

ISSN 1343-4292
CODEN : KISHFC

国立医薬品食品衛生研究所報告

平成 11 年

Bulletin of National Institute of Health Sciences

No.117

1999



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

平成 11 年

Bulletin of National Institute of Health Sciences

No.117 1999

Published by
National Institute of Health Sciences
Tokyo, Japan

国立医薬品食品衛生研究所

目 次

国立医薬品食品衛生研究所報告第 117 号第一部

特論

バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学

—組換え医薬品, 細胞培養医薬品, 遺伝子治療用医薬品, 細胞治療用医薬品, トランスジェニック動物由来タンパク質性
医薬品, トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品—

..... 早川堯夫 1

総説

種子島の植物 (世界遺産屋久島の植物分布との類似性について)

..... 佐竹元吉・鎗木紘一・関 寅一郎・野崎とも子, 李 宜融・香月茂樹 39

光励起フラレーンの生物作用 山越葉子・末吉祥子・宮田直樹 50

ヒト肝薬物代謝活性形質診断法の最近までの進歩 小澤正吾 63

FISH 法による免疫グロブリン Cε 遺伝子の比較マッピングに基づいたヒトおよび高等霊長類における 14 番および 9 番染
色体の核型進化に関する研究 田辺秀之 77

研究論文

へマトコッカス藻色素の F344 ラットによる 13 週間反復混餌投与毒性試験

..... 小野 敦・関田清司・斉藤 実・梅村隆志・小川幸男・降矢 強・金子豊蔵・井上 達 91

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) のラットを用いた経口投与による催奇形性試験

..... 酒見和枝・宇佐見 誠・紅林秀雄・大野泰雄 99

シソ抽出物の F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

..... 劉 雲・小野寺博志・高木久宜・糀谷高敏・安原加壽雄・三森国敏・広瀬雅雄 104

硫酸アンモニウムの F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

..... 高木久宜・小野寺博志・劉 雲・安原加壽雄・糀谷高敏・三森国敏・広瀬雅雄 108

D-キシロースの F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

..... 今沢孝喜・西川秋佳・古川文夫・池田尚子・中村英明・宮内 慎・広瀬雅雄 115

納豆菌ガムの F344 ラットを用いた 90 日間亜慢性毒性試験

..... 中村英明・今沢孝喜・西川秋佳・古川文夫・池田尚子・宮内 慎・広瀬雅雄 119

オレンジ色素の F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験

..... 宮内 慎・古川文夫・西川秋佳・中村英明・今沢孝喜・広瀬雅雄 123

F344 ラットにおけるキチンの 13 週間亜慢性毒性試験

..... 仁保直子・田村 啓・豊田和弘・畝山智香子・渋谷 淳・広瀬雅雄 129

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

..... 四方田千佳子・宮崎玉樹・岡田敏史 135

Somatic Embryogenesis and Ginsenoside Production of *Panax ginseng* in Phytohormone-free Medium

..... Wendy Shu, Kayo Yoshimatsu, Hiroko Yamaguchi and Koichiro Shimomura 140

High production of ginsenosides by transformed root cultures of *Panax ginseng*: Effect of basal medium and *Agrobacterium*
rhizogenes strains Wendy Shu, Kayo Yoshimatsu, Hiroko Yamaguchi and Koichiro Shimomura 148

ノート

農作物中の 17 種有機塩素系農薬及び 9 種ピレスロイド系農薬の同時分析法の検討

..... 根本 了・忠田吉弘・長尾影文・佐々木久美子・豊田正武 155

抗酸化物質の作用機構解明への化学計算の利用 栗原正明・近藤一成・福原 潔・豊田正武・宮田直樹 163

イソバリンより構成されるホモペプチドの分子力学法によるコンフォメーション解析

..... 栗原正明・田中正一・今若直人・末宗 洋・宮田直樹 166

研究に関する資料

輸入チューインガム中の不許可着色料の検査 川崎洋子・石綿 肇・山田 隆 169

化学物質に関する法律についてのデータベースおよびホームページの作成	
.....山本 都・森田真理子・神沼二真	172
IPCS からコメントを依頼された環境保健クライテリアのドラフトについて (1998 年度)	大竹千代子
177	
食用黄色 5 号 (サンセットイエローFCF) の不適事例について	
.....辻 澄子・松村郁子・中村優美子・外海泰秀	180
平成 10 年度における食用タール色素 (アルミニウムレーキを含む) 製品検査より算出した生産量	
.....辻 澄子・岡田 舞・松村郁子・中村優美子・外海泰秀	185
標準品に関する資料	
国立医薬品食品衛生研究所ジゴキシン標準品 (Control 991)	
.....斎藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛・岡田敏史	189
国立医薬品食品衛生研究所ラナトシド C 標準品 (Control 981)	
.....斎藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛・岡田敏史	192
国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 991)	
.....斎藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛・岡田敏史	195
国立医薬品食品衛生研究所コハク酸トコフェロール標準品 (Control 981)	
.....前川京子・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛・岡田敏史	199
国立医薬品食品衛生研究所フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 981)	
.....岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛・岡田敏史	202
国立医薬品食品衛生研究所フルオシノニド標準品 (Control 981)	
.....岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛・岡田敏史	205
国立医薬品食品衛生研究所トリアムシノロンアセトニド標準品 (Control 981)	
.....岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛・岡田敏史	208
国立医薬品食品衛生研究所トリアムシノロン標準品 (Control 981)	
.....岩田美保・河口和子・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛・岡田敏史	211
国立医薬品食品衛生研究所報告第 116 号第二部	
業務報告	215
誌上発表 (原著論文)	268
誌上発表 (総説・解説等)	313
単行本	323
行政報告	325
学会発表	330
レギュラトリーサイエンス関連会議報告	358
衛研例会	370
平成 10 年度に行った主な研究課題	373
国家検定及び検査等の処理状況	381
国立医薬品食品衛生研究所標準品	386
国立医薬品食品衛生研究所報告第 117 号人名索引	395
国立医薬品食品衛生研究所報告第 117 号キーワード索引	400

CONTENTS

Bulletin of National Institute of Health Sciences, No.117, Part1

Special Report

Science of Evaluating the Characteristics, Quality and Safety of Biotechnological Products: rDNA-derived products, cell culture technology-derived products, gene therapy products, cellular therapy products, and transgenic animal-derived protein products and cellular products Takao Hayakawa 1

Reviews

Geobotanical studies on the island of Tanegashima (Affinity of world property Island Yakushima)

..... Motoyoshi Satake, Kouichi Kaburagi, Toraichiro Seki, Tomoko Nozaki, I-jung Lee and Shigeki Katsuki 39

Biological Activity of Photoexcited Fullerene Yoko Yamakoshi, Shoko Sueyoshi and Naoki Miyata 50

Diagnosis of hepatic enzyme activities of drug metabolizing enzymes-phenotyping and genotyping Shogo Ozawa 63

Studies on karyotype evolution in higher primates in relation to human chromosome 14 and 9 by comparative mapping of immunoglobulin C ϵ genes with fluorescence in situ hybridization Hideyuki Tanabe 77

Originals

A 13-week subchronic oral toxicity study of haematococcus color in F344 rats

..... Atsushi Ono, Kiyoshi Sekita, Minoru Saito, Takashi Umemura,

Yukio Ogawa, Tsuyoshi Furuya, Toyozo Kaneko and Tohru Inoue 91

Teratogenicity study of sodium chlorite in rats by oral administration

..... Kazue Sakemi, Makoto Usami, Hideo Kurebayashi and Yasuo Ohno 99

A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of *Perilla* Extracts in F344 Rats

..... Liu Yun, Hiroshi Onodera, Hisayoshi Takagi, Takatoshi Koujitani,

Kazuo Yasuhara, Kunitoshi Mitsumori and Masao Hirose 104

13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Ammonium Sulfate in Rats

..... Hisayoshi Takagi, Hiroshi Onodera, Liu Yun, Kazuo Yasuhara,

Takatoshi Koujitani, Kunitoshi Mitsumori and Masao Hirose 108

A 13-Week Subchronic Toxicity Study of D-xylose in F344 Rats

..... Takayoshi Imazawa, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takako Ikeda,

Hideaki Nakamura, Makoto Miyauchi and Masao Hirose 115

A 90-day Subchronic Oral Toxicity Study of *Bacillus subtilis* Gum in F344 Rats

..... Hideaki Nakamura, Takayoshi Imazawa, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa,

Takako Ikeda, Makoto Miyauchi and Masao Hirose 119

A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Orange Color in F344 Rats

..... Makoto Miyauchi, Fumio Furukawa, Akiyoshi Nishikawa, Hideaki Nakamura, Takayoshi Imazawa and Masao Hirose 123

A 13-week Subchronic Toxicity Study of Chitin in F344 Rats

..... Naoko Niho, Toru Tamura, Kazuhiro Toyoda, Chikako Uneyama, Makoto Shibutani and Masao Hirose 129

Evaluation of Molecular Weight of Hyaluronate Preparations by Size-exclusion Chromatography

..... Chikako Yomota, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada 135

Somatic Embryogenesis and Ginsenoside Production of *Panax ginseng* in Phytohormone-free Medium

..... Wendy Shu, Kayo Yoshimatsu, Hiroko Yamaguchi and Koichiro Shimomura 140

High production of ginsenosides by transformed root cultures of *Panax ginseng*: Effect of basal medium and *Agrobacterium rhizogenes* strains Wendy Shu, Kayo Yoshimatsu, Hiroko Yamaguchi and Koichiro Shimomura 148

Notes

Studies on Simultaneous Determination of 17 Organochlorine and 9 Pyrethroid Pesticides in Agricultural Products

..... Satoru Nemoto, Yoshihiro Tyuda, Akihumi Nagao, Kumiko Sasaki, Masatake Toyoda 155

Computational Study on Antioxidation Mechanisms of Catechins.

..... Masaaki Kurihara, Kazurari Kondo, Kiyoshi Fukuhara, Masatake Toyoda and Naoki Miyata 163

Molecular Mechanics Study on Conformation of a Homooligopeptide Constituted by Isovaline.

..... Masaaki Kurihara, Masakazu Tanaka, Naoto Imawaka, Hiroshi Suemune and Naoki Miyata	166
Technical Data	
Inspection of Undesignated Food Color in Imported Chewing Gum	
..... Yoko Kawasaki, Hajimu Ishiwata and Takashi Yamada	169
Preparation of the Database and the Internet (WWW) Homepage for Regulations on Chemicals in Japan	
..... Miyako Yamamoto, Mariko Morita and Tsuguchika Kaminuma	172
First Drafts of the Environmental Health Criteria (EHC) Circulated for Comments by IPCS in 1998.4~1999.3.	
..... Chiyoko Ohtake	177
Studies on Rejected Food Yellow No.5 (Sunset Yellow FCF)	
..... Sumiko Tsuji, Ikuko Matsumura, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai	180
Estimated Production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes (Including Dye Aluminum Lakes) in Fiscal Year 1998	
..... Sumiko Tsuji, Mai Okada, Ikuko Matsumura, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai	185
Reference Standard Data	
Digoxin Reference Standard (Control 991) of National Institute of Health Sciences	
..... Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	189
Lanatoside C Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	192
Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 991) of National Institute of Health Sciences	
..... Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	195
Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Keiko Maekawa, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	199
Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	202
Fluocinonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	205
Triamcinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	208
Triamcinolone Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences	
..... Miho Iwata, Wako Kawaguchi, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada	211
Bulletin of National Institute of Health Sciences, No.117, Part2	
Annual Reports of Divisions	215
Summaries of Papers Published in Other Journals (Original Papers)	268
Summaries of Papers Published in Other Journals (Reviews and Articles)	313
Title of Scientific Books	323
Scientific Reports to Governmental Agencies	325
Titles of Speeches at Scientific Meetings etc.	330
Meeting Reports Related to Regulatory Science	358
NIHS Seminars	370
Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1998	373
Survey of the Results of National Tests	381
Reference Standards Prepared by the National Institute of Health Sciences	386
Author Index	395
Subject Index	400

バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学

—組換え医薬品, 細胞培養医薬品, 遺伝子治療用医薬品, 細胞治療用医薬品,
トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品, トランスジェニック動物
由来細胞治療用医薬品—

早川堯夫

Science of Evaluating the Characteristics, Quality and Safety of Biotechnological Products: rDNA-derived products, cell culture technology-derived products, gene therapy products, cellular therapy products, and transgenic animal-derived protein products and cellular products

Takao Hayakawa

Recent progress in biotechnology, including recombinant DNA (rDNA) technology and cell culture technology, has enabled us to produce new medically useful agents intended for human use. These agents include therapeutic peptides and proteins derived from rDNA-modified cell substrates, continuous cell lines, diploid cell lines, and hybridoma cell lines, gene therapy products, cellular therapy products, and therapeutic protein products and cellular products derived from transgenic animals. To enable these products to be of use in human therapy, it is essential that suitable measures be taken by manufacturers and regulatory authorities to assure their quality, efficacy, and safety. This article describes points based on the latest sound scientific principles to be considered when producing, testing, evaluating and controlling biotechnology products for human therapy, especially with respect to their characteristics, quality, and safety.

Keywords: Biotechnology products, Characterization, Quality control, Safety

はじめに

生物もしくはその機能単位を利用した技術による医薬品生産は, 抗生物質をはじめ, アミノ酸や酵素などの生産方法としてかなり古くから行われていたが, 遺伝子工学, 細胞工学, 細胞大量培養技術などのバイオテクノロジーの飛躍的發展により 1970 年代後半から全く新たなステージに入った. 新たに登場したバイオテクノロジーとは, 生物やその機能単位を単にそのまま利用するのではなく, 遺伝子, 細胞, 生物などを人工的に操作し, その機能や性質を意図的に変え, 改変された生物やその機能単位をより積極的に利用しようとするまさに革新的な技術であった. こうした技術により, 遺伝子, 細胞, 生物などの機能や性質を変えたり, 生物の種の壁や細胞の寿命をのりこえることが可能になり, これはいち早く医薬品生産技術として応用されることになった.

バイオテクノロジーが医薬品生産へ最初に応用され, そして画期的な成果を挙げたのが, 生物の種の壁や細胞の寿

命をのりこえて大腸菌やネズミの細胞でヒトのタンパク質を作ったり, 培養細胞から有用タンパク質を大量に得ることであった¹⁾. こうしたアプローチにより, 従来の手法, あるいは天然からの抽出や化学合成などでは入手することが困難であったヒト型のホルモンや酵素, サイトカイン, 各種成長因子をはじめ, 血液成分, ワクチン類, モノクローナル抗体などを大量に生産することが可能になったのである. また, タンパク質のアミノ酸配列を自在に変換して, ある特異的な活性の発現や増幅, 持続性や安定性の増大, 好ましくない作用の軽減などを図ることも可能になってきた. このような歴史的経緯から, 現在一般に, バイオテクノロジー応用医薬品 (以下バイオ医薬品) と称されているのは, 組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術を応用して生産され, 組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品として臨床に使用されているタンパク質性医薬品のことである.

一方, 最近, バイオテクノロジーの医薬品生産への応用はさらに大きな広がりを見せはじめている. すなわちバイオテクノロジーにより, 1) 生命現象や疾病の仕組みの解明

が飛躍的に進み、それをもとにした新しい医薬品の設計が可能になってきているほか、2) 遺伝子治療用医薬品の創製、3) 細胞治療用医薬品の創製、4) トランスジェニック/クローン動物によるタンパク質性医薬品、5) トランスジェニック動物由来細胞治療用医薬品開発などが推進されてきている。

こうしたバイオテクノロジーという画期的な医薬品製造技術の応用が、医薬品に結実していくためには、品質、安全性及び有効性に関する試験方法や評価方法の開発というもう一つの要素が不可欠である。もともと、新たな医薬品の創製（創薬）は、医薬品生産技術と製品に対する適切な試験・評価といういわば車の両輪によって推進、達成される。製造技術の開発と並んで試験・評価法を開発し、あるいは評価方法に関する適切な指針を提示することは、当面の問題を解いていくためばかりではなく、将来、新たな医薬品開発を適正にかつ効率よく促進させるための先導的基盤の要素にもなる。このことが、きわめて明確な形で認識され、立証されたのは、バイオ医薬品の開発においてであった。バイオ医薬品の種類や製造方法は多様でそれぞれに特徴があり、その特性解析、品質や安全性等の評価などには、従来の医薬品とは異なる手法を用いたり、新しい観点から捉えなければならぬ面が多々ある。したがって、さまざまなバイオ医薬品のユニークさを加味した上で開発の各段階で適切に対応し、円滑な医薬品開発やその評価作業を進めていくためには、それぞれのケース毎に応じた適切な試験方法や評価方法をむしろ新たに創造していく必要があった。そうした認識は、バイオテクノロジーの利用が考えられた当初から、開発メーカー側や、バイオ医薬品の開発に関係するすべての国々の行政側、WHO などの関係国際機関において共通するものであった。そのような背景のもと、国内外、産官学を問わず、関係者はそれぞれの立場で、共通の目標を達成すべく注力することとなった。こうした中、1991年に開始された ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: 日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議) では、バイオ医薬品分野も検討対象となり、その試験・評価法の開発に関する日・米・欧の国際共同作業の推進を決定的なものとした。その過程はまさにバイオ医薬品評価科学における新たな挑戦と創造の連続であり、そうした挑戦は今後もさらに絶えず続けられるものであると予測される。

本稿では、最も実用化が進んでいる組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品、すなわちタンパク質性のバイオ医薬品の特性解析、品質・安全性確保がどのようになされてきたかを中心にしながら、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品、トランスジェニック動物 (Tg 動物) 由来タンパク質性医薬品、Tg 動物由来細胞治療用医薬品などの次世代バイ

オテクノロジー応用医薬品の品質・安全性等確保問題についても言及したい。

1. バイオテクノロジーによる各種の医薬品生産

Fig. 1 には、バイオテクノロジーを利用した各種の医薬品生産方式を模式的に示している。これらのうち、組換え医薬品あるいは細胞培養医薬品といわれるタンパク質性医薬品が、最も早くから実用化されているものであり、わが国でもすでに約 50 品目の製品が臨床に使用されている。これらが現在のところ一般に、バイオ医薬品と称されている²⁻³⁾。

組換え医薬品や細胞培養医薬品の生産のポイントは、遺伝子組換え技術、細胞工学技術、あるいは細胞分離・培養技術といったバイオテクノロジーを駆使して、目的とする有用タンパク質生産性と増殖性に優れた細胞株を医薬品素材として得ることである。例えば、ヒト成長ホルモンの遺伝子を組換え技術で作成し、大腸菌や CHO 細胞に導入して得た組換え体細胞や、細胞融合で得た特異抗体を産生するハイブリドーマなどが有用タンパク質生産・増殖性細胞に相当する。こうして得た有用細胞から目的タンパク質を大量に生産する段階では発酵あるいは細胞大量培養といった技術が大きな威力を発揮する。得られた生産物は加工・精製されて最終目的物質であるタンパク質性医薬品になる。

遺伝子治療や細胞治療は、臨床研究あるいは治験としてヒトへの応用が緒についた段階である。それに用いられる遺伝子治療用医薬品の場合、医薬品成分の本質は遺伝子である。基本となる技術は、遺伝子組換え技術であり、その核心部分は、医薬品素材としての治療用遺伝子を含むベクターを作成するところである。ベクターの大量生産技術も重要な要素である。得られたベクターを加工・精製して遺伝子治療用の医薬品を製する。

細胞治療用医薬品の場合、その成分の本質は細胞である。基本となる技術は遺伝子組換え技術や細胞工学技術、細胞分離・培養技術などである。最も核心をなすところは医薬品素材としての目的有用細胞を分離あるいは細胞株を樹立することである。目的に応じた細胞の加工（薬剤処理、生物学的特性の改変、遺伝子工学的改変など）、細胞の増殖や大量生産技術も重要な要素である。得られた細胞を加工・精製して、細胞治療用の医薬品を製する。

動物工場 (トランスジェニック/クローン動物) 由来医薬品の場合、その成分の本質は、タンパク質あるいは細胞・組織である。とりあえずはタンパク質製品が実用化に近い状態にある。しかし、将来的には、細胞あるいは組織も考えられている。基本となる技術は遺伝子組換え技術や細胞工学技術、細胞分離培養技術に加えて動物育種・繁殖技術が重要である。最も核心をなすのは目的とする有用タンパク質あるいは有用細胞を生産するトランスジェニック/ク

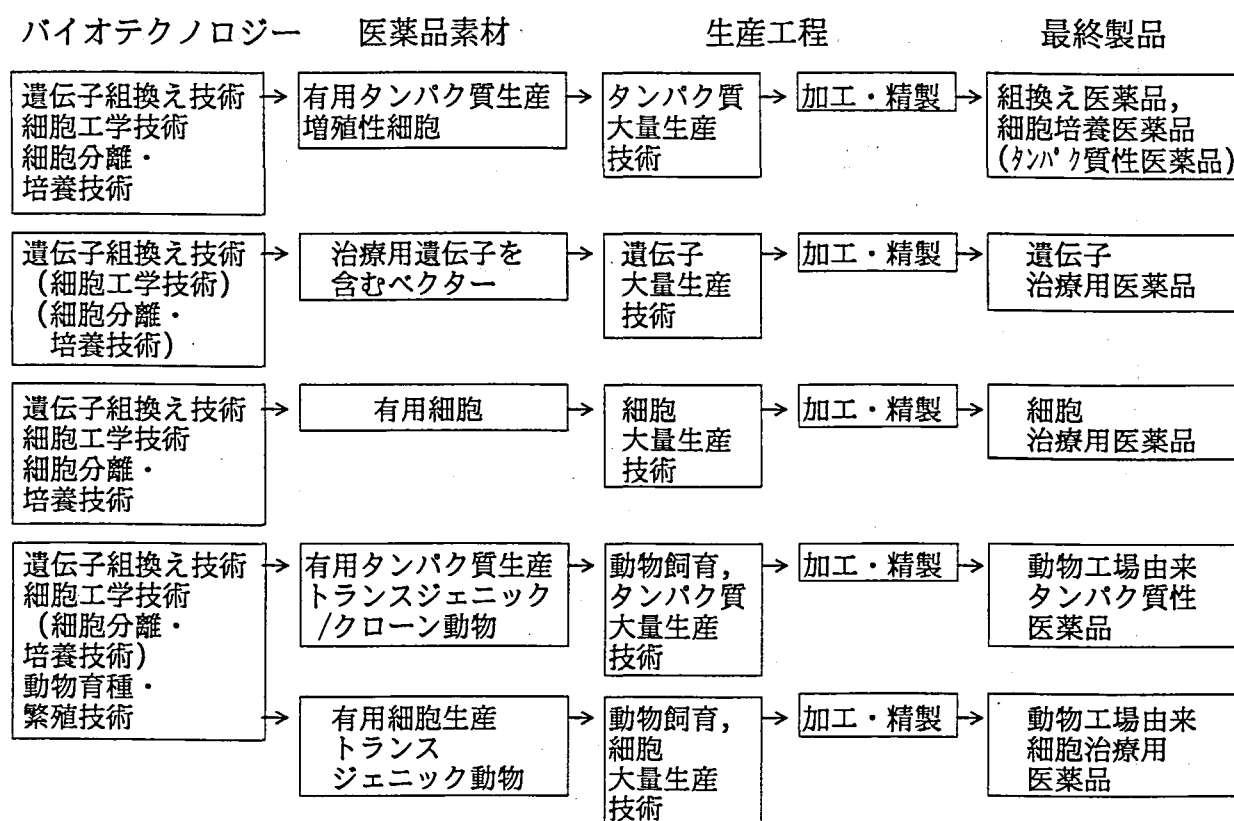


Fig.1. バイオテクノロジーによる各種の医薬品生産

クローン動物を樹立することである。この場合は、文字通り動物自体が医薬品素材である。動物は目的タンパク質や細胞の生産工場となるので、生産用動物系をいかに樹立し、繁殖、維持管理して、いかに目的物質を大量生産させるかの技術が重要になる。

2. 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質、安全性等の確保

2.1 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の評価のあり方をめぐる草創期と国際調和への胎動

組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術を応用して製造されるいわゆる組換え医薬品及び細胞培養医薬品（狭義のバイオ医薬品）の品質、安全性等の保証に関して、とくにどのような点に留意して試験が行われ、どのような基準で評価すればよいかについては、バイオテクノロジーによる有用物質の生産が可能になった時点から、開発メーカー、学界、行政それぞれの立場での検討が行われてきた。この問題に関する各関係国や機関の取り組み状況を歴史的にみると、1983年頃から WHO^{4,5)}、米国 FDA⁶⁾、EC（現 EU）医薬品委員会（Committee for Proprietary Medical Products：CPMP）⁷⁾から公的見解や文書が次々に公表された。

わが国では1985年に組換え DNA 技術を応用した医薬品の実用化第1号として、大腸菌由来のヒトインスリンが誕生したのを手始めに、ヒト成長ホルモン、インターフェロン α -2a、 α -2B、酵母由来のB型肝炎ワクチン、また、連続継代性細胞株（リンパ芽球腫細胞：NAMALWA細胞）を製造基質としたインターフェロン α 、ヒト2倍体細胞を製造基質としたインターフェロン β 、ウロキナーゼなどが続々と臨床の場に提供されようとしていた。この組換えヒトインスリンの実用化に先んずること4年前の1981年4月に、厚生省は、遺伝子組換えを利用して生産される医薬品に関する研究班を設置し、その品質、有効性、安全性を評価するためにはどのような試験データが必要かについての検討を開始した⁸⁾。その結果は厚生省より1984年3月に「組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」（昭和59年3月30日：薬審第243号）という形で公表された⁹⁾。この薬審第243号の背景説明やその内容の解釈、運用などについては、さまざまな機会を通じて公表された¹⁰⁻¹⁶⁾。薬審243号は組換え医薬品のうちでも大腸菌などの微生物を宿主として生産された糖鎖をもたないペプチドやタンパク質を対象とするものであった。一方、ヒトや動物細胞などを宿主とした組換え医薬品、モノクローナル抗体、その他の細胞培養医

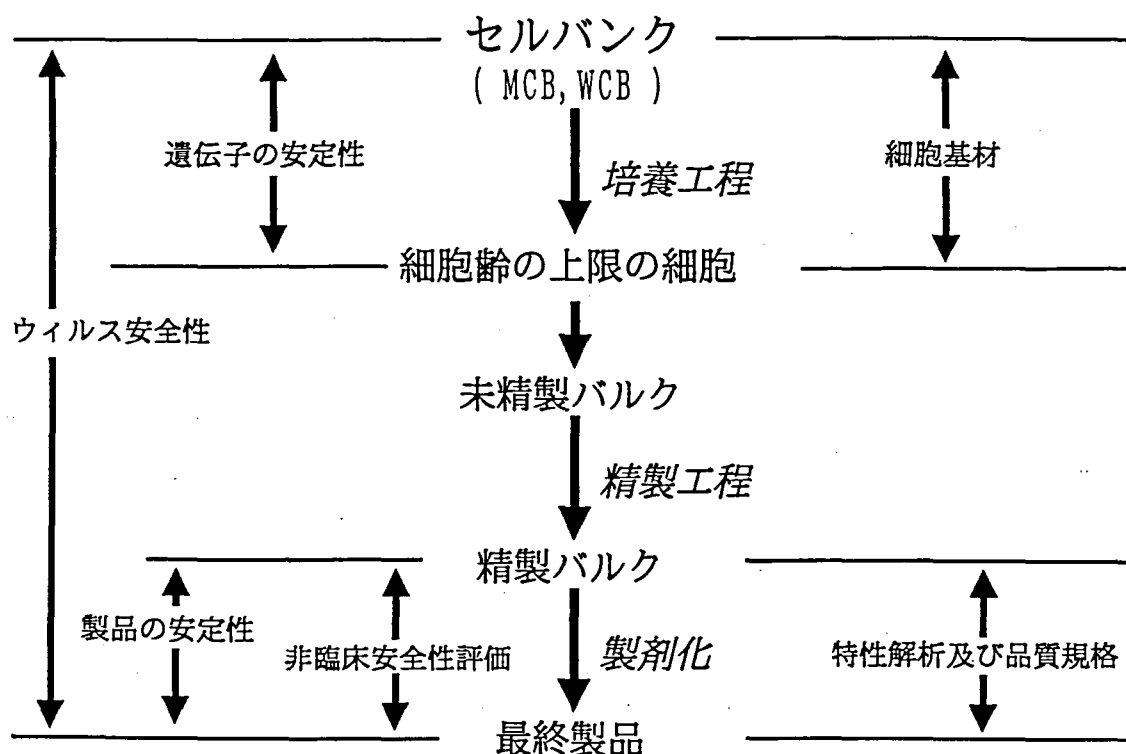


Fig.2. ICH 各トピックの位置づけ

薬品の品質、有効性、安全性を評価するためにはどのような試験データが必要かについての指針の提示は、1988年6月に「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」(昭和63年6月6日：薬審1第10号)として公表された¹⁷⁾。薬審1第10号の背景説明やその内容の解釈、運用などについては、さまざまな機会を通じて公表されているので^{13,16,18-23)}、詳細はこれらの記事を参照されたい。

一方、国際的にこうした問題点を明らかにし、その解決を目指して、産、学、官はもとより国のレベルを超えて討議しようとする国際シンポジウムなども盛んに行われた²⁴⁻²⁵⁾。

こうした中でいわゆる物質面からみた品質・安全性確保策については、ほぼ現在の規制の基礎となるような方向性が出されてきた²⁶⁾。しかし、最も着目すべきは、既にこの時点で日・米・欧を中心とした各国、各界関係者の意見、技術、経験等の交流がかなりの頻度と濃密さで行われており、バイオ医薬品の評価のあり方をめぐる国際調和への胎動が図らずも始まっていたということである。

なお、わが国では、1992年に薬審第243号の改訂版が作製され内示された。ところが、ICHが本格的な活動を展開しようとしていたタイミングとの関係で内示段階で

とどまった。しかし、本内示案は内容的にはきわめて充実したものであり、関係者の間では事実上の国内ガイドラインであり、また後年、ICHガイドラインの基盤をなすこととなった。

2.2 バイオ医薬品の品質・安全性確保にかかわるICHガイドライン

ICHのバイオ医薬品(組換え医薬品及び細胞培養医薬品)の品質・安全性分野では、6つの課題に関するガイドラインが作成対象になった。略称でよぶと、1)細胞基材(生産細胞株の適格性と管理)、2)遺伝子の安定性(遺伝子組換え体の解析と安定性)、3)ウイルス安全性、4)製品の安定性、5)非臨床安全性評価、6)製品の特性解析及び品質規格に関するガイドラインということになる。これらについては1991年にICH1で非臨床安全性評価の問題が取り上げられて以来²⁷⁾、通算8年余りの作業の末に全ての課題が既に日・米・欧間で合意に達している。

Fig.2には、バイオ医薬品に関するICH各トピックが、バイオ医薬品の製造工程に沿ってみた場合、どのような製造段階の問題を取り扱っているか、すなわちバイオ医薬品製造過程におけるICH各トピックの位置づけを示した。6

つのICHガイドラインは、バイオ医薬品の製造過程の出発点である細胞基材の問題から、培養を経て製品に至り、その品質、安全性の確保に関係する主な課題をカバーしていることになる²⁸⁾。

国際合意に達したICHガイドラインの内容は当然、国内におけるバイオ医薬品の試験や評価を行う際の基本となり、そこに記載されている内容については遵守する必要がある。しかし、一方でこれらICHガイドラインは、バイオ医薬品の品質・安全性確保のための試験や評価にかかわるすべての問題をカバーしているわけではない。そこで本稿では、全体として話を進めながら、話の流れの中で必要に応じて適宜、ICHガイドラインの内容を織り込むこととする。

2.3 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の品質、安全性等確保に必要な一般的留意事項

以下には、現時点で、組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質、安全性等を確保するために必要とされている一般的留意事項の要点を示した^{16,29-32)}。

1) 採用した製造方法について詳細なデータを示し、それが一定の目的物質を製造する上で適正なものであることを立証し、かつ、そうした製造方法を一定に保っていくことを保証する必要がある。このことは、複雑でかつ変動要因の多い人工的な製造過程を経て生産される複雑な高分子タンパク質（組換え医薬品及び細胞培養医薬品）の品質、有効性、安全性を確保する上できわめて重要な意味を持っている。

2) 組換え医薬品や細胞培養医薬品は人工的シナリオで得られる人工的産物で、かつ高分子タンパク質であるので、その構造、特性や品質について物理的・化学的方法、免疫学的方法あるいは生物学的方法などを駆使して徹底的に解析する必要がある。

3) 最終目的物質に混入してくる可能性がある有害因子、あるいは製造工程由来不純物や目的物質由来不純物について特に注意を払う必要がある。

4) 組換え医薬品や細胞培養医薬品は、例えばヒト型のホルモンや酵素、サイトカイン、モノクローナル抗体、ワクチンなどといった、きわめて特異な化学的あるいは生物学的特徴を有するものであるから、毒性試験などの非臨床動物試験を実施するにあたって、従来の低分子の有機合成医薬品に用いられたようなアプローチをとることは必ずしも適切ではなく、その製品の特性や臨床上の使用目的を考慮しながらケース・バイ・ケースの原則で対処する必要がある。その際、目的とする製品の生化学、生理学あるいは薬理学的作用を十分に把握し、生物学的応答性に関して適切な試験動物を選択することが重要である。

5) 臨床試験の目的や実施方法自体が他の医薬品の場合と変わるところはないが、組換え医薬品や細胞培養医薬品の

場合は、それ自体がタンパク質であり、また、不純物の多くが高分子であるので、目的有効成分や不純物が患者になんらかの免疫応答を引き起こし、結果的にその有効性、安全性に影響を及ぼす可能性に関して特に留意する必要がある。

6) 品質の恒常性を保証するための適切な規格及び試験方法を確立する必要がある。

いずれにしても、個々の組換え医薬品や細胞培養医薬品に関して、最も適切な非臨床試験及び臨床試験は、目的物質の製造方法、成分の種類・特性、臨床適用上の対象とする効能・効果、臨床用量、臨床投与経路、投与頻度、投与対象患者などに応じて実施することにある。

2.4 製造方法の明確化とその妥当性の証明、一定性に関する詳細な情報の提供により品質の恒常性を確保することの必要性

2.4.1 組換え医薬品及び細胞培養医薬品の製造工程の特徴

組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造工程はきわめて複雑な多くのステップからなる。また、その特徴は、1) 人工的に遺伝子や生物あるいはその両者を操作し、任意にデザインされた多様なシナリオに従い、2) 不確定要素を秘める生細胞を用いて、3) 不安定な高分子タンパク質を生産し、4) 高度に精製して医薬品として利用する、ことにある。そのため目的有効成分の化学構造や生物活性に変化が生じる可能性があり、これにより医薬品の品質・安全性・有効性確保上の問題を生じる可能性がある。

2.4.1.1 多様な人工的シナリオによる医薬品製造

例えば、組換え医薬品の場合、最終的に同一目的物を目指すとしても、その戦略及び戦術は以下に述べるように非常に多様であり、いく通りものシナリオが可能である。まず、1) 目的発現タンパク質をコードする塩基配列（構造遺伝子）をどのような種類や起源の細胞から得るのか、どのような方法で作成するのかにはさまざまな選択肢がある。また、2) 構造遺伝子の直接の発現産物は、必ずしも最終目的タンパク質である必要はなく、細胞内での生化学的プロセスあるいは分離後の人工的プロセッシングなどを考慮して定められるので、最終的に目指す目的物は同じであってもスタートに用いる構造遺伝子部分の構造やデザインの仕方ともさまざまである。しかも、3) これらの発現様式は、直接発現、あるいは雑種融合タンパク質としての発現などの違いもあり、後者では他のタンパク質の一部をコードする遺伝子と連結する形をとっている。次に、4) 発現を調節するプロモーターやエンハンサー及びその周辺の塩基配列部分の由来、選択やデザインはさらにバリエーションに富む。それ以外に複製や選択系（薬剤耐性）などにかか

わる部位のデザインを含めると遺伝子発現構成体（発現ベクター）の構築方法も非常に多様になる。また、5) この構造遺伝子部分や発現調節塩基配列の選択、遺伝子発現構成体の構築方法は、宿主の選択とも関連する。宿主には大腸菌のような微生物から、動物細胞までさまざまな細胞が用いられる。宿主の選択は、目的物質の種類・性質、発現効率、生産効率、宿主内でのプロセッシングや安定性、分離・精製効率などを考慮して行われる。さらに、6) 遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法、遺伝子発現構成体を増殖する方法、クローン細胞株を選択する方法もさまざまである。動物細胞を用いた場合、同一のクローン細胞株（種細胞株）の樹立を再現することは難しいので、この点を考慮に入れた対応が必要である。次に、7) セル・バンクの調製経緯や調製法、その維持・管理、更新法もさまざまであろう。また、8) 細胞の特性・品質あるいは目的タンパク質の特性や安定性、生産効率、精製効率等に応じて、培養方法、精製方法にはさまざまな設計、条件設定がなされる。さらに、9) 製剤化も各製品の安定性、臨床上の用法、用量を考慮した製剤設計や適切な生産スケールが個別に選択されることになる。

非組換え体細胞、正常2倍体、ハイブリドーマなどを出発素材とする細胞培養医薬品の場合でも、種細胞株やマスター・セル・バンク（MCB）の樹立法のシナリオは多様である。それ以降の製造方法における多様性については、組換え医薬品の場合と事情は同じである。

2. 4. 1. 2 不確定要素を秘める生細胞

目的物質を生産する細胞が人工的できわめて多様なシナリオに基づき作製される一方で、その細胞が保存中に変化したり、医薬品生産のための大量培養中に変異したり、あるいはその機能（DNA複製、転写、翻訳、プロセッシング等）が目的通り発揮されない可能性など、生き物のもつ不確定性を考慮に入れる必要がある。大量培養をタンクでやるのか、動物体を経由するのかなどの培養手段も重要な関心事の一つである。

2. 4. 1. 3 生産物からみた視点

生産物の面、すなわち物質特性や品質面からみた組換え医薬品及び細胞培養医薬品固有の特徴も考慮に入れる必要がある。製造方法と関連する生産物における問題については、採用された製造方法に応じて、二次的修飾に関連する問題を考慮する必要がある。二次的修飾には、遺伝子発現段階あるいはタンパク質への翻訳後の段階での修飾による変異体やメチオニル化体の生成、宿主内での前駆体から活性体への変換、高次構造形成、アミド化、糖鎖の付加、あるいは細胞内での分解などがある。最終目的物質を得るための必要な加工などが行われる場合もある（遺伝子発現産物が直接の最終目的物質でない場合も多い：例、インスリン、成長ホルモン）。こうした二次的修飾の有無や修飾のさ

れ方如何では、化学構造上の問題のみならず、有効性や安全性の問題にも関連する可能性がある。

また、生産物が主に不安定な高分子のポリペプチドもしくはタンパク質であるという点も特別な注意を要することである。生産過程や精製過程での安定性についても種々問題が多く、最終的に得られる製品の同一性、均一性、純度などは、採用された生産細胞の種類や性質、培養方法あるいは精製方法などに大きく依存することになる。

さらに、これら生産の各段階で採用した目的タンパク質の構造遺伝子をめぐる遺伝情報の発現方式などのデザインのやり方、使用細胞の種類・性質、培養条件、精製方法などに密接に関連して生じてくる重要な問題として有害因子や微量混在物の問題がある。どのような有害因子や不純物が問題になるかということも、結局はどのような製造方法を採用したかにかかっている。

2. 4. 2 製品の品質・安全性の確保やその恒常性を図るためには

これまで述べたような問題点が組換え医薬品及び細胞培養医薬品製造の背景にあることを考慮すれば、製品の品質・安全性の確保とその恒常性を図るためには、まず、それぞれのケースごとに、1) 採用された製造方法の詳細を明確にして、その科学的妥当性を示す、2) さらにその製造方法で得た製品の物性、品質、有効性、安全性に関する詳細な検討を行って、製品の面からその製法の妥当性を立証する、3) こうして得られた製品の品質、有効性、安全性の恒常性を維持、保証するために必要なロット毎の品質規格、試験法を定める、4) 必要に応じて、適切な工程内管理試験を設定する、などの対応が必要である。

結局、多様性や不確定性を秘めた製造方法が特徴のバイオ医薬品にあつては、製品の品質管理試験のみならず、妥当性が検証された製造方法を一定に維持していくことや、そのための工程管理試験を厳密に行うことによって、生産物の品質・安全性を確保し、その恒常性を保証しようとする視点が不可欠である。

2. 4. 3 製造方法において、その詳細を明確にし、その恒常性を維持すべき主な項目

Table 1には、製造方法において、その詳細を明確にし、その恒常性を維持すべき主な項目について、要約した。これに関連する詳細な検討事項については、現在のわが国のガイドラインや日・米・欧のICH国際調和ガイドライン及び関連記事などに記載されているが^{16,22,23,30,33-42)}、ここでは紙数の関係で主な要点だけを述べることにする。

1) 組換え医薬品の製造にあたっては、①目的発現タンパク質をコードする構造遺伝子の起源（入手方法）と構造、②遺伝子発現構成体（発現ベクター）を構成する諸要素（例

Table 1. 製造方法において、その詳細を明確にし、その恒常性を維持すべき主な項目

- ・遺伝子操作の妥当性
- ・生産細胞株の由来や特性の明確化と恒常性の保持
- ・細胞における微生物汚染や他の細胞汚染の否定
- ・生産各段階の細胞基材の管理
 - ・セル・バンク・システムの構築
 - ・調製法・特性の明確化
 - ・微生物汚染等否定・保存管理
 - ・更新方法
- ・細胞の保存中や大量培養中の安定性
 - ・生存率・遺伝子安定性・細胞特性・生産物
- ・培養法
- ・精製法
 - ・目的物質精製状況
 - ・外来性有害因子や不純物の不活化・除去状況
- ・プロセスバリデーションによる工程の妥当性検証
- ・工程内管理試験

えば複製開始点、抗生物質耐性遺伝子、プロモーター、エンハンサーなど)の由来と機能及び構造, ③目的タンパク質の発現方法に関する記述, ④遺伝子発現構成体を構築する手順と構造, ⑤宿主細胞の由来や特性と選択理由, ⑥遺伝子発現構成体を宿主細胞に入れる方法, ⑦遺伝子発現構成体を増幅する方法, ⑧クローン細胞株の選択に用いた評価基準と樹立方法, などを含む遺伝子操作の妥当性を明らかにすることが重要である。

2) 非組換え体による細胞培養医薬品の製造にあつては、①細胞の起源、由来、特性, ②細胞の培養歴、培養方法, ③セル・バンクの元となる細胞株(種細胞株)の樹立方法、関連情報などについて明らかにすることが重要である。

3) 目的細胞における微生物汚染や他の細胞混入否定に関する試験データが不可欠である。

4) 生産にかかわる細胞基材の恒常性を図る基本的方策として、一般にクローン(種)細胞株を出発素材としたセル・バンク・システムが構築されるが、バンクを構成する細胞の調製法、特性、保存管理法や更新方法を明らかにし、細胞基材の恒常性を維持していくことが重要である。その具体的内容として考えられる項目には、①マスター・セル・バンク(MCB)やワーキング・セル・バンク(WCB)を初めて調製した際の調製法、調製アンプル数、細胞特性や微生物汚染等否定に係わる試験項目、試験方法、試験結果(評価基準)、②両セル・バンクを更新する際の調製法、調製アンプル数、細胞特性や微生物汚染等否定に係わる試験項目、試験方法、各試験項目結果の判定基準(更新されたバンクの適否評価基準)、③両バンクの保存方法、現行保存アンプル数、④保存中の細胞の安定性試験実施要領(試験の時期、項目、方法、評価基準)、廃棄基準等、⑤両バンクの使用スケジュール、更新スケジュール等が挙げられる。細胞特性解析は表現型や遺伝子型などにかかわる適切な指

標に関して行われる。動物細胞では、例えば形態学的解析、アイソザイム分析、染色体のバンドング解析、種特異的抗血清による解析、染色体のバンドング解析による(細胞特有の)マーカー染色体の検出、遺伝子多型を検出するためのDNA分析などが考えられるが、その他当該細胞に特有な指標も含めて、適切に指標を選択する。微生物細胞では、選択培地での増殖特性解析などが考えられる。遺伝子発現構成体が染色体に導入された組換え体細胞においては、そのコピー数、挿入と欠失、組み込み部位の数、染色体外発現系の場合は、遺伝子発現構成体を保持する細胞の割合(%)を測定しておく必要がある。また、いずれの場合も、遺伝子発現構成体中の目的タンパク質をコードする部分の塩基配列が正しいことを立証しておく必要がある。非組換え体細胞であっても目的タンパク質をコードする部分の塩基配列が解析できることもある。目的タンパク質の発現も細胞特性の指標の一つである。

5) 細胞の保存中や大量培養中の安定性評価を行う必要がある。医薬品製造条件下で、細胞が安定に一定の目的物質を生産することを検証しておくことは、組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質の恒常性確保にきわめて重要である。実際には、医薬品製造のためにどこまでの期間あるいは細胞数倍加レベルまで細胞を増殖培養するのか、できるのか、すなわち、パイロットスケールあるいはフルスケールで、医薬品製造条件として提案するイン・ビトロ細胞齢まであるいはそれ以上に増殖させた製造用細胞における細胞の特性、目的物質をコードする遺伝子の塩基配列、あるいは生産タンパク質などの適切な指標について、MCB(WCB)のそれと比較したとき、変化がなく、予期される目的物質が恒常的に生産されることを立証しておく必要がある。その最も代表的な評価方法の例が、組換え体細胞における遺伝的安定性の評価である³⁵⁾。

6) 培養法の一定性を保つ必要がある。さもなければ、前項で述べた医薬品製造条件下で、細胞が安定に一定の品質の目的物質を生産することの検証は意味をなさなくなる。培地の組成など培養の方法が変われば、培地由来の不純物の混入が問題になるほか、培地の変更が実際の発現の場で誘導条件に影響し、発現状況が変わる可能性や、培養方法如何では細胞の安定性や変異の確率が変ることなども懸念される。また、培地の成分による発現タンパク質の変性や修飾が安全性(免疫原性など)に影響を及ぼすことも考えられる。培地の組成に依存して、細胞中で、ある種のプロテアーゼの作用が発現して生産物を一部分解し、最終産物の品質の均一性が変動することもある。また、細胞の大量培養に動物などを經由する場合で、動物の種類、株その他の条件を変更するようなケースも考え得るが、その際は動物由来の有害因子の混入問題等について改めて評価が必要になってくる。

7) 精製法の一定性を保つ必要がある。特に、①目的物質の細胞からの分離と精製手順、②各精製段階での精製状況(例えばタンパク質収量、活性収率、比活性、電気泳動パターン等)、③エンドトキシン等の有害因子や主な不純物の除去状況と除去効率、④一次産物を加工して目的物質に変換する場合はその手順と目的物質の精製手順、などについてその妥当性を証明し、その後はこの妥当性が証明された分離精製工程を一定にしておく必要がある。目的物が比較的不安定な高分子タンパク質であることから、生産細胞(とくに菌体内)からの抽出・分離法の変更も含めて精製方法を変更した際に、分離精製過程での目的物質に対する物理的、化学的あるいは生物学的作用の種類や程度が変わり、目的物の構造や性質に影響を及ぼす結果、最終製品の品質が変わることが懸念される。また、細胞の一次生産物がプロ体や雑種融合タンパク質あるいはインスリンのA鎖のような最終目的物の一部である場合には、最終産物を得るための加工の方法などが変更される可能性があるが、これも最終製品の品質に影響を及ぼすことが考えられる。細胞培養法によるインターフェロン- α に典型的にみられるように、最終産物が不均一な複数の活性成分からなる場合には、精製方法の変更は最終産物中の(活性の異なる)成分の種類や成分比の変動につながり、有効性等に影響する可能性がある。生産菌体や動物細胞由来、培地由来その他製造工程中に混入する可能性がある有害因子や不純物の不活化や除去状況が精製工程に依存して変わることもきわめて重大な問題である。その他、精製工程中で用いる試薬の混入や抗体カラムからの抗体の漏出など、採用された精製方法そのものに由来する安全性上の問題もある。

8) 製造工程全体にわたって、プロセスバリデーションによる工程の妥当性検証が不可欠である。

9) こうした製造工程の恒常性を常にモニターするために、製品のみならず、原材料の品質、機械や装置の作動状況にかかわる工程内管理試験がきちんと実施される必要がある。

このように製造方法の主要部分の一定性を保つことは非常に重要なので、もし、既存の組換え医薬品や細胞培養医薬品と同じ目的物質を目指すとしても、上に述べたようなことのいずれかが変更された場合には、その変更の程度に応じて改めてその妥当性について評価し直す必要がある。

2.5 ウイルス面からみた組換え医薬品及び細胞培養医薬品の安全性確保^{33,34,41,43)}

ヒトあるいは動物細胞由来の組換え医薬品や細胞培養医薬品すべてに共通の課題できわめて重要な問題の一つにウイルス汚染という安全性上の問題がある。ウイルス汚染は、出発素材である細胞系に由来して起きる可能性がある。また、製造工程中に外来性因子として導入された結果生ずる可能性もある。これらの医薬品についてウイルス面からみ

た安全性を確保する方策として考慮すべき事項には以下のようものが挙げられる。1) ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような生産用細胞系及び製造関連物質(培地成分、試薬、抗体カラムなど)を選択すること、2) 出発素材である細胞基材などにつき徹底的な解析とスクリーニングを行い、ウイルス存在の有無及び存在するウイルスの種類について検討すること、3) 汚染ウイルスがどの程度ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること、4) 製造工程の適当な段階において製品のウイルス否定試験を実施すること、例えば、未加工/未精製バルクなどにおいて外来性ウイルスを検出するための適切な試験計画を設定すること、5) ウイルスクリアランスを最大限達成するために製造工程中にウイルスの除去・不活化に関する各種の方法を用いること、6) 周到なウイルススクリアランス試験計画を立てること、7) ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施し、評価すること。これらの方策は、段階的にかつ相互補完的に活用していくことが重要であると考えられている。以下には、そのさらに根幹をなす部分に焦点をあて概説する。

2.5.1 各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験の要領

ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような生産用細胞系及び製造関連物質を選択するとともに、これらにつき徹底的なスクリーニングを行うことは、ウイルス面からみた安全性を確保する上で、なによりもまず実施すべき基本的アプローチである。Table 2には、マスター・セル・バンク(MCB)、ワーキング・セル・バンク(WCB)、及び医薬品製造条件として提案されたインビトロ細胞齢の上限まで培養された細胞(CAL)などの各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験の実施要領を例示したものである。

2.5.2 未精製バルクにおけるウイルス試験

製造工程の適当な段階において製品のウイルス否定試験を実施することは、製品のウイルス安全性確保上の第2の基本的アプローチともいえるべき必須事項である。

医薬品生産のための培養を終了し精製工程へ受け入れる段階での製品を未加工/未精製バルク(unprocessed bulk)と称している。この未加工/未精製バルクは、最終製品への外来性微生物汚染の可能性を高確率で測定することができ、最も効果的なレベルの一つであること、また、各細胞レベルでの一回のウイルス試験は、細胞株適格性についてであって、それらの細胞株に外来性ウイルスが存在しないことが、次々生産されるバルク各ロットにもウイルスが存在しないことを必ずしも常に保証するものではないということから、少なくとも3ロットのデータが評価資料として

Table 2. 各細胞レベルで一度は実施すべきウイルス試験

	MCB	WCB	CAL
レトロウイルス及び内在性ウイルス試験			
感染性試験	+	-	+
電子顕微鏡観察	+	-	+
逆転写酵素活性	+*1	-	+*1
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	-	適宜実施
非内在性ウイルスまたは外来性ウイルス試験			
in vitro試験	+	-*2	+
in vivo試験	+	-*2	+
抗体産生試験	+*3	-	-
その他細胞種特異ウイルス試験	適宜実施	-	-

*1:レトロウイルス感染性試験が陽性のときは不要

*2:CAL (イン・ビトロ細胞数の上限の細胞)で試験が実施されるときは不要

*3:例えばマウス, ラット, ハムスターでの抗体産生試験, 通常, げっ歯類由来の細胞に対し適用する

必要であるとされている。この段階で外来ウイルスの迷入が検出された場合には、一般にそのバルクを製品生産用を使用すべきではないことはいうまでもなく、また汚染原因をつきとめるなど適切な対応が必要である。

2. 5. 3 ウイルスクリアランスに関する工程の評価及び精製バルクでのウイルス試験実施要領

MCB を含めた細胞レベル及び製造工程の適切な段階の製品レベルにおいて、それぞれに最も適切で合理的なウイルス試験を実施するという2つの基本的アプローチと並んで、未加工/未精製バルクからの製品の精製工程がいかにウイルスを不活化/除去できるかに関するクリアランス能力を適切に試験・評価することは、ウイルス安全性確保上もう一つの柱となるべき必要なアプローチである。

細胞レベルでのウイルス試験や未精製バルクでの試験結果により、ウイルスの存在の有無、同定の可否、存在ウイルスのヒトへの病原性の可能性が明らかになるが、これらさまざまなケースに応じて、ウイルス不活化/除去に関する工程の評価をどのように実施すべきか、あるいは精製バルクでどのように対応すべきかに関する考え方が Table 3 に要約されている。ここでは、5つのケースを想定した上

で、とるべき対応策を提示している。このなかにあつて、とくに中心的な役割を果たすのがウイルスクリアランス工程評価試験と特性解析試験という2つの異なるウイルスクリアランス試験である。

まず、ウイルスクリアランス工程評価試験とは、存在が知られているか予測されるウイルスに関して製造工程が有する不活化/除去能力を解析することを目的に行う試験である。試験に用いるウイルスは、製造工程で使用される細胞基材、その他の試薬類や各種物質に混在することが知られているか、あるいは存在の可能性があるウイルス類と同一かあるいは同種のウイルス(“関連ウイルス”)である。精製工程や不活化工程はこれら関連ウイルスを不活化/除去する能力があることを示す必要がある。この“関連ウイルス”の入手が困難であったり、ウイルスクリアランスに関する工程評価試験にうまく適用出来ない(例えば *in vitro* で十分に高力価になるまで培養できない)場合には、代替として“特異的モデルウイルス”を用いることになる。適切な“特異的モデルウイルス”とは、存在が知られているかあるいは存在が疑われるウイルスに密接に関連しているウイルス、すなわち同一の属もしくは科のもので、検出されたウイルスあるいは存在が疑われるウイルスと類似した

Table 3. ウイルスクリアランスに関する工程の評価及び精製バルクでのウイルス試験実施要項

	ケースA	ケースB	ケースC	ケースD	ケースE
[細胞や未精製バルクでのウイルス試験結果]					
ウイルスの存在	—	—	+	+	(+) *1
ウイルス様粒子の存在	—	—	—	—	(+) *1
レトロウイルス様粒子の存在	—	+	—	—	(+) *1
ウイルスの分離同定の可否	適用外	+	+	+	—
ウイルスのヒトへの感染性	適用外	—	—	+	未知
[必要とする対応]					
ウイルススクリアランスに関する工程特性解析試験	必要*2	必要*2	必要*2	必要*2	必要*4
ウイルススクリアランスに関する工程評価試験	不要*3	必要*3	必要*3	必要*3	必要*4
精製目的産物でのウイルス否定試験	適用外	必要*5	必要*5	必要*5	必要*5

*1:未知のウイルスまたは(レトロ)ウイルス様粒子が直接あるいは間接法で検出

*2:非特異的モデルマウスを用い、当該精製工程の一般的ウイルス排除能力の特性を解析する

*3:検出されたウイルス及び存在が予測されるウイルスと同じか同種のウイルス(関連ウイルス)、またはそれらと同一の属や科で物理的・化学的性質が類似しているウイルス(特異的モデルウイルス)を用い、当該精製工程の特定ウイルス不活化・除去能力を評価する

*4:規制当局に相談する

*5:最低3-5ロットについて実施する必要があるが、CHO細胞におけるレトロウイルス様粒子(例: Type A, B 又は C)のようなものについては不要である

物理的、化学的性質を有するものである。

一方、それ以外のウイルスを不活化/除去する能力に関する工程の特性を評価する試験を一般に行うべきであるとされている。これは、ウイルススクリアランス工程特性解析試験と呼ばれ、その目的は、ある工程がウイルスの除去や不活化に関して一般にどの程度の能力を有するかを解析すること、すなわち工程が確実にウイルススクリアランス能力を発揮するという面での特性(robustness)を解析することである。この工程特性解析試験には、細胞などに存在が知られていないか、予測されていないウイルスで、かつ広範な生化学的・生物物理的性質を有するさまざまなウイルス(“非特異的モデルウイルス”)を用いる。この試験は特定のウイルスによるリスクに対する安全性を評価するために行うわけではない。したがって、クリアランスに関して特定の数値目標が達成される必要はない。

なお、Table 3 における5つのケースのうち、実用化されている組換え医薬品等で最も一般的なケースは、ケースAとケースBである。

2.6 目的物質の構造、特性、品質の検討

目的物質の製造工程の明確化、妥当性の検証と表裏一体

の関係で重要なことは、最終目的物質の組成分析、構造解析、物理的・化学的性質、生物学的性質、免疫化学的性質などを含む特性解析と有害因子や不純物の混入問題も含めた品質評価である。幸いなことに、生理活性タンパク質の構造解析技術や特性・品質解析法、不純物の分離検出法などが、バイオ医薬品の開発と期を一にして発達し、生産物の構造解析や特性解析、品質評価に大きな威力を発揮している。バイオ医薬品における構造解析、特性解析、品質評価の重要性は、これが本質的には人工的な技術に基づいて生産される高分子タンパク質であることを考えれば自ずと明らかである^{16,30,44-48)}。

2.6.1 組換え医薬品や細胞培養医薬品における成分の不均一性問題とその対応

組換え医薬品や細胞培養医薬品における構造解析、特性解析、品質評価を行うにあたって、まず留意すべきことの一つは、これら医薬品の成分を物質構造面からみると、不可避免的な不均一性が存在する可能性があることである。不均一性は、組換え医薬品等の製造面の特徴及び成分の本質がタンパク質であるという物質面の特徴の双方に起因して生じる^{30,44,46,49)}。まず、組換え医薬品や細胞培養医薬品は

その生産のために、完全な人為的制御が不可能な生きた細胞による生合成過程を利用していることから、生産物であるタンパク質において分子構造的な不均一性が不可避免的に発生する可能性がある。最も典型的な例は、生産物が糖タンパク質の場合である。これは、仮に単一の遺伝子から単一の発現タンパク質に翻訳されたとしても、糖鎖付加という翻訳後の修飾により、①発現タンパク質各糖鎖結合部位への糖鎖付加の有無をはじめ、②付加した糖鎖の種類が多様性、③同一糖鎖結合部位に付加した糖鎖における種類の多様性と存在量の不均一性などが生じ、結果的に生産物の構成成分が分子種としてきわめて多様な糖鎖付加体（グリコフォーム）の集合体となるケースである^{30,45,47,50}。目的物質が分子としての不均一性を示す原因となる翻訳後修飾には、糖鎖付加の他に、リン酸化、アセチル化、タンパク分解プロセッシング等がある。いずれの場合も、目的物質は予想される範囲内での翻訳後修飾を受けた不均一な分子種の混合物ということになる。これとは別に、細胞培養医薬品であるインターフェロン α のように、生産誘導剤により複数（10数種類）存在する遺伝子が同時発現するため、必然的に生産物が分子種の異なる複数の遺伝子発現タンパク質の混合物になるケースもある¹⁵。

このような、組換え医薬品や細胞培養医薬品の製造面の特徴及びタンパク質であるという物質面の特徴に起因して生じる不可避免でかつ人為的に制御不可能な不均一性については、それを前提とした科学的で合理的な対応が必要である。

一方、不均一性は、不安定な高分子タンパク質であるという物質面の特徴に起因して、原薬又は製剤の製造中あるいは保存中にも起こりうる。これについては回避するべく可能な方策がとられるとしても、完全に回避することは難しいので、それ相応の適切な対応が必要となる。

2.6.2 バイオテクノロジーにより生産された製品における目的物質とは

前項での問題点とも関連して、バイオ医薬品における「目的物質」とは、物質面からみてどのようなものであり、目的物質といえないものはどのようなものであるかを明確に定義しておくことがまず何よりも重要である。これは、組換え医薬品や細胞培養医薬品の本質やアイデンティティについて論じ、一般名称を定め、構造解析や特性解析、品質評価をする上での基本中の基本となる^{46-47,49}。この問題については、ICHの特性解析・規格に関する国際調和ガイドラインを作成する際にも最もホットな議論の対象の一つとなった⁵¹。議論の収束に基本的な方向づけをしたのは、わが国から出されたコンセプトであった。これは、前項で述べたバイオ医薬品生産の特徴であり、生産物に不可避免的に存在する分子の不均一性の問題に対してどのように対処すれば

よいかを含めて提示されたものであった。このコンセプトは、以下に述べるバイオ医薬品における「有効成分」、「目的物質関連物質」、「目的物質由来不純物」の定義や各物質の相互の関連づけも含めて論点を整理し、向かうべき方向を明確にするべく提起されたものであった。

論議の結果、「目的物質」とは、1) 予期した構造を有するタンパク質、2) DNA塩基配列から期待されるタンパク質、3) しかるべき翻訳後修飾（グリコフォームを含む）から期待されるタンパク質、4) 生物活性分子を生産するのに必要な、意図的な加工・修飾操作から期待されるタンパク質のいずれかにあてはまるものを指すと定義された。このうち、1) はモノクローナル抗体のような場合を想定している。また、3) は、前項で述べた生産物に不可避免的に存在する分子の不均一性の問題への対処を考慮したもので、得られた不均一な分子集合体を総体として目的物質として取り扱うことが合理的であるとの考えに基づいて定義されたものである。

一方、明らかに翻訳後修飾以降に起こった変化によって生じたとみなされる変化体は、当然、目的物質の範疇には含めない。しかし、これら製造中あるいは保存中に生成する目的物質由来の物質は、その特性に応じてさらに2つのカテゴリーに分類して取り扱うことが合理的であるとされた。まず、目的物質から派生した物質のうち、活性があり、製品の安全性及び有効性に関して悪影響を及ぼさないもの、すなわち、目的物質に匹敵する特性を備えているものは「目的物質関連物質」と称し、不純物とは考えず、「有効成分」として扱うこととした。生物活性の面から考えると「目的物質」と「目的物質関連物質」を合わせたものを「有効成分」とすることが実際のであり合理性もあるということである。ただし、「目的物質関連物質」には当然、許容量に限界が設けられる必要がある。他方、目的物質の分子変化体（例えば、前駆体、製造中や保存時に生成するある種の分解物・変化物など）で、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質のそれに匹敵する性質を持たないものは「目的物質由来不純物」と称し、文字通り不純物として扱うこととなった。

2.6.3 目的物質等の組成分析、構造及び特性解析

目的物質について当初のシナリオどおり意図した化学構造を有する物質が得られたかどうかを適切な組成分析、構造解析法を駆使して確認、同定する必要がある^{32,48}。糖タンパク質については、糖鎖の種類、構造及び付加状況などについて技術的に一般に可能な範囲で解析を行う必要がある。これは糖鎖が有効性、安全性にどのような影響を及ぼすのかを知るための基礎資料となる。また、目的タンパク質に期待される正しいジスルフィド架橋の形成も含めた正しい折りたたみ構造、すなわち活性高次構造を形成し、

天然型(もし同一のものあるいは類似のものがあれば)に匹敵する生物活性を有することを立証することも重要である⁵²⁾。細胞内に組み込まれた目的タンパク質に対応する構造遺伝子は特定のアミノ酸配列の作成に関する青写真ではあるが、高次構造形成に関する情報は提供しないからである。特に原核細胞を用いた組換え遺伝子産物の場合は、活性高次構造形成上の問題点が比較的多い。また仮に当初は正しい高次構造が形成されたとしても、製造過程等における化学的、物理的原因による構造変化も考えられるので、その意味でも最終産物での検討が必要である。さらに各種の理化学的、免疫化学的あるいは生物学的試験を徹底的に行って、生産物の均一性や純度あるいは目的とする生物活性を示すかどうか、その他の性状に関するデータを集める必要がある。

2.6.3.1 目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標と解析方法^{30,37,44,48,56)}

目的物質等のタンパク質部分の構造や組成の解析目標としては、1) アミノ酸組成分析、2) 末端アミノ酸及び末端アミノ酸配列分析、3) スルフヒドリル基とジスルフィド結合の数と位置の解析、4) ペプチド分析、5) 全アミノ酸配列分析、6) 高次構造解析などの項目が挙げられる。全アミノ酸配列分析は、通常、1)~4)について可能な範囲で解析し、このデータと目的物質の遺伝子塩基配列から推定されるアミノ酸配列を照合しながら決定(推定)する。こうした目標を達成するための分析方法は、ある程度ルーチン化してきている。アミノ酸組成分析にはアミノ酸自動分析法、N-末端アミノ酸配列分析にはEdman自動分析法、C-末端アミノ酸配列にはカルボキシペプチダーゼ法が汎用される。質量分析法も用いられる。末端アミノ酸が複数の場合はその存在比を適切な方法を用いて明らかにする必要がある。ペプチド分析とは、タンパク質のある特定のペプチド結合を適当な酵素あるいは化学試薬を用いて選択的に切断し、得られたペプチド断片を高性能液体クロマトグラフ法(HPLC)などで分離し、アミノ酸組成分析、N-末端アミノ酸配列分析や質量分析(FABMS, ESIMS, MALDI-TOFMSなど)を利用して各ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法である。各ペプチド断片の分析結果を重ね合わせていけば全アミノ酸配列の推定につながる。高次構造解析法としては、円二色性(CD)、核磁気共鳴スペクトル(NMR)、X線回折法などがあるが、CDから得られる情報は限られており、一方、NMR、X線回折法は必ずしも一般的ではない。

どの程度まで詳細に、徹底して解析するかは、タンパク質におけるサイズ、構造的複雑さ、目的物質を構成する分子種の多様性などの要素とその時点での分析技術の到達度など、さまざまな要素によって様々ではない。組換え医薬品の場合は、一般に全アミノ酸配列を少なくとも推定でき

ることが望ましい。細胞融合法で生産するモノクローナル抗体の場合は少なくとも免疫グロブリンクラス、サブクラスを明らかにしておく必要がある。

目的タンパク質以外の目的物質関連タンパク質の構造解析についても上記の要素に加えて、存在量、目的物質関連物質としてのアイデンティティの確認なども考慮に入れて合理的対応をすることになる。

2.6.3.2 糖タンパク質における糖鎖の構造と機能^{30,45,47-48,50)}

糖タンパク質性医薬品においては糖鎖の構造と機能に着目する必要がある。糖タンパク質における糖鎖が、標的細胞におけるレセプターとの結合性を含む生物活性の発現や調節、生体内動態、輸送のための血漿タンパク質との結合性増強、免疫学的性質、物性、安定性、溶解性などに影響を与えている事例が報告されているからである。糖タンパク質の生物学的、免疫学的、物理的・化学的性質は、糖鎖の種類、すなわち構造上の特徴如何で影響を受ける可能性があり、また、ポリペプチド鎖中の糖鎖結合部位数や占有率、各糖鎖結合部位での糖鎖の種類や分布状況によっても影響を受ける可能性がある。また、同種の糖タンパク質であっても、ポリペプチド鎖が一部改変されたものにあつては、もとのタンパク質と同じ糖鎖結合位置に存在する糖鎖の生物学的役割が変わってくることも知られている。

もう一つの注目すべきポイントは、バイオテクノロジーにより糖タンパク質を生産する場合、種はもとより組織や細胞種が異なると、糖鎖構造も異なってくるということである。また、糖鎖付加装置を有するもとの(宿主)細胞は同じでも、組換え体などの作製方法、挿入遺伝子、培養条件等が異なれば、生産物の糖鎖構造や糖鎖付加状況は異なってくることに留意する必要がある。

糖鎖構造が適正でないタンパク質は、生体内動態や組織分布に関して本来のものとは異なる挙動を示したり、あるいは天然型に対する拮抗剤的作用などの有害反応をひき起こしたり、あるいは長期連用投与の注射剤のような用法では抗原性が問題となってくる。

糖タンパク質の糖鎖構造の解析や特性解析は必ずしも容易なことではないが、最近の糖鎖構造解析技術の進歩やその特性解析事例をふまえて、糖鎖付加状況や糖鎖構造及びその機能等との関係を技術的に可能な範囲で把握する努力が必要である。

2.6.3.3 糖タンパク質の糖鎖の構造や組成の解析目標と解析方法

糖タンパク質の糖鎖に関しては、1) 糖組成分析(中性糖、アミノ糖、シアル酸等)、2) 結合型解析(N-結合型やO-結合型)、3) シアル酸分子種分析、4) 分岐鎖型、サイズ、分布、5) 糖鎖構造解析(主要糖鎖については単糖間の結合様式に至るまで解析)、6) 糖鎖結合位置、7) 結合位置毎の

糖鎖分布、構造解析などが解析目標である。糖鎖の生物学的活性における役割等を考慮し、これらについて可能な範囲で解析することが望ましい。糖鎖部分の構造解析に必要な要素と代表的な解析方法を以下に示した。1) 各種単糖分析（化学分析、ガスクロマトグラフィー、蛍光標識-HPLC、強アニオン交換 HPLC など）、2) 糖鎖マッピングや 2 次元又は 3 次元糖鎖マッピング（例えば、蛍光体支援糖質電気泳動法（FACE 法）、キャピラリー電気泳動法（CE）、ピリジルアミノ（PA）標識糖鎖の HPLC などによる）、3) 糖鎖構造解析：①各種修飾・分解（逐次酵素分解、メチル化、アセトリシス）、②分離（GC、HPLC）と各種解析法（MS：FABMS、ESIMS、MALDI-TOFMS；NMR など）の組合せ。

現在までに汎用されている動物細胞を用いて製造した糖タンパク質の糖鎖は、数種類の基本構造をベースにしたさまざまなバリエーションであることが判明している。また、90 種類以上の PA 標識標準糖鎖も存在し、かつ適切な条件下での HPLC では糖鎖構造と溶出時間に規則性があることも判明している⁵³⁾。そのため、例えばわが国で繁用されている PA 標識糖鎖の 2 次元マッピング法を利用すれば、糖タンパク質に存在するほとんどの糖鎖構造と分布状況を推定することが可能である。結合位置毎の糖鎖分布、糖鎖構造なども、例えば、糖ペプチド断片の LC/MS で比較的短時間で分析できるようになってきている⁵⁴⁾。

2. 6. 3. 4 目的物質の理化学的手法、免疫化学的手法及び生物学的手法による特性・品質解析^{37,44,48,52,56)}

目的物質については、各種の理化学的、免疫化学的あるいは生物学的手法による特性・品質解析を十分に行う必要がある。

1) 目的物質の物理化学的性質に関しては、①分子量・分子サイズ、②アイソフォームパターン、③比吸光度（モル吸光係数）、④各種電気泳動パターン、⑤各種液体クロマトグラフィー・パターン、⑥分光学的性質（例：紫外及び可視吸収スペクトル、円二色性）などについて詳細なデータの蓄積が必要である。

理化学的手法は目的タンパク質の確認・同定、均一性や純度の検定、定量にきわめて有用である。この目的には、各種 HPLC 法（サイズ排除（SE）；逆相（RP）；イオン交換（IEX）；疎水的相互作用（HI））や電気泳動法（SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法（SDS-PAGE）；PAGE；等電点電気泳動法（IEF）；ゾーン-CE；ミセル-CE；ゲル-CE）がきわめてすぐれた威力を発揮し、かつ簡便な方法として繁用されている。例えば、HPLC 法は、カラムの充填剤や移動相などに適切な条件を選択すればポリペプチド鎖のアミノ酸 1 個の違いでも識別、分析できる。一方、電気泳動法は分子量、電荷の違いなどを識別できるほか、免疫化学的検出法（例えばウエスタンブロッティング）と組み合わせ

れば試験の特異性はより高いものとなる。

最終製品における分子種の均一性に関しては十分な解析を行い、その実態をきちんと把握しておき、製造ロットが変わってもその恒常性を保証することが重要である。先に述べた目的物質等における分子構造上の不均一性はそのものの品質を規定するものであるため、この不均一性の程度及びプロファイルを解析する必要があるが、その最も有力な武器になるのも HPLC 法及び電気泳動法である。目的物質等の不均一性のパターンを定義し、非臨床・臨床試験に用いたロットのパターンと一貫していることを証明し、さらに承認後の製品のロット毎に不均一性のパターンが一貫していることを保証することで製品の品質の恒常性を確認することができる。製品の不均一性のパターンの一貫性が証明されれば、個々の分子種の生物活性、有効性及び安全性（免疫原性を含む）を評価する必要は必ずしもないケースもある。なお、これら工程の変更や分解物・変化物生成により、非臨床及び臨床試験に用いた製品で認められていたものと不均一性パターンが異なってしまった場合には、その変化がもたらす影響について評価する必要がある。

2) 目的物質の特性・品質解析には、理化学的手法による解析に加えて、生物学的手法あるいは免疫化学的手法による検討が不可欠である。そのアプローチ法は個々の製品の種類や特性とアッセイ系の特徴を最大限考慮した適切で合理的なものである必要がある。

免疫化学的手法の活用は、目的物質がモノクローナル抗体等の場合には免疫化学的性質を解析する手段として必須である。抗体が目的物質の場合、その免疫学的性質を徹底的に特性解析する必要がある。精製抗原と抗原の特定領域に対する抗体の結合試験を行い、可能な範囲でアフィニティー（1 価の抗原結合部位と 1 価の抗原決定基との間での結合の強さ）、アビディティー（多価抗体と多価抗原との結合の強さ）及び交叉性反応を含む免疫反応性を検討すべきである。さらに、可能な範囲でエピトープに関連する標的分子及びエピトープ自身を生化学的に解析する。モノクローナル抗体以外が目的物質の場合でも、当該タンパク質上にある様々なエピトープを認識する適切な抗体（類）が入手できれば、免疫化学的方法（例えば、ELISA、ウエスタン・ブロット）は、目的物質の同定や均一性、純度あるいは含量を試験するのに有用である。抗原抗体反応ではタンパク質の高次構造もある程度反応性に影響するので目的物質の高次構造に関する情報もある程度得ることも可能である。しかし、抗原抗体反応に関わるポリペプチド鎖中の領域と生物活性に関わる領域とは必ずしも同一とは限らないので、免疫化学的試験の結果から目的物質の生物活性に言及することは慎重でなければならない。特異的中和抗体による生物活性の抑制や、レセプターなどへの結合性の阻害を検討することは同一性確認の精度を一層高めることに

なる。

目的物質の免疫化学的性質が、精製、確認試験、純度試験、定量法、体内動態試験等に利用されている場合には、目的物質と抗体に関する全ての関連情報を提供する必要がある。例えば、①イムノアッセイ、免疫電気泳動、抗体中和法等の適切な方法を用いて検討した目的物質とこれに特異な抗体との反応性、②類似物質に対する抗体又は類似物質が比較的容易に入手できる場合に、目的物質又は目的物質に対する特異抗体との反応性などが挙げられる。

3) 生物学的手法は、まず何よりも目的タンパク質を特徴づける生物学の性質や生化学的性質の解明に必須である。例えば、酵素の場合には酵素化学的性質、モノクローナル抗体の場合には標的抗原に対する特異性や組織学的結合性、ワクチンの場合には免疫原性、ホルモンの場合には目的とするホルモン活性、サイトカインの場合にも目的とするサイトカイン活性などである。一方、目的とする性質以外にも多彩な生物学的作用を有することが知られていることが多く、ケース毎に適宜、適切な検討あるいは文献からの情報の提供が必要である。生物学的手法は、生物学の機能を指標とする確認・同定法や比活性を指標とする純度検定法、力価測定のための定量法などに活用される。さらには活性高次構造形成あるいは保持の確認や、活性を指標とする安定性評価にも有用である。生物学的手法には、動物を使用する *in vivo* 法と、培養細胞での応答や生化学的反応性を指標として用いる *in vitro* 法がある。基礎研究の段階、開発段階では、両法を駆使した詳細な検討が必要である。品質管理を目的とするような試験などの場合、従来は *in vivo* 法がよく使われていたが、最近では動物愛護の問題とか、細胞生物学の発展をふまえたより簡便で正確な *in vitro* 法によるアッセイがむしろ主流になってきている。しかし、*in vivo* 法による生物活性は投与後の体内動態及び標的細胞（標的分子）との相互作用が反映されるが、*in vitro* 法で得られる生物活性は体内動態に係わる要素が反映されないため、両測定結果が相関しない場合があることに留意すべきである。その典型的な例は糖タンパク質であり、糖鎖の状態如何では、*in vivo* 法と *in vitro* 法で得られた生物活性が逆相関になることもある⁵⁵⁾。

4) 純度については、①目的物質の理化学的純度、②比活性を主な指標とする生物学の純度、さらに、③工程由来不純物及び混入汚染物質の観点から品質評価する。

5) ここで得られた物理的・化学的、免疫化学的あるいは生物学の諸性質は、品質管理試験のほか、前臨床試験や臨床試験における有効成分の量の把握、体内動態や作用の追跡、作用機構の解析などのための基礎資料としてきわめて有用である¹¹⁾。

2.7 有害因子や不純物混入の可能性に関する検討

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保、安全性の観点から特に留意する必要があるとされていることのひとつが不純物の問題である。混在が予想される不純物には大別して外来性の有害因子、製造工程由来不純物と目的物質関連不純物の3種類が考えられる。

このうち外来性の代表的有害因子である微生物（細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス）や発熱性物質の混在は適切な試験方法あるいはクリアランス評価試験などにより否定される必要がある^{23,34,36,42)}。

製造工程由来不純物と考えられる主なものには生産細胞由来のタンパク質、核酸（宿主ゲノム由来 DNA、ベクター由来 DNA など）、その他の細胞成分、培地由来の不純物（遺伝子発現誘導剤、抗生物質、血清、その他）、目的物質の抽出、分離、加工、精製過程で用いた各種試薬、溶媒や抗体カラムなどに由来する不純物等が挙げられる⁵⁶⁾。細胞や培地由来のタンパク質などの混入が安全性確保の点から最も問題とされるのは、これら不純物が免疫原性物質となり得る可能性が考えられるからである。また大腸菌由来のポリペプチドのように、それ自体が免疫原性を示すというよりもアジュバントとして目的産物の免疫原性を修飾する可能性があることについても考慮しておく必要がある⁵⁷⁾。さらに培地に用いる抗生物質などはアレルギーになる可能性もあるので注意が必要である。とくにラクタム系のもはそもそも使用しないよう勧告されている。これらの不純物を検出し、試験する方法としては一般に免疫化学的方法が多用される他、HPLC 法や電気泳動法も必要に応じて用いられる。一方、細胞基材由来 DNA は、継代培養細胞株に存在する可能性のあるオンコジーンなどが医薬品中に混入して人体に悪影響を及ぼすことを危惧する議論の中心課題として問題となってきた^{5,20)}。最近では、さまざまなデータの蓄積に伴い、初期ほどの危惧はなくなり、1投与あたり 10 ng が限度値の目安とされているが⁵⁸⁾、実績としてより低い限度値が達成できている場合には、あえてレベルを下げることはない。試験法としては、一般に DNA ハイブリダイゼーション法がよく用いられる。

一般に不純物として問題となる可能性があるものについては、精製工程における分離状況や除去効率を明らかにし、必要に応じて最終製品での許容限度を定め、適切な試験を行ってチェックする必要がある。実験室スケールでいわゆるスパイク試験を行って、不純物の精製工程における分離状況や除去効率が満足できることをより明確に立証したり、工程内管理試験を行うことで最終製品での混在許容限度試験を実施しないというアプローチも考へられる。

目的物質由来不純物としては、目的物質を直接生産する過程で生じた副生成物類（切断体、S-S 結合ミスマッチ体など）と、目的物質の二次的修飾の結果生じた①凝集体（二量体、多量体）、②デスアミド体などの分解物、③酸化生成

物などが考えられる。

これらの不純物の混在状況については、製造方法や物質特性を考慮した上で試験対象を定め、HPLC法、電気泳動法など適切な方法による検討を行い、その実態に関する詳細なデータを蓄積しておくことが必要である。その上で、最終製品中での許容限度を定める必要のあるものについては、その検出や混在量測定のための適切な試験を設定しておく必要がある^{19,56)}。

2.8 プロセス評価、工程内管理試験

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質確保の最も基礎となるのは、前項で述べた製品の特性・品質解析結果であることはいままでの間もない。この結果は、同時に製造工程全体の妥当性に関する最も重要なデータでもある。同時に、医薬品としての承認後、将来にわたって継続的に同一の特性・品質を有する医薬品を供給していくための規格及び試験方法の設定に際して最も基礎となるデータを提供する。

しかし、組換え医薬品や細胞培養医薬品が複雑な製造工程の産物であり、かつ製造工程には望ましくない有害因子が迷入する可能性があること、製品が複雑な構造や性質を有し安定性にも乏しいものであることなどを考え合わせると、開発ステージでの製品の特性・品質解析結果や規格及び試験方法のみに依存して品質の恒常性確保を望むことができないことは明らかである。そこにプロセスバリデーションの概念の導入と実施の必然性が生じてくる。いったん確立して製品の特性・品質等が評価された製造工程は、あらゆる角度から検証されること、その継続性を保証することをとおして、医薬品の品質の恒常性の確保に寄与することになる。

こうしたプロセスバリデーションの一部を形成するもので、製品の品質保証や品質の恒常性に最も直接的に関わるのが、製造・精製工程のプロセス評価である。その最大の目的は、目的産物とその生物学的特性（免疫学的特性等）を損なうことなく効率よく純化され、また、有害因子や不純物が最終産物に混入して安全性上問題となることがない製造・精製工程であることを立証し、その恒常性を確保することにある。後者の場合、当該製造・精製工程により不純物や有害因子が許容できるレベルにまで除去されているか、またその恒常性があるかを評価するのである。この恒常性を日常的にモニターするために製造工程のある段階において工程内管理試験や規格の設定が必要であるという方策もしばしば出てくる。こうして工程中で迷入の可能性がある有害因子や最終目的産物に混入が予想される不純物に関し、その除去状況又は混在状況等が示されることになる。また、それらをふまえて、最終製品（原薬や製剤）段階での規格の設定の必要性や規格値が定められることになる。

組換え医薬品や細胞培養医薬品の品質確保にあたって、①プロセス評価、②製造工程の適切な段階における工程内管理試験や規格の設定、③原薬及び製剤の規格の3つのアプローチを相互補完的に合わせて、全体として目的医薬品の品質を保証するという方策は、最近国際的な合意事項として明確にされたところである⁵⁰⁾。この方策によれば、工程内管理試験で設定した規格・試験に関しては、最終製品での規格及び試験方法で設定する必要はなく、重複を避けることが可能となる。

2.9 規格及び試験方法(ロット毎の品質試験)^{3, 32, 55, 59)}

開発研究の段階で特性・品質、有効性、安全性について詳細に検討された組換え医薬品や細胞培養医薬品は、最終的にその有用性が評価されると承認・販売され、臨床の場に供されることになる。この承認された医薬品の特性・品質、有効性、安全性は、医薬品の規格及び試験方法によって維持、保証されることになる。すなわち、製造ロット毎に、承認時に定められた方法により試験を行い、定められた規格の適合性についてチェックを行うことで品質の恒常性を図ることになる。

したがって開発段階で明らかになった組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質面での解析結果は、当然、ロット毎の品質試験にも反映させる必要がある。

そのためには少なくとも、①目的物質の同一性・構造確認に関する試験法の設定、②目的物質の均一性もしくは目的物質（有効成分）が複数の分子種からなる場合はそれらの構成比がほぼ一定であることの保証に関する試験法の設定、③目的物質のタンパク質化学的純度の保証に関する試験法の設定、④製造工程由来不純物や目的物質由来不純物にたくに配慮した純度試験の設定、⑤生物活性や生物学的純度（比活性）の保証に関わる試験法の設定、などに留意する必要がある。

規格及び試験方法に採用する試験方法の選択は、製品により異なるが、選択した試験方法の妥当性や規格値の適合範囲を設定するために用いた根拠を明らかにする必要がある。規格値は、非臨床・臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一貫性の証明に用いたロットから得られたデータ、及び安定性試験データ、並びに関連する開発上のデータに基づいて設定し、根拠を示す必要がある。複数の同種同効医薬品を生物学的方法で測定し、力価で表示する場合には、医療現場の混乱を避け、相対比較ができるように、可能な限り生物活性単位表示の統一と力価測定法の標準化に努めるべきである。標準的試験法の簡便、高精度化も目指すべき方向である⁶⁰⁻⁶²⁾。わが国では、組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)、トロンボモジュリン、エリスロポエチン等の標準的試験法が開発された^{61,63)}。

その一方で留意すべきことは、組換え医薬品等の場合、

生物活性の保証を主な柱とする従来の方式からタンパク化学的性質の保証をもう一つの柱にすることが必然的な流れとなってきたということである。技術面でも、組換え医薬品や細胞培養医薬品の開発に呼応してタンパク質に関する分析手段が急速に発展してきたので、こうした対応が現実的に可能になってきた。こうした背景のもとで、同一性の確認や純度検定に際しては、しばしば高分子タンパク質中のアミノ酸1個が置換した誘導体が識別あるいは検出すべき対象となり、また、安定性試験においても、タンパク分子中のわずかな変化、例えば、ある特定のアミノ酸残基の脱アミノ化反応や酸化反応などですら試験対象となってきた^{44,48)}。タンパク質性医薬品の品質確保や評価のあり方も、物性面ではまさに有機化学薬品に近いような精密度を要求されるという新たな局面が生まれてきているといえてよい。この延長線上に、生物学的試験法から理化学的試験法へ切り替えることが試みられている。

2. 10 品質管理における生物学的試験法から理化学的試験法への切り替え

ヒト成長ホルモンやインスリンの品質管理における定量法は、従来、生物学的試験法で行われていたが、生物活性成分のみを分離、測定できる HPLC 法が開発され、近い将来これに切り替えられる予定であり、もはや生物活性試験を行う必要がなくなった。品質管理における生物学的試験法から理化学的試験法への切り替えへの要件と戦略としては、1) 開発段階での徹底的な生物学的特性解析の実施、2) 製造方法の明確化と一定性の確保、3) 生物活性を保持する目的有効成分を選択的に識別し、定量することが可能な試験系の確立が挙げられる。このうち、3) に関する実証的研究においては、①各ロットにおいて生物活性(力価)と理化学的試験測定値(タンパク質量)が相関することの証明、②一たん理化学的試験法に切り替えると、以降は、その測定結果(タンパク質量)が同時に生物活性(力価)を反映したものでなければならないことの確認、すなわち理化学的試験測定値(タンパク質量)の中に生物活性のないものは含まれず、生物活性のあるものは理化学的試験測定値に含まれることの確認、③具体的には、製造過程、保存中にどのような事態が生じて、生物活性のあるもののみを選択的に識別し、定量可能な理化学的試験法の確立が必要である。ヒト成長ホルモンやインスリンの場合もこのような考えに基づいて検討が行われた。その結果、前者については、適切な条件下でのサイズ排除(SE)-HPLCのhGHに相当するピークから分取した試料は、実験誤差の範囲内ですべてヒト成長ホルモン有効成分として満足できる活性を有することが確認され、後者についても、適切な条件下での RP-HPLC 法は、生物活性を有するインスリンのみを選択的に識別、定量できることが判明した^{61,64)}。

2. 11 標準品、標準物質

組換え医薬品や細胞培養医薬品の特性・品質評価の基準となる物質の設定に関して最も理想的なのは国際標準品あるいは国内の統一標準品が制定されているケースである。しかし、組換え医薬品等の開発テンポは早いので、開発時にこうした公的標準品が制定されていることはまれである。また、複数のメーカーにより、それぞれ異なるソース(種細胞)から開発された同種、同効製品に対して公的標準品を制定しようとする場合、最も大きな問題となるのは、標準物質と対象となる製品との化学的及び生物学的同一性である。複数の同種製品が相互に、化学構造的に同一ではなく、目的とする理化学的試験に不適切な場合は、共通の標準品を制定することはできない。相互の化学的構造上の微妙な差異が各種の生物学的作用に影響を及ぼさないのであれば、アッセイ系の標準化や力価表示法の統一も含めれば共通の力価測定用標準品を制定できる可能性があるが、化学的構造上の差異が各種生物学的作用の差異として現れるようなケースでは共通の標準品はできない。

公的標準品が存在しない場合、医薬品開発者としてはとりあえず、自家標準物質を確立する必要がある。その場合のアプローチはおよそ次のようなものであろう^{47,56,59)}。

1) 開発ステージにおける目的物質の解析で構造、組成、諸性質などについて徹底的に吟味されたロットのものをリザーブして第1次標準物質とする。これは、非臨床試験、臨床試験で使用されたロットの品質と同等もしくはそれ以上のものでもあることが望ましい。

2) それが困難な場合、あるいはストック切れで更新を必要とする場合は、1)の手順と基準で得られたものとその物性、純度などにおいて同一、同等であることを客観的に立証できる試験を行うよう適正なルールを定め、これに適合したものを第1次標準物質とする。なお、標準物質の力価に関しては、範囲で定めることはしない。

3) 第1次標準物質から試験目的に則した評価法で常用標準品を確立する。

4) 標準物質とは、あくまで試験目的に則した形でその規格、基準などが定められるべきものである。例えば力価測定用の標準物質の場合には、その標準物質について、同一性と正確な力価が定まっていることが重要で、厳密な HPLC 的純度は必ずしも要求されない。一方、HPLC 用の標準物質の場合には、厳密な HPLC 的純度が要求される。

5) 組換え医薬品や細胞培養医薬品はタンパク質製剤であるのでその安定性に問題があるが、標準物質はその保存期間中なんらの変化もしないことが絶対の前提条件である。

6) 標準物質は通常、バイアルの内容物を所定量の適当な溶媒に溶解すれば所定の力価(質量)を示すよう製造する。表示値は、バイアルに分注・充填後に力価検定(質量定量分析)を行い、一定値を定める。範囲では定めない。この

場合、再溶解したとき、容器の材質や溶媒の性質によって標準タンパク質が容器に吸着して表示通りの力価（質量）を示さない可能性がある。また、溶解後の安定性に問題はなくとも、経時的に容器への吸着が増す場合もある。標準物質製造時には、凍結処理や製剤化がどのような影響を起こすかという問題とともに、容器の材質や標準物質溶解液の種類、あるいは溶解後の取り扱い方について十分な吟味が必要である。

2. 12 組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験

38,40-41,65-66)

組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験の目的は、1) 品質保証可能な保存条件、保存期間の設定、2) 医薬品が経時的にどのような変化をうける可能性があるかについて検討していくことにある。

試験の実実施計画や評価に際して第一義的に重要な点は、実保存期間、実保存条件での安定性試験データが、貯法を決める場合はもとより、分解物の確認やその後の処置などのことを考える際にも、基本になるということである。換言すると、申請しようとする精密な範囲の保存温度と保存条件で長期安定性試験のプロトコールをつくり、データを評価すべきであるということである。有効期間が化学薬品に比較して短期間というケースも考えられるが、それに応じて経時変化をモニターするための試験間隔を短くする必要がある。

試験の実実施にあたっては、対象となる製品の同一性、純度、生物活性における変化を検出/測定できる検証された適切な理化学的試験方法（各種電気泳動法、高分解能クロマトグラフィ、ペプチドマッピングなど）、生化学的方法、免疫化学的方法、生物学的方法を駆使してデータを集積する必要がある。分解物・変化物に関しては、長期保存試験で有意に生成するような分解物等がある場合にその特性解析や定量、安全性上の問題について考慮する必要がある。その許容量は、前臨床や臨床試験で用いた試料でのレベルを勘案して設定し、その根拠を明らかにする必要がある。

2. 13 組換え医薬品や細胞培養医薬品の非臨床生物試験におけるポイントと問題点

一般に動物等を用いた非臨床生物試験の目的は、まず臨床試験の開始に先立って、当該医薬品の効果の発現、その作用持続時間、作用機序等の予測、あるいは副作用の発現の推定に関する多大な情報を与えることにある。また、臨床試験により得られた観察結果の解釈を裏付けるための試験やデータを要に応じて追加蓄積し、臨床上的有効性、安全性の適正な評価に資することのできる必要な情報を提供することも非臨床試験の重要な目的の一つである。したがって、一般に非臨床試験の実施は新医薬品の開発研究上不

可欠なものである。バイオ医薬品の場合もこの点では例外ではない。

しかし、バイオ医薬品の物性面あるいは作用面での特性などから、従来の医薬品、特に化学薬品に対する非臨床試験の種類・項目及び試験方法をそのまま適用することは必ずしも妥当ではないさまざまな特徴を有するので、従来の一般の医薬品の場合とは異なる観点や方法で非臨床試験を実施すべき点が多い。

現時点ではあらゆる組換え医薬品や細胞培養医薬品に対応できるよう試験の実実施基準、実施方法について一律に定める事は合理的ではなく、ケース・バイ・ケースで柔軟に対応していくのを基本姿勢とするのがよいというのが世界の共通認識となっている^{24,67-69)}。

もちろん、このケース・バイ・ケースでの対処の基本精神は、当該医薬品の臨床上的有効性及び安全性の適正な評価に役立てるということをあくまで目的として、その時点で最も科学的に適切な試験がなされ、データが蓄積される事を一般原則とするところにあることはいまでもない。その上で、個々の医薬品についての試験の内容及び範囲に関しては、いま、対象としている医薬品の特性、臨床適用法などを配慮して合理的に考えようということである。従って、試験の種類・項目及び試験方法の取捨選択に関しては、その合理的根拠について十分説明できることが必要とされている。さらに積極的に、個別の申請資料の作成という観点からだけでなく、社会的な意義、責務も考えて、この方面のデータの蓄積を増やし、この方面の進歩を図るといことも望まれている。さらに詳細な技術的留意事項についてはICHガイドラインに記述されている⁶⁸⁾。

2. 14 臨床試験について

臨床試験の実実施にあたっては第1相、第2相及び第3相と段階的に慎重に行い、有効性及び安全性について、精密かつ客観的な考察を行う。これに加えて、組換え医薬品や細胞培養医薬品の特殊性を勘案して、特に、タンパク質性の有効成分あるいは宿主等に由来する抗原に対する抗体産生やアレルギーの発現など患者における免疫応答状況、産生した抗体との相互作用による薬物動態の変化及び有効性に対する影響、投与部位の局所反応、あるいは発熱性などについての詳細な検討が必要である。かつてヒト型のタンパク質にはヒトに対して抗原性を持たないであろうとの期待が寄せられていたが、ヒト型といえども医薬品として投与したときには抗原性を賦与されているケースも多いので、この点に関する留意が必要である⁷⁰⁾。有効成分の物性、品質と密接に関連している可能性も高いのでそうした観点からの詳細な解析、考察が今後とも重要であると思われる。

3. 遺伝子治療用医薬品の品質、安全性等の確保⁷¹⁾

最近、人の疾病治療を目的とする革新的な医療技術として遺伝子治療が注目されている。この医療技術は、人為的に加工した遺伝子を人の体内に投与し、疾病の治療を図ろうとするものである。米国では、1998年までにガンで約150、エイズで20余、先天性遺伝子疾患で30余、血管、リウマチ病で約10の合計210余のプロトコールで約3000名の患者に遺伝子治療が実施されている。わが国では現在までに4つのプロトコールでの遺伝子治療臨床研究が実施されている。

遺伝子治療は、全く新たな医療実践であるところから、わが国では「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(平成6年2月告示)を基に、臨床研究が科学的妥当性及び倫理性を確保しながら適正に実施されるよう厚生科学審議会で審査するなど必要な施策を講じている。一方で、企業活動としてこのような治療用遺伝子開発及び製造が活発に行われ始めていることなどから、その円滑な推進、長期的な研究・技術開発の推進には、企業が遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性等に関し、臨床研究、治験などに先だって評価を受け、治療薬としての適切性の確認を得られる仕組みが必要とされ、そのための施策も講じられている。すなわち、「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針(平成7年11月薬務局長発)」により、企業が臨床研究用薬剤の適合性確認を求めようとする際にどのようなデータ、情報を提出すればよいか提示されている。審査体制としては、中央薬事審議会バイオテクノロジー特別部会/遺伝子治療用医薬品調査会が遺伝子治療薬の製造法の妥当性や品質、安全性評価に関する審議を行っている。

遺伝子治療に用いられる薬剤は、①その品質、有効性及び安全性の確保、②体内への導入に際しての安全性の確保、③治療目的の達成、について十分な科学的知見に基づき予測、確認されたものでなければならない。この確認はその時点の科学的水準をもとに適切になされたものである必要がある。とくに、企業活動として治療用遺伝子の開発及び製造を行う場合には、これを従来にはないさまざまな特徴や留意点を有する一種の医薬品と考えた上で、医薬品としての一般性、普遍的広がりを視野におき、その適格性を示す必要がある。

遺伝子治療に用いられる製品について、未だ具体的事例や経験は乏しいものの、医薬品としての観点からどのような製造管理、特性・品質解析、有効性・安全性評価などがなされる必要があるかについて、薬務局長指針をふまえて概説する。

Table 4. 各種遺伝子導入法に共通して情報提供が求められる事項

- 当該遺伝子導入法を選択した理由及びその特徴
- 導入DNA又はRNAの作製方法、構造分析、性質
- 導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性
- その他のDNAの作製方法、構造及び性質
- セルバンクシステム

3.1 遺伝子治療用医薬品の製造方法の明確化とその妥当性の検証、一定性の維持

製造方法の詳細とその妥当性を明らかにすること、製法の一貫性を示すことは、遺伝子治療用医薬品の品質、安全性の確保、品質恒常性の維持にとって特に重要とされる事項の一つである。遺伝子治療用医薬品の製造方法に関しては、どのような遺伝子導入法を目指すのか、どのような投与方法によるのかによってアプローチや評価方法が異なるので、遺伝子導入法による区分と投与方法による区分にそれぞれ整理した。遺伝子導入法による区分ではさらに、1) ウイルスベクターを用いる場合、2) 非ウイルスベクターを用いる場合、3) ベクターを用いずに直接導入する場合に分け、必要な試験や情報、評価すべきデータについて例示した。Table 4には遺伝子導入方法の如何を問わず、製造方法に関し、それぞれのケースで共通して資料提供が必要な主な項目を示した。

投与方法による区分では、(1) *ex vivo* 法の場合と(2) *in vivo* 法の場合に分ける。

3.1.1 ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合には、Table 4の項目に加えて、「野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響」、「パッケージングに用いる細胞の培養方法、生物学的特徴及び人に対する影響」、「パッケージング細胞の培養方法、生物学的特徴及び人に対する影響」、「ウイルスベクター産生細胞の人に対する影響」、「ウイルスベクターの粒子構造上の特徴」、「ウイルスベクターの生物学的特徴」、「ウイルスベクターの製造方法」などに関するデータや情報の提供を必要とする。

このうち、「ウイルスベクターの生物学的特徴」として情報提供が求められている内容は、①ウイルスベクターにより、どのような細胞に遺伝子導入が行えるか、種特異性・組織特異性があるか、静止期の細胞への遺伝子導入は可能かなどについて明らかにすること、②遺伝子の導入効率及び導入遺伝子の発現効率について示すこと、③導入遺伝子の細胞内での存在様式、安定性について明らかにすること、染色体内に組み込まれる場合には、その位置が特定されて

いるか不特定かを明らかにすることなどである。また、「ウイルスベクターの製造方法」として求められている事項は、①人に導入される DNA 又は RNA の作製方法から始まりウイルスベクターの製造にいたる一連の製造過程を総括的に示すこと、②ウイルスベクターの精製法について示すこと、③実用化のためスケールアップ等の措置を講じた場合は、適切なバリデーションデータを示し、その内容を明らかにすること、④パッケージング細胞を使用する場合は、その作製手順、選択・同定方法及び種細胞株を確立するまでの単離純化方法、MCB 及び WCB の調製・保存方法、管理法、更新法、特徴及びパッケージング細胞に挿入された DNA 又は RNA の安定性についても明らかにすること、⑤培養期間中を通じて、またロット間で細胞フェノタイプ等が変化していないことの確認試験方法及び試験結果を示すこと、⑥増殖性ウイルスを含めて品質管理に必要な安全試験の時期、方法及び結果を示すことなどである。

一方、共通して資料提供が必要な項目のうち「セルバンクシステム」の項は、遺伝子治療用医薬品の製造過程のいろいろな局面で細胞の使用が予測されることと関連している。使用が予測される細胞は、例えば、①ウイルスベクター（人に導入される DNA 又は RNA）、目的遺伝子、ウイルスベクターを製造するために用いたプラスミド、その他の DNA の製造、ウイルスの製造などに使用する細胞、②パッケージングに用いる細胞、③パッケージング細胞及びウイルスベクター産生細胞などである。その際、セルバンクシステムを構築して、一定の品質の細胞、あるいは特定の細胞からある目的産物の供給を図り、利用することも多いと思われる。そのような場合には、セルバンクの調製方法、保存方法、管理方法、更新法等について、各物質の製造、各細胞毎に詳細に情報を提供する必要がある。パッケージングに用いる細胞やパッケージング細胞では凍結及び解凍手順、解凍後及び培養後の確認試験並びに凍結有効期間についても明らかにしておく必要がある。これらの概念や内容は、すでにバイオ医薬品の製造に際してセルバンクシステムを使う場合に述べられていることと基本的には同じである。その他、「導入 DNA 又は RNA の作製方法、構造分析、性質」、「導入遺伝子からの生成物の構造及び生物活性」、「その他の DNA の作製方法、構造及び性質」などについて、どの程度の、どのような内容の資料が必要であるかは、組換え DNA 技術あるいは細胞培養技術由来の医薬品について、国内のガイドラインあるいは ICH 国際ガイドラインなどで求められている内容、程度に準ずると考えれば良いと思われる。

3. 1. 2 非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合

非ウイルスベクターを用いて遺伝子を導入する場合に提

供を必要とするデータや情報の主なものは、Table 4 で挙げた共通項目に加えて、ウイルスベクターの場合とは異なりこのケースに特徴的だと思われる「非ウイルスベクターの製造方法」、「非ウイルスベクターの構造又は組成分析」、「非ウイルスベクターの生物学的特徴」などである。

非ウイルスベクターの製造方法で最も特徴的なのは、タンパク質、糖質、脂質等が構成成分になる可能性があることである。これらについては、すでに規制があるもの、例えば、バイオテクノロジー由来のタンパク質が構成成分の場合は、まずその構成成分について現行ルールでその品質や安全性の確保に対し求められているのと同様のデータが必要である。また、既存のルールがないものについても、基本的な考え方は既存のものを準用しながらケース・バイ・ケースでそれらの品質や安全性確保を図っていくことになると思われる。いずれにしても、ベクターを構成するすべての成分（例えばタンパク質、糖質、脂質等）それぞれについて、由来、調製法、精製法、品質等の詳細な情報提供が必要である。生物起原由来の材料を使用する場合には、ウイルスをはじめ、感染性微生物による汚染の可能性を否定するための試験、評価を行っておくことも不可欠である。これらの各構成成分の製法に関する試験、評価を前提として、最終的には非ウイルスベクターそのものの製造手順、精製法及び管理法についての資料を提出するということになる。

非ウイルスベクターの構造又は組成分析についても考え方は同じである。まず、①ベクターを構成する成分（例えばタンパク質、糖質、脂質等）それぞれについて、ベクター製造前後の構造又は組成を明らかにしておくこと、②各構成成分のロット更新を行う場合には、ロット間の恒常性を明らかにすること、例えば、組換えタンパク質やモノクローナル抗体が構成成分の一部である場合には、目的タンパク質生産用の種細胞株の樹立、セルバンクの調製方法、保存方法、管理方法、更新法、生産のための細胞培養方法、目的タンパク質の精製法、構造・組成解析、特性解析、規格及び試験方法並びに保存安定性などに関する資料の提出が必要である。また、こうした各構成成分での試験、評価、品質管理に加え、③ベクター全体としての構造又は組成分析が当然のことながらリンケージして求められている。

3. 1. 3 直接 DNA 又は RNA を導入する場合

直接 DNA 又は RNA を導入する場合に情報提供が必要な項目は、Table 4 で挙げた共通項目に加えて、「遺伝子導入操作」や「当該導入法の生物学的特徴」などである。このケースの場合、遺伝子導入操作に導入法としての最大の特徴がある。したがって、実際の導入手順、使用する試薬、機器等について明確にする必要がある。その他の各項目についての基本的な考え方は、すでに述べたことと同様である。

3. 1. 4 *Ex vivo*法及び*in vivo*法による投与を行う場合の留意事項

投与方法に言及している理由は、開発された遺伝子治療用医薬品を使用するにあたっての基本的なプロトコール、基準をあらかじめ開発者に設定、評価させ、この標準化された使用法を守ることを通して、医薬品としての品質、安全性の確保をより一層確実なものとするためである。

まず、*ex vivo*法の場合、次の項目を中心に詳細な検討と評価が求められている。1) 標的細胞の由来や特性、選択理由を明らかにすることによるその適格性、2) 感染性微生物汚染の可能性、免疫適合性、健康状態などの面での評価を含めた細胞供与者の選択基準と適格性、3) 細胞採取から始まり、遺伝子導入、導入遺伝子の安定性、培地、培養期間、微生物汚染対策も含めた細胞培養方法関連事項、4) 微生物汚染の否定、試薬等の残留量測定などを含む遺伝子導入細胞の適格性試験、5) 遺伝子導入細胞の患者への投与方法など。

*in vivo*法の場合には、標的細胞の生物学的特徴、当該細胞を標的細胞として選択した理由、投与方法（遺伝子導入の方法、投与量、投回数、間隔等）、標的細胞以外（特に生殖細胞系列）への遺伝子導入の可能性に関する検討・考察などが重要なポイントである。

3. 2 規格及び試験方法並びに製剤設計

遺伝子治療用医薬品の品質を確保し、その恒常性を図るためには、医薬品本体の特性や不純物の種類、存在量などについて十分な解析を行い、その特性・品質プロファイルを明確にした後、それらを適切に反映した規格及び試験方法を設定し、ロット間の製品管理をすることがなによりも重要である。また、細菌、迷入ウイルス、マイコプラズマ、真菌等による汚染の可能性について否定することも必須である。さらに、予測される混入物やウイルス混入の可能性に関するプロセスバリデーションを製造及び精製過程でどのように行ったのか、あるいは次項で述べる安定性試験の結果も品質確保、規格及び試験方法の設定上の重要な参考事項となる。なお、特別の製剤処方がある場合には、その合理的説明と必要に応じて製剤機能試験を設定することが必要である。

3. 3 遺伝子治療用医薬品の安定性

安定性については、原体及び製剤について、流通使用期間を考慮し、適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定する必要がある。また、貯法以外又は有効期限を超える保存について、試験を実施し、安定性の限界を確認することや、各試験において用いたロットの数の妥当性を合理的に説明することなどが重要である。

3. 4 遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験

遺伝子治療用医薬品の非臨床安全性試験に関しては、製品の安全性について、適当な動物を用いた試験及び*in vitro*における試験を適切に実施することが必要である。この安全性試験は、人における製品の投与経路を反映している必要がある。安全性を確認するにあたっては、特に、1) 増殖ウイルス出現の可能性、2) 細胞又は組織に傷害を与える可能性、3) 導入遺伝子が生体に及ぼす影響、4) 発現産物の異常発現に起因する安全性、5) がん原性、6) 免疫原性、7) 試験実施が技術的に可能であれば一般毒性などに着目することが必要とされている。しかし、すべての項目について試験の実施を求めている訳ではない。ケース・バイ・ケースで対応し、かつ、合理的な説明がなされることが肝要である。

3. 5 遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験、体内動態等

遺伝子治療用医薬品の効力を裏付ける試験としては、1) 適切に設計された培養細胞及び実験動物を用いた試験により、遺伝子の導入効率、導入遺伝子の構造及び安定性、導入遺伝子からの目的産物の発現効率及びその持続性、発現産物の生物活性、細胞、組織及び個体への期待される効果等を検討すること、2) 適当な疾病モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討すること、などが期待されている。

遺伝子治療用医薬品の体内動態に関しては、1) 遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞の実験動物での吸収、分布等の体内動態に関する試験等により、人における遺伝子導入細胞の生存期間等を推測し、目的とする効果が十分得られることを説明すること、2) 特に、遺伝子治療用医薬品又は遺伝子導入細胞が特定の部位（組織等）に到達する必要がある場合には、その局在性を十分に説明すること、などが必要である。

3. 6 非臨床試験結果等の総括及び遺伝子治療臨床試験

非臨床試験結果等の総括として、以上述べてきたような製造方法から体内動態までのデータを総括し、現在の知見で遺伝子治療用医薬品の安全性が適切に確保されており、品質、安全性及び予想される有効性の面から臨床試験を行うことの正当性を記載し、臨床試験の開始が十分な基礎データに裏付けられたものであることを示す必要がある。

なお、参考事項として、予定されている遺伝子治療臨床試験の概要に関し、次のような項目についての情報提供が必要である。1) 適応症として選択した疾患に関して、現在得られている知見、2) すべての検査、治療内容等の臨床試験計画、3) どのような機序で治療効果が得られるのかを明

らかにすること。また、既存の治療法と比較して遺伝子治療を行うべき理由および妥当性、4) 遺伝子治療臨床試験実施施設・体制の適正性、5) 被験者の選択基準および除外基準、6) 被験者の同意の取得方法、7) 必要とする症例数および実施期間ならびにその根拠、8) 細胞治療臨床試験の具体的な実施方法、9) 患者（被験者）のフォロー観察予定、10) 患者以外への遺伝子導入の可能性、11) 患者の QOL を含む効果判定基準。

3.7 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けての課題

遺伝子治療の実用化に向けての研究はその初期段階を経て、今後に向けての問題点が明らかになってきた。現行の遺伝子導入技術、中でも根幹をなすレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、リポソームなどの遺伝子導入ベクター（遺伝子治療用医薬品）には、それぞれ機能面あるいは安全性面での一長一短があり、いずれをとっていても治療技術として普遍化できるだけの満足すべき結果が得られていない⁷²⁾。

これらのデータをふまえ、評価科学の観点から将来の遺伝子治療用医薬品に求められる機能と安全性要件を考察してみると、主なものとして以下のような事項が挙げられる。すなわち、①ヒトに対する非病原性、②低細胞毒性、③非抗原性、④導入遺伝子の数やサイズに関する許容性、⑤標的細胞特異性、⑥遺伝子導入効率、⑦安定性、⑧導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節、⑨遺伝子毒性の回避などの諸要件である。遺伝子導入ベクターにおけるこれらの要件の達成度が医薬品としての品質・安全性・有効性に関する評価に耐え、治療の成否を決める鍵になるということである。

これらの評価科学からみた課題は、とりもなおさず遺伝子治療の現状を切り拓き、将来の進展を図るための開発基盤研究の目標でもある。そしてそれぞれの要件の目標達成に向けての開発基盤研究が適正に進展するためには、さらに細部にわたる評価科学が必要になる。例えば、上記①～⑨の大半の条件を充たすには、ウイルスベクターを限りなく非ウイルス化したもの⁷³⁾、あるいは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターの長所を最大限活かし、かつ短所を最小限にしたいわばハイブリッド型ベクターの開発研究が必要である⁷⁴⁻⁷⁵⁾。後者の場合、①から④の要件は、例えば、「安全で品質管理が容易な素材から大量に調製でき、封入できる物質の種類やサイズに関する許容性が非常に高く、また標的細胞との膜融合によりきわめて短時間で直接細胞質内に高効率で物質を導入することができ、細胞毒性も示さないという特徴を持つ膜融合リポソーム⁷⁵⁻⁷⁸⁾」のようなものの開発研究を進めることで充たされる可能性があるが、所期の目的に叶うかどうかは適正に評価、検証する必要がある。

ある。次に、⑤の標的細胞特異性を付与しようとするれば、例えば、標的細胞表面に特異的に存在する受容体その他の分子を認識する分子をベクターに付与するか、導入遺伝子構成体に細胞特異的プロモータを装着する必要がある⁷²⁾。また、⑥の遺伝子導入効率を高めるための方策としては、目的導入遺伝子に核移行シグナルを持たせるなどで核への遺伝子送達能を高めるか、T7 プロモータ/T7RNA ポリメラーゼ系などを利用して核移行を伴わず細胞質内で高効率で目的遺伝子を発現する方法^{75,79)}を開発する必要がある。さらに、⑦安定性、⑧導入遺伝子の高発現や安定発現、発現調節、⑨遺伝子毒性の回避などを図ろうとすれば、目的導入遺伝子が細胞核内の宿主染色体外で安定に存在することができるような要素（例えばウイルスが核内独立レプリコンとして存在しうるための要素やテロメアなど）及び細胞種特異的プロモータ並びに核移行に必要な要素を装備した遺伝子導入構成体として「ミニ人工染色体」の開発を目指すか⁷⁴⁻⁷⁶⁾、あるいは宿主染色体の安全な特定位置（例えば第19染色体の長腕部）に選択的に目的遺伝子を挿入するなどの技術開発が必要である。

このようなそれぞれ新たな技術開発を行った場合、その妥当性を適正に評価する必要があることは言うまでもない。その際、これら先端的技術開発の渦中で自らも研究に従事するか、あるいは周辺領域に位置し、技術開発の成果が理解、把握できる状態にあって問題点を明らかにし、解決策を探っていく中ではじめて、より適切な評価や評価技術開発が可能になると考えられる。逆に、新たな技術開発をする場合に評価のポイントを常に念頭に置いて研究を行えば、効率的な開発が可能となる。安全性評価のポイントを念頭において、あるベクター開発の企画・設計の段階から安全性設計を十二分に盛り込んだものとするれば、安全性設計なしに開発を進めた場合と比較して、安全性評価において実体としても、時間や労力においても明らかに合理的に事を運ぶことが可能であろう。

このように、先端技術応用医薬品分野にあっては、評価科学研究の対象は、次々と新たに展開していく開発研究の成果に他ならない。逆に、技術開発研究は評価科学に動機づけられ、またそれを羅針盤としながら進めることになる。評価科学研究と技術開発研究は相互に触発・啓発し合い、あるいは補完的な役割を果たしながら進展していくことになるので、評価科学研究は、開発型研究と背中合わせの関係にあることが望ましい。その際、双方からみて、企画・設計段階から問題点を克服したものを創るという思想はきわめて重要であることを再度強調しておきたい。

4. 細胞治療用医薬品の品質及び安全性の確保

近年のバイオテクノロジーの発展によって、ヒトや動物の細胞を大量に培養増殖させることや、細胞に各種の加工を行うことにより、その細胞の性質や機能を改変することが可能になってきた。これらの細胞を患者に投与することによりガンや糖尿病の治療を行うことが試みられている。このようないわゆる細胞治療の試みは、従来は臨床現場において医師の裁量による治療研究として実施されてきたが、最近、米国を中心に、企業活動として治療用細胞の開発や製造が活発に行われ始めており、わが国においても同様の動きがみられるようになってきている。細胞治療用医薬品の製造管理や品質・安全性確保には従来の医薬品にはないさまざまな特徴や留意点があり、また、細胞の由来、製造方法、特性、用法などによる特徴や留意点のバリエーションも多岐にわたるが、少なくとも具体化が想定されるものについては、これらに対応し、どのような製造管理法、品質・有効性・安全性評価法、品質管理法が必要であるかがあらかじめ明らかにされていることが望まれる。筆者らは、評価科学の観点から、細胞治療用医薬品の品質、安全性確保に必要と考えられる主な事項について検討を行ってきたので⁷¹⁾、その概略を紹介する。ただし、最近、厚生省医薬安全局が細胞・組織利用医薬品・医療用具等の品質・安全性確保についての指針を作成するための作業を開始したので、近い将来にはより充実適正化された公的指針が提示され、活用できるものと期待される。

4.1 細胞治療及び細胞治療用医薬品とは

本稿では、細胞治療及び細胞治療用医薬品について仮に次のように定義した。「細胞治療」とは、ヒト疾患の治療を目的として、自己(Autologus)、同種(Allogenic)あるいは異種(Xenogenic)の細胞を、生体外(ex vivo)で選別し、加工(薬剤処理、生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変)し、あるいは増殖した後にヒトに投与する治療をいう。なお、骨髄移植、角膜移植あるいは腎臓移植、肝臓移植のようなすでに一般に組織移植や臓器移植として知られている治療技術、血液の成分輸血等、最小限の操作を加えた、あるいは選別を行った従来の骨髄移植は細胞治療には含まれない。

「細胞治療用医薬品」とは、「細胞治療」を目的として、自己、同種あるいは異種の細胞を、生体外で選別し、加工し、あるいは増殖した後にヒトに投与する医薬品をいう。

例えば、ヒトの骨髄、末梢血、胎盤または臍帯血に含まれる全血球細胞への分化能を保持した増殖性細胞、これを純化した細胞群、またはこれを骨髄造血系の再構築を目的として加工したもの；抗ガン作用や抗ウイルス作用などを目的としたリンホカイン活性化キラー細胞(LAK)や腫

瘍浸潤リンパ球(TIL)、ex vivoで遺伝子導入した細胞；複雑な生体機能を発揮させるための肝細胞、筋肉細胞や心筋細胞、膵臓細胞、神経細胞；酵素、サイトカイン、凝固因子といった分子の供給源としての細胞などがヒト疾患の治療を目的として業として製造され、臨床研究、治験、臨床治療に使用される場合の製品が考えられる。

4.2 製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の保持

細胞治療用医薬品の製造方法について、その詳細と妥当性を明らかにすること、製法の一定性を示すことは、品質、安全性の確保、品質恒常性の維持にとって特に重要とされる事項の一つである。以下には、製造方法の中でとくに情報やデータ提供が必要と思われる事項を示した。

4.2.1 原材料となる細胞

原材料となる細胞については、1)細胞の起源・由来、選択理由、2)細胞の特性と適格性、3)細胞の採取・保存・運搬、などについて明らかにしておく必要がある。

ヒト細胞の場合、特性解析には、表現型、機能解析、HLAタイピングによる解析などを含めることが必要である。また、細胞供与者の選択基準、適格性(病歴、健康状態、感染性微生物汚染チェック、免疫適合性など)を定め、その妥当性を明らかにしておく必要がある。原材料細胞のトレーサビリティの保証手段などに留意する必要がある。異種細胞やバンク化細胞を用いる場合は、その特性、適格性、管理方法、更新方法などを明らかにしておく必要がある。

細胞の採取に関しては、①作業者の適格性、②採取行為及び利用の倫理的妥当性、③インフォームドコンセント、プライバシー保護、④ドナーの安全性確保のための試験検査、対処法、⑤採取状況(採取環境、用具、採取方法の妥当性を含む)、⑥採取した細胞の試験検査(採取収率、生存率、細胞特性解析、微生物試験等)などについて明らかにし、その妥当性を示す必要がある。また、治療用細胞の製造や治療の前に保存あるいは運搬する場合には、保存方法(保存条件、保存期間、取り違えを避けるための手順等)や運搬方法(運搬容器、運搬手順など)の妥当性を明らかにする必要がある。採取した細胞は、その一部を適当な保存方法を用いて治療用細胞の製造や治療の成果を判定するのに必要な期間保存することが必要である。さらに、細胞はドナーに関する試験検査、細胞の安全性に関する試験検査等の記録と照合可能なラベルが添付された用具に採取され、保存されるべきである。

細胞は生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性・品質に影響を及ぼさない範囲で感染物質を不活化・除去する処理を行う必要がある。細胞の投与時まで培養液中で保存される細胞については、ウイルス及びマイコ

プラズマの検査を含む適切なスクリーニング及び病理組織学的検査により感染物質の存在を否定する必要がある。これらの方法は手順として文書化され、責任の所在を明らかにしておくことが必要である。

4. 2. 2 原材料となる遺伝子、ベクター、ウイルスなど

細胞に遺伝子を導入して目的細胞を得ようとする場合には、1) 目的遺伝子の由来、入手方法、クローニング方法、セルバンク情報、2) 目的遺伝子の構造、3) 目的遺伝子産物の構造、生物活性、性質、4) ベクターの由来、性質、入手方法をはじめ、遺伝子導入構成体を作製するために必要な全ての原材料、性質、手順に関する情報、5) 遺伝子導入構成体の構造や特性、6) ベクターや遺伝子導入構成体を作製するための細胞やウイルスのバンク化、バンク管理法に関する詳細な情報を示す必要がある。

4. 2. 3 細胞や遺伝子以外の原材料

細胞とともに最終製品の一部を構成する原材料がある場合には、その品質・安全性に関する知見及び当該原材料と細胞との相互作用等が細胞に及ぼす影響について明らかにする必要がある。

4. 2. 4 治療用細胞の製造工程

治療用細胞の製造に際してもその基本は言うまでもなく製造方法の明確化、妥当性の検証、一定性の保持を図ることにある。そのためには、1) 細胞の分離、洗浄方法、2) 細胞の加工（薬剤処理、生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変）方法、3) 細胞の培養方法（培地の組成、培養条件、培養期間など）、4) 細胞の製剤化方法（製剤設計や製剤処方を含む）などの詳細及び各工程の諸条件を定めるに至った根拠を明らかにして、各工程の妥当性を検証する必要がある。临床上の使用目的、用法や製剤設計の最適化等の理由により医療用具と治療用細胞とを組み合わせた場合には、その内容と根拠について明らかにすること。これらいずれかの過程で細胞をバンク化する場合は、その理由、細胞バンクの作製方法及び細胞バンクの特性解析、保存・維持・管理法、更新方法その他の各作業工程や試験に関する手順などについて詳細を明らかにし、妥当性を示す必要がある。また、5) 製造施設及び設備の適格性、6) 要員の適格性、7) 製造工程で用いる培地成分、試薬・試液・器具等の適格性や品質保証、品質管理法についても詳細を明らかにして妥当性を示す必要がある。さらに治療用細胞の製造工程で、細胞の品質、安全性確保と製造の一定性をモニターするための工程内試験を設定する場合には、その規格及び試験方法内容と設定根拠及び妥当性を明らかにする必要がある。

これらのデータをもとに製造標準書／標準作業手順書を作成し、以降その一定性を維持する必要がある。製造のための細胞にはロット番号を付し、細胞ロット毎に全作業工程についての製造記録を作製する。その際、原材料並びに作業に用いられた器具、試薬、培地の構成成分、また、製品を入れる容器についても、必要事項を記録する。手順書等を改変する場合は、細胞の純度、回収率、細胞機能の保持、および安全性等を十分評価した上で実行する必要がある。さらに、培養ロット間での細胞のクロスコンタミネーションや取り違えを防ぐ工程管理法や品質管理法を整備し、実施すべきである。新規な装置を導入あるいは使用する場合には、治療用細胞製造用装置としての安全性、有用性と妥当性を明らかにする必要がある。

治療用細胞の製造工程は個々の細胞や治療目的などによって非常に多様であろうと予測される。しかし、あらゆる場合や局面において常に基本とすべきは、目的細胞の生存率や本質的な特徴（表現型、遺伝形質、機能特性、細胞活性等）が損なわれないことである。また、細菌、酵母、真菌、マイコプラズマ、迷入ウイルスはもとよりその他の汚染物質により汚染されないことである。製造工程の適切な段階における病原体や感染微生物の検査方法、汚染防止のための管理体制及び採用した不活化・除去方法並びに工程評価について明らかにする必要がある。

4. 2. 5 製造方法等の変更

細胞の採取から細胞治療用の最終製剤の製造にいたる過程で製造方法、作業手順、工程内管理試験などを変更した場合には、その内容の詳細を示し、適切なデータに基づいてその妥当性を明らかにする必要がある。

4. 3 細胞の品質管理

細胞治療用医薬品の品質確保には、最終製品の規格及び試験方法を設定する他、投与ロット毎の原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持、各工程の中間製品の品質管理を適正に行うことが必要である。最終製品（原体／製剤）の規格及び試験方法並びにその設定根拠を、原材料の品質管理、製造工程の妥当性の検証と一定性の維持、各工程の中間製品の品質管理のあり方を考慮に入れて示す必要がある。なお、ロットを構成しない個人単回使用を意図して調製された治療用細胞は、各治験の目的やプロトコールに適合する適切な品質基準、出荷基準により管理する。ロット毎の品質管理項目例としては、(1) 回収率並びに生存率、(2) 同一性の確認、(3) 細胞由来の各種活性因子に関する考慮、(4) 無菌試験（真菌、細菌、マイコプラズマ等）、(5) エンドトキシン試験、(6) 製造工程由来不純物試験、(7) 細胞由来目的外生理活性物質試験、(8) 細胞の純度試験、(9) 効能試験、(10) 輸送や凍結・解凍に伴う細胞

変化に関するチェック項目、(11) HBV, HCV, HIV 等のヒト由来病原体による感染の可能性に関する否定試験などが挙げられる。細胞の無菌性については、細胞を患者に注入する以前に試験により示すべきである。しかし、最終製品における無菌試験に関しては、その結果がレシピエントへの投与後にしか得られない場合も想定され、このような場合は、直近で得られているデータを参考とする。ただし、最終製品の無菌試験は必ず実施すること。また、投与後に無菌性が否定された場合の対処方法をあらかじめ設定しておく必要がある。一方、細胞凍結保存や細胞加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合においては、ある一定期間ごとに無菌試験を実施することが望ましい。また、無菌試験での微生物の培養はレシピエントに細胞を注入する直前に実施すべきである。数日以上維持された培養についてはマイコプラズマを検査することが望ましい。

4. 4 安定性試験

製品となる細胞あるいは重要な中間体である細胞について、流通使用期間や使用形態を充分考慮して、例えば、細胞の生存率・力価等に基づく適切な安定性試験を実施し、貯法及び有効期限を設定することが必要である。また、標準的な製造期間を超える場合や標準的な保存期間を超える長期保存についても検討し、安定性の限界を確認することが望ましい。各試験において用いたロット数の妥当性を合理的に説明する必要がある。輸送や凍結・解凍等が必要な場合には、それらの操作が細胞の安定性や規格に影響を及ぼさないことを確認することが必要である。

4. 5 細胞治療用医薬品の非臨床安全性試験

最終製品の安全性について、適切な動物を用いた試験及び *in vitro* での試験を代表的なロットで適切に実施する必要がある。適宜、文献の知見等より考察、説明してもよい。安全性試験は、ヒトにおける製品の投与経路を考慮して設定すべきである。例えば、次の項目について、安全性を確認又は考察することが望ましいと考えられる。①検出可能な微生物汚染の可能性(細菌、真菌、マイコプラズマ、HBV、HIV 等)、②細胞の性質の変化の解析(表現型、染色体検査等)、③細胞が産生する各種サイトカイン、成長因子等の生体内への影響、④正常な細胞または組織に影響を与える可能性、⑤望ましくない免疫反応が生じる可能性、⑥外来遺伝子を導入して治療用細胞を調製した場合は、増殖性ウイルス、導入遺伝子並びにその産物についての安全性評価、増殖性の変化、腫瘍形成及びがん化の可能性、⑦最終製品が大量に得られる場合の一般毒性試験。

4. 6 細胞治療用医薬品の効力を裏付ける試験、体内動態等

実験動物や細胞等を用い適切に設計された試験により、治療用細胞の機能発現や作用持続性、医薬品として期待される効果等に関する裏付けデータを得る必要がある。遺伝子導入細胞にあつては、導入遺伝子からの目的産物の発現効率、発現の持続性、導入遺伝子の発現産物の生物活性、医薬品として期待される効果等を検討するべきである。適当な疾患モデル動物がある場合には、それを用いて治療効果を検討するのが望ましい。適宜、他の治療法との比較も行う。

製品を構成する細胞及び導入遺伝子の発現産物の実験動物での吸収、分布等の体内動態に関する試験等により、人における移植細胞の生存期間及び導入遺伝子の発現産物の持続期間を推測し、目的とする効果が得られることを説明する必要がある。特に、移植細胞が特定の部位(組織等)に到達して作用する場合には、その局在性を十分に説明するべきである。

4. 7 非臨床試験等の内容の総括及び臨床試験

非臨床試験の内容を総括し、現在の時点で細胞治療用医薬品の安全性が確保されており、品質、安定性、安全性および予想される有効性の面から臨床試験を行うことの妥当性を示す必要がある。最終製品の病原体及び感染性物質による感染の危険性の否定に関しては特に留意すること。細胞治療用医薬品の臨床試験の実施に際して情報提供が必要と思われる項目は、基本的には遺伝子治療用医薬品の項(3.6項)で示したような項目と同様な趣旨のものである。

4. 8 試料の保管、記録、市販後調査報告事項等

細胞治療については経験によらないと分からないことも多いと考えられるため、細胞ドナー(細胞の起源)の記録の保存、試料の保存および患者の追跡記録はその後の安全性評価にきわめて重要と考えられる。したがって細胞を臨床使用した場合には、倫理的、技術的に可能な範囲で細胞を採取したドナーの血清、血漿試料、治療に用いた細胞以外の細胞試料を保存すべきである。細菌、真菌、ウイルスによる汚染の発生の有無を必ず追跡し、感染が生じた場合はその原因を追及し、明らかにするよう努めることが重要である。

細胞治療用医薬品の製造業者又は輸入業者は、細胞治療に関する情報を収集し、自らが取り扱う細胞治療用医薬品の評価に影響を及ぼす知見を発見した場合には、速やかに規制当局に報告する必要がある。

5. トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保

最近、欧米を中心にトランスジェニック技術を応用したヤギ、ウシ等の動物に製造させた製品が開発され、最も進んだものについては臨床試験が始まるなど、動物を医薬品工場として利用する技術が実用化段階に入ってきている。さらにはクローン動物の医薬品生産への利用の可能性も検討され始めている。こうした動向をうけて米国 FDA、EU (CPMP) では Tg 動物を利用して製造した医薬品の製造及び試験における留意事項をガイダンスとして示している。

このトランスジェニック技術を応用した動物による医薬品の製造は、従来のバイオ技術による医薬品の製造よりはるかに効率的であり、我が国においても近い将来、当該技術を利用した医薬品が臨床に供されることが予想される。このような状況に鑑み、筆者らは、今後、開発が進展すると思われるトランスジェニック (Tg) 動物/クローン動物を応用した製品の製造技術の状況を把握し、医薬品製造の観点から、製造に利用される動物を作製、育成、維持する上での留意事項及び製品の品質、有効性、安全性を確保するために必要な試験方法や評価方法の検討を行うとともに、ガイドライン等を作成するための基礎的研究を行っているのでその概略を紹介する。

5.1 トランスジェニック動物を用いた医薬品開発の現状

Tg 動物とは、人為的に組換え DNA を導入され形質が変化した動物と仮に定義される。タイプとしては、胚系に DNA が導入され遺伝性が獲得された動物と生殖細胞以外の体細胞に遺伝子が導入され遺伝性は獲得されていない動物の 2 種類が考えられる。

医薬品生産への応用が検討されている Tg 動物由来製品としては、ヒトアンチトロンビンⅢ、ヒト型モノクローナル抗体 (MAb) 類 (MAb-融合タンパク質、MAb-腫瘍マーカー、抗ルイス Y 抗原 MAb、抗ヒトトランスフェリンレセプター-MAb、抗ヒトトランスフェリンレセプター-1 本鎖 MAb)、アルファー-1 プロテナーゼインヒビター、アンギオテンシン、ベータインターフェロン、蝨 (のう) 胞性繊維症トランスメンブラン制御因子、血液凝固ⅨⅩ及びⅩⅩⅩ因子、グルタミン酸脱炭酸酵素、グルコセレブロシダーゼ、ヒト成長ホルモン、ヒト血清アルブミン、持続型組織プラスミノゲン活性化因子、ミエリン塩基性タンパク、プロインスリン、プロラクチン、可溶性 CD4HIV レセプター、プロテイン C、ヒトフィブリノーゲン、サイトカイン受容体、医療用ペプチド、ヒトアルブミン等の発現が報告されている。このうちヒトアンチトロンビンⅢについては、米国では現在臨床第 2 相試験を終了したと伝えられている。

医薬品生産のための Tg 動物の作製とその利用法に関してはさまざまな戦略や技術があり得る。その中で、現在最も検討が進んでいる方法は、乳腺特異的に発現する乳タンパク質のプロモーター配列に目的遺伝子をコードする領域を連結させ、受精卵にマイクロインジェクションし、個体として誕生・成熟させた後、乳線に目的物質を発現させ、乳中に分泌させるというものである。この方法は、細胞培養系とくらべて目的物質の効率的生産が可能な系として注目されている。また、乳タンパク質の発現やタイミングを調節する要素 (塩基配列) もよく解明されており、目的タンパク質が外分泌されるという点も含めて、挿入された外来遺伝子発現が動物の健康に及ぼすリスクも低いという利点もある。さらに、目的タンパク質がきわめて高濃度に発現し、しかも共存するタンパク質類等が明らかであるところから精製法に関する戦略も立てやすい。乳腺という天然のフィルターを通過して生産物が得られるという過程を経るので、生産動物由来のウイルス等微生物汚染の可能性が比較的 low、安全性に関する対策を立てやすいという利点も考えられる。乳汁は、いわゆるプリオンに関しても比較的安全性の高い医薬品出発物質であると考えられている。WHO も乳汁と精液はプリオンに関して非感染であろうとみなしている。

ここで生産しようとするタンパク質の多くは糖タンパク質であるが、生産動物として利用されようとしているのはヤギやウシであり、従来の細胞培養系による糖タンパク質生産に一般的に利用されているげっ歯類細胞に比べ、系統発生学的にヒトにより近い動物系であるところから、付加される糖鎖もヒト型に近くなるのではないかの期待もある。

一方、マウスの自己抗体の発現をブロックしてヒトの抗体遺伝子を導入し、ヒト型抗体をつくらせるトランスジェニックマウスの開発も報告されている。

このように Tg 動物を利用したタンパク質生産系は、細胞培養系と比べて優れた特長を有するタンパク質性医薬品の新しい生産方法として、研究が盛んに行われているばかりでなく、欧米ではすでに医薬品としての承認申請もなされている。我が国においても Tg 動物を利用して生産される製品が医薬品候補として出現してくるのは時間の問題といえる。上記に述べたように、Tg 動物を利用したタンパク質性医薬品の生産には、多くの利点が期待されるものの、製造方法は従来にない全く新しいものであり、生産物の品質、安全性、有効性評価に関しても未知、未経験の要素があることは否めない。したがって、この新たな創薬技術による医薬品創製を推進する立場を基本としながらも、製品の医薬品としての品質、安全性、有効性を確保するためにどのような試験とデータが必要であり、どのような評価方法が適正であるかについて慎重に検討する必要がある。

5.2 トランスジェニック動物を利用して生産されるタンパク質性医薬品の品質、安全性等確保に必要な諸要素及び評価にあたって考慮すべき要件

Tg動物を応用して製造した製品の医薬品としての品質、安全性等確保を図るためには、特徴ある製造方法の詳細を明確にし、その妥当性と恒常性の検証を行う必要がある。また、併せて製品における適切な試験を実施する必要がある。そこで、Tg動物由来医薬品の製造及び試験においてどのような事項が一般的に留意されるべきかについて検討した。また、その評価に際してポイントとなる事項について考察した。

5.2.1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

Tg動物を作出するために動物に導入された組換え遺伝子(遺伝子導入構成体)に関する情報は、最終目的物質の構造や特性が期待されたものであり、安全であることを立証するための最も基本となる情報として重要である。どのようなデータ、情報が必要かという点に関しては、従来の組換え医薬品や遺伝子治療用医薬品の場合に述べられている事項を参考に考慮することが適切であると考えられる。

5.2.2 初代トランスジェニック動物の作出と特性解析

5.2.2.1 Tg動物の作製に使われる動物

Tg動物の作製に用いられる動物に関しては、以下の点に留意すべきである。①動物は、系列系譜が証明され、閉鎖系で繁殖・飼育されたものを使用すべきである。②血清学的によく解明された動物で、その動物種およびヒトに感染する物質を可能な限り排除した閉鎖集団またはコロニーから入手したものを使用すべきである。③一定の管理された閉鎖系で飼育されているが、自由に動きまわることが可能であり、節足動物や他の動物と接触する機会があるため偶発的に感染物質を取り込む可能性があるような環境下で飼育された動物は、代替動物が存在しないなど合理的な理由がない限り使用を避ける。こうした動物をやむなく使用する場合は、感染物質に関してより徹底したスクリーニングが必要である。④捕獲した野生動物は使用しない。⑤輸入動物や輸入後の第1世代の動物は、わが国では入手できない種又は系統の動物でない限り、使用しない。万一、使用の是非につき検討することがあるとしても、その特性が文書で明らかにされ、妥当性が検証され、かつ承認を得た場合に限る。⑥プリオンにより伝達される疾病(例えば伝達性海綿状脳症)が報告されている動物種を使用する際には、発症例がなく、飼料管理も適切である閉鎖集団から入手すること。同じ動物種でプリオンにより伝達される疾病が生じていることが報告されている国から輸入した動物の使用は避けるべきである。ちなみにウシについては動物個

体はもとより、ウシ由来製品に至るまで輸入禁止である。

⑦農場や市場から集められた動物は、他の動物と接触する機会も多く、一般に過去の健康状態に関する記録も整備されていないので使用は避けるべきである。

初代Tg動物の作製に使われる配偶子あるいは胚性幹細胞(ES細胞)を取り出す動物、および仮親となる動物の履歴については詳細に記述される必要がある。例えば種、系統、起源となる国、健康状態、その他血統に関する情報を記述する。種特有の疾病あるいは血液関連の疾病などに関する獣医学的検査結果も示すべきである。有害感染物質に関する管理については、5.2.5項を参照のこと。

5.2.2.2 遺伝子の導入方法

組換えDNAを動物に導入する方法について詳細を明らかにする必要がある。

5.2.2.3 Tg動物の確認

初代Tg動物及びその後の各世代のTg動物の確認法とその妥当性を示す必要がある。初代動物に導入された遺伝子の存在を試験する方法の感度も明確にする必要がある。外来遺伝子を取り込んでいるにもかかわらず、目的遺伝子発現産物を発現していない動物と、外来遺伝子を取り込んでいない動物との区別も明確にすべきである。初代動物が目的物質を生産していることを確認する方法の詳細を明らかにする必要がある。目的遺伝子産物の発現量については、季節変動、年齢差も含めて報告されるべきであろう。導入遺伝子が、予定された臓器で、適切なタイミングで発現しているか確認しておく必要がある。また、当該組織において、その他の機能が正常に働いていることも確認する必要がある。さらに、導入遺伝子産物が動物個体に悪影響を及ぼしたり、内在性物質の発現レベルに影響する恐れがあるので、注意する必要がある。

5.2.2.4 目的物質の生産の安定性

目的物質の継続的な生産は、導入遺伝子の安定性、及び導入遺伝子の発現の安定性に依存しているため各安定性の確認方法、基準及びそれらの妥当性について明らかにしておく必要がある。

5.2.3 トランスジェニック動物系の保存、継続的維持・供給体制の確立

Tg動物による医薬品生産を継続的に可能にしてゆくためのシステムを確立する必要がある。そのための方法としては、細胞バンクの概念が役立つものと思われる。

5.2.4 生産用トランスジェニック動物の作製

生産用動物として用いるTg動物の作製法及び選別評価基準、生産用Tg動物個々についてのトレーサビリティの保証手段などについての詳細を明らかにする必要がある。

5. 2. 5 トランスジェニック動物の維持管理

Tg 動物の繁殖・飼育法及び施設・環境，衛生状態のモニタリング方法，誕生から死亡までの記録（特に投薬や疾病記録），飼料成分及びその品質管理法，飼育期間中に与えた飼料の内容および摂取量，医薬品製造に各 Tg 動物を用いることを一時的，あるいは恒久的に止める詳細な基準などを明らかにしてそれらの妥当性を示す必要がある。

Tg 動物の微生物学的統御は，医薬品生産動物の品質維持，個体維持のためにきわめて重要であるが，困難な課題でもある。まず，Tg 動物作製の動物の微生物学的品質は，現行の実験動物に適用される SPF 以上とする。また，微生物統御は動物作製，維持管理方法と密接に関連することから，動物施設自体が基準に適合したものが要求される。また，これらを管理するために実験動物医学認定医や有資格の実験動物技術者が必要である。一方，当該 Tg 動物種に感染する可能性のある病原体に関して可能な限り情報を収集し，対策を講ずることができるようにしておく必要がある。特に，新興の感染症や，宿主に感染後，発症まで長期間かかるレトロウイルスやウイルスの組換えの可能性については注意が必要である。人獣共通感染症の観点から，Tg 動物に存在する異種親和性の内因性ウイルス，持続性ウイルスのヒトへの感染性や疾病との関連性について明らかにしておくことや，既知の人獣共通感染症原因微生物について注目しておくことは特に重要と考えられる。後者については，もともとなる動物の適切な選択，清浄化とその後の厳格な微生物統御によって問題点を可能な限りクリアする方策がとられるべきである。Tg 動物及び細胞，組織，臓器に対する既知感染物質のスクリーニングは，目的産物の回収法及び精製方法をも加味して適切に実施する。なお，スクリーニングに用いる検査法は特異性，感受性，有効性が示されているものでなければならない。また，当該分野の学問・科学技術の進歩や，感染疾患に関する知識の進歩にあわせて適宜更新されるべきである。

5. 2. 6 トランスジェニック動物から目的産物の採取

Tg 動物から目的産物を採取する方法は様々ある。現状では乳中，血中あるいは尿中からの採取がほとんどであるが，摘出した組織からの抽出も考えられる。採取方法については一般的には，目的産物の力価や生物学的純度を保つことなど，品質や安全性に留意しながら無菌的に行う必要があるが，動物種や材料などによってそれぞれ注意すべき点は異なる。以下に留意事項を列記する。

1) 用いる動物種によって，混入する可能性のある有害物質あるいは微生物は異なる。目的産物の採取および精製の段階におけるこれら汚染物質のモニタリングにおいては，それぞれの物質に応じた適切な測定法を選択する必要がある。

る。

2) Tg 動物を応用して医薬品を生産する場合，通常，乳汁，血液，尿へ分泌される目的産物を採取して用いる。これら製造材料への分泌量は変動しやすく，有害物質による汚染の程度も一定とはいえない。したがって，このようなばらつきがあっても安全かつ安定に製品が得られるような製法を選ぶ必要がある。目的産物を得るために動物から材料を採取するにあたって，個々の動物の適格性の判定は品種，系列系譜，ワクチン接種歴等を含む健康記録に基づいて行う。動物については使用前に隔離し，使用する個々の動物ごとに適切な血清学的検査，培養，血球数測定，末梢血スミアの検査，糞中の寄生虫検査等を行い，感染物質（細菌，寄生虫，ウイルス）の有無を検査することが必要である。特に動物に存在することが予想されるウイルスに着目した検討を行い，合理的理由がある場合を除きその存在を否定することが必要である。ヒト，及びヒト以外の霊長類に感染することが証明されているウイルス又はウイルス様物質の検査は慎重に行うべきである。また組換え，相補，擬型の可能性のあるウイルスには注意が必要である。ヒトに病原性を示す可能性のあるウイルスが存在する動物由来細胞・組織は原則として使用すべきではない。スクリーニング，適格性の判定は材料採取の直前に実施すべきであり，判定から時間が経った場合，検疫期間中や細胞，組織，臓器採取時に他の被検疫動物と接触した場合は再度スクリーニングを行う必要がある。

5. 2. 7 トランスジェニック動物から目的産物の精製，製品化

目的物質の精製に関しては，2. 4. 3 の第 7 項に記述したことが参考になる。

5. 2. 8 製品の構造，特性・品質解析

精製を終了した Tg 動物由来タンパク質製品の構造，特性・品質解析にあたっては，従来の組換え医薬品や細胞培養医薬品などにおけるアプローチや留意点（本稿 2. 6. 3 項及び 2. 7 項）が参考になる。しかし，これらはあくまで一般的事項や例示であり，個々の Tg 動物由来製品の製造工程や個別製品の特徴を加味した科学的合理性に基づく試験の省略あるいは試験の追加がなされることがむしろ望ましいと考えられる。例えば，Tg 動物由来糖タンパク質製品における糖鎖がいかなるものであるかは構造，特性面からみて重大な関心事である。従来の組換え医薬品や細胞培養医薬品のそれとは異なることが予測され，また糖鎖構造がヒトにより近いとの期待もあるからである。天然由来の物質あるいは遺伝子組換え細胞や培養細胞系等で製造した同一あるいは非常に類似した物質を入手できる場合には，それらとの比較も行うことが望まれる。

5. 2. 9 プロセス評価, 工程内管理試験

Tg 動物由来医薬品においても, 他のバイオ医薬品と同様に (2. 8 項参照), プロセス評価や工程内での管理試験と規格のような上流の製造工程での品質管理と, 原薬及び製剤レベルでの規格を合わせて考えるという, 科学的にも, 経済的にも合理的なアプローチの導入が図られるべきである。今後, 関係者がこうした新たな考え方に柔軟に対応し, 個々のケース毎に最も合理的で適切な具体策を講ずることが期待される。

有害因子や不純物については, 2. 7 項における記述が参考になる。

安全性確保の観点から最も大きな関心が払われるべきはウイルス汚染及びウイルスの不活化, 除去に関するプロセス評価である。一般に Tg 動物由来製品におけるウイルス汚染の可能性を制御するには, 1) 生産用動物系, 飼料, その他の試薬類をはじめとする製造関連物質の選択と試験, 2) 製造過程がどの程度ウイルス除去, 不活化能力を有するかに関する評価 (試験), 3) 製造工程の適当な段階における製品のウイルス否定試験の3つのアプローチを採用し, 相互補完的に活用, 実施する必要がある。迷入ウイルス否定試験を Tg 動物から目的物質を採取し, 精製工程へ受け入れる段階で実施することはきわめて重要である。どのような頻度で, どの程度のウイルス試験を実施するかは, ケース・バイ・ケースであるが, いずれにしても製造者が各製造バッチ中の外来性ウイルスの存在の有無を継続的に評価するための計画を作成することが望ましい。また, 目的物質の精製工程におけるウイルスクリアランス評価試験を適切に行う必要がある。さらに詳細については2. 5. 2 項及び2. 5. 3 項の記述が参考になる。

5. 2. 10 規格及び試験方法, 安定性評価

Tg 動物由来医薬品の規格及び試験方法は, 他のバイオ医薬品同様, 製造方法, 特性解析・品質評価結果, 製品の安定性, 非臨床安全性試験や臨床試験, 分析法, プロセス評価と工程内管理試験などの要素を考慮しながら設定すべきである。

安定性評価については, 2. 12 項の記述, 及び ICH ガイドライン⁶⁵⁾が参考になる。

5. 2. 11 非臨床安全性等試験, 臨床試験

組換え医薬品等に対するアプローチに準じて考えるが, 人獣共通感染症が発生する可能性について絶えず高い関心を払い, 適切なデータや情報の収集に努める必要がある。

6. トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性等の確保

Tg 動物由来の細胞・組織・臓器を治療に用いる異種移植 (Xenotransplantation) については, 臓器移植でしか治療できない患者の慢性的臓器不足を解決する有望な治療法として, またヒトからの臓器や細胞の移植が不可能な疾病に対する新たな治療法として欧米を中心に研究開発が進められており, Tg 動物由来の細胞・臓器を生体応用を目的とした製品として供給するための幾つかの会社が設立されている。一方で, 細胞を大量に培養, 増殖させることや各種加工を行い細胞の性質や機能を改変することが可能となり, これらの細胞を患者に投与することにより治療を行ういわゆる細胞治療も, 米国を中心に細胞の開発や製造が行われ始めている。Tg 動物由来の細胞を治療に用いた例はまだ報告がないが, 今後の開発の進展により, わが国においても将来, このような製品が臨床に供される事が予想される。しかし, その品質・安全性等の確保に関してはガイドラインはなく, 個別企業に任されているなど必ずしも十分な対策がなされていないのが現状である。

本項では, 今後開発が進展すると思われる Tg 動物由来細胞をそのまま, あるいは加工や増殖して, ヒト疾患の治療を目的とした製品として利用する場合の品質及び安全性確保を図るために必要な諸要素と, その評価方法について検討した結果の概略を述べる。なお, 最近, 厚生省医薬安全局が細胞・組織利用医薬品・医療用具等の品質・安全性確保についての指針を作成するための作業を開始したので, 近い将来にはより充実適正化された公的指針が提示されるものと期待される。

6. 1 異種細胞治療・異種移植研究開発の現状と安全性等確保上の問題点

本項で論ずるのは, Tg 動物由来の異種細胞を用いた細胞治療である。異種細胞のヒトへの投与は異種移植の一種とも考えられる。異種移植とは, ヒトに移植, 又はインプラントされたり, *ex vivo* 灌流に用いられるヒト以外の動物由来の生存細胞・組織・臓器の使用に関わる全ての手法を対象とした用語である。Tg 動物由来細胞を用いた治療の安全性確保については, 免疫学的な面, 生理学的な面, 感染症の観点から考える必要がある。

6. 1. 1 異種細胞治療における免疫学的問題点

細胞・組織や臓器の移植では拒絶反応が一番の問題となる。特に, 異種移植では, ヒトに存在する自然抗体と異種抗原との抗原抗体反応による補体活性化により血管内皮で超急性拒絶反応が引き起こされることが問題である。そこでトランスジェニック技術を応用して動物をヒト型に改変

することにより，異種移植の際の拒絶反応を抑制し，免疫適合性を確保して生着を延長させる研究が進められている。現在までに，(1) 超急性免疫拒絶反応を引き起こす補体系を制御する試みとして，ヒト補体制御因子 (CD46 (MCP)，CD55 (DAF)，CD59 (Protectin) など) の遺伝子を導入した Tg 動物，(2) ドナー臓器の抗原性を低下させる試みとして，異種移植抗原である Gal α 1 \rightarrow 3Gal を生成する糖転移酵素 (α 1,3 Galactosyltransferase) の遺伝子を破壊したノックアウト動物，または Gal α 1 \rightarrow 3Gal を修飾する酵素 (α 1,2 Fucosyltransferase， α 1,2 Sialyltransferase など) の遺伝子を導入した Tg 動物，などの開発が行われている。

異種移植に用いる動物としてはブタがヒトへの移植治療に用いる最も有力な候補として考えられている。DAF 遺伝子を導入した Tg ブタのヒト型心臓やヒト型腎臓，ヒト型肝臓において超急性拒絶反応が回避できる可能性がサルやヒヒのレベルで示されている。

Tg 動物由来の細胞を用いたヒトへの臨床試験は現在まだ行われていないが，Tg ブタのドパミン産生ニューロンのパーキンソンモデルラットへの移植で拒絶反応回避の可能性が示されている。異種細胞の移植としては，ブタ胎児神経細胞を用いたパーキンソン病治療の臨床第 1 相試験が既に開始されており，症状の改善が認められること，移植後 7 ヶ月でブタのニューロンとグリア細胞が患者脳内で生着，成長していることが確認され，有望な治療法となりうることが報告されている⁸⁰⁾。その他，難治性疼痛患者にカプセル化ウシ副腎細胞，糖尿病患者にカプセル化ブタランゲルハンス島細胞，肝不全患者にブタ肝臓細胞，AIDS 患者にヒヒの骨髄細胞などの移植治療が臨床試験されており，また脳腫瘍の臨床治療研究として自殺遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター産生マウス培養細胞の移植も報告されている⁸¹⁾。動物実験レベルではクローン培養したウシの副腎皮質細胞を副腎摘出免疫不全マウスに移植すると，副腎機能が代行できることも報告されている⁸²⁾。今後，Tg 動物開発の進展にともなって，Tg 動物由来細胞を用いた治療も進展することが予想される。

しかし，Tg 動物由来の細胞・組織を用いた治療は，現在のところ未だ基礎研究段階にあり，十分な安全性に関する保証がなされていない。免疫拒絶反応については，遺伝子組換えにより超急性拒絶反応が回避されたとしても，それに引き続く拒絶反応として血管内皮細胞の活性化による Delayed xenograft rejection (DXR) が障壁として想定され，さらにその後には同種移植にも見られる T 細胞/MHC 系を介した細胞性拒絶反応を克服する必要がある⁸³⁾。DXR については内皮細胞活性化によるサイトカイン産生，炎症反応惹起に働く転写因子 Nuclear factor κ B (NF κ B) を阻害する I κ B 遺伝子の導入や，アンチトロンピン III，トロンボモジュリンなど抗凝固因子遺伝子の導入，アポトーシス

抑制のための遺伝子導入なども検討されているが，有効性，安全性に関してはこれからの研究を待たねばならない。細胞移植の場合には，臓器移植と比べて超急性拒絶反応を被る度合いは低いと考えられるが，細胞性免疫拒絶反応の克服は必要となる。

6. 1. 2 異種細胞治療における生理学的問題

同種細胞にない異種移植固有の問題点として，異種細胞がヒトの体内で細胞間のクロストークあるいは生体ネットワーク内での制御などに関して種特異性を超えて正常に機能するかどうかが挙げられる。正常に機能しなければ有効性の面からみても問題が生ずる可能性があるが，さらに宿主の正常な代謝や生理的機能を妨げたり，ネットワークによる制御を含む恒常性維持機構をかき乱すようなことがあれば，安全性の面から大きな問題となる。

6. 1. 3 異種細胞治療における感染症問題

遺伝子組換え動物由来細胞をヒトへの治療に用いる際の安全性確保において極めて重要な問題は，感染症の危険性をいかに回避するかである。異種細胞治療では異種細胞と体内で直接接触することになるため，ズーノシス感染物質として知られているものや動物に内在する正常な微生物叢あるいは共生生物のような微生物など，通常は感染しない動物の病原体がヒトに感染する危険性がある。さらに移植時には大部分の患者において免疫抑制剤を使用することにより通常の生理的及び免疫学的防御が抑制されているため，既知あるいは未知の感染物質が移植細胞を通して容易にヒトに感染する危険性が高まる。さらに感染物質の性質や危険性がさまざまであり，これらへの対応を一律にすることが難しい点も問題である。例えば，レトロウイルスやプリオンのようなある種の病原体は，宿主に侵入した後，長期間を経て始めて臨床的に識別可能な疾患を発病させる。また，現在の診断技術では組織試料中で容易に検出又は識別できない感染物質もある。ヒト由来の細胞，臓器の場合には，伝染する感染物質の種類は非常に良く特定されているが，異種由来の細胞によって伝染する可能性のある感染物質については未知の面が多い。動物ではごく軽度の症状のみを引き起こす感染物質であってもヒトに感染した場合に重篤な症状を引き起こしたり，死亡の原因となる可能性も考えられる。また異種動物からの感染は，特に自然宿主ではないヒトを通過することにより病原性が変化する恐れがある。レトロウイルスがヒトレトロウイルスと組換えを起こして新たに危険なレトロウイルスになる可能性もある。しかも，一度移植用細胞を通じて動物からヒトに水平感染が成立すると，その患者から他の一般の人々へ病気が広がり，HIV/AIDS，エボラウイルス，新型 CJD のようにヒトに新種の疫病を蔓延させる懸念も否定できない。

ズーノシス（人獣共通感染症）とは、動物との日常的な接触や動物の摂取によって動物からヒトに伝播する疾患である。既にズーノシスの原因となる多くの物質の特徴が明らかにされ、特定されている。しかし、典型的なズーノシスとして認識されていない異種間感染物質が、異種細胞からレシピエントへ、さらにレシピエントから他の人々に伝播する可能性は公衆衛生上大きな問題である。患者への異種細胞の移植、それに関連した解剖学的バリアの崩壊及び患者における免疫抑制状態は、ヒトと動物との通常の接触に比べて異種間感染物質をさらに容易に伝播させる可能性がある。したがって、異種動物の細胞を人間に移植するには感染症の可能性、公衆衛生上の危険性に対する安全性確保がきわめて慎重に行われる必要がある。

現在はブタがヒトへの移植治療の有望な候補と考えられ、遺伝子組換えブタが開発されている。しかし、ブタにおいては、1) 既知の人獣感染症病原体のほか、最近、2) ヒトの細胞株に感染性を示すレトロウイルス類（ブタの腎臓細胞株 PK15 から産生される C 型レトロウイルス）の存在⁸⁴⁾ や、多くのブタ組織から新たに 2 種類の内在性プロウイルス（PVRV-A, PVRV-B）の同定⁸⁵⁾、3) 新興感染症病原体（E 型肝炎ウイルス、メニングルウイルス）⁸⁶⁾、4) 導入遺伝子産物（CD55, CD46 等）がウイルスレセプターとして働く可能性⁸⁷⁾、5) 遺伝子導入によりウイルスの種の壁が取り除かれる可能性⁸⁴⁾、などが報告され、Tg ブタの細胞等を移植に用いることによる感染症の新たな危険性も浮上してきている。

6.2 異種細胞治療による感染症発生防止のため一般的に考慮すべき事項

既知ズーノシスや異種間感染物質による疾患が異種細胞治療を通して一般大衆においても発現する危険性を最小限にとどめるためには基本的には以下の項目が一般的に考慮すべき事項と考えられる⁸⁸⁾。

1) 適切な専門技術を用い、十分なデータ管理、組織の保存及び監視過程が確立されるような異種細胞治療チームの構成及び機能。

2) 異種細胞治療による感染に関する公衆衛生上の問題に関連した臨床試験プロトコール、試験施設及びインフォームドコンセント。

3) 厳重に微生物管理できる動物飼育施設による動物の維持管理。

4) 既知及び未知のズーノシス物質の種を超えた伝播の可能性を最少にとどめるための細胞移植前の動物のスクリーニング体制に関する規定。

5) 予想されない、または過去に認知されていない感染物質が患者及び医療従事者に伝播する可能性を追跡調査するための異種細胞治療後の監視体制。

6) 異種間感染物質の病院内伝播の危険性を少なくするための院内感染防止。

7) 異種細胞治療により生じ、公衆衛生に影響を及ぼすと考えられる感染症について研究するためのドナー動物及び患者より得られた生物学的試料（血清、血漿、白血球及び組織を含む）の保管。

8) 集中型データベース作成。公衆衛生に関する研究を行うために必要な長期にわたる安全性データの必要性。

6.3 トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性等確保に必要な諸要素及び評価にあたって考慮すべき要件

Tg 動物由来細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保にあたって、留意すべき主な事項及び評価に際してポイントとなる事項には次のようなものが挙げられる。(1) 遺伝子導入構成体の構築と特性解析、(2) 初代 Tg 動物の作出と特性解析、(3) Tg 動物系の保存、継続的維持・供給体制の確立、(4) 細胞採取用 Tg 動物の作製、(5) Tg 動物の維持管理、(6) 既知感染物質のスクリーニング、(7) 動物集団／コロニーの健康維持及び管理、(8) 個々のドナー動物のスクリーニング及び適格性の判定、(9) 移植用細胞の採取及びスクリーニング、(10) ドナー動物の医学的記録及び標本の保管、(11) 細胞の採取及び治療用細胞の製造、(12) 細胞の品質管理、(13) 前臨床試験、(14) 臨床試験、(15) 試料の保管及び記録。

なお、Tg 動物由来の細胞を直接細胞治療に用いるのではなく、最終目的細胞を得るための原料にするという可能性もある。すなわち、①まずヒト型に改変することにより異種移植の際の拒絶反応を抑制し、免疫適合性を確保して生着を延長させるよう工夫した組換え動物由来の細胞を、②生体外 (*ex vivo*) で選別し、加工（薬剤処理、生物学的特性の改変もしくは遺伝子工学的改変）し、あるいは増殖した後にヒト疾患の治療を目的としてヒトに投与することもありうる。ここで異種細胞に新たに遺伝子導入を図り、目的の細胞を得ようとする場合には、用いる「遺伝子導入構成体」について、その構築と特性解析に関する詳細なデータが提示される必要がある。

6.3.1 遺伝子導入構成体の構築と特性解析

Tg 動物を作出するために動物に導入された組換え遺伝子（遺伝子導入構成体）や組換え動物由来の細胞をさらに形質転換するために細胞に導入された組換え遺伝子（遺伝子導入構成体）に関する情報は、最終製品である細胞の特性が期待されたものであり、安全であることを立証するための最も基本になる情報として重要である。この基本概念は、本稿で述べてきた遺伝子組換え技術を応用した医薬品の場合と同じである。

6. 3. 2 トランスジェニック動物の作出、特性解析、保存、継続的維持・供給体制の確立、細胞採取用 Tg 動物の作製

細胞の供給源である Tg 動物の作製に至るまでの主な項目には、1) Tg 動物の作製に用いられる動物、遺伝子の導入方法、初代 Tg 動物の作製、Tg 動物の特性解析、導入遺伝子の安定性及び導入遺伝子発現の安定性評価、2) Tg 動物系の保存、継続的維持・供給体制の確立、3) 細胞採取用 Tg 動物の作製、などが含まれる。これらに関して留意すべき主な点は、5. 2. 2～5. 2. 4 項に述べたことが基本になる。しかし、6. 1. 3 項や 6. 2 項でも述べたように、Tg 動物由来の細胞治療の安全性確保における最大の関心事の 1 つは、異種細胞移植による感染性物質からの危険性の回避であるところから、細胞採取用 Tg 動物の作製に至る過程においても、動物の微生物汚染を防止し、点検するための可能なあらゆる方策を講ずることが必要である。

一般に生物由来医薬品の微生物安全性確保策としては、①出発材料の吟味、②製品製造に関係するあらゆる過程や操作での微生物迷入の防止策と適切な微生物クリアランス過程の設置、③製品製造に関係する適切な段階での試験、検査などを相互補完的に組み合わせ、二重三重の安全策を講ずることが必要であると考えられる。Tg 動物由来細胞治療の場合は製品が細胞であることから、①細胞採取から最終製品に至る工程での微生物クリアランスにおいて、Tg 動物由来のタンパク質性医薬品の精製工程でのクリアランスほどの高い達成度は期待できない、②ヒトに投与する段階の治療用細胞でスクリーニングを広範囲に行い、安全性を保証しようとする方策には自ずと限界がある、と考えられる。従って、出発原料である動物の段階から、問題となるような感染物質に関する懸念を可能な限り取り除き、かつ予期せぬ汚染を未然に防止するために、厳密な方策を講ずることがきわめて重要である。考慮すべき要素には、①Tg 動物の作製に用いられる動物、飼料、導入遺伝子を含む各種試薬、器具などの微生物学的純度に関する品質の厳密な確保、②適正な動物飼育施設、設備及び専門家のもとでの厳密な動物の取り扱いと管理、③Tg 動物を外部へ輸送、移動することを含む外部環境との接触を極力排除することなどがある。以降の Tg 動物を取り扱う過程でも基本的な考え方は同じである。なお、Tg 動物から採取した細胞をバンク化し、その段階で徹底的にスクリーニングができるようなアプローチがとれば、安全性の確保に関する信頼度はきわめて高くなる。細胞バンクの試験については、組換え医薬品等における細胞バンクの微生物試験実施要領 (2. 4. 3 項の 4) 及び 2. 5 項) や ICH 文書³⁶⁾ が参考になる。

6. 3. 3 トランスジェニック動物の維持管理

動物の品質管理は飼育する動物施設や要員の適格性に決

定的に依存する。したがって動物の飼育管理は、すべて所定の飼育管理基準を満たした認定施設において、実験動物医学専門医や実験動物技術師のような有資格者による施設運営と監督がなされる必要がある。Tg 動物の維持管理に関しては、5. 2. 5 項に記述された事項も併せて参考にする。

6. 3. 3. 1 施設

異種移植に用いる Tg 動物は感染物質への暴露の可能性が非常に少ない厳密に管理された施設で繁殖・飼育される必要がある。複数種の動物を一つの施設で飼育する場合は、他種の動物からの汚染の可能性に配慮しなければならない。また外部からの動物の侵入、あるいは Tg 動物が逃亡して繁殖することがないように細心の注意が必要である。少なくともこれらの施設は、遺伝子組換え動物の取り扱い及び使用に関する指針の認定基準を満たしている必要がある。動物施設には、定期的に動物集団の健康状態を証明し監視するシステムが構築されている必要がある。

6. 3. 3. 2 施設に関する標準作業手順

動物施設の標準作業手順には、以下の事項を詳細に記載する。

(1) 動物の受け入れ基準、(2) 疾病監視プログラム、(3) 罹患動物の隔離及び排除に関する基準、(4) 施設内立入者の健康診断及び健康調査に関する基準、(5) 施設内の清掃、(6) 飼料、水及び備品の入手先及び調達手順、(7) 節足動物及び他の動物の排除手段、(8) 動物の移送、(9) 死亡動物の処分。

動物、動物管理職員及び他の関係者の出入りを管理し、伝染性感染物質による環境汚染や不注意による暴露を最小にとどめる必要がある。

施設に関する標準作業手順には、閉鎖施設内の動物の移動に関する規定を設けなければならない。出産による場合を除いて、動物は全て明確に規定された検疫及び検査を経た後、使用目的に応じた動物コロニーに加える。動物を繁殖及び育成しようとする場合、人工受精、胚移植、医学的早期離乳 (MEW)、クローニングあるいは子宮切開/子宮摘出のような方法を用いたり人工哺育することによって、感染物質に対する安全性を高め、コロニー化を繰り返す必要性を最小限に抑えることができる。

6. 3. 3. 3 動物の施設内移動

個々のドナー動物の最終スクリーニングと適格性の判断を行い、また細胞採取中に感染物質が伝播する可能性を最小限にとどめるには、選択したドナー動物 (一匹以上) を、当該作業中、閉鎖集団又はコロニーから隔離する方法を採り入れるとよい。この同一バッチの全動物に対する作業が完了し、動物を移動させた後、隔離場所及び細胞採取作業所を洗浄及び消毒してから次のバッチの動物を入室させるようにする。

6. 3. 3. 4 飼料成分

医薬品やその他の添加物を含め、飼料成分については、少なくとも細胞提供動物の一世代前まで明らかにされ、記録文書が残されていなければならない。特に飼料中に再利用又は動物の脂肪を精製した物質が含まれていないことを明らかにしておく必要がある。このような物質が含まれないことは、顕在化が遅く、適切な検出方法がないプリオン関連疾患及びスローウイルス型感染、あるいはその他の感染物質による伝播を防止する方策として重要である。また飼料中に残留する農薬成分についてもモニタリングし、飼育期間中に与えた飼料の内容および摂取量を記録する必要がある。

6. 3. 3. 5 ドナー動物健康記録システム

異種細胞治療に用いる動物を維持、供給する施設は、全ての動物、臓器、組織又は移植に用いる細胞の種類及び供給先の移植施設について明記したドナー動物記録システムを装備する必要がある。衛生状態のモニタリングは、動物の健康状態の維持のためばかりでなく、製品としての細胞を動物薬等による汚染から防ぐ意味でも重要である。したがって、Tg動物の飼育計画、動物および飼育施設の衛生状態をモニタリングする方法を詳細に述べる必要がある。細胞治療に用いられるすべての動物について、投与された動物薬やワクチンを含めて、誕生から死亡までの記録を行い、疾病記録はできる限り詳細に残す。施設はドナー動物の生涯にわたる健康記録、動物集団の健康調査記録及び動物入手施設の標準作業手順などの記録を保管する必要がある。これらの各種記録に含まれる情報を容易に、正確にかつ迅速に照合させるために、動物の背番号制その他の識別システムを活用すべきである。

6. 3. 3. 6 動物が疾病等に罹ったときの処理

疾病にかかった動物は細胞治療用ドナー動物から外すべきである。バリアー動物施設で飼育できない動物の場合は、感染についてより詳細に試験を行う必要がある。

細胞治療に各 Tg 動物を用いることを一時的、あるいは恒久的に中止する詳細な基準を設ける必要がある。細胞採取用動物から外す理由としては病気、感染物質の発見等があげられる。もし病気が一時的なものであれば、細胞採取用動物から外して治療期間中に施された治療法とその結果を記す。

6. 3. 3. 7 Tg 動物施設が操業を停止する場合

Tg 動物施設が操業を停止する場合は、全動物の健康記録及び標本を該当する臨床試験実施施設に移管するか、あるいは新しい保管場所を当該臨床施設に通知する必要がある。

6. 3. 4 既知感染物質のスクリーニング

動物集団、コロニー、Tg 動物、細胞ドナーとなる動物及び細胞における既知感染物質の検出やスクリーニングをど

のように実施するかは、それぞれの管理目的、動物の種や臨床適用に応じて異なる。個々のケースについて最も適切な試験の実施計画を立て、その科学的合理性について説明できることが必要である。試験結果及びその解釈や説明は、目的細胞を臨床に用いてもよいかどうかの適格性を判定する上のきわめて重要な要素となる。その他の一般の留意事項は 5. 2. 5 項及び 5. 2. 6 項に記述した。

その中での重要事項として挙げられているヒトに感染を引き起こす可能性がある異種親和性内在性レトロウイルス及び他の異種由来ウイルスの増殖及び検出を容易にするために、Tg 動物由来の細胞試料は、ヒト末梢血単核細胞を含む適切な指標細胞のパネルを用いた共培養検定などにより試験する必要がある。共培養パネルにおける指標細胞は、細胞治療の臨床適用に応じて選択するべきである。例えば、ヒトの中樞神経系に関わる細胞治療では、神経親和性ウイルスを検出するためにヒトのニューロン細胞と共に治療用細胞試料を共培養する。感染物質の有無を明らかにするには、無作為継代培養を行い、細胞傷害性やフォーカス形成の観察、逆転写酵素試験、電子顕微鏡検査などを行うことが適切であると考えられる。培養によりウイルスまたはウイルス様物質の存在が示唆された場合は、さらに検討する。潜伏性ウイルスは化学的方法や照射法により誘発・活性化させることで検出が容易となる。予想される細菌の検出には PCR を適用できる。

6. 3. 5 動物集団/コロニーの健康維持及び管理

動物集団又はコロニーが異種移植に用いる動物の供給源として適格であることを証明するための主要な条件は、

(1) 閉鎖集団又はコロニーであること、(2) 感染物質に対する適切な監視プログラムがあることである。特定の使用に関連した動物集団又はコロニーの健康維持及び管理計画については、動物施設の標準作業手順に明記する必要がある。動物集団又はコロニー及び特定の個々のドナー動物に関する医学的記録は、動物施設で無期限に保管すべきである。

1) 動物施設においては、動物種に関する標準獣医学的管理(例えば寄生虫駆除対策)などをはじめ、動物集団又はコロニーの健康管理策を履行し、記録する必要がある。動物集団又はコロニーの健康に影響を及ぼすと考えられる事象はすべて記録する(例えば、安全施設の環境維持装置の故障、疾患の突発的発生、動物の突然死)。ワクチン接種及びスクリーニング計画についても詳細に記録する。ワクチンを使用した場合は記録し、安全性評価の際に考慮する必要がある。

2) 標準的な医学的管理に加えて、臨床所見には必ずしも顕在化しない感染物質が動物集団/コロニーに侵入しないか監視する必要がある。感染物質検出のための身体的検

査及び臨床検査の種類及びスケジュールを含むこの管理プログラムについては標準作業手順に記載する必要がある。

(1)管理プログラムの一環として、無作為に選択した集団又はコロニーの代表動物から定期的に血清試料を採取する。これらの試料について当該動物種で問題となる感染物質や疫学的暴露について検査する。集団やコロニーあるいは個々のドナー動物、又は異種移植患者やその接触者において予想されない疾患が発症した場合の検査に備えて、血清試料を無期限に保管しなければならない。

(2)胎児死産や流産を含む死因が不明又は不確実な全動物について完全な剖検を実施し、感染原因を検討して記録する。

(3)動物を生涯にわたって監視し、検査するためのサブセット群を設ける旨を標準作業手順で規定することが望まれる。これらの動物を生涯にわたって監視することにより、プリオンによる疾患のような無症状の潜伏性又は遅発性疾患が検出できる機会が増えることになる。

6. 3. 6 個々のドナー動物のスクリーニング及び適格性の判定

個々のドナー動物の適格性の判定は、品種及び系列系譜、何らかの弱毒性生ワクチン使用に関する記録、ワクチン接種歴などを含む通常の健康記録に基づいて行う。急性感染を引き起こす病原体については、①個々のドナー動物の臨床検査及び治療、②当該病原体の培養期間を上回る適切な隔離期間を個別に設定すること、③ドナー動物が選ばれる集団における感染の有無を明らかにするための集団監視などによって制御することが可能である。検査期間中、臨床適用において問題となる感染物質をドナー動物ごとにスクリーニングする。

1) 各ドナー動物を移植用細胞の採取前の一定期間（最低3週間）隔離する。動物集団又はコロニーから移される直前に感染した急性疾患はこの期間に臨床所見として顕在化すると考えられる。検査期間中の検査等は、5. 2. 6項や6. 3. 4項に準ずる。

2) 臨床使用のために採取した細胞については、可能な限り感染物質の存在が否定されなければならない。潜伏性ウイルスを含む感染物質が検出された動物の使用は可能な限り避けなければならない。例えば消化管のような特定の解剖学的部位で感染性物質が検出された場合は、そのものが移植用細胞に存在しないことが証明された場合に限り、ドナー動物としての使用が認められる。

3) ドナー候補動物の選択並びに移植用細胞の採取前に、動物集団及び個々の動物の供給元、関連する飼育記録及び全てのワクチン接種の記録を含む生涯にわたる健康関連の記録について検討し、適格性を判定する。これらの記録はレトロスペクティブな研究のために無期限に保管されるべ

きである。移植用細胞にはドナー動物の個別記録のコピーを添付し、異種移植レシピエントの永久的医学記録の一部として保管しなければならない。

4) 移植用細胞の採取後にドナー動物又は動物集団に感染性物質が検出された場合、動物施設側は臨床試験実施施設に通知する必要がある（例えば、監視動物でプリオンによる遅発性疾患が確認された場合）。

6. 3. 7 移植用細胞の採取及びスクリーニング

1) 移植用細胞の採取及び処理は、適切な施設で無菌条件下で実施する必要がある。

2) 移植用細胞の完全性及び機能に影響を及ぼすことなく、病原体を不活化又は除去する手法を可能な限り採用すること。

3) 移植時まで培養液中で保存されている移植用の細胞について、ウイルス及びマイコプラズマの検査を含む定期的な検査を行い、無菌状態が維持されていることを確認する必要がある。このための指針としては、ICHガイドラインやわが国の関連文書を参照すること。

4) 移植用細胞の採取及びスクリーニング過程における品質管理の再現性を保証するために、患者において移植が行われるまでの移植用細胞の採取に関わる全ての手順を明確にし、その一定性を維持するよう文書化すること。この間生じた事象について詳細に記録し報告すること。

5) 移植用細胞の採取のために動物を安楽死させる場合は、肉眼的検査、病理組織学的検査及び微生物学的検査を含む完全な剖検を実施すること。ドナー動物を安楽死させずに移植用細胞を採取する場合は、生涯にわたり健康状態を監視すること。これらの動物が死亡又は安楽死した場合、移植用細胞の採取から死亡に至るまでの時間の経過にかかわらず完全な剖検を行うこと。これら剖検結果の記録は無期限に保管する。剖検所見により、異種移植レシピエントの健康に影響を及ぼす感染が示唆された場合（例えばプリオンによる疾患の確認）、ドナー動物の細胞が提供された全ての臨床試験実施施設にその旨報告すること。

6. 3. 8 ドナー動物の医学的記録及び標本の保管

異種移植レシピエントと個々のドナー動物の記録及び生物学的標本を速やかに正確に照合させることができるように、ドナー動物の生物学的試料及び記録を系統的に保管することは、公衆衛生上の検討及び異種間感染を防ぐために重要である。

1) 組織及び記録の保管管理及びその取り扱いに関する責任について、研究及び臨床プロトコルに明確に規定すること。

2) ドナー動物の集団又はコロニーの健康記録、個々のドナー動物の健康記録及び移植用細胞のスクリーニングに関

する記録は、無期限に保管しなければならない。ドナー動物の個別の健康記録及び移植用細胞のスクリーニング及び適格性の判定に関する記録の要約は、異種移植レシビエントの医学的記録の一部として臨床試験実施施設でファイリングし、保管すること。

3) レトロスペクティブな公衆衛生上の検討のために、移植用細胞の採取時にドナー動物の生物学的標本を保管し、公衆衛生に資するようにすること。公衆衛生上の必要が生じた場合にレトロスペクティブな分析が行えるように全ての標本を無期限に保管する。ドナー動物の生物学的標本は、取り扱い並びにドナー動物とレシビエントの健康記録の照合が容易にできるように保管すること。

4) 可能な限り、各ドナー動物の血清及び血漿試料を0.5ml ずつ5検体以上保管することが望まれる。検査可能な量(1×10^7 個)の白血球を3検体以上低温保存する。できれば白血球よりDNA及びRNAを抽出して分割保存すること。仮に移植用細胞を採取する際にドナー動物を安楽死させたような場合には、その主要臓器(例えば、脾臓、肝臓、骨髄、中枢神経系)より代表的な組織を採取し、パラフィン包埋、ホルマリン固定及び低温保存すること。

6.4 治療用細胞の製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の維持

異種細胞移植のための治療用細胞の製造方法の明確化とその妥当性の検証及び一定性の維持については、4.2項で述べた趣旨にしたがって実施する必要がある。具体的には、1) 原材料となる細胞の由来、特性、適格性、2) 細胞の採取・保存・運搬、3) 原材料となる遺伝子、ベクターなど、4) 細胞以外の原材料、5) 細胞のバンク化や製剤設計を含む治療用細胞の製造工程、6) 製造施設、設備及び器材の適格性、7) 要員の適格性、8) 培地液成分及び資材・試薬の適格性と品質管理、などについて詳細を明らかにし、妥当性を示す必要がある。特にTg動物種に存在が予想されるウイルスに着目した検討を行い、合理的理由がある場合を除き、その存在を否定すべきである。医療用具と治療用細胞とを組み合わせた場合には、その内容と根拠について明らかにしておく。製造方法等の変更にあたっては、その内容の詳細を示し、適切なデータに基づいてその妥当性を明らかにする必要がある。

6.5 細胞の品質管理及び安定性試験

Tg動物由来細胞治療用医薬品の品質を確保するための品質管理や安定性試験のあり方に関する一般的留意事項については、4.3項及び4.4項の記述を参考にすること。

6.6 その他

異種細胞治療用医薬品の非臨床安全性試験、効力を裏付

ける試験、体内動態に関する試験、臨床試験、試料の保管と記録等については4.5項～4.8項を参照すること。なお、異種Tg動物細胞を用いた細胞治療は、未経験であることに加えて未知の要素もきわめて多いので慎重の上にも慎重なアプローチをとる必要がある。中でも、動物からヒトへの有害因子の感染の危険性に対する安全性確保策については特に留意する必要がある。

おわりに

最近15年間で数多くのバイオ医薬品(組換え医薬品、細胞培養医薬品)が誕生した背景にあるのは、単に有用物質の生産にかかわる革新的技術が発展したということのみではない。創薬のもう一つの必須要素である評価科学の進展があったことを改めて認識する必要がある。バイオ医薬品の製造方法、特性解析、品質及び有効性、安全性に係わる評価をいかに客観的、合理的かつ科学的に行うかという概念や方法論、具体的技術などが生産技術としてのバイオテクノロジーの応用と期を一にして発展することで画期的な新規医薬品が臨床の場に提供されることとなったのである。医薬品に関する評価科学は、新たに開発された製品の評価を適正にして、安全で優良な医薬品を待つ医療現場の期待に応えるという役割を果たす。それにとどまらず、開発途上の医薬品がいかに試験・評価されるべきかの指針を示す役割や、将来の開発研究を合理的にかつ効率的に進める上で必要不可欠な役割を果たす。評価科学の成果の典型的な結晶は、ガイドラインである。その国際的な集大成はICHガイドラインである。注目すべきは、組換え医薬品や細胞培養医薬品に関するICHガイドラインの基本部分及び新しく創り出された評価の概念や方法論のかなりな部分はわが国からのデータ、提案や発想によるということである。これはバイオ医薬品開発の草創期から、産・学の協力のもとで研究、蓄積してきたわが国の評価科学の成果の賜物である。バイオ医薬品の品質・安全性確保に関する問題を国際性との関係で捉える必要性はますます高まっている。それぞれの国や地域がもつ優れた科学や考え方が国際社会に集められ、その中で活用され、あるいは新たな創造を生み、整合される方向が明確に目指されている。ここで、いかに国際社会との整合性を高め、必要な国際貢献をし得るかは、優れた科学性と、そして国際社会との交流の継続性に負うところが大きいと思われる。優良な医薬品は人類共通の資産といえるので、わが国の評価科学の成果が国際社会に敬意を持って受け入れられ、新医薬品開発のために活用されている状況は、最も平和的で意義ある国際貢献の一翼をわが国が担っていることを意味する。今後も、このような状態が継続、発展していくことを願っている。

ところで、バイオテクノロジーによる医薬品開発は今再

び新たなステージに入ろうとしている。新たなテクノロジーは新たな評価科学を必要とする。遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品、動物工場由来タンパク質性医薬品や細胞治療用医薬品に関する評価科学のあり方として、まずは、従来、組換え医薬品や細胞培養医薬品で蓄積されてきた知識や経験を基盤にして多面的、重層的に構築していくアプローチが考えられる。本稿では随所でこのことを示唆した。しかし、新たなコンセプトやアプローチを創出し、今後の発展を期すべきところも多い。これらの次世代バイオ医薬品については、その開発自体が試行錯誤的で途上にあり、先端技術の粋を尽くしたさまざまな展開を見せようとしている。こうした分野の評価科学が目指す方向の一つは、具体的課題を前にして、日進月歩の科学的成果を迅速にキャッチし、洞察力と判断力を駆使して、その時点で最も科学的に適切な試験並びに評価を行うことである。さらにその際蓄積されたさまざまなデータや経験から新たな地平を切り拓くよう努めることである。もう一つの方向は、先端的研究の渦中に身を置き、当該分野の進歩を視野に収めながら、品質、安全性上の未解決問題を見出し、評価科学の側からブレークスルーポイントを指し示すことである。出来上がった製品について品質・安全性等の適正な評価をすることは評価科学の重要な使命である。しかし、将来に向けての品質・安全性確保の要諦は、医薬品創製の戦略や企画を立てる際、安全性思想や設計を可能な限り盛り込んだシナリオとするところにより重きをおくことにあると思われる。その際、開発メーカー、学界、行政関係者を問わず、国や地域を問わず、各方面、各分野の専門家からの積極的な問題提起やコメントが出され、建設的な論議が重ねられていく中で、より合理的な品質・安全性確保のためのシナリオが描かれ、適切な試験法や評価法が確立されていくことが期待される。各関係者間の建設的なコミュニケーションこそが、こうした新しい分野を発展させていく決定的な要因とも推進力ともなると思われる。

個々の製品についての試験の実施や評価に関しては、本稿で述べてきたような事項が参考となる場合が多ければ幸いである。しかし、最終的には個々の特性、臨床適用法などに応じ、かつ医薬品の品質及び安全性の確保という目的をふまえ、その時点の学問の進歩を反映した合理的根拠に基づき、柔軟に対応していくことがより重要であろうと思われる。バイオ医薬品のような急速に進展する分野にあっては、事例から学びつつも、その評価の科学的根拠の合理性を絶えず洗い直すという柔軟な姿勢が、開発メーカー側にも行政側にも特に求められていると思われる。そのようなアプローチや事例の蓄積の中から、さらに目的に叶ったコンセプトやデータも生まれ、また、新たな評価技術の開発もなされて、この分野の進展が図られるのではないかと期待している。

参考文献

- 1) a) Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heynecker, H.L., Bolivar, F. and Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056-1063 (1977); b) "Insulins, Growth Hormone, and Recombinant DNA Technology", eds. by Gueriguian, J.L., Miller, H.L., Schaffenburg, C., Gregoire, A.T. and Sobel, S., Raven Press, New York, (1982); c) 早川堯夫, 川村次良: 医薬品研究, **14**, 171-191(1983); d) 日本薬学会編 "薬とバイオテクノロジー", ファルマシアレビュー No.15, 日本薬学会, 東京 (1984): 宮田篤郎, 水野健作, 松尾壽之, 同誌, pp.37-51; e) 野本明男, 同誌, pp.69-76; f) 中里紘, 田中正治, 東直樹, 同誌, pp.77-87; g) 丸山博巳, 同誌, pp.135-145; h) 川村次良, 早川堯夫, 同誌, pp.147-153 (1984)
- 2) a) 早川堯夫: 月刊薬事, **34**, 23-29 (1992); b) 早川堯夫: 総合臨床, **42**, 3198-3203 (1993)
- 3) 早川堯夫: 薬局, **48**, 105-112 (1997)
- 4) a) World Health Organization(WHO): Quality Control of Biologicals Produced by Recombinant DNA Techniques. Bull. WHO 61:897 (1983); Bangham, D.R. & Bristow, A.F. Discussion paper on Standardization and Control of Biological Hormones Made by Recombinant DNA Methods, WHO/BS/82.1371 (1982); b) WHO Report: Interferon Therapy: Report of a WHO Scientific Group, WHO Technical Report Series No.676 (1982); WHO: Proposed Requirements for the Production of Human Interferon Preparations from Lymphoblastoid Cells (Requirements for Biological Substances No.42), WHO/BS/87.1546 (1987); c) WHO: Proposed Requirements for the Hepatitis B Vaccines Made by Recombinant DNA techniques (Requirements for Biological Substances No.39), WHO/BS/85.1478 (1985); d) WHO Report: WHO Expert Committee on Biological Standardization, 36th report. WHO Technical Report Series No.745, Annex 3, Requirements for Continuous Cell Lines Used for Biological Production (Requirements for Biological Substances No.37) pp.93-107 (1987)
- 5) WHO Report: WHO Study Group on Biologicals. Acceptability of Cell Substrates for Production of Biologicals. WHO Technical Report Series No.747 (1987)
- 6) a) Esber, E.C.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology", Banbury Report Vol.29, eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.265-274 (1988); b) Liu, D.T.: *ibid.*, pp.317-330 (1988); c) Office of Biologics Research and Review, Center for Drugs and Biologics, FDA; Points to Consider in the Production and Testing of New Drugs and Biologicals Produced By Recombinant DNA Technology. April 10 (1985); d) *Idem.*: Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Production for Human Use. June 1 (1987); e) *Idem.*: Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals. November 18 (1987)
- 7) a) Sauer, F. and Hankin, R.: *J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 639-646 (1987); b) Commission of the European Communities: Notes to Applicants for Marketing Authorizations on the Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology. Rev. 8(Final), June 1987: III/860/87-EN (1987); c) *Idem.*: Notes to

- Applicants for Marketing Authorizations on the Production and Quality Control of Monoclonal Antibodies of Murine Origin Intended for Use in Man. Rev. 7(Final), June 1987: III/859/87-EN (1987); d) Idem.: Notes to Applicants for Marketing Authorizations on the Pre-clinical Biological Safety Testing of Medicinal Products Derived from Biotechnology (and Comparable Products Derived from Chemical Synthesis). Rev. 3, April 1987: III/407/87-EN (1987)
- 8) 野島庄七, 川村次良, 小池克郎, 清水直容, 寺尾允男, 名取俊二, 山崎修道, 早川堯夫: 医薬品研究, **15**, 492-496 (1984)
 - 9) 厚生省薬務局審査課長, 生物製剤課長: (昭和 59 年 3 月 30 日) 薬審第 243 号通知「組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」, (1984)
 - 10) a) 平山一男: 組換え DNA 技術を応用して製造される医薬品に関する添付資料の説明会 (昭和 59 年 8 月, 大阪) 記録, 日本製薬団体連合会編, pp.3-9 (1984); b) 早川堯夫: 同誌, pp.10-36 (1984); c) 早川堯夫: 臨床医, **11**, 735-737 (1985); d) 早川堯夫: 「組換え DNA 技術医薬品の製造承認について」, 医薬品先端技術振興協会研修会講演録, 昭和 61 年度 HS レポート No.2, (財) ヒューマンサイエンス振興財団編, (1986)
 - 11) a) 早川堯夫: PHARM TECH JAPAN, **2**, 685-691 (1986); b) *ibid.*, **2**, 799-804 (1986); c) *ibid.*, **2**, 1211-1217 (1986); d) *ibid.*, **3**, 127-137 (1987)
 - 12) a) Hayakawa, T.: "Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use", Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 235, ed. by Graham, C.E., Alan. R. Liss Inc., New York, pp.15-29 (1987); b) Hayakawa, T.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology", Banbury Report Vol.29, eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.309-316 (1988)
 - 13) Hayakawa, T.: "Biotechnologically Derived Medical Agents: The Scientific Basis of their Regulation", eds. by Gueriguian, J.L., Fattorusso, V. and Poggiolini, D., Raven Press, New York, pp.152-156 (1988)
 - 14) a) 早川堯夫: ホルモンと臨床, **34**, 483-488 (1986); b) 新薬承認審査質疑応答集 1987 年度版: 厚生省薬務局審査第一課監修, 薬業時報社, 東京, pp.75-131 (1987); c) 早川堯夫: 化学と薬学の教室, バイオテクノロジー特集号, pp.65-71 (1988); 野口 浩: 同特集号, pp.93-100 (1988)
 - 15) 早川堯夫: Clinical Neuroscience, **6**, 1049 (1988)
 - 16) 早川堯夫: "遺伝子工学と医薬品開発 (医薬品の開発 6)", 池原森男編, 広川書店, 東京, pp.223-262 (1989)
 - 17) 厚生省薬務局審査第一課長, 審査第二課長, 生物製剤課長: (昭和 63 年 6 月 6 日) 薬審 1 第 10 号課長通知「細胞培養技術を応用して製造される医薬品の承認申請に必要な添付資料の作成について」, (1988)
 - 18) 山崎修道: PHARM TECH JAPAN, **2**, 875-881 (1986)
 - 19) 早川堯夫: トキシコロジーフォーラム, **11**, 9-19 (1988)
 - 20) a) 小池克郎: PHARM TECH JAPAN, **3**, 795-797 (1987); b) 小池克郎: トキシコロジーフォーラム, **11**, 27-31 (1988)
 - 21) a) 松橋 直: トキシコロジーフォーラム, **11**, 20-26 (1988); b) 山田正篤: 同誌, **11**, 32-40 (1988)
 - 22) 早川堯夫: 医薬品研究, **23**, 137-148 (1992)
 - 23) 早川堯夫: 医薬品研究, **23**, 519-532 (1992)
 - 24) "Preclinical Safety of Biotechnology Products Intended for Human Use: Progress in Clinical and Biological Research Vol. 235", ed. by Graham, C.E., Alan. R. Liss Inc., New York, (1987)
 - 25) a) "Therapeutic Peptides and Proteins: Assessing the New Technology: Banbury Report Vol.29", eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1988); b) "Biotechnologically Derived Medical Agents: The Scientific Basis of Their Regulation", eds. by Gueriguian, J.L., Fattorusso, V. and Poggiolini, D., Raven Press, New York, (1988); c) "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting: Current Communications in Molecular Biology", eds. by Marshak, D.R. and Liu, D.T. in 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)
 - 26) a) 早川堯夫: PHARM TECH JAPAN, **3**, 553-559 (1987); b) *ibid.*, **4**, 367-374 (1988); c) *ibid.*, **4**, 523-530 (1988); d) *ibid.*, **4**, 789-794 (1988); e) *ibid.*, **4**, 943-946 (1988); f) *ibid.*, **4**, 1205-1210 (1988); g) Hayakawa, T.: "Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting", eds. by Marshak, D. and Liu, D.T., Current Communication in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp.195-200 (1989); h) 早川堯夫: 医薬品研究, **20**, 580-583 (1989)
 - 27) a) Hayakawa, T.: "The First International Conference on Harmonisation Brussels 1991", eds. by Darcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.295-301 (1992); b) 早川堯夫: "第 1 回 ICH, 21 世紀への扉", 厚生省薬務局新医薬品課監修, 薬業時報, 東京, 58-66 (1991); c) 林 裕造, 早川堯夫, 大野泰雄, 五十嵐俊一, 高山 敏: 月刊薬事, **34**, 395-398 (1992)
 - 28) a) Hayakawa, T.: "The Fourth International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Brussels 1997", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.153-156 (1998); b) 早川堯夫: ファルマシア, **34**, 992-994 (1998); c) Hayakawa, T.: "Current Opinion in Biotechnology 1999", Vol.10, ed. by Omenn, G., Current Biology Publications, Elsevier Science Ltd., London, UK, pp.307-311 (1999); d) Hayakawa, T.: "Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century", eds. by Ikura, K., Nagao, M., Masuda, S. and Sasaki, R., Kluwer Academic Publishers, pp.215-219 (1999)
 - 29) 早川堯夫: 臨床薬理, **20**, 347-352 (1989)
 - 30) Hayakawa, T.: "Scientific and Regulatory Aspects of Drug Biotechnology", eds. by Chiu, Y.Y. and Gueriguian, J.L., Marcel Dekker Inc., New York, pp.468-498 (1990)
 - 31) Hayakawa, T.: *Pharmeuropa, Special Edition* (Proceedings of the conference and workshops), pp.65-72 (1993)
 - 32) Hayakawa, T.: *Dev. Biol. Stand.*, **91**, 15-23 (1997)
 - 33) a) Hayakawa, T.: "The Second International Conference on Harmonisation, Orlando 1993", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.150-157 (1994); b) Hayakawa, T.: "The Third International Conference on Harmonisation, Yokohama 1995", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.167-174 (1996)

- 34) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin", (1997)
- 35) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products", (1995)
- 36) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products", (1997)
- 37) 早川堯夫: "バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー, 東京, pp.385-407 (1992)
- 38) 早川堯夫: "ICH-3 横浜に向けて", (財)公定書協会編, (株)ミクス, 東京, 82-112 (1995)
- 39) 早川堯夫: バイオサイエンスとインダストリー, 53, 16-20 (1995)
- 40) 早川堯夫: 月刊薬事, 38, 955-959 (1996)
- 41) 早川堯夫: "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, 72-95 (1996)
- 42) 早川堯夫, 内田恵理子: 医薬品研究, 29, 895-903 (1998)
- 43) a) Hayakawa, T.: "Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, vol.6", eds. by Kobayashi, T., Kitagawa, Y. and Okumura, K., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.1-8 (1994); b) 早川堯夫: 医薬品研究, 24, 1279-1281 (1993); c) Hayakawa, T.: *IYAKUHIN KENKYU*, 24, 1282-1292 (1993); d) Hayakawa, T.: *ibid.*, 25, 15-24 (1994); 早川堯夫: 医薬品研究, 25, 12-14 (1994); e) Hayakawa, T.: *Dev. Biol. Stand.*, 88, 15-18 (1996); f) Hayakawa, T.: *ibid.*, 88, 331-332 (1996)
- 44) 早川堯夫, 山口照英, 新見伸吾, 内田恵理子, 押沢正: 医薬品研究, 20, 281-308 (1989)
- 45) 早川堯夫, 山口照英, 新見伸吾, 内田恵理子, 押沢正: 医薬品研究, 20, 735-759 (1989)
- 46) 早川堯夫: 医薬品研究, 21, 531-546 (1990)
- 47) 早川堯夫: 医薬品研究, 21, 964-972 (1990)
- 48) 早川堯夫: "バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー, 東京, pp.253-263 (1992)
- 49) Hayakawa, T.: "The Terminology of Biotechnology: A Multidisciplinary Problem", ed. by Loening, K.L., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, pp.115-123 (1990)
- 50) a) 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイド, 徳永裕司, 春日井 勲, 早川堯夫: 医薬品研究, 25, 405-425 (1994); b) 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, アハメド・アブド・サイド, 徳永裕司, 春日井 勲, 早川堯夫: 同誌, 25, 501-523 (1994)
- 51) 早川堯夫: "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 平成十年度研究業績報告書", 東京, 26-37 (1999)
- 52) 早川堯夫: "バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー, 東京, pp.376-382 (1992)
- 53) Yanagida, K., Ogawa, H., Omichi, K. and Hase, S.: *J. Chromatogr. A.*, 800, 187-198 (1998)
- 54) a) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, 269, 297-303 (1999); b) Kawasaki, N., Ohta, M. and Hayakawa, T.: *ibid.*, (In preparation)
- 55) Morimoto, K., Tsuda, E., Said, A.A., Uchida, E., Hatakeyama, S., Ueda, M. and Hayakawa, T.: *Glycoconjugate J.*, 13, 1013-1020 (1996)
- 56) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological / Biological Products" (1999)
- 57) a) 鎮目和夫: 臨床医, 11, 661-664 (1985); b) Fryklund, L., Brandt, J., Hagerman, M., Pavlu, B., Skoog, B. and Wichman, A.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R. A., Plenum Co., New York, pp.257-266 (1986)
- 58) WHO Requirements for the Use of Animal Cells as *in vitro* Substrates for the Production of Biologicals. (Requirements for Biological Substances No 50), Geneva, WHO (1998)
- 59) 早川堯夫: "バイオテクノロジー関連医薬品", 医薬品の品質管理及び試験法 (医薬品の開発 14), 鈴木郁生編, 広川書店, 東京, pp.42-54 (1990)
- 60) Hayakawa, T., Niimi, S. and Uchida, E.: *Pharmeuropa, Special Edition (Human Growth Hormone)*, 33-40 (1991)
- 61) Hayakawa, T.: "Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs, 19 (Proceedings of 3rd International Conference on Pharmacopoeias and Quality Control of Drugs)", eds. Italian Pharmacopoeia Commission General Secretariat and Istituto Superiore di Sanita, Editrice Compositori, Bologna, pp.207-212 (1993)
- 62) a) 内田恵理子, 森本和滋, 川崎ナナ, 早川堯夫: 医薬品研究, 25, 348-353 (1994); b) 新見伸吾, 押沢 正, 横田椅江, 早川堯夫: 同誌, 28, 863-873 (1997)
- 63) a) Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M. and Ueda, M.: *Biologicals*, 20, 243-251 (1992); b) Hayakawa, T., Wada, M., Mizuno, K., Abe, S., Miyashita, M. and Ueda, M.: *ibid.*, 20, 253-257 (1992); c) Niimi, S., Oshizawa, T. and Hayakawa, T.: *IYAKUHIN KENKYU*, 28, 337-342 (1997); d) 新見伸吾, 横田椅江, 押沢 正, 溝田雅洋, 小山定利, 横沢 彰, 村田智代, 早川堯夫: 医薬品研究, (1999,印刷中); e) 田中 彰, 早川堯夫, 関沢 文, 林 紘, 里 忠, 石浜 洋, 大森照夫, 村山敬一, 大橋 彰: "昭和63年度ヒューマンサイエンス基礎科学研究事業, 官民共同プロジェクト研究報告 (第一分野)", ヒューマンサイエンス振興財団, pp.218-225 (1989)
- 64) a) 早川堯夫, 森本和滋, 内田恵理子, 川崎ナナ, 徳永裕司, 山口照英, 新見伸吾, 押沢 正: 医薬品研究, 25, 339-347 (1994); b) 森本和滋, 日高哲郎, 本広繁徳, 七里寛江, 奥田秀毅, 坂口慶貴, 高橋 尊, 江島伸一, 長南義勝, 早川堯夫: 同誌, 26, 404-412 (1995)
- 65) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products", (1995)
- 66) Hayakawa, T.: "The Second International Conference on Harmonisation, Orlando 1993", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.133-135 (1994)
- 67) a) 早川堯夫, 高橋道人, 田中 悟, 松本清司, 戸部満寿夫: 医薬品研究, 22(1), 28-40 (1991); b) 早川堯夫: "バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法", 小林茂保, 早川堯夫, 山崎修道編, エル・アイ・シー, 東京, pp.413-424 (1992)

- 68) ICH Harmonised Tripartite Guideline: "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals", (1997)
- 69) a) Cavagnaro, J.A.: "The Fourth International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Brussels 1997", eds. by D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Greystone Books Ltd., Northern Ireland, pp.204-209 (1998); b) Inoue, T.: *ibid.*, pp.209-219 (1998)
- 70) a) Velcovsky, H.G. and Federlin, K.F.: *Diabetes Care*, **5(Suppl. 2)**, 126-128 (1982); b) Galloway, J.A., Peck, F.B.J.R., Fineberg, S.E., Spradlin, C.T., Marsden, J.H., Allemenos, D. and Ingulli-Fattic, J.: *ibid.*, 135-139 (1982); c) Fireman, P., Fineberg, S.E. and Galloway, J.A.: *ibid.*, 119-125 (1982); d) Fineberg, S.E.: *Diabetologia*, **25**, 465-469 (1983); e) Hintz, R.L., Rosenfeld, R.G., Wilson, D.M., Bennett, A., Finno, J. and McMlellan, B.: *Lancet*, **1**, 1276-1279 (1982); f) Kaplan, S.L., Underwood, L.E., August, G.P., Bell, J.J., Blethen, S.L., Brown, D.R., Foley, T.P., Hintz, R.L., Hopwood, N.J., Johanson, A.J., Kirkland, L.P. and Plotnick, L.P.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R. A., Plenum Co., New York, pp.267-277 (1986); g) Bierich, J.R.: "Human Growth Hormone", eds. by Raiti, S. and Tolman, R.A., Plenum Co., New York, pp.287-300 (1986)
- 71) 早川堯夫：遺伝子治療用医薬品及び細胞治療用医薬品の品質・安全性等の確保，低温生物工学会誌，**45(1)**，18-33 (1999)
- 72) a) 衛藤義勝：「遺伝子治療開発研究ハンドブック」，日本遺伝子治療学会編，エヌ・ティー・エス，東京，pp.3-6 (1999)； b) 香川靖雄，遠藤仁司，浜本敏郎，：同誌，pp.265-282； c) 小澤敬也：同誌，pp.283-290； d) 金田安史：同誌，pp.291-301； e) 島田 隆：同誌，pp.302-309
- 73) 水口裕之，早川堯夫：蛋白質核酸酵素，**44**，1405-1414 (1999)
- 74) 中西真人，真弓忠範，早川堯夫：治療学，**31**，11-14 (1997)
- 75) 早川堯夫：「平成10年度厚生科学研究費補助金 ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業研究報告書，遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究 (H10-ゲノム-033)」
- 76) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Ashihara, K., Senda, T., Akuta, T., Okabe, J., Nagoshi, E., Masago, A., Eguchi, A., Suzuki, Y., Inokuchi, H., Watabe, A., Ueda, S., Hayakawa, T. and Mayumi, T.: *J. Controlled Release*, **54**, 61-68 (1998)
- 77) Nakanishi, M., Mizuguchi, H., Ashihara, K., Senda, T., Eguchi, A., Watabe, A., Nakanishi, T., Kondo, M., Nakagawa, T., Masago, A., Okabe, J., Ueda, S., Mayumi, T. and Hayakawa, T.: *Molecular Membrane Biology*, **16**, 123-127 (1999)
- 78) Watabe, A., Mizuguchi, H., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Uchida, E., Mayumi, T., Nakanishi, M. and Hayakawa, T.: *Biochem. Biophys. Acta*, **1416**, 339-348 (1999)
- 79) a) Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Morioka, Y., Imazu, S., Nakanishi, M., Kondo, T., Hayakawa, T. and Mayumi, T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 15-18 (1997); b) Suzuki, R., Nakagawa, T., Mizuguchi, H., Imazu, S., Nakanishi, T., Nakagawa, S., Nakanishi, M., Hayakawa, T. and Mayumi, T.: *Drug Delivery System*, **13(2)**, 87-93 (1998)
- 80) Deacon T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer P., Kott, S., Edge, A., Penny, D., Kassissieh, S., Dempsey, P. and Isacson, O.: *Nature Medicine*, **3**, 350-353 (1997)
- 81) Oldfield E.H., Ram, Z., Culver, K.W., Blaese, R.M., DeVroom H.L. and Anderson, W.F.: *Hum. Gene Ther.*, **4**, 39-69 (1993)
- 82) Thomas, M., Robert Northrup, S. and Hornsby P.J.: *Nature Medicine*, **3**, 978-983 (1997)
- 83) Bach, F.H., Ferran, C., Soares, M., Wrighton, C.J., Anrather, J., Winkler, H., Robson, S.C. and Hancock, W.W.: *Nature Medicine*, **3**, 944-948 (1997)
- 84) Patience, C., Takeuchi, Y. and Weiss, R.A.: *Nature Medicine*, **3**, 282-312 (1997)
- 85) a) LeTissier, P., Stoye, J.P., Takeuchi, Y. and Weiss, R.A.: *Nature*, Vol.386, 681-682 (1997)； b) Martin U., Kiessig V., Blusch J.H., Haverich A., von der Helm K. Herden T., Steinhoff G.: *The Lancet*, **352**, 692-694, (1998)
- 86) news in brief, *Nature*, **392**, 10, (1998)
- 87) Weiss R.A.: *Nature*, **391**, 327-328, (1998)
- 88) "Draft Public Health Service Guideline on Infectious Disease Issues in Xenotransplantation" (Notice. Federal Register, Dept. Health and Human Services, Public Health Service: **61(185)**, 49920-49932, Sept. 23, 1996)

種子島の植物（世界遺産屋久島の植物分布との類似性について）

佐竹元吉*・鎗木紘一・関 寅一郎・野崎とも子, 李 宜融・香月茂樹

Geobotanical studies on the island of Tanegashima (Affinity of world property Island Yakushima)

Motoyoshi Satake*, Kouichi Kaburagi, Toraichiro Seki, Tomoko Nozaki,
I-jung Lee and Shigeki Katsuki

A list was drawn up of wild plants growing on Tanegashima island that were identified in our field work, and the list was compared with the flora of the rest of Japan and the flora of Taiwan.

There were 166 families and 1,218 species consisting of 23 families and 159 species of Pteridophyta, 4 families and 7 species of Gymnosperma, 113 families and 700 species of the dicotyledous Angiosperma, and 26 families and 353 species of monocotyledous Angiosperma.

There are 229 families and 5,500 species of plants in Japan, 196 families and 3,019 species in Kyushu, and 228 families and 3,477 species in Taiwan.

There are 11 species of endemic plants on Tanegashima and Yakushima, and the best known of them is *Pinus armandii* Francht. var. *amamiana* Hatsushima. There are 181 species of flora of flora limited to the northern element, including several important medicinal plants, such as *Akebia quinata* Decaisne and *Zanthoxylum piperitum* DC.

The 69 species of flora limited to the southern element include several important tropical plants, such as *Messerschmidia argentea* Johnston and *Clerodendrum inerme* Gaertn.

Most of these plants are distributed on both island, but some of are distributed only Tanegashima.

We concluded that one of the temperate borderlines of Japanese flora in the temperate zone is the islands of Tokara.

The flora of Tanegashima and Yakushima are having a closely affinity of plant species and having the rich plant species.

Keywords: geobotanical studies, flora of Tanegashima, Yakushima, medicinal plant

はじめに

当研究所の種子島薬用植物栽培試験場が昭和 27 年に設置されてから暖地性の薬用植物の栽培を手がけ、多くの薬用植物の実用化及び栽培方法の確立、研究材料の提供を行ってきたが、近年薬用植物の生育環境が都市化や開発のために悪化し、多くの植物が自然状態では生育できなくなっている。佐竹は昭和 33 年に 1 カ月間屋久島に入り、島全体の植物に触れる機会を得、その後、数度に渡る沖縄、種子島、屋久島の採集旅行で得た標本を合わせ 1978 年に当時の琉球大学教授初島住彦及び鹿児島大学農学部教授大野照好に同定していただき、沖縄と種子島及び屋久島の植物

の分布の特徴を議論する機会があった。このとき、種子島の植物が、標高差が 282 m しかないにも拘らず、屋久島（標高差 1935 m）と共通する植物が多いことが話題となった。

これに関して中井¹⁾が日本植物区系の南限は屋久島、種子島で、日本固有種はここが南限であると述べている。初島住彦は「琉球列島の植物²⁾」で屋久島、種子島を北琉球と位置づけ、琉球列島との関連要素より、本州要素の方が多いいことをあげている。屋久島に関しては正宗厳景³⁾が台湾から北海道までの分布の比較を行っている。

種子島調査は佐々木、大内山氏等の調査⁴⁾があるのみで不十分であったため、1965 年に佐竹元吉、鎗木紘一は島内を調査し、当場の高城正勝、鎗木紘一が種子島有用植物目録⁵⁾を書いた。その後、日常的な調査活動から目録に記載されていない多くの植物が鎗木によって発見され、1980 年に種子島の自生植物目録⁶⁾をまとめた。

本年、薬用資源植物の利用と保護に関する厚生科学研究において、分布地図がまとまってきたので、国内の植物分

* To whom correspondence should be addressed: Motoyoshi Satake; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9154; Fax: 03-3700-6950

布確認調査を北海道から沖縄、西表島まで行った。その結果、日本の野生植物を広く見る機会ができ、過去35年の国内各地で観察した分布地を念頭において種子島の特徴を台湾の植物も含めてまとめた。今後の薬用植物の利用、研究や資源保存に寄与できれば幸いである。

(1) 種子島の植物数

種子島に分布する植物の数は我々が調べ確認できたものは164科1,218種で、しだ植物23科162種、裸子植物4科7種、被子植物の双子葉離弁花植物81科414種、合弁花植物30科292種、単子葉植物は26科353種である。屋久島の植物は1,275種(初島1979年⁶⁾、正宗²⁾は1,143種、1934

年)と報告されている。種子島が海拔282mの平坦な島に対して、屋久島は海拔1,935mの山地がある。この両島を比較しても種子島の植物の豊富さは明らかである。ちなみに九州全体では196科3,019種⁷⁾、台湾では228科3,477種⁸⁾が知られている

(2) 種子島と屋久島の固有種⁹⁾ (Table 1, 2)

屋久島と種子島の固有種は11種で、ヤクタネゴヨウ *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* Hatusima, ヤクシマミヤマスミレ *Viola sieboldii* Maxim. ssp. *boissieuana* F. Maek. et Hashimoto var. *pseudo-selkirkii* F. Maek. & Hashimoto, ヤクシマカンアオイ *Asarum yakushimense* Masamune, ヤクシマ

Table 1. Wild plant number growing in Island Tanegashima

Endemic species	11	1 %
Distributed limit line northern Element	181	15 %
Distributed limit line southern Element	69	6 %
Hokkaido Element	280	23 %
to Taiwan	215	
to Okinawa	33	
to Island Amami	22	
Honsyu Element	425	35 %
to Taiwan	321	
to Okinawa	50	
to Island Amami	51	
Shikoku Element	35	3 %
to Taiwan	30	
to Okinawa	1	
to Island Amami	4	
Kyusu Element	114	9 %
to Taiwan	88	
to Okinawa	15	
to Island Amami	11	
Naturalized or escaped Plant	103	8 %
Total	1218	100 %

Table 2 Endemic Species in Island Tanegashima

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Apostasia nipponica</i> Masamune	ヤクシマラン				○				
<i>Asarum yakushimense</i> Masamune	ヤクシマカンアオイ				○				
<i>Balanophora yakushimensis</i> Hatusima et Masamune	ヤクシマツチトリモチ				○				
<i>Calanthe</i> × <i>matsumurana</i> Schltr.	ユウヅルエビネ				○				
<i>Cirsium yakushimense</i> Masamune	ヤクシマアザミ				○				
<i>Farfugium hiberniflorum</i> Kitam.	カンツワブキ				○				
<i>Lagerstroemia subcostata</i> Koehne var. <i>fauriei</i> Hatusima	ヤクシマサルスベリ				○				
<i>Laurembergia walkeri</i> Ohwi	タネガシマアリノトウグサ								Not distributed in Yaku shima
<i>Pinus armandii</i> Franch. var. <i>amamiana</i> Hatusima	ヤクタネゴヨウ				○				
<i>Sasaella masamuneana</i> Hatusima et Muroi	クリオザサ				○				
<i>Viola sieboldii</i> Maxim. ssp. <i>boissieuana</i> F. Maek. et Hashimoto var. <i>pseudo-selkirkii</i> F. Maek. et Hashimoto	ヤクシマミヤマスミレ				○				

ツチトリモチ *Balanophora yakushimensis* Hatusima et Masamune, ヤクシマサルスベリ *Lagerstroemia subcostata* Koehne var. *fauriei* Hatusima ex Yahara, ヤクシマアザミ *Cirsium yakushimense* Masam., ホソバアリノトウグサ *Laurembergia walkeri* Ohwi, ヤクシマラン *Apostasia nipponica* Masamune, ユウヅルエビネ *Calanthe × dominii* Lindl, カンツワブキ *Farfugium tatewakii* (Saiki) Hatusima, comb. nov., クリオザサ *Sasaella masamuneana* Hatusima & Muroi があげられる。この中で種子島固有種はホソバアリノトウグサ *Laurembergia walkeri* Ohwi のみであるが、屋久島はシダ植物のオノアイダカナワラビ, ヤクイヌワラビ, ヤクシマタニヌワラビ, カワバタハチジョウシダ, シノブホングウシダ, 双子葉類ではオニカンアオイ, ヤクシマカワゴロモ, コスギニガナ, シマコウヤボウキ, ヒメククタピラコ, ホソバハグマ, ヤクシマニガナ, ヤクシマノギク, ヤクシマヒヨドリ, オオゴカヨウオウレン, ヒメウマノアシガタ, ヤクシマグミ, ヤクシマシオガマ, アクシバモドキ, ヤクシマツリガネツツジ, ヤクシマヤマツツジ, ヤクシマキイチゴ, ヤクシマカラスザンショウ, マルバメグミ, ヒメチャルメルソウ, ハナヤマツルリンドウ, ヤクシマリンドウ, 単子葉類では, ヤクシマダケ, ヤクシマノガリヤス, ヤクシマホシクサ, ヒメクリソラン, マツゲカヤラン, ヤクシマチドリ, ヤクシマトンボがある。屋久島固有変種や品種もあり, 変種として 39 種 (ホソバナカイタチシダ, ホソバコウシュンシダ, ヤクシマハシカンボク, ヤクシマムグラ, ヒメミズ, ヤクシマオオバコ, ヤクシマコオトギリ, ヤクシマオナガカエデ, イッスンキンカ, ヤ

クシマコウモリ, ヒメキツネノボタン, ヤクシマカラマツ, ヤクシマママコナ, ヒメコナスビ, ヤクシマシソバツツナミ, ヤクシマタツツナミ, コケトウバナ, マルバヤマシグレ, コケスマレ, ヤクシマノダケ, ヤクシマシャクナゲ, ヤクシマミツバツツジ, ヤクシマカマツカ, ヤクシマヒメバライチゴ, ヤクシマフウロ, ヤクシマガクウツギ, ヤクシマショウマ, ヤクシマコケリンドウ, ヤクシマツルリンドウ, ヤクシマスズメノヤリ, チャボカワズスゲ, ヤクシマカンスゲ, ヤクシマスゲ, ヤクシマヒロハテンナンショウ, ヤクシマギボウシ, ヤクシマショウジョウバカマ, ヤクシマチャボゼキショウ, アマミトンボモドキ, ヤクシマヤマラッキョウ), 品種として 8 種 (ヒメコイワカガミ, タマゴバキッコウハグマ, マルバキッコウハグマ, モミジバキッコウハグマ, ヤクシマタチツボスマレ, オタクミツツジ, ヒメウメバチソウ, ヤクシマダイモンジソウ) がある。このように固有種が多いのは, 山地とそれに伴う深い溪谷と温暖多雨な条件が重なって, 変異が生じた結果と想像される。屋久島の溪流での変異は葉にでることが多く, 葉が細くなる傾向がみられる。このことは西表島でのハマヒサカキ (*Eurya emarginata* Makino) が線状長だ円形になり, テリバサカキ (*Eurya emarginata* Makino var. *ryukuensis* Hatusima) に変異することと細葉になることが一致している。本州においても, ゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) の溪流形がヤシャゼンマイ (*Osmunda lancea* Thunb.) であると考えれば理解できる。

Table 3-1 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (1. from Hokkaidou to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Ainsliaea apiculata</i> Schütz-Bip.	キッコウハグマ				○	○	○	○	○
<i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	カラヨモギ				○	○	○	○	○
<i>Artemisia princeps</i> Pamp.	ヨモギ				○	○	○	○	○
<i>Aster ageratoides</i> Turcz. ssp. <i>ovatus</i> Kitam.	ノコンギク				○	○	○	○	○
<i>Bromus pauciflorus</i> Hack.	キツネガヤ				○	○	○	○	○
<i>Calanthe discolor</i> Lindl.	エビネ				○	○	○	○	○
<i>Calystegia japonica</i> Choisy	ヒルガオ				○	○	○	○	○
<i>Carex lenta</i> D. Don	ナキリスゲ				○	○	○	○	○
<i>Carex nervata</i> Fr. Et Sav.	シバスゲ				○	○	○	○	○
<i>Cephalanthera falcata</i> Bl.	キンラン				○	○	○	○	○
<i>Clinopodium chinense</i> O.K. var. <i>parviflorum</i> Hara	クマバナ				○	○	○	○	○
<i>Clinopodium micranthum</i> Hara	イヌトウバナ				○	○	○	○	○
<i>Cnidium japonicum</i> Miq.	ハマゼリ				○	○	○	○	○
<i>Cymbidium goeringii</i> Reichb. f.	シュンラン				○	○	○	○	○
<i>Desmodium laxum</i> DC.	オオバナヌビトハギ				○	○	○	○	○
<i>Dioscorea tokoro</i> Makino	オニドコロ				○	○	○	○	○
<i>Eleocharis kamtschatica</i> Komar.	ヒメハリイ				○	○	○	○	○
<i>Epilobium pyrricholophum</i> Fr. et Sav.	アカバナ				○	○	○	○	○
<i>Equisetum arvense</i> L.	スギナ				○	○	○	○	○
<i>Eriocaulon hondoense</i> Satake	ニッポンイヌノヒゲ				○	○	○	○	○
<i>Eupatorium chinense</i> L. var. <i>simplicifolium</i> (Makino) Kitamura	ヒヨドリバナ				○	○	○	○	○
<i>Gentiana zollingeri</i> Fawc.	フデリンドウ				○	○	○	○	○
<i>Hemerocallis citrina</i> Baroni var. <i>vespertina</i> M. Hotta	ユウスゲ				○	○	○	○	○
<i>Hemerocallis fulva</i> L. var. <i>littorea</i> M. Hotta	ハマカンゾウ				○	○	○	○	○
<i>Hydrangea macrophylla</i> Ser. ssp. <i>serrata</i> Makino	サワアジサイ				○	○	○	○	○
<i>Hypericum pseudopetiolatum</i> R. Kell.	サワオトギリ				○	○	○	○	○
<i>Ilex purpurea</i> Hassk.	ナナムノキ				○	○	○	○	○
<i>Indigofera pseudo-tinctoria</i> Matsum.	コマツナギ				○	○	○	○	○
<i>Ischaemum antheophoroides</i> Miq.	ツクシケカモノハシ				○	○	○	○	○
<i>Ischaemum antheophoroides</i> Miq. var. <i>eristostachyum</i> Honda	ケカモノハシ				○	○	○	○	○
<i>Isodon inflexus</i> Kudo	ヤマハッカ				○	○	○	○	○
<i>Isodon inflexus</i> Kudo f. <i>leucanthus</i> Hara	シロバナヤマハッカ				○	○	○	○	○
<i>Isodon japonicus</i> Hara	ヒキオコシ				○	○	○	○	○
<i>Juniperus conferta</i> Parl.	ハイネズ				○	○	○	○	○

(3) 日本の植物分布から見た種子島の植物

種子島に分布する植物 1,218 種の中、種子島を南限とする植物と北限とする植物を比較してみた。南限とする植物は 181 種で (Table 3), 種子島から奄美大島、沖縄には分布せず台湾に分布する 8 種である。主な薬用植物にはドクダミ *Houttuynia cordata* Thunb., イタドリ *Polygonum cuspidatum* S. et Z., アケビ *Akebia quinata* Decaisne, サンショウ *Zanthoxylum piperitum* DC., ワレモコウ *Sanguisorba officinalis* var. *carnea* Regel, ヒシ *Trapa bispinosa* var. *iinumai* Nakano, ヒキオコシ *Isodon japonicus* Hara, スギナ *Equisetum arvense* L., セッコク *Dendrobium moniliforme* Sw., オニバス *Euryale ferox* Salisb.がある。ドクダミ *Houttuynia cordata* Thunb.は台湾には分布するが沖縄と奄美には分布が確認されていない。

北限とするものは 69 種で (Table 4), シダ植物が多く、シマオオタニワタリ *Asplenium nidus* L., コブラン *Ophioglossum pendulum* L., チャボヘゴ *Cyathea metteniana* C. Chr. et Tard., タイワンクリハラン等の 17 種類がある。裸子植物はオキナワハイネズ *Juniperus taxifolia* var. *lutchuensis* Satake, 被子植物は気根を出すガジュマル *Ficus microcarpa* L. f.を初めとする亜熱帯の植物のモンパノキ *Messerschmidia argentea* Johnston, イボタクサギ *Clerodendrum inerme* Gaertn., オオハマボウ *Hibiscus tiliaceus* L., ポチヨウジ *Psychotria rubra* Poir., ツキイゲ *Spinifex littoreus* Merr., アマミヒトツバハギ *Securinega suffruticosa* Rehd. var. *amamiensis* Hurusawa で、台湾にも分布しているものが多い。北限とした中のセイタカイワヒメ

ワラビは伊豆半島に飛んで分布している。北海道から沖縄まで分布している植物は 216 種で、クロマツ *Pinus thunbergii* Parl., クズ *Pueraria lobata* Ohwi, ゲンノシヨウコ *Geranium nepalense* ssp. *thunbergii* Hara, ハマボウフウ *Glehnia littoralis* Fr. Schmidtex Miq., オオバコ *Plantago asiatica* L., チガヤ *Imperata cylindrica* var. *major* C. E. Hubb., ヤマノイモ *Dioscorea japonica* Thunb.の薬用植物が含まれる。この中の 195 種は台湾まで分布している。

北海道から奄美大島に分布するものはセンブリ *Swertia japonica* Makino, キカラスウリ *Trichosanthes japonica* Regel 等 22 種である。本州から沖縄まで分布する植物は最も多く 420 種で、ヤマモモ *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., オオツツラフジ *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils., クスノキ *Cinnamomum camphora* Presl, クララ *Sophora flavescens* var. *angustifolia* Kitagawa, タチバナ *Citrus tachibana* C. Tanaka, アカメガシワ *Mallotus japonicus* Muell. -Arg., アオキ *Aucuba japonica* Thunb., ハマゴウ *Vitex rotundifolia* L. f., クチナシ *Gardenia jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakai, クサスギズラ *Asparagus cochinchinensis* Merr.等が含まれる。本州から奄美大島ではリンドウ *Gentiana scabra* Bunge var. *buengeri* Maxim., ヤブツバキ *Camellia japonica* L.等 39 種である。四国以南ではヤッコソウ *Mitrastemon yamamotoi* Makino 等 35 種、九州以南ではヘゴ *Cyathea spinulosa* Wall. ex Hook., ソテツ *Cycas revoluta* Thunb., メヒルギ *Kandelia candel* Druce, ビロウ *Livistona chinensis* var. *subglobosa* Becc. 等 96 種である。帰化植物は温帯性のものと、亜熱帯性のものが混在して、102 種である。

多くの植物は屋久島と共通しているが、屋久島に無く種

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaid
<i>Lapsana humilis</i> Makino	ヤブタピラコ				○	○	○	○	○
<i>Luzula capitata</i> Miq.	スズメノヤリ				○	○	○	○	○
<i>Lycopus ramosissimus</i> Makino var. <i>japonicus</i> Kitam.	コシロネ				○	○	○	○	○
<i>Lysimachia clethroides</i> Duby	オカトラノオ				○	○	○	○	○
<i>Macleania cordata</i> R. Br.	タケニグサ				○	○	○	○	○
<i>Mazus miquelii</i> Makino	ムラサキサギゴケ				○	○	○	○	○
<i>Pilea kamaoi</i> Makino	ミズ				○	○	○	○	○
<i>Polygonum nipponense</i> Makino	ヤノネグサ				○	○	○	○	○
<i>Potentilla chinensis</i> Scr.	カワラサイコ				○	○	○	○	○
<i>Potentilla fragarioides</i> L. var. <i>major</i> Maxim.	キジムシロ				○	○	○	○	○
<i>Potentilla freyniana</i> Borm.	ミツバツチグリ				○	○	○	○	○
<i>Pyrola japonica</i> Klenze	イチヤクソウ				○	○	○	○	○
<i>Quercus dentata</i> Thunb.	カシワ				○	○	○	○	○
<i>Rhododendron kaempferi</i> Planch.	ヤマツツジ				○	○	○	○	○
<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	ノイバラ				○	○	○	○	○
<i>Rosa multiflora</i> Thunb. f. <i>rosipetala</i> Honda	ウスアカノイバラ				○	○	○	○	○
<i>Rubus crataegifolius</i> Bunge	クマイチゴ				○	○	○	○	○
<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	ワレモコウ				○	○	○	○	○
<i>Scutellaria dependens</i> Maxim.	ヒメナミキ				○	○	○	○	○
<i>Solidago virga-aurea</i> L. var. <i>asiatica</i> Nakai	アキノキリンソウ				○	○	○	○	○
<i>Tillaea aquatica</i> L.	アズマツメクサ				○	○	○	○	○
<i>Trapa japonica</i> Flerov	ヒシ				○	○	○	○	○
<i>Tylophora aristolochioides</i> Miq.	オオカモメツル				○	○	○	○	○
<i>Viburnum dilatatum</i> Thunb.	ガマズミ				○	○	○	○	○
<i>Viburnum erosum</i> Thunb.	コバノガマズミ				○	○	○	○	○
<i>Viola grypoceras</i> A. Gray	タチツボスミレ				○	○	○	○	○
<i>Viola obtusa</i> Makino	ニオイタチツボスミレ				○	○	○	○	○
<i>Viola phalacrocarpa</i> Maxim.	アカネスミレ				○	○	○	○	○
<i>Viola verecunda</i> A. Gray	ツボスミレ				○	○	○	○	○
<i>Vitis ficifolia</i> Bunge var. <i>lobata</i> Nakai	エビツル				○	○	○	○	○
<i>Youngia denticulata</i> Kitam.	ヤクシソウ				○	○	○	○	○
<i>Zanthoxylum piperitum</i> DC.	サンショウ				○	○	○	○	○

子島に分布する植物もある。南限の植物としてはヤマヤナギ *Salix sieboldiana* Bl., ワレモコウ *Sanguisorba officinalis* var. *carnea* Regel, ハマサジ *Limonium tetragonum* A. A. Bull., オニバス *Euryale ferox* Salisb., ミツバツチグリ *Potentilla freyniana* Bormm., タコノアシ *Penthorum chinense* Pursh, クマイチゴ *Rubus crataegifolius* Bunge, ハマベノギク *Heteropappus hispidus* Less. ssp. *arenarius* Kitam., コジイ *Castanopsis cuspidata* Schottky, ヒロハイヌノヒゲ *Ericcaulon robusifus* Makino, ノヒメユリ *Lilium callosum* Sieb. et Zucc., マルバウツギ *Deutzia scabra* Thunb., アケビ *Akebia quinata* Dence., ヤマツツジ *Rhododendron kaempferi* Planch., オトコエシ *Patrinia villosa* Juss., サワアジサイ *Hydrangea macrophylla* Seringe ssp. *serrata* Makino, シラヤマギク *Aster scaber* Thunb., ハイネズ *Juniperus conferta* Parl., ノコンギク *Aster ageratoides* Turcz. ssp. *ovatus* Kitam., コナミキ *Scutellaria guilielmii* A. Gray, ニワトコ *Sambucus racemosa* L. ssp. *sieboldiana* Hara 等である。北限の植物はタカツラン *Galeola altissima* Reichb. f., レンギョウエビネ *Calanthe lyroglossa* Reichb. f., ヒメムヨウラン, イモネヤガラ *Eulophia zollingeri* J. J. Sm., ミヤコジマニシキソウ *Euphorbia vachellii* Hook. et Arn., モンパノキ *Messerschmidia argentea* Johnston, イボタクサギ *Clerodendrum inerme* Gaertn., タンゲブ *Campanumoea javanica* Bl., オオキバナムカシヨモギ *Blumea conspicua* Hay., ヒメミチヤナギ *Polygonum plebeium* R. Br., アマミヒトツバハギ *Securinega suffruticosa* Rehd. var. *amamiensis* Hurusawa, イルカンド *Mucuna macrocarpa* Wall., ヤンバル

ガラシ *Coronopus wrightii* Hara, ハイシバ *Lepturus repens* R. Br., ソナレシバ *Sporobolus virginicus* Kunth, ホウキガヤツリ *Cyperus distans* L. f., ケタデ *Polygonum barbatum* L., アカバシスラン *Cheirostylis liukuensis* Masamune, シナクスモドキ *Cryptocarya chinensis* Hemsl.等が屋久島には見られない。

北海道から沖縄¹⁰⁾まで分布しているものは 22 %, 北海道から奄美諸島までは 1.8 %, 本州から沖縄までは 34 %, 本州から奄美諸島までは 3.2 %, 四国以南は 2.9 %, 九州以南は 3.2 %であった。

南限植物は 16 %, 北限植物は 7.1 %で, 南限が北限の 2 倍以上であることは北の要素が多いことを示しており, 例えば, スギ *Cryptomeria japonica* D. Don, コナラ *Quercus serrata* Thunb. ex Murray 等を代表とする日本植物要素の南限が屋久島及び種子島であると述べている中井や初島の説を裏付けることができる。

屋久島, 種子島の植物と奄美大島の植物はトカラ海峡で洪積世に分けられ, その後植物が環境の変異で独自に適正化して現在のフローラになった。なお, トカラ列島は中積世の火山活動でできたため, 特異な植物の分布は見られない。

(4) 自然環境から見た種子島, 屋久島

種子島は平地が多いので開発が進み, 自然環境はわずかに溪谷や川岸及び海岸付近に見られる。南種子町の大星海岸でイソマツ約 10 株を発見 (1987 年), この付近にはスナヅル, ノアサガオなど多くの植物が自生している。御崎海

Table 3-2 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (2. from Honsyu to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Alnus sieboldiana</i> Matsum.	オオバヤシャブシ				○	○	○	○	
<i>Alopecurus japonicus</i> Steud.	セトガヤ				○	○	○	○	
<i>Ampelopsis leoides</i> Planch.	ウドカズラ				○	○	○	○	
<i>Arisaema japonicum</i> Bl.	マムシグサ				○	○	○	○	
<i>Arisaema thunbergii</i> Bl. ssp. <i>thunbergii</i>	ナンゴクウラシマソウ				○	○	○	○	
<i>Aristolochia kaempferi</i> Willd.	オオバウマノスズクサ				○	○	○	○	
<i>Aster ageratoides</i> Turcz. ssp. <i>amplexifolius</i> Kitam.	イナカギク				○	○	○	○	
<i>Aster ageratoides</i> Turcz. ssp. <i>ripensis</i> Kitam.	タニガワコンギク				○	○	○	○	
<i>Beckmannia syzigachne</i> Fern.	ミノグメ (カズノコグサ)				○	○	○	○	
<i>Boehmeria holosericea</i> Bl.	オニヤブマオ				○	○	○	○	
<i>Broussonetia kazinoki</i> Sieb.	コウゾ				○	○	○	○	
<i>Bulbophyllum inconspicuum</i> Maxim.	ムギラン				○	○	○	○	
<i>Bulbophyllum japonicum</i> Makino	ミヤマムギラン				○	○	○	○	
<i>Calanthe aristulifera</i> Reichb. f.	キリシマエビネ				○	○	○	○	
<i>Carex gibba</i> Wahlenb.	マスクサ				○	○	○	○	
<i>Carex tei n. ogyna</i> Boott	フサナキリスゲ				○	○	○	○	
<i>Carpesium rosulatum</i> Miq.	ヒメガンクビソウ				○	○	○	○	
<i>Castanopsis cuspidata</i> Schottky	ツブラジイ				○	○	○	○	
<i>Cirsium japonicum</i> DC.	ノアザミ				○	○	○	○	
<i>Clematis apiifolia</i> DC.	ボタンツル				○	○	○	○	
<i>Conyza sumatrensis</i> Walker	オオアレチノギク				○	○	○	○	
<i>Corydalis heterocarpa</i> Sieb. & Zucc.	ツクシケマン				○	○	○	○	
<i>Cymbidium nipponicum</i> Makino	マヤラン				○	○	○	○	
<i>Cynanchum purpurascens</i> Morren et Decusiens	クロバナイヨカズラ				○	○	○	○	
<i>Cyperus microiria</i> Steud.	カヤツリグサ				○	○	○	○	
<i>Dendrobium moniliforme</i> Sw.	セッコク				○	○	○	○	
<i>Deutzia scabra</i> Thunb.	マルバウツギ				○	○	○	○	
<i>Dianthus japonicus</i> Thunb.	フジナデシコ				○	○	○	○	
<i>Elaeagnus nikaii</i> Nakai	オオナワシログミ				○	○	○	○	
<i>Elaeagnus pungens</i> Thunb.	ナワシログミ				○	○	○	○	
<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf. var. <i>japonicum</i> Milde	イヌドクサ				○	○	○	○	
<i>Eriocaulon atrum</i> var. <i>intermedium</i> Nakai	サイコククロイヌノヒゲ				○	○	○	○	
<i>Eriocaulon miquelianum</i> Koem.	イヌノヒゲ				○	○	○	○	
<i>Eriocaulon parvum</i> Koern.	クロホシクサ				○	○	○	○	

Not distributed in Yaku shima

岸ではアマミヒトツバハギ, ハマカンゾウ, ヨナクニハギカズラ, 野木崎海岸の岩礁にハママンネングサ, 門倉岬にはイタドリ, 深川海岸にはハマサジが見られる。阿武鋤川河口ではアイアシの自生が見られ, メヒルギ, ハマボウ, クチナシ, シマエンジュ, ケウバメガシ, シチトウイ, オオアブラガヤ, ススキ, シオクグ, クモノギク, タイワンカモノハシ, リュウキュウチク, ホウライチクが見られた (1983年)。サダソウは立山海岸で (1983年), スナヅルは熊野海岸, 大崎海岸 (1982年) で観察された。溪谷の植物はキノボリシダをはじめ多くのシダ類が目立ち, 屋久川学術参考林ではツチアケビ, イモネヤガラ, ヤクシマラン, ヤクシマアカシユスラン, シマシユスラン, シユスラン, ヤッコソウが確認された (1979年)。この他西之表市万波鍋割学術林, 中種子町の熊野山に多くの自生植物が保護されている。我々の試験場内にもこれらに匹敵する自生植物が生育している。

屋久島は山地と溪谷が植物の種の分化を促しており, 固有種は種子島に比べて多い。高地ではヤクザサがあり, 溪流では葉が細くなった, 種の分化の過程と思われるサルトリイバラ *Smilax china* の葉が狭くなったものや, 正宗²⁾ がキッコウハグマ *Ainsliaea apiculata* の変異に, トウザキキッコウハグマ *f. scapifolia* Masamune, タギョウキッコウハグマ *var. multiscapa* Masamune, モミジバキッコウハグマ *var. acerifolia* Masamune, モマタマゴバキッコウハグマ *var. ovatifolia* Masamune があり, 種として分化し, 屋久島の固有種となったホソバハグマ *Ainsliaea fauriana* Beauverd がある。

海岸まで断崖の島である屋久島と平坦であるが多くの自然植生を残す種子島は, 北では礼文島と利尻島の関係に類似し, 高地性のケシ属 *Papaver* は利尻島で, 平地の固有種は礼文島に多く見られることと似ている。南では高地の有る西表島と平地の多い石垣島がこの関係にある。ヤシ科のヤエヤマヤシ *Satakenia liukuensis* は両島に見られるが, 深い溪流に見られる葉の細くなる溪流型の変異は石垣島には少なく, 西表島で多く見られ, 屋久島と種子島の植物の変異に類似している。

(5) 世界及び日本の植物区系からみた種子島及び屋久島の植物

世界の植物区系とその代表的薬用植物はエングラーの1964年の区系がある。これによると世界をI. 北帯, II. 旧熱帯, III. 新熱帯, IV. 南帯, V. 南極帯, VI. 南アフリカ帯の6地区に分けている。日本は北帯に属し, 北帯は熱帯を除く北半球で, 年平均気温線 20℃より北の区域で, 暖帯, 温帯, 亜熱帯および寒帯で, 更に細分して, 東部アジア区 (ヒマラヤ以東で, 中国北部および中部, 朝鮮半島, 日本を含む地域) でその代表的薬用植物はイチョウ, シヤクヤク, ボタン, オウレン類, チョウセンゴミシ, ダイオウ, ホオノキ類である。

日本の植物区系は7種に区分出来る。

タイプIは北海道のみに分布する植物分布地域で, エゾウコギ, エゾトリカブト, エゾシモツケ, チシマセンブリ, エゾノヨモギギク, アカエソマツ, エゾマツである。

タイプIIは屋久島以北に分布する植物分布地域で, ハシ

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Eriocaulon senile</i> Honda	ゴマシオホシクサ				○	○	○	○	○
<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	トウダイグサ				○	○	○	○	○
<i>Fatsia japonica</i> Decne. et Planch.	ヤツデ				○	○	○	○	○
<i>Galeola septentrionalis</i> Reichb. f.	ツチアケビ				○	○	○	○	○
<i>Heteropappus hispidus</i> Less. ssp. <i>arenarius</i> Kitam.	ハマベノギク				○	○	○	○	○
<i>Illicium anisatum</i> L.	シキミ				○	○	○	○	○
<i>Ischaemum aristatum</i> L. var. <i>glaucum</i> T. Koyama	カモノハシ				○	○	○	○	○
<i>Lecanorchis japonica</i> Bl.	ムヨウラン				○	○	○	○	○
<i>Lespedeza cyrtobotrya</i> Miq.	ミヤマハギ				○	○	○	○	○
<i>Lespedeza cuneata</i> G. Don var. <i>serpens</i> Ohwi	ハイメドハギ				○	○	○	○	○
<i>Lyonia ovalifolia</i> Drude var. <i>elliptica</i> Handel-Mazz.	ネジキ				○	○	○	○	○
<i>Matricaria inodora</i> L.	イヌカミツレ				○	○	○	○	○
<i>Microlepia marginata</i> C. Chr. var. <i>yakusimensis</i> H. Ito	ケブカフモトシダ				○	○	○	○	○
<i>Monotropa uniflora</i> L.	ギンリョウソウモドキ				○	○	○	○	○
<i>Nervilia nipponica</i> Makino	ムカゴサイシン				○	○	○	○	○
<i>Pellionia minima</i> Makino	サンショウソウ				○	○	○	○	○
<i>Perilla frutescens</i> Britt. var. <i>citriodora</i> Ohwi	レモンエゴマ				○	○	○	○	○
<i>Petasites japonicus</i> Maxim.	フキ				○	○	○	○	○
<i>Picris hieracioides</i> L. var. <i>japonica</i> (Thunb.) Regel	ケナシコウゾリナ				○	○	○	○	○
<i>Picris hieracioides</i> L. var. <i>glabrescens</i> (Regel) Ohwi	コウゾリナ				○	○	○	○	○
<i>Plagiogyria x wakabae</i> Kurata ex Nakaïke	アイキジノオ				○	○	○	○	○
<i>Pleioblastus simonii</i> Nakai	メダケ				○	○	○	○	○
<i>Polygonum sieboldi</i> Meisn. var. <i>sericeum</i> Nakai	アキノウナギツカミ				○	○	○	○	○
<i>Quercus acutissima</i> Carr.	クヌギ				○	○	○	○	○
<i>Quercus gilva</i> Bl.	イチイガシ				○	○	○	○	○
<i>Quercus glauca</i> Thunb.	アラカシ				○	○	○	○	○
<i>Rohdea japonica</i> Roth	オモト				○	○	○	○	○
<i>Rorippa islandica</i> Borbas	スカシタゴボウ				○	○	○	○	○
<i>Rosa luciae</i> Fr. et Ro. var. <i>onoei</i> Momiyama	ヤブイバラ				○	○	○	○	○
<i>Sceptridium japonicum</i> Lyon	オオハナワラビ				○	○	○	○	○
<i>Sciaphila japonica</i> Makino	ホンゴウソウ				○	○	○	○	○
<i>Scutellaria parvifolia</i> Koidz.	コバナツツナミ				○	○	○	○	○
<i>Selaginella nipponica</i> Fr. et Sav.	タチクラムゴケ				○	○	○	○	○
<i>Semiaquilegia adaxoides</i> Makino	ヒメウス				○	○	○	○	○
<i>Urtica thunbergiana</i> Sieb. et Zucc.	イラクサ				○	○	○	○	○
<i>Utricularia aurea</i> Lour.	ノタヌキモ				○	○	○	○	○

Not distributed in Yaku shima

リドコロ、オケラ、ウラシマソウ、フタバアオイ、フシグロセンノウ、ダンコウバイ、クサアジサイ、サワダツ、ホツツジ、ホタルカズラ、アケボノソウ、ジャコウソウ、ツルカノコソウ、モミジガサ、フクオウソウ、ツクバネソウ、クマガエソウである。この中で北海道の北部から九州まで分布する植物はホガエリガヤとハマボウフウ等の少数の植物のみで、他の植物は北海道の南部から南に分布している。

タイプⅢは本州以西の区域で、種子島、屋久島以北に分布するもので、A及びBに細分し、タイプⅢ-Aとして福島、栃木、群馬、長野、岐阜、福井各県を境とする地域の南または西に分布する植物分布地域の太平洋側要素で、日本海側は能登半島以西である。ここにはキミズ、カナクキノキ、ジンジソウ、イヨフウロ、ササノハカエデ、ナガバノスミレサイシン、シコクスミレ、イワセントウソウ、ヒカゲツツジ、サワリソウ、ヤブムラサキ、タニジャコウソウ、オカタツナミソウ、イワタバコ、アリドオシ、イナモリソウ、ヤハズハハコ、ハンカイソウ、ナガバノコウヤボウキ、ウチョウラン、ヤツデがある。

タイプⅢ-Bは静岡県、愛知県、岐阜県の南側または岐阜県の西側および石川、富山、新潟各県の日本海側を境と

する地域に分布する植物分布地域で低地または丘陵地に生育する植物が多い。ここにはヤマトグサ、ヤマアイ、ウツボグサ、ヤブミョウガ、ササユリがある。

タイプⅣは神奈川、山梨、静岡、愛知、三重、奈良、和歌山各県および瀬戸内海、関門海峡を境とする地域の南または西に分布する植物分布地域で襲隼紀要素といわれるもので、種子島、屋久島以北に分布するものがある。ここにはミツバコンロンソウ、イワユキノシタ、チドリノキ、ヒメシャラ、ヒコサンヒメシャラ、コイワザクラ、イワザクラ、ヤマジオウ、タテヤマギク、テバコモミジガサ、ナベワリ、コバイモ、タチバナがある。

タイプⅤは本州中部要素でA、B及びCに細分し、タイプⅤ-Aは富士、伊豆、箱根地方に分布する植物分布地域である。ここにはオトメアオイ、マツノハマンネングサ、ヒトスバシヨウマ、ウメウツギ、サンシヨウバラ、ハコネグミ、アシタカツツジ、ハコネコメツツジ、アシタカジャコウソウである。タイプⅤ-Bは福島県、栃木県、群馬県、長野県、岐阜県、愛知県、県を境とする地域の南または西に分布する植物分布地域で、ここにはシバヤナギ、ムカゴネコノメ、ミヤマウコギ、イワナンテン、キヨスミツバ

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkkaido
<i>Utricularia exoleta</i> R. Br.	ミカワタヌキモ				○	○	○	○	
<i>Veronica linariaefolia</i> Pall. ex Link	ホソバヒメトラノオ				○	○	○	○	
<i>Viola japonica</i> Langsd.	コスミレ				○	○	○	○	
<i>Viola mandshurica</i> W. Beck. var. <i>triangularis</i> Mizushima	アツバスミレ				○	○	○	○	
<i>Viola maximowicziana</i> Makino	コミヤマスミレ				○	○	○	○	
<i>Viola yedoensis</i> Makino	ノジスミレ				○	○	○	○	
<i>Zanthoxylum × fauriei</i> Ohwi	コカラスザンシヨウ				○	○	○	○	
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> S. et Z.	イヌザンシヨウ				○	○	○	○	

Table 3-3 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (3. from Shikoku to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkkaido
<i>Amorphophalus kiusianus</i> Makino	ヤマコンニャク				○	○	○		
<i>Dendranthema occidentale-japonense</i> Kitam.	ノジギク				○	○	○		
<i>Lilium speciosum</i> Thunb.	カノコユリ				○	○	○		
<i>Ludwigia decurrens</i> Walt.	ヒレタゴボウ				○	○	○		
<i>Weigela coraeensis</i> Thunb.	ハコネウツギ				○	○	○		

Table 3-4 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (4. from Kyusyu to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkkaido
<i>Buddleja curviflora</i> Hook. et Arn.	コフジウツギ				○	○			
<i>Calanthe japonica</i> Blume	ヒロハノカラン				○	○			
<i>Camellia japonica</i> L. var. <i>macrocarpa</i> Masamune	リンゴツバキ				○	○			
<i>Cinnamomum × durifruticicola</i> Hatusima.	ヒロハヤブニッケイ				○	○			
<i>Cryptocarya chinensis</i> Hemsl.	シナクスモドキ				○	○			
<i>Cynanchum austrokiusianum</i> Koidz.	ナンゴクカモメズル				○	○			
<i>Epipactis thunbergii</i> A. Gray f. <i>subconformis</i> Sakata	イソマカキラン				○	○			
<i>Habenaria monticola</i> Ridl.	ダケトンボ				○	○			
<i>Hetaeria agyokuana</i> K. Nakajima	カゲロウラン				○	○			
<i>Heteropappus hispidus</i> Less.	ヤマジノギク				○	○			
<i>Lactuca raddeana</i> Maxim. var. <i>raddeana</i>	チョウセンヤマニガナ				○	○			
<i>Lygodium japonicum</i> Sw. f. <i>elongatum</i> Rosenst.	テリハカニクサ				○	○			
<i>Oplismenus undulatifolius</i> Roem. et Schult. var. <i>japonicus</i> Koidz.	コチヂミザサ				○	○			
<i>Oplismenus undulatifolius</i> Roem. et Schult. var. <i>microphyllus</i>	チャボチヂミザサ				○	○			
<i>Osmanthus rigidus</i> Nakai	オオモクセイ				○	○			
<i>Pteris × namegatae</i> Kurata	イブスキキノモトソウ				○	○			
<i>Rhododendron indicum</i> Sweet	マルバサツキ				○	○			
<i>Rosa thoryi</i> Tratt var. <i>cathayensis</i> (Rehd. et Wils.) Hatusima	ツクシサクラバラ				○	○			
<i>Salix sieboldiana</i> Bl.	ヤマヤナギ				○	○			
<i>Wikstroemia ganpi</i> Maxim.	イヌガンピ				○	○			

ツツジ, トウゴクミツバツツジ, ハンカイシオガマ, シロバナイナモリソウ, キバナウツギ, イワシャジン, ウラハグサ, スルガテンナンショウがある. タイプV-Cは福島県, 新潟県以西で, 愛知県, 三重県, 奈良県, 京都府以東に分布する植物 分布地域で, タマアジサイ, ハルユキノシタ, ヤマホタルブクロ, フジアザミ, イトイがある.

タイプVIは福井県, 滋賀県, 愛知県以北に分布する植物 分布地域で北方要素といわれるもので, ヤグルマソウ, ドクウツギ, イワウチワ, ウスユキノソウ, マルバダケブキ, ハンゴンソウ, ヤマユリ, ホザキイチョウラン, アリドオシラン, オノエランがある.

タイプVIIは南西諸島に分布する植物 分布地域でトカラ海峡以南の地域のもので, ハバカズラア, ヤハズカズラ, イジュ, リュウキュウアオキ, リュウキュウモチ, タカワラビ, シバニッケイ, グミモドキ, キュウキュウガキ, サルカケミカンが挙げられる.

(6) 栽培植物から見た種子島

種子島薬用栽培試験場で 45 年間に渡って栽培してきた薬用植物は温帯要素としてはキハダ, ミシマサイコ, ケシ, オオカラスウリ, ドクダミ, トウキ, ニッケイ等があり, 熱帯・亜熱帯の植物としてはインドジャボク, ウコン, ガジュツ, サンピロート, クスノハガシワ, ハズ, ゲッキツ, カンラン, レイシ, レモンガラス, セイロンニッケイ等が圃場や標本園で生育している. 無加温のビニールハウスではビヤクダン, コカノキ, クミスクチン, キャッサバ, クスリウコン等が生育可能である. 加温を要するものにはチョウジ, トコン, アカキナノキ, コショウ, ショウズク, イランイランノキ等などがある.

本州では冬季に休眠するミシマサイコやツルドクダミが周年生育し, トウゴマやニチニチソウなど1年草とされているものが多年草になる.

種子島の植物の多様性はすでに述べてきたが, これは地理的に, また気象学的に極めて微妙な位置にあり平均気温は約 20℃ (過去の極値は, -1.6℃, 35.0℃). 降雨量は約 2,500 mm という, 植物の生育に好条件であることなどがあげられる.

このような環境条件の下, 当薬用植物栽培試験場は設置以来, 内外の有用植物の収集・保存・栽培に努めてきた. 以下に, 主要な品目について記す (特に記していない場合は露地栽培である) とおり, 南北の重要な薬用植物の生育が可能な貴重な地である.

インドジャボク *Rauwolfia serpentina*: 冬季, 地上部の1部は枯死するが, 春萌芽し, 実生4~5年で収穫可能となる. *R. canescens*, *R. perakensis*, *R. verticillata* も同様の生育をする.

セイロンニッケイ *Cinnamomum zeylanicum*: 露地での生育は緩慢で実用性はないが, 冬季の傷みも少なく, 遺伝子資源としての保存は可能である.

シナニッケイ *Cinnamomum cassia*: 腐植質に富み, 排水良好な土壌で, 空気がよどみ, 冬季温暖な場所では, 良好な生育をしている.

ニッケイ *Cinnamomum okinawense*: シナニッケイと同様な環境で非常に良好な生育をしている. 1968年秋播種し, 1972年3月定植した個体群の最大株は1999年5月現在, 樹高14.5m, 地上1.5mで135cmの幹周りとなっている. 塩害とその回復力は弱い.

ガジュツ *Curcuma zedoaria*, ウコン *C. longa*: 根茎は, 暖冬の年は傷まず越冬するが, 寒い年のガジュツは一部腐敗する. 越冬のための防寒対策は簡素でよい.

ヤクチ *Alpinia oxyphylla*, コウリョウキョウ *A. officinarum*: 冬季も傷むことなく越冬し, 生育旺盛である. ヤクチはよく結実する.

クミスクチン *Orthosiphon grandiflorus*: 暖冬の年は, 落

Table 3-5 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (5. Island Hachijyo and both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwann	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Goodyera hachijoensis</i> Yatabe	ハチジョウシュスラン								○

Table 3-6 Distributed limit line northern Element in Island Tanegashima and Yakushima (6. Taiwan and both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwann	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Callicarpa japonica</i> Thunb.	ムラサキシキブ	○			○	○	○	○	○
<i>Dennstaedtia hirsuta</i> Mett. ex Miq.	イヌシダ	○			○	○	○	○	○
<i>Euryale ferox</i> Salisb.	オニバス				○	○	○	○	
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	ドクダミ				○	○	○	○	
<i>Phiheiospermum japonicum</i> Kanitz	コシオガマ				○	○	○	○	○
<i>Pilea petiolaris</i> Bl.	ミヤマミズ				○	○	○	○	
<i>Pteris tokioi</i> Masamune	ヒカゲアマクサシダ				○	○	○	○	
<i>Quercus acuta</i> Thunb.	アカガシ				○	○	○	○	
<i>Schizophragma hydrangeoides</i> Sieb. et Zucc.	イワガラミ				○	○	○	○	○
<i>Senecio pierotii</i> Miq.	サワオグルマ				○	○	○	○	
<i>Uncaria rhynchophylla</i> Miq.	カギカズラ				○	○	○	○	

葉するものの、枝枯れもなく、春には萌芽する。しかし、寒い年はほとんど枯死する。

カンラン *Canarium album*：近年まで九州南部で散見されたが、今日での成株の確認は当薬用植物栽培試験場にある個体群のみである。成株には、播種後約10年を要する。

キナノキ *Cinchona sp.*：真夏・真冬にやや疲弊するが、露地で十分生育する。

ビャクダン *Santalum album*：温室に導入後32年になる国内最大の成木が生育し、開花結実が良好で、各地に種苗の配布を行っている。すでに心材が形成され香る。露地での苗の越冬は困難であるが、無加温で傷まず越冬し、良好な生育をする。

ナンバンサイカチ *Cassia fistula*：根挿し5年ほどで開花する。越冬は問題ない。

ミシマサイコ *Bupleurum falcatum*：島内に自生はない。冬季も枯死せず、緩慢ではあるが生長を続ける。生薬はしっかりとし、しなやかで、非常に良質との評価を得ている。

終わりに

南西諸島の代表的な植物のマングローブ植物のメヒルギが九州南部の無霜地帯に分布することや屋久島、種子島の常緑広葉樹林の植生と類似していることから、1月の平均気温8℃、年平均気温18℃の線以南は同一区と考えることも出来る。世界の植生から考えると暖かさの指数で亜熱帯とされる180の線がトカラ海峡にあるので、この地域も亜熱帯型の植物区とも言える。

日本の植物（維管束植物）の総数は5,500種であるが、種子島にはその約22%の1,218種が分布しており、ひとつの島としては、屋久島、西表島に匹敵する植物数である。屋久島がスギをはじめとする山地の植物の自然が保存されているのに対して、種子島は平地の植物が屋久島より豊富で、メヒルギ、ハマジンチョウ、モンバノキ、イボタクサギがそれに属する。屋久島と種子島が一体となって、日本植物区系の代表的な要素の南限を示す地域であること、固

有種があること、北限の植物も小さい島のわりには多いことと植物地理的に非常に貴重な存在であり、その植物資源を大切にし、有用に活用したいものである。

35年前に植えた種子島野生のニッケイが試験場の溪谷の斜面に純林を形成し、一部には熱帯植物特有の板根をなしているものも観察された。このニッケイはかつては和漢薬の原料として広く使われてきたものであるが、中国からシナニッケイが輸入されるようになり、需要がなくなった植物であるが、医薬資源として、伝統的医療の中での使用や新しい薬効の発見に利用したいものである。種子島の自然の中で保存されてきた貴重な資源を有効に利用したいものである。

医薬資源の確保と自然との調和に関して、我々は平成10年11月20日に西表宣言を発表し、具体的な薬用植物の利用と保護、知識の普及の必要性を述べてきたが、この総説もこの一環である。

文 献

- 1) 中井猛之進：東亜植物区景，岩波書店，東京，p.34-39，昭和9年
- 2) 初島住彦，中島邦夫：琉球の植物，講談社，東京，pp.34-39 pp.180-181（1979）
- 3) 正宗巖景：台北大学紀要，11，1-634（1934）
- 4) 佐々木舜一，大内山茂樹：九州農試報，2-1，1-45（1953）
- 5) 高城正勝，鍋木紘一：衛生試験所報告，83，157-164，（1965）
- 6) 鍋木紘一，高城正勝：衛生試験所報告，98，154-172，（1980）
- 7) 初島住彦：鹿児島植物目録（改訂），鹿児島植物同好会（1986）
- 8) Hui-Lin Li, Tang-Shui Liu, Tseng-Chiang Huang, Tesuo Koyama, Charles E Devol: Flora of Taiwan, 1-6, Epoch Publishing Co., Ltd. Taipei（1975）
- 9) 初島住彦：鹿児島の自然，鹿児島県理科教育会，鹿児島島，pp.58-64（1964）
- 10) 初島住彦，天野鉄也：琉球植物目録，でいご出版社，沖縄（1977）

Table 4-1 Distributed limit line southern Element in Island Tanegashima and Yakushima (1. from Taiwan to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Anoetochilus inabae</i> Hay.	イナバラン	○	○	○	○			
<i>Asarum yakusimense</i> Masam	ヤクシマアオイ	○	○	○	○			
<i>Asplenium cheilosorum</i> Kunze ex Mett.	ウスバクジャク	○	○	○	○			
<i>Asplenium nidus</i> L.	シマオオタニワタリ	○	○	○	○			
<i>Blumea conspicua</i> Hay.	ツルヤブタバコ	○	○	○	○			
<i>Blumea lacera</i> DC. var. <i>blumei</i> DC.	サケバコウゾリナ	○	○	○	○			
<i>Bulbophyllum macraei</i> Reichb. f.	シコウラン	○	○	○	○			
<i>Campanumoea lancifolia</i> Merr.	タンゲブ	○	○	○	○			
<i>Carex crucitata</i> Wahlenb.	ハナビスゲ	○	○	○	○			
<i>Cassytha filiformis</i> L.	スナツル	○	○	○	○			
<i>Centaurium japonicum</i> Druce	ホウライセンブリ	○	○	○	○			
<i>Cheirostylis liukuensis</i> Masam	タネガシマカイロラン	○	○	○	○			
<i>Clerodendrum inerme</i> Gaertn.	イボタクサギ	○	○	○	○			
<i>Codonacanthus pauciflorus</i> Ness	アツモリソウ	○	○	○	○			
<i>Cornopteris opaca</i> Tagawa	ナンゴクシケチシダ	○	○	○	○			
<i>Coronopus integrifolius</i> Spreng.	ハマガラシ	○	○	○	○			
<i>Cyathea metteniana</i> C. Chr. & Tard.	チャボヘゴ	○	○	○	○			
<i>Cyperus distans</i> L. f.	ホウキガヤツリ	○	○	○	○			
<i>Diplazium donianum</i> Tard. -Blot. var. <i>aphanoneuron</i> Tagawa	アツバキノポリシダ	○	○	○	○			
<i>Diplosora dubia</i> Masam.	シロミミズ	○	○	○	○			
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq.	ハウチワノキ	○	○	○	○			
<i>Eria corneri</i> Reichb. f.	ホザキオサラン	○	○	○	○			
<i>Euphorbia atoto</i> Forst. f.	ハマタイゲキ	○	○	○	○			
<i>Euphorbia vachellii</i> Hook. & Arn.	ミヤコジマニシキソウ	○	○	○	○			
<i>Ficus microcarpa</i> L. f.	ガジュマル	○	○	○	○			
<i>Galeola altissima</i> Reichb. f.	タカツラン	○	○	○	○			
<i>Hedyotis tenelliflora</i> Bl.	ケニオイグサ	○	○	○	○			
<i>Hydrangea macrophylla</i> Seringe ssp. <i>serrata</i> Makino	ヤマアジサイ	○	○	○	○			
<i>Ipomoea stolonifera</i> J.F.Gmel.	アツバアサガオ	○	○	○	○			
<i>Lagerstroemia subcostata</i> Koehne var. <i>fauriei</i> Hatusima ex Yahara	ヤクシマサルスベリ	○	○	○	○			
<i>Lasianthus fordii</i> Hance	タシロルリミノキ	○	○	○	○			
<i>Lilium longiflorum</i> Thunb.	テップウユリ	○	○	○	○			
<i>Lindernia anagallis</i> Penn.	シマウリクサ	○	○	○	○			
<i>Lindsaea javanensis</i> Bl.	サンカクホングウシダ	○	○	○	○			
<i>Lindsaea orbiculata</i> Mett. ex Kuhn	マルバホングウシダ	○	○	○	○			
<i>Lindsaea orbiculata</i> Mett. ex Kuhn var. <i>commixta</i> Kramer	シンエダウチホングウ	○	○	○	○			
<i>Lysimachia decurrens</i> Forst. f.	シマギンレイソウ	○	○	○	○			
<i>Messerschmidia argentea</i> Johnst.	モンバノキ	○	○	○	○			Not distributed in Yaku shima
<i>Morinda umbellata</i> L.	ハナガサノキ	○	○	○	○			
<i>Mucuna macrocarpa</i> Wall.	クズモダマ	○	○	○	○			
<i>Murdannia loriformis</i> R. Rao. et Kammathy	シマイボクサ	○	○	○	○			
<i>Mussaenda parviflora</i> Miq.	コンロンカ	○	○	○	○			
<i>Ophioglossum pendulum</i> L.	コブラン	○	○	○	○			
<i>Phaius tancarvilleae</i> Bl.	カクラン	○	○	○	○			
<i>Pinus armandii</i> var. <i>amamiana</i> Hatusima	アツバキノポリシダ	○	○	○	○			
<i>Polygonum plebeium</i> R. Br.	ヤンバルミチヤナギ	○	○	○	○			
<i>Psychotria rubra</i> Poir.	ボチョウジ	○	○	○	○			
<i>Pteris semipinnata</i> L.	オオアマクサシダ	○	○	○	○			
<i>Rubus grayanus</i> Maxim.	センロンベンケイ	○	○	○	○			
<i>Securinega suffruticosa</i> Rehd. var. <i>amamiensis</i> Hurusawa	アマミヒトツバハギ	○	○	○	○			
<i>Selaginella doederleinii</i> Hieron.	オニクラマゴケ	○	○	○	○			
<i>Sida rhombifolia</i> L. ssp. <i>insularis</i> Hatusima	ハイキンゴジカ	○	○	○	○			
<i>Spinifex littoreus</i> Merr.	ツキイゲ	○	○	○	○			
<i>Symplocos cochinchinensis</i> var. <i>philippinensis</i> Noot.	アオバナノキ	○	○	○	○			
<i>Vigna angularis</i> var. <i>nipponensis</i> Ohwi et Ohashi	ヤブツルアズキ	○	○	○	○			
<i>Zoysia sinica</i> Hance	コオニシバ	○	○	○	○			

Table 4-2 Distributed limit line southern Element in Island Tanegashima and Yakushima (2. from Okinawa to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Carex ischnostachya</i> Steud. var. <i>fastigiata</i> T. Koyama	オキナワジュズスゲ		○	○	○				
<i>Goodyera hachijoensis</i> Yatabe var. <i>matsumurana</i> Ohwi	アカバシユスラン		○	○	○				
<i>Juniperus taxifolia</i> Hook et Arn. var. <i>lutchuensis</i> Satake	オキナワハイネズ		○	○	○				
<i>Rubus grayanus</i> Maxim.	リュウキュウイチゴ		○	○	○				
<i>Selaginella lutchuensis</i> Koidz.	ヒメムカデクラマゴケ		○	○	○				
<i>Zeuxine flava</i> Benth.	イシガキキヌラン		○	○	○				

Table 4-3 Distributed limit line southern Element in Island Tanegashima and Yakushima (3. from Island Amami to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Achyranthes bidentata</i> Bl. var. <i>hachijoensis</i> Hara	ハチジョウイノコズチ			○	○				
<i>Calanthe lyroglossa</i> Reichb. f.	レンギョウエビネ			○	○				
<i>Calanthe masuca</i> Lindl.	オナガエビネ			○	○				
<i>Pennisetum purpureum</i> Schum.	ネピアグラス			○	○				

Table 4-4 Distributed limit line southern Element in Island Tanegashima and Yakushima (4. from Taiwan Izu peninsula to both islands)

Botanical name	Japanese name	Taiwan	Ryukyu	Amami	Yakushima	Kyusyu	shikoku	Honsyu	Hokkaido
<i>Hypolepis alte-gracillima</i> Hay.	セイタカイワヒメワラビ	○			○				○

光励起フラーレンの生物作用^{#1}山越葉子^{#2}・末吉祥子・宮田直樹Biological Activity of Photoexcited Fullerene^{#1}Yoko Yamakoshi^{#2}, Shoko Sueyoshi and Naoki Miyata

Fullerene (C_{60} , C_{70} , etc.) is a third carbon allotrope discovered in 1985, and a great deal of attention has been focused on its physical and chemical properties in recent years. We are very interested in its biological properties for use fullerene as a pharmacophore. We first developed a method of solubilizing fullerene itself in water to perform *in vitro* biological screening. The concentrations of aqueous C_{60} and C_{70} solution with 5 % poly(vinylpyrrolidone) (PVP) are 400 and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively. By using aqueous fullerene solutions prepared in this manner, we have clarified a series of biological activities of fullerene, consisting of DNA-cleavage, hemolysis, cancer-initiation, and cell-toxicity under photoirradiation, and chondrogenesis and inhibition of glutathione *S*-transferase activity without photoirradiation. The biological activity of photo-excited fullerene was found to be promising, because fullerene is a highly efficient photo-sensitizer. We synthesized a C_{60} derivative with an acridine moiety as a DNA-chelating function and assessed its effective DNA-cleaving activity. What kind of active species is involved in the biological action of photo-excited fullerene is our next concerns. Two pathways have been reported for the photo-excitation of fullerene. The so-called *Type II* energy transfer pathway generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), while the *Type I* electron transfer pathway gives a fullerene radical anion ($C_{60}^{\cdot-}$, $C_{70}^{\cdot-}$). In order to clarify the effective oxygen species actually responsible for the biological action of photo-excited fullerene, we performed DNA-cleaving tests and EPR spectroscopic analyses under several conditions. The results showed that the photo-induced biological activity of fullerene is not caused by $^1\text{O}_2$, but by reduced oxygen species ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$) generated by the electron transfer reaction of $C_{60}^{\cdot-}$, with molecular oxygen. Its specificity is thought to be mainly attributed to the high-reducible property of fullerene. Since the reductive activation of molecular oxygen by photo-excited fullerene was observed at physiological concentrations of NADH as the reductant, fullerene can be classified as an oxyl-radical-generating photo-sensitizer. Pharmaceutical application of fullerene to cancer photo-dynamic therapy appears promising.

Keywords: fullerene, superoxide, hydroxylradical, DNA-cleavage, photosensitization

1. はじめに

1985年に存在が確認されたフラーレン (C_{60}) は¹⁾, ダイヤモンドおよびグラファイト以来 200年ぶりに発見された炭素第三の同素体として脚光を浴び、物理学・化学・材料工学・電気化学などの分野で精力的な研究が展開されている。フラーレン発見の功績は高く評価され、1996年に発見者である英国 Sussex 大学の H.K.Kroto 教授, 米国 Rice 大学の R.E.Smalley 教授, および E.F.Curl 教授にノーベル

化学賞が贈られた。近年、フラーレン研究の中でも特に生体への影響が注目され、創薬を志向した研究がアメリカ・日本・フランスを中心に盛んに行われている。本総説では、フラーレンの構造的・物理化学的性質、その性質に基づく光増感性、および、光照射下における生物作用発現に重要な役割を果たしている活性酸素種について、著者らの研究を中心に紹介する。

2. フラーレンの構造特性

C_{60} (バックミンスターフラーレン: 最も代表的なフラーレンで、サッカーボールの表面模様と同じ分子構造を有する) と C_{70} の構造を Fig. 1 に示す。特に C_{60} (Fig. 1a) は、12個の五員環と 20個の六員環を有する球状カゴ型の化合物であり、完全対称体と呼ばれる非常に対称性の高い構造をしている。すなわち、六員環と六員環の縮合部位の中心

^{#1} 本総説は、山越葉子の学位論文「光励起フラーレン類の生物活性に関する研究」(東京大学大学院薬学系研究科博士号, 1999.5) の内容の一部を要約したものである。

^{#2} To whom correspondance should be addressed: Yoko Yamakoshi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.224, E-mail: yamakosh@nihs.go.jp

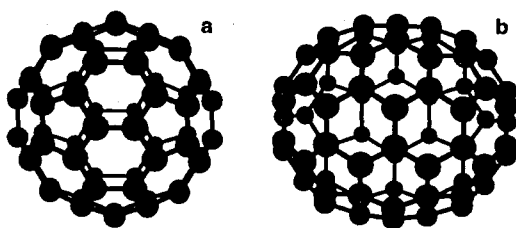


Fig. 1. Chemical structures of C_{60} (a) and C_{70} (b)

を通る 15 本の二回回転軸 (C_2 軸) と、六員環の中心を通る 10 本の三回回転軸 (C_3 軸)、および、五員環の中心を通る 10 本の五回回転軸 (C_5 軸)、さらには多数の対称面を有する。この構造を点群で表すと、正二十面体の属する I_h 点群という。

このように非常に高い対称性を有する C_{60} の 60 個の炭素原子は、すべて等価である。また、結合は、二種、すなわち、六員環と六員環の縮合部位である 6,6-junction と、六員環と五員環の縮合部位である 5,6-junction が存在する。30 本の二重結合はすべて共役しており、12,500 種類ものケクレ構造式を書くことができる。この分子の高い対称性に起因して、多くの分子軌道が縮退している。特に特徴的なのは HOMO が五重に、LUMO が三重に縮退し、HOMO-LUMO ギャップが小さいこと、また、球形構造に起因して、 C_{60} の π 電子雲は球の外側に偏った形で局在化していることであり、 C_{60} の還元特性、化学反応性、光増感性は、これらの構造特性に起因している。

3. C_{60} の化学反応性^{2,3)}

C_{60} は、特異なカゴ型縮合芳香族化合物である。以下、 C_{60} の構造特性に基づく物理化学的特質について述べる。ここでは特に、生物活性発現に大きく関与すると考えられる還元性、化学反応性及び光増感性について説明する。

(1) C_{60} の還元性

C_{60} は、前に述べたように、三重に縮退した LUMO と、五重に縮退した HOMO とのエネルギー差が小さい。また、LUMO のエネルギーレベルが低い。この低い LUMO とその縮退に起因して、 C_{60} は芳香族炭化水素としては高い還元電位 ($E_1 = -1.42$ V vs SCE in ベンゾニトリル) を有し、非プロトン性溶媒中 -10°C では可逆的に六電子まで還元されることが報告されている⁴⁾。

(2) C_{60} の化学反応性

1990 年に Kraetschmer らにより、アーク放電法による C_{60} の大量合成法⁵⁾が報告されて以来、 C_{60} の化学反応性の解析が可能になり、種々の反応性が明らかになるとともに、多

くの C_{60} 誘導体が合成された⁶⁻⁹⁾。以下に C_{60} の化学反応性を挙げる。

1) 求核付加反応¹⁰⁻¹²⁾

電子欠損性の高い C_{60} の二重結合に対する反応としてまず挙げられるのは求核剤との反応である。求核剤としてアミンを用いた場合、アミンが C_{60} の一つの炭素を攻撃し付加すると、6,6-junction でつながった隣の炭素の電子密度が他の炭素の電子密度に比べて高くなり、そこに H^+ が付加し付加体が生成する¹⁰⁾。このほか、求核剤としては、グリニャール試薬、アルキルリチウムを用いた例などが報告されている。

2) 環化付加反応¹³⁻¹⁸⁾

環化付加反応も、求核付加と同様 C_{60} の二重結合の電子欠損性に基づく反応である。これまでに、[4+2] 付加 (Diels-Alder 反応)、[3+2] 付加 (1,3-双極子付加反応)、[2+2] 付加、および、[2+1] 付加が報告されている。 C_{60} の二重結合には、前記のように 5,6-junction と 6,6-junction の二種類が存在する。 C_{60} 分子内の π 電子は全て共役しているが、5,6-junction (1.45 Å) と 6,6-junction (1.38 Å) とでは、6,6-junction の方が結合距離が短く二重結合性が高い。そのために、ジエン分子は 6,6-junction を攻撃し付加体が生成する。

[3+2] 環化付加反応の例としてジアソアルカンとの反応がある¹⁴⁾。環化付加により生じるピラゾリン環は、脱窒素を起しシクロプロパン環となる。生成した 6,6-closed 付加体は、熱的に安定な 5,6-open 付加体へと転移する。この反応で生じたアルキルフラレーンは一般にメタノフラレーンと呼ばれ、本反応は C_{60} 誘導体の合成に多用されている。アジドアルカンの場合も同様の反応が起き、脱窒素後転移反応し、5,6-open 型のピペリジン様付加体が生じる。

また、アゾメチンイリドとも、[3+2] 環化付加反応が起きフレロピロリジンと呼ばれる C_{60} 誘導体が合成できる¹⁵⁾。このフレロピロリジンは、収率よく合成できるうえ、二級アミンを持つために、ここに別の官能基を結合させることができ、種々の C_{60} 誘導体を合成するのに非常に有用である¹⁶⁾。

その他、[2+2] 付加反応としては、ベンザイン、エノンなどとの反応、 C_{60} が光にて二量化する反応などが¹⁷⁾、また、[2+1] 反応としては、カルベン、ナイトレン、シリレンなどとの反応¹⁸⁾が報告されている。

3) 水素化^{19,20)}

C_{60} に関して最初に報告された有機反応は Birch 還元による $C_{60}H_{36}$ の合成である¹⁹⁾。これは DDQ で酸化され、元の C_{60} に戻ることが知られている。また、オリゴヒドロフラレーンと呼ばれる水素が少数個付加した誘導体の合成も報告されている²⁰⁾。

4) 酸化・ハロゲン化²¹⁻³¹⁾

C_{60} は高い還元電位を有し、還元的な反応を受けやすいことを前述したが、一方ではアノディックに酸化を受け C_{60}^{2+} などを生じることも報告されている²¹⁾。また、酸素存在下光照射によるエポキシドの合成²²⁾や、ジオキシランによる酸化反応²³⁾も知られている。このエポキシドは、薬物代謝酵素の一つであるチトクロームP450のモデル化合物を用いた酸化反応においても生成することから、 C_{60} が生体内で代謝されて生ずる代謝産物の可能性がある²⁴⁾。

C_{60} のハロゲン化反応²⁵⁻³¹⁾も C_{60} に対する求電子的な反応である。これまで、フッ素化、クロル化、ブロム化が報告されている。この反応では、多数のハロゲンが付加した生成体を得るので付加位置の決定が困難である。

5) ラジカル付加³²⁾

C_{60} へのラジカル付加反応も容易に起き、これを用いたEPR実験に関する研究が報告されている³²⁾。また、ヒドロキシルラジカルなどのラジカル活性種との反応も知られている³³⁻³⁸⁾。

6) ホスト-ゲスト複合体の形成³⁹⁻⁴⁴⁾

C_{60} は結晶内で高速に回転している。そのため、単結晶を作成しても通常のX線結晶解析法では構造解析が困難であった。そこで、考えられた方法がピンセット型の分子で C_{60} をはさみ、分子回転をとめる方法である。この方法により C_{60} のX線結晶構造解析が可能となり、初めて C_{60} の分子構造が確定された³⁹⁾。また、この報告が、 C_{60} と他分子との分子間相互作用の初めての報告である。また、最近では、 C_{60} はシクロデキストリン⁴¹⁾やカリクスアレノ⁴²⁾といった包接化合物と相互作用を起し、ホスト-ゲスト複合体を形成して取り込まれる、という報告もある。その機序としては、 C_{60} の高い電子親和性に起因して、包接分子側の電子密度の高い原子たとえば酸素などと、電荷移動相互作用していることによると考えられている。包接化合物による C_{60} の取り込みは、分子認識の化学としても非常に興味を持たれている。

(3) 光増感性⁴⁵⁻⁴⁶⁾

1) C_{60} および C_{70} の光励起

C_{60} は光照射により基底一重項状態($^1C_{60}$)から励起一重項状態($^1C_{60}^*$)に励起され、項間交差反応(intersystem crossing: ISC)により励起三重項状態($^3C_{60}^*$)へと変わる⁴⁵⁾。 C_{70} も同様の反応を起こすことが報告されている⁴⁶⁾。

2) Type II 光増感エネルギー移動反応

1991年 Foote らは、酸素存在下において光励起された C_{60}



Scheme 1. Mechanism of singlet oxygen generation by photoexcited C_{60} (Type II energy transfer pathway)

から活性酸素種の一つ一重項酸素(1O_2)が生成することを報告した(Scheme 1)⁴⁵⁻⁴⁷⁾。

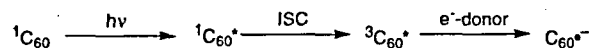
すなわち、光励起により生じた $^3C_{60}^*$ が基底状態の三重項の酸素分子(3O_2)にエネルギーを渡すことで、 1O_2 が生成する⁴⁸⁻⁵²⁾。ベンゼン溶液中での量子収率($\Phi(^1O_2)$)は約100%と非常に高いことが特徴的であり、これは、 $^1C_{60}^*$ から $^3C_{60}^*$ へのISCの効率が非常に高いことに起因している。実際 C_{60} に光を当てて励起させると、 $^3C_{60}^*$ が減衰して生じるりん光は観測されるが、 $^1C_{60}^*$ から生じる蛍光は殆ど観測されないことが報告されている。同様の反応は C_{70} においても観察されている⁴⁶⁾。

C_{60} の 1O_2 生成能に関する化学的研究は多数報告されている⁵³⁻⁶⁰⁾。特に、1994年、Nagano, Arakane, Hirobe らは、近赤外発光法を用いて C_{60} 溶液中の一重項酸素発生量を調べ、ベンゼンまたはベンゼン-メタノール混合溶媒中、 C_{60} による一重項酸素の発生における量子収率が、メチレンブルー、ローズベンガル、エオシンといった他の光増感剤と比較し、非常に高いことを示した⁵³⁾。

3) Type I 光増感電子移動反応

他方、酸素非存在下における光励起 C_{60} による電子移動反応に関する研究も多数報告されている⁶¹⁻⁷⁸⁾。1991年、Krusic らは、電子供与性の分子(ジ-*t*-ブチルパーオキシド)の存在下 C_{60} に光を照射すると、photolysisが起き、 C_{60} ラジカルアニオン($C_{60}^{\cdot-}$)が生じることをEPR法で直接検出する方法で確認した⁶¹⁾。次いで、1993年 Foote らは、光照射により生じた $^3C_{60}^*$ はアミンなどの電子供与性の化合物と反応して一電子還元され、 $C_{60}^{\cdot-}$ を生じること(Scheme 2)、さらに、酸化電位の異なる種々の還元剤を用いて実験した結果から、 $^1C_{60}$ の還元電位($E_1 = -0.42$ V vs SCE in ベンゾニトリル)に比較して、 $^3C_{60}^*$ の還元電位($E_1 = +1.41$ V vs SCE in ベンゾニトリル, *calcd.*)が非常に高いと報告している⁴⁶⁾。その他にも Stasko らが、トリエチルアミンなどの還元剤の存在下光励起 C_{60} から $C_{60}^{\cdot-}$ の生成に関して、EPR法を用いた一連の研究を報告している⁶²⁻⁶⁴⁾。

更に、 $^3C_{60}^*$ への電子移動反応を利用した、光励起 C_{60} による化学反応に関する報告も多数ある。1993年 Foote らは、*N,N*-ジエチルプロピニルアミンと C_{60} との光環化反応を報告した⁷⁴⁾。この反応は光非照射の条件下では80℃に加熱しても8%以下の収率でしか進行しないが、反応系に>530nmの光を20分間照射することで、室温下で50%以上の収率で付加体を与えた。光による反応の加速は、光照射により、励起した C_{60} ($^3C_{60}^*$)の二重結合の電子欠損性が増し、[2+2]環化付加反応が進みやすくなったためと考えら



Scheme 2. Electron transfer to triplet C_{60} (Type I electron transfer pathway)

れる。

また、1995-1998年にFukuzumiらは、ケテンシリラセタールのC₆₀への光付加反応⁷⁵⁾、10-メチル-9,10-ジヒドロアクリジンとC₆₀との光反応⁷⁶⁾、NADHアナログ化合物とC₆₀との光反応⁷⁷⁾など、光電子移動反応に関する研究を報告している。また、ごく最近にもAkasakaらが光励起C₆₀に対するシラ化に関する報告をしている⁷⁸⁾。

4. フラレーンの光生物作用

フラレーン(C₆₀, C₇₀)の物理化学的性質に関しては多くの研究が報告されてきたにも関わらず、生物作用に関する研究は他の分野に比較して大きく立ち後れていた。その理由の一つは、疎水性の高いフラレーンを極性溶媒に溶かすことができず、生物試験が困難であったことである。しかし近年、界面活性剤を用いた可溶化法や、水溶性誘導体が合成されるようになり、フラレーンの生物試験が可能となった。最近では、フラレーンの生物活性に関する研究は、フラレーン研究の一つの柱として非常に注目を集めている^{79,80)}。フラレーンの生物作用は、その作用機構に基づいて大きく三種類に分類できる。一つは、光増感性に基づくもので、ガンの光力学療法への利用などが注目されている。次は、ラジカルとの反応性に基づくものであり、ヒドロキシルラジカル(・OH)や一酸化窒素(NO)の消去剤として抗炎症剤への応用が期待されている。最後は、フラレーンの骨格構造に基づくものであり、電子欠損のπ電子系球形構造と電子供与性官能基との相互作用を利用した生体分子との相互作用、たとえば、酵素活性阻害作用である。以下、著者らの研究を中心に、フラレーンの水溶化および光生物作用に関する研究を概説する。

(1) フラレーンの水溶化⁸¹⁾

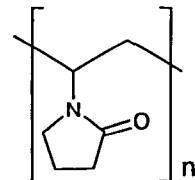
フラレーンの生物作用に関する最初の報告⁸²⁾では、マウスの表皮にC₆₀のベンゼン溶液を塗り、表皮におけるDNA生成や、オルニチンデカルボキシラーゼ活性を調べることにより、急性毒性の有無を検討するという方法がとられた。この実験では、C₆₀には急性毒性は無いという結果が報告されている。しかし、フラレーンの生体影響を詳細かつ簡便に調べるためには、*in vitro*の系でスクリーニング実験を行うことが簡便であり、そのためには、フラレーンを水溶化する必要がある。

C₆₀は二硫化炭素あるいはトルエンやベンゼン等の低極性の芳香族溶媒には比較的よく溶解するものの、ヘキサン等の脂肪族の低極性の溶媒には溶けにくく、さらに水や、アルコール類等の水と混和する極性溶媒には殆ど溶解しない。著者らは比較的高濃度(0.89 mg/mL)でC₆₀を溶解する溶媒であるN-メチルピロリドンに着目し、このN-メチルピロリドン構造を有したポリマーであるポリビニルピロ

リドン(PVP, Fig. 2)を用いてフラレーンを可溶化することを検討した。PVPは日本薬局方収載品⁸³⁾として医薬品や化粧品に広く使用されており、毒性が低く安全性が確立されている化合物である。また、PVPは、幾つかの水に難溶性な化合物を水溶化しその生物活性を調べるのにも用いられている⁸⁴⁻⁸⁶⁾。フラレーンの水溶化はFig. 3に示す方法で行った。

Fig. 4に示すように、最終濃度で5%のPVPを用い、C₆₀, C₇₀の添加量を増加させていった時、C₆₀の溶解度曲線は400 μg/mL, C₇₀は200 μg/mLまで直線性を示した。C₆₀, C₇₀の添加量をさらに増加させると、吸光度はそれ以上上昇せず、溶液中には沈殿が生じた。この結果より、5% PVP水溶液に対するC₆₀, C₇₀の溶解度を各々400 μg/mL, および、200 μg/mLと決定した。

調製したC₆₀, C₇₀/PVP水溶液のUV-VISスペクトルを測定したところ、5% PVP水溶液中においては、C₆₀, C₇₀ともに、*n*-ヘキサン溶液と比較し長波長側にシフトしたスペクトルが得られた(C₆₀: λ_{max} 258, 328 (in *n*-hexane) → 262, 340 (in 5% PVP-Aq.)). これは、PVP水溶液中でC₆₀, C₇₀がPVPと分子間相互作用(電荷移動複合体形成)を起こしているためと考えられる。一般に、電子の非局在化が進むと物質の吸収スペクトルは長波長側にシフトする。C₆₀, C₇₀の電子欠損性の二重結合が、PVPのアミド官能基と配



poly(vinylpyrrolidone) K30 (n = abt. 360)
MW = abt. 40,000
LD₅₀ > 100 g / kg (mouse, rat)

Fig. 2. Structure of poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

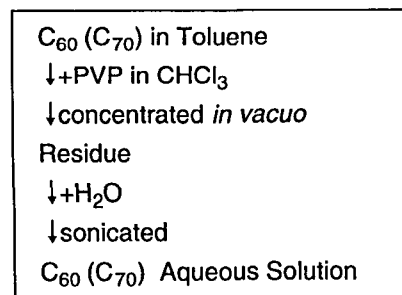


Fig. 3. Solubilization of C₆₀ and C₇₀ by poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

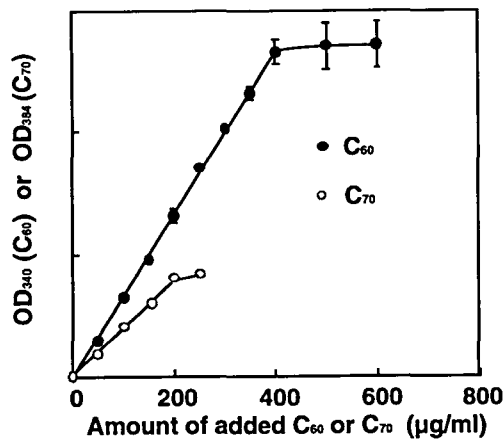


Fig. 4. Solubility curves of C_{60} and C_{70} in water with 5% of poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

ODs were measured after dilution with water by one tenth.

The approximate equation and correlation coefficients of the portions of straight lines are as follows.

$$C_{60} (y = 6.80 \times 10^{-3}x - 0.00281, R^2 = 0.998)$$

$$C_{70} (y = 4.08 \times 10^{-3}x - 0.00390, R^2 = 0.999)$$

位して、電子の非局在化が進み、 C_{60} 、 C_{70} のスペクトルが長波長側にシフトしたと推定した。

PVP を用いて水溶化した C_{60} 、 C_{70} は、周囲を PVP に囲まれていると考えられる。 C_{60} 、 C_{70} が PVP と共有結合を形成していないことを確認するため、LSI-MS による質量分析および塩析回収を行った。LSI-MS による質量分析の結果、 C_{60} (m/z 720) のピークが検出され、PVP 水溶液中で、 C_{60} が未反応のまま存在していることが示唆された。また、塩化カリウムを用いた塩析後、トルエンで抽出したところ、 C_{60} が定量的に回収された。以上の結果から、 C_{60} と PVP が水溶液中で共有化学結合していないと判断した。

Fig. 5 に種々の溶媒に対する C_{60} の溶解度と、5% PVP 水溶液に対する C_{60} の溶解度を比較したグラフを示す。界面活性剤 PVP を用いることにより、 C_{60} はメチレンクロライドやヘキサンといった有機溶媒に対する溶解度よりも高い溶解度で C_{60} を水中に溶かすことができる。また本法を用いることにより、著者らの報告と相前後して報告された、レシチン等の両親媒性の界面活性剤を用いる水溶化法⁸⁷⁾や、シクロデキストリンを用いる水溶化法⁸⁸⁾よりも、高い濃度で C_{60} を溶かすことが可能である。

以上、PVP を可溶化剤として用いて生物試験を行うために十分な高濃度の C_{60} を溶解することができた。また本法では、化学的に未修飾のフラレーンを水溶化することができるので、 C_{60} そのものの生物作用の検討を行うことができる。

著者らは、この水溶液を種々の生物活性試験に適用し、すでに、以下に示すような C_{60} の生物作用を明らかにした。それらは、光照射下では、DNA 切断活性^{89,90)}、溶血活性⁹¹⁾、発ガンイニシエーション作用^{92,93)}、抗菌作用⁹⁴⁾、また、光

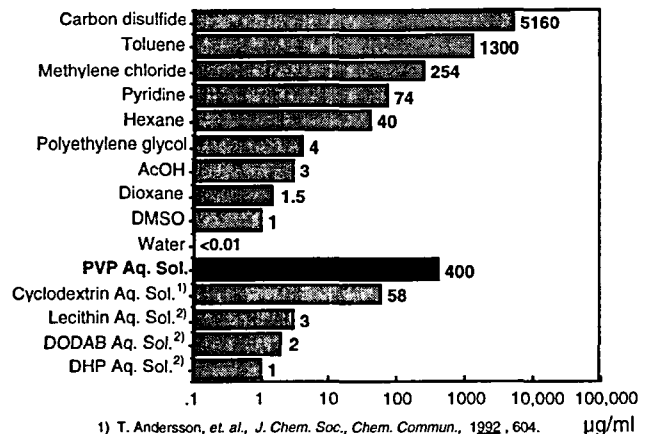


Fig. 5. Solubilities of C_{60} in various solution

非照射下では、軟骨等の分化促進に対する作用⁹⁵⁻⁹⁷⁾、グルタチオン S-トランスフェラーゼ阻害活性⁹⁸⁾などである。このうち光照射下における DNA 切断活性について、活性種の解析を含め詳細な検討を行ったので以下報告する。

(2) 光 DNA 切断活性

C_{60} 、 C_{70} の水溶化に成功したので、これを用いて C_{60} の生物作用を調べる実験を行った。まず最初にフラレーンの光増感性に着目し、ターゲットとする生体分子として DNA を選び、光照射下における DNA 切断活性について検討した。

光照射下フラレーンの DNA 切断活性については Nakamura らにより水溶性 C_{60} 誘導体を用いた結果が報告されている⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。著者らは、化学的に未修飾の C_{60} 、 C_{70} を用い、 C_{60} 、 C_{70} そのものの DNA 切断活性を明らかにする目的で光 DNA 切断実験を行った⁸⁹⁾。

可視光の照射下においてスーパーコイル型のプラスミド DNA と PVP で水溶化した C_{60} あるいは C_{70} を共存させ、DNA 切断活性を調べた。切断活性の検討法としては、アガロースゲル電気泳動を行い、Form I (スーパーコイル型) と Form II (ニック型) の量を比較する方法をとった。結果を Fig. 6 に示す。その結果、フラレーン非存在下 (Lane 1) や、可視光非照射下 (Lane 4 および 7) の結果に比較して、 C_{60} 、 C_{70} ともに光照射下 (Lane 3 および 6) で有意に DNA 切断活性を示した。活性の強さは、 C_{60} 、 C_{70} の間で差はなかった。しかし、ここで注目すべきことには、 C_{60} 、 C_{70} いずれの場合も NADH 非存在下 (Lane 2 および 5) では、切断活性が見られなかったことである。この結果から、 C_{60} 、 C_{70} の光 DNA 切断においては光励起電子移動反応によって生じる還元型活性種が寄与している可能性を考えた。その他の活性酸素種阻害剤を添加した実験結果については、後述する。

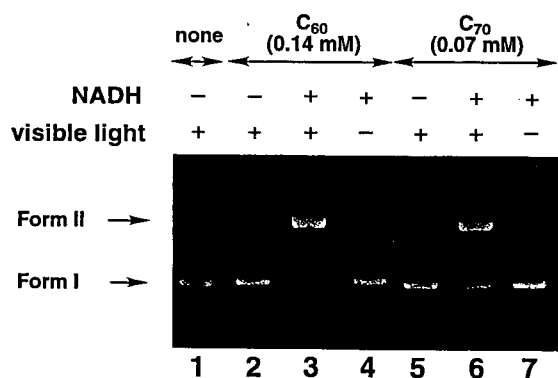


Fig. 6. Photoinduced DNA cleavage by C₆₀ and C₇₀

The pBR322 supercoiled plasmid was incubated with each chemical in TDC buffer for 4 h at 37°C under irradiation with a 300-W reflector lamp. Lanes 1 - 3 and 5 - 6, incubation under visible light irradiation: lane 1, pBR322 DNA with 1.25 % of PVP; lane 2, with 0.14 mM C₆₀; lane 3, with 0.14 mM C₆₀ and 10 mM NADH; lane 5, with 0.07 mM C₇₀; lane 6, with 0.07 mM C₇₀ and 10 mM NADH. Lanes 4 and 7, in the dark: lane 4, pBR322 DNA with 0.14 mM C₆₀ and 10 mM NADH; lane 7 with 0.07 mM C₇₀ and 10 mM NADH.

(3) 光 DNA 切断活性を増強した分子

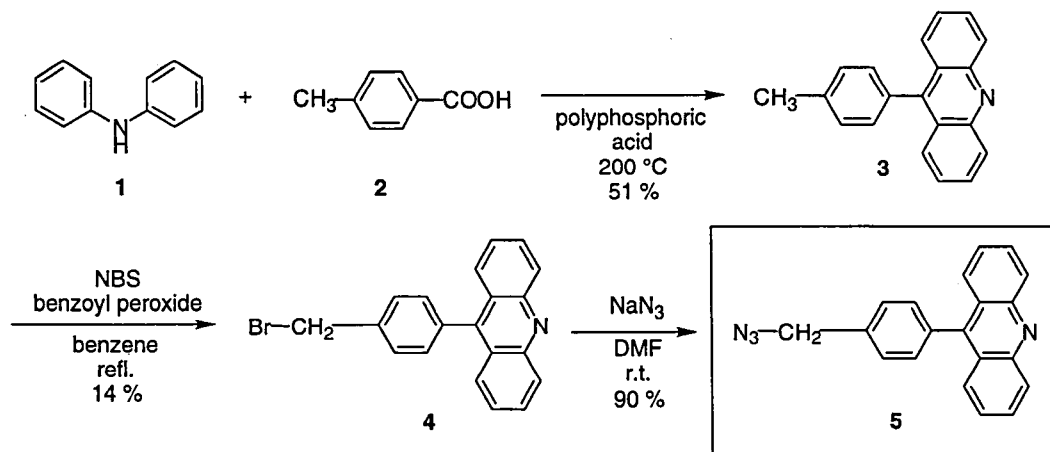
未修飾の C₆₀ および C₇₀ の DNA 切断活性について述べたが、種々の誘導体を用いた DNA 切断活性に関する研究も行われている。Nakamura らは、水溶性 C₆₀ 誘導体が光照射下 DNA 切断反応を示すことを報告した⁹⁹⁾。この化合物は C₆₀ に極性の官能基を導入し、両親媒性を持たせることで、水溶性を向上させた化合物である。また、彼らは、特定の DNA 鎖に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結合させた DNA 切断分子を合成し、これらが一重鎖・二重鎖・ヘアピン型の DNA に作用することも報告している。

また、Foote, Rubin らは、デオキシヌクレオチド型 C₆₀ 誘導体を用いた光 DNA 切断活性を報告している¹⁰²⁾。彼らは、エオシン（電子欠損型ではない光増感剤）に同じデオキシ

ヌクレオチドを結合させた化合物を対照化合物として合成し、活性発現の挙動を比較し、活性種の検討を行っている。

著者らは、未修飾のフラーレンの光 DNA 切断活性を明らかにしたが、さらに、その切断活性を増強する目的で DNA に親和性のあるインターカレート基を C₆₀ に導入した誘導体を合成し、その活性について検討した⁸⁹⁾。合成スキームを Scheme 3, 4 に示す。一般的に C₆₀ へのアジド基の付加の形式としては Fig. 7 に示す四種が考えられる。その付加の形式によって、C₆₀ 誘導体の面对称性および付加部分の炭素の sp 混成が異なるため、どの形式で付加しているかを ¹³C-NMR のスペクトルを解析することにより明らかにすることができる¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。付加体 (7) の ¹³C-NMR のスペクトルで、C₆₀ 骨格部分について sp³ 炭素が無いこと、また、sp² 炭素が 32 種類確認できたことから、付加体 (7) の構造は Fig. 7 に示す四種のうち、[5,6]-ring junction に付加した、[5,6]-open の形式であることが分かった。この付加体が生成するメカニズムを Scheme 5 に示す。すなわち、C₆₀ の電子欠損性の二重結合 ([6,6]-ring junction) に、求核性の高いアジド基が 1,3-双極子環化反応により求核付加し、生じたトリアゾール体は熱により脱窒素を受けさらに転移反応を起こし、[5,6]-open のジアジリン付加体へと変化する。

次に、C₆₀ と付加体 (7) の DNA 切断活性を比較した。アクリジン基自身の DNA 切断活性を調べる目的で、同時に化合物 (3) の DNA 切断活性も調べた。付加体 (7) と化合物 (3) は溶解性を向上させるため、塩酸塩にして用いた。化合物は全て、最終濃度 5 % の PVP を用いて水溶化した。結果を Fig. 8 に示す。付加体 (7) は C₆₀ や化合物 (3) に比較し、有意に強い DNA 切断活性を示した。一般に、C₆₀ 誘導体の光増感性は、分子の対称性の低下や共役系の変化によりモノ付加体で C₆₀ の 70-80 % 程に低下するという報告がある。付加体 (7) が C₆₀ よりも高い DNA 切断活性を示したことは、付加体 (7) のアクリジン部分と DNA が



Scheme 3. Synthesis of 9-(4-azidomethylphenyl)acridine (5)

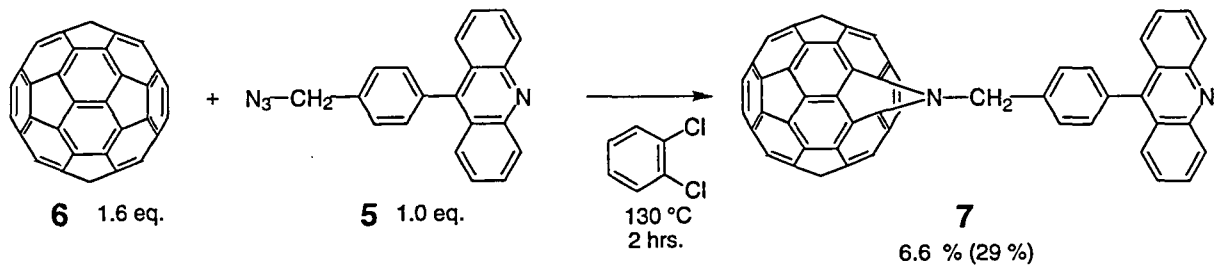
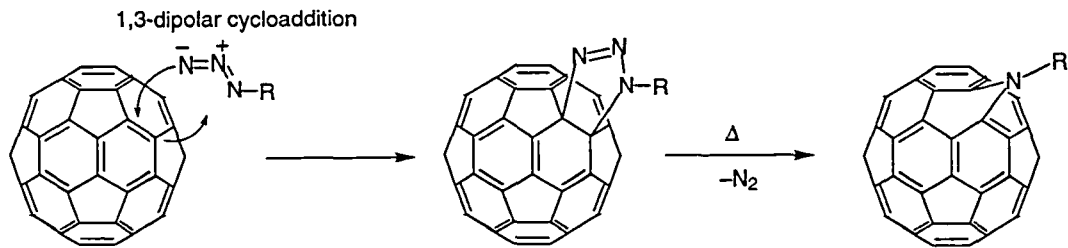
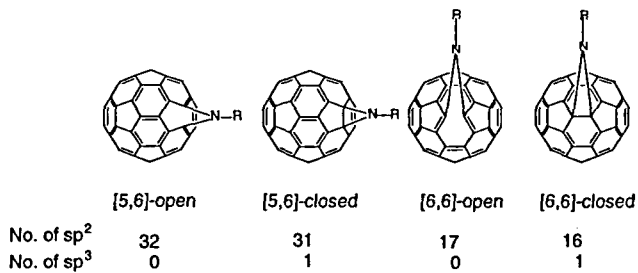
Scheme 4. Reaction of C_{60} and 9-(4-azidomethylphenyl)acridine (5).Scheme 5. Possible mechanism in the reaction of C_{60} and benzylazide derivative.

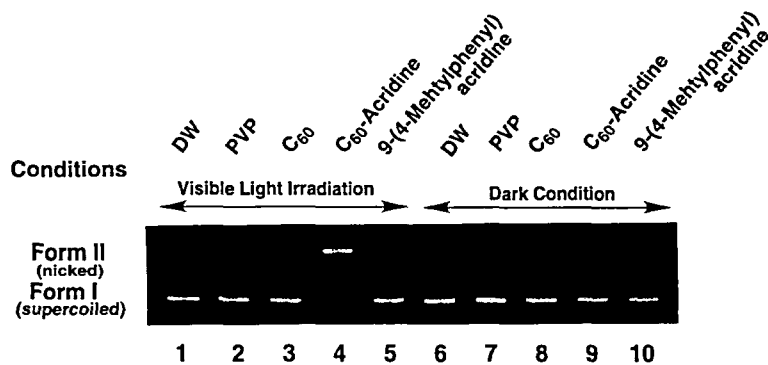
Fig. 7. Four possible isomeric iminofullerenes

相互作用 (インタカレート) し, DNA と C_{60} 分子が近接したことによって活性が増強されたと考えている. この結果は, 化学反応性に富み, 化学修飾が容易である C_{60} を母核として用いることにより, 一層強い生物活性を有する化合物を合成することが可能であることを示す.

(4) 光 DNA 切断活性に関わる活性種の解析

Nakamura らは, 水溶性 C_{60} 誘導体の DNA 切断活性の活性種の解析実験を行っている. すなわち, 1O_2 の寿命を延長させる効果のある重水中における活性, および, 切断部位の塩基特異性を検討し, 重水中で活性の増強が見られたこと, また, 切断活性はグアニンに特異的であったことから, この実験系における光 DNA 切断活性種を 1O_2 と推定している^{99,101}.

光励起 C_{60} の生物作用の活性種を考える場合, この Nakamura らによる光 DNA 切断実験の解析結果に代表されるように, 従来 1O_2 がその活性種と考えられてきた. しかし, 生体内では溶存酸素に加えて NADH などの還元剤や求核性を有する生体成分が存在することから, このような条件下で実際に光励起 C_{60} からどのような活性種が生成するのかを実証する必要がある. 特に, 光励起 C_{60} の高い還元電位を考えると, 溶存酸素存在下でも光増感作用の項で述

Fig. 8. DNA-cleaving activities of C_{60} (6), C_{60} -acridine adduct (7) and 9-(4-methylphenyl) acridine (3)

べた *Type I* の反応が進行する可能性は高いと考えられる。実際、前に述べた光 DNA 切断作用の解析実験において、還元剤の存在下でのみ切断活性が見られた結果はこの推定を支持し、活性種が *Type II* のエネルギー伝達反応で生成する $^1\text{O}_2$ ではなく、*Type I* の電子移動反応が関与している可能性を示唆する。

また、Foote, Rubin らは、デオキシヌクレオチド型 C_{60} 誘導体を合成し、その光 DNA 切断活性の発現メカニズムについて検討している。その結果、切断活性はグアニン選択的に見られたが、既知の $^1\text{O}_2$ 生成剤であるエオシン（電子欠損型ではない光増感剤）に同じデオキシヌクレオチドを結合させた化合物を対照化合物として比較検討すると、それぞれの化合物が活性発現において異なる挙動を示したと報告した¹⁰²⁾。すなわち、エオシン付加体では重水中での実験や $^1\text{O}_2$ 消去剤であるアジ化ナトリウム、DABCO を添加する系での実験の結果、切断活性に $^1\text{O}_2$ の関与が確認されたのに対し、 C_{60} 付加体では $^1\text{O}_2$ の関与が全くみられなかった。彼らは、この結果に加えて、光励起 C_{60} の還元電位を併せ考え、デオキシヌクレオチド型 C_{60} 誘導体の光 DNA 切断は $^1\text{O}_2$ による酸化によって起きているのではなく、電子密度の高いグアニン塩基が電子供与体となって $^3\text{C}_{60}^*$ へ電子移動反応すること、すなわち、 $^3\text{C}_{60}^*$ による核酸塩基の酸化反応によって起きていると推定している。

1) DNA 切断実験による活性種の解析

著者らは、PVP で水溶化した未修飾の C_{60} を用いて活性種を解析した⁹⁰⁾。まず、DNA 切断活性への $^1\text{O}_2$ の関与を、 $^1\text{O}_2$ 消去剤を実験系に添加してその影響を調べる方法で検討した。 $^1\text{O}_2$ 消去剤としては、アジ化ナトリウム、L-ヒスチジン、2,5-ジメチルフランの 3 種類を用いた。この三種の消去剤は、電荷移動型 (charge transfer type) の消去剤であり電子欠損性の $^1\text{O}_2$ と反応しやすい性質を持つ。求核性のあるアジ化ナトリウムは、電子欠損性の $^1\text{O}_2$ と反応し、電荷移動錯体を形成し、 $^1\text{O}_2$ を $^3\text{O}_2$ に変化させる¹⁰⁶⁾。また、L-ヒスチジンおよび 2,5-ジメチルフランは、電子欠損性の $^1\text{O}_2$ とエン反応を起こすことで、 $^1\text{O}_2$ を捕捉すると考えられている¹⁰⁷⁾。

以上三種の $^1\text{O}_2$ 消去剤を用いた C_{60} 、 C_{70} による DNA 切

断実験結果を Fig. 9 に示す。結果として、いずれの消去剤も、 C_{60} 、 C_{70} の DNA 切断活性を抑制することがなかった。この結果は、DNA 切断活性の発現に $^1\text{O}_2$ が関与している可能性が低いことを示す。

そこで、この反応系における活性種として、還元型活性酸素種であるスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の関与を推定し、それを証明するため、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ を消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を反応系に添加しその影響を調べた。SOD による $\text{O}_2^{\cdot-}$ の消去のメカニズムとしては、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の不均化反応を SOD が触媒することで、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の拡散よりも $\text{O}_2^{\cdot-}$ の不均化が優先し、その結果、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 との反応が抑制され、 $\cdot\text{OH}$ が生成しなくなり DNA 切断が抑制されると考えられている。この SOD を用いれば、DNA 切断の活性発現のメカニズムに $\text{O}_2^{\cdot-}$ が関与しているかどうかを調べることができる。実験結果を Fig. 10 に示す。SOD を添加しない Lane 1, 3 では Form II が生成するのに対し、添加した Lane 2, 4 では Form II の生成が殆ど見られなかった。すなわち、SOD の添加により C_{60} 、 C_{70} による DNA 切断活性が完全に抑制された。この結果から、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成が DNA 切断活性の発現において重要である事が示された。

以上、光励起フラレーンの DNA 切断において、活性発現には還元剤が必要である、 $^1\text{O}_2$ 消去剤の影響は見られない、SOD の添加により活性が弱められる、という結果を得た。これらの結果は、還元型の活性酸素種が活性発現における活性種となっていることを示唆する。

2) EPR 法によるスーパーオキシドラジカルアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の検出

次にこの仮説を証明するため、分光学的手法等を用いて光励起フラレーンより生じる活性種を解明する実験を行った⁹⁰⁾。まず第一にスピントラップ剤を用いた EPR 法により $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出を試みた。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はそれ自身がラジカルであるので EPR 検出可能であるが、この直接検出法ではサンプルを凍結し分子運動を停止させた状態で測定する必要がある。それに対して本法は、スピントラップ剤で $\text{O}_2^{\cdot-}$ を捕捉することで簡便に $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出が行える。スピントラップ剤としては 5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド^{108,109)} (DMPO)

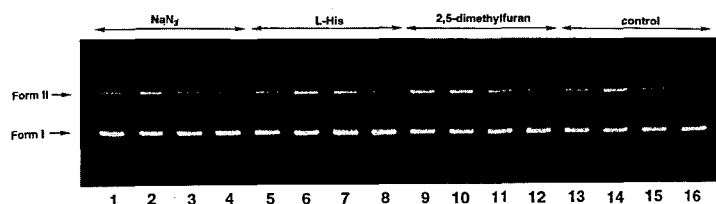


Fig. 9. Effects of $^1\text{O}_2$ scavengers on the photoinduced DNA-cleaving activities of C_{60} and C_{70}

The pBR322 was incubated with each chemical for 4 hours at 5°C under irradiation by 300-W photorelector lamp (at 15 cm distance). Lanes 1-4, with 10mM NaN_3 ; lanes 5-8, with 10mM L-histidine; lanes 9-12, with 10mM 2,5-dimethylfuran; lanes 13-16, control. Lanes 1, 5, 9 and 13, with 0.07 mM C_{60} ; lanes 2, 6, 10 and 14, with 0.14 mM C_{60} ; lanes 3, 7, 11 and 15, with 0.07 mM C_{70} ; lanes 4, 8, 12 and 16, with 1.25 % PVP only.

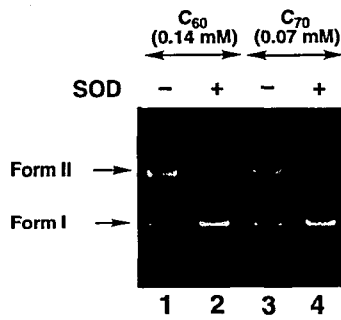


Fig. 10. Effects of SOD on the photoinduced DNA cleavage by C_{60} and C_{70}

The pBR322 supercoiled plasmid was incubated with each chemical in TDC buffer for 2 h at 37°C under irradiation with a 300-W reflector lamp. Lanes 1 - 4, incubation under visible light irradiation: lane 1, pBR322 DNA with 0.14 mM C_{60} and 10 mM NADH; lane 2, with 0.14 mM C_{60} , 10 mM NADH and 0.04 units/mL of SOD; lane 3, with 0.07 mM C_{70} and 10 mM NADH; lane 4, with 0.07 mM C_{70} , 10 mM NADH and 0.04 units/mL of SOD.

を用いた。DMPOは、 $O_2^{\cdot-}$ のスピントラップ剤として最も一般的に用いられている試薬であるが、 $\cdot OH$ とも反応するため、 $\cdot OH$ を消去するためにジメチルスルフォキシド (DMSO)を添加した実験も行った。

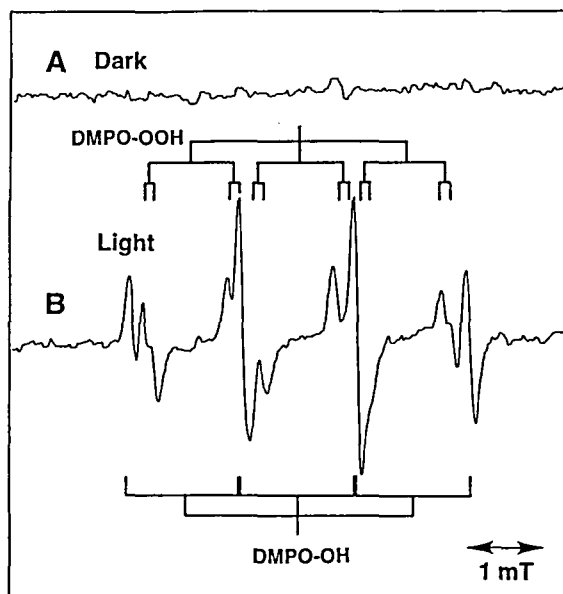


Fig. 11. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp.

C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM, DMPO 0.72 M, DETAPAC 1 mM, in 50 mM phosphate buffer. Irradiation time: (A) 0 sec., (B) 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

電子供与性の還元剤としては生体内還元剤の一つである NADH を用い、照射光としては 300 W の可視光ランプを用いた。まず、Fig. 11 に還元剤存在下 C_{60} / PVP 水溶液に光照射し生じた酸素ラジカルを DMPO にてトラップした実験結果を示す。10 秒間の光照射により DMPO と $O_2^{\cdot-}$ の付加体 (DMPO-OOH) および DMPO と $\cdot OH$ の付加体 (DMPO-OH) のピークが見られた。この結果は、還元剤存在下 C_{60} / PVP 水溶液に可視光を照射すると、還元型の酸素ラジカル種である $O_2^{\cdot-}$ と $\cdot OH$ の両方が生じることを示す。

次に、 $O_2^{\cdot-}$ を選択的に検出するため、反応系に DMSO を添加し生成する $\cdot OH$ を消去し同様の測定を行った。結果を Fig. 12 に示す。Fig. 12 の a (Light) に示すように光照射下、還元剤存在下でのみ C_{60} / PVP 水溶液中において DMPO-OOH のピークが見られた。一方、DMSO 添加により DMPO-OH のピークが消失し、かわりに DMPO-CH₃ のピークが検出された。これは、DMSO の S に $\cdot OH$ が付加した後

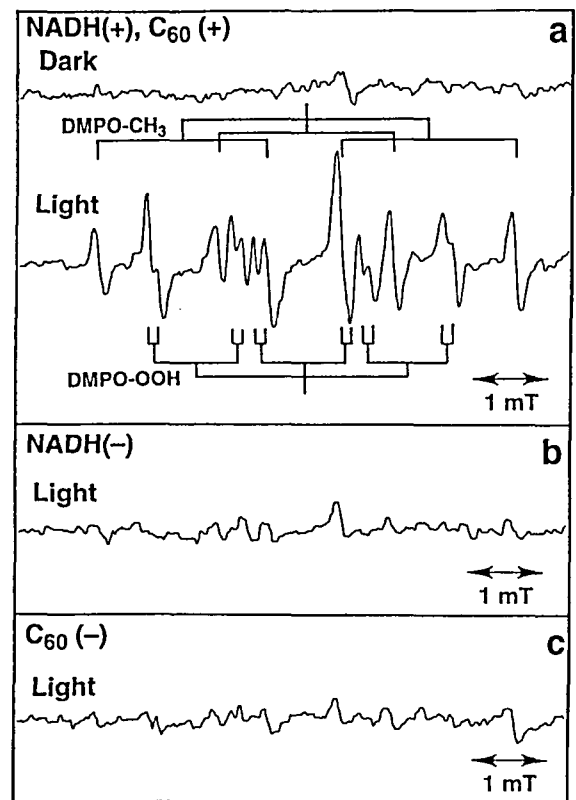


Fig. 12. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $O_2^{\cdot-}$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp

DMPO 0.72 M, DETAPAC 1 mM, DMSO 3.1 M, in 50 mM phosphate buffer, (a) C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM, (b) C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, (c) PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time: Dark 0 sec., Light 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

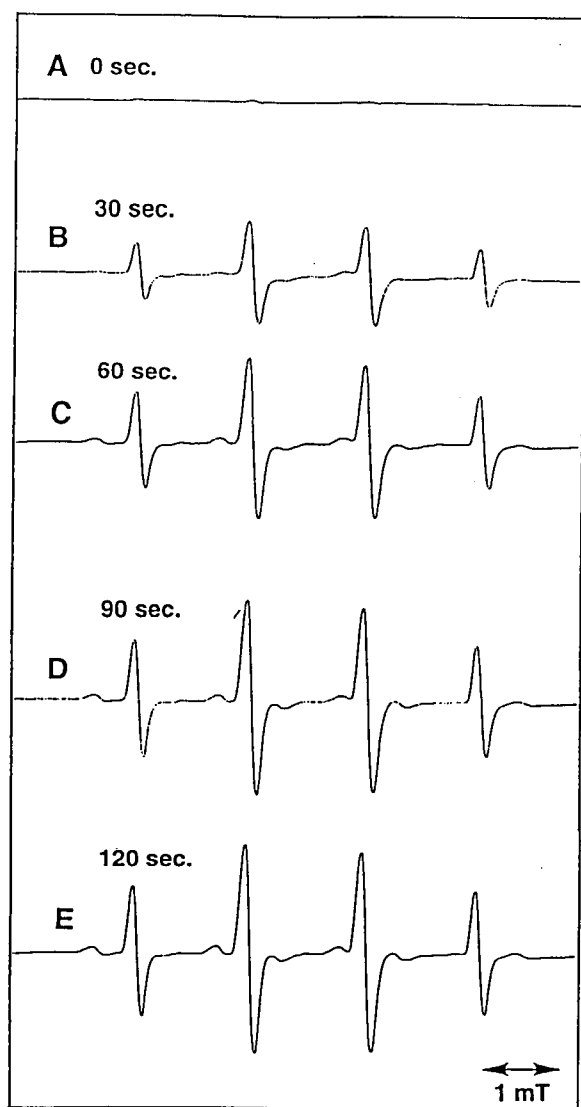


Fig. 13. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $\cdot\text{OH}$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp
DMPO 0.72 M, Fe(II)-DETAPAC 0.2 mM, in 50 mM phosphate buffer, C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time: Dark 0 sec., Light 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

メチル基が一つラジカル的に脱離し生じたメチルラジカルと DMPO が反応したために生じるピークである。ハイパーファインスプリッティングは、DMPO-OOH は $a_{\text{H}} = 1.37$ mT, $a_{\text{H}}^{\beta} = 1.09$ mT, $a_{\text{H}}^{\alpha} = 0.10$ mT, DMPO-CH₃ は $a_{\text{N}} = 1.57$ mT, $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.23$ mT であり、文献値とよく一致した。光非照射下 (Fig. 12 の a (Dark)), 還元剤非存在下 (Fig. 12 の b), あるいは、 C_{60} 非存在下 (Fig. 12 の c) では、ピークは見られなかった。また、ピークの高さは、 C_{60} 濃度や添加した NADH 量に依存し、また、DMPO-OOH のピークは SOD の添加 (20 units / mL) により完全に消失した。

以上、EPR 法を用いて還元剤 NADH 存在下、光励起 C_{60} から $\text{O}_2\cdot^-$ が生成することを確認した。同様の実験を C_{70} / PVP を用いて行ったところ、スピントラップ剤との付加体が照射時間、還元剤濃度、 C_{70} 濃度に依存して生じ、その生成量は C_{60} を用いた場合とほとんど変わらなかった。 C_{60} と C_{70} の光増感性を比較すると、この $\text{O}_2\cdot^-$ 生成系に大きく関わると考えられる三重項エネルギーや、三重項フラレーン生成における量子収率、三重項フラレーンの寿命がほとんど同じであるため、光励起電子移動で生成する $\text{O}_2\cdot^-$ 生成量が同じであったと考えた。

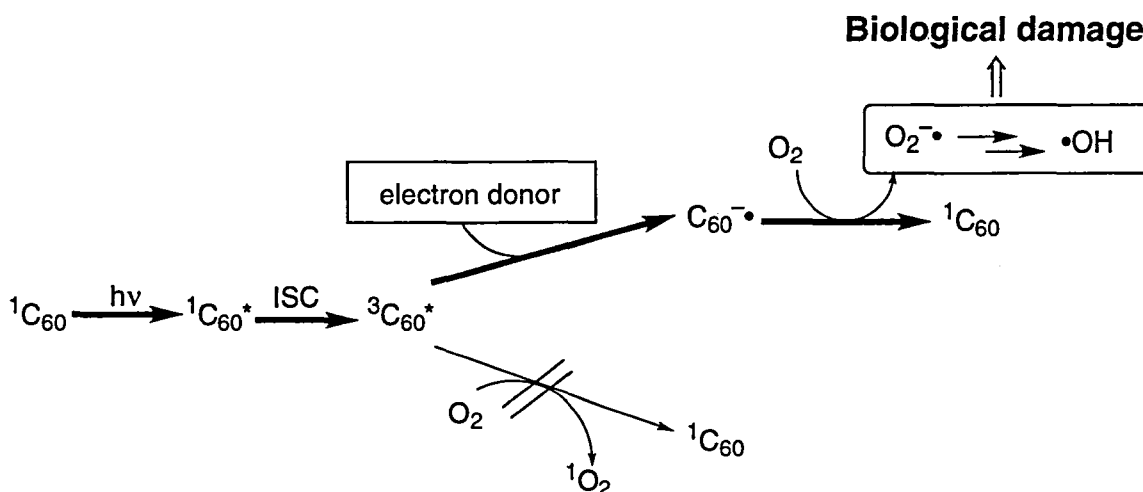
3) EPR 法によるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の検出

次に、より活性の強い還元型活性酸素種であるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を EPR 法を用いて検討した⁸⁹⁾。なお、 $\cdot\text{OH}$ は、 $\text{O}_2\cdot^-$ が非酵素的に不均化して生成する過酸化水素のフェントン反応により生成すると考えられている。スピントラップ剤である DMPO は前述の $\text{O}_2\cdot^-$ の捕捉にも用いられる試薬であるが、 $\cdot\text{OH}$ との反応性の方が高い。また、 $\cdot\text{OH}$ との反応で生成する付加体は、 $\text{O}_2\cdot^-$ との反応で生成する付加体より安定であり、本法で $\cdot\text{OH}$ を高感度で検出することが出来る。結果を Fig. 13 に示す。NADH の存在下 C_{60} に光を照射すると、光照射時間 (0-120 秒) に依存して、安定な $\cdot\text{OH}$ と DMPO との付加体のピークが認められ、 $\cdot\text{OH}$ がこの実験系において生成していることを確認した。また、 C_{60} の非存在下や、NADH の非存在下においては $\cdot\text{OH}$ の生成量が低く抑えられた。以上、水溶液中、酸素および還元剤存在下で光励起フラレーンから強力な酸化剤であり実際の生体分子損傷に働くと考えられる $\cdot\text{OH}$ が生成していることを実証した。

これらの結果は、還元剤および溶存酸素存在下におけるフラレーンの DNA 切断作用の活性種が、従来考えられていた 1O_2 ではなく、 $\cdot\text{OH}$ や $\text{O}_2\cdot^-$ のような還元型の活性酸素種である可能性を強く示唆する (Scheme 6)。

5. おわりに

C_{60} , C_{70} などのフラレーンは、星間物質の構造予測研究で、カーボングラファイトにレーザー光を照射したりアーク放電したりすることにより偶然見いだされた人工化合物である。しかし、その後の研究で、炭素含量の多い岩石や墨などにも少量ではあるが存在することも明らかになっている。フラレーンは、表面をゆがんだ sp^2 炭素で覆われた球状構造をしており、その特徴的な構造に起因して、既存の有機化合物とは異なる物理化学的性質を有する。このような特異な性質を有するフラレーンは、機能性素材として多方面から注目を集めている。著者らは、これまで殆ど研究されていなかったフラレーンの生物作用を探索し、生物活性物質としての利用を検討することは、今までに無い新しいタイプの医薬品素材の開発という点で非常に有意義で



Scheme 6. Proposed pathway for the generation of superoxide radical anion by photoexcited fullerene in the presence of reductant.

あると考え研究を開始した。

まず最初に、生物試験を行うためにフラーレン (C_{60} , C_{70}) の水溶化を検討し、界面活性剤ポリビニルピロリドンを用いた可溶化法を見出した。本法により高濃度のフラーレン水溶液を調製する事が可能であり、多くの *in vitro* 生物試験が可能になった。次に、可溶化したフラーレン水溶液を用いて可視光照射下 DNA 切断活性を検討し、 C_{60} および C_{70} は、光照射条件下還元剤と酸素存在下効率良く DNA を切断することを見出した。また、DNA とインタカレートすることが知られているアクリジン基を導入した C_{60} 誘導体を合成し、この化合物がより強力な光 DNA 切断活性を有することを明らかにした。最後に、光励起フラーレンから生成する DNA 切断活性種の解析実験を行い、活性種は、従来考えられていた 1O_2 ではなく、還元型のオキシラジカル類 ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) であることを明らかにした。この特性はフラーレンの電子欠損性に起因する。すなわち、フラーレンは長波長の可視光により効率良く光励起され還元されやすい励起三重項状態になることから、分子状酸素との光増感電子移動反応によりこのような還元型の活性酸素種が生成したと考えられる。

光増感剤の医薬品への応用としては、まず第一にガン治療の一つである光線力学療法にもちいる薬剤があげられる。これは、腫瘍親和性光感受性物質に特定波長のレーザー光を照射し、これによって起きる光増感反応によりガン細胞を変性・壊死させる療法である。この目的に合う化合物の条件としては、一般的に (1) 化学的に純粋である、(2) 組織透過性が高く生体損傷活性が低い長波長 (600 - 800 nm) の光で励起される、(3) 光非照射下においては毒性が無い、(4) 組織特異性がある といったことが挙げられる。フラーレンは、(1) - (3) の条件に非常によく合致している。ガンの光線力学療法に関しては、Ikada らの C_{60} とポリエチレングリコールとの付加体を用いた研究があり、ガン細胞

特異性が增强したとの報告がある^{110,111)}。フラーレンは、他の光増感剤で活性種とされる 1O_2 よりも酸化活性の強いオキシラジカル類 ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) が生じることから高い殺細胞性が期待され、非常に有効なリード化合物である。

文 献

- 1) Kroto, H. M., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley, R. E.: *Nature*, **318**, 162-163 (1985).
- 2) 「化学」編集部編: C_{60} ・フラーレンの化学, 化学同人, (1993).
- 3) 篠原久典, 齊藤弥八: フラーレンの化学と物理, 名古屋大学出版会, (1997).
- 4) Ohsawa, Y., Saji, T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 781-782.
- 5) Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos, K., Huffman, D. R.: *Nature*, **347**, 354-358 (1990).
- 6) Taylor, R., Walton, D. R. M.: *Nature*, **363**, 685-693 (1993).
- 7) Hirsch, A.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 1138-1141 (1993).
- 8) Hirsch, A.: "The Chemistry of the Fullerenes", George Thieme Verlag: Stuttgart (1994).
- 9) Diederich, F., Thilgen, C.: *Science*, **271**, 317-323 (1993).
- 10) Hirsch, A., Li, Q., Wudl, F.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1309-1310 (1991).
- 11) Fagan, P. J., Krusic, P. J., Evans, D. H., Lerke, S. A., Johnston, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9694-9699 (1992).
- 12) Hirsch, A., Soi, A., Karfunkel, R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 766-768 (1992).
- 13) Tsuda, M., Ishida, T., Nogami, T., Kurono, S., Ohashi, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 781-782.
- 14) Suzuki, T., Li, Q., Khemani, K. C., Wudl, F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7301 (1991).
- 15) Maggini, M., Scorrano, G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9798-9799 (1993).
- 16) Wilson, S. R., Wang, Y., Cao, J., Tan, X.: *Tetrahedron Lett.*, **37**, 775-778 (1996).
- 17) Hoke II, S. H., Molstad, J., Dilettato, D., Jay, M. J., Carlspon,

- D., Kahr, B., Cooks, R. G.: *J. Org. Chem.*, **57**, 5069-5071 (1992).
- 18) Vassela, A., Uhlmann, P., Waldraff, C. A. A., Diederich, F., Thilgen, C.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 1388 (1992).
- 19) Haufler, R. E., Conceicao, J., Chibante, L. P. F., Chai, Y., Byrne, N. E., Flanagan, S., Haley, M., O'Brien, S. C., Pan, C., Xiao, Z., Billups, W. E., Ciufolini, M. A., Hauge, R. H., Magrave, J. L., Wilson, L. J., Curl, R. F., Smalley, R. E.: *J. Phys. Chem.*, **94**, 8634-8636 (1990).
- 20) Hendsen, C. C., Cahill, P. A.: *Science*, **259**, 1885-1887 (1993).
- 21) Wood, J. M., Kahr, B., Hoke II, S. H., Dejarne, L., Cooks, R. G., Ben-Amotz, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5907-5908 (1991).
- 22) Creegan, K. M., Robbins, J. L., Robbins, W. K., Millar, J. M., Sherwood, R. D., Tindall, P. J., Cox, D. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1103-1105 (1992).
- 23) Elemes, Y., Silverman, S. K., Sheu, C., Kao, M., Foote, C. S., Alvarez, M. M., Whetten, R. L.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 351-353 (1992).
- 24) Hamano, T., Mashino, T., Hirobe, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1537-1538.
- 25) Foeler, P. W., Kroto, H. W., Taylor, R., Walton, D. R. M.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **87**, 2685-2686 (1991).
- 26) Tuinman, A. A., Mukherjee, P., Adcock, J. L., Hettich, R. L., Compton, R. N.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 7584-7589 (1992).
- 27) Selig, H., Lifshitz, C., Peres, T., Fischer, J. E., McGhie, A. R., Romanow, W. J., McCauley Jr., J. P., Smith III, A. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5475-5476 (1991).
- 28) Holloway, J. H., Hope, E. G., Taylor, R., Langley, G. J., Avent, A. G., Dennis, T. J., Hare, J. P., Kroto, H. W., Walton, R. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 966-969.
- 29) Olah, G. A., Bucsi, I., Lambert, C., Aniszfeld, R., Trivedi, N. J., Sensharma, D. K., Prakash, G. K. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9385-9387 (1991).
- 30) Birkett, P. R., Hitchcock, P. B., Kroto, H. W., Taylor, R., Walton, R. M.: *Nature*, **357**, 479-481 (1992).
- 31) Tebbe, F. N., Harlow, R. L., Chase, D. B., Thorn, D. L., Campbell Jr., G. C., Calabrese, J. C., Herron, N., Young Jr., R. J., Wasserman, E.: *Science*, **256**, 822-825 (1992).
- 32) Morton, J. R., Preston, K. F., Kursic, P. J., Hill, S. A., Wasserman, E.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 3576-3578 (1992).
- 33) Chiang, L. Y., Lu, F.-J., Lin, J.-T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1283-1284.
- 34) Okuda, K., Mashino, T., Hirobe, M.: *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 539-542 (1996).
- 35) Tsai, M. -C., Chen, Y. H., Chiang, L. Y.: *J. Pharm. pharmacol.*, **49**, 438-445 (1997).
- 36) Lai, Y.-L., Chiang, L. Y.: *J. Atomic Pharmacol.*, **17**, 229-235 (1997).
- 38) Dugan, L. L., Turetsky, D. M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almili, C. R., Shen, C. K.-F., Luh, T.-Y., Choi, D. W., Lin, T.-S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9434-9439 (1997).
- 39) Izuoka, A., Tachikawa, T., Sugawara, T., Saito, Y., Shinohara, H.: *Chem. Lett.*, **1992**, 1049-1052.
- 40) Andersson, T., Nilsson, K., Sundahl, M., Westman, G., Wennerström, O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 604-606.
- 41) Yoshida, Z., Takekuma, H., Takekuma, S., Matsubara, Y.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1597-1599 (1994).
- 42) Atwood, J. L., Koustantonis, G. A., Raston, C. L.: *Nature*, **368**, 229-231 (1994).
- 43) Suzuki, T., Nakashima, K., Shinkai, S.: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 249-252 (1995).
- 44) Araki, K., Akao, K., Ikeda, A., Suzuki, T., Shinkai, S.: *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 73-76.
- 45) Arbogast, J. W., Darmanyan, A. P., Foote, C. S., Rubin, Y., Diederich F. N., Alvarez, M. M., Anz, S. J., Whetten, R. L.: *J. Phys. Chem.*, **95**, 11-12 (1991).
- 46) Arbogast, J. W., Foote, C. S., Kao, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2277-2279 (1992).
- 47) Foote, S.: *Top. Curr. Chem.*, **169**, 347-363 (1994).
- 48) Wasielewski, M. R., O'Neil, M. P., Lykke, K. R., Pellin, M. J., Gruen, D. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2774-2776 (1991).
- 49) Kim, D., Lee, M., Suh, Y. D., Kim, S. K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4429-4430 (1992).
- 50) Dmitrijevic, N. M., Kamat, P. V.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 4811-4814 (1992).
- 51) Sun, Y.-P., Wang, P., Hamilton, N. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6378-6381 (1993).
- 52) Bensasson, R. V., Hill, T. J., Land, E. J., Leach, S., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Ebenhoch, J., Gerst, M., Rüchardt, C.: *Chem. Phys.*, **215**, 111-123 (1997).
- 53) Nagano, T., Arakane, K., Ryu, A., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashioko, S., Hirobe, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2291-2294 (1994).
- 54) Hamano, T., Okuda, K., Mashino, T., Hirobe, M., Arakane, K., Ryu, A., Mashiko, S., Nagano, T.: *Chem. Commun.*, **1997**, 21-22.
- 55) Hung, R. R., Grabowski, J. J.: *J. Phys. Chem.*, **95**, 6073-6075 (1991).
- 56) Hung, R. R., Grabowski, J. J.: *Chem. Phys. Lett.*, **192**, 249-248 (1992).
- 57) Anderson, J. L., An, Y.-Z., Rubin, Y., Foote, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9763-9764 (1994).
- 58) Williams, R. M., Verhoeven, J. W.: *Spectrochem. Acta*, **50A**, 251-254 (1994).
- 59) An, Y.-Z., Viado, A. L., Arce, M.-J., Rubin, Y.: *J. Org. Chem.*, **50**, 8330-8331 (1995).
- 60) Bensasson, R. V., Bienvenue, E., Janot, J. M., Leach, S., Seta, P., Schuster, D. I., Wilson, S. R., Zhao, H.: *Chem. Phys. Lett.*, **254**, 566-570 (1995).
- 61) Krusic, P. J., Wasserman, E., Parkinson, B. A., Malone, B., Holler, Jr., E. R., Keizer, P. N., Morton, J. R., Preston, K. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6274-6275 (1991).
- 62) Brezov*, V., Stasko, A., Rapta, P., Domschke, G., Bartl, A., Dunsch, L.: *J. Phys. Chem.*, **99**, 16234-16241 (1995).
- 63) Brezová, V., Gügel, A., Rapta, P., Stasko, A.: *J. Phys. Chem.*, **100**, 16232-16237 (1996).
- 64) Stasko, A., Brezová, V., Rapta, P., Biskupic, S., Guegel, A.: *Res. Chem. Intermed.*, **23**, 453-478 (1997).
- 65) Ruebsam, M., Dinse, K.-P., Plueschau, M., Fink, J., Krätschmer, W., Fostiropoulos, K., Taliani, C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10059-10061 (1992).
- 66) Hwang, K. C., Mauzerall, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9705-9706 (1992).

- 67) Hwang, K. C., Mauzerall, D.: *Nature*, **361**, 138-141 (1993).
- 68) Osaki, T., Tai, Y., Tazawa, M., Yanemura, S., Inukai, K., Ishiguro, K., Sawaki, Y., Saito, Y., Shinohara, H., Nagashima, H.: *Chem. Lett.*, **1993**, 789-792.
- 69) Imahori, H., Cardoso, S., Tatman, D., Kin, S., Noss, L., Seely, G. R., Sereno, L., Silber, J. C., Moore, T. A., Moore, A. L., Gust, D.: *Photochem. Photobiol.*, **62**, 1009-1014 (1995).
- 70) Williams, R. M., Zwier, J. M., Verhoeven, J. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4093-4099 (1995).
- 71) Imahori, H., Hagiwara, K., Aoki, M., Akiyama, T., Taniguchi, S., Okada, T., Shirakawa, M., Sakata, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11771-11782 (1996).
- 72) Kuciauskas, D., Kin, S., Seely, G. R., Moore, A. L., Moore, T. A., Gust, D., Drovestskaya, T., Reed, C. A., Boyd, P. D. W.: *J. Phys. Chem.*, **100**, 15926-15932 (1996).
- 73) Guldi, D. M., Asmus, K.-D.: *J. Phys. Chem.*, **101**, 1472-1481 (1997).
- 74) Zhang, X., Romeo, A., Foote, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11024-11025 (1993).
- 75) Mikami, K., Matsumoto, S., Ishida, A., Takamura, S., Suenobu, T., Fukuzumi, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11134-11141 (1995).
- 76) Fukuzumi, S., Suenobu, T., Kawamura, S., Ishida, A., Mikami, K.: *Chem. Commun.*, **1997**, 291-292.
- 77) Fukuzumi, S., Suenobu, T., Patz, M., Hirasaka, T., Itoh, S., Fujitsuka, M., Ito, O.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8060-8068 (1998).
- 78) Akasaka, T., Suzuki, T., Maeda, Y., Ara, M., Wakahara, T., Kobayashi, K., Nagase, S., Kako, M., Nakadaira, Y., Fujitsuka, M., Ito, O.: *J. Org. Chem.*, **64**, 566-569 (1999).
- 79) Jensen, A.W., Wilson, S.R., Schuster, D.I.: *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 767-779 (1996).
- 80) Ros, T.D., Prato, M.: *Chem. Commun.*, **1999**, 663.
- 81) Yamakoshi, Y., Yagami, T., Fukuhara, K., Sueyoshi, S., Miyata, N.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 517-517.
- 82) Nelson, M. A., Domann, F. E., Bowden, G. T., Hooser, S. B., Fernando, Q., Carter, D. E.: *Toxic. Ind. Health*, **9**, 623-630 (1993).
- 83) 第十三改正日本薬局方, 厚生省編, 914-915 (1996).
- 84) Chun, Y.-T., Sankawa, U.: *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 314-323 (1989).
- 85) Inamura, I., Isshiki, M., Araki, T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 1671-1673 (1989).
- 86) Inamura, I., Isshiki, M., Araki, T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2413-2415 (1989).
- 87) Hungerbühler, H., Guldi, D. M., Asmus, K.-D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3386-3387 (1993).
- 88) Andersson, Y., Nilsson, K., Sundahl, M., Westman, G., Wennerström, O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 517-518.
- 89) Yamakoshi, Y., Yagami, T., Sueyoshi, T., Miyata, N.: *J. Org. Chem.*, **61**, 7236-7237 (1996).
- 90) Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Fukuhara, K., Miyata, N., Masumizu, T., Kohno, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12363-12364 (1998).
- 91) Yamakoshi, Y., Ymakazaki, E., Sueyoshi, S., Miyata, N.: "Fullerenes, Recent Advances in the Chemistry and Physic of Fullerenes and Related Materials, vol.5"; eds. Ruoff, R. S., Kadish, K. S., The Electrochem. Soc., Inc, Pennington, NJ, pp. 238-243 (1997).
- 92) Sakai, A., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **3**, 377-388 (1995).
- 93) Sakai, A., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **7**, 743-756 (1999).
- 94) Kai, Y., Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Miyata, N.: Presented at the General Fullerene Symposium, Jan 1997, Okazaki; Abstract p 88.
- 95) Tsuchiya, T., Yamakoshi, Y. N., Miyata, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 885-894 (1995).
- 96) Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y. N., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **4**, 989-999 (1996).
- 97) Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *FEBS Lett.* **393**, 139-145 (1996).
- 98) Iwata, N., Mukai, T., Yamakoshi, Y., Hara, S., Yanase, T., Shoji, M., Endo, T., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **6**, 213-226 (1998).
- 99) Tokuyama, H., Yamago, S., Nakamura, E., Shiraki, T., Sugiura, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7918-7919 (1993).
- 100) Bourtine, A. S., Tokuyama, H., Takasugi, M., Isobe, H., Nakamura, E., Hélène, C.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2462-2465 (1994).
- 101) Nakamura, E., Tokuyama, H., Yamago, S., Shiraki, T., Sugiura, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 2143-2151 (1996).
- 102) An, Y.-Z., Chen, C.-H. B., Anderson, J. L., Sigman, D. S., Foote, C. S., Rubin, Y.: *Tetrahedron*, **52**, 5179-5189 (1996).
- 103) Schick, G., Grösser, T., Hirsch, A.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2289-2290.
- 104) Isaacs, L., Wehrsig, A., Diederich, F.: *Helv. Chim. Acta*, **76**, 1230-1250 (1993).
- 105) Diederich F., Isaacs, L., Philp, D.: *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 243-254.
- 106) Foote, C. S.: "Singlet Oxygen", ed. Murray, W., Academic Press: New York, pp. 152-154 (1979).
- 107) Wasserman, H. H., Lipshulz, B. H.: "Singlet Oxygen", ed. Murray, W., Academic Press: New York, pp. 431-490 (1979).
- 108) Habour, J. R., Chow, V., Bolton, J. R.: *Can. J. Chem.*, **52**, 3549-3553 (1974).
- 109) Buettner, G., Mason, R. P.: "Methods in Enzymology", eds. Packer, L., Glazer A.N., Academic Press: San Diego, Vol.186, Part B, pp.127-133 (1990).
- 110) Tabata, Y., Murakami Y., Ikada, Y.: *Fullerene Sci. Technol.*, **5**, 989-1007 (1997).
- 111) Tabata, Y., Murakami Y., Ikada, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 1108-1116 (1997).

ヒト肝薬物代謝活性形質診断法の最近までの進歩

小澤正吾[#]

Diagnosis of hepatic enzyme activities of drug metabolizing enzymes-phenotyping and genotyping

Shogo Ozawa[#]

Drug metabolizing enzymes (DMEs) play an important role in the biotransformation of various xenobiotics, generally by detoxifying and eliminating substrates by converting them to more hydrophilic derivatives, or in some cases, activating substrates by conversion to intermediates that are highly reactive with biological macromolecules. It is widely accepted that the enzymatic activities of hepatic DMEs are one of the most important determinants of the concentration of drugs at their site of action or in the blood. Wide inter-individual variability in drug concentrations in the blood has been demonstrated even after the administration of the same doses on the basis of body weight, and in many cases the wide differences in plasma drug concentrations have been attributed to the individual differences in the enzymatic activities of DMEs. Attempts have therefore been made to estimate the hepatic DME activities of each individual before administration of drugs clinically.

Three different approaches were taken to estimate patients' hepatic DME activities: 1) the use of probe drugs (phenotyping); 2) molecular diagnosis of genetic DME deficiency (genotyping); 3) examination of DME levels/activities in peripheral blood leukocytes/lymphocytes on the assumption that their activities in leukocytes/lymphocytes are well correlated with hepatic enzyme activities. A great number of data have been accumulated concerning the specificity of certain DME for candidate probe drugs, and searches have been made for mutated alleles of DME genes that indicate whether an individual is deficient in DMEs. Gene expression is measured by sensitive methods such as the reverse-transcriptase polymerase chain reaction and/or immunochemical methods in peripheral blood leukocytes/lymphocytes, which are less invasive tissues. Knowledge is being accumulated that will allow the development of useful methods of predicting the activities of hepatic DMEs that affect individual pharmacokinetics/pharmacodynamics.

In this article, various reported methods of assessing hepatic DME activities are reviewed for the purpose of maximizing the efficacy and safety of pharmacotherapy.

Keywords: drug metabolizing enzymes, probe drugs, pharmacogenetics, peripheral blood lymphocytes, drug efficacy and safety

1. はじめに

薬物代謝酵素は、ヒトをとりまく膨大な種類の化学物質に対応し、それらの水溶性を高め、解毒・排泄する重要な役割を果たしている。また、薬物代謝活性の高低は化学物質の体内動態に大きく影響を与える重要な因子であることが明らかになっている。半世紀近く前にはすでに、薬効の重要指標である薬物の血中濃度に、等量の薬物が投与されていても著しい個体差があることが認識されていた。一卵

性双生児の代謝能はほとんど差異が認められないのに対し、二卵性双生児ではかなり大きな代謝能の差異が認められることから、薬物代謝能という一つの表現形質が遺伝因子により決定されていることが示された。さらに、病態時に薬物代謝能が低下する場合があることが判明したことで、薬物療法上、患者の薬物代謝能をあらかじめ知る必要性が感じられるようになった。そこで、大別して以下の3つの方法で薬物代謝能を診断する方法の開発が行われ始めた。1) 第一の方法は、antipyrine等すでに用いられている薬物を低用量投与した後に得られる全身クリアランスなどの体内動態の指標を用いて、薬物代謝能の診断をすることである(2-1項)。その後酵素学的解析が進み、どの基質がどの薬物代謝酵素で代謝されるかが理解されるようになると共に、

[#]To whom correspondence should be addressed: Shogo Ozawa; 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ext.349; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: sozawa@nihs.go.jp

分子多様性の大きい薬物代謝酵素のうちのある特定の分子種の酵素活性を診断する方法の確立へ、努力が払われた(2-2 から 5 項). 2) 第二の方法は、薬物代謝多型を規定する遺伝子上の変異の有無を調べる方法である(3 項). これまでに種々の薬物代謝酵素欠損や時には過剰発現、またそれを規定する変異遺伝子が同定された。変異遺伝子の検出は、患者の血液から白血球を分離すれば可能であり、簡便である。3) 第三の方法は、白血球等比較的少ない侵襲で得られる組織に発現している代謝酵素の活性、タンパク量、mRNA を測定することである。これは、得られたデータが、薬物代謝に重要な、肝などの組織の活性と相関することを確認する必要があると考えられる(4 項)。

これらの方法のうち、代謝酵素欠損に結びつく変異対立遺伝子による検査法はその簡便さと方法の確実性から最良の方法かと思われるが、たとえ知られている変異対立遺伝子を有していないとしても、未知の変異遺伝子の存在の可能性は常につきまとう。また、病態下、薬物相互作用、食品成分による相互作用など、遺伝以外の因子により、薬物代謝能が変動していることも考慮しなければならない。このことは、代謝酵素の基質を投与する方法や、肝外組織における薬物代謝酵素活性を測定する方法を適宜組み合わせる必要があることを意味する。薬物代謝能を「診断」することは、次に列記する薬物療法上極めて重要な諸問題の解決のための方策である。すなわち、i) 病態下における薬物代謝能を知る、ii) 併用薬物や、食品成分による相互作用の結果としての薬物代謝能の変化を知る、iii) 薬物治療上

好ましくない結果に結びつく変異遺伝子を検出し、変異遺伝子を有する患者への不要で危険な投与を避ける。究極的には、薬物の適正使用という目標達成に資することであると考えられる。以上の観点から、本稿では現在までに開発されたヒトの薬物代謝能を「診断」する方法について概説したい。本稿では、主にヒト肝で発現している薬物代謝酵素について述べる。

それら多様な薬物代謝酵素分子種、および本稿では取り上げなかったが特徴的な分子種につき、その代表的基質や知られている遺伝子多型の現況について、"Table for Introduction"にまとめた。

2. 診断薬投与後の尿中、血中代謝物の測定による方法

薬物の代謝能に遺伝因子で規定された個体差があること、薬物の代謝能は病態下や、薬物相互作用により変動することが古くから知られている。このため、肝での代謝が、体内動態に反映され、血中や尿中代謝物量を測定することで、肝代謝能が診断できる「プローブ薬(診断薬)」の開発は極めて多くの研究グループにより試みられてきた¹⁻³⁾。タンパクの分析技術や遺伝子クローニングなど分子生物学的方法の進歩により、薬物代謝酵素の多様性が明らかになっている。各種薬物代謝酵素はそれぞれ多くの分子種から構成されており、ある程度の特異性がある一方、同じ基質に対して親和性を示すことも多い。たとえば、降圧薬 debrisoquin や子宮収縮薬 sparteine はシトクロム P450 (CYP) の一分子種である CYP2D6 の欠損によって特徴的

Table for Introduction

Introduction to molecular diversity and genetic polymorphism in human drug metabolizing enzymes expressed in livers including phase I enzymes, cytochrome P450 (CYP) and epoxide hydrolase (EH), and phase II conjugation enzymes

	主な基質	遺伝子多型と酵素の機能との関連
Phase I 酵素 (シトクロム P450 など)		
CYP1A2	carcinogenic aromatic amines, phenacetin, caffeine	+
CYP2A6	coumarin, nitrosoamines in tobacco smoke	+++
CYP2C9	phenytoin, hexobarbital, tolbutamide, S-mephenytoin	++
CYP2C19	S-mephenytoin, imipramine, amitriptyline, omeprazole	+++
CYP2D6	debrisoquin, sparteine, codeine, dextromethorphan	+++
CYP2E1	benzene, chlorzoxazone, ethanol, nitrosamines, p-nitrophenol	+
CYP3A4	testosterone, cyclosporine, erythromycin, dapsone, nifedipine	+ ~ ?
EH	benzo[a]pyrene 7,8-oxide, styrene 7,8-oxide	+
Phase II 酵素 (抱合系酵素)		
NAT	sulfamethazine, isoniazid, carcinogenic N-OH aromatic amines	+++
SULT	p-nitrophenol, dopamine, dehydroepiandrosterone	+
UGT	bilirubin, p-nitrophenol, steroids	*
GSTA1	carcinogenic N-OH aromatic amines	?
GSTM1	(+)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-oxide, trans-stilbene oxide	+++

NAT, arylamine N-acetyltransferase; SULT, sulfotransferase; UGT, UDP-glucuronyltransferase; GST, glutathione S-transferase; N-OH, N-hydroxy

+++、遺伝子多型と *in vivo* 薬物代謝の表現形質がよく対応；++、遺伝子多型とヒト肝組織を用いた *in vitro* の酵素活性が対応、一部 *in vivo* の薬物代謝の表現形質との対応がみられる；+、遺伝子多型の報告はあるが、代謝活性との関連について、さらに検討が必要なもの；?、肝の酵素活性に個体差があるが、遺伝子多型によるものかどうか検討の途上にあるもの；

*、Crigler-Najjar syndrome の原因となる変異のような疾病を引き起こす変異遺伝子が明らかにされている。

Table 1. Assessment of *in vivo* activities of various drug metabolizing enzymes using probe drugs

Drug metabolizing enzymes assessed Probe drugs used	Metabolic reactions or other pharmacokinetic parameters assessed	References
CYP1A2		
Antipyrine (Phenazone)	Amounts of urinary 4-hydroxy-antipyrine (phenazone) excreted	4,7-12
Aminopyrine	Aminopyrine clearance	5
Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine)	Amounts of urinary N-3-demethyl caffeine excreted	13,14,16-22
CYP2D6		
Debrisoquin	MR (Debrisoquin/4-hydroxy debrisoquin)	23
Sparteine	Sparteine/ Sparteine-N1-oxide	24
Dextromethorphan	Dextromethorphan/Dextrorphan	26-29
CYP2C19		
S-Mephenytoin (Meph.)	HI (Meph. administered/urinary 4'-hydroxy meph. ratio)	30,31
Omeprazole	Omeprazole 5-hydroxylation	32
Proguanil	MR (proguanil/cycloguanil ratio)	33
CYP3A		
Erythromycin	Breath test, N-demethylation of erythromycin	34
Midazolam	1'-Hydroxylation of midazolam	35
Nifedipine	Aromatization of nifedipine	36
Dapsone	Amounts of urinary N-hydroxy dapsone excreted	37
CYP2E1		
Chlorzoxazone	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	42-44
NAT2		
Caffeine	Ratio of urinary AFMU and 1X excreted (AFMU/1X)	18,20-22
Dapsone	MR (Urinary Dapsone/Monoacetyldapsone)	57
UDP-glucuronyltransferase		
Lorazepam	Clearance of lorazepam	45,46
(S, R) Oxazepam	Oxazepam clearance; raio of S/R oxazepam glucuronide in urine	47
CYP1A2, CYP2D6, CYP3A, CYP2E1 and NAT2	Urinary metabolites of caffeine, dextromethorphan, dapsone (N-hydroxy dapsone), 6-hydroxy-chlorzoxazone and dapsone (monoacetyldapsone)	57

MR, metabolic ratio

HI, hydroxylation index

な血中動態が認められる薬物として有名で、CYP2D6の典型的、特異的基質である。また、mephenytoinは、CYP2C19の欠損に関連して、CYP2C19の典型的基質であることが示された。CYP2D6とCYP2C19のN-末端の30アミノ酸配列は全く異なり、全体の相同性も低い。一方、大きく異なるこれらCYP分子種が、共に抗うつ薬 amitriptyline を基質とする。ただし、酸化を行う部位は異なる。このような状況では、多種の薬物代謝酵素活性形質を診断するために、多数の診断薬を、しかも、診断する酵素に特異的なものを選定することが必要であることが容易に推察できる。以上の条件を満足するために、実際に投与された後の体内動態のデータと、ヒト組織より精製した酵素や、cDNAの異種細胞発現系を用いて、問題の薬物に対し、どの酵素が特異性を示すかについてのデータが集積された (Table 1)。

2-1. 初期の薬物代謝能の診断薬, antipyrine (phenazone) および aminopyrine

併用薬物や食品成分による antipyrine (phenazone) や aminopyrine の体内動態の変化、および病態時のクリアランスの測定などを通じて肝薬物代謝能を診断する試みは古く

から始まり、最近も行われている⁴⁻¹²⁾。また、antipyrine (phenazone) の主要代謝物 4-hydroxy phenazone, 3-hydroxymethyl-phenazone, norphenazone の生成にどのCYP分子種が関与するかが調べられ、4-hydroxy-phenazone の生成にはCYP1A2が、norphenazone の生成にはその生成量がCYP3A誘導薬であるrifampicin (rifampin) により増加することから、CYP3Aが関与することを示唆する結果が得られている。aminopyrine については、4-dimethyl-¹⁴C-aminopyrine を健常者に投与した後の脱メチル化による呼気中の¹⁴CO₂の排泄量と血清 aminopyrine クリアランスによい一致をみた。また、フェノバルビタールを同一の個体に前投与した後の呼気中¹⁴CO₂の排泄および血清中 aminopyrine クリアランスの分析により、フェノバルビタールが両者を上昇させることを示した⁹⁾。

2-2. シトクロム P450 の一分子種, CYP1A2 および抱合系酵素の一分子種, arylamine N-acetyltransferase 依存的な薬物代謝能の診断薬

CYP1A2による代謝能の診断薬としてカフェインテストが開発された。caffeine についてもCO₂の呼気中の排泄の

測定などを通じ¹³⁾, caffeine の脱メチル化に CYP1A2 が関与することが示された¹⁴⁾. この後 caffeine の代謝物パラキサンチンを経由し, N-アセチル化を経て生成し, 尿中に検出される代謝物 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU)¹⁵⁾ の量から arylamine N-acetyltransferase (NAT) によるアセチル化能を評価することが可能であることが示され, カフェインテストが非常に有用であると認識され, 多くの研究グループに使用されるようになった¹⁶⁻²²⁾.

2-3. シトクロム P450 の一分子種, CYP2D6 依存的な薬物代謝能の診断薬

CYP2D6 の欠損者は debrisoquin の代謝欠損に関する 1977 年の Mahgoub の報告²³⁾ や sparteine の代謝欠損に関する 1979 年の Eichelbaum の報告²⁴⁾ 以来世界中で研究されてきた. 1980 年代は, いろいろな薬物の代謝欠損が debrisoquin や sparteine の代謝欠損形質と一致するかどうかに関して非常に多くの研究が行われた. その膨大な研究のなかで, dextromethorphan の O-demethylation の主代謝酵素が CYP2D6 であり, 肝ミクロソーム中の CYP2D6 の活性のよい指標であることが示された²⁵⁾. その後, dextromethorphan 服用後の尿中代謝物 dextrorphan の量を測定し, metabolic ratio (MR) = $\mu\text{mol dextromethorphan} / \mu\text{mol dextrorphan}$ を求めて CYP2D6 活性の指標とする方法が用いられている²⁶⁻²⁹⁾.

2-4. シトクロム P450 の一分子種, CYP2C19 依存的な薬物代謝能の診断薬

CYP2C19 の欠損は S-mephenytoin の代謝欠損に関する 1984 年の Küpfer ら³⁰⁾ や Wedlund ら³¹⁾ の報告以後よく研究されてきた. CYP2C19 欠損者でないヒトの肝において, S-mephenytoin 4-hydroxylase の主酵素は CYP2C19 であるという強い証拠が提出されるまでには S-mephenytoin の代謝欠損が知られてから約 10 年の歳月を要した. ヒト肝には CYP2C19 よりも含量はるかに高く, 肝 CYP 全体からみてもかなり高い割合を占める CYP2C9 が存在する. CYP2C9 も S-mephenytoin 4-hydroxylase 活性を示す. 当初は, 良質かつ大量の出発材料が得られ難いヒト肝組織から本酵素活性を指標にしてタンパク精製が試みられた. その結果現在の命名法で CYP2C9, CYP2C8 に相当すると考えられる分子種が単離されてきた. その後, 分子クローニングがなされ, 現在 CYP2C19 と呼ばれる分子種の存在が明確になった. さらに, cDNA の発現系を用いることにより, 電気泳動上の微妙な挙動の差異が捉えられ, ヒト肝ミクロソームにおける CYP2C19 含量が, S-mephenytoin 4-hydroxylase 活性と最もよく相関する分子種であることが示され, CYP2C19 が, ヒト肝の S-mephenytoin 4-hydroxylase の主酵素であることが確実になった. このような歴史をたどり,

CYP2C19 の診断薬として, S-mephenytoin^{30,31)} が用いられるようになり, 最近では, 他に omeprazole³²⁾, proguanil³³⁾ などが用いられている.

2-5. シトクロム P450 の一分子種, CYP3A 依存的な薬物代謝能の診断薬

CYP3A 分子種については, erythromycin を用いた breath test³⁴⁾, midazolam³⁵⁾, nifedipine³⁶⁾, dapsone³⁷⁾ を用いる方法が報告されている. しかし, 尿中の dapsone の N-水酸化体を測定する方法について, 本反応には生体内で主に CYP2E1 が dapsone に対する "low Km enzyme" として役割を果たしているとする報告もあり³⁸⁾, 議論の余地がある. 一方, Jones らは, CYP3A4/5 が生体内で dextromethorphan の N-demethylation の主代謝酵素であり, N-脱メチル化体である 3-methoxymorphan が尿中に回収されることを示した³⁹⁾. 回収量は dextromethorphan に比べればはるかに少ないものの, breath test を日本で施行できる可能性は少ないこと, 上述の dapsone の代謝酵素の特異性の問題を考えると, 一考に値する方法かもしれない.

2-6. シトクロム P450 の一分子種, CYP2E1 依存的な薬物代謝能の診断薬

CYP2E1 については, chlorzoxazone の主代謝物 6-hydroxychlorzoxazone の生成反応を触媒する主酵素であることが示されて以来⁴⁰⁻⁴²⁾, 血しょう中の 6-hydroxychlorzoxazone/chlorzoxazone (6OH-CHZ/CHZ) の比が本酵素活性の指標となりうるかどうか検討された⁴³⁾. (6OH-CHZ/CHZ) の比をもって, アルコール中毒患者における CYP2E1 の誘導と禁酒による CYP2E1 の誘導の解除の観察に応用された⁴⁴⁾.

2-7. 抱合系薬物代謝酵素の一分子種, UDP-glucuronyltransferase 依存的な薬物代謝能の診断薬

抱合酵素系のうち, 前出の NAT の他, UDP-glucuronyltransferase (UGT) の診断薬として, lorazepam^{45,46)}, oxazepam⁴⁷⁾ が用いられた報告がある. oxazepam は estradiol や 3,4-catechol estrogen を基質とするヒト UGT2B7 という UGT 分子種によってグルクロン酸抱合を受けることが示唆されている⁴⁸⁾.

2-8. 複数の診断薬の同時投与 (カクテル) による複数の薬物代謝酵素依存的代謝能の診断

CYP 分子種の多様性が明かになるにつれ, 多様な CYP 分子種の活性形質を迅速に知るため, いくつかの診断薬の同時投与が試みられた⁴⁹⁻⁵⁶⁾. そのために, i) 別種の CYP 分子種により代謝され, ii) 代謝経路があまり複雑ではなく, かつその経路が律速段階であり, iii) 薬物が安全で入

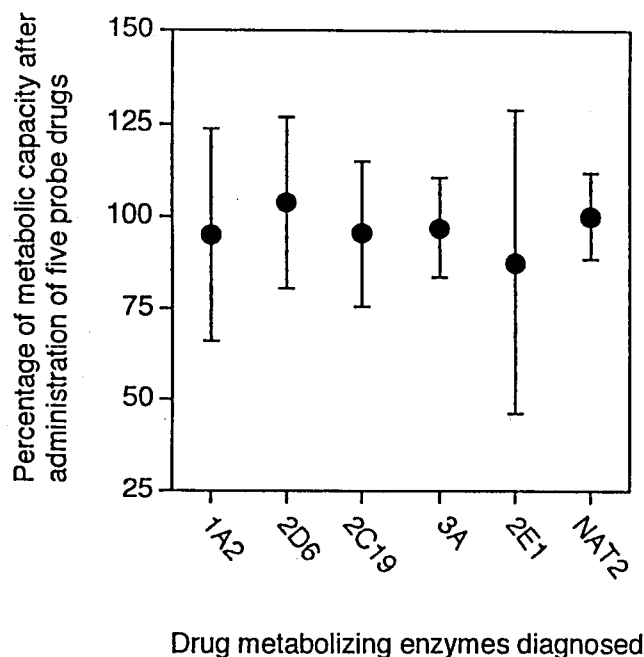


Fig. 1. Percentage of metabolic capacity after simultaneous administration of five probe drugs as compared to that after administration of each probe drug. Adapted from Ref. 57)

Names of CYP forms are abbreviated: 1A2, CYP1A2; 2D6, CYP2D6; 2C19, CYP2C19; 3A, CYP3A; 2E1, CYP2E1. NAT2 means arylamine N-acetyltransferase 2.

手が容易であり、iv) 生体試料からの分離定量及び速度論的解析が容易であるという条件を満たす薬物が選定された。いわゆる"cocktails of test compounds"あるいは単に"cocktail approach"などとも呼ばれている。カクテルの最大の問題は相互作用であろう。しかし、CYP3A, CYP2D6, CYP2Cの活性形質の診断薬と考えられる nifedipine, sparteine, phenytoin を同時投与した場合でも、それらの体内動態はそれぞれの単独投与の場合と比較して大きな変化は認められ

なかった⁵⁰⁾。

1997年、FryeらのPittsburg大学の研究グループは5種の薬物のカクテル"Pittsburg cocktail"を考案した⁵⁷⁾。さらに、Fig. 1に示すように、これら5種の薬物により、14名のボランティアについて測定する5種のCYP分子種の活性の診断結果に対し、診断薬をカクテルにするものの影響は(少数の例外はあるが)大きくないと思われた⁵⁷⁾。また、dapsonのN-アセチル化を指標としたNAT活性に対しては併用したCYP分子種の診断薬をカクテルにするものの影響はほとんど認められなかった⁵⁷⁾。

3. ヒト肝薬物代謝酵素の遺伝子多型に着目した遺伝子診断

ヒト肝薬物代謝酵素活性の顕著な個体差を規定する遺伝因子が最近までの知見の積み重ねにより明かにされつつある。ある薬物代謝酵素をコードする対立遺伝子上に変異があり、その変異が当該酵素の欠損の原因となることが明かにされている場合、そのような変異遺伝子を両方の対立遺伝子に有する個体は明瞭な酵素欠損の形質をもったヒトであることが予想される。前章で述べた診断薬を用いて、著しく薬物の代謝能が低い形質を有することが明らかになったヒトの血液から白血球DNAを抽出し、どのような変異を有しているために問題の薬物の代謝欠損になったかを調べ(genotyping)、遺伝子型の情報を蓄積して、genotypingで代謝欠損を予測できれば、遺伝子診断はもっとも被検者の負担が少ない方法であるといえる。genotyping, すなわち変異遺伝子の検出に用いられるよく普及した方法は、southern blotting, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法や、PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)法であろう。genotypingにより遺伝的に雑種であるヒトの全集団のうちの代謝欠損者を100%に限りなく近い正確さで予測する努力がいろいろな薬物代謝酵素遺伝子について払われ、

Table 2. Homozygosity of certain genetic polymorphism observed in genes encoding drug metabolizing enzymes which are associated with deficiency in the enzyme activities

Genotypic defects	Phenotypic defects	(Blanket) References
CYP2D6 Numerous known allelic variants such as CYP2D6*2-CYP2D6*17, J9, C8 etc.	MR (Debrisoquin/4-hydroxy debrisoquin) Sparteine/N-oxidated metabolite Dextromethorphan/Dextrorphan	68,78,79
CYP2C19 Known allelic variants such as CYP2C19*2-CYP2C19*6	HI (Meph. administered/urinary 4'-hydroxy meph. ratio)	30,31 80-84
NAT2 Known allelic variants such as NAT2*5A-*5C, *6A, *7B, *14B	Ratio of urinary AFMU and 1X excreted (AFMU/1X) MR (Urinary Dapsone/Monoacetyldapsone)	18,20-22 57 85,88

MR, metabolic ratio

HI, hydroxylation index

No allelic variant has been associated with defects in CYP1A2.

No conclusive report has been thus far available on association of allelic variants of CYP2E1 genes with alteration of its enzymatic activities, in spite of some suggestive reports such as refs. 92 and 95.

CYP2D6, CYP2C19, NAT2 については、その努力目標が達成されつつある (Table 2)。しかし、診断薬を用いて、著しい代謝活性の個体差が明らかにされており、しかもその酵素遺伝子につき多くの変異遺伝子が発見されているにもかかわらず、genotype (遺伝子型) と phenotype (形質) の対応につき今後引き続いて検討がなされるべき薬物代謝酵素 (遺伝子) が存在することもまた事実である。そのよい例は CYP1A2 や CYP2E1 と考えられる。

3-1. シトクロム P450 の一分子種、CYP2D6 の遺伝多型による代謝欠損の診断

抗高血圧薬 debrisoquin の 4-水酸化や子宮収縮・抗不整脈薬 sparteine の N-酸化反応を、これら薬物を用いて代謝活性を診断する際、血中または尿中における親化合物量 (濃度)/CYP2D6 依存性代謝物量 (濃度) すなわち MR が用いられることは前章で述べた。CYP2D6 欠損の分子機構の解明を求め、異常な splicing の結果と考えられる mRNA の検出や CYP2D6 酵素タンパクの欠如などが報告された⁵⁸⁾。Kimura ら⁵⁹⁾により、野生型 CYP2D6 遺伝子の構造、核酸塩基配列が明らかにされ、CYP2D6A, B, C, D の変異型遺伝子が相次いで報告された⁶⁰⁻⁶⁶⁾。これら変異遺伝子を有するヒトのうち、白人では B 型の頻度が約 80% と圧倒的に高く、次いで D 型の頻度が約 14% とされていた。これら変異型遺伝子を見出すため、前出の 2 種の薬物のほか、鎮咳薬 dextromethorphan を用いて本酵素による代謝能の欠損者が選り出された。1994 年、Evert らによる T 型対立遺伝子を明らかにした報告では⁶⁷⁾、sparteine を診断薬として、CYP2D6 依存的活性を欠損している、いわゆる poor metabolizer (遅延群, PM) の形質を有すると判断されたヒトの遺伝子が解析された。その時点までの遺伝子型の判定では、野生型/B 型のヘテロ接合子を有することになっており、遺伝子型からでは PM 形質を説明できなかったのだからさらに遺伝子の検索が進められた。このようにして、より出現頻度の低い対立遺伝子が発見され、1996 年、Daly らにより遺伝子型の命名法が整理された⁶⁸⁾。ところで、CYP2D6 依存的な代謝活性の PM の出現率には明瞭な人種差が認められている⁶⁹⁻⁷⁴⁾。日本人の PM のうち、最も頻度が高い変異遺伝子型は D 型であるといわれていた⁷⁵⁾。このような人種差に着目し、Yokoi らは CYP2D6 で主に代謝される抗ヒスタミン薬 (H1 受容体拮抗薬) promethazine により持続的な眠気が残るヒト⁷⁶⁾、あるいは sparteine の MR を指標にして日本人の PM のヒトを選定した⁷⁷⁾。そのようにして選ばれた日本人 PM 集団からはじめて J9 と呼ばれる変異遺伝子⁷⁸⁾や CYP2D6 遺伝子のエクソン 5 の 2661 番からのシトシンが 7 個連続する部位にさらに 1 個のシトシンが挿入された変異遺伝子が発見された⁷⁹⁾。

3-2. シトクロム P450 の一分子種、CYP2C19 の遺伝多型による代謝欠損の診断

抗癌薬メフェニトインのラセミ体投与後の、尿中の 4(')-ヒドロキシメフェニトインの排泄量に著しい個体差が認められた。メフェニトインの 4(')-水酸化形質の指標として mephenytoin hydroxylation index (HI, $\mu\text{mol S-メフェニトイン投与量}/8\text{-}12\text{時間尿中}4(')\text{-ヒドロキシメフェニトイン回収量比}$) や³⁰⁾、S-体の尿中回収量には著しい個体差が認められることから、尿中の R/S 比が用いられた³¹⁾。S-mephenytoin の水酸化酵素 CYP2C19 の欠損の原因となる遺伝子の多型は、エクソン 5 のスプライシングの異常をきたす m1 変異 (*2) と、エクソン 4 内でコードされるアミノ酸が終止コドンに変化する m2 変異 (*3) により、日本人における遅延群のヒトを診断できた⁸⁰⁾。また、白人においては、S-mephenytoin の 4 位の水酸化の PM の頻度が 18-23% である日本人に比べて非常に低く、2-5% である。また、白人の m2 対立遺伝子の頻度も非常に低く、0.3% であったので、さらに、白人において PM の原因となる遺伝子の変異が調べられた。その結果、1997 年に 74 名の中国人 PM のうち 1 例から見い出された Arg433Trp (*5) をはじめ^{81,82)}、開始コドンの変異 (*4)⁸³⁾、Arg132Gln (*6)⁸⁴⁾ の変異が最近 2 年のうちに報告された。*6 の変異を有するヒトはスイス人であり、その変異は 172 名のフランス系白人について検索されたが、一例も見い出されなかった⁸⁴⁾。白人ではもともと PM の頻度が低いこともあり、人種ごとの正確な対立遺伝子の出現頻度の算出は難しいかも知れない。これら CYP2C19 の変異対立遺伝子すべての発見に関わった Goldstein らの研究グループは、いわゆるヨーロッパ系白人集団から CYP2C19 依存性の代謝活性に関する PM37 名を集め、PM の原因遺伝子の検索を進めた結果 CYP2C19*6 を発見した。その報告の時点で遺伝子型から mephenytoin 代謝欠損の形質が説明できない例 (outlier) はさらに少数まで絞り込まれた⁸⁴⁾。

3-3. 抱合系薬物代謝酵素の一分子種、N-acetyltransferase 2 (NAT2) の遺伝多型による代謝欠損の診断

ヒト NAT2 遺伝子については 1995 年、多くの異型遺伝子の情報が整理された⁸⁵⁾。ヒト NAT2*4 と呼ばれる遺伝子型が野生型で、アミノ酸翻訳領域内のいくつかの塩基置換及びそれらの組み合わせにより、野生型遺伝子がコードするアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する NAT2 タンパクがコードされる。異種細胞に発現した酵素分子種の機能の比較により、*12 と命名された対立遺伝子によりコードされる異型酵素 (²⁶⁸Lys→Arg の置換) 以外は、野生型に比べ明瞭な機能低下が示されている。アセチル化能の多型につき、迅速群と遅延群の出現頻度には白人と東洋人間で大きな差異があることが知られており、白人における遅延

群の割合は、52-68%であるのに対し、日本人の遅延群の頻度は10-15%と報告されている⁸⁶⁾。

ヒト NAT2 の欠損に結びつく変異遺伝子を同定するため Cascorbi らは caffeine を診断薬としたテストを行い、アリルアミン N-アセチル化能と、NAT2 遺伝子型との関連を調べた⁸⁷⁾。563 名にカフェインテストを行い、尿中代謝物につき、 $\log[\text{AFMU}/1\text{-methylxanthine (1X)}]$ (2-2 の項参照) の値を求めたところ、その分布には明瞭な二相性が認められた。それに対し、その時点で知られていたアセチル化能が低いヒト (遅延群) と関連する遺伝子型を、両方の対立遺伝子共にもつ個体群を遺伝子型から判定した遅延群 (318 名) とした。また、野生型対立遺伝子を 1 つ以上もつ個体群を遺伝子型から判定した迅速群 (245 名) とした。前者のうちの 23 名 (7.2%) は、カフェインテストからは高いアセチル化能を示す (迅速群) 個体と判定され、後者のうちの 15 名 (6.1%) は、カフェインテストでは低いアセチル化の遅延群の個体と判定された。1995 年の NAT2 に関する本報告⁸⁷⁾ の時点で、遺伝子型と表現形質の間にこの程度の不一致が認められた (Table 3)。genotyping における技術的な問題がごく最近、上述の文献の著者 Cascorbi らにより指摘された⁸⁸⁾。問題が生じる原因は、PCR-RFLP 法において用いられる制限酵素による消化が不十分であることと、特定の対立遺伝子にのみ PCR 増幅が起こるいわゆる allele-specific primer を用いることに伴う false positive/negative に集約される⁸⁸⁾。簡便にテストできる反面、検体数が多くなってくると、実験者の技術の巧拙による問題が生じるものと考えられた。

3-4. 遺伝多型による代謝欠損の診断についてさらなる検討が必要な例 - CYP1A2 および CYP2E1

Table 3. Relationship between genotype and phenotype of human NAT2 (adapted from Ref. 87)

Genotypically rapid	Phenotypically slow
*4/*4	0/29
*4/*5A	0/11
*4/*5B	9/107
*4/*5C	1/14
*4/*6A	4/77
*4/*7B	1/7
*4/*14B	0/1
Genotypically slow	Phenotypically rapid
*5A/*5A	0/2
*5A/*5B	1/16
*5A/*5C	1/3
*5A/*6A	1/4
*5A/*7B	0/1
*5B/*5B	7/78
*5A/*5C	2/14
*5B/*6A	8/118
*5B/*7B	0/1
*5B/*13	0/5
*5C/*5C	0/2
*5C/*6A	1/13
*6A/*6A	2/46
*6A/*7B	0/6
*6A/*13	0/8
*13/*13	0/1

Numbers in phenotype columns represent numbers of individuals with the corresponding phenotype/numbers of individuals with the corresponding genotype.

ヒト肝ミクロソームを用いた CYP1A2 依存的代謝活性 (phenacetin O-dealkylation; 2-acetylaminofluorene N-oxidation; 4-aminobiphenyl N-oxidation; caffeine N-demethylation 等) の著しい個体差およびその二峰性、三峰性の分布から、CYP1A2 に遺伝的多型が存在することが示唆されている²⁰⁾。しかし、カフェインテストで CYP1A2 高活性 (extensive metabolizer, EM, 迅速群)、低活性 (PM) の形質が決められた日本人の CYP1A2 遺伝子の解析では、EM, PM 間に塩基配列の相違が認められなかった⁸⁹⁾。ごく最近、日本人喫煙者において、CYP1A2 依存的代謝反応である caffeine の 3-demethylation を低下させる、すなわち、喫煙による CYP1A2 の誘導を起こりにくくさせる CYP1A2 遺伝子の 5'-上流領域の多型が報告された⁹⁰⁾。さらに今後の解析に期待がもたれる。

ヒト CYP2E1 はエタノールを酸化的に代謝すると共に、エタノールで誘導される。このことから、CYP2E1 は肝ミクロソームにおけるアルコール代謝すなわち、microsomal ethanol oxidizing system (MEOS) の本体であると考えられている⁹¹⁾。最近、CYP1A2 も本反応に関わることが示された⁹²⁾。また、CYP2E1 は、癌原性を有するニトロソ化合物の代謝活性化に関与することが知られており、発癌感受性を規定する因子の候補という観点からもよく研究されている。これらのことから、CYP2E1 依存的代謝活性を規定する変異対立遺伝子がこれまでにいくつか見い出されてきた。それらを列挙すると、CYP2E1 遺伝子の 5'-上流領域の PstI/RsaI 多型⁹³⁾、イントロン 6 の DraI 多型⁹⁴⁾、イントロン 7 の TaqI 多型⁹⁵⁾、アミノ酸翻訳領域内の 2 ヶ所の変異⁹⁶⁾ の他、1998 年、6 種の新規 CYP2E1 対立遺伝子が北ヨーロッパ起源のヒト集団に認められた⁹⁷⁾。これら変異遺伝子のうち、5'-上流領域の PstI/RsaI 多型および 1998 年に報告された G-35T についてはそれら変異により CYP2E1 の発現が若干高まることが示唆されている。変異対立遺伝子と酵素活性との関連について、今後さらに検討が必要である。

4. 侵襲の少ない組織に発現している酵素活性の測定による肝薬物代謝酵素活性形質の診断

近年、肝外での組織、特に小腸における薬物代謝の役割が注目されている。肝外組織での薬物代謝の役割はいろいろな薬物代謝酵素について調べられている。ヒト肝での薬物代謝能を診断する目的で肝外組織における酵素の発現を調べる場合、血液由来の細胞のように、被検者の負担を最小限にして採取できる組織が対象となる。肝での発現が非常に低い場合はこの限りではないかもしれないが、血液由来細胞の酵素活性と、肝における酵素活性との相関が何らかの方法で示され、血液由来細胞の酵素活性が肝での薬物代謝活性の指標になりうる可能性があるか否かについて考察したいと考える (Table 4)。

Table 4. Activities of drug metabolizing enzymes that are detected in easily accessible tissues as blood leukocytes, lymphocytes and platelets as well as livers and small intestines

Enzymes	Easily accessible tissues where enzyme activities are detected	Correlation with enzyme activities in other tissues as liver etc.	References
CYP1A1	AHH in lymphocytes	Very low level of hepatic CYP1A1	97-100,102
	CYP1A1 mRNA in leukocytes		101
	Induction of AHH activity in lymphocytes		97-100,102
CYP1B1	CYP1B1 mRNA in lymphocytes, monocytes and macrophage	?	104
			105
CYP2E1	CYP2E1 level in lymphocytes	Blood concentration of 6-hydroxy-chlorzoxazone correlated with lymphocyte CYP2E1 levels	106
CYP3A	CYP3A3/4 mRNA in monocytes/macrophage (under induced condition)	?	107
EH (microsomal)	EH activities using (+/-)-benzo[a]pyrene-4,5-epoxide as a substrate in polynuclear leukocytes	Leukocyte enzyme activities correlated with microsomal enzyme activities in livers	110,111
GSTM1	GSH-conjugation with TSO as a substrate GSTM1 deletion	Subjects with defect in GST activities toward TSO showed defect in GSTM1 gene by PCR method	115
TS-PSULT	Platelet p-nitrophenol sulfating-activities	Platelet activities correlated with activities in intestine and brain	119,120

AHH, Aryl hydrocarbon hydroxylase; EH, epoxide hydrolase; GST, glutathione S-transferase; GSH, glutathione; TSO, trans-stilbene oxide; PCR, polymerase chain reaction; TS-PSULT, thermostable phenol sulfotransferase

4-1. ヒト血球系細胞を用いたシトクロム P450 の一分子種、CYP1A1 依存的薬物代謝能の診断

ヒト CYP1A1 は、肝での発現レベルは低く、むしろ肝外組織で発現していると考えられている⁹⁸⁾。本酵素は、benzo[a]pyrene の代謝活性化酵素、すなわち、いわゆる aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) と呼ばれている酵素である。また、aryl hydrocarbon receptor (Ahr) および Ahr nuclear translocator (Arnt) 複合体による本酵素の誘導率と肺癌感受性との関連、あるいは、CYP1A1 遺伝子そのものの遺伝子型と肺癌感受性との関連など、様々な角度から研究されてきた。AHH 活性は約 30 年前にはヒトリンパ球に検出されていた⁹⁹⁻¹⁰²⁾。Williams らは、CYP1A1 mRNA をヒト好中球に検出した¹⁰³⁾。また、別の報告によれば、ヒトリンパ球の AHH 活性の 3-methylcholanthrene による誘導率が高いことと、肺癌高感受性との関連しているという興味深い結果が報告されている¹⁰⁴⁾。

4-2. ヒト血球系細胞を用いたシトクロム P450 の一分子種、CYP1B1 依存的薬物代謝能の診断

ヒト CYP1B1 も、dioxin で誘導される CYP 分子種であり、dioxin 等への暴露の生物学的指標を確立することを目指してリンパ球における CYP1B1 mRNA の測定が行われた。in vitro culture に移したリンパ球を dioxin (TCDD) で処理すると、CYP1B1 mRNA のレベルの上昇が観察しうる^{105,106)}。ヒト単球/マクロファージ系で、reverse-transcriptase PCR 法により、強い CYP1B1 mRNA のシグナルが検出された¹⁰⁷⁾。他に、CYP2B6/7、CYP2E1 も検出された。単球系を単離するか、lipopolysaccharide、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-

acetate 24 時間処理を行うことにより、CYP1A1 mRNA も検出された。この系で、cyclosporine A や phenobarbital により CYP3A3/4 mRNA の検出できることが示された¹⁰⁷⁾。CYP1A1 や CYP1B1 をコードする mRNA を血球系細胞で検出する方法は、それぞれの分子種の肝での活性を予測するというよりは、むしろ、疾病との関連や、dioxin のバイオマーカーの確立としての意義があると考えられる。

4-3. ヒト血球系細胞を用いた肝シトクロム P450 の一分子種、CYP2E1 依存的薬物代謝能の診断

ヒトリンパ球における CYP2E1 レベルと、肝 CYP2E1 依存的代謝活性を反映していると考えられる診断薬 chlorzoxazone 服用後生成する 6-hydroxychlorzoxazone の量とが相関することが示された¹⁰⁸⁾。ある薬物代謝酵素について少ない侵襲で得られる組織における代謝活性/代謝酵素レベルと肝における代謝活性が相関する一つの例であり、貴重な研究結果であると考えられる。

4-4. ヒト血球系細胞を用いた肝シトクロム P450 の一分子種、CYP3A 依存的薬物代謝能の診断

多核白血球およびリンパ球において、ヒト CYP3A 分子種すべてに免疫交差性を示すとされたマウス単クローン抗体を用いて、51 kDa のタンパクが検出された¹⁰⁹⁾。しかし、この免疫交差性を示すタンパクは、血球細胞を rifampicin で処理しても誘導が認められなかった。rifampicin 処理により、肝 CYP3A の主な構成タンパクである CYP3A4 が誘導されると考えられている。このことから、血球細胞で認められた CYP3A タンパクの発現レベルが、肝 CYP3A4 依存

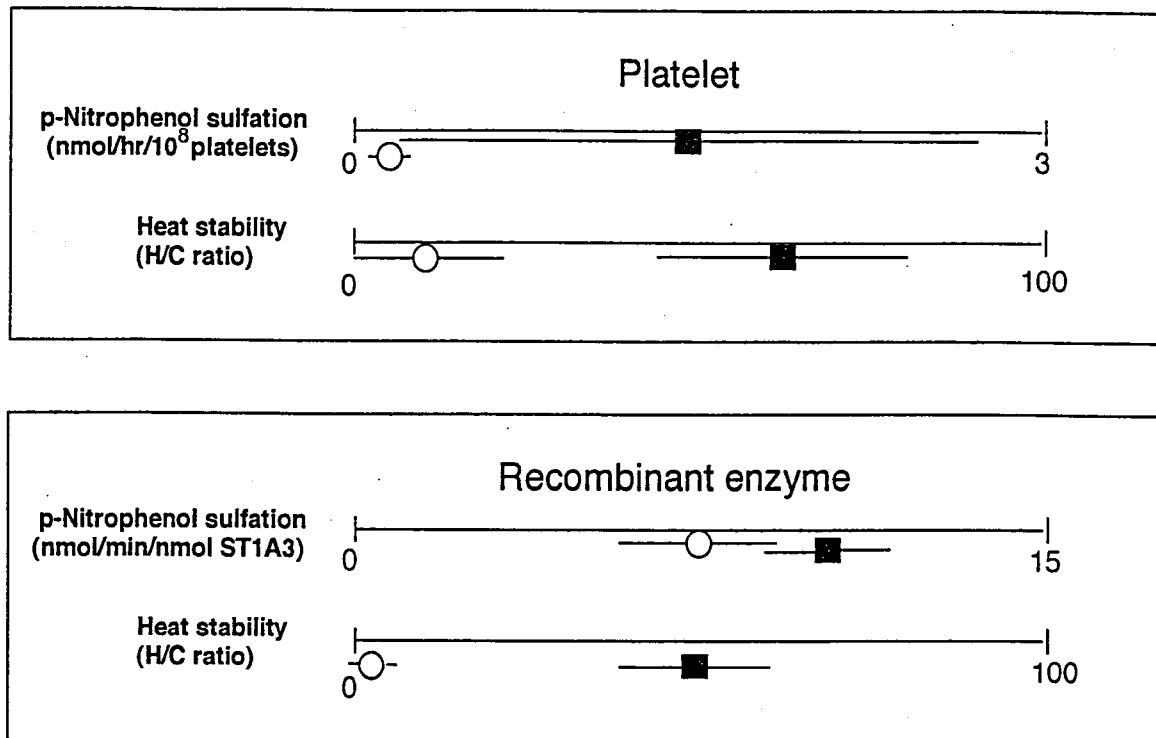


Fig. 2. p-Nitrophenol-sulfating activities and heat stability of human platelets and recombinant ST1A3*1 and ST1A3*2. Results with platelets are adapted from Ref. 130). In "platelets", ■ and ○ represent values of *1/*1 and *2/*2 homozygotes; and bars represent range of enzymatic activities and enzyme stability of 11 and 13 different individuals, respectively. Heat stability implies percentage of enzyme activities in the platelet preincubated at 44°C for 15 min to those without heat treatment. In "recombinant enzymes", ■ and ○ represent values with *1 and *2 recombinant enzymes. Data is expressed mean \pm SD (bars). Heat stability implies percentage of enzyme activities in the platelet preincubated at 37°C for 12 hr to controls.

的代謝活性を反映する可能性は低いかもしれないと思われた¹⁰⁹⁾。

4-4. ヒト血球系細胞を用いた肝 microsomal epoxide hydrolase 依存的薬物代謝能の診断

ヒト epoxide hydrolase (EH) はヒト肝をはじめとした組織の上清画分に存在する分子種¹¹⁰⁾と、ミクロソーム画分に存在する分子種が知られている¹¹¹⁾。これら分子種の活性は、ミクロソーム酵素は cis-stilben oxide, 上清酵素は trans-stilben oxide を基質にして、多核白血球中で測定できることが示された¹¹²⁾。(±)-benzo[a]pyrene-4,5-epoxide を基質としたヒト末梢リンパ球ミクロソーム画分の EH 活性と、同一被験者の肝ミクロソーム画分の EH 活性とはよく相関することが報告され¹¹³⁾、ヒトリンパ球の EH 活性がヒト肝ミクロソームの EH の活性形質を知る指標になることが明らかになった。

4-5. ヒト血球系細胞を用いた肝抱合系薬物代謝酵素の一分子種 glutathione S-transferase M 依存的薬物代謝能

の診断

抱合系薬物代謝酵素では, glutathione S-transferase (GST) 分子種のうち GSTM に属する分子種のリンパ球や白血球における検出結果が報告された¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾。GSTM1 については, PCR を用いてその遺伝子欠損が容易に検出できることが知られている。trans-stilbene oxide (TSO) の glutathione (GSH) 抱合活性の陰性/陽性と, PCR を用いた *GSTM1* 遺伝子の欠損/陽性とがよく相関しており, リンパ球の TSO の GSH 抱合活性により, *GSTM1* 欠損が診断できると考えられた¹¹⁷⁾。

4-6. ヒト血球系細胞を用いた抱合系薬物代謝酵素の一分子種 phenol sulfotransferase 依存的薬物代謝能の診断

Sulfotransferase (SULT) は UDP-glucuronyltransferase と並ぶ重要な抱合系代謝酵素である。ヒト肝では, phenol SULT (3 分子種), estrogen SULT (1 分子種), steroid SULT (1 分子種) が発現している¹¹⁸⁾。phenol SULT は, 温度安定で p-nitrophenol を典型的基質とする 2 分子種 (TS-PSULT) と温度不安定で dopamine を典型的基質とする 1 分子種

(TL-PSULT) が知られている¹¹⁹⁾。TS-およびTL-PSULT 依存的活性は共に、血小板においても測定される¹²⁰⁾。p-nitrophenol を用いて測定した同一被験者の血小板の TS-PSULT 活性と、小腸¹²¹⁾および脳¹²²⁾の活性が相関するとの結果が Mayo Clinic の Weinshilboum らの研究グループにより報告された。また、血小板に発現している TS-PSULT 分子種は、肝における TS-PSULT 分子種のうち、mRNA レベルが高く、酵素活性からも主要と考えられる分子種 (ST1A3¹²³⁾) と、生化学的性質が類似している¹¹⁹⁾。Van Loon ら¹²⁴⁾は、44℃の前処理で著しく不安定な血小板 TS-PSULT を有するヒトの亜集団を見出した¹²⁴⁾。その TS-PSULT の不安定性は遺伝因子によって規定されていることも明らかにされた¹²⁴⁾。その後、50 核家族、237 名のヒト由来の血小板を用いて、詳細な遺伝学的解析が行われ、TS-PSULT の不安定性と個体の熱処理前の TS-PSULT 活性の高/低の形質とは異なる遺伝因子により規定されていることが示唆された¹²⁵⁾。TS-PSULT の 2 分子種 ST1A3 (P-PST, HAST1/2) と ST1A2 (HAST4) のアミノ酸配列が分子生物学的方法で明らかにされた¹²⁶⁻¹²⁹⁾。Raftogianis¹³⁰⁾ および Ozawa¹²³⁾ により、白人集団において、コドン 213 が Arg である ST1A3*1 対立遺伝子 (出現率約 68%)、およびコドン 213 が His である ST1A3*2 対立遺伝子 (出現率約 31%) の存在が報告された。さらに、Raftogianis らは、213His 対立遺伝子ホモのヒトは、例外なく熱不安定で、低活性 (213Arg の対立遺伝子を 1 つでも有するヒトの血小板の活性の約 7 分の 1 以下) の血小板 TS-PSULT を有していたと報告した¹³⁰⁾。著者らは、ST1A3*1、ST1A3*2 をコードする cDNA を単離、大腸菌内に発現させ、213His 型酵素は 45℃の前処理ばかりでなく、37℃の前処理でも 213Arg 型酵素に比べて不安定であることを示した¹³¹⁾。また、nmolTS-PSULT タンパク分子当たりで比較すると、p-nitrophenol 硫酸抱合活性は、不安定な 213His 型酵素でも 213Arg 型酵素の約 70% 程度の活性が認められた¹³¹⁾。これらの結果を、Fig.2 にまとめ、血小板の結果と、著者らの大腸菌内発現系を用いた結果とを比較した。著者らの結果は Weinshilboum らの研究グループが「血小板 TS-PSULT の不安定性と、低活性の形質は異なる遺伝因子により規定される」と示唆していたことを支持するものであったと考えられる。このように、ヒト血小板における TS-PSULT の多型の一部は 213Arg/His 多型によって説明できることが明らかとなった。しかし、Raftogianis¹³⁰⁾ にも述べているように、*1/*1、*1/*2 の遺伝子型を有するヒトの中にも、*2/*2 と同程度に低い血小板 TS-PSULT 活性を有するヒトが認められた。肝臓でも明らかにされた個体差の少なくとも一部が血小板と同様の議論により 213Arg/His 多型で説明できるかどうかを明らかにすることが、今後に残された課題である。

おわりに

薬物代謝酵素活性の遺伝的多型性が種々の酵素活性について認められ、中でも著しい代謝欠損が起こっている場合、薬物治療上大きな問題が生ずる。すなわち、薬物の血中濃度が高すぎたり、薬物が代謝活性化を受けたりする場合には期待された薬効が現われないということである。薬物代謝能の欠損による問題を簡便に、正確に、また、被験者の負担をできる限り軽くして測定するために、いろいろな方策がとられており、それらについて本稿で述べた。大別すると 1) 診断薬投与後の尿中、血中代謝物の測定、2) 遺伝子多型の判定で代謝酵素欠損を正確に予測、3) 侵襲の少ない組織の薬物代謝酵素活性から肝の薬物代謝活性を予測すること、の 3 つとなる。これらの方法を適宜組み合わせることにより、酵素欠損を含め、個体差を「診断」できる薬物代謝酵素がかなり多くなってきていると思われた。その反面、多数の薬物代謝に関与し、肝における含量も高い CYP3A や、肝における主な GST と思われる GSTA1、UGT では 2 family 以外のもの、SULT のうち、肝での含量が高い hydroxysteroid SULT (SULT2 family) の分子種など、肝での活性を診断するよい方法が今のところ見当たらないものも存在する。特に CYP3A 分子種は多くの薬物の代謝に関与することが知られている。また、CYP3A は肝のみならず、小腸でもかなり高いレベルの発現が見られ、薬物の初回通過効果に果たす役割が大きいと考えられているので、本酵素活性の形質を診断する方法を開発することはきわめて重要である。

方法論としては、核酸塩基配列の差異を測定する方法が最も簡便、確実かつ再現性も高いと思われる。最近、ヒトの遺伝子多型を網羅的に明らかにする計画が進んでいる。実際、DNA チップの開発や DNA シークエンサーの改良により従来よりはるかに速いスピードで未知の遺伝多型を見つけ出せる状況が生み出されてきた。それら新発見の多型の中から、生物学的に意義の深い多型をつかまえることが重要であろう。DNA チップは同時に多数の検体の遺伝子型を素早くスクリーニングすることができるので、薬物代謝形質の差異と一致する遺伝子多型を見出す break through となる可能性は高い。このような新しい方法を用いることにより、薬物代謝の形質を遺伝子型で false positive, false negative を可能な限り少なくして診断できる薬物代謝酵素が増えることが大いに期待される。本稿で、薬物代謝酵素遺伝子の多型で薬効や薬物毒性の発現が「診断」できる場合もあるが、新しい遺伝子多型を見出す努力を継続しなければならぬ薬物代謝酵素遺伝子もあると述べた。一方、薬物以外の一般化学物質にもヒトは常に暴露されている。

「化学物質の安全性・リスク評価」と「生体外異物の代謝に関与する薬物代謝酵素の遺伝子多型」の関連では、化学

物質による発癌リスクに関する多くの疫学的研究が行われてきた。具体的には、癌原物質の代謝活性化や解毒に関与する酵素の遺伝子多型に着目した症例対照研究である。すなわち、benzo[a]pyrene など喫煙により暴露される癌原物質代謝酵素の特定の遺伝子型（または表現形質）の出現頻度に、健康者グループと肺癌患者のグループとの間に差異が認められるかどうかを調査し、統計学的手法で解析することである。このような研究において、考慮されるべき因子はがん原物質代謝酵素にとどまらない。DNA修復酵素の遺伝子多型や、癌（抑制）遺伝子の遺伝子多型（例、p53 など）もその例であると考えられる。このように、癌という疾病に対する感受性の決定要因はきわめて複雑であるゆえ、研究は非常に難しい。できるだけ多くの因子を含めて統計学的な解析を行おうとすると解析の信頼性が低下するからである。しかし、上述のように多検体由来の遺伝子の配列や、多型を短時間に解析できる方法が開発された。現状を打開するためには、これまでよりはるかに大きな規模の症例対照研究を行い、ヒトの健康を守るための有用情報を蓄積し、活用することを目指して研究する戦略をたてる必要がある。

文 献

- 1) Kivistö, K. T. and Kroemer, H. K.: *J. Clin. Pharmacol.*, **37**, 40S-48S (1997)
- 2) Brockmöller, J. and Roots, I.: *Clin. Pharmacokin.*, **27**, 216-248 (1994)
- 3) Sturgill, M. G. and Lambert, G. H.: *Clin. Chem.*, **43**, 1512-1526 (1997)
- 4) Vesell, E. S. and Page, J. G.: *Science*, **161**, 72-73 (1968)
- 5) Hepner, G. W. and Vesell, E. S.: *New Engl. J. Med.*, **291**, 1384-1388 (1974)
- 6) Conney, A. H., Pantuck, E. J., Kuntzman, R., Kappas, A., Anderson, K. E. and Alvares, A. P.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **22**, 707-720 (1977)
- 7) Vesell, E. S.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **26**, 275-286 (1979)
- 8) Dssing, M., Poulsen, H.E., Andreasen, P. B. and Tygstrup, N.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 392-396 (1982)
- 9) Toverud, E.-L., Boobis, A. R., Brodie, M. J., Murray, S., Bennett, P. N., Whitmarsh, V. and Davies, D. S.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 155-160 (1981)
- 10) Danhof, M., van Zuilen, A., Boeijinga, J. K. and Breimer, D. D.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 433-441 (1982)
- 11) Teunissen, M. W. E., Kampf, D., Roots, I., Vermeulen, N. P. E., and Breimer, D. D.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **28**, 589-595 (1985)
- 12) Groen, K., Horan, M. A., Roberts, N. A., Gulati, R. S., Miljkovic, B., Jansen, E. J., Paramsothy, V., Breimer, D. D. and van Bezooijen, C. F. A.: *Clin. Pharmacokin.*, **25**, 136-144 (1993)
- 13) Kotake, A. N., Schoeller, D. A., Lambert, G. H., Baker, A. L., Schaffer, D. D. and Josephs, H.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **32**, 261-269 (1982)
- 14) Wietholtz, H., Voegelin, M., Arnaud, M. J., Bircher, J. and Preisig, R.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 53-59 (1981)
- 15) Tang, B. K., Grant, D. M. and Kalow, W.: *Drug Metab. Dispos.*, **11**, 218-220 (1983)
- 16) Campbell, M. E., Spielberg, S. P. and Kalow, W.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **42**, 157-165 (1987)
- 17) Rost, K. L., Brösicke, H., Brockmöller, J., Scheffler, M., Helge, H. and Roots, I.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **52**, 170-180 (1992)
- 18) Kalow, W. and Tang, B. K.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**, 503-514 (1993)
- 19) Fuhr, U. and Rost, K. L.: *Pharmacogenetics*, **4**, 109-116 (1994)
- 20) Butler, M. A., Lang, N. P., Young, J. F., Caporaso, N. E., Vineis, P., Hayes, R. B., Teitel, C. H., Massengill, J. P., Lawsen, M. F. and Kadlubar, F. F.: *Pharmacogenetics*, **2**, 116-127 (1992)
- 21) Notarianni, L. J., Dobrocky, P., Godlewski, G., Jones, R. W. and Bennett, P. N.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **41**, 169-173 (1996)
- 22) Straka, R. J., Hansen, S. R., Benson, S. R. and Walker, P. F.: *J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 740-747 (1996)
- 23) Mahgoub, A., Idle, J. R., Dring, L. G., Lancaster, R. and Smith, R. L.: *Lancet*, **2(8038)**, 584-586 (1977)
- 24) Eichelbaum, M., Spannbrucker, N., Steincke, B., Dengler, H. J.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **16**, 183-187 (1979)
- 25) Dayer, P., Leemann, T., and Striberni, R.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **45**, 34-40 (1989)
- 26) Guttendorf, R. J., Britto, M., Blouin, R. A., Foster, T. S., John, W., Pittman, K. A. and Wedlund, P. J.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **29**, 373-380 (1990)
- 27) Köhler, D., Härter, S., Fuchs, K., Sieghart, W. and Hiemke, C.: *Pharmacogenetics*, **7**, 453-461 (1997)
- 28) Griese, E.-U., Zanger, U. M., Brudermanns, U., Gaedigk, A., Mikus, G., Mörike, K., Stüven, T. and Eichelbaum, M.: *Pharmacogenetics*, **8**, 15-26 (1998)
- 29) Desta, Z., Kerbusch, T. and Flockhart, D. A.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **65**, 10-20 (1999)
- 30) Küpfer, A. and Preisig, R.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **26**, 753-759 (1984)
- 31) Wedlund, P. J., Aslanian, W. S., McAllister, C. B., Wilkinson, G. R. and Branch, R. A.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **36**, 773-780 (1984)
- 32) Chang, M., Tybring, G. Dahl, M.-L., Götharson, E., Sagar, M., Seensalu, R. and Bertilsson, L.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **39**, 511-518 (1995)
- 33) Somogyi, A. A., Reinhard, H. A. and Bochner, F.: *Br J Clin Pharmacol.*, **41**, 175-179 (1996)
- 34) Watkins, P. B., Hamilton, T. A., Annesley, T. M., Ellis, C. N., Kolars, J. C. and Voorhees, J. J.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **48**, 120-129 (1990)
- 35) Thummel, K. E., Shen, D. D., Podoll, T. D., Kunze, K. L., Trager, W. F., Hartwell, P. S., Raisys, V. A., Marsh, C. L., McVicar, J. P., Barr, D. M., Perkins, J. D. and Carithers, R. L., Jr.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 549-556 (1994)
- 36) Schellens, J. H. M., Ghabrial, H., van der Wart, H. H. F., Bakker, E. N., Wilkinson, G. R. and Breimer, D. D.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **50**, 520-528 (1991)
- 37) May, D. G., Porter, J., Wilkinson, G. R. and Branch, R. A.:

- Clin Pharmacol. Ther.*, 55, 492-500 (1994)
- 38) Mitra, A. K., Thummel, K. E., Kalhorn, T. F., Kharasch, E. D., Unadkat, J. D. and Slattey, J. T.: *Clin Pharmacol. Ther.*, 58, 556-566 (1995)
- 39) Jones, D. R., Gorski, J. C., Haehner, B. D., O'Mara, E. M., Jr. and Hall, S. D.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60, 374-384 (1996)
- 40) Peter, R., Böcker, R., Beaune, P. H., Iwasaki, M., Guengerich, F. P. and Yang, C. S.: *Chem. Res. Toxicol.* 3, 566-573 (1990)
- 41) Lucas, D., Berthou, F., Girre, C., Poitrenaud, F. and Menez, J.-F.: *J. Chromatogr.*, 622, 79-86 (1993)
- 42) Kharasch, E. D., Thummel, K. E., Mhyre, J. and Lillibridge, J. H.: *Clin Pharmacol. Ther.*, 53, 643-650 (1993)
- 43) Frye, R. F., Adedoyin, A., Mauro, K., Matzke, G. R. and Branch, R. A.: *J. Clin Pharmacol.*, 38, 82-89 (1998)
- 44) Girre, C., Lucas, D., Hispard, E., Menez, C., Dally, S. and Menez, J.-F.: *Biochem. Pharmacol.*, 47, 1503-1508 (1994)
- 45) Bachmann, K. A., Nunlee, M., Martin, M., Schwartz, J., Jauregui, L. and Forney, R.B., Jr.: *Xenobiotica*, 20, 537-547 (1990)
- 46) Relling, M.V., Crom, W. R., Pieper, J. A., Cupit, G. C., Rivera, G. K., Evans, W. E.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 41, 651-660 (1987)
- 47) Patel, M., Tang, B. K., Grant, D. M. and Kalow, W.: *Pharmacogenetics*, 5, 287-297 (1995)
- 48) Patel, M., Tang, B. K., Kalow, W.: *Pharmacogenetics*, 5, 43-49 (1995)
- 49) Campbell, M. E., Grant, D. M., Inaba, T., and Kalow, W.: *Drug Metab. Dispos.*, 15, 237-249 (1987)
- 50) Schellens, J. H. M., Soons, P. A., van der Wart, J. H. F., Hoevers, J. W. and Breimer, D. D.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 31, 175-178 (1991)
- 51) Israel, B. C., Blouin, R. A., McIntyre, W. and Shedlofsky, S. I.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 36, 229-235 (1993)
- 52) Setiabudy, R., Kusaka, M., Chiba, K., Darmansjah, I. and Ishizaki, T.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 56, 142-153 (1994)
- 53) Endres, H. G. E., Henschel, L., Merkel, U., Hippus, M. and Hoffmann, A.: *Pharmazie*, 51, 46-51 (1996)
- 54) Lautenschlager, M. T., Viktor, S., Müller, U. A. and Hoffmann, A.: *Pharmazie*, 51, 750-753 (1996)
- 55) Lanchote, V. L., Ping, W. C. and Santos, S. R. C. J.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 50, 83-89 (1996)
- 56) Evans, W. E., Relling, M. V., Petros, W. P., Meyer, W. H., Mirro, J. and Crom, W. R.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 45, 568-573 (1989)
- 57) Frye, R. F., Matzke, G. R., Adedoyin, A., Porter, J. A. and Branch, R. A.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 62, 365-376 (1997)
- 58) Gonzalez, F. J., Skoda, R. C., Kimura, S., Umeno, M., Zanger, U. M., Nebert, D. W., Gelboin, H. V., Hartwick, J. P. and Meyer, U. A.: *Nature*, 331, 442-446 (1988)
- 59) Kimura, S., Umeno, M., Skoda, R. C., Meyer, U. A. and Gonzalez, F. J.: *Am. J. Hum. Genet.*, 45, 889-904 (1989)
- 60) Skoda, R. C., Gonzalez, F. J., Demierre, A. and Meyer, U. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5240-5243 (1988)
- 61) Broly, F., Gaedigk, A., Heim, M., Eichelbaum, M., Mörike, K. and Meyer, U. A.: *DNA Cell Biol.*, 10, 545-558 (1991)
- 62) Kagimoto, M., Heim, M., Kagimoto, K., Zeuglin, T. and Meyer, U. A.: *J. Biol. Chem.*, 265, 17209-17214 (1990)
- 63) Gough, A. C., Miles, J. S., Spurr, N. K., Moss, J. E., Gaedigk, A., Eichelbaum, M. and Wolf, C. R.: *Nature*, 347, 773-776 (1990)
- 64) Gaedigk, A., Blum, M., Gaedigk, R., Eichelbaum, M. and Meyer, U. A.: *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 943-950 (1991)
- 65) Hanioka, N., Kimura, S., Meyer, U. A. and Gonzalez, F. J.: *Am. J. Hum. Genet.*, 47, 994-1001 (1990)
- 66) Tyndale, R., Aoyama, T., Broly, F., Matsunaga, T., Inaba, T. and Kalow, W., Gelboin, H. V., Meyer, U. A. and Gonzalez, F. J.: *Pharmacogenetics*, 1, 26-32 (1991)
- 67) Evert, B., Griese, E.-U. and Eichelbaum, M.: *Pharmacogenetics*, 4, 271-274 (1994)
- 68) Daly, A. K., Brockmöller, J., Broly, F., Eichelbaum, M., Evans, W. E., Gonzalez, F. J., Huarig, J.-D., Idle, J. R., Ingelman-Sundberg, M., Ishizaki, T., Jacqz-Aigrain, E., Meyer, U. A., Nebert, D. W., Steen, V. M., Wolf C. R. and Zanger, U. M.: *Pharmacogenetics*, 6, 193-201 (1996)
- 69) Nakamura, K., Goto, F., Ray, W. A., McAllister, C. B., Jacqz, E., Wilkinson, G. R. and Branch, R. A.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38, 402-408 (1985)
- 70) Alván, G., Bechtel, P., Iselius, L. and Gundert-Remy, U.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 39, 533-537 (1990)
- 71) Lou, Y. C., Ying, L., Bertilsson, L. and Sjöqvist, F.: *Lancet*, 2(8563), 852-853 (1987)
- 72) Horai, Y., Nakano, M., Ishizaki, T., Ishikawa, K., Zhou, H.-H., Zhou, B.-I., Liao, C.-L. and Zhang, L.-M.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 46, 198-207 (1989)
- 73) Sohn, D.-R., Shin, S.-G., Park, C.-W., Kusaka, M., Chiba, K. and Ishizaki, T.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 32, 504-507 (1992)
- 74) Bertilsson, L., Lou, Y.-Q., Du, Y.-L., Liu, Y., Kuang, T.-Y., Liao, X.-M., Wang, K.-Y., Reviriego, J., Iselius, L. and Sjöqvist, F.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 51, 388-397 (1992)
- 75) Yokoi, T. and Kamataki, T.: *Seikagaku*, 69, 1196-1199 (1997)
- 76) Nakamura, K., Yokoi, T., Inoue, K., Shimada, N., Ohashi, N., Kume, T. and Kamataki, T.: *Pharmacogenetics*, 6, 449-457 (1996)
- 77) Ishizaki, T., Eichelbaum, M., Horai, Y., Hashimoto, K., Chiba, K. and Dengler, H. J.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 23, 482-485 (1987)
- 78) Yokoi, T., Kosaka, Y., Chida, M., Chiba, K., Nakamura, H., Ishizaki, T., Kinoshita, M., Sato, K., Gonzalez, F. J. and Kamataki, T.: *Pharmacogenetics*, 6, 395-401 (1996)
- 79) Yokoi, T. and Kamataki, T.: *Pharmaceutical Research*, 15, 517-524 (1998)
- 80) Kubota, T., Chiba, K. and Ishizaki, T.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60, 661-666 (1996)
- 81) Xiao, Z. S., Goldstein, J. A., Xie, H.-G., Blaisdell, J., Wang, W., Jiang, C.-H., Yan, F.-X., He, N., Huang, S.-L., Xu, Z.-H. and Zhou, H.-H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281, 604-609 (1997)
- 82) Ibeanu, G. C., Blaisdell, J., Ghanayem, B. I., Beyeler, C., Benhamou, S., Bouchardy, C., Wilkinson, G. R., Dayer, P., Daly, A. K. and Goldstein, J. A.: *Pharmacogenetics*, 8, 129-135 (1998)
- 83) Ferguson, R. J., de Morais, S. M. F., Benhamou, S., Bouchardy, C., Blaisdell, J., Ibeanu, G., Wilkinson, G. R., Sarich, T. C., Wright, J. M., Dayer, P. and Goldstein, J. A.:

- J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 356-361 (1998)
- 84) Ibeanu, G. C., Goldstein, J. A., Meyer, U., Benhamou, S., Bouchardy, C., Dayer, P., Ghanayem, B. I. and Blaisdell, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 1490-1495 (1998)
- 85) Vatsis, K. P., Weber, W. W., Bell, D. A., Dupret, J.-M., Evans, D. A. P., Grant, D. M., Hein, D. W., Lin, H. J., Meyer, U. A., Relling, M. V., Sim, E., Suzuki, T. and Yamazoe, Y.: *Pharmacogenetics*, **5**, 1-17 (1995)
- 86) Kalow, W.: *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 102-107 (1991)
- 87) Cascorbi, I., Drakoulis, N., Brockmöller, J., Maurer, A., Sperling, K. and Roots, I.: *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 581-592 (1995)
- 88) Cascorbi, I. and Roots, I.: *Pharmacogenetics*, **9**, 123-127 (1999)
- 89) Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Shin, S., Kadlubar, F. F. and Kamataki, T.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **3**, 413-421 (1994)
- 90) Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Kinoshita, M., Funayama, M. and Kamataki, T.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **125**, 803-808 (1999)
- 91) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2505-2512 (1970)
- 92) Asai, H., Imaoka, S., Kuroki, T., Monna, T. and Funae, Y.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 1004-1009 (1996)
- 93) Hayashi, S., Watanabe, J. and Kawajiri, K.: *J. Biochem.*, **110**, 559-565 (1991)
- 94) Uematsu, F., Kikuchi, H., Motomiya, M., Abe, T., Sagami, I., Ohmachi, T., Wakui, A., Kanamaru, R. and Watanabe, M.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 254-256 (1991)
- 95) McBride, O. W., Umeno, M., Gelboin, H. V. and Gonzalez, F. J.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 10071 (1987)
- 96) Hu, Y., Oscarson, M., Johansson, I., Yue, Q.-Y., Dahl, M.-L., Tabone, M., Arinco, S., Albano, E. and Ingelman-Sundberg, M.: *Mol. Pharmacol.*, **51**, 370-376 (1997)
- 97) Fairbrother, K. S., Grove, J., de Waziers, I., Steimel, D. T., Day, C. P., Crespi, C. L. and Daly, A. K.: *Pharmacogenetics*, **8**, 543-552 (1998)
- 98) Schweikl, H., Taylor, J. A., Kitareewan, S., Linko, P., Nagorney, D. and Goldstein, J. A.: *Pharmacogenetics*, **3**, 239-249 (1993)
- 99) Nebert, D. W. and Gelboin, H. V.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 6242-6249 (1968)
- 100) Whitlock, J. P. Jr., Cooper, H. L. and Gelboin, H. V.: *Science*, **177**, 618-619 (1972)
- 101) Busbee, D. L., Shaw, C. R. and Cantrell, E. T.: *Science*, **178**, 315-316 (1972)
- 102) Kellermann, G., Shaw, C. R. and Luyten-Kellerman, M.: *N. Engl. J. Med.*, **289**, 934-937 (1973)
- 103) Williams, J. A., Stone, E. M., Millar, B. C., Gusterson, B. A., Grover, P. L. and Phillips, D. H.: *Pharmacogenetics*, **8**, 519-528 (1998)
- 104) Kiyohara, C., Nakanishi, Y., Inutsuka, S., Takayama, K., Hara, N., Motohiro, A., Tanaka, K., Kono, S. and Hirohata, T.: *Pharmacogenetics*, **8**, 315-323 (1998)
- 105) Dassi, C., Signorini, S., Gerthoux, P., Cazzaniga, M. and Brambilla, P.: *Clin. Chem.*, **44**, 2416-2421 (1998)
- 106) Spencer, D. L., Masten, S. A., Lanier, K. M., Yang, X., Grassman, J. A., Miller, C. R., Sutter, T. R., Lucier, G. W. and Walker, N. J.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **8**, 139-146 (1999)
- 107) Baron, J. M., Zwadlo-Klarwasser, G., Jugert, F., Hamann, W., Rübber, A., Mukhtar, H. and Merk, H. F.: *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1105-1110 (1998)
- 108) Raucy, J. L., Schultz, E. D., Wester, M. R., Arora, S., Johnston, D. E., Omdahl, J. L. and Carpenter, S. P.: *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1429-1435 (1997)
- 109) Stärkel, P., Sempoux, C., Van Den Berge, V., Stevens, M., De Saeger, C., Desager, J. P. and Horsmans, Y.: *Life Sci.*, **64**, 643-653 (1999)
- 110) Meijer, J. and DePierre, J. W.: *Chem.-Biol. Interact.*, **64**, 207-249 (1988)
- 111) Seidegård, J. and DePierre, J. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **695**, 251-270 (1983)
- 112) Seidegård, J., DePierre, J. W. and Pero, R. W.: *Cancer Res.*, **44**, 3654-3660 (1984)
- 113) Omiecinski, C. J., Aicher, L., Holubkov, R. and Checkoway, H.: *Pharmacogenetics*, **3**, 150-158 (1993)
- 114) Seidegård, J., DePierre, J. W., Birberg, W., Pilotti, Å. and Pero, R. W.: *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3053-3058 (1984)
- 115) Seidegård, J., DePierre, J. W. and Pero, R. W.: *Carcinogenesis*, **6**, 1211-1216 (1985)
- 116) Seidegård, J., Guthenberg, C., Pero, R. W. and Mannervik, B.: *Biochem. J.*, **246**, 783-785 (1987)
- 117) Brockmöller, J., Gross, D., Kerb, R., Drakoulis, N. and Roots, I.: *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 647-650 (1992)
- 118) Coughtrie, M. W. H., Sharp, S., Maxwell, K. Innes, N. P.: *Chem.-Biol. Interact.*, **109**, 3-27 (1998)
- 119) Weinshilboum, R. M.: *Federation Proc.*, **45**, 2223-2228 (1986)
- 120) Hart, R. F., Renskers, K. J., Nelson, E. B. and Roth, J. A.: *Life Sci.*, **24**, 125-130 (1979)
- 121) Sundaram, R. S., Van Loon, J. A., Tucker, R. and Weinshilboum, R. M.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **46**, 501-509 (1989)
- 122) Young, W. F., Jr., Okazaki, H., Laws, E. R., Jr. and Weinshilboum, R. M.: *J. Neurochem.*, **43**, 706-715 (1984)
- 123) Ozawa, S., Tang, Y.-M., Yamazoe, Y., Kato, R., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F.: *Chemico-Biological Interactions*, **109**, 237-248 (1998)
- 124) Van Loon, J. and Weinshilboum, R. M.: *Biochem. Genetics*, **22**, 997-1014 (1984)
- 125) Price, R. A., Spielman, R. S., Lucena, A. L., Van Loon, J. A., Maidak, B. L. and Weinshilboum, R. M.: *Genetics*, **122**, 905-914 (1989)
- 126) Wilborn, T. W., Comer, K. A., Dooley, T. P., Reardon, I. M., Heinrikson, R. L. and Falany, C. N.: *Mol. Pharmacol.*, **43**, 70-77 (1993)
- 127) Zhu, X., Veronese, M. E., Sansom, L. N. and McManus, M. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 671-676 (1993)
- 128) Ozawa, S., Nagata, K., Shimada, M., Ueda, M., Tsuzuki, T., Yamazoe, Y. and Kato, R.: *Pharmacogenetics*, **5**, S-135-S140 (1995)
- 129) Zhu, X., Veronese, M. E., Iocco, P. and McManus, M. E.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **28**, 565-571 (1996)
- 130) Raftogianis, R. B., Wood, T. C., Otterness, D. M., Van Loon, J. A. and Weinshilboum, R. M.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **239**, 298-304 (1997)

- 131) Ozawa, S., Shimizu, M., Katoh, T., Miyajima, A., Ohno, Y., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Tang, Y.-M., Lang, N. P. and Kadlubar, F. F.: *J. Biochem (Tokyo)*, 126, 271-277(1999)

本文中で用いられた略語,およびその説明

1. CYP, cytochrome P450 日本語表記ではシトクロム (またはチトクロム) P450
2. cDNA, complementary DNA (相補 DNA). すなわち, mRNA から逆転写酵素により DNA に「逆転写」されたもの。また, 分子クローニングによりプラスミドなどに挿入され, 大腸菌などで容易に増やせる形にされた mRNA 由来の

DNA 断片のことをいう。

3. AFMU, caffeine の代謝物の一つ, 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil
4. PM, poor metabolizer (遅延群) の略。代謝活性が低い (遅い) 形質のことをこのように呼ぶ。
5. 1X, caffeine の代謝物の一つ, 1-methylxanthine. caffeine は別名 1,3,7-trimethylxanthine である。caffeine が *N*-demethylation (*N*-脱メチル化) をうける際, 3位のメチル基が脱離して生成した代謝物が 1,7-dimethylxanthine であり 17X, 別名 paraxanthine である。
6. EM, extensive metabolizer (迅速群) の略。4. の PM の反対語として用いられる。

Studies on karyotype evolution in higher primates in relation to human chromosome 14 and 9 by comparative mapping of immunoglobulin C ϵ genes with fluorescence in situ hybridization^{#1}

Hideyuki Tanabe^{#2}

FISH 法による免疫グロブリン C ϵ 遺伝子の比較マッピングに基づいたヒトおよび高等霊長類における 14 番および 9 番染色体の核型進化に関する研究^{#1}

田辺秀之^{#2}

Karyotypic homologies in relation to human chromosome 14 and 9 were studied through comparative mapping of the immunoglobulin C ϵ genes in higher primates by fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. The C ϵ genes will be suitable probes for the analysis of evolutionary rearrangements due to that the multiple recombinational events such as gene duplications and deletions have occurred repeatedly in the immunoglobulin CH gene family (IGH@) during the course of primate evolution. IGH@ locating on the terminal region of human chromosome 14 (HSA14), at band HSA14q32.33, has generated multiple pseudogenes and among subclasses of IGH@ the C ϵ genes have shown most dynamic changes with generating both truncated type (C ϵ 2) and processed type (C ϵ 3) pseudogenes. In this study, chromosomal homologies and rearrangements on HSA14 (C ϵ 1) and HSA9 (C ϵ 3) in relation to the evolutionary genesis of their primate homologous chromosomes in speciation were investigated by comparative mapping with FISH and chromosome painting (ZOO-FISH) techniques. Comparative mapping of the C ϵ 1 gene at HSA14q32.33 was carried out in seven species of nonhuman primates: common chimpanzee (PTR), pygmy chimpanzee (PPA), gorilla (GGO), orangutan (PPY), white-handed gibbon (HLA), agile gibbon (HAG), and Japanese macaque (MFU). The C ϵ 1 gene was assigned to the telomeric region of HSA14 homologues in each species, namely, PTR15q32, PPA15q32, GGO18q16, PPY15q32, HLA17qter, HAG17qter, and MFU7q29, respectively. These results suggested that HSA14 has high degree of syntenic organization with its primate homologues confirmed by ZOO-FISH. Concerning HSA9, comparative mapping of the C ϵ 3 gene at HSA9p24.2→p24.1 was performed. The mapped positions indicated the HSA9 homologous regions detected by ZOO-FISH in each species, namely, PTR11q34, PPA11q34, GGO13q22, PPY13q16, HLA8qter, HAG8qter, and MFU14q22, respectively, suggesting that several dynamic chromosomal rearrangements including at least twice pericentric inversions have occurred during the course of hominoid evolution. The comparison of syntenic groups and painting results has provided a hypothesis of the evolutionary genesis of HSA9 and its homologues with defined breakpoints on the present chromosomes. Likewise, studies on karyotype evolution will be promoted by combining comparative mapping with ZOO-FISH that can more clearly define the chromosomal rearrangements among species.

Keywords: karyotype evolution, FISH, primates, comparative mapping, immunoglobulin C ϵ genes

1. Introduction

1.1 Comparative cytogenetics in higher primates

The understanding of evolutionary processes in mammals has been greatly facilitated by the development of cytogenetic, cellular and molecular procedures in the last two decades. The

advent of differential staining techniques of Q-, G-, R-, and C-bands has permitted the unequivocal identification of human chromosomes as well as other primate chromosomes¹⁻⁵⁾. An example of Q-/G-banded images of human cells is shown in Fig. 1. The application of chromosome banding to cytogenetic studies of mammalian chromosomes has made it possible to monitor more accurately the divergence of chromosome structure in mammalian evolution⁶⁻⁹⁾.

Cytogenetic analyses of G-banding pattern have carried out in more than 80 primate species, and these results have led to several general conclusions. Perhaps most striking is the

^{#1} This review was summarized in part of the thesis presented to the Graduate School of Science, Hokkaido University (1998.3)

^{#2} To whom correspondence should be addressed: Hideyuki Tanabe; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Phone: +81-3-3700-9874; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: tanabe@nihs.go.jp

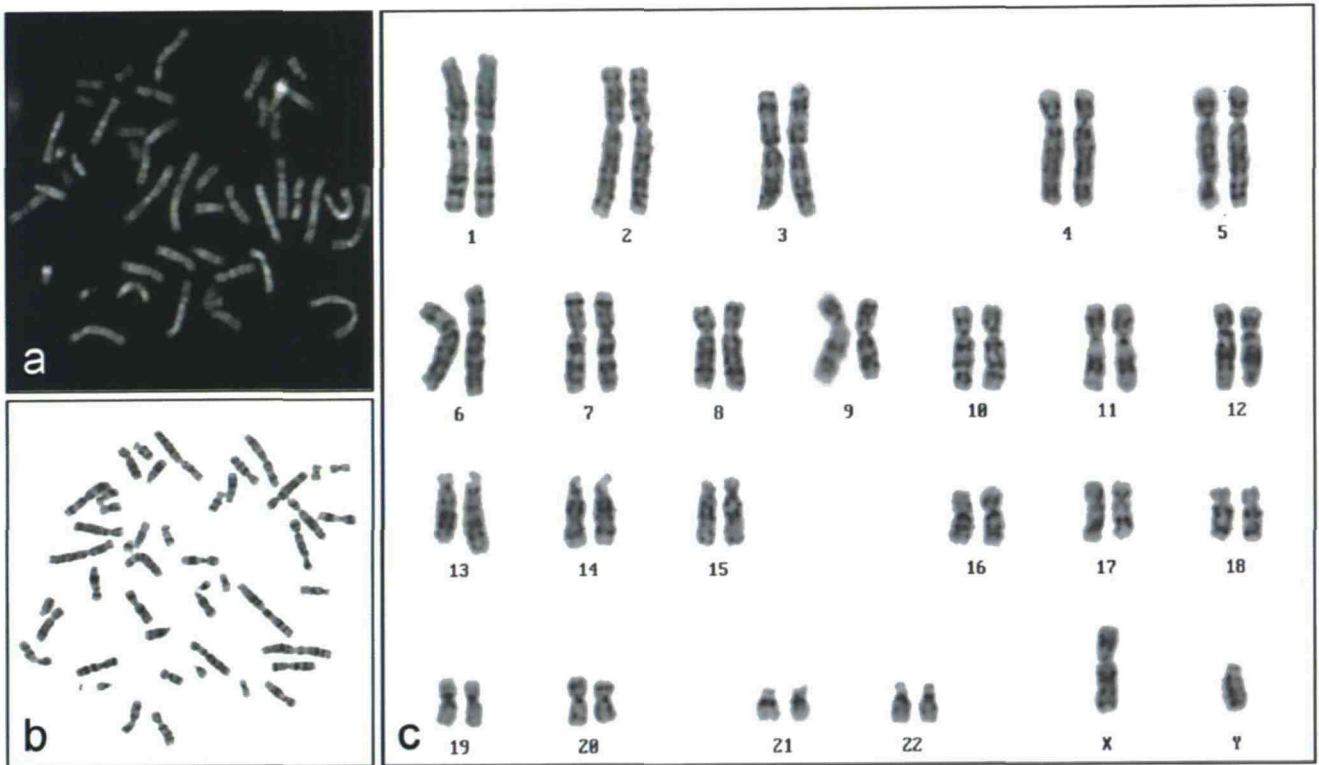


Fig. 1. Chromosome banded images of cells from a human male individual

a) Q-banded metaphase, b) G-banded metaphase, c) G-banded karyotype of the same cell as in b)

extensive conservation of chromosome banding patterns among various primate species^{6,8,10-12}. Comparative chromosome analysis has showed that extensive chromosome banding homology exists not only between closely related primates, such as man and the great apes (chimpanzee, pygmy chimpanzee, gorilla, and orangutan)^{6,7,11,3}, but also to a lesser extent between distantly related primates such as man and the woolly monkey^{14,15}. Only a few chromosome rearrangements between man and the great apes have been observed, and all the human chromosomes have tentative homologues in these species⁶. Yunis and Prakash (1982)¹³ have used high-resolution banding of the chromosomes of man and the great apes to reconstruct the chromosomal rearrangements that have presumably occurred and become fixed during hominoid evolution. Their report confirmed previous observations^{11,16-19} that most of the postulated rearrangements were pericentric inversions, although other rearrangements, such as Robertsonian translocations, paracentric and pericentric inversions, fusions, and fissions, have also occurred in primate species. For example, comparative karyotype analysis between human and the great apes showed the difference in the diploid number of man ($2n=46$) and the great apes ($2n=48$). Human chromosome 2 has no single counterpart in the great apes. Instead, there is an acrocentric

homologue pair for 2p, and another acrocentric homologue pair for 2q. This chromosome comparison between species suggested that human chromosome 2 emerged as a result of a fusion between two nonhomologous ancestral chromosomes similar to these arm counterparts. This fusion event explains the difference in diploid number between man and the great apes^{3,6,11,16,20}. The high extent of chromosome conservation in primates has allowed the construction of chromosome phylogenies, which demonstrate tentative chromosomal changes that have occurred during the simian radiation^{6,21,22}.

Modern primates include 175 species, and a representative phylogenetic tree of hominoid based on several morphological characters (dentition, skeletal traits, cephalic arterial system, larynges, and others) is presented in Fig. 2^{23,24}. Although several methodologies of molecular evolution have been extensively applied to the hominoids (man and apes), relatively less molecular data are available for primate species outside this group²⁵⁻²⁷.

1.2 Comparative gene mapping

The genetic map of homologous loci in a number of mammalian species provides a basis for the evolutionary field of comparative gene mapping²⁸. The occurrence of homologous linkage groups in related species is generally interpreted to

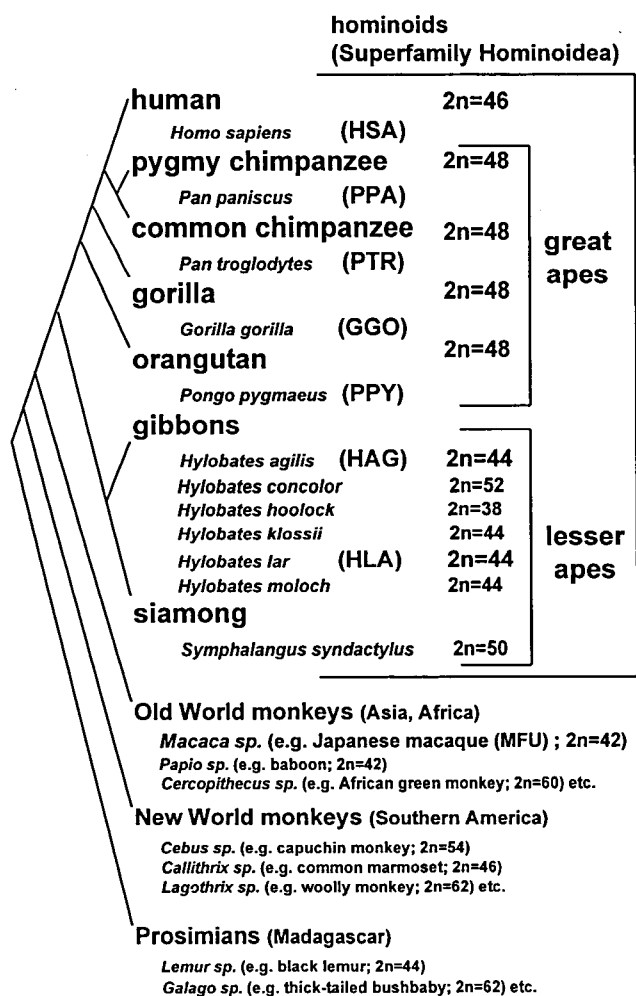


Fig. 2. Primate phylogenetic tree

Classification of the Order Primates. The tree shows phylogenetic relationships and the diploid chromosome number of each species is also described.

reflect the presence of that linkage arrangement in species which were ancestral to the modern species. The genetic maps have been derived primarily by sexual genetic analysis or by parasexual procedures by means of somatic cell hybridization^{29,30}. The application of somatic cell hybridization to gene mapping resulted in a remarkable increase in chromosome assignments in man^{31,32}. With the development of techniques for molecular cloning, thousands of cloned structural genes and anonymous DNA segments have become available for use in the genetic map as well^{33,34}. The molecular clones allow the genetic localization of virtually any gene or DNA segment regardless of whether the locus is expressed or functional. Since human is the most extensively mapped mammalian species³⁴, technologies similar to those employed in human genetics have been also used to construct comparative gene maps in other mammalian species, and the human genetic map is used as an index for primate and for mammalian comparisons^{34,35}. A

general conclusion from comparative mapping studies in man and the nonhuman primates is that many syntenic associations have been evolutionarily conserved and that such conservation can be traced to each of the primate suborders^{8,11,36-40}. A positive correlation seems to exist between morphological and syntenic changes at the chromosome level. This makes morphological attributes, such as banding patterns useful indicators of syntenic homologies in the primate order.

1.3 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

An important advance in human gene mapping has been the development of in situ hybridization of cloned probes to metaphase chromosomes⁴¹. This method involves the molecular hybridization of radiolabelled cloned probes to homologous DNA segments on a metaphase chromosome, followed by an autoradiography and chromosome banding procedure. Regional localization of genes can be directly visualized on individual chromosomes. More recently, nonisotopic hybridization techniques, particularly fluorescence in situ hybridization (FISH), have become an important tool in studies of genome mapping and chromosome structure and function⁴²⁻⁴⁴. Currently composite DNA probe sets for delineating whole chromosomes, chromosomal regions such as telomere and centromere, or gene-specific loci are available⁴⁵. In particular whole chromosomes or large chromosomal regions in a metaphase are painted by FISH using an entire chromosomes as probe DNA. This procedure called "chromosome painting"^{43,46,47} has become a valuable tool to elucidate karyotype rearrangements in primate evolution, since FISH with human chromosome-specific probes has enabled interspecific chromosome homologies to be much precise. This new approach is called as comparative chromosome painting^{48,49}, or ZOO-FISH⁵⁰. For example, the well-known fusion-origin of human chromosome 2 was confirmed by the human chromosome 2 library which painted two chromosome pairs in all great apes^{51,52}. In contrast to previous comparative gene mapping experiments that have been restricted to single-copy sequences, the chromosome painting approach provides an overall comparison of DNA sequence homologies for complete chromosomes.

Although FISH data clearly show that the human genome is closely related to the great apes by the presence of similar DNA sequences providing another phylogenetic parameter for interspecific comparison, whole chromosome painting does not allow the demonstration of homology among subchromosomal regions or intrachromosomal rearrangements, which are supposed to be prominent in the evolution of human and great ape karyotypes. However, these subchromosomal regions or intrachromosomal rearrangements can be readily detected by

defined human probes that span subregions of chromosomes, especially if one of the assumed breakpoints is included⁵³⁻⁵⁵). As the human genome analysis is remarkably progressing, an increasing number of DNA probes will become available for comparative gene mapping studies of any region of interest. Therefore, in this study I used both procedures of ZOO-FISH and comparative mapping for detailed analysis of genome alignment and also precise recognition of chromosome rearrangements in homologous segments.

1.4 Immunoglobulin Cε genes

In the present study, I analyzed localization of genes for immunoglobulin heavy chain in order to obtain additional information about homologies as well as chromosome rearrangements in karyotypes of primate species at the molecular cytogenetic level for better understanding of their karyotype evolution. Immunoglobulins are the effector molecules of the immune system and they are composed of two identical light (L) and heavy (H) chains, each of which consists of variable (V) and constant (C) regions, and have a Y-shaped structure connected by the hinge region⁵⁶). The antigen-binding sites that are formed by a complex of their V regions including three small hypervariable regions of both L and H chains could bind numerous different antigens. There are five classes of H chains, α, δ, ε, γ, and μ, which form the different classes of antibodies, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, respectively, that determine the each effector function. The human H chain genes, which are divided into the ~300 variable (VH), ~20 diversity (D),

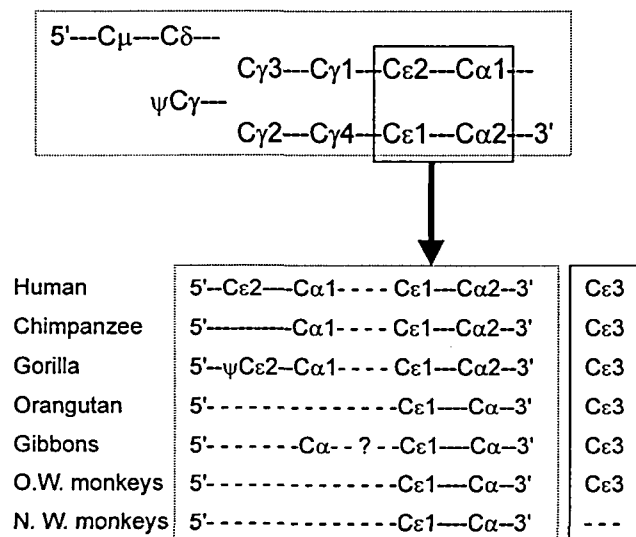


Fig. 3. Organization of IGH@ in higher primate genomes
IGH@ has evolved by the gene duplication involving the Cγ-Cγ-Cε-Cα region after Old World monkeys branched out. Organization of the Cε and Cα genes is described in the lower dotted rectangle with Cβ gene at each side from human to New World monkeys.

6 joining (JH), and 11 constant (CH) gene segments, are arrayed in a direction from telomere to centromere to build up a huge gene cluster at the distal region of chromosome 14 (HSA14q32.33) and the total length is estimated to encompass 2.5 to 3 megabases DNA, making it one of the largest gene clusters in the mammalian genome⁵⁷⁻⁶¹). In this gene cluster the combinatorial somatic recombination of the VDJ-segments greatly increases the diversity of antibody that occurs in the B lymphocyte in which the antibody is expressed and the process called class switching allows the antibodies with varied biological properties^{62,63}). During the switch recombination, DNA deletion occurs by cutting and rejoining between the assembled VDJ sequence and the upstream of the particular CH gene segment. From the evolutionary view point, likewise, the dynamic genetic rearrangements such as deletions, duplications, insertions, and gene conversions as well as point mutations have occurred in the genesis of CH genes (defined as to IGH@⁶⁴) during the course of primate evolution⁶⁵⁻⁷¹) (Fig. 3). The human IGH@ contains 9 functional CH genes and 2 pseudogenes with the order of 5'-Cμ-Cδ-Cγ3-Cγ1-Cε2(Ψ)-Cα1-ΨCγ-Cγ2-Cγ4-Cα2-3'. It seems that a Cγ gene must have been duplicated to give the subcluster of Cγ-Cγ-Cε-Cα, after which the entire group was then duplicated^{58,72}). IGH@ contains another pseudogene, the processed pseudogene Cε3 (IGHEP2)⁷³, which is located on a different chromosome from HSA14⁷⁴), suggesting

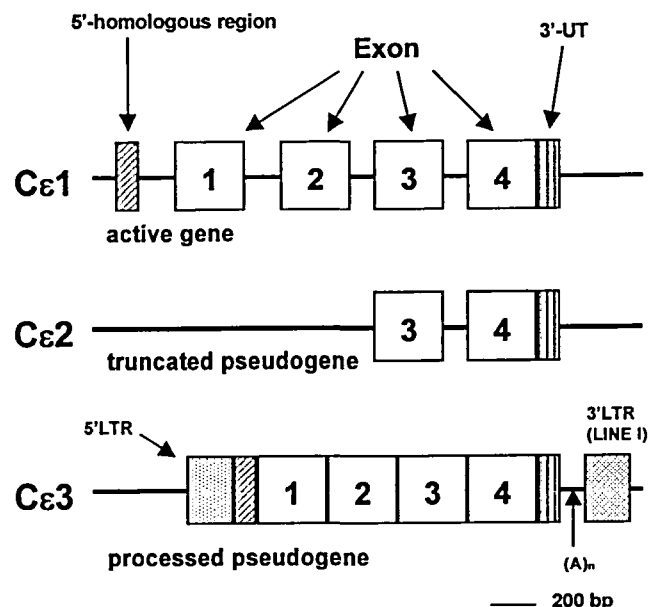


Fig. 4. Schematic representation of the three Cε genes
The Cε2 gene lacks the 5' upstream region including exon 2. The Cε3 gene lacks the three introns entirely and has an A-rich sequence followed by the 3'-untranslated region so far indicating a processed pseudogene.

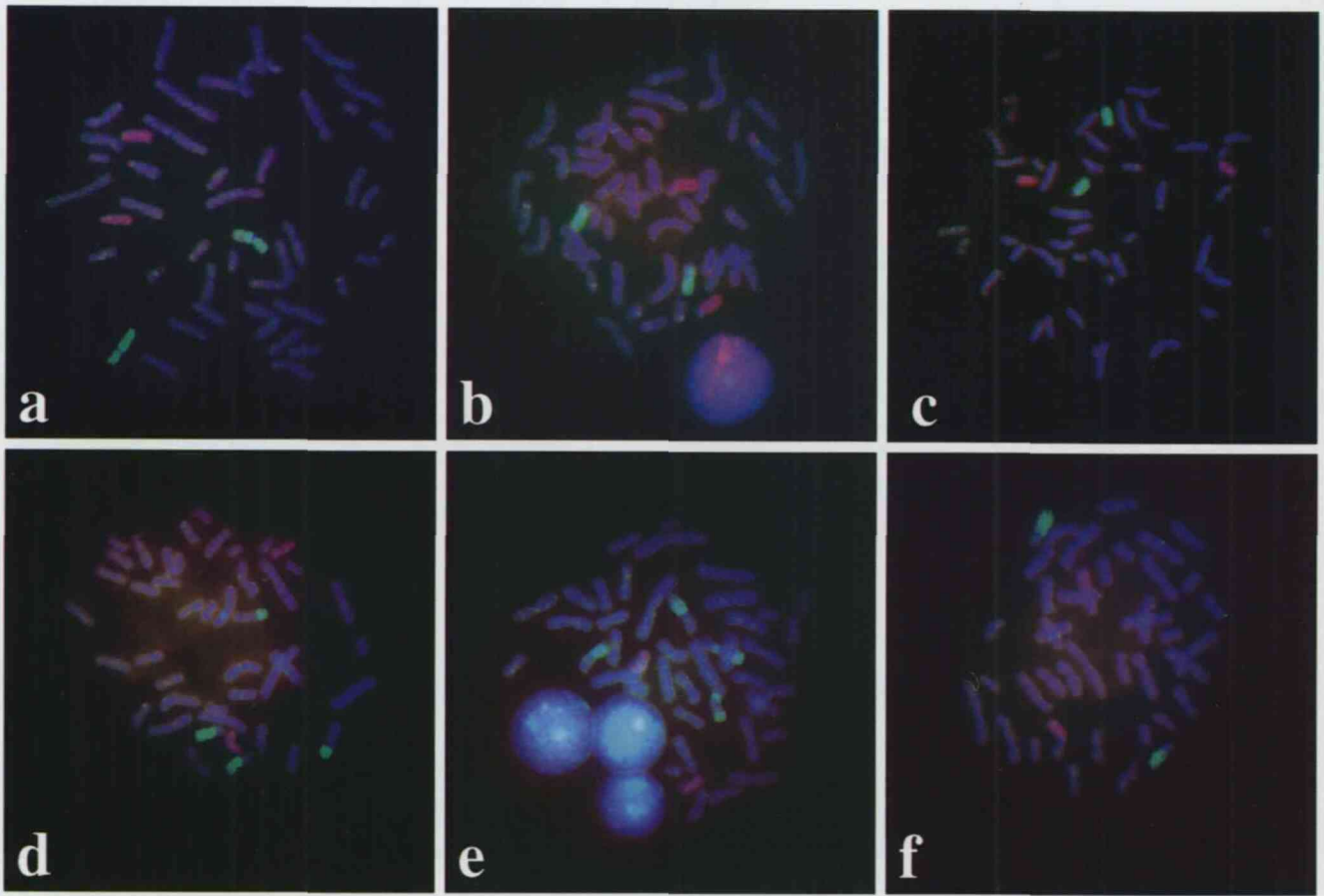


Fig. 5. ZOO-FISH images

Cy3-labelled WCP#14 and SpectrumGreen-labelled WCP#9 probes were hybridized to human and primate metaphases: a) human, b) common chimpanzee, c) orangutan, d) white-handed gibbon, e) agile gibbon, and f) Japanese macaque.

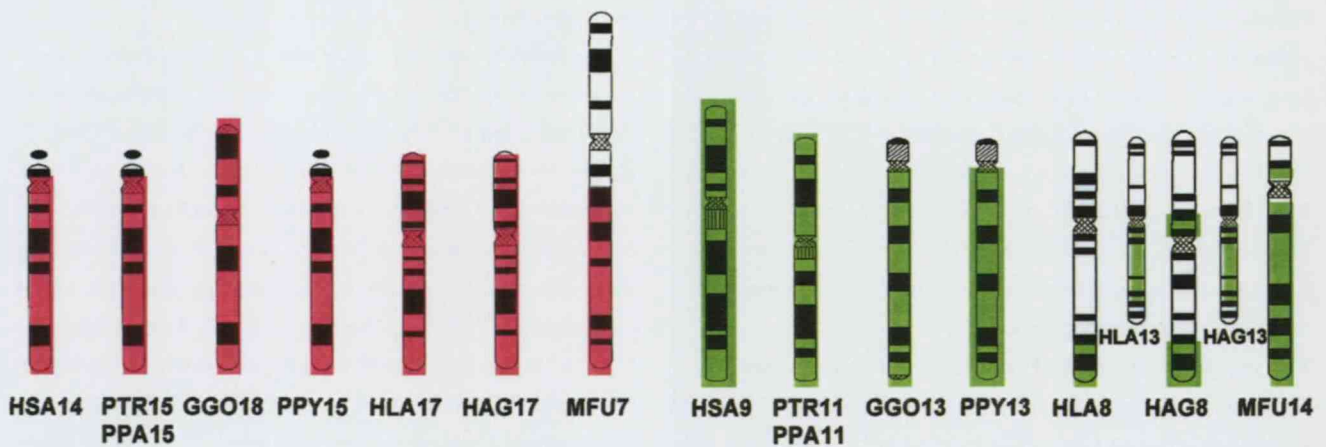


Fig. 6. Idiogrammatic summary of ZOO-FISH results

Painted chromosomal regions of both WCP probes in human and the primates were indicated by respective colors, pink and green. Note the difference between HLA8 and HAG8.

extensive reorganization of IGH@ loci. The presence of homologues of the processed pseudogene C ϵ 3 has been demonstrated in catarrhine primate species (Old World monkeys, apes, and human) so far examined⁷⁵. Thus, detailed comparative mapping of IGH@ loci between human and nonhuman primates will reveal a dynamic evolutionary trail of this gene family in relation to chromosome rearrangements. In this study among IGH@ a class of the C ϵ genes is adopted since the most dynamic reorganization might be occurred in the C ϵ loci by the existence of two types of pseudogenes, namely, C ϵ 2 (IGHEP1) which is a truncated-type pseudogene and C ϵ 3 (IGHEP2) which is a processed-type pseudogene (Fig. 4). Moreover, the phylogenetic relationships among human and the great apes based on the gene trees in relation to the processed pseudogene C ϵ 3 were documented^{75,76}.

2. Syntenic organization of HSA14 in the primate homologues

In the present study I used the following seven primate species by employing the systems for the great apes⁷, gibbons^{77,78}, and Japanese macaque^{79,80}: common chimpanzee (*Pan troglodytes*; PTR), pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*; PPA), gorilla (*Gorilla gorilla*; GGO), orangutan (*Pongo pygmaeus*; PPY), white-handed gibbon (*Hylobates lar*; HLA), agile gibbon (*Hylobates agilis*; HAG), and Japanese macaque (*Macaca fuscata*; MFU).

2.1 Comparative chromosome painting (ZOO-FISH) with HSA14 DNA probe

I employed FISH with a HSA14 specific composite DNA probe, WCP#14, to demonstrate homology between HSA14 and its counterpart in seven primate species. This probe produced uniform hybridization signals in one pair of whole chromosomes in each species of six primates except for Japanese macaque whose hybridization signals appeared on only a distal part of the long arm of a chromosome pair (Figs. 5 and 6). Each painted chromosome was identified by Q-banding as PTR15 and PPA15 for both common and pygmy chimpanzees, GGO18 for gorilla, PPY15 for orangutan, HLA17 and HAG17 for both white-handed and agile gibbons, and MFU7q for Japanese macaque, respectively (Fig. 6). The present painting results confirmed the homology of the previous works^{5,51}.

2.2 Comparative mapping of the C ϵ 1 gene in higher primates

I performed comparative mapping at the single gene level by FISH using a human Ch4A-H-Ig ϵ -12 probe⁸¹ for the human C ϵ 1 gene. This probe gave hybridization signals on HSA14q32.3 (Fig. 7), confirming the localization of the IGH@ gene cluster. This probe also hybridized to specific loci on metaphase chromosomes of each primate species, indicating existence of

homologous chromosome regions among these species. After chromosome identification by Q-banding, the primate C ϵ 1 genes were mapped to bands PTR15q32, PPA15q32, GGO18q16, PPY15q32, HLA17qter, HAG17qter, and MFU7q29, respectively (Fig. 7)⁸². These mapped positions were all the telomeric regions of long arms of each homologue of HSA14 that corresponding to the position of HSA14q32.33. A summary of FISH mapping data is given in Fig. 8.

2.3 Comparative mapping and ZOO-FISH reveal syntenic organization of HSA14 in the primate homologues

Comparative chromosome banding analysis has shown homology between HSA14 and its equivalent chromosome of the great apes, but homologies with the white-handed gibbon, agile gibbon, and Japanese macaque were unclear until the application of comparative chromosome painting technique, in another word, ZOO-FISH^{49,51}. As proposed after these studies, HSA14 corresponds to PTR15, PPA15, GGO18, PPY15, HLA17, HAG17, and a distal part of MFU7q and these were confirmed in this study. Although ZOO-FISH method is effective for identification of chromosome homologies, further approach for more detailed analysis to identify syntenic chromosome segments for intrachromosomal rearrangements is necessary. As shown in Fig. 8, the primate C ϵ 1 genes localized at the terminal region of the long arms of HSA14 homologues. This assignment provides us a new information of syntenic segments at telomeric region and that human genome is closely similar to these primate species at the single gene level. The present data also suggest that GGO18 which is only a submetacentric chromosome among the homologues of HSA14 in the great apes might have been derived from at least one pericentric inversion during the evolution (Fig. 6). Further analyses will clarify the rearrangements.

In contrast to the great apes which have diploid chromosome numbers of 48, the lesser apes show karyotypic variation: *Hylobates agilis* (2n=44), *Hylobates concolor* (2n=52), *Hylobates hoolock* (2n=38), *Hylobates klossii* (2n=44), *Hylobates lar* (2n=44), *Hylobates moloch* (2n=44), and *Symphalangus syndactylus* (2n=50). Moreover, these lesser apes show little similarity of chromosome banding patterns to human chromosomes^{19,77,78,83-87}. Painting with 22 human autosome libraries to these hylobatid metaphases showed considerably complicated chromosomal rearrangements including numerous translocations in hylobatid chromosomes^{51,88,89}. These results demonstrated that the 22 autosomes have been divided into 51 elements to composing the 21 gibbon autosomes (2n=44)⁵¹, while at least 33 translocations have occurred in the siamong (*Symphalangus syndactylus*, recently changed to *Hylobates*

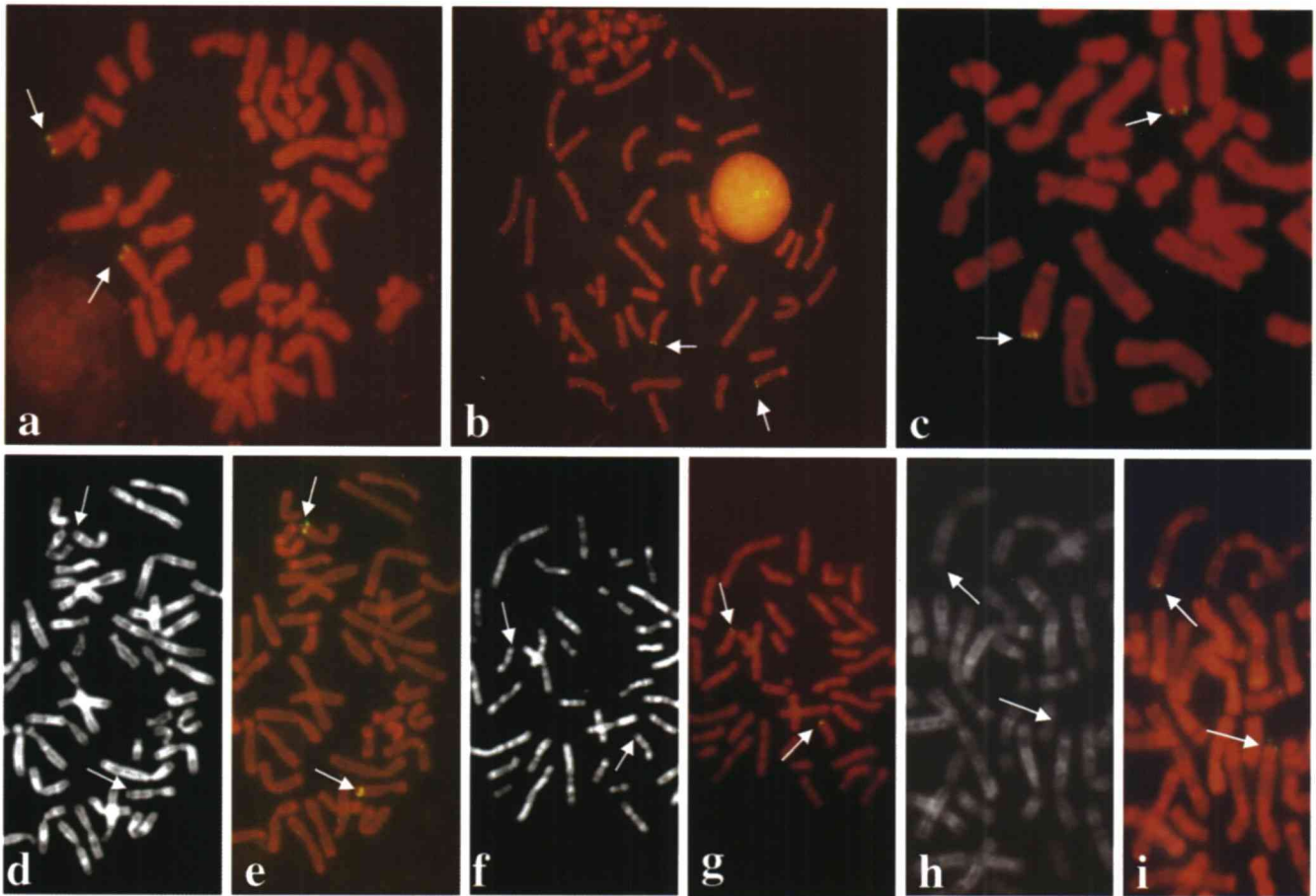


Fig. 7. FISH images of metaphases hybridized with the C ϵ 1 gene

Localization of the human and primate C ϵ 1 genes: a) human, b) common chimpanzee, c) pygmy chimpanzee, d)-e) gorilla, f)-g) white-handed gibbon, and h)-i) Japanese macaque. Pre-Q-banded images showed in d), f), and h) indicating the same images as in e), g), and i), respectively.

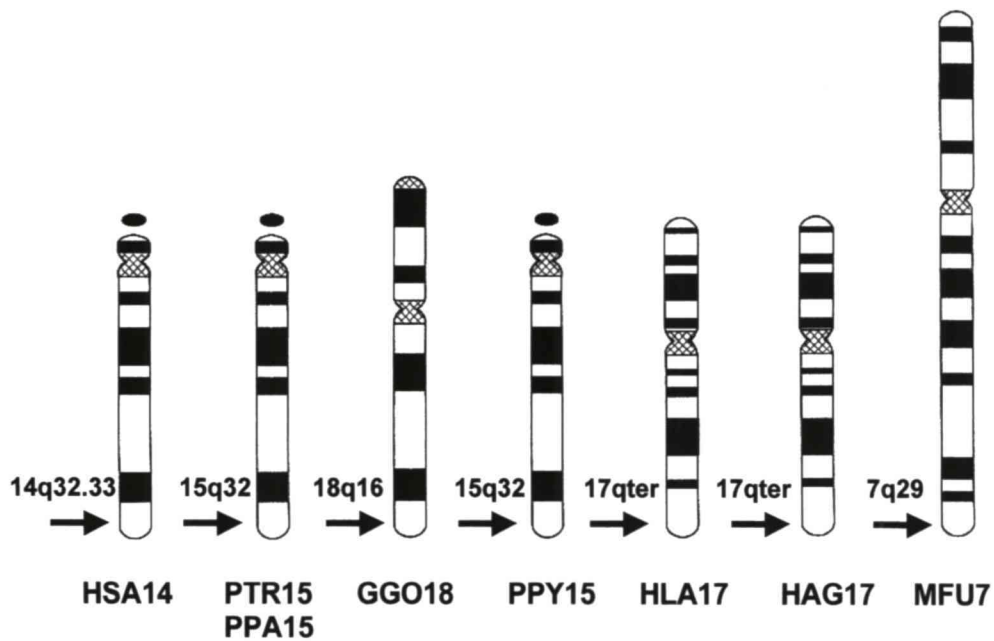


Fig. 8. Idiogrammatic representation of the localization of the primate C ϵ 1 genes

Arrows indicate the position of the C ϵ 1 genes and chromosome band numbers of each species are given.

syndactylus; 2n=50)⁸⁸⁾. In spite of many rearrangements between human and gibbon chromosomes, the present ZOO-FISH studies showed that only HLA17 and HAG17 was painted indicating no interchromosomal rearrangements. However, the present between HSA14 and HLA17/HAG17 indicate the occurrence of complicated intrachromosomal rearrangements including at least one pericentric inversion event, since HSA14 is acrocentric and both HLA17 and HAG17 are submetacentric, and no banding similarities is found between them. It is interesting to know why HSA14 homologues in gibbon karyotypes are highly conserved without interchromosomal rearrangements, because extremely high evolutionary rate and interchromosomal rearrangements have been noted in gibbon genomes^{51,77,78,90,91)}.

In Japanese macaque, HSA14 corresponded to the distal part of MFU7q by the present ZOO-FISH confirming the previous painting studies^{49,92)} as well as chromosome banding studies^{12,39,80,93-95)}. The present comparative mapping data confirmed syntenic segment between HSA14 and MFU7q at the single gene level.

Collectively, the comparative mapping of the Cε1 genes in higher primates supports the previous chromosome banding and painting studies and suggests that HSA14 has a high degree of syntenic organization with its homologues of the great apes, white-handed and agile gibbons, and Japanese macaque. The combined procedure of ZOO-FISH and comparative mapping here indicates interspecies chromosome homologies as well as syntenic segments at the DNA level.

3. Evolutionary genesis of HSA9 and its primate homologues

3.1 ZOO-FISH with HSA9 DNA probe in higher primates

FISH with HSA9 DNA probe (WCP#9) to metaphases of each species resulted as expected in a specific delineation of chromosome homology. These painted chromosomes were PTR11, PPA11, GGO13, PPY13, distal portion of HLA8q and proximal portion of HLA13q, centromeric and distal regions of HAG8q and proximal portion of HAG13q, and MFU14q, respectively (Figs. 5 and 6), in accordance with the previous painting data⁵¹⁾. According to Stanyon *et al.* (1987)⁷⁸⁾, balanced inversion and translocation polymorphisms have been reported for different gibbon species, and three forms of inversion of gibbon chromosome 8 are noted as 8a, 8b, and 8c. The presented gibbon species here also indicated polymorphism to form 8b/8b in HLA and 8c/8c in HAG (Fig. 6). WCP#9 probe indicated that the form 8b had one painted part of distal q subregion whereas the form 8c showed two painted parts of centromeric and distal q subregions (Figs. 5 and 6).

3.2 High resolution mapping of the human Cε3 gene to HSA9p24.2→p24.1

FISH using WES-H-Ig ε-31 probe⁸¹⁾ for the Cε3 gene to human metaphases resulted in assignment of the gene to the telomeric region of HSA9p, band 9p24 (Fig.9). The locus for the Cε3 gene was further examined by high-resolution G-banding at approximately 600 or more band-stage resulting the subregional assignment to 9p24.2→p24.1 (Fig. 9)⁹⁶⁾.

3.3 Comparative mapping of the Cε3 gene in higher primates

The DNA probe, Ch28-PTR-Ig ε-301, for the chimpanzee genomic Cε3 gene⁷⁶⁾ used to comparative mapping in higher primates hybridized to specific chromosomes of each species. The primate Cε3 genes localized to PTR11q34, PPA11q34, GGO13q22, PPY13q16, HLA8qter, HAG8qter, and MFU14q22, respectively (Figs. 9 and 10), suggesting that several dynamic chromosomal rearrangements including at least twice pericentric inversions have occurred during the course of hominoid evolution. To investigate the interchromosomal rearrangements with more precise chromosomal breakpoints in speciation, three other cosmid markers of cCI9-37, cCI9-135 and cCI9-208 on HSA9 were used for further comparative mapping in the great apes. The idiogrammatic summary of all the results of comparative mapping indicated in Fig. 10.

3.4 Evolutionary genesis of HSA9 and its primate homologues

Comparative banding analysis between human and primates has been used for a number of years as a basis for studying primate phylogenies^{6,13,16)}. Yunis and Prakash (1982)¹³⁾ have used high resolution banding techniques to chromosomes of human and the great apes to reconstruct chromosome rearrangements that have presumably occurred and become fixed during hominoid evolution. They reported that the orangutan lineage was first branched off after 6 karyotypic changes and subsequently each lineage of the gorilla after 14 karyotypic changes, chimpanzee after 15 karyotypic changes, and human after 11 karyotypic changes has occurred. Most of the postulated chromosomal rearrangements were pericentric inversions, although other rearrangements of paracentric inversions, fusions, etc., have also occurred. The presumed common ancestors of human and the great apes shared a substantially identical genetic set, which might have possessed a more-or-less orang-gorilla type of chromosomes equivalent to human chromosomes. However, the details of the evolutionary scenario of HSA9 were still unclear, even with high-resolution banding techniques. The present comparative mapping of the Cε3 genes and the other three markers combined with ZOO-FISH data supports the hypothesis of Yunis and Prakash (1982)¹³⁾ for the origin of HSA9. I defined the breakpoints of the pericentric

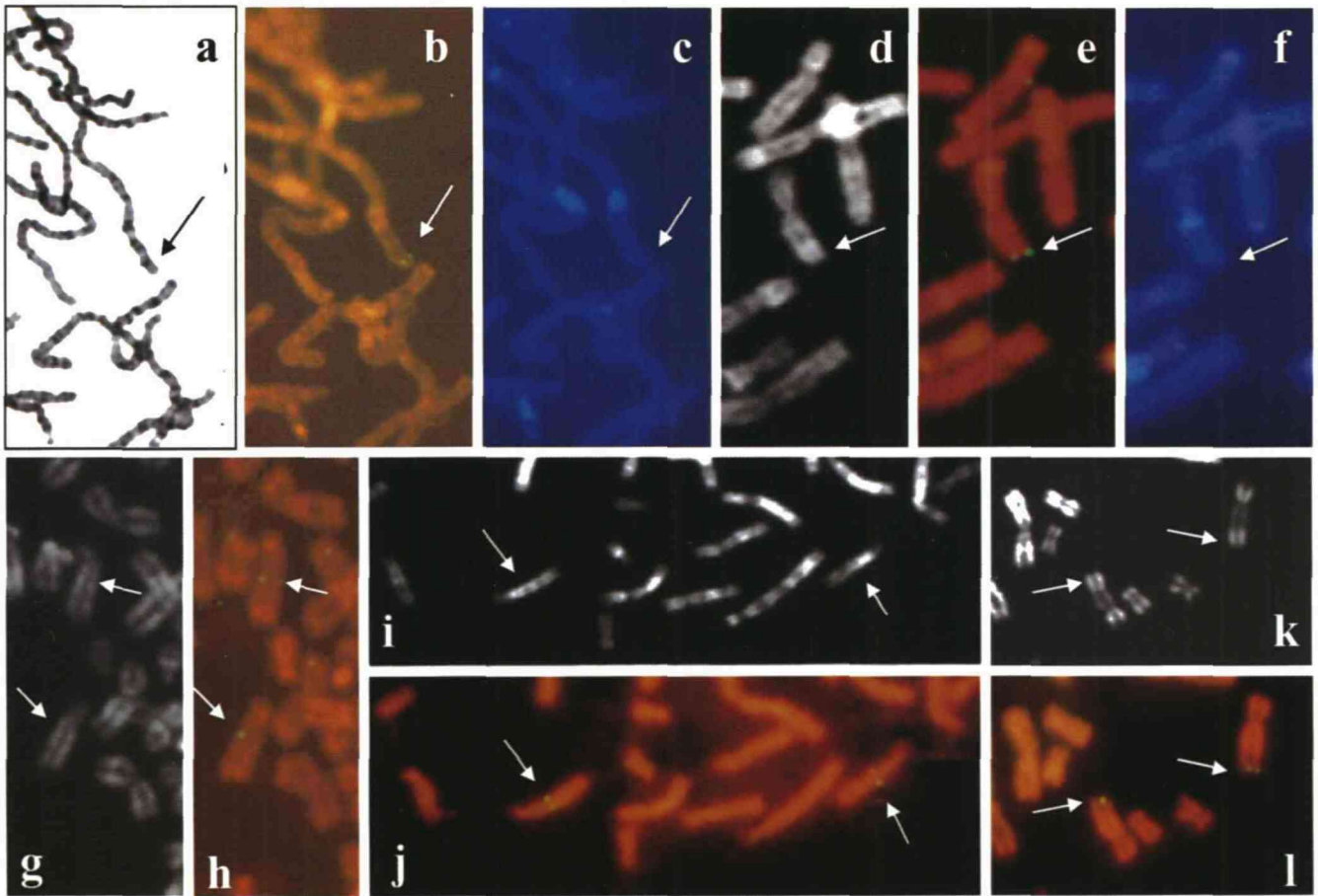


Fig. 9. FISH images of metaphases hybridized with the Cε3 gene

Localization of the human and primate Cε3 genes: a)-c) human, d)-f) pygmy chimpanzee, g)-h) gorilla, i)-j) orangutan, and k)-l) white-handed gibbon. High resolution G-banded image was shown in a) and DAPI images showed in c) and f). Pre-Q-banded images showed in d), g), i) and k) indicating the same images as in e), h), j) and l), respectively.

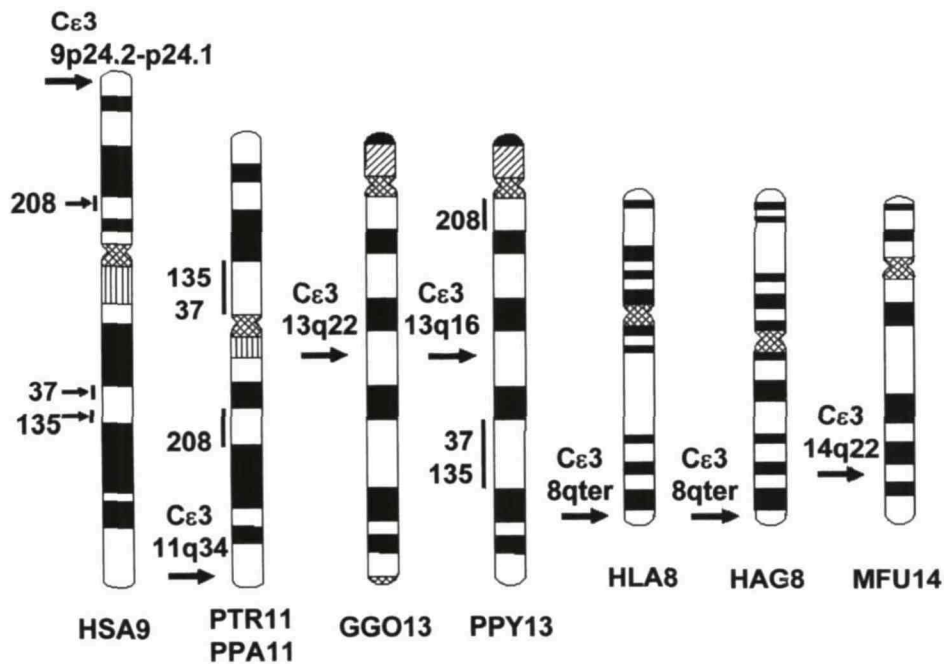


Fig. 10. Idiogrammatic summary of the localization of the primate Cε3 genes and other comparative mapping results

Arrows indicate the position of the Cε3 genes and other markers on HSA9. Chromosome band numbers of each species of the Cε3 genes are given.

inversions that occurred in the human-chimp ancestor of the present orangutan chromosome 13 (PPY13p13 and PPY13q16) and gorilla chromosome 13 (GGO13p13 and GGO13q22), and in the chimp ancestor of the present chimpanzees chromosome 11 (the proximal region between PTR/PPA11p11 and PTR/PPA11q22). Putting these data together with other comparative mapping data involving the ABL1 proto-oncogene⁹⁷, it is hypothesized that HSA9 genesis took place as follows; 1) The human-chimp-gorilla-orang ancestral HSA9 chromosome was an orang-gorilla type acrocentric chromosome (PPY13/GGO13), and nucleolar organizer regions appeared on PPY13p only after branching from a human-chimp-gorilla common ancestor. 2) After the gorilla branched off, the first pericentric inversion occurred in a human-chimp ancestor with breakpoints at the regions of the present PPY13q16 and PPY13p13. 3) Centromeric heterochromatin subsequently accumulated in the human-chimp ancestral chromosome. 4) The second pericentric inversion took place in the chimp branch, with breakpoints in the middle region of the present PTR/PPA11p11 and the proximal portion of the PTR/PPA11q22. 5) Further accumulation of centromeric heterochromatin and G-positive band on the short arm occurred in the human branch, generating the present HSA9. The inversion breakpoints that occurred in the human-chimp ancestral chromosome were proximal to the markers cCI9-208 and cCI9-37, corresponding to the present HSA9 proximal region between HSA9p13.3 and HSA9q22.2 (Figs. 11 and 12). This model will be refined and confirmed by the analysis of further comparative mapping of other DNA markers of HSA9 to the great apes⁹⁸.

As for the gibbon species, the C ϵ 3 genes were mapped to HLA8qter and HAG8qter, and HSA9 homologues were divided into two or three segments detected by ZOO-FISH suggesting interchromosomal rearrangements in these species. Indeed, ZOO-FISH with HSA5, 16, 17, 22, and HSA9 specific probes hybridized to the gibbon chromosomes 8 demonstrated the presence of complex interchromosomal rearrangements as well as intraspecific heteromorphisms in the lar gibbon group (2n=44) (Figs. 5, 6, 10 and 12)⁵¹. Further analysis will clarify the gibbon chromosomal reconstitution.

For Japanese macaque, the C ϵ 3 gene was mapped to MFU14q22 and HSA9 homologue was hybridized to one chromosome pair of MFU14 detected by ZOO-FISH. However, chromosome banding homology between HSA9 and MFU14 shows little similarities suggesting that only intrachromosomal rearrangements have occurred on MFU14 with syntenic conservation during the macaque speciation (Figs. 6 and 12).

3.5 Evolutionary aspects of chromosome breakpoints

A cohesive picture of the patterns of chromosomal evolution among mammals is beginning to take shape, largely from the combination of comparative studies of cytogenetics and gene mapping studies. In general, the standard observation is a relatively conserved mode of chromosome change. The occurrence of chromosomal exchange is so slow that ancestral karyotypes of living families or even certain orders (primates, carnivores, marsupials) can be deduced from ZOO-FISH analysis of living species⁵⁰. The syntenic predictions of these cytological conclusions usually have been affirmed.

The rule of chromosomal conservation has a number of exceptional species in every group thus far studied. In primates, the gibbons and owl monkeys have highly rearranged karyotypes relatively to the ancestral forms. Stanyon and Chiarelli (1983)⁷⁷ hypothesized that changes in the hylobatid karyotype are characterized by an extremely high evolutionary rate compared with other primates. Recently this was confirmed by chromosome painting studies^{51,88,89}. The mechanism of this rapid rate of chromosomal evolution in gibbons remains still unanswered, but the molecular data suggested that the evolutionary rate of genes or whole genome in gibbons is within the range of other primates^{27,72,99,100}.

Relatively few reports have been published on the breakpoints in evolutionary chromosome changes in primates. Previously, fragile site expression was studied in human and the great apes in relationships to a potential involvement of the site in chromosome rearrangements in evolutionary changes. However, no apparent correlation was found between the expression of a certain fragile site and the sites of chromosome rearrangement in evolutionary changes^{101,102}, although there was a report of the breakpoint of pericentric inversion between Bornean and Sumatran orangutans at PPY2q14 which corresponds to a conserved fragile site in human (FRA3B at HSA3p14) and primate species¹⁰³.

4. Concluding remarks

Karyotypic homologies in higher primates were studied through comparative mapping of the immunoglobulin C ϵ genes by FISH combined with ZOO-FISH techniques. Here, I analyzed loci of the C ϵ 1 gene at HSA14q32.33 and the C ϵ 3 gene at HSA9p24.2 \rightarrow p24.1, evolutionary genesis in relation to HSA14 and HSA9 and their primate homologues were considered. Combined method of both comparative mapping and ZOO-FISH procedures suggested the highly syntenic organization of HSA14 and provided the refined hypothesis of the genesis of HSA9 and its primate homologues in speciation. During the course of hominoid evolution, at least twice

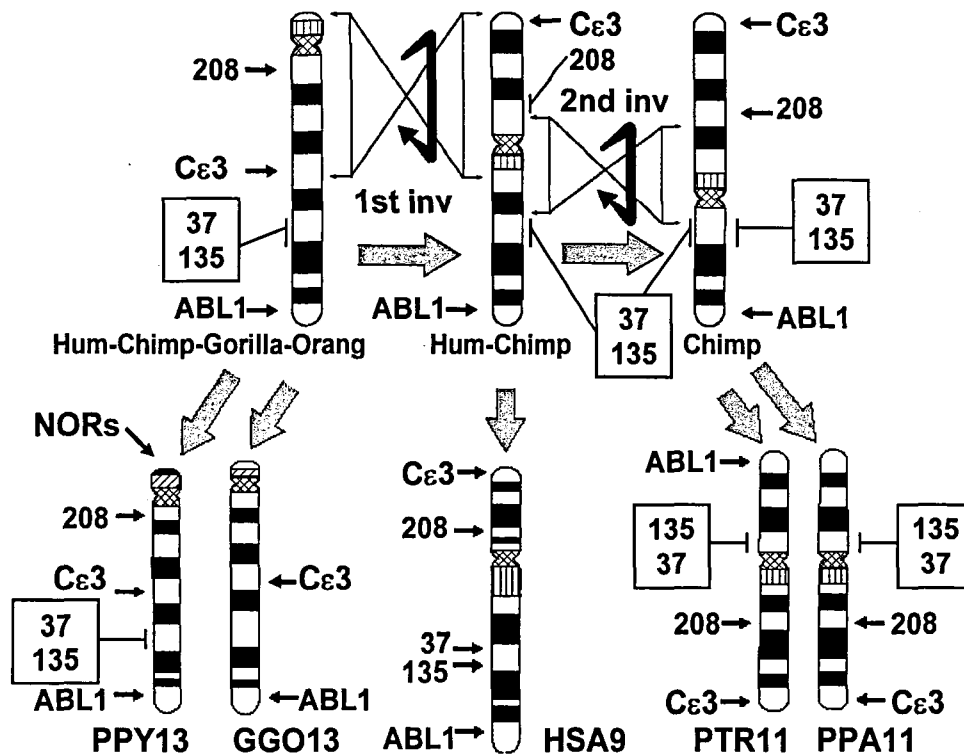


Fig. 11. Schematic representation of an evolutionary scenario on HSA9 genesis in the great apes and human
 Small arrows combined with the vertical bar indicate the region of the pericentric inversions (see text for details). Arrows or vertical bars indicate the positions of assigned genes.

pericentric inversions have occurred as dynamic chromosomal rearrangement and their inversion breakpoints have been subregionally determined by the present procedures.

It is noteworthy that recently developed novel molecular cytogenetic approaches such as comparative genomic hybridization (CGH) procedure^{104,105} and spectral karyotyping (SKY) method¹⁰⁶. CGH procedure provides information on gains or losses of DNA sequences in targeted cells by measuring FISH signals on each chromosome and utilized to various tumor cells. Analysis of interspecies genomes by CGH may be possible to show species specific chromosomal subregions with amplifications or deletions in several megabases. On the other hand, SKY method allows that all human chromosomes have been visualized simultaneously in 24 different colors by combinatorial chromosome painting probes labelled with 5 kinds of fluorochromes utilizing Fourier spectroscopy, which can identify the specific emission spectral patterns of each fluorochrome combination corresponding to each human chromosome. This new technique will shed light on the molecular cytogenetic analysis of highly rearranged karyotypes with numerous marker chromosomes such as in tumor cells and facilitate the comparative cytogenetic studies among interspecies since so far only two or three different colored painting probes

can be applied at a time. Moreover, recently developed "DNA chip" that is a small solid substrate comprising an array of numerous short DNA pieces enables us to examine the gene expression and/or mutation patterns of an entire genome at one time¹⁰⁷⁻¹¹⁶. This epoch-making DNA microarray technology will be applicable to various fields such as mutagenesis, tumorigenesis, developmental biology, and evolutionary comparative studies^{109-111,114-116}. The last one has been undertaken as the Great Ape genome project¹¹¹.

No matter how excellent these novel technologies are in the application to interspecies ZOO-FISH analysis that will allow us to see the patterns of genome exchange by direct observation, there are still intriguing questions unanswered in the evolutionary breakpoints of chromosomes at the fine structure level. Are they random or do they represent evolutionary "fragile sites" that tend to divide an ancestral mammalian genome into discrete conserved units? Is there a relationship between chromosomal breakpoints in primate evolution and the specific breakpoints observed in human tumorigenesis? Are there interesting genes or sequences at these breakpoints? These questions, of course, require maps of much greater density around the evolutionary junctions in order to determine their relative similarities in different mammalian taxa. Eventually, of

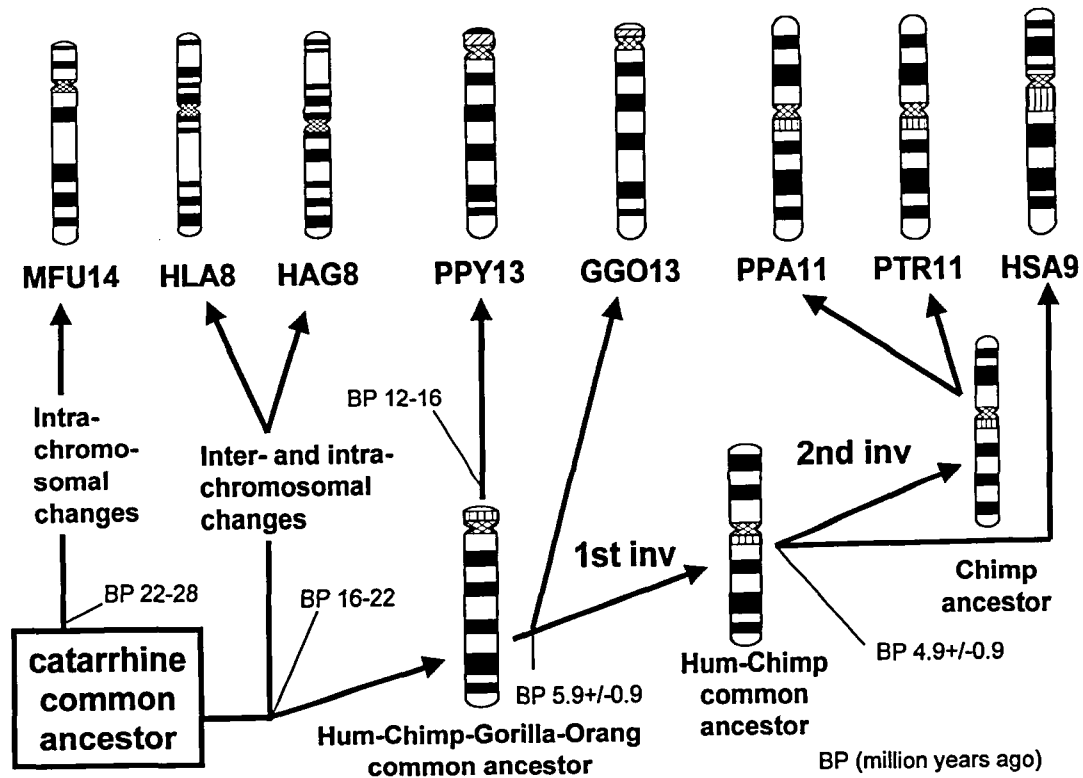


Fig. 12. Evolutionary tree of the HSA9 genesis in higher primates

The schematic tree shows the evolutionary relationships from the catarrhine common ancestor to the present species, respectively.

course, they must be defined at the nucleotide level—now a realistic expectation from the human genome sequencing initiative, especially if it is accompanied by concentrated gene mapping of prototype species from other mammalian families. This might be also facilitated by the other approach, Great Ape genome project, using DNA chips. Rapid technological advances driven by human genome mapping have clearly facilitated progress in comparative gene mapping in other species. As the human genome project provides nearly 6000 genes and 16000 expressed sequence tags in linear order on 24 chromosomes, making high resolution gene-dense map, comparative mapping will be more and rapidly extended by use of these human genome data for phylogenetic description of the genomes of mammalian ancestors.

Acknowledgments

I would like to express my deeply appreciation to Drs. Yoshida, M. C.*¹, Sofuni, T.*², Ishida, T.*³, Ueda, S.*³, Takenaka, O.*⁴, Mizusawa, H., and all of the members of Division of Genetics and Mutagenesis, for valuable suggestions, continuous encouragements, and providing primate samples and DNA clones. Without all their continuous supports and kindly helps this work would not have been possible at all.

- *¹ Professor emeritus, Chromosome Research Unit, Faculty of Science, Hokkaido University
- *² ex-Division Head, Division of Genetics and Mutagenesis
- *³ Graduate School of Science, The University of Tokyo
- *⁴ Primate Research Institute, Kyoto University

References

- 1) "Paris Conference 1971, Birth Defects: Original Article Series VIII 7", The National Foundation, New York (1972): *Cytogenetics*, **11**, 313-362 (1972)
- 2) "Paris Conference 1971, Supplement, Birth Defects: Original Article Series XI 9", The National Foundation, New York (1975): *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**, 201-238 (1975)
- 3) "ISCN 1978: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Birth Defects: Original Article Series XIV 8", The National Foundation, New York (1978): *Cytogenet. Cell Genet.*, **21**, 313-409 (1978)
- 4) Pearson, P. L., Roderick, T. H., Davison, M. T., Garver, J. J., Warburton, D., Lalley, P. A. and O'Brien, S. J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **25**, 82-95 (1979)
- 5) "ISCN 1985: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature", eds. by Harnden, D. G. and Klinger, H. P., S. Karger, Basel/New York (1985): *Cytogenet. Cell Genet.*, Appendix 2 (1985)
- 6) Dutrillaux, B.: *Hum. Genet.*, **48**, 251-314 (1979)
- 7) Dutrillaux, B., Couturier, J., Viegas-Péquignot, E. and Muleris, M.: *Prog. Clin. Biol. Res.*, **103**, 183-194 (1982)

- 8) Seuáñez, H. N.: "Subcellular Biochemistry Vol. 10", ed. by Roodyn, D. B., Plenum, New York/London, pp.455-537 (1984)
- 9) O'Brien, S. J., Seuáñez, H. N. and Womack, J. E.: *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 323-351 (1988)
- 10) Grouchy, J. de, Turleau, C. and Finaz, C.: *Annu. Rev. Genet.*, **12**, 289-328 (1978)
- 11) Seuáñez, H. N.: "The Phylogeny of Human Chromosomes", Springer, Berlin (1979)
- 12) Seuáñez, H. N.: "Cytogenetics", eds. by Obe, G. and Basler, A., Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, pp.65-89 (1987)
- 13) Yunis, J. J. and Prakash, O.: *Science*, **215**, 1525-1530 (1982)
- 14) Dutrillaux, B., Couturier, J. and Fosse, A. M.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **27**, 45-51 (1980)
- 15) Clemente, I. C., Garcia, M., Ponsa, M. and Egozeue, J.: *Am. J. Primatol.*, **13**, 23-36 (1987)
- 16) Turleau, C., Grouchy, J. de and Klein, M.: *Ann. Genet. (Paris)*, **15**, 225-240 (1972)
- 17) Dutrillaux, B., Rethore, M. O. and Lejeune, J.: *Ann. Genet.*, **18**, 153-161 (1975)
- 18) Miller, D. A.: *Science*, **198**, 1116-1124 (1977)
- 19) Stanyon, R. and Chiarelli, B.: *J. Hum. Evol.*, **11**, 493-504 (1982)
- 20) Grouchy, J. de, Turleau, C., Roubin, M. and Klein, M.: *Ann. Genet. (Paris)*, **15**, 79-84 (1972)
- 21) Couturier, J. and Dutrillaux, B.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **29**, 233-240 (1981)
- 22) Dutrillaux, B., Couturier, J., Muleris, M., Lombard, M. and Chauvier, G.: *Ann. Genet.*, **25**, 96-109 (1982)
- 23) Simpson, G. G.: *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **85**, 1-350 (1945)
- 24) Goodman, M.: "Phylogeny of the Primates", eds. by Luckett, W. P. and Szalay, J. S., Plenum Press, New York, pp.219-248 (1975)
- 25) King, M. C. and Wilson, A. C.: *Science*, **188**, 107-116 (1975)
- 26) Koop, B. F., Goodman, M., Xu, P., Chan, K. and Slightom, J. L.: *Nature*, **319**, 234-238 (1986)
- 27) Sibley, C. G. and Ahlquist, J. E.: *J. Mol. Evol.*, **26**, 99-121 (1987)
- 28) "Human Gene Mapping 3 (HGM3); Baltimore Conference 1975": *Cytogenet. Cell Genet.*, **16**, 75-82 (1976)
- 29) Ruddle, F. H. and Creagan, R. P.: *Annu. Rev. Genet.*, **9**, 407-486 (1975)
- 30) Minna, J. D., Lalley, P. A. and Francke, U.: *In Vitro*, **12**, 726-733 (1976)
- 31) McKusick, V. A. and Ruddle, F. H.: *Science*, **196**, 390-405 (1977)
- 32) Ruddle, F. H.: *Hum. Genet.*, **42**, 269-283 (1978)
- 33) McKusick, V. A.: *FASEB J.*, **5**, 12-20 (1991)
- 34) "Human Gene Mapping 1995: A compendium", ed. by Cuticchia, A. J., Johns Hopkins University Press, Baltimore (1996)
- 35) O'Brien, S. J., Peters, J., Searle, A., Womack, J. and Graves, J. M.: "Chromosome Coordinating Meeting 1992: Genome Priority Reports Vol. 1", eds. by Cuticchia, A. J., Pearson, P. L. and Klinger, H. P., S. Karger, Basel, pp.758-809 (1993)
- 36) Estop, A., Garver, J. J., Meera-Khan, P. and Pearson, P. L.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **25**, 150-151 (1979)
- 37) Creau-Goldberg, N., Cochet, C., Turleau, C. and Grouchy, J. de: *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**, 228-239 (1981)
- 38) Creau-Goldberg, N., Turleau, C., Cochet, C. and Grouchy, J. de: *Ann. Genet.*, **25**, 14-18 (1982)
- 39) Creau-Goldberg, N., Turleau, C., Cochet, C. and Grouchy, J. de: *Ann. Genet.*, **26**, 75-78 (1983)
- 40) Estop, A. M., Garver, J. J., Egozcue, J., Meera-Khan, P. and Pearson, P. L.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**, 46-50 (1983)
- 41) Pardue, M. L. and Gall, J. G.: *Science*, **168**, 1356-1358 (1970)
- 42) Pinkel, D., Straume, T. and Gray, J. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2934-2938 (1986)
- 43) Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L. and Ward, D. C.: *Hum. Genet.*, **80**, 224-234 (1988)
- 44) Trask, B. J.: *Trends Genet.*, **7**, 149-154 (1991)
- 45) Morrison, L. E.: *Clin. Chem.*, **39**, 733-734 (1993)
- 46) Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D. C. and Manuelidis, L.: *Hum. Genet.*, **80**, 235-246 (1988)
- 47) Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J. and Gray, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9138-9142 (1988)
- 48) Wienberg, J., Jauch, A., Stanyon, R. and Cremer, T.: *Genomics*, **8**, 347-350 (1990)
- 49) Wienberg, J., Stanyon, R., Jauch, A. and Cremer, T.: *Chromosoma*, **101**, 265-270 (1992)
- 50) Scherthan, H., Cremer, T., Arnason, U., Weier, H.-U., Lima-de-Faria, A. and Frönicke, L.: *Nat. Genet.*, **6**, 342-347 (1994)
- 51) Jauch, A., Wienberg, J., Stanyon, R., Arnold, N., Tofanelli, S., Ishida, T. and Cremer, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8611-8615 (1992)
- 52) Wienberg, J., Jauch, A., Lüdecke, H.-J., Senger, G., Horsthemke, B., Claussen, U., Cremer, T., Arnold, N. and Lengauer, C.: *Chrom. Res.*, **2**, 405-410 (1994)
- 53) Ried, T., Arnold, N., Ward, D. C. and Wienberg, J.: *Genomics*, **18**, 381-386 (1993)
- 54) Toder, R., Zeitler, S., Goodfellow, P. N. and Schempp, W.: *Chrom. Res.*, **1**, 117-120 (1993)
- 55) Arnold, N., Wienberg, J., Ermert, K. and Zauchau, H. G.: *Genomics*, **26**, 147-150 (1995)
- 56) Honjo, T., Alt, F. W. and Rabbitts, T. H.: "Immunoglobulin Genes", Academic Press, London (1989)
- 57) Croce, C. M., Shander, M., Martinis, J., Cicurel, L., D'Ancona, G. G., Dolby, T. W. and Koprowski, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3416-3419 (1979)
- 58) Flanagan, J. G. and Rabbitts, T. H.: *Nature*, **300**, 709-713 (1982)
- 59) Shimizu, A., Takahashi, N., Yaoita, Y. and Honjo, T.: *Cell*, **28**, 499-506 (1982)
- 60) Blackwell, T. K. and Alt, F. W.: *Annu. Rev. Genet.*, **23**, 605-636 (1989)
- 61) Cox, D. W., Nakamura, Y. and Gedde-Dahr, T. Jr.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **58**, 605-623 (1991)
- 62) Davis, M. M., Kim, S. K. and Hood, L.: *Cell*, **22**, 1-2 (1980)
- 63) Gellert, M.: *Annu. Rev. Genet.*, **26**, 425-446 (1992)
- 64) Cox, D. W. and Donlon, T. A.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **51**,

- 280-298 (1989)
- 65) Honjo, T., Nakai, S., Nishida, Y., Kataoka, T., Yamawaki-Kataoka, Y., Takahashi, N., Obata, M., Shimizu, A., Yaoita, Y., Nikaido, T. and Ishida, N.: *Immunol. Rev.*, **59**, 33-67 (1981)
- 66) Max, E. E., Battey, J., Ney, R., Kirsch, I. R. and Leder, P.: *Cell*, **29**, 691-699 (1982)
- 67) Flanagan, J. G., Lefranc, M. and Rabbitts, T. H.: *Cell*, **36**, 681-688 (1984)
- 68) Migone, N., Oliviero, S., Lange, G. de, Delacroix, D. L., Boschis, D., Altruda, F., Silengo, L., DeMarchi, M. and Carbonara, A. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5811-5815 (1984)
- 69) Ueda, S., Takenaka, O. and Honjo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3712-3715 (1985)
- 70) Ueda, S., Matsuda, F. and Honjo, T.: *J. Mol. Evol.*, **27**, 77-83 (1988)
- 71) Kawamura, S., Saitou, N. and Ueda, S.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 7359-7367 (1992)
- 72) Kawamura, S. and Ueda, S.: *Genomics*, **13**, 194-200 (1992)
- 73) Ueda, S., Nakai, S., Nishida, Y., Hisajima, H. and Honjo, T.: *EMBO J.*, **1**, 1539-1544 (1982)
- 74) Battey, J., Max, E. E., McBride, W. O., Swan, D. and Leder, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5956-5960 (1982)
- 75) Ueda, S., Watanabe, Y., Hayashida, H., Miyata, T., Matsuda, F. and Honjo, T.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**, 429-432 (1986)
- 76) Ueda, S., Watanabe, Y., Saitou, N., Omoto, K., Hayashida, H., Miyata, T., Hisajima, H. and Honjo, T.: *J. Mol. Biol.*, **205**, 85-90 (1989)
- 77) Stanyon, R. and Chiarelli, B.: *J. Hum. Evol.*, **12**, 305-315 (1983)
- 78) Stanyon, R., Sineo, L., Chiarelli, B., Camperio-Ciani, A., Haimoff, A. R., Mootnick, E. H., Sutarman, D. R.: *Folia Primatol.*, **48**, 56-64 (1987)
- 79) Pearson, P. L., Roderick, T. H., Davisson, M. T., Garver, J. J., Warburton, D., Lalley, P. A. and O'Brien, S. J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **25**, 82-95 (1979)
- 80) Stanyon, R., Romagno, D., Wienberg, J. and Maurer, U.: *Genetica*, **80**, 45-52 (1990)
- 81) Nishida, Y., Miki, T., Hisajima, H. and Honjo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3833-3837 (1982)
- 82) Tanabe, H., Ishida, T., Ueda, S., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **70**, 239-242 (1995)
- 83) Chiarelli, B.: "The Gibbon and Siamang Vol. 2", ed. by Rumbaugh, D. M., S. Karger, Basel, pp.90-102 (1972)
- 84) Tantravahi, R., Dev, V. G., Firschein, I. L., Miller, D. A., Miller, O. J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **15**, 92-102 (1975)
- 85) Warburton, D., Henderson, A. S. and Atwood, K. C.: *Chromosoma*, **51**, 35-40 (1975)
- 86) Prouty, L. A., Buchanan, P. D., Pollitzer, W. S. and Mootnick, A. R.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **35**, 141-142 (1983)
- 87) Van Tuinen, P. and Ledbetter, D. H.: *Am. J. Phys. Anthropol.*, **61**, 453-466 (1983)
- 88) Koehler, U., Arnold, N., Wienberg, J., Tofanelli, S. and Stanyon, R.: *Am. J. Phys. Anthropol.*, **97**, 37-47 (1995)
- 89) Koehler, U., Bigoni, F., Wienberg, J. and Stanyon, R.: *Genomics*, **30**, 287-292 (1995)
- 90) Marks, J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **34**, 261-264 (1982)
- 91) Arnold, N., Stanyon, R., Jauch, A., O'Brien, P. and Wienberg, J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **74**, 80-85 (1996)
- 92) Stanyon, R., Arnold, N., Koehler, U., Bigoni, F. and Wienberg, J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **68**, 74-78 (1995)
- 93) Dutrillaux, B., Viegas-Pequignot, E., Dubos, C. and Masse, R.: *Hum. Genet.*, **43**, 37-46 (1978)
- 94) Soares, M. B. M., Armada, J. L., Armada, A., Silva, V. F. da and Seuánez, H. N.: *J. Hum. Evol.*, **11**, 291-296 (1982)
- 95) Small, M., Stanyon, R., Smith, D. G. and Sineo, L.: *Am. J. Primatol.*, **9**, 63-67 (1985)
- 96) Tanabe, H., Ishida, T., Ueda, S., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **66**, 93-95 (1994)
- 97) Verma, R. S. and Luke, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 369-373 (1994)
- 98) Tanabe, H., Ishida, T., Ueda, S., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **73**, 92-96 (1996)
- 99) Kawamura, S., Omoto, K. and Ueda, S.: *J. Mol. Biol.*, **215**, 201-206 (1990)
- 100) Kawamura, S., Tanabe, H., Watanabe, Y., Kurosaki, K., Saitou, N. and Ueda, S.: *Mol. Biol. Evol.*, **8**, 743-752 (1991)
- 101) Miro, R., Clemente, I. C., Fuster, C. and Egozcue, J.: *Hum. Genet.*, **75**, 345-349 (1987)
- 102) Smeets, D. F. C. M. and Klundert, F. A. J. M. van de: *Cytogenet. Cell Genet.*, **53**, 8-14 (1990)
- 103) Seuánez, H. N., Evans, H. J., Martin, D. E. and Fletcher, J.: *Cytogenet. Cell Genet.*, **23**, 137-140 (1979)
- 104) Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.-P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F. and Pinkel, D.: *Science*, **258**, 818-821 (1992)
- 105) 田辺秀之, 祖父尼俊雄, 水沢 博: *組織培養*, **22**, 194-198 (1996)
- 106) Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M. A., Ning, Y., Ledbetter, D. H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y. and Ried, T.: *Science*, **273**, 494-497 (1996)
- 107) Brown, P. O.: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 366-373 (1994)
- 108) Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O.: *Science*, **270**, 467-470 (1995)
- 109) Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. and Davis, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10614-10619 (1996)
- 110) McGall, G., Labadie, J., Brock, P., Wallraff, G., Nguyen, T. and Hinsberg, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13555-13560 (1996)
- 111) Marshall, A. and Hodgson, J.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 27-31 (1998)
- 112) Schafer, A. J. and Hawkins, J. R.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 33-39 (1998)
- 113) Ramsay, G.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 40-44 (1998)
- 114) "The Chipping Forecast", *Nat. Genet.*, **21**, Supplement (1999)
- 115) DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. and Trent, J. M.: *Nat. Genet.*, **14**, 457-460 (1996)
- 116) Hacia, J. G., Makalowski, W., Edgemon, K., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Fodor, S. P., Brody, L. C. and Collins, F. S.: *Nat. Genet.*, **18**, 155-158 (1998)

ヘマトコッカス藻色素の F344 ラットによる 13 週間反復混餌投与毒性試験

小野 敦[#]・関田清司・斉藤 実・梅村隆志・小川幸男・降矢 強・金子豊蔵・井上 達

A 13-week subchronic oral toxicity study of haematococcus color in F344 rats

Atsushi Ono[#], Kiyoshi Sekita, Minoru Saitoh, Takashi Umemura, Yukio Ogawa,
Tsuyoshi Furuya, Toyozo Kaneko and Tohru Inoue

A 13-week oral repeated dose toxicity study of haematococcus color, a food additive mainly composed of astaxanthin, was conducted in male and female F344 rats. Rats were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 males and 10 females and given CRF-1 powder diet containing 0%, 0.025%, 0.075%, and 0.25% haematococcus color, correspond to 0%, 0.5%, 1.5%, and 5% as the product. None of the animals died during the administration period. There were no exposure-related changes in body weight gain or food consumptions. Serum biochemical examinations showed dose-related increase in cholesterol, but the differences were slight and not defined as an adverse effect. No effects related to treatment were noted in hematological examinations and organ weights, and no abnormalities that could be ascribed to exposure to haematococcus color were observed in histopathological examinations. In conclusion, ingestion of haematococcus color in the diet for 13 weeks does not cause any toxicological changes in F344 rats.

Keywords: food additive, haematococcus color, astaxanthin, F344 rats, subchronic toxicity study

緒 言

天然物由来の食品添加物（天然添加物）の需要は、近年の合成添加物に対する使用規制や消費者の自然志向などより増大の傾向にある。しかし天然添加物の多くは、それ自体もしくはその原料が、長年食用に供されてきた経験に基づいて使用されているが、その安全性について動物実験などに基づいた科学的な検討の乏しいものが少なくない。平成7年の食品衛生法及び栄養改善法の一部改正より、新たに開発される食品添加物については、天然添加物であっても合成添加物と同様に指定制度の対象となったが、従来使用されてきた天然添加物については既存添加物名簿に記載され毒性試験の実施などを義務付けることなく引き続きその使用が認められている¹⁾。

ヘマトコッカス藻色素は、アスタキサンチンを主成分とする橙色～赤色色素で、主として魚肉ねり製品や油脂製品などの着色料として使用される。アスタキサンチンは、鯛、海老および蟹など水産物の赤色の主成分をなす物質で、色

調、熱安定性にすぐれており天然食用色素としての有用性が期待されてきた。さらに近年、βカロテンの類縁体であるアスタキサンチンが、活性酸素消去能^{2,3,4)}や免疫賦活能^{5,6)}および発がん抑制作用^{7,8)}などを有することが報告され、単に食品用色素としてだけではなくその機能からも再び注目されている。これまでアスタキサンチンは、オキアミやアメリカザリガニなどの甲殻類より抽出されたが、色素濃度の均一性や原料特有の臭気など品質および経済性などの問題から食用色素としての実用化には至っていない。一方、*Haematococcus pluvialis*（ヘマトコッカス藻）はアスタキサンチンを高産生することが従来より知られる微細藻類で、近年、培養法や抽出法の改良により、その抽出色素がアスタキサンチン系食品着色料として実用化された⁹⁾。現在のところ我が国では、食品添加物としてほとんど使用されていないが、優れた色調と機能性を有する天然着色料として、今後の使用増加が予想される。

ヘマトコッカス藻色素についてはこれまで毒性試験および毒性に関する報告はない。また原料のヘマトコッカス藻が食用に供されることもないため、早急に毒性の検討が必要であると考えられる。そこで今回、ラットを用いてヘマトコッカス藻色素混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施したので報告する。

[#] To whom correspondence should be addressed: Atsushi Ono; Division of Toxicology, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 1588501, Japan; Tel:+81-3-3700-9646; Fax:+81-3-3700-2348; E-mail:atsushi@nihs.go.jp

実験材料および方法

1. 被験物質および投与方法

ヘマトコッカス藻色素はヤエガキ発酵株式会社(姫路)より供与されたものを用いた。ヘマトコッカス藻色素は、コナヒゲムシ科ヘマトコッカス (*Haematococcus C.A. AGARCH*) の全藻を乾燥後、粉碎し、含水エタノール、アセトン、ヘキサンもしくはこれらを2種類以上混合したもので抽出し溶媒を除去したものであり、特有の臭気を有する暗褐色のペースト状液体である。ヘマトコッカス藻色素は、水にはほとんど溶けず、エーテル、アセトン、クロロホルム、ベンゼンなどに溶解する。吸湿性はなく、耐熱性に優れるが、紫外線および可視光線により容易に退色する。ヘマトコッカス藻色素製剤は大豆油にヘマトコッカス藻色素を5%となるよう溶解したものである。本試験では、添加剤である大豆油の影響を除外するため、ヘマトコッカス藻色素原体(100%)を用い、投与は被験物質の使用目的が食品添加物であることから粉末飼料による混餌により行った。色素添加飼料の調整は、ヘマトコッカス藻色素を適量のアセトンに溶解して基礎飼料に添加し、一晚ドラフト内でアセトンを除去した後、基礎飼料と混合してそれぞれ規定量の添加飼料とした。添加飼料の調整は1回/2週行い、調整した添加飼料は4℃に維持された飼料保管室に遮光して保存した。

2. 投与用量

本試験では食品添加物製剤としての影響を調べることを目的としたため、用量設定は製剤としての量を基準に行った。すなわち食品添加物の混餌投与試験における上限が5%とされている¹⁰⁾ことから、製剤として5%に相当する量(0.25%ヘマトコッカス藻色素)を上限とした。本試験を行うにあたり、添加飼料中の色素安定性および動物の被験物質混合飼料の忌避を確認する目的で、0.25%ヘマトコッカス藻色素を最高用量とする2週間の予備試験を行った。またヘマトコッカス藻色素をアセトンに溶解して飼料に混じるため、同量のアセトンを添加した対照群を設けた。この結果、いずれの群においても体重、摂餌量に基礎飼料対照群とのあいだに差は認められなかった。これらより本試験におけるヘマトコッカス藻色素の最高用量は、0.25%(H群、ヘマトコッカス藻色素製剤5%)とし、以下、0.075%(M群、同1.5%)、0.025%(L群、同0.5%)および対照群(C群)を加えた4群で試験を行った。また、添加飼料中の色素は、光(特に紫外光)により容易に退色するが、暗所においては室温および冷蔵のいずれの条件下においても安定であった。試験期間中は、給餌器に蓋をして遮光した。

3. 動物および飼育条件

5週齢のF344ラット(SPF)雌雄を日本チャールス・リ

バー(神奈川)より購入し、基礎飼料(オリエンタル酵母(株)CRF-1粉末飼料)で1週間馴化飼育した後、無作為に雌雄各4群(1群10匹)に分け、それぞれを試験に供した。動物は雌雄とも透明なプラスチックケージ(幅26cm、長さ42cm、高さ17cm)に5匹ずつ収容し、床敷はソフトチップ(三協ラボサービス社(東京))を用い、週2回交換を行った。試験期間中、飲料水として水道水を自由に摂取させた。試験は室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、12時間明暗サイクルの条件下の飼育室にて行った。

4. 検査項目および方法

雌雄各3群を被験物質投与群とし、それぞれ規定量のヘマトコッカス藻色素を混合した粉末飼料を13週間、懸架式粉末給餌器を用いて自由に摂取させた。対照群として雌雄各1群にはヘマトコッカス藻色素を含まない基礎飼料を同期間自由に摂取させた。試験期間中、一般状態および死亡動物の有無を連日観察し、体重および摂餌量の測定を週1回行った。投与開始13週後に全動物を一晚絶食させた後、エーテル麻酔下に眼窩静脈叢より採血し、放血後剖検し以下に示す検査を行った。

採取した血液について、希釈血液を用いてSysmex M2000(東亜医用電子、兵庫)により赤血球数(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)、血小板数(Plt)、及び白血球数(WBC)を測定した。またライト染色を施した血液塗抹標本を作成し白血球の型別分類を、Microx HEG-120A(オムロン、東京)を用いて測定した。遠心分離により得た血清試料を用いて、総蛋白量(TP、ビュレット法)、アルブミン量(Alb、BCG法)、アルブミン・グロブリン比(TP及びAlbより算出)、尿素窒素(BUN、UV法)、クレアチニン量(CRN、酵素法)、血糖値(Glc、酵素法)、トリグリセライド量(TG、酵素法)、総コレステロール量(T-Cho、酵素法)、遊離コレステロール(F-Cho、酵素法)、総ビリルビン(Tbil、アゾビリルビン法)、アルカリフォスファターゼ活性値(ALP、Rate法)、トランスアミナーゼ活性値(A-T, AsT, Rate法)、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ(γ -GT、Rate法)、カルシウム(Ca、OCPC法)、無機リン(P、モリブデン酸直接法)、ナトリウム、カリウム、クロール(Na, K, Cl、イオン電解質法)を日立7150型オートアナライザーを用いて測定した。

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(卵巣)については重量を測定した後に、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、唾液腺、舌、気管、甲状腺、食道、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、前立腺、精囊腺、精巣上体、子宮、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、骨格筋、脊髄、坐骨神経、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、常法に従いパラフィン包埋後、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、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。

5. 統計学的処理¹¹⁾

体重、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、不等分散の場合は Kruscal-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は各群の例数が等しいことより、Dunnett 法により対照群と各群との有意差検定を行った。

結 果

1. 一般状態

試験期間を通して、いずれの群においても外見的 (皮膚、体毛など) 異常および被験物質投与に伴う一般状態への影響は認められなかった。また、すべての動物が試験終了時まで生存した。

2. 体重および摂餌量

試験期間中の雌雄ラットの体重および摂餌量の推移をそれぞれ Fig.1, Fig.2 に示した。また、試験期間中の平均摂

餌量および被験物質摂取量を Table 1 に示した。雌雄各群ともに体重、摂餌量に試験期間を通して対照群との間に大きな差は認められなかった。また試験期間中の平均摂餌量においても、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、被験物質であるヘマトコッカス藻色素の摂取量も被験物質の用量段階にほぼ相関した。

3. 血液形態学的検査

血液学的検査の結果を Table 2,3 に示した。雄ではいずれの項目においても有意差および被験物質投与による変化は認められなかった。雌の H 群で対照群に比べ MCV, MCH の低下が有意に認められたが、いずれも投与用量との相関は認められなかった。

4. 血清生化学的検査

血清生化学的検査の結果を Table 4,5 に示した。雌では、T-Cho および F-Cho の上昇が H 群で有意に認められた。特に T-Cho の上昇はヘマトコッカス藻色素投与用量に相関しており、雄においても有意ではないが同様の傾向が認められた。雄ではこのほか、H 群で A/G 比, CRN および Na の減少、M 群で BUN の減少、L 群で CRN および Na の減少が有意に認められたが、いずれも用量に相関するものではなくまたその程度もわずかであった。

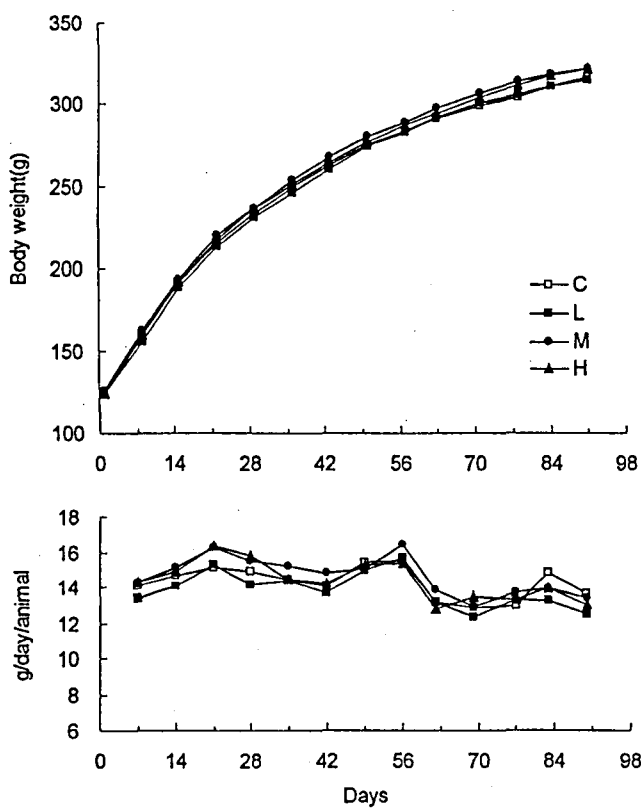


Fig.1. Body weight and food consumption curves of male F344 rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks; Dose levels of haematococcus color were C: 0 %, L: 0.025 %, M: 0.075 %, H: 0.25 %, respectively.

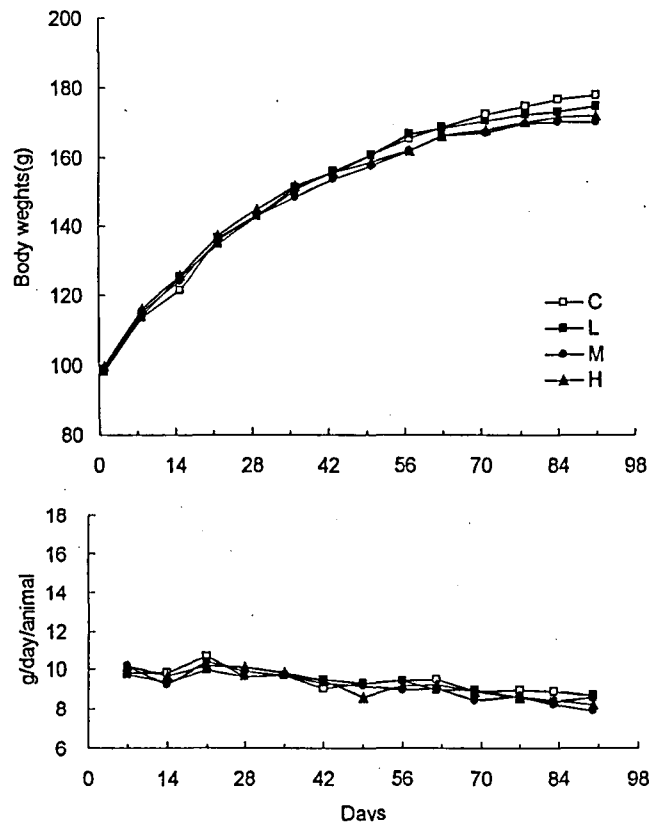


Fig.2. Body weight and food consumption curves of female F344 rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks; Dose levels of haematococcus color were C: 0 %, L: 0.025 %, M: 0.075 %, H: 0.25 %, respectively.

Table 1. Mean food consumption and haematococcus color intake in F344 rats

Sex	Group	No. of rats examined	Food consumption g/rat/day	Mean daily intakes of		Total intakes of haematococcus mg/kg/13 weeks
				Food g/kg/day	Haematococcus color mg/kg/day	
Male	C	10	14.2	60.9	0.0	0.0
	L	10	13.9	60.0	15.0	1364.0
	M	10	14.6	61.7	46.3	4208.9
	H	10	14.4	61.3	153.2	13941.1
Female	C	10	9.4	65.1	0.0	0.0
	L	10	9.3	64.1	16.0	1457.5
	M	10	9.2	64.0	48.0	4367.3
	H	10	9.5	66.1	165.2	15034.1

5. 臓器重量

剖検時の臓器重量の結果を Table 6,7 に示した。雌のM群で心臓の実重量の減少が有意に認められたほかには、対照群と比較して有意差もしくは用量相関性のある変化は雌雄ともに認められなかった。

6. 病理組織学的検査

病理組織学的検索の結果を Table 8 に示した。雌雄ともにヘマトコッカス藻色素の摂取に依存すると思われる変化は認められなかった。また病理組織学的検査で散見された病変はいずれも既に自然発生病変として報告されているもので、その程度、頻度を考慮に入れるとこれら病変が被験物質投与により誘発されたものではないと考えられた。

考 察

ヘマトコッカス藻色素の安全性を確認するため、F344 ラットの混餌投与による 13 週間の亜慢性毒性試験を実施した。ヘマトコッカス藻色素製剤はヘマトコッカス藻色素原体を大豆油に 5% となるよう溶解したものであるが、本試験では大豆油による影響を除くためヘマトコッカス藻色素原体を用い、投与用量は予備試験の結果などから製剤として 5.0, 1.5 および 0.5% (ヘマトコッカス藻色素として 0.25, 0.075 および 0.025%) とした。試験期間を通じて、雌雄各群ともに順調に成育し被験物質投与に伴う皮膚、体毛など外見上の異常や一般状態への影響は認められなかった。体重や摂餌量に对照群と投与群で差は認められず、本色素の添加は摂餌行動や栄養状態に特に影響を及ぼさないことが示された。13 週投与後の血清生化学検査において、雌のH群で T-cho の上昇が有意に認められ、弱いながらも用量相関性が認められ、また雄においても同様の傾向が認められたが、変化の程度も軽度であることから毒性学的意義は乏しいものと考察された。ヘマトコッカス藻の主成分である

アスタキサンチンについてはコレステロール増加作用¹²⁾が報告されている。一方、本試験で用いたヘマトコッカス藻色素のアスタキサンチン (及びエステル体) 含有量は約 39% (data not shown) と低く、またアスタキサンチンを主成分としてヘマトコッカス藻色素よりも高濃度に含有するファフィア色素の 13 週間の亜慢性毒性試験¹³⁾においては、同様の変化は認められていないことから本試験における T-cho 上昇の機序は不明である。この他、血液形態学的検査や臓器重量には投与による変化は認められず、病理組織学的検査において認められた雄の心筋炎および腎臓の鉍質沈着等はいずれも対照群においても発生し、また F344 ラットでの自然発生病変として報告されているものであることなどからヘマトコッカス藻色素の投与により誘発されたものではないと考察された。本色素と同様にアスタキサンチンを主成分とするファフィア色素では、F344 ラットへの 13 週間混餌投与により最高 5.0% で毒性は示されていない。¹³⁾ 今回のヘマトコッカス藻色素についても、いずれの投与群においても摂餌量および体重増加への影響はなく、また血液形態学的および血清生化学検査、臓器重量および病理組織学的にも投与に伴う明らかな毒性所見は認められなかったことから、ラットでの混餌投与によるヘマトコッカス藻色素の毒性は極めて低いものと考察された。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課編：食品衛生法改正に伴う既存添加物名簿関係法令通知集，社会保険出版社，東京，pp5-25, pp83-169 (1996)
- 2) Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M. and Utsumi, K.: *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*, **22**, 27-38 (1990)
- 3) Rousseau, E. J., Davison, A. J. and Dunn, B.: *Free. Radic. Biol. Med.*, **13**, 407-33 (1992)
- 4) Palozza, P. and Krinsky, N.I.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291-5 (1992)

Table 2. Hematological data of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	9.55 ± 0.31	9.68 ± 0.22	9.67 ± 0.18	9.68 ± 0.20
Hb	g/dl	16.1 ± 0.3	16.1 ± 0.3	16 ± 0.2	16.1 ± 0.3
Ht	%	45.3 ± 1.6	45.9 ± 1	45.8 ± 0.8	45.7 ± 1.1
MCV	fl	47.5 ± 0.4	47.4 ± 0.4	47.3 ± 0.5	47.2 ± 0.4
MCH	pg	16.8 ± 0.6	16.6 ± 0.1	16.6 ± 0.3	16.6 ± 0.2
MCHC	g/dl	35.5 ± 1.4	35.1 ± 0.3	35.1 ± 0.4	35.2 ± 0.4
Plt	10 ¹² /l	0.54 ± 0.11	0.51 ± 0.07	0.5 ± 0.08	0.49 ± 0.13
WBC	10 ⁹ /l	6.51 ± 1.11	6.78 ± 0.89	6.61 ± 1.1	7.16 ± 1.3
Neut-B	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Base	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino	%	0.8 ± 0.7	1.1 ± 0.8	1 ± 0.7	1 ± 0.5
Neut-S	%	16.4 ± 3.1	16.4 ± 5.6	17.5 ± 4.1	19.4 ± 6.1
Lympho	%	81 ± 4.1	80.3 ± 5.5	78.9 ± 2.9	77.1 ± 7
Mono	%	1.9 ± 1.4	2.2 ± 0.9	2.7 ± 1.3	2.5 ± 1.4

Values represent mean ± S.D..

Table 3. Hematological data of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	8.88 ± 0.26	8.93 ± 0.28	8.95 ± 8.17	8.93 ± 0.18
Hb	g/dl	15.8 ± 0.4	15.8 ± 0.5	15.8 ± 0.3	15.7 ± 0.3
Ht	%	44.2 ± 1.3	44.3 ± 1.3	44.4 ± 0.8	44.1 ± 1.0
MCV	fl	49.8 ± 0.3	49.6 ± 0.2	49.6 ± 0.3	49.3 ± 0.2 **
MCH	pg	17.8 ± 0.1	17.7 ± 0.1	17.7 ± 0.2	17.5 ± 0.1 **
MCHC	g/dl	35.7 ± 0.3	35.6 ± 0.3	35.6 ± 0.3	35.6 ± 0.2
Plt	10 ¹² /l	0.48 ± 0.12	0.47 ± 0.12	0.47 ± 0.05	0.48 ± 0.09
WBC	10 ⁹ /l	5.49 ± 0.72	4.62 ± 0.68	5.35 ± 1.01	5.16 ± 0.89
Neut-B	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Base	%	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Eosino	%	1.3 ± 0.7	1.4 ± 1.0	1.1 ± 1.1	1.1 ± 0.6
Neut-S	%	19.0 ± 3.7	18.0 ± 4.0	16.3 ± 4.0	16.0 ± 3.4
Lympho	%	77.4 ± 3.8	79.3 ± 4.2	80.7 ± 4.0	81.2 ± 3.5
Mono	%	2.3 ± 1.3	1.3 ± 0.9	2.0 ± 0.8	1.7 ± 0.8

Values represent mean ± S.D..

** show significant difference from the control groups at p<0.01.

Table 4. Serum biochemical data of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.13 ± 0.13	6.14 ± 0.16	6.19 ± 0.08	6.15 ± 0.14
Alb	g/dl	3.92 ± 0.12	3.93 ± 0.08	3.92 ± 0.05	3.85 ± 0.07
A/G		1.77 ± 0.09	1.78 ± 0.06	1.73 ± 0.05	1.68 ± 0.06 *
BUN	mg/dl	21.4 ± 1.6	20.8 ± 0.8	19.8 ± 1.1 *	20.2 ± 1.2
CRN	mg/dl	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01 **
Glc	mg/dl	119 ± 12	120 ± 6	119 ± 8	121 ± 9
TG	mg/dl	133 ± 37	142 ± 38	128 ± 37	139 ± 24
TCho	mg/dl	64 ± 5	64 ± 5	65 ± 6	68 ± 3
FCho	mg/dl	11.9 ± 1.3	11.9 ± 1.7	11.5 ± 1.5	12.3 ± 0.8
TBil	mg/dl	0.04 ± 8.8	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
AIP	mU/ml	228 ± 20	227 ± 21	218 ± 11	218 ± 15
AIT	mU/ml	57 ± 5	58 ± 10	55 ± 4	59 ± 4
AsT	mU/ml	88 ± 18	84 ± 15	84 ± 12	90 ± 13
γ-GT	mU/ml	0.22 ± 0.29	0.17 ± 0.3	0.12 ± 0.15	0.18 ± 0.17
Ca	mg/dl	10.3 ± 0.1	10.5 ± 0.2	10.4 ± 0.1	10.4 ± 0.1
P	mg/dl	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.5	5.7 ± 0.4	5.5 ± 0.6
Na	mEq/l	139 ± 2	139 ± 1	139 ± 1	138 ± 1
K	mEq/l	4.9 ± 0.4	4.8 ± 0.3	5 ± 0.3	4.9 ± 0.3
Cl	mEq/l	101 ± 4	102 ± 1	101 ± 2	101 ± 2

Values represent mean ± S.D..

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

Table 5. Serum biochemical data of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
TP	g/dl	6.04 ± 0.13	5.96 ± 0.15	6.05 ± 0.14	5.93 ± 0.11
Alb	g/dl	4.01 ± 0.11	3.96 ± 0.1	4.05 ± 0.11	4.01 ± 0.08
A/G		1.99 ± 0.12	1.98 ± 0.1	2.03 ± 0.09	2.09 ± 0.07
BUN	mg/dl	18.1 ± 1.5	19.1 ± 1.2	19 ± 1.5	17.7 ± 1.4
CRN	mg/dl	0.35 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.02
Glc	mg/dl	110 ± 7	113 ± 7	112 ± 7	109 ± 10
TG	mg/dl	83 ± 20	80 ± 16	76 ± 18	82 ± 24
TCho	mg/dl	91 ± 6	92 ± 10	98 ± 8	107 ± 6 **
FCho	mg/dl	20.2 ± 1.3	19.7 ± 2.6	21.5 ± 2.4	22.8 ± 1.6 *
TBil	mg/dl	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02
AIP	mU/ml	138 ± 11	153 ± 11	143 ± 15	147 ± 14
AIT	mU/ml	40 ± 3	39 ± 2	40 ± 3	40 ± 4
AsT	mU/ml	83 ± 10	81 ± 11	85 ± 10	78 ± 6
γ-GT	mU/ml	0.32 ± 0.32	0.13 ± 0.16	0.10 ± 0.14	0.37 ± 0.40
Ca	mg/dl	10.1 ± 0.1	10.2 ± 0.2	10.3 ± 0.2	10.3 ± 0.2
P	mg/dl	4.0 ± 0.6	4.6 ± 0.6	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.7
Na	mEq/l	138 ± 1	137 ± 1	137 ± 1	138 ± 1
K	mEq/l	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3	4.8 ± 0.2
Cl	mEq/l	102 ± 1	101 ± 1	102 ± 1	102 ± 1

Values represent mean ± S.D..

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

Table 6. Organ weights of F344 male rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
Absolute					
Body Weights	g	310.65 ± 9.34	308.24 ± 10.15	315.69 ± 10.8	315.48 ± 11.12
Brain	g	1.931 ± 0.051	1.92 ± 0.062	1.932 ± 0.059	1.917 ± 0.048
Heart	g	0.884 ± 0.034	0.899 ± 0.059	0.894 ± 0.057	0.909 ± 0.054
Lungs	g	0.967 ± 0.056	0.923 ± 0.047	0.933 ± 0.035	0.941 ± 0.029
Liver	g	7.12 ± 0.419	7.088 ± 0.288	7.308 ± 0.376	7.15 ± 0.227
Kidney	g	1.732 ± 0.064	1.725 ± 0.089	1.791 ± 0.087	1.779 ± 0.061
Spleen	g	0.571 ± 0.026	0.573 ± 0.021	0.569 ± 0.029	0.559 ± 0.021
Testes	g	3.003 ± 0.079	2.945 ± 0.119	2.943 ± 0.081	2.943 ± 0.102
Adrenal	mg	32.41 ± 3.49	32.25 ± 4.12	34.21 ± 3.22	33.52 ± 2.83
Thymus	mg	204.51 ± 54.71	202.08 ± 46.27	185.95 ± 40.44	199.16 ± 38.71
Relative					
Brain	g%	0.622 ± 0.025	0.622 ± 0.023	0.613 ± 0.028	0.608 ± 0.019
Heart	g%	0.283 ± 0.011	0.29 ± 0.018	0.284 ± 0.017	0.287 ± 0.014
Lungs	g%	0.311 ± 0.02	0.299 ± 0.014	0.294 ± 0.011	0.299 ± 0.011
Liver	g%	2.29 ± 0.087	2.299 ± 0.062	2.315 ± 0.068	2.267 ± 0.06
Kidney	g%	0.558 ± 0.016	0.559 ± 0.016	0.566 ± 0.021	0.564 ± 0.022
Spleen	g%	0.182 ± 0.01	0.186 ± 0.007	0.179 ± 0.009	0.177 ± 0.008
Testes	g%	0.967 ± 0.038	0.954 ± 0.039	0.933 ± 0.046	0.934 ± 0.037
Adrenal	mg%	10.45 ± 1.24	10.48 ± 1.39	10.84 ± 1.12	10.64 ± 1.03
Thymus	mg%	65.62 ± 16.44	65.26 ± 13.08	59.02 ± 13.66	63.28 ± 13.29

Values represent mean ± S.D..

Table 7. Organ weights of F344 female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Group		C	L	M	H
% of haematococcus color		0.000	0.025	0.075	0.250
No. of animals		10	10	10	10
Absolute					
Body Weights	g	172.19 ± 5.46	170.53 ± 7.06	165.33 ± 9.01	166.86 ± 4.06
Brain	g	1.78 ± 0.02	1.787 ± 0.037	1.769 ± 0.029	1.782 ± 0.036
Heart	g	0.567 ± 0.029	0.548 ± 0.018	0.532 ± 0.024 **	0.555 ± 0.028
Lungs	g	0.71 ± 0.044	0.7 ± 0.042	0.676 ± 0.034	0.675 ± 0.046
Liver	g	3.658 ± 0.205	3.735 ± 0.229	3.612 ± 0.175	3.708 ± 0.184
Kidney	g	1.049 ± 0.062	1.063 ± 0.069	1.032 ± 0.055	1.054 ± 0.044
Spleen	g	0.370 ± 0.02	0.367 ± 0.026	0.355 ± 0.021	0.347 ± 0.018
Ovaries	g	48.72 ± 11.41	48.31 ± 8.44	49.19 ± 7.78	49.72 ± 5.24
Adrenal	mg	38.32 ± 4.67	39.44 ± 4.83	35.50 ± 4.41	37.64 ± 4.51
Thymus	mg	167.11 ± 24.53	168.28 ± 25.31	164.76 ± 16.85	152.67 ± 23.88
Relative					
Brain	g%	1.035 ± 0.04	1.047 ± 0.034	1.072 ± 0.052	1.069 ± 0.039
Heart	g%	0.329 ± 0.014	0.322 ± 0.014	0.323 ± 0.013	0.333 ± 0.016
Lungs	g%	0.412 ± 0.026	0.411 ± 0.03	0.409 ± 0.023	0.406 ± 0.034
Liver	g%	2.126 ± 0.119	2.192 ± 0.121	2.187 ± 0.10	2.223 ± 0.12
Kidney	g%	0.609 ± 0.036	0.624 ± 0.037	0.624 ± 0.027	0.633 ± 0.031
Spleen	g%	0.214 ± 0.01	0.215 ± 0.011	0.215 ± 0.018	0.206 ± 0.012
Ovaries	g%	28.34 ± 6.68	28.22 ± 4.18	29.83 ± 5.00	29.81 ± 3.25
Adrenal	mg%	22.24 ± 2.47	23.18 ± 3.14	21.49 ± 2.62	22.54 ± 2.53
Thymus	mg%	97.02 ± 13.75	98.57 ± 13.37	99.69 ± 9.05	91.71 ± 15.46

Values represent mean ± S.D..

** show significant difference from the control groups at p<0.01.

Table 8. Histological findings in male and female rats fed diet containing haematococcus color for 13 weeks

Sex Group	Male		Female	
	C	H	C	H
No. of animals examined	10	10	10	10
Heart				
Myocardial degeneration	1	2	0	0
Intramyocardial cell infiltration	1	0	0	0
Lung				
Microgranuloma	1	0	0	1
Liver				
Extratmedullary hematopoiesis	1	0	0	0
Microgranuloma	1	4	3	1
Vacuolation of hepatocyte	0	1	0	0
Kidney				
Tubular regeneration	2	2	0	0
Hyalin droplet	10	10	0	0
Calcification of collecting tubule	1	0	0	0
Calcification at cortico-medullary junction	0	0	0	1
Hyalin cast	0	1	0	0
Pancreas				
Vacuolation of acinar cell	1	0	0	1
Spleen				
Microgranuloma	0	0	1	0
Adrenal gland				
Accessory adrenal gland	1	1	0	1
Dilatation of sinusoid	0	0	1	1

- 5) Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y. and Gross, M.D.: *J. Nutr.*, **125**, 2483-92 (1995)
- 6) Jyonouchi, H., Zhang, L. and Tomita, Y.: *Nutr. Cancer.*, **19**, 269-80 (1993)
- 7) Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A.: *Cancer. Res.*, **55**, 4059-64 (1995)
- 8) Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A.: *Carcinogenesis*, **16**, 2957-63 (1995)
- 9) 日本水産、ヤエガキ醱酵技研：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，フードデザイン技術研究組合，東京，pp215-247 (1994)
- 10) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針，日本食品添加物協会，東京，pp19-22 (1986)
- 11) 山崎実，野口雄次，丹田勝，新谷茂：武田研究所報，**40**，163-187 (1981)
- 12) Murillo, E.: *Arch. Latinoam. Nutr.*, **42**, 409-13 (1992)
- 13) Onodera, H., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 99-106 (1997)

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) のラットを用いた経口投与による催奇形性試験酒見和枝[#]・宇佐見 誠・紅林秀雄・大野泰雄

Teratogenicity study of sodium chlorite in rats by oral administration

Kazue Sakemi[#], Makoto Usami, Hideo Kurebayashi and Yasuo Ohno

The teratogenicity of sodium chlorite (NaClO₂) was assessed in Wistar rats (Crj : Wistar). Sodium chlorite dissolved in distilled water was given to pregnant Wistar rats by gavage once a day from day 6 through 15 of pregnancy at doses of 0, 25, 50 and 100 mg/kg/day. The pregnant rats were sacrificed on day 20 of pregnancy, and their fetuses were examined for malformations. Sodium chlorite caused decreased food consumption, anemia, sedation, hematuria, and death in the pregnant rats at 100 mg/kg, but no fetal effects, such as malformations or growth retardation, were observed even at 100 mg/kg. It was concluded that sodium chlorite has no teratogenicity in rats when administered orally. The no-observed-adverse-effect level was 50 mg/kg/day for pregnant rats and 100 mg/kg/day or more for rat fetuses.

Keywords: sodium chlorite, Wistar rat, teratogenicity, malformation, developmental toxicity

緒 言

亜塩素酸ナトリウムは、さくらんぼ、ふき、ぶどうおよびももに限り、食品の漂白剤としての使用が認められている¹⁾。使用に当っては最終食品の完成前に分解または除去することが義務づけられている。

経口摂取された亜塩素酸ナトリウムは、血球系等に毒性を示すことが知られている。100 ppm の亜塩素酸ナトリウムを含む飲水で 30 日間飼育したマウスには赤血球の浸透圧抵抗性の減少、血球容積の増加および血球 G6PD 値の上昇が認められた²⁾。同様の飲水を妊娠マウスに与えた場合には、新生児に体重の減少および体重増加の抑制が認められた²⁾。また、亜塩素酸ナトリウムの経口での 50% 致死量はラット・マウスで 350 mg/kg、モルモットで 300 mg/kg であること並びに、微生物突然変異試験および染色体異常誘発試験において変異原性が認められることが知られている¹⁾。精子毒性については、ラットへの 5 日間曝露において亜塩素酸ナトリウムの毒性は認められていない³⁾。

催奇形性に関しては、妊娠ラットへの亜塩素酸ナトリウムの腹腔内 (10, 20, 50 mg/kg)、又は経口 (200 mg/kg) 又は飲水混入 (0.1, 0.5, 2.0 %) による 8 日間 (妊娠 8 ~ 15 日) の投与又は摂取実験が行われている⁴⁾。その結果、母動

物に対しては、経口投与群で 100%、腹腔内投与 50 mg 群、20 mg 群でそれぞれ 100%、50% が死亡し、0.1% 飲水混入群を除いた全群で体重減少、摂餌量および飲水量の低下が見られた。胎児に対しては、腹腔内投与 20 mg 群、飲水混入 2.0% 群で胎児の早期死亡が増加しているものの、奇形発生率に変化はなく、催奇形性は認められていない。しかしこの実験では、母動物に影響の認められない用量での検討が不十分であり、母動物および胎児に対する無影響量が求められていない。そこで本試験では用量設定を検討した上で、経口投与による催奇形性についてラットを用いて調べた。

材料および方法

1. 被験物質

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) は和光純薬工業株式会社より入手した。性状は白色の粉末結晶で、純度は 90% である。CAS 登録番号は、7758-19-2 で、式量は 90.44 である。

2. 試験系

Crj : Wistar ラット (日本チャールス・リバー) の雌 (12 週齢) および雄 (13 週齢) を用いた。未経産の雌を雄と終夜同居させ、翌朝腔垢中に精子が認められたものを妊娠動物として試験に供した。妊娠日の起算は精子確認日を妊娠 0 日とした。

3. 飼育条件

妊娠動物は、試験期間をとおしてアルミ製ケージで個別飼育し、固形飼料 (オリエンタル酵母, MF) および水道水

[#] To whom correspondence should be addressed : Kazue Sakemi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950; E-mail: sakemi@nihs.go.jp

を自由に摂取させた。動物飼育室内の環境は、温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気回数 15 回/時間、明暗交代 12 時間（明期 6:00 ~ 18:00）とした。

4. 用量および群構成

用量設定にあたって、亜塩素酸ナトリウム 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 mg/kg の 6 用量を用いて 1 群 3 匹にて予備試験を実施した。その結果、250 mg 以上の投与群で腹臥、呼吸不整、痙攣等が観察され、全例死亡した。生存動物の生殖に関する成績には亜塩素酸ナトリウムの影響は認められなかった。これらの結果を考慮して、本試験における群構成は、亜塩素酸ナトリウム投与群として 25, 50 および 100 mg/kg/day の 3 用量を設定し、対照群を加えて計 4 群とした。1 群の動物数は 26 匹とし、解剖時に妊娠が確認された動物のうち、動物番号順に 20 匹のデータを試験成績として用いた。但し、妊娠 20 日以前に死亡した妊娠動物が多かった 100 mg 投与群では、検査胎児数を多くするために、すべての妊娠動物のデータを用いた。

5. 投与方法

蒸留水に溶解した被験物質を、妊娠 6 日の体重に基づいて妊娠 6 ~ 15 日の 10 日間、1 日 1 回、胃ゾンデを用いて妊娠動物に強制経口投与した。被験物質溶液の濃度は、投与液量がいずれの用量においても 5 ml/kg となるようにした。対照群には蒸留水 5 ml/kg を同様に経口投与した。

6. 観察方法

妊娠動物の体重および摂餌量を妊娠 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15,

17 および 20 日に測定した。また、一般状態を毎日観察した。妊娠 20 日に妊娠動物を屠殺し、黄体数、着床数および胎児死亡を調べた。生存胎児については、外表の異常および性別を調べ、体重を測定した。各妊娠動物の約 3 分の 2 の生存胎児について Alizarin red S 染色骨格標本作製し骨格を観察した⁵⁾。残り約 3 分の 1 の生存胎児については内部器官を観察した。内部器官の観察には、頭部および腹部については粗大切片法⁶⁾を、胸部については顕微解剖法⁷⁾を用いた。

7. 統計学的方法

妊娠動物または一腹を標本の単位とした。対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との差の有意性の検定には、度数データについては Fisher の直接確立法を用いた。計量データについては、Bartlett の等分散検定により群間で分散に差がないことを調べた後、分散分析および Scheffé 法を用いた。群間で分散に差が認められた計量データおよび計数データについては、Kruskal-Wallis の H 検定および Scheffé 法を用いた。

結 果

1. 妊娠動物に及ぼす影響

1.1. 一般状態

妊娠動物の一般状態を Table 1 に示した。対照群、25 および 50 mg 投与群では一般状態の変化並びに死亡動物は認められなかった。100 mg 投与群では投与 3 日頃から貧

Table 1. Toxic signs in pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of pregnant rats examined	20	20	20	24
No. of dead pregnant rats	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	9 (37.5%)**
No. of pregnant rats with toxic signs	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	9 (37.5%)**
Anemia	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (25.0%)*
Cyanosis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)
Cheyne-Stokes' respiration	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Decrease in locomotor activity	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Lacrimation	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (16.7%)
Loose stool	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (8.33%)
Piloerection	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	3 (12.5%)
Sedation	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	5 (20.8%)*
Hematuria	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	6 (25.0%)*
Staggering gait	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (4.17%)

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

血、鎮静および血尿等の症状が観察された。これらの症状を示した動物は、殆どが発症後 1 ないし 2 日で死亡した。また、回復したものおよび無症状で死亡したものが各 1 匹認められた。

1.2. 体重および摂餌量

体重には、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。また、体重増加量にも有意差は認められなかった。

摂餌量は、妊娠 9 日に 100 mg 投与群において対照群に比べて有意な減少が認められた (Fig. 2)。

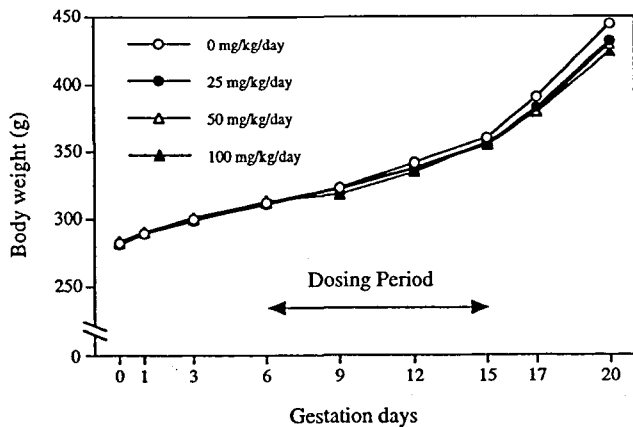


Fig.1. Body weight of pregnant rats treated with sodium chlorite

2. 胎児に及ぼす影響

2.1. 生存胎児数、性比、胎児体重、胚胎児死亡および胎児外表

生存胎児数、性比、胎児体重および胚胎児死亡率には、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった (Table 2)。また、いずれの群においても胎児に外表奇形は認められなかった。

2.2. 胎児骨格

胎児骨格には、いずれの群においても奇形は認められなかった (Table 3)。骨格変異には、対照群と亜塩素酸ナトリ

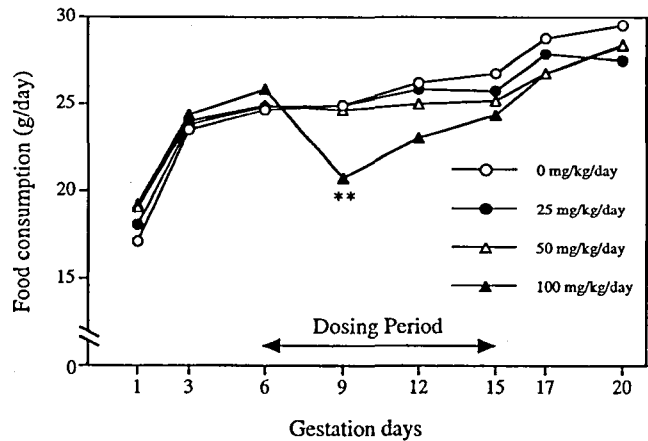


Fig.2. Food consumption of pregnant rats treated with sodium chlorite

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

Table 2. Fetal growth in pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	20	20	15
No. of corpora lutea	348	328	336	238
Mean \pm S.D. ^a	17.4 \pm 1.6	16.4 \pm 3.6	16.8 \pm 1.5	15.9 \pm 4.5
No. of implants	317	298	293	197
Mean \pm S.D. ^a	15.9 \pm 2.5	14.9 \pm 4.9	14.7 \pm 3.6	13.1 \pm 4.8
Implantation rate (%)	91.5	90.3	87.0	83.8
No. of live fetuses	306	281	267	187
Mean \pm S.D. ^a	15.3 \pm 2.8	14.1 \pm 4.7	13.4 \pm 3.9	12.5 \pm 4.7
Sex ratio (male/female)	1.10	1.17	1.41	1.51
Fetal weight (g) ^a				
Male	3.93 \pm 0.23	3.94 \pm 0.36	3.99 \pm 0.20	3.90 \pm 0.22
Female	3.69 \pm 0.24	3.66 \pm 0.26	3.76 \pm 0.15	3.67 \pm 0.23
No. of dead implants	11	17	26	10
Early death	11	17	26	10
Late death	0	0	0	0
Mortality (%)	3.8	5.2	9.7	10.7
No. of fetuses with gross malformation	0	0	0	0

a) Mean \pm S.D. is shown.

Table 3. Skeletal variations in the fetuses from pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	20	20	14
No. of fetuses examined	202	187	177	124
No. of fetuses with variation ^a	50 (25.9%)	33 (16.5%)	26 (14.4%)	21 (16.6%)
Hypoplastic supraoccipital	30 (14.5%)	11 (5.69%)	5 (2.46%)	9 (7.07%)
Cervical rib	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (0.97%)	0 (0.00%)
Wavy rib	8 (4.33%)	2 (0.96%)	1 (0.63%)	4 (3.47%)
Deformed rib	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.89%)
Deformed cervical vertebral arch	7 (3.39%)	3 (1.54%)	5 (2.67%)	2 (1.43%)
Deformed sternbrae	5 (2.44%)	6 (4.23%)	5 (3.54%)	2 (1.36%)
Deformed thoracic vertebral body	4 (1.93%)	5 (2.69%)	1 (0.63%)	3 (1.89%)
25 presacral vertebrae	0 (0.00%)	1 (0.50%)	0 (0.00%)	1 (0.71%)
Lumbar rib	24 (10.7%)	13 (6.12%)	12 (6.18%)	4 (3.55%)
Extra rib	1 (0.42%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (0.71%)
Rudimentary rib	24 (10.7%)	13 (6.12%)	12 (6.18%)	4 (3.55%)
No. of sacro-caudal vertebrae ^b	7.73 ± 0.87	7.90 ± 0.65	7.95 ± 0.53	8.02 ± 0.49
No. of metacarpus ^b	7.84 ± 0.22	7.93 ± 0.17	7.92 ± 0.15	7.90 ± 0.18
No. of metatarsus ^b	8.16 ± 0.35	8.21 ± 0.41	8.13 ± 0.34	8.13 ± 0.26

a) Total number and mean incidence are shown.

b) Mean ± S.D. is shown.

ウム投与群との間に有意差は認められなかった。腰肋および過剰肋骨を有する胎児の発生率においても有意な変化はなかった。また、骨化の進行度の指標として調べた仙尾椎骨、中手骨および中足骨の骨化核数にも有意な変化は認められなかった。

2.3. 胎児内部器官

いずれの群においても2～8匹の胎児に小奇形が認められた (Table 4)。また、50 mg 投与群で、1匹の胎児に心血管系および肺分葉異常の奇形が認められた。しかし、いずれの奇形の発生率においても、対照群と亜塩素酸ナトリウム投与群との間に有意差は認められなかった。

考 察

本試験の結果から、亜塩素酸ナトリウムにはラットにおける経口投与では催奇形性はないと考えられる。すなわち亜塩素酸ナトリウムは、妊娠動物に摂餌量減少、貧血、鎮静および血尿等の毒性徴候並びに死亡を起こす用量においても、胎児の奇形発生率を増加させなかった。更に、胎児

骨格検査において、低用量での催奇形性の指標となると考えられている過剰肋骨⁸⁾の発生率にも変化が認められないので、より高用量においても胎児奇形発生率が増加することはないと考えられる。また、ラットにおける飲水混入による催奇形性実験⁴⁾では、母動物に影響の認められる用量では胎児の早期死亡が報告されているが、低用量では胎児に異常はなく、本試験の結果と一致した。

本試験条件下での亜塩素酸ナトリウムの妊娠ラットに対する無影響量は50 mg/kg/day であると考えられる。これは、100 mg 投与群では母動物に毒性徴候および死亡が認められたが、50 mg 投与群では対照群と比較して有意な変化が認められないからである。

ラット胎児に対する無影響量は100 mg/kg/day 以上であると考えられる。これは、100 mg 投与群においても対照群と比較して、胎児に被験物質投与による有意な変化が認められないからである。このことは亜塩素酸ナトリウムは母動物に影響を与えない用量では胎児に対して影響を及ぼさないことを示している。

Table 4. Visceral malformations in the fetuses from pregnant rats treated with sodium chlorite

	Dose (mg/kg/day)			
	0 (control)	25	50	100
No. of litters	20	18	20	14
No. of fetuses examined	104	94	90	63
No. of litters with malformed fetus	5 (25.0%)	5 (27.8%)	5 (25.0%)	2 (14.3%)
No. of fetuses with malformation ^a	8 (7.92%)	6 (6.48%)	5 (4.92%)	2 (2.62%)
Thymic remnant in neck	6 (5.42%)	5 (5.56%)	1 (0.84%)	2 (2.62%)
Abnormal heart and great vessels	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (1.25%)	0 (0.00%)
Hypoplasia of lung	0 (0.00%)	0 (0.00%)	1 (1.25%)	0 (0.00%)
Dilatation of renal pelvis	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (1.84%)	0 (0.00%)
Persistent left umbilical artery	2 (1.67%)	1 (0.93%)	1 (1.00%)	0 (0.00%)

a) Total number and mean incidence are shown.

文 献

- 1) 石館守三, 谷村顕雄監修: "第 5 版食品添加物公定書解説書", 廣川書店, 東京 (1987).
- 2) Moore, G. S. and Calabrese, E. G.: *Environ. Health Perspect.*, **46**, pp. 31-37 (1982).
- 3) Linder, R. E., Strader, L. F., Slott, V. L. and Suarez, J. D.: *Reprod. Toxicol.*, **6**, pp. 491-505 (1992).
- 4) Couri, D., Miller, C. H. Jr., Bull, R. J., Delphia, J. M. and Ammar, E. M.: *Environ. Health Perspect.*, **46**, pp. 25-29 (1982).
- 5) Dawson, A. B.: *Stain Technol.*, **1**, 123 (1926).
- 6) Wilson, J. G.: "Teratology principles and techniques", eds. by Wilson, J. G. and Warkany, J., The University of Chicago Press, Chicago, pp. 262 (1965).
- 7) 西村耕一: 先天異常, **14**, pp. 23-40 (1974).
- 8) 安田峯生, 前田広由: 先天異常, **13**, pp. 25 (1973).

シソ抽出物の F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

劉 雲・小野寺博志*・高木久宜・糀谷高敏・安原加壽雄・三森国敏・広瀬雅雄

A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of *Perilla* Extracts in F344 RatsLiu Yun, Hiroshi Onodera[#], Hisayoshi Takagi, Takatoshi Koujitan, Kazuo Yasuhara, Kunitoshi Mitsumori and Masao Hirose

A 13-week subchronic oral toxicity study of *Perilla* extracts in drinking water containing 0%, 2.5%, 5% and 10% extracts was performed in both sexes of F344 rats. Rats were randomly divided into 4 groups each consisting of 10 males and 10 females. No animals died during the period of administration. There were no treatment-related changes in body weight gain or in hematological or blood biochemistry values. Nor were any treatment-related histopathological changes observed in the highest dose group. These findings indicate that ingestion of 10% *Perilla* extracts in drinking water for 13-week does not cause any toxicological changes in rats.

Keywords: *Perilla* extracts, F344 rats, subchronic toxicity study.

はじめに

シソ抽出物はシソ科シソの種子または葉よりアルコール等で抽出濃縮して得られ、その主成分はテルペノイドで性状は液状である。用途は調味料等の各種食品素材として主に日持向上や香料を目的として使用されている。シソ抽出物についての安全性試験成績は現在まで無く、天然香料やシソ色素として使用されているものについて変異原性は陰性と報告されている¹⁾。また、一般飲食物添加物として使用されているシソ色素のラット、マウスにおける急性経口毒性試験で LD₅₀ 値は 5 g/kg 以上とされている。しかし、その他の毒性に関する情報は無い。そこで、今回シソ抽出物についての毒性を明らかにするためラットにおける 13 週間反復投与毒性試験を行った。

試験材料および方法

1. 被験物質ならびに投与量：

シソ抽出物は梅屋(株)(和歌山)より供与されたものを用いた。13 週間反復投与毒性試験に先立ち、動物の検体摂取状況を検討する目的で、5 %での 2 週間予備試験を行った。その結果、体重増加率、飼料摂取量、検体混入飲料水

の忌避などは対照群と比べ差は無く、むしろ飲水量は増加する傾向が認められた。その結果と被験物質が抽出物であることを考慮して、本試験のシソ抽出物の濃度を最高 20 %とし、以下公比 2 で減じ 10, 5, 2.5, 0 %とした。またシソ抽出物はシヨ糖に溶解しているため、シヨ糖の影響を考慮し、シヨ糖 20 %の溶媒対照群も設定して実験を開始した。しかし実験開始当初よりシソ抽出物投与群は飲料水の消費が激しく、最高で対照群の 10 倍近くまで達した。供給検体の不足と、実摂水量の算定が不可能なため、投与開始 10 日目で最高用量の 20 %および溶媒対照シヨ糖 20 %群を実験から除外して実験を継続した。

2. 動物および方法：

5 週齢の F344 ラット雌雄各 60 匹を日本チャールスリバー(株)より購入し、約 1 週間馴化飼育後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 6 群に分けて実験を行った。動物の飼育はバリアーシステムの動物飼育室にて行い、室内環境条件は温度 24±1 °C、湿度は 55±5 %、換気回数 18 回/時間、蛍光照明 12 時間(7-19 時)とした。動物はポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い、週 2 回交換した。飼料は基礎飼料(CRF-1)を自由に摂取させた。

被験物質の調製は原液を調製時まで 4 °C に保存し、週 2-3 回または不足時に適宜新しいものと交換した。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摂水量は交換時に残量を測定した。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。

[#] To whom correspondence should be addressed: Hiroshi Onodera; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-Ku, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9845 Fax: 03-3700-1425 E-mail address: onodera@nihs.go.jp

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 Sysmex 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)。また総蛋白 (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 (BUN)、クレアチニン (CRN)、カルシウム (Ca)、無機リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、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 ピルピック トランスアミラーゼ (GPT)、アルカルホス ファターゼ (ALP)、およびアルブミン (Alb) の各項目についての血清生化学的検査を (株) SRL で実施した。動物を剖検後、脳、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、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。

4. 結 果：

(1) 死亡動物および体重変化：

実験全期間を通じ死亡動物は認められなかった。

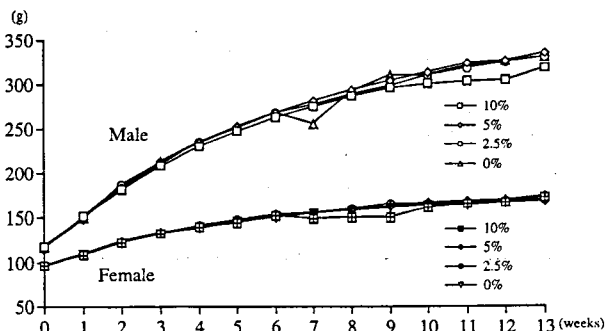


Fig.1. Body weight curve in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

体重は雄の 10 % 群で 9 週目以降軽度の増加抑制傾向が認められたが、有意な変動ではなかった (Fig.1, Table1)。雌も同様に 10 % 群で 7 週以降増加抑制傾向が認められたが、10 週目以降は他の群と同様の推移を示し、実験最終時には差は認められなくなった。

(2) 摂水量および飼料摂取量：

摂水量は検体の用量に比例して増加したが、雄の 10 % 群では対照群の約 2 倍、雌ではその傾向が著しく 10 % 群で対照群の約 4 倍に増加した。しかし飼料摂取量は摂水量とは逆に最高投与群で減少する傾向を示した (Table1)。摂水量から積算した一日検体摂取量は投与群で摂水量が増加したため、実験開始時の公比 2 での設定より大きく上回った。

(3) 血液学および血清生化学的検査：

血液学的検査では、雄の 5 % および 10 % 群と雌の 10 % 群で WBC の有意な増加が認められた (Table2)。血液像での白血球百分率では、雄の全投与群で Seg が有意に増加し、Lymph が有意に増加した。

その他、雌の 2.5 % および 5 % 群で Seg が増加し、5 % 群で Lymph が減少した。雌の 5 % 群では Mono の増加が

Table 1. Body weight, water consumption, food intake in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Group (%)	Final body weight (g)	Water consumption (g/rat/day)	Diet intake (g/rat/day)	Daily <i>Perilla</i> extracts intake (g/kg/day)
Male 0	320.4 ± 13.9	22.2	14.4	0.0
2.5	317.8 ± 13.0	24.7	14.5	1.94
5	323.1 ± 12.0	33.1	14.2	5.12
10	305.5 ± 19.1	42.6	12.6	13.9
Female 0	158.5 ± 5.4	14.8	8.7	0.0
2.5	160.4 ± 8.7	30.5	9.2	4.76
5	162.8 ± 9.0	47.3	8.4	14.5
10	162.0 ± 6.5	60.2	6.3	37.1

Table 2 Hematological changes in rats given water containing *Perilla* extracts for 13 weeks

Dose level (%)	0				2.5				5				10			
	No. of animals				10				10				10			
Male																
RBC	10 ¹² /l	9.53±0.22*	9.62±0.18	9.65±0.15	9.34±0.30											
Hb	g/dl	15.7±0.3	15.7±0.3	15.8±0.2	15.4±0.4											
Ht	%	45.6±1.0	45.7±1.0	45.7±0.7	44.5±1.5											
Ebl	count/200 WBC	1.8±2.6	2.0±1.2	1.8±1.8	0.7±0.8											
WBC	10 ⁹ /l	4.27±0.45	4.18±0.27	4.80±0.55*	4.69±0.43*											
Differential cell count (%)																
Seg		43.7±5.7	34.1±7.4*	27.1±3.3*	26.3±4.3*											
Eosin		1.2±0.8	0.8±1.0	1.4±0.8	2.0±1.2											
Lymph		54.9±5.2	64.3±3.1*	71.1±3.6*	71.5±4.3*											
Mono		0.2±0.2	0.2±0.3	0.4±0.3	0.2±0.3											
Female																
RBC	10 ¹² /l	8.95±0.40	9.03±0.27	9.09±0.46	9.01±0.24											
Hb	g/dl	15.9±0.7	15.9±0.4	16.1±0.7	16.0±0.7											
Ht	%	45.6±2.1	46.0±1.3	46.3±2.3	46.3±1.2											
Ebl	count/200 WBC	2.4±1.9	2.1±1.6	1.5±1.4	3.3±1.8											
WBC	10 ⁹ /l	3.72±0.78	3.81±0.36	3.79±0.32	4.59±0.35*											
Differential cell count (%)																
Seg		20.3±3.6	24.2±3.8*	28.1±5.9*	23.2±5.8											
Eosin		1.2±0.5	1.0±0.7	1.3±0.8	1.2±0.7											
Lymph		77.3±4.6	74.5±3.5	69.7±5.9*	75.2±5.3											
Mono		0.2±0.3	0.3±0.4	0.9±0.9*	0.4±0.4											

a) Mean ± S.D.
*: Significantly different from the control at p<0.05.

考 察

今回の 13 週間反復投与毒性試験では、5 %以上の群で飲水量が増加した、これはシソ抽出物の溶媒として添加されたショ糖を動物が好んで摂取したことによるものと考えられる。体重は 10 %群の雄で 9 週以降、雌で 7 週以後有意ではないが、増加抑制傾向を示した、しかし実験終了時に差は認められなかった。この原因としては摂水量の増加により逆に飼料摂取量が減少したことによる可能性が考えられた。

血液学的検査では、雄の 5 %以上の群および雌の 10 %群で WBC の有意な増加が見られ、雄の全投与群で分葉核好中球 (Seg) が減少し、リンパ球 (Lymph) が増加した。WBC 数の変動は無処置ラットの背景データに比し明らかに高いものではなく、病理組織学的にも造血器関連臓器に投与に関連したと思われる変化は認められなかったことから、これらの変動は毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。

血清生化学的検査では、雄の 5 %以上の群で TC, Alb, TP が、A/G 比は 10 %でも増加した。TC は雌の全投与群でも増加し、10 %群では Na と ALP も増加した。しかし、これらの検査指標の変動値は無処置ラットの背景データの範囲内に入るものであり、かつ、病理組織学的にもこれらの変動を裏付ける形態学的変化は肝や造血器系にみられなかったことから、これらの変動は直接検体投与によって誘発されたものとは考えられなかった²⁻⁵⁾。

臓器重量では、雄の 10 %群で肝と心の相対重量が増加

し、雌の 5 %以上の群で肝の絶対・相対重量および雌の全投与群で心の絶対・相対重量が増加したが、病理組織学的に心および肝に臓器障害性や重量増加を示唆する変化は認められず、これらが直接投与に起因した変化とはみなすことは出来なかった。

以上の結果より、シソ抽出物を 10 %飲料水に混じ 13 週間雌雄の F344 ラットに投与した本実験では、投与に起因すると思われる直接的な毒性変化は認められず、シソ抽出物としての無毒性量を雄で 10 % (13.9 g/kg/日)、雌で 10 % (37.1 g/kg/日) と判定された。

文 献

- 1) 藤井正美, 清水孝重, 中村幹雄: 概説 食用天然色素, 光琳, 東京 76-79 (1993)
- 2) 高田幸一, 豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 田村啓, 高橋道人: カロブ色素の F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 93-98 (1997)
- 3) 小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 竹川潔, 高橋道人: 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. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 99-106 (1997)
- 4) 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: ベクチン分解物のラットにおける 13 週間亜急性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 119-124 (1997)
- 5) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 今沢孝喜, 広瀬雅雄: クロロフィルの F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **116**, 107-112 (1998)

硫酸アンモニウムの F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

高木久宜*・小野寺博志・劉雲・安原加壽雄・糀谷高敏・三森国敏・広瀬雅雄

13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Ammonium Sulfate in Rats

Hisayoshi Takagi*, Hiroshi Onodera, Liu Yun, Kazuo Yasuhara, Takatoshi Koujitani,
Kunitoshi Mitsumori and Masao Hirose

A 13-week subchronic oral toxicity study of ammonium sulfate was performed in both sexes of F344 rats by feeding them a CRF-1 powder diet containing concentrations of 0%, 0.38%, 0.75%, 1.5%, and 3.0% of the substance. Rats were randomly divided into 5 groups each consisting of 10 males and 10 females. Male animals in the 3% group exhibited diarrhea during the administration period. No changes indicating obvious ammonium sulfate toxicity were observed in the body weights, organ weights, hematological, serum biochemical, or histopathological examinations. Based on these results, the NOEL (no-observed-effect level) of ammonium sulfate for F344 rats was judged to be 1.5% in males (886 mg/kg/day) and 3% in females (1975 mg/kg/day), and the MTD (maximally tolerated dose) for 2-year carcinogenicity studies in F344 rats was concluded to be 3.0% or more in the diet.

Keywords : ammonium sulfate, rat, subchronic study

はじめに

硫酸アンモニウム (Ammonium sulfate) は、元来コークス炉ガス中のアンモニアを硫酸で回収する際の副産物であり、俗に「硫安」と呼ばれる物質である。窒素肥料として用いられていた時期は生産量が非常に多かったが、近年の技術改良による尿素の生産増や回収硫安の増加で、本品の生産量は減少しつつある。硫酸アンモニウムは、昭和 32 年食品添加物として指定されており、主な用途に醸造用剤として使用されている。その他、イモ類、糖蜜などを原料とする発酵の助成剤として、また、酵母、もろみに対しても用いられている。またパン酵母の栄養源としても加えられ、その添加により発酵が促進され、熟成を早めると同時にガス保持性を高め、パンの容積が増大するという効能が知られている¹⁾²⁾。1986年、WHOで発行されている Environmental Health Criteria 第 54 巻において Ammonia に関する安全性評価がなされている。その中に硫酸アンモニウムを用いて行った評価の記述が部分的にあるが、それは急性毒性データであり、硫酸アンモニウム自体の反復投与毒性試験に関するデータが報告されていない。そこで今回、F344 ラット

を用いて硫酸アンモニウムの短期間投与による毒性を明らかにする目的と共に、慢性毒性・発癌性試験の投与量を設定する目的で、13 週間の反復投与試験を行った。

実験材料および方法

1. 被験物質および投与量

今回用いた Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分子量 132.14) は、白色微粉末状である。水に溶けやすいが、エタノール、アセトンにはほとんど不溶性である。空気中で加熱すると、120°C で分解し、357°C で融け、アンモニアを放出して硫酸水素アンモニウムと硫酸アンモニウムの混合物になる。今回の実験には、米山化学工業株式会社より提供された硫酸アンモニウム粉末状を粉末飼料中に添加した。13 週間亜慢性毒性試験を実施するに当たり、動物の被験物質混合飼料の忌避を確認する目的で、雌 F344 ラットを用い、5.0% を最高濃度とする 2 週間の予備投与試験を行った。5.0% 投与群で対照群に比し、有意な体重増加抑制が認められ、投与一週目より下痢が観察された。この結果に基づいて、13 週間亜慢性毒性試験における硫酸アンモニウムの最高用量を 3.0% とし、以下公比 2 で減じ、1.5, 0.75 および 0.38% (端数切り上げ) を投与用量とした。

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

* To whom correspondence should be addressed: Hisayoshi Takagi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-Ku, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9845 Fax: 03-3700-1425; E-mail: htakagi@nihs.go.jp

験に共した。

動物は温度 24 ± 1 °C, 湿度 55 ± 5 %, 換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ), 12 時間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, そのうち 4 群を被験物質投与群として硫酸アンモニウムを 3.0, 1.5, 0.75, 0.38% 添加させた混合飼料を 13 週間投与し, 1 群を対照群として粉末基礎飼料 (CRF-1) を同期間自由摂取させた。被験物質を添加した混合飼料の調整は, オリエンタル酵母株式会社に依頼した。混合飼料は使用時まで 4°C に維持された飼料保管室において保存した。硫酸アンモニウムは 4.0% の濃度で粉末基礎飼料に添加した場合, 室温で 1 週間は安定であることが確認されている。

体重および摂餌量は毎週測定した。一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し, 投与開始 13 週後に全生存動物を屠殺剖検し, 試験を終了した。動物は屠殺の前日より一晩絶食後, エーテル麻酔下で開腹し, 腹部大動脈より採血を行った。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

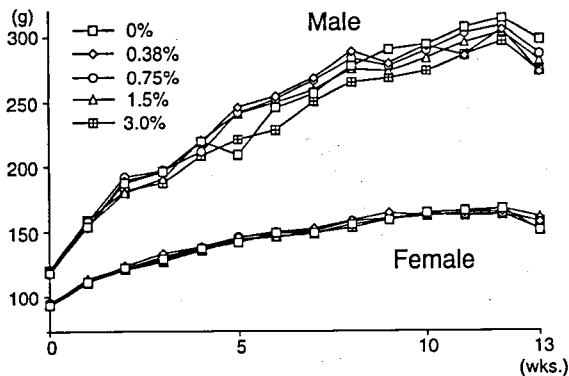


Fig. 1. Body weight curves and rats fed containing ammonium sulfate for 13 weeks

Table 1. body weight, food intake and chemical intake in rats containing ammonium sulfate for 13 weeks

Group (%)	Final body weight (g)	Food intake (g/rat/day)	Total chemical intake (mg/kg/day)
Male 0	297.8 ± 13.0 ^{a)}	14.2	0
0.38	273.4 ± 14.8*	14.0	222
0.75	286.7 ± 21.4	14.3	441
1.5	282.0 ± 17.7*	14.1	886
3.0	283.9 ± 15.2*	13.8	1792
Female 0	150.8 ± 7.5	9.2	0
0.38	157.0 ± 9.6*	9.1	239
0.75	151.6 ± 7.7	9.3	484
1.5	161.2 ± 8.0*	9.3	961
3.0	158.1 ± 10.4*	8.4	1975

a) : Mean ± S.D.

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

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・グロブリン比 (A/G), アルブミン (Alb), 総コレステロール (TCho), 尿素窒素 (BUN), 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 (P), グルタミン酸オキサロアセテクトランスアミラーゼ (GOT), グルタミンピルビクトランスアミラーゼ (GOT), アルカリ性フォスファターゼ (ALP) の各項目の測定を行った。採血の終了した動物は放血屠殺して剖検した後, 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³⁾。

結 果

1. 一般状態および死亡動物

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。試験開始 1 週間後より雄の 3.0% 投与群に下痢が認められ, 試験終了時まで持続的に見られた。

2. 体重および飼料摂取量

13 週間の試験期間中, 雄の 3.0% 群で対照群と比し体重増加抑制傾向が認められた (Fig. 1)。最終体重では, 雄の 0.38, 1.5 および 3.0% 群で有意な増加抑制が認められた。雌では 0.38, 1.5 および 3.0% 群で有意な増加が認められた。0.38% 群の体重の変化は用量に関連するものではなかった。飼料摂取量は, 雌雄共に対照群との間に差は認められなかった (Table 1)。

3. 血液学的検査および血清生化学的検査結果

血液学的検査において (Table 2, 3), 雄の 3.0% 投与群で WBC の有意な減少が, 雌の 3.0% 投与群で RBC, Hb, PCV および Plt の有意な減少, MCH, MCHC の有意な上昇がそれぞれ認められた。MCH は, 雌の 1.5% 投与群においても有意に上昇した。さらに, 1.5% 以上の群で用量に関連して MCV は増加し, MCHC は 0.75% 群から増加した。雄の WBC は 1.5% 以下の投与群でも有意な減少を示したが, これは用

Table 2. Hematological changes in male rats fed diet containing ammonium sulfate for 13 weeks

Dose level (%)		0	0.38	0.75	1.5	3.0
No. of animals		10	10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	8.87±0.20 ^{a)}	9.36±0.24 *	9.09±0.41	9.13±0.51	8.93±0.29
Hb	g/dl	14.8±0.3	15.6±0.5*	15.2±0.7	15.2±0.8	15.0±0.5
PCV	%	43.1±1.0	45.5±1.3*	44.4±2.0	44.5±2.4	43.6±1.3
MCV	fl	48.5±0.3	48.6±0.5	48.9±0.4*	48.7±0.2	48.9±0.3
MCH	pg	16.7±0.2	16.4±0.3*	16.7±0.2	16.7±0.1	16.8±0.2
MCHC	g/dl	34.4±0.4	34.2±0.8	34.1±0.4	34.2±0.3	34.4±0.3
Plt	10 ¹² /l	0.73±0.03	0.80±0.05*	0.77±0.05*	0.74±0.03	0.73±0.04
Ebl	count/200 WBC	1.2±1.1	0.8±0.9	1.9±2.0	1.2±1.4	0.8±0.9
WBC	10 ⁹ /l	3.85±0.30	3.16±0.63*	2.94±0.47*	3.00±0.37*	3.36±0.20*
Differential cell count (%)						
	Eosino	0.8±0.5	1.1±0.3	1.0±1.0	0.9±0.5	1.0±0.7
	Neut-S	22.2±2.2	24.3±5.2	26.6±5.2*	24.7±5.4	25.3±5.4
	Lympho	74.6±2.4	73.4±5.7	71.9±5.3	71.0±10.4	72.4±4.9
	Mono	1.2±1.1	1.4±0.9	0.9±0.7	0.8±0.4	1.3±0.9

a) Mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p<0.05

Table 3. Hematological changes in female rats fed diet containing ammonium sulfate for 13 weeks

Dose level (%)		0	0.38	0.75	1.5	3.0
No. of animals		10	10	10	10	10
RBC	10 ¹² /l	9.34±0.32 ^{a)}	8.64±0.18*	8.60±0.31*	8.90±0.27*	8.72±0.34*
Hb	g/dl	16.3±0.5	15.2±0.4*	15.3±0.5*	15.8±0.5*	15.5±0.6*
PCV	%	47.7±1.4	44.5±0.7*	44.2±1.5*	45.3±1.5*	44.1±1.6*
MCV	fl	51.1±0.9	51.5±0.4	51.3±0.5	52.8±0.4*	50.6±0.2
MCH	pg	17.5±0.2	17.5±0.1	17.7±0.3	17.7±0.2*	17.7±0.2*
MCHC	g/dl	34.2±0.4	34.1±0.5	34.7±0.5*	34.9±0.3*	35.1±0.3*
Plt	10 ¹² /l	0.95±0.05	0.84±0.05*	0.77±0.03*	0.83±0.04*	0.81±0.03*
Ebl	count/200 WBC	2.5±1.3	2.5±2.0	2.8±1.5	3.0±2.4	4.6±2.8
WBC	10 ⁹ /l	3.85±0.36	3.71±0.32	3.27±0.44*	3.35±0.51*	3.45±0.51
Differential cell count(%)						
	Eosino	0.9±0.8	0.8±0.8	1.0±0.8	1.1±0.6	0.8±0.3
	Neut-S	16.3±4.5	13.8±4.9	17.7±5.1	16.0±3.7	14.4±2.2
	Lympho	81.1±5.4	83.6±5.1	79.3±6.1	81.2±3.6	82.8±2.0
	Mono	1.6±1.6	2.5±2.0	1.8±1.2	2.1±1.7	1.7±1.4

a) Mean ± S.D.

*: Significantly different from the control at p<0.05

Table 4. Serum biochemistry in male rats treated with ammonium sulfate for 13 weeks

Dose level (%)	0	0.38	0.75	1.5	3.0
No. of animals	10	10	10	10	10
TP g/dl	6.41±0.14 ^{a)}	6.28±0.11*	6.35±0.17	6.34±0.20	6.48±0.18
A/G	2.40±0.18	2.68±0.27*	2.48±0.25	2.52±0.28	2.36±0.11
Alb g/dl	4.52±0.18	4.56±0.14	4.51±0.10	4.53±0.08	4.54±0.11
TCho mg/dl	61±6	69±5*	73±11*	73±11*	66±7
BUN mg/dl	18.90±2.58	17.22±2.15*	16.61±1.35*	16.61±1.18*	17.40±1.01
Na mEQ/l	145±1	146±1*	146±1*	146±1*	146±1*
Cl mEQ/l	103±0.8	107±1.0*	106±0.7*	105±0.8*	103±0.8
K mU/dl	4.42±0.17	4.56±0.18	4.73±0.19*	4.79±0.14*	4.60±0.25
Ca mg/dl	10.1±0.1	10.1±0.3	10.1±0.2	9.9±0.2*	10.1±0.2
P mg/dl	5.9±0.4	6.0±0.4	5.7±0.6	5.6±0.3*	5.3±0.4*
GOT IU/l	83±11	68±8*	75±6	83±6	77±5
GPT IU/l	48±8	46±7	61±9*	67±10*	50±4*
ALP IU/l	410±28	294±59*	295±76*	288±81*	390±21

a) : Mean ± S.D.

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

Table 5. Serum biochemistry in female rats treated with ammonium sulfate for 13 weeks

Dose level (%)	0	0.38	0.75	1.5	3.0
No. of animals	10	10	10	10	10
TP g/dl	6.18±0.15 ^{a)}	6.13±0.11	6.12±0.19	6.14±0.14	6.11±0.17
A/G	3.05±0.20	2.83±0.27	2.87±0.19	2.70±0.18*	2.70±0.22*
Alb g/dl	4.65±0.11	4.52±0.14*	4.52±0.12*	4.48±0.09*	4.45±0.14*
TCho mg/dl	93±8	94±5	94±8	87±6	87±8
BUN mg/dl	21.14±1.32	19.45±1.90*	21.44±1.70	19.65±1.20	19.87±2.64
Na mEQ/l	146±0.9	145±0.8*	146±1	145±0.5	146±1
Cl mEQ/l	108±0.9	107±1.2	107±0.5*	107±0.5*	106±1.2*
K mU/dl	4.14±0.18	4.15±0.31	4.20±0.22	4.20±0.17	4.17±0.26
Ca mg/dl	9.9±0.2	10.1±0.2	9.9±0.2	9.9±0.2	10.1±0.3
P mg/dl	5.6±0.3	5.8±0.4	5.6±0.3	5.8±0.3	6.0±0.5*
GOT IU/l	86±11	68±5*	74±4*	76±3*	69±5*
GPT IU/l	45±7	36±4*	37±4*	39±2*	39±3*
ALP IU/l	240±14	255±35	227±16	287±25*	278±27*

a) : Mean ± S.D.

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

Table 6. Organ weight of male rats treated with ammonium sulfate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.38	0.75	1.5	3.0
Body weight (g)	297.8±13.0	273.4±14.8*	286.7±21.4	282.0±17.7*	283.9±15.2*
Absolute (g)					
Brain	1.932±0.061 ^{a)}	1.903±0.034	1.907±0.062	1.932±0.034	1.905±0.040
Lung	0.930±0.078	0.921±0.056	0.942±0.093	0.905±0.056	0.893±0.076
Heart	0.847±0.049	0.806±0.046	0.855±0.080	0.848±0.061	0.838±0.059
Spleen	0.561±0.034	0.522±0.023*	0.554±0.044	0.540±0.052	0.516±0.044*
Liver	7.051±0.397	5.702±0.497*	6.039±0.871*	6.082±0.879*	6.834±0.393
Adrenal	0.038±0.006	0.040±0.002	0.036±0.003	0.041±0.004	0.036±0.004
Kidney	1.804±0.063	1.716±0.088*	1.819±0.155	1.873±0.139	1.956±0.121*
Testis	2.952±0.116	3.043±0.107	3.083±0.086	3.019±0.075	3.052±0.127
Relative (g/100g B.W.)					
Brain	0.649±0.025	0.698±0.035*	0.668±0.046	0.687±0.038*	0.673±0.042
Lung	0.312±0.022	0.338±0.030*	0.329±0.022	0.322±0.023	0.314±0.016
Heart	0.284±0.012	0.296±0.023	0.298±0.021	0.301±0.011*	0.295±0.011
Spleen	0.188±0.007	0.192±0.016	0.193±0.008	0.191±0.010	0.182±0.011*
Liver	2.367±0.070	2.088±0.187*	2.097±0.160*	2.147±0.187*	2.408±0.078
Adrenal	0.013±0.002	0.014±0.001	0.013±0.001	0.014±0.002	0.013±0.002
Kidney	0.606±0.024	0.629±0.037	0.634±0.015*	0.664±0.025*	0.689±0.025*
Testis	0.962±0.039	1.115±0.057*	1.079±0.062*	1.074±0.069*	1.077±0.058*

a) : Mean±S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05

Table 7. Organ weight of female rats treated with ammonium sulfate for 13 weeks

	Dose level (%)				
	0	0.38	0.75	1.5	3.0
Body weight (g)	150.8±7.5	157.0±9.6*	151.6±7.7	161.2±8.0*	158.1±10.4*
Absolute (g)					
Brain	1.770±0.051 ^{a)}	1.771±0.044	1.766±0.052	1.776±0.029	1.773±0.039
Lung	0.708±0.066	0.683±0.050	0.717±0.121	0.699±0.037	0.692±0.051
Heart	0.515±0.045	0.542±0.037	0.515±0.032	0.528±0.021	0.545±0.042
Spleen	0.348±0.020	0.361±0.032*	0.351±0.018	0.369±0.015*	0.370±0.027
Liver	3.043±0.215	3.366±0.254*	3.189±0.157	3.460±0.139*	3.357±0.301
Adrenal	0.040±0.005	0.039±0.005	0.040±0.004	0.039±0.004	0.039±0.004
Kidney	1.000±0.057	1.041±0.078	1.015±0.050	1.081±0.030*	1.126±0.065*
Relative (g/100g B.W.)					
Brain	1.175±0.046	1.129±0.047*	1.166±0.063	1.104±0.050*	1.125±0.066
Lung	0.469±0.054	0.435±0.034	0.476±0.095	0.435±0.030	0.438±0.031
Heart	0.341±0.017	0.346±0.022	0.340±0.020	0.328±0.019	0.345±0.020
Spleen	0.231±0.009	0.230±0.013	0.232±0.020	0.229±0.009	0.235±0.020
Liver	2.016±0.075	2.142±0.095*	2.104±0.081*	2.149±0.073*	2.237±0.096*
Adrenal	0.027±0.004	0.025±0.003	0.027±0.002	0.035±0.002*	0.025±0.002
Kidney	0.663±0.020	0.663±0.033	0.670±0.033	0.672±0.030	0.713±0.017*

a) : Mean±S.D.

* : Significantly different from the control at p<0.05

量に関連するものではなかった。雌の RBC, Hb, PCV および Plt は 1.5% 以下の投与群でも有意に減少したが、これも用量に関連するものではなかった。

その他、種々の測定項目で対照群に比し有意な変動が認められたが、これらは用量に関連しないか、あるいは変動傾向が一定でなく、偶発的な変動であった。

血清生化学的検査では雄の P が 1.5% 以上投与群で有意に減少し、GPT が 0.75% 以上の投与群で有意に増加した。Na は全ての投与群で有意に増加した (Table 4)。雌では Alb, GOT および GPT が全ての投与群で、Cl が 0.75% 以上の群で、A/G 比が 1.5% 以上の群で減少した。P が 3.0% 群で、ALP が 1.5% 以上の群でそれぞれ有意に増加した (Table 5)。

その他、いくつかの測定項目で対照群に比し有意な変動がみられたが、これらは用量に関連しないか、あるいは変動傾向が一定でなく、偶発的な変動であった。

4. 臓器重量

雄の 3.0% 投与群では、体重の増加抑制に対応して脾臓で実、相対重量共に有意な減少が認められた。腎臓では、3.0% 群で実、相対重量共に有意な増加がみられた。精巣の相対重量は投与全群で有意に増加した (Table 6)。雌では肝臓の相対重量が全ての投与群で有意に増加した。腎臓は、実、相対重量共に 3.0% 群で有意に増加した (Table 7)。

その他、いくつかの測定項目で対照群に比し有意な変動がみられたが、これらは用量に関連しないか、あるいは変動傾向が一定でなく、偶発的な変動であった。

5. 病理組織学的所見

雄の 3.0% 投与群において、雄で心臓に心筋線維化、腎臓尿管の好塩基性化および脾臓の褐色沈着が、雌で腎臓尿管の好塩基性化および脾臓の褐色沈着がみられたが、対照群と比し発現頻度において有意な変動は認められなかった。

考 察

ラット経口投与における急性毒性試験において、硫酸アンモニウムの致死量は 3000-4000mg/kg であるとの報告がある⁴⁾。また、*Salmonella* および *Saccharomyces* に対する変異原性は陰性であることが確認されている^{5) 6)}。今回行った硫酸アンモニウムの亜慢性毒性試験では、2 週間予備試験の 5.0% 群で確認された体重増加抑制が、雄の 3.0% 群においても試験期間を通じみられ、最終体重では、1.5 および 3.0% 群の雄では増加抑制、雌では増加が認められた。これは、体重の変動に雌雄同一性がなく、雄の 0.38% 群での体重増加抑制の方が高用量のそれより明らかであったことから、投与による影響でないと判断した。また、雄の 3.0% 群では下痢が持続してみられたことから、これは本物質の毒性作用と考えた。血液生化学的検査では、投与濃度に関連すると思われる変化として、雄では WBC の減少、雌では

RBC, Hb, PCV, MCV, Plt の減少と、MCH, MCHC の増加が投与群にみられたが、これらは背景データ⁷⁻¹⁰⁾ の変動の範囲内に入るものであり、かつ病理組織学的に造血器系になら異常はみられなかったことから、投与に起因する変化とはみなさなかつた。

血清生化学的検査では、投与濃度に関連すると思われる変化として、雄では P の減少、Na および GPT の増加、雌では Alb, GOT, GPT, Cl および A/G 比の減少、P, ALP の増加が投与群にみられたが、これらは背景データ⁷⁻¹⁰⁾ の変動の範囲内に入るものであり、かつ病理組織学的に造血器系になら異常はみられなかったことから、投与に起因する変化とはみなさなかつた。

1.5% Ammonium chloride を 1 週間飲水投与することにより、尿細管上皮の肥大と新生を伴う腎肥大が誘発されるという報告がある¹¹⁾。今回我々が行った試験においても、腎重量の増加が雄の 3.0% 群および雌 1.5 および 3.0% 群でみられた。しかし、病理組織学的に投与による腎障害を疑う所見はみられず、また血清生化学的検査において異常な変動はみられなかったということから、これらは毒性学的意義に乏しいものであると考えられた。

雄の精巣の相対重量が、投与群で有意に増加している。しかし、濃度依存性がみられず、絶対重量の減少もみられず、組織学的に異常所見はみられないことから、偶発的な変動と判断した。

以上の結果より、雄の 3.0% 群で下痢がみられたことから、本実験条件下における硫酸アンモニウムの無毒性量 (NOEL) は雄で 1.5% (886mg/kg/day)、雌で 3.0% (1975mg/kg/day)、最大耐量 (MTD) は雌雄共に 3.0% であると考えられた。

文 献

- 1) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄 (監修): 第六版食品添加物公定書解説書, 廣川書店, 東京, D1182-D1183 (1992)
- 2) 玉虫文一, 富山小太郎, 小谷正雄, 安藤鋭郎, 高橋秀俊, 久保亮五, 長倉三郎, 井上敏 (編集): 岩波理化学辞典第 3 版増補版, 岩波書店, 1424 (1981)
- 3) 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学的手法の検討. 武田研究所内報, 40 (3/4), 163-187
- 4) Frank, J. F.: The toxicity of sodium chlorate herbicides. *Can. J. comp. Med.* 12: 319-327 (1948)
- 5) IPCS "Environmental Health Criteria 54 Ammonia" WHO. 112 (1986)
- 6) Demerec, M., Bertani, G. and Flint, J.: A survey of chemicals for mutagenic action on *E. coli*. *Am. Nat.* 85: 119 (1951)
- 7) 池崎信一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝善, 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. 衛生試験所報告, 112, 57-63 (1994)

- 8) 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: ベクチン分解物のラットにおける13週間亜急性毒性試験. 国立衛研報, **115**, 119-124 (1997)
- 9) 高田幸一, 豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 田村啓, 高橋道人: カロブ色素の F344 ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立衛研報, **115**, 93-98 (1997)
- 10) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 今沢孝善, 広瀬雅雄: クロロフィルの F344 ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立衛研報, **116**, 107-112 (1997)
- 11) Lotspeich, W. D: Renal hypertrophy in methabolic acidosis and its reaction to ammonia excretion. *Am. J. Physiol.*, **208** (6): 1135-1142 (1965)

D-キシロースの F344 ラットにおける 13 週間亜慢性毒性試験

今沢孝喜[#]・西川秋佳・古川文夫・池田尚子・中村英明・宮内 慎・広瀬雅雄

A 13-Week Subchronic Toxicity Study of D-xylose in F344 Rats

Takayoshi Imazawa[#], Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takako Ikeda, Hideaki Nakamura, Makoto Miyauchi and Masao Hirose

A 13-week subchronic toxicity study of D-xylose was performed in male and female F344 rats at dose levels of 0 %, 0.2 %, 0.6 %, 1.7 %, and 5 % D-xylose in the CRF-1 powder diet to determine the maximum tolerable dose (MTD) for subsequent investigation of carcinogenicity. Rats were randomly allocated to 5 groups each consisting of 10 males and 10 females. Rats were randomly allocated to 5 groups each consisting of 10 males and 10 females. No treated groups showed changes in body weight gain or food intake, and all animals survived until the end of the experiment. Hematological examination revealed significant increases in RBC, Hb, and Ht in the male groups treated with 0.6 % and 5 % concentrations, whereas these values decreased significantly in all of the female groups treated with D-xylose. However, no clear dose-response effect was observed in the hematological data in either males or females given D-xylose. Serum biochemistry studies revealed decreases in AsT in the 0.2 % and 5 % D-xylose group male and 0.2 %, 1.7 %, and 5 % group female, compared to the control value. However, the changes were not considered specific because of the lack of any clear dose-response effect. In addition, no histopathological changes indicating obvious toxicity of D-xylose were observed in the livers of either sex treated with D-xylose. Based on these data, the MTD of D-xylose in F344 rats of both sexes is judged to be 5 % or more in the diet.

Keywords: D-xylose, subchronic toxicity, food additive, F344 rat

1. はじめに

D-キシロース (D-xylose) はりんご, 桃の果汁中に含まれる多糖類 (キシラン) の一要素として含まれている¹⁾. 工業的には綿実殻, バカス, ブナチップなどから抽出し, 加水分解して得られる単糖類で, 五単糖 (木糖) に属する^{2,4)}. D-キシロースは白色の結晶または結晶性の粉末で臭いはなく, 味は温和でさわやかな甘さで甘味度は砂糖の 60~70 % である. 吸湿性が少なく, 耐熱性もあるため保存性が良好で, 水には良く溶けるが, アルコール, エーテルには不溶である⁵⁾. わが国における D-キシロースの用途は食肉加工品, 水産練製品, クッキー, パンなどに天然食品添加物として食品業界で広く使用されている. また, D-キシロースは低カロリーのゆえに美容食, 糖尿病患者のダイエット食品として利用されている⁶⁻⁸⁾. D-キシロースのマ

ウスにおける経口投与での LD₅₀ 値は 23 g/kg 以上, 静脈投与で 11.3 g/kg 以上である⁹⁾. また, D-キシロースを 10~25 % の割合で基礎食に混入しラットに 380 日間与えた毒性試験では, ほとんど毒性を示さなかったが, 35 % 及び 50 % の濃度で 33 日間与えた毒性試験では両群ともに下痢及び体重増加抑制がみられ, さらに白内障を誘発するといふことが報告されている¹⁰⁾. しかし, ラットにおける発癌性については安全性評価のための十分な知見が未だ得られていない. そこで今回, がん原性試験の投与量を決定するため, 最高用量を混餌投与の上限とされる 5 % とし, 13 週間の亜慢性毒性試験を実施したので, その成績を報告する.

2. 実験材料及び方法

2. 1. 被験物質及び動物

D-キシロースは日本キシロース・キシリトール工業会 (東京) より供与されたものを用いた.

動物は 5 週齢の F344/DuCrj 系ラット (SPF) 雌雄各 50 匹を日本チャールス・リバー社 (神奈川) より購入し, 基

[#] To whom correspondence should be addressed: Takayoshi Imazawa; Division of Pathology, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9819; Fax: 03-3700-1425; e-mail: imazawa@nihs.go.jp

礎飼料 (CRF-1 固型飼料, オリエンタル酵母工業株式会社; 東京) と水道水で1週間馴化飼育した後, 無作為に雌雄各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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$, 換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ), 12 時間蛍光灯照明, 12 時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージ (幅 26 cm, 長さ 42 cm, 高さ 17 cm) に5匹ずつ収容し, 床敷は三協ラボサービス社 (東京) のソフトチップを用い, 週2回交換を行った。飲料水として, 水道水を試験期間中自由に摂取させた。

2. 2. 試験方法

予備試験の結果に基づき最高用量を5%とし, 公比3で除して1.7%, 0.6%, 0.2%の用量を設定し, 被験物質を粉末CRF-1飼料に混合し, 13週間自由に摂取させた。対照群として雌雄各1群にはD-キシロースを含まない粉末CRF-1基礎飼料を同期間自由に摂取させた。試験期間中, 全動物の一般状態を連日観察し, 体重及び摂餌量の測定を週1回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた後, エーテル麻酔下に開腹, 腹部大動脈より採血し, 瀉血後剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し, 脳, 肺, 心臓, 脾臓, 肝臓, 副腎, 腎臓, 精巣については重量測定の後, また鼻腔を含む頭蓋, 下垂体, 舌, 胸腺, 唾液腺, 気管, 甲状腺, 食道, 胃, 小腸, 大腸, 膵臓, 膀胱, 前立腺, 精嚢腺, 子宮, 陰, 乳腺, リンパ節, 胸骨, 大腿骨, 脊髄, 眼球, 皮膚及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。その後, 各臓器及び

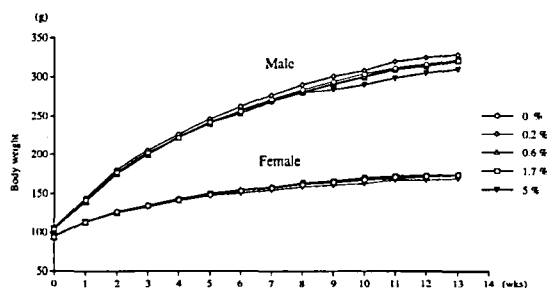


Fig.1. Growth curves of F344 rats treated with D-xylose for 13 weeks

Table 1. Food consumption and intake of D-xylose

Group	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/rat)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
0 %	14.0	9.3	—	—	—	—
0.2 %	14.3	9.3	0.03	0.02	2.6	1.6
0.6 %	14.4	9.3	0.09	0.06	7.8	5.1
1.7 %	14.4	9.4	0.25	0.16	22.3	14.5
5 %	14.9	9.4	0.75	0.47	67.9	42.9

組織を切り出し, 通常の方法によりパラフィン包埋後, 薄切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施して, 病理組織学的に検索を行った。採取した血液については, 多項目自動血球計数装置 M-2000 型 (シスメックス社, 兵庫) 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), 平均血色素量 (MCH), 平均血色素濃度 (MCHC), 血小板数 (PLT) の測定を行った。血清生化学的検査は分離した血清を凍結後, 総蛋白 (TP), アルブミン・グロブリン比 (A/G), アルブミン (ALB), 総ビリルビン (T. Bil), 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 (P), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AsT), アラントランスアミナーゼ (AIT), アルカリホスファターゼ (ALP) 及び γ -グルタミルトランスアミナーゼ (γ -GTP) について SRL 社 (東京) に依頼し測定した。

2. 3. 統計学的処理方法

血液学的・血清生化学的検査結果及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¹⁾。

3. 結 果

3. 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。

3. 2. 体 重

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 1 に示した。雌雄ともに被験物質投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。

3. 3. 摂餌量及び被験物質摂取量

雌雄各群の摂餌量及び被験物質摂取量を Table 1 に示した。雌雄とも投与期間を通じて対照群とほぼ同様な傾向を示した。1日当たりの平均摂餌量は雄において対照群で 14 g, 投与群で 14.3~14.9 g, 雌の対照群で 9.3 g, 投与群で 9.3~9.4 g であり, 摂餌量は雌雄とも対照群と比較して被験物質投与群はやや多い傾向がみられた。

D-キシロースの13週間の総摂取量は雄では0.2%投与群で2.6g, 0.6%投与群で7.8g, 1.7%投与群で22.3g, 5%投与群で67.9g, 雌ではそれぞれ1.6g, 5.1g, 14.5g, 42.9gであり, 雌雄ともに投与濃度に依存していた。

Table 2. Hematological and serum biochemical data of F344 male rats treated with D-xylose for 13 weeks

Dose level	0 %	0.2 %	0.6 %	1.7 %	5 %
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	41±4 ^{a)}	42±5	42±5	42±5	43±4
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	843±20	872±31	898±34**	873±41	894±15**
Hb (g/dl)	14.1±0.3	14.4±0.4	14.8±0.5**	14.5±0.6	14.8±0.3**
Ht (%)	40.9±1.1	42.1±1.5	43.2±1.4**	42.5±2.0	43.1±0.7**
MCV (fl)	48.6±0.4	48.3±0.3	48.2±0.4	48.7±0.4	48.2±0.4
MCH (pg)	16.7±0.2	16.5±0.2	16.5±0.2	16.6±0.2	16.5±0.1
MCHC (g/dl)	34.4±0.4	34.2±0.3	34.2±0.4	34.1±0.4	34.3±0.4
PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	76.8±2.6	77.2±3.3	78.7±3.8	78.2±4.8	79.4±3.1
TP (g/dl)	6.2±0.1	6.2±0.2	6.2±0.1	6.2±0.1	6.2±0.1
A/G	2.4±0.1	2.5±0.2	2.6±0.1	2.6±0.2	2.6±0.1
ALB (g/dl)	4.4±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1
T. Bil (mg/dl)	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0
T. Cho (mg/dl)	70±10	65±3*	69±3	66±4	64±5**
BUN (mg/dl)	18.1±1.0	18.0±1.8	18.0±1.1	18.5±1.4	18.6±1.0
CRN (mg/dl)	0.3±0.1	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
Ca (mg/dl)	10.1±0.2	10.4±0.3*	10.2±0.2	10.3±0.2	10.3±0.3
P (mg/dl)	5.7±0.4	6.1±0.4	6.2±0.4	6.4±0.2*	6.5±0.2*
Na (mEq/l)	145±1	145±1	144±1	144±1	145±1
Cl (mEq/l)	104±2	106±2	105±1	105±1	106±1
K (mEq/l)	4.4±0.2	4.3±0.3	4.5±0.1	4.5±0.2	4.3±0.2
AsT (IU/l)	75±6	65±5*	79±8	71±8	61±10**
AIT (IU/l)	46±4	50±3	51±6	50±2*	48±5
ALP (IU/l)	350±16	360±24	349±25	363±30	350±23
γ -GTP (IU/l)	<2	<2	<2	<2	<2

a): Mean \pm S.D.

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

Table 3. Hematological and serum biochemical data of F344 female rats treated with D-xylose for 13 weeks

Dose level	0 %	0.2 %	0.6 %	1.7 %	5 %
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	35±6 ^{a)}	33±5	33±4	36±8	38±6
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	869±33	824±32**	803±42**	810±18**	827±22*
Hb (g/dl)	15.4±0.5	14.7±0.6*	14.5±0.8**	14.5±0.3**	14.8±0.4*
Ht (%)	44.0±1.7	42.0±1.4*	41.3±2.2**	41.3±0.8**	42.1±1.1*
MCV (fl)	50.7±0.3	51.0±0.5	51.5±0.2	51.0±0.3	50.9±0.3
MCH (pg)	17.8±0.2	17.9±0.2	18.0±0.2	17.8±0.1	17.9±0.2
MCHC (g/dl)	35.0±0.3	35.1±0.5	35.1±0.5	35.0±0.3	35.2±0.4
PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	80.9±4.5	78.4±4.3	78.2±7.5	76.4±3.7	78.0±4.0
TP (g/dl)	6.3±0.2	6.2±0.1	6.1±0.2	6.0±0.1*	6.0±0*
A/G	3.0±0.2	3.0±0.2	3.0±0.2	3.1±0.3	3.1±0.2
ALB (g/dl)	4.7±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1	4.5±0.1**	4.5±0.1**
T. Bil (mg/dl)	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0
T. Cho (mg/dl)	83±7	86±5	84±6	83±7	80±4
BUN (mg/dl)	17.8±3.5	19.0±1.9	18.8±3.0	17.5±2.2	17.9±2.0
CRN (mg/dl)	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
Ca (mg/dl)	10.2±0.3	10.2±0.1	10.0±0.3	9.8±0.2*	10.0±0.1
P (mg/dl)	6.0±0.7	5.6±0.2	5.9±0.4	5.9±0.4	5.6±0.5
Na (mEq/l)	146±2	145±1	146±1	144±1	144±1
Cl (mEq/l)	107±2	107±1	107±2	106±1	106±1
K (mEq/l)	4.0±0.5	4.0±0.2	4.4±0.2*	4.2±0.1	4.2±0.2
AsT (IU/l)	75±5	66±4**	74±4	70±3*	62±4**
AIT (IU/l)	41±5	40±3	40±3	39±5	38±5
ALP (IU/l)	288±28	282±17	278±27	258±21*	267±13
γ -GTP (IU/l)	<2	<2	<2	<2	<2

a): Mean \pm S.D.

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

3. 4. 血液学的及び血清生化学的検査結果

血液学的及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、雄では赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の上昇が 0.6% 及び 5.0% 投与群で、総コレステロールの減少が 0.2% 及び 5% 投与群で、カルシウムの上昇が 0.2% 投与群で、無機リンの上昇が 1.7% 及び 5% 投与群で、アスパラギン酸トランスアミナーゼの減少が 0.2% 及び 5% 投与群で有意に認められた。しかし、いずれも投与用量に相関しない変化が軽度の変化で毒性学的意義の乏しい変化であった。一方、雌では赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の減少が投与群全群で、総蛋白及びアルブミン値の減少が 1.7% 及び 5% 投与群で、カルシウムの減少が 1.7% 投与群でカリウムの上昇が 0.6% 投与群で、アスパラギン酸トランスアミナーゼの減少が 0.2%, 1.7% 及び 5% 投与群で、アルカリフォスファターゼの減少が 1.7% 投与群で有意に認められた。

3. 5. 臓器重量

相対重量の結果を Table 4 に示した。雄では 5% 投与群の肝及び精巣(右, 左)で有意な増加が認められた。雌では肝及び腎(左)の増加が 0.2% 投与群で、腎(右, 左)の増加が 0.6% 及び 5% 投与群で有意に認められた。その他の臓器の重量については雌雄とも対照群との間に有意な

Table 4. Final body and relative organ weight of F344 male and female rats treated with D-xylose for 13 weeks

Dose level	0 %	0.2 %	0.6 %	1.7 %	5 %
[Male]					
Body Weight (g)	312.3±10.3 ^{a)}	315.6±53.7	306.6±6.4	309.8±10.4	302.8±12.9
Brain	0.62±0.01	0.59±0.10	0.62±0.001	0.62±0.02	0.62±0.03
Lung (R)	0.22±0.00	0.20±0.02	0.20±0.01	0.20±0.02	0.21±0.03
Lung (L)	0.12±0.00	0.11±0.01	0.11±0.00	0.11±0.01	0.11±0.01
Heart	0.29±0.02	0.32±0.06	0.29±0.03	0.28±0.02	0.29±0.03
Spleen	0.21±0.01	0.21±0.01	0.21±0.001	0.20±0.01	0.21±0.01
Liver	2.37±0.02	2.35±0.09	2.38±0.02	2.50±0.15	2.52±0.03**
Adrenal (R)	0.005±0.001	0.005±0	0.005±0	0.005±0	0.005±0
Adrenal (L)	0.005±0.003	0.005±0.001	0.007±0.002	0.006±0	0.003±0.002
Kidney (R)	0.30±0.02	0.29±0.01	0.30±0.02	0.30±0.02	0.30±0.03
Kidney (L)	0.30±0.02	0.29±0.01	0.30±0.01	0.30±0.01	0.31±0.02
Testis (R)	0.48±0.004	0.47±0.05	0.49±0.01	0.47±0.01	0.53±0.04**
Testis (L)	0.51±0.04	0.49±0.03	0.50±0.02	0.47±0.04	0.52±0.05*
[Female]					
Body Weight (g)	167.5±9.7	165.2±12.5	161.7±1.34	167.3±13.9	162.3±2.4
Brain	1.07±0.04	1.01±0.17	1.11±0.02	1.06±0.09	1.09±0.04
Lung (R)	0.26±0.01	0.26±0.00	0.27±0.01	0.26±0.02	0.26±0.00
Lung (L)	0.14±0.00	0.14±0.01	0.14±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01
Heart	0.31±0.01	0.30±0.01	0.32±0.00	0.32±0.03	0.36±0.02
Spleen	0.23±0.02	0.28±0.05	0.23±0.01	0.24±0.01	0.23±0.02
Liver	2.13±0.19	2.27±0.05*	2.19±0.04	2.20±0.06	2.20±0.13
Adrenal (R)	0.011±0.001	0.010±0.002	0.012±0	0.012±0	0.014±0.004
Adrenal (L)	0.012±0.002	0.012±0	0.013±0	0.012±0	0.014±0
Kidney (R)	0.31±0.00	0.32±0.01	0.33±0.02**	0.31±0.00	0.32±0.03*
Kidney (L)	0.32±0.02	0.32±0**	0.34±0.01**	0.32±0.02	0.36±0.02**

a): Mean \pm S.D.

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

差はみられなかった。

3. 6. 病理組織学的検索結果

病理組織学的検索の結果、雌雄とも対照群をおよび5%投与群に軽度ではあるが肝細胞に小葉中心性の空胞変性及び肝の髄外造血がみられた。また、雄の腎臓に好塩基性尿細管の出現、心臓の小肉芽腫が認められた。雌では腎臓に鉍質沈着、膵腺房細胞に限局性の萎縮がみられたが、群間に差は認められなかった。雌雄ともにD-キシロースの投与に依存すると思われる病変は認められなかった。

4. 考 察

今回、F344 ラットを用いてD-キシロースの粉末混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施した。その結果、雌雄各群ともに動物は順調に成育し、試験期間を通じ、皮膚、体毛などに異常は認められず、平均体重にも差はなく外見上被験物質の影響を受けていないことを示しているものと考えられた。

血液学的に、赤血球、ヘモグロビン及びヘマトクリット値の有意な上昇が雄の0.6%及び5%投与群でみられ、逆に雌の投与全群にこれらの有意な減少がみられたが、正常値範囲内であり¹²⁾、用量相関性もなく、病理組織学的にも造血系などに異常を示唆する組織所見もみ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。

血清生化学的にアスパラギン酸トランスアミナーゼ及び総コレステロールの減少が雄の0.2%及び5%投与群で有意に認められ、雌ではアスパラギン酸トランスアミナーゼ、総蛋白、アルブミン及びアルカリフォスファターゼ値の減少が0.2%、1.7%及び5%投与群で有意に認められたが、本試験でのこれらの血清生化学的データの変動は明らかな用量相関性のみられない、あるいは軽度な変動であり、さらに肝臓を含めた諸臓器に組織障害性変化はみられなかった。したがって、これら検査項目における変動はいずれも、毒性学的意義に乏しいものと考えられた。

雄の肝、精巣及び雄の肝、腎における相対重量の変動が認められたが比較的軽度であり、他の関連するパラメータにも著しい変化が認められなかったことから、毒性学的意義は乏しい変化と考えられた。

病理組織学的に雌雄とも対照群を含め、軽度ではあるが肝細胞小葉中心性に空胞変性及び髄外造血がみられた。また、雄の腎臓に好塩基性尿細管の出現、心臓に小肉芽腫が認められた。雌では腎臓に鉍質沈着、膵腺房細胞に限局性の萎縮がみられたが、D-キシロースの投与用量との間に明らかな相関性が認められなかったこと、またF344ラットでの自然発生が知られている病変であることから、偶発的な病変であると考えられた¹³⁾。

以上、いずれの投与群においても体重増加抑制及び中途死亡例が無く、組織学的に明らかな毒性所見も認められな

かったことから、ラットでの混餌投与によるD-キシロースの最大耐量は雌雄ともに5%以上であると判断した。

文 献

- 1) Hardinge, M. G., Swarner, J. B. and Crooks, H.: Carbohydrates in foods. *J. Am. Diet Ass.*, 46, 197-204 (1965)
- 2) Burkitt, D. P.: "Refined carbohydrates foods and disease", ed. by Trowell, H. C., Academic Press, New York, pp. 35 (1975)
- 3) Preece, I. A. MacDougall, M.: Enzymic degradation of cereal hemicelluloses. II. Pattern of pentosan degradation. *J. Inst. Brew.*, 64, 489-499 (1958)
- 4) Preece, I. A. MacDougall, M., Darby, O. C. and Steven, R. I.: Non-starchy polysaccharides of cereal grains. IX. Further studies on autolysis. *J. Inst. Brew.* 64, 501-510 (1958)
- 5) Galligani, L., Hopwood, J., Schwartz, N. B. and Dorfman, A.: Stimulation of synthesis of free chondroitin sulfate chains by β -D-xylosides in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 250, 5400-5406 (1975)
- 6) Miller, M. M. and Lewis, H. B.: Pentose metabolism I and II. Pentose I: the rate of absorption of D-xylose and the formation of glycogen in the organism of the white rat after oral administration of D-xylose. *J. Biol. Chem.* 98, 133-140 (1932)
- 7) Miller, M. M. and Lewis, H. B.: Pentose II: the pentose content of the tissues of the white rat after the oral administration of D-xylose. *J. Biol. Chem.* 98, 141-150 (1932)
- 8) Loos, M.: Studies in the utilization of pentoses in diabetes. *Acta Med. Scand.* 148, 425-431 (1954)
- 9) 梅津綱吉: 家庭用化学薬品の知識 (20), 薬局, 32, 67-72 (1981)
- 10) Chung, M., Chien, C. Huang, P. and Tung T.: Effects of prolonged feeding of D-Xylose on rats. *J. Formosan Med. Assoc.* 72, 467-471 (1973)
- 11) 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)
- 12) 石井 暢, 吐山豊秋, 坂口 孝 (監訳): "実験動物とヒトの血液・臨床生化学検査値集", eds. by Mitruka, B. M. and Rawnsley, H. M., 清至書院出版社, 東京, pp. 39-134 (1981)
- 13) 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)

納豆菌ガムの F344 ラットを用いた 90 日間亜慢性毒性試験

中村英明・今沢孝喜*・西川秋佳・古川文夫・池田尚子・宮内 慎・広瀬雅雄

A 90-day Subchronic Oral Toxicity Study of *Bacillus subtilis* Gum in F344 Rats

Hideaki Nakamura, Takayoshi Imazawa*, Akiyoshi Nishikawa, Fumio Furukawa, Takako Ikeda, Makoto Miyauchi and Masao Hirose

A 90-day subchronic toxicity study of *Bacillus subtilis* gum was performed in both sexes of F344 rats by feeding of CRF-1 pellet diet containing 0%, 0.18%, 0.55%, 1.66% and 5%. Rats were randomly allocated to 5 groups, each consisting of 10 males and females.

No animals died during the administration period and no differences in body weights and food intakes were found among groups of either sex. Kidney weight was significantly increased in both sexes in the groups given concentrations of 1.66% or more. However, the increases of kidney weight were slight in themselves and other data on serum biochemistry and histopathology did not show any apparent toxicological signs including renal toxicity.

These findings indicate that the treatment of *Bacillus subtilis* gum in the diet for 90 days does not exert serious toxicity in rats even at the highest dose.

Keywords: *Bacillus subtilis* gum, F344 rat, subchronic toxicity, food additive

はじめに

納豆菌ガムは納豆菌 (*Bacillus subtilis*) の培養液から精製される, ポリグルタミン酸を主成分とする食品添加物である。主に増粘安定剤, 製造用材に使用されており, 加工食品に添加することにより, 増粘安定, 品質改良, 保水, 栄養補助などの効果を有する。性状は白色若しくは淡黄色の粉末で, 臭いは無いか又はわずかに特異な臭いがある。この物質は既知の食品添加物ではあるが, これまでに毒性評価に関する報告はない。そのため, 今回, 安全性評価の一環としてラットを用いた 90 日間の亜慢性毒性試験を実施した。

実験材料及び方法

1. 動物並びに飼育条件

5 週齢の F344 ラット (F344/DuCrj) 雌雄各 50 匹を日本チャールス・リバー (株) より購入し, 約 1 週間の馴化飼育の後, 雌雄とも各群 10 匹ずつ 5 群に配した。動物の飼育

はバリエーションシステムの動物室にて行い, 室内の環境条件は温度 24 ± 1 °C, 湿度 55 ± 5 %, 換気回数 18 回/時間, 12 時間蛍光灯照明, 12 時間消灯の条件下で行った。動物は, ポリカーボネート製箱形ケージに 5 匹ずつ収容し, 床敷は三協ラボサービス (株) のソフトチップを用い, 週 2 回交換した。また, 飲料水として水道水を自由に摂取させた。

2. 被験物質並びに投与量

納豆菌ガムは味の素 (株) から提供された原体を, オリエンタル酵母 (株) において基礎飼料 CRF-1 に規定量混じてペレットとしたものを検体として使用した。検体は最高用量を 5 % とし, 以下公比 3 で用量を 1.66, 0.55, 0.18 % に設定した。それぞれの濃度のペレットを 90 日間自由に摂取させ, 対照群には CRF-1 固形飼料のみを同様に摂取させた。

3. 観察並びに検索方法

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

血液学的検査は, 自動血球計数装置 (Sysmex M-2000, シスメックス社) を用いて, 白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 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) 及び血小板数 (PLT) につい

* To whom correspondence should be addressed: Takayoshi Imazawa; Division of Pathology, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9819; Fax: 03-3700-1425; E-mail: imazawa@nihs.go.jp

て測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を、総蛋白 (TP) A/G 比, アルブミン (AIB), ブドウ糖 (Glu), 総コレステロール (T.Cho), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRN), カルシウム (Ca), 無機リン (P), ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl), コリンエステラーゼ (ChE), γ -グルタミルトランスアミナーゼ (γ -GT), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AsT), アラントランスアミナーゼ (AIT), 乳酸脱水素酵素 (LDH) 及びアルカリフォスファターゼ (ALP) について (株) SRL 社 (東京) に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、副腎、腎臓及び精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髓、唾液腺、胸腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣及び陰を 10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。病理組織学的検索は、雌雄の各 5 % 群と対照群のみ実施した。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

4. 統計学的処理法¹⁾

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の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 Dunnett の方法で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。

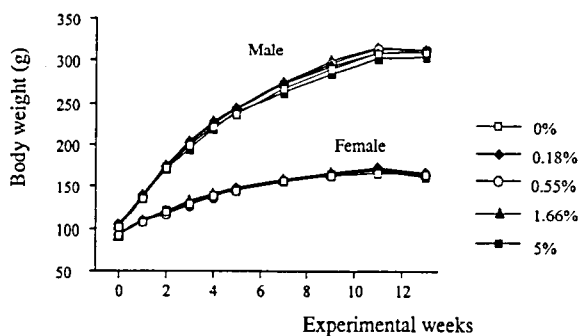


Fig.1. Body weight curves for rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Table 1. Food consumption and intake of *Bacillus subtilis* gum

Dose level (%)	Food consumption (g/animal/day)		Daily intake (mg/kg/day)		Total intake (g/kg)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
5	13.4	8.5	2616.4	2727.6	238.1	248.2
1.66	13.7	8.7	875.9	931.7	79.7	84.8
0.55	13.5	8.5	288.0	302.8	26.2	27.6
0.18	13.9	8.7	97.6	102.3	8.9	9.3
0	14.0	8.9	-	-	-	-

結 果

1. 一般状態及び死亡動物

投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。

2. 体重及び摂餌量

投与期間中の各群の体重推移を Fig. 1 に示した。雌雄と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。

摂餌量を Table 1 に示した。雌雄とも投与期間を通じて対照群とほぼ同様な推移を示した。

被験物質摂取量は用量公比にほぼ相関した値を示し、雌雄間に大きな差はなかった。

3. 血液学的及び血清生化学的検査

血液学的及び血清生化学的検査の結果を Table 2 及び 3 に示した。

血液学的検査では、雄で RBC の有意な増加が 0.55 % 群に、MCHC の有意な減少が 1.66 % 群で認められたが、用量相関性は認められなかった。雌では MCV の有意な減少及び MCHC の有意な増加が 5 % 群で認められた。

Table 2. Hematological and serum biochemical data for F344 male rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Item	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
WBC($10^3/\mu$ l)	51 \pm 7 ^a	45 \pm 7	45 \pm 5	42 \pm 4	45 \pm 4
RBC($10^6/\mu$ l)	932 \pm 31	946 \pm 27	956 \pm 28*	936 \pm 25	923 \pm 25
Hb(g/dl)	15.4 \pm 0.5	15.5 \pm 0.5	15.8 \pm 0.3	15.5 \pm 0.4	15.4 \pm 0.3
Ht(%)	44.6 \pm 1.6	44.7 \pm 1.6	45.1 \pm 1.2	44.3 \pm 1.2	44.0 \pm 1.2
MCV(fL)	47.9 \pm 0.4	47.2 \pm 0.7	47.2 \pm 0.3	47.3 \pm 0.5	47.6 \pm 0.3
MCH(pg)	16.6 \pm 0.2	16.4 \pm 0.3	16.5 \pm 0.2	16.5 \pm 0.2	16.7 \pm 0.2
MCHC(g/dl)	34.6 \pm 0.4	34.7 \pm 0.9*	35.0 \pm 0.4	34.9 \pm 0.4	35.0 \pm 0.4
PLT($10^{11}/\mu$ l)	79.2 \pm 3.6	77.6 \pm 4.1	78.6 \pm 3.1	77.0 \pm 2.2	78.7 \pm 3.3
TP(g/dl)	6.8 \pm 0.2*	6.7 \pm 0.1	6.7 \pm 0.2	6.7 \pm 0.2	6.6 \pm 0.4
A/G	2.0 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.2
AIB(g/dl)	4.6 \pm 0.1	4.6 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.1	4.5 \pm 0.3
Glu(mg/dl)	129 \pm 5	133 \pm 14	131 \pm 6	129 \pm 8	135 \pm 10
T.Cho(mg/dl)	70 \pm 4	78 \pm 9	72 \pm 2	73 \pm 6	71 \pm 8
BUN(mg/dl)	25.6 \pm 1.4**	23.4 \pm 2.1	22.3 \pm 0.8	21.3 \pm 1.2**	23.4 \pm 1.6
CRN(mg/dl)	0.3 \pm 0.0*	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
Ca(mg/dl)	10.3 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2	10.4 \pm 0.2	10.4 \pm 0.1	10.3 \pm 0.4
P(mg/dl)	6.1 \pm 0.3**	5.9 \pm 0.3	5.7 \pm 0.2	5.6 \pm 0.3	5.6 \pm 0.4
Na(mEQ/l)	145 \pm 1**	145 \pm 1**	145 \pm 1**	143 \pm 1	143 \pm 1
K(mEQ/l)	4.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.3	3.8 \pm 0.1	4.1 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2
Cl(mEQ/l)	103 \pm 1	104 \pm 1**	104 \pm 1**	103 \pm 1	103 \pm 1
AsT(IU/l)	72 \pm 8	75 \pm 12	71 \pm 10	75 \pm 6	66 \pm 5
AIT(IU/l)	52 \pm 8	53 \pm 5	52 \pm 4	52 \pm 5	48 \pm 3
LDH(IU/l)	338 \pm 154	386 \pm 342	115 \pm 57	358 \pm 317	203 \pm 93
ALP(IU/l)	344 \pm 24	336 \pm 36*	342 \pm 29	371 \pm 21	371 \pm 29

a): Mean \pm S.D.

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

Table 3. Hematological and serum biochemical data for F344 female rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

Item	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
WBC($10^3/\mu\text{l}$)	36±6 ^a	37±8	43±13	38±5	34±7
RBC($10^4/\mu\text{l}$)	897±22	896±21	881±23	887±34	871±28
Hb(g/dl)	16.0±0.4	16.0±0.4	15.8±0.4	15.9±0.6	15.6±0.5
Ht(%)	44.6±1.2	45.0±0.9	44.4±1.2	44.8±1.8	43.9±1.5
MCV(FL)	49.8±0.2**	50.2±0.4	50.5±0.3	50.5±0.3	50.4±0.4
MCH(pg)	17.8±0.1	17.8±0.1	17.9±0.1	17.9±0.1	17.9±0.2
MCHC(g/dl)	35.8±0.3*	35.5±0.3	35.5±0.2	35.4±0.2	35.4±0.4
PLT($10^3/\mu\text{l}$)	82.9±4.8	81.7±5.1	84.3±4.9	82.9±3.5	83.7±6.6
TP(g/dl)	6.5±0.2	6.8±0.3	6.7±0.1	6.6±0.2	6.7±0.3
A/G	2.5±0.2	2.6±0.2	2.6±0.2	2.8±0.3	2.7±0.1
AIB(g/dl)	4.7±0.1**	4.9±0.2	4.8±0.2	4.8±0.2	4.9±0.2
Glu(mg/dl)	116±7	122±6*	119±12	111±8	111±10
T.Cho(mg/dl)	96±7	102±9	93±8	97±9	95±9
BUN(mg/dl)	22.9±1.5	18.3±1.0	19.7±2.7	20.9±3.0	20.7±3.2
CRN(mg/dl)	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0
Ca(mg/dl)	10.3±0.2	10.6±0.2	10.5±0.2	10.3±0.3	10.5±0.2
P(mg/dl)	5.4±0.3	5.3±0.5	5.5±0.5	5.9±0.4*	5.3±0.5
Na(mEQ/l)	145±1	146±1	145±1	144±1	145±1
K(mEQ/l)	3.8±0.1	3.8±0.2	3.8±0.2	3.9±0.2	3.9±0.3
Cl(mEQ/l)	107±2	106±1	107±1	106±2	105±2
ChE(IU/l)	7.2±0.6*	7.7±0.9	8.1±1.3	8.6±0.7	8.2±0.6
AsT(IU/l)	66±4	65±5*	72±10	78±3	74±11
AlT(IU/l)	39±4	36±4	38±5	38±5	36±4
LDH(IU/l)	107±56*	116±61	186±162	631±109**	313±329
ALP(IU/l)	211±28**	233±30	247±31	248±20	256±16

a) : Mean±S.D.

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

血清生化学的検査では、雄で Na の有意な増加が 0.55 % 以上の群で、Cl の有意な増加が 0.55 及び 1.66 % の群で、また P の有意な増加及び増加傾向が 0.18 % 以上の群で認められた。雌では ALP の有意な減少及び減少傾向が投与群で認められた。このほかに TP, AIB, BUN などいくつかの項目で有意差が散見されたが、用量相関性は認められなかった。なお、雄の ChE 及び γ -GT, 雌の γ -GT は全ての群で測定値が検出限界以下であった。

4. 臓器重量

相対重量の結果を Table 4 に示した。腎(右)重量の増加が 5 % 群の雌雄に、腎(左)重量の増加が 1.66 % 以上の群の雌雄に認められた。また、脾臓重量の増加が雄の 5 % 群に、肝重量及び副腎(左)重量の増加が雌の 5 % 群に認められた。そのほかの臓器では、雌雄とも対照群との間に有意差は認められなかった。

5. 病理組織学的検索

病理組織学的検索の結果、対照群及び 5 % 群共に雄では肝臓の小肉芽腫、腎臓の好塩基性尿細管の出現及び鉍質沈着、雌では肝臓の小肉芽腫が散見されたが群間に差は認められなかった。

Table 4. Final body weights and relative organ weights of rats treated with *Bacillus subtilis* gum for 90 days

♂	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
Body Weight(g)	303.0±15.2 ^a	312.6±14.6	311.9±11.2	312.2±14.4	308.9±14.0
Brain(g%)	0.64±0.04	0.63±0.03	0.62±0.02	0.63±0.03	0.62±0.03
Heart(g%)	0.30±0.02	0.29±0.02	0.29±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01
Lung(R)(g%)	0.21±0.02	0.21±0.01	0.21±0.01	0.22±0.03	0.26±0.18
(L)(g%)	0.11±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.12±0.03	0.13±0.07
Liver(g%)	2.35±0.15	2.37±0.07	2.33±0.04	2.28±0.05	2.28±0.08
Spleen(g%)	0.21±0.01*	0.20±0.00	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.01
Adrenal(R)(mg%)	5.3±0.6	5.1±0.4	5.5±0.7	5.2±0.7	5.0±0.5
(L)(mg%)	5.6±0.4	5.7±0.5	6.1±1.0	6.0±1.1	6.1±0.9
Kidney(R)(g%)	0.32±0.02**	0.30±0.01	0.29±0.01	0.30±0.01	0.28±0.01
(L)(g%)	0.33±0.02**	0.31±0.02**	0.31±0.02	0.31±0.02	0.29±0.01
Testis(R)(g%)	0.49±0.03	0.49±0.03	0.49±0.02	0.48±0.02	0.48±0.02
(L)(g%)	0.50±0.03	0.50±0.03	0.49±0.02	0.49±0.02	0.49±0.02

♀	Dose level (%)				
	5	1.66	0.55	0.18	0
Body Weight(g)	161.3±5.1	165.7±9.6	163.8±8.5	164.9±8.1	164.5±5.6
Brain(g%)	1.07±0.05	1.06±0.07	1.06±0.06	1.05±0.06	1.06±0.05
Heart(g%)	0.34±0.02	0.33±0.01	0.32±0.02	0.32±0.01	0.32±0.01
Lung(R)(g%)	0.34±0.20	0.28±0.02	0.27±0.02	0.27±0.02	0.27±0.01
(L)(g%)	0.15±0.01	0.15±0.01	0.14±0.01	0.15±0.03	0.14±0.01
Liver(g%)	2.26±0.07*	2.23±0.09	2.17±0.10	2.16±0.07	2.15±0.09
Spleen(g%)	0.24±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01	0.23±0.02
Kidney(R)(g%)	0.33±0.02*	0.32±0.02	0.29±0.02	0.30±0.01	0.31±0.02
(L)(g%)	0.34±0.01**	0.32±0.02*	0.31±0.02	0.31±0.01	0.30±0.02
Adrenal(R)(mg%)	11.5±0.8	11.7±1.0	10.3±1.4	10.7±1.5	10.8±1.3
(L)(mg%)	13.0±1.8*	12.7±1.4	12.3±1.6	12.0±1.2	11.2±1.2

a) : Mean±S.D.

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

考 察

今回、F344 ラットを用いて納豆菌ガムの混餌投与による 90 日間亜慢性毒性試験を実施した。その結果、一般状態に変化は認められず、死亡動物もなかった。体重及び摂餌量にも有意な差は認められず、被験物質の摂取量も用量に相関して変化した。

血液学的検査では、雄の 0.55 % 群で RBC の増加が、1.66 % 群で MCHC の減少が認められたが、変化は用量に相関せず、変動幅も小さかった。雌では 5 % 群で MCV の減少及び MCHC の増加が認められた。これらの変化は統計学的に有意差はあるものの、関連して変動すると考えられるその他の血液学的検査値にも変化が認められなかったことから毒性学的意義は低いと考えられた。

血清生化学的検査では、雄の 0.55 % 以上の群で Na の増加、0.55 % 及び 1.66 % の群で Cl の増加、投与群で P の増加および増加傾向が認められた。しかし、過去に当部で実施した亜慢性毒性試験の対照群のデータと比較しても、大きな差はなく毒性学的意義は低いと考えられた^{2), 3), 4)} 雌では ALP の有意な減少及び減少傾向が投与群で認められたが、

増加ではなく減少であることから毒性学的意義は低いと考えられた。このほかにTP, AIB, BUNなどいくつかの項目で有意差が散見されたが、用量相関性は認められず変動幅も小さなものであった。

臓器重量測定では、腎重量の増加が1.66%以上の群の雌雄にみられたが、関連する血清生化学的変化や病理組織学的な変化は認められず、重篤な変化ではないと考えられた。脾臓重量の増加が雄の5%群に、肝重量及び副腎重量の増加が雌の5%群に認められた。しかし、変動幅が小さく、関連する血清生化学的変化や病理組織学的な変化もみられなかったことから毒性学的な意義は低いと考えられた。

病理組織学的検索の結果、対照群及び5%群ともに雄では肝臓の小肉芽腫、腎臓の好塩基性尿細管の出現及び鉍質沈着、雌では肝臓の小肉芽腫が散見された。これらの変化はF344ラットでの自然発生が知られており、群間にも差は認められなかったことから偶発的な病変であると考えられた⁵⁾。

以上の結果、納豆菌ガムを混餌で90日間雌雄のラットに投与したところ、被験物質に起因すると思われる重篤な変

化は認められず、最高用量の5%でも病理組織学的な毒性変化はみられなかったため、無毒性量は5%と考えられた。また無影響量は腎臓の相対重量の変化から0.55%と考えられた。

文 献

- 1) 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)
- 2) 高田幸一, 豊田和弘, 正田俊之, 畝山智香子, 田村 啓, 高橋道人: カロブ色素のF344を用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 115, 93-98 (1997)
- 3) 小野寺博志, 三森国敏, 安原加壽雄, 竹川 潔, 高橋道人: ファフィア色素のF344を用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 115, 99-106 (1997)
- 4) 古川文夫, 笠原健一郎, 西川秋佳, 今沢孝喜, 広瀬雅雄: クロロフィルのF344を用いた13週間亜慢性毒性試験. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 116, 107-112 (1998)
- 5) Boorman, G.A., Eutis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., Jr. And Mackenzie, W.F. (eds) "Pathology of the Fischer Rat, References and Atlas" Academic Press, San Diego (1990)

オレンジ色素の F344 ラットを用いた 13 週間亜慢性毒性試験

宮内 慎・古川文夫*・西川秋佳・中村英明・今沢孝喜・広瀬雅雄

A 13-week Subchronic Oral Toxicity Study of Orange Color in F344 Rats

Makoto Miyauchi, Fumio Furukawa*, Akiyoshi Nishikawa, Hideaki Nakamura, Takayoshi Imazawa and Masao Hirose

A 13-week subchronic toxicity study of orange color was performed in both sexes of F344 rats by feeding them a CRF-1 powder diet containing 0%, 0.18%, 0.55%, 1.66%, and 5% concentrations of the substance. No animals died during the administration period, and no changes in body weight or food intake were found in any of the dosage groups. There were significant increases in serum cholesterol in males given 1.66% or higher concentrations of orange color and in females given 0.55% or higher concentrations, and significant increases in alkaline phosphatase in males given 1.66% or higher concentrations, possibly due to the high-fat composition of the orange color diets. In addition, some hematological, serum biochemical, and histopathological changes were observed in the groups given greater than 0.55% concentrations, but they did not suggest obvious toxicity. These findings indicate that under these experimental conditions the no-observed-effect level (NOEL) of orange color in the diet for 13 weeks is 0.18% and the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) is 5%.

Keywords: orange color, F344 rat, subchronic toxicity study, food additive

はじめに

オレンジ色素はミカン科アマダイダイ (*Citrus sinensis*) の果実もしくは果皮より搾汁したもの、又は加熱時にエタノール、ヘキサンもしくはアセトンで抽出し、溶媒を除去して得られたものである。主色素はキサントフィル及びカロテン、性状は暗赤色のやや粘調な液体で、特有のにおいがある¹⁾。用途としては菓子類、冷菓、柑橘系飲料の着色料として用いられている²⁾。この色素は黄色系色素として初めて果実色素と表示できるようになった色素であり、ブドウ果汁色素等の赤色の果実色素と組み合わせて、果汁色素表示で幅広い色調を作出できる³⁾。しかし、これまでにオレンジ色素の毒性評価に関する報告はない。今回、ラットを用いてオレンジ色素の安全性評価の一環として 13 週間の亜慢性毒性試験を実施した。

実験材料及び方法

1. 動物ならびに飼育条件

5 週齢の F344 ラット雌雄各 50 匹を日本チャールス・リ

バー (株) より購入し、約 1 週間の馴化飼育の後、雌雄とも各群 10 匹ずつ 5 群に配した。動物の飼育はバリヤーステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度 24±1 °C、湿度 55±5 %、換気回数 18 回/時間、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は、ポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス (株) のソフトチップを用い、週 2 回交換した。また、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

2. 被験物質ならびに投与量

オレンジ色素は原体として三栄源エフ・エフ・アイ (株) から供与を受けた (Lot No. 97.10.28)。実験に使用したオレンジ色素は、オレンジ果皮より得たオレンジ油を減圧濃縮したものであり、脂質を 97.1 % 含有する。既に実施した予備試験の結果に基づき、最高用量を 5 % とし、公比 3 で除して以下の用量を 1.66, 0.55, 0.18 % に設定した。それぞれ CRF-1 粉末飼料 (日本チャールス・リバー社) に混じて 13 週間自由に摂取させ、また対照群には粉末飼料のみを同様に摂取させた。なお、安定性試験の結果、0.04 % のオレンジ色素を 5 °C で 28 日間保存したときでも 90 % の色価が残存していたことから、混合飼料は隔週ごとに作製し、使用時まで 4 °C、遮光下で保存した。

3. 観察ならびに検索方法

投与期間中、一般状態の観察を連日実施し、体重及び摂餌量は毎週 1 回測定した。動物は、剖検日前日より一晩絶

* To whom correspondence should be addressed: Fumio Furukawa; Division of Pathology, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9819; Fax: 03-3700-1425; E-mail: furukawa@nihs.go.jp

食させ、翌日エーテル麻酔下で腹部大動脈から採血後、剖検した。

血液学的検査は、自動血球計数装置 (Sysmex M-2000, シスメックス社) を用いて、白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC) 及び血小板数 (PLT) について測定した。

血清生化学的検査は、分離した血清を凍結後、総蛋白 (TP), アルブミン・グロブリン比 (A/G), アルブミン (Alb), 総ビリルビン (T.Bil), トリグリセリド (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), 塩素 (Cl), カリウム (K), カルシウム (Ca), 無機リン (P), アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AsT), アラニントランスアミナーゼ (AIT), アルカリフォスファターゼ (ALP) 及び γ -グルタミルトランスアミナーゼ (γ -GT) について SRL 社に依頼し測定した。

諸臓器は肉眼的に観察後摘出し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣の重量を測定した。上記の臓器に加え、鼻腔を含む頭蓋、下垂体、眼球、ハーダー腺、脊髄、唾液腺、胃、小腸、大腸、膵臓、膀胱、皮膚、乳腺、リンパ節、気管、食道、甲状腺、舌、大腿筋、坐骨神経、精巣上体、精囊、前立腺、子宮、卵巣及び膈を 10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。なお、精巣は対照群及び最高用量群各 5 匹 (番号の小さいものから) をブアン液にて固定した。病理組織学的検索は、雌雄の各 5 % 群

と対照群のみ実施した⁴⁾。臓器は常法に従い、パラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。なお、精巣に関しては PAS 染色を施した。

4. 統計学的処理法⁵⁾

血液学的検査、血清生化学的検査及び臓器の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 Dunnett の方法で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. 一般状態及び死亡動物

投与期間中の死亡動物は認められず、いずれの動物においても一般状態の異常は認められなかった。なお、1.66 % 以上の群の糞色は黄褐色を呈した。

2. 体重及び摂餌量

試験期間中の各群の体重推移を Fig. 1 に示した。雌雄と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。摂餌量を Table 1 に示した。雌雄とも投与期間を通じて対照群とはほぼ同様な推移を示した。1 日当たりの平均摂餌量は、雄において約 14 g, 雌で約 9 g であり、摂餌量の減少は認められなかった。オレンジ色素の 13 週間の総摂取量は、雄では 5 % 群で 64.3 g, 1.66 % 群で 21.0 g, 0.55 % 群で 7.1 g, 0.18 % 群で 2.3 g, 雌では 5 % 群で 39.9 g, 1.66 % 群で 13.6 g, 0.55 % 群で 4.5 g, 0.18 % 群で 1.5 g であり、雌雄とも

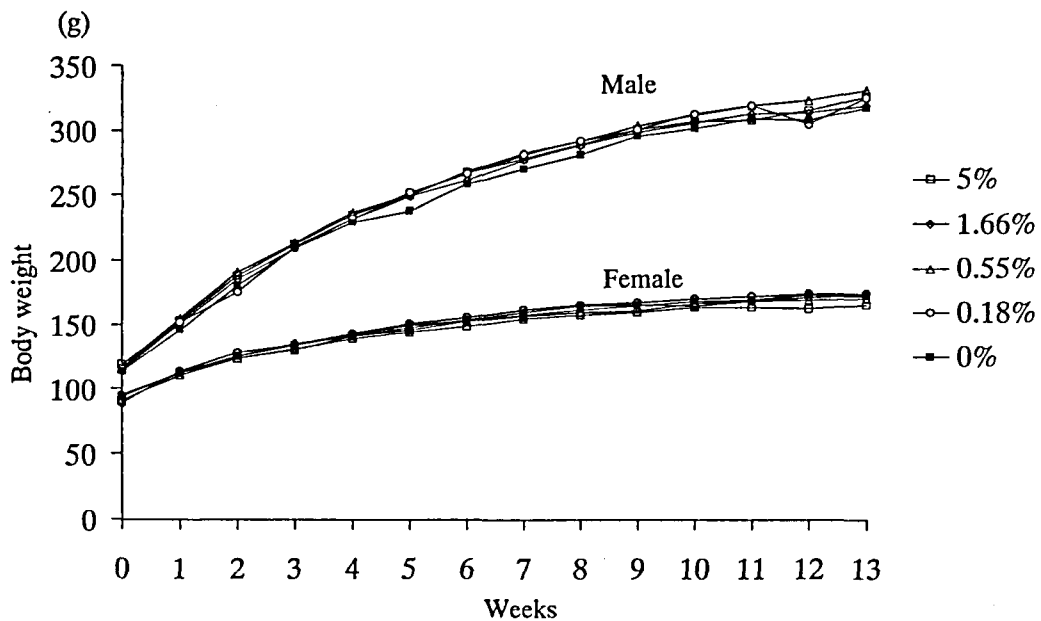


Fig.1. Growth curves for F344 rats treated with orange color for 13 weeks

Table 1. Food consumption and intake of orange color

Group	Food consumption (g/rat/day)		Daily intake (g/rat)		Total intake (g/rat)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
5%	14.1	8.8	0.71	0.44	64.3	39.9
1.66%	13.9	9.0	0.23	0.15	21.0	13.6
0.55%	14.2	9.1	0.08	0.05	7.1	4.5
0.18%	14.0	9.3	0.03	0.02	2.3	1.5
0%	13.8	9.3	-	-	-	-

Table 2. Hematological and serum biochemical data for F344 male rats treated with orange color for 13 weeks

♂	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	44±5 ^{a)}	45±5	40±4	42±2	42±6
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	919±41	943±36	911±26	918±26	907±29
Hb (g/dl)	15.1±0.6	15.6±0.6	15.1±0.5	15.3±0.4	15.0±0.5
Ht (%)	43.2±1.9	44.3±1.6	43.6±1.1	43.5±1.1	43.3±1.3
MCV (fl)	47.0±0.4 ^{**}	47.0±0.3 ^{**}	47.9±0.6	47.4±0.3	47.8±0.5
MCH (pg)	16.4±0.1 [*]	16.5±0.2	16.5±0.1	16.6±0.1	16.5±0.4
MCHC (g/dl)	34.9±0.4	35.1±0.2	34.5±0.5	35.1±0.3	34.7±0.7
PLT ($10^4/\mu\text{l}$)	82.9±2.4	82.2±5.2	81.3±1.2	81.9±3.7	80.7±3.5
TP (g/dl)	6.8±0.2 ^{**}	6.5±0.1	6.6±0.1	6.5±0.1	6.5±0.1
A/G	2.5±0.1 ^{**}	2.4±0.1 [*]	2.3±0.2	2.4±0.2 [*]	2.2±0.2
Alb (g/dl)	4.9±0.2 ^{**}	4.6±0.1	4.6±0.1	4.6±0.1 [*]	4.5±0.1
T.Bil (mg/dl)	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0
TG (mg/dl)	89±23	96±22	109±41 ^{**}	78±22	69±21
T.Cho (mg/dl)	74±4 ^{**}	63±5 ^{**}	60±4	57±7	56±5
BUN (mg/dl)	23.0±0.8 ^{**}	20.2±1.3	18.7±1.5	18.0±1.6	19.2±2.0
CRN (mg/dl)	0.3±0.1 ^{**}	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
Na (mEQ/dl)	144±1	144±1	145±1 [*]	143±1	143±1
Cl (mEQ/dl)	103±1	104±1	103±1	104±1	104±1
K (mEQ/dl)	4.5±0.2	4.6±0.2	4.7±0.2	4.8±0.1	4.6±0.3
Ca (mg/dl)	10.8±0.3 [*]	10.3±0.2	10.4±0.1	10.4±0.2	10.4±0.2
P (mg/dl)	6.4±0.6	5.8±0.4 ^{**}	6.1±0.2 [*]	6.0±0.3 ^{**}	6.5±0.3
AsT (IU/l)	88±6	79±10	93±6 [*]	75±9	81±11
AIT (IU/l)	55±5	56±7	58±6	50±5	55±5
ALP (IU/l)	369±19 ^{**}	351±25 [*]	344±15	329±19	323±30

^{a)}: Mean±S.D

^{*},^{**}: Significantly different from the control group at p<0.05, p<0.01, respectively.

Table 3. Hematological and serum biochemical data for F344 female rats treated with orange color for 13 weeks

♀	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%
WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	30±7 ^{a)} *	39±5	37±5	36±5	37±7
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	873±27	891±37	889±19	884±20	864±20
Hb (g/dl)	15.4±0.5	15.8±0.7	15.8±0.3	15.6±0.4	15.4±0.3
Ht (%)	43.3±1.3	44.4±1.9	44.5±1.0	44.0±0.9	43.2±1.1
MCV (fl)	49.6±0.3 [*]	49.8±0.3	50.0±0.3	49.8±0.4	50.1±0.4
MCH (pg)	17.6±0.2	17.7±0.2	17.8±0.3	17.7±0.3	17.8±0.2
MCHC (g/dl)	35.6±0.4	35.6±0.4	35.5±0.4	35.5±0.5	35.6±0.5
PLT ($10^4/\mu\text{l}$)	79.6±3.5	80.7±4.3	81.7±5.0	81.9±3.5	77.4±3.6
TP (g/dl)	6.6±0.2	6.5±0.2 ^{**}	6.5±0.2 ^{**}	6.6±0.2	6.9±0.2
A/G	2.7±0.2	2.6±0.2	2.7±0.2	2.7±0.1	2.7±0.2
Alb (g/dl)	4.8±0.2 [*]	4.7±0.1 ^{**}	4.8±0.2 ^{**}	4.8±0.1	5.0±0.1
T.Bil (mg/dl)	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0	0.1±0
TG (mg/dl)	48±21 [*]	55±15 ^{**}	41±16	53±21 ^{**}	29±8
T.Cho (mg/dl)	117±9 ^{**}	103±5 ^{**}	93±14 [*]	89±14	82±6
BUN (mg/dl)	18.8±2.2	17.3±1.7	17.3±1.7	16.1±0.9	17.2±1.3
CRN (mg/dl)	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0	0.3±0
Na (mEQ/dl)	143±1	143±1 [*]	144±1	144±1	144±2
Cl (mEQ/dl)	104±2	105±1	107±1 [*]	106±1	105±1
K (mEQ/dl)	4.3±0.4	4.5±0.3 ^{**}	4.3±0.3	4.4±0.7	4.0±0.3
Ca (mg/dl)	10.5±0.4 [*]	10.4±0.2 ^{**}	10.5±0.1	10.6±0.2	10.8±0.2
P (mg/dl)	5.6±0.7	5.4±0.3	5.6±0.5	5.9±0.7	5.9±0.3
AsT (IU/l)	72±6	75±6	75±7	80±10	76±5
AIT (IU/l)	43±5	43±3	41±4	41±4	42±4
ALP (IU/l)	234±19	240±17	238±22	215±25	216±27

a): Mean ± S.D

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

に投与濃度に相関していた。

3. 血液学的及び血清生化学的検査

血液学的及び血清生化学的検査の結果を Table 2 及び 3 に示した。血液学的検査では雄で MCV の減少が 1.66 % 以上の群で、MCH の減少が 5 % 群で認められた。雌では WBC 及び MCV の減少が 5 % 群で認められた。これらの変化は統計学的に有意であるものの、その変化は小さいものであった。なお、白血球型別分類については雌雄ともに各群間に有意差を認めなかった。血清生化学的検査では、投与用量に相関した変化として、雄で T.Cho 及び ALP の増加が 1.66 % 以上の群で認められた。雌では Alb の減少及び T.Cho の増加が 0.55 % 以上の群で、Ca の減少が 1.66 % 以上の群で認められた。しかし、それらの生化学的検査値の変動は統計学的に有意であるものの、いずれも軽微な増減であった。この他に TP, TG, Na 等様々な項目で有意差が散見されたが、その変化は小さく、明らかな用量相関性は認められなかった。なお、 γ -GT は全ての群で測定値が検出限界以下であった。

4. 臓器重量

相対重量の結果を Table 4 に示した。肝重量の増加が雄の

1.66 % 以上の群及び雌の 5 % 群で認められたが、いずれも 15 % 以下の軽度の増加であった。精巣 (右) 重量が 0.55 % 及び 0.18 % 群で、精巣 (左) 重量が 5 % 群で対照群に比し有意に減少した。その他の臓器では、雌雄とも対照群と比し有意差は認められなかった。

5. 病理組織学的所見

病理組織学的検索の結果、雄では対照群及び 5 % 群に軽度ではあるが、肝臓及び心臓の小肉芽腫、腎臓の再生性尿管の出現、膀胱増生、限局性の膵腺房細胞の壊死、射精管上皮下の限局性血管内皮の増生、雌では肝臓の小肉芽腫が認められたが、群間に差は認められなかった。

考 察

今回、F344 ラットを用いてオレンジ色素の混餌投与による 13 週間亜慢性毒性試験を実施した。その結果、一般状態に変化は認められず、死亡動物もなかった。体重推移、摂餌量も群間に差は認められず、被験物質の摂取量も用量に相関して認められた。血液学的検査で、雄で MCV の減少が 1.66 % 以上の群で、MCH の減少が 5 % 群で認められた。雌では WBC 及び MCV の減少が 5 % 群で認められた。こ

Table 4. Relative organ weights of rats treated with orange color

♂	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%
Body weight (g)	312.0±12.3 ^{a)}	316.5±28.5	327.3±29.1	310.1±18.6	302.5±16.0
Brain (g%)	0.62±0.03	0.61±0.04	0.60±0.05	0.62±0.03	0.63±0.03
Thymus (g%)	0.071±0.015	0.065±0.016	0.060±0.015	0.065±0.010	0.068±0.012
Lung (R)(g%)	0.20±0.01	0.20±0.02	0.19±0.02	0.20±0.01	0.20±0.01
(L)(g%)	0.11±0.00	0.11±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01
Heart (g%)	0.29±0.01	0.29±0.03	0.29±0.02	0.29±0.02	0.30±0.02
Spleen (g%)	0.20±0.01	0.20±0.01	0.20±0.02	0.21±0.01	0.20±0.01
Liver (g%)	2.48±0.08 ^{**}	2.26±0.20 [*]	2.23±0.22	2.24±0.06	2.19±0.07
Adrenal (R)(g%)	0.006±0.001	0.005±0.001	0.005±0.001	0.006±0.001	0.005±0.001
(L)(g%)	0.006±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001	0.006±0.001
Kidney (R)(g%)	0.30±0.02	0.29±0.03	0.29±0.03	0.31±0.01	0.27±0.10
(L)(g%)	0.30±0.01	0.30±0.02	0.30±0.03	0.31±0.01	0.31±0.02
Testis (R)(g%)	0.48±0.02	0.47±0.03	0.47±0.04 ^{**}	0.48±0.02 ^{**}	0.50±0.03
(L)(g%)	0.48±0.02 [*]	0.48±0.04	0.47±0.04	0.48±0.01	0.51±0.02

♀	5%	1.66%	0.55%	0.18%	0%
Body weight (g)	158.9±7.0	164.7±8.3	160.5±5.2	167.7±7.6	163.4±6.4
Brain (g%)	1.12±0.05	1.07±0.04	1.09±0.04	1.06±0.04	1.08±0.05
Thymus (g%)	0.097±0.014	0.095±0.010	0.097±0.009	0.097±0.016	0.093±0.013
Lung (R)(g%)	0.29±0.02	0.28±0.03	0.28±0.02	0.27±0.02	0.28±0.02
(L)(g%)	0.16±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01	0.15±0.01
Heart (g%)	0.37±0.03	0.35±0.02	0.36±0.02	0.36±0.02	0.35±0.03
Spleen (g%)	0.24±0.02	0.24±0.01	0.24±0.01	0.23±0.01	0.23±0.01
Liver (g%)	2.53±0.17 ^{**}	2.28±0.10	2.25±0.12	2.13±0.11	2.19±0.10
Adrenal (R)(g%)	0.012±0.002	0.011±0.002	0.011±0.001	0.011±0.001	0.012±0.002
(L)(g%)	0.014±0.002	0.012±0.002	0.012±0.002	0.012±0.002	0.014±0.002
Kidney (R)(g%)	0.32±0.02	0.31±0.02	0.32±0.01	0.32±0.02	0.33±0.01
(L)(g%)	0.32±0.02	0.32±0.01	0.33±0.01	0.32±0.02	0.33±0.01

^{a)}: Mean±S.D

^{*}, ^{**}: Significantly different from each control group at p<0.05, p<0.01, respectively.

これらの変化は統計学的に有意であるものの、その変化は小さいものであった。また、他の関連するパラメータに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。

血清生化学的検査では雄で T.Chol 及び ALP の増加が 1.66 % 以上の群で、雌では Alb の減少及び T.Chol の増加が 0.55 % 以上の群で、いずれも用量相関的に認められ、被験物質摂取による影響と考えられた。肝・胆道障害時または高脂肪食摂取などにより、血清中のコレステロール及び ALP が増加することが知られている^{6,9)}。しかし、病理組織学的に、肝・胆道病変を示唆する所見は認められなかった。今回使用したオレンジ色素には脂質が 97.1 % 含まれており、肝比重量が増加していることから、これらの変化は、被験物質中の脂肪成分による可能性が考えられた。しかし、対照群と被験物質投与群との間の体重推移に差は認められず、肝臓に脂肪変性等の毒性所見が認められないこと、脂肪組織にオレンジ色素の沈着が認められなかったことから、高脂肪による影響はそれほど強くないものと考えられた。また、血清 Ca の増加が雄の 5 % 群で認められたが、雌の 1.66 % 以上の群では減少しており、被験物質投与による影響とは考えられなかった。雄の 5 % 群で BUN, CRN の有

意な増加が認められたが、組織学的にこれを裏付ける所見が認められず、偶発的な所見と考えられた。この他に TP, TG, Na 等様々な項目で有意差が散見されたが、その変化は小さく、明らかな用量相関性は認められず、被験物質投与による影響とは考えられなかった。

病理組織学的検査の結果、雄では肝臓及び心臓の小肉芽腫、腎臓の再生性尿細管の出現、膵管増生、限局性の膵腺房細胞の壊死、射精管上皮下の限局性血管内皮の増生、雌では肝臓の小肉芽腫が軽度で認められた。しかし、これらの病変は対照群にも観察され、F344 ラットでの自然発生が知られていることから、偶発的な病変であると考えられた¹⁰⁾。

以上の結果、オレンジ色素を混餌で 13 週間雌雄のラットに投与したところ、最高濃度の 5 % でも病理組織学的に被験物質に起因すると思われる顕著な毒性変化は認められなかったため、本実験条件下において無毒性量は 5 % と考えられる。また、オレンジ色素中の脂肪分に起因すると考えられる血清中の総コレステロール及びアルカリホスファターゼの増加が雄の 1.66 % 以上の群、血清総コレステロールの増加が雌の 0.55 % 以上の群で認められたことから、無影響量は 0.18 % と考えられた。

文 献

- 1) 日本食品添加物協会編集：第二版 化学的合成品以外の食品添加物 自主規格追補，日本食品添加物協会，東京，pp.12 (1996)
- 2) 総合食品安全事典編集委員会編集：総合食品安全事典，産業調査会，東京，pp.714-715 (1994)
- 3) 佐々木泰司，土井 巖，西山浩司：月刊フードケミカル，5，74-79 (1996)
- 4) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針，日本食品添加物協会，東京，pp.19-22 (1996)
- 5) 山崎 実，野口雄次，丹田 勝，新谷 茂：武田研究所報，40，163-187 (1981)
- 6) 谷本義文：実験動物の臨床化学，清至書院，東京，pp.126 (1981)
- 7) Pugalendhi K.V. and Ramakrishnan S.: *Indian J. Exp. Biol.*, 28, 895-897 (1990)
- 8) Saini P.K. and Posen S.: *Biochim. Biophys. Acta*, 177,42-49 (1969)
- 9) Rao, G.N.,: *Fundam. Appl. Toxicol.*, 32, 102-108 (1996)
- 10) Eustis, S.L., Boorman G.A. and Hayashi Y.: "Pathology of the Fischer Rat, References and Atlas" eds. by Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A., Jr. and Mackenzie, W.F., Academic Press, San Diego, pp.95-108 (1990)

F344 ラットにおけるキチンの 13 週間亜慢性毒性試験

仁保直子[#]・田村 啓・豊田和弘・畝山智香子・渋谷 淳・広瀬雅雄

A 13-week Subchronic Toxicity Study of Chitin in F344 Rats

Naoko Niho[#], Toru Tamura, Kazuhiro Toyoda, Chikako Uneyama,
Makoto Shibutani and Masao Hirose

A subchronic toxicity study of chitin, a natural structural component of crustacean shells, was performed in F344 rats by feeding of the powdered diet containing 5%, 1.7%, 0.6%, 0.2%, and 0% concentrations of the substance. Each group consisted of 10 males and 10 females. All animals survived until the end of the experiment. There were no changes indicating obvious toxicity of chitin in the clinical signs, body weight, food intake, hematology, serum biochemistry, or histopathological findings, except a slight decrease in body weight gain in the 5% chitin-treated males. Although the mechanism is unclear, the suppression of body weight gain may be due to the slight decrease in caloric content of the food in the 5% chitin-treated animals, a change unrelated to toxicity. Thus, there was no obvious toxicity of chitin in F344 rats at concentrations up to 5% in the diet for 13 weeks.

Keywords: chitin, subchronic toxicity study, rat

結 言

キチン (poly- β - (1 \rightarrow 4) -N-acetyl- D-glucosamine) はムコ多糖の一種で、節足動物の皮膚、軟体動物の殻、菌類の細胞膜などの構成成分として自然界に広く存在する^{1) 3)}。現在、一般的に利用されているキチンはカニやエビなどの甲殻類十脚目のクチクラを原料としている⁴⁾。性状は白色、無定形粉末または繊維状で、水、有機溶媒及びアルカリに不溶であり⁵⁾、キチナーゼ及びリゾチームによって分解され、N-acetyl-D-glucosamine 及びそのオリゴ糖を生ずる。

キチンは生体親和性が高く、かつ生体内で分解され吸収されることから医療材料 (手術用縫合糸、創傷被覆剤) として利用されている。また、食品、化粧品、農業分野での活用も増加している。特に、食品添加物として厚生省食品添加物リストに掲載されているほか、天然の数少ない塩基性アミノ多糖であるなどの特徴を生かした特定保健用食品や整腸剤などへの応用が期待されている⁴⁾。毒性作用については、マウスやイヌなどを用いた実験で、経口、皮下、腹腔内投与のいずれにおいても毒性は報告されていない⁴⁾。しかし、我が国では合成添加物に比較して天然添加物につ

いての規格の作成や安全性評価が立ち遅れていることから、今回、これらの天然添加物の安全性再評価の一貫として、キチンの 13 週間の亜慢性毒性試験を実施した。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び動物

被験物質として、株式会社共和テクノス製の精製キチン粉末を用いた。

動物は 5 週齢の F344/DuCrj 系ラット (SPF) 雌雄各 50 匹を日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) より購入し、基礎飼料 (CRF-1 固形飼料、日本チャールス・リバー株式会社) と水道水で 6 日間馴化飼育した後、全動物の体重を測定し、群間に体重の偏りがないように雌雄各 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 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージ (幅 26 cm、長さ 42 cm、高さ 17 cm) に 3 匹もしくは 4 匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス株式会社 (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

キチン添加飼料の製造はオリエンタル酵母工業株式会

[#] To whom correspondence should be addressed: Naoko Niho; Division of Pathology, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9821; Fax: 03-3700-1425; E-mail: niho@nihs.go.jp

社(東京)に依頼した。飼料に添加したキチンの安定性試験及び飼料製造におけるキチンの混合均一性試験は日本化薬フードテクノ株式会社(群馬)に依頼した。安定性試験は、5%及び0.2%の割合でキチンを混合した粉末飼料について、製造直後、2週間冷蔵保存(4℃)後、4週間冷蔵保存(4℃)後及び4週間冷蔵保存(4℃)した後1週間室温放置した後に、飼料中のキチン含量を求めた。その結果、いずれの飼料においても保存期間中にキチン含量の変化は認められなかった。従って、本試験での飼料の保存方法は4週間冷蔵保存(4℃)とし、飼料の製造は4週ごとに行うよう依頼した。混合均一性試験は、5%及び0.2%の割合でキチンを添加後、混合機の上部、中間部、下部よりサンプリングし、飼料中のキチンを定量した。その結果、飼料中に添加されたキチンは混合機内部で均一に分散されていることが確認された。

雌雄各4群を被験物質投与群とし、5%、1.7%、0.6%及び0.2%の割合でキチンを添加した粉末飼料を13週間自由に摂取させた。その他に对照群として雌雄各1群にはキチンを含まない基礎飼料(CRF-1粉末飼料)を同期間自由に摂取させた。試験期間中、全動物の一般状態を連日観察し、体重及び摂餌量の測定を週1回行った。投与最終日に全動物を一晩絶食させた後、エーテル麻酔下に開腹、腹部大動脈より採血し、瀉血、屠殺、剖検した。諸臓器は肉眼的に観察した後摘出し、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓及び精巣については重量測定の後に、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、膀胱、前立腺、精囊腺、子宮、膣、乳腺、リンパ節、胸骨、大腿骨、脊髄、眼球、皮膚及び筋肉など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。ただし、精巣は、对照群及び5%投与群の各5匹をブアン氏液にて固定した。その後、各臓器及び組織を切り出し、通常の方法によりパラフィン包埋後、薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施して、病理組織学的に検索を行った。採取した血液については、多項目自動血球計数装置(M-2000型、東亜医用電子株式会社、兵庫)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)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)及び血小板数(PLT)の測定を行ったほか、実験動物用血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-120A型、立石電機株式会社、東京)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、株式会社エスアールエル(東京)に依頼し下記検査項目について測定を行った。

血清生化学的検査項目：総蛋白(TP)、アルブミン・グロブリン比(A/G)、アルブミン(Alb)、グルコース(Glc)、総コレステロール(TC)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRNN)、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(P)、glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)、glutamic pyruvic transaminase(GPT)、アルカリホスファターゼ(ALP)、 γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP)、コリンエステラーゼ(ChE)。

3. 統計学的処理方法

血液学的・血清生化学的検査結果及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、Dunnettの方法で对照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行った。

結 果

1. 一般状態

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、すべての動物が試験終了時まで生存した。

2. 体 重

試験期間中の各群の体重の推移をFig.1に示した。雄では、5%投与群において軽度の体重抑制がみられた。しかし、雌雄とも对照群と被験物質投与群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

3. 摂餌量及び被験物質摂餌量

試験期間中の摂餌量の推移をFig.2に、ラット1匹1日当たりの平均摂餌量及び被験物質摂取量をTable 1に示した。摂餌量の推移については、雌雄とも对照群と被験物質投与群との間に差は認められなかった。また、平均摂餌量に関しても对照群と被験物質投与群との間に差はみられず、被験物質であるキチンの摂取量も被験物質の用量段階にほぼ相関していた。

4. 血液学的及び血清生化学的検査結果

血液学的及び血清生化学的検査の結果をTable 2, 3に示した。对照群に対する有意差検定の結果、雄では、白血球数が5%投与群で有意に減少した。また、TP値、Alb値及びCa値の上昇が0.2%投与群で、P値の上昇が5%及び1.7%投与群で、CRNN値の低下が0.6%投与群で、Na値の低下がすべての投与群で、K値の低下が5%、1.7%及び0.6%投与群で、GOT値の低下が5%、1.7%及び0.6%投与群で、ALP値の低下が1.7%及び0.6%投与群で有意に認められた。また、雌では、Ca値の上昇が5%投与群で、P値の上昇がすべての投与群で、CRNN値の低下が5%投与群で、Na値の低下が0.6%及び0.2%投与群で、Cl値の低下がすべての投与群で有意に認められた。

このほか、白血球の型別分類の結果、雄では、いずれの型の白血球においても被験物質投与群と对照群との間に差はみられなかった。また、雌では、0.2%投与群で好酸球数の比率が对照群の $0.9 \pm 0.6\%$ に対し $2.1 \pm 1.2\%$ と有意に高か

った ($P < 0.05$)。

5. 臓器重量

絶対重量及び相対重量をそれぞれ Table 4, Table 5 に示した。絶対重量については、雄の5%投与群の肺(右)、心臓及び脾臓重量、1.7%及び0.2%投与群の肺重量(右)の有意な減少が認められた。相対重量については、雄の5%、1.7%、0.2%投与群及び雌の0.6%投与群で脳重量の有意な増加が認められた。その他の臓器の重量については雌雄ともに対照群との間に差はみられなかった。

6. 病理組織学的検索結果

病理組織学的検索の結果、雌雄とも対照群を含むすべての群の動物において、心臓及び肝臓のグリソン鞘や小葉内に、リンパ球を主体とする炎症性細胞の局所的な浸潤が認められ、腎臓に尿細管の再生像が認められた。また、雌の各群において、腎臓に鉍質沈着を示す動物がみられた。しかし、これらの変化はいずれも軽度であり、病変の程度及び発生率も、対照群と被験物質投与群との間に差はみられなかった。

考 察

今回、F344 ラットを用いてキチンの混餌投与による13週間の亜慢性毒性試験を実施した。その結果、一般状態及び摂餌量においては、雌雄とも被験物質投与による用量依存性の明らかな差は認められなかった。また、有意差は認められなかったものの、雄ラットの最高用量群で軽度の体重増加抑制が観察された。その原因は明らかではないが、5%投与群での摂餌量が他の投与群ないし対照群と差を認めなかったことから、相対的なカロリー摂取量の減少によるものと考えられた。

血清生化学的検査の結果、雄においてK値及びP値の投与量に関連した増減が認められた。文献的には、25%及び50%の制限給餌を2週間行った実験で、P値においては不明であるが、Na値、K値、Cl値及びCa値に変動のないことが報告されている⁶⁾。これらのことから、本実験で認められた電解質濃度の変化はカロリー摂取量の減少に起因するとは考えられなかった。また、投与群において血清中TP値、Alb値、A/G比、BUN値のいずれも対照群との間に明らかな差を認めず、腎重量、腎の病理組織学的検索結果に投与に起因する変化を認めなかったことから、血清電解質の変化と腎障害との関連性は非常に低いと考えられた。更に、これらの電解質変化は正常値の範囲内にある微弱ないし軽度の変化であるため^{7) -10)}、食品添加物の無毒性量(NOEL)を求める観点からすると、キチン投与に起因する毒性変化とは考えられなかった。このほか、いくつかの生化学的検査項目及び臓器重量が変動したが、いずれも投与用量との間に明らかな相関性はみられず、正常値の範囲内であったこと^{7) -10)}、組織学的にそれらの変化を裏付け

Fig.1. Growth curves of male and female F344 rats treated with chitin for 13 weeks

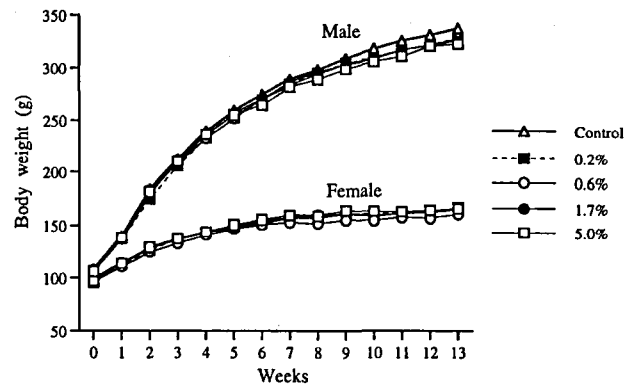


Fig.2. Daily food intakes of male and female F344 rats treated with chitin for 13 weeks

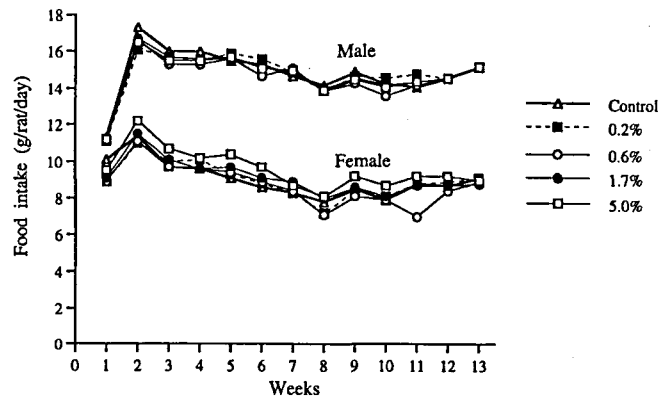


Table 1. Average daily intakes of food or chitin per rat

Sex	Groups	No. of rats examined	Daily intakes of	
			Food (g/rat)	Chitin (mg/rat)
Male	Control	10	14.7	—
	0.2%	10	14.7	29
	0.6%	10	14.6	87
	1.7%	10	14.8	252
	5%	10	14.9	745
Female	Control	10	9.6	—
	0.2%	10	9.2	18
	0.6%	10	8.7	52
	1.7%	10	9.0	153
	5%	10	9.1	453

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

Items	Groups				
	Control (10) ^{a)}	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
WBC ($\times 10^2/\mu 1$)	45.8 \pm 5.9 ^{b)}	51.3 \pm 8.4	45.6 \pm 6.5	43.8 \pm 3.7	38.2 \pm 2.9 *
RBC ($\times 10^4/\mu 1$)	914 \pm 39	931 \pm 32	926 \pm 19	936 \pm 37	938 \pm 50
Hb (g/dl)	15.0 \pm 0.6	15.3 \pm 0.5	15.3 \pm 0.3	15.3 \pm 0.5	15.4 \pm 0.6
Ht (%)	43.6 \pm 1.9	44.6 \pm 1.7	44.2 \pm 1.1	44.4 \pm 1.7	44.4 \pm 2.3
MCV (fl)	47.7 \pm 0.4	47.9 \pm 0.3	47.7 \pm 0.3	47.4 \pm 0.5	47.4 \pm 0.4
MCH (pg)	16.4 \pm 0.1	16.4 \pm 0.2	16.5 \pm 0.1	16.4 \pm 0.1	16.4 \pm 0.2
MCHC (g/dl)	34.5 \pm 0.2	34.3 \pm 0.4	34.6 \pm 0.3	34.6 \pm 0.5	34.7 \pm 0.5
PLT ($\times 10^4/\mu 1$)	81.3 \pm 3.4	82.5 \pm 2.8	80.9 \pm 2.6	82.9 \pm 3.8	78.9 \pm 4.4
TP (g/dl)	6.49 \pm 0.19	6.71 \pm 0.23 *	6.56 \pm 0.16	6.48 \pm 0.10	6.41 \pm 0.11
A/G	2.21 \pm 0.13	2.23 \pm 0.12	2.19 \pm 0.12	2.27 \pm 0.08	2.28 \pm 0.12
Alb (g/dl)	4.46 \pm 0.10	4.63 \pm 0.12 **	4.51 \pm 0.12	4.49 \pm 0.07	4.44 \pm 0.11
Glc (mg/dl)	141 \pm 12	140 \pm 15	133 \pm 5	136 \pm 8	143 \pm 7
TC (mg/dl)	75.9 \pm 6.2	81.9 \pm 6.0	74.3 \pm 5.1	72.2 \pm 4.3	69.6 \pm 7.0
BUN (mg/dl)	19.6 \pm 1.4	20.5 \pm 1.4	19.1 \pm 1.3	20.2 \pm 2.2	20.2 \pm 2.6
CRNN (mg/dl)	0.30 \pm 0.05	0.26 \pm 0.5	0.23 \pm 0.05 **	0.28 \pm 0.04	0.25 \pm 0.05
Na (mEQ/l)	147 \pm 1	146 \pm 1 *	146 \pm 1 *	145 \pm 1 **	144 \pm 1 **
Cl (mEQ/l)	105 \pm 1	104 \pm 1 **	105 \pm 1	105 \pm 1	105 \pm 1
K (mEQ/l)	4.67 \pm 0.20	4.52 \pm 0.15	4.29 \pm 0.27 **	4.24 \pm 0.28 **	4.14 \pm 0.18 **
Ca (mg/dl)	10.3 \pm 0.2	10.6 \pm 0.1 **	10.3 \pm 0.2	10.3 \pm 0.1	10.4 \pm 0.1
P (mg/dl)	5.71 \pm 26	6.06 \pm 0.29	6.04 \pm 0.18	6.18 \pm 0.50 **	6.21 \pm 0.20 **
GOT (IU/l)	78.7 \pm 3.7	73.4 \pm 9.7	68.8 \pm 8.3 **	64.4 \pm 5.1 **	64.7 \pm 4.5 **
GPT (IU/l)	52.6 \pm 3.8	53.0 \pm 7.0	51.7 \pm 4.2	50.1 \pm 4.8	48.0 \pm 2.2
ALP (IU/l)	395 \pm 24	387 \pm 32	341 \pm 24 **	350 \pm 22 **	360 \pm 48
γ -GTP (IU/l)	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
ChE (IU/l)	6.20 \pm 1.03	5.30 \pm 1.06	5.90 \pm 0.99	5.10 \pm 0.88	5.40 \pm 0.52

a) : Numbers in parenthesis represent the number of samples examined.

b) : Mean \pm S. D.**, * : Significantly different from the respective control group at $p < 0.01$ and $p < 0.05$

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

Items	Groups				
	Control (10) ^{a)}	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
WBC ($\times 10^2/\mu 1$)	28.1 \pm 5.9 ^{b)}	33.0 \pm 5.1	28.8 \pm 5.1	30.7 \pm 5.7	28.7 \pm 4.8
RBC ($\times 10^4/\mu 1$)	866 \pm 131	903 \pm 38	901 \pm 29	878 \pm 62	871 \pm 36
Hb (g/dl)	15.3 \pm 2.2	16.0 \pm 0.6	16.1 \pm 0.5	15.6 \pm 1.0	15.5 \pm 0.5
Ht (%)	43.3 \pm 6.6	45.3 \pm 1.8	44.9 \pm 1.5	43.7 \pm 3.0	43.4 \pm 1.7
MCV (fl)	50.0 \pm 0.4	50.2 \pm 0.3	49.9 \pm 0.2	49.8 \pm 0.3	49.8 \pm 0.2
MCH (pg)	17.7 \pm 0.3	17.7 \pm 0.2	17.8 \pm 0.2	17.7 \pm 0.3	17.8 \pm 0.3
MCHC (g/dl)	35.4 \pm 0.7	35.2 \pm 0.4	35.8 \pm 0.3	35.6 \pm 0.5	35.8 \pm 0.4
PLT ($\times 10^4/\mu 1$)	80.6 \pm 12.7	83.6 \pm 4.9	85.2 \pm 4.4	80.6 \pm 7.2	80.3 \pm 4.2
TP (g/dl)	6.28 \pm 0.24	6.32 \pm 0.16	6.18 \pm 0.17	6.33 \pm 0.14	6.26 \pm 0.07
A/G	2.78 \pm 0.20	2.79 \pm 0.15	2.87 \pm 0.16	2.79 \pm 0.15	2.85 \pm 0.23
Alb (g/dl)	4.61 \pm 0.19	4.65 \pm 0.14	4.58 \pm 0.09	4.65 \pm 0.13	4.63 \pm 0.10
Glc (mg/dl)	114 \pm 10	111 \pm 9	107 \pm 10	108 \pm 9	111 \pm 7
TC (mg/dl)	92.4 \pm 6.2	96.0 \pm 5.9	97.4 \pm 7.6	91.1 \pm 7.3	94.8 \pm 6.2
BUN (mg/dl)	18.0 \pm 1.5	17.9 \pm 1.6	17.9 \pm 1.5	17.5 \pm 1.5	17.5 \pm 2.1
CRNN (mg/dl)	0.30 \pm 0.05	0.28 \pm 0.06	0.29 \pm 0.07	0.28 \pm 0.04	0.22 \pm 0.04 **
Na (mEQ/l)	148 \pm 1	146 \pm 2 **	146 \pm 1 **	147 \pm 1	147 \pm 1
Cl (mEQ/l)	109 \pm 1	106 \pm 1 **	106 \pm 2 **	107 \pm 1 *	107 \pm 2 *
K (mEQ/l)	4.00 \pm 0.16	4.22 \pm 0.44	4.12 \pm 0.49	4.05 \pm 0.22	4.12 \pm 0.25
Ca (mg/dl)	10.0 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2	10.2 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2 *
P (mg/dl)	5.09 \pm 0.29	5.59 \pm 0.37 *	5.80 \pm 0.63 **	5.76 \pm 0.45 **	5.75 \pm 0.37 **
GOT (IU/l)	71.2 \pm 4.5	69.5 \pm 4.3	72.8 \pm 7.5	69.5 \pm 4.5	68.9 \pm 3.8
GPT (IU/l)	40.5 \pm 1.4	42.9 \pm 4.0	41.5 \pm 4.5	37.5 \pm 2.5	39.3 \pm 2.4
ALP (IU/l)	233 \pm 20	231 \pm 27	238 \pm 36	235 \pm 28	234 \pm 22
γ -GTP (IU/l)	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
ChE (IU/l)	9.90 \pm 0.88	10.3 \pm 0.95	9.00 \pm 0.94	9.70 \pm 1.16	9.00 \pm 1.83

a) : Numbers in parenthesis represent the number of samples examined.

b) : Mean \pm S. D.**, * : Significantly different from the respective control group at $p < 0.01$ and $p < 0.05$

Table 4. Organ weights of F344 rats treated with chitin for 13 weeks (g)

		Groups				
		Control (10) ^{a)}	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
Male	Body weight	326.6 ± 16.9 ^{b)}	314.1 ± 10.8	316.8 ± 13.3	314.3 ± 17.1	306.9 ± 11.4
	Brain	1.990 ± 0.034	1.963 ± 0.039	1.976 ± 0.047	1.964 ± 0.037	1.940 ± 0.045
	Lung (R)	0.715 ± 0.054	0.651 ± 0.046 ^{**}	0.671 ± 0.043	0.666 ± 0.032 [*]	0.643 ± 0.037 ^{**}
	Lung (L)	0.349 ± 0.045	0.341 ± 0.019	0.348 ± 0.031	0.351 ± 0.019	0.344 ± 0.025
	Heart	1.005 ± 0.070	0.954 ± 0.037	0.977 ± 0.052	0.957 ± 0.066	0.924 ± 0.036 ^{**}
	Spleen	0.654 ± 0.038	0.642 ± 0.034	0.662 ± 0.036	0.664 ± 0.027	0.612 ± 0.027 [*]
	Liver	8.154 ± 0.419	7.902 ± 0.393	7.871 ± 0.402	7.799 ± 0.496	7.559 ± 0.383
	Adrenal g. (R)	0.017 ± 0.003	0.016 ± 0.003	0.018 ± 0.001	0.017 ± 0.003	0.017 ± 0.003
	Adrenal g. (L)	0.019 ± 0.002	0.019 ± 0.002	0.020 ± 0.002	0.019 ± 0.002	0.018 ± 0.003
	Kidney (R)	1.011 ± 0.057	0.992 ± 0.039	0.988 ± 0.056	0.994 ± 0.074	0.982 ± 0.040
	Kidney (L)	1.031 ± 0.047	0.995 ± 0.037	0.998 ± 0.063	1.021 ± 0.077	1.008 ± 0.042
	Testis (R)	1.566 ± 0.072	1.458 ± 0.207	1.536 ± 0.055	1.565 ± 0.063	1.486 ± 0.067
	Testis (L)	1.591 ± 0.064	1.579 ± 0.044	1.596 ± 0.061	1.584 ± 0.061	1.526 ± 0.089
Female	Body weight	155.6 ± 5.2	156.2 ± 8.3	150.8 ± 6.2	155.2 ± 6.1	155.8 ± 9.4
	Brain	1.763 ± 0.026	1.786 ± 0.047	1.757 ± 0.042	1.760 ± 0.045	1.756 ± 0.026
	Lung (R)	0.478 ± 0.088	0.448 ± 0.028	0.434 ± 0.029	0.453 ± 0.056	0.443 ± 0.022
	Lung (L)	0.245 ± 0.027	0.244 ± 0.015	0.232 ± 0.023	0.260 ± 0.085	0.237 ± 0.020
	Heart	0.540 ± 0.034	0.544 ± 0.028	0.520 ± 0.024	0.540 ± 0.031	0.531 ± 0.043
	Spleen	0.350 ± 0.019	0.353 ± 0.022	0.353 ± 0.019	0.356 ± 0.016	0.355 ± 0.028
	Liver	3.569 ± 0.155	3.597 ± 0.164	3.444 ± 0.197	3.514 ± 0.170	3.461 ± 0.273
	Adrenal g. (R)	0.018 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.018 ± 0.003
	Adrenal g. (L)	0.019 ± 0.002	0.019 ± 0.003	0.020 ± 0.003	0.019 ± 0.004	0.019 ± 0.003
	Kidney (R)	0.538 ± 0.018	0.540 ± 0.021	0.523 ± 0.024	0.537 ± 0.027	0.543 ± 0.036
	Kidney (L)	0.544 ± 0.021	0.559 ± 0.023	0.532 ± 0.026	0.544 ± 0.022	0.549 ± 0.039

a) : Numbers in parenthesis represent the number of samples examined.

b) : Mean ± S. D.

**, *: Significantly different from the respective control group at p < 0.01 and p < 0.05

Table 5. Relative organ weights of F344 rats treated with chitin for 13 weeks (g%)

		Groups				
		Control (10) ^{a)}	0.2 % (10)	0.6 % (10)	1.7 % (10)	5 % (10)
Male	Brain	0.61 ± 0.01 ^{b)}	0.62 ± 0.01 [*]	0.62 ± 0.01	0.63 ± 0.01 [*]	0.63 ± 0.01 ^{**}
	Lung (R)	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
	Lung (L)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	Heart	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.01
	Spleen	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01
	Liver	2.50 ± 0.13	2.52 ± 0.13	2.48 ± 0.13	2.48 ± 0.16	2.46 ± 0.12
	Adrenal g. (R)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	Adrenal g. (L)	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	Kidney (R)	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01
	Kidney (L)	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.01
	Testis (R)	0.48 ± 0.02	0.46 ± 0.07	0.48 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.48 ± 0.02
	Testis (L)	0.49 ± 0.02	0.50 ± 0.01	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.02	0.50 ± 0.03
	Female	Brain	1.13 ± 0.02	1.14 ± 0.03	1.17 ± 0.03 [*]	1.13 ± 0.03
Lung (R)		0.31 ± 0.06	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.04	0.28 ± 0.01
Lung (L)		0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.06	0.15 ± 0.01
Heart		0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.03
Spleen		0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.02
Liver		2.29 ± 0.10	2.30 ± 0.10	2.28 ± 0.13	2.26 ± 0.11	2.22 ± 0.18
Adrenal g. (R)		0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Adrenal g. (L)		0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Kidney (R)		0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.02
Kidney (L)		0.35 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.03

a) : Numbers in parenthesis represent the number of samples examined.

b) : Mean ± S. D.

**, *: Significantly different from the respective control group at p < 0.01 and p < 0.05

る所見も認められなかったことから、毒性学的意義はないものと考えられた。

キチンは経口投与された後、腸内細菌の分泌するキチナーゼにより消化され、生成するオリゴ糖が消化器官から吸収されることにより、様々な生物活性を示すと推定される^{2), 4)}。一方、キチンの毒性についてはマウスを用いた実験では、経口投与による急性毒性及び変異原性は認められず、50週間の経口投与によっても毒性は認められていない⁴⁾。本研究においても、いずれの投与群も毒性学的に明らかな変動を示すパラメーターを認めず、病理組織学的に明らかな毒性所見も認めなかった。以上より、今回の実験条件下では、キチンの毒性影響は極めて低いと考えられた。

文 献

- 1) Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E. and Zikakis, J. P.: Chitin: New facets of research. *Science*, **212**, 749-753 (1981)
- 2) Lisbeth, I.: Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.*, **15**, 1326-1331 (1998)
- 3) 玉虫文一, 富山小太郎, 小谷正雄, 安藤鋭郎, 高橋秀俊, 久保亮五, 長倉三郎, 井上 敏編: 岩波理化学辞典, 岩波書店, pp.297, 東京 (1985)
- 4) キチン・キトサン研究会編: キチン, キトサンハンドブック, 技報堂出版, pp.1-202, 300-400, 東京 (1995)
- 5) 今堀和友, 山川民夫監修: 生化学辞典, 東京化学同人, pp. 324, 東京 (1990)
- 6) Stuart, L., David, S., and Zadok, R.: Effects of two weeks of feed restriction on some common toxicologic parameters in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Pathol.*, **21**, 1-14 (1993)
- 7) 谷本義文: 実験動物の臨床化学, 清至書院, pp.157-172, 東京 (1981)
- 8) 石井 暢, 吐山豊秋, 坂口 孝監訳: 実験動物とヒトの血液・臨床生化学検査値集, 清至書院, pp.161, 東京 (1983)
- 9) 豊田和弘, 川西 徹, 畝山智香子, 高橋道人: F344 ラットにおける流動パラフィンの亜慢性毒性試験, 衛生試験所報告, **112**, 64-70 (1994)
- 10) 豊田和弘, 林 修次, 畝山智香子, 川西 徹, 高田 幸一, 高橋道人: β -cyclodextrin 13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)
- 11) 渡部俊彦, 日野綾子, 小野幸栄, 三上 健, 松本達二, 鈴木茂生, 鈴木益子, 又平芳春, 坂井和男: キチンおよび低分子キチン長期経口投与老齢マウスの免疫細胞に及ぼす影響について, キチン・キトサン研究, **3**, 11-15 (1997)

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

四方田千佳子[#]・宮崎玉樹・岡田敏史

Evaluation of Molecular Weight of Hyaluronate Preparations by Size-exclusion Chromatography

Chikako Yomota, Tamaki Miyazaki and Satoshi Okada

Hyaluronate (HA), a glycosaminoglycan polysaccharide, has been used as a biomedical polymer to treat osteoarthritis by intra-articular injections and in ophthalmic surgery, such as anterior segment surgery.

In this study, the molecular weight (M_w) of HA preparations was estimated by size-exclusion chromatography (SEC), using HA and pullulan fractions as molecular weight standards, and the M_w values obtained were compared to those obtained with a low angle laser light scattering detector (LALLS). The results showed that the universal calibration with pullulan as the standard is useful for HA preparations.

The conditions of SEC for HA were also investigated, and the results suggested that a high ionic strength and low flow rate of the eluent were preferable for high molecular weight HA preparations.

Keywords: hyaluronate, size-exclusion chromatography, laser light scattering

はじめに

ヒアルロン酸ナトリウム(HA)は、鶏冠からの抽出あるいは微生物発酵法により製造される生体内多糖であり、現在、変形性膝関節症、肩関節周囲炎に対する関節内注射剤、眼内レンズ挿入術、全層角膜移植時における手術補助剤及び目薬として使用されている。現在これらの分子量規格として、極限粘度値が採用されているが、粘度測定では、あくまで粘度平均分子量を見積もることができるだけであり、分子量分布に関する情報が得られないなど分子量規格として必ずしも十分とはいえない。そこで、最近外国薬局方でデキストラン製剤の分子量試験法として採用されつつあるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)をHA含有製剤に適用し、分子量評価法の最適化を試みた。

実験方法

1. 試料 市販HA含有製剤として、変形性膝関節症用剤の18種、眼手術補助剤の4種、目薬3種の計25製剤を使用した。このうち大部分は極限粘度11.8-19.5(dl/g)のもので、眼手術補助剤のうちの3種は極限粘度が24(dl/g)以上の高

分子量のものであった。SECにおける分子量標準品としてHAの酵素分解による分子量の異なる一連の試料及びプルランを用いた。ヒアルロン酸は文献にしたがって調製されたもので¹⁾、それらの光散乱法(LS)による絶対分子量と極限粘度値をまとめてTable 1に示した。プルランは昭和電工(株)製p-82及び特注品の160万、246万のものを用いた。

2. 測定条件 SEC装置はTosoh製ポンプCCPD、示差屈折計RI-8012、カラムTSKgelG6000PWxl+TSKgelG3000PWxl(7.8mmIDx30cm)を用い、溶離液0.2MNaCl、流速0.8ml/min、カラム温度40℃で測定した。試料は、製剤を0.02%となるように希釈し、100 μ l注入した。分子量はTosoh製スーパーシステムコントローラーSC-8020により計算した。分子量標準品として、プルラン及びHA分画試料を用いた。また、SECに低角度光散乱検出器(LALLS)であるTosohLS-8000光散乱光度計を検出器として接続したSEC-LALLSにより、同一試料の分子量を測定し比較した。SEC-LALLSでは、流速を0.5ml/minとし、試料は0.02%となるように希釈後1ml注入した。また、各製剤の粘度はオストワルド型希釈粘度計により極限粘度が11.8-19.5(dl/g)の製剤では0.25%-0.01%の濃度範囲で、極限粘度が24(dl/g)以上のものでは0.01%-0.0025%の濃度範囲でそれぞれ4濃度で測定し、極限粘度を計算した。

[#]To whom correspondence should be addressed: Chikako Yomota; Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; E-mail: yomota@nihs.go.jp

Table 1. Molecular weights of a series of hyaluronate(HA)

No.	Mw by LS*	$[\eta]$ (dl/g)	Mv**
1	18,900	0.59	13,200
2	104,000	3.01	107,000
3	460,000	8.26	390,000
4	637,000	12.7	676,000
5	847,000	15.7	888,000
6	993,000	17.7	1,035,000
7	1,410,000	22.9	1,440,000
8	2,130,000	28.9	1,940,000

*Weight average molecular weight measured by light scattering.

**Viscosity average molecular weight calculated using Laurent's equation.²⁾

Table 2. Molecular weights(Mw) of a series of hyaluronate(HA) measured by SEC

No.	HA	Standards used for calibration		
		pullulan		
		No correction	MH correction 1*	MH correction 2**
1	19,600	64,000	22,900	24,100
2	124,000	421,000	137,000	139,000
3	497,000	1,740,000	532,000	524,000
4	743,000	2,630,000	786,000	769,000
5	981,000	3,480,000	1,030,000	1,000,000
6	1,100,000	3,910,000	1,150,000	1,120,000
7	1,620,000	5,790,000	1,670,000	1,620,000
8	1,820,000	6,530,000	1,880,000	1,810,000

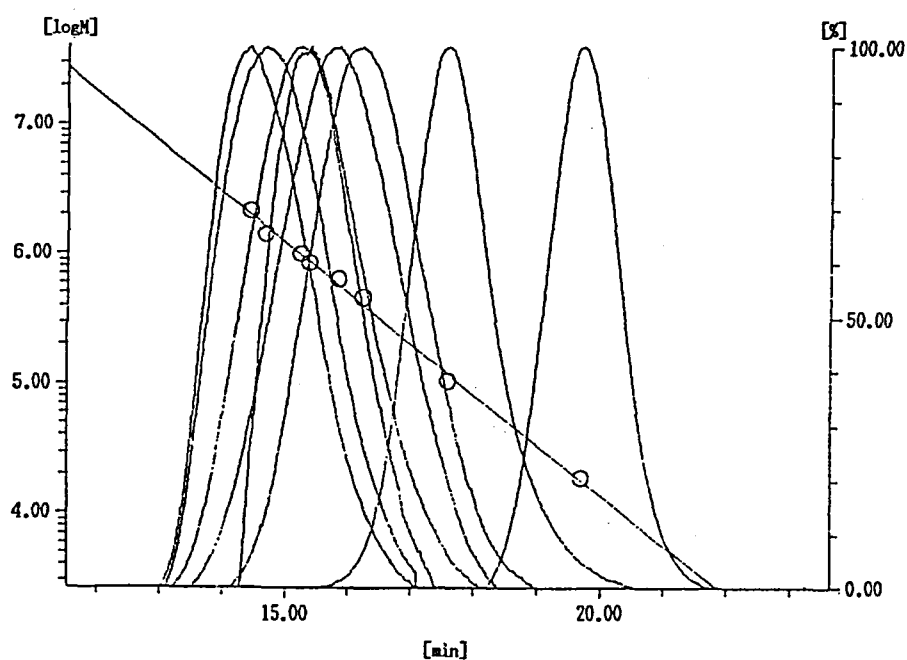
*Mark-Houwink correction using Laurent's equation.²⁾**Mark-Houwink correction using Cleland's equation.³⁾

Fig.1. Elution pattern of 8 kinds of hyaluronate fraction for SEC standards and calibration curve.

Table 3. Molecular weights of 25 kinds of hyaluronate(HA) preparations

No.	Mw				Mv*
	SEC-LALLS	SEC			
		HA	pullulan	pull-MH**	
1	246.1	162.1	580.9	162.1	253.6
2	219.9	177.8	638.2	177.2	172.5
3	179.6	153.6	550.0	153.9	171.1
4	125.2	98.5	350.0	100.7	80.1
5	120.7	97.1	344.9	99.3	92.8
6	120.5	114.9	409.6	116.6	116.6
7	119.6	103.4	367.5	105.5	99.8
8	119.1	100.4	356.7	102.6	93.6
9	118.8	98.6	350.2	100.9	96.8
10	118.5	102.2	363.4	104.3	90.4
11	117.9	102.6	364.6	104.7	97.5
12	117.1	98.8	350.9	101.0	96.4
13	115.7	92.5	327.9	94.9	93.1
14	115.2	105.6	375.7	107.6	81.1
15	110.9	97.6	346.7	99.9	90.9
16	109.6	92.8	329.3	95.2	88.8
17	109.1	90.5	320.9	92.8	80.9
18	109.0	101.7	360.0	104.0	71.6
19	106.8	99.8	355.2	101.9	94.7
20	103.0	104.3	370.8	106.4	87.8
21	102.5	100.0	355.4	102.2	90.6
22	102.1	91.0	322.6	93.3	85.5
23	99.2	93.3	329.9	95.6	66.1
24	95.4	92.5	327.3	94.9	82.6
25	87.8	72.1	254.8	74.8	65.1

*Viscosity average molecular weight calculated using Laurent's equation.²⁾

**Mark-Houwink correction using Cleland's equation.³⁾

結果及び考察

1. ヒアルロン酸分画試料の分子量測定

ヒアルロン酸の SEC 測定において分子量校正曲線をどのように設定できるかを検討するため、Table 1 に示した一連の分子量既知の HA 分画試料について、分画 HA そのものを分子量標準とした場合、市販の分子量標準品プルランを用いた場合、プルランを標準として粘度補正を行った場合の校正曲線を用いて SEC により分子量を再計算した。得られた分子量値を Table 2 にまとめて示した。HA そのものを標準とするには、光散乱により求められた HA の重量平均分子量(Mw)値をピークトップの分子量として校正曲線を求め(Fig.1)、それぞれの分子量を再計算すると、Mw 値は No.8 を除くと全体的に光散乱の場合よりやや大きな値となった。これは、用いた分画試料が分子量分布を有するため、重量平均分子量は実際にはピークトップよりやや溶出の速い位置となるためである。No.8 で、SEC による分子量値が光散乱による値より小さくなったのは、No.8 の分子量が使用した SEC 用カラムの排除限界を越えたためと推測される。次に、市販の分子量標準品であるプルランを標準として校正曲線を求め、分子量計算を行うと、HA の

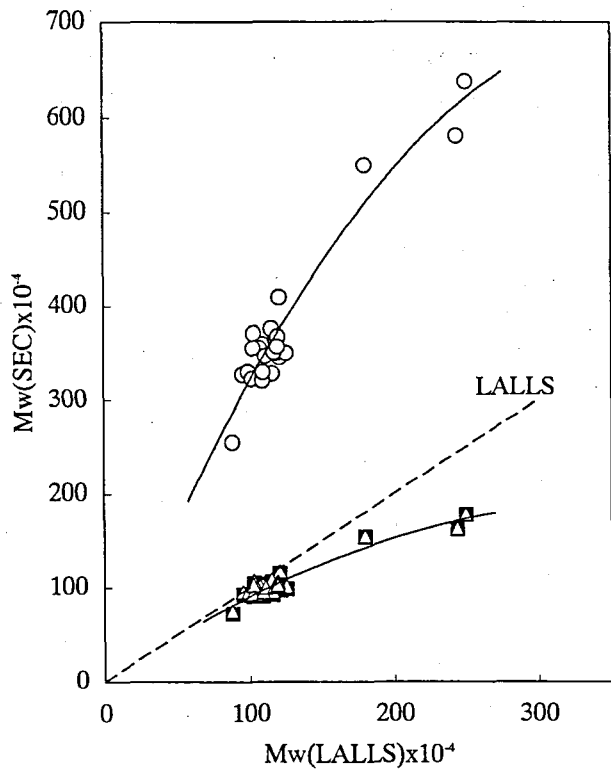


Fig.2. Relationship between molecular weights(Mw) of HA preparations obtained by SEC-LALLS and those estimated by SEC using three kinds of calibration.

Used Standard for SEC calibration: ○, pullulan; ■, hyaluronate; △, pullulan with Mark-Houwink correction.

分子量は HA を標準とした場合の 3 倍程度大きな値となった。HA は電荷を有し、プルランに較べ大きく広がった構造をとっているため、同じ分子量でも HA の方が排除体積が大きく、溶出が速くなるためと考えられる。分子量標準品は、測定しようとする高分子そのものを用いるのが理想であるが、個々の高分子に対して通常の SEC の校正曲線に使用できるほど十分に分子量分布の狭いものを調製するのは困難である。測定法が簡便で、特殊な装置を必要としない SEC 法にあって残された問題点でもある。そのため、特に合成高分子などでは分子サイズの差を相殺しようとする試みが見られる。一般に高分子の分子量は固有粘度 $[\eta]$ により $Mw = K[\eta]^a$ という関係式で表される。SEC の分離モードは流体力学的体積で、これは $[\eta]Mw$ に比例することから、A, B 二種類の高分子ではそれぞれの溶出位置において $[\eta]_A Mw_A = [\eta]_B Mw_B$ が成り立つ。したがって、高分子の粘度式が既知の場合には、高分子 A を標準として高分子 B の分子量を $\log M_B = \{1/(1+a_B)\} \log K_A/K_B + \{(1+a_A)/(1+a_B)\} \log M_A$ により求めることができる。この方法は、粘度式の別名をとってマークホーインク補正と呼ばれ、通常の GPC 用ソフトに組み込まれていることが多い。HA では 0.2MNaCl を溶媒とする粘度式として、Laurent の式²⁾ $[\eta] = 0.036 Mw^{0.78}$ や

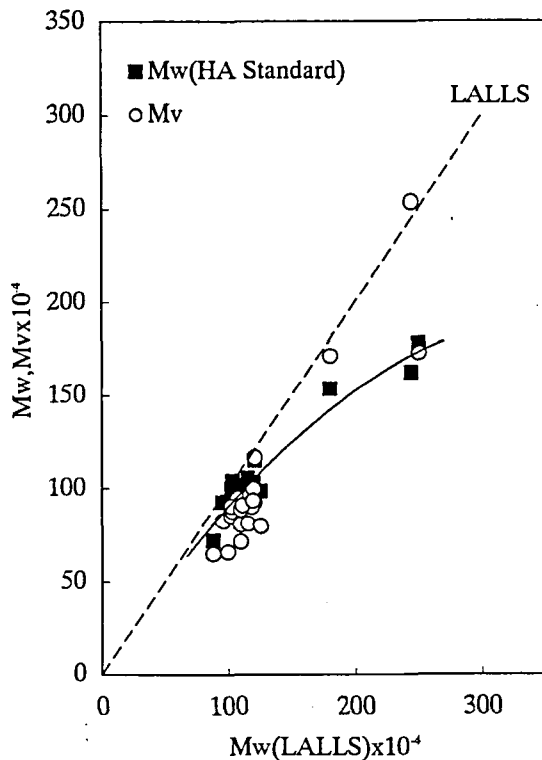


Fig. 3. Mw obtained by SEC and Mv of HA preparations are plotted against Mw by SEC-LALLS
Weight average molecular weight(Mw) obtained by SEC using HA standards and viscosity average molecular weight(Mv) calculated using Laurent's equation.

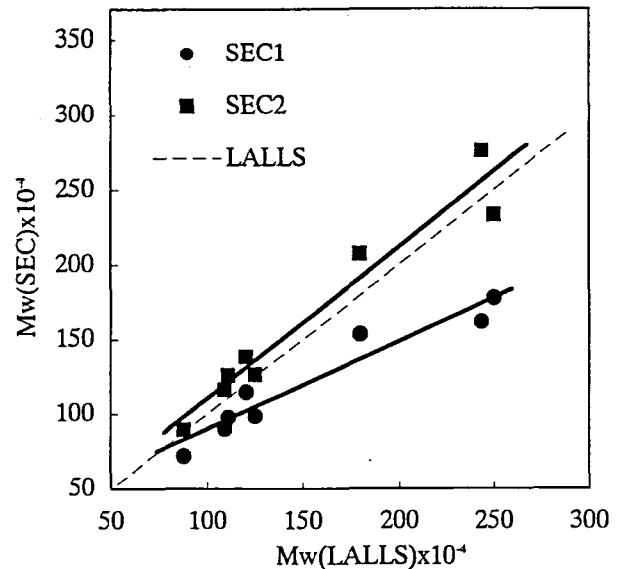


Fig. 4. Effect of SEC conditions to Mw of HA preparations
SEC1, eluent: 0.2MNaCl; flow rate: 0.8ml/min
SEC2, eluent: 0.5MNaCl; flow rate: 0.4ml/min

Cleland の式³⁾ $[\eta] = 0.0228 Mw^{0.816}$ が、プルランの粘度式として⁴⁾ $[\eta] = 0.014 Mw^{0.70}$ などが知られている。これらの粘度式を用いてマークホーインク補正を試みたところ、検討した実験条件下では、プルランを標準としても HA を標準とした場合に近い Mw 値が得られることが明らかとなった (Table 2)。HA の二つの粘度式による補正値を較べると、試料 3 以上ではやや Laurent 式の方が大きな分子量を与えたが、両者は類似した値となった。すなわち、HA のような、水溶性高分子電解質においても、マークホーインク補正の適用によりより妥当な分子量値が見積もられることが示唆された。

2. 市販ヒアルロン酸ナトリウム製剤の分子量測定

HA 分画試料における検討を基に、市販製剤 25 品目について粘度測定及び SEC, SEC-LALLS による分子量測定を試み、結果を Table 3 に示した。Fig. 2 に SEC による 3 種の分子量値を SEC-LALLS により求めたそれぞれの Mw 値に対して図示した。マークホーインク補正では Cleland の式を用いた。SEC では、HA 分画試料を標準とした場合と、プルランを標準としマークホーインク補正を行った場合でほぼ一致する Mw 値が得られた。これは、HA 含有製剤の分子量評価においても、プルランを分子量標準として使用

できる可能性を示している。また、Fig. 2 から分子量が大きな 3 製剤では、SEC による Mw 値は SEC-LALLS による値よりかなり小さく、本報の SEC の測定条件下では Mw が 150 万以上の分子は排除限界に達し、実際よりやや小さな Mw 値を得ていることが示唆された。

さらに、Fig. 3 では SEC による Mw と実測した極限粘度から Laurent の式により計算した粘度平均分子量(Mv)を SEC-LALLS による Mw に対して図示した。極限粘度を基に計算される Mv 値は、分布が大きな試料では通常 Mw よりやや小さな値となることが知られており、Fig. 3 でも分子量 100 万程度付近では、 $Mv < Mw$ であったが、高分子量の 3 製剤のうち、2 製剤では Mv 値は SEC-LALLS の Mw 値に近い値となり、1 製剤では Mv 値は他の二つと比較するとかなり小さくなった。HA は 100 万以上の高分子量域では、高分子同士のからみあいが大きくなり粘度測定値には慎重な取り扱いが必要となることが示されており⁵⁾、高分子製剤においては、粘度測定から得られる Mv 値は、必ずしも真の Mw 値を反映しない場合があると思われた。

3. SEC 測定条件の Mw 値に及ぼす影響

以上の結果から、100 万程度の分子量を有する HA 製剤の分子量は、SEC で充分評価可能と思われたが、高分子量

のヒアルロン酸製剤に関しては、SECの排除限界に達していることが示された。水系のSEC用カラムの排除限界は大きいものでデキストランあるいはプルラン換算で 10^7 程度とされているが、電荷を有するヒアルロン酸では、分子が大きく広がっているためにMw 200万程度でも排除限界に達していると考えられる。そこで、同じカラム系で排除限界が小さくなるようなSEC条件を検討した。測定条件を溶離液0.5MNaCl、流速0.4ml/minとして、高分子量製剤3種を含む8種のHA製剤を選択してSEC測定を試みたところ、Mw値は溶離液0.2MNaCl、流速0.8ml/minの場合と比較して全体にやや大きくなり、特に高分子量の製剤では差はかなり大きく、SEC-LALLSの値と近い値を示すようになった (Fig.4)。イオン強度を大きくし、流速を遅くすることで高分子鎖子の広がりが小さくなり、排除限界が大きくなるた

めに、300万近い高分子量の製剤でもSECによる分子量評価が可能となることが示された。

文 献

- 1) Ueno, Y., Tanaka, Y., Horie, K. and Tokuyasu, K.: *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4971-4975 (1988)
- 2) Laurent, T.C., Ryan, M. and Pietruszkiewicz, A.: *B. B. A.*, **42**, 476-485 (1960)
- 3) Cleland, R.L. and Wang, J.L.: *Biopolymers*, **9**, 799-810 (1970)
- 4) 河原一男：分子量及び分子量分布研究会－水溶性ポリマーの分離とキャラクタリゼーション－，講演要旨集 pp.14-15 (1979)
- 5) Bothner, H., Waaler, T. and Wik, O.: *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 287-291 (1988)

Somatic Embryogenesis and Ginsenoside Production of *Panax ginseng* in Phytohormone-free Medium

Wendy Shu*¹, Kayo Yoshimatsu[#], Hiroko Yamaguchi*² and Koichiro Shimomura

Embryogenic cultures of *Panax ginseng* were established without using phytohormones. Somatic embryos developed from the roots of an *in vitro* seedling and from excised leaf and petiole segments cultured in half-macro-salt strength Murashige and Skoog medium. Excised leaf and petiole segments were obtained from *in vitro* germinated seedlings. Plantlets were subsequently obtained from developing somatic embryos in phytohormone-free media. Shoot formation from somatic embryos was influenced by light intensity. The rate of growth and frequency of embryogenesis were improved when cut-up embryogenic tissues were inoculated into liquid media in the dark. The ginsenoside contents of a 4 year-old field-cultivated root, seedlings from zygotic embryos, somatic embryos and embryogenic tissues were determined and compared. Somatic embryos contained 1.7 times the amount of ginsenoside Rb1 and 2.3 times the amount of ginsenoside Re compared to seedlings from zygotic embryos. Ginsenoside Rd, which was absent in the seedlings derived from zygotic embryos, was detected in somatic embryos. Higher ginsenosides Rd and Rg1 levels were found in embryogenic tissues grown on solid media than in tissues grown in liquid media. The total ginsenoside yields, including the ginsenosides Rb1 and Rg1 levels of cut-up embryogenic tissues, were higher than those of clump tissues.

Keywords: *Panax ginseng*, somatic embryogenesis, phytohormone-free, ginsenoside contents

Introduction

Panax ginseng C.A. Meyer is a valuable medicinal plant, of which roots are used as a traditional tonic to preserve life and longevity¹⁾. Its pharmacological activity is attributed to the triterpene saponins, namely ginsenosides, produced in the root²⁾. Propagation of ginseng by conventional methods is a difficult and long process, making the ginseng roots an expensive commodity. In the field, seeds are used for plant propagation and this often results in the variable quality of the roots. *In vitro* propagation via somatic embryogenesis represents a promising method in obtaining clonal plants. There have been numerous reports on somatic embryogenesis in *P. ginseng*, however in most of papers published, the use of phytohormones in the media was essential in achieving embryogenesis¹⁻¹¹⁾. Recently, Choi and Soh¹²⁾ reported somatic embryogenesis in the cultures of *P. ginseng* immature zygotic embryos without phytohormone and they subsequently reported regenerative ability of somatic embryos from cotyledons¹³⁾. However in

their system, the somatic embryos induced from cotyledonous explants without phytohormone ceased to grow and required either gibberellic acid or chilling treatment for germination^{13, 14)}. In this paper, somatic embryogenesis, embryo propagation via secondary embryogenesis and plantlet formation of *P. ginseng* occur readily in phytohormone-free medium. In addition, ginsenoside content of these somatic embryos was compared to seedlings derived from zygotic embryos and a 4-year old field-cultivated root.

Materials and Methods

Establishment of embryogenic cultures

Immature seeds of *Panax ginseng* C.A. Meyer were surface sterilized in 75 % ethanol for 30 seconds¹⁻¹¹⁾ and then in 2 % (v/v) sodium hypochlorite solution with Tween 20 (1 drop / 40 ml) for 10 min. Seeds were rinsed three times with sterile deionized water and cultured on 0.5 % agar medium containing 0.5 % sucrose and incubated in the dark at 25 ± 2 °C. After 9 to 10 months of culture, germination occurred. Seedlings removed of leaves, excised leaf and petiole segments from seedlings were transferred to phytohormone-free (HF) a half macro salt strength Murashige and Skoog (1/2 MS)¹⁵⁾ solid medium supplemented with 3 % sucrose and 0.2 % Gelrite and cultured under dim light (16 h photoperiod, 9 μEm⁻²s⁻¹) at 25 ± 2 °C.

*¹ Department of Chemical Process & Biotechnology, Singapore Polytechnic, 500 Dover Road, Singapore 139651

*² Department of Inspection, Kito Public Health Center, 265 Showa, Takeo-machi, Takeo, Saga 843-0023 Japan

[#] To whom correspondence should be addressed: Kayo Yoshimatsu; 1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan; Tel: 0298-38-0573; Fax: 0298-38-0575; E-mail: yoshimat@nihs.go.jp

After 1 month, embryogenic tissues formed on the surface of the root of the seedling (Pg, Fig. 1A). Leaf and petiole segments excised from seedlings gave rise to embryogenic tissues (Pga and Pgb, respectively) on HF 1/2 MS solid medium.

Maintenance of embryogenic cultures

Embryogenic cultures of *P. ginseng* derived from root of the seedling (Pg), leaf (Pga) and petiole (Pgb) could be maintained via secondary embryogenesis on HF 1/2 MS solid medium at 25 ± 2 °C under dim light (16 h photoperiod, $9 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). Approximately 0.4 g of embryogenic tissues was inoculated into culture tubes (40 i.d. x 130 mm, 30 ml solid medium) and transferred to fresh HF 1/2 MS medium every 8 weeks.

Effect of light on frequency of somatic embryogenesis and shoot formation

Embryogenic tissues (Pg) were inoculated into culture tubes containing HF 1/2 MS solid medium as described above. Cultures were subjected to full light at $57 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, dim light at $9 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ or complete darkness. After 6 weeks, frequency of somatic embryogenesis and shoot formation were determined.

Effect of cutting up embryogenic tissues prior to culture on solid or in liquid media

Embryogenic tissues (Pg) grown on HF 1/2 MS solid medium were prepared into clumps (10 - 20 mm) or into small pieces (1 - 2 mm, cut-up using a scalpel). On solid media (0.2 % Gelrite), 0.4 g of tissues was inoculated into a culture tube (40 i.d. x 130 mm, 30 ml medium). In liquid media, 0.5 g of tissues was inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml liquid media. Culture tubes were incubated as described above and flasks were incubated at 25 ± 2 °C in the dark on a gyratory shaker at 100 rpm. After 6 weeks, growth (fresh weight) and somatic embryogenesis frequency were determined.

Effect of light on cut-up embryogenic tissues in liquid media

Cut-up embryogenic tissues were cultured in 1/2 MS liquid medium with light (16 h photoperiod at $68 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) or in the dark. Small pieces of tissues (0.5 g) were inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml liquid media and flasks were incubated at 25 ± 2 °C in the dark on a gyratory shaker at 100 rpm. After 6 weeks, growth (fresh weight) and somatic embryogenesis frequency were determined.

HPLC analysis for ginsenosides

Ginsenoside fraction was extracted as reported previously¹⁶. Freeze dried tissues (50 mg) of a 4-year old field-cultivated root, seedlings from zygotic embryos (2 months after germination), somatic embryos (2 months of culture in 1/2 MS liquid media) and embryogenic tissues (6 weeks of culture in 1/2 MS media) were extracted with methanol (7 ml) at 70 °C for 1 h. This procedure was repeated three times. The combined extract was centrifuged and the supernatant was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 2 ml water and adsorbed on a Sep-Pak C18 cartridge (MILLIPORE®). The cartridge was washed with water (5 ml) and 30 % methanol (5 ml) and eluted with 5 ml methanol. After evaporation to dryness, the residue was redissolved in 1 ml methanol and filtered. Ginsenosides Rb1, Rc and Rd in the resulting supernatant were analyzed by HPLC [column: TSKgel ODS 80Ts, 4.6 mm i.d. x 150 mm (TOSOH); flow rate: 1.1 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (3/7); detection: UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rb1=13.01 min, Rc=16.73 min, Rd=35.01 min]. Ginsenosides Rg1 and Re were analyzed by HPLC conditions using either column: Wakosil II ODS 3C18 HG, 4.0 mm i.d. x 100 mm (Wako Chemicals, Japan); flow rate: 0.45 ml min⁻¹, temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (2/8); detection: UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rg1=33.34 min, Re=35.10 min, or column: Hibar Mightysil RP-18, 4.6 mm i.d. x 150 mm (MERCK); flow rate: 0.75 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (2/8); detection: UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rg1=29.03 min, Re=30.40 min.

Results

Establishment of embryogenic cultures

Immature seeds just after harvest from the field-grown plants germinated after a long culture period (9 - 10 months) on agar-sucrose medium at 25 °C in the dark. Embryogenic tissues (Pg) developed on the surface of the seedling root when the seedlings were transferred and cultured on 1/2 MS solid medium without any phytohormones for 1 month (Fig. 1A). Leaf and petiole segments excised from the seedlings gave rise to embryogenic tissues (Pga and Pgb, respectively) on 1/2 MS solid medium without any phytohormones. The frequency of embryogenesis was highest in the tissues derived from the seedlings (Pg), followed by the tissues derived from the petiole (Pgb) and leaf (Pga) (Fig. 2A). A total of 82 somatic embryos could develop via secondary embryogenesis from a piece of embryogenic tissue (Pg) of 0.4 g cultured for 6 weeks under dim light (Fig. 1B). Subsequently plantlet formation via

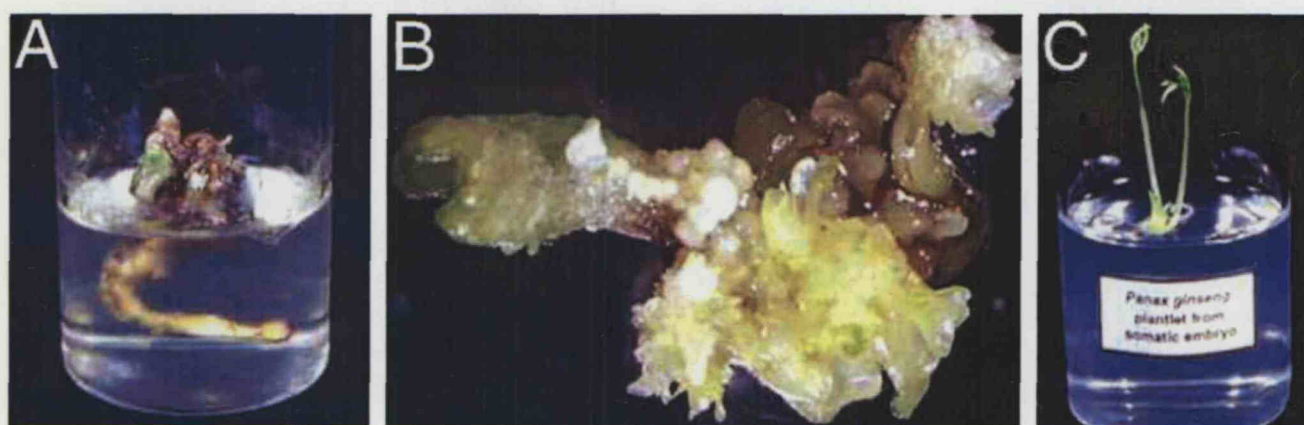


Fig. 1. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in phytohormone-free medium A, embryogenic tissues formed on the surface of the root part of the plantlet; B, further somatic embryos could be obtained via secondary embryogenesis; C, somatic embryos developed into plantlets without the use of phytohormones

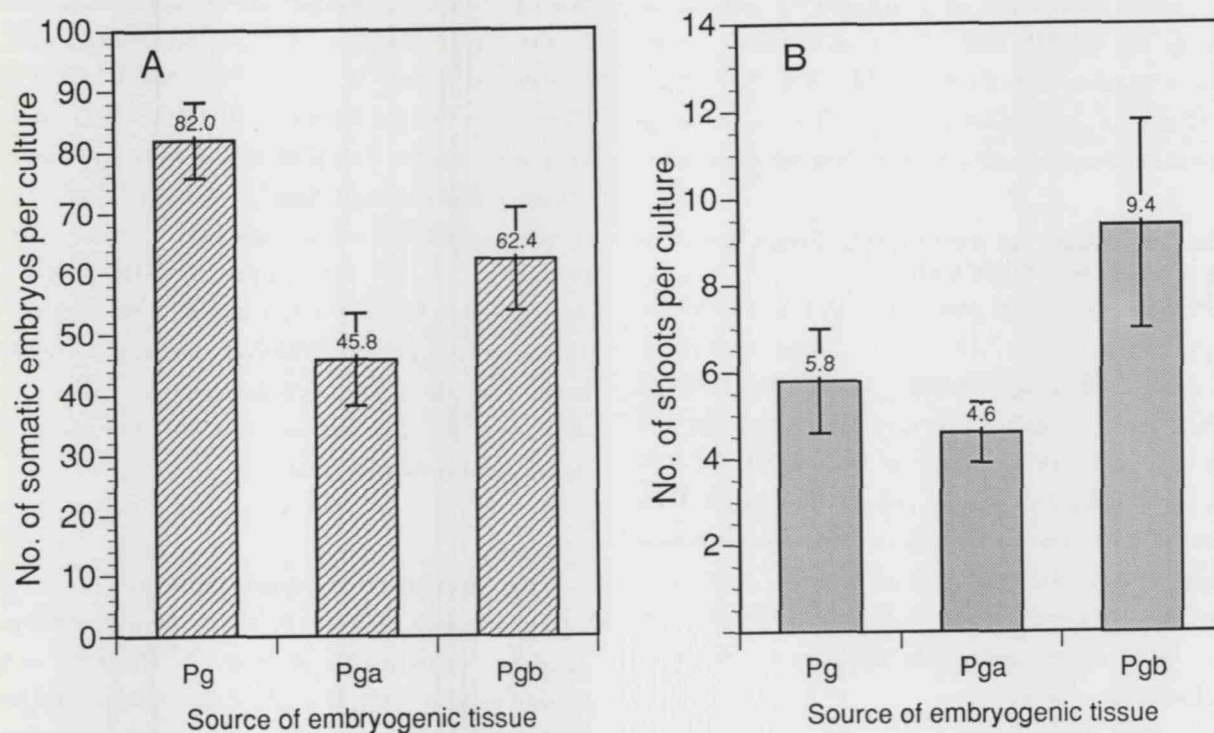


Fig. 2. Influence of plant sources on the frequency of somatic embryogenesis (A) and shoot formation (B) of *P. ginseng* after 6 weeks of culture on 1/2 MS solid medium under dim light condition
Bars represent standard errors.

shoot formation in germinating somatic embryos occurred on phytohormone-free medium (Fig. 1C). Highest number of shoots per culture was obtained from somatic embryos of petiole tissues (Pgb) (Fig. 2B). *P. ginseng* plantlets could be transplanted into pots and acclimatized in a phytotron (25 ± 1 °C, $35 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$). All further experiments were carried out using Pg tissues as this source of embryogenic tissue produced

the highest number of somatic embryos.

Effect of light on frequency of somatic embryogenesis and shoot formation

Number of somatic embryos formed per culture was optimum when embryogenic tissues were cultured on 1/2 MS solid medium in the dark (Fig. 3A). Full light intensity at 57

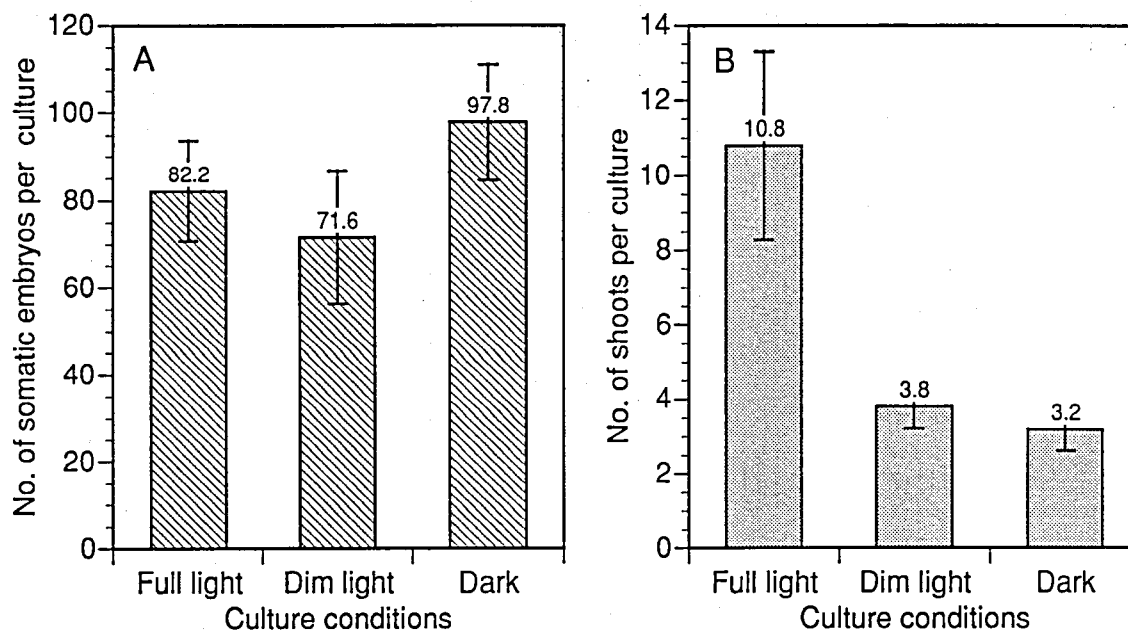


Fig. 3. Effect of light on the frequency of somatic embryogenesis (A) and shoot formation (B) of *P. ginseng* after 8 weeks of culture on 1/2 MS solid medium

Bars represent standard errors.

$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ was found to be beneficial for the shoot formation in somatic embryos (Fig. 3B).

Effect of cutting up embryogenic tissues prior to culture on solid or in liquid media

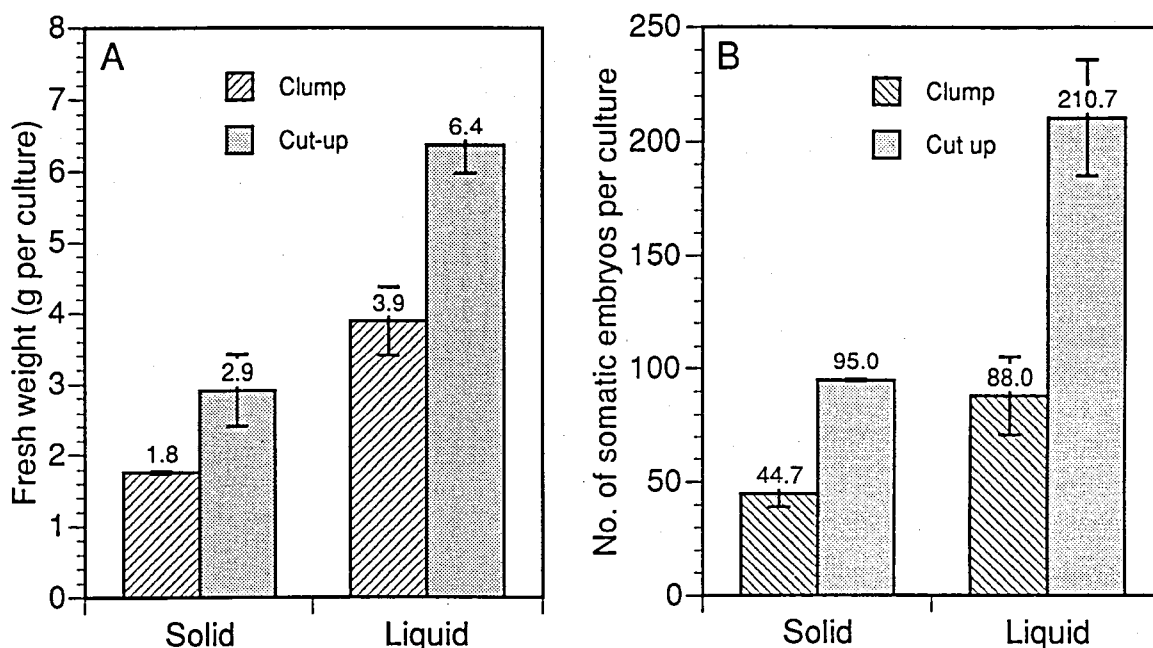


Fig. 4. Effect of cutting up embryogenic tissues on growth (A) and somatic embryogenesis (B) of *P. ginseng*

Embryogenic tissues were cultured either on 1/2 MS solid media or in liquid media in the dark for 6 weeks. Bars represent standard errors.

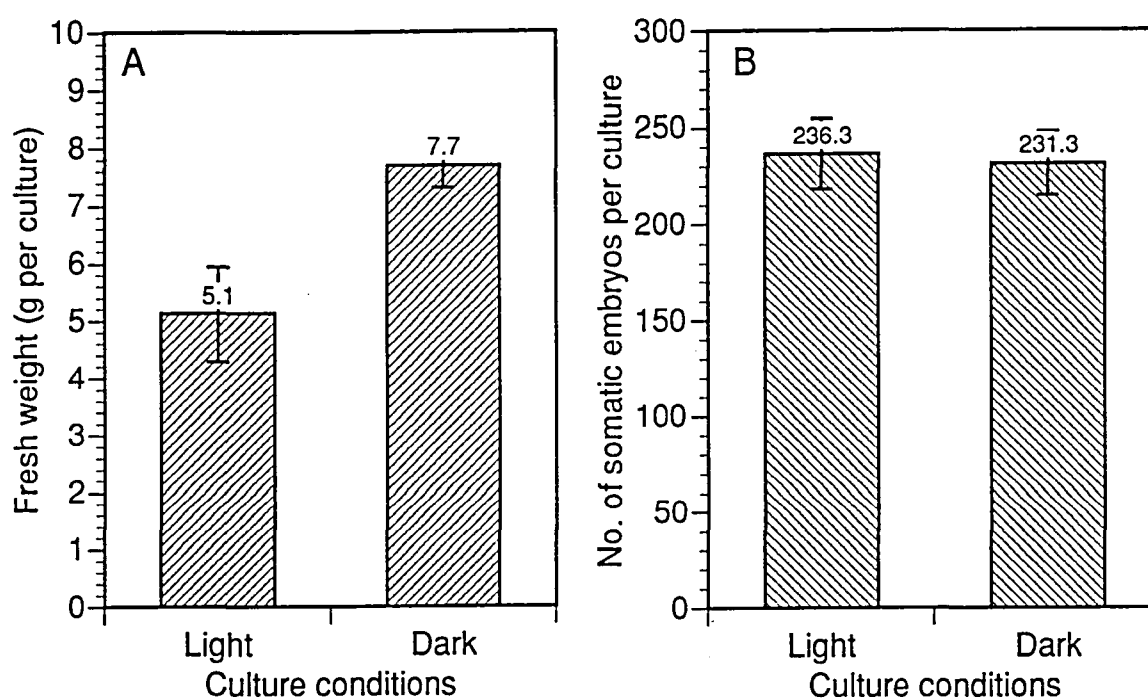


Fig. 5. Effect of light on growth (A) and somatic embryogenesis (B) of *P. ginseng* tissues in 1/2 MS liquid media after 6 weeks of culture

Embryogenic tissues were cut up prior to culture. Bars represent standard errors.

embryos formed in liquid medium was twice the number formed on solid medium. The number of somatic embryos formed per culture in liquid medium increased from 88 in clump tissues to 211 when tissues were cut-up. These results show that a liquid culture system was superior. Growth and frequency of somatic embryogenesis were also enhanced when embryogenic tissues were cut into 1 - 2 mm in size.

Effect of light on cut-up embryogenic tissues in liquid media

Growth of cut-up embryogenic tissues cultured in 1/2 MS liquid medium in the dark was 1.5 times higher than the tissues grown under the light (Fig. 5A). In a period of 6 weeks, tissues in the dark grew approximately 15 times (7.7 g) the original inoculum of 0.5 g per flask. However, the number of somatic embryos formed per culture was the same, 236 in light-grown tissues and 231 in dark-grown tissues (Fig. 5B).

Ginsenoside contents in field-cultivated root, plantlets from zygotic embryo and somatic embryo

The ginsenoside contents of a 4-year old field-cultivated root were compared to ginsenoside contents in seedlings from zygotic and somatic embryos (Fig. 6). Two-month old seedlings and somatic embryos cultured in 1/2 MS liquid

medium for 2 months contained less ginsenosides than the 4-year old field-cultivated root. However, somatic embryos contained 1.7 times the amount of ginsenoside Rb1 and 2.3 times the amount of ginsenoside Re when compared to seedlings. It is of interest that ginsenoside Rd which was absent in seedlings, was detected in somatic embryos. It was found that the ginsenoside Re content in somatic embryos was comparable to that of a 4-year old field-cultivated root.

Embryogenic tissues grown on solid medium contained higher ginsenosides Rd and Rg1 levels than those in liquid medium (Fig. 7A). Levels of ginsenosides Rb1, Rc and Re were not much different between the liquid and solid culture system. The ginsenosides Rb1 and Rg1 levels in cut-up tissues were higher than levels in clump tissues. This was observed in both liquid and solid culture systems. The ginsenoside Rg1 content in cut-up embryogenic tissues grown on solid media (Fig. 7A) was as high as that in a 4-year old field-cultivated root (Fig. 6). Fig. 7B shows the ginsenoside yield in embryogenic tissues cultured in liquid and on solid media. Ginsenoside yields were clearly higher in cut-up tissues than in clump tissues.

Discussion

In all previously published reports on somatic embryogenesis

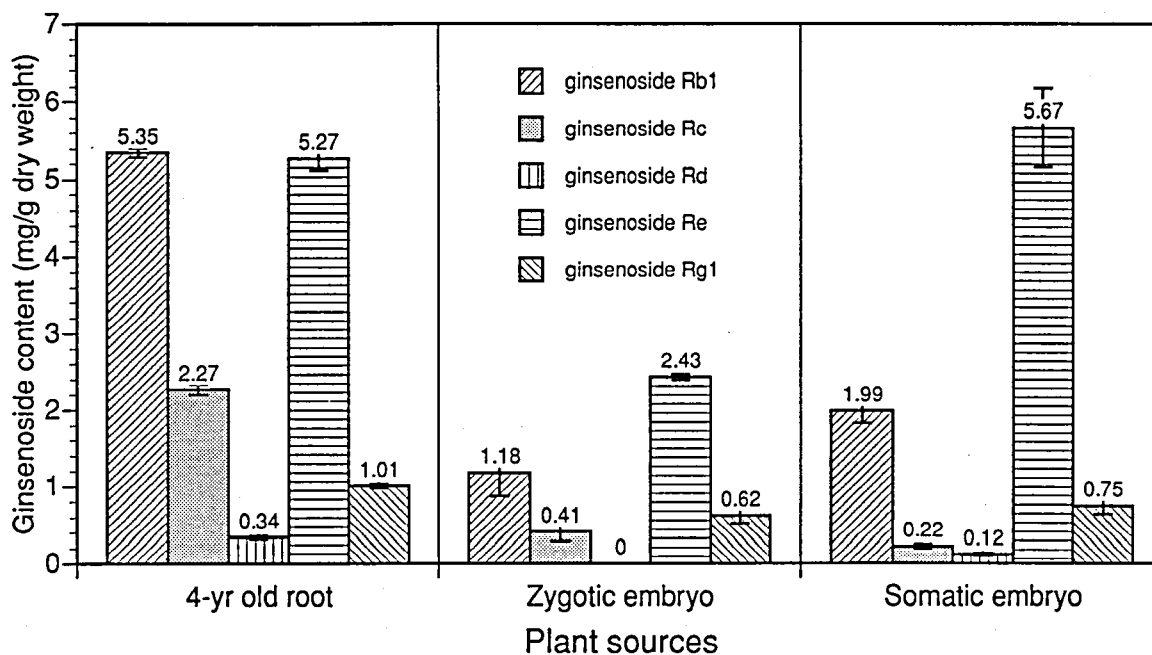


Fig. 6. Ginsenoside content in a 4-year old field-cultivated root, zygotic embryos and somatic embryos of *P. ginseng*. Bars represent standard errors.

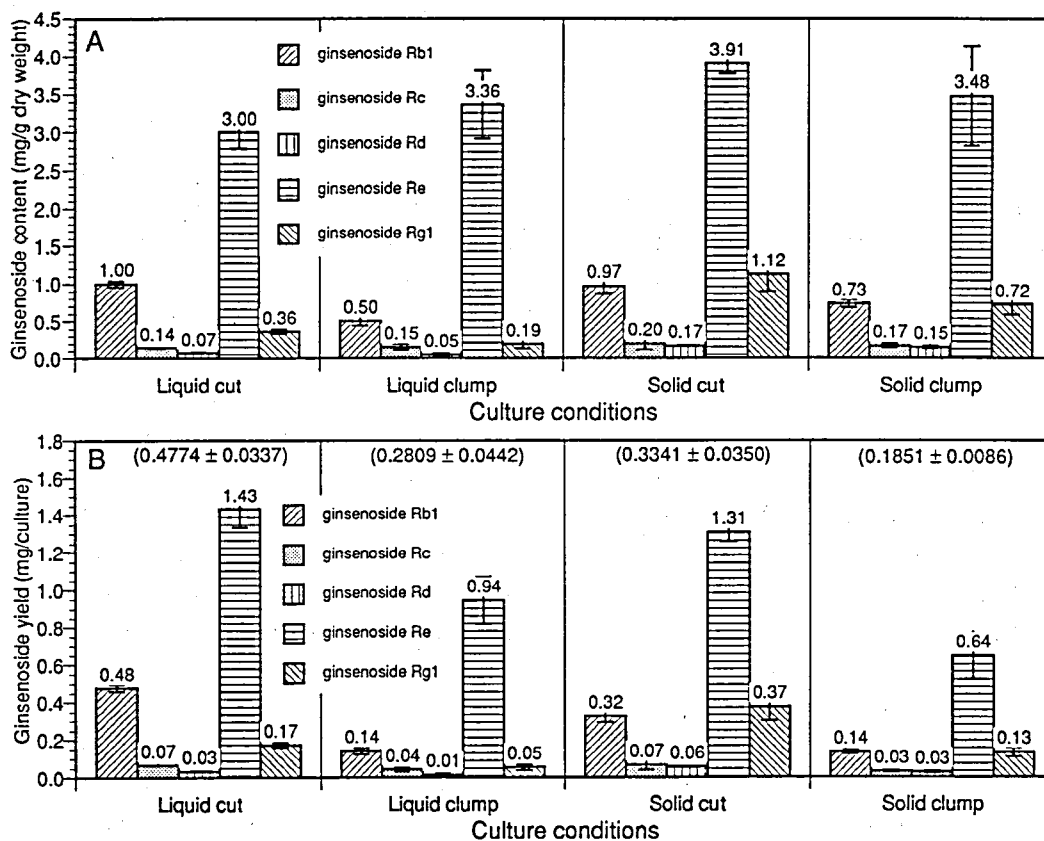


Fig. 7. Ginsenoside content (A) and yield (B) of *P. ginseng* embryogenic tissues cultured in 1/2 MS medium for 6 weeks. Embryogenic tissues were prepared into cutting up tissue (1 - 2 mm) or into clump (10 - 20 mm) prior to culture on solid or in liquid media. Values in the parentheses represent dry weight of tissues per culture \pm standard error. Bars represent standard errors.

and plant propagation via somatic embryogenesis of *P. ginseng*, no system has been established without the use of phytohormones. Auxins, cytokinins and/or gibberellins have played important roles in somatic embryogenesis and plantlet formation of *P. ginseng*. In our present study, stress caused by a long culture period in an agar-sucrose medium could have triggered somatic embryogenesis. Similarly, high temperature treatment (30 - 40 °C for 12 - 24 h)¹⁷⁾ and high concentration of sugar (100 g/l sucrose)¹⁸⁾ were able to induce somatic embryogenesis in multiple shoots of *P. ginseng* cultured in MS medium supplemented with 1 mg/l kinetin¹⁹⁾. The physiological state of the germinating zygotic embryo may be an important factor to consider before somatic embryogenesis occurs¹²⁾. This is also supported by the results which show that leaf and petiole segments produced tissues with varying embryogenic capacity in media without phytohormones (Fig. 2) though Choi and Soh reported that somatic embryogenesis was not observed on the germinating zygotic embryos. The supply of somatic embryos in this culture system is maintained via secondary embryogenesis in phytohormone-free medium. This is important because a continuous supply of somatic embryos and clonal plantlets can be maintained using this system. No phytohormones are required for regeneration in this system. This is unlike results obtained by Choi et al^{19,20)} where gibberellic acid or a cold treatment was required for germination of somatic embryos. This system is preferred as it is a simpler, more manageable and the cost of propagation can be reduced without use of phytohormones. Unlike callus, the embryogenic tissues are organized tissues. This also lowers the chances for genetic instability. Therefore, this culture system offers an *in vitro* propagation system which will produce a supply of genetically-stable plants. To optimize this propagation system, some factors affecting somatic embryogenesis were studied. Light was shown to be an important factor in controlling the germination of *P. ginseng* somatic embryos in phytohormone-free medium. Other reports showed that cytokinin, gibberellin and a half strength media with reduced sucrose concentration (1.5 %) was effective in promoting shoot development in somatic embryos of *P. ginseng*^{6,8)}. Cut-up embryogenic tissues cultured in liquid media exhibited an increase in growth rate and number of somatic embryos. This could be because there is better absorption of nutrients and higher dissolved oxygen levels in cut-up tissues grown in a liquid culture system. Choi¹⁾ also reported that the growth rate of cultured ginseng roots was higher in liquid medium. Embryogenic tissues in liquid media also grew well in the dark and this is an important consideration for the commercial scale-up of this system.

In comparing the ginsenoside contents of somatic embryos, embryogenic tissues, seedlings from zygotic embryos and field-cultivated root, qualitative and quantitative differences were found. Specific ginsenosides Rb1, Rc, Rd, Re and Rg1 which were measured in the 4-year old field-cultivated root were also produced in somatic embryos and embryogenic tissues. These results show that somatic embryos and embryogenic tissues in culture produced similar types of ginsenosides as a 4-year old field-cultivated root. These data may be useful for the production of specific types of ginsenosides from ginseng cultures. For example, the production of ginsenoside Re in 2-month old somatic embryos (5.67 mg/g dry weight) was equivalent to level produced in a 4-year old field-cultivated root (5.27 mg/g dry weight). Somatic embryos could be used as a source of the ginsenoside Re and studies can be conducted to determine its pharmaceutical role. The ginsenoside levels (ginsenosides Rb1, Rc and Rg1) in somatic embryos and embryogenic tissues are generally lower than that of a 4-year old field-cultivated root. Results of this study also show that contents of ginsenosides Rb1 and Rg1 in somatic embryos were higher than those found in seedlings from zygotic embryos. Other results show that the biosynthetic pathway of ginsenosides in embryos requires further study as it is not well-understood or reported. Evidence of this is seen as only four of the ginsenosides (ginsenosides Rb1, Rc, Re and Rg1) measured were found in seedlings of zygotic origin and the ginsenoside Rd was absent. The *in vitro* production of ginsenosides using somatic embryos and embryogenic tissues seems promising due to the high growth rate, shorter time frame and the use of culture medium without phytohormones. Instead of waiting 4 years to harvest a field-cultivated root, 2 month old somatic embryos can be used for extraction of specific ginsenosides.

Ginsenoside production has been reported in ginseng callus cultures, however, the use of phytohormones was crucial not only in maintaining growth but also in maintaining its capability for saponin production^{1, 20-22)}. In our study, we examined the ginsenoside production capability of embryogenic tissues in phytohormone-free medium. It was found that the development of embryogenic tissues into somatic embryos increased the ginsenoside production capability. This is observed when comparisons are made between ginsenoside production in embryogenic tissues and somatic embryos. Efforts to increase growth and yield of ginsenosides in embryogenic tissues were made by liquid culture and by cutting up tissues. Ginsenoside yield was comparatively higher in cut up tissues than clump tissues, but culturing on solid or in liquid media did not have much varying effect. The production of

ginsenoside Rg1 (1.12 mg/g dry weight) in cut up embryogenic tissues cultured on solid media was equivalent to level produced in a 4-year old field-cultivated root (1.01 mg/g dry weight). Ginsenoside Rg1 is one of the more important ginsenosides.

This unique culture system in this study not only offers possibilities in producing clonal plants which are genetically stable but also the *in vitro* production of ginsenosides from somatic embryos and embryogenic tissues without the use of phytohormones.

Acknowledgements

The authors are grateful to T. Kitazawa for his expert technical assistance. W. Shu was the recipient of a Science & Technology Fellowship (Japan) during the tenure of this work. This study was supported in part by Ministry of Health and Welfare, Health Sciences Research Grants, Special Research.

References

- 1) Choi, K.T.: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants I, ed. by Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 484-500 (1988)
- 2) Shibata, S., Tanaka, O., Shoji, J. and Saito, H.: Journal of Economics and Medicinal Plant Research I, eds. by Wagner, H.H. and Farnsworth, N. R., Academic Press, London, pp. 217-284 (1985)
- 3) Butenko, R., Brushwitzky, I. V. and Slepian, L. I.: *Bot. Zh.*, **7**, 906-911 (1968)
- 4) Jhang, J.J., Staba, E.J. and Kim, J.Y.: *In Vitro*, **9**, 253-259 (1974)
- 5) Chang, W.C. and Hsing, W.I.: *Nature*, **284**, 341-342 (1980)
- 6) Chang, W.C. and Hsing, W.I.: *Theor. Appl. Genet.*, **57**, 133-135 (1980)
- 7) Lee, H.S., Liu, J. R., Yang, S.G. and Lee, Y.H.: *Hort. Science*, **25**, 1652-1654 (1990)
- 8) Shoyama, Y., Kamura, K. and Nishioka, I.: *Planta Med.*, **54**, 155-156 (1988)
- 9) Arya, S., Liu, J. R. and Eriksson, T.: *Plant Cell Rep.*, **10**, 277-281 (1991)
- 10) Arya, S., Arya, I.D. and Eriksson, T.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **34**, 157-162 (1993)
- 11) Shoyama, Y., Matsushita, H., Zhu, X. X. and Kishira, H.: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 31, Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II, ed. by Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 343-356 (1995)
- 12) Choi, Y. E. and Soh, W. Y.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **45**, 137-143 (1996)
- 13) Choi, Y. E., Yang, D. C., Park, J. C., Soh, W. Y. and Choi, K. T.: *Plant Cell Rep.*, **17**, 544-551 (1998)
- 14) Choi, Y. E., Yang, D. C., Yoon, E. S. and Choi, K. T.: *Plant Cell Rep.*, **18**, 493-499 (1999)
- 15) Murashige, T. and Skoog F.: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 16) Yoshimatsu, K., Yamaguchi, H. and Shimomura, K.: *Plant Cell Rep.*, **15**, 555-560 (1996)
- 17) Asaka, I., Ii, I., Yoshikawa, T., Hirotsu, M. and Furuya, T.: *Planta Med.*, **59**, 345-346 (1993)
- 18) Asaka, I., Ii, I., Hirotsu, M., Asada, Y., Yoshikawa, T. and Furuya, T.: *Planta Med.*, **60**, 146-148 (1994)
- 19) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ushiyama, K., Oda, H.: *Experientia*, **42**, 193-194 (1986)
- 20) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K.: *Planta Med.*, **47**, 183-187 (1983)
- 21) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K.: *Planta Med.*, **47**, 200-204 (1983)
- 22) Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *Planta Med.*, **48**, 83-87 (1983)

High production of ginsenosides by transformed root cultures of *Panax ginseng*: Effect of basal medium and *Agrobacterium rhizogenes* strains

Wendy Shu*¹, Kayo Yoshimatsu[#], Hiroko Yamaguchi*² and Koichiro Shimomura

Successful transformation of *Panax ginseng* was achieved when petiole segments were infected with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 and MAFF 03-01724. Transformed roots were obtained after galls developed at infected sites. The root morphology, growth and ginsenoside productivity of roots transformed with different bacterial strains differed, and the roots from *A. rhizogenes* ATCC 15834 grew better and produced much more ginsenosides. Using the ATCC transformed root clone, various liquid culture media were tested to determine the optimum culture medium for ginsenoside production. The root growth was optimum in phytohormone-free Gamborg B5 liquid medium, however highest content of ginsenosides (a total of five ginsenosides 1.88 % dry weight) was obtained when the roots were cultured in half-macro-salt strength Gamborg B5 liquid medium. Growth of the roots over a period of 8 weeks showed that their fresh and dry weight continued to increase. The ginsenoside Rb1 content was optimum after 5 weeks of culture. Ginsenoside Rc content began to decrease slightly after the third week of culture. Ginsenosides Rd and Rg1 contents fluctuated, while ginsenoside Re content continued to rise throughout the 8 weeks of culture. Ginsenoside production, however, did not peak within the 8 weeks of culture.

Keywords: *Panax ginseng*, transformed roots, *Agrobacterium rhizogenes*, ginsenoside content

Introduction

The root extracts of ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer, is traditionally used as a health tonic for preserving life and longevity¹⁾. Its roots contain saponins called ginsenosides. Among its many therapeutic properties, *P. ginseng* is said to have the ability to counter stress, cancer, hypothermia and hyperglycemia. It not only stimulates the central nervous system but also acts as a sedative¹⁾. The demand for ginseng roots and extracts has increased over the years. In addition, the long and difficult cultivation method of this plant has resulted in the high costs of ginseng roots.

Plant tissue culture may be an alternative to conventional cultivation methods for producing valuable plant chemicals. Biosynthesis of secondary metabolites using cell cultures was first suggested in the 1970s. One of the problems encountered when using cell cultures is the low rate of secondary metabolite production after prolonged culture. Screening for cells with high

productivity must be regularly conducted. In *P. ginseng*, ginsenoside production from callus cultures has been reported by Furuya et al.²⁻⁴⁾, however, the use of phytohormones was crucial in maintaining growth of cells and its saponin productivity.

The use of plant organ culture has its advantages over cell cultures in that it has the ability to accumulate secondary metabolites more easily. This is especially true in bioactive compounds which accumulate in organized tissues such as roots. Transformed root cultures have a further advantage over cultured adventitious roots because transformed roots grow more rapidly in culture medium without any phytohormones. Researchers have demonstrated that transformed roots of *P. ginseng* accumulated the same type of ginsenosides as field-cultivated roots⁵⁻⁷⁾. Ginsenoside contents of their transformed roots were equal or higher than field-grown roots on a dry weight basis. In this study, the transformation of *P. ginseng* petiole segments was successfully carried out using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 and MAFF 03-01724. Growth and ginsenoside production of *P. ginseng* transformed root clones in various basal media are reported.

*¹Department of Chemical Process & Biotechnology, Singapore Polytechnic, 500 Dover Road, Singapore 139651

*²Department of Inspection, Kito Public Health Center, 265 Showa, Takeo-machi, Takeo, Saga 843-0023 Japan

[#]To whom correspondence should be addressed: Kayo Yoshimatsu; 1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki 305-0843, Japan; Tel: 0298-38-0573; Fax: 0298-38-0575; E-mail: yoshimat@nihs.go.jp

Materials and Methods

Establishment and maintenance of hairy root cultures

Direct infection of petiole segments of a 4-year old *Panax ginseng* plant with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 and MAFF 03-01724 was carried out according to methods described by Yoshimatsu et al.⁸⁾. Transformed roots developed from the galls after six weeks culture on Gamborg B5 (B5)⁹⁾ medium supplemented with 1.0 mg/l indole-3-butyric acid (IBA). Nine ATCC 15834 and three MAFF 03-01724 transformed root clones were obtained. One transformed root clone of each bacterium strain (ATCC 15834 or MAFF 03-01724) which showed good growth was selected for further experiments. Transformation was confirmed by opine detection using paper electrophoresis¹⁰⁾ and PCR analysis for T-DNAs⁸⁾. The transformed *P. ginseng* root clones were maintained in a half macro salt strength Murashige and Skoog (1/2 MS)¹¹⁾ liquid medium supplemented with 3% sucrose without phytohormone on a gyratory shaker (100 rpm) in the dark at 25 ± 2 °C. Approximately 0.1g (fresh weight) of transformed roots was inoculated in a 100 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of liquid medium. Cultures were transferred to fresh media every 4 weeks.

Culture media for optimum growth and ginsenoside production

Transformed roots of *P. ginseng* were inoculated into different phytohormone-free liquid media. Culture media containing a half and full macro salt strength MS (1/2 MS and MS), Gamborg B5 (1/2 B5 and B5), Woody Plant (1/2 WP and WP)¹²⁾, White (1/2 W and W)¹³⁾ and Root Culture (1/2 RC and RC)¹⁴⁾ media were used. All media tested were supplemented with 3 % sucrose. The roots (0.1g fresh weight) were inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of liquid medium and placed on a gyratory shaker at 100 rpm in the dark at 25 ± 2 °C. After 4 weeks of culture, the roots were harvested. Growth (fresh and dry weight) and ginsenoside contents were determined. All subsequent experiments were conducted using the similar culture conditions unless otherwise stated.

Time course and ginsenoside production in 1/2 B5 liquid medium

Transformed roots were cultured in 1/2 B5 liquid medium and flasks were incubated on a gyratory shaker in the dark. Growth and ginsenoside contents were determined weekly.

HPLC analysis for ginsenosides

Ginsenoside fraction was extracted as reported previously⁸⁾. Freeze dried transformed root tissues were ground prior to

extraction. The powdered sample (50mg each) was extracted with methanol (7ml) at 70 °C for 1 h. This procedure was repeated three times. The combined extract was centrifuged and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 2 ml water and adsorbed on a Sep-Pak C18 cartridge (MILLIPORE®). The cartridge was then washed with water (5ml) and 30 % methanol (5ml) and eluted with 5ml methanol. After evaporation to dryness, the residue was redissolved in 1 ml methanol and filtered. Ginsenosides Rb1, Rc and Rd in the resulting supernatant were analyzed by HPLC using either column: TSKgel ODS 80Ts, 4.6 mm i.d. x 150 mm (TOSOH); flow rate: 1.1 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (3/7); detection : UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rb1=13.01 min, Rc=16.73 min, Rd=35.01 min or column Wakosil II ODS 3C18 HG, 4.0 mm i.d. x 100 mm (Wako Chemicals, Japan); flow rate: 0.45 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (3/7); detection : UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rb1=13.36 min, Rc=17.06 min, Rd=38.60 min. Ginsenosides Rg1 and Re were analyzed separately under these HPLC conditions using either column: Hibar Mightysil RP-18, 4.6 mm i.d. x 150 mm (MERCK); flow rate: 0.75 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (2/8); detection : UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rg1=29.03 min, Re=30.40 min; or column Wakosil II ODS 3C18 HG, 4.0 mm i.d. x 100 mm (Wako Chemicals, Japan); flow rate: 0.45 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (2/8); detection : UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rg1=33.34 min, Re=35.10 min or column TSKgel ODS 80Ts, 4.6 mm i.d. x 150 mm (TOSOH); flow rate: 1.1 ml min⁻¹; temperature: 40 °C; solvent: acetonitrile / water (2/8); detection : UV 203 nm; retention time for ginsenosides: Rg1=25.13 min, Re=26.47 min.

Results and Discussion

The transformation of *P. ginseng* using *Agrobacterium rhizogenes* has been shown to be more difficult than transformation of other plant species. Yoshikawa and Furuya⁵⁾ tried various methods including the use of excised leaf discs, root discs and *in vitro* plantlets for infection with *Agrobacterium rhizogenes* A4, agropine strain. Transformed roots were successfully obtained when *A. rhizogenes* A4 was co-cultivated with ginseng callus which had been pretreated with cellulase and macerozyme. Ko et al.⁶⁾ infected 3-year old plants cultivated in soil with *A. rhizogenes* ATCC 15834 and sterilized root discs. Inomata et al.⁷⁾ used 1-year old field root sections for *A. rhizogenes* ATCC 15834 inoculation. In our experiments, petiole segments from a 4-year old plant were used. Direct infection

of *A. rhizogenes* resulted in the formation of galls at the infected sites after 2 weeks on 1/2 MS solid medium. Transformed roots could only develop after the excised galls were transferred to medium containing 1.0mg/l IBA. The supplement of auxin has been beneficial in some plant species which were recalcitrant for *Agrobacterium*-mediated transformation. Agropine and mannopine (ATCC 15834) or mikimopine (MAFF 03-01724), opines specific to these *Agrobacterium* strains, were detected in the transformed roots using paper electrophoresis (data not shown).

The root morphology of ATCC and MAFF clones was completely different from each other. Seven of the ATCC clones were thick roots and exhibited remarkable lateral root branching (Fig. 1A) and two of them formed callus, whereas all the MAFF clones were thinner than ATCC clones and elongated showing less lateral root branching (Fig.1B).

One of each clone which showed the best growth among the clones was selected and their growth (Fig.2A) and ginsenoside productivity (Fig.2B and C) were compared after 8 weeks of culture in 1/2 MS liquid medium in the dark. The ATCC roots grew slightly better than MAFF roots (1.4 fold as fresh weight basis, Fig. 1, 2A) and superiority of ATCC clone was much more pronounced in its ginsenoside productivity (Fig. 2B and C). When the contents of ginsenosides Rb1, Rc, Rd, Re and Rg1 were compared, the ATCC clone accumulated 5 times (4.1 mg/culture) higher than the MAFF clone (0.8 mg/culture). Different ginsenoside pattern was also observed between the clones (Fig.2C). The main ginsenoside in ATCC was ginsenoside Rb1, while that in MAFF was ginsenoside Rg1 (Fig. 2B). The ATCC clone was chosen for further experiments because of its high ginsenoside productivity.

Effect of culture conditions (basal media, illumination and sucrose concentration) on the growth and ginsenoside productivity of ATCC clone was investigated (Fig.3-5). Growth of the roots measured by fresh and dry weights after 4 weeks of culture was optimum in B5 culture medium (Fig.3A).

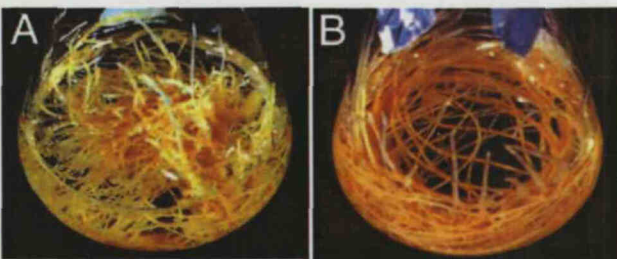


Fig.1. Transformed roots of *Panax ginseng* induced by *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834 (A) and MAFF 03-01724 (B) cultured in 1/2 MS liquid medium at 25°C in the dark for 8 weeks

Inferior growth was observed in the roots cultured in low concentration of salts media such as W and RC. Ginsenoside contents in the roots grown in W and RC media were relatively higher than those of the roots grown in other culture media (Fig. 3B). It was interesting to note that ginsenoside contents of transformed roots cultured in a half macro salt strength media were higher than those in full macro salt strength media (Fig. 3B). These results indicate that ginsenoside contents of ginseng transformed roots were higher when culture medium with a low salt concentration was used. *P. ginseng* transformed roots produced an optimum yield of ginsenosides in 1/2 B5 medium (Fig.3C). Our results show that when growth of the transformed roots is low, ginsenoside contents are high and vice versa. Physiological stress on roots due to low growth may have caused an increase in ginsenoside contents. In suspension cultures of *P. ginseng*, the increase in cell growth was not always accompanied by an increase in saponin production^{4, 15}. In both cases, higher growth was obtained when the culture conditions were modified, but saponin production did not increase accordingly. On the contrary, Yoshikawa and Furuya⁵ demonstrated that the addition of IBA and kinetin could increase both growth and saponin production in both cultured roots and

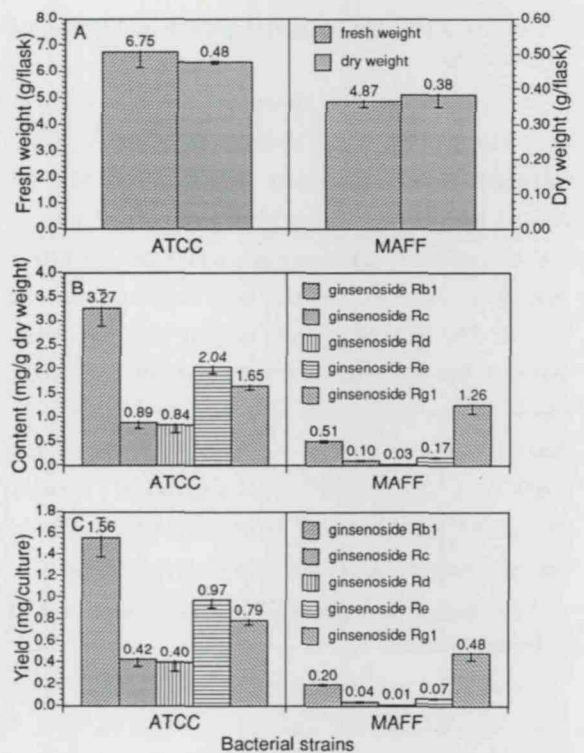


Fig.2. Growth (A), ginsenoside content (B) and yield (C) of *P. ginseng* transformed roots cultured in 1/2 MS liquid medium for 8 weeks in the dark. Bars represent standard errors.

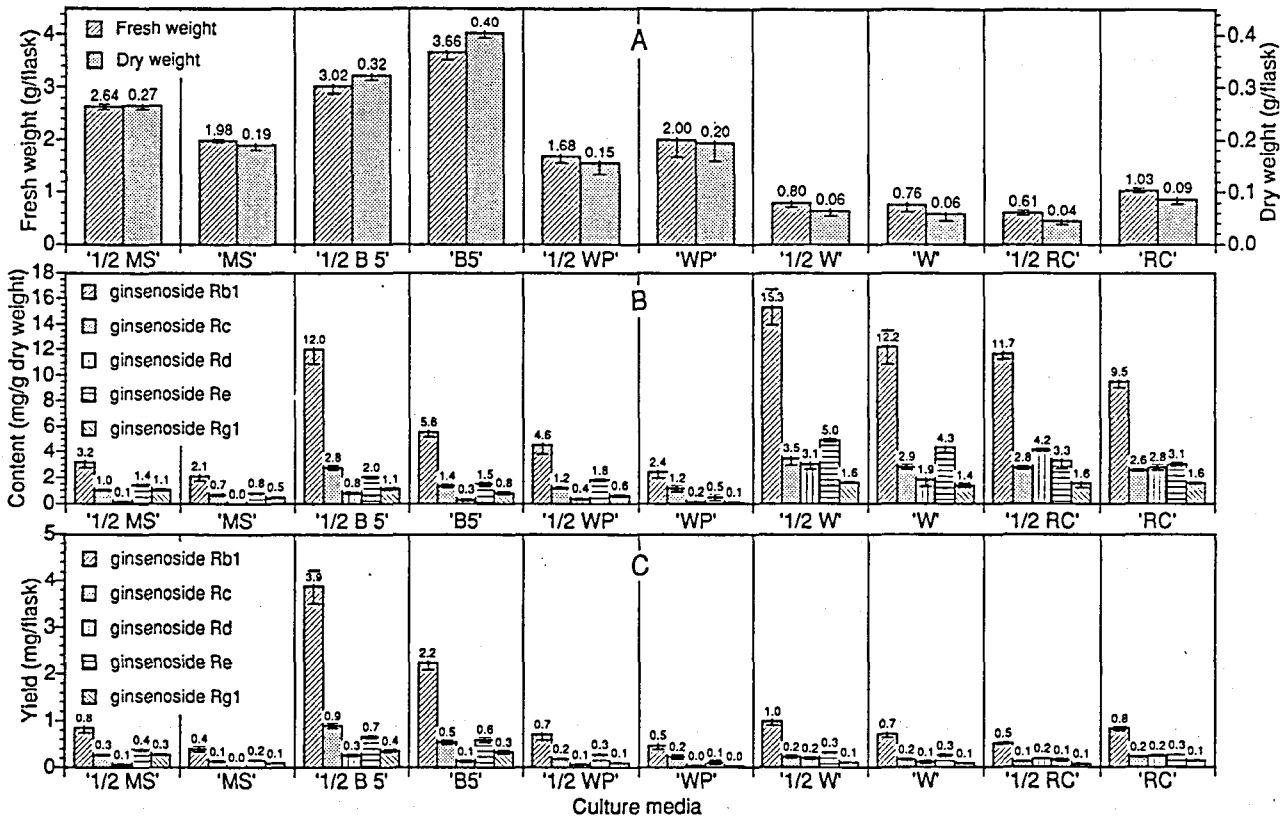


Fig. 3. Growth (A), ginsenoside content (B) and yield (C) of *P. ginseng* transformed roots (ATCC) cultured in various liquid media for 4 weeks in the dark
 Bars represent standard errors.

transformed roots of *P. ginseng*.

Growth rates of ginseng callus cultures varied from 1.5 to 8.2 fold after 20 to 30 days of culture^{4,5,16}. Contents of ginsenosides Ra, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2 and Rh measured 0.65 % dry weight⁵. In root cultures, a growth rate of 4 to 6 fold was achieved after 21 to 30 days^{5,16,17}. Content of ginsenosides Ra, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg1, Rg2 and Rh varied from 0.38 to 0.91 % dry weight⁵ and 0.53 % dry weight (ginsenosides Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf and Rg1)¹⁶. Higher growth exhibited by transformed roots of *P. ginseng* is an important consideration for the production of ginsenosides in culture. Growth of *P. ginseng* roots transformed with *A. rhizogenes* A4 was reported to be much lower than those in many other plant species⁵. *P. ginseng* roots transformed with *A. rhizogenes* ATCC 15834 exhibited higher growth rates: 20-fold growth after 30 days⁶; 31-fold growth in 32 days⁷. In our experiments, the fresh weight after 4 weeks in 1/2 B5 liquid medium was 30 fold (Fig.3A). The ginsenoside content of transformed roots previously reported varied from 0.36 - 0.95 % dry weight⁵, 0.47-0.82 % dry weight⁶ and 1.19-1.69 % dry weight⁷. By comparison, it is noted that transformed roots could produce a higher yield of ginsenoside than callus or root culture. Furthermore, the total content of five ginsenosides (Rb1, Rc, Rd, Re and Rg1) in this

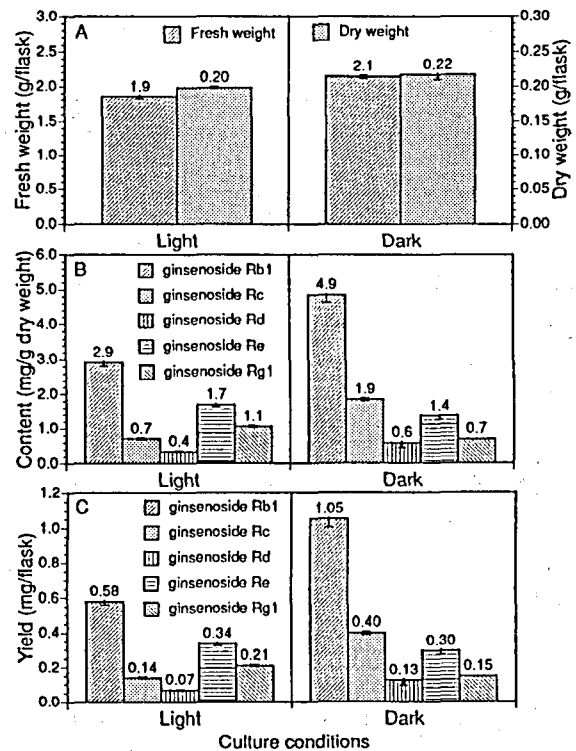


Fig. 4. Growth (A), ginsenoside content (B) and yield (C) of *P. ginseng* transformed roots (ATCC) cultured in 1/2 B5 liquid media for 4 weeks either under 16 h light ($68 \mu E m^{-2} s^{-1}$) or in the dark
 Bars represent standard errors.

transformed root clone was 18.8 mg/g dry weight (1.88 % dry weight). The total content of the same five ginsenosides in a 4-year old field-cultivated root was 14.2 mg/g dry weight (1.42 % dry weight). The ginsenoside content of hairy roots can equal or exceed that of a field plant as shown by results obtained here and elsewhere⁵⁻⁷.

Growth of *P. ginseng* transformed roots was higher in the dark than that under the light (16h photoperiod, 68 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Fig. 4A). The morphology of light and dark-grown roots was not much different. Occasionally, purple pigments appeared in the aerial parts of the roots which were exposed to light. Similar results were observed in rhizoids developing from ginseng callus under a 16 h photoperiod¹⁸. The formation of red pigments in ginseng callus cultures grown under a 12 h photoperiod was also reported by Odnevall and Björk¹⁹. The ginsenoside contents of transformed roots grown in the dark and under light are shown in Fig. 4B. Ginsenosides Rb1, Rc and Rd contents of the roots grown in the dark were higher than those in the roots grown under the light. On the other hand, ginsenosides Re and Rg1 contents were lower in the dark (Fig.4B). Ginsenoside yield of transformed roots grown in the dark was higher than that under the light (Fig.4C). This indicates that under different light

conditions, production of different ginsenosides can be optimized. This may be useful when specific ginsenosides are required. Although the effect of light on *Panax ginseng* transformed roots have not so far been studied, Choi¹⁾ reported that light inhibited growth of ginseng callus though ginsenoside contents were not measured. In another study, growth of ginseng callus in various phytohormone-supplemented media was higher under the light (2500-4000 lux, 16 h photoperiod) than in the dark⁴). The ginsenoside contents did not exhibit any particular trend due to light. Odnevall and Björk¹⁹) showed that light influenced the presence of specialized cells in ginseng callus and that the formation of specialized cells was essential for ginsenoside accumulation. Light therefore had a stimulatory effect on ginsenoside accumulation in callus cultures of ginseng. This stimulatory effect of light was not seen in callus-derived root cultures¹⁹).

Fig.5A shows the effects of sucrose on the growth of ginseng transformed roots. Growth of the roots depended entirely on the concentration of sucrose. This was demonstrated by the poor growth of the roots in culture media without sucrose (Fig.5A). Culture media supplemented with 1 % sucrose produced the roots with high fresh weight but low dry weight. This indicates

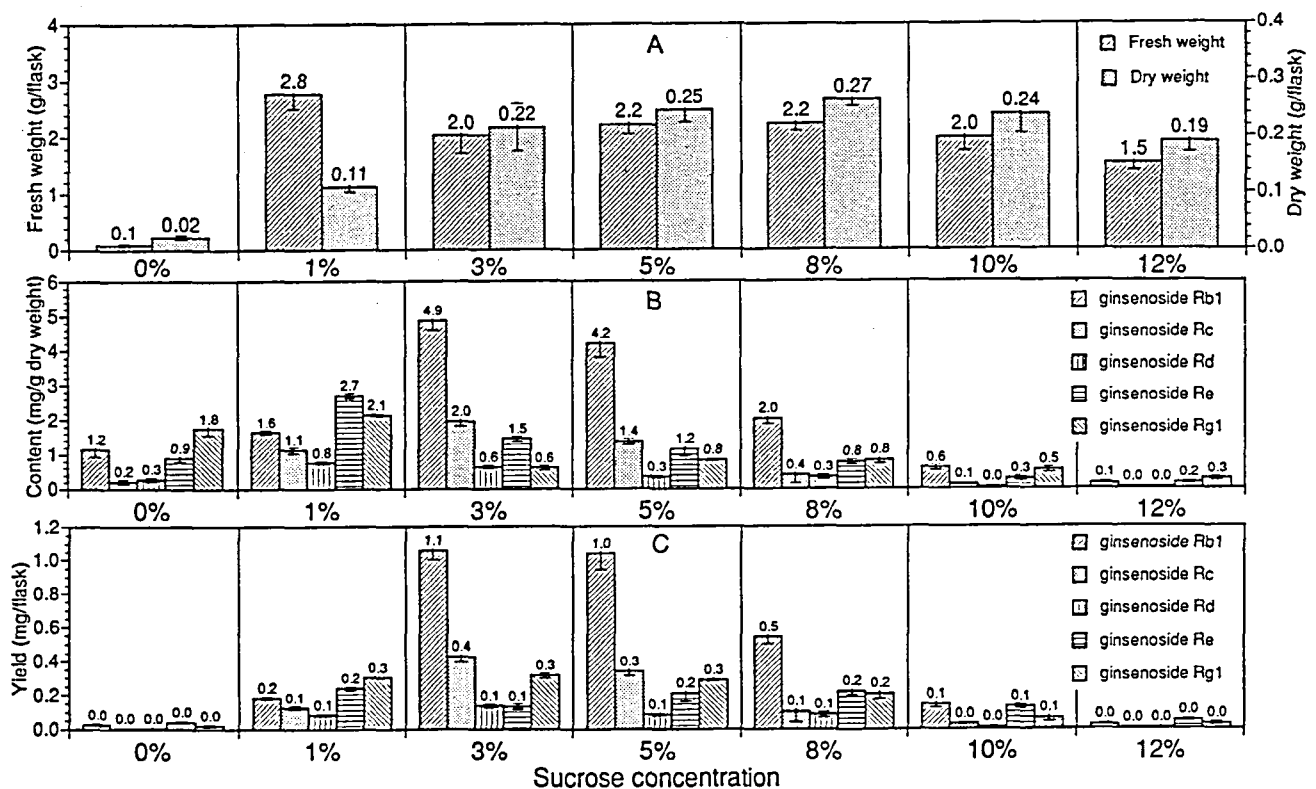


Fig. 5. Growth (A), ginsenoside content (B) and yield (C) of *P. ginseng* transformed roots (ATCC) cultured in 1/2 B5 liquid media containing various sucrose concentration for 4 weeks in the dark. Bars represent standard errors.

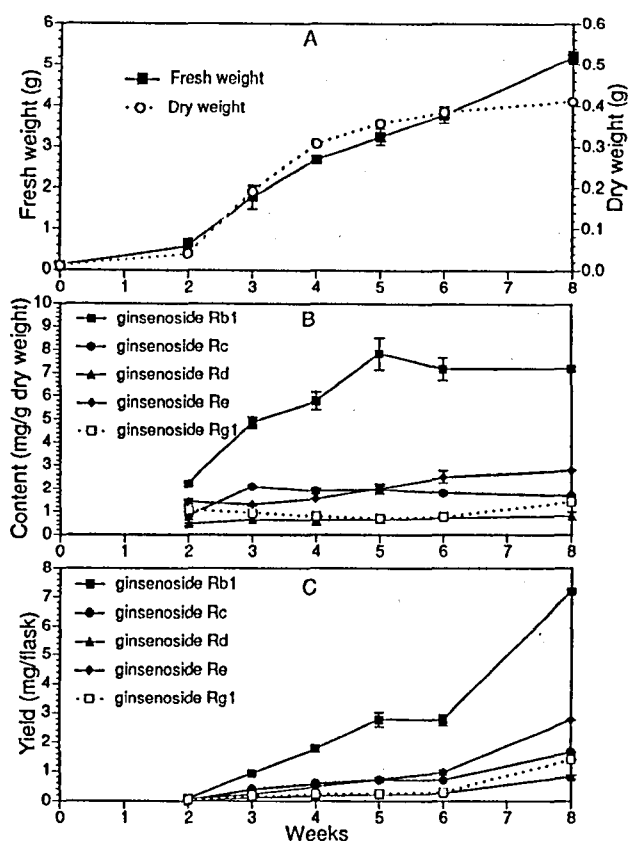


Fig. 6. Growth (A), ginsenoside content (B) and yield (C) of *P. ginseng* transformed roots (ATCC) cultured in 1/2 B5 liquid media containing 3 % sucrose in the dark over a period of 8 weeks
 Bars represent standard errors.

that the fresh weight increase was more likely due to the accumulation of water in the root cells cultured in 1 % sucrose. Although growth of the roots were optimum in media with 5 % and 8 % sucrose, the ginsenoside content and yield of ginsenosides per culture flask were highest in media supplemented with 3 % sucrose (Fig.5B and C). The individual ginsenoside content changed with the concentration of sucrose used in the culture media. Ginsenosides Rd, Re and Rg1 levels were highest when 1 % sucrose was used while ginsenosides Rb1 and Rc levels peaked when 3 % sucrose was used (Fig.5B). Ginsenoside contents of transformed roots grown in 10 % and 12% sucrose were very low (Fig.5B). Inomata et al.⁷ found that growth of transformed ginseng hairy roots slowed down after the initial 2 weeks of culture in 3 % sucrose. This was due to the conversion of sucrose to glucose and fructose. Periodic changes of culture medium containing 3 % sucrose could maintain high growth rates and increase ginsenoside contents of transformed roots⁷. Higher concentrations of sugars have been shown to retard growth of ginseng callus cultures^{1,16}. This may have been

caused by the high osmotic pressure exerted by high sugar concentrations¹⁶.

The growth of ginseng transformed roots was measured over a period of 8 weeks (Fig.6A). Fig. 6A shows that fresh and dry weights continued to increase throughout the culture period. By the 8th week of culture, the original inoculum of 0.1 g of fresh transformed roots had grown to 5.2 g (ca. 52 times). Dry weight increased approximately 41 times in 8 weeks of culture (Fig.6A). The ginsenoside Rb1 content was optimum after 5 weeks of culture (Fig.6B). Ginsenoside Rc content began to decrease after the 3rd week of culture. The ginsenosides Rd and Rg1 contents fluctuated whereas the ginsenoside Re content continued to rise during the 8 weeks of culture. Ginsenoside production, however, did not peak within the 8 weeks of culture. Using this data, a suitable culture period may then be chosen for the production of ginsenosides. This pattern of ginsenoside accumulation was slightly different from that reported by Ko et al.⁶ and Inomata et al.⁷. In the transformed root cultures established by Ko et al.⁶: ginsenoside Rb1 contents reached a maximum after 10 days then decreased to half its content by the 30th day, ginsenosides Re and Rg1 contents reached their maximum after 30 days whereas ginsenosides Rc and Rd maintained the same levels. Studies conducted by Inomata et al.⁷ showed that ginsenoside contents remained at the same level within the 30 days of culture. When the transformed roots were cultured with culture medium exchange every 7 days, total ginsenoside content reached its highest levels after 2 weeks⁷.

Our results have shown that the use of transformed roots of *P. ginseng* may be more feasible for the production of ginsenosides *in vitro* when compared to callus or root cultures if growth and ginsenoside production are the only two criteria used for evaluation. Unlike callus and root cultures, transformed root cultures do not depend on exogenously-supplied phytohormones to maintain growth or the capability for saponin production. Results from this study show that the culture of ginseng transformed roots in 1/2 B5 medium without phytohormones for 4 weeks could proliferate 30 fold its original inoculum. There was no need to supply fresh media every week and the ginsenoside content was higher than field-cultivated roots (1.88 % dry weight).

Acknowledgements

The authors are grateful to T. Kitazawa for his expert technical assistance. W. Shu was the recipient of a Science & Technology Fellowship (Japan) during the tenure of this work. This study was supported in part by Ministry of Health and Welfare, Health Sciences Research Grants, Special Research.

References

- 1) Choi, K.T.: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants I, ed. by Bajaj, Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 484-500 (1988)
- 2) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K.: *Planta Med.*, **47**, 183-187 (1983)
- 3) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ishii, T. and Kajii, K.: *Planta Med.*, **47**, 200-204 (1983)
- 4) Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *Planta Med.*, **48**, 83-87 (1983)
- 5) Yoshikawa, T. and Furuya, T.: *Plant. Cell Rep.*, **6**, 449-453 (1987)
- 6) Ko, K. S., Noguchi, H., Ebizuka, Y. and Sankawa, U.: *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 245-248 (1989)
- 7) Inomata, S., Yokoyama, M., Gozu, Y., Shimizu, T. and Yanagi, M.: *Plant Cell Rep.*, **12**, 681-686 (1993)
- 8) Yoshimatsu, K., Yamaguchi, H. and Shimomura, K.: *Plant Cell Rep.*, **15**, 555-560 (1996)
- 9) Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158 (1968)
- 10) Petit, A., David, C., Dahl, G.A., Ellis, J.G., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Tempé, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 204-214 (1983)
- 11) Murashige, T. and Skoog F.: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 12) Lloyd, G. and McCown, B.: *Intl. Plant Propag. Soc. Comb. Proc. for 1980 Vol. 30*, pp. 421-427 (1980)
- 13) White, P.R.: *The Cultivation of Animal and Plant Cell*, 2nd edition, Ronald Press, New York (1963)
- 14) Thomas, E. and Davey, M.R.: EMBO course on Ti plasmids, Lab. Genetics Riaks Universiteit, Gent, Belgium, p 109 (1982)
- 15) Furuya, T., Yoshikawa, T., Orihara, Y. and Oda, H.: *J. Nat. Prod.*, **47**, 70-75 (1984)
- 16) Odnevall, A. and Björk, L.: *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **185**, 403-413 (1989)
- 17) Furuya, T., Yoshikawa, T., Ushiyama, K. and Oda, H.: *Experientia*, **42**, 193-194 (1986)
- 18) Čelláková, E., Rychlová, M. and Vranová, E.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **30**, 165-170 (1992)
- 19) Odnevall, A. and Björk, L.: *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **185**, 253-259 (1989)

農作物中の17種有機塩素系農薬及び9種ピレスロイド系農薬の同時分析法の検討

根本 了*・忠田吉弘*・長尾影文*・佐々木久美子・豊田正武

Studies on Simultaneous Determination of 17 Organochlorine and 9 Pyrethroid Pesticides in Agricultural Products

Satoru Nemoto*, Yoshihiro Tyuda*, Akihumi Nagao*, Kumiko Sasaki, Masatake Toyoda

A method for simultaneous determination of 17 organochlorine and 9 pyrethroid pesticides in agricultural products by capillary GC with ECD detection was studied. The samples were extracted with acetone under acidic conditions followed by Florisil column clean-up and then injected into a GC-ECD. The organochlorine pesticides used in this study included unstable captan and captafol in the homogenized preparations of fruits and vegetables. Captan and captafol were also found to decompose in rice and wheat samples when the samples were allowed to stand after the addition of water. Addition of phosphoric acid to the samples was effective in preventing the decomposition of captan and captafol. Recovery of the pesticides investigated in this study was not decreased by the addition of phosphoric acid. Addition of phosphoric acid was also effective in removing interfering substances from onion extract.

Recovery of organochlorine and pyrethroid pesticides from samples spiked at levels of 0.05-0.25 ppm by the proposed method was 51.4-100.8% for rice and wheat and 60.1-119.0% for vegetables.

Keywords: pesticide, organochlorine, pyrethroid, Florisil column, agricultural product

緒 言

有機塩素系農薬とピレスロイド系農薬はともに電子捕獲型検出器 (ECD) に感度を有するが、告示分析法ではこれらは別々に分析されており、また、ECD を用いてこれらの同時分析を試みた報告は少ない¹⁾。そこで、フロリジルカラムによるクリーンアップ過程において、これらを系統的に溶出して同時に分析する方法について検討した。今回検討した有機塩素系農薬のうちキャプタン及びカプタホールは、試料をホモジナイズするときあるいは GC 測定時に分解することが指摘されている²⁻⁴⁾。試料をホモジナイズする際のキャプタン及びカプタホールの分解は試料の pH を酸性にすることで防ぐことができるとされている^{2,3)}ので、抽出操作の際にリン酸を添加することにより分解を抑える方法について検討するとともに、リン酸酸性条件下で抽出した場合の他の有機塩素系農薬及びピレスロイド系農薬に対する影響について検討した。

実験方法

1. 試料

米 (玄米)、小麦、きゅうり、キャベツ、だいこん (根) 及びたまねぎを用いた。

2. 試薬及び試液

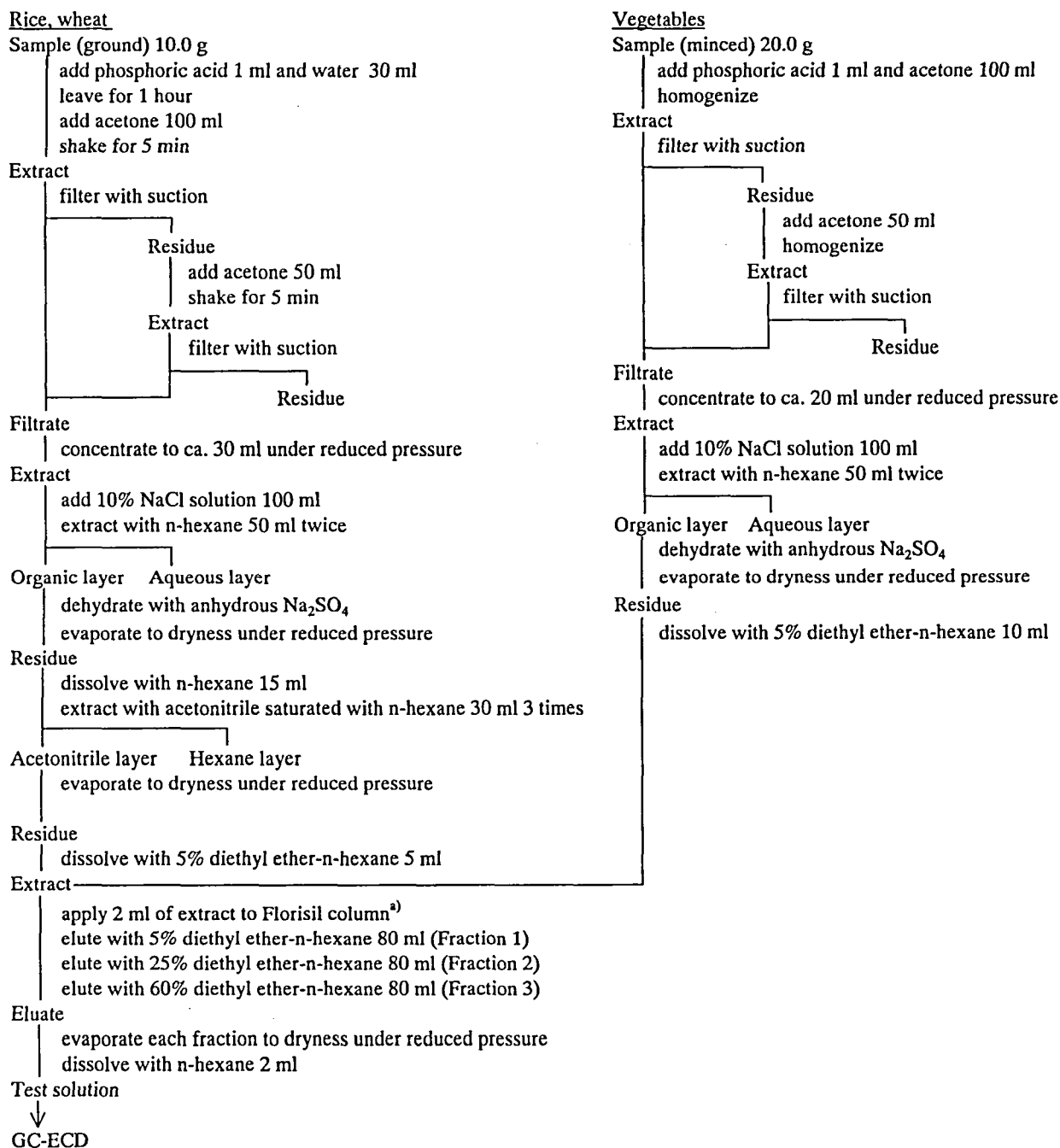
各農薬標準品: α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, p,p' -DDD, p,p' -DDE, p,p' -DDT, o,p' -DDT, アルドリン, エンドリン, カプタホール, キャプタン, クロルベンジレート, ジコホール, ディルドリン, ヘプタクロル, ヘプタクロルエポキシサイド, シハロトリン, シフルトリン, シベルメトリン, デルタメトリン, トラロメトリン, フェンバレレート, フルシトリネート, フルバリネート, バルメトリンは、林純薬工業 (株)、リーデル・デ・ヘーン社及び和光純薬工業 (株) 製の残留農薬試験用標準試薬を用いた。

各農薬標準原液: 各農薬標準品を n-ヘキサン (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ヘキサンで希釈して) 1 mg/ml の濃度に調製し冷凍庫 (-20°C) に保存した。

標準混合溶液 A: α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, p,p' -DDD, p,p' -DDE, p,p' -DDT, o,p' -DDT, アルドリン, カプタホール, キャプタン, ディルドリン, ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシサイドが各々 10 μ g/ml の濃度に、

* 農林水産省東京農林水産消費技術センター

To whom correspondence should be addressed: Satoru Nemoto; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: nemoto@nihs.go.jp



Scheme 1. Schematic diagram for determination of organochlorine and pyrethroid pesticides

a) Five g of activated Florisil was used.

またクロルベンジレート、シハロトリン、シフルトリン、デルタメトリン、フェンバレート、フルシトリネート、フルバリネート及びベルメトリンが各々50 μ g/mlの濃度になるように各農薬標準原液をとり、ヘキサンの希釈し冷凍庫に保存した。

標準混合溶液 B: エンドリンが10 μ g/mlの濃度に、またジコホール、シベルメトリン及びトラロメトリンが各々50 μ g/mlの濃度になるように各農薬標準原液をとり、ヘキサンの希釈し冷凍庫に保存した。なお、ジコホールはアセト

ン溶液中では不安定であり、また、アセトン溶液でGCに注入した場合、4,4'-ジクロロベンゾフェノン (DCBP) に分解する⁵⁾ため農薬標準原液及び標準混合溶液の調製の際にはアセトンは使用せずヘキサンを使用した。

各種有機溶媒: アセトン、ヘキサン、アセトニトリル及びジエチルエーテルは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。

セライト: 和光純薬工業(株)製のセライト545を用いた。
 シラン処理試薬: 注入口ライナー及び石英ウールのシラ

ン処理には Surfa-Sil (Pierce Chemical 社製) を用いた。

フロリジル：和光純薬工業(株)製のフロリジル PR (残留農薬分析用) を 130℃ で一夜活性化しデシケーター内で放冷後使用した。

その他：無水硫酸ナトリウムは和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用試薬を、また塩化ナトリウム及びリン酸は同社製の試薬特級を用いた。

3. 装置

フロリジカラム：フロリジル 5 g を内径 15 mm、長さ 300 mm のコック付きガラスカラムにヘキサンで湿式充てんし、無水硫酸ナトリウム 5 g を積層した。

減圧濃縮器：ロータリーエバポレーター

粉碎機：日本精機製作所製遠心粉碎機 (米及び小麦の粉碎には孔径が 0.25 mm のメッシュスクリーンを用いた。)

ホモジナイザー：Biotrona 社製バイオトロン

ECD 付きガスクロマトグラフ (GC-ECD)：(株)島津製作所製の GC-14A を用いた。また、注入はオートインジェクター AOC-14 で行い、データ処理にはクロマトパック C-R4A を使用した。注入ライナーはシラン処理をし、内部にシラン処理した石英ウールを少量詰めたものを使用した。

4. 分析操作法

分析法の概略を Scheme 1 に示した。

4.1 試験溶液の調製

(1) 抽出操作

A) 米, 小麦

粉碎した試料 10.0 g にリン酸 1 ml 及び水 30 ml を加え、全体に水をよくなじませてから 1 時間放置した後、アセトン 100 ml を加え 5 分間振とう抽出した。抽出液をセライトを敷いた吸引ろ過器でろ過後、ろ過盤上の残留物を採りアセトン 50 ml を用いて同様の操作を繰り返した。両アセトン抽出液を合わせ、40℃ 以下で約 30 ml になるまでアセトンを減圧留去した。得られた濃縮液をあらかじめ 10% 塩化ナトリウム溶液 100 ml を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 ml で 2 回振とう抽出した。ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、40℃ 以下でヘキサンを減圧留去した。残留物をヘキサン 15 ml で溶解しこれを分液漏斗に移し、ヘキサン飽和アセトニトリル 30 ml で 3 回振とう抽出した。アセトニトリル層を合わせ 40℃ 以下でアセトニトリルを減圧留去した。この残留物に 5% ジエチルエーテル含有ヘキサン (E/H) 5 ml を加えて溶解し抽出液とした。

B) 野菜 (きゅうり, キャベツ, だいこん, たまねぎ)

細切均一化した試料 20.0 g にリン酸 1 ml 及びアセトン 100 ml を加えホモジナイズした後、セライトを敷いた吸引ろ過器でろ過した。ろ過盤上の残留物を採り、アセトン 50 ml を用いて同様の操作を繰り返した。両アセトン抽出液を合わせ、40℃ 以下で約 20 ml になるまでアセトンを減圧留去した。得られた濃縮液をあらかじめ 10% 塩化ナトリウム

溶液 100 ml を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 ml で 2 回振とう抽出した。ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、40℃ 以下でヘキサンを減圧留去した。この残留物に 5% E/H 10 ml を加えて溶解し抽出液とした。

(2) フロリジカラムによるクリーンアップ

抽出操作で得られた抽出液 2 ml (試料 4 g 相当) をフロリジカラムに注入した後、5% E/H 80 ml (Fraction 1)、25% E/H 80 ml (Fractoin 2) 及び 60% E/H 80 ml (Fraction 3) で順次溶出した。各画分は、40℃ 以下で溶媒を減圧留去し、ヘキサン 2 ml に定容したものを試験溶液とした。

4.2 GC-ECD による定量

試験溶液 1 µl を GC に注入し、得られたピーク面積による絶対検量線法により定量した。ピレスロイド系農薬は複数のピークを与えるものがあるが定量はその総和で行った。また、GC 条件は下記の通りである。

カラム：DB-1 (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 µm、J&W 社製)、カラムの注入口側にガードカラムとして内径 0.25 mm、長さ 1 m の不活性化処理をした溶融シリカチューブ (J&W 社製) を接続した。

カラム温度：50℃ (1 min) -25℃/min -175℃ -10℃/min -300℃ (4 min)

注入口温度：250℃

検出器温度：320℃

キャリアーガス：ヘリウム (1.9 kg/cm²)

メイクアップガス：窒素 (30 ml/min)

注入量：1 µl (スプリットレス)

結果及び考察

1. エンドリン及びジコホルの GC 注入における分解

Fig.1 にエンドリン及びジコホルのヘキサン溶液を GC に注入したときのガスクロマトグラムを示した。注入ライナーにシラン処理をしていないものを用いた場合には、エンドリンはエンドリンアルデヒド及びエンドリンケトンに分解し、また、ジコホルは DCBP に分解した。一方、シラン処理した注入ライナー及び石英ウールを用いた場合には分解物のピークはほとんど消失し、分解を抑えて測定することが可能であった。

試料の繰り返し注入により注入ライナーが汚れてくると、エンドリン及びジコホルの分解ピークが大きくなっていくが、これは注入ライナーを洗浄することにより回復することが可能であった。また、面積比から求めたエンドリン及びジコホルの分解率は、今回の検討では 10% 以内を目安とし、いずれかの農薬の分解率が 10% を越えた場合には、インサートを交換して測定を行った。なお、インサートが良好な状態での分解率は両農薬とも 5% 以内であった。このようにジコホルあるいはエンドリンの分解を指標にすることは、GC 測定の際の装置の状態の管理に有

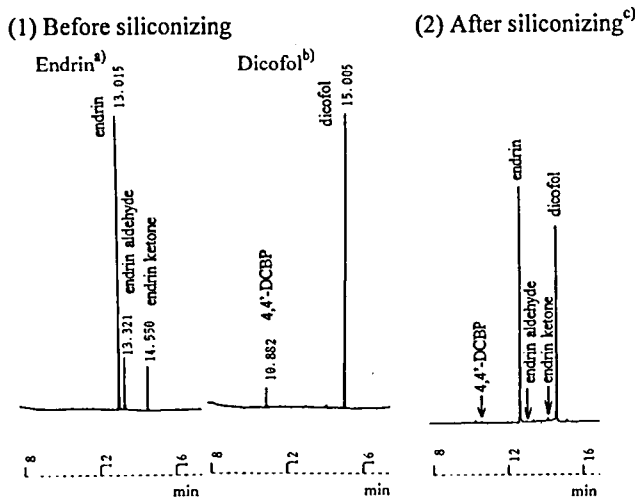


Fig.1. Gas chromatograms of endrin and dicofol by GC-ECD before and after siliconizing of GC injection liner
 a) Endrin (0.2 μ g/ml) in n-hexane was injected.
 b) Dicofol (0.8 μ g/ml) in n-hexane was injected.
 c) Mixture of endrin (0.1 μ g/ml) and dicofol (0.4 μ g/ml) in n-hexane was injected.
 4,4'-DCBP: 4,4'-dichlorobenzophenone

効な方法であると思われる。

2. GC-ECD 条件の検討

GC 条件について検討した結果、実験方法の項の4. 2 GC-ECD による定量で示した条件を設定した。Fig.2 に検討した農薬標準品のガスクロマトグラムを示した。GC 上で他の農薬と分離が困難であったシベルメトリン及び GC 中で分解しやすいエンドリン及びジコホル、更に GC 中で分解してデルタメトリンとなるトラロメトリンの4 農薬を標準混合溶液 B とし、他の農薬を標準混合溶液 A とした。また、クロルベンジレート、ジコホル及びピレスロイド系農薬は、ECD に対する感度が他の有機塩素系農薬よりも低かったことから5 倍濃度とした。なお、ピレスロイド系農薬は異性体があるため複数のピークを与えるものがあるが、これらの異性体のピークも含めた農薬の保持時間を Table 1 に示した。

3. 検量線

クロルベンジレート、ジコホル及びピレスロイド系農薬は 0.005-2.5 μ g/ml の範囲で、そのほかの有機塩素系農薬は 0.001-0.5 μ g/ml の範囲で、各農薬とも相関係数が 0.998 ~0.999 の良好な直線関係が得られた。また、各農薬の本法における定量限界値 (LOQ) を Table 1 に示したが、告示で示された定量限界値と同じか、それよりも低い値が得られた。

4. フロリジルカラムによるクリーンアップ条件の検討

佐藤らは有機塩素系農薬とピレスロイド系農薬の一斉分析法のクリーンアップに Sep-Pak アルミナ A と Sep-Pak フロリジルの連結カラムを用いているが、クロルベンジレ

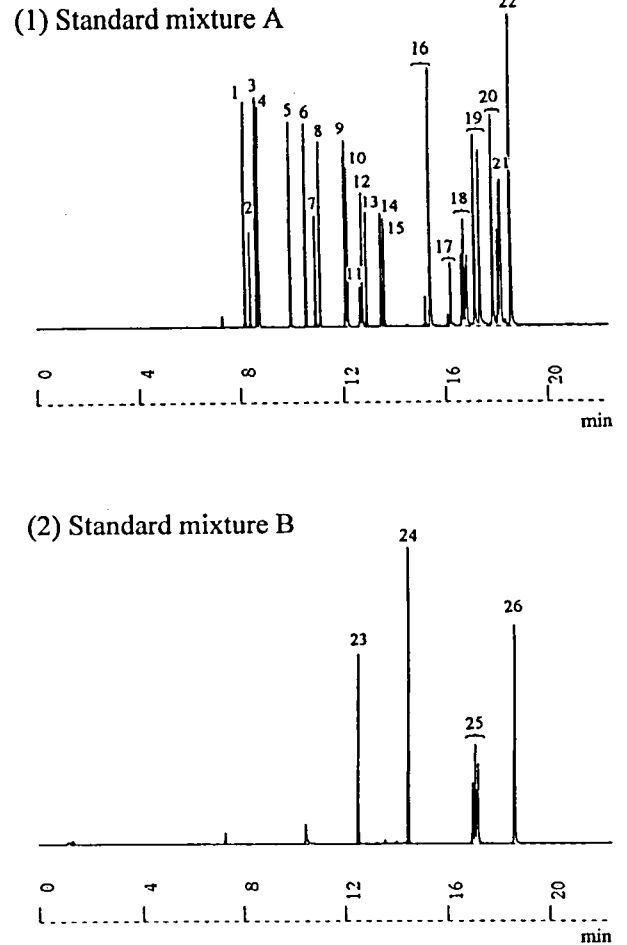


Fig.2. Gas chromatograms of standard mixture A and B by GC-ECD

1: α -BHC (0.2 ng); 2: β -BHC (0.2 ng); 3: γ -BHC (0.2 ng); 4: δ -BHC (0.2 ng); 5: heptachlor (0.2 ng); 6: aldrin (0.2 ng); 7: captan (0.2 ng); 8: heptachlor epoxide (0.2 ng); 9: *p,p'*-DDE (0.2 ng); 10: dieldrin (0.2 ng); 11: chlorobenzilate (1.0 ng); 12: *p,p'*-DDD (0.2 ng); 13: *o,p'*-DDT (0.2 ng); 14: *p,p'*-DDT (0.2 ng); 15: captafol (0.2 ng); 16: cyhalothrin (1.0 ng); 17: permethrin (1.0 ng); 18: cyfluthrin (1.0 ng); 19: flucythrinate (1.0 ng); 20: fenvalerate (1.0 ng); 21: fluvalinate (1.0 ng); 22: deltamethrin (1.0 ng); 23: endrin (0.2 ng); 24: dicofol (1.0 ng); 25: cypermethrin (1.0 ng); 26: tralomethrin (1.0 ng)

ートの回収率が著しく低く、その大部分はアルミナ A に吸着しているためとしている¹⁾。そこでアルミナを使用せずフロリジルのみでクリーンアップする方法を検討することとした。また、カートリッジカラムの使用も検討したが、カラム毎の活性のばらつきが大きく分画が不安定であったため、ガラスカラムを使用した。

また、ECD は試料由来の妨害物質の影響を受けやすく、検討したすべての農薬をフロリジルカラムから一度に溶出する条件では、農作物試料の場合妨害が多く測定が困難で

Table 1. Retention times (t_r) and limits of quantitation (LOQ) of 17 organochlorine and 9 pyrethroid pesticides using GC-ECD analysis

No.	Pesticide	t_r (min)	LOQ ^{a)} (ppm)	No.	Pesticide	t_r (min)	LOQ (ppm)
1	α -BHC	8.19	0.001	17	Permethrin ^{b)}	16.13	0.01
2	β -BHC	8.39	0.002			16.25 *	
3	γ -BHC	8.63	0.001	18	Cyfluthrin ^{c)}	16.69	0.01
4	δ -BHC	8.74	0.001			16.78	
5	Heptachlor	9.95	0.001			16.90 *	
6	Aldrin	10.56	0.001	19	Flucythrinate ^{b)}	17.21 *	0.005
7	Captan	10.94	0.003			17.40	
8	Heptachlor epoxide	11.13	0.001	20	Fenvalerate ^{b)}	17.91 *	0.005
9	<i>p,p'</i> -DDE	12.12	0.001			18.10	
10	Dieldrin	12.20	0.001	21	Fluvalinate	18.23	0.005
11	Chlorobenzilate	12.67	0.01	22	Deltamethrin	18.62	0.005
12	<i>p,p'</i> -DDD	12.77	0.001	23	Endrin	12.54	0.001
13	<i>o,p'</i> -DDT	12.93	0.002	24	Dicofol	14.52	0.005
14	<i>p,p'</i> -DDT	13.50	0.002	25	Cypermethrin ^{c)}	17.00	0.01
15	Captafol	13.61	0.003			17.09	
16	Cyhalothrin ^{b)}	15.23	0.005			17.21 *	
		15.43 *		26	Tralomethrin	18.62	0.008

a) LOQs were calculated from the concentration that gave $s/n = 10$.

b) Two peaks were observed and the LOQs were calculated using main peak.

c) Three peaks were observed and the LOQs were calculated using main peak.

* Main peak.

あったため、いくつかの画分に分けて溶出する方法について検討した。溶出溶媒について検討した結果、酢酸エチル-ヘキサン系を用いた場合には、クロルベンジレートが低回収率になり、また溶出位置が不安定であった。一方、ジエチルエーテル-ヘキサン系を用いた場合には、良好に溶出されることがわかった。Table 2 には各農薬の溶出パターンを示したが、5% E/H で有機塩素系農薬 14 種及びペルメトリンが溶出され、次に 25% E/H でペルメトリンを除く 8 種のピレスロイド系農薬が溶出され、最後に 60% E/H でクロルベンジレート、キャプタン及びカプタホールが溶出された。また、当初フロリジル 10 g を用いて検討したが、1 画分あたり溶出に 150~200 ml 必要であった。そこで有機溶媒の使用量をできる限り抑えるためにフロリジル量を 5 g にして検討した結果、使用する溶媒量を約半分の 80 ml に減らすことができた。実際の試料のクリーンアップに当たっては、カラムへの負荷量を減らしクリーンアップ効果を高めるために、全量ではなく試料 4 g 相当量の抽出液を用いることとした。担体量が 5 g でも今回検討した農作物については、十分なクリーンアップ効果が得られた。

5. 抽出条件の検討

キャプタン及びカプタホールは試料をホモジナイズするとき植物成分により分解することが知られている²³⁾。また、ある種の食品成分が最終試験溶液中に残留すると GC 測定

時に分解するとする報告もある⁴⁾。これらの農薬の分解は SH 基を持つ化合物との反応による非酵素的なものといわれており、また塩酸やリン酸の添加により試料の pH を酸性に保つことにより分解を防ぐことができるとされている²³⁾。そこで、ホモジナイズ中にカプタホールが分解することが報告されている²⁾キャベツ、だいこん、きゅうり及びたまねぎに加え、米及び小麦を用いて Scheme 1 に示した方法で添加回収実験を行い、リン酸添加の影響について検討した。

Table 3 にはリン酸の添加量とキャプタン及びカプタホールの回収率の関係を農作物毎に調べた結果を示した。リン酸を添加しない場合にはたまねぎでのキャプタンを除き検討したいずれの農作物でも 70% 未満の低い回収率となり、特にキャベツでは全く回収されなかった。また、今回の検討で、これまでに報告があった果実・野菜以外に米及び小麦でもキャプタン及びカプタホールが分解することがわかった。これに対して、リン酸を 1, 3 及び 5 ml 添加した場合には、米及びキャベツで回収率が 50~60% 台のものがあつたものの、だいこん、きゅうり及びたまねぎでは 80% 以上の回収率となりいずれの農作物でも大幅な改善が見られた。また、リン酸の添加量については 1 ml で十分であり、このときの試料ホモジネートの pH は 1~2 であつた。この結果から、キャプタン及びカプタホールの分解を抑え

Table 2. Recoveries of 17 organochlorine and 9 pyrethroid pesticides from Florisil column ^{a)}

No.	Pesticide	Recovery (%), n=2		
		Fraction 1 ^{b)}	Fraction 2 ^{c)}	Fraction 3 ^{d)}
1	α-BHC	95.3		
2	β-BHC	94.5		
3	γ-BHC	94.3		
4	δ-BHC	91.4		
5	Heptachlor	93.6		
6	Aldrin	94.2		
7	Captan			88.9
8	Heptachlor epoxide	95.5		
9	p,p'-DDE	93.1		
10	Dieldrin	92.8		
11	Chlorobenzilate			88.1
12	p,p'-DDD	97.1		
13	o,p'-DDT	92.9		
14	p,p'-DDT	93.7		
15	Captafol			86.8
16	Cyhalothrin		83.0	
17	Permethrin	94.0		
18	Cyfluthrin		82.1	
19	Flucythrinate		87.8	
20	Fenvalerate		90.0	
21	Fluvalinate		85.9	
22	Deltamethrin		83.5	
23	Endrin	98.4		
24	Dicofol	95.3		
25	Cypermethrin		98.1	
26	Tralomethrin		97.1	

a) Five g of activated Florisil was used.

b) Fraction 1: eluted with 5% diethyl ether-n-hexane 80 ml.

c) Fraction 2: eluted with 25% diethyl ether-n-hexane 80 ml.

d) Fraction 3: eluted with 60% diethyl ether-n-hexane 80 ml.

るには、リン酸 1 ml を添加してから抽出を行う方法が有効であることが確認された。なお米の場合、水を加えて放置後アセトン抽出する直前にリン酸を加えたのではキャプタン及びカプタホルの分解を防止する効果は見られなかったため、先にリン酸と水を加えて試料を酸性状態にしてから放置後アセトン抽出した。小麦も米と同様に処理した。

6. たまねぎの分析

長南は ECD を用いた測定の際に、たまねぎを凍結してからリン酸溶液中でホモジナイズする方法を提案している

⁶⁾が、今回は凍結せずにリン酸の添加のみでホモジナイズする方法について検討した。たまねぎを Scheme 1 に従い、リン酸を加えない場合と加えた場合とで試験溶液を調製し、得られたガスクロマトグラムを Fig. 3 に示した。リン酸未添加の場合には、Fig. 3 (A) に示したようにいずれのフラクションにも多くの妨害ピークが認められ、特に保持時間の短い有機塩素系農薬の定量が妨害された。一方、リン酸を添加した場合には、Fig. 3 (B) に示したように妨害ピークは大幅に減少し問題なく定量可能であった。今回の検討では凍結をしなくても測定が可能であり、凍結処理に要する時間を短縮することができた。

以上の結果から、抽出時のリン酸の添加は、キャプタン及びカプタホルの分解を抑制するとともに、たまねぎの妨害成分の低減効果があることが示された。そこで次にリン酸添加及び未添加で添加回収実験を行い、今回検討したキャプタン及びカプタホル以外の農薬に対するリン酸の影響を検討した。

7. 添加回収実験

Scheme 1 に従い、リン酸添加及び未添加で添加回収実験を行った。Table 4-1 には米及び小麦の結果を示したが、リン酸を添加しない場合には、キャプタン及びカプタホルの分解がみられたため、回収率は 31.6~103.0% で RSD も 0.8~26% と幅がみられた。一方、リン酸を添加した場合には、米でアルドリン、キャプタン及びカプタホルが、小麦でアルドリン、p,p'-DDE、ヘプタクロル及びトラロメトリンの回収率が 51.4~67.7% とやや低回収率であった以外は 70.3~100.8% の良好な回収率が得られ、RSD も 0.5~7.7% と精度の良い結果が得られた。

Table 4-2 には、キャベツ、だいこん、きゅうり及びたまねぎの添加回収実験の結果を示した。リン酸を添加しなかった場合には、キャベツでキャプタン及びカプタホルが全く回収されなかったほか、たまねぎで δ-BHC が妨害ピークと重なったため、ND~130.9% の回収率となった。また、RSD も 0.3~32% とかなりばらつきがみられた。これに対して、リン酸を添加した場合には、キャベツでキャプタンの回収率が 60.1% であった以外は 70.2~119.0% の良好

Table 3. Effect of addition of phosphoric acid to the samples on the recoveries of captafol and captan ^{a)}

Volume of H ₃ PO ₄ added to the sample	Recovery (%), n=2 or 3											
	Captan						Captafol					
	Rice	Wheat	Cabbage	Radish	Cucumber	Onion	Rice	Wheat	Cabbage	Radish	Cucumber	Onion
0 ml	34.3	32.8	ND ^{b)}	22.5	66.1	72.4	31.6	49.5	ND	30.3	62.0	58.1
1 ml	63.0	76.1	58.7	88.5	92.3	85.7	54.0	71.4	67.5	93.6	81.0	81.0
3 ml	68.9	— ^{c)}	59.9	98.4	96.7	87.5	61.1	—	73.3	98.7	84.1	79.8
5 ml	66.4	—	61.6	85.1	94.2	87.6	58.6	—	69.9	86.8	83.4	83.2

a) Spiking level of each pesticide was 0.05 ppm.

b) ND: not detected.

c) —: not studied.

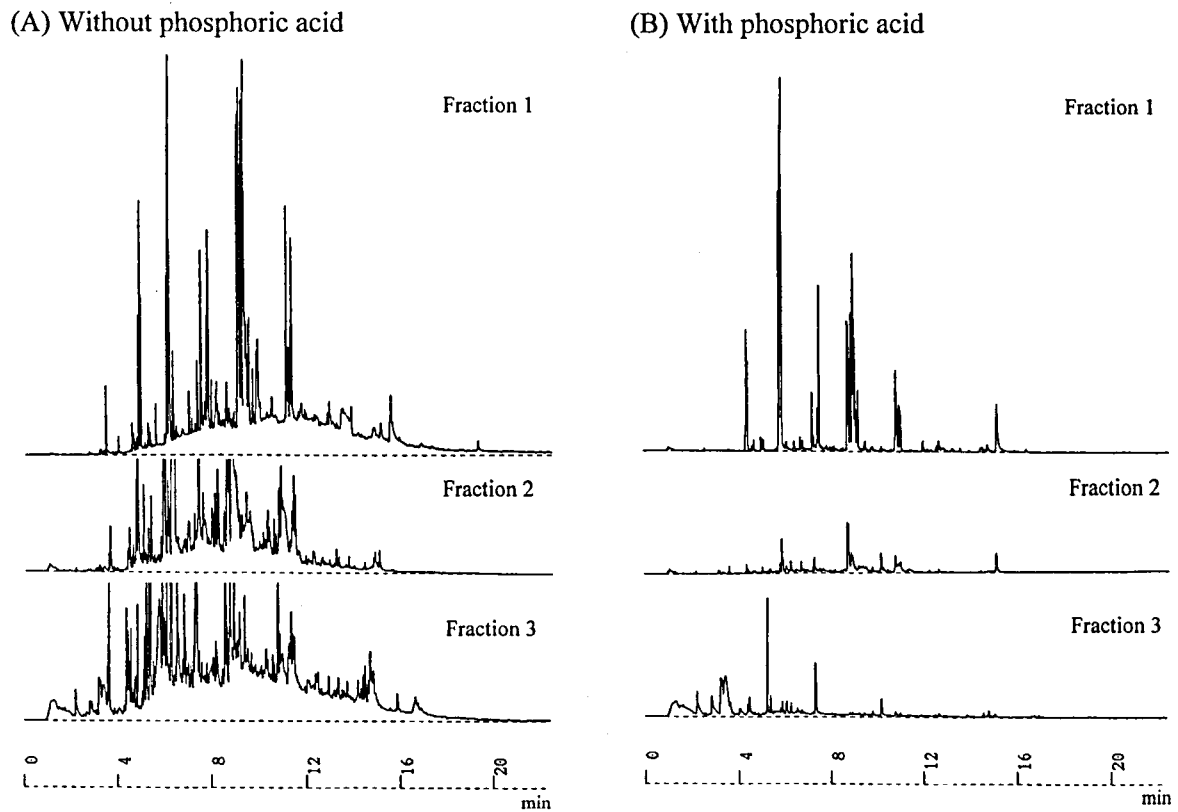


Fig.3. Gas chromatograms of onion extracts with or without phosphoric acid treatment determined by GC-ECD

Table 4-1. Recoveries of 17 organochlorine and 9 pyrethroid pesticides from spiked samples with or without phosphoric acid (n=3)

No.	Pesticide	Spiking level (ppm)	Recovery (%), Mean (RSD ^b)			
			Rice		Wheat	
			- H ₃ PO ₄ ^{b)}	+ H ₃ PO ₄ ^{c)}	- H ₃ PO ₄	+ H ₃ PO ₄
1	α-BHC	0.05	86.4 (6.1)	83.0 (2.7)	87.2 (6.5)	79.9 (4.1)
2	β-BHC	0.05	85.2 (3.1)	87.2 (1.9)	88.7 (5.2)	83.3 (2.7)
3	γ-BHC	0.05	87.5 (5.0)	84.7 (2.4)	87.9 (6.2)	81.8 (4.0)
4	δ-BHC	0.05	83.8 (1.2)	85.6 (2.4)	87.9 (6.4)	79.0 (2.2)
5	Heptachlor	0.05	75.1 (7.3)	70.3 (1.7)	71.0 (6.9)	67.7 (6.6)
6	Aldrin	0.05	64.0 (14)	54.0 (0.5)	54.0 (8.0)	51.4 (4.5)
7	Captan	0.05	34.3 (16)	66.1 (4.5)	32.8 (26)	76.1 (6.9)
8	Heptachlor epoxide	0.05	85.8 (1.5)	85.7 (1.5)	88.5 (5.8)	83.0 (3.9)
9	p,p'-DDE	0.05	73.6 (4.2)	70.6 (0.9)	72.3 (6.8)	67.3 (5.2)
10	Dieldrin	0.05	88.9 (7.1)	83.9 (2.4)	86.0 (5.1)	79.4 (3.9)
11	Chlorobenzilate	0.25	91.5 (7.3)	92.5 (2.6)	98.7 (6.7)	93.1 (2.8)
12	p,p'-DDD	0.05	86.0 (5.8)	84.5 (2.0)	88.7 (5.9)	90.6 (3.3)
13	o,p'-DDT	0.05	83.2 (7.2)	77.2 (1.0)	79.8 (6.5)	73.7 (4.2)
14	p,p'-DDT	0.05	94.7 (6.9)	91.4 (5.7)	91.2 (11)	79.6 (1.9)
15	Captafol	0.05	31.6 (12)	57.9 (6.2)	49.5 (18)	71.4 (4.1)
16	Cyhalothrin	0.25	85.6 (0.8)	86.7 (1.1)	87.8 (6.5)	93.2 (7.0)
17	Permethrin	0.25	88.3 (4.1)	91.2 (4.8)	90.6 (6.2)	95.3 (2.2)
18	Cyfluthrin	0.25	85.8 (4.5)	86.7 (0.6)	90.3 (6.9)	100.8 (6.3)
19	Flucythrinate	0.25	89.5 (3.8)	88.4 (1.1)	93.5 (7.8)	97.2 (6.3)
20	Fenvalerate	0.25	88.6 (6.5)	91.4 (1.3)	91.4 (6.4)	94.0 (6.5)
21	Fluvalinate	0.25	85.8 (7.3)	80.6 (3.3)	88.3 (6.4)	88.6 (7.7)
22	Deltamethrin	0.25	88.9 (7.8)	88.9 (1.5)	89.0 (3.1)	78.8 (5.7)
23	Endrin	0.05	94.4 (1.4)	85.8 (3.7)	103.0 (3.1)	88.6 (2.8)
24	Dicofol	0.25	92.2 (3.4)	85.9 (2.8)	89.2 (3.2)	81.0 (7.2)
25	Cypermethrin	0.25	96.3 (6.2)	90.6 (2.2)	101.3 (4.3)	94.0 (4.3)
26	Tralomethrin	0.25	- ^{d)}	88.3 (2.8)	-	56.8 (4.7)

a) RSD: relative standard deviation.
 b) - H₃PO₄: without phosphoric acid.
 c) + H₃PO₄: with phosphoric acid.
 d) -: not studied.

な回収率が得られ、RSD 値も 0.2~7.7%と精度の良い結果が得られた。

Table 4-1 及び 4-2 の結果から、今回検討した農薬については、リン酸を添加したことによる回収率の減少などの影響は認められなかった。このことから、抽出操作時にリン酸を添加することによりキャプタン及びカプタホールを含む有機塩素系農薬及びピレスロイド系農薬を同時に分析することが可能であると思われる。

また、今回検討した農作物では、リン酸添加によるクロマトグラムへの悪影響も見られず、いずれも妨害を受けずに測定可能であった。むしろ、たまねぎではリン酸添加により妨害ピークの減少が認められた。

今回の検討では、ECD が妨害物質の影響を受けやすいため、フロリジルカラムからの溶出液を3つの画分に分けたが、農作物によっては画分を合わせて一回の注入で、検討した全ての農薬を妨害を受けずに測定することが可能であった。ただし、トラロメトリンはGCで分解してデルタメトリンとなり、フロリジルカラムでの挙動も同じであったことから、いずれにしても両者を区別することはできなかった。

今回、ホモジナイズ中に分解しやすいキャプタン及びカプタホールを含む有機塩素系農薬とピレスロイド系農薬の

Table 4-2. Recoveries of 17 organochlorine and 9 pyrethroid pesticides from spiked samples with or without phosphoric acid (n=3)

No.	Pesticide	Spiking level (ppm)	Recovery (%), Mean (RSD ^a)							
			Cabbage		Radish		Cucumber		Onion	
			- H ₃ PO ₄ ^b	+ H ₃ PO ₄ ^c	- H ₃ PO ₄	+ H ₃ PO ₄	- H ₃ PO ₄	+ H ₃ PO ₄	- H ₃ PO ₄	+ H ₃ PO ₄
1	α-BHC	0.05	89.1 (2.8)	94.6 (3.8)	98.9 (0.3)	99.6 (2.9)	95.2 (2.8)	96.4 (0.2)	90.0 (0.4)	101.3 (2.8)
2	β-BHC	0.05	91.4 (2.3)	89.4 (2.2)	96.8 (0.8)	98.6 (1.2)	88.7 (2.0)	92.3 (1.8)	124.3 (19) ^d	96.9 (2.2)
3	γ-BHC	0.05	90.7 (2.4)	94.0 (3.1)	95.6 (0.3)	97.6 (2.0)	94.4 (2.6)	95.3 (1.5)	106.7 (2.6)	97.2 (2.5)
4	δ-BHC	0.05	91.9 (6.3)	97.9 (2.4)	91.8 (2.0)	91.6 (5.7)	94.2 (1.7)	94.7 (2.0)	130.9 (32) ^d	115.2 (2.0)
5	Heptachlor	0.05	80.6 (3.4)	91.0 (4.6)	88.9 (6.2)	88.0 (7.7)	92.9 (1.9)	92.9 (0.8)	108.0 (5.8)	92.5 (6.1)
6	Aldrin	0.05	84.8 (2.2)	90.0 (4.2)	87.0 (5.9)	87.9 (5.8)	92.5 (1.6)	93.6 (1.2)	93.0 (3.2)	92.1 (5.2)
7	Captan	0.05	ND ^d	60.1 (2.4)	22.5 (35)	90.7 (7.6)	66.1 (10)	98.0 (4.7)	72.4 (14)	86.9 (1.2)
8	Heptachlor epoxide	0.05	89.5 (2.1)	93.4 (3.1)	98.5 (0.7)	99.0 (2.3)	96.6 (2.1)	97.0 (1.2)	87.4 (6.4)	99.5 (2.5)
9	p,p'-DDE	0.05	89.9 (1.0)	96.2 (2.2)	95.7 (0.3)	96.3 (0.9)	97.6 (2.4)	96.3 (1.3)	106.0 (0.4)	95.0 (1.8)
10	Dieldrin	0.05	87.8 (4.7)	93.0 (1.4)	99.6 (2.8)	101.3 (2.0)	96.8 (0.8)	97.3 (1.8)	92.9 (1.7)	103.5 (2.1)
11	Chlorobenzilate	0.25	79.9 (3.6)	84.3 (5.1)	102.8 (1.1)	101.8 (0.5)	91.6 (2.2)	96.7 (4.8)	117.1 (7.4)	102.9 (1.2)
12	p,p'-DDD	0.05	91.0 (2.3)	92.6 (2.1)	94.7 (1.3)	95.0 (0.5)	94.4 (2.6)	94.9 (1.8)	116.1 (4.4)	95.6 (1.9)
13	o,p'-DDT	0.05	89.3 (1.7)	93.8 (2.6)	96.7 (0.8)	97.0 (0.4)	97.5 (0.5)	95.9 (1.1)	102.1 (1.4)	98.3 (2.1)
14	p,p'-DDT	0.05	87.7 (1.0)	96.1 (2.5)	96.0 (0.9)	94.6 (0.7)	104.3 (8.3)	94.9 (0.7)	107.8 (4.4)	95.9 (1.2)
15	Captafol	0.05	ND	70.2 (4.1)	30.3 (55)	93.0 (6.4)	62.0 (2.2)	87.1 (6.8)	58.1 (20)	81.3 (2.1)
16	Cyhalothrin	0.25	88.2 (7.3)	92.9 (3.2)	92.7 (4.2)	98.1 (3.8)	91.1 (9.2)	90.0 (1.6)	93.9 (3.1)	94.7 (3.5)
17	Permethrin	0.25	84.9 (7.2)	94.6 (3.5)	102.1 (0.5)	104.7 (1.0)	102.7 (6.5)	105.0 (4.0)	104.1 (1.8)	98.7 (3.2)
18	Cyfluthrin	0.25	83.2 (8.0)	92.8 (2.7)	95.3 (5.2)	101.0 (4.8)	89.4 (13)	86.1 (0.8)	93.0 (2.2)	96.3 (4.7)
19	Flucythrinate	0.25	87.4 (4.5)	96.8 (4.2)	95.7 (4.7)	102.6 (3.6)	89.3 (11)	86.4 (2.0)	89.6 (1.4)	99.4 (2.8)
20	Fenvalerate	0.25	91.0 (7.1)	97.5 (3.4)	95.3 (5.1)	102.7 (3.5)	91.2 (10)	87.8 (1.9)	95.9 (1.1)	96.2 (3.2)
21	Fluvalinate	0.25	88.3 (6.5)	94.8 (1.8)	95.3 (3.9)	101.4 (3.8)	90.9 (9.8)	86.7 (1.9)	90.4 (0.3)	94.8 (4.7)
22	Deltamethrin	0.25	94.1 (8.0)	98.4 (4.9)	94.9 (7.1)	104.0 (3.9)	91.8 (5.5)	91.3 (3.6)	97.9 (1.0)	93.5 (5.0)
23	Endrin	0.05	- ^e	100.4 (0.4)	-	108.1 (4.2)	-	99.5 (3.4)	-	94.2 (2.1)
24	Dicofol	0.25	-	95.9 (2.2)	-	98.5 (5.3)	-	91.5 (4.8)	-	97.8 (1.9)
25	Cypermethrin	0.25	-	97.1 (1.3)	-	107.3 (2.5)	-	93.9 (3.2)	-	97.7 (3.3)
26	Tralomethrin	0.25	-	102.1 (2.3)	-	110.3 (3.2)	-	119.0 (4.5)	-	110.7 (6.9)

a) RSD: relative standard deviation.

b) - H₃PO₄: without phosphoric acid.c) + H₃PO₄: with phosphoric acid.

d) ND: not detected.

e) -: not studied.

f) Interfering peak was overlapped.

同時分析の検討において良好な結果が得られたことは、分析の迅速化の意味で有意義であると思われる。

まとめ

1. 有機塩素系 17 農薬 (α-BHC, β-BHC, γ-BHC, δ-BHC, p,p'-DDD, p,p'-DDE, p,p'-DDT, o,p'-DDT, アルドリン, エンドリン, カプタホル, キャプタン, クロルベンジレート, ジコホール, ディルドリン, ヘブタクロール, ヘブタクロールエポキシド) 及びピレスロイド系 9 農薬 (シハロトリン, シフルトリン, シベルメトリン, デルタメトリン, トラロメトリン, フェンバレレート, フルシトリネート, フルバリネート, ベルメトリン) の合計 26 農薬について、リン酸酸性条件下で抽出操作を行い、フロリジルカラムでクリーンアップ後、GC-ECD で高感度で測定する同時分析法を設定した。
2. 注入口ライナーをシラン処理することにより GC 注入時におけるジコホール及びエンドリンの分解を抑えることができた。また、両農薬は GC 装置の状態管理の指標として有効であった。
3. ホモジナイズ時にキャプタン及びカプタホルが分解す

る農作物を試験する場合には、リン酸を添加して液性を酸性にする方法が分解を防止するのに有効であることが確認された。また、今回検討した農薬については、いずれもリン酸の添加による回収率の減少は見られなかった。

4. リン酸を添加してホモジナイズする方法は、たまねぎ抽出液中の妨害物質を除くのに効果的であった。

文献

- 1) 佐藤通子, 菅原正明, 渡部津子, 菊池正行, 三島靖子, 加藤丈夫, 小場正彦: 食衛試, 35, 390-396 (1994)
- 2) 奴田原誠克, 山本公昭: 日本農薬学会誌, 3, 101-107 (1978)
- 3) 後藤真康, 加藤誠哉: 残留農薬分析法, ソフトサイエンス社, 東京, 1989, pp11-14
- 4) 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 松木宏晃, 伊藤誉志男: 衛生化学, 38, 270-281 (1992)
- 5) 根本了, 高附巧, 佐々木久美子, 豊田正武: 国立衛研報, 115, 86-92 (1997)
- 6) 長南隆夫: 食衛試, 34, 532-534 (1993)

抗酸化物質の作用機構解明への化学計算の利用

栗原正明*・近藤一成・福原 潔・豊田正武・宮田直樹

Computational Study on Antioxidation Mechanisms of Catechins.

Masaaki Kurihara[#], Kazunari Kondo, Kiyoshi Fukuhara, Masatake Toyoda and Naoki Miyata

All C-H and O-H bond dissociation enthalpies (BDE's) in catechins ((-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin) were calculated by semi-empirical molecular orbital calculation using the SPARTAN program. The BDE's of benzyl hydrogens (C-2 position in catechins) were found to be quite low. This suggests that abstraction of benzyl hydrogen is a crucial step for antioxidative activity. This is corroborated by the reported results of LC/MS and spectrophotometric analysis of reaction intermediates from catechins treated with AAPH.

Keywords: semi-empirical molecular orbital calculation, bond dissociation enthalpy, antioxidant, catechin

はじめに

フラボノイドに代表されるポリフェノール類は植物界に広く分布している。その中で茶 (*Camellia sinensis*) に含まれるカテキン類は、発がん抑制¹⁾、抗アレルギー作用²⁾など数多くの生物活性が報告されて注目されている。その作用は主にカテキンの抗酸化作用に基づくものと考えられている。この抗酸化作用は、抗酸化物質が酸素ラジカルを一電

子還元し消去することにより発揮される。通常、抗酸化物質のフェノール性水酸基が反応部位となる。したがって、フェノール性水酸基の数が多く、高い電子還元能を有するものが優れた抗酸化物質であると考えられてきた。しかしながら、この考え方は、カテキンには当てはまらないことがわかってきた。実際、カテキンの一成分である (-)-epicatechin はフラボノイドの quercetin より還元能が低いにも関わらず、その抗酸化作用はより強く、より長く持続する。これは、カテキンの場合には抗酸化作用に関わる反応部位がフェノール性水酸基以外にも存在することを示唆している。これまで抗酸化作用に関する数多くの報告が存在するものの、その作用機構、反応機構に関する報告はほとんどなく、唯一カテコール部分が反応して自身は α -キノンとなると推測されているのみである。(Fig. 2) ポリフェノール類の生物活性発現にはその酸化体も関与していることが十分考えられる。したがって、種々の生物活性機構を理解するうえで抗酸化作用機構を明らかにすることは不可欠である。今回、複雑なカテキン類のラジカル消去のメカニズムを明らかにするため、(-)-epicatechin と (-)-epigallocatechin について化学計算を用いることを検討した。

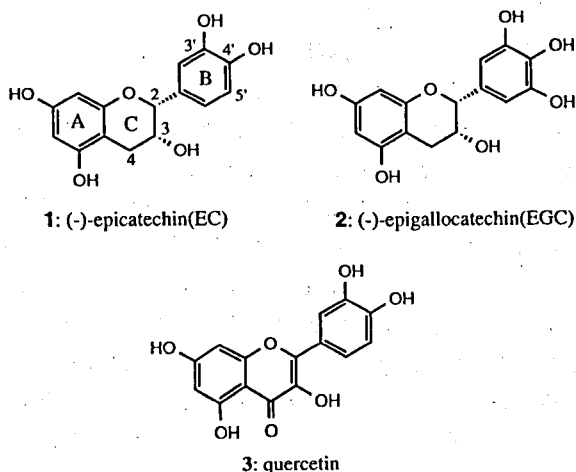


Fig.1

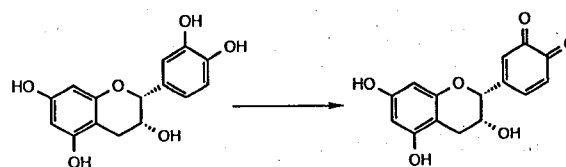


Fig.2

[#]To whom correspondence should be addressed: Masaaki Kurihara; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.224; Fax: 03-3707-6950; E-mail: masaaki@nihs.go.jp

計算方法

カテキン類の(-)-epicatechin 1, (-)-epigallocatechin 2の全てのC-H, O-HのBond Dissociation Enthalpy (BDE)³⁾を求めた (Fig. 3). 計算方法の手順を Fig. 4 に示した.

最初に, 分子力学計算 (Molecular Mechanics) による化合物のコンフォメーション解析 (Conformational Search) を行い, 最安定構造 (Global Minimum) を求めた. Fig. 5 に 1 および 2 の最安定コンフォマーの三次元構造を示した. その構造を初期構造とし, 半経験的分子軌道法 (Semi-empirical Molecular Orbital Calculation) により生成熱 (Heat of Formation) を求めた. その際, 水酸基から水素ラジカルを除いたラジカル種の場合, 隣接する水酸基の向きによりエネルギーが異なる場合があるので隣接する水酸基を回転

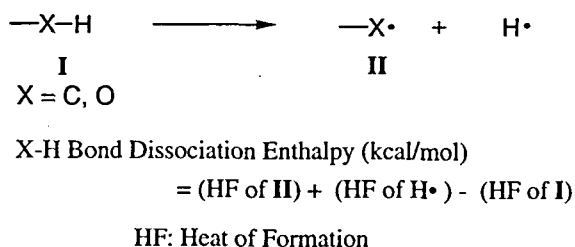


Fig.3

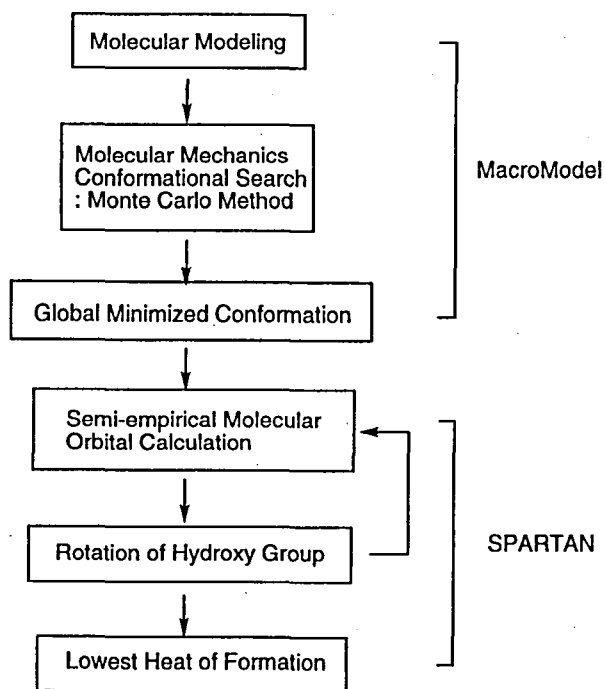


Fig.4

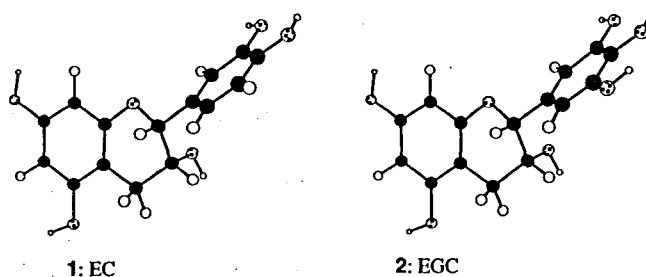


Fig.5

Conformational search:	Program	MacroModel ver. 6.5 (Schrodinger, Inc.) on SGI Indigo2, SGI O2
	Method	Conformational Search; Monte Carlo Method (2000-3000 structures were minimized) Force Field: MM2*
Semi-empirical molecular orbital calculation:	Program	SPARTAN ver. 5.0 (Wavefunction, Inc.) on SGI Indigo2, SGI O2
	Method	Geometry Optimization Hamiltonian: AM1, PM3

Fig.6

させたものも計算し, 一番低いエネルギーのものを求めた. プログラムは分子力学計算によるコンフォメーション解析には MacroModel (Schrodinger, Inc.) を, 半経験的分子軌道法は SPARTAN (Wavefunction, Inc.) を用いた. 計算の仕様に関しては Fig. 6 の条件を用いた.

結果・考察

1 および 2 の BDE の計算結果を Fig. 7 (PM3) に示した. AM1, PM3 とも同様の結果を与えた. カテキンのベンジル位であり, 酸素原子と結合した C-2 位の水素の BDE は, フェノール性水酸基の O-H のそれと比較しても, 特に低いことがわかった. このことは, C-2 位からの H \cdot の引き抜きが容易におこることを示す. カテキン類がラジカル種と共存したとき, フェノール性水酸基の水素に加えて, この水素引き抜きがラジカル消去の機構に重要な役割を果たすことが示唆された. さらに, パーオキシラジカルとカテキンから生成する反応中間体の LC/MS および UV スペクトルの実験結果と併せて考察することにより, カテキン類のラジカル消去のメカニズムを明らかにすることができた⁴⁾. ごく最近カテキン 2 量体であり, C-2 位のプロトンの一部欠くプロアントシアニン A-2 は superoxide に対して B-2 の半分以下の抗酸化作用しか示さないことが報告された⁵⁾. この結果はカテキンの抗酸化作用には C-2 位の水素が重要であるとする今回の結果とよく一致する.

以上のように, 化学計算の利用は, 実験結果では得られ

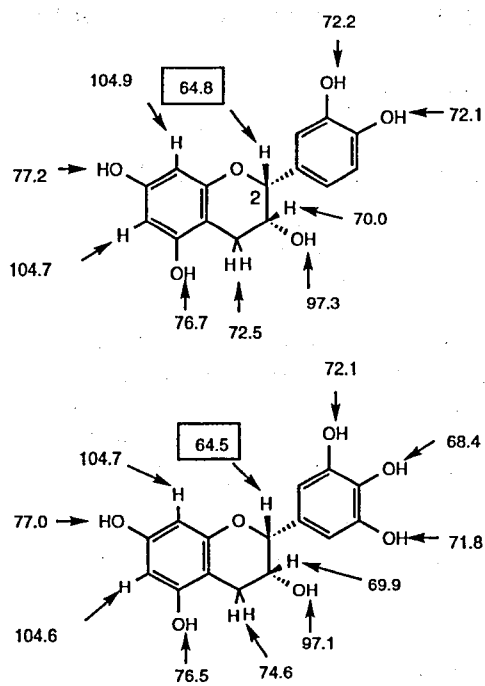


Fig.7

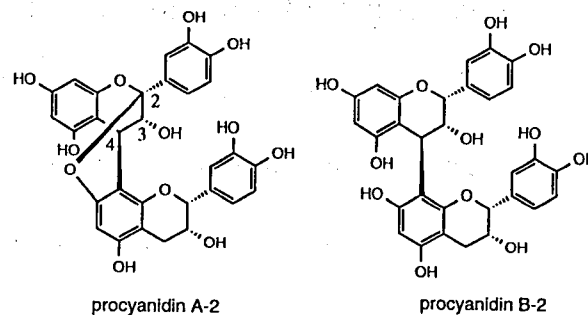


Fig.8

謝 辞

本研究の一部は、厚生省特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明」によって行った。

文 献

- 1) Brown, J. P. A. *Mutat. Res.*, **75**, 243-277 (1980)
- 2) Middleton, E. and Kondasmami, C.: *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1167-1179 (1992)
- 3) Van Arnum, S. D. and Stepsus, N.: *Tetrahedron Lett.*, **38**, 305-308 (1997)
- 4) Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T. and Toyoda M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **362**, 79-86 (1999)
- 5) Saint-Cricq de Gaulejac, N., Provost, C. and Vivas, N.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 425 (1999)

ない貴重な情報を与え、その結果化学物質の生物作用の機構解明に役立つことを示した。今後、他の抗酸化物質へ適用することも考えている。

イソバリンより構成されるホモペプチドの分子力学法によるコンフォメーション解析

栗原正明*・田中正一*・今若直人*・末宗 洋*・宮田直樹

Molecular Mechanics Study on Conformation of a Homooligopeptide Constituted by Isovaline.

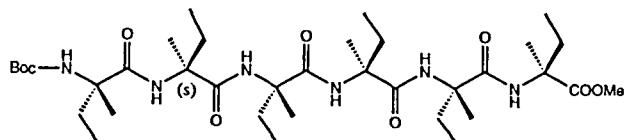
Masaaki Kurihara*, Masakazu Tanaka*, Naoto Imawaka*, Hiroshi Suemune* and Naoki Miyata

Conformational energy computations on a homohexapeptide of (S)-isovaline were performed using molecular mechanics on MacroModel[®]. Conformational search calculations were carried out by Monte Carlo method. AMBER* was used as the force field. The global minimum energy conformation was found to be a 3_{10} -helix coordinated by four hydrogen bonds. The results of the theoretical analysis of the conformation of the peptide are in agreement with its reported conformational properties in the solid state determined by X-ray crystallographic analysis.

Keyword: α, α -disubstituted amino acid, isovaline, molecular mechanics, Monte Carlo method, 3_{10} -helix

はじめに

α, α -ジ置換アミノ酸は、 α 位に2つのアルキル置換基を有するアミノ酸であり、タンパク質を構成する通常の α -アミノ酸と比較してコンフォメーションの自由度が制限されている。それゆえ、ペプチドのコンフォメーションの固定化、脂溶性の増大、生体内での加水分解の抵抗性、などの観点から注目され、各種の研究がなされている。 α, α -ジ置換アミノ酸より構成されるホモペプチドは、 α 位のアルキル置換基の種類により、それぞれ異なるコンフォメーション（ヘリックス、プラナー等）をとることが報告されている¹⁾。今回、置換基としてメチル基とエチル基を有するイソバリン (isovaline, Iva) より構成されるホモペプチド (Fig. 1) の分子力学法によるコンフォメーション解析を行い、実験データ (X線, NMR等)²⁾と比較し、 α, α -ジ置換アミノ酸ペプチドのコンフォメーションを計算によるシミュレーションで解析する可能性について検討した。



Boc-((S)-Iva)₆-OMe
Fig.1. Homohexapeptide of (S)-isovaline

計算方法

分子力学法 (Molecular Mechanics) により、(S)-イソバリンより構成されるホモヘキサペプチド1のコンフォメーション解析を行った。用いたプログラムおよび条件は Table1 に示した。conformational search の方法は、MacroModel (ver. 6.5, Schrodinger, Inc.) の Monte Carlo 法³⁾を用い、5000回繰り返した。(5000個の構造をoptimizeしたことになる。) カ場としては、ペプチドの計算に適していると考えられている AMBER* (MacroModel 開発者, W. C. Still により AMBER のパラメータが改良されている) を用いた。

初期構造はプラナーな構造を用いた。イソバリンは不斉中心を有するキラルなアミノ酸であり、ヘリックス構造の場合、右回りと左回りが存在する。両ヘリックスが conformational search で出現しない場合は、得られたヘリッ

Table 1. Calculation method

Program	MacroModel ver.6.5 (Schrodinger, Inc.) on SGI Indigo2, SGI O2
Method	Conformational Search Monte Carlo Method (5000 structures were minimized)
Force Field	AMBER* Solvent: H ₂ O

*九州大学大学院・薬学研究科

*To whom correspondence should be addressed: Masaaki Kurihara;
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.224;
Fax: 03-3707-6950; E-mail: masaaki@nihs.go.jp

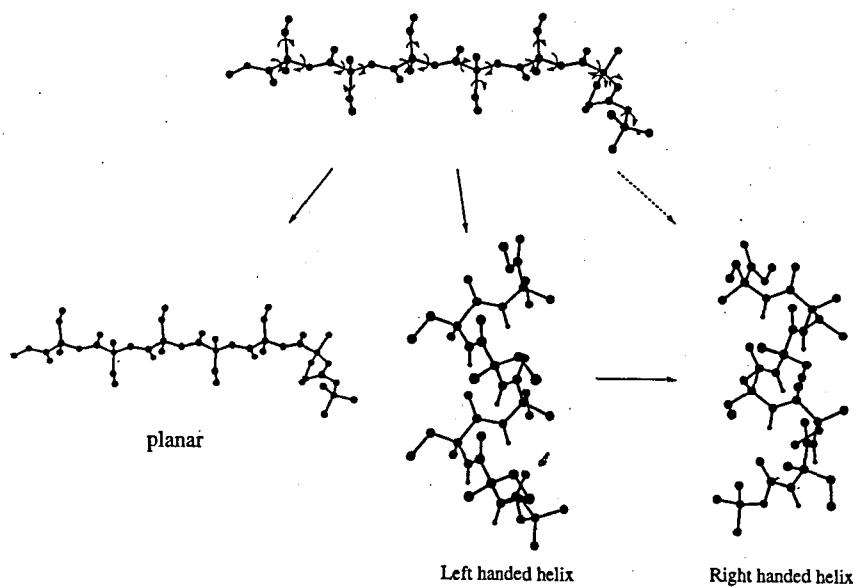


Fig.2. Conformational search by Monte Carlo Method

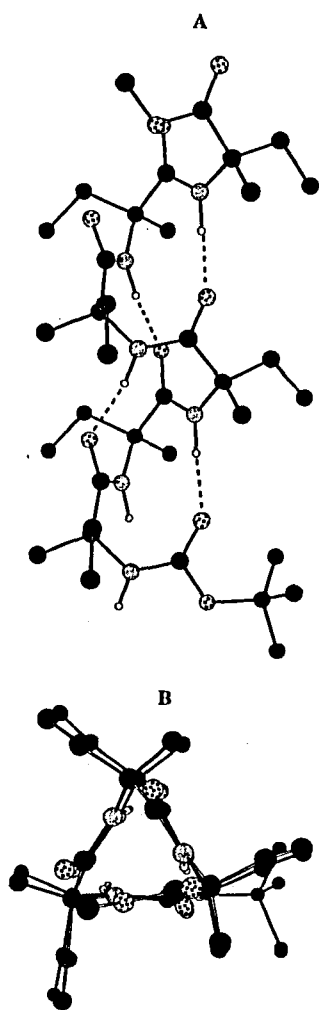


Fig.3. Structure of global minimum energy conformation (left handed helix); side view(A) and view along the helix axis(B)

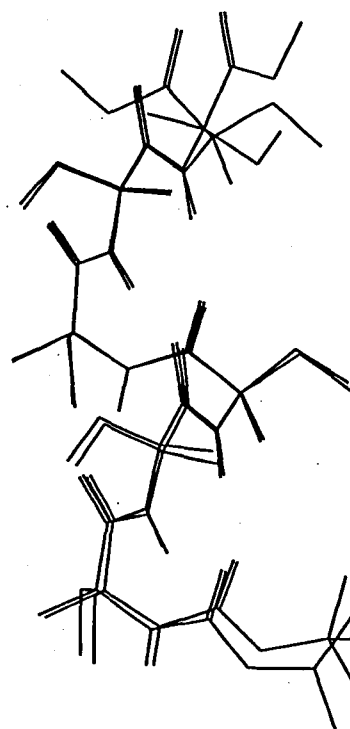


Fig.4. Structure of peptide 1 as determined by X-ray crystallographic analysis, superimposed on the minimum energy conformation

クスよりその逆巻きのヘリックス構造を作成し、それを初期構造とした conformational search も同様に行った。(Fig. 2)

結果及び考察

力場として AMBER* を用いた conformational search の結果、最安定構造 (Global Minimum) は left handed の 3_{10} -helix 構造 (1 回転あたり 3 残基で 10 原子間のカルボニル酸素とアミド水素間に水素結合がある) であった。(Fig. 3) この構造は分子内に 4 つの水素結合が存在した。これは、ペプチド 1 の X 線構造解析による構造と非常によく一致する。

Fig. 4 に X 線の構造と今回求めた最安定構造とを重ね合わせた図を示した。分子力学法による conformational search で、特異な構造である 3_{10} -helix 構造が最安定構造として導き出されたことは、本方法論がオリゴペプチドのコンフォメーション解析に有効であることを示す。(S)-イソバリンを用いた場合、左回り (left handed) である (M)-helix の方

が右回り (right handed) である (P)-helix より安定であった。(S)-イソバリンのホモペプチドは、結晶中では (M)-helix と (P)-helix が 1:1 で存在する。しかし、NMR の実験より溶液中では (P)-helix が多く存在するという報告もされており、その点では一致しなかった。今後、さらに力場、溶媒効果等を検討することが必要と考える。また、本法を用いて他の α, α -ジ置換アミノ酸のペプチドに関しても検討を行う予定である。

文 献

- 1) Tanaka, M., Imawaka, N., Kurihara, M. and Suemune, H.: *Helv. Chim. Acta.*, **82**, 485 (1999) and references cited therein.
- 2) Jaun, B., Tanaka, M., Seiler, P., Kuhnle, F. N. M., Braun, C. and Seebach, D.: *Liebigs Ann./Recueil*, 1697 (1997)
- 3) Chang, G., Guida, W. C. and Still, W. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4379 (1989)

輸入チューインガム中の不許可着色料の検査

川崎洋子[#]・石綿 肇・山田 隆

Inspection of Undesignated Food Color in Imported Chewing Gum

Yoko Kawasaki[#], Hajimu Ishiwata and Takashi Yamada

An unknown color in chewing gum imported from Canada was determined. The color was identified by TLC and HPLC as the trisodium salt of 3-hydroxy-4-[(4-sulfophenyl)azo]-2,7-naphthalenedisulfonic acid (RS-SA), one of the subsidiary colors of sunset yellow FCF. The concentration of RS-SA in sunset yellow FCF used in the chewing gum was 4.3%.

Keywords: trisodium salt of 3-hydroxy-4-[(4-sulfophenyl)azo]-2,7-naphthalenedisulfonic acid (RS-SA), food color, undesignated food color, sunset yellow FCF, chewing gum.

はじめに

我が国では食品衛生法により食品に使用できる着色料は指定されている。しかし、輸入食品のなかには指定外の着色料が使用されたり、混在していることがある。1998年10月、成田空港検疫所において、カナダより輸入されたチューインガムに指定外と考えられる着色料が認められた。そこで、この輸入チューインガム中の不明着色料の同定、定量を検討した。

実験方法

1. 検体

原産国カナダの輸入チューインガム

2. 試薬及び試液

ポリアミド：カラムクロマトグラフィ用、60-80メッシュ（和光純薬（株））

ポリアミドカラム：ポリアミドを水に懸濁し、ガラスカラム（10 mm i.d. x 20 mm）に約5 cmに充填し、水洗後、酢酸（1→100）を約20 ml流した。

アセトニトリル：HPLC用（和光純薬（株））

食用黄色5号（Sunset Yellow FCF）：ダイワ化成（株）

食用黄色5号付随色素、1:3-ヒドロキシ-4-[(4-スルフォフェニル)アゾ]-2,7-ナフタレン-ジスルホン酸三ナトリウム塩(RS-SA)、2:4[(2-ヒドロキシ-1-ナフタレニル)アゾ]ベンゼンスルホン酸一ナトリウム塩(2N-SA)、3:6-ヒドロキシ

-5-(フェニルアゾ)2-ナフタレンスルホン酸一ナトリウム塩(SS-AN)：三栄源エフ・エフ・アイ（株）

エタノール・アンモニア混液：アンモニア水1 mlに水を加えて28 mlとした液にエタノール28 mlを混和した。

3. TLC条件

A法. 担体：シリカゲル、展開溶媒：酢酸エチル/エタノール/28%アンモニア水（2:1:1）。

B法. 担体：HPセルロース、展開溶媒：n-ブタノール/エタノール/1%アンモニア水（6:2:3）。

4. HPLC装置

高速液体クロマトグラフ：（株）島津製作所製 LC 6A及びフォトダイオードアレー（PDA）検出器付き LC 10A

5. HPLC条件

A法. カラム：デュボン社製 Zorbax C8（4.6 mm i.d. x 250 mm）、移動相：0.02 mol/l 酢酸アンモニウム溶液-アセトニトリル（9:1）、流速：1.0 ml/min、検出波長：482 nm。

B法. カラム：GLサイエンス社製 Inertsil ODS-3（4.6 mm i.d. x 250 mm）、移動相：A液；0.02 mol/l 酢酸アンモニウム溶液（酢酸アンモニウム7.7gを水11に溶解し、その200 mlを水で11とした）、B液；アセトニトリル、グラジエント：40分間でB液が40%に達するように直線グラジエントを行い、そのまま10分間保持した。流速：1.0 ml/min、検出波長：482 nm。

6. 験溶液の調製¹⁾

検体10.0 gに水40 mlを加え、沸騰水浴上で10分間加熱した。冷後、遠心分離し、水層を分取した。残留物に50%エタノール40 mlを加えて同様に操作し、全エタノールと水層を合わせた。エタノールを留去し、ポリアミド0.5 gを加えて振り混ぜた。静置後、上澄液を傾斜して捨て、

[#] To whom correspondence should be addressed: Yoko Kawasaki; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.265; Fax: 03-3700-6965; E-mail: yoko@nihs.go.jp

着色したポリアミドをポリアミドカラムに負荷し、カラムを酢酸(1→100)100 ml で洗浄した。更に水 100 ml を流して洗った。次いでエタノール・アンモニア混液を加えカラムの着色がなくなるまで溶出させた。溶出液を酢酸(3→50)で中和後、濃縮乾固し、残留物に水 10 ml を加えて溶解し、試験溶液とした。

7. 測定方法

1) TLC による定性分析

試験溶液, 0.1% 食用黄色 5 号及び 0.1% 食用黄色 5 号付随色素 (RS-SA, 2N-SA, SS-AN)²⁾ 2 μ l を採り, TLC 条件 A 及び B 法 で TLC を行った。展開後, クロマトグラムの R_f 値並びに色調を比較観察した。

2) HPLC による定量分析

試験溶液 2 ml に水を加えて正確に 5 ml とし, その 5 μ l を HPLC 条件 A 及び B 法で HPLC を行った。得られたピーク面積と食用黄色 5 号及び RS-SA の検量線より, 検体中の 食用黄色 5 号及び RS-SA を定量した。

結果及び考察

検体はカナダからの輸入品であり, イチゴ, レモン, スイカ, リンゴ, オレンジ形のチューインガムで外側がそれ

ぞれの果物の色に着色されていた。表示には砂糖, ガムベース等の原材料の他に, 着色料として食用黄色 4 号, 黄色 5 号, 青 1 号, 赤 40 号, 赤 3 号, 二酸化チタンが記載されていた。成田空港検疫所において ペーパークロマトグラフィー, TLC 及び HPLC を用いた検査の結果, オレンジ形のチューインガムに食用黄色 5 号, 赤色 40 号, 青色 1 号及び表示以外の色素が見られた。この色素は TLC の結果より天然着色料の可能性は少ない。カナダで許可されている黄色から赤色系の合成着色料のうち, 我が国で指定されていないものは, シトラスレッド No2 とボンソーSX である。不明色素は, 我が国の指定の合成着色料及びボンソーSX でないことが確認された。シトラスレッド No2 は入手できなかったため未確認であるが, 不明色素がオレンジ色であること, また, 食用黄色 5 号に比べ, 濃度が低いことから, 食用黄色 5 号の付随色素であることが推察された。そこで, 試験溶液, 食用黄色 5 号, 及び食用黄色 5 号の付随色素 3 種類(RS-SA, 2N-SA, SS-AN)について A 法及び B 法の TLC を行った。その結果, 不明色素の R_f 値は食用黄色 5 号の付随色素のひとつである RS-SA の R_f 値に一致した。また, 2 種類の異なるカラムを用いて HPLC を行った (Fig.1): 食用黄色 5 号及び RS-SA の極大吸

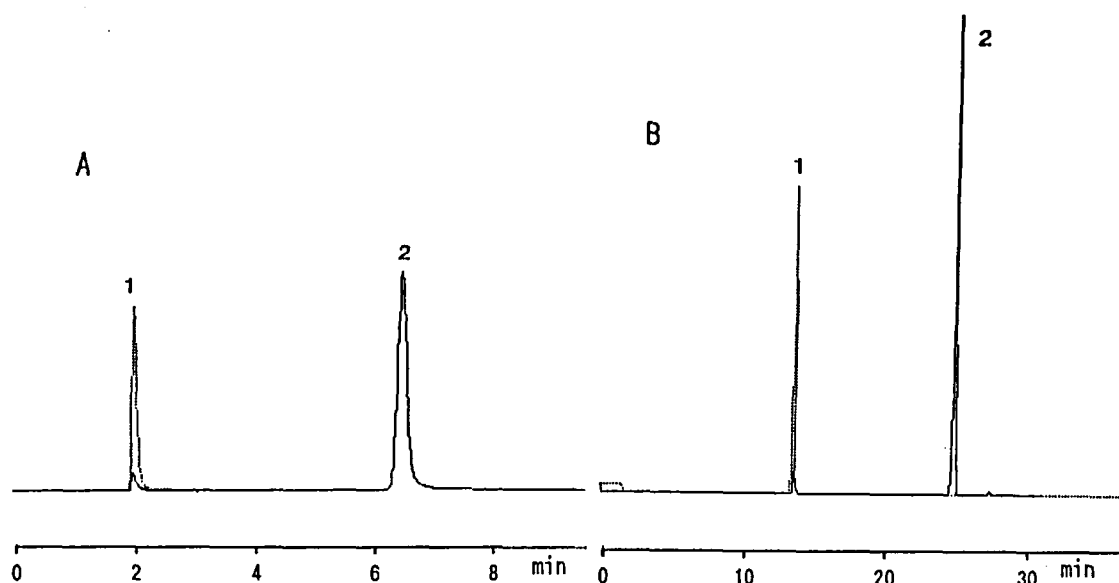


Fig.1. High performance liquid chromatograms of test solution prepared from imported chewing gum and standard RS-SA.

1: RS-SA, 2: Sunset yellow FCF

— : Test solution prepared from imported chewing gum

----- : Standard RS-SA

HPLC conditions: A; column: Zorbax C8; mobile phase: 0.02 mol/l ammonium acetate-acetonitrile (9:1); flow rate: 1.0 ml/min; detection: 482 nm.

B; column: Inertsil ODS-3; mobile phase: solvent A (0.02 mol/l ammonium acetate), solvent B (acetonitrile); gradient: (A:B) 0 min(100:0)→40 min(60:40)→10 min(60:40). flow rate: 1.0 ml/min; detection: 482 nm.

収波長はそれぞれ 482, 488 nm である²⁾が、A, B 法ともに食用黄色 5 号の極大吸収波長である 482 nm を検出波長とした。試験溶液から 2 つのピークが検出され、ピーク 1 及び 2 の保持時間は、それぞれ RS-SA, 食用黄色 5 号に該当した。更に、PDA により紫外可視スペクトルを比較したところ、チューインガム由来の不明色素のピーク(ピーク 1)は RS-SA のスペクトルに一致した。

HPLC により得られたピーク面積から RS-SA の濃度を定量したところオレンジ形ガムに使用されていた食用黄色 5 号中に 4.3% 含有されていることが明らかになった。

ま と め

カナダから輸入されたチューインガム中の不明色素は食用黄色 5 号の付随色素のひとつである RS-SA であった。また、本色素は食用黄色 5 号中 4.3% 含有されており、これは、食用黄色 5 号の付随色素に関する規格(約 2%; ペーパークロマトグラフィーによる)を超えていた。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修“食品中の食品添加物分析法” p.142-146 (1989).
- 2) 山田真記子, 井上哲夫, 加藤喜昭, 中村幹雄, 柴田 正, 木村実加, 辻 澄子, 伊藤誉志男: 食衛誌, 34, 239-247 (1993).

化学物質に関する法律についてのデータベースおよびホームページの作成

山本 都[#]・森田真理子・神沼二真

Preparation of the Database and the Internet (WWW) Homepage for Regulations on Chemicals in Japan

Miyako Yamamoto[#], Mariko Morita and Tsuguchika Kaminuma

We prepared a database on chemical regulations in Japan. The regulations consist of "The Law concerning the Examination and Regulation of Manufacture, etc., of Chemical Substances", "Poisonous and Deleterious Substances Control Law", "Waterworks Law", "Law for the Control of Household Products containing Harmful Substances", and "Pesticide Residues in Food Sanitation Law". We also set up a World Wide Web (WWW) homepage containing an explanation of the law as well as chemical names, CAS registry numbers, and standards. The WWW pages contain lists of chemicals and the retrieval page for the database.

Keywords: regulation of chemicals, database, World Wide Web, Internet

はじめに

我が国ではさまざまな化学物質が各種の法律で規制されているが、化学物質を扱う研究者や企業等の間で、規制に関する情報が入手しづらい、内容がわかりにくいとの声が多い。その理由としては、これらの法律が収載されている市販資料が限られていること、市販資料があってもその存在が広く知られていない場合が多いこと、官報が見つらいこと、などがある。また、化学物質の規制に関する法律は、対象物質の追加、削除、規制内容の変更など更新頻度が高く、本などの印刷物がその変化に対応するのは困難な面がある。さらにこうした印刷物資料では多数の化学物質の中から目的の化学物質の規制状況を名称や CAS 番号から検索することができない。こうした種々の理由から、化学物質の専門家さえ化学物質の規制内容を調べるのが容易でない状況にある。

こうした点を改善するために、化学物質の規制に関する主な法律について、データベースを作成し、検索もできる Web ホームページを作成した。

方法

1. 法律データベースの作成

(1) 対象とした法律と情報源

- ・対象とした法律は以下のとおりである。
化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）
毒物及び劇物取締法（毒劇法）
水道法（水道水質基準）
有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律
食品中の残留農薬基準（食品衛生法）

- ・それぞれの法律に関する情報は以下から入手した。
化審法：厚生省生活衛生局生活化学安全対策室，国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室
毒劇法：厚生省医薬安全局安全対策課，改訂新版“毒物劇物取扱の手引き”1998年6月1日（時事通信社）
水道法（水道水質基準）：厚生省生活衛生局水道整備課
有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律：厚生省生活衛生局生活化学安全対策室
食品中の残留農薬基準（食品衛生法）：「食品衛生学雑誌」Vol.39（1），1998，日本食品衛生学会

(2) データベースの作成

データベースソフトとして Microsoft Access 97 を使用し、各法律について次の項目を入力した。

- ・入力項目：官報名，日本語化合物名，日本語別名，英語名，英語別名，CAS 番号，RTECS 番号，施行年月日，各法律に応じた規制内容および規制値。

2. Web ホームページの作成

[#] To whom correspondence should be addressed: Miyako Yamamoto; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel:03-3700-1141 ext.337; Fax:03-5717-7180; E-mail: yamamoto@nihs.go.jp

(1) 内容

規制対象化学物質の名称や CAS 番号、および規制値などデータベースに入力した情報のうち、主な項目を抽出して表の形で html ファイルに変換した。また各法律について、定義や規制内容の概要、対象物質の除外規定、別表など周辺の情報についてのテキストを作成し、html ファイルに変換した。これらの html ファイルは UNIX の Web サーバーに置いた。

また、データベースに入力した各情報のうち、英語名、CAS 番号、規制値などの英語部分のみを選択して、英語の Web ページを作成した。法律や項目の定義などについても英語のページを作成した。

(2) 検索機能の付加

法律全体のホームページおよび個々の法律のページに、官報告示名、化学物質名、CAS 番号などから目的物質の規制状況を検索できる機能を付加した。すなわち、Access ファイルで作成した法律データベースについては、WWW 上で検索できるようにするためにそれぞれの法律について 2 種類のプログラム (search.htx および search.idc) を作成すると共に、化学物質名や CAS 番号を入力できる検索ページを作成した。データベースに関するファイルはすべて Windows NT サーバーに置いた。データベース内容を更新する際は、Access ファイルのみ更新すればよい。

結 果

1. 法律データベースの作成

以下の事項について規制内容を調査・収集し、データベース (Access file) に入力した (1999.5.30 現在)。

(1) 化審法

以下の物質について、官報告示名、英名、指定年月日、官報告示番号、CAS 番号、RTECS 番号、主要用途の各項目を入力した。

第一種特定化学物質：9 物質 (PCB、アルドリン、DDT、クロルデン類、ビス (トリブチルスズ) オキシド等)

第二種特定化学物質：23 物質 (トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、四塩化炭素、トリフェニルスズクロリド、トリブチルスズアセタート等)

指定化学物質：292 物質

(2) 毒劇法

特定毒物、毒物、劇物について、官報告示名、化学物質 (例)、別名、英名、英語別名、CAS 番号、RTECS 番号、規定の各項目を収載した。毒劇法では官報名として、有機シアン化合物、無機亜鉛塩類などグループ名として記載されているものも多い。グループ名のみをデータベースに入力すると、個々の化学物質名や CAS 番号で検索しても抽出されてこないため、それぞれのグループ化合物の中で代表的な化学物質については、グループ名に加えてそれぞれの

物質についても日本語名、英語名、別名、CAS 番号等を入力した。したがって、データベースへの入力件数は、官報に記載されている対象物質数よりも多い。

(3) 水道法 (水道水質基準)

以下の各項目について、規制対象が化学物質の場合は、日本語名、英語名、CAS 番号、RTECS 番号、基準値 (または目標値、指針値) を入力した。

水質基準項目：健康に関する項目 (29 項目)

水質基準項目：水道水が有すべき性状に関連する項目 (17 項目)

快適水質項目：13 項目

監視項目：26 項目

(4) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律

規制対象となっている 17 化学物質について、官報告示名、化学物質 (例)、別名、CAS 番号、RTECS 番号、用途、対象家庭用品、基準の各項目を入力した。

(5) 食品中の残留農薬基準 (食品衛生法)

食品衛生法で食品中の残留農薬基準が定められている約 160 の農薬について、農薬名、英名、CAS 番号、RTECS 番号を入力した。

2. Web ホームページの作成

上述の 5 種類の法律を収載した「化学物質に関連する法律」の Web ホームページを作成した。(図 1)

URL は次のとおりである。

<http://www.nihs.go.jp/incident/law/law.html> (日本語)

<http://www.nihs.go.jp/incident/law/elaw.html> (英語)

本ホームページでは、ユーザーが法律ごとの規制対象物質を表として見ることもでき、また物質名 (日本語、英語) や CAS 番号から目的の情報を検索することもできるようにデザインした (図 2)。これは、1) ある法律で規制されている物質の全体像を知りたい場合、2) ある物質がどの法律で規制されているか知りたい場合、の両方に対応できるようにするためである。

これらの各ページに関してそれぞれ対応する英語の Web ページも作成した。

考 察

1. Web による規制情報提供の利点

化学物質の規制に関する情報が入手しにくい、わかりにくい、などの理由としては、次のようなことが考えられる。

・官報が見づらい：官報は縦書きのため、非常に長いカタカナの物質名にはなじまない。また改正部分だけが官報に収載されるので法律の全体像は官報だけではわからない。

・法律によってそれぞれ形式や用語が異なるので、慣れないと理解しにくい。

・一般の人が入手しやすい市販資料が少ない、もしくは存在が広く知られていない。

- ・市販資料の改訂が、規制内容の更新に追いつかない。
- ・目的の物質や規制内容を検索できるシステムがきわめて少ない。

それぞれの法律はかなり膨大な内容量を含むものであり、それらすべてに目を通し理解するのは容易ではなく、また必ずしも必要ではない。まず最初の入り口情報として、その法律ではどのような物質が規制対象になっているか、また逆にある物質を規制している法律にはどのようなものがあるか、といったことを簡単に調べたい場合も多い。こうしたことから、各法律の対象物質とその簡単な規制内容を含んだ規制情報ページを作成した。

一般に化学物質等の情報を収載した web ページには、検索画面のみから内容にアクセスするタイプのページも少なくない。しかし、検索画面ではユーザーがまず目的の物質名や CAS 番号を入力することが必要となり、これらがはっきりしていない場合は検索することができない。また法律に関するページの場合、個々の物質の規制情報ではなく、法律で規制対象になっている物質全体のリストがほしいことも多い。したがって、今回のホームページには検索画面のあるページと対象物質リスト（表形式）のページの両方を収載した。

Web による規制情報の提供には次のような利点がある。

- ・内容の追加、削除、変更などがあった場合、迅速かつ容易に内容を更新できる。
- ・印刷物の場合法律ごとに別々の資料に収載されているため複数の法律を調べたい時には資料の入手等に時間を要するが、Web の場合は 1ヶ所（ホームページ）から複数の規制情報にアクセスでき、目的の情報を採しやすい。
- ・法律名から規制対象物質の検索、および物質名や CAS 番号から関連法律名の検索が容易に行える。

2. 利用度

「化学物質に関連する法律」ホームページ（図 1）は、そのプロトタイプを試験的に 1997 年末から Web で提供し始めたが、当初は検索ページがなかった。その後検索機能を付加して現在の形としたが、1998 年 4 月以降現在に至るまで本ページへのアクセス件数は、毎月 1,000 件～1,400 件にのぼっている。この中では化審法および毒劇法へのアクセス件数が多い（毎月約 700 件）。毒劇法は、官報告示名としてグループ名（有機シアン化合物、無機亜鉛塩類など）であげられているものも多く、またその中で除外される物質などもある。さらに物質の濃度や塩によっても規制内容が異なる。こうした詳細な記述については、従来本 Web ページには収載しておらず、その旨と詳細について知りたい場合に参照すべき参考書をあげておくにとどめていた。しかし、昨年（1998 年）の和歌山ヒ素混入カレー事件に端を発した一連の毒物混入事件以降、全国の大学や研究所などで毒劇物保有状態などのチェックが厳しくなり、毒劇法の Web ページ

への意見や問い合わせが増加した。試薬を使用している大学や研究所から、本ページが役立つとの意見と共に、除外物質など詳細な記述もあると助かるという要望も多かったため、その後これらの詳細な記述を加えた。

英語のページについては、国際会議などで外国の研究者から、日本の法律で規制されている化学物質の状況がわかりにくい、資料が入手できない、との声がよく聞かれたため、日本語ページと同様に作成した。

アクセス件数は現時点では毎月 150-200 件前後である。

3. 今後の課題

今後の課題は、現在収載しているもの以外の法律の収載である。化学物質の規制に関連する法律は、他に食品添加物の使用基準（食品衛生法）、環境関連法令（水や空気に関する環境基準、悪臭防止法など）、農薬取締法、労働安全衛生法、消防法など 20 種類以上にのぼる。法律は内容の更新頻度が高いものも多く、更新情報の入手方法がある程度確保されているものでないと収載を開始できない面がある。現在収載している 5 種類の法律は、更新された規制内容を担当部署あるいは関連資料から継続的に入手することが可能な状態にある。これ以外の法律については、物質数や規制内容量が多く入力するにはマンパワーの問題がある、更新内容の把握が困難、規制内容が難解、などの理由でまだ Web ページ収載に踏み切れていない。今後いかに法律の種類を増やしていくかが課題のひとつである。

文 献

- 1) 鶴田康則：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律に基づく化学物質の安全管理について、中毒研究, 3, 409-414 (1990)
- 2) 改訂新版“毒物劇物取扱の手引き”, 厚生省医薬安全局安全対策課, 1998 年 6 月 1 日 (時事通信社)
- 3) 農薬の残留基準, 食品衛生学雑誌, 39(1), J-29-75 (1998)

Fig. 1: Homepage of regulations on chemicals (Japanese and English)

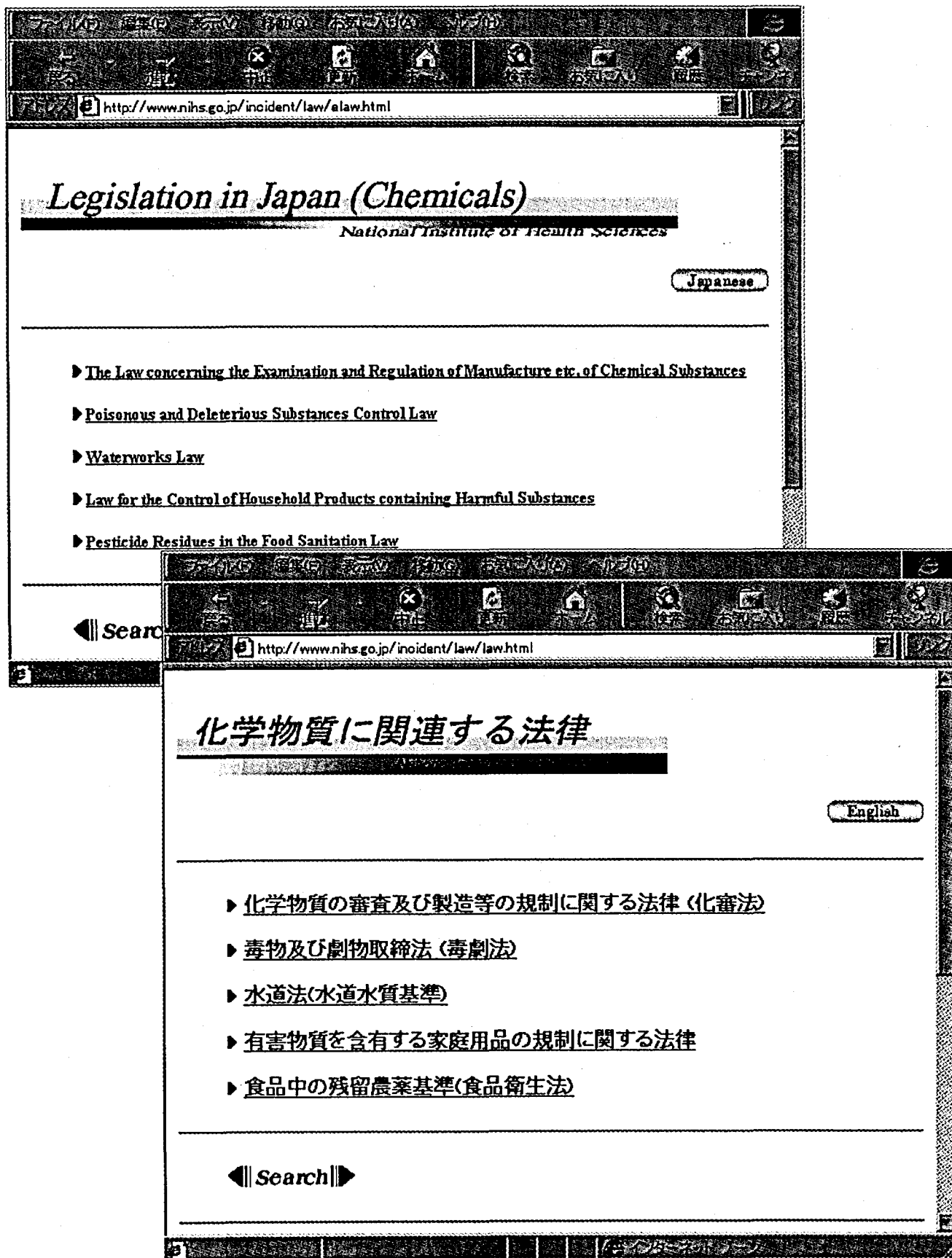


Fig.2: Web pages on the list of chemicals controlled by the law and the retrieval page

The image shows two overlapping browser windows from the National Institute of Health Sciences (NIHS). The top window displays a page titled "有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律" (Law regarding the regulation of household products containing harmful substances). Below the title is a table listing regulated chemicals. The bottom window shows a search page with instructions in Japanese and a search form.

有害物質を含有する 家庭用品の規制に関する法律

National Institute of Health Sciences

English

官報告示名	化学物質(例)	別名	cas	rtccs	用途	対象家庭用品	基準
4,6-ジクロロ-7-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)-2-トリフルオルメチルベンズイミダゾール	4,6-Dichloro-7-(2,4,5-trichlorophenoxy)-2-trifluoromethylbenzimidazol		57648-21-2	DE1150000	防虫加工剤	繊維製品のうち、おしめかぶり、下着、寝衣、手袋、くつした、中衣、外衣、帽子、寝具及び床敷物。家庭用毛糸。	30ppm以下 (試料1gあたり) 30 µg以下 X電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ
テトラクロロエチレン	Tetrachloroethylene		127-18-4	KX3850000	溶剤	家庭用エアゾル製品。家庭用洗剤。	0.1% 以下 (電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ)
トリクロロエチレン	Trichloroethylene		79-01-6	KX4550000	溶剤	家庭用エアゾル製品。家庭用洗剤。	0.1% 以下 (電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフ)
トリス(1-アジリジニル)ホスフィンオキサイド	Tris (1-phosphorimidate)						
トリス(2,3-ジブロムプロピル)ホスフェイト	Tris (2,3-dibromopropyl phosphite)						
トリフェニルスズ化合物							

Search

CAS番号、化学物質名等を入力し、検索ボタンをクリックして下さい。
下記の法律に関し、その物質が規制されている法律名が検索できます。

個々の内容については各法律のページを参照して下さい。

- 化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)
- 毒物及び劇物取締法(毒劇法)
- 水道法(水道水質基準)
- 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律
- 食品中の残留農薬基準(食品衛生法)

例) Chloroform, chloro, 67-66-3

ここに CAS番号、化学物質名を入力して下さい

Search Chemicals Search

注:この検索画面はCAS番号のついている物質のみが検索対象です。

IPCS からコメントを依頼された環境保健クライテリアのドラフトについて (1998 年度)

大竹千代子*

First Drafts of the Environmental Health Criteria (EHC) Circulated for Comments by IPCS in 1998.4~1999.3.

Chiyoko Ohtake*

Summaries of the first draft of Environmental Health Criteria (EHC) circulated for comments by IPCS during the period of 1998.4~1999.3 are presented. EHC drafts on 3 compounds were received during this period.

Keywords: EHC, IPCS

はじめに

1998 年 4 月から 1999 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 3 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 Vinyl Chloride (塩化ビニル) (98/8/7)

塩化ビニルは定常状態で無色、わずかに甘い匂いのする可燃性の気体である。高い蒸気圧を持ち、高いヘンリー係数と相対的に低い水溶解性が特徴である。空気より重く、ほとんどの有機溶媒に溶ける。真空、室温では非常に安定である。450℃以上あるいは、ナトリウムまたはカリウム水酸化物の存在で腐食性が生じ、部分的な分解が起きる。

塩化ビニルは天然には存在が知られていないが、使用済み溶剤として廃棄された塩素化炭化水素製品の分解物が、埋め立て地からでる排ガス中や地下水に見られる。

世界の生産量は 2,700 万トン (1995 年) である。ポリ塩化ビニルはプラスチック原材料の 20% を占める。世界生産量の 95% はポリ塩化ビニルに利用される。

蒸気圧が高いため大気中に放出された塩化ビニルはほと

んどが蒸気の状態で存在していると考えられる。大気中で通常 $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下の濃度で存在し、高くても $24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 未満であったが、廃棄物処分場では $86,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ が検出されたことがある。表層水、底質、下水汚泥中からそれぞれ最高値 $570 \mu\text{g}/\text{l}$ 、 $580 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、および $62,000 \mu\text{g}/\text{kg}$ が検出されている。飲料水中は $8 \mu\text{g}/\text{l}$ 以下であるが、最大値としては $50 \mu\text{g}/\text{l}$ が報告されている。

ポリ塩化ビニル素材あるいはそれを含む包装材は、食品、医薬品あるいは化粧品の塩化ビニル汚染の原因になっている。これまでに、アルコール類には最大 $20 \text{mg}/\text{kg}$ 、野菜類には $18 \text{mg}/\text{kg}$ 、ピネガー類には $9.8 \text{mg}/\text{kg}$ の濃度が検出されている。

ヒトへの影響に関しては、長期的に塩化ビニルに暴露されたオートクレーブ清掃業の労働者に関する報告が多い。1974 年までは異常とは考えられていなかった、 $1,000 \text{ppm}$ 塩化ビニル濃度の労働環境では、1ヶ月から数年までの期間暴露された労働者に「塩化ビニル病」と呼ばれた特殊な病理学的症候群があったことが報告されている。症状は耳痛や頭痛、めまい、不明瞭な視野、食欲不振、不眠、呼吸困難、悪心、胃痛、肝臓/脾臓の辺りの痛み、足や手の痛みとヒリヒリする感覚、先端の冷え感、リビドの減退および体重の減少などがある。臨床知見には、強皮症やレイノ一病の典型的な様相と全く同じ末梢循環器の変化、および明らかな組織学的所見を伴った肝臓と脾臓の拡大、呼吸器での兆候が含まれる。

動物試験および疫学的な研究からは、塩化ビニルの高濃度暴露は希に肝臓の血管肉腫 (ASL) を誘発することが明らかである。ASL 以外の塩化ビニル暴露に関連するがん発

* To whom correspondence should be addressed: Chiyoko Ohtake; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext361; Fax: 03-3700-7592; E-mail: ohtake@nihs.go.jp

生部位には、肝臓 (血管肉腫以外の肝がん、肝細胞がん)、呼吸器系、消化器官、リンパおよび造血細胞、脳と他の中枢神経系が報告されている。塩化ビニルはヒトと動物に遺伝子毒性がある。

塩化ビニルによる微生物の EC_{50} の最低値は 40 mg/l である。魚毒性試験の 98 時間 LC_{50} は 210 mg/l および NOAEC は 128 mg/l である。(全 253 ページ)

No.2 Nonylphenol および Nonylphenol Ethoxylate (ノニルフェノールおよびノニルフェノールエトキシレート) (98/7/30)

アルキルフェノールエトキシレートは非イオン系の界面活性剤である。通常はフェノール基に枝分かれしたアルキル鎖が付いており、別のところにエチレンオキサイドが結合している。ノニルフェノール (NP) は今のところ商業的には最も重量なアルキルフェノールである。ノニルフェノールエトキシレート (NPE) は洗浄剤として通常使用され、NP 1 モル当たり 9-10 モルのエチレンオキサイドを含んでいる。工業用の NP は、わずかにフェノール臭を持つ白黄色の液体である。NPE はわずかに黄色い無色に近い液体である。含まれているエトキシレートの鎖の長さが長くなると、密度と粘性が増加する。

NPE は、工業用洗浄剤 (国によっては家庭用洗浄剤中にも)、塗料、農薬製剤、乳化高分子、織物などの中に使用されている。

動物試験の研究から、ラットにおける NP の経口急性毒性 LD_{50} は、580 から 1,620 mg/kg 体重の幅が見られた。 LD_{50} は NP より NPE の方が一般的に毒性は低く、1,410 以上から 1,600 mg/kg 体重である。NP のウサギの経皮急性毒性 LD_{50} は 2,000、NPE では 1,800~>10,000 mg/kg 体重である。ラットの NPE の食餌による 90 日間暴露では、成長と肝重量への影響を伴う LOEL がおよそ 40 mg/kg/日であった。雌のラットの食餌による 28 日の NOEL は 400 mg/kg/日であったが、雄の NOEL は決定できなかった (最低の濃度は 25 mg/kg/日)。最も敏感なエンドポイントは、心筋の壊死であり、犬の 90 日の食餌による LOEL は、NPE₂₀ では 40 mg/kg/日であった。さらに高い用量での NPE₁₅、NPE_{17.5}、および NPE₂₀ の 14 日間以上の犬への投与では、心筋の壊死が見られた (用量 1,000 mg/kg/日)。ラット、猫あるいはウサギには NPE₂₀ を 14 日間 NPE₂₀ 混餌投与による心筋壊死は見られなかったが、モルモットでは観察された。

NP は皮膚への腐食作用が報告されているが、感作性物質 (sensitizer) ではない。NPE は塗布の仕方によって「刺激がない」から「激しい刺激」まで幅のある結果が報告されている。NP もまた、目への刺激作用を有する。

NP をラットの妊娠 6 日目から 15 日目に投与した場合の発生影響の NOEL は、300 mg/kg であった。150 mg/kg で弱

い母体毒性が見られた。

Nonoxynol-9 (殺精子剤) を子宮内に投与されたラットに急性症状が観察された。いくつかの研究では出産児数、生存児への影響は報告されていない。卵巣摘出ラットのエストロゲン性スクリーニング試験では、エストロゲン性エンドポイントに関して、1,000 mg/kg までの NP の濃度での影響は見られなかった。Nonoxynol の皮下注射による NOEL は 10 mg/kg であった。

ヒトエストロゲンレセプターおよびエストロゲン感受性細胞系を用いた *in vitro* 系での試験では、NP および非常に短い鎖のエトキシレートにエストロゲン活性が見られた。エストロゲン活性は天然エストロゲンと比較して弱い。NP 殺精子剤使用の女性での研究では有害影響が見られなかった。

Nonoxynol-9 はヒトでの研究結果、感作性物質ではない。

あるバクテリアは培養中に NPE の 20 から 800 mg/l に暴露されると、成長が阻害される。また、他のバクテリアや別の種は炭素の供給資源として NPE を利用する。1 バクテリアの酸素消費の EC_{10} は、10 mg 以上である。胚芽発生の短期的阻害は 32 mgNP/l で現れ、長期暴露では阻害が見られない。単細胞藻は NPE より NP に非常に敏感で、影響は NP、NPE それぞれの NOEL が 0.025 mg/l、6 mg/l であった。

水棲無脊椎動物による、NP と NPE の実験室内の急性毒性試験では、鎖の長さに従い減少する傾向にあり、結果は様々である。初期のライフステージでは成体より敏感である。初期の発生に与える慢性影響は、マッセルの初期の発生、F1 ミシッドエビの生存、およびミジンコへの慢性毒性影響の NOEC は、それぞれ、200、6.7 および 39 μ g/l である。マッセルの成長に関する LOEC は 56 μ g/l である。

NP の魚類に対する急性毒性は NPE よりも大きく、 LC_{50} は 1mg/l である。 LC_{50} 値の範囲は 1~12.5 mg/l の範囲であった。

マスの肝臓によるヴィテロゲニンの産生は *in vitro* 系 (エストロゲン性の測定) で NP と短い鎖のエトキシレートおよび代謝物によって強められる。しかし、活性は 17 β エストラジオールに比して低い。NP、NPE₂、カルボキシル酸代謝物の雄のマス成魚への暴露の結果では、精巣の発達影響と血液中のヴィテロゲニンレベルの NOEC が、それぞれ 20.3 および 5.02 μ g/l を示した。

水棲植物の生産量は NP が 0.5 mg/l 前後の暴露で減少する。(全 147 ページ)

No.3 Principle and Methods for the Assessment of Risk from Essential Trace Elements (必須微量元素のリスク評価の原則と方法) (99/3/12)

目次は以下の通りである。

1. サマリー (サマリーは第一ドラフトの後に書かれ、送付された)
2. はじめに
 - 2.1 範囲と目的
 - 2.2 微量元素の必要性のクライテリア (判定基準)
 - ・必要性と恒常性のメカニズム
 - 2.3 用語の説明
 - ・栄養としての必須摂取量と安全な許容量の定義
 - ・毒性学用語：一日許容摂取量 (ADI), 耐容摂取量 (TI), レファレンスドーズ (RfD)
 - ・栄養要求量 (NRs) と耐容摂取量 (TI) の基礎となる導出の原則
 - ・不確実係数 (UFs) の判定
 - ・臨界影響を知るための量-反応曲線から TI の推定
3. ある必須微量元素 (ETE) の経口摂取の許容範囲 (AROI)
 - 3.1 AROI の定義
 - ・AROI の限界値
 - ・安全性評価の比較
4. ヒトの集団における多様性
 - 4.1 ヒト体内での ETEs のホメオスタシスの原理
 - 4.2 バイオアベイラビリティ
 - 4.3 ETE のバイオアベイラビリティと利用度 (utilisation) に影響する食事の違いと生理学
 - 4.4 年齢に関連した数値；胎児，子供，高齢者
 - 4.5 性による違い
 - 4.6 妊娠と授乳
 - 4.7 ETEs 間の相互関連
 - 4.8 元素の化学的特性
 - 4.9 一般にいられているヒトでの多様性とホメオスタシスの障害
 - 4.10 得られたホメオスタシスの障害事例
5. 欠乏による影響と毒性
 - 5.1 影響の深刻さの程度
 - ・死にいたる欠乏
 - ・ETE 欠乏による臨床的疾患
 - ・臨床的な重要性が有る場合・無い場合の欠乏の前臨床的なバイオマーカー
 - ・過剰な暴露による臨床的な影響
 - ・機能面で重要である場合・そうでない場合の欠乏症の前臨床的な毒性影響
 - 5.2 欠乏と毒性を定義するために用いられる影響の比較
6. 必須微量元素のリスクアセスメントのための応用と原則
 - 6.1 原則のサマリー
 - 6.2 原則の応用スキーム
 - 6.3 ETEs のための AROIs の導出

- 6.4 銅の AROI-多くの変化を持つ ETE
- 6.5 亜鉛の AROI-他の評価との比較

7. 勧告
8. 文献 (全 59 ページ)

この 1 年に出版された EHC, HSG および CICAD

EHC

No.200 Copper

No.201 Selected Chloroalkyl Ether

No.202 Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

No.203 Chrysotile Asbestos

No.204 Boron

No.205 Polybrominated Dibenzo-*p*-dioxins and Dibenzofurans

No.206 Methyl *t*-Butyl Ether

No.207 Acetone

HSG

No.108 Carbon Tetrachloride

CICAD (これまで出版されたもの)

No.1 1,2-Dichloroethane

No.2 3,3'-Dichlorobenzene

No.3 1,1,2,2-Tetrachloroethane

No.4 Methyl Methacrylate

No.5 Limonene

No.7 *o*-Touidine

No.8 Triglycidyl Isocyanurate

No.9 N-Phenyl-1-naphthylamine

No.10 2-Butoxyethanol

No.11 1,1,1,2-Tetrafluoroethane

食用黄色5号(サンセットイエローFCF)の不適事例について

辻 澄子[#]・松村郁子・中村優美子・外海泰秀

Studies on Rejected Food Yellow No.5 (Sunset Yellow FCF)

Sumiko Tsuji[#], Ikuko Matsumura, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai

One of the sunset yellow FCFs (Y-5) in the official inspection of coal-tar dyes in 1998 was rejected. The results of tests of the rejected sample were submitted to JSFA-VI except for a sub-spot by paper chromatography. HPLC of the raw materials, intermediates, and subsidiary dyes according to JSFA-VII was performed on the rejected and submitted samples of Y-5. The sub-spot in the rejected sample was identified as sulfanilic acid-azo-R salt, and its content was estimated at more than 5%.

Keywords: sunset yellow FCF, subsidiary dye, paper chromatography, HPLC

緒 言

平成10年度の製品検査において食用黄色5号(Y-5)40件中1件が第六版食品添加物公定書(食添VI)¹⁾“他の色素”の項(ろ紙クロマトグラフィーによる)で付随色素が検出され不合格と判定された。一方、平成11年4月に公表された第7版食品添加物公定書(食添VII)²⁾には食用黄色5号の未反応原料、反応中間体及び副成色素等の含有量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により測定して規制することが記載されている。そこで、今回の不合格品中の未反応原料、反応中間体及び副成色素の含有量をHPLCにより測定するとともに、平成10年度に合格したY-5中の含有量も測定し、これらを比較検討したので報告する。

実験方法

1. 試料: 製品検査検体
2. 標品: 未反応原料、反応中間体及び副成色素標品; 4-アミノベンゼンスルホン酸(スルファニル酸, SA)は試薬特級を、7-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸=二ナトリウム塩(GS), 3-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホン酸=二ナトリウム塩(RS), 6-ヒドロキシ-2-ナフタレンジスルホン酸=一ナトリウム塩(SS), 6,6'-オキシピス(2-ナフタレンジスルホン酸)=二ナトリウム塩(DONS), 4,4'-(ジアゾアミ

ノ)ジベンゼンスルホン酸=二ナトリウム塩(DAADBSA), スルファニル酸アゾG塩色素(GS-SA), スルファニル酸アゾR塩色素(RS-SA), スルファニル酸アゾβ-ナフトール色素(2N-SA)及びアニリンアゾシエファー塩色素(SS-AN)は三栄源エフ・エフ・アイ(株)標品を使用した。色素標準品;サンセットイエローFCF(食用黄色5号:Y-5)は国立医薬品食品衛生研究所標準品を使用した。

3. 試薬: アセトニトリル; HPLC用アセトニトリルを用いた。その他の試薬は全てJIS特級品を使用した。

4. ろ紙クロマトグラフィー

食添VIに従った。すなわち、試料0.1gを量り、水を加えて100mlとして、検液とした。検液2μlをろ紙にスポットし、n-ブタノール・1%アンモニア溶液・無水エタノール混液(6:3:2)を展開溶媒としてろ紙クロマトグラフィーを行った。ただし、Y-5標準品は0.1gを量り、他の標品は10mgを量り、水を加えて100mlとした。

5. HPLC

カラム: 化学品検査協会製 L-column ODS-5 μm(4.6 mm φ×250 mm), 流速: 1.0 ml/min, 検出波長: 紫外; 253 nm, 可視; 482 nm, 注入量: 20 μl, 温度: 40℃。

移動相の濃度勾配条件: 移動相A; 0.02 mol/l 酢酸アンモニウム溶液, 移動相B; アセトニトリル-水混液(7:3), 濃度勾配; A, 100%で10分間保持した後, A:B(100:0)から(42:58)までの直線濃度勾配を40分間行い, そのまま5分間保持した。次の分析再開前15分間移動相A液での平衡化を行った。

試験溶液の調製: 各試料約100mgを精密に量り, 0.02 mol/l 酢酸アンモニウム溶液(pH 8.0)を加えて, 全量を正確に100mlとし, 試験溶液とした。

[#]To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tsuji@nihs.go.jp

Table 1. Analytical result of rejected sample of sunset yellow FCF

Tests	Specification of JSFA-VI*	Result (4 samples of one lot)
Description	Normal	Normal
Identification	Normal	Normal
Absorption maximum	480-484 nm	482 nm
Purity		
Chloride and Sulfate	Not more than 5.0 %	1.11 ± 0.22 % 0.09 ± 0.07 %
Heavy methals	Not more than 20 μg/g as Pb	Passed
Arsenic	Not more than 4.0 μg/g as As ₂ O ₃	Passed
Other coloring matters	Only one spot	Two spots
Loss on Drying	Not more than 10.0 %	2.13 ± 0.36 %
Assay	Not less than 85.0 %	92.6 ± 1.6 %

*JSFA-VI:Japanese Standards of Food Additives,Sixth Edition.

6. 装置

ポンプ：日本分光(株)製 JASCO 880-PU (2台)，溶媒脱気装置：ユニフローズ(株)製デガシス DG-1200，システムコントローラー：日本分光(株)製 JASCO 802-SC，オートサンプラー：日本分光(株)製 JASCO 851-AS，カラム恒温槽：日本分光(株)製 JASCO CO-1560 (冷却装置付)，検出器：日本分光(株)製及び JASCO 870UV，データー処理装置：日本分光(株)製 JASCO/JMBS BORWIN，Dell-Latitude CP/，HP LaserJet 6P。

7. 規格値

Y-5の規格値は食添VIに従った。ただし，HPLCに関しては食添VIIに準じた。

実験結果及び考察

1. 試験成績

Table 1にY-5の規格値及び不適検体A-aの試験成績を示した。“他の色素”の項(ろ紙クロマトグラフィーによる)以外は全て規格内であった。

2. ろ紙クロマトグラフィー

食添VIに従ってろ紙クロマトグラフィーを行った結果，Fig.1に示したように，A-aは主色素のスポット以外に原点近くにスポットを認めた。主色素に対して10%濃度の副成色素標品のスポットは肉眼でようやく確認出来，それらのRfからA-aの主色素以外のスポット(他の色素)はRS-SA又はGS-SAと推測された。

3. HPLC

Fig.2に示したように，Y-5の未反応原料，反応中間体及び副成色素の標品のHPLCクロマトグラムは，食添VII記載のHPLC条件²⁻³⁾によって分析すると，GS-SA及びDAADBSAのピークが同一の保持時間(Rt)を示し分離できないが(Fig.2-I)，A液を10分間保持することにより，GS-SA及びDAADBSAが分離した(Fig.2-II)⁴⁾。したがって，改良したHPLC条件によって当該Y-5の分析を行った。

当該Y-5(A-a)中の巨大ピーク4のRtはRS-SAに一致し(Fig.3,A-a)，吸収スペクトルも標品と全く一致した(Fig.4)。一方，同一会社の合格検体であるA-bのピーク4は小さく(Fig.3,A-b)，A-a中の他の色素はRS-SAと判定され，その含有量は5%以上であった。また，A-a中にはRS-SA以外の不明な有機性不純物ピークも検出された。

平成10年度に行った製品検査中すべてのY-5検体につ

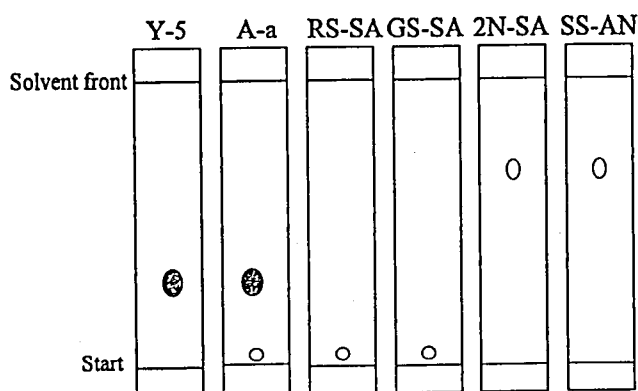


Fig.1. Paper chromatograms of rejected sample and standards
Substance:standard of Y-5; 1 mg/ml, A-a(rejected sample); 1 mg/ml, another standards;each 0.1 mg/ml.
Condition:developing solvent;a mixture of n-butanol, 1% ammonia solution and absolute ethanol(6:3:2),sample size; 2 μl.

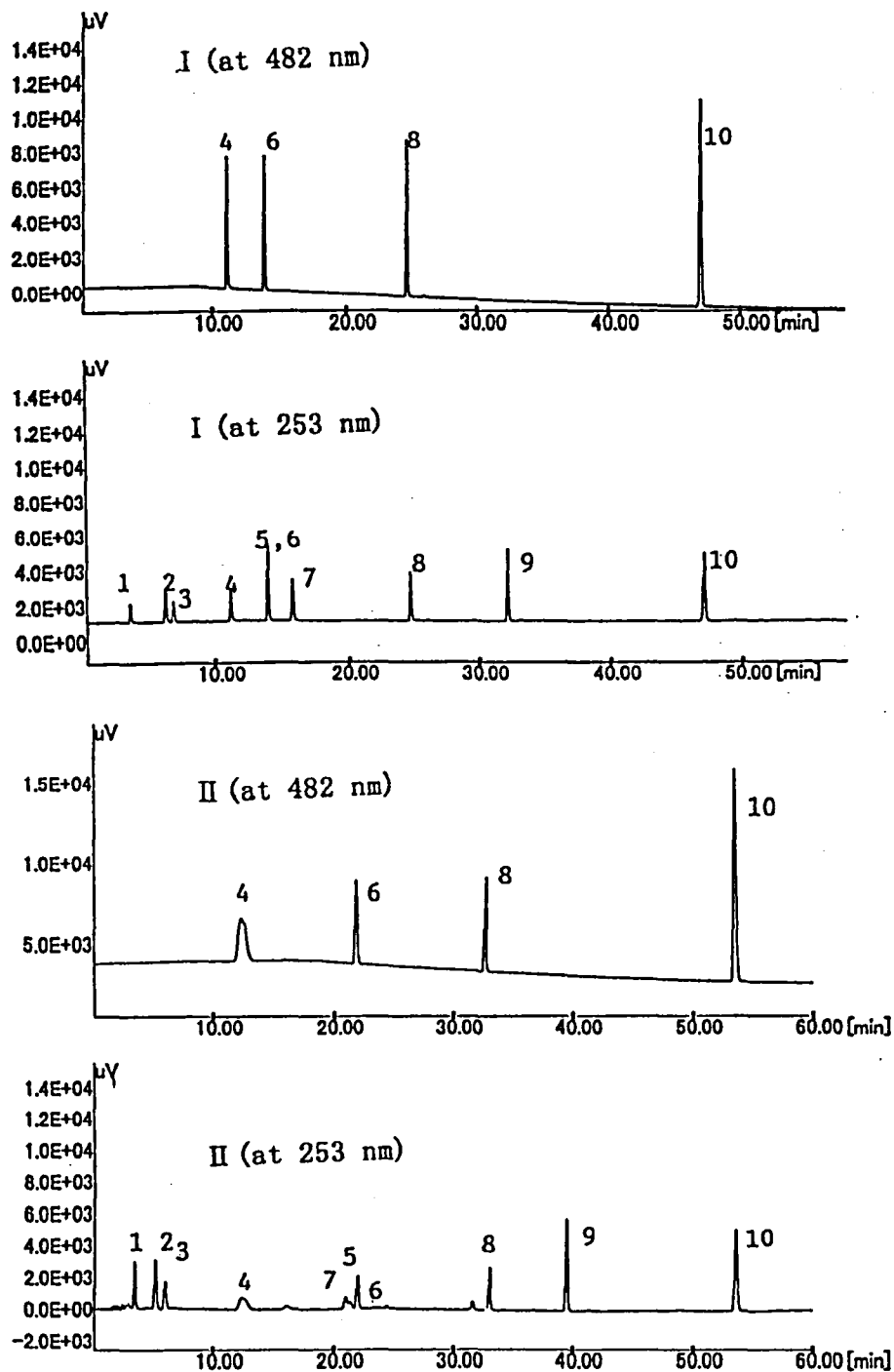


Fig.2. HPLC chromatograms of standard solution of sunset yellow FCF and organic impurities

1: SA, 2: GS, 3: RS, 4: RS-SA, 5: DAADBSA, 6: GS-SA, 7: SS, 8: Y-5, 9: DONS, 10: 2N-SA+SS-AN.

HPLC condition: column: L-column ODS (ϕ 4.6 mm \times 250 mm), eluent; A, 0.02 mol/l ammonium acetate, B, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (7/3), flow rate; 1.0 ml/min, concentration of each standard solution; 1.0 μ g/ml, sample size; 20 μ l.

Condition I : column temp.; 30 $^\circ\text{C}$, gradient profile; 0 min \rightarrow 50 min (A:100 \rightarrow 42), 50 min \sim 60 min (A:42).

Condition II : column temp.; 40 $^\circ\text{C}$, gradient profile; 0 min \sim 10 min (A:100), 10 min \rightarrow 50 min (A:100 \rightarrow 42), 50 min \sim 55 min (A:42).

Column was allowed equilibrium with eluent A for 15 min before reanalysis, at HPLC condition I or II, respectively.

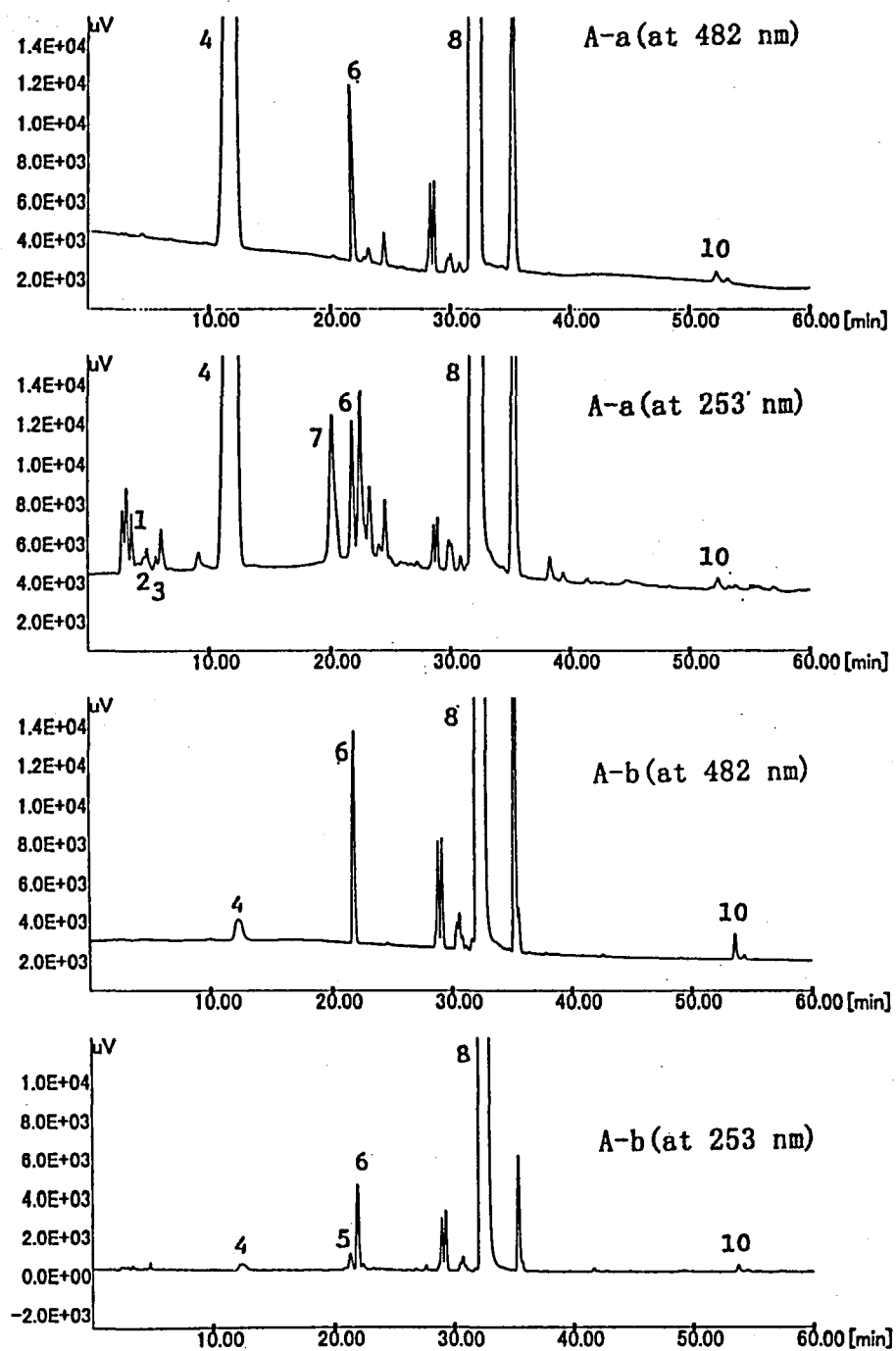


Fig.3. HPLC chromatograms of sample solution of Y-5
 HPLC condition II: see Fig.2.
 Substance: A-a; rejected sample, A-b; submitted sample produced by the same company.
 Concentration of sample solution: 1 mg/ml.

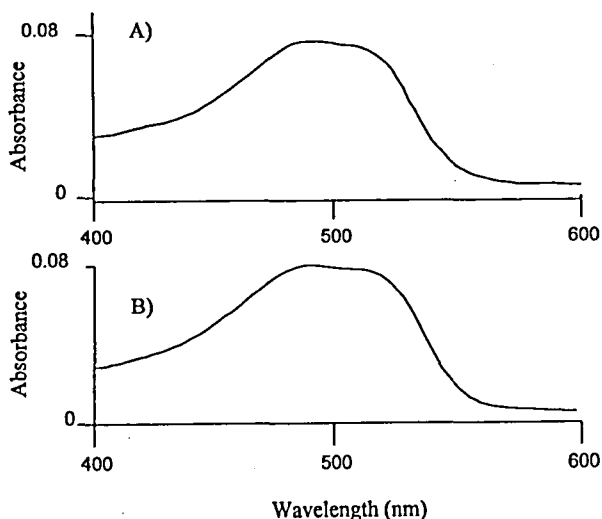


Fig.4. Absorption spectra of the peak corresponded to the retention time of RS-SA

A) Spectrum of standard solution (RS-SA:10 μ g/ml).
B) Spectrum of sample solution (A-a:1mg/ml).

いて、同様に HPLC により有機性不純物を測定し、その結果を Table 2 に示した。A-a 以外の検体については、有機性不純物はいずれも少なく、食添Ⅶの規格値にも合格していた。

以上のことから、ろ紙クロマトグラフィーで認められた他の色素は RS-SA であり、この副成色素は原料中に含まれる不純物がジアゾカップリング時に生成したと考えられた。

不適検体を製造した会社に対して、反応原料中の夾雑物の含有量を少なくするよう指導したことにより、その後の同社から製造された Y-5 にはろ紙クロマトグラフィーによる不随色素は検出されず、HPLC による他の夾雑物ピークも Fig.3, A-b のように少なく、すべて食添Ⅶの規格値内であった。

まとめ

平成 10 年度の製品検査中 Y-5 において、“他の色素”の項(ろ紙クロマトグラフィーによる)で付随色素が検出され不適と判定された検体が 1 件認められた。当該 Y-5 中の未反応原料、反応中間体及び副成色素の含有量を HPLC により測定した結果、他の色素は RS-SA であり、約 5% 含んでいることが明らかになった。また、他の Y-5 の合格検体はいずれも食添Ⅶの規格値にも合格していた。

文献

- 1) 厚生省：“第六版食品添加物公定書” pp.29-33, 325(1992)
- 2) 厚生省：“第七版食品添加物公定書” pp.25-31, 308-309(1999)
- 3) 山田真記子, 中村幹雄, 山田 隆, 米谷民雄, 合田幸広：日食化誌, 3, 151-155 (1996)
- 4) 辻 澄子, 松村郁子, 中村優美子, 外海泰秀：日本食品衛生学会第 77 回学術講演会講演要旨集, p.33 (1999)

Table 2. Contents of raw materials, intermediates and subsidiary dyes in inspected samples of sunset yellow FCF

Company Sample (n)	Raw materials and intermediates (%)							Subsidiary dyes (%)			
	SA	SS	RS	GS	DONS	DAADBSA	Total	RS-SA	GS-SA	2N-SA+SS-AN	Total
A-a	0.03	0.29	0.09	0.02	ND	ND	0.43	5.14	0.01	0.04	5.19
b	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	0.06	0.03	0.21	0.05	0.29
c	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.04	0.31	0.02	0.37
d	0.01	0.09	ND	ND	ND	0.02	0.12	0.01	ND	0.01	0.02
e	ND	0.13	ND	ND	ND	ND	0.13	0.56	0.01	0.02	0.59
f	0.12	0.01	ND	ND	0.12	ND	0.25	0.17	0.11	0.31	0.59
B(16)	ND-0.03	ND-0.19	ND	ND	ND	ND-0.06	0.04-0.20	ND-0.03	ND-0.21	ND-0.03	ND-0.26
C(7)	ND-0.02	0.02-0.15	ND	ND	ND	ND-0.13	0.10-0.20	ND-0.44	ND-0.02	0.02-0.05	0.02-0.47
D(5)	ND-0.01	0.05-0.13	ND	ND	ND	ND-0.02	0.06-0.15	ND-0.07	ND-0.05	ND-0.07	0.04-0.11
E(5)	ND-0.01	0.01-0.07	ND	ND	ND	ND-0.04	0.02-0.11	0.04-0.95	ND-0.01	0.01-0.03	0.07-0.98
F(1)	0.01	0.07	ND	ND	ND	0.03	0.11	0.04	0.01	0.02	0.07

Specification of JSFA-VII

Total of raw materials and intermediates: not more than 0.5 %

Total of subsidiary dye: not more than 5 %

Total of three subsidiary dyes except of RS-SA:
not more than 2 %

ND: less than 0.01 %

平成10年度における食用タール色素(アルミニウムレーキを含む)製品検査より
算出した生産量

辻 澄子[#]・岡田 舞・松村郁子・中村優美子・外海泰秀

Estimated Production by the Official Inspection of Coal-Tar Dyes
(Including Dye Aluminum Lakes) in Fiscal Year 1998

Sumiko Tsuji[#], Mai Okada, Ikuko Matsumura, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai

There were 284 official inspections of coal-tar dyes and their lakes in fiscal year 1998, and 283 of the lots qualified, one of the 40 samples of Food Yellow No. 5 was rejected.

The quantity of coal-tar dyes that passed inspection in Japan in fiscal year 1998 reached 150.3 tons. Coal-tar dye production is summarized by manoth in Table 2 and by manufacturer in Table 3. The food coal-tar dye produced in the largest quantity was Food Yellow No. 4, accounting for 44.1% during this period.

Keywords : production, food color, coal-tar dye, official inspection, dye aluminum lake

食品用の着色料は合成着色料と天然着色料に大別され、合成着色料として主にタール色素が汎用されている。わが国での食用タール色素として、現在はタール色素12品目とそのアルミニウムレーキ8品目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、その販売などに当たって製品検査が必要とされている。製品検査に申請されたタール色素は実際に食用として用いられる量は減少する傾向にあるが、医薬品、化粧品及び幼児玩具など法的に定められた用途以外、例えばサインペン、インクジェットプリンター用インク、トイレの洗浄剤など、多方面に使用されていくものと考えられる。

わが国における食用タール色素の製品検査は、昭和26年より東京及び大阪で行っていたが、平成2年4月1日より大阪支所食品試験部ですべての検査を行っている。したがって、食用タール色素の需要の状況は製品検査申請書に記載されている申請数量により、明確に把握できる。申請数量はこれまで、タール色素のロットサイズ300kgまで製品検査1件としていた。しかし、規制緩和の要求の下、「タール色素の製品検査におけるロットを形成する最大量については、これまで300kgとされていたが、この最大量を撤廃することとした¹⁾」に改められ、平成10年4月1日から

施行された。Table 1に示したように、申請件数として平成9年度571件から平成10年度は284件とほぼ半分になったが、各保健所からの申請手続き回数は平成9年度73回から平成10年度68回と余り変化がなかった。

平成10年度に申請された284検体の内訳は、食用赤色2号(R-2);6,食用赤色3号(R-3);16,食用赤色40号(R-40);4,食用赤色102号(R-102);51,食用赤色104号(R-104);10,食用赤色105号(R-105);2,食用赤色106号(R-106);17,食用黄色4号(Y-4);89,食用黄色5号(Y-5);40,食用緑色3号(G-3);1,食用青色1号(B-1);25,食用青色2号(B-2);4,食用赤色3号アルミニウムレーキ(R-3Al);5,食用黄色4号アルミニウムレーキ(Y-4Al);4,食用黄色5号アルミニウムレーキ(Y-5Al);6,食用青色1号アルミニウムレーキ(B-1Al);2,食用青色2号アルミニウムレーキ(B-2Al);2検体であった。

タール色素及びタール色素レーキは、検査当時の第六版食品添加物公定書²⁾において含量、性状、確認試験、純度試験(水不溶物、塩化物及び硫酸塩、重金属、ヒ素、他の色素)及び乾燥減量の規格値が定められているが、申請されたY-5の40検体のうち1検体に他の色素のはん点が認められ不合格となり、合格検体総数は283検体であった。その他、合格した検体の中で、R-40の4検体の内1検体が4-アミノ-5-メトキシ-2-メチルベンゼンスルホン酸において規格値に近い結果を示し、B-1の25検体の内1検体は含量において、また、他の1検体は塩化物及び硫酸塩において規格値

[#]To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail:tsuji@nihs.go.jp

Table.1 Application number according to prefecture on the official inspections of coal-tar dyes

Prefecture	F.Y.1998		F.Y.1997	
	Lot size Application times	Unlimited No. of Sample	Not more than 300kg Application times	No. of Sample
Osaka	22	122	31	286
Saitama	20	102	21	234
Tokyo	11	16	13	32
Kanagawa	13	39	4	9
Shiga	2	5	2	6
Hyogo	0	0	1	3
Tokushima	0	0	1	1
Total	68	284	73	571

に近い結果を示した。平成11年4月に公表された第7版食品添加物公定書⁴⁾では、R-40以外のアゾ色素の純度試験に高速液体クロマトグラフィーによる試験法が追加された。したがって、タール色素の製品検査は今後更に強化される。

平成10年度に申請された284検体の内合格した283検体について各色素毎に月別及び製造社別の許可量統計を作成した。各色素の月別許可量をTable 2に、製造社別許可量をTable 3に示した。

総量は164.5トン(平成8年度)⁵⁾、160.7トン(平成9年度)⁶⁾、平成10年度は150.3トンと少しずつ減少傾向を示した。

各色素別では製造量の多いものからY-4、R-102、Y-5、B-1、R-3であり、前年度に比べB-1とR-3の順位の入れかわりがあったが製造量あまり変わらなかった。前年度製造されていなかったG-3は製造されたが、前年度製造されていたR-40AIは製造されなかった。また、R-2AI及びG-3AIは前年度と同様製造されなかった。

色素別製造量では、第1位のY-4が63.8トン(色素別比率39.8%)から66.2トン(44.1%)と増加したのに対して、第2位のR-102は38.0トン(23.7%)から29.3トン(19.5%)と減少した。第3位のY-5は24.1トン(15.0%)から22.8

トン(15.2%)とほぼ同量であった。上位5色素の製造量合計は131.1トンで総製造量の88.3%であった。

製造社別では製造量の多い順にA,B,G,C,D,F社であり、前年度の順位からA社とB社が入れかわり、前年度6位のG社は3位となった。また、昨年度申請製造社は12社であったが、本年度は10社に減少した。

製造量はA社が54.1トン(製造社別比率36.0%)と最も多く、次いでB社が50.5トン(33.6%)、G社20.0トン(13.3%)、C社14.6トン(9.7%)であった。

文 献

- 1) 平成10年3月30日生衛発第546号厚生省生活衛生局長通知
- 2) 厚生省：“第六版食品添加物公定書” pp.29-38(1992)
- 3) 辻 澄子, 松村郁子, 中村優美子, 外海泰秀：食用黄色5号中の不適事例について。国立衛研報, 117, 投稿中(1999)
- 4) 厚生省：“第7版食品添加物公定書” pp.25-34(1999)
- 5) 石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正：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。国立衛研報, 115, 171-174(1997)
- 6) 石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 外海泰秀, 柴田 正：平成9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。国立衛研報, 116, 153-156(1998)

Table 2. Monthly permission quantity of coal-tar dye

(Unit:kg)

Dye	1999												F. Y. 1998		F. Y. 1997		
	Application month												Total	Ratio (%)	Total	Ratio (%)	
	1998	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February					March
R-2	300	---	305	430	495	---	---	670	---	---	---	---	---	2200	1.46	1565	0.98
R-3	300	1535.95	300	850	---	520	300	300	300	300	1560	300	300	6265.5	4.17	8374.9	5.22
R-40	---	231	---	225	---	---	---	---	---	---	230	185	---	871	0.60	620	0.39
R-102	1504.925	3150	2545	990	2397.5	2770	1945	1945	3525	2200	3340	2830	2080	29277.425	19.48	37960	23.67
R-104	1200	300	300	36.5	---	100	---	---	---	---	500	---	300	2736.5	1.82	3350	2.09
R-105	---	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	256.25	556.25	0.37	250	0.16
R-106	600	200	4285	2200	200	200	500	500	780	---	500	200	---	5808.5	3.86	4544.9	2.83
Y-4	1800	7180	5989	5925	5977.5	1570	7875	7875	7730	3630	8250	4545	5700.25	66221.75	44.06	63765.875	39.77
Y-5	---	3440	1700	2112.5	2967	700	1590	1590	2465	1500	1275	2720	2340.25	22309.75	15.17	24055	15.00
G-3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	48.225	48.225	0.03	0	0
B-1	300	600	600	699.5	600	300	600	600	500	300	841	600	600	6540.5	4.35	7351	4.53
B-2	---	---	---	553.5	---	445	---	---	---	---	---	300	---	1298.5	0.86	1134.925	0.71
R-2A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
R-3A1	300	---	400	---	---	---	---	---	4.9	---	290	300	---	1294.9	0.86	1200	0.75
R-40A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	30	0.02
Y-4A1	---	750	---	---	---	---	---	---	---	---	600	---	300	1650	1.1	2710	1.69
Y-5A1	---	---	---	500	---	---	300	300	---	---	300	600	300	2000	1.33	1510	0.94
G-3A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0
B-1A1	---	---	326	---	---	---	---	---	---	300	---	---	---	626	0.42	1500	0.94
B-2A1	---	---	---	---	100	---	---	---	---	---	---	---	1.4	101.4	0.07	410	0.26
F. Y. 1998																	
Total	6304.925	17686.5	12893.5	14522	12737	6605	13780	13780	15304.9	7980	17686	12580	12226.375	150396.2	----	----	----
Monthly ratio (%)	4.19	11.77	8.58	9.66	8.47	4.39	9.17	9.17	10.18	5.31	11.77	8.37	8.14	100.00	----	----	----
F. Y. 1997																	
Total	2672.875	18087.725	14866	15045	15630	5073	16286	16286	14300	9368	14628	10860	13515	160331.6	----	----	----
Monthly ratio (%)	7.91	11.28	9.27	9.38	9.75	3.17	10.16	10.16	8.92	5.84	9.12	6.77	8.43	100.00	----	----	----

Table 3. The permission quantity of coal-tar dye according to the manufacture company

(Unit: kg)

Dye	The manufacture company												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
R-2	675	600	430	---	---	---	495	---	---	---	---	---	---
R-3	2960	600	300	1200	---	900	305.5	---	---	---	---	---	---
R-40	686	---	185	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R-102	7880	13600	2520	300	---	600	4372.5	---	---	4.925	---	---	---
R-104	136.5	1800	---	---	---	300	500	---	---	---	---	---	---
R-105	---	---	---	---	---	300	256.25	---	---	---	---	---	---
R-106	3000	1200	200	600	---	200	608.5	---	---	---	---	---	---
Y-4	21415	26700	7040	300	---	1200	9341.75	---	235	---	---	---	---
Y-5	9375	3000	2850	4200	---	300	3084.75	---	---	---	---	---	---
C-3	---	---	---	---	---	---	48.235	---	---	---	---	---	---
B-1	3100	1800	600	41	---	---	599.5	300	100	---	---	---	---
B-2	125	300	445	---	---	---	428.5	---	---	---	---	---	---
R-2AI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R-3AI	990	300	---	---	---	---	---	---	---	4.9	---	---	---
R-40AI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y-4AI	1350	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y-5AI	1700	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G-3AI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B-1AI	626	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B-2I	100	---	---	---	1.4	---	---	---	---	---	---	---	---
F. Y. 1998													
Total	54118.5	50500	14570	6641	1.4	3800	20040.475	300	325	9.825	0	0	0
Ratio (%)	36.00	33.60	9.69	4.42	0.01	2.53	13.33	0.20	0.21	0.01	0.00	0.00	0.00
F. Y. 1997													
Total	61217	64500	17240	5600	0	5300	4900	300	715	29.6	260	240	30
Ratio (%)	38.18	40.23	10.75	3.49	0.00	3.30	3.06	0.19	0.45	0.02	0.16	0.15	0.02

国立医薬品食品衛生研究所ジゴキシン標準品 (Control 991)

斎藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛[#]・岡田敏史

Digoxin Reference Standard (Control 991) of National Institute of Health Sciences

Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto[#], and Satoshi Okada

The raw material of digoxin was examined to prepare a "Digoxin Reference Standard". The analytical data obtained were: optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +11.7^\circ$; loss on drying, 0.008%; infrared spectrum, the same as that of the Digoxin Reference Standard (Control 807); high-performance liquid chromatography, several impurities detected and the total amount estimated to be about 0.31%; assay by spectrophotometry, 100.1%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Digoxin Reference Standard (Control 991) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: digoxin, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方「ジゴキシン」、「ジゴキシン錠」、及び「ジゴキシン注射液」の純度試験及び定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「ジゴキシン標準品 (Control 991)」（日本薬局方標準品）を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料はグラクソウエルカム社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。乾燥減量：0.015 %，HPLCによる純度試験：純度 99.8 %，定量：102.2 %。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方ジゴキシン標準品 (Control 807；日局標準品と略称)¹⁾を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又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、下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計：島津製作所，UV2500PC。

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。

液体クロマトグラフ装置：島津製作所製の LC-6A 型ポンプ，SPD-6A 型検出器，CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc。

4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法および医薬品各条「ジゴキシン」の試験法を準用した。

1) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品約 15 mg を精密に量り、希エタノール 15 ml を加えて溶かし、試料溶液とする。この液 1 ml を正確に量り、希エタノールを加えて正確に 100 ml とし、標準溶液とする。標準溶液 5 ml を正確に量り、希エタノールを加えて正確に 100 ml とし、希釈標準溶液とする。試料溶液、標準溶液、及び希釈標準溶液 10 μ 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。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピーク面積に対する相対値 (%) を記録する。

操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：218 nm)

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm ϕ × 250 mm)

カラム温度：35 $^\circ$ C 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液 (7 : 3)

流量：1.5 ml/min

カラムの選定：ジゴキシン及びジゴキシゲニン各 1 mg を希エタノールに溶かして 25 ml とする。この液 10 μ l につき、上記の条件で操作するとき、ジゴキシゲニン、ジゴキシンの順に溶出し、分離度が 2 以上のものを用いる。

検出感度：希釈標準溶液 10 μ l につき分析するとき、ジゴキシンのピーク面積が自動積分法により確実にカウントされるように調整する。また、標準溶液 10 μ l から得られ

[#] To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006 Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

るジゴキシンのピーク高さがフルスケールの 20 %前後となるようにデータ処理装置の感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、ジゴキシンの保持時間の3倍の範囲

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき、試験を5回繰り返すとき、ジゴキシンのピーク面積の相対標準偏差は 2.0%以下である。

5. 試験結果

1) 性状

白色の結晶性粉末で、においはない。

2) 乾燥減量

本品の乾燥減量は $0.008 \pm 0.014\%$ ($n=3$) (0.2 g, 105°C, 1時間) であった。

3) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

4) 旋光度

日局「ジゴキシンの」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 $[\alpha]_D^{20}$ は $+11.7 \pm 0.2^\circ$ ($n=5$) であった。

5) HPLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 2 に示した。標準品原料及び日局標準品とも、微量の不純物ピークが複数個検出された。面積百分率で 0.05 %以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で $0.31 \pm 0.04\%$ ($n=8$)、日局標準品で $0.64 \pm 0.02\%$ ($n=8$) と推定された。

6) 定量

日局「ジゴキシンの」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、 100.1 ± 1.0 ($n=4$) の値が得られた。

結 論

ジゴキシンの標準品原料につき、日局標準品 (Control 807) を対照にその品質を比較検討した結果、両者の間に物質特性の差はなく、標準品原料の純度は 99.5 %以上であることを認めた。これらの結果から、本標準品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ものと認定し、Control 991 として製造・配布することとした。

文 献

1) 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 衛生試報, 101, 121 (1983)

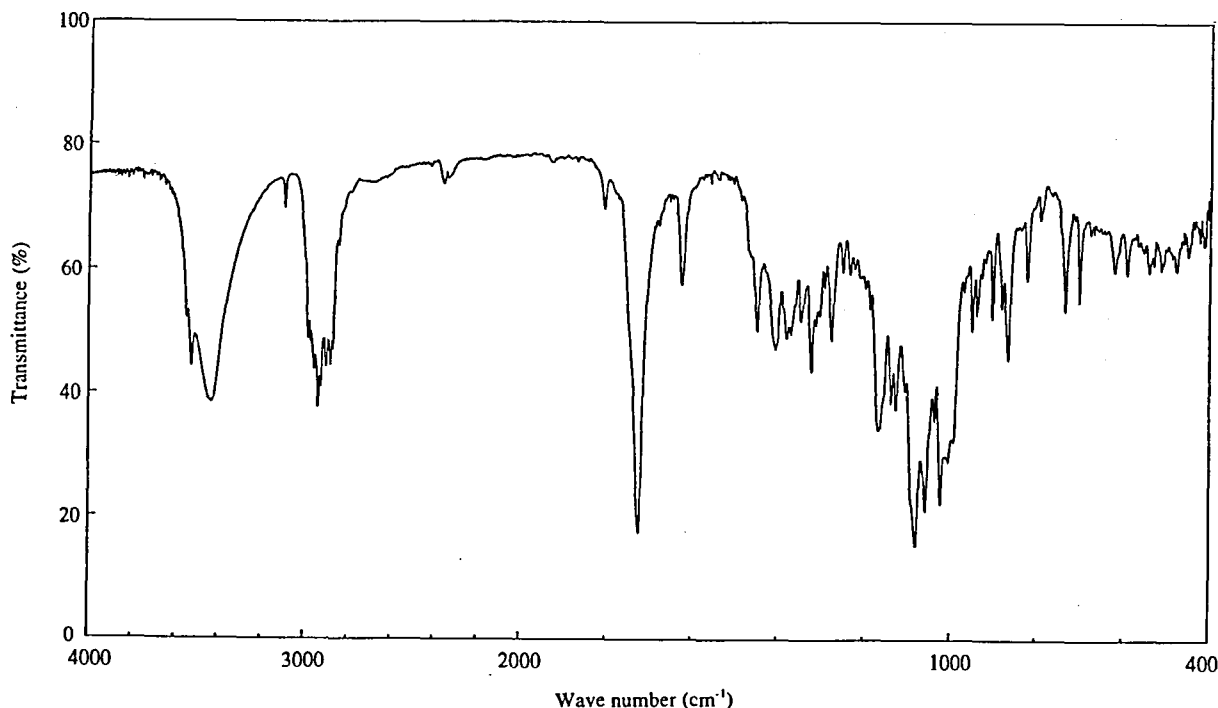


Fig. 1. Infrared absorption spectrum of the raw material for Digoxin Reference Standard

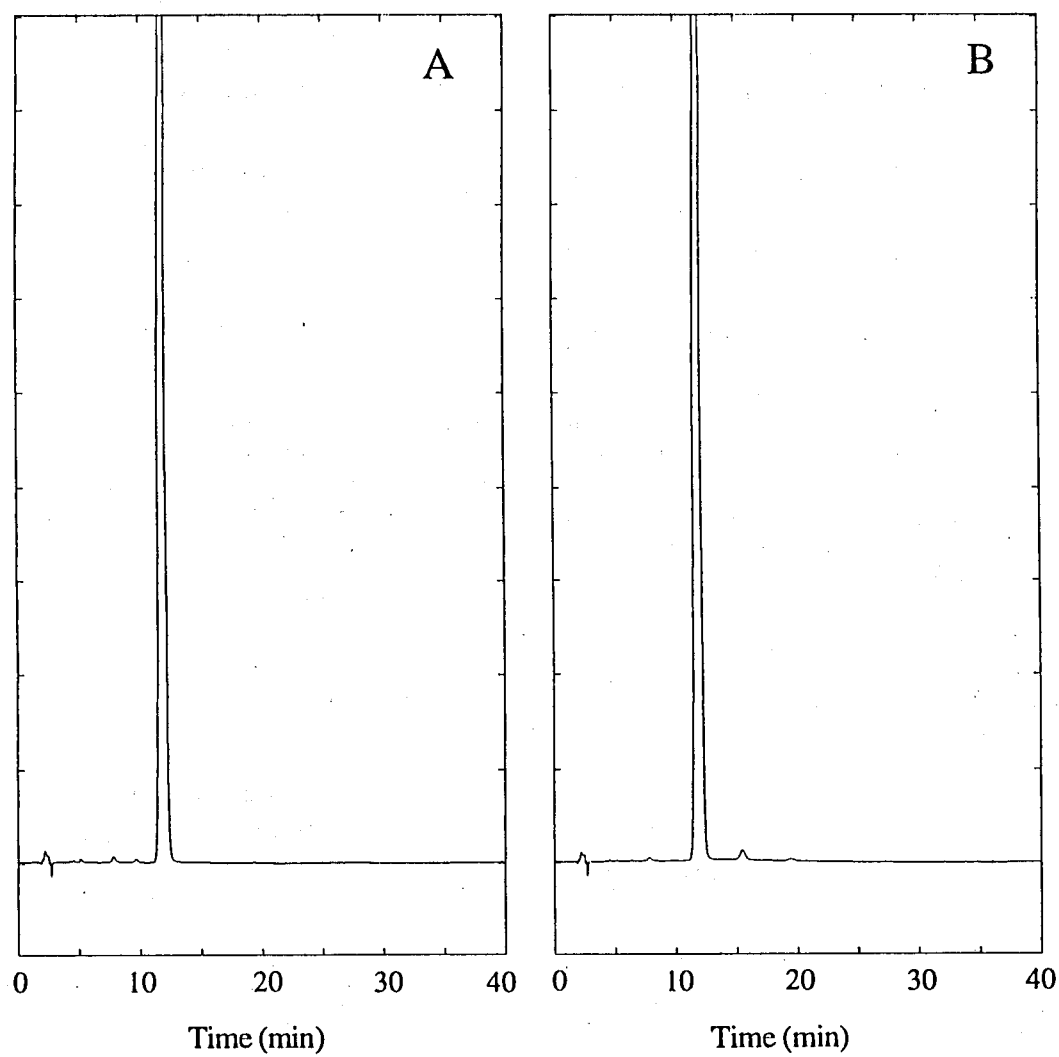


Fig.2. High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Digoxin Reference Standard (Control 807) (B)

国立医薬品食品衛生研究所ラナトシド C 標準品 (Control 981)

齋藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛*・岡田敏史

Lanatoside C Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto*, and Satoshi Okada

The raw material of lanatoside C was examined for preparation of the "Lanatoside C Reference Standard". The analytical data obtained were: melting point, 247.4 °C; optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +34.0^\circ$; loss on drying, 6.93%; infrared spectrum, the same as that of the Lanatoside C Reference Standard (Control 784); thin-layer chromatography, two impurities detected; high-performance liquid chromatography, several impurities detected and the total amount estimated to be about 1.26%; assay by spectrophotometry, 103.0%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Lanatoside C Reference Standard (Control 981) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: lanatoside C, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方「ラナトシド C」及び「ラナトシド C 錠」の純度試験及び定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「ラナトシド C 標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は藤沢薬品工業株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。乾燥減量：5.3 %，旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ ：+33°，定量：98.7 %。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方ラナトシド C 標準品 (Control 784；日局標準品と略称)¹⁾を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又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，下記の測定装置を用いた。

融点測定器：宮本理研，PA-20S 型。

自記分光光度計：島津製作所，UV2500PC。

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。

液体クロマトグラフ装置：島津製作所製の LC-6A 型ポンプ，SPD-6A 型検出器，CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc。

4. 試験方法

特に記すもののほかは，日局一般試験法及び医薬品各条「ラナトシド C」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 F₂₅₄ (厚さ，0.25 mm)。

展開溶媒：ジクロロメタン/メタノール/水混液 (84:15:1)。

試料溶液及び標準溶液の調製：標準品原料及び日局標準品約 10 mg を精密に量り，それぞれにメタノール 2 ml を正確に加えて溶かし，試料溶液及び標準溶液とする。

操作条件及び検出方法：試料溶液及び標準溶液のそれぞれ 10 μl を薄層板にスポットし，約 13 cm 展開した後，風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧した後，110 °C で 10 分間加熱し，直ちに不純物スポットの有無を確認する。

2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

本品約 10 mg を精密に量り，希エタノール 10 ml を加えて溶かし，試料溶液とする。この液 1 ml を正確に量り，希エタノールを加えて正確に 100 ml とし，標準溶液とする。標準溶液 5 ml を正確に量り，希エタノールを加えて正確に 100 ml とし，希釈標準溶液とする。試料溶液，標準溶液及び希釈標準溶液 10 μl につき，次の条件で液体ク

* To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006 Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

ロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピーク面積に対する面積百分率を求める。

操作条件

検出器：紫外吸光度計（測定波長：218 nm）

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mmφ×250 mm)

カラム温度：35℃ 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液 (7:3)

流量：1.5 ml/min

検出感度：希釈標準溶液 10 μ l につき分析するとき、ラナトシドCのピーク面積が自動積分法により確実にカウントされるように調整する。また、標準溶液 10 μ l から得られるラナトシドCのピーク高さがフルスケールの 20%前後となるようにデータ処理装置の感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、ラナトシドCの保持時間の3倍の範囲

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき、試験を5回繰り返すとき、ラナトシドCのピーク面積の相対標準偏差は 2.0%以下である。

5. 試験結果

1) 性状

白色の粉末で、においはない。

2) 乾燥減量

本品の乾燥減量は 6.93 \pm 0.03% (n=3) (0.5 g, 減圧, 五酸化リン, 60℃, 4時間) であった。

3) 融点

本品の融点は 247.4 \pm 0.1℃ (n=3) であった。

4) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

5) 旋光度

日局「ラナトシドC」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 $[\alpha]_D^{20}$ は +34.0 \pm 2.1° (n=3) であった。

6) 純度試験

(a) TLC 法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 2 に示した。試料溶液及び標準溶液とも2個の不純物スポットが検出された。

(b) HPLC 法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 3 に示した。標準品原料 (A) 及び日局標準品 (B) とも微量の不純物ピークが多数検出された。面積百分率で 0.05% 以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で 1.36 \pm 0.07% (n=9)、日局標準品で 2.83 \pm 0.07% (n=6) と推定された。

7) 定量

日局「ラナトシドC」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、103.0%の値が得られた。これは、標準品原料の絶対純度が上昇したことにより、定量値が 100% を越えたものと考えられる。なお、日局のラナトシドCの定量法は測定誤差が大きく、今回の測定においてもその測定値の標準誤差は 7.4% (n=20) であった。

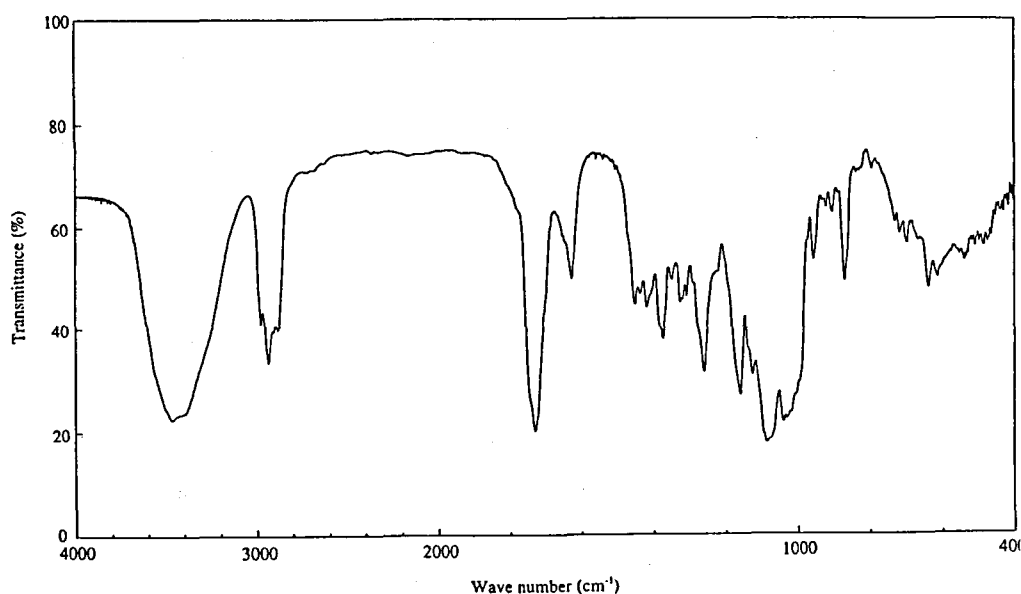


Fig. 1. Infrared absorption spectrum of the raw material for Lanatoside C Reference Standard

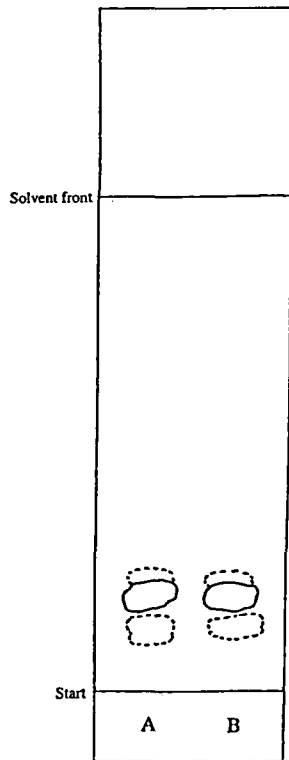


Fig. 2. Thin-layer chromatograms of the raw material and the Lanatoside C Reference Standard
Spot: 50 μ g of the Lanatoside C Reference Standard (Control 784) (A) and the raw material (B)

結 論

ラナトシドC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ものと認定し、Control 981として製造・配布することとした。

文 献

- 1) 徳永裕司, 木村俊夫, 川村次良: 衛生試報, 97, 117 (1979)

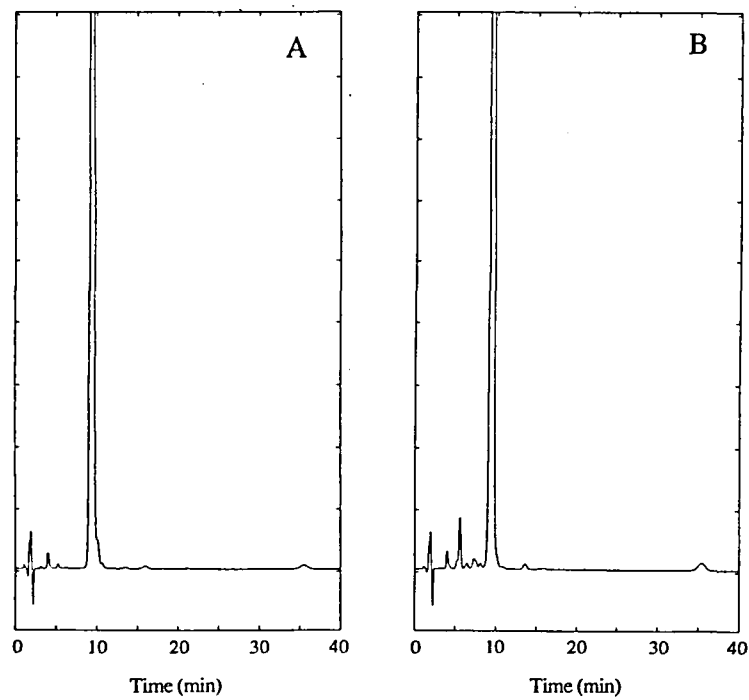


Fig. 3. High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Lanatoside C Reference Standard (Control 784) (B)

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 991)

齋藤博幸・河口和子・岩田美保・前川京子・谷本 剛*・岡田敏史

Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 991) of National Institute of Health Sciences

Hiroyuki Saito, Wako Kawaguchi, Miho Iwata, Keiko Maekawa, Tsuyoshi Tanimoto*, and Satoshi Okada

The raw material of glycyrrhizic acid was examined for preparation of the "Glycyrrhizic Acid Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum: λ_{\max} , 251 nm; specific absorbance ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in ethanol at 251 nm, 146; IR spectrum, specific absorptions at 1716, 1656, 1215, and 1170 cm^{-1} ; and the spectrum of raw material was consistent with that of Standard (Control 941). Also, thin-layer chromatography, no impurities detected; high-performance liquid chromatography, three impurities detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.1%, and the total amount of impurities was less than 0.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 991) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: glycyrrhizic acid, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十三改正日本薬局方に収載されている「カンゾウ」, 「カンゾウ末」, 「カンゾウエキス」及び「カンゾウ粗エキス」中のグリチルリチン酸含量の定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「グリチルリチン酸標準品 (Control 991)」（日本薬局方標準品）を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は丸善製薬株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。水分: 0.8 %, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ_{\max}): 148.7, HPLCによる純度試験: 純度 99.7 %。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方グリチルリチン酸標準品 (Control 941; 日局標準品と略称)¹⁾を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又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、下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC.

赤外分光光度計: 日本分光, FT-IR VALOR-III.

水分測定器: 平沼産業, AQ-6 型.

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc.

4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料をデシケーター中で 12 時間以上乾燥し (減圧 0.67 kPa 以下, 五酸化リン, 50 °C), その約 4 mg を精密に量り, 希エタノール 30 ml を加えて溶かした後, 希エタノールを加えて正確に 100 ml とし, 試料溶液とする。この液につき, 希エタノールを対照にして吸光度測定法により, 210~300 nm の波長範囲における吸収スペクトルを測定し, 吸収極大波長における吸光度より比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ を求める。

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料をデシケーター中で 12 時間以上乾燥し (減圧 0.67 kPa 以下, 五酸化リン, 50 °C), その 1 mg を量り, 赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム 0.2 g と混合, 磨砕した後, 打錠する。この臭化カリウム錠剤につき, 空気を対照に 4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定する。

3) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

標準品原料 5 mg を希エタノール 2.5 ml に溶かし, 試料溶液とする。この液 0.1, 0.3, 0.5 ml を量り, 希エタノールを加えてそれぞれ正確に 50 ml とし, 標準溶液 1,

* To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006 Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

2, 3とする。試料溶液及び各標準溶液 10 μ lにつき、以下の条件で薄層クロマトグラフ法による試験を行う。

薄層板：メルク社製プレコート薄層板シリカゲル F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)。

展開溶媒：n-ブタノール/水/氷酢酸混液 (7:2:1)。

展開距離：10 cm

検出：1) 紫外線照射 (主波長：254 nm)

2) 薄めた硫酸 (1 \rightarrow 2) を噴霧し, 105 $^{\circ}$ C, 10 分間加熱

不純物スポットの蛍光または呈色の強さを標準溶液 1~3 のスポットのそれと比較し, 不純物量を推定する。

4) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料約 5 mg を精密に量り, 希エタノール 5 ml を加えて溶かし, 試料溶液とする。この液 1 ml を正確に量り, 希エタノールを加えて正確に 100 ml とし, 標準溶液とする。標準溶液 5 ml を正確に量り, 希エタノールを加えて正確に 100 ml とし, 希釈標準溶液とする。試料溶液, 標準溶液及び希釈標準溶液 20 μ 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。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し, 全ピーク面積に対する相対面積百分率を求める。

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ ×150 mm)

カラム温度：30 $^{\circ}$ C 付近の一定温度

移動相：薄めた酢酸 (1 \rightarrow 50) /アセトニトリル混液 (20:11)

流量：グリチルリチン酸の保持時間が約 10 分になるように調整する。

カラムの選定：グリチルリチン酸 5 mg 及びパラオキシ安息香酸プロピル 1 mg を希エタノールに溶かして 20 ml とする。この液 20 μ lにつき, 上記の条件で操作するとき, グリチルリチン酸, パラオキシ安息香酸プロピルの順に溶出し, それぞれのピークが完全に分離するものを用いる。

検出感度：希釈標準溶液 20 μ lにつき分析するとき, グリチルリチン酸のピーク面積が自動積分法により確実にカウントされるように調整する。また, 標準溶液 20 μ l から得られるグリチルリチン酸のピーク高さがフルスケールの 20%前後となるようにデータ処理装置の感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後, グリチルリチン酸の保持時間の 3 倍の範囲

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき, 試験を 5 回繰り返すとき, グリチルリチン酸のピーク面積の相対標準偏差は 1.5%以下である。

5) 水分

標準品原料約 5 mg を精密に量り, 電量滴定法によるカールフィッシャー水分測定法により本候補品中の水分含量を測定する。

5. 試験結果

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料の希エタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき, 波長 251 nm 付近に吸収の極大が観察され (Fig. 1), 極大吸収波長における比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (251 nm) は 145.9 ± 1.3 (n=8) であった。

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき, 同一波長のところに同様の強度の吸収が認められた。

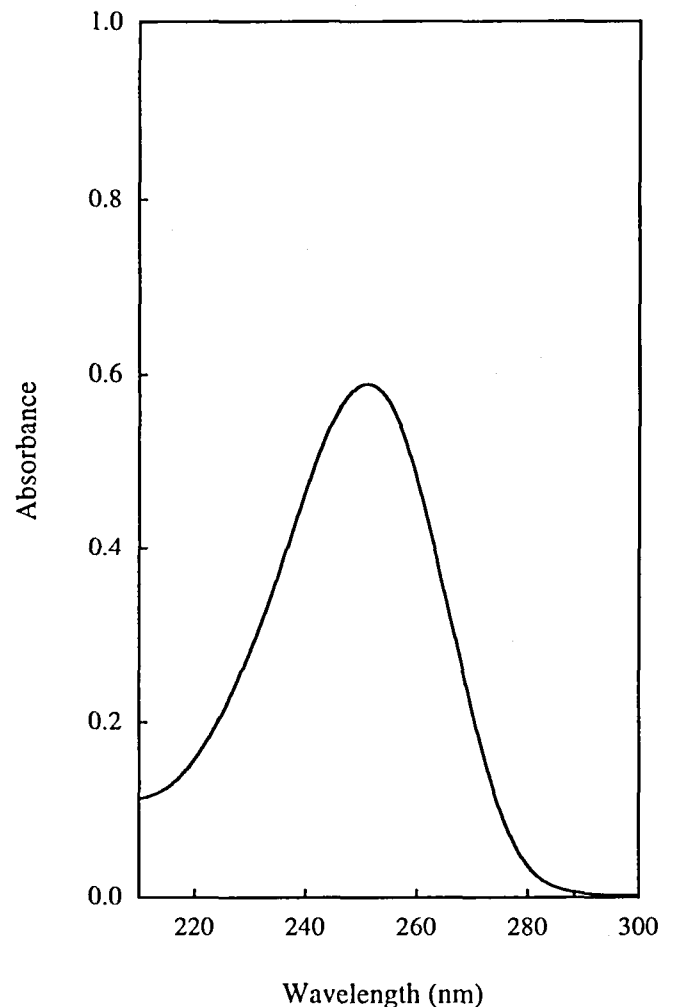


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard

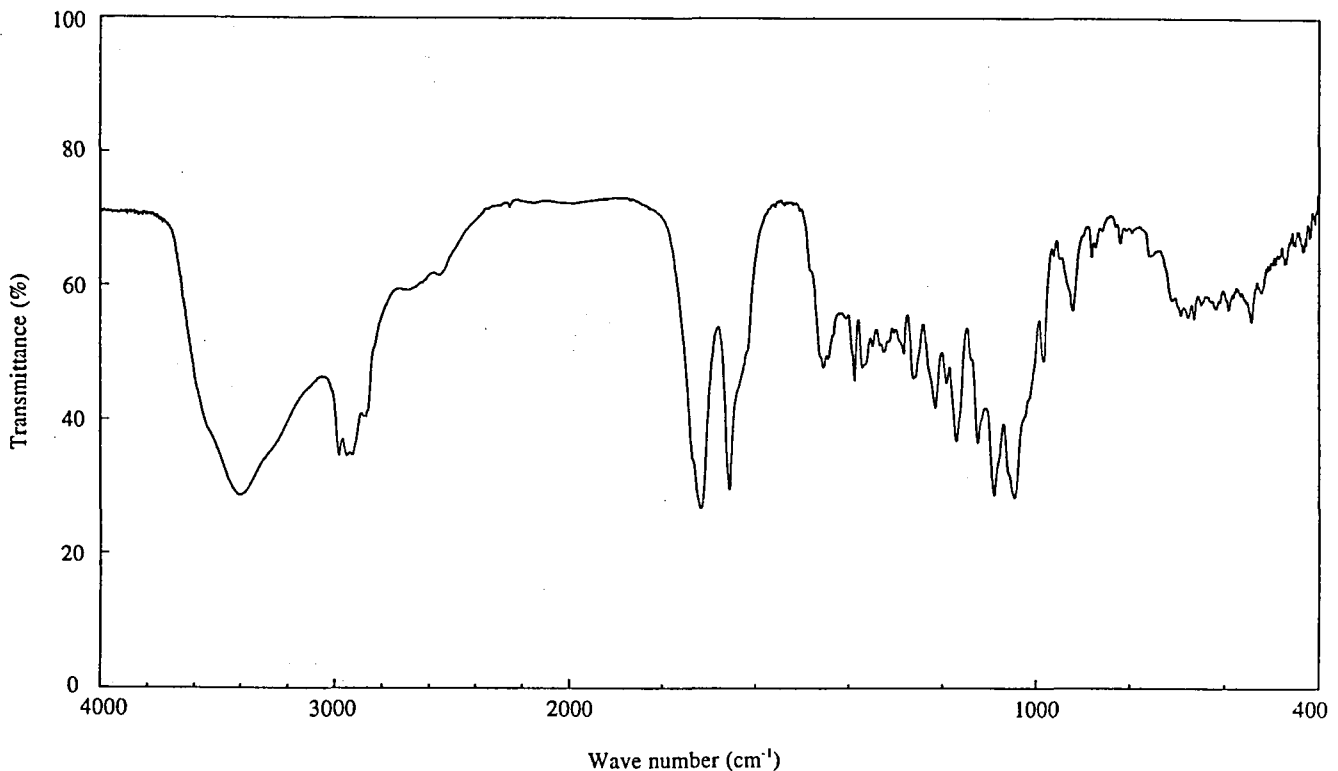


Fig. 2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard

3) 純度試験

(a) TLC 法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。標準品原料及び日局標準品とも、それらの試料溶液からは主スポット以外のスポットは検出されなかった。また、本法によるグリチルリチン酸の検出限界は、 $0.04\mu\text{g}$ であった。

(b) HPLC 法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。標準品原料及び日局標準品とも、微量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、標準品原料で $0.15 \pm 0.03\%$ ($n=6$)、日局標準品で $0.11 \pm 0.03\%$ ($n=6$) と推定された。

4) 水分

標準品原料のカルフィッシャー法による水分含量は $2.03 \pm 0.09\%$ ($n=5$) であった。

結 論

グリチルリチン酸標準品原料につき、日局標準品 (Control 941) を対照にその品質を比較検討した結果、両者の間に物質特性の差はなく、標準品原料の純度は 99.5 % 以上であることを認めた。これらの結果から、本標準品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ものと認定し、Control 991 として製造・配布することとした。

文 献

- 1) 岡田敏史, 北島 文, 谷本 剛, 鈴木英世, 佐竹元吉: 衛生試報, **113**, 114 (1995)

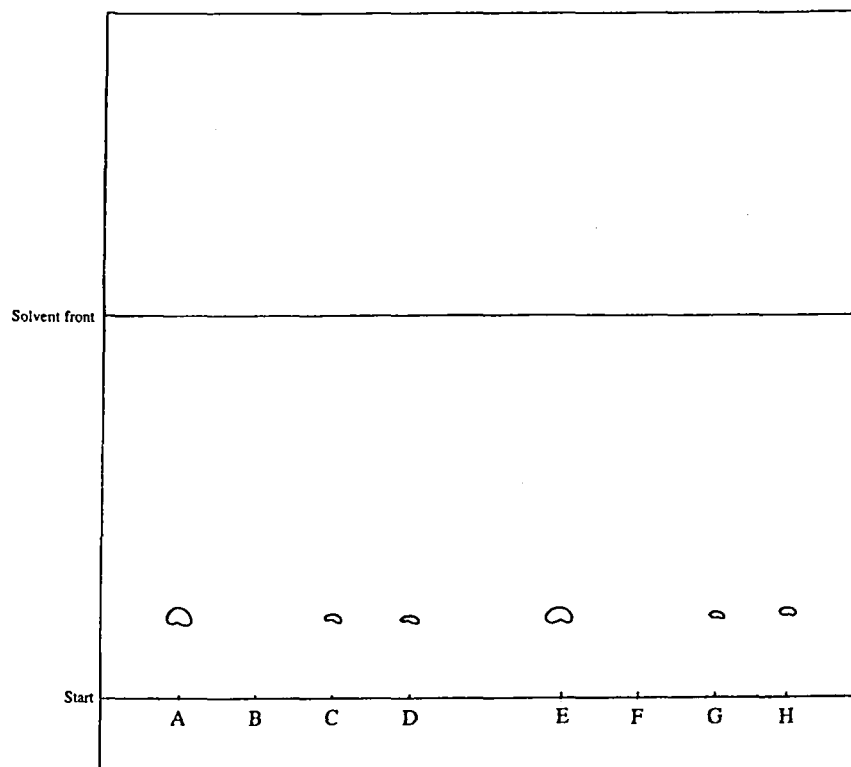


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the raw material for Glycyrrhizic Acid Reference Standard
Spot: 20 μg (A), 0.04 μg (B), 0.12 μg (C), and 0.2 μg (D) of the raw material; 20 μg (E), 0.04 μg (F),
0.12 μg (G), and 0.2 μg (H) of Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 941).

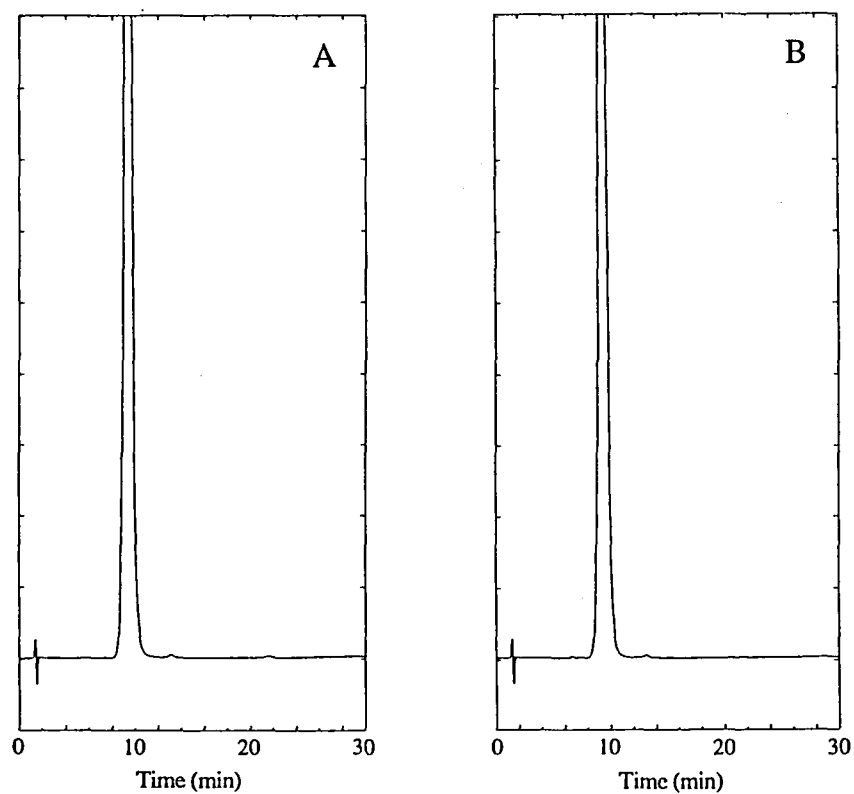


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 941) (B)

国立医薬品食品衛生研究所コハク酸トコフェロール標準品 (Control 981)

前川京子・岩田美保・斉藤博幸・谷本 剛[#]・岡田敏史

Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Keiko Maekawa, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto[#] and Satoshi Okada

The raw material of tocopherol succinate was tested for preparation of the "Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981)". The analytical data obtained were: infrared spectrum, same as that of the Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 8510); specific absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286nm) = 40.7; thin-layer chromatography, no impurities detected until 50.0 μg ; high-performance liquid chromatography (HPLC), three impurities detected and amount of tocopherol succinate estimated to be 98.2%; loss on drying, 0.19%; assay by HPLC, 101.7%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Control 981).

Keywords: tocopherol succinate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

第十三改正日本薬局方「コハク酸トコフェロールカルシウム」の純度試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「コハク酸トコフェロール標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

本標準品原料はエーザイ株式会社より購入した。同社による試験成績は次のとおりである。

薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験: 37.5 μg まで異種スポットなし。液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 不純物量 1.53 %, 比吸光度: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286nm) 37.3, 定量 (HPLC 法): 100.4 %。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方コハク酸トコフェロール標準品 (Control 8510; 日局標準品と略称) 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: 島津製作所, UV2500PC.

赤外分光光度計: 日本分光, FT-IR VALOR-III.

液体クロマトグラフ装置: 日本分光製の PU-986 型ポンプ, UV-970M 型検出器, CO-965 型カラムオープン及び資生堂製 S-mc 型データ処理装置。

4. 試験方法

特に記すもののほかは、日局一般試験法及び医薬品各条「コハク酸トコフェロールカルシウム」の試験法を準用した。

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ト薄層板シリカゲル 60 (厚さ, 0.25 mm), 展開溶媒: トルエン, 酢酸混液 (95:5)。試料溶液及び標準溶液の調製: 標準品原料及び日局標準品 0.01 g をとり、クロロホルム 2.0 ml を加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。操作法及び検出法: 試料溶液及び標準溶液 2.5~10 μl を薄層板にスポットし、約 15 cm 展開した後、風乾する。濃硫酸を均等に噴霧した後、110 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間加熱し、直ちに白色光下で観察する¹⁾。

2) 液体クロマトグラフ法による純度試験

標準品原料及び日局標準品約 0.03 g ずつを量り、それぞれを無水エタノール・薄めた氷酢酸 (1→5) 混液 (9:1) に溶かし 10 ml とし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 20 μl 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

[#] To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

検出器：紫外吸光度計（測定波長：284 nm）
 カラム：ULTRON N-C18L (4.6 mmφ x 150 mm)
 移動相：メタノール・水・氷酢酸混液 (97:2:1)
 流量：0.9 ml/min
 カラム温度：25 °C

5. 試験結果

1) 性状

白色の粉末で、においはない。

2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料及び日局標準品それぞれを乾燥し、その 0.08 g を四塩化炭素 0.2 ml に溶かし、液膜法（赤外吸収スペクトル測定用塩化ナトリウム板）により測定した。Fig.1 に標準品原料の赤外吸収スペクトルを示す。標準品原料のスペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

3) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

日局の方法で調製した標準品原料のエタノール溶液の赤外吸収スペクトルを測定するとき、286 nm 付近に吸収の極大を認めた。極大吸収波長における比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286 nm) = 40.7 ± 0.52 (n=3) (0.01 g, クロロホルム, 100 ml) であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルを Fig.2 に示す。

4) TLC 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig.3 に示した。試料溶液及び標準溶液とも、スポット量 50 μ g まで異種スポットは認められなかった。また、本法によるコハク酸トコフェロールの検出限界は 0.2 μ g であった。

5) HPLC 法による純度試験

標準品原料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 に示した。標準品、標準品原料ともに 3 個の不純物ピークが認められた。全ピーク面積総和を 100 % とした時、標準品及び標準品原料のコハク酸トコフェロールの含量はそれぞれ 97.8 ± 0.01 % (n=2), 98.2 ± 0.02 % (n=3) であった。

6) 乾燥減量

0.19 ± 0.14 % (n=3) (0.1 g, 減圧, 五酸化リン, 24 時間)。

7) 定量

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、 101.7 ± 1.64 % (n=5) の値が得られた。

結 論

コハク酸トコフェロール標準品原料につき、日局標準品 (Control 8510) を対照にその品質を試験した結果、両者の間には物質特性及び純度に差のないことを確認した。この結果から、本標準品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ものと認定し、Control 981 として製造・配布を開始した。

文 献

- 1) 勝井五一郎, 大前雅彦, 江沢敏一, 江沢 総: トコフェロール, 酢酸トコフェロール及びコハク酸トコフェロール標準品に関する研究, 医薬品研究, 16, 506-514 (1985)

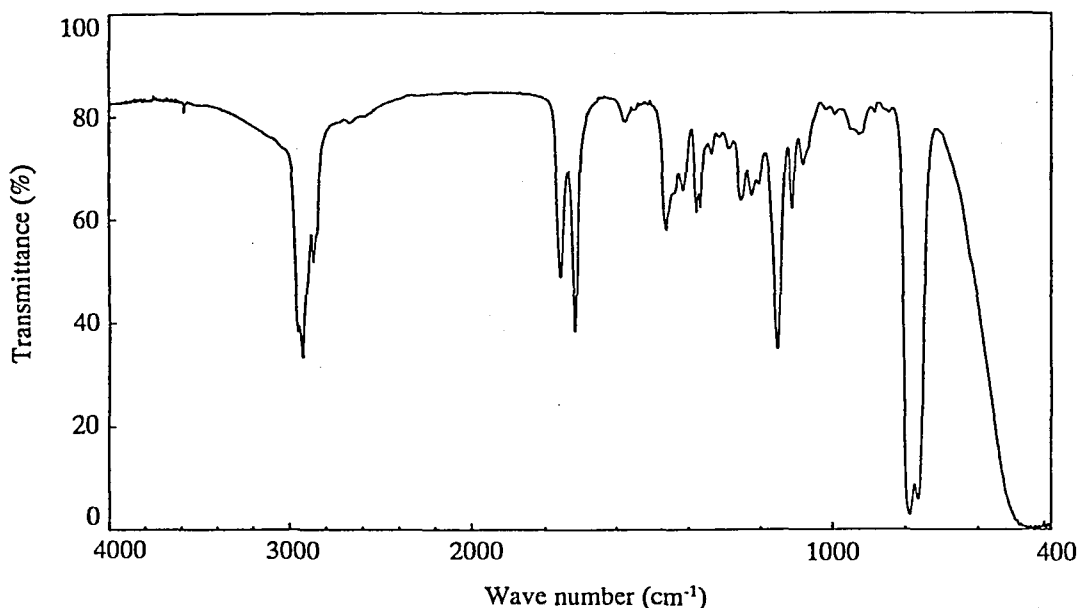


Fig. 1. Infrared absorption spectrum of the material for Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981)

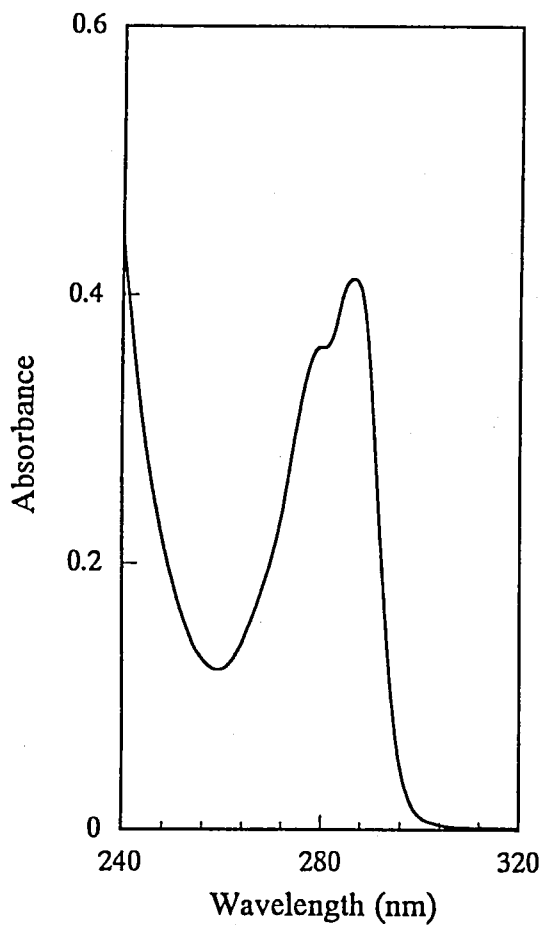


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of the material for Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981)

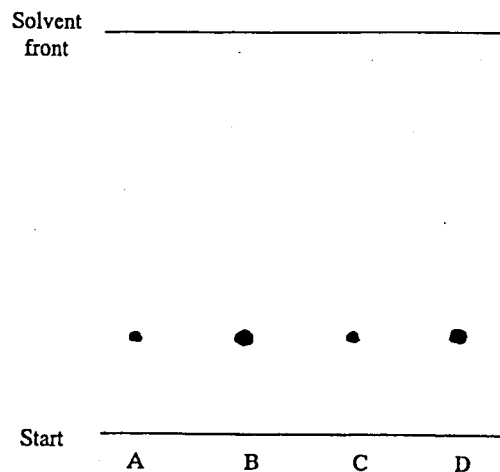


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of tocopherol succinate
A, B; material 12.5 μ g, 50.0 μ g
C, D; Japanese pharmacopoeia standard (control 8510)
12.5 μ g, 50.0 μ g

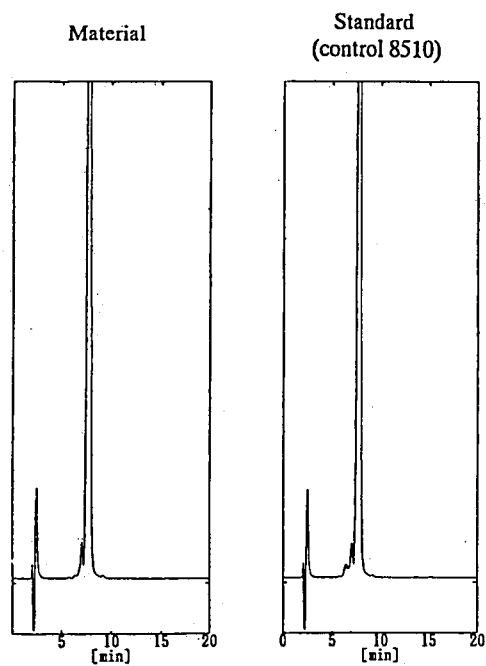


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of tocopherol succinate

国立医薬品食品衛生研究所フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 981)

岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛*・岡田敏史

Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto* and Satoshi Okada

The raw material of fluocinolone acetonide was examined for preparation of the "Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 981)". The analytical data obtained were: melting point, 271.5°C; UV spectrum, λ max of 237.0 nm and specific absorbance in ethanol at 237 nm of 359.3; IR spectrum, same as that of the Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 904); optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +102.8$; thin-layer chromatography, no impurities detected; high-performance liquid chromatography, one impurity detected and total amount estimated to be about 0.17%; loss on drying, 0.29%; assay by HPLC, 100.9%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Fluocinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: fluocinolone acetonide, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十三改正日本薬局方「フルオシノロンアセトニド」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は田辺製薬株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。赤外吸収スペクトル: 日局標準品と一致, 旋光度 $[\alpha]_D^{20}$: +105°, 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 他のステロイド 0.17%, 乾燥減量: 0.15%, 定量 (HPLC 法): 99.7%。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方フルオシノロンアセトニド標準品 (Control 904; 以下, 日局標準品と略称) を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又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, 下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC。

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。

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc。

4. 試験方法

特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「フルオシノロンアセトニド」の試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料約 10 mg を精密に量り, 無水エタノールに溶かし, 正確に 100 ml とする。この液 10 ml を正確に量り, 無水エタノールを加えて正確に 100 ml とする。この液につき吸光度測定法により測定する。

2) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

試料溶液及び標準溶液の調製: 標準品原料及び日局標準品 0.02 g をとり, アセトン 2 ml を加えて溶かし, 試料原液及び標準原液とする。アセトンを加えて試料原液を希釈し, 数種の濃度 (0.01~10 mg/ml) 試料溶液を調製する。

薄層板: メルク社製プレコート薄層板シリカゲル 60 F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)。

展開溶媒: クロロホルム/酢酸ブチル/アセトン混液 (2: 2: 1)。

* To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006 Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

操作法及び検出法：試料溶液 5.0~20 μ l (フルオシノロンアセトニド 0.05~200 μ g 相当量) 及び標準原液 10, 20 μ l (フルオシノロンアセトニド 100, 200 μ g 相当量) を薄層板にスポットし, 約 15 cm 展開した後, 風乾する。これに紫外線 (254 nm) を照射し, 不純物スポットの有無及び検出限界を確認する。

3) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品 0.0100 g ずつを正確に量り, メタノール 5 ml に溶かし, 試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 10 μ l につき, 次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：Inertsil ODS (4.6 mm ϕ x 250 mmL)

カラム温度：40°C

移動相：水/アセトニトリル混液 (13 : 7)

流量：1.5 ml/min

カラムの選定：パラオキシ安息香酸イソプロピル及びパラオキシ安息香酸プロピル 5 mg ずつをアセトニトリル 50 ml に溶かし, 更に水を加えて 100 ml とする。この液 20 μ l につき, 上記の条件で操作するとき, パラオキシ安息香酸イソプロピル, パラオキシ安息香酸プロピルの順に溶出し, その分離度が 1.9 のものを用いる。

検出感度：試料注入液の 1 % に相当する量を注入し, 得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 1/10 の高さになるように記録計の感度を調整する。さらに, この条件で試料注入量の 0.05 % に相当する量を注入するとき, 得られる主ピークの面積が検出されるように感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピーク後, フルオシノロンアセトニドの保持時間の 2 倍の範囲

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：271.5°C (分解)。

2) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

標準品原料のメタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき, 波長 237 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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (237 nm) は 359.3 ± 2.45 (n=3) であった。標準品原料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

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき, 同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

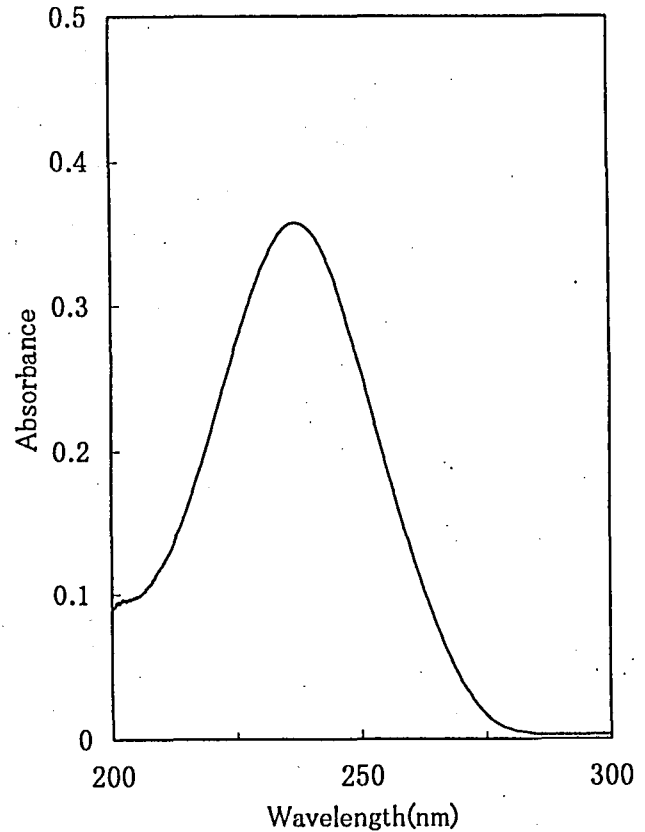


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Fluocinolone Acetonide Reference Standard

4) 旋光度

日局「フルオシノロンアセトニド」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 $[\alpha]_D^{20}$ は $+102.8 \pm 1.07^\circ$ (n=3) であった。

5) 純度試験

(a) TLC 法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。試料溶液及び標準溶液とも, スポット量 200 μ g まで異種スポットは認められなかった。また, 検出限界は 0.1 μ g であった。

(b) HPLC 法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。標準品原料及び日局標準品とも, 微量の不純物ピークが観察された。面積百分率 0.05 % 以上の不純物ピークの総和は, 標準品原料で 0.17 ± 0.01 % (n=3), 日局標準品で 0.27 ± 0.00 % (n=3) と推定された。

6) 乾燥減量： 0.29 ± 0.11 % (n=3, 0.2g, 減圧, 105°C, 3時間)

7) 定量

標準品原料の液体クロマトグラフ法による定量試験を日局標準品を対照にして行った結果, 100.9 ± 0.25 % (n=3) の値が得られた。なお, 定量試験における液体クロマトグラフ法の操作条件は, 日局「フルオシノロンアセトニド」の定量法を準用した。

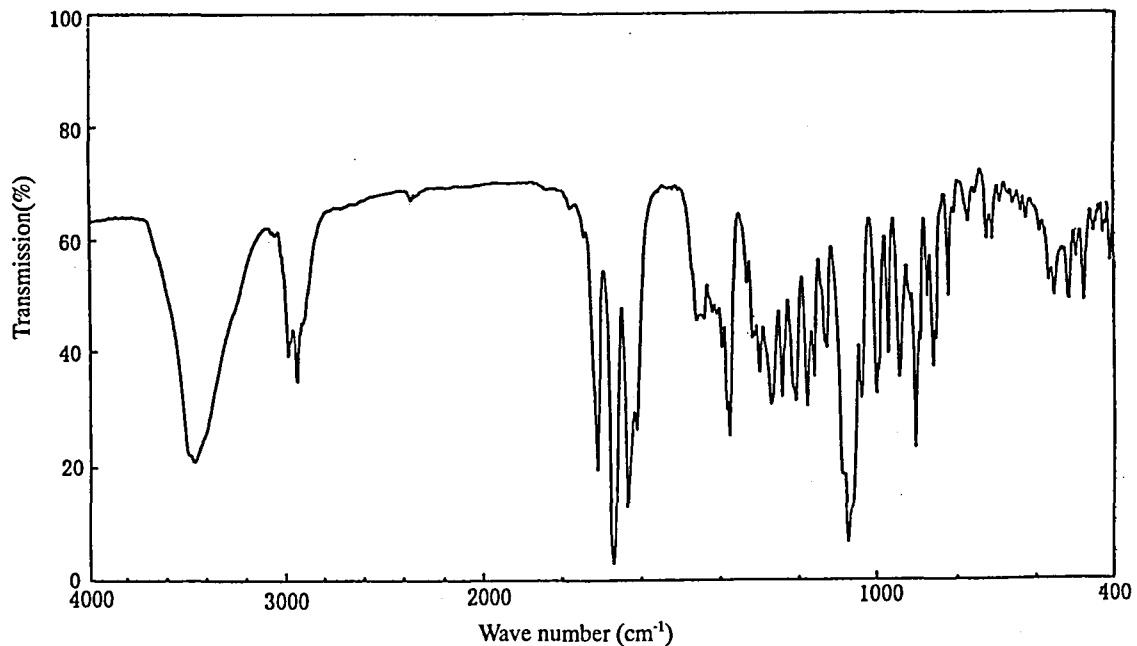


Fig.2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Fluocinolone Acetonide Reference Standard

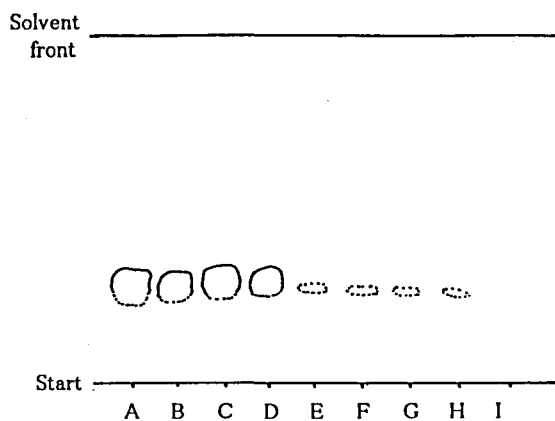


Fig.3. Thin-layer chromatogram of the raw material and the JP Fluocinolone Acetonide Reference Standard
Solvent system : chloroform/butyl acetate/acetone (2:2:1)
Spot : A and B are 200 μ g and 100 μ g of the JP Reference Standard, respectively
C to I are 200, 100, 1.0, 0.5, 0.3, 0.1 and 0.05 μ g of the raw material, respectively

結 論

フルオシノロンアセトニド標準品原料につき、日局標準品 (Control 904) を対照に比較検討した結果、両者の間には物質特性に差はなく、標準品原料の純度は 99.5 % 以上であることを確認した。この結果から、本標準品原料は国立医薬品食品衛生研究所フルオシノロンアセトニド標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有することを認定し、Control 981 として製造・配布することとした。

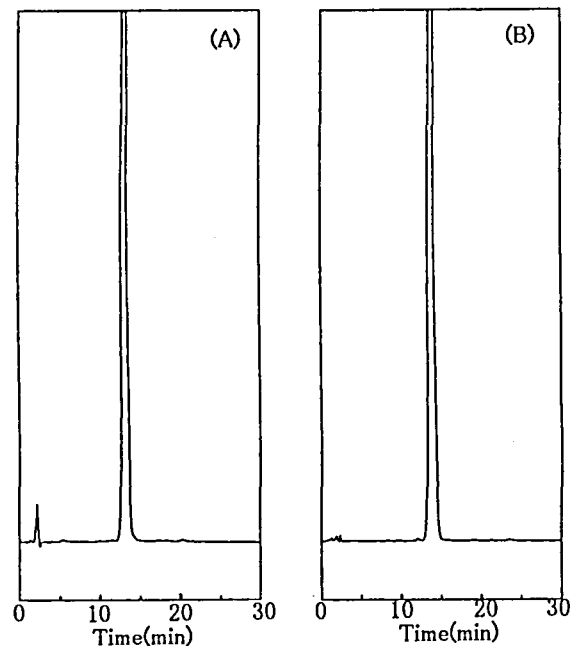


Fig.4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Fluocinolone Acetonide Reference Standard
(A): The raw material
(B): The JP Fluocinolone Acetonide Reference Standard

文 献

- 1) 笥 華子・村井真美・小松裕明・石光 進・岡田敏史：衛生試報，109，145 (1991)

国立医薬品食品衛生研究所フルオシノニド標準品 (Control 981)

岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛[#]・岡田敏史

Fluocinonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto[#] and Satoshi Okada

The raw material of fluocinonide was examined for preparation of the "Fluocinonide Reference Standard (Control 981)". The analytical data obtained were: UV spectrum, λ max of 237.4 nm; IR spectrum, same as that of the Fluocinonide Reference Standard (Control 841); optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +84.4^\circ$; thin-layer chromatography, one impurity detected; high-performance liquid chromatography, three impurities detected and total amount estimated to be about 0.20%; loss on drying, 0.15%; assay by HPLC, 99.6%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Fluocinonide Reference Standard (Control 981) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: fluocinonide, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十三改正日本薬局方「フルオシノニド」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「フルオシノニド標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

本標準品原料は田辺製薬株式会社より入手した。同社による試験成績は以下のとおりである。紫外吸収スペクトル: 238 nm に吸収極大を示す, 赤外吸収スペクトル: 日局標準品と一致, 旋光度 $[\alpha]_D^{20}$: $+84.0^\circ$, 液体クロマトグラフ法 (HPLC) による純度試験: 不純物量 0.23 %, 乾燥減量: 0.06 %, 残留溶媒: 0.05 % (アセトニトリル), 定量法: 99.9 % (対日局標準品)。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方フルオシノニド標準品 (Control 841; 以下, 日局標準品と略称) を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

3. 装置

標準品原料の品質評価試験にあたり, 下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC.

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.

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-10A 型検出器, CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc.

4. 試験方法

特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「フルオシノニド」の試験法を準用した。

・液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品 0.01 g ずつを正確に量り, アセトニトリル 5 ml に溶かし, 水を加えて 10 ml とし, 試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 20 μ 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: 254 nm)

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ x 250 mmL)

カラム温度: 40 $^\circ$ C

移動相: 水/アセトニトリル混液 (1:1)

流量: 1.5 ml/min

カラムの選定: フルオシノニド標準品を乾燥し, その約 0.02 g を精密に量り, アセトニトリル 50 ml を加えて溶かし, 安息香酸プロピルのアセトニトリル溶液 (1 \rightarrow 100) 8 ml を正確に加えた後, 水を加えて 100 ml とする。この液 20 μ l につき, 上記の条件で操作するとき, フルオ

[#] To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

シノニド, 安息香酸プロピルの順に溶出し, その分離度が 6 以上のものを用いる。

検出感度: 試料注入量の 1% に相当する量を注入し, 得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 1/10 の高さになるように記録紙の感度を調整する。さらに, この条件で試料注入量の 0.05% に相当する量を注入するとき, 得られる主ピークの面積が検出されるように検出感度を調整する。

面積測定範囲: 溶媒ピーク後, フルオシノニドの保持時間の 2 倍の範囲

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

標準品原料のメタノール溶液 (1→100000) の紫外吸収スペクトルを測定するとき, 波長 237 nm 付近に吸収の極大が観察された (Fig. 1)。

3) 赤外吸収スペクトル

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。標準品原料の赤外スペクトルを日局標準品それと比較するとき, 同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

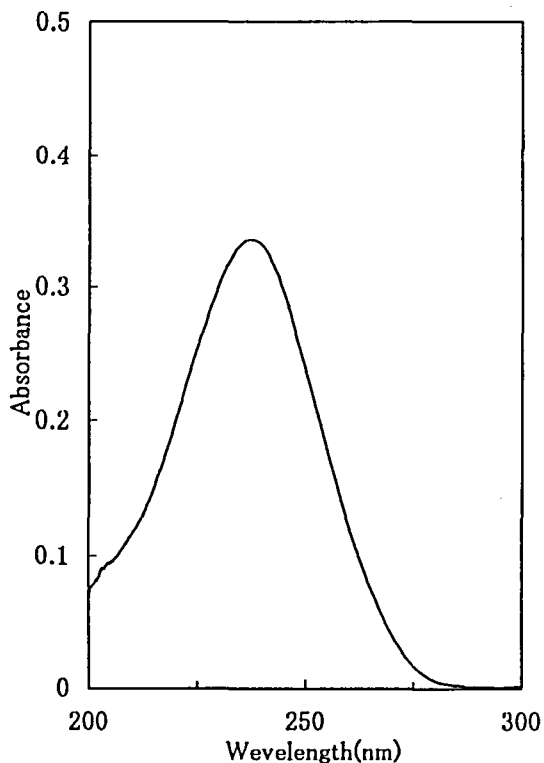


Fig. 1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Fluocinolone Reference Standard

4) 旋光度

日局「フルオシノニド」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 $[\alpha]_D^{20}$ は $+84.4 \pm 0.29^\circ$ (n=3) であった。

5) 純度試験

(a) TLC法: 日局「フルオシノニド」の純度試験の項の測定条件を準用して試験したときの標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。試料溶液及び標準溶液とも, スポット量 50 μ g まで異種スポットは認められなかった。

また, 検出限界は 0.04 μ g 以下であった。

(b) HPLC法: 標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。標準品原料及び日局標準品とも, 微量の不純物ピークが観察された。面積百分率で不純物ピークの総量は, 標準品原料で $0.20 \pm 0.005\%$ (n=3), 日局標準品で $0.05 \pm 0.0002\%$ (n=2) と推定された。

6) 乾燥減量: $0.15 \pm 0.04\%$ (n=3, 0.5g, 105 $^\circ$ C, 3時間)

7) 定量

標準品原料の液体クロマトグラフ法による定量試験を日局標準品を対照にして行った結果, $99.6 \pm 0.50\%$ (n=3) の値が得られた。なお, 定量試験における液体クロマトグラフ法の操作条件は, 日局「フルオシノニド」の定量法を準用した。

結 論

フルオシノニド標準品原料につき, 日局標準品 (Control 841) を対照に比較検討した結果, 両者の間には物質特性に差はなく, 標準品原料の純度は 99.5% 以上であることを確認した。この結果から, 本標準品原料は国立医薬品食品衛生研究所フルオシノニド標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有するものと認定し, Control 981 として製造・配布することとした。

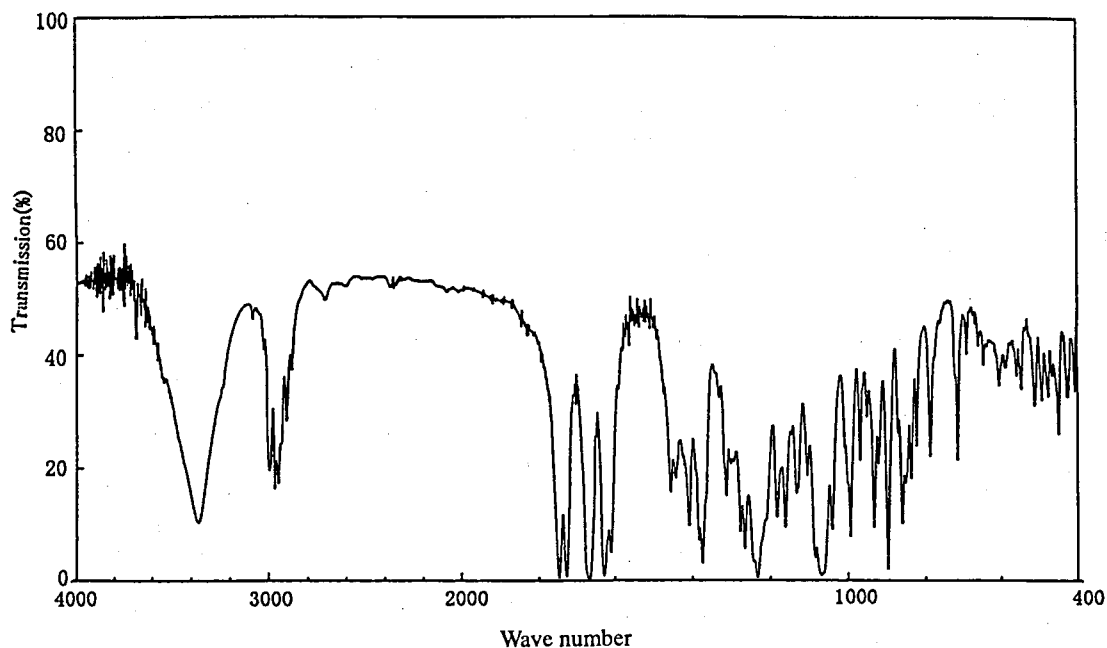


Fig.2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Fluocinonide Reference Standard

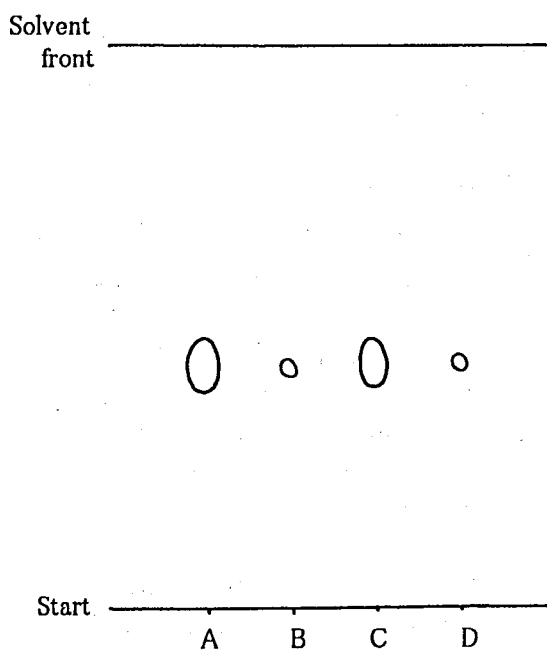


Fig.3. Thin-layer chromatogram of the raw material and the JP Fluocinonide Reference Standard
 Solvent system : chloroform/methanol (97:3)
 Spot : A is 50 μ g of the raw material
 B is 0.5 μ g of the raw material
 C is 50 μ g of the JP Fluocinonide Reference Standard
 D is 0.5 μ g of the JP Fluocinonide Reference Standard

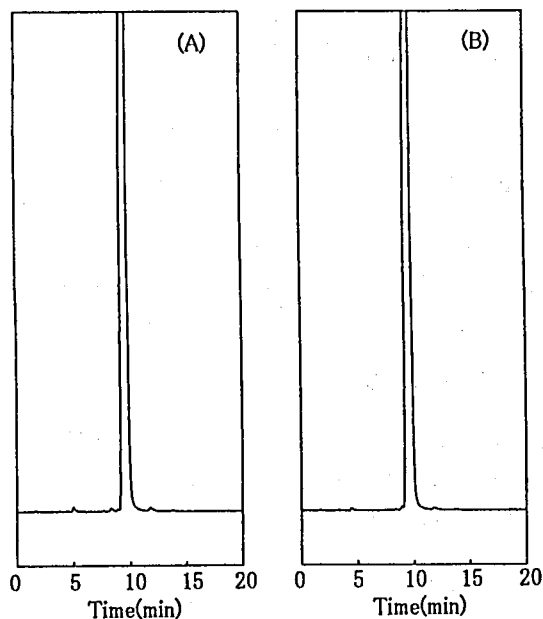


Fig.4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Fluocinonide Reference Standard
 (A): The raw material
 (B): The JP Fluocinonide Reference Standard

国立医薬品食品衛生研究所トリアムシノロンアセトニド標準品 (Control 981)

岩田美保・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛*・岡田敏史

Triamcinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto* and Satoshi Okada

The raw material of triamcinolone acetonide was examined for preparation of the "Triamcinolone Acetonide Reference Standard (Control 981)". The analytical data obtained were: melting point, 289 °C (decomposition); UV spectrum, λ max of 238 nm; IR spectrum, same as that of the Triamcinolone Acetonide Reference Standard (Control 834); optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +106.8^\circ$; thin-layer chromatography, no impurities detected; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities less than 0.4%; loss on drying, 1.3%; assay by HPLC, 100.1%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Triamcinolone Acetonide Reference Standard (Control 981) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: triamcinolone acetonide, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十三改正日本薬局方「トリアムシノロンアセトニド」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「トリアムシノロンアセトニド標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

標準品原料は日本レダリー株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。旋光度 $[\alpha]_D^{20} : +107^\circ$, 乾燥減量: 1.4%, 定量 (HPLC法): 100.8%。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方トリアムシノロンアセトニド標準品 (Control 834; 以下, 日局標準品と略称)を対照物質とした。試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

3. 装置

標準品原料の品質評価試験にあたり, 下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC。

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。

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-6A 型検出器, CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc。

4. 試験方法

特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「トリアムシノロンアセトニド」の試験法を準用した。

・液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品 0.01 g ずつを正確に量り, メタノール 25 ml に溶かし, 試料溶液及び標準溶液とする。これらの液 20 μ 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: 240 nm)

カラム: TOSOH TSK-GEL ODS-80TM (4.6 mm ϕ \times 150 mm L)

カラム温度: 30 °C

移動相: 水/アセトニトリル混液 (7:3)

流量: 1.2 ml/min

カラムの選定: トリアムシノロンアセトニド標準品を乾燥し, その約 0.02 g を精密に量り, メタノールに溶かし, 正確に 50 ml とする。この液 10 ml を正確に量り, プレドニゾロンのメタノール溶液 (1 \rightarrow 5000) 10 ml を正確に加えた後, 移動相を加えて 50 ml とした液 20 μ l につき, 上記の条件で操作するとき, プレドニゾロン, トリアムシ

* To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

ノロンアセトニドの順に溶出し、その分離度が 6 以上のものを用いる。

検出感度：試料注入量の 1 % に相当する量を注入し、得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 1/10 の高さになるように記録紙の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の 0.05 % に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が検出されるように検出感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピーク後、トリアムシノロンアセトニドの保持時間の 2 倍の範囲

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：288.7 °C (分解)。

2) 紫外吸収スペクトル

標準品原料のエタノール溶液 (1→100000) の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長 238.1 nm 付近に吸収の極大が観察された。標準品原料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

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。標準品原料の赤外吸収スペクトルを日局標準品のそれと比較するとき、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

4) 旋光度

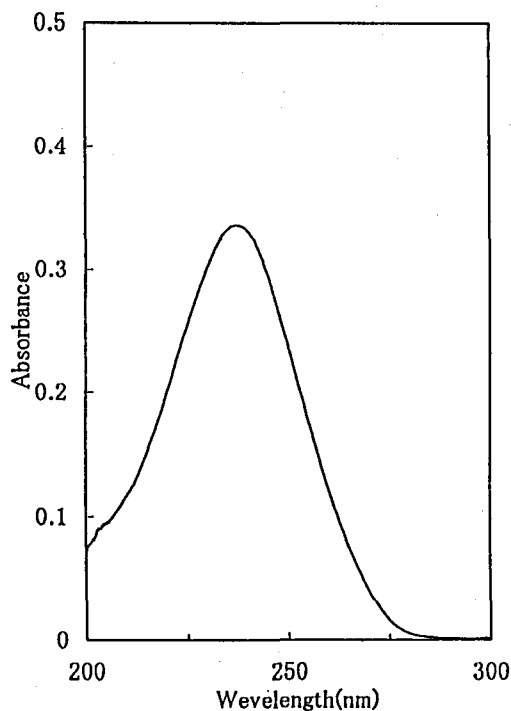


Fig.1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Triamcinolone Acetonide Reference Standard

日局「トリアムシノロンアセトニド」の旋光度の項の測定条件を準用して試験したとき、その旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は $+106.8 \pm 3.38^\circ$ (n=3) であった。

5) 純度試験

a) TLC 法：標準品原料及び日局標準品の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。スポット量 200 μ g まで標準品原料では異種スポットは認められなかったが、日局標準品では 1 個の微量不純物が検出された。また、検出限界は 0.02 μ g であった。

b) HPLC 法：標準品原料及び日局標準品の液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。標準品原料及び日局標準品とも、微量の不純物ピークが観察された。不純物の総和は、面積百分率法で、標準品原料で 0.34 ± 0.02 % (n=3)、日局標準品で 1.57 ± 0.06 % (n=3) と推定された。

6) 乾燥減量：1.34 \pm 0.03 % (n=3, 0.2g, 減圧, 五酸化リン, 60°C, 3時間)

7) 定量

標準品原料の液体クロマトグラフ法による定量試験を日局標準品を対照にして行った結果、 100.1 ± 0.57 % (n=3) の値が得られた。なお、定量試験における液体クロマトグラフ法の操作条件は、日局「トリアムシノロンアセトニド」の定量法を準用し、定量値は相対面積百分率法により求めた。

結 論

トリアムシノロンアセトニド標準品原料につき、日局標準品 (Control 834) を対照に比較検討した結果、両者の間には物質特性に差はなく、標準品原料の純度は 99.5 % 以上であることを確認した。この結果から、本標準品原料は国立医薬品食品衛生研究所トリアムシノロンアセトニド標準品 (日本薬局方標準品) として十分な品質を有するものと認定し、Control 981 として製造・配布することとした。

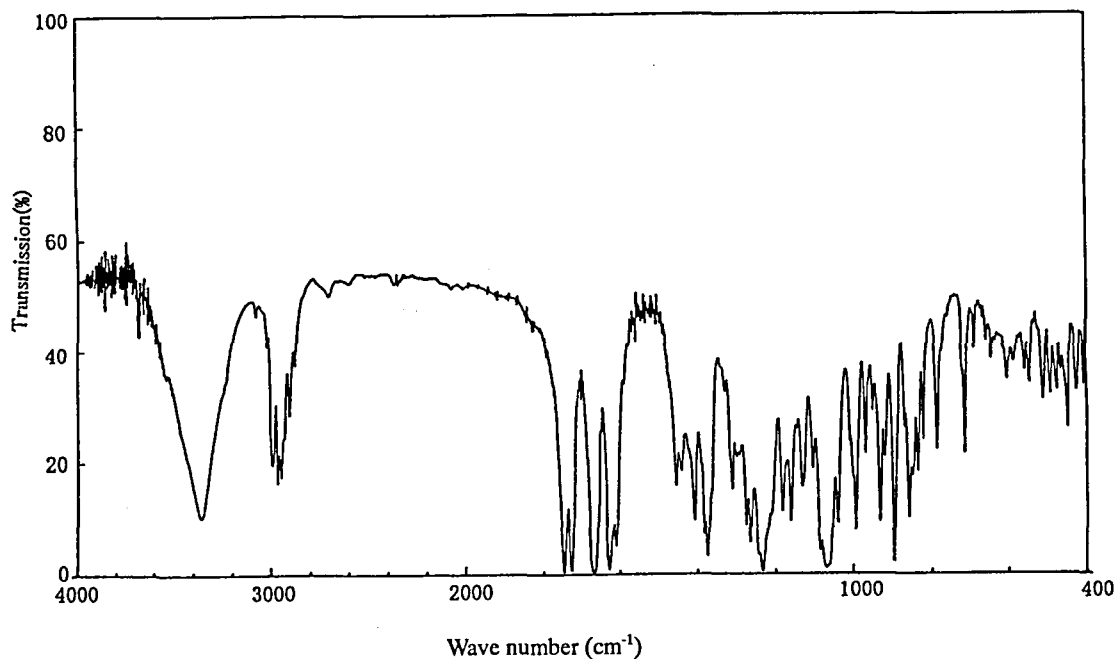


Fig.2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Triamcinolone Acetonide Reference Standard

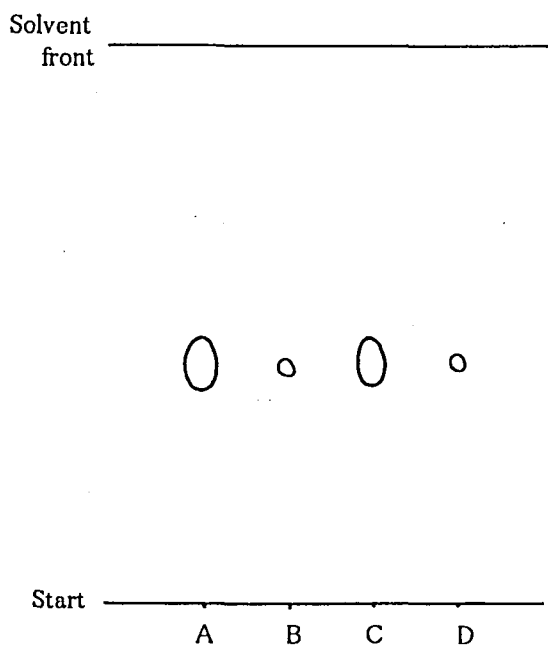


Fig.3. Thin-layer chromatogram of the raw material and the JP Triamcinolone Acetonide Reference Standard

Solvent system : chloroform/methanol (97:3)

Spot : A is 200 μg of the raw material

B is 200 μg of the JP Triamcinolone Acetonide Reference Standard

C is 2 μg of the raw material

D is 2 μg of the JP Triamcinolone Acetonide Reference Standard

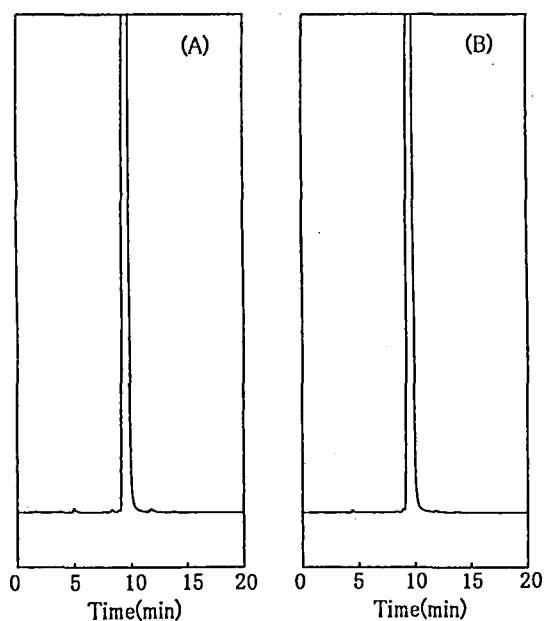


Fig.4. High-performance liquid chromatograms of the raw material and the JP Triamcinolone Acetonide Reference Standard

(A): The raw material

(B): The JP Triamcinolone Acetonide Reference Standard

国立医薬品食品衛生研究所トリアムシノロン標準品 (Control 981)

岩田美保・河口和子・前川京子・斎藤博幸・谷本 剛[#]・岡田敏史

Triamcinolone Reference Standard (Control 981) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Wako Kawaguchi, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto[#] and Satoshi Okada

The raw material of triamcinolone was examined for preparation of the "Triamcinolone Reference Standard (Control 981)". The analytical data obtained were: melting point, 246 °C (decomposition); UV spectrum, λ max of 239 nm and specific absorbance in methanol at 289 nm of 394; IR spectrum, specific absorptions at 3462, 1716, 1659, 1615, 1604, 1132 and 1061 cm^{-1} ; optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +69.7^\circ$; high-performance liquid chromatography, five impurities detected and amount of each impurity estimated to be less than 0.6% and total amount of impurities less than 1.4%; loss on drying, 0.24%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Triamcinolone Reference Standard (Control 981) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: triamcinolone, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十三改正日本薬局方「トリアムシノロン」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「トリアムシノロン標準品 (Control 981)」(日本薬局方標準品)を製造したので報告する。

1. 標準品原料

本標準品原料は日本レダリー株式会社より入手した。同社による試験成績は次のとおりである。旋光度 $[\alpha]_D^{20}$: +67°, 乾燥減量: 0.2%, 定量 (HPLC法): 100.5%。

2. 試 薬

試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

3. 装 置

標準品原料の品質評価試験にあたり、下記の測定装置を用いた。

自記分光光度計: 島津製作所, UV2500PC.

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.

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所製の LC-6A型ポン

プ, SPD-10A型検出器, CTO-6A型カラムオープン, 東ソ一製 AS-8020型オートサンプラー及び資生堂製データ処理装置 S-mc.

4. 試験方法

特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「トリアムシノロン」の試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料 0.01 g を正確に量り、メタノールに溶かして正確に 100 ml とする。この液 5 ml を正確に量り、メタノールを加えて正確に 25 ml とし、試料溶液とする。

2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料 0.01 g を正確に量り、アスコルビン酸のメタノール溶液 (1→1000) に溶かし、正確に 25 ml とする。

この液 10 μ l につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。

操作条件

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長: 254 nm)

カラム: Inertsil ODS-2 (4.6 mm ϕ x 150 mmL)

カラム温度: 25 °C

移動相: 水/アセトニトリル混液 (3:1)

流 量: 0.7 ml/min

カラムの選定: トリアムシノロン標準品を乾燥し、その約 0.02 g を精密に量り、アスコルビン酸のメタノール溶液 (1→1000) に溶かし、正確に 50 ml とする。この液 50 ml

[#] To whom correspondence should be addressed: Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006 Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716; E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

を正確に量り、パラオキシ安息香酸メチル 0.015 g をアスコルビン酸のメタノール溶液 (1→1000) に溶かし、100 ml とした液 5 ml を正確に加えた後、アスコルビン酸のメタノール溶液 (1→1000) を加えて 20 ml とする。この液 10 μ l につき、上記の条件で操作するとき、トリアムシノロン、パラオキシ安息香酸メチルの順に溶出し、その分離度が 2.0 以上のものを用いる。

検出感度：試料注入量の 1 % に相当する量を注入し、得られた主ピークの高さが記録紙のフルスケールの約 1/10 の高さになるように記録紙の感度を調整する。さらに、この条件で試料注入量の 0.05 % に相当する量を注入するとき、得られる主ピークの面積が検出されるように検出感度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、トリアムシノロンの保持時間の 3 倍の範囲

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：246.1 $^{\circ}$ C (分解)。

2) 紫外吸収スペクトル

標準品原料のメタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長 238.8 nm 付近に吸収の極大が観察された。最大吸収波長における比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ_{max}) は 393.6 ± 2.44 ($n=3$) であった。標準品原料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

標準品原料の臭化カリウム錠剤法による赤外吸収スペク

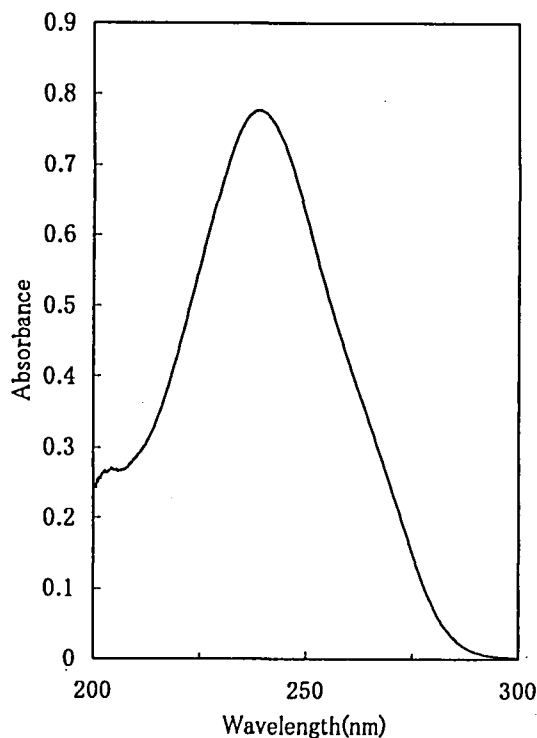


Fig.1. Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Triamcinolone Reference Standard

トルを Fig. 2 に示した。測定の結果、3462, 1716, 1659, 1615, 1604, 1132, 1061 cm^{-1} のところに特徴的な吸収を認めた。

4) 旋光度

日局「トリアムシノロン」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 $[\alpha]_D^{20}$ は $+69.7 \pm 0.50^{\circ}$ ($n=3$) であった。

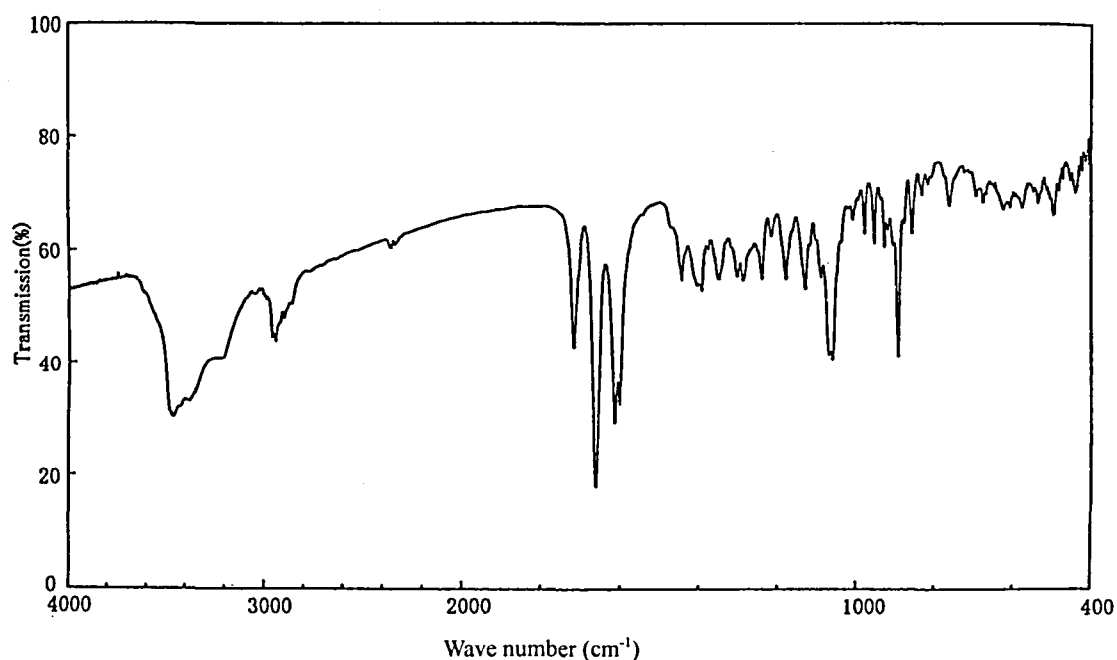


Fig.2. Infrared absorption spectrum of the raw material for Triamcinolone Reference Standard

5) 純度試験

HPLC 法：標準品原料の液体クロマトグラムを Fig. 3 に示した。5 個の微量の不純物ピークが観察された。不純物の総和は、面積百分率法で 1.33 ± 0.05 % (n=3) と推定された。

6) 乾燥減量： 0.24 ± 0.03 % (n=3) (0.2g, 減圧, 五酸化リン, 60℃, 3 時間)

結 論

トリアムシノロン標準品原料につき、検討した結果、国立医薬品食品衛生研究所（日本薬局方標準品）として十分な品質を有するものと認定し、Control 981 として製造・配布をすることとした。

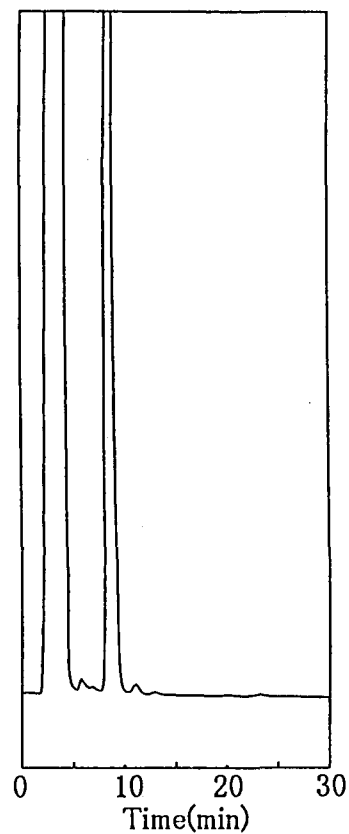


Fig.3. High-performance liquid chromatograms of the raw material for Triamcinolone Reference Standard

平成10年度業務概要

所長 寺尾 允 男

平成10年度は我が国の国立試験研究機関の独立行政法人化が検討され、国研にとって大変革の年であった。当所も対象機関の一つであったが国研として残ることとなり、従来にも増して医薬品の承認審査や健康危機管理にも重い責任を負うこととなった。

また、ダイオキシンや内分泌かく乱化学物質の健康影響に対する懸念が国民の間で広がり、当所もこの問題についていろいろな研究を行った。

試験研究業務

当所の業務目的は、医薬品、食品、食品添加物、医療用具、生活環境中で我々が日常接する化学物質などの品質、安全性、有効性を適切に評価するための研究、調査及び行政試験等を行うことにあり、この目的に沿った多くの研究が従来から行われてきている。

平成10年度に行った研究成果として紙上発表した原著論文数は283編であった。これらの論文の著者、表題、要旨等については本誌268～312ページにまとめてある。また、平成10年度に行った主要研究テーマは373～380ページに示してある。

国際共同研究

当所は多くの国際機関と連携して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)化学品プロジェクト
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
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. 日米二国間科学技術協力

なお、過去5年間、JICAのプロジェクトとして当所が全面的に協力して多大な成果を上げてきた中国天津薬品検所技術プログラムは平成10年11月をもって終了した。

国際協力

国際交流としては、厚生行政に関連する国際会議への科学専門家としての参加、技術指導、国際学会あるいは外国の学会での発表及び招待講演、並びに外国人研究生の受け入れなどが主なものである。

平成10年度海外派遣研究者は延べ145人であった。内訳は留学5名、二国間共同研究あるいは学会への招聘又は参加延べ58人、JICA等のプロジェクトによる外国への技術指導等16名のほか、行政に関連する国際会議等への出席が延べ66名であった。国際会議等への出席者内訳はICH 10

名、IPCS 15名、OECD 5名、FAO/WHO 合同会議 8名、その他 28名であった。

関連集会

平成10年7月7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関係者の交流を目的とした、第8回薬用植物栽培技術フォーラムを厚生省健康政策局研究開発振興課と共催で開催した。

当所が深く関わっている全国衛生化学技術協議会の第35回年会は平成10年10月22日、23日の二日間、高知県衛生研究所、鈴木秀吉所長を年会長として、高知市において開催した。

人事異動

平成10年4月1日付けで野口 衛和歌山薬用植物栽培試験場長が大阪支所長に、藤森観之助薬理部第二室長が代謝生化学部長に、長谷川隆一毒性部機器試験室長が安全性生物試験研究センター総合評価研究室長に、外海泰秀大阪支所食品試験室長が食品試験部長に昇任した。また、広瀬雅雄名古屋市立大学医学部第一病理学講座助教授を病理部長に迎えた。

医薬品医療機器審査センターにおいては審査第三部の新設に伴い、平成10年4月、苗村光廣同センター審査第二部審査管理官が審査第三部長に昇任した。同年7月には平山一男審査第一部長の厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室長への就任に伴い、審査第一部長に池谷壮一審査第二部長が配置換えとなり、同第二部長の後任に村上貴久医薬安全局審査管理課医療機器審査管理官が就任した。

平成11年3月31日付けで齋藤行生副所長、野口 衛大阪支所長、祖父尼俊雄変異遺伝部長、及び西 孝三郎筑波薬用植物栽培試験所長が定年退職した。

総 務 部

部長 長 田 守

1. 組 織

平成9年7月、医薬品等の承認審査体制の強化及び効率化を図るため、当所に医薬品医療機器審査センターが設置され、3年計画でその体制を整備していくこととなり、平成10年度、審査第三部の設置が新たに認められた。

2. 定 員

平成9年度末の定員は304名であったが、審査支援事務の強化に伴う増として1名、承認審査体制の充実強化に伴う増として8名、信頼性確保体制の充実強化に伴う増として3名、遺伝子治療薬の試験研究体制の充実強化に伴う増として1名、計13名の定員増が認められた。その一方で、第9次定員削減計画に基づき行政職(二)1名、研究職1名、

計2名の定員が削減されたことにより、平成10年度末の定員は、指定職2名、行政職(一)47名、行政職(二)18名、専門行政職50名、研究職198名、計315名となった。

3. 予算

平成10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、4,743,661千円で前年度に比較して64,802千円(1.4%)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 | 37,579千円 |
| 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 @1,400千円→@1,438千円) | 3,603千円 |
| ③ 特別研究費の減
(第一次研究課題「生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明」に伴う減△874千円、第二次研究課題「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」に伴う減△1,094千円) | △1,968千円 |
| ④ 施設管理事務経費の増
(北海道試験場及び本所自動車交換差金に伴う増3,400千円、庁舎管理費のうち自動車運転手メンテナンス振替2人→3人に伴う増7,542千円、北海道試験場けん引自動車交換差金終了減△8,492千円) | 3,028千円 |
| ⑤ 総合化学物質安全性研究費の減
(安全性点検体制支援システム経費72,096千円→71,980千円、安全性試験法開発等研究費28,708千円→17,876千円、生活環境暴露評価基盤研究費31,742千円→28,310千円) | △14,380千円 |
| ⑥ 研究情報活動基盤整備費の減
(研究情報ネットワークシステム基盤整備費21,902千円→21,387千円、研究情報整備費23,115千円→18,989千円、情報を基盤とする化学物質安全性国際協力事業費42,911千円→37,969千円) | △9,583千円 |
| ⑦ 内分泌かく乱性物質のリスク評価手法開発研究費の増(新規事項) | 32,201千円 |
| ⑧ 新規食品等のアレルギー性評価法の基盤研究費の増(新規事項) | 32,039千円 |
| ⑨ 医薬品医療機器審査センターに必要な経費の増 | 39,501千円 |

等が挙げられる。

(2) 移替予算

予算額は、162,979千円で前年度に比較して△746千円(0.45%)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が1課題(ダイオキシン等内分泌系かく乱環境汚染物質の健康影響評価方法の開発・確立に関する研究16,945千円)、国立機関原子力試験研究

費が4課題(生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした照射生薬の検知法に関する研究12,606千円、照射食肉等の検知法に関する研究15,411千円、新規グルココルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的研究6,999千円、低線量放射線による微生物毒素産生能の低減化に関する研究12,518千円)認められた。

なお、平成10年度事項別予算額は別紙のとおりである。

4. 施設整備等の状況

平成10年度の施設整備等については、以下のとおり整備を行った。

(1) 予算関係

- ① 本所2号館冷暖房用設備等改修工事
- ② 大阪支所本館及び別館1号館等冷暖房設備改修工事
- (2) 補正予算関係
 - ① ダイオキシン類分析のための施設、設備工事及び機器整備
 - ② 筑波薬用植物栽培試験場ガラス温室改修工事
 - ③ 種子島薬用植物栽培試験場ガラス温室改修工事

5. 国立医薬品食品衛生研究所標準品交付規程の一部改正

国立医薬品食品衛生研究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「バイカリン標準品」、「シュウ酸カルシウム一水和物標準品」及び「エンドトキシン(100)標準品」を追加し、「エストリオール標準品」外10品目を(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73品目、色素試験用標準品38品目、計111品目となった。

6. 移転関係

(1) 本所

当所の移転については、昭和63年7月19日「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ついて」の閣議決定、翌平成元年8月24日「国の行政機関等移転推進連絡会議」において移転先地が府中市米軍基地跡地に決定された。移転に向けて今日に至るまでの間、関係省庁(大蔵省、建設省)、東京都及び府中市と各種折衝を進めてきたが諸々の要因(府中市の市民斎場問題、都市計画法の改正等々)により殆ど進展はみられなかったことに加え、平成7年4月には国立試験研究機関重点整備・再構築(案)の提示、さらには中央省庁等改革基本法に基づく省庁再編等の要素が生じたこと等から移転への作業が進展しなかった。

しかしながら、中央省庁等改革に係る大綱が平成11年1月に示されたことから、今後は、移転に向けた作業を精力的に進めることとなる。

(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

別紙

平成10年度予算額

事 項	平成9年度	平成10年度	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(A)	(B)	(千円)	
	(千円)	(千円)	(千円)	
(組織) 厚生本省試験研究機関	4,678,859	4,743,661	64,802	
(項) 厚生本省試験研究所	3,992,590	4,057,814	65,224	
国立衛生試験所に必要な経費	3,992,590	4,057,814	65,224	
既定定員に伴う経費	2,596,293	2,695,810	99,517	
人 件 費	2,596,293	2,695,810	99,517	
増員要求に伴う経費	0	37,579	37,579	
人 件 費	0	36,243	36,243	
人 当 経 費	0	581	581	
研 究 費	0	755	755	
経 常 事 務 費	314,163	313,317	△ 846	
人 当 経 費	9,154	8,937	△ 217	
一 般 事 務 経 費	46,479	42,247	△ 4,232	
研 究 費	250,422	254,025	3,603	
官庁会計事務データ通信システムに必要な経費	8,108	8,108	0	
特 別 研 究 費	18,078	16,110	△ 1,968	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 (8,997千円) 2. 生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明 (7,113千円)
標準品製造費	46,288	42,490	△ 3,798	
安全性生物試験研究センター運営費	207,433	185,353	△ 22,080	
薬用植物栽培試験場運営費	103,399	97,398	△ 6,001	
施設管理事務経費	102,175	105,203	3,028	
受託研究費	165,277	107,430	△ 57,847	1. バイテクノロジーによるワカシの創製と改良技術の開発 (3,500千円) 2. バイテクノロジー応用医薬品の評価技術の開発 (6,253千円) 3. バイテクノロジーを利用した食品の開発と安全性評価技術の開発 (4,200千円) 4. バイテクノロジーを応用した毒性・薬効の新評価技術の開発 (9,501千円) 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 (8,253千円) 6. 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 (13,228千円) 7. 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 (7,000千円) 8. 医用材料と生体の相互作用の総合化技術の開発 (4,464千円) 9. 先端技術による廃棄物処理技術の開発 (3,200千円) 10. 薬用植物の科学的研究 (10,905千円) 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 (16,900千円)

事 項	平成9年度	平成10年度	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(A)	(B)		
	(千円)	(千円)	(千円)	
乱用薬物基礎研究費	19,142	17,086	△ 2,056	1 2. 神経系の機能・病態の解析と医療への応用 (11,926千円) 1 3. 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(3,500千円) 1 4. 代謝調節機能に及ぼす環境要因の解析(4,600千円) 薬物乱用,特に依存性薬物の強化効果の修飾ならびに薬物依存性の評価法に関する基礎的研究 (17,086千円)
総合化学物質安全性研究費	132,546	118,166	△ 14,380	1. 安全性点検体制支援システム経費(71,980千円) 2. 安全性試験法開発等研究費(17,876千円) 3. 生活環境暴露評価基盤研究費(28,310千円)
移 転 調 査 検 討 費	2,673	2,381	△ 292	
共 同 利 用 型 高 額 研 究 機 器 整 備 費	101,233	90,409	△ 10,824	
培 養 生 物 資 源 保 存 管 理 基 盤 整 備 費	41,711	38,149	△ 3,562	
研究情報活動費基盤整備費	87,928	78,345	△ 9,583	1. 研究情報ネットワークシステム基盤整備費(21,387千円) 2. 研究情報整備事業(18,989千円) 3. 情報を基盤とする化学物質安全性国際協力事業(37,969千円)
抽出インプラント用具の適合性解析法研究費	20,705	18,450	△ 2,255	
遺伝子治療薬の品質、安全性等確保のための基盤研究費	33,546	29,898	△ 3,648	
内分泌かく乱性化学物質のリスク評価手法開発研究費	0	32,201	32,201	
新規食品等のアレルギー性評価法の基盤研究費	0	32,039	32,039	
(項) 血清等製造および検定費	602,106	641,618	39,512	
医薬品の国家検定及び検査等に必要経費	602,106	641,618	39,512	
一般事務経費	12,925	12,936	11	
事業費	109,991	109,991	0	
医薬品医療機器審査センターに必要な経費	479,190	518,691	39,501	
(項) 厚生本省試験研究所施設費	84,163	44,229	△ 39,934	
国立衛生試験施設整備費	84,163	44,229	△ 39,934	本所2号館冷暖房用設備等改修工事 大阪支所本館及び別館1号館等冷暖房設備改修工事
(移替予算)				
(組織) 厚生本省試験研究機関	163,725	162,979	△ 746	
国立機関公害防止等試験研究費	68,961	64,992	△ 3,969	
(項) 国立機関原子力試験研究費	94,764	97,987	3,223	
	4,842,584	4,906,640	64,056	

* 予算額については両年度とも当初予算額
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、国立試験研究機関の重点整備・再構築(案)に

示された大阪支所業務を東京に集約するとともに『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がうちだされたこと。

等から、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つとしていたが、中央省庁再編成等の大きな環境変化の中で、具体的な動きが取れない状況であった。

薬 品 部

部 長 小 嶋 茂 雄

概 要

平成10年度にも、昨年度に引き続いて、医薬品の品質規格に関する研究、製剤評価に関する研究、ならびに麻薬およ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。しかしながら、省庁再編により厚生省と労働省が合体して厚生労働省となることが決まっており、それに向けての厚生省内での体制の見直しが進められる中で、国の研究機関として残る道を選択した当所に対しても、行政サイドからの要求がさらに強まっていくものと思われる。また、国立公衆衛生院の研修部門が平成14年に和光に移転するのに伴い、その実験部門を当所が受け入れることになっていることから、当所の再編も焦眉の問題となってきた。平成7年に策定された厚生省の試験研究機関の再編案では、現在の薬品部の各室が3分され、大阪支所の薬品試験部や国立公衆衛生院の衛生薬学部などと合体して、薬剤研究部、医薬品科学部および生薬・麻薬部に再編成されることになっており、この大きな変化の波を乗り越えていくための積極的な対応が求められている。一方、研究面でも、従来の品質規格や製剤評価に関する研究にとどまらず、ソリブジン事件を契機に大きくクローズアップされた薬物の相互作用など、医薬品の安全性、適正使用に関わる問題などについても研究できる体制を整える必要があるものと思われる。

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、ならびに日本薬局方の規格および試験方法に関する研究を行った。製剤評価に関する研究では、後発医薬品の品質再評価の動きとも関連した経口固形医薬品の品質保証のための溶出試験適用に関する研究や溶出試験法のキャリブレーションに関する研究、ならびに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などを行った。また、麻薬およ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、ならびに毛髪への乱用薬物の移行に関する研究などを行った。

人事面に関しては、伊豆津健一主任研究官は、平成10年7月から厚生省大臣官房厚生科学課に外向している（外向期間は、当初6ヶ月の予定であったが、その後1年間に延長された）。また、小村純子氏は、科学技術特別研究員として、平成9年4月から第1室において医薬品のバイオアベイラビリティ評価法に関する研究を行ってきたが、平成10年10月に当所医薬品医療機器審査センターの審査官として採用され、同センター審査第2部に移った。

Karen S. Scott氏が、科学技術庁のSTAフェローとして、平成10年8月より、麻薬室においてベンゾジアゼピン系向精神薬の毛髪への取り込み機構に関する研究を行っている。森原元彦氏が、医薬安全総合研究推進事業（若手研究者育成活用事業）のリサーチレジデントとして、平成10年9月より、第1室において定期的試験/スキップ試験による医薬品の品質保証に関する研究を行っている。また、Valentino J. Stella 米国カンサス大学薬学部主任教授が、医薬安全総合研究推進事業（外国人研究者招へい事業）の研究者として、平成11年1月～2月に第2室において医薬品の安定性試験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（なお、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関連の海外出張については、業務成績 5. 国際協力の項を参照していただきたい）：

青柳室長は、EP主催の製剤試験法と物性試験法に関する国際会議（平成10年10月）において講演するため、スペインに出張した。小嶋部長、青柳室長および吉岡室長は、ICH5準備会議（品質分野）に出席するため、ベルギー（平成11年3月）に出張した。また、石橋室長は、平成5～7年度に国際厚生事業団が開発した不正医薬品の鑑別試験法の英文版である「*Rapid Examination Methods against Counterfeit and Substandard Drugs*」の改定のためのWHO主催の検討会議（平成11年5月）に出席するため、ベトナムに出張した。

阿曾主任研究官は、コントロールドリリース学会第25年会（平成10年6月）における研究発表のため、米国に出張した。中原室長および木倉技官は、第36回国際法中毒学会（平成10年10月）において研究発表を行うため、米国に出張した。また、吉岡室長は、米国薬剤学会第12年会（平成10年11月）における研究発表のため、米国に出張した。

業 務 成 績

1. 特別審査試験

新薬59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い、医薬安全局麻薬課に報告した（国産あへん20件、輸入あへん59件、合計79件）。

3. 標準品の製造

次の向精神薬標準品を製造した：

塩酸 4-プロモ-2,5-ジメトキシフェネチルアミン (2-CB) (6g)

4. 国際協力

国際厚生事業団の第14回アジア諸国薬事行政官研修（平成10年7月）および第9回必須医薬品製造管理研修（平成10年10月）に協力して、アジア諸国の薬事行政官なら

びに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平成10年度の研修員として平成10年9月7日に来日した天津市薬品検査所の王樹嵐薬師は、国立医薬品食品衛生研究所(薬品部)における7ヵ月間の生体内薬物分析に関する研修を終えて、平成11年3月25日帰国した。

小嶋部長は、同プロジェクトの終了時評価調査団の一員として、中国天津市薬品検査所を訪問し、医薬品検査業務に必要な技術移転の進捗状況を視察して、同プロジェクトの成果と問題点について評価を行った(平成10年7月)。また、天津市薬品検査所の主催により中国天津市で開催された第5回日中薬品分析セミナー(平成10年9月)において、化学合成医薬品の品質に関するICHガイドラインについて講演を行った。

5. その他

中央薬事審議会の各種調査会における審議(薬務局審査管理課および安全課)、日本薬局方の改正作業(薬務局審査管理課)、日本薬局方外医薬品規格および医薬品添加物規格の改正作業(薬務局審査管理課)、地方衛生研究所技術者講習会(薬務局監視指導課)、麻薬および乱用薬物に関する情報収集(薬務局麻薬課)ならびに日本工業規格(JIS)の改正作業(通商産業省)などに協力した。

また、処方変更のための生物学的同等性試験ガイドラインおよび含量違いの製剤の生物学的同等性試験ガイドラインを作成し、公表するとともに、後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインに関する質疑応答集(Q&A)を作成し、公表した(薬務局審査管理課)。

研究業績

1. 医薬品の分析法に関する研究

平成10年12月22日に監視指導課から通知された外用抗真菌薬(イミダゾール系抗真菌薬)の迅速分析法の適用外とされた外用抗真菌薬の試験方法を新たに開発した(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た他種成分配合の消化器官薬中のアズレンスルホン酸ナトリウムの分析法を検討した。

希少疾病(熱帯地域からの輸入寄生虫症)用の未承認医薬品である塩酸メフロキン錠およびリン酸プリマキン錠の「規格及び試験方法」をさらに整備した。これにより、治験薬として供給するこれらの稀少薬の品質をよりよく確保できるようになった(官民共同プロジェクト研究/創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

指定検査機関の試験検査結果の信頼性確保を目的として、精度管理に関する検討を行った(薬務局監視指導課委託研究費)。

監視指導課、国研および地方衛研の間に、国立衛研をキーステーションとし、39機関、152名の参加した双方向ネットワークを試験的に構築し、検査データや試験法などに

関する情報交換を行った(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

中毒起因物質になりうると思われる医薬品8種について、その分析マニュアルを作成した(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

2. 日本薬局方の規格および試験方法に関する研究

第13改正日本薬局方の第1追補および第2追補収載品目について、参照赤外吸収スペクトルを作成した。また、参照スペクトルの作成に関連して、臭化カリウム錠剤法により測定試料の調製を行うとき、塩酸塩の形の医薬品では塩素イオンが臭素と置換を起こすため、スペクトルに変化が現れる問題を検討し、一定の解決策を見出した(日本公定書協会/医薬品の規格及び試験方法に関する研究)。

医薬品各条への原薬の新規収載ならびに既収載品目の見直しの際に、ICHの原薬の不純物ガイドラインとの関連で、どのような点に留意して純度試験、特に不純物(類縁物質)の規格を整備するかを検討した(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

3. 医薬品の有効性、安全性に関する薬剤学的研究

溶出挙動の異なる2種のインドメタシン顆粒および1種のインドメタシン錠を調製し、パドル法の50rpmにおける溶出速度の差違とバイオアベイラビリティの差違について比較検討した結果、溶出試験において同等でなくても生物学的には同等となるケースがあることが判明した(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

溶出試験の適格性を93施設で調査した結果、溶出試験器の振動に鋭敏なセファレキシリン徐放顆粒は、溶出試験の操作法の適格性を判断する上でも有用であることが判明した。また、振動に問題のある試験器はほとんど使用されていないことが分かった(医薬品機構/生物学的同等性の評価に関する研究)。

ICHで合意されている定期的試験/スキップ試験の我が国への導入を目指して、適用し得る試験項目や実施上の課題などについて検討した結果、GMPに基づく医薬品の品質保証が定着しつつある現状においては、含量均一性試験や確認試験などに定期的試験/スキップ試験を適用できること、管理図に基づくスキップ試験の採用が望ましいことなどを明らかにした(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

4. 医薬品の物理・化学的安定性に関する研究

デキストランをはじめとする種々の水溶性高分子を添加剤とするタンパク質凍結乾燥製剤の分子運動性をパルスNMR緩和法、熱分析法および誘電緩和スペクトル法によって測定した。凍結乾燥製剤は、ガラス転移温度より20~30℃低い温度ですでに高い運動性をもつことが明らかになった(厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

溶融法によって得られるニフェジピンの非晶質医薬品について、保存による経時的な結晶化現象を等温型マイクロ熱

量計および示差熱量計 (DSC) を用いて検討し、DSC が結晶化の評価法として、また、エンタルピー緩和現象の測定法として有用であることを明らかにした (官民共同プロジェクト研究/創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

γ 線照射によって調製したデキストランゲルからのタンパク質の放出速度は、ゲルの網目サイズとタンパク質の分子サイズによって決まることが分かった。架橋度を調節し、目的とするタンパク質の分子サイズに適合した網目サイズを有するゲルを調製することによって、タンパク質の放出速度を制御できることが明らかになった (国立機関原子力試験研究費)。

5. 麻薬および依存性薬物に関する研究

GC/MS および HPLC を用いた毛髪中のベンゾジアゼピン系催眠剤 (8 種) の分析法を確立し、これらの薬物をラットに投与した場合の毛髪への取込率を測定した結果、塩基性の Flurazepam が比較的取込率が高かったものの、他の薬物群と比較して、毛髪への取込率の低い薬物群であることが明らかとなった (科学技術庁 STA フェローシップ研究費)。

アミノピリンを投与したラットの毛髪中の親化合物および 3 種の代謝物 (4-methylaminoantipyrine, 4-aminoantipyrine, 4-acetylaminoantipyrine) の分析法を確立し、長期に投与を続けるほど代謝物の生成が促進されることを見出した。また、トリアゾラム投与のラット毛髪中の主成分は、4-水酸化トリアゾラムであることを確認するとともに、バラコート投与のラット毛根中からバラコートを検出することに成功した (厚生科学研究/厚生科学特別研究事業)。

偽覚せい剤の Dimethylamphetamine と覚せい剤メタンフェタミンとの識別法を検討し、毛髪分析により両者を識別する方法を確立した。併せて、ラットにおける尿や血液への代謝物の分布を毛髪中のそれと比較検討した (厚生科学研究/医薬安全総合研究事業)。

6 種のフェネチルアミン系薬物 (*d*-phenylpropanolamine, *l*-phenylpropanolamine, cathine, 2-CB, diphenylamphetamine) と LSD について、呈色反応、赤外吸収スペクトル分析、薄層クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、ならびにガスクロマトグラフ/質量分析を行い、こ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)。

アルコール併用時の覚せい剤中毒の際に体内で生成することが疑われている精神毒性の高い Tetrahydroisoquinoline (TIQ) を確認するための検討を行い、覚せい剤とアルコールを同時投与した動物の毛髪中から TIQ を微量ながら検出することができた (乱用薬物基礎研究費)。

生物薬品部

部長 早川 堯夫

概要

生命科学の急速な進歩が製品化に直結する生物薬品の品質・安全性確保は、アイデア段階、研究開発段階から、その動向をみながら対応を図っていく必要がある。特に、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品、トランスジェニック動物/クローン動物由来医薬品などにおけるレギュラトリーサイエンスでは、これらに関わる先端的研究の渦中で、自らも研究に従事しながら問題点を明らかにし、解決法を探っていくことが重要であると思われる。

一方、生物薬品の品質・安全性確保に関する問題を国際性との関係で捉える必要性もますます高まっている。それぞれの国や地域がもつ優れた科学や考え方が国際社会に集められ、その中で活用され、あるいは新たな創造を生み、整合される方向が明確に目指されている。ここで、いかに国際社会との整合性を高め、必要な国際貢献をし得るかは、まずは優れた科学性と、そして国際社会との交流の継続性に負うところが大きいと思われる。ICH 活動では、わが国の科学的蓄積や提示したコンセプトが大幅にとり込まれてきた。「バイオ医薬品の特性/品質、規格」に関する ICH 国際調和文書が完成したが、それに対するわが国の貢献はきわめて大きかったと考えている。

人事面では、平成 11 年 3 月 31 日付けで横田橋江主任研究官が定年退職された。同氏は 30 年 8 ヶ月の長きにわたって部の業務に精励された。その労に感謝している。平成 10 年 7 月 1 日付けで水口裕之氏が研究員として採用された。平成 10 年 10 月 1 日付けで遺伝子治療薬研究室が新設され、室長に内田恵理子主任研究官が昇任した。小林 哲研究員が平成 10 年 10 月 1 日付けで主任研究官に昇格した。平成 11 年 4 月 1 日付けで河合 洋氏が研究員として採用された。平成 10 年 10 月 1 日付けで細野哲司氏が HS 振興財団よりヒトゲノム・遺伝子治療研究推進事業の流動研究員として派遣された。平成 11 年 4 月 1 日付けで村井 淳氏が HS 振興財団よりヒトゲノム・遺伝子治療研究推進事業の研究支援者として派遣された。

海外出張は以下の通りであった。早川部長：WHO における生物製剤標準化品質管理の進歩：50 年記念シンポジウム等に参加 (スイス、平成 10 年 10 月 24 日～31 日)、ワクチン類の国レベルでの規制のあり方に関する WHO 専門家会議に参加 (スイス、平成 11 年 1 月 19 日～25 日)、日米 EU 医薬品規制整合化国際会議 (ICH) バイオテクノロジー医薬品の品質に関する専門家会議に参加 (ベルギー、平成 11 年 3 月 6 日～14 日)、米国化学会“生物薬品の有用性確保

に関する第9回学術大会”に出席(カナダ, 平成11年5月23日~28日); 川西 徹第3室長: 日米EU医薬品規制整合化国際会議(ICH)バイオテクノロジー医薬品の品質に関する専門家会議に出席(ベルギー, 平成11年3月6日~14日)

業務成績

1. 特別審査 5件
2. その他

第13改正日本薬局方改正に伴う業務, 中央薬事審議会各種調査会・部会, 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(いずれも医薬安全局審査管理課), GMP評価委員会(医薬安全局監視指導課), 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) LC/MS および LC/MS/MS を用いた糖タンパク質糖鎖の解析法を開発し, 未知糖鎖の構造, 糖鎖分岐構造および各糖鎖の相対比を解析できることを示した(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

ii) LC/MS による糖鎖構造解析法とペプチドマップ法を組み合わせたエリスロポエチンの糖鎖結合部位特異的な糖鎖の不均一性の解析法を確立した(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

iii) 時間分解蛍光法による抗血栓治療薬トロンボモジュリン(TM)の活性試験法の開発を目的として, 無水 DTPA を用いた TM のユーロピウム標識化を行なった。

iv) バイオテクノロジー応用医薬品の生物活性の評価法の開発の一環として, DMSO 処理した HL-60 細胞の増殖性を指標とする G-CSF の生物活性測定法の科学的妥当性について検討した。

2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

i) 多形核白血球の分子機構並びに各種薬剤の有害作用発現に関する生物化学的研究の一環として, 抗 L-plastin 抗体を作成し多形核白血球の活性酸素産生酵素の細胞質因子と L-plastin の相互作用について解析した。その結果 L-plastin と細胞質因子は直接は結合しないことを明らかにした。

ii) 海馬神経細胞におけるグルタミン酸処置によるナトリウムイオン濃度調節機構の不可逆的障害には, 細胞内カルシウムイオン濃度上昇以外の機序が関係することを明らかにした。

iii) 血栓溶解剤の副作用の原因と考えられているプラスミンによる血小板凝集が, ADP アンタゴニストによって抑制されることを見いだした(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

3. 生体内活性物質の作用機序と細胞機能に関する生物化学的研究

i) フォリスタチン(FS)のイソフォーム FS-288 および

FS-315の生物活性の違いを検討し, FS-288の方が, アクチビン, ヘパリンおよびヘパラン硫酸に対して高い親和性を示すことを確認した(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

ii) Con A アガロースを用いて分離した糖鎖結合 FS および非結合 FS について表面プラズモン共鳴法を行ない, FS の糖鎖は, プロテオグリカンを介したアクチビンのクリアランスに対して抑制的に作用していることが示唆された(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

iii) 高転移性癌細胞の運動能は HGF 及び PDGF-AB によって誘導されること, また, ガングリオシド GD1a は, これらの因子で誘導される運動能を抑制することを明らかにした。さらに, これらの因子で刺激すると, 高転移性細胞は形態変化を起こすが, GD1a はこの形態変化を抑制することを見出した(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

iv) アクチビン A が, 高転移性腫瘍細胞の運動能を誘導することを見出した。

v) 3種類のヒト巨核球系培養細胞(MEG, HEL, CMK)について, TPA による分化誘導モデルの確立を試みた。

vi) ホルモン等の作用発現に関与する諸因子に関する研究の一環として, 初代培養ラット肝細胞におけるハービマイン A 依存的及び非依存的なグルココルチコイド受容体減少にプロテアソームが関与していることを明らかにした。

vii) 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, G-CSF と GM-CSF のクロストークの解析を行った。その結果, GM-CSF による HL-60 細胞の好中球分化の抑制作用の最も大きな要因は, STAT3 の核移行の阻害であることを明らかにした。また, HL-60 細胞の好中球分化における p70 S6 キナーゼの役割についても検討した。

viii) 初代培養肝細胞における細胞内膜系のカルシウムチャンネル開口を画像化法で捉える方法の検討を行い, 内膜系へ低親和性カルシウム蛍光プローブを取り込ませ, 高速高空間分解能で画像化することにより開口の瞬間を捉える条件を見出した(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

ix) 肝細胞で観察されるカルシウムウェーブと細胞内イノシトール3リン酸受容体チャンネルの細胞内局在との関係を明らかにした(HS 財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

x) 細胞内チロシンリン酸化反応のリアルタイム画像化法の開発を目的に, リン酸化チロシン抗体を用いた画像化の可能性を検討した(文部省科学研究費補助金)。

4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品の有用性確保に関する基礎的研究

i) 膜融合リポソームの遺伝子導入効率の向上を目的に, 陽イオン性高分子による封入 DNA 量の増加について検討

した(厚生科学研究費補助金)。

ii) 非ウイルスエピソームベクターの開発を目的に、プラスミドの複製、安定性に寄与するヒト染色体断片候補を取得した。またヒト細胞において染色体 DNA の安定性に寄与すると考えられているテロメア配列断片を調製した(厚生科学研究費補助金)。

iii) 非ウイルスベクター類の遺伝子導入効率と毒性発現の関係を *in vitro* でヒト細胞パネルを用いて検討し、評価に資するパラメーターに関する知見を得た(厚生科学研究費補助金)。

iv) 遺伝子組換え動物由来細胞製品の安全性確保について、特に遺伝子組換え動物の安定的かつ安全な生産維持、及び生体応用の際の安全性確保に必要な諸要素について検討を深めた。

v) トランスジェニック動物を利用して製造される医薬品の品質・有効性・安全性を評価するにあたっての評価基準をまとめた(厚生科学研究費補助金)。

vi) 細胞内に導入されたオリゴヌクレオチドの細胞内動態を捉える方法の検討の第一段階として、高感度顕微鏡画像化機器の構築に着手した。

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、肝疾患モデルラットにおいてフォリスタチン mRNA が変動することを見だし、フォリスタチン mRNA の変動が肝毒性指標として有用であることを明らかにした(厚生省特別研究)。

ii) 新規グルココルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的検討として、新規グルココルチコイド受容体は既知の受容体に比べリガンドに対する結合において親和性が異なることを明らかにした(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

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、生薬薬理学的研究を行った。薬局方の生薬の微生物限度値に関する研究を行っている。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、そのイオン機序を引き続き、解析した。国際的交流としては天津医薬品検査技術プロジェクト及び日本と中国との二国間での薬局方の生薬分野での国際調和を行った。

行政との対応では、13改正日本薬局方第二追補の作成試験、いわゆる合法ドラッグの生薬類の解明、モルヒネの資源としてのケシ濃縮物の検討、たばこの喫煙の影響、及び

生薬製剤の安全性に関与する検討を行った。

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尾崎幸紘室長が平成 10 年 6 月 26 日から 8 月 14 日まで及び川原信夫主任研究官が平成 10 年 7 月 29 日から 8 月 28 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 10 年 9 月 23 日から 9 月 29 日までアメリカへ出張した。職員の移動については、李宜融氏を平成 11 年 4 月 1 日付けで定員外職員として採用した。淵野裕之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 10 年 12 月 1 日から受け入れ、尹永淑氏を長寿財団フェロー流動研究員として平成 11 年 1 月 1 日から受け入れ、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呉貴華氏(平成 11 年 1 月 15 日から 3 か月間)を研修員として受け入れた。

研究内容

i) 薬局方関連で第二追補収載予定の生薬の基原を検討した。また、定量法の設定を検討した。又生薬の微生物限度試験と関連して、滅菌方法の検討を行った。その結果、微生物の制御法として電子線照射法は γ 線照射と同様に 5~10K Gy で効果が認められた。生薬成分の変化に対しても電子線照射法と γ 線照射法は同傾向を示した。

ii) 大麻の DNA 鑑定法の確立のための試験として、国内外より収集した大麻種子を発芽、育成させ、葉の形態による分類を行った。また、これらのうち 10 種から得られた DNA について AFLP 法による解析を行った。

iii) バイカリン標準品の候補品について、共同検定を受け持ち、品質評価を行った。覚醒剤原料メチルアンフェタミンの合成を行い、取り締まり業務における標準品とした。

iv) 生薬製剤の副作用の原因究明として、細辛および中国産製剤中のアリストロキア酸の定量を行った。マウスに投与するための小柴胡湯エキスを調整し指標物質の含量を測定した。

v) 新しい活性物質の探索として沖縄産及び南米産薬用植物のエキスを作成し、南米産 *ringa de vaca* に抗原虫作用を見だし、活性成分を単離同定した。又、避妊に用いられている *Cyperus prolixus* のメターノルエキスをラットに投与したところ下垂体遺伝子の発現には影響を及ぼさず、視索前野の Estrogen mRNA, Vasopressin V1a-RmRNA を変動していることが明らかとなった。

ブラジル産生薬 *Luffa operculata* より 2 種の新規 cucurbitacin 誘導体を単離し、構造決定を行った。ペルー産生薬 *Gentianella nitida* の成分検討を行い、ジクロロメタンエキスより IL-2 遺伝子発現増強活性を有する新規セステルペノイドを単離し、構造を決定した。南米産植物 *Brosimopsis oblongifolia* に 5 α -リダクターゼ阻害活性を認めた。

vi) 生薬及び漢方処方作用の解明として中国産レンギョウのヘキサノ分画に抗炎症作用及び鎮痛作用が認められた。脳卒中易発症高血圧ラットに七物降下湯を投与し、病理学的に検討したところ、対照群に見られた脳の出血巣が湯剤投与群では有意に低下し、梗塞巣の程度も軽減していた。更に血管周囲腔の拡張や石灰沈着はいづれも観察されなかった。

vii) エンドセリン ET_A 受容体を介する陰性変時作用の脱感作の細胞内機序を、蛋白リン酸化酵素との関連を中心に明らかにした。心臓の単離ペースメーカー細胞を用い、 ET_A 受容体を介する陰性変時作用のイオン機序を、電気生理学的手法により解明した。

viii) 温湯負荷マウスを用いた増精子のためのアッセイ法により *Codonopsis* sp., *Himatanthus* sp., *Pirocarpus* sp. に活性を認めた。

ix) 薬用植物栽培・品質評価指針 (part VII) 収載の生薬 (ウワウルシ, オオカラスウリ, キハダ, クコ, ヒロハセネガ) の調査を行った。

x) 薬用生物資源の保存と保護を目的に、薬局方収載薬用植物の視認調査を行いデータベース入力と一部の地図作成を行った。更に沖縄県, 広島県, 神奈川県と共催で、薬用植物の観察会を開催した。

xi) 真菌 *Trichoderma* spp. の長期保存下での指標化合物の定量を行い前年度と比較したところ、代謝産物生合成能の明らかな低下を認めた。

xii) 未規制医薬品中の興奮作用, 幻覚作用を期待して配合されることが予想される化合物として、メスカリン, ヨヒンビン, カフェイン等の分析法を検討した。また、成分の検討を目的に、*Psilocybe* sp. を培養した。瘦身茶に含まれる「センナ茎」の実体を明らかにするため、葉, 茎, 葉軸などの部位別のセンノシド量を測定し「茎」と称している物の殆どが「葉軸」であることを明らかにした。

xiii) 生薬の化学的品質評価の研究

生薬への γ 線および電子線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。成分に関しては、オウバク, ジオウ, サイコについて検討をしたところ、指標成分には大きな変動は認められなかった。別にオウバクに関しては熱水抽出画分の HPGPC を行ったところ、溶出パターンに照射前後で異なった部分が認められた (科技庁・原子力)。

xiv) タバコの健康増進に及ぼす影響に関する研究として、タバコ主流煙・副流煙に含まれる化合物のデータベース化を行うと共にフィルターに収集した成分を GC-MS で検出した。

xv) 化学物質の機能と三次元構造相関の解明として、分子力場計算による chaetoglobosin 類の計算値と酵素活性化法による活性発現の相関性を解析した。

療 品 部

部 長 中 村 晃 忠

概 要

中村晃忠は1999年4月1日付けで当所医薬品医療機器審査センター審査第4部長を併任することとなった。

HS 財団流動研究員・王 春仁博士は1999年3月末で退職した。交代に、4月1日付で朴正雄博士が流動研究員として採用され着任した。「人工臓器材料の長期間安全性評価に有用な指標に関する基礎的研究」に従事している。

医薬品機構からの派遣研究員 Md. Abu Sayed 博士は、1998年10月に退職した。

科学技術特別研究員として市川明博士が1999年1月1日付で着任した。「遺伝子組込型人工臓器の安全性・有効性評価に関する基礎的研究」に従事している。

神奈川歯科大学・熊田秀文講師は引き続き客員研究員として「成人性歯周炎に関する基礎的研究および薬物開発への応用」研究を実施している。

業務報告

1. 家庭用品関係

例年通りに、家庭用品に係わる毒性試験計画の一環として、(1) 計画の策定, (2) 分析法作成, (3) 試験物質の純度検定と安定性試験, (4) 細胞毒性試験を担当した。平成10年度の分析法設定および細胞毒性試験品目は下記の通りであった。

分析法設定：抗菌剤 2 種：10,10'-oxy-bis (phenoxyarsine) 1-bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene

細胞毒性試験：抗菌剤 2 種：Hiba oil ; 2,3,5,6-tetrachloro-4-methylsulfonylpyridine および、ゴム添加剤 2 種：N-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine ; zinc butylxanthate

2. 国際調和, 国際基準など

i) 医療用具関係国際標準化機構技術委員会 (ISO/TCs) への参加：ISO/TC194/WG14「材料キャラクターゼーション」および ISO/TC194/WG15/TF1「免疫毒性」(London, 1998.10, 中村); ISO/TC194/WG15「医療用具の生物学的評価への戦略的アプローチ」コアグループ会議 (Brussels, 1998.12, 中村); ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」年次総会 (Helsingor, 1999.5, 中村, 土屋); ISO/TC172「光学機器 (眼科器具を含む)」年次総会 (Balcerona, 1999.5, 土屋); ISO/TC194/WG14/TF1「免疫毒性」(Biltohoven, 1999.3, 中村)

ii) 国際調和関連会議への参加：第2回ヘンリー・スチュアート会議「医療用具の生物学的評価」(Brussels, 1998.12, 中村); 第9回 AAMI/FDA 国際標準会議 (Washington DC, 1999.3, 中村)

iii) 国際評価文書作成作業への参加: IARC Monograph「インプラント医療用具などによる発癌」作成作業 (Lyon, 1999.2-3, 中村, 土屋)

3. 医療用具関係国内基準改訂

各種の基準を改訂あるいは新規策定する作業に参画している。主なものは、(i) 薬事法第42条に基づく基準をISOスタンダードとの整合を考慮しつつ改訂する作業班、(ii) 医療用具の臨床試験の在り方に関する厚生科学研究班(赤松班)、である。

研究業績

1. 医用材料などの生体適合性評価に関する研究

I-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

標記アレルギーは植物生体防御蛋白質を抗原とするもので植物性食物によるアレルギーと交差するが、この種の蛋白質は胃液で分解することが分かった。すなわち、この種の蛋白質は食物摂取による感作抗原とはならないが、ゴムラテックス蛋白に呼吸器系あるいは経皮的に暴露され感作された人では、植物性食品を摂取してもアレルギーを発現することになるといえる(経常研究費)。

I-2. 天然由来医用材料の生物学的安全性評価に関する研究

天然ゴムラテックス製品(手術用手袋, 尿道カテーテル)の発熱活性の原因を以下の手段で追求した: ウサギによる発熱性試験, 各種のエンドトキシン試験, マクロファージからのサイトカイン誘導活性, エンドトキシン構成化学成分の分析, エンドトキシン吸着剤による失活, エンドトキシン阻害剤によるメディエータ放出の阻害。その結果, 天然ゴム製品による発熱はエンドトキシンに起因することが確かめられた(厚生科学研究費)。

I-3. 放射線照射によって医療用具から生じる揮発性物質に関する研究

透析器などの医療用具から発生する揮発性物質の定量を行い, その毒性評価を行った結果, 安全性に問題はないことが確認された(経常研究費)。

I-4. 放射線照射をうけた医用材料の表面解析と細胞機能影響評価に関する研究

γ 線照射材料の表面分析 (FTIR, GPC, 摩耗性) を行い, 照射線量と表面変化との関係を明らかにした。 γ 線照射ポリ-L-乳酸は骨芽細胞の骨分化を促進させた(原子力研究費)。

I-5. 金属酸化物微粒子の生体適合性評価に関する研究

ルチル型酸化チタンは, 試験条件下で, 細胞形質転換活性を認めなかったが, アナターゼ型酸化チタンでは活性を認めた(科学技術振興調整費)。

I-6. 医療用具・医療材料の細胞毒性評価に関する研究 直接眼に触れることになるコンタクトレンズケア製品の

細胞毒性試験を行った結果, ケア製品間で細胞毒性強度が異なることが明らかとなった(経常研究費)。

I-7. 人工臓器材料の長期間安全性評価に有用な指標に関する基礎的研究

人工血管に使用されるポリエステル (PET) はギャップ結合を強く阻害することが明らかになった。PET のオリゴマーやモノマーおよび溶出物に阻害活性はなかった。また, PET 表面でのギャップ結合阻害活性については, 結晶性, 非結晶性にかかわらず同程度に阻害が起こることが明らかとなった。一方, MPC-co-BMA ポリマーは細胞形質転換能およびギャップ結合阻害能とも検出されず, 優れた生体適合性を示した (HS 受託研究費)。

I-8. 医療用具・医用材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究

N-硫酸化アルキルポリウレタンの合成法を検討し, スルホン化プロピル基置換率が各 9, 19, 47%になるサンプルの合成に成功した(厚生科学研究費)。

I-9. 発毒性物質の安全性評価のための迅速・鋭敏な毒性指標の確立に関する研究

石灰化を指標とした新しい定量的骨分化培養系を確立した(特別研究費)。

I-10. マイクロマスカルチャーを用いた催奇形性の *in vitro* 試験に関する研究

ベンゾトリアゾール系 UV 吸収剤のギャップ結合阻害機構を阻害剤やウエスタンブロット法を用いて検討した結果, コネキシンのチロシンのリン酸化は関与していないことが明らかとなった(経常研究費)。

I-11. 医療用具などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

ポリカーボネートおよびポリサルホン製透析器からのビスフェノール A (BA) の溶出状況を検討するため, 原材料中の BA 含量の検討および牛血清を含めた各種溶媒による溶出試験を行った。また, 林が開発した FUMI 理論によって分析系のバリデーションを行った(厚生科学研究費)。

II. バイオ人工臓器に関する基礎的研究

II-1. 細胞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

細胞間連絡機能を阻害するポリエチレン表面上では連絡機能を担うコネキシンの細胞内での局在性が通常と異なっているが, ポリエチレン表面にコラーゲンを固定することによって局在性が正常化することが認められた。この変化にはコネキシンのリン酸化状態が影響することが示唆された(経常研究費)。

II-2. QOL を指向した生体融和材料の新創出に関する研究

種々の微粒子による細胞間連絡機能への影響を評価する方法を検討し, 従来より高い感度で機能への影響を検出で

きることを明らかにした。また、同材料でもフィルム状の方がより強く機能を阻害することが認められた(科学技術振興調整費)。

II-3. 組織細胞工学技術を用いた医療材料・用具の有効性・安全性・品質評価に関する研究

ヒトおよび動物細胞・組織を利用した医療材料・用具の有効性・安全性・品質確保のための課題と原則を多数の専門家の討議を通じて整理し提言を行った。これらは研究班ホームページを通じて公開された(厚生科学研究費)。

II-4. 自己化を獲得する機能組織の再生技術

ラットへの長期埋植で発癌を起こすポリ乳酸には発癌イニシエーション作用とギャップ結合阻害作用の両方があることを明らかにした。一方、ポリグリコール酸では発癌イニシエーション活性はなかった。ポリウレタンによる発癌強度と相関のあったギャップ結合機能阻害は、コネキシンのコーディング領域 DNA の変異によるものではなく、コネキシン蛋白分子のリン酸化修飾が要因であることを *in vitro* で癌化したクローンを用いて明らかにした(医薬品機構基礎研究プロジェクト)。

II-5. 遺伝子組込型人工臓器の安全性・有効性評価に関する基礎的研究

発現ベクターに組み込むコネキシン遺伝子を PCR で増幅した。この遺伝子をもとに、部位特異的突然変異導入法でリン酸化部位に変異を導入した変異型コネキシン遺伝子を作成した(科学技術振興調整費)。

III. 微生物および微生物由来物質に関する研究

III-1. リピド A アナログの合成に関する研究

リピド A 前駆体(Lipid IVa, 化学合成品 406) のバックボーンの 3'-位に結合する 3-ヒドロキシミリスチン酸の水酸基にメチル基を導入したアナログ(3'-Me-406) の合成が終了した(経常研究費)。

III-2. 感染性廃棄物中間処理における新技術の有効性および安全性に関する評価研究

医療廃棄物処理に関する国際セミナーを開催し、日米欧の医療廃棄物処理の現状と今後の課題に関して討議した。また、米国に導入されている新処理技術調査および高周波照射処理装置の微生物不活化能に関して検討した(厚生科学研究費)。

III-3. 成人性歯周炎に関する基礎的研究と薬物開発への応用

P. gingivalis 線毛/γCTB コンジュゲートは、マウス鼻粘膜投与により血清中の IgG, IgA レベルおよび唾液中の分泌型 IgA レベルを顕著に上昇させ、成人性歯周炎の予防薬となり得ることを明らかにした(HS 受託研究費)。

III-4. 新課題医療廃棄物の処理システム構築に関する研究

医療施設内においてプリオン汚染廃棄物を安全かつ容易

に処理するシステムとして、加圧アルカリ加水分解装置が応用できることを示した。また、米国の医療施設におけるプリオン汚染廃棄物処理の実態調査を行った(厚生科学研究費)。

IV. インプラント用具の適合性解析法開発に関する研究

IV-1. 医用材料の物性・生物試験データベースに関する研究

既承認の医療用具に用いられている医用材料のデータベースに試験用データを追加入力した(経常研究費)。

IV-2. インプラント用具の埋植情報の集積と分析に関する研究

日本の制度として適切なモデル用具として、整形外科用インプラント、眼内レンズなどを選択し、各学会に依頼して用具の使用状況および摘出事例を調査し、データベースを作成した(経常研究費)。

IV-3. 摘出インプラントの分析法の開発に関する研究

眼内レンズ屈折手術学会を中心として、物理的・化学的分析を試行し、分析手法を検討した(経常研究費)。

IV-4. 医療用具の不具合報告データベースに関する研究

医療用具の事後評価に資するものとして不具合報告のデータベースを試作し、800 件以上のデータを入力した。技術的にはネットワーク上での参照を可能にした(経常研究費)。

V. 医療用具の適正使用に関する研究

V-1. 眼内レンズおよびコンタクトレンズの適正使用に関する研究

種々の素材の摘出眼内レンズについて組織学的な検討を行った。また、コンタクトレンズに関連する眼障害の臨床と現在各企業が作成しているレンズとケア用品の使用説明書の記載方法について検討した(経常研究費)。

V-2. 医療用具の添付文書の記載要領に関する研究

医療用具全般の取り扱い説明書などの作成実態を調査した結果、記載要領の自主基準が不十分であったため、医療機関および製造業者で構成する研究班で添付文書の基本的な記載要領ガイドラインを策定した(厚生科学研究費)。

V-3. 医療用具の不具合情報等の適正管理に関する研究

各企業におけるインプラント用具の情報管理体制の実態と情報開示の意識を調査すると共に、「医薬品等安全性情報報告制度」の在り方について今後の検討事項を明らかにした(厚生科学研究費)。

VI. 医療用具の滅菌バリデーションにおけるバイオバーデン菌抵抗性の変動要因の究明

滅菌で損傷を受けたバイオバーデン菌の生育が市販生育培地のメーカーあるいはロットによって異なることが判明した。その原因を究明したところ、培地中のカルシウム濃度の違いに起因することが分かった。通常の培地のカルシウム濃度の変動範囲は抵抗値の変動の急な範囲にあって、

少しのカルシウム濃度変化が生育に影響を与えることが分かった（厚生科学研究費）。

VII. 家庭用品に含まれる化学物質の安全性情報に関する研究

VII-1. 接触アレルゲンに関する情報の収集・提供に関する研究

日本接触皮膚炎学会が刊行する「接触アレルゲン解説書」の作成準備のために、家庭用品関連化学物質のうち、染料、着色剤および抗菌剤について、日本における接触皮膚炎の発生状況、原因化学物質に関する文献収集を行った（移替予算）。

VII-2. 抗菌防臭加工剤に関する情報の収集・提供に関する研究

市販抗菌防臭加工製品の市場調査および分析調査を行いデータベース化した（移替予算）。

VII-3. 広域ネットワークを利用した家庭用品の安全性情報の収集・提供に関する研究

インターネットを利用して家庭用品の安全性に関する情報の提供を行った（移替予算）。

VIII. 家庭用品に含まれる化学物質の呼吸器系暴露の安全性に関する研究

VIII-1. 家庭内空気汚染物質と化学物質過敏症の関連性に関する研究

化学物質過敏症との関連が疑われているホルムアルデヒドをマウスに経皮塗布した場合、TMAによる感作誘導が増強され、IgE抗体価の上昇が認められた。一方、DNCBによる感作誘導には著しい変化はなく、惹起反応はむしろ低下した。よって、ホルムアルデヒドの経皮暴露はI型アレルギー反応を増悪する一方、IV型アレルギーは抑制されることが分かった（厚生科学研究費）。

IX. 家庭用品に含まれる化学物質の皮膚暴露の安全性に関する研究

IX-1. 抗菌加工製品による皮膚障害に関する研究

合成皮革製椅子による接触皮膚炎事例2例の原因物質は、各々10,10'-oxy-bis(phenoxyarsine)および2,3,5,6-tetrachloro-4-methylsulfonylpyridineであること、また、靴の臭い取り用防かびシールによる事例の場合は、 α -bromocinnamaldehydeであることを確認した（移替予算）。

環境衛生化学部

部 長 安 藤 正 典

概 要

当部では、生活関連化学物質の経気道、食品経由を除く経口及び経皮の三大暴露経路からの安全性評価をそれぞれの媒体特有の変化などによる生物学的にあるいは分析化学

的に評価する研究を実施している。平成10年度の研究業務は、その時々におけるそれぞれの分野における課題に対する研究の他、経口、経気道、経皮暴露の観点から共通の課題が提示された。内分泌攪乱物質の生活環境における存在量調査は他省庁と同様に厚生省でも緊急且つ迅速に結果を国民に示さなければならないような大きな業務となった。室内空気での関連では、室内空気中のフタル酸エステルなど15種類の内分泌攪乱性化学物質の存在量調査のための予備的研究が開始された。また、食品を除く経口暴露の代表である水道水中の存在量調査では、原水、浄水の25種類に及ぶ化学物質の存在量と共に水道管等の内面塗装剤からの溶出に関する調査も綿密に検討された。さらに、故意に皮膚に塗布する化粧品等での内分泌攪乱物質の使用状況の調査などが行われた。一方、内分泌攪乱性化学物質の一つである、ダイオキシン類の水道や水道原水中の存在量調査には、極微量なため独自の測定方法及び精度管理マニュアルの確立を行った。

室内空気に係わる課題では、揮発性有機化学物質の個人暴露調査を室内空気中化学物質安全対策事業（厚生省生活衛生局化学物質安全対策室）と当所暴露評価研究所との研究組織と内容とを合わせて実施した。さらに、防虫剤であるパラジクロロベンゼンの安全性評価の一環として、存在量調査と個人暴露の実態を全国的に実施し、貴重な資料を得た。

水道に係わる課題では、WHOによる飲料水ガイドラインの中間的な改正が行われたことと関連して、わが国でのそれら化学物質水質基準化の動向を見極めるための多くの施策に関連した調査研究（農薬類、金属類、マイクロシステン等）を実施した。この結果は、平成11年3月における水道水での監視項目等の新設や見直し等に反映された。

経皮に係わり化粧品関連分野では、長年にわたって取り組んできた包括協議や種別許可基準等の問題がほぼ解決したことなども踏まえて、基準や規制に係わる業務の比重を軽くし、化学物質による経皮に係わる皮膚アレルギーや皮膚機能に与える影響などの新しい研究に取り組んでいる。

また、暴露研究では、室内空気に係わる研究として室内化学物質の分析方法の開発やそれをを用いた全国の状況についての研究を地方衛生研究所と共同で研究を実施した。ヒ素の暴露に関しては、インドー日本の二国間共同研究が2年目に入り、具体的な共同研究機関として西ベンガル州jadavpur 大学と研究を開始した。1つには、Jadavpur 大学 postdoctoral を3ヶ月招聘したこと、大学 postdoctoral を STA フェローで2年間研究に従事させたこと及び試験的にインドヒ素汚染地域の血液、尿等の試料についてヒ素の形態分析を行った。

業務成績

1. 空気関係

前年度に引き続き、大気汚染の調査研究として東京都内3カ所(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. 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い、わが国の飲料水水質基準を見直すため、未規制農薬類、1,4-ジオキサン等の測定方法の策定と実態調査及びそれらの毒性データの収集を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。水道水及び水道原水に含まれる可能性がある内分泌攪乱性を疑われている化学物質の測定方法を設定した。また、水道用資材から溶出する可能性のある内分泌攪乱性を疑われている化学物質の測定方法を設定し、模擬溶出試験を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。水道水質検査の精度管理のあり方について検討し、全国的精度管理の実施に向けた組織や実施要領等の具体案を作成した(厚生省生活衛生局水道整備課)。水道水質危機管理システムの充実を図るため、研究開発を行った(厚生省生活衛生局水道整備課)。

3. 化粧品・医薬部外品関係

化粧品に添加されていることが禁止されている成分である塩酸プロカイン及び塩酸ジブカインの試験法を作成した(厚生省医薬安全局審査管理課)。

研究業績

1. 室内空気関連

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) 建築物の多様化に対応した新たな維持管理手法の構築に関する研究では、ビル管理法が制定されて以来30年近くになり、維持管理上、種々の問題点が出てきている。本研究においてはビル管理法の改正にむけて問題点の抽出、検討を行った。

(2) 建築物内における総揮発性有機化合物(TVOC)の調査研究では、TVOCのガイドライン設定の基礎資料の提出を目的として、居住環境内におけるTVOCの実態調査を実施した。更に、新築住宅内におけるTVOC濃度の平衡到達時間と換気回数との関連性を明らかにした。

2) 建築物内空気質の安全性に関する研究

(1) 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では、建材、内装剤等から放散し、かつ、刺激性及び神経毒性を有する有機リン酸エステル類について、居住環境内における汚染の実態を明らかにした。

(2) 室内空気中の化学物質が起因とされる疾患と化学物質の関連性に関する研究では、化学物質過敏症等の発症に関与が指摘されているVOCs、HCHO、有機リン化合物等の実態調査を新築住宅をターゲットに年間を通して実施し、

複数汚染物質の挙動を明らかにした(厚生科学研究費)。

3) 空気中の汚染物質の分析法に関する研究

(1) 室内空気中の揮発性有機化合物(VOCs)の定量法の検討では、sick building syndromeやsick house syndrome等の原因物質として注目されているVOCsについて、全自動加熱脱着GC/MS法の基礎的検討(室内空気用標準ガスの開発を含めた)を行った。

(2) 室内空気中の有機リン化合物の分析法の検討では、10種類の有機リン化合物(対象物質は前年度と同じ)について、分析法の高感度化を図る観点から、GC/FPDに大量試料導入装置を装着し、試料導入量の直線性等の基礎的検討を行い、実用性を明らかにした。

(3) 室内空気中の化学物質の測定法に関する研究では、固体捕集-溶媒抽出-GC/MS法、固体捕集-加熱脱着-GC/MS法を用いたVOCsの分析法の確立を目的として、全国の衛生研究所10機関等と協力して基礎的検討を行った(厚生科学研究費)。

2. 水道水質関連

1) 水質基準及び試験方法の設定に関する研究

(1) 水中標準分析法として、固相抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析計によるベンタゾン、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、トリクロピルの一斉分析法の条件を設定した。また、高速液体クロマトグラフィーポストカラム法によるカルボフランの測定条件を設定した(厚生省生活衛生局水道整備課)。

(2) 1,4-ジオキサンの固相抽出-ガスクロマトグラフィー質量分析計による測定条件を設定し、環境モニタリングのために解決すべき問題点について検討を加えた。

(3) 水道原水に含まれている可能性のある、アルキルフェノール類や内分泌を攪乱することを疑われている化学物質の測定条件を検討した。ビスフェノールA、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノール類の一斉分析を考慮に入れた測定方法を設定した。

(4) ミクロシスチンの高速液体クロマトグラフィー質量分析計による高感度選択的測定法を検討し、環境試料から調製した標品の分析を容易に行えるための検討を加えた。

(5) オクチルフェノールポリエトキシレート(POE)の生物分解物であるオクチルフェノールモノエトキシレート体、オクチルフェノキシ酢酸及びオクチルフェノールの塩素化体を標準品として合成した。これらの化合物のガスクロマトグラフィー質量分析計による分析法を確立した。

(6) 水中生物に関して、再現性が高く、精度のよい定量法を確立し、その定量法を行う上で適した測定計測板を考案した。

(7) これまで未規制であったベンタゾン、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、トリクロピル、カルボフラン等の農薬類の、ヒトの肝薬物代謝酵素系に及ぼす健康影響に関する文

献調査を行った。

2) 水道薬品または水道用品の安全性に関する研究

(1) 水道用品から水道水に溶出する恐れのあるアルキルフェノール類, フタル酸類アジピン酸類, スチレン 2 量体・3 量体などの内分泌系を攪乱する恐れのある物質の溶出の程度を検討した。

(2) 水道用ダクタイル鋳造管内面エポキシ樹脂粉体塗料の水道水への溶出程度を検討した。塩化ビニルモノマー, スチレンモノマー, エピクロロヒドリン等の溶出に関して検討した。

3) 水道水の安全性に関する研究

(1) 遺伝子工学技術を用いた環境汚染物質の健康影響評価方法・確立に関する研究: シトクロム P4504A1 遺伝子制御領域に対する結合活性を指標とした環境汚染物質評価法を確立し, 種々の化学物質に対する応答について調べた。

(2) 界面活性剤の水道水源及び利水過程における挙動と適正管理に関する研究: オクチルフェノールポリエトキシレートの生物分解物であるオクチルフェノールモノエトキシレート体, オクチルフェノキシ酢酸及びオクチルフェノールの塩素化体のステロイド代謝に及ぼす作用を中心に, 内分泌系に対する影響について検討した。その結果, CYP3A の誘導に伴って, 遺伝子障害性のある 4-ヒドロキシエストラジールの生成量が顕著に増加することを明らかにした。

(3) オクチルフェノールポリエトキシレートの生物分解物であるモノエトキシレート体やカルボン酸体及びオクチルフェノールの塩素化体のヒトエストロゲン α 受容体との結合親和性を蛍光偏光競合結合アッセイ法により検討した。

(4) 酵母の遺伝子組換え体である Two-Hybrid System を用いて, フェノール類のヒトエストロゲン α 受容体との結合親和性を測定し, 内分泌系への攪乱作用の強弱について考察を加えた。フェノール類の構造とヒトエストロゲン α 受容体との結合活性との間の関係を検討した。

(5) トリアジン系農薬類 3 種の代謝に関与するラット肝シトクロム P450 分子種を明らかにし, その代謝産物の同定・生成比及び雌雄の性別による相違を明らかにした。

(6) ラット肝初代培養細胞を用いて, 5 種類のクロロプロパノン類の細胞毒性を検討した。塩素原子の増加と共に毒性作用は軽減し, 置換する位置により細胞毒性の強弱が変化することを明らかにし, 構造活性相関による毒性発現機構を推定した。

(7) 藍藻毒であるミクロキスチン LR のオゾン処理生成物の肝細胞毒性作用について検討し, ミクロキスチン様の作用物質がオゾン処理によりほとんど消失することを明らかにした。この結果より, 藍藻毒の除去・分解にはオゾン処理が有効であることを明確にした。

3. 化粧品など経皮暴露関連

1) 化粧品の試験法に関する研究では, 衛生試験法の化粧品試験法にエストラジールおよびエチニルエストラジールの定量法が記載されており, その試験法にはクロロホルムが使用されている。昨年度に引き続きクリーンアナリシスの観点から, クロロホルムを用いない試験を検討した。

2) *In vitro* 試験法を用いた化粧品の安全性評価法及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究では, *in vitro* の安全性試験法について調査及び実験的研究を行うことにより, 化粧品などの安全性評価にどこまで *in vitro* の試験が利用できるか文献的及び実験的な検討を行う。試験項目としては, OECD ガイドライン化が検討されている眼刺激試験, 皮膚刺激性試験, 皮膚光毒性試験及び経皮吸収試験を対象とした。この内, 第二室では, 経皮吸収試験法を城西大学薬学部森本教授と共同して実施した。実験方法は, 縦型の Franz 型拡散セルを用い, 防腐剤の一種である安息香酸ナトリウム, サリチル酸が 32℃ でモルモットの腹部剥離皮膚を透過する際の透過速度, lag time 及び市販化粧水あるいは乳液に添加したときの透過速度, lag time の変化を検討した (厚生科学研究補助金)。

3) 医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究では, 化粧品および医薬部外品に含まれると想定されるエンドクリン障害物質の経皮吸収的な試験をモルモットの剥離皮膚を用いて実施すると共に化粧品および医薬部外品の可溶化剤として多用され, 皮膚角質層への影響が懸念される界面活性剤の存在下でのエンドクリン障害物質の経皮吸収に関する影響を, エポキシ樹脂イソステアリン酸エステルビスフェノール A エポキシ樹脂オレイン酸エステル等の出発原料として用いられるビスフェノール A について検討した。0.05 % ビスフェノール A の 5 % プロピレングリコール溶液 1 ml を donor 側に添加したとき, ビスフェノール A は約 10 時間の Lag time の後, receptor 側に出現し, 透過速度 3.7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$ であり, 24 時間後の累積透過量は 51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。donor 側の界面活性剤がビスフェノール A の経皮吸収に大きな影響を与えることが示唆された (厚生科学研究補助金)。

4) 皮膚ホメオスタシスに及ぼす環境要因とその評価法に関する研究では, 過酸化脂質の正常ヒト表皮ケラチノサイト及び CHO 細胞に対する細胞毒性への影響について検討し, 過酸化脂質が細胞膜脂質を過酸化し, サイトカイン放出量の変動を引き起こして細胞毒性を発現することを示唆した。更にブラジル産生薬抽出物及び漢方処方について細胞毒性防御効果を指標とする活性評価を行った。紫外線散乱剤として化粧品に多用されている酸化チタンのコーティングの有無による OH ラジカルの生成量の差違あるいは細胞毒性について検討した。

また, 皮膚角質層に対する界面活性剤の影響を *N*-lauroyl

amino acid を用いて検討し、透過指標物質のメチルパラベンおよびサリチル酸の皮膚透過速度を用いて評価した。

4. 暴露評価研究関連

1) 暴露評価基盤研究

暴露評価基盤研究の一環として、平成10年度は対象物質として VOCs を設定し、全化協に加盟する30機関と協力して、VOCs の個人暴露量(主婦、勤労者等)の実態を全国規模で明らかにした。

2) *in vitro* 評価系を用いた環境汚染物質のアレルゲン性評価に関する研究

昨年度に引き続き肥満細胞様培養細胞(RBL-2H3)を用いて脱顆粒誘導の指標である β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定することによって環境汚染物質のアレルゲン性を評価した。内分泌攪乱物質や発がん物質を含む150検体の化学物質について評価を行い、その中から antimony (III) chloride, Cadmium chloride, 2,6-Di-*t*-butyl-4-methyl-phenol, Sodium lauryl sulfate, Diphenylmethane, Diethylbenzene をはじめとする総25種類の化学物質から有意なアレルギー誘発性が認められた。これらの物質の殆どはこれまでアレルギー誘発性に関する報告例がなく、今回初めてアレルギーとしての可能性が示唆され、今後これらの物質に対する具体的な調査が必要とされた(環境庁未来環境創造型基礎研究推進制度)。

3) 有害ヒ素の健康影響評価と地下水低減化技術開発に関する研究

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、ヒ素中毒患者が多発し、汚染面積8,300km²、汚染地域人口三千万人、汚染水飲用人口百万人、発生患者数二十万人に及ぶ深刻な事態に至っている。事態解決のための科学的あるいは資金的な状況は極めて乏しく、我が国との共同研究が急務の課題である。そこで、インド国側の協力機関として、インド国西ベンガル州カルカッタ市の Jadapur 大学環境科学部 Chakuraborurti 教授との共同研究を実施し、ヒ素中毒患者からの尿、血液、爪、毛髪中のヒ素含有量の測定及びヒ素形態分析を行った(科技厅国際共同研究総合推進制度：二国間型)。

食 品 部

部 長 豊 田 正 武

概 要

平成10年度の食品衛生分野において特記すべき事は、内分泌攪乱化学物質いわゆる環境ホルモンについての関心が益々高まり、環境ホルモン学会が創設され、また同時に厚生省の平成10年度暫定予算として内分泌攪乱化学物質による健康影響に関する研究班が組織され検討が実施された

事である。当部も本研究班に分担研究班として参加し、内分泌攪乱作用の疑いのあるとされているフェノール化合物等について食品の汚染実態調査を行った。また食品化学課により本年度より実行されることとなった残留農薬の基準値の見直しに伴い、既告示分析法の見直しに関する業務が開始された。引き続き、食品保健課、乳肉衛生課と協力しダイオキシン類等の食品中汚染実態調査及びトータルダイエットスタディーによる1日摂取量を調査した。

通常業務として、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、また食物アレルギーの実験動物による評価系の確立に関する研究、さらに有用成分として、抗アレルギー成分、抗酸化成分等の検索及びその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、組換え食品の検知法に関するワークショップに出席のためベルギー・ブリュッセルに出張(平成10年6月2日~7日)した。またFAO/WHO合同食品規格計画第31回食品添加物・汚染物質部会及び専門委員会に出席のためオランダ・ハーグに出張(平成11年3月19日~27日)した。合田幸広室長はFAO/WHO/UNEP合同マイコトキシン国際会議に出席のためチュニジア・チュニスに出張(平成11年3月1日~8日)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

超臨界流体抽出を用いた穀類中の残留農薬の多成分分析法を開発し、有機溶媒抽出法と比較した(厚生省生活衛生局生活安全総合研究)。

ロ) 残留農薬基準値未設定農薬の残留分析に関する研究
キザロホップエチルの残留分析法を確立した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

ハ) 残留農薬告示分析法見直しに関する研究

ダミノジッド、臭素、含窒素系7農薬について、コラボラティブ・スタディーを行って分析法を評価した(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

農薬のGC/MS測定における試料マトリックスの影響について検討した。

ホ) 農作物における複数農薬の残留実態調査研究

国産農産物について複数農薬残留実態調査を実施した(厚生省生活衛生局食品化学課)。

2) 内分泌攪乱化学物質に関する研究

11種フェノール化合物の一斉分析法を開発し残留実態を調査した(厚生省生活衛生局生活安全総合研究)。

3) 有機スズ化合物の生化学的研究

有機スズ暴露によるマダイの有機スズ代謝への影響を検

討した（科学技術庁）。

4) 食品中に溶出するアルミニウムの摂取形態に関する研究

引き続きトータルダイエツト試料中のアルミニウムを分析し、1日摂取量を推定した。またアルミニウム分析法の精度管理を行った（厚生省生活衛生局生活安全総合研究）。

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

トリクラベンダゾール及びモキシデクチンの検査法を確立した（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

22種食品中のダイオキシン類等の実態調査を行い、またトータルダイエツト試料により1日摂取量を推定した（厚生省生活衛生局食品保健課及び乳肉衛生課）。

7) かび毒の汚染実態調査に関する研究

食道癌多発地域と食品のフモニシン汚染との関連性を検討した（厚生省癌研究）。またアフラトキシンの分析法の改良と広範な食品への応用性を検討した（厚生省生活衛生局生活安全総合研究）。

2. 汚染物モニタリングと情報

1) 全国から収集されたモニタリングデータは約235万件に達した。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（厚生省生活衛生局生活安全総合研究）。

2) 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（厚生省生活衛生局生活安全総合研究）。

3) 中毒試料中の原因物質の検索分析法

農薬、かび毒、シアン、ヒ素、メタノールの分析法マニュアルを作成した（厚生省生活衛生局厚生科学特別研究）。

3. 新開発食品の評価

1) バイオテクノロジー応用食品の評価に関する研究

組換え大豆中除草剤耐性遺伝子の検知法を開発した。また遺伝子組換え後代交配大豆と非組換え大豆との主二次代謝物を比較した（厚生省生活衛生局生活安全総合研究）。

2) 新開発食品の食品化学的特性の評価に関する研究

食品蛋白質のマウスを用いた簡易抗原性評価手法の開発を行った。また人参、赤キャベツ、リングゴ未熟果における抗アレルギー活性及び抗アレルギー成分を検索した。更にカテキンの抗酸化機構について検討した（HS財団受託研究）。

4. 照射食品の判定と健全性に関する研究

照射冷凍肉の検知に関し、オルトチロシン法とESR法の比較検討を行った（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、玩具等に関する試験、研究業務であるが、他に、第7版食品添加物公定書の作成や、既存添加物名簿収載品目リストに対して、平成10年度に追加・訂正の申出があった事項につき、その妥当性を確認するための調査を行った。また、ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究として、「食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究」を行っている。

人事面では、佐々木史歩技官が平成10年6月30日付で退職し、秋山卓美技官が平成10年7月1日付けで採用となり、第二室に配属された。

Kavita Shah氏をSTAフェローとして平成10年6月8日から受け入れた。

長岡 恵氏を科学技術特別研究員として平成11年1月1日から受け入れた。

劉宏民（Liu Hong-Min）教授をヒューマンサイエンス振興財団流動研究員として平成11年1月16日から受け入れた。

河村葉子室長は第51回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会に出席のため、ジュネーブに出張した（平成10年6月7日～6月20日）。

山田隆部長は、国際食品規格委員会第22回分析・サンプリング部会出席のためブダペストに（平成10年11月21日～11月29日）、国際食品規格委員会第31回食品添加物汚染物質部会に出席のため、ハーグに出張した（平成11年3月18日～3月28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、食品中からの食品添加物分析法の検討を行った。「食品中の食品添加物分析法（厚生省食品化学課）」を大幅に改訂する予定であるため、その準備として、改訂すべき試験法を集め、詳細な検討を行った（食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課）。

(2) 第7版食品添加物公定書作成のため、改正すべき品目の各条、及び新規に収載する既存添加物の規格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）。

(3) 新規食品添加物として申請されたスクラロースとアセスルファミカリウムについて規格及び試験法の検討を行った（食品添加物規格基準設定費、生活衛生局食品化学課）。

(4) 輸入チューインガム中の未知色素について試験を行い黄色5号の副色素であることを確認し、その含量が規格値を超えることを認めた(生活衛生局検疫所業務管理室検疫所依頼検査)。

(5) 燻煙処理を行った鮮魚に関して、燻煙の分析、燻煙にしたマス中の一酸化炭素の定量、燻煙処理したマグロ切り身の赤色度の変化等について検査を行った(食品添加物規格基準設定費, 生活衛生局食品化学課)。

(6) 天然保存料のカワラヨモギ抽出物, 酵素分解ハトムギ抽出物, ツヤプリシン(抽出物), ホオノキ抽出物, レンギョウ抽出物につき抗菌活性を調べ, また, 前3者の主成分の化学構造を検討した(食品添加物規格基準設定費, 生活衛生局食品化学課)。

(7) 医薬品添加剤規格の国際調和作業に協力した(日本薬局方調査会医薬品添加剤委員会, 医薬安全局審査管理課)。

(8) 天然添加物のアレルゲン性につき, ラットガン化好塩基球細胞を用いて, *in vitro* 試験を行った。

(9) 二重収束型高分解能 ICP-MS による, 生体中微量元素の分析法につき検討した。

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パラオキシ安息香酸メチルの分析法について検討した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(2) 第7版食品添加物公定書の中で, 人体や環境に有害な試薬を使用している項目を拾い出し, 今後の改訂の資とした(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(3) 食品添加物として申請のあったスクラロースの含量試験法として銀電極を用い, 硝酸銀溶液で滴定する方法について検討した(食品添加物規格基準設定費, 生活衛生局食品化学課)。

(4) 食品中のアルギン酸の分析法を開発した。ペクチン質との分別が可能となり, マメ製品にも適用できた(食品添加物規格基準設定費, 生活衛生局食品化学課)。

(5) 輸入食品中の未知着色料の定性を迅速化するため, 指定外着色料 28 品目について HPLC を行い, 指定食用色素 12 品目との相対保持時間を求めた(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(6) ガムベースの1種である酢酸ビニル樹脂中の酢酸ビニルモノマーの分析法を開発し, ガムベースに応用した(食品添加物規格基準設定費, 生活衛生局食品化学課)。

(7) 酵素を用いて製造されるクチナシ青色素につき, 分子量, メタノール含量, 遊離アミノ酸量, 及び確認試験法について検討した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(8) 黒色を呈する天然着色料の炭末色素及びイカスミ色素につき, 確認試験法, 純度試験法, 色価測定法について

検討した。

(9) シントウ中のカプサイシノイドを, 超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフィーを用いて分析する方法を検討した。

2. 食品添加物等の安全性に関する研究

(1) 平成6年度に全国で行われた食品添加物の行政試験の結果を基に, 食品中の16種34品目の濃度を求め, それを基に摂取量の推定を行った(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(2) 平成8年度に全国で行われた食品添加物の行政試験の結果を基に, 食品中の保存料の濃度を求め, それを基に摂取量の推定を行った(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(3) 中毒試料中の原因物質(重金属)の検索分析法につき検討した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品保健課)。

(4) タバコの煙中の化学成分につき, GC/MSによる分析方法を検討した(厚生科学研究費, 健康政策局)。

(5) トリプトファン製品による好酸球増多筋肉痛症に関する文献調査研究を実施した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品保健課)。

3. 食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究

(1) 色素産生植物培養細胞の培地中に重金属を過剰添加した時の色素産生量の増加, 及び重金属により誘導されるペプチドの誘導機構について検討した(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

(2) 天然物に糖を結合させた天然添加物である酵素処理ルチン(抽出物), 酵素処理イソクエルシトリン, 酵素処理カンゾウにつき, 構成成分の分析及び構造決定を行った(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

4. 器具・容器包装等の安全性に関する研究

(1) ポリスチレン製品及び即席食品中のスチレンダイマー及びトリマーの分析法を開発した(科学技術振興調整費, 科学技術庁)。

(2) 即席食品容器を含むポリスチレン製品の材質中のスチレンダイマー及びトリマー残存量を調査するとともに, 即席食品への移行量を分析し, 移行に関わる因子を検討した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(3) 缶飲料中のビスフェノールAの分析法を開発して, 市販飲料中のビスフェノールA移行量を分析するとともに, 缶コーティング材や内容飲料の影響を考察した(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)。

(4) シリコンゴム製器具類中の残存化学物質の検索を行い, 酸化防止剤, 可塑剤, 及び原料または添加剤由来の環状ポリジメチルシロキサン類を検出した。さらにそれらの溶出傾向も検討した(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

(5) 各種酸化防止剤を添加したポリエチレン、ポリプロピレン及びポリスチレンのモデル試料を用い、 γ 線照射によるポリマーの変化に対する酸化防止剤の影響及び酸化防止剤の消長について検討した(国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

(6) ポリ塩化ビニル製のおもちゃについて、幼児が口に含まれた場合のフタル酸エステル類の溶出に近い溶出量を見いだすための条件を検討し、暴露量算出の基礎的検討を行った(厚生科学研究費, 生活衛生局食品化学課)。

有機化学部

部長 宮田 直樹

概要

平成10年度の研究業務として、1) 有用生理活性物質の合成および化学反応性に関する研究、2) 有害物質の構造決定および毒性評価に関する有機化学的研究、3) 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究、などを行った。研究プロジェクトとしては、前年度から引き続き、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)」、環境庁の環境汚染物質の影響評価に関する総合研究「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」、医薬品機構の保健医療分野における基礎研究推進事業「コンピュータ分子設計法の高度化とその有効性の実験的検証」の分担研究課題「コンピュータ分子設計による核内レセプターリガンド候補化合物の合成と構造解析」、国立医薬品食品衛生研究所特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明」を実施した。

学会出席のための短期外国出張としては、宮田が、平成10年5月4日より10日まで米国に出張し、サンジエゴで開かれた193rd Meeting of the Electrochemical Society(第193回電気化学会)に出席し、 C_{60} によるグルタチオンS-トランスフェラーゼ活性阻害機構について研究成果を発表した。また、栗原正明第1室長が、平成10年6月27日より7月4日までイリアに出張し、ベニスで開かれた12th International Conference on Organic Synthesis(第12回国際有機合成化学会)に出席し、ジオキシランを用いた立体選択的エポキシ化反応について研究成果を発表した。また、宮田と山越葉子技官が、平成10年8月31日より9月14日までブラジルに出張し、カラグアツバおよびサンパウロで開かれた9th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research(第9回国際フリーラジカル会議)およびそのサテライト会議(Singlet Molecular Oxygen: Chemical, Biological and Medical Aspects)に出席し、光励起フラレーンによる生物活性発現機構について研究成果を

発表した。また、末吉第2室長と丹野雅幸主任研究官が、平成10年11月12日より16日まで台湾に出張し、新竹で開かれた1998 International Symposium on Organic Reactions(1998年有機反応国際シンポジウム)に出席し、末吉はNOドナー:N-ニトロソ化合物におけるN-NO結合のラジカル解裂について、また、丹野は無溶媒条件下N-ニトロソウレア類の熱分解について研究成果を発表した。また、宮田が、平成10年11月18日より25日まで米国に出張し、ワシントンD.C.で開かれた5th Annual Meeting of the Oxygen Society(第5回酸素学会)に出席し、レスベラトロールによるDNA切断反応について研究成果を発表し、さらにメリーランド州ベセスダのNIH(米国国立衛生研究所)にて、フラレーンの生物作用について講演を行った。また、宮田と福原潔主任研究官が、平成11年3月2日より8日まで米国に出張し、サンタバーバラで開かれたAnnual Meeting of the Oxygen Club of California: '99 Word Congress(カリフォルニア酸素学会年会:1999年世界会議)に出席し、レスベラトロールおよびその類縁物質のDNA切断機構について研究成果を発表した。また、末吉、丹野、栗原が、平成11年3月20日より26日まで米国に出張し、アナハイムで開かれた217th American Chemical Society National Meeting(第217回米国化学会年会)に出席し、末吉はN-ニトロソ化合物の室温における一酸化窒素発現能について、丹野は芳香族N-ニトロソウレア類の熱分解メカニズムについて、また、栗原はプロテアーゼ阻害剤の合成鍵中間体アミノエポキシドの合成について、それぞれ研究成果を発表した。

なお、山越は、上記の9th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research(第9回国際フリーラジカル会議)において、最近の研究成果「Generation of Oxy Radicals by Photoexcited Fullerene (C_{60} and C_{70}) in an Aqueous Solution - an EPR Study-」により、Young Investigator Award(若手研究奨励賞)を受賞した。

長期外国出張としては、山越が、平成11年3月31日より科学技術振興事業団長期在外若手研究員として2年間の予定でスイスに出張し、スイス連邦工科大学F. Diederich教授のもとで「人工超分子による選択的分子認識と機能発現に関する化学的研究」を開始した。

国際会議のための外国出張としては、宮田が、平成10年4月21日より26日までスイスに出張し、ジュネーブのWHOで開かれた28th Consultation on Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances(第28回医薬品国際一般名(INN)策定委員会)に出席した。

平成10年10月26日より、Abu Shara Shamsaru Roufが、医薬品機構の派遣研究員として「コンピュータ分子設計による核内レセプターリガンド候補化合物の合成と構造解析」の研究に加わった。

厚生省試験研究機関共同利用大型機器(傾斜磁場型600

MHz 核磁気共鳴装置)及び所内共同利用機器(400 MHz 及び 300 MHz 核磁気共鳴装置)の管理は、栗原、福原が行った。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。前年度から引き続き、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。

有機化学部主催の講演会として、平成11年1月28日に「制がん物質の細胞標的化へのアプローチ(生命工学工業技術研究所生体物質部部長奥野洋明博士)」を開催した。また、宮田が世話人となり、平成10年12月11日にSFRR Japan (Society of Free Radical Research - Japan)の後援のもと、第13回生体フリーラジカル研究会を当所講堂にて開催した(参加者約110名)。

宮田、末吉は、厚生省日本薬局方調査会委員として、日本薬局方の規格の作成、並びに、収載品の化学名や構造式の決定と改正に従事した。また、宮田は、厚生省中央薬事審議会医薬品名称調査会委員として医薬品の一般名(JAN)の決定に、また、世界保健機関/国際医薬品一般名命名委員会(WHO/INN)委員として国際一般名(INN)の選定作業に従事した。また、末吉は、日本化粧品工業連合会全成分表示名称専門委員会命名部会のアドバイザーとして、化粧品全成分表示名称リストの作成に協力した。

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) 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として、HIVプロテアーゼ阻害剤合成のための重要な鍵中間体アミノエポキシドの合成を達成した(科技厅科学技術振興調整費)。

2) DNA二重鎖巻き戻し機能を持つDNA切断化合物の合成：新規に合成した1,6-ジヒドロキシフェナジンN-オキシド誘導体が好氣的条件下及び嫌氣的条件下でDNA鎖を切断することを明らかにした(文部省科学研究費補助金)。

3) 骨分化促進作用を有するC₆₀誘導体の合成：C₆₀にピロリジン環を結合させたフレロピロリジン類を合成し、これらが軟骨組織に親和性化合物の合成のための有用な中間体になることを示した(文部省科学研究費補助金)。

4) フラーレンを基本骨格としたがん光線力学療法薬の開発研究：フルーレンが光還元剤/酸素系で効率良く還元型活性酸素種を生成しDNAを切断することから、がん光線力学療法薬のファルマコフォアとして有用であることを明らかにした(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業費)。

5) 生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明：化学計算を用いたサイトカラシン類のコンフォメーション解析を行い、最安定三次元構造を明らかにした(国立衛研特別研究費)。

6) 抗酸化剤の抗酸化メカニズムの解明に関する研究：分子軌道計算によりカテキン類の特定の水素の引き抜きが抗酸化作用の発現に重要であることを明らかにした(一般研究費)。

7) パーオキシナイトライトを発生する化合物の合成と機能解析：パーオキシナイトライトを遊離する化合物として、一酸化窒素とスーパーオキシドを発生するSIN-1類似化合物を合成した(一般研究費)。

8) 代謝活性型NOドナーの開発：代謝酵素の作用によりNOを遊離する化合物として、脂肪族および芳香族アミジン類を合成した(文部省科学研究費補助金)。

9) 薬効成分を有する天然物の安全性に関する研究：分子軌道法計算を行い、Aristolochic acid類とAristolactam類の性質を比較し、後者の方が還元されにくいことを明らかにした(厚生科学研究費補助金)。

10) 非ペプチド型HIVプロテアーゼ阻害剤の分子設計と合成：HIVプロテアーゼ阻害活性を有するサイトカラシン類から発想した非ペプチド型阻害剤の分子設計を行い、候補化合物として二環性ラクタム化合物を得た(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：新規水溶性NO遊離化合物を合成し、それらがプラスミドDNAを切断することを明らかにした(環境庁国立機関公害防止等試験研究費)。

2) ポリヒドロキシ芳香族炭化水素の生体に及ぼす影響に関する研究：レスベラトロール誘導体を合成し、フェノール性水酸基の数と位置がDNA切断活性に影響を与えることを明らかにした(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) DNA認識ペプチド誘導体による遺伝子発現の制御に関する研究：新規に合成したフェナジン骨格を有するアミノ酸誘導体がDNAと強い親和性を有すること、および、還元剤存在下DNAを切断することを明らかにした(一般研究費)。

2) コンピュータ分子設計法の高度化とその有効性の実験的検証：「コンピュータ分子設計による核内レセプターリガンド候補化合物の合成と構造解析」を分担し、レチノイド活性を有する化合物を合成する目的でウレア誘導体の合成法を確立した(医薬品機構基礎研究推進費)。

3) 光励起されたC₆₀、C₇₀の生体分子との反応に関する研究：光励起されたC₆₀、C₇₀が生理的条件下、スーパーオ

キシドおよびヒドロキシルラジカルを発生することを明らかにした（一般研究費）。

4) DPV 法を利用した簡便なりガンドレセプター相互作用解析手法の開発：CV法を用いて、化学物質とDNAとの相互作用を調べ、相互作用に伴い酸化還元波がDNAの濃度依存的に減少することを明らかにした（文部省科学研究費補助金）。

以上の研究は、駒沢由香学士（東京薬科大学生命科学部分子生命科学科分子生化学研究室：高橋健治教授）、小田原毅実習生（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）、山科敦子実習生（共立薬科大学有機薬化学教室：望月正隆教授）、金子由美実習生（昭和女子大学生活科学部：谷村顕雄教授）、岡田英治実習生（東京薬科大学生命科学部分子生命科学科分子生化学研究室：高橋健治教授）、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、The 193rd Electrochemical Society Meeting (San Diego), 第20回磁気共鳴医学会-第2回SFRR Japan 合同学会（横須賀）、12th International Conference on Organic Synthesis (Venice), 第15回フラーレン総合シンポジウム（岡崎）、Singlet Molecular Oxygen: Chemical, Biological and Medical Aspects (Caragatatuba), IX Biennial Meeting of International Society for Free Radical Research: Free Radical Research for the 21th Century (Sao Paulo), 第71回日本生化学会大会（名古屋）、1998 International Symposium on Organic Reactions (Hsinchu), 反応と合成の進歩シンポジウム（千葉）、5th Annual Meeting of The Oxygen Society: Oxygen '98 (Washington D.C.), 生体フリーラジカル研究会（東京）、第16回フラーレン総合シンポジウム（岡崎）、Oxygen Club of California: 1999 World Congress (Santa Barbara), The 217th ACS National meeting (Anaheim), 日本薬学会第119年会（徳島）、などで発表するとともに、Chem. Pharm. Bull., Bioorg. and Med. Chem. Let., J. Am. Chem. Soc., Tet. Let., Fullerenes: Recent Adv. in the Chem. and Phys. of Fullerenes and Related Materials, Arch. Biochem. Biophys., Biol. Pharm. Bull., Biomed. Chromatogr., Bull. Natl. Inst. Health Sci., などの学術誌、及び、厚生科学研究報告書、医薬品機構研究成果報告書、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究報告書、環境庁総合研究プロジェクト別環境保全研究成果集、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、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10年度の研究業務として、免疫系細胞の機能に関する研究、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分析法の開発等を継続して行ったが、主たる研究業務は、薬物アレルギー、食物アレルギー、プリオン蛋白に関わる研究に移行している。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、引き続き池淵第二室長が、医薬安全局安全対策課の併任官として、医療放射線の規制緩和及び医療法施行規則等の改正に関する業務を担当した。また、齋藤嘉朗技官が、平成10年7月15日より、カナダのトロント大学のWilliams博士のもとで抗原提示蛋白とその機能制御蛋白に関する研究に従事するため留学した。

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。また、有機リン系農薬をモデル系として用い、アレルギー亢進指標をいくつか検討した（厚生科学研究費）。

(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並びに神経系細胞との相互作用に関する研究を行った（文部省科学研究費）。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ケモカイン等の種々の因子の測定法の検討を行った（特別研究費）。さらに、好塩基球細胞に存在するエクトキナーゼの探索並びに情報伝達における役割の解明も行った（文部省科学研究費）。次いで、化学物質及び食品のアレルゲン性並びにアレルギー促進活性を調べるための動物モデルの開発及び、血清を用いる *in vitro* での抗原性の確認法に関する研究に着手した（厚生科学研究費）。

2. 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) ヒト成長ホルモン結合蛋白に対するモノクローナル抗体の性質を検討した。

(ii) 昨年度樹立したOBCAM（オピオイド結合性細胞接着分子）発現細胞株について、DNA, RNA, 蛋白質レベルで性質を検討した。

3. モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究

(i) モノクローナル抗体の抗原特異性の改変の遺伝子工学的手法について検討した。

4. イムノアッセイ等を用いる微量検出法の開発

(i) 内因性蛋白結合物質(フラン脂肪酸)に対する高感度イムノアッセイ法の開発をし、その血中濃度測定への応用を検討した。

(ii) 前年度に引き続いて、真菌アレルギーの抗原検出法の開発を目的として、*A.Fumigatus* 抗原による血清学的検討を行った。

(iii) エストロジェ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、ヒト乳癌細胞に対する標識化合物の結合能と、細胞増殖能の関係を検討した(国立機関原子力試験研究費)。

(iv) 食品や医薬品原材料への異常プリオン蛋白の汚染を想定した高感度イムノアッセイ法の開発を目的として、ウサギ、ニワトリ、マウスを用いて高反応性の抗プリオン蛋白抗体(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)を複製し、その特性を解析した(厚生科学研究費)。

代謝生化学部

部長 藤森 観之助

概要

平成10年度の研究として、生体における情報の受容・機能あるいは代謝変化に関する研究及び化学物質により誘発される代謝異常あるいは機能異常に関する研究など生体保護・機能保持に重点を置いた研究を行った。国際行政協力としては、WHO/FAO 残留農薬合同会議のための担当農薬の毒性評価ドラフト作成があった。人事に関しては、平成10年7月1日付けで藤森 観之助部長が第2室長併任を解かれ、最上知子主任研究官が第2室長に昇任した。またシンシナティ大学医学部薬理学教室ポスドク(東京大学薬学系大学院修了)として研究を行っていた佐藤陽治博士を10月1日付けで新規採用した。

業務関連の海外出張として、藤森部長はWHO/FAO 残留農薬合同会議(平成10年9月21日~10月1日、イタリア)およびICH-S7 安全性薬理試験ガイドライン EWG 会議(平成11年3月8日~11日、ベルギー)で討議・作業を行った。研究関連の海外出張として、最上知子室長が第38回アメリカ細胞生物学会年会(平成10年12月12日~15日)に出席するため科学技術振興調整費により米国へ出張した。佐藤陽治技官は第71回アメリカ心臓学会科学部門会議(平成10年11月8日~11日、米国)において心筋機能におけるホスホランバンの役割およびカルセクエストリンの役割について発表した。

研究業績

1. 生体における情報の受容・代謝変化に関する研究

(i) 白血球の活性制御に関する研究を行うためにコフィ

リン結合蛋白検索用ファージディスプレイ実験系を確立した(受委託研究)。

(2) 好中球のコフィリンの役割に関する研究を行うためにコフィリンアンチセンスによる発現制御系を確立オリゴヌクレオチドの細胞内導入効果を検討し、有効性を確認している(文部省科学研究費補助金)。

(3) NOの食細胞機能に対する効果に関する研究を行い、サイクリック GMP が関与していると思われる NO による白血球の遊走を検討した結果、コフィリンの変形細胞膜領域への移行・集積を明らかにした。さらに *in vitro* 系で食細胞の機能的成熟(分化)に対する NO の影響を検討し、気相/液相平衡から大気中 NO 濃度を推定する系を確立した(環境庁国立機関公害防止等試験研究費)。

2. 化学物質等により誘発される代謝異常に関する研究

(1) 代謝性因子を標的とした高脂血症の予防・治療薬の開発に関する研究を行い、フッ素置換脂肪酸誘導体の新規分泌制御作用を明らかにした(受委託研究)。

(2) アポリポ蛋白分泌制御における糖鎖の機能に関する研究を行い、アポ B の N 型糖鎖の VLDL 分泌における重要性を明らかにした(文部省科学研究費補助金)。

3. 心筋の機能制御と病態・創薬に関する研究

(1) 心筋小胞体カルシウム制御蛋白を標的とした研究を行い、ホスホランバンの5量体形成が心筋制御に必要であることを明らかにした。

4. 医薬品・化学物質等の安全性評価のための技術開発に関する研究

(1) 一般薬理試験ガイドラインの改訂案として検討・作成した安全性薬理試験ガイドライン案を基に医薬品等国際ハーモナイゼーション会議(ICH)での正式議題化を実現した(厚生科学研究補助金)。

(2) OECD 試験法の精度管理に関する研究として12試験研究機関による28日間神経毒性試験を協同で行い、試験における精度、評価等の問題点を神経行動毒性研究会で検討し、生活化学安全対策室に報告書を提出した(厚生省移替予算)。

衛生微生物部

部長 棚元 憲一
前部長(副所長) 三瀬 勝利

概要

医薬品、食品等における微生物学的試験及び研究を進展させた。

人事に関しては当部の部長を13年に渡って務められ、多大な功績を残された三瀬勝利部長が平成11年3月31日をもって定年退官され、引き続き平成11年4月1日付けで当

研究所の副所長に就任された。新部長には平成 11 年 4 月 1 日付けで棚元憲一第一室長が昇任した。同じく平成 11 年 4 月 1 日付けで大阪大学微生物病研究所博士課程修了の大西貴弘氏を研究員として迎えた。また平成 11 年 1 月 1 日より、科学技術特別研究員として安住聡子博士を迎えた。

海外出張は以下の通りであった。松谷佐知子主任研究官は平成 10 年 9 月 1 日から平成 11 年 2 月 28 日まで英国オックスフォード大学生化学部でヒト人工染色体の構築に関する研究を行った。高鳥浩介室長は平成 10 年 7 月 16 日より 7 月 20 日まで、中国広東州珠海市での第 4 回中国国際真菌学会議に出席し研究発表を行った。棚元憲一室長は平成 10 年 9 月 10 日より 9 月 17 日米国に出張し、ニューメキシコ州サンタフェで開催された国際エンドトキシン学会で研究成果を発表をした。三瀬勝利部長、及び高鳥浩介室長は平成 10 年 10 月 31 日より 11 月 6 日まで、アメリカハワイ州での第 33 回有毒微生物専門部会日米合同部会に出席し、研究発表を行った。菊池裕主任研究官は平成 11 年 3 月 8 日より 3 月 17 日まで米国に出張し、ニューメキシコ州タオスでのキーストンシンポジウムで研究成果を発表した。

業務成績

1. 特別審査

合計 7 件について特別審査を行った。

2. 規格・基準など

日本薬局方・微生物試験法の国際調和に関する研究（医薬安全局審査管理課）、エイズ医薬品候補スクリーニング研究（医薬安全局、HS 財団）、新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究（医薬安全局）、殻付き卵のサルモネラ汚染の制御に関する研究、と畜場および食肉の HACCP に関する研究（生活衛生局乳肉衛生課）、調理施設と食品製造業における衛生管理に関する研究、農産物の微生物汚染実態に関する研究、調理施設におけるドライシステムによる微生物制御の有用性評価に関する研究（生活衛生局食品保健課）、JIS-Z-2911「かび抵抗性試験法」の改定作業（日本規格協会・通産省工技院標準部）、生活環境中の汚染物質の存在状況に関する研究報告（公害健康被害補償予防協会）等が行われた。

3. その他

中央薬事審議会の各調査会（医薬安全局審査管理課）、食品衛生調査会（生活衛生局食品保健課、乳肉衛生課）、HACCP 主任技術者講習（生活衛生局食品保健課、乳肉衛生課）、食品保健特殊技術講習（生活衛生局食品保健課）、毒素等国際規制対策推進研究調査委員会（通産省基礎産業局生物化学産業課）、生物化学的プロセスの標準化に関する調査研究委員会（日本規格協会・通産省工技院標準部）などに協力した。

研究業績

1. 内毒素に関する研究

グラム陰性菌でありながら全菌ではリムルス活性を示さない *Flavobacterium meningosepticum* のリピド A を単離し、その構造決定を行った。その結果、このリピド A は同一菌種中に 2 種のリピド A 骨格をもち、脂肪酸として (R)-3-OH iC17:0, (R)-3-OH iC15:0, (R)-3-O- (iC15:0) -iC17:0 及び (R)-3-OH C16:0 を持つ特徴的な構造体であることを明らかにした。

LPS 不応答性 C3H/HeJ マウスはガラクトサミンの前感作により *P. gingivalis* 由来の LPS で強い致死作用を示すこと、さらに同 LPS を C3H/HeJ マウスに前投与した場合、LPS に特徴的なトレランスが誘導されることを見出した。一方、LPS 応答性マウスに対して同様の致死作用、及びトレランスの誘導を引き起こすサルモネラ LPS、及び緑膿菌の蛋白-LPS 複合体は、いずれも C3H/HeJ マウスには活性を示さなかったことから、*P. gingivalis* の LPS が C3H/HeJ の活性化に中心的な役割を果たしていることを示した。

2. O157 に関する研究

PCR 法による食肉からの腸管出血性大腸菌 O157 ペロ毒素産生遺伝子の検出について検討し、O157 が菌数にして約 5×10^7 cfu (colony forming unit) /mL 存在していた生肉でも、検討した PCR 法では検出できなかった。DNA 精製で血液成分除去する必要がある。

かいわれ大根の芽および牛挽肉から O157 を検出・分離するための試験法を検討し、ノボビオシンを加えた変法 EC 培地 (mEC+n) 42°C・18 時間培養後に免疫磁気ビーズを用いて集菌し、選択分離培地には CT-SMAC および酵素基質を添加した BCM O157 および CHROMagar O157 が優れていることを見出した。

3. 植物分類への PCR の応用に関する研究

クワ科植物において Takhtajan の分類で 2 つに分類されている Moraceae と Cannabaceae が PCR によって区別され得るのかどうかを検討し、Moraceae と Cannabaceae は二つに分類されること、さらに生薬粉末の鑑別法に PCR 法を導入することによって鑑定が可能であることを示した。

4. イニシエーターに関する研究

[60]フラレーン (C₆₀) の光活性化による細胞生物学的影響を調べた結果、C₆₀ は、可視光照射により活性化され、C₆₀ の濃度、照射時間に依存した細胞毒性を示すこと、及びその条件下では、細胞トランスフォーメーションのイニシエーション活性を示すことを明らかにした。

5. 真菌に関する研究

市販消毒剤の真菌に対する殺菌効果について検討し、EtOH (70% v/v)、活性塩素 55 μg/ml の酸化水、200 μg/ml 次亜塩素酸 Na は殺菌性は強いが、いずれも有機物存在下では不活化されることを明らかにした。

白線病と密接な関連があると疑われている蹄真菌症 (Onychomycosis) の、病理学的、真菌学的解明を試みた。

また、ズーノーシスの関係から体表感染微生物について解析し、細菌では *Staphylococcus hyicus*, *S. aureus* が、一方真菌では *Trichophyton equinum*, *Microsporium equinum* が分離され、皮膚炎との関わり、人畜での伝播等を明らかにした。

化学物質情報部

部長 神 沼 二 眞

概 要

全所的な研究情報計算基盤として、インターネットを基盤とするネットワークを拡充するとともに、医薬品や化学物質の安全性等に関する情報提供機能をさらに充実した。横浜で開催された化学物質安全性に関する政府間会合で GINC のデモを行った。また、ケミカルハザードを想定した健康危機管理対応事業をスタートした。

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 (IMnet) 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継続した。このネットワークへの接続マシンは平成 8 年の 200 台、平成 9 年 400 台から 600 台を越えた。

2. 電子メールの利用と WWW による情報提供

主として電子メールと WWW を利用し、ケミカルハザードに対応した専門家のネットワークを試験的に立ち上げた。またこれまで提供してきた化学物質の安全性情報や、ICH、審査管理課通知等を含む医薬品情報および環境中の健康影響汚染物質などに関する情報、さらに食中毒一般の発症地図、漂着レジンベレット分布図などに関しては、コンテンツを一層充実した。

3. 化学物質の安全性に関する国際協力

(1) 国際簡潔評価文書 (CICAD) の作成

6月末に第3回 CICAD 原案最終検討会議の東京での開催を支援した。また第4回 CICAD 原案最終検討会議 (ワシントン DC, 12月) に関沢室長が出席した。これらを通じて、日本が担当した物質を含む 10 物質の CICAD 原案について討議した。

(2) 国際化学物質安全性カード (ICSC) の作成

所外国内委員の協力を得て、日本分担分 20 物質の ICSC の原案を作成した。1999 年 3 月 (ブリュッセル) の原案検討会議に山本主任研究官が出席した。また、IPCS で新たに更新された約 340 物質の ICSC について日本語翻訳作業を進めている。1998 年 9 月には米国シンシナチで ICSC の各国語への翻訳検討会議が開かれ、山本主任研究官が出席した。

(3) GINC (Global Information Network on Chemicals) プロジェクトの推進

GINC のホームページの作成を続けた。また、11 月 26 日-28 日、東京で第 4 回東京 GINC 会議 (化学物質の安全性に関する情報交換ネットワークの構築と促進) (海外 17 名、国内 16 名) を開催した。

(4) その他の事業

10 月にベルリンで開催された IPCS のアドバイザー会議に神沼が出席した。また、GINC アジア計画、および地球環境研究総合推進費による研究の一環として北京、天津、青島、ソウルを訪問し、化学物質の安全性の東アジアネットワークの構築を進めた。

7 月に、第 3 回 CICAD 会議のサテライトとして、第 7 回ケミカルセーフティフォーラム「健康・環境リスク評価の考え方とそのダイオキシン、内分泌攪乱物質への適用」を海外からの演者 3 名と国内の 3 名のパネリストを迎え、所内で開催した。

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、内分泌攪乱物質のリストアップとデータベース開発を開始した。

2. 新しい分子計算法の開発

外部の専門家の協力を得て、化合物と生体系の相互作用を分子レベルでリアリスティックにモデリングするための ab initio ペア近似計算法のプログラムを開発している。

3. 生体分子の構造と機能に関する研究

多細胞生物の生体反応で重要な役割を果たしている受容体のデータベースと細胞内信号伝達に関与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信号伝達経路の探索機能を追加した。

4. その他の研究

海岸に漂着したレジンベレットの分類、分析を続け、汚染物質の表面に吸収することを見いだした。

厚生科学研究費により「内分泌攪乱物質等、生活環境中の化学物質による健康リスク評価における不確実性の解析に関する研究」として、ダイオキシン、有機錫、植物ホルモン物質、農薬の健康リスク評価における不確実性に関する研究と調査を行った。厚生科学研究費により毒劇物中毒事件に関する研究として、過去の毒劇物事件等に関する調査と分析を行った。また、化審法、毒劇法、水道法等を収載した化学物質に関する規制・法律の WWW ページに情報の追加と更新を行った。

5. 図書・情報サービス

(1) 雑誌類の管理と相互貸借

雑誌 36 タイトルを中止、20 タイトルを新規に購入し、単行本 356 冊を購入した。この結果、購入中の雑誌は 317

タイトル、管理している単行本は 11,067 冊となった。文献の相互貸借事業に関しては、外部から 1,200 件の依頼を受け、外部へ 2,034 件を依頼した。

(2) 図書情報検索サービス

所内にある図書・資料類をインターネットにより検索できるシステムの整備を行った。また、インターネットによる MEDLINE などの文献検索案内機能を充実した。

(3) 貴重本のデジタル化

貴重本の劣化を防ぐため、Geerts 氏が執筆した日本薬局方論文草案のデジタル化 (PDF ファイル) を行った。

(4) 国立医薬品食品衛生研究所報告編集業務

当所の報告書編集委員会に協力し、第 116 号の作成と配布に協力した。

安全性生物試験研究センター

センター長 黒川 雄二

平成 10 年 5 月以後の安全センターにおける人事異動は下記の如くである。平成 11 年 3 月に、祖父尼俊雄変異遺伝部長、津田充宥薬理部室長が定年退官。4 月に、林真変異遺伝部室長が同部部長に、本間正充同部主任研究官が同部室長に、小沢正吾薬理部主任研究官が同部室長に、それぞれ昇格。Peter Cruz の変異遺伝部研究員への採用。併任官としては、平成 9 年 5 月以来広瀬明彦総合評価室主任研究官が生活衛生局生活化学安全対策室へ派遣中。

従って平成 11 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 23、研究員 10、動物飼育長 1 で総計 56 名 (前年度より 2 名減) であり、さらに技術・事務補助員 14 名、客員・協力・流動研究員 18 名、研究・実習生 18 名等が在籍している。今後の問題として、特に毒性部動物管理室の省令室化、総合評価研究室の増員が上げられる。

海外出張として安全センタースタッフが例年通り厚生省・科学技術庁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 (詳細は、各部の報告を参照)。黒川の海外出張は、① WHO/ECEH・IPCS によるダイオキシン類に関する耐容一日摂取量 (TDI) 再評価会議、ジュネーブ WHO 本部、平成 10 年 5 月 25 日～29 日、② IPCS 国際化学物質安全性計画運営委員会、ジュネーブ WHO 本部、平成 10 年 9 月 7 日～8 日であった。

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 A8 毒性学、日本側コンタクトパーソン、安全センター長) では、井上達毒性部長、菅野純毒性部室長及び小野敦、山

本雅也毒性部研究員がダイオキシン類と内分泌攪乱物質関連情報の交換を行った。

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 (平成 10 から 12 年度) の安全性部門において、5 名の研究協力者及びのべ 39 名の協力研究者の参画を得て、発がん性 (S1B, S1CR)、遺伝毒性 (S2B)、反復投与毒性 (S4B)、安全性・一般薬理試験 (S7B)、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 5 分野についてのガイドライン作成等専門家会合を開催・討論を行ない、それらの成果を平成 11 年 1 月の ICH 報告会で発表した。

医薬品に関する GLP 調査は、昨年度の医薬品機構との合意に基づき、安全センターの職員の調査への参加は、トキシコキネティクスに関する場合を除いて行わないこととなり、その原則のもとに順調に経過しているが、将来的に GLP 評価委員会委員の問題が残る。

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およ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 に報告するとともに今後の試験物質についての情報整理、試験計画作成をも行なった。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きた。

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、平成 7 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、それらの研究結果を積極的に学会・専門誌等に発表してきたが、昨年度で三年が経過したので、総括的報告を衛研報告書に掲載した。

平成 6 年に安全センターが中心となり、「毒性試験用語集」を発行し関係者に好評であったが、配布用ストックがなくなり、かつかなりの変更を要する時期となって改版の必要が生じた。この件を日本トキシコロジー学会に依頼し、トキシコロジー専門家によって学会内に新たに用語集作成小委員会 (委員長、黒川雄二) を設けて平成 11 年春から作業を開始し、平成 13 年度末に刊行の予定である。

医薬品機構基礎研究推進事業；新医薬品開発技術関連分野において、「医薬品の安全性・有効性を評価するためのヒト型試験系の開発に資する基礎的研究」(研究代表者、井上達毒性部長、平成 9—13 年度) が採択されている。この研究は、予算・研究者等の規模からも大型であり、今後の毒性試験へのヒト型試験系導入の可能性を探るためにも、極めて重要なものと認識される。

新薬申請資料調査に関する安全センターの業務は、審査センターとの協議の上、平成 10 年 4 月から毒性担当委員を、毒性班、病理班、変異原性班に分けて対応することとなっ

た。この新体制により、以前に比べて簡素化・能率化の向上が期待されており、更に平成11年10月予定の調査会廃止により安全センターの負担が軽減すると予測されている。同時にこの体制をより充実するために、審査センター毒性関連職員の研修が安全センター各部で行われた。しかし、この予測・期待に関してはかなり厳しいものがありそうで、今後もこの方式を見直すために審査センターとの継続的な協議が是非必要と思われる。

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いる。今後も、それらの成果を広く社会に発表して貢献することが重要であろう。

安全センターに関わる事項の審議・報告等は、原則として4週に1回の安全センター運営会議（センター長、各部長、省令室長、動物管理室長の7名）においてなされているが、厚生省、医薬品機構、審査センターに特に関連する問題では、直接当該担当者との討議の場として有効に活用されている。さらに海外の学会・会議等の報告書は、即国立衛研安全性生物試験研究センターホームページに掲載しているので参考とされたい。

毒 性 部

部 長 井 上 達

概 要

平成10年度は、常勤研究員の転入出人事に変化がなかった。厚生技官佐井君江博士は、10月、主任研究官に昇任した。10月よりダイオキシン研究の強化のため、東京農業大学より渡辺昌教授を客員研究員として迎えたほか、平成11年4月からは、日本大学より森本幸治博士を客員協力研究員として迎えることとなった。また、平成10年10月よりソウル大学からポストドクトラルフェローとして来所して研究に従事していたByoung-II博士は、平成11年4月から、医薬品機構派遣研究員として新たにヒト型試験系開発の研究を中心にすえて研究を継続することになった。また同じく平成11年4月より、国立感染症研究所から北林あや博士をヒューマンサイエンス財団流動研究員として、また東京大学農学部より五十嵐勝秀博士を研究生としてそれぞれ迎え入れた。

試験・調査・研究などの業務関連での海外出張では、井上達部長は内分泌攪乱化学物質に関するWHO/IPCSの会議への出席（平成10年6月23日～28日、ワシントンDC, 米国）、国際トキシコロジー学会での発表（7月5日～11日、パリ市、フランス）、韓国内分泌攪乱国際シンポ

ジウムへの招待講演のための出席（10月12日～14日、ソウル市、韓国）、OECD/EDTAの内分泌障害性化学物質に関する合同会議への出席（11月11日～15日、パリ市、フランス）、WHO/IPCSの内分泌攪乱物質に関する編集会議と米国健康財団研究所の訪問と「本邦における内分泌攪乱化学物質研究」と題する招待講演（12月8日～16日、ワシントンD.C及びニューヨーク市、米国）、日米非エネルギー研究協力の一環として、内分泌攪乱物質に関する研究交流のためミシガン州立大学への公式訪問（平成11年3月12日～18日）、また、OECD/EDTAの内分泌攪乱化学物質の検出試験系の開発のための専門家会議への出席（4月17日～21日、パリ市、フランス）のため、それぞれ出張した。菅野純室長は、韓国毒科学会及び韓国環境変異原学会共催の特別シンポジウム「遺伝子導入及び欠失動物モデル—その毒性学研究への応用」での講演（平成10年10月8日～11日）、OECD/EDTAの内分泌障害性化学物質に関する合同会議（11月13日～19日、パリ、フランス）への出席、WHO/IPCSの内分泌攪乱物質に関する編集会議への出席と内分泌攪乱物質に関する研究交流のためのミシガン州立大学訪問（12月8日～17日、ワシントンD.C及びランシング、アーカンソー州、米国）、日米非エネルギー研究協力の一環として、内分泌攪乱物質に関する研究交流のため米国NCTR（リトルロック、アーカンソー州、米国）、NIEHS（リサーチトライアングルパーク、ノースカロライナ州、米国）を訪問（平成11年3月22日～31日）、また、OECD/EDTAの内分泌攪乱化学物質の検出試験系の開発のための専門家会議、及びNational Coordinator Meetingへの出席（4月17日～24日、パリ、フランス）のため、それぞれ出張した。相賀裕美子室長は、コールドスプリングハーバー学会（Conditional Genetic Technologies in the mouse及びMouse Molecular Genetics）（平成10年8月31日～9月6日、ニューヨーク州、米国）及びIIGB（International Institute of Genetics and Biophysics）Meeting（平成10年10月10日～13日、イタリア）に参加した。平林容子主任研究官は、The 40th Annual Meeting of the American Society of Hematologyにて発表のためマイアミ市へ（平成10年12月4日～8日、マイアミ市、米国）、「第4回IBC異種間移植に関する国際会議」に出席のためボストン市へ（平成10年12月10日～12日、ボストン市、米国）それぞれ出張した。佐井君江主任研究官は、文部省科研費（国際学術研究）により出張し、1998年国際トキシコロジー学会（平成10年7月4日～11日、パリ、フランス）に参加、またその後ミシガン州立大学を訪問し、共同研究課題である発がんプロモーター機序の解析に関する実験を実施した（平成10年7月26日～8月16日）。さらに12月には再び科学技術振興調整費（国際研究交流育成）によりミシガン州立大学へ出張し、ギャップ結合細胞間連絡制御における酸化的ストレスに関する

研究交流を行った（平成10年12月10日～12月18日）。北嶋 聡技官は、第8回国際トキシコロジー学会（ICT）（平成10年7月4日～11日，パリ，フランス）に参加し，精巣生殖細胞系列に関する研究演題を発表した。小野 敦技官は，日米非エネルギー研究協力の一環として，核内レセプターシンポジウム（主催：米国がん学会，平成11年1月8日～1月12日，インディアンウェルズ，米国）に発表のため参加し，引き続き米国 NIEHS, CIIT, EPA（ノースカロライナ州）に出張した（平成11年1月7日～17日）。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11年1月30日～2月7日，夕ホ，米国）に参加し，内分泌攪乱物質に関する研究発表を行った。山本雅也技官は，核内レセプターシンポジウム（平成11年1月8日～1月12日，インディアンウェルズ，米国）に発表のため参加し，引き続き米国 NIEHS, CIIT, EPA（ノースカロライナ州）に出張した（平成11年1月7日～17日）。

試験業務

1. 家庭用品に含まれる化学物質の安全性に関する試験

3-Iodo-2-propargylbutylcarbamate (IPBC), 10,10'-Oxy-bis(phenoxyarsine)(OBPA)及び p-Chlor-phenyl-3-p-chlorophenyl-3-iodopropargylformyl (CPIP) の28日間反復投与毒性試験を実施した。Zinc butylxanthate (ZBX) の28日間反復投与毒性試験のための予備試験を実施した（生活化学安全対策室移し替え）。

2. 食品および食品添加物の毒性試験

健康食品の安全性に関して，プロポリス，ガルシニアエキス（新規）について，ラットによる12ヵ月間の慢性毒性試験を行っている（食品化学課健康食品対策室）。また，食品添加物として，フクロノリ抽出物，西洋わさび抽出物，クロー色素などの各品目について，ラットによる90日間混餌投与を実施した（厚生省食品化学課）。

3. 医薬品及び医用材料の安全性に関する試験

1) 毒・劇物指定のための急性毒性試験

フルオロスルホン酸及び3-ニトロベンゼンスルホン酸の経口・経皮急性毒性試験及び皮膚刺激性試験を行なった（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，酸化的ストレスを誘発する化学物質の投与による臓器毒性の発現とその毒性発現機序を探る目的で，遺伝子改変動物を用いた解析を行った（生活衛生局生活化学安全対策室）。

研究業務

1. 生殖・発生障害に関する基礎的研究

1) 体節形成における分節化と開始機構の解析

発生初期の体節形成における分節化機構を明らかにする

ため，遺伝子改変動物の作製と解析及び分節化に関する遺伝子のクローニングを行う。

2) Mesp1, Mesp2 遺伝子エンハンサー特異的欠損マウスの作製と解析

Mesp1, Mesp2 遺伝子上流をレポーター遺伝子につないだ種々のベクターを作成後，マウスに導入，エンハンサーの解析を行うとともにエンハンサー特異的ノックアウトマウスを作製する。

3) 原腸陥入をモデルとした組織系形成の研究

原腸陥入によって形成される初期中胚葉に発現する遺伝子 Mesp1 の機能を解析することにより，中胚葉細胞の運命決定機構を探る。

4) 生殖細胞の発生と分化に関する基礎的研究

生殖細胞形成に及ぼすミトコンドリアのリボソーム RNA の関与を調べるため，リボソーム RNA を特異的に切断するリボザイムの over expression トランスジェニックマウスを作製し，解析する。また，マウス始原生殖細胞の発生分化に関するクローニングを行う。

5) ダイオキシン等内分泌攪乱環境汚染物質のヒト及び生態系に対するリスク評価に関する研究

マウス胚幹細胞は多分化能を有する胚盤胞内部細胞塊由来細胞である。この細胞を利用して内分泌攪乱性化学物質の発生・遺伝子毒性への影響を評価する。

6) 精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作製と精巣の分化・増殖に関する医薬品開発のための技術基盤の整備

セルソーターを用いて，精巣における精子形成過程の状態を，迅速かつ鋭敏に把握する解析技術を確認するため，検討を行う。

7) 脊椎動物の体節形成の分子機構に関する発生遺伝学的解析

体節形成において重要な役割を果たすと考えられる遺伝子，Mesp2, Dll1, Dll3 および paraxis のノックアウトマウスを掛け合わせて，遺伝学的解析を行う。

2. 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，とくにテロメアおよびテロメアーゼの変化に関する研究

細胞寿命や発がんに関与するとされる，テロメアやテロメアーゼのレギュレーション機構の研究，およびこれらの変化を指標とした細胞障害の評価系構築のため，実験動物および p53 欠失マウスの発がん過程におけるテロメアの長さやテロメアーゼ活性について検討をすすめている（科技厅国研原子力）。

2) プロモデオキシユリジン投与 (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 (BUUV 法) の開発に関する研究

前年度までにほぼ技術的に完成した BUUV 法を用い，p53 遺伝子欠失マウスの培養性造血前駆細胞の動態解析を，

定常状態及びベンゼン暴露下にて行いこれまで知られていなかったユニークな成果を得た(文部省科研費奨励)。

3) TGF- β の増殖抑制機構に関する研究

昨年までに造血幹細胞TGF- β のシグナル伝達経路にp53が関与する経路とそうでないものがあることが明らかになったので、本年度はこの経路に関与すると考えられる各種抑制因子を用いた検討を行い成果を得た(文部省科研費・基盤)

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(厚癌研・指定研究)

(1) c-Ha-ras 遺伝子導入マウスに一次発がん剤としてウレタン 1000mg/kgを単回腹腔内投与し、その後ブチルヒドロキシトルエン(BHT)を投与すると、発生腫瘍のサイズにおいて3週間の実験期間でBHTのプロモーション効果が検出され、本マウスを用いた肺を標的とした発がん性プロモーター物質の早期検出系樹立の可能性が示された。

(2) p53 遺伝子欠失マウスに p-cresidine, benzene, 及び DES(ディエチルスチルベストロール)と DENを掛け合わせた二段階発がん性試験の結果を整理した他、骨髄移植アッセイ系による約10週間で発がん試験結果が得られるモデル系を樹立した。

(3) p53 遺伝子欠失マウスをはじめ c-myc, ADFなどの各種遺伝子改変動物による発がん特性の解析を進めつつある。さらに交配による系統の変更・多重遺伝子改変マウスの作出などにより発がん特性のヒトへの外挿の可能性が検討できる系の樹立を目指す。p53 欠失マウスを用い、遺伝子変異の固定性(genotoxic fixation)に関する試験として、パラクレシディンによる発がん試験を開始した。

5) 自己複製シグナル制御による臨床応用可能なヒト造血幹細胞の体外増幅法の開発に関する研究

造血幹細胞の体外増幅のための培養条件を養育細胞層を用いるなどして検討した他、その無限増殖性にかかる理論問題としてのp53やklotho遺伝子欠失マウスなどによる、造血幹細胞の特性の検討を進めた(医薬品機構, 中畑班)。

6) アリールヒドロカーボン受容体と造血幹細胞のシグナルクロストークに関する研究

アリールヒドロカーボン受容体を介するシグナルが造血幹細胞に与える影響を造血シグナル経路とのクロストークの面から解明する。本年度は培養性造血前駆細胞及びin vitroで増殖と分化を制御可能な初代培養性B細胞系コロニーを用いた解析を進める。

7) 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、細胞増殖作用、細胞間連絡阻害ならびにアポトーシス阻害の関与について調べ、発がんプロモーター作用の予測およ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)。

8) 発がんプロモーター作用に対する緑茶の抑制効果
PCPによる発がんプロモーター作用に対する緑茶の抑制効果、ならびに細胞間連絡に対する効果を検討している。

9) 発がんプロモーター物質の in vitro 短期検出系の開発に関する研究

ギャップ結合細胞間連絡阻害作用ならびにギャップ結合構成分子の発現・修飾、さらにアポトーシスへの影響を指標とした、インビトロ発がんプロモーター検出系の樹立について検討している(生活安全総合研究事業)。

10) 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、大腸粘膜上皮における細胞増殖活性等の条件設定を進めた(食品化学課)。

3. 非分裂細胞系の組織障害毒性に関する研究

1) 薬物乱用と薬物依存性の強化効果の修飾ならびに薬物依存性評価法に関する基礎的研究

アカゲザルの臨床血液検査値に及ぼすコカインおよび覚せい剤反復静脈内投与の影響について検討した(薬務局麻薬課)。

4. シグナル伝達系を介した細胞障害発生機構の研究

1) 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への影響が懸念される化学物質の作用機序とその検出系の樹立のための研究(OECD対応の試験法開発を含む)を行っている(厚生科学研究生活安全総合研究事業, 科学技術振興調整費生活者ニーズ対応, 環境庁国立機関公害防止等試験研究費)。

生後21日齢の未成熟ラットと卵巣摘出した成熟ラットに17 β -estradiolを投与し、子宮肥厚の感度を比較検討した。また卵巣摘出マウスに各濃度の17 β -estradiolを投与し、経時的に子宮重量、上皮及び間質のBrdU標識率の変化を比較した。

内分泌かく乱化学物質の神経系分化に対する影響を検討するため、モデル系としてのマウス初代神経幹細胞培養系と、エストロゲンレセプターを特異的に認識するRT-PCR法の確立をめざし研究を進めている。

5. 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成

化学物質投与動物の血清、肺、心、肝、腎、脾、精巣中の必須元素の測定を行うと同時に、正常値の集積も継続している(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9年度~平成11年度)。

2) 知的基盤「化学物質安全特性予測基盤の確立に関する研究

“生体内化学物質の挙動”で平成10年度はチオレドキシ

ン遺伝子過剰発現マウスにパラコートを投与し、生体への影響についての基礎的検討を行った（科学技術庁、平成9年度～平成11年度）。

3) ヒト型免疫系再構築マウスの開発

ヒト型組織適合抗原系を導入したマウスを作製することを通じて、ヒトの可移植性腫瘍組織やヒト正常組織の移植可能な実験動物の開発を目指す。そのため、ヒト染色体とマウス A9 細胞のハイブリッド細胞約 700 クローンの中からヒト HLA 領域を含む 6 番染色体を有するクローンを PCR 法にてスクリーニングし、ES 細胞と融合するクローンを同定した。

薬 理 部

部 長 大 野 泰 雄

概 要

有効性・安全性評価のための科学技術開発に関する研究、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、生体機能における情報伝達に関する薬理学的研究、医薬品等のトキシコキネティクスに関する研究、および医薬品等の細胞機能に及ぼす影響に関する薬理学的研究を行った。調査に関する業務としては、ダイオキシンの TDI の設定のための調査研究、臨床薬物動態試験ガイドランス作成に関する調査研究、薬物相互作用検討ガイドランス作成に関する調査研究を行った。行政協力の面では昨年に引き続き、新医薬品や化粧品・医薬部外品などの承認審査、化学物質の安全性評価、GLP 評価など、数多くの調査会に協力した。

人事面では、容量性カルシウム流入現象に関与するイオンチャンネルについて研究するために、平成9年12月1日よりイギリス、ケンブリッジ大学バブラハム研究所のペリッジ教授のもとに留学していた小泉修一技官が帰国した（平成10年11月30日）。科学技術特別研究員の引間知広博士は昨年度より継続して採用され、医薬品の皮膚吸収および代謝に関する研究を行っている。津田誠博士は平成11年1月より同研究員として採用され、中枢における ATP 受容体と痛みに関する研究を行っている。また、平成11年3月31日付けで津田充寿第四室長が退職した。これに伴い、4月1日付けで紅林秀男第三室長が第四室長に異動し、小澤正吾主任研究官が第三室長に昇任した。なお、津田充寿元室長は薬理部の客員研究員として引きつづき生体内における一酸化窒素やニトロソ体生成の研究に従事することとなった。

国際会議のための短期海外出張としては、大野泰雄部長がロンドンで開催された ECVAM 主催の眼刺激性試験代替法に関する会議に出席し、我が国で行われた眼刺激性試験代替法バリデーション結果とそれに基づいて作成した眼刺

激性評価ガイドランス案を説明し、コメントを求めた（6月15日～17日）。国際学会としては、大野泰雄部長がパリで開催された国際トキシコロジー学会に参加し（7月6日～9日）、肝臓由来細胞を用いた安全性評価法について招待講演を行った。また、オーストラリアのケアンズで開催された国際薬物動態学会に出席し（11月26日～29日）、昨年6月に厚生省より通知された非臨床薬物動態試験ガイドラインについて説明した。井上和秀第一室長はライブチヒで開催された国際薬理学会のサテライトシンポジウム（IUPHAR Satellite International symposium- Nucleotides and Their Receptors in The Nervous System）に組織委員として参画するとともに、海馬からのグルタミン酸および GABA 放出に対する ATP の影響について招待講演を行った（7月30日～8月7日）。また、ロサンゼルスで開催された米国神経科学会年會に参加し（11月6日～11月14日）、海馬からのグルタミン酸放出について発表した。中沢憲一第二室長はミュンヘンで開催された第13回国際薬理学会（7月26日～31日）に招待され、神経型 ATP 受容体のゲート機構と内因性活性物質との相互作用について講演した。

国際協力としては、JICA の中国天津医薬品検査技術プロジェクトにおいて、篠内桃子主任研究官は遊離肝細胞を用いた肝細胞毒性研究法の技術指導のために、天津に出張した（9月17日～10月15日）。

研究業績

1. 有効性安全性評価のための科学技術開発に関する研究

眼刺激性試験代替法バリデーションの結果に基づいて作成した、代替法を従来のドレイズ試験法と組み合わせ、動物の使用数と苦痛が最少限になるような評価ガイドライン案を英訳し、欧米のコメントを求めたが、特に問題となる指摘は無かった。そこで研究班の最終案として厚生省に提出した（厚科研）。また、臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミングに関する国際的ハーモナイゼーション研究（ICH-M3）の一環として、2週間の反復投与毒性試験による雄性生殖能評価の可否についての情報を得るために病理部および多くの医薬品企業等の協力を得て、バリデーションを開始した（厚科研）。臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究においては凍結ヒト肝細胞は融解後も viability が比較的高く維持でき、培養も可能であることを示した。また、ヒト肝細胞の保存方法について文献調査を行い、HS 財団に報告した（厚科研、委員長）。

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を利用した有効性・安全性評価系開発に関する研究においては、ラット型のニコチン受容体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、その薬理学的性質を検討し、この系がこの受容体を標的とする化学物質の有効性・安全性の評価に利用できる可能性

を示した(財公研)。

ヒト薬物代謝酵素を用いた薬物の毒性試験系の開発研究においては、ヒト抱合系薬物代謝酵素を発現する動物細胞系を開発することを目標に、まず、野生型、および異型ヒト硫酸転移酵素遺伝子の大腸菌内発現系を作成し、これを用い、異型酵素が野生型酵素に比し不安定な酵素タンパクであることを示した。これにより、ヒト硫酸転移酵素の多型の機構の一端が明らかになった。薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究においては、ヒトフェノール硫酸転移酵素の多型の出現の割合を、日本人について明らかにした(委員長)。

ダイオキシン等内分泌攪乱環境汚染物質のヒトおよび生態系に対するリスク評価法に関する研究においては、ピオチン化エストラジオールを合成し、生体分子相互作用検出装置に用いるエストラジオール固定センサーチップを作成した。作成したセンサーチップを用いてヒト組み替えエストロゲン α 受容体と化学物質の結合を解析するための実験条件を検討したところ、エストロゲン受容体結合が知られている物質に、エストロゲン受容体とセンサーチップとの結合に対する阻害作用が認められた(環公害)。また、ピオチン化エストロゲン受容体応答配列オリゴヌクレオチドを合成し、生体分子相互作用検出装置に用いるオリゴヌクレオチド固定センサーチップを作成し、同様の検討を行ったところ、エストロゲン受容体結合が知られている物質に、エストロゲン受容体とセンサーチップとの結合に対する促進作用が認められた(試一般)。

内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究においては、エストロゲンの影響を受け易い鳥類初期胚において性分化関連遺伝子発現に及ぼす影響を *in situ* ハイブリダイゼーション法により明らかにした。正常雄胚の性腺では抗ミュラー管ホルモン (AMH) mRNA 発現が著しく、アロマターゼ mRNA の発現はほとんどみられない。しかしエストロゲン処理により AMH mRNA 発現は著しく低下し、アロマターゼ mRNA 発現は著しく増加した(科振調)。

2. 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

中枢神経系における ATP 受容体の機能に関する研究では、ATP が培養海馬細胞標本からのグルタミン酸放出を抑制し、この作用に G-蛋白共役型 ATP 受容体が関与することを明らかにした(委員長)。また、グリア・ニューロン・ネットワークでの ATP の機能に関して検討し、ニューロンから放出される ATP はミクログリアを活性化し神経栄養因子様作用を持つプラスミノーゲンを外液カルシウム依存性に放出することを示した(委員長)。また、痛みの情報伝達における ATP 受容体群の役割について検討し、脊髄後根神経節ニューロンにはイオンチャンネル型 ATP 受容体が

発現している痛みの発生に関与している可能性を示した(文科研)。

3. 生体機能における情報伝達に関する薬理学的研究

ATP 受容体チャンネルの構造-機能相関について分子生物学的手法および神経薬理学的研究を行い、ATP 受容体チャンネルの構造を分子生物学的手法により改変し、開口およびイオン透過に関わるアミノ酸残基を同定した(文科費)。

4. 医薬品等のトキシコキネティクスに関する研究

食品添加物の安全性評価における代謝の役割に関する研究においては、食品添加物である Diphenyl が BDF1 マウス CYP4A および CYP2B 型の誘導を示すことを示した。また、Biphenyl の毒性代謝物 2,5-dihydroxybiphenyl の生成に、ラット CYP2C11 が関与することを示した(厚特研)。環境汚染化学物質の安全性評価における代謝の役割に関する研究においては、有機りん系農薬 Diazinon のラットでの代謝を *In Vivo* および *In Vitro* で検討した。また、内分泌攪乱物質ビスフェノール A の体内動態をラットおよびサルを用いて検討し、ラットでは著しい腸肝循環が認められることが明らかになった(厚移替)。

甲状腺障害物質、2-Mercaptobenzimidazole (MBI) 反復投与ラットと甲状腺摘出ラットへ LPS を投与し、血中および尿中の NO₂-/NO₃- 量の測定により、体内一酸化窒素産生量を調べた。MBI と LPS の複合投与でのみ、血中 NO₂-/NO₃- 量が上昇したが、逆に尿中への NO₂-/NO₃- 排泄量は抑えられた。

5. 医薬品等の細胞機能に及ぼす影響に関する薬理学的研究

残留農薬の相乗毒性に関する薬物動態学的研究を行い、IBP のラットミクロソームを用いた *In Vitro* および *In Vivo* 代謝試験においてケトコナゾールとの相互作用により代謝が抑制されること、また、血中濃度が高まることを示した(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においては、ブルーム症候群原因遺伝子の酵母相同遺伝子の N 末、C 末の欠損変異株を作成し、DNA 修復および減数分裂における機能領域について明らかにした。

6. その他

臨床薬物動態試験ガイドラインおよび薬物相互作用ガイドラインの作成のための研究班を組織し、検討を開始し、中間報告書を厚生省に提出した。また、ダイオキシン類の耐容一日摂取量 (TDI) 設定のための厚生省と環境庁の合同会議に出席し、トキシコキネティクスの立場から協力した。

病 理 部

部 長 広 瀬 雅 雄

概 要

前年度に引き続き、化学物質の毒性・発癌性に関する病理学的研究、自然発生病変の診断の確立に関する研究、安全性評価のための試験法・生体指標に関する研究、動物発癌モデルに関する研究及び発癌メカニズムに関する研究、環境化学物質のリスクアセスメントに関する研究等を行った。

人事面では、高橋道人部長が平成10年3月31日付けで定年退官し、その後任として名古屋市立大学医学部より広瀬雅雄博士が平成10年4月1日付けで着任した。また、同4月1日付けで渋谷淳博士が第二室長として採用され、畝山智香子研究官が同10月1日付けで主任研究官に昇任した。また、国際協力事業団を通じて中国天津医薬品検査技術プロジェクトの研修員として、天津市薬品検査所薬理室より劉雲氏が平成11年2月1日より半年の予定で派遣され、毒性試験に関連する病理診断技術の習得のための研修を行っている。

短期海外出張は、西川秋佳第一室長がスイス・ジュネーブで開催された第51回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)に出席し、討議を行った(平成10年6月9日～6月18日)。また、米国・ワシントンDCで開催された第4回国際簡潔評価文書(CICAD)最終検討会議に出席し、討議を行った(平成10年12月8日～12月11日)。さらに、フランス・リヨンで開催された「発がん性リスクアセスメントに関するIPCSワークショップ」に出席し、討議を行った(平成11年2月16日～2月18日)。三森国敏第三室長はフランス・リヨンで開催された国際癌研究機関モノグラフ作成作業委員会に出席し、討議を行った(平成10年6月1日～6月11日)。さらに、イタリア・ローマでの第52回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会(JECFA)に出席し、討議を行った(平成11年2月1日～2月13日)。

国外の学会出張としては、広瀬雅雄部長、渋谷淳室長、小野寺博志主任研究官が米国ニューオーリンズで開催された第38回米国トキシコロジー学会に出席し、発表および討議を行った(平成11年3月14日～3月18日)。

研究業績

1. ラットの自然発生病変に関する研究

1) LEC ラットの肝炎発生前後における肝細胞の超微形態学的変化に関する実験を行い、発症直後から肝細胞内に二次性ライソゾームが多数観察され、免疫電顕にてDNA付加体が核内に観察された。

2) WBN/Kob ラットの膵炎発症に対するエストラジオールおよび合成トリプシン阻害剤の影響を検討した結果、慢性膵炎の発生を遅延した。

3) ラット慢性腎症の発生に対するジョサマイシンの影響を検討した結果、慢性腎症を抑制した。

2. 神経毒性の改善に関する研究

1) 抗癌剤であるピンクリスチンをラットに投与し、誘発される神経変化に対してのグルタミン酸の効果についてRota-Rod 法および超微形態学的な検索を開始した。

3. カドミウムの健康影響に関する研究(農林水産省委託研究費、環境庁委託研究費)

1) 微量の塩化カドミウムないしその汚染米をラットに2年間投与し、カドミウムの臓器障害性と臓器内蓄積との関連性を検討する動物実験を終了し、臓器中カドミウムの蓄積、誘導メタロチオネインの解析、病理組織学的検査を継続中である。

2) 微量塩化カドミウムないしその汚染米をラットに8ヶ月間混餌投与し、用量による体内吸収率の差異の有無について検討する実験を終了し、用量によりカドミウムの吸収率が変わらないことを明らかにした。

3) カドミウムの長期間低濃度曝露による腎障害発現の閾値について文献を収集した。

4. 骨粗鬆症と栄養因子に関する研究

1) 大豆粉をラットに10週間投与し、骨への影響を病理学的に検索する実験を開始した。

5. 生薬成分の副作用に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) 生薬である小柴胡湯のマウスモノクロタリン誘発間質性肺炎に対する修飾作用およびインターフェロン α の相互作用の検索を開始した。

6. 食品添加物の毒性並びに発がん性に関する研究(食品等試験検査費)

1) クチナシ青のラットを用いた慢性毒性・がん原性試験を終了し、最高用量5%の投与でも顕著な毒性徴候は観察されず、がん原性は認められなかった。ベクチン分解物、乳酸鉄、パラオキシ安息香酸イソプロピルのがん原性試験は終了し、病理組織標本検索を開始ないし継続した。硫酸アンモニウム、キシロース、アカネ色素のがん原性試験の用量設定のための3カ月投与試験を終了し、用量設定を行った。塩化マグネシウムのがん原性試験の用量設定のための3カ月投与試験を開始した。

2) キチン、シソ抽出物、オレンジ色素の90日間反復投与毒性試験を行った結果、投与に起因する毒性は認められなかった。納豆菌ガムの90日間反復投与毒性試験は終了し、病理組織学的検索を開始した。また、補骨脂抽出物、没食子酸、トコトリエノールの90日間反復投与毒性試験を継続中である。

3) 抗甲状腺物質による甲状腺発がんプロモーション作用への下垂体除去の影響についてラットを用いた実験を行い、病理組織学的解析を継続中である。

4) 甲状腺二段階発がんモデルを用いて、コウジ酸によるイニシエーション作用を検討した結果、弱いイニシエーション作用を有することが示唆された。

7. 動物用医薬品の毒性並びに発がん性評価に関する研究(食品等試験検査費)

1) チアンフェニコールをラットに反復投与する実験を追加し、精巢毒性発現メカニズムを検討した結果、セルトリ細胞への弱い毒性作用のあることがわかった。

2) フルメキンの肝腫瘍イニシエーションないしプロモーション作用の有無を検討するため、p53 ノックアウトマウスを用いた実験を開始した。

8. 動物用医薬品の残留防止対策に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) DHPN ラット二段階発がんモデルを用い、キシラジンとその代謝物 2,6-キシリジンを1年間投与する実験を終了し、病理組織学的に検索した結果、2,6-キシリジンに鼻腔に対するプロモーション作用が、また、キシラジンに甲状腺に対するプロモーション作用のあることがわかった。

2) p53 ノックアウトマウスおよび rasH2 マウスを用いて 2,6-キシリジンおよび *t*-ブチルヒドロキノンについての発がん性の有無を検討する実験を行った。

9. 食品中化学物質の相互作用等に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) 食品中および添加物の抗酸化作用を示す化合物と亜硝酸をラットに同時投与して、上部消化管に対する病理組織学的な検索を行った。

10. 内分泌かく乱化学物質の人体影響に関する調査研究(厚生科学研究補助金)

1) フルタミドおよびメチルテストステロンのラット経口・28日間反復投与毒性試験を実施し、臓器重量、血清ホルモンレベル、病理組織所見、雌の性周期がホルモン関連作用の検査項目として有用であることを明らかにした。

11. 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(厚生科学研究補助金)

1) ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックマウスと p53 ノックアウトマウスについての短期発がん性試験系に関する実験及び文献を収集し、これらの試験系の有用性や問題点について検討を行った。

12. 安全性試験法開発に関する研究(厚生科学研究補助金)

1) Ca-ATPase 阻害剤をラットに反復投与した結果、末梢神経の神経終末に近い部位は障害されず、Ca-ATPase 阻害剤が必ずしも distal axonopathy を引き起こさないことがわかった。

13. 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(厚生省特別研究費)

1) 大腸、前立腺等に発がん性を有する加熱分解産物の PhIP を F344 雄ラットに単回経口投与後、経時的に電子顕微鏡にて検索した結果、投与4時間後の大腸腺上皮細胞および投与24時間後の前立腺上皮細胞に核小体分離が観察された。

14. 発がんメカニズム解明のための新手法に関する研究(文部省科学研究費)

1) 肝および甲状腺発がんのプロモーション時期に特異的に発現する遺伝子の同定および細胞増殖に関連する情報伝達系の解析を開始した。

15. トランスジェニックマウスの特性に関する研究(喫煙財団委託研究費, 厚生科学研究補助金)

1) 種々の発がん物質で誘発されたヒトプロト型 c-Ha-ras 導入トランスジェニックマウスにおける皮膚と前胃の乳頭腫について遺伝子解析を行った結果、それらの腫瘍誘発に導入遺伝子の点突然変異が必ずしも関与しないことが分かった。

2) c-Ha-ras マウスのエチルニトロソ尿素に対する発がん感受性を検討した結果、標的臓器は前胃、肺であり、p53 ノックアウトマウスのそれとは異なることが明らかとなった。

3) p53 ノックアウトマウスのペルオキシゾーム増殖剤に対する肝発がん感受性の有無を検討するための動物実験を行った結果、肝腫瘍は誘発されなかった。

4) c-Ha-ras マウスのフェノールフタレインに対する発がん感受性の有無を検討した結果、腫瘍はいずれの器官にも誘発されなかった。

5) p53 ノックアウト CBA マウスのフェノールフタレインに対する発がん感受性の有無を検討するための6カ月混餌投与実験を継続した。

16. 環境因子の発がんリスク評価に関する研究(文部省科学研究費)

1) ラット肝 GST-P 陽性細胞巣を指標として、DEN の低濃度域でのリスク評価を行った。

2) lacI 導入 p53 欠損マウスを用いて、MeIQx の発がん性に関する動物実験を行った。

3) gpt delta マウスを用いて、MeIQx の発がん性に関する動物実験を行った。

17. 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(厚生省がん研究助成金)

1) 新生仔マウスを用いた二段階発がんモデルを作成する目的で、生後1週齢の新生仔マウスに MNU を単回腹腔内投与し、腫瘍発生状況を検討した後、既知発がん物質 UDMH ならびに HQ のプロモーション効果を確認した。

2) 新生児マウスに ENU を単回投与し、離乳後に PNU

ないトリリス (2-クロロエチル) リン酸の反復投与を行った結果、PNUによりリンパ腫誘発が増強された。

3) 新生児マウスに BOP を単回投与し、離乳後に MeIQx を 26 週間混餌投与する実験を行った結果、このモデルの有用性が明らかにできなかった。

4) 新生児マウスに BOP を単回投与し、離乳後に PhIP を 26 週間混餌投与する実験を行った結果、このモデルの有用性が明らかにできなかった。

18. 消化器癌発生に影響する食品中の要因に関する研究 (厚生省がん研究助成金、喫煙財団依託研究費)

1) ラット胃癌がんモデルによるオーラプテンとアセトキシキャピコールの胃に対する抑制効果の動物実験を開始した。

2) ハムスター BOP 膀胱がんモデルのイニシエーション段階でのアロエの影響を検索を行う動物実験を終了した。

3) ハムスター二段階膀胱がんモデルを用いて、柑橘類成分プロトカテキユ酸の影響を検討する実験を終了し、病理組織学的検索を行った結果、膀胱がんの進展過程を抑制した。

4) ハムスター二段階膀胱がんモデルを用いて、ショウガ科植物含有成分の影響を検索した結果、肝内胆管腫瘍の発生に対する抑制効果が認められた。

5) ハムスター二段階膀胱がんモデルを用いて、柑橘類含有成分オーラプテンの影響を検索する動物実験を終了した。

6) ハムスターに発がん物質 BOP を投与し、O6-メチルデオキシグアノシンの生成を経時的に検索する動物実験を終了した。

19. トランスジェニックマウスの化学発がん増強メカニズムに関する研究 (文部省科学研究費)

1) p-クレシディンで c-Ha-ras 遺伝子導入マウスに誘発された膀胱腫瘍における遺伝子変異を解析した結果、導入遺伝子に変異は見られなかった。

2) p53 ノックアウト CBA マウスと野生型マウスに DEN でイニシエーション処置した後、フェノバルビタールを 26 週間投与したところ、p53 ノックアウトマウスに肝腫瘍とその前駆病変が有意に増加した。

3) p53 ノックアウト CBA マウスのメチルニトロソ尿素に対する発がん感受性の有無を検討するための 6 か月間飲水投与実験を継続した。

20. 喫煙関連発がんの制御機構と予防に関する研究 (喫煙財団依託研究費)

1) 喫煙の負荷はハムスターの肝臓における生体異物代謝酵素系に影響することを明らかにした。

21. タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究 (厚生科学研究補助金、喫煙財団依託研究費)

1) 肝及び大腸発がんにおけるタバコ煙と MeIQx の相互

作用を追求するためのラットを用いた実験を開始した。

22. 実験的肺線維症における肺腫瘍誘発に関わる諸因子の解析 (喫煙財団依託研究費)

1) MNUR の投与条件を変更した再実験を行い、p53 が肺線維症に併発する肺腫瘍誘発に関与するか否かを検討した結果、p53 は必ずしも肺腫瘍誘発には関与しないことが明らかとなった。

2) ハムスター MNUR 肺線維症モデルを用いて、タバコ特異的ニトロサミンである NNK の投与経路を皮下に変更して再実験を実施し、肺線維症から肺腫瘍誘発の可能性について検討した結果、NNK は誘発腫瘍に対して何ら修飾作用を示さなかった。

23. 食品の発がん抑制に関する研究

1) DMBA でイニシエーション処置した高脂肪食摂取ラットに、プランタゴオバタを 26 週間投与する実験を行い、全身臓器における発がん修飾作用を検討した結果、乳腺腫瘍以外については何ら修飾作用は見られなかった。

2) 短期間発がんモデルにおける IP6 とミオイノシトールの抑制効果の検討を行った結果、抑制効果は明らかではなかった。

3) 多臓器発がんモデルにおける IP6 とミオイノシトールの抑制効果の検討のための動物実験を開始した。

24. 内分泌かく乱化学物質の発がん修飾作用に関する研究 (科学技術振興調整費、厚生科学研究補助金)

1) p53 ノックアウト CBA マウスにエチルニトロソ尿素を投与することにより子宮腫瘍が早期に誘発されることから、このモデルを用い内分泌かく乱作用のあるエチニールエストラジオール (EE) ないしメトキシクロールの子宮腫瘍に対する修飾作用を検討した結果、EE は強いプロモーション作用を示した。

2) ラットの甲状腺二段階発がんモデルを用いて、内分泌かく乱作用のあるメトキシクロール、アトラジン、ビスフェノール A の甲状腺腫瘍に対する修飾作用を検討した結果、いずれにもその様な作用はなかった。

3) p53 ノックアウトマウス (OYC 由来) にエチルニトロソ尿素を投与することにより子宮腫瘍が早期に誘発されることから、このモデルを用い各種内分泌かく乱化学物質の子宮腫瘍に対する修飾作用を検討した結果、エチニールエストラジオール (EE) ではプロモーション効果を認めたが、メトキシクロールではその効果が明らかではなかった。

25. 食品による膀胱発がんに関する研究 (食品等試験検査費)

1) アリルイソチオシアネート (AITC)、およびベンジルイソチオシアネート (BITC) とその抱合体をラットの膀胱内に注入した結果、AITC、BITC とグルタチオン抱合体、システイン抱合体で膀胱上皮細胞増殖亢進が見られたが、アセチルシステイン抱合体では増殖亢進はなかった。

26. 抗酸化剤の発がん抑制に関する研究

1) 大腸発がん物質 PhIP のラット薬物代謝酵素誘導における抗酸化剤 HTHQ 併用投与の影響を調べるため2週間の混餌投与を行った結果, HTHQ では肝 P450 分子種の誘導が起こるが, PhIP のみでは明らかな酵素誘導が起こらないことがわかった。

27. 非遺伝子傷害性物質による胃発がんに関する研究

1) カテコールをラットに混餌投与する動物実験を行い, 1日, 3日, 7日, 14日と経時的に屠殺して胃を採取した。

28. 既存化学物質安全性点検支援システムを利用した評価手法の研究

1) システムを構築し, データ入力を行うとともに, 安全性評価業務と評価手法の研究を開始した。

変異遺伝部

部長 林 真
前部長 祖父尼 俊雄

概要

平成8年12月1日より科学技術庁フェローとして第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 Dr. Petr Gruz が平成10年10月1日付けで厚生技官として採用され, 引き続き第2室で試験, 研究業務に携わることとなった。平成9年3月31日をもって定年退官した第2室松井道子主任研究官は平成10年度も客員研究員として当部の業務に協力している。平成11年3月31日付けで祖父尼俊雄前部長が定年退官し, 平成11年4月1日付けで林 真前第1室長が部長に, 本間正充前主任研究官が第1室長に就任した。

平成8年4月1日より HS 財団流動研究員として第1室にてトランスジェニックマウスを用いた遺伝子突然変異に関する研究に従事してきた王 雪氏は平成11年3月31日で終了し, 4月より中国北京の中国薬品生物製品検定所毒理室において遺伝毒性の試験, 研究に従事することとなった。平成9年2月24日より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 Dr. Jérôme Wagner は平成10年5月帰国した。

平成8年10月1日より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および増殖動態に関する研究に従事している松野淳美氏, 平成9年1月9日より HS 振興財団からの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樽松美治氏は, それぞれ引き続き研究に従事している。

HS 振興財団の研究支援者活用事業の一環として平成10年1月16日より百瀬真希氏が, また平成10年10月1日よ

り田所聡氏が研究支援者として第1室において培養細胞を用いた研究に従事している。

平成9年8月1日より第1室の鈴木孝昌主任研究官は科学技術庁長期在外研究員としてフランス, リヨンの国際発がん研究機構 (International Agency for Research on Cancer: IARC) の Dr. Hiroshi Yamasaki (Unit of Multistage Carcinogenesis) のもとで, 生体内での遺伝子突然変異を直接検出する新技術の開発に関する研究に従事し, 平成10年7月31日に帰国, 第一室の業務に復帰した。

平成10年6月11日に, 厚生省生活衛生局化学物質安全対策室と共催で, 過去3年間に実際に申請の届けを出した企業を対象として, 化審法のガイドライン改訂に伴う問題点を中心に技術懇談会を開催した。

平成10年11月7日~20日まで, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団外国人研究者招へい事業 (ヒトゲノム・遺伝子治療研究推進事業) の一環として英国コバンス研究所より Dr. Richard Marshall を招聘し, 第1室および第3室において「ウエルナー症候群患者由来細胞における染色体異常誘発性」に関する共同研究を行った。

平成10年11月20日~29日まで, 医薬安全総合研究推進事業・外国人研究者招へい事業の一環として, 英国コバンスの Dr. David Kirkland を招聘し, 第1室において「マウスリンフォーマ細胞 L5178Y を用いる突然変異試験における用量間隔に関する研究」を行った。また, 後半は大阪で開催した国際ワークショップのための準備会の開催に協力した。

平成10年11月22, 23日に, 平成11年の3月にワシントンで開催される遺伝毒性試験法に関する国際ワークショップのための準備会を日本環境変異原学会年大会のサテライトミーティングとして大阪で開催した。各ワーキンググループの座長を招聘し, ワシントン会議の討議内容に関して議論すると共に具体的な打ち合わせを行った。

短期海外出張としては, 林 真前第1室長, 松岡厚子主任研究官は平成10年8月19日~9月6日にドイツのエッセンで開催された第4回染色体異常国際シンポジウムに出席した。林前室長は末梢血を用いる小核試験の自動化に関する研究の成果を講演し, 松岡主任研究官は哺乳類培養細胞における異数性誘発に関する発表を行った。また, 国際シンポジウムの前後に, 主に化審法の評価のための試験を行っているドイツと英国の6研究機関 (Cytotest Cell Research GmbH, GSF-Institut fuer Saecugtiergenetik, Covance Laboratories, SafePHarm Laboratories, Huntingdon Life Science, Glaxo Wellcome Research and Development) を訪問し, 遺伝毒性の最近の動向に関する講演を行うと共に情報交換を行った。

祖父尼俊雄前部長は平成10年9月4日~9月12日までオーストリア・ザルツブルグで開催されて欧州環境変異原

学会に出席し、ICH および OECD の新しいガイドラインに関するワークショップにおいて「マウスリンフォーマ試験における染色体の構造ならびに数的異常との関係」について講演すると共に、および「閾値が介在する変異原性のメカニズム」と題するシンポジウムにおいて日本の規制当局における経験と今後の展望について発表を行った。

能美健彦第2室長は平成10年9月6日～15日まで、米国・メイン州バーハーバーで開催された「リスク評価のための動物モデルに関するシンポジウム」に出席し、突然変異検出用トランスジェニックマウスの開発について講演した。また9月16日～19日までフランス、ストラスブルグの国立中央科学研究所（CNRS）において開催された HFSP（Human Frontier Science Program）シンポジウムにおいて大腸菌の自然突然変異を促進する蛋白質に関し講演を行い、HFSP 共同研究の進め方に関し打ち合わせを行った。

能美健彦第2室長は平成10年9月27日～10月3日までメキシコ、アカプルコで開催されたメキシコ遺伝学会、環境変異原学会合同年會に参加し、遺伝子工学的手法を用いて開発した変異原性試験法について講演した。

増井 徹主任研究官は平成10年9月6日～17日までオランダ、フランス、英国を訪問。オランダではユトレヒトの国立発生学研究所、フランスはパリで高等師範学校、英国ロンドンのヨーロッパ版細胞バンクを訪問し、情報交換とセミナーを行った。また、英国オックスフォードで開催された英国細胞生物学会に出席し、「ヒト正常上皮由来の増殖停止関連遺伝子によるアポトーシスの誘導」に関する発表を行った。

祖父尼俊雄前部長は平成10年9月21日～26日まで国際協力事業団の中国天津医薬品検査技術プロジェクトに係わる短期専門家として出張し、「遺伝毒性試験の ICH ガイドラインについて」講演を行うと同時に、プロジェクト全体に関する意見交換を行った。

林 真前第1室長は平成10年10月10日～22日までフランスリヨンの国際癌研究機構（IARC）で開催された癌モノグラフ会議に遺伝毒性の専門家として出席し、モノグラフの作成に携わった。

水沢 博第3室長は平成10年5月30日～6月4日までアメリカインビトロバイオロジー学会（旧米国組織培養学会）に出席し日本の厚生省細胞バンクの現状について発表を行った。また、6月26日～29日までは、韓国ソウル大学医学部がん研究所細胞バンク（朴教授）で主催した韓国細胞株ワークショップに招待されて培養細胞の品質管理手法等に関する招待講演を行った。また、平成10年10月17日～24日まで、フィリピン諸大学との学術交流ならびに細胞バンクシステム確立のため、フィリピン大学をはじめ5ヵ所の研究施設を訪問し、意見交換ならびに指導を行った。12月1日～14日まで、韓国細胞バンクの担当者を招聘し、

韓国細胞バンクにおける情報システムの状況および現状について講演を実施した。また、システムの構築等に関するコンピュータシミュレーション等を共同で行った。

山田雅巳主任研究官は平成10年10月23日～11月1日まで、フランス、ボルドーで開催された第6回抗変異発がん抑制機構国際会議に出席し、大腸菌の自然突然変異を抑制する *dinB* の変異体について発表を行った。

増村健一研究員は平成10年11月11日～17日まで、米国、フロリダ州フォートメイヤースで開催された米国癌学会主催の「内因性変異原」に関する会議に出席し、開発したトランスジェニックマウスにおいて検出される自然突然変異の特徴について発表を行った。

祖父尼俊雄前部長は平成10年11月28日～12月5日まで、タイのバンコクで開催された第3回ヒト集団における環境変異原国際会議に参加した。変異原性発現の機構解明に加え、ヒトへの暴露量の評価、感受性の個人差、疾病との関係、等が議論された。

能美健彦第2室長は平成11年2月8日～12日まで、米国、ハワイ州、マウイで開催された日米がん研究協力事業セミナーに参加しトランスジェニック変異原性試験の開発について講演し、発がん予防研究における動物モデルの役割について意見交換を行った。

林 真前第1室長は平成11年2月28日～3月9日まで OECD GLP 相互受け入れのための加盟国相互訪問プロジェクトに参加するためベルギーを訪問し、米国 FDA およびハンガリーの査察官と共にベルギー当局の行う査察に同行した。

能美健彦第2室長とピーター・グルーズ研究員は、平成11年3月14日から米国ノースカロライナ州ダーラムのデューク大学メディカルセンターを訪問し、大腸菌 *DinB* 蛋白質の結晶解析条件の検討を行った。能美室長は3月17日に大腸菌の SOS 突然変異について講演を行い、3月21日～23日まではマサチューセッツ州、マサチューセッツ工科大学生物学部を訪問し、大腸菌の突然変異誘発促進蛋白質について意見交換を行った。グルーズ研究員はデューク大において3月28日まで実験を行い、その後帰国した。

祖父尼俊雄前部長、林 真前第1室長、能美健彦第2室長、本間正充前主任研究官は平成11年3月23日から米国ワシントンに出張し、環境変異原学会に併設されて開催された第2回遺伝毒性試験法に関する国際ワークショップに主催者およびワーキンググループの座長として出席した。また、祖父尼俊雄前部長を除く3名は引き続き環境変異原学会にも出席し、最近の成果に関する発表を行った。

研究業績

1. 食品添加物の変異原性に関する研究
2. 種類の天然添加物（酵素処理イソクエルシトリンおよび精油除去ウイキョウ抽出物）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

農薬およびその関連物質について mutM 破壊微生物を用いて変異原性を検索した(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

有機砒素化合物(ジメチルアルシン酸, メチルアルソン酸, トリメチルアルシンオキシド)について昨年度に引き続き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連続処理法について行った(環境庁企画調整局環境保健部)。

4. 遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発

新たに作製したトランスジェニックマウス(*gpt delta*)を用いて, PhIP によって誘発された *gpt* 突然変異体の突然変異スペクトルを解析した(HS 財団受託研究費)。

5. 化学物質の総合的評価手法に関する研究

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*, *ogt* 遺伝子を破壊した大腸菌株に, メチルメタンサルフォネート処理した入フェージを感染させ変異原性を検索した(生活衛生局生活化学安全対策室)。

6. 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の確立のために行われた共同研究のまとめの論文の作成を行った(労働省化学物質情報課)。

7. 培養細胞を用いる異数性検出系の開発ならびに異数性誘発機構の解明に関する研究

チャイニーズ・ハムスター細胞株 V79-MZ 細胞株において, ジメチルベンツアントラセンが代謝活性化系非存在下で倍数性を誘発することが判明した。しかし, 通常染色体異常試験で用いている CHL/IU 株では同一条件下で異数性を誘発しなかった。さらに, ベンツピレンは不完全な紡錘体を形成し, 結果として異数性が誘発されることが判明した。

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

MeIQ_x により誘発された Big Blue マウスの突然変異について, 従来用いられた *lacI* 遺伝子と同様に *cII* 遺伝子を用いて変異頻度の解析, 誘発された変異の同定が可能であることが明らかとなった(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

ICH の S2 グループにおいて問題となっている *in vitro* 培養細胞を用いる小核試験について, EU を中心とした国際共同研究に参加し, サイトカラシン処理の必要性等, 試験法を中心に検討した(医薬安全局審査管理課)。

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

魚類, 貝類, ウニ等の水生生物を用いる小核試験法の確立を行い, 水環境汚染のモニタリングのための試験系の確立を行った。また, 水質汚染を定性的に評価するため, 神奈川県酒匂川の自然水を数カ所にわたって採取し, 化学分析による汚染度の結果と細胞毒性を引き続き行い, その成績を比較検討した(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

開発したトランスジェニックマウスにガンマー線を照射し, 脾臓において検出された欠変異の特徴について分子レベルで検討した(国立機関原子力試験研究費, 科学技術庁)。

12. 誤りがち DNA 修復による突然変異誘発の分子機構の解析に関する研究

誘発突然変異におけるトランスリジョン DNA 合成の役割について検討した(文部省科学研究費)。

13. 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

p53 タンパクの発現を欠失したヒトリンパ球由来の TK6-E6 細胞を用いて突然変異の特異性を検討し, TK6-E6 細胞では組換え修復能が欠損しているため, DNA の 2 本鎖切断は速やかに修復されず, 染色体の欠失や転座をもたらすことが明らかとなった(科学技術振興調整費, 重点基礎研究, 科学技術庁)。

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

In vitro 染色体異常試験のデータの整理を行い, データ集の作製を行った。

15. 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

ヒト由来組織の凍結保存及び回復法について検討を加えた。倫理規定の原案を作成し, 登録時の書式等についての原案を作成し, 公表した(HS 財団受託研究費)。

16. CGH 法および染色体ペインティング法による培養細胞株の染色体再配列の解析

細胞バンクの各種ヒト培養細胞株(計 8 種)について, CGH 法による各染色体ごとのゲノムの増幅および欠失領域の特定を行い, さらに染色体ペインティング法によるデータを加え, それらを統合して染色体再配列の総合的な検討を行った(文部省科学研究費)。

17. 培養細胞研究資源の高度化と研究資源基盤整備に関する研究

培養細胞の長期的保存のための「種」細胞の一部について再構築を実施した。月間 3~4 種類の細胞を対照にマイコプラズマ汚染が見いだされたものについては除去を実施した。ヒト細胞からのウシ下痢症ウイルス(BVDV)の除去

法を確立した。それに基づいて、ヒト由来細胞の培養については、変更可能な細胞については全て BVDV フリー血清に変更した（厚生科学研究費補助金事業）。

18. 細胞株の相互混入確認のための新たな実験手法に関する研究

ドイツの細胞バンク DSMZ より、我国で樹立された血管内皮系細胞株 ECV304 に疑問があるという連絡が平成 10 年 12 月に入った。緊急な課題として、これを確認すると同時に迅速に細胞株の確認を実施できる手法として新たに STR-PCR 法の導入についての検討を開始することとした。ECV304 のケースについては、確かに他の細胞の混入であること、それが有名な癌細胞 EJ-1, T24 と同じものであることを確認した。新規細胞ならびに培養時に確実に細胞がユニークであることを確認することが出来る細胞管理システムの確立が必須であることが指摘され、その構築に向けて研究を開始した。

19. 培養細胞株情報サーバー構築に関する研究

コンピュータによる培養細胞管理システムを更新し、Windows 上で扱えるようにし、細胞バンク管理業務の効率化を図った。細胞バンク情報を公開している WWW サイトを他のサイトとの連携をより緊密にとれるようにするため、基本システムをこれまでの全文データベースから、HTML を用いたスタイルに改めることとした。今年度のホームページへのアクセスは月間平均 1200 名に増加した（厚生科学研究費補助金事業）。

総合評価研究室

室 長 長 谷 川 隆 一

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。

広瀬明彦主任研究官は平成 9 年 5 月 1 日より継続して厚生省生活化学安全対策室化学物質専門官との併任として新規化学物質および既存化学物質の安全性試験結果の予備評価に従事している。平成 10 年 6 月 1 日付けで、小泉陸子技術補助員が就任し、OECD の評価文書作成の補助を行っている。

本年度は昨年度に引き続き、安全性生物試験研究センターの各部と連携して、化審法に基づく新規および既存化学物質の安全性評価および現在進行中の OECD 高生産量既存化学物質の安全性点検作業に関する業務を行っており、また研究面では環境化学物質および水道汚染物質の毒性評価に関する研究を行っている。

海外出張としては OECD 関連で、長谷川室長が OECD 主催の「第 10 回ナショナルコーディネーター会議」（平成 10

年 9 月、フランス）、「高生産量化学物質初期評価会議及び第 28 回合同会議」（平成 9 年 10～11 月、フランス）に出席した。また、鎌田主任研究官は、厚生省職員として、「第一回 POPs クライテリア専門家グループ会合」（平成 10 年 10 月）、「IPCS（国際化学物質安全性計画）における TDI の取り扱いに係わる国際的動向調査及び OECD における既存化学物質安全性点検計画（第 3 次点検計画）に係わる動向調査」（平成 11 年 3 月）のため出張した。

化審法 GLP の査察には、当室から 2 カ所、延べ 2 名が参加した。

業務業績

1. OECD 高生産量化学物質の評価文書の作成

1993 年から開始された OECD 高生産量化学物質安全性点検計画に関する業務として、本年度は 1998 年 3 月に開催された第 7 回初期評価会議において合意されたジフェニルクレジルリン酸、ジクロロペンタジエンおよび（1-メチルエチル）ベンゼンの評価文書を修正・完成させ、OECD 事務局に送付した。続いて、4 物質の評価文書案を作成・送付し、10 月に開催された第 8 回初期評価会議において討議した。そのうち合意の得られたベンジルクロライド、ペンタエリスリトールおよび 2,6-ジクロロベンゼンの 3 物質の評価文書を修正・完成させ、OECD 事務局に送付した。さらに、1999 年 7 月に開催される第 9 回初期評価会議に提出するための 8 物質の評価文書案を作成し、OECD 事務局ならびに加盟各国に送付した。

2. 新規化学物質の安全性評価業務

昭和 48 年 10 月 16 日制定され、昭和 49 年 4 月施行された「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」『化審法』は、難分解性・低蓄積性の性状を有する新規化学物質について、毒性試験（いわゆるスクリーニング毒性試験）実施を要求している。この試験結果から新規化学物質は、指定化学物質または白物質として公表されている。この試験結果の評価作業に協力するとともに、これら試験結果のデータベース化を行っている。平成 10 年度は計 242 の新規化学物質についての評価作業を行った。

3. 既存化学物質の安全性評価業務

1993 年から開始された OECD 高生産量化学物質安全性点検計画の業務に関連した化合物と国内独自の既存点検物質のスクリーニング毒性試験を、厚生省が国内の受託試験機関に委託している。これらの試験計画書の確認と最終報告書のピアレビュー及び評価作業に協力するとともに、これら試験結果のデータベース化を行っている。

4. 化審法の届出業務の電子化に伴う業務

行政改革の一環として、新規化学物質の届出業務を電子化することとなり、それに伴う新規化学物質の評価作業手順や新規化学物質データベースの変更作業に協力している。

5. その他（各種調査会等）

中央薬事審議会医薬品添加物調査会、残留農薬安全性評価委員会、医薬品 GLP 評価委員会、内分泌かく乱作用を指標とした農薬リスク評価法試験法検討会、ダイオキシン類の TDI 見直しに関するワーキンググループ、既存天然食品添加物の安全性評価に関する調査研究班会議、生活環境審議会水道部会水道管理専門委員会および化学物質安全性評価検討会〔環境庁〕の活動に協力した。

研究業務

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となる2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構築に関する研究

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 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。本システムは昨年度末で一応完成したが、本年度もさら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 36 品目、国内点検 38 品目について、急性毒性試験 37 件、28 日間反復投与毒性試験 38 件、反復投与毒性/生殖毒性併合試験 15 件、簡易生殖毒性試験 7 件、変異原性試験 2 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 1300 品目のデータを入力し、安全性評価作業に利用している。

2. 化学物質の乳幼児における毒性発現に関する研究

離乳直後の動物に対し、適切かつ可能な投与方法や投与期間の設定等の検討を行い、広範な種類の化学物質について、同一の化学物質の成熟動物に対する無毒性量と乳幼児に対する無毒性量を求め、この値や毒性変化を比較することにより、乳幼児における毒性発現の特性を把握するための研究を本年度から開始した。

3. ラット $\alpha 2\text{U}$ グロブリンの分析手法に関する研究

ラットを用いた毒性学的試験で、雄の腎臓の組織学的検査で特異的に見られる好酸性小体または硝子滴所見は、雄ラットのみが産生する $\alpha 2\text{U}$ グロブリンと化学物質複合体の蓄積により発現するとされている。そこで、 $\alpha 2\text{U}$ グロブリン抗体を作成し、それを用いた免疫組織化学的検討を行うため、雄ラットの尿から $\alpha 2\text{U}$ グロブリンを分離・精製し、

ウサギを用いて抗体の作成を行った。

4. 内分泌かく乱化学物質の毒性評価に関する研究

内分泌かく乱作用の検出法について文献調査し、まとめるとともに内分泌かく乱物質とされている化学物質のうち、特にヒトが暴露される可能性が高いビスフェノール A について、主に一般毒性、エストロゲン様作用、生殖発生への影響を文献調査し、評価した(平成 10 年度厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業:内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査研究:分担研究)。また、環境化学物質の内分泌かく乱作用について、日本油化学会、医薬品包装研究会および日本石油学会で講演するとともに、内分泌かく乱作用の検出法について食品衛生学雑誌で解説した。

5. 水道水に係わる毒性情報評価に関する研究

日本水道水質基準の中間見直しのために、アンチモン、ニッケル、ジオキサン、ジクロロ酢酸、抱水クロラル、ホルムアルデヒドの 8 物質について、最近 10 年間のすべての毒性関連情報を整理・評価するとともに、一般毒性、生殖・発生毒性、発がん性について耐容 1 日摂取量 (TDI) の提案を行った(平成 10 年度厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業:水道における化学物質の毒性、挙動及び低減化に関する研究:分担研究)。また、ジクロロ酢酸については、さらに詳細な再調査・評価を行い、水環境学会誌に公表した。

6. ダイオキシンの毒性評価に関する研究

平成 10 年 5 月に WHO で行われたダイオキシン類の 1 日摂取量 (TDI) の改定作業を受け、日本でも平成 8 年に暫定的に設定されたダイオキシン類の TDI の見直しを行うため、ダイオキシン類の実験動物に対する毒性影響を最新の知見を踏まえ再調査し、その毒性評価を行った。また、ダイオキシン類の毒性影響をまとめた総説を日本薬学会の会員誌及び日本トキコロジー学会誌に公表した。

7. 既存天然食品添加物の安全性評価に関する調査研究

平成 7 年度から始まった既存天然食品添加物の安全性評価の一環として、既存食品添加物名簿 489 品目中、安全性が確認されていない 139 品目について安全性試験成績を収集し、基本的な安全性評価が行われているが、当室ではこれら安全性試験成績のうち単回及び反復投与毒性試験の試験結果を評価しており、平成 10 年度は 10 品目について安全性評価を行った(平成 10 年度厚生科学研究費補助金 既存天然添加物の安全性評価に関する調査研究)。

医薬品医療機器審査センター

センター長 首藤 紘一

平成 9 年 7 月に設立された、医薬品医療機器審査センタ

一発足以来、国立衛研各部や厚生本省、医薬品機構など各方面のご支援をいただき、おかげで、平成10年度の審査センター業務はおおむね順調に推移した。審査体制については更に充実が図られることとなり、4月から新たに審査第三部が設置され苗村光廣部長が就任した。また、7月の人事異動により審査第一部に池谷壮一部長が、審査第二部に村上貴久部長がそれぞれ就任した。増員も12名が認められ、このため、4月から5月にかけて新人研修を行った。また、平成11年1月から2月にかけて、医薬品機構と共催で技術研修を行い、審査担当職員の専門知識のレベルアップを図った。

わが国の医薬品や医療機器の審査体制については更に充実強化を図っていく必要がある。平成11年度には審査第四部の設置や11名の増員が認められたところであり、新年度からは、さらに強化された陣容で適切に業務を執行していきたい。

また、平成11年中には審査関係の調査会は廃止される見込みであり、これにより本格的な内部審査体制が確立するとともに、審査における科学的評価の部分は名実ともに当審査センターが責任を負うこととなることから、一層気を引き締めて審査業務に当たってきたい。

企画調整部、審査第一部、審査第二部、審査第三部

企画調整部長	福 山 圭 一
審査第一部長	池 谷 壮 一
審査第二部長	村 上 貴 久
審査第三部長	苗 村 光 廣

概 要

医薬品医療機器審査センターにおいては、医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療用具について、その製造、輸入の承認や再審査、再評価のため、品目ごとに有効性、安全性及び品質の審査を行っている。新規性のあるものなどについては中央薬事審議会の調査会で審議が行われるが、調査会の事務局としての業務もその一環として行っている。

そのうち、企画調整部においては、承認や再審査、再評価申請書類の受付、審査を終了したものについて審査結果の厚生本省への送付、治験届や治験中の医薬品等に係る副作用症例報告の受理、審査支援情報の収集や審査官への提供等を行っている。品目ごとの審査の事務は審査第一部、審査第二部及び審査第三部において行い、このうち、審査第一部は、医療用新医薬品のうち、消化器官用薬、泌尿生殖器官用薬、腫瘍用薬、抗生物質製剤、化学療法剤、生物学的製剤などを、審査第二部は、そのほかの医療用新医薬品（循環器官用薬、中枢神経用薬、呼吸器官用薬、アレルギー用薬等）を、審査第三部は、医療用後発医薬品、一般

用医薬品、医薬部外品、化粧品並びに体外診断用医薬品及び医療用具を担当した。なお、平成11年度からは審査第四部が設置されることから、この分担は平成10年度限りのものである。審査第一部、審査第二部及び審査第三部においては、それぞれの分担に応じ、調査会の事務局業務を行った。

審査センターの設置に伴い、審査の仕方は調査会中心の外部審査から事務局中心の内部審査へ重点を移すこととされている。このため、薬学、医学、獣医学、統計学等各分野の専門知識を有する審査官がチームとなって審査を行うこととし、平成9年4月以降申請された新医薬品について順次審査チームを組織し、審査結果は審査レポートに取りまとめることとした。また、それ以前の申請品目についても専門分野を異にする複数の審査官で各調査会の担当を分担する体制を取っている。

審査センターにおいては、治験計画の届出や治験中の医薬品等についての副作用報告の受付を行っている。治験は届出制であり、あくまで治験の実施は治験依頼企業の判断と責任において行われるものであるが、審査センターとしても、主として安全性の観点から必要に応じ、企業に見解を照会したりコメントを行う形で注意喚起する等所要の対応を行っている。また、これらは審査に当たっての参考情報として適宜活用を図っているところである。

以上のほか、後発品の審査、海外も含めたGCP査察の実施、再審査・再評価関係の審査事務などもしっかり実施した。

業務実績

平成10年度における各業務の執行状況については次のとおりである。

製造又は輸入の承認申請について審査センターの審査を終了し、審査結果を厚生本省に送付した品目数は、医薬品、医薬部外品、化粧品及び医療用具の合計で9,200余に上る。これらは、更に本省において、必要なものは中央薬事審議会の各部会での審議を経て、最終的に承認の是非が判断され、必要な手続きが取られることとなるものである。

中央薬事審議会の審査関係の調査会は215回開催され、その全てに審査センター職員が事務局として出席した。

医薬品の治験については、計画の変更届（件数としてはこれが大半）などを含め4,007件の届出があった。また、治験中の副作用報告として10,854件の報告があったが、9割以上は海外のものであった。

承認申請品目のうち新有効成分であるものに係る臨床試験について、申請企業、医療機関合計で68ヵ所に対してGCP査察を実施した。

医薬品再審査については128品目、医薬品再評価については220品目の処理を行った。

大阪支所

支所長 岡田敏史
前支所長 野口衛

大阪支所の発展的改組による「国立厚生科学基盤技術開発研究所(仮称)(基盤研)の創設計画は、平成7年4月に試験研究機関の重点整備・再構築(案)として提起されたものであり、その後、同年度中にそのあり方に関する検討会が発足したものの、社会経済状況の急変により具体的な青写真づくりに至らないまま休眠状態にあった。平成9年度には厚生科学研究班が組織され、「厚生科学基盤技術調査研究」が行われる一方、「基盤研整備構想検討委員会」(座長:石井威望教授)が組織され、同年中に2回の検討会が開催され、基盤研の構想(案)がまとめられた。以上のような経過をたどりながら、この構想を具体化するための大きな動きは、平成10年度中みられなかった。

平成11年1月、行政改革推進本部による省庁付属試験研究機関のうち、独立行政法人化が望ましい機関がリストアップされ、国立衛研は対象外とされた。省庁再編の方向及び独立行政法人への移行組織が明確化される中で、半ば休眠状態にあった重点整備・再構築の動きが、平成11年4月以降、急に慌ただしいものとなってきている。平成12年度予算要求に向けて、再編成のための全体調整及びグループ別調整が急速に進められつつあり、平成11年度の早い段階で当初のグランドデザインに対する見直し(微調整)を完了させ、再構築へ向けて動き出そうとしている。

施設・設備等の改修工事関係では、老朽化した冷暖房設備の全面的な取り替え工事が行われた。これに付随して、懸案であった男子用トイレの改修工事も行われ、車椅子利用者に対する配慮もなされ、面目を一新した。

試験検査業務については、ヒトインスリン製剤に対する国家検査及び食用タール色素に対する製品検査が引き続き実施された。ただし、ヒトインスリン製剤に対する国家検査は、平成11年3月を以て2年間の検査期間を終了するが、1社については、前年度に不適合品を出していること及び製造施設の移転後1年余りしか経過していないことから、引き続き検査を継続することとなった。

平成10年度の国家検査、製品検査、標準品製造等についての大阪支所全体としての業務実績は、次のとおりである:医薬品の国家検査211件、食用タール色素の製品検査284件、一斉取締試験150件について実施した。このうち、製品検査及び一斉取締試験で各1件ずつの不合格品があった他は、すべて合格であった。また、標準品については、医薬品試験用34品目(6,441個)を製造した。

平成10年度の厚生科学研究費補助金及びHS財団の創薬

等ヒューマンサイエンス総合研究事業による研究費は、従来までの仕組みに代わり、公募による事前審査を経て決定されることになり、レギュレーションに関わる重要な研究課題だからといって、所内的な判断だけで容易に研究費を獲得できる状況でなくなっている。これらの研究費により、支所において実施された研究課題数は、厚生省特別研究2課題、厚生科学研究8課題、食品等試験検査費3件、HS振興財団受託研究3課題のほか、薬品試験部及び生物試験部は、医薬安全局監視指導課による「後発医薬品の再評価事業」への協力をを行った。それらの成果については、以下の支所各部による業務報告のとおりである。

研修指導は、大阪医療技術学園専門学校専攻科学生(3名、8ヶ月)に対して行われた。

なお、平成11年3月31日付けで野口衛支所長が定年退職し、引き続いて4月1日付けで岡田敏史薬品試験部長が支所長に就任した。また、薬品試験部長は岡田支所長が事務取扱をすることとなった。その他、大阪支所庶務課の人事異動は次のとおりである。

(11.3.31) 赤川俊彦 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構へ転出(庶務課課長補佐)

(11.4.1) 中島一登 総務部庶務課庶務係長(庶務課会計係長)

(11.4.1) 遠藤 薫 庶務課課長補佐(医薬安全局麻薬課総務係長)

(11.4.1) 栗野久子 庶務課庶務係長(庶務係主任)

(11.4.1) 松本竜希 採用

薬品試験部

部長(支所長事務取扱) 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性医薬品の高分子特性評価とそれらの応用に関する研究、エマルジ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、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機序の解明とそれに基づく薬物療法の最適化設計に関する研究、ヒト型試験系の確立に関する研究などを行った。

また、HS財団のヒューマンサイエンス基礎研究事業及び創薬科学総合研究事業は、平成10年度より一本化され、新たに創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業としてスタートしたが、この研究事業に1課題で参加したほか、厚生科学研究費補助金による医薬安全総合研究事業の3課題に分担研究者として参加し、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査が昨年度に引き続き行われ、件数は前年度に比べやや増加した。なお、ブドウ糖注射液及びリンゲル液の国家検査は、昨年3月末をもって終了し、今後は製薬メーカーによる製造者責任に基づく製造及び品質管理が行われることとなった。また、ヒトインスリン製剤の国家検査も1社については、本年3月末をもって終了し、他の1社については、最近になって不適品を出したことから、製造施設の移転があったことなどから、当面、国家検査を継続することとなった。

新規標準品として、バイカリン及びシュウ酸カルシウム一水和物の2品目を新たに設定した。

谷本室長は、WHOの臨時アドバイザーとして、不正医薬品の試験・検査技術の研修指導のため、タイ国に出張した（平成10年7月20日～30日、バンコク）。また、同室長はJICA専門家として中国の天津薬品検査技術プロジェクトの指導のため、中国に出張した（平成10年8月6日～9月30日、天津）。岡田部長は、韓国医薬品食品衛生研究所（KFDA）の招きにより同国に出張し、日本薬局方標準品の製造及び供給に関する現状紹介を行った（平成10年10月11日～14日、ソウル）。

業務成績

1. 国家検査

ヒトインスリン製剤の国家検査は208件あり、すべて合格であった。また、ブドウ糖注射液3件も、すべて合格であった。なお、ブドウ糖注射液の国家検査は、平成10年3月を以て終了しており、今回検査の対象となったものは、国家検査対象期間中に受け付けられていたものである。

2. 一斉取締試験

今年度の一斉取締試験は、後発医薬品の再評価事業の一環として行われることとなった。平成10年度の再評価対象品目とされたシメチジンなどβ-ブロッカー11件につき、崩壊試験又は溶出試験を行った結果、1件につき、溶出試験で不適となった。その他は、すべて合格であった。

また、後発品の多い注射液製剤137件につき、異物試験を行った結果、すべて合格であった。他に輸液製剤2件につき、浸透圧試験などを行った結果、すべて合格であった。

3. 標準品製造

33品目につき、合計4,041個の標準品の製造を行った。また、新規標準品2品目を新たに設定した：バイカリン、シュウ酸カルシウム一水和物。また、本年4月よりエピテオスタノールほか11品目の日局標準品の製造につき、(財)日本公定書協会への委譲を行った。

4. 国際協力

WHOからの依頼により、不正医薬品の試験検査・検査技術の指導を東南アジア諸国及び中国の技術者に対して行った。

また、国際協力事業団の天津薬品検査技術プロジェクトに協力した。

5. その他

中央薬事審議会の各種調査会における審議及び日本薬局方、日本抗生物質基準、日本薬局方外医薬品成分規格の改正作業（医薬安全局審査管理課）、指定検査機関に対する精度管理（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

(1) 医薬品の規格及び試験法作成に関する研究

(1)-1 日局一般試験法の改正及び新規設定に関する研究
日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正案を「浸透圧測定法（オスモル濃度測定法）」として提案し、局方調査会において審議された。その結果、ほぼ原案どおり承認され、内示案として公開された。

「粘度測定法」、「電気滴定法」及び「pH測定法」につき、改正案を作成し、局方調査会に提出した。現在、審議中であり、本年中に審議終了の予定である。

また、昨年に引き続き、生物薬品の品質評価のための「SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法」及び「アミノ酸分析法」の国際調和案の作成に協力した。

(1)-2 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バルミチン酸レチノール）含有製剤のHPLC法による迅速分析法案につき、東西技術委員会からの意見を考慮して再提案の結果、酢酸レチノール含有製剤及びバルミチン酸レチノール含有製剤の迅速分析法として承認され、都道府県宛通知された。

(2) 標準品の品質規格の設定に関する研究

(2)-1 ヘパリンナトリウム標準品及びバイカリン標準品の各候補品につき、生薬部及びその他の外部機関を含む複数機関での共同検定による品質評価を行い、それぞれ定量試験用の標準品として確立した。

また、シュウ酸カルシウム一水和物標準品の候補品につき、装置メーカー及び製薬メーカー等の計12機関での共同検定による水分含量の評価を行い、熱重量分析装置のための校正用標準品として新規設定を行った。

(2)-2 平成11年度新規製造予定のニコチン酸トコフェロール、スウェルチアマリン及びトロンボモジュリン標準品製造のための調査研究を行った。

(3) 情報理論に基づいた分析値信頼性評価手法の開発

UVを検出器とするHPLC分析においては、データの取り込み間隔を小さくするとベースのノイズは大きくなり、ピークの測定精度は、面積測定ではあまり影響を受けないが、ピーク高さの測定ではその測定精度は低下し、相対標準偏差（RSD）は大きくなった。また、検出器のレスポンスは、あまり測定精度に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(4) 医薬品の光学分割に関する検討

ヒヨスチアミンは、逆相系の光学分割カラムを用いることにより、良好な光学分割が可能となることを見いだした。これによりロートエキス製剤中のヒヨスチアミンの光学分割を試みたところ、製品間でラセミ化の度合いに若干の差異が認められたことから、植物体からの抽出又は精製過程でのラセミ化の可能性が示唆された。

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) 低分子量ヒアルロン酸の調製

高分子多糖性医薬品のヒアルロン酸は、水溶液中で超音波照射を受けることにより、低分子へと分解されることから、超音波分解を利用した低分子量ヒアルロン酸の調製を試みた。超音波照射によるヒアルロン酸の分解においては、ノンランダムな高分子鎖切断により分子量分布の小さい低分子化試料が得られること、超音波の強度あるいは溶液のイオン強度を調整することにより、意図した分子量を有する低分子量ヒアルロン酸を比較的容易に調製可能であることが示唆された(HS受託研究)。

(2) 酸性多糖類と医薬品との複合体生成

デキストラン硫酸とある種のカチオン性医薬品は、特異的な相互作用により、水溶液中で容易に不溶性微粒子を形成することを見いだした。また、脂溶性の高いテトラサイクリン類は、水溶液中で酸性多糖類と複合体を形成し、カルシウムなど2価の金属イオンの存在下では、熱可逆性のゲル構造体を形成することが明らかとなった(HS受託研究)。

3. 分散系製剤の品質評価とその有効利用に関する研究

脂質分散系製剤の品質評価法として¹³C-NMRによる観察を行い、これまでの蛍光評価法による結果と比較した。その結果、NMR法を用いることで、蛍光法では困難であった原子サイトレベルでの粒子構造の評価が可能であることが示唆された。また、NMR法によって明らかとなった粒子構造の違いとエマルジョン製剤の保存安定性及び血中消失挙動との関連性についても検討を行い、粒子表面脂質だけでなくコア脂質の構造の重要性を初めて明らかにした。

4. 創薬基盤技術の開発に関する生物化学的研究

(1) 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

培養シュワン細胞にはアルドース還元酵素(AR)及びソルビトール脱水素酵素(SDH)のmRNAが発現しており、培地中のグルコース濃度はARmRNAの発現に影響を与えなかったが、浸透圧の上昇が、ARmRNAの発現を誘導することを明らかにした。

(2) ヒト型試験系に関する研究

129/SVJマウス由来遺伝子ライブラリーから、マウスARcDNAをプローブとしてAR遺伝子をクローニングし、

塩基配列を決定し、制限酵素地図を作製した。また、マウス遺伝子を欠損させていたヒトAR遺伝子を発現するノックアウトマウスを作製するためのターゲティングベクター構築のための設計図を考案した。

(3) 糖尿病合併症の発症機序の解明とそれに基づく薬物療法の最適化設計に関する研究

糖尿病性神経障害の発症機序の一つとしてのポリオール経路は、末梢神経シュワン細胞で強く発現しており、培養シュワン細胞を用いた実験から、AR阻害剤が高血糖下でのポリオール代謝を是正することが示唆された。この結果から、AR阻害剤による薬物療法は、生体内ARレベルを指標として投与設計することが重要と考えられた。

食品試験部

部長 外海 泰秀

概要

昨年に引き続きタール色素及びレーキの製品検査、輸入食品検査、残留農薬の分析等に関する研究、食品添加物等の安全性に関する研究、新開発食品等の安全性確保に関する研究などを行うとともに、新たに内分泌かく乱物質の食品・食器からの暴露に関する調査研究を行った。

人事面では平成11年3月末で松村郁子技術補助員が退職し、同年4月1日付けで天倉吉章研究員、開原亜樹子技術補助員が採用された。

海外出張では外海泰秀部長が平成10年8月2日より7日まで英国・ロンドンで開催された第9回農薬化学国際会議に、石光進及び辻澄子室長は平成10年9月13日から17日にカナダ・モントリオールで開催された第112回AOAC国際会議に、吉井公彦研究員は平成11年3月20日から25日に米国・サクラメントで開催された第11回カリフォルニア残留農薬ワークショップにそれぞれ参加し、発表した。また外海泰秀部長は平成11年3月14日から20日までフィリピン農薬モニタリング体制改善計画の運営指導調査団としてマニラへ出張した。

業務成績

1. 製品検査

タール色素及びタール色素レーキ284検体(平成10年4月1日～平成11年3月31日)について検査を行った。食用黄色5号の1件が他の色素の項で不合格となった。

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

食用タール色素のヒ素試験法への水素化物-ICP発光分析法の適用を検討した結果、還元気化-原子吸光法の感度

と同等であり、測定時間の短縮が可能であることが明らかになった。本法を用いて市販食用タール色素中のヒ素含有量を調査した結果、いずれも規格値の十分の一以下であった。

(2) 食品中の添加物の分析法に関する研究

食品中の食品添加物分析法に記載されている添加物のうちの5品目(クエン酸イソプロピル, dl- α -トコフェロール, 過酸化水素, 亜硝酸ナトリウム, 硝酸カリウム及びナトリウム)の分析法を、有害試薬を極力回避した第七版食品添加物公定書に従って改正した。

(3) 化学的合成品以外の食品添加物の規格基準に関する研究

第7版食品添加物公定書に記載された既存添加物であるd- α -トコフェロール及びミックストコフェロールについて、高速液体クロマトグラフィーを用いた分析法を作成した。

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

エマメクチン安息香酸塩及びその代謝物(アミノ体, ホルミルアミノ体, N-メチルホルミルアミノ体, 8,9-Z 異性体)の蛍光誘導体化HPLCによる一斉分析法を作成した。本法では数種の固相抽出カラムを連結し、迅速に試験を行えるよう工夫した。大根については蛍光化阻害物質のあることが分かったので、より厳密なクリーンアップが必要であった。本法を各種農作物に適用したところ、良好な結果を得た。

(2) 農薬告示分析法見直しに関する研究

フルスルファミド, ベンタゾン, イナベンフィドの告示分析法の改訂法を提案した。上記3農薬の現告示法では抽出に有害溶剤ジクロロメタンを使用し、誘導体化後GCで個別に分析する方法となっている。提案法では抽出にアセトニトリルを用い、穀類ではヘキサンで洗浄・脱脂後シリカゲルカラムでクリーンアップし、HPLCで同時測定した。一方、野菜ではアセトニトリル抽出液を食塩飽和リン酸緩衝液と振り混ぜて水層を分離後、シリカゲルカラムでクリーンアップし、HPLCで同時測定した。本法を米・あぶらな科野菜を中心とした基準設定農作物に適用し、良好な結果を得た。

(3) 残留農薬の超迅速分析法開発に関する研究

平成9年度残留農薬迅速分析法開発で検討された方法の農作物への適用性について検討し、その問題点を明らかにした。本法は検討農薬に対しておおむね良好な適用性を認めたが、対象農薬が多数であるためGC/MSのデータ解析に時間を要した。そこで、対象農作物ごとにSIMスケジュールを作成し、その作物の規制対象となっている農薬だけを測定することを提案した。

3. 輸入食品検査に関する研究

輸入農産物の試験方法に関する調査研究では穀類中残留農薬の分析における各種脱脂法の比較検討を行った。穀類中の残留農薬を分析するには脂質が妨害するため、それを除去することが重要な問題となる。脂質の除去法として超臨界流体抽出(SFE)法、ヘキサン/アセトニトリル分配法、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)法並びに固相抽出ミニカラム法を検討し、その優劣を比較した。また、農作物中各種農薬をSFE抽出、GPC精製した後、GCまたはHPLCで測定する、多成分一斉分析法を作成し、輸入農作物に適用した。

4. 新開発食品等の安全性の確保に関する研究

フラボノイド化合物の生体内抗酸化能及び脂質代謝を指標とした安全性評価に関する研究では、5週令のWistar系雄性ラットにケルセチンまたはルチンを0.01-1.0 g/kgの用量で3週間連続経口投与し、血清及び肝臓中の脂質含量及び血清TBARS値及び遊離フラボノイド濃度を測定した。対照群に比べ血清トリグリセライド濃度がルチン1.0 g/kg投与時にのみ有意に減少した以外は、脂質含量には有意な影響は認められなかった。血清TBARS値は用量依存的に減少し、血清遊離フラボノイド濃度と負の相関が認められた。

5. 内分泌かく乱物質の食品・食器からの暴露に関する調査研究

(1) フタル酸エステル類の暴露に関する調査研究

内分泌かく乱作用が疑われているフタル酸エステル類12種の食品中含有量を測定するために、バックグランドを低減化しGC/MSを用いた高感度一斉分析法を作成した。3ヶ所の地方衛生研究所と共同して同一試料を用いた分析及び添加回収実験を行った結果、回収率はd-体標準品で補正することによりほぼ均一な値が得られたが、一部の分析値には機関間で差が見られた。

(2) 食品中の植物エストロゲンに関する調査研究

9種植物エストロゲンの大豆及びその加工品中の含有量を、フォトダイオードアレイ検出器付きHPLCで測定した。酸加水分解したものを総量とし、酸加水分解しないものをgenuineとして算出した。その結果、食品の加熱処理や発酵により、加工食品中の遊離型の割合が増加した。大豆及びその加工品から植物エストロゲンの日本人の一日摂取量は、遊離型として約27.75 mgと推定された。

生物試験部

部長 川島 邦夫

概要

前年度に引き続き、医薬品の規格及び分析法に関する研究、天然由来医用材料の生物学的安全性評価に関する研究、

胎児毒性の発現に関する研究, 化学物質の生殖細胞形成および受精能に及ぼす毒性学的研究, 既存化学物質の生殖毒性発現に関する研究, 内分泌かく乱化学物質等, 生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査研究, タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究, 医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究, ビスフェノール A, ゲニステイン等の繁殖影響及び体内動態に関する調査研究, 細胞周期の制御機構に関する研究などを行った。ヒューマンサイエンス振興財団による「培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究」, 同財団による「アトピー性皮膚炎自然発症 (NC) マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製」, 厚生省特別研究の「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」に参加し, それぞれ成果を上げた。

海外出張は, 江馬 真第二室長が米国での毒科学会第38回年会(平成11年3月13日~20日, ニューオリンズ)でジフェニルスズのラットにおける胚致死作用についての成績を発表した。

人事面では平成11年4月1日から田中寿一技官が代謝生化学部との併任を解除された。

業務成績

1. 国家検査

インスリン製剤 208 件(生物試験, 無菌試験), ブドウ糖注射液 3 件(発熱性物質試験, 無菌試験)で, 全品目とも合格であった。

2. 一斉取締試験

後発品の多い注射剤 137 件(発熱性物質試験, 無菌試験)および輸液製剤 2 件(発熱性物質試験, 無菌試験)を行い, 全品目とも合格であった。

3. 標準品製造

エンドトキシン標準品 2400 個を製造した。

4. その他

前年度に引き続き日本薬局方の改正(薬務局研究開発振興課), 特にエンドトキシン試験法の改正案及び国際調和案作成に協力した。

研究業績

1. 発熱性物質に関する研究

i) 医薬品の規格及び分析法に関する研究

局方エンドトキシン試験法の国際調和に向けて, 日局試験法の見直しを行った。また, 低含量エンドトキシン標準品(エンドトキシン 100 標準品)を新規に設定した。

ii) 天然由来医用材料の生物学的安全性評価に関する研究

ラテックス製医療用具の使用により惹起される発熱の原因について追究し, エンドトキシン汚染が主たる原因であることを明らかにした(厚生科学研究補助金)。

2. 医薬品等の有効性, 安全性に関する研究

i) 胎児毒性の発現に関する研究

(1) 可塑剤として使われている dibutyl phthalate (DBP) をラットの妊娠後半に投与したところ, オス胎児の肛門一生殖器間距離が短縮し, 精巣下降不全が観察され, DBP の内分泌攪乱作用が示唆された。

(2) 船底の防汚剤として使われてきた tributyltin chloride をラットの妊娠初期に投与したときに観察される着床阻害作用と飼料摂取量との関係について検討したところ, 着床阻害は, 摂餌量減少ではなく, 投与された TBTCI そのものによって惹起されることが明らかになった。

(3) triphenyltin chloride をラット胎児の器官形成期に投与して発生毒性について検討したところ, 奇形胎児の発現が有意に上昇することにはなかったが, 着床後の胚死亡率の上昇が認められた。

ii) 培養細胞を用いた発熱性物質のインビトロ試験法の開発に関する研究

新規試験法開発の第一段階として, 発熱性物質に高感度に応答するヒト単球細胞株をクローニングした。また, 同細胞株の指標細胞としての有意性, 有用性を検証するための実験に着手した(HS 振興財団受託研究費)。

iii) 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

tributyltin chloride (TBTCI) を偽妊娠ラットに投与したところ, 脱落膜反応を抑制することが明らかになり, TBTCI による着床阻害との関連が示唆された(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)。

iv) 化学物質の生殖細胞形成に及ぼす毒性学的研究

Diethylstilbestrol を妊娠後期のラットに投与した場合, 雄の精子形成過程を障害するだけでなく, 雌胎児の男性化を惹起することが明らかとなった。

v) 化学物質の受精能に及ぼす毒性学的研究

α -chlorohydrin を雄ラットに投与し, 精子の受(授)精能を自然交配の成績とハムスター卵貫通性試験の成績を比較検討した結果, ハムスター卵貫通性試験の受(授)精率は, 自然交配による受(授)精率より高かった。

vi) 内分泌かく乱化学物質等, 生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査研究

ラットの妊娠初期に投与した DBP による胚致死作用は妊娠母体の生殖機能に対する悪影響を介して発現することを示唆した(厚生科学研究費補助金分担研究: フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究)。

vii) タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究

妊娠ハムスターに喫煙負荷を行ったところ, 胚致死率及び外表奇形発現頻度の上昇は認められないことを明らかに

した（厚生科学研究費補助金分担研究：タバコの喫煙による次世代への影響）。

viii) 医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究

DBP をラットの妊娠後半に投与したところ、オス胎児の肛門一生殖器間距離が短縮し、精巣下降不全が観察され、DBP の内分泌攪乱作用が示唆された（厚生科学研究費補助金分担研究：フタル酸エステル等の発生毒性）。

ix) ビスフェノール A、ゲニステイン等の繁殖影響および体内動態に関する調査研究

ビスフェノール A 及びゲニステインのラット二世世代繁殖試験のための文献調査を行い、試験計画書を作製し試験を実施中である（厚生科学研究費補助金分担研究：ビスフェノール A 及びゲニステインのラット二世世代繁殖試験）。

x) ヒノキチオールラットのラットにおける催奇形作用に関する研究

ラットの胎児器官形成期にヒノキチオールを投与したところ、高投与群において母体重増加抑制、摂餌量低下、胎児体重低下、胚死亡率上昇等が惹起されることを明らかにした（厚生科学研究費補助金）。

3. 創薬研究及び創薬研究資源の開発に関する研究

i) 中枢神経系幹細胞の増殖と分化に関する研究

ラット胎生 12 日胚神経管より調製した神経上皮細胞を低カルシウム無血清培地で培養すると、神経及びグリア細胞への分化が誘発された。これに対して、カルシウムフリー無血清培地中で培養すると神経細胞への分化は維持されず、上皮細胞様の形態を示す細胞のみが残った。以上の観察より、神経細胞の形態形成および維持にカルシウムイオンが重要な役割を持つことが示唆された。

ii) 細胞周期の制御機構に関する研究

がん細胞に対するインターロイキン 1 の増殖抑制作用の分子機構について検討し、細胞周期の進行を負に制御する CDK インヒビター p21 Cip1 が関与していることを明らかにした。

iii) アトピー性皮膚炎自然発症 (NC) マウスを用いた皮膚掻痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製

NC マウスおよび対照マウス (Balb/c その他) の皮膚構成細胞 (ケラチノサイト、繊維芽細胞等) の採取方法および培養諸条件の検討を行った。また、各構成細胞の同定法を確立した (HS 振興財団受託研究費委託研究：NC マウス皮膚構成細胞 (ケラチノサイトおよび繊維芽細胞等) の培養系の確立；日本オルガノン、富山医科薬科大学、鐘紡)。

北海道薬用植物栽培試験場

場 長 柴 田 敏 郎
前場長 畠 山 好 雄

概 要

平成 11 年 4 月 1 日付で、畠山好雄場長が筑波試験場長に配置替えになり、後任として筑波試験場の柴田敏郎栽培研究室長が着任した。

研究業務としては、厚生省医薬安全局麻薬課の委託研究である「けしの直接抽出法に関する研究」、厚生省健康政策局研究開発振興課の委託研究である「薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験」、厚生科学研究費、ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業による「薬用生物資源の分布調査とその活用に関する研究」を実施し、各報告書及び指針案を提出した。

研究生の受け入れとして、大阪大学薬学部の竹田経子氏が薬用植物の採種と植物園の冬期管理の準備作業に関する研修のため、平成 10 年 10 月 4 日から 9 日まで研修を行った。

業務成績

1. 種子交換

採取 266 種 (筑波試験場へ送付)

受け入れ 25 件 76 種

分譲 31 件 42 種

2. 指導業務

けしの講習会が平成 10 年 8 月 27 日に名寄市保健所で開催され、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. けしのあへん多収穫技術の開発

前年度までに、セル苗の育成による移植栽培法を確立したが、今年度は引き続いて、トレイの種類があへん収量に及ぼす影響を 5 種類のトレイを用いて比較検討した。その結果、ペーパーポット区の収量が最も高く、従来の直播法よりも高い収量が得られ、前年度までの結果を確認するとともに、セル苗による移植栽培法の実用性が明かとなった。

2. けしの直接抽出法に関する研究

朔果およびアルカロイド収量に及ぼす、栽培形態 (セル苗利用による移植及び直播栽培の比較)、機械による培土、腋芽の切除ならびに収穫期の影響について検討した。その結果、本実験においては朔果収量は直播栽培が高かったが、アルカロイド収量は移植・直播栽培間では差は認められなかった。また、アルカロイド収量は、完熟期における朔果の収穫により高まることが判明した。なお、腋芽の切除や

機械培土の効果は、本実験においては認められなかった。

3. 薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験
トリカブトの植付け時の種根重量が、母根・子根収量に及ぼす影響について、2系統・6試験区(2.0~19.4g)を設定して検討した。栽培1年目における結果では、地上部乾物重・母根・子根収量は種根が大きくなるにつれて増大する傾向が認められたが、10.5~13.4g以上では差は認められなかった。

4. トウキの新品種育成に関する研究

トウキの栽培生産においては、栽培2年目における抽苔を抑制することが必要である。本種は冬期の低温に感応して花芽が誘導され抽苔に至るため、本州で育成された系統は北海道においては抽苔が起りやすく、抽苔耐性を有した(難抽苔性)品種が求められてきた。1980年に導入したヤマトトウキを母本として9世代選抜を繰り返して育成した系統について、新品種審査基準にもとづく特性調査を実施した。その結果、育成された品種の個体間変異は、各形質ともに従来の系統に比べ極めて小さかったが、抽苔性については従来の系統とほぼ同程度の結果となり、抽苔耐性形質の獲得は不十分であると考えられた。

筑波薬用植物栽培試験場

場長 畠山好雄
前場長 西孝三郎

概要

人事面では、平成11年3月31日を以って西孝三郎前場長が定年退官され、後任に畠山好雄北海道薬用植物栽培試験場長が同年4月1日付けで着任した。また、同日付けで柴田敏郎前栽培研究室長が北海道薬用植物栽培試験場長に転任となり、その後任に細川敬三技官が就任した。

本年度の施設整備としては、研究本館の冷暖房配管工事を昨年に引き続き、筑波研究施設特別整備費で行った。また、温室3棟の中1棟は建替え、1棟は開閉装置および暖房用配管の更新を、当所施設整備費で実施した。

研究業務としては、(財)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で、「薬用植物の種に特異的な機能の分子生物学的解析」および、「植物バイオテクノロジーによる次世代薬用資源の開発に関する研究」を行い、厚生科学研究費補助金により、「薬用植物の遺伝的・形質的多様性の極長期保存技術構築に関する研究」、「薬用生物資源の保存及び保護に関する研究」を実施している。他に、厚生省医薬安全局麻薬課の委託研究「けしの直接抽出法に関する研究」、同健康政策局研究開発振興課の委託研究「薬用植物栽培・品質評価法に関する試験」も継続している。今年、突発的に、中国から麻黄の輸出禁止が

うちだされ、これに対処するため、5栽培試験場・3大学・1県立試験場にて「マオウの国内栽培に関する研究」を開始することにした。

実習生の受け入れとしては、JICAから派遣された武田恵枝氏が平成10年5月11日から6月12日まで海外青年協力隊の事前研修として、さらに、宮崎県農政水産部から派遣された本山宏氏が平成10年10月1日から11月30日まで研修をそれぞれ終了した。千葉大学からの研究生東野薫氏は平成9年4月1日~研修中で、筑波大学からの研究生中尾伸子氏は平成11年3月31日で研修を終了した。なお、科学技術庁から派遣されている科学技術特別研究員のDr. Mia Md Wahiduzzaman及びヒューマンサイエンス財団から派遣の流動研究員南基泰氏は前年度に引き続き、栽培研究室で研究に当たっている。

平成11年3月2日、本所第一会議室において、寺尾所長・齋藤副所長・長田総務部長・佐竹生薬部長出席のもと、平成10年度薬用植物栽培試験場業務打ち合わせ会議を開催し、同10年度研究業務・11年度研究計画を報告、討論した。平成10年7月7日には第8回薬用植物栽培技術フォーラムをつくば市の科学技術庁研究交流センターにて開催し、岩尾総一郎研究開発振興課長・糸川秀治東京薬科大学名誉教授・野呂征男名城大学教授・山岸喬北見工業大学教授・水上元 助教授の招待講演及び3試験場の研究報告を依頼した。

海外出張は、柴田敏郎栽培研究室長が平成10年10月8日~16日まで中国に赴き、延辺大学薬学院において栽培・調製の技術指導に当たった。また、下村講一郎育種生理研究室長が同年11月5日~8日まで韓国に赴き、大韓民国植物組織培養学会において特別講演を行った。

業務成績

種子保管数(貯蔵庫)

交換用種子保管数

入手種子数	823点
分譲種子数	5175点
種子目録配布数	75ヶ国 431機関

研究業績

1. 薬用植物の栽培に関する研究

(1) 茵陳蒿生産に関する研究—エコタイプ

カララヨモギにはほふく型と直立型があり、ほふく型は海岸にのみ分布し、直立型は河岸を主とし、内陸部の人為的攪乱地・道路脇・山道法面・海岸などにも分布がみられた。両草姿型の区別は、筒状花冠が完全に開花し花粉が飛来するまでの時期ならば、頭花のサイズや形状から可能であるが、それ以降になると、判別は不可能であった。

2) 石川県手取川のエコタイプ

石川県美川海岸及び手取川河口から14.5km上流までの9地点で自生調査を行った。その結果、海岸の集団は全てほ

ふく型であり、河岸のものは直立型であることが確認されたが、河口付近では中間的草姿の株が見出され、自然交雑の可能性が示唆された。RAPD 分析によっても、集団間及び集団内で遺伝的多様性が認められ、同一水系内で集団間の遺伝子交流が起こっていることが推測された。

(3) カワラヨモギとオトコヨモギの自然交雑について

両種の自然雑種が生薬中に混入した際の鑑別に資するため、両種および自然雑種の開花の早晚性・頭花の形態・成分含量の比較を行った。自然雑種はカワラヨモギとオトコヨモギの混生集団中に自生し、葉の形は中間的特徴を示し、染色体数もカワラヨモギ $2n=18$ 、オトコヨモギ $2n=36$ に対し、 $2n=27$ であった。カワラヨモギの頭花の長さや幅はオトコヨモギ、自然雑種より有意に小さかった。また、オトコヨモギと自然雑種では筒状花冠裂片部に分泌嚢が確認できた。頭花中の CAP 及び DME 含量はカワラヨモギが各 0.02~0.69、0.03~1.52% であるのに対し、他の 2 種は trace であった。

2. *Scutellaria* 属植物の DNA 解析

PCR 産物として 95 種類のバンドが検出された。この中、種特異的バンド 26 本を 8 種類のプライマーから確認できた。特に、プライマー A-02 では *Scutellaria* 3 種各々に特異的なバンドを同時に確認できた。

rpl16 領域と PS-ID の塩基配列を各 400bp と 121bp に決定した。その結果、前者の領域で 5 ケ所、後者の領域でも 5 ケ所の塩基が異なっており、検討した 5 種 (*S. altissima*, *S. baikakensis*, *S. galericulata*, *S. incana*, *S. lateriflora*) は塩基配列の相違から識別可能であった。また、rpl16 の塩基配列情報から作成した系統樹による 5 種の類縁関係を明らかにした。

3. 薬用植物の超低温保存に関する研究

多くの植物においては 0.3M しよ糖を含む培地で前培養が行われているが、ムラサキ培養細胞では、前培養を行わずに保存処理を施した細胞に解凍後、再生が認められ、前培養後保存処理を行うと再生しなかった。ガラス化液処理温度及び時間については、0℃よりも 25℃処理の方が再生が良好であり、最適処理時間はクローンにより異なっていた。シコニン高生産株は非生産株に比べ、長い時間のガラス化液処理 (25℃, 15 分間) が良好であり、非生産株は 10 分以上処理を行うと解凍後、再生が認められなかった。

4. ペパーミント培養シュートにおける香り成分及びコーヒー酸誘導体の生産

ペパーミントシュート培養中の光条件と物質生産の関連を検討した。シュート (ca. 7mm, 約 0.04g) を 4000lux・16 時間照明下で培養した場合、約 1 週間で発根し、3 週間で過ぎると草丈 10cm 以上になり、6 週目には新鮮重量 0.3g に達した。香り成分は、培養 1 週目では主成分として carvone が生産され、他に menthone, pulegone も極微量生

産されたが、親植物の主成分である menthol は全く認められなかった。また、コーヒー酸の 2 量体である RA は生産されたが、3 量体の LA および 4 量体の LAB は検出されなかった。

一方、暗黒条件下で培養されたシュートは葉の展開が認められず、白色で細長く伸長し、6 週間の培養でも新鮮重量 0.02g までしか生育しなかった。その香り成分は、carvone のみが培養開始直後から極微量検出されただけである。コーヒー酸誘導体は培養期間中 RA のみが生産され、その含量は 16 時間照明と同様の値であった。

暗黒下で 3 週間培養したシュートを 16 時間照明に移すと、白色の幼植物は培養開始 1 日目で緑化が始まり、5 日目には葉数 4 枚以上に増加した。しかし、香り成分は carvone のみであり、含量も 16 時間照明に比べ非常に低い物であった。コーヒー酸誘導体は RA のみが検出され、暗黒下から照明下に移しても含量変化は少なく、その生産に対し光照射は必ずしも重要因子ではないようである。植物体は土壌移植後順調に生育し、7 週間で平均 2.5g 以上に増加した。香り成分は主成分が carvone であることに変わりはないが、移植後 3 週間になると、ペパーミントの主成分である menthol の生産も始まり、コーヒー酸については、RA の他、5 週目には 3 量体である LA の生産も認められた。

伊豆薬用植物栽培試験場

場 長 飯 田 修

概 要

平成 10 年 4 月 1 日をもって、当場は創立 50 周年を迎えた。記念事業として、記念誌「五十年史」を作成し、関係機関及び関係者に配布した。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金によるヒトゲノム・遺伝子治療研究事業「薬用生物資源の分布調査とその活用に関する研究」を受け、北海道及び青森県における野生トウキの自生地調査並びに沖縄県西表島の植生調査を行った。また、厚生省健康政策局研究開発振興課の委託研究である「薬用植物栽培・品質評価指針」に関する栽培試験を行い、「クコ」の報告書を提出した。

研究員の受け入れとしては、科学技術振興事業団の科学技術特別研究員である高上馬希重氏は、前年度に引き続き研究活動を継続している。

機器の購入については、所内大型機器購入費により DNA 解析装置 (超低温冷凍庫、遺伝子増幅装置、微量高速遠心機、電気泳動撮影装置) を導入した。

施設整備関係では、場長官舎の屋根瓦葺き替え工事を所内施設整備費で行った。9 月 16 日の台風 5 号の強風により、第 1 及び第 2 温室のガラスが合計 9 枚破損し修理した。ま

た、8月12日午後7時から27時間にわたり南伊豆町全域が停電し、施設や機器には直接的な被害はなかったものの、冷凍・冷蔵庫、気象観測装置や自動警備機能などが停止し、業務に大きな支障をきたした。

生薬標本の受け入れについて、生薬部より約500点、大阪支所の仲介により、厚生省医薬安全局監視指導課大阪神戸薬事専門官事務所より約400点の標本が寄贈された。

業務成績

1. 種子交換

採種 194種(筑波試験場へ送付)

内訳 野生植種 104種

標本植物 83種

温室植種 7種

受入 74件 122種

分譲 23件 33種

本年度の主な導入植物は、シナジンコウ *Aquilaria sinensis* Gilg(栽培種)、野生トウキ各種、ウコン属各種(栽培種)、カラスビシャク各種(栽培種)などであった。

2. 指導業務

平成10年8月28日、会場において耕作者及び関係機関に対するケシの講習会を行った。本年はあへん収納日に合わせ実施した。

3. 薬用植物の自生地調査

上記自生地調査のほか、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。

研究業務

1. あへん滲出量と蒸散量の関係

ケシ未熟果実を切傷した時にしみ出るあへん量の多少は、植物体内の水分状態に大きく影響を受けるとの予測を基に、ケシ果実における蒸散量とあへん量の関係を検討した。

蒸散量の測定は、切傷直前の未熟果実をビニール袋で被い強制的に蒸散させ、その水分量を脱脂綿で捕捉して行った。処理は日光下の日中と夜間にそれぞれ異なる個体で行い、その後にあへんを採取し、両者の関係を求めた。

その結果、いずれの処理条件下においても、あへん量と蒸散量との間には一定の関係が見られなかった。今後、自然状態下での蒸散量の測定あるいは植物体内の水分状態を直接的に測定し、両者の関係を再検討したい。一方、あへん中のモルヒネ含量は袋掛けにより高くなる傾向が認められたため、この点について次年度に詳細に検討する予定である。

2. チンネベリーセンナの1年生植物の生育と成分

センナの国内生産の可能性を探るため、チンネベリーセンナを用い、1年生植物の生育と成分を明らかにするため栽培試験を行った。

検討項目として、圃場への定植時期、施肥量及び生産性に関わる生長要因の解析を設定した。

加温温室下で播種、育成した幼苗を用い、時期を変えて圃場に移植した結果、5月15日以降の移植が良好であった。それ以前の移植では活着率が極めて低かった。しかしながら、早期定植で活着した株のその後の生長は順調であった。施肥量の効果は明確に確認できず、むしろ地力や圃場の位置による影響が大きいように思われた。すなわち、植物体の生長量は圃場周辺部で大きく、中央部で小さい傾向が観察された。

無肥料条件下で栽培した株群から生長量が極端に異なる大小株を選び、生産性に関わる要因を検討した結果、両者の分枝数が大きく異なること、また1株当たりの収量に寄与する第一次分枝の占める割合が大きいことから、収量を高めるためには第一次分枝の発生を多く促す栽培法が必要であった。

小葉の総センノシド含量は、施肥量により異なり0.4～16.4mg/gのばらつきが見られた。今後施肥量条件をはじめ、収穫時期、部位別及び収穫後の乾燥条件とセンノシド含量の関係さらには検討する予定である。

また、作業上の問題として、センナの収穫目的部位は小葉であるため、収穫作業は手作業に頼らざるを得ず困難であった。収穫後の調製作業が栽培の普及を妨げる大きな要因になりうると懸念された。

和歌山薬用植物栽培試験場

場長事務取扱 三瀬 勝利

前場長事務取扱 斎藤 行生

概要

人事関係では、平成10年7月1日付けで酒井英二研究員が筑波試験場から配置換えとなった。同年9月1日付けで物品供用官が宇都作業員から酒井研究員へ、同年10月1日付けで出納員が赤川課長補佐(大阪支所)から酒井研究員へそれぞれ引継がれた。平成11年3月31日付けで、場長事務取扱斎藤行生副所長が定年退官され、同年4月1日付けで三瀬勝利副所長が場長事務取扱として就任した。また、酒井英二研究員は同日付けで主任研究官となった。

施設関係では、台風7号、10号により、敷地西側フェンスが倒壊し、作業舎でも瓦が飛び、壁に穴が開き、ドアが吹き飛ばす等の被害を受けた。無加温ガラス温室は、骨組みに歪みが生じ1/3近くのガラスが割れた。台風被害復旧として、西側フェンスの撤去および設置、作業舎の修繕、温室の改修工事を行った。また、庁舎内の照明器具、コンセントの増設を行った。

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調査を行い、「キハダ」の報告書を提出した。平成10年7月の薬用植物栽培

技術フォーラムにおいて、『カワラヨモギ』について、同年9月の生薬学会では漢薬『羅布麻』について、平成11年3月の薬学会では『センナ茎』について研究報告を行った。

研究備品については、平成10年7月に筑波試験場より顕微鏡システム、実体顕微鏡システムおよび顕微鏡写真撮影装置の供用替えを行った。

気象関係では、台風の直撃があり、施設及び栽培植物に被害を受けた。

平成10年9月21日 台風8号 田辺市上陸（近隣市）

最大瞬間風速 11.4m/s 総降雨量 29.5mm

平成10年9月22日 台風7号 御坊市上陸（当场直撃）

最大瞬間風速 51.7m/s 総降雨量 77.5mm

平成10年10月17～18日 台風10号 関西地方通過

最大瞬間風速 42.1m/s 総降雨量 91.5mm

その他では、敷地北に隣接する民地との境界問題が表面化した。足立施設係長に来和頂き、川辺町役場立会いの上で、民地所有者との話し合いがもたれ、十数年来に渡るわだかまりを解消し解決した。

業務成績

1. 種子（種苗）交換業務

採種 57種（筑波試験場に送付）

導入 5件 11種

分譲 8件 32種

2. 指導業務

見学者は、年間で275名余りを数えた。おもに団体見学であり、毎回スライドを使用して1時間程度の講義を行った。

電話等（E-mailを含む）により、植物の利用に関して（18件）、栽培に関して（10件）の問合せがあった。

野口前場長が中心となり当試験場を活動の場としてきた地元住民サークル「薬草を食べる会」は、その事務局を試験場より独立させた。

和歌山県薬用植物調査研究委員会に参加し、薬草栽培のあり方について意見を述べた。

3. 薬用植物の調査

キハダの収穫に立ち会い、栽培管理、収穫方法等について実地調査を行った。

研究業績

1. 薬用植物栽培・品質評価指針に関する研究

栽培キハダ林の調査として、7月22日に奈良県生駒郡の信貴山麓の栽培地での収穫状況を調査した。植付け後の管理は行き届いておらず、林床下は笹で覆われていた。樹齢20年前後で、胸高直径が20cm、樹高さ20mの木から乾物で約10kgのオウバクが収穫できた。この時期は、形成層の分裂が活発で、樹皮及びコルク層を簡単に剥ぐことが出来た。（栽培指針 Part 7）

2. 羅布麻の資源について

漢薬である羅布麻は、近年の健康茶ブームにより日本でも使用されるようになってきた。近縁植物との分布が重なっていることもあり、原料の基原を明らかにすることが重要課題と思われる。先に、成分パターンの特徴、葉の形態の特徴を明らかにしているため、サク葉標本をもとに中国での分布について検討を行った。羅布麻の産地とされている新疆省から基原植物を特定できない標本が見つかった。今後、異なる栽培条件下での成分、形態の変化を検討する必要があることが示唆された。（生薬学会で発表）

3. センナ茎の鑑定

無承認無許可医薬品の範囲基準に関連し、近年多量に消費されている「いわゆるダイエット茶」に配合されているセンナ茎について、使用状況の調査を市場品を用いて行った。その結果、茎以外にも多くの葉軸の配合が確認でき、原料段階で、茎と葉軸を区別していないことが明らかになった。さらに、一部については小葉の配合も認められた。葉軸は、小葉同様に専ら医薬品に分類されるため、このままでは薬事違反の疑いがあることを示唆した。葉軸と茎の鑑別については、多方面より問い合わせがあり、厚生省、東京都等に資料（鑑定マニュアル）を送付した。（薬学会で発表）

種子島薬用植物栽培試験場

場長 香月茂樹

概要

人事面では、平成11年3月31日、行政職（二）職員 関寅一郎技官が定年退職した。

施設整備として、ガラス温室が改築され、平成11年3月26日引き渡され、旧温室の植物を移植・移動した。旧温室は4月末までに取り壊しが完了した。備品としてトレンチャーを購入した。

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、「クチナシ」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「ケシの直接抽出法に関する研究」、厚生科学研究費補助金による「薬用植物資源の保存保護に関する研究」等を実施した。

気象面では、梅雨の期間は6月2日から7月2日の31日間で、総降雨量は821.0mmで、この期間中の6月21日集中豪雨があり、最大時間雨量63.0mm（18:00～19:00）が記録されたが、特に被害はなかった。台風の接近・通過は2個あり、特記すべきものは下記のとおりである。被害は樹木・栽培植物等に見られただけで軽微であり、施設への被害はなかった。

9月18日 6号

最大瞬間風速 36.6m/s・総降雨量 26.5mm

10月16日～17日 10号

最大瞬間風速 27.0m/s・総降雨量 48.5mm

業務成績

1.種子交換

採種 299種(筑波試験場へ送付)

内訳 野生種 185種

栽培種 114種

露地 110種

温室 4種

受入 31件 67種

分譲 35件 158種

2.指導業務

見学者 36件 278名以上

問い合わせ件数は30件以上あり、内訳(重複あり)は種苗の入手法5,栽培法7,植物鑑定11,薬効・用法7,その他(地域振興,薬用植物の自生地,販売先等)5件であった。

研究業績

1.ケシの直接抽出法に関する研究

有機質肥料と化学肥料の施肥効果に関する試験を行った。1993年伊豆試験場より導入した「一貫種」の継代栽培した1996年産種子で、1月27日に播種した。肥料条件は総施肥量としてN:63, P₂O₅:28.8, K₂O:20.1(kg/10a)を施用した。

生育期間中の天候不良(多雨・多湿・日照不足等)により、病害が多発し、開花直後までにほぼ枯死した。特に有機質肥料の多施用区での被害が顕著であった。

2.薬用植物の品質評価法に関する研究

クチナシの繁殖と育苗に関する試験を実施した。挿し木は、生育適温(約20℃以上が望ましい)の管理条件下であ

れば、周年可能であった。自然条件下では、6月～10月で新梢が固まった部分の挿し穂を使用した場合、最良であった。種子繁殖は、生育のばらつき、定植までの仕事内容の繁雑さ、各個体の形質のばらつき等により、実務上不適当と思われた。

3.野生・未栽培種の栽培化に関する研究

アカネスイセンに対する温度条件(15～35℃)による発根・発芽試験を実施した。いずれも高温条件下で早期であった。低温で緩慢であり、15℃では発根はするものの、発芽は100日後もしていない。鱗茎の大中小では、大で反応が早く、小は緩慢または無の傾向が見られた。

4.薬用植物資源の保存及び保護に関する研究

種子島における薬用植物の分布確認と効能・用途について調査した。130科597種(内栽培種277種)を明らかにした。

島という極めて狭い地域内で、沿岸部の多くが無霜地帯、内陸部が降霜地帯という自然条件として非常に得難い環境にあるため、温帯的(本土)植物と亜熱帯的(琉球)植物が同居している状況が再確認された。そのほか、以下のような貴重な状況・現象が把握できた。熱帯・亜熱帯では常緑のものが、冬季の自然環境の悪化(特に低温)による落葉。本土では越冬が困難で1年草的植物が多年草的または木本的植物として生育している状況。本土では冬季休眠するが、その間わずかではあるが生育し、周年活動が認められること。開花・萌芽が不自然な植物の存在・通常年では露地栽培は困難だが、暖冬の年、また無加温のビニールハウス等では越冬・生育が可能な熱帯・亜熱帯植物に多くあること。

平成10年度所外研究員等受け入れ名簿

平成11年3月31日

(客員研究員) 11名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
下村裕子	東京薬科大学名誉教授	生薬部	4.10.1		女	
熊田秀文	神奈川歯科大学口腔細菌教室助手	療品部	4.10.22		男	
一戸正勝	東京家政大学教授	衛生微生物部	7.4.1	11.3.31	男	
田中悟	前当所毒性部動物管理室長	毒性部	9.4.1	11.3.31	男	
福岡正道	昭和薬科大学薬物動態学教授	生物薬品部	9.4.1	11.3.31	男	
松井道子	元当所変異遺伝部	変異遺伝部	9.4.1	11.3.31	女	
三木敬三郎	テルモ医学研究所顧問	化学物質情報部	9.8.1		男	
内藤克司	元当所毒性部	毒性部	10.4.1	11.3.31	男	
高橋道人	元当所病理部	病理部	10.4.9	11.3.31	男	
中館正弘	元当所総合評価研究室	総合評価研究室	10.4.9		男	
渡辺昌	東京農業大学応用生物科学部教授	毒性部	10.12.1		男	

(協力研究員) 8名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
小林茂樹	昭和薬科大学講師	有機化学部	8.6.1	11.3.31	男	
松藤寛	日本大学生物資源科学部助手	食品部	8.6.10	11.3.31	男	
鄭然孫	九州大学薬学部特別研究員	環境衛生化学	9.10.1		女	
香川聡子	北里大学薬学部公衆衛生学教室講師	環境衛生化学部	9.10.1		女	
樽松美治	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	10.1.9		女	
満長克祥	東邦大学薬学部生薬学教室助手	薬理部	10.4.1	11.3.31	男	
宮城恵理	山梨医科大学医学部	毒性部	10.4.1	11.3.31	女	
村松芳多子	共立女子大学家政学部助手	衛生微生物部	10.4.9		女	

(流動研究員) 11名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
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	11.3.31	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	
橋本統	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	9.4.1		男	
南基泰	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	筑波試験場	9.4.18		男	
百瀬真希	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	10.1.16	11.3.31	女	
小出達夫	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	10.4.1	11.3.31	男	
田所聡	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	10.10.1	11.3.31	男	
細野哲司	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生物薬品部	10.10.1	11.3.31	男	
瀨野裕之	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	10.12.1		男	
Liu Hong-Min	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	食品添加物部	10.12.1		男	
佐久嶋順一郎	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	食品部	10.12.1		男	

(科学技術特別研究員) 9名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
上野伸哉	科学技術振興事業団	薬理部	7.10.1	11.3.31	男	
引間知広	科学技術振興事業団	薬理部	8.10.1		男	
Mia,Md Wahiduzzaman	科学技術振興事業団	筑波試験場	8.10.1		男	
高上馬希重	科学技術振興事業団	伊豆試験場	9.8.1		男	
小村純子	科学技術振興事業団	薬品部	9.9.1	11.3.31	女	
市川明	科学技術振興事業団	療品部	11.1.1	11.3.31	男	
長岡恵	科学技術振興事業団	食品添加物部	11.1.1	11.3.31	女	
安住聡子	科学技術振興事業団	衛生微生物部	11.1.1	11.3.31	女	
津田誠	科学技術振興事業団	薬理部	11.1.1	11.3.31	男	

(重点支援協力研究員) 6名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
豊田淑江	科学技術振興事業団	生物薬品部	8.8.1		女	
佐々木晴代	科学技術振興事業団	代謝生化学部	8.8.1	11.3.31	女	
高木加代子	科学技術振興事業団	機能生化学部	8.8.26		女	
柴山恵	科学技術振興事業団	生物薬品部	9.4.1		女	
日向須美子	科学技術振興事業団	生物薬品部	9.11.1		女	
日向昌司	科学技術振興事業団	生物薬品部	10.4.1		男	

(派遣研究員) 6名 Abu Shara Shamsur Rouf

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
Md. Abu Sayed	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	療品部	9.10.27	10.9.30	男	
金 秀 良	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	変異遺伝部	9.11.17	11.3.31	男	
康 景 宣	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	毒性部	10.6.1	11.3.31	男	
高 橋 雄	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	毒性部	10.6.1	11.3.31	男	
Abu Shara Shamsur Rouf	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	有機化学部	10.10.26		男	
板 橋 由 佳	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	療品部	10.11.1	11.3.31	女	

(リサーチ・レジデント) 2名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
森 原 元 彦	長寿科学振興財団	薬品部	10.9.1		男	
尹 永 淑	長寿科学振興財団	生薬部	11.1.1	11.3.30	女	

(科学技術庁フェロー) 3名

氏名	国籍	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
Kavita Shah	インド	Banaras Hindu University	食品添加物部	10.6.1		女	
Karen Skinner Scott	英国	University of Glasgow	薬品部	10.8.1		女	
N.chandrasekaran	インド	School of Energy Sciences Department of Environment Madurai Kamra University	環境衛生化学部	11.2.1		男	

(研究生) 37名

氏名	依頼者	受入部(室)	入所	退所	性別	備考
太 田 利 子	相模女子大学学芸学部助教授	衛微	6.12.1	10.11.30	女	
畝 山 寿 之	東京医科大学薬理学教室	薬理	8.7.31	10.3.31	男	
池 田 尚 子	昭和女子大学大学院教授	病理	9.4.1		女	
堀 口 美 恵 子	東京農業大学農学部教授	変異	9.4.1	11.3.31	女	
高 木 久 宜	麻布大学教授	病理	9.4.1	11.3.31	男	
李 宜 融	日本大学生物資源科学部教授	生薬	9.4.1	11.3.31	男	
小野瀬 淳 一	明治薬科大学第三薬理学教室	機能	9.4.8	11.3.31	男	
田 村 啓 敏	日本獣医畜産大学教授	病理	9.5.1		男	
糺 谷 高 敏	鳥取大学農学部	病理	9.10.1		男	
藤 澤 正 彦	東京大学農学生命科学研究科教授	衛微	10.2.1	11.1.31	男	
明 谷 早 映 子	東京大学大学院理学系教授	機能	10.3.1		女	
津 田 誠 子	星薬科大学理学教室助教授	薬理	10.3.1	11.2.28	男	
松 井 幸 子	共立薬科大学学長	代謝	10.4.10	11.3.31	女	
山 田 丈 士	日本医科大学教授	薬品	10.4.13	11.3.31	男	
山 田 典 代	昭和薬科大学教授	変異	10.5.1	11.3.31	女	
山 本 雄 幸	昭和大学教授	生物	10.5.11	11.3.31	男	遺伝子
中 村 英 明	岐阜大学教授	病理	10.7.1		男	
宮 内 慎 一	順天堂大学医学部教授	病理	10.7.1		男	
Byung-Il Yoon	ソウル大学獣医病理学教室教授	毒性	10.9.1	11.3.31	男	
佐 藤 基 英	横浜検疫所長	食品	10.9.1	10.10.31	男	
中 根 孝 久	昭和薬科大学	生薬	10.9.1		男	
WANG Shu Lan	天津市薬品検査所主管薬剤師	薬品	10.9.7	11.3.25	女	
西 岡 暢 彦	農林水産省農薬検査所長	毒性	10.9.16	10.12.15	男	
山 本 淳 子	岐阜県食肉衛生検査所長	衛微	10.10.5	10.11.4	女	
富 岡 昭 裕	群馬大学教授	薬理	10.10.15	11.3.31	男	
李 仁 朱	国立水産物検査所長	食品	10.10.19	10.10.23	男	
Wu,Gui-Hua	天津市薬品検査所主管薬剤師	生薬	10.10.26		男	
Anchalee Chuthautti	タイ国公衆健康局所長	毒性	10.11.2	10.11.6	女	
Pranee Chavalitumron	タイ国公衆健康局所長	毒性	10.11.2	10.11.6	女	
Li,Ming-Ke	国際協力事業団所長	情報	10.11.2		男	
重 本 由 香 里	広島大学教授	薬理	11.1.7	11.3.31	女	
青 木 啓 子	福井県衛生研究所長	食品	11.1.25	11.1.29	女	
Liu,Yun	国際協力事業団所長	病理	11.2.3		女	
東 野 薫	千葉大学大学院自然科学研究科	筑波	9.4.1	11.3.31	女	
中 尾 伸 子	筑波大学教授	筑波	9.6.1	11.3.31	女	
本 山 宏	宮崎県農政水産部長	筑波	10.10.1	10.11.30	男	
竹 田 経 子	大阪大学薬学部部長	北海道	10.10.4	10.10.9	女	

(実習生) 49名

氏 名	依 頼 者	受入部 (室)	入 所	退 所	性 別	備 考
相原真紀	お茶の水女子大学生生活科学部	衛微	8.6.24	11.3.31	女	
中西礼子	お茶の水女子大学生生活科学部	衛微	8.6.24	11.3.31	女	
阿部有希子	昭和女子大学大学院教授	食品	8.9.1	11.3.31	女	
藤田薫子	昭和大学教授	生物	9.4.15	10.12.31	女	
互井千恵子	昭和女子大学大学院教授	食添	9.8.1	11.1.30	女	
小嶋裕美	昭和女子大学大学院教授	食添	9.8.1		女	
金子由美	昭和女子大学大学院教授	有機	9.8.18	11.3.31	女	
大久保千春	北里大学理学部教授	衛微	10.3.1	11.2.28	女	
渡辺香織	日本大学生物資源科学部教授	食添	10.3.2	11.2.26	女	
福田純子	日本大学生物資源科学部教授	食添	10.3.2	11.2.26	女	
酢山恵美子	日本大学生物資源科学部教授	食品	10.3.2	11.3.1	女	
堀口真治	中央大学教授	情報	10.4.1	11.3.24	男	
柴田操	日本獣医畜産大学教授	衛微	10.4.1	11.3.31	女	
篠原秀美	昭和薬科大学教授	有機	10.4.1	11.3.31	女	
金子裕美	東京理科大学教授	環境	10.4.1	11.3.31	女	
佐々木春美	星薬科大学教授	食添	10.4.1	10.12.28	女	
倉田敦代	東京理科大学講師	生薬	10.4.14	11.3.31	女	
小林雄輔	星薬科大学教授	生物	10.4.17	11.3.31	男	
清水万紀子	昭和薬科大学教授	薬理	10.4.20		女	
小田原毅	日本大学教授	有機	10.4.20	11.3.31	男	
岡田英治	東京薬科大学教授	有機	10.4.20	11.3.31	男	
山川祥夫	昭和大学教授	生物	10.5.6	10.12.25	男	
菜原恭子	実践女子大学教授	食品	10.5.11	11.2.26	女	
中村みち恵	実践女子大学教授	食品	10.5.11	11.2.26	女	
熊谷奈央子	実践女子大学教授	食品	10.5.11	11.2.26	女	
生田研一	日本大学理工学部長	環境	10.5.18	11.2.27	男	
中村木豊	日本大学理工学部長	環境	10.5.18	11.2.27	男	
鈴木洋一郎	日本大学理工学部長	環境	10.5.18	11.2.27	男	
山科敦子	共立薬科大学教授	有機	10.6.1	11.3.31	女	
成松怜子	共立薬科大学学長	食品	10.6.29	10.12.28	女	
濱野美紀子	共立薬科大学教授	代謝	10.6.29	10.12.22	女	
中島明子	昭和女子大学大学院教授	食添	10.8.1		女	
柏田智子	昭和女子大学大学院教授	情報	10.8.1		女	
浅井綾	昭和女子大学大学院教授	情報	10.8.1		女	
杉山悦子	昭和女子大学大学院教授	有機	10.8.3		女	
福島彩子	昭和女子大学大学院教授	食添	10.8.3		女	
本多麻理子	昭和女子大学大学院教授	食添	10.8.28		女	
大川高晶	昭和女子大学大学院教授	評価室	10.9.1		女	
川上裕里	昭和女子大学大学院教授	食品	10.9.10		女	
藤井麻理	昭和女子大学大学院教授	食添	10.9.21		女	
志波早苗	昭和女子大学大学院教授	評価室	10.10.1		女	
梶村友加里	日本大学生物資源科学部教授	生物	11.2.19		女	
風間宏美	日本大学生物資源科学部教授	生物	11.2.19		女	
山田光男	日本大学生物資源科学部教授	食添	11.2.23		男	
杉村優美	日本大学生物資源科学部教授	食添	11.2.23		女	
吉村幸代	日本大学生物資源科学部教授	食添	11.3.1		女	
大槻崇	日本大学生物資源科学部教授	食品	11.3.1		男	
菊井美里	麻布大学環境保健学部部長	衛微	11.3.1		女	
若林靖貴	北里大学教授	衛微	11.3.4		男	

Kaniwa, N., Katori, N., Aoyagi, N., Ishigame, N.*1, Seta, Y.*1, Shinba, T.*1, Fujiwara, K.*2, Nakai, T.*2, Oda, Y.*2 and Kojima, S.: Collaborative study on the development of a standard for evaluation of vibration levels for dissolution apparatus

Int. J. Pharm., **175**, 119-129 (1998)

溶出試験装置の振動レベルを検出する溶出試験用カリブレーターEGを開発し、その特性を明らかにするとともに、その性能についてUSPカリブレータと比較した。EGの毎分50回転による回転バスケット法の溶出試験結果を用いることにより、振動のレベルが0.05 m/s²以上の装置を識別できることが分かった。EGの識別能力は、現在USPで用いられている2つのカリブレータよりも高いことも示された。この結果は、EGが溶出試験装置の振動レベルを評価するためのカリブレータとして有用であることを示唆している。

Keywords: dissolution test apparatus, vibration level, calibrator

*1 東京医薬品工業協会

*2 大阪医薬品協会

香取典子, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 小嶋茂雄: 溶出試験の判定基準の問題点および改善 II

日本薬局方フォーラム, **7**, 157-165 (1998)

日本薬局方溶出試験の判定基準について統計学的な背景を考察し、より良い試験法とはなにかについて述べると共に、新たな判定基準を提案した。前報では溶出率の平均を規制する目的で新計量型判定基準を新たに提案し、他の判定基準と検査特性を比較して試験の妥当性について検討したが、今回は新計量型判定基準の両側規格への適用を行い、また消費者危険との関わり等について詳細に記述することを試みた。

Keywords: dissolution test, confidence limit, Japanese Pharmacopoeia

Katori, N., Kaniwa, N., Aoyagi, N. and Kojima, S.: A new acceptance sampling plan for the official dissolution test

JP Forum., **7**, 166-173 (1998)

日本薬局方溶出試験の判定基準について統計学的な背景を考察し、より良い試験法とはなにかについて述べると共に、新たな判定基準を提案した。また、新判定基準の特質を述べると共に、他の試験規格との比較を行った。

Keywords: dissolution test, confidence limit, Japanese Pharmacopoeia

Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: The Effect of Excipients on the Molecular Mobility of Lyophilized Formulations, as Measured by Glass Transition Temperature and NMR Relaxation-Based Critical Mobility Temperature

Pharm. Res., **16**, 135-140 (1999)

メチルセルロースなど6種類の水溶性高分子の医薬品添加剤を用いて調製したタンパク質凍結乾燥製剤について、ガラス転移温度(T_g)、NMR緩和に基づく分子運動性の限界温度(T_{mc})および誘電緩和スペクトルを測定し、製剤の分子運動性に及ぼす医薬品添加剤の影響を検討した。これらの製剤中には、添加剤との相互作用によって運動を束縛された水および束縛されずに自由な動きを示す水が存在することがわかった。凍結乾燥製剤のT_gおよびT_{mc}は、メチルセルロースの製剤のように、自由な動きを示す水の量が多く、その運動性が高いものほど低くなることが明らか

かになった。また、T_{mc}はT_gより23℃~34℃低いことが分かり、製剤はT_gよりも低い温度領域ですでに、液体プロトンの存在で示されるような高い運動性をもつことが明らかになった。

Keywords: NMR relaxation, molecular mobility, lyophilized formulation

Nakai, Y., Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: Solid-State Rehydration-Induced Recovery of Bilirubin Oxidase Activity in Lyophilized Formulations Reduced during Freeze-Drying

Chem. Pharm. Bull., **46**, 1031-1033 (1998)

ビルリピンオキシダーゼの凍結乾燥製剤を固体状態で適切な量の水分を再吸着させることによって、凍結乾燥過程で受けた構造的なダメージを一部回復し、活性を回復できることを明らかにした。この活性の回復は製剤中の高分子添加剤に大きく依存し、ポリビニルアルコールの製剤はデキストランの製剤に比べて、水分再吸着による活性の回復率が著しく大きいことが分かった。ポリビニルアルコールは凍結乾燥過程において水分子の代わりにタンパク質の構造を保護し、可逆的な構造のダメージにとどめる役割を果たすことが示唆された。

Keywords: protein stability, lyophilized formulation, solid-state rehydration

Luo, Y., Aso, Y. and Yoshioka, S.: Swelling Behavior and Drug Release of Amphiphilic N-Isopropylacrylamide Terpolymer Xerogels Depending on Polymerization Methods: g-Irradiation Polymerization and Redox Initiated Polymerization

Chem. Pharm. Bull., **47**, 579-581 (1999)

N-イソプロピルアクリルアミド、アクリル酸およびn-ドデシルアクリルアミドから成る両親媒性キセロゲルを、重合開始剤を用いる化学重合法およびγ線照射によって重合を開始する方法によって調製し、それぞれの平衡膨潤率、膨潤速度および内包薬物5-フルオロウラシルの放出速度を比較し、重合法の影響を検討した。γ線照射による方法では化学重合法より膨潤速度が遅く、それにもなって遅い薬物放出速度を示すキセロゲルが得られることが明らかになった。

Keywords: amphiphilic hydrogel, g-irradiation, drug release

Aso, Y., Yoshioka, S. and Kojima, S.: Determination of the Diffusion Coefficient of Insulin and Lysozyme in Crosslinked Dextran Hydrogels by Pulsed-Field-Gradient NMR

Chem. Pharm. Bull., **46**, 1836-1839 (1998)

メタクリル酸グリシジルを修飾したデキストランにγ線照射することにより、タンパク質医薬品のモデルとしてインスリンやリゾチームを内包した架橋デキストランハイドロゲルを調製した。ハイドロゲル中の医薬品の拡散係数をパルスドフィールドグラジエントNMR法によって測定し、ゲルからの薬物放出速度とNMRで測定した拡散係数とが相関することを明らかにした。NMRで測定される拡散係数はハイドロゲルからの薬物放出速度の指標として有用であることが示された。

Keywords: diffusion, hydrogels, drug release

最所和宏, 王 麗琴, 石橋無味雄, 外岡弘道, 奥田秀毅, 小嶋茂雄: 高速液体クロマトグラフ法によるH₂受容体

拮抗薬の迅速分析法

医薬品研究, 29, 620-626 (1998)

HPLC 法の移動相の組成比などの諸条件を検討し, 4 種 H₂ 受容体拮抗薬の同一条件による迅速分析法を確立した. 市販品 9 剤形に確立した方法を適用し, 特異性, 真度及び精度を調べたところ良好な結果が得られた.

Keywords: H₂-antagonist, rapid analysis, validation

Wang Liqin, Saisho, K., Ishibashi, M. and Kojima, S.: **Rapid determination of H₂-receptor-antagonists by high performance Liquid Chromatography**

Tianjin Pharmacy, 10, 64-66 (1998)

ODS カラムを用いた HPLC 法による H₂ 受容体拮抗薬の迅速分析法を確立した. 4 種 6 剤形の製剤中からの主薬の抽出溶媒を検討したところ, メタノールによる抽出が最適であった. 本法による製剤の定量は回収率及び精度は迅速分析法として十分なものであった.

Keywords: H₂-antagonist, rapid analysis, HPLC

Nakahara, Y., Kikura, R. and Takahashi, K.: **Hair Analysis for Drug Abuse XX. Incorporation and Behaviors of seven Methamphetamine Homologs in rat hair roots**

Life Sci., 63, 883-893 (1998)

毛髪への薬物の分布特性を調べるために, 7 種のフェネチルアミンのラット毛根への取込と保持に関する挙動を調べた. 黒, 白の 2 色の毛を持つ Long Evans ラットの背部の毛を刈り取った 10 日後に, 薬物を 10mg/kg 単回腹腔内に投与し, 経時的に毛根を採取した. 試料は洗浄後, メタノール/塩酸で抽出し, 抽出物を GC-MS で分析した. 毛根中濃度の最大の増加を示したのは, 5 分から 1 時間の間であった. 薬物が黒色毛に取り込まれる様式は 4 群に分かれた: 迅速かつ長く取り込まれる薬物 (NO₂MA, MDMA), 迅速で短い取込の薬物 (MA, DMA), ゆっくりと長く取り込まれる薬物 (BZP, EP), そしてほとんど取り込まれない薬物 (AcMA). すべての薬物は白色毛にはほとんど取り込まれなかった. 本研究結果から, 毛髪に取り込まれる薬物は, 塩基性であること,メラニンの存在 (黒色毛) の 2 つの要素が必要であると結論づけた. また, 毛根に入った薬物の一部が毛幹に蓄積され, その他の薬物は毛幹外に再分布すること, 及び毛髪に取り込まれる薬物量は 2 つの過程 (取込と保持) で決定されることを実証した.

Keywords: methamphetamine homologs, hair root, drug incorporation into hair

Sakamoto, T., Endo, M.*, Nagasaki, A.*, Nakamura, A.*, Watanabe, S.*, Tanaka, A.* and Nakahara, Y.: **Evaluation of Hair Root Analysis for Acute PCP Poisoning and Behavior of PCP Metabolites in Rat Hair Root**

Pharmazie, 53, 310-314 (1998)

ラットを用いて, フェンシクリジン (PCP) 急性中毒を診断する毛根分析の有用性を検討した. 有色毛のラットに PCP の中毒量 (80, 100 and 120 mg/kg) を腹腔内に投与し, 毛根を経時的に採取した. 毛根試料は 30°C で 16 時間, ボルテックスで浸透抽出し, 薬物の定量は, GC-MS で行った. PCP は 5 分後から高濃度で検出され, 投与 6 時間後に最高濃度に達し, その後, やや減少し, 24 時間後にほぼ一定となった. 毛根中の濃度レベルは投与量に比例し, ラットが死亡した後は, 死亡時の濃度で一定濃度で推移した. PCP 主代謝物の水酸化体 (PCHP, t-PCPdial) も同時に 48 時間まで検出され, 急性 PCP 中毒の診断に毛根は有用な検査試料となりうることを示唆された.

Keywords: Phencyclidine, acute poisoning, hair analysis

* 昭和薬科大学

Tagliaro, F.*, De Battisti, Z.*, Groppi, A.*, Nakahara, Y., Scarcella, D.*, Valentini, R.* and Marigo, M.*: **High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection.**

J. Chromatogr. B., 723, 195-202 (1999)

エクスタシー (MDMA) 関連薬物 (MDA, MDMA, MDE) の単純で高感度・高選択性の蛍光検出 HPLC 検査法を開発した. 毛髪試料 (100 mg) を 0.25 M 塩酸中で 45 °C でインキュベートし, 液々抽出後, HPLC で分析した. カラムは poly(styrene-divinylbenzene) 担体を用い, 移動層は 0.1 M potassium phosphate (pH 3)-acetonitrile (82:18) を用い, 励起波長は 285 nm, 測定波長は 320 nm を用いた. この条件下で, 3 種の薬物は良好なピークの形状と分離を示した. 検出限界は 1 ng/ml, であり, カットオフ値は 0.1 ng/mg であった. 日内偏差は 10 ng/mL で 1~3%, 100 ng/mg で 0.52~0.88% であった. 日間偏差はそれぞれ 5.12 と 11.12% であった. 92 の治療薬や乱用薬物はこれらのピークを妨害しなかった.

Keywords: methylenedioxymethamphetamine, HPLC, fluorometric detection

* Department of Medicine, Verona University

木倉瑠理, 中原雄二, 渡部基信*: **妊娠中プロン R 液及び覚せい剤乱用の母親と新生児の毛髪分析例**

中毒研究, 12, 43-50 (1999)

出産時異常な状態の新生児とその母親の毛髪の検査を行った. 新生児は, 早産で生まれ, 出産翌日より嘔吐, 四肢振戦, 吸啼反射が強く, 泣き止むことが無く, 38°C 以上の発熱があった. 母親は妊娠中, エスエスプロンを常用していたとのことであった. 毛髪を根元側から 1cm 毎に分画し, 母親は 11 分画, 新生児は 3 分画とし, 検査したところ, プロン液の成分である methylephedrine, dihydrocodeine, caffeine, chlorpheniramine が母親及び新生児の毛髪の各分画から万遍なく検出され, それぞれ 157, 5.7 ng/mg, 136, 24.5 ng/mg, 192, 14.9 ng/mg, 1398, 259 ng/mg が検出された. その他に, 覚醒剤 (メタンフェタミン) が検出され, その濃度は母親で, 6~23 ng/mg, 新生児で, 6~7.5 ng/mg であった. 代謝物のアンフェタミンも同時に確認され, 新生児の異常な状態は, 母親の妊娠中の薬物乱用の影響であると推定された.

Keywords: Hair analysis, Drug abuse during pregnancy, Methamphetamine

* 福井赤十字病院

Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: **Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry**

Anal. Biochem., 269, 297-303 (1999)

LC/MS および LC/MS/MS を用いた糖タンパク質糖鎖の不均一性解析方法を開発した. モデル糖タンパク質リボスクレアゼ B (RNaseB) の糖鎖をエンドグリカナーゼ H で切り出し, NaBH₄ で還元後, カーボンカラムを用いた LC/MS で分析することによって, Man₉GlcNAc, 3 種の Man₈GlcNAc, 3 種の Man₇GlcNAc, 3 種の Man₆GlcNAc, Man₅GlcNAc および Hex₆HexNAc₂ 構造を有する糖鎖を同定

することができた。さらに、LC/MS/MSによって、3種のMan₇GlcNAcの分岐構造の決定およびHex₆HexNAc₂がハイブリッド型糖鎖であることの同定を行うことができた。また、ESI-MSによって得られた各糖鎖の相対ピーク強度がUV,HPAEC-PADおよびFACEによって得られた相対比とほぼ一致することから、LC/MSにおける高マンノース型糖鎖のピーク強度は、ほぼモル比に一致することが示唆された。LC/MSおよびLC/MS/MSは、糖タンパク製剤の品質評価試験法としても有用であると考えられる。

Keywords: ESI-LC/MS, graphitized carbon column, oligosaccharides

Deras, I.*, Kawasaki, N. and Lee, Y.C.*: **Quantitative recovery of Man₉GlcNAc₂Asn derivatives from concanavalin A**

Carbohydrate Res., **306**, 469-471 (1998)

分子量の大きい高マンノース型糖鎖は、コンカナバリンA (Con A) に強く結合し、溶出されにくいことが知られている。そこで、一般的に使用されている Con A セファロースから、高分子量の高マンノース型糖鎖を溶出させる方法を開発した。Con A セファロースカラムに吸着したユーロピウム標識化 Man₉GlcNAc₂Asn, Soybean agglutinin, ユーロピウム標識化 soybean agglutinin を 1M methyl α -D-mannopyranoside 中で放置し、再溶出することによって、オリゴ糖や糖タンパク質をカラムから完全に分離させることができた。本条件は、様々な高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質の分離精製に有用であると考えられる。

Keywords: Con A, Man₉GlcNAc₂Asn, DELFIA

* Department of Biology, Johns Hopkins University

Lee, Y.C.*, Kawasaki, N., Lee, R.T.* and Suzuki, N.*: **Quantum-dye labeled proteins for glycobiology. A viable non-radioactive alternative tracer**

Glycobiology, **8**, 849-856 (1998)

糖鎖生物学分野での定性的び定量的研究における環状ユーロピウム錯体 quantum-dye (QD) の標識化剤としての有用性を検討した。まず、QD-soybean agglutinin, および QD-RCA₁₂₀ を用いることによって、ガラクトース転移酵素活性の高感度測定が可能になることを示した。さらに、QD-Man-BSA および QD-Gal-BSA が血清 mannose-binding protein や肝臓 Gal/GalNAc 受容体の研究において、放射性標識法を用いた場合と同様な結果を与えることを確認した。ユーロピウム標識法は、放射性同位元素と比較して長い蛍光寿命を有しており、より安定した実験結果を与えることから、QD は糖鎖生物学分野において有用な標識剤であることが示された。

Keywords: quantum dye, europium, lectins

* Department of Biology, Johns Hopkins University

Morimoto, K., Maeda, N., Abdel-Alim, F.A.A., Toyoshima, S.* and Hayakawa, T.: **Structural characterization of recombinant human erythropoietins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis**

Biol. Pharm. Bull., **22**, 5-10 (1999)

糖鎖含有タンパク質製剤の糖鎖の特性・品質評価試験法の開発に関する基礎的研究の一環として、8-amino-naphthalene-1,3,6-trisulphonic acid (ANTS) 標識糖鎖の蛍光体支援糖質電気泳動法 (FACE 法) による糖鎖解析の有用性について、CHO 細胞由来エリスロポエチン (EPO) 2 種及び BHK 細胞由来 EPO 1 種を用いて調べた。N-結合型糖鎖のシアロ体、アシアロ体の解析、及び exoglycosidase 逐

次消化によるシークエンシング法による解析を行った。3種の EPO 試料間では、各バンドの位置はほぼ同じであったが、濃度の割合には、相違が認められた。

FACE 法は、糖鎖の分子多様性をパターン解析することにより、迅速に、再現性を持って、総合的に糖鎖構造を観察でき、品質管理にも応用可能であることが示唆された。

Keywords: recombinant human erythropoietin, FACE, N-linked oligosaccharide

* 星薬科大学

Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K., Yamamoto, Y.* and Hayakawa, T.: **Granulocyte colony-stimulating factor-induced dephosphorylation of a 45 kD cytosolic protein in HL-60 cells differentiating into neutrophils**

Br. J. Haematol., **102**, 798-803 (1998)

HL-60 細胞の好中球分化の G-CSF による促進機構を明らかにするために、G-CSF 添加によるタンパク質リン酸化の解析を行った。その結果、DMSO で分化を開始した HL-60 細胞に G-CSF を添加することにより細胞質に存在する 45kDa タンパク質の脱リン酸化が起こることを見出した。

Keywords: G-CSF, neutrophilic differentiation, phosphorylation

* 都臨床研

Yamaguchi, T., Mukasa, T., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T. and Hayakawa, T.: **The role of STAT3 in granulocyte colony-stimulating factor-induced enhancement of neutrophilic differentiation of Me₂SO-treated HL-60 cells**

J. Biol. Chem., **274**, 15575-15581 (1999)

HL-60 細胞の好中球への分化に対する G-CSF と GM-CSF のクロストークについての解析を行った。G-CSF は HL-60 細胞の好中球分化を促進するが、この G-CSF 添加により STAT3 の核移行が惹起される。一方、GM-CSF はこの G-CSF の分化促進作用を阻害するとともに STAT3 の核移行も阻害した。従って、GM-CSF による分化の阻害作用は STAT3 の核移行を阻害するためと考えられた。

Keywords: G-CSF, GM-CSF, STAT3

Yamamoto, M., Kawanishi, T., Kiuchi, T.*, Ohta, M., Yokota, I., Ohata, H.*, Momose, K.*, Inoue, K. and Hayakawa, T.: **Discrepant intracellular pH changes following intracellular Ca²⁺ increase induced by glutamate and Ca²⁺ ionophores in rat hippocampal neurons**

Life Sci., **63**, 55-63 (1998)

グルタミン酸を処置した初代培養海馬ニューロンの細胞内 pH の測定を行った。1mM グルタミン酸を 10 分間処理すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に遅れて pH の低下が観察され、グルタミン酸洗浄後においてさえ 60 分以上にわたってアシドーシスが観察された。カルシウムイオン濃度上昇およびアシドーシスは細胞外のカルシウムイオンを除去すると観察されなくなり、NMDA 受容体阻害剤 MK-801 の存在下では減弱した。また、細胞外のカルシウムイオンを除いた状態でグルタミン酸を処置した後、グルタミン酸を洗浄しカルシウムイオンを再添加したところ、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇およびアシドーシスが観察された。一方カルシウムイオンフォア (イオノマイシンと Br-A23187) は、カルシウムイオン濃度は上昇させるが、細胞内 pH は上昇させた。以上の結果から以下の 3 点が示唆された: (1) グルタミン酸処置によって生じる細胞内アシドーシスは細胞外のカルシウムイオンに依存する、(2) 細胞内アシドーシスは細胞内カルシウムイオン濃度の

上昇によってのみ生じるのではない, (3) グルタミン酸はカルシウムイオン依存性の機構ではなく, カルシウムイオン非依存性の機構によってカルシウムイオン濃度調節機構の不可逆的な障害を生じる。

Keywords: tributyltin, calcium response, hepatocyte

* 昭和大学薬学部

Kawanishi, T., Asoh, H.*, Kato, T.*, Uneyama, C., Toyoda, K., Teshima, R., Ikebuchi, H., Ohata, H.*, Momose, K.*, Hayakawa, T. and Takahashi, M.: **Suppression of calcium oscillation by tributyltin chloride in cultured rat hepatocytes**

Toxicol. Appl. Pharmacol., **155**, 54-61 (1999)

塩化トリブチル錫を初代培養肝細胞に処置すると, 細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察されるとともに, やがて細胞死が生じる。この細胞死は細胞外カルシウムイオンを除いて細胞内カルシウムイオンの上昇を抑えても生じる。次に処置濃度を 0.1 μM 程度にまで減少すると, 細胞毒性を示唆するような変化は生じなくなる。しかしながら, 塩化トリブチル錫を 30 分間前処置した細胞では α アドレナリン性刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇は抑制される。この抑制は短時間のインキュベーションでは生じないが, バソプレシンや ATP 刺激による上昇においても観察される。このとき細胞内の ATP 濃度やイノシトール三リン酸生成の抑制は観察されない。以上の結果から以下の 3 点が示唆された: (1) トリブチル錫の肝細胞への細胞毒性は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によるのではない, (2) トリブチル錫は形態変化を起こさないような低濃度においても肝細胞に機能毒性を示す, (3) この機能毒性のメカニズムはイノシトール三リン酸の生成後の細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオンの遊離の抑制にある。

Keywords: calcium, tributyltin, hepatocyte

* 昭和大学薬学部

Nakanishi, T.*, Kunisawa, J.*, Hayashi, A.*, Tsutsumi, Y.*, Hayakawa, T. and Mayumi, T.*: **Enhancement of liposomal adjuvant actions for tumor vaccines by increasing the degree of positive surface charge**

Drug Delivery System, **13**, 151-157 (1998)

近年, 腫瘍免疫の獲得には抗原提示細胞 (APC) が重要な役割を担っていることが示されつつある。我々は既に, APC 一つであるマクロファージが陽電荷担体を積極的に取り込む細胞生理機能を利用することで, 陽電荷リポソームが優れたアジュバント効果を示すことを見出している。そこで本研究では, リポソームの陽電荷密度とアジュバント効果の連関を追求し, ワクチンアジュバントとしての粒子設計を試みた。その結果, リポソーム陽電荷密度を上昇させることにより, 効果的な腫瘍ワクチンアジュバントの粒子設計が可能であることが明らかとなった。

Keywords: antigen-presenting, liposome, vaccine

* 大阪大学薬学部

Imazu, S.*¹, Nakagawa, S.*¹, Nakanishi, T.*¹, Hayakawa, T., Uemura, H.*², Yamada, O.*² and Mayumi, T.*¹: **Development of VSV-liposomes as a novel gene transfer vector**

Drug Delivery System, **13**, 159-164 (1998)

全身循環血中に投与可能な遺伝子導入ベクターを新規開発すべく, VSV (Vesicular Stomatitis Virus) の特性をリポソームに付与した VSV-リポソーム (VL) を作製し, VL の遺伝子導入ベクターとしての可能性を検討した。その結果,

VL は赤血球溶血活性を示さないうえ, 血清中における安定性も極めて高かった。また, ルシフェラーゼ遺伝子封入 VL を培養細胞に作用させることで, 高いルシフェラーゼ発現が認められた。VL は, 血管内に投与可能な新規遺伝子導入ベクターになりうる可能性が示唆された。

Keywords: VSV, liposome, gene therapy

*¹ 大阪大学薬学部

*² 扶桑薬品工業研究開発センター

Nakanishi, T.*, Kunisawa, J.*, Hayashi, A.*, Tsutsumi, Y.*, Hayakawa, T. and Mayumi, T.*: **Cationization of liposomal surface charge enhances adjuvant effect of liposomes for tumor vaccine**

J. Pharm. Sci. Technol. Jpn., **58**, 59-68 (1998)

抗原提示細胞のひとつであるマクロファージは, 陽電荷担体を積極的に取り込むことが知られている。そこで本研究では, リポソームアジュバントを粒子設計する目的で, リポソームの電荷とアジュバント効果の相関を検討した。その結果, リポソームをカチオン化することにより, マクロファージに封入抗原を効率よく取り込ませることが可能となる結果, アジュバント効果が増強されることが明らかとなった。

Keywords: macrophage, liposome, vaccine

* 大阪大学薬学部

早川 堯夫, 内田 恵理子: **局方を介した生物薬品の品質確保の国際調和に関する基盤的研究 - マイコプラズマ否定試験法について -**

医薬品研究, **29**, 895-903 (1998)

生物薬品の品質確保の国際ハーモナイゼーションの一環として, 生物薬品の生産に用いるバンク化された細胞 (細胞基材) のマイコプラズマ否定試験法の局方収載試験法案の作成に資することを目的に検討を行った。既存の各公定ガイドラインの比較検討および科学的進歩を考慮して検討した結果, 培養法, DNA 検出法, PCR 法はいずれも一長一短があることから, これらの試験法を組み合わせることで実施することが適切であることを示し, 試験法案の詳細を提示した。

Keywords: mycoplasma testing, cell substrates, pharmacopeia

Watabe, A., Yamaguchi, T., Kawanishi, T., Uchida, E., Eguchi, A.*¹, Mizuguchi, H., Mayumi, T.*², Nakanishi, M.*¹ and Hayakawa, T.: **Target cell specificity of fusogenic liposomes - membrane fusion-mediated macromolecule delivery into human blood mononuclear cells -**

Biochim. Biophys. Acta, **1416**, 339-348 (1999)

標的細胞の細胞膜と融合することにより封入物質を細胞内に導入できる膜融合リポソームについて, ヒト血球系細胞に対する標的細胞特異性を検討した。膜融合リポソームは, ヒト末梢血由来 CD14⁺ monocytes, CD4⁺/CD8⁺ T cells とは効率よく融合するが, CD19⁺ B lymphocytes, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells とは融合しないことが分かった。血球系培養細胞との融合は, U937 (monoblastic leukemia) > MOLT4, Jurkat (T lymphoma) > Daudi, BALL1 (B lymphoma) > K562 (erythroblastic leukemia) の順であり, 末梢血リンパ球と同様の傾向を示した。しかし, 膜融合リポソームはこれらの細胞株いずれに対しても同程度の結合能を示し, 融合の標的細胞特異性は, 結合に関与する分子のみではなく, 他の未同定の因子によって規定されていると考えられた。

Keywords: fusogenic liposome, lymphocyte

*¹ 大阪大学微生物病研究所

*2 大阪大学薬学部

Nakanishi, M.*¹, Mizuguchi, H., Ashihara, K.*², Senda, T.*³, Akuta, T.*^{1,4}, Okabe, J.*¹, Nagoshi, E.*¹, Masago, A.*¹, Eguchi, A.*¹, Suzuki, Y.*⁴, Inokuchi, H.*⁵, Watabe, A., Ueda, S.*¹, Hayakawa, T. and Mayumi, T.*²: **Gene transfer vectors based on sendai virus**

J. Control. Release, **54**, 61-68 (1998)

遺伝子治療の基礎技術として、遺伝子を細胞に効率よく導入し、安定に発現させることが必須であるが、現在の遺伝子導入法でこれらを全て満たすものはない。既存のベクターの欠点を克服した新しい遺伝子導入法を開発するため、遺伝子導入と発現に関わる生命現象を分析し、(1)膜融合リポソームを用いた細胞質への DNA の直接導入、(2)核移行シグナルを用いた DNA の核への送達、(3)独立レプリコンとしての核内での DNA の安定化、の3項目について、遺伝子治療用ベクターに必要な機能を人工的に構築することを試みた。これらの要素を統合することにより、新規ベクターの開発が可能になる考えられる。

Keywords: gene therapy, non-viral vector

- *1 大阪大学微生物病研究所
- *2 大阪大学薬学部
- *3 名古屋大学医学部
- *4 DNAVEC 研究所
- *5 京都大学理学部

Mizuguchi, H., Nakagawa, T.*¹, Toyosawa, S.*², Nakanishi, M.*³, Imazu, S.*¹, Nakanishi, T.*¹, Tsutsumi, Y.*¹, Nakagawa, S.*¹, Hayakawa, T., Ijuhin, N.*² and Mayumi, T.*¹: **Tumor necrosis factor α -mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumors**

Cancer Res., **58**, 5725-5730 (1998)

Tumor Necrosis Factor- α (TNF) が腫瘍血管内皮細胞に特異的に作用すること、免疫系の細胞が腫瘍内に侵入する際には最初に腫瘍血管内皮細胞に作用する必要がある点に着目し、腫瘍上流の動脈血管内皮細胞に膜融合リポソームを用いて直接 TNF 遺伝子を導入し、下流に移植された腫瘍の増殖抑制に及ぼす効果について検討した。その結果、TNF 遺伝子を導入したマウスでは顕著な腫瘍増殖の抑制が観察された。

Keywords: tumor necrosis factor- α , gene therapy, fusogenic liposome

- *1 大阪大学薬学部
- *2 大阪大学歯学部
- *3 大阪大学微生物病研究所

Mizuguchi, H. and Kay, M.A.*: **Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method**

Human Gene Ther., **9**, 2577-2583 (1998)

アデノウイルスベクターは、現存している遺伝子治療用ベクターの中では、最も効率の優れたベクターであるが、その作製法は比較的煩雑であり、効率の悪い動物細胞内での相同組換えを利用しているため、容易ではない。そこで本研究では、アデノウイルスゲノムの E1 欠損部位にユニークな制限酵素部位である I-CeuI, SmaI, PstI 認識配列を付与し、簡便な in vitro ligation により、全長の組換えアデノウイルス DNA を含むプラスミドを作製するシステムを開発した。in vitro ligation で目的遺伝子を E1 欠損部位に挿入したプラスミドを、293 細胞内に導入すると、homogeneous な組換えアデノウイルスベクターの産生が

期待できる。本系は、特別な試薬、技術を必要とせず、簡便に効率よく組換えアデノウイルスを作製でき、ベクター backbone の構造も通常のプラスミド構築で容易に改変できることから、ベクターの作製に大きな進歩をもたらすものと考えられた。

Keywords: alpha 1-antitrypsin, gene therapy, adenovirus vector
* Stanford University

Mizuguchi, H., Nakanishi, T.*¹, Kondoh, M.*¹, Nakagawa, T.*¹, Nakanishi, M.*², Matsuyama, T.*¹, Tsutsumi, Y.*¹, Nakagawa, S.*¹ and Mayumi, T.*¹: **Fusion of sendai virus with liposome depends on only F protein, but not HN protein**

Virus Res., **59**, 191-201 (1999)

センダイウイルスはレセプターの存在しないリポソームと融合することができるがその機構については不明である。そこで、センダイウイルスを各種プロテアーゼで処理することにより、ウイルス表面蛋白質である F あるいは HN 蛋白質を選択的に不活化したウイルスを用いて、リポソームとの融合に及ぼす影響を調べた。その結果、センダイウイルスとリポソームとの融合には F 蛋白質だけが必要であり、HN 蛋白質は関与しないことが明らかとなった。

Keywords: Sendai virus, liposome, fusion

- *1 大阪大学薬学部
- *2 大阪大学微生物病研究所

Ikeda, K.*¹, Utoguchi, N.*^{1,2}, Makimoto, H.*¹, Mizuguchi, H., Nakagawa, S.*¹ and Mayumi, T.*¹: **Different reactions of aortic and venular endothelial cell monolayers to histamine on macromolecular permeability: role of cAMP, cytosolic Ca²⁺ and F-actin**

Inflammation, **23**, 87-97 (1999)

血管内皮細胞は炎症時において亢進している血管透過性の調節において中心的な役割を演じている。そこで、培養ヒト動脈あるいは静脈由来血管内皮細胞を用いて、血管透過性、細胞内カルシウム濃度、cAMP、F-actin 量に及ぼすヒスタミンの影響を検討した。その結果、細胞内カルシウム濃度の上昇は血管透過性を亢進させ、細胞内 cAMP 濃度の上昇は透過性を減少させた。また、最終的には、F-actin が血管透過性を調節していることが明らかとなった。

Keywords: endothelial cell, histamine, permeability

- *1 大阪大学薬学部
- *2 昭和薬科大学

Niimi, S., Yamaguchi, T. and Hayakawa, T.: **Effect of dexamethasone pretreatment on the dexamethasone - dependent induction of tyrosine aminotransferase activity in primary cultured rat hepatocytes**

Biol. Pharm. Bull., **21** 1009-1012 (1998)

初代培養ラット肝細胞を用いてデキサメタゾン (Dex) 依存性チロシンアミノトランスフェラーゼ (TAT) 活性誘導能を調べた結果、TAT 活性誘導能は培養に伴い低下するが、Dex 前処理によりこの低下は抑制されることが示された。さらに、³H 標識 Dex を用いた結合実験から、肝細胞のサイトソールには高及び低親和性結合部位が存在し、両結合部位の数は培養に伴い減少するが、Dex 前処理により低親和性結合部位の数のみ減少が部分的に抑制されることが明らかになった。これらの結果から Dex 前処理は TAT 活性誘導の減少に対して拮抗することが示されると共にこの Dex の作用は低親和性結合部位の維持によることが示唆された。

Keywords: cultured hepatocytes, glucocorticoids, tyrosine aminotransferase, glucocorticoid receptor

丙 菁*, 尾崎幸紘, 唐元泰*: レンギョウの抗炎症作用及び鎮痛作用

中華薬, 30, 43-45 (1999), (中国)

レンギョウの70%メタノールエキスの抗炎症作用及び鎮痛作用について検討した。メタノールエキスの経口投与によりマウスでの酢酸誘発色素透過性亢進の抑制, 酢酸誘発 writhing の抑制, ラットでのカラゲニン誘発浮腫の抑制, 綿球誘発肉芽組織増殖の抑制などの抗炎症作用及び鎮痛作用が認められた。これらの作用はメタノールエキスから得られたヘキサソリン可溶画分に移行し, 活性成分は脂溶性成分であることが示唆された。

Keywords: Forsythia suspensa Vahl, antiinflammation, analgesic effect

* 中国天津市薬品検査所

Ozaki, Y., Sakaguchi, I.*, Tugimura, M.*, Ikeda, N.*, Nakayama, M.*, Kato, Y.*, Suzuki, H. and Satake M.: Study of the accelerating effect of shikonin and alkannin on the proliferation of granulation tissue in rats

Biol. Pharm. Bull., 21, 366-370 (1998)

シコニンとアルカニンの局所投与によるラットでの綿球誘発肉芽組織増殖におよぼす作用を検討した。シコニンとアルカニンは綿球を埋め込んで5日後には肉芽組織増殖を促進する傾向を示し, 10日後では顕著に促進した。両化合物は5日, 10日後において肉芽組織中のマクロファージや単球のような顆粒球の出現を増加させ, 10日後ではさらに繊維芽細胞及びコラーゲン繊維を増加させた。一方, 両化合物は5日, 10日後において肉芽組織中のリンパ球を増加させなかった。これらのことから, シコニンとアルカニンは肉芽組織増殖において組織中の顆粒球の出現を増加させ, さらに繊維芽細胞とコラーゲン繊維を増加させることにより肉芽組織増殖を促進させることが示唆された。

Keywords: shikonin, alkannin, histological, change

* (株)クラブコスメテックス

鎌倉浩之, 佐竹元吉: (-)-, (+)-及び(±)-ノルエフェドリンの体内動態に関する研究

薬学雑誌, 118, 143-149 (1998)

(-)-, (+)-及び(±)-ノルエフェドリンを静脈内投与したときの血漿中濃度, 尿中排泄, 血清たんぱく結合について, 光学分割定量することにより, 比較検討をした。光学活性体とラセミ体とで体内動態に違いが認められ, (-)-ノルエフェドリンに関しては主に尿中排泄量が増加したため (Clr: 4.05 ml/min/kg → 17.6 ml/min/kg) であり, (+)-ノルエフェドリンにおいては, 主に代謝クリアランスが低下したため (Clm: 25.6 ml/min/kg → 12.1 ml/min/kg) であると考えられた。

Keywords: norephedrine, stereoselective disposition, enantiomer-enantiomer interaction

Ono, K., Sakamoto, A.*¹, Masaki, T.*² and Satake, M.: Desensitization of ET_A endothelin receptor-mediated negative chronotropic response in right atria - species difference and intracellular mechanisms.

Br. J. Pharmacol., 125, 787-797 (1998)

心臓の陰性変時作用を媒介するET_Aエンドセリン受容体(ET_AR)脱感作に著しい種差を見出した。ET-1 (50 nM)を反復投与すると, ラット心筋では BQ123 (1 μM) 感受性の

陰性変時効果が急速に脱感作したのに対し, モルモット心筋では脱感作が欠如していた。protein kinase C (PKC) 阻害剤 staurosporine (100 nM) の前処置によりラット心筋のET_AR 脱感作はほぼ消失した。ET_AR の第2-第4膜貫通領域のアミノ酸配列を動物種間で比較した結果, 全てのSer/Thr リン酸化部位 (PKC サイトを含む) はモルモット, ラット, ウサギ, ウシ及びヒトの間で完全に保存されていた。一方, モルモット心筋はPKC 刺激下に isoproterenol (300 nM) を処置すると, ET-1 反復投与によりET_AR 脱感作が惹起された。以上の結果より, ET_AR 脱感作にPKC リン酸化が必要条件であること, PKC リン酸化の種による難易の差は同受容体アミノ酸配列の違いには起因しないことが判明した。さらに, 同受容体脱感作に GRK の関与が示唆された。

Keywords: desensitization, negative chronotropic response, ET_A endothelin receptor

*¹ 理化学研究所 (現 国立循環器病センター研究所)

*² 京都大学医学部 (現 国立循環器病センター研究所)

Higuchi, Y., Ono, K., Sekita, S., Onodera, H., Mitsumori, K., Nara, Y.*¹ and Satake, M.: Preventive effects of shichimotsu-koka-to on renal lesions in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Biol. Pharmaceut. Bull., 21(9), 914-918 (1998)

わが国で本態性及び腎性高血圧症の治療に用いられている七物降下湯 (SKT) を用い, 脳卒中易発症自然高血圧ラット (SHRSP) に自然発症する腎傷害に対する効果を検討した。SKT エキスを飲水に混ぜ, 約 1.5 g/Kg/day の用量で SHRSP に 8 週齢から 29 週齢の間自由摂取させることで投与した。29 週齢の時点で, 対照群の動物は小葉間動脈の血管平滑筋細胞の増殖, 尿管の拡張と変性, 炎症細胞浸潤と出血, 糸球体の膨潤と壊死を特徴とする増殖性動脈炎を発症するのに対し, SKT 投与群ではこれらの病理学的傷害が有意に緩解し, 血漿中の尿素窒素の量が有意に減少していた。更に, SKT 投与により腎臓のキサンチンオキシダーゼ (XOD) の活性が有意に低下し, スーパーオキシサイドディスムターゼ (SOD) 活性が有意に増大していた。これらの結果より, SKT は腎臓の病理組織学的病変の進行を抑制することが判明した。またそれには, 腎臓におけるラジカルの発生の抑制が関与する可能性が示唆された。

Keywords: SHRSP, kidney, shichimotsu-koka-to

*¹ 東亜大学

Totsuka, Y.*¹, Hada, N.*¹, Matsumoto, K.*¹, Kawahara, N., Murakami, Y.*², Yokoyama, Y.*², Sugimura, T.*¹ and Wakabayashi, K.*¹: Structural determination of a mutagenic aminophenylnorharman produced by the co-mutagen norharman with aniline

Carcinogenesis, 19(11), 1995-2000 (1998)

ノルハルマンはたばこ煙中や環境中に幅広く存在し, それ自身では変異原性を示さないが, アニリンなどの芳香族アミンと共存させることにより変異原性を示すことが知られている。今回, ノルハルマンの co-mutagenic 作用機構の解明を目的として S9 mix 存在下でノルハルマンとアニリンを共存させた時に生成する新規変異原物質を検索, 分離し, 各種機器データ解析によりその構造を決定した。さらにこの化合物は S9 mix により代謝活性化され, ヒドロキシアミノ体に変換し, アセチル化された後に DNA と付加体を生成し, 最終的にサルモネラ菌に対して変異原性を示すことが明らかとなった。

Keywords: aminophenylnorharman, co-mutagenic action,

norharman

*1 国立がんセンター研究所

*2 東邦大学薬学部

Kuroyanagi, M.*1, Arakawa, T.*2, Mimaki, Y.*2, Yoshida, K.*2, Kawahara, N., Hayashi, T.*3 and Ishimaru, H.*3:
Phytoalexins from Hairy Roots of *Hyoscyamus albus* Treated with Methyl Jasmonate

J. Nat. Prod., 61(12), 1516-1519 (1998)

トロパンアルカロイドの生産植物として知られているヒヨソの起源植物の一つであるナス科の *Hyoscyamus albus* に毛根病菌 *Agrobacterium rhizogenes* を感染させて誘導した毛状根より3種の新規セスキテルペン型ファイトアレキシンを分離し、各種機器データ解析によりそれらの構造を決定した。

Keywords: *Hyoscyamus albus*, Phytoalexins, Methyl Jasmonate

*1 広島県立大学

*2 静岡県立大学

*3 ライオン(株)

松田宗人*1, 武藤理英*1, 筒井夫美子*1, 小坂 昇*1, 関田節子, 佐竹元吉: 当帰の基原植物と化学的・薬理的性質に関する研究

和漢医薬学雑誌, 15, 452-453 (1998)

当帰の基原植物は、日本薬局方では *Angerica acutiloba* Kitagawa または *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino と規定されている。一方、中国では基原の異なる *A. sinensis* Diels としていて、それぞれに特徴的な薬理活性が報告されている。化学成分について両者を比較下報告はあるが、薬理作用についての比較は行われていなかった。そこで、日本産当帰と中国産当帰のラット子宮平滑筋に対する作用を *in vitro*, *in vivo* で比較したところ、*in vitro* において oxytocin 収縮、PGF2 α 収縮および自動運動に対して中国産当帰は 10^{-4} ~ 10^{-3} g/ml で濃度依存的に抑制したが、日本産当帰は殆ど活性は認められなかった。しかし、*in vivo* の生体位子宮運動に対しては作用強度、作用パターンに大きな差は認められなかった。両者に共通の成分として2種類の新規化合物を分離し、構造決定を行った。

Keywords: *Angerica acutiloba*, *A. sinensis*, uterine contraction

*1 鐘紡漢方研究所

矢上 健, 配島由二, 中村晃忠: ラテックス蛋白質の人工胃液中における安定性

日本ラテックスアレルギー研究会会誌, 2, 97-101 (1998)

天然ゴムや果物・野菜に含まれる交差反応性アレルギーの幾つかは、植物の生体防御に関わるような蛋白質であることが既に明らかにされている。一方こうした蛋白質は、抗カビ活性や病虫害防除活性等を有することから、植物育種の面で注目を集めている蛋白質でもある。そこで問題となるのが、新たに誘導された抵抗性蛋白質のアレルゲン性である。本研究では、食品に導入される蛋白質のアレルゲン性を調べる試験法の一つとして採用されている消化実験により、天然ゴムラテックスに含まれる交差反応性アレルギーを検出することができるかどうかを検討した。粗ラテックス蛋白質と分離した各ラテックス抗原をそれぞれ人工胃液に溶解した後、反応液を経時的に採取して SDS-PAGE 及びラテックスアレルギー患者のプール血清を用いたイムノブロット法で分析し、消化の進行具合を調べた。その結果、患者の IgE 抗体が認識するラテックス抗原の多くが、人工胃液により4分以内に消化されたことがわかった。この結果から、人工胃液を利用する消化実験は、経口感作を

成立させるような食物アレルギーの検出には有効であるものの、交差反応性に基づくアレルギーの検出には有効ではない可能性が示唆された。

Keywords: latex allergy, defense-related protein, food allergy

大砂博之*1, 山本美穂*1, 岡島光也*1, 千葉由幸*1, 加藤有紀*1, 武川るみ*1, 高橋さなみ*1, 山本有子*1, 大沼すみ*1, 相原通子*1, 池澤善郎*1, 椿 和文*2, 矢上 健, 新井健司*3, 永井宏幸*3, 三田晴之*4: アトピー性皮膚炎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, 2, 41-47 (1998)
アトピー性皮膚炎の患者は、ラテックスアレルギーのハイリスクグループを形成すると考えられている。しかし、IgE 抗体が陽性であっても、症状を経験しない例が多く見られる。そこで、症状がある患者とない患者とで、各種ラテックス抗原 (β -1,3-グルカナーゼ, ヘパミン, カルボキシエステラーゼ, ヘペイン) に対する反応性に差があるかどうかを、IgE-ELISA, プリックテスト及びヒスタミン遊離テストで調べた。その結果、天然ゴム製品に対して実際に症状を有する患者群は、 β -1,3-グルカナーゼ以外の抗原に対する反応性が有意に高いことがわかった。しかし、特定の抗原に対する反応性の有無が症状の有無を決定するといった、明確な関連性を確認することはできなかった。

Keywords: latex allergy, atopy, allergen

*1 横浜市立大学医学部

*2 AFT 研究所

*3 旭化成

*4 国立相模原病院臨床研究部

Futaki, S.*1, Aoki, M.*2, Ishikawa, T.*2, Kondo, F.*2, Asahara, T.*2, Niwa, M.*2, Nakaya, Y.*3, Yagami, T. and Kitagawa, K.*4: **Chemical ligation to obtain protein comprising helices with individual amino acid sequences**
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 7, 187-192 (1999)

人工蛋白質の設計・合成に際しては、様々な機能を有するペプチドセグメントを効率的に組み立て、一つの分子として完成させる段階が重要なステップとなる。本研究では、テンプレートペプチドにペプチドセグメントを順次選択的に導入する手法として、ケミカルリゲーション法を採用した。4つのヘリックスペプチドを組み合わせて構築した人工蛋白質の CD スペクトルには、ヘリックス構造に特徴的な 220nm 付近の極小値が記録された。さらに、イオンチャネル構造を指向し、設計・合成した人工ヘリックス蛋白質は、実際にイオン透過活性を有していた。以上の実験結果は、ケミカルリゲーション法が人工蛋白質の合成手法として非常に有効であることを示している。

Keywords: artificial protein, chemical ligation, α -helical protein

*1 京都大学化学研究所

*2 徳島大学薬学部

*3 徳島大学医学部

*4 新潟薬科大学

入江和夫*, 吉田啓子*, 前田典子*, 庄司裕美*, 鹿庭正昭: ペンキ塗膜に関する CPSC の情報と学校、公園施設にある塗膜の鉛中毒につながる大きさの算出
家庭科教育, 72(8), 94-99 (1998)

中学校、小学校、幼稚園、保育園及び公園において採取した塗膜中の鉛濃度を原子吸光度法により定量した。その結果、試料 44 点中 42 点が米国消費者製品安全委員会 (CPSC) による基準である 0.06% を越えていた。また、44 点中 34 点が 1992 年に鉛による健康被害防止のための目安

値とされた0.5%を越えていた。以上のように、日本においても、子供たちの周辺に存在する鉛濃度は、いまなお健康影響が懸念されるレベルにあることを明らかにした。

Keywords: lead, paint, atomic absorption spectrometry

* 山口大学教育学部

Nishioka, K.*¹, Seguchi, T.*¹, Kaniwa, M. and Suetomi, R.*²: **Occupational contact dermatitis due to biotin precursor** *Contact Dermatitis*, 39, 49-51 (1998)

ビオチンの前駆体である(3aS,6aR) hexahydro-1,3-debenzyl-6-hydroxyfurano[3,4-d]imidazol-2,4-dione を合成している医薬品工場において作業者がアレルギー性接触皮膚炎を発生した事例について検討し、上記の化合物が強い皮膚感作性物質であり、原因化学物質となっていたことを明らかにした。

Keywords: biotin precursor, occupational contact allergy, pharmaceutical industry

*¹ 山口赤十字病院

*² 末富皮膚科医院

日野治子*¹, 長谷川 毅*¹, 湧川基史*¹, 鹿庭正昭, 見城一敏*²: **眼鏡フレームの“先セル”による接触皮膚炎** *臨床皮膚科*, 52(9), 701-703 (1998)

眼鏡フレームの先セルが当たる両耳介にアレルギー性接触皮膚炎を生じた事例について検討し、先セルに配合されていた樹脂の着色剤がパッチテストで強い陽性反応を示し、原因となっていたことを明らかにした。着色剤中の色素成分についての詳細な検討は患者の協力が得られず実施できなかったが、2種の有機系着色剤が原因化学物質の候補と推定された。

Keywords: allergic contact dermatitis, eyeglass, colouring agent

*¹ 関東中央病院

*² コンテス

Kato, H.*¹, Kuwano, A.*¹, Ishii, M.*¹ and Kaniwa, M.: **A case of contact dermatitis due to a raincoat** *Environmental Dermatology*, 5(3), 186-190 (1998)

ナイロン製レインコートによるアレルギー性接触皮膚炎事例を検討した結果、裏地にコーティングされていた合成ゴムに配合された加硫促進剤の2-mercaptobenzothiazole が原因化学物質となっていたことを明らかにした。

Keywords: allergic contact dermatitis, rubber raincoat, 2-mercaptobenzothiazole

* 大阪市立大学医学部

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Nakamura, A., Beppu, M.* and Kikugawa, K.*: **Effect of vitamin E on contact sensitization responses induced by 2,4-dinitrochlorobenzene in mice** *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 44, 225-236 (1998)

ビタミンEがマウスの2,4-dinitrochlorobenzene (DNCEB) に対する接触感作性反応に与える影響を検討した。ビタミンE欠乏食を摂取させたマウスでは脾臓及びリンパ節のチオバルビツール酸価が増加し、ビタミンEによる臓器脂質過酸化の抑制が認められた。ビタミンE欠乏食摂取マウスではDNCEBによる感作誘導に伴うリンパ節細胞増殖反応が通常食摂取マウスよりも低下し、in vitroの惹起反応の脾臓リンパ球幼若化反応も低下した。この幼若化反応はビタミンEの外来添加により回復、増強された。ビタミンEは活性酸素種の消去を通じて、接触アレルギーに対するリンパ球の反応性に関与している可能性が考えられた。

Keywords: vitamin E, contact sensitization, lymphocyte

* 東京薬科大学薬学部

Isama, K., Momma, J.*¹, Kaniwa, M. and Nakamura, A.: **Structure-activity relationships for skin sensitization potential of 2-mercaptobenzimidazole and its methyl derivatives**

Environmental Dermatology, 5, 26-33 (1998)

モルモットマキシミゼーション法を用いて、2-メルカプトベンズイミダゾール(MBI)及びそのメチル誘導体の皮膚感作性について検討した。チオアミド/イミノチオール互変異性する水素原子をもつMBI、2-メルカプト-1-メチルベンズイミダゾール(1MMBI)、2-メルカプト-4-メチルベンズイミダゾール(4MMBI)、2-メルカプト-5-メチルベンズイミダゾール(5MMBI)、2-メルカプト-5,6-ジメチルベンズイミダゾール(56DMBI)には皮膚感作性が認められた。ところが、互変異性する水素原子をもたない2-(メチルメルカプト)ベンズイミダゾール、1-メチル-2-(メチルメルカプト)ベンズイミダゾール、2-メルカプト-1,3-ジメチルベンズイミダゾールには皮膚感作性が認められなかった。また、皮膚感作性強度は、56DMBI > 1MMBI > 4MMBI > 5MMBI > MBIとなり、n-オクタノール/水系における分配係数(log P)と直線関係を示すことが分かった。

Keywords: structure-activity relationship, skin sensitization potential, 2-mercaptobenzimidazole

* 医薬品機構

Isama, K., Momma, J.*¹, Kaniwa, M. and Nakamura, A.: **Skin sensitization potentials of 2-mercapto-5-substituted benzimidazoles in guinea pigs**

Environmental Dermatology, 5, 86-92 (1998)

2-メルカプト-5-置換ベンズイミダゾール(5-置換MBI)の皮膚感作性及び交叉反応性について検討した。その結果、モルモットマキシミゼーション法において、すべての被験物質で感作が成立した。皮膚感作性強度は、5-メトキシMBI > 5-クロロMBI > 5-ニトロMBI > 5-メチルMBI > MBIとなり、これらの皮膚感作性強度とn-オクタノール/水系における分配係数(log P)とは直線関係を示さなかった。また、すべての被験物質間で相互に交叉反応性が認められた。5-置換MBIの抗原決定基は、チオアミド/イミノチオール互変異性する水素原子をもつチオアミド構造であった。

Keywords: skin sensitization potential, guinea pig maximization test, 2-mercapto-5-substituted benzimidazole

* 医薬品機構

Isama, K., Momma, J.*¹, Kaniwa, M. and Nakamura, A.: **Structure-activity relationships for skin sensitization potential of 2-mercaptobenzimidazole derivatives in guinea pigs**

The Journal of Toxicological Sciences, 23, 361 (1998)

2-メルカプトベンズイミダゾール(MBI)誘導体の皮膚感作性についてモルモットマキシミゼーション法を用いて検討した。その結果、チオアミド/イミノチオール互変異性する水素原子をもつ誘導体には皮膚感作性が認められた。また、メチル置換体の皮膚感作性強度はn-オクタノール/水系における分配係数(log P)と直線関係を示した。さらに、メチル置換体同士及び5-置換体同士はそれぞれ交叉反応性を示し、MBI誘導体の抗原決定基はチオアミド/イミノチオール互変異性する水素原子をもつ部分構造であることが確認された。

Keywords: structure-activity relationship, skin sensitization potential, 2-mercaptobenzimidazole derivative

* 医薬品機構

伊佐間和郎：インターネットによる家庭用品の安全性に関する情報提供

生活と環境, 43, 65-71 (1998)

「NIHS 家庭用品 (療品部第 2 室ホームページ) (http://dmd.nihs.go.jp/dmd2/) で提供している家庭用品の安全性に関する情報の概要と、アクセス状況をまとめた。月間総アクセス件数は 1997 年 2 月には 3708 件であったが、1998 年 2 月には 19173 件と大幅に増加した。アクセスしてきたドメインでは、「or.jp (各種団体)」が 23%、co.jp (一般企業)」が 20%、「ne.jp (ネットワーク関連機関)」が 10% を占めていた。さらに、World Wide Web (WWW) による情報提供の有用性について言及した。

Keywords: internet, world wide web, safety information

Shintani, H.: Differential analysis of blood urea using combined automated ultrafiltration and solid phase extraction in on-line series

J. Liquid Chromatogr., 21, 2205-2210 (1998)

尿毒症に罹患すると血中に尿素が蓄積するため人工透析などで除去し、一定値にまで低減させる必要がある。そのためには血中尿素の選択的な分析法が要求される。まず、マトリックスが血液であるため最適な前処理法の開発が要求される。それゆえ自動化された固相抽出、透析などを高速液体クロマトグラフィーと組み合わせて血中尿素の回収率を比較した。その結果、強陽イオン交換を用いた固相抽出と強陽イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせが尿素分析に一番適していた。

Keywords: urea, solid phase extraction, dialysis

新谷英晴, 佐々木公一*1, 森 由美*1, 梶原庸生*2, 田中敦子*2, 高橋正毅*3, 小久保 護*4, 林 秀雄*5: Soybean Casein Digest (SCD) 培地のメーカー間の差並びに同一メーカーでのロット間の差に拠る滅菌保証達成の違いについて

防菌防黴, 27, 145-151 (1999)

SCD 培地のロット間ならびに/あるいはメーカー間の差により滅菌保証を達成するための D 値が異なることが報告されている。しかし培地組成の中のどの成分がばらつきに原因しているのかは充分明らかになっていない。それが明らかにされなければ再現性のある滅菌保証はうまく達成されないことになる。著者等は種々の SCD 培地を用いて検討した。その結果 SCD 液体培地と SCD 寒天固形培地との間で有意に D 値が異なり、後者での D 値は前者で得られた D 値より有意に高いことが判明した。それゆえ寒天中の成分が D 値ばらつきに寄与している可能性が示唆された。

Keywords: culture medium, biological indicator, variation

*1 エーザイ(株)美里工場

*2 日本製薬(株)

*3 テルモ(株)甲府工場

*4 渋谷工業(株)

*5 センコム(株)

黒須志のぶ*, 鮫島光曜*, 谷合悦子*, 三木亜希子*, 新谷英晴: バイオバーデン測定におけるメンブレンフィルター法での膜孔径の妥当性について

防菌防黴, 27, 159-162 (1999)

ISO TC/198 (医療用品の滅菌)ではろ過滅菌において 0.22 ミクロンさらには 0.1 ミクロン孔径のフィルターの採用が検討されている。その理由は従来から使用されている 0.45

ミクロンのフィルターではバイオバーデン菌数の多少により、ろ液中へのバイオバーデン菌の漏出の可能性が考えられるためとしている。その可能性が正しいかどうかは実験で検証される必要がある。それゆえバイオバーデン菌の同定法、バイオバーデン数ならびに用いたメンブレンの膜孔径の妥当性について検討した。0.45 ミクロンの孔径の膜を用い、バイオバーデン菌が多い場合と少ない場合でバイオバーデン菌の膜からの漏出の差の可能性を検討した。バイオバーデン菌としては *Pseudomonas cepacia* を用いた。*Pseudomonas cepacia* の負荷の多少に関係なく、0.45 ミクロンの膜からの菌の漏出は否定された。

Keywords: bioburden, pore size, membrane filter

* ミノファージェン製薬(株)座間工場

Ando, M., Hiratsuka, H.*1, Nakagawa, J.*2, Sato, S.*3, Hayashi, Y.*4 and Mitsumori, K.: Cadmium accumulation in rats treated orally with cadmium chloride for 8 months J. Toxicol. Sci., 23, 243-248 (1998)

カドミウムを 8 ヶ月連続高濃度で暴露させた場合の臓器中カドミウムの蓄積性を検討するための予備試験として、閾値設定の根拠とされる腎臓中の存在量と暴露量の関係を検討した。600 ppm の 2 ヶ月投与群では既に腎臓に 25 µg/g の蓄積が認められ、腎機能障害とされる 200 µg/g を超過していた。また、200 ppm の 8 ヶ月の暴露条件でも 250 µg/g の濃度に達していた。このことから、閾値設定のための長期 (2 年間) 低濃度の試験には、これ以下の濃度で試験することとした。

Keywords: Cadmium, Tissue Distribution, Renal Toxicity

*1 三菱化学安全科学研究所

*2 東京都立衛生研究所

*3 イナリサーチ

*4 北里大学薬学部

松村年郎, 濱田実香, 伊藤健司*1, 安藤正典, 磯崎昭徳 *2: 室内空気中の有機リン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

室内環境学会誌, 1, 11-17 (1998)

室内環境で検出が予想される有機リン化合物 10 種類について、ガス状と粒子状の形態別測定法を GC/FPD 法を用いて検討した。すなわち、捕集フィルターの選定、添加回収率、ブランク試験、破過試験、試料の保存安定性、実測試験等である。その結果、ガス状と粒子状の分別測定には石英と Empore C18 Disk フィルターの組み合わせが回収率、破過試験、ブランク等の観点からベターであることが判った。本法を居住環境内の有機リン化合物の実測に適用した結果、トリブチルホスフェート (TBP) とトリス (2-クロロエチル) ホスフェート (TCEP) はガス (G) と粒子状 (P) が常に存在しており、TBP はガス/粒子状の比は 0.98、TCEP は 0.56 を示し、TCEP は粒子状物質が高い傾向を示していた。その他、ダイアジノン、クロルピリホス、フェニトロチオン等の農薬系の有機リン化合物も検出された。

Keywords: organophosphorus compounds, determination method, indoor air

*1 日本大学理工学部 (現、東洋特紙工業株式会社)

*2 日本大学理工学部

松村年郎, 長田英二*, 安藤正典: 二酸化窒素とホルムアルデヒドの個人暴露濃度の測定結果について

室内環境学会誌, 1, 19-26 (1998)

著者らが開発したパッシブサンプラーを用いて、都内の集合住宅に居住する主婦を対象に、暖房期と非暖房期に分

けて個人暴露量の実態調査を行い、個人暴露量に及ぼす暖房器具、換気扇使用時間の影響、室内温・湿度の影響、また、ヒトの生活行動パターンの影響等について統計学的に検討し、個人暴露量の予測モデル式を提案した。

Keywords: nitrogen dioxide, formaldehyde, personal exposure levels

* 電気化学計器(株)

渡辺文雄*, 松延邦明*, 松村年郎, 安藤正典: 二酸化窒素のパッシブドジチューブの開発

室内環境学会誌, 1, 35-40 (1998)

化学的知識を持たない一般の人が室内環境中の二酸化窒素濃度を簡単に、安価に、迅速に測定し、その結果を基に窓の開放等の室内汚染防止対策を自らできることを目的として、パッシブドジチューブの開発を行った。本法は分子の拡散原理に基づいた検知管方式のサンプラーで室内に設置するだけで室内NO₂濃度が簡単に測定できる簡易測定器である。本法の総合精度は±20.7%、米国立労働安全衛生研究所(NIOSH)のガイドラインをクリア(±25%)している。また、本サンプラーは2時間暴露で0.05 ppmのNO₂の測定が可能である。更に、化学発光法のNO₂自動計測器と高い相関が認められた。

Keywords: nitrogen dioxide, passive dosi-tube, multipore plastic diffuser

* ガステック(株)

徳永裕司, 小笹知彦, 内野 正, 安藤正典: UVAによる紫外線防御剤の *In vitro* 評価法に関する研究

日本化粧品技術者会誌, 32, 287-291 (1998)

我が国において、UVAに対する紫外線防御剤の *in vitro* 評価法は1996年以来設定されている。この方法は実験にヒトの背部皮膚を用いるため、被験者に苦痛を与える方法である。そこで、我々はUVA *in vivo* 評価法の代替法として *in vitro* 評価法を検討した。トランスポアサージカルテープに紫外線防御剤2 mg/cm²を塗布した後、そのテープを0.1 mM リポフラビン溶液、8 mM メチオニン溶液および1.5 mM ニトロブルーテトラゾリウム溶液の混液(4:1:5) 0.1 mlを入れた96穴マイクロプレート上に置き、350~380 nmのUVAを照射した。3分間隔で30分間550 nmでの吸光度を測定したとき、吸光度と測定時間の間の回帰方程式は直線を示した。紫外線防御剤のテープへの塗布と無塗布のものをを用いたときに得られた直線の傾き、S_T及びS₀から *in vitro* PFA 値を求めたとき、両者によい相関関係が認められ、*in vitro* 評価法としての可能性が示唆された。

Keywords: sunscreen, *in vitro* PFA value, UVA

徳永裕司, 内野 正, 安藤正典: ウサギ赤血球の溶血に及ぼす界面活性剤の影響

日本化粧品学会誌, 22, 175-181 (1998)

界面活性剤の生体膜への影響を調べるため、アニオン性界面活性剤8種類、カチオン性界面活性剤9種類および非イオン性界面活性剤12種類のウサギ赤血球膜への影響が溶血反応を用いて研究された。種々の濃度の界面活性剤溶液で赤血球を処理した後、20分後の740 nmでの吸光度が測定され、赤血球を50%溶血するのに必要な界面活性剤の濃度(EC₅₀)が求められた。アニオン性界面活性剤の赤血球への影響は界面活性剤のアルキル鎖長に依存しており、アルキル鎖長12のsodium dodecyl sulfate, lauroyl L-glutamate, sodium dodecane sulfonateで出現し、1/EC₅₀は0.21/mMであった。カチオン性界面活性剤の場合には、アルキル鎖長14で赤血球の溶血が現れ、アルキル鎖長の増加

に伴い1/EC₅₀は増加することが明らかになった。アニオン性およびカチオン性界面活性剤の場合、赤血球の溶血の出現点でのアルキル鎖長とメチルパラベン、サリチル酸を透過指標物質としたモルモットの腹部剥離皮膚での透過速度の増加点でのアルキル鎖長の間には一致が観察された。非イオン性界面活性剤のHLBと1/EC₅₀の間には関連性が認められなかった。

Keywords: red blood cells, hemolysis, surfactants

徳永裕司, 鄭 然孫, 内野 正, 安藤正典: 非イオン性界面活性剤のポリオキシエチレン鎖のモルモットの剥離皮膚および赤血球の溶血に及ぼす影響

日本化粧品学会誌, 22, 287-293 (1998)

非イオン性界面活性剤のポリオキシエチレン(EO)鎖の生体膜への影響を調べるため、EO鎖の異なる4種類の非イオン性界面活性剤の影響をモルモットの腹部剥離皮膚および赤血球を用いて研究した。37℃で2時間皮膚を0.5%界面活性剤溶液で処理した後、透過指標物質のメチルパラベン(MP)およびサリチル酸(SA)の皮膚累積透過量を2~6時間測定した。また、赤血球を50%溶血するのに必要な界面活性剤の濃度(EC₅₀)を求めた。4.2~25のEO鎖を持つpolyoxyethylene lauryl ether(POE.LE)および5~20のEO鎖を持つpolyoxyethylene nonylphenyl ether(POE.NP)の場合、親水性/疎水性バランスとMPの相対透過速度(%)の間および1/EC₅₀の間に良い相関関係が認められた。2~50のEO鎖を持つpolyoxyethylene oleyl ether(POE.OE)の場合、SAの相対透過速度(%)は150.7~134.5%であり、皮膚角質層のpolar pathwayに影響を与えていることが示唆された。40~100のEO鎖を持つpolyoxyethylene hydrogenated castol oilの場合、赤血球膜への影響は低いことが示唆された。

Keywords: excised skin, red blood cells, nonionic surfactants

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: 赤血球を用いたUVA防御剤の *in vitro* 評価法

日本化粧品学会誌, 22, 98-101 (1998)

UVA防御指数(PFA)の代わりにUVA防御剤の *in vitro* 評価法を開発するため、光増感剤としてヘマトポルフィリン及びPFA既知のUVA防御剤の存在下でウサギ赤血球にUVA(350~380 nm)を照射し、溶血率を測定した結果、防御剤の濃度依存的に溶血率の減少が有意に抑制された。溶血を50%抑制する防御剤の濃度の逆数(1/IC₅₀)とPFAとの相関性を検討すると、1/IC₅₀とPFAとは顕著に有意な相関を示した。これらの結果から1/IC₅₀はUVA防御剤の *in vitro* 評価法の指標になり得ることが示唆された。

Keywords: UVA, PFA, 1/IC₅₀

Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T. and Ando, M.: Changes in rat liver cytochrome P450 enzymes by atrazine and simazine treatment

Xenobiotica, 28, 683-698 (1998)

ラットにアトラジンあるいはシマジン(100, 200および400 μmol/kg)を1日1回3日間腹腔内投与し、肝シトクロムP450の変動について検討した。テストステロン2α-ヒドロキシラーゼ活性は、アトラジンおよびシマジンの投与により有意に減少し、その活性は、対照群のそれぞれ59~46および60~32%であった。しかし、抗ラットCYP2C11/6抗体を用いたウエスタンブロッティングからは、これら化合物によるCYP2C11レベルの有意な変化は認められなかった。アトラジンおよびシマジン投与群のテストステロン2α-ヒドロキシラーゼのV_{max}およびCl_{int}は、対照群のそれらより低かったことからアトラジンおよびシマジンは、ラ

ット肝の CYP2C11 を不活性化させることが推察された。
Keywords: atrazine, simazine, cytochrome P450

Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M.:
Suppression of male specific cytochrome P450 isoforms by bisphenol A in rat liver

Arch. Toxicol., **72**, 387-394 (1998)

ラットにビスフェノール A (10, 20 および 40 mg/kg) を 1 日 1 回 4 日間腹腔内投与し、肝シトクロム P450 の変動について検討した。テストステロン 2 α -ヒドロキシラーゼ活性は、ビスフェノール A 投与により用量依存的に減少し、最も減少した 40 mg/kg 投与群における活性は、対照群の 13% であった。また、テストステロン 6 β -ヒドロキシラーゼも 40 mg/kg のビスフェノール A 投与により対照群の 50% まで活性が減少した。ウエスタンブロッティングからビスフェノール A 投与による CYP2C11 および CYP3A2 レベルの低下が認められたが、それらの減少率は、シトクロム P450 依存性酵素活性のような顕著なものではなかった。また、テストステロン 2 α -ヒドロキシラーゼおよびテストステロン 6 β -ヒドロキシラーゼの Cl_{int} は、20 および 40 mg/kg のビスフェノール A 投与により有意に減少し、ビスフェノール A は、ラット肝の雄特異的シトクロム P450 分子種である CYP2C11 および CYP3A2 を不活性化させることが示唆された。

Keywords: bisphenol A, cytochrome P450

Hanioka, N., Jinno, H., Kitazawa, K.*, Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M. and Ogawa, K.*: **In vitro biotransformation of atrazine by rat liver microsomal cytochrome P450 enzymes**

Chem.-Biol. Interact., **116**, 181-198 (1998)

ラット肝ミクロソームにおけるアトラジンの *in vitro* 代謝について検討した。主代謝物として *N*-脱イソプロピル化体 (DeiPr-ATZ) が、微量代謝物として *N*-脱エチル化体 (DeEt-ATZ) およびイソプロピルアミノ基の 1-水酸化体 (iPrOH-ATZ) が雌雄いずれのラットでも検出された。シトクロム P450 阻害剤・基質および抗ラットシトクロム P450 抗体を用いた阻害実験から、雄ラットでは、CYP2B2, CYP2C11, CYP2D1 (iPrOH-ATZ のみ) および CYP2E1 が、雌ラットでは、CYP2B2, CYP2D1 および CYP2E1 がアトラジンの代謝に関与していることが示唆された。しかし、雌雄いずれのラットにおいてもアトラジンから DeiPr-ATZ, DeEt-ATZ, iPrOH-ATZ の生成と各シトクロム P450 指標との間には全く有意な相関関係は認められず、未処理ラットにおけるアトラジンの *in vitro* 代謝にはあるシトクロム P450 分子種が選択的に関与するのではなく、複数のシトクロム P450 分子種が関与することが示唆された。

Keywords: atrazine, metabolism, cytochrome P450

* 三菱化学安全科学研究所

Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T. and Ando, M.: **In vitro metabolism of chlorotriazines: Characterization of simazine, atrazine, and propazine metabolism using liver microsomes from rats treated with various cytochrome P450 inducers**

Toxicol. Appl. Pharmacol., **156**, 195-205 (1999)

シマジン (SIZ), アトラジン (ATZ) およびプロバジン (PRZ) のラット肝ミクロソームにおける *in vitro* 代謝について検討した。*N*-脱アルキル化体 (SIZ-M1, ATZ-M1, ATZ-M2 および PRZ-M2) の生成は、3-メチルコランズレン、フェノバルビタールおよびピリジン投与により、イソプロ

ピルアミノ基の 1-水酸化体 (ATZ-M3 および PRZ-M4) の生成は、フェノバルビタール、ピリジンおよびクロフィブレートにより有意に増加した。Eadie-Hofstee プロットを用いて *in vitro* 代謝の速度論的解析を行ったところ、SIZ, ATZ および PRZ の代謝物生成の V_{max} および Cl_{int} は、デキサメタゾン以外の P450 誘導剤で有意な影響を受けた。また、SIZ-M1, ATZ-M1, ATZ-M2 および PRZ-M2 の生成は、CYP1A1/2 と、ATZ-M3 および PRZ-M4 の生成は、CYP2B1/2 と良い相関性を示し、クロロトリアジン系農薬の代謝における脱アルキル化反応と水酸化反応の誘導性あるいはこれら反応に関与する各 P450 分子種の寄与率は異なることが示唆された。

Keywords: chlorotriazine, metabolism, cytochrome P450

Jinno, H., Hatakeyama, N.*, Hanioka, N., Yoda, R.*, Nishimura, T. and Ando, M.: **Cytotoxic and porphyrinogenic effects of diphenyl ethers in cultured rat hepatocytes: Chlornitrofen (CNP), CNP-amino, chlormethoxyfen and bifenox**

Food Chem. Toxicol., **37**, 69-74 (1999)

ジフェニルエーテル系除草剤 CNP, CNP アミノ体, クロメトキシフェン及びピフェノックスについて、ラット肝細胞の細胞生存率とヘム合成に対する影響を検討した。CNP アミノ体の肝細胞毒性が最も強く、その LC_{50} は 0.36 mM であった。CNP にも 0.5 mM 以上で細胞毒性が観察されたが、クロメトキシフェンとピフェノックスでは 1 mM までの濃度で細胞生存率の低下は認められなかった。CNP アミノ体の肝細胞毒性は SKF 525-A 前処理で増強され、メチマゾール処理で抑制されることから、フラビン含有モノオキシゲナーゼが CNP アミノ体の代謝活性化に関与していることが明らかになった。一方、いずれの化合物も濃度依存的に肝細胞のポルフィリン蓄積を引き起こし、蓄積した主なポルフィリン種はプロトポルフィリン IX であり、ジフェニルエーテル化合物及びそのアミノ体による肝細胞プロトポルフィリンノーゲンオキシダーゼの阻害が示唆された。

Keywords: diphenyl ether herbicides, hepatotoxicity, heme biosynthesis

* 共立薬科大学

佐々木久美子, 中村優美子, 二宮隆博*¹, 田中敏嗣*², 豊田正武: 1997 年告示 10 農薬への残留農薬迅速分析通知法の適用

食品衛生学雑誌, **39**, 448-452 (1998)

1997 年 9 月に残留基準値が告示された 10 農薬への迅速分析通知法 (1997 年 4 月通知) の適用を検討した。3 試験室で各々 6 作物への添加回収試験を行った結果、アセタミプリド、シプロコナゾール、テブコナゾール、ピリプロキシフェン、ピリミジフェン、メトラクロールには通知法が適用できた。EPTC とブチレートは、濃縮時の揮散に注意すれば適用できた。アクリナトリンとジフェンゾコートには適用できなかった。一部の作物の残留基準値が特に低いシプロコナゾールとテブコナゾールを除いては基準値の 1/2 以下の検出限界が得られた。

Keywords: pesticide residue, rapid analytical method, gel permeation chromatography

*¹ 日本食品衛生協会

*² 神戸市環境保健研究所

石川雅章*¹, 松田りえ子, 林 譲, 四方田千佳子, 山口 晶*², 岩木和夫*², 尾花裕孝*³, 佐藤守俊*⁴, 吉田徹也*⁴,

辻 正彦⁵: 高速液体クロマトグラフィー分析の精度と検出限界に関する共同実験

分析化学, 48, 265-269 (1999)

9 機関において, パラハイドロキシ安息香酸エステル類の HPLC における検出下限を測定した. ベースライン揺らぎから精度及び LOD を予測するソフトウェア TOCO を用いて, 各機関の結果を解析した. 各機関で得た LOD は, 0.16 µg/L から 30 µg/L の範囲にあった.

Keywords: limit of detection, precision, HPLC

*1 静岡県富士保健所

*2 荏原総合研究所

*3 大阪府立公衆衛生研究所

*4 長野県衛生公害研究所

*5 兵庫県立衛生研究所

Katsumine, M.*, Iwaki, K.*, Matsuda, R. and Hayashi, Y.: Routine check of baseline noise in ion chromatography

J. Chromatogr. A, 833, 97-104 (1999)

2 年間にわたるイオンクロマトグラフィーのベースライン揺らぎを解析した. この結果, サプレッサーの異常, 溶離液の異常がベースライン揺らぎ解析から, 早期に検出できることが明らかとなった.

Keywords: ion chromatography, precision

* Ebara Research Co. Ltd., Center of Technology Development

Nemoto, S. and Lehotay, S. J.*: Analysis of multiple herbicides in soybeans using pressurized liquid extraction and capillary electrophoresis

J. Agric. Food Chem., 46, 2190-2199 (1998)

加圧溶媒抽出 (PLE) 及びキャピラリー電気泳動 (CE) を用いて大豆中の 6 種類 (イマザキン, クロリムロンエチル, チフェンスルフロンメチル, アシフルオフエン, ベンタゾン, 2,4-D) の極性の高い除草剤の同時分析法を開発した. PLE 抽出液はクリーンアップ後 CE で UV (240 nm) を用いて測定した. クリーンアップ法については, 液-液分配, ゲル浸透クロマトグラフィー, セミ分取 HPLC, 固相抽出など様々な方法について比較検討し, 最もクリーンアップ効果の高い組み合わせを選択した. 6 種類の除草剤のうち 4 種類については基準値濃度での添加回収実験で測定が可能であり, 平均回収率は 71%, 相対標準偏差 (RSD) は 11% であった. また, 高濃度添加回収実験ではいずれの除草剤も 70% 以上の回収率が得られ, RSD はばらつきが大きかったアシフルオフエンを除き 10% 未満であった.

Keywords: herbicides, pressurized liquid extraction, capillary electrophoresis

* USDA Agricultural Research Service

Akiyama, H., Uraroongroj, M., Miyahara, M., Goda, Y. and Toyoda, M.: Quantitation of fumonisins in corn by HPLC with o-phthalaldehyde postcolumn derivatization and their identification by LC/MS

Mycopathologia, 140, 157-161 (1998)

フモニシン B1 とフモニシン B2 についてイオンペア試薬と揮発性緩衝液を使用しないでアイソクラティック分離し, オルトフタルアルデヒドを用いポストカラム HPLC 法を開発した. このシステムによるトウモロコシ試料におけるフモニシン B1 とフモニシン B2 の検出限界は各々 0.01 mg/g であった. また, 定性確認分析をするために分離条件をイオントラップ LC/MS に適用した. ポストカラム HPLC 法により FB1 が 3.75 mg/g, FB2 が 1.44 mg/g 検出された自然

汚染トウモロコシ試料の LC/MS 分析において, 選択イオンモニタリングモードにより各フモニシンが定性確認された.

Keywords: fumonisins, HPLC, LC/MS

松岡 猛*, 川島よしみ*, 穂山 浩, 三浦裕仁*, 合田幸広, 瀬畑 環*, 一色賢司*, 豊田正武, 日野明寛*: **ダイズ及びダイズ加工食品からの組換え遺伝子の検出方 (第 1 報)**

食衛誌, 40, 149-157 (1999)

PCR 法を用いて, 遺伝子組換えダイズ (GM ダイズ), 非組換えダイズ (non-GM ダイズ) 及びそれらのダイズを用いた加工食品から, 組換え遺伝子の検出を行った. 検知感度は, ダイズ種子においては 0.05% の GM ダイズの混入したもので, 豆腐においては 0.5% の GM ダイズを含有した豆腐までであった. 市販豆腐 41 試料に本法を適用し, 27 試料の豆腐から組換え遺伝子を検出した. 納豆では, 本法による組換え遺伝子の検出は困難であった. しかし, 挽き割り納豆において, nested PCR 法によりダイズに内在的に含まれるレクチン遺伝子を検出できた.

Keywords: genetically modified soybean, PCR, detection technique

* 農水省食品総合研究所

神田智正*, 穂山 浩, 柳田顕郎*, 田辺正行*, 合田幸広, 豊田正武, 手島玲子, 齋藤行生: **Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells**

Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(7), 1284-1289 (1998)

リンゴ未熟果実からポリフェノール画分の抗アレルギー活性を各種試験法により評価した. 未熟果実から逆相カラムクロマトグラフィーで得られた粗ポリフェノール画分 (CAP) をさらに LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製しエピカテキン類の 2 量体から 15 量体の混合物から構成されている縮合型タンニン画分 (ACT) を得た. ACT は抗原抗体刺激による RBL-2H3 からのヒスタミン遊離や compound 48/80 刺激によるラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離を阻害した. また ACT はヒアルロニダーゼ活性を阻害し, RBL-2H3 における抗原刺激時の細胞内カルシウム濃度の増加も阻害した. この結果より ACT はカルシウム流入を含んだ早期の細胞内情報伝達系に影響することが示唆された.

Keywords: apple polyphenol, anti-allergic activity, calcium influx

* ニッカウヰスキー (株)

豊田正武, 内部博泰*, 柳 俊彦*, 河野洋一*, 堀 就英*, 飯田隆雄*: **日本における食事経由の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs の摂取量**

食衛誌, 40, 98-110 (1999)

全国 7 地区から集めたトータルダイエット試料 (1997 年度) を用い, 14 食品群別及び総摂取量を調べた. 1 日摂取量は, PCDDs+PCDFs が平均 48.0 ± 11.7 pgTEQ/人 (29.9~69.5 pgTEQ/人), Co-PCBs が平均 72.7 ± 21.6 pgTEQ/人 (37.7~102.2 pgTEQ/人) で, Co-PCBs を含めた 1 日総摂取量は平均 120.7 ± 31.3 pgTEQ/人 (68.7~158.8 pgTEQ/人) で, 体重 kg 当たりでは平均 2.4 ± 0.6 pgTEQ/kgbw/day (1.4~3.2 pgTEQ/kgbw/day) であった. 食品群別摂取割合は, 10 群 (魚介類) 62.4%, 11 群 (肉・卵類) 17.3%, 12 群 (乳・乳製品) 7.8% で, その他 12.5% であった.

Keywords: dioxins, PCDDs, coplanar PCBs

*1 (財)日本食品分析センター

*2 福岡県保健環境研究所

豊田正武, 飯田隆雄*1, 堀 就英*1, 柳 俊彦*2, 河野洋一*2, 内部博泰*2: 日本における市販食品中の PCDDs, PCDFs 及び Coplanar PCBs 含有量

食衛誌, 40, 111-121 (1999)

市販の魚, 酪農食品, 野菜, 果実等 26 種 119 試料についてダイオキシン類等の汚染レベルを調査した。当量濃度は, 魚類が平均 1.600TEQpg/g (0.121~10.397TEQpg/g), スズキの 1 例は 10TEQpg/g を超えた。肉類は平均 0.295TEQpg/g (0.011~2.960TEQpg/g) で, 濃度は牛肉, 鶏肉, 豚肉の順であった。牛乳は平均 0.050TEQpg/g (0.012~0.081TEQpg/g), チーズは平均 0.179TEQpg/g (0.059~0.263TEQpg/g) であった。米, サツマイモ, 豆類, リンゴは, 平均 0.015TEQpg/g 以下で, キュウリ, 長ネギ, 白菜, 椎茸も平均 0.021TEQpg/g 以下であった。小松菜は平均 0.144TEQpg/g で, ホウレン草は平均 0.189TEQpg/g と最も高い。

Keywords: dioxins, PCDDs, coplanar PCBs

*1 福岡県保健環境研究所

*2 (財)日本食品分析センター

豊田正武, 松田りえ子, 五十嵐敦子, 齋藤行生: 日本における環境汚染物の 1 日摂取量の推定およびその由来の解析

食品衛生研究, 48(9), 43-65 (1999)

1986年~1997年にかけ9~11 地方衛生研究所と協力して行ったトータルダイエット試料からの環境汚染物の摂取量を報告した。同時に各環境汚染物について濃度の高い個別食品別含有量の経年変化も示した。HCH, DDT, PCB の摂取量は低レベルにあるものの減少傾向は緩やかであり, 魚介類中の濃度が高く摂取量への寄与率も大きい。有害金属の鉛, ヒ素, 水銀, カドミウムの摂取量には近年ほとんど変化がない。鉛とカドミウムは穀類, 水銀は魚類由来の摂取が多い。有機塩素系農薬の 1 日摂取量は, 検出限界を定量下限の 1/2 として計算しても ADI の 5% 以下であった。

Keywords: DDT, PCB, cadmium

Kondo, K., Kurihara, M., Miyata, N., Suzuki, T. and Toyoda, M.: Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation,

Arch. Biochem. Biophys., 362, 79-86 (1999)

カテキン類, (-)-epicatechin 及び (-)-epigallocatechin の peroxy radical に対する抗酸化反応機構について, 初期反応生成物を LC/MS, photodiode array (PDA) により構造解析するとともに, 半経験的分子軌道法を用いて結合解離エンタルピーを計算することにより反応部位を詳細に検討した。その結果, カテキンは phenol 性水酸基に加え C-2 位の水素が radical 消去に重要であることを明らかにした。

Keywords: catechin, LC/MS, semiempirical MO calculation

Ueno*, S.*, Susa, N.*, Furukawa, Y.*, Komatsu, Y.*, Koyama, S.* and Suzuki, T.: Butyltin and Phenyltin Compounds in Some Marine Fishery Products on the Japanese Market.

Archives of Environmental Health, 54, 20-25 (1999)

日本を代表する 11 種の魚についてブチルスズ化合物及びフェニルスズ化合物の実態調査を行った。その結果, 天然魚中のブチルスズ濃度に比べ, 養殖魚中の濃度は一般に高かった。一方, フェニルスズの濃度はブチルスズの濃度に比べ遙かに低かった。これらの有機スズ濃度は 1990 年の

法による規制の結果, 劇的に減少したものと考えられる。一日許容摂取量を基にして, 日本の市場における摂取量を計算すると, 健康を損なう濃度レベルより遙かに低い濃度であると判明した。しかしながら, ある種の養殖魚においては, 依然, 好ましくないレベルにあることが判明した。

Keywords: butyltin, fish, survey

* Department of Veterinary Public Health School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University

Miura, H.*1, Kitamura, Y.*1, Ikenaga, T.*1, Mizobe, K.*1, Shimizu, T.*2, Nakamura, M.*2, Kato, Y.*2, Yamada, T., Maitani, T. and Goda, Y.: Anthocyanin production from *Glehnia littoralis* callus cultures

Phytochemistry, 48, 279-283 (1998)

ハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) の葉柄由来のアントシアニン産生カルスを確立し, 産生する主アントシアニンの構造を, 新規化合物である cyanidin3-(6-(6-(E)-feruloyl)- β -D-glucopyranosyl-2- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside と同定した。培養細胞中のアントシアニン含量は, 乾燥重量で 14% に達し, 生産性は, 5 年間に渡って維持された。

Keywords: *Glehnia littoralis*, callus culture, acylated anthocyanin

*1 長崎大学薬学部

*2 三栄源エフ・エフ・アイ(株)

合田幸広, 酒井信夫, 中村高敏, 穂山 浩, 豊田正武: モロヘイヤ種子中の主強心配糖体の同定, 分析及び, マウスに対する経口毒性について

食衛誌, 39, 256-265 (1998)

モロヘイヤ (*Corchorus olitorius* L.) はシナノキ科の植物で, 中央及び南アジアからアフリカにかけて広く栽培されているが, 近年我が国でも, 野菜として利用される様になり, また健康食品材料として注目されている。他方, 平成 8 年 10 月, 長崎県の農家で牛が同植物種子を食べて死亡する事件がおこった。本報告では, 安全性確保の観点から, 日本で栽培されているモロヘイヤの種子中の強心配糖体の単離構造決定を行い, モロヘイヤ種子に, strophanthidin 強心配糖体に加え, これまで報告のなかった digitoxigenin 配糖体が主強心配糖体として存在していることを明らかにした。次いで, 単離した主強心配糖体について, マウス経口毒性を評価した。さらに, 日本各地で採取したモロヘイヤ種子の成分分析を行い, その結果から, モロヘイヤ種子中の成分は, 種子の色と明確な関連があることを示し, 強心配糖体生合成とモロヘイヤの種子の熟度が関連することを推定した。

Keywords: *Corchorus olitorius*, cardenolide glycoside, mice acute oral toxicity

Nakamura, T., Goda, Y., Sakai, S., Kondo, K., Akiyama, H., Toyoda, M.: Cardenolide glycosides from seeds of *Corchorus olitorius*

Phytochemistry, 49, 2097-2101 (1998)

日本で栽培されているモロヘイヤの種子中の強心配糖体として, 8 種の既知強心配糖体に加え, 新規な digitoxigenin, periplogenin 及び, cannogenol 配糖体 3 種の単離構造決定を行った。

Keywords: cannogenol glycoside, periplogenin glycoside, digitoxigenin glycoside

合田幸広, 酒井信夫, 中村高敏, 近藤一成, 穂山 浩,

豊田正武: HPLCによるモロヘイヤ (*Corchorus olitorius*)
及びその加工品中の Digitoxigenin 配糖体の分析

食衛誌, 39, 415-412 (1998)

HPLC と固相抽出を組み合わせた, モロヘイヤ各部位及びモロヘイヤ関連食品中の digitoxigenin (DG) 強心配糖体の分析方法を開発し, 食品中には, DG 強心配糖体が含まれていないことを明らかにした.

Keywords: *Corchorus olitorius*, digitoxigenin glycoside, HPLC

石綿 肇, 山田 隆, 他 21 名: 日本人の B 群 (食品の常成分としても存在する化合物) 食品添加物の一日摂取量調査

日本食品化学学会誌, 5, 178-190 (1998)

マーケットバスケット法により, 食品の常成分としても存在する食品添加物 160 品目 (56 化合物) の一日摂取量調査を行った. 1 人 1 日当たりのこれらの食品添加物の摂取量は天然由来成分も含めて 16.1 mg であった. ADI を越えたものは硝酸塩で, ADI の 125% であった. その大部分は自然含有量であった.

Keywords: food additives, daily intake, ADI

杉田たき子, 川崎洋子, 長田正大*, 石綿 肇, 山田 隆:
GCによる酢酸ビニル樹脂中の酢酸ビニルモノマーの分析

食品衛生学雑誌, 39, 410-414 (1998)

ガムベースとして用いられる酢酸ビニル樹脂中の酢酸ビニルモノマーの分析法を開発した. 試料をトルエンに溶解し, FID-GC (DB-1, 0.32 mmx30 m) により分析した. 12 試料について分析を行ったところ, 6 試料よりモノマーが検出された. 濃度は, 3~12 µg/g であった. 検出限界は 3 µg/g.

Keywords: chewing gum base, polyvinyl acetate, vinyl acetate monomer

* 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

川崎洋子, 石綿 肇, 加藤千晶, 山田 隆: 食品中のアルギン酸ナトリウムの定量分析法

食品衛生学雑誌, 39, 297-302 (1998)

食品中のアルギン酸ナトリウムの分析法を開発した. 除たんばく剤として硫酸マグネシウム/硫酸ナトリウム溶液を用い, 1% 炭酸水素ナトリウム溶液でベクチン質を沈殿除去した. 17 品目の食品で 0.01% の添加回収率は 75% 以上. 定量限界は 0.002% であった.

Keywords: sodium alginate, uronic acid, naphthoresorcinol reaction

Maitani, T., Kabashima, J., Kubota, H., Sugimoto, N. and Sato, K.: Contents of mercury and cadmium in commercial annatto extracts

Jpn. J. Food Chem., 5, 226-229 (1998)

天然添加物アナー色素及び合成添加物水溶性アナー色素の成分規格において, 水銀及びカドミウム単独の規格が必要かを検討するために, 市販製品の実態調査を実施した. 水銀については EU の規制値 (1 mg/kg) を越える製品が存在したこと等により規格の必要性が示唆されたが, カドミウムについては全製品で EU の規制値 (1 mg/kg) の 1/10 以下であったため, 単独の規格は必要ないと考えられた.

Keywords: annatto extract, mercury, cadmium

坂元 (佐々木) 史歩, 合田幸広, 米谷民雄: 市販カラメル色素中の 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミ

ダゾールの分析

日本食品化学学会誌, 5(1), 47-50 (1998)

天然着色料カラメル色素の成分規格を設定するための研究として, 市販のカラメル I, III, IV の製品につき, 免疫毒性等が報告されている 2-アセチル-4-テトラヒドロキシブチルイミダゾール (THI) の含量を, HPLC により分析した. その結果, 製造工程の熱処理時にアンモニウム化合物が加えられるカラメル III においては, すべての製品中に THI が検出された. 一方, 熱処理時にアンモニウム化合物と亜硫酸化合物の両者が加えられるカラメル IV では, THI は全く検出されなかった. そのため, THI の規格はカラメル III のみで必要と考えられた.

Keywords: caramel color, 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole, ammonium compound

坂元 (佐々木) 史歩, 佐藤恭子, 阿部雅美, 杉本直樹, 米谷民雄: 天然着色料ウコン色素の成分分析とクルクミンの光安定性

日本食品化学学会誌, 5(1), 57-63 (1998)

天然着色料ウコン色素の成分規格設定のための研究として, 既存添加物ウコン色素及び一般飲食物添加物のウコンにつき, 色素成分を HPLC で分析した. 3 色素成分の比率等から, 市販製品は 2 種に分類された. また, 主色素成分であるクルクミンの光照射実験を実施したところ, クルクミンの閉環化合物のほかに, 数種の分解物が確認された. しかし, 市販のウコン色素からは, これらの光分解物は検出されなかった.

Keywords: turmeric oleoresin, curcumin, photo-stability

坂元 (佐々木) 史歩, 佐藤恭子, 阿部雅美, 杉本直樹, 米谷民雄: クルクミン類の光安定性に及ぼす溶存酸素の影響

日本食品化学学会誌, 5(2), 211-217 (1998)

天然着色料ウコン色素の色素成分であるクルクミン類 (クルクミン, デメトキシクルクミン, ビスデメトキシクルクミン) の光安定性に及ぼす溶存酸素の影響を調べた. その結果, 溶液をあらかじめアルゴンガスで通気処理した場合の方が, 酸素ガスで通気処理した場合より, 光照射に対して不安定であり, 溶存酸素が光安定性に関与していることが示唆された. 一方, 光分解物の構造を調べたところ, クルクミンの光分解物に対応する構造の分解物が, 他の 2 色素の場合においても確認された.

Keywords: curcumin, dissolved oxygen, photo-stability

佐藤恭子, 坂元 (佐々木) 史歩, 川崎洋子, 米谷民雄: ベニコウジ色素中のシトリニンの分析法に関する研究

日本食品化学学会誌, 5(1), 64-68 (1998)

ベニコウジ色素中のシトリニンの分析法として, 前処理に TLC 分取法を用いる方法, 固相抽出カートリッジを用いる方法及び合成吸着剤であるダイヤイオン HP20 のカラムを用いる方法を検討した. TLC 分取-HPLC 法では回収率が低く, かつ粉末試料では, 基剤のデキストリンが Rf 値に影響を与えた. また, 8 種類の固相抽出カートリッジは, 前処理法としていずれも不相当であった. 一方, HP20 カラム処理-HPLC 法では良好な結果が得られた. その方法では, シトリニンの回収率は 90% 以上であった. 検出限界は蛍光検出器を用いた場合, 液体試料で 0.2 µg/g, 粉末試料で 2 µg/g であった.

Keywords: monascus color, citrinin, HPLC

佐藤恭子, 杉本直樹, 坂元 (佐々木) 史歩, 安井義徳*

山田 隆, 米谷民雄: 天然着色料ヘマトコッカス藻色素中の主色素成分の同定

食品衛生学雑誌, 39(6), 368-374 (1998)

天然着色料ヘマトコッカス藻色素の主色素成分について, HPLC を用いて分析したところ, アスタキサンチン (Ast) と類似の UV-Vis スペクトルを持つ 4 種の主色素成分の存在が確認された。けん化したヘマトコッカス藻色素の HPLC 分析及びヘマトコッカス藻色素の LC/APCI-MS 分析により 4 種の主色素成分は Ast モノ脂肪酸エステルと推定された。さらに, それら Ast 脂肪酸エステルを合成し, その LC/APCI-MS 分析を行った結果, 4 種の主色素成分はリノレン酸, リノール酸, オレイン酸及びバルミチン酸を結合脂肪酸とする Ast モノ脂肪酸エステルと同定された。

Keywords: haematococcus algae color, astaxanthin monoester, LC/APCI-MS

* 研修, 現: 東京農林水産消費技術センター

久保田浩樹, 佐藤恭子, 米谷民雄: イオンクロマトグラフィーによるビートレッド製品中の硝酸塩の分析

日本食品化学学会誌, 5(1), 44-46 (1998)

天然着色料ビートレッドの成分規格設定のための研究として, 硝酸塩の分析方法及び市販製品が JECFA 規格の硝酸塩の規格に適合するかについて検討した。その結果, 分析方法としては, イオンクロマトグラフィーが適当であった。それを用いて市販製品を分析したところ, JECFA の規格値を超える製品がいくつかあった。そのため, その規格値を国内で採用した場合には, 製造方法が現行のままだと, 適合できない製品ができる可能性が考えられた。

Keywords: beet red, nitrate anion, ion-chromatography

河村葉子, 河村麻衣子, 武田由比子, 山田 隆: 食品用ポリスチレン製品中のスチレンダイマー及びトリマーの分析

食品衛生学雑誌, 39, 199-205 (1998)

食品用ポリスチレン製品中のスチレンダイマー及びトリマーをシクロヘキサン-2-プロパノール混液で抽出し, GC-FID により, 1,3-diphenylpropane 及び benzyl *n*-butyl phthalate を標準として定量した。25 検体のすべてから, ダイマーが 90~1,030 μ g/g (平均 380 μ g/g), トリマーが 650~20,770 μ g/g (平均 9,210 μ g/g) 検出された。また, トリマーの約 2/3 は, 環状の 1-phenyl-4-(1'-phenylethyl)tetralin であった。溶出試験では, 溶媒の脂溶性が高くなるほど溶出量及び化合物の種類が増加した。またポリスチレンの種類により, 溶出量に大きな差がみられ, 耐衝撃性ポリスチレンが最も多く, 次いで発泡ポリスチレンであり, 一般用ポリスチレンは低かった。

Keywords: polystyrene, styrene dimers, styrene trimers

河村葉子, 三浦麻記子, 三浦由希子, 山田 隆: 酸化防止剤及び紫外線吸収剤に対する γ 線の照射影響

食品照射, 33, 1-9 (1998)

合成樹脂の酸化防止剤及び紫外線吸収剤 28 種類について, γ 線照射影響を検討したところ, 添加剤単独ではいずれの添加剤も安定であった。しかし, それらを練り込んだポリエチレンシートでは, 酸化防止剤の多くは材質中の含量が大きく減少した。このことは, 酸化防止剤が, 合成樹脂中に生成したラジカルや過酸化物と反応して自らも分解し, 照射による合成樹脂の劣化に対して防御的に作用したものと推定された。一方, 紫外線吸収剤は, 照射による変化はほとんどみられず, 照射によりポリマー中に誘起される反応には, ほとんど関与しないものと思われた。ポリエ

チレンシートからの添加剤の溶出については, 水性の食品擬似溶媒では, 照射の有無に関わらず, いずれの添加剤も溶出しなかった。しかし, 脂肪性食品の擬似溶媒においては, 照射により添加剤の溶出量が大幅に減少し, 添加剤自体の分解のほか, ポリマーと添加剤のクロスリンクも示唆された。

Keywords: gamma irradiation, antioxidants, ultra-violet stabilizers

河村葉子, 西 暁子*, 佐々木春美, 山田 隆: ポリスチレン容器入り即席めん中のスチレンダイマー及びトリマーの分析法

食品衛生学雑誌, 39, 310-314 (1998)

ポリスチレン容器入り即席めん中のスチレンダイマー及びトリマーの分析法を検討した。スープまたは調理棄て汁は, *n*-ヘキサンを加えて振とう抽出し, めんは超音波抽出を行った。また, めんとスープを含む試料では, めんを超音波抽出した *n*-ヘキサンでスープを抽出した。抽出液はヘキサン/アセトニトリル分配とフロリジルカラムにより精製した。定量は GC-FID を用い, 1,3-diphenylpropane 及び benzyl *n*-butyl phthalate を基準物質とした。回収率は 77.5~111.7%, 定量限界は 5 ppb であった。即席めん 8 検体の移行試験において, ダイマーは検出されなかったが, トリマーは 5 検体から 5~62 ppb 検出された。

Keywords: instant noodles, styrene trimers, GC-FID

* 日本食品分析センター

河村葉子, 西 暁子*, 前原玉枝, 山田 隆: ポリスチレン容器から即席食品へのスチレンダイマー及びトリマーの移行

食品衛生学雑誌, 39, 390-398 (1998)

即席食品 32 種類について, ポリスチレン容器からのスチレンダイマー及びトリマーの移行量を測定した。調理した食品から, トリマーが nd~62.4 ng/g, 1 食あたり 0~33.8 μ g 検出されたが, ダイマーは検出されなかった。即席めんでは, スープよりもめんの方が, また調理後の放置時間の長い方が, 移行量が多かった。ビーズ発泡成形容器 (EPS) では, 材質濃度が 800 μ g/g 以下と低く, 食品への移行はみられなかった。一方, 押し出し法シート成形容器 (PSP) の材質濃度は 4,800 μ g/g 以上であるが, 生めんやノンフライめんへの移行量は低く, 揚げめんが高かった。また, 電子レンジ調理ではやや高い移行を示した。

Keywords: instant noodles, styrene trimers, migration

* 日本食品分析センター

河村葉子, 佐野比呂美, 山田 隆: 缶コーティングから飲料へのビスフェノール A の移行

食品衛生学雑誌, 40, 158-165 (1999)

飲料中のビスフェノール A は, ポリスチレン固相カートリッジにより抽出精製し, TMS 化後 GC/MS/SIM により定量した。缶入り飲料 47 種類中のビスフェノール A 含有量及び検出頻度は, コーヒー飲料で 3.3~213 ng/mL (11/13) と最も高く, 次いで紅茶飲料 8.5~90 ng/mL (4/9), 茶飲料 3.7~22 ng/mL (5/8) であったが, アルコール飲料では 13 ng/mL (1/10) のみで, 清涼飲料 7 検体からは検出されなかった。缶コーティングの材質別では, 天蓋部が塩化ビニル樹脂の試料で高い移行がみられたが, 天蓋部がエポキシ樹脂で本体が PET の場合は移行はほとんどみられず, 天蓋部本体ともエポキシ樹脂ではその中間の移行量を示した。また飲料缶を 60°C で 4 週間保存しても移行量は増加しなかった。1 缶あたりのビスフェノール A 移行量は最大で 40 μ g であった。

た。

Keywords: can coatings, drinks, bisphenol A

武田由比子, 河村葉子, 山田 隆: アルミ箔製品から各種食品擬似溶媒へのアルミニウム溶出挙動

日本食品衛生学雑誌, 39, 178-183 (1998)

アルミホイルから各種食品擬似溶媒へのアルミニウムの溶出について検討したところ, 溶媒により溶出挙動は大きく異なった。水への溶出は少なく, 水道水では超純水よりわずかに高かった。4%酢酸及び0.5%クエン酸溶液では, 水道水の25~200倍であった。また, 4%酢酸へは, 0.5%クエン酸溶液の2倍以上の溶出量であった。酸性溶媒への溶出は温度及び時間に相関して増加した。一方, アルカリ性溶媒への溶出は, 2時間以内に急激に増加し, その後はほぼ一定の状態となった。市販アルミ箔製品10種類の溶出調査を行ったところ, 95°C30分で超純水への溶出は0.1~0.2 µg/cm², 0.5%クエン酸溶液では4.4~14.6 µg/cm², 4%酢酸では24.4~37.6 µg/cm²であった。

Keywords: aluminium foil product, food-simulating solvent, dissolution

武田由比子, 河村葉子, 山田 隆: アルミホイルから各種食品等へのアルミニウムの移行と食品成分の影響

日本食品衛生学雑誌, 39, 266-271 (1998)

アルミホイル片を酸性21種類, アルカリ性6種類の食品から調製した溶液へのアルミニウム移行は, 酢類, 梅干し類, アルカリ性食品で多かった。酸性食品では, 95°C30分でりん酢, レモン酢及び梅干し漬汁で10.02~13.83 µg/cm², りんご酢, かばす酢, ワインビネガーで6.85~3.11 µg/cm²で果汁及び乳製品で0.66~0.92 µg/cm²であった。穀物酢は0.20 µg/cm²と低く, 4%酢酸の約200分の1であった。アルカリ性食品では, 95°C30分でこんにゃく煮汁で13.72~16.24 µg/cm², しらたき煮汁で88.03~107.4 µg/cm², 中華麺煮汁で10.55~10.97 µg/cm²と高かった。また, 食塩は溶出を高めるが, 糖, タンパク質, アミノ酸及び脂肪は溶出抑制の傾向があり, 特にタンパク質, アミノ酸類は4%酢酸の95°C30分の溶出を10%以下に抑えた。

Keywords: aluminium foil, food component, dissolution

武田由比子, 河村葉子, 山田 隆: 調理によるアルミ箔成型容器から食品へのアルミニウムの移行

日本食品衛生学雑誌, 40, 172~177 (1999)

使い捨てアルミ箔成型容器で調理した食品へのアルミニウム移行量は, あらかじめ薄めたつゆや食材を入れて調理したものは, 水を沸騰させた後につゆ原液や食材を入れた場合の約1/2~1/6であった。食材等の添加により, アルミニウムの移行が大きく抑制された。市販のアルミ箔成型鍋入り食品やトレー入り冷凍食品を, 表示の方法で調理したところ, 前者で0.2 µg/g以下, 後者で0.03 µg/g以下と移行量は極めて少なかった。このように, 調理によるアルミ箔成型容器から食品への移行は, 食品擬似溶媒よりはるかに低い。したがって, アルミ箔成型容器入り食品からのアルミニウムの摂取量は極めて少ないと考えられた。

Keywords: disposable aluminium foil vessel, migration, Cooking

Miyata, N., Yamakoshi, Y., Inoue, H.*¹, Kojima, K.*¹, Takahashi, K.*¹, Iwata, N.*²: Mechanistic study of the inhibition of glutathione S-transferase by C₆₀

Recent Advances in the Chemistry and Physics of Fullerenes and Related Materials, 6, 1227-1235 (1998)

PVPで可溶化したC₆₀によるグルタチオン S-トランスフ

エラーゼ (GST) 活性の阻害について, 精製したマウスのGSTを用いた酵素阻害反応速度の解析, ならびに, 分子動力学計算による酵素阻害反応のシミュレーション解析を行った。C₆₀によるGST活性の阻害は非拮抗的であり, エタクリン酸を基質とするときのKi値は48.8±0.3 µMであった。Sybylプログラムを用いた化学計算の結果は, C₆₀がGSTの二つのサブユニットの間に取り込まれ, 阻害活性を発現する可能性を示した。

Keywords: fullerene, glutathione S-transferase

*¹ 東京医科大学 法医学

*² 理化学研究所

Fukuhara, K. and Miyata, N.: Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent

Bioorg. Med. Chem. Lett., 8, 3187-3192 (1998)

赤ワイン中に含まれるレスベラトロールは抗酸化作用の他, 抗変異原作用, 発癌抑制作用等, 多様な生物作用を示すことから近年特に注目されているポリフェノールの一つである。今回, レスベラトロールはCu²⁺存在下では酸素ラジカルを発生してDNA鎖を切断することを明らかにした。DNAに対する親和性と酸素ラジカル生成機構についても解析を行なった。

Keywords: resveratrol, polyphenol, antioxidant

Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Fukuhara, K., Miyata, N., Masumizu, T.*¹ and Kohno, K.*¹: ·OH and O₂^{·-} Generation in Aqueous C₆₀ and C₇₀ Solutions by Photoirradiation - An EPR Study

J. Am. Chem. Soc., 120, 12363-12364 (1998)

フラレーン類は優れた光増感剤であり, ガンの光線力学療法剤への利用など, 照射下でのフラレーンの生物作用について活発な研究が行われている。照射条件でのフラレーン (C₆₀やC₇₀) の生物作用発現に関与する化学活性種を明らかにする目的で, DNA切断を指標とした*in vitro*生物作用解析実験を行い, 活性発現にはNADHなどの還元剤の存在が重要な役割を果たしていること, また, 従来活性種と考えられていた一重項酸素が活性発現に関与している可能性は非常に低いことを明らかにした。活性種を直接検出する目的でEPR-スピントラップ実験を行い, 反応系内に, ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドが生成していることを見いだした。これらが生物作用発現の活性種と考えられる。

Keywords: fullerene, photosensitizer, hydroxylradical

*¹ 日本電子(株)研究所

Kobayashi, S.*¹, Hamashima, H.*², Kurihara, M., Miyata, N. and Tanaka, A.*¹: Hardness Controlled Enzymes and Electronegativity Controlled Enzymes: Role of an Absolute Hardness-Electronegativity(h-c) Activity Diagram as a Coordinate for Biological Activities

Chem. Pharm. Bull., 46, 1108-1115 (1998)

化学的ハードネス概念から求めた簡潔なパラメータ (物理量) と種々の化合物の生物活性との相関を検討した。その結果, 絶対ハードネス-絶対電気陰性度 (h-c) がキノロン化合物, ダイオキシン類等の生物活性とよい相関があることを見いだした。

Keywords: hardness concept, h-c activity diagram, dioxin

*¹ Department of Drug Analysis, Showa College of Pharmaceutical Sciences

*² Department of Microbiology, Showa College of Pharmaceutical Sciences

Kurihara, M., Ishii, K., Kasahara, Y. and Miyata, N.:
Stereoselective Synthesis of an Erythro N-protected α -Amino Epoxide Derivative

Tetrahedron Lett., **40**, 3183-3184 (1999)

α -アミノエポキシドはプロテアーゼ阻害剤 (HIVPR, レニン, など) の重要な合成中間体である。ここでは、特に合成が難しいエリスロ体の立体選択的な合成を行った。

酵素リパーゼの加水分解を用いた光学分割により末端にトリメチルシリル基を有するプロパルギルアルコールを光学活性体で得た。次に、それを還元して得られるシスオレフィンであるアリルアルコールをエポキシ化し、高選択的にスレオエポキシドを得た。シリル基を除去した後、アルコールを光延試薬でアミノ基に置き換えることでエリスロアミノエポキシドを合成した。

Keywords: stereoselective synthesis, α -amino epoxide, HIV protease inhibitor

Omori, K., Kishi, M.*¹, Nakaoka, T.*¹ and Miyata, N.:
Synergetic Effect of Naphthoquinones on the Mutagenicity of Nitroarenes

Biol. Pharm. Bull., **22**, 90-92 (1999)

環境化学物質であるニトロアレーンとキノンとの相互作用がニトロアレーンの変異原性に及ぼす影響を明らかにする目的で、Ames 法を用いた変異原性試験を行った。その結果、ナフトキノン類が、強い環境変異原物質である 1,3-ジニトロピレンなどの変異原性を 6-10 倍増強することが明らかになった。

Keywords: nitroarene, quinone, mutagenicity

*¹ 神奈川県衛生研究所

Tanaka, M.*, Imawaka, N.*, Kurihara, M. and Suemune, H.*:
Helical versus Planar Conformation of Homooligopeptides Prepared from Diethylglycine (= 2-Amino-2-ethylbutanoic Acid)

Helv. Chim. Acta., **82**, 485-493 (1999)

α, α -ジ置換アミノ酸は、 α 位に2つのアルキル置換基を有するアミノ酸であり、タンパク質を構成する通常の α -アミノ酸と比較してコンフォメーションの自由度が制限されている。 α, α -ジ置換アミノ酸より構成されるホモペプチドは、 α 位のアルキル置換基の種類により、それぞれ異なるコンフォメーション(ヘリックス, プラナー等)をとることが報告されている。ここでは、 α, α -ジ置換アミノ酸であるジエチルグリシンの3, 5, 6 量体を合成し、その結晶中および溶液中の構造を X 線, NMR, 化学計算等により明らかにした。

Keywords: homooligopeptide, α, α -disubstituted amino acid, X-ray crystallographic analysis

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Liu, Y.-M., Jinno, H., Kurihara, M., Miyata, N. and Toyo'oka, T.:
Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in Primary Rat Hepatocyte Cultures by Liquid Chromatography with Laser Induced Fluorescence Detection

Biomed. Chromatogr., **13**, 75-80 (1999)

過酸化脂質である 4-ヒドロキシ-2-ノネナルをレーザー誘起蛍光分析法により、ラット肝細胞より高感度で検出できることを示した。

Keywords: 4-hydroxy-2-nonenal, primary rat hepatocyte culture, laser induced fluorescence detection

Teshima, R., Onose, J., Ikebuchi, H. and Sawada, J.: Ca^{2+} -

ATPase inhibitors and PKC activation synergistically stimulate TNF- α production in RBL-2H3 cells.

Inflamm. Res., **47**, 328-333 (1998)

ラット好塩基球(RBL-2H3)細胞の細胞内カルシウム濃度を上昇させることの知られている3種の小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤(thapsigargin(TG), cyclopiazonic acid(CPA), 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone(DTBHQ)につき、RBL-2H3細胞からの炎症性サイトカインである TNF- α 産生への影響を検討した。プロテインキナーゼC活性化剤であるフォルボルエステル(TPA)共存下で、相乗的な産生がみられることが判明し、この TNF- α 産生は、RNA 合成阻害剤 Actinomycin D で阻害され、免疫抑制剤 FK506 でも抑制されたことより、転写レベルでの活性化の起きていることが示された。

Keywords: RBL-2H3, Ca^{2+} -ATPase inhibitors, TNF- α

Kitani, S.*¹, Silva, N.R.D.*¹, Morita, Y.*¹ and Teshima, R.:
Global environmental pollutant substance vanadium activates mast cells and basophils at the late phase in the presence of hydrogen peroxide.

Environ. Toxicol. Pharmacol., **6**, 1-12 (1998)

チロシン脱リン酸化酵素阻害剤であり、大気中の SPM (浮遊粒子状物質)の成分でもある五酸化バナジウムのヒト好塩基球細胞, ラットマスト細胞, ラットがん好塩基球(RBL-2H3)細胞からの脱顆粒, ロイコトリエン(LTC₄)産生, 細胞内カルシウム濃度上昇への影響について検討した。これらの細胞からの脱顆粒反応は、過酸化水素存在下で、相乗的に促され、細胞内カルシウム濃度上昇, LTC₄産生とよい相関がみられた。バナジウムによる脱顆粒反応は、PI-3-kinase 阻害剤ワートマニンにより阻害されること、IgE 受容体を介する情報伝達系を欠損するヒトの好塩基球細胞においても引き起こされることから、比較的後期の情報伝達系に作用しているものと考えられた。

Keywords: vanadium, mast cells, degranulation

*¹ 東京大学医学部

Onose, J.*¹, Teshima, R. and Sawada, J.: Ca^{2+} -ATPase inhibitor induces IL-4 and MCP-1 production in RBL-2H3 cells.

Immunol. Lett., **64**, 17-22 (1998)

2種の小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤(cyclopiazonic acid(CPA), 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone(DTBHQ)につき、RBL-2H3細胞からのサイトカイン IL-4 及びケモカイン MCP-1 の産生への影響を検討した。この細胞からの TNF- α の産生に関しては、すでに報告したように、プロテインキナーゼC活性化剤であるフォルボルエステル(TPA)の共存を必要としたが、IL-4, MCP-1 の産生に関しては、TPA の共存を必要とせず、 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤単独で、すなわち、細胞内カルシウム濃度上昇のみで引き起こされること、刺激後、それぞれ9時間及び6時間で産生が最高に達することが判明した。これら因子の産生は、FK-506 存在下で抑制されることより、カルシウム及びFK-506 依存性の転写活性化経路の存在するものと考えられた。この報告は、RBL-2H3細胞からの Th-2 タイプのサイトカインの産生及びケモカインの産生を始めて示したものである。

Keywords: RBL-2H3 cells, IL-4, MCP-1

*¹ 明治薬大

Saito, Y., Teshima, R., Takagi, K., Ikebuchi, H., Yamazaki, T. and Sawada, J.: **Activation of protein kinase C α enhances human growth hormone-binding protein release.**

Mol. Cell. Endocrinol., **146**, 197-205 (1998)

ヒト IM-9 細胞からのヒト成長ホルモン結合蛋白質質 (hGH-BP) の放出へのホルボルエステル (PDBu) の影響につき検討したところ、用量依存性の放出増強効果がみられ、その増強効果は、刺激後 60 分で最高に達した。PDBu による hGH-BP 産生増強効果は、EDTA 存在下で、また、プロテインキナーゼ C (PKC) 特異的阻害剤 Ro31-8220 で抑制された。この反応に関与する PKC のサブタイプとしては、PKC α が関与することが、各サブタイプへの感受性を異にするいくつかの PKC 阻害剤を用いることにより示された。
Keywords: IM-9, protein kinase C α , growth hormone-binding protein

Iba, Y.*¹, Hayashi, N.*¹, Sawada, J., Titani, K.*¹ and Kurosawa, Y.*¹: **Changes in the specificity of antibodies against steroid antigens by introduction of mutations into complementarity-determining regions of the V_H domain.** *Protein Eng.*, **11**, 361-370 (1998)

抗ステロイドモノクローナル抗体 (1E9) の可変部のモデリングを行い、変異を導入した種々の改変抗体を用いて、抗体のハプテンに対する特異性の変化を検討した。特異性の変化は、結合ポケットの構造変化に対応することが示唆された。

Keywords: anti-steroid antibody, protein engineering, immunoglobulin

*¹ 藤田保健衛生大学医学部総合医科学研究所

Tanaka, T., Ikebuchi, H., Sawada, J. and Tanaka, Y.: **Production of antiserum for sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid by chemiluminescence.** *Lipids*, **33**, 733-736 (1998)

内因性蛋白結合物質であるフラン脂肪酸の 1 つであり、腎障害のマーカーとなる 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) に対する抗体をモルモットを用いて作製し、発光法を用いる高感度で特異性の高い酵素固相免疫測定法 (ELISA) の開発を行った。

Keywords: furan fatty acid, enzyme-assay, chemiluminescence

Suzuki, M.*¹, Furuno, T.*¹, Teshima, R., Sawada, J. and Nakanishi, M.*¹: **Soluble factors from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells stimulated cooperatively the neurite outgrowth of PC12 cells.** *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1267-1270 (1998)

RBL-2H3 細胞から産生されるサイトカインの中で、ラット副腎由来 PC12 細胞の神経突起伸張を促す因子の探索を行った。RBL-2H3 細胞培養上清中に NGF (神経増殖因子) 及び IL-6 の存在が確認され、それぞれの抗体で処理を行うことで、PC12 細胞の神経突起伸張が抑制され、神経突起伸張作用への NGF と IL-6 の相乗効果も示された。

Keywords: RBL-2H3 cells, NGF, IL-6

*¹ 名古屋市立大学薬学部

Sato, Y., Ferguson, D.G.*¹, Sako, H.*², Dorn, G.W. II*³, Kadambi, V.J.*², Yatani, A.*², Hoit, B.D.*³, Walsh, R.A.*³ and Kranias, E.G.*²: **Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice**

J. Biol. Chem., **273**, 28470-28477 (1998)

心筋小胞体カルシウム結合タンパク質、カルセクエス

リンの in vivo における機能を検討する目的で心筋特異的にカルセクエスチンを過剰発現したトランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの心筋小胞体は高カルシウム貯蔵能を示したが、心筋興奮-収縮連関における筋小胞体カルシウム放出および心筋収縮性は著明に減弱したことからカルセクエスチンは心筋興奮-収縮連関におけるカルシウム制御に大きく寄与していることが明らかとなった。

Keywords: transgenic animal, sarcoplasmic reticulum, cardiac hypertrophy

*¹ Department of Anatomy, Case Western Reserve University

*² Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati

*³ Division of Cardiology, University of Cincinnati

Chu, G.*¹, Li, L.*², Sato, Y., Harrer, J.M.*¹, Kadambi, V.J.*¹, Hoit, B.D.*³, Bers, D.M.*² and Kranias, E.G.*¹: **Pentameric assembly of phospholamban facilitates inhibition of cardiac function in vivo**

J. Biol. Chem., **273**, 33674-33680 (1998)

ホスホランバンは心筋小胞体カルシウム取りこみ抑制作用および心筋弛緩減弱作用を持つ心筋小胞体上のタンパク質で、心筋小胞体上で 5 量体および単量体として存在することが知られている。ホスホランバンの in vivo における機能的単位を検討する目的で、野生型ホスホランバンもしくは単量体としてのみ存在する変異型ホスホランバン (C41F) を、心筋特異的プロモーターを用いてホスホランバン欠損マウスに再導入したトランスジェニックマウスを作製した。心筋表現型を比較したところ、変異型ホスホランバンは野生型よりも生理機能的に減弱していることが明らかとなり、ホスホランバンの 5 量体形成は in vivo における心筋収縮の適切な制御に必要であることが示唆された。

Keywords: transgenic animal, cardiac sarcoplasmic reticulum, phospholamban

*¹ Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati

*² Department of Physiology, Loyola University Chicago

*³ Division of Cardiology, University of Cincinnati

Okochi, E., Nishimaki-Mogami, T., Suzuki, K. and Takahashi, A.: **Perfluorooctanoic acid, a peroxisome proliferating hypolipidemic agent, dissociates apolipoprotein B48 from lipoprotein particles and decreases secretion of very low density lipoproteins by cultured rat hepatocytes**

Biochim. Biophys. Acta, **1437**, 393-401 (1999)

ペルオキシゾーム増殖剤の血清脂質低下作用には、核内レセプター PPAR の遺伝子転写制御によるアポ B リポタンパククリアランス増加の機構が提唱されている。我々は、ペルオキシゾーム増殖剤である perfluorooctanoic acid (PFOA) が、PPAR 作用とは独立に、肝での VLDL 産生を直接阻害する作用を持つことを明らかにした。PFOA 処理肝細胞から分泌されるアポ B リポタンパク粒子からアポ B を分離させるきわめて特異的な性質を示したことから、PFOA が肝細胞内でのアポ B と脂質との初期会合過程を阻害し VLDL 産生を低下させる機構を推定した。

Keywords: apolipoprotein B, secretion, perfluorooctanoic acid

Nagaishi, K., Adachi, R., Kawanishi, T., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Hayakawa, T. and Suzuki, K.: **Participation of cofilin in opsonized zymosan-triggered activation of**

neutrophil-like HL-60 cells through rapid dephosphorylation and translocation to plasma membranes

J. Biochem., **125**, 891-898 (1999)

フォスファターゼ阻害剤のオカダ酸が濃度によって、オプソニン化ザイモザンによる好中球様 HL-60 細胞の活性化を促進したり、阻害する二相性効果をもつことを既に報告していた。その二相性効果は、細胞内においてコフィリンが早い脱リン酸化反応を起こすこと、および細胞膜領域へ移行することと良く一致することを示した。さらに、無細胞系における活性酸素産生において、抗コフィリン抗体が促進効果を有することも明らかにし、白血球の活性化におけるコフィリンの重要性を示唆した。

Keywords: actin-binding protein, okadaic acid, superoxide

* 共立薬科大学

Kato, H., Haishima, Y., Tanaka, A. and Tanamoto, K.: Chemical structure of lipid A isolated from *Flavobacterium meningosepticum* lipopolysaccharide

J. Bacteriol., **180**, 3891-3899 (1998)

グラム陰性菌でありながら全菌ではリムルス活性を示さない *Flavobacterium meningosepticum* のリピド A を単離し、その構造決定を行った。その結果、リピド A 骨格として一般的な β (1 \rightarrow 6) 結合 2-amino-2-deoxy-D-glucose 以外に 2-amino-6-O- (2,3-diamino-2,3-dideoxy-b-D-glucopyranosyl) -2-deoxy-D-glucose が 1.00 : 0.35 の比率で存在することが明らかになった。いずれも 1 位はリン酸が α グリコシド結合しており、4, 4', 6' 位は遊離水酸基であった。最大画分は m/z 1673 [M-H]⁻ に認められ、還元末端の 3, 2 位にそれぞれアミド結合 (R)-3-OH iC17:0, エステル結合の (R)-3-OH iC15:0, 非還元末端の 2', 3' にはそれぞれアミド結合の (R)-3-O-(iC15:0)-iC17:0 と (R)-3-OH C16:0 の脂肪酸が置換している特異な構造体であることがわかった。

Keywords: *Flavobacterium meningosepticum*, chemical structure of lipid A, lipopolysaccharide

Tanamoto, K.: Induction of lethal shock and tolerance by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in D-galactosamine sensitized C3H/HeJ mice.

Infect. Immun., **67**, 3399-3402 (1999)

P. gingivalis 由来の LPS は LPS 不応性 C3H/HeJ マウスに 1 mg 投与しても致死作用は示さないが、30 mg のガラクトサミンの前感作により 1 μ g でも致死作用を示した。これは LPS 応答性の C57BL/6 マウスの致死量とほぼ同等であった。さらに同 LPS 1 μ g を C3H/HeJ マウスに前投与した場合、マウスは LPS にトレランスとなり、この系での致死量の 100 倍量の LPS で攻撃しても致死作用は起こらなかった。トレランス誘導に要する時間は LPS 応答性マウスでの時間と同様、1 時間以内では誘導されなかった。一方、LPS 応答性マウスに対して同様の致死作用やトレランスの誘導を引き起こす、サルモネラ LPS 及び緑膿菌の蛋白-LPS 複合体は、いずれも C3H/HeJ マウスには活性を示さなかった。以上の結果は、*P. gingivalis* の LPS が C3H/HeJ の活性化に中心的な役割を果たしていることを示している。

Keywords: *Porphyromonas gingivalis* LPS, C3H/HeJ mice, endotoxin tolerance

Miyahara, M., Sugaya, K.*, Tanimura, A.* and Satake, M.: Nucleotide Sequences of 5S-rRNA Gene Spacer Region of *Moraceae* and *Cannabaceae*

Natural Medicines, **52**, 209-212 (1998)

クワ科植物は分類法にもよるが、一般的に使われている Engler の分類では、*Moraceae* Family として、*Ficus*, *Morus*, *Broussonetia*, *Maclura*, *Artocarpus*, *Castilla*, *Humulus* と *Cannabis* の属に分類されている。また、もう一つのよく使われる Takhtajan の分類では、上記の *Moraceae* Family は *Moraceae* と *Cannabaceae* の二つに Family に分類されている。この研究では、Takhtajan で 2 つに分類されている *Moraceae* と *Cannabaceae* が PCR によって区別され得るかどうかを検討してみることを第一の検討目的とした。この分類での *Moraceae* にはクワ、イチジク、こうぞなどがあり、*Cannabaceae* としては、ホップ、カナムグラや麻が分類される。PCR で検討する DNA 領域は 5S-rRNA がいくつかある間の必要ではない領域に着目して、検討することとした。この結果検討した領域では、*Moraceae* と *Cannabaceae* は二つに分類されることがわかった。Takhtajan の分類の法が妥当である結果を得た。また、*Cannabis sativa* はこの検討した中では特徴的な配列を持っていることがわかったので、粉末状になっていても PCR で検討することによりある程度鑑別可能であることがわかった。本来生薬として、葉の形のままであれば区別が付いたかもしれない生薬粉末の鑑別法に PCR 法を導入することによって鑑定が可能である結果を得た。

Keywords: *Moraceae*, PCR, 5S-rRNA gene spacer

* 昭和女子大学生生活機構研究科

宮原美知子, 小沼博隆: PCR 法による食肉からの腸管出血性大腸菌 O157 ベロ毒素産生遺伝子の検出について

食衛誌, **39**, 315-317 (1998)

腸管出血性大腸菌 O157 の迅速検出法として種々検討されている。その中で、PCR 法による検出の問題点について検討した。O157 が菌数にして約 5×10^7 cfu (colony forming unit)/mL 存在していた生肉でも、検討した PCR 法では検出できなかった。PCR 法で検出するためには血液成分が PCR 反応液に混入しない DNA 精製を行う必要があることが示唆された。

Keywords: blood component, vero toxin, inhibition on PCR

Nakagawa, H.*¹, Hara-Kudo, Y.*², Onoue, Y.*³, Konuma, H., Hujita, T.*⁴ and Kumagai, S.*²: Method for isolation *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts: A collaborative study

Biocontrol Sci., **4**, 45-49 (1999)

かいわれ大根の芽から腸管出血性大腸菌 O157 を検出・分離するための試験法を評価するために 20 試験研究機関が参加して研究室間共同研究 (コラボ) を実施した。その結果、腸管出血性大腸菌 O157 は、増菌培地にトリプトソイブロスを用いた 37°C・6 時間培養よりも、増菌培地にノボピオシンを加えた変法 EC 培地を用いた 42°C・18 時間培養法において効率よく検出することができたことを報告した。

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, radish sprouts, ground beef

*¹ 財団法人東京顕微鏡院

*² 国立感染症研究所

*³ 神奈川県衛生研究所

*⁴ 国立公衆衛生院

Onoue, Y.*¹, Konuma, H., Nakagawa, H.*², Hara-Kudo, Y.*³, Hujita, T.*⁴ and Kumagai, S.*³: Collaborative evaluation of detection methods for *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts and ground beef

Int. J. Food Microbiol., **46**, 27-36 (1999)

かいわれ大根の芽および牛挽肉から腸管出血性大腸菌 O157 を検出・分離するための試験法 (寒天平板法と免疫学的方法) を評価するために 20 試験研究機関が参加して研究室間共同研究 (コラボ) を実施した。その結果、腸管出血性大腸菌 O157 の検出には、ノボビオシンを加えた変法 EC 培地 (mEC+n) 42°C・18 時間培養後に免疫磁気ビーズを用いて集菌し、選択分離培地には CT-SMAC および酵素基質を添加した BCM O157 および CHROMagarO157 が優れていることを報告した。

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, radish sprouts, ground beef

- *1 神奈川県衛生研究所
- *2 財団法人東京顕微鏡院
- *3 国立感染症研究所
- *4 国立公衆衛生院

Ji-Cheng Huang, Takatori, K., Ohta, T., Kosuge, J., Takahashi, A.*¹ and Kumagai, S.*²: Comparison of fungicidal effects of commercial disinfectants at concentrations suggested for practical use

Biocontrol Science, 3, 105-108 (1998)

市販消毒剤の 34 真菌に対する殺菌効果について検討した。EtOH (70% v/v) の著効は証明されたが、有機物添加によりその活性は著しく低下した。活性塩素 55 μg/ml の酸化水、200 μg/ml 次亜塩素酸 Na は基本的には殺菌性強いが、有機物存在下では不活化された。このように有機物の存在が真菌に対する活性に大きく影響を及ぼすことからその用法には細心の注意を払う必要がある。

Keywords: disinfectants, fungi, fungicidaleffects/yeastextract

- *1 (財)食品薬品安全センター
- *2 国立感染症研究所

Kuwano, A.*, Yoshihara, T.*, Takatori, K. and Kosuge, J.: Onychomycosis in white line disease in horses: pathology, mycology and clinical features

Equine vet. J., Suppl.26, 27-35 (1998)

白線病に焦点を当てて病態の側面、特に現在、世界中に白線病と密接な関連があると疑われている蹄真菌症 (Onychomycosis) に焦点をあてて、病理学および真菌学的に解明を試みた。

Keywords: horse, white line disease, onychomycosis

- * 日本中央競馬会総合研究所

Simozawa, K.*, Anzai, T.*, Kamada, M.* and Takatori, K.: Fungal and bacterial isolation from racehorses with infectious dermatosis

J. Equine Sci., 8, 89-93 (1998)

体表感染微生物について解析した。細菌では、*Staphylococcus hyicus*, *S. aureus* が高率に分離され、いずれも皮膚炎との関わりが証明された。また真菌では *Trichophyton equinum*, *Microsporum equinum* が分離され、馬間での伝播性に注視する必要がある。

Keywords: horse, dermatosis, *Trichophyton equinum*

- * 日本中央競馬会

Takai-Igarashi, T, Nadaoka, Y.* and Kaminuma, T.: A database for cell signaling networks

J. Comp. Biol., 5, 747-754 (1998)

細胞内情報伝達系の知識は急速な勢いで増大している。我々はこれらの知識を有効に利用できるように、ヒトを対象とした細胞内情報伝達系の知識ベースを開発した。本デ

ータベースはオブジェクト指向技術に基づいており、細胞内情報伝達に関する必要な情報、すなわちシグナルを伝達する生体反応と生体分子の配列、構造、機能といった、多種多様な知識を統一して格納できる構造の高い軟性をもつ。本データベースは情報伝達経路のグラフ表示や生体分子の立体構造表示などの有用な視覚表現を内部に装備している。本データベースは線虫のゲノム情報を格納する目的で開発された ACEDB の新しい応用例である。本データベースはインターネットを介して公開している

(<http://geo.nihs.go.jp/csndb.html>).

Keywords: cell signaling network, object-oriented database, information visualization

- * The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

Takai-Igarashi, T. and Kaminuma, T.: A Pathway Finding System for the Cell Signaling Networks Database
In Silico Biology, 1, 129-146 (1999)

細胞内情報伝達系データベース CSNDB 上に構築した、知識ベース型経路探索システムについて報告する。この新しいシステム PaF-CSNDB は、組み込まれた一般的な推論エンジンを用いて情報伝達経路の繋がりを探し出すことができるので、CSNDB に格納された任意の生体分子について分子の周囲の経路や複数個の分子の間を繋ぐ経路を検索できる。細胞内情報伝達に関して報告される知識は膨大な知識断片の集合なので、必要な知識をふるい分け拡張した 2 項関係でモデル化する方法を考案した。システムは WWW からアクセスできる (<http://geo.nihs.go.jp/csndb.html>).

Keywords: cell signaling network, knowledge-based expert system, information visualization

関沢 純：リスクコミュニケーション—共存へのカギをにぎる情報と意見の交換

化学, 54(1), 27-30 (1999)

リスクコミュニケーションという言葉が認知されつつあるが、その内容は正しく理解されていない現状にある。なぜリスクコミュニケーションが必要か、情報が伝われば良いのかということから、立場が異なれば考え方も異なり、さまざまな情報と意見を交換し、新しい考え方を作ってゆく過程としてのリスクコミュニケーションのあり方を示した。さらに筆者が参画している日本化学会での化学物質のリスクコミュニケーション手法検討委員会、また FAO と WHO 合同の食品安全にかかわるリスクコミュニケーション会議での検討の内容を解説するとともに、最後に日本の現状の分析を基に共存のカギとしてのリスクコミュニケーションはどうあるべきかを論じた。

Keywords: Risk communication, Exchange of information and opinion, Improving communication in Japan

関沢 純：化学物質リスク評価の最前線—ダイオキシンと環境ホルモンのリスク評価と今後の課題

化学と生物, 37(5), 292-294 (1999)

化学物質のリスク評価の基本および、筆者が担当する国際化学物質安全性計画 (IPCS) における化学物質のリスク評価活動を紹介した。土壌を汚染しているダイオキシンの摂取によるリスクの評価からリスク管理指針を導く手法の例と、筆者が研究した植物ホルモンの評価の実際について解説した。最後に、未知の部分も多く含む不確実な事柄について不確実性要因の解明を含め科学的な予測を行う考え方および、評価過程における透明性を確保し、結果をわかりやすく提示する手法の例として IPCS の国際簡潔評価文書 (CICAD = Concise International Chemical Assessment

Document) 作成について記した。

Keywords: Risk assessment, Dioxins, Endocrine disrupters

関沢 純：環境リスク問題への対応とリスクコミュニケーション

21世紀フォーラム, No.68, 38-39 (1999)

リスクとハザードの違い, リスクコミュニケーション過程での公衆のリスク認知や価値判断への配慮と, 関係者の意思決定過程への参加の重視とそのあり方について, 事例を用いて論じた。またリスクコミュニケーション過程におけるメディアと専門家の役割を検討し, リスクコミュニケーション能力の養成と, リスクコミュニケーションを支える枠組みの構築の重要性を提示した。

Keywords: Risk communication, Environmental risk, Judgement of risk and communication process

関沢 純：化学物質・環境問題のリスクコミュニケーション

環境情報科学, 28(2), 13-19 (1999)

ダイオキシン, 環境ホルモンなどをめぐって化学物質・環境リスクへの関心が高まり, わからないことへの不安, 不満, 不信も高まっている。科学的推測, 価値判断, およびこれらを総合してくだされるリスク対応の関係と, それぞれの過程に含まれる要因とリスクコミュニケーションの関連について論じた。筆者らが監訳した米国 National Research Council の Improving Risk Communication における分析, とりわけ情報公開の先進国である米国でリスクコミュニケーションが問題とされるようになった理由と, その解決方向の模索の結果出されてきたコミュニケーション過程の重視および, その詳細な検討について触れた。米国環境保護庁のインターネットホームページに見られるコミュニケーションへの取り組みの考え方など, いくつかの事例を用いリスクコミュニケーションの改善方向について記した。

Keywords: Risk communication, National Research Council, Assessment and Judgement

関沢 純：化学物質のリスクコミュニケーションを進展させるために

化学と工業, 52(5), 64-66 (1999)

筆者が参画する日本化学会の「化学物質のリスクコミュニケーション手法検討委員会」の活動を紹介した。本委員会発足の背景となった諸問題および, 環境庁, 通産省が推進しようとしている「環境汚染物質排出・移動登録 (PRTR)」におけるリスクコミュニケーションのあり方について解説した。本委員会の行ったアンケートや, これまでのいくつかのリスクコミュニケーションの失敗や成功事例の分析結果および, 今後わが国でのリスクコミュニケーションを進展させるための参考としてのガイドの作成, 検討について記した。

Keywords: Risk communication, Preparation of guidance Material, Chemical Society of Japan

関沢 純：化学物質リスクコミュニケーション問題点と今後のあり方

日本学術会議 50 周年記念 - 第 14 回環境工学連合講演会講演論文集, 49-51 (1999)

化学物質のリスクとそのコミュニケーションをめぐる問題について, 現在の日本社会でおこっているさまざまな問題との共通点およびその背景について論じ, ついでその解決方向を提示した。すなわち従来のリスクに関するコミュ

ニケーションが専門家から非専門家あるいは, 権限を持つ者から権限を持たず被害を蒙る可能性のある人々への一方的な情報提供にすぎなかったこと, そして今後はリスクにかかわるさまざまな関係者がリスクに関する意思決定をチェックし, 意見を述べることで参加してゆく可能性について論じた。一例として筆者が担当する国際化学物質安全性計画 (IPCS) での化学物質のリスク評価における国際簡潔評価文書 (CICAD = Concise International Chemical Assessment Document) 作成のプロセスも引用して, そのあり方を示し, まとめとして, 違いの尊重, リスク評価とコミュニケーションの枠組みの構築の重要性についても記した。

Keywords: Risk communication, Involvement of stake-holders, IPCS

山本 都：化学物質その他の安全性情報

国民生活, 29(1), 50-53 (1999)

国立医薬品食品衛生研究所における化学物質の安全性情報の収集および提供について解説した。特に国立衛研ホームページから提供している生活関連分野の情報等について, その種類と内容を紹介した。

Keywords: chemical safety, WWW, critical document

Kurata, H.*, Liu, C.B.*, Valkova, J.*, Koch, A.E.*, Yssel, H.*, Hirabayashi, Y., Inoue, T., Yokota, T.* and Arai K.*: Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice.

Allergy Clin. Immunol., 103, 471-84 (1999)

遺伝子治療の為のベクター開発の基盤研究を行った。Adenovirus vector のマウス個体への投与による発現の分布及びその強度をヒト GM-CSF のマウスとの非交差性を利用した特異的な生物活性を指標にして観察し, 実験系としての基本的な有用性を示すことができた。

Keywords: gene therapy, adenovirus, GM-CSF

* 東京大学医科学研究所

Yoshida, K.*, Inoue, T., Hirabayashi, Y., Nojima, K.* and Sado, T.*: Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/He mice

J. Nutrition, Health and Aging, 3, 123-128 (1999)

カロリー制限によって齧歯類で寿命が延長するのは, 腫瘍発生が抑制される為だと考えられてきたが, この機構については未だはっきり理解されていなかった。今回, 自然発生腫瘍として肝腫瘍好発系である C3H/He マウスを用い観察したところ, カロリー制限により腫瘍発生の抑制と寿命の延長が観察された。さらに, 比較的若い時期から制限した群では腫瘍発生時期も遅れ, 頻度も減少したのに対して, 十分成長してから制限した群では発生時期は遅れるものの腫瘍の最終累積頻度は非制限群と変わらず制限する時期も重要な因子であることが明らかとなった。

Keywords: calorie restriction, hepatic tumor, C3H/He mice

* 放射線医学総合研究所

Momma, J., Kitajima, S. and Inoue, T.: The guinea-pig skin sensitization test revisited: an evaluation formula to predict possible sensitization levels for eight chemicals used in household products

Toxicology, 126, 75-82 (1998)

我々はこれまで化学物質の皮膚感作性を検討する目的で, モルモットを用いたマキシミゼーションテストを行ってきた。データを解析する中で, 実験により得られる最低感作

濃度 (MID) および標準惹起濃度 (SCD) に加えて、ヒトでの皮膚感作性強度との関係が明らかでない DED (感作性物質の製品中の濃度) という、3つの独立したパラメーターの間に等式で示される法則性があることを発見し、この法則性が、ヒトでの化学物質の皮膚感作性を実験結果から予測するというレギュラトリーサイエンスのみならず、基礎免疫学にも寄与することを報告した。

Keywords: sensitization test, guinea pigs, chemical allergy

花田信継*1, 手島英雄*1, 木村好秀*1, 荷見よう子*1, 天神尚子*1, 有田白峰*1, 成高和稔*1, 菅野 純, 谷澤 徹*2: 悪性卵巣腫瘍と術前診断された後腹膜原発脂肪肉腫の一例

日本産科婦人科学会関東連合地方部会会報, 35, 411-416 (1998)

脂肪肉腫は全悪性腫瘍中の0.1%を占めるに過ぎないが、悪性軟部腫瘍の中では比較的頻度が高く、9.8~16%と言われている。今回我々は、術前診断が悪性卵巣腫瘍であった後腹膜由来の脂肪肉腫を経験したので報告する。

Keywords: retroperitoneal neoplasm, liposarcoma, ovarian neoplasm

*1 三葉病院

*2 東京医科歯科大学

関田清司, 齊藤 実, 内田雄幸, 小野 敦, 小川幸男, 金子豊蔵, 降矢 強, 黒川雄二, 井上 達: F344 ラットによるペカンナッツ色素の90日間反復混餌投与毒性試験

食衛誌, 39, 375-382 (1998)

ペカンナッツ色素(デキストリン60%含有)の0, 0.5, 1.5, 5.0%およびデキストリン添加飼料を90日間ラットの摂取させ、一般毒性について検討した。ペカンナッツによると考えられる毒性は観察されなかった。5.0%添加飼料(デキストリンを除いた平均色素摂取量:雄で1287 mg, 雌で1344 mg/kg/day)は毒性が認められない用量と結論した。このことから本色素の一般毒性は弱いものと推察された。

Keywords: pecan nut color, 90-days toxicity study, rat

相賀裕美子: Mesp1, MesP2 と体節形成

実験医学, 17(増刊), 156-162 (1999)

脊椎動物の分節性は体節から由来する。近年の遺伝子破壊技術の導入は、体節形成の分子機構にかかわる遺伝子の同定、それらの相互作用を明らかにしつつある。その結果、いろいろな発生過程で重要な働きをもつ Notch-delta や FGF のシグナル系が分節化にも関与することが明らかになってきた。一方、体節形成過程でのみ発現するユニークな遺伝子 Mesp2 は、このシステムの制御系に中心的役割を担っていると考えられる。

Keywords: segmentation, anterior-posterior polarity, notch-delta signaling

Saga, Y.: Genetic rescue of segmentation defect in MesP2-deficient mice by MesP1 gene replacement

Mechanism of Development, 75, 53-66 (1998)

遺伝子ノックアウト及びノックイン法が MesP1 の機能を調べるために用いられた。MesP1 は MesP2 と同じ bHLH 転写因子ファミリーに属する。原腸陥入期の初期中胚葉における発現は Mesp1 に限られるが、体節形成期における anterior presomitic mesoderm での発現は Mesp2 と Mesp1 はほとんど同一である。Mesp1 ホモ欠失マウスは 7.5dpc で成長の遅れを示し、10.5dpc 前に死亡する。体節形成における

Mesp1 の機能は早期の死と Mesp2 による代償機能のため明確ではない。体節形成における Mesp1 の機能を調べるため、ノックイン法を用いて、Mesp1 の cDNA を Mesp2 遺伝子に導入した。導入された Mesp1 cDNA は dosage-dependent に MesP2 の欠失を rescue した。MesP2 が欠失し、4 コピーの Mesp1 を有するマウスは成長し、妊娠可能であった。Mesp2 欠失マウスで見られた骨格の異常と Notch 1, Notch 2, FGFR-1 の発現低下はほぼ完全に Mesp1 により rescue された。以上、体節形成における MesP1 の機能は MesP2 のように notch-delta および FGF シグナル系を介するものと結論された。

Keywords: MesP1, MesP2, somitogenesis

Takahashi, Y., Imanaka, T.* and Takano, T.*: Spatial pattern of smooth muscle differentiation is specified by the epithelium in the stomach of mouse embryo

Developmental Dynamics, 212, 448-460 (1998)

マウス胚胃では、胎齢 11 日から 13 日の間に平滑筋が分化し輪走筋を形成する。胎齢 15 日になると前胃に縦走筋が出現し、生後になって粘膜筋板が生じる。上皮-間充織の分離・再結合と器官培養により、平滑筋の分化と空間的パターンの形成に対する上皮の影響を解析した。胃間充織の平滑筋分化には上皮からの誘導が必要であること、器官特異的な平滑筋分化の空間的パターンが上皮からの作用に依存すること、発生段階特異的な空間的パターンが上皮からの作用に依存することがわかった。

Keywords: smooth muscle, stomach, epithelial-mesenchymal interaction

* 帝京大学薬学部

Sai, K., Kai, S., Umemura, T., Tanimura, A., Hasegawa, R., Inoue, T. and Kurokawa, Y.: Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane

Fd. Chem. Toxicol., 36, 1043-1051 (1998)

2-Nitropropane (2NP) のラットへの反復経口投与による肝毒性、肝酸化的 DNA 損傷、細胞増殖作用に対する緑茶の抑制効果を検討した。F344 雄マウスに 2NP (60mg/kg または 90mg/kg) を週 3 回、2 週間強制経口投与し、2%緑茶浸出液を 2NP 投与の 1 週間前より飲料水の代わりに投与した。2NP による肝毒性と関連した生物学的変化(血清 GOT 活性、肝脂質過酸化、肝グリコーゲン減少、血清トリグリセライド減少)、肝酸化的 DNA 損傷ならびに肝細胞増殖作用がいずれも緑茶投与により有意に減少した。これらのことから、緑茶の飲用が 2NP による慢性毒性の予防に有効であることが示唆された。

Keywords: 2-nitropropane, tea, 8-hydroxydeoxyguanosine

Sai, K., Upham, B.L.*, Kang, K.S.*, Hasegawa, R., Inoue, T. and Trosko, J.E.*: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells in vitro

Cancer Lett., 130, 9-17 (1998)

非変異原性でマウス肝腫瘍を誘導する pentachlorophenol (PCP) 及び変異原性の代謝産物 tetraochlorohydroquinone (TCHQ) の発がんイニシエーション/プロモーション作用機構について調べるため、肝上皮細胞株 (WB 細胞) のギャップ結合細胞間連絡 (GJIC) を scrape loading/dye transfer 法により検討した。PCP により濃度依存的な一過性 (4 時間後) 及び持続性 (16 時間以降) の阻害が起こり、PCP 除

去により2時間後にはこれらの阻害は回復した。PCPによるGJIC阻害にはコネクシンのリン酸化及び細胞膜状での局在には変化が認められないが、持続性(24時間後)の阻害にはコネクシン蛋白質量の減少を伴っていた。一方、代謝産物のTCHQにはGJIC阻害作用は認められなかった。これらの結果から、PCPそのもののエピジェネティックな作用が発がんプロモーター作用に寄与することが示唆された。

Keywords: pentachlorophenol, tetrachlorohydroquinone, gap

junctional intercellular communication

* Michigan State University

Ohno, Y., Miyajima, A. and Sunouchi, M.: **Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells.**

Toxicology Letters., **102-103**, 569-573 (1998)

遊離肝細胞, 初代培養肝細胞, 及びウサギ眼由来の細胞株(SIRC細胞)を用いて種々農薬の作用について検討し, それらの細胞で得られた結果を比較検討することにより, 肝特異的な毒性を検出できることを示した。

Keywords: hepatocytes, hepatotoxicity, SIRC cells

Uchida, H.*, Nagai, S.*, Shimada, K.*, Ohno, Y. and Kamikawa, Y.*: **Responsiveness of human and guinea-pig isolated pulmonary arteries to α -agonists in-vitro.**

Pharm. Pharmacol. Commun., **4**, 349-353 (1998)

肺高血圧症の患者に対して α -遮断薬が使用されるが, 肺動脈における α -受容体の分布は余り判明していないことから, ヒトとモルモットについてその反応性について検討した。その結果, ヒト肺動脈では $\alpha 1$ 受容体の分布は少ないが, モルモットでは多いことが判明した。また, ヒトでは抑制性の $\alpha 2$ 受容体が肺動脈内皮上に分布しているが, モルモットでは興奮性 $\alpha 2$ 受容体が肺動脈平滑筋に存在していることが判明した。

Keywords: human, pulmonary artery, α -agonist

* 獨協医科大学

Ohno, Y., Sunouchi, M., Miyajima, A., Ogawa, Y., Umemura, T., Inoue, T., Nagamatsu, K.*: **Lack of preneoplastic changes and induction of CYP2B11 in the liver of dogs treated with CNP.**

Reviews in Toxicology, **2**, 47-51 (1998)

ジフェニルエーテル系農薬のCNPはヒトで胆嚢がんを誘発するのでは無いかと疑われている。そこで, ヒトと類似した胆管系を有するイヌを用いてCNPの代謝と肝臓の前がん症状発現作用の有無を検討した。その結果, 胆汁中には変異原性を有するニトロソ体に変化した代謝物が検出され, 肝臓ではフェノバルビタール様の代謝酵素誘導作用を示したが, BrdU法によっても前がん変化は認められなかった。なお, 対照物質として用いたaramiteでは胆嚢に著明な変化が認められた。

Keywords: CNP, induction of CYP2B11, preneoplastic change

* 日本大学薬学部

Uchida, H.*, Sakuma, A.*, Kogure, H.*, Ohno, Y., Kamikawa, Y.*: **Mechanical reactivity of isolated human and guinea-pig portal veins to spasmogens.**

Polish J. Pharmacol., **50**, 453-456 (1998)

Prostaglandin F 2α とエンドセリン-1の門脈の収縮性はヒト及びモルモットで異なっており, モルモットではPGF 2

α で律動的収縮が増強され, その収縮も $3\mu\text{M}$ でほぼ最高に達するのに対し, ヒトでは律動的収縮は抑制され, $30\mu\text{M}$ で最高収縮に達した。エンドセリン収縮はモルモットではtonic相が短かった。

Keywords: human, portal veins, α -receptor

* 獨協医科大学

Shiraga, T.*¹, Iwasaki, K.*¹, Hata, T.*¹, Yoshinari, K.*¹, Nagata, K.*², Yamazoe, Y.*² and Ohno, Y.: **Purification and characterization of two amine N-sulfotransferases, AST-RB1 (ST3A1) and AST-RB2 (ST2A8), from liver cytosols of male rabbits.**

Arch. Biochem. Biophys., **362**, 265-274 (1999)

アミン N-硫酸抱合活性の高い二つのリン酸抱合酵素(AST-RB1, AST-RB2)をラット肝臓可溶性分画より生成し, その特性を明らかにした。分子量は約34kDaでAST-RB1は環状アミン, アルキルアミン, 芳香族アミン類に対する活性が高いが, ナフトールやデヒドロエピアンドロステロンに対する活性は低い。一方, AST-RB2はデシフラミンやDHEAの硫酸芳香活性が高いが, 2-ナフトールへの活性は低かった。AST-RB1のアミノ酸配列は今までに報告された硫酸抱合酵素との類似性はなかった。一方, AST-RB2はST2ファミリーとの類似性が高かった。

Keywords: purification, rabbit, sulfotransferase

*¹ 藤沢薬品工業

*² 東北大学薬学部

Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y.*¹, Yoshida, T.*², Fujii, A.*¹, Masuda, M.*¹, Ohno, T.*³, Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T.*¹, Chiba, K.*¹, Ikeda, N.*¹, Imanishi, Y.*¹, Itagaki, H.*¹, Kakishima, H.*¹, Kasai, Y.*¹, Kurishita, A.*¹, Kojima, H.*¹, Matsukawa, K.*¹, Nakamura, T.*¹, Ohkoshi, K.*¹, Okumura, H.*¹, Saijo, K.*³, Sakamoto, K.*¹, Suzuki, T.*⁴, Takano, K.*¹, Tatsumi, H.*¹, Tani, N.*¹, Usami, M.*¹, Watanabe, R.*¹: **Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests.**

Toxicology in Vitro, **13**, 73-98 (1999)

眼刺激性試験代替法として開発された11種の方法について国立衛研と日本化粧品工業連合会を中心とする多施設バリデーションを行った。被験物質としては, 主に化粧品原料(39種)を用いた。その結果, それぞれの試験法についての基礎的なデータを収集することができた。なお, 使用した試験法の内では培養液に血清を添加した細胞毒性試験法の結果がウサギの眼を用いたドレイス試験の結果と最も良く対応した。また, 細胞の種類は結果に大きな影響を与えなかった。

Keywords: Validation study, Draize eye irritation test, Alternatives

*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

*⁴ セイギケン

Hagino, S.*, Kinoshita, S.*, Tani, N.*, Nakamura, T.*, Ono, N.*, Konishi, K.*, Iimura, H.*, Kojima, H.* and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 2) chorioallantoic membrane (Cam) test.**

Toxicology in Vitro, **13**, 99-113 (1999)

受精鶏卵の漿尿膜に薬物を接触させ、その変性や出血 (HET-CAM 法)、また、トリバンブルー染色性 (CAM-TB 法) を指標に被験物質の刺激性を検討する方法である。この方法は液体検体のみならず、個体、化粧品最終製品にも応用可能である。しかし、肉眼観察に依存する HET-CAM 法ではドレイズ評点との相関性は 0.688 であり、十分とは言えなかった。一方、CAM-TB 法では液体検体では 0.801、粉体検体では 0.926 であった。また、順位相関係数は HET-CAM 法で 0.802 であった。これらの結果は受精鶏卵を用いた本方法が眼刺激性試験代替法として使用可能であることを示唆している。

Keywords: Validation study, Draize eye irritation test, Alternatives

* 日本化粧品工業連合会

Okamoto, Y.*, Ohkoshi, K.*, Itagaki, H.*, Tsuda, T.*, Kakishima, H.*, Ogawa, T.*, Kasai, Y.*, Ohuchi, J.*, Kojima, H.*, Kurishita, A.*, Kaneko, T., Matsushima, Y., Iwabuchi, Y. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 3) Evaluation of hemolysis test.**

Toxicology in Vitro, **13**, 115-124 (1999)

羊赤血球を用いた溶血性試験が化粧品原料の眼刺激性を評価するのに使用できるか否か判定するためにバリデーションを行った。本方法は簡便であるが、適用可能な物質数は他の方法と比較し少なく、ドレイズ評点との相関性も余り良く無かった (-0.631)。一方、本方法は細胞膜に対する直接の作用を検討するものであることから、刺激性発現機序についての情報を得たり、また、スクリーニング法として使用することが望ましいと思われた。

Keywords: validation study, Draize eye irritation test, Alternatives

* 日本化粧品工業連合会

Hatao, M.*, Murakami, N.*, Sakamoto, K.*, Ohnuma, M.*, Matsushige, C.*, Kakishima, H.*, Ogawa, T.*, Kojima, H.*, Matsukawa, K.*, Masuda, K.*, Chiba, K.*, Yoshizawa, K.*, Kaneko, T., Iwabuchi, Y., Matsushima, Y., Momma, J. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients (4) Hemoglobin denaturation test.**

Toxicology in Vitro, **13**, 125-137 (1999)

本方法はヘモグロビン変性作用から被験物質の眼刺激性を評価するものである。当初はヘモグロビン変性による吸光度の変化をピーク波長周辺の吸光度変化で捉え、評価する方法を用いていたが、フィルターの特性がロット毎にこととなり、十分な施設間バリデーションが行えなかった。そこで、陽性対照物質による変性の 50% 変性を起こす濃度 (50% HD)、1% の被験物質による変性 (1% RDR)、及び最大吸収波長の相対的変化 (1% λ max) の三つのプロトコールで再度施設間バリデーションを行った。その結果、それぞれの方法についていくつかの問題点が明らかになったものの、RDC50 法の相関係数は -0.91 と大きかったことから、単独では問題があるが、他の方法と組み合わせることにより眼刺激性評価の上で有用であると思われた。

Keywords: validation study, Draize eye irritation test, Alternatives

* 日本化粧品工業連合会

Kurishita, A.*, Katoh, T.*, Ohsawa, H.*, Nakasawa, H.*, Sugiura, H.*, Usami, M.*, Kakishima, H.*, Kuwahara, H.*,

Ohuchi, J.*, Kasai, Y.*, Ohkoshi, K.*, Okamoto, Y.*, Morito, Y.*, Shibata, M.*, Tsuda, T.*, Kojima, H.*, Mizutani, A.*, Ikeda, N.*, Sumida, Y.*, Nishifuji, M.*, Katagiri, M.*, Kazama, A.*, Hayashi, N.*, Hirose, A., Kaneko, T. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 5) Skin² ZK1100 and tissue equivalent assay.**

Toxicology in Vitro, **13**, 139-151 (1999)

本方法はヒト皮膚モデルとして開発されたものであり、単層培養法 (ZK1100) と三次元モデル (ZK1200) の二つの種類について検討した。ドレイズ評点との相関係数は、それぞれ -0.71 と -0.63 であった。なお、cetyltrimethylammonium chloride, domiphen bromide, 及び di (2-ethylhexyl) sodium sulfosuccinate では施設間のバラツキが大きかった。

Keywords: Draize eye irritation test, artificial skin model, Validation study

* 日本化粧品工業連合会

Ohuchi, J.*¹, Kasai, Y.*¹, Sakamoto, K.*¹, Ohnuma, M.*¹, Kitamura, M.*¹, Kawasaki, Y.*¹, Kakishima, H.*¹, Suzuki, K.*¹, Kuwahara, H.*¹, Imanishi, Y.*¹, Tatsumi, H.*¹, Kotani, M.*¹, Inoue, K.*¹, Okumura, H.*¹, Arashima, M.*¹, Kurishita, A.*¹, Kinoshita, S.*¹, Tani, N.*¹, Kojima, H.*¹, Nakamura, T.*¹, Suzuki, K.*¹, Ishibashi, T.*², Hori, H.*², Takahashi, H.*², Nishikawa, T.*², Kitano, Y.*² and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 6) Evaluation of matrex.**

Toxicology in Vitro, **13**, 153-162 (1999)

MATREX は皮膚モデルとして開発されたものであり、ヒトの皮膚線維芽細胞とコラーゲン層からなる三次元モデルである。バリデーションの結果ではドレイズ評点との相関係数は -0.672 であった。なお、使用するプレート数を削減させたプロトコールにおいても同様の結果が得られた。

Keywords: Matrex, Draize eye irritation test, Alternative

*¹ 日本化粧品工業連合会

*² 東洋紡

Uchiyama, T.*, Akiyama, J.*, Miyai, E.*, Sakamoto, K.*, Takino, Y.*, Ohnuma, M.*, Ohkoshi, K.*, Okamoto, Y.*, Morito, Y.*, Kojima, H.*, Okumura, H.*, Sawamura, J.*, Ikeda, N.*, Sumida, Y.*, Chiba, K.*, Makino, I.*, Kawakami, K.*, Yamamoto, R., Torishima, H., Yanase, H., Miyajima, A., Sunouchi, M., Hayashi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 7) Evaluation of cytotoxicity test by CornePack.**

Toxicology in Vitro, **13**, 163-173 (1999)

本方法はウサギ角膜上皮由来の正常細胞を無血清で培養するキットで、他の培養細胞法と比較して、感度が高い。しかし、酸やアルカリ、低分子アルコールなどの被験物質を除いたときのドレイズ評点との相関は -0.738 であり、血清添加細胞培養法と比較し、若干小さい。

Keywords: alternative, CornePack, validation

* 日本化粧品工業連合会

Tani, N.*¹, Kinoshita, S.*¹, Okamoto, Y.*¹, Kotani, M.*¹, Itagaki, H.*¹, Murakami, N.*¹, Sugiura, S.*¹, Usami, M.*¹, Kato, K.*¹, Kojima, H.*¹, Ohno, T.*², Saijo, K.*², Kato, M.*², Hayashi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 8) evaluation of cytotoxicity tests on tsdts on SIRC cells.**

Toxicology in Vitro, 13, 175-187 (1999)

本方法はウサギ角膜上皮由来の細胞株 (SIRC 細胞) を血清添加 MEM 培地で単層培養するものである。施設間のバラツキが少なく、再現性が良い。また、培養法に適さない酸やアルカリ、低分子アルコールなどの被験物質を除いたときのドレイズ評点との相関は-0.924 であり、極めて良い相関を示したことから、この方法の特徴をわきまえて使用するならば、眼刺激性代替法として使用可能と思われた。なお、細胞毒性のエンドポイントや細胞の種類の異なる、他の血清添加培養細胞法 (HeLa 細胞法, CHL 細胞法) と極めて良い相関を示したことから、通常の被験物質の場合は使用する細胞の種類やエンドポイントに関わらずほぼ一定の結果を与えるものと思われた。

Keywords: Validation study, Draize eye irritation test, *in vitro*

*1 日本化粧品工業連合会

*2 理研ジーンバンク

Chiba, K.*, Makino, I.*, Ohuchi, J.*, Kasai, Y.*, Kakishima, H.*, Tsukumo, K.*, Uchiyama, T.*, Miyai, E.*, Akiyama, J.*, Okamoto, Y.*, Kojima, H.*, Okumura, H.*, Tsurumi, Y.*, Usami, M.*, Katoh, K.*, Sugiura, S.*, Kurishita, A.*, Sunouchi, M., Miyajima, A., Hayashi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 9) evaluation of cytotoxicity test on HeLa cells.**

Toxicology in Vitro, 13, 189-198 (1999)

本方法は生化学実験で広く使用されているヒト子宮由来の細胞株 (HeLa 細胞) を血清添加 MEM 培地で単層培養するものである。施設間のバラツキが少なく、再現性が良い。また、界面活性剤のみについて比較した場合のドレイズ評点との相関は-0.913 であり、極めて良い相関を示したことから、この方法の特徴をわきまえて使用するならば、眼刺激性代替法として使用可能と思われた。

Keywords: Cytotoxicity test, Draize eye irritation test, Validation study

* 日本化粧品工業連合会

Okumura, H.*, Arashima, M.*, Ohuchi, J.*, Kasai, Y.*, Tsukumo, K.*, Kakishima, H.*, Kotani, M.*, Kojima, H.*, Kurishita, A.*, Hayashi, M., Miyajima, A., Sunouchi, M. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients 10) Evaluation of cytotoxicity test on CHL cells.**

Toxicology in Vitro, 13, 199-208 (1999)

本方法は染色体異常試験で広く使用されているチャイニーズハムスター肝臓由来の細胞株 (CHL 細胞) を血清添加 MEM 培地で単層培養するものである。施設間のバラツキが少なく、再現性が良い。但し、培養液に溶けにくい検体では他の培養細胞法と比較し施設間のバラツキが大きい傾向があった。また、界面活性剤のみについて比較した場合のドレイズ評点との相関は-0.840 であった。この方法の特徴をわきまえて使用するならば、眼刺激性代替法として使用可能と思われた。

Keywords: validation, Draize eye irritation test, cytotoxicity test

* 日本化粧品工業連合会

Matsukawa, K.*1, Masuda, K.*1, Kakishima, H.*1, Suzuki, K.*1, Nakagawa, Y.*1, Matsushige, C.*1, Imanishi, Y.*1, Nakamura, T.*1, Mizutani, A.*1, Watanabe, R.*1, Shingai, T.*2, Kaneko, T., Hirose, A. and Ohno, Y.: **Inter-laboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic**

ingredients 11) Eytex.**Toxicology in Vitro, 13, 209-217 (1999)**

Eytex 法は植物由来の試料を用いた非生物試験系であり、被験物質による試料の変性により評価する方法である。方法は容易である。しかし、本方法で得られた結果は今回用いた被験物質についてはドレイズ評点との相関は悪かった。

Keywords: validation, *in vitro*, Draize eye irritation test

*1 日本化粧品工業連合会

*2 インビトロテクノロジー社

Koizumi, S., Bootman, M.D.*1, Bobanovic, L.K.*1, Schell, M.J.*2, Berridge, M.J.*1 and Lipp, P.*1: **Characterization of elementary Ca²⁺ release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons.**

Neuron, 22, 125-137 (1999)

NGF で分化させた PC12 細胞及び海馬初代培養神経細胞における、空間的に局在した、非常にライフタイムの短いカルシウム遊離現象をとらえ、視覚化し、その性質を明らかにした。低濃度の caffeine によりリアノジン受容体をからのカルシウム遊離 "spark" が、低濃度 bradykinin により inositol-1,4,5-trisphosphate 受容体を介するカルシウム応答 "puff" が、認められた。これらの応答は、神経線維の分岐点 "branch point" で多く認められ、その近傍に局在していたが、小胞体内カルシウム増加させることにより、グローバルなカルシウム応答に移行しうることを明らかにした。

Keywords: puffs, sparks, Ca²⁺

*1 Babraham Institute

*2 University of Cambridge

Koizumi, S., Ishiguro, M.*, Ohsawa, I.*, Morimoto, T.*, Takamura, C.*, Inoue, K. and Kohsaka, S.*: **A secreted form of β -amyloid-precursor protein stimulates intracellular Ca²⁺ increase in cultured rat hippocampal neurones.**

Br. J. Pharmacol., 123, 1483-1489 (1998)

培養海馬神経細胞において分泌型 β -amyloid-precursor protein (APP) が細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことを明らかにした。この作用の活性部位を明らかにするために分泌型 β -amyloid-precursor protein の C 末端側ならびに N 末端側のペプチドを合成して同様の検討を行ったところ、N 末端側のみ活性を認めた。アルツハイマーと APP の関係について論議がなされているが、神経細胞発育段階あるいは特定の条件下の神経細胞ではこのような APP の作用が重要な働きをしている可能性が示唆された。

Keywords: β -amyloid-precursor proteins, Ca²⁺, hippocampal neurone

* 国立精神神経センター神経研究所

Uneyama, H.*1, Uchida, H.*1, Yoshimoto, R.*1, Ueno, S., Inoue, K. and Akaike, N.*2: **Effects of a novel antihypertensive drug, cilnidipine, on the catecholamine secretion from the differentiated PC12 cells.**

Hypertension, 31, 1195-1199 (1998)

PC12 細胞を用い、Ca 拮抗薬の一般的な副作用反射性頻脈のない新規 Ca 拮抗薬シルニジピンの作用を検討した。シルニジピンは電位依存性カルシウムチャネルの L 型と同様、N 型をも著明に抑制し、それぞれを介するドバミン放出ならびに細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。以上のことから、シルニジピンは交感神経終末からのノルエピネフリン放出を抑制し、血中ノルエピネフリン濃度を調節し、交感神経の緊張が関与した高血圧病態に対して望ましい効果を発揮する可能性がでてきた。

Keywords: cilnidipine, N-type Ca^{2+} current, sympathetic neurones

*1 味の素(株)

*2 九州大学医学部

Ueno, S., Koizumi, S. and Inoue, K.: **Characterization of Ca^{2+} influx through recombinant P2X receptor in C6BU-1.** *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 1484-1490 (1998)

C6BU-1 細胞を用い、痛みに関係すると思われるイオンチャンネル型 ATP 受容体を介するカルシウム流入の特徴を明らかにした。同細胞に P2X2, P2X3 の cDNA をそれぞれ単独、あるいは同時強制導入し、発現した受容体の機能を電気生理学的手法およびカルシウムイメージングで検討した。P2X2 導入群では比較的高濃度の ATP により持続性の大きな内向き電流と再現性良い細胞内カルシウム濃度上昇を認め、P2X3 導入群では比較的低濃度の ATP により一過性の小さな内向き電流を認めたが、細胞内カルシウム濃度上昇はほとんど認められなかった。一方、同時導入群では、単独群とは明らかに異なる性質を示し、恐らくヘテロマーとして機能していることが示唆された。

Keywords: recombinant P2X receptor, Ca^{2+} , C6BU-1

Poelchen, W.*, Sieler, D.*, Inoue, K. and Illes, P.*: **Effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate on principal neurons of the rat ventral tegmental area.** *Brain Res.*, **800**, 170-173 (1998)

ラット脳 ventral tegmental 部位での主な神経細胞における外液性 ATP の効果が明らかになった。

Keywords: ATP, neuron, ventral tegmental

* Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Leipzig

Shibata, K.*, Ikuko, M.*, Inoue, K. and Katsuragi, T.*: **Muscarinic acetylcholine receptor-mediated increase of angiotensin type 2 receptor mRNA in PC12 cells.** *NeuroReport* **9**, 3783-3789 (1998)

PC12 細胞でのアンジオテンシタイプ 2 受容体のムスカリン・アセチルコリン刺激による mRNA 生合成増大を見いだして報告した。

Keywords: Muscarinic acetylcholine receptor, angiotensin type 2 receptor mRNA, PC12

* 福岡大学医学部

Ueno, S., Tsuda, M., Iwanaga, T. and Inoue, K.: **Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons.** *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 429-436 (1999)

ラット後根神経節 (DRG) 神経細胞での ATP 刺激により誘発される生理反応の特徴を明らかにした。DRG ニューロンは大きさから大中小に分けられるが、知覚神経毒カプサイシンに反応するのは中型および小型細胞であった。in situ hybridisation の結果、中型には P2X2 および P2X3 の mRNA が発現しており、小型細胞には P2X3 のみが発現していることが明らかとなった。ATP 誘発生理反応もこの成績と一致し、痛みを伝える C 繊維では P2X3 受容体が、A デルタ繊維では P2X2 と P2X3 のヘテロ受容体が機能していることを示唆している。

Keywords: ATP, nociception, rat dorsal root ganglion neuron

Nakazawa, K., Ohno, Y. and Inoue, K.: **An aspartic acid residue near the second transmembrane segment of ATP**

receptor/channel regulates agonist sensitivity.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **244**, 599-603 (1998)

ATP 受容体チャンネル (P2X₂ 受容体) の M2 セグメントおよびその近傍の電荷あるいは極性を有するアミノ酸残基を中性アミノ酸と置換した変異体を作製し、アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、その電気生理学的特性を検討した。315 番目のアスパラギン酸をバリンに置換した変異体 (D315V) では、ATP 感受性が 60 分の 1 に低下していた。Walker A 型の ATP 結合配列に含まれる 324 番目のリジンをイソロイシンに置換した場合 (K324I) にはこのような低下は認められなかった。D315V においては ATP 以外の作動薬に対する感受性も低下したが、遮断薬に対する感受性には変化が認められなかった。以上のことから 315 番目のアスパラギン酸残基がチャンネルの正常な開口に必須であることが示された。

Keywords: ATP receptor/channel, site-directed mutagenesis, activation mechanism

Nakazawa, K., Inoue, K. and Ohno, Y.: **An asparagine residue regulating conductance through P2X₂ receptor/channels.**

Eur. J. Pharmacol., **347**, 141-144 (1998)

野性型および変異型の ATP 受容体チャンネルをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、単一チャンネル電流記録を行なった。透過イオンとして 100 mM ナトリウムを用いた場合、野性型チャンネルでは 80 pS の単一チャンネル電流が記録された。このチャンネル電流は 333 番目のアスパラギン酸残基をイソロイシンに置換 (N333I) することにより、半減した。同様のコンダクタンス低下はリチウムあるいはセシウムを透過イオンとして用いた場合でも認められた。以上のことから、333 番目のアスパラギン酸残基がチャンネル孔の形成に関与し、正常なイオン透過に必須であることが示された。

Keywords: ATP receptor/channel, site-directed mutagenesis, ion permeation

Chou, H.-C.*¹, Ozawa, S., Fu, P. P.*¹, Lang, N.P.*² and Kadlubar, F.F.*¹: **Metabolic activation of methyl-hydroxylated derivatives of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by human liver dehydroepiandrosterone-steroid sulfotransferase.**

Carcinogenesis, **19**, 1071-1076 (1998)

7,12-dimethylbenz[a]anthracene の methyl-hydroxy 誘導体はラットなどの実験動物の種々の組織において、硫酸抱合を受けて、代謝活性化されることが示されていた。今回、ヒト肝に存在する種々の硫酸転移酵素分子種のうち、dehydroepiandrosterone など steroid のアルコール性水酸基に硫酸抱合を行う steroid sulfotransferase により、ラットで認められた硫酸抱合反応による代謝活性化が触媒されることを示した。

Keywords: human liver, steroid sulfotransferase, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene

*¹ National Center for Toxicological Research, AR, USA

*² John L. McClellan VAMC, AR, USA

Nakajima, M.*¹, Takahashi, H.*¹, Sasaki, M.*¹, Kobayashi, Y.*¹, Awano, T.*², Irie, D.*², Ohno, Y., Usami, M.: **Developmental toxicity of indium chloride by intravenous or oral administration in rats.**

Teratogen. Carcinogen. Mutagen., **18**, 231-238 (1998)

インジウムの発生毒性をラットを用いて調べた。その結果、インジウムはラットにおいて催奇形性を示すことを明らかにした。

Keywords: developmental toxicity, indium chloride, rat

*1 旭化成工業株式会社

*2 山崎産業株式会社

Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y.: **Effects of ascorbic acid on selenium teratogenicity in cultured rat embryos.**

Toxic. Lett., **105**, 123-128 (1999)

セレンの催奇形性に及ぼすアスコルビン酸の影響を調べた。その結果、アスコルビン酸は亜セレン酸の催奇形性には増強作用を示し、セレン酸の催奇形性には阻害作用を示すことを明らかにした。

Keywords: selenium teratogenicity, embryo culture, ascorbic acid

Mitsumori, K., Imazawa, T., Onodera, H., Takahashi, M., Kitajima, S., Inoue, T. and Kurokawa, Y.: **Ultrastructural changes in motor endplates of the lumbrical muscles from rats induced by a microsomal Ca²⁺ ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone**

Arch. Toxicol., **72**, 115-118 (1998)

Ca²⁺ ATPase 阻害剤の 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone (DTBHQ) 80 mg/kg を雌 Wistar ラットに 5 日間経口投与し、虫様筋の運動終板を顕微鏡および電顕的に観察した。投与 1 日目より体重減少、3 日目より伏臥、流涎、流涙、歩行異常、筋力低下がみられた。最終投与後 1 日目では、虫様筋の運動終板に肉眼および顕微鏡的異常は認められなかった。電顕観察では、虫様筋における運動終板のシナプス小胞とミトコンドリアの消失、運動終末の崩壊を特徴とする神経毒性が認められた。以上より、DTBHQ の標的部位はラット虫様筋の運動終板であり、その障害の結果として、歩行異常および筋制御障害などの神経症状が現れることが強く示唆された。

Keywords: 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, neurotoxicity, ultrastructure

Hayashi, S.*1, Mori, I.*2, Nonoyama, T.*2 and Mitsumori, K.: **Point mutations of the c-Ha-ras gene in spontaneous liver tumors of transgenic mice carrying the human c-H-ras gene**

Toxicol. Pathol., **26**, 556-561 (1998)

ヒトプロト型 c-H-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウス (rasH2) の肝臓の自然発生増殖性病変について、ヒトおよびマウス内因性 c-H-ras 遺伝子の codon 61 における変異を PCR-SSCP およびドットプロットハイブリダイゼーションにより解析した。肝細胞癌ではマウス c-H-ras 遺伝子の codon 61 に CAA→AAA, CAA→CT あるいは CAA→CGA の変異が認められた。血管肉腫ではヒト c-H-ras 遺伝子の codon 61 に CAG→CTG の変異がみられたが、マウス c-H-ras 遺伝子の変異は認められなかった。変異細胞巢および肝細胞腺腫にヒトおよびマウス c-H-ras 遺伝子の変異は認められなかった。rasH2 マウスの自然発生肝腫瘍における c-H-ras 遺伝子の変異パターンの違いは腫瘍の組織型あるいは細胞起源に起因することが示唆された。

Keywords: human prototype c-H-ras transgenic (rasH2 Tg) mouse, hepatocellular carcinoma, hepatic hemangiosarcoma

*1 (株)武田薬品工業 薬理研究所

*2 (株)武田薬品工業薬剤安全性研究所

Koujitani, T., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Mori, I.*1, Onodera, H., Nonoyama, T.*1 and Hayashi, Y.*2: **Modifying effects of NNK on lung tumorigenesis in hamsters with**

pulmonary fibrosis induced by MNUR

J. Toxicol. Pathol., **11**, 169-175 (1998)

雌シリアンハムスターに 2 週間間隔で 5 回、0.6 mg MNUR (I, II 群) あるいは 0.5% エタノール (III, IV 群) を皮下投与し、3 ppm 濃度の NNK を混じた蒸留水 (I, III 群) あるいは水道水 (II, IV 群) を 27 週間与えた。腺様化生、乳頭状増殖、気管支-肺胞腺腫が I および II 群の全例の肺にみられたが、その多発性および PCNA 陽性率に有意差は認められなかった。I 群の動物にみられた気管支-肺胞腺腫および腺癌に c-K-ras 遺伝子の codon 12 あるいは 61 における点突然変異が認められた。遺伝子変異は 4/13 例の腺腫と 3/4 例の腺癌にみられ、その変異は codon 12 における GGT→GAT と codon 61 における CAA→CGA であった。以上より、本実験条件下では、MNUR により誘発されるハムスター肺線維症モデルにおける肺増殖性病変に対し、NNK 投与による修飾作用は認められなかった。

Keywords: hamsters, N-methyl-n-nitrosourea, 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridinyl)-1-butanone

*1 武田薬品工業(株)薬剤安全性研究所

*2 北里大学

Mitsumori, K., Shibutani, M., Sato, S.*1, Onodera, H., Hayashi, Y.*2 and Ando, M.: **The relationship between the development of hepato-renal toxicities and cadmium accumulation in rats given minimum to large amounts of cadmium chloride for a long-term: Preliminary study**

Arch. Toxicol., **72**, 545-552 (1998)

塩化カドミウムを 0, 8, 40, 200 ないし 600 ppm 含有する飼料を SD ラットに 8 ヶ月間投与し、肝腎毒性の発現と臓器内カドミウム (Cd) 蓄積の関連を検討した。600 ppm 群では一般状態の悪化により 4 ヶ月で全例屠殺した。肝毒性は 200 ppm 以上の群で 2 ヶ月からみられ、600 ppm 群では 4 ヶ月までに小葉周辺部の肝細胞壊死が認められた。近位尿管上皮の変性を特徴とする腎毒性が 200 ppm 以上の群で 2 ヶ月からみられ、600 ppm 群ではその程度は 4 ヶ月で顕著となった。600 ppm 群での腎皮質への Cd の蓄積は 2 ヶ月で 250 μg/g に到達し、以後増加しなかった。200 ppm 群では 2 ヶ月で腎障害がみられ、その時点での Cd の蓄積は 104-244 μg/g であった。一方、40 ppm 群では腎毒性はみられなかったが、Cd の蓄積は 91-183 μg/g であった。以上の成績から、微量の塩化カドミウムを長期間投与しても腎障害が発現しないであろうことが示唆された。

Keywords: cadmium, renal toxicity, body burden of Cd

*1 (株)イナリサーチ

*2 北里大学 薬学部

Okamiya, H.*1, Mitsumori, K., Onodera, H., Ito, S.*2, Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M.: **Mechanistic study on liver tumor promoting effects of piperonyl butoxide in rats**

Arch. Toxicol., **72**, 744-750 (1998)

ピペロニル・ブトキシドはラットの発癌性試験において肝腫瘍を誘発することが報告されている。その発癌メカニズムを明らかにするため、本物質を 0.05, 0.2 ないし 2% 含有する飼料を F344 ラットに 4 週間投与した。陽性対照として 0.1% のフェノバルビタールを 4 週間飲水投与した。0.2% 以上の群で、肝重量の増加、SER の増加による小葉中心性肝細胞肥大、コネクシン 32 の数および面積の減少、細胞増殖活性の増加がみられた。肝細胞壊死が 2% 群においてのみ認められた。同様の変化がフェノバルビタール群にみられた。以上の成績から、ピペロニル・ブトキシドは

肝腫瘍プロモーション作用を有し、その作用はフェンバルピタールのそれと非常に類似することが示唆された。さらに、高用量群での肝細胞の壊死に続く細胞増殖活性の増加もこのプロモーション作用の原因と考えられた。

Keywords: piperonyl butoxide, promoting mechanism, gap junction

*1 山之内製薬 安全性研究所

*2 日本実験医学研究所

Shoda, T., Mitsumori, K., Imazawa, T., Toyoda, K., Tamura, T., Takada, K and Takahashi, M.: A spontaneous seminal vesicle papillary adenocarcinoma in an aged F344 rat *Toxicol. Pathol.*, **26**(3), 448-451 (1998)

ラットにおける精嚢腫瘍は極めて希であり、今まで詳細な症例報告はない。我々は、癌原性試験の対照群の109週例の雄F344ラットの1例に自然発生精嚢腫瘍を見出した。剖検では、右側精嚢が黒色～灰白色となり腫大していた。組織学的に、腫瘍細胞はやや好塩基性の核と豊富な細胞質を持ち、充実性もしくは腺管状に増殖し、その管腔内にマクロファージ様細胞の集簇がみられた。核異型や細胞分裂像もしばしば認められた。免疫染色では、腫瘍細胞はkeratin および S-100 に陽性であり、マクロファージ様細胞は vimentin および ED-1 に陽性であった。顕微鏡観察では、腫瘍細胞は多数の分泌顆粒や microvilli および細胞間結合装置を有し、一方マクロファージ様細胞は穹入した核と、lysosome および豊富な rER を持ち、反応性に浸潤したマクロファージであった。本例は精嚢腺癌と診断したが、精嚢の自然発生悪性腫瘍は、F344 ラットにおいて初めての報告である。

Keywords: seminal vesicle, adenocarcinoma, rat

Watanabe, T.*¹, Manabe, S.*¹, Ohashi, Y.*¹, Okamiya, H.*², Onodera, H. and Mitsumori, K.: Comparison of the induction profile of hepatic drug-metabolizing enzymes between piperonyl butoxide and phenobarbital in rats *J. Toxicol. Pathol.*, **11**, 1-10 (1998)

piperonyl butoxide (PiB) と phenobarbital (PhB) を4週間ラットに投与した。肝相対重量、チトクローム p450 値、種々の薬物代謝酵素活性値が変動した。2%と0.2% PiB 群のパラメーターが有意に変動した。p450 アイソザイムは、肝小葉中心部への誘導が認められた。PiB 群では、CYP1A1 誘導以外は陽性対照の PhB 群と類似した結果が得られた。これらの結果から、PhB の肝腫瘍プロモーター活性と CYP2B1/2 誘導は関連し、PiB は肝腫瘍プロモーターとして有用であることが示唆された。

Keywords: piperonyl butoxide, cytochrome p450, CYP2B1/2

*1 (株)三共 安全性研究所

*2 (株)山之内製薬 創薬安全性研究所

Mitsumori, K., Koizumi, H.*¹, Nomura, T.*¹ and Yamamoto, S.*^{1,2}: Pathological features of spontaneous and induced tumors in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene used for six-month carcinogenicity studies *Toxicol. Pathol.*, **26**, 57-69 (1998)

rasH2 マウスを用いた発癌試験の有用性を実証するため6ヶ月試験を行った。rasH2 マウスは non-Tg マウスに比し、一般的に発癌物質の感受性が高かった。腺胃乳頭腫、脾血管肉腫の発生率は non-Tg マウスに比し高かったが、自然発生腫瘍としては一般的に低かった。既知発癌物質を投与した rasH2 マウスの結果は、B6C3F1 を用いた癌原性試験と一致するとは限らず、non-Tg マウスとも一致しなかった。

肺、脾、腺胃腫瘍は既知発癌物質を投与した rasH2 マウスで誘発されることより、長期発癌性試験より早急な標的臓器検索の可能性が示唆された。

Keywords: human prototype c-Ha-ras mice, ras H2 mice, 6-month carcinogenicity testing

*1 (財)実験動物中央研究所

*2 慶応大学医学部

Yamamoto, S.*^{1,2}, Urano, K.*², Koizumi, H.*², Wakana, S.*², Hioki, K.*², Mitsumori, K., Kurokawa, Y., Hayashi, Y.*³ and Nomura, T.: Validation of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene as a bioassay model for rapid carcinogenicity testing

Environ. Health Perspect., **106 Suppl.1**, 57-69 (1998)

発がん性試験は化合物の安全性を確認するために不可欠であるが、動物、時間およびコストの問題から、短期間で発がん性が評価できる短期発がん試験系の開発が社会的に求められている。今回、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニック (Tg) マウス (rasH2 マウス) を用いて短期発がん試験系の動物モデルとしての有用性を検討した。その結果、rasH2 マウスでは6ヶ月以内に様々な変異原性発がん物質が検出可能であること、また、非変異原性発がん物質も検出出来ることが明らかにされた。さらに、rasH2 マウスは非遺伝子導入マウスに比べ変異原性および非変異原性発癌物質に対してより敏感であることが明らかにされた。なお、rasH2 マウスでは変異原性あるいは非変異原性非発癌物質において腫瘍の増加は認められなかった。以上の成績より、この rasH2 マウスは短期発がん試験系の動物モデルとして有用であることが明らかにされた。

Keywords: CB6F1-TgHras2 mouse, human c-Ha-ras, transgenic mouse

*1 慶応大学

*2 (財)実験動物中央研究所

*3 北里大学

Shinoda, K.*¹, Mitsumori, K., Yasuhara, K., Uneyama, C., Onodera, H., Takegawa, K., Takahashi, M. and Umemura, T.*²: Involvement of apoptosis in the rat germ cell degeneration induced by nitrobenzene *Arch. Toxicol.*, **72**, 296-302 (1998)

Nitrobenzene (NB) はラット生殖細胞、特に精母細胞に変性を起こすことが知られており、また、この過程にアポトーシスの関与が疑われている。今回、アポトーシスの関与を明らかにするため、成熟 SD 系雄性ラットに 250mg/kg の NB を単回経口投与後 6, 12, 24 時間および 2, 3, 5, 7 日に精巣を摘出し、核 DNA の断片化を TUNEL 法およびアガロースゲル電気泳動法を用いて解析すると共に、病理組織学および超微形態学的に観察した。形態学的に生殖細胞の変性は 24 時間後にパキテン期精母で観察され、これらの変性は超微形態学的にアポトーシスの特徴である核クロマチンおよび細胞内小器官の凝縮として認められた。また、TUNEL 法により DNA の断片化が検出される共に、アガロースゲル電気泳動により DNA にラダーが観察された。以上の成績より、NB による生殖細胞の変性にはアポトーシスが関与していることが明らかとなった。

Keywords: nitrobenzene, apoptosis, testicular toxicity

*1 (財)化学品検査協会

*2 鳥取大学

Mitsumori, K., Yasuhara, K., Mori, I.*¹, Shimo, T.*¹, Onodera, H., Nomura, T.*², Takahashi, M. and Hayashi, Y.*³:

Pretreatment with N-methyl-N-nitroso-urethane inhibits lung tumors induced by urethane in transgenic mice carrying human prorotype c-Ha-ras gene

Cancer Lett., 129, 181-190 (1998)

肺線維症に合併する肺癌の組織発生を解明する目的でヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニック (Tg) マウス (rasH2 マウス) および同腹仔の野生型マウス (Non-Tg マウス) の雌雄に肺線維症を誘発する N-methyl-N-nitrosourethane (MNUR) 0.3mg/個体を隔週 1 回計 3 回皮下投与後 2 週目に 1000mg/kg の urethane (UR) を腹腔内に投与し、その後 14 週目に生存動物全例の肺を病理組織学的に検索した。rasH2 マウスでは雌雄とも UR 単独投与により 100% に肺腫瘍が認められたが、MNUR 投与後 UR を投与した群では約 20% と有意に減少して見られた。また、Non-Tg マウスでも同様の傾向が認められたが、UR 単独投与による肺腫瘍は 20~40% と少なかった。以上の成績より、rasH2 マウスは UR 誘発肺腫瘍のに対して感受性が高いこと、また、肺線維症修復過程の肺胞上皮は UR などの肺発癌物質による DNA 障害に対して耐性を有することが示唆された。

Keywords: N-methyl-N-nitrosourethane, urethane, transgenic mouse

*1 (株)武田薬品工業

*2 (財)実験動物中央研究所

*3 北里大学

Takegawa, K., Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Kitaura, K., Shimo, T. and Takahashi, M.: Induction of squamous cell carcinoma in the salivary glands of rats by potassium iodide

Jpn. J. Cancer Res., 89, 105-109 (1998)

F344/DuCrj ラットを用いたよう化カリウム (KI) の 2 年間の癌原性試験において、KI を 1000 ppm の濃度で含む飲料水を摂取した雄 4/40 例および雌 3/40 例の唾液腺に扁平上皮癌 (SCC) が認められた。高用量群の動物の顎下腺においては腺房の萎縮に伴う小導管の増殖が高率に認められ、増殖した小導管および太い小葉間導管はしばしば扁平上皮化生を示していた。化生から SCC への移行も認められた。これらの結果より、KI により誘発された小葉の障害に対して二次的に小導管が増殖し、そこに生じた扁平上皮化生から非遺伝毒性的に SCC が発生した可能性が示唆された。

Keywords: squamous cell carcinoma, salivary gland, potassium iodide

Takegawa, K.*1, Mitsumori, K., Onodera, H., Yasuhara, K., Takahashi, M., Yanai, T.*2, Masegi, T.*2 and Hayashi, Y.*3: Immunohistochemical studies of TSH-producing cells in the pituitary and expression of growth factors in thyroidal proliferative lesions in rats treated with thiourea and excess vitamin A

J. Toxicol. Sci., 23, 213-221 (1998)

下垂体における TSH 産生細胞の変化、および増殖因子である transforming growth factor α (TGF α), epidermal growth factor receptor (EGFR) ならびに cyclin D1 の甲状腺における発現が、チオウレア (TU) 誘発甲状腺腫瘍発生に対する過剰ビタミン A (VA) の増強効果に関与するかどうかを明らかにするために、それらを免疫組織化学的に検討した。雄ラットに DHPN (2800 mg/kg) を単回皮下投与した後、対照群、TU 群、VA 群、および TU+VA 群の 4 群に分け、それぞれ無処置、0.2% TU 含有飲料水、0.1% VA 含有飼料、その両方の処置を 10 週間または 19 週間与えた。抗 TSH 抗

体を用いた免疫組織化学の結果、TU+VA 群では TU 群に比べて TSH 産生細胞が肥大しており、TSH 刺激の増強が過剰 VA の効果の主な原因であるとする我々の結論に一致していた。今回の実験では、TU 群および TU+VA 群の間で、甲状腺の増殖性病変における TGF α , EGFR, および cyclin D1 の発現に差が認められなかったことから、VA による腫瘍発生の増強にこれらの因子が関与する可能性は低いと考えられた。

Keywords: immunohistochemistry, thyroidal carcinogenesis, excess vitamin A

*1 (株)吉富製薬

*2 岐阜大学

*3 北里大学

Wada, S.*1, Hirose, M., Shichino, Y.*1, Ozaki, K.*1, Hoshiya, T.*1, Kato, K.*1 and Shirai, T.*1: Effects of catechol, sodium chloride and ethanol either alone or in combination on gastric carcinogenesis in rats pretreated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Cancer Lett., 123, 127-134 (1998)

ラット MNNG 誘発胃発がんモデルを用いたポストインシエーション時期でのカテコール、食塩、エタノール投与の影響を検索した。6 週齢の雄 F344 ラットに 150mg/kg の MNNG を単回投与後、0.8% カテコール、5% 食塩、10% エタノールを単独ないしは組み合わせて、51 週間にわたり混餌投与した。その結果、前胃ではバピローマ及び扁平上皮癌の発生率が、MNNG 単独群に比較してカテコール投与群で高く、逆にエタノール投与群ではバピローマの発生が減少した。また、カテコール投与群に比べ、カテコール・食塩・エタノールの併用投与は扁平上皮癌の発生を減少させた。腺胃においてもカテコール投与により腺癌の発生率が著しく上昇し、食塩とエタノールの併用により抑制された。また MNNG の前処置なしの食塩投与により、前胃の上皮の増殖が軽度に進化した。これらの結果より、食塩とエタノールの併用投与は、カテコールにより誘発される前胃ならびに腺胃の腫瘍発生に対して抑制作用を示すものと考えられ、その大部分はエタノールの寄与によるものと考えられた。

Keywords: rat gastric carcinogenesis, catechol, modifying effects

* 名古屋市立大学医学部

Takahashi, S.*1, Hirose, M., Tamano, S.*1,*2, Ozaki, M.*1, Orita, S.*1, Takeuchi, M.*3, Ochi, H.*3, Fukada, S.*4, Kasai, H.*4 and Shirai, T.*1: Immunohistochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in paraffin-embedded sections of rat liver after carbon tetrachloride treatment

Toxicol. Pathol., 26, 247-252 (1998)

四塩化炭素誘発ラット肝傷害モデルを用いて、パラフィン包埋切片を用いた 8-OH-dG 抗体の免疫組織学的応用を検討した。雄のラットに四塩化炭素を単回投与し、6 時間、12 時間、1, 2, 3, 7 日目に肝臓を取り出し、その傷害の程度を検索した。その結果、強い小葉中心性壊死が 1 日目で認められ、2 日目ではその壊死領域に単核細胞浸潤を認めた。2 日目および 3 日目で、浸潤単核細胞、洞様毛細血管内皮細胞、および肝細胞が 8-OH-dG 抗体により染色された。この時期では、DNA における 8-OH-dG の形成ならびに 8-oxo-dGTPase mRNA の発現が増加し、また、marondialdehyde と 4-hydroxy-2-nonenal の量が 6 時間目と 3 日目に二峰性のピークを示した。これらの結果より、肝細胞壊死には 8-OH-dG の過剰の形成よりも脂質過酸化が強く関与し、8-

OH-dG の形成は浸潤した単核細胞によるものであることが明らかになった。これらの生化学的データと免疫組織学的染色結果の整合性から、抗 8-OH-dG 抗体は、パラフィン包埋切片においてフリーラジカルに傷害された細胞の検出に有用であり、発がん等の酸化的ストレスの関連した疾患のメカニズムの解析に有用であることが示された。

Keywords: lipid peroxidation, liver injury, oxidative damage

- *1 名古屋市立大学医学部
- *2 大雄会医科学研究所
- *3 日本老化制御研究所
- *4 産業医科大学

Tamano, S.*1, Hirose, M., Tanaka, H.*1, Hagiwara, A.*1 and Shirai, T.*1: Variation in susceptibility to the induction of forestomach tumors by butylated hydroxyanisole among rats of different strains

Fd. Chem. Toxic., **36**, 299-304 (1998)

Butylated hydroxyanisole (BHA) の前胃発がん性の系統差を、雄の F344, SHR, Lewis および SD ラットを用いて検索した。1 群 30 匹の 6 週齢のラットに対して 2% BHA の混餌投与を 104 週間行った。系統に関連なく BHA 投与したすべてのラットに前胃扁平上皮のパピローマおよび過形成が認められたが、扁平上皮がんの発生率には系統差が認められ、SHR ラットにおいて最も高率であった。この系統では、炎症に起因する細胞傷害性の影響が最も強く、扁平上皮がんの発生とよく相関していた。この結果より、BHA によるラットの前胃発がんに関して大きな系統差の存在すること、およびそれには細胞傷害に対する感受性の差が重要なパラメーターとして存在することが示唆された。

Keywords: forestomach carcinogenesis, butylated hydroxyanisole, strain difference in rats

- *1 名古屋市立大学医学部

Futakuchi, M.*1, Hirose, M., Miki, T.*2, Tanaka, H.*1, Ozaki, M.*1 and Shirai, T.*1: Inhibition of DMBA-initiated rat mammary tumor development by the novel synthetic ascorbic acid derivatives, synthetic phenolic antioxidant 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) and phenylethyl isothiocyanate

Eur. J. Cancer Prev., **7**, 153-159 (1998)

DMBA 誘発ラット乳腺発がんモデルを用いて、合成フェノール性抗酸化剤である HTHQ、合成アスコルビン酸誘導体である 3-O-ethyl ascorbic acid (EAsA) と 3-O-dodecylcarboxymethyl ascorbic acid (DAsA)、および phenylethyl isothiocyanate (PEITC) の乳腺発がんに対する影響を検索した。1 群 20 匹の 7 週齢の SD ラットに対し、DMBA を 50mg/kg の割合で強制経口投与し、1 週間後より 1% HTHQ、1% EAsA、1% DAsA もしくは 0.1% PEITC の混餌投与を 35 週間行った。これらの群では最終的な乳腺がんの発生率に有意な差を認めなかったが、EAsA 投与群と HTHQ 投与群では基礎食投与群と比べ、発生頻度が有意に低下していた。また、1 個当たりの平均腫瘍容積も EAsA、DAsA、PEITC 投与群で DMBA 単独群に比べ有意に低下していた。この結果より、HTHQ、EAsA および PEITC のすべては DMBA 誘発ラット乳腺発がんのプロモーション/プログレッション時期に抑制効果を示すものと考えられた。

Keywords: antioxidant, chemoprevention, rat mammary carcinogenesis model

- *1 名古屋市立大学医学部
- *2 (株)日本ハイボックス

Hirose, M., Futakuchi, M.*1, Tanaka, H.*1, Orita, S.*1, Ito, T.*1, Miki, T.*2 and Shirai, T.*1: Prevention by antioxidants of heterocyclic amine-induced carcinogenesis in a rat medium term liver bioassay -results of extended and combination treatment experiments

Eur. J. Cancer Prev., **7**, 61-67 (1998)

ラット中期肝発がんモデルを利用して、ヘテロサイクリックアミンによる肝発がんへの HTHQ および他の抗酸化剤の修飾作用を検索した。実験 I では、6 週齢の雄の F344 ラットに対して 200mg/kg の DEN を単回腹腔内投与し、2 週間後に 0.03% Glu-P-1+0.5% HTHQ、Glu-P-1 単独、HTHQ 単独の混餌投与を 26 週間行った。DEN 処置後 3 週間目で肝部分切除を施した。肝腺腫および腺がんの総発生率は Glu-P-1 単独群で高く (89%)、HTHQ 併用群では低く (40%)、DEN 単独群と同程度の発生率を示した。実験 II では、DEN 投与後、ヒトにおける暴露状況に似せた肝発がん性のヘテロサイクリックアミンの混合物 (0.003% Glu-P-1, 0.015% Trp-P-1, 0.004% MeAaC, 0.003% IQ, 0.004% MeIQx) を 0.0155% の割合で 6 週間混餌投与し、同時に 0.5 ないし 0.125% の HTHQ の併用投与を行った。GST-P 陽性肝細胞変異巣の数は、併用投与した HTHQ の用量に依存して減少した。実験 III は、DEN イニシエーション処置後、0.02% MeIQx + 0.25% HTHQ + 0.05% PEITC + 1% 緑茶カテキン (GTC) もしくは HTHQ + PEITC + GTC の混合物、MeIQx 単独、抗酸化剤単独もしくはその組み合わせを 6 週間にわたり混餌投与した。MeIQx + HTHQ 群および MeIQx + 抗酸化剤混合物投与群における GST-P 陽性細胞巣の数は MeIQx 単独群に比べ有意に減少したが、相乗作用は証明できなかった。これらの結果から、ヘテロサイクリックアミンにより誘発される肝発がんは HTHQ により抑制されることが明らかとなった。

Keywords: antioxidant, rat hepatocarcinogenesis, heterocyclic amines

- *1 名古屋市立大学医学部
- *2 (株)日本ハイボックス

Ogawa, K.*1, Futakuchi, M.*1, Hirose, M., Boonyaphiphat, P.*1, Mizoguchi, Y.*1, Miki, T.*2, Shirai, T.*1: Stage and organ dependent effects of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone, ascorbic acid derivatives, n-tritriacontane-8,10-dione and phenylethyl isothiocyanate in rat multi-organ carcinogenesis model

Int. J. Cancer, **76**, 851-856 (1998)

ラット多臓器発がんモデルにおける HTHQ、PEITC、3-O-ethyl ascorbic acid (EAsA)、dodecylcarboxymethylascorbic acid (DAsA)、n-heptadecane-8,10-dione の影響を検索した。動物は DEN の単回腹腔内投与を行い、次いで MNU の 4 回腹腔内投与、BBN の 2 週間にわたる飲水投与ののちに、dimethylhydrazine の 4 回皮下投与と同時に DHPN の 2 週間にわたる飲水投与を行い、多臓器発がんモデルとした。被験化学物質は、イニシエーション時期もしくはポストイニシエーション時期に投与し、28 週目に実験を終了した。検索した 5 つの化学物質はどれも肺における過形成の発生率を減少させ、特にイニシエーション期での PEITC 投与によりその効果は顕著であった。さらに、HTHQ は、食道上皮過形成の発生率をイニシエーション時期に減少させ、小腸・大腸腺腫の発生率をポストイニシエーション時期に減少させた。しかし、HTHQ は、舌および前胃における扁平上皮過形成とパピローマの発生を増加させた。PEITC はイニシエーション時期に投与した場合、食道上皮過形成、腎異形成尿管、肝 GST-P 陽性細胞巣の誘発を抑制した。

他方, PEITC をポストイニシエーション時期に投与することにより, 肝 GST-P 陽性細胞巢, 膀胱腫瘍の発生を増加させた。これらの結果から, HTHQ の舌および前胃に対する発がん標的性が明らかとなり, イニシエーション時期に投与することにより, いくつかの臓器で発がん抑制性に作用する PEITC が, ポストイニシエーション時期に投与することにより肝および膀胱に発がんプロモーション作用を示すことが明らかとなった。

Keywords: multiorgan carcinogenesis model, antioxidant, isothiocyanate

*1 名古屋市立大学医学部

*2 (株)日本ハイボックス

Hirose, M., Yamaguchi, T.*, Kimoto, N.*, Ogawa, K.*, Futakuchi, M.*, Shirai, T.*: Strong promoting activity of phenylethyl isothiocyanate and benzyl isothiocyanate on urinary bladder carcinogenesis in F344 male rats
Int. J. Cancer, 77, 773-777 (1998)

肝および膀胱発がんのポストイニシエーション時期における phenylethylisothiocyanate (PEITC) と benzylisothiocyanate (BITC) の影響を検索するために, ラットに DEN および BBN の投与を行い, 投与終了後3日目より PEITC もしくは BEITC の 0.1% 混餌投与を 32 週間行った。また, イニシエーションなしの群も設定した。肝臓においては, PEITC 投与により, 腫瘍発生率に有意な差は認められなかったものの, 径 0.5cm 以上の変異巢の発生頻度が軽度増加した。膀胱においては, 乳頭状/結節性 (PN) 上皮過形成 および癌の発生率がポストイニシエーション時期における PEITC もしくは BITC 投与により有意に増加した。イニシエーション処置をしない動物においても, 膀胱の PN 過形成がすべての動物で認められ, いくつかの動物で乳頭腫および癌の発生が認められた。これらの結果より, PEITC および BITC は, 完全発がん物質の特性を有する膀胱発がんの強力なプロモーターであることが示された。

Keywords: isothiocyanate, rat urinary carcinogenesis, tumor-promotion effect

* 名古屋市立大学医学部

Hirose, M., Ito, T.*1, Takahashi, S.*1, Ozaki, M.*1, Ogiso, T.*1, Nihro, Y.*2, Miki, T.*2, Shirai, T.*1: Prevention by synthetic phenolic antioxidants of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinixaline (MeIQx)- or activated MeIQx-induced mutagenesis and MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis, and role of antioxidant activity in the prevention of carcinogenesis

Eur. J. Cancer Prev., 7, 233-241 (1998)

合成フェノール性抗酸化剤である HTHQ, BHA, BHT, TBHQ および propyl gallate (PG) の, MeIQx もしくは活性化 MeIQx 誘発変異原性とラット肝発がん性に対する影響を検索し, それらの抗酸化作用と発がん抑制作用の関連性について検討を行った。抗変異原性作用の検索の結果, HTHQ が最も強く, BHA, BHT, PG, TBHQ の順で作用が减弱した。ラットを用いた肝中期発がんモデルにおいて, 混餌にて 0.03% の MeIQx 単独投与ないし MeIQx とそれぞれの抗酸化剤 (0.25%) の併用投与もしくは抗酸化剤のみの投与を 6 週間にわたり行った。DEN イニシエーション後 3 週目に肝部分切除を行い, この摘出肝臓につき 8-OHdG と脂質過酸化の程度を測定した。MeIQx 投与により, GST-P 陽性細胞巢の数および面積が有意に増加した。また抗酸化剤併用投与によりその効果は减弱し, HTHQ で最も強い抑制作用が認められた。肝臓の DNA における

8-OHdG レベル, malondialdehyde, 4-hydroxyalkenals のレベルは群間に差を認めなかった。これらの結果より, MeIQx に対する抗変異原性作用と抗酸化作用は発がん抑制作用とパラレルであり, HTHQ は, 最も強い抗腫瘍効果を示した。しかし, 酸化ストレスおよび抗酸化作用はそれぞれ MeIQx 誘発肝発がんとその抑制には関連しないものと考えられた。

Keywords: antimutagenesis, antioxidant, rat hepatocarcinogenesis

*1 名古屋市立大学医学部

*2 (株)日本ハイボックス

Mizoguchi, Y.*1, Hirose, M., Yamaguchi, T.*1, Boonyaphiphat, P.*1, Miki, T.*2, Shirai, T.*1: Dose dependence of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone promotion of forestomach carcinogenesis in rats pretreated with N-ethylnitrosourea
Jpn. J. Cancer Res., 89, 475-480 (1998)

雄 F344 ラットを用いた ENUR 誘発前胃/舌発がんに対するポストイニシエーション時期における HTHQ の用量依存性の修飾作用を検索した。ENUR の 4 週間にわたる飲水投与後, HTHQ を 1%, 0.5%, 0.25% もしくは 0.125% の割合で 36 週間にわたり混餌投与した。すべての動物は 40 週目に屠殺した。舌の乳頭状過形成および乳頭腫は 0.125~0.5% の HTHQ 群で増加したが, 最高用量である 0.5% HTHQ では効果を認めなかった。BrdU 標識率も同様の結果を示した。前胃の乳頭腫および扁平上皮がんは ENUR イニシエーションに引き続く 0.125% HTHQ 投与群においてのみ有意に増加した。ENUR 前処置なしでは, 乳頭状過形成は 0.125% ~1% HTHQ 投与群においてのみ認められたが, 用量依存性は明らかではなかった。以上の結果から, HTHQ は舌および前胃発がんに対して非常に弱い発がんプロモーション作用を有することが示唆され, 閾値の上限と下限の存在することが明らかとなった。

Keywords: rat forestomach carcinogenesis, antioxidant, dose-dependence

*1 名古屋市立大学医学部

*2 (株)日本ハイボックス

Kato, T.*1, Hirose, M., Takahashi, S.*1, Hasegawa, R.*1, Kohno, T.*2, Nishibe, S.*3, Kato, K.*1, Shirai, T.*1: Effects of the lignan, arctiin, on 17- β ethinyl estradiol promotion of preneoplastic liver cell foci development in rats
Anticancer Res., 18, 1053-1058 (1998)

ラット肝中期発がんバイオアッセイ法を用いて 17- β ethinyl estradiol (EE) と 2-acetylaminofluorene (2-AAF) に対する, 抗エストロゲン作用をもつリグナンである arctiin の抗プロモーション作用を GST-P 陽性細胞巢の解析により検討した。雄 F344 ラットを DEN 処置後, 2 週目より arctiin (1%), EE (1.5 ppm ないし 5 ppm), 2AAF (20 ppm), arctiin+EE (1.5 ppm ないし 5 ppm), arctiin+2AAF (20 ppm) を 6 週間にわたり混餌投与した。肝部分切除は 3 週目に行った。その結果, EE と 2AAF は GST-P 陽性細胞巢の活性を増加させ, arctiin による抗プロモーション作用は 2AAF のみに認められた。これらの結果から, arctiin はラット肝発がんに対して弱い抑制作用を有することが示された。

Keywords: arctiin (lignan), 17-B ethinyl estradiol, rat hepatocarcinogenesis

*1 名古屋市立大学医学部

*2 (株)明治乳業

*3 東日本学園大学薬学部

Takahashi, S.*1, Tamano, S.*2, Hirose, M., Kimoto, N.*1,

Ikeda, Y.*¹, Sakakibara, M.*¹, Tada, M.*³, Kadlubar, F. F.*⁴, Ito, N.*¹, Shirai, T.*¹: **Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution**

Cancer Res., **58**, 4307-4313 (1998)

抗 PhIP-DNA adduct ポリクローナル抗体を作製し、パラフィン包埋切片における免疫組織学的な検出法の検討を行った。この抗体の特異性は competitive ELISA によって確認した。陽性シグナルは、PhIP 単回投与後、1, 2, 7 日目における F344 ラットのアセトン固定材料において検出されたが、ホルマリン固定材料においては検出されなかった。この陽性シグナルは、ほとんどすべての臓器で用量依存性に認められた。また adduct の消失によって判断される修復活性は、臓器ないしは細胞のタイプによって異なっていた。これらの結果より、この抗体は、パラフィン包埋切片において PhIP の標的となる細胞の検出に有効であり、PhIP による発がんメカニズムの研究に有用であると考えられた。

Keywords: PhIP, antibody development, carcinogen-DNA adducts

*¹ 名古屋市立大学医学部

*² 大雄会医科学研究所

*³ 愛知淑徳大学

*⁴ Office of Reseach, National Center for Toxicological Reseach, U.S.A.

Shibutani, M., Lazarovici, P.*¹, Johnson, A.J.*², Katagiri, Y.*¹, Guroff, G.*¹: **Transcriptional down-regulation of epidermal growth factor receptor by nerve growth factor in PC12 cells**

J. Biol. Chem., **273**, 6878-6884 (1998)

PC12 細胞の NGF 神経分化過程に生じる EGFR (EGFR) の慢性的な down-regulation の分子制御機構を検索した。まず PC12 細胞を NGF 刺激し、EGFR の蛋白質量の経時的变化を Western blotting にて、mRNA 量の変化を Northern blotting と Competitive RT-PCR にて検索した。蛋白質量は mRNA 量に対応して慢性的に減少し、無処置対照と比較し、刺激 5 日目で蛋白で 67%, mRNA で 85% 減少した。ActinomycinD 処置後の EGFR mRNA の半減期を比較した結果、NGF 刺激の有無で RNA stability に差が無く、更に核 Run-on assay により NGF 刺激 5 日後で EGFR 転写量が 56% 減少した。NGF 刺激 5 日後の細胞に EGFR 遺伝子プロモーター領域の transfection 後、Reporter gene assay によるプロモーター活性と、RNA template-specific PCR による実際の転写産物量を測定した結果、両者の著しい低下を認めた。p140^{nk} を欠損した PC12 nnr5 mutant での NGF 刺激は、EGFR の蛋白質及び mRNA 量、EGFR プロモーター活性に影響を与えなかった。同様に Dominant-negative (DN) Ras 及び DN Src 細胞でも、NGF 刺激により EGFR 蛋白質量は低下しなかった。EGFR の転写抑制因子である GCF2 は、PC12 細胞で NGF 刺激により経時的にその発現が増加したが、nnr5, DN Ras 及び DN Src 細胞では増加しなかった。以上より、NGF による EGFR の down-regulation は転写レベルで制御され、それは p140^{nk}, Ras, Src 依存性であった。更にその転写抑制には GCF2 の関与が示唆された。

Keywords: nerve growth factor, EGF receptor, transcriptional down-regulation

*¹ NIH/NICHD

*² NIH/NCI/DBS

Uneyama, C., Uneyama, H*., Akaike, N*., and Takahashi, M.: **Cyclic GMP inhibits cytoplasmic Ca²⁺ oscillation by increasing Ca²⁺-ATPase activity in rat megakaryocytes**

Eur. J. Pharmacol., **347**, 355-361 (1998)

ラット巨核球のプリン受容体刺激誘発性の細胞質カルシウムオシレーションに対する cGMP の影響をホールセルパッチクランプ法により調べた。ATP 誘発性の K⁺電流オシレーションはニトロプルシドナトリウムや 8-Br-cGMP で抑制され、その抑制は環状ヌクレオチド依存性キナーゼ阻害剤 H-8 で阻害された。またニトロプルシドナトリウムは IP3 誘発性の K⁺電流オシレーションに対しても抑制効果を示したが、Ca²⁺-ATPase 阻害剤存在下では抑制作用は見られなかった。従って cGMP は Ca²⁺-ATPase 活性を増強することでカルシウムオシレーションを抑制すると考えられる。

Keywords: cGMP, Ca²⁺ oscillation, megakaryocyte

* 九州大学医学部

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人, 広瀬雅雄: **胃発がん修飾要因の探索に関する実験的検討**

消化器癌の発生と進展, **10**, 207-210 (1998)

MNNG を発がんのイニシエーターとしてラットに一定期間投与し、同時に塩化ナトリウムを混餌投与すると胃がんの発生が増加することを明らかにしてきた。今回、それを利用した二段階胃発がんモデルを用いて、胃がん発生の修飾要因を探索した成績を総括した。有意な促進影響を及ぼした物質は、プロモーション相では formaldehyde, potassium metabisulfite, glyoxal, methylglyoxal, potassium chloride, ethoxyquin, 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-2(5H)-furanone (MX) などであり、イニシエーション相では cysteamine hydrochloride であった。一方、有意な抑制影響を示した物質は、プロモーション相では calcium chloride, caffeine, 24R,25-vitamin D3 などであり、イニシエーション相では oltipraz であった。

Keywords: gastric carcinogenesis, modifying factor, rat

Furukawa, F., Nishikawa, A., Imazawa, T., Kasahara, K., and Takahashi, M.: **Enhancing effects of quinacrine on development of hepatopancreatic lesions in N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-treated hamsters**

Jpn. J. Cancer Res., **89**, 131-136 (1998)

Quinacrine (QC) は合成マラリア剤として用いられたアクリジン誘導体の化合物であり、肝臓をはじめとして膵臓等に強い親和性を示し、長期間の蓄積は脂質症を誘発する。我々はハムスターの N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) による発癌モデルを用いて腫瘍の発生に対する QC の影響を検討した。5 週齢のハムスターに 10mg/kg の BOP を週 3 回皮下投与し、その後 300ppm, 100ppm および 0ppm を粉末基本飼料に混じり投与した。実験は 40 週後に終了した。膵管癌および異形成は有意に増加し、肝細胞腺腫も有意に増加した。肝内胆管、肺および腎臓の腫瘍性病変の増加は認められなかった。

Keywords: quinacrine, hamster, BOP-induced pancreatic carcinogenesis

Nishikawa, A., Tanakamaru, Z.*¹, Furukawa, F., Lee, I. S.*², Kasahara, K., Ikezaki, S.*¹ and Takahashi, M.: **Chemopreventive activity of oltipraz against induction of glandular stomach carcinogenesis in rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine**

Carcinogenesis, **19**, 365-368 (1998)

ラット二段階胃発癌モデルのイニシエーション期に

oltipraz を投与して腫瘍発生に対する影響を検討した。6週齢の雄 Wistar ラットに、第1~3群には10週間100ppm MNNG を飲水投与し、また実験開始12週間後まで第1群には0.04%、第2群には0.02%の oltipraz 混餌飼料、第3群には基本食のみを与えた。実験開始80週間後には実験は終了した。第1群における幽門部腺癌発生率および異型の粘膜上皮過形成の多発性が第3群に比べて有意に抑制された。さらに短期試験で oltipraz は MNNG 投与後のラット胃粘膜の細胞増殖活性を減少させ、glutathione レベルを上昇させた。oltipraz はラット MNNG 投与による胃粘膜増殖病変の誘発を抑制することが示された。

Keywords: oltipraz, stomach carcinogenesis, rat

*1 岐阜大学医学部

*2 Department of Food Sciences & Technology, Keimyung University

Hori, T.*1, Wanibuchi, H.*1, Yano, Y.*2, Otani, S.*2, Nishikawa, A., Osugi, H.*3, Kinoshita, H.*3 and Fukushima, S.*1: **Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced by space restriction and water-immersion stress** *Cancer Lett.*, **125**, 141-148 (1998)

消化管、特に食道、胃および十二指腸の上皮細胞増殖における水浸拘束ストレスの影響を8週齢のSD雄ラットを用いて検討した。組織学的検索により、腺胃の胃底部粘膜に出血巣が認められ、有意な BrdU 標識率の増加を伴っていた。生化学的検索により、胃底部において polyamine 合成の律速酵素である ODC と SAT の活性増加が認められた。また、ストレスにより、腺胃粘膜において c-fos, c-jun および c-myc の mRNA レベルでの発現が著明に増加する可能性が示された。一方、食道には顕著な変化を認めなかった。これらの成績から、水浸拘束ストレスは胃発がんの促進に関連する可能性がある。

Keywords: space restriction, water-immersion stress, cell proliferation

*1 大阪市立大学医学部 病理学教室

*2 大阪市立大学医学部 生化学教室

*3 大阪市立大学医学部 外科学教室

Watanabe, M., Nishino, T., Takio, K.*1, Sofuni, T. and Nohmi, T.: **Purification and characterization of wild-type and mutant "classical" nitroreductases of *Salmonella typhimurium***

J. Biol. Chem., **273**, 23922-23928 (1998)

S. typhimurium のニトロ還元酵素 (NR) はフラビンを含む酵素であり、*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* の NR, *Vibrio fischeri* の oxidoreductase, *Thermus thermophilus* の NADH oxidase と共通の構造を有している。*S. typhimurium* TA1535NR 株の NR 遺伝子上の変異部位を同定し、T から G への transversion により 33 番目のロイシンがアルギニンに変異しているものと推定した。この変異 NR は標準的な測定条件下では活性を示さず、限外濾過により簡単に FMN を失った。ロイシン 33 からアルギニンへの変異が NR の FMN 結合能に及ぼす影響に関して考察した。

Keywords: classical nitroreductase, flavin mononucleotide, metabolic activation

* 理化学研究所

Espinosa-Aguirre, J. J.*1, Yamada, M., Matsui, K., Watanabe, M., Sofuni, T. and Nohmi, T.: **New *O*-acetyltransferase-deficient Ames *Salmonella* strains generated by specific gene disruption**

Mutat. Res., **439**, 159-169 (1999)

O-アセチル転移酵素 (OAT) は、ニトロアレーンや芳香族アミン由来の *N*-ヒドロキシアリアルアミンの代謝活性化に関わる酵素である。*oat* 遺伝子を特異的に破壊したエームス試験菌株を作製し、既存の *oat* 欠損株 (TA100/1,8-DNP, TA98/1,8-DNP₆) と感受性を比較した。YG7126 株と YG7130 株は、1,8-ジニトロピレン (1,8-DNP), 1-ニトロピレン, Glu-P-1, IQ に対し既存の *oat* 欠損株とほぼ同様の感受性を示した。既存の *oat* 欠損株は変異原処理により得られた菌株であるが、この結果から変異原の活性化に関しては *oat* 遺伝子のみが欠損しているものと考えられる。一方、2-ニトロフルオレン (2-NF) に対する YG7126 株と YG7130 株の感受性は、親株と既存の *oat* 欠損株との中間の値を示した。*cat* 遺伝子を含むプラスミドを既存の *oat* 欠損株に導入し、2-NF に対する感受性を調べると、プラスミド導入株が 3~10 倍高い感受性を示した。この結果から、クロラムフェニコールアセチル転移酵素が 2-NF の活性化に関与することが示唆された。

Keywords: acetyltransferase, nitroarene, aromatic amine

* メキシコ大学生物医学研究所

Yoshida, T.*1, Kim, S.-R. and Komano, T.*1: **Twelve *pil* genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus**

J. Bacteriol., **181**, 2038-2043 (1999)

Inc11 プラスミド R64 は、太細 2 種類の性線毛を産生する。IV 型線毛に分類される細線毛は、液内接合伝達にのみ必要とされる。R64 の細線毛の形成に必要とされる DNA 領域内には *pilI* から *pilV* までの 14 個の遺伝子が発見された。本研究では、R64 細線毛形成における各遺伝子の必要性を調べるため、14 個の *pil* 遺伝子それぞれにフレームシフト型突然変異を導入した。細線毛の菌対外への分泌と液内接合における伝達頻度の解析により、*pilK* から *pilV* までの 12 個の遺伝子が細線毛の形成に必要とされることを明らかにした。また、相補性試験により、今回導入した変異が下流の遺伝子の発現に影響を及ぼさないことを確認した。この領域の上流に位置する *traBC* 遺伝子が *pil* 遺伝子群の発現に必要とされることはすでに示した。加えて、下流の *rci* 遺伝子はシャフロンでの DNA 再編成を引き起こすことにより、細線毛の構造と機能の変換に寄与している。これらのことから、*traBC* と *pilK* から *pilV*, *rci* の 15 の遺伝子が R64 の細線毛の形成とその働きに必要とされる。

Keywords: R64 thin pilus, type IV pilus, conjugal transfer

* 東京都立大学理学部

Kohno, T.*1, Shinmura, K.*1,*2, Tosaka, M.*1, Tani, M.*1, Kim, S.-R., Sugimura, H.*2, Nohmi, T., Kasai, H.*3 and Yokota, J.*1: **Genetic polymorphisms and alternative splicing of the *hOGG1* gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA**

Oncogene, **16**, 3219-3225 (1998)

hOGG1 遺伝子は、損傷 DNA から 8-ヒドロキシグアニンを切り出す DNA グリコシラーゼをコードしている。*hOGG1* の遺伝子構造とその転写産物の解析を正常細胞と肺ガン細胞を用いて行った。コドン 326 での遺伝的多型により、*hOGG1*-Ser³²⁶ と *hOGG1*-Cys³²⁶ タンパクがヒト細胞内で作られていた。大腸菌の 8-ヒドロキシグアニン修復欠損株を用いた相補試験により、8-ヒドロキシグアニンに対する修復活性は、*hOGG1*-Ser³²⁶ タンパクが *hOGG1*-Cys³²⁶ タンパクより高かった。*hOGG1* 転写産物は、スプライシングの相違によって異なる *hOGG1* タンパクをコードする 2 つのアイソフォームが作られていた。一方は核移行シグナ

ルと思われる配列を持っていたが、他方は持っていなかった。hOGG1 座位での LOH は肺ガン細胞で高頻度 (15/23, 62.2%) に観察され、培養細胞株の一つである NCI-H526 は、短い hOGG1 をコードする転写産物の形成をもたらす変異を持っていた。しかし、核 DNA の 8-ヒドロキシグアニンのレベルは、肺ガン細胞株と発現している hOGG1 のタイプの関係ない白血球細胞間で差が無かった。これらの結果は、8-ヒドロキシグアニンのレベルは、hOGG1 遺伝子の遺伝的多型や突然変異、スプライシングの相違によって多様な hOGG1 タンパクが作られたとしても安定したレベルで維持されていることを示す。

Keywords: hOGG1 gene, genetic polymorphism, alternative splicing

*1 国立がんセンター研究所

*2 浜松医科大学

*3 産業医科大学

Hayashi, M., Ueda, T.*1, Uyeno, K.*2, Wada, K.*3, Kinac, K.*4, Saotome, K.*5, Tanaka, N.*6, Takai, A.*7, Sasaki, Y. F.*8, Asano, N.*9, Sofuni, T. and Ojima, Y.*10: **Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms** *Mutat. Res.*, **399**, 125-133 (1998)

水生生物を用いた遺伝毒性試験を行い水質汚染のモニタリングを行う試験系の確立を目的とした共同研究の報告書である。主に、魚類の末梢血を用いた小核試験と、タイリクバラタナゴの初期発生胚を用いた染色体異常試験に関する手法について共同研究の成果をまとめた。また、予備的検討として実際の環境水に適用した場合の試験結果についても考察した。

Keywords: genotoxicity assay, aquatic organisms, water pollution

*1 宇都宮大学教育学部

*2 近畿大学農学部

*3 国立養殖研究所遺伝育種

*4 静岡県立大学食品栄養科学部

*5 横浜市立衛生研究所

*6 食品薬品安全センター秦野研究所

*7 大阪信愛女学院短期大学

*8 八戸工業高等専門学校

*9 日東電工(株)安全性試験センター

*10 日本魚類生物学研究所

谷所達幸*, 八木利仁*, 岩崎浩一*, 下位香代子*, 木苗直秀*, 林 真, 祖父尼俊雄: **魚類の小核試験を用いる沿岸水域の汚染モニタリング**

環境変異原研究, **20**, 1-9 (1998)

静岡県清水港, 用宗港, および大井川港で採取した小型魚類について、末梢血とエラ細胞を用いて小核試験を実施し、試験方法に検討を加えると同時に汚染度の比較を試みた。エラ細胞を用いることにより末梢血を用いた場合より高感度に汚染が検出できることが判明した。

Keywords: water pollution, micronucleus assay, genotoxicity

* 静岡県立大学大学院生活健康科学研究科

Asano, N.*1, Katsuma, Y.*2, Tamura, H.*3, Higashikuni, N.*4 and Hayashi, M.: **An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells**

Mutat. Res., **404**, 149-154 (1998)

イメージアナライザーを用い、げっ歯類を用いる小核試

験の自動化に関する共同研究のバリデーション研究に関する報告。数種類のモデル化学物質についてマウスを用いる小核試験を実施し、アクリジンオレンジ超生体染色標本を蛍光顕微鏡とイメージアナライザーを用いて解析し、両手法の結果を比較したところ、よく一致することが判明した。

Keywords: micronucleus assay, image analysis, acridine orange supravital staining

*1 日東電工(株)安全性試験センター

*2 東洋紡績株式会社

*3 日本新薬株式会社

*4 伊藤ハム株式会社

Adler, I.-D.*1, Bootman, J.*2, Favor, J.*1, Hook, G.*3, Schriever-Schwemmer, G.*1, Welzl, G.*1, Whorton, E.*4, Yoshimura, I.*5 and Hayashi, M.: **Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis**

Mutat. Res., **417**, 19-30 (1998)

In vivo 変異原性試験結果の評価のための統計学的手法の統一化を目的とした国際ワークショップの報告。小核試験、骨髄を用いる染色体異常試験、生殖細胞を用いる染色体異常試験、優性致死試験結果の統計学的评价法についての指針を示した。今後、この分野での評価について検討を加える場合のたたき台となることが期待される。

Keywords: in vivo mutagenicity test, statistical design, data evaluation

*1 GSF-National Research Center for Environmental and Health, Germany

*2 Pharmaco-LSR, UK

*3 National Institute of Environmental Health Sciences, USA

*4 University of Texas Medical Branch, USA

*5 東京理科大学

Morita, T.* and Hayashi, M.: **1,4-Dioxane is not mutagenic in five in vitro assays and mouse peripheral blood micronucleus assay, but is in mouse liver micronucleus assay**

Environ. Mol. Mutagen., **32**, 269-280 (1998)

1,4-Dioxane について 5 種類の in vitro 試験と 2 種類の in vivo 試験を行い、遺伝毒性について総合的に検討した。その結果 5 種類の in vitro 試験の全てとマウスの末梢血を用いる小核試験で陰性の結果が得られたが、マウスの再生肝細胞を用いた小核試験において陽性の結果が得られた。この陽性反応は非常に高用量でのみ観察されたものであり、腫瘍形成とは直接関係のないものと考えられる。

Keywords: 1,4-Dioxane, genotoxicity, mouse liver micronucleus assay

* 日本グラクソ(株)筑波研究所

Miyamae, Y.*1, Yamamoto, M.*1, Sasaki, Y. F.*2, Kobayashi, H.*3, Igarashi-Soga, M.*4, Shimoi, K.*5 and Hayashi, M.: **Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories**

Mutat. Res., **418**, 131-140 (1998)

DNA 損傷性を検出する試験法として単細胞ゲル電気泳動法(コメット法)が用いられるようになってきた。この手法を in vivo の評価系として確立するために行った共同研究の成果をまとめたものである。処理した動物の肝臓、腎臓、脾臓、肺および骨髄細胞に対してコメット法の実験条件に検討を加え、モデル化学物質について評価を行った。

Keywords: single cell gel electrophoresis assay, comet assay, DNA damage

- *1 藤沢薬品(株)安全性研究所
- *2 八戸工業高等専門学校
- *3 資生堂株式会社
- *4 第一製薬株式会社
- *5 静岡県立大学食品栄養科学部

Ohno, T.*1, Asakura, M.*2, Awogi, T.*3, Futamura, Y.*4 and Hayashi, M. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-I. Overview of the study and analyses of variations of ED50 values

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 1-38 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーション共同研究の結果をまとめたものである。コロニー形成法、クリスタルバイオレット染色法、乳酸脱水素酵素湧出法(LDH法)、ニュートラルレッド取り込み法およびMTT法について49機関が参加して行われ、機関間のばらつき等について検討した。

Keywords: alternatives, cytotoxicity assay, collaborative study

- *1 理化学研究所
- *2 日本バイオアッセイ研究センター
- *3 大塚製薬(株)徳島研究所
- *4 東邦大学医学部
- 他 44 機関

Omori, T.*1, Saijo, K.*2, Kato, M.*2, Itagaki, H.*3, Hayashi, M., Miyazaki, S.*2, Ohno, T.*2, Sugawara, H.*2, Teramoto, N.*2, Tanaka, N.*4, Wakuri, S.*4 and Yoshimura, I.*1: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-II. Statistical analysis

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 39-58 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーション共同研究の結果を評価するに当たり、50%影響濃度(ED50)を正確に求めるために開発した統計学的手法に関する論文である。本プログラムはSASで書かれており、現在市販されている。

Keywords: alternatives, inter-laboratory validation, non-linear least squares method

- *1 東京理科大学
- *2 理化学研究所
- *3 資生堂株式会社
- *4 食品薬品安全センター秦野研究所

Omori, T.*1, Saijo, K.*2, Kato, M.*2, Itagaki, H.*3, Hayashi, M., Miyazaki, S.*2, Ohno, T.*2, Sugawara, H.*2, Teramoto, N.*2, Tanaka, N.*4, Wakuri, S.*4 and Yoshimura, I.*1: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-III. Quality of collected data files

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 59-73 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーション共同研究の結果を評価するに当たり、各参加機関から集めたデータの質を評価した論文である。実際の評価に先立ち、質の評価手法に関する検討がなされた。

Keywords: alternatives, cytotoxicity assay, quality of data

- *1 東京理科大学
- *2 理化学研究所
- *3 資生堂株式会社
- *4 食品薬品安全センター秦野研究所

Tanaka, N.*1, Asakura, M.*2, Hattori, C.*3, Hayasaka, A.*4 and Hayashi, M. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-IV. Details of the colony formation assay

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 74-86 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーションの内、コロニー形成法に関する共同研究の結果をまとめたものである。27機関が参加してHeLa S3とBALB/3T3 A31-1-1細胞を用い、6種類のモデル化合物について研究が行われた。

Keywords: alternatives, colony formation assay, inter-laboratory validation

*1 食品薬品安全センター秦野研究所

*2 日本バイオアッセイ研究センター

*3 第一製薬株式会社

*4 中外製薬株式会社

他 22 機関

Itagaki, H.*1, Ohno, T.*2, Hatao, M.*1, Hayasaka, A.*3 and Hayashi, M. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-V. Details of the crystal violet staining assay

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 87-98 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーションの内、クリスタルバイオレット染色法に関する共同研究の結果をまとめたものである。18機関が参加してHeLa S3とCHL細胞を用い、6種類のモデル化合物について研究が行われた。

Keywords: alternatives, crystal violet staining assay, inter-laboratory validation

*1 資生堂株式会社

*2 理化学研究所

*3 中外製薬株式会社

他 14 機関

Ohno, T.*1, Futamura, Y.*2, Harihara, A.*3, Hatao, M.*4 and Hayashi, M. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-VI. Details of the LDH release assay

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 99-118 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーションの内、乳酸脱水素酵素遊離試験に関する共同研究の結果をまとめたものである。16機関が参加してHeLa S3とSQ-5細胞を用い、6種類のモデル化合物について研究が行われた。

Keywords: alternatives, LDH release assay, inter-laboratory validation

*1 理化学研究所

*2 持田製薬株式会社

*3 塩野義製薬株式会社

*4 資生堂株式会社

他 11 機関

Itagaki, H.*1, Ohno, T.*2, Hatao, M.*1, Hattori, C.*3, Hayasaka, H.*4 and Hayashi, M., *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-VII. Details of the MTT assay

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 119-130 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーションの内、MTT試験に関する共同研究の結果をまとめたものである。22機関が参加してHeLa S3とSQ-5細胞を用い、6種類のモデル化合物について研究が行われた。

Keywords: alternatives, MTT assay, inter-laboratory validation

- *1 資生堂株式会社
- *2 理化学研究所
- *3 第一製薬株式会社
- *4 中外製薬株式会社
- 他 17 機関

Ohno, T.*1, Futamura, Y.*2, Harihara, A.*3, Hatao, M.*4, Hayasaka, A.*5 and Hayashi, M. *et al.*: Validation study on five cytotoxicity assays by JSAAE-VIII. Details of the neutral red uptake assay

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 131-145 (1998)

日本代替法学会が主催して行った5種類の細胞毒性試験に関する大規模バリデーションの内、ニュートラルレッド取込試験に関する共同研究の結果をまとめたものである。26機関が参加してHeLa S3とNRCE細胞を用い、6種類のモデル化合物について研究が行われた。

Keywords: alternatives, neutral red uptake assay, inter-laboratory validation

- *1 理化学研究所
- *2 持田製薬株式会社
- *3 塩野義製薬株式会社
- *4 資生堂株式会社
- *5 中外製薬株式会社
- 他 20 機関

Matsuoka, A., Hayashi, M. and Sofuni, T.: In vitro clastogenicity of 19 organic chemicals found in contaminated water and 7 structurally related chemicals

Environ. Mutagen Res., 20, 159-165 (1998)

水質汚染物質として報告されている19種の有機化学物質とそれらの構造類似体7種について培養細胞CHLを用いる染色体異常試験を行った。マウスS9存在下、および非存在下について実施した。その結果、全26種のうち9物質が陽性となった。特に、高頻度の染色体異常を誘発した物質は、1,2-dichloroethane, pentachlorophenol, heptachlor, biphenyl, cyclohexylamineであった。内分泌攪乱物質も3種(DBP, DEHP, methoxychlor)含まれていたが、この方法では陰性に終わった。

Keywords: chromosome aberration test, contaminated water, endocrine disrupters

Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. and Sofuni, T.: Spindle disturbances induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in a Chinese hamster cell line (V79-MZ) and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow

Mutat. Res., 419, 1-12 (1998)

Benzo[a]pyren(BP)および7, 12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)がチャイニーズハムスター細胞株、V79-MZで染色体の数の異常を誘発する事をこれまでに報告した。今回は、紡錘体染色を行い、その作用機構の解析を行った。その結果、BPは不完全な紡錘体を形成し、結果として異数性を誘発し、DMBAは紡錘体の形成を阻害し、結果として倍数性を誘発することが判明した。

Keywords: numerical chromosome aberrations, benzo[a]pyrene, spindle disturbances

Hayashi, M., Honma, M. and Sofuni, T.: Dilution series for test chemicals in the mouse lymphoma mutation assay

Mutat. Res., 415, 165-166 (1998)

マウスリンフォーマ試験(MLA)においては用量設定が重要である。これは、最高用量における細胞の生存率が10~20%に入る必要があるためである。しかし、現実的にはこの範囲に最高用量を設定することが困難である場合が多い。我々は、必ずしもこの範囲に最高用量が入らなくとも10%以下の生存率を示す用量があり、それが陰性を示せば、その1/2の用量を最高用量にすることができることを提案する。この用量設定方法は現実的であり、また過去のデータにもよく適応した。

Keywords: mouse lymphoma assay (MLA), dose-finding, cytotoxicity

Honma, M., Hayashi, M., Shimada, Y.*1, Tanaka, N.*2, Wakuri, S.*2, Awogi, T.*3, Yamamoto, K. I.*4, Kodani, N.-U.*4, Nishi, Y.*5, Nakadate, M. and Sofuni, T.: Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the in vitro chromosomal aberration test

Mutagenesis, 14, 5-22 (1999)

マウスリンフォーマ試験(MLA)が染色体異常試験の代替となりうるかを検討する国際共同研究を行った。染色体異常試験陽性の34化合物についてマイクロウェル法のMLAを実施したところ、陽性と判定されたものは20化合物にとどまり、14/34(41%)はMLAでは検出できないことがわかった。MLAの低い検出力はそのプロトコールに問題があることが指摘され、この問題を解決することによりMLAは染色体異常試験と同程度の検出力を持つ可能性が示唆された。

Keywords: mouse lymphoma assay (MLA), chromosome aberration test, clastogenicity

- *1 第一製薬株式会社
- *2 食品薬品安全センター秦野研究所
- *3 大塚製薬(株)徳島研究所
- *4 武田薬品工業株式会社
- *5 日本たばこ産業株式会社

Honma, M., Zhang, L.-S., Sakamoto, H., Ozaki, M., Takeshita, K., Momose, M., Hayashi, M. and Sofuni, T.: The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay

Mutagenesis, 14, 23-29 (1999)

マウスリンフォーマ試験(MLA)は多くの変異原物質を検出できる遺伝毒性試験として利用されているが、我々の共同研究の結果では41%の染色体異常誘発物質を検出できないことがわかった。この検出力の低さは短時間処理(3時間)のみで試験を行うプロトコールに起因すると考え、染色体異常試験と同様に、長時間処理(24時間)のプロトコールを検討した。共同研究において短時間のMLAで検出できなかった15化合物について24時間処理のMLAを実施したところその12化合物が陽性を示した。これら化合物には、核酸アナログ、spindle poisonなど、細胞周期に依存して間接的に突然変異や染色体異常をもたらすものが多く含まれる。MLAは長時間処理を導入することにより染色体異常と同程度の検出力を持つものと考えられる。

Keywords: mouse lymphoma assay (MLA), protocol, continuous treatment

Kohara, A., Shimizu, N.* and Kawazoe, Y.*: Cytotoxic factor induced in murine serum after intravenous administration of a dehydrogenation polymer of p-coumaric acid (a synthetic lignin)

Biol. Pharm. Bull., 21, 1098-1101 (1998)

p-クマル酸の脱水素重合体(DHP-pCA)をマウスに静脈

内投与することにより、その血清中に哺乳動物培養細胞に対して細胞傷害活性を持つ因子が誘導される。その細胞傷害活性は血清中よりエタノールによって抽出され、エタノール上清分画 (EtOH-sup) に保存される。陰性対照群より調製した EtOH-sup にも、このような細胞傷害活性を持つ因子が存在するが、その量は極めて微量である。この細胞傷害性因子の活性はアルカリ処理に対しては安定であるが、酸性条件下 90 °C で 30 分間熱処理することで失活する。さらにタンパク質分解酵素による処理に対しても安定で、タンパク質性の因子ではないと考えられる。この EtOH-sup から DHP-pCA 由来物質を分離除去したところ、細胞傷害性因子は DHP-pCA の代謝体などではなく、血清中に内在する因子であることが強く示唆された。

Keywords: lignin, cytotoxic factor

* 名古屋市立大学薬学部

Wakata, A.*¹, Miyamae, Y.*², Sato, S.*³, Suzuki, T., Morita, T.*⁴, Asano, N.*⁵, Awogi, T.*⁶, Kondo, K.*⁷ and Hayashi, M.: **Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS · MMS**

Environ. Mol. Mutagen., **32**, 84-100 (1998)

日本環境変異原学会の哺乳動物試験研究会における小核試験研究グループの第9回の共同研究として、34の国内機関と6つの海外機関が参加し、ラット骨髄および末梢血を用いた小核試験の有効性について検討を行った。これまでラットでは、小核を持った赤血球が脾臓で除去されるため末梢血を使った解析は適さないと考えられてきたが、今回40化合物を用いて検討したところ、骨髄での小核試験の結果とよい相関が得られ、その有効性が示された。

Keywords: micronucleus test, rat, peripheral blood

- *¹ 山之内製薬(株)創薬安全性研究所
- *² 藤沢薬品工業(株)安全性研究所
- *³ 日本たばこ産業(株)安全性研究所
- *⁴ 日本グラクソ(株)筑波研究所
- *⁵ 日東電工(株)安全性試験センター
- *⁶ 大塚製薬(株)徳島研究所
- *⁷ 塩野義製薬(株)新薬研究所

Ochiai, M.*, Ishida, K.*, Ushijima, T.*, Suzuki, T., Sofuni, T., Sugimura, T.* and Nagao, M.*: **DNA adduct level induced by 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]-quinoline in Big BlueTM mice does not correlate with mutagenicity**

Mutagenesis, **13**, 381-384 (1998)

2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ) は魚の焼けこげの中に含まれる変異原物質として知られているが、トランスジェニックマウス (Big Blue) を用いた解析により肝臓、大腸、骨髄などの臓器で遺伝子突然変異を誘発することを既に報告している。今回の報告では各臓器に誘発された DNA 付加体量と *lacI* 遺伝子の突然変異頻度との相関について検討した。MeIQ により誘発された DNA 付加体を ³²P ポストラベル法にて調べて結果、グアニンの C8 位への付加体である N2-(deoxyguanosin-8-yl)MeIQ 5'-monophosphate に相当するスポットがいずれの臓器においても単一スポットとして認められた。混餌投与4週と12週目における DNA 付加体生成量は、肝臓で最も高く、次いで心臓、大腸、前胃、骨髄の順であった。この結果は各臓器での変異頻度の強さとは相関せず、突然変異の誘発には付加体だけでなく、細胞増殖など他の要因も重要であることが示唆された。

Keywords: MeIQ, DNA adduct, ³²P-post-label

* 国立がんセンター研究所

Miyata, Y.*, Saeki, K.*, Kawazoe, Y.*, Hayashi, M., Sofuni, T., Suzuki, T.: **Antimutagenic structural modification of quinoline assessed by an in vivo mutagenesis assay using *lacZ*-transgenic mice**

Mutat. Res., **414**, 165-169 (1998)

キノリンは各種医薬品の基本骨格となっているが、それ自身肝発がん性を有することが知られている。その作用機序を探るとともに、毒性軽減化を目的として、キノリンのフッ素置換効果を、トランスジェニックマウス (MutaTMMouse) を用いた変異原性試験を用いて調べた。その結果、キノリンのベンゼン環側を置換した 5-fluoroquinoline はキノリンと同程度に肝臓での *lacZ* 遺伝子変異頻度を上昇させたが、ピリジン環側をフッ素置換した 3-fluoroquinoline においては、変異原性が消失した。このことは、キノリンの代謝活性化にはピリジン環の酸化 (2,3-epoxy 化) が関与していることを示唆している。またフッ素置換による修飾は、キノリンの遺伝子傷害性を消失させる上で有効であることが示された。

Keywords: quinoline, fluorine-substitution, antimutagenesis

* 名古屋市立大学薬学部

Suzuki, T., Miyata, Y.*, Saeki, K.*, Kawazoe, Y.*, Hayashi, M., Sofuni, T.: **In vivo mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the *lacZ* transgenic mouse: evidence for its in vivo genotoxicity**

Mutat. Res., **412**, 161-166 (1998)

肝発がん物質であるキノリンの in vivo での変異原性について、*lacZ* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである MutaTMMouse を用いて検討した。その結果、キノリン投与後の各臓器の *lacZ* 変異頻度は、発がん標的臓器である肝臓で4倍程度上昇した。一方、非標的臓器と考えられる肺、腎臓、脾臓などの臓器では変化が認められなかった。この結果から、トランスジェニックマウスを用いた変異原性試験が発がん標的臓器での遺伝子傷害性の検出に有効であることが示されるとともに、キノリンの発がん性には、遺伝子突然変異誘発によるイニシエーション作用も深く関与していることがわかった。

Keywords: quinoline, *lacZ*, mutation

* 名古屋市立大学薬学部

Wang, X., Suzuki, T., Itoh, T., Honma, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, M., Kato, T.* and Sofuni, T.: **Specific mutational spectrum of dimethylnitrosamine in the *lacI* transgene of Big Blue[®] C57BL/6 mice**

Mutagenesis, **6**, 625-630 (1998)

lacI 遺伝子を標的として組み込んだトランスジェニックマウス (Big Blue) を用いて、肝発がん剤であるジエチルニトロソアミン (DMN) により誘発された突然変異の特徴を、変異体のシーケンス解析により明らかにした。DMN は O⁶-methylguanine 付加体を形成することにより G:C から A:T へのトランジション変異を誘発すると考えられていたが、肝臓、腎臓、肺において誘発された変異体の解析を行った結果、いずれも G:C から A:T の変異が多く見られたものの、それ以外のタイプの変異も認められた。中でも、2-23塩基対の短い欠失型変異が特徴的に見られた。この欠失にはその切断部位に繰り返し配列を持っており、相同配列が欠失の生成に関与すると予想されるが、そのメカニズムについてはさらに検討が必要である。

Keywords: mutation spectrum, dimethylnitrosamine, deletion

* 京都大学放射線生物研究センター

Ishidate, M. Jr.*¹, Miura, K. F.*² and Sofuni, T.: **Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro** *Mutat. Res.*, **404**, 167-172 (1998)

染色体異常試験が実施された 951 の化学物質について調査を行ったところ、47%が一貫して陽性を示したが、そのうちの 8%は 10mM を超える高用量でのみ陽性を示した。それらのほとんどの化学物質は染色分体型の切断を誘発したが、交換型の異常を示すものも存在した。そこで分裂中期像の 20%に異常が検出される最小用量 (mg/ml) D_{20} 値と交換型の頻度を表す TR 値を用いて、被験化学物質の比較検討を行った。その結果、陽性対照となりうるグループは比較的低い D_{20} 値であるにもかかわらず、高い TR 値を示すことが判明した。

Keywords: chromosome aberration, CHL/IU cell, D_{20} value

* オリンパス光学工業(株)染色体研究センター

Nagao, M.*¹, Fujita, H.*², Ochiai, M.*¹, Wakabayashi, K.*¹, Sofuni, T., Matsushima, T.*², Sugimura, T.*¹ and Ushijima, T.*¹: **No direct correlation between mutant frequencies and cancer incidence induced by MeIQ in various organs of Big Blue[®] mice**

Mutat. Res., **400**, 251-257 (1998)

ヘテロサイクリックアミンである MeIQ の発がん性について、変異原性の解析に用いたトランスジェニックマウス Big Blue で検討を行った。300ppm の MeIQ を飼料に混ぜ、雌マウスに 92 週間投与した結果、42% (8/19) に大腸がんが、68% (13/19) に盲腸のがんが見られた。また、肝細胞がんの発生も 84% (16/19) のマウスに見られた。これに対し、対照群ではいずれのがんの発生も認められなかった。既に報告したように、同じマウスを用いた *lacI* 遺伝子の変異頻度の解析では、大腸において最も高い変異頻度が得られており、肝臓ではその 1/10 程度の頻度であった。また、がんの発生の認められなかった臓器である骨髄や前胃でも変異頻度の上昇が認められたことより、変異頻度の上昇は直接がんの発生とは相関しないことが示唆された。

Keywords: MeIQ, carcinogenesis, *lacI*

*¹ 国立がんセンター研究所

*² 日本バイオアッセイ研究所

Takahashi, I.*¹, Nobukuni, T.*², Ohmori, H.*³, Kobayashi, M.*², Tanaka, S.*², Ohshima, K.*⁴, Okada, N.*⁴, Masui, T., Hashimoto, K.*¹ and Iwashita, S.*²: **Existence of a bovine LINE repetitive insert that appears in the cDNA of bovine protein BCNT in ruminant, but not in human, genomes** *Gene*, **211**, 387-394 (1998)

ウシの GTPase 活性を有する BCNT 遺伝子は、ウシ特有の LINE 反復配列をもちその部分が翻訳されて蛋白質配列に反映している。しかし、ヒトの相同遺伝子に LINE 配列は存在しない。そこで、LINE 配列の起源について検討し、それがヒツジ、ヤギ、シカに存在し、ブタとヒトに存在しないことを明らかにした。

Keywords: repetitive sequence, GTPase, evolution

*¹ 国立感染症研究所

*² 三菱化学生命科学研究所

*³ 京都大学ウイルス研究所

*⁴ 東京工業大学生命理工学部

水沢 博, 田辺秀之, 増井 徹, 高田容子, 樽松美治,

峯岸大輔, 吉田東歩*¹, 佐藤元信*¹, 竹内昌男*¹, 阿部武丸*², 原沢 亮*³: **技術情報「細胞培養系に混入するウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の RT-PCR 法による検出」**

Tiss. Cult. Res. Commun., **18**, 131-138 (1999)

JCRB 細胞バンクでは、研究資源として培養細胞を配布する立場での品質管理の一環として、ペスティウイルスの 1 種であるウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV, Bovine Viral Diarrhea Virus) のネステッド PCR 法による検出法を確立した。これを用いて、8 社 22 ロットのウシ胎児血清を調査したところ 1 ロットを除いた全ての血清から BVDV のゲノム断片が検出された。この結果は必ずしも感染性ウイルスが混入していることを意味するものではないが、少なくとも BVDV ゲノム断片が検出されるウシ血清はかなり広範囲に及んでいるものと思われる。また、ATCC ならびに JCRB 細胞バンクで品質管理を受けている細胞について調査した結果では 20 株中 15 株から BVDV が検出された。

Keywords: BVDV, RT-PCR, virus contamination

*¹ 財団法人発酵研究所

*² 三菱化学(株)中標津製造所

*³ 東京大学医学部附属動物実験施設

van den Berg M*¹, Birnbaum L*², Bosveld ATC*³, Brunstrom B*⁴, Cook P*⁵, Feeley M*⁶, Giesy JP*⁷, Hanberg A*⁸, Hasegawa R, Kennedy SW*⁹, Kubiak T*¹⁰, Larsen JC*¹¹, van Leeuwen FXR*¹², Liem AKD*¹³, Nolt C*¹⁴, Peterson RE*¹⁵, Poellinger L*¹⁶, Safe S*¹⁷, Schrenk D*¹⁸, Tillitt D*¹⁹, Tysklind M*²⁰, Younes M*²¹, Warn F*²², Zacharewski*²³: **Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife**

Environ. Health Perspect., **106**, 775-792 (1998)

本論文は国際化学物質安全計画 (IPCS) 主催の専門家会合でダイオキシン類に関するすべての毒性情報を整理・再評価し、それらの毒性等価係数 (Toxic equivalency factors: TEFs) を決定し、それを公表したものである。TEFs は 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンの毒性を 1 としたときの値で、6 種の高塩素化ジベンゾダイオキシン、10 種の高塩素化ジベンゾフランおよび 10 種のコプラナー PCB に属する高塩素化ビフェニールについて、それぞれヒト/ほ乳類、魚類および鳥類に対する TEFs が設定された。本論文では、TEFs 設定の経緯、考え方、根拠および混合物への適用法などを詳細に説明している。

Keywords: toxic equivalency factors, dioxins, co-planar PCB

*¹ Research Institute of Toxicology, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

*² Experimental Toxicology Division, US Environmental Protection Agency, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, NC, USA

*³ Institute for Forestry & Nature research, Department of Ecotoxicology, Wageningen, Netherlands

*⁴ Uppsala University, Department of Environmental Toxicology, Uppsala, Sweden

*⁵ US Environmental Protection Agency, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, MN, USA

*⁶ Toxicological Evaluation Section, Bureau of Chemical Safety, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada

*⁷ Michigan State University, Department of Fisheries & Wildlife, East Lansing, MI, USA

*⁸ Unit of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

- *9 Environment Canada, Canadian Wildlife Service, National Wildlife Research Centre, Hull, Quebec, Canada
- *10 U.S. Fish and Wildlife Service, Division of Environmental Contaminants, Arlington, VA, USA
- *11 Institute of Toxicology, National Food Agency of Denmark, Ministry of Health, Soborg, Denmark
- *12 European Centre for Environment and Health, Bilthoven Division, World Health Organization, The Netherlands
- *13 Laboratory for Organic-Analytical Chemistry, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Netherlands
- *14 US Environmental Protection Agency, Office of Science Policy, Washington, DC, USA
- *15 University of Wisconsin-Madison, School of Pharmacy, Madison, WI, USA
- *16 Laboratory of Molecular Biology, Dept. of Cellular and Molecular Biology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- *17 Veterinary Physiology and Pharmacology, Texas A&M University, College Station, Texas, USA
- *18 Food Chemistry and Environmental Toxicology, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany
- *19 Midwest Science Center, Dept. of Interior, US Geological Survey, Biological Resource Division, Columbia, Missouri, USA
- *20 Institute of Environmental Chemistry, Umea University, Umea, Sweden
- *21 Programme for the Promotion of Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland
- *22 Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
- *23 University of Western Ontario, Dept. of Pharmacology and Toxicology, London, Ontario, Canada

奥田秀毅*1, 松尾賢明*1, 外岡弘道*2, 岡田敏史: 一般試験法浸透圧測定法の改正に関する検討
医薬品研究, 29, 904-912 (1998)

日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正案作成にあたり、装置の適合性試験を規定すること、標準生理食塩液のオスモル濃度の定数化が可能か判断すること及び 1000 mOsM 以上のオスモル濃度の試料に対する希釈測定のは非につき、結論を出す必要があり、東西の技術委員会の協力を得て 17 施設による共同実験が行われた。

本報告は、この共同実験の結果をまとめたものであり、この実験成績を基に「浸透圧測定法(オスモル濃度測定法)」(案)が最終的にまとめられた。

Keywords: Osmolarity Measurement, Japanese Pharmacopoeia, Revision

- *1 大阪医薬品協会技術研究委員会
*2 東京医薬品工業協会技術委員会

Miyazaki, T., Yomota, C. and Okada S.: Degradation of hyaluronic acid at the metal surface
Colloid Polym. Sci., 276, 388-394 (1998)

以前、回転粘度計を用いた測定中に、ヒアルロン酸分子の切断が引き起こされる現象を報告したが、回転のずり応力を負荷しない場合にも分子量の低下が認められた。粘度計の材質であるステンレスとの接触によってもヒアルロン酸の分解が引き起こされる可能性が示唆されたため、固体状態の金属によるヒアルロン酸の分解について検討を行った。その結果、ステンレスからの金属イオンの溶出は認め

られなかったにもかかわらず、投入したステンレス球の表面積及び接触時間に依存して、ヒアルロン酸は低分子化された。また、タングステンカーバイドとの接触では分子量が低下しなかったこと、銅球の投入によっては著しい分解が引き起こされたこと、ヒドロキシラジカルのスカベンジャーであるマンニトールの添加によってこれらの分解反応が抑制されたことなどから、酸化還元反応を触媒する遷移金属を含む固体金属の表面において、ラジカルを介した反応によりヒアルロン酸が分解されることを見出した。

Keywords: hyaluronic acid, degradation, metal surface

中村邦男*1, 塩田知美*1, 荻野一善*2, 西成勝好*3, 小川悦代*4, 岡本彰夫*5, 窪田健二*6, 平沼正弘*7, 四方田千佳子: ヒアルロン酸の構造と特性の解析による高機能性発現の基礎的研究

酪農学園大学紀要, 第23号, 153-158(1999)

ヒアルロン酸の分子量、溶液中の分子形態に関する浸透圧、光散乱、カ学生理作用に関するレオロジー測定、溶液中の水のダイナミクスと分子間相互作用に関する構造解析・熱測定グループ研究組織を構成し、共通・標準試料の測定により得られた結果を比較検討し、総合的にヒアルロン酸の特性の研究を開始した。

Keywords: hyaluronate, properties, functionality

- *1 酪農学園大学酪農学部食品科学科
*2 千葉工業大学工業化学科
*3 大阪市立大学生活科学部食品栄養学科
*4 昭和学院短期大学
*5 電気化学工業(株)総合研究所
*6 群馬大学工学部生物化学工学科
*7 HOYA ヘルスケア(株)児玉開発研究所

Hamada, Y.*1, Nishimura, C.*2, Koh, N.*1, Sakakibara, F.*1, Nakamura, J.*1, Tanimoto, T. and Hotta, N.*1: Influence of interindividual variability of aldose reductase protein content on polyol-pathway metabolites and redox state in erythrocytes in diabetic patients
Diabetes Care, 21, 1014-1018 (1998)

糖尿病患者におけるポリオール経路に関連する代謝へのアルドース還元酵素(AR)レベルの影響を明らかにする目的で、赤血球中のソルビトール量、フルクトース量、乳酸/ピルビン酸(L/P)比とARレベルとの関連を検討した。ARレベルが平均値以上の患者群でのソルビトール量、フルクトース量、L/P比はARが平均値以下の患者群より有意に上昇していた。また、ARレベルとAR活性、ソルビトール量、フルクトース量、L/P比との間には有意な相関が認められた。これらの結果から、ARレベルは糖尿病患者のポリオール経路の流れや細胞内酸化還元偏異に大きく関与していることが示唆された。

Keywords: aldose reductase, diabetes, polyol pathway

- *1 名古屋大学医学部
*2 京都府立医科大学

斎藤博幸, 岩田美保, 北島 文, 谷本 剛, 岡田敏史, 鎌倉浩之, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉, 横田洋一*1, 津野敏紀*1, 鈴木英世*1, 山岸恭子*2, 白砂勝也*2, 岩嶋浄*2, 松浦敬一*2: 国立医薬品食品衛生研究所ベオニフロリン標準品の新規設定
医薬品研究, 29, 725-729 (1998)

ベオニフロリン標準品の新規設定のために標準品原料の品質を4機関での共同検定により評価した。次の試験結果より本原料を初回国立医薬品食品衛生研究所ベオニフロリ

ン標準品 (Control 981) とした。1) 比吸光度[E 1 % 1cm(230nm)]: 260±3。2) IR スペクトル: 3414, 1713, 1280 及び 1076 cm⁻¹ に特異吸収を認める。3) 水分: 1.73±0.12%。4) HPLC による純度: 2 個の不純物質ピークを認めるが、各不純物質の量は 0.3% 以下で、全不純物質の量は 0.5% 以下。

Keywords: Paeoniflorin, NIHS Reference standard

*1 富山県薬事研究所

*2 松浦薬業株式会社

Tanimoto, T., Maekawa, K., Okada, S. and Yabe-Nishimura, C.*1: **Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication**
Anal. Chim. Acta, **365**, 285-292 (1998)

ヒト組織のアルドース還元酵素量 (AR) を測定するための酵素免疫測定法を確立した。本測定法の室内及び室間再現性はそれぞれ 3.7 及び 4.8%、回収率は 101-106% であり、血中成分や糖尿病治療薬の妨害は認められなかった。本測定法でヒトの各組織内 AR 量を調べたところ、腎臓髄質、末梢神経、水晶体などの糖尿病合併症好発器官に高レベルに存在することが明らかになった。また、末梢神経の AR レベルは赤血球 AR レベルとよく相関した。罹病期間 10 年未満の患者では、神経障害を有する患者の赤血球 AR レベルは合併症を併発していない患者のそれより有意に高値であり、罹病期間の短い患者においては赤血球の AR レベルが神経障害の発症と相関することが明らかになった。このことより、患者の赤血球 AR 量の測定は AR 阻害剤療法の至適化に有用な情報を提供しうることが示唆された。

Keywords: aldose reductase, ELISA, diabetic complication

*1 京都府立医科大学

Arimoto, I.*, Matsumoto, C.*, Tanaka, M.*, Okuhira, K.*, Saito, H. and Handa, T.*: **Surface Composition Regulates Clearance from Plasma and Triolein Lipolysis of Lipid Emulsions**

Lipids, **33**, 773-779 (1998)

レシチンと共にリポ蛋白質の主要な表面脂質であるスフィンゴミエリンとコレステロールのリポ蛋白質代謝における役割を、モデル粒子として脂質エマルションを用い、ラット血中動態、アポリポ蛋白質結合性、トリグリセライドリポリシス等から検討した。スフィンゴミエリンは LPL やアポ E の表面結合を阻害することでエマルションの血中消失を遅延させたが、コレステロールはアポ C 群によるアポ E レセプター認識阻害効果を弱めることで血中消失を逆に促進した。これらのエマルション表面組成と血中動態との関係はリポ蛋白質の体内挙動とよく一致し、スフィンゴミエリンやコレステロール含量が血中リポ蛋白質の代謝に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Keywords: sphingomyelin, cholesterol, lipolysis

* 京都大学大学院薬学研究所

Nakamura, Y., Tsumura, Y., Tonogai, Y. and Shibata, T.: **Differences in the toxicological behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats**

Journal of Health Sciences, **45**, 15 (1998)

7 種の希土類元素即ちイットリウム (Y)、セリウム (Ce)、プラセオジウム (Pr)、ユーロピウム (Eu)、ジスプロシウム (Dy)、イッテルビウム (Yb) 及びルテチウム (Lu) をラットに静脈内投与し、希土類元素の体内分布、臓器内のカルシウム (Ca) 蓄積作用、肝毒性の発現の違いについて調べた。

REE は生体内分布パターン、Ca 蓄積作用、肝毒性の発現の違いにより軽希土類、Y 及び中希土類、重希土類の 3 つに分類できることが示唆された。

Keywords: rare earth elements, calcium, hepatotoxicity

石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正: **食用タール色素試験法への水素化物発生-ICP 発光分析法の応用**
食品衛生学雑誌, **39**, 341-344 (1998)

食用タール色素中のヒ素試験法への水素化物発生-ICP 発光分析法の応用を検討した。ヒ素の検出限界は 0.005 μg/ml であり、0.5 μg/ml までは原点を通る直線性が得られた。三酸化ヒ素として 4 μg/g 添加し添加回収率の検討を行ったところ、回収率は 76.7~101.3% と良好な結果が得られた。市販国産品 67 製品及び外国産品 7 製品の実態調査を行ったところヒ素含有量は 0.43 μg/g が最高で規格値のほぼ十分の一であった。また、国産品と外国産品の比較においてヒ素含量に差異は認められなかった。

Keywords: food coal-tar dyes, arsenic, ICP atomic emission spectrometry

津村ゆかり, 中村優美子, 吉井公彦, 外海泰秀, 肥後真美子*, 柴田 正: **HPLC を用いる農産物中の N-メチルカルバメート系農薬 21 種及びそれらの代謝物 12 種の同時分析**

食品衛生学雑誌, **39**, 357-367 (1998)

N-メチルカルバメート (NMC) 系農薬 21 種及びそれらの代謝物又は異性体 12 種を同時に定量する方法を確立した。ジクロロメタンを使用せず、分析操作中に酸化生成した物質をも検出できる方法とした。試料をアセトン次いで酢酸エチルで抽出し、アセトニトリル/*m*-ヘキササン分配及び Sep-Pak[®] アミノプロピルミニカラムで精製した。NMC はボストカラム反応蛍光検出 HPLC で定量し、添加回収率 (0.1~1 μg/g 添加) は玄米、たまねぎ、りんご等 10 種の穀類、果実類、野菜類でブトカルボキシスルホキシドを除き 56.9~108.2 % であった。検出限界は大多数について試料中 0.01 μg/g であった。

Keywords: HPLC, agricultural product, N-methyl carbamate pesticide

* 大阪薬科大学

吉井公彦, 外海泰秀, 津村ゆかり, 中村優美子, 柴田 正: **超臨界流体抽出及び HPLC による穀類中 15 種農薬の一斉分析法の検討**

食品衛生学雑誌, **39**, 184-191 (1998)

穀類に使用される農薬 15 種を超臨界流体抽出 (SFE) で抽出後、Extrelut[®] + Sep-Pak[®] C₁₈ で脱脂し、Sep-Pak[®] フロリジルでクリーンアップし、HPLC で測定する一斉分析法を作製した。SFE 装置からの抽出物を Extrelut[®] で補集する方法を考案した。また脂肪の抽出率から SFE の有用性を明らかにした。また脂質を多量に含むとうもろこし等の試料は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を併用するのが有効であった。クリーンアップに Sep-Pak[®] フロリジルを使用し、各種農薬を 3 画分に分けて溶出することによって、検体からの農薬の検出を容易にした。また、GC での測定の必要性が生じることも考慮して、最終溶媒をイソプロパノールで調製した。

Keywords: pesticide, super critical fluid extraction, HPLC

吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光 進, 外海泰秀, 土屋 鍛*1, 木村実加*2, 関口幸弘*2: **超臨界流体抽出及び GC, HPLC による穀類中残留農薬の多成分一**

斉分析法

食品衛生学雑誌, 40, 68-74 (1999)

穀類に使用される農薬をSFEで一度に抽出し, Extrelut^R + Sep-Pak^RC₁₈で脱脂, GPC及びSep-Pak^Rフロリジルでクリーンアップした後, HPLC (フォトダイオードアレイ検出器及び蛍光検出器付き) 又はGC (FPD, FTD, ECD, MS) で測定する一斉分析法について検討した。また, 本法を輸入小麦及びとうもろこしに適用し, マラチオン, クロルピリホスメチル, フェニトロチオン, シフルトリンがGC及びGC/MSで定量, 確認された。また, HPLCでエトフェンブロックス, ジフェノコナゾール, イプロジオンが検出された。

Keywords: pesticide, super critical fluid extraction, GC

*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

Emma, M., Gebrewold, A.*, Altura, B.T.*, Zhang, A.* and Altura, B.M.*: Alcohol-induced vascular damage of brain is ameliorated by administration of magnesium

Alcohol, 15, 95-103 (1998)

ラット脳表面の細動脈血管に対する magnesium aspartate HCl (MgA) の作用を検討した。局所投与した MgA は雌雄のラットの脳細動脈血管を拡張させ, 細動脈では細静脈に比べて拡張度が大きかった。血管拡張を惹起しない用量の MgA を静脈内又は動脈内投与したところ, エタノール又はバリウムによる細動脈血管収縮を抑制し, エタノールによる脳血管損傷を防御した。エタノール投与後, 脳血管筋細胞の Mg イオンは消失し, Mg イオンの血中レベルは上昇した。これらの結果から, Mg イオンは脳微小血管に対して拡張因子として作用し, 抗収縮作用を有することが示された。また, Mg はエタノールによる脳血管損傷防御作用を有し, エタノールによる脳血管痙攣及び脳血管損傷(脳血管筋細胞からの Mg イオンの急速な消失)に関連していることが示唆された。

Keywords: cerebral arteriole and venule, alcohol, magnesium

* Department of Physiology and Medicine, State University of New York, Health Science Center at Brooklyn

Emma, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K.: Further evaluation of developmental toxicity of di-n-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats

Toxicol. Lett., 98, 87-93 (1998)

dibutyl phthalate (DBP) を妊娠後半に与えたときの発生毒性について検討した。Wistar ラットの妊娠 11 日から妊娠 21 日 (精子発見日=妊娠 0 日) の間に 0.5, 1.0 又は 2.0% の DBP を含む飼料を与え, 妊娠 21 日に母体を開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。1 日当たりの平均 DBP 摂取量は 0.5, 1.0 及び 2.0% 投与群でそれぞれ 331, 555 及び 661 mg/kg であった。DBP 投与による着床後の胚死亡率の上昇はみられなかった。2.0% 投与群において雌雄の胎児体重の低下がみられた。2.0% 投与群における口蓋裂及び胸骨核癒合を有する胎児の出現頻度, 1.0 及び 2.0% 投与群における精巣下降不全を有する胎児の出現頻度の上昇が認められた。1.0 及び 2.0% 投与群におけるオス胎児の肛門-生殖器間距離 (AGD) の短縮, 胎児体重に対する AGD 比の低下も認められた。これらのことから, ラットの妊娠後半に与えた DBP はオス胎児の生殖器官に異常を惹起することが明らかになった。

Keywords: dibutyl phthalate, developmental toxicity, Anogenital distance

Emma, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K.: Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats

Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 363-370 (1998)

triphenyltin chloride (TPTCI) の発生毒性について検討した。Wistar ラットの妊娠 7-9 日, 妊娠 10-12 日又は妊娠 13-15 日 (精子発見日=妊娠 0 日) に 6.3, 9.4 又は 12.5 mg/kg の TPTCI を与え, 妊娠 20 日に母体を開腹して胚/胎児に対する影響を調べた。TPTCI 投与のすべての群で妊娠ラットの体重増加抑制及び摂餌量の減少がみられた。妊娠 7-9 日の 6.3 mg/kg 以上の投与群及び妊娠 10-12 日又は妊娠 13-15 日の 9.4 mg/kg 以上の投与群において着床後胚死亡率の上昇が観察された。妊娠 10-12 日の 12.5 mg/kg 投与群及び妊娠 13-15 日の 9.4 mg/kg 以上の投与群において胎児体重の低下が観察された。しかしながら, いずれの TPTCI 投与群においても奇形胎児の発現頻度の上昇は認められなかった。

Keywords: triphenyltin chloride, developmental toxicity, teratogenicity

Harazono, A., Emma, M. and Kawashima, K.: Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-induced pregnancy failure in rats

Bull. Environ. Contam. Toxicol., 61, 224-230 (1998)

ラットの妊娠 0-7 日に tributyltin chloride (TBTCI) を 16.3mg/kg 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。投与期間中に TBTCI 投与群で摂餌量減少及び体重減少がみられたので, 妊娠 0-8 日に飼料摂取量を制限した群をもうけ比較した。妊娠 0-7 日に TBTCI を投与した群の妊娠率は 15.4% となり, 対照群 (100%) 及び飼料制限群 (80%) と比べて有意に低下した。妊娠の成立した母体において, TBTCI 投与群では, 黄体数, 着床数及び生存胎児数に対照群との差はみられなかったが, 飼料制限群では, TBTCI 投与群と異なり着床後死亡率の有意な上昇がみられた。以上のことから, TBTCI を妊娠 0-7 日に投与したときの着床阻害作用は, 飼料摂取量の減少によるものではなく TBTCI による作用であることが明らかになった。

Keywords: tributyltin chloride, pregnancy failure, feed restriction

Mia, M. W., Sakai, E., Minami, M., Nishi, K., Anetai, M.*, Aoyagi, M.*, Hatakeyama, Y. and Shibata, T.: Effect of Plowing Conditions in the Field on Root Growth and Glycosides Contents in Taproots of 1- and 2-year-old Plants of *Astragalus mongholicus* Bunge (Leguminosae)

Natural Medicines, 52(6), 477-484 (1998)

生薬黄耆の基原植物 *Astragalus mongholicus* 1~2 年生根の生育・形状・品質に及ぼす土壌硬度の影響を検討し, 地表から 50 cm 以下の土壌の貫入抵抗値が 12 kg/cm² 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: *Astragalus mongholicus*, tap root growth, soil penetration resistance

* 北海道立衛生研究所

Shibano, M.*¹, Nakao, E.*¹, Matsumoto, Y.*¹, Henmi, A.*¹, Kusano, G.*¹, Shibata, T., Hatakeyama, Y., Hayashi, H.*² and Kinoshita, T.*³: Studies on Index Compounds for HPLC Analysis of *Glycyrrhiza glabra*

Natural Medicines, 52(3), 279-283 (1998)

生薬甘草の基原植物 *Glycyrrhiza glabra* 根中の指標成分の

検索を45点の植物材料について行ない、*G. glabra* に特有の10成分を単離・同定し、さらに、3-hydroxyglabrolとglabrolにより特徴づけられるタイプと、parvisoflavone Bにより特徴づけられるタイプの2タイプが存在することを明らかにした。

Keywords: *Glycyrrhiza glabra*, HPLC analysis

- *1 大阪薬科大学
- *2 新潟薬科大学
- *3 帝京大学薬学部

Hosokawa, K.: Cell layer-specific accumulation of anthocyanins in response to gibberellic acid in tepals of *Hyacinthus orientalis*.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **63**, 930-931 (1999)

野外で開花したヒアシンスの花被ではアントシアニンがL2細胞(表皮細胞直下の細胞)で生成していた。一方、生育ステージ初期の蕾をGA3を含むMS培地で培養することにより花被のL1細胞(表皮細胞)においてもアントシアニンが生成することを見出した。このGA3の効果は蕾の生育ステージにより大きく異なり、生育初期のL1細胞に対して効果を示し、蕾の生育ステージが進むに従いその効果を失った。一方、L2細胞はGA3の有無に関わらず生育ステージ初期にはアントシアニンを生成せず、ステージが進むに従いその生成能を示した。花被に含まれるアントシアニン成分は、培養において生成した成分と野外で開花した花被の成分で同じであった。

Keywords: gibberellic acid, *Hyacinthus orientalis*

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

Natural Medicines, **52**(1), 10-13 (1998)

北海道で栽培されたナイモウオウギの根を温風乾燥及び自然乾燥したところ、しょ糖と希エタノールエキス含量は乾燥方法によって大きく変動し、乾燥品をえるまでに要した時間が長くなると両含量は増加した。エキス含量から判断すると、本植物には自然乾燥が適していると判断される。

Keywords: *Astragalus mongholicus*, preparation, chemical evaluation

- * 北海道立衛生研究所

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*, 林 隆章*, 姉帯正樹*: シャクヤクの栽培・育種に関する研究(1) 薬用品種「北宰相」の特性について

Natural Medicines, **52**(2), 103-108 (1998)

1996年に登録された薬用品種「北宰相」の特性を概括した。その形態的特性は茎数型・一重咲、生態的には萌芽および開花早生であり、早熟性でもあるので3年目に収穫可能である。多収性であり、paeoniflorin含量も安定して高い。根重と成分含量の間には相関性が認められないので、多収・高含量成分の品種育成が可能であることが示された。

Keywords: *Paeonia lactiflora*, medicinal cultivar, 'Kitasaishou'

- * 北海道立衛生研究所

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*, 林 隆章*, 姉帯正樹*: シャクヤクの栽培・育種に関する研究(2) 生育・成分に関する研究

Natural Medicines, **52**(2), 109-115 (1998)

シャクヤクは根の特徴によって根数型と根重型の2つに

分けられる。萌芽及び開花期は系統によって異なり、萌芽晩生系統はおおむね開花も晩生であった。1株根重は3年生で240~580g, 5年生で470~1161gと系統間変異が大きい。乾物率はいずれも50%前後であった。供試54系統の5年生根のペオニフロリン含量は1.32~4.47%と変化し、日本薬局方の既定値2.0%以上の系統は66%であった。

Keywords: *Paeonia lactiflora*, multi-root type, thick root type

- * 北海道立衛生研究所

畠山好雄, 熊谷健夫: シャクヤクの栽培・育種に関する研究(3) 北海道における花芽形成

Natural Medicines, **52**(3), 284-286 (1998)

北海道におけるシャクヤクの花芽形成を観察したところ、八重系統では1月に外花卉, 3月に内花卉の分化が始まった。一重系統は2月が花芽形成期に当り、萌芽期まで雌雄蕊が分化, 生長を続け、真の休眠は見られなかった。

Keywords: anther, carpel, rest

畠山好雄: シャクヤクの栽培・育種に関する研究(4) 無機栄養の吸収特性

Natural Medicines, **52**(3), 236-244 (1998)

シャクヤクの生長過程を見てみると、1年めの中期に根の生長が始まり、2年目以上の株では前半に地上部が増加し、開花から休眠まで地下部が増加する。葉中チッソ含量は生育初期に高く、開花期に下がり、開花後再び上昇し以降、休眠期に向けて漸減する。リン酸とカリの消費もチッソとよく似た経過を示す。地下部のチッソ・カリ含量は生育期間中ほぼ一定であり、根茎中のリン酸含量は時期によって激しく変化するが、これは新芽の分化、伸長に対応しているようである。

Keywords: nitrogen, phosphoric acid, potash

Mimaki, Y.*, Satou, T.*, Kuroda, M.*, Sashida, Y.* and Hatakeyama, Y.: New Steroidal Constituents from the Bulbs of *Lilium candidum*

Chem. Pharm. Bull. **46**(11), 1829-1832 (1998)

マドンナリリーの新鮮球根から8種のスピロスタノール型サポニン(中4種は新規物質)と2種の既知フロスタノール型サポニンが単離され、新規物質については構造決定がなされた。また、サポニン類のNa⁺/K⁺ATPaseに対する阻害活性を検討した。

Keywords: *Lilium candidum*, steroidal saponin, spirostanol saponin

- * 東京薬科大学

西川和孝*1, 西岡 恵*1, 下村講一郎, 中西 史*2, 石丸幹二*1: 小町リンドウの組織培養と二次代謝成分

日本食品化学会誌, **5**, 111-115 (1998)

小町リンドウの茎葉およびカルス培養系を確立し、茎葉培養体において、*Centaurium* 属植物では初めてセコイリドイド苦味配糖体である gentiopicrin と swertiamarin の生産が認められた。カルスからは、キサントン成分である 3,5,6,7,8-pentamethoxy-1-O-primeverosylxanthone を単離同定した。これら苦味配糖体やキサントンの生合成に関して、小町リンドウ植物体における部位特異性や細胞の分化との関係を明らかにした。さらに、不定根から直接再生した植物体からもカルス誘導を行った。これら再生植物体または再生植物体由来カルスにおける二次代謝成分の分析も行い、小町リンドウの不定根からの再生過程における二次代謝の遺伝的安定性を示した。

Keywords: Gentianaceae, *Centaurium scilloides*, secondary

metabolites

- *1 佐賀大学
*2 東京学芸大学

大本俊郎*1, 浅井以和夫*1, 村上慶枝*2, 石丸幹二*2, 下村講一郎: ペパーミント (*Mentha piperita* L.) のシュート培養における生育と香気成分生産及びコーヒー酸誘導体生産

日本食品化学会誌, 5, 163-169 (1998)

培養シュートは、約1週間で発根し、培養3週以降には草丈は10 cm以上となった。香気成分は、培養初期から主成分として carvone が茎葉部当り約 80 μg 生産され、menthone, pulegone は極く微量検出された。親植物の主成分である menthol の生産は全く認められなかった。Rosmarinic acid (RA) は生産された(乾燥重量当り 1~1.5%) が、lithospermic acid (LA) や lithospermic acid B (LAB) は全く検出されなかった。暗黒下で培養したシュートは、葉の展開が認められず、carvone のみが培養開始直後から極く微量検出され、また、RA のみ生産(約 1.5% 乾燥重量当り)された。暗黒から照明へと光条件を変えると、シュートの緑化が認められ、良好に生育した。Carvone のみが検出されたが、含量は非常に低いものであった。コーヒー酸誘導体は、RA (約 1.5%) のみが検出された。香気成分生産の場合とは異なり、コーヒー酸誘導体生産のためには、光照射は必ずしも重要な因子ではないことが示唆された。植物体は土壌移植後、良好に生育した。香気成分は、移植後3週目になると主成分である menthol の生産が開始された。RA の生産は、土壌移植後1週目では培養時とほぼ同じ含量(約 1%)であったが、その後、徐々に増加し、栽培7週目では乾燥重量当り約 4%と高含量になった。また、栽培5週目からは3量体である LA の生産も認められた。

Keywords: *Mentha piperita* L., menthol, caffeic acid derivative

- *1 三栄源エフエフアイ
*2 佐賀大学

Yagi, A.*1, Hine, N.*1, Asai, M.*1, Nakazawa, M.*1, Tateyama, Y.*1, Okamura, N.*1, Fujioka, T.*2, Mihashi, K.*2 and Shimomura, K.: Tetrahydroanthracene glucosides in callus tissue from *Aloe barbadensis* leaves

Phytochemistry, 47, 1267-1270 (1998)

アロエベラの葉切片よりカルス培養系を確立した。光照明下で培養したカルスは黒色になり生育も悪かった。しかし、暗黒下では、カルスは黄色を呈し旺盛に生育した。黄色カルスの成分検索の結果、2種の新規 tetrahydroanthracene 配糖体 3,4-dihydro-2,4,8,9-tetrahydroxy-6-methyl-1(2H)-anthracenone-4-O-β-D-glucopyranoside および 3,4-dihydro-2-methoxy-4,8,9-trihydroxy-6-methyl-1(2H)-anthracenone-4-O-β-D-glucopyranoside を単離同定した。

Keywords: *Aloe barbadensis*, tetrahydroanthracene glucosides, callus

- *1 福山大学
*2 福岡大学

Murakami, Y.*1, Shimomura, K., Yoshihira, K.*2 and Ishimaru, K.*1: Polyacetylenes in hairy root cultures of *Trachelium caeruleum* L.

J. of Plant Physiology, 152, 574-576 (1998)

Trachelium caeruleum 毛状根を *Agrobacterium rhizogenes* 15834 株で形質転換し誘導した。毛状根は、幾つかの基本液体培地で生育し、WP 液体培地で polyacetylene monoglucoside である lobetyolin を 4.72 % (乾燥重量) と高い含

量で生産した。毛状根培養系において lobetyolin 含量の最高レベルは、親植物の 16 倍以上であった。本研究は、今回初めて *Trachelium* 属植物の二次代謝産物の同定を示した。

Keywords: *Trachelium caeruleum* L., hairy root, polyacetylene

- *1 佐賀大学
*2 東亜大学

Murakami, Y.*1, Omoto, T.*2, Asai, I.*2, Shimomura, K., Yoshihira, K.*3 and Ishimaru, K.*1: Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 53, 75-78 (1998)

誘導したヒソップ形質転換根は各種基本培地に植え付けて生育を調査した。ホルモンフリーWP 培地で形質転換根を培養するとフェノール性化合物である rosmarinic acid (最高値 8.03 % 乾燥重量) および lithospermic acid B (最高値 3.89 % 乾燥重量) 高レベルで生産することを明らかにした。

Keywords: *Hyssopus officinalis*, transformed root, caffeic acid derivative

- *1 佐賀大学
*2 三栄源エフエフアイ
*3 東亜大学

Ishimaru, K.*1, Ando, M.*1, Yamakawa, T.*2, Touno, K.*3 and Shimomura, K.: Polyacetylene production in transformed root cultures of *Campanula lactiflora*

Natural Medicines, 52, 448-481 (1998)

日本産 *Agrobacterium rhizogenes* の感染により *Campanula lactiflora* の形質転換根を誘導した。各種ホルモンフリー基本培地で形質転換根は良好に生育した。WP 液体培地を用いて7週間培養した結果、13.6g の新鮮重量(100 ml フラスコ当たり)、0.22 % lobetyolin 含量が得られた。1/2MS 液体培地で培養した形質転換根の乾燥重量は、ショ糖の添加量により増加したが、lobetyolin の含量は、変化しないことが判明した。

Keywords: *Campanula lactiflora*, transformed root, polyacetylene

- *1 佐賀大学
*2 東京大学
*3 千葉大学

Watanabe, A.*1, Araki, S.*1, Kobari, S.*1, Sudo, H.*2, Tsuchida, T.*2, Uno, T.*2, Kosaka, N.*2, Shimomura, K., Yamazaki, M.*1 and Saito, K.*1: In vitro propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plants

Plant Cell Reports, 18, 187-192 (1998)

トウキの側芽培養によるクローン増殖法を確立した。増殖したトウキと培養に使用した親植物について RAPD 分析を行った結果、培養により増殖しても DNA 配列に変化がないことが示された。数種の *Angelica* 属植物の遺伝的相同性を RFLP および PAPD 分析により調査した。中国産 *Angelica* 属植物の RFLP および PAPD パターンは、日本産のものとは明らかに異なっていた。10種の異なった制限酵素を使用した。日本産トウキの品種における RFLP は、認められなかった。RAPD 分析により日本産トウキは、*A. acutiloba* Kitagawa と *A. acutiloba* Kitagawa var. *sugiyamae* Hikino の2種の主サブグループに分類可能である。日本産トウキと中国北東部の *Angelica* 属植物は、非常に近接した遺伝的関係にあることを示した。

Keywords: *Angelica* plants, RFLP, RAPD-PCR

*1 千葉大学

*2 鐘紡(株)

Nakanishi, F.*1, Sasaki, K.*2 and Shimomura, K.: **Isolation and identification of littorine from hairy roots of *Atropa belladonna***

Plant Cell Reports, **18**, 249-251 (1998)

日本産 *Agrobacterium rhizogenes* MAFF03-01724 により形質転換したトロパンアルカロイド高生産するベラドンナ毛根 M8 クローンを確立した。本形質転換根にトロパンアルカロイドの生合成の中間体である littorine を HPLC および GC-MS によりアルカロイドフラクションに検出した。Littorine を単離し、NMR により同定した。本化合物は、これまで、ベラドンナには検出されていなかったが、非形質転換根においても生産されることを明らかにした。

Keywords: *Atropa belladonna*, hairy root, littorine

*1 東京学芸大学

*2 青森大学

Lee, K.-T.*1, Yamakawa, T.*1, Kodama, T.*2, Igarashi, Y.*1 and Shimomura, K.: **Effects of aeration on tropane alkaloid production by transformed root of *Atropa belladonna* in flask cultures**

J. of Fermentation and Bioengineering, **86**, 614-616 (1998)

ベラドンナ形質転換根 M8 をフラスコ培養で通常空気を 1 vvm で通気、アルミニウムフイルでキャップ、シリコンゴムでキャップし、根の生育とアルカロイド生産とその比率に対する通気の効果を検討した。4 週間の培養後、1 vvm で通気しながら培養した形質転換根は、良好に生育し、アルカロイド生産は 52.9 mg/l と最も良かった。特に、形質転換根に蓄積された全アルカロイドの比率で scopolamine は 5.7 % から 11.2 % と増加した。

Keywords: *Atropa belladonna*, hairy root, aeration

*1 東京大学

*2 信州大学

田中章江*1, 神谷 隆*2, 下村講一郎, 石丸幹二*1: ***Cornus capitata* 培養根のポリフェノール成分**

Natural Medicines, **52**, 510-517 (1998)

ヒマラヤヤマボウシ (ミズキ科) の不定根の生育およびポリフェノール生産に対する各種培地の組成および濃度の効果について検討した。炭素源としてマルトース、グルコース、ラフィノースなどを添加した MS 培地で大量の galloylglucose 類が生産された。硝酸アンモニウムを除いた MS 液体培地で培養した不定根の 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloyl- β -D-glucose の含量は、MS 基本培地に培養した不定根の 3.7 倍であった。Woody Plant 培地においては、pentagalloyl glucose の蓄積は、添加した銅イオンの濃度に影響されることが明らかになった。

Keywords: *Cornus capitata*, adventitious root, polyphenol

*1 佐賀大学

*2 秩父小野田

西川和孝*, 西岡 恵*, 下村講一郎, 石丸幹二*: ***Blackstonia perfoliata* および 3 種の *Gentiana* 属植物の組織培養と二次代謝成分**

Natural Medicines, **52**, 536-540 (1998)

Blackstonia perfoliata および *Gentiana* 属植物である *G. lutea*, *G. triflora*, *G. rubicunda* のシュートおよびカルス培養系を確立し、苦味配糖体およびフェノール性化合物の量を調べた。ホルモン無添加 MS 培地上で培養した *B. perfoliata*

の培養植物体は、乾燥重量当たり約 4.5 % の gentiopicrin を生産した。これは、*G. lutea* とほぼ同程度であった。IAA 3 mg/l を添加した 1/2 MS 培地で培養した *B. perfoliata* のカルスは、乾燥重量当たり約 1.4 % の gentiopicrin を生産したが、*G. lutea*, *G. triflora*, *G. rubicunda* のカルスでは、苦味物質およびフェノール性化合物の生産は、低かった。

Keywords: *Blackstonia perfoliata*, *Gentiana*, secondary metabolite

* 佐賀大学

Takamiya, M.*1, Tanaka, N.*1, Touno, K.*2, Terahara, N.*3, Shimomura, K. and Ishimaru, K.*1: **Anthocyanin and procyanidin in *Hypericum patulum* tissue cultures**

Japanese J. of Food Chemistry, **5**, 3-8 (1998)

キンシバイのカルス、懸濁培養細胞および不定根の二次代謝産物について分析したところ、2 種のアントシアニン類と 3 種のプロシアニジン類の生産を認めた。各種スペクトルデータの解析により、アントシアニン類は、cyanidin 3-glucoside と cyanidin 3-rutinoside、プロシアニジン類は、(-)-epicatechin, (+)-catechin と procyanidin B2 とそれぞれ決定した。*Hypericum* 属植物においては、今回のキンシバイの不定根培養系が初めての成功例である。不定根は、暗黒下では、良好に生育したが、照明下では、ほとんど生育せず、暗黒下でプロシアニジン類の生産のみ認められた。

Keywords: *Hypericum patulum*, anthocyanin, procyanidin

*1 佐賀大学

*2 千葉大学

*3 南九州大学

Jung, D.-W.*1, Shibuya, M.*2, Ebizuka, Y.*2, Yoshimatsu, K., Shimomura, K. and Sung, C. K.*1: **ELISA for the determination of saikosaponin a, an active component of *Bupleuri radix***

Chem. Pharm. Bull., **46**, 1140-1143 (1998)

Saikosaponin a を定量分析する目的で、競合および間接 ELISA 法を開発した。ウサギを免疫して得たポリクロナール抗体は、50 pg/ml から 20 ng/ml の saikosaponin a を定量することが可能で、検出限界は、40 pg/ml (5.13 pM) であった。Saikosaponin c との交差反応性は、12.7% と若干高いが、saikosaponin d, saikosaponin b1, saikosaponin g に対しては、約 2 % 以下で、saikosaponin a を定量するには、十分な高感度 ELISA 法を開発できた。

Keywords: ELISA, saikosaponin a, *Bupleuri radix*

*1 Chonnam National University

*2 東京大学

Lee, K.-T.*1, Suzuki, T.*1, Yamakawa, T.*1, Kodama, T.*2, Igarashi, Y.*1 and Shimomura, K.: **Production of tropane alkaloids by transformed root cultures of *Atropa belladonna* in stirred bioreactors with a stainless net**

Plant Cell Reports, **18**, 567-571 (1998)

300 ml から 30 l へのベラドンナ形質転換根培養のスケールアップが、アルカロイドの生産性を減少させる事なく行えた。種培養の切断処理は、1 ヶ月間のフラスコ培養期間において根の生育、形態およびアルカロイド含量に顕著な影響は、示さなかった。この様に生育シランダムに切断した根は、スケールアップのための 3 l および 30 l 改良型攪拌培養槽で更に培養した。1 ヶ月の培養後、30 l 培養槽で約 1500 mg の総トロパンアルカロイドが生産された。培養した根は、圃場で 12 ヶ月間栽培した植物の根と同レベルの atropine を含有し、他のアルカロイドに関しても満足すべ

き量を含有していた。

Keywords: *Atropa belladonna*, bioreactor, transformed root

*1 東京大学

*2 信州大学

米光 裕*, 楠部真崇*, 野口 衛: キキョウ (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) の組織培養による増殖

Natural Medicines, 52, 368-371 (1998)

キキョウは、鎮咳、去痰の作用を持つ重要な生薬で、切り花、鉢植えとしても広く栽培されている。優良品種の作出と遺伝資源の保存を目的に、組織培養技術の利用を試みた。腋芽からの増殖法を確立し、最終的に圃場に定植することが出来た。ただし、分枝根が多く、生薬の性状としては不適當であり、今後の検討が示唆された。

Keywords: *Platycodon grandiflorum*, tissue culture, multiple shoots

* 和歌山工業高等専門学校

橋爪 崇*1, 田中敬子*1, 直川和弘*1, 山下善樹*2, 野口衛: シャクヤクの優良品種の検索に関する研究 (第2報) 一次選抜系統の根の生育と品質

Natural Medicines, 52, 385-389 (1998)

シャクヤクは、婦人病等に用いる漢方薬に配合される重要な生薬であり、古くから栽培されてきた。薬用種としては主に白花の一重が栽培されてきたが、一方で観賞用として多くの品種が作出されている。そこで、栽培される品種

について、その生薬としての品質を明らかにする目的で、成分等の調査を行った。何れも成分含量に問題はなく、生薬としての利用の可能性が示唆された。

Keywords: *Paeonia lactiflora*, tannin, paeoniflorin

*1 和歌山県薬事指導所

*2 和歌山県立大学付属病院

Yoshida, M.*1, Tanaka, J.*1, Sakai, E., Noro, Y.*2, Kawamura, T.*2, Thuan, N., V.*3 and Tanaka, T.*4: Cultivation of *Geranium thunbergii* in Vietnam (1) Morphological Characteristics and Geraniin Contents

Natural Medicines, 52, 529-532 (1998)

Geranium thunbergii (ゲンノヨウコ) は、整腸、止瀉を目的に使用される生薬であり、日本を代表する民間薬である。国内に於いては人件費等の問題により、栽培生産が困難であるため、ベトナムでの栽培を試みた。試験栽培に選んだ地方には、同属植物の分布はなく、自然交配により種が変化する可能性は少ないと思われた。日本より種子を導入し栽培した植物の形態は、国内栽培品と同等であり、geraniin含量も同程度を示した。これにより、ベトナムでの *Geranium thunbergii* の栽培の可能性が示唆された。

Keywords: *Geranium thunbergii*, geraniin, morphology

*1 本草製薬(株)

*2 名城大学薬学部

*3 Research Station of Medicinal Plants Van Dien

*4 岐阜薬科大学

鹿庭なほ子：溶出試験とバイオアベイラビリティ

日本医薬品添加剤協会誌, 7 (No.2,3), 1-2 (1999)

製剤の溶出速度について, *in vitro/in vivo* 相関が成立しにくい原因を紹介した. このような限度をわきまえた上で, 医薬品行政において, 溶出試験が後発医薬品の生物学的同等性試験では補助的に, また, 品質管理や処方変更においては, バイオアベイラビリティが変動していないことの確認のために, ヒト生物学的同等性試験に変わり得ることを, 述べた.

Keywords: bioequivalence test, dissolution test, *in vitro/in vivo* correlation

青柳伸男：生物学的同等性と溶出試験

日本薬剤会雑誌, 50, 1433~1441 (1998)

生物学的同等試験と溶出試験法の関連に関して, 溶出速度とバイオアベイラビリティとの相関性, 生物学的同等性評価に果たす溶出試験の役割と有用性, 即ち, 被験者の選択及び生物学的同等性を裏付ける手段として溶出試験を積極的に活用する理由, 低胃酸被験者あるいは医薬品適用集団を対象とする試験を要求する理由等について紹介した.

Keywords: bioequivalence test, dissolution test, bioavailability

Aoyagi, N. and Katori, N.: Uniformity of mass and content: scope and acceptance criteria

Pharmeuropa (special issue), February, 89-94 (1999)

含量均一性試験, 重量偏差試験について, 試験の目的は各製剤の治療上の有用性を保証することであり, そのためには主薬含量が表示量を中心とした一定の許容範囲内に収まっていることを確認する試験でなければならないことを述べた. 重量偏差試験は含量均一性試験の代替試験と位置づけるべきであり, 試験法 (サンプル数, 合否の判定法) は費者危険率を考慮して定めることが重要で, 現在の日局含量均一性試験, 重量偏差試験はこの概念に基づいて作成されていることを紹介した. それを踏まえ, 日局試験法を国際的標準試験法として採用するよう提案した.

Keywords: content uniformity, weight variation, harmonization of pharmacopeia

Aoyagi, N.: Disintegration test; apparatus, media and acceptance criteria

Pharmeuropa (special issue), February, 155-160 (1999)

我が国では崩壊試験が依然, 多用されているが, 溶出試験が普及している今日, 崩壊試験の役割は減少してきている. 腸溶性製剤の崩壊試験は, 欧米で行われている pH を酸性から中性へ連続的に変化させる試験より, 日局の試験, 即ち別々の pH で試験するパラレルテストの方が製剤間の差の識別性は優れているので, パラレルテストを採用すべきであろう. また, 崩壊試験の国際調和は, 崩壊試験の役割の減少, 個別規格の設定の増大を考慮し, 進めるべきとの見解を述べた.

Keywords: disintegration test, apparatus, harmonization of pharmacopoeia

吉岡澄江：DSC等の熱分析による医薬品の安定性評価

熱測定, 25, 86-91 (1998)

医薬品の保存安定性の評価における熱分析の有用性について解説した. DSC, 熱機械分析および動的粘弾性分析を用いてエンタルピー緩和や機械的緩和を観察することによって, 医薬品の安定性に密接に関連している医薬品の分子運動性についての有益な情報を得ることができる.

Keywords: stability, molecular mobility, thermal analysis

最所和宏, 石橋無味雄：医薬品の迅速分析法—フェニルプロピオン酸系消炎鎮痛剤

月刊薬事, 40 (12), 2883-2887 (1998)

厚生省医薬安全局監視指導課の研究班において国立医薬品食品衛生研究所が作成した原案を東京医薬品工業会および大阪医薬品協会にて検討を加え, その結果に基づき作成されたフェニルプロピオン酸系消炎鎮痛剤の HPLC 法による迅速分析法の概要および試験法を実施するにあたっての注意点を解説した.

Keywords: Phenylpropionic acid, rapid analysis, HPLC

中原雄二：依存性薬物の毛髪分析の進歩

ファルマシア, 34, 889-894 (1998)

依存性薬物の毛髪分析の進歩に関し, 以下の項目別に研究の動向を解説した.

1. はじめに
2. 毛髪とはどのような組織か
3. 毛髪中の薬物の抽出
4. 毛髪中での薬物の挙動
5. 毛髪中の薬物分布と薬物使用時期
6. 毛髪に見出されている薬物
7. 毛髪中の薬物の安定性
8. 血中薬物濃度と毛髪中薬物濃度
9. 妊婦の薬物乱用による胎児への影響診断
10. 多剤乱用のモニタリング
11. どのくらい過去まで検出可能か
12. 毛根を利用した急性中毒の原因解明
13. 覚醒剤使用と類縁医薬品の使用識別
14. おわりに

Keywords: Hair analysis, drug abuse, drug incorporation into hair

鹿庭なほ子：ICHの分析法バリデーションについて

Jap. J. Biometrics, 19 (12), 19-31 (1998)

ICHの分析法バリデーションに関するテキストに基づいて, 検討が必要なバリデーション・パラメータ, 分析における固定効果と偶然誤差の考え方, 検出限界の考え方, 分析法バリデーションが必要なとき, などについて紹介した. また, 生体試料を対象とした分析法のバリデーションにおいて, 考慮が必要な事項についても, 紹介した.

Keywords: analytical validation, ICH, validation characteristics

早川堯夫：バイオテクノロジー医薬品分野におけるICHの進展

ファルマシア, 34 (10), 992-994 (1998)

バイオテクノロジー医薬品分野におけるICHの進展に関連して, 1) ICHとは, 2) ICH活動の内容と期待される成果, 3) ICHの歩みとトピックス, 4) バイオテクノロジー医薬品分野におけるICHのトピックとその内容の概略, 5) ICHの当初予測を超えた成果と波及効果, 6) バイオテクノロジー医薬品分野におけるICHの今後, について解説した.

Keywords: biotechnology drugs, ICH

早川堯夫：第十三改正日本薬局方第一追補について：生物薬品委員会に関連する薬局方改正について

医薬品研究, 29 (6), 441-453 (1998)

生物薬品委員会における薬局方改正に関連して, 1) 生物薬品委員会の発足と審議所管事項, 2) 生物薬品委員会各条

新規収載品目の進捗状況, 3) 改正予定既収載品目, 4) 実測値に基づく規格設定, 5) 性状の溶解性試験の意義, 6) 試験動物の使用削減の観点からみた合理的試験法の設定, 7) バイオアッセイ法から理化学試験法に移行する際の条件, 8) ヒスタミン及びヒスタミン様物質試験, 異常毒性否定試験などの設定意義及び必要性, 9) 毒性試験と異常毒性否定試験の区別, 10) 発熱性物質試験のエンドトキシン試験への切り替え, 11) 血液凝固物質や血液型物質試験の設定意義及び必要性, 12) 比活性の独立示性値としての設定, 13) 組織体液由来(特にヒト由来)の製剤に関するウイルス安全性の検討の必要性, 14) 純度試験: 電気泳動で試験を実施する際の検出感度の保証, 15) 「ヘパリンナトリウム注射液」のエンドトキシン規格値の設定について, 16) 3極薬局方国際調和活動の推進と課題, 17) ICHと生物薬品委員会: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法作成, 18) バイオテクノロジー応用医薬品の日本薬局方収載に関する基本的考え方, 19) バイオテクノロジー応用医薬品各条の具体的作成法, などについて解説した。

Keywords: Japanese Pharmacopoeia, biologicals

Liu, G.Y.* and Morimoto, K.: Evaluation of RP-HPLC as an assay method for quality control of recombinant human insulin (Part 1 Assay)

Annual Report Tianjin Municipal Institute for Drug Control, 148-151 (1996)

遺伝子組換えヒトインスリン製剤(rh-インスリン)の品質管理のための定量法としての米国薬局方や欧州薬局方で採用されている逆相高速液体クロマトグラフ法(RP-HPLC法)の妥当性を, rh-インスリンの標準品と製剤について検討した。その結果, 4種の製剤を迅速, 再現性をもって定量することができた。

Keywords: recombinant human insulin, RP-HPLC, Assay

* 天津市薬品検験所

Sui, Y.R.* and Morimoto, K.: Evaluation of RP-HPLC as an assay method for quality control of recombinant human insulin (Part 2 Purity)

Annual Report Tianjin Municipal Institute for Drug Control, 152-155 (1996)

遺伝子組換えヒトインスリン製剤の純度試験法を, rh-インスリンの類縁物質として, デスアミド体を調製し, 重合体と共にその分離法の最適条件を検討し, 製剤の純度試験に応用した。

Keywords: recombinant human insulin, RP-HPLC, Purity

* 天津市薬品検験所

川西 徹: イオンインジケータ

病理と臨床, 16, 1141-1147 (1998)

近年蛍光プローブを用いて細胞内で生じる生命現象を視覚化して解析する方法が, 生物学, 医学領域で用いられるようになってきている。これらのプローブの中で現在最も広く用いられているものはイオンインジケータである。そこでこれらイオンインジケータについて, その分類, 使用法, 使用例についてまとめ, さらにその将来について概観した。

Keywords: fluorescence probe, ion indicator

川西 徹: 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた細胞内カルシウムイオンの高速高分解能画像化

日本薬理学雑誌, 112, 89-95 (1998)

細胞内カルシウムイオン動態研究は顕微鏡画像解析法による視覚化によって飛躍的に進展したが, 最近さらに画像

化機器として高速走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いることによって空間分解能, 時間分解能の両面で大きな進歩を遂げた。筆者らはミクロン単位の空間分解能を維持しながら, ミリ秒以下の時間分解能でカルシウムイオン動態を解析する事に成功し, (1) 心筋細胞の興奮収縮連関におけるカルシウムイオン濃度上昇はカルシウムスパークの集合からなること, (2) 細胞内膜系のカルシウムチャンネルの開口現象と考えられるカルシウムスパークには不応期があること, を明らかにした。本稿では, この高速高分解能画像化技術について実験方法, および実験を行うにあたって注意すべきポイントについて概説した。

Keywords: confocal microscopy, calcium ion, imaging

中西真人*, 水口裕之: 膜融合リポソームによる細胞内への物質導入

日本薬理学雑誌, 112, 299-305 (1998)

膜融合リポソームとは, センダイウイルスの膜融合蛋白質をリポソーム表面に付与したものであり, ウイルスの膜融合能を利用し, リポソーム内に封入した物質を直接細胞質内に導入できる。本リポソームは蛋白質や遺伝子をはじめリポソーム内に封入できるものであればあらゆる物質を, センダイウイルスと同等の高い効率で細胞質内に導入できるため, 遺伝子導入ベクターとしてはもとより, 多方面から注目されている。本総説では, 膜融合リポソームの性質・応用について, これまで得られた結果を中心に解説した。

Keywords: Sendai virus, liposome, fusogenic liposome

* 大阪大学微生物病研究所

藤野廣春, 鈴木正一, 吉崎正雄, 佐竹元吉, 神田博史*: イトヒメハギの栽培研究 I. 種子発芽と種子の保存方法

Natural Medicines, 52 (2), 97-102 (1998)

イトヒメハギは局方生薬オンジ(遠志)の基原植物であるが, 中国での野生植物の採取に依存しており, 栽培方法が確立していない植物である。このため, 栽培方法を確立し, 生薬の安定供給に寄与するために本研究を行い, 種子に関する発芽条件及び保存条件を明らかにした。

Keywords: *Polygala tenuifolia*, Polygala root, seed germination

* 広島大学

鈴木正一, 藤野廣春, 吉崎正雄, 佐竹元吉, 神田博史*: イトヒメハギの栽培研究 II. 播種密度と収量との関係

Natural Medicines, 52 (2), 187-190 (1998)

イトヒメハギは播種密度は5a当たり50g播種した区が, 5g区に比べて収量は増加するが, 個体は小さくなる。生薬として調製され多量の品質は5g区が良い結果を得た。

Keywords: *Polygala tenuifolia*, Polygala root, cultivation

* 広島大学

鹿庭正昭: 抗菌製品の使用実態と健康被害

生活と環境, 43 (9), 28-32 (1998)

抗菌製品について, 市販製品の分析調査, 及び健康被害, 特に皮膚障害に関する事例の原因究明の結果をもとに, どのような抗菌製品, どのような抗菌剤によって, どのような健康被害が発生したことがあるか, 今後, どのようにして抗菌製品の安全性を確保して行けばよいかを解析した。

Keywords: antimicrobial/deodorant agent, commercially available household product, allergic contact dermatitis

鹿庭正昭: 家庭内の化学物質と健康被害 第一回: 化学物質過敏症・シックハウス症候群

国民生活, 10, 48-51 (1998)

家庭内で使用される化学物質によって、どのような健康被害が発生する可能性があるか、またそうした健康被害を防止するために、どのような安全対策がとりうるかについて、現状及び今後の課題を中心に解析した。まず、家庭内空気汚染化学物質による健康被害として、化学物質過敏症、シックハウス症候群について取り上げた。

Keywords: household product, health hazard, chemical sensitivity

鹿庭正昭：家庭内の化学物質と健康被害 第二回：皮膚障害について

国民生活, 11, 52-55 (1998)

皮膚に接触する形で使用される家庭用品中の化学物質によって発生する皮膚障害として、刺激性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ラテックスアレルギー、アトピー性皮膚炎について取り上げた。

Keywords: household product, health hazard, skin disorder

鹿庭正昭：家庭内の化学物質と健康被害 第三回：呼吸器障害について

国民生活, 12, 60-63 (1998)

家庭用品発生する急性中毒事故として、実際に発生したことがある家庭用洗剤 (塩素系, 酸性タイプの混用等), 防水スプレーによる呼吸困難等を伴う中毒事故について取り上げた。

Keywords: household product, health hazard, respiratory tract disorder

Kitagishi, K.*, Shintani, H.: Analysis of compounds containing carboxyl groups in biological fluids by capillary electrophoresis

J. Chromatogr., 717, 327-339 (1998)

カルボニル基を有する化合物のキャピラリー電気泳動分析について従来の文献を総説した。

Keywords: carboxyl group compounds, biological fluids, capillary electrophoresis

* 大塚電子 (株)

新谷英晴, 数馬昂始*: 日本に於ける滅菌バリデーションならびに日常管理の問題点

防菌防黴, 26, 309-320 (1998)

使用者が滅菌保証を行う実際に行う際の問題点について質疑-応答の形式で解説した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

* K2 インターナショナル (株)

新谷英晴, 数馬昂始*: 日本に於ける滅菌バリデーションならびに日常管理の問題点-第2報-

防菌防黴, 26, 629-638 (1998)

使用者が滅菌保証を行う実際に行う際の問題点について質疑-応答の形式で解説した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

* K2 インターナショナル (株)

仲谷満子*, 新谷英晴: 滅菌器センサー, 滅菌器稼働性能, 滅菌保証の達成の査察事例

防菌防黴, 26, 580 (1998)

滅菌器センサー, 滅菌器稼働性能ならびに滅菌保証達成に関しバリデーションガイドラインに添って査察を受けた事例を記載した。

Keywords: sensor, sterilizer performance, sterility assurance

* スーガン (株)

新谷英晴: バイオバーデン菌を用いる滅菌保証 防菌防黴, 26, 385-393 (1998)

使用者がバイオバーデン菌を用いて滅菌保証を行う際の問題点について解説した。

Keywords: validation study, bioburden, sterility assurance

新谷英晴: バイオバーデン菌を用いない滅菌保証 防菌防黴, 26, 453-465 (1998)

使用者がバイオバーデン菌を用いずに従来の生物指標で滅菌保証を行う際の問題点について解説した。

Keywords: validation study, biological indicator, sterility assurance

越川富比古*, 新谷英晴: バイオバーデン測定の問題点 防菌防黴, 26, 511-520 (1998)

滅菌保証に於いてバイオバーデン管理, バイオバーデン回収などの微生物学的観点について解説した。

Keywords: biological study, bioburden, sterility assurance

* 日本アイソトープ協会

新谷英晴: 現行滅菌保証の問題点と現実的な解決法 防菌防黴, 26, 647-656 (1998)

使用者が滅菌保証を実施するに際し問題となる点について解説した。

Keywords: validation study, biological indicator, sterility assurance

新谷英晴: 日本に於ける滅菌バリデーションならびに滅菌保証での問題点

防菌防黴, 26, 687-700 (1998)

使用者が滅菌バリデーションならびに滅菌保証を達成するに際し問題となる点について解説した。

Keywords: validation study, biological indicator, sterility assurance

新谷英晴: 培地含有型生物指標による高圧蒸気滅菌での滅菌保証の問題点

ファーマテックジャパン, 14, 1173-1179 (1998)

使用者が高圧蒸気滅菌で滅菌し, その際指標に培地含有型生物指標を用いた場合の培地含有型生物指標の問題点を ISO/TC 198 規格に準じて解説した。

Keywords: validation study, self-contained biological indicator, sterility assurance

新谷英晴: 滅菌バリデーション実施と諸問題の解決法について (1)

ファーマテックジャパン, 14, 2035-2040 (1998)

使用者が滅菌バリデーションを実施するに際し問題となる点を取り上げ, それらに関して解決法を示した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

新谷英晴: 滅菌バリデーション実施と諸問題の解決法について (2)

ファーマテックジャパン, 15, 61-68 (1999)

使用者が滅菌バリデーションを実施するに際し問題となる点を取り上げ, それらに関して解決法を示した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

新谷英晴: 滅菌バリデーション実施とそれに伴う諸問題

の解決法

防菌防黴, 27, 97-108 (1999)

使用者が滅菌バリデーションを実施するに際し問題となる点を取り上げ, それらに関して解決法を示した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

新谷英晴: 現行医療機関の滅菌保証の問題点ならびに現行滅菌バリデーションの問題点

医器学, 68, 478-479 (1998)

使用者が滅菌バリデーションならびに滅菌保証を達成するに際し問題となる点について解説した。

Keywords: validation study, biological indicator, sterility assurance

安藤正典: 水域環境中の化学物質の分析法とその基準改正の考え方

フードケミカル, 14, 63-70 (1998)

水質基準設定の項目には水道原水, 浄水処理過程及び配給水に侵入する可能性がある多くの化学物質や生物に対して設定しなければならない。水質基準設定にあたっては, これらの物質に対する安全性の評価法と基準値設定方法を決めておく必要がある。そこで, 基準値設定のための安全性評価の考え方を解説した。さらに, 新しい水質基準の概要として水道水に混入する化学物質を人への安全性と検出頻度から基準項目, 監視項目及び快適水質項目の3つの分類についての考え方を述べた。

Keywords: Analytical Method, Standards for Drinking Water, Risk assessment

安藤正典: 飲料水中重金属類の安全性評価

海外医療, 22, 10-19 (1998)

我が国の水道水では重金属の安全性については極めて厳格に遵守されている。これに対して, 外国, 特に発展途上国では水道の普及や水源の確保等の種々の問題から, 我が国のような水道基準を守っていることは困難な状況にある。そこで, 水域環境を汚染する化学物質の健康影響からのリスクアセスメントの考え方を述べると共に, 世界的に未解決の飲料水における重金属の安全性について概念を述べた。

Keywords: Drinking Water, Heavy Metal, Health Effect

安藤正典: 化粧品の産官学共同研究の必要性

フレグランスジャーナル, 26, 36-42 (1998)

安全性や機能性に係わる製品の国際交流システムは, 製品情報を世界共通の視点で提供することが要求される段階に来ている。この傾向は化粧品の分野でも同様で, 規制緩和の具体的な措置が着々と実施に移され, 化粧品における製品開発の在り方が変貌しようとしている。これに加えて, 最近の皮膚科学や経皮吸収技術の著しい進歩は, 化粧品の役割をも大きく変化させようとしている。化粧品を取り巻く環境は時事変化していることから, 化粧品の製造・開発や消費者の要求はもちろんのこと, その概念についても新しい考え方を思考していく必要がある。新たな化粧品を考える上で, 共通の認識を持つための化粧品に係わる分野を結集して産官学で共同して“すべき”あるいは“できる”作業や研究の概念を構築するにあたっての皮膚科学と経皮吸収技術の進歩と国での認識の違いから生ずる課題を簡単に整理した。

Keywords: Harmonization of Cosmetics, Cosmetics, Skin Care

安藤正典: 室内空気環境の化学物質と衛生的課題

労働の科学, 53, 208-212 (1998)

生活環境に存在する数え切れないほどの化学物質や微生物は, 食品, 水などを介して経口的に, また居住空間や労働環境あるいは大気を通して経気道的に, さらに化粧品などの故意の接触や家庭用品, 建築資材などの居住環境を通して経費的にヒトに絶えず暴露している。このことから, 化学物質の安全性は, リスクアセスメントとそれに続くリスクマネジメントである安全性評価科学(レギュラトリーサイエンス)の考え方を踏まえた基準値設定やガイドラインまでの一連の行政施策によって確保される。

Keywords: Indoor Air, Volatile Organic Compounds, Health Effect

安藤正典: 揮発性有機化合物(VOC)の毒性

アレルギーの臨床, 18, 986-994 (1998)

化学物質の毒性を評価して生活環境分野における基準値やガイドライン値を設定するには, 毒性に関する多くの指標によるDose-Response評価と暴露評価のプロセスを経て行われている。しかしながらSick Houseシンドロームに関連すると思われる揮発性有機化合物は, 毒性が明確にされているわけではない。Sick Houseシンドロームや室内空気に関連性があると考えられている疾病は高濃度の化学物質暴露による一過性または短期的な健康影響が微量・長期または多量・短期暴露によって誘発され, それ以降微量で慢性的に発症するなど, 種々の形態が考えられている。しかし, これらの疾病の発生は動物実験によって証明されているわけではなく, まして暴露量と健康影響の量的関連性が示されているわけでもない。そこで, 揮発性有機化合物の有害性のDose-Responseが明確にされ, 国際的あるいは国内で基準値やガイドラインとして規制されている化学物質についてその概略を述べると共に, 室内空気中化学物質の安全性評価の問題点を明らかにした。

Keywords: Volatile Organic Compounds, Toxicity, Sick House Syndrome

安藤正典: 化学物質過敏症を引き起こす化学物質

別冊化学 環境ホルモン&ダイオキシン, 176-187 (1998)

室内空気中のVOCsは室内空間を形づくる建築物およびその資機材, エアークンディションシステム, コピー機, 暖房器具, 家具, 家庭用品などの消費財, 農業, 燃焼といった空気空間を取り巻くほとんどの製品から放出される。また, 室内生活活動の炊事, 入浴, 喫煙あるいは換気に伴う外気の侵入, 気温, 湿度, 風力などの気候といった空気環境要因によっても様々な化学物質が発生している。この室内空気中化学物質の環境が大きな原因とされる疾病として, 化学物質過敏症が最近大きな話題を呼んでいる。そこで, 化学物質過敏症と室内空気中化学物質の関連性を整理するため, 室内での発生源と空気環境で問題となる化学物質および室内空気中で確認されている化学物質を取り上げた。

Keywords: VOC, Indoor Air, Multiple Chemical Sensitivity

安藤正典: 原水監視と水質情報の管理

資源環境対策, 35, 143-146 (1999)

自然水域では絶えず化学物質汚染の危機にさらされている。ひとたび水質汚染事故が発生すると, これらの汚染は自然水域を利用する工業用水, 水道水, 漁業・農業用水等多くの産業に多大な影響を与える。特に水道水源での汚染は水道システムの第一段階であり, この段階で事故の把握ができなかった場合は以後の水道システム全体に大きな影響を及ぼすことになる。従って, 水道水質の管理にはヒト

が直接飲用する水道ばかりではなく自然水域での平時の汚染や突発的な水質汚染事故に対しても監視していくことが求められる。そこで、本項では日本の水域における化学物質の規制、水道水源の水質管理、水源における常時水質管理、水道水質データの信頼性、日本における水道水質について解説した。

Keywords: Monitoring, Quality Assurance, Quality Control

松田りえ子：検査方法の評価について

食品衛生研究, 48, 59-66 (1998)

分析法バリデーション, 内部精度管理, 外部精度管理等の分析評価方法について解説した。

山田 隆：食品添加物

臨床栄養, 93, 859-862 (1998)

食器・容器からこれまでに検出された内分泌かく乱を疑われる物質について、現在までに判明していることについて、分かりやすく解説した。

Keywords: container, wrapping, endocrine disrupting chemicals

石綿 肇, 山田 隆：1994年度の行政検査結果を基に推定した食品添加物の食品中の濃度と摂取量

食品衛生研究, 48 (9), 67-79 (1998)

全国の地方自治体が1994年度に行った食品添加物の行政検査のうち、16種34品目について摂取量調査を行った。検査件数は122,952検体であった。ADIに対し摂取量の最も高かったものは亜硝酸塩で、ADIの10.6%であった。調査方法の前提条件と限界について詳細に考察した。

Keywords: food additives, daily intake, ADI

石綿 肇：食品中の添加物含量の実態と摂取量の推定

JAFAN, 18, 171-183 (1998)

食品添加物の摂取量の調査方法はいくつか報告されている。各方法の利点と欠点を比較して論じた。また、日本及び外国における摂取量について解説した。

Keywords: food additives, daily intake, ADI

石綿 肇：新規指定添加物, グルコン酸カリウム及びグルコン酸ナトリウムについて

食品衛生学雑誌, 39, J474-J475 (1998)

新規に食品添加物として指定されたグルコン酸カリウム及びグルコン酸ナトリウムの規格について簡単に解説した。

Keywords: potassium gluconate, sodium gluconate, food additive

米谷民雄：天然添加物の規格基準について

食品衛生研究, 49 (1), 45-54 (1999)

第7版食品添加物公定書で新たに天然添加物60品目3製剤の成分規格が設定された。そこで、これまでの天然添加物の規格基準, 天然添加物の規格設定における問題点, 新規に収載される天然添加物の規格基準, 一般試験法の新規収載と追加, 製造基準や表示基準の追加等につき, 概説した。

Keywords: natural food additives, standards and specifications, JSFA-VII

米谷民雄：新収載された添加物の品目とその規格

月刊フードケミカル, 4, 92-97 (1999)

第7版食品添加物公定書で新収載された天然添加物の品目, 成分規格各条の形式の変更, 天然アミノ酸, 天然着色料, 天然増粘安定剤及び他用途品目の規格, JECFA規格と

の比較等につき, 詳しく解説した。

Keywords: natural food additives, standards and specifications, JSFA-VII

河村葉子：食品用容器包装中の内分泌攪乱化学物質とその溶出

日本医師会雑誌, 121, 687-690 (1999)

内分泌攪乱が疑われる化学物質のうち, 食品用容器包装に残存する可能性がある化学物質について, 用途, 毒性, 材質中の残存量及び食品擬似溶媒や食品への移行などを解説した。

Keywords: food packagings, endocrine disrupting chemicals, migration

河村葉子：食品用器具・容器包装に関わる内分泌攪乱化学物質

ファルマシア, 35, 229-233 (1999)

食品用器具・容器包装に関わる内分泌攪乱が疑われる化学物質のうち, ビスフェノールA, フタル酸エステル類, スチレン類について解説した。

Keywords: bisphenol A, phthalates, styrenes

手島玲子：環境化学物質と過剰免疫

The Lung Perspectives, 6, 21-25 (1998)

環境化学物質として, 化学薬品としては, イソシアネート類および, TMAなど, それ自身が抗原性を持つがゆえに職業性喘息の原因物質とされている低分子物質, また, 偽アレルギー作用を持つ物質, アレルギー促進活性を持つ物質を取り上げ概説した。次いで, 若干の天然由来のアレルゲンについても, 吸入性アレルゲンとして気管支喘息を引き起こしている高分子物質を中心に, 科学的, 免疫学的根拠が示されている例につき概説し, 環境化学物質によるアレルギー反応の現状についての紹介を行った。

Keywords: TMA, allergy, pseudoallergy

最上 (西巻) 知子：アポBリポ蛋白の分泌の機構とその制御

The Lipids, 10, 32-39 (1999)

高アポBリポ蛋白血症は動脈硬化症・虚血性心疾患の危険因子であり, 血漿レベルの制御はこれらの予防・治療の上で重要な課題である。この総説では, 肝でのアポBリポ蛋白産生(VLDL分泌)に焦点を絞り, その機構と制御について最近の知見を中心に解説し考察を加えた。

Keywords: apolipoprotein B, secretion, VLDL

最上 (西巻) 知子：フィブラートの作用機序とPPAR

Medical Practice, 16, 458-459 (1999)

抗高脂血症薬フィブラート類の作用機序について, 核内レセプターPPARの関連する最近の報告を中心に解説した。

Keywords: fibrates, PPAR, hypolipidemic effect

藤森観之助：総説 医薬品開発の国際化における薬理学の役割: 医薬品の一般薬理作用と薬物動態の位置づけ(1)

一般(安全性)薬理作用の位置づけ

日薬理誌, 113, 31-39 (1999)

一般薬理試験を安全性評価の上から見直した安全性薬理試験に関するガイドラインについて国際ハーモナイゼーションを要望し, 本年度より3極間で作成作業が開始された。本総説では我が国の研究班により3年の討議を経て作成, 提案されている安全性薬理試験ガイドライン案を紹介すると共に, その科学的背景および国際理念に即した整合等に

ついて解説している。

Keywords: safety pharmacology, ICH, Guideline

小沼博隆: HACCPによる衛生管理

農工研通信, 107, 2-8 (1998)

米国で発案され、現在では国際的な認知を受けている HACCP システムによる衛生管理の誕生の背景から、その概要、海外における HACCP システム導入の現状とわが国の現状および HACCP の実施方法や導入効果を解説した。

Keywords: hazard analysis, critical control point, monitoring

高鳥浩介: 住環境にみるカビと健康障害

公衆衛生研究, 47, 13-18 (1998)

カビの生物学的性状、住環境にみるカビの分布、アレルギーを含めた障害性そして防御法の観点からまとめた。

Keywords: moulds, house environments, health problem

高鳥浩介, 太田利子: 喘息憎悪因子への対応

ASTHMA, 11, 39-41 (1998)

住環境にみる喘息憎悪因子としてカビも重視されつつある。カビによるアレルギーの関係がはっきりしてきた住環境にみる喘息憎悪因子となるカビをいかに防止するか論じた。

Keywords: fungi, allergens, human health

李 憲俊*, 高鳥浩介: やさしいかびの検査法

環境管理技術, 16, 46-49 (1998)

微生物の検査を行う場合、対象微生物の形態、生態、生理などを知ることは重要であり、その基本から検査法について解説した。

Keywords: fungi, identification, examination

* 衛生・微生物試験センター

高鳥浩介, 秋山一男*: カビとヒトとの関わりーカビによる害を中心にー

防菌防黴, 27, 201-206 (1998)

カビはヒトの生活環境で普遍的に存在する生物であり、ヒトを含めた動物、植物と共生あるいは拮抗しながら生態に広く分布している。カビとヒトとの関わりを有害な面に限ってまとめた。

Keywords: fungi, human environments, allergens

* 国立相模原病院

井上 達: 内分泌かく乱化学物質とは、内分泌かく乱化学物質特集

厚生, 10月号, 12-13 (1998)

内分泌かく乱化学物質の特集にあたって、厚生科学研究におけるこの問題への取り組みと、問題点解明の方向性について概説した。

Keywords: hormone-like effect, chemicals, receptor function

井上 達: 内分泌かく乱化学物質問題に関する現状および今後の課題

食品衛生研究, 48, 47-57 (1998)

食品におけるこの課題について特にこの1年間に国内外で取り組みの進んだ点を中心に、食品衛生講習会の受講者を対象に課題を整理して総説した。

Keywords: estrogen receptor, androgen receptor, thyroid hormone receptor

武木田 薫, 井上 達: 内分泌攪乱化学物質の生体影響,

特集「内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)」

環境管理, 34, 1068-1074 (1998)

内分泌かく乱化学物質の特集にあたって、とくに植物ホルモンのおかれている特異な位置について、現状での考え方を総説した。

Keywords: chemicals, plant hormones, estrogen receptors

井上 達: 環境ホルモンの“毒性”の特徴と評価方法の課題, 特集「環境ホルモン」

化学物質と環境, 31, 4-6 (1998)

内分泌かく乱化学物質の特集にあたって、当該物質の「毒性」の特徴を分子生物学的に、受容体科学の立場から、5つの面から整理して、研究課題のありかについて総説的に解説した。

Keywords: toxicological index, NOEL, NOAEL

井上 達, Kyung-Sun Kang: 内分泌攪乱化学物質(統報)ー作用の特徴と試験法ー

J. of Toxicological Sciences, 23, app., 191-199 (1998)

内分泌かく乱化学物質の新たに明らかに成りつつある性質に焦点をあて、これらに即して必要な試験法についての考え方を中心に解説した。

Keywords: uterotopic assay, hersherberger test, 407 test

Inoue T.: Book review "Hematopoietic Cell Growth Factors and Their Receptors"

International J. of Hematology, 67, 101-103 (1998)

頭記の書籍について、編者の求めに応じておこなった書評。血球系の増殖因子と受容体に関する近年の研究の方法論が浮き彫りにされ、この領域の研究者の専門参考書として比較的良好に編集されている。

Keywords: hemopoietic growth factors, receptor, stem cells

菅野 純, 相賀裕美子, 井上 達: 化学物質の生物毒性試験ー内分泌障害性を中心にー

組織培養工学, 24, 268-271 (1998)

内分泌攪乱化学物質の生体作用の特徴、その毒性の考え方、障害性に関するエンドポイント、試験法についての考え方などについて解説した。

Keywords: endocrine disrupting chemicals, reproductive toxicity, hormone receptors

井上 達, 菅野 純: エンドクリン問題の最近の動向

ポリ衛協会報, 3, 4-21 (1998)

リスクアセスメントにおける「毒性の評価」の観点から見たエンドクリン問題の最近の動向について概説した。

Keywords: endocrine disrupting chemicals, risk assesment, estrogen

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質の生物影響

ファルマシア, 35, 219-223 (1999)

本稿では内分泌攪乱化学物質(EDCs)の複雑な生体作用のメカニズム、EDCsにおける「毒性」の捉え方、EDCsの検出方法などについて概説している。

Keywords: endocrine disrupting chemicals, reproductive toxicity, hormone receptors

菅野 純: 内分泌攪乱化学物質についてー生物学的立場からー

有機合成化学協会誌, 57, 35-39 (1999)

内分泌攪乱化学物質(EDCs)に関して、野生生物やヒト

への影響, これまでに解明された点, そのメカニズム, 及び in vivo, in vitro 試験系, 神経内分泌免疫系への影響など全般にわたり, わかりやすく解説を行った。

Keywords: endocrine disrupting chemicals, hormone receptors, signal transduction systems

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質について—生物影響の立場から—

ビルと環境, 84, 10-15 (1999)

内分泌かく乱化学物質とは何か, どういう現象が問題となっているのか, その試験法などについて一般向けに解説した。

Keywords: endocrine disrupting chemicals, hormone receptors, the estrogen window

平林容子, 井上 達: 老年医学の展望「環境ホルモン」—内分泌かく乱化学物質による障害機構の考え方—

日老医誌, 35, 873-87 (1998)

内分泌かく乱化学物質の生体作用の特徴, その対象として想定されている化学物質, ならびに現時点での問題点について概説した。

Keywords: aging, receptor function, endocrine disrupting chemicals

大野泰雄: 医薬品の一般薬理作用と薬物動態の位置づけ (2) 薬物動態試験

日薬理誌, 113, 41-45 (1999)

医薬品の評価における薬物動態試験結果の意義について解説した。特に, in vitro 試験結果の in vivo への外挿, 動物実験からヒトへの外挿, および薬物動態の関連する薬物相互作用予測において重要である。薬物動態試験の結果にもとづいて, 薬理試験で検出された作用が患者で本当に現れるのかどうか判定される。これは医薬品の審査に不可欠な臨床での作用機序推定に極めて重要であるだけでなく, 病態に応じた医薬品の選択や併用時の薬力学的相互作用の予測にも重要である。

Keywords: Pharmacokinetics, evaluation, new drug

大野泰雄: 動物実験代替法の現状と OECD ガイドラインに関するワークショップ 1) イントロダクションと代替法の現状

Altern. Animal Test. Experiment., 5, 241-244 (1998)

動物実験代替法の理念, その社会的背景, 行政的受け入れについて解説した。また, 眼刺激性試験代替法および代替法のバリデーションのあり方についての OECD の考え方について解説した。

Keywords: alternative method, validation, OECD

下山正徳, 大橋靖雄, 西條長宏, 島田安博, 鶴尾 隆, 吉田茂昭, 浅野茂隆, 有吉 寛, 江口研二, 大野泰雄, 佐々木康綱, 杉山雄一, 福岡正博, 矢守隆夫: 抗悪性腫瘍薬の第 I 相試験のガイドライン

薬理と治療, 26, 441-454 (1998)

厚生科学研究として行われた抗悪性腫瘍薬の第 I 相試験に関するガイドライン適正化研究班の成果をまとめた。また, 新規抗悪性腫瘍薬の第 I 相試験における基盤整備の必要性, 例えば医薬品機構の治験相談制度の充実とその活用や我が国で第 I 相試験が行われた抗悪性腫瘍薬の学術情報のデータベース化とその情報公開の必要性, また, 実施施設及び治験責任医師の条件および第 I 相試験実施上の注意についてのガイドラインの考え方について解説した。

Keywords: guideline, anticancer drug, Phase study

井上和秀: 陽イオンチャネル内蔵型 ATP 受容体 生体の科学, 49, 326-328 (1998)

陽イオンチャネル内蔵型 ATP 受容体の種類とそれぞれに対するアゴニストおよびアンタゴニストについて概説した。

Keywords: ionotropic ATP receptors, agonist, antagonist

井上和秀: G 蛋白共役型 ATP 受容体 生体の科学, 49, 351-353 (1998)

G 蛋白共役型 ATP 受容体の種類とそれぞれに対するアゴニストおよびアンタゴニストについて概説した。

Keywords: metabotropic ATP receptors, agonist, antagonist

Inoue, K.: The functions of ATP receptors in the hippocampus

Pharmacol Res., 38, 323-331 (1998)

ATP 受容体の海馬における機能について概説した。

Keywords: functions, ATP receptors, hippocampus

Inoue, K.: ATP receptors for the protection of hippocampal functions.

Jpn. J. Pharmacol., 78, 405-410 (1998)

ATP 受容体の海馬機能保護作用の可能性について概説した。

Keywords: functions, ATP receptors, hippocampus

井上和秀, 上野伸哉, 小泉修一, 津田 誠: ATP 受容体 シグナル伝達系と創薬

日本薬理学雑誌, 112 補冊 1, 36p-40p (1998)

ATP 受容体の情報伝達系について新知見を述べ, 創薬の可能性について論じた。

Keywords: ATP receptors, signal transduction, drug

Mitsumori, K.: A Japanese view on a global toxicology testing program before ICH1 and ICH4

Toxicol. Letters, 103, 557-560 (1998)

8 年間にわたる医薬品についての国際ハーモナイゼーション会議 (ICH) での討議により, 医薬品の毒性評価についての多くの未調和な部分が解決された。ICH1 以前の我が国の毒性試験ガイドラインと ICH4 後のガイドラインでは, 以下の点が明らかに異なっている。(1) 繁殖毒性試験では交配前期間が短縮した。(2) 非げっ歯類の慢性毒性試験の投与期間が 9 ヶ月となった。(3) 新しくトキシコカインテックスのガイドラインが制定された。(4) がん原性試験において用量設定法が新たに大幅に変更され, さらに, 従来のマウスのがん原性試験に代わり短期代替動物試験が発癌性評価に追加された。今後, 我が国は ICH の基本概念に従って, 科学的根拠の重要度に応じた毒性評価を採用するが, 新しいガイドラインをさらに理解するためには未だ未解明な点が多く残されているため, 行政当局は当分の間はフレキシブルな対応が必要であろう。

Keywords: ICH, Test guideline, Japanese regulation

高橋道人: 最近の発がん性評価法について

マイコトキシン, 第 47 号, 1-7 (1998)

現在までの発がん性試験の知見の蓄積, 発がんメカニズムの解析, 変異原性試験の改良等に伴い, 発がん性を示す物質は, 大別して直接遺伝子を傷害する遺伝子傷害性発がん物質と直接には遺伝子に作用しない非遺伝子傷害性発がん物質とに分けられる。

ん物質の存在することが明らかとなってきた。この総説では、医薬品として開発される非遺伝子傷害性発がん物質の発がん性評価法に関する国際的な合意にあわせて、その発がんメカニズム研究の重要性について、実際の例を挙げて解説した。

Keywords: carcinogenicity, non-genotoxic carcinogen, kojic acid

高橋道人：変わりつつある発がん性評価法

FOODS & FOOD INGREDIENTS JOURNAL OF JAPAN, No. 175, 2-4 (1998)

1997年に開催された医薬品申請国際ハーモナイゼーション会議において、非遺伝子毒性発がん物質の発がん性評価法に関して、1種類の長期試験と現在開発中の各種の in vivo 短・中期発がん性試験法を組み合わせたという方法が日・米・欧間で合意され、ステップ4に到達した。この総説では、短・中期発がん性試験法として有望と考えられている二段階発がん中期検索法、トランスジェニック動物を用いる検索法、新生仔動物を用いる検索法について、それらの利点及び将来の展望について概説した。

Keywords: non-genotoxic carcinogen, medium-term carcinogenicity study, transgenic mouse

三森国敏：食品に含まれる化学物質の安全性評価

日本食品衛生学雑誌, 40, 1-6 (1998)

国際連合の食品規格委員会 (CAC) では、食品中の化学物質の安全性評価は以下のように実施されている。(1) 一日摂取許容量 (ADI) は、収集可能な毒性学的情報から、ヒトが生涯にわたって摂取しても有害作用が発現しないと考えられる化学物質の食品中残留の一日あたりの最大摂取量と定義されている。通常、各種の毒性試験成績を総合的に評価して、実験動物に対する無影響量 (NOEL) を求め、安全係数で除して、ADI が算出される。(2) 最大残留基準値 (MRL) は、食品中における農薬ないし動物薬の許容できる最大残留濃度である。動物薬については、残留物がすべて抽出可能な場合は、適正動物薬規範に従って使用された動物薬の食品中残留濃度、ADI および分析限界値を考慮して MRL が設定される。(3) 理論的最大の一日摂取量 (TMDI) は、農薬の場合、ある食品中の残留農薬の摂取量は、その食品中の残留量にその食品の消費量を乗じ、全ての食品の摂取量を合計してその全摂取量が算定される。この TMDI が ADI より少ない場合、その薬物の食品中への使用が許可される。

Keywords: ADI, MRL, TMDI

三森国敏, 黒川雄二：遺伝子改変動物を用いた短期発がん性試験法の国際的動向

J Toxicol Sci., 23,3, App.107-111 (1998)

遺伝子改変動物を用いた短期発癌試験モデルを発癌性評価の一つとして用いることが新しい ICH ガイドラインとなった。rasH2 マウスモデルは我が国で、TG.AC マウスと p53 (+/-) マウスは米国でそれぞれ有用性に関する実験が実施されており、ILSI を中心としてその検証作業を行っている。TG.AC マウスは発癌物質、p53KO マウスは遺伝毒性発癌物質の発癌性の検索に有用な実験動物であり、rasH2 マウスは遺伝毒性発癌物質の検出に有用であることが示唆されている。しかし、rasH2 マウスはその発癌感受性が母体であるマウスに影響される可能性があるため、その有用性をさらに評価すべきである。p53KO マウスは一部の既知遺伝毒性発癌物質に感受性が低いため、発癌誘発メカニズムの検討が必要である。現時点では、rasH2 および p53KO マウスにおいても全ての発癌物質を検索できないことから、ICH

ガイドラインでは発癌物質の検出を見逃す可能性がある。従って、それぞれの短所を考慮して発癌物質により2種類以上の短期発癌試験も考慮すべきである。

Keywords: ICH guideline, transgenic mouse, carcinogenicity

渋谷 淳, 高橋道人：ダイオキシンと発がん
癌の臨床, 44, 1517-1522 (1998)

ダイオキシン類の発がん性に関しては多数の報告があるが、その殆どは2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) に関するものである。現在まで、主にラットおよびマウスにおいて2,3,7,8-TCDDの長期発がん性試験が実施されており、多数の臓器、組織で発がん性が示されている。また2,3,7,8-TCDD他のダイオキシン類についていくつかの臓器で二段階発がん性試験が行われており、いくつかの臓器で明らかに発がんプロモーション作用が認められている。その他のダイオキシン類化合物については長期発がん性の検討は不十分であり、現在まで hexachlorodibenzo-p-dioxin (HxCDD) の異性体の混合物、2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin などにおいて発がん性が確認され、dibenzo-p-dioxin では発がん性を認めていないとの報告があるのみである。また、polychlorinated dibenzofuran 類の長期発がん性試験は行われていない。2,3,7,8-TCDDの発がんプロモーション作用は aryl hydrocarbon (Ah) レセプターを介した多数の遺伝子群の発現の変化によると考えられており、細胞増殖ないしは二次的な遺伝子変異を引き起こす非遺伝子毒性発がん物質と考えられている。

Keywords: 2,3,7,8-TCDD, carcinogenicity, non-genotoxic carcinogen

古川文夫, 西川秋佳：食器からのビスフェノール A の溶出

日本医事新報, 3872, 115-116 (1998)

ビスフェノール A を原材料としたポリカーボネートは食器や包装用フィルムなどに広く使用されている。食器などからの溶出試験の結果を紹介し、食品衛生法の基準に適合した食器であれば、通常の使用方法ではほとんど溶出しな

Keywords: bisphenol A, polycarbonate

松村外志張*1, 梅田 誠*2, 佐藤敬喜*3, 柴沼質子*4, 田中憲徳, 蓮村 哲*5, 秦 宏樹*6, 平井玲子*7, 増井 徹, 宇都木 伸*8: 非医療分野におけるヒト組織・細胞の取り扱いについて—とくに組織培養研究での取り扱いを中心とした法・倫理・安全視点からの基本的遵守事項と自主ルール構築のための参考事項—

Tiss. Cult. Res. Commun., 17, 117-171 (1998)

ヒトに由来する組織、あるいは細胞を扱う場合の倫理問題についての大枠の原則を検討、整理し、勧告という形で倫理原則を示している。この報告書の特徴は、情報開示、公開討論の原則を元にそれぞれの企業体 (大学、研究機関、企業等) が責任をもって独自の倫理審査を行うことを奨励している点にある。

Keywords: human tissue, ethical issue, biosafety

*1 明治乳業 (株) 細胞工学センター

*2 食品薬品安全センター 秦野研究所

*3 第一製薬 (株) 医薬開発第四部

*4 昭和大学薬学部

*5 東京慈恵会医科大学

*6 北里大学医学部

*7 東京都臨床医学総合研究所

*8 東海大学法学部

祖父尼俊雄: Genotoxicity の翻訳は遺伝毒性でよいのか?
Environ. Mutagen Res., 20, 69-70 (1998)

OECD, WHO, IARC などの国際機関から出される正式文書などに, genotoxicity, genotoxic, genotoxin という言葉が近年多用され, それが翻訳されて「遺伝毒性」という言葉が使われるようになってから, いささか混乱が生じてきているように感じられる。そこで, genotoxicity の訳語として「遺伝子毒性」を用いることを提案したい。場合によっては「遺伝子障害性」という言葉で置き換えてもよいだろう。その意味するところは遺伝子突然変異, 染色体異常, DNA 損傷など全ての DNA に対する影響を包括し, あらゆる生物系での細胞から細胞, あるいは個体から次世代の個体への伝達を含めた概念である。しかし逆に親から子に伝わる影響としての「遺伝毒性」に対応する英語訳や, 別な問題提起として genotoxicity と mutagenicity の定義の問題があり, 今後の議論を期待する。

Keywords: genotoxicity, mutagenicity, terminology

水沢 博: JCRB/HSRRB 細胞バンク培養細胞研究資源データベース

蛋白質核酸酵素, 43, 2015-2019 (1998)

培養細胞は, 現代生物学・医学・薬学研究に必須な研究資源である。この資源の特徴は生きていること及び人工的な培養条件下でしか生存し得ないという点であり, 資源として分譲を前提とした保存と管理は大変に手間と暇がかかる仕事である。そのため, これを独立した研究支援組織として整備することが重要であると認識され, 我国では多くのヨーロッパ・アジア諸国に先駆けて, 厚生省細胞バンクが設立されることになった。培養細胞研究資源は, 多くの研究者に使われて初めて有効な資源として機能することは自明であるが, そのためには多くの研究者の目に触れるところに情報が提供される必要がある。細胞バンクでは 1984 年設立当初よりパーソナルコンピュータをいち早く導入して効率の良い細胞管理システムを構築した。現在, インターネットが整備され様々な情報の提供が容易になったが, 今回, 培養細胞データベースの内容を効率よく WWW 情報に変換して提供することに成功した。特に, 実際に資源を保有し, その品質管理を実施している特徴を生かして, 基本的な細胞の特性データに加え, 文献データ, 画像データを含む品質を示す生データを公開する情報提供システムを構築した (<http://cellbank.nihs.go.jp/>)。

Keywords: JCRB/HSRRB Cell Bank, database, WWW

広瀬明彦, 長谷川隆一, 黒川雄二: ダイオキシンの生体毒体

J. Toxicol. Sci., 23, app.93-106 (1998)

ダイオキシン類の生体へ及ぼす影響を最近のレビューや厚生省や環境庁の発表した中間報告などをもとに実験動物およびヒトに対する毒性や Ah レセプターと相互作用をまとめた。さらに, TEF (毒性等価係数) の概念を解説すると共に, 最近の国際機関での再評価 (IARC で TCDD を Group I 「ヒトに対して発がん性物質である」に分類したことや, WHO/EURO・IPCS で TCDD の TDI を 1~4 pg TEQ/kg bw/day と設定したこと) について解説した。

Keywords: Dioxins, TDI

長谷川隆一, 中館正弘, 黒川雄二: OECD 化学物質対策の動向

J. Toxicol. Sci., 24, app.11-19 (1999)

経済協力開発機構 (OECD) における化学物質対策の意義, 組織, 活動状況を紹介するとともに, 主な活動内容と

して, テストガイドライン, GLP, 上市前最小安全性データセット, 既存化学物質対策について解説した。特に, 高生産量化学物質安全性点検計画については, その目的, 成り立ち, 初期評価文書の内容, 進捗状況, さらにヒトの健康影響評価についてはその考え方と評価方法を示した。初期評価に必要な最小のデータセットは物理化学的性状 5 項目, 暴露関連 3 項目, 環境中運命 3 項目, 生態毒性 4 項目, 毒性関連 4 項目 (急性毒性, 反復投与毒性, 遺伝毒性 2 種, 生殖・発生毒性) である。

Keywords: OECD, high production volume chemicals, initial risk assessment

長谷川隆一, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 菅野誠一郎*¹, 福岡康之臣*², 高月峰夫*³, 中館正弘, 黒川雄二: OECD 化学物質対策の動向 (第 2 報)

J. Toxicol. Sci., 24, app.85-92 (1999)

第 7 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議において, 日本から提出した 4 化学物質の初期評価文書案のうち, 討議の結果その評価案に合意の得られたジフェニルクレジルリン酸, ジクロロペンタジエンおよび (1-メチルエチニル) ベンゼンの評価文書について, 健康影響リスク評価部分の要点をまとめて紹介した。いずれの化学物質もそれらの毒性の程度と暴露状況から現時点ではこれ以上の試験や行政対応は必要ではないと判断された。

Keywords: diphenyl cresyl phosphate, dichloropentadiene, (1-methylethenyl) benzene

*¹ 労働省産業医学総合研究所

*² 社団法人日本化学工業協会 化学物質総合安全管理センター

*³ 財団法人化学品検査協会 安全性評価技術研究所

小泉睦子, 長谷川隆一: 内分泌かく乱化学物質の検出法
食品衛生学雑誌, 40, J-203-207 (1999)

現在までに行なわれてきた内分泌かく乱化学物質の検出法のうち, 哺乳動物に対する作用を検出するための主な方法を, 実験例を含め簡単に紹介した。最後に, 各国および OECD などの国際機関で検討されている内分泌かく乱化学物質の試験法について解説した。

Keywords: endocrine disruptors, detection methods, estrogenic activity

Inoue H.: Good Clinical Practice in Japan: Current Status and Future Perspectives

Drug Information Journal, 32, 1213S-1216S (1998)

我が国における治験環境の変化とその問題点及び将来の展望について国外の臨床開発担当者や規制当局へ向けて概説した。

まず, 平成 9 年 4 月から施行された新 GCP とそれまでの旧 GCP の相違点について説明し, 新 GCP の施行のために臨床現場はどのような課題を抱えているのかを解説した。それとともに, これらの課題へ向けた規制当局の取り組みと, 外国臨床試験データの受け入れを踏まえた我が国の治験の将来展望を示した。

Keywords: GCP, Informed Consent, Foreign Clinical Data

森本和滋: コモン・テクニカル・ドキュメントについて
—品質分野—

医薬品研究, 30, 45-59 (1999)

申請技術資料の共通化をめざすコモン・テクニカル・ドキュメント (CTD) の目的, 歴史, フィービリティスタディ, 品質固有の問題点, 日本の審査制度などを紹介した。

さらに、第1回会議で化成品のタスクフォースとして①原薬の製造方法、②製剤の製造方法、③容器/栓が設定されたこと。第2回会議では、バイオのグループも参加したことやその後の化成品の進捗状況についても言及した。また、1998年12月時点でのCTD-Qの議論のポイントについても整理した。

Keywords: Common Technical Document (CTD), Quality

Fujiwara, Y.: MD reviewers' role in the new anticancer drug approval process in the newly established Japanese regulatory agency, PMDEC (Pharmaceuticals and Medical Devices Evaluation Center).

Jpn. J. Clin. Oncol., 28, 653-656 (1998)

医薬品医療機器審査センター(審査センター)の設立の経緯と新医薬品の承認審査における厚生省審査管理課、医薬品機構、審査センターのそれぞれの役割を解説すると共に、臨床医が医薬品の承認審査に参画して感じた、現在の抗癌剤承認審査、臨床試験並びに癌治療の現況に対する問題点とその解決策の提言を述べた。

Keywords: anticancer drugs, new drug approval, PMDEC

藤原康弘：日本における抗癌剤の承認審査

癌と化学療法, 26, 196-203 (1999)

医薬品の承認審査等における専門性、透明性を高め、審査体制を強化するとともに、医薬品医療機器の安全対策のみならず、医療の面を含めた幅広い安全対策を推進するため、平成9年7月1日をもって、薬務局を中心とした厚生省内部部局及び国立衛生試験所の組織再編が行われた。薬務局は医薬安全局へと改組され、審査担当部門は審査管理課と、旧国立衛生試験所が改組されてできた国立医薬品食品衛生研究所に所属する形で新設された医薬品医療機器審査センター(略称、審査センター)の二部門が担うこととなった。さらに審査に関連して、厚生省は医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構(略称、医薬品機構)に適合性調査(書面調査と実地調査)を委託している。審査センターには、旧薬務局での審査経験者に加えて、薬学、毒性学、生物統計学、臨床医学等を専攻した審査担当官が新たに採用され、これまでより専門性・科学性の高い審査体制の構築を目指している。

Keywords: anticancer drugs, new drug approval, PMDEC

斎藤博幸：生体エマルジョン“血漿リポ蛋白質”の構造と代謝

膜(MEMBRANE), 23, 120-125 (1998)

生体内でのリポ蛋白質の代謝が、その表面脂質組成やコア脂質の構造と密接に関連していることを、リポ蛋白質粒子モデルとして脂質エマルジョンを用い、その構造評価、表面アポリポ蛋白質結合性、動物体内での代謝挙動等から明らかにした。

Keywords: lipoproteins, emulsions, apolipoproteins

岡田敏史：日本薬局方一般試験法への熱分析法の採用について

熱測定, 25, 84-85 (1998)

日本薬局方一般試験法として「熱分析法」が採用されることになり、その内容は日本薬局方フォーラム(JPF, 6-4, 1, 1997)において公表(内示)された。

本試験法(案)作成の経緯及び日局「熱分析法」の概要について解説した。

Keywords: Thermal Analysis, Japanese Pharmacopoeia

外海泰秀：フィリピン農薬モニタリング体制改善計画－短期専門家を見た JICA の ODA 活動－

食品衛生研究, 48 (7), 39-55 (1998)

フィリピンと日本の間に平成9年4月から5カ年計画で始まった当該プロジェクトに短期専門家として2ヶ月半出張したので、その目的・計画等を紹介するとともに、プロジェクト活動実施上の問題点などを解析した。本プロジェクトにおける日本側の協力分野は、次の5課題である。1) 残留農薬及び農薬製剤についての分析技術の改善、2) 作物残留試験手法の改善、3) 農薬残留モニタリングのためのマーケットバスケット調査手法の改善、4) 農薬最大残留基準の設定手法の関係機関への情報の提供、5) 農薬の安全な取り扱い及び適正使用の普及のための関係機関への情報の提供。

Keywords: Philippine, pesticide, JICA

熊谷健夫：オケラについて

薬用植物研究, 1998年1号, 31-34 (1998)

オケラ *Atractylodes japonica* およびホソバオケラ *A. alncea* の来歴や古くからの利用方法、成分等について述べ、ホソバオケラの栽培方法について概説した。

Keywords: *Atractylodes japonica*, *Atractylodes lancea*, cultivation method

- Yoshioka, S.: "International Stability Testing", ed. by Mazzo, D.J., Interpharm Press, Illinois (1999) Chapter 11, pp.255-264.
- Nakahara, Y.: "Effects of Physicochemical Factors on Incorporation of Drugs into Hair and Behavior of Drugs in Hair Root", ed, Mieczkowski, T., CRC Press, New York (1999) pp.49-72.
- Nakahara, Y.: "Guidelines for Testing Drugs Under International Control in Hair, Sweat and Saliva", United Nations Publication, New York (1999) pp.1-23.
- 林 譲, 松田りえ子: "HPLC 分析の精度", 林純薬工業, 大阪 (1999)
- 新谷英晴: "生物指標並びにバイオバーデン菌を用いた滅菌保証, 滅菌バリデーションの実際", 新谷英晴監修, 薬業時報社, 東京 (1998) pp.1-29
- 新谷英晴: "これからの滅菌バリデーション, 医療用具機器における GMP バリデーションの実際", 村上謙吉監修, 技術情報協会, 東京 (1998) pp.1-7
- Shintani, H.: "Absorption and its Application in Industry and Environmental Protection. Studies in Surface Science and Catalysis, Vol.120", Selective Retention, Removal and Elution of Hazardous Compounds in Biological Fluids to Maintain Human Health, ed, Dabrowski, A., Elsevier Science, Amsterdam (1998) pp.77-109
- 佐藤道夫: "バイオマテリアルと生体-副作用と安全性-", XII. 医療用具の開発と安全性評価法 D. 溶出試験, 佐藤温重, 石川達也, 桜井靖久, 中村晃忠編, 中山書店, 東京 (1998) pp.432-437
- Tsuchiya, T., Sayed Md. Abu and Nakamura, A.: "Animal Cell Technology", Tumor promoting mechanism of biomaterials: No involvement of mutation in cx43 gene in the tumorigenesis induced by polyurethanes in vitro, eds, Ikura, K., Nagao, M., Masuda, S. and Sasaki, S., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1999) pp.181-185
- 中村晃忠: "医療用高分子材料の開発と応用", 第8章医療用高分子の安全性評価, 中林宣男監修, シーエムシー, 東京 (1998) pp.255-268
- 中村晃忠: "バイオマテリアルと生体-副作用と安全性-", 佐藤温重, 石川達也, 桜井靖久, 中村晃忠編, 中山書店, 東京 (1998) pp.395-420
- 安藤正典, 西村哲治: "バイオアッセイ 水環境のリスク管理", 鈴木基之, 内海英雄編, 講談社, 東京 (1998) pp.14-41
- 埴岡伸光, 神野透人: "バイオアッセイ 水環境のリスク管理", 鈴木基之, 内海英雄編, 講談社, 東京 (1998) pp.55-70
- 安藤正典: "水のリスクマネジメント実務指針", 土屋悦輝, 中室克彦, 酒井康行編集, サイエンスフォーラム, 東京 (1998) pp.22-35, 127-134, 437-444
- 西村哲治: "水のリスクマネジメント実務指針", 土屋悦輝, 中室克彦, 酒井康行編集, サイエンスフォーラム, 東京 (1998) pp.110-121
- 神野透人: "水のリスクマネジメント実務指針", 土屋悦輝, 中室克彦, 酒井康行編集, サイエンスフォーラム, 東京 (1998) pp.122-126
- 松田りえ子: "内部精度管理", 林純薬工業株式会社, 大阪 (1998)
- 山田 隆: "改訂食品衛生学", 管家祐輔編著, 光生館, 東京 (1999) pp.19-24, pp.139-159
- 石綿 肇: "くらしの豆知識'99", 食品添加物の基礎知識, 国民生活センター, 東京 (1998) pp.180-181
- Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T.: "Metallothionein IV", Phytochelatins (class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in root cultures of *Rubia tinctorum* L., ed, Klaassen, C.D., Birkhäuser Verlag, Basel (1999) pp.201-205
- 河村葉子他: "食品安全性辞典", 小野 宏, 小島康平, 斎藤行生, 林 裕造監修, 共立出版, 東京 (1998) pp.172-173, p.344
- 小沼博隆, 今井中平, 江口郁男, 佐藤静夫, 品川邦汎, 中村雅之他: "鶏卵・鶏肉のサルモネラ全書" 第5章鶏卵の処理・加工におけるサルモネラ汚染対策, 鶏病研究会編, 日本畜産振興会, 東京 (1998.5) pp.88-114
- 小沼博隆, 一島英治, 大沢俊彦, 鈴木寛一, 須田浩行, 豊田正武, 三瀬勝利, 森 国光, 森地俊樹他, 保坂秀明編: "食品製造・流通データ集" 第1編原材料, 飲料水の基準, 産業調査会辞典出版センター, 東京 (1998.7) pp.151-161
- 関沢 純: "ダイオキシンと環境ホルモン", ダイオキシンと環境ホルモナー問題の広がりと対応のありかた, 日本化学会編: 富永 健, 関沢 純, 松本和子監修, 東京化学同人, 東京 (1998) pp.1-30
- 池田正之, 川島邦夫, 関沢 純, 高仲 正, 林 裕造, 藤森観之助監訳: "食品中の残留農薬における毒性評価の原則", Environmental Health Criteria 104, "Principles for the Toxicological assessment of Pesticide Residues in Food" International Programme on Chemical Safety, 日本食品衛生協会, 東京 (1998) pp.208
- 関沢 純 編集協力: "食品安全性辞典", 小野 宏, 小島康平, 斎藤行生, 林 裕造 監修, 共立出版(株), 東京 (1998) pp.505
- Inoue, K. and Koizumi, S.: "Ca ion modulators The new wave of psychotropic drugs, ATP receptors in psychosis." ed, Inoue, K. and Watanabe, Y., harwood academic publishers, Amsterdam (1998) pp.199-213
- Uneyama, H., Uchida, H., Maeda, K., Yoshimoto, R., Watanabe, Y. and Inoue, K.: "Ca ion modulators The new wave of

psychotropic drugs, Non-L-type actions of organic Ca²⁺ channel blockers: Implications for Na⁺ and N-type Ca²⁺ channel blockades." ed, Inoue, K. and Watanabe, Y., harwood academic publishers, Amsterdam (1998) pp.13-23

Inoue, K., Koizumi, S., Nakazawa, K. and Ueno, S.: "The adrenal chromaffin cell: Archetype and exemplar of cellular signalling in secretory control, Reciprocal regulation by zinc ion of ATP-receptors." ed, Kanno, T., Hokkaido University Press, Sapporo (1998) pp.133-142

井上和秀: "生化学辞典第3版", 東京化学同人 (1998) pp.198ほか

Nakazawa, K., Koizumi, S., Ito, K. and Inoue, K.: "Calcium Ion Modulators - The New Wave of Psychotropic Drugs" Selective inhibition by fluspirilene and pimozide of L-type Ca²⁺ channels, ed. Inoue, K. and Watanabe, Y., harwood academic publishers, Amsterdam (1998) pp.185-198

Mitsumori, K.: Evaluation of new models. I. Initiation and promotion models and the rasH2 mouse model, "Proceedings of the Fourth International Conference on Harmonization", ed., D'Arcy, P.F. and Harron, D.W.G., Queen's University of Belfast, N. Ireland. (1998) pp.263-272

Mori, H.* and Nishikawa, A.: Naturally occurring organosulphur compounds as potential anticarcinogens, "Nutrition and Chemical Toxicity", ed., Ioannides, C., John Wiley & Sons, Chichester (1998) pp.285-299

* 岐阜大学医学部

広瀬雅雄, 白井智之*: 抗酸化物質の安全性, "抗酸化物質のすべて", 吉川敏一編集, 先端医学社, 東京 (1998) pp.322-330

* 名古屋市立大学医学部

広瀬雅雄, 白井智之*: 天然抗酸化物質の発がん抑制および促進作用, 脂質栄養学シリーズ2, "脂質栄養と脂質過酸化", 日本脂質栄養学会監修 (奥山治美, 菊川清美編集), 学会センター関西, 大阪 (1998) pp.194-201

* 名古屋市立大学医学部

増井 徹: "実験医学別冊 バイオマニュアル UP シリーズ・新培養細胞実験法 第2章②培地の選択", 黒木登志夫・許南浩・千田和弘編, 羊土社, 東京 (1998) pp.27-32

水沢 博: "細胞バンク・遺伝子バンク 情報検索と研究資源の入手法", 日本組織培養学会 細胞バンク委員会編, 共立出版, 東京 (1998) pp.1-26, pp.62-71, pp.122-140, pp.142-166

藤原康弘: "抗癌剤の相互作用 抗癌性抗生物質 (ドキシソルピジンなど)", 杉山雄一、佐々木康綱 編, 医薬ジャーナル社, 東京 (1998) pp.163-179

Yomota, C., Okada, S.: Strong contraction of crosslinked hyaluronate gel by cationic drugs, "HYDROCOLLOIDS 2: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS IN BIOLOGY, MEDICINES AND FOOD." ed. Israelachvili, Elsevier Amsterdam (1999)

四方田千佳子他: "天然資源キチン・キトサンの活用法", 鈴木茂夫監修, 財界研究所, 東京 (1998)

外海泰秀: "食品安全性辞典", 小野 宏, 小島康平, 齋藤行生, 林 裕造監修, 共立出版, 東京 (1998)

Hosokawa, K.: "Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 43 Medicinal and Aromatic Plants XI", X *Hyacinthus orientalis* L.: In Vitro Culture and the Production of Anthocyanin and Other Secondary Metabolites", ed, Bajaj Y.P.S., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1999) pp.177-198

下村講一郎: "食品安全性辞典", 小野 宏, 小島康平, 齋藤行生, 林 裕造監修, 共立出版 (1998)

Ishimaru, K., Omoto, T., Murakami, Y., Asai, I., Yoshihira, K. and Shimomura, K.: "Recent Res. Devel. in Phytochem., Vol. 2, Rosmarinic acid and related phenolics in Lamiaceae and Boraginaceae", edited by S. G. Pandalai, Research Signpost, Trivandrum, India (1998) pp.1-10

向精神薬の分析法に関する研究：中原雄二，木倉瑠理，坂本知昭

委託研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省医薬安全局麻薬課に報告。

薬物中毒，薬害，農薬中毒等の予防と原因解明のための毛髪診断研究：中原雄二，木倉瑠理，坂本知昭

厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省大臣官房厚生科学課に報告。

医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究：佐藤温重¹，配島由二，徳永祐司，江馬 眞，本郷敏雄²

厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

¹ 昭和大学歯学部

² 東京医科歯科大学

医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究：土屋利江，中村晃忠，配島由二

厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

新課題医療廃棄物の処理システムの構築に関する研究：松島 肇¹，配島由二，保科定頼²

厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省生活安全局水道環境部計画課に報告。

¹ 浜松医科大学

² 東京慈恵会医科大学

感染性廃棄物中間処理における新技術の安全性および有効性に関する評価研究：配島由二，田中 勝¹，Ira Salkin²，Wayne Turnberg³，Edward Krisiunas⁴，竹内 敏⁵，矢島成倅⁶

厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省生活安全局水道環境部計画課に報告。

¹ 国立公衆衛生院廃棄物工学部

² ニューヨーク州保健局

³ ワシントン州保健局

⁴ スペクトラム

⁵ 日本産業廃棄物処理振興センター

⁶ セイコーインターナショナル

医療用具の適正使用に関する研究：佐藤道夫，澤 充¹，酒井順哉²

厚生科学研究（平成10年4月～平成12年3月），平成11年4月厚生省安全対策課へ報告。

¹ 日本大学医学部

² 名城大学都市情報学部

抗菌剤の1-プロモ-3-エトキシカルボニルオキシ-1,2-ジアイオド-1-プロベンの分析法策定：五十嵐良明，鹿庭正昭，中村晃忠

家庭用品等調査研究費（平成10年4月～平成11年3月），平成11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。

抗菌剤の10,10-オキシ-ビス（フェノキシアルシン）の分析法策定：五十嵐良明，鹿庭正昭，中村晃忠

家庭用品等調査研究費（平成10年4月～平成11年3月），

平成11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。

Hiba oil, 2,3,5,6-tetrachloro-4- (methylsulfonyl) pyridine, N-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine 及び zinc butylxanthate の細胞毒性：五十嵐良明，鹿庭正昭
家庭用品等調査研究費（平成10年4月～平成11年3月），平成11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。

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，濱田実香，安藤正典
環境庁環境保全費（平成10年4月～平成11年3月），平成11年5月環境庁大気保全局自動車環境対策第二課に報告。

キザロホップエチル試験法：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10年4月～平成11年3月），平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

残留農薬告示分析法の見直しに関する研究：佐々木久美子，松田りえ子，豊田正武
食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

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
厚生科学特別研究事業（平成10年4月～平成11年3月），平成11年3月厚生省厚生科学課に報告。

食品中パツリン分析法の改良と汚染実態調査：穂山 浩，合田幸広，豊田正武
食品等の規格基準の設定等に係わる試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成11年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

アフラトキシンの告示試験法の改良に関する研究：合田幸広，穂山 浩，豊田正武
厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成10年4月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

モロヘイヤ中の digitoxigenin 配糖体の分析に関する研究：合田幸広，穂山 浩，豊田正武
食品等の規格基準の設定等に係わる試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成11年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

原因不明の中毒事故における情報提供体制のあり方と発生初期の分析法に関する研究：重金属：山田 隆
厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11年3月厚生省厚生科学課に報告。

北海道薫製マス中の一酸化炭素濃度：山田 隆，石綿 肇，川崎洋子
食品添加物規格基準設定費（平成10年4月～平成11年3月），平成10年12月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

マグロの赤色度変化について：山田 隆，石綿 肇，川崎洋子
食品添加物規格基準設定費（平成10年4月～平成11年3月），

月),平成11年1月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

1996年度(平成8年度)の食品中の食品添加物の行政試験結果を基にした保存料の摂取量の推定:石綿 肇,杉田たき子,川崎洋子,武田由比子,西島基弘¹,深澤喜延²
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

¹ 東京都立衛生研究所

² 山梨県衛生公害研究所

スクラロースの規格案について:山田 隆,石綿 肇,武田由比子,川崎洋子,杉田たき子
食品添加物規格基準設定費(平成10年4月~平成11年3月),平成11年1月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

アセシルファムカリウムの規格案について:山田 隆,石綿 肇,武田由比子,川崎洋子,杉田たき子
食品添加物規格基準設定費(平成10年4月~平成11年3月),平成11年1月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

天然保存料の抗菌活性と主成分に関する試験結果:杉本直樹,米谷民雄,山田 隆
食品添加物規格基準設定費(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究(文献調査による最新の研究情報と現段階での結論):米谷民雄,齋藤博士^{*},佐藤恭子
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

^{*} 国立相模原病院

食品添加物の規格設定のための検討:米谷民雄,佐藤恭子,小見邦雄¹,川村 洋²
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

¹ 日本食品添加物協会

² 日本香料工業会

タバコの葉の添加物の分析:山田 隆,杉本直樹,米谷民雄
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

ポリスチレン製器具・容器等のスチレンダイマー及びトリマーに関する研究:山田 隆,河村葉子
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ゴム製器具中の残存化学物質に関する研究—シリコーンゴム—:河村葉子,渡辺悠二^{*}
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

^{*} 東京都立衛生研究所

缶コーティングから飲料へのビスフェノールAの移行について:河村葉子,山田 隆
容器包装等試験検査費(平成10年4月~平成11年3月),平成11年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

体外診断用医薬品標準化調査班報告:河合 忠¹,梅本雅

夫²,大澤 進³,菅野 剛⁴,桑 克彦⁵,中原一彦⁶,澤田純一,瀬戸四郎⁷,谷山忠義⁸
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年4月厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

¹ 国際臨床病理センター

² 福祉・医療技術振興会

³ 千葉大学医学部

⁴ 浜松医科大学

⁵ 筑波大学医療技術短期大学部

⁶ 東京大学医学部

⁷ 日本臨床検査薬協会

⁸ 国立感染症研究所

食品中化学物質の相互作用に関する調査研究—アレルギーモデルを用いた化学物質の複合投与に関する研究:小野宏^{*},小島幸一^{*},金沢由基子^{*},澤田純一,手島玲子
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年4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

放射線医療用施設の管理における評価基準の指標に関する研究:澤田純一,古賀佑彦¹,菊地 透²
厚生科学研究(平成10年4月~),平成11年4月厚生省医薬安全局安全対策課に報告。

¹ 藤田保健衛生大学

² 自治医科大学

放射線照射器具の品質確保に関する研究:池淵秀治,浜田達二^{*}
厚生科学研究(平成10年4月~),平成11年4月厚生省医薬安全局監視指導課に報告。

^{*} 社団法人日本アイソトープ協会

調理施設と食品製造業における衛生管理に関する研究:小沼博隆,品川邦汎^{*}
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年5月),平成11年5月厚生省保健医療局結核感染症予防課に報告。

^{*} 岩手大学

調理施設におけるドライシステムによる微生物制御の有用性評価に関する研究:小沼博隆,丹野憲二^{*}
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年5月),平成11年5月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

^{*} 日本食品分析センター

微生物の汚染実態に関する研究:小沼博隆,金子誠一¹,増田高志²,後藤公吉³,正木宏幸⁴
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年5月),平成11年5月厚生省生活衛生局食品保健課に報告。

¹ 東京都衛生研究所

² 静岡県環境衛生科学研究所

³ 新潟県保健環境科学研究所

⁴ 埼玉県衛生研究所

内分泌かく乱物質等,生活環境中の化学物質による健康リスクの評価における不確実性の解析に関する研究:関沢純,西川秋佳,三森国敏,今井 清¹,吉田喜久雄²
厚生科学研究(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局企画課に報告。

¹ 食品薬品安全センター秦野研究所

² 三菱化学安全科学研究所

化学物質のリスクコミュニケーション手法検討調査：浦野 紘平¹，関沢 純，北野 大²，長島 実³
日本化学会平成 10 年度環境庁受託研究（平成 10 年 4 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 3 月環境庁環境保健部環境安全課に報告。

¹ 横浜国立大学

² 淑徳大学

³ 協和発酵工業（株）

毒劇物中毒事件に関する研究：山本 都，黒木由美子¹，屋敷幹雄²，奈女良昭²，植木眞琴³，陰山信二³
厚生科学研究（平成 10 年 9 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 4 月厚生省医薬安全局安全対策課に報告。

¹（財）日本中毒情報センター

² 広島大学医学部

³ 三菱化学 BCL

F344 ラットによるペカンナツ色素の 90 日間反復混餌投与毒性試験：関田清司，斉藤 実，内田雄幸，小野 敦，小川幸男，降矢 強，金子豊蔵，井上 達
食品添加物安全性再評価費（平成 7 年 4 月～8 年 3 月），平成 10 年 8 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ヘマトコッカス藻色素の 90 日間反復混餌投与毒性試験：小野 敦，関田清司，斉藤 実，梅村隆志，小川幸男，降矢 強，金子豊蔵，井上 達
食品添加物安全性再評価費（平成 7 年 4 月～8 年 3 月），平成 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

放射線及び化学物質による細胞障害機構の検討とリスクアセスメント系の開発「遺伝子改変動物におけるテロメア及びテロメアーゼの変化を指標にした研究」（中間報告）：井上 達，小野 敦，平林 容子，北嶋 聡
国立機関原子力試験研究（平成 9 年 4 月～12 年 3 月），平成 10 年 12 月科学技術庁原子力局研究技術課に報告。

医薬品等の安全性確保の基礎となる研究－アポトーシスを指標とした遺伝子改変動物による毒性評価：井上 達，菅野 純，平林容子，北嶋 聡，斎藤 実，松島裕子，宮城 恵理，佐井君江，金子豊蔵，川崎 靖
厚生科学研究（平成 10 年 4 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 4 月厚生省医薬安全局安全対策課に報告。

in vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究：大野泰雄，田中 憲徳，高松 翼，安藤正典，森本雅憲
医薬安全総合研究事業（平成 10 年 4 月～平成 12 年 3 月），平成 11 年 4 月厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

“OECD Test Guideline 407 enhanced”案に基づく Flutamide のラット 28 日間反復投与毒性試験（最終報告）：広瀬雅雄，豊田和弘
平成 10 年度補正予算内分泌かく乱物質の人体影響に関する調査研究費，平成 11 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

“OECD Test Guideline 407 enhanced”案に基づく 17- α -methyltestosterone のラット 28 日間反復投与毒性試験（最終報告）：今沢孝喜，西川秋佳，古川文夫，広瀬雅雄
平成 10 年度補正予算内分泌かく乱物質の人体影響に関する調査研究費，平成 11 年 4 月厚生省生活衛生局食品化学課

に報告。

シソ抽出物の 90 日間毒性試験（最終報告）：小野寺博志，三森国敏，安原加壽雄，広瀬雅雄
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 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

キチンの 13 週間毒性試験（最終報告）：仁保直子，豊田和弘，畝山智香子，渋谷 淳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 9 年 4 月～平成 10 年 3 月），平成 11 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

オレンジ色素の 90 日間毒性試験（最終報告）：古川文夫，今沢孝喜，西川秋佳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 9 年 4 月～平成 10 年 3 月），平成 11 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

トコトリエノールの 90 日間毒性試験（中間報告）：古川文夫，今沢孝喜，西川秋佳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 10 年 4 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

没食子酸の 13 週間反復投与毒性試験（中間報告）：豊田和弘，畝山智香子，渋谷 淳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費，食品添加物安全性試験（平成 10 年 4 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 5 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ホコッシ抽出物の 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，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 10 年 4 月～平成 11 年 3 月），平成 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

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，広瀬雅雄
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 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

D-キシロースの亜慢性毒性試験（中間報告）：今沢孝喜，古川文夫，西川秋佳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 9 年 4 月～平成 10 年 3 月），平成 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

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（最終報告）：小野寺博志，三森国敏，安原加壽雄，広瀬雅雄
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 11 年 1 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

クチナシ青色素の F344 ラットにおける長期毒性・癌原性試験（最終報告）：今沢孝喜，古川文夫，西川秋佳，広瀬雅雄
食品添加物安全性再評価費（平成 6 年 4 月～平成 8 年 3 月），平成 10 年 9 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

ペクチン分解物の F344 ラットにおける慢性毒性・発癌性試験（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 11 年 3 月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

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,広瀬雅雄

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11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

硫酸アンモニウムの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,広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費(平成9年4月~平成12年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

アカネ色素の13週間反復投与毒性試験-慢性毒性・発がん性併合試験の予備試験-(中間報告):豊田和弘,畝山智香子,渋谷 淳,広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費,食品添加物安全性試験(平成10年4月~平成12年3月),平成11年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

塩化マグネシウムのF344ラットにおける慢性毒性・発癌性試験(中間報告):安原加壽雄,小野寺博志,三森国敏,広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費(平成10年4月~平成13年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

乳酸鉄のF344ラットにおける長期毒性・発癌性試験(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7年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

麴酸の甲状腺発癌メカニズムの検討(最終報告):三森国敏,田村啓,小野寺博志,広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

フルメキンの肝発癌メカニズムに関する研究(最終報告):

三森国敏,小野寺博志,安原加壽雄,広瀬雅雄
畜水産食品中の残留有害物質に係わる資料の収集・解析および毒性試験(平成10年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局乳肉衛生課に報告。

イソチオシアネート類の膀胱発癌作用に関する研究(中間報告):豊田和弘,畝山智香子,渋谷 淳,広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費,発がんメカニズム(平成10年4月~平成12年3月),平成11年5月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

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11年3月),平成11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11年3月),平成11年3月労働省労働基準局化学物質調査課に報告。

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:林 真,松岡厚子,本間正充,鈴木孝昌,祖父尼俊雄

(平成8年4月~平成11年3月),平成11年3月環境庁企画調整局環境技術課に報告。

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:松岡厚子,本間正充,林 真,能美健彦,祖父尼俊雄

(平成4年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

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,松井恵子,祖父尼俊雄

(平成5年4月~平成11年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告。

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,山田雅巳,増村健一,松井恵子,祖父尼俊雄

(平成6年4月~平成11年3月),平成11年3月科学技術庁原子力局技術振興課に報告。

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11年3月),平成11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11年3月),平成11年3月厚生省厚生科学課に報告。

内分泌かく乱物質等,生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査-内分泌かく乱物質等の文献情報に関する調査研究:長谷川隆一,広瀬明彦
厚生科学研究(平成10年4月~平成13年3月),平成11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。

水道における化学物質の毒性,挙動及び低減化に関する研究:長谷川隆一,鈴木幸子,西川秋佳,能美健彦,紅林秀雄,広瀬明彦

厚生科学研究(平成10年4月~平成13年3月),平成11年3月厚生省生活衛生局水道環境部水道整備課に報告。

OECD/HPV点検化学物質安全性調査:長谷川隆一,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11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。

日局一般試験法「浸透圧測定法」の改正に関する研究:岡田敏史

厚生科学研究(平成10年4月~平成11年4月),厚生省医薬安全局企画課に報告。

医薬品の迅速分析法:谷本 剛,岡田敏史

厚生省医薬安全局監視指導課迅速分析法作成費(平成10年4月~平成10年11月),厚生省医薬安全局監視指導課に報告。

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査研究:谷本 剛(分担報告)

医薬安全総合研究事業(平成10年4月~平成11年3月),

厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

日本薬局方等医薬品基準の規格・試験方法に関する研究：
谷本 剛，八木澤守正，藤原 博（分担報告）
医薬安全総合研究事業（平成10年4月～平成11年3月），
厚生省医薬安全局審査管理課に報告。

地域における医薬品試験等のネットワーク化に関する研
究：谷本 剛，田頭洋子（分担報告）
医薬安全総合研究事業（平成10年4月～平成11年3月），
厚生省医薬安全局監視指導課に報告。

食品添加物の規格基準設定費（食用タール色素のヒ素試験
法への水素化物発生-ICP 発光分析法の応用に関する検
討）：辻 澄子，松村郁子，石光 進，外海泰秀
食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成
11年3月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品中食品添加物の分析法の設定（食品中食品添加物“8.
クエン酸イソプロピル，11.dl- α -トコフェロール，14.過酸
化水素，26.亜硝酸ナトリウム，27.硝酸カリウム及び硝酸ナ
トリウム”の分析法の改正）：辻 澄子，外海泰秀
食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成
11年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定（d- α -
トコフェロール及びミックストコフェロールの分析法）：辻
澄子，外海泰秀
食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成
11年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品残留農薬告示分析法の設定（エマメクチン安息香酸塩
試験法の作成）：吉井公彦，津村ゆかり，石光 進，外海泰
秀

食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成
11年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

食品残留農薬告示分析法の改訂法の設定（フルスルファミ
ド，ベンタゾン，イナベンフィド試験法の作成）：吉井公彦，
津村ゆかり，石光 進，外海泰秀
食品等試験検査費（平成10年4月～平成11年3月），平成
11年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

内分泌攪乱物質の食品，食器からの暴露に関する調査研究，
食品中の植物エストロゲンに関する調査研究：外海泰秀，
中村優美子
厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11
年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

内分泌攪乱物質の食品，食器からの暴露に関する調査研究，
フタル酸エステル等の暴露に関する調査研究：石光 進，
津村ゆかり，岡田 舞，吉井公彦，外海泰秀
厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11
年4月厚生省生活衛生局食品化学課に報告。

新開発食品等の安全性の確保に関する研究，フラボノイド
化合物の生体内抗酸化能及び脂質代謝を指標とした安全性
評価に関する研究：中村優美子，外海泰秀
厚生科学研究（平成10年4月～平成11年3月），平成11
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。

- 青柳伸男：後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン
ラジオ短波：薬学の時間（1998.7）
- 青柳伸男：経口固形製剤の生物学的同等性の保証—処方の一部変更を中心として
製剤機械技術研究会第7回講演会（1998.7）
- 鹿庭なほ子：分析法バリデーション
東京理科大学生涯教育センター講習会（1998.7）
- 青柳伸男：溶出試験による医薬品の品質評価—生物学的同等性を保証できるか
薬剤師会大会（1998.9）
- 鹿庭なほ子：分析法バリデーション
分析化学シンポジウム（1998.9）
- Kaniwa, N.: Japanese Regulatory Perspective on Analytical Validation
The 112th Annual Meeting of International Association of Official Analytical Chemists（1998.9）
- Aoyagi, N.: Proposal of mass and content uniformity tests
Interpharmacopoeial Open conference（1998.10）
- Aoyagi, N.: Disintegration test: Viewpoint of Japanese pharmacopoeia
Interpharmacopoeial Open conference（1998.10）
- 鹿庭なほ子：品質再評価における BE と溶出試験
'98 国際医薬品技術総会会議（1998.10）
- 鹿庭なほ子：溶出試験のバリデーション
第6回日本 PDA 年会（1998.12）
- 鹿庭なほ子：処方変更製剤・含量違い製剤の生物学的同等性試験について
製剤機械技術研究会・SUPAC-MR ワークショップ（1998.12）
- 鹿庭なほ子，香取典子，青柳伸男，小嶋茂雄，石亀則子¹，瀬田康生¹，榛葉 徹¹，藤原和文²，中井 亨²，小田容三²：溶出試験法のバリデーション：装置の振動レベルの評価
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
¹ 東京医薬品工業協会
² 大阪医薬品協会
- 森原元彦，青柳伸男，香取典子，鹿庭なほ子，小嶋茂雄：異なる溶出試験装置の攪拌強度の比較
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- 香取典子，鹿庭なほ子，青柳伸男，小嶋茂雄：溶出試験の判定基準の問題点および改善—新計量型試験の適用例—
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- Aso, Y., Yoshioka, S. and Kojima, S.: Diffusion Coefficient of Insulin and Lysozyme in Dextran Hydrogels Determined by Pulsed-Field-Gradient NMR and Relation to the Release Rate from the Gels.
The 25th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials（1998.6）
- Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima, S.: Destabilization of Lyophilized Protein Formulations due to Over-dehydration and Recovery from Freeze Drying-caused Damage upon Solid-state Rehydration.
American Association of Pharmaceutical Scientists, 12th Annual Meeting（1998.11）
- 吉岡澄江，阿曾幸男，小嶋茂雄，櫻井智司^{*}，藤原敏道^{*}，阿久津秀雄^{*}：固体高分解能 ¹³C-NMR による凍結乾燥製剤中のタンパク質および医薬品添加剤の分子運動性の測定
第 37 回 NMR 討論会（1998.11）
^{*} 横浜国立大学工学部
- 阿曾幸男，吉岡澄江，小嶋茂雄：拡散係数測定に基づくハイドロゲル高分子と医薬品の相互作用の評価
第 37 回 NMR 討論会（1998.11）
- 吉岡澄江，阿曾幸男，小嶋茂雄：固体高分解能 ¹³C-NMR によって測定した凍結乾燥製剤中のタンパク質および医薬品添加剤の分子運動性と製剤の安定性の関係
日本薬剤学会第 14 年会（1999.3）
- 阿曾幸男，吉岡澄江，小嶋茂雄：重合法によって異なる両親媒性ハイドロゲルの薬物放出速度
日本薬剤学会第 14 年会（1999.3）
- 吉岡澄江，阿曾幸男，小嶋茂雄：タンパク質凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす高分子添加剤の可塑性特性の影響
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- 阿曾幸男，吉岡澄江，小嶋茂雄：生分解性高分子を架橋したハイドロゲルからの薬物放出速度と NMR 緩和時間により測定されるゲル高分子の運動性の関係
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- 伊豆津健一，小嶋茂雄，石井文由^{*}：Polyvinyl alcohol (PVA) 凍結融解ゲル形成に対する共存物質と凍結相分離現象の影響
日本薬学会 119 年会（1999.3）
^{*} 明治薬科大
- 中原雄二，木倉瑠理，清田和也^{*}：急性中毒検査における毛根の利用と得られる情報
第 20 回日本中毒学会（1998.7）
^{*} 都立墨東病院
- 坂本知昭，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 XXII. ラットにおける新規麻薬 2C-B 及び代謝物の血液・尿・毛髪への分布
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- 木倉瑠理，中原雄二，小嶋茂雄：薬物乱用歴推定のための毛髪分析 XXI. ラットにおける dimethylamphetamine 及びその代謝物の血液・尿・毛髪への分布
日本薬学会第 119 年会（1999.3）
- 中原雄二，Scott, K.S.：薬物乱用推定のための毛髪分析 XXIII. 毛髪中ベンゾジアゼピン系向精神薬の抽出法・分

析法の検討とそれらの毛髪取込率

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

上堀雅由*, 熊木祐介*, 大江知行*, 宮原武恒*, 豊岡利正*, 中原雄二: LC-MS を用いたトリアゾラムとその代謝物の毛髪分析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

* 静岡県立大薬学部

日向須美子, 橋本 統, 川崎ナナ, 杉野 弘¹, 山形貞子², 山形達也², 早川堯夫: 高転移性 FBJ-LL 細胞の運動能に対する HGF 及び Activin A の効果

第 71 回日本生化学会大会 (1998.9)

¹ 徳島大学分子酵素学研究センター² (財) 日本皮革研究所

橋本 統, 新見新吾, 小林 哲, 川崎ナナ, 杉野 弘*, 早川堯夫: 初代培養ラット肝細胞におけるフォリスタチン分子種の発現調節

第 71 回日本生化学会大会 (1998.9)

* 徳島大学分子酵素学研究センター

川崎ナナ, 太田美矢子, 日向須美子, 橋本 統, 早川堯夫: LC/MS 及び LC/MS/MS を用いた糖タンパク質糖鎖の解析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

太田美矢子, 川崎ナナ, 日向須美子, 橋本 統, 早川堯夫: LC/MS によるエリスロポエチンの糖ペプチドマッピング

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

小林雄輔¹, 豊島 聡¹, 杉野 弘², 橋本 統, 太田美矢子, 川崎ナナ, 早川堯夫: フォリスタチン (アクチビン結合蛋白質) の糖鎖の構造と機能に関する研究

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

¹ 星薬科大学² 徳島大学分子酵素学研究センター

豊田淑江, 山口照英, 内田恵理子, 早川堯夫: HL-60 細胞の好中球分化過程におけるトランスフェリン受容体発現陰性・陽性細胞における分化・増殖能の比較解析

第 19 回日本炎症学会 (1998.9)

豊田淑江, 山口照英, 内田恵理子, 早川堯夫: トランスフェリンレセプター (Trf-R) の発現の差異による HL-60 細胞の好中球への分化能の解析

第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

山口照英, 豊田淑江, 内田恵理子, 早川堯夫: トランスフェリンレセプター (Trf-R) の発現の差異による HL-60 細胞の好中球への分化能の解析

第 28 回日本免疫学会総会 (1998.12)

山本雅幸, 柴山理恵, 川西 徹, 大幡久之*, 早川堯夫, 百瀬和享*: ラット海馬培養神経細胞におけるグルタミン酸によるアシドーシス: ミトコンドリア機能との関連

第 98 回日本薬理学会関東部会 (1998.6)

* 昭和大学薬学部

川西 徹, 柴山理恵, 内田恵理子, 渡部明子, 早川堯夫: 共焦点レーザー顕微鏡による細胞内カルシウムイオン貯蔵の画像化

第 7 回日本バイオイメージング学会学術集会 (1998.10)

川西 徹: 高速共焦点レーザー顕微鏡を用いたカルシウムイオンダイナミクスの解析—イオンチャネルの開口の画像化をめざして—

日本電子顕微鏡学会第 43 回シンポジウム (1998.10)

川西 徹, 柴山理恵, 早川堯夫: 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内カルシウムイオン貯蔵の画像化

第 72 回日本薬理学会年会 (1998.3)

柴山理恵, 川西 徹, 早川堯夫: 肝細胞におけるカルシウムウェーブとイノシトール 3 リン酸受容体の細胞内局在との関係

第 72 回日本薬理学会年会 (1998.3)

久光 隆¹, 大幡久之¹, 川西 徹, 岩本隆宏², 重川宗一², 天野 均³, 山田庄司³, 百瀬和享¹: 細胞内 Na⁺濃度減少時に引き起こされる細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出に対する Na⁺/Ca²⁺ exchange のアンチセンスによる影響

第 72 回日本薬理学会年会 (1998.3)

¹ 昭和大学薬学部² 国立循環器病センター³ 昭和大学歯学部Nakagawa, T.¹, Suzuki, R.¹, Mizuguchi, H., Nakagawa, S.¹, Nakanishi, M.² and Mayumi, T.¹: Application of T7 expression system to a cytoplasmic gene expression using fusogenic liposomes

第 4 回日本遺伝子治療学会 (1998.7)

¹ 大阪大学薬学部² 大阪大学微生物病研究所中川哲彦¹, 鈴木 亮¹, 水口裕之, 堤 康央¹, 久保一義¹, 中川晋作¹, 中西真人², 早川堯夫, 真弓忠範¹: 膜融合リポソームを用いた細胞質内遺伝子発現系の確立

第 14 回日本 DDS 学会 (1998.7)

¹ 大阪大学薬学部² 大阪大学微生物病研究所鈴木 亮¹, 中川哲彦¹, 水口裕之, 堤 康央¹, 久保一義¹, 中川晋作¹, 中西真人², 早川堯夫, 真弓忠範¹: 遺伝子発現増強を目指した膜融合リポソームの改良

第 14 回日本 DDS 学会 (1998.7)

¹ 大阪大学薬学部² 大阪大学微生物病研究所Nakanishi, M.¹, Mizuguchi, H., Eguchi, A.¹, Watabe, A., Hayakawa, T. and Mayumi, T.²: Gene delivery system using Sendai virus

International Symposium Membrane Fusion: Mechanisms and application to Cell biology, Drug Delivery and Gene Therapy (1998.7)

¹ 大阪大学微生物病研究所² 大阪大学薬学部鈴木 亮¹, 岡 宏明¹, 吉岡竜伸¹, 宮本 創¹, 岡田直貴¹, 堤 康央¹, 中川晋作¹, 大杉義征², 早川堯夫, 真弓忠範¹: 「細胞性製剤」の長期機能性維持に関する基礎的検討

第 48 回日本薬学会近畿支部総会 (1998.9)

¹ 大阪大学薬学部

² 中外製薬

渡部明子, 柴山理恵, 川西 徹, 山口照英, 内田恵理子, 早川堯夫: プラスミンによる血小板凝集機構について
第71回日本生化学会大会 (1998.10)

中野里佐子¹, 中川哲彦¹, 水口裕之, 形山和史¹, 堤 康央¹, 久保一義¹, 中川晋作¹, 早川堯夫, 中西真人², 真弓忠範¹: β -globin sequence の付加にともなう T7 細胞質内遺伝子発現系の改善

日本薬剤学会第14年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 大阪大学微生物病研究所

米屋由理¹, 今津 進¹, 林 和行¹, 堤 康央¹, 中川晋作¹, 中西真人², 早川堯夫, 真弓忠範¹: 膜融合リボソームの細胞質内直接物質導入機構に関する基礎的検討

日本薬剤学会第14年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 大阪大学微生物病研究所

石井 (渡部) 明子, 内田恵理子, 早川堯夫: プラスミンによる血小板凝集のプライミング因子とその機構

日本薬学会第119年会 (1999.3)

水口裕之, Kay M. A.: In vitro ligation に基づいた簡便なアデノウイルスベクター作製法の開発

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ Stanford University

岡 宏明¹, 鈴木 亮¹, 吉岡竜伸¹, 堤 康央¹, 中川晋作¹, 岡田直貴², 早川堯夫, 宮崎純一³, 真弓忠範¹: 異種補体抵抗性を有する細胞性製剤の開発に関する基礎的検討~補体失活作用を付与した新規高分子担体の設計~

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 京都薬科大学

³ 大阪大学医学部

鈴木 亮¹, 岡 宏明¹, 吉岡竜伸¹, 堤 康央¹, 中川晋作¹, 岡田直貴², 早川堯夫, 宮崎純一³, 真弓忠範¹: MIN6 細胞を封入した細胞性製剤の糖尿病モデルラットへの適用~細胞性製剤に対する異種動物免疫系の影響~

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 京都薬科大学

³ 大阪大学医学部

今津 進¹, 林 和行¹, 中西 剛¹, 中川哲彦¹, 水口裕之, 堤 康央¹, 中川晋作¹, 中西真人², 早川堯夫, 真弓忠範¹: 膜融合リボソームの DNA ワクチンベクターとしての基礎的検討

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 大阪大学微生物病研究所

中野里佐子¹, 中川哲彦¹, 水口裕之, 形山和史¹, 堤 康央¹, 久保一義¹, 中川晋作¹, 早川堯夫, 中西真人², 真弓忠範¹: mRNA を利用した新規細胞質内遺伝子発現系の確立

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 大阪大学薬学部

² 大阪大学微生物病研究所

掛樋一晃*, 船窪 整*, 田中日出美*, 小田泰雄*, 森本和滋, 早川堯夫: キャピラリー電気泳動による糖タンパク質性医薬品のバリデーションに関する基礎検討

第20回糖質シンポジウム (1998.7)

¹ 近畿大学薬学部

鎌倉浩之, 関田節子, 高鳥浩介*, 鈴木明子*, 成田紀子*, 伊藤 均*, 佐竹元吉: 生薬の滅菌法に関する研究 (IV)

日本薬学会119年会 (1999.3)

¹ 原研, 高崎

川原信夫: 日本で栽培されている薬用植物について
薬用植物シンポジウム (1998.6)

川原信夫, 野沢雅人*, 関田節子, 佐竹元吉, 倉田敦代*, 袴塚高志*: ペルー生薬 *Hercampuri* より得られる新規 IL-2 遺伝子発現増強活性成分

日本生薬学会第45回年会 (1998.9)

¹ 東京理科大学薬学部

黒柳正典¹, 荒川 武², 内田幸作², 吉田健一², 林 達男³, 石丸英彦³, 川原信夫: ヒヨス毛状根によるファイトアレキシンの生産に関する研究

第40回天然有機化合物討論会 (1998.10)

¹ 広島県立大学生物資源学部

² 静岡県立大学薬学部

³ (株)ライオン

黒柳正典¹, 関 貴弘², 林 達男³, 永島慶士³, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉: *Cordia multicapata* の抗男性ホルモン作用トリテルペン

第42回精油・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (1998.11)

日本薬学会第118年会 (1998.3)

¹ 広島県立大学生物資源学部

² 静岡県立大学薬学部

³ (株)ライオン

川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉, 倉田敦代*, 袴塚高志*: ブラジル生薬 *Bucha* の化学的研究 (1)

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 東京理科大学薬学部

黒柳正典¹, 杉山和優², 金沢雅紘³, 川原信夫: トドマツ (*Abies sachalinensis*) の抗菌物質

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 広島県立大学生物資源学部

² 静岡県立大学薬学部

³ 拓豊産業

小野景義, 阪本英二*, 眞崎知生*, 佐竹元吉: 心拍調節におけるエンドセリン A 受容体脱感作の種差と細胞内機序

第72回日本薬理学会年会 (1999.3)

¹ 国立循環器病センター研究所

田城孝雄*, 小野景義: ヒスタミン H₂ 受容体におけるリガンド結合様式の検討

第 72 回日本薬理学会年会 (1999.3)

* 東京大学医学部

配島由二, 矢上 健, 林 譲, 松田りえ子, 中村晃忠: ポリカーボネートおよびポリスルホン製血液透析器からのビスフェノール A の溶出
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

矢上 健, 配島由二, 中村晃忠: ラテックス蛋白質の人工胃液中における安定性
第 3 回日本ラテックスアレルギー研究会 (1998.7)

大砂博之¹, 山本美穂¹, 岡島光也¹, 千葉由幸¹, 加藤有紀¹, 武川るみ¹, 高橋さなみ¹, 山本有子¹, 大沼すみ¹, 相原通子¹, 池澤善郎¹, 椿 和文², 新井健司³, 永井宏幸³, 矢上 健, 三田晴之⁴: アトピー性皮膚炎とラテックスアレルギー
第 3 回日本ラテックスアレルギー研究会 (1998.7)

¹ 横浜市立大学医学部² AFT 研究所³ 旭化成⁴ 国立相模原病院臨床研究部

矢上 健: ラテックスアレルギーとしての植物の生体防御蛋白質
第 14 回兵庫県免疫皮膚アレルギー談話会 (1998.11)

Yagami, T., Haishima, Y., Nakamura, A., Osuna, H.* and Ikezawa, Z.*: Digestibility of latex allergens and cross-reactive vegetable allergens
55th Annual Meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (1999.3)

* 横浜市立大学医学部

矢上 健: ラテックスアレルギーとしての植物の生体防御蛋白質
ラテックスアレルギーフォーラム第 6 回例会 (1999.5)

二木史朗¹, 表 雅之¹, 山之内佳代子¹, 杉浦幸雄¹, 福田正幸², 丹羽峰雄², 矢上 健: 膜外配列による膜内ペプチドの会合調節と膜を介する場での超分子構造の構築
日本薬学会第 119 年会 (1999.4)

¹ 京都大学化学研究所² 徳島大学薬学部

鹿庭正昭: 抗菌剤及び抗菌製品の安全性をめぐる話題
第 25 回日本防菌防黴学会 (1998.5)

鹿庭正昭: 抗菌グッズの消費者への健康影響—家庭用品を中心に—
第 46 回日本化学療法学会市民公開講座 (1998.6)

Kaniwa, M.: A study on a new allergenic antimicrobial agent, 10,10'-oxy-bis (phenoxyarsine), in polyvinyl chloride leather for the slipseat of chair causing leg dermatitis
4th Congress of European Society of Contact Dermatitis (1998.7)

Shono, M.* and Kaniwa, M.: Allergic contact dermatitis from C.I. Solvent Orange 60 in ear pieces of spectacle frames
4th Congress of European Society of Contact Dermatitis

(1998.7)

* しょうの皮膚科

鹿庭正昭, 五十嵐良明: 合成皮革製椅子によるアレルギー性接触皮膚炎: 有機ヒ素系抗菌剤の役割
第 35 回全国衛生化学技術協議会 (1998.10)

鹿庭正昭, 伊佐間和郎, 五十嵐良明, 生野麻美子¹, 山崎玲子²: プラスチック製めがね部品によるアレルギー性接触皮膚炎: 着色剤の役割
第 23 回日本接触皮膚炎学会 (1998.12)

¹ しょうの皮膚科² 山崎医院

盛田千登世*, 関東裕美*, 阿部典子*, 斎藤美紀子*, 伊藤正俊*, 鹿庭正昭: 眼鏡先セルによる色素沈着性接触皮膚炎の 1 例
第 23 回日本接触皮膚炎学会 (1998.12)

* 東邦大学医学部第一皮膚科

* 東邦大学医学部第一皮膚科

鹿庭正昭: 抗菌のあるべき姿, 評価 (使用する側からの話題提供)
第 26 回日本防菌防黴学会 (1999.5)

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江, 中村晃忠: 家庭用品に使用される化学物質の細胞毒性試験による眼刺激性の予測
第 35 回全国衛生化学技術協議会 (1998.10)

伊佐間和郎, 門馬純子*, 鹿庭正昭, 中村晃忠: 2-メルカプトベンズイミダゾール誘導体のモルモットにおける皮膚感作性と化学構造との関係について
第 25 回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

* 医薬品機構

伊佐間和郎, 土屋利江, 中村晃忠: 微小集積培養法を用いたγ線照射 PLLA の骨分化影響評価
第 20 回日本バイオマテリアル学会大会 (1998.11)

伊佐間和郎, 土屋利江, 中村晃忠: 骨芽細胞の骨分化に及ぼすポリ L-乳酸の影響
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

中岡竜介, 土屋利江, 中村晃忠: 種々の高分子材料からなる粒子状物質の生体融和能評価
第 11 回バイオエンジニアリング講演会 (1999.3)

新谷英晴: 医療現場での滅菌保証の問題点
第 73 回医科器械学会大会 (1998.6)

Shintani, H.: Sterility assurance attainment for places difficult to insert biological indicator
4th Annual Conference on International Validation (1998.11)

Shintani, H.: Several problems to be conquered for attaining reproducible sterility assurance
PDA Asia symposium (1999.2)

新谷英晴: 医療用品の滅菌バリデーションならびに滅菌保証に伴う諸問題と解決法
第 14 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 (1999.3)

- 新谷英晴：医療用具滅菌保証達成に於ける生育培地の変動要因の究明
第26回防菌防黴学会(1999.5)
- 新谷英晴：ISO/TC 198が要求する再現性のある滅菌保証法とは
第74回医科器械学会総会(1999.5)
- 佐藤道夫：医療用具のインプラント・データシステム
第13回日本眼内レンズ屈折手術学会シンポジウム「21世紀の眼内レンズをめざして」(1998.5)
- 佐藤道夫：インプラント・データシステムの概要
第52回日本臨床眼科学会、インプラントデータシステム研究会(1998.10)
- 佐藤道夫、中村晃忠、平野滋三^{*}、宮下健吾^{*}、長尾正憲^{*}：
義歯床中モノマーの唾液への溶出に関する研究(2)
第20回日本バイオマテリアル学会大会(1998.11)
^{*} 東京医科歯科大学歯学部
- 稲富 誠¹、雑賀司珠也²、澤 充³、山中昭夫⁴、佐藤道夫：眼内レンズインプラントデータシステム委員会の活動報告
第64回日本中部眼科学会関連研究会(1998.10)
¹ 昭和大
² 和歌山県立医大
³ 日本大学医学部
⁴ 神戸海星病院
- 林 譲、松田りえ子：検出限界推定ソフト(TOCO)の構造と考え方
第5回クロマトグラフィーシンポジウム(1998.8)
- 林 譲、松田りえ子：機器分析の精度予測理論(FUMI理論)の信頼性について
分析化学第47年会(1998.10)
- 林 譲、松田りえ子：化学分析操作の総合的最適化ソフト(TOCO)の現状
分析化学第47年会(1998.10)
- 林 譲、松田りえ子、高山光男^{*}：質量分析計の定量精度の予測
第47回質量分析総合討論会(1999.5)
^{*} 東邦大学薬学部
- 土屋利江、Sayed, Md. Abu, 関口裕巳、張 清、秦 英代、伊佐間和郎、中村晃忠：組織工学材料の発癌性評価に関する研究(2) ポリ乳酸等の細胞形質転換活性等について
第20回日本バイオマテリアル学会大会(1998.11)
- 土屋利江、Sayed, Md. Abu, 張 清、王 春仁、中岡竜介、中村晃忠：ポリウレタンの発癌性の分子機構：ラット腫瘍組織よりクローン化した細胞のコネキシン遺伝子とその機能変化
第20回日本バイオマテリアル学会大会(1998.11)
- 土屋利江、張 清、中岡竜介、中村晃忠：無機材料の発癌性評価に関する研究(1) セラミックス微粒子の細胞間連絡機能評価
第20回日本バイオマテリアル学会大会(1998.11)
- 土屋利江、張 清、Sayed, Md. Abu, 中岡竜介、中村晃忠：組織工学材料の発癌性評価に関する研究(1) ポリ乳酸等の発癌プロモーター作用について
第1回日本組織工学会(1998.6)
- 土屋利江：バイオマテリアルの安全性評価法
日本バイオマテリアル学会講座(1998.6)
- Sayed, Md. Abu, Tsuchiya, T. and Nakamura, A.: Tumor promotion mechanism of biomaterials: No involvement of mutation in CX43 gene in the tumorigenesis induced by polyurethanes in vivo
1998 JAACT/ESACT(1998.7)
- Tsuchiya, T., Yoshizawa, N. Ohshima, Y. and Nakamura, A.: Studies on the biocompatibility of particles of titanium and its oxides produced by mechanical stress: Inhibitory activities on the gap-junctional intercellular communication and neuronal cell differentiation
1998 Third World Congress of Biomechanics(1998.8)
- Tsuchiya, T., Sayed, Md. Abu and Nakamura, A.: Role of connexins in tumors induced by biomaterials
1999 Cell adhesion and communication in growth control and cancer(1999.1)
- 山中昭夫¹、土屋利江、西畑利明²：ISO/TC172/SC7/WG7 Ocular Endotamponades Stockholm 1998 報告
第1回眼科生体材料研究会(1998.10)
¹ 神戸海星病院
² 参天製薬
- 西畑利明¹、土屋利江、山中昭夫²：ISO/TC172/SC7/WG7 (Ophthalmic Implant) の国際規格
第1回眼科生体材料研究会(1998.10)
¹ 参天製薬
² 神戸海星病院
- Nakamura, A.: Harmonization of Japanese Guidelines with ISO 10993: Progress and problems
2nd Annual Henry Stewart Conference on Biological Evaluation of Medical Devices(1998.12)
- Nakamura, A.: Concept and background of the Japanese test protocols
9th Annual AAMI/FDA International Standards Conference on Medical Devices(1999.3)
- 中村晃忠：新医療用具の開発と承認
第4回日本血管内治療学会(1998.7)
- 安藤正典：突発的水質汚染と自動モニタリング～ライン川のモニタリングシステム
日本分析化学会第2回分析化学東京シンポジウム(1998.9)
- 安藤正典：飲料水質基準の見直しと分析法
第25回環境化学講演会(1998.9)
- 安藤正典：インド・西ベンガル州の地下水ヒ素汚染と健康

影響

第 24 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合同大会 (1998.10)

香川 (田中) 聡子, 神野透人, 埴岡伸光, 西村哲治, 安藤正典: ヒ素化合物による MAP キナーゼの活性化
第 24 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合同大会 (1998.10)

安藤正典: 水質基準監視項目の改訂の背景と ICP-MS 導入について
プラズマ分光分析研究会第 44 回講演会 (1998.11)

神野透人, 香川 (田中) 聡子, 埴岡伸光, 徳永裕司, 西村哲治, 安藤正典: 無機ヒ素化合物によるヒト表皮角化細胞 MAP キナーゼの活性化
理研シンポジウム: 生体微量元素 '99 (1999.3)

松村年郎, 関田 寛, 濱田実香, 安藤正典, 西村隆雄: 化学物質による室内汚染 (27) ホルムアルデヒド簡易測定計の開発
第 39 回大気環境学会年会 (1998.9)
* ファームテック (株)

濱田実香, 松村年郎, 関田 寛, 安藤正典: 化学物質による室内汚染 (28) 室内空気中の有機リン系化合物の分析法の検討とそのアプリケーションについて
第 39 回大気環境学会年会 (1998.9)

松村年郎, 濱田実香, 関田 寛, 安藤正典, 大塚健次: 化学物質による室内汚染 (29) 居住環境内における VOC と HCHO 濃度の経時変化について
第 39 回大気環境学会年会 (1998.9)
* 鋼管計測 (株)

松村年郎, 濱田実香, 関田 寛, 安藤正典, 平野純子: 化学物質による室内汚染 (30) 居住環境内における有機塩素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 39 回大気環境学会年会 (1998.9)
* 柴田科学機械工業 (株)

松村年郎, 濱田実香, 関田 寛, 安藤正典, 長田英二: 化学物質による室内汚染 (31) 暖房器具使用時における VOC と HCHO 濃度について
第 39 回大気環境学会年会 (1998.9)
* 電気化学計器 (株)

人見敬一*, 松村年郎, 安藤正典: 栃木県の住宅内における室内ホルムアルデヒドおよび揮発性有機化合物の状況について
第 39 回大気環境学会年会 (1998.9)
* 栃木県保健環境センター

長谷川麻子*, 小峰裕己*, 松村年郎: 住宅内における化学物質汚染の防止に関する研究
平成 10 年度空気調和・衛生工学会学術講演会 (1998.8)
* 千葉工業大学

松村年郎: 実験住宅における内装材の室内化学物質濃度に及ぼす影響
日本建築学会大会 (1998.9)

松村年郎, 濱田実香, 安藤正典, 岡本繁雄*: 居住環境内における化学物質汚染について
第 1 回室内環境学会総会 (1998.12)
* 日本大学薬学部

長田英二*, 松村年郎, 濱田実香, 関田 寛, 安藤正典: 暖房器具使用時における汚染物質の変化について (VOC を中心として)
第 1 回室内環境学会総会 (1998.12)
* 電気化学計器 (株)

徳永裕司, 鄭 然孫, 内野 正, 安藤正典: CHO 細胞に及ぼす非イオン性界面活性剤の EO 鎖の影響
日本化粧品科学会第 23 回学術大会 (1998.6)

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典, 内海英雄*: 酸化チタンの光毒性 OH ラジカル生成による細胞毒性への影響
日本化粧品科学会第 23 回学術大会 (1998.6)
* 九州大学

内野 正, 川原信夫, 斉藤嘉朗: SQOOH, t-BuOOH の細胞毒性及びサイトカイン放出量への影響ならびに生薬等の防御効果
第 6 回生体パーオキシド研究会 (1998.9)

徳永裕司, 鄭 然孫, 内野 正, 安藤正典: 化粧品中のエストラジオールおよびエチニルエストラジオールの定量
第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

鄭 然孫, 徳永裕司, 安藤正典: Octylphenol Polyethoxylate の生分解物の免疫系における影響
第 24 回環境トキシコロジーシンポジウム・第 2 回衛生薬学フォーラム合同大会 (1998.10)

徳永裕司, 鄭 然孫, 内野 正, 安藤正典: 化粧品中の卵胞ホルモンの分析法に関する研究
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

内野 正, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉, 徳永裕司, 安藤正典: 過酸化脂質の培養細胞に対する細胞毒性及びサイトカイン放出への影響 (第 2 報) - 生薬等の防御効果 -
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

鄭 然孫, 徳永裕司, 安藤正典: マスト細胞脱顆粒に対する非イオン性界面活性剤 Octylphenol ethoxylate の生分解物の影響
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

Tokunaga, H., Shiroma, T., Chung, Y., Uchino, T. and Ando, A.: Effect of N-Lauroyl Amino Acid on Excised Skin, Red Blood Cells and CHO Cells
4th Scientific Conference of the Asian Societies of Cosmetic Scientists (1999.4)

西村哲治: ダイオキシン類の毒性評価
1998 年東京理科大学分析科学セミナー (1998.6)

西村哲治: 内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) とバイオアッセイ
第 1 回日本水環境学会シンポジウム (1998.9)

西村哲治, 金子裕美*, 埴岡伸光, 神野透人, 武田 健*, 安藤正典: 遺伝子組換え細胞を用いた環境有害物質の評価
第35回全国衛生化学技術協議会年会(1998.10)

* 東京理科大学薬学部

神野透人, 尾澤玉青*, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 武田 健*, 安藤正典: 消毒副生成物ハロ酢酸類およびハロアセトン類の肝細胞毒性
第24回環境トキシコロジーシンポジウム・第2回衛生薬学フォーラム合同大会(1998.10)

* 東京理科大学薬学部

埴岡伸光, 神野透人, 小川邦彦*, 北澤 憲*, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 安藤正典: アトラジン代謝に関与するラット肝ミクロゾームのシトクロム P450 分子種
第13回日本薬物動態学会年会(1998.11)

* 三菱化学安全科学研究所

西村哲治, 埴岡伸光, 神野透人, 安藤正典, 金子裕美¹, 武田 健¹, 西川淳一², 西原 力²: 酵母 Two-Hybrid System 法によるフェノール類のエストロゲン様活性の検討

第33回日本水環境学会年会(1999.3)

¹ 東京理科大学薬学部

² 大阪大学大学院薬学研究科

加納佐江子¹, 小野芳朗¹, 西村哲治, 山田正人²: 廃棄物処分場浸出水等の内分泌攪乱性

第33回日本水環境学会年会(1999.3)

¹ 岡山大学環境理工学部

² 国立公衆衛生院廃棄物工学部

埴岡伸光, 神野透人, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 安藤正典: ラット肝シトクロム P450 に対する非イオン性界面活性剤 octylphenol ethoxylate 生分解物の影響

日本薬学会第119年会(1999.3)

神野透人, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 安藤正典: ラット肝細胞の性ステロイド代謝に対する非イオン性界面活性剤 octylphenol ethoxylate 生分解物の影響

日本薬学会第119年会(1999.3)

土屋悦輝¹, 安藤正典, 西村哲治, 内海英雄², 大橋則雄¹, 中室克彦³, 広瀬義文⁴, 深澤喜延⁵, 吹野秀亀⁶, 伏脇裕一⁷, 森 康明⁸: 環境試験法, 水質試験法・全有機炭素(TOC)

日本薬学会第119年会(1999.3)

¹ 東京都立衛生研究所

² 九州大学薬学部

³ 摂南大学薬学部

⁴ 埼玉県衛生研究所

⁵ 山梨県公害研究所

⁶ 環境管理センター

⁷ 神奈川県環境科学センター

⁸ 神奈川県衛生研究所

Akiyama, H., Kikuchi, Y., D. Chen, Goda, Y., Takatori, K., Ichinoe, M. and Toyoda, M.: A rapid analytical method of ochratoxin A (OTA) in foods and natural contamination of OTA in red pepper

Mycotox 98, international symposium (1998.7)

穂山 浩, 手島玲子, 成松怜子, 合田幸広, 澤田純一, 豊田正武: オポアルブミン経口投与による感作性の誘導
免疫毒性研究会(1998.9)

日野明寛*, 松岡 猛*, 川島よしみ*, 三浦裕二*, 一色賢司*, 穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武: 農作物からの組換え遺伝子の検知法について

日本食品衛生学会第76回学術講演会(1998.11)

* 農水省食品総合研究所

穂山 浩, 菊池 裕, 成田紀子, 鈴木明子, 合田幸広, 高鳥浩介, 豊田正武: 中国産赤トウガラシから分離された *Aspergillus ochraceus* のオクラトキシン A の産生能
マイコトキシン研究会第47回学術講演会(1999.1)

高木しのぶ¹, 中込和哉¹, 定金 豊¹, 谷村たけ徳¹, 穂山 浩, 福森保則², 岡 修一³: シソ葉熱水抽出液より精製した糖蛋白質の抗アレルギー活性

日本薬学会第119年会(1999.3)

¹ 富山医科薬科大学

² ホクレン(株)

³ 生命化学研究所

穂山 浩, 徳住真帆, 合田幸広, 手島玲子, 澤田純一, 豊田正武, 菅沼大行*, 稲熊隆博*: ニンジン果汁の特異的 IgE 抗体産生抑制機構について

日本薬学会第119年会(1999.3)

* カゴメ総合研究所

日野明寛*, 松岡 猛*, 川島よしみ*, 三浦裕二*, 一色賢司*, 穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武: 農作物・加工食品からの組み換え遺伝子の検知法

日本農芸化学会1999年度大会(1999.4)

* 農水省食品総合研究所

穂山 浩, 合田幸広, 豊田正武, 古庄義明*: 固相抽出を用いたリンゴジュース中のパツリンの分析

日本食品衛生学会第77回学術講演会(1999.5)

* ジーエルサイエンス(株)

合田幸広, 酒井信夫, 中村高敏, 近藤一成, 穂山 浩, 豊田正武: モロヘイヤ種子中の主強心配糖体の成分比較
日本食品化学学会第4回総会学術大会(1998.6)

合田幸広, 中村高敏, 酒井信夫, 松藤 寛, 近藤一成, 穂山 浩, 豊田正武: モロヘイヤ (*Corchorus olitorius*) 中の強心配糖体について

第40回天然有機化合物討論会(1998.10)

阿部有希子, 合田幸広, 穂山 浩, 豊田正武, 佐藤正幸*: アカキャベツ中のアントシアニンと, そのヒスタミン遊離抑制活性について

日本薬学会第119年会(1999.3)

* 北海道衛生研究所

合田幸広, 酢山恵美子, 穂山 浩, 豊田正武, 金城順英*, 野原稔弘*: 遺伝子組換え, 非組換えダイズ中のソヤサポニン及びイソフラボン量の比較

日本薬学会第119年会(1999.3)

* 熊本大学薬学部

酒井信夫*, 松藤 寛*, 千野 誠*, 合田幸広, 武田明治*:
モロヘイヤ (*Corchorus olitorius*) 種子の色彩と強心配糖体
含量及び発芽について

日本農芸化学会 1999 年大会 (1999.4)

* 日本大学生物資源科学部

合田幸広, 穂山 浩, 豊田正武, 藤井明美*: 多機能カラム
利用アフラトキシン分析法の改良

日本食品衛生学会第 77 回学術講演会 (1999.5)

* 横浜検疫所輸入食品検査センター

近藤一成, 栗原正明, 宮田直樹, 鈴木 隆, 豊田正武:
Catechin の抗酸化反応機構について

第 13 回生体フリーラジカル研究会 (1998.12)

近藤一成, 栗原正明, 宮田直樹, 鈴木 隆, 豊田正武:
Catechin の抗酸化反応機構

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

高山光男*, 松田りえ子, 林 譲: 質量分析計の精度に関す
る研究 2

第 119 回日本薬学会年会 (1999.3)

* 東邦大学薬学部

松田りえ子, 林 譲, 靄島由二, 高山光男*: 質量分析計の
精度予測

第 47 回質量分析総合討論会 (1999.5)

* 東邦大学薬学部

Ishikawa, M., Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Precision and
Detection Limit without Replication in Instrumental
Analyses

AOAC INTERNATIONAL 112-th annual meeting (1998.9)

* Numadzu health center

石川雅章*, 松田りえ子, 林 譲: HPLC 信頼性評価におけ
る検出限界予測ソフト TOCO の適用性について

第 5 回クロマトグラフィシンポジウム (1998.8)

* 沼津保健所

根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武: 食品中の残留農薬の
キャピラリー-GC-MS 測定における試料マトリックスの影
響について

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

村上恵美子^{*1}, 久保田昌子^{*1}, 宮田大典^{*1}, 衛藤修一^{*1}, 吉
川克彦^{*1}, 城戸浩三^{*1}, 重田勲次^{*1}, 根本 了, 福田映美^{*2}:
負化学イオン化 GC-MS を用いた残留農薬分析法の検討

日本食品衛生学会第 76 回学術講演会 (1998.11)

^{*1} 北九州市環境科学研究所

^{*2} 門司農林水産消費技術センター

Lehotay, S. J.^{*1}, Fetcho, J. H.^{*1}, Heighton, L.^{*1}, Lightfield, A.^{*2},
Barney, J.^{*3}, Hopper, M.^{*4}, Rosenblum, L.^{*5}, McIntyre, R.^{*6},
Schaner, A.^{*7}, Benedicto, J.^{*8}, Deets, R.^{*9}, Harvey, R.^{*10},
Valverde, A.^{*11}, Pihlstrom, T.^{*12}, Santer, J.^{*13}, Anastassiades,
M.^{*14}, Nemoto, S. and Barden, T.^{*15}: Collaborative Study for
the Determination of Pesticide Residues in Nonfatty Foods
by SFE and GC-MS.

11th Annual California Pesticides Residue Workshop (1999.3)

^{*1} USDA Agricultural Research Service, Beltsville

^{*2} USDA Agricultural Research Service, Wyndmoor

^{*3} USDA, GIPSA

^{*4} FDA, TDRS

^{*5} EPA, NERL

^{*6} North Carolina Department of Agriculture

^{*7} Montana Department of Agriculture

^{*8} Midwest Research Institute

^{*9} Campbell's Soup Co.

^{*10} Beech-Nut Nutrition Co.

^{*11} University of Almeria

^{*12} National Food Administration

^{*13} Agricultural and Forestry Research Center

^{*14} Chemistry and Veterinary Sciences Lab.

^{*15} Australian Govt. Analytical Lab.

根本 了: 残留農薬分析に対する超臨界流体抽出の適用に
ついて

日本食品衛生学会第 77 回学術講演会 (1999.5)

高附 巧, 佐々木久美子, 豊田正武: PDA 検出器による
HPLC 測定農薬の一斉分析法について

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

宮原 誠, 伊藤 均^{*1}, 長沢妙子^{*2}, 豊田正武, 斎藤行生:
オルトチロシン法による照射食品の検知 3

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

^{*1} 日本原子力研究所 高崎研究所

^{*2} 北里大学 医療衛生学部

宮原 誠, 豊田正武, 斎藤行生, 伊藤 均^{*1}, 長沢妙子^{*2},
田辺寛子^{*3}, 後藤典子^{*3}: 炭化水素法による照射食品の検知
日本食品照射研究協議会第 34 回大会 (1998.12)

^{*1} 日本原子力研究所 高崎研究所

^{*2} 北里大学 医療衛生学部

^{*3} 東京都産業技術研究所

宮原 誠, 豊田正武, 斎藤行生, 伊藤 均^{*1}, 長沢妙子^{*2},
田辺寛子^{*3}, 後藤典子^{*3}: 炭化水素法による照射食品の検知
2

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

^{*1} 日本原子力研究所 高崎研究所

^{*2} 北里大学 医療衛生学部

^{*3} 東京都産業技術研究所

Miyahara, M., Toyoda, M., Saito, Y., Ito, H.^{*1} and Nagasawa,
T.^{*2}: Identification of Gamma-Irradiated Foods by New o-
Tyrosine Procedure 2

the 112th AOAC International Annual Meeting (1998.9)

^{*1} Japan Atomic Energy Research Institute Takasaki
Radiation Establishment

^{*2} School of Allied Health Sciences, Kitasato University

石綿 肇: 食品添加物の摂取量

食品衛生学会公開シンポジウム (1998.10)

石綿 肇, 西島基弘^{*1}, 深澤喜延^{*2}, 伊藤蒼志男^{*3}: 1994 年
度の全国の行政検査結果を基にした食品添加物の使用実態
と摂取量の測定

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

^{*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

新野竜大*, 飯島百子*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 坂井千三*, 石綿 肇, 山田 隆: ゴム製品中の N-ニトロソアミンの分析法とその存在量

日本食品衛生学会第 76 回学術講 (1998.11)

* (財) 東京顕微鏡院

清水隆浩*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 坂井千三*, 石綿 肇: 食品中の指定外酸化防止剤の HPLC 分析法

日本食品衛生学会第 76 回学術講 (1998.11)

* (財) 東京顕微鏡院

新野竜大*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 伊藤 武*, 坂井千三*, 石綿 肇, 山田 隆: 食品中の N-ニトロソアミンの生成に関する研究 II-ジチオカルバメート系加硫促進剤の N-ニトロソ化について

日本食品衛生学会第 77 回学術講 (1999.5)

* (財) 東京顕微鏡院

石綿 肇, 杉田たき子, 川崎洋子, 武田由比子, 山田 隆, 西島基弘¹, 深澤喜延²: 全国の行政検査 (1999 年度) を基にした食品中の保存料の濃度実態と摂取量の推定

日本食品衛生学会第 77 回学術講 (1999.5)

¹ 東京都立衛生研究所

² 山梨県衛生公害研究所

鈴木昌宜*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 伊藤 武*, 坂井千三*, 石綿 肇: 食品中のアフラトキシン簡易分析法について

日本食品衛生学会第 77 回学術講 (1999.5)

* (財) 東京顕微鏡院

川崎洋子, 杉田たき子, 石綿 肇, 山田 隆: 食品中のアルギン酸の定量分析

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

米谷民雄, 中納徳子, 久保田浩樹: 天然増粘安定剤カラギナンの分子量分布の分析

日本食品化学学会第 4 回学術大会 (1998.6)

山田真記子¹, 加藤喜昭¹, 中村幹雄¹, 神谷恒雄², 関川富士夫³, 米谷民雄: 二酸化チタンの定量法に関する研究

日本食品化学学会第 4 回学術大会 (1998.6)

¹ 三栄源エフ・エフ・アイ (株)

² 東邦チタニウム (株)

³ フロイント産業 (株)

佐藤恭子, 安井義徳*, 杉本直樹, 米谷民雄: カロテノイド系天然着色料の主色素成分

日本食品化学学会第 4 回学術大会 (1998.6)

* 東京農林水産消費技術センター

佐藤恭子, 坂元 (佐々木) 史歩, 鈴木則彦*, 米谷民雄, 山田 隆: 天然添加物コウジ酸の食品中残存量への調理等の影響

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

* 横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

杉本直樹, 福田純子, 高鳥浩介, 山田 隆, 米谷民雄: 保存料として用いられる天然添加物の有効成分

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

秋山卓美, 佐藤恭子, 久保田浩樹, 山田 隆, 米谷民雄: 酵素処理ルチン及び酵素処理イソクエルシトリンの成分分析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

河村葉子: 食品用器具・容器包装からの暴露

内分泌攪乱化学物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム (1998.6)

河村葉子: 内分泌かく乱化学物質—容器包装関連における問題

第 35 回全国衛生化学技術協議会年会 (1998.10)

河村葉子: 食品用容器包装と放射減菌

第 23 回日本アイソトープ放射線総会合議 (1998.12)

河村葉子: プラスチック製器具・容器包装中の残存化学物質に関する研究

日本食品衛生学会第 77 回学術講演会 (1999.5)

河村葉子: 容器包装由来の環境ホルモン

日本食品保全研究会第 24 回シンポジウム (1999.5)

武田由比子, 河村葉子, 山田 隆: アルミ箔製品からのアルミニウム溶出に関する検討

第 7 回日本包装学会年次大会 (1998.6)

Kurihara, M. and Miyata, N.: Stereoselective Epoxidation with Bulky Dioxiranes Generated from Substituted Cyclohexanones
12th International Conference on Organic synthesis (ICOS-12) (1998.6)

山越葉子, 末吉祥子, 宮田直樹: Study on the Active Species Responsible for the Biological Action of Photoexcited Fullerenes

第 15 回フラーレン総合シンポジウム (1998.7)

駒沢友香, 奥原俊輔*, 小島正樹*, 井上英史*, 高橋健治*, 山越葉子, 宮田直樹: Docking Study on the Mechanism of Inhibition of Glutathione S-Transferase by C₆₀

第 15 回フラーレン総合シンポジウム (1998.7)

* 東京薬科大 生命科学部

Miyata, N. and Yamakoshi, Y.: Active Oxygen Species Responsible for the Biological Actions of Photoexcited Fullerenes

Singlet Molecular Oxygen: Chemical, Biological and Medical Aspects (1998.9)

Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Generation of Oxy Radicals by Photoexcited Fullerene (C₆₀ and C₇₀) in an Aqueous Solution - an EPR Study-

IX Biennial Meeting of International Society for Free Radical Research: Free Radical Research for the 21st Century (1998.9)

Miyata, N. and Yamakoshi, Y.: Biological Activities of Photoexcited Fullerenes (C₆₀ and C₇₀)

IX Biennial Meeting of International Society for Free Radical Research: Free Radical Research for the 21st Century (1998.9)

駒沢友香, 奥原俊輔*, 小島正樹*, 井上英史*, 宮田直樹,

高橋健治*: フラーレン (C₆₀) によるグルタチオントラン
スフェラーゼの阻害に関する Docking Study
第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

* 東京薬科大 生命科学部

田中正一*, 今若直人*, 末宗 洋*, 栗原正明: α, α -エチ
ル化ジ置換アミノ酸より合成したホモペプチドコンフォメ
ーション

第 24 回反応と合成の進歩シンポジウム (1998.10)

* 九州大学

福原 潔, 永川真希, 宮田直樹: レスベラトロールによる
活性酸素の生成と消去

日本環境変異原学会第 27 会大会 (1998.11)

Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Thermal
Decomposition of Aromatic N-Nitrosoureas under Solvent-
free Conditions

1998 International Symposium on Organic Reactions-Hsinchu
(1998.11)

Sueyoshi, S., Tanno, M. and Miyata, N.: NO-Donor: Radical
Cleavage of the N-NO Bond in N-Nitroso Compounds

1998 International Symposium on Organic Reactions-Hsinchu
(1998.11)

Miyata, N. and Fukuhara, K.: DNA-cleavage Caused by
Resveratrol

5th Annual Meeting of The Oxygen Society: Oxygen '98
(1998.11)

山越葉子, 末吉祥子, 宮田直樹, 梅沢直樹¹, 長野哲雄¹,
笠 明美², 荒金久美²: Active Oxygen Species Generated
from Photoexcited C₆₀ (singlet oxygen versus superoxide)

第 16 回フラーレン総合シンポジウム (1999.1)

¹ 東京大学薬学部

² コーセイ(株) 研究所

岡田英治, 駒沢友香, 井上英史*, 高橋健治*, 山越葉子,
末吉祥子, 宮田直樹: Synthesis of Photoaffinity-labeling
Reagent having C₆₀ Skelton

第 16 回フラーレン総合シンポジウム (1999.1)

* 東京薬科大 生命科学部

駒沢友香, Gan, L.*¹, 小島正樹², 井上英史², 高橋健治²,
山越葉子, 末吉祥子, 宮田直樹: Inhibition of Glutathione
S-transferase by water-soluble C₆₀-derivatives

第 16 回フラーレン総合シンポジウム (1999.1)

¹ Peking Univ.

² 東京薬科大 生命科学部

Fukuhara, K. and Miyata, N.: DNA-cleaving activities of
resveratrol and its analogues

Oxygen Club of California 1999 World Congress (1999.3)

Kurihara, M. and Miyata, N.: Stereocontrolled synthesis of an
erythro N-protected α -amino epoxide, a versatile intermediate
for preparation of protease inhibitors

217th ACS National Meeting (1999.3)

Tanno, M., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Thermal

Decomposition Mechanism of Aromatic N-Nitrosoureas

217th ACS National Meeting (1999.3)

Sueyoshi, S., Tanno, M., Fukuhara, K. and Miyata, N.: NO-
Generating Ability of N-Nitroso Compounds at Ambient
Temperature

217th ACS National Meeting (1999.3)

栗原正明, 小田原毅, 加藤幸弘, 福原 潔, 宮田直樹: ト
リガーを有する新規エンジン骨格の設計と合成

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

福原 潔, 宮田直樹: フェナジン骨格を有するアミノ酸の
合成と DNA 切断活性

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

丹野雅幸, 末吉祥子, 宮田直樹: 無溶媒条件下アザポリエ
ン類の新規合成

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

末吉祥子, 丹野雅幸, 福原 潔, 宮田直樹: 香族ニトロソ
化合物における一酸化窒素発生能の解析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

山越葉子, 末吉祥子, 宮田直樹, 梅沢直樹¹, 長野哲雄¹,
笠 明美², 荒金久美²: 光励起 C₆₀ の DNA 切断活性種の
解析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

¹ 東京大学薬学部

² コーセイ(株) 研究所

田中正一*, 今若直人*, 末宗 洋*, 栗原正明: α, α -ジ置
換アミノ酸ジエチルグリシンから合成したホモペプチドの
コンフォメーション解析

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

* 九州大学

Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S. and Miyata, N.: Reduced oxygen
species (superoxide and hydroxyl radical) are responsible for
the biological actions of photoexcited fullerenes

The 195th Electrochemical Society Meeting (1999.5)

宮田直樹, 山越葉子, 末吉祥子, 増水章季¹, 河野雅弘¹,
笠 明美², 荒金久美², 梅沢直樹³, 長野哲雄³: 光励起

フラーレンの生物作用発現に關与する酸化活性種の解析
第 21 回磁気共鳴医学会第 3 回 SFRRJapan 合同学会 (1999.5)

¹ 日本電子(株) 研究所

² コーセイ(株) 研究所

³ 東京大学薬学部

中島 治, 蜂須賀暁子, 山崎 壮, 澤田純一: CHO 細胞
を用いた OBCAM (オピオイド結合性細胞接着分子) の発
現

第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

蜂須賀暁子, 中島 治, 高木加代子, 山崎 壮, 澤田純一:
OBCAM (オピオイド結合性細胞接着分子) の機能解析

第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

山崎 壮, 中島 治, 斎藤嘉朗, 蜂須賀暁子, 田中東一,
澤田純一: 一本鎖抗体 (scFv) -メタロチオネイン融合タン
パクの大腸菌発現系による調製

第71回日本生化学会大会 (1998.10)

高木加代子, 斎藤嘉朗, 内田博司*, 内藤直和*, 本城 勝*, 浅田典明*, 澤田純一: 新規抗ヒト成長ホルモン受容体モノクローナル抗体 GHBP-116 の調製とその性質について
第71回日本生化学会大会 (1998.10)

* 三井化学

小野瀬淳一*, 手島玲子, 澤田純一: 小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤による RBL-2H3 細胞, BMBC からの IL-4, MCP-1 産生及びそのメカニズム

第71回日本生化学会大会 (1998.10)

* 明治薬大

手島玲子, 斎藤嘉朗, 小野瀬淳一*, 池淵秀治, 木谷誠一*, 澤田純一: RBL-2H3 細胞, BMBC に存在するエクトキナーゼについて

第71回日本生化学会大会 (1998.10)

*¹ 明治薬大*² 東京大学医学部

手島玲子, 穂山 浩, 小野瀬淳一, 合田幸広, 豊田正武, 澤田純一: オポアルブミンのラット及びマウスを用いる経口感作について

第3回日本ヒスタミン研究会 (1998.11)

手島玲子, 小野瀬淳一*, 澤田純一: Ca^{2+} -ATPase 阻害剤によるマスト細胞からの各種サイトカイン産生について

第48回日本アレルギー学会 (1998.12)

* 明治薬大

鈴木 亮*, 古野忠秀*, 手島玲子, J. Bienenstock*, 中西守*, 神経節初代培養細胞と RBL-2H3 細胞の相互作用

第28回日本免疫学会総会 (1998.12)

*¹ 名古屋市立大学薬学部*² MacMaster University

小野瀬淳一*, 手島玲子, 澤田純一: Ca^{2+} -ATPase 阻害剤による肥満細胞からのサイトカイン遊離への MAP-kinase の関与について

日本薬学会第119年会 (1999.3)

* 明治薬大

藤森観之助: OECD 発達あるいは発生神経毒性試験のガイドライン化の動向

第38回日本先天異常学会 (1998.7)

佐々木晴代, 永石恵子, 安達玲子, 松井幸子, 最上 (西巻) 知子, 山口照英, 笠原 忠*, 早川堯夫, 鈴木和博: 食細胞の機能発現に対する Herbimycin A の効果とコフィリンの変化

第71回日本生化学会大会 (1998.10)

* 共立薬科大学

最上 (西巻) 知子, 鈴木和博, 藤森観之助: VLDL アセンブリー・分泌制御におけるアポ B の N-型糖鎖の役割: アポ B48 の糖鎖は VLDL を完成する後期脂質付加過程に要求される

第71回日本生化学会大会 (1998.10)

藤森観之助: 一般薬理/安全性薬理試験を巡る新しい概念と

新ガイドライン案

神経行動毒性研究会第5回学術集会 (1998.11)

Sato, Y., Yamamoto, S.*, Yatani, A.* and Kranias, E.G.*: Rescue of the depressed contractile parameters in calsequestrin overexpressing hearts by phospholamban ablation

The 71st Scientific Sessions of American Heart Association (1998.11)

* Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati

Sako, H.*, Sato, Y., Kranias, E.G.* and Yatani, A.*: Subcellular mechanisms in transgenic cardiac myocytes with altered excitation-contraction (E-C) coupling

The 71st Scientific Sessions of American Heart Association (1998.11)

* Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati

藤森観之助: WHO/IPCS のリスク評価法の意義, JMPR

第9回ケミカル・セイフティ・フォーラム (1998.12)

松井幸子, 安達玲子, 佐々木晴代, 山口照英, 早川堯夫, 笠原 忠*, 鈴木和博: 白血球機能の発現におけるコフィリンの役割とチロシンキナーゼの関与について

第28回日本免疫学会総会・学術集会 (1998.12)

* 共立薬科大学

Vukmirica, J.*, Nishimaki-Mogami, T., McLeod, R.S.* and Yao, Z.*: N-linked glycosylation is important for posttranslational stability and efficient secretion of apo-B

38th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (1998.12)

* University of Ottawa Heart Institute

佐藤陽治, Luo, W.*, Chu, G.*, Zhou, Z.*, Kadambi, V.J.* and Kranias, E.G.*: β アドレナリン刺激下におけるホスホランバン磷酸化部位の生理的役割—トランスジェニック動物を用いた検討—

第72回日本薬理学会年会 (1999.3)

* Department of Pharmacology and Cell Biophysics, University of Cincinnati

細瀬和成*, 棚元憲一: ディスポーザブル医療用具の非発熱性の確保に関する研究—放射線や化学薬剤を用いてのエンドトキシンの不活化—

日本医科器械学会 (1998.6)

* 東京都立産業技術研究所

Tanamoto, K. and Azumi, S.: Lipid A forms which mediate the activation of C3H/HeJ mice.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998.9)

Azumi, S. and Tanamoto, K.: Protection of animals from endotoxemia by an inhibitor derived from cinnamon bark.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998.9)

室井正志, 安住聡子, 棚元憲一: マクロファージのエンドトキシン応答における血清の影響と種差

第 72 回日本細菌学会総会 (1999.3)

棚元憲一, 安住聡子: サルモネラ型リビド A はヒトマクロファージを活性化しない

第 72 回日本細菌学会総会 (1999.3)

細瀨和成*, 棚元憲一: 各種滅菌法による凍結乾燥エンドトキシンの不活化

第 27 回日本防菌防黴学会年次大会 (1999.5)

* 東京都立産業技術研究所

Miyahara, M. and Konuma, H.: Trial for Classification of Shiga-like Toxin II producing Gene

112th Annual Meeting of AOAC International (1998.9)

宮原美知子, 小沼博隆: 生野菜・果物からサルモネラの検出方法の検討

日本食品衛生学会第 76 回学術講演会 (1998.11)

宮原美知子, 小沼博隆: 腸管出血性大腸菌 O157 におけるペロ毒素産生遺伝子

第 21 回日本分子生物学会年会 (1998.12)

宮原美知子, 小沼博隆: 生野菜と果物からの腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラの簡易検出法の検討

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

宮原美知子, 小沼博隆: 農産物の病原微生物検査方法の検討 (腸管出血性大腸菌 O157 とサルモネラ)

日本防菌防黴学会第 26 回年次大会 (1999.5)

酒井綾子, 手島玲子: 小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害剤であるハイドロキノン系酸化防止剤の形質転換促進作用について

日本環境変異原学会第 25 回大会 (1998.11)

酒井綾子: 内分泌攪乱物質ノニルフェノールの BALB/3T3 細胞形質転換に於けるプロモーション作用

日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

Benno, Y¹., Watabe, J.², Kojima, S.³, Nishihama, E.⁴, Hosoda, M.⁵, Kaneko, T.⁶, Suzuki, H.⁶, Yaeshima, T.⁷, Sonoike, K.⁸, Yamashita, T.⁸, Hashiba, H.⁹, Konuma, H., Kokubo¹⁰, Okada, S.¹¹ and Y., Morichi, T.¹²: A co-laborative study on selective enumeration of Bifidobacteria in fermented milk

25th International Dairy Congress 1998 Denmark (1998.5)

¹ 特殊法人理化学研究所

² カルピス食品工業(株) 基盤技術研究所

³ グリコ共同乳業(株) 中央研究所

⁴ 小岩井乳業(株) 東京工場

⁵ タカナン乳業(株) 商品研究所

⁶ 明治乳業(株) 中央研究所

⁷ 森永乳業(株) 栄養科学研究所

⁸ (株) ヤクルト本社中央研究所

⁹ 雪印乳業(株) 技術研究所

¹⁰ 東京都衛生研究所

¹¹ 東京農業大学

¹² 日本大学

工藤由起子¹, 熊谷 進¹, 小沼博隆, 中川 弘², 小高秀正³, 池戸正城⁴, 小島 禎⁴, 尾上洋一⁵: 腸管出血性大腸菌 O157 の食品中での凍結損傷とその検出方法の検討

第 19 回日本食品微生物学会学術総会 (1998.10)

¹ 国立感染症研究所

² (財) 東京顕微鏡院

³ 日水製菓(株)

⁴ 栄研化学(株)

⁵ 神奈川県衛生研究所

後藤公吉¹, 渡 昭博², 瀬ノ口芳文³, 春口真一⁴, 増田高志⁵, 塚本定三⁶, 小沼博隆, 品川邦汎⁷: 食肉のサルモネラモニタリングにおける米国連邦食肉検査規則及び食品衛生指針による検出状況

第 19 回日本食品微生物学会学術総会 (1998.10)

¹ 新潟県保健環境科学研究所

² 群馬県中央食肉検査所

³ 宮崎県高崎食肉検査所

⁴ 鹿児島県末吉食肉検査所

⁵ 静岡県環境衛生科学研究所

⁶ 大阪府公衆衛生研究所

⁷ 岩手大学

小澤一宏¹, 仁科徳啓¹, 浅川 豊¹, 増田高志², 久保亮一³, 小沼博隆: CHROMagarO157TAM の保菌検査における多菌種分離培地としての有用性

日本食品衛生学会第 76 回学術講演会 (1998.11)

¹ (株) 中部検査センター

² 静岡県環境衛生科学研究所

³ 関東化学(株)

小高秀正¹, 後藤公吉², 増田高志³, 池戸正城⁴, 小島 禎⁵, 中川 弘⁶, 小沼博隆, 工藤由起子⁶, 熊谷 進⁶: 食品からの凍結損傷腸管出血性大腸菌 O157 の検出法; 接種実験

日本食品衛生学会第 76 回学術講演会 (1998.11)

¹ 日水製菓(株)

² 新潟県保健環境科学研究所

³ 静岡県環境衛生科学研究所

⁴ 栄研化学(株)

⁵ (財) 東京顕微鏡院

⁶ 国立感染症研究所

中川 弘¹, 小島 禎², 池戸正城², 小高秀正³, 尾上洋一⁴, 小沼博隆, 工藤由起子⁵, 熊谷 進⁵: 凍結損傷を受けた腸管出血性大腸菌 O157 の回復と増殖の条件

日本食品衛生学会第 76 回学術講演会 (1998.11)

¹ (財) 東京顕微鏡院

² 栄研化学(株)

³ 日水製菓(株)

⁴ 神奈川県衛生研究所

⁵ 国立感染症研究所

工藤由起子¹, 中川 弘², 小高秀正³, 小島 禎⁴, 池戸正城⁴, 増田高志⁵, 後藤公吉⁶, 尾上洋一⁷, 小沼博隆, 熊谷 進¹: 腸管出血性大腸菌 O157 の食品中での凍結損傷とその検出方法の検討

第 72 回日本細菌学会総会 (1999.3)

¹ 国立感染症研究所

² (財) 東京顕微鏡院

³ 日水製菓(株)

⁴ 栄研化学(株)

⁵ 静岡県環境衛生科学研究所

⁶ 新潟県保健環境科学研究所

⁷ 神奈川県衛生研究所

工藤由起子¹, 中川 弘², 後藤吉吉³, 増田高志⁴, 小沼博隆, 熊谷 進¹: 食品からの腸管出血性大腸菌 O26 の検出方法の検討

日本獣医学会平成 11 年度定時総会 (1999.4)

- ¹ 国立感染症研究所
- ² (財) 東京顕微鏡院
- ³ 新潟県保健環境科学研究所
- ⁴ 静岡県環境衛生科学研究所

中川 弘¹, 小島 禎², 池戸正城², 小高秀正³, 尾上洋一⁴, 小沼博隆, 工藤由起子⁵, 熊谷 進⁵: 凍結損傷を受けた腸管出血性大腸菌 O157 の回復と増菌方法の検討

日本獣医学会平成 11 年度定時総会 (1999.4)

- ¹ (財) 東京顕微鏡院
- ² 栄研化学(株)
- ³ 日水製菓(株)
- ⁴ 神奈川県衛生研究所
- ⁵ 国立感染症研究所

Takatori, K., Ohta, T., Park, J-C.¹ and Akiyama, K.²: Application of fluorescence staining technique on findings of viable and non-viable fungal cells

4th Japan-China International Congress of Mycology (1998.7)

- ¹ Yonsei Univ.
- ² 国立相模原病院

菊池 裕, 山崎 壮, 高鳥浩介, 澤田純一: 正常プリオンタンパク質のヒト・グリオーマ細胞における発現機構

第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Takatori, K. and Sawada, J.: High-level expression of cellular form of prion protein in human glioblastoma cell line T98G

Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology. Infections of Nervous System: Host-Pathogen Interactions (1999.3)

神沼二眞, 大竹千代子, 蕪山典子, 森川直樹*: 海洋環境汚染物質としてのレジンペレットの分布と特性について

環境科学会 1998 年会 (1998.9)

- * 沖縄県海洋深層水開発共同組合

神沼二眞: 開放された情報と知識と計算力, インターネットによる計算化学とバイオインフォマティクスの研究基盤づくり

化学ソフトウェア学会年会 '98 研究討論会, 新潟 (1998.10)

山本美智子, 神沼二眞: DES による世代間にまたがる健康影響に関する調査研究

日本内分泌撓乱化学物質学会 (環境ホルモン学会), 京都 (1998.12)

大竹千代子, 堀正典¹, 磯部友彦², 高田秀重², 小島あずさ³, 栗山雄司⁴, 兼広春之⁴, 伊藤尚史⁵, 神沼二眞: 漂着レジンペレットの分類と成分の分析

第 7 回環境化学討論会, 京都 (1998.6)

- ¹ 関西新技術研究所
- ² 東京農工大
- ³ クリーンアップ全国事務局
- ⁴ 東京水産大
- ⁵ 旭化成工業(株)

大竹千代子, 高田秀重¹, 間藤ゆき枝¹, 堀正典², 兼広春之³, 伊藤尚史⁴, 神沼二眞: 漂着レジンペレットの分類と成分の分析 第 2 報

環境科学会, つくば (1998.9)

第 7 回環境化学討論会, つくば (1998.9)

- ¹ 東農工大
- ² 関西新技術研究所
- ³ 東京水産大
- ⁴ 旭化成工業(株)

大竹千代子, 神沼二眞: EDCs 問題先進国の研究と規制への取り組み

内分泌撓乱化学物質学会 (環境ホルモン学会), 京都 (1998.12)

Nakata, K., Takai, T. and Kaminuma, T.: Development of a Receptor Database

First International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk (1998.8)

中田琴子, 中野達也, 神沼二眞: エストロジェン受容体のモデリング

第 5 回「タンパク質立体構造の構築原理」ワークショップ, 東京 (1998.12)

中田琴子, 高井貴子, 神沼二眞: 受容体データベース: 内分泌かく乱への応用

日本内分泌撓乱化学物質学会 (環境ホルモン学会), 京都 (1998.12)

Sekizawa, J.: Uncertainty analysis using database on chemical risk

China-Japan Conference on Risk Assessment and Management (1998.12)

関沢 純: わが国の有機すず汚染のリスク評価

第 4 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 (1998.9)

関沢 純, 大屋幸江: 日常摂取する植物由来ホルモン物質の役割, 日本人におけるリスクとベネフィットの評価

第 4 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 (1998.9)

関沢 純: リスクコミュニケーションー何が必要なのか

第 41 回油化学入門講座 (1998.11)

関沢 純, 大屋幸江: 植物エストロゲン物質の日本人における定量的リスク・ベネフィット解析

第 1 回日本内分泌撓乱化学物質学会研究発表会 (1998.12)

山本 都, 森田真理子, 中野達也, 神沼二眞: 農薬の内分泌撓乱作用に関する文献調査と解析

第 1 回日本内分泌撓乱化学物質学会研究発表会 (1998.12)

Takai-Igarashi, T.: Cell Signaling Networks Database Modeling and Simulation of Genes and Cell Regulation and Metabolic Pathways, Germany (1998.6)

Takai-Igarashi, T.: Development of a Database for Cellular Signal Transduction in Human

Forum on Bioinformatics in Genome Research, Germany (1998.6)

高井貴子, 長谷川式子, 神沼二真: 内分泌攪乱物質に関する生体作用データベース
第21回情報化学討論会, 東京 (1998.11)

神沼二真, 中田琴子, 中野達也, 高井貴子: 内分泌攪乱物質(環境ホルモン)研究を支援する情報計算基盤の概念について
第21回情報化学討論会, 東京 (1998.11)

中野達也, 小谷野和郎, 大竹千代子, 山本 都, 長谷川式子, 瀧 明子, 山本美智子, 神沼二真: 内分泌攪乱物質の構造データベースの開発
第21回情報化学討論会, 東京 (1998.11)

中野達也, 高井貴子, 中田琴子, 神沼二真: 内分泌攪乱物質と生体との相互作用を記述するためのインターフェイスの開発
第21回情報化学討論会, 東京 (1998.11)

小谷野和郎, 中野達也, 神沼二真: ダイオキシン類の毒性の分子計算による解析
第26回構造活性相関シンポジウム, 東京 (1998.11)

Inoue, T.: Symposium: Endocrine disrupting chemicals: testing and their possible health effects
Korean Annual Meeting of Toxicology Society (1998.10)

Kitajima, S., Takagi, A., Hirabayashi, Y., Saga, Y. and Inoue, T.: Testicular cell sorting, using flow cytometry, to analyze their lineage specific characters
第8回国際トキシコロジー学会 (1998.7)

井上 達: 講演「内分泌かく乱化学物質(環境ホルモン)」
第101回東京都衛生局学会 (1998.11)

井上 達: パネルディスカッション 内分泌攪乱化学物質を考える「内分泌攪乱物質の概要」
第35回全国衛生科学技術競技会年会 (1998.10)

井上 達: フォーラム・Endocrine Disruptor—現状と課題—「メカニズム」
第24回環境トキシコロジーシンポジウム・第2回衛生薬学フォーラム合同大会 (1998.10)

小野 敦, 菅野 純, 井上 達: 内分泌攪乱物質の作用メカニズム
The Fifth BIA symposium in Japan (1998.11)

井上 達: 内分泌攪乱化学物質の人体影響とその作用機構
第25回日本医学会総会 (1999.4)

相澤志郎*, 神作仁子*, 渡辺恵子*, 吉田和子*, 平林容子, 井上 達: p53 ヘテロ欠失マウスからの放射線誘発胸腺リンパ腫の発生機序の解析
放射線影響学会第41回大会 (1998.12)
*放射線医学総合研究所

吉田和子*, 井上 達, 平林容子, 野島久美恵*, 佐渡敏彦*:

放射線誘発骨髄性白血病発症におけるカロリー制限の効果
放射線影響学会第41回大会 (1998.12)
*放射線医学総合研究所

降矢 強: GLP 試験と動物管理—動物愛護を含む—
日本 QA 研究会 (1998.9)

降矢 強: わが国における照射馬鈴薯の健全性について
第23回日本アイソトープ放射線総会会議 (1998.12)

梅村隆志, 甲斐幸恵, 長谷川隆一, 佐井君江, 黒川雄二, Williams, G.M.*: マウス肝二段階がんモデルを用いたペントクロロフェノール(PCP)のイニシエーション及びプロモーション作用の検討
第15回日本毒性病理学会 (1999.1)
* American Health Foundation, U.S.A.

宮城恵理, 松島裕子, 平林容子, 井上 達, 菅野 純: 内分泌かく乱化学物質(Xenoesrogen)高感度検出系としての卵巣摘出マウスのエストロゲン反応の経時変化
第15回日本疾患モデル学会 (1998.11)

根本哲生*, 菅野 純, 熊谷二郎*, 明石 巧*, 大橋健一*, 江石義信*, 中林恭一*: 画像取り込み機能を持つ病理情報システム
第87回日本病理学会総会 (1998.4)
* 東京医科歯科大学

湧川温子*, 宇津山正典*, 菅野 純, 若林あや子*, 白石淳一*, 広川勝彦*: 高ビタミンE食投与における老化マウスの免疫機能の修飾
第87回日本病理学会総会 (1998.4)
* 東京医科歯科大学

井上 達, 菅野 純: 内分泌攪乱物質とは何か
内分泌攪乱物質をめぐる生活と食の安全についての国際シンポジウム (1998.6)

Kang, K. S., Kanno, J. and Inoue, T.: Additive Estrogenic Effect of Genistein and Bisphenol A, and Anti-Estrogenic Effect of (-)-Epigallocatechin Gallate in MCF-7 Cells
第25回日本トキシコロジー学会 (1998.6)

菅野 純: 内分泌攪乱化学物質について—生物学的立場から—
第169回有機合成化学協会懇談会 (1998.7)

菅野 純: 拘束ストレスの生体への影響—マウスを用いた実験から—
第5回免疫毒性研究会 (1998.9)

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質について
平成10年度化工誌ニュース委員会第1回研究会 (1998.10)

菅野 純: Carcinogenesis and Toxicology Bioassays Using Transgenic Mice in Japan.
Transgenic and Knockout Animal Models: Application to Toxicological Research (韓国) (1998.10)

菅野 純: 内分泌攪乱化学物質について—生物学的立場から—

学術情報センター軽井沢公開ワークショップ パネルディスカッション (1998.10)

菅野 純：動物の生態と内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) について
第25回環境保全・公害防止研究発表会 (1998.11)

菅野 純, Kyung-Sun Kang, 武木田薫, 宮城恵理, 斉藤 実, 松島裕子, 山本雅也, 平林容子, 金子豊蔵, 井上 達：内分泌かく乱化学物質における *in vitro* 試験系の *in vivo* 試験に対する代替性
第12回日本動物実験代替法学会 (1998.11)

菅野 純：内分泌攪乱化学物質について
第9回安科研究学術講演会 (1998.12)

菅野 純, 山本雅也, 松島裕子, 西岡暢彦, 宮城恵理, Byung-Il Yoon：内分泌かく乱物質の短期 *in vivo* 試験系について
日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究会 (1998.12)

菅野 純：内分泌かく乱化学物質について
第26回建築物環境衛生管理全国大会 (1999.1)

脇園亮子¹, 松浦春甫¹, 宮永禎子¹, 小林宏至¹, 吉川雄二¹, 和田友則¹, 中野美代子¹, 三好秀征¹, 森山好和¹, 大橋健一², 菅野 純：抗リン脂質抗体症候群 (APS) を合併した自己免疫性肝炎 (AIH) の1症例
第85回日本消化器病学会総会 (1999.4)

¹ 三楽病院

² 東京医科歯科大学

吉田和子*, 平林容子, 井上 達：p53 遺伝子欠失 C3H/He マウスに発症した放射線誘発未分化白血病の特性
第61回日本血液学会総会 (1999.4)
* 放射線医学総合研究所

Yoon Byung-Il, 平林容子, 井上 達：BUUV 法で見いだされたベンゼンの白血病原性と解離した細胞動態抑制現象
第61回日本血液学会総会 (1999.4)

平林容子, 吉田和子*, 児玉幸夫, 宮城理恵, 内田雄幸, 梅村隆志, 菅野 純, 黒川雄二, 井上 達：p53 ホモ欠失マウスを用いた化学発がん閾値問題の解析
第88回日本病理学会総会 (1998.4)
* 放射線医学総合研究所

Hirabayashi, Y., Kodama, Y., Yoshida, K.* and Inoue, T.: Characteristics of kinetics in CFU-S from mice carrying Myc-transgene, facilitating the lympho-leukemogenic promotion
American Society of Hematology Fortieth Annual meeting (1998.12)
* 放射線医学総合研究所

平林容子, 児玉幸夫, 菅野 純, 黒川雄二, 横田 崇*, 井上 達：ヒト IL-3 受容体遺伝子導入マウス未熟 B リンパ球系幹細胞の自己増殖と分化
第57回日本癌学会総会 (1998.10)
* 東京大学医科学研究所

平林容子, 梅村隆志, 児玉幸夫, 金子豊蔵, 菅野 純, 黒

川雄二, 井上 達：BUUV 法を用いた造血幹細胞の細胞動態解析 3) *in vitro* 標識と *in vivo* 標識の差異について 4) p53 遺伝子欠失マウスについて
第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

平林容子, 井上 達, 児玉幸夫, 相賀由美子：p53 遺伝子欠失マウスにおける MNU を用いた閾値のない白血病原性 DNA 損傷
第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

Saga, Y.: Conditional Genetic Technologies in the Mouse
Cold Spring Harbor Laboratory Meetings (1998.8)

Saga, Y.: Mouse Molecular Genetics
Cold Spring Harbor Laboratory Meetings (1998.9)

Saga, Y.: Cell fate and The generation of Cell Diversity
11th IIGB meeting (1998.10)

相賀裕美子：体節の分節メカニズム
第31回日本発生生物学会 (1998.5)

相賀裕美子, 高木篤也, 北嶋 聡, 井上 達：遺伝子置換による, bHLH 転写因子 MesP1, MesP2 の機能解析
第21回日本分子生物学会 (1998.12)

高木篤也, 北嶋 聡, 平林容子, 相賀裕美子, 黒川雄二, 井上 達：発生毒性解析系としての細胞分化を指標とした胚性幹細胞 (ES 細胞) 利用の試み
第25回日本トキシコロジー学会 (1998.6)

高橋 雄, 相賀裕美子, 井上 達, 高野立哉*: 株化上皮細胞による平滑筋分化の誘導と空間的パターン
第69回日本動物学会 (1998.9)
* 帝京大学薬学部

Kitajima, S., Takagi, A., Hirabayashi, Y., Saga, Y. and Inoue, T.: Testicular cell sorting, using flow cytometry, to analyze their lineage specific characters
International Congress of Toxicology-ICT VIII (1998.7)

Ono, A., Kanno, J. and Inoue, T.: Differences of Estradiol and non-steroidal agonists and/or antagonist effects on the estrogen receptor and estrogen response element interaction kinetics
1999 Keystone Symposia on Molecular & Cellular Biology: Endocrine Disruptors (1999.2)

Ono, A., Yamamoto, M., Takagi, A., Kanno, J. and Inoue, T.: Molecular mechanism of endocrine disrupting chemicals (EDCs)
The Steroid Receptor Superfamily: Special Conference of American Association for Cancer Research (1999.1)

佐井君江, Kang, K.-S., 黒川雄二, 井上 達：ペンタクロロフェノールによる培養肝細胞のアポトーシス誘導—ギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害および酸化ストレスの関連—
第25回日本トキシコロジー学会 (1998.6)

Kang, K.-S., Sai, K. and Inoue, T.: PCP-induced apoptosis is

related to the inhibition of gap junctional intercellular communication through p53-dependent manner
第 8 回国際トキシコロジー学会 (1998.7)

Sai, K., Upham, B.L.^{*}, Kang, K.-S., Hasegawa, R., Inoue, T. and Trosko, J.E.^{*}: Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junction in rat liver epithelial cells in vitro
第 8 回国際トキシコロジー学会 (1998.7)
^{*} Michigan State University

佐井君江, 長谷川隆一, 黒川雄二, 井上 達: ペンタクロロフェノールのギャップ結合細胞間コミュニケーション阻害に対するエピガロカテキンガレートの効果
第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

佐井君江: 緑茶の肝発がん抑制過程における生物学的諸変化
第 30 回放医研シンポジウム (1998.11)

大野泰雄: 安全性試験における in vitro と in vivo の接点 局所刺激性試験を中心として - 4. 眼粘膜刺激性試験 1) in vitro の立場から
第 45 回日本実験動物学会総会シンポジウム (1998.5)

大野泰雄: 薬物動態試験におけるヒト組織の利用
HAB 協議会 (1998.5)

Ohno, Y.: Harmonization of the Timing of Non Clinical Test in Relation to the Conduct of Clinical Trials
Conference on "Challenges for Drug Delivery and Pharmaceutical Technology" (1998.6)

Ohno, Y.: Results of validation of alternatives to Draize eye irritation tests and a proposal of evaluation scheme for evaluation of eye irritation potentials of cosmetic ingredients
ECVAM workshop on alternatives to Draize eye irritation test. (1998.6)

Ohno, Y., Miyajima, A., Sunouchi, M.: Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. (Evaluation of hepatotoxicity by using hepatocytes)
International Congress on Toxicology (1998.7)

大野泰雄: 今の非臨床試験は万全か?
千葉大学薬学部宮木高明記念特別講演会 (1998.7)

大野泰雄: 臨床試験各段階を開始するタイミング
日本生物薬剤学シンポジウム (1998.7)

吉村 功¹, 大森 崇¹, 大野泰雄, 大越健自², 板垣 宏², 金子豊蔵, 栗下昭弘², 小島肇夫², 高野勝弘², 高松 翼², 林 真, 吉田武美³: Draize 眼刺激評点の代替法による予測についての統計学的検討
日本トキシコロジー学会 (1998.7)

¹ 東京理科大学理工学部

² 日本化粧品工業連合会

³ 昭和大学薬学部

大野泰雄: 薬物動態研究の進め方, 開発, 申請, 許可まで, 薬物動態試験データの新薬審査における利用
薬物動態談話会セミナー (1998.8)

大野泰雄: トキシコキネティクスと GLP と上の留意点
医薬品機構 GLP 講演会 (1998.9.7, 1998.9.22)

大野泰雄: ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価法
ヒューマンサイエンス振興財団 (1998.11)

Ohno, Y.: New Japanese guidelines for nonclinical pharmacokinetics studies
5th International Society for Studies on Xenobiotics. (1998.11)

大野泰雄: 薬物動態試験の最新の動向 - トキシコキネティクスと臨床薬物動態試験ガイドラインを中心として -
製薬協医薬品評価委員会・基礎研究部会第 86 回総会 (1999.2)

Nakazawa, K.: Neuronal ATP receptor/channels - gating properties and interactions with endogenous active substances
Symposium, XIIIth International Congress of Pharmacology (1998.7)

中澤憲一, 大野泰雄: P2X₂ 受容体に存在する隣接したグリシン残基の受容体チャネル機能における役割
第 72 回日本薬理学会年会 (1999.3)

佐藤 薫, 中澤憲一, 松木則夫^{*}, 大野泰雄: 培養海馬切片における電氣的興奮伝播に対する ATP の作用の光生理学的解析
第 72 回日本薬理学会年会 (1999.3)
^{*} 東京大学薬学部

小澤正吾, 加藤貴彦^{*}, 高沢 信^{*}, 永田直幹^{*}, 伊藤英明^{*}, 大野泰雄: ヒトフェノール硫酸転移酵素の遺伝子多型と大腸癌感受性
第 57 回日本癌学会総会 (1998.10)
^{*} 産業医科大学

Ozawa, S., Katoh, T.^{*}, Takasawa, S.^{*}, Nagata, N.^{*}, Itoh, H.^{*} and Ohno, Y.: Genetic polymorphism of heterocyclic amine-activating human phenol sulfotransferase and colon cancer susceptibility in Japanese population
The 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds (1998.11)
^{*} University of Occupational and Environmental Health

小澤正吾, 清水万紀子^{*}, 加藤貴彦^{*}, 高沢 信^{*}, 永田直幹^{*}, 伊藤英明^{*}, 大野泰雄: ヒトフェノール硫酸転移酵素の遺伝子多型と大腸癌感受性
第 13 回日本薬物動態学会年会 (1998.11)
^{*} 昭和薬科大学

小澤正吾, 清水万紀子^{*}, 松本宜明^{*}, 福岡正道^{*}, 大野泰雄: 多型性ヒトフェノール硫酸抱合酵素 (SULT1A1_{hum}) の野生型, 異型分子種の内分泌攪乱物質や種々の薬物に対する硫酸抱合活性
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)
^{*} 昭和薬科大学

宮島敦子, 関 政幸¹, 小野田文俊¹, 太田邦史², 大野泰雄, 榎本武美¹: 出芽酵母 SGS1 の減数分裂における機能の解析

第13回「遺伝的組換えとその制御」ワークショップ
(1998.12)

- ¹ 東北大学薬学部
² 理化学研究所

小野田文俊*, 佐藤友里恵*, 小野寺涼子*, 宮島敦子, 関 政幸*, 榎本武美*: 出芽酵母 SGS1 の機能ドメインの遺伝学的解析

第13回「遺伝的組換えとその制御」ワークショップ
(1998.12)

- * 東北大学薬学部

宮島敦子, 関 政幸¹, 小野田文俊¹, 太田邦史², 大野泰雄, 榎本武美¹: 減数分裂における出芽酵母 SGS1 の機能の解析

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

- ¹ 東北大学薬学部
² 理化学研究所

小野田文俊*, 佐藤友里恵*, 小野寺涼子*, 宮島敦子, 関 政幸*, 榎本武美*: 出芽酵母 SGS1 の遺伝学的解析

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

- * 東北大学薬学部

佐藤友里恵*, 小野寺涼子*, 小野田文俊*, 宇井彩子*, 宮島敦子, 関 政幸*, 榎本武美*: 出芽酵母 SGS1 の機能ドメインの解析

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

- * 東北大学薬学部

宮島敦子, 大野泰雄, 太田邦史¹, 関 政幸², 小野田文俊², 榎本武美²: DNA 修復および減数分裂における出芽酵母 SGS1 の機能の解析

日本薬学会第119年会 (1999.3)

- ¹ 東北大学薬学部
² 理化学研究所

紅林秀雄, 大野泰雄: IBP (iprofenfos) の代謝 (1) ラット及びヒト肝ミクロソームを用いた代謝

日本薬学会第119年会 (1999.3)

酒見和枝, 伊藤理恵乃, 宇佐見 誠, 大野泰雄, 津田充宥: ゴム老化防止剤 2-Mercapto-4-methyl-benzimidazole (4MeMBI) 及び 5-Me 異性体 (5MeMBI) のラットにおける単回及び反復投与毒性とトキシコキネティクスの比較

第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

津田充宥, 酒見和枝, 宇佐見 誠, 大野泰雄: 体内 NO 産生を指標とした安全性評価手法の開発に関する研究 甲状腺障害ラットにおける LPS による体内 NO 産生について

第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

中島幹夫¹, 佐々木眞敬¹, 小林洋四郎¹, 粟野武夫², 入江大祐², 宇佐見 誠, 大野泰雄: インジウムの発生毒性のラット全胚培養及びトキシコキネティクス実験による検討

第38回日本先天異常学会学術集会 (1998.7)

- ¹ 旭化成工業(株)
² 山崎産業(株)

満長克祥*, 二階堂 保*, 宇佐見 誠, 酒見和枝, 津田充宥, 大野泰雄: BIACORE バイオセンサーによるエストロゲン受容体結合能の解析

日本薬学会第119年会 (1999.3)

- * 東邦大学

Koizumi, S., Bootman, M.D.¹, Bobanovic, L.K.¹, Schell, M.J.², Berridge, M.J.¹ and Lipp, P.¹: Characterization of elementary Ca²⁺ release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons

Cambridge Ca²⁺ symposium (1998.9)

- ¹ Babraham Institute

- ² University of Cambridge

小泉修一, 井上和秀: 容量性カルシウム流入と神経伝達物質放出

第72回日本薬理学会年会 (シンポジウム) (1999.3)

小泉修一, M.D. Bootman*, P. Lipp*, M.J. Berridge*, 井上和秀: 神経系細胞における素量 Ca²⁺放出シグナルの解析

第72回日本薬理学会年会 (1999.3)

- * Babraham Institute

Koizumi, S. and Inoue, K.: Inhibition by ATP of calcium oscillation in cultured rat hippocampal neurons

IUPHAR Satellite International Symposium- Nucleotides and Their Receptors in The Nervous System (1998.8)

Akaike, N.*, Ree, J.S.* and Inoue, K.: ATP facilitate the glycine release from the CNS nerve terminals

IUPHAR Satellite International symposium- Nucleotides and Their Receptors in The Nervous System (1998.8)

- * 九州大学医学部

井上和秀, 中嶋一行*, 森本高子*, 本田静世*, 高坂新一*: ミクログリアにおける ATP 誘発プラスミノーゲン放出

第41回日本神経化学・第21回日本神経科学合同大会ミニシンポジウム (1998.9)

- * 精神神経センター神経研究所

井上和秀, 小泉修一: ATP によるグルタミン酸放出

第41回日本神経化学・第21回日本神経科学合同大会ミニシンポジウム (1998.9)

岩本武夫*, Broughman Jr., J.R.*, Tomich, J.M.*, 井上和秀: ATP 受容体の構造と機能

第41回日本神経化学・第21回日本神経科学合同大会ミニシンポジウム (1998.9)

- * Kansas University

柴田和彦*, 牧野郁子*, 井上和秀, 桂木 猛*: PC12 細胞におけるカルバコールによるアンジオテンシンタイプ2受容体 mRNA の増加-プロテインキナーゼCの関与

第41回日本神経化学・第21回日本神経科学合同大会 (1998.9)

- * 福岡大学医学部

井上和秀, 上野伸哉, 小泉修一, 津田 誠: ATP 受容体シグナル伝達系と創薬

第26回薬物活性シンポジウム (1998.10)

井上和秀: ATP による海馬神経細胞からのグルタミン酸放出抑制

第 76 回日本生理学会大会シンポジウム (1999.3)

木苗直秀*, 谷所達幸*, 今村希美*, 古群三千代*, 下位香代子*, 西川秋佳, 高橋道人: 水道水中の強力な変異原性物質 MX の二段階発がん性

第 32 回日本水環境学会 (1998.3)

* 静岡県立大学食品栄養科学部

古川文夫, 西川秋佳, 高橋道人: BOP 投与ハムスターにおける O6-medG 発現の経時的検討

第 87 回日本病理学会総会 (1998.4)

西川秋佳, 古川文夫, 高橋道人: 四塩化炭素投与ラット肝における脂質過酸化修飾生体分子の経時的変化

第 87 回日本病理学会総会 (1998.4)

糀谷高敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 三森国敏, 高橋道人: 新生児マウスへの ethyl nitrosourea (ENU) 投与による肺癌誘発の試み

第 125 回日本獣医学会 (1998.4)

Mitsumori, K.: A Japanese view on a global toxicology testing program before ICH1 and after ICH4

Eighth International Congress of Toxicology (1998.7)

西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 高橋道人, 広瀬雅雄: BOP 誘発 DNA 障害に対する PEITC の抑制効果

第 5 回日本がん予防研究会 (1998.7)

Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Uchida, K., Takahashi, M.: Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis on WBN/Kob rats

8th Meeting of the International Association of Pancreatology (1998.7)

* 名古屋大学農学部

Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Imazawa, T., Takahashi, M.: Specific inhibition by PEITC of initiation phase of BOP-pancreatic tumorigenesis in the hamster

8th Meeting of the International Association of Pancreatology (1998.7)

古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 誘発癌イニシエーションおよびポストイニシエーション期における PEITC の影響

第 5 回日本がん予防研究会 (1998.7)

Kimura, S., Ikeda, T., Imazawa, T., Nishikawa, A., Takahashi, M.: Effects of dietary magnesium deficiency and/or calcium excess on some organs in the rats

8th. International Trace Element Symposium (1998.8)

* 昭和女子大学

安原加壽雄, 三森国敏, 糀谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄: DHPN 単回投与によるラット鼻腔二段階発癌モデルの検討

第 126 回日本獣医学会 (1998.8)

渋谷 淳, Lazarovici, P.¹, Johnson, A.C.², 片桐康博¹, Guroff,

G.¹, 畝山智香子, 広瀬雅雄: PC12 細胞の NGF 神経分化過程に生じる EGF receptor down-regulation の遺伝子発現制御

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

¹ SGF/NICHD/NIH

² LMB/DBS/NCI/NIH

三森国敏, 若菜茂晴*, 丸山千佳*, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高橋道人, 広瀬雅雄, 野村達次*: ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニック (rasH2) マウスにおける urethane ないし vinylcarbamate 誘発肺腫瘍における導入遺伝子変異の経時的観察

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* (財) 実験動物中央研究所

田村 啓, 豊田和弘, 渋谷 淳, 広瀬雅雄, 高橋道人: 新生児マウス二段階発癌モデルを用いた UDMH 及び HQ の発癌性検出の試み

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

広瀬雅雄, 木本直哉*, 山口 剛*, 佐野真士*, 小川久美子*, 杉浦 諭*, 白井智之*: フェネチルおよびベンジルイソチオシアネートの強力な膀胱発がん促進および細胞増殖作用

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* 名古屋市立大学医学部

小野寺博志, 三森国敏, 竹川 潔, 安原加壽雄, 高木久宜, 高橋道人, 広瀬雅雄, 丸山千佳*, 若菜茂晴*: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA/ORJ マウスにおける N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) による子宮腫瘍の誘発とその癌抑制遺伝子変異

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* (財) 実験動物中央研究所

竹川 潔, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 高橋道人, 林 裕造*: チオウレアおよび過剰ビタミン A 同時投与ラットの TSH 産生細胞および甲状腺増殖性病変の増殖性因子における免疫組織化学的検討

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* 北里大学薬学部

安原加壽雄, 三森国敏, 丸山 聡*, 藤本成明*, 松井 元, 竹川 潔, 小野寺博志, 高橋道人, 広瀬雅雄: 乳酸鉄の F344 ラットにおけるがん原性試験およびエストロゲン活性の検討

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* 広島大学

高木久宜, 三森国敏, 小野寺博志, 竹川 潔, 安原加壽雄, 高橋道人, 広瀬雅雄: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA/ORJ マウスにおける dimethylnitrosamine (DEN) と phenobarbital (PB) による肝発癌感受性

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

糀谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 高橋道人, 広瀬雅雄, 野村達次*: phenolphthalein のヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子導入トランスジェニックマウスにおける 6 ヶ月発癌性試験

第 57 回日本癌学会総会 (1998.9)

* (財) 実験動物中央研究所

西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 今沢孝喜, 李仁善^{*1}, 木苗直秀^{*2}, 高橋道人, 広瀬雅雄: 変異原性物質 MX によるラット腺胃発癌の促進

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*1} 韓国啓明大学

^{*2} 静岡県立大学食品栄養科学部

古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 李仁善^{*}, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター-BOP 腺癌イニシエーションに対する oltipraz の影響

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*} 韓国啓明大学

今沢孝喜, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 池田尚子^{*}, 高橋道人, 広瀬雅雄: クチナシ青色素の F344 ラットにおける癌原性試験

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*} 昭和女子大学

笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 李仁善^{*}, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ハムスター-BOP 発癌ポストイニシエーション期における PEITC の影響

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*} 韓国啓明大学

池田尚子^{*}, 今沢孝喜, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一^{*}, 広瀬雅雄: 大豆食で起こるラット甲状腺腫瘍の発現機序に関する検討

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*} 昭和女子大学

松永研吾^{*1}, 田中丸善洋^{*1}, 西川秋佳, 山田泰広^{*1}, 川端邦裕^{*1}, 杉江茂幸^{*2}, 森秀樹^{*1}: NNK 誘発マウス肺発癌における S-methyl methanethiosulfonate (MMTS), Protocatechuic acid (PCA), KYN-54 の修飾作用

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*1} 岐阜大学医学部

^{*2} 岐阜大学動物実験施設

西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄, 高橋道人: 胃発がん修飾要因の探索に関する実験的検討

第9回日本消化器癌発生学会(1998.9)

堀高明^{*}, 市原敏夫^{*}, 森村圭一郎^{*}, 鰐淵英機^{*}, 西川秋佳, 福島昭治^{*}: ラット食道発癌におけるエタノール摂取の影響

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*} 大阪市立大学医学部

李仁善^{*1}, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 金秀彦^{*2}: 生薬 *Selaginella tamariscina* の p53 遺伝子発現

第57回日本癌学会総会(1998.9)

^{*1} 韓国啓明大学

^{*2} 韓国ソウル大学

戸塚ゆ加里^{*1}, 川森俊人^{*1}, 石原純子^{*1}, 三森国敏, 久田茂^{*2}, 杉村隆^{*1}, 若林敬二^{*1}: Aminophenylnorharman のラットに対する毒性

第27回日本環境変異原学会(1998.11)

^{*1} 国立がんセンター

^{*2} (株) 帝国臓器製薬

Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T., Takahashi, M.: Detection of in vivo mutagenicity of MeIQx using IacI transgenic mice

The 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds (1998.11)

Kasahara, K., Furukawa, F., Nishikawa, A., Tanakamaru, Z., Mori, I., Takahashi, M.: Aberrant crypt foci in the rat colon induced by MeIQx

The 7th International Conference on Carcinogenic/Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds (1998.11)

^{*} (株) 武田薬品工業

Koide, K., Fuwa, K., Mori, Y., Furukawa, F., Hirose, M., Nishikawa, A.: Effect of cigarette smoke on mutagenic activity of environmental carcinogens by rodent liver

3rd International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (1998.12)

^{*} 岐阜薬科大学

小野寺博志, 三森国敏, 高木久宜, 安原加壽雄, 梶谷高敏, 広瀬雅雄: p53 ノックアウト(ヘテロ欠損) CBA マウスを用いた ENU 誘発子宮腫瘍モデルにおけるメトキシクロールの発がん修飾作用

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

田村啓, 三森国敏, 小野寺博志, 森安眞津子^{*}, 渋谷淳, 広瀬雅雄: 甲状腺発がん物質の下垂体摘出ラットにおける甲状腺増殖性病変への影響

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

^{*} (株) パナファーム・ラボラトリーズ

梶谷高敏, 三森国敏, 安原加壽雄, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄: N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を用いた二段階発癌モデルにおける 2,6-dimethylaniline (DMA) のラット鼻腔発癌プロモーション作用の検討

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

岩田聖^{*}, 木原亨^{*}, 細井理代^{*}, 宮島留美子^{*}, 山本慎二^{*}, 三上真一^{*}, 山川誠己^{*}, 廣内康彦^{*}, 榎本眞^{*}, 今沢孝喜, 三森国敏: F344 ラット下垂体神経葉における異所性上皮様組織についての免疫組織化学・電子顕微鏡学的解析

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

^{*} (財) 食品農医薬品安全性評価センター

豊田和弘, RC Sills^{*}, TV Ton^{*}, HL Hong^{*}, RR Maronpot^{*}: 1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone により誘発されたマウス肺腫瘍における K-ras 遺伝子変異: Laser Capture

Microdissection 法の検討

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

^{*} Laboratory of Experimental Pathology, NIEHS

宮内慎, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 中村英明, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生仔マウス二段階発癌モデルによる MeIQx のリスク評価

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

中村英明, 西川秋佳, 古川文夫, 笠原健一郎, 宮内慎, 高橋道人, 広瀬雅雄: 新生仔マウス二段階発癌モデルによる PhIP のリスク評価

第15回日本毒性病理学会(1999.1)

森 郁生¹, 三森国敏, 安原加壽雄, 林新 茂¹, 野々山孝¹, 榎木利昭², 野村達次³: ウレタン単回および複数回投与とヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニック (rasH2) マウスにおける肺腫瘍誘発と Cyclin D1 の発現
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

¹ (株) 武田薬品工業

² 岐阜大学

³ (財) 実験動物中央研究所

下 武男^{*}, 小野寺博志, 片山淳一^{*}, 斉藤明美^{*}, 青木康治^{*}, 桶崎英一^{*}, 永田 治^{*}, 三森国敏: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA マウスでの N-ethyl-N-nitrosourea 誘発性の子宮腫瘍に対する ethinylestradiol の修飾作用
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} (株) 北陸製薬

古川文夫, 西川秋佳, 笠原健一郎, 千原 猛^{*}, 新保 寛^{*}, 葛谷博磁^{*}, 広瀬雅雄: ハムスター BOP 膀胱癌に及ぼすキダチアロエの影響
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} 藤田保健衛生大学

笠原健一郎, 西川秋佳, 古川文夫, 池崎信一郎, 田中丸善洋, 李 仁善^{*}, 今沢孝喜, 高橋道人, 広瀬雅雄: ジョサマイシンのラットへの 52 週間投与による組織学的変化
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} 韓国啓明大学

安原加壽雄, 三森国敏, 糀谷高敏, 小野寺博志, 高木久宜, 広瀬雅雄, 林 裕造^{*}: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA マウスの MNUR 誘発肺病変に対する NNK の修飾作用
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} 北里大学薬学部

高木久宜, 三森国敏, 西川秋佳, 小野寺博志, 古川文夫, 安原加壽雄, 笠原健一郎, 広瀬雅雄: p53 ノックアウト (ヘテロ欠損) CBA マウスにおける N-methyl-N-nitrosourea (MNU) の発癌感受性
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

桑原真紀^{*}, 乾 公正^{*}, 竹内幸子^{*}, 原田孝則^{*}, 小坂忠司^{*}, 真板敬三^{*}, 安原加壽雄, 三森国敏: チアンフェニコールの精巢毒性のメカニズムについて - Dual Compartment Chamber を用いた in vitro 検索
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} (財) 残留農薬研究所

正田俊之^{*}, 三森国敏, 今沢孝喜, 豊田和弘, 田村 啓, 高田幸一, 高橋道人, 広瀬雅雄: F344 ラットに認められた精囊腫瘍の一例
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} (株) 鳥居薬品

今沢孝喜, 池田尚子^{*}, 西川秋佳, 笠原健一郎, 木村修一^{*}, 広瀬雅雄: 大豆食で惹起されるラット甲状腺および下垂体の超微形態学的変化
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

^{*} 昭和女子大学

渋谷 淳, 畝山智香子, 豊田和弘, 宮崎恵子, 田村 啓, 広瀬雅雄: PhIP のラット薬物代謝酵素誘導における抗酸化

剤 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone 併用投与の影響
第 15 回日本毒性病理学会 (1999.1)

Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Hirose, M.: Mechanistic studies of kojic acid on thyroid tumor promotion on enhancement of thyroid carcinogenesis

38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999.3)

^{*} 広島大学

Shibutani, M., Mitsumori, K., Sato, S.¹, Onodera, H., Nakagawa, J.², Hayashi, Y.³, Hirose, M., Ando, M.⁴: Sequential analysis of the hepato-renal toxicity and cadmium accumulation in rats given minimum to large amounts of cadmium chloride for 2 years

38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999.3)

¹ (株) イナリサーチ

² 東京都立衛生研究所

³ 北里大学薬学部

⁴ 環境衛生化学部

Hirose, M., Sano, M.^{*}, Ogawa, K.^{*}, Sugiura, S.^{*}, Toyoda, K., Shibutani, M., Shirai, T.^{*}: Strong, toxicity associated, promotion of rat urinary bladder carcinogenesis by phenethyl and benzyl isothiocyanates

38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999.3)

^{*} 名古屋市立大学医学部

Koujitani, T., Mitsumori, K., Yasuhara, K., Kobayashi, H.^{*}, Onodera, H., Takagi, H. and Hirose M.: Tumor promoting activities of xylazine (XZ) and its metabolite, 2,6-dimethylaniline (DMA), in a two-stage nasal carcinogenicity model in rats initiated with N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)

38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999.3)

^{*} (財) 残留農薬研究所

Onodera, H., Mitsumori, K., Takahashi, M.¹, Funakoshi, T.², Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K.² and Hirose, M.: Promotion activity of kojic acid on rat carcinogenesis and its effect on thyroid

38th Annual Meeting of Society of Toxicology (1999.3)

¹ (財) 佐々木研究所

² (株) 吉富製薬

本間正充, 百瀬真希, 林 真, Y. U. Yongjia^{*}, John B. Little^{*}, 祖父尼俊雄: p53 による組み換え修復制御と遺伝的安定化機構

日本癌学会第 57 回総会 (1998.9)

^{*} 米国ハーバード大学

王 雪, 鈴木孝昌, 林 真, 祖父尼俊雄: MutaTM Mouse における各種制がん剤の突然変異誘発性と cII 突然変異のスペクトル

日本癌学会第 57 回総会 (1998.9)

松岡厚子, 室伏 擴^{*}, 坂本浩子, 林 真, 祖父尼俊雄: Benzo[a]pyrene および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene で誘発された染色体の数的異常と紡錘体形成および tubulin 重合への影響

日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)

* 東京大学理学部

本間正充, 百瀬真希, 林 真, 祖父尼俊雄: p53 による組換え修復制御とゲノム安定化機構
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)

百瀬真希, 本間正充, 松岡厚子, 坂本浩子, 林 真, 祖父尼俊雄: Spindle poison による遺伝子突然変異誘発機構
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)

松浦克子, 本間正充, 坂本浩子, 松岡厚子, 林 真, 祖父尼俊雄: ヒ素化合物の変異原性
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)

森本茂子*, Alasdair Gordon*, 福西暢尚*, 本間正充, 祖父尼俊雄, 花岡文雄*, 矢田貝文夫*: 重イオン照射による HRRT 変異誘発 - 変異 p53 遺伝子の効果 -
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
* 理化学研究所

本間正充: Molecular cytogenetics by FISH - 突然変異と染色体異常を結ぶ -
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)

Suzuki, T., Reguer, G.¹, Ueda, M.², Ichihashi, M.² and Yamasaki, H.¹: Detection of the UV-specific mutation (CC to TT) in mitochondrial DNA of human skin by the mutant allele specific PCR
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ International Agency for Research on Cancer, France
² 神戸大学医学部

王 雪, 鈴木孝昌, 宇野芳文¹, 大河内亜紀子¹, 近藤耕治², 鶴岡雅樹², 林 真, 祖父尼俊雄: 第 2 回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 I. Procarbazine により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 27 回大会 (1998.11)
¹ 三菱化学(株) 横浜総合研究所 (安全性研究所)
² 塩野義製薬(株) 新薬研究所

小林 浩*, 林 真: コメット法における泳動像の分類と評価
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
* 資生堂(株) 安全性研究所

トランスジェニックマウス変異原性試験研究グループ (JEMS・MMS 研究会) 世話人 王 雪, 伊東 悟¹, 中嶋 圓², 蜂谷紀之³, 原 巧⁴, 鈴木孝昌: 第 2 回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 - cII 遺伝子を用いた解析及び lacZ 遺伝子との比較 -
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ 第一製薬(株) 安全性研究所
² 食品農薬安全性評価センター
³ 秋田大学医学部
⁴ 食品薬品安全センター 秦野研究所

浜田修一¹, 須藤鎮世², 林 真, 他: ラットを用いた 4 週間反復投与小核試験 - JEMS・MMS 研究会 小核試験共同研究グループ第 13 回共同研究 -
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ エスエス製薬(株) 中央研究所

* 伊藤ハム(株)

西川貴文*, 晴佐久満*, 足立邦明*, 増田光輝*, 林 真: 皮膚を用いた in vivo 小核試験法の開発
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
* ライオン(株) 安全性評価センター

田村博信¹, 浅野哲秀², 勝間祥行³, 林 真: 末梢血網赤血球を用いる小核試験における骨髓細胞増殖抑制の評価
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ 日本新薬(株) 安全性研究所
² 日東電工(株) 安全性試験センター
³ 東洋紡績(株) 生化学事業部

朝波省吾¹, 大島輝男², 林 真, 他: マイトマイシン C へのヒトのリスク評価
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ 大塚製薬工場(株) 鳴門研究所
² 化学品安全管理研究所

石川 卓¹, 高井明德², 祖父尼俊雄, 林 真, 上野紘一¹: 河川魚を用いる小核試験法による水質汚染の細胞遺伝毒性評価
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ 近畿大学農学部
² 大阪信愛女学院短期大学

高井明德¹, 石川 卓², 上野紘一², 中室克彦³, 奥野智史³, 上野 仁³, 北野雅昭⁴, 祖父尼俊雄, 林 真: 河川魚を用いる小核試験法による水質汚染の細胞遺伝毒性評価
日本環境変異原学会第 27 回大会 (1998.11)
¹ 大阪信愛女学院短期大学
² 近畿大学農学部
³ 摂南大学薬学部
⁴ 大阪市立環境科学研究所

楠洋一郎*, 京泉誠之*, 本間正充, 濱谷清祐*, 林 奉権*, 瀬山敏雄*: MHC クラス I アリル欠失細胞発生の生体内抑制機構に関する研究
第 28 回日本免疫学会総会・学術集会 (1998.12)
* 放射線影響研究所

本間正充, 楠洋一郎*, 京泉誠之*, 大西 寿*, 林 真, 祖父尼俊雄, 瀬山敏雄*: 主要組織適合抗原クラス I アリルの発現を欠損したマウス T 細胞のフローサイトメトリーによる検出
日本放射線影響学会第 41 回大会 (1998.12)
* 放射線影響研究所

森本茂子*, Alasdair Gordon*, 福西暢尚*, 本間正充, 祖父尼俊雄, 花岡文雄*, 矢田貝文夫*: 重イオン照射による HPRT 遺伝子突然変異の検出
日本放射線影響学会第 41 回大会 (1998.12)
* 理化学研究所

本間正充: p53 による組換え修復制御とゲノム安定化機構 第 13 回ワークショップ「遺伝的組換えとその制御」 (1998.12)

Honma, M., Momose, M., Matsuoka, A., Sakamoto, H., Hayashi, M. and Sofuni, T.: Spindle poisons induce gene mutations

through mitotic nondisjunction in mouse lymphoma cells
1999 Environmental Mutagen Society Meeting (1999.3)

能美健彦：微生物遺伝学的手法を利用したトランスジェニックマウス変異原性試験の開発
微生物変異原性試験研究会第22回定例会 (1998.6)

中山佳都夫*, 串田浩孝*, 岩田 宏*, 鈴木昭浩*, 山折 大*, 藤田健一*, 山田雅巳, 能美健彦, 鎌滝哲也*: 10種類のヒトチトクローム P450 と NADPH-P450 還元酵素のサルモネラ菌同時発現系の構築
第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)
* 北海道大学大学院薬学研究科

山田雅巳：新しい手法により開発した変異原性試験菌株の有用性について
微生物変異原性試験研究会第22回定例会 (1998.6)

増村健一, 能美健彦：新しいトランスジェニックマウス *gpt* Δ の開発
第25回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

Nohmi, T.: A transgenic mouse test system with two selection methods for detection of point mutations and deletion mutations
1st annual meeting on rodent models in modern risk assessment (1998.9)

能美健彦：トランスジェニックマウスを用いる個体レベルの突然変異の検出
平成11年度変異・発癌抑制機構研究会 (1998.6)

Nohmi, T.: Genetics and biochemistry of the proteins that promote mutagenesis, UmuDC, MucAB and DinB
HFSP (Human Frontier Science Program) Symposium (1998.9)

Nohmi, T.: New mutagenicity test development by genetic engineering
5th Congress of Mexican Societies of Genetics and Genotoxicology (1998.9)

新村和也^{1,3}, 河野隆志¹, 葛西 宏², 金 秀良, 能美健彦, 梶村春彦³, 横田 淳¹: DNA 修復酵素遺伝子 hOGG1 の多型・変異と発がんとの関連性
日本癌学会第57回総会 (1998.10)
¹ 国立がんセンター研究所
² 産業医科大学
³ 浜松医科大学

鈴木昭浩*, 山田雅巳, 能美健彦, 藤田健一*, 鎌滝哲也*: サルモネラ菌において発現させたヒト NAT2 変異株のヘテロサイクリックアミン代謝的活性化能の検討
日本癌学会第57回総会 (1998.9)
* 北海道大学大学院薬学研究科

Kushida, H., Fujita, K., Suzuki, A., Yamada, M., Nohmi, T. and Kamataki, T.: Functional co-expression of human CYP2A6 or CYP2E1 with NDAPH⁺P450 reductase in *Salmonella typhimurium* YG7108: Comparison of ability to activate various N-nitrosamines between CYP2A6 and CYP2E1

5th International ISSX meeting (1998.10)
* 北海道大学大学院薬学研究科

Yamada, M., Kim, S.-R., Gruz, P. and Nohmi, T.: Antimutagenic effects of DinB003 mutant against wild type DinB which can enhance untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*

6th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis & Anticarcinogenesis (1998.10)

Masumura, K., Matsui, K., Yamada, M., Horiguchi, M.¹, Ishida, K.², Watanabe, M.², Ueda, O.³, Suzuki, H.³, Kanke, Y.¹, Tindall, K. R.⁴, Wakabayashi, K.², Sofuni, T. and Nohmi, T.: In vivo mutagenicity of PhIP in new transgenic mouse *gpt*-delta
The 7th International Conference on Carcinogenic and Mutagenic N-Substituted Aryl Compounds (1998.11)

¹ 東京農業大学

² 国立がんセンター研究所

³ 中外製薬(株)

⁴ NIEHS, USA

藤田健一*, 串田浩孝*, 岩田 宏*, 鈴木昭浩*, 中山佳都夫*, 山田雅巳, 能美健彦, 鎌滝哲也*: ヒト CYP 発現系の現状と可能性 (シンポジウム)
第12回日本動物実験代替法学会 (1998.11)
* 北海道大学大学院薬学研究科

Masumura, K. and Nohmi, T.: Spontaneous mutagenesis of transgenic mouse *gpt* delta
AACR special conference "Endogenous source of mutations" (1998.11)

須井 哉¹, 鈴木 任², 山田雅巳, 原 巧¹, 川上久美子¹, 澁谷 徹¹, 能美健彦, 祖父尼俊雄: マウス精子における突然変異の生成機構 (その1)
日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)
¹ 食品薬品安全センター秦野研究所
² 理化学研究所

増村健一, 松井恵子, 山田雅巳, 堀口美恵子^{1,2}, 石田 香², 渡辺雅彦², 上田乙也³, 鈴木宏志³, 管家祐輔¹, 若林敬二², 能美健彦, 祖父尼俊雄: トランスジェニックマウス *gpt* Δ を用いた PhIP により誘発される突然変異の解析
日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)
¹ 東京農業大学
² 国立がんセンター研究所
³ 中外製薬(株)

山田雅巳：遺伝子工学的手法を用いて作製したアルキル化剤高感受性サルモネラ試験菌株の作製とその応用 (奨励賞受賞講演)
日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)

堀口美恵子¹, 増村健一, 池畑広伸², 小野哲也², 管家祐輔¹, 能美健彦, 祖父尼俊雄: トランスジェニックマウス *gpt* Δ を用いた紫外線誘発突然変異の in vivo 解析
日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)
¹ 東京農業大学
² 東北大学医学部

鈴木昭浩*, 山田雅巳, 能美健彦, 藤田健一*, 鎌滝哲也*:

ヒトアセチルトランスフェラーゼ2を発現するサルモネラ菌株の樹立

日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)

・北海道大学大学院薬学研究科

山田雅巳, ハビエル エスピノーサ=アギレ¹, 松井恵子, 渡辺雅彦², 能美健彦, 祖父尼俊雄: O-アセチル転移酵素遺伝子を特異的に破壊したエームス試験菌株の作製

日本環境変異原学会第27回大会 (1998.11)

¹ メキシコ大学生物医学研究所

² 国立がんセンター研究所

能美健彦: DNA損傷と突然変異

第8回放射線生物学ワークショップ (1998.12)

新村和也^{1,3}, 河野隆志¹, 佐々木麻里子¹, 葛西 宏², 金 秀良, 能美健彦, 梶村春彦³, 横田 淳¹: DNA修復酵素遺伝子 hOGG1 の多型・変異と発がんとの関連性

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

¹ 国立がんセンター研究所

² 産業医科大学

³ 浜松医科大学

金 秀良, 松井恵子, 山田典代, 能美健彦: 大腸菌の自然突然変異に関与する *dinB* 遺伝子の解析

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

山田雅巳, ピーター グルーズ, 金 秀良, ジェローム ワグナー, 能美健彦: 大腸菌 *DinB* 蛋白質とその部位特異的変異体の性状比較

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

Curz, P. and Nohmi, T.: Site-directed mutagenesis of the MucB mutagenesis protein: Generation, purification and analysis of MucB104 mutant

第21回日本分子生物学会年会 (1998.12)

能美健彦: トランスジェニックマウスを用いる放射線突然変異の解析

科学技術庁原子力基盤クロスオーバー研究, 放射線リスク評価・低減化分野ワークショップ (1999.1)

本間正充: p53 タンパク質による DNA 二本鎖切断修復の調節

科学技術庁原子力基盤クロスオーバー研究, 放射線リスク評価・低減化分野ワークショップ (1999.1)

祖父尼俊雄: トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 遺伝子突然変異の検出

科学技術庁原子力基盤クロスオーバー研究, 放射線リスク評価・低減化分野ワークショップ (1999.1)

能美健彦: 遺伝子改変・導入細胞およびマウスを用いた変異原, 癌原物質の評価系の構築

日本学術会議 50 周年記念シンポジウム「分子生物学と環境」(1999.1)

Nohmi, T.: Transgenic mice *gpt-delta* as a new tool for investigation of *in vivo* mutagenicity of carcinogenic heterocyclic amines

U.S.-Japan workshop on "New rodent models for the analysis

and prevention of carcinogenesis" (1999.2)

Nohmi, T.: New transgenic mouse mutagenicity test using *gpt* and *Spi* selections

U.S.-Japan cooperative medical science program, Environmental mutagenesis and carcinogenesis panel (1999.2)

Nohmi, T.: *gpt-delta* mouse as a new research tool for *in vivo* mutagenesis

30th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (1999.3)

堀口美恵子¹, 増村健一, 池畑広伸², 小野哲也², 管家祐輔¹, 祖父尼俊雄, 能美健彦: トランスジェニックマウス *gpt Δ* を用いた突然変異の検出: 紫外線により誘発される突然変異の *in vivo* 解析

Workshop on "DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 1999" (1999.2)

¹ 東京農業大学

² 東北大学医学部

田辺秀之, 中川ゆづき¹, 峯岸大輔, 橋本雄之², 田中憲徳¹, 押村光雄³, 祖父尼俊雄, 水沢 博: FISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの性状解析

日本組織培養学会第71回大会 (1998.5)

¹ 食品薬品安全性研究センター-秦野研究所

² 国立感染症研究所

³ 鳥取大学医学部

増井 徹, 高田容子, 岩下新太郎¹, 樽松美治, 田辺秀之, 祖父尼俊雄, 水沢 博: 増殖停止関連遺伝子 *eti-1* のアポトーシス誘導活性

日本組織培養学会第71回大会 (1998.5)

・三菱化学生命科学研究所

増井 徹, 高田容子, 岩下新太郎¹, 田辺秀之, 祖父尼俊雄, 水沢 博: 増殖停止関連遺伝子 *eti-1* のアポトーシス誘導活性

第57回日本癌学会総会 (1998.9)

・三菱化学生命科学研究所

田辺秀之, 中川ゆづき¹, 峯岸大輔, 橋本雄之², 田中憲徳¹, 押村光雄³, 祖父尼俊雄, 水沢 博: 染色体ペインティング法および Reverse FISH 法によるヒト単一染色体保持雑種細胞株パネルの解析

日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10)

¹ 食品薬品安全性研究センター-秦野研究所

² 国立感染症研究所

³ 鳥取大学医学部

田辺秀之, 峯岸大輔, 増井 徹, 祖父尼俊雄, 水沢 博: FISH 法によるテロメアおよびセントロメア DNA を指標とした各種培養細胞株の染色体分析

財団法人染色体学会 1998 年度 (第49回) 広島大会 (1998.11)

田辺秀之, 峯岸大輔, 増井 徹, 祖父尼俊雄, 水沢 博: ヒト腫瘍細胞株におけるテロメア癒合 (telomeric association; tas) について

第16回染色体ワークショップ (1999.1)

Mizusawa, H.: Slow but steady movement of cell banking in

Japan

Workshop on the Cell Banking Management and Function of National Cell Line Repositories, Congress on In Vitro Biology (1998.6)

Hamada, S.^{*1}, Morita, T.^{*2}, Wakata, A.^{*3}, Sutou, S.^{*4}, Shimada, H.^{*5}, Nakajima, M.^{*6} and Hayashi, M.: **Evaluation of the rat chronic micronucleus assay: summary of the 13th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS**

1999 Environmental Mutagen Society Meeting (1999.3)

^{*1} エスエス製薬(株)中央研究所

^{*2} 日本グラクソ(株)筑波研究所

^{*3} 山之内製薬(株)安全性研究所

^{*4} 伊藤ハム(株)

^{*5} 第一製薬(株)安全性研究所

^{*6} 食品農医薬品安全性評価センター

Masui, T., Iwashita, S.^{*}, Takada, Y., Okado, K., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: **Epithelial Topoinhibition Inducible-1 (*eti-1*) gene isolated from normal human epithelium at growth arrest induced apoptosis**

BSCB Autumn Meeting, Epithelial Cell Biology (1998.9)

^{*} 三菱化学生命科学研究所

Hayashi, M.: **An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computalized image analysis of acridine orange supravivally stained peripheral blood cells**
4th International Symposium on Chromosomal Aberrations (1998.8)

Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. and Sofuni, T.: **Numerical aberrations and spindle disturbances induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in the Chinese hamster cell line V79-MZ**

4th International Symposium on Chromosomal Aberrations (1998.8)

Hamada, S.^{*1,2}, Hayashi, M., Yamazaki, K.^{*2}, Nakanishi, S.^{*2} and Serikawa, T.^{*2}: **Strain differences in the rat to induction of micronuclei by cyclophosphamide**

1999 Environmental Mutagen Society Meeting (1999.3)

^{*1} エスエス製薬(株)中央研究所

^{*2} 京都大学大学院医学研究科

Sui, H.^{*1}, Suzuki, M.^{*2}, Yamada, M., Hara, T.^{*1}, Shibuya, T.^{*1}, Nohmi, T. and Sofuni, T.: **Role of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in host *E. coli* cells for the detection of gene mutation by MMS and ENU in transgenic mice sperm**

1999 Environmental Mutagen Society Meeting (1999.3)

^{*1} 食品薬品安全性研究センター秦野研究所

^{*2} 理化学研究所

長谷川隆一: **環境化学物質の内分泌かく乱作用**
日本石油学会 創立40周年記念仙台大会 (1998.11)

広瀬明彦: **化学物質の安全性と評価 (1) 最新の有害危険性評価**
日本化学会・防災専門委員会 第8回化学安全セミナー (1998.11)

藤原康弘: **審査センターにおける審査体制 医系審査官の**

役割 特別講演「抗癌剤の評価 日米の審査の現場から」
第10回日本臨床腫瘍研究会 (1998.2)

藤原康弘: **日米における新医薬品の承認審査体制**
第30回 General Hospital Psychiatry 研究会 (1998.6)

藤原康弘: **審査センターにおける新医薬品の承認審査 ワークショップ 3BRM 製剤の開発, 承認に関わる International Harmonization の現況と Breakthrough**
第11回日本 BRM 学会総会 (1998.11)

藤原康弘: **新薬承認に関する最近の考え方**
平成10年度がん研究助成金によるシンポジウム「がん臨床試験の問題点と今後の課題」 (1999.1)

Fujiwara, Y.: **Improvement of evaluation process for new anticancer drugs in MHW and PMDEC in Japan**
The 1st US-Japan Workshop on Clinical Trials - for further development of cancer therapeutics - (1999.2)

藤原康弘: **抗腫瘍薬の開発に対する審査センターの立場からの提言 シンポジウム「新 GCP 施行開始後の日本の抗腫瘍薬の開発の諸問題」**
第11回日本臨床腫瘍研究会 (1999.2)

Okada, S.: **Revision of the Japanese Pharmacopoeia (JP) and the JP Reference Standard**
The 2nd KFPA International Symposium (1998.11)

四方田千佳子, 田頭洋子, 岡田敏史, 鈴木英世^{*}: **逆相系光学異性体分離カラムによるロートエキス中トロパンアルカロイドの光学分割**
第5回クロマトグラフィーシンポジウム (1998.8)

^{*} 富山県薬事研究所

四方田千佳子, 岡田敏史: **Strong contraction of crosslinked hyaluronate gel by cationic drugs**
第4回ハイドロコロイド国際会議発表 (1998.10)

宮崎玉樹, 四方田千佳子, 岡田敏史: **ヒアルロン酸の超音波分解における共存カチオンの影響**
第48回日本薬学会近畿支部大会 (1998.10)

四方田千佳子, 宮崎玉樹, 岡田敏史: **ヒアルロン酸の SEC 及び SEC-Lalls による分子量測定**
第3回高分子分析討論会 (1998.11)

岩谷敬仁^{*}, 工藤憲一^{*}, 四方田千佳子: **円二色性検出器を用いたロートエキス中アルカロイドの光学純度測定**
第4回 LC テクノプラザ (1999.2)

^{*} 日本分光(株)第二技術部 LC 応用技術課

四方田千佳子, 岡田敏史: **医薬品修飾ヒアルロン酸の DSC 測定**
日本薬学会第119年会 (1999.3)

四方田千佳子, 田頭洋子, 岡田敏史, 勝峰万里^{*}, 岩木和夫^{*}, 林 譲, 松田りえ子: **HPLC 分析における適切なデータ取り込み間隔について**
日本薬学会第119年会 (1999.3)

^{*} 荏原総合研究所

宮崎玉樹, 四方田千佳子, 岡田敏史: ヒアルロン酸の超音波分解に伴う分子量分布の変化と極限分子量への収束
日本薬学会第119年会(1999.3)

工藤憲一*, 岩谷敬仁*, 四方田千佳子: 円二色性検出器を用いたロートエキス中アルカロイドの選択的検出による光学純度測定

日本薬学会第119年会(1999.3)

* 日本分光(株)第二技術部 LC 応用技術課

谷本 剛, 前川京子, 谷本 剛, 岡田敏史, 久保江理¹, 赤木好男¹, 藤澤茂樹²: OLETf ラット水晶体の糖白内障発症における生化学的・形態学的変化.

日本薬学会第119年会(1999.3)

¹ 福井医科大学

² 大塚製薬(株)

斎藤博幸, 有本 達*, 半田哲郎*: 血漿アポリポ蛋白質による脂質粒子表面のレシチン単分子膜と2分子膜の認識と差別化

第40回日本脂質生化学研究会研究集会(1998.7)

* 京都大学大学院薬学研究科

有本 達*, 松本智津子*, 斎藤博幸, 谷本 剛, 岡田敏史, 半田哲郎*: 脂質エマルションの体内動態とリポリシスの制御

第14回日本DDS学会(1998.7)

* 京都大学大学院薬学研究科

Saito, H., Miyako, Y., Tanimoto, T., Okada, S. and Handa, T.: Role of Surface Structure in Apolipoprotein A-I Binding to Lipid Bilayers and Emulsions

39th International Conference on the Biochemistry of Lipids (1998.9)

* Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University

Arimoto, I., Saito, H. and Handa, T.: Regulation of Lipolysis and Plasma Clearance by Sphingomyelin and Cholesterol in Lipoprotein Surface

39th International Conference on the Biochemistry of Lipids (1998.9)

* Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University

斎藤博幸: 血漿アポリポ蛋白質の結合性を制御する脂質エマルションの動的構造の解明

第48回日本薬学会近畿支部大会(1998.10)

有本 達*, 斎藤博幸, 半田哲郎*: リポ蛋白質リパーゼの反応機構とエマルション表面膜構造

第20回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(1998.10)

* 京都大学大学院薬学研究科

斎藤博幸, 有本 達*, 半田哲郎*: レシチン単分子膜(エマルション)と2分子膜(ベシクル)による血漿アポリポ蛋白質の認識と代謝

膜シンポジウム '98(1998.11)

* 京都大学大学院薬学研究科

斎藤博幸: 血漿アポリポ蛋白質によるエマルション単分子

膜とリポソーム二分子膜の認識機構

日本薬学会第119年会(1999.3)

奥平桂一郎*, Aline Vertut-Doi*, 松本智津子*, 半田哲郎*, 斎藤博幸: 培養肝細胞 HepG2 を用いたエマルションの取り込み評価

日本薬学会第119年会(1999.3)

* 京都大学大学院薬学研究科

田中将史*, 有本 達*, 半田哲郎*, 斎藤博幸: トリグリセライドアシル鎖長によるエマルションの表面構造とアポリポ蛋白質結合性の変化

日本薬学会第119年会(1999.3)

* 京都大学大学院薬学研究科

堀伸二郎*, 小西良昌*, 尾花裕孝*, 石光 進: 合成着色料中の有機塩素系化合物の不純物の分析法

日本食品化学学会第4回学術大会(1998.6)

* 大阪府立公衆衛生研究所

Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y.: Multi-residue analysis for pesticides in cereals by SFE and HPLC/GC

Ninth International Congress of Pesticide Chemistry (1998.8)

Tsuji, S., Mishima, I., Ishimitsu, S., Shibata, T. and Tonogai, Y.: Variations and Determined Values of Hydrogen Peroxide Contents in Milk, Coffee Drinks and Soft Drinks Using a Sensitive Oxygen Electrode Method

112th International Annual Meeting (1998.9)

Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S., Shibata, T. and Tonogai, Y.: Application of ICP Atomic Emission Spectrometry Connect with Automatic Hydride Generator for Tests of Arsenic in Food Coal-Tar Dyes

112th International Annual Meeting (1998.9)

中村優美子, 津村ゆかり, 外海泰秀, 柴田 正: 静脈内投与時におけるラットの7種希土類元素の塩化物の毒性発現の違いについて

第24回環境トキシコロジーシンポジウム(1998.10)

辻 澄子, 三島郁子, 石光 進, 柴田 正, 外海泰秀: 逆相 HPLC によるミックストコフェロールオイル製剤中のトコフェロール同族体の分析

第35回全国衛生化学技術協議会年会(1998.10)

石光 進, 三島郁子, 辻 澄子, 柴田 正, 外海泰秀: ヒ素試験法の違いによる活性炭中のヒ素含有量の変動

第35回全国衛生化学技術協議会年会(1998.10)

吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光 進, 外海泰秀: SFE 及び HPLC/GC を用いた穀類中残留農薬の一斉分析法

第35回全国衛生化学技術協議会年会(1998.10)

吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美子, 石光 進, 外海泰秀: 穀類中に残留する有機リン系農薬の抽出時における分解(2)

日本食品衛生学会第76回学術講演回(1998.11)

Yoshii, K., Okada, M., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Nakamura, Y.

and Tonogai, Y.: **Determination of 10 Chloroacetanilide Pesticides and Pyriminobac-methyl in Crops by SFE and GC/MS: Comparison with Japanese Bulletin Method**
11th Annual California Pesticide Residue Workshop (1999.3)

外海泰秀, 宮田秀明¹, 佐々木久美子, 田中敏嗣², 谷 孝之³, 中村好志⁴, 永山敏広⁵, 岡 尚男⁶, 前川吉明⁷, 堀伸二郎⁸: **食品中のダイオキシン類の分析**
日本薬学会第 119 年会 (1999.3)

- ¹ 摂南大学薬学部
- ² 神戸市環境保健研究所
- ³ 神奈川県衛生研究所
- ⁴ 静岡県立大学薬学部
- ⁵ 東京都立衛生研究所
- ⁶ 愛知県衛生研究所
- ⁷ 日本食品分析センター
- ⁸ 大阪府立公衆衛生研究所

石光 進, 津村ゆかり, 岡田 舞, 吉井公彦, 外海泰秀:
食品中フタル酸エステル類の試験法の検討
日本食品衛生学会第 77 回学術講演回 (1999.5)

吉井公彦, 岡田 舞, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀:
HPLC による農作物中のエマメクチン (殺ダニ剤) 及びその類縁化合物の一斉分析法の検討
日本食品衛生学会第 77 回学術講演回 (1999.5)

岡田 舞, 吉井公彦, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀:
クロロアセトアニリド系農薬及びピリミノバックメチルの超臨界流体抽出及び GC/MS を用いた一斉分析法
日本食品衛生学会第 77 回学術講演回 (1999.5)

辻 澄子, 松村郁子, 中村優美子, 外海泰秀: **HPLC による食用黄色 5 号中の副成色素, 未反応原料及び反応中間体の定量における内部精度管理について**
日本食品衛生学会第 77 回学術講演回 (1999.5)

村井敏美, 中川ゆかり, 田中寿一, 前田秀子, 川島邦夫:
IL-1 β によるヒトメラノーマ細胞の細胞周期停止機構の解析: p21Cip1 はサイクリン E/Cdk2 複合体の活性を選択的に阻害する
第 71 回日本生化学会大会 (1998.10)

江馬 眞, 宮脇英美子, 川島邦夫: **可塑剤 butyl benzyl phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害**
第 25 回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

原園 景, 江馬 眞, 川島邦夫: **ラットにおける着床前期間に投与したトリブチルスズの着床阻害作用—脱落膜反応に与える影響—**
第 25 回日本トキシコロジー学会学術年会 (1998.6)

江馬 眞, 宮脇英美子, 川島邦夫: **ラットの妊娠後半に投与した dibutyl phthalate の発生毒性**
第 38 回日本先天異常学会総会・学術集会 (1998.7)

宮脇英美子, 江馬 眞, 川島邦夫: **トリフェニルスズの着床阻害作用: 偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応の抑制**
第 38 回日本先天異常学会総会・学術集会 (1998.7)

江馬 眞: **トリフェニルスズのラットにおける生殖毒性**

第 59 回関西実験動物研究会 (1998.9)

Emm, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K.: **Early embryonic loss induced by diphenyltin dichloride (DPTCl) in rats**
Society of Toxicology, 38th Annual Meeting (1999.3)

柴田敏郎: **Astragalus 属植物の栽培研究及び薬用植物栽培指針について**
第 7 回国際伝統医薬シンポジウム富山 (1998.8)

南 基泰, 酒井英二, 柴田敏郎, 西 孝三郎, 佐竹元吉, 岡 賢治¹, 近藤誠三¹, 田部井 豊², 番 保徳², 萱野 暁明²: **茵陳蒿の生産について (3) カワラヨモギ (*Artemisia capillaris*) の集団間変異**

日本生薬学会第 45 回年会 (1998.9)

- ¹ 小太郎漢方製薬 (株)
- ² 農林水産省生物資源研究所

芝野真喜雄¹, 草野源次郎¹, 縣 功², 柴田敏郎, 畠山好雄: **ウラルカンソウ *Glycyrrhiza uralensis* の栽培のための基礎研究 1.**

日本生薬学会第 45 回年会 (1998.9)

- ¹ 大阪薬科大学
- ² 北海道医療大学

柴田敏郎, 南 基泰, 酒井英二, 西 孝三郎, 近藤誠三¹, 岡 賢治¹, 佐竹元吉, 田部井 豊², 番 保徳², 萱野暁明²: **茵陳蒿の生産について (4) カワラヨモギとオトコヨモギの自然雑種について**

日本薬学会 119 年会 (1999.3)

- ¹ 小太郎漢方製薬 (株)
- ² 農林水産省生物資源研究所

熊谷健夫: **トリカブトの栽培に関する研究**
第 8 回薬用植物栽培技術フォーラム (1999.7)

横井崇秀*, 細川敬三, 及川弥生*, 山村三郎*: **アントシアニン生成系酵素遺伝子を導入したリンドウ形質転換体の作出**

日本育種学会第 94 回講演会 (1998.10)

- * (財) 岩手生物工学研究センター

高上馬希重, 飯田 修, 熊谷健夫, 畠山好雄, 李 宜融, 関田節子, 佐竹元吉, 吉田尚利¹, 神田博史², 山根千枝²: **トウキの基原植物の研究 (2)**

日本薬学会第 119 年会, 徳島 (1999.3)

- ¹ 北海道大学薬学部
- ² 広島大学医総薬

谷 宏志¹, 柏田良樹¹, 池城安正¹, 畠山好雄, 土田貴志², 宇野敏夫², 小坂 昇²: **ダイオウのフェノール成分パターンの乾燥による変化**

日本薬学会第 119 年会, 徳島 (1999.3)

- ¹ 新潟薬科大学
- ² 鐘紡漢方研究所

安藤理子*, 田中章江*, 寺原典彦*, 下村講一郎, 石丸幹二*: ***Campanula* 属植物の組織培養と二次代謝成分**

日本食品化学学会第 4 回学術大会, 下関 (1998.6)

- * 佐賀大学

Lee, K.-T.¹, Suzuki, T.¹, Yamakawa, T.¹, Kodama, T.², Igarashi, Y.¹ and Shimomura, K.: **Scale up and tropane alkaloids production by transformed root cultures of *Atropa belladonna*.**

IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel (1998.6)

¹ 東京大学

² 信州大学

Sommer, S.¹, Yazaki, K.², Shimomura, K., Bechthold, A.¹ and Heide, L.¹: **Genetic engineering of shikonin biosynthesis with bacterial *ubiC* in *Lithospermum erythrorhizon***

第16回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 仙台 (1998.7)

¹ Tübingen Universität

² 京都大学

下村講一郎, 東野 薫¹, 原田久也¹, 大本俊郎², 吉松嘉代, 矢崎一史³: **培養ムラサキシユートにおける赤色素生成**

第16回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 仙台 (1998.7)

¹ 千葉大学

² 三栄源エフエフアイ

³ 京都大学

東野 薫¹, 原田久也¹, 吉松嘉代, 大本俊郎², 矢崎一史³, 下村講一郎: **培養ムラサキシユートにおける赤色素生成—植物ホルモンによる影響—**

第16回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 仙台 (1998.7)

¹ 千葉大学

² 三栄源エフエフアイ

³ 京都大学

吉松嘉代, 中尾伸子, 西 孝三郎, 下村講一郎: **オウレン毛根培養によるプロトベルリン型アルカロイド生産**

第16回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム, 仙台 (1998.7)

Kamada, H.¹, Kobayashi, T.¹, Eun, C.², Shen, S.², Yang, G.², Maeda, K.³, Sasaki, K.³, Shimomura, K., Hanai, H.², Matsubayashi, Y.² and Sakagami, Y.²: **Physiological effects of phytosulfokine on morphogenesis in higher plants**

The International Symposium on Novel Signal Compounds in Plants: Chemistry, Biochemistry Molecular Biology and Physiology, Tsukuba, Japan (1998.8)

¹ 筑波大学

² 名古屋大学

³ 青森大学

Sasaki, K.¹, Ishise, T.¹, Kobayashi, T.², Higashi, K.², Matsubayashi, Y.³, Sakagami, Y.³, Shimomura, K., Umetsu, H.¹ and Kamada, H.²: **Effect of phytosulfokine- α on growth and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* hairy roots**

The International Symposium on Novel Signal Compounds in Plants: Chemistry, Biochemistry Molecular Biology and Physiology, Tsukuba, Japan (1998.8)

¹ 青森大学

² 筑波大学

³ 名古屋大学

下村講一郎, 東野 薫¹, 原田久也¹, 石丸幹二², 吉松嘉代, 矢崎一史³: **培養ムラサキシユートにおける赤色素とフェノール性化合物**

日本生薬学会第45回年会, 仙台 (1998.9)

¹ 千葉大学

² 佐賀大学

³ 京都大学

吉松嘉代, 下村講一郎, 矢崎一史¹: **ガラス化法によるムラサキシ細胞の超低温保存**

日本生薬学会第45回年会, 仙台 (1998.9)

¹ 京都大学

中西 史¹, 巢立 透², 下村講一郎: **培養セイヨウアカネシュートにおけるアントラキノン類の生産**

日本植物学会62回大会, 広島 (1998.9)

¹ 東京学芸大学

西川和孝¹, 古川綾子¹, 石丸幹二¹, 藤岡稔大², 三橋國英², 下村講一郎: ***Scutellaria* 属植物の組織培養と二次代謝**

日本農芸化学会第240回西日本支部大会, 山口 (1998.10)

¹ 佐賀大学

² 福岡大学

八木 晟¹, 佐藤由美子², 赤崎健司³, 辻 宏⁴, 下村講一郎: **アロエベラ葉, クローン植物および製品におけるベレクチンの免疫化学的検索**

日本薬学会第119年会, 徳島 (1999.3)

¹ 福山大学

松岡秀明¹, 佐藤文彦², 下村講一郎, 矢崎一史³: **GFPを用いた暗黒下発現タンパク LEDI-2 の局在部位の解析**

日本農芸化学会1999年度大会, 福岡 (1999.4)

¹ 京都大学

Tanaka, N.¹, Kamiya, T.², Shimomura, K. and Ishimaru, K.¹: **Micropropagation and polyphenol production in *Cornus capitata***

日本農芸化学会1999年度大会, 福岡 (1999.4)

¹ 佐賀大学

² 大平洋セメント(株)

飯田 修, 栗原孝吾, 山田和也, 高上馬希重, 香月茂樹: **ニッケイ属植物の環境適性について**

日本薬学会第119年会 (1999.3)

高上馬希重, 飯田 修, 熊谷健夫, 畠山好雄, 李 宜融, 関田節子, 佐竹元吉, 吉田尚利¹, 神田博史², 山根千枝²: **トウキの基原植物の研究(2) 北海道内ホッカイトウキおよび野生トウキのRAPD法による系統解析**

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 北海道大学薬学部

² 広島大学医学部

李 宜融, 高上馬希重, 飯田 修, 関田節子, 佐竹元吉, 牧野由紀子¹, 花田裕美², 番 保徳³, 萱野暁明³: ***Cannabis sativa* の AFLP 法による系統解析**

日本薬学会第119年会 (1999.3)

¹ 関東地区麻薬取締官事務所

*2 和歌山県暖地園芸センター

*3 農業生物資源研究所

酒井英二：カワラヨモギの栽培及び成分に関する研究
第8回薬用植物栽培技術フォーラム（1998.7）

酒井英二，柴田敏郎，西 孝三郎，西部三省*1，川村智子*2，
野呂征男*2，田中俊弘*3：羅布麻の資源について
日本生薬学会第45回年会（1998.9）

*1 北海道医療大学薬学部

*2 名城大学薬学部

*3 岐阜薬科大学

南 基泰，酒井英二，柴田敏郎，西 孝三郎，佐竹元吉，
岡 賢治*1，近藤誠三*1，田部井 豊*2，番 保徳*2，萱野
暁明*2：茵陳蒿の生産について（3）カワラヨモギ（*Artemisia*
capillaris）の集団間変異
日本生薬学会第45回年会（1998.9）

*1 小太郎漢方製薬（株）

*2 農林水産省生物資源研究所

酒井英二，佐竹元吉，渡辺多加子*，池田正慶*，遠山美知
子*：いわゆるダイエット茶に含まれる「センナ茎」につい
て

日本薬学会第119年会（1999.3）

* 国民生活センター

南 基泰，柴田敏郎，酒井英二，西 孝三郎，近藤誠三*1，
岡 賢治*1，佐竹元吉，田部井 豊*2，番 保徳*2，萱野
暁明*2：茵陳蒿の生産について（4）カワラヨモギとオトコヨ
モギの自然雑種について

日本薬学会第119年会（1999.3）

*1 小太郎漢方製薬（株）

*2 農林水産省生物資源研究所

香月茂樹，高上馬希重，飯田 修，坂元（佐々木）史歩，
米谷民雄，渡辺高志*：Curcuma 属植物の種苗特性に関する
研究

日本薬学会第119回年会（1999.3）

* 北里大学薬学部

会議名：ICH5 準備会議

出席者：薬品部 小嶋茂雄，青柳伸男，吉岡澄江 (①，②のいずれにも参加)

開催場所，時期：①東京 (日本)，1998年8月31日～9月3日，②ブリュッセル (ベルギー)，1999年3月8日～11日

参加者内訳，人数：日米欧3極の医薬品規制当局および製薬団体関係者多数

会議内容：小嶋と青柳が，化学合成医薬品の規格及び試験方法に関するガイドライン (Q6A) 策定のための専門家会議に，また，吉岡が安定性試験ガイドライン (Q1A) 改訂のための専門家会議に参加した：

1. 化学合成医薬品の規格及び試験方法に関するガイドライン (Q6A) の策定

本ガイドラインは，平成9年7月のブリュッセルでの専門家会議において，薬局方の試験法の調和の課題の解決を先送りした形でステップ2に漕ぎ着けており，その後の各極での内示を経て，平成10年夏の東京での専門家会議で，ステップ4に向けての検討が始められた。この会議では，判定基準の絡む6つの試験法の調和のためのスキームをICHの場で作る必要があるとの日本側からの提案に基づいて，日米欧がそれぞれ下記の試験法を担当し，各極の行政当局，企業側，薬局方がタスクチームを作り，調和案を作成して，各極に送付し，それを専門家会議で検討することで合意された。

担当：日本 含量均一性試験法&重量偏差試験法
米国 微生物限度試験法&保存効力試験法
EU 溶出試験法&崩壊試験法

平成11年3月のブリュッセルでの会議における議論のポイントは，東京での会議に引き続き，薬局方の試験法の調和の問題であった。上記6つの試験法について，各極が分担した試験法に関する調和案の作成状況やその内容に関する議論が行われ，次回のワシントンでのICH専門家会議までの調和の作業のスケジュールが決められた。

ガイドライン本体に関しては，一部の検討を次回送りとした他はほぼ合意に達しており，本ガイドラインがステップ4に達することができるかどうかは，薬局方の試験法の調和が達成できるかどうかにかかっている。

2. 安定性試験ガイドライン (Q1A) の改定

最も早く合意に達して実施段階にある安定性試験ガイドラインには，十分にカバーされていない点がいくつかあることから，3極間で共通の認識を得るための非公式会合が開催されるなどの努力が払われてきた。そうした経過を踏まえて，どのような項目についてガイドラインの改定を行うべきかを検討するための準備会議が平成10年夏に東京で開催された。平成11年3月のブリュッセルで開催された改定のための最初の専門家会議では，下記の5項目について検討が行われ，ほぼ合意に達することができた：

- ①試験間隔
- ②実生産ロットでの試験
- ③低温保存の場合の試験条件
- ④半透湿性容器に入った液剤の場合の試験条件
- ⑤ガイドラインの記載中にある不整合な点の解消

なお，今後の検討事項としては，次の項目が予定されている：

- ⑥ブラケットティング&マトリキシング
- ⑦ゾーンⅢ&Ⅳの気候条件の地域への拡張
- ⑧統計処理したデータの解釈

会議名：薬局方製剤の一般試験法に関する国際調和会議

出席者：薬品部 青柳伸男

開催場所，時期：セビリア (スペイン)

①製剤試験法に関するワークショップ，1998年10月26日～27日，

②専門家会議，1998年10月28日，

③薬局方代表者会議，1998年10月29日～30日

参加者内訳，人数：

①欧米を中心に約150名

②日米欧の行政，薬局方，製薬団体の代表約30名

③日米欧の薬局方代表者7名

会議内容：製剤試験法に関するワークショップでは，国際調和が課題となっている溶出，崩壊，含量均一性，重量偏差，粒度試験等について，日本，欧米の行政，薬局方，製薬団体の各代表が，各国の実状と調和に向けての見解を述べ，質疑応答により課題を整理した。専門家会議では，ワークショップで明らかにされた問題点について，代表専門家間で意見交換が行われ，調和案作成へ向けての役割，スケジュール等が決められた。日本が原案作成の担当責任となっている含量均一性試験に関しては，日局の試験法を採用することとし，含量の閾値，許容値等については，対案を提示した米国製薬団体と協議することに決定した。薬局方代表者会議では，医薬品添加剤の調和案について討議が行われた後，薬局方製剤試験の国際調和に関する討議が行われ，合意事項，問題点の整理がなされた。その後，ICHとの調整法，今後の計画，役割分担等について話し合われ，4月に東京で開催される会議で，製剤試験の調和を再度，討議することとなった。本会議で問題点が整理されたので，今後，製剤試験の調和は進展するものと思われる。

会議名：医薬品生産における動物血清使用問題をめぐる国際会議等

出席者：生物薬品部 早川堯夫

開催場所，時期：ストラスブール (フランス)，1998年5月2日～10日

参加者内訳，人数：日，米，欧，オセアニアなどの公的研究機関，規制当局，大学，製薬企業関係者など約200名

会議内容：本国際会議は，バイオ医薬品等の品質・安全性確保上，世界で議論的になっている医薬品生産に使用される動物血清，血清誘導体，あるいは代替品に関する問題について科学的な討議を行い，今後のあり方を探ろうとするものであった。得られた共通認識は，①多くの細胞培養の培地成分として血清がきわめて有用なものであり，適切な代替品が存在しない，という現状をふまえて問題を論ずる必要があること，②血清使用の是非については，当該生産物 (医薬品) のベネフィットとリスクを勘案すべきこと，③血清使用に当たっては，供給源の選択を適正にすることや適切なウイルス除去・不活化方法を適用し，リスクの最小限化を図ること，④より適切なウイルス除去・不活化方法や血清 (成分) 代替品に関する開発研究を進展させる必要があること，⑤新たに細胞培養による医薬品生産を企画する際には，血清をはじめ生物由来成分を極力培地成分から除外する方向で生産設計すること，などであった。早川は，セッションの議長を務め，討議に参画した。またその機会に，バイオ医薬品等の品質評価試験法の薬局方間国際調和問題に関して，欧州薬局方バイオ医薬品専門家達と討議を行った。

会議名：WHOにおける生物薬品 (生物製剤) 標準化と品質管理の進歩：50年記念シンポジウム

出席者：生物薬品部 早川堯夫
開催場所、時期：ジュネーブ（スイス）、1998年10月24日～31日

参加者内訳、人数：日、米、欧、アジア、オセアニアなどの公的研究機関、規制当局、大学、製薬企業関係者など約200名

会議内容：本国際会議は、WHOがこの50年間に生物起源に由来する医薬品の標準化や品質管理に関して活動してきた成果を振り返り、又新たな生物薬品（生物製剤）の時代、すなわちバイオ応用医薬品を中心とする生物薬品の品質管理や安全性確保に関する活動にむけてどのような展望を持つのかを討議しようとするものであった。さらに、世界標準化の一層の推進にむけて、日・米・欧が行っている医薬品に対する技術要求の国際調和活動とどのように歩調を合わせて行くのかも討議しようとする会議であった。これまでの代表的成果としては、①国際標準品の確立、②天然痘撲滅を象徴的成果とする各種ワクチン類の品質確保・標準化と普及啓蒙活動、③ホルモン等生物由来医薬品の品質確保・標準化、④血液製剤の品質確保・標準化及び輸血分野における標準化、⑤医薬品生産素材としての細胞基材に関する概念及び評価法の確立などが挙げられ、討議された。

21世紀に向けては、①生物薬品に関する新たな品質・安全性評価技術の提示、②TSE対策、③核酸ワクチンやコンビネーションワクチンの標準化、④国際調和などが討議された。早川は、セッションの議長を務め、討議に参画した。

会議名：ワクチン類の国レベルでの規制のあり方に関するWHO専門家会議

出席者：生物薬品部 早川堯夫
開催場所、時期：ジュネーブ（スイス）、1999年1月19日～25日

参加者内訳、人数：6つのWHO region（北米、南米、欧州、アジア、オセアニア、アフリカ）から：米FDA（2名）、カナダ、アルゼンチン、スイス、独（PEI）、英（NIBSC）、イラン、日本、インド、インドネシア、オーストリア、セネガル、チュニジア、南アフリカから各1名、及びWHO職員約15名

会議内容：本会議は、1) WHOがワクチン類を開発途上国等に適切に供給するためにその品質保証に関してどのような規制がなされるべきかを討議すること、2) ユニセフなどの国連関連機関で購入したワクチンの品質・安全性の面での受入れ評価手順などに関するWHO文書を改訂すること、3) ワクチンの臨床評価ガイドラインを作成する必要性の有無について討議することを目的としていた。1) に関しては、規制のシステムとして備えるべき7つの機能（ワクチン規制環境の法的整備、審査機構、監視、ロットリリース、試験研究機関評価、GMP査察、臨床評価）とそのさらに詳細な内容54項目について集中的に議論した。2) に関しては、既存の受入評価手順書における再評価の項の改訂及び新たなワクチンの導入に関する追加記載が提案され、了承された。3) については、①ワクチンに関わるWHO世界研修ネットワークの研修内容として是非必要、②ワクチンの臨床試験の至適化、③国連機関によるワクチン買い上げの際の基準、参考資料としての活用、などの理由から、WHOが主体となってワクチンの臨床評価ガイドライン作成に着手する方針が了承され、その基本要件が討議された。

会議名：ICH バイオテクノロジー応用医薬品の品質関連専門家会議

出席者：生物薬品部 早川堯夫、川西 徹
開催場所、時期：ブリュッセル（ベルギー）、1999年3月6日～14日

参加者内訳、人数：日米EU三極のバイオテクノロジー応用医薬品品質分野の薬事規制当局および製薬団体関係者約15名

会議内容：生物薬品分野の品質部門においてICH4後に残されたトピックスであるQ6B: Specifications（バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の特性解析と規格）ガイドラインについて討議を行った。本ガイドラインは1996年5月から本格的討議が開始され、1998年2月ワシントンでの専門家会議でStep2へ達した。今回の会議では、Step2文書を対象に各国において意見聴取を行った結果、提出されたコメント（厚生省から約45、FDAから約135、EUから約50のコメント）をもとに検討を行った。その間、“Specification（規格）”の定義については、Q6Aガイドライン（化学合成医薬品の規格）関連の専門家との合同協議も行った。その結果、本ガイドラインの基本骨格での変更はなかったものの、“Specification”の定義の修正を含めた数多くの表現の修正を行ったのち、Step4文書を完成させた。

会議名：米国化学会“生物薬品の有用確保に関する第9回学術大会”

出席者：生物薬品部 早川堯夫
開催場所、時期：ウィスラー（カナダ）、1999年5月23日～28日

参加者内訳、人数：北米、欧州を中心に、日、アジア、オセアニアなどの公的研究機関、規制当局、大学、製薬企業関係者など約300名

会議内容：米国化学会ではその活動の一環として、“生物薬品の有用確保”を最終目的とし、生物薬品の開発研究や生産に関する科学的問題を論ずるための定期的な学術大会を主催しており、今回その第9回大会であった。主なシンポジウムとして、1) 世界における医薬品開発の将来、2) 生産初期工程をめぐる諸問題、3) 現に存在するかあるいは存在する可能性がある感染性因子への対処、4) 分子レベルでの生物製品分離技術、5) クロマトグラフィーに代わる新規精製方法、6) 生産工程の設計、模擬試験、経済性、7) クロマトグラフィー、8) ゲノミクスを利用した生産技術開発、9) 製造方法変更とその管理、10) 遺伝子治療薬やトランス動物由来医薬品等の遺伝子組換え技術を応用した新たなタイプの製品開発、などが取り上げられた。早川は、“現に存在するかあるいは存在する可能性がある感染性因子への対処”に関するセッションの特別講演者の一人として、“ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価”について話題を提供し、討議に参加した。その他6つのワークショップとポスターセッションが行われた。

会議名：「遺伝子組換え体由来食品のDNA検出技術」に関する国際ワークショップ

出席者：食品部 豊田正武
開催場所、時期：ベルギー、ブリュッセル、1998年6月3日～5日

参加者内訳、人数：欧米各国の行政官、バイオ関連企業、消費者団体、約100名参加

会議内容：本会議はWHO及びFAOに対しコンサルティングを行っているILSI（国際生命科学研究所）が主催で、EUの組換え食品に対する表示規制の決定のための科学的検討を行う目的で開催された。セッション1は遺伝子組換え体

の検出法とサンプリング法に関する総論、セッション2は組換え蛋白質の検出法、セッション3は組換えDNAの検出法、セッション4はサンプリング、組換えDNAの定性的分析と定量的分析、組換え蛋白質の検出の分科会で確認の為の有効な実施基準が検討された。特にセッション3でECの共同研究プロジェクト(組換えDNA検出技術のための研究所間評価)の結果が報告され、組換え大豆で検出率93~98%、非組換え体判定率97~100%で、混入率0.1%では検出感度が落ちていた。会議の結論として、組換え遺伝子を検出する定性的なPCR法は、一般的に利用できる程度になっているが、定量的なPCR法は更なる開発が必要である。規制に際しては分析者のトレーニングプログラムが必要である。設定される境界値(threshold)に合わせた実施基準とすべきである。

会議名: 第三回 FAO/WHO/UNEP マイコトキシン国際会議

出席者: 食品部 合田幸広

開催場所、時期: チュニス(チュニジア), 1999年3月3日~6日

参加者内訳、人数: 38カ国代表, 16国際団体(IUPAC, ILSI等企業系団体, 国際ピーナッツフォーラム等企業系団体及び、主催者側4団体 FAO, WHO, UNEP, African Association of Microbiology and Food Hygiene) 約150人

会議内容: 本会議は、食品及び飼料のマイコトキシン汚染がもたらす健康危害と貿易上の問題を含む経済損失に関し政策決定者の知見を増やすこと、マイコトキシンに関する最新の科学的、技術的な情報を交換すること、マイコトキシンの規制と汚染の制御法に関し国際調和をはかること、安全で健全な食料供給を行うためにマイコトキシン汚染の評価、防止、制御を目的とした戦略とプログラムに関する勧告を行うことを目的として、同年3月20日以降ハーグで開催されたCodex委員会の直前に開かれた。会議の議長は、米国FDAのDr. Poland(現AOACの会長)が推薦された。会議では、マイコトキシンの健康影響評価と規制、マイコトキシンの汚染防止と解毒化、マイコトキシン制御のためのHACCPシステム、試料のサンプリングと分析方法、マイコトキシン汚染標準品と分析標準品、分析熟練度テスト、アフラトキシン、フモニシン、オクラトキシン、トリコセン、ゼアラレノン汚染に関する個別の問題等について、発表と活発な議論があり、いくつかの課題ごとに勧告がなされた。

会議名: 第22回 FAO/WHO 合同食品規格委員会分析・サンプリング部会

出席者: 食品添加物部 山田 隆

開催場所、時期: ブダペスト(ハンガリー), 1998年11月23日~27日

参加者内訳、人数: 38の機関代表, 11の国際団体から148名

会議内容: 以下の議題について論議された。①サンプリングに関する一般ガイドライン、②MRLに従った残留農薬測定のための推奨サンプリング法の改定案、③国際食品規格で採用できる分析法を評価するための判断基準、④回収率により補正された試験結果報告の調和、⑤国際基準に則った分析用語の調和、⑥Measurement Uncertainty、⑦方法の内部検証、⑧コーデックス基準での分析法の承認、⑧分析法に関するInter-Agency会議(IAM)の報告。

①に関しては、ドラフティンググループで再度案を作り、Step3として、次期部会までに各国に回付されることとな

った。②では、用語等についてISO7002と調和を図るべきだとの意見を残留農薬部会へ提出することとなった。④は、IUPACのガイドラインが公表されてから、さらに各国の意見を求めることとなった。⑦もIUPACのガイドラインが利用できるようになってから検討することとなった。⑧では、IAMについては、AOACのホームページで参照可能なこと、残留農薬部会、動物用医薬品残留部会では、バリデーションされた方法を見出すのが困難になっていること、"Limit(s)"という語の定義や必要性を考慮することなどが報告された。③、⑤、⑥は引き続き検討されることとなった。

会議名: 第31回国際食品規格委員会食品添加物汚染物質部会

出席者: 食品部 豊田正武

食品添加物部 山田 隆

開催場所、時期: ハーグ(オランダ), 1999年3月22日~26日(19日~20日 ad hoc working group)

参加者内訳、人数: 55の機関代表, 46の食品関連の国際機関・団体などから300名弱

会議内容: 食品添加物一般基準(GSFA)を180あまりの食品添加物について各国からの情報を集めた結果がまとめられ、ステップ8として、次のコーデックス会議にかけられることとなった。

2月にジュネーブで開催された第46回JECFA会議の要点の報告が行われた。次の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るべき品目の選定が行われた。

汚染物部会では、食品・飼料中のかび毒としてオクラトキシンA及びパツリンの設定ML、ゼアラレノンの提案文書について討議した。また環境汚染物として鉛、錫及びカドミウムのML、ヒ素及びダイオキシンの提案文書について討議した。規格優先品目としてかび毒のフモニシンが選定された。

会議名: 第51回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)

出席者: 食品添加物部 河村葉子

病理部 西川秋佳

開催時期、場所: ジュネーブ(スイス), 1998年6月9日~18日

参加者内訳、人数: WHO委員6名, FAO規格グループ14名, FAO摂取評価グループ6名, WHO事務局及び顧問18名の合計44名

会議内容: 安全性評価の対象となったのは、1)以前のJECFAで毒性学的再評価が勧告されていた添加物(trans-アニソール、カラギーナン、加工ユーケマ藻類、クルクミン、流動パラフィン等)、2)新しいデータが出てきたために毒性学的再評価が必要となった添加物(グルコノデラクトン、メントール等)、3)優先的な評価が必要とされた新規添加物等(γ -サイクロデキストリン、ポリグリシトールシロップ、ステビオサイド等)、4)第44回のJECFAでの新しい評価手法が適用される香料等であった。また、BHA、BHT、TBHQ等の摂取量の評価が行われた。そのほか、約70品目の添加物及び約230品目の香料について、製品規格が検討された。

会議名: 第28回医薬品国際一般名(INN)に関する会議

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）、1998年5月22日～24日

参加者内訳、人数：日、米、欧などから INN 委員 7 人、WHO 事務局 6 人、オブザーバー 4 人

会議内容：WHO の Division of Drug Management & Policies の主催で、28th Consultation on Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances（第 28 回医薬品国際一般名委員会）が開催され、1) Proposed INN リスト#80 等に収載するため、医薬品 86 品目について国際一般名（INN）の選定および見直しを行った。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、立体異性体、セルロース誘導体、インスリン、免疫抑制剤等について、ステム名及び置換基名について検討を行った。

会議名：日米 EU 医薬品規制整合化国際会議 ICH

出席者：代謝生化学 藤森観之助

開催場所、時期：ブリュッセル（ベルギー）、1999年3月8日～11日

参加者内訳、人数：ICH 会議のうち S7 専門家会議には 7 団体、1 オブザーバー（EU:1 名、EFPIA:2 名、MHV:1 名、JPMA:3 名、FDA:1 名、PhRMA:1 名、EFTA:1 名、Canada:1 名）計 11 名

会議内容：日米 EU 医薬品規制整合のための国際ブリュッセル会議において安全性第 7 分野（S7）として「有害作用に関連する薬理試験」即ち、安全性薬理試験のガイドラインに関する専門家会議（EWG）を開いた。本分野は、今回初めて ICH において公式議題となり、従って、今回が最初のガイドライン素案作成作業会議であった。本試験は日本では元々一般薬理試験と称されていたものであり、また日本のみにガイドラインが存在していたために、これまで国際整合が望まれていたものである。素案の原案は研究班作成の英文改正案、FDA の Concept paper および EU/CPMP のガイダンス案の 3 案を並列して用いた。素案作成作業はガイドラインの構成を目次として決めることから始まり、次いで内容の検討、作成を行った。目次とその構成についても安全性薬理試験の範囲、Vital function の解釈と GLP 適用における柔軟性の差を反映するものであり、かなりの時間を討論に割いた。内容に関する論議の中心は試験の背景、定義、試験タイミング、試験系（GLP、試験分類・項目、試験方法等）であったが、試験範囲を含む全ての項目に GLP 適用の有無あるいは適用範囲が絡んでいるために論議は GLP を念頭に置いたものとなった。最も重要な ICH-M3（試験 timing）で合意が得られている vital function の解釈と GLP 適用における Deviation の範囲の解釈において日本と欧米特に米国に差が存在することにより、論議が白熱し、試験項目の検討も討議未了で終了した。素案 1 の完成は 8 月の臨時東京 EWG 会議で行う予定である。

会議名：FAO/WHO 合同残留農薬会議

出席者：代謝生化学部 藤森観之助

開催場所、時期：ローマ（イタリア）、FAO 本部、1998年9月21日～10月2日

参加者内訳、人数：WHO 毒性評価正式委員 7 名、FAO 残留評価正式委員 8 名、事務局 18 名（WHO 臨時顧問 8 名を含む）

会議内容：FAO/WHO 合同残留農薬会議の WHO 専門家グループ会議に WHO 毒性評価臨時顧問として参加した。会議では WHO 毒性評価臨時顧問が WHO から依頼されて作成したヒトを含む哺乳動物における動態、急性から長期毒性試験、がん原性、変異原性毒性試験、生殖・発生毒性試

験などを含むデータからなる毒性評価作業資料を基に、毒性評価を行った。藤森は担当農薬であるクレソキシメチルの評価基盤および評価指標について説明し、4 回の draft 修正を経て評価概要を完成すると共に上記資料を基にモノグラフを作成する作業を行った。同時にその他 11 農薬についての毒性評価の討議に加わり、計 12 品目の許容一日摂取量 ADI および急性参照用量 acute RfD を設定した。本会議では毒性評価だけでなく、評価過程に生じる問題および CCPR より提起された問題をも討議し、再評価精査を請け負う JMPR の受容能力について参加者への所属機関の配慮要請、OECD 農薬フォーラムによる国際ガイダンスドキュメントの重要性の認識、データのまとめのためのフォーマット、決定の透明性のためのがん原性評価体制、急性参照用量の計算方法、コリンエステラーゼ阻害の解釈が討議、一般見解として文書化された。他に EPA のヒト試験の勧奨の動きとヘルシンキ宣言をうけて、ヒト関与の臨床医学データの危機評価における利用について討議した。

会議名：第 9 回 IPCS PAC（プログラム・アドバイザー委員会）会合

出席者：化学物質情報部 神沼二真

開催場所、時期：ベルリン、1998年10月5日～9日

参加者内訳、人数：各国の委員と事務局 40 名

会議内容：事務総長の交代に伴い、WHO では大きな組織再編が行われている。IPCS を担当する WHO の部門（PCS：Promotion for Chemical Safety）も上部組織は新しい 9 クラスター編成の中の Sustainable Development となり Executive Director としてインドの P. Sing 女史が就任し、これまでの部門責任者である Dr. Mercier や副部長の Dr. Toft の退任が決定している。しかし、新しい PCS の責任者は未定であり、こうした状況で如何にこれまでの IPCS の機能を持続していくかが全体として大きな課題となった。IPCS 自身の機能としては、化学物質のリスクアセスメント、化学物質による被害状況把握と対応、情報交換と各国の対応機能強化が柱であることは変わらないが、途上国の対応機能強化とともに、情報基盤の重要さが指摘された。また、従来のリスクアセスメントに関しては、OECD などでの評価作業と重複をさけて協力すべきことが助言された。さらに PAC の中に 7 人からなる推進会を置き、機能を強化することになった。報告者もその一人に選出された。

会議名：リスク評価研究の進歩に関する第 4 回米国健康・環境影響研究所シンポジウム—人の健康と生態リスク評価における外挿について

出席者：化学物質情報部 関沢 純

開催場所、期間：ケアリ（米国）、1998年4月27日～30日

参加者内訳、人数：米国環境保護庁、大学、海外の研究者、計約 300 名

会議内容：各回テーマを設定して行う米国環境保護庁傘下研究所の合同シンポジウムであり、表記が今回のテーマである。外部の研究者を含む招待講演 25 題と、ポスターによる研究発表 44 題があった。筆者は本シンポジウムと期日をあわせ開かれた IPCS/OECD/US EPA 合同の「健康環境影響の統合的リスク評価企画会議」との双方に招待を受けた。招待講演は、健康影響と生態影響リスクにおける外挿の諸問題への導入、種間外挿と生物の階層構造、時間外挿、空間および規模の外挿、健康・生態リスク評価のための測定値から未測定値への外挿の改善の 5 つのセッションに分けて行われ、毎日最後にパネル討論があった。わが国で同種シンポジウムを開くとデータに基づく討論にほぼ終始する

が本シンポジウムでは種々の知見に基づきながら、外挿における諸問題の同定、整理と、問題克服のための新しい概念の提出という指向が強く見られた。

会議名: IPCS (国際化学物質安全性計画) / OECD / US EPA (米国環境保護庁) 合同の統合的・健康/環境リスク評価企画会議

出席者: 化学物質情報部 関沢 純

開催場所, 期間: ケアリ (米国), 1998年4月30日~5月2日

参加者内訳, 人数: 米国のほか4カ国の専門家および IPCS, OECD, EU の代表, 計15名

会議内容: 内分泌攪乱物質問題などで要求されているように、これまで別個に活動してきた健康リスクと環境リスク評価の専門家が、共通する課題と方法について討議しているという企画である。曝露評価と影響評価に分け、健康リスクと環境リスクの間で統合的に評価を進める可能性と必要性を枚举し、次に化学物質のグループ毎に統合的にリスク評価を進める可能性と必要性について検討した。「統合」の意味を大まかに「健康リスク評価と環境リスク評価は相互に作用しあって進めるべきであり、それぞれの評価結果が相互に影響を及ぼすこと」と確認した。曝露データの共用、影響データにおけるメカニズムや評価結果の表現の改善による相互理解の推進、推計的手法の導入による不確実性分析の改善、適切なバイオインディケータの設定、生物間の化学物質の移動、種間・時間・空間における外挿の改善、地域的な要因の同定、感受性の高い生物種や個体の同定などがあげられ、この主題に沿った既存の活動を調べ、健康リスク評価の専門家と環境リスク評価の専門家が同席する場を設定し、今後より具体的に討議することが確認された。

会議名: IPCS の第4回 CICAD (国際簡潔評価文書) 運営委員会

出席者: 化学物質情報部 関沢 純

開催場所, 期間: ハノーバー (ドイツ), 1998年9月28日~30日

参加者内訳, 人数: 17名 (9カ国, 1国際機関, 2非政府団体)

会議内容: CICAD は国連環境開発会議の決議により各国の化学物質安全性評価資料を基に作る国際的な批判的検討とリスク評価を加えた国際的に使える簡潔な評価文書である。1995年に計画案がスタートし試行期間中に生ずる問題の解決のため CICAD 運営委員会が設置された。2年間に17物質について CICAD を作成、うち7巻 (当時) は出版、さらに5物質の CICAD 案を1998年中に最終討議予定である。このことは国際的なリスク評価の推進への貴重な貢献であると同時に作成プロセスにおいても、より透明性を確保し確かな運営を保証する枠組が成功裡に確立されたことと総括した。今後さらに効果的に計画を進めるためにピアレビュー (批判的検討) のあり方、最終検討会議のメンバーシップ、OECD が進めている SIDS 計画との関係などを討議した。試行期間と運営委員会の任務終了を宣言し、IPCS の諮問委員会にこれまでの成果を報告し、今後のあり方に関し Environmental Health Criteria を含む IPCS のリスク評価計画全体につき助言するグループの必要性を提案した。

会議名: リスクアセスメント手続におけるピアレビュープロセス検討会議

出席者: 化学物質情報部 関沢 純

開催場所, 期間: ハノーバー (ドイツ), 1998年10月1日

~2日

参加者内訳, 人数: 15名 (7カ国, 1国際機関)

会議内容: IPCS は環境中の化学物質による有害影響の科学的な評価と結果の提供を主要な任務とし 2百数十巻の Environmental Health Criteria (EHC) を出版、最近ではアジェンダ 21 決議に沿い簡潔でリスク管理に直接結びつく評価情報をまとめ Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) を作成し国際的に高く評価されている。しかし EHC 作成への業界の影響を批判する文書が学術誌に投稿され、IPCS の信頼性の根底に関わる問題としてピアレビュープロセス全体を検討した。CICAD 作成では、(1) 委員から評価対象品目への利害関係の有無の誓約書を取る、(2) 業界や非政府団体に会議を公開し意見を聞くが最終判断には参加させない、(3) 対象品目の事前公表と迅速かつ効果的なコメント収集、(4) コメントへの回答と最終評価会議での検討結果の記録と明示が、ルール化されている。(1) 同プロセスの EHC 作成への適用、(2) 最終検討会議委員の資格、選別過程やコメント収集先の登録のルール化、(3) 問題発生時に解決のため臨時の小グループ設置、(4) リスク評価全般に支援、助言する常設グループの設置とメンバー資格、構成、任務、任期を検討、IPCS 諮問委員会向けの提案を作成した。

会議名: 第19回環境毒性化学会年会

出席者: 化学物質情報部 関沢 純

開催場所, 期間: シャーロット (米国), 1998年11月15日~19日

参加者内訳, 人数: 環境毒性化学の研究者、関係行政官および業界、環境団体などから約千名

会議内容: わが国では人や環境が晒されるリスクについて行政あるいは学会でも、水、大気、廃棄物などの環境媒体別に研究し対策を進めており、総合的にリスクを評価する考え方や手法の開発についての研究の遅れ、国としての指針の欠如があった。内分泌攪乱物質のように、人へのリスクと環境中生物へのリスクが関連する可能性があるため、関係分野の研究者が連携して研究を進める必要性があり本学会は参加者や発表内容からもこのようなことが行いやすい場である。「自然の関係: 環境の健全性と人の健康」が今回の共通テーマであり、筆者は健康リスク評価における不確実性要因の解析をテーマのひとつとしているが、会議では大学、行政、業界の研究者が推測手法、メカニズムの研究、実際状況の分析に基づく仮定の設定など、リスク評価と管理について、考え方と手法を討議する場がありたいへん参考になった。わが国の学会などでもこのようなテーマをオープンな場で討議し、より良い解決方向を探るという取り組みがあって良いと考える。

会議名: 第2回 IPCS/OECD/US EPA 統合的・健康/環境リスク評価企画会議

出席者: 化学物質情報部 関沢 純

開催場所, 期間: シャーロット (米国), 1998年11月19日~20日

参加者内訳, 人数: 16名 (5カ国, 3国際機関)

会議内容: 健康リスクと環境リスクの評価にたざざる研究者の交流と協力関係を強め両分野の研究推進に寄与するだけでなく、実社会の統合的なリスク評価への要求に答えることを目的として、表題の3機関が合同で開催した。第一回会議で挙げられた健康リスクと環境リスク評価の統合の概念に基づき統合的リスク評価のフレームワークについて討議、健康と、環境リスク評価で用いられる用語の共通理解を持つことにした。結果を基により広い範囲の人々に

呼びかけ、多くの人の共通の関心事項をテーマに統合的リスク評価の可能性につき討議するワークショップを企画することになった。主題に関連して、有機すずによる人の健康と環境中生物への影響が非常に多様でありながら、その背景に分子メカニズムとして共通の背景が存在する可能性を IPCS におけるリスク評価と、日本人と環境生物へのリスク評価についての筆者の研究成果から紹介し、興味深いものとして今後開催予定のワークショップにひとつの話題として提供すべきことになった。

会議名：IPCS の第 4 回 CICAD (国際簡潔評価文書) 最終検討会議

出席者：化学物質情報部 関沢 純
病 理 部 西川秋佳

開催場所、期間：ワシントン DC (米国), 1998 年 12 月 8 日～12 日

参加者内訳、人数：メンバー12名 (日本から関沢と西川), 事務局 8 名, オブザーバー6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 IPCS の計画であり、今回は 5 物質についての CICAD 原案を最終検討した。前回の東京での最終検討会議 (7 月はじめ) から、5 ヶ月と間がなかったが 2 年前にスタートした本計画が軌道にのってきたことから手際良く進行した。日本から関沢に加え、西川が病理の専門家として出席し最終検討会議を強化し、わが国の協力体制もより充実できるようになった。関沢は検討物質につき、新たな知見にもとづきリスク評価の参考となるコメントを予め多数送付し、これらを最終文書に反映させることができた。

会議名：IPCS 国際化学物質安全性カード (ICSC) 翻訳に関する国際ワークショップ

出席者：化学物質情報部 山本 都

開催場所、時期：シンシナチ (米国), 1998 年 9 月 6 日～12 日

参加者内訳、人数：ベルギー、スペイン、ハンガリー、ポーランド、中国、韓国、タイ、インドネシア、ベトナム、シリア、日本、IPCS、ILO 等の担当者 約 20 名

会議内容：化学物質を扱う作業者等を対象に作成されている IPCS の国際化学物質安全性カード (ICSC) の各国における利用をはかるために、現在各国語への翻訳が進められている。既に翻訳を行っているベルギー、スペイン、日本などと今後翻訳作業を開始予定のハンガリー、ベトナム、シリアなどがこれまでの経過、翻訳の進め方、翻訳ソフトの利用、今後の計画等について協議した。日本では現時点で約 900 物質の ICSC を翻訳しており、印刷物およびウェブ (国立医薬品食品衛生研究所ホームページ) で提供している。

会議名：IPCS 国際化学物質安全性カード (ICSC) 原案検討会議

出席者：化学物質情報部 山本 都

開催場所、時期：ブリュッセル (ベルギー), 1999 年 3 月 21 日～28 日

参加者内訳、人数：EU 各国、米国、カナダ、日本、IPCS、ILO、IARC の担当者、EU 委員会等約 20 名

会議内容：各国の担当者が分担して作成した IPCS の国際化学物質安全性カード (ICSC) の原案について最終検討会議を行った。本検討会議では、各国の担当者が集まって

原案を詳細に検討し完成させた。2 グループに分かれ、それぞれ毒性データや化学データ等について約 70 物質のカード原案を検討した。日本は、1,4-ブタンジオール、クロロギ酸メチル、4,4'-メチレンジアニリンなど 6 物質の原案作成を分担した。

会議名：WHO/ECEH・IPCS によるダイオキシン類に関する耐容一日摂取量 (TDI) 再評価会議

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：ジュネーブ WHO 本部, スイス国, 1998 年 5 月 25 日～29 日

参加者内訳人数：先進国 15 カ国からの当該専門家及び UNEP, WHO 等の担当者, 約 50 名

会議内容：ダイオキシン類の TDI は、1990 年に WHO/EURO が開催した会議において、10 pgTCDD/kg bw/day とされている。その後、新たな毒性データ、特に神経毒性、疫学的に内分泌への影響等が報告されていることから、再評価が必要となつて WHO/ECEH (European Center for Environment and Health) と IPCS が開催したものである。今回の会議の参考資料として、暴露、動物実験、疫学、毒性発現機構、定量的リスク評価、TEF・TEQ、各国の規制値等に関する 11 の文書が事前に各国に配布され、厚生省では特に国立医薬品食品衛生研究所と生活衛生局による会議を開催して討議した。本会議ではまず議長にデンマークのラーセン博士を選び、その後 6 つのテーマ、即ち①暴露、②毒性等価係数、③作用メカニズム、④動物における影響、⑤ヒトにおける影響、⑥体内動態と用量反応モデルについてそれぞれの専門家によるサブグループを作成して討議した。

その結果、ダイオキシンによる影響は、ほとんどが Ah-receptor を介するものであり、その結合能・反応が直接 Ah-receptor の活性化に依存していることから、ダイオキシンへの感受性はヒトと動物でほとんど同じ (生化学的変化) か、ヒトが低い (有害性影響) であろうことが、現時点での共通の認識となった。従って、今回は 1990 年以降に発表された動物実験における LOAEL を用い、さらに薬物動態学的見地に基づいた body burden (体内蓄積量) が最も種差を比較するのに適当と考え、TDI を設定することとした。

TDI 再評価に用いるため、最も低い体内蓄積量 (10-100ng/kg) で発現している明らかな有害性影響として、ラットでの精子数減少、生殖器官奇形発現、免疫抑制およびアカゲザルでの精神・神経毒性発現、子宮内膜症が取り上げられた。一方、上記の毒性発現より低い体内蓄積量 (1-10ng/kg) で、肝 P450 酵素等の生化学的変化が認められているが、常にそれらが有害性であることが明確でないとして、取り入れていない。従って下記の式 (*) でヒト一日摂取量を求めると、14-37pg TEQ/kg/day となり、丸めた数字として、10-40 pgTEQ/kg/day とした。不確実係数に関しては、体内蓄積量を用いたことから種差を考慮しないが、LOAEL を用いたこと、ヒトが動物より感受性が低い場合もあること、ヒトと動物の半減期の違い等を含めて、総合的に見て 1-10 が必要とされ、TDI は 1-4 pgTEQ/kg/day と計算された。なお、この数字は 97 年の新しい WHO-TEF に基づく TEQ を用いていることから、コプラナー (ダイオキシン様) PCB を含むものである。

最後に、現在の先進諸国におけるダイオキシン類平均ヒト一日摂取量が 2-6 pg WHO-TEQ/kg/day (体内蓄積量 2-6ng/kg/day) とされており、一部には既に TDI を上回るレベルもあることから、ダイオキシン削減対策を今後も強力に推し進め、最終的には暴露が出来る限り低いレベルになるよう、あらゆる努力を払うことが提案された (なお、

98年7月14日付けのWHO評価文書に対するコメントは7月末に締め切れ、12月に最終文書が公表されたが、TDI等の重要な点の変更はない。

*ヒト摂取量 (ng/kg bw/day) = 体内蓄積量 (ng/kg) × ln(2)/ヒト半減期 (7.5年)/ヒト吸収率 (50%)

会議名: 国際化学物質安全性計画運営委員会; IPCS Steering Committee on the Harmonization of Approaches to the Assessment of Risk from Exposure of Chemicals

出席者: 安全性生物試験研究センター 黒川雄二

開催時期, 場所: 1998年9月7日~8日, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland

参加者内容, 人数: Steering Committee メンバー, 関連企業・機関代表, IPCS 関係者など24名, 13カ国 (米国, 英国, ドイツ, カナダ, オランダ, スウェーデン, オーストラリア, ウルグアイ, ベルギー, フランス, イタリア, スイス, 日本)

会議内容; このプロジェクトは92年にUNCED Agenda21で提唱され, IPCSの主導のもとに93年から開始された。その目的・原則として, ①リスクアセスメントに関するものであり, リスクマネジメントは含まない, ②リスクアセスメントプロセスの透明化を図る, ③リスクアセスメントガイドライン等を作成するのではなく, まず各国・各機関での手法を理解する, ④健康影響評価を目的とするが, 随時曝露評価及び疫学も取り入れる, の4点が上げられ, そのためには第一に科学的根拠を重視し, 第二に政策決定と科学的見解の差を考慮することとしている。プロジェクト全体に関する助言・勧告をするためのSteering Committeeが95年に始まり, 今回は3回目である (座長: Dr. Fielder, ラポーター: Dr. Farland と Dr. Hartley)。会議では以下のHarmonization Projectについて各担当者から報告を受け討論を行なった。①発がん性; リスクアセスメントの過程で重要な因子 (発癌機構, ヒトへの外挿性, genotoxic or nongenotoxic など) を取り上げ, データの豊富な12発がん物質について各国・各機関での差異を検討した。さらに, Mechanism of action よりも Mode of action を重視し, 5物質について論理的 (conceptual framework) に考える方法の検討を行う。②生殖発生毒性; 用語集・図譜及び共通化を目指す報告書の作成, 有害性の定義が進行中である。③Non-cancer endpoint に関する定量的評価; 評価の際の不確実性 (UF, NOAEL, LOAEL など) に関する問題を, 適切な化学物質を選び, 各国・各機関での評価手法の差異を認識することを計画したが, 未だその目的・方法の認識に問題があって進展していない。④用語集の作成; リスクアセスメントにおける一般概念的用語を50選びそれにWHOで集めた定義から適当なものをつけ個人単位で150カ国以上へ送付し意見を問い合わせ集計結果が出ており, 完成が間近い。⑤リスクアセスメント手法総覧表作成; OECDとの共同事業として, 各国・各機関における行政上の健康及び環境影響に関するリスクアセスメント過程を相互に理解する目的で作成を完了し, インターネットで閲覧できる。総覧には, 企業が申請する際に要求されるデータ・資料, リスクアセスメントに従事する行政側のトレーニング方法などが含まれる。⑦神経毒性・免疫毒性; OECDのテストガイドラインとの連携を図りつつ進める。⑧金属毒性, 曝露評価については, 今後の課題とする。⑨その他; この委員会は, 毎年9月に欧米で開催する。

会議名: IPCS/OECD 内分泌障害性化学物質 (EDCs) に関する合同会議

(IPCS/Steering Committee on Endocrine Disruptors)

(主催: 国際化学物質安全計画 (IPCS), 経済開発協力機構 (OECD))

出席者: 毒性部 井上 達

開催場所, 時期: JRC Ispra, Italy, bldg 29, meeting room, 欧州共同体合同研究センター (イタリア, イスプラ市), 1998年6月24日~26日

参加者内容, 人数: Membership Steering Group: (計19人), Susan Barlow, Aarke Bergman, Abraham Brouwer, Eileen Burt, Kathleen Cameron, Terri Damstra, Fernando Diaz-Barriga, Warren Forster, Andreas Gies, Tohru Inoue, Robert Kavlock (座長代行), Erminio Marafante, Canice Nolan, James Seiber, John Shirley, Glen Van Der Kraak, Rolaf van Leeuwen, Bo Wahlstroem, Maged Younes. (後援: 欧州委員会)

会議内容:

目的

A) 内分泌かく乱物質に関する研究登録 (Research inventory) の作成と, B) WHOとしてのこのものに対する position paper の出版計画を遂行すること。

A)

1. 研究登録データ (Inventory) を作成することの意義を討議: 研究水準の維持, 重複や不必要な課題設定による無駄な研究の排除。

2. Inventory は, センターとして Ispra にあつめる。Health Canada および EPA のデータも Ispra にあつめる。

3. Gate keeper を Robert Kavlock とし, 新規性などを中軸に Selection を行う。

Research Inventory を一つのファイルに納める方向性を打ち出すこと。

B)

1. 2年程度の緊急作業で, この問題についての WHO Publication を刊行すること。Steering Committee は, その編集を担当する。

2. 各項目の決定, 項目毎の編集方針 (別紙参照)。

3. この為, 著者を選出 (第一次著者, 受諾が得られない場合の第二次著者, 第三次著者まで)。

4. 各候補著者への連絡分担, 作業日程の決定。次期会合は, 著者が全員決まったところで, Steering Committee と著者とで会合し, 著者の執筆計画を聞き, 討論を行う。本年, 11月後半から12月上旬。

5. 日本での会合の可能性を打診する。

備考:

1. 本邦での研究計画登録は, 各省庁が個別に対応する形になると思われる。本来なら, 日本国内の研究 gate keeper が必要だが, これは放任?。

2. 主著者には本邦からは, 唯一名のみ名古屋市大・白井智之教授が指名された (実験がんの項)。また, 分担著者として, 菅野 純室長も指名された。

会議名: 眼刺激性試験代替法についての ECVAM 会議

出席者: 薬理部 大野泰雄

開催場所, 時期: イギリス, Egham, Runneymede hotel & Spa, 1998年6月15日~17日

参加者: M. Ball, J. Fentem (ECVAM), L. Bruner (P&G, EC/HO Validation Study), L. Earl, (Unilever, COLIPA Validation Study), Y. Ohno (NIHS, Japan),

M. Liebsch, H. Spielman (ZEBET Validation Study), D. Lovell (Loreal, BIBRA), D. Esdaile (Rhône-poulenc), M. Prinsen (TNO, Netherland), N. Nib (Novo, Denmark), R. Curren (IIVS)

会議内容：眼刺激性試験代替法について、日本および欧州のバリデーション結果について検討した。また、日本の *in vitro* 試験法とドレイズ試験を組み合わせた眼刺激性評価ガイドライン案について説明された。それらを踏まえ、短期的に行うべき事項及び長期的な目標について話し合った。具体的には、1) 対照物質を用いた *in vitro* 眼刺激性試験 validation の新しいアプローチ、2) 動物使用の reduction, refinement のための段階的な試験の実施、3) 将来の解析のため、過去の評価研究により得られたデータをもとにした多変量解析及び他の統計手法の応用、4) 眼刺激に関する作用機作の解明を目的に検討した。過去の validation としては、EC/HO, COLIPA, BGA/BMBF, CTFA, IRAG 及び厚生省/粧工連における試験結果が挙げられている。これらのバリデーションについて、a) 計画と予測モデルが不十分であった、b) 最大評価点を指標とした、c) *in vitro* と *in vivo* を比較する統計的な手法が適当でなかったとされている。今後、replacement よりも異種の予測基準による段階的なスクリーニングを目指すこととされ、その手順としては、コンピューターによるシミュレーション、物質の分類、対照物質の利用、1つ以上の validate された *in vitro* 試験の実施（細胞毒性試験と組織モデルの組み合わせ）などの評価が挙げられた。

EU の規制委員会への提言として、OECD ガイドライン 405 (眼刺激性/腐蝕性試験) は、被験物質が固体の場合の試験削除、pH 測定値の利用について修正すべきである。眼刺激に関する OECD 戦略においては、validate された *in vitro* 試験 (5a: 強刺激及び 6a: 刺激スクリーニング) を組み入れるべきであるとされた。

将来検討として、EU と OECD ガイドライン両方の基準にあった方法の開発、戦略の多様化、構造活性相関モデルの必要性、作用機作の解明、眼刺激回復モデル代替法の必要性などが挙げられた。

会議名：発がんリスク評価の基本的枠組みの作成についての IPCS ワークショップ

出席者：病理部 西川秋佳

開催場所、時期：リヨン、フランス、1999年2月16日～18日

参加者内訳、人数：機関代表、IPCS 関係者など 34 名、11 カ国 (米国、英国、ドイツ、カナダ、オランダ、スウェーデン、イタリア、デンマーク、ノルウェー、オーストラリア、日本)

会議内容：このプロジェクトは、1992年に UNCED Agenda 21 で提唱され、IPCS の主導のもとに 1993 年から開始されている。プロジェクト全体に関する助言・勧告をするための IPCS が 1995 年に始まり、1997 年に発がん性リスク評価がとり上げられ、1998 年に腫瘍発生の発現様式を解析するための発がん性リスク評価における包括的なアプローチとしての一つの枠組みが提案され、既知の化学発がん物質のデータセットを用いて、この枠組みの有用性が慎重に検討された。この枠組みは、種々の腫瘍発現の様式を決定するような一般的な原則や関連する問題点を明らかにすることを通じて提案されたものであり、その基本は因果関係を判定するための Bradford-Hill 基準に基づいているが、発生毒性評価の際に Faustman が用いたような修正が加えられている。今回のワークショップでは、名前を伏せた 6 つの化学

物質の発がんリスク評価過程をその枠組みに基づいて検証し、その考え方の妥当性について検討した。現在の枠組みガイドライン (案) は 9 つの部分から構成されており、その構成の妥当性についてもさらに検討した。

会議名：第 52 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (残留動物薬)

出席者：病理部 三森国敏

開催場所、時期：FAO 本部 ローマ (イタリア)、1999年2月2日～11日

参加者内訳、人数：WHO 側から 20 名、FAO 側から 20 名
会議内容：porcine somatotropin, estradiol-17 β (E2), progesterone (P), testosterone (T), phoxim, thiamphenicol について ADI および MRL 案が設定された。azaperone, dihydrostreptomycin, streptomycin, doramectin, neomycin, deltamethrin に対しては FAO のみで審議がなされ、MRL 案が設定された。第 32 回 JECFA において評価された E2, P ないし T については、実験動物の実験成績およびヒトの疫学的データから十分な発癌性の根拠が示されており、特に、E2 に関しては、ヒトへの遺伝毒性を介した発癌リスクの懸念が欧州共同体から出されている。しかし、さらなる文献および疫学的データから、E2 によるヒトおよび実験動物での内分泌関連臓器での発癌は、ホルモン・リセプターを介した非遺伝毒性的な発癌メカニズムによるものであるとの結論が出された。さらに、ヒトでの臨床用量で何ら異常をおこさない投与量が明確にされていることから、これらについて ADI を設定することとなった。一方、標的動物に動物薬適性使用規範に準じてこれらが投与されている限り、MRL を特定する必要はないと結論された。

会議名：国際癌研究機関 (IARC) モノグラフ作成作業委員会 会議

出席者：病理部 三森国敏

開催場所、時期：国際癌研究機関、リヨン (フランス)、1998年6月1日～11日

出席者内訳、人数：学術専門家 25 名、IARC 事務局 16 名
会議内容：エストロゲン置換療法薬、エストロゲン・プロジェスチン併用置換療法薬、エストロゲン・プロジェスチン併用経口避妊薬、プロジェスチン単独経口避妊薬のヒトへの発がん性についての評価を行った。エストロゲン置換療法薬は、ヒトおよび実験動物のデータで発がん性について「十分な証拠」が得られていることから、「ヒトに対して発がん性あり (Group 1)」と評価された。エストロゲン・プロジェスチン併用置換療法薬は、ヒトでは「限られた証拠」、実験動物では「評価するには不十分な証拠」が得られていることから、総合的には「ヒトに対して多分発がん性あり (Group 2B)」と評価された。エストロゲン・プロジェスチン併用経口避妊薬は、肝細胞癌のリスクが増加するとの疫学的データが得られている。実験動物では、必ずしも「十分な証拠」が得られている訳ではないが、総合的には「Group 1」と評価された。プロジェスチン単独経口避妊薬は、ヒトのデータでは発がん性について「不十分な証拠」が得られている。実験動物では、必ずしも「十分な証拠」が得られていないことから、「Group 2B」と評価された。

会議名：遺伝毒性試験法に関する国際ワークショップ (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures)

出席者：変異遺伝部 祖父尼俊雄

林 真

” 能美健彦
” 本間正充

開催場所、時期：米国、ワシントン (米国)、1999年3月25日～26日

参加者内訳、人数：日本、米国、英国、フランス、カナダ等20カ国以上より遺伝毒性に関する研究者、行政関係者など200人以上

会議内容：遺伝毒性試験法の国際的な標準化のために開催されたワークショップである。今回はこれまでの標準的な試験法とはされていない、比較的新しい試験法を論議の対象とした。つまり、Comet assay, In vitro micronucleus test, Mouse lymphoma assay, Transgenic mutation assays, Photochemical genotoxicity, DNA adducts/DNA binding assays である。これに広く国際的に用いられているが、最近の知見を基に論議が必要であることから、in vivo micronucleus test が加えられた。また、in vitro 染色体異常試験の問題点である「適切な細胞毒性のレベル」および「統計的解析」についても論議が行われた。

1) Comet assay: In vitro 及び in vivo の試験法の基本的なプロトコールがまとめられ、標本作製及び観察法などについても合意が得られた。2) In vitro micronucleus test: ヒト培養リンパ球及び樹立した株細胞を用いる場合について論議が行われ、標本作製、染色法、小核の定義、サイトカラシンBの使用法などについて合意が得られたが、その他の項目は十分な論議ができず、結論に至っていない。3) Mouse lymphoma assay: 短時間処理法で陰性結果が得られた場合に、非代謝活性化法での24時間連続処理法が必要であるとの認識に至ったが、新たなデータの収集が必要とされた。また、細胞毒性の指標としてRSGがマイクロウェル法およびアガー法に用いることができるが、暫定的にはRTGが推奨された。4) Transgenic mutation assays: lacI, lacZ, cII, gpt-delta のアッセイ系が受け入れられた。投与期間としては5連投以上、一ヶ月程度の投与が必要と考えられるが、これについてはデータの収集が必要である。通常、5～10匹/用量の動物を用い、125,000-300,000 プラーク/動物を用いることが推奨された。5) Photochemical genotoxicity: 光照射などの基本的なプロトコールなどについて合意が得られた。6) In vivo micronucleus test: 連続処理によるマウス末梢血を用いる方法の受け入れが確認され、ラット末梢血を用いる方法も28日間までの投与では受け入れの可能性が示唆された。また、自動測定法についても論議が行われた。7) DNA adducts/DNA binding assays: 測定技術の基本的な方向づけについて論議が進められた。8) Cytotoxicity in chromosomal aberration tests: DNAに直接作用する物質 (Ames試験陽性) の多くは細胞毒性が比較的弱い (50%未満) 用量で陽性となるが、DNAに直接作用しない物質 (Ames試験陰性) の多くは細胞毒性が強い (50%以上) 用量で陽性となる傾向があることが報告された。9) Statistics: 研究機関内/間でのバラツキを検討する手法およびそれを評価するための新しい手法の確立などが提案された。

ワークショップの成果については、Environmental and Molecular Mutagenesis に公表される予定である。

プロジェクト名：OECD/GLP 相互受入のための加盟国相互訪問

出席者：変異遺伝部 林 真

開催場所、時期：Belgium (Brussels, Beerse), 1999年2月28日～3月9日

参加者内訳、人数：4ヶ国、6名

プロジェクト内容：本プロジェクトの目的は、OECDのGLPを相互受入するための加盟国相互訪問プロジェクトの一環

として、米国、ハンガリー、日本がベルギーの行う査察に同行し、ベルギーの査察が受け入れ可能か否かを評価することにある。初日にベルギーのGLPの現状に関する説明を受け、GLPと真剣に取り組んでいる印象を受けた。ベルギーのGLPはOECDのGLPをほぼそのまま持ち込んでいるが、査察官になるための資格が明確にされている点、年1回の施設との懇談会を開催して意見交換を行い、公開されたGLPを目指している点が印象的であった。我が国の全てのGLPを一本化することは困難かもしれないが、守備範囲を明確にし、もっと効率の良い、開かれたものにする努力が必要であろう。その後、査察施設に場所を移し、ベルギーの査察官が行う査察に同行した。日本の査察と大きく異なるのは、査察資料を事前に入手していない点で、現地が必要資料を最初から検討していた。全体として今回のベルギー側の査察に対するMJVの評価は、OECEのガイダンスNo.111に照らし合わせる限り特に大きな問題は見あたらず、相互受け入れ可能と考えられた。個人的な見解としては、本プロジェクトはあくまで行政官のためのものであり、専門家を意識したものではない。安全対策室のGLP担当官の参加の必要性を痛感した。

会議名：IARCモノグラフ会議

出席者：変異遺伝部 林 真

開催場所、時期：France (Lyon) Belgium, 1998年10月10日～22日

参加者内訳、人数：21名の専門家および数名の事務局

会議内容：本会議の目的は、事前に定められた化学物質等について、人に対するがん原性を、各研究分野の専門家を集めて公表論文を元に評価することにある。今回は2つの新規化学物質と21種の見直し化学物質に関して、最新のデータをもとに評価が行われた。今回も遺伝毒性等をはじめとする発がん機構についても審議され、最終評価が下された。今回の会下で評価された物質とそれらの最終評価は以下の通り。新規：meta-dichlorobenzene (group-3); methyl-tert-butyl ether (3)。再評価：atrazine (2B*3*); butyl benzyl phthalate (3R3); chlorothalonil (3R2B); cyclamates (3R3); ortho-dichlorobenzene (3R3); para-dichlorobenzene (2BR2B*); hexachloroethane (3R2B); d-limonene (3R3*); malamine (3R3*); paracetamol (3R3); ortho-phenylphenol (3R3); saccharin and its salts (2BR3*); simazine (3R3); allyl isothiocyanate (3R3); ortho-anisidine (2BR2B); chloroform (2BR2B); exachlorobutadiene (3R3); nitrilotriacetic acid and its salts (2BR2B); potassium bromate (2BR2B); sodium ortho-phenylphenate (2BR2B); quercetin (3R3)。

会議名：第10回OECDナショナルコーディネーター会議

出席者：総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所、時期：OECD本部 (パリ、フランス)、平成10年9月16日～17日

参加者内訳、人数：OECD加盟国の専門家47名

会議内容：OECDテストガイドライン(TG)について、討議が行われた。そのうち、本研究所の業務に関係の深い部分について紹介する。ヒトパッチテストについて、各国から倫理上の問題があることが発言され、TG作成の優先順位はlowとされた。急性毒性TGについて、従来の経口急性毒性試験法TG401の削除について議論された。3つ目の経口急性毒性試験法の代替法であるUpdown法が最終段階に入っているため、これを含めた3つの代替法に関するガイダンス・ドキュメントの完成 (半年後を目処) 後、1～2年でTG401を削除することが合意された。また、急性毒性に関しては、片性 (雌を推奨) で良いことが了承された。今

後、皮膚急性毒性試験法、吸入急性毒性試験法の順で、同様に代替法の方向でゆくことが推奨された。皮膚吸収 TG 案の修正、文献情報等の収集、ガイダンスドキュメントの作成に関する今後のタイムスケジュールが説明された。免疫毒性については、TG407 (28 日間反復投与毒性試験) において、免疫毒性に関連するより詳細な組織学的検査を追加することが提案されているが、内分泌攪乱作用に関する TG407 の検討が行われることになっていることから、その内容が決定されてから考慮されることとなった。一方、ヒツジ赤血球を用いた機能試験などの新しい TG の作成が提案された。内分泌攪乱物質の試験および評価 (EDTA) については、4 月にパリで行われた EDTA ワーキンググループの会議報告があり、初期評価、スクリーニング、試験の 3 つの段階で行われることの説明があった。スクリーニングとしては、uterotrophic アッセイ、Hershberger アッセイの validation の必要性が推奨された。また、試験法としては TG407 に内分泌に必要な項目を加えることが提案された。さらに、試験法のうち、現在改訂中の 2 世代繁殖試験 (TG416) が最終試験とされている。続いて、8 月にワシントンで行われた内分泌攪乱物質のスクリーニングと試験法の validation に関する報告があり、最優先 validation 項目 (uterotrophic アッセイ、Hershberger アッセイ、TG407)、それぞれの重要項目、さらにこの validation が国際的に行われること、日本についてはこれを実施する研究機関の発表のあったことが報告された。また、基準物質のリストも決められた。テスト validation のガイダンス: Environment Monograph No.76 (Guidance Document No.1 in the Series on Testing and Assessment) を改訂して、OECD TG の全体を包括するテスト validation を盛り込むことになっていたが、本年 6 月にその諮問委員会が発足し、現在年内を目標に原案の作成中である。TG 計画の調整に関して、多くの TG の作成・改訂が進行中であるため、優先度を定める必要があり、その判断基準 (Criteria) について討議・決定し、それに基づいて各 TG の優先度が決められた。次回のナショナルコーディネーター会議は 4 月 21~22 日に行われることが決定された。

会議名: OECD の第 8 回高生産量化学物質の安全性点検初期評価会議

出席者: 総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所、時期: OECD 本部 (パリ, フランス), 平成 10 年 10 月 28 日~31 日

参加者内訳、人数: OECD 加盟国の専門家 42 名

会議内容: 19 化学物質についての初期評価討議が行われ、そのうち 10 化学物質について、結論および勧告が合意された。会議の最後に全化学物質の討議内容、合意事項ならびに結論および勧告の合意された化学物質についての要旨 (SIDS Full Summary Profile) 案が配布された。SIDS Full Summary Profile については必要事項を修正の上、11 月 16 日までに完成版を OECD 事務局に送付するよう指示された。日本からは今回、1,1,2-trichloroethane (TCE), benzyl chloride, pentaerythritol, 2,6-dichlorotoluene についての評価文書を説明し、TCE を除いた 3 物質については結論および勧告が合意された。TCE については、マウスの実験で発がん性が認められており、遺伝子障害試験では Ames 試験で陰性結果が得られているものの、酵母では陽性結果が報告されている。そこで、遺伝子障害性について、in vitro の染色体異常試験または in vivo の小核試験を追加し、それに基づいて発がん性を再評価することとなった。なお、合意された各物質についても、各国のコメントを取り入れて完成させ、OECD 事務局に送付することになった。次回の SIAM はパ

リで、1999 年 6 月 29 日~7 月 1 日とし、3 月末までにその評価文書草案を回覧することとなった。

会議名: 第一回 POPs クライテリア専門家グループ会合 (The first session of the Criteria Expert Group for POPs)

出席者: 総合評価研究室 鎌田栄一

開催場所、時期: バンコク (タイ), 1998 年 10 月 26 日~30 日

参加者内訳、人数: 日本 6 名 (環境庁 2 名, 通産省 2 名, 厚生省 [鎌田], 化学工業会 1 名), その他約 50 数カ国 70 数名の専門家と国際機関およびグリーンピースを含む NGO のメンバー。合計約 100 名

会議内容: 1998 年 6 月モントリオールで開催された第 1 回政府間交渉会議で、12 の POPs (残留性有機汚染物質: 有害性を有し、難分解性で、生物濃縮しやすく、かつ大気により長距離移動する化学物質) に追加される化学物質を、科学的見地に基づいて選出するための基準と確認作業手順を決める専門家会合の設置が決定された。この決定をうけて、今回、バンコクで第一回の会合が開催された。

Ms. Fatoumata Jallow Ndoya (ザンビヤ) と Mr. Reiner Arndt (ドイツ) の両氏の議長が紹介され、議事は進行した。

最初、Suwit Khunkitti タイ科学技術環境大臣が歓迎の挨拶を行い、20 年国家プロジェクトとして上記の物質対策を行う事を表明した。次いで Suvit Yodmany UNEP アジア太平洋事務局長が挨拶を行い、POPs 問題の複雑さとこの専門家会議 (CEG) の重要性を強調した。

次いで、各国の代表、国連機関及び NGO の代表から、この専門家会合に対する意見が述べられ、今後の国際活動における次の POPs 物質選択は、各国が物質を推薦し、その後、評価し実行の手順をとることが確認され、更に物質選択に際しては大気・水・移動生物 [渡り鳥?] による化学物質の移動、生物濃縮性および socio-economic の条件を考慮する事となった。

長距離移動 (long-range transport), 特に水系での移動に関して、物理化学的性質の決定には、残留性が重要な要因であることが示唆され、水中と同様に堆積物中の残留性も重要との意見も出された。その際、トリブチルチン化合物 (TBT) の船舶による拡散が話題になった。大気中の移動に関しては、蒸気圧で 1000 パスカルを超える物質を選択すべとの意見が出たが、モニタリング・データを使う事が重要であると示唆された。

生物濃縮と長距離移動の基準に関しては、大気と土壌のような異なる環境や異なる気候帯の中での結果を考慮すべきとの意見が出され、日本から生物濃縮 5000 倍または log Kow 値 4 以上を基準値として提案した。

長距離移動のための基準としては、蒸気圧 1000 パスカル、大気中での半減期 2 日または、離れた地域でのモニタリングで認められるという条件が既に示されているが、大気での移動だけでなく水界や移動生物も考慮すべきとの意見も出た。また、EC は、年 1000 トンを越えて生産される高生産量化学物質のデータ利用を申し出た。

各国からの意見や提案をふまえてコンタクトグループが、第 2 回の政府間交渉会議に提出するドキュメントを作成した。下記にその概要を記す

1. 残留性については、水中での半減期を 2 又は 6 ヶ月以上、土壌や堆積物中は 6 ヶ月以上とする。
2. 生物濃縮は、水生生物で 5000 倍以上とし、データが無い場合は log Kow 値を 4 又は 5 とし、もし、生物濃縮が 5000 倍以下であっても強い毒性や環境毒性やモニタリングデー

タが高い蓄積性を示した場合も考慮する。

3. 長距離移動については、発生源からはるか離れた場所での潜在的なレベルや、大気、水、移動生物によって起きた長距離移動のモニタリングデータや、環境中での消失等の情報を考慮する。

4. 人や環境に毒性を示すという情報がある場合。

5. 追加情報がある場合には、可能な範囲で配布する。

また、更に、データの有用性の分析や新規化学物質に関しての問題については、日本から既存化学物質の国内点検結果がインターネットを通じ公表されている事を紹介した。更にEC、米国、スウェーデン、ノルウェー、フィンランド、ドイツから高生産量化学物質や農薬のデータ提供の発言があった。また、新規化学物質のPOPsとしての扱いは次回政府間交渉会議の判断とした。

Socio-Economicの考慮に関しては、下記の問題点があることを書類に残した。

- a. リスク削減の最終目標におけるコントロールされた方法の有効性と効率
- b. 変換方法 (製造や製法)
- c. 社会活動におけるポジティブやネガティブ要因
- d. 消費や廃棄の関連性

会議名：ICH-CTD 有効性 (臨床) 分野専門家会議

出席者：審査第三部 苗村光廣

開催場所、時期：ボストン (米国)、1998年6月6日～10日

参加者内訳、人数：日米欧の三極の薬事規制当局及び製薬団体関係者12名

会議内容：CTDのE (有効性) の部分、即ち、臨床試験及び吸収・分布・代謝・排泄等の項のハーモナイゼーションを行うため、第二回目の専門家会議が開催された。事前に、この部分に使用する「表」の原案や「目次」の案が、FDA等から、提示されていたが、今回の会議では、EUの規制当局より、EUが申請書類の一部として申請者に要求しているExpert Report (専門家レポート) を、ハーモナイゼーションの対象にするか否かという議論がむしかえされたため、この議論に終始した。結論は出ず、この議論及び、「表」や「目次」の検討は、次回に継続することになった。

会議名：日・EU相互承認協力協議専門家会合

出席者：審査第三部 堀内直哉

審査管理課 川原医療機器審査管理官

開催場所、時期：ブリュッセル (ベルギー)、1998年7月26日～30日

参加者内訳、人数：日、欧の医療機器規制当局関係者等約10名

会議内容：日・EU相互承認協力協議 (MRA) については'94年11月の日・EU閣僚会議において協議開始が合意されたことにより、本格的に会合が開催されることとなったもので、通信機器、電気用品、医薬品GMP、化学品GLP、医療用具、圧力機器、建築用材料、身体保護用具が取り上げられている。各分野に応じ、関係省庁により対応しているところであるが、医療用具分野については厚生省及び外務省が対応しており、今回、医療用具分野の専門家会合に出席したものである。

今次会合においては、'97年12月の会合に引き続き、EU側と日本側での技術的、制度的同等性や、EU全体の技術的レベルの同等性、信頼性の確保や、EU側の行う適合性評価期間の指定基準や加盟国当局、欧州委員会、適合性評価機関、製造業者間の責任関係等について質疑を行うことにより、日・EUにおける医療用具の相互承認について検

討が行われた。

会議名：ICH-CTD 品質関連会議

出席者：審査第一部 森本和滋、奥田晴宏、志田あゆみ
医薬品機構 山本順二

開催場所、時期：港区台場、1998年8月31日～9月3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28名

会議内容：第2回目のEWG会議となり、今回よりバイオのメンバーも参加した。範囲 (Scope) の議論では、GenericとかOTCを現時点で含めることは困難であること、化成品の範囲は、Q6Aの範囲に、バイオは、Q6Bの範囲を原則としてはどうか等の意見がでて、現在も議論中である。化成品のほうで第1回EWGで設定された3つの下記のタスクフォースについての具体的検討をすすめた。原薬と製剤の製造方法、容器/栓のIllustrative Examplesの内容について検討し、最終ドラフトは、Step 1, Version 5.1とされた。

会議名：後発医薬品の生物学的同等性試験における国際標準製剤に関する非公式会合

出席者：審査第一部 森本和滋

開催場所、時期：WHO本部、1999年2月8日～9日

参加者内訳、人数：米国、ドイツ、ジンバブエ、タイ、南アフリカ、日本より7名及び事務局数名

会議内容：先の、1996年の会議で生物学的同等性試験の実施において、適切な標準製剤の有用性が確認されており、今回の会議では、最終版が作成され、後発医薬品の同等性試験の標準製剤選択のガイダンス (Guidance on the Selection of Comparator Pharmaceutical Product for Equivalence Assessment of Interchangeable Multi-source (Generic) Products) と呼ぶこととなった。次のステップとしてフィージビリティスタディーを行い、本リストの有用性を検討することが合意された。本リストは、途上国に対してどういうものを標準製剤として選んだらいいかの有用なガイダンスとなることが期待される。

会議名：ICH-CTD 品質関連会議

出席者：審査第一部 森本和滋

医薬品機構 山本順二

開催場所、時期：ブラッセル (ベルギー)、1999年3月8日～11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27名

会議内容：第3回EWG会議で、①フォーマットのみか、②地域特性の要素を含むCTDをサポートするのか、③各極で内容の相違があってもIllustrative Examplesの調和を続けるのか、④薬局方の調和を待つか、⑤バイテクと一緒にCTDにするのか、⑥本当に規制当局は、単一のCTDをつくるつもりは有るのか、の質問があり、全体としての方向性のコンセンサスをはかった。その結果、申請データ項目の配列表 (Table of Contents) について検討し、Step 1 Draft Version 8.0を作成し、ほぼ合意に達した。範囲 (Scope) については、Q6A/Bに準ずることで最終的に合意した。

また、ステージの概念が導入され、ステージ1とは、Table of Contents、ステージ2とは、それぞれの項目に含めるべきデータの概要と要約 (Body of Information, Summary of Contents) であることが確認され、品質は、ステージ1が終了したことになる。

会議名：ICH CTD 有効性 (臨床) 分野専門家会議

出席者：審査第二部 小野喜志雄
審査管理課 成川 衛
医薬品機構 蛭田浩一

開催場所、時期：港区台場、1998年8月31日～9月3日
参加者内訳、人数：日米欧三極の臨床分野の薬事規制当局
及び製薬団体関係者 15名

会議内容：過去2回の会合を経て、日米EU各極における医薬品の承認申請資料の構成・内容等についてはお互いに一定の理解がなされ、今後の具体的な作業方針として、申請資料における個々の試験レポートの並べ方及び臨床試験データのまとめ資料（資料概要）についてガイダンスを作成することとされたところである。

試験レポートの並べ方については、臨床試験を大きく①臨床薬理試験、②探索的試験、③検証的試験に分類し、その中で、試験の性格、実施時期等を考慮してレポートを並べることで概ね合意した。そして、実際の分類に当たってのガイダンスの作成を開始した。一方、まとめ資料の作成方法に関するガイダンスについては、図表の例を含め、ガイダンス文書の作成を開始し、また、各試験の概要については、総括報告書のガイドライン（E3）に基づき作成するシノプシスを充実させることで対応することとなった。

今後は、まとめ資料のガイダンスの作成に作業の比重を移し、合意に向け、詳細な詰めを行っていくこととなる。

会議名：ICH-CTD 安全性関連会議

出席者：審査第一部 高田幸一、児玉康夫、西村多美子、
佐藤洋一
医薬品機構 高仲 正

開催場所、時期：東京（日本）、1998年8月31日～9月3日

参加者内訳、人数：日米欧三極の安全性分野の薬事規制当局
及び製薬団体関係者 28名

会議内容：前回タイソングコーナの会議において、①試験項目の記載順序は薬理、薬物動態、毒性試験の順に項目別に細分化。②薬理、薬物動態、毒性試験毎に共通したものとして実施試験一覧表及び要約を作成する。③毒性試験に関しては試験の内容により記載事項の詳細度の重み付けを行う。④薬理、薬物動態試験については記載の重複を避け簡潔に書けるよう柔軟性を持たせた形にすること。上記の合意事項に基づいて、日、米、欧の三極がそれぞれ分担して素案を作成し、会議に臨んだ。Written Summaryについては、前回の会議において骨子は合意されていたので文章の追加、削除などの修正にとどまり大きな問題はみられていない。一般的なこととして、動物種、投与経路、用量群などについて記載すべきとしている。表及び図の使用については例示して説明している。なお、Written Summaryの長さは100～150ページを越えないこととされている。表については、前回の会議においてたたき台で合意がなされたレベルAからレベルDまでを具体的に作表すると共に、表の形式及び数値を入れた実例を提示しながら検討した。表は約37形式について作成し、表形式の全体像、さらに測定項目、注釈などをそれぞれ個別に検討・修正が成された。レベルA：実施試験一覧表、レベルB：毒性試験を簡潔に表記、レベルC：毒性試験結果を詳細に表記、レベルD：薬理・薬物動態試験に適用される。

会議名：ICH-CTD 安全性関連会議

出席者：審査第一部 高田幸一
医薬品機構 塚本郁夫

開催場所、時期：ブラッセル（ベルギー）、1999年3月8日～12日

参加者内訳、人数：日米欧三極の安全性分野の薬事規制当局
及び製薬団体関係者 23名

会議内容：タイソングコーナ、東京の前2回の会議に引き続き、Written Summary及びTableの検討を行った。今回、Written Summaryにおいて、一部日本語に翻訳する場合に困ることが考えられる表現は削除させ、またADMEの項で薬物動態パラメーターの算出に使われる測定法及び検出限界などの必要性を記載させた。さらに、表の測定（観察）項目について追加及び修正させた。今回新たに検討したものは、Executive Summary（EUにおけるExpert Reportに相当するものと思われる）で、これを検討した結果、このサマリーは薬理、薬物動態、毒性試験を一体化し、臨床評価に反映させるものであるとされた。また、EUより安全性薬理について薬理の項ではなく毒性の項へ移動させるべきであるとの指摘が出されたが、この問題はS7EWGメンバーに任せるべきであるとの見解が出された（今回、新たにトピックスとして取り上げられた）。

今回の会議において、安全性グループとしてはStep2とすることに合意されたが、安全性グループが提示した品質、安全性及び有効性を統括したドラフトの内容が3者で十分検討されていないことから最終合意に至らなかった。以上、安全性に関しては目次及び表形式に大きな問題はみられていない。

所員の研究、試験および検査に関する発表を主とする「衛研例会」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10年度に行った演題は次のとおりである。

第410回（平成10年4月7日）

1. 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—茶試料について—

食品部 根本了

2. 培養ラットシュワン細胞におけるアルドース還元酵素遺伝子発現に対する高浸透圧ストレスの影響

大阪支所薬品試験部 前川京子
谷本剛

第411回（平成10年5月12日）

1. HIV プロテアーゼ阻害剤の合成鍵中間体アミノエポキシドの合成

有機化学部 栗原正明

2. ラット初代培養海馬神経細胞におけるグルタミン酸による細胞内カルシウムイオンとpH変化

生物薬品部 山本雅幸
川西徹

3. 超臨界流体抽出（SFE）-HPLCによる穀類中残留農薬の一斉分析法

大阪支所食品試験部 吉井公彦

第412回（平成10年6月9日）

1. ポリマー水溶液の凍結による相分離

薬品部 伊豆津健一

2. 漢方方剤七物降下湯の脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）に対する効果

生薬部 樋口行人

3. 硫酸化チロシン含有ペプチドのFmoc型固相合成法の開発

療品部 矢上健

4. 新生仔マウス二段階発癌モデルにおける ODMH 及び HQ の発癌標的性

病理部 田村啓
渋谷淳

5. ラット乳腺二段階発癌モデルにおける食物繊維成分のプラントゴオバタ種皮未の発癌修飾作用

病理部 高木久宣
三森国敏

第413回（平成10年7月14日）

1. 生物の微生物汚染に対するγ線照射に関する研究

生薬部 鎌倉浩之

2. 大豆食で起こるラット甲状腺腫瘍の発現機序に関する検討

病理部 池田尚子
西川秋佳

第414回（平成10年10月13日）

1. ATP受容体チャネルの機能とその構造との相関

薬理部 中澤憲一

2. ヒト型反応を基礎とした毒性試験：ヒト由来細胞を用いた変異原性試験

変異遺伝部 本間正充

第415回（平成10年12月8日）

1. アレルギーと環境化学物質

機能生化学部 手島玲子

2. ラテックスアレルギー概論—現状と対策—

療品部 中村晃忠

3. ラテックスアレルギーと植物の生体防御蛋白質—交差反応性に基づくアレルゲン—

療品部 矢上健

4. クレソン中の in vitro 抗アレルギー活性成分について

食品部 合田幸広

5. リンゴ未熟果由来プロアントシアニジンの抗アレルギー活性について

食品部 穂山浩

第416回（平成11年2月9日）

1. ポリウレタンの発癌機構

療品部 土屋利江

2. マウス肝二段階発がんモデルを用いたベンタクロロフェノール（PCP）のイニシエーションおよびプロモーション作用の検討

毒性部 梅村隆志

3. 遺伝子改変動物を用いた発がん性評価：p53 ノックアウトマウスを用いた発がん性の解析

病理部 小野寺博志
三森国敏

4. 麩酸のラット甲状腺発がんメカニズム—ホルモンを介した発がん性—

病理部 田村啓
三森国敏

5. トランスジェニックマウスを用いた各種制がん剤の変異原生に関する検討

変異遺伝部 鈴木孝昌

支 所 例 会

第 159 回 (平成 10 年 6 月 23 日)

1. ポストカラム反応蛍光検出 HPCL を用いる農産物中 N-メチルカルバメート系農薬とそれらの代謝物の分析法
食品試験部 津村 ゆかり
2. ラットにおけるトリブチルスズの着床阻害作用(脱落膜反応に与える影響)
生物試験部 原 園 景
3. 可塑剤 butyl benzy phthalate の妊娠及び偽妊娠ラットにおける生殖障害
生物試験部 江 馬 眞
4. ハムスターテストによるラット受胎能検査の検討
生物試験部 川 島 邦 夫

第 160 回 (平成 10 年 9 月 22 日)

1. 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
生物試験部 天 野 博 夫
2. 私の研究生活 35 年を振り返る
支 所 長 野 口 衛

第 161 回 (平成 10 年 10 月 27 日)

1. ヒト・アルドース還元酵素遺伝子導入マウスを用いた糖尿病合併症発症機序の解明並びに合併症治療薬の有効性・安全性評価への応用に関する研究 -その 1-
薬品試験部 前 川 京 子
2. 逆相系光学異性体分離カラムによるロートエキス中トロパンアルカロイド光学分割
薬品試験部 四方田 千佳子
田 頭 洋 子
3. 超臨界流体抽出(SFE)-GC(GC/MS)及び HPLC による穀類中残留農薬の一斉分析法
食品試験部 吉 井 公 彦
4. ICP 発光分析による食用色素中のヒ素の測定とその実態調査
食品試験部 石 光 進

5. ヒトメラノーマ細胞に対する IL-1 の増殖抑制作用の解析 -IL-1 の細胞内情報伝達機構-
生物試験部 中 川 ゆかり

第 162 回 (平成 10 年 12 月 22 日)

1. ヒアルロン酸水溶液の超音波分解における溶質濃度および共存イオン種の影響
薬品試験部 宮 崎 玉 樹
2. 東南アジア諸国における医薬品事情 -不正医薬品を中心に-
薬品試験部 谷 本 剛
3. 健康食品ギムネマ酸含量の実態調査並びにギムネマ酸の糞中ステロイド排泄増加作用について
食品試験部 中 村 優 美 子
4. 内分泌かく乱物質の食品・食器等から暴露に関する調査研究 -特にフタル酸エステル類の暴露量調査方法の設定について-
食品試験部 外 海 泰 秀
5. DNA 三重鎖形成による転写因子活性の制御 -アンチジーン法の確立に向けて-
生物試験部 田 中 寿 一

第 163 回 (平成 11 年 1 月 26 日)

1. アポリポ蛋白質 E による脂質粒子の認識機構
薬品試験部 齋 藤 博 幸
2. 日局「浸透圧測定法」の改正について
薬品試験部 岡 田 敏 史
3. 食用黄色 5 号 (サンセットイエロー FCF) の不随色素について
食品試験部 辻 澄 子
4. 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 (第 3 報) -IL-1 によって誘導される CDK インヒビター p21Cipl の役割について-
生物試験部 村 井 敏 美
前 田 秀 子

 特別講演会

平成 10 年 6 月 2 日

Isolation of Human Breast Stem Cells and Tyrosine Kinase
Activation are related to Breast Carcinogenesis by Tonzing
Radiation and Oncogenes

Michigan State University Dr.Kang Kyung-Sun,D.V.M.

平成 10 年 12 月 7 日

Endocrine Disrupting Chemicals molecular mechanism of
its low dose effects

NCTR Dr.Daniel M.Sheehan

平成 10 年 6 月 10 日

The Role of Chemistry in HACCP, Analysis of Food
Additives

FDA Dr.Charles R.Warner

平成 11 年 1 月 19 日

Effect of TCDD on Prostate Cytochrome CYP1A1 Gene
Activation and it's potential on sequences

KFDA Dr.Insu.P.Lee

平成 10 年 7 月 16 日

Endocrine Disrupting Issue in Food Safety

Michigan State University Dr.Kang Kyung-Sun,D.V.M.

平成 11 年 1 月 20 日

Identification of Transgene Instability and Loss of
Tumorigenic Response in The Tg.AC Mouse
Carcinogenicity Model

FDA Dr.Frank Sistare

平成 10 年 9 月 11 日

造血幹細胞の ex vivo 増幅臨床応用の可能性とその問
題点

東京大学医科学研究所教授 中畑 龍俊

平成 11 年 1 月 28 日

制がん物質の細胞標的化へのアプローチ

通産省生命工学工業技術研究所 奥野 洋明

平成 10 年 10 月 19 日

アレルギーとプロスタグランジン、ヒスタミン

京都大学大学院教授 市川 厚

平成 11 年 2 月 18 日

The Role of Inter -and Intra- Cellular Communication in
Oxidative-Induced Epigenetic Pathways

Michigan State University Dr.Brad L.Upham

平成 10 年 11 月 2 日

Metabolic Polymorphisms, Drug Metabolism, and Cancer
Susceptibility

NCTR Dr.Fred F.Kadlubar

平成 11 年 2 月 23 日

CD44 分子の癌浸潤・転移機構における役割

千葉大学医学部教授 張ヶ谷健一

平成 10 年 11 月 6 日

c-kit 遺伝子の分子病理学：マスト細胞欠損マウスから
ヒト消化管間質腫瘍まで

大阪大学医学部教授 北村 幸彦

平成 11 年 3 月 5 日

神経筋シナプス形成の分子機構の解析

愛媛大学医学部教授 重本 和宏

平成 10 年 11 月 9 日

アデノウイルスベクターと発現制御技術、現状と将来

東京大学医科学研究所教授 斎藤 泉

 支所特別講演会

平成 10 年 11 月 26 日

「内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）in vitro スクリ
ーニング試験法」

大阪大学大学院薬学研究科 西原 力

平成 10 年度に行った主な研究課題

Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 1998

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. 生物システムに作用する化学物質の機能と三次元構造相関の解明 (生薬, 有機, 食品, 支食, 衛微, 環境)
The relationship between three dimensional structure and functional activity observed in the chemical compounds on biological system

国立機関原子力試験研究費 (科学技術庁)

1. 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
2. γ 線照射により誘起される食品包装材料の化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
3. 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
4. γ 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)
 γ -irradiation-controlled drug release from biodegradable drug delivery systems
5. 放射線照射を受けた医用材料の表面解析と細胞機能影響評価に関する研究 (療品)
Studies on the material surface analysis and cellular function on the gamma-ray sterilized biomaterials
6. 放射線及び化学物質による細胞障害機構のリスクアセスメント系の開発「遺伝子改変動物におけるテロメア及びテロメアーゼの変化を指標にした研究」(毒性)
Studies on the application of telomere length and telomerase activity for risk assessment of chemicals and irradiation
7. 生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした照射生薬の検知法に関する研究 (生薬)
8. 照射食肉等の検知法に関する研究 (食品)
Study on Detection procedures for Irradiated Frozen Foods
9. 新規グルココルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的研究 (生物)
Study on newtype of glucocorticoid receptor and its clinical application
10. 低線量放射線による微生物毒素産生能の低減化に関する研究 (衛微)
Effects of gamma irradiation on toxin production by food-borne pathogen.

科学技術振興調整費 (科学技術庁)

(総合研究)

1. QOL を指向した生体融和材料の新創出に関する研究 (療品)
New development of biointegration materials for high quality of life.
2. 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
(生活・社会基盤研究)

3. 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
4. 性分化関連分子 (エストロジェン受容体など) の遺伝子発現及び化学物質との結合を指標とする内分泌攪乱物質の検出系の確立・応用に関する研究 (薬理)
Studies on screening methods for endocrine disruptors by their effects on sex related gene expression and binding to estrogen receptors
(知的基盤整備推進制度)
5. 国際的先進材料の実用化を促進するための基盤構築に関する研究 (療品)
摩耗粉の生体適合性評価に関する研究
Studies on the method evaluating for the friction resistant and biocompatible materials
6. 化学物質安全特性予測基盤の確立に関する研究 (毒性)
Study on safety prediction of chemical substances
7. 生体内化学物質の挙動解明 (生物)
Study on the in vivo behavior of chemical substances
8. 研究資料データベースの共有化・効率化に関する研究 (変異)
生物系研究資料データベース構築に関する研究
Study on establishing biological database for sharing and efficient operations.
Construction of databases for biological research resources.
(ゲノムフロンティア開拓研究推進制度)
9. 生体制御物質の分子設計と精密合成のための基盤技術開発に関する研究 (有機, 情報)
Research and development of basic technology for molecular design and efficient synthesis of bio regulators
(重点基礎研究)
10. 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
11. アレルギー疾患に係わる環境要因の解明とその治療薬の基礎的研究 (環境, 薬品, 生薬, 情報, 筑植)
Allergy associated with environmental factor
12. 食品中化学物質の効率的分離手法の開発とその応用に関する研究 (支食, 食品, 食添)
Studies on development and application for effective separation method of chemical substances in foods
(臓器・組織再生システムのための基盤技術の開発)
13. 組織間相互作用の制御による臓器・組織構築技術の研究 (毒性)
Studies toward the establishment of basic technology for the reconstruction of organs and tissues via regulating tissue interaction
(内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究)
14. 内分泌攪乱物質の食品用器具, 包装容器中の検出と食品への移行性, 並びに環境経由食品汚染の評価手法の開発 (食添)
Screening of endocrine-disrupting substances in utensils

- containers and packaging materials for foods and their migration into foods, and development of environmental risk assessment approach via food consumption.
15. 高次元での内分泌攪乱物質の影響に対する分子レベルでの発生メカニズムの解明(毒性)
Molecular biological approach on the effects of endocrine disrupting chemicals on the development of organism.
(共同研究)
 16. 有害ヒ素の健康影響評価と地下水低減化技術開発に係る共同研究(環境)
Japan-India intergovernmental cooperation program in science and technology: Human health risk assessment of arsenic and development of remediation technologies for arsenic-contaminated groundwater
- 国立機関公害防止等試験研究費(環境庁)**
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(有機, 代謝)
Chemical and biochemical studies on toxicity of nitrogen oxides as environmental pollutants using nitric oxide releasing compounds
 2. 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-biosenser model for monitoring of water pollution
 3. 遺伝子工学技術を用いた環境汚染物質の健康影響評価方法の開発・確立に関する研究(環境)
The establishment of the methods to evaluate the influence for human health by gene engineering
 4. ダイオキシン等内分泌系攪乱環境汚染物質のヒト及び生態系に対するリスク評価に関する研究(環境)
Human health and ecological risk assessment of endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment
 5. 有害金属の形態分析技術の開発と地下水汚染機構解明に関する研究(環境)
Chemical form and contamination mechanism of toxic metals in groundwater
 6. 界面活性剤の水道水源水域及び利水過程における挙動と適正管理に関する研究(環境)
Comprehensive approaches to the management of surfactants and related chemicals in water sources and drinking water treatment processes
- 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
- 未来環境創造型基礎研究推進制度(環境庁)**
1. 化学物質による生物・環境負荷の総合評価手法の開発(環境)
Total evaluation of chemicals on load against the creature and the environment
- 厚生科学研究費補助金(厚生省)**
1. 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
 2. 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 tungi and parasitic tungi on medicinal plants
3. ラット肝細胞による消毒副生成物ハロアセトン類の毒性評価とその構造活性相関に関する研究(環境)
Structure-activity relationship for the cytotoxicity of haloacetones in cultured rat hepatocytes
 4. 薬用植物の遺伝的・形質的多様性の極長期保存技術構築に関する研究(筑植)
Development of the long-term storage technique for the conservation of medicinal plant germplasm and biodiversity
 5. 薬物中毒, 薬害, 農薬中毒等の予防と原因解明のための毛髪診断研究(薬品)
Studies on hair diagnosis for prevention of medicinal poisoning, drug misuse and agricultural, chemical hazards, and elucidation of the causes
 6. 新開発食品素材の安全性評価に関する研究(支食)
Study on the valuation of safety about newly developed foodstuffs
 7. 輸入農産物の試験方法に関する研究(支食)
Studies on investigation method for imported agricultural products
 8. 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
 9. 農産物の食中毒菌による汚染機序等に関する研究(衛徴)
Studies on contamination mechanism of pathogenic bacteria for farm products
 10. 調理施設と食品製造業における衛生管理に関する研究(衛徴)
Studies on hygiene management for food preparation facilities and food manufacturers
 11. 感染性廃棄物中間処理における新技術の有効性および安全性に関する評価研究(療品)
Evaluation of alternative technologies of medical waste treatment
 12. 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(療品)
Study on household aerosol products containing silicon oils
 13. 遺伝子治療薬の安全性確保基盤技術に関する研究(生物)
Studies on the development of new fundamental technologies to ensure the safety of gene therapy products
 14. 医薬品の品質保証基準及び品質判定システムに関する研究(薬品)
Studies on new evaluation concepts for quality assurance of drug products
 15. 内分泌攪乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究(毒性)
Study of endocrine disrupting chemicals on human effects: mechanism of their actions
 16. in vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究(薬理)
Studies on safety evaluation of cosmetics by in vitro methods and its international harmonization
 17. ダイオキシン類の汚染状況及び子宮内膜症等健康影響に関する研究(毒性)
A study of health effect of dioxin exposure including possible induction of endometriosis
 18. 食品中の有害物質等の評価に関する研究(食品)

- Studies on evaluation of toxic compounds in foods
19. 日本薬局方等医薬品基準の規格・試験方法に関する研究 (薬品、支薬)
Studies on the specifications and test methods for the Japanese Pharmacopoeia
20. 医薬安全総合研究の企画と評価に関する研究 (副所長)
21. 食品中残留農薬分析の超迅速化に関する研究 (食品)
Development of rapid analytical methods for pesticide residue
22. 未規制薬物の乱用防止に関する研究 (生薬)
Studies on prevention of extravagant use for unregulated drugs medicinal substances
23. タバコ含有物質による健康増進に及ぼす影響に関する研究 (生薬, 病理, 食添, 支生)
Chemical studies of tobacco and tobacco smoke for effect upon the human health
24. 薬効成分を有する天然物-生薬、漢方製剤-の安全性に関する研究 (生薬, 病理, 有機, 情報, 代謝)
Studies on safety of natural medicines (herbal medicines and chinese medicines) containing effective components
25. 医療用具・医療材料の有効性・安全性・品質評価に関する研究 (療品)
Studies on the evaluation of effectiveness, safety and quality of medical devices and its materials
26. 生活安全総合研究の企画及び評価に関する研究 (所長)
27. 高度先端医療 (人工血液) 研究事業の企画と評価に関する研究 (所長)
28. ダイオキシン類の食品経路総摂取量調査研究 (食品)
Studies on the intake of dioxins from foods.
29. 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究 (病理, 薬理, 毒性, 食品)
Studies on the interactive effects of food chemicals on biological systems
30. 食中毒原因究明方策に関する研究 (衛微)
Studies on prevention system of causative pathogen on foodborne diseases
31. 日本薬局方・微生物試験法の国際調和対応のための調査、研究 (衛微)
International harmonization of microbial tests in Japanese pharmacopoeia
32. 畜水産食品中の化学物質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
33. 食品添加物の規格基準設定等に関する基礎的調査研究 (食添)
Basical-studies on the establishment of standards and specifications for food additives
34. 分子運動性スケールの利用による効率的省資源型安定性試験法の確立 (薬品)
Stability evaluation of pharmaceuticals based on a scale of molecular mobility
35. 内分泌かく乱物質等、生活環境中の化学物質による健康リスクの評価における不確実性の解析に関する研究 (情報)
Uncertainty analysis in health risk assessment of environmental chemicals, such as endocrine disruptors
36. 室内空気中の化学物質に関する調査研究 (環境)
Studies on the chemicals in indoor air
37. 医薬品等の安全性確保の基盤となる研究-アポトーシスを指標とした毒性評価のための動物の組織・細胞の利用法に関する研究- (毒性)
Basic research on the safety of drugs - research on the development of methodology using apoptosis in animal tissues and cells as an index of toxicity.
38. 新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究 (衛微、支薬)
Study on the technical advancement of quality assessment for newly developed drugs
39. 放射線照射器具の品質確保に関する研究 (機能)
The quality control of the radiation devices
40. 動物組織由来医薬品等原材料の異常プリオンタンパク汚染の高感度検出法の開発 (機能)
The development of the sensitive assay of prion proteins in materials derived from animal tissues
41. 放射線医療施設の管理における評価基準の指標に関する研究 (機能)
The guideline for the control of medical radiation institution
42. 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 (食品)
Studies on the intake of aluminum from foods
43. トランスジェニック動物/クローン動物を利用して製造した医薬品の安全性評価に関する研究 (生物)
Studies on safety evaluation of Pharmaceuticals derived from transgenic animals/clone animals
44. 薬用生物資源の分布調査とその活用に関する研究 (生薬)
Studies on distribution of medicinal plants and its utilization
45. DNA 修復異常遺伝病の分子機構の解明に関する研究 (変異)
Studies on molecular mechanisms of genetic diseases caused by DNA repair abnormalities
46. 培養細胞研究資源の高度化及び研究資源基盤整備に関する研究 (変異)
Studies on establishing an infrastructure and qualification systems of the cell culture research resources
47. 地域における医薬品試験等のネットワーク化に関する研究 (薬品、支薬)
Development of network within provincial Institute of Health Sciences for tests of pharmaceuticals
48. 医療用具の適正使用に関する研究 (療品)
Study for appropriate usage of medical devices
49. 医療用具滅菌バリデーションに於けるバイオバーデン菌抵抗性変動要因の究明 (療品)
Study on cause of resistance variation of bioburden microorganism for attainment of sterilization validation of health care products
50. 医療用具関係の国際ハーモナイゼーションに関する研究 (療品)
Research and other activities relevant to international harmonization in medical devices area
51. 感染症廃棄物中間処理における新処理技術の安全性および有効性に関する評価研究 (療品)
Evaluation for safety and efficacy of alternative technologies on infectious waste treatment
52. 新しい日米科学技術に関する研究 (毒科学研究) (センター長)
US-Japan exchange program on new toxicological information
53. 食品中ダイオキシン類実態調査 (食品)

- Monitoring study on residual dioxins in foods
54. 毒劇物中毒事件に関する研究 (情報)
Study on poisonings caused by poisonous and deleterious substances
 55. トランスジェニックマウスの特性に関する研究 (病理)
Analysis of carcinogenic potential of transgenic mice
 56. 安全性試験法開発に関する研究 (病理、食品)
Studies on the development of testing methods for chemical safety evaluation
 57. 内分泌かく乱物質の食品、食器等からの曝露に関する調査研究 (副所長、食品、食添支食)
Study on the exposure of endocrine-disrupting chemicals from foodstuffs and tablewares
 58. 食品中のアルキルフェノール化合物及び 2,4-ジクロロフェノールの含有量に関する調査研究 (食品)
Study on the determination of alkylphenols and 2,4-dichlorophenol on foods
 59. 新課題医療廃棄物の処理システムの構築に関する研究 (療品)
Establishment of treatment system for non-regulated alternative medical wastes
 60. 医療材料などにおけるエンドクリン阻害物質に関する研究 (療品)
Chemical and biological analysis on endocrine disruptors existing in medical materials
 61. 臨床薬物動態試験ガイドラインに関する調査研究 (薬理)
Studies on clinical pharmacokinetics guideline
 62. 薬物相互作用ガイドラインに関する調査研究 (薬理)
Studies on guidelines for evaluation of drug interactions
 63. 内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の健康影響についての試験法に関する調査研究 (薬理)
Studies on test methods for evaluation of health effects by endocrine disruptors
 64. 甲状腺障害物質の in vivo 相互作用予測に関するトキシコキネティクスの研究 (薬理)
Drug interaction of thyroid toxic substances (Toxicokinetic studies)
 65. 新薬の有効性・安全性評価のためのヒト肝組織・細胞の利用法に関する研究 (薬理)
Studies on the use of human liver tissues and hepatocytes for evaluation of new drugs
 66. 2 週間の反復投与毒性試験による雄性生殖器への影響評価の可否に関する研究 (薬理)
Validation of 2 Week repeated dose toxicity studies to evaluate effects of drug substances on male genital organs
 67. Bisphenol A のラット及びサルにおける体内動態試験 (薬理)
Pharmacokinetic studies of Bisphenol A in rats and monkey
- 科学研究費補助金 (文部省)
- (特定 A)
1. 体節形成における分節化開始機構の解析 (毒性)
Analysis of the initiation mechanism of somite segmentation
 2. MesP1, MesP2 遺伝子エンハンサー特異的欠損マウスの作製と解析 (毒性)
Generation and analysis of MesP1 and / or MesP2 enhancer specific deficient mice
- (基盤 A)
3. 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)
Short-term detection system adverse effect of pharmaceutical drugs by means of point-mutation assay on the embryonic stem cell after in vitro exposure
 4. P53 欠失マウスにおける造血因子および TGF β を介したシグナル伝達 (毒性)
Signal transduction through hemopoietic factors and TGF β in the p53-deficient mouse
 5. 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
- (基盤 B)
6. トランスジェニックマウスの化学発癌における増強作用機序解明に関する研究 (病理)
Mechanistic studies on the enhancement of chemical carcinogenesis in transgenic mice.
 7. 細胞内チロシンリン酸化のリアルタイム画像化法の開発 (生物)
Development of realtime-imaging method of tyrosine-phosphorylation in cells.
 8. 分子生物学的手法を用いた ATP 受容体のチャネルの構造-機能相関の研究 (薬理)
Studies on structure-function relationship for ATP receptor/channel using molecular biological techniques
 9. 好塩基球細胞の情報伝達におけるエクトキナーゼの役割の解明 (機能)
The study for the role of ecto-kinases on signal transduction in basophils
 10. 単離心筋細胞を用いたエンドセリン A 受容体脱感作機序の解明 (生薬)
Electrophysiological and pharmacological study on the mechanism for desensitization of ET_A endothelin receptor, by using isolated single cardiomyocytes
 11. 糖鎖結合によるアポ B リポ蛋白分泌の制御機構の研究 (代謝)
The role of N-glycosylation in the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins
 12. 代謝活性型 NO Donor の開発 (有機)
Synthesis of NO donors classified as biotransformation type
 13. 形質転換実験系における遺伝子発現変化の解析による発癌促進物質の作用機序の研究 (衛微)
Mechanistic studies on the action of tumor promoters by the analysis of altered gene expression in cell transformation
 14. 体節形成における分節化開始機構の解析 (毒性)
Analysis of the initiation mechanism of somite segmentation

- (萌芽)
15. DPV 法を利用した簡便なりガンドーレセプター相互作用解析手法の開発 (有機)
Development of the convenient methods for the analysis of ligand-receptor interaction using DPV technique
(奨励 A)
 16. BrdU 標識細胞の近紫外線照射法による新しい個体内造血幹細胞動態の解析法 (毒性)
Newly developed in vivo assay system for kinetics onhomopoietic stem cells using BrdU labeled cells followed by an elimination using UVA irradiation
 17. DNA 二重鎖構造巻き戻し機能を持つ DNA 切断化合物の合成 (有機)
Synthesis of antitumor agents that induce unwinding and cleavage of duplex DNA.
 18. 骨分化促進機能を有する C60 誘導体の合成 (有機)
Synthesis of C60 derivative with chondrogenesis promoting activity
 19. CGH 法および染色体ペインティング法による培養細胞株の染色体再配列の解析 (変異)
Studies on chromosomal rearrangements in cell lines by comparative genomic hybridization and whole chromosome painting.
 20. 白血球の機能発現におけるコフィリンの役割に関するアンチセンス法による解析 (代謝)
Study on the role of cofilin in leukocyte functioning using antisense method
 21. 環境因子の発がんリスク評価に関する研究 (病理)
Risk assessment analysis on the carcinogenicity of environmental factors
 22. 血漿アポリポ蛋白質の結合選択性を利用した脂質エマルジョンの体内代謝の制御 (支葉)
Studies on binding of plasma apolipoproteins and metabolism of lipid emulsions

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, 毒性, 変異, 病理)
Studies on establishment of new methods for evaluation of carcinogenicity studies using animals and its implication
3. 遺伝子改変マウスを用いた短期 in vivo assay 系の開発 (毒性)
Use of biotechnology-derived experimental mouse to assay an in vivo carcinogenesis-their mechanism of action and the time-intervals after exposures
4. ヒト発がん要因の相互作用の解明に基づくがん制御に関する研究 (薬理)
発癌感受性に影響を及ぼす遺伝子多型性に関する研究
Studies on human genetic polymorphisms affecting individual susceptibility to environmental mutagens and carcinogens

その他

- 喫煙科学研究財団研究助成金
1. 喫煙関連発がんの卸御機構と予防に関する研究 (病理)
Mechanistic studies on smoking-related carcinogenesis and its prevention

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 development of official analytical method for pesticide residue
2. 農薬衛生対策推進費・残留農薬分析法再評価検討 (食品, 支食)
Study on improvement of official analytical method for pesticide residue
3. 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
4. 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
5. 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等の規格基準の設定 (食添, 支食)
Establishment of standards and specifications of food additives other than chemical synthetics
6. 食品添加物安全性再評価費・慢性・発がん性併用試験 (ラット) (硫酸アンモニウム, アカネ色素, 塩化マグネシウム) (病理)
Chronic toxicity and carcinogenicity tests in rats (Ammonium sulfate, Madder color, Magnesium chloride)
7. 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
8. 食品添加物安全性再評価費・90 日間投与試験 (ラット) (補骨子抽出物, トコトリエノール, 没食子酸) (病理, 毒性)
Ninety-days toxicity studies of natural food additives (Extract of psoralea corylifolia, Tocotrienol, Gallic acid)
9. 食品添加物安全性再評価費・発がんメカニズム (イソチオシアネート) (病理)
Mechanistic studies on carcinogenesis induced by isothiocyanates
10. 食品添加物安全性再評価費・催奇形性試験 (ラット) (支生)
Teratology study of hinokitiol in rats
11. 食品添加物安全性再評価費・その他 (既存添加物の安全性評価に関する調査研究・コウジ酸) (病理)
Mechanistic study on thyroid carcinogenesis of kojic acid in rats
12. 容器包装等試験検査費 (食添)
Studies on food package and container
13. 畜水産食品中の残留有害物質に係るモニタリング検査 (抗菌性物質・内寄生虫用剤) (食品)
Monitoring study on pesticide residue in livestock product and sea foods
14. 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 (フルメキン) (病理)
Mechanistic study on toxicity/carcinogenicity of some drug residues contained in food products of animal origin (Flumequine)

15. 食品中のダイオキシン類等汚染実態調査の実施 (ダイオキシン類・コプラナーPCB) (食品)
Actual survey for dioxins contamination of foods (dioxins coplanar PCB)
16. 食品等の規格基準の設定等に係る試験検査 (食品, 衛
微, 毒性)
Studies for establishment of standards and specifications on
foods.
17. 水質試験検査の実施 (水質管理調査・未規制物質基準
化検討 MIP・未規制物質基準化 MX) (環境, 病理)
Standardization of analytical methods for drinking water

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) (支生)
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・連続投与
毒性試験 (Zinc butylxanthate) (毒性)
Repeated-dose toxicity studies for a 28day-subacute
administration of IPBC, OBPA, CPIP in rat
3. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査・細胞毒性
試験 (療品)
Cytotoxicity test of chemicals used in household products:
IPBC, GPII, OBPA, BECDIP
4. 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 bisether
5. 家庭用品に使用される化学物質の試験検査・分析法設
定 (療品)
Development of analytical methods of chemicals used in
household products
6. 第二種特定化学物質曝露量調査・人体暴露調査 (トリ
フェニルスズ化合物, トリブチルスズ化合物) (食品)
Exporsure survey of second class special chemical
substances (triphenyltin, tributyltin compounds)
7. 環境化学物質の曝露量測定の見直し (情報)
Studies on exposure of environmental pollutants
8. OECD 試験法ガイドラインの導入に係わる試験検査機
関間精度管理 (代謝)
Revision of japanese testing methods associated with
revised OECD test guideline
9. 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
10. 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 (変異)
Revision of Japanese test guidelines associated with the
OECD test guidelines
11. 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
12. 室内空気環境汚染化学物質対策事業 (環境)
Program of strategy for volatile chemicals in indoor air

厚生本省庁費 (厚生省医薬安全局)

1. 鑑識用麻薬等の標準品製造 (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 (外用性抗真菌薬
ビタミン A) (支薬)

Studies on rapid examination method of drugs

厚生本省医薬品等審査業務庁費 (厚生省医薬安全局)

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. 医療用後発医薬品再評価品質規格設定等 (溶出試験規
格の設定等) (薬品, 審査センター)
Reevaluation of generic prescription drugs by dissolution
tests and application of dissolution specifications
4. 医療用後発品品質確保対策事業 (各都道府県衛生機関
の外部試験精度管理を行うための標準品の測定, 管理,
配布, 測定結果の分析, 講評) (薬品)
Quality control of generic drugs (reliability of quality
assurance on provincial health sciences institute)
5. 医療用後発品品質確保対策事業 (医療用注射剤の後発
品の無菌試験, 発熱性物質試験, 不溶性異物試験等) (支
生, 支薬)
Quality control of generic drugs (pyrogen test, sterility test
and foreign insoluble matter test for injections of generic
drugs)
6. 医薬品関連情報の管理及び活用方法に関する調査 (情
報)

厚生本省あへん等取扱業務庁費

1. けし直接抽出法に関する研究 (第二次) (北植, 筑植,
種植)
Study on direct extract method for opium alkaloid from
Papaver somniferum

診断用生物学的製剤等基準作成費 (厚生省健康政策局委託 事業)

1. 細胞治療安全性有効性評価法研究 (生物)
Studies on the evaluation of safety and efficacy of cells
derived from transgenic animals for human cell therapy

内分泌かく乱化学物質の人体影響に関する調査研究費

1. "OECD Test Guidwline 407 enhanced"案に基づくラット
を用いた反復投与試験 (フルタミド, 17 α -メチルテス
トステロン) (病理)
Validation study of proposed protocol for an "Enhanced
OECD Test Guideline 407" using flutamide and 17 α -
methyltestosterone

環境庁環境保全調査費

1. 国設自動車交通環境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創薬等ヒューマンサイエ ンス総合研究事業

研究事業: 創薬等ヒューマンサイエンス研究事業

1. アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚
掻痒症の発症機序の解明と新規治療, 薬の創製 (支生)
Clarification of mechanism of pruritics in spontaneous
atopic dermatitis mouse (NC mouse) and discovery of anti-
pruritogenic agents
2. 中枢神経系における ATP 受容体の機能の解析と医療
への応用 (薬理)

3. 精巢細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備 (毒性)
Establishment of lineage specific antibodies during rat spermatogenesis to analyze testicular toxicity
 4. 加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究 (薬品)
Stability testing for characteristics of dosage forms, alternative to accelerated testing
 5. 新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究 (食品)
Evaluation and characterization of functional activity on new foods.
 6. 食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究 (食添)
Techniques for the development of food additives and evaluation methods for the quality and the safety
 7. 遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発 (変異)
Development of second generation mutagenesis test using modified tester by gene engineering
 8. 臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究 (薬理)
Promotion of predictability of drug evaluation by using human tissues
 9. 培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究 (支生)
Development of an *in vitro* cell culture assay system for detecting pyrogenic contamination in pharmaceuticals
 10. 薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究 (薬理)
Studies on polymorphism of drug metabolizing enzymes and evaluation of drugs used for high-risk patients
 11. 新規制御因子を標的とした高脂血症・動脈硬化症予防治療薬の開発に関する基礎的研究 (代謝)
Studies on the regulatory mechanisms of VLDL secretion and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux
 12. 薬用植物の開発研究 (生薬)
Studies on development of medicinal plants
 13. 高齢化社会に向けた歯周疾患対策：特に成人性歯周炎に関する基礎的研究と薬物開発への応用 (療品)
The control for periodontal disease in an advanced age society: basic research on adult periodontal disease and development of vaccine for the prevention
 14. 薬用植物の種に特異的な機能の分子生物学的解析 (筑植)
Molecular analysis of specific function for some medicinal plant species
 15. 植物バイオテクノロジーによる次世代薬用資源の開発に関する研究 (筑植)
Research on exploitation of new medicinal resources for next generation by plant biotechnology
 16. 酸性多糖類の医用材料としての応用に関する基礎的研究 (支薬)
Fundamental studies on the biomedical applications of anionic polysaccharides
 17. 人工臓器材料の長期間安全性評価に有用な指標に関する基礎的研究 (療品)
Studies on the useful indices of long-term safety evaluation of artificial organ materials
 18. 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
 19. 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-purinoceptors on synaptic transmission
 20. 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
 21. 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
 22. 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
 23. 分析法の評価法の研究 (療品, 食品)
A method for evaluating the reliability of measurements
 24. 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.
 25. フラーレンを基本骨格とするがん光線力学治療薬の開発研究 (有機)
Study on the development of cancer photodynamic therapeutic drug with fullerene moiety as a pharmacophore
 26. 発がん抑制・転移抑制薬の開発のための研究 (病理)
Studies on the development of drugs to suppress carcinogenesis and tumor metastasis
 27. 糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発 (生物)
Studies on the characterization, standardization and control of glycoprotein products
 28. 血液凝固線溶制御因子に関する基礎的研究並びに関連医薬品の有用性確保及び診断技術の確立 (生物)
Studies on factors regulating blood coagulation and acquisition of their usefulness as protein drugs, and establishment of diagnostic method
 29. チャネルの開口を視る技術の開発研究 (生物)
Development of technologies for imaging channel opening
 30. 白血球機能の新しい制御手法の開発に関する研究 (代謝)
Studies on development of new methods for regulation of leukocyte functions
- 研究事業：エイズ医薬品等開発研究事業**
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
- 推進事業：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. 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
 3. 変異ヒトアポ B 発現細胞を用いた VLDL 分泌制御機構の解明 (代謝)

Structure and function of human apolipoprotein B in the assembly and secretion of VLDL

医薬品副作用被害救済研究振興調査機構保健医療分野における基礎研究推進事業研究プロジェクト

- 1. コンピュータ分子設計法の高度化とその有効性の実験的(核内レセプターリガンドの設計による)検証(有機)
Evolution in computer drug design and experimental evaluation of the methods (in design of nuclear receptor ligands)
- 2. 自己化を獲得する機能組織の再生技術(療品)
Technology for regeneration of functional self tissues
- 3. 医薬品の安全性・有効性を評価するためのヒト型試験系の開発に資する基礎的研究(薬理)
ヒト型薬物代謝酵素遺伝子導入細胞系を用いた医薬品, 農薬, 一般化学物質の安全性, 有効性の評価系の構築
Development of testing system for biological actions induced by therapeutic drugs and chemicals utilizing in vitro and in vivo expression of human xenobiotic metabolizing enzymes
ニコチン様アセチルコリン受容体を用いたヒト型機能タンパク質発現系に関する研究
Studies on human functional protein expression system using nicotinic acetylcholine receptors
ヒト型バソプレッシン受容体発現細胞の樹立および発現させた受容体の性質解明に関する研究
Studies on establishment of cells expressing human vasopressin receptors and clarification of properties of expressed receptors
- 4. 種々のヒト・サイトカン受容体導入マウス幹細胞自己複製機構の解析と造血幹細胞増幅への応用(毒性)
Evaluation of the self-renewal capacity of the hemopoietic stem cell from transgenic mice carrying a variety of human cytokine receptor genes to apply on the

stem cell proliferation

同一性評価調査研究経費(医薬品機構)

- 1. 生物学的同等性の評価方法の研究: 溶出試験及びヒト試験(薬品)
Evaluation of in vitro and in vivo bioequivalence of oral drug products.

部 名 略 称	
薬 品 部	薬品
生 物 薬 品 部	生物
生 薬 部	生薬
療 品 部	療品
環 境 衛 生 化 学 部	環境
食 品 部	食品
食 品 添 加 物 部	食添
有 機 化 学 部	有機
機 能 生 化 学 部	機能
代 謝 生 化 学 部	代謝
衛 生 微 生 物 部	衛微
化 学 物 質 情 報 部	情報
毒 性 部	毒性
薬 理 部	薬理
病 理 部	病理
変 異 遺 伝 部	変異
総 合 評 価 研 究 室	評価
大 阪 支 所 薬 品 試 験 部	支薬
大 阪 支 所 食 品 試 験 部	支食
大 阪 支 所 生 物 試 験 部	支生
北 海 道 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場	北植
筑 波 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場	筑植
伊 豆 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場	伊植
和 歌 山 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場	和植
種 子 島 薬 用 植 物 栽 培 試 験 場	種植

平成10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10年度処理件数			対前年度増減数	対前年度増減数
	東 京	大 阪	合 計		
	件	件	件	件	%
国 家 検 定	(0) 0	(0) 0	(0) 0	-	-
国 家 検 査	(0) 0	(227) 211	(227) 211	△ 16	92.95
製 品 検 査	(0) 0	(571) 284	(571) 284	△ 287	49.74
特 別 審 査 試 験	(175) 71	(0) 0	(175) 71	△ 104	40.57
特 別 行 政 試 験	(151) 171	(6) 0	(157) 171	14	108.92
一 斉 取 締 試 験	(5) 0	(38) 148	(43) 148	105	344.18
輸 入 食 品 検 査	(0) 3	(0) 0	(0) 3	0	-
合 計	(331) 245	(842) 643	(1,173) 888	△ 285	

() 内数字は平成9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10年度国家検査品目別月別判定別件数 実績表	383 頁	○平成10年度特別行政試験実績表	384 頁
○平成10年度製品検査月別判定別件数実績表	384 頁	○平成10年度一斉取締試験判定別件数実績表	385 頁
○平成10年度特別審査試験月別件数実績表	384 頁		

平成10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	2	-	2	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	
内 訳	内 容 量 100ml 未満	大阪	2	-	2	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
	内 容 量 100ml 以上	大阪	0	-	0	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	
ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液	大阪	2	-	2	2	-	2	1	-	1	1	-	1	1	-	1	0	-	0	
ヒトインスリン注射液	大阪	3	-	3	1	-	1	1	-	1	2	-	2	2	-	2	0	-	0	
リンゲル液	大阪	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	
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	2	-	2	2	-	2	0	-	0	2	-	2	3	-	3	4	-	4	
生合成ヒトインスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	2	-	2	0	-	0	0	-	0	2	-	2	0	-	0	2	-	2	
ヒト結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液	大阪	1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	
生合成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	1	-	1	
生合成ヒト二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液	大阪	11	-	11	4	-	4	0	-	0	9	-	9	7	-	7	11	-	11	
生合成ヒトイソフェンインスリン水性懸濁注射液	大阪	4	-	4	1	-	1	0	-	0	5	-	5	2	-	2	4	-	4	
ヒト二相性イソフェンインスリン水性懸濁注射液	大阪	2	-	2	4	-	4	0	-	0	1	-	1	0	-	0	2	-	2	
計		31	-	31	15	-	15	2	-	2	22	-	22	16	-	16	24	-	24	

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	3	-	3
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	2	-	2
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	1	-	1
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	7	-	7
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	9	-	9
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0
2	-	2	3	-	3	1	-	1	6	-	6	0	-	0	2	-	2	27	-	27
1	-	1	1	-	1	2	-	2	0	-	0	0	-	0	0	-	0	10	-	10
1	-	1	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	2	-	2	4	-	4
0	-	0	1	-	1	1	-	1	1	-	1	0	-	0	1	-	1	8	-	8
4	-	4	10	-	10	10	-	10	8	-	8	3	-	3	10	-	10	87	-	87
5	-	5	2	-	2	4	-	4	5	-	5	2	-	2	3	-	3	37	-	37
3	-	3	2	-	2	0	-	0	4	-	4	0	-	0	1	-	1	19	-	19
16	-	16	19	-	19	18	-	18	24	-	24	5	-	5	19	-	19	211	-	211

平成10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	22	-	22	28	1	29	22	-	22	27	-	27	21	-	21	13	-	13
計	22	-	22	28	1	29	22	-	22	27	-	27	21	-	21	13	-	13

平成10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	9	3	16	2	14	1	-	5	9	14	-	-	59
生 物 薬 品 部	-	1	-	-	-	-	3	-	-	8	-	1	5
衛 生 微 生 物 部	3	1	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	7
	12	5	16	3	15	1	3	6	9	22	0	1	71

平成10年度特別行政試験実績表

局(部) 課(室)	品(項) 目	件 数	担 当 部
医薬安全局 麻薬課	国産生あへんのモルヒネ含有率試験について	112	東京 171件 大阪 0件
		20	
	輸入生あへんのモルヒネ含有率試験について	92	
		59	
合 計		171	

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
24	-	24	27	-	27	12	-	12	35	-	35	27	-	27	25	-	25	283	1	284
24	-	24	27	-	27	12	-	12	35	-	35	27	-	27	25	-	25	283	1	284

平成10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		0	0	0	0
大 阪		147	1	0	148
合 計		147	1	0	148

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

別表

(平成11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 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	インスリン	20mg入 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, イソフェンインスリン水性懸濁注射液, 中性インスリン注射液の定量法, イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
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
5	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
6	エンドトキシン	10,000単位 1本	20,500	・エンドトキシン試験
7	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
8	含糖ペプシン	5g入り 1本	22,200	・含糖ペプシンの定量法
9	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
10	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
11	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
12	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
13	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
14	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
15	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
16	ジキタリス	1g入り 3本	16,800	・ジキタリス, 同末の定量法
17	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
18	シ克蘭デラート	300mg入り 1本	16,300	・シ克蘭デラートの定量法
19	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, 同注射液の定量法注射液の純度試験および定量法

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	
20	シヨ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
21	G-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
22	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
23	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
24	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
25	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
26	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
27	トロンピン	500単位入り	2本 39,000	・トロンピンの定量法
28	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
29	薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	10,000単位入り	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
		10カプセル		
30	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	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
		10カプセル		
31	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
32	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
33	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
34	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
35	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
36	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
37	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
38	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
39	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
40	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
41	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11年4月1日現在)

号	標準品名		価格	使用目的
			円	
1	インドシアニングリーン	300mg入り	1本 16,200	・インドシアニングリーンおよびその製剤の定量法
2	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
3	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
4	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
5	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
6	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
7	エンドトキシン100	100単位	3本 16,100	・エンドトキシン試験
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	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
10	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
11	酢酸レチノール	10,000単位入	17,000	・酢酸レチノールおよびその製剤の定量法
		5カプセル		
12	シュウ酸カルシウム水和物	100mg入り	1本 20,600	・熱分析法・熱重量測定法における質量スケールの校正
13	セクレチン	100単位入り	36,000	・セクレチンの定量法
14	センノシド	150mg入り	1本 24,000	・センノシドの定量
15	組織培養ウロキナーゼ	8,000単位入り	1本 22,600	・組織培養ウロキナーゼの定量法
16	低分子量ヘパリン	100mg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
17	テオプロミン	100mg入り	1本 12,300	・ベントキシフィリンの純度試験
18	バイカリン	30mg入り	1本 27,400	・オウゴンの確認試験及びオウゴン中のバイカリンの定量
19	パルミチン酸レチノール	10,000単位入り	16,000	・パルミチン酸レチノールおよびその製剤の定量法
		5カプセル		
20	ヒアルロニダーゼ	500mg入り	1本 20,000	・注射用ヒアルロニダーゼの定量法
21	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
22	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
23	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
24	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法
25	ベオニフロリン	20mg入り	1本 31,500	・ベオニフロリンの定量法
26	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
27	融点測定用	各1g入り	6本 53,000	・融点測定用温度計, 同装置の補正
	{ アトアノド, アトフェネジン, カフェイン, } スルファコルアミド, スルファピリジン, アニリン }			

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

号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
28	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
29	リゾチーム	500mg入り	1本 29,000	・リゾチーム製品の定量法
30	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
31	リン酸ヒスタミン	50mg入り	1本 14,000	・ヒスタミン試験
32	リン酸プレドニゾンナトリウム	100mg入り	1本 15,500	・リン酸プレドニゾンナトリウムおよびその製剤の定量法

国立医薬品食品衛生研究所標準品(色素試験用標準品)

(平成11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	アゾルビンエキストラ	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ゾルビンエキストラの確認試験
4	アマランス	1g入り	1本 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ロムフルオレセイン	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ロムフルオレセインの確認試験
20	テトラブロムフルオレセイン	1g入り	1本 3,300	・外用医薬品, 化粧品および製剤中のテトラブロム

国立医薬品食品衛生研究所標準品（色素試験用標準品）

号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
			円	
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キシンの確認試験
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
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試験
30	フロキシシ	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10年度国立医薬品食品衛生研究所標準品出納状況

(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	
アルプロスタジル	6	50	30	0	26	
インスリン	40	0	11	4	29	
インドシアニングリーン	6	20	10	0	16	
ウリナスタチン	45	0	32	1	12	
ウロキナーゼ	61	0	27	0	34	
エストラジオール	43	101	103	11	30	
エストリオール	20	0	6	0	14	
エストロン	19	47	26	1	40	
エテンザミド	74	0	69	0	5	
エピチオスタノール	65	0	6	0	59	
エルカトニン	28	100	29	0	99	
エルゴカルシフェロール	103	100	143	0	60	
塩化ベルベリン	27	150	139	0	38	
塩酸チアミン液	8	20	14	0	14	
エンドトキシン	565	2,400	2,460	0	505	
下垂体性腺刺激ホルモン	36	0	8	0	28	
カリジノゲナーゼ	96	0	68	2	26	
含糖ペプシン	16	0	3	0	13	
吉草酸ジフルコルトロン	32	0	1	0	31	
ギトキシン	20	0	18	0	2	
グリチルリチン酸	48	349	394	1	2	
血清性腺刺激ホルモン	68	0	17	0	51	
高分子量ウロキナーゼ	50	100	86	1	63	
コハク酸トコフェロール	4	180	96	0	88	
コレカルシフェロール	77	100	137	0	40	
酢酸クオルマジノン	53	0	34	0	19	
酢酸デキサメタゾン	26	0	22	0	4	
酢酸トコフェロール	0	1,120	988	0	132	
酢酸ヒドロコルチゾン	23	75	98	0	0	
酢酸レチノール	0	50	13	0	37	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシン	71	0	18	0	53	
シ克蘭デラート	22	0	4	0	18	
ジクロルフェナミド	9	0	0	0	9	
ジゴキシン	64	50	77	0	37	
ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	44	0	28	0	16	
G-ストロファンチン	25	0	1	0	24	
セクレチン	0	50	0	0	50	
センノシド	37	0	11	0	26	
組織培養ウロキナーゼ	0	47	0	0	47	
胎盤性腺刺激ホルモン	98	0	45	3	50	
低分子量ヘパリン	44	0	6	0	39	
デオプロミン	20	0	0	0	20	
デスラノシド	24	0	10	0	14	
トコフェロール	37	258	261	0	34	
トリアムシノロン	19	0	3	0	16	
トリアムシノロンアセトニド	27	0	12	0	15	
トルナフタート	58	0	19	0	8	
トロンピン	50	50	68	1	31	
脳下垂体後葉	17	0	17	0	0	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	15	50	22	0	43	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	41	0	23	0	18	
パルミチン酸レチノール	0	50	19	0	31	
ヒアルロニダーゼ	37	0	11	0	26	
ヒトインスリン	39	100	21	0	118	

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	
ヒト成長ホルモン	95	100	37	0	158	
ヒドロクロロチアジド	26	0	0	0	26	
プリミドン	28	0	2	0	26	
フルオシノニド	45	0	11	0	34	
フルオシノロンアセトニド	50	0	9	0	41	
フルオロメトロン	37	50	49	0	38	
フルドロキシコルチド	49	0	1	0	48	
プロピオン酸テストステロン	44	0	5	0	39	
プロピオン酸ベクロメタゾン	46	50	55	0	41	
ベオニフロリン	0	51	29	0	22	
ヘパリンナトリウム	3	150	61	48	44	
マレイン酸メチルエルゴメトリン	21	0	6	0	15	
メシル酸ジヒドロエルゴトキシシ	48	0	8	0	40	
メストラノール	34	0	0	0	34	
メチルジゴキシシ	30	0	9	0	21	
メトキサレン	15	0	0	0	15	
融点測定用	4	75	63	0	16	
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> アセトアニリド, アセトフ エネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スル ファピリジン, ワニリン </div>						
酪酸ヒドロコルチゾン	10	0	2	0	8	
ラナトシドC	43	0	6	0	37	
リゾチーム	14	200	213	1	0	
硫酸プロタミン	19	0	0	0	19	
リン酸デキサメタゾンナトリウム	11	50	41	0	20	
リン酸ヒスタミン	42	0	9	0	33	
リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム	17	48	25	0	40	
リン酸ブ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	17	50	28	0	39	
計	3,237	6,441	6,448	71	3,159	

(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	64	0	0	0	64	
アシッドレッド	464	0	7	0	457	
アゾルビンエキストラ	68	0	0	0	68	
マランス	405	0	7	0	398	
アルラレッドAC	303	0	7	0	296	
インジゴ	122	0	0	0	122	
インジゴカルミン	505	0	7	0	498	
エオシン	106	0	0	0	106	
エリスロシン	446	0	8	0	438	
オイルエローAB	209	0	0	0	209	
オイルエローOB	218	0	0	0	218	
オイルオレンジSS	219	0	0	0	219	
オイルレッドXO	193	0	0	0	193	
オレンジI	265	0	0	0	265	
オレンジII	144	0	0	0	144	
ギネアグリーンB	55	0	0	0	55	
サンセットエローFCF	456	0	12	0	444	
タートラジン	426	0	9	0	417	
テトラクロルテトラプロムフルオレセ イン	142	0	0	0	142	
テトラプロムフルオレセイン	103	0	0	0	103	
トルイジンレッド	69	0	0	0	69	
ナフトールエローS	129	0	0	0	129	
ニューコクシン	457	0	0	0	457	
パーマネントオレンジ	20	0	0	0	20	
ハンサエロー	67	0	0	0	67	
ファストグリーンFCF	437	0	9	1	427	
ファストレッドS	189	0	0	0	189	
ブリリアントブルーFCF	411	0	11	0	400	
フルオレセイン	179	0	0	0	179	
フロキシシン	284	0	7	0	277	
ボンソーR	239	0	0	0	239	
ボンソーSX	139	0	0	0	139	
ボンソー3R	149	0	0	0	149	
リソールルビンBCA	350	0	1	0	349	
レーキレッドC	376	0	0	0	376	
レーキレッドCBA	113	0	0	0	113	
レーキレッドDBA	154	0	0	0	154	
ローズベンガル	418	0	7	0	411	
計	9,093	0	100	1	8,992	

国立医薬品食品衛生研究所報告第 117 号人名索引 (アルファベット順)

A

Abe, Masami (阿部雅美) 281
 Abe, Yukiiko (阿部有希子) 336
 Adachi, Reiko (安達玲子) 285, 340
 Akiyama, Hiroshi (穉山 浩) 279, 280, 325, 336, 337, 340, 370
 Akiyama, Takumi (秋山卓美) 338
 Amano, Hiroo (天野博夫) 371
 Ando, Masanori (安藤正典) 276, 277, 278, 294, 316, 323, 325, 327, 334, 335, 336
 Aoyagi, Nobuo (青柳伸男) 268, 313, 330, 358
 Aso, Yukio (阿曾幸男) 268, 330
 Azumi, Satoko (安住聡子) 340, 341

B

Byung-Il Yoon (尹 秉一) 344

C

Chen, Dayi 336
 Chung, Youn-son (鄭 然孫) 277, 335

E

Ema, Makoto (江馬 眞) 308, 325, 355, 371

F

Fujimori, Kannosuke (藤森観之助) 317, 323, 340, 361
 Fujiwara, Hiroshi (藤原 博) 329
 Fujiwara, Yasuhiro (藤原康弘) 322, 324, 353
 Fukuda, Junko (福田純子) 338
 Fukuhar, Kiyoshi (福原 潔) 163, 283, 339
 Fukuoka, Masamichi (福岡正道) 345
 Furukawa, Fumio (古川文夫) 115, 119, 123, 299, 304, 320, 327, 347, 348, 349
 Furuya, Tsuyoshi (降矢 強) 91, 289, 327, 343

G

Goda, Yukihiro (合田幸広) 279, 280, 281, 325, 336, 337, 340, 360, 370

H

Hachisuka, Akiko (蜂須賀暁子) 339
 Haishima, Yuji (配島由二) 274, 286, 325, 333, 337
 Hamada, Mika (濱田実香) 276, 325, 335
 Hanioka, Nobumitsu (埴岡伸光) 277, 278, 323, 335, 336
 Harazono, Akira (原園 景) 308, 355, 371
 Hasegawa, Ryuichi (長谷川隆一) 289, 305, 321, 328, 343, 345, 353, 366, 367
 Hasegawa, Shikiko (長谷川式子) 343
 Hashimoto, Osamu (橋本 統) 269, 331
 Hata, Hideyo (秦 英代) 334

Hatakeyama, Naoko (畠山尚子) 278
 Hatakeyama, Yoshio (畠山好雄) 308, 309, 355, 356
 Hayakawa, Takao (早川堯夫) 1, 269, 270, 271, 272, 285, 313, 331, 332, 340, 358, 359
 Hayashi, Makoto (林 眞) 290, 291, 292, 301, 302, 303, 304, 328, 345, 348, 349, 350, 353, 365, 366
 Hayashi, Yuzuru (林 譲) 278, 279, 323, 333, 334, 337, 353
 Hibayama, Rie (柴山理恵) 332
 Higuchi, Yukito (樋口行人) 273, 370
 Hirabayashi, Yoko (平林容子) 288, 319, 327, 343, 344
 Hirano, Junko (平野純子) 335
 Hirose, Akihiko (広瀬明彦) 291, 292, 321, 328, 353
 Hirose, Masao (広瀬雅雄) 104, 108, 115, 119, 123, 129, 296, 297, 298, 299, 324, 327, 328, 347, 348, 349
 Honma, Masamitsu (本間正充) 303, 304, 328, 349, 350, 352, 366, 370
 Horiuchi, Naoya (堀内直哉) 368
 Hosokawa, Keizo (細川敬三) 309, 324, 355
 Hyuga, Sumiko (日向須美子) 269, 331

I

Ichinoe, Masakatsu (一戸正勝) 336
 Igarashi-Takai, Takako (高井(五十嵐)貴子) 287, 342, 343
 Iida, Osamu (飯田 修) 309, 356, 357
 Ikarashi, Atsuko (五十嵐敦子) 280
 Ikarashi, Yoshiaki (五十嵐良明) 275, 325, 333
 Ikebuchi, Hideharu (池淵秀治) 271, 284, 285, 326, 340
 Ikeda, Takako (池田尚子) 115, 119, 347, 348, 349, 370
 Ikezaki, Shin-ichiro (池崎信一郎) 349
 Imazawa, Takayoshi (今沢孝喜) 115, 119, 123, 294, 295, 299, 327, 347, 348, 349
 Inoue, Hajime (井上 肇) 321
 Inoue, Kazuhide (井上和秀) 270, 292, 293, 319, 323, 324, 346, 347
 Inoue, Tohru (井上 達) 91, 288, 289, 290, 294, 318, 319, 327, 343, 344, 345, 364
 Isama, Kazuo (伊佐間和郎) 275, 276, 333, 334
 Ishibashi, Mumio (石橋無味雄) 268, 269, 313
 Watabe-Ishii, Akiko (石井(渡部)明子) 271, 272, 331, 332
 Ishimitsu, Susumu (石光 進) 307, 329, 354, 355, 371
 Ishiwata, Hajimu (石綿 肇) 169, 281, 317, 323, 325, 326, 337, 338
 Ito, Kenji (伊藤健司) 276
 Ito, Rieno (伊藤理恵乃) 346
 Itoh, Toshiaki (伊藤俊明) 304
 Iwata, Miho (岩田美保) 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211, 306
 Izutsu, Ken-ichi (伊豆津健一) 330, 370

J

Jinno, Hideto (神野透人) 277, 278, 284, 323, 335, 336

K

Kabashima, Junichi (梶島淳一) 281
 Kaburagi, Kouichi (鏑木紘一) 39
 Kabuyama, Noriko (蕪山典子) 342
 Tanaka-Kagawa, Toshiko (香川(田中)聡子) 277, 278, 335, 336
 Kamakura, Hiroyuki (鎌倉浩之) 273, 306, 332, 370
 Kamata, Eiichi (鎌田栄一) 321, 328, 367
 Kaminuma, Tsuguchika (神沼二真) 172, 287, 342, 343, 361
 Kanayasu-Toyoda, Toshie (豊田(金安)淑江) 270, 331
 Kaneko, Hiromi (金子裕美) 336
 Kaneko, Toyozo (金子豊蔵) 91, 289, 290, 291, 292, 327, 344, 345
 Kaniwa, Masa-aki (鹿庭正昭) 274, 275, 314, 315, 325, 333
 Kaniwa, Nahoko (鹿庭なほ子) 268, 313, 330
 Kanno, Jun (菅野 純) 289, 318, 319, 327, 343, 344
 Kasahara, Ken-ichiro (笠原健一郎) 299, 347, 348, 349
 Kato, Chiaki (加藤千晶) 281
 Katori, Noriko (香取典子) 268, 313, 330
 Katsuki Shigeki (香月茂樹) 39, 309, 356, 357
 Kawaguchi, Wako (河口和子) 189, 192, 195, 211
 Kawahara, Nobuo (川原信夫) 273, 274, 306, 332, 335
 Kawamura, Maiko (河村麻衣子) 282
 Kawamura, Yoko (河村葉子) 282, 283, 317, 323, 326, 338, 360
 Kawanishi, Tohru (川西 徹) 270, 271, 285, 314, 331, 332, 359, 370
 Kawasaki, Nana (川崎ナナ) 269, 270, 331
 Kawasaki, Yasushi (川崎 靖) 327
 Kawasaki, Yoko (川崎洋子) 169, 281, 325, 326, 338
 Kawashima, Kunio (川島邦夫) 308, 323, 355, 371
 Kikuchi, Yutaka (菊池 裕) 336, 342
 Kikura, Ruri (木倉瑠理) 269, 325, 330
 Kim, Su-Ryang (金 秀良) 300, 351, 352
 Kitajima, Aya (北島 文) 306
 Kitajima, Satoshi (北嶋 聡) 288, 294, 327, 343, 344
 Kitaura, Keisuke (北浦敬介) 296
 Kiuchi, Takeshi (木内 猛) 270
 Kobayashi, Tetsu (小林 哲) 331
 Kobayashi, Yusuke (小林雄輔) 331
 Kodama, Yasuo (児玉康夫) 369
 Kodama, Yukio (児玉幸夫) 344
 Kohara, Arihiro (小原有弘) 303
 Kohjyouma, Mareshige (高上馬希重) 356, 357
 Koizumi, Mutsuko (小泉睦子) 321
 Koizumi, Schuichi (小泉修一) 292, 293, 319, 323, 324, 346
 Kojima, Shigeo (小嶋茂雄) 268, 269, 330, 358
 Kondo, Kazunari (近藤一成) 163, 280, 336, 337
 Konuma, Hirotaka (小沼博隆) 286, 318, 323, 326, 341, 342
 Koujitani, Takatoshi (糀谷高敏) 104, 108, 294, 347, 348, 349
 Koyano, Kazuo (小谷野和郎) 343
 Kubota, Hiroki (久保田浩樹) 281, 282, 323, 338
 Kumagai, Takeo (熊谷健夫) 309, 322, 355, 356
 Kurebayashi, Hideo (紅林秀雄) 99, 328, 346
 Kurematsu, Miharuru (榎松美治) 305, 352
 Kurihara, Kogo (栗原孝吾) 356
 Kurihara, Masaaki (栗原正明) 163, 166, 280, 283, 284, 337, 338, 339, 370
 Kurokawa, Yuji (黒川雄二) 289, 294, 295, 320, 321, 343, 344, 345, 363, 364
 Kyung-Sun, Kang (康 景宣) 318, 343, 344, 345

L

Lee, I-Jyng (李 宜融) 39, 356
 Liu, Yun (劉 雲) 104, 108
 Luo, Yi (羅 毅) 268

M

Maeda, Hideko (前田秀子) 355, 371
 Maeda, Nozomi (前田 希) 270
 Machara, Tamae (前原玉枝) 282
 Maekawa, Keiko (前川京子) 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211, 307, 354, 370, 371
 Maitani, Tamio (米谷民雄) 280, 281, 282, 317, 323, 326, 338, 357
 Masui, Tohru (増井 徹) 305, 320, 324, 328, 352, 353
 Masumura, Ken-ichi (増村健一) 328, 351, 352
 Matsuda, Rieko (松田りえ子) 278, 279, 280, 317, 323, 325, 333, 334, 337, 353
 Matsufuji, Hiroshi (松藤 寛) 336
 Matsui, Hajime (松井 元) 347
 Matsui, Keiko (松井恵子) 300, 328, 351, 352
 Matsui, Sachiko (松井幸子) 340
 Matsumura, Ikuko (松村郁子) 180, 185, 329, 355
 Matsumura, Toshiro (松村年郎) 276, 277, 325, 335
 Matsuoka, Atsuko (松岡厚子) 303, 328, 349, 350, 353
 Matsushima, Yuko (松島裕子) 291, 327, 343, 344
 Matsuura, Katuko (松浦克子) 303, 350, 353
 Mia, MD, Wahiduzzaman 308
 Minami, Motoyasu (南 基泰) 308, 355, 357
 Minegishi, Daisuke (峯岸大輔) 305, 352
 Mise, Katsutoshi (三瀬勝利) 323
 Mishima, Ikuko (三島郁子) 307, 354
 Mitsumori, Kunitoshi (三森国敏) 104, 108, 273, 276, 294, 295, 296, 319, 320, 324, 326, 327, 328, 347, 348, 349, 365, 370
 Miura, Makiko (三浦麻記子) 282
 Miura, Yukiko (三浦由希子) 282
 Miyagi, Eri (宮城恵理) 327, 343, 344
 Miyahara, Makoto (宮原 誠) 279, 337
 Miyahara, Michiko (宮原美知子) 286, 341
 Miyajima, Atsuko (宮島敦子) 290, 291, 292, 345, 346
 Miyata, Naoki (宮田直樹) 50, 163, 166, 280, 283, 284, 337, 338, 339, 360
 Miyauchi, Makoto (宮内 慎) 115, 119, 123, 348
 Miyawaki, Emiko (宮脇英美子) 308, 355
 Miyazaki, Keiko (宮崎恵子) 349
 Miyazaki, Tamaki (宮崎玉樹) 135, 306, 353, 354, 371
 Mizuguchi, Hiroyuki (水口裕之) 271, 272, 314, 331, 332
 Mizusawa, Hiroshi (水沢 博) 305, 321, 324, 328, 352, 353
 Nishimaki-Mogami, Tomoko (最上(西巻)知子) 285, 317, 340
 Momose, Maki (百瀬真希) 303, 349
 Morihara, Motohiko (森原元彦) 330
 Morimoto, Kazushige (森本和滋) 270, 314, 321, 332, 368
 Morita, Mariko (森田真理子) 172, 342
 Mukasa, Takashi (武笠 隆) 270
 Murai, Toshimi (村井敏美) 355, 371
 Muroi, Masashi (室井正志) 340

N

Naemura, Mitsuhiro (苗村光廣) 368
 Nagaishi, Keiko (永石恵子) 285, 340
 Nagasawa, Taeko (長沢妙子) 337
 Nakadate, Masahiro (中館正弘) 303, 321
 Nakagawa, Yukari (中川ゆかり) 355, 371
 Nakahara, Yuji (中原雄二) 269, 313, 323, 325, 330, 331
 Nakai, Yuji (中井雄治) 268
 Nakajima, Osamu (中島 治) 339
 Nakamura Yumiko (中村優美子) 355
 Nakamura, Akitada (中村晃忠) 274, 275, 323, 325, 333, 334, 370
 Nakamura, Hideaki (中村英明) 115, 119, 123, 348
 Nakamura, Takatoshi (中村高敏) 280, 336
 Nakamura, Yumiko (中村優美子) 180, 185, 278, 307, 329, 354, 371
 Nakano, Noriko (中納徳子) 338
 Nakano, Tatsuya (中野達也) 342, 343
 Nakaoka, Ryusuke (中岡竜介) 333, 334
 Nakata, Kotoko (中田琴子) 342, 343
 Nakazawa, Ken (中澤憲一) 293, 324, 345, 370
 Narimatsu, Reiko (成松怜子) 336
 Narita, Noriko (成田紀子) 332, 336
 Narukawa, Mamoru (成川 衛) 369
 Nemoto, Satoru (根本 了) 155, 279, 337, 370
 Niho, Naoko (仁保直子) 129, 327
 Niimi, Shingo (新見伸吾) 272, 331
 Nishi, Kozaburo (西 孝三郎) 308, 355, 356, 357
 Nishikawa, Akiyoshi (西川秋佳) 115, 119, 123, 299, 300, 304, 320, 324, 326, 327, 328, 347, 348, 349, 360, 363, 365, 370
 Nishimaki-Mogami, Tomoko (最上(西巻)知子) 285, 317, 340
 Nishimura, Tamiko (西村多美子) 369
 Nishimura, Tetsuji (西村哲治) 277, 278, 323, 335, 336
 Nishino, Tatsuya (西野達哉) 300
 Noguchi, Mamoru (野口 衛) 312, 371
 Nohmi, Takehiko (能美健彦) 300, 328, 351, 352, 353, 366
 Nozaki, Tomoko (野崎とも子) 39

O

Ogawa, Yukio (小川幸男) 91, 289, 290, 327
 Ohno, Yasuo (大野泰雄) 99, 290, 291, 292, 293, 294, 319, 327, 345, 346, 364
 Ohshima, Yuichi (大島雄一) 334
 Ohta, Miyako (太田美矢子) 269, 270, 331
 Ohtake, Chiyoko (大竹千代子) 177, 342, 343
 Okada, Mai (岡田 舞) 185, 329, 354, 355
 Okada, Satoshi (岡田敏史) 135, 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211, 306, 307, 322, 324, 328, 353, 354, 371
 Okado, Kiyoshi (岡戸 清) 353
 Okochi, Eriko (大河内恵里子) 285
 Okuda, Haruhiro (奥田晴宏) 368
 Ono, Atsushi (小野 敦) 91, 289, 327, 343, 344
 Ono, Kageyoshi (小野景義) 273, 332
 Ono, Kishio (小野喜志雄) 369
 Onodera, Hiroshi (小野寺博志) 104, 108, 273, 294, 295, 296, 327, 328, 347, 348, 349, 370
 Onose, Jun-ichi (小野瀬淳一) 284, 340

Osada, Eiji (長田英二) 276, 335
 Oshizawa, Tadashi (押沢 正) 270
 Otsuka, Kenji (大塚健次) 335
 Oya, Yukie (大屋幸江) 342
 Ozaki, Masayasu (尾崎正康) 303
 Ozaki, Yukihiko (尾崎幸紘) 273
 Ozasa, Tomohiko (小笹知彦) 277
 Ozawa, Shogo (小澤正吾) 63, 293, 345
 Ozawa, Tamao (尾澤玉青) 336

P

Petr, Gruz 351, 352

S

Saga, Yumiko (相賀裕美子) 289, 318, 343, 344
 Sai, Kimie (佐井君江) 289, 327, 343, 344, 345
 Saisho, Kazuhiro (最所和宏) 268, 269, 313
 Saito, Hiroyuki (斎藤博幸) 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211, 306, 307, 322, 354, 371
 Saito, Yoshiro (斎藤嘉朗) 284, 335, 339, 340
 Saito, Yukio (斎藤行生) 279, 280, 324, 337
 Saitoh, Minoru (斎藤 実) 91, 289, 327, 344
 Sakai, Ayako (酒井綾子) 341
 Sakai, Eiji (酒井英二) 308, 312, 355, 357
 Sakai, Shinobu (酒井信夫) 280, 336
 Sakamoto, Hiroko (坂本浩子) 303, 328, 349, 350, 353
 Sakamoto, Tomoaki (坂本知昭) 269, 325, 330
 Sakamoto-Sasaki, Shiho (佐々木(坂元)史歩) 281, 338, 357
 Sakemi, Kazue (酒見和枝) 99, 346
 Sano, Hiromi (佐野比呂美) 282
 Sasaki, Harumi (佐々木春美) 282
 Sasaki, Haruyo (佐々木晴代) 340
 Sasaki, Kumiko (佐々木久美子) 278, 325, 337, 355, 155
 Satake, Motoyoshi (佐竹元吉) 39, 273, 274, 286, 306, 314, 332, 335, 356, 357
 Sato, Kaoru (佐藤 薫) 345
 Sato, Kyoko (佐藤恭子) 281, 282, 323, 326, 338
 Sato, Michio (佐藤道夫) 323, 325, 334
 Sato, Yoji (佐藤陽治) 285, 340
 Sato, Youichi (佐藤洋一) 369
 Sawada, Jun-ichi (澤田純一) 284, 285, 326, 336, 339, 340, 342
 Sawai, kiyomichi (沢井清道) 309
 Sayed, Md. Abu 323, 334
 Scott, Karen S. 330
 Seki, Toraichiro (関 寅一郎) 39
 Sekiguchi, Hiromi (関口裕巳) 334
 Sekita, Hiroshi (関田 寛) 325, 335
 Sekita, Kiyoshi (関田清司) 91, 289, 327
 Sekita, Setsuko (関田節子) 273, 274, 306, 332, 335, 356
 Sekizawa, Jun (関沢 純) 287, 288, 323, 326, 327, 342, 361, 362, 363
 Shibata, Tadashi (柴田 正) 307, 354
 Shibata, Toshiro (柴田敏郎) 308, 309, 355, 357
 Shibayama, Rie (柴山理恵) 331
 Shibutani, Makoto (渋谷 淳) 129, 294, 299, 320, 327, 328, 347, 348, 349, 370
 Shida, Ayumi (志田あゆみ) 368
 Shimizu, Makiko (清水万紀子) 345

Shimo, Takeo (下 武男) 296
 Shimomura, Koichiro (下村講一郎) 140, 148, 309, 310, 311, 324, 355, 356
 Shintani, Hideharu (新谷英晴) 276, 315, 316, 323, 333, 334
 Shiroma, Takayo (城間貴代) 335
 Shoda, Toshiyuki (正田俊之) 295
 Sofuni, Toshio (祖父尼俊雄) 300, 301, 303, 304, 305, 321, 328, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 365
 Sueyoshi, Shoko (末吉祥子) 50, 283, 338, 339
 Sugimoto, Naoki (杉本直樹) 281, 326, 338
 Sugita, Takiko (杉田たき子) 281, 326, 338
 Sunouchi, Momoko (簾内桃子) 290, 291, 292, 345
 Suyama, Emiko (酢山恵美子) 336
 Suzuki Sachiko (鈴木幸子) 328
 Suzuki, Kazuhiro (鈴木和博) 270, 285, 340
 Suzuki, Meiko (鈴木明子) 332, 336
 Suzuki, Takashi (鈴木 隆) 280, 337
 Suzuki, Takayoshi (鈴木孝昌) 304, 328, 349, 350, 370

T

Tabata, Hirobumi (田畑洋文) 294
 Tagashira, Yoko (田頭洋子) 329, 353, 371
 Takada, Kouichi (高田幸一) 295, 349, 369
 Takada, Yoko (高田容子) 305, 352, 353
 Takagi, Atsuya (高木篤也) 343, 344
 Takagi, Hisayoshi (高木久宜) 104, 108, 347, 348, 349, 370
 Takagi, Kayoko (高木加代子) 284, 339, 340
 Takahashi, Atsushi (高橋 惇) 285
 Takahashi, Kazunori (高橋一徳) 269
 Takahashi, Michihito (高橋道人) 271, 294, 295, 296, 299, 304, 319, 320, 327, 328, 347, 348, 349
 Takahashi, Yu (高橋 雄) 289, 344
 Igarashi-Takai, Takako (高井(五十嵐)貴子) 287, 342, 343
 Takatori, Kosuke (高鳥浩介) 287, 318, 332, 336, 338, 342
 Takatsuki, Satoshi (高附 巧) 337
 Takeda, Yuiko (武田由比子) 282, 283, 326, 338
 Takegawa, Kiyoshi (竹川 潔) 294, 295, 296, 347, 349
 Takekida, Kaoru (武木田 薫) 318, 344
 Takeshita, Kenji (武下健次) 303
 Taki, Haruko (瀧 明子) 343
 Tamura, Toru (田村 啓) 129, 295, 328, 347, 348, 349, 370
 Tanabe, Hideyuki (田辺秀之) 77, 305, 328, 352
 Tanaka, Toshikazu (田中寿一) 355, 371
 Tanaka, Touichi (田中東一) 285, 339
 Tanaka-Kagawa, Toshiko (香川(田中)聡子) 277, 278, 335, 336
 Tanakamaru, Zen-yo (田中丸善洋) 348, 349
 Tanamoto, Ken-ichi (棚元憲一) 286, 340, 341
 Tanimoto, Tsuyoshi (谷本 剛) 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211, 306, 307, 328, 329, 354, 370, 371
 Tannno, Masayuki (丹野雅幸) 339
 Teshima, Reiko (手島玲子) 271, 279, 284, 285, 317, 326, 336, 340, 341, 370
 Tokunaga, Hiroshi (徳永裕司) 277, 335
 Tokunaga, Yuji (徳永祐司) 325
 Tokuzumi, Maho (徳住真帆) 336
 Tonogai, Yasuhide (外海泰秀) 180, 185, 307, 322, 324, 329,

354, 355, 371

Touno, Kaori (東野 薫) 310, 356
 Toyoda, Kazuhiro (豊田和弘) 129, 271, 295, 327, 328, 347, 348, 349
 Toyoda, Masatake (豊田正武) 155, 163, 278, 279, 280, 281, 323, 325, 336, 337, 340, 359, 360
 Kanayasu-Toyoda, Toshie (豊田(金安)淑江) 270, 331
 Tsuchiya, Toshie (土屋利江) 275, 323, 325, 333, 334, 370
 Tsuda, Makoto (津田 誠) 293, 319, 346
 Tsuda, Mitsuhiro (津田充宥) 346
 Tsuji, Sumiko (辻 澄子) 180, 185, 307, 329, 354, 355, 371
 Tsumura, Yukari (津村ゆかり) 307, 329, 354, 355, 371

U

Uchida, Eriko (内田恵理子) 270, 271, 331, 332
 Uchida, Osayuki (内田雄幸) 289, 327, 344
 Uchino, Tadashi (内野 正) 277, 335
 Umemura, Takashi (梅村隆志) 91, 289, 290, 327, 343, 344, 370
 Uneyama, Chikako (畝山智香子) 129, 271, 295, 299, 327, 328, 347, 349
 Usami, Makoto (宇佐見 誠) 99, 293, 294, 346

W

Wang, Chunren (王 春仁) 334
 Wang, Liqin (王 麗琴) 268, 269
 Wang, Xue (王 雪) 304, 349, 350
 Watabe-Ishii, Akiko (石井(渡部)明子) 271, 272, 331, 332
 Watanabe, Masahiko (渡辺雅彦) 300

Y

Yagami, Takeshi (矢上 健) 274, 333, 370
 Yagisawa, Morimasa (八木澤守正) 329
 Yamada, Kazuya (山田和也) 356
 Yamada, Masami (山田雅巳) 300, 328, 351, 352, 353
 Yamada, Noriyo (山田典代) 352
 Yamada, Takashi (山田 隆) 169, 280, 281, 282, 283, 317, 323, 325, 326, 338, 360
 Yamaguchi, Takamasa (山口高正) 270
 Yamaguchi, Teruhide (山口照英) 270, 271, 272, 285, 331, 332, 340
 Yamakoshi, Yoko (山越葉子) 50, 283, 338, 339
 Yamamoto, Masaya (山本雅也) 344
 Yamamoto, Masayuki (山本雅幸) 270, 331, 370
 Yamamoto, Michiko (山本美智子) 342, 343
 Yamamoto, Miyako (山本 都) 172, 288, 327, 342, 343, 363
 Yamazaki, Takeshi (山崎 壮) 284, 339, 342
 Yasuhara, Kazuo (安原加壽雄) 104, 108, 294, 295, 296, 327, 328, 347, 348, 349
 Yokota, Isue (横田持江) 270
 Yomota, Chikako (四方田千佳子) 135, 278, 306, 324, 353, 354, 371
 Yoon Byung-II (尹 秉一) 344
 Yoshii, Kimihiko (吉井公彦) 307, 329, 354, 355, 370, 371
 Yoshimatsu, Kayo (吉松嘉代) 140, 148, 311, 356
 Yoshioka, Sumie (吉岡澄江) 268, 313, 323, 330, 358
 Yoshizawa, Naoko (吉沢直子) 334

Z

Zhang, Li-Shi (張 立實) 303
Zhang, Qing (張 清) 334

国立医薬品食品衛生研究所報告第117号キーワード索引 (アルファベット順)

A

α , α -disubstituted amino acid 166, 284
 α -agonist 290
 α -amino epoxide 284
 α -helical protein 274
 α -receptor 290
 alpha 1-antitrypsin 272
 2-acetyl-4-tetrahydroxybutylimidazole 281
 acetyltransferase 300
 acridine orange supravital staining 301
 actin-binding protein 286
 activation mechanism 293
 acute poisoning 269
 acylated anthocyanin 280
 adenocarcinoma 295
 adenovirus 288
 adenovirus vector 272
 ADI 281, 317, 320
 adventitious root 311
 aeration 311
 affeic acid derivative 310
 aging 319
 agonist 319
 agricultural product 155, 307
Agrobacterium rhizogenes 148
 alcohol 308
 aldose reductase 306, 307
 alkannin 273
 allergen(s) 274, 318
 allergic contact dermatitis 275, 314
 allergy 317
Aloe barbadensis 310
 alternative method 319
 alternative splicing 301
 alternative(s) 290, 291, 302, 303
 aluminium foil 283
 aluminium foil product 283
 aminophenylnorharman 273
 ammonium compound 281
 ammonium sulfate 108
 amphiphilic hydrogel 268
 analgesic effect 273
 analytical method 316
 analytical validation 313
 androgen receptor 318
Angelica plants 310
Angerica acutiloba 274
 angiotensin type 2 receptor mRNA 293
 annatto extract 281
 anogenital distance 308
 antagonist 319
 anterior-posterior polarity 289
 anther 309
 anthocyanin 311
 anti-allergic activity 279
 antibody development 299

anticancer drug(s) 319, 322
 antigen-presenting 271
 antiinflammation 273
 antimicrobial/deodorant agent 314
 antimutagenesis 298, 304
 antioxidant(s) 163, 282, 283, 297, 298
 anti-steroid antibody 285
 apolipoprotein B 285, 317
 apolipoproteins 322
 apoptosis 295
 apparatus 313
 apple polyphenol 279
 aquatic organisms 301
 arctiin (lignan) 298
 aromatic amine 300
 arsenic 307
 artificial protein 274
 artificial skin model 291
 ascorbic acid 294
A. sinensis 274
 Assay 314
 assessment and judgement 288
 astaxanthin 91
 astaxanthin monoester 282
Astragalus mongholicus 308, 309
 atomic absorption spectrometry 275
 atopy 274
 ATP 293
 ATP receptor/channel 293
 ATP receptors 319
Attractylodes japonica 322
Attractylodes lancea 322
 atrazine 278
Atropa belladonna 311, 312
 authorization 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211

B

β -amyloid-precursor proteins 292
Bacillus subtilis gum 119
 beet red 282
 benzo[a]pyrene 303
 bioavailability 313
 bioburden 276, 315
 bioequivalence test 313
 biological fluids 315
 biological indicator 276, 315, 316
 biological study 315
 biologicals 314
 bioreactor 312
 biosafety 320
 biotechnology drugs 313
 biotechnology products 1
 biotin precursor 275
 bisphenol A 278, 283, 317, 320
Blackstonia perfoliata 311
 blood component 286
 body burden of Cd 294

bond dissociation enthalpy 163
 BOP-induced pancreatic carcinogenesis 299
 Bupleuri radix 311
 butylated hydroxyanisole 297
 butyltin 280
 BVDV 305

C

C3H/He mice 288
 C3H/HeJ mice 286
 C6BU-1 293
 Ca²⁺ 292, 293
 Ca²⁺ oscillation 299
 Ca²⁺-ATPase inhibitors 284
 cadmium 276, 280, 281, 294
 caffeic acid derivative 310
 calcium 271, 307
 calcium influx 279
 calcium ion 314
 calcium response 271
 calibrator 268
 callus 310
 callus culture 280
 calorie restriction 288
Campanula lactiflora 310
 can coatings 283
 cannogenol glycoside 280
 capillary electrophoresis 279, 315
 caramel color 281
 carboxyl group compounds 315
 carcinogen-DNA adducts 299
 carcinogenesis 305
 carcinogenicity 320
 cardenolide glycoside 280
 cardiac hypertrophy 285
 cardiac sarcoplasmic reticulum 285
 carpel 309
 catechin 163, 280
 catechol 296
 CB6F1-TgHras2 mouse 295
 cell proliferation 300
 cell signaling network 287
 cell substrates 271
Centaurium scilloides 309
 cerebral arteriole and venule 308
 cGMP 299
 characterization 1
 chemical allergy 289
 chemical evaluation 309
 chemical ligation 274
 chemical safety 288
 chemical sensitivity 315
 Chemical Society of Japan 288
 chemical structure of lipid A 286
 chemicals 318
 chemiluminescence 285
 chemoprevention 297
 chewing gum 169
 chewing gum base 281
 chitin 129

CHL/IU cell 305
 chlorotriazine 278
 cholesterol 307
 chromosome aberration 305
 chromosome aberration test 303
 cilnidipine 293
 citrinin 281
 classical nitroreductase 300
 clastogenicity 303
 CNP 290
 coal-tar dye 185
 collaborative study 302
 colony formation assay 302
 colouring agent 275
 comet assay 302
 commercially available household product 314
 Common Technical Document(CTD) 322
 comparative mapping 77
 co-mutagenic action 273
 Con A 270
 confidence limit 268
 confocal microscopy 314
 conjugal transfer 300
 contact sensitization 275
 container 317
 contaminated water 303
 content uniformity 313
 continuous treatment 303
 cooking 283
 coplanar PCB(s) 279, 280, 305
Corchorus olitorius 280, 281
 CornePack 291
Cornus capitata 311
 cosmetics 316
 critical control point 318
 critical document 288
 crystal violet staining assay 302
 cultivation 314
 cultivation method 322
 culture medium 276
 cultured hepatocytes 273
 curcumin 281
 CYP2B1/2 295
 cytochrome P450 278, 295
 cytotoxic factor 304
 cytotoxicity 303
 cytotoxicity assay 302
 cytotoxicity test 292

D

D₂₀ value 305
 daily intake 281, 317
 data evaluation 301
 database 172, 321
 90-days toxicity study 289
 DDT 280
 defense-related protein 274
 degradation 306
 degranulation 284
 deletion 305

DELFIA 270
 dermatosis 287
 desensitization 273
 detection methods 321
 detection technique 279
 determination method 276
 developmental toxicity 99, 294, 308
 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone 294
 diabetes 306
 diabetic complication 307
 dialysis 276
 dibutyl phthalate 308
 dichloropentadiene 321
 diffusion 268
 digitoxigenin glycoside 280, 281
 digoxin 189
 7,12-dimethylbenz[a]anthracene 293
 dimethylnitrosamine 305
 1,4-dioxane 301
 dioxin(s) 283, 279, 280, 288, 305, 321
 diphenyl cresyl phosphate 321
 diphenyl ether herbicides 278
 disinfectants 287
 disintegration test 313
 disposable aluminium foil vessel 283
 dissolution 283
 dissolution test 268, 313
 dissolution test apparatus 268
 dissolved oxygen 281
 DNA adduct 304
 DNA damage 302
 DNA-cleavage 50
 dose-dependence 298
 dose-finding 303
 Draize eye irritation test 290, 291, 292
 drinking water 316
 drinks 283
 drug 319
 drug abuse 313
 drug abuse during pregnancy 269
 drug efficacy and safety 63
 drug incorporation into hair 269, 313
 drug metabolizing enzymes 63
 drug release 268
 dye aluminum lake 185

E

EGF receptor 299
 EHC 177
 ELISA 307, 311
 embryo culture 294
 emulsions 322
 enantiomer-enantiomer interaction 273
 endocrine disrupters 288, 303
 endocrine disrupting chemicals 317, 318, 319
 endocrine disruptors 321
 endothelial cell 272
 endotoxin tolerance 286
 environmental risk 288
 enzyme-assay 285

epithelial-mesenchymal interaction 289
Escherichia coli O157:H7 286, 287
 ESI-LC/MS 270
 estrogen 318
 estrogen receptor(s) 318
 the estrogen window 319
 estrogenic activity 321
 ET_A endothelin receptor 273
 ethical issue 320
 17- β ethinyl estradiol 298
 europium 270
 evaluation 319
 evolution 305
 examination 318
 excess vitamin A 296
 exchange of information and opinion 287
 excised skin 277
 eyeglass 275

F

F344 rat(s) 91, 104, 115, 119, 123
 FACE 270
 feed restriction 308
 fibrates 317
 FISH 77
 fish 280
 flavin mononucleotide 300
Flavobacterium meningosepticum 286
 flora of Tanegashima 39
 Florisil column 155
 fluocinolone acetonide 202
 fluocinonide 205
 fluorescence probe 314
 fluorine-substitution 304
 fluorometric detection 269
 food additive(s) 91, 115, 119, 123, 281, 317
 food allergy 274
 food coal-tar dyes 307
 food color 169, 185
 food component 283
 food packagings 317
 food-simulating solvent 283
 foreign clinical data 321
 forestomach carcinogenesis 297
 formaldehyde 277
Forsythia suspensa Vahl 273
 fullerene 50, 283
 fumonisins 279
 functionality 306
 functions 319
 fungi 287, 318
 fungicidal effects/yeastextract 287
 furan fatty acid 285
 fusion 272
 fusogenic liposome 271, 272, 314

G

γ - irradiation 268, 282
 gap junction 295

gap junctional intercellular communication 290
 gastric carcinogenesis 299
 GC 308
 GC-FID 282
 GCP 321
 G-CSF 270
 gel permeation chromatography 278
 gene therapy 271, 272, 288
 genetic polymorphism 301
 genetically modified soybean 279
 genotoxicity 301, 321
 genotoxicity assay 301
Gentiana 311
 Gentianaceae 309
 geobotanical studies 39
 geraniin 312
Geranium thunbergii 312
 gibberellic acid 309
 ginsenoside content 148
 ginsenoside contents 140
Glehnia littoralis 280
 glucocorticoids 273
 glucocorticoid receptor 273
 glutathione S-transferase 283
Glycyrrhiza glabra 309
 glycyrrhizinic acid 195
 GM-CSF 270, 288
 graphitized carbon column 270
 ground beef 286, 287
 growth hormone-binding protein 285
 GTPase 305
 guideline 318, 319
 guinea pig maximization test 275
 guinea pigs 289

H

H₂-antagonist 269
 haematococcus algae color 282
 haematococcus color 91
 hair analysis 269, 313
 hair root 269
 hairy root 310, 311
 hamster(s) 294, 299
 hardness concept 283
 harmonization of cosmetics 316
 harmonization of pharmacopoeias 313
 hazard analysis 318
 h-c activity diagram 283
 health effect 316
 health hazard 315
 health problem 318
 heavy metal 316
 3₁₀-helix 166
 heme biosynthesis 278
 hemolysis 277
 hemopoietic growth factors 318
 hepatic hemangiosarcoma 294
 hepatic tumor 288
 hepatocellular carcinoma 294
 hepatocyte(s) 271, 290

hepatotoxicity 278, 290, 307
 herbicides 279
 hershberger test 318
 heterocyclic amines 297
 high production volume chemicals 321
 hippocampal neurone 292
 hippocampus 319
 histamine 272
 histological change 273
 HIV protease inhibitor 284
hOGG1 gene 301
 homooligopeptide 284
 hormone receptors 318, 319
 hormone-like effect 318
 horse 287
 house environments 318
 household product 315
 HPLC 180, 269, 279, 281, 307, 313
 HPLC analysis 309
 human 290
 human c-Ha-ras 295
 human environments 318
 human health 318
 human liver 293
 human prototype c-Ha-ras mice 295
 human prototype c-H-ras transgenic (rasH2 Tg) mouse 294
 human tissue 320
Hyacinthus orientalis 309
 hyaluronate 135, 306
 hyaluronic acid 306
 hydrogels 268
 4-hydroxy-2-nonenal 284
 8-hydroxydeoxyguanosine 289
 hydroxylradical 50, 283
Hyoscyamus albus 274
Hypericum patulum 311
 hypolipidemic effect 317
Hyssopus officinalis 310

I

1/IC₅₀ 277
 ICH 313, 318, 319
 ICH guideline 320
 ICP atomic emission spectrometry 307
 identification 318
 IL-4 284
 IL-6 285
 IM-9 285
 image analysis 301
 imaging 314
 immunoglobulin 285
 immunoglobulin C ε genes 77
 immunohistochemistry 296
 improving communication in Japan 287
in vitro 292
in vitro PFA value 277
in vitro/in vivo correlation 313
in vivo mutagenicity test 301
 indium chloride 294
 indoor air 276, 316

- induction of CYP2B11 290
 information visualization 287
 informed consent 321
 inhibition on PCR 286
 initial risk assessment 321
 instant noodles 282
 inter-laboratory validation 302, 303
 Internet 172, 276
 involvement of stake-holders 288
 ion chromatography 279
 ion indicator 314
 ion permeation 293
 ion-chromatography 282
 ionotropic ATP receptors 319
 IPCS 177, 288
 isothiocyanate 298
 isovaline 166
- J**
- Japanese Pharmacopoeia 314, 268, 306, 322
 Japanese regulation 319
 JCRB/HSRRB Cell Bank 321
 JICA 322
 JP reference standard 199, 202, 205, 208, 211
 JSFA-VII 317
 judgement of risk and communication process 288
- K**
- karyotype evolution 77
 kidney 273
 Kitasaishou 309
 knowledge-based expert system 287
 kojic acid 320
- L**
- lacI* 305
lacZ 304
 lanatoside C 192
 laser induced fluorescence detection 284
 laser light scattering 135
 latex allergy 274
 LC/APCI-MS 282
 LC/MS 279, 280
 LDH release assay 302
 lead 275
 lectins 270
 lignin 304
Lilium candidum 309
 limit of detection 279
 lipid peroxidation 297
 lipolysis 307
 lipopolysaccharide 286
 lipoproteins 322
 liposarcoma 289
 liposome 271, 272, 314
 littorine 311
 liver injury 297
 lymphocyte 271, 275
- lyophilized formulation 268
- M**
- macrophage 271
 magnesium 308
 malformation 99
 Man₆GlcNAc₂Asn 270
 mast cells 284
 MATREX 291
 MCP-1 284
 medicinal cultivar 309
 medicinal plant 39
 medium-term carcinogenicity study 320
 megakaryocyte 299
 MeIQ 304, 305
 membrane filter 276
Mentha piperita L. 310
 menthol 310
 2-mercapto-5-substituted benzimidazole 275
 2-mercaptobenzimidazole 275
 2-mercaptobenzimidazole derivative 275
 2-mercaptobenzothiazole 275
 mercury 281
 MesP1 289
 MesP2 289
 metabolic activation 300
 metabolism 278
 metabotropic ATP receptors 319
 metal surface 306
 methamphetamine 269
 methamphetamine homologs 269
 methyl jasmonate 274
 methylenedioxymethamphetamine 269
 (1-methylethenyl)benzene 321
 mice acute oral toxicity 280
 micronucleus assay 301
 micronucleus test 304
 migration 282, 283, 317
 6-mo carcinogenicity testing 295
 modifying effects 296
 modifying factor 299
 molecular mechanics 166
 molecular mobility 268, 313
 monascus color 281
 monitoring 317, 318
 Monte Carlo method 166
Moraceae 286
 morphology 312
 moulds 318
 mouse liver micronucleus assay 301
 mouse lymphoma assay (MLA) 303
 MRL 320
 MTT assay 303
 multiorgan carcinogenesis model 298
 multiple chemical sensitivity 316
 multiple shoots 312
 multipore plastic diffuser 277
 multi-root type 309
 muscarinic acetylcholine receptor 293
 mutagenicity 284, 321

mutation 304
 mutation spectrum 305
 mycoplasma testing 271

N

naphthoresorcinol reaction 281
 National Research Council 288
 natural food additives 317
 negative chronotropic response 273
 nerve growth factor 299
 neuron 293
 neurotoxicity 294
 neutral red uptake assay 303
 neutrophilic differentiation 270
 new drug 319
 new drug approval 322
 NGF 285
 NIHS reference standard 189, 192, 195, 307
 nitrate anion 282
 nitroarene 284, 300
 nitrobenzene 295
 nitrogen 309
 nitrogen dioxide 277
 2-nitropropane 289
 N-linked oligosaccharide 270
 N-methyl carbamate pesticide 307
 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridinyl)-1-butanone 294
 N-methyl-N-nitrosourethane 294, 296
 NMR relaxation 268
 NOAEL 318
 nociception 293
 NOEL 318
 non-genotoxic carcinogen 320
 nonionic surfactants 277
 non-linear least squares method 302
 non-viral vector 272
 norephedrine 273
 norharman 274
 notch-delta signaling 289
 N-type Ca²⁺ current 293
 numerical chromosome aberrations 303

O

object-oriented database 287
 occupational contact allergy 275
 OECD 319, 321
 official inspection 185
 okadaic acid 286
 oligosaccharides 270
 oltipraz 300
 onychomycosis 287
 orange color 123
 organochlorine 155
 organophosphorus compounds 276
 Osmolarity Measurement 306
 ovarian neoplasm 289
 oxidative damage 297

P

Paeonia lactiflora 309, 312
 paeoniflorin 307, 312
 paint 275
Panax ginseng 140, 148
 paper chromatography 180
 passive dosi-tube 277
 PCB 280
 PCDDs 279, 280
 PCR 279, 286
 pecan nut color 289
 pentachlorophenol 290
 perfluorooctanoic acid 285
Perilla extracts 104
 peripheral blood 304
 peripheral blood lymphocytes 63
 periplogenin glycoside 280
 permeability 272
 personal exposure levels 277
 pesticide 155, 307, 308, 322
 pesticide residue 278
 PFA 277
 pharmaceutical industry 275
 pharmacogenetics 63
 pharmacokinetics 319
 pharmacopeia 271
 phase study 319
 phenacyclidine 269
 phenylpropionic acid 313
 Philippine 322
 PhIP 299
 phospholamban 285
 phosphoric acid 309
 phosphorylation 270
 photosensitization 50
 photosensitizer 283
 photo-stability 281
 phthalates 317
 phytoalexins 274
 phytohormone-free 140
 piperonyl butoxide 295
 piperonyl butoxide 295
 plant hormones 318
Platycodon grandiflorum 312
 PMDEC 322
 polyacetylene 310
 polycarbonate 320
Polygala tenuifolia 314
 Polygala root 314
 polyol pathway 306
 polyphenol 283, 311
 polystyrene 282
 polyvinyl acetate 281
 pore size 276
Porphyromonas gingivalis LPS 286
 portal veins 290
 potash 309
 potassium gluconate 317
 potassium iodide 296

- PPAR 317
³²P-post-label 304
 precision 279
 pregnancy failure 308
 preneoplastic change 290
 preparation 309
 preparation of guidance material 288
 pressurized liquid extraction 279
 primary rat hepatocyte culture 284
 primates 77
 probe drugs 63
 procyanidin 311
 production 185
 promoting mechanism 295
 properties 306
 protein engineering 285
 protein kinase C α 285
 protein stability 268
 protocol 303
 pseudoallergy 317
 puffs 292
 pulmonary artery 290
 purification 290
 purity 314
 pyrethroid 155
- Q**
- quality 322
 quality assurance 317
 quality control 1, 317
 quality evaluation 189, 192, 195, 199, 202, 205, 208, 211
 quality of data 302
 quantum dye 270
 quinacrine 299
 quinoline 304
 quinone 284
- R**
- R64 thin pilus 300
 rabbit 290
 radish sprouts 286, 287
 RAPD-PCR 310
 rapid analysis 269, 313
 rapid analytical method 278
 rare earth elements 307
 ras H2 mice 295
 rat 108, 129, 289, 294, 295, 299, 300, 304
 rat dorsal root ganglion neuron 293
 rat forestomach carcinogenesis 298
 rat gastric carcinogenesis 296, 297
 rat hepatocarcinogenesis 298
 rat mammary carcinogenesis model 297
 rat urinary carcinogenesis 298
 RBL-2H3 284
 RBL-2H3 cells 284
 RBL-2H4 cells 285
 receptor 318
 receptor function 318, 319
 recombinant human erythropoietin 270
 recombinant human insulin 314
 recombinant P2X receptor 293
 red blood cells 277
 regulation of chemicals 172
 renal toxicity 276, 294
 repetitive sequence 305
 reproductive toxicity 318
 respiratory tract disorder 315
 rest 309
 resveratrol 283
 retroperitoneal neoplasm 289
 Revison 306
 RFLP 310
 risk assessment 288, 316, 318
 risk communication 287, 288
 5S-rRNA gene spacer 286
 routine control 315, 316
 RP-HPLC 314
 RT-PCR 305
 rubber raincoat 275
- S**
- safety 1
 safety information 276
 safety pharmacology 318
 saikosaponin a 311
 salivary gland 296
 sarcoplasmic reticulum 285
 secondary metabolite(s) 309, 311
 secretion 285, 317
 seed germination 314
 segmentation 289
 selenium teratogenicity 294
 self-contained biological indicator 315
 semiempirical MO calculation 280
 semi-empirical molecular orbital calculation 163
 seminal vesicle 295
 Sendai virus 272, 314
 sensitization test 289
 sensor 315
 shichimotsu-koka-to 273
 shikonin 273
 SHRSP 273
 sick house syndrome 316
 signal transduction 319
 signal transduction systems 319
 simazine 278
 single cell gel electrophoresis assay 302
 SIRC cells 290
 site-directed mutagenesis 293
 size-exclusion chromatography 135
 skin care 316
 skin disorder 315
 skin sensitization potential 275
 smooth muscle 289
 sodium alginate 281
 sodium chlorite 99
 sodium gluconate 317
 soil penetration resistance 308
 solid phase extraction 276

solid-state rehydration 268
 somatic embryogenesis 140
 somitogenesis 289
 space restriction 300
 sparks 292
 sphingomyelin 307
 spindle disturbances 303
 spirostanol saponin 309
 squamous cell carcinoma 296
 stability 313
 standards and specifications 317
 standards for drinking water 316
 STAT3 270
 statistical design 301
 stem cells 318
 stereoselective disposition 273
 stereoselective synthesis 284
 sterility assurance 315, 316
 sterilizer performance 315
 steroid sulfotransferase 293
 steroidal saponin 309
 stomach 289
 stomach carcinogenesis 300
 strain difference in rats 297
 structure-activity relationship 275
 styrene dimers 282
 styrene trimers 282
 styrenes 317
 subchronic study 108
 subchronic toxicity 115, 119
 subchronic toxicity study 91, 104, 123, 129
 subsidiary dye 180
 sulfotransferase 290
 sunscreen 277
 sunset yellow FCF 169, 180
 super critical fluid extraction 307, 308
 superoxide 50, 286
 surfactants 277
 survey 280
 sympathetic neurones 293

T

tannin 312
 tap root growth 308
 2,3,7,8-TCDD 320
 TDI 321
 tea 289
 teratogenicity 99, 308
 terminology 321
 407 test 318
 test guideline 319
 testicular toxicity 295
 tetrachloroquinone 290
 tetrahydroanthracene glucosides 310
 thermal analysis 313, 322
 thick root type 309
 thyroid hormone receptor 318
 thyroidal carcinogenesis 296
 tissue culture 312
 tissue distribution 276

TMA 317
 TMDI 320
 TNF- α 284
 tocopherol succinate 199
 toxic equivalency factors 305
 toxicity 316
 toxicological index 318
Trachelium caeruleum L. 310
 transcriptional down-regulation 299
 transformed root(s) 148, 310, 312
 transgenic animal 285
 transgenic mouse 295, 296, 320
 triamcinolone 211
 triamcinolone acetonide 208
 tributyltin 271
 tributyltin chloride 308
Trichophytonequinum 287
 triphenyltin chloride 308
 trisodium salt of 3-hydroxy-4-[(4-sulphophenyl)azo]-
 2,7-naphthalenedisulfonic acid (RS-SA) 169
 tumor necrosis factor- α 272
 tumor-promoting effect 298
 turmeric oleoresin 281
 type IV pilus 300
 tyrosine aminotransferase 273

U

ultrastructure 294
 ultra-violet stabilizers 282
 undesignated food color 169
 urea 276
 urethane 296
 uronic acid 281
 uterine contraction 274
 uterotrophic assay 318
 UVA 277

V

vaccine 271
 validation 269, 291, 292, 319
 validation characteristics 313
 validation study 290, 291, 292, 315, 316
 vanadium 284
 variation 276
 ventral tegmental 293
 vero toxin 286
 vibration level 268
 vinyl acetate monomer 281
 virus contamination 305
 vitamin E 275
 VLDL 317
 VOC 316
 volatile organic compounds 316
 VSV 271

W

water pollution 301
 water-immersion stress 300

weight variation 313
white line disease 287
Wistar rat 99
World Wide Web 172, 276, 288, 321
wrapping 317
WWW → World Wide Web

X

X-ray crystallographic analysis 284
D-xylose 115

Y

Yakushima 39

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、研究論文、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。
 - 研究論文：新知見を含むか、あるいは独創的な内容の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、新知見を含むか、あるいは独創的な内容の研究成果をまとめたもので、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。
 - 研究論文：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、研究論文、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、研究論文、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、研究論文については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，研究論文については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はかるため，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かな用例集に従う。〔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，必ず半角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），示差熱分析法ー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，、。 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」，「」，「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：L-ascorbic acid
8. 特論，総説，研究論文，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に*印（複数のときは*1,*2...）を記して脚注とする。
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*1・東 京子*2
Studies on the Identification of Drugs II
Chromatographic Methods for the Analgesics
Mamoru Yoga*, Ichiro Seta*1 and Kyoko Azuma*2
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, Tokyo
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.200;
Fax: 03-3700-6950; 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¹⁾,²⁾,⁴⁾のように記し，終わりに文献として引用順に書く。雑誌名はChemical Abstracts及び日本化学総覧の略記法による。外国雑誌名はイタリック体，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, 2345-2356 (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a), b), ... の様に記して示す。

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119回レギュラトリーサイエンス討論会（1999.3,徳島）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 11 年 11 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 あきらかに あげる あたためる あたる あたらしい あてる あつかる あつめる あらかじめ あらたに あらためる あらわす	明るい 明らかに 上げる →加温する 当たる 新しい 当てる 扱う 集める あらかじめ 新たに 改める 表 (現) す	明い 明かに 上る 当る 新 [□] しい 当る 扱 [□] う 集る 予め 新 [□] たに 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 ある あるいは あわ あわす	あらゆる ある あるいは あわ 合 [□] わす	全る 在る, 有る 或は 泡 合す	
イ	いう いくぶん いずれ いちじるしい いっかねん いっそう いったん いって いる いる 入れる いわゆる	いう いくぶん いずれ 著しい 一カ年 一層 一端 いって いる 入る 入れる いわゆる	言う 幾分 何れ 著 [□] しい 1箇年, 一ケ年 いっそう いったん 行 [□] って 居る 入る 所謂	
ウ	うしなう うすい (物) うすい (色) うすめる うちに うながす うる うるおす	失う 薄い うすい →希釈する うちに 促す うる 潤す	薄 [□] い 薄める 内に, 中に 促 [□] す 得る (can or may) →える 潤 [□] す	
エ	えがく えらぶ える	描く 選ぶ 得る	画く (get) →うる	
オ	おいて おおう	おいて 覆う	於いて 被う	

分類	用 語	使 う 字	使わない字	備考
オ	おおきい おおむね おこなう おこる おそらく おそれ おだやかに おとし おのおの おのずから おびる おもな およそ および おわる	大きい おおむね 行う 起 [□] こる 恐らく おそれ 穏やかに 落 [□] とし 各々 おのずから 帯びる 主な およそ 及び 終 [□] わる	大い 概ね 行 [□] う 起る 恐れ, 畏れ おだやかに 落し おのおの 自ら おもな 凡そ 終る	
カ	かえす かえって かかわらず かける かさねる かつ かつしよく かならず かねる ～から がらす かわる かわる カ月 10カ所	返す かえって かかわらず 欠ける 重ねる かつ 褐色 必ず 兼ねる 〇〇から作る. △△から再結晶 よりは使わない ガラス 代 [□] わる 変 [□] わる カ月 10カ所	返 [□] す 却て 拘らず 欠る 且つ かつ色 必 [□] ず 兼る △△から再結晶 硝子 代る (代理・代人など) 変る(うつりか わる, 変化) 箇月 10ヶ所, 10箇所	
キ	きしゃく きめる きりあげ きわめて	希釈 決 [□] める 切上げ 極めて	決る 切りあげ きわめて	
ク	くふう くらい (助詞) くらべる くりかえす くみあわせ	工夫 くらい 比 [□] べる 繰 [□] り返す 組合せ (名詞) 組 [□] み合せ (動詞)	くふう 位 比る 繰返 [□] す	
ケ	けんたく	懸濁	けんたく	
コ	こえる こげる ここ こころみる	超える 焦 [□] げる ここ 試 [□] みる	越える 焦る 此处 試る	

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考
コ	こたえ こたえる こと ごと ことなる ことに この こまかい (洗い) こむ これ これら	答え こたえる こと ごと 異なる 殊に この 細かい (洗い) 込む これ これら	答 (表中) 応える 事 毎 異なる 此の 細い 之 此等, これ等
サ	さきに さける さげる さしこむ さしつかえない さまざま さら さらに	先に 避ける 下げる さし込む 差し支えない 様々 皿 更に	さきに 避る 下る 挿し込む(挿入) 差支えない さら
シ	しかし しがたい しげき したがう したがって したのち (に) しばしば しぶい しまう しめす しめる しゃこう しやすい しゅうまつてん じゅうぶん しょうじる じょうりゅう じょじょに しらべる	しかし し難い 刺激 従う したがって (接 続詞) 従って (動詞) したのち (に) しばしば 渋い しまう 示す 湿る 遮光 しやすい →終点 充分, 十分 生じる 蒸溜 徐々に 調べる	然し, 併し, 而し 刺戟 したがう 屢々 しぶい 終う, 了う 湿 ^ぬ る しゃ光 し易い, 仕易い 終末点 じゅうぶん 生ずる 蒸溜 調る
ス	すくない ずつ すてる すでに すなわち すべて すみやかに	少ない ずつ 捨てる 既に すなわち すべて 速やかに	少い 宛 捨る すでに 即ち 総て, 凡て, 全て すみやかに
セ	せん せんじょう	栓 洗淨	せん, セン 洗滌
ソ	そう そうにゅう そこ その そのほか	浴う 挿入 そこ その そのほか	そう入 其処 其の 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 たいてい たえず たがいに たしかめる だす ただ ただし ただちに たとえば ために	大体 大抵 絶えず 互いに 確かめる だす ただ ただし 直ちに 例え ために	だいたい たいてい 絶ず たがいに 確める 出す 唯、只 但し 直に たとえば 為に
チ	ちいさい ちかづく ちょうど ちよっと	小さい 近づく ちょうど ちよっと	小い 近付く, 近づく 丁度 一寸
ツ	ついて ついで づつ つぎに つくる つける つめる つねに	ついて 次いで ずつ 次に 作る 付ける 詰める 常に	就いて, 付いて 宛 つぎに
テ	ていする できる	呈する できる	出来る
ト	とおり とき ときどき とくに どこ ところ ともせん ともなう ともに とりあつかい	とおり とき 時々 特に どこ ところ 共栓 伴う 共に 取扱い (名詞) 取り扱い (動詞)	通り 時 ときどき 何処 所 共せん 伴 ^あ う
ナ	ないし なお なかば ながら なづける など ならびに なるべく	ないし なお 半ば ながら 名付ける など 並びに なるべく	乃至 尚 中ば 乍ら 名づける 等 成べく, 成る可く
ニ	にかわじょう にごる にそう にゅうばち	にかわ状 濁る 二層 乳鉢	膠状 2層 乳ばち
ヌ	ぬぐう ぬらす	ぬぐう ぬらす	拭う 濡らす

分類	用 語	使 う 字	使わない字	備考
ネ	ねんちゅう	粘稠		
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	
ハ	はかり はかる	はかり 量る	秤 測る, 計る →当用漢字	
	はじめて はじめの はじめる はやい	初めて 初めの 始める 速い	初て	
ヒ	ひとしい ひとつ ひとつづつ	等しい 一つ 一つづつ		
フ	ふきん ふくぎつ ふたたび ふりまぜる ふれる	付近 複雑 再び 津り混ぜる 触れる	附近 振混ぜる 触る	
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	
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 儘	
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 _団 ぶ	
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	

分類	用 語	使 う 字	使わない字	備考
モ	もつとも もつぱら 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	もつぱら 許に 基く 物*, 者*	
ヤ	やすい やはり やむをえず 止むを得ず 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 稍々 柔い, 軟かい	
ユ	ゆえ ゆく	ゆえ 行く	故	
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	
ラ	ら	ら	等	
リ	りゅうぶん りんぱ	留分 リンパ	溜分 淋巴, りんぱ	
ロ	ろう ろうと ろかする	ろう 漏斗 ろ過する	蠟 (正名はロウ)	
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	

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	単位の記号	量	単位の名称	単位の記号
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 ⁻¹	デシ (deci)	d
10 ²	ヘクト (hecto)	h	10 ⁻²	センチ (centi)	c
10 ³	キロ (kilo)	k	10 ⁻³	ミリ (milli)	m
10 ⁶	メガ (mega)	M	10 ⁻⁶	マイクロ (micro)	μ
10 ⁹	ギガ (giga)	G	10 ⁻⁹	ナノ (nano)	n
10 ¹²	テラ (tera)	T	10 ⁻¹²	ピコ (pico)	p
10 ¹⁵	ペタ (peta)	P	10 ⁻¹⁵	フェムト (femto)	f
10 ¹⁸	エクサ (exa)	E	10 ⁻¹⁸	アト (atto)	a

例えば，長さの単位 m の10³倍はkm，10²倍はcm，10⁻³倍はmm，10⁻⁶倍はμm，10⁻⁹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	Wb
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 ² , cm ²	体積	m ³ , cm ³ , l, ml	速さ	m/s
加速度	m/S ²	波数	cm ⁻¹	密度	kg/m ³ , g/cm ³ , g/ml
電流密度	A/m ²	磁場の強さ	A/m	モル濃度	mol/l
輝度	cd/m ²	粘度	Pa · s	動粘度	m ² /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	<i>K_m</i>	標準偏差値	S.D.
分解点	mp (dec.)	Rf 値	<i>R_f</i>	標準誤差	S.E.
沸点	bp	保持時間	<i>tr</i>	紫外吸収	UV
凝固点	fp	50%致死量	LD ₅₀	赤外吸収	IR
比重	<i>d</i>	50%有効量	ED ₅₀	核磁気共鳴	NMR
屈折率	<i>n</i>	経口投与	p.o.	電子スピン共鳴	ESR
施光度	α	静脈投与	i.v.	施光分散	ORD
吸光度	<i>A</i>	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	p <i>K</i>	筋肉投与	i.m.		

編集後記

所員の皆様の多大なご協力のおかげで、無事編集を終えることができました。編集委員各位、図書係はもちろん、ご多忙中にもかかわらず快く原稿依頼を引き受けてくださった著者の方々に心よりお礼申し上げます。今年度は編集上2点の改革がありました。一つは英文概要の校正を行うことにしたことであり、もう一つは新たに著者索引を設けたことでもあります。いずれも質的、あるいは利用上の改善に役立てばと願っています。また本報告書の名前の変換に伴い、略称も「国立衛研報」としました。(K.T.)

また1つ、巻を重ねた。確実に一つ、歳も重ねた。この1年で自分は何が出来ただろう。そう思って業績欄を見ると、おびただしい数の論文が今年も、当所から発信されていることに驚く。これらの研究成果に見合うだけ当所がちゃんと評価されているのかと思いを巡らすとき、広報の重要性を改めて感じる。(K.O.)

入所十数年目にして初めて編集委員(図書委員)を勤めさせていただき、衛研報告の舞台裏を知ることができました。審査員の先生方には急なお願いにもかかわらず丁寧に査読していただきありがとうございました。それにしても、ワープロで入力した書式付きの文章をわざわざテキスト形式に変換、出力して校正記号を記入する、という作業がもどかしくて、来年度からは是非、衛研報告のDTP化を目指しましょう。(H.J.)

今回初めて編集委員を経験しました。衛研報告の在り方については、投稿論文の内容、英文チェック、審査制度等に関して各委員の考えが少しずつ異なるように感じました。もっと議論すべきだったかもしれません。とは言っても時間の制約もあり、例年通りに発刊するだけでも大変なことです。最近、総説が増えて論文誌として充実してきたように思いますので、研究論文と業務報告等との分冊にするというのはどうでしょうか。(S.S.)

今年度は、担当した論文の審査に関して、筆者と審査委員の間にとって、少し手間取った感があります。論文を提出する時、投稿規定に従い、完全な形で提出をお願いしたいと思います。また、今年は、著者索引を設けるなど新しい試みが導入されましたが、衛研報告が、衛生科学領域の情報誌として、大いに活用されることを願っています。(R.T.)

今回はじめて編集委員をさせていただきました。会議や編集作業、また日頃自分がなかなか目を通す機会の少ない分野の論文まで拝見させていただき、すべてが初体験なのでいろいろと勉強になりました。とはいえ、編集半ばで長期の出張をしてしまい、多くの仕事を研究室の方にご協力いただいたこと、また細部まで査読してくださった審査員の先生方、および図書係の川島さんにこの場を借りて御礼申し上げます。(Y.S.)

今回、初めて編集に参加いたしました。100年以上の歴史のある衛研報告であっても、常に進化が求められているということを実感しました。(M.S.)

「国立衛研報」の編集委員を初めて担当し、これまでの編集後記も初めて読みました。皆さんご苦労さまでした。また、表面に出ない審査委員の方々にお礼申し上げます。私も関わった以上、少しでも良いものにと努力しましたが、結果はどうでしょうか。要旨が外部に校閲して載けて良かったですね。(S.T.)

衛研報告の編集に携わること3年目、4月の原稿募集に始まり、投稿原稿の審査を経て原稿の最終校正と、毎年同じスケジュールをこなすわけですが、今年も発行日ぎりぎりまでの調整に終わってしまい、著者の方々や図書委員の方々には大変ご迷惑をお掛けいたしました。この編集後記には、編集過程にあった事について書くものと思いますが、毎年反省文のようなものになってしまいます。(S.K.)

平成11年度図書委員

三瀬勝利	神沼二真	*棚元憲一	香取典子
小林哲	*小野景義	五十嵐良明	*神野透人
*宮原誠	久保田浩樹	*末吉祥子	*手島玲子
*佐藤陽治	宮原美知子	関田清司	*簾内桃子
*渋谷淳	増村健一	広瀬明彦	岩崎仁
*辻澄子	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117号

平成11年11月10日 印刷

平成11年11月15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 大和綜合印刷株式会社
東京都千代田区飯田橋1丁目12番11号