

ISSN 1343-4292
CODEN : KISHFC

国立医薬品食品衛生研究所報告

平成 14 年

Bulletin of
National Institute of
Health Sciences

No.120

2002



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 14 年

Bulletin of
National Institute of
Health Sciences

No.120 2002

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120号第一部

特論

食品の微生物学的リスクアナリシス	山本茂貴.....	1
居住空間と化学物質による健康影響	安藤正典.....	6

総説

トキシコジノミクスーリバーズ・トキシコロジーの誕生とトキシコロジーにおける新しいパラダイムの展開ー	平林容子・井上 達.....	39
DNAヘリカーゼ原因遺伝子疾患と酵母相同遺伝子の機能解析	宮島敦子.....	53

研究論文

ガンマ線と電子線照射による嫌気性菌と通性嫌気性菌の生存への影響	宮原美知子・宮原 誠.....	75
Tropane Alkaloids in Adventitious Root Cultures of <i>Physochlaina physaloides</i>	下村講一郎・広瀬 誠・名取信策・佐竹元吉・吉松嘉代・石丸幹二.....	81
Tropane Alkaloids in Auxin-Independent Root Cultures of <i>Physochlaina physaloides</i>	下村講一郎・広瀬 誠・名取信策・佐竹元吉・吉松嘉代・石丸幹二.....	85

ノート

糖鎖含有タンパク製剤の評価試験法に関する研究 (IV) エリスロポエチン製剤その4	太田美矢子・川崎ナナ・伊藤さつき・早川堯夫.....	89
--	----------------------------	----

研究に関する資料

化粧品に配合が制限されている成分の分析法に関する研究：

2- (2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル) ベンゾトリアゾール

.....	徳永裕司, 森 謙一郎, 野坂富雄, 土井佳代, 坂口 洋, 藤井まき子, 高野勝弘,	林 正人, 磯 敏明, 西尾裕幸, 佐藤信夫.....	98
-------	--	-----------------------------	----

平成13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・海野有紀子・中村優美子・外海泰秀.....	101
-------	----------------------------	-----

GC/MSによる食用赤色104号及び105号中のヘキサクロロベンゼン含有量調査

.....	海野有紀子・辻 澄子・中村優美子・外海泰秀.....	107
-------	----------------------------	-----

標準品に関する資料

国立医薬品食品衛生研究所フルオロメトロン標準品 (Control 011)

.....	岩田美保・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛.....	112
-------	--------------------------	-----

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 021)

.....	斎藤博幸・小出達夫・岩田美保・谷本 剛.....	115
-------	--------------------------	-----

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 0211及び0221)

.....	小出達夫・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛.....	119
-------	--------------------------	-----

国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品 (Control 011)

.....	小出達夫・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛.....	124
-------	--------------------------	-----

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品 (日本薬局方エンドトキシン10000標準品) (Control 0211)

.....	中川ゆかり・村井敏美・堀内善信.....	128
-------	----------------------	-----

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品 (日本薬局方エンドトキシン100標準品) (Control 0201)

.....	中川ゆかり・村井敏美・堀内善信.....	131
-------	----------------------	-----

国立医薬品食品衛生研究所報告第120号第二部	
業務報告	135
平成13年度所外研究員等の受入名簿	193
誌上発表 (原著論文)	196
誌上発表 (総説・解説等)	279
単行本	295
行政報告	298
学会発表	303
レギュラトリーサイエンス関連会議報告	343
衛研例会	351
平成13年度に行なった主な研究課題	355
製品検査等の処理状況	366
国立医薬品食品衛生研究所標準品	369
国立医薬品食品衛生研究所報告第120号人名索引	378
国立医薬品食品衛生研究所報告第120号キーワード検索	383

CONTENTS

Bulletin of National Institute of Health Sciences, No.120, Part 1

Special Report

- Microbiological Riskanalysis in Food Shigeki Yamamoto 1
- Indoor Air and Human Health - Sick House Syndrome and Multiple Chemical Sensitivity
..... Masanori Ando 6

Reviews

- Toxicogenomics - a new paradigm of toxicology and birth of reverse toxicology
..... Yoko Hirabayashi, Tohru Inoue 39
- Functional analysis of yeast homologue gene associated with human DNA helicase causative syndromes
..... Atsuko Miyajima 53

Originals

- Effects of Gamma Ray and Electron-Beam Irradiations on Survival of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria
..... Michiko Miyahara, Makoto Miyahara 75
- Tropane Alkaloids in Auxin-Independent Root Cultures of *Physochlaina physaloides*
..... Koichiro Shimomura, Makoto Hirose, Shinsaku Natori, Motoyoshi Satake,
..... Kayo Yoshimatsu, Kanji Ishimaru 81
- Tropane Alkaloids in Adventitious Root Cultures of *Physochlaina physaloides*
..... Koichiro Shimomura, Makoto Hirose, Shinsaku Natori, Motoyoshi Satake,
..... Kayo Yoshimatsu, Kanji Ishimaru 85

Notes

- Study on evaluating methods for the quality control of glycoprotein products (IV) - Erythropoietin products part 4
..... Miyako Ohta, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Takao Hayakawa 89

Technical Data

- Studies for analyzing the restricted ingredients such as 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole
..... Hiroshi Tokunaga, Kenichirou Mori, Tomio Nosaka, Kayo Doi, Hiroshi Sakaguchi, Makiko Fujii,
..... Katsuhiko Takano, Masato Hayashi, Toshiaki Iso, Hiroyuki Nishio, Nobuo Sato 98
- Estimated Production by the Official Inspection of Tar Colors (Including Aluminum Lakes) in Fiscal Year 2001
..... Sumiko Tuji, Yukiko Umino, Yumiko Nakamura, Yasuhide Tonogai 101
- Determination and Survey of Hexachlorobenzene in Food Red Nos. 104(Phloxine) and 105(Rose Bengale) by GC/MS
..... Yukiko Umino, Sumiko Tsuji, Yumiko Nakamura, Yasuhide Tonogai 107

Reference Standard Data

- Fluorometholone Reference Standard (Control 011) of National Institute of Health Sciences
..... Miho Iwata, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto 112
- Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences
..... Hiroyuki Saito, Tatsuo Koide, Miho Iwata, Tsuyoshi Tanimoto 115
- Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 0211 and 0221) of National Institute of Health Sciences
..... Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto 119
- Paeoniflorin Reference Standard (Control 011) of National Institute of Health Sciences
..... Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto 124
- The Endotoxin 10000 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 10000 Reference Standard) (Control 0211)
..... Yukari Nakagawa, Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi 128
- The Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 Reference Standard) (Control 0201)
..... Yukari Nakagawa, Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi 131

Bulletin of National Institute of Health Sciences, No. 120, Part 2

Annual Reports of Divisions	135
Researchers List in Fiscal Year 2001	193
Summaries of Papers Published in Other Journals (Original Papers)	196
Summaries of Papers Published in Other Journals (Review and Articles)	279
Title Scientific Books	295
Scientific Reports to Governmental Agencies	298
Titles of Speeches at Scientific Meetings etc	303
Meeting Reports Related to Regulatory Science.....	343
NIHS Seminars	351
Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 2001	355
Survey of the Results of Food Coal-Tar Dyes	366
Reference Standards Prepared by the National Institute of Health Sciences	369
Author Index	378
Subject Index	383

食品の微生物学的リスクアナリシス

山本茂貴

Microbiological Riskanalysis in Food

Shigeki Yamamoto

1. はじめに

食品由来の健康危害を防除するため、これまでも様々な試みが成されてきた。GMP (Good Manufacturing Practice) を初めとする衛生管理手法が確立され、現在では、HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point : 危害分析重要管理点) システムが世界の主流となっている。我が国でも HACCP システムへの取り組みがようやく始まり、輸出用水産食品における HACCP システムの導入は輸出企業にとって最重要課題である。国内向けの食品でも、乳・乳製品及び加熱食肉製品で HACCP システムの導入がなされており、魚肉練り製品、容器包装後加熱食品さらに清涼飲料へと導入対象品目が拡大してきている。HACCP システムにおいては、危害分析を行わなければならないが、生物学的危害 (特に微生物による危害) に関する分析にリスクアセスメントに基づく方法を用いていくことが提案され^{1), 2)}、FAO/WHO の専

門家部会でも規格基準の設定にリスクアナリシスの考えを導入することが提案された³⁾。さらに1998年には食品の輸出入にリスクアナリシスの考えを導入すること⁴⁾、1999年にはコーデックス食品衛生部会 (Codex : FAO/WHO 合同食品規格国際会議) において討議され、食品の微生物学的リスクアセスメントに関するガイドラインがだされた⁵⁾。食品の微生物学的リスクアセスメントのガイドラインはリスクアセスメントに関する枠組みを示しているが、その具体的な方法論は現在 FAO/WHO 合同の専門家部会で検討中である。本稿では、食品の微生物学的リスクアセスメントについて、その概要とこれまでコーデックス委員会等で討議されている内容を中心に紹介したい。

リスクアナリシスの枠組みを理解する上で重要なのはハザードとリスクの相違を知ることである。ハザードとは日本語で危害と訳されており、人の健康を害する原因

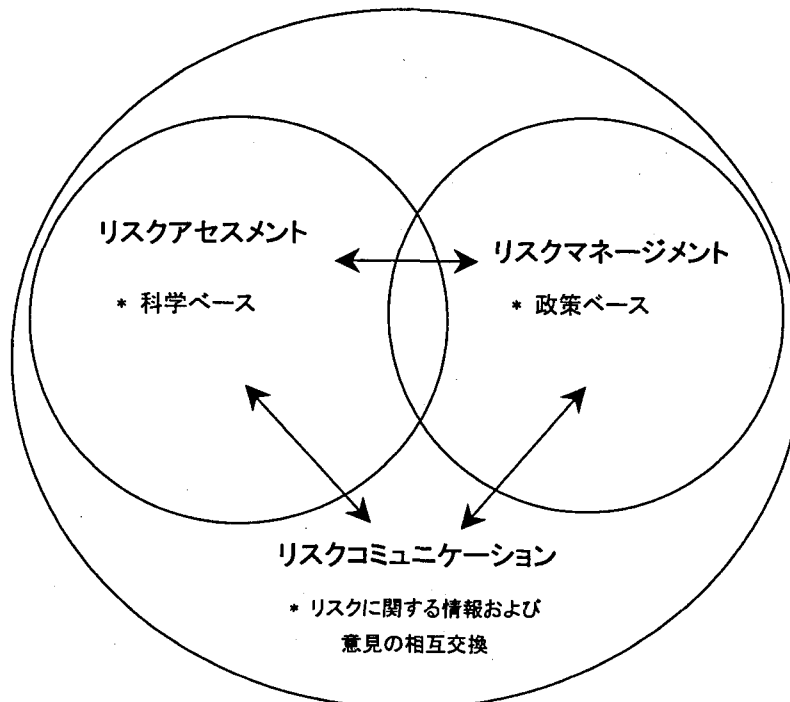


図1 リスクアセスメントの3要素とその関係
矢印は相互のコミュニケーションを示している。

物質もしくは状態を意味する。それには微生物学的危害、化学的危険、物理的危険の3つがある。リスクはその危険が人の健康を害する確率、つまりそれらの危険原因物質により、人が十万人中何人病気になるかといった表現で表されるものである⁶⁾。

3. リスクアナリシスとは

リスクアナリシスにはリスクアセスメント、リスクマネージメント及びリスクコミュニケーションの3つが含まれている(図1)。微生物学的リスクアナリシスは決してリスク分析ではない。日本語でのリスク分析は言葉の感じからリスクアセスメントをイメージさせる。微生物学的リスクアナリシスはリスクコントロール、つまり、微生物による食中毒のコントロールととらえる方がより正しいイメージとなろう。その観点からするとリスクアナリシスは、リスクアナリシスとしてそのまま使用の方がよりよいと考える。リスクアナリシスの中でリスクマネージメントとリスクコミュニケーションはコーデックス委員会でも未だ最終合意が得られていないが、リスクアナリシスにとってリスクマネージメントは最も重要なコンポーネントである。リスクマネージメントの枠組みの中でリスクエバリュエーションは最初に行われるステップである⁷⁾。日本の場合、リスクエバリュエーションはリスクマネージメントを行う主体である行政が必ず行うことにはなっていない。その点が、今後の行政システムの改革が必要とされ、さらには厚生労働省以外にリスク評価機関が設置されようとしている理由の一つであろう。リスクコミュニケーションにしても専門の担当者が設置されたことはなく、強いていえば政府における官房長官がそれを実行していることになる。しかし、リスクコミュニケーションはマスコミ対応のみならず、一般消費者、業界関係者、リスクマネージャー、リスクアセッサーを含む全ての関係者が情報交換し、情報を共有することである^{8), 9)}。

さて、化学物質に対するリスクアセスメントはこれまでコーデックス委員会等でもかなり議論されており、ほぼ方法論的に確立している。先に述べたように、微生物学的リスクアセスメントについては、1995年にFAO/WHOによりガイドライン³⁾が出されコーデックス委員会でも食品衛生部会において1999年にガイドラインがだされた⁵⁾。このガイドラインによれば、リスクアセスメントとは次の4項目を行うことである。

1) Hazard Identification

食中毒発生時の疫学調査データ、人の疾病データ、食品中の細菌の種類及び菌数、毒素に関するデータ等を用いて危害を同定することであるが、調査費用の不足と疫学データが不足している等の問題点が指摘されている。

2) Exposure assessment

病原体または毒素の摂取量の推計を行うこと。食品中での微生物の動態、食品中の他の細菌からの阻害物質の影響、また、製造工程や調理の段階でダイナミックに変化するので最終的な摂取量を推計することは困難である。さらに、食習慣が地域により異なることも問題となる。

3) Hazard Characterization

食品中に含まれる病原微生物による危害の重篤度と期間の質的又は量的確率推計を行うこととなっている。つまり、発症菌量の推計が中心となる。アメリカでは囚人やボランティアを用いて実験的に解析したデータがあるが、人道的見地からも今後そのような実験は困難となるであろう。実験動物を用いた実験も外挿の問題や動物愛護の観点から問題がある。また、宿主の感受性の差、病原体の感染力及び感染率の多様性、発症率の差、さらに食品そのものによる病原性への影響等のデータが不足している事が問題点として指摘されている。

4) Risk Characterization

特定の集団に対して潜在的な微生物危害を質的あるいは量的に推計すること。先にも述べたが、量的推計は現時点で困難である。質的推計には食品の喫食経験、病原体の生態、疫学データ及び製造工程に関連した危害の専門家による判断が必要となる。質的推計の際の表現は、リスクが高い、中等度、低い、リスク無しといった記述であったり、段階的な数値となる。Risk Characterizationを行う上で、シナリオ(食品の製造から消費までの流れ及び危害発生点の予測)の不確実性、データの不確実性、及びデータの多様性を明確にし分析することが必要となる。

3. 定量的リスクアセスメント

微生物学的リスクアセスメントはこれまで定性的に行われてきた。定性的とは、例えば、危険度をランク付けし5段階で評価するというような方法である。しかし、近年、リスクアセスメントを定量的に行うことが主流となってきている¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。定量的リスクアセスメントには、確定論的リスクアセスメントと確率論的リスクアセスメントがある。確定論的リスクアセスメントは、データの平均値と標準偏差を考慮し、最悪のケースを想定してリスクを推定する方法である。これらは、データが少ない段階でも可能であり、比較的早く結論がでることが特徴である。しかし、危険度を過度に重く推定したり、逆に過度に軽度に推定したりする危険がある。一方、確率論的リスクアセスメントは、まだデータが少なく研究ならびに調査を行う必要があるが、モンテカルロシミュレーションによる確率論的方法を導入することにより、現実社会の現象に近い形で行えるようになってきている。

モンテカルロシミュレーションは農場から消費に至るまで各段階においてデータ分布の状態を確率分布として

表し、最終的に人が摂食する菌数を分布として表すことが可能となる。モンテカルロシミュレーションは最初の分布範囲内の乱数を発生させ、各過程における分布内の数値が推計されることにより、最終的な摂食菌数の一つの値が推計される。これらを数千回、数万回繰り返すことにより最終的摂食菌数の分布が推計される。次に、各菌数による感染及び発症確率が推計されていればどれくらいの人が感染・発症するかが推計されることになる。

4. 衛生措置の同等性の評価

国際貿易において、輸出国と輸入国の食品衛生管理手法の同等性をどのように評価するかが今後の課題である。WTO（世界貿易機関）によるSPS（Sanitary Phytosanitary）協定とも関連して重要となってくるであろう。同等性の評価は、輸入国と輸出国の衛生措置が異なる場合、お互いに透明で科学的根拠を持って行う必要がある^{3), 4)}。そのためには、リスクアセスメントを行った上で、その国の規格基準が設定される必要がある。この場合のリスクアセスメントは定量的リスクアセスメントであることが望ましい。そのため、Codex委員会の食品衛生部会は国際的な微生物学的リスクアセスメントが必要であることを認識し、その実施をFAO/WHOに依

頼した。その際、最優先すべき事項として表1に示す5項目について優先的に国際的リスクアセスメントを行うこととした¹⁵⁾。

5. FAO/WHO合同の微生物学的リスクアセスメント

Codex委員会食品衛生部会の依頼を受け、2000年から2001年、鶏肉と卵における *Salmonella spp.* と *S. Enteritidis* ならびに調理済み食品における *Listeria monocytogenes* が最初の国際的アセスメントの対象となり、草案作成が開始された¹⁶⁾⁻²⁰⁾。さらに、2001年からは鶏肉とカンピロバクター及び水産食品と *Vibrio*（コレラを含む）の国際リスクアセスメントも開始された。*Salmonella* と *Vibrio* のリスクアセスメントには日本からも参加しており、*Salmonella* の Hazard Characterization における定量データが多数提供できた²³⁾。

卵の Exposure Assessment では、卵の生産、流通・保存、液卵加工、調理・消費の4段階に分けて、SEによる汚染率と汚染菌数を分析した（図2）。卵のSE汚染のリスクアセスメントとしてこれまでに実施された3例について、その根拠としたデータ、数学的取り扱い方法等を比較分析し、今後新たに行われるリスクアセスメントのために、参考となる方向性を示した。また、関連文献

表1 国際的リスクアセスメントにおける優先課題

1. *Salmonella spp.* と鶏肉、*Salmonella Enteritidis* と鶏卵¹⁾
 2. *Listeria monocytogenes* と Ready-to-Eat Food
 3. *Campylobacter jejuni/coli* と鶏肉
 4. *Vibrio parahaemolyticus* とカキ^{1), 2)}
 5. EHEC³⁾ と牛挽肉および発芽野菜
- 1) 日本からアセスメントチームに参加している。
 2) *Vibrio parahaemolyticus* とカキだけではなく、*V. parahaemolyticus* と魚介類、*Vibrio cholera* とエビについてもリスクアセスメントを行っている。
 3) EHEC : enterohaemorrhagic *Escherichia coli*

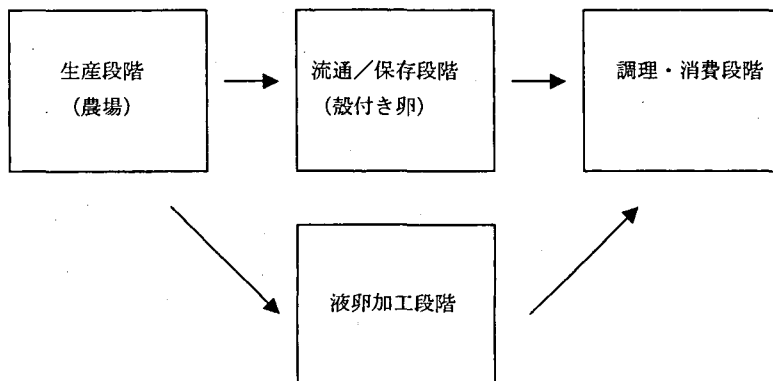


図2 鶏卵のフードチェーン
 農場から消費に至るまで大きく分けて4つの段階がある。

を精査し、データベースを作成した。

サルモネラのHazard Characterizationでは、経口投与試験と現実の食中毒事例のそれぞれから得られた、摂食菌数と発症率との相関を比較した。食中毒事例については1950年代からこれまでの全世界の報告例をまとめたが、このうち半数以上が日本からのデータであった。大量調理施設マニュアルに基づく検食システムによって、食中毒事件が発生した場合にも原因食品が確保されるケースが増えたことと、各地方衛生試験所において原因菌数を定量する努力が払われたためであり、これらの事例は国際的に非常に高く評価された。

さらにRisk Characterizationでは、単位人口当たりの食中毒発症者数を推定するとともに、種々の対策の効果を比較した。例えば、常温流通時の消費期限として流通段階で14日を設定した場合、食中毒発生数を減らす効果はほとんどなかった一方、7℃以下での流通にすると患者数は半減すると推定された。流通段階を7日に限定すると、低温流通と同等の効果が予測された。

国際的リスクアセスメント手法を用いた国内における微生物学的リスクアセスメントも平行しておこなわれている²⁴⁾。定量的リスクアセスメントでは、データがまだまだ不足していることから、食中毒の疫学データの充実や定量的リスクアセスメントに必要なデータ形式での調査研究を推進する必要がある。

7. 参考文献

- 1) Notermans, S. and Mead, G. C.: Incorporation of elements of quantitative risk analysis in the HACCP system. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 157-173, (1996)
- 2) Buchanan, R. L. and Whiting, R.: Risk assessment: A means for linking HACCP plans and public health. *Journal of Food Protection*, 61, 1531-1534, (1998)
- 3) FAO and WHO: Application of risk analysis to food standards issues. Report of the joint FAO/WHO expert consultation. Geneva, Switzerland, 13-17 March 1995 (1995)
- 4) WHO: Food safety and globalization of trade in food. A challenge to the public health sector. WHO/FSF/FOS/97.8 Rev 1 (1998)
- 5) CODEX Alimentarius Commission: Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. CAC/GL-30 (1999)
- 6) 山本茂貴: 食品のリスクアナリシス. *食品衛生研究*, 48, 67-70 (1998)
- 7) FAO and WHO: Risk management and food safety. Report of joint FAO/WHO consultation. Rome, Italy, 27 to 31 January 1997 (1997)
- 8) FAO and WHO: The application of risk communication to food standards and safety matters. Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation Rome, Italy, 2-6 February 1998 (1999)
- 9) 中山智紀: FAO/WHO 合同専門家会議「食品安全へのリスクコミュニケーションの適用」に出席して. *食品衛生研究*, 48, 55-61 (1998)
- 10) 藤川浩, 小久保彌太郎: 食品における微生物学的安全性確保のための定量的リスク評価. *日本食品微生物学会雑誌 Japanese Journal of Food Microbiology*, 16(2), 87-97, (1999)
- 11) Cassin, M. H., Paoli, G. M. and Lammerding, A. M.: Simulation modeling for microbial risk assessment. *Journal of Food Protection*, 61, 1560-1566, (1998)
- 12) Vose, D.: *Risk Analysis: A Quantitative Guide*. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England (2000)
- 13) Haas, C.H., Rose, J.B., and Gerba, C.P. *Quantitative Microbial Risk Assessment*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England (1999)
- 14) Lammerding, A. M.: An overview of microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protection*, 60, 1420-1425, (1997)
- 15) Report of the thirty second session of the CODEX committee on food hygiene. (1999)
- 16) Buchanan, R. and Lindqvist R.: Hazard identification and hazard characterization of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. MRA 00/01, FAO/WHO (2000)
- 17) Ross, T., Todd, E. and Smith, M.: Exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. MRA 00/02, FAO/WHO (2000)
- 18) Fazil, A., Morales, R. A., Lammerding, A. M., Vicari, A. S. and Kasuga, F.: Hazard identification and hazard characterization of *Salmonella* in broilers and eggs. MRA 00/03, FAO/WHO (2000)
- 19) Ebel, E., Kasuga, F., Schlosser, W. and Yamamoto, S.: Exposure assessment of *Salmonella* Enteritidis in eggs. MRA 00/04, FAO/WHO (2000)
- 20) Kelly, L., Anderson, W. and Snary, E.: Exposure assessment of *Salmonella* spp. in broilers. MRA 00/05, FAO/WHO (2000)
- 21) WHO/FAO draft guidelines on hazard characterization for pathogens in food and water. WHO/FAO/RIVM workshop on hazard characterization of pathogens in food and water, 13-17 June 2000, Bilthoven, The Netherlands. MRA 00/06, FAO/WHO (2000)
- 22) FAO and WHO: Report of a joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological

- hazards in foods. Rome, Italy, 17-21 July 2000 (2000)
- 23) Fumiko Kasuga. Archiving of food samples from restaurants and caterers. 1st International Conference on Microbiological Risk Assessment: Foodborne Hazards July 24-26, 2002, Inn and Conference Center, University of Maryland, USA organized by JIFSAN and RAC (Risk Assessment Consortium).
- 24) 山本茂貴, 食品中の微生物のリスク評価に関する研究. 2002, 厚生科学研究費補助金 生活安全総合研究事業 平成13年度 総括・分担研究報告書

居住空間と化学物質による健康影響
—シックハウス症候群・化学物質過敏症と室内空气中化学物質—

安藤正典*

Indoor Air and Human Health
-Sick House Syndrome And Multiple Chemical Sensitivity-

Masanori Ando*

The number of complaints about the quality of indoor air has increased during the past two decades. These complaints have been frequent enough that the term "Sick House Syndrome or Sick Building Syndrome" and "Multiple Chemical Sensitivity" has been coined. Complaints are likely related to the increased use of synthetic organic materials in house, furnishing, and consumer products; and the buildings, furnishings, and consumer products; and the decreased ventilation for energy conservation in homes. Approximately thousand volatile chemicals have been identified in indoor air. The main sources of these chemicals are house materials, combustion fumes, cleaning compounds, and paints or stains. Exposure to high levels of these emissions and to others, coupled with the fact that most people spend more time indoors than outdoors, raises the possibility that the risk to human health from indoor air pollution may be potentially greater than the risk posed from outdoor pollutants. The complaints most frequently voiced with respect to Sick House Syndrome are irritations of the eye, nose, and throat; cough and hoarseness of voice; headache and mental fatigue. The syndrome of multiple chemical sensitivities is controversial subject with increasing impact on the field of indoor air quality. The controversy surrounding Multiple Chemical Sensitivity includes its definition, theories of etiology and pathogenesis, diagnostic, and life style. Multiple Chemical Sensitivity is considered the hypothesis that is a disease caused by exposure to many chemically distinct environmental substances at very low.

Key Words: Sick House Syndrome, Sick Building Syndrome, Multiple Chemical Sensitivity, Indoor Air Chemicals, Indoor Air Quality

1. はじめに

我々を取りまく周辺には多くの化学物質が存在し、これら化学物質が我々の快適な生活を維持している。しかしながら、1950年代後半から始まった快適性追求の手段としての化学物質の生産とその利用は多くの不用物を生産し、これが公害問題で代表される自然環境の破壊や、ついにはヒトの健康影響を及ぼす事態に至った。その後、化学物質の環境への放出や化学物質の規制については国内ばかりでなく、国際的な取り組みがはじまってから約40年を経過して、一応の環境汚染化学物質削減の効果もみられ健康保持の戦略と体制は完成しつつあるように見える。このような国内外の化学物質利用に伴うヒトへ

の暴露に対する抑制策にも係わらず、最近化学物質の健康影響評価に係わる根幹的な新たな問題が発生してきた。

すなわち、1990年代までの化学物質の健康影響の評価は既存の毒性指標にのっとった評価によって規制されてきた。この方式による化学物質の環境汚染の防止対策は功を奏したことは言うまでもない。しかしながら、新たな毒性指標や尺度、疾病の母集団あるいはダイオキシンにみられるような非意図的の化学物質による汚染など毒性評価手法について考えるべき事柄が多く現れてきた。その毒性指標に係わる典型的な例が内分泌攪乱化学物質問題であり、暫定的対応はあるもののしばらくの間、その答えは導き出される状況にない。また、疾病の母集団の捉え方の問題として免疫反応による過敏等のアレルギー疾患に対する評価値設定の明確な回答は得られていない。このような問題は室内空気に関連した分野でも同様に化学物質過敏症やシックハウス症候群に見られるように不特定多数における不定愁訴に対する対応の仕方を考

*To whom correspondence should be addressed: Masanori Ando; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.253; Fax: 03-3707-6950; E-mail: ando@nihs.go.jp

え直さなければならぬような状況が生じている。

しかしながら、化学物質の社会での利用と普及はすさまじく、環境に放出されてからの挙動や環境及び人への影響について施策を講じるのにスピードが追いついていない。また、化学物質の挙動は一つ一つの特性に従って移動し、特有の経路で人に暴露される。あるものは経口的に、ある化学物質は経気道的に、またあるものは経皮的に暴露する。したがって、各々の化学物質は社会での使われ方によって、暴露する経路や頻度や量はすべて異なる。

確立された毒性指標で明らかになった化学物質についてはリスクアセスメントとリスクマネージメントの手法にのっとってレギュラトリーサイエンスが行われている。食品、水等のような個々・媒体を通じて摂取する化学物質については化学物質ごとにレギュラトリーサイエンスが厳密に実施され、最終的なモニタリングと規制が施行されている。これに対して、生活環境、特に室内空気からの化学物質の暴露については著者と全国衛生研究所の共同研究で行った暴露評価研究が全国を網羅し、政府機関により調査した研究としては唯一であり、暴露評価研究は遅れていると言わざるを得ない。このことから、室内空气中化学物質において立ち遅れているレギュラトリーサイエンス、特にリスクアセスメントの考え方から室内空気による化学物質を評価する手法を論じることがもとめられる。ここでは、室内空气中化学物質の発生要因、シックビルディング症候群や化学物質過敏症のような室内空気に関連する疾病及び化学物質の安全性のためのリスクアセスメント等を整理する為に健康影響を評価する考え方及び室内空气中化学物質のコントロールについて概説する。なお、室内空气中の化学物質の発生源、健康影響、各化学物質の毒性については、別にまとめたので参照されたい¹⁾。

2. 住環境及び生活環境の変遷

住まいの環境に関係する疾病を考える場合、住環境や生活環境の変化を理解しておかなければ疾病の原因にたどりつくことはできない。

2.1 住環境

1950年代まで遡れば、公営鉄筋コンクリートアパートが建築されたのをはじめ、住宅建築10ヶ年計画が建設省より示されて、第1次ビル建設ブームが起こった。我が国の住宅環境の長年の大きな取り組みは熱エネルギー問題で、1969年に防寒住宅建設促進法の制定を契機として、断熱化対策が考えられるようになった。さらに、アルミサッシの導入や鉄筋コンクリート住宅の普及によって旧来の日本家屋様式や工法に比べて気密性が増した建築物が急速に普及した。その結果、長い年月を掛けて

工夫して築き上げてきた高温多湿に対応できる日本家屋の良さ、すなわち通気性が遮断されたことになり、結露や湿気が居住環境にたまり、ダニやかびの発生はもちろんのこと、化学物質濃度の増加を促す結果となった。住宅の気密性は向上したが、従来の湿気対策が無防備であったため、室内に水分を蓄積させ結露が発生しやすい状況となった。また、湿気発生の多い開放型ストーブがほぼ同時に普及したことも、結露被害の拡大に大きく影響した。こういった結露問題の解決策の一つとして断熱材の使用が推奨された。その後、省エネルギー性能の基準値策定を契機として、本州でも断熱材使用が本格化した。また、柱を中心とした建築方法から面を中心とした2×4様式等、建築方法の変化も起こり、高気密、高断熱の住宅が多く生産されて、快適な空間を作り出すことに成功した。

1980年代に入り、石油ショックに伴う省エネルギー対策の実施により、欧米では換気率の低減等が打ち出された。その結果、欧米では室内空気質の悪化に伴ってシックビル症候群に代表される室内空気質の健康影響が多く発生させた。しかしながら、我が国ではビル等の建築物において換気率を低減化することはしなかった。このことは、我が国でのビル等におけるシックビル症候群等の発症事例を問題視されずにすんだ要因であった。これに対して居住住宅において、省エネルギー対策として、高気密、高断熱住宅の開発が盛んに行われてきた。一方、新築住宅に居住した人々の間の中に不定愁訴する事例が数多く報告されるようになってきた。1992年にはより一層の断熱構造化が求められ、新築住宅の断熱構造化率は現在では90%を越えるに至った。また、施工方法も迅速化が進み経済効率の高い建物が生まれた。

2.2 建築資機材・家具の接着剤・塗料の開発

つい50年前までは、住宅の空間を形成する床、壁、天井の六面には、畳、むく板、漆喰壁、障子、ふすま等が使われていた。これらの資材は、木材や土、紙等の天然素材で空气中に化学物質を放散しにくいことは明らかであった。しかし、これらの資機材は経済性、生産性、施行性等あるいは気密性や断熱性の面から極めて劣るものであった。このような背景から、それを満足させる建築資機材の開発や改良が行われ、アルミサッシや合板のような代表的な製品が出現した。合成繊維の生産が盛んになり、壁紙、床材、カーペットなどの製品が生まれ、それらの生産が増加していった。

一方、これらの技術や施工方法を支えたのは接着剤や塗料である。とりわけ接着剤の開発の進歩はすさまじく、建築物に使われる合板には接着剤が多用された。また、現在の建物や家具はむくの木材そのものを使用することは少なく、木材の切れ端や薄板と接着剤と塗料からでき

ていると言っても過言ではない。

住宅内で使われる家具においても建築資材と同様で、合板、パーティクルボード等に、接着剤や塗料が使われ、化学物質の放散が多い家具が市場にでまわっている。また、我々が生活する上でなくてはならないものや便利なものとしての家庭用品も接着剤や塗料の原料となる高分子樹脂等をはじめとする新しい化学物質が次々に使われるようになってきた。

2.3 生活スタイルの変化

住宅の気密性の向上と相まって、暖房器具や加湿器等の開発と使用などによって快適な温・湿度の維持などが可能となり、生活スタイルも変化してきた。また、板の間やフローリング仕様の増加と畳スペースの減少と逆比例的に絨毯、カーペットの利用の増加、狭い空間に家具を配置するなど生活様式の変化による埃や生物の生存のしやすさを助長させ、ダニやカビにとって好ましい環境が与えられ、彼らが増殖しやすい状況になってきた。

また、生活習慣では、掃除機や洗濯機等の電化製品の普及による習慣も簡略化され、気候条件等は変わっていないにも関わらず、古い日本家屋の習慣スタイルが変えてしまった。

2.4 大気環境の変化

大気環境では、昭和40年代における公害問題を契機として、大気環境基準や固定発生源（煙突）、移動発生源（自動車）の排出規制がなされ、大気質の改善がなされた。この規制によって、イオウ酸化物などの一部の古典的な大気汚染物質は減少したが、窒素酸化物や粒子状物質などは減少しているとは言い難く、その他の有害化学物質についての規制ははじまったばかりである。特に大気中粒子状物質や窒素酸化物がアレルギーを増悪する要因として注目されてきた。

2.5 自然環境の変化

自然環境ではスギ等、人にとって利用価値の高い木材の生産が過去50年間続けてきた。その結果、我が国土の植生あるいは土地開発が大きく変化してきた。そのため、スギ等を中心としたアレルギー源となる種々の花粉抗原が大気中に飛散するようになった。

2.6 食生活の変化

日本人ほど古くからの食生活を変えた民族はいないといわれている。我が国では米食を中心とした食生活に対して、卵、牛乳、小麦などの三大アレルゲンの利用や新しい食品による食生活の変化が起こった。これらの食品は食物アレルギーをはじめとするアレルギー疾患を引き起こす原因として取り上げられ、特に乳児期での発症が

大きな問題となってきた。生活環境におけるアレルギー疾患については昨年度の本誌に手島¹⁾がレビューしているので省いた。

2.7 食品や飲料水中に存在する化学物質の変化

食品や飲料水は製造の過程で多くの化学物質で汚染される機会がある。食品、飲料水中では、有害代謝物質は基準以内であることは当然であるものの、その他の汚染化学物質の種類も変化し、数は多くなるばかりである。

3. 室内空気中の化学物質とその発生源

室内空気中に検出される揮発性有機化学物質（VOCs）の数は大気中で確認されるよりもはるかに多く、かつその濃度は大気に比べて数～数百倍も高い。またその数は年々増加し、1980年代では300種程度が確認されていたのに対し、1989年ではすでに900種に及び、最近では喫煙による化学物質を入れると4000種にも及んでいる。また、アレルギーに関連するカビ等から放出される化学物質も同定され、その数は膨大なものになると考えられる。

これら化学物質は室内空間を形づくる建築物およびその材料や冷暖房器具、家庭電化製品、家具等の耐久消費物、日常生活で使用する家庭用品、あるいは農薬、炊事、喫煙等の燃焼、生活行動に伴う発生等、室内空間を取り巻くほとんどの製品や生活行動に伴って放出される。シックハウス症候群や化学物質過敏症等の化学物質は特定されているわけではなく、むしろ、多くの微量の化学物質を複合的に暴露することが問題となる。また、経口暴露における体内への吸収に比べて経気道暴露での体内への吸収は極めて高い。

室内空気に影響する主な発生源を分類すると、図1に示すように第1には建築物に用いられる資機材、第2には家具などの製品、家庭で用いられる消費材、第3にはヒトの生活に係わる燃焼、暖房、冷房あるいは喫煙に伴う発生、第4に外気などである。

米国環境保護庁は主な室内の発生源について検討し、発生源と化学物質の分類を行った。建築物からは、表1に示すように建築資機材の他、生活やその様式に伴って発生する暖房、換気あるいはエアーコンディショニングシステム、車庫、燃焼器具から無機ガス、粒子状物質、揮発性有機化合物等を発生することを明らかにした。

家庭内で使用する製品からは表2に示すように洗浄・ワックス剤、塗料およびそれらの製品、家具その他で用いる農薬、種々の粘着・接着剤、化粧品・芳香剤等、自動車製品、趣味製品、加湿器、家具・布製品等あらゆる製品から多種類の化学物質が発生している。

またヒトの生活に伴って発生するものには、燃焼、水の使用および喫煙によるものがあげられ、その主なもの

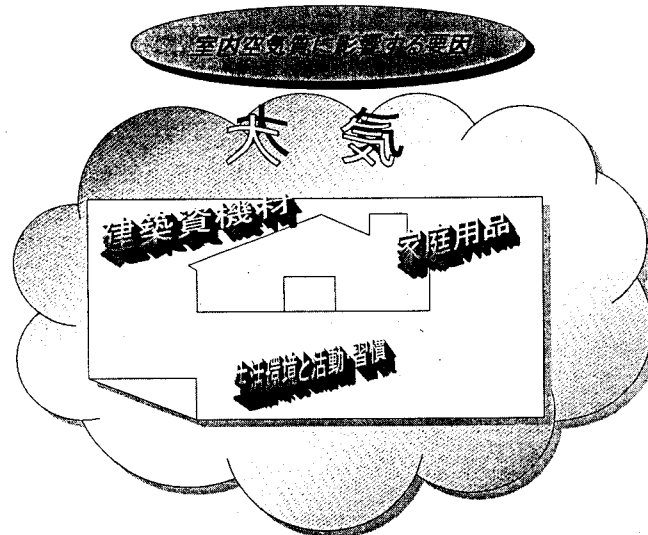


図1 室内空気質に影響する要因

表1 建築物からの発生源と化学物質

建築資機材及び家具類	脂肪族炭化水素 (n-decane, n-dodecane) 芳香族炭化水素類 (toluene, styrene, ethylbenzene) 有機ハロゲン化合物 (vinyl) アルデヒド類 (formaldehyde) ケトン類 (2-propanone, 2- エステル類 (urethane, ethylacetate, di-(2- エーテル類 放射性物質 (radon gas)
暖房、換気あるいはエアコンディションシステム	無機ガス (SO ₂ , CO, CO ₂ , NO _x) 脂肪族炭化水素 (methane) 多環芳香族炭化水素 (benzo(a)pyrene)
車庫	金属 (鉛、ニッケル、プラチナ、パラジウム) 無機ガス (SO ₂ , CO, NO _x) 芳香族炭化水素 (benzene) 有機ハロゲン化合物 (vinyl) 多環芳香族炭化水素 (benzo(a)pyrene)
燃焼器具	無機ガス (SO ₂ , CO, CO ₂ , NO _x) 脂肪族炭化水素 (propane, butane, isobutane) 多環芳香族炭化水素 (benzo(a)pyrene) アルデヒド類 (acetaldehyde, 放射性物質 (radon gas)

は表3に示した通りである。特に、燃焼器具からの無機ガスの発生は建築物や家庭内の製品から発生する物質とは異なり、一時に大量発生することが特徴的である。その他に室内空気にバックグラウンドとして直接的に影響する大気がある。

4. 室内環境が要因となる疾病

4.1 室内環境が要因となる疾病

このような生活環境やスタイルの変化によって、住環

境における室内空気中化学物質の存在量は増加の一途をたどり、以前には考える必要がなかったような化学物質や生物で暴露する機会が増えてきた。明確に証明されていることは少ないものの、室内空気を吸入することによって発症すると考えられる疾病群の存在が確実化し、大きな社会問題となってきた。また、生活環境の変化に伴うダニ・カビなど、生物の増加によるアレルゲンが気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのアレルギー疾病群を増加させている。

4.2 室内空気中の化学物質に係わる疾病

経気道からの暴露は、職業、生活様式、生活空間、年齢、性別、経済的要因等に加えて、ヒトの移動に伴う周辺環境の変化等が複雑に交錯していることから個人差が大きい。このことから、化学物質の経気道暴露と健康影響との因果関係を証明する手段である暴露量を推定することは重要であるが、非常に難しい。また、同じ化学物質でも暴露経路によって発症する疾病の形態や発症の程度は異なる。オイルショック以来、換気率の低下に伴って室内空気にかかわりとされるシックビル症候群 (Sick Building Syndrom : SBS) や化学物質過敏症が欧米を初め、先進諸国で増加する一方である。ここでは、化学物質が原因とされているシックビル症候群及び化学物質過敏症について、現在の情報について整理した。

5. シックビル症候群

5.1 シックビル症候群

1970年代のオイルショックを契機として北欧とイギリスに始まったシックビル症候群は、欧米に広がり社会問題化していった。空気質に対して安全性に疑問をいだく利用者がビルに対して用いた「プロブレムビル」とい

表2 家庭内での使用する製品から発生するもの

洗浄剤	芳香族炭化水素類 (toluene, p-dichlorobenzene) 有機ハロゲン化合物 (tetrachloroethylene, methylene chloride, 1,1,1-trichloroethane) アルコール類 ケトン類 (acetone, methyl ethyl ketone) アルデヒド類 (formaldehyde) エステル類 (alkyl ethoxyate) エーテル類
塗料、スプレー	芳香族炭化水素類 (toluene) 脂肪族炭化水素類 (n-hexane, heptane) 有機ハロゲン化合物 (methylene chloride, polypylene dichloride) アルコール類 ケトン類 (methyl isobutyl ketone, methyl ethyl ketone) エステル類 (ethylacetate) エーテル類 (methyl ether, ethyl ether, butyl ether)
農薬	脂肪族炭化水素 (kerosene) 芳香族炭化水素 (xylene) 有機ハロゲン化合物 (chlordane, 1,4-dichlorobenzene, heptachlor, chloropyrifos, diazolon) ケトン類 (methyl isobutyl ketone) 有機硫黄/リン化合物 (malathion)
粘着/接着剤	脂肪族炭化水素 (hexane, heptane) 芳香族炭化水素類 有機ハロゲン化合物 アルコール類 ケトン類 (acetone, methyl ethyl ketone) エステル類 (vinyl acetate) エーテル類
芳香剤	アルコール類 (propylene glycol, ethyl alcohol, isopropyl alcohol) ケトン類 (acetone) アルデヒド類 (formaldehyde, acetaldehyde) エステル類 エーテル類 (methyl ether, ethyl ether, butyl ether)
自動車製品	脂肪族炭化水素 (kerosene, mineral, spirits) 芳香族炭化水素 (xylene) benzene, toluene, xylene) 有機ハロゲン化合物 (tetrachloroethylene) アルコール類 (ethylene glycol, isopropyl alcohol) ケトン類 (methyl ethyl ketone) アミン類 (triethanolamine, isopropanolamine)
趣味	脂肪族炭化水素 (kerosene, hexane, heptane) 芳香族炭化水素 (toluene, xylene, benzene) 有機ハロゲン化合物 (methylene chloride, ethylene dichloride) アルコール類 (benzyl alcohol, ethanol, methanol isopropyl alcohol) ケトン類 (acetone, methyl isobutyl ketone) エステル類 (di-(2-ethylhexyl)phtalate) エーテル類 (ethylene glycol ether) アミン類 (ethylene diamine)
家具・布製品	芳香族炭化水素類 (styrene, brominated aromatics) 有機ハロゲン化合物 (vinyl chloride) エステル類 (di-(2-ethylhexyl)phtalate) アルデヒド類 (formaldehyde) エーテル類 (ethylene glycol ether)

う用語がその後「シックビル」と呼ばれるようになった。Molhave²⁾は、「シックビルは、一般的に許容される閾値 (threshold) 以下の暴露であっても、微量で多数の化学物質が要因となりうる」とした。また、シックビル症候群についての総説は Godish³⁾ によって発刊されている。一方、シックビル症候群に関する報告は我が国では少ないが、シックハウス症候群が我が国独自の社会的用語として定着し、その発症要因はシックビル症候群とほぼ同様と考えられるので、ここでは同種の疾患として述べていく。

5.2 シックビル症候群の“あいまい”な定義

大規模なビルの調査を実施した結果、そのビルに在室あるいは居住して何らかの愁訴した人々は「ビル関連疾患」(building-related illness : BRI) あるいは「特定ビル関連疾患」(specific building-related illness : SBRI) と報告されることが多かった。ビルに関連した疾患は、異なるビルにおける患者や同じビルにおける患者の間に共通する症状が確認されているわけでもなく、また汚染物質に由来すると思われる症状等によって特徴づけられているわけでもない。BRIあるいはSBRIの原因には、病院内感染、過敏症疾患 (過敏性肺炎、加湿器熱、喘息、

表3 ヒトの生活に伴って発生するもの

炊事などの燃焼	無機ガス(SOx, CO, CO ₂ , NOx) 多環芳香族炭化水素 (benzo(a)pyrene) 脂肪族炭化水素 (methane) 芳香族炭化水素 (toluene) アルデヒド類 (acetaldehyde)
飲料水の使用	有機ハロゲン化合物 (trihalomethanes, 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene, tetrachloroethylene) 無機ガス 金属類 多環芳香族炭化水素 (benzo(a)pyrene) 含窒素化合物 ケトン類
ヒト・動物・植物	無機ガス 揮発性物質 脂肪族炭化水素 (methane) 芳香族炭化水素 (toluene) アルデヒド類 (acetaldehyde) 代謝物 カビ・ダニ 病原性物

アレルギー性鼻炎), レジオネラ症, グラスファイバー皮膚炎等の他, 一酸化炭素, アンモニア, ホルムアルデヒド, その他の汚染物質の暴露による直接的あるいは間接的な有害作用も含まれる。すなわち, シックビル症候群は臨床症状から定義付けられたものではなく, 発症した場所から定義されたものである。したがって定義された本症候群は, 多臓器にわたる不定愁訴であり, 現在の臓器あるいは疾病の専門分野の体系における類別からみると, 類別できない境界領域を超えた極めて異質な疾病で, 診断が困難となるのは至極当然のことである。

5.3 シックビルの要因調査事例

オイルショックは, オフィスビルの環境における冷暖房エネルギー消費を抑制する施策が各国で実施させた。それ以来, シックビル症候群と言われる疾病が諸外国で多く発生し, その原因究明のため, 米国とカナダでは政府機関による大規模な調査が行われた。

米国国立労働安全衛生研究所 (NIOSH) は1978年以来, 健康有害性評価プロジェクトを組織し, 米国内の700件以上のプロブレムビルディングの調査を行った⁴⁾。カナダの保健福祉省では1984~1989年の間に1,362ヶ所のビルの愁訴の調査を実施し, NIOSHが実施したのと同様に愁訴を原因別に分類している⁵⁾。そのほかの調査事例でも, 表4に示すようにシックビルの寄与する原因として, 不適切な換気52~53%, 室内で発生する汚染物質5~15%, 建築繊維製品2~4%, 生物学的汚染物質0.4~0.5%, 屋外で発生した汚染物質によるもの9~10%, 問題の解析不能13~24%で米国, カナダのいずれもほぼ同様の結果であった。

内部発生源に起因すると考えられるビルは, 調査ビル

の15%で主な原因はコピー機であったが, その他にアルコール使用の複写機のメタノール, 印刷機からのメタクリル酸エステル, 青写真機からのアンモニアと酢酸などが含まれていた。

屋内の材料や製品による汚染は, 全調査の5%以下であった。汚染原因物質には, パーティクルボード, 硬質木材合板, 中密度ファイバーボード (MDF) 等のユリア樹脂 (ホルムアルデヒド) 接着剤からのホルムアルデヒドの放出によるファイバーグラス微粒子, 種々の有機溶剤, シリコンコーキング材からの酢酸, アスファルトからの液状・蒸気状汚染, 蛍光灯バラスト破損からのPCBsなどが含まれていた。

一方, 屋外が発生源と考えられるシックビルは全ビルの10%で, 自動車排気, ボイラーガス, アスファルト等の建築や道路工事からの汚染物質, 溶剤や塵埃, ガソリン蒸気などであった。

また, 微生物汚染は, 全調査による愁訴の約5%であると報告された。極めて高濃度の真菌類 (カビの一種) の孢子あるいは好温放線菌 (thermophilic actinomycetes) の暴露によって生じる重症の過敏性肺炎 (hypersensitivity pneumonitis) も報告された。

アンケート調査は, プロブレムビル現象の特性の確認に役立ったが, 利用者の健康と快適性は愁訴に支配されやすく, ビル環境や個人の偏り (バイアス) のため, その科学的根拠が不十分で客観性に乏しいと指摘した。

これらより, 換気がシックビル症候群の第一義的な要因であることが示されたが, 換気率の低下によって二酸化炭素等の古典的汚染物質の濃度上昇による空気質の悪化によるものか, 建材等に由来する汚染物質の濃度の増加によるものか不明であったとした。

5.4 愁訴による症状の分類

イギリス^{6), 7)}, デンマーク⁸⁾⁻¹⁰⁾, オランダ¹¹⁾, 米国¹²⁾⁻¹⁷⁾ 及びスウェーデン¹⁸⁾ 等の政府を中心とした機関では少なくとも1000人以上居住するビルを対象とした調査が行われている。各国がまとめたシックビルに関する調査報告は表5のようで, 大部分は自己申告によるもの

表4 プロブレムビルディング調査による発生源と要因

問題のタイプ	米国の調査		カナダの調査	
	ビル件数	発生率[%]	ビル件数	発生率[%]
室内発生源による汚染	80	15	68	5
建築用繊維が汚染源	21	4	27	2
微生物汚染	27	5	5	0.4
不適切な換気	280	53	708	52
屋外発生源による汚染	53	10	123	9
不明	68	13	427	24
合計	529	100	1362	92.4

査ビルによって大きな変動が認められた。眼の刺激、鼻づまり、咽喉の乾燥、風邪様症状、頭痛、異常な倦怠感が特に高い発生率（30%以上）を示したと報告された。

5.4.2 シックビルに関連して愁訴した症状の評価と課題

Godish¹⁹⁾ はこれらの報告について、次のようなことが考えられると指摘している。第1にこれらの報告は、大部分がアンケート調査を基にしていることから、愁訴された症状に対して一定した評価が出来るわけではなく、データの信頼性は低く見積もる必要があるとしている。第2に、シックビル症候群の多くの報告事例は、個人における症候の表現とビルに対する不満の双方の「現れ」と解釈でき、報告の程度あるいはレベルの差異、対象のビルの入居者集団における「苦情」の解釈 (inclusion)、アセスメント手法の差異等によって大きく変動する可能性が高いとした。

このような条件にも係わらず、報告事例から愁訴には特徴がみられ、いくつかの結論を導くことが可能である。ビルで生活している人からの情報によってもシックビル症候群の愁訴する器官は、眼、鼻、及び咽喉等の粘膜に対する化学物質の刺激性及び臭気が必要なファクターであると考えられることができる。鼻と心身に関して愁訴する人は全愁訴者の35%以上であった。一方、皮膚に関する愁訴は少ない。しかしながら、これらの報告でも分かるように、あくまでも愁訴によるもので、愁訴した患者の精神衛生状態はデータに反映されてこないのが、客観的な評価が確立されることが望まれる。

5.5 主な症状

5.5.1 神経作用

シックビルにおける神経系への影響としての頭痛は、室内空気中の総揮発性有機化合物 (TVOC)* の濃度に相関する可能性を Molhave²⁰⁾ は示唆した。

頭痛は、三叉神経の刺激の直接の結果としてではなく、身体が望ましくない感覚情報の拒絶による保護的反射作用 (protective reflex) の結果として起こると Molhave¹⁹⁾ は考えた。また Berglund²¹⁾ は三叉神経などの刺激や感覚の変化に対するシグナルの欠乏状態によって引き起こされるとの考え方を示した。

眠気、倦怠感、疲労感等の神経症状は具体的に指標化あるいは定量化することは難しい。室内空気中化学物質による疾病発症に否定的な研究者らは、化学物質における神経作用の定量的評価を麻酔性で説明しようと考え

た^{22), 23)}。しかし、極めて低レベルの化学物質の暴露によって引き起こされる頭痛を化学物質単独と考えるのには無理がある。

5.5.2 刺激と嗅覚への作用

眼、鼻あるいは呼吸器等の粘膜に対する臭気や刺激は、空気の質を感覚的に感じる第一の器官で、嗅覚および三叉神経の両経路が関係していると考えられている。Molhave⁸⁾ や USEPA²⁴⁾ の研究では、総揮発性有機化合物 (TVOC*) の暴露が嗅覚および三叉神経の双方を刺激し、それらが相互に影響し合って発現するとした²⁵⁾。これに加えて、他の刺激物質の付加²⁶⁾ や臭気物質に刺激物質が付加されれば刺激の感覚や臭気強度を増強させる²⁷⁾ との報告もある。また、三叉神経を介する刺激性や嗅覚異常は、感覚の神経伝達の回路の交錯によるものと考え方も示されている。

(1) 嗅覚の特性

嗅覚は生理的条件、心理的条件、年齢、性別などの個人差のほか温度、湿度などの物理的条件にも影響される。また、嗅覚疲労、順応性、選択性なども加わり、個人差ばかりでなく同一個人でも時々によって大きな差異を生ずる。

嗅覚に対する温湿度の影響は、室温および湿度が高くなるごとに嗅覚が鋭敏となり、一定温度では湿度が高くなるに従い嗅覚が鈍くなることが示されている。したがって、嗅覚は温度と湿度の2つの因子の組合せによって影響が生じるようである。

住宅の玄関に入った時の臭いが、数秒間で気になるが、そののちにおいになれてしまう現象である嗅覚順応が起こる。一方、樟脳を数分間嗅ぐと嗅覚の機能が停止するような嗅覚に疲労現象も生じる。

病的嗅覚異常には嗅覚過敏症、嗅覚減退症、無嗅覚症、嗅覚錯誤症、嗅覚幻覚症等があり、日本人の嗅覚異常は一割程度存在すると言われている。

(2) 化学物質の刺激性と臭気他覚的評価と閾値

化学物質による眼・鼻・咽喉・気道への刺激や臭気の生理的感受性に対する他覚的評価については幾つかの試みがなされている。

Muniz & Cain²⁵⁾ は化学物質と刺激性や臭気などの閾値の関連性についてデータを整理している。n-アルキルアルコールを用いて臭覚喪失者と臭覚正常者における閾値の差異について検討したところ、図2のように臭覚正常者ではアルコールの炭素鎖が長くなるほど閾値が低濃度でも感じる事がみられるとした。一方、臭覚喪失者ではいずれの化合物でも閾値が高濃度レベルであり、しかも炭素鎖の長さによっても差がみられず、化学物質

* TVOC (総揮発性有機化合物: Total Volatile Organic Compounds): 室内空気中には数百種に及ぶ化学物質があるので、これらをトータルの指標として総揮発性有機化合物として表す。

間の違いによる感受性が乏しく正常者との間には、 $10^3 \sim 10^6$ の閾値の差が確認されるとした。これら炭素鎖の長さとお臭いの閾値との関係はアルコール類以外にエステル類や芳香族化合物類でも同様な傾向で、炭素鎖が長鎖になるに従い低濃度でも臭気が認められた^{28), 29)}。また、化学物質の飽和蒸気圧と鼻の刺激とお臭いの閾値との関連性は図3に示すように官能基がない場合では炭素鎖に直線関係がみられるがアルコール、ケトン、フェニル基等の官能基が分子内に存在すると閾値が低くなることを認めた²⁸⁾。また、Abrahamら³⁰⁾は、非反応性化学物質の上気道刺激性は理論的推定が可能であるとした。最近では、臭気の閾値に関して構造活性相関から科学的な数処理から求められるようになってきた^{31), 32)}。一方、鼻刺激性、眼刺激性及び臭いは、図4に示すように他の

化学物質の共存下では閾値が低濃度にシフトすることがみられ、特に臭いの閾値は顕著であること及び化学物質の数が多くなるほどこの傾向が高いことがみられたこと等が報告されている^{2), 3), 33), 34)}。

(3) 刺激による発症機序の提案

三叉神経系は外部からの刺激に対して刺激、かゆみ、灼熱感を感じさせるが、臭気を持つ化学物質に暴露されると、くしゃみあるいは呼吸の中断のような反射作用を主要な機能としてもっている³⁵⁾。

このことよりWHOは「シックビル症候群における感覚領域の愁訴は、化学物質による粘膜内の三叉神経の非特異的な刺激あるいは過剰刺激である」としている。また、室内空気による複合物質の刺激反応は単独の汚染物質による刺激反応とは異なる作用が含まれている³⁶⁾。さらに、Godish³⁾は痛覚の発症は鼻腔粘膜内の三叉神経の刺激によると思われることを示唆している。

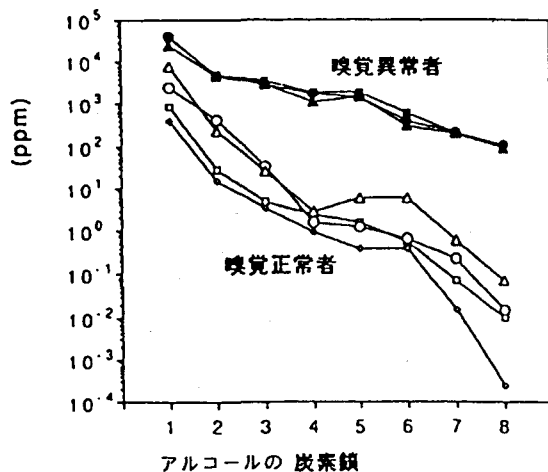


図2 嗅覚正常者と異常者のアルキルアルコール類に対する閾値の違い

5.5.3 皮膚症状

NIOSHの調査報告³⁷⁾による皮膚の検査では、顔面、頸部、手の暴露部位に刺激性的発疹、灼熱感とかゆみが見られたとした。Godish³⁸⁾は、顔面の紅疹の高率の発生(5~65%)を報告している。Skovらや⁷⁾ Finnegan⁶⁾は、皮膚乾燥とかゆみあるいは発疹を特徴とする皮膚症状が多いと報告している。Norbackら¹⁸⁾は、皮膚の部位での症状までを評価し顔面のかゆみ12%、顔面の発疹14%、手のかゆみ12%、手の発疹8%、湿疹15%であったとしている。Stenberg³⁹⁾によると、診断された症状には脂漏性皮膚炎、頭皮・耳・顔面の鱗状皮膚炎、顔面紅疹、頬部・顎部・頸側部の発赤あるいは充血、眼

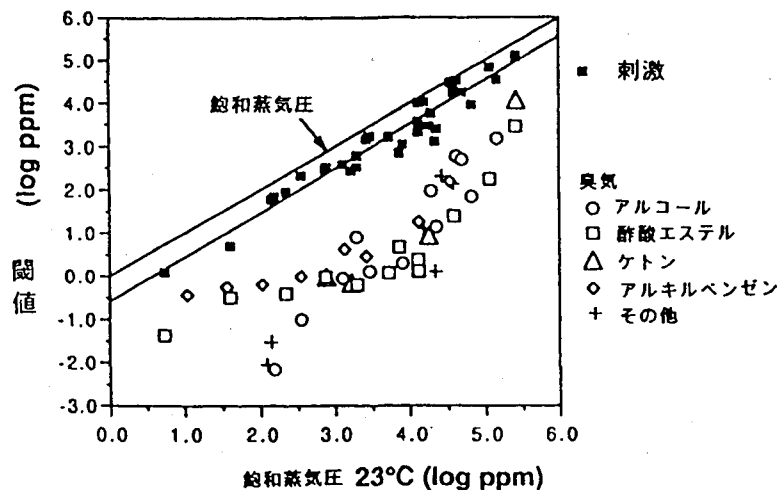


図3 化学物質の飽和蒸気圧と鼻の刺激とお臭いの閾値

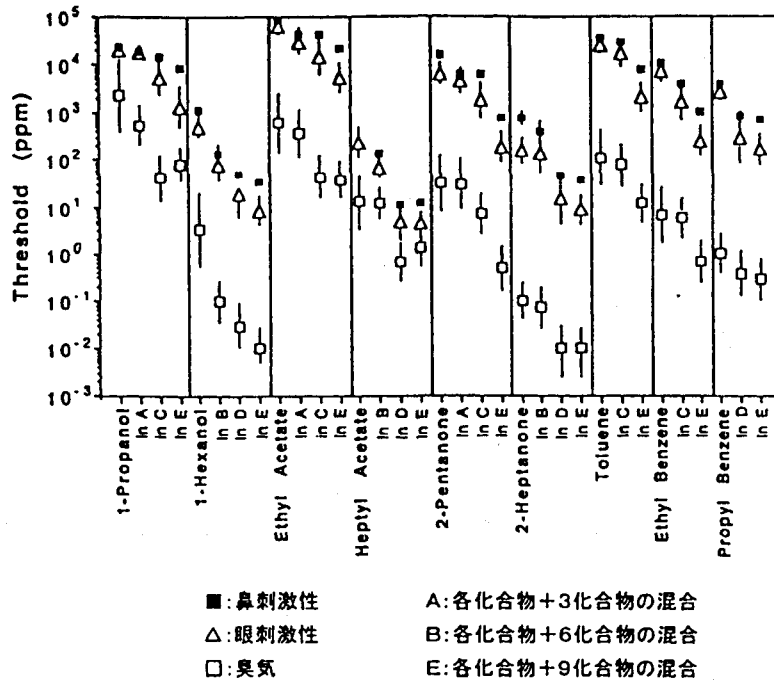


図4 化学物質の共存による、眼の刺激性及び香りの閾値の変動

窩周辺湿疹、顔面紅疹・拡張性小血管・丘疹・膿疱を特徴とする慢性皮膚疾患、蕁麻疹/掻痒症、掻痒性毛囊炎、主として上胸部と背部に出現する再発性のにきび様発疹が含まれるとした。このように、皮膚に関する愁訴も調査の集計の仕方にも大きな隔たりがみられ、皮膚に対する愁訴の割合は比較的少なく、皮膚のシックビル症候群の評価に見解の違いをみせている。

シックビル症候群の定義についてWHO委員会⁴⁰⁾は、眼・鼻・咽喉等の粘膜に対する刺激の他に、皮膚の乾燥、湿疹様皮膚を挙げ、これを包含すべきとした。しかし、欧州共同体委員会 (Commission of European Communities: CES)⁴¹⁾ および米国胸部医学会 (American Thoracic Society: ATS)⁴²⁾ の委員会では、シックビルの定義や概念に皮膚症状を含めておらず、シックビル症候群における皮膚症状は定義が定まっていない。

一方、Hodgson⁴³⁾ は、中枢神経系の症状は溶剤の神経毒性、眼と鼻の刺激はアレルギー性の反応、光刺激性皮膚病 (photo-dermatitis) は光やVOCsの刺激、臭気の愁訴は溶剤の神経毒性による臭気感覚ミスなどそれぞれの症状には独自性が認められるとしている。

5.6 全般的症状と閾値

Molhaveら⁹⁾ は、VOCの混合物の暴露による影響をみるため、シックビル症候群の人々に脂肪族炭化水素 (7種)、芳香族炭化水素 (4種)、アルデヒド・ケトン (4種)、アルコール類 (3種) 等、22種類を用いて暴露

試験を行った。その結果、臭気の強さによって粘膜刺激の感覚や短期記憶に障害が認められ、VOC混合物が感覚や粘膜刺激と共に神経性挙動の変化を生じさせることを示した^{10), 44), 45)}。また、Molhaveら⁸⁾ は別の研究で、彼らの知見を再確認すると共に、用量-反応関係を確立するため、前回と異なるTVOC混合物で暴露試験を行い、評価指標によって、明らかに異なる閾値があることを示唆している。一方、U.S.EPAやOttoら⁴⁶⁾⁻⁵⁰⁾ が行った暴露研究ではVOCsの臭気は不快なほど、感覚の低下や頭痛、不快感が観察されたが、TVOC暴露による行動や神経性挙動には変化が認められなかったと報告している⁴⁸⁾⁻⁵¹⁾。Godish¹⁹⁾ は、これらの研究結果を比較し、Molhaveらの研究では正常な集団を対象としていなかったのに対し、U.S.EPAの研究では、若い成人男性が選ばれたことが大きな差異の要因であると解析している。

しかし、被験者集団の違いにも関わらず、U.S.EPA研究では、TVOCs濃度と臨床症状に関連性を認めている。U.S.EPAの研究ではTVOC濃度 $25\text{mg}/\text{m}^3$ の24時間暴露で炎症細胞の有意の増加が認められており⁵⁰⁾、瞬目 (まばたき) の有意な増加が見られたが、呼吸数への影響はなかったとしている²⁴⁾。また、Molhaveら⁴⁴⁾ は、肺機能や炎症作用の変化をシックビル症候群発症者と正常人とで比較したところ、肺機能 (FEF₂₅) の低下、眼の涙液中の多形核好中球 (PMN) の増加、心理学的テストによる学習能力の低下がみられたとしている。Molhaveら⁴⁵⁾ は、別の研究で蒸気圧の異なる混合物について暴

露試験を行ったところ、3種類のすべてで急性影響の閾値は $1.7\text{mg}/\text{m}^3$ 以下であったが、急性影響の強い混合物では、皮膚の水分や眼内の気泡形成などの客観的症候が強く現れるのに対して、より蒸気圧の高い混合物では、感覚に対する影響が力くに認められたとしている。

このように、TVOCや複合的化学物質の暴露は、閾値の指標、暴露させる化学物質の種類、被暴露者相によって異なるものの、低い濃度で閾値を示すものと考えられる。

5.7 疾病の原因として考えられる物質

5.7.1 化学物質

先に述べたとおり、シックビルにおける愁訴の調査では愁訴の原因となる化学物質に関連性を見いだした報告は少ない。一般的に、汚染原因物質には、種々のビル建築材料、内装材、その他から排出されるガスや揮発性物質あるいは粒子状物質、生物学的由来が推定されるがそのいくらかを示す。

(1) ホルムアルデヒド

シックビル症候群の原因物質に挙げられている第1がホルムアルデヒドである。

Norbackら^{18), 52)}およびHodgsonら⁵³⁾のほか、いくつかの研究では、ホルムアルデヒドの暴露とシックビル症候群との間には関連性は認められなかったとの報告が多い。

一方、 $61\sim 610\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($0.05\sim 0.50\text{ppm}$)のホルムアルデヒド濃度範囲でシックビル症候群の多様な症状が大部分で当てはまるとの報告もある^{54)–60)}。Sundellら⁶¹⁾は、ホルムアルデヒドが $31\mu\text{g}/\text{m}^3$ (25ppb)のレベルでも粘膜症状あるいは皮膚症状の少なくともどちらかで有意の相関を認めたと報告している。このように、低レベルのホルムアルデヒドでも皮膚症状がみられる事実があることを踏まえてECのワーキンググループでは、シックビル症候群はホルムアルデヒド自身よりむしろ、他のファクターの増強作用による可能性を示唆し⁴¹⁾、この不明確な増強作用とは別に、刺激性の観点から、 $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ (82ppb)を欧州の閾値ガイドライン⁶²⁾として提案している^{63), 64)}。

その一方、ホルムアルデヒドには臭気感覚に対して促進作用と抑制作用がある濃度を境に混在している可能性が指摘され⁶⁵⁾、嗅覚閾値付近の低濃度ホルムアルデヒドにおける反応は、嗅覚回路と交錯する三叉神経反応が相互に作用し合っていると考えられている。

(2) 個々の揮発性有機化合物類 (VOCs)

ビル内ではホルムアルデヒドと共に個々のVOCsがシックビル症候群の原因の一つと考えられている。VOCs

の多くは、シックビル症候群の特徴である感覚刺激と中枢神経系症状を発生させる作用があり、複合的化学物質の暴露によって相加的または相乗的作用等により症状を発生させる可能性がある。しかしながら、個々のVOCについてはシックビル症候群との関連性を示唆している報告は少ない。

(3) 総揮発性有機化合物 (TVOC)

多数の低濃度のVOCs (TVOC) の暴露とシックビル症候群との間の因果関係を明らかにするための研究としてMolhave^{10), 11), 44), 45)}やUSEPAの科学者たち^{24), 46)–50), 65), 66)}は感覚刺激の閾値がモデル化合物を用いたTVOCと相関性があることを示唆している。すなわち感覚刺激は、室内空気中で見出される多数のVOCs (TVOC) によって総合的に作用される結果であり、TVOCがシックビル症候群の指標になり得る可能性を示唆している。

5.7.2 生物由来物質

生物起源の物質は、シックビル症候群の原因の一つの可能性を有するが、その他に過敏性肺炎、加湿器熱、在郷軍人病 (レジオネラ症)、喘息などもビル関連疾患 (BRI) の原因として報告されている。生物由来物質による暴露は、アレルギーに対して遺伝的素因を持つ患者ではアレルギー疾患の発症に対して大きく寄与すると考えられる。生物由来物質には、細菌、アメーバ、真菌の増殖、植物性物質、チリダニや昆虫が含まれる。これら生物は、生物自体ばかりでなくそれらの代謝物や排泄物等の抗原性物質の他、グルカン、エンドトキシン、マイコトキシン、揮発性有機化合物、有機物質、大分子有機粉塵 (MOD) の物質も生産する。

室内空気中のカビは代謝物として多くの揮発性物質が産生されていることも古くから知られている。Larsenn and Frisvadは室内の壁紙などによく発生するPenicilliumとAspergillusの8種のカビの培養を行い、表6のような多くの揮発性化学物質を確認している⁶⁷⁾。

Wessen & Schoeps⁶⁸⁾はスウェーデンのプロブレムビルにおいてカビ由来の揮発性物質を検討し、TMVOC (Total Microbial VOC) として $0.1\sim 17.4\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均 $1.0\mu\text{g}/\text{m}^3$)であったと報告した。MVOC (Microbial VOC) の指標には2-ethyl-2-hexenalが、カビの指標として3-methyl furan, dimethyldisulfide, 1-octen-3-olが有効であるとしている⁶⁹⁾。

5.8 国際機関の現在の考え方

シックビル症候群は、不特定な場所において病気の原因を確定できない広範な症状の報告事例に対して用いられているが⁷⁰⁾、国際機関での考え方は以下の通りである。

表6 カビから発生する揮発性化学物質

	Aspergillus versicolor	penicillium aurantiigriseum	Penicillium brevicompectum	Penicillium chrysogenum	Penicillium commune	Penicillium olsonii	Penicillium expansum	Penicillium glabrum
1,2-dimethoxy-benzene	○							
1,3-nonadiene				○				
1-heptane				○				
1-octen-3-ol	○	○		○				
1-pentanol	○		○		○	○	○	○
2-butanone						○		
2-heptanone	○							
2-methyl-1-propanol	○	○	○	○	○	○	○	○
2-methyl-isoborneol					○			
3-methyl-1-butanol	○	○	○	○	○	○	○	○
3-methyl-1-butanol-acetate								○
3-methyl-3-buten-1-ol				○				
3-methyl-hexane		○						
3-octanol				○	○			
3-octanone	○			○	○			○
4-methyl-3-hexanone		○						○
ester 1 (903)	○							
ester 2 (933)	○							
limonene							○	
m-methyl-anisol							○	
monoterpene 1					○			
monoterpene 2					○			
sesquiterpene 1		○					○	○
sesquiterpene 2		○					○	○
sesquiterpene 3							○	○
sesquiterpene 4							○	○
sesquiterpene 5							○	○
styrene								○
unsaturated monoterpenes						○		
β-pinene							○	

5.8.1 WHO

1980年代初期に世界保健機関（WHO）の作業委員会^{40), 71)}は、シックビル症状と暴露との関連性については明らかな因果関係は確認されていないことを前提として、症状および愁訴をグループ毎に整理している。まずシックビルは在ビル者の多数（a large percentage）が愁訴した場合とし、少数（minority）が反応した場合は室内汚染物質の暴露に対して感受性が異常に高い人々であり、シックビル症候群とは見なされないとしている。

その症候は①眼・鼻・咽喉の感覚的刺激、②神経系および全身的健康問題、③皮膚刺激、④非特異的過敏性反応、⑤悪臭および味覚、を含むと定義している。

- ①感覚刺激は、痛み、乾くような感じ、刺すような痛み、ひりひりする刺激、かすれ声あるいは音声障害、
- ②神経系および全身的健康問題は、頭痛、機能鈍化、精神疲労、記憶減退、注意力・集中力の低下、目まい、中毒、吐き気と嘔吐、疲労感、
- ③皮膚刺激は、痛み・発赤・刺すような痛み・かゆみ・皮膚の乾燥感、
- ④非特異的過敏性反応は、鼻汁あるいは涙の流出・非喘息患者における喘息様症状・呼吸器音の変聴、

⑤悪臭および味覚ではそれらの異常または変化であるとした。

このうち、最も頻繁に現れる症状は、眼、鼻、咽喉の粘膜刺激であるが、気道下部および内臓を含むその他の症状は頻繁ではないとしている。

5.8.2 WHO, CEC（欧州共同委員会）、ATS（米国胸部医学会）の3機関におけるシックビル症候群の症候に関する定義の違い

CEC, ATS機関でもシックビル症候群の考え方を整理している。シックビル症候群の特徴は、WHO, CEC及びATSのそれぞれがまとめた症状の概要は表7に示すようにいくつかの点で差が認められる。眼、鼻、咽喉の感覚刺激と、中枢神経系に影響する症状（頭痛、嗜眠、疲労）は3機関とも共通な症状として挙げている。これに対して皮膚症状についてはWHOとCECの委員会はシックビル症候群症状の一部として認めているが、ATSは認めていない。さらに、胸部への影響についてはWHOとATSのグループはシックビル症候群に含めているが、CECは含めていない。また、WHO委員会は悪臭と味覚を挙げているが、他の二つの委員会では挙げていない。

このようにWHO, CEC, ATSの委員会により報告された症候群は、因果関係が不明な症状及び自己申告とい

表7 各組織機関でのSBSの定義の比較

	CEC	ATS	WHO	WHOに対するHodgson の反対論
評価が共通した症状				
目、鼻、咽喉の感覚刺激	○	○	○	アレルギー性汚染物質
中枢神経系への影響 (頭痛、老眼、疲労)	○	○	○	溶剤による神経毒性
評価が異なる症状				
皮膚症状	○	×	○	VOCによる刺激
胸部への影響	×	○	○	
悪臭、味覚異常	×	×	○	神経毒性物質、感覚ミス
	類似した症状 を示す多成分 による複数の 現象		類似した症状 を示す他成分 による単一の 症状	

う手段による不正確な愁訴の全てを対象として検討したが、3委員会の間では異なる定義として示され、大枠での了解はなされているものの細部については一致していない。

5.9 シックビル症候群に類似する生物に起因する疾病

シックビル症候群は多臓器における不定愁訴であることから、他の疾病との区別が難しい場合がある。シックビル症候群に類似した生物に由来すると考えられる疾患として、加湿器熱、在郷軍人病、喘息、慢性アレルギー鼻炎等が挙げられている。

5.9.1 アレルギー疾患

室内空気に関係する疾患として大きな位置を占めるものにアレルギー疾患がある。アレルギー疾患には喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性皮膚炎・結膜炎、アトピー性皮膚炎等多くの疾病が含まれ、その原因も多様である。

ハウスダスト、カビ、花粉、昆虫のようなアレルゲン類は、遺伝的素因（アトピー性）の人々に免疫学的感作のリスクを増大させ、ひとたび感作が起こった場合には、継続的暴露は増悪発症させる可能性が高い⁷²⁾。アレルギー疾患については既に本誌（第120号、2001）に記載されているので省く。

5.9.2 在郷軍人病（レジオネラ症）

在郷軍人病（LD）は、1976年にホテルで開催された米国在郷軍人大会の参加者に *Legionella Pneumophila* 菌が主な原因で、2～10日間の潜伏期間の後、風邪に似た高熱・頭痛・不快感を特徴とし、咳、胃腸の異常も含まれ、肺炎様症状を呈し、場合によっては肺の硬変、呼吸不全へと進行して死に至ることがあり、発症した患者の15%が死亡したものである⁷³⁾。在郷軍人症の症例が報告されて以来、ヒトの肺炎の原因の一つとなっている⁷⁴⁾。多数の症例は、ホテル^{75), 76)} および病院^{77), 78)} での発生

が報告され、散発的な患者は一般の集団の中で観察されている。

我が国では1996年7月に慶応大学病院で、3人の幼児が加湿器によりレジオネラ症にかかり、うち1人が死亡した最近の事例がある。*Legionella Pneumophila* は、河川や湖沼に広く分布している細菌で、塩素に対して抵抗力を持っているため、給水システムにおいて一般的に見出され、通常の水処理プロセスの中では除去できない。レジオネラ属菌は、温水貯蔵タンク、再循環配管、噴水、クーリングタワー、蒸発コンデンサーなどの水利用放熱システム、閉鎖系ループ再循環冷却システムで育成するので、これらのエアロゾルによって経気道的に暴露することが原因とされている^{74), 79), 80)}。

その他、1986年に、米国ポンティアック市（ミシガン州）の保険局ビルにおいて144名の勤務者に発熱性筋痛症の発生がみられた「ポンティアック熱」が知られている。

5.9.3 過敏性肺炎（HP）

過敏性肺炎（hypersensitivity pneumonitis：HP）は、ビル施設である冷暖房、換気及び空調システムによる多様な生物の拡散とそのエアロゾルの吸入によって発生する免疫学的および細胞毒性学的反応の疾患である^{81) - 85)}。暴露後4～6時間に発熱、悪寒、筋肉痛、不快感、息切れ、咳などの呼吸器および全身的に急性症状が起こり、通常は暴露後18時間以内に自発的に回復する。慢性になると肺炎が発症しガス交換の障害を伴う肺傷害またはアレルギー性肺炎となると報告されている。

過敏性肺炎の原因生物は高温性の放線菌^{81), 82)}、カビ^{83), 86)}、耐熱性細菌⁸⁴⁾ や在郷軍人病（レジオネラ症）を発生させる細菌^{87), 88)} が挙げられている。NIOSHによるとオフィス等の非居住環境における過敏性肺炎の突然の発生は、シックビルの原因としての評価では5%以下と比較的少なかったと報告している^{89) - 91)}。

5.9.4 加湿器熱 (HF)

加湿器熱 (humidifier fever: HF) は水スプレー加湿器により生成された汚染物質の暴露に関連したもので、過敏性肺炎と密接に関連している呼吸器疾患で、インフルエンザに似た症状を示し、ヨーロッパにおいて報告されている。勤務の交代終期あるいは勤務後の夕方に発症しやすく、その程度は勤務日が進むにつれて減弱化する。非病原性アメーバ⁹²⁾ あるいはグラム陰性菌⁹³⁾ が原因ファクターと示唆されている。

6. 化学物質過敏症

化学物質過敏症は最近の我が国では極めて社会的な疾病として、生活や習慣の中に広く浸透してきているにもかかわらず、不明確な状況が続いている。シックビル症候群ではビルという共通事項以外は不特定多数に発症したことから、諸外国では公的機関による大がかりな疫学的研究がなされてきた。これに対して、化学物質過敏症は個人レベルによる患者の散発的な発症で共通事項があまり見あたらず、しかも専門医が少なく、症状が多岐にわたることから、組織だった検討がなされ難いことが理由の一つであった。この10年来、諸外国ではいくつかのプロジェクト研究が組織され、知見も重ねられてきた。また、我が国では厚生省が1997年、化学物質過敏症に対する研究委員会(化学物質のクライシスマネジメントに関する研究: 瀬高守夫)を組織し現段階での評価を行った。環境庁では1998年に本態性化学物質過敏症について多くの分野の専門家を集めて研究委員会(大井玄)を組織し、各専門家の考え方を極めて客観的に評価してまとめた。本項では著者が係わったこれらの報告を含めて化学物質過敏症について概説する。

6.1 化学物質過敏症の経緯

化学物質過敏症 (multiple chemical sensitivity: MCS) は、1950年代 Randolph によって Environmental illness (EI) として報告された。Randolph は、環境化学物質によってアレルギーが増悪されたようにみられたため、臨床アレルギーに対する治療を試みた。しかしながら、いずれの免疫学的疾病と対比させても EI に相当する疾病に当てはめることはできなかった⁹⁴⁾⁻⁹⁶⁾。その後、産業医等が作業場において高濃度の暴露の後に、低濃度暴露しても急性症状を示す患者を観察したことを契機として、これが従来の産業中毒とは異なる範疇の病態で、環境中の複数の化学物質で反応が昂進する疾病の可能性を示し、これらの疾病を環境病と定義した。しかしながら、産業医や精神科医に確認された MCS や EI は、低濃度の化学物質暴露に対する生理学的な反応によるものではなく、心因的な精神作用に影響されたものであって^{94), 97)-100)}、「立証のない経験的な方法論によるもので、科

学的妥当性が欠けている」と種々の医学関係学会¹⁰¹⁾⁻¹⁰³⁾から懐疑的に扱われていた。

1987年に入り、Cullen¹⁰⁴⁾ によって MCS の名称が初めて提唱され、その診断基準も提案されている。また、1989年には、American College of Physician のグループ¹⁰⁵⁾ は客観的な身体的所見や病理的異常および特異的臨床検査所見に欠如する多彩な臨床症状を示すもので、環境化学物質や食品が原因と考えられるが、これら化学物質による免疫機能の低下を考慮に入れるべきであるとの見解を示している。1990年には、Blackら⁹⁴⁾ は、通常の食品や環境化学物質を原因として、免疫調整機能異常と多彩な臨床症状を持つ病態であると定義し、疾病の約65%は、気分障害、不安障害、身体表現性障害の診断基準を満たすが、本疾病の精神疾患との関連性については否定できるだけの情報はないとしている。Ashford & Miller⁹⁵⁾ は、本症は疑われる化学物質について除去あるいは負荷試験によって症状が消失・再発するとし、これを Multiple Chemical Intolerances (MCI) としている。また、環境要因が大きいとの考えから、Gothe は Environmentally Associated Symptoms (EAS) を提唱した。その他にも National Research Council の定義や Nethercott 等の定義等、多くの考え方が示されている。

環境からの暴露によって反応が昂進すると推定される症候群は、今までに「複合化学物質感受性症候群 (Multiple Chemical Sensitivity Syndrome)」、 「化学物質高感受性症候群 (Chemical Hypersensitivity Syndrome)」、 「普遍性アレルギー (Universal Allergy)」、 「21世紀病 (21th Century Disease)」、 「環境衛生病 (Ecologic Disease)」、 「精神性アレルギー (Cerebral Allergy)」、 「環境不適応症候群 (Environmental Maladaptation Syndrome)」、 「食物化学物質過敏症 (Food and Chemical Sensitivity)」 などと呼ばれ、本疾病の概念を基にした多くの呼び名と定義が生み出された。

最近では、1996年に WHO と国際労働機構 (International Labour Office: ILO) の合同会議が行われ、後天的な異常で、多種の器官に再発する症状であること、ほとんどの人に異常を認めない程度の環境要因に関連していること及び現段階の医学、心理学では説明できないこと等から、本症状を MCS ではなく、Idiopathic Environmental Intolerances (本態性環境非寛容症) と提唱し、国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety (UN): IPCS) に示している。

ただし、以下の項では(複合)化学物質過敏症 (MCS) がほぼ定着しているため MCS として記述する。また、複合化学物質過敏症と化学物質過敏症との違いは化学物質の暴露実態と疾病との関連性に関する研究が不足していることから現状では明確に区別して述べることはできない。

6.2 化学物質過敏症

6.2.1 定義

MCSの診断の概念については、1987年にCullenが提唱した考え方が一般的に用いられている¹⁰⁴⁾。

MCSの患者は多彩な臨床症状を呈するが、その多くは臭気異常、頭痛、全身倦怠感、心悸亢進、関節痛、筋肉痛などの非特異的な自覚症状であり¹⁰⁶⁾、他の気質性疾患を除外して診断することによってはじめて診断が下される疾病概念である。しかしこれら症状を問診を通じて観察すると、①神経系、②免疫系、③内分泌系、④消化器系、⑤その他の異常に大別できるとしている。患者の診断には、詳しい問診及びアンケートで、とくに化学物質との因果関係を聞くことによって得られるものである。

それによると

- ①記憶上認められる環境物質の暴露
- ②複数臓器の症状
- ③予想される環境物質の刺激による症状の発症と排除による軽減
- ④多彩な化学物質によって惹起される症状
- ⑤証明可能な化学物質暴露による症状の誘発
- ⑥超低濃度化学物質暴露による症状の誘発
- ⑦症状を説明しうる臨床検査成績の欠如

の7項目が挙げられている。

その他の機関でもMCSに対する定義が提案されているが、現段階では明確な診断基準が確定されているわけではない。また、厚生労働省では化学物質過敏症についての概念と診断基準を示している。

6.2.2 MCSの“あいまいな”定義

上記のようにMCSの定義は極めて概念的なもので、特に、原因と想定される化学物質については、化学物質暴露の記憶、刺激を伴う発症、多彩な化学物質、可能な症状の誘発、低濃度の症状の誘発と7項目中5項目までが化学物質暴露による症状との関連を示したものであるにもかかわらず、化学物質について確認した例はほとんどない。しかもこれらの定義は問診でしか診断できず、科学的データによる診断ができない状況にある。すなわち、診断基準が、第三者を理解させる科学的評価法が含まれていないことが専門家の中で受け入れ難い状況を作りだしていると言っても過言ではない。

厚生省並びに環境庁では化学物質過敏症について、各専門家の考え方を極めて客観的に評価してまとめた。それらによると、いずれの委員会でも自律神経障害、耳鼻咽喉の障害、眼科的障害、皮膚障害等の多様な症状が多臓器に発現することは認識しているものの、心因性の影響を無視できないとの観点を捨ててはいない。

6.3 化学物質過敏症の症状

MCS患者は70～80%が女性で、これらの多くは高学歴で、サービス業を職業とすることが多く30歳以後に発症することが報告されている^{107), 108)}。

化学物質過敏症における多器官にわたる症状は、自律神経障害として発汗異常、手足の冷え、易疲労性、精神障害として不眠、不安、うつ状態、不定愁訴、気道障害としてのどの痛み、乾き、消化器障害として下痢、便秘、悪心、眼科的障害として結膜の刺激症状、循環器障害として心悸亢進、免疫障害として皮膚炎、ぜん息、自己免疫疾患、その他には集中力の欠如、記憶障害、頭痛などが挙げられている。

6.3.1 自律神経障害

MCS患者からの愁訴は心理的なものであるとの考え方に自律神経障害の可能性を示唆する報告も多い。Morrow¹⁰⁹⁾らは、混合有機溶剤の暴露経験者22名について多面性格テスト(MMPI)を用いて検討したところ、長期間の暴露歴を有するものほど身体的障害、不安、抑圧、社会的孤立、抑制喪失が顕著に見られるとしている。

Simonら¹¹⁰⁾は、(MCS)EIを明確に定義するため化学物質で惹起したとする37名について検討し、24名の被験者では化学物質に異常に敏感で、不安と抑圧障害の著しい既往歴を有し、かつ暴露前に医学的に説明のつかない身体症状が見られたとした。このことから、MCSの被験者は心理的抑圧の潜在的特性と強い関連を有するとし、有害物質暴露に対する潜在的な脆弱性のため、化学物質の悪影響を増強することが考えられるとした。

また、Ashfordら⁹⁵⁾は、化学物質の暴露の機会が多い工場労働者に本症を多くみることが一般市民にも存在するとした。症状は“アレルギー様症状”と“神経系、主に自律神経系症状”が中心であるが、アレルゲンに反応する患者とは異なり、極く微量の化学物質に反応することによって症状が発現するのが本症の特徴であるとした。このように自律神経系の情報が多く見られるようになってきたにも係わらず、科学的な評価の少なさから未だに心理的愁訴の結果との考え方を否定できる状況にはなっていない。

6.3.2 耳鼻咽喉における障害性

MCSの耳鼻咽喉における症状は、鼻腔から気管に至る呼吸器と、口腔から頸部食道に至る器官の聴覚、嗅覚、味覚、及び平衡感覚などの器官・組織における多彩な症状と相互の関連性に起因するものと考えられる。

(1) 嗅・知覚の感知機構

人における化学物質の臭気を感知する機構には図5の

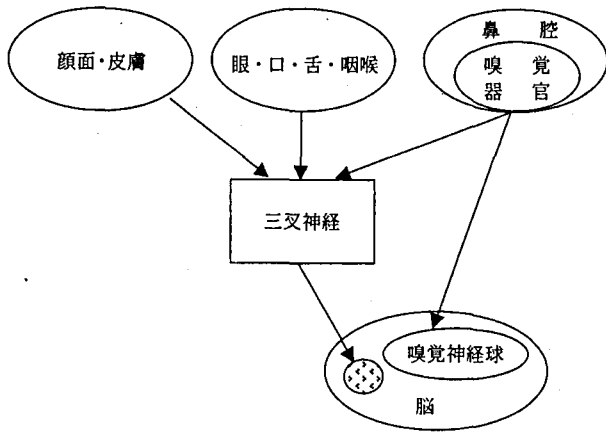


図5 嗅覚知覚の神経回路の概念

ように二つがあると考えられている。一つは、味・臭気等の感覚は司る三叉神経を介して脳と結ばれる系で、鼻腔内全体に分布する嗅覚器官のほか、顔面、口、舌、咽喉、眼やその他の皮膚とも結ばれている。嗅覚器官で感じた化学物質の刺激は、三叉神経を通して心拍数の変化、咳、くしゃみ、呼吸数増加、催涙を生じさせる。

他の一つは匂いや味を感知するもので、鼻腔の嗅覚上皮細胞と脳の嗅覚神経球が直結され、嗅覚を感じる。これらの二つの嗅覚器官は脳の異なる部分を刺激するが、化学物質の暴露によって双方の伝搬経路を刺激すると考えられる。これら神経回路の刺激で重要なことは、化学物質による臭気や刺激が、質の類似した反応を双方の神経回路に伝搬することである。

(2) MCS患者の臭覚の異常

Bellら¹¹¹⁾は、MCSは臭気に対する嫌悪感による過敏状態の昂進による一般的症状の発現と考えたが、多くの場合は香水や自動車排気ガスなどの匂いに過敏になると報告している。MCS患者の嗅覚閾値は正常者と比べて同程度との報告もあることから、嗅覚の過敏な状態は中枢での嗅覚情報の処理過程の異常との考え方がある。これに対して、Doty^{112), 113)}らはMCS患者は化学物質の暴露によって過敏状態となるのではなく、むしろ、うつ、呼吸数増加、あるいは鼻腔気通性と関連性が強いとしている。また、Hummelら¹¹⁴⁾は2-propanolを用いた2重盲検試験をMCS患者に対して行った結果、脳の電位パターンの変化から大脳皮質での化学物質の受容情報の処理過程を反映している可能性を示唆している。

(3) 嗅覚に関連した神経的障害

MCS患者の訴える症状の中で、聴覚障害、耳鳴りも比較的高率に発症する神経系の障害を疑わせるものも多いが、その中にめまい、ふらつきが含まれている¹¹⁵⁾。

めまいには図6に示すように嗅覚性と心因性があるとされている¹¹⁶⁾。嗅覚性めまいは大脳辺縁系、特に扁桃核に含まれる交換成分の活動性亢進が重要な因子で、嗅受容器、嗅球、大脳辺縁系（前梨状葉、扁桃核）、視床下部、脳幹平衡中枢が関与するとされている。また、嗅覚の過敏な状態も、中枢神経系の交換神経性の活動亢進により引き起こされるとしている。一方、心因性めまいは、大脳皮質、大脳辺縁系（海馬）、視床下部、脳幹平衡中枢が関与し、交感神経成分の活動性亢進が発症の有力な要因であるとし、2種類のめまいは大脳辺縁系以下で共通であることを指摘している。竹中らは環境庁の報告の中で、これらめまいの伝達経路の類似性から、MCS患者における愁訴は嗅覚性めまいの刺激の表現が心因性めまいと交差または混在状態を呈していたとも考えられる。

(4) 鼻腔

Meggs & Cleaveland¹¹⁷⁾は、MCSの定義に合致する10名の患者の鼻部について病理学的研究を実施した結果、すべての患者に鼻部に浮腫、粘液過剰、咽頭後方（咽喉）基部の敷石状所見（a cobblestone appearance）、粘膜の充血等の異常を確認したとの報告している。また、アデノイドの浮腫および扁桃の肥厚もしばしば認めたとされている。

6.3.3 眼科的障害

MCSの診断が自覚的症候をその基準としているなかで、眼科的臨床検査は数少ない他覚的診断の一つである。MCS患者においては、症例の6割以上で視覚が低下しているとされている。石川らはMCS患者に対する瞳孔の

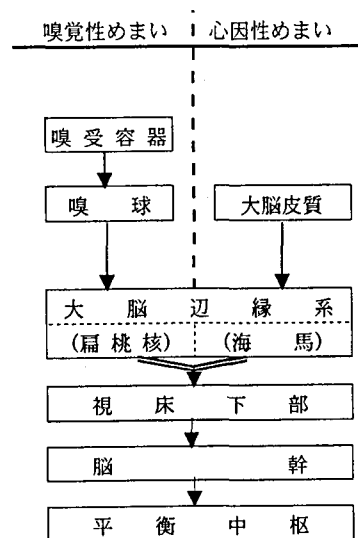


図6 めまいの神経回路の概念

対光反応検査で8割近くに異常が認められ、ダラス臨床環境医学センターでの調査結果と同様であったとした¹¹⁸⁾。眼球運動検査においては、ほぼ全例で階段状波形の滑動性追従運動が見られ、滑動性追従運動の中枢での神経経路が傷害されやすいことを示唆しているとした。副交感神経優位の自律神経バランス異常の割合が多かったことも米国の報告と一致しており、このバランス異常が何らかの形でMCSの発症に関与している可能性があるとしている¹¹⁹⁾。

6.3.4 皮膚症状

MCSの種々の症状の一つとして皮膚症状が挙げられ、他器官の種々の症状の中でも、客観性を持つ症状の一つである¹¹⁷⁾。報告された皮膚症状には、掻痒、発疹、蕁麻疹、皮膚の潮紅発作など他、既存の皮膚疾患の増悪も指摘されている。皮膚症状の発現の頻度は報告例により異なり、低い場合には15～30%で、高い頻度では82%にのぼる例もある^{120), 121)}が、高頻度の発症の報告の中には、皮膚症状が毎日発症を繰り返す例ばかりでなく、月1回以下の皮膚症状までも含めている報告例がみられ、一律には評価することはできない。これらの皮膚症状の報告例からも明らかなように、皮膚症状は他の器官の愁訴と同じように、自己申告によるアンケート調査がほとんどで、客観的な皮膚症状の実態は明らかにされていないわけではない。

報告されたMCS患者の症状から西岡は環境庁報告の中で以下のように予想される症状と既存疾患との区別について可能性を述べている¹¹⁶⁾。MCS患者の症状には自律神経失調に起因すると考えられることが多いことから、皮脂分泌異常による脂漏性皮膚炎、皮膚の乾燥による乾皮症、皮膚そう痒症、蕁麻疹¹²²⁾などの出現やアトピー性皮膚炎が発症したようにとられることが予測されるとしている¹¹⁶⁾。また、皮膚の化学物質刺激に対する

閾値の低下によって引き起こされる刺激性接触皮膚炎や、化学物質に対してアレルギー機序を介して引き起こされるアレルギー性接触皮膚炎の発症の可能性があるとした。

また、感作状態にある化学物質と全く無関係な多種類の化学物質に対して皮膚が反応する場合 (Angry back syndrome) や、Sensitive Skinと呼ばれる皮膚の過敏状態¹²³⁾と、特異的自覚症状を持たないMCSとは区別される病態であるとした。MCS患者では、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患を増悪する可能性が考えられる¹⁰⁶⁾と述べている。

6.3.5 アレルギー性疾患との違い

MCSは、化学物質の一過性の大量、もしくは長期間の少量暴露することによって過敏状態が引き起こされ、それ以後にごく微量に暴露しただけでも臨床症状が発現する特徴が考えられ、この過程がアレルギー疾患と似ていると言える。アレルギーは、アレルゲンが体内に進入後、感作が成立し、免疫系の異常反応によって発症する過敏症である。アレルギーの場合は、血清中のIgEの増加やそれに伴うインターロイキン等のサイトカインの上昇、ヒスタミンの異常放出などの客観的な診断指標があるのに対し、MCSの場合は現段階ではこれに相当する指標はない。また、MCSを発症する可能性の化学物質は低分子物質で発症するのに対し、アレルゲンは比較的高分子量物質であり、MCSをアレルギー疾患と結びつけるのは困難である。

6.4 MCSの発症メカニズム

厚生省はMCSを図7のように一過性の大量暴露または少量の反復暴露による過敏性の獲得が行われ、その後の微量の化学物質の暴露で過敏状態が発症する疾病との考え方を示した。Ashford & miller⁹⁵⁾、Bell⁹⁶⁾らは、化

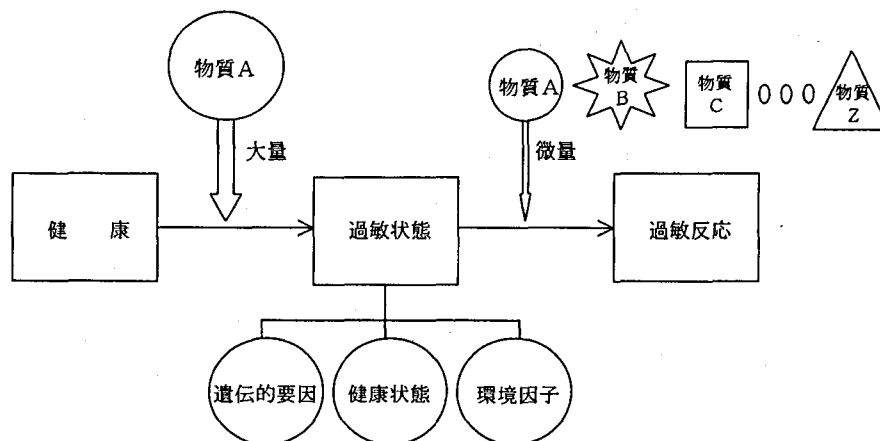


図7 MCS発症機序

学物質過敏症のメカニズムについて提示している。MCSは、化学物質の急性あるいは慢性の暴露によって、嗅覚-辺縁系の感作 (sensitization) あるいはkindling (興奮・刺激) により生じると示唆している。辺縁系領域内には血液-脳関門がないため、各種の物質は嗅球に入り、嗅覚ニューロンに運ばれる。終局的な影響は、神経細胞の反応が反復的、間欠的に増幅を誘発し、閾値以下の刺激で特殊なタイプの時間依存性の感作となるkindlingが発症するとしている。ひとたびkindlingが起こると、軽度の電気生理学的反応により発生した低レベルの刺激が、症状の発現の引き金となると考えられるとされている。

なお、Kindlingの定義自体は、ある電氣的刺激を継続的にあたえられても無反応あるいは軽微な応答であったものが、ある時期以降、それまで与えていた刺激よりも遙かに小さい刺激をあたえても、極めて大きな応答を引き起こすことである。この一連の生体での応答がMCSの症状と似ていることから化学物質の暴露によるMCSの発症もこのメカニズムによる可能性が指摘されている。

6.5 許容暴露濃度

MCSで発症する複数の器官は、再発を特徴とする後天的な障害であると考えられるが、図8に示すように、今までの毒性評価指標による有害作用よりもはるかに低い用量で発症し、しかも化学物質の種類に無関係な化学物質による暴露によっても発症すると考えられている¹⁰⁴⁾。すなわち、MCSの症状は、各化学物質の毒性情報から得られた許容濃度値 (threshold limit values) 以下の遙かに低い暴露濃度でも健康影響を及ぼすと考えられている。したがって、MCSの閾値は現在の毒性における「用量-反応評価」における評価指標に従って設定された閾値と異なり、新たな評価閾値を設定すべき時期が来るかもしれない。しかしながら、MCSにおける閾値

の客観的な評価指標は見つかっていない。

6.6 診断基準

厚生省ではMCSについての診断基準を表8のように示した。主症状、副症状に分け、さらに検査所見を示している。

主症状としては、①持続あるいは反復する頭痛、②筋肉痛あるいは筋肉の不快感、③持続する倦怠感、疲労感、④関節痛である。

副症状としては、①咽頭痛、②微熱、③下痢・腹痛、便秘、④羞明、一過性の暗点、⑤集中力・思考力の低下、健忘、⑥興奮、精神不安定、不眠、⑦皮膚のかゆみ、感覚異常、⑧月経過多などの異常等となっている。

さらに検査所見には、①副交感神経刺激型の瞳孔異常、②視覚空間周波数特性の明らかな閾値低下、③眼球運動の典型的な異常、④SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) による大脳皮質の明らかな機能低下、⑤誘発試験の陽性反応等について検査を実施し、複合的に診断することとしている。ただし、これらの問診における診断は他の慢性疾患が除外されることが大前提であるとしている。

6.7 MCSと類似した疾病群

MCSは先にも示したように多種の臓器に種々の症状を呈し、これに心因的な症状も加わっていることも予想される等、多面性を持った疾病と考えられている。このような疾病は、MCSが報告される以前からいくつかの疾病群にも報告されている。その代表例が慢性疲労症候群 (chronic fatigue syndrome : CFS) や結合繊維筋痛症 (fibromyalgia : FM) 等である。これら二つの疾病を比較すると表8のようである。

6.7.1 慢性疲労症候群 (CFS)

CFSは疾病として位置付けられてから30年余りにな

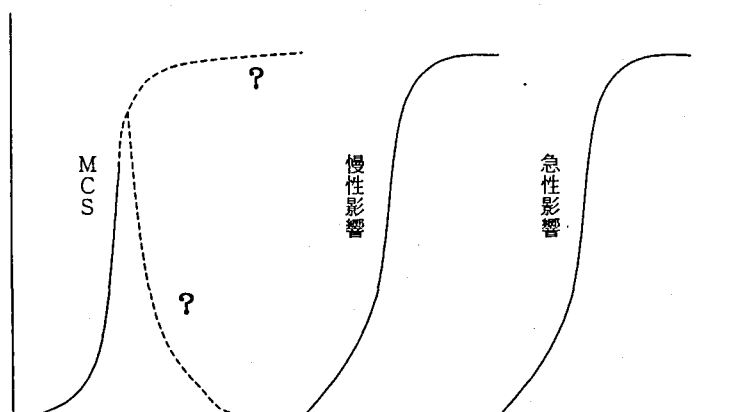


図8 暴露量

表8 MCSに類似する症病の症状の比較

	MSC	CFS	FM
主症状 (大基準)	1. 他の慢性疾患を除外 2. 持続あるいは反復する頭痛 3. 筋肉痛あるいは筋肉の不快感 4. 持続する倦怠感、疲労感 5. 関節痛	1. 病歴、身体所見、検査所見によって他の疾患を除外 2. 6カ月以上にわたる持続性あるいは再発性の激しい疲労感	1. 類似の症状を呈する他の全身性疾患の除外 2. 3カ月以上続く3箇所以上の全身の疼痛 3. 6ヵ所以上の再現性のある圧痛点(18カ所)
副症状 (小基準)	1. 咽頭痛 2. 微熱 3. 下痢・腹痛、便秘 4. 羞明、一過性の暗点 5. 集中力・思考力の低下、健忘 6. 興奮、精神不安定、不眠 7. 皮膚のかゆみ、感覚異常 8. 月経過多などの異常等となっている	1. 微熱 2. 咽頭痛 3. 頸部あるいは腋窩リンパ節の痛性腫脹 4. 筋力低下 5. 筋痛 6. 運動後24時間以上続く全身倦怠感 7. 頭痛 8. 腫脹、発赤を伴わない移動性関節痛 9. 神経精神症状 10. 睡眠障害(仮眠、不眠) 11. 症状の急激な出現	1. 全身倦怠感 2. 慢性頭痛 3. 睡眠障害 4. 神経精神症状 5. 自覚的間接腫脹(しかし他覚的には認めない) 6. 結腸過敏 7. 頭痛 8. しびれ感 9. 手指の腫脹感 10. ストレス、天候、活動による症状の変動
検査所見	1. 副交感神経刺激型の瞳孔異常 2. 視覚空間周波数特性の明らかな閾値低下 3. 眼球運動の典型的な異常 4. SPECTによる大脳皮質の明らかな閾値低下 5. 誘発試験の陽性反応等について検査を実施	1ヶ月間に2回認めること 1. 微熱 2. 非滲出性咽頭炎 3. リンパ節触知あるいは圧痛	1. 全身性の疼痛 ①上胸部②肩③背部 ④腰部⑤上肢⑥下肢 2. 精神症状 完全主義的 自己中心的 物事にこだわる 3. 睡眠障害 熟眠不能 早期覚醒
診断	・主症状2項目+副症状4項目 ・主症状1項目+副症状6項目 +検査所見2項目	・大基準2項目 +小基準・自覚症状6項目 +他覚所見2項目以上 ・大基準2項目 +小基準・自覚症状8項目 以上	
定義	・症状 ①神経系②免疫系③内分泌系 ④消化器系⑤その他の異常 ・化学物質との因果関係 ①記憶上認められる環境物質の暴露 ②複数臓器の症状 ③予想される環境物質の刺激による症状の発症と軽減 ④多彩な化学物質によって惹起される症状 ⑤証明可能な化学物質暴露によって惹起される症状 ⑥超低濃度化学物質暴露による症状の誘発 ⑦症状を説明しうる臨床検査成績の欠如		病態 ①慢性身体疾患 ②感染後疾患 ③精神・行動傷害

っているが、病因・本態が不明である。この間、CFSに対する研究は、米国、英国、ベルギー、オーストラリアあるいは我が国など世界各国で報告がなされ、国際会議も開かれている。我が国でも1991年に表8に示したように診断基準が設定された。これによると微熱、咽頭痛、リンパ節腫瘍、筋痛、全身倦怠感、頭痛、関節痛、睡眠

障害の他、神経精神症状として集中力低下、思考力低下、うつ症状、健忘等を挙げている。

一方、米国のNIH(National Institute of Health)はCDCの診断基準としてCFSの病態を慢性身体疾患、感染後疾患、精神・行動傷害の3つに分け、非精神病性うつ病、身体表現性障害、不安障害などの症状はCFSの

中に含まれて良いと提案した。同様にFMもCFSに含まれてよいし、伝染性単核球症が蔓延した場合もCFSのcriteriaを満たせばCFSと診断してよいこととされている¹²⁴⁾。

6.7.2 結合繊維筋痛症 (FM)

FMは、心因反応も原因の一部とする多くの要素が関与したものと考えられているが、病因は未だ不明である。FMの顕著な症状は表8に示したように、前上胸部、肩、背部、腰部、上肢、下肢などの限定した部位の全身性の疼痛、こわばりと全身倦怠感を伴っている。その他に随伴する臨床病態として結腸過敏症、頭痛、しびれ感、手指の膨張感などが問題となる。また、精神症状も認められ、熟眠不能、早期覚醒の睡眠障害は特徴的とされる。

6.7.3 MCS, CFS及びFMとの相異

MCSとCFS及びFMの臨床像、病態、発症の背景などは類似することが多いことから、Buchwaldら¹²⁴⁾は、年齢、教育歴、全日勤務、性別などの社会的状況がほぼ同様なそれぞれの疾患と診断された各30名について表9のようにCFS、FM、MCSの患者群の関連性を詳細に検討されている。

MCSとCFSの関係については、CFSの診断基準（米

国CDC)に含まれる症状は、MCSの患者でも共通に持つと指摘した。特に全身倦怠感、筋肉痛、関節痛、反復性頭痛、不眠精神症状などの出現頻度はほぼ同程度である。これに対して臨床症状の出現頻度、急性発症、有痛性リンパ節、労作後の疲労感等はいずれかの出現頻度に差はみられている。さらに、疑われる化学物質の暴露による症状の悪化は、MCS患者では大気汚染、排気ガス、喫煙、塗料、溶剤、香水などで症状の悪化を示すが、CFSでも53~67%、FMでも47~67%である。

さらにMCSはシックビル症候群との関係で論じられ、MCSもCFSもシックビル症候群と深いかわりを持つと考えられ、集団発生したシックビル症候群と思われる患者23名中5名はCFSの診断基準を満たしたという報告もある¹²⁶⁾。

このように、MCSとCFSやFMは、その患者の疫学的特徴、臨床症状が極めて類似しており、現在繁用されているCFSの診断基準を用いると、MCSの30%の患者はCFSと診断されることである^{104), 105), 124)}。

すなわち、発生した患者が愁訴する内容と経験した状況の問診と医師の知識レベルによって診断病名が換わる可能性を有している。

6.8 化学物質過敏症と疑われた患者の周辺の空気環境で確認された化学物質

特殊な場合を除いて化学物質過敏症が疑われる患者について原因と考えられる化学物質が明らかにされているわけではない。しかしながら、化学物質過敏症と診断された患者の生活環境の空気中における化学物質の存在状況は、少しずつ報告例が蓄積されつつある。以下にその例を表10に示す。

宮田、難波^{98), 127), 128)}は多種化学物質過敏症の臨床研究の中での室内空気を分析し、化学物質を検出している。また、米国における化学物質過敏症患者の血液中化学物質の検索では1,1,1-トリクロロエタン、メチルペンタンをはじめとして多くの化学物質の検出頻度を示している。

Haustein & Ziegler¹²⁹⁾は塩化ビニル、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、芳香族及び脂肪族炭化水素等の他、エポキシ樹脂、シリコン、シリカ、プレオマイシン等を挙げている。Byersら¹³⁰⁾は低沸点有機塩素化合物が白血球の異常や免疫不全を引き起こすとした。また、Megge & Cleveland¹³¹⁾は、化学物質過敏症発症の原因として、新築ビル中揮発性有機物及びヘキサン、ヘプタン、トルエン、キシレンなどの溶剤を疑っている。有機溶剤の混合物の労働環境暴露が精神行動異常と相関することをRyanら¹³²⁾、Linzら¹³³⁾は示した。Bombassei & Kaplan¹³⁴⁾は、Goodpasture's症候群と化学物質との関連性が疑われるものとして、トリクロロエタン、四塩化

表9 患者の特徴

	(単位:%)		
	MCS	CFS	FM
MCSの定型的症状			
嗔声/発語異常	40	17	27
鼻・口内熱感	22	3	10
呼吸異常感	47	23	37
搔痒感/皮膚刺激感	37	27	40
CFSの定型的症状			
全身倦怠感	90	100	93
6ヶ月以上続く疲労感	83	100	90
日常動作50%低下	90	100	83
労作後疲労感	50	83	83
急激発症	40	70	57
発熱	10	33	33
咽頭痛	37	37	50
有痛性リンパ節腫脹	27	27	67
関節痛	73	70	93
筋痛	63	77	97
筋力低下	67	67	80
睡眠障害	60	53	77
CFS診断基準合致	30	—	70
精神神経症状			
記憶力低下/健忘	90	63	77
混迷/思考力低下	90	63	73
易刺激性	67	50	57
抑うつ	67	50	33
疑われる化学物質			
公害/排気ガス	97	53	60
喫煙	87	57	64
ガス/塗料/溶剤	97	67	67
香水	90	57	46

と思われる化学物質過敏症の典型的な例として湾岸戦争時の兵士に多発したとの報告例も多い。一方、Megge & Clevelandは、化学物質過敏症発症の最初のきっかけをそれぞれの患者について検討し、農薬であるアセフェート、アルドリンである可能性を示している。

McConnachie & Zahalsky¹⁴¹⁾は、かつて広く使用されていた防蟻剤のクロルデンの免疫学的変化を検討しその活性が亢進していることを示している。Davideff¹⁴²⁾は、地下トンネル管理従事者の高濃度ガソリン排ガス暴露による化学物質過敏症発症について検討し、排ガス暴露との相関性が高いことを示している。

Meggs¹⁴³⁾はたばこ煙、トルエンイソシアネート、ウイルス伝染なども過敏性や神経性の炎症を引き起こす可能性があることを示唆した。また、無機物としてのハンダの鉛、リン酸、ミネラル水、エポキシ樹脂の可能性も示唆されている。

一方、いくつかの症状発症時の室内空气中化学物質濃度を測定した例がある。Lohmann¹⁴³⁾は自律神経失調症における揮発性化学物質について検討し、脂肪族および芳香族炭化水素類の濃度は34～68ppbと低いもののホルムアルデヒドが230ppbと高いことを認めている。また、Norback¹³⁵⁾は夜間に息切れや胸の締め付けを感じる患者などの室内濃度を調べた。その結果、TVOCでは790 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と示し、感じない人に比べてその濃度差は100倍も異なることと示したと報告している。

このように、化学物質過敏症に伴う化学物質の確認は蓄積されつつあるが、化学物質過敏症と言われる環境中化学物質の存在状況は異なっている。また、それぞれの時点で測定した化学物質は、それぞれの研究者の関心のある一部の化学物質に焦点をあてて測定している傾向があり、推定の域を脱しているわけではなく、まして因果関係を証明し得るだけの情報と根拠を示した訳でもないことは記憶しておく必要がある。

6.9 MCS解決のための課題

MCSは、社会的に受け入れられる環境は整いつつある。しかしながら専門分野からは認知される状況には未だ至っていない。その理由には以下のようないくつかの課題が存在するためである。

基本的課題としては

- ・診断基準に客観性・具体性が不足している。
- ・症状が多岐にわたり、総合的に評価する必要がある。
- ・MCSと化学物質との関連性が証明されていない。
- ・客観的あるいは科学的証明と評価が不足している。
- ・化学物質の分析技術が追いついていない。

MCSを取り巻く環境背景

- ・保健所や総合病院等に本疾病に関する相談する窓口がない

- ・多器官にわたる愁訴に応じた専門分野がなく、かつ専門医や施設が不足している。
- ・患者、医師および化学物質の存在量把握の連携がない。
- ・化学物質の対象が広すぎて全体が把握されていない。これらの課題について着実なデータの積み重ねを損なわなければ、次の診断基準や原因解明につながっていかない。

7. 住まいの化学物質を減らす～規制と対策～

シックハウス症候群や化学物質過敏症の発症の要因が室内空气中の化学物質が大きな要因であると考えられている。しかしながら、暴露する化学物質は我々が建物、家具、家庭用品として資機材や製品を利用する限り、室内空气中から排除することはできない。したがって、資機材や製品として使われる化学物質の利用の仕方や使用量を減らして、室内空气中に放散する化学物質を間接的に減らす方策しか考えられない。そこで、我国の空気質の化学物質の管理についてや規制の仕組みと空気における特殊性を考えてみる。

7.1 我が国の空気質の管理

7.1.1 空気の特異性

空気における化学物質の制御は、経口的な摂取における化学物質の規制とはおもむきを異にしている。

(1) 規制できる空間とできない空間

ヒトが社会で日常生活をいとなむ場合の場所についての調査によると、室外での作業を職業とする人々を除いて、大部分の人々は仕事場の室内空気を1/3～1/2、住宅での空気を1/2～2/3と、室内空気を呼吸していることが圧倒的に多く、大気すなわち屋外の空気を吸入しているのは1日のうち1～1.5時間程度と考えられている。室内環境は大気の影響を直接的に受けているものの、室内空気質に圧倒的に影響を与えているものは構築物や家具やその他の室内の製品である。したがって、大気環境もさることながら、室内空気質に影響する化学物質の制御あるいは規制が重要となる。労働環境や学校などの公共施設では、その空気質を呼吸する人々是不特定あるいは特定多数であり、極めて公共性が高いものでそれぞれの行政管轄の分野で抑制策を講じることは可能である。しかしながら、個人の居住域は個人の選択によって形作られた空間であり、その使用状況も個人個人によって大きく異なり、あくまで個人の空間レベルの問題であり、国が規制値などで関与できるものではない。

(2) 大気における選択の非自由

汚染化学物質の人への暴露は経口的な食品を介する暴

露が最も大きく寄与していると考えられる。しかしながら、食品等からの化学物質の暴露は、流通システムの中での個人の趣向に合わせた食品の購入という手段からはじまるもので、個人個人の選択性に委ねられている（少なくとも口に入れる、入れないの判断は、）。ひとたび問題が発生すれば、各個人は汚染物質の暴露から回避するために汚染された食品を廃棄することやその食品の購入を控えることができる。これに対して、環境大気は基本的に「購入」できるものではない。まして代替の空気があるわけでもない。行政対応によって長い年月をかけて質の改善をもたらすことができたとしても、個人の選択や努力で改善できる余地はない。

(3) 室内空気における受動的な暴露

大気に比較して室内空気質、特に居住環境の空気質は、室内空間を形成する建物と利用する製品によって左右され、先にも示した食品の場合と同じように消費者の選択の自由にまかされているところが大きい。しかしながら、居住する室内空気質は食品の場合のような消費材の“選択の自由”で片付けるわけにはいかない。室内空間の空気質は、室内空間を形造る床、壁、天井等の建築費機材と設置される家具や家庭用品、これに大気質がベースとなって構成されている。したがって、大気を除く建築物、家具、家庭用品は購入に際して“選択の自由”が消費者に存在している。しかしながら、これら製品は食品の様な流通システムを介した製品と違って耐久消費材であり、かつ製品に対する知識を持ち合わせておらずその購入を誤ったとしても容易に買い換えたり、廃棄できるものではない。また、建物等の製品に対して強度などの物理的保障等は規定されている場合が多いものの、化学物質の放散等について規定は最近やっと法律ができたものの有効に機能されるとは限らない。これに加えて、室内空気のベースとなる大気の侵入は選択できない。このよ

うなことから我々が呼吸する空気は食品のような“選択の自由”の商品ではなく“選択不可能”に近いものであることは明らかであり、翻れば能動的な“選択の自由”の結果として化学物質の摂取しているのではなく、受動的に化学物質を暴露してしまう“選択の非自由”の世界にはかならない。また労働環境では、職業そのものであることからこちらも選択の余地はない。

(4) 暴露する環境空気の違い

食品は使用・利用の段階から製品中の存在量まで細かく規制されている。したがって、どの製品でも、またどこで購入しても平均的に摂取していれば化学物質の暴露量が基準レベル数値以上を大きく上まわることはない。

一方、空気質においては大気、労働環境及び居住環境ではそれぞれの場所や時間によって化学物質の濃度、種類は異なる。

その結果として、空気に関する種々の基準値では1日平均濃度、8時間平均濃度あるいは最高濃度あるいは年平均等の複雑な規制のしかたを用いるのはその濃度の変動が大きいことを裏付けるもので、短期暴露での濃度が重要な意味を持つ場合、長期暴露における濃度がさらに重要な意味を持っている場合及び両者が重要である場合等があるので、複数の条件で規制値が示されている。

7.1.2 暴露媒体としての水域と空気環境の規制

暴露の例として公共性の高い水域を経由する経口的暴露の場合の化学物質制御のシステムをみると、図9に示すように、第1に公共用水域を汚染する発生源の段階、第2に公共用水域の段階、第3に水を飲用する暴露の3つのカテゴリーに分けることができる。水域環境では工業、農業、水産業などによって公共用水域を汚染する発生源があるが、これらは水質汚染防止法によって規制されている。また、公共用水域の段階では環境基準が設定

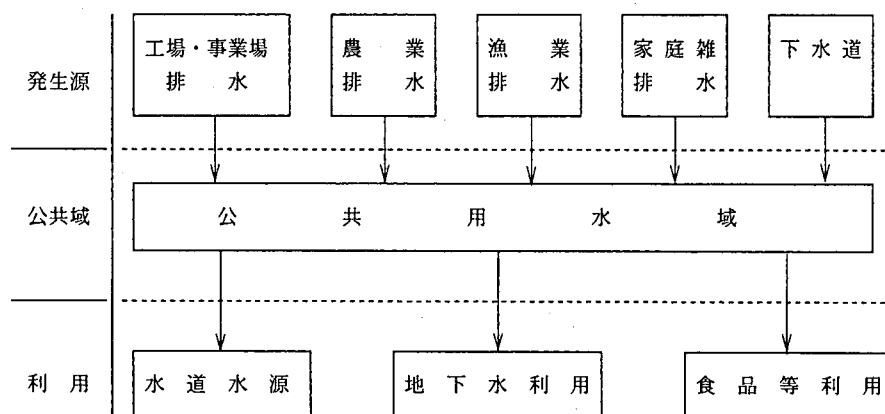


図9 環境水汚染の発生源、公共用水及びこれを利用する製品の規制の関連性

されている。さらに、消費者の摂取する飲料水は水道水質基準で厳しく規制され、発生源-公共用水-水道水と一連の規制の中にあり、かつ発生源は第一の段階のみである。一方、空気環境でも水域環境と同様に、発生源-大気-人に身近な室内空気の3つのカテゴリーに分けることができる(図10)。公共性の高い大気を工場等の汚染する工場等の発生源のカテゴリーの段階では工場や自動車などの発生源に対する抑制策があり、大気では発生源対策と連動して環境基準が設定されている。これに対して、人が最も多く呼吸する室内空気環境のカテゴリーでは、建物や家具等からの汚染の発生源に他ならず、空気中の化学物質の濃度は最も高い状況となっている。また、工場等の労働環境を除いた居住環境では個人の空間であることから規制をすることはできない。このように、経口摂取における汚染発生源からヒトの摂取までの水域の規制は発生源から連動した規制に従って健康の保持の体制が確立しているのに対し、空気環境では発生源が工場ばかりでなく、最も身近な居住環境の2つの段階が発

生源となっており、発生源から消費者までの一連の経路で連動した化学物質抑制の体制はとれない。

7.1.3 空気における規制

まず発生源対策の面からみると、各空気質に影響を及ぼす発生源における現在の規制の状況は表12に示すようである。その内容は固定発生源、移動発生源にいずれも詳細な発生源条件とそれに対する基準値設定と監視が大気汚染防止法で全国的に展開されている。大気汚染防止法は1996年5月に改正され、それまでの窒素酸化物やイオウ酸化物等の古典的物質に加えて「低濃度長期暴露による健康影響が懸念される有害大気汚染物質対策」等が法律の枠組みに取り込まれることになった。もちろん大気については環境基準を達成するために目標値が設定されている。室内空気に係わる労働環境も発生源となり得る空間で、労働衛生的見地から空気質を維持するように発生源対策を講じる規制がなされる。

一方、室内からの空気環境を法体系に従って類別する

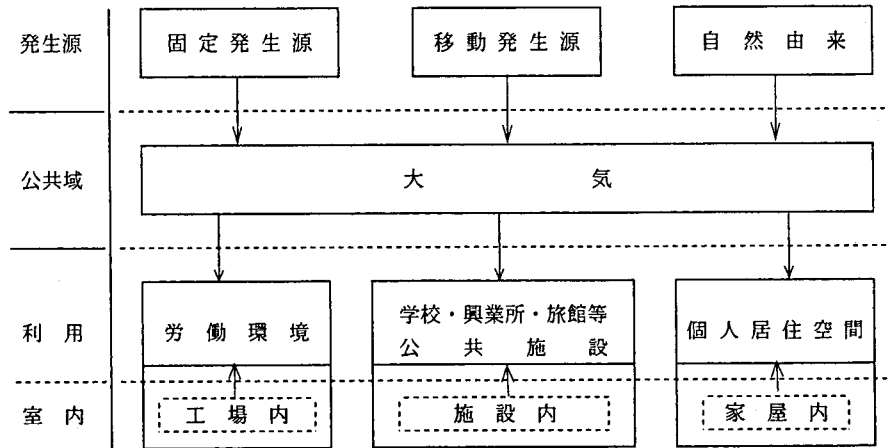


図10 空気質における規制の概念

表12 空気環境の質に関する現在の規制

	暴露濃度	対策	汚染・発生源	影響される対象地域	現在の法類	基準・ガイドライン	
							最近のVOC等
大気	低	不特定多数	固定発生源 移動発生源 自然発生源	大気	大気汚染防止法 大気汚染防止法 —	排出基準	—
	希釈					—	—
室内空気	高	不特定多数	各種産業化学物質	作業環境	労働安全衛生法	労働安全指針値、ACGIH	—
	中		医療薬品等	医療機関	医療法	—	—
	低		新築等の一時的	学校	学校保健法	—	—
	低		新築等の空調	興学場	興学場法	—	—
	低	新築等の空調	旅館	旅館業法	—	—	
高	不特定少数	建築物及び資機材	住宅環境	建築基準法	—	一部有	
高	↓ 集団	家具・家庭用品等	居住環境	厚生労働省ガイドライン	—	—	

と、空気環境は大きく2つに分かれるものと考えられる。1つは不特定多数を対象とした大気環境空気であり、直接的には大気環境基準として、あるいは間接的には大気汚染防止法の範疇で基準が設定されている。

もう1つは不特定多数または特定少数を対象とした公共性の高い建物の空気で、限局された空間の空気で、一般事務や不特定のヒトが呼吸する空気環境としてビル内の空気を規制する法律としてビル衛生管理法、特殊な作業環境を想定した労働環境における基準やガイドライン、その他にも学校における空気環境を規定した学校保健法（平成14年6月本法律の改正が行われ、厚生労働省のガイドラインが設定された）、不特定多数を収容する施設に関する興業、旅館、医療機関等の法律などで室内空気についての規定がなされる。しかしながら、居住空間の室内空気質については何ら規制されていない。

7.2 個人曝露と室内空気

人は常に行動しているので、各個人は同一の空気質を呼吸しているわけではない。我々が全国調査を行ったホルムアルデヒドの結果によると、図11に示すように個人の行動とともに採取測定された個人曝露濃度は、室内濃度と極めて高い相関がみられる。また、図12に示すように43化学物質のうち、実に37化合物が最低値と最高値の濃度が 10^3 以上の差を示している。このように、個人曝露量の第一の要因は、居住住宅環境が影響していることは明らかであり、しかもその濃度は $10^3 \sim 10^5$ までの開きが認められる。

7.3 室内空気汚染に係るガイドライン

快適で健康的な住宅に関する検討会議では、国民が安全で快適な生活を送るために必要な住居衛生の知識の普及等を行うため、平成7年3月から、住居衛生を巡る課題の検討を行ってきた。このうち、住まいにおける健康関連の指針の策定については、健康住宅関連基準策定専門部会において検討を行っている。

これまでに得られている知見について考慮した結果、ホルムアルデヒド、トルエン、キシレン、パラジクロロベンゼン、エチルベンゼン、スチレン、クロロピリホス及びフタル酸エステル等についての室内濃度指針値を、影響に基づいて以下のように設定している（表13）。

ここに示した指針値は、現状において入手可能な科学的知見に基づき、人がその化学物質の示された濃度以下の暴露を一生受けたとしても、健康への有害な影響を受けないであろうとの判断により設定された値である。これらは、今後集積される新たな知見や、それらに基づく国際的な評価作業の進捗に伴い、将来必要があれば変更され得るものであるとしている。これら物質の指針値は、いずれも長期間の暴露によって起こる毒性を指標として策定している。指針値の策定によって、室内空気汚染の低減化が促進され、快適で健康な室内空間が確保されることを期待する。ただし、ここで言う健康に影響が現れない値とは、確立された毒性評価指標によって求められた値であって、化学物質過敏症やシックハウス症候群のような疾病の定義式が定まっていないものを指すものではない。

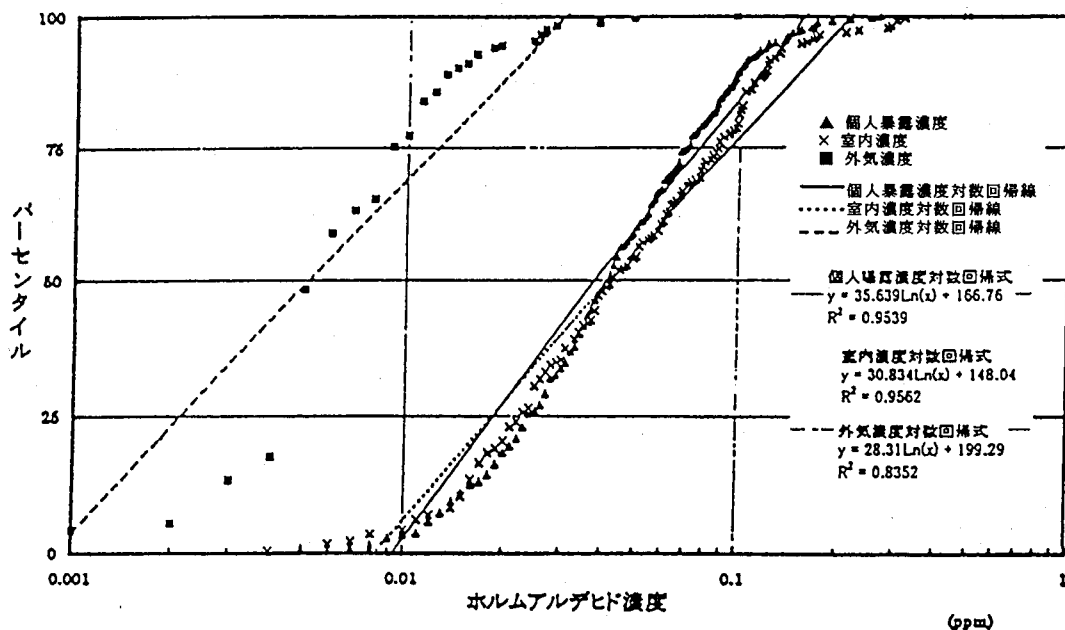


図11 ホルムアルデヒド個人曝露、室内及び外気濃度の累積度数分布（全測定値）

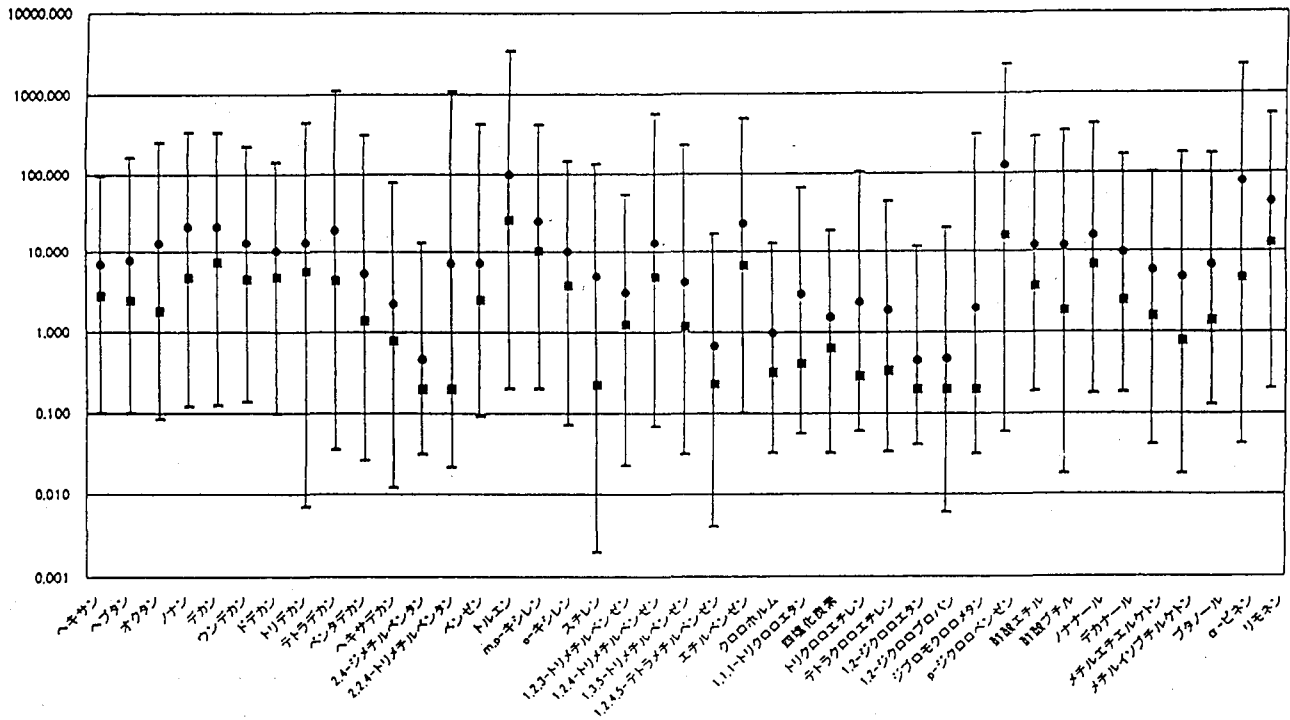


図12 室内揮発性有機化合物濃度の測定結果

表13 個別の揮発性有機化合物の指針値

揮発性有機化合物	毒性指標	室内濃度指針値	選定理由	設定日
ホルムアルデヒド	ヒト吸入暴露における鼻咽頭粘膜への刺激	100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.08ppm)		1997.6.13
トルエン	ヒト吸入暴露における神経行動機能及び生殖発生への影響	260 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.07ppm)	①②	2000.6.26
キシレン	妊娠ラット吸入暴露における出生児の中枢神経系発達への影響	870 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.20ppm)	①②	2000.6.26
パラジクロロベンゼン	ビーグル犬経口暴露における肝臓及び腎臓などへの影響	240 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.04ppm)	①②	2000.6.26
エチルベンゼン	マウス及びラット吸入暴露における肝臓及び腎臓への影響	3800 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.88ppm)	①②③	2000.12.15
スチレン	ラット吸入暴露における脳や肝臓への影響	220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.05ppm)	①②	2000.12.15
クロルピリホス	母ラット経口暴露における新生児の神経発達への影響及び新生児脳への形態学影響	1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.07ppb) 小児の場合は 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.007ppb)	④⑤	2000.12.15
フタル酸ジ-n-ブチル	母ラット経口暴露における新生児の生殖器の構造異常等の影響	220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.02ppm)	①③⑤	2000.12.15
テトラデカン	C ₈ -C ₁₆ 混合物のラット経口暴露における肝臓への影響	330 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.04ppm)	②⑥	2001.7.5
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	ラット経口暴露における精巣への病理組織学的影響	120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (7.6ppb)	③⑤	2001.7.5
ダイアジノン	ラット吸入暴露における血漿及び赤血球コリンエステラーゼ活性への影響	0.29 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.02ppb)	④⑤	2001.7.5
総揮発性有機化合物量 (TVOC)	国内の室内VOC実態調査の結果から、合理的に達成可能な限り低い範囲で決定	暫定目標値 400 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	①③	2000.12.15
アセトアルデヒド	ラットの経気道暴露における鼻腔臭覚上皮への影響	48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.03ppm)	①②	
フェノブカルブ	ラットの経口暴露におけるコリンエステラーゼ活性等への影響	33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (3.8ppb)	③⑤	

7.3 建物や資機材等から放散する化学物質の抑制

7.3.1 建物の資機材からの放散量の抑制

空气中化学物質の放散の第1は建築物に使用される資機材である。したがって、資機材からの放散量を抑えることが最も効果的である。既に合板やパーティクルボードにおいてはホルムアルデヒドの放散量の多いものから少ないもののランクが農林規格としてF₃~F₁までである。現在、国土交通省、文部科学省やその他の機関では放散量に関する規格の策定や空間の基準化の作業が行われている。

7.3.2 建物自体の室内空气中化学物質

建物自体の室内空气中の化学物質についても規格することが進んでいる。「住宅の品質確保の促進などに関する法律」が平成11年6月に制定された。この法律により、住宅品質の確保の促進、住宅購入者などの利益の保護及び住宅に係わる紛争の迅速かつ適正な解決を図ることを目的に制度などが設けられることとされている。新築の建物においては常に室内ガイドライン値以下でなければならない。また、品確法が平成13年に成立し、この規格を超えたものは規制されることになっている。しかしながら、本法律は制定されて日も浅く、不備が多く、消費者保護の立場から見守っていく必要がある。また、建築基準法の改正も行われ、室内空気質についての配慮が求められることに至っている。

7.4 住まいの中でできること

室内での揮発性化学物質の濃度を抑制する方法として厚生労働省が示したガイドラインは新築の建物や資機材からの放散を抑えるのに各企業に対して抑止力としては有効と思われる。しかしながら、住まいの空气中の化学物質は建物のほか、生活に伴って生活者がもちこんだ家具や家庭用品からの放散も非常に多いことは既に述べてきた。このことからすると、住まいの揮発性化学物質の濃度を減らすには化学物質を放散しやすい家具や家庭用品の購入を控えることと、同時に外気の取り入れによって濃度を薄める換気による方法がある程度取り除く原始的な方法しかない。その他にも、ベークアウト（建物全体を高温で揮発性物質を蒸散させる方法）や化学物質を放散する原因、資機材をリフォームによって変えるなどが提案されているが、コストをとめない、低減化の方策は少ない。

7.5 まとめ

室内空气中の化学物質は少ないことが望ましい。シックハウス症候群や化学物質過敏症の解説にはより詳細で緻密な研究の積み重ねが必要である。しかしながら、今まで述べてきたように、建物から放散される化学物質に

ついては、資機材中の化学物質を製造段階で抑制するしか方法はない。我々消費者ができることは、建物以外の家具、家庭用品等の消費剤の製品を選択することとその利用の仕方に注意を払うこと、あるいは空気を入れ換えることである。また、間接的には室内空气中化学物質に対して興味・関心をもち、行政施策に対して注文をつけることである。私は、行政施策を行う上での科学的根拠を明確にするために、何十万件という居住環境の空气中の化学物質のデータを基に国の研究機関の変換で行政に対して提案している。今後の新しい考え方の提案があれば、科学的情報をもとに、更にクリーンな室内空間を目指して研究する。

引用文献

- 1) Tesima R. : Hypersensitivity about Environmental Chemicals -Mainly about Food Allergy-. Buul. Natl. Inst. Health Sci., 119, 27-39 (2001)
- 2) Guadagni D. G., Buttery R. G., Okano S. and Burr H. K. : Additive effect of subthreshold concentrations of some organic compounds associated with food aromas. Nature, 200, 1288-1289 (1963)
- 3) Tosen A. A., Peter J. B. and Middleton F. M. : Odor thresholds of mixed organic chemicals. J. Water Pollut. Control Fed., 34, 7-14 (1962)
- 4) Melius J. et al. : Indoor air quality-the NIOSH experience, Ann. ACGIH : Evaluating office environmental problems. 10, 3-8 (1984)
- 5) Kirkbride J. : Health and Welfare Canada's Experience in Indoor Air Quality Investigation. 99-106. In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.5, Toronto (1990)
- 6) Finnegan M.J. et al. : The Sick Building Syndrome : Prevalence Studies. Br.Med. J., 289, 1573-1575 (1984)
- 7) Burge S. et al. : Sick building syndrome : a study of 4373 office workers. Ann.Occup.Hyg., 31, 493-504 (1987)
- 8) Skov P. et al. : The Sick Building Syndrome in the Office Environment : The Danish Town Hall Study. Environ.Int., 13, 339-349 (1987)
- 9) Molhave L. et al. : Human Reactions to Low Concentrations of Volatile Organic Compounds. Environ.Int., 12, 157-176 (1986)
- 10) Molhave L. : The Sick Building Syndrome (SBS) Caused by Exposures to Volatile Organic Compounds (VOCs). 1-18. In : Weekes D. M. and R. B. Gammage (Eds.). Proceedings of The Indoor Air Quality International Symposium : The Practitioner's Approach to Indoor Air Quality Investigations. American

- Industrial Hygiene Association. Akron, OH. (1990)
- 11) Zweers T. et al. : Health and Indoor Climate Complaints of 7043 Office Workers in 61 Buildings in the Netherlands. *Indoor Air*, 2, 127-136 (1992)
 - 12) Turiel I. et al. : The Effects of Reduced Ventilation on Indoor Air Quality in an Office Building. *Atmos. Environ.*, 17, 51-64 (1983)
 - 13) U. S. Environmental Protection Agency. : Indoor air quality and work environment study. EPA headquarters building, vol.1 : Employee survey-office of administration and resource management. Washington. D. C. (1989)
 - 14) U. S. Environmental Protection Agency : Indoor air quality and work environment study, EPA headquarters building, Vol.2 and Supplement : Results of indoor air environmental monitoring study. Office of Administration and Resource Management. Washington D. C. (1990)
 - 15) Fideler A.T. et al. : Library of congress indoor air quality and work environment study : Health symptoms and comfort concerns. 603-608, In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.4, Toronto (1990)
 - 16) Nelson C. J. et al. : Environmental protection agency indoor air quality and work environment study : Health symptoms and comfort concerns. 615-620, In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.4, Toronto (1990)
 - 17) Mendell M. J. : Risk factors for work-related symptoms in Northern California office workers. Ph. D. thesis, Lawrence Berkeley Laboratory, LBL-32636 UC-350 (1991)
 - 18) Norback D. et al. : Indoor Air Quality and Personal Factors Related to the Sick Building Syndrome. *Scand. J. Work Environ. Health*, 16, 121-128 (1990)
 - 19) T. Godish : Sick buildings definition, diagnosis and mitigation, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, U.S.A. (1996)
 - 20) Molhave L. : Volatile Organic Compounds, Indoor Air Quality and Health. 15-33. In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.5, Toronto (1990)
 - 21) Berglund B. et al. : Characterization of Indoor Air Quality and Sick Buildings. *ASHRAE Trans.* 90, Pt.1, 1045-1055 (1984)
 - 22) Abraham M. H. : The potency of gases and vapors : QSARs - Anesthesia, sensory irritation, and odor. In : Gammage, R. B. and Berven, B. A. (ed.) *Indoor air and Human health*. 2nd ed. Lewis Pub., 67-91 (1996)
 - 23) Abraham M. H. : The potency of gases and vapors : QSARs-Anesthesia, sensory irritation, and odor. In : Gammage, R. B. and Berven, B. A. (ed.) *Indoor air and Human health*. 2nd ed. Lewis Pub., 67-91 (1996)
 - 24) Hudnell K. et al. : Time Course of Odor and Irritation Effects in Humans Exposed to a Mixture of 22 Volatile Organic Compounds. 567-572. In : proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.1, Helsinki (1993)
 - 25) Hudnell H. K. et al. : Odour and Irritation Effects of a Volatile Organic Compound Mixture. 263-268 In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.1, Toronto (1990)
 - 26) Cain W. S. et al. : Irritation and Odor from Formaldehyde : Chamber Studies. 126-137 In : Proceedings of IAQ '86 : Managing Indoor Air for Health and Energy Conservation. American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, Atlanta (1986)
 - 27) Cain W. S. and C. L. Murphy : Interaction Between Chemoreceptive Modalities of Odor and Irritation. *Nature*, 284, 254-257 (1980)
 - 28) Cometto-Muniz J. E. and Cain W. S. : Influence of airborne contaminants on olfaction and the common chemical sense. In : Gatchell T. V. et al. (ed.) *Smell and taste in health and disease*, New York, Raven Press, 765-785 (1991)
 - 29) Cometto-Muniz J. E. and Cain W. S. : Sensory irritation. Relation to indoor air pollution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 641, 137-151 (1992)
 - 30) Abraham M. H., Nielsen G. D. and Alarie Y. : *J. Pharm. Sci.*, 83, 680-688 (1994)
 - 31) Cometto-Muniz J. E. and Cain W. S. : *Physiol. Behav.*, 48, 719-725 (1990)
 - 32) Cometto-Muniz J. E. and Cain W. S. : *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39, 983-989 (1991)
 - 33) Laska M. and Hudson R. : A comparison of the detection thresholds of odour mixtures and their components. *Chem. Senses*, 16, 651-662 (1991)
 - 34) Patterson M. Q., Stevens J. C., Cain W. S. and Cometto-Muniz J. E. : Detection thresholds for an olfactory mixture and its three constituent compounds. *Chem. Senses*, 18, 723-734 (1993)
 - 35) Anderson I. : Sick buildings : physical and psychosocial features, effects on humans and preventative measures. 77-81 In : Proceedings of the Third International Conference on Indoor Air Quality and

- Climate. Vol.6, Stockholm (1986)
- 36) Akimenko V. V. et al. : The sick building syndrome. 87-97 In : Proceedings of the Third International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.6, Stockholm (1986)
- 37) Melius J. et.al. : Indoor air quality-The NIOSH experience. Ann. ACGIH : Evaluating office environmental problems. 10, 3-8 (1984)
- 38) Godish T. : HVAC System Materials as a Potential Source of Contaminants and Cause of Symptoms in a School Building. 208-217 In : Proceedings of the Eleventh International Conference of the Clean Air Society of Australia and New Zealand. Brisbane, Australia (1992)
- 39) Stenberg B. : Skin Complaints in Buildings with Indoor Climate Problems. Environ.Int., 15, 81-84 (1989)
- 40) World Health Organization. : Indoor Air Pollutants, Exposure and Health Effects Assessment. Euro-Reports and Studies No.78, World Health Organization Regional Office for Europe. Copenhagen (1983)
- 41) Molina C. et.al. : Sick building syndrome-A practical guide. Report No.4, Commission of the European Communities, Brussels-Luxembourg (1989)
- 42) American Thoracic Society. : Environmental controls and lung disease. Report of the ATS Workshop on Environmental Controls and Lung Disease. Santa Fe, NM, March 24-26, 1988. Am. Rev. Respir. Dis., 142, 915-939 (1990)
- 43) Hodgson M. J. : Clinical diagnosis and management of building-related illness and the sick building syndrome. 593-606 In : Cone J. E. and M. J. Hodgson (Eds.) Problem buildings : Building-associated illness and the sick building syndrome. Occupational Medicine : State of the Art Reviews. Hanley and Belfus, Inc., Philadelphia (1989)
- 44) Molhave L. et al. : Subjective Reactions to Volatile Organic Compounds as Air Pollutants. Atmos.Environ., 25A, 1283-1293 (1989)
- 45) Molhave L. et al. : Human response to Different Mixtures of Volatile Organic Compounds. 555-560 In : Proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Vol.1, Helsinki (1993)
- 46) Otto D.A et al. : Neurotoxic Effects of Controlled Exposure to a Complex Mixture of Volatile Organic Compounds."U.S.Environmental Protection Agency-Health Effects Research Laboratory. EPA/600/1-90/00/. (1990)
- 47) Otto D.A. et al. : Neurobehavioral and Sensory Irritant Effects of Controlled Exposure to a Complex Mixture of Volatile Organic Compounds. Neurotox.Teratol, 12, 1-4 (1990)
- 48) Hudnell H. K. et al. : Exposure of Humans to a Volatile Organic Mixture. II. sensory. Arch. Environ. Health, 47, 31-38 (1992)
- 49) Otto D. A. et al. : Exposure of Humans to a Volatile Organic Mixture I.Behavioral Assessment. Arch. Environ. Health, 47, 23-30 (1992)
- 50) Koren H. S. et al. : Exposure of Humans to a Volatile Organic Mixture III. Inflammatory Response. Arch. Environ. Health., 47, 39-43 (1992)
- 51) Wilken-Jnesen, K. and Grabesen, S. (eds.) : Atlas of moulds in Europe causing respiratory allergy. Foundation for Allergy Research in Europe, ASK Publishing, Copenhagen (1984)
- 52) Skov P. et al. : Influence of Indoor Air Climate on the Sick Building Syndrome in an Office Environment. Scand. J. Work Environ. Health, 16, 367-371 (1990)
- 53) Hodgson M. J. et al. : Sick Building Symptoms, Work Stress, and Environmental Measures. 47-56 In : Proceedings of IAQ '92 : Environments for people. American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, Atlanta (1992)
- 54) Ritchie I. M. and R. H. Lehnen : Formaldehyde-Related Health Complaints of Residents Living in Mobile and Conventional Houses. Am. J. Pub. Health, 77, 323-328 (1987)
- 55) Dally K. A. et al. : Formaldehyde Exposure in Nonoccupational Environments Arch. Environ. Health, 33, 277-284 (1981)
- 56) Ritchie I. M. and R. H. Lehnen. : An Analysis of Formaldehyde Concentrations in Mobile and Conventional Homes. J. Environ. Health, 47, 300-305 (1985)
- 57) Hanrahan L. P. et al. : Formaldehyde Concentrations in Wisconsin Mobile Homes. JAPCA, 35, 1164-1167 (1985)
- 58) Anderson I. et al. : Indoor Air Pollution Due to Chipboard Used as a Construction Material. Atmos. Environ., 9, 1121-1127 (1975)
- 59) Syrotynski S. : Prevalence of Formaldehyde Concentrations in Residential Settings. 127-136 In : Wakinshaw D.S.(Ed.) Transactions : Indoor Air Quality in Cold Climates. Air Pollution Control Association. Pittsburgh (1985)
- 60) Godish T. : Formaldehyde Sources and Levels. Comments Toxicol., 2, 115-134 (1988)
- 61) Sundell J. et al. : Volatile Organic Compounds in

- Ventilating Air in Buildings at Different Sampling Points in the Building and their Relationship with the Prevalence of Occupant Symptoms. *Indoor Air*, 3, 82-92 (1993)
- 62) World Health Organization. : Air Quality Guidelines for Europe. World Health Organization Regional Publications European Series No.23, Copenhagen (1987)
- 63) Ahlstrom R. and B. Berglund. : Odor Interaction Between Formaldehyde and The Indoor Air of a Sick Building. 461-466 In : Proceedings of The Third International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Vol.3, Stockholm (1984)
- 64) Ahlstrom R. et al. : Formaldehyde Odor and Its Interaction with the Air of a Sick Building. *Environ. Int.*, 12, 289-295 (1986)
- 65) Prah J. D. et al. : Pulmonary, Respiratory, and Irritant Effects of Exposure to a Mixture of VOCs at Three Concentrations in Young Men. 607-612 In : proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Vol.1, Helsinki (1993)
- 66) Otto D. et al. : Neurobehavioral and Subjective Reactions of Young Men and Women to a Complex Mixture of Volatile Organic Compounds. 59-64 In : Proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Vol.1, Helsinki (1993)
- 67) Larsen T. O. and Frisvad J. C. : Production of volatiles and presence of Mycotoxins in conidia of common indoor *Penicillia* and *Aspergillii*. In : Samson, R. A. (Ed.) *Air Quality Monographs vol.2, Health Implications of Fungi in Indoor Environments*. Elsevier, 251-279 (1994)
- 68) Wessen B. and Schoeps K.-O. : Microbial volatile organic compounds-what substances can be found in sick buildings? *Analyst*, 121, 1203-1205 (1996)
- 69) Whillans F. D. and Lamont G. S. : Fungal volatile metabolites released into indoor air environments : variation with fungal species and growth media. In : Morawska, L. (eds.) *Indoor air : an integrated approach*. Elsevier Science, Oxford, 47-50 (1995)
- 70) Spengler J. D. and K. Sexton : Indoor air pollutants, exposure and health perspective. *Science*, 221, 9-17 (1983)
- 71) World Health Organization : Indoor air quality research. Euro-Reports and Studies No.103, World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen (1984)
- 72) Reed C. E. and R. G. Toconley : Asthma-Classification and Pathogenesis. 811-831 In : Middleton E. et al. (Eds.) *Allergy : Principles and Practice*. 2nd ed. C. V. Mosby, St. Louis, MO. (1983)
- 73) Imperato P. J. : Legionellosis and the Indoor Environment. In : Proceedings Symposium Health Aspects of Indoor Air Pollution. *Bulletin New York Acad. Med.*, 57, 922-935 (1981)
- 74) Muraca P. W. et al. : Legionnaires' Disease in the Work Environment : Implications for Environmental Health. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 49, 584-590 (1988)
- 75) Rosmini F. et al. : Febrile Illness in Successive Cohorts of Tourists at a Hotel on the Italian Adriatic Coasts : Evidence for a Persistent Focus of *Legionella* Infection. *Am. J. Epidemiol.*, 119, 124-134 (1984)
- 76) Grist N. R. et al. : Legionnaires' Disease and Traveller. *Ann.Int.Med.*, 90, 563-564 (1979)
- 77) Best M. et al. : Legionellaceae in the Hospital Water Supply : Epidemiological Link with Disease and Evaluation of a Method for Control of Nosocomial Legionnaires' Disease and Pittsburgh Pneumonia Agent. *Lancet.*, 2, 307-310 (1983)
- 78) Fisher-Hoch S. P. et al. : Investigation and Control of an Outbreak of Legionnaires' Disease in a District General Hospital. *Lancet.*, 1, 932-936 (1983)
- 79) Witherell L. E. et al. : *Legionella* in Cooling Towers. *J. Environ. Health*, 49, 134-139 (1986)
- 80) Tukki A. et al. : *Legionella* in Cooling Tower and Humidifier Systems : The Effects of Temperature and Nutrient Concentrations. 547-549 In : Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate. Vol.4, Toronto (1990)
- 81) Melius J. et al. : Indoor Air Quality-The NIOSH Experience. *Ann.ACGIH : Evaluating Office Environmental Problems.*, 10, 3-8 (1984)
- 82) Wallingford K.M. and J.Carpenter. : Field Experience Overview : Investigating Sources of Indoor Air Quality Problems in Office Buildings. 448-453 In : Proceedings IA Q '86 : Managing Indoor Air for Health and Energy Conservation. American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, Atlanta (1986)
- 83) Seitz T. A. : NIOSH Indoor Air Quality Investigations 1971-1988. 163-171 In : Weekes. D. M. and R. B. Gammage (Eds.) *Proceedings Indoor Air Quality International Symposium : Practitioner's Approach to Indoor Air Quality Investigations*. American Industrial Hygiene Association, Akron, OH. (1990)
- 84) Banaszak E. F. et al. : Hypersensitivity Pneumonitis Due to Contamination of an Air-Conditioner. *New Engl. J. Med.*, 283, 271-276 (1970)
- 85) Patterson R. et al. : Hypersensitivity Lung Disease

- Presumptively Due to Cephalosporium in Homes Contaminated by Sewage Flooding or by Humidifier Water. *J. Aller. Clin. Immunol.*, 68, 128-132 (1981)
- 86) Bernstein R. S. et al. : Exposures to Respirable Airborne Penicillium from a Contaminated Ventilation System : Clinical, Environmental, and Epidemiological Aspects. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 44, 161-169 (1983)
- 87) Kohler P. F. et al. : Humidifier Lung : Hypersensitivity Pneumonitis Related to Thermotolerant Bacterial Aerosols. *Chest. Suppl.*, 69, 294-296 (1976)
- 88) Morey P. R. et al. : Environmental Studies in Moldy Office Buildings : Biological Agents, Sources, Preventative Measures. *Ann. ACGIH : Evaluating Office Environmental Problems.*, 10, 21-36 (1984)
- 89) Solley G. O. and R. E. Hyatt. : Hypersensitivity Pneumonitis Induced by Penicillium Species. *J. Aller. and Clin. Immunol.*, 65, 65-70 (1980)
- 90) Glick T. H. et al. : Pontiac Fever. An Epidemic of Unknown Etiology in a Health Department. I. Clinical and Epidemiological Aspects. *Am. J. Epidemiol.*, 107, 149-160 (1978)
- 91) Kaufmann A. F. et al. : Pontiac Fever : Isolation of the Etiologic Agent (*Legionella Pneumophila*) and Demonstration of its Mode of Transmission. *Am. J. Epidemiol.*, 114, 337-347 (1981)
- 92) Edwards J. H. : Microbial and Immunological Investigations and Remedial Action After an Outbreak of Humidifier Fever. *Br. J. Ind. Med.*, 37, 55-62 (1980)
- 93) Rylander R. et al. : Humidifier Fever and Endotoxin Exposure. *Clin. Aller.*, 8, 511-516 (1980)
- 94) Black D. W. et al. : Environmental illness : a controlled study of 26 subjects with '20th century disease. *J. A. M. A.*, 264, 3166-3170 (1990)
- 95) Ashford N. A. and C.S. Miller : Chemical exposures. Low levels and high stakes. *Van Nostrand Reinhold. New York.* (1991)
- 96) Bell I.R. et al. : An olfactory-limbic model of multiple chemical sensitivity syndrome : possible relationships to kindling and affective spectrum disorders. *Biol. Psych.*, 32, 218-242 (1992)
- 97) Brodsky C. M. : Allergic to Everything : a medical subculture. *Psychosomatics*, 24, 731-742 (1983)
- 98) Stewart D. E. and J. Raskin. : Psychiatric assessment of patients with '20th century disease (total allergy syndrome). *Can. Med. Assoc. J.*, 133, 1001-1006 (1985)
- 99) Terr A. I. : Environmental illness. A clinical review of 50 cases. *Arch. Int. Med.*, 146, 145-149 (1986)
- 100) Rosenberg S. J. et al. : Personality styles of patients asserting environmental illness. *J. Occup. Med.*, 32, 679-681 (1990)
- 101) California Medical Association Scientific Board. Task Force on Clinical Ecology. : Clinical ecology-a critical appraisal. *West. J. Med.*, 144, 239-245 (1986)
- 102) Ontario Ministry of Health. : Report of the ad hoc advisory panel on environmental hyper-sensitivity disorders. Toronto (1985)
- 103) Executive Committee of the American Academy of Allergy and Immunology. : Clinical ecology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78, 269-271 (1986)
- 104) Cullen M. R. : The worker with multiple chemical sensitivity. An Overview. *State Art Rev. Occup. Med.*, 2, 655-661 (1987)
- 105) American College of Physician : Clinical Ecology-Position Paper. *Ann. Intern. Med.*, 111, 168-178 (1989)
- 106) Council on Scientific Affairs, AMA. Council Report. Clinical Ecology. *JAMA*, 268, 3465-3467 (1992)
- 107) Brod B. A. : Multiple chemical sensitivity syndrome : A review. *Am. J. Contact Dermatitis*, 7, 202-211 (1996)
- 108) Bell I. R. et al. : Neural sensitization and physiological markers in multiple chemical sensitivity. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.*, 24, 539-547 (1996)
- 109) Morrow L. A. et al. : A distinct pattern of personality disturbance following exposure to mixtures of organic solvents. *J. Occup. Med.*, 31, 743-746 (1989)
- 110) Simon G. F. et al. : Allergic to life : psychological factors in environmental illness. *Amer. J. Psych.*, 147, 901-906 (1990)
- 111) Bell I. R. et al. : Self-reported illness from chemical odors in young adults without clinical syndromes or occupational exposures. *Arch. Environ. Health*, 48, 6-13 (1993) *Arch. Environ. Health*, 47, 76-87 (1992)
- 112) Doty R. L. : Olfaction and multiple chemical sensitivity. *Toxicol. Ind. Health.*, 10 (4-5), 359-368 (1994)
- 113) Doty R. L., Deems D. A., Frye R., Pelberg R. and Shapiro A. : Olfactory sensitivity, nasal resistance, and autonomic function in patient with multiple chemical sensitivities. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.*, 114, 1422-1427 (1986)
- 114) Hummel T., Roscher S., Jaumann M. P. and Kobal G. : Intranasal chemoreception in patients with multiple chemical sensitivities : a double-blind investigation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 24 (1pt2), S79-86 (1996)
- 115) Harrison R. : Multiple chemical sensitivity. 752-758, *Occupational & Environmental Medicine* 2nd ed., Prentice-Hall International, Inc.
- 116) 平成10年度環境庁委託業務結果報告書 環境中微

- 量化学物質影響調査研究「本態性多種化学物質過敏状態の調査研究」(財)日本公衆衛生協会
- 117) Meggs W.J. and C.H.Cleveland. : Rhinolaryngoscopic examination of patients with the multiple chemical sensitivity syndrome. *Arch.Environ.Health*, 48, 14-18 (1993)
- 118) 難波龍人：環境問題と瞳孔，神眼，10 (2)，137 - 145 (1993)
- 119) 宮田幹夫，難波龍人：多種化学物質過敏症 (multiple Chemical sensitivity) の臨床，自律神経，33, 257-261 (1997)
- 120) Fiedler N. et al. : Chemical sensitivity and the Gulf war : Department of Veterans Affairs Research Center in basic and clinical science studies of environmental hazards. *Regulatory Toxicol.Pharmacol.*, 24, S129-S138 (1996)
- 121) Ziem G. and McTamney J. : Profile of patients with chemical injury and sensitivity. *Environ. Health Perspect.*, 105, 417-436 (1997)
- 122) Overstreet DH. et al. : Potential animal model of multiple chemical sensitivity with cholinergic supersensitivity. *Toxicology*, 111, 119-134 (1996)
- 123) Goffin V., Pierard-Franchimont C. and Picard G. E. : Sensitive skin and stratum corneum reactivity to household cleaning products. *Contact Dermatitis*, 34, 81-85 (1996)
- 124) Schluenderberg A. et al. : Chronic fatigue syndrome research-Definition and medical outcome assessment. *Ann.Intern.Med.*, 117, 325-331 (1992)
- 125) Buchwald D. and Garrity D. : Comparison of patients with chronic fatigue syndrome (CFS), fibromyalgia (FM) and multiple chemical sensitivities. *Arch. Int.Med.*, 154, 2049-2053 (1994)
- 126) Chestes Ac. and Levine P. H. : The natural history of CFS associated with SBS. Research Conference of American Association for CFS. Oct. 7-10, Fort Lauderdale, Florida (1994)
- 127) 宮田幹夫：化学物質過敏症の臨床症例，平成9年度厚生科学研究「化学物質のクライシスマネジメントに関する研究」-化学物質過敏症の研究・調査-総括報告書
- 128) 辻沢宇彦：Dallas 環境医学研究所報告。神経眼科 8, 163-170 (1991)
- 129) U. F. Haustein and V. Ziegler : Environmentally induced systemic sclerosis-like disorders. *Inte. J. Dermatology*, 24, 147-151 (1985)
- 130) V. S. Byers, A. S.Levin, D.M.Ozonoff and R. W. Baldwin : Association between clinical symptoms and lymphocyte abnormalities in a population with chronic domestic exposure and a high incidence of leukaemia. *Cancer Immunol. Immunother.*, 27, 77-81 (1988)
- 131) Meggs W. J. and C. H.Cleveland. : Rhinolaryngoscopic examination of patients with the multiple chemical sensitivity syndrom. *Arch. Environ. Health*, 48, 14-18 (1993)
- 132) C. M. Ryan, L. A. Morrow and M. Hodgson : Cacosmia and neurobehavioral dysfunction associated with occupational exposure to mixtures of organic solvents. *Am. J. Psychiatry*, 145, 1442-1445 (1988)
- 133) D. H. Linz, P. L. de Garmo, W. E. Motron, A. N. Wiens, B. M. Coull and R. A.Maricle : Organic solvent-induced encephalopathy in industrial painters. *J. Occup. Med.*, 28, 119-125 (1986)
- 134) G. J. Bombassei and A.A.Kaplan : The association between hydrocarbon exposure and anti-glomerular basement membrane antibody-mediated disease (Goodpasture's syndrome). *Am. J. Ind. Med.*, 21, 141-153 (1992)
- 135) D. Norback et al. : Asthmatic symptoms and volatile organic compounds, formaldehyde, and carbon dioxide in dwellings. *Occup. Environ. Med.*, 52, 388-395 (1995)
- 136) R. E. Madison, A. Broughton and J. D. Thrasher : Immunologic biomarkers associated with an acute exposure to exothermic byproducts of a ureaformaldehyde spill. *Environ. Health Perspectives*, 94, 219-223 (1991)
- 137) J. D. Thrasher, R. Madison, A. Broughton and Z. Gard : Building-related illness and antibodies to albumin conjugates of formaldehyde, toluene diisocyanate, and trimellitic anhydride. *Am. J. Ind. Med.*, 15, 187-195 (1989)
- 138) M. B. Lax : P. K. Henneberger : *Arch. Environ. Health*, 50, 425 (1995)
- 139) N. Fiedler, C. Maccia and H.Kipen : Evaluation of chemically sensitive patients. *J. Occup. Med.*, 34, 529-538 (1992)
- 140) P. R. McConnachie and A. C. Zahalsky : Immune alterations in humans exposed to the termiticide technical chlordane. *Arch. Environ. Health*, 47, 295-301 (1992)
- 141) A. L. Davidoff and P. M. Keyl : Development of multiple chemical sensitivities in laborers after acute gasoline fume exposure in an underground tunneling operation. *Arch. Environ. Health*, 53, 183-189 (1998)
- 142) W. J. Meggs : Neurogenic inflammation and sensitivity to environmental chemicals. *Environ. Health Perspectives*, 101, 234-238 (1993)

- 143) Lohmann K., Prohl A. and Schwarz E. : Multiple chemical sensitivity disorder in patients with neurotoxic illnesses (see comments). Gesundheitswesen, 58, 322-331 (1996) (in German)

トキシコジノミクス

—リバーズ・トキシコロジーの誕生とトキシコロジーにおける新しいパラダイムの展開—

平林 容子[#]・井上 達

Toxicogenomics - a new paradigm of toxicology and birth of reverse toxicology

Yoko Hirabayashi[#] and Tohru Inoue

Toxicogenomics is, similar to other genome science fields, based on DNA microarray and/or DNA chip technologies, which has enabled a large number of gene expressions, thus, have been applied to such functional genomics as pharmacogenomics, oncogenomics, proteomics, metabonomics, etc. Toxicogenomics has advantages such as deducing the number of test animals and the test period, and adopts simpler techniques using new biomarkers. What toxicogenomics can offer to conventional toxicology is given herein.

Keywords: toxicogenomics, reverse toxicology, microarray, DNA chip, proteomics

1. はじめに

マイクロアレイやDNAチップ (Gene Chip[®]) による遺伝子の大量発現技術の試行的普及がすすんでいる。それらの“ゲノム発現情報とリンクして包括的に把握される比較的大容量の分子生物学的情報”は、-omicsの接尾語を付してジノミクス、プロテオミクス、メタボノミクス、などと呼称されるあたらしい生物学領域を形成しつつあり、それらのトキシコロジーへの適用がトキシコジノミクスである。米国の国立衛生研究所 (NIH: National Institutes of Health) の1分野として、国立環境衛生科学研究所 (NIEHS: National Institute of Environmental Health Sciences) に新しく附置された国立トキシコジノミクスセンター (NCT: National Center for Toxicogenomics) は、その設立趣旨の中で、トキシコジノミクスに対して、環境ストレスや環境化学物質の生体影響に関わるゲノムの働きを明らかにするものとし、同センターは、遺伝子の情報、その発現、ならびにそれらの情報のデータベースに関する諸研究を総合することによって「ゲノムと環境」の相互作用の理解を可能とすることを役割としている^{1) 脚注1}、と述べている。

分子生物学の発展は、生物学の課題に対して、帰納的に背景機構を解析理解する方法と、演繹的に蓋然的な推

論をする方法との双方向的戦略の可能性を切り開いた。トキシコジノミクスの技術的基礎はゲノムの大容量の発現情報処理にあり、後で述べるようなマイクロアレイ法やDNAチップ法の開発によって技術的に可能となった。これらの方法は、ヒトの疾病に対する特異性や感受性などの人類遺伝学領域での応用、薬物とヒトの相互作用に関する創薬面からの応用ならびにそれらの個別治療への応用、さらには腫瘍の病理診断としてのパソジノミクスとしての応用、など幅広い領域で、双方向性の新しい科学の世界を展開しようとしている。

トキシコジノミクスも、これらのゲノム戦略のトキシコロジーへの適用に他ならないので、しばしば分子遺伝学やファーマコジノミクスなどの延長線上で理解されがちである。しかしそこに描き出される科学の世界は、既知の遺伝子の発現を見るにとどまらぬと言う意味にお

¹ Toxicogenomics is a new scientific field that elucidates how the entire genome is involved in biological responses of organisms exposed to environmental toxicants/stressors. Toxicogenomics combines information from studies of genomic-scale mRNA profiling (by microarray analysis), cell-wide or tissue-wide protein profiling (proteomics), genetic susceptibility, and computational models to understand the roles of gene-environment interactions in disease. The National Center for Toxicogenomics (NCT) is a coordinated, multi-disciplinary research program of the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), National Institutes of Health (NIH). The goal of this document is to specify the mission, goals and operational scheme of the NCT. <http://www.niehs.nih.gov/nct/concept.htm> 参照.

[#] To whom correspondence should be addressed: Cellular & Molecular Toxicology Division, Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyohga, Setagayaku, Tokyo, 158-8501, Japan; phone 03-3700-9639, facsimile 03-3700-9647, e-mail yokohira@nihs.go.jp

いて、いわば既知から未知を描きだす、「応用」を越えた、文字通りボーダーレスな生命観の中に位置づけられる新しいトキシコロジーの様式である。そしてトキシコジノミクスは、技術の変化が研究の進め方そのものに影響を与えるという意味で、単なる技術論ではなく方法論に他ならない。本総説の筆者の一人、平林は、毒性部機器試験室長を務めるが、ここではその立場から、以上のようなトキシコジノミクスの登場が、「新しい時代の機器試験」としてトキシコロジーにどんな展望を与えるかについての検討をもって本稿の目的としたい。

2. トキシコジノミクスの概観

トキシコジノミクスは、始まったばかりの新しい方法論である。1999年9月、米国のVirginia州Warrenton郊外の瀟洒な別荘でニューヨーク科学アカデミー (New York Academy of Sciences) 主催の「来世紀の毒性学」 (“Toxicology for the Next Millennium”) と称する非公開のワークショップ²⁾ が行われた。Affymetrix社のJing-Shan Huや、Large Scale Proteomics社のSandra Steinerといった若手の技術者が、当時すでに佳境にあったファーマコジノミクスやプロテオミクスに関する目を見張るような成果の一端を紹介し、さらにその将来について活き活きと語ったとき、その発表要旨にトキシコジノミクスの言葉はなかった。Nature Geneticsの特集に、Brown & BotsteinのDNAマイクロアレイの総説³⁾ や、Debouck & Goodfellowの医薬品開発への応用の解説⁴⁾ が掲載されて間もない頃で、この時、データの説明でいわばトキシコジノミクスとも云うべきといったささやかな意味で「トキシコジノミクスへの挑戦」 (“the advent of toxicogenomics”) と云う表現が将来の可能性として使われたのみであった。

1) DNA マイクロアレイ

トキシコジノミクスでは、他のゲノムサイエンスと同様、DNAマイクロアレイやDNAチップを基本技術として用いる⁵⁾⁻⁷⁾。DNAマイクロアレイは、スタンフォード大学のBrownらによる高密度集積アレイ解析法³⁾ を基礎としており、cDNAを、スポットターを用いてガラス基盤上に固定し、これに組織から抽出したmRNAをcDNAに転写させると同時に蛍光標識してハイブリダイズさせる⁸⁾⁻⁹⁾。他方、DNAチップは、オリゴヌクレオチドプローブを、光リトグラフィ^{脚注ii)}を用いて合成したもので、これに組織材料由来のmRNAをcRNAに変換してハイブリダイズする¹⁰⁾。もとより、DNAマイクロアレイ法は、大量の遺伝子発現の観察を可能とした点に意義があり、すでに種々の方面に応用されるに至っている。転写因子を検索するトランスクリプトーム⁷⁾、薬物代謝酵素関連の遺伝子の検索や、Single Nucleotide

Polymorphism (SNP) に関わる薬物感受性の検索を対象としたファーマコジノミクス¹¹⁾⁻¹³⁾、病理診断に関わるパソジノミクス (pathogenomics)¹⁴⁾⁻¹⁶⁾、変異原性のサーベイに関わるミュータジノミクス (mutagenomics)¹⁷⁾⁻¹⁸⁾、更に治療の予後診断に関わる予知医学的応用¹⁹⁾⁻²¹⁾、などは、その応用の一部である。殊にDNAチップの方は、ハイブリダイズした遺伝子の塩基配列の解読が可能であるから、先のSNPの選別にも力を発揮し、そうした情報の蓄積は、いわゆる個別創薬 (a tailor-made pharmaceutical)、個別医療への未来を切り開く原動力となっている。

このようなマイクロアレイ技術やDNAチップ技術をとキシコロジーに適用するのがトキシコジノミクスであるが、注目すべき点は、その結果従来の帰納的解析 (inductive analysis) にとどまらず、演繹的 (deductive) に未来予測が可能となった点にある。ここで云う演繹的毒性学 (“deductive toxicology”) は、結果的には後述するリバース・トキシコロジー (“reverse toxicology”) を意味する。その予見性に対して、個体の同定を意図するDNAフィンガープリント (finger print) からの演繹で、相当規模のデータベースが形成されないとリバース・トキシコロジーが成立し得ないものとの解説がしばしば行われるが、後述の通り、これは事の本質に関わる誤解である。また遺伝子発現に変化を及ぼさないような急性変化や様々のトキシコロジーの表現型が網羅的に把握できるかの如何は、今後の試行に待つところが無いわけではないが、これまで予知できなかった背景が把握される原理が明らかになりつつあるだけに、これに立脚して浮上してくる新たなバイオマーカーの発掘への期待は大きい²²⁾。

2) トキシコロジーの領域とトキシコジノミクス

トキシコジノミクスについて概観する前に、トキシコロジーの領域と構造を理解し、再認識しておくことは意義をなしとしない。それは、トキシコジノミクスであらたに見えてくる世界を分析する際に大きな役割を果たすことになる。トキシコロジーの分野に放射線生物学という領域がある。これは、物理学と生物学の複合領域を形成していて、物理学の一部でもなければ生物学の一部で

ii) 光リトグラフィ (photo-lithograph): 半導体製造技術においては、光を利用して平面基盤にパターンを転写する写真製版技術を意味する。ここでは、一連の型 (フォトリソグラフィックマスク) を用いてチップの露光部位を順次決定し、光照射によるその部位の活性化を利用した特異的な化学合成を行うことで、プローブとなるオリゴヌクレオチドを合成する手段として使われている。

もない。そこでトキシコロジー全般についてその構造を見ると、このものは化学物質や物理現象の基礎としての化学や物理学と、生物学や医学・獣医学との間の学際的境界領域である。獣・医・薬の領域の生化学や薬理学では、トキシコロジーを構成分野として研究対象とすることが少なくないが、実際にトキシコロジーに携わる研究者・技術者の幅は更に広く、理学、農学、工学、薬学、医・獣医学、ひいては、環境科学や「安全科学」と呼ばれる諸領域にも密接に関連している。結果として各国ともトキシコロジーを複合科学として位置づけ、環境科学やライフサイエンスの中に学部組織として取り扱う方向をとりつつある²³⁾。

トキシコロジーの学際性についてももう少し注目してみよう。図1は、生体と物質の相互作用を、横軸を反応の時間軸にとって種々の例を列挙したものである。しかし実際には、横軸は標的物質の質量と考えても良い。化学物質や放射線の生体作用は、物理的・反応過程から、化学的、さらに生物学的に種々の階層の反応がこれに応じた時間軸あるいは質量軸に沿って進行しているものと考えられる。ここでは、たとえば生理学的反応と毒性学的な反応の間に関与する分子群が、共有された関係にあるものと理解される。光や酸素の役割をそれぞれ取り上げてみよう。“光”無くして動物に視覚器は発達しないが、光は斯くの如く生物に必須でありつゝ、同時に、単独でも化学物質との相互作用としてでも、光毒性を惹き起こす。呼吸によって得られる酸素の一部はいわゆる活性酸素種 (ROS: Reactive oxygen species) を生成し酸化ストレスを引き起こすが、同じROSそのものが、細胞内シ

グナル伝達にも役割を果たしている²⁴⁾。生体の発生段階には、神経系をはじめとして多くの組織でアポトーシスが進行していることが知られているが、同時にアポトーシスは、生体が傷害を被った際の細胞処理に利用されている²⁵⁾。同様のことは、時間軸のもっと長いレベルでも生じているものと考えられる。老化に関する遺伝子群は、生体傷害の際、促進加齢とゲノムの不安定化を亢進するという際だった特徴をもつことが想定されており、トキシコジノミクスは、こうした現象の拡がりや背景を明らかにするかも知れない。それらは生理学的に必要な生体刺激である面と、生体に対して様々な傷害を惹起するモメントがあることが理解される。これは、生理学と、トキシコロジーが、生体反応としては本来「連続現象」(the continuum)として理解されるべき本態を意味している。そしてこのことは同時に、トキシコロジーで生体傷害の発現機構を担う発現遺伝子のレパトワ (repertoire) を、生理的現象を担うそれから切り分けることが困難な課題であることを示唆している。

中国語にはトキシコロジー (毒性学) を薬理学と対比して、「毒理学」と呼称する言葉遣いがあるが、この両領域に眼を向けると、薬理学とトキシコロジーの間では、それぞれ薬理効果や毒性機構のメカニズムの理解という方向性で相互に視点が共有されている反面、きわだった方向性の違いがある。薬理学が何らかの「或る効果・効能」を突き止めること、いわばポジティブ・セレクション (positive selection) を焦点にしているものとする、トキシコロジーは、比喩的に云うならば、“何もないこと”、“何もないレベル”を探索するネガティブ・セレクション

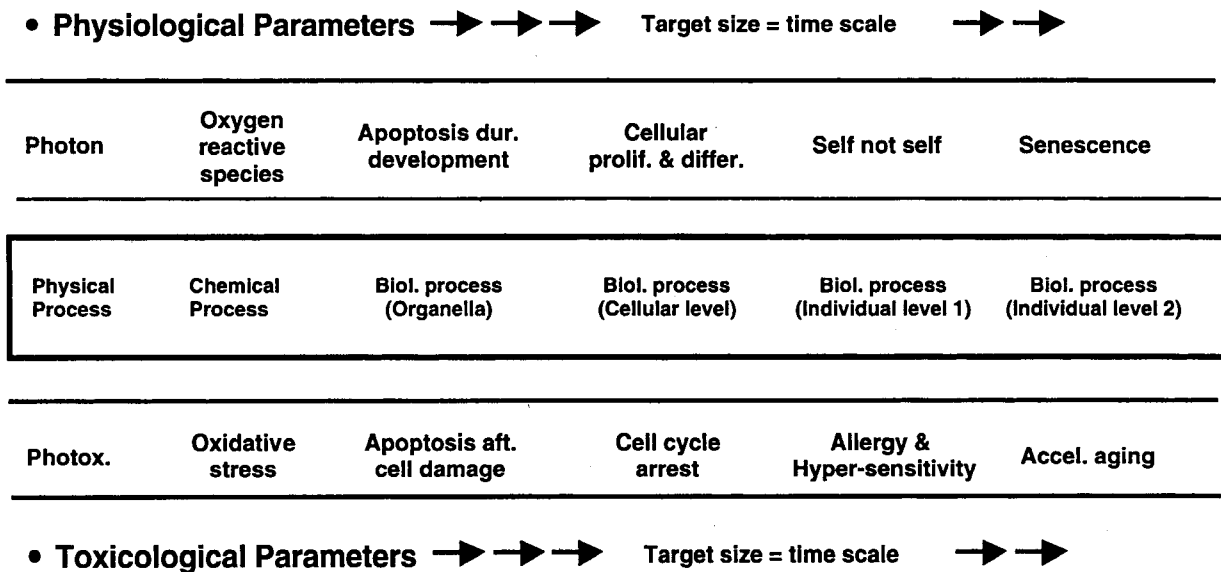


Figure 1: 生体と物質の相互作用

横軸を反応の時間軸にとった場合の種々の例を示す。生理学的指標と毒性学的指標の相対関係を示す。

尚、Biological Process (Individual level 1)とBiological Process (Individual level 2)の違いは、時間レベルの差を便宜的に表現する。

(negative selection) の分野と表現することができる。トキシコロジーでは、その物質の生体影響の認められないレベルの用量（無作用量, NOEL: no observed effect level）や、生体傷害性の影響の認められないレベルの用量（無毒性量, NOAEL: no observed adverse effect level）といった指標を求めることが、なかば目的化している面もないではないからである。いまトキシコジノミクスが「オミクス」サイエンスのトキシコロジーへの適用であるとすれば、その目的は、上記のNOELとか、NOAELといった概念を大量の遺伝子発現法によって一気に解析しようとするに他ならない。ここでも、トキシコジノミクスは、先に見た“連続体”としての生理反応とトキシコロジーにおける反応とを切り分ける遺伝子レベルでの分界点の存在を前提としなくてはならない。

トキシコジノミクスでしばしば論じられる「新しいバイオマーカー」にはそうした期待が込められており、これまでの試行の中でも、それまで認識されなかったようなバイオマーカーの存在が示唆されている。そして“リスク表現バイオマーカー”としての遺伝子群を明らかにする様々の試みがなされている。種々の薬物代謝酵素の動きをモニターする方法、アポトーシスの抑制や、細胞周期の亢進を促す遺伝子群をモニターする方法、エピジェネティック発がん関連化学物質を投与した時に発現が亢進したり低下したりする遺伝子群を取り上げてモニターする方法などは最終のゴールではないまでもその一例ではある（表1：アフィメトリクス社が公開している特定の毒性スクリーニング系の市販チップを示す。）。

振り返ってみると、従来のトキシコロジーは、現象的に‘何もない’という認識を支える、現実の観察手法上の諸要素の上に立脚していた。例えば測定系の側から見ると顕微鏡の分解能がそれであるし、他方、生体の側

もホメオステシスといった、変動が表に現れない‘invisibleな領域’が閾値のような役割を果たすものと信じられてきた。実際には物質の分析法の進歩はこの分界点を大きく揺るがせ、現実には、測定された結果の毒性的な意義の理解が困難な時代に直面させられているが、ゲノム科学は、これを生体反応の分析法全般としても、そうした無境界領域に近づけようとしようとしている面がある²⁶⁾。

3) トキシコジノミクスの立脚点

前項では、トキシコジノミクスに課せられた生理的領域とトキシコロジーのそれとの境界の切り分けについての課題を明らかにした。それにも関わらずトキシコジノミクスには、実際の作業仮説として種々の立脚点が成り立ち得る。確かにこの課題をどのように考えるかは生物観の問題がありゴールに達してはじめて示し得るものであるが、現在、各国のコンソーシアムあるいは個々の地球規模の巨大な製薬企業群が盛んに模索しているところでもある²⁷⁾⁻²⁹⁾。前述のNCTは、表2のような諸点を作業仮説としてプロジェクトを実施している。このような立脚点は、現象的には存在するものと考えられるが、同時にこの方法に限界があることも示唆される。これらの本質を明らかにしようとするならば、単なる曝露と非曝露のサブトラクション法のみでは解析の難しいことも知られており、遺伝子発現のみで解決することは技術的に困難なことである。理論的には、転写後制御による薬物代謝酵素の関与する毒性反応といえども、これによって惹起させるであろう、あるいは未知の遺伝子群の発現が想定されるので、これらの検出を目指すことが究極の方法となるが、さしあたりの段階ではプロテオミクス、メタボノミクスなどを併行し、タンパクレベルでの発現

Table 1: GeneChip® expression arrays: Rat Toxicology U34 Array

Included on Array	Examples
Metabolism Enzymes	CYP450s, acyltransferases, sulfotransferases, etc.
Growth Factors and Receptors	IGFs, Interleukins, NGFs, TGFs, VEGF, etc.
Kinases and Phosphatases	Lipid kinases, MAPKs, Stress-activated kinases, etc.
Nuclear Receptors	Retinoic acid, Retinoid X, PPARs, etc.
Transcription Factors	Oncogenes, Stats, NF-kappa B, Zinc-finger, etc.
DNA Damage Repair Genes	Polymerases, Topoisomerases, GADDs, RAG, etc.
Apoptosis Genes	Bcl-2 family, Bad, Bax, Caspases, Fas, etc.
Stress Response Genes	Drug transporters, Heat-shock proteins, etc.
Membrane Proteins	Gap-junction proteins, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, Selectins
Cell-cycle Regulators	Cyclins and associated proteins

GeneChip Probe Array Technology®; Copyright 2000 Affymetrix, Inc.; all rights reserved

Table 2: National Center for Toxicogenomics の作業仮説

- ① 特定の化学物質“群”は、遺伝子発現の上でユニークな“expression signature*”を持つ³⁰⁾。
- ② 異なった細胞や異なった組織は、厳密な意味では異なった反応性を示す。
- ③ 各種の動物種は、遺伝子発現の多くで相同的反応プロファイリングを共有している。
- ④ 特定の化学物質“群”のユニークな“expression signature”は、生体の側の条件、例えば胎生期発生過程とか、他の生体条件下で、反応様式が異なっている。
- ⑤ 複合物質反応でのそれらの相同反応性の如何や相違は、より明確に把握される。
- ⑥ 薬剤感受性/反応性を増す遺伝子多型が抽出される。
- ⑦ 環境化学物質の曝露による長期低用量効果の機構解析³¹⁾。

* トキシコジノミクスでは、個体の同定を意図する DNA フィンガープリントのアナロジーとしての、発現遺伝子のパターンからの化学物質の同定ということは、必ずしも目的ではない。即ち毒性の表徴傾向を掴むことに主眼があり、特定の化学物質“群”に共通する毒性発現機構に対応する遺伝子発現パターンが存在することを想定し、このパターンの抽出を目指すものである。

プロファイリングや、SNP解析の結果を情報科学的に照合することによって、実用的な解決の展望を切り開くこともかかせない。

4) リバース・サイエンスの誕生とトキシコロジー

Elizabeth Robertson³²⁾ と Mario Capecchi³³⁾ がそれぞれ独立して遺伝子相同組換え動物、即ちノックアウト (KO) マウスの作製に成功したのは、1989年のことである。これは大腸菌などの下等生物で行われていた組換え体の作出とは、時代の一線を画すインパクトをその後の生物学に与えた。当初の KO マウスは、個々の遺伝子が或る程度よく調べ尽くされた上で作られたので、マウスを作る事によって認められた“予想外”の事柄は多くはなかった^{34)–37)} が、KO動物の作出技術の進展と共に比較的容易に作成が可能となるに従って、逆に遺伝子機能の解析を目的とした KO動物の作成³⁸⁾ も逐次なされるようになった。相賀 (元・当安全センター毒性部第4室室長) らが手がけていた、機能未知の遺伝子としてクローニングした、転写因子特有の配列のうち、basic helix-loop-helix と呼ばれる配列をもつ遺伝子、Mep1 は、このものの KO マウスに奇形が見出され、体節形成の根幹となる機能がはじめて明らかとなるなど、そのよい例と云えよう³⁹⁾。これらは、かつての特徴的な機能を持つ遺伝子をクローニングして後、必要に応じて KO動物を作出する手法に対して逆向きの方法論という意味で、リバース・ジェネティクスと呼ばれることとなった。遺伝子の塩基配列のみが明らかでアノテーション (annotation) のない遺伝子、例えば既知の特異配列を含むことで機能がある程度推測されるものや、そうした既知の特異配列を全く含まず、予測がつかないものなどが含まれるが、こうした遺伝子をノックアウトすることに

より、その遺伝子の持つ機能を明らかにするリバース・ジェネティクスという分子遺伝学あたらしい方法は、科学一般に普及し、帰納法的解析による認識と、それらを背景とした演繹的な推論との双方向性の方法論を導き出し、その結果リバース・サイエンスを創り上げた。分子生物学の歴史が切り開いた双方向性の研究推進戦略は、科学の力をそれまで以上に強め、高める役割を果たしつつある。

かくしてマウスでも全ゲノム解読のプロジェクトが進展するに至り、この双方向性の戦略をとることが分子遺伝学以外の領域でも可能になってきた。トキシコロジーでも例外でなく、ある化学物質の曝露に伴う毒性学的な表現型と、同時に観察される遺伝子発現のプロファイルは、前者の解析が毒性メカニズムの理解を飛躍的に前進させる結果となったのに対して、後者は、遺伝子発現のそのプロファイリングからその物質の惹き起こすであろう表現型を、限られた条件下で推論する可能性を導き出した。これにマイクロアレイ技術やジーンチップ技術が大容量の遺伝子発現解析を実現するに至って、双方向性の解析手段としての‘ジノミクス’が成立する基礎が整っていった。とくに特定の機能指標に限定したチップをデザインすることにより、目的の特性をもつ遺伝子をスクリーニングする手法は、直ちに取り上げられ、薬物代謝や増殖因子、細胞周期などの因子に適用された。そしてファーマコジノミクス、さらにファーマコプロテオミクスなどが成立し、この手法を用いて同様のトキシコロジーチップが作製された。先に見た表1は、その一例である。前述の通り、これはトキシコロジーにおけるいわばポジティブ・スクリーニングであり、対象のはっきりした創薬過程での、毒性によるいわゆる“ドロップアウト”の排除などにすでに大きな威力を発揮してきたものであ

る。しかしながら、前にも述べたとおり、毒性発現のメカニズムの中には、少なくともその反応の初期のレベルでは、転写後制御の修飾が役割を果たすことが少なくない。多くの薬物代謝酵素、膜チャネルに関与するトランスポータ、種々の免疫反応認識の伝達などは、その一例である。従って、これに該当するポジティブ・スクリーニングによるトキシコロジーにはプロテオミクス、メタボノミクスなどの導入が必須となる。そうした課題はあるにせよ、これら一連の方法は、既知の毒性メカニズムによる傷害性を認識するためのポジティブ・スクリーニングとして有効である。他方、トキシコロジーが“何もない”レベルを探索する、つまり、ネガティブ・スクリーニングに対しては、必ずしも目的を達し得ず、別の視点が必要となる。トキシコジノミクスの一般的な可能性を悲観的にとらえる考え方があるが、その多くは、同時にこうしたネガティブ・スクリーニングとしてのトキシコジノミクスに含まれる限界を念頭に置いたものと云えよう。

5) リバース・トキシコロジー

リバース・ジェネティクスの歴史と同様、リバース・

トキシコロジーは、マイクロアレイ技術と全ゲノムの解読の終了という2本の柱に支えられて、“遺伝子発現のみから、より短期でより少数の動物試験、さらには試験管内培養細胞のみで、毒性予測が可能になるもの”と期待されている。前項でみたような問題点にも関わらず、トキシコロジーにおけるポジティブ・セレクションとしての既知遺伝子の現実的な発現情報を提供してゆく傍らで、全ゲノムの発現情報が着実に蓄積されてゆくならば意外に早い時期の実用化も考えられよう。特に、リバース・トキシコロジーにおける予知能には、実用的に考えるならば、無限の情報量が求められているのではなく、また更には、人工頭脳的な要素の導入も想定されている。しかもここで想定される新規のバイオマーカーとなり得る遺伝子群のプロファイリング、即ち、発現遺伝子の構成と発現強度による特徴付けをとっても、前述のとおりホメオステシスによって表現型の明らかでなかった一連の遺伝子群が浮かび上がってくるものと想定されている。一度それらが明らかになれば、それら新しいバイオマーカーに基づく基準は、熟練を要しない簡明な方法として普及してゆくことになるものと思われる。

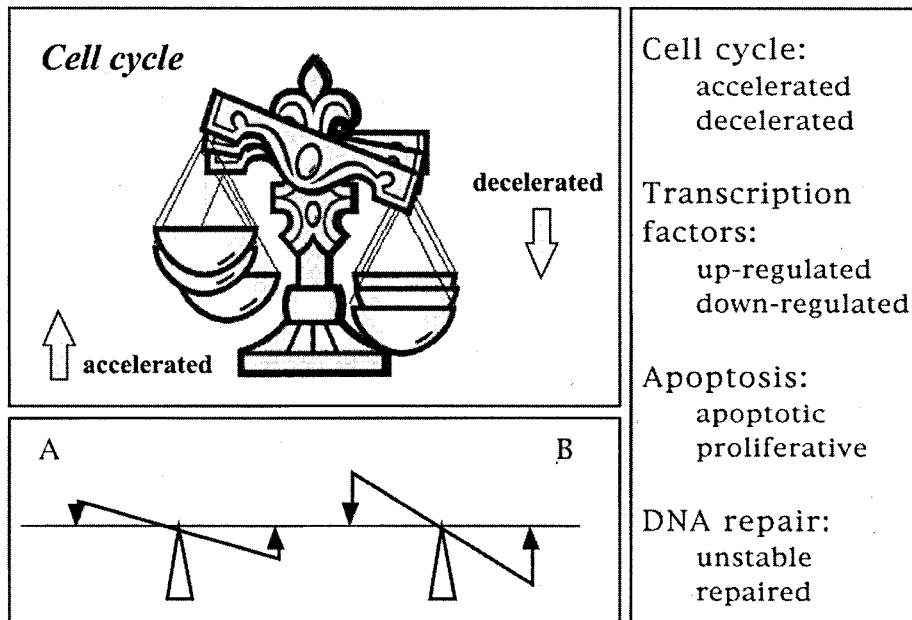


Figure 2: 細胞周期に関する遺伝子群の拮抗関係

細胞回転のアクセルとして働く遺伝子群、例えばE2Fやサイクリン及びサイクリン依存性キナーゼなどと、ブレーキとして働く遺伝子群、例えばp53やサイクリン依存性キナーゼ抑制因子などがそうであるし、単純に二つの要素に分解できるとは思わないが、ある転写因子の発現上昇を促す遺伝子群と逆に発現抑制に働く遺伝子群のネットワーク構造も同様に考えることができる。アポトーシス、DNA修復、などといったその他の様々な生命現象も、何らかの意味でそうした関係の上に成り立っているものと理解される。こうした背景をもつ生命現象に対して、トキシコジノミクスが、どのようにして生体障害(傷害)性の影響を設定しエンドポイントの線を引くかは検討課題であるが、トキシコジノミクスでは、それらの拮抗関係にある双方の遺伝子群の動きや一連のシグナルの流れが把握されることになる。さしずめこれは、機械的に過ぎるかも知れないが、拮抗する筋肉群のバランスによって四肢の運動が静止状態にあることを筋電計はその双方を検知することのアナロジーと考えればよい。ところで図のA、Bのようにこうした拮抗関係では同じバランスがとれていてもその相互の拮抗関係が小さい場合と大きい場合がある。エピジェネティック発がんにおける調節因子の過剰発現などは、リスクの高い状態と考えられる。トキシコジノミクスでは、この相違が認識され得るものと考えられる。

一方、リバース・トキシコロジーは、前々項で見たような立脚点に沿って初歩的なデータが報告されている³⁰⁾ものの、フォワード・ジノミクスの手法による種々の蓄積と異なり、ある程度のプロファイリングデータの蓄積なしでは成立し得ない。そういう意味では現状でのリバース・トキシコロジーは、未だ仮説の域を出ない。その予測力は、遺伝子発現プロファイルのデータ量やそれらと表現型とをリンクさせた情報量、そして更にそれらをインフォマティクス、即ち、遺伝子発現情報から得られる機能情報データベースとして確立させる作業のテンポに掛かっている。更に正確な予測戦略としては、特化した遺伝子発現に基づいて作製されるプロテオームチップのようなリバース・プロテオミクスとのデータリンク、即ち、相互的なデータの統合作業も求められている。

さてリバース・トキシコロジーには、NOELやNOAELに相当するあらたな概念の提供が求められていることは前述の通りである。図2はこの点を概念的にまとめている。種々の遺伝子群は、様々な機能の遺伝子の、網の目のような拮抗関係の中に位置づけられるものと考えられる。図2の細胞周期を顕すバランスは、細胞が細胞周期のアクセルに関わる遺伝子群とブレーキに関わる遺伝子群の拮抗関係の中で、平衡状態を維持しているとの想定を戯画化している。図の右に示すいくつかの例のごとく、細胞周期のみならず転写因子の発現の亢進と抑制、アポトーシスの亢進と抑制、DNA修復の亢進と抑制など、いずれも同様と考えられ、ある拮抗関係の、バランスシート上の“結果”を見ているものと理解される。

さてこのとき、例えば図2左下の平衡状態AとBを想定すると、こうしたAとBのようなバランスの振幅の差は、従来のトキシコロジーの指標では一般に観察することの出来なかったものである。こうしたあらたに可視化されてくる概念を前にして、ではつぎに、AとBでは、いずれのリスクが高いと考えるべきであろうか。リバース・トキシコジノミクスでは、こうした拮抗関係を破綻する種々のKO動物のようなモデルを駆使し、そこで動く遺伝子群を截然と切り分けて、個々のインフォマティクスと密接に関連したプロファイリング・データベースを形成してゆく過程が重要である。

3. リバース・トキシコジノミクスの実用的なアプローチ

トキシコジノミクスのデータ・プロファイリングは化学物質と遺伝子発現の1対1対応を求めるものではなく、その意味で、DNAフィンガープリントによって個体識別をする作業とは本質的に異なる。即ち、一連の包括的に分類される化学物質群と特定の遺伝子発現プロファイリングの対応関係で整理されてゆくものであり、そのために必要な基本データは実用的には有限であると考えて差し支えない。但し同時に、リバース・トキシコジノミ

クスの構築は、漫然と毒性指標のポジティブ・セレクションの傍らで、データ・プロファイリングの蓄積を積み重ねてゆくだけでは、その確立はおぼつかない。すでに試みられているかもしくは計画されているリバース・トキシコジノミクスの実用的なアプローチの中から、いくつかの例に絞って解決すべき課題を検討してみたい。

1) 未知化学物質の毒性予測

図3は、未知化学物質の毒性指標を明らかにするプログラムの例を図示している。ここで掲げている毒性陽性あるいは、陰性の化学物質としては、極端な例を挙げるならば、化審法^{脚注iii)}で取り上げる指定化学物質と非指定化学物質を対象に考えるのも良い。既知の種々の毒性表現型に関する代表例を取り上げて、それらの投与マウスと非投与マウスから、図の右側の要領でそれぞれmRNAを抽出し、ここでは、これを逆転写させてcDNA化しつつ、赤と緑の色素標識をした後、競争的ハイブリダイゼーションを行っている。データベースの取り方は、種々考えられるが、これらの結果を左下のような魔法陣の中にデータベース化してゆく。これに対して未知物質の遺伝子発現プロファイリングが、先のデータベースのいずれに位置づけられるか等を繰り返しデータ照合してゆく中で、その発現パターンの特徴をインフォマティクスとしてデータベース化してゆくものである。

2) モデル動物の有効性

内分泌攪乱性の化学物質のスクリーニングにはエストロゲン受容体やアンドロゲン受容体との親和性を見る方法が用いられている。それらにはそれらの役割があるとしても、核内受容体がDNAの応答配列に結合する際のコファクターの影響など、未知の要素を予測することはできない。

これを短期目標として解決する方法は、例えば標的の受容体遺伝子KOマウスを用いる事などによって確実に当該受容体原性変化であることを確認しつつ捨象してゆくことである。即ち、モデル動物を用いることによる網羅的ないし包括的な遺伝子群の中から関連遺伝子を“あぶり出す”ことである。アリアル hidrocarbon 受容体のKOマウス (AhR・KO) では、ダイオキシンによる影響が観察されない。野生型の動物にダイオキシンを投与して発現する遺伝子は様々であるが、その中でAhR・KOで、発現が見られない遺伝子は決して多くはない。これらの遺伝子群の中には、AhRを介する特異的な影響のバイオマーカーとなる遺伝子が含まれているか

ⁱⁱⁱ 化審法：化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律。昭和48年制定。

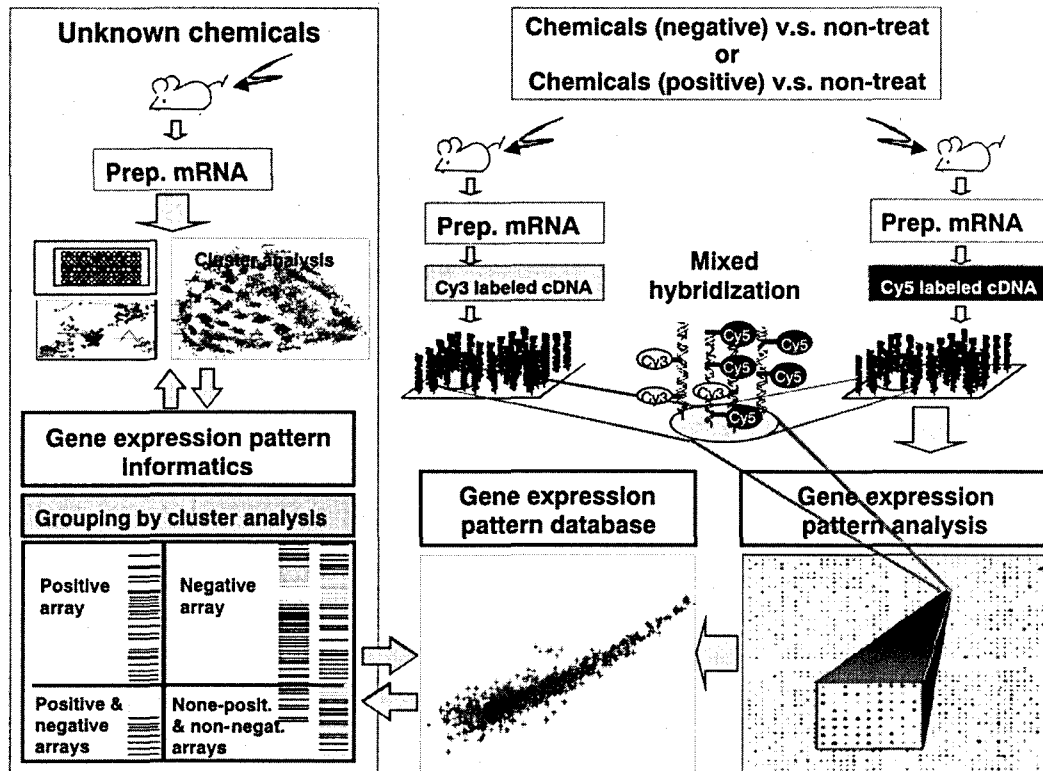


Figure 3: 未知化学物質の毒性指標を明らかにするプログラム

本文参照

ら、何らかの折りにこれらの発現をセットで修飾する物質があれば、それらの発現機構はともかくとして、ダイオキシン様の毒性を示すリスク対象となるものと考えられることができる。われわれの研究室で用いられるチオレドキシシンKOマウスでの情報は、それ自体有効要素であるが、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) のKOマウスやカタラーゼ欠乏マウスなどでの結果と複合させると酸化ストレスに対するより包括的な簡易バイオマーカーの“あぶり出し”が成功することになる。

ベンゼンは、明らかな遺伝毒性化学物質であるが、同時に強いp53依存性の細胞周期抑制を引き起こし、野生型のマウスでは、よほど特徴的な条件でなければ白血病を作らない^{40)–42)}。1887年のLe Noireのバリの靴職人での報告⁴³⁾以来、われわれがマウスで報告するまで100年の年月が掛かったのは、理由のないことではなかったと云えよう^{40), 44)}。このベンゼン曝露時の野生型とp53KOマウスでのマイクロアレイにおける発現遺伝子パターンを見ると、野生型マウスでの発現遺伝子は、遺伝子障害性のモニター遺伝子が中心である⁴⁵⁾。ベンゼン白血病は、p53KOマウスと野生型の双方で観察されるが、両者の発生メカニズムには相当の違いがあることが判る。

以上モデル動物の利用の意義をまとめた。但し、このものの利用が、リバーズ・トキシコジノミクスの樹立に、本質的に必要と言うことではない。ここで探索しようと

する新しいバイオマーカーとなり得る発現遺伝子プロファイリングは、いずれは適切な曝露実験系の中で、同定検出されるはずのものとして期待されるからである。

3) 試験管内試験の有効性

前項で個体レベルのin vivo試験法による試料の収集を取り上げたが、ここでは、試験管内試験の材料を用いた場合に得られる情報について、その可能性を考えてみたい。

表3には、in vitroとin vivoの組織採取によって得られる種々の表徴型、即ち毒性学で言うところのエンドポイントに沿った毒性の諸標的を掲げている。表の左端に表示してある“yes”は、試験管内試験で充分意味のある情報が得られるものと考えられるエンドポイントを示しており、“no”は、個体試験でなければ意味のある結果が得られないと考えられるパラメータを表示している。イオンチャンネルやイオンポンプに関わる生体膜の役割を明らかにすることには、培養細胞で充分代替可能と考えられるし、他方、胎児形成期の諸情報のように、現段階で試験管内試験による良い対象マーカーは見いだせず、個体試験でのみ把握可能なものを示している。

同じ試験管内試験でも、取り扱う培養細胞系によって、得られる情報が格段に高度になりつつあるのが近年のこの領域の科学の発展である。図4に示すように、これま

Table 3: トキシコジノミクスのための試料とエンドポイント—試験管内試験試料は有効か？

試験管内試験の有効性	毒性指標
No [yes]*	<i>Morphogenesis, developmental anomaly</i>
No	<i>Identifying tissue-specific toxicity</i>
No/ yes	<i>Epigenetic carcinogenesis (as modification of gene expression)</i>
	<i>Metabolic activation</i>
No	Hepatic activation leading to multi-tissue damage
Yes	Tissue-specific activation
	<i>Receptor-mediated events</i>
Yes/ no	Neuronal tissue
Yes/ no	Steroid hormonal tissue
Yes/ no	Ah-receptors
Yes	<i>Cytotoxicity</i>
	<i>Membrane activities</i>
Yes	ion channels, ion pumps
	<i>Inhibition of biochemical process</i>
Yes	Uncoupling oxidative phosphorylation, inhibition of ATP production by redox cycling initiation to produce ROS
Yes	Oxidative phosphorylation to inhibit ATP production
Yes/ no	Alteration of calcium homeostasis

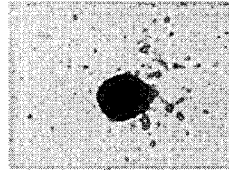
*[yes]: 全胚培養のような、現状での問題点は多くとも、個体レベルの試験を限定的に模倣する実験系が将来期待されるもの。

で分化が先行して培養の困難だった胚性幹細胞や、神経、造血といった組織の幹細胞など、幹細胞システムでも Leukemia inhibitory factor, Thrombopoietin, kit ligand, Interleukin-6, basic fibroblast growth factor などを用いることにより自己複製能を保持したままそれらを培養することが可能になった^{32), 46)–48)}。また、初期培養細胞系や樹立培養細胞系では、ヒト細胞なども充分駆使できる体制が整っている。それらの細胞系の機能に即して、遺伝子発現を効果的に観察できる場合が多々あることは疑いない。とりわけ、胚性幹細胞系については、その由来が実験動物由来とヒト由来とに関わらず、1個の細胞の増殖分化の観察から予見される情報は、実験動物1個体の情報に相当するという点は、発生毒性学の将来を考える上で画期的且つ、極めて重要な視点である^{49), 50)}。

4) 標準化のための戦略

多くの試験・研究施設で取り組まれているマイクロア

レイやDNAチップ関連のデータは、現段階では、その施設間にあっても、また個々の研究・技術者間にあっても、互換性に乏しく、比較が困難なことが知られている。トキシコジノミクスでは、この実態を革命的に改変して種々の採取試料から種々の条件で得られる結果を標準化 (standardization) することが求められている。こうした標準化は、トキシコジノミクスにおける応用以外の領域では、大きな問題点であることには変わりはなくも、その深刻さは比較にならず、黙過し得た面が少なくない。トキシコジノミクスの取り組みによってはじめてその必要性が焦眉の課題になったといつてよい。mRNAの不安定性はこのプログラムの大きな課題であり、組織採取からRNA抽出までの効率の安定化を考えるだけでも制御すべき条件が多段階に及ぶ。更に、これに先にもふれた逆転写、色素標識、ハイブリダイゼーションなどの諸過程を経て、スキャン操作と続く。しかも比較にならない膨大な数量の遺伝子が対象となる。従って試料の発現デー

Stem cells:

Neurosphere Culture

Embryonic stem cells
neuron, hemopoietic system, vascular
system, cartilage-osteocyte system

Hemopoietic stem
a variety of hemopoietic lineages

Neuronal stem cells,
neuron, retinal stem cells, glia, and other
tissue lineages

Tissue cells:

Primary hepatic cells
Primary renal cells
Variety of cell lines

metabolism
cell cycle modulators
proliferators and a variety of inhibitors
terminal differentiation

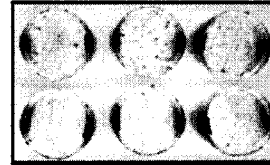


Figure 4: 試験管内試験で取り扱われる細胞系

幹細胞系は、自己複製能を保持したままそれらを培養することが可能になり、これらの細胞の分化能に基づく遺伝子発現を観察する材料として利用され得る。

初期培養細胞系や樹立培養細胞系では、ヒト細胞なども充分駆使できる体制が整い、各々の細胞系の機能に即した遺伝子発現を観察する材料として利用され得る。

タにバラツキを生ずる要因は、単に数的にステップが多
いだけではなく、チップの均質性を含め、多次元に及ぶ
ことを指摘しておかなければならない。さまざまな角度
から発現データの標準化の取り組みがなされている。

その方法としては、①トキシコジノミクスの標準化を
必要とする研究・技術者のコンソーシアム形成がなにより
も重要となる。ついで諸問題があがるが、②標準試料
を用いた試料採取条件の均一化、③同様条件下での
RNA操作の均一化はもっとも基本的な課題となる。一
般に多くの試みではリファレンス遺伝子群を設定して、
逆転写、色素標識、ハイブリダイゼーションなどの各ス
テップの効率をモニターしているようであるが、組織の
採取やRNAの質がネックになっては意味がないので、
これらは総合的に至適条件にむけての検討を求められる
ことになる。④かくして、②や③をサポートする条件を、
ソフトとハードの両面から確立する作業をすすめ、相互

にフィードバックを重ねつつ、最終的には自動化、即ち
ロボテックシステムへと創り上げてゆく作業が必要である。

さらに、⑤これらの原則的な作業の側からの標準化の
他に、データの互換性をサポートするためのリファレン
スとなる塩基配列を導入して、最終的に得られるデータ
の補正を行う試みは、格段に重要な意味をもつ。スパイク
^{iv}情報と呼ばれるデータの標準化補正配列などを導
入しつつ、解析的方法と演繹的方法の双方からデータを
収集する試みは、当研究所におけるトキシコジノミクス
のプロジェクト^vでも主要な課題のひとつとして取り
組まれている。

尚、米国医薬品庁 (FDA: Food and Drug Agency) の
外郭団体の国際生命科学研究機構 (ILSI: International
Life Sciences Institute) ^{vi}でも、異なる実験間で得ら
れるアレイデータの比較のためのプロトコル探求に向け

^{iv} スパイク：外部標準として加える細菌などに由来する遺伝子配列。

^v 国立衛研プロジェクト：平成14年度の厚生労働科学研究において実施されることとなった「萌芽的先端医療技術推進（トキシコゲノミクス分野）研究事業」。当研究所と民間企業との共同研究により、「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性予測システムの構築」を行う計画となっている。このプロジェクトでは、トキシコゲノミクスを、集中的かつ大規模に、網羅的遺伝子発現プロファイリングを基にしたインフォーマティクス技術を利用して、創薬過程における安全性の予測システムを作成するものとしており、平成14年度から平成18年度までの5カ年計画で約150化学物質を対象に、ラットなどの小型実験動物および培養細胞を用いた曝露実験を行い、肝・腎を主標的として、発現プロファイルを可能な限り多数の遺伝子について採取し、データベースの構築を行うこととしている。産官学の提携によって実施する。http://www.nihgs.go.jp/toxico/toxico.html 参照。

^{vi} http://www.ilsi.org/参照

た取り組みが進行している。

4. トキシコロジーにおけるパラダイムシフト

1) 生理から毒性への生体反応の連続性

トキシコロジーの領域について概観した際にも触れたとおり、生体の生理的变化と毒性徴候の境界は、通常の毒性試験で見たものが、分子の動きで見た場合には、相互に連続体であるものと考えられる。こうした認識は、従来生体反応を見るときに、全く存在しなかったわけではないが、トキシコジノミクスが動き出したことにより、少しずつ明らかになってきた。この認識のパラダイムシフトは、生理的変動と、トキシコロジー領域での変化の、截然とした切り分けをむしろ困難にする面があるが、同時に研究のゴールとして個々の毒性の本質的なメカニズムとリンクした、要となる遺伝子、即ち新しい毒性分子マーカーの同定へとつながる事が期待されている。

2) ホメオステシスの背景の可視化

トキシコロジーにおける低用量問題は、長年のエンigma (enigma) である。分子生物学的認識の進展とともに、たとえばDNA障害を伴った発がん物質の低用量域での閾値現象が、p53欠失動物では、無閾値性に観察され、通常動物でのそれは、修復に関与することが明らかになりつつある。このような通常観察されない、静止変化や閾値現象は、トキシコジノミクスによって、“見えてくる”，即ち、可視化される。

この点については、リバース・トキシコロジーの項でも触れたが、実際にはホメオステシスの裏に隠れた二つの平衡関係といった、単純な関係ではなく、三つ巴から網の目の制御関係を呈していることが少なくないであろうから、これが更にリスク評価の基礎となってゆくとすれば、これも大きなパラダイムシフトといわなければならない。

3) インフォマティクスによる多元次元認識

内分質かく乱性化学物質と想定される諸物質を投与後6時間の子宮における遺伝子発現の変動を見たcDNA マイクロアレイの結果によれば、エストラジオールにより発現の誘導される遺伝子のごく一部をビスフェノールA (BPA) とノニルフェノールが共有し、その他の物質によって誘導される遺伝子についても多様であった⁵¹⁾。また、エチニルエストラジオール、BPA、ゲニスタインの母体投与後の胎児の子宮や卵巣での遺伝子発現解析でも、3物質に共通する遺伝子群は存在するが、同時に全く共通性を持たない遺伝子発現も観察されている⁵²⁾。これらの結果は、内分泌攪乱化学物質として、エストロゲン受容体に対する反応性で見ると単一の切り口からみたエンドポイントでこれらの物質の生体影響を特徴づける

ことが困難であり、将来のトキシコロジーがこれらの発現遺伝子群の集まり (clusterと呼んでいる) のインフォマティクスによって共通性のものと非共通性の多くの遺伝子群の特徴を多元次的に把握して、理解することを求められていることを意味する。もとより、こうした認識論がなかった訳ではないが、明確な認識方法に遭遇したという点で、これもトキシコロジーの新しいパラダイムの展開と考えられている。

4) アナログ認識からデジタル認識へ

最後は、データのアナログ認識とデジタル認識の問題である。薬理学では、薬効学的用量相関を越えたところでトキシコロジー・レベルの遺伝子発現が顕れるものと考え、これを把握しようという戦略がある。事実、マイクロアレイの世界では、しばしば単純に増加する関数の任意のA点とB点でもそれぞれに発現する遺伝子群のレパトワには違いがあり、発現の強さにのみ差があると考えはしない。しかし従来の技術で見たときの用量相関は連続性と認識されることが少なくないので、両者の認識のギャップの分子背景がさらに明らかにされる必要がある。蓋し、発達成長などの生物変化は、概して単純片対数増殖を示すことが少なくないので、そこからの認識に支配されているものと思われるが、薬物投与の際の遺伝子変化は、そうしたアナログ的な遺伝子発現よりも諸用量に対して様々に異なったグループの遺伝子のデジタルな変化として観察されるものと想定される。放射線でも照射量に応じて発現する遺伝子のレパトアに相違が見られるとの報告がある⁵³⁾。

おわりに

Toxicogenomics International Forum 2001と称する国際フォーラムが昨秋東京で開催された。このフォーラムは、網羅的な遺伝子発現手法を用いた様々の応用について、各国の研究の現状を相互交流し、今後の発展方向を探ることを目的としたものであった。このフォーラムでの発表内容を中心にしてSpringer Verlagからその名もToxicogenomicsと銘打っての出版が既に決まっている。

本所においては、脚注vにも触れたとおり、創薬のためのトキシコジノミクスの大きなプロジェクトがスタートしつつある。NCTの設立趣旨を述べた米国のクリントン前大統領の教書によれば、トキシコジノミクスによる化学物質からのリスクの回避は、国家の責務であるとしている。当研究所のこの課題に対する使命はますます大きくなっていくものと考えられる。

以上、トキシコジノミクスの登場によって新しい変革を求められる毒性学を、筆者の一人が担当する機器試験の展望の面から考察した。トキシコジノミクスによって与えられるであろう個々の試験結果は、これまでの膨大

な動物による、時に解釈の困難な大量の数値から、明らかに毒性学的な意味をもった機能的表現型となるものと思われる。そのことが、危害同定 (Hazard Identification) をたやすくしてくれるものとの期待は大きいですが、果たしてリスクアセスメントとの関係ではどのような展望となるのか、今少し実績を重ねながら、見つめてゆきたい。校正時注：上記の“Toxicogenomics”は10月末日現在、既に出版されている。(ISBN 4-431-70344-6 Springer-Verlag Tokyo)

REFERENCES

- 1) Tennant, R. W.: The National Center for Toxicogenomics: using new technologies to inform mechanistic toxicology. *Environ Health Perspect*, **110**: A8-10. (2002)
- 2) "Toxicology for the Next Millennium." Proceedings of a conference. September 20-23, 1999, Warrenton, Virginia, USA. eds. by, Isfort, R.J. and Lederberg, J., *Annals of the New York Acad Sci*, **919**, New York, pp. 1-324. (2000)
- 3) Brown, P. O. and Botstein, D.: Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, **21**: 33-7. (1999)
- 4) Debouck, C. and Goodfellow, P. N.: DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*, **21**: 48-50. (1999)
- 5) Lovett, R. A.: Toxicogenomics. Toxicologists brace for genomics revolution. *Science*, **289**: 536-7. (2000)
- 6) Hamadeh, H. K., Bushel, P., Paules, R. and Afshari, C. A.: Discovery in toxicology: mediation by gene expression array technology. *J Biochem Mol Toxicol*, **15**: 231-42. (2001)
- 7) Storck, T., von Brevern, M. C., Behrens, C. K., Scheel, J. and Bach, A.: Transcriptomics in predictive toxicology. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **5**: 90-7. (2002)
- 8) Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**: 467-70. (1995)
- 9) Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. and Davis, R. W.: Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 10614-9. (1996)
- 10) Fodor, S. P., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P. and Adams, C. L.: Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, **364**: 555-6. (1993)
- 11) Adam, G. I.: The development of pharmacogenomic models to predict drug response. *Curr Opin Drug Discov Devel*, **4**: 296-300. (2001)
- 12) Lloyd, A.: Pharmacogenomics: Qualitative gene profiling using differential analysis of transcripts with alternative splicing. *Drug Discov Today*, **5**: 429-430. (2000)
- 13) McCarthy, J. J. and Hilfiker, R.: The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nat Biotechnol*, **18**: 505-8. (2000)
- 14) Liefers, G. J., Tollenaar, R. A., Nakamura, Y. and van de Velde, C. J.: Genetic cancer syndromes and large-scale gene expression analysis: applications in surgical oncology. *Eur J Surg Oncol*, **27**: 343-8. (2001)
- 15) Gabrielson, E., Berg, K. and Anbazhagan, R.: Functional genomics, gene arrays, and the future of pathology. *Mod Pathol*, **14**: 1294-9. (2001)
- 16) Kallioniemi, O. P., Wagner, U., Kononen, J. and Sauter, G.: Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, **10**: 657-62. (2001)
- 17) Aardema, M. J. and MacGregor, J. T.: Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res*, **499**: 13-25. (2002)
- 18) Gollapudi, B. B. and Krishna, G.: Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutat Res*, **455**: 21-8. (2000)
- 19) Herrmann, J. L., Rastelli, L., Burgess, C. E., Fernandez, E. E., Rothberg, B. E., Rothberg, J. M. and Shimkets, R. A.: Implications of oncogenomics for cancer research and clinical oncology. *Cancer J*, **7**: 40-51. (2001)
- 20) Nakamura, Y.: Isolation of disease-associated genes through genome analysis and their clinical application. *Keio J Med*, **50**: 134-40. (2001)
- 21) Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O. P. and Sauter, G.: Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, **159**: 2249-56. (2001)
- 22) Reynolds, L. J. and Richards, R. J.: Can toxicogenomics provide information on the bioreactivity of diesel exhaust particles? *Toxicology*, **165**: 145-52. (2001)
- 23) "Information Resources in Toxicology," 3rd ed., eds. by, Wexler, P., Hakkinen, P.J., Kennedy, G., Stoss, F.W., Academic Press, San Diego, pp.921 (1999)
- 24) Inoue, M., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Tani, H. and Ogiwara, Y.: Role of reactive oxygen species in gallic acid-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*, **23**: 1153-7. (2000)
- 25) Hetts, S. W.: To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *Jama*, **279**: 300-7.

- (1998)
- 26) Smith, L. L.: Key challenges for toxicologists in the 21st century. *Trends Pharmacol Sci*, **22**: 281-5. (2001)
 - 27) Fielden, M. R. and Zacharewski, T. R.: Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol Sci*, **60**: 6-10. (2001)
 - 28) Pennie, W. D., Woodyatt, N. J., Aldridge, T. C. and Orphanides, G.: Application of genomics to the definition of the molecular basis for toxicity. *Toxicol Lett*, **120**: 353-8. (2001)
 - 29) Nuwaysir, E. F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J. C. and Afshari, C. A.: Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog*, **24**: 153-9. (1999)
 - 30) Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S. and Afshari, C. A.: Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicol Sci*, **67**: 219-31. (2002)
 - 30) Hamadeh, H. K., Bushel, P. R., Jayadev, S., DiSorbo, O., Bennett, L., Li, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Paules, R. S., Blanchard, K. and Afshari, C. A.: Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicol Sci*, **67**: 232-40. (2002)
 - 31) Olden, K., Guthrie, J. and Newton, S.: A bold new direction for environmental health research. *Am J Public Health*, **91**: 1964-7. (2001)
 - 32) Schwartzberg, P. L., Goff, S. P. and Robertson, E. J.: Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science*, **246**: 799-803. (1989)
 - 33) Capecchi, M. R.: Altering the genome by homologous recombination. *Science*, **244**: 1288-92. (1989)
 - 34) Stanton, B. R., Reid, S. W. and Parada, L. F.: Germ line transmission of an inactive N-myc allele generated by homologous recombination in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **10**: 6755-8. (1990)
 - 35) te Riele, H., Maandag, E. R., Clarke, A., Hooper, M. and Berns, A.: Consecutive inactivation of both alleles of the pim-1 proto-oncogene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **348**: 649-51. (1990)
 - 36) Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T. and Aizawa, S.: Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 9918-22. (1990)
 - 37) Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S. and Jaenisch, R.: Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, **342**: 435-8. (1989)
 - 38) Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Court, D. L.: Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, **2**: 769-79. (2001)
 - 39) Saga, Y., Hata, N., Kobayashi, S., Magnuson, T., Seldin, M. F. and Taketo, M. M.: MesP1: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development*, **122**: 2769-78. (1996)
 - 40) Yoon, B. I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kim, D. Y. and Inoue, T.: Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol*, **29**: 278-85. (2001)
 - 41) Snyder, C. A., Goldstein, B. D., Sellakumar, A. R., Bromberg, I., Laskin, S. and Albert, R. E.: The inhalation toxicology of benzene: incidence of hematopoietic neoplasms and hematotoxicity in ARK/J and C57BL/6J mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **54**: 323-31. (1980)
 - 42) Cronkite, E. P., Bullis, J., Inoue, T. and Drew, R. T.: Benzene inhalation produces leukemia in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **75**: 358-61. (1984)
 - 43) Le Noir, and Claude: Sur un cas de purpura attribué a l'intoxication par la benzine, *Séance du*, **29**, 1251-60. (1887)
 - 44) Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Yoon, B.I., Huo, Y., Kaneko, T., Kyrokawa, Y., Inoue, T.: Benzene inhalation induced an early onset and a high incidence of leukemias in the p53 deficient C57BL/6 mice. *Japanese Journal of Cancer Research*, **92** suppl.: 71. (2001)
 - 45) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Igarashi, K., Kanno, J., Kaneko, T., Inoue, T.: cDNA microarray in mouse bone marrow cells: Profiles reflecting the epigenetic responses to benzene. *Meeting abstract of the 23rd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan*, **669**. (2000)
 - 46) Berger, M., Fagioli, F., Piacibello, W., Sanavio, F., Mareschi, K., Biasin, E., Bruno, S., Gammaitoni, L., Gunetti, M., Nesi, F., Madon, E. and Aglietta, M.: Role of different medium and growth factors on placental blood stem cell expansion: an in vitro and in vivo study. *Bone Marrow Transplant*, **29**: 443-8. (2002)
 - 47) Batard, P., Monier, M. N., Fortunel, N., Ducos, K., Sansilvestri-Morel, P., Phan, T., Hatzfeld, A. and Hatzfeld, J. A.: TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle

- and induces CD34 antigen up-modulation. *J Cell Sci*, **113**: 383-90. (2000)
- 48) Pincus, D. W., Keyoung, H. M., Harrison-Restelli, C., Goodman, R. R., Fraser, R. A., Edgar, M., Sakakibara, S., Okano, H., Nedergaard, M. and Goldman, S. A.: Fibroblast growth factor-2/brain-derived neurotrophic factor-associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. *Ann Neurol*, **43**: 576-85. (1998)
- 49) 胚幹細胞 (ES細胞) に対するダイオキシンの影響—マイクロアレイによる解析 (高木篤也:平成13年度厚生科研費金子班報告)
- 50) 高木篤也:胚幹細胞を用いた検討, In:内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法, 監修:井上 達, シュプリンガーフェアラーク東京, pp143-149. (2000)
- 51) マウス生殖腺の分化及び精子, 卵形性への内分泌攪乱化学物質の影響及び低用量影響に関する研究 (井口泰泉:平成13年度厚生科研費井上班報告)
- 52) Naciff, J. M., Jump, M. L., Torontali, S. M., Garr, G. J., Tiesman, J. P., Overmann, G. J. and Daston, G. P.: Gene expression profile induced by 17alpha-ethynyl estradiol, bisphenol a, and genistein in the developing female reproductive system of the rat. *Toxicol Sci*, **68**: 184-99. (2002)
- 53) Schreyer, S. K., Karkanitsa, L. V., Albanese, J., Ostapenko, V. A., Shevchuk, V. Y., and Dainiak, N.: Analysis of radiation-associated changes in gene expression using microarray technology. In: Proceedings of the Advanced Research Workshop on Protracted Intermittent or Chronic Irradiation: Biological Effect and Mechanisms of Tolerance, 14-17 May 2002, Schloss Reisenburg, Germany (in press).

DNAヘリカーゼ原因遺伝子疾患と酵母相同遺伝子の機能解析

薬理部 宮島 敦子*

Functional analysis of yeast homologue gene associated with human DNA helicase causative syndromes

Atsuko Miyajima*

Proteins having DNA helicase activity play very important roles in many processes involving DNA workings such as replication, repair, and recombination. In this decade, many DNA helicase genes have been cloned as the causative genes of human recessive heredity diseases. These are the causative genes for Xeroderma pigmentosum (*XPB* and *XPD*), Cockayne syndrome (*CSB*), diffuse collagen disease (*Ku80*), α -thalassaemia (*ATR-X*), Bloom syndrome (*BLM*), Werner syndrome (*WRN*) and Rothmund-Thomson syndrome (*RTS*). The yeast homologue genes of these human DNA helicase genes exist. *S. cerevisiae* *RAD25/SSL2*, *RAD3*, *RAD26*, *YKU80/HDF2* and *RAD54* are the homologue for *XPB/ERCC3*, *XPD/ERCC2*, *CSB/ERCC6*, *Ku80/XRCC5* and *ATR-X/HX2*, respectively. *E. coli. recQ* gene and *S. cerevisiae* *SGS1* are the homologue for all *BLM*, *WRN* and *RTS*. A search of whole genome of *S. cerevisiae* revealed that *SGS1* is the sole homologue of *recQ* in *S. cerevisiae*. Thus it seems likely that *SGS1* is a functional homologue of one or several human RecQ family genes. Many basic or essential functions are well conserved in the cells from lower eukaryotic to higher mammalian. The functional analysis in yeast could make an useful insight for the human homologue.

To clarify the functions of *S. cerevisiae* Sgs1 and to get an insight into the functions of Blm, Wrn and Rts, in this study, we analyzed the phenotype of *sgs1* disruptant and in detail the cause of the poor sporulation phenotype of *sgs1* disruptants in relation to meiotic processes including meiotic recombination. The poor sporulation of *sgs1* disruptants was complemented with a mutated *SGS1* gene encoding a protein lacking DNA helicase activity; however, the mutated gene could suppress neither the sensitivity of *sgs1* disruptants to methyl methanesulfonate (MMS) and hydroxyurea nor the mitotic hyperrecombination phenotype of *sgs1* disruptants. The N-terminal 1-45 amino acid region and 698-1195 amino acid region of Sgs1, which including helicase domain and C-terminal RecQ conserved region with helicase activity, were required for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyperrecombination of *sgs1* disruptants in mitotic growth. The 126-400 and 596-1195 amino acid regions of Sgs1 were required for complementation of poor sporulation and of reduced meiotic functions. These regions required for the mitotic or meiotic functions of Sgs1 were well overlapped with the interaction regions of Top3 and Top2. Some of these results might explain the mechanism of the symptom of RecQ-related syndromes.

Key word: DNA helicase, yeast homologue, *SGS1*, Bloom syndrome, Werner syndrome

1. はじめに

2000年6月26日、米、英の大統領、首相によりヒトのゲノム解析の終了宣言がなされた。この日から遺伝子研究は、ポストゲノム時代と位置付けられることとなった。そして、2001年、2月15日、2月16日付けの科学雑誌に、相次いでヒトのゲノム配列のドラフトに関する論

文が掲載され^{1, 2)}、ポストゲノム時代の到来が現実のものとなった。とはいえ、研究の上でその日を境に何かが大きく変わる訳ではなく、それまでの遺伝子研究における積み重ねの上に宣言、公表されたものであり、ヒトのゲノムに関する database は今後も蓄積を必要とする。しかしながら、ヒトにおける遺伝情報、生体機能、疾患、創薬等、分子生物学の分野において、ポストゲノム時代として、公表されているゲノム情報を最大限利用し、研究の認識、戦略の変更をしなければならなくなったことは確実である。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、早期から全塩基配列を database 化する試みがなされていた

* To whom correspondence should be addressed: Atsuko Miyajima; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan;
Tel: 03-3700-1141 ext. 327; Fax: 03-3707-6950;
E-mail: miyajima@nihs.go.jp

が、ゲノムプロジェクトが終了し出芽酵母の約12Mb、16本の全染色体の塩基配列が、Web siteにより検索可能になったのは1996年4月であった³⁾。真核生物の中で全塩基配列が明らかにされたのは、出芽酵母が最初で、その後、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)⁴⁾ をはじめとしてヒト (*Homo sapiens*) に至る数多くの種においてもゲノムプロジェクトが進行している。出芽酵母に次いで、2002年2月、分裂酵母 (*S. pombe*) の全塩基配列も明らかになった⁵⁾。

酵母細胞を用いた研究においてポストゲノム研究への移行は、確かに大きな変化があった。遺伝子クローニングの必要は無くなり、Web site上を検索すれば、目的とする遺伝子の配列、染色体map、相同遺伝子の存在等の情報を容易に得ることができるようになった。ポストゲノム時代に入った酵母細胞の研究は、機能解析、構造解析、他の蛋白質との複合体形成など、遺伝子から蛋白質へその中心が移ってきた。さらに、DNA chipの開発に伴って、出芽酵母の各遺伝子の細胞周期におけるmRNAの発現量の変化もプロファイル化された⁶⁾。しかしながら、出芽酵母の全ORF数6327個のうち、一定の機能が示唆されて遺伝子名が名付けられているものは、未だに半分程度にすぎない。

遺伝情報を担っているDNAは、放射線、紫外線、変異原物質、活性酸素等により、細胞の内外から種々の損傷を絶えず受けている。DNAに損傷が生じると、複製、転写が阻害されたり、突然変異、欠失等が引き起こされる。これらDNA損傷、突然変異は、細胞死、癌化、老化、その他様々な疾患を引き起こす。細胞が持つ遺伝情報が正確に維持されるためには、DNA複製が正確に行われ、DNAが損傷を受けた際には、速やかにそれを修復する機構が働く必要がある。

DNAの複製、修復、転写、組み換え、細胞周期、細胞死等のDNAの遺伝情報維持に関わる多数の遺伝子がクローニングされ、その機構について徐々に明らかにされてきた。その遺伝子産物の中にはDNA helicaseが幾つか含まれている。

Helicaseは、ATPの加水分解エネルギーを用いて、二本鎖のポリヌクレオチドを巻き戻し、一本鎖にする酵素の総称である。DNA鎖を巻き戻すか、RNA鎖を巻き戻すかにより、DNA helicaseまたはRNA helicaseに分類される。Helicaseには共通して、helicase domainと呼ばれる、7つの特徴的な配列 (motif) が保存されている。それらはI, Ia, II, III, IV, V, VIで、helicase活性の中心となるmotif IIのDEXH配列により、helicaseのtypeが分類される。Helicaseは、それぞれ2本鎖の巻き戻し方向が決まっており、使用可能なヌクレオチドの種類や、巻き戻すDNAの長さ、構造に特徴がある。二本鎖DNAが一本鎖に巻き戻される過程は、DNA複製における複製

フォークの二本鎖DNA巻き戻し、DNA修復におけるヌクレオチド切り出し除去、転写の伸長、組み換え等、DNAの遺伝情報維持に関わる多くの過程に必要とされる。出芽酵母においては、82個のhelicase motifを有する遺伝子が報告されているが、これらの遺伝子が実際にhelicase活性を持つか、また酵母細胞における機能について明らかにされているものは、ほんの一部の遺伝子に過ぎない。

近年、DNA helicase遺伝子が原因遺伝子である常染色体劣性遺伝疾患が相次いで報告されてきている (Table 1)。それらの遺伝子疾患は、高発癌を示し、日光過敏、免疫不全、早老、成長障害などの症状を示す疾患や、自己免疫疾患、異常ヘモグロビン症など様々な症状を示す疾患であった。

疾患原因DNA helicase遺伝子として、まず、色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum : XP) において、2種の遺伝子が同定された。1990年に同定された、XP-B群の原因遺伝子XPBは、UV-sensitive CHO細胞変異株を相補するヒト遺伝子ERCC3と同一の遺伝子で、出芽酵母RAD25/SSL2の相同遺伝子であった⁷⁾⁻⁹⁾。1992年に同定されたXP-D群の原因遺伝子XPDは、同様にERCC2と同一で、酵母RAD3の相同遺伝子であった¹⁰⁾⁻¹²⁾。XPB、XPD蛋白質は、いずれも基本転写因子TFIIHに含まれていた^{13), 14)}。1992年にコケイン症候群 (Cockayne syndrome) B群の原因遺伝子CSBが、同定された。CSB/ERCC6は、酵母のRAD26に相同性を有していた¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。次いで1994年、自己免疫疾患である膠原病の自己抗原Ku (Ku70-Ku80) のサブユニットであるKu80もDNA helicase遺伝子であることが明らかにされた^{18), 19)}。1995年、異常ヘモグロビン症の一つである、 α サラセミア (α -thalassaemia, ATR-X syndrome) の原因遺伝子ATR-Xが同定された。ATR-Xは、染色体Xq13において同定されたX-linked helicase-2 (XH2) と同一で、この遺伝子は酵母のRAD54に相同性を有していた^{20), 21)}。さらに、1995年から1999年にかけて、3つのDNA helicase遺伝子が、常染色体劣性遺伝子疾患の原因遺伝子として同定された。それらは、ブルーム症候群 (Bloom syndrome: BLM)²²⁾、ウェルナー症候群 (Werner syndrome: WRN)²³⁾、ロトムント・トムソン症候群遺伝子 (Rothmund-Thomson syndrome: RTS)²⁴⁾ である。これら3つの遺伝子は、どれも大腸菌のrecQ、出芽酵母のSGS1に相同性を有していた。以上の疾患の原因遺伝子となるヒトDNA helicase遺伝子は、いずれも酵母相同遺伝子を有していた。

酵母は、1940年代から遺伝学の研究が盛んにされてきた最も下等な真核生物である。単細胞で、倍加時間が2時間程度と短く、扱いが容易である。ゲノムプロジェクトが終了し、出芽酵母16本の全染色体の塩基配列が

Table 1 DNA helicase genes for human recessive heredity diseases

Human gene	Disease	Gene map locus	(Yeast homologue)	Function
<i>XPB/ERCC3</i>	Xeroderma pigmentosum	2q21	(<i>RAD25/SSL</i>)	3'→5' helicase, Subunit of THIIH
<i>XPD/ERCC2</i>	Xeroderma pigmentosum	19q13.2-q13.3	(<i>RAD3</i>)	5'→3' helicase, Subunit of THIIH
<i>CSB/ERCC6</i>	Cockayne syndrome	10q11	(<i>RAD26</i>)	DNA dependent ATPase, RNA Polymerase II complex
<i>Ku80/XRCC5</i>	Diffuse collagen disease	2q35	(<i>YKU80/HDF2</i>)	DNA helicase, Subunit of Ku autoantigen
<i>ATR-X/HX2</i>	α -Thalassemia	Xq13	(<i>RAD54</i>)	?
<i>BLM</i>	Bloom syndrome	15q26.1	(<i>SGS1</i>)	3'→5' helicase
<i>WRN</i>	Werner syndrome	8p12-p11.2	(<i>SGS1</i>)	3'→5' and or 5'→3' helicase
<i>RTS/RECQ4</i>	Rothmund-Thomson syndrome	8q24.3	(<i>SGS1</i>)	?

真核生物で最初に明らかになったのには、イントロンがわずかで、ゲノムの量が少ないこともあるが、酵母細胞の生活環の特異性により、遺伝学的な研究が盛んに進められたことが背景にある。

酵母は単核単細胞の真核生物で、Fig. 1に示すように、一倍体、二倍体をそれぞれ正規のライフサイクルとし、高次倍数体の生育も可能である。2Nの遺伝子を持つ二倍体酵母細胞は、窒素源および栄養性炭素源の枯渇により減数分裂が誘導され一倍体の胞子を形成する。形成されたaまたは α 一倍体酵母細胞は、栄養条件下において、一倍体のまま安定に増殖を繰り返すことが可能である。さらに、a、 α 一倍体酵母細胞は、接合により二倍体を形成する。

この生活環の特性を利用することにより、分子遺伝学的解析を進める上で、以下のような利点がある。

- 1) 一倍体酵母細胞を用いて目的とする遺伝子を破壊することにより、容易に遺伝子破壊株を取得することができる。また、a、 α の一倍体酵母株において、それぞれ、遺伝子を修飾した上で接合を行わせることにより、種々の研究上有用な二倍体株を得ることが可能である。
- 2) 遺伝子変異の入った一倍体と野生株を掛け合わせ、四分子解析 (tetrad analysis) により、目的の遺伝子の変異を有する一倍体を取得することができる。また、四分子解析により分離した四胞子の表現型を観察したり、二対の対立遺伝子についての解析が可能

である。

- 3) 二倍体酵母株は貧栄養条件により容易に減数分裂を誘導することができるため、減数分裂期における機能についての解析を容易に進めることができる。
- 4) 酵母細胞においては、DNA複製、修復、組み換えといったDNA代謝に関与する蛋白質群の多くのアミノ酸配列や細胞内機能が、高等真核生物と酵母で極めて高度に保存されており、酵母の実験系で得られた結果が、高等真核生物における機能解析に有用である。

本稿では、DNA helicaseが原因遺伝子となる疾患について、酵母相同遺伝子による機能解析の結果、特に、筆者らが進めた出芽酵母*SGS1*の機能解析に関する研究を中心に、疾患発症のメカニズムとの関連について紹介する。

2. 色素性乾皮症、コケイン症候群原因DNA helicase 遺伝子

色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum : XP) は、常染色体性劣性遺伝子疾患で、約10万人に1人の割合で発症し、日光過敏症を示す。乳幼児期から短時間の日光照射で紅斑、水泡などの急性皮膚炎症を繰り返し、その皮膚病変部において、数千倍もの高頻度で皮膚癌が発生する²⁵⁾。また他の臓器においても、10~20倍の頻度で癌を発生する。これらの皮膚症状に加えて、重篤なものは、精神神経症状 (進行性知能低下、小頭症、小脳性運

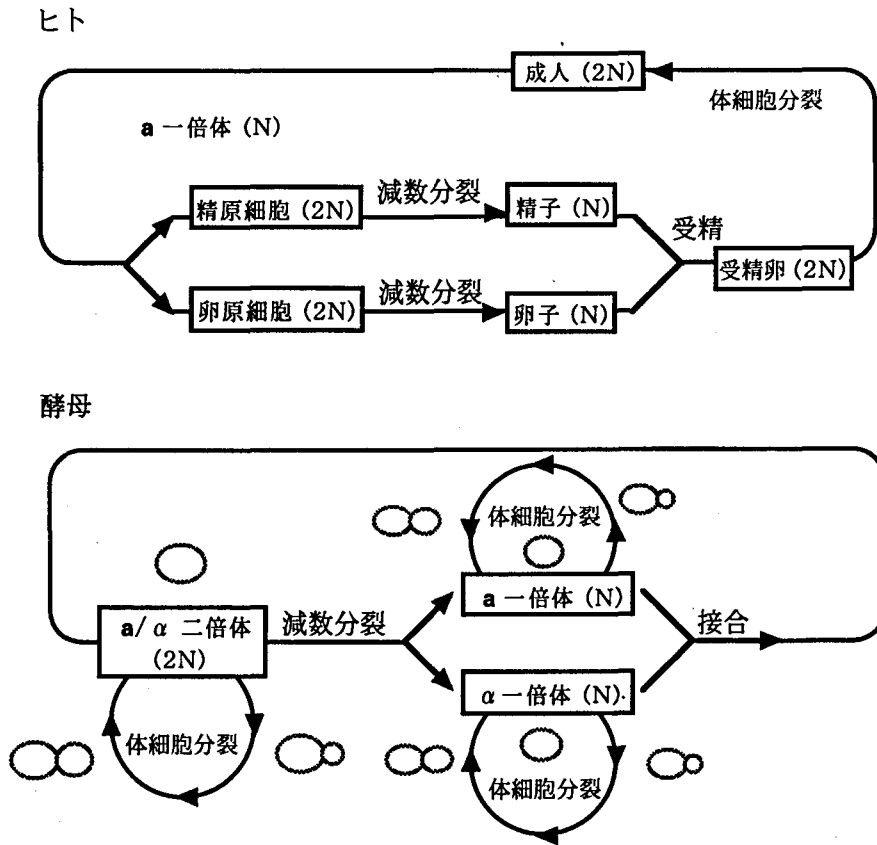


Fig. 1 Comparison of life cycle between human and yeast

動失調症, 神経原性の難聴や筋萎縮)を示す。相補性試験の結果, XPはA~GおよびV (variant) の8つの群に分類されている。XP-A~G群の原因遺伝子産物は, 紫外線によるピリミジン二量体 (pyrimidine dimer) や(6-4) 光産物, シスプラチンによるDNA鎖内架橋, アセチルアミノフルオレン (AFF) による塩基付加体などの様々なDNA損傷を修復するヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair: NER) 機構に関与することが知られている。XP-Vは, 損傷の乗り越え複製に機能する²⁶⁾。コケイン症候群 (Cockayne syndrome: CS) も同様に, ヌクレオチド除去修復に欠損を示すヒト劣性遺伝子疾患で, 小人症, 精神発達遅延, 小頭症, 神経原性難聴, 運動失調, 網膜色素変性症などを示し, A, Bの2群に分類される^{27, 28)}。

大腸菌においても, ヌクレオチド除去修復に関わるUvrA, UvrB, UvrC, UvrDの4種類の蛋白質が報告されており^{29, 30)}, クレオチド除去修復機構は, 大腸菌からヒトまで保存されていると考えられる。ヌクレオチド除去修復に関する研究は, DNA修復に欠損を示す細胞株を用いて解析されてきた。出芽酵母細胞においては, 放射線, 紫外線に感受性を示す変異株に対する解析から, その原因となるRAD遺伝子が数多く報告された。それらの変異株の2重遺伝子変異株を作成し, それらの株の感

受性を比較することにより, 同じDNA修復経路に属するかどうかを検討 (epistasis test) した結果, RAD3, RAD6, RAD52の3つのepistasis groupに分類された³¹⁾。これら3つのepistasis groupのうち, RAD3 epistasis group群に属する遺伝子群が, 酵母細胞においてNERに関わっていた³²⁾。RAD3 epistasis group群に属する遺伝子の中には, DNA helicaseのmotifをもつ遺伝子が3つ (RAD3, RAD16, RAD25) 含まれていた。

また, げっ歯類細胞のCHO細胞においてUVに高感受性の突然変異株が単離され, 11種類の遺伝的相補群が存在した。これらの細胞に正常ヒト細胞のゲノムDNAをtransfectionし, UV感受性を回復する遺伝子 (excision repair cross complementing rodent repair deficiency: ERCC) が同定され³³⁾, そのうちのERCC2, ERCC3, ERCC5, ERCC6, ERCC8は, それぞれ, XPまたはCSの原因遺伝子XPD, XPB, XPG, CSB, CSAであることが明らかになった^{34)~36)}。

XPのA~GおよびV群の原因遺伝子は, 1990年代に相次いでクローニングされ, 既にすべての遺伝子が同定されている。コケイン症候群A, Bの原因遺伝子も同定された。それらの遺伝子は, いずれもNERの過程 (①DNA損傷の認識, ②損傷の両側におけるDNA鎖の切断, ③損傷を含むDNA鎖の除去, ④新しいDNA鎖の合成,

⑤新しいDNA鎖の結合)に関わるものであった。ヌレオチド除去修復は、ゲノム中のあらゆる場所で発生した損傷を対象とする修復機構(global genome repair: GGR)と、転写と共役して鋳型鎖上の損傷を特異的に修復する機構(transcriptional coupled repair: TCR)に分類される。XPAは損傷DNAに結合するZn finger蛋白質でRPA, ERCC1, TFIIHと結合し³⁷⁾⁻³⁹⁾, XPCはHR23Bとcomplexを形成しGGR特異的に損傷認識を行う^{40, 41)}。XPEはp48のDDB因子(damaged DNA binding factor)が候補として有力である⁴²⁾。XPFはERCC1とcomplexを形成し損傷の5'側特異的なエンドヌクレアーゼ、XPGは損傷の3'側特異的なエンドヌクレアーゼである^{43), 44)}。XPVはDNA polymerase η (eta)で、損傷の乗り越え複製機能する²⁶⁾。XP-CおよびXP-E群はGGR特異的に欠損を示す。コケイン症候群A, Bの原因遺伝子も同定されており、それらは転写共役型修復(TCR)に関わる遺伝子であった。CSAは、5個のWD-40リピートを持ち、CSBおよびTFIIHのp44に結合する⁴⁵⁾。

2.1 ヒトXPB, XPD, CSB遺伝子および酵母相同遺伝子

XP-B群の原因遺伝子XPB/ERCC3は、出芽酵母RAD25/SSL2の相同遺伝子であった⁷⁾⁻⁹⁾。XP-D群の原因遺伝子XPD/ERCC2は、出芽酵母のRAD3の相同遺伝子であった¹⁰⁾⁻¹²⁾。XPB, XPD蛋白質は、いずれもヌレオチド除去修復に関与し、9個のサブユニット(XPB(p89), XPD(p80), p62, p52, p44, Cdk7(p38), p34,

Cycline H(p34), MAT1(p32))からなる基本転写因子TFIIHに含まれている^{13), 14)}。XPB蛋白質は3'→5' DNA helicase, XPD蛋白質は5'→3' DNA helicaseである。NERにおいては両方のDNA helicase活性が必要とされるが⁸⁾, 転写の開始にはXPBが主要な役割を担っており、XPDのhelicase活性は必須ではなかった^{46), 47)}。

XPBおよびXPDの出芽酵母相同遺伝子産物Rad25, Rad3はいずれもhelicaseで、酵母において、基本転写因子transcriptional factor b (TFIIHのyeast homologue)の9個のサブユニット(Ccl1, Kin28, Rad3, Ssl1, Ssl2/Rad25, Tfb1, Tfb2, Tfb3, Tfb4)に含まれている⁴⁸⁾⁻⁵⁰⁾(Table 2)。酵母において、RAD25およびRAD3のnull遺伝子破壊株はどちらも致死で、これらの遺伝子産物が、酵母の生存に関わる重要な機能を担っていることが示された⁵¹⁾。

CBSはhelicase motifをもつ168KのSWI/SF2 familyに属する蛋白質で、DNA依存性のATPase活性は有するが、helicase活性は有しない。CBSは、RNA polymerase complexに含まれる¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。酵母におけるCSBの相同遺伝子産物Rad26は、同様にDNA依存性のATPase活性を有し、TCRに関与する⁵²⁾。酵母細胞においてRAD26遺伝子破壊株は生存可能であったが、TCR欠損を示した⁵³⁾。

ヒト色素性乾皮病、コケイン症候群原因遺伝子群の遺伝子には、何れも酵母の相同遺伝子が存在することから、NER機構が酵母からヒトに至る真核生物において、高度に保存された機構であることが予想される。酵母の

Table 2 Function of yeast DNA helicase genes for human recessive heredity diseases

Yeast helicase gene	Gene Chr. locus, Systematic name	ORF size	Mutant phenotype	Function
<i>RAD25/SSL2</i>	Chr. IX, YIL143C	2352 bp	inviable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Subunit of transcription factor b
<i>RAD3</i>	Chr. V, YER171W	2337 bp	inviable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Subunit of transcription factor b
<i>RAD26</i>	Chr. X, YJR035W	3258 bp	viable, radiation sens.	Nucleotide- excision repair, Transcription-coupled repair
<i>YKU80/HDF2</i>	Chr. XIII, YMR106C	1890 bp	viable, MMS sens.	DNA end-joining repair, Subunit of Ku autoantigen
<i>RAD54</i>	Chr. VII, YGL163C	2697 bp	viable, radiation sens.	X-ray damaged repair, Mitotic and meiotic DNA recombination
<i>SGS1</i>	Chr. XIII, YMR190C	4334 bp	viable, MMS sens.	DNA repair, Mitotic and meiotic DNA recombination

変異株を用いたNERに関する分子遺伝学的な研究は、高等動物細胞（哺乳類細胞）におけるNER機構の研究の発展に大いに寄与した。このように、酵母細胞は下等ではあるが真核細胞に属しており、下等から高等までよく保存された機能の解析において、良いモデル系となる実例的な例を、DNA helicase 遺伝子の機能解析研究は数多く示している。

3. 自己免疫疾患原因 DNA helicase 遺伝子と酵母相同遺伝子

膠原病 (diffuse collagen disease) は、広範性結合組織疾患で、全身のフィブリノイド変性を示す。発熱、関節痛、皮膚症状、腎障害、胸膜炎など血管結合組織において炎症症状が観察され、自己免疫現象を示す。Ku 蛋白質 (Ku70-Ku80) は、自己免疫疾患 (autoimmune disease) の強皮症 (scleroderma)・多発性筋炎重複症候群の自己抗原として発見された。Ku 蛋白質のサブユニットである *Ku80* も DNA helicase 遺伝子であることが、明らかにされた^{18), 19)}。Ku 蛋白質は触媒サブユニット (p465) に結合し、DNA 依存性プロテインキナーゼの DNA 結合性調節成分として機能し、DNA 修復および V (D) J recombination に関与している。*Ku80* は、げっ歯類細胞の CHO 細胞において X-ray に高感受性を示す突然変異株の感受性を回復するヒト XRCC (X-ray repair cross complementing rodent repair deficiency) 遺伝子群の XRCC5 と同一の遺伝子で、酵母細胞の *YKU80/HDF2* の相同遺伝子であった。Ku 蛋白質は、DNA helicase 活性を有している⁵⁴⁾。

酵母においても、*yKu80/Hdf2* は、*yKu70/Hdf1* と complex を形成し、non-homologous end-joining (NHEJ) 因子として機能する⁵⁵⁾。DNA は内在的なストレスや紫外線、電磁放射線、環境変異原物質等により、DNA に 2 本鎖切断を生じる。真核生物においては、生じた 2 本鎖切断は通常相同組み換えにより修復されるが、生成した DNA 末端は、末端再結合機構 (NHEJ) により修復される。出芽酵母の NHEJ に関与する因子は、*yKu80-yKu70* complex, *Mre11-Rad50-Xrs2* complex, *Sir2-Sir3-Sir4* complex, *Lig4-Lif1* complex が報告されている。*yKu80-yKu70* complex は、切断された DNA 末端に結合し、DNA 末端同士を引き寄せる働きをする⁵⁶⁾。

ヒトやマウス等の高等真核生物においては、2 本鎖切断修復だけでなく免疫グロブリンや T 細胞受容体の多様性獲得に必要な V (D) J recombination にも、NHEJ が関与する。その場合、*Ku70-Ku80-DNA-PK* complex と *XRCC4-DNA ligase IV* complex が関与することが報告された^{57), 58)}。

4. α サラセミア原因 DNA helicase 遺伝子と酵母相同遺伝子

サラセミア (地中海貧血) は、異常ヘモグロビン症の一つで、1 つまたは複数のグロビンのポリペプチド鎖に産生欠損を生じ、正常ヘモグロビンの合成が障害される疾患である。異常を伴う鎖によって、サラセミアは α , β , γ 等に分類される。 α サラセミアの症状は、重症型では子宮内死亡または生後直後の胎児水腫により死亡する。軽症の場合は、小球性、低色素性、再生不良性貧血を示し、赤血球内にヘモグロビン H の封入体が観察される。 α サラセミアはアジア南東部に局在する。1995 年、 α サラセミアの原因遺伝子 X-linked α -thalassemia / mental retardation (*ATR-X*) が、X-linked helicase-2 (*XH2*) 遺伝子と同一であることが示された。*ATR-X* 遺伝子は、酵母の *RAD54* に相同性を有していた^{20), 21)}。*ATR-X* は α グロビン発現の制御に関わっているのではないかと考えられているが、その機能については明かになっていない。

Rad54 は、DNA 依存性 helicase 活性を有し、酵母において、X-ray による傷害の修復、体細胞分裂組み換え、減数分裂組み換えに関わっている^{59), 60)}。酵母には、*RAD54* に相同性を有する、*RDH54/TID1* 遺伝子が存在し、この遺伝子も helicase motif を有している⁶¹⁾。*Rdh54* は DNA 修復および DNA の supercoiling に関与し、*DMC1* と相互作用する⁶²⁾。また、ヒトにおいて、酵母 *RAD54* の相同遺伝子 *hRAD54* (Chr. 1p32) も報告されており⁶³⁾、これらの遺伝子の機能との関連についても興味を持たれる。

ATR-X が、ヒトの α グロビンを含む遺伝子の発現にどのように関わっているかについては、まだ明らかになっていないが、今後、*Rad54*, *Rdh54* 等の転写制御における機能が明らかになるに連れて、*ATR-X* の機能についての解析が進むことが期待される。

5. ブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群原因 DNA helicase 遺伝子と大腸菌、酵母相同遺伝子

1995 年から 1999 年にかけて、3 つの DNA helicase 遺伝子が、常染色体劣性遺伝子疾患の原因遺伝子として同定された。それらは、ブルーム症候群 (Bloom syndrome: *BLM*)²⁰⁾、ウェルナー症候群 (Werner syndrome: *WRN*)²¹⁾、ロトムント・トムソン症候群遺伝子 (Rothmund-Thomson syndrome: *RTS*)²²⁾ である。これら 3 つの遺伝子は、何れも大腸菌の *recQ*, 出芽酵母の *SGS1* に相同性を有していた。大腸菌の *RecQ* は、*recBC sbcB* background における thymineless death の抵抗性に関わる遺伝子として 1984 年に同定され、*RecF* の組み換えの経路に関与していることが明らかにされた^{64), 65)}。*RecQ* 蛋白

質は、610 amino acids(aa), 分子量74 KDa, スクレオチドとしてATP, dATPを利用することができ、巻戻しの方向は3'→5'のDEAH typeのDNA helicaseである⁶⁶⁾. *recF*変異株は、*recBCD sbcBC* backgroundにおいてUV抵抗性を消失し、また、*recQ*欠失変異株は*recBCsbcBC* backgroundにおいてUVおよびMMS感受性を示すことが報告されている^{67), 68)}.

5.1 ヒト *recQ* 相同遺伝子

ヒトにおいては、現在までに5種類のRecQ相同遺伝子産物 (DNA helicase Q1/RecQL, Blm, Wrn, Rts/RecQ4, RecQ5) が報告されている (Fig. 2). 我々の研究グループおよびPuranam & BlackshearによりクローニングされたDNA helicase Q1/RecQLは、大腸菌の*recQ*相同遺伝子としてcDNAが同定された最初の哺乳類細胞遺伝子であった^{69), 70)}. その後、1995年、1996年に相次いで、DNA helicase 遺伝子である*BLM*, *WRN*が、positional cloningにより同定された^{22), 23)}. その後、ヒト*recQ*相同遺伝子が集中的に探索された結果、更に2つの*recQ*相同遺伝子 (*RECQ4*, *RECQ5*) がクローニングされた⁷¹⁾. *RECQ4*は、ロトムント・トムソン症候群遺伝子*RTS*であることが明らかとなった²⁴⁾.

ブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群、これら3つの症候群はいずれも、癌多発性、DNA修復異常、染色体不安定性を示す、常染色体

劣性遺伝疾患である。ブルーム症候群は、高発癌の他に、成長遅延、免疫不全、男性患者の不妊 (有効な精子を持たない) が報告されている⁷²⁾⁻⁷⁴⁾. 発症例は、世界で200例ほどでウクライナのユダヤ人に多いが、日本人でも16例ほどが報告されている。ブルーム症候群患者の細胞においては、相同染色体間の組み換えや、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange : SCE) の頻度の上昇が観察され、細胞がアルキル化剤であるEMSに感受性を示すことが報告されている⁷⁵⁾.

ウェルナー症候群は、世界の症例1200例のうち、約70%が日本において報告されたものである。最も顕著な症状は、早老症で、20代から白髪、皮膚の硬化、白内障などの症状が始まり、患者平均的寿命は46-47才である⁷⁶⁾⁻⁷⁸⁾. ウェルナー症候群患者の細胞においては、細胞寿命の短縮、telomereの短縮、染色体の欠失、転座の亢進が観察され^{79), 80)}, 細胞は、topoisomerase Iの阻害剤であるcamptothecin⁸¹⁾ や4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)⁸²⁾ に感受性を示すことが報告されている。

ロトムント・トムソン症候群は、高発癌の他に、発育不全や早老症を呈し、ブルーム症候群、ウェルナー症候群、両症候群を併せ持つような症状を呈する^{24), 83)}. 世界で200例が報告されており、メキシコ人系で高い。日本人でも、数例の報告がある。ロトムント・トムソン症候群の患者細胞においては、染色体のモザイク化現象が観察され、細胞は、UV, 放射線に感受性を示す⁸⁴⁾.

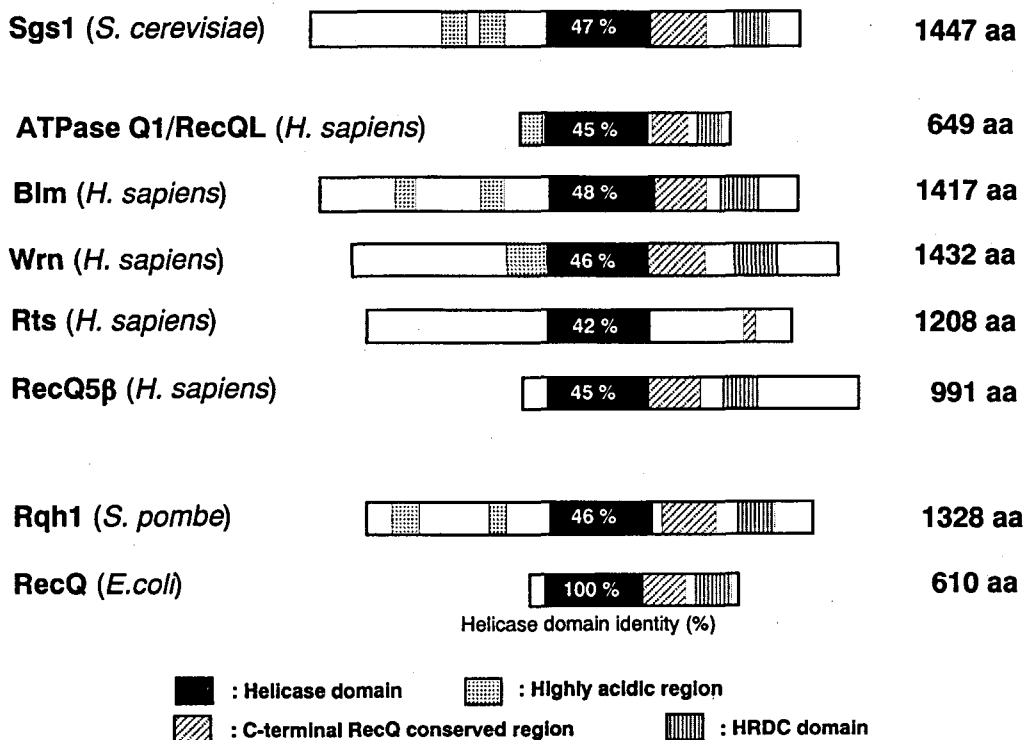


Fig. 2 Comparison of RecQ family protein

DNA helicase Q1/RecQL, RecQ5の変異に由来する、遺伝性疾患は現在までのところ報告されていない。RecQ5については、最近、Topo III α および β と相互作用することが報告された⁸⁵⁾。

5.2 出芽酵母SGS1

SGS1は、出芽酵母においてDNA topoisomerase III (Top3)の遺伝子破壊株の増殖遅延を相補する変異遺伝子として1994年に同定され、slow growth suppressorの頭文字を取ってSGS1と名付けられた⁸⁶⁾。出芽酵母において、top3変異株は、野生株に比べて細胞増殖が遅延し、細胞はlate S/G2に停止していた。また、DNA繰り返し配列間の遺伝子組み換え頻度の上昇が観察され、胞子形成が低下していた⁸⁶⁾。top3変異株を継代して培養していると、増殖遅延が回復する株が高頻度で生じてくる。この増殖遅延を回復した変異株を解析したところ、更に別の遺伝子に変異が入っていることがわかり、その遺伝子を同定して得られたのがSGS1である。sgs1-top3二重遺伝子変異株においては増殖遅延が回復するが、sgs1単独の変異株においては、細胞増殖の速度は変化せず野生株と同様であった。また、sgs1-top3二重遺伝子変異株においては、top3変異株の高頻度組み換えも抑制された。Sgs1は、1447 aa、DEAH型のDNA helicaseで、大腸菌においてDNA修復および組み換えに関与しているRecQにhelicase domainにおいて高い相同性を有している。Two-hybrid systemによる実験の結果、Sgs1はDNA topoisomerase III (Top3)⁸⁶⁾およびDNA topoisomerase II (Top2)⁸⁷⁾と相互作用することが明らかにされた。SGS1遺伝子がコードする蛋白質は、ほぼ中央部分に大腸菌RecQに相同性を有するhelicase domainが存在し、helicase domainのRecQとの相同性は47%であった。SGS1遺伝子は、さらにhelicase domainの両側に長いN末、C末部分があり、N末側には、highly acidic region、C末側には、C-terminal RecQ conserved region, helicase and RNaseD C-terminal (HRDC) domainを有していた。Sgs1は実際にDNA helicase活性を有することが明らかにされた^{88), 89)}。また、Sgs1は、G-G pairの4重鎖DNAを巻き戻す活性も有していた⁹⁰⁾。

これまでに、sgs1変異株においては、体細胞分裂期および減数分裂期における染色体分配の正確さの低下⁸⁷⁾、体細胞分裂期の相同染色体間のDNA組み換え頻度の上昇、非相同組み換えの頻度の上昇が報告されている^{91), 92)}。また、我々の研究グループにおいても、sgs1変異株において姉妹染色分体交換 (SCE) が亢進することを報告した⁹³⁾。

またsgs1変異株において母細胞のみの分裂を観察すると、細胞の分裂寿命が40%にまで低下し、Sgs1が老化の抑制に関与していることが示された⁹⁴⁾。出芽酵母に

おいては、細胞の継代に伴って核小体機能が低下すると同時に、染色体から組み換えにより生じるrDNAのリング (extrachromosomal rDNA circle : ERCs) の増加が観察されるが、sgs1変異株においては、この反応が野生株より早く進行し、母細胞の老化の進行が早く進んでいると考えられた⁹⁵⁾。

現在までに報告されているRecQ family蛋白質は、その大きさにより、大きく2つに分類される。大腸菌RecQ, マウスmRecQL, mRecQ5, ヒトDNA helicase Q1/RecQL, RecQ5は、600~900 aaでhelicase domainの後ろのC末側にのみ長い配列を持つものである。もう1つのグループは、出芽酵母Sgs1, 分裂酵母Hus2/Rqh1/Rad12, マウスBlm, Wrm, ヒトBlm, Wrm, Rts/RecQ4で、約1400 aaからなるものである。後者のグループは、helicase domainの両側に様々なN末、C末領域を有している²⁴⁾。

出芽酵母においてはゲノムプロジェクトが終了し、全ゲノム配列の情報がdatabaseを用いて検索可能になった。RecQ相同遺伝子間で高く保存されているhelicase domainをプローブとして、出芽酵母のゲノムライブラリーを検索した結果、SGS1以外の遺伝子は得られなかった。ヒトにおいては既に、5つのRecQ family蛋白質が報告されていることから、進化の過程で分かれ、機能を別にしてきたことが推測され、酵母細胞においてSgs1蛋白質はヒトにおけるRecQ family蛋白質の機能をオーバーラップして担っていると考えられる。

5.3 出芽酵母Sgs1の機能とヒトRecQ相同遺伝子産物の機能

我々のグループにおいて、Sgs1の酵母細胞における機能について検討した結果、

1) 出芽酵母においてSgs1は、体細胞分裂期のDNA修復、DNA組み換えにおいて機能を果たしていることを明らかにした⁶⁵⁾。

sgs1遺伝子破壊株は、アルキル化剤 (MMS, EMS, MNNG), およびHUに感受性を示し (Table 3), interchromosomal recombinationが亢進していることを見いだした (Table 4)。これらの結果より、出芽酵母においてSgs1は、体細胞分裂期のDNA修復、DNA組み換えにおいて機能を果たしていることを明らかにした。sgs1遺伝子破壊株は、アルキル化剤 (MMS, EMS, MNNG) に感受性を示すという結果は、ブルーム症候群患者の細胞がアルキル化剤 (EMS) に感受性を示すという報告と一致していた⁹⁷⁾。MMS, EMS, MNNG等のアルキル化剤は、DNAの塩基部分のアルキル化⁹⁸⁾、塩基の変異および欠失、single-strand DNA, double-strand DNAの切断を生じること⁹⁹⁾が知られている。また、アルキル化剤によるDNA傷害がS期通過後dsDNAの切断を引き起こす

ことも報告されている¹⁰⁰⁾。そのため、これらのアルキル化剤により引き起こされるDNA傷害に対して、様々なDNA修復機構が働いていると考えられる。我々の研究グループにおいて、MMSによるDNA傷害に対するSgs1によるDNA修復機構について、詳細な検討を進めた。出芽酵母においては、既にDNA傷害に対する修復経路とそれに関わる因子が同定されていることからこれらの既存のDNA修復経路にSgs1が関与するか、epistasis testによる解析を行った結果、SGS1は、RAD51, RAD52と同じepistasis groupに属することが示され、Sgs1が関与するDNA修復経路に相同組み換え修復機構があることが明らかになった¹⁰¹⁾。

SGS1のDNA修復における機能を考える上で、重要な役割を果たしている因子として、注目される遺伝子がSRS2である。Srs2は、Sgs1と同様に3'→5' helicase活性をもつことが知られている¹⁰²⁾。srs2とsgs1の二重遺伝子破壊株は、致死になる株と致死にならないまでも強い増殖阻害が起きる株があることが報告されている¹⁰³⁾、¹⁰⁴⁾。我々の研究グループにおいても、srs2遺伝子破壊株

は、僅かにMMS, HU感受性を示したが、srs2-sgs1二重遺伝子破壊株は、非常に強いMMS, HU感受性を示した。また、srs2破壊株をbackgroundとしたsgs1温度感受性株(srs2-sgs1-ts)を制限温度下で培養すると、DNA合成, RNA polymerase I transcriptionが阻害された¹⁰²⁾。したがって、Sgs1とSrs2は別々の経路で機能しているが、DNA修復, DNA合成, RNA polymerase I transcriptionにおいてその経路は一部が重複していると考えられる。

sgs1遺伝子破壊株は、体細胞分裂期においてinterchromosomal homologous recombinationが亢進していた。これまでに、sgs1変異株においては、体細胞分裂期および減数分裂期における染色体分配の正確さの低下⁸⁷⁾、体細胞分裂期の相同染色体間のDNA組み換え頻度の上昇、非相同組み換えの頻度の上昇が報告されている^{91), 92)}。また、我々の研究グループにおいても、sgs1変異株において姉妹染色分体交換(SCE)が亢進することを報告した⁹³⁾。組み換えにおける頻度の上昇は、ブルーム症候群患者の細胞におけるSCE頻度上昇⁷²⁾、ウ

Table 3 Sensitivity of *sgs1* disruptants to various DNA damaging agents

Strain background		W303	YPH	MR
Genotype		<i>sgs1::URA3</i>	<i>sgs1::URA3</i>	<i>sgs1::URA3</i>
UV	200 J / m ²	+	+	+
X-ray	8 Krad	+	+	N.D
MMS	0.01%	-	-	-
EMS	0.2%	-	-	N.D
MNNG	0.001%	-	-	N.D
Mitomycin C	100 µg/ ml	+	+	N.D
Bleomycin	100 µg/ ml	+	+	N.D
Hydroxyurea	100 mM	-	-	-

+ : same degree as wild type, - : sensitive, N.D : not determined, MMS : methylmethanesulfonate, EMS : ethylmethanesulfonate, MNNG : N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

Table 4 Effect of *sgs1* disruption on interchromosomal homologous recombination in mitosis

Strain	Genotype	Plasmid	Mitotic recomb. (His ⁺ frequency)
MR101	SGS1 / SGS1	vector	5.8 x 10 ⁻⁵
MR301	<i>sgs1::AUR / sgs1::AUR</i>	vector	42.1 x 10 ⁻⁵
		SGS1	7.0 x 10 ⁻⁵

エルナー症候群患者の細胞における、染色体の欠失、転座の亢進が^{79), 80)} ロトムント・トムソン症候群における染色体モザイク現象⁸⁴⁾ と関連していると考えられる。また、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群において観察される早期老化の症状とも深い関連があると考えられる。

Sgs1の機能のユニーク(特徴的)な点は、体細胞分

裂期と減数分裂期の組み換えに対する作用が、一見、全く逆なところである。体細胞分裂期では抑制的に作用しており、遺伝子破壊株はhyper recombinationとなる。これに対して、減数分裂期においては、促進的に働いており、遺伝子破壊株においては組み換えの頻度が低下する。しかしながら、これらは、生体の本質的な機能を考えると、大変合理的といえる。つまり体細胞分裂期にお

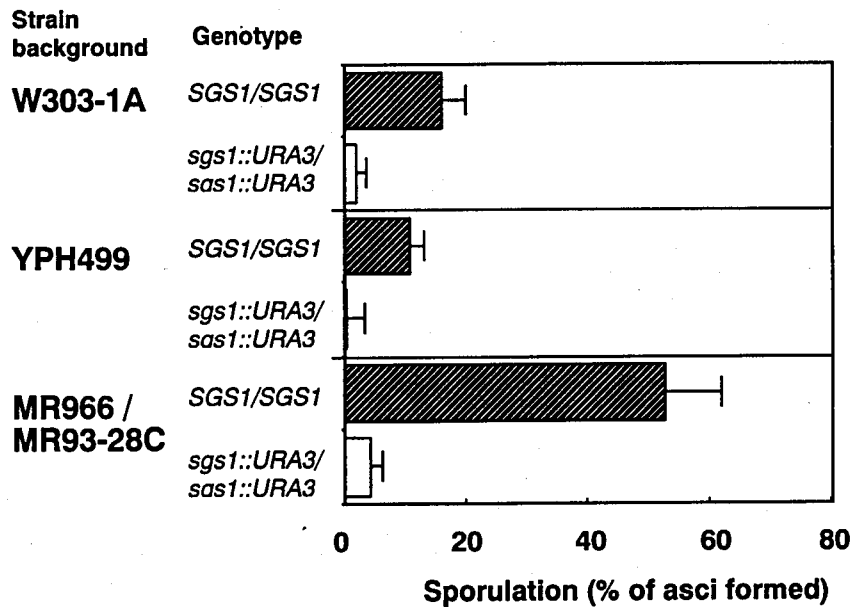


Fig. 3 Poor sporulation of *sgs1* disruptants

Diploid cells incubated on YPD plates for 2 days were transferred onto 1% KAC plates and incubated for 5 days to allow sporulation. Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope and the percentage the cell number which formed asci was measured.

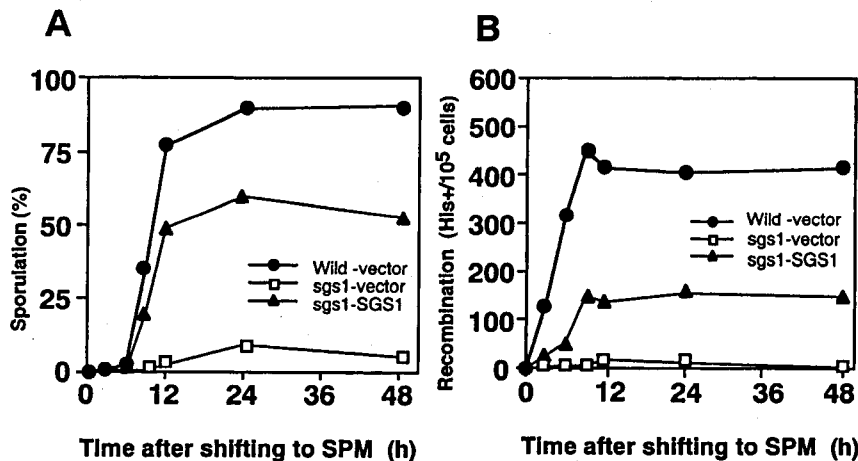


Fig. 4 Poor sporulation and reduction in the level of intergenic recombination of *sgs1* disruptant

Cells were removed at various times after shifting to SPM. Aliquots of 1 ml were taken at the various time points after shifting to SPM, and the sporulation, recombination and cell viability were examined. MR101 (wild type) tvector (●), MR202 (*sgs1::URA3*)+vector (pRS314) (□), MR202+SGS1 (pYCP1305) (▲). (A) Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope and the percentage of the cell number which formed asci was measured. (B) The frequency of recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was measured by return to-growth-assay. The frequency was examined by the number of forming colonies on SC-His(-) plates versus the number of forming colonies on SC plates after incubation for 3 days at 28 °C.

いては、DNA修復も含めて、よりミスが少なく遺伝情報を複製、維持することが必要である。一方、減数分裂期においては、より多彩な組み換えにより、環境に順応、進化できることが必要とされる。この両過程における作用を、Sgs1は、共に作用する蛋白質（相手となる役者）を変えることで、制御していると考えられる。

2) Sgs1は減数分裂期において機能を果たしていることを明らかにした。

sgs1 遺伝子破壊株は、胞子形成の低下、減数分裂組み

換え頻度の低下を示した (Fig. 3, 4)。また、*SGS1* mRNAの誘導が胞子形成の進行時に観察された (Fig. 5)。

ヒトの臓器・組織における mRNA の発現は、*BLM* は胸腺と精巣、*WRN* は脾臓、精巣、卵巣、*RTS* は胸腺と精巣で高い⁷¹⁾。*BLM*、*WRN*、*RTS* の mRNA が高発現する臓器・組織は、臨床症状の現れる部位と関連していると考えられる。さらにブルーム症候群患者において、男性患者の精子形成不全が報告されている¹⁰⁵⁾。

マウスにおいては、精巣において特に高い発現が観察され、精子形成の各ステージを追って *BLM* の発現につ

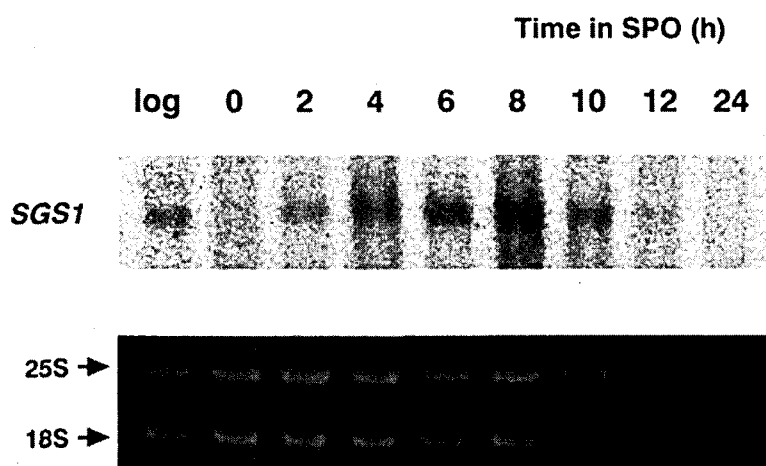


Fig. 5 Fluctuation in the level of *SGS1* mRNA after shifting to SPO

Wild-type cells were removed at various times after shifting to SPO. Total RNA was isolated from the cells, and aliquots (30 μ g) of the RNA were analyzed by Northern blotting.

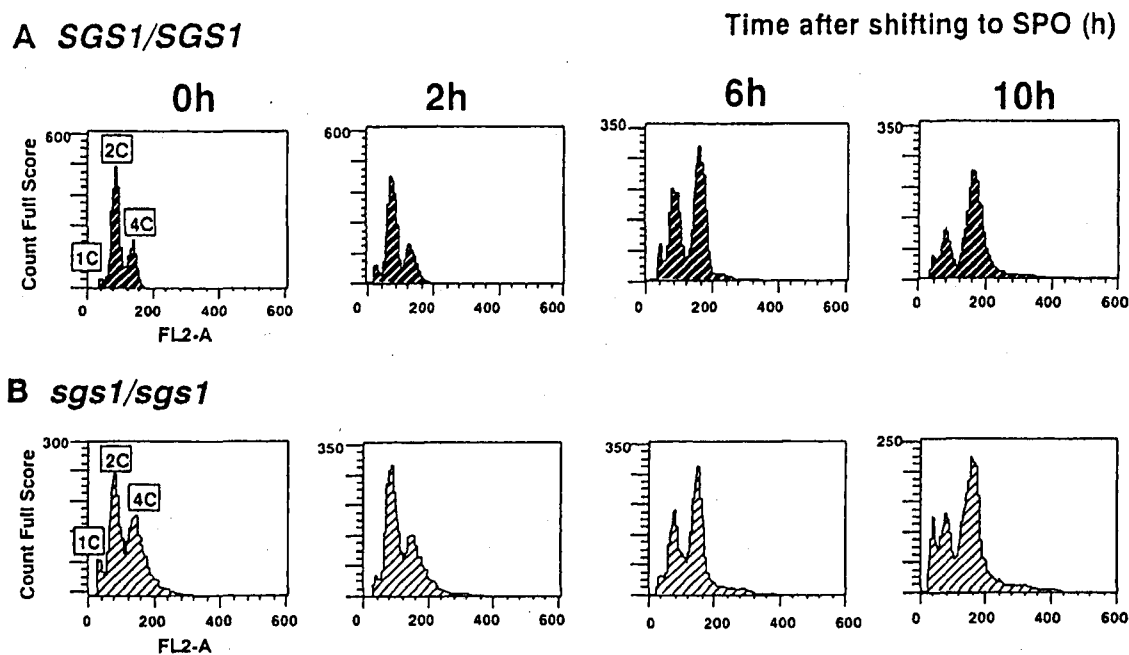


Fig. 6 Flow cytometrical analysis of DNA content

MR101 (*SGS1*) and MR202 (*sgs1::URA3*) cells were removed at various times after shifting to SPO and fixed with 70% ethanol. DNA content of the samples was analyzed with a FACScan/CellFIT System.

いて調べた結果、サイゴテン期の細胞が増加する生後17日目に顕著に増加していることが示された¹⁰⁶⁾。さらに、Blm蛋白質は、精巣で減数分裂が起こる前のサイゴテン期の初期から後期に掛けてシナプトネマ複合体が形成されていく過程で、シナプトネマ複合体上にRPAと共にdot状に存在する¹⁰⁷⁾。BLM遺伝子のノックアウトマウスの作製が試みられた結果、BLMのノックアウトマウスは胎生致死で、発生の遅れが観察された¹⁰⁸⁾。胎生13.5日までにほとんどの胚が死滅し、その理由はapoptosisによるものと考えられた。

酵母細胞の減数分裂の過程を追いながら、SGS1の減数分裂における機能について検討を行った結果、*sgs1*遺伝子破壊株においては、減数分裂前DNA合成は野生株と同程度に進行していた (Fig. 6)。次に減数分裂期における、二本鎖切断産物、遺伝子組み換え産物について解析した。減数分裂組み換えの過程は、Fig. 7のように進行する。減数分裂組み換えの最初のステップは、染色体にDNA double strand break (二本鎖切断, DSB) が入る過程である^{109)–113)}。まず最初に、Mre11, Spo11により

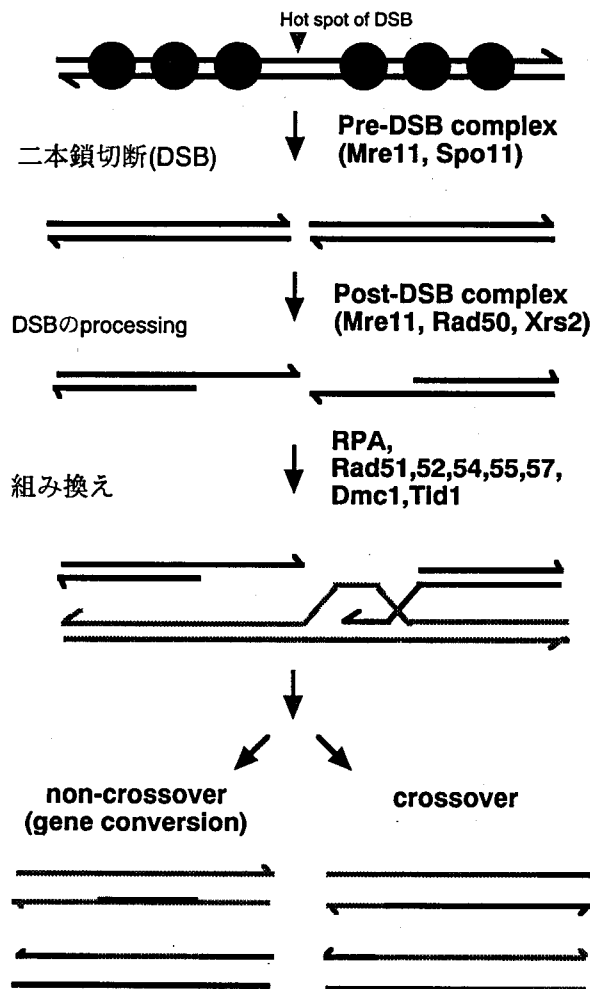
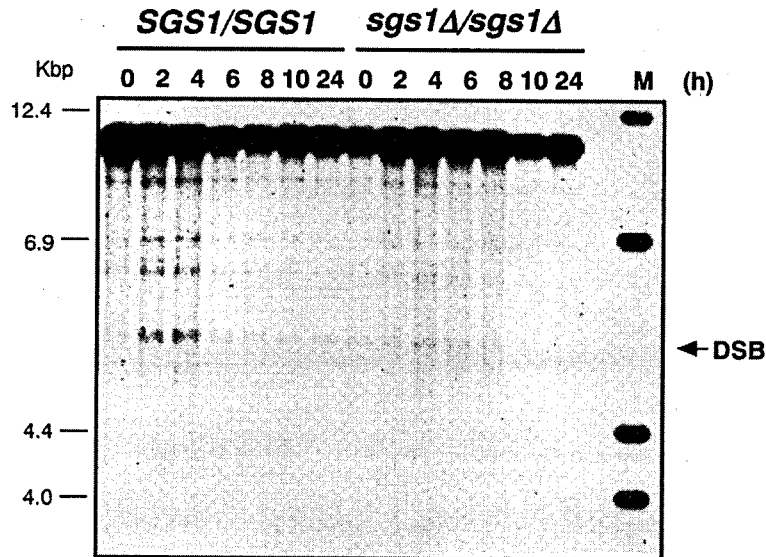


Fig. 7 Meiotic recombination process in yeast

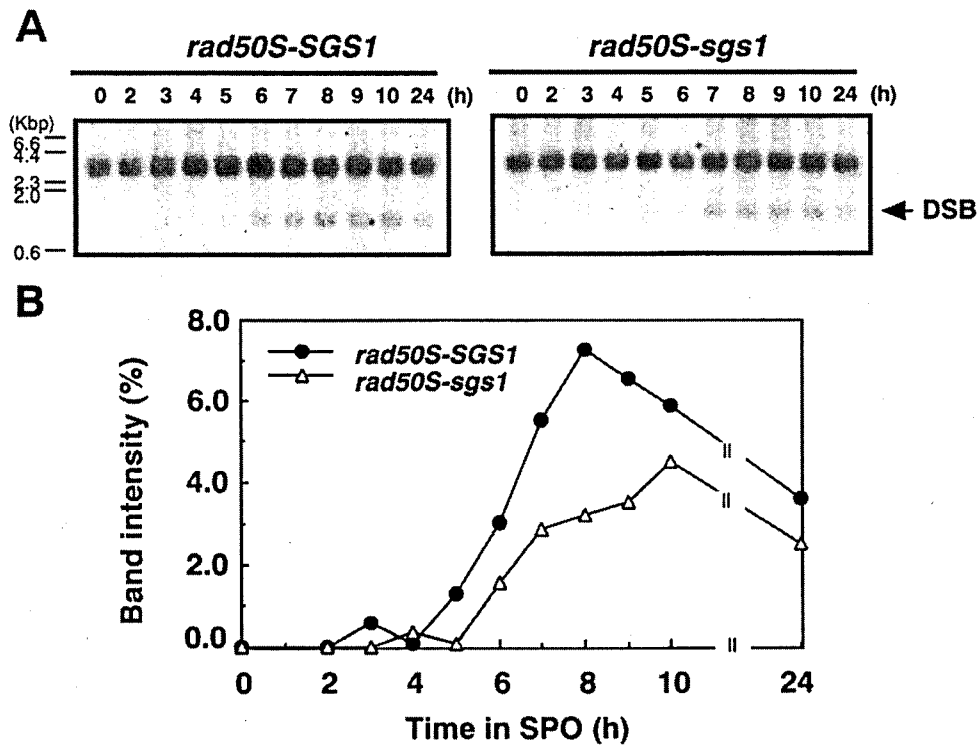
能動的にDSBが導入される。次に、Rad50, Xrs2が導入されMre11と複合体を形成し、Spo11の除去と exonuclease活性によりDSB末端からのDNA鎖の消化 (DSBのprocessing) を行う^{114)–119)}。Mre11複合体によるDSBのprocessingにより露出された1本鎖DNAにRPA (replication protein A) が結合し、そこにRad51, 52, 54, 55, 57等が結合し組み換え反応が開始する^{120), 121)}。1本鎖DNAに結合しているRPAに、まずRad52が結合し¹²²⁾、Rad55, 57存在下で、Rad52にRad51が結合すると、Rad51同士で重合し、フィラメント構造を形成する¹²³⁾。さらにRad51にRad54が結合し、相同染色体の検索、鎖交換反応が進行する^{124)–127)}。修復DNA合成とHolliday構造の解離により、crossover型もしくはnon-crossover (gene conversion) 型の組み換え産物が生じる¹⁰⁹⁾。non-crossover型の組み換え産物の場合には、DNAの連結とミスマッチ修復が行われる¹²⁸⁾。二倍体酵母株を用いて、減数分裂組み換えにおけるDSB産物について制限酵素切断断片多型法 (RFLP: restriction fragment length polymorphism)-Southern hybridization法により^{129), 130)}解析を行った結果、DSB量の減少と進行の遅れが観察された (Fig. 8)。DSBのprocessingが進行せず、DSBが蓄積していくことが知られている*rad50S*株をbackgroundとした場合には^{111), 117), 119), 131)}、DSBの進行は少し遅れているが、*rad50S-sgs1*株においても、DSBがある程度導入されていた (Fig. 9)。同様の報告は、*red1*および*mek1/mre4*変異株においても報告されている¹³⁰⁾。*red1*および*mek1*変異株において、DSBの減少が観察されるが、*red1-rad50S*、*mek1-rad50S*の全体のDSB量は*rad50S*とほぼ同程度のレベルであった。この理由としてDSB formationのkineticsが、*red1*および*mek1*変異株においては、DSBからdouble Holliday junctionsに向かうrecombination checkpointにより抑制される方向に制御されていると推測される。

*sgs1*遺伝子破壊株においても、同様に、DSBの形成機構自身よりもDSB形成のkineticsが影響を受けている可能性が考えられる。遺伝子組み換え産物について解析した結果、crossover型、non-crossover型共に野生株と同程度観察された (Fig. 10)。

減数分裂に機能する遺伝子群では、ある遺伝子に欠損がある場合、以降のプログラムは進行しないが、別の経路は独立に進行することが知られている。*SPO13*は、第一減数分裂 (meiosis I) に必須な遺伝子で、*spo13*遺伝子破壊株は、第一減数分裂をbypassして第二減数分裂に進み、生育可能な2胞子ができる。そのため、組み換え初期に関与する遺伝子の破壊による胞子の致死性は、*spo13*遺伝子の破壊によりrescueすることが可能である^{132)–135)}。*MRE11*は、減数組み換えの初期の過程に関与する遺伝子で、DSBの形成に関与する。そのため、

Fig. 8 Detection of DSB in *sgs1* disruptants

MR101 (*SGS1*) and MR301 (*sgs1Δ::AUR*) cells were harvested at various times after shifting to SPO. DNA samples were isolated from the cells, and aliquots (5 μg) of the DNA were digested with *Xho* I and separated in agarose gel. DSB was analyzed by Southern blotting in the YCR47C-YCR48W region.

Fig. 9 Accumulation of DSB in *rad50S-sgs1* mutants

Wild-type cells and *sgs1* disruptants of *rad50S* background, S1510 (*SGS1*) and RKH 221 (*sgs1::AUR*), were harvested at various times after shifting to SPO. DNA was isolated from the cells, and aliquots (5 μg) of the DNA were separated in agarose gel. DSB was analyzed by Southern blotting in the YCR47C-YCR48W region. (B) The intensity of the band corresponding to DSB was quantified and expressed as a percentage of the intensity of all bands in the lane. *rad50S-SGS1* (●), *rad50S-sgs1* (△).

mre11 遺伝子破壊株は、DSB形成が正常に進行せず、胞子は致死となる^{114), 136), 137)}。そこで *SPO13*, *MRE11* と *SGS1* の二重遺伝子破壊株を作製し、胞子形成能、胞子

の生存率について tetrad analysis, 減数分裂組み換えについて検討した。その結果、大部分の *sgs1-spo13* 破壊株は、*spo13* 破壊株と異なり第一減数分裂 bypass する事が

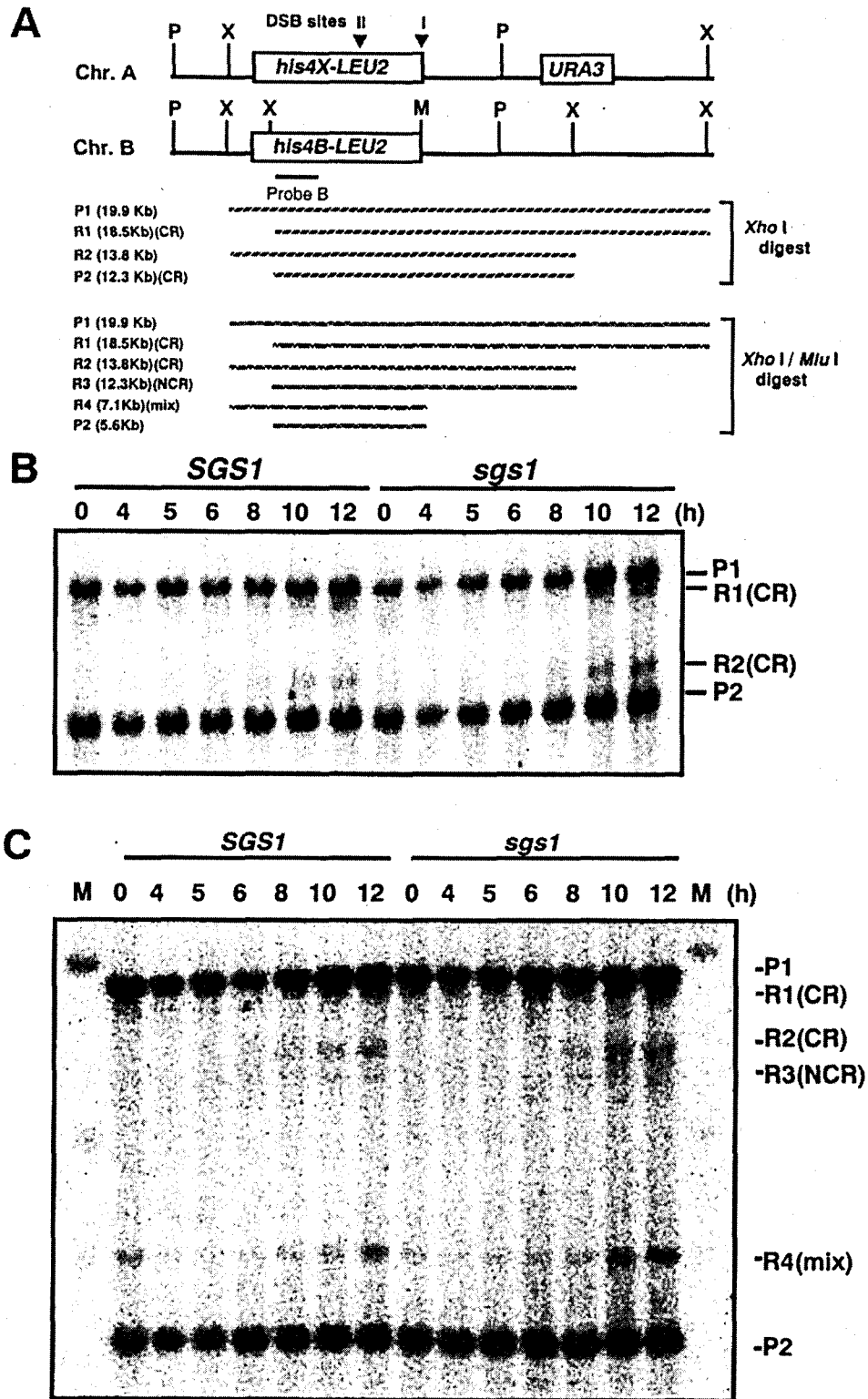


Fig. 10 Detection of physical recombinants *sgs1* disruptants

(A) A map of the *his4-LEU2* locus on Chromosome III. P, X, and M indicate the restriction sites of *Pst* I, *Xho* I and *Mlu* I, respectively. P1 and P2 indicate the fragments derived from the parental DNAs after digestion with *Xho* I or *Xho* I/*Mlu* I. R1 and R2 indicate the fragments derived from crossover products. R3 indicate the fragments derived from non-crossover product. (B)(C) NKY2846 (*SGS1*) and RKH225 (*sgs1::AUR*) cells were harvested at various times after shifting to SPO. DNA was isolated from the cells, and aliquots (5 μ g) of DNA digested with *Xho* I (B) or *Xho* I/*Mlu* I (C) were analyzed by Southern blotting. Probe B was derived from pNKY155.

Table 5 Sporulation, spore viability and recombination in *sgs1-spo13* and *sgs1-mre11* double gene disruptants

Strain	Genotype	Mitotic recomb ^a	Sporulation ^b		Spore viability ^c	Meiotic recomb ^d
		(His+ frequency)	(%) 24 h	(%) 96 h	(%)	(His+ frequency) 24 h
MR101	<i>SGS1 SPO13 MRE11</i>	5.8×10^{-4}	81	88	75/84 (89.3)	37.9×10^{-3}
ds1	<i>sgs1</i>	57.6×10^{-4}	8	10	72/124 (58.1)	3.9×10^{-3}
ds13*	<i>spo13</i>	9.5×10^{-4}	52*	79*	48/120 (40.0)	6.5×10^{-3}
ds1s13*	<i>sgs1 spo13</i>	56.3×10^{-4}	10*	15*	15/128 (11.7)	3.9×10^{-3}
ds1m11	<i>sgs1 mre11</i>	38.8×10^{-4}	0.6	0.1	0/120 (0.0)	0.2×10^{-3}
ds13m11*	<i>spo13 mre11</i>	44.6×10^{-4}	33*	55*	86/136 (63.2)	0.1×10^{-3}

^aThe frequency of mitotic recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined by measuring the number of colonies on SC-His(-) plates versus the number of colonies on SC plates.

^bDiploid cells were pre-cultured in SPS and inoculated into SPO at a density of 2×10^7 cells/ml with vigorous shaking. Aliquots of 1 ml were taken at the time points, and the sporulation was monitored at the time of 24 or 96 h after shifting to SPO with a phase-contrast microscope and the percentage of tetrads (or dyads (*) for *spo13* disruptants) versus total cell number was examined.

^cSpore viability was determined for after dissection, by dividing the number of spores forming colonies by the total number dissected.

^dThe frequency of meiotic recombination between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined at time of 24 h after shifting to SPO by the number of forming colonies on SC-His(-) plates versus the number of forming colonies on SC plates.

できなかった。*sgs1-mre11*破壊株では、*mre11*株と同様、胞子は致死であった (Table 5)。

以上の結果から、Sgs1はHolliday junctionsの解離に必須では無いと考えられ、check pointも含めて、減数分裂前DNA合成の終了からDSB形成の間の過程に、DSB形成のkineticsを制御するかたちでSgs1は機能していると考えられた。しかしながら、いったん、DSBが入ることができた細胞株については、その後のDSBのprocessing等の過程は通常に進行し、組み換えの過程が

野生株と同様に進行すると考えられた。

3) 部位特異的変異導入、N末、C末の欠失vectorを用いた解析の結果、Sgs1の機能の発現に重要な部位を明らかにした^{138), 139)}。

Sgs1の機能において、体細胞分裂期と減数分裂期の機能において、helicase活性の要求性が異なることを初めて明らかにした。疾患と対応した変異vectorを使用した酵母細胞実験系は、患者の持つ変異を評価する上で有

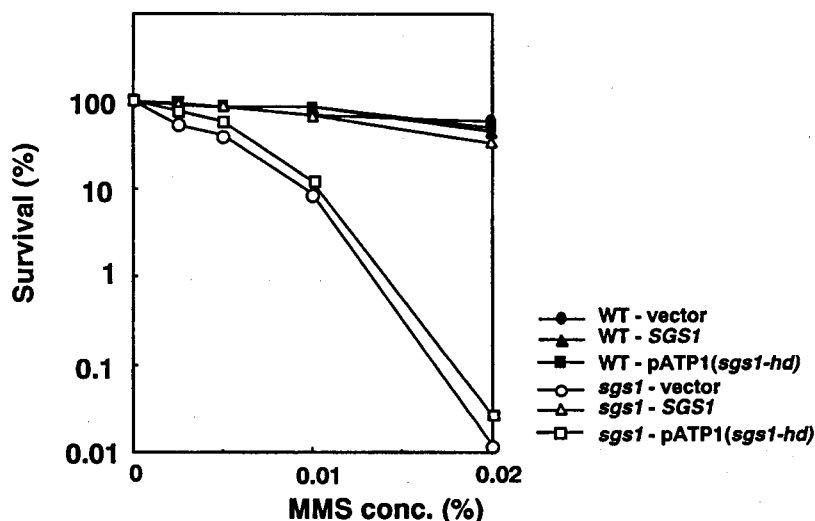


Fig. 11 Effect of pATP1(*sgs1-hd*) on MMS sensitivity of *sgs1* disruptant

Wild type cell(MR101) was transformed with vector (pRS314) (●), full length of *SGS1* (▲), and pATP1(*sgs1-hd*) (■). *sgs1* disruptant(MR301) was transformed with vector (pRS314) (○), full length of *SGS1* (△), and pATP1(*sgs1-hd*) (□). Transformed cells were cultured in SC medium lacking Trp at 28 °C, diluted and inoculated on SC plate lacking Trp, with indicated concentration of MMS.

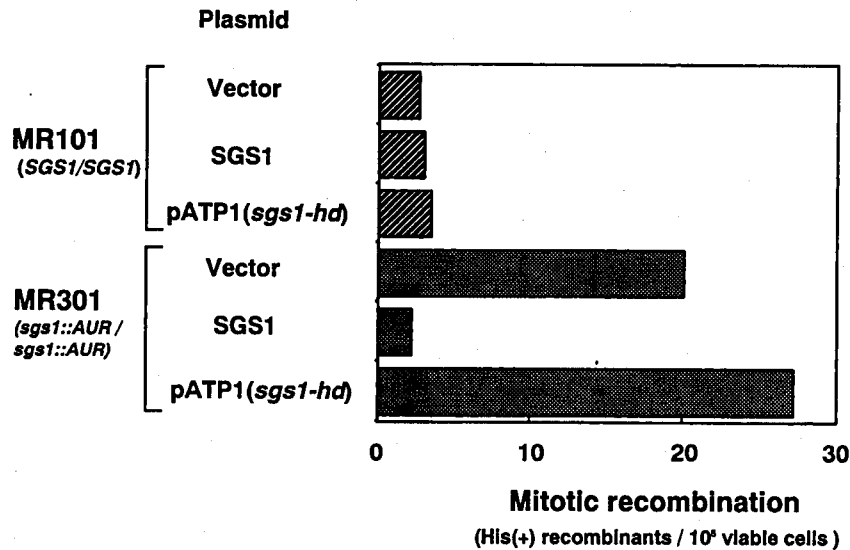


Fig. 12 Effect of pATP1 (*sgs1-hd*) on mitotic interchromosomal homologous recombination of *sgs1* disruptant

用なモデル系であると考えられた。Sgs1は、生化学的解析により、3'→5' helicase 活性を持つことが示されている⁸⁸⁾。そこで、RecQ helicaseにおいて高度に保存されている helicase motif I に変異を入れた pATP1 (*sgs1-hd*) を作製した。pATP1 はこの変異により helicase 活性が消失することが、既に報告されている⁸⁹⁾。pATP1 を、*sgs1* 遺伝子破壊株に発現させ、MMS, HU 感受性、体細胞分裂期の組み換えに及ぼす影響について検討した。pATP1 は *sgs1* 遺伝子破壊株において、MMS 感受性、HU 感受性、体細胞分裂組み換えの亢進を相補することができなかつたのに対して、pATP1 は孢子形成率および減数分裂組み換えの低下をある程度まで回復した。以上の結果から、減数分裂期の Sgs1 の機能には helicase 活性が要求されないと考えられ、体細胞分裂期および減数分

裂期の Sgs1 の機能における helicase 活性の要求性が異なることを初めて明らかにした。

我々の研究グループにおいて、MMS, HU による DNA 傷害に対する DNA 修復の他、SCE の亢進の相補においても、pATP1 では相補することができず、helicase 活性が必要であることを見いだした⁹³⁾。また、*top1-sgs1* 破壊株の増殖遅延の回復に、helicase 活性は必要でないことが報告されている¹⁴⁰⁾。一方、*top3-sgs1* 破壊株の増殖の抑制には、helicase 活性は必要であった¹⁴¹⁾。

以上の結果をまとめると Fig. 13 のようになる。MMS, HU による傷害に対する DNA 修復、体細胞分裂期の組み換え、*top3* 破壊株による増殖抑制の回復には、Sgs1 の helicase 活性を必要とした。孢子形成、減数分裂組み換えおよび、*top1* 破壊株の増殖抑制においては、Sgs1 の

Table 6 Dissection of Sgs1 functions

Strain	plasmid	^a Sporulation		^b Meiotic recomb.
		(% of asci formed)		(His+ frequency)
		12 h	24 h	24 h
MR101 (WT)	+ vector	82	89	27.8 × 10 ⁻³
	+ pSGS1	82	89	26.1 × 10 ⁻³
	+ pATP1 (<i>sgs1-hd</i>)	81	89	24.1 × 10 ⁻³
MR301 (<i>sgs1</i> Δ)	+ vector	7.0	9.2	5.5 × 10 ⁻³
	+ pSGS1	25	58	24.8 × 10 ⁻³
	+ pATP1 (<i>sgs1-hd</i>)	28	51	17.3 × 10 ⁻³

^aWild-type cells (MR101) and *sgs1* null deletion disruptants (MR301) were transformed with pRS314 (vector only), pYCp1305 (containing the full length of *SGS1*), and pYCp1309 (pATP1; *sgs1-hd*). Sporulation was monitored with a phase-contrast microscope at 12 and 24 h after shifting to SPO.

^bThe recombination frequency between the *his1-1* and *his1-7* alleles was examined at 24 h (for RTG assay) after shifting to SPO.

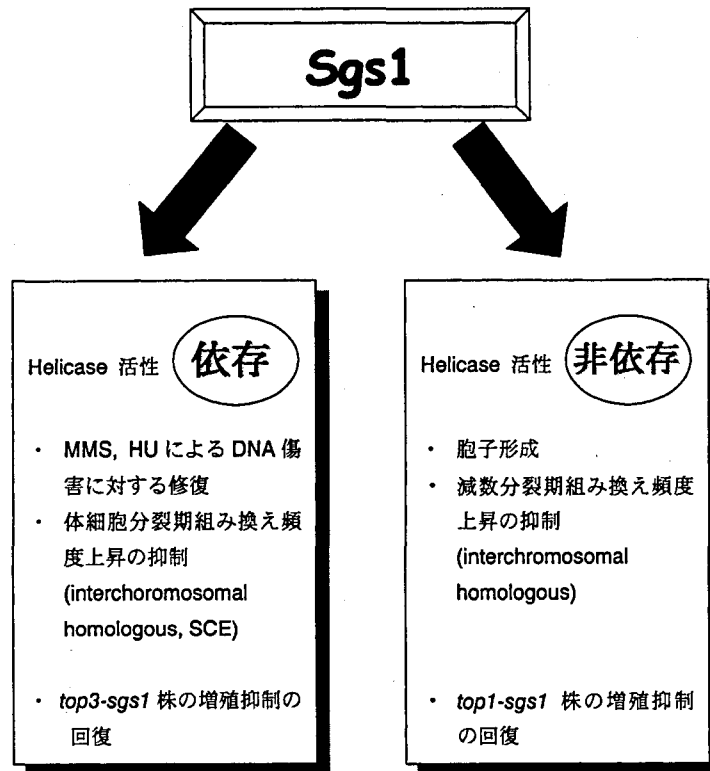


Fig. 13 Function of Sgs1 helicase

helicase 活性はを必要とされず、蛋白質の構造や、他の蛋白質との相互作用が重要であることが考えられた。

Sgs1 の N 末、C 末の部分の機能について解析を進めるため、N 末、C 末欠失および、Sgs1 の helicase domain より上流部位の highly acidic region など幾つかの領域を欠失させた *SGS1* vector を作製した。これらの改変 *SGS1* vector を用いて、*sgs1* 遺伝子破壊株の DNA 修復 (MMS, HU 感受性)、体細胞分裂期組み換え、胞子形成、減数分裂期組み換えに及ぼす作用について検討した。その結果、DNA 修復および体細胞分裂期組み換えについては、helicase 活性が必須で、N 末 1-45 aa および 698-1195 aa の helicase domain, RecQ conserved region が必要であり、減数分裂における機能については、helicase 活性は必須ではなかったが、126-400 aa, 596-1195 aa 部分が必要であることを示した (Fig. 14)。酵母 Two-hybrid system を用いた解析の結果、Sgs1 の N 末 1-283 aa は Top3 と、446-746 aa は Top2 と相互作用する事が示されており、両機能において、これらの蛋白質との相互作用が大きく関与していることが示唆された。

これら結果を、ヒト RecQ family 蛋白質と比較、適応することにより、Blm, Wrn, Rts 蛋白質の機能において重要な部位および、他の蛋白質との相互作用に重要な部位を推測するのに、有益な知見となることが期待できる。蛋白質の高次構造、他の蛋白質との相互作用を含めた解析を進めることにより、*SGS1* の機能および、ヒト RecQ

相同遺伝子の機能、疾患発症のメカニズムについて、さらに詳細な解析が進められることが期待される。また、今後、新しい疾患に関わる遺伝子の検索に発展することが期待される。

6. おわりに

酵母でなされた変異株を用いた分子遺伝学的な研究は、高等動物細胞 (哺乳類細胞) における相同遺伝子の機能解析の研究の発展に大いに寄与した。酵母細胞は下等ではあるが真核細胞に属しており、その機能が下等から高等生物に至るまで良く保存されている場合には、高等な真核生物における機能の解析において良いモデル系となる実際的な例を、DNA helicase 遺伝子の機能解析研究は数多く示している。酵母において特定の機能を持った遺伝子が、進化の過程で分化する際に、保存される生体機能と新たに獲得する生体機能とが存在する。RecQ family 蛋白質においては、大腸菌 RecQ は、出芽酵母 Sgs1 に進化する過程で、長い N 末、C 末を獲得し、他の蛋白質との相互作用を可能にし、DNA helicase 活性を必要としない機能もあった。更にその N 末、C 末が、それぞれの必要に応じて進化しそれぞれが保存されて、最終的にヒトにおいては 5 種類の RecQ family 蛋白質として機能するに至っている。

疾患において臨床症状として現れてくる症状は、個々の細胞における機能の変化がもとであったとしても、組

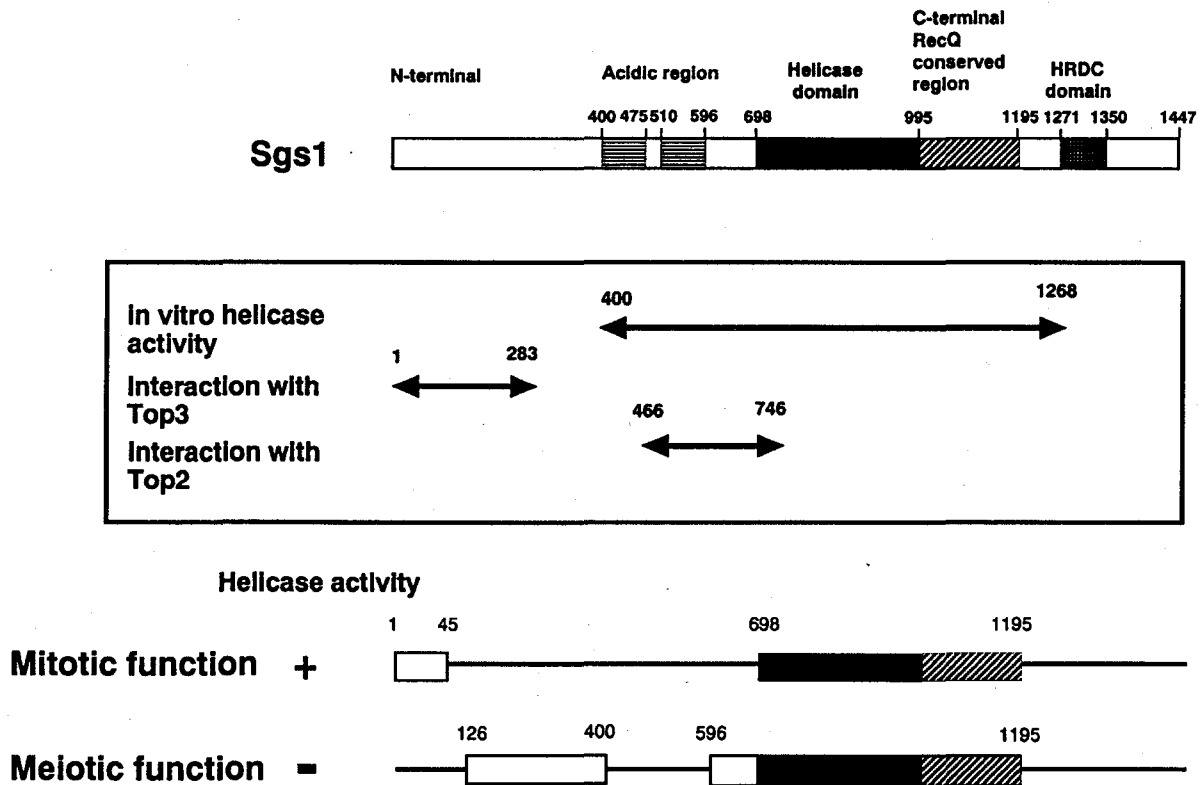


Fig. 14 Schematic diagrams of domains of Sgs1 for mitotic and meiotic functions

The symbols + and - indicate to require and not require helicase activity for the functions, respectively.

織, 全身症状として現れ, 最終的には個体全体の表現型や寿命などに影響をする. これらの結果は, 1つの遺伝子の欠損により, 複合的に生じてくる結果である. 分化した各組織 (臓器) における表現型の差は, 疾患遺伝子の発現量の差, 疾患遺伝子と相互作用する遺伝子産物の差が各細胞におけるその遺伝子の機能を修飾し, 病変となって現れると推測される. 近年, 高等真核生物における機能解析として, 全身症状を観察するためノックアウト マウスを作成し, その表現型を観察されることが多い. しかしながら, 得られたノックアウト マウスの表現型が, ヒトにおける表現型から予想されたものとはかなり異なることがある. 実際, *BLM* 遺伝子のノックアウト マウスは胎生致死で, *WRN* 遺伝子のノックアウト マウスは早老症を呈さなかった. この結果は, マウスとヒトにおける *Blm*, *Wrn* の機能の違いによるもの, およびマウスとヒトの発生の過程, テロメアの構造の違い等によるものと考えられるが, この相違がヒトにおける *RecQ* family 蛋白質の機能解析において, その過程が遺伝子のターゲットとなることが示され, さらにヒトにおける疾患発症のメカニズム解析に役立つことが期待される.

謝辞

本研究の遂行にあたり, ご支援いただきました大野泰雄部長に深く感謝いたします. また, 数々のご協力, ご助言をいただきました薬理部の皆様にも心より感謝いたします. 本研究の遂行にあたり, ご指導, ご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野, 榎本武美教授, 関政幸助教授に深く感謝いたします. そして, 本研究の総括に際し, 適切にご指導, ご鞭撻を賜りました, 東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室, 堅田利明教授に謹んで感謝いたします.

本総説は, 学位論文「ブルーム症候群原因遺伝子の酵母相同遺伝子 *SGS1* の機能解析」より一部抜粋したものです.

参考文献

- 1) Inter National Human Genome : *Nature*, **409**, 860-921 (2001)
- 2) Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., *et al.* : *Science*, **291**, 1304-1351 (2001)
- 3) <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/> Goffeau, A., Aert, R., Agostini-Carbone, M.L., *et al.* : *Nature*, **387**, 1-105 (1997)
- 4) http://genome.wustl.edu/gsc/C_elegans/, http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/

- The C. elegans Sequencing Consortium : *Science*, **282**, 2012-2018 (1998)
- 5) http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/
Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A. : *Nature*, **415**, 871-880 (2002)
- 6) Cho, R.J., Campbell, M.J., Winzler, E.A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T.G., Gabrielian, A.E., Landsman, D., Lockhart, D.J., Davis, R.W. : *Mol. Cell*, **2**, 65-73 (1998)
- 7) Weeda, G., van Ham, R.C.A., Vermeulen, W., Bootsma, D., van der Eb, A.J., Hoeijmakers, J.H.J. : *Cell*, **62**, 777-791 (1990)
- 8) Weeda, G., Wiegant, J., van der Ploeg, M., Geurts van Kessel, A.H.M., van der Eb, A.J., Hoeijmakers, J.H.J. : *Genomics*, **10**, 1035-1040 (1991)
- 9) Park, E., Guzder, S.N., Koken, M.H.M., Jaspers-Dekker, I., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., Prakash, S., Prakash, L. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **89**, 11416-11420 (1992)
- 10) Flejter, W.L., McDaniel, L.D., Johns, D., Friedberg, E.C., Schultz, R.A. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **89**, 261-265 (1992)
- 11) Friedberg, E.C. : *Cell*, **71**, 887-889 (1992)
- 12) Sung, P., Bailly, V., Weber, C., Thompson, L.H., Prakash, L., Prakash, S. : *Nature*, **365**, 852-855 (1993)
- 13) Hwang, J.R., Moncollin, V., Vermeulen, W., Seroz, T., van Vuuren, H., Hoeijmakers, J.H.J., Egly, J.M. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 15898-15904 (1996)
- 14) Coin, F., Marinoni, J.-C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A.M., Egly, J.-M. : *Nature Genet.*, **20**, 184-188 (1998)
- 15) Troelstra, C., van Gool, A., de Wit, J., Vermeulen, W., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H.J. : *Cell*, **71**, 939-953 (1992)
- 16) Guzder, S.N., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L., Prakash, S. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 18314-18317 (1996)
- 17) Selby, C.P., Sancar, A. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **94**, 11205-11209 (1997)
- 18) Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. : *Science*, **265**, 1442-1445 (1994)
- 19) Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N.W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L., Chen, J., Zhang, J., Wang, S., Pongor, S., Falaschi, A. : *EMBO J.*, **13**, 4991-5001 (1994)
- 20) Stayton, C.L., Dabovic, B., Gulisano, M., Gecz, J., Broccoli, V., Giovanazzi, S., Bossolasco, M., Monaco, L., Rastan, S., Boncinelli, E., Bianchi, M.E., Consalez, G.G. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 1957-1964 (1994)
- 21) Gibbons, R.J., Picketts, D.J., Villard, L., Higgs, D.R. : *Cell*, **80**, 837-845 (1995)
- 22) Ellis, N. A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D. J., Ciocchi, S., Proytcheva, M., German, J. : *Cell*, **83**, 655-666 (1995)
- 23) Yu, C.-E., Oshima, J., Fu, Y.-H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., Martin G.M., Mulligan, J., Schellenberg G.D. : *Science*, **272**, 258-262 (1996)
- 24) Kitao, S., Shimamoto, A., Goto, M., Miller, R.W., Smithson, W.A., Lindor, N.M., Furuichi, Y. : *Nat. Genet.*, **22**, 82-84 (1999)
- 25) van Steeg, H., Kraemer, K.H. : *Mol. Med. Today*, **5**, 86-94 (1999)
- 26) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K., Hanaoka, F. : *Nature*, **399**, 700-704 (1999)
- 27) Squires, S., Oates, D.J., Bouffler, S.D., Johnson, R.T. : *Somat. Cell Mol. Genet.*, **18**, 387-401 (1992)
- 28) Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C., Warren, S.L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 11586-11590 (1996)
- 29) Lin, C.G., Kovalsky, O., Grossman, L. : *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3151-3158 (1997)
- 30) Moolenaar, G.F., Moorman, C., Goosen, N. : *J. Bacteriol.*, **182**, 5706-5714 (2000)
- 31) Henriques, J.A., Moustacchi, E. : *J. Bacteriol.*, **148**, 248-256 (1981)
- 32) Prakash, S., Prakash, L. : *Mutat. Res.*, **451**, 13-24 (2000)
- 33) Hoeijmakers, J.H. : *J. Cell Sci. Suppl.*, **6**, 111-125 (1987)
- 34) Drapkin, R., Reardon, J.T., Ansari, A., Huang, J.C., Zawel, L., Ahn, K., Sancar, A., Reinberg, D. : *Nature*, **368**, 769-772 (1994)
- 35) Nospikel, T., Clarkson, S.G. : *Hum. Mol. Genet.*, **3**, 963-967 (1994)
- 36) Itoh, T., Shiomi, T., Shiomi, N., Harada, Y., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Friedberg, E.C., Yamaizumi, M. : *Mutat. Res.*, **362**, 167-174 (1996)
- 37) Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M.C., Satoh, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H., Okada, Y. : *Nature*, **348**, 73-76 (1990)
- 38) Asahina, H., Kuraoka, I., Shirakawa, M., Morita, E.H., Miura, N., Miyamoto, I., Ohtsuka, E., Okada, Y., Tanaka, K. : *Mutat. Res.*, **315**, 229-237 (1994)
- 39) Kobayashi, T., Takeuchi, S., Saijo, M., Nakatsu, Y., Morioka, H., Otsuka, E., Wakasugi, M., Nikaido, O., Tanaka, K. : *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4662-4668 (1998)
- 40) Venema, J., van Hoffen, A., Natarajan, A.T., van

- Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. : *Nucleic Acids Res.*, **18**, 443-448 (1990)
- 41) Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. : *Mol. Cell*, **2**, 223-232 (1998)
- 42) Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., Linn, S. : *Biol. Chem.*, **275**, 21422-21428 (2000)
- 43) Park, C.H., Bessho, T., Matsunaga, T., Sancar, A. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 22657-22660 (1995)
- 44) Matsunaga, T., Mu, D., Park, C.H., Reardon, J.T., Sancar, A. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 20862-20869 (1995)
- 45) Henning, K.A., Li, L., Iyer, N., McDaniel, L.D., Reagan, M.S., Legerski, R., Schultz, R.A., Stefanini, M., Lehmann, A.R., Mayne, L.V., *et al.* : *Cell*, **82**, 555-564 (1995)
- 46) Sung, P., Guzder, S.N., Prakash, L., Prakash, S. : *J. Biol. Chem.*, **271**, 10821-10826 (1996)
- 47) Winkler, G.S., Araujo, S.J., Fiedler, U., Vermeulen, W., Coin, F., Egly, J.M., Hoeijmakers, J.H., Wood, R.D., Timmers, H.T., Weeda, G. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 4258-4266 (2000)
- 48) Feaver, W.J., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., Gulyas, K.D., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., Kornberg, R.D. : *Cell*, **75**, 1379-1387 (1993)
- 49) Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C., Kornberg, R.D. : *Cell*, **80**, 21-28 (1995)
- 50) Myer, V.E., Young, R.A. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 27757-27760 (1998)
- 51) Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R.W., *et al.* : *Science*, **285**, 901-906 (1999)
- 52) van Gool, A.J., Verhage, R., Swagemakers, S.M., van de Putte, P., Brouwer, J., Troelstra, C., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. : *EMBO J.*, **13**, 5361-5369 (1994)
- 53) Tijsterman, M., Brouwer, J. : *J. Biol. Chem.*, **274**, 1199-1202 (1999)
- 54) Tuteja, R., Tuteja, N. : *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 1-33 (2000)
- 55) Cervelli, T., Galli, A. : *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 56-63 (2000)
- 56) Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., Tomkinson, A.E. : *Mol. Cell*, **8**, 1105-1115 (2001)
- 57) Frank, K.M., Sekiguchi, J.M., Seidl, K.J., Swat, W., Rathbun, G.A., Cheng, H.L., Davidson, L., Kangaloo, L., Alt, F.W. : *Nature*, **396**, 173-177 (1998)
- 58) d'Adda di Fagagna, F., Hande, M.P., Tong, W.M., Roth, D., Lansdorp, P.M., Wang, Z.Q., Jackson, S.P. : *Curr. Biol.*, **11**, 1192-1196 (2001)
- 59) Cole, G.M., Mortimer, R.K. : *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 3314-3322 (1989)
- 60) Emery, H.S., Schild, D., Kellogg, D.E., Mortimer, R.K. : *Gene*, **104**, 103-106 (1991)
- 61) Shinohara, M., Shita-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.M., Shinagawa, H., Ogawa, H., Shinohara, A. : *Genetics*, **147**, 1545-1556 (1997)
- 62) Shinohara, M., Gasior, S.L., Bishop, D.K., Shinohara, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 10814-10819 (2000)
- 63) Miyagawa, K., Tsuruga, T., Kinomura, A., Usui, K., Katsura, M., Tashiro, S., Mishima, H., Tanaka, K. : *EMBO J.*, **15**, 175-180 (2002)
- 64) Nakayama, K., Irino, N., Nakayama, H. : *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 266-271 (1985)
- 65) Nakayama, K., Shiota, S., Nakayama, H. : *Can. J. Microbiol.*, **34**, 905-907 (1988)
- 66) Urmez, K., Nakayama, K., Nakayama, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 5363-5367.
- 67) Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggeleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W.M. : *Microbiol. Rev.*, **58**, 401-465 (1994)
- 68) Mendonca, V.M., Klepin, H.D., Matson, S.W. : *J. Bacteriol.*, **177**, 1326-1335 (1995)
- 69) Seki, M., Miyazawa, H., Tada, S., Yanagisawa, J., Yamaoka, T., Hoshino, S., Ozawa, K., Eki, T., Nogami, M., Okumura, K., Taguchi, H., Hanaoka, F., Enomoto, T. : *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4566-4573 (1994)
- 70) Puranam, K.L., Blackshear, P.J. : *J. Biol. Chem.*, **269**, 29838-29845 (1994)
- 71) Kitao, S., Ohsugi, I., Ichikawa, K., Goto, M., Furuich, Y., Shimamoto, A. : *Genomics*, **54**, 443-452 (1998)
- 72) German, J. : *Medicine*, **72**, 393-406 (1993)
- 73) Kauli, R., Prager-lewin, R., Kaufman, H., Laron, Z. : *Clin. Endocrinol.*, **6**, 285-289 (1977)
- 74) Online Menelian Inheritance in Man (OMIM), (BLOOM-SYNDROME; BLM, #210900)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=210900>
- 75) Hashimoto, T., Sukenaga, T., Lopetegui, P., Furuyama, J. : *Basic Life Sci.*, **29**, 765-774 (1984)
- 76) Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz, A.L., Motulsky

- A.G. : *Medicine*, **45**, 177-221 (1966)
- 77) 坂本修一, 嶋本顕, 古市泰宏. : 蛋白質核酸酵素, **46**, 1073-1081 (2001)
- 78) OMIM (WERNER SYNDROME; WRN, #277700)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?id=277700>
- 79) Martin, G.M. : *Am. J. Pathol.*, **89**, 484-511 (1977)
- 80) Schulz, V.P., Zakian, V.A., Ogburn, C.E., McKay, J., Jarzbowicz, A.A., Edland, S.D., Martin, G.M. : *Hum. Genet.*, **97**, 750-754 (1996)
- 81) Okada, M., Goto, M., Furuichi, Y., Sugimoto, M. : *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 235-239 (1998)
- 82) Gebhart, E., Bauer, R., Raub, U., Schinzel, M., Ruprecht, K.W., Jonas, J.B. : *Hum. Genet.*, **80**, 135-139 (1988)
- 83) OMIM (ROTHMUND-THOMSON SYNDROME; RTS, #268400)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?id=268400>
- 84) van Brabant, A.J., Stan, R., Ellis, N.A. : *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **1**, 409-459 (2000)
- 85) Shimamoto, A., Nishikawa, K., Kitao, S., Furuichi, Y. : *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1647-1655 (2000)
- 86) Gangloff, S., McDonald, J. P., Bendixen, C., Arthur, L., Rothstein, R. : *Mol. Cell Biol.*, **14**, 8391-8398 (1994)
- 87) Watt, P.M., Louis, E.J., Borts, R.H., Hickson, I.D. : *Cell*, **81**, 253-260 (1995)
- 88) Bennett, R.J., Sharp, J.A., Wang, J.C. : *J. Biol. Chem.*, **273**, 9644-9650 (1998)
- 89) Lu, J., Mullen, J.R., Brill, S.J., Kleff, S., Romeo, A.M., Sternglanz, R. : *Nature*, **383**, 678-679 (1996)
- 90) Sun, H., Bennett, R.J., Maizels, N. : *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1978-1984 (1999)
- 91) Watt, P.M., Hickson, I.D., Borts, R.H., Louis, E.J. : *Genetics*, **144**, 935-945 (1996)
- 92) Yamagata, K., Kato, J., Shimamoto, A., Goto, M., Furuichi, Y., Ikeda, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 8733-8738 (1998)
- 93) Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., Enomoto, T. : *Mutat. Res.*, **459**, 203-209 (2000)
- 94) Sinclair, D.A., Mills, K., Guarente, L. : *Science*, **277**, 1313-1316. (1997)
- 95) Sinclair, D.A., Guarente, L. : *Cell*, **91**, 1033-1042 (1997)
- 96) Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Shiratori, M., Odagiri, N., Ohta, K., Kikuchi, Y., Ohno, Y., Enomoto, T. : *Mol. Cell Biol.*, **20**, 6399-6409 (2000)
- 97) Bennett, R.J., Noiro-Gros, M.F., Wang, J.C. : *J. Biol. Chem.*, **275**, 26898-26905 (2000)
- 98) Lee, G.S., Blonsky, K.S., Van On, D.L., Savage, E.A.; Morgan, A.R., von Borstel, R.C. : *J. Mol. Biol.*, **223**, 617-626 (1992)
- 99) Schwartz, J.L. : *Mutat. Res.*, **216**, 111-118 (1989)
- 100) Game, J.C., Kaufman, P.D. : *Genetics*, **151**, 485-497 (1999)
- 101) Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A., Enomoto, T. : *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 702-708 (2001)
- 102) Rong, L., Klein, H.L. : *J. Biol. Chem.*, **268**, 1252-1259 (1993)
- 103) Lee, S.K., Johnson, R.E., Yu, S.L., Prakash, L., Prakash, S. : *Science*, **286**, 2339-2342 (1999)
- 104) Gangloff, S., Soustelle, C., Fabre, F. : *Nat. Genet.*, **25**, 192-194 (2000)
- 105) Online Menelian Inheritance in Man (OMIM), (BLOOMSYNDROME; BLM, #210900)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/80/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=210900>
- 106) Seki, T., Wang, W.S., Okumura, N., Seki, M., Katada, T., Enomoto, T. : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1398**, 377-381 (1998)
- 107) Sikorski, R.S., Hieter, P. : *Genetics*, **122**, 19-27 (1989)
- 108) Chester, N., Kuo, F., Kozak, C., O'Hara, C.D., Leder, P. : *Genes Dev.*, **12**, 3382-3393 (1998)
- 109) Roeder, G.S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 10450-10456 (1995)
- 110) Nicolas, A., Treco, D., Schlatters, N.P., Szostak, J.W. : *Nature*, **338**, 35-39 (1989)
- 111) Alani, N., Padmore, R., Kleckner, N. : *Cell*, **62**, 419-436 (1990)
- 112) Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., Szostak, J.W. : *Nature*, **338**, 87-90 (1989)
- 113) 山下一郎. : 蛋白質核酸酵素, **39**, 447-457 (1994)
- 114) Ogawa, H., Johzuka, K., Nakagawa, T., Leem, S.H., Hagihara, A.H. : *Adv. Biophys.*, **31**, 67-76 (1995)
- 115) Tsubouchi, H., Ogawa, H. : *Mol. Cell Biol.*, **18**, 260-268 (1998)
- 116) Haber, J.E. : *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 561-599 (1998)
- 117) Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. : *Cell*, **88**, 375-384 (1997)
- 118) Celerin, M., Merino, S.T., Stone, J.E., Menzie, A.M., Zolan, M.E. : *EMBO J.*, **19**, 2739-2750 (2000)
- 119) Cao, L., Alani, E., Kleckner, N. : *Cell*, **61**, 1089-1101 (1990)
- 120) Benson F.E., Baumann P., West S.C. : *Nature*, **91**, 401-404 (1998)
- 121) New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., Kowalczykowski, S.C. : *Nature*, **391**, 407-410 (1998)
- 122) Gasior, S.L., Wong, A.K., Korá, Y., Shinohara, A.,

- Bishop, D.K. : *Genes Dev.*, **12**, 2208-2221 (1998)
- 123) Sung, P. : *Genes Dev.*, **11**, 1111-1121 (1997)
- 124) Petukhova, G., Stratton, S., Sung, P. : *Nature*, **393**, 91-94 (1998)
- 125) Clever, B., Interthal, H., Schmuckli-Maurer, J., King, J., Sigrist, M., Heyer, W.D. : *EMBO J.*, **16**, 2535-2544 (1997)
- 126) Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., Ogawa, T. : *Nat. Genet.*, **4**, 239-243 (1993)
- 127) Baumann, P., West, S.C. : *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 247-251 (1998)
- 128) Storlazzi, A., Xu, L., Cao, L., Kleckner, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 8512-8516 (1995)
- 129) Goldway, M., Sherman, A., Zenvirth, D., Arbel, T., Simchen, G. : *Genetics*, **133**, 159-169 (1993)
- 130) Xu, L., Weiner, B.M., Kleckner, N. : *Genes Dev.*, **11**, 106-118 (1997)
- 131) Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., Kleckner, N. : *Cell*, **69**, 439-456 (1992)
- 132) Klapholz, S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **96**, 567-588 (1980)
- 133) Klapholz, S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **96**, 589-621 (1980)
- 134) Klapholz, S., Waddell, C.S., Esposito, R.E. : *Genetics*, **110**, 187-216 (1985)
- 135) McCarroll, R.M., Esposito, R.E. : *Genetics*, **138**, 47-60 (1994)
- 136) Ajimura, M., Leem, S.H., Ogawa, H. : *Genetics*, **133**, 51-66 (1993)
- 137) Johzuka, K., Ogawa, H. : *Genetics*, **139**, 1521-32 (1995)
- 138) Miyajima, A., Seki, M., Onoda, F., Ui, A., Satoh, Y., Ohno, Y., Enomoto, T. : *Genes Genet. Syst.*, **75**, 319-326 (2000)
- 139) Ui, A., Satoh, Y., Onoda, F., Miyajima, A., Seki, M., Enomoto, T. : *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 837-850 (2001)
- 140) Mullen, J.R., Kaliraman, V., Brill, S.J. : *Genetics*, **154**, 1101-1114 (2000)
- 141) Onodera, R., Seki, M., Ui, A., Satoh, U., Miyajima, A., Onoda, F., Enomoto, T. : *Genes Genet. Syst.*, **77**, 11-21 (2002)

ガンマ線と電子線照射による嫌気性菌と通性嫌気性菌の生存への影響

宮原美知子[#], 宮原誠

Effects of Gamma Ray and Electron-Beam Irradiations on Survival of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria

Michiko Miyahara[#] and Makoto Miyahara

An extension of the approval for food irradiation is desired due to the increase in the incidence of food poisoning in the world. One anaerobic (*Clostridium perfringens*) and four facultatively anaerobic (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Enteritidis) bacteria irradiated with gamma ray or electron beam (E-beam) were tested in terms of survival on agar under packaging atmosphere. Using pouch pack, effects of two irradiations on survival of anaerobic and facultatively anaerobic bacteria were evaluated comparatively. E-beam irradiation was more effective than gamma ray irradiation in decreasing the D₁₀ value of *B. cereus* at 4 °C, slightly more effective in that of *E. coli* O157, and similarly effective in that of the other three bacteria at 4 °C. The gamma irradiation of the bacteria without incubation at 4 °C before irradiation was more effective than that of the bacteria with incubation overnight at 4 °C before irradiation in decreasing the D₁₀ values of these bacteria (*B. cereus*, *E. coli* O157, and *L. monocytogenes*). Furthermore, ground beef patties inoculated with bacteria were irradiated with 1 kGy by E-beam (5 MeV) at 4 °C. The inoculated bacteria in the 1-9 mm beef patties were killed by 1 kGy E-beam irradiation and some bacteria in more than 9 mm beef patties were not killed by the irradiation.

Keywords: gamma ray irradiation, Electron-beam irradiation, anaerobic bacteria, facultatively anaerobic bacteria

Introduction

Due to increasing concerns on food safety, the Food and Drug Administration, USA, has recently approved meat irradiation¹⁾. This approval has attracted attention of food-processing industries and consumers worldwide. One of the major targets of this approval is the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157), the causative agent of several outbreaks in the USA²⁾. Irradiation causes radical formation³⁾ followed breakage of the chemical bonds of DNA molecules⁴⁾, and consumption oxygen and water. Oxygen reduction is more eminent in inner part of irradiated food with electron beam (E-beam) than those with gamma ray. Oxygen demand of bacteria affects their survival in food.

Therefore, depth-survival relationship of actual food is not predictable by dose-depth curve, which is provided by American Standard and Testing Materials (ASTM).

Gamma ray and E-beam irradiations are major methods of food irradiation⁵⁾. We report herein the effects of these methods on the survival of five types of bacteria. Furthermore, E-beam irradiation of ground beef patties inoculated with bacteria is discussed.

Materials and Methods

1) Irradiation of pouch packs

The bacteria strains used were *Bacillus cereus* (IFO3001, spore-former), *E. coli* O157 (non-verotoxin type), *Listeria monocytogenes* [AZ-97035, Scot A(4b)], *Salmonella* Enteritidis (PT4, E930448), and *Clostridium perfringens* (NCTC 8798). *C. perfringens* is anaerobic. The other four bacteria used are facultatively anaerobic.

Preparations of bacteria samples were performed as follows. Overnight cultures of the bacteria (excluding *B. cereus*) at 36 °C were diluted with physiological saline solution to 10⁻⁷ concentration. The overnight culture

[#]To whom correspondence should be addressed: Michiko Miyahara; Division of Microbiology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.548; Fax: 03-3707-6950; E-mail: miyahara@nihs.go.jp

medium used for *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, and *S. Enteritidis* was trypto-soy broth, and that for *C. perfringens* was Gifu anaerobic medium (GAM, Nissui, Tokyo). *B. cereus* was prepared as follows. After culturing *B. cereus* on a trypto-soy agar plate (TSA, Nissui) overnight at 36 °C, the plate was further incubated for a few more days at room temperature. From the colonies on the plate, a bacterial suspension was prepared in pasteurized physiological saline solution, heated at 70 °C for 20 min, and then immediately cooled. The suspension was stored in a 0.5-ml micro-tube at -20 °C prior to use. Before use, the stock solution was diluted to 10⁶ concentration.

TSA was used as the culture medium for *B. cereus*, *E. coli* O157, *L. monocytogenes*, and *S. Enteritidis*. Clostridia Count Agar (Nissui) was used as the culture medium for *C. perfringens*.

Sample preparations (three samples at the dose level) in pouch packs were performed as follows. Ten ml of the bacterial suspension and 15 ml of the sterilized medium at approximately 50 °C were mixed in a pouch pack (pouch pack for culture of anaerobic bacteria, polyethylene terephthalates, thickness 30 µm plus polyethylene, thickness 20 µm, Sakami Ika, Osaka). The mixtures were sealed by a heat sealer and were left to stand overnight at 4 °C. These cells were resting cells, when they were irradiated. The thickness and the diameter of the pouch packs were 5 mm and 94 mm, respectively, when the packs were filled with the above-mentioned mixture. The number of bacteria just before irradiation was represented by colony number of un-irradiated bacteria pack. Each bacterium grew up in the agar in the pouch pack to form a colony by incubating overnight at 36 °C.

For the studies on the effect of gamma ray irradiation on bacterial survival without pre-incubation at 4 °C (as growing cells), freshly prepared packs were also irradiated at room temperature. Other conditions were the same as those described above.

Gamma ray irradiation (Source ⁶⁰Co at 2 kGy/h) and E-beam irradiation (5 MeV, 36 MGy/h) with pre-incubation at 4 °C were performed at 4 °C in pouch pack (slightly permeable to air) without big air bubble. On the other hand, samples without pre-incubation at 4 °C were irradiated at room temperature. The doses applied were approximately 0, 0.5, 1.0, and 1.5 kGy. The levels of applied doses of E-beam were controlled by cart speed.

Dosimetry was performed according to the methods of Miyahara et al.⁶⁾ The absorbed dose was measured using a Gammachrome YR PMMA dosimeter (AEA, UK) for

gamma ray irradiation and Radiachromic dosimeter (Far West Technology, USA) for E-beam irradiation. Each dosimeter of calibration was performed by the National Physics Laboratory, UK, and was traceable to the source. The power of E-beam was measured by the method of ASTM⁷⁾. For measurement of absorbed dose of gamma irradiation, dosimetry was performed on the irradiated surface on each sample. For that of E-beam, dosimetry was performed at three points on a cart surface at each dose level.

Determinations of bacterial survival were performed as follows. Irradiated samples were cultured overnight at 36 °C. The effects of irradiation on bacterial survival were measured by determining the colony count in media. Cell concentration in the bacterial suspension was expressed as CFU (colony-forming unit(s)).

2) Irradiation of ground beef

Sample preparations of ground beef patties with bacteria for E-beam irradiation were performed as follows. Ground beef patties (10 g, 52 mm in diameter and 3 mm in thickness) inoculated with bacteria (*E. coli* O157, *L. monocytogenes*, and *C. perfringens*) were wrapped. They were arranged in a pile (3 mm thickness of each patty) and were irradiated at 1 kGy with 5 MeV E-beam at 4 °C. The inoculation was carried out as follows. An overnight-culture diluted with physiological saline solution was used for inoculation. Each concentration of bacteria was calculated by plating, culturing overnight at 36 °C, and measuring colonies (TSA for *E. coli* O157 and *Listeria* under aerobic conditions, Clostridium welchii agar (CW agar) (Eiken, Tokyo) under anaerobic conditions). The inoculation doses were 3700, 600, and 165 cells, respectively. A 5-mm-diameter paper tab was put on each patty and permeated with each bacteria 50 µl solution. Three sets of 9 folded patties with bacteria were irradiated and CFU were showed as the mean value of three data. The ground beef patties were kept at 4 °C during preparation, overnight pre-incubation, irradiation and overnight post-incubation.

Detections of bacteria in irradiated beef patties were performed as follows. The patties were homogenized in 90 ml physiological saline solution using a homogenizer. Ten ml of the homogenate and 15 ml of the sterilized medium at approximately 50 °C were mixed in a pouch pack, and the mixture was incubated overnight at 36 °C. CHROMagar O157 TAM (CHROMagar, Paris), PALCAM agar (Merck, Darmstadt), and Clostridia Count Agar were

used for the detection of *E. coli* O157, *L. monocytogenes* and *C. perfringens*, respectively. These selective media showed the colonies colored violet, black, and black, respectively. Colonies that grew in the medium in the pouch pack were counted and used as a measure of bacterial survival.

Dosimetry of absorbed dose of E-beam was measured on each surface of beef patty. Details about dosimetry of E-beam described above. Absorbed dose of each patty, the mean dose was calculated by absorbed doses on each surface of two patties.

Statistical analyses were performed as follows. The means of triplicate pack counts and population reduction data were analyzed using T-test, and D_{10} values were calculated by fitting the regression line, respectively. D_{10} value is the amount of radiation required to reduce the population of a specific bacterium by 90% (1 log₁₀ cycle) under the stated conditions⁸⁾.

Results and Discussion

The effects of the gamma ray and E-beam irradiations were compared with the dose-population plots of each bacterium as shown in Fig. 1. The population of *B. cereus* with E-beam irradiation was reduced more sharply with dose increase than that with gamma irradiation. Although the population of bacteria (*E. coli* O157, 1741.7 CFU/10 ml) in the sample for E-beam irradiation was larger than that (878.0 CFU/10 ml) for gamma irradiation before irradiation, the population in sample irradiated by E-beam was less than that by gamma ray at any dose we examined. This means that E-beam irradiation reduced the bacteria population more effectively than gamma irradiation but without any statistical difference. As to *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, and *C. perfringens*, we could not conclude which irradiation was exceeding by the data of Fig.1. The smaller reductions of Bacteria (*B. cereus*, *E. coli* O157, *S. Enteritidis*, and *C. perfringens*) were observed at low dose (0.5 kGy) by gamma-irradiation than those by E-beam.

The effects of these irradiations were also compared by D_{10} values. The results are shown in Table 1. When *B. cereus* were incubated overnight at 4 °C before irradiation, E-beam irradiation was significantly more effective than gamma-ray irradiation in decreasing the D_{10} value. There were statistically significant differences between the means of CFU with gamma ray and E-beam irradiations (Table 1). These results are accord with the conclusions of following reports. Tallentire reported that E-beam

irradiation of *B. megaterium* was more effective than gamma irradiation at anaerobic condition⁹⁾. Sekiguchi et al. also reported that gamma irradiation at anaerobic condition was less effective than E-beam irradiation to *B. pumilus* and *B. globigii*¹⁰⁾. However, 90% cells of *B. cereus* in the pouch were heat-unstable (60 °C, 10 min). It meant that these cells were not spore type. We need to perform further studies why gamma irradiation was not effective to the Bacillus in anaerobic condition. Other bacteria did not show remarkable differences of the efficacy between two kinds of irradiations.

Without incubation at 4 °C, D_{10} values of three kinds of bacteria (*B. cereus*, *E. coli* O157 and *L. monocytogenes*) were reduced by gamma ray irradiation comparing to that of bacteria with incubation overnight at 4 °C, as shown in Table 1. When bacterial suspensions were prepared in the pouch packs with hot media (50 °C), all the bacteria might appear to be in the log phase of growth. On the other hand, these bacteria in the pouch packs incubated overnight at 4 °C might be resting cells. Therefore, the cell cycle of bacteria during irradiation appears to be crucial for the effects of irradiation on bacterial survival.

In order to examine depth-survival relation in food sample, ground beef patties were inoculated with bacteria and were irradiated with 1 kGy E-beam. Bacteria in the patties homogenates were cultured in a pouch pack. The results are shown in Fig. 2. The range (depth where dose is equivalent to that at the surface) is 9.8 mm.

In the first, second, and third patties, the irradiation effect on bacterial survival rate was evident. In the first patty, no survival bacteria were found. In the second and third patties, few survivors were observed. The absorbed doses at the center of 1st, 2nd and 3rd patties were 1.03, 1.13, and 1.18 kGy, respectively. These patties were sufficient to reduce most of bacteria population, respectively. The absorbed doses at the center of 4th, 5th and 6th patties were 0.95, 0.41 and 0.05 kGy, respectively. As shown in Fig. 2, the populations of *E. coli* O157 and *L. monocytogenes* in the fourth patty were 1757 and 140 CFU/10 g, respectively. The mean CFU were larger than those expected by the D_{10} values of them and the absorbed doses in the fourth patty. In the fourth patty (boundary between irradiated and un-irradiated or below effective dose), many black colonies appeared in the Clostridia pouch pack. Although all black colonies that appeared in Clostridia Count Agar were not necessarily anaerobic bacteria, these many black colonies (5037 black colonies) were not only the inoculated anaerobic bacteria

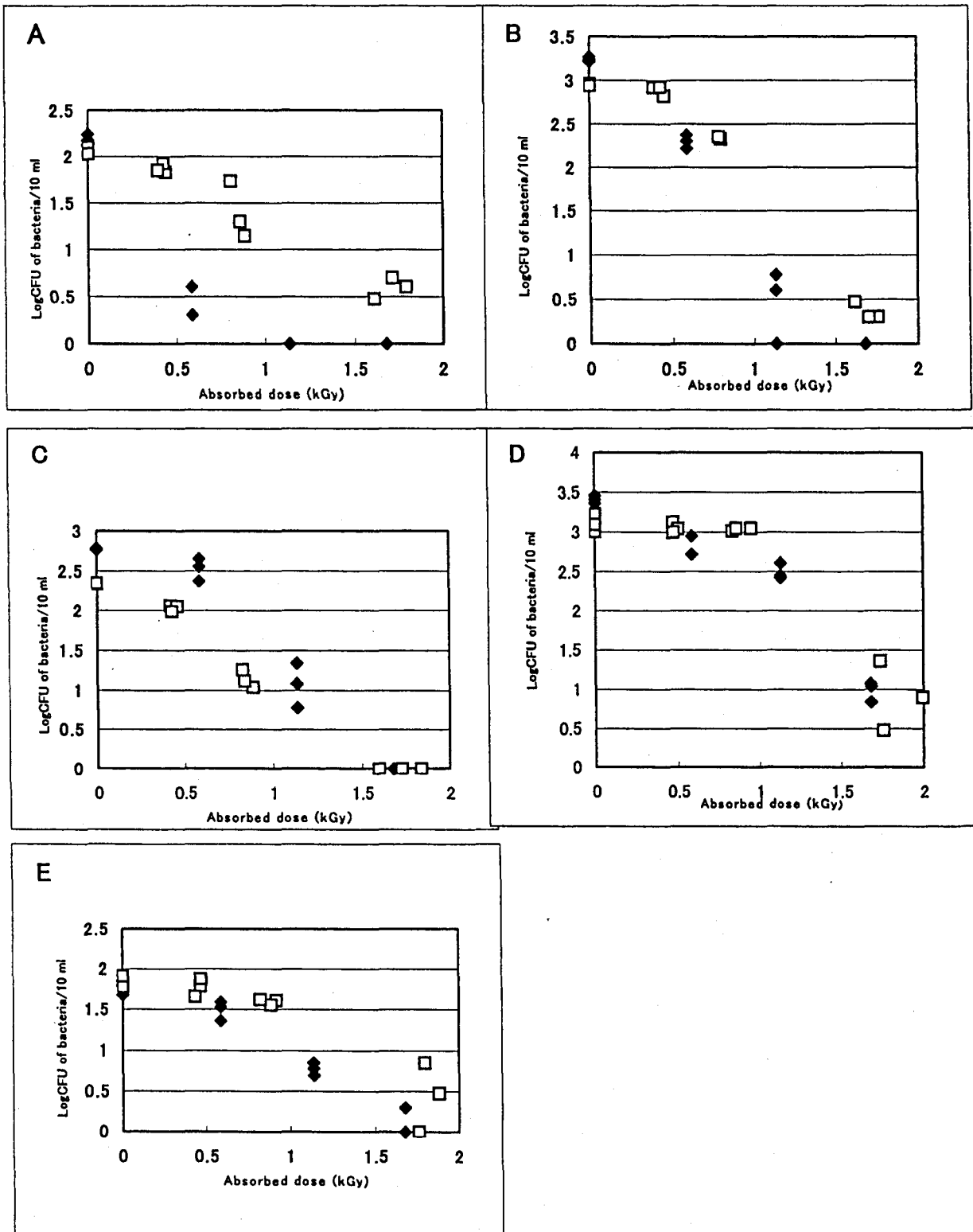


Fig. 1. Reduction of bacterial populations by irradiation

These samples were incubated overnight at 4 °C before irradiation. Populations of bacteria are shown as □(gamma irradiation) and ◆(E-beam irradiation). To facilitate log analysis, CFU values of zero were assigned a values of 0.001. A: Irradiation of *B. cereus*. B: Irradiation of *E. coli* O157 NVT. C: Irradiation of *L. monocytogenes*. D: Irradiation of *S. Enteritidis*. E: Irradiation of *C. perfringens*.

Legend to TABLE 1. Comparison of D_{10} (kGy) of pathogenic bacteria with gamma-ray or E-beam irradiation and with or without incubation before gamma-ray irradiation at 4 °C.

a) D_{10} (kGy) values were calculated by fitting the regression line. b) Bacteria incubated overnight at 36 °C, packed in pouch pack, incubated overnight at 4 °C and irradiated c) Bacteria incubated overnight at 36 °C, packed in pouch pack and irradiated soon. d) Statistically significant difference ($\alpha > 0.05$) between the mean of CFU with gamma-ray irradiation and that with E-beam at the similar dose.

Bacterium	With incubation overnight at 4 °C before irradiation ^{b)}		Without incubation at 4 °C before irradiation ^{c)}
	Gamma ray irradiation	E-beam irradiation	Gamma ray irradiation
<i>B. cereus</i>	1.12 ^{a)}	0.33 ^{*d)}	0.47
<i>E. coli</i> O157	0.5	0.48	0.22
<i>L. monocytogenes</i>	0.47	0.43	0.32
<i>S. Enteritidis</i>	0.46	0.36	0.53
<i>C. perfringens</i>	0.98	0.78	1.68

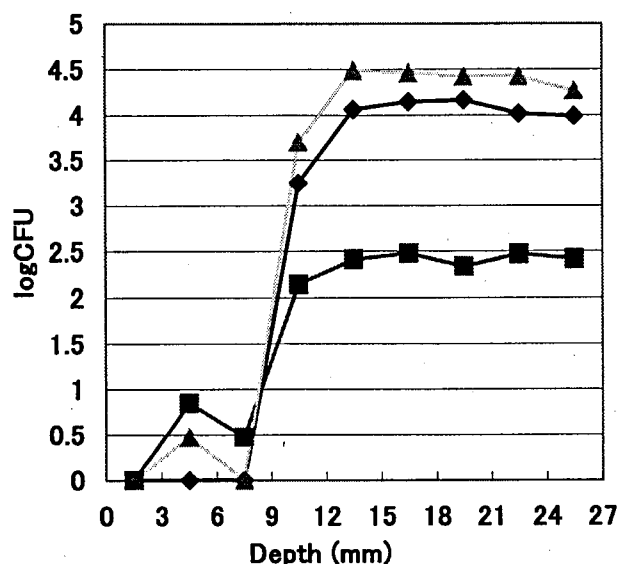


Fig. 2. Depth vs. CFU profiles in ground beef patties

Ground beef patties (10 g, 52 mm in diameter and 3 mm in thickness) inoculated with bacteria [◆ *E. coli* O157, (3700 cells), ■ *L. monocytogenes*, (600 cells), and ▲ *C. perfringens*, (165 cells)] were wrapped with Saran wrap. They were arranged in a pile (3 mm thickness of each patty, 9 piles thick) and were irradiated at 1 kGy with 5 MeV E-beam at 4 °C. After irradiation, the numbers of bacteria in the patties were detected as colored colonies in selective agar after cultivation overnight.

(165 cells inoculated), but also originally present ones (resident bacteria) in the beef patty. At the bottom of the fourth patty, absorbed dose (0.73 kGy) were insufficient to reduce the population of *C. perfringens*. But these results could not be expected enough from the D_{10} value in Table 1 and the absorbed dose. After irradiation, the action of the repairing enzyme requires induction time at a particular temperature in survival bacteria¹¹⁾. The long

incubation period at 4 °C may facilitate the recovery and growth of anaerobic bacteria. Therefore, storage condition of food after irradiation affects survival of contaminated bacteria in food.

In conclusion, comparing gamma-ray irradiation, E-beam irradiation of the pouch packs was remarkably effective in reducing the survival rates of *B. cereus*, slightly in that of *E. coli* O157, and even in that of *L.*

monocytogenes, *S. Enteritidis* and *C. perfringens* with incubation overnight at 4 °C before irradiation. With gamma irradiation, growing bacteria without incubation at 4 °C before irradiation were more easily damaged than resting cells with incubation overnight at 4 °C before irradiation. E-beam irradiation (1 kGy, 36 MGy/h, 5 MeV) of ground beef patties inoculated with bacteria decreased bacterial survival rate in a certain area (0-9 mm thickness of beef patty). In the boundary area (9-12 mm), however, bacteria sensitive to irradiation were decreased, while population of resistant bacteria inoculated and originally present increased. From these results, in order to ensure that food is sufficiently irradiated with E-beam, absorbed dose and anaerobic bacterial growth should be checked both on the surface and at the bottom of sample.

REFERENCES

- 1) Food and Drug Administration: Irradiation in the production, processing and handling of food. *Fed. Regist.*, **62**, 64107-64121 (1997)
- 2) Tarr, P. I., Besser, T. E., Hancock, D. D., Keene, W. E., and Goldoft, M.: *J. Food Prot.*, **60**, 1466-1471 (1997)
- 3) von Sonntag, C.: "The chemical basis of radiation biology," Taylor & Francis, London (1987)
- 4) Urbain, W. M.: "Food irradiation," Academic Press, Inc., Orlando, Fla. (1986)
- 5) Anonymous: "ANNUAL BOOK of ASTM STANDARDS 2000," 12.02, p.857. Nuclear, Solar, and Geothermal Energy, West Conshohocken (2000)
- 6) Miyahara, M., Ito, H., Ueno, K., Yamase, Y., Toyoda, M.: *J. Health Sci.*, **48**, 37-41 (2002)
- 7) Diehl, J. F.: "Safety of irradiated foods," 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1995)
- 8) Dickson, J. S.: "Food irradiation: principles and applications," ed. by Molins, R. A., A John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 25-27 (2001)
- 9) Tallentire, A.: *Adv. Space. Res.*, **3**, 105-112 (1983)
- 10) Sekiguchi, M., Tabei, M.: *J. Antibact. Antibung. Agents*, **17**, 167-173 (in Japanese) (1989)
- 11) Lopez-Gonzalez, V., Murano, P. S., Berennan, R. E. and Murano, E. A.: *J. Food Prot.*, **62**, 10-15 (1999)

Tropane Alkaloids in Adventitious Root Cultures of *Physochlaina physaloides*

Koichiro Shimomura^{*1}, Makoto Hirose^{*2}, Shinsaku Natori^{*3}, Motoyoshi Satake^{*4},
Kayo Yoshimatsu[#] and Kanji Ishimaru^{*5}

Adventitious root cultures of *Physochlaina physaloides* were established and their growth and tropane alkaloid production were investigated. Although the roots cultured in Murashige-skoog liquid medium containing 1.0-3.0 mg/l IBA grew well, the addition of lower concentrations of auxins was more suitable for alkaloid production. The best alkaloid yield was obtained with 0.01 mg/l NAA in 1/2 MS liquid medium. In addition, the alkaloid differences between the cultured roots and the regenerated plant cultivated in the soil was studied. Cultured roots in this condition showed higher level of alkaloids when compared to leaf, stem and roots from the regenerated plant (3 months in field conditions).

Keywords: *Physochlaina physaloides*, Solanaceae, root culture, auxin, tropane alkaloid

Introduction

Physochlaina physaloides G. Don, a small solanaceous plant, grows mainly in the north and northeast parts of China, Inner Mongolia and Russian countries. The plant, containing tropane alkaloids such as scopolamine (1) and hyoscyamine (2) (Fig. 1), has been well-known in China as a medicinal herb for its antitussive and sedative properties¹⁾. The biochemical research on tropane alkaloid metabolism using plant tissue culture techniques has so far been intensively carried out in

various solanaceous plants²⁾, however, there is no report on the tissue culture work of *Physochlaina physaloides* as far as we know. In this study, the adventitious root cultures of this plant were established and the growth and tropane alkaloid production in several different conditions were investigated.

Materials and Methods

Plant material

The seeds of *Physochlaina physaloides* were sterilized [2%

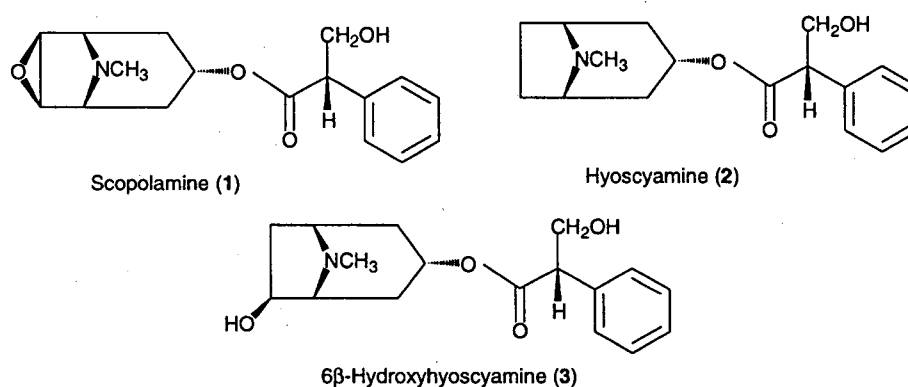


Fig. 1 Tropane alkaloids analyzed by HPLC in this study

^{*1} Faculty of Life Science, Toyo University, 1-1-1 Izumino, Itakura-machi, Oura-gun, Gunma, 374-0193 Japan

^{*2} Health Sciences Division, Minister's Secretariat, Ministry of Health, Labor and Welfare, 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8916 Japan

^{*3} 2-5-2-401 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-0012 Japan

^{*4} 2-2-24 Mizuhiki, Atsugi, Kanagawa, 243-0004 Japan

^{*5} Department of Applied Biological Sciences, Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo, Saga, 840-8502 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

NaOCl with Tween 20 (1 drop in 50 ml)] for 10 min and germinated aseptically on 0.5% agar medium containing 0.5% sucrose under 16 h light/day ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$) at 25 °C. The axenic plants were transferred to 1/2 Murashige-Skoog (MS)³ solid medium containing 2% sucrose and subcultured monthly.

Induction of adventitious roots

The adventitious roots were induced with some calli from leaf segments (5 × 5 mm) of the axenic plants cultured on MS solid medium containing 1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) in the dark for 3 weeks. The roots were cut off and maintained in MS liquid medium with 1 mg/l IAA. Only one clone was selected by its rapid growth and high production of tropane alkaloids [1, 2 and related alkaloid 6 β -hydroxyhyoscyamine (3)] (Fig. 1) and used for this experiment.

Analysis of alkaloids by HPLC

The sample preparation and the method of HPLC analysis for tropane alkaloids (1-3) were done by the same method as mentioned in our previous paper⁴.

Effects of auxins

The adventitious roots [ca. 100 mg, fresh weight (fw)] were inoculated in MS liquid medium containing various concentrations of IAA (0.1, 0.5, 1 or 3 mg/l), indole-3-butylic acid (IBA) (0.1, 1 or 3 mg/l) or 1-naphthaleneacetic acid (NAA) (0.01, 0.1 or 1 mg/l). After 3 weeks of culture, the roots were harvested and their alkaloid contents were measured by HPLC.

Effects of media

The adventitious roots (ca. 150 mg, fw) were inoculated in four basal media [MS, 1/2 MS, Gamborg B5 (B5)⁵ and Woody Plant (WP)⁶] supplemented with 0.01 mg/l NAA. After 3 weeks of culture, the growth and alkaloid production were determined.

Time course of growth and alkaloid production

The adventitious roots (ca. 150 mg, fw) were inoculated in 1/2 MS liquid medium containing 0.01 mg/l NAA. The growth and alkaloid production were measured periodically (once a week, from 1 to 6 weeks).

Alkaloid content in the regenerated plant cultivated in the soil

The axenic plant *in vitro* was transplanted to a pot and acclimatized in a phytotron at 25 °C in 70 % humidity under 16 h/day light ($150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$). After 3 weeks of culture, the plant was transferred to a field and cultivated for 3 months. The grown plant was separated to four portions (leaf, stem, root and rootlet) and their alkaloid contents were determined.

General experimental procedures

The volume of the liquid media (3 % sucrose) for the adventitious root cultures was 50 ml per 100 ml Erlenmeyer flask. The liquid cultures were maintained on a rotary shaker at 100 rpm in the dark at 25 °C. All the media were adjusted to pH 5.7 before autoclaving at 121 °C for 15 min. Solidified medium was obtained by adding 0.2 % Gelrite. The data for all experiments are shown as the mean of three replicates.

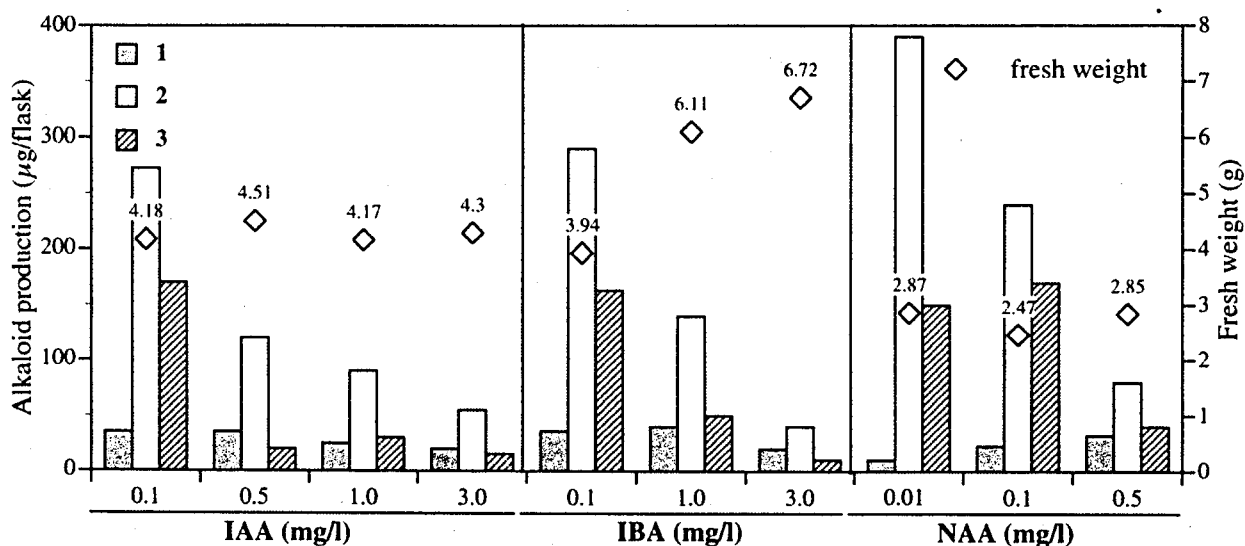


Fig. 2 Effects of auxins on the growth and alkaloid production in adventitious root cultures of *Physochlaina physaloides*

The roots (ca. 100 mg fw) were cultured in MS liquid medium (50 ml/100 ml flask) for 3 weeks at 25 °C in the dark on a rotary shaker (100 rpm). The value above symbol (◇) shows fresh weight (g). 1 (▨), scopolamine; 2 (□), hyoscyamine; 3 (▩), 6 β -hydroxyhyoscyamine.

Results and Discussion

The effects of three auxins, IAA, IBA and NAA, on the growth and alkaloid production (1-3) of *P. physaloides* adventitious roots were determined using MS liquid medium (Fig. 2). The roots (inoculum: ca. 100 mg fw) cultured with 1 mg/l or 3 mg/l IBA for 3 weeks showed the rapid growth (6.11 g and 6.72 g, fw, respectively) where the level was more than 2-fold compared to those cultured with NAA. In the media containing IAA the roots also showed satisfactory growth (4.17-4.51 g, fw). In this experiment, the roots accumulated 2 as the main alkaloid and lower concentrations of auxins were more effective for the tropane alkaloid production. Particularly, the highest alkaloid production was obtained with the addition of 0.01 mg/l NAA with yielding 390 $\mu\text{g}/\text{flask}$ of 2 and 150 $\mu\text{g}/\text{flask}$ of 3. Although the tropane alkaloids in the culture medium were also determined by HPLC, they were at extremely low levels.

As the culture with 0.01 mg/l NAA was the most effective for alkaloid production, the effects of various basal media (MS, 1/2 MS, B5 and WP) containing 0.01 mg/l NAA on the growth and alkaloid production were tested (Fig. 3). The roots grew the best in 1/2 MS liquid medium of the four media tested. The roots cultured either in 1/2 MS or MS medium accumulated high amounts of 2, however, B5 or WP media were not suitable for alkaloid production. The highest yield of total three alkaloids was obtained in the roots cultured in 1/2 MS liquid medium (397 $\mu\text{g}/\text{flask}$). Therefore contents of 1-3 and the growth of the adventitious root cultures in 1/2

MS liquid medium containing 0.01 mg/l NAA were periodically investigated (Fig 4).

Fresh weight of the roots increased from the beginning of the culture and it reached a plateau level after 5 weeks. The content of 2 showed a transient increment at week 2, and then after week 3, its level was constant. The contents of 1 and 3 gradually increased from the beginning until the end of the culture. The level of 3 was approximately 2-3 times larger than that of 1 in most part of the culture period.

To compare the alkaloid contents of the adventitious roots with that of the regenerated plant cultivated in the field, the axenic plants *in vitro* were transplanted to soil. After 3 weeks of acclimatization in a phytotron, the plants were transferred to a field and cultivated for 3 months. The grown plants were harvested and their alkaloid contents in four separated parts (leaf, stem, root and rootlet) were examined (Table 1). The levels of 1-3 were high in the underground part (especially in the rootlet), whereas they were remarkably low in the leaf and stem portions. The alkaloid production in the cultured adventitious roots was superior to those in the roots of the field-grown plant. This result indicates the usefulness of root cultures of this plant for the production of tropane alkaloids because the cultured roots grow much faster than field-grown roots and rootlets.

Acknowledgement

Authors are grateful to Ms. Wendy Shu (Singapore Polytechnic) for her critical reading of this manuscript. This

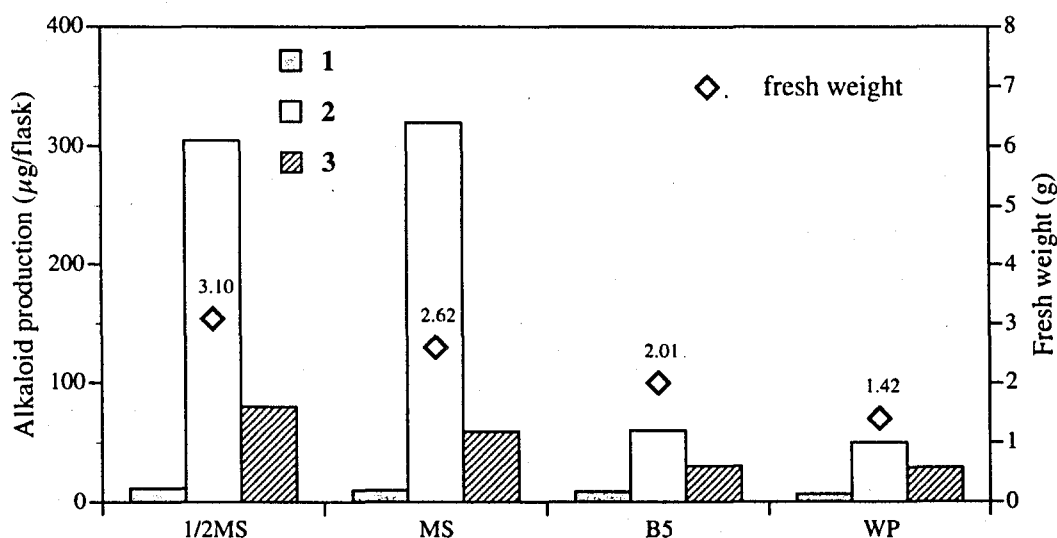


Fig. 3 Effects of various basal media on the growth and alkaloid production in adventitious root cultures of *P. physaloides*

The roots (ca. 150 mg fw) were cultured in various liquid medium containing 0.01 mg/l NAA (50 ml/100 ml flask) for 3 weeks at 25 °C in the dark on a rotary shaker (100 rpm). The value above symbol (\diamond) shows fresh weight (g). 1 (□), scopolamine; 2 (□), hyosyamine; 3 (▨), 6 β -hydroxyhyoscyamine.

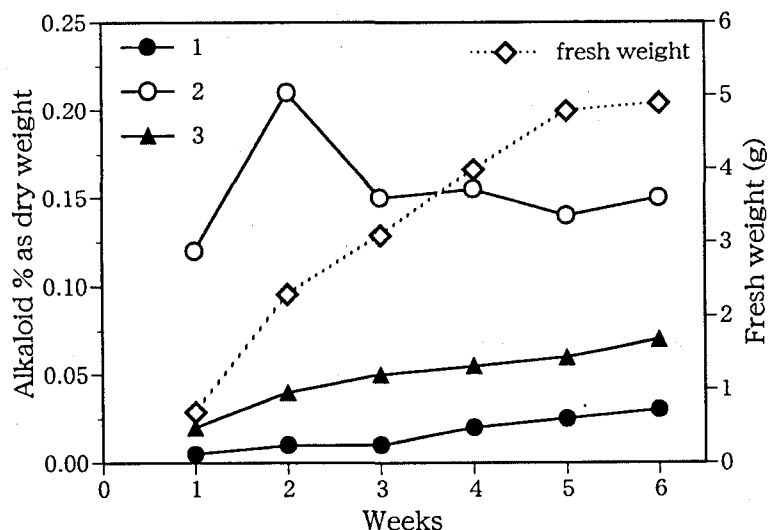


Fig. 4 Growth and alkaloid production in adventitious root culture of *P. physaloides*

The roots (ca. 150 mg fw) were cultured in 1/2 MS liquid medium containing 0.01 mg/l NAA (50 ml/100 ml flask) at 25 °C in the dark on a rotary shaker (100 rpm). ◇, fresh weight (g); 1 (●), scopolamine; 2 (○), hyosyamine; 3 (▲), 6β-hydroxyhyoscyamine.

Table 1 Tropane alkaloid contents in adventitious roots and regenerated plant

plant material		alkaloid % as dry weight		
		1	2	3
Adventitious roots		0.022	0.154	0.068
Plant	Leaf	trace	trace	0.004
	Stem	0.004	0.009	0.009
	Root	0.005	0.089	0.011
	Rootlet	0.052	0.341	0.230

Adventitious roots were cultured in 1/2 MS liquid medium (50 ml/100 ml flask) containing 0.01 mg/l NAA at 25 °C in the dark for 6 weeks. Axenic plantlets *in vitro* were transplanted to soil, acclimatized in a phytotron (25 °C, 70 % relative humidity, 16 h/day light) for 3 weeks, and then cultivated in a field for 3 months. 1, scopolamine; 2, hyosyamine; 3, 6β-hydroxyhyoscyamine.

work was supported in part by the Ministry of Health and Welfare, Science Research Fund Subsidy granted to the Japan Health Science Foundation.

References

- 1) Peigen, X.: *ZHONGCAOTAO*, **16**, 259-261 (1985)
- 2) Sauerwein, M., Yoshimatsu, K., Ishimaru, K. and Shimomura K.: "Studies in Natural Products Chemistry, vol. 17: Tropane Alkaloids in Root Cultures of Solanaceous Plants", ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier Science B. V., pp. 395-419 (1995)
- 3) Murashige, T. and Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 4) Shimomura, K., Sauerwein, M. and Ishimaru, K.: *Phytochemistry*, **30**, 2275-2278 (1991)
- 5) Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158 (1968)
- 6) Lloyd, G. B. and McCown, B. H.: *Int. Plant. Prop. Soc.*, **30**, 421-427 (1980)

Tropane Alkaloids in Auxin-Independent Root Cultures of *Physochlaina physaloides*

Koichiro Shimomura^{*1}, Makoto Hirose^{*2}, Shinsaku Natori^{*3}, Motoyoshi Satake^{*4},
Kayo Yoshimatsu[#] and Kanji Ishimaru^{*5}

Adventitious and hairy root cultures of *Physochlaina physaloides* were established. These roots grew well and produced high amounts of tropane alkaloids (particularly hyoscyamine and 6 β -hydroxyhyoscyamine) in auxin-free culture medium. The effects of basal media and temperature on the growth and alkaloid production of these roots were investigated. Both root cultures produced highest amount of tropane alkaloids in B5 medium though the optimum temperature for hairy roots were lower than that for adventitious roots.

Keywords: *Physochlaina physaloides*, Solanaceae, root culture, hairy root, tropane alkaloid

Introduction

Physochlaina physaloides G. Don, a small solanaceous plant, grows in the north and northeast parts of China, Inner Mongolia and Russian countries. The plant, containing tropane alkaloids such as scopolamine (1) and hyoscyamine (2) (Fig. 1), has been used as a medicine in China for its antitussive and sedative properties¹⁾. We established the adventitious root cultures of this plant and investigated the effect of auxins on the growth and alkaloid production²⁾. Although this plant is regarded to be rich in biosynthetically important tropane alkaloid 6 β -hydroxyhyoscyamine (3)²⁾ (an intermediate in the conversion of 2 to 1), detailed research on

the production of the alkaloids and the tissue culture experiments have not been done. In the present study, we established auxin-independent root cultures, non-transformed and transformed root cultures, of this plant and determined their growth and secondary metabolites (tropane alkaloid production) in different culture conditions.

Materials and Methods

General experimental procedures

The volume of the liquid medium for root cultures of *Physochlaina physaloides* was 50 ml / 100 ml Erlenmeyer flask. The cultures were maintained on a rotary shaker at 100

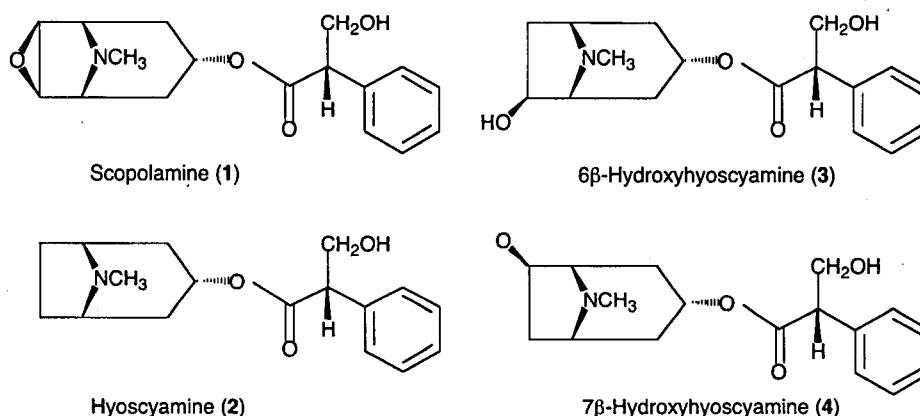


Fig. 1 Tropane alkaloids analyzed by HPLC in this study

^{*1} Faculty of Life Science, Toyo University, 1-1-1 Izumino, Itakura-machi, Oura-gun, Gunma, 374-0193 Japan

^{*2} Health Sciences Division, Minister's Secretariat, Ministry of Health, Labor and Welfare, 1-2-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8916 Japan

^{*3} 2-5-2-401 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-0012 Japan

^{*4} 2-2-24 Mizuhiki, Atsugi, Kanagawa, 243-0004 Japan

^{*5} Department of Applied Biological Sciences, Faculty of Agriculture, Saga University, 1 Honjo, Saga, 840-8502 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

rpm in the dark at 25 °C (except for the experiment for the effects of temperature). All the media [a half strength Murashige-Skoog (1/2 MS)³⁾, Gamborg B5 (B5)⁴⁾ and Woody Plant (WP)⁵⁾ media] were adjusted to pH 5.7 before autoclaving at 121 °C for 15 min. Solidified medium was obtained by adding 0.2 % Gelrite.

Plant materials

The seeds of *P. physaloides* were sterilized [2% NaOCl with Tween 20 (1 drop in 50 ml)] for 10 min and germinated aseptically on 0.5% agar medium containing 0.5% sucrose under 16 h light/day ($70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$) at 25 °C. The axenic plants were transferred to 1/2 MS solid medium containing 2% sucrose and subcultured monthly.

Induction of adventitious roots

The adventitious roots were induced with some calli from leaf segments (5 x 5 mm) of the axenic plants cultured on MS solid medium containing 1 mg/l indole-3-acetic acid (IAA) in the dark for 3 weeks. The roots were cut off and maintained in the same liquid medium. One clone was selected by its rapid growth and high production of tropane alkaloids (quantified by HPLC) and transferred into phytohormone-free 1/2 MS liquid medium. The roots could be maintained as a phytohormone-independent culture and used for this experiment.

Induction of the hairy roots

Agrobacterium rhizogenes A4 strain harboring Ri plasmid was inoculated onto the stem of the axenic plant by a needle. The hairy roots, appeared at the infected sites, were cut off and cultured on phytohormone-free 1/2 MS solid medium containing the antibiotic (0.5 g/l Claforan) to eliminate the bacteria. After elimination of the bacteria, the axenic hairy roots (10 clones) were transferred and maintained on phytohormone-free 1/2 MS liquid medium. Among them, one clone that showed rapid growth was selected and used for this experiment. Opines (agropine and mannopine) of the hairy roots were extracted and detected using paper electrophoresis⁶⁾.

HPLC analysis

The sample preparation and the method of HPLC analysis for tropane alkaloids were done by the same method as mentioned in our previous paper⁷⁾.

Study of culture conditions

The adventitious [40 - 90 mg, fresh weight (fw)] and hairy (10 - 20 mg, fw) roots were inoculated in a liquid medium and

cultured under the conditions indicated in the Tables 1 and 2. The growth and alkaloid production in these roots were determined.

Periodical study of growth and alkaloid production

The adventitious (90 mg fw) and the hairy roots (10 mg fw) were inoculated in phytohormone-free MS or B5 liquid medium. The growth and alkaloid production were determined periodically (1 to 7 weeks).

Results and discussion

The growth and contents of four tropane alkaloids, 1-3 and related compound 7 β -hydroxyhyoscyamine (4)⁸⁾ (Fig. 1) in the adventitious and hairy roots cultured in four phytohormone-free liquid media (MS, 1/2 MS, B5 and WP) are shown in Table 1. The adventitious roots grew well in phytohormone-free liquid medium (37- to 80-fold increase of fw after 3-week culture), especially in B5 medium (ca. 80-fold increase of fw). In this medium, the highest amount of 2 (926.15 μg / flask) was obtained, however, the accumulation of 1 was much less than those cultured in 1/2 MS or WP medium. Taking into account the relatively high yield of 3 (73.16 μg / flask) and 4 (27.67 μg / flask) in B5 medium, the conversion of 3 (or 4) to 1 in the roots seemed to be suppressed. In the case of the hairy roots, the clear difference of the growth was not observed in these four media tested. Despite the vigorous growth of the hairy roots (approximately 300 fold increase of fw after 3-week culture), their alkaloid production was much less than those in the adventitious roots. The highest amount of 2 in the hairy roots was obtained in MS medium. Therefore we selected MS and B5 medium for further experiments.

The effects of temperature (15 °C - 25 °C) on the growth and alkaloid production in the adventitious and hairy roots were determined (Table 2). The growth of the roots (both adventitious and hairy roots) cultured at 15 °C was inferior to those at 20 °C or 25 °C. Highest yield of 2 by adventitious roots was obtained in B5 medium at 25 °C. On the other hand, hairy roots produced highest amount of 2 in B5 medium at 20 °C. It was noteworthy that for the production of 1 (conversion of 2 to 1), low temperature (20 or 15 °C) was suitable in both adventitious and hairy root cultures.

Because the adventitious and hairy roots showed the rapid growth in B5 liquid medium at 25 °C, we examined the amount of 1-4 and the growth of these roots periodically (Fig. 2). In this medium the adventitious roots grew gradually and the fresh weight reached ca. 5 g at week 7 (Fig. 2A). On the other hand, the growth of the hairy roots rapidly increased

Table 1 Effects of various basal liquid media on the growth and alkaloid production (μg / flask) in adventitious and hairy root cultures of *Physochlaina physaloides*

material	medium	fw (g)	GI	dw (mg)	1	2	3	4
Adventitious roots	MS	1.99	36.9	170.1	0.61	519.86	68.25	trace
	1/2 MS	3.08	57.0	210.2	4.44	567.84	67.59	trace
	B5	4.31	79.8	266.3	0.84	926.15	73.16	27.67
	WP	2.31	42.8	189.6	2.43	702.33	41.16	trace
Hairy roots	MS	3.09	309	208.1	trace	378.11	7.74	trace
	1/2 MS	3.07	307	181.1	trace	258.53	trace	trace
	B5	3.18	318	200.4	trace	234.58	trace	trace
	WP	3.46	285	285.4	trace	363.54	10.12	trace

The roots were cultured for 3 weeks at 25°C. fw, fresh weight; dw, dry weight; GI, growth index: final fw / inoculum fw (ca. 50 mg for adventitious roots and ca. 10 mg for hairy roots).
1, scopolamine; 2, hyoscyamine; 3, 6 β -hydroxyhyoscyamine; 4, 7 β -hydroxyhyoscyamine.

Table 2 Effect of temperature on the growth and alkaloid production (μg / flask) in adventitious and hairy root cultures of *Physochlaina physaloides*

material	medium	temp. (°C)	fw (g)	GI	dw (mg)	1	2	3
Adventitious roots	MS	15	0.60	14.6	39.1	5.25	40.23	10.31
		20	2.01	49.0	138.8	2.01	420.95	39.68
		25	3.81	92.9	273.2	0.91	572.43	92.23
	B5	15	0.99	24.1	55.9	3.37	124.59	12.54
		20	4.62	112.7	243.8	2.22	684.55	48.20
		25	4.52	110.2	300.5	trace	983.32	71.41
Hairy roots	MS	15	0.69	43.1	46.8	1.41	32.79	3.76
		20	5.30	331.3	307.0	20.38	509.92	144.63
		25	6.09	380.6	357.3	4.09	579.71	106.87
	B5	15	1.92	120.0	110.0	2.42	158.53	13.20
		20	4.93	308.1	319.6	0.85	1252.17	140.33
		25	6.02	376.3	361.4	trace	1014.73	89.49

The roots were cultured for 4 weeks. fw, fresh weight; dw, dry weight; GI, growth index: final fw / inoculum fw (ca. 40 mg for adventitious roots and ca. 20 mg for hairy roots).

1, scopolamine; 2, hyoscyamine; 3, 6 β -hydroxyhyoscyamine.

through the entire culture period until it reached to ca. 17 g (fw) at the end of culture (Fig. 2B). In both cultures (adventitious and hairy roots), the amount of **2** increased at the early stage of the culture, reached the maximum level at week 4 and began to decrease. The amount of **3** was slightly enhanced at the last stage (week 6 to week 7) and conversion of **2** to **3** became active after week 3 when the level of **2** approached the maximum level in both cultures. No clear difference in the accumulation of tropane alkaloids (**1-4**) between hairy and adventitious root cultures was observed. We also determined the periodical accumulation of **1-4** and the growth of adventitious and hairy roots in MS liquid medium. The patterns of the growth and alkaloid production were similar to those observed in B5 liquid medium, however,

the amount of the alkaloids was almost half the level in B5 medium (data not shown).

We established two kinds of auxin-independent root culture, adventitious and hairy root cultures. Although the intact roots were reported to contain **3** as the main alkaloid [**1**, 0.06 % dry weight (dw); **2**, 0.21 % dw; **3**, 0.47 % dw]¹⁾, both root cultures accumulated **2** as the main alkaloid in all the culture periods (except week 7 in hairy roots) and under all the culture conditions tested. This might be one of the differences between field-grown roots and cultured roots that previously reported^{9,10)}. Yields of **3** increased according to the decrease of **2** in the adventitious and the hairy root cultures (Fig. 2). Therefore the expression of genes responsible for the conversion of **2** to **3** might be more

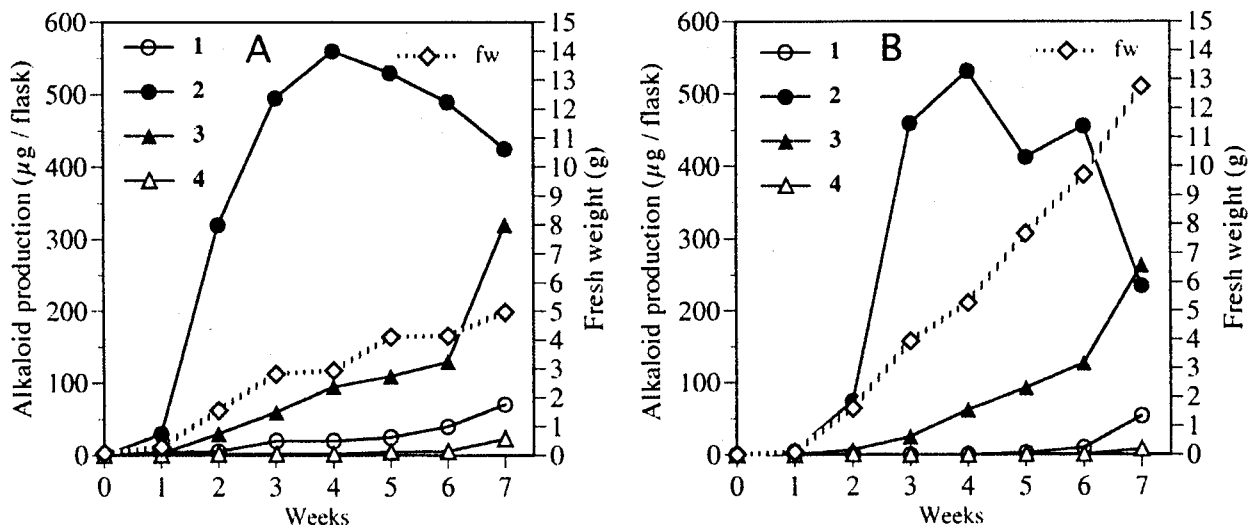


Fig. 2 Periodical growth and alkaloid production of *Physochlaina physaloides* adventitious (A) and hairy (B) roots cultured in phytohormone-free B5 liquid medium at 25°C

1 (○), scopolamine; 2 (●), hyoscyamine; 3 (▲), 6β-hydroxyhyoscyamine; 4 (△), 7β-hydroxyhyoscyamine; fw (◇), fresh weight (g).

obvious in the intact plants than cultured roots. With the optimization of culture conditions rather than auxin, even adventitious root cultures produced high amounts of tropane alkaloids (983.32 μg / flask of 2 and 71.41 μg / flask of 3 in Table 2) in phytohormone-free B5 medium. In the case of hairy roots, results in Table 1 (highest yield of 2 in MS medium) seems to be contrary to the results in Table 2 (higher yield of 2 in B5 medium at 25°C). However the results of Table 1 was obtained after three weeks of culture while after 4 weeks in Table 2. In addition productivity of alkaloids by hairy root cultures was much higher in B5 medium in the time course study. Therefore the optimum culture medium for the growth and the alkaloid accumulation in hairy roots might be B5 medium. These plant materials (adventitious and hairy root cultures) could be one of the most useful systems for biosynthetic experiments of tropane alkaloids, especially the pathway in the conversion of 2 to 3, because they do not require phytohormones (especially auxins) for their growth and alkaloid production.

Acknowledgement

Authors are grateful to Ms. Wendy Shu (Singapore Polytechnic) for her critical reading of this manuscript.

References

- 1) Peigen, X.: *ZHONGCAOTAO*, **16**, 259-261 (1985)
- 2) Shimomura, K., Hirose, M., Natori, S., Satake, M., Yoshimatsu, K. and Ishimaru, K.: *Bulletin of N.I.H.S.*, **120**, 81-84 (2002)
- 3) Murashige, T. and Skoog, F.: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 4) Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.: *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158 (1968)
- 5) Lloyd, G. B. and McCown, B. H.: *Int. Plant. Prop. Soc.*, **30**, 421-427 (1980)
- 6) Petit, A., David, C., Dahl, G. A., Ellis, J. G., Guyon, P., Casse-Delbart, F. and Temp, J.: *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 204-214 (1983)
- 7) Shimomura, K., Sauerwein, M. and Ishimaru, K.: *Phytochemistry*, **30**, 2275-2278 (1991)
- 8) Ishimaru, K. and Shimomura, K.: *Phytochemistry*, **28**, 3507-3509 (1989)
- 9) Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: "Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 21, Medicinal and aromatic plants IV", ed. by Bajaj, Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin, New York, pp. 87-103 (1992)
- 10) Yoshimatsu, K., Yamaguchi, H. and Shimomura, K.: *Plant Cell Reports*, **15**, 555-560 (1996)

糖鎖含有タンパク製剤の評価試験法に関する研究 (IV)

- エリスロポエチン製剤 その4

太田美矢子[#], 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫

Study on evaluating methods for the quality control of glycoprotein products. (IV)

- Erythropoietin products. Part 4

Miyako Ohta[#], Nana Kawasaki, Satsuki Itoh and Takao Hayakawa

We have previously reported on peptide mapping of recombinant human erythropoietin (rhEPO) by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Using this method, both peptides and glycosylation at each glycosylation site can be elucidated based on the mass chromatogram and mass spectrum. In this study, we evaluated the mass spectrometric peptide mapping with regard to its use in comparability assessment of both protein parts and carbohydrates parts in glycoprotein products. Models of closely related glycoprotein products used in this study are rhEPOs produced from three different sources. We demonstrated that the mass spectrometric peptide mapping can elucidate the identity of protein part, and differences in site-specific carbohydrates heterogeneity due to acetylation and sulfation among the three rhEPOs. Our method can thus be useful in comparability assessment of therapeutic glycoproteins.

Keywords: peptide mapping, LC/MS, erythropoietin, comparability

緒言

近年、バイオテクノロジーを応用した医薬品の開発がめざましく進展し、多くの糖タンパク質が医薬品として製造・販売されている。遺伝子組換えにより産生された糖タンパク質性医薬品の場合、完全に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分子構造的な不均一性が発生する可能性がある。また、仮に挿入遺伝子により単一のタンパク質に翻訳されたとしても、糖鎖部分の構造は、産生細胞が有する糖転移酵素群の発現状況等に依存するため、産生細胞の種類、発現方法、培養条件などの要因により変化することが知られている。糖鎖部分は生物活性、体内動態、溶解性及び安定性に関与していることが明らかにされていることから¹⁾⁻³⁾、糖タンパク質性医薬品の製造方法を変更した場合、新旧医薬品のタンパク質部分及び複雑な糖鎖部分の構造の同等性/同質性 (comparability) を正しく評価することは重要である。しかし、糖鎖部分には、単糖組成、分岐構造、結合様式、及び硫酸基やアセチル基などによる修飾などの違いによ

る不均一性が存在し、これらを簡便かつ迅速に解析するのは容易ではない。従って、タンパク質部分だけでなく、糖鎖部分の構造の同等性/同質性を簡便かつ詳細に解析する方法の開発が望まれている。

エリスロポエチン (EPO) は腎臓で産生される赤血球前駆細胞の分化増殖を調節する糖タンパク質であり、組換え型ヒトEPO (rhEPO) が貧血を治療する薬として利用されている。EPOは165個のアミノ酸から成り、3本のN-結合糖鎖 (Asn24, Asn38及びAsn83) 及び1本のO-結合糖鎖 (Ser126) が結合している。さらに、これらの糖鎖はEPOの生物活性や体内挙動に、深く関与していることが報告されている^{4), 5)}。

我々は、糖タンパク質のタンパク質部分の構造及び部位特異的糖鎖不均一性を同時に解析するために、rhEPOをモデル糖タンパク質として用いて、LC/MSを用いたペプチドマッピング法を検討し、ペプチドマッピングは糖タンパク質のペプチドの確認、及び各糖鎖結合部位に付加している糖鎖の不均一性解析に有用であることを確認している^{6), 7)}。この分析法は、糖鎖の誘導体化及び精製過程を必要とせず、簡便かつ迅速にタンパク部分及び糖鎖部分の構造と不均一性を詳細に解析できることから、異なった産生細胞、発現方法、培養条件によって産生された糖タンパク質の糖鎖部分の同等性/同質性評価にも応用できるものと期待される。本研究では、製造方

[#] To whom correspondence should be addressed; Miyako Ohta; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-6950; E-mail: ohta@nihs.go.jp

法の異なる3種類のrhEPOを類似構造を持つ糖タンパク質のモデルとして用いて、ペプチドマッピングによりrhEPOのペプチド部分及び糖鎖部分の同時解析を行い、同等性/同質性評価におけるLC/MSを用いたペプチドマッピング法の有用性を評価した。

実験方法

1) 試薬

3種のrhEPOはCHO細胞あるいはBHK細胞で産生し、精製したものを用い、便宜上、EPO-A, B, 及びCとした。Endoproteinase Glu-C (Glu-C) はベーリンガーマンハイム (株) 社製を用いた。

2) 装置

HPLCはFinnigan spectra systemを用いた。

MSはESI-MS (TSQ-7000, Finnigan) を使用した。

3) Glu-CによるrhEPOの消化

rhEPO 1mgを100mM酢酸アンモニウム溶液 (pH8.0)

100 μ lに溶解させた。これにGlu-C 0.25mgを同溶液62 μ lに溶解させたものを加え、37 $^{\circ}$ C, 20時間反応させた。

4) ペプチドマッピング

HPLC

分離カラム:Pegasil ODS (2.1 x 250 mm, センシュー科学 (株))

溶離液A: 0.05%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む水溶液

溶離液B: 0.05% TFAを含む50%アセトニトリル溶液
グラジエントプログラム: 1-90%B液 (0-130分)

試料量: 50 μ l

流速: 0.2ml/min

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

UV検出波長: 206 nm

ESI-MS

測定モード: ネガティブイオンモード

シーガス: 70psi

オグジナリーガス: 10 unit

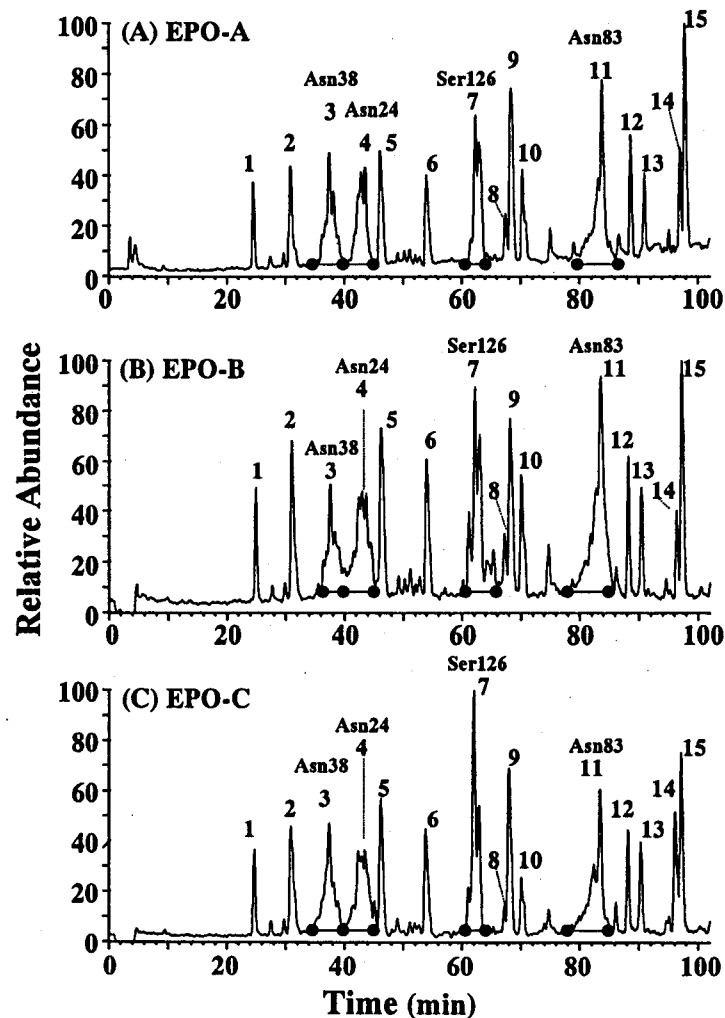


Fig. 1 TIC chromatograms of Glu-C digested EPO-A, EPO-B and EPO-C

キャピラリー温度：225℃
 マルチプライヤー：1,200V
 ESI電圧：4,500V
 スキャン範囲：550-2,400
 スキャン回数：4秒おき

結果

1. ペプチドマッピング

発現細胞の異なる3種のEPOをGlu-Cで消化し、ODSカラムを用いたLC/MSにより、ペプチドマッピングを行った。Fig. 1A, B及びCはそれぞれEPO-A, -B及び-Cのネガティブイオン測定によるtotal ion current (TIC)クロマトグラムである。各クロマトグラム中のピークは、4本の糖ペプチドを含むペプチド断片に由来するピークであり、保持時間の短い順に1から15と番号をつけた。各ピークのマススペクトル中の m/z 値を、アミノ酸配列から計算されるペプチドの理論値と照合した結果、11本のピークの m/z 値は一致し、これらはペプチドであることが確認された。一致しないものは糖鎖による修飾を受けているためと推定された。

2. ペプチド部分の比較

TICクロマトグラム上のペプチドピークをアサインした結果をTable 1に示す。ペプチドは単一ピークとして分離され、そのマススペクトルは1価及び2価イオンとして検出された。ネガティブイオン測定のため、ペプチドによっては1~数本のTFA(平均分子量; 114.0)が付加したピークが検出された。Glu-CはGlu-X及びAsp-Xの間の結合を切断する酵素であり、ピーク1, 2, 5, 6, 9, 12, 14, 15はGlu(Asp)-Xの切断により生じたペプチドであることが確認された。また、Glu-CはSer-X及びGly-Xの結合の一部を切断することが報告されているが^{8), 9)}、ピーク8及び10はこの反応によって、ピーク14から生じたものであり、ピーク13は同様にピーク15から生成したものであることが確認された。以上のように、3つのrhEPOから得られたペプチドマップ中の11個のピークのペプチドを特定することができた。その結果、EPO-A, -B及び-Cのペプチド部分に違いは存在しないことが確認された。

3. 糖ペプチド部分の比較

Fig.1においてペプチドとしてアサインされなかった幅広いピーク、ピーク3, 4, 及び11は、複雑なマススペクトルを示し、これは糖鎖構造の不均一性によるものと考えられた。一例として、EPO-A, -B及び-Cのピーク11のマススペクトルを示す(Fig.2)。これらの複雑なマススペクトルの各イオンは、 m/z 値を各糖ペプチドの理論値と照合することによりTable 2のように帰属する

ことができた。すなわち、ピーク3, 4, 及び11はそれぞれAsn38, Asn24及びAsn83にN-結合糖鎖が付加した糖ペプチドであると同定された。同様に、ピーク7はSer126にO-結合糖鎖が付加した糖ペプチドと特定された(Table 3)。TFAが付加したピークはN-結合糖鎖が結合したペプチドには検出されず、O-結合糖鎖が結合したペプチドにのみ少し検出された。

3-1. EPO-AのN-結合糖鎖

EPO-AのAsn83を含む糖ペプチドのマススペクトル(Fig.2A)を解析した結果、Asn83にはフコースが結合したジ、トリシアロ3本鎖(Tri-NA_{2,3})、モノ、ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖糖鎖(Tetra-NA_{1,2,3,4})、ラクトサミン1分子結合ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖(Tetra-Lac₁-NA_{2,3,4})、ラクトサミン2分子結合ジ、トリ、テトラシアロ4本鎖(Tetra-Lac₂-NA_{2,3,4})、及びラクトサミン3分子結合トリシアロ4本鎖(Tetra-Lac₃-NA₃)糖鎖が付加していることが確認された(Fig.2A, Table 2)。また、硫酸化糖鎖は観察できず、アセチル化糖鎖も少なかった。

Asn38を含む糖ペプチドには、Asn83と同様に、シアロ3本鎖及びシアロ4本鎖糖鎖、並びに僅かのアセチル化糖鎖の結合が確認された。Asn24には、Asn83と同様にシアロ3, 4本鎖糖鎖の結合が確認されたが、一番大きいイオンピークはフコシル結合ジシアロ2本鎖糖鎖(Bi-NA₂)であった。また、モノシアロ2本鎖糖鎖も確認された(Table 2)。

3-2. EPO-BのN-結合糖鎖

EPO-BのAsn83に結合している主な糖鎖は、EPO-Aと共通のシアロ3, 4本鎖であるが、それら以外にも多数の糖鎖が結合していることが分かった(Fig.2B)。これらのEPO-Aでは認められなかった糖鎖は3価イオンの m/z 値が14ずつ異なっていることから、複数のアセチル基が結合した糖鎖であることが明らかになった。例えば、Tetra-NA₄ではモノ、ジ、トリ、テトラ、ペンタ、ヘキサ、ヘプタ、オクタアセチル結合糖鎖(Ea₁-Ea₈)が観察された。Asn24及びAsn38にはEPO-Aと共通の糖鎖の他に、それぞれに1-3個のアセチル基が付加した糖鎖が結合していた。代表的な糖鎖Tetra-NA₄(E)に対するTetra-NA₄-Ac₁(Ea₁)の含有率は、各糖ペプチドに結合しているEのピーク高さに対するEa₁のピーク高さ比を計算するとき、Asn38, Asn24及びAsn83ではそれぞれ約17%, 27%及び43%であった(Fig.3A)。これらのことから、アセチル化はAsn24やAsn38よりもAsn83に多いことが確認された。

Table 1 Peak number in Fig.1, amino acid residues, and theoretical mass and observed m/z values

Peak No.	Residues	Theoretical mass (average)	Observed m/z		
			EPO-A	EPO-B	EPO-C
1	56-62	729.8	728.5 [M-H] ⁻	728.7 [M-H] ⁻	728.7 [M-H] ⁻
			842.5 [M+TFA-H] ⁻	842.6 [M+TFA-H] ⁻	842.7 [M+TFA-H] ⁻
			956.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	956.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	956.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
2	9-13	602.7	601.5 [M-H] ⁻	601.5 [M-H] ⁻	601.5 [M-H] ⁻
			715.5 [M+TFA-H] ⁻	715.6 [M+TFA-H] ⁻	715.5 [M+TFA-H] ⁻
			829.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	829.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	829.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
3 ^a	38-43 (Asn38)				
4 ^a	22-37 (Asn24)				
5	(1-8) S-S (160-165)	1,503.7	1,502.0 [M-H] ⁻	1,502.2 [M-H] ⁻	1,502.2 [M-H] ⁻
			1,616.3 [M+TFA-H] ⁻	1,616.3 [M+TFA-H] ⁻	1,616.3 [M+TFA-H] ⁻
			1,730.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,731.0 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,730.8 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
6	14-18	692.8	691.6 [M-H] ⁻	691.6 [M-H] ⁻	691.7 [M-H] ⁻
			805.6 [M+TFA-H] ⁻	805.6 [M+TFA-H] ⁻	805.7 [M+TFA-H] ⁻
			919.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	919.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	919.7 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
7 ^a	118-136 (Ser126)				
8	137-146 ^b	1,316.6	1,315.2 [M-H] ⁻	1,315.3 [M-H] ⁻	1,315.1 [M-H] ⁻
			1,429.1 [M+TFA-H] ⁻	1,429.9 [M+TFA-H] ⁻	1,429.3 [M+TFA-H] ⁻
			1,543.6 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,543.2 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,543.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
			1,657.6 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻	1,657.2 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻	1,657.1 [M+(TFA) ₃ -H] ⁻
			1,771.5 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻	1,771.5 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻	1,771.8 [M+(TFA) ₄ -H] ⁻
9	44-55	1,572.9	1,571.3 [M-H] ⁻	1,571.2 [M-H] ⁻	1,571.3 [M-H] ⁻
			1,685.6 [M+TFA-H] ⁻	1,685.6 [M+TFA-H] ⁻	1,685.2 [M+TFA-H] ⁻
			1,799.2 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,800.1 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,799.3 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
10	147-159 ^b	1,538.8	1,537.2 [M-H] ⁻	1,537.4 [M-H] ⁻	1,537.7 [M-H] ⁻
			1,651.7 [M+TFA-H] ⁻	1,651.6 [M+TFA-H] ⁻	1,651.4 [M+TFA-H] ⁻
			1,765.8 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,765.4 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻	1,765.5 [M+(TFA) ₂ -H] ⁻
11 ^a	73-96 (Asn83)				
12	63-72	1,115.3	1,113.9 [M-H] ⁻	1,114.0 [M-H] ⁻	1,114.1 [M-H] ⁻
			1,228.0 [M+TFA-H] ⁻	1,228.0 [M+TFA-H] ⁻	1,228.1 [M+TFA-H] ⁻
13	102-117 ^c	1,770.1	1,768.8 [M-H] ⁻	1,769.1 [M-H] ⁻	1,769.0 [M-H] ⁻
			1,883.2 [M+TFA-H] ⁻	1,882.8 [M+TFA-H] ⁻	1,883.3 [M+TFA-H] ⁻
14	137-159 ^b	2,837.4	1,418.3 [M-2H] ²⁻	1,417.7 [M-2H] ²⁻	1,417.7 [M-2H] ²⁻
			1,474.7 [M+TFA-2H] ²⁻	1,474.4 [M+TFA-2H] ²⁻	1,475.4 [M+TFA-2H] ²⁻
			1,531.6 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,531.6 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,531.9 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻
			1,589.0 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,588.5 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,588.9 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻
			1,645.3 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,645.8 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,646.1 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻
15	97-117 ^c	2,212.6	2,211.4 [M-H] ⁻	2,211.7 [M-H] ⁻	2,212.2 [M-H] ⁻
			2,326.1 [M+TFA-H] ⁻	2,325.9 [M+TFA-H] ⁻	2,326.1 [M+TFA-H] ⁻
			1,105.3 [M-2H] ²⁻	1,105.7 [M-2H] ²⁻	1,105.3 [M-2H] ²⁻
			1,162.8 [M+TFA-2H] ²⁻	1,162.4 [M+TFA-2H] ²⁻	1,162.2 [M+TFA-2H] ²⁻
			1,219.3 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,219.5 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻	1,219.2 [M+(TFA) ₂ -2H] ²⁻
			1,276.2 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,276.2 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻	1,276.3 [M+(TFA) ₃ -2H] ²⁻
			1,333.2 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,333.3 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻	1,333.4 [M+(TFA) ₄ -2H] ²⁻

The peptide contained amino acid residues from 19 to 21 was not detected. TFA, trifluoroacetic acid; ^a, glycopeptides;

^b, the part of peak 14 was hydrolyzed peaks 8 and 10; ^c, the part of peak 15 was hydrolyzed peak 13.

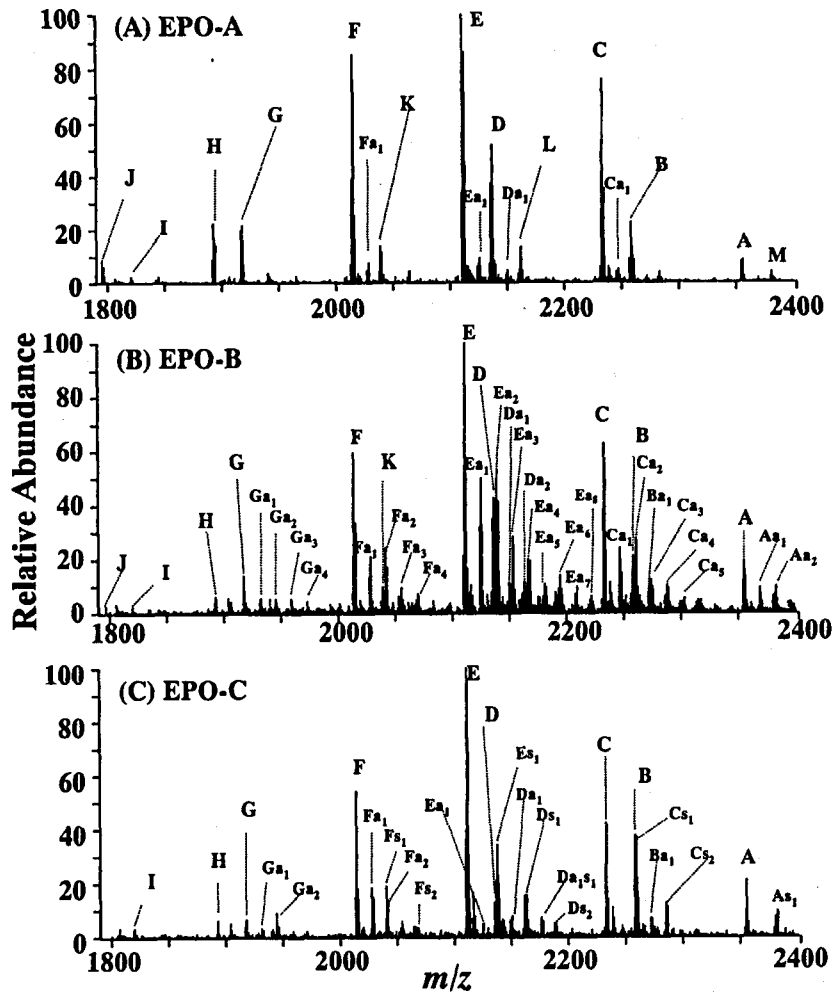


Fig. 2 Mass spectra of Asn83 glycopeptides (peak 11) in EPO-A, EPO-B and EPO-C

A, Tetra-Lac₂-NA₄; B, Tetra-Lac₂-NA₃; C, Tetra-Lac₁-NA₄; D, Tetra-Lac₁-NA₃; E, Tetra-NA₄; F, Tetra-NA₃; G, Tetra-NA₂; H, Tri-NA₃; I, Tetra-NA₁; J, Tri-NA₂; K, Tetra-Lac₁-NA₂; L, Tetra-Lac₂-NA₂; M, Tetra-Lac₃-NA₃; a, acetylated; s, sulfated.

3-3. EPO-CのN-結合糖鎖

EPO-CのAsn83にはEPO-Aと共通のシアロ3, 4本鎖の他に, それらがアセチル化 (Ba₁, Da₁, Da₁s₁, Ea₁, Fa₁₋₂, Ga₁₋₂) または硫酸化 (As₁, Cs₁₋₂, Ds₁₋₂, Da₁s₁, Es₁, Fs₁₋₂) された糖鎖が付加していることが観察された (Fig.2C). アセチル化糖鎖の種類はEPO-Bとは異なり, 非還元末端がシアル酸で飽和されているTetra-NA₄には少なく, 飽和されていないTetra-NA_{2,3}がモノ, ジアセチル化されていることが観察された. Tetra-NA₃ (F) に対する Tetra-NA₃-Ac₁ (Fa₁) の含有率は, Asn38, Asn24 及び Asn83 ではそれぞれ約 48%, 91% 及び 19% であり, Asn24 には Fa₁ が F と同程度結合していることが分かった (Fig.3B). また, Asn24 に結合している Bi-NA₁, Tri-NA₂, 及び Tetra-Lac₁-NA₃ のモノアセチル化糖鎖は非アセチル化糖鎖の, それぞれ約 2.6, 3.5 及び 0.9 倍であることが確認された.

Fig.2C には EPO-A 及び EPO-B では検出されないピ

ーク Es₁ が検出された. ピーク Es₁ の m/z 値は 2137.9 であり, Tetra-NA₄ (E) の 3 価イオンの m/z 値より 26.5 増加していることから, モノ硫酸化糖鎖であることが明らかになった. Es₁ は Asn24 には含まれておらず, E に対する Es₁ の含有率は, Asn38 及び Asn83 ではそれぞれ約 20% 及び 37% であった (Fig.3C). Tetra-NA₄ 以外に, Tetra-NA₃, Tetra-Lac₁-NA₃, Tetra-Lac₁-NA₄ 及び Tetra-Lac₂-NA₄ にも硫酸化が認められた (Table 2).

3-4. Ser126のO-結合糖鎖

Ser126 を含む糖ペプチドのマスマスペクトルから 3 種の EPO には共通して NA₂-Gal-GalNAc 及び NA-Gal-GalNAc が結合していることが確認された. また, Fig.1 のピーク 7 の形状が EPO-B のみ異なっているが, それは共通ピーク以外に, それらのモノ, ジアセチル化糖鎖が結合していることに起因することが確認された (Table 3).

Table 2 Structural assignments of N-linked glycopeptides peaks in Fig 1, and the theoretical masses and observed m/z values

Glycoform ^a	Peak 3 (Asn38 glycopeptide)				Peak 4 (Asn24 glycopeptide)				Peak 11 (Asn83 glycopeptide) ^b			
	Theoretical Charge		Observed m/z		Theoretical Charge		Observed m/z		Theoretical Charge		Observed m/z	
	mass ^c	state	EPO-A	EPO-B / EPO-C	mass ^c	state	EPO-A	EPO-B / EPO-C	mass ^c	state	EPO-A	EPO-B / EPO-C
Bi-NA ₁					3,750.7	2-	1,874.3	1,874.8	1,874.6			
Bi-NA ₂ -Ac ₁					3,792.7	2-	-	-	1,895.4			
Bi-NA ₂					4,042.0	2-	2,020.3 ^d	2,020.2 ^d	2,020.2			
Bi-NA ₂ -Ac ₁					4,084.0	2-	2,041.4	2,041.4	-			
Bi-NA ₂ -Ac ₂					4,126.0	2-	-	2,161.9	-			
Tri-NA ₁					4,116.0	2-	2,057.6	2,057.4	2,057.3			
Tri-NA ₁ -Ac ₁					4,158.1	2-	-	-	2,077.2			
Tri-NA ₁ -Ac ₂					4,200.1	2-	-	-	2,099.4			
Tri-NA ₂	3,375.2	2-	1,686.8	1,686.7	4,407.3	2-	2,202.7	2,202.5	2,203.4	5,388.5	3-	1,795.1 / 1,795.8
Tri-NA ₂ -Ac ₁	3,417.3	2-	-	1,708.2	4,449.3	2-	-	2,223.6	2,223.8			
Tri-NA ₂ -Ac ₂	3,666.5	2-	1,831.8	1,832.5	4,491.4	2-	-	2,244.9	2,244.5			
Tri-NA ₃	3,708.6	2-	-	1,853.2	4,698.6	3-	1,565.6	1,565.4	1,565.3	5,679.8	3-	1,892.8 / 1,892.7 / 1,892.8
Tri-NA ₃ -Ac ₁					4,740.6	3-	-	1,579.4	-			
Tri-NA ₃ -Ac ₂					4,782.6	2-	-	2,391.1	-			
Tetra-NA ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₁)										5,462.6	3-	1,820.5 / 1,819.8 / 1,819.9
Tetra-NA ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂)	3,740.6	2-	1,869.1	1,869.8	4,772.6	3-	1,590.7	1,590.6	1,590.2	5,753.9	3-	1,917.0 / 1,917.1 / 1,917.7
Tetra-NA ₂ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₁)	3,782.6	2-	-	1,890.2	4,814.7	3-	-	-	1,603.4	5,795.9	3-	- / 1,931.6 / 1,931.2
Tetra-NA ₂ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₂)	3,822.5	2-	-	1,910.2	4,856.7	3-	-	-	1,617.9	5,837.9	3-	- / 1,945.5 / 1,944.6
Tetra-NA ₂ -Ac ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₃)										5,880.0	3-	- / 1,958.8 / -
Tetra-NA ₂ -Ac ₄ (or Tri-Lac ₁ -NA ₂ -Ac ₄)										5,922.0	3-	- / 1,973.3 / -
Tetra-NA ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃)	4,031.8	2-	2,014.5 ^d	2,015.1	5,063.9	3-	1,687.3	1,687.5	1,687.7	6,045.1	3-	2,014.2 / 2,014.0 / 2,014.6
Tetra-NA ₃ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₁)	4,073.9	2-	2,035.8	2,036.5	5,105.9	3-	-	1,701.4	1,701.7	6,087.2	3-	2,028.5 / 2,028.5 / 2,027.9
Tetra-NA ₃ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₂)	4,115.9	2-	-	2,057.4	5,148.0	3-	-	1,715.2	1,715.5	6,129.2	3-	- / 2,042.1 / 2,041.7
Tetra-NA ₃ -Ac ₃ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₃)					5,190.0	3-	-	1,729.6	-	6,171.2	3-	- / 2,056.3 / -
Tetra-NA ₃ -Ac ₄ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₄)										6,213.3	3-	- / 2,070.0 / -
Tetra-NA ₃ -SO ₁ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁)	4,111.9	2-	-	-	5,255.4	3-	-	-	-	6,125.2	3-	- / - / 2,040.7
Tetra-NA ₃ -SO ₂ (or Tri-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₂)	4,323.1	2-	2,160.2	2,160.9 ^d	5,355.2	3-	1,784.5	1,784.4	1,784.4 ^d	6,205.3	3-	- / 2,111.1 ^d / 2,111.4 ^d
Tetra-NA ₄ -Ac ₁	4,365.1	2-	2,181.6	2,182.1	5,397.2	3-	-	1,798.5	1,797.7	6,336.4	3-	2,111.1 ^d / 2,125.7 / 2,125.2
Tetra-NA ₄ -Ac ₂	4,407.1	2-	-	2,202.3	5,439.2	3-	-	1,812.9	-	6,420.5	3-	- / 2,139.3 / -
Tetra-NA ₄ -Ac ₃	4,449.2	2-	-	2,223.6	5,481.2	3-	-	1,825.8	-	6,464.5	3-	- / 2,153.1 / -
Tetra-NA ₄ -Ac ₄										6,504.5	3-	- / 2,167.0 / -
Tetra-NA ₄ -Ac ₅										6,546.6	3-	- / 2,181.7 / -

Continued

Table 2. Continued

Glycoform ^a	Peak 3 (Asn38 glycopeptide)			Peak 4 (Asn24 glycopeptide)			Peak 11 (Asn83 glycopeptide) ^b		
	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>	Theoretical Charge		Observed <i>m/z</i>
	mass ^c	state		mass ^c	state		mass ^c	state	
Tetra-NA ₄ -Ac ₆									
Tetra-NA ₄ -Ac ₇									
Tetra-NA ₄ -Ac ₈									
Tetra-NA ₄ -SO ₁	4,403.1	2-	-	2,200.4					
Tetra-Lac ₁ -NA ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₂)					5,138.0	3-	1,712.2	-	
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃)	4,397.1	2-	2,198.0	2,197.2	5,429.2	3-	1,808.6	1,809.4	1,808.7
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -Ac ₁)	4,439.2	2-	-	2,219.0	5,471.3	3-	-	-	1,822.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -Ac ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -Ac ₂)									6,494.5
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₁)									6,490.5
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₂ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₂)									6,570.6
Tetra-Lac ₁ -NA ₃ -SO ₁ -Ac ₁ (or Tri-Lac ₂ -NA ₃ -SO ₁ -Ac ₁)	4,688.4	2-	2,343.2	2,342.9	5,720.5	3-	1,905.7	1,906.5	1,906.1
Tetra-Lac ₁ -NA ₄									6,532.6
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₁	4,730.4	2-	-	2,364.8	5,762.5	3-	-	1,920.5	1,919.5
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₂	4,772.5	2-	-	2,385.5	5,804.6	3-	-	1,933.1	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₃					5,846.6	3-	-	1,947.9	-
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₄									6,827.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -Ac ₅									6,869.9
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -SO ₁	4,768.5	2-	-	2,383.1					6,911.9
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -SO ₂									6,781.8
Tetra-Lac ₁ -NA ₄ -SO ₂									6,861.9
Tetra-Lac ₂ -NA ₂					5,503.3	3-	1,834.0	-	6,484.6
Tetra-Lac ₂ -NA ₃	4,762.5	3-	1,586.1	1,586.8	5,794.6	3-	1,931.1	1,930.9	1,931.3
Tetra-Lac ₂ -NA ₄									6,817.9
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₁	5,053.7	3-	1,683.6	1,683.5	6,085.9	3-	2,028.1	2,028.1	2,027.9
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₂									7,067.1
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₃									7,109.1
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -Ac ₄									7,151.1
Tetra-Lac ₂ -NA ₄ -SO ₁									7,147.1
Tetra-Lac ₂ -NA ₄									7,141.1

^a, All carbohydrates contain fucosylated core; ^b, Mass spectra of peaks 11 in three EPO digests are shown in Fig. 2; ^c, average mass; ^d, The highest *m/z* peak of mass spectra of peaks 3, 4, and 11 in three EPO digests are shown; Bi, biantennary; Tri, triantennary; Tetra, tetraantennary; NA, NeuAc; Lac, *N*-acetylglucosamine; Ac, acetyl; SO, sulfate.

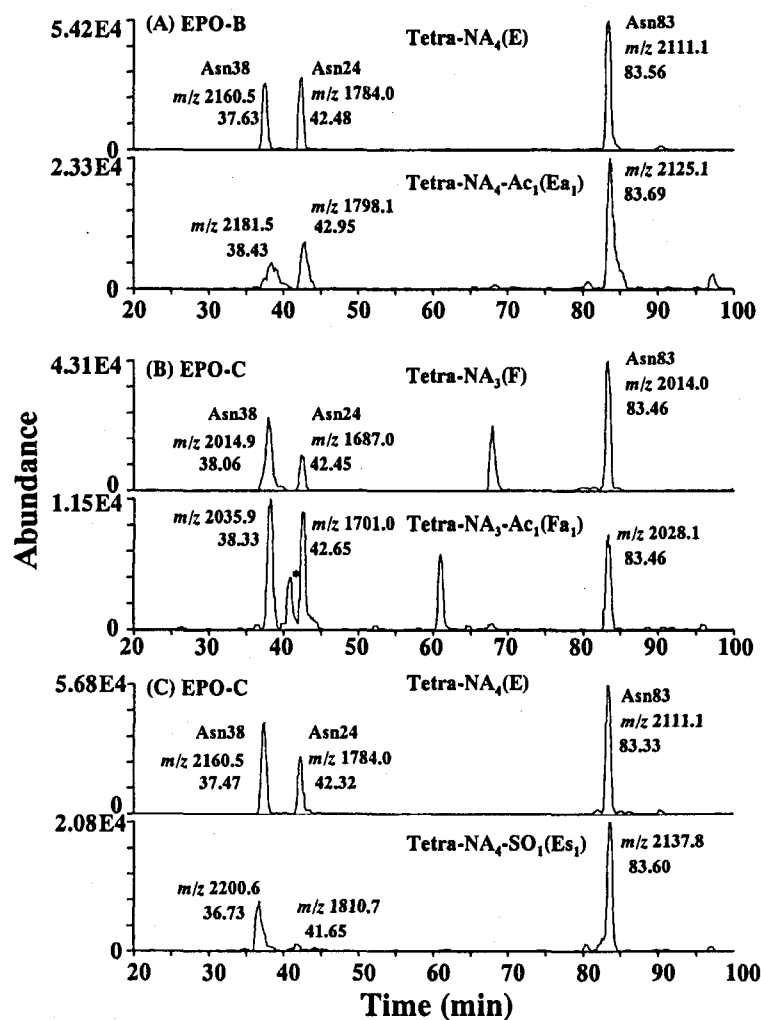


Fig. 3 Special mass range chromatograms of EPO-B and EPO-C

*; Tetra-Lac₂-NA₄ (theoretical *m/z* value of 3-ion; 2028.0) peak of Asn24 glycopeptide.Table 3 Structural assignments of *O*-linked glycopeptide peak (peak 7) in Fig 1, and the theoretical mass and observed *m/z* values

Glycoform	Theoretical mass		Observed <i>m/z</i>		
	(Average)	EPO-A	EPO-B	EPO-C	
NA ₂ -Gal-GalNAc	2,785.9	1,391.6 [M-2H] ²⁻	1,391.6 [M-2H] ²⁻	1,391.7 [M-2H] ²⁻	
		1,448.7 [M+TFA-2H] ²⁻	1,449.0 [M+TFA-2H] ²⁻	1,448.8 [M+TFA-2H] ²⁻	
NA ₂ -Gal-GalNAc-Ac ₁	2,827.9	-	1,412.8 [M-2H] ²⁻	-	
NA ₂ -Gal-GalNAc-Ac ₂	2,869.9	-	1,433.9 [M-2H] ²⁻	-	
NA-Gal-GalNAc	2,494.6	1,246.1 [M-2H] ²⁻	1,246.3 [M-2H] ²⁻	1,246.2 [M-2H] ²⁻	
		1,303.1 [M+TFA-2H] ²⁻	1,303.2 [M+TFA-2H] ²⁻	1,303.2 [M+TFA-2H] ²⁻	
NA-Gal-GalNAc-Ac ₁	2,536.6	-	1,267.2 [M-2H] ²⁻	-	
NA-Gal-GalNAc-Ac ₂	2,578.6	-	1,288.6 [M-2H] ²⁻	-	

TFA, trifluoroacetic acid.

考察

遺伝子組換えにより産生された糖タンパク質性医薬品の場合、生きた細胞による生合成システムを利用しているので、細胞の種類、培養条件等の製造方法を変更した場合、生産された糖タンパク質の分子構造上に変化が生

じる可能性がある。特に、糖鎖部分の構造は、産生細胞の種類、発現方法、培養条件などの変更により変化することが知られている。これらの構造上の変化は生物活性や体内動態に影響することが明らかにされており、製法変更後、新旧糖タンパク質の同源性/同質性を評価する

ことが重要である。そこで、新旧糖タンパク質のモデルとして3種のrhEPOを用いて同等性/同質性を評価法としてのLC/MSによるペプチドマッピングの有用性評価を行った。その結果、まず、LC/MSによるペプチドマッピングにより、3種のrhEPOのペプチド部分の同一性を明らかにできることが確認された。つぎに、本分析法によって、4つの糖鎖結合部位ごとの糖鎖の不均一性の違いを明らかにできることが確認された。すなわち、1) EPO-AのAsn38とAsn83にはシアロ3、4本鎖糖鎖が、Asn24にはこれらの糖鎖に加えてシアロ2本鎖糖鎖が、またSer126にはNA₂-Gal-GalNAc及びNA-Gal-GalNAcが結合しており、これらはEPO-B及び-Cに共通に結合していること、2) EPO-Bではすべての部位に結合している糖鎖にアセチル化が起こっており、アセチル基の結合数及びアセチル化糖鎖の割合はAsn83で顕著に大きいこと、3) EPO-C結合糖鎖におけるモノ、ジアセチル化は非還元末端がシアル酸で飽和されていない糖鎖に多く、特にAsn24で顕著であること、また、硫酸化糖鎖がAsn38及びAsn83にのみに結合していること、を明らかにすることができた。

我々は、すでにEPO-C結合糖鎖における硫酸基の結合位置は、我々の開発したLC/MSによる糖鎖マッピング法¹⁰⁾、エキソグリコシダーゼ消化法、及びNMRによってGlcNAcの6位の水酸基であることを明らかにしている¹¹⁾。また、エキソグリコシダーゼ消化糖鎖の糖鎖マッピングによりEPO-B及び-Cの結合糖鎖のアセチル化は、それぞれシアル酸及びガラクトースに起こっていること¹²⁾、を明らかにしている。LC/MSを用いたペプチドマッピングは類似糖タンパク質におけるこれらの修飾糖鎖の分布の違いを簡単に識別できることが明らかになった。

これまで、著者らは、high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD法)を用いて、本研究と同じ3種のrhEPOの糖鎖構造を分析し、活性に関与しているN-結合糖鎖のシアル酸結合数と分岐構造等の違いを簡便で比較的高感度に解析できることを明らかにした^{13), 14)}。さらに、糖ペプチドのみがピークとして検出され、各糖ペプチドは結合している糖鎖の違いによって分離されるLC/MSによる糖ペプチドマッピング法を開発し、3種のrhEPOの部位特異的な糖鎖の不均一性を解析できることを明らかにした^{15), 16)}。今回用いたLC/MSによるペプチドマッピングは、一度の分析でペプチドのアミノ酸部分の違いはもちろんのこと、各糖結合部位に付加している糖鎖構造とその分布の違いを簡単に識別できる。従って、本分析法は製法変更に伴う糖タンパク質性医薬品の同等性/同質性評価法としても有用であると思われる。

謝辞

本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の支援を受けて行われたものである。

文献

- 1) Morimoto, K., Uchida, E., Kawasaki, N., Said, AA., Tokunaga, Y., Kasugai, I. and Hayakawa, T.: *Iyakuhin Kenkyu*, **25**, 405-425 (1994)
- 2) Morimoto, K., Uchida, E., Kawasaki, N., Said, AA., Tokunaga, Y., Kasugai, I. and Hayakawa, T.: *Iyakuhin Kenkyu*, **25**, 501-523 (1994)
- 3) Hayakawa, T.: "Drug Biotechnology Regulation", eds. by Chiu, YH. and Gueriguian, JL., MARCEL DEKKER, INC., New York, pp. 468-498 (1991)
- 4) Imai, N., Higuchi, M., Kawamura, A., Tomonoh, K., Oheda, M., Fujiwara, M., Shimonaka, Y. and Ochi, N.: *Eur. J. Biochem.*, **194**, 457-462 (1990)
- 5) Misaizu, T., Matsuki, S., Strickland, TW., Takeuchi, M., Kobata, A. and Takasaki, S.: *Blood*, **86**, 4097-4104 (1995)
- 6) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **285**, 82-91 (2000)
- 7) Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **119**, 65-69 (2001)
- 8) Chance, RE., Hoffmann, JA., Kroeff, EP., Johnson, MG., Schirmer, EW. and Bromer, WW.: "Peptides", eds. By Rich, DH. And Gross, E., PIERCE CHEMICAL COMPANY., Rockford, Illinois, pp. 721-728 (1981)
- 9) Canova-Davis, E., Kessler, TJ. and Ling VT.: *Anal. Biochem.*, **196**, 39-45 (1991)
- 10) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O. and Hayakawa, T.: *Anal. Biochem.*, **269**, 297-303 (1999)
- 11) Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Glycobiology*, **11**, 1043-1049 (2001)
- 12) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: *Biologicals*, **30**, 113-123 (2002)
- 13) Kawasaki, N., Morimoto, K. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **113**, 69-73 (1995)
- 14) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hashimoto, O., Morimoto, K. and Hayakawa, T.: *Bull. Nat. Inst. Health Sci.*, **116**, 117-121 (1998)
- 15) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T.: *J. Chromatogr.*, **910**, 1-11 (2001)
- 16) Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S. and Hayakawa, T.: *Biologicals*, **30**, 235 (2002)

化粧品に配合が制限されている成分の分析法に関する研究：
2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル) ベンゾトリアゾール

徳永裕司[#], 森 謙一郎^{*1}, 野坂富雄^{*2}, 土井佳代^{*3}, 坂口 洋^{*4}, 藤井まき子^{*5}, 高野勝弘^{*6},
林 正人^{*7}, 磯 敏明^{*8}, 西尾裕幸^{*9}, 佐藤信夫^{*10}

Studies for analyzing the restricted ingredients such as 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole

Hiroshi Tokunaga, Kenichiro Mori^{*1}, Tomio Nosaka^{*2}, Kayo Doi^{*3}, Hiroshi Sakaguchi^{*4}, Makiko Fujii^{*5},
Katuhiro Takano^{*6}, Masato Hayashi^{*7}, Toshiaki Iso^{*8}, Hiroyuki Nishio^{*9}, Nobuo Sato^{*10}

2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole (HMB) is nominated as the restricted ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for HMB was investigated by HPLC. After dissolving HMB in cream or oil with tetrahydrofuran and making the constant volume with methanol, the test solution was prepared. Twenty micro-liter of the test solution was determined by HPLC by using CAPCELL PAK C₁₈ column, the mixture of methanol and water (17:3) as mobile phase, the detection wavelength at 306 nm. The concentrations of 10 to 80 µg/ml HMB gave the linear relationship between the concentrations and the peak areas. In creams and oil 0.1% and 1% HMB were sufficiently determined by the established method.

Key Words: 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole, HPLC, restricted ingredients, cream, oil

1. 緒 言

平成12年9月29日、厚生省医薬安全局長から医薬発第990号「化粧品規制緩和に係る薬事法施行規則の一部改正等について」が通知された。化粧品の規制緩和については、「化粧品規制の在り方に関する検討会」が組織され、その最終とりまとめを踏まえ、医薬発第990号の通知が出されたものである。この通知には、「薬事法施行規則の一部を改正する省令」、「厚生大臣の指定する化粧品の成分を定める件」、「化粧品基準を定める件」及び「名称を記載しなければならないものとして厚生大臣の指定する医薬部外品及び化粧品の成分を定める件」の改正が含まれており、平成13年4月1日から実施されている。

この改正により、新たに「化粧品品質基準」が定めら

れ、これまでの化粧品に用いられる新規原料に関して、承認・許可の手続きが廃止された。この基準の第3条には、「防腐剤、紫外線吸収剤及びタール色素以外の成分の配合制限」が別表第2に規定され、2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル) ベンゾトリアゾール (HMB) を始めとして18品目が含まれている。

今回、石けん、シャンプー等の直ちに洗い流す化粧品以外の化粧品に100g中に最大配合量7gまでの使用が認められているHMBの液体クロマトグラフ法による試験法を検討し、化粧品中のHMBの試験法を確立したので報告する。

2. 実 験

2.1 装置

液体クロマトグラフ (HPLC) 装置は、島津製LC-10A型ポンプ、島津製CTO-10A型カラムオープン、島津製SPD-6AV型紫外可視検出器、島津製L-10AXL型オートサンプラーおよび島津製C-R6A型クロマトパックを連結して用いた。

2.2 試薬および試液

HMBは東京化成製のものを用いた。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

HMBは油溶性の高い物質であるため、0.1%及び1%

[#] To whom correspondence should be addressed: Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan:

Tel:03-3700-1141 ext.255; Fax: 03-3707-6950;

E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

^{*1} 東京都衛生研究所, ^{*2} 埼玉県衛生研究所, ^{*3} 神奈川県衛生研究所, ^{*4} 北里大理学部, ^{*5} 昭和薬科大学, ^{*6} 日本化粧品工業連合会, ^{*7} 資生堂リサーチセンター, ^{*8} ポーラ化成工業株式会社中央研究所, ^{*9} カネボウ株式会社化粧品研究所, ^{*10} コーセー株式会社研究本部

のHMBを含有する化粧オイル及びクリームを資生堂リサーチセンターで調製し、試験に供した。

HMB標準溶液：HMB約100 mgを精密に量り、テトラヒドロフランを加えて溶かし正確に100 mlとした。

2.3 HMBの定量法

試料0.2～2 gを精密にはかり、ビーカーに入れる。テトラヒドロフラン2 mlを加え、ガラス棒でかき混ぜながら基材を十分に溶解させる。50 mlのメスフラスコに移し、メタノールにて洗い込む。ビーカーにテトラヒドロフラン2 mlを加え、ガラス棒でかき混ぜる。溶解液をメスフラスコに合わせ、メタノールにて50 mlとし、試料溶液とする。試験溶液20 μ lを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラム上のピーク面積をはかり、別に作成した検量線から試験溶液中のHMBの濃度Aを求め、次式により試料100 g中の含有量を算出する。

検量線の作成：標準溶液をメタノールで希釈し、1 ml当たり、10, 40および60 μ gを含む標準系列をつくり、各20 μ lを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラム上のピーク面積と濃度から検量線を作成する。

$$\text{試料100g中のHMBの量} = \frac{A \times 50}{\text{試料採取量(g)}} \times \frac{1}{1000} \times 100$$

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：306 nm）

カラム：内径約4 mm、長さ25 cmのステンレス管に5 μ mの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：35℃付近の一定温度

移動相：メタノール/水混液（17：3）

流量：HMBの保持時間が約9分になるように調整する。

3. 結果および考察

HMB標準溶液の一定量を正確に量り、メタノールを加えて希釈し、1.0 ml当たりHMB 60 μ gを含有する溶液を調製し、その液20 μ lを用いて以下の検討を行った。

3.1 アセトニトリルの影響

メタノール/水混液の比率を（100：0）～（70：30）まで変化させ、HMBの保持時間（ t_R ）の変化を検討した。用いたカラムとして、資生堂製CAPCELL PAK C₁₈（4.6 mm i.d.×250 mm）、ジェルサイエンス製のUnisil Q C₁₈（4.6 mm i.d.×150 mm）及び東ソー製TSKgel ODS（4.6 mm i.d.×150 mm）の3種類のカラムを用いた。その結果をFig.1に示した。

Fig.1から分かるように、メタノールの濃度が70～100%に上がるに従い、 t_R が25分～3.5分に減少することが分かった。この結果より、資生堂製CAPCELL PAK C₁₈カラムにて、 t_R 9分を示したメタノール/水混液（17：3）を移動相に用いることにした。その他の2本のカラムもHMBの測定に利用できることが明らかになった。

3.2 カラム温度の影響

カラム温度を25～40℃に変更し、カラム温度のHMBの t_R への影響を検討した。カラム温度の上昇に伴い、HMBの t_R は10～8.4分にわずかに低下した。このことより、カラム温度を35℃に設定することにした。

3.3 検量線および再現性

HMB標準溶液の一定量を正確に量り、メタノールで希釈し、1 ml当たりHMB 10～80 μ gを含有する溶液を調製した。この液20 μ lを用いて、検量線の作成を行った。その結果をFig.2に示した。

Fig.2から分かるように、HMBの濃度とピーク面積の間には良好な直線関係が成立した。

HMBの10 μ g/ml及び80 μ g/mlの溶液20 μ lを用い、5回の繰り返し注入によるピーク面積の平均値（相対標準偏差）は、それぞれ、649040（0.43%）及び5174371（0.42%）であった。

3.4 化粧品への応用

HMB1%を含有するクリーム約0.2 gを精密に量り、2.3. HMBの定量法に従って調製した試料溶液20 μ lから

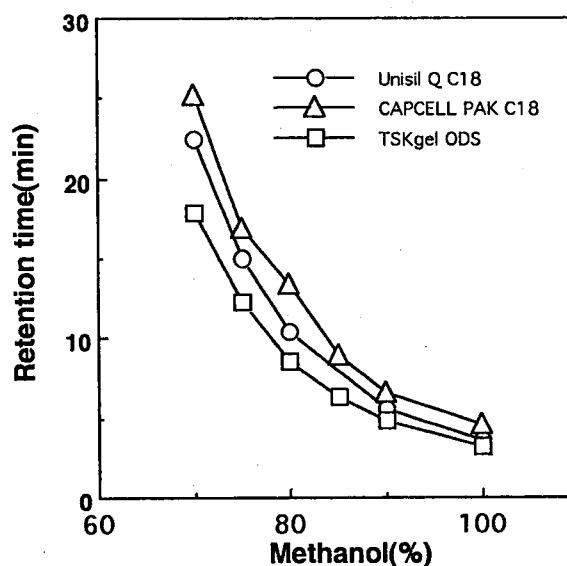


Fig. 1 Effect of methanol on retention time of 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole

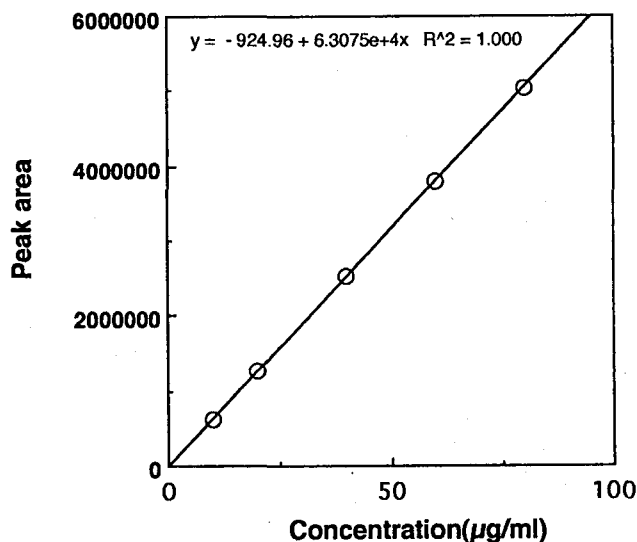


Fig. 2 Working Curve for 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole

HPLC conditions: column, CAPCELL PAK C₁₈; mobile phase, the mixture of methanol and water (17:3), flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C, detection wavelength, 306 nm

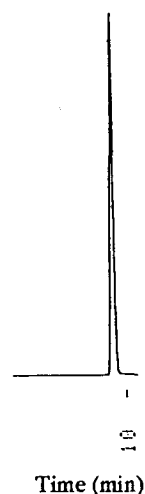


Fig. 3 Chromatogram for 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole in cream

HPLC conditions: column, CAPCELL PAK C₁₈; mobile phase, the mixture of methanol and water (17:3), flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C, detection wavelength, 306 nm

得られたHPLCクロマトグラムをFig.3に示した。

Fig.3から分かるようにクリーム中の賦形剤の妨害を受けることなく、HMBが測定できることが明らかになった。操作法では、クリームあるいは化粧オイルに溶解するため、テトラヒドロフランを2 ml用いているが、テトラヒドロフランの使用量を2~20 mlの範囲まで変更しても、HPLC法での定量に影響を与えないことが分かった。

クリームおよび化粧オイル中のHMBの測定を行い、その結果をTable 1に示した。

Table 1から分かるように、クリームあるいは化粧オイル中のHMBは十分に測定できることが明らかになった。

4. まとめ

化粧品への使用が制限されている2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾールの液体クロマトグラフ法による測定法を確立し、試作したクリームあるいは化粧オイルに適応し、今回確立した方法が十分に応用できることが分かった。

Table 1 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole in creams and oils

	weigh(g)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)	avrage (%)	RSD(%)
0.1% cream 1	1.9969	2438169	2447977	2443073	96.0	95.8	0.69
0.1% cream 2	1.9957	2416727	2426634	2421681	95.0		
0.1% cream 3	2.0019	2437992	2455229	2446611	96.3		
1% cream 1	0.2008	2602352	2592586	2597469	104.1	102.1	3.03
1% cream 2	0.2005	2590868	2590486	2590677	103.6		
1% cream 3	0.1994	2476949	2473437	2475193	98.5		
0.1% oil 1	1.9992	2422079	2422385	2422232	97.7	97.6	0.30
0.1% oil 2	1.9961	2430543	2397486	2414015	97.2		
0.1% oil 3	2.0006	2436537	2406936	2421737	97.8		
1% oil 1	0.2013	2490172	2482164	2486168	101.0	101.5	0.62
1% oil 2	0.2022	2507124	2505461	2506293	102.2		
1% oil 3	0.2014	2497387	2497847	2497617	101.5		

平成13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[#]・海野有紀子・中村優美子・外海泰秀

Estimated Production by the Official Inspection of Tar Colors (Including Aluminum Lakes)
in Fiscal Year 2001

Sumiko Tsuji[#], Yukiko Umino, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai

There were 162 official inspections of tar colors and their lakes in fiscal year 2001, and 162 samples were qualified.

Total production amount of tar colors that passed inspection in Japan in fiscal year 2001 reached 134.8 tons. Tar color production amounts were described by month and by manufacturer. The food tar color produced in the largest amount was Food Yellow No. 4, accounting for 43.9% during this period.

Their yearly total productions were decreased from 238.7 to 134.8 tons during 12 years.

Keywords : production, food color, tar color, official inspection, aluminum lake

食品用の着色料は近年化学的合成品以外の着色料の需要量が3,116トンと延びてきており¹⁾、化学的合成品である合成着色料、主にタール色素は化学的合成品以外の着色料のほぼ30分の1ではあるが今だなお汎用されている。わが国での食用タール色素としてはタール色素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、検定に合格した検体の申請数量のみが販売される。

わが国における食用タール色素の製品検査は、一括し

て、大阪支所食品試験部で行っており、食用タール色素の申請数量により、検定に合格した食用タール色素の製造量が把握できる。申請件数及び各保健所からの申請手続き回数はタール色素のロットサイズの規制が無制限になった²⁾ 10年度 (F. Y. 1998) 284件及び68回から徐々に減少傾向であり³⁾⁻⁵⁾、Table 1に示したように平成13年度 (F. Y. 2001) は162件及び53回に減少した。

平成13年度 (F. Y. 2001) に申請された検体の内訳は、食用赤色2号 (R-2), 4; 食用赤色3号 (R-3), 14; 食用赤色40号 (R-40), 2; 食用赤色102号 (R-102),

Table 1 Application number according to prefecture on the official inspections of tar colors

Prefecture	F. Y. 2001		F. Y. 2000	
	Sample number /Application times		Sample number /Application times	
Osaka	76 /	17	78 /	20
Saitama	59 /	15	71 /	20
Tokyo	12 /	11	12 /	9
Kanagawa	15 /	10	11 /	5
Shiga	0 /	0	4 /	2
Total	162 /	53	176 /	56

[#]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

29; 食用赤色104号 (R-104), 6; 食用赤色105号 (R-105), 1; 食用赤色106号 (R-106), 13; 食用黄色4号 (Y-4), 45; 食用黄色5号 (Y-5), 18; 食用緑色3号 (G-3), 1; 食用青色1号 (B-1), 17; 食用青色2号

Table 2 Monthly production amounts of tar colors

Food color	Application month												Total	Ratio(%)	Total	Ratio(%)	Total	Ratio(%)				
	2001						2002												F. Y. 2001		F. Y. 2000	
	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March							January	February	March	April
R-2	---	---	200	---	1320	---	---	---	---	---	---	---	---	---	500	---	---	2020	1.5	1270	0.92	
R-3	450	1360	600	---	1960	---	---	---	1500.5	201.25	500	---	---	---	500	---	---	6571.75	4.88	5030	3.66	
R-40	180	---	---	750.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	930.5	0.69	0	0	
R-102	2800	4190	2400.2	3030.5	4975.5	1900	3420	1200	1200	2032	---	---	---	---	---	---	---	29848.2	22.14	36900	26.84	
R-104	500	600	320	---	500	---	---	---	---	---	---	---	---	---	660	---	---	2580	1.92	1600	1.16	
R-105	---	---	---	---	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	300	0.22	90	0.07	
R-106	---	200.5	---	---	993.5	510	---	---	---	---	---	---	404.925	500.5	---	---	---	3889.425	2.89	3731	2.71	
Y-4	6181	2100	2865	8660.5	3200	7664	3370	5355.5	6008	8106.5	3202	2400	---	---	---	---	---	59112.5	43.85	59599	43.35	
Y-5	821	2775	4195	1100	---	1860	---	1050	900	1920.5	1520	---	---	---	---	---	---	16141.5	11.97	18914.9	13.76	
G-3	---	---	100.25	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	100.25	0.07	0	0	
B-1	940	1495	299.5	---	---	---	---	540	900.5	---	---	---	---	---	---	---	---	5475	4.06	4568	3.32	
B-2	---	---	---	---	---	---	---	---	450	---	---	---	---	---	---	---	---	800	0.59	1250	0.91	
R-2A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0	
R-3A1	221	---	---	---	---	---	---	---	1731	---	---	---	---	---	---	---	---	1952	1.45	1321	0.96	
R-40A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	43.4	0.03	
Y-4A1	300	---	---	---	1702	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	2002	1.49	855.4	0.62	
Y-5A1	975	---	---	---	---	---	---	---	850	---	---	---	---	---	---	---	---	1825	1.35	910	0.66	
G-3A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0	0	0	0	
B-1A1	---	---	910	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	910	0.68	1213	0.88	
B-2A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	336	0.25	203.6	0.15	
F. Y. 2001	13368	12720.5	11889.95	13541.5	14951	11934	6790	8550.425	14040	13463.5	9485.25	4060	134794.125	---	---	---	---	---	---	---	---	
Total	13368	12720.5	11889.95	13541.5	14951	11934	6790	8550.425	14040	13463.5	9485.25	4060	134794.125	---	---	---	---	---	---	---	---	
Monthly	ratio(%)	9.92	9.44	8.82	10.05	11.09	8.85	5.04	10.41	9.99	7.04	3.01	100.00	---	---	---	---	---	---	---	---	
F. Y. 2000	15511	9928	17178	11620	9435	10209.3	13614	4500	13280	11594	14240	6390	---	---	---	---	---	---	---	---	137499.3	
Total	15511	9928	17178	11620	9435	10209.3	13614	4500	13280	11594	14240	6390	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Monthly	ratio(%)	11.28	7.22	12.49	8.45	6.86	7.43	3.27	9.66	8.43	10.36	4.65	---	---	---	---	---	---	---	---	100.00	

(Unit:kg)

Table 3 The production amounts of certified tar colors according to manufacturers (Unit:kg)

Food color	Manufacturer										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
R-2	1220	300	500	---	---	---	---	---	---	---	---
R-3	4000.5	600	---	470	---	1300	201.25	---	---	---	---
R-40	750.5	---	180	---	---	---	---	---	---	---	---
R-102	3900.5	14952	4400	---	---	500	6095.7	---	---	---	---
R-104	100	1000	500	320	---	---	660	---	---	---	---
R-105	---	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R-106	601	1280	400	380	---	430	493.5	300	---	---	---
Y-4	17727.5	23944	11000	---	---	500	5691	---	---	---	250
Y-5	5716.5	4050	1200	2470	---	500	2205	---	---	4.925	---
G-3	---	---	---	---	---	---	100.25	---	---	---	---
B-1	1885.5	950	1239.5	---	---	300	---	1000	---	---	100
B-2	---	350	450	---	---	---	---	---	---	---	---
R-2A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R-3A1	1731	---	221	---	---	---	---	---	---	---	---
R-40A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y-4A1	1702	300	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Y-5A1	1825	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G-3A1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B-1A1	910	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B-2A1	336	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F. Y. 2001											
Total	42406	48026	20090.5	3640	0	3530	15446.7	1300	0	4.925	350
Ratio(%)	31.460	35.629	14.905	2.700	0	2.619	11.459	0.964	0	0.004	0.260
F. Y. 2000											
Total	40425	55900	21520	5980	14.4	2900	9830	300	625	4.9	0
Ratio(%)	29.400	40.655	15.651	4.349	0.010	2.109	7.149	0.218	0.455	0.004	0

Table 4 The production amounts of certified tar colors according to manufacturers

Food color	Fiscal year													(Unit:t)
	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001		
R-2	3.62	3.80	2.00	3.38	2.10	1.66	2.47	1.57	2.20	2.34	1.27	2.02		
R-3	9.84	13.08	10.91	12.17	9.41	9.17	10.23	8.37	6.27	5.31	5.03	6.57		
R-40	0.12	0.50	0.02	0.42	0.32	0.57	0.31	0.62	0.87	0.90	0.00	0.93		
R-102	44.83	44.18	43.67	44.00	37.15	38.26	32.78	37.96	29.28	32.33	36.90	29.85		
R-104	4.20	4.16	2.84	3.92	4.38	2.95	1.50	3.35	2.74	2.20	1.60	2.58		
R-105	0.00	0.30	0.20	0.35	0.25	0.30	0.20	0.25	0.56	0.06	0.09	0.30		
R-106	6.11	6.85	6.53	6.26	5.26	3.78	4.65	4.54	5.81	4.73	3.73	3.89		
Y-4	110.33	103.09	82.03	91.72	75.73	72.99	71.35	63.77	66.22	67.14	59.60	59.11		
Y-5	38.02	42.41	34.25	32.99	32.80	20.93	23.82	24.06	22.81	21.96	18.91	16.14		
G-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.05	0.00	0.00	0.10		
B-1	9.24	8.61	8.63	7.90	9.40	6.24	7.27	7.35	6.54	5.04	4.57	5.48		
B-2	1.10	1.35	1.01	0.96	1.10	0.71	1.15	1.13	1.30	0.82	1.25	0.80		
R-2A1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
R-3A1	1.28	2.00	1.17	1.10	1.07	1.50	0.60	1.20	1.29	1.10	1.32	1.95		
R-40A1	0.00	0.07	0.07	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.03	0.04	0.00		
Y-4A1	3.60	3.60	2.85	3.70	2.70	3.12	3.60	2.71	1.65	3.14	0.86	2.00		
Y-5A1	3.00	4.40	3.04	2.77	2.10	2.40	2.70	1.51	2.00	2.88	0.91	1.83		
G-3A1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
B-1A1	2.60	1.50	1.80	1.83	2.00	1.80	1.50	1.50	0.63	1.67	1.21	0.91		
B-2A1	0.80	0.30	0.36	0.30	0.30	0.00	0.30	0.41	0.10	0.31	0.20	0.34		
Total	238.70	240.19	201.36	213.75	186.07	166.41	164.49	160.33	150.31	151.95	137.50	134.79		

(B-2), 2; 食用赤色3号アルミニウムレーキ (R-3Al), 3; 食用黄色4号アルミニウムレーキ (Y-4Al), 3; 食用黄色5号アルミニウムレーキ (Y-5Al), 2; 食用青色1号アルミニウムレーキ (B-1Al), 1; 食用青色2号アルミニウムレーキ (B-2Al), 1検体であった。

タール色素及びタール色素レーキは、第7版食品添加物公定書 (JSFA-VII)⁶⁾ に含量、性状、確認試験、純度試験 [水不溶物、塩化物及び硫酸塩、ヨウ化物、臭化物、重金属、ヒ素、バリウム、他の色素 (ろ紙クロマトグラフィーによる)、副成色素、未反応原料及び反応中間体 [高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による]] 及び乾燥減量の規格値が設定されているが、試験した検体は全て合格であった。しかし、Y-4の45検体のうち1検体が塩化物及び硫酸塩において規格上限値に近い結果を示した。またG-3の他の色素の確認 (ろ紙クロマトグラフィーによる) が難しい検体のHPLCを行ったところ、G-3として1.8%の付随色素を認めたと、過去の市販製品⁷⁾ より低いことより合格とした。これらの試験以外に、近年のダイオキシンの問題からR-104の6検体及びR-105の1検体について原料由来の不純物ヘキサクロベンゼン (HCB) の分析を行ったところ、全検体からHCBを0.16~32.9 mg/kg (検出限界0.125 mg/kg以下) の範囲で検出した⁸⁾。

平成13年度 (F. Y. 2001) に申請され合格した162検体について、各色素毎に月別及び製造者別の製造量統計を作成した。各色素の月別製造量をTable 2に、製造者別製造量をTable 3に示した。

総量は平成9年度 (F. Y. 1997)⁹⁾ 160.7トンから少しずつ減少傾向を示した^{3), 4)} が、平成12年度 (F. Y. 2000)⁵⁾ は137.5トンに対して平成13年度 (F. Y. 2001) は134.8

トンであり、ほぼ横ばいであった。

各色素別では製造量の多いものからY-4, R-102, Y-5, R-3, B-1であり、ここ数年色素別比率も非常に近似していた。前年度製造されていなかったR-40が製造され、平成8年度製造されて以来5年ぶりにG-3も製造された。また、ここ数年製造されていない食用赤色2号アルミニウムレーキ (R-2Al) 及び食用緑色3号アルミニウムレーキ (G-3Al) はどちらも製造されなかった。

色素別製造量は、第1位のY-4が59.1トン (色素別比率43.4%) から59.7トン (43.9%) とほぼ横ばいであるのに対して、第2位のR-102は36.9トン (26.8%) から29.8トン (22.1%) と減少し、第3位のY-5も18.9トン (13.8%) から16.1トン (12.0%) と減少した。上位5色素の製造量合計は117.1トンであり、総製造量の86.9%であった。

製造者別では製造量の多い順にB, A, C, G, D, F社と前年度と同様であり、E及びI社が製造しなくなり、K社が新たに製造した。したがって申請製造者は前年度と異なり9社となった。

製造者別製造量は、B社が48.0トン (製造者別比率35.6%) と前年度に比して7.9トンの減少であったが、A社は42.4トン (31.5%)、C社は20.1トン (14.9%) とほぼ横ばいであり、G社は逆に5.6トンの増加の15.4トン (11.5%) であった。

平成2年度から平成13年度までのタール色素製造量^{3)-5), 9)-16)} の推移を調査しTable 4に示した。この12年間で総量が238.7トンから134.8トンと約半分になっており、12年間一度も製造されなかったタール色素はR-2Al及びG-3Alであった。また、製造されても年間製造量が5トン以下のタール色素はR-2, R-40, R-104, R-

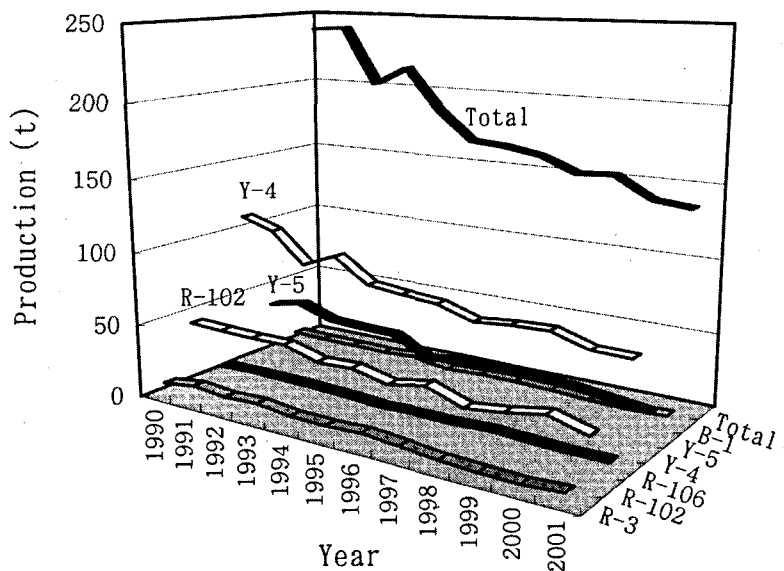


Fig 1 Time-course of production amounts of tar colors during 12 years

105, B-2及び他のアルミニウムレーキであった。年間製造量が5トン以上を示すタール色素の製造量の経年変化を見やすくするためにFig. 1に示したが、いずれのタール色素も増減を繰り返しながら減少傾向であり、製造量の多いY-4の増減が総量に影響していた。

文献

- 1) Nakamura, M.: *Food Sanitation Research*, **45**, 35-57 (1995)
- 2) 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
- 3) Tsuji, S., Okada, M., Matsumura, I., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 185-188 (1999)
- 4) Tsuji, S., Okada, M., Amakura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 135-138 (2000)
- 5) Tsuji, S., Umino, Y., Amakura, Y., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 70-73 (2001)
- 6) "Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 7th ed., Japanese ed.", eds. by Ministry of Health and Welfare, Japan pp. 25-34, 294-315 (1999)
- 7) Kamikura, M.: *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **27**, 398-407 (1986)
- 8) Umino, Y., Tsuji, S., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **120**, submitted (107-111)
- 9) Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S., Tonogai, Y. and Shibata, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **116**, 153-156 (1998)
- 10) Shibata, T., Kimura, M., Kawamoto, R., Kakiuchi, M., Tsuji, S. and Ito, Y.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **109**, 178-181 (1991)
- 11) Shibata, T., Kimura, M., Kawamoto, R., Tsuji, S. and Ito, Y.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **110**, 128-131 (1992)
- 12) Shibata, T., Kimura, M., Umemoto, M., Tsuji, S. and Ito, Y.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **111**, 112-115 (1993)
- 13) Ishimitsu, S., Kimura, M., Umemoto, M., Tsuji, S. and Shibata, T.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **112**, 152-154 (1994)
- 14) Ishimitsu, S., Umemoto, M., Mishima, I., Tsuji, S. and Shibata, T.: *Eisei Shikenjo Hokoku*, **113**, 97-100 (1995)
- 15) Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S. and Shibata, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **114**, 102-105 (1996)
- 16) Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S. and Shibata, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 171-174 (1997)

GC/MSによる食用赤色104号及び105号中のヘキサクロロベンゼン含有量調査

海野有紀子・辻 澄子[#]・中村優美子・外海泰秀

Determination and Survey of Hexachlorobenzene in Food Red Nos. 104 (Phloxine) and 105 (Rose Bengale) by GC/MS

Yukiko Umino, Sumiko Tsuji[#], Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai

The contents of hexachlorobenzene (HCB) in Food Red Nos. 104 and 105 samples certified in fiscal years 1998-2001 were determined by GC/MS. All 32 samples contained HCB ranging from 0.2 to 32.9 mg/kg. The daily intakes of HCB based on the production of food colors was estimated to be from 0.018 to 1.456 ng, and their average (0.441 ng) corresponded to 0.0052% of the ratio for the Tolerable Daily Intake (8.5 μ g for 50 kg body weight) of HCB developed by the IPCS.

Keywords : hexachlorobenzene, phloxine, rose bengale, GC/MS, food color.

緒言

食用タール色素である食用赤色104号 (R-104 ; フロキシシン) 及び赤色105号 (R-105 ; ローズベンガル) は、

レゾルシンと有機塩素系化合物であるテトラクロロ無水フタル酸から合成される (Fig. 1)¹⁾. テトラクロロ無水フタル酸中には不純物としてヘキサクロロベンゼン

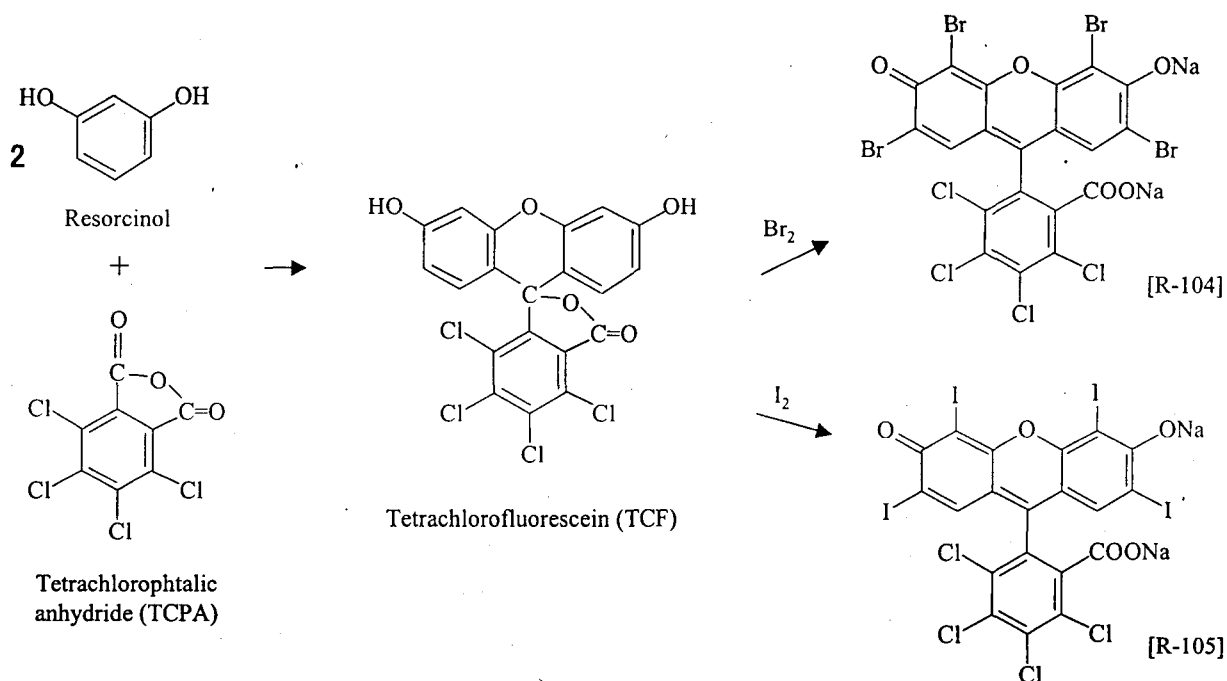


Fig. 1 Preparation of R-104 and R-105

[#]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

(HCB) (Fig. 2) が混入する可能性がある²⁾. HCBは第一種特定化学物質である上に、ダイオキシン類の先駆体の一つであると考えられている³⁾. AndrzejewskiらはR-104及びR-105中に0.2~244.3ppm²⁾, 堀らは0.55~

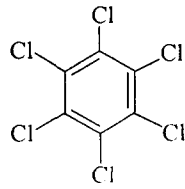


Fig. 2 Structure of hexachlorobenzene (HCB)

78ppm⁴⁾のHCBが含有することを報告している。第7版食品添加物公定書ではR-104及びR-105の純度試験として、水不溶物、液性、塩化物・硫酸塩、重金属、ヒ素、他の色素に係わる規格値¹⁾が設定されているが、HCBについての規格は設けられていない。近年製造されたこれらの色素中のHCB残留濃度を把握する為、平成10～13年度(F.Y.1998～F.Y.2001)のR-104及びR-105の製品検査合格検体についてGC/MSによりHCB含量実態調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

平成10～13年度(F.Y.1998～F.Y.2001)製品検査合格検体R-104, 27検体及びR-105, 5検体の計32検体を用いた。

2. 試薬及び溶媒

HCB標準品(残留農薬試験用)は和光純薬工業(株)製を、*n*-ヘキサン及びジエチルエーテルは残留農薬試験用を用いた。フロリジルミニカラムはSep-Pak[®] Plusフロリジルカートリッジ(Waters社製)を用い、あらかじめ10%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液及び*n*-ヘキサン10 mlずつで順次洗浄して分析に供した。

3. 標準原液及び標準溶液の調製

HCB標準品約20.0 mgを精密に量り、*n*-ヘキサンを加えて溶かし正確に20 mlとし、標準原液(1000 µg/ml)とした。標準原液を*n*-ヘキサンで希釈して1.0 µg/mlになるように調製したものを標準溶液とした。

標準溶液を適宜量り採り、*n*-ヘキサンを加えて定容とし、検量線用標準溶液とした。

4. 試験溶液調製法

4-1) 簡易法

試料100 mgに水150 mlを加え色素を溶解した後、*n*-ヘキサン50 mlを加え5分間機械振とうした。*n*-ヘキサン層を分取し、ろ紙でろ過を行った後、ロータリーエバポレーター(約40℃, 減圧)にて濃縮し、*n*-ヘキサンで5 mlの定容とし、調製直後GC/MS分析に供した。

4-2) フロリジルカラム精製法

堀らの試験溶液調製法⁴⁾を準用した。すなわち、試料100 mgに水150 mlを加え色素を溶解した後、*n*-ヘキサン50 mlを加え5分間機械振とうした。*n*-ヘキサン層を分取し、ロータリーエバポレーター(約40℃, 減圧)にて濃縮し、濃縮液をフロリジルミニカラムに負荷し、10%ジエチルエーテル/*n*-ヘキサン溶液10 mlで溶出した。溶出液を濃縮(約40℃, 減圧)後、*n*-ヘキサンで5 mlの定容とした。

5. GC/MS条件

装置：島津製作所(株)製 Shimadzu QP-5050(質量分析計), GC-17(ガスクロマトグラフ), AOC-20i(オートインジェクター)；カラム：J&W DB-5(内径0.25 mm, 長さ30 m, 膜厚0.25 µm)；気化室温度：260℃；カラム温度：50℃(1 min)→20℃/min→300℃(7 min)；キャリアガス：高純度ヘリウム, 圧力100 kPa, 全流量20 ml/min；注入方法：スプリットレス；インターフェース温度：260℃；イオン化法：EI；イオン化検出ゲイン：1.5kV；測定イオン： $m/z = 284$ ；注入量：1 µl。

6. 色素由来HCBの1日摂取量の算出方法

生産流通調査方式⁵⁾に準じて行った。すなわち、各年度各社のR-104及びR-105各合格検体の申請製造量に各年度各社の平均HCB含量を乗じて各年度各社のHCB擬製造量を算出し、365日及び日本人人口(12,700万人)⁶⁾で除して、各年度各色素由来HCBの1日摂取量を算出し、その合計値を各年度の色素由来HCBの1日摂取量として推定した。

実験結果及び考察

1. HCBのGC/MS(TIC)及びマススペクトル

HCB標準品のGC/MS(TIC)及びマススペクトルをFig. 3に示した。ピーク感度の高い $m/z = 284$ (M⁺)を測定イオンに設定した。検量線は、0.01～1.00 µg/mlの範囲で直線性を示し、GC-ECDとは感度、精度及び操作性ともほぼ同等であった。定量限界は0.125 mg/kgであった。なお、GC-ECDのデータはここでは示していないが、HCB以外にも多くの不純物ピークが認められる検体があった⁷⁾ので、以下ではすべてGC/MS(SIM)で測定することにした。

2. 試験溶液調製法について

フロリジルカラムによる精製過程を省略した簡易法を用いても、精製した場合と結果はほぼ同等であった。しかしTable 1に示したように、試験溶液を保存後、GC/MS(SIM)法で再測定した場合には、精製過程を

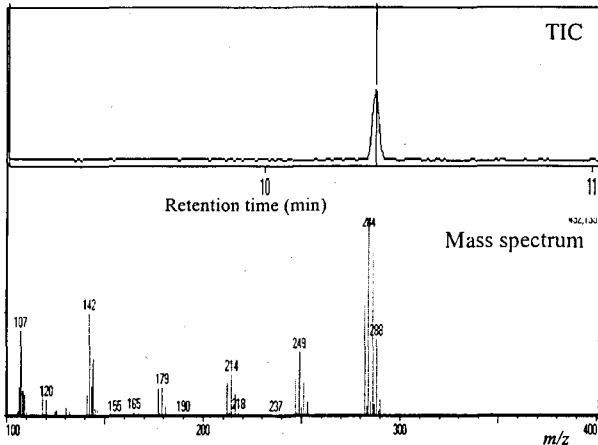


Fig. 3 GC/MS(TIC) chromatogram and mass spectrum of HCB
HCB standard solution: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

省略した簡易法による測定値は高くなる傾向が見られた。そこで、簡易法により試験溶液を調製し、調製直後に分析に供した。

3. 添加回収試験

各色素に対してHCBを1.0 mg/kg添加したときの回収率はR-104及びR-105について、それぞれ96.0 \pm 5.5%及び101.0 \pm 7.2%であった。

4. 実態調査

平成10～13年度(F.Y.1998～F.Y.2001)製品検査合格検体のR-104及びR-105の計32検体についてHCB含量実態調査を行った結果をTable 2に示した。全検体より、0.16～32.9 mg/kgの範囲でHCBが検出された。

平成10年度(F.Y.1998)のR-104は、他年度に比べ高い含量のHCBが検出され、すでに報告されている比較的高い含量(30 mg/kg以上)⁴⁾に匹敵した。しかし平成11年度(F.Y.1999)以降は1検体を除いてほとんどの検体の測定値は低かった。また、R-105についても突出したHCB含量を示す検体はなく、平成13年度(F.Y.2001)の検体については他年度に比べ、HCB含量が非常に低

かった。HCBは色素の合成原料であるテトラクロロ無水フタル酸の合成過程での混入物であると指摘されており^{2), 4)}、HCB混入率の低いテトラクロロ無水フタル酸を使用する必要があることを推奨している。したがって、現在はHCB含量の低いテトラクロロ無水フタル酸を食用色素の合成原料として用いているものと考えられる。ただ、1社については近年の検体についても比較的HCB含量が高値であったことから、引き続き監視する必要があると考えられる。

5. R-104及びR-105由来HCBの1日摂取量

平成11年度(F.Y.1999)の食用色素の日本人1日摂取量調査⁸⁾では、R-104及びR-105の摂取量がいずれも0 mg/day/人であり、近年のデータ(平成6年度, F.Y.1994)⁹⁾でも、R-104, 0.0276 mg/day/人, R-105, 0.0009 mg/day/人であり、非常に少ない。一方、各年度各社のR-104及びR-105の製造量は各検体の申請書から把握でき、毎年生産量統計として報告している^{10)–13)}。そこで、その各色素の生産量統計からHCBの擬生産量(Table 2)を算出し、1日摂取量を推定することにした。Table 3に示したように、生産流通調査方式⁵⁾による色素の1日摂取量においては年度間のばらつきはさほど大きくなかった。色素由来HCBの1日摂取量は色素中の含有量が高かった平成10年度のR-104において一番多く摂取され1.35 ngであった。色素由来HCBの推定1日摂取量は平均で0.441 ngであった。FAO/WHOでは1975年に許容1日摂取量(Acceptable Daily Intake, ADI)を0.6 HCB $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/dayと定めていたが、1978年にこれを撤回した¹⁴⁾。しかし、国際化学物質安全性計画(International Programme on Chemical Safety, IPCS)におけるHCBの耐容1日摂取量(Tolerable Daily Intake, TDI; 0.17 HCB $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/day, 50体重のヒトに対して8.5 μg)¹⁴⁾が定められており、TDIに対するHCBの推定1日摂取量の比は0.0052%であった。また、HCB低摂取国である日本人のトータルダイエット方式による食品由来HCBの1日摂取量は53 ngと報告¹⁵⁾されており、今回の生産流通

Table 1 Effects of clean-up through Florisil column and storage on the contents of HCB in the R-104 sample solution

	Florisil column clean-up	After preparation of sample solution	
		Immediately	Storage for 2 weeks
Content (mg/kg) ^a			
Sample I	through	23.3 \pm 1.3	24.5 \pm 5.5
	—	23.7 \pm 1.8	29.1 \pm 2.8
Sample II	through	27.7 \pm 1.6	25.4 \pm 1.3
	—	25.9 \pm 1.8	31.6 \pm 1.0

a: Average and S.D. of three determinations

Table 2 Contents and pseudo-productions of HCB in the certified food colors R-104 and R-105

Food color	Fiscal Year	Manufacturer	Production (number of samples) (kg)	Content (mg/kg)		Pseudo-production (mg)
				Min ^a - Max ^a	Average	
R-104	1998	A (6)	1800	19.20 - 32.86	29.58	53244
		B (1)	300	28.91	28.91	8673
		C (2)	136.5	0.83 - 1.64	1.24	169.26
		D (1)	500	0.94	0.94	470
	1999	A (3)	1300	0.63 - 0.83	0.74	962
		B (2)	600	0.48 - 2.81	1.64	984
		C (1)	100	0.38	0.38	38
		E (1)	200	5.54	5.54	1108
	2000	A (2)	800	0.34 - 0.73	0.54	432
		B (2)	800	0.24 - 0.46	0.35	280
	2001	A (2)	1000	0.42 - 0.74	0.58	580
		C (1)	100	0.39	0.39	39
		D (1)	660	0.52	0.52	343.2
		E (1)	320	27.46	27.46	8787.2
F (1)		500	0.42	0.42	210	
R-105	1998	B (1)	300	6.74	6.74	2022
		D (1)	256.25	11.35	11.35	2908.438
	1999	F (1)	58	5.55	5.55	321.9
	2000	F (1)	90	1.69	1.69	152.1
	2001	A (1)	300	0.16	0.16	48

a: Each value is the average of two determinations

Table 3 Daily intakes of HCB from food colors estimated by production

Fiscal Year	Food color	Daily intake		
		(mg/day)	HCB (ng/day)	
			(ng/day)	Total (ng/day)
1998	R-104	0.059	1.350	} 1.456
	R-105	0.012	0.106	
1999	R-104	0.047	0.067	} 0.074
	R-105	0.001	0.007	
2000	R-104	0.035	0.015	} 0.018
	R-105	0.002	0.003	
2001	R-104	0.056	0.215	} 0.216
	R-105	0.006	0.001	
Average	R-104	0.049 ± 0.011	0.412 ± 0.631	} 0.441 ^a ± 0.682
±S.D.	R-105	0.005 ± 0.005	0.029 ± 0.051	

a: This value corresponded to 0.0055% of the ratio for the TDI (0.17 µg /kg body weight/day; 8.5 µg/day for 50 kg body weight) of HCB developed by the IPCS

調査方式による推定1日摂取量の寄与率は1%にも満たなかった。これらより食用色素 (R-104及びR-105) 由来HCBの1日摂取量は非常に少なく、問題のない量であることがわかった。

まとめ

近年製造されたR-104及びR-105中のHCB含量を把握する為、平成10～13年度 (F.Y.1998～F.Y.2001) 製品検査合格検体 (R-104, R-105) の計32検体についてHCB含量実態調査を行った。その結果、全検体から

HCBが検出された。しかし、HCB含量は近年になるにつれ非常に減少していた。また生産流通調査方式による色素由来HCBの1日摂取量は0.441 ngであり、この値はIPCSによるTDI (50 kg体重に対して8.5 µg) の0.0052%となり、非常に少なく、問題のない量である事がわかった。

文献

- 1) Suzuki, I., Nojima, S., Tanimura, A., eds.: "Shokuhin Tenkabutsu Koteisho Kaisetsusho, 7th Ed.", Hirokawa Shoten, 1999, p. D713-727 (ISBN4-567-01852-4)
- 2) Andrzejewski, D., Weisz, A.: *J. Chromatogr. A*, **863**, 37-46 (1999)
- 3) Kato, M. and Urano, K.: *Waste Manag.*, **21**, 63-68 (2001)
- 4) a) 堀 伸二郎, 小西 良昌, 尾花 裕孝, 石光 進, 日本食品化学学会第4回講演要旨集, p.63(1998); b) Hori, S.: *The San-Ei Gen Foundation For Food Chemical Research ANNUAL REPOET*, No. 5, 115-124 (1999)
- 5) 食品添加物研究会編: あなたが食べている食品添加物—食品添加物一日摂取量の実態と傾向—総合編(本編・資料編), 日本食品添加物協会 p.1-10 (2001)
- 6) Jinkou Suikei Geppo: <http://www.stat.go.jp/data/jinsui/tsuki/index.htm>
- 7) 海野有紀子, 辻 澄子, 中村優美子, 外海泰秀, 日本食品衛生学会第83回学術講演会講演要旨集, p.50 (2002)
- 8) Ishiwata, H.: *Shokuhinn Eisei Kenkyu*, **51** (3), 83-101 (2001)
- 9) Koh, T., Yada, T., Tobimatsu, Y., Hamasaki, N., Tabuchi, Y., Fujii, M., Semma, M., Tsuji, S., Shibata, T. and Ito, Y.: *Jpn. J. Food. Chem*, **2**, 64-68 (1995)
- 11) Kuwabara, K., Matsumoto, H., Murakami, Y. and Hori, S.: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **38**, 286-295 (1995)
- 10) Tsuji, S., Okada, M., Matsumura, I., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 185-188 (1999)
- 11) Tsuji, S., Okada, M., Amakura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 135-138 (2000)
- 12) Tsuji, S., Umino, Y., Amakura, Y., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 70-73 (2001)
- 13) Tsuji, S., Umino, Y., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **120**, submitted (101-106)
- 14) Environmental Health Criteria 195 (EHC 195, 1997): <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc195.htm>

国立医薬品食品衛生研究所フルオロメトロン標準品 (Control 011)

岩田美保・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛[#]

Fluorometholone Reference Standard (Control 011) of National Institute of Health Sciences

Miho Iwata, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto[#]

The raw material of fluorometholone was examined for the preparation of the "Fluorometholone Reference Standard (Control 011)". The analytical data obtained were: optical rotation, $[\alpha]_D^{20} = +54.5^\circ$; UV spectrum, λ max of 240 nm and specific absorbance in methanol at 240nm = 350.7; IR spectrum, same as that of the Fluorometholone Reference Standard (Control 864); high-performance liquid chromatography (HPLC), total amount of impurities estimated to be less than 0.5%; loss on drying, 0.01%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Fluorometholone Reference Standard (Control 011) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: fluorometholone, quality evaluation, authorization, reference standard

「フルオロメトロン」とその製剤の定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品「フルオロメトロン標準品 (Control 011) (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

標準品原料は参天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。旋光度: $[\alpha]_D^{20} = +52^\circ$, 乾燥減量: 0.0%, 定量: 99.8%

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方フルオロメトロン標準品 (Control 864; 日局標準品) 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試験にあたり、下記の装置を用いた。

微量水分測定装置: 平沼産業 AQ-6

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-317型

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所の LC-6A型ポンプ, SPD-10AV型検出器, CTO-6A型カラムオーブ

ン, 東ソー製の AS-8010型オートサンプラー及び資生堂製 S-mc データ処理装置

4. 試験方法

特に記するもののほかは、第十四改正日本薬局方の一般試験法及び医薬品各条「フルオロメトロン」の試験法を準用した。

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料約 0.010 g を精密に量り、メタノールを加えて正確に 20 ml とする。この液 1 ml を正確に量り、水を加えて 50 ml とし、試料溶液とする。

2) 液体クロマトグラフ法 (HPLC法) による純度試験

標準品原料及び日局標準品約 0.010 g ずつを量り、それぞれをメタノール 10 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、次の条件で分析を行った。

操作条件

検出法: 紫外吸光光度計 (波長: 254 nm)

カラム: TSK-GEL ODS-Ts (4.6 mm ϕ \times 250 mm)

移動相: メタノール/水 (6:4)

流量: 1.0 ml/min

カラム温度: 35 $^\circ$ C

カラムの選定: 日局「フルオロメトロン」の定量法におけるカラムの選定を準用する。

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感

[#]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

度を調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後，フルオロメトロンの保持時間の2倍の範囲

6) 乾燥減量

本標準品原料の乾燥原料は $0.01 \pm 0.01\%$ ($n=3$)であった。

5. 試験結果

1) 性状：白色の粉末ではない。

2) 旋光度

標準品原料の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は $+54.5 \pm 0.8^\circ$ ($n=$

3) (乾燥後, 0.15 g, ピリジン, 15 ml, 100 mm) であつた。

3) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度

標準品原料溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき，波長240 nm付近に吸収の極大が認められた。また，極大吸収波長における比吸光度 $E_{1cm}^{1\%}$ (240nm) は350.7であつた。標準品原料の紫外吸収スペクトルをFig.1に示す。

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.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を認めた。

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クロマトグラムをFig.3に示す。標準品原料及び日局標準品ともに微量の不純物ピークが確認された。面積百分率法での不純物の総和は，標準品原料で $0.41 \pm 0.00\%$ ($n=3$)，日局標準品で $1.15 \pm 0.06\%$ ($n=2$)と推定された。

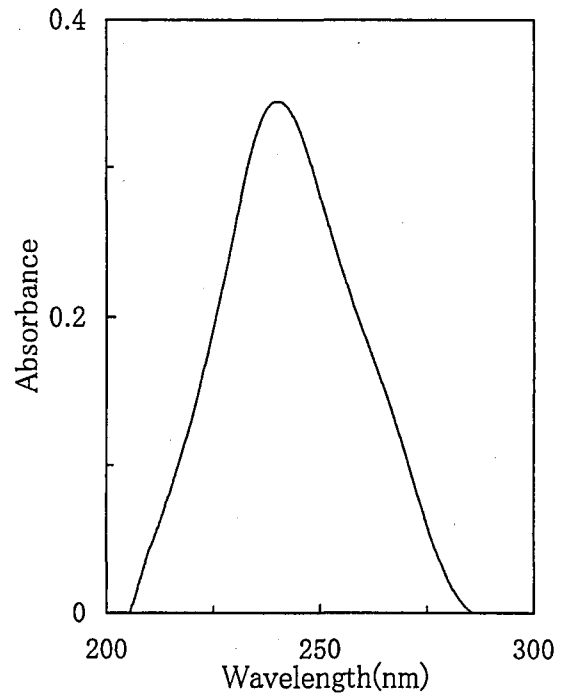


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Fluorometholone Reference Standard

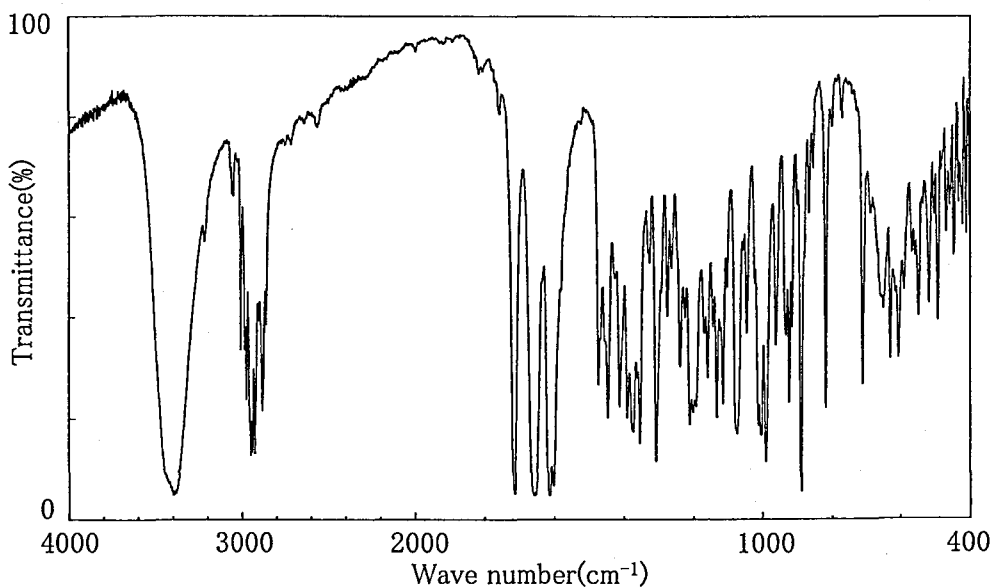


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Fluorometholone Reference Standard

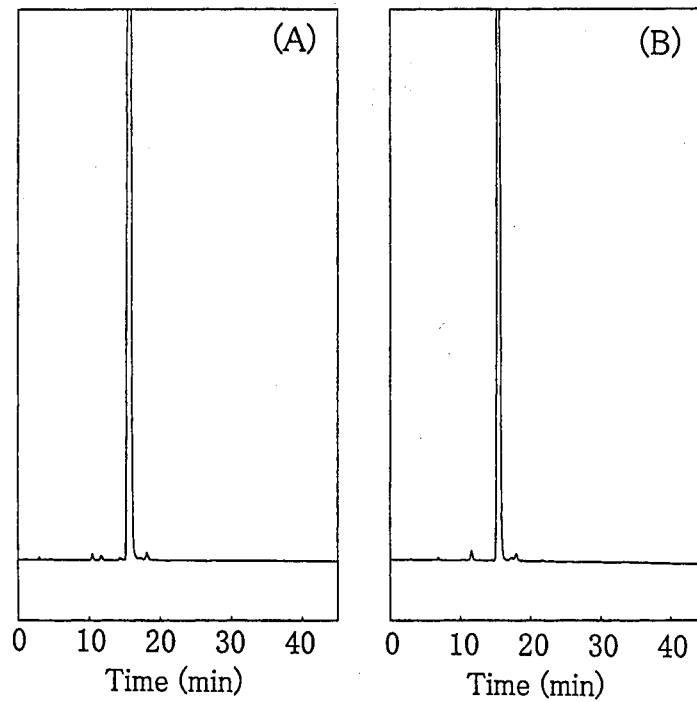


Fig.3 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and for Fluorometholone Reference Standard (Control 864) (B)

結 論

フルオロメトロン標準品原料につき、日局標準品 (Control 864) を対照にその品質を検討した結果、両者の間には物質特性に差はなく、標準品原料の純度は

HPLC法による試験において99.5%以上であることを確認した。この結果から、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 011として製造・配布を開始した。

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 021)

斎藤博幸・小出達夫・岩田美保・谷本 剛[#]

Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

Hiroyuki Saito, Tatsuo Koide, Miho Iwata, and Tsuyoshi Tanimoto[#]

The raw material of tocopherol succinate was tested for the preparation of the "Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 021)". Analytical data obtained were as follows: infrared spectrum, same as that of the Tocopherol Succinate Reference Standard (Control 981); specific absorbance, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286nm) = 40.7; thin-layer chromatography, no impurities were detected until 50.0 μg ; high-performance liquid chromatography (HPLC), four impurities were detected and the amount of tocopherol succinate was estimated to be 99.0%; loss on drying, 0.11%.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Control 021).

Keywords: tocopherol succinate, quality evaluation, authorization, JP Reference Standard

第十四改正日本薬局方「コハク酸トコフェロールカルシウム」の純度試験および定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品（日本薬局方標準品）“コハク酸トコフェロール標準品 (Control 021)”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 0.91%, 比吸光度: $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (286 nm) 37.6.

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 981; 日局標準品と略称) を対照物質とした。試薬および溶媒類は、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 型カラムオープンおよび資生堂製 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、日局一般試験法および医薬品各条「コハク酸トコフェロールカルシウム」の試験法を準用した。

1) 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).

試料溶液および標準溶液の調製: 標準品原料および日局標準品 0.01 g をとり, クロロホルム 2.0 ml を加えて溶かし, 試料溶液および標準溶液とする。

操作法および検出法: 試料溶液および標準溶液 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°C で 15 分間加熱し, 直ちに白色光下で観察する¹⁾。

2) HPLC 法による純度試験

標準品原料および日局標準品約 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, 試料溶液および標準溶液とする。これらの液 20 μl につき, 次の条件で HPLC 法による試験を行う。

操作条件

検出器: 紫外吸光光度計 (測定波長: 284 nm)

[#] 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

カラム：ULTRON N-C18L (4.6 mm ϕ \times 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℃

カラムの選定：コハク酸トコフェロール及びトコフェロール0.05 gずつを無水エタノール/薄めた氷酢酸 (1 \rightarrow 5) 混液 (9 : 1) 50 mlに溶かす。この液20 μ lにつき、上記の条件で操作するとき、コハク酸トコフェロール、トコフェロールの順に溶出し、その分離度が2.0以上のものを用いる。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、コハク酸トコフェロールの保持時間の3倍の範囲。

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

標準品原料およ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および比吸光度

日局の方法で調製した標準品原料のクロロホルム溶液の紫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 $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (286nm) = 40.7 ± 0.3 (n=3) 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

標準品原料および日局標準品の薄層クロマトグラムをFig. 3に示した。試料溶液および標準溶液とも、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0.3 μ gであった。

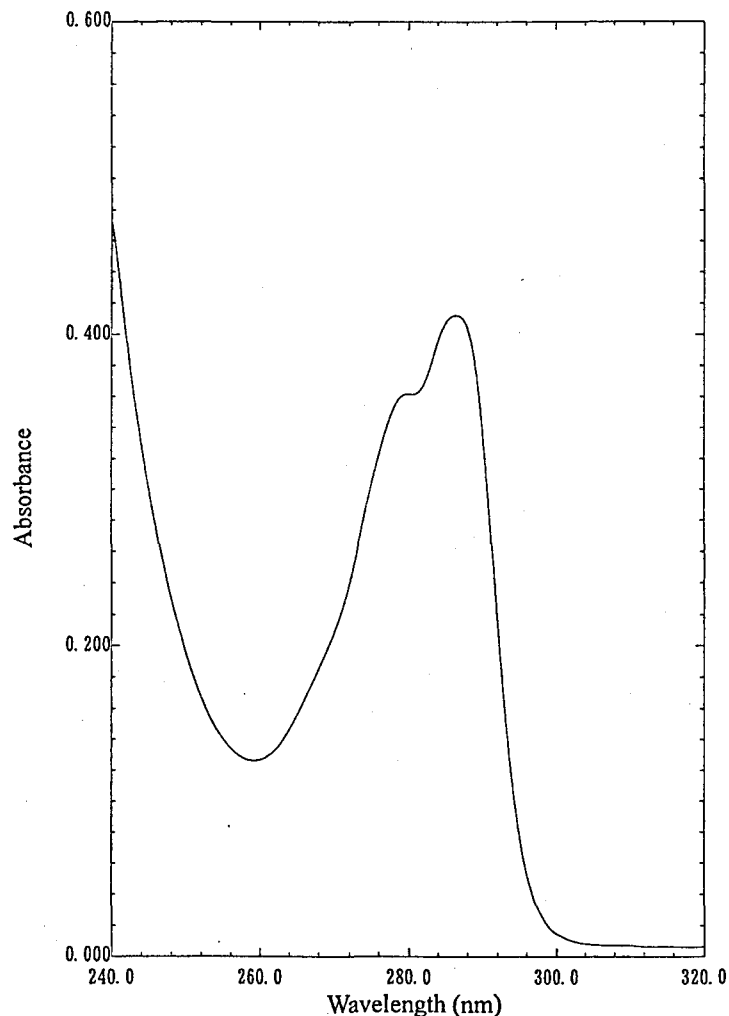


Fig. 1 Infrared absorption spectrum of the raw material for Tocopherol Succinate Reference Standard

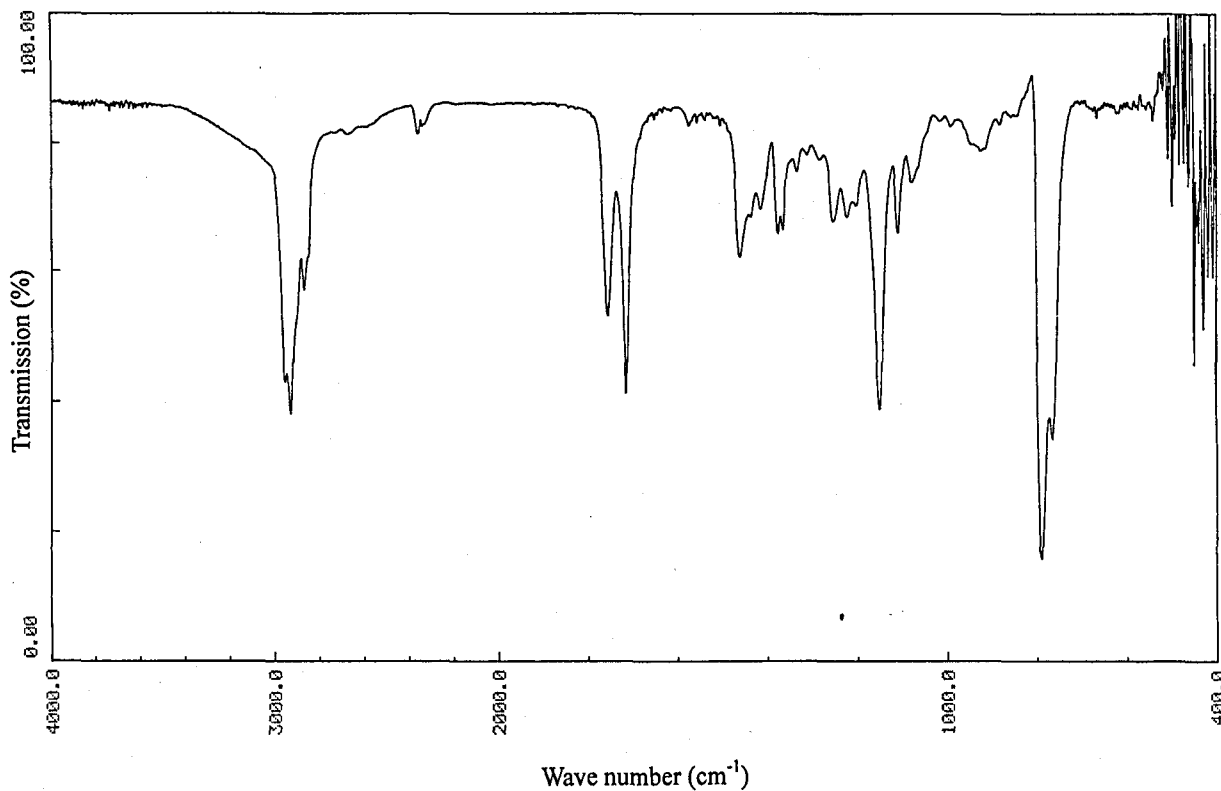


Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Tocopherol Succinate Reference Standard

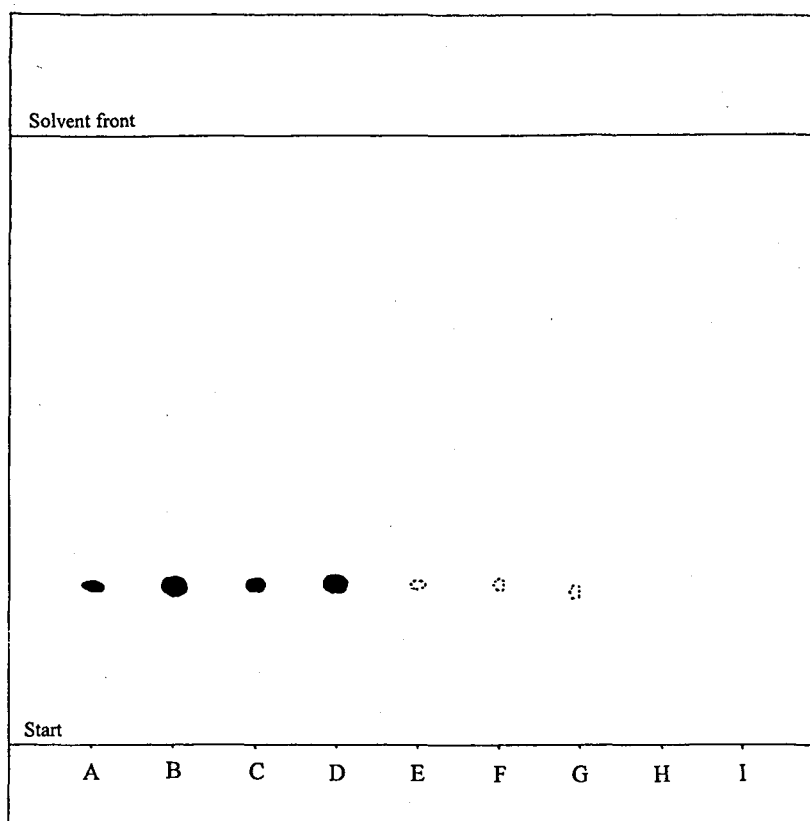


Fig. 3 Thin-layer chromatogram of tocopherol succinate

A, B; Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Control 981) 12.5 μ g, 50.0 μ g

C to I are 12.5, 50, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2; 0.1 μ g of the raw material for Tocopherol Succinate Reference Standard

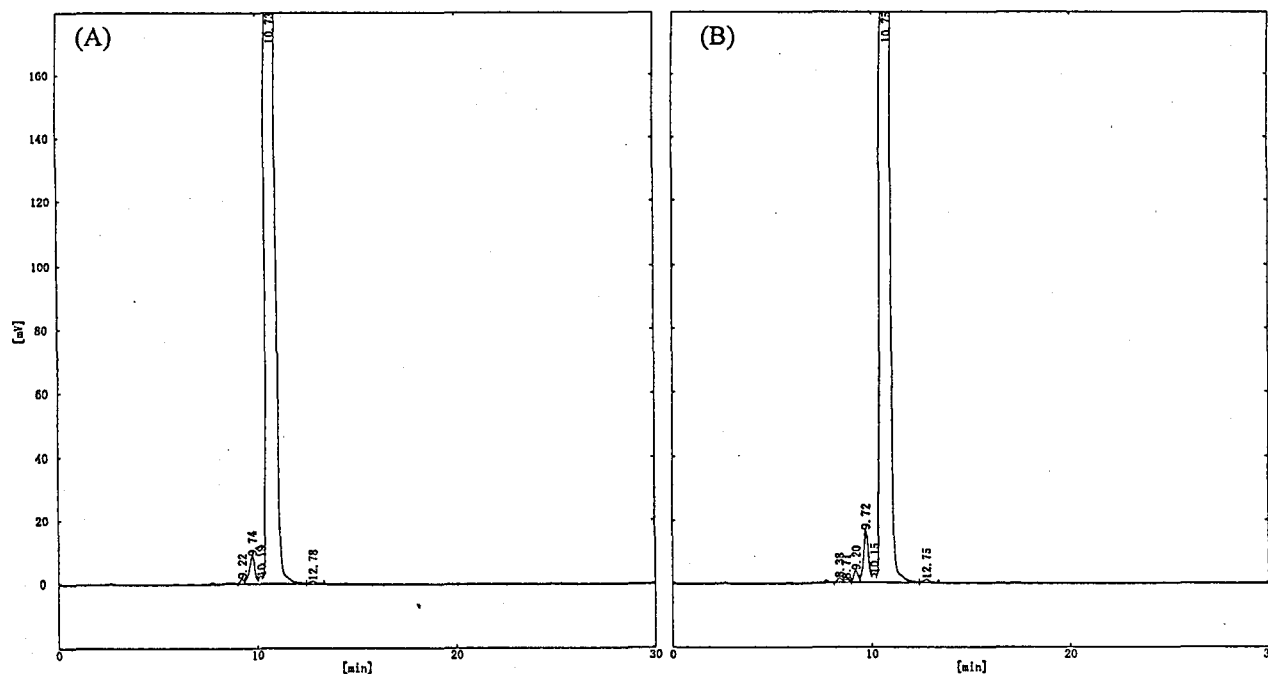


Fig. 4. High-performance liquid chromatograms of tocopherol succinate
 (A) the raw material for Tocopherol Succinate Reference Standard
 (B) Japanese Pharmacopoeia Reference Standard (Control 981)

5) HPLC法による純度試験

標準品原料および日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られた液体クロマトグラムをFig. 4に示した。標準品、標準品原料ともに4~6個の不純物ピークが認められるものの、全ピーク面積総和を100%とした時の標準品及び標準品原料の不純物総量はそれぞれ $1.80 \pm 0.02\%$ ($n=3$), $1.04 \pm 0.01\%$ ($n=3$)であった。

6) 乾燥減量

$0.11 \pm 0.02\%$ ($n=3$) (0.1 g, 減圧, 五酸化リン, 24時間)。

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 981) 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およ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 021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およびコハク酸トコフェロール標準品に関する研究, 医薬品研究, **16**, 506-514 (1985)

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 0211 及び 0221)

小出達夫・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛[#]

Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211 and 0221) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto[#]

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; and specific absorbance ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in ethanol at 251 nm, 149.6 (Control 0211) and 145.7 (Control 0221); IR spectrum, specific absorptions of raw material were consistent with that of Standard (Control 001). Also, thin-layer chromatography, no impurity was detected; high-performance liquid chromatography, several impurities were detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.2% and total amount of impurities was less than 0.6%.

Based on the above results, the candidate materials were authorized as the Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211 and 0221) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: glycyrrhizic acid, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十四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 0211)」及び「グリチルリチン酸標準品 (Control 0221)」(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: 0.38%, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ max): 147.5, 液体クロマトグラフ (HPLC) による純度試験: 純度 99.4% (Control 0211)

水分: 0.60%, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ max): 149.3, HPLCによる純度試験: 純度 99.6% (Control 0221)

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 001; 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-10A型検出器, CTO-6A型カラムオーブ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℃), 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℃), その2 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, 4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを

[#] 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

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0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 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, 2, 3, 4, 5, 6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TLC法による試験を行う。

薄層板：メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル60F₂₅₄ (厚さ, 0.25 mm)。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (100) 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→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1～6のスポットのそれと比較し、不純物量を推定する。

4) 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HPLC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：TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm ϕ \times 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 (100) (1→50) / アセトニトリル混液 (3 : 2)

流量：0.7 ml/min

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

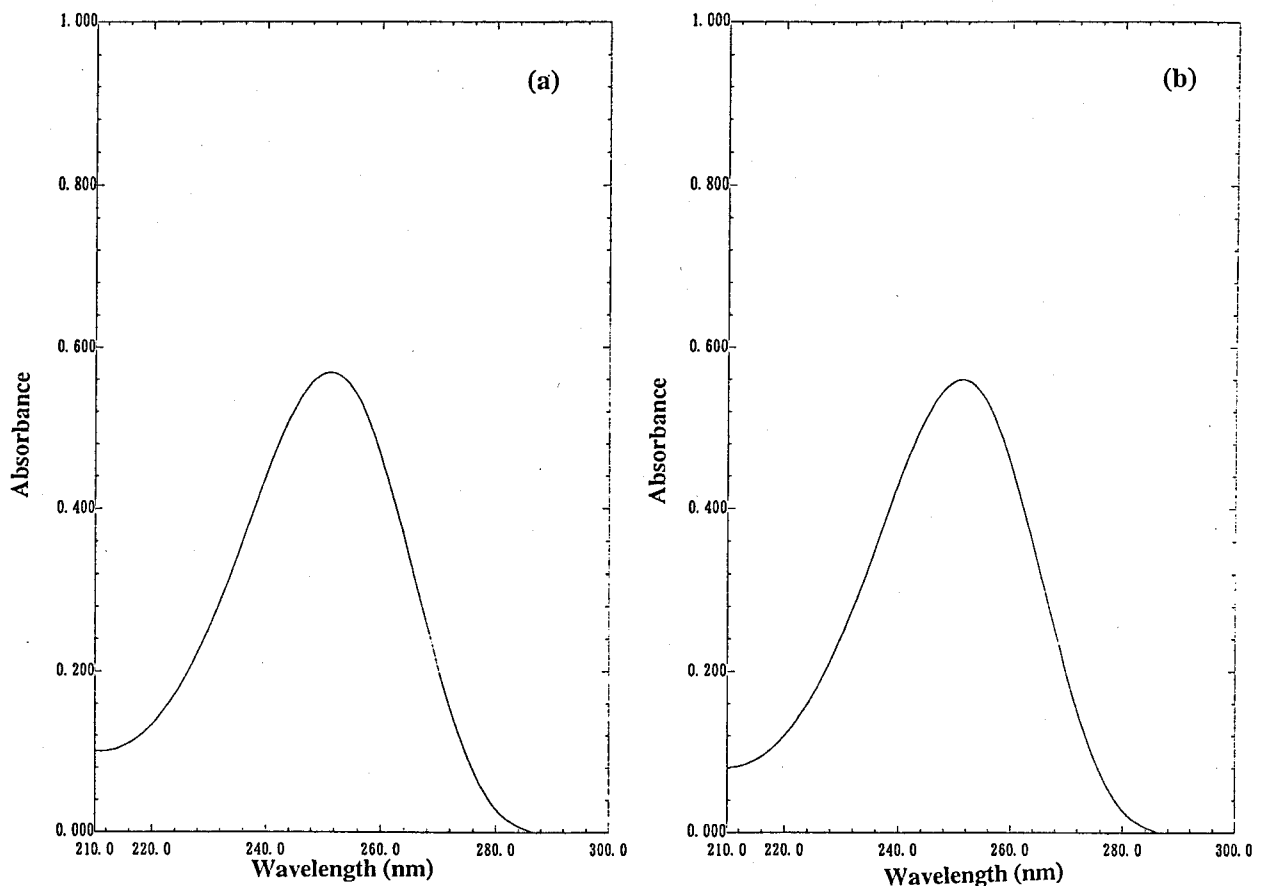


Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b)

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。

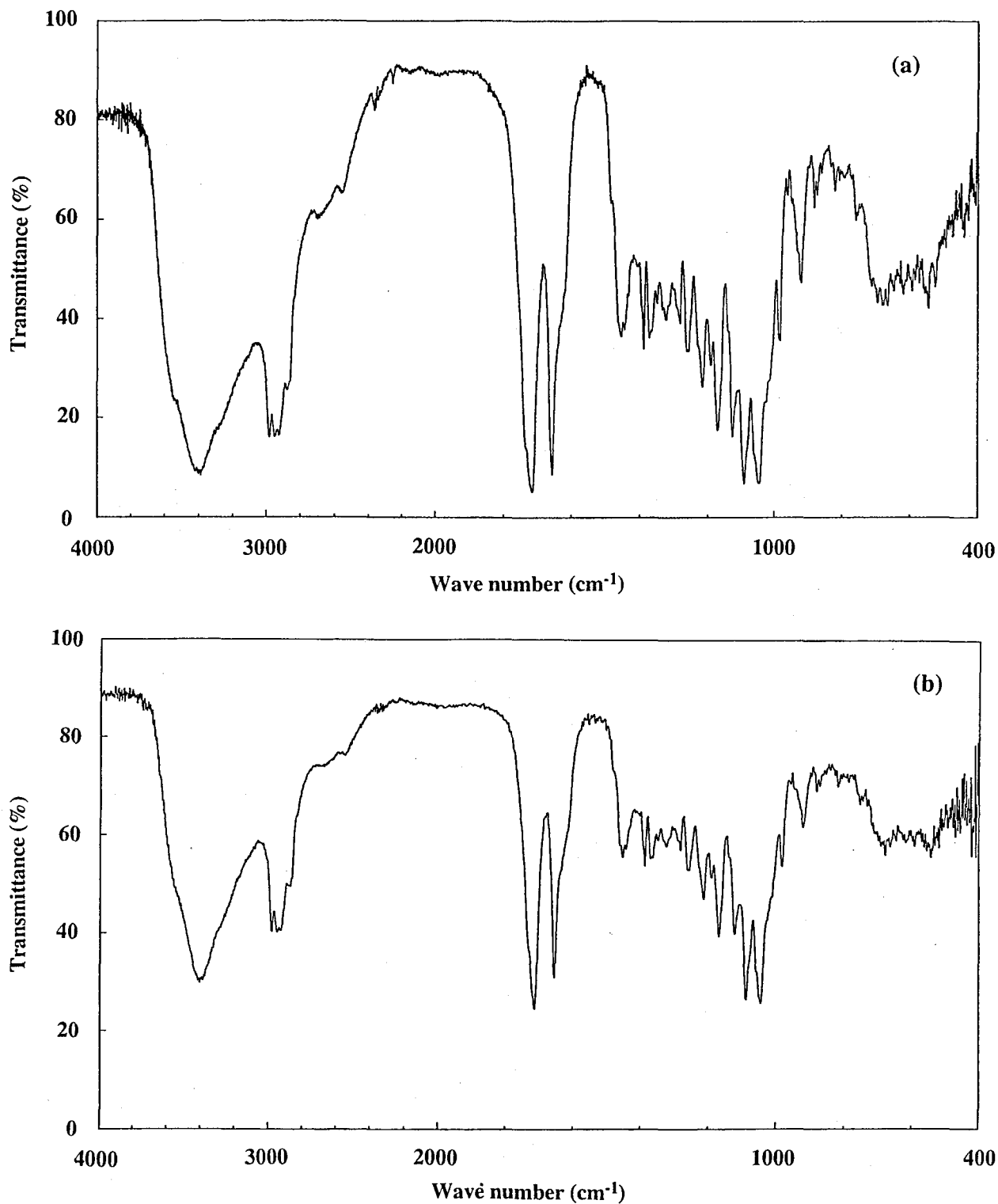


Fig. 2 Infrared absorption spectra of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b)

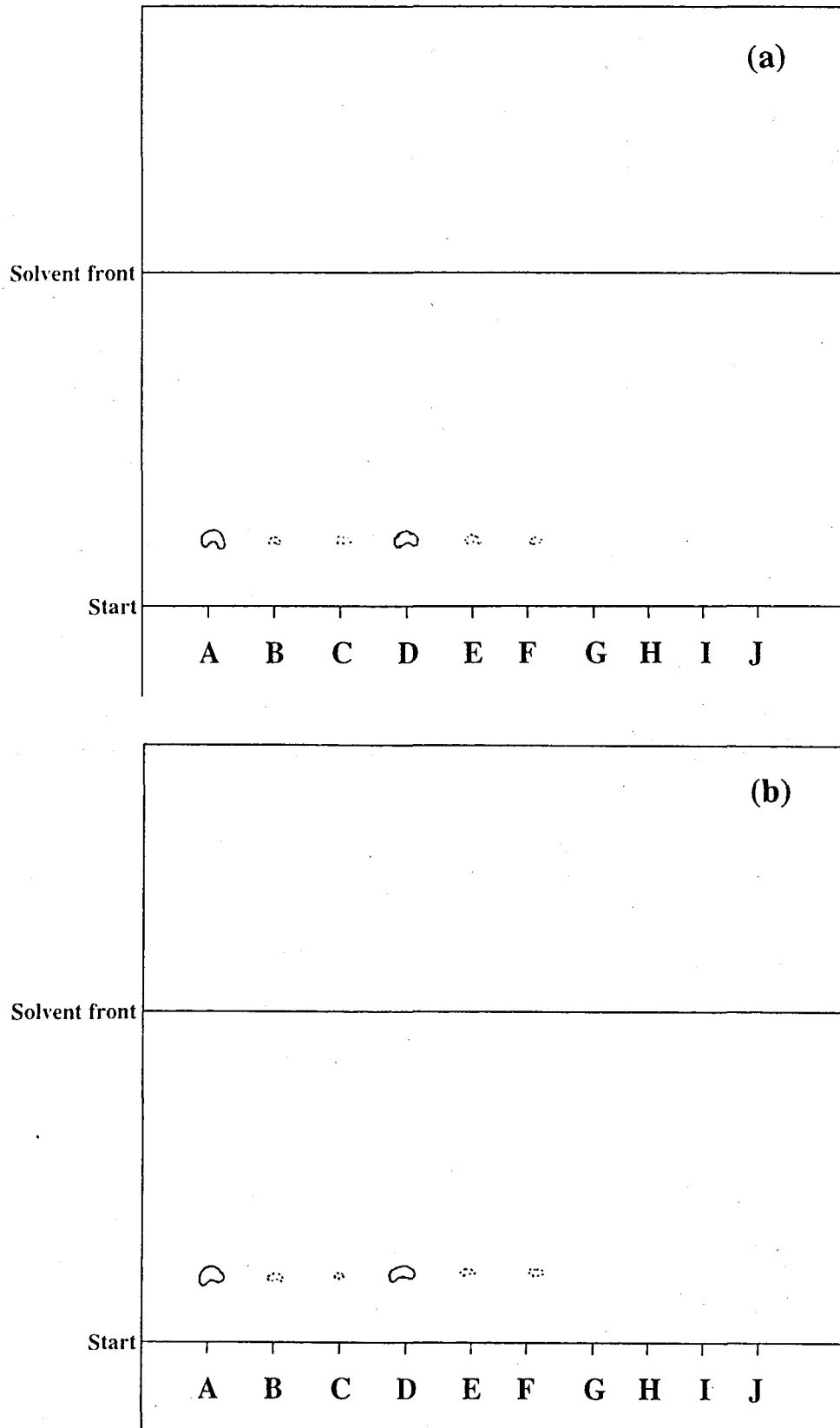


Fig. 3 Thin-layer chromatograms of the raw materials for Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b) Spot: 20 μg (A), 0.2 μg (B) and 0.1 μg (C) of Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 001); 20 μg (D), 0.2 μg (E), 0.1 μg (F), 0.08 μg (G), 0.06 μg (H), 0.04 μg (I) and 0.02 μg (J) of the raw material.

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 (Control 0211 及び Control 0221) 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 149.6 ± 1.8 (Control 0211, $n=3$) 及び 145.7 ± 0.8 (Control 0221, $n=3$) 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、同一波数のところに同様の強度の吸収が認められた。

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、 $0.1 \mu\text{g}$ 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 0.01% 以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で

$0.52 \pm 0.01\%$ ($n=3$, Control 0211), $0.33 \pm 0.01\%$ ($n=3$, Control 0221), 日局標準品で 0.47% ($n=2$) 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 $4.5 \pm 0.17\%$ ($n=3$, Control 0211), $4.2 \pm 0.5\%$ ($n=3$, Control 0221) 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 001) を対照にその品質を比較検討した結果、これらの中に物質特性の差はなく、標準品原料の純度は 99.0% 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 0211 及び 0221 として製造・配布することとした。

文 献

- 1) Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 93-96 (2001)

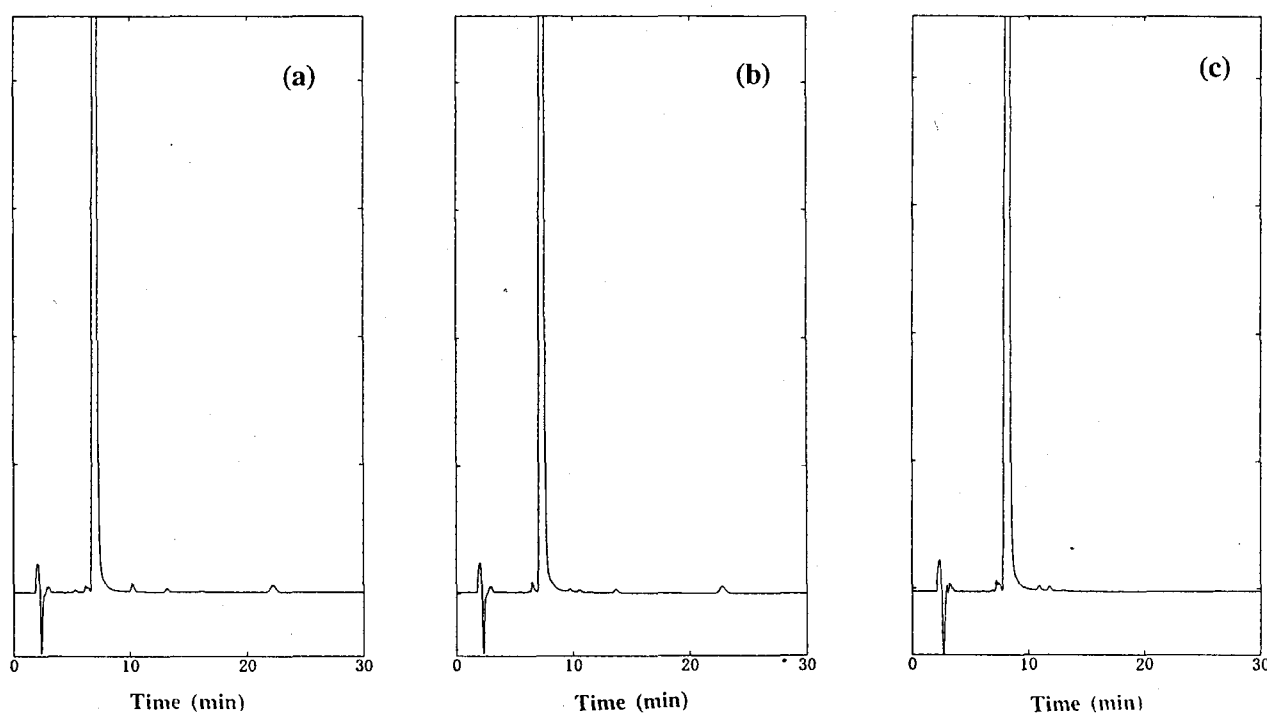


Fig. 4 High-performance liquid chromatograms of the raw materials (Control 0211) (a) and (Control 0221) (b) and Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 001) (c)

国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品 (Control 011)

小出達夫・岩田美保・斎藤博幸・谷本 剛[#]

Paeoniflorin Reference Standard (Control 011) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Iwata, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto[#]

The raw material of paeoniflorin was examined for preparation of the "Paeoniflorin Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum: λ max, 231.7 nm; and specific absorbance ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) in methanol at 230 nm, 265.4; IR spectrum, specific absorptions of raw material were consistent with that of Standard (Control 985). High-performance liquid chromatography, several impurities were detected. The amount of each impurity was estimated at less than 0.1% and total amount of impurities was less than 0.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Paeoniflorin Reference Standard (Control 011) of the National Institute of Health Sciences.

Keywords: paeoniflorin, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十四改正日本薬局方に収載されている「シャクヤク」, 及び「シャクヤク末」中のペオニフロリン含量の定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所「ペオニフロリン標準品 (Control 011)」(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

標準品原料は松浦薬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。水分: 0.3%, 比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ (230 nm): 259, 液体クロマトグラフ (HPLC) による純度試験: 純度 99.8%。

2. 参照物質及び試薬

日本薬局方ペオニフロリン標準品 (Control 985; 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-10A型検出器, CTO-6A型カラムオーブ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8時間以上乾燥し(減圧, 五酸化リン, 80℃), その約1mgを精密に量り, 薄めたメタノール(1→2)に溶かして正確に100mlとし, 試料溶液とする。この液につき, 薄めたメタノール(1→2)を対照にして吸光度測定法により, 200~300nm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8時間以上乾燥し(減圧, 五酸化リン, 80℃), その2mgを量り, 赤外吸収スペクトル測定用臭化カリウム0.2g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, 4000~400 cm^{-1} の範囲で赤外吸収スペクトルを測定する。

3) HPLC法による純度試験

標準品原料約5mgを精密に量り, 移動相を加えて正確に50mlとし, 試料溶液とする。この液1mlを正確に量り, 移動相を加えて正確に100mlとし, 標準溶液とする。標準溶液5mlを正確に量り, 移動相を加えて正確に100ml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 μl につき, 次の条件でHPLC法により試験を行う。それぞれの液の各々のピー

[#] 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

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：230 nm）

カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm φ×150 mm)

カラム温度：30℃ 付近の一定温度

移動相：pH 7.4 リン酸塩緩衝液／メタノール混液 (3 : 1)

流量：ペオニフロリンの保持時間が約10分になるように調整する。

カラムの選定：ペオニフロリン及びパラヒドロキシアセトフェノン各1 mgを薄めたメタノールに溶かして10 mlとする。この液20 μlにつき、上記の条件で操作するとき、ペオニフロリン、パラヒドロキシアセトフェノンの順に溶出し、その分離度が3以上のものを用いる。

検出感度：希釈標準溶液20 μlにつき分析するとき、

ペオニフロリ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20 μlから得られるペオニフロリ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。

4) 水分

標準品原料の一定量を精密に量り、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

標準品原料の薄めた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231.7 nm付近に吸収の極大が観察され (Fig. 1), 極大吸収波長付近における比吸光度 $E_{1cm}^{1\%}$ (230 nm) は 265.4 ± 9.7 (n=3) であった。

2) 赤外吸収スペクトル

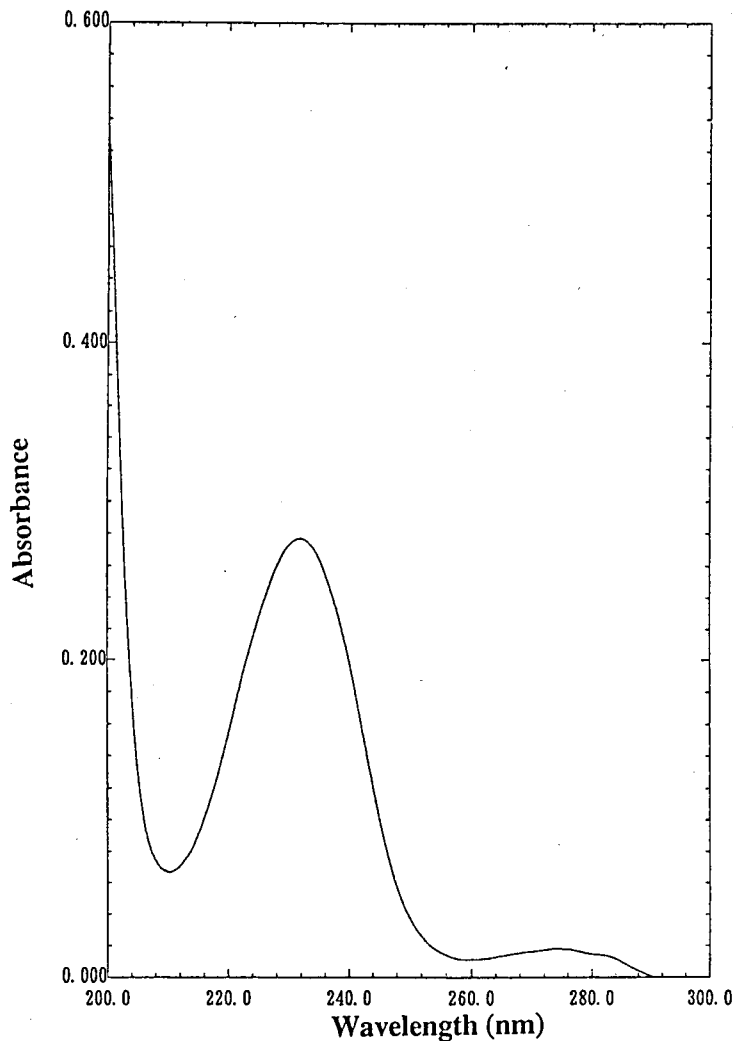


Fig. 1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Paeoniflorin Reference Standard

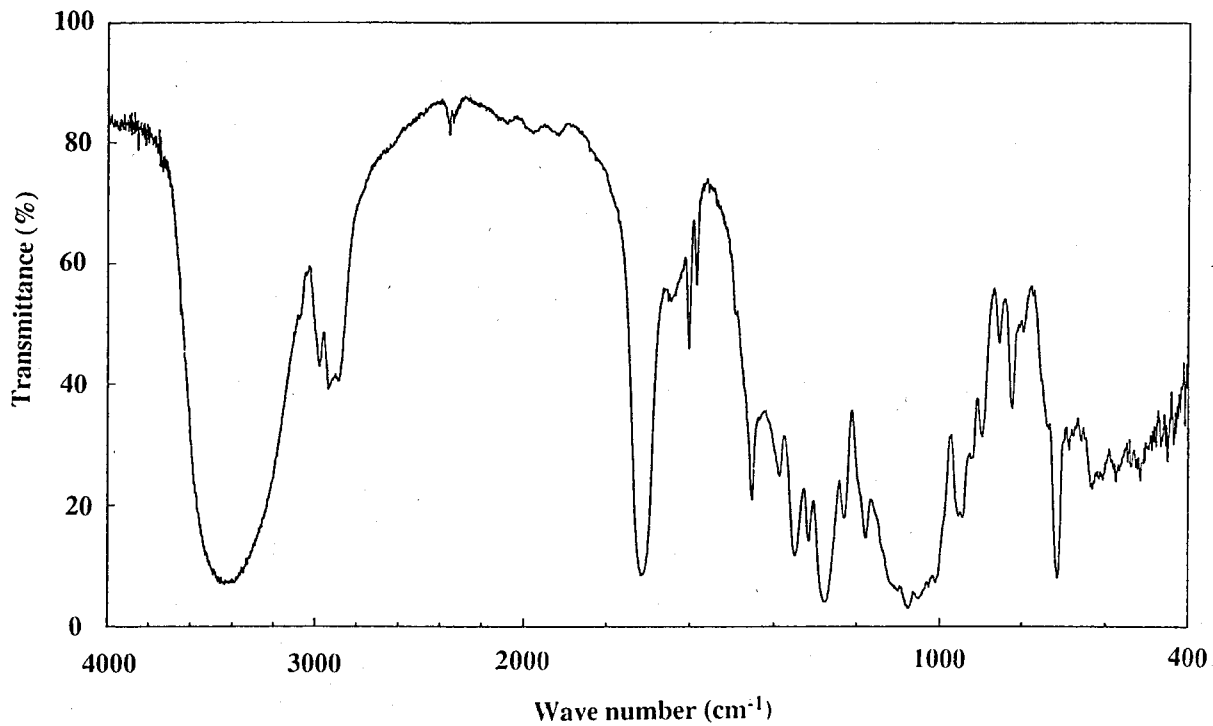


Fig. 2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Paeoniflorin Reference Standard

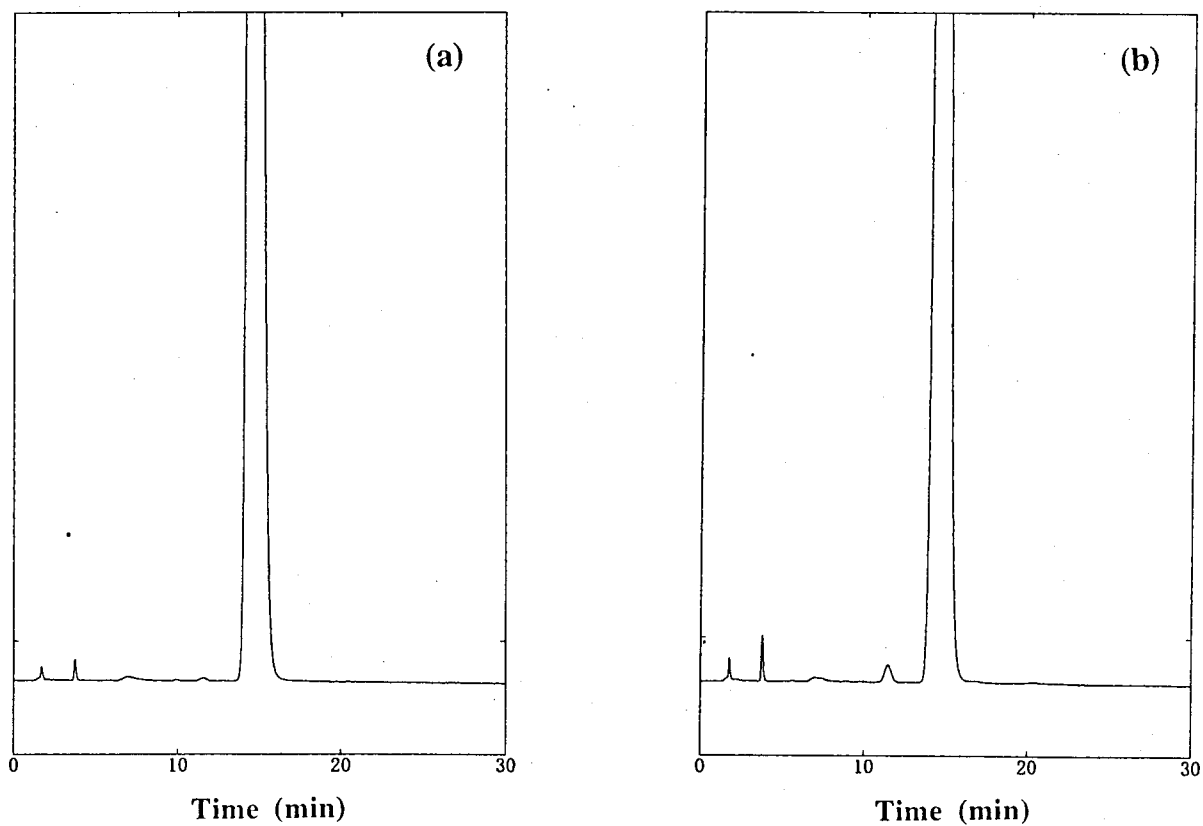


Fig. 3 High-performance liquid chromatograms of the raw material (a) and Paeoniflorin Reference Standard (Control 985) (b)

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。

3) 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. 3 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0.01%以上の不純物ピークの総量は、標準品原料で $0.11 \pm 0.02\%$ ($n=3$)、日局標準品で0.30% ($n=2$) と推定された。

4) 水分

標準品原料のカールフイッシャー法による水分含量は $4.07 \pm 0.19\%$ ($n=3$) であった。

結 論

ペオニフロリン標準品原料につき、日局標準品

(Control 985) 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 011として製造・配布することとした。

文 献

- 1) 齊藤博幸, 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, 津野敏紀, 鈴木英世, 山岸恭子, 白砂勝也, 岩嶋 浄, 松浦敬一: 医薬品研究 **29** (10), 725-729 (1998)

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品
(日本薬局方エンドトキシン10000標準品) (Control 0211)

中川ゆかり[#]・村井敏美・堀内善信^{*}

The Endotoxin 10000 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 10000 Reference Standard) (Control 0211)

Yukari Nakagawa[#], Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi^{*}

To establish the fifth lot (Control 0211) of the Endotoxin 10000 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 10000 Reference Standard), a candidate standard (CS) was prepared and then evaluated. The potency of the CS was assayed against USP Endotoxin Reference Standard (Lot G-1) and defined as containing approximately 16,000 endotoxin units (EU) per vial by a collaborative study in which 5 laboratories participated. Based on the results, the CS was authorized to be the fifth lot of the Endotoxin 10000 Reference Standard containing 16,000 EU per vial.

Keywords: endotoxin, reference standard

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品(日本薬局方エンドトキシン10000標準品)の新ロット(第5回標準品, Control 0211)候補品を調製し, 力価設定のための共同検定を実施したので報告する。

実験材料及び方法

1. 標準品原料及び製造

当部において大腸菌 (*E. coli* UKT-B) 乾燥菌体より抽出精製したりボ多糖を原料(前ロットで使用したものと同一原料)として用いた。本原料をエンドトキシン試験用水に溶解し, これに賦形剤としてマンニトールを添加した後バイアルに無菌的に分注し(標準品原料2 µg/vial, マンニトール40 mg/vial), 凍結乾燥したものを標準品候補品とした(和光純薬工業株式会社に製造を依頼した)。

2. 力価(エンドトキシン単位, EU)の検定

標準品候補品の力価は, 米国薬局方標準品(USP)エンドトキシン標準品 Lot G-1 (EC-6, 10,000 EU/vial) を基準としてこれに対する相対力価を算出することによ

り求めた。力価の検定は, 公的機関として国立医薬品食品衛生研究所大阪支所(生物試験部)及び国立感染症研究所(安全性研究部)の2機関, 国内の主要エンドトキシン定量試薬(ライセート試薬)関係企業として和光純薬工業株式会社, 生化学工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の3社の計5機関による共同検定で行った。

3. 試薬及び測定

測定試薬のロットを統一するために, 参加各企業から1種類ずつ(計3種類)同一ロットのライセート試薬が提供された(Limulus ES-II Test Wako, lot DMQ2570; 和光純薬工業, Endospecy ES-50M, lot 36M058; 生化学工業, Kinetic-QCL Kit, lot 1L267J; 第一化学薬品)。測定は第十四改正日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠し, Limulus ES-II Test Wakoはカイネティックー比濁法, Endospecy ES-50M及びKinetic-QCL Kitはカイネティックー比色法により行った。

4. 検定方法

方法及び操作は, 各参加機関とも詳細を規定した同一のプロトコールに従って行った。検定方法の概略を以下に記す。

USP標準品及び標準品候補品(17,000 EU/vialと仮定)をエンドトキシン試験用水に溶解し, 5,000及び10,000 EU/mlの原液を調製した。なお, これらについてバイアル間ではばらつきがある可能性を考慮し, USP標準品は

* 国立感染症研究所

[#] To whom correspondence should be addressed: Yukari Nakagawa; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533 ext. 22; Fax: 06-6941-5672; E-mail: yukari@nihs.go.jp

3本分の原液を、標準品候補品は5本分の原液をプールして用いた。このプールした原液から、連続3日間にわたり、それぞれ3希釈系列を各日1回調製し測定を行った。企業各社は自社の測定試薬を用いて測定を行い、国立2機関は3種類すべての試薬を用いて測定を行った。

5. 相対力価の算出

得られた測定値から、用量反応回帰の直線性、平行性が成立する回帰線を用いて、平行線定量法（生物学的製剤基準エンドトキシン試験法第二法）により、USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を算出した。得られた相対力価を対数変換したのち、以下の統計学的処理を行った。

1機関で1試薬について行った9回（3希釈系列×1回測定×3日間）の測定を同一条件下での9繰り返し測定とみなし、1機関1試薬単位での対数相対力価の平均値M及びMの分散の推定値Vmを求めた。3機関×3試薬での測定で得られた9個のMにつき、下式によりVmの逆数を重みとする加重平均値wMを求め、全体での平均相対力価とした。

$$wM = \{\sum(Mi/Vmi)\} / \sum(1/Vmi)$$

結果及び考察

標準品候補品の力価を17,000 EU/vialと仮定し、USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を共同検定により求めた。共同検定の実施にあたっては、過去における

エンドトキシン100標準品候補品の共同検定¹⁾において作成したプロトコルに準拠し、力価検定用として選定された3種類の試薬を用いて実験を行った。プロトコルの作成に当たっては、偏りとなり得る様々な要因（変動因）をできるだけ排除し、また排除できない場合にはそれらが特定の試料の測定値に偏って働くことのないよう配慮した。

各機関で力価検定を実施し、3種類の試薬についてそれぞれ3機関（国立機関2機関、企業1機関）での測定データを得た。データの集計に際し、得られた測定値が正規性を示すか否かを累積確率プロットにより検討したところ、全データを一括して評価した場合には正規性は否定された（データは省略した）が、各試薬について機関ごとにデータを評価したところ、大部分のデータにおいて正規性が認められた（データは省略した）。そこで、Table 1に示したように、まず各試薬について機関（A～E）単位で対数相対力価（Log RP）の平均値Mを算出し、得られた9個のMについて、測定精度に応じて重みを与えて加重平均し、全体の平均相対力価を求めた。すなわち、Mの分散の推定値Vmを求め、その逆数を重みwとして加重平均値wMを求めた。その結果、wM = -0.0189となり、その逆対数として求められる、全体の平均相対力価は0.9575と算定された。この成績より、標準品候補品の力価は16,300 EU/vialと推定された。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を16,000 EU/vialと決定した。

Table 1 Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate standard against USP Endotoxin Reference Standard

	LAL reagent/ Laboratory ^{d)}								
	Limulus ES-II			Endospey			Kinetic-QCL		
	A	B	E	A	C	E	A	D	E
M ^{a)}	0.0434	0.0782	0.0293	-0.0647	-0.0972	-0.0788	-0.0049	-0.0248	-0.0359
Ve ^{b)}	0.0001039	0.0001701	0.0003335	0.0013122	0.0005933	0.0014234	0.0001916	0.0000629	0.0001388
Vm ^{c)}	0.000044	0.0000850	0.000075	0.000116	0.000043	0.0000730	0.000198	0.000097	0.000121
w ^{d)}	22563.3	11799.7	13302.0	8642.5	23252.1	13675.4	5042.1	10350.4	8282.9
wM ^{e)}	-0.0189								
antilog wM	0.9575								

^{a)} M: mean log R.P. (n=9), R.P.: relative potency.

^{b)} Ve: error variance.

^{c)} Vm: variance of M.

^{d)} w: weight.

^{e)} wM: weighted mean of M.

^{f)} A-E: laboratories participated in the collaborative study.

結 論

今回新たに製造したエンドトキシン10000標準品候補品の力価について、USPエンドトキシン標準品Lot G-1を対照として国内5機関による共同検定を行った結果、候補品の力価は16,000 EU/vialのエンドトキシンを含有するものと認められた。この成績に基づき、本候補品を国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品（日本薬局方エンドトキシン10000標準品）（Lot 5, Control 0211）とし、その1バイアル中にエンドトキシン16,000 EUを含むものと認定した。

終わりに、本標準品の製造に御協力頂いた和光純薬工業株式会社、生化学工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) Murai, T., Nakagawa, Y., Maeda, H., Kawashima, K., Tanaka, S., Tamura, H., Tsuchiya, M., Takaoka, A., Matsukawa, M. and Horiuchi, Y. : *Iyakuhinkenkkyu*, **31**, 75-79 (2000)

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品
(日本薬局方エンドトキシン100標準品) (Control 0201)

中川ゆかり[#]・村井敏美・堀内善信^{*}

The Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences
(the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 Reference Standard) (Control 0201)

Yukari Nakagawa[#], Toshimi Murai, Yoshinobu Horiuchi^{*}

To establish the third lot (Control 0201) of the Endotoxin 100 Reference Standard of the National Institute of Health Sciences (the Japanese Pharmacopoeia Endotoxin 100 Reference Standard), a candidate standard (CS) was prepared and then evaluated. The potency of the CS was assayed against USP Endotoxin Reference Standard (Lot G-1) and defined as containing approximately 130 endotoxin units (EU) per vial by a collaborative study in which 5 laboratories participated. Based on the results, the CS was authorized to be the third lot of the Endotoxin 100 Reference Standard containing 130 EU of endotoxin per vial.

Keywords: endotoxin, reference standard

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品(日本薬局方エンドトキシン100標準品)の新ロット(第3回標準品, Control 0201)候補品を調製し, 力価設定のための共同検定を実施したので報告する。

実験材料及び方法

1. 標準品原料及び製造

国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン10000標準品(1バイアル当たりエンドトキシン2 µg, マンニトール40 mg/ml含む)をエンドトキシン試験用水で溶解し, 安定剤として新たにポリエチレングリコール及びトリエタノールアミンを添加した。希釈により最終的に0.5 ml当たりエンドトキシン14.4 ng, ポリエチレングリコール#6000 0.02 mg, グリセロール0.5 µl, トリエタノールアミン0.005 µl, マンニトール0.26 mgを含む溶液を調製した。この溶液を1バイアル当たり0.5 mlずつ無菌的に充てんして凍結乾燥し, 窒素置換して打栓したものを標準品候補品とした(生化学工業株式会社に製造を依頼した)。

2. 力価(エンドトキシン単位, EU)の検定

標準品候補品の力価は, 米国薬局方(USP)エンドトキシン標準品Lot G-1(EC-6, 10,000 EU/vial)を基準としてこれに対する相対力価を算出することにより求めた。力価の検定は, 公的機関として国立医薬品食品衛生研究所大阪支所(生物試験部)及び国立感染症研究所(安全性研究部)の2機関, 国内の主要エンドトキシン定量試薬(ライセート試薬)関係企業として生化学工業株式会社, 和光純薬工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の3社の計5機関による共同検定で行った。

3. 試薬及び測定

測定試薬のロットを統一するために, 参加各企業から1種類ずつ(計3種類)同一ロットのライセート試薬が提供された(Endospey ES-50M, lot 36M037; 生化学工業, Limulus ES-II Test Wako, lot EMM2101; 和光純薬工業, Kinetic-QCL Kit, lot 0L126A; 第一化学薬品)。測定は第十四改正日本薬局方エンドトキシン試験法に準拠し, Limulus ES-II Test Wakoはカイネティック-比濁法, Endospey ES-50M及びKinetic-QCL Kitはカイネティック-比色法により行った。

4. 検定方法

方法及び操作は, 各参加機関とも詳細を規定した同一のプロトコールに従って行った。検定方法の概略を以下に記す。

^{*}国立感染症研究所

[#]To whom correspondence should be addressed: Yukari Nakagawa; 1-1-43, Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel: 06-6941-1533 ext. 22; Fax: 06-6941-5672; E-mail: yukari@nihs.go.jp

USP標準品及び標準品候補品 (140 EU/vialと仮定) をエンドトキシン試験用水に溶解し, 前者については5,000 EU/ml, 後者については100 EU/mlの原液を調製した。なお, これらについてバイアル間でばらつきがある可能性を考慮し, USP標準品は3本分の原液を, 標準品候補品は5本分の原液をプールして用いた。このプールした原液から, 連続3日間にわたり, それぞれ3希釈系列を各日1回調製し測定を行った。企業各社は自社の測定試薬を用いて測定を行い, 国立2機関は3種類すべての試薬を用いて測定を行った。

5. 相対力価の算出

得られた測定値から, 用量反応回帰の直線性, 平行性が成立する回帰線を用いて, 平行線定量法 (生物学的製剤基準エンドトキシン試験法第二法) により, USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を算出した。得られた相対力価を対数変換したのち, 以下の統計学的処理を行った。

1機関で1試薬について行った9回 (3希釈系列×1回測定×3日間) の測定を同一条件下での9繰り返し測定とみなし, 1機関1試薬単位での対数相対力価の平均値M及びMの分散の推定値Vmを求めた。3機関×3試薬での測定で得られた9個のMにつき, 下式によりVmの逆数を重みとする加重平均値wMを求め, 全体での平均相対力価とした。

$$wM = \{\sum(M_i/V_{mi})\} / \sum(1/V_{mi})$$

結果及び考察

標準品候補品の力価を140 EU/vialと仮定し, USP標準品に対する標準品候補品の相対力価を共同検定により求めた。共同検定の実施にあたっては, 過去におけるエンドトキシン100標準品候補品の共同検定¹⁾において作成したプロトコールに準拠し, 力価検定用として選定された3種類の試薬を用いて実験を行った。プロトコールの作成にあたっては, 偏りとなり得る様々な要因 (変動因) をできるだけ排除し, また排除できない場合にはそれらが特定の試料の測定値に偏って働くことのないよう配慮した。

各機関で力価検定を実施し, 3種類の試薬についてそれぞれ3機関 (国立機関2機関, 企業1機関) での測定データを得た。データの集計に際し, 得られた測定値が正規性を示すか否かを累積確率プロットにより検討したところ, 全データを一括して評価した場合には正規性は否定されたが, 各試薬について機関ごとにデータを評価したところ, 大部分のデータにおいて正規性が認められた (データは省略した)。そこで, Table 1に示したように, まず各試薬について機関 (A~E) 単位で対数相対力価 (Log RP) の平均値Mを算出し, 得られた9個のMについて, 測定精度に応じて重みを与えて加重平均し, 全体の平均相対力価を求めた。すなわち, Mの分散の推定値Vmを求め, その逆数を重みwとして加重平均値wMを求めた。その結果, $wM = -0.0267$ となり, その逆対数として求められる, 全体の平均相対力価は0.9404

Table 1 Summary of the collaborative study for determining relative potency of the candidate standard against USP Endotoxin Reference Standard

	LAL reagent/Laboratory ⁶⁾								
	Limulus ES-II			Endospeccy			Kinetic-QCL		
	A	B	E	A	C	E	A	D	E
M ^{a)}	0.0899	-0.0280	0.0637	-0.0595	-0.1192	-0.0561	-0.0502	-0.1213	-0.0026
Ve ^{b)}	0.0000523	0.0000108	0.0000101	0.0036519	0.0015049	0.0026034	0.0000977	0.0003812	0.0001693
Vm ^{c)}	0.000092	0.0000670	0.000128	0.000355	0.000085	0.000189	0.000108	0.000185	0.000209
w ^{d)}	10874.7	14910.5	7828.1	2813.6	11796.6	5295.1	9270.9	5409.4	4779.7
wM ^{e)}	-0.0267								
antilog wM	0.9404								

^{a)} M: mean log R.P. (n=9), R.P.: relative potency.

^{b)} Ve: error variance.

^{c)} Vm: variance of M.

^{d)} w: weight.

^{e)} wM: weighted mean of M.

^{f)} A-E: laboratories participated in the collaborative study.

と算定された。この成績より、標準品候補品の力価は132 EU/vialと推定された。

以上の成績に基づき、本標準品候補品の力価を130 EU/vialと決定した。

結 論

今回新たに製造したエンドトキシン100標準品候補品の力価について、USPエンドトキシン標準品Lot G-1を対照として国内5機関による共同検定を行った結果、候補品の力価は130 EU/vialのエンドトキシンを含有するものと認められた。この成績に基づき、本候補品を国立医薬品食品衛生研究所エンドトキシン100標準品（日本

薬局方エンドトキシン100標準品）（Lot 3, Control 0201）とし、その1バイアル中にエンドトキシン130 EUを含むものと認定した。

終わりに、本標準品の製造に御協力頂いた生化学工業株式会社、和光純薬工業株式会社及び第一化学薬品株式会社の関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) Murai, T., Nakagawa, Y., Maeda, H., Kawashima, K., Tanaka, S., Tamura, H., Tsuchiya, M., Takaoka, A., Matsukawa, M. and Horiuchi, Y. : *Iyakuhinkenkyu*, **31**, 75-79 (2000)

平成13年度国立医薬品食品衛生研究所 業務報告に当たって

前所長 首藤 紘一
所長 長尾 拓

もっとも大きな出来事は、平成14年度における厚生労働省の研究機関の組織再編の一環として、国立公衆衛生院と国立感染症研究所からの3研究部の受け入れと伊豆薬用植物栽培試験場の廃止が決定され、それに関わる研究部の振り替え新設、所掌の変更、人員の再配置について平成14年4月に向けての具体的な作業が行われたことである。この結果、新しい組織は次ページのとおりである。

この再編の国立医薬品食品衛生研究所にとっての第一の特徴は食品部門の拡充である。また、医薬品の安全性にかかわる情報科学を所掌の一部とする医薬安全科学部が設置されたことも特筆すべきである。伊豆試験場の廃止が和歌山試験場の廃止に先行したが、和歌山試験場については平成16年度に計画されている大阪支所の廃止のうちに考慮されるべきであろう。

研究部の転入に伴い、約3000m²の研究棟が、仮設とはいえ立派なものが完成した。対比して従来の建物の老朽化と不効率さがさらに目立つのであるが、長らく凍結状態にあった府中への移転問題が具体化しつつある。土地問題の決着には時間を要するものと見られるが、平成14年度の重要案件となろう。

医薬品医療機器審査センターは医薬品機構とともに平成16年度をめどに独立行政法人となることとなった。本研究所の業務にも直接間接に影響がでると思われる。

各研究部の業務は以下に報告されるが、その合間を縫って、ミレニアム(薬剤反応性遺伝子解析プロジェクト)、メディカルフロンティア(蛋白質科学研究による疾病対策・創薬等推進事業)という課題プロジェクトに加え、新たに、トキシコゲノミクスプロジェクトが産官共同の指定研究として発足した。これらは課題研究としての成果が期待されるとともに、本研究所のこれからの技術基盤となるものである。多くの行政科学研究も時々刻々変化しており、その変化に追いつくためにもこのような新しい研究に関与していかねばならない。時間的人的資源の不足する中ではあるが、先端研究への関わりは本研究所の使命達成のために不可欠である。また、長期的にもこの研究所が平成16年発足予定の医薬基盤技術研究施設(仮称)と補完的に創薬とかわることが求められる。

一方、このたびの再編においてこの研究所の食品衛生分野の重みが大きくなった。多岐にわたる食品衛生の問

題には社会的な関心も高まっているが、現体制では情報分野等に欠けているところもあり、人的資源の増強と再配置が必要であろう。

平成16年の大阪支所の廃止もあと二年となり、新しい組織が有効に働くよう職員一同が努力していく時である。

総務部

部長 持田 秀男

1. 組織・定員

(1) 組織

国立試験研究機関の重点整備・再構築の一環として、平成14年4月1日付けで国立公衆衛生院より衛生薬学部及び衛生獣医学部を国立感染症研究所より食品衛生微生物部を受け入れ、伊豆薬用植物栽培試験場を廃止し、遺伝子細胞医薬部、食品衛生管理部及び医薬安全科学部が新設されることとなった。

また、ゲノム科学、たんぱく質科学等の成果を活用し、産官学の連携による画期的な医薬品や医療用具の開発につながる医薬基盤技術研究の推進が喫緊の課題となっている。これらを総合的に実施するための研究施設を平成16年度に独立行政法人として「医薬基盤技術研究施設(仮称)」を発足させることとしているが、当該研究施設全般にわたる統括・調整を行う企画調整官が新設されることとなった。

(2) 定員

平成12年度末定員は、323名であったが、組換え食品の遺伝子解析及びアレルギー性評価に係わる研究業務の強化に伴う増として1名、治験有害事象の処理体制の強化に伴う増として1名、計2名の増員が認められた。

その一方で、第10次定員削減計画に基づき3名の定員が削減されたことにより、平成13年度末定員は、指定職2名、行政職(一)49名、行政職(二)16名、専門行政職61名、研究職194名、計322名となった。

また、前述のとおりの組織再編等により、平成14年4月1日付けで国立公衆衛生院より10名、国立感染症研究所より9名、国立医療・病院管理研究所より1名、合計20名の定員の振替増及び伊豆薬用植物栽培試験場廃止に伴う場長ポスト1名の振替減が行われる。

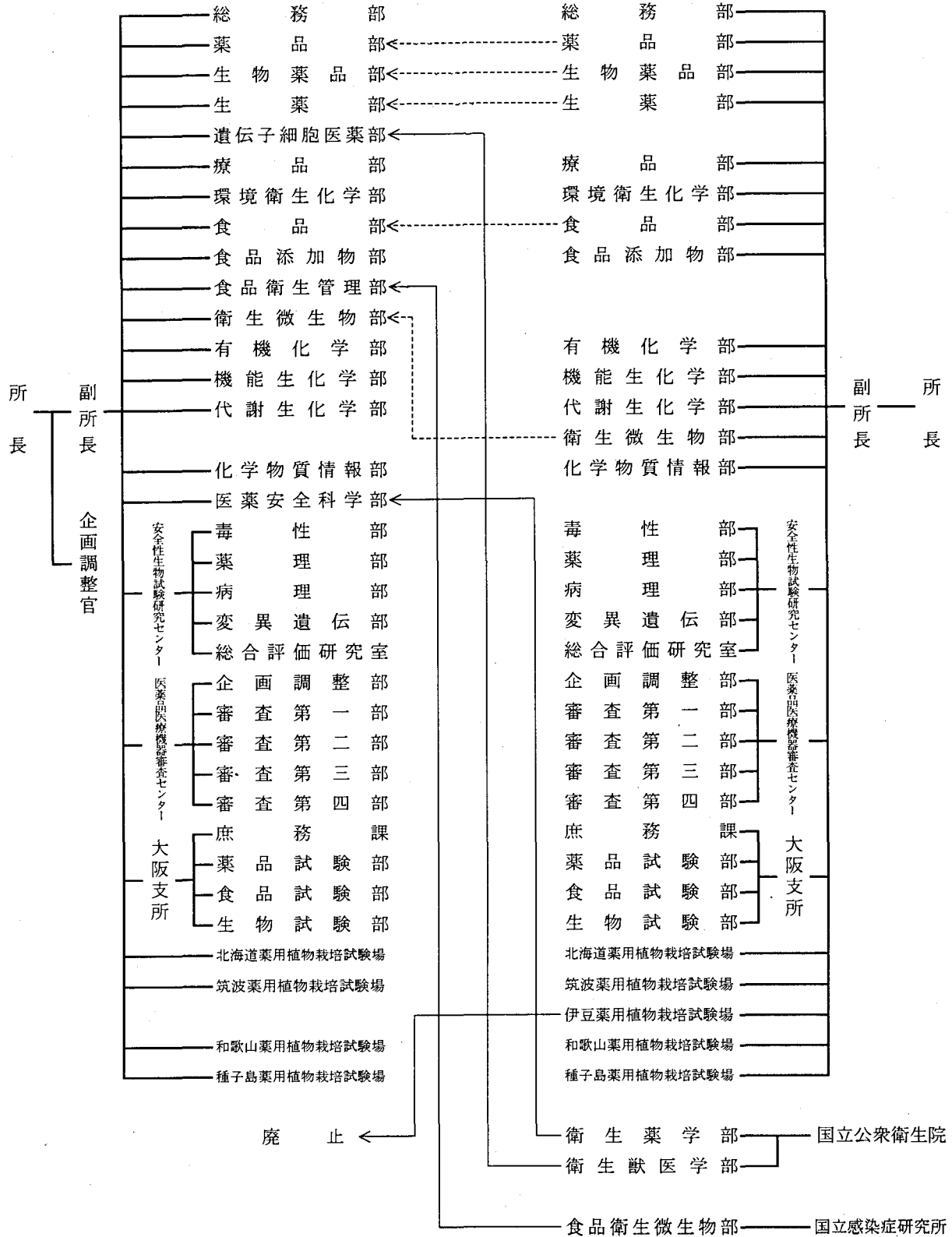
2. 人事異動

平成13年4月1日付けで三瀬勝利副所長、黒川雄二安全性生物試験研究センター長及び長田 守総務部長が退職し、同日付けで持田秀男厚生労働省医政局経済課首席流通指導官が総務部長に就任し、合田幸広食品部第三室長が生薬部長に、関田節子生薬部第二室長が筑波薬用植

国立医薬品食品衛生研究所 組織新旧対照表

新(平成14年度以降)

旧(平成13年度まで)



←----- 所掌事務の一部変更
 ←----- 廃止、振替新設

平成13年度予算額

別紙

事 項	平成12年度	平成13年度	対前年度差 引増△減額
	(A)	(B)	(B)-(A)
	(千円)	(千円)	(千円)
(組織) 厚生労働本省試験研究機関	5,233,559	6,454,854	1,221,295
(項) 厚生労働本省試験研究所	4,535,023	4,606,955	71,932
国立医薬品食品衛生研究所に必要な経費	4,535,023	4,606,955	71,932
既定定員に伴う経費	3,184,847	3,156,481	△ 28,366
増員要求に伴う経費	0	4,249	4,249
経常事務費	346,348	346,824	476
特別研究費	16,048	16,048	0
標準品製造費	42,490	42,267	△ 223
安全性生物試験研究センター運営費	184,525	183,643	△ 882
薬用植物栽培試験場運営費	97,539	95,996	△ 1,543
施設管理事務経費	102,598	106,398	3,800
受託研究費	107,546	107,546	0
乱用薬物基礎研究費	17,022	17,023	1
総合化学物質安全性研究費	118,086	118,089	3
移転調査検討費	1,415	7,068	5,653
共同利用型高額研究機器整備費	90,413	90,324	△ 89
培養生物資源保存管理基盤整備費	38,077	37,800	△ 277
研究情報活動費基盤整備費	78,343	78,342	△ 1
摘出埋植医療用具の適合性解析法研究費	44,765	44,762	△ 3
遺伝子治療薬の品質、安全性等確保のための基盤研究費	33,882	33,881	△ 1
内分泌かく乱性化学物質のリスク評価のための分子発化学物質による緊急の危害対策を支援する知識情報基盤事業	31,079	31,079	0
競争的研究事務経費	0	30,590	30,590
(項) 血清等製造および検定費	698,536	697,899	△ 637
医薬品の国家検定及び検査等に必要な経費	698,536	697,899	△ 637
一般事務経費	12,990	12,990	0
事業費	109,991	109,594	△ 397
医薬品医療機器審査センターに必要な経費	575,555	575,315	△ 240
(項) 厚生本省試験研究所施設費	0	1,150,000	1,150,000
国立衛生試験施設整備費経費	0	1,150,000	1,150,000
(移替予算)			
(組織) 厚生労働本省試験研究機関	223,690	218,928	△ 4,762
(項) 地球環境保全等試験研究費	106,662	132,236	25,574
(項) 国立機関原子力試験研究費	117,028	86,692	△ 30,336

* 予算額については両年度とも当初予算額

物栽培試験場長に昇任した。

同年7月1日には、長尾 拓東京大学大学院薬学系研究科教授を副所長に迎え、井上 達安全性生物試験研究センター毒性部長が安全性生物試験研究センター長に昇任した。

同年10月1日には、石綿 肇食品添加物部第一室長が大阪支所生物試験部長に昇任した。

同年11月30日には、宮田直樹有機化学部長が退職した。

平成14年2月1日には、谷本 剛大阪支所薬品試験部第二室長が大阪支所薬品試験部長に昇任した。

同年3月31日付けで首藤紘一所長が退職し、早川堯夫生物薬品部長及び豊田正武食品部長が定年退職となったが、早川堯夫生物薬品部長は同年4月1日付けで副所長に就任予定である。

医薬品医療機器審査センターにおいては、平成13年7月6日付けで浜田 淳企画調整部長の厚生労働省大臣官房付への配置換えに伴い、姫野孝雄内閣府参事官を企画調整部長に迎えた。

3. 予 算

(1)平成13年度予算の概要は、別紙のとおりである。

なお、平成13年度の新規事業予算としては、いわゆるケミカルハザードへ対応するため、危害事例の分析、健康危害対策に関する情報の調査研究及び情報利用のためのシステム構築等を行う「化学物質による緊急の危害対策を支援する知識情報基盤事業」の経費として、30,590千円が認められている。

その他、競争的研究に係る機関経理事務経費として、58,545千円が新たに計上された。

4. 医薬基盤技術研究施設

同施設は大阪府茨木市（国際文化公園都市：彩都）内に設置することとなり、平成13年4月から国土交通省近畿地方整備局に支出委任し、本施設に係る各種打合わせを関係者（厚生労働省、近畿地方整備局、国立感染症研究所、大阪府、当所）と頻繁に行っているところである。

平成13年度においては、施設整備費（約9億円）による設計及び土地調査を行ったところである。また、平成13年度補正予算施設整備費の一部（約48億円）が追加された。また、平成14年度予算で施設整備工事費約15億円が計上されたところである。

平成13年7月から設計を着手し、同年8月下旬から造成工事を開始、平成14年3月工事業者が決定した。

平成14年度から本施設の建物本体工事に入る予定であり、平成15年度末の完成を目指している。

5. 施設整備等の状況

平成13年度の補正予算で次の施設整備費が認められたが、(2)と(3)については、翌年度に予算を繰越し、工事

に着手することとしている。

- (1) 医薬基盤技術研究施設建設工事
（補正予算額 [改革推進公共投資施設費]
：4,809,000千円）
- (2) 種子島薬用植物栽培試験場温室設置工事
（補正予算額 [改革推進公共投資施設費]
：68,250千円）
- (3) 筑波薬用植物栽培試験場資源保存棟設置等工事
（補正予算額 [改革推進公共投資施設費]
：206,850千円）

6. 国際協力

国際交流としては、厚生行政に関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で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を行っている。

平成13年度海外派遣研究者は、110名であった。内訳は留学が6名、二国間共同研究、学会への招聘又は参加延べ59名、JICA等のプロジェクトによる外国への技術指導等に10名のほか、行政に関する国際会議等への出席が延べ34名であった。国際会議等への出席内訳は、ICH 8名、IPCS 10名、OECD 7名、FAO/WHO合同会議3名、その他7名であった。

7. 国立医薬品食品衛生研究所標準品交付の状況

現在、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75品目、色素試験用標準品38品目、計113品目（194,406千円の歳入）である。

8. 移転関係

平成13年度においても、移転に関する諸問題等について、関係機関である財務本省、関東財務局、東京都、府中市、厚生労働省との協議を進めてきた。東京都及び府中市においては、跡地利用の計画は当面はないとのことであり、当研究所のみが先行する見通しである。また、平成14年度予算で基本構想作成経費及び土地調査が予算措置されたので、区割りの決定、用途地域の変更等の手続きに着手することとなる。

薬 品 部

部長 小嶋茂雄

概 要

平成13年度には、引き続き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。また、平成11年度に開始したミレニアムプロジェクト（薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業）に関連する研究も継続して実施した。医薬品の品質規格に関する研究では、不正医薬品の簡易識別法の開発などの

研究を行った。製剤評価に関する研究では、経口固形製剤のスケールアップ、製法変更の際の生物学的同等性を確保するための研究や溶出試験の適性化に用いる溶出試験用カリブレータを開発するための研究、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。麻薬および依存性薬物に関する研究では、毛髪分析による薬物使用の鑑定法の研究などを行った。また、ミレニアムプロジェクト（薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業）に関連する研究では、薬剤反応性遺伝子の多形解析に関する研究の一環として、ターゲットとする疾病の患者における薬物動態の検討を進めている。

厚生省試験研究機関の再編が平成14年4月1日に現実のものとなった。医薬品分野では、この再編で国立公衆衛生院衛生薬学部が当所に移管されて、医薬品の安全性情報の解析評価、薬剤疫学的手法や薬物動態の解析による問題の掘り下げを業務とする「医薬安全科学部」に再編された。これまで衛生薬学部で行われてきたGMP関連の業務については、薬品部第3室で引き継ぐこととなった。一方、麻薬室が薬品部から生薬部に移管されて、麻薬関連の試験検査業務が生薬部に一元化されることになった。また、生物薬品部から「遺伝子細胞医薬部」が独立することになった。今回の再編によって、医薬品関連の部がこれまでの3部から5部に増えて、国立衛研の業務が医薬品の承認だけでなく、市販後の製造管理や安全対策にまで広がったことになる。形の上からはバランスがかなり良くなったように感じられるが、この業務の広がりに見合うだけの人員は手当てされていない。新しい業務が課せられたところに配置された人達にはその分野を積極的に開拓していくことを期待したいが、人が足りないという壁を何とかしないとこうした新しい業務も結局思うように展開できずに終わってしまうのではないかと危惧される。薬品部も、これまで規格・試験方法の検討が中心であった第3室の業務にGMP関連の業務が新しく加わることになり、医薬品の品質管理の両輪となる規格に基づく品質試験と製造管理を一元的に検討できるようになったが、そのための人員増はなく、第3室のわずか2名で新しい業務にも対応することになる。このGMP関連の業務への対応も含めて、薬品部の今後の方向について部内でも十分検討する必要があると考えられる。

人事面では、前述の機構再編と中原雄二麻薬室長の退職に伴う人事異動により、薬品部の人事配置にも大きな変化が生じた：長く麻薬室長を勤めてこられた中原雄二氏が平成14年3月31日付で退職され、後任の室長（機構の再編で麻薬室が薬品部から生薬部に移管されて生薬部第3室となったため、生薬部第3室長）には、花尻瑠理薬品部主任研究官が平成14年4月1日付で就任した。

麻薬室所属の最所和宏研究員も、麻薬室の生薬部への移管に伴い、同日付で生薬部第3室に配置換えとなった。また、鹿庭なほ子薬品部第3室長が新設された医薬安全科学部第3室長に平成14年4月1日付で配置換えとなり、その後任には檜山行雄国立公衆衛生院衛生薬学部薬品化学室長が同日付で就任した。

なお、大阪支所薬品試験部の宮崎玉樹主任研究官が、平成13年7月1日付で薬品部に配置換えとなった。また、ミレニアムプロジェクト／薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業の医薬品機構からの派遣研究員の中島由起子氏は、平成11年4月から引き続いて第1室において薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究に従事している。平成13年4月から同プロジェクトの研究のために派遣されていた加藤史江氏は同年12月付で退所した。

長期の海外出張では、平成12年7月より米国カンザス大学 Lunte 教授の下で薬物および生体分子の高感度高性能分析と体内動態特性の解析に関する研究を行っていた花尻瑠理主任研究官は、平成13年9月に帰国した。

短期の海外出張については、次のとおりである：鹿庭室長は、DIA Workshop on Drug Dissolution Testing: Current Status and Future Challenges（平成13年6月）において招待講演を行うため、英国へ出張した。また、鹿庭室長、香取主任研究官および中島派遣研究員は、6th International ISSX Meeting（平成13年10月）に参加するため、ドイツに出張した。

小嶋部長および吉岡室長は、ICH6準備会議（品質分野）（平成13年2月）に出席するため、ベルギーに出張した。

業務成績

1. 特別審査試験

新薬50件について試験した。

2. 一斉取締試験

アジマリン錠（溶出試験） 2品目

3. 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、医薬局監視指導・麻薬対策課に報告した（国産あへん15件、輸入あへん91件、合計106件）。

4. 国際協力

国際厚生事業団（JICWELS）の第17回アジア諸国薬事行政官研修（平成13年6月）および第12回必須医薬品製造管理研修（平成13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。

国際協力事業団のフィリピン薬局方プロジェクトに協力して、平成13年6～12月の6ヶ月間、フィリピン食品医薬品局の Rosario M. dela Cruz 氏および Yolanda O. Zurita の両氏を同プロジェクトの研修員として薬品部に受け入れ、薬局方制定に必要な試験技術に関する指導を

行った。

5. その他

薬事・食品衛生審議会の医薬品の承認審査ならびに再評価における審議（医薬局審査管理課，国立医薬品食品衛生研究所医薬品医療機器審査センターおよび医薬局安全対策課），日本薬局方，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（医薬局審査管理課），GMP専門分野別研修（医薬局監視指導・麻薬対策課），麻薬および乱用薬物に関する情報収集（医薬局監視指導・麻薬対策課）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、ISO/TC69国内対策委員会に参加し，国際標準規格の作成および日本工業規格（JIS）の作成に協力した。

平成12年度までの厚生科学研究により国立衛研および全国の地方衛研の間に構築された双方向ネットワーク（衛研薬事ネットワーク）を、医薬品を巡る種々の情報ならびに検査データや試験法などに関する情報の交換の場として、化学物質情報部の協力の下に維持した。地方衛生研究所が溶出試験の一斉取り締まり試験を行う際に使用する標準品59品目を用意し配布した。

研究業績

1. 医薬品の分析法に関する研究

稀少疾病（熱帯地域からの輸入感染症および輸入寄生虫症）用の未承認医薬品であるフラジール注射液およびエガテン錠の品質に関する研究を行い，国内におけるこれらの未承認医薬品の緊急供給体制を確保した（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）。

発展途上国で不正医薬品の発生事案が多い医薬品（抗生物質，合成抗菌薬，抗マalaria薬など15種類，69医薬品について，簡易識別法の開発研究を行い，WHO研修会用資料として編集・製本した（国際協力事業団／不正医薬品対策に関する研究）。

2. 日本薬局方の規格及び試験方法に関する研究

第14改正日本薬局方（日局14）に向けて化学合成医薬品各条の改正と新規収載に関する検討を行う中で提起された①紫外吸収スペクトルによる確認試験における参照スペクトル法の採用，②赤外吸収スペクトルによる確認試験における測定法の見直し，ならびに③ICHの原薬の不純物ガイドライン（Q3A）に基づいた類縁物質規格をもつ新規原薬が日本薬局方収載の俎上に上ってくる場合に備えた日本薬局方の類縁物質規格のあり方についての検討などを行った（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

経口固形製剤のスケールアップ，製法変更に関する生物学的同等性試験法を確立すべく，*in vitro*溶出試験による同等性評価法について検討を行い，難溶性医薬品で

あっても界面活性剤を添加しない条件で試験を行えば，生物学的同等性が保証し得ることを明らかとした。また，溶出試験の変動要因について検討を行い，ビーカーの形状の相違が試験結果に影響することを示した（厚生科学研究／医薬安全総合研究事業）。

溶出試験の変動要因を明らかにし制御することを目的として，試験液の脱気方法と溶存酸素量，溶出率との関連について，4研究室間で共同研究を行った。USP方式，He還流方式，大日本精機方式は溶存酸素量が低く脱気の高さが高いことが判明した。NIHS方式，FDA方式は溶存酸素量からみた場合には脱気の高さが低かった。しかし，プレドニゾン錠（USPカリプレータ）の溶出率は無脱気の試験液およびFDA方式で脱気した試験液を用いた場合に比較して，USP方式，He還流方式，大日本精機方式およびNIHS方式による脱気では低く，溶存酸素量は溶出試験液の脱気の高さの指標としては適当でないことが判明した（厚生科学研究／医薬安全総合研究事業）。

溶出試験の適性化に用いる溶出試験用カリプレータを開発し，その有用性を検討した。溶出試験用カリプレータ候補製剤ST1は，回転軸の中心線からのズレ，脱気の高さなど，溶出試験条件の正常な状態からの逸脱に対して溶出率が変化し，カリプレータとしての有用性が示された。しかし，USPのカリプレータであるプレドニゾン錠に比較して，条件の変動に対する溶出率の変動が小さく，カリプレータとしての性能はプレドニゾン錠には及ばなかった。また，局所点鼻薬の生物学的同等性の評価方法について調査を行った。局所点鼻薬では，ヒトを対象とした適切な生物学的同等性試験法が存在しないために，製剤の物理化学的特性の同等性を評価することが重要であることが明らかとなった（医薬品機構／生物学的同等性評価方法に関する研究）。

薬剤疫学的手法の一つである母集団薬物動態試験法を用いてリスクの高いサブ集団を検出する方法を確立することを目的として，同手法を用いて患者を対象とした臨床薬物動態試験を実施する上での問題点を明らかにするために，製薬会社を対象にアンケート調査を行った。患者を対象とした臨床薬物動態試験を実施する際には，データの質の確保が重要であること，データの質を確保するためには治験コーディネータが設置され，SMOと提携している病院を対象とすること，医療従事者および医薬品の開発に携わる人々の教育の重要性，採血現場におけるSOPと記入用紙などの工夫が必要であることなどが明らかになった（医薬品機構からの受託研究）。

医薬品や生活関連化学物質の環境中への排出による生体影響の可能性について，排出量に対する代謝の影響を調査し環境中濃度推定への有用性を明らかにした（環境省未来創造事業）。

4. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

ミレニアムプロジェクトにおいて、患者から採取した血液中の薬物およびその代謝物の濃度を測定するため、パクリタキセル、塩酸ゲムシタピン、カルバマゼピンについて、その代謝経路を調査し、生体試料中の分析法を確立、バリデーションを行った。また、塩酸イリノテカンおよびカルバマゼピンについては患者より得られた血漿および尿中の薬物濃度を測定し、薬物動態解析を開始した（薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業）。

5. 医薬品の物性と安定性に関する研究

デキストラン等の高分子添加剤を用いたタンパク質凍結乾燥製剤について、その安定性と密接に相関し、正確な安定性評価に活用できる分子運動性のパラメータの探索を行った。その結果、NMR緩和測定によって得られる実験系スピン-格子緩和時間 (T_1) および回転軸系スピン-格子緩和時間 ($T_{1\rho}$) が、それぞれ時間軸の異なる運動を反映し、凍結乾燥製剤の分子運動性の指標として活用できることを明らかにした（厚生科学研究/医薬安全総合研究事業）。

NMRスピン拡散によるプロトン緩和時間の平均化の現象を観察することによって、薬物と高分子添加剤からなる固体分散体の均一性を評価する方法を開発した。この方法は、従来のDSCによって測定されるガラス転移温度に基づいて均一性を評価する方法と比較して、1オーダー高い精度で固体分散体の均一性を評価できることを明らかにした。また、この方法を用いて、研究対象のニフェジピン-ポリビニルピロリドン混合系が数nmのスケールで均一に分散した固体分散体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）。

DNA-カチオン性脂質複合体のモデルとしてカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤の保存安定性について検討し、保存によるリポソームの粒子径の増大が製剤の T_g すなわち運動性と関連することを明らかにした。また、液体窒素で急速に凍結した製剤の方が粒子径の増大の速度が大きく、凍結方法によって安定性に差があることが示された（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刺激応答性ハイドロゲルは、重合開始剤を用いる従来法に比較してより均一なゲルネットワークを有することが、デキストランやポリアスパラギンなどの生分解性ポリマーを用いたハイドロゲルにおいても明らかとなった（国立機関原子力試験研究費）。

6. 麻薬および依存性薬物に関する研究

薬物中毒の頻度の高いシルデナフィルをラットに投与し、その毛髪から投与薬物および代謝物を確認した。シルデナフィル摂取患者のヒト毛髪からも、親化合物およ

びその代謝物を検出し、毛髪によるシルデナフィルの薬物中毒診断の有用性を示した。

還元反応を経由したTMS誘導体化法による11種類のベンゾジアゼピン系向精神薬のGC/MS高感度分析法を開発した。

生 物 薬 品 部

前部長 早川 堯 夫
部長 川西 徹

概 要

ポストゲノムの流れが本格化しつつある。そのような状況の中、明らかにされた遺伝子あるいはタンパク質の構造・機能解析をもとに、今後多くの新規化学合成医薬品、タンパク質性医薬品、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品、核酸医薬品、診断用医薬品等が開発されるものと予想される。さらにトランスジェニック動物/クローン動物やトランスジェニック植物を利用するなど、新しい製造方法による生物薬品の開発も活発になることが予想される。

このような新しい医薬品開発を促進させるための基盤技術開発として、当部では次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究を行い、標的細胞指向性や目的遺伝子発現調節機能を備えたベクターを迅速、簡便に構築する遺伝子導入技術を開発してきた。また新しいタイプや製法による医薬品が出現した場合に備え、その品質・安全性・有効性の評価法の開発研究も行ってきた。例えば、細胞・組織加工医薬品等に関する研究においては、各種ウイルス検出法の高感度化に成功し、今後のウイルス安全性試験への応用をめざしている。さらに、糖タンパク質の解析に関しても、質量分析法を利用した迅速、簡便、高精度、高感度な解析法の開発を進めてきている。

このように、当部では新しい時代に備えるべく準備を進めてきたが、生物薬品周辺領域の今後の発展/拡大を考えると、一つの部での対応はもはや困難となってきた。そこで、平成14年4月の所内の組織再編にあわせて、遺伝子治療用医薬品、細胞治療用医薬品および診断用医薬品に関する研究、試験業務は新設された遺伝子細胞医薬部の業務とし、生物薬品部は主としてペプチド・タンパク質性医薬品の品質に関わる研究・試験業務を担当することとなった。

新生物薬品部は組織細則上では平成10年10月1日に旧遺伝子治療薬室が創設される以前の状態からさらに診断用医薬品室を切り離した3室体制に戻るようになる。しかし、ゲノム時代の次はタンパク質の時代であることを考えれば、生物薬品の品質・安全性評価、および品質・安全性評価法の開発を主たる業務とする当部の重

要性は今後増すことはあっても、けっして減ることはないと考えられる。今後は、従来の生物薬品部の有してきたタンパク質の各種特性解析技術に加えて、高次構造解析技術、糖鎖構造解析技術およびタンパク質機能解析技術の開発に重点をおきながら、ペプチド・タンパク質性医薬品の品質評価法に関する研究をさらに推進する予定でいる。

人事面では、生物薬品部長として平成3年より11年間在任した早川堯夫は平成14年3月31日をもって定年退職し、4月1日付で副所長に採用された。平成14年4月1日付で川西徹第三室長が部長に昇任し、新見伸吾診断用医薬品室長が第二室長に異動した。また山口照英第二室長は遺伝子細胞医薬部長に昇任し、内田恵理子遺伝子治療室長、押澤正主任研究官、水口裕之研究員、技術補助員の細野哲司氏、同村岡ひとみ氏、ヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究支援者伊藤さつき氏、及び機構派遣研究員豊田淑江氏が同部に異動した。平成13年10月1日付で賃金職員の櫻井文教氏が日本公定書協会の医薬安全総合研究推進事業リサーチ・レジデントとして採用された。同じく平成13年10月1日付で鈴木琢雄氏が機構派遣研究員として採用された。平成14年3月31日付でヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究事業流動研究員日向須美子氏が退所した。また平成14年4月1日より中国から日中笹川医学研究者(中国医学研究生)として袁進氏を受け入れた。

海外出張は以下のとおりであった。早川部長および川西室長：生物薬品の品質・製法の同等性・同質性に関する専門家研究グループ会議に出席(ベルギー：平成14年2月2日～平成14年2月9日)；山口室長：細胞組織利用医薬品の品質・安全性に関する専門家研究グループ会議に出席(ベルギー：平成14年2月2日～平成14年2月9日)；水口裕之研究員：第4回アメリカ遺伝子治療学会で発表(米国：平成13年5月29日～6月5日)。

業務成績

1. 特別審査 17件
2. その他

薬事・食品衛生審議会各種部会・専門協議、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(いずれも医薬局審査管理課)、科学技術会議政策委員会/革新技術審査委員会、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
 - 1) バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発に関する研究の一環として、①キャピラリーLC/MS及びLC/MS/MSを用いた微量糖タンパク質糖鎖構造解析法を開発し、NS0細胞産生肝細胞増殖因子の糖鎖構造を

解析した。②遺伝子組換えフォリスタチンをモデルとして用い、表面プラズモン共鳴イムノアッセイによるタンパク質性医薬品の迅速定量法を開発した(HS財団創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

2) 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究の一環として、①ポリエチレンイミン(PEI)磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズを用いることによりNAT法によるウイルス検出の高感度化に成功した。PEIセファロースの利用により細胞分画からのウイルスの除去に成功した。②Gバンド解析、Competitive Genome hybridization解析、マルチカラーFISH、c-mycプローブFISHを適切に組み合わせることにより、染色体転座などの細胞特性変化を的確に解析できる手法を確立した。③細胞由来タンパク質プロファイル迅速・高感度解析法の一環として、2次元電気泳動での特定タンパク質の帰属決定にMSが有用であることを明らかにした。トロンボモジュリンをモデルタンパク質として用いて、キャピラリーLC/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピングが、細胞由来微量タンパク質の一次構造、及び糖鎖構造を含む翻訳後修飾の解析法として感度・迅速性に優れていることを確認した。④細胞・組織由来生理活性タンパク質の新規体内動態解析法を開発を目的として、FlAsH反応性タグペプチドをモデル目的タンパク質であるTNF- α 等に付加させた融合タンパク質を作製、目的タンパク質の機能に大きく影響することなくタグペプチドを付加させる方法を見出し、タグペプチドが蛍光標識に利用可能であることを確認した。⑤AC133陽性ヒト血液幹細胞より血管内皮細胞を誘導する系を確立するとともに、AC133陽性細胞から誘導されるCD31強陽性細胞が血管内皮前駆細胞であることを明らかにした。また、annexin IIIがラット小型肝細胞の有用な特性指標となる可能性を見出した(厚生労働省科学研究費補助金)。

3) 医薬品の品質規格に関わる国際動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、①細胞・組織利用医薬品の品質や安全性確保のための試験法や基準の設定、さらには規制のあり方について、CPMPのガイドラインを中心に国際動向の調査研究を行った。②遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保の基準や試験法に関する研究として、レトロウイルスベクターに混入する増殖性レトロウイルスの迅速、高感度検出法について検討した。③製造方法が変更されたバイオテクノロジー医薬品の変更前の製品との同等性/同質性に関する評価法を確立するため、欧米の現状の調査研究を行い、我が国の現状と比較、考察した。④LC/MSを用いた糖鎖マッピング及び糖ペプチドマッピングにより、類似糖タンパク質のモデルとして用いた3種類のエリスロポエチンの糖鎖構造や不均一性の違いを識別できることから、糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の同等性/同質性評価法として有用であるこ

とを示した。⑤生物薬品の統一力価試験法と標準物質の確立方策についてヒトトロポモジュリンを例として検討し、他の生物薬品等にも適用できる共通の留意事項を明らかにした（厚生労働省科学研究費補助金）。

2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

1) 多形核白血球機能の分子機構並びに各種薬剤の有害作用発現に関する研究の一環として、多形核白血球よりL-plastinを精製し、L-plastinの単クローン抗体を作製した。この単クローン抗体を用いて好中球の活性化におけるL-plastinの役割についての解析を行った。

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

1) 糖タンパク質の糖鎖合成に関わるGnT-III遺伝子は、HGFレセプターであるc-Metの糖鎖をBisect化し、c-Metの自己リン酸化反応を亢進することを明らかにした。

2) HGFシグナルの抑制に必要なガングリオシドの糖鎖構造はGM1の糖鎖構造であり、シアル酸結合数の増加により抑制効果が増強されることを明らかにした（文部科学省科学研究費補助金）。

3) 食細胞の活性酸素産生系の調節因子の解明とその機能分化についての研究の一環として、HL-60細胞の好中球分化の過程で出現するトランスフェリン陽性細胞と陰性細胞を用いた分化・増殖シグナルの解析より、好中球分化・増殖にはPI3K-PKCi-p70 S6キナーゼシグナル系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

4) タンパク質チロシンリン酸化画像化用プローブ開発をめざし、GFP類、src相同ドメイン、チロシン含有ペプチド鎖からなる各種融合タンパク質を作製し、チロシンリン酸化反応検出能を検討した（文部科学省科学研究費補助金）。

5) 種々の細胞の細胞質およびミトコンドリアに選択的にCa²⁺蛍光プローブYellow cameleonを発現させる方法を確立し、さらに汎用レーザーを用いた共焦点レーザー顕微鏡による高分解能細胞内カルシウムイオン測定法を確立した（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

6) プロモーター、ホルモン応答性配列、蛍光タンパク質遺伝子を組み合わせた計10種類のレポータープラスミドを試作し、蛍光タンパク質発現を指標にしたレポーターアッセイが核内受容体へのリガンド候補化合物の検索に利用可能であることを確認した（医薬品機構受託研究費）。

7) グルココルチコイドによるチロシンアミノトランスフェラーゼmRNAレベルの上昇がプロテアソームの阻害剤により抑制されることを明らかにした。

8) 初代培養ラット肝細胞においてEGF依存的なDNA合成の促進をアクチビンABは阻害するが、アクチビン

Bは阻害しないことを明らかにした。MRC-5細胞におけるTPA依存的なHGF産生促進をアクチビンA, AB, Bが阻害し、その阻害はHGFmRNAレベルの低下によることを明らかにした。

4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品の有用性確保に関する基礎的研究

1) 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究の一環として、①相同組換え法によってgutlessアデノウイルスベクターを作製した。②インテグリン指向性のアデノウイルスベクターを開発し、遺伝子導入効率の点で極めて優れていることを明らかにした（厚生科学研究費補助金）。

2) 癌への特異的標的化を可能とするアデノウイルスベクターシステムの開発の一環として、自殺遺伝子やサイトカイン遺伝子を用いた癌遺伝子治療応用実験に成功した（文部科学省科学研究費補助金）。

3) 外来遺伝子の発現調節を有した高効率遺伝子導入・発現系の開発の一環として、テトラサイクリンの遺伝子発現制御系を搭載したアデノウイルスベクターシステムを開発した（厚生科学研究費補助金）。

4) 低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発の一環として、マイクログリア細胞等への高効率な遺伝子導入が可能なアデノウイルスベクターを開発した（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

5. 診断用医薬品に関する基礎的研究

1) 四塩化炭素投与ラット肝疾患モデルにおいてウロキナーゼ受容体mRNAが上昇することを明らかにした（厚生労働省特別研究）。

2) 新規グルココルチコイド受容体と既知受容体をクロマトグラフィー上で分離させる条件について検討を行った。

生 薬 部

部 長 合 田 幸 広

概 要

当部では、主として生薬の規格・試験法に関する研究、生薬成分、生薬資源及び天然有機化合物に関する試験、研究、生薬薬理学的研究並びに、食薬区分に関する調査、研究を行っている。また、国際的交流として、WHO西太平洋事務局と協力し、中国、韓国、シンガポール、ベトナム、香港とWestern Pacific Regiona Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH)を設立した。さらに、JICAのプロジェクト（フィリピン薬局方制定）に関する協力を行っている。

人事面では、空席であった第二室長に、平成13年7月1日付けで川原信夫主任研究官が昇格した。また、9月

30日付けで、李宣融臨時職員が退職した（平成14年3月31日まで派遣研究員として在籍）。さらにHS財団の流動研究員として、平成13年10月1日付けで、田中理恵博士が採用された。

平成14年4月の組織再編では、麻薬、向精神薬関連の所掌が薬品部から当部に振り替えとなった。これに伴い、従来薬品部に所属していた麻薬室が生薬部第三室として移管され、花尻薬品部主任研究官が、生薬部第三室長に、最所薬品部研究員が、生薬部主任研究官に昇格した。また、所掌業務の見直しに伴い、川原第二室長が第一室長に、尾崎第一室長が第二室長に配置換えとなった。さらに、丸山卓郎博士が第一室の研究員として、城崎裕子が共同利用型機器担当の臨時職員として採用された。

海外出張は、以下のとおりであった。合田幸広：生薬の規格並びに規制方法の調和に関するワーキンググループ会議（ソウル，大韓民国，平成13年11月26日～12月1日），生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会（the Western Pacific Regional Forum on Harmonization of Herbal Medicine, FHH）設立準備会議（北京，中国，平成14年3月6日～11日）。

所外研究員等としては、昨年に引き続き、下村裕子東京薬科大学名誉教授を客員研究員として受け入れた。なお、下村裕子博士は、平成13年11月3日、勲四等宝冠賞を受賞された。

業務実績

1. アリストロキア酸混入の恐れのある生薬（サイシン、ポウイ、モクツウ、モッコウ）を含有する生薬製剤並びに生薬類（48品目）についてアリストロキア酸の分析試験を行い、結果について医薬局監視指導・麻薬対策課に報告した。
2. 無承認無許可医薬品に関する買い上げ調査を行い、各都道府県より収去された試料123検体についてシロシン、シロシピン、メスカリン、GHB、GBL、BD、AMT及びエフェドリンの分析試験を行い、結果について医薬局監視指導・麻薬対策課に報告した。
3. 国立医薬品食品衛生研究所標準品ギンセノシドRb1、Rg1について純度試験を行った。
4. 鑑定用麻薬サイロシンおよびサイロシピンを標準品として製造した。
5. 生薬の国際調和のための国際会議に出席し、中国、韓国、ベトナム、シンガポール、香港、日本の5カ国6地区からなる生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会（FHH）を設立した。
6. 医薬局監視指導・麻薬対策課より依頼のあった90品目について、食薬区分を目的として文献調査を行った。
7. 薬事・食品衛生審議会の部会、調査会、委員会の委員等として日本薬局方の改訂作業、動物用医薬品の承認審査、新開発食品の評価等に協力した。また、農林物資

規格調査会の専門員として、JAS規格の改正作業に従事するとともに、JAS分析試験ハンドブックの改訂作業に協力した。

8. 厚生労働省の共同利用型大型機器の運用、更新、選定等に協力した。

研究業績

1. 第14改正日本薬局方第一追補に新規収載予定生薬15種のうち、ビワヨウについて確認試験法の検討を行い、指標成分の分離・同定並びに逆相TLCを用いた新規確認試験を設定した。同時に本生薬の成分検索を行い、1種の新規化合物を含む数種のflavonoid配糖体を単離し、その構造を決定した。また、新規収載予定生薬15種の各種試験法について検討した。（医薬局審査管理課に報告）
2. 骨代謝を制御する骨芽細胞分化促進因子及び破骨細胞形成因子の遺伝子発現変動をモニターするバイオアッセイにおいて活性を示したブラジル産薬用植物 *Cannna angustifolia* の成分検索を行い、数種のkaurane型diterpenoidを誘導体を単離しその構造を決定した。またペルー産薬用植物 *Gentianella nitida* の成分検索を行い、1種の新規化合物を含む数種のiridoid配糖体並びに1種の新規sesquiterpenoid誘導体を単離し、その構造を決定した。
3. 薬用植物栽培・品質評価指針（part 10）収載生薬（アミガサユリ、ウスバサイシン、ウツボグサ、オオバコ、カンゾウ、テンダイウヤク、ヒナタイノコズチ）の調査を行い、指針原案を作成した。また、既収載8品目（オオカラスウリ、クマコケモモ、コガネバナ、センブリ、ブクリョウ、ボタン、ムラサキ、モッコウ）については指針に基づいた確認栽培試験を行い、栽培法の検証を行った。（厚生科学研究・厚生科学特別研究事業）
4. 生薬の滅菌法の一つとして、放射線照射滅菌の有効性・安全性の検討を行い、照射前後で変化の認められたオウバク多糖に関して、構成糖のグルコース比が低下することや照射により多糖を構成する糖の一部が切断されることを明らかにした。（原子力試験研究）
5. 臨床で炎症の治療に用いられている漢方薬で既にその効能、効果の評価として顕著な抗炎症作用を示した桔梗湯の薬理作用発現機序、さらに、その構成生薬の甘草と桔梗に含まれる成分の相互作用について検討するために、桔梗の含有成分の桔梗サポニンとイヌリンを桔梗熱水抽出エキスからブタノール分画、さらに、アセトン沈殿により分離し桔梗粗サポニンとイヌリンを得た。
6. 幻覚性キノコ（いわゆるマジックマッシュルーム）の成分であるサイロシンおよびサイロシピンの大量合成法を確立した。また、シロシン及びシロシピンを含む幻覚性キノコの鑑定法に関して検討を行った（厚生科学研究・医薬安全総合研究事業）

7. 合成的手法とCDを組み合わせてフィリピン生薬 Sambong から得られた新規ジテルペンの立体構造を決定した。(特別研究)
8. 新機能素材の抗高脂血作用解明のための研究として、サトイモをとりあげ、活性成分として monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) 及び, digalactosyl diacylglycerol (DGDG) を単離した。さらに、構造確定のため、各種脂肪酸側鎖をもつ MGDG の合成並びに DGDG の合成検討を行った。(創薬等 HS 総合研究事業)
9. 遺伝子組換え食品の検知技術開発のための基礎的研究として、市販のダイズ加工品を用い、DNA を抽出し、加工により遺伝子がどの程度断片化するか検討した。さらに、実際に GM ダイズ含量既知のダイズ製品を調製し、加工により GM 比率が変化するかどうか検討した。(厚生科学研究・ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
10. 理化学試験用標準生薬の可能性を検討する目的で、モクツウ、センキュウ、ジオウ等について産地の異なる数ロットの形態、TLC、HPLC の結果等を比較した。
11. 一般用医薬品として「一般用漢方処方の手引き」に示された 210 の処方の見直しについて検討するため、協力医療機関における直近 2 年間に処方された漢方処方について整理分類等を行い、今後必要とされる漢方処方を調査した。(厚生科学研究・医薬安全総合研究事業)
12. 世界各地より種子導入した大麻 (*Cannabis sativa*) の細胞核 DNA 量をフローサイトメーターを利用して測定し、大麻の形態形質と DNA 量の変異が関連していることを明らかにした。さらに DNA 量から形態形質に関する予測について検討した。

遺伝子細胞医薬部

部長 山口 照 英

概 要

ポストゲノムを迎えて、プロテオミックスやトラスレーショナルリサーチに基づくテーラーメイド医療、あるいは新たなバイオ医薬品創製を目指した活発な医薬品開発が急テンポで行われようとしている。さらには、21世紀の画期的な先端医療として遺伝子治療、細胞治療、再生医療等の研究・開発が急速な進展を見せている。これらの先端医療に用いられる遺伝子治療薬、細胞・組織利用医薬品等の品質、有効性、安全性等を確保し、本格的な実用化を推進するためには国レベルでの試験研究体制の整備が必要とされるようになった。また、遺伝子技術の進歩によりテーラーメイド医療のための遺伝子診断薬の開発もめざましい進展を見せている。このようなわが国における遺伝子治療薬、細胞・組織利用医薬品、診断薬等の開発や実用化のための品質、安全性面での基盤

を確立することを目的として、本年4月に組織再編に伴い生物薬品部を主な母体として遺伝子細胞医薬部の振替新設が認められた。

遺伝子細胞医薬部は、3室から構成され、第1室は生物薬品部の遺伝子治療薬研究室が当てられた。第2室は、大阪支所生物試験部第2室の振り替え新設により、細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性等の確保に関する研究を行う室として設置が認められた。第3室は、生物薬品部、診断用医薬品室が当てられた。さらに、細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性等の確保に関する研究体制の強化のために、平成14年度10月から第2室に主任研究官の増員が認められた。

ミレニアムプロジェクトのヒトゲノム・再生医療のプロジェクトとして次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究及び細胞・組織加工医薬品・医療用具に関する品質確保に関する研究を開始して2年が経過したが、順調な成果が得られている。前者の研究においては、高効率・高発現可能な細胞指向性のある発現ベクターや発現制御可能なベクターの開発が進んでいる。また、後者の研究プロジェクトに関しては、NAT法を用いたウイルス検出の高感度化技術をほぼ確立することができた。

現在までに遺伝子治療臨床研究は11プロトコール、30名以上に実施されているほか、平成13年度には7件の新規申請が提出されるなど、遺伝子治療分野はさらに急速な展開をみせている。ここに来て、遺伝子治療が研究の段階から実用化の段階に入ってきたといえるようになった。一方、細胞・組織加工医薬品としては、現在まで4件の確認申請が出されており、さらに一件の承認申請が出され、順調に進めばここ1-2年で我が国に初の細胞治療薬の承認がでる可能性がある。このように遺伝子治療薬や細胞・組織利用医薬品の実用化に向けてさまざまな臨床研究や企業活動が大きく展開されている状況にあって、その品質や安全性等をどのように確保していくかについて最新の科学的根拠に基づいた施策が求められている。また、ここ数年のうちに実用化されてくるであろう遺伝子診断等についても同様に最新の科学的根拠に基づいた施策が求められている。国研として、このような革新的医療に用いる医薬品の品質管理や安全性確保のためにさまざまな基礎的研究を行うとともに国際協力等を通じて、行政に科学的根拠の提供していくことが求められている。

遺伝子細胞医薬部の役割としては、このような急速に進展している遺伝子治療薬や細胞・組織利用医薬品等の開発を巡る状況に適切に対応していくために、これらの先端医薬品の品質や安全性に関わる評価技術に関する研究を積極的に推進していく必要があるのは当然であるが、このような複合的な先端医療の評価には幅広い観点からの基礎研究を展開していくことも重要である。さら

には、革新的な遺伝子治療薬用ベクターの開発など先導的な研究を行うことにより、より有用性の高い治療薬のシーズを提供していくことも重要な役割であろう。

人事面に関しては、第1室の室長として、生物薬品部内田恵理子遺伝子治療薬研究室長が異動となられ、水口裕之研究員が生物薬品部より異動になられた。また、川端健二研究員が本年4月1日より第1室の研究員として採用された。第2室長には、国立公衆衛生院から宮澤宏室長が着任された。また、代謝生化学部の佐藤陽治研究員が主任研究官として昇格されるとともに遺伝子細胞医薬部に異動となられた。第3室長として変異遺伝部の鈴木孝昌主任研究官が昇格された。また、押澤正主任研究官が生物薬品部から異動になられた。生物薬品部非常勤職員の細野哲司氏と村岡ひとみ氏が異動になられた。さらに、ヒューマンサイエンス振興財団ヒトゲノム・再生医療等研究事業研究支援者伊藤さつき氏、及び機構派遣研究員豊田淑江氏、日本公定書協会の医薬安全総合研究推進事業リサーチレジデント櫻井文教氏が生物薬品部から遺伝子細胞医薬部に異動になられた。

療 品 部

部 長 土 屋 利 江

概 要

平成13年度は、Tissue Engineering 領域の国際的標準化に向けた活動がにわかに具体的に動き出した年であった。2001年9月キャンベラで開かれたISO/TC150インプラント技術委員会でTissue Engineered Implants がWG11としてとり上げられた。リーダーは、オーストラリア人である。その半年後の2002年3月には、ベルリンで開催されたISO/TC194 医療用具の生物学的評価の技術委員会でもWG15のTask ForceとしてTissue Engineeringをとり上げ、オランダ人がリーダーとなった。各個別医療用具の他の技術委員会でも関心を示していることから、ISOの世界で幅広く議論される可能性がでてきた。グローバルハーモナイゼーションの動きの中で、先端的な医療用具の扱いをどのように進めるのか、現在、日欧米の規制環境、ガイドライン等について、調査する作業がはじまっている。わが国でも、細胞・組織を利用したtissue engineering の今後の急速な進歩・普及に対応すべく、医薬安全総合研究事業で、細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究班が組織された。大学・産業界を中心にした開発競争が繰り広げられる中で、細胞・組織利用医療用具の安全性と標準化といった基盤研究の充実の必要性が国内外で話題になった年である。

当部の主要研究業務である医療用具および家庭用品の

安全性を中心にした研究に加えて、平成12年度より、スタートしたヒトゲノム・再生医療研究事業が2年目を迎え、安全性に加えて、一定レベルの品質を確保できるための定量的な指標が、各製品で欠如していることから、この方面の評価手法を更に進展させる必要がある。

人事面では、平成13年6月1日付けで、松岡厚子主任研究官が変異遺伝部から療品部へ異動した。長年培われた細胞遺伝学技術を医療用具、細胞・組織利用医療用具の異分野で更に進展すべきである。2002年1月から6か月の予定で、日本学術振興会スウェーデン派遣研究者としてStockholm UniversityのWallenberg Laboratoryへ出張し、医療用具由来オリゴマーでしばしば誘発する「染色体異数性誘発機構に関する研究」に着手している。「1999年1月より科学技術特別研究員として採用され、当部の研究に貢献した市川明博士は、「遺伝子組込型人工臓器の安全性・有効性評価に関する研究」を2001年10月31日付けで終了し、京都繊維工芸大学助手に採用された。1999年4月よりHS流動研究員として活躍されていた朴正雄博士は、2001年10月1日付けで医薬安全研究事業リサーチレジデントとして採用され、「医療用具の有効性・安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究」を新たに開始した。1999年12月24日付けでSTAフェローとして採用されたMd. Shahidur Rahman博士は、「Studies on the development of useful and safety tissue engineered artificial organ for xeno- and allo-transplantation」の研究について2年間の任務を終え、2001年12月25日付けでHS流動研究員に採用され「生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究」を新たに開始し、ヒト軟骨細胞の培養用3次元担体や分化促進因子に関する研究に従事している。2001年10月1日付けでYasmin Banu博士は、HS流動研究員として採用され、「生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究」を開始し、免疫隔離膜の評価手法に関する研究に主に従事している。2001年11月1日付けでAhmed Saifuddin博士は、医薬安全研究事業リサーチレジデントとして採用され、「医療用具有害事象に相関する遺伝子多型の同定に関する基礎研究」を開始した。医療用具不具合因子について、新たな視点からその本質に迫る研究をスタートさせた。2001年10月1日付けで楊軍博士は日本学術振興会外国人特別研究員に採用され「各種遺伝子導入による肝細胞のスーパー化と体内埋め込み人工肝臓の開発」研究を開始している。平成13年6月から客員研究員として10ヶ月間在籍した西谷孝子博士は、「各種人工血管材料によるフローシステムでの血小板活性化反応」について研究した。矢上健研究官は、科学技術庁長期在外研究員として平成12年7月15日より、米国ノースイースタン大学生物学部のJames M. Manning教授と「胎児型ヘモグロビンと

成人型ヘモグロビンの間に生理学的な特性の差異を与える分子メカニズムの解明に関する研究」を1年6ヶ月行い帰国した。これまでの研究を礎にして、平成14年から新規にスタートした萌芽的先端医療技術促進事業「ナノレベルイメージングによる分子の機能および構造解析」で医療材料学分野に新たな切り口を開くことを期待する。

業務成績

1. 家庭用品関係

家庭用品に関わる毒性試験計画の一環として、(1)計画の策定、(2)分析法の作成、(3)試験物質の純度検定及び安定性試験、(4)細胞毒性試験を担当した。平成13年度の分析法設定、細胞毒性試験品目は以下の通りであった。

分析法作成：抗菌剤のN,N'-hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide(HMBCDPB), zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)(ZPT)。

細胞毒性試験：防カビ剤の4-chloro-3-methylphenol(PCMC), 4-chloro-3,5-dimethylphenol(PCMX), chloroacetamide(CAA), スコーチ防止剤のN-(cyclohexylthio)phthalimide(CTP)。

「平成13年度家庭用品に係る健康被害病院モニター報告」に関して、皮膚科モニター病院連絡会、小児科モニター病院連絡会、吸入事故等分科会に参画し、報告結果の検討、原案の作成・とりまとめ等に携わった。また、「家庭用カビ取り・防カビ剤安全確保マニュアル作成の手引き」に関して、検討会に参画し、関連資料の調査、原案の作成・とりまとめ等に携わった。

2. 国際調和、国際基準

医療用具関係国際標準化機構技術委員会への参加：

ISO/TC150「インプラント」年次総会 (Canberra, 2001.9, 土屋)

ISO/TC194「医療用具の生物学的評価」年次総会 (Berlin, 2002.3, 土屋)

スペインでの透析器による50名死亡事故の教訓から、医療用具のすべての生物学的評価基準にリスクマネジメントを導入する方向付けが決定された。ISO10993が単なる試験法の基準ではなく、生物学的リスクを評価し管理するために必要な手順とそのための試験系に位置付けた点で大きな転換である。

2. 細胞・組織利用医療用具関係

以下の国内外の会議に出席した。

国際：ISO/TC150 WG11「Tissue Engineered Implants」設立 (Canberra, 2001.9, 土屋) ISO/TC194 WG15 TF「Tissue Engineering」(Berlin, 2002.3, 土屋)

国内：厚生科学研究(医薬安全総合研究事業 主任研究者 桜井靖久 東京女子医科大学名誉教授)細胞・組織利用医療用具評価手法に関する研究班会議(班長：岡野光夫 東京女子医科大学 先端生命医学研究所長)国

内外の細胞・組織利用医療用具技術の現状把握と、日米欧における規制、ガイドライン等について比較検討した。

3. 医療用具関係国内基準改訂等

医療用具及び医療材料の基礎的生物学的試験ガイドライン改訂版作成検討会を平成14年2月19日と同5月22日の2回開催した。生物安全ガイドラインのpart 1に相当する部分を生物安全評価の基本的考え方について記載した文書とし、part 2以降の各試験法と分けることを提案し、了承された。この提案は、各試験法について適宜改正しやすくするためである。改正作業を進める事務的な手続きについて、医薬安全局審査管理課で検討することとなった。医療用具GLPについても現在検討中である。(班長 土屋)

ISO/TC194国内委員会(土屋)、ISO/TC150国内委員会(佐藤)、バイオマテリアル学会標準化委員会(伊佐間)日本工業標準調査会(JIS関連)医療用具技術専門委員会(土屋)等の各種委員会に出席した。医療用具、細胞組織医療用具の薬事・食品衛生審議会の専門協議、各部会、小委員会などに協力した。

研究業務

I. 医用材料などの安全性・生体適合性に関する研究

I-1. 血液接触型プラスチック製医療用具からの可塑性の溶出評価に関する研究

実際の使用条件に近似させた方法により、日本で使用されている主な血液透析回路および人工心肺回路からのフタル酸エステル溶出実験を行い、時間平均曝露量の評価を行った(厚生科学研究費)。

I-2. 天然由来医用材料のエンドトキシン汚染と不活化に関する研究

種々の温和な化学処理によるエンドトキシンの活性変化を検討した結果、酸性電解水処理を初めとした幾つかの処理法が天然医用材料に混入するエンドトキシンの不活化に応用できる可能性を見出した(厚生科学研究費)。

I-3. 医用材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究

試験溶液の動物への投与法の検討と有用な指標の探索を行った。マウスにタンパクアレルゲンOVAをアジュバントとともに腹腔内投与すると、血清総IgE抗体濃度が増加した。アジュバントなしでは対照群と差はなかった。脾臓重量並びに脾臓リンパ球のCon A刺激によるサイトカイン産生に変化はないが、OVA刺激によるIL-4産生はOVA濃度と投与回数に依存して増加した(厚生科学研究費)。

I-4. 放射線照射をうけた天然医療材料の組織再生に及ぼす影響評価に関する研究

天然医用材料に混入するエンドトキシンをガンマ線照射により不活化する条件を検索するため、リムルス活性およびヒト細胞に対するサイトカイン産生誘導能を指標として、種々の照射条件下におけるエンドトキシンの活

性変化を精製エンドトキシンレベルおよび菌体レベルで追跡した。また、コラーゲン膜上で培養した骨芽細胞の増殖及び分化の測定法について検討した（原子力研究費）。

I-5. 金属酸化微粒子の生体適合性評価に関する研究

酸化チタンは、アナターゼ型およびルチル型ともに軟骨分化・増殖阻害作用は弱く、酸化ジルコニウムでは、更にその作用は弱いことが明らかになった（科学技術振興調整費）。

I-6. 医療用具・医療材料の有効性・安全性評価に関する研究

生分解性材料の微細粉をラット皮下に埋植した結果、埋植量に応じて、著しい浮腫反応が観察された。整形インプラントの力学的強度を3通りの手法を用いて評価した（厚生科学研究費）。

I-7. 発生毒性物質の *in vitro* 試験に関する研究

超分子フラーレン誘導体は、ヒト軟骨細胞の増殖に影響を与えない濃度において分化を抑制した。

I-8. 遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究：金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価

各種金属イオンについて、正常ヒト骨芽細胞における増殖阻害強度及び分化阻害強度を明らかにした。さらに、正常ヒト骨芽細胞の増殖及び分化を指標として、歯科鑄造用金銀パラジウム合金の毒性評価を行った（特別研究費）。

II. バイオ人工臓器に関する基礎的研究

II-1. QOLを指向した生体融和材料の新創出に関する研究

種々の医用材料からなる粒子状物質が細胞の恒常性維持に必要な機能である細胞間連絡機能と骨分化とに与える影響を正常ヒト骨芽細胞を用いて *in vitro* で調べた。その結果、ハイドロキシアパタイトからなる微粒子が両機能を促進すること、分化とともにコネキシン43が発現していくことが認められ、材料の細胞間連絡機能に与える影響と骨芽細胞の分化への影響との関連を示すことができた（科学技術振興調整費）。

II-2. 自己化を獲得する機能組織の再生技術

チロシンリン酸化によるギャップ機能阻害を受けない変異型CX43遺伝子を導入した細胞株を樹立し、ポリウレタン構成成分のギャップ結合機能影響を評価した。CX43高発現細胞でギャップ機能阻害抑制効果を確認した。変異型CX43では、強い抑制効果を示した。また、発癌剤である3-MCによる形質転換試験でもギャップ機能阻害抑制効果と同様に、形質転換を顕著に抑制することを初めて明らかにした（医薬品機構基礎研究プロジェクト）。

II-3. 生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開

発に関する研究

多糖類含有培地で、動的条件下でヒト軟骨細胞をコラーゲンハニカム3D構造体で培養すると、軟骨分化レベルおよび圧縮弾性率が著しく向上した。ヒト皮膚細胞でギャップ結合機能を特異的に亢進あるいは抑制する3種の新規多糖類を見出した（HS受託研究費）。

II-4. 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

軟骨分化および機能維持にどのようにコネキシン遺伝子が関与するのか検討するために、マウス軟骨前駆細胞にCX43遺伝子を導入し、インシュリンによる軟骨分化誘導に対する反応性を検討した（科学技術振興調整費）。

III. 細胞・組織加工医療用具の品質等の確保・評価技術の開発に関する研究

III-1. 組織加工医療用具とウイルス感染動態に関する研究

コラーゲンハニカムをスキャホールドとするバイオ皮膚モデルで、感染細胞の動態及びHIV-1の検出に応用できた。低分子量生分解性ポリマーは、種類によりHIV-1の増殖に影響することが明らかになった（厚生科学研究費）。

III-2. 組織加工医療用具に起因する免疫反応解析と評価に関する研究

免疫隔離膜に異系免疫担当器官を封入し、レシピエントの腹腔内に長期間埋入し、レシピエント側の血液学的検査を詳細に検討した（厚生科学研究費）。

III-3. 組織加工医療用具適用時の癌化予測のための評価技術の開発に関する研究

ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 (hTERT) プロモーター領域の様々な断片長のルシフェラーゼコンストラクトを複数種のヒト癌細胞にトランスフェクションした。癌細胞には、250塩基からなるコアプロモーター領域があることを明らかにした。正常細胞では、プロモーター活性は検出されなかった（厚生科学研究費）。

III-4. 幹細胞や前駆細胞分化誘導系を用いたハイブリッド型再生組織および器官の品質確保技術と評価法に関する研究

種々の生分解性オリゴマーについて比較した結果、ラットおよびヒト細胞間では、軟骨分化や細胞増殖に及ぼす影響が著しく異なることが明らかになった。ヒト肝細胞株は、ある種の多糖類の存在下、動的培養を行うと増殖の亢進作用が認められ、NH₃濃度を一定レベル以下に保持し、肝機能改善が観察された（厚生科学研究費）。

IV. 微生物および微生物由来物質に関する研究

IV-1. リムルス試験の分析法バリデーションに関する研究

カイネティック比色法リムルス試験の分析精度は、実際に繰り返し測定を行うことなく、測定装置のノイズの

SD, ピペット誤差および検量線データ(試薬反応性)から予測できることを明らかにした(厚生科学研究費)。

V. 医療用具の滅菌バリデーションにおけるバイオペーデン菌抵抗性の変動要因の究明

医療用具に使用される素材としては各種高分子, ステンレススチールなどの金属類がある。滅菌バリデーションで使用される生物指標菌は濾紙あるいはポリスチレン担体に塗布された物であるが, 製品汚染菌であるバイオペーデン菌が付着する素材は濾紙あるいはポリスチレンに限定されていない。素材の違いに拠ってバイオペーデン菌の抵抗が異なるか否かについて検討し, ステンレススチール担体の場合の菌の抵抗が一番高く, 高分子では親水性ほど低くなる傾向が見られた。またある素材では滅菌で菌生育阻害物質が見られたため, 抵抗値は低くなった。素材と菌抵抗値との関係について更に因果関係を研究する。

VI. インプラント用具の適合性解析法開発に関する研究

VI-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)。

VI-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

埋植心臓弁, 及びステントの登録システムの作成, 眼内レンズ摘出事例のデータベースの維持を各学会・医療機関に依頼して行った(経常研究費)。

VI-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, 摘出眼内レンズの物理化学的分析, レンズ表面, 及び周辺組織の病理分析を行い, 試料収集法, 標準的分析法をほぼ確立した(経常研究費)。

VI-4. 医療用具の不具合報告データベースに関する研究

米国の膨大な不具合報告データの検索を容易にするために, 一部の用具分類別の検索システムを構築すると共に, 細分類別の統計解析を行った(経常研究費)。

VI-5. 整形外科インプラントの不具合データに関する研究

過去数年間の人工股・膝関節の国内文献収集を行なうと共に, 日本整形外科学会のアンケートの解析, 米国の整形外科用具不具合データの集計解析を行った(厚生科学研究費)。

VI-6. 医療用具有害事象に相関する遺伝子多型の同定に関する基礎研究

医療用具の不具合と関連する異物反応高誘発群, 低誘発群のマウス2系統に生分解性材料を1ヶ月間皮下に埋植した。2系統マウスでのインプラント周囲組織の細胞の形態的性状, 生化学的性状を調べた結果, 不具合反応と関連するサイトカイン産生量に差異が認められた(厚

生科学研究)。

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している「接触アレルゲン解説書」において, 家庭用品関連化合物のうち, ゴム添加剤, 染料・着色剤・抗菌剤・防カビ剤, 消臭剤等について, 日本における接触皮膚炎の発生状況, 原因究明の取り組み, 原因製品における表示などの実態について情報収集を進め, 日本語版, 英語版の作成・改定準備を引き続いて行った(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について, 市場調査を行い, データベース化した。特に, 失禁ケア製品における抗菌加工・消臭加工について, 加工剤の種類, 成分名等に関する製品表示, 化学物質等安全データシートの内容を調査した(移替予算)。

VII-3. インターネットを利用した家庭用品の安全性及び事故事例情報の収集提供に関する研究

NIHS家庭用品のホームページにおける全国衛生化学技術協議会家庭用品部門の活動内容の更新及び家庭用品試験品目の追加を行った。また, リンクの更新を行った(移替予算)。

VIII. 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

プラスチック製眼鏡フレームの先セルによる接触皮膚炎事例において, ベリノン系油性染料のC.I. Solvent Orange 60, C.I. Solvent Red 179ともにアレルギー性物質で, 原因化学物質となっていたこと, さらにC.I. Solvent Orange 60感作患者はC.I. Solvent Red 179に交差感作性を示したが, C.I. Solvent Red 179感作患者はC.I. Solvent Orange 60に交差感作性を示さなかったことを明らかにした(移替予算)。

イヤホンゴムリングによる接触皮膚炎事例において, ゴム老化防止剤の*N*-isopropyl-*N'*-phenyl-*p*-phenylenediamineが原因化学物質となっていたことを明らかにした。また, その改良品の開発について, 継続して取り組んでいる。ネオプレン(ポリクロロプレン)製の釣り用タイツによる接触皮膚炎事例において, チオウレア系ゴム加硫促進剤のdiethylthioureaが原因化学物質となっていたことを明らかにした(移替予算)。

革製サンダルによる接触皮膚炎事例において, なめし剤由来のクロムだけでなく, 接着剤成分の*p*-tert-butylphenol formaldehyde resinが原因化学物質となっていたことを明らかにした(移替予算)。

IX. 家庭用品に含まれる化学物質の呼吸器系暴露に係わ

る安全性に関する研究

IX-1. 家庭用品による家庭内空気の汚染に関する研究

寝具類について、製品表示の調査、メーカーへの問い合わせ等により、そばがら・ヒノキチップ・備長炭等の天然系素材、ポリエチレン、ポリエステル、ウレタンフォーム等のプラスチック系素材が主に使用されていることを明らかにした(移替予算)。

IX-2. 室内空気物質のアレルギー反応に及ぼす影響に関する研究

ホルムアルデヒド及びパラジクロロベンゼンのタンパクアレルギー反応に及ぼす影響を見るため、効率的な動物への感作方法を検討し、同時に *in vitro* サイトカイン産生に及ぼす影響を検討するための試験条件の設定を行った(厚生科学研究費)。

X. 家庭用品に含まれる化学物質の分析化学的研究

抗菌剤 *N,N'*-hexamethylene-bis(4-carbamoyl-1-decylpyridium bromide) 及び zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) の分析法を策定し、市販塗料並びにシャンプーへ適用した(移替予算)。ホルムアルデヒド公定法の改定の準備として、標準液を用いてアセチルアセトン法での吸光度と濃度の関係を調べた(移替予算)。

XI. 家庭用品中の化学物質の細胞毒性に関する研究

ニュートラルレッド法を用いて検討した結果、防かび剤3種、4-chloro-3-methylphenol, 4-chloro-3,5-dimethylphenol 及び chloroacetamide は中程度の細胞毒性強度、ゴムスコーチ剤 *N*-(cyclohexyl)thiophthalimide は強い細胞毒性強度をもつことがわかった(移替予算)。

環境衛生化学部

部長 安藤 正典

概 要

平成14年3月に松村年朗室長が定年退官した。4月に環境衛生化学部第3室塩岡伸光主任研究官が同部第1室長に昇格した。第2室内野 正研究員が主任研究官に昇格した。第1室研究員として大野彰子氏が入所した。また、千葉大学講師内山茂久氏を室内空気中アルデヒドに関わる問題に従事するため協力研究員として受け入れた。

前年度に引き続き経気道暴露媒体としての室内空気、食品を除く経口としての水道水及び経皮の暴露としての化粧品・医薬部外品などの媒体特有の経路からの生活関連化学物質の安全性評価を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た。

他機関とのプロジェクト研究は、文部科学省科学技術振興調整費による「皮膚を守る総合研究」、文部科学省革新的技術開発研究費による「DNAチップを用いた環

境汚染化学物質に関連する疾病の遺伝子多型の検索とリスクアセスメントにおける不確実性の理論的検証研究」、及び厚生科学研究「化学物質過敏症等室内空気中化学物質に係わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究」等について大学や地方衛生研究所等の協力を得て主催した。

室内空気に係わる課題では、文部科学省革新的技術開発研究費「DNAチップを用いた環境汚染化学物質に関連する疾病の遺伝子多型の検索とリスクアセスメントにおける不確実性の理論的検証研究」では、室内環境に係わるアレルギー疾患の発症メカニズム解決のため遺伝子多型とアレルゲンと発症の関係について研究を着手した。厚生科学研究「化学物質過敏症等室内空気中化学物質に係わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究」において、国民の関心が高い室内空気質のガイドラインの設定のため、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との研究組織と内容を合わせて実施した。さらに、これを受けて、現在室内空気中化学物質のガイドライン作りが進行し、その基礎的研究を実施している。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。

水道に係わる課題では、水道法の改正に伴う検査体制や検査方法の開発の必要性から、全国水道事業体25機関の協力を得て5年の歳月をかけて上水試験方法(日本水道協会)を改訂した。また、2003年のWHO飲料水ガイドラインの大改正に向けて関連する化学物質の調査研究(農薬類、金属類、マイクロシスチン、非イオン界面活性剤等)を開始し、我が国の汚染実態の調査すると共に、水道水質基準改訂に向けた研究を実施した。また、微量の測定方法及び精度管理の体制を確立し、厚生省と共に水道法20条指定検査機関に対して精度管理を実施した。

医薬部外品・化粧品などの経皮暴露に係わる分野では、皮膚に関連する基礎的研究として科学技術庁振興調整費による研究である「日常生活において守る総合研究」として皮膚と生活環境とを結ぶ疾病であるアトピー性皮膚炎を主体とした基礎的研究、診断機器の開発、疾病の発症要因及び皮膚をケアする機能性化粧品の開発など、多くの医学、工学、薬学等の大学と企業など30機関との共同研究を引き続き実施した。

国際的共同研究としては、ヒ素の暴露による健康影響に関する研究でインド・バンガラディッシュー日本との多国間共同研究を西ベンガル州jadavpur大学と研究を継続し、Jadavpur大学postdoctoralを2年間研究に従事させたこと及び本格的にインド・バンガラディッシューヒ素汚染地域の人の血液、尿、爪、毛髪及び食物等の試料につい

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、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、窒素酸化物、二酸化硫黄、炭化水素、オゾン、ホルムアルデヒド、浮遊粒子状物質）の常時測定を実施した（環境省環境管理局自動車環境対策課）。

2. 水道水質関係

(1) 分析測定精度管理

1) 水道水質検査精度管理調査

全国152指定機関に対してクロム、鉛、シマジン、チオベンカルブの統一試料を配布し、得られた測定結果に基づいて、水質検査精度管理調査のとりまとめを行った。分析精度の確保に関して考察を行い、今後の分析に対する提言を行った。（厚生労働省健康局水道課に報告書を提出）

2) 環境測定分析統一精度管理

環境試料分析機関に対して送付した統一試料の分析結果をとりまとめ、異常値発生の要因解析を行った。特に、エチルベンゼン、塩化アリルおよび塩化ビニルについての詳細検討とノニルフェノールに対する正準判別分析、分類樹モデル、重回帰分析及び回帰樹モデルによる解析を行い、異常値発生要因の検討を行なった。（環境省環境管理局に報告書提出）

3. 化粧品・医薬部外品関係

1) 医薬品製造業等一斉監視指導による化粧品への使用実態調査

医薬品製造業等一斉監視として、化粧品中の（パラオキシ安息香酸エステル類）パラベン類の定量試験を実施した。対象品目は、平成13年7月～8月にかけて、日本全国の化粧品製造工場で製造された化粧水205品目、乳液1品目、クリーム2品目、化粧品ゲル1品目及びシャンプー1品目であった。全ての製品が、パラベン類の配合上限1%以下であった。全製品でメチルパラベンが検出され、一部製品ではパラベン類と防腐剤のフェノキシエタノールの両者が検出されたことを報告した。（厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課）

2) プレドニゾロン及びデキサメタゾンの試験法の開発

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プレドニゾロン及びデキサメタゾンの試験法を作成し、報告した。（厚生労働省医薬局審査管理課）

研究成績

1. 室内空気関連

1) 室内空気汚染物質の分析化学的研究

(1) 空気中に含まれる可塑剤の分析法に関する研究

建材中の可塑剤から放散するフタル酸エステル類の

GC分析法を確立した（室内環境学会）。

(2) 空気中の有機リン化合物の分析に関する研究

室内空気中の粒子状有機リン酸エステル類（トリブチルホスフェート、トリス（2-クロロエチル）ホスフェート、トリクレジルホスフェート等）の粒径別測定法を検討した（大気環境学会）。

(3) 空気中のアルデヒド類の分析法に関する研究

o-(2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロベンジル) ヒドロキシアミン含浸シリカゲルカートリッジ捕集-HPLC法を開発した（大気環境学会）。

2) 建築物内における空気質の衛生管理基準設定に関する研究

(1) オフィス及び居住環境内における揮発性有機化合物（VOC）の調査研究

一般住宅及びオフィスビル内の人々を対象に、準揮発性有機化合物、揮発性有機化合物及び粒子状有機物質の室内空気中濃度及び個人暴露の実態調査を行った（厚生科学研究費）。

(2) 呼吸器疾患関連危険因子の調査研究

居住環境内における粒子状酸性物質（蟻酸、亜硝酸）の実態調査を既築及び改築住宅を中心に行った（大気環境学会）。

3) 建築内空気質の安全性に関する研究

(1) 建築用資機材の有害化学物質の放散量に関する研究

加熱脱着法を用いて内分泌攪乱化学物質として注目されているフタル酸エステル類の放散量試験を行い、居住環境内では粒子状及びガス状が常に混在していることを明らかにした（室内環境学会）。

(2) 家庭用品に使用される化学物質の安全対策調査

神経毒性や発ガン性が指摘されている有機リン酸エステル類の一般住宅及びオフィスビル内における粒子状及びガス状の放散量試験を行い、トリブチルホスフェート、トリス（2-クロロエチル）ホスフェート、トリクレジルホスフェート等の放散量を昨年度に引き続き明らかにした（大気環境学会）。

(3) 化学物質過敏症患者宅の化学物質汚染の調査研究

化学物質過敏症との関連性が指摘されている、ガス状酸性物質及び揮発性有機化合物の実態調査を既築及び改築住宅を中心に行った（厚生科学研究費）。

(4) 大気中多種化学物質暴露と疾病要因解明の研究

室内外の多種化学物質についてTVOC計、ホルムアルデヒド計、温度計、湿度計、窒素酸化物計、二酸化炭素計等各種自動計測器及びマニュアル法を用いて、実態調査を行った。

(5) 化学物質過敏症等室内空気中化学物質に係わる疾病と総化学物質の存在量の検討と要因解明に関する研究

室内空気中総揮発性化学物質（TVOC）のマトリックス及び存在状況と発生要因別化学物質の国勢に関する研

究, 室内空气中カビ由来化学物質の存在状況に関する研究, 化学物質過敏症の発症要因化学物質の検索に関する研究, 病院等多量放散施設における室内空气中化学物質の調査と評価に関する研究, 室内空气中化学物質の免疫学的評価に関する研究, 生体反応性化学物質としてのアルデヒド類の挙動に関する研究, 室内空气中化学物質の加熱脱着法に関する実態調査研究, 全国における室内空气中化学物質の実態に関する研究などについて大学, 地方衛生研究所の協力を得て実施した。(厚生科学研究費)

2. 水道水質関係

1) 水道水質関係

(1) 水道水質管理のための有機物質に関する研究

過マンガン酸カリウム消費量, BOD, TOC, DOC, 紫外線吸光度, 総トリハロメタン生成能, TOX生成能, 濁度, 色度, AOCを検討項目として取り上げ, それぞれの項目の浄水工程における水質把握や水質管理の指標としての数値に対する科学的根拠の検討を行なった。平成12年度, 水道事業体で測定された有機物指標の項目から, 重複する項目について過マンガン酸カリウム消費量との関係を中心に相互比較を行った。

過マンガン酸カリウム消費量が浄水工程に従って減少することから, 現在の浄水工程の水質管理指標として長期間継続して使用されてきていることは適切な選択であり, 数値の持つ意味が重要であることが認められた。(厚生科学研究「WHO飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究」)

(2) 浄水処理過程における生物障害に関する研究

浄水処理過程における生物障害の実態調査と解析を行い, ガイドライン作成のための資料を収集した。

(3) 水道用品の安全性に関する研究

水道用塩化ビニール管の接着剤の衛生性に関する規格案の情報を整理し, 安全性と衛生性に対する検討を行なった。

2) 水道水の安全性評価に関する研究

(1) 有機化学物質の日本における存在状況の把握

WHO飲料水水質ガイドライン改訂に際して, ガイドライン(値)策定の対象となっている14化学物質について, 日本の実態を把握するために資料を収集した。

日本で基準項目となっている四塩化炭素, トリクロロエチレン, テトラクロロエチレンの3化学物質については, 平成11年度の水道水源域と浄水における検出頻度および濃度について, 日本水道協会の水道水質データベースをもとに資料を整理した。

揮発性有機化学物質に区分される, 塩化ビニルモノマー, o-ジクロロベンゼン, 1,2,4-トリクロロベンゼン, ヘキサクロロブタジエン, エピクロロヒドリンについては, 環境省による化学物質の実態調査の結果を整理し

た。

フルオランテン, ベンゾ(a)ピレン, ベンゾ(b)フルオランテン, ベンゾ(k)フルオランテン, ベンゾ(ghi)ペリレン, インデノ(1, 2, 3-cd)ピレンの多環芳香族炭化水素類に属する6化学物質については, 環境省による実態調査, および水道水源水域及びその浄水を対象に平成9年度厚生労働省で行った6化学物質の実態調査を整理した。(厚生科学研究「WHO飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究」)

(2) 農薬類の分析優先順位づけに検討

水質汚濁性農薬354農薬について, 全国総使用量, ADI, 水溶解性, 水/オクタノール係数等の要素を用い, 農薬に関する分析対象プライオリティリストの作成を試みた。

その結果, 262農薬について, 全国総使用量をADIと水溶解性の積で除した数値を基にした分析対象プライオリティリストを作成し, 提言した。また, そのリストにあがった農薬の分析法について整理した。(厚生科学研究「WHO飲料水水質ガイドライン改訂等に対応する水道における化学物質等に関する研究」)

(3) 内分泌かく乱化学物質の水道中の挙動と対策等に関する調査研究

水道水に混入してくる可能性がある内分泌かく乱化学物質が, 浄水処理過程でどのように推移するかを把握するため, エストロゲン受容体との競合的結合親和性を指標とした蛍光偏光度法を用いて, 浄水処理過程における試料水のエストロゲン様活性の変動を評価した。また, 蛍光偏光度法のモニタリング法としての有効性と問題点について, 評価を行なった。(厚生科学研究「内分泌かく乱化学物質の水道中の挙動と対策等に関する調査研究」)

(4) 水道水源水域等における親水性かつ難分解有害化学物質の動態と水道のリスク評価に関する研究

1,4-ジオキサン及びメチル-tert-ブチルエステル(MTBE)について, 全国水道原水91地点の存在実態調査のとりまとめを行った。

1,4-ジオキサンの陰膳方式による食品摂取量調査を行った。得られた結果では, 食品による摂取は1地区を除き認められなかった。(国立研究機関公害防止等試験研究「水道水源水域等における親水性かつ難分解有害化学物質の動態と水道のリスク評価ならびに制御に関する研究」)

(5) 内分泌かく乱化学物質の発生期に及ぼす影響に関する研究

Xenopus初期胚に17β-エストラジオール(E2), ビスフェノールAまたは4-tert-オクチルフェノールに暴露すると, 発生時に形態異常が生じた。そこで, E2暴露

により発現に変化が生じる遺伝子を蛍光ディファレンシャル・ディスプレイ法またはDNAマイクロアレイ法を用い、網羅的に調べた。発現の変化が見られた遺伝子について、リアルタイムPCR法によって、半定量的に発現量を測定し、変化の有無や強弱を詳細に確認した。

マウス胚幹細胞に対する、 17β -エストラジオール(E2)、ビスフェノールAまたは4-tert-オクチルフェノールの細胞致死濃度を決定した。(国立研究機関公害防止等試験研究「水域環境における内分泌かく乱化学物質の次世代への影響評価法確立に関する分子遺伝学的研究」)

(6) 環境汚染物質による健康影響評価に関する研究

ラット肝細胞を用いて、ヒ素を曝露した際のタンパク質リン酸化状態及び遺伝子発現について検討を行った。

1,4-ジオキサン及びフェノバルビタールに曝露したラット肝細胞の遺伝子解析を行い、G0/G1シフトあるいはG1/Sシフトの指標となる遺伝子の発現量が増加することを明らかにした。

(7) 環境汚染化学物質の遺伝子多型の検索と環境リスク評価に関する研究

アレルギー性疾患との関係が疑われる13遺伝子の21SNPsについてTaqMan MGBプローブアッセイ法を確立した。

農薬等の解毒代謝に関与するCYP2B6をクローニングし、既知のSNPを導入した発現ベクターを作成した。

3) 所内プロジェクト研究

(1) 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

a) UDP-グルクロン酸の機能と発現制御機構に関する研究

UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9及びUGT1A10をクローニングし、既知のSNPを導入した。

UGT1Aの発現制御に関与するCARをクローニングし、レポーターアッセイによる機能解析を行った。

b) SXR遺伝子の転写発現機構に関する研究

SXR遺伝子の転写開始点から上流4500ntの間にntの間に、転写活性を促進するシグナルが存在する領域が2ヶ所と、転写活性を抑制するシグナルが存在すると推測された領域が1ヶ所存在することを明らかにした。

(2) MFタンパク質科学による創薬研究

PPAR γ またはRXR α と相互作用をする物質の探索試験系を確立した。試験系は、遺伝子発現活性を検出の対象作用とするルシフェラーゼの誘導能を指標とした試験系である。RXR α の新規合成アゴニストを検討した結果、単独ではPPAR γ のアゴニストと同様の遺伝子発現増強作用を示した。PPAR γ のアゴニストと併用すると、相加的に作用する物質と相加的以上に作用を示す物質の2種類が存在することが明らかとなった。

3. 化粧品など経皮暴露関連

1) 化粧品・医薬部外品原料の規格に関する研究

(1) 防腐剤の一種であるパラベン類及びフェノキシエタノールの化粧水中での分離・分析法として液体クロマトグラフ法による方法を確立した。

(2) クリーム及び化粧オイル中の2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾールの分離・定量法を確立した。

2) 化学物質の皮膚安全性評価に関する研究

3次元ヒト皮膚培養モデルを用いた経皮吸収試験に関する研究では、3次元ヒト皮膚培養モデルのTESTSKIN及びVitrolife-Dermisを用い、安息香酸ナトリウム、レゾルシン、サリチル酸、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル及び4-クロロ-m-クレゾールの経皮吸収を検討し、モルモットの腹部剥離皮膚を用いた結果と比較検討した(厚生科学研究補助金)。

3) 生活環境からのアトピー性皮膚炎等の増悪化学物質の検索と評価法に関する研究

化粧品で既に接触皮膚炎の症例が報告されている化学物質を含む44物質について、肥満細胞の脱顆粒を用いる評価系並びにPorkweed mytogenで活性化された脾細胞からのIgM産生能に及ぼす評価系を用い、化学物質の影響を検討した。同時に、上記の18成分について、ヒト角化細胞からのサイトカイン放出量を利用した評価系を用い、化学物質の影響を検討した。

4) 地下水利用に伴う広域的ヒ素汚染に対する地球環境保全のための環境計画に関する研究

インド西ベンガル州の地下水のヒ素汚染地域の皮膚がんなどのリスクアセスメントに資するため、住民から採取した尿・毛髪あるいは地下水のヒ素汚染地域で住民が食する米、野菜等の食物またはヒ素汚染地下水を灌漑に用いている地域での灌漑用水、耕作地での土壌の調査及び検体中のヒ素化合物の分析を行った(環境省地球環境総合推進費)。

食 品 部

部長 米谷民雄
前部長 豊田正武

概 要

当部における主要業務は、残留農薬や残留動物用医薬品の分析法の作成と見直し、ダイオキシン類の汚染実態や摂取量調査、トータルダイエットスタディ、照射食品の検知法の開発、遺伝子組換え食品の検知法の開発、食品アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の開発などである。それに加えて、ヒューマンサイエンス振興財団の受託研究として「新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究」を行っている。

人事面では、当部の部長を6年間務められた豊田正武部長が平成14年3月31日をもって定年退官され、後任として平成14年4月1日付けで米谷民雄食品添加物部長が転任した。空席であった第三室長に穂山浩主任研究官が平成13年8月1日付けで昇任した。また、遺伝子組換え食品業務の緊急性と重要性から第三室の増員が認められ、渡邊敬浩博士が平成13年10月1日付けで採用された。免疫・アレルギー等研究推進事業リサーチ・レジデントの五十鈴川和人氏が平成13年12月31日付けで退職した。張替直輝氏が科学技術振興事業団重点支援協力研究員に平成13年10月1日付けで採用された。和久井知世子氏が生活安全総合研究事業のリサーチ・レジデントとして平成14年1月1日付けで採用された。

海外出張としては、穂山浩室長は、遺伝子組換え食品の日本の表示制度と検知法について講演するため、台湾に出張した(平成13年11月18日~22日)。また、米国スクリプス研究所に留学していた近藤一成研究員が1年間の予定を終え平成14年4月15日に帰国した。

業務成績

- (1) 地方衛生研究所、厚生労働省食品衛生検査指定検査機関の協力の下に、残留農薬告示分析法の見直しに関する研究を実施し、エトキシキン、ピリフェノックス等の告示試験法改正案を作成した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部基準課)。
- (2) 食品衛生法の残留農薬試験法としてジチオカーバメート系4農薬の試験法を開発した。さらに地方衛生研究所等の協力の下に12農薬の告示試験法案を作成するとともに告示試験法に関する講習会に協力した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部基準課)。
- (3) 各2週間、3回に分けて地方衛生研究所職員7名を対象に、食品中ダイオキシン分析法講習会を実施した(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (4) 有機フッ素化合物であるperfluorooctane sulfonateの食品汚染等に関する文献調査を行うとともにLC/MSによる分析を検討した(化学物質安全対策室)。
- (5) 食品中の残留動物用医薬品のモニタリング法改訂に伴い、新たに6項目を追加した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部基準課)。
- (6) トータルダイエツト試料分析およびモニタリングデータから、クロルデン類およびアルドリンの一日摂取量を推定した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部監視安全課)。
- (7) 照射香辛料類の検知法に関するデータベースを作製した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部監視安全課)。
- (8) 食品中の残留動物用医薬品の試験法について、食肉衛生検査所員等3名に対し技術研修を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (9) 食品中の動物用医薬品の残留基準設定に伴い、栃木県食鳥検査関係研修会、食品衛生指定検査機関協会研修会において、残留動物用医薬品の試験法の技術指導を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (10) 厚生労働省食品保健講習会(2002.3)において、平成13年度に告示される残留農薬試験法の概説及び変更点、残留動物用医薬品分析法、アレルギー特定原材料検出法、アフラトキシン試験法について、それぞれの技術講習を行った(医薬局食品保健部)。また、指定検査機関による残留動物用医薬品研修会(2002.3)においてアフラトキシン試験法についての技術講習を行った。
- (11) 遺伝子組換え食品の検知法について横浜検疫所センター2名、神戸検疫所センター1名に対し技術研修を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (12) 安全性未審査の遺伝子組換えジャガイモおよびそれを原料とする製品の調査を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (13) 市場で見つかった安全性未審査の遺伝子組換えパパイアの確認を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (14) 安全性審査中遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Y)の調査を行った(医薬局食品保健部監視安全課)。
- (15) 食品衛生法およびJAS法で遺伝子組換えに関する表示が義務付けられている大豆およびトウモロコシを主な原材料とする加工食品24食品群の74商品を定量PCR分析を行い調査した(医薬局食品保健部企画課)。
- (16) 所内共通機器の維持、管理を行った(放射能汚染食品等試験用低放射能測定機器および微量成分測定用LC-MS)。
- (17) 残留農薬暴露評価調査会、食品残留農薬実態調査、加工食品残留農薬実態調査、農薬摂取量調査(いずれも医薬局食品保健部基準課)、農薬登録保留基準分析法策定分科会(環境省水環境部農薬環境管理室)精度管理調査会(医薬局食品保健部監視安全課)、動物用抗菌性物質製剤調査会、動物用一般用医薬品調査会、動物用医薬品再評価調査会(農林水産省生産局畜産部衛生課薬事室)に協力した。ISO/TC34国内対策委員会の遺伝子組換え分析法に係わる専門分科会(医薬局食品保健部企画課)に協力した。CODEX第3回バイオテクノロジー応用食品特別部会および検知法ワーキンググループに日本代表で参加した。

研究業績

1. 食品中の農薬の残留とその変動に関する研究

- (1) 農薬およびその他の化学物質による動物性食品の複合汚染に関する調査研究

超臨界流体抽出およびGC/MS(SIM)測定を用いた肉類中の残留農薬の多成分分析法を開発した(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

- (2) 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

トマト、レモン、ほうれんそうを用いて130農薬の添加回収試験を行い、超臨界流体抽出法と有機溶媒抽出法の比較検討を行った。さらに実試料を用いて両試験法の比較検討を行った（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

2. 食品汚染物の調査、監視及び検知システムの確立とその応用

(1) ダイオキシン類の汚染実態の把握および摂取量低減化に関する研究

培養細胞を用いてレポータージーンアッセイによる市販魚中のダイオキシン類を検出する迅速法の検討を行った。また、ダイオキシン類簡易測定バイオアッセイ法を一次スクリーニングとして用い、各種食品抽出物によるダイオキシンの毒性発現抑制の可能性について検討を行った（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(2) ダイオキシン類の摂取量等に関する研究

ダイオキシン類およびコプラナーPCBの一日摂取量を調べ、平成12年度は1.45 pgTEQ/kgbw/日であることを明らかにした。また、個別食品におけるダイオキシン類の異性体組成を解析し、食品における汚染因子を推定した（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(3) 鯨類由来食品中の有害物質によるヒト健康に及ぼす影響に関する研究

鯨類由来食品中のPCBおよび水銀濃度について実態調査を行い、ヒト健康に及ぼす影響について検討を行った（厚生科学研究特別研究費）。

3. 食品中の残留動物用医薬品の分析法に関する研究

(1) 食品中の動物用医薬品の残留基準設定に伴い、シロマジン等4項目の残留試験法を開発した（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

4. 日常食の汚染物質摂取量および汚染物モニタリング調査研究

(1) 国内に流通している食品に含まれる汚染物質の量と、その摂取量を明らかにするために、全国の衛生研究所の協力を得て、汚染物モニタリング調査と、マーケットバスケット方式による汚染物摂取量調査を実施した。汚染物モニタリングにおいては、全国50カ所での食品中汚染物検査データ22万件を収集し、食品中の汚染物の検出率、複数の汚染物による汚染状況を調査した。汚染物摂取量調査では、全国十カ所で各食品を通常の調理法に従って調製したトータルダイエツト試料を調製し、その汚染物濃度を測定して、1日当たりの汚染物摂取量を推定した（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

5. 精度管理に関する研究

(1) 9機関についてダイオキシンの外部精度管理を行った（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(2) FUMI理論で推定したピーク面積標準偏差推定値の変動とノイズパラメータの関係を検討した。LAL試験の精度予測および解析法の改善を行った。粉末X線回折測定

の精度予測および検出限界の推定を行った（HS財団受託研究）。

6. 照射食品の検知に関する研究

(1) 照射食肉の検知に関して、実際の食肉についてコメントアッセイ法が適用可能であることを示した。また、シクロブタノンの分析条件を検討し、実際の食品について実用性を調べたところ、さらに検討が必要であることが分かった（国立機関原子力試験研究費）。

(2) X線照射食品の検知に関する基礎的な検討として、X線照射における基礎的な問題点を検討した。また、照射時間等実用上の問題点を明らかにした。

(3) 電子線照射食品の検知に関する基礎的な検討として、深度分布等電子線の特質を明らかにした。

(4) 照射食品の安全性について、文献調査を行った。

7. 新開発食品の安全性・有効性に関する研究

(1) 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究

(i) 血清中リンゴポリフェノールの高感度分析法を開発し、経口投与後の血中濃度を追跡した（HS財団受託研究）。

(ii) 培養OVA感作脾細胞を*in vitro*でOVA再刺激した際に、コンドロイチン硫酸が共存するとTh1レスポンスを増強することを示した。また、コンドロイチン硫酸添加によるIFN- γ サイトカイン産生とmRNAの増大を確認した（HS財団受託研究）。

(2) 原因食品中のアレルギー誘発物質の解明に関する研究

ソバアレルゲンに関して、ソバアレルギー患者血清と反応する111kDaのタンパク質の存在を明らかにした（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(3) バイオテクノロジー応用食品等の安全性評価に関する研究

(i) 安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewleaf Plusならびに審査中遺伝子組換えジャガイモNewleaf Yのそれぞれについて定性PCR検知法を開発した（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(ii) ジャガイモ加工原材料について調査を行った結果、調査に供した54検体については当該遺伝子組換えジャガイモが混入している検体がないことを示した（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(iii) 安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewleaf PlusならびにNewleafについて、定量分析法開発のための検討を行った（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(iv) マイクロキャピラリー型リアルタイム定量PCRシステムを用いた定量分析法開発のための検討を行った（厚生科学研究費生活安全総合研究）。

(v) 通知されたDNA技術応用食品の検査方法に示されている酵素免疫測定法（ELISA）法と定量的PCR法を用

いて遺伝子組換え大豆を検体とした測定を行った場合の測定値比較を行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(vi) 表示義務制度施行以前ならびに以後の市販豆腐を検体とし、定性PCR法並びに定量的PCR法を用いた調査を行い、表示義務精度の与える影響についての検討を行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(4) 遺伝子組換え食品の腸内分解性・アレルギー性に関する研究

(i) B10マウス, BNラットを用いてCBH351混合飼料経口投与によるアレルギー性評価を行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(ii) 大腸菌にCry9C蛋白質を発現させる系を構築し、大量に発現させた(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(5) 遺伝子組換え食品検査の信頼性確保に関する研究

トウモロコシ, ジャガイモの定性試験において、遺伝子組換え食品検査法の外部精度管理を行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(6) 食品アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の開発に関する研究

(i) 人血清を用いた卵, 乳のサンドイッチELISA法およびイムノプロットング法を確立した。患者のアレルギー反応に即した食品中の特定原材料混入を検出するためには有効な手段であると思われる(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(ii) 特定原材料の総タンパク質を定量する方法として複合抗原認識抗体を用いたELISA法と精製抗原認識抗体を用いたELISA法の2種類の方法を開発した。また、食品の抽出液に添加する方法でその両方法の10機関によるinter-laboratory validationを検討した。また実際に10 μ g/gのモデル加工食品を作製し、同様に4機関によるinter-laboratory validationを行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(iii) 卵, 乳の2品目の総タンパク質を定性する方法としてウェスタンプロットング法を確立した(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(iv) 落花生の特異的遺伝子を定性的に検知するPCR法を確立した(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

8. 天然有害化学物質に関する研究

(1) 食品中の有害物質の評価に関する研究として、環食128号に替わるアフラトキシン検査法改正案を作成した。また作成したアフラトキシン検査法の妥当性を評価する目的で、5機関によるinter-laboratory validationを行った(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

(2) アフラトキシンM1の汚染実態調査として、全国の2地区から集められた50検体のアフラトキシンM1の汚染実態調査を行った(厚生科学特別研究事業)。

(3) 中毒原因物質の同時分析法のマニュアル作成に関す

る研究として、中毒の原因となるかび毒(アフラトキシン, オクラトキシンA, パツリン, シトリニン, フザリウムトキシン)の分析法マニュアルを作成し、関連した毒性情報をまとめた(厚生科学研究費生活安全総合研究)。

食品添加物部

部長 棚元 憲一
前部長 米谷 民雄

概 要

平成14年4月1日付で、米谷民雄前部長が食品部長へ転任し、同日付で棚元憲一前衛生微生物部長が後任部長に就任した。また、平成13年10月1日付けで石綿肇第一室長が大阪支所生物試験部長に昇任し、その後任として12月1日付で四方田千佳子大阪支所薬品試験部第一室長が配置換えとなった。その間、米谷民雄部長が第一室長事務取扱を命ぜられた(10月1日~12月1日)。科学技術特別研究員として研究に従事してきた長岡恵博士は、平成14年1月1日より生活安全総合研究推進事業のリサーチ・レジデントとして採用され、引き続き研究に従事している。

海外出張としては、河村葉子第三室長が第57回FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会に出席のためローマ(平成13年6月4日~6月16日)に、また、山崎壮第一室長がFAO/WHO合同食品規格委員会第34回食品添加物汚染物質部会及び特別作業部会に出席のためオランダ(平成14年3月7日~3月16日)に出張した。

当部における主要業務は、香料を含む化学的合成添加物や天然添加物、器具・容器包装、玩具等に関する試験・研究業務であるが、その他に、「食品添加物公定書」及び「食品中の食品添加物分析法」に関する調査・検討を行った。

業務成績

(1) 地方衛生研究所、厚生労働省指定検査機関の協力の下に、食品中の食品添加物分析法の検討を行った(食品添加物基準策定費, 医薬局食品保健部基準課)。

(2) 未指定添加物としてポリソルベートを取り上げ、HPLCによる食品中のポリソルベートの分析法を改良し、クリーミングパウダー及びレトルトパウチカレーからの分析を可能とした(未指定添加物対策費, 医薬局食品保健部基準課)。

(3) 新規指定の食品添加物「次亜塩素酸水」の規格基準及び試験法の設定に関する検討を行った(食品添加物基準策定費, 医薬局食品保健部基準課)。

(4) 市販パン中の小麦粉改良剤臭素酸カリウムのポストカラムHPLC法による分析法を改良し、一層の高感度分

析を可能とした。また、定性及び定量を目的としてICP-MSを用いた高感度分析法を開発した（食品添加物基準策定費，医薬局食品保健部基準課）。

(5)マーケットバスケット方式による食品添加物の1日摂取量調査のために、食品中の総リン酸塩の簡便な定量分析法を検討した。その結果、市販の強陰イオン交換カートリッジを用いることにより、迅速な分析法が確立された（食品添加物基準策定費，医薬局食品保健部基準課）。

(6)天然酸化防止剤の有効成分の同定及びその有効性を評価するために、不飽和脂肪酸の自動酸化抑制活性、フリーラジカル消去活性及び生体内活性酸素消去活性を指標とした簡便かつ迅速な活性測定法の開発を行った（食品添加物基準策定費，医薬局食品保健部基準課）。

(7)食品製造企業における食品添加物の使用実態を食品分類別に調査する計画に協力した（食品添加物規格策定費，医薬局食品保健部基準課）。

(8)ポリ塩化ビニル製器具・容器包装及びおもちゃにおけるフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)及びフタル酸ジイソノニルの試験法を確立した（容器包装等試験検査費，医薬局食品保健部基準課）。

(9)薬事・食品衛生審議会における新開発食品検討調査部会及び同新開発食品評価第1調査会（医薬局食品保健部新開発食品保健対策室）、添加物部会及び同食品添加物調査会、器具容器包装部会（医薬局食品保健部基準課）、医薬品添加物規格検討委員会（医薬局審査管理課）、日本薬局方部会医薬品添加物調査会、医薬品名称調査会（医薬局審査管理課）等における具体的作業に協力した。

研究業績

1. 食品添加物の規格基準に関する研究

(1)食品香料の規格のあり方及び流通量調査による暴露量評価に関する研究

食品香料の規格のあり方を考えるために、諸外国における香料規格の考え方を調査するとともに、流通量調査による暴露量評価をおこなうために、適切と考えられる摂取量推定法を国際的に調査した（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(2)食品香料の規格定量法及び不純物に関する研究

第7版食品添加物公定書の製造基準には一部の天然香料等の残留溶媒限度値が設定されているが、分析法は記載されていないため、残留溶媒の分析法として、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィーについて検討し、残留溶媒試験法（案）を作成した（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(3)天然添加物の規格設定及び有害試薬使用の排除のための研究

既存添加物自主規格案の規格試験法の問題点を検討し、将来公的規格基準を設定する場合の検討課題をまとめた。天然添加物中の不純物及び添加物本体のアレルゲ

ン性に関する規格設定の必要性を検討することを目的に、アレルゲン性検出法の予備検討を行った（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

2. 食品添加物等の安全性に関する研究

(1)1998年度（平成10年度）の行政検査を基にした保存料の摂取量の推定

1998年度の行政検査結果のデータ解析を実施した（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(2)パン中の臭素酸カリウムの残留量実態調査

市販パン中の小麦粉改良剤臭素酸カリウムの残留量実態調査を実施したところ、すべての検体で臭素酸カリウムは検出されなかった（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(3)食品中の未許可添加物の分析法の開発

油脂のシネルギストであるチオジプロピオン酸の分析法を検討した。アセトニトリル・水混液による抽出及び陰イオン交換カートリッジでのクリーンアップ後、HPLCにより定量した。油脂中からの妨害成分の除去が良好であり、精度の高い分析法が確立された。また、輸入食品中の未指定着色料である耐酸性コチニールの構造決定を行った（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(4)配糖化された食品添加物に関する研究

酵素を用いて配糖化された食品添加物の有効性と安全性に関する研究の一環として、ウコン色素の主色素成分クルクミンの配糖化を試みた。合成したクルクミンモノグルコシドに酵素を用いてグルコースを付加することにより、クルクミンマルトシドなどの水溶性の高い配糖体を得ることができた。

3. 器具・容器包装等の安全性に関する研究

(1)ポリ塩化ビニル製ラップフィルム中のノニルフェノール及び可塑剤の溶出に関する研究

ポリ塩化ビニル製ラップフィルムに残存するノニルフェノール、アジピン酸エステル等について、食品擬似溶媒、ナタネ油及び食品を用いて溶出試験、移行試験を行い、それらの溶出傾向を明らかにした（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(2)器具・容器包装の規格基準のハーモナイゼーションに関する研究

器具・容器包装の規格基準について、諸外国の調査を行い、欧米と我が国の相違点、問題点を抽出した（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(3)リサイクル包装材の安全性確保に関する研究

リサイクル包装材の海外での使用状況、安全性確保のための法規制、ガイドライン、認可状況等を調査した（厚生科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(4)器具・容器包装の規格試験法の精度向上に関する研究

ポリ塩化ビニル中のクレゾールリン酸エステルの試験

法を開発した (厚生科学研究費, 医薬局食品保健部基準課).

(5) 使い捨て手袋中の残存物質に関する研究

非フタル酸エステルを使用したポリ塩化ビニル製手袋, 及びニトリル手袋中の未知物質の同定を行った.

(6) おもちゃからのフタル酸エステル類の溶出に関する研究

軟質玩具の素材調査並びにポリ塩化ビニル製玩具中のフタル酸エステル類及びその他の可塑剤等の含有量調査を行った. 検出された可塑剤はシミュレーション溶出試験法により溶出量を測定し, 含有量と溶出量の関係を調べた (厚生科学研究費, 医薬局食品保健部基準課).

4. 食品の安全性に関する研究

(1) 異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発

異常型プリオン蛋白質に高感受性培養細胞株を開発するために, ウシプリオン蛋白質を発現するトランスフェクタントの作製を行った (厚生科学研究費, 医薬局審査管理課).

(2) HPLC/ICP-MS法による金属と生体成分・食品成分・食品添加物の結合の解析

トランスフェリン(Tf)の糖鎖がアルミニウム(Al)-Tf結合に与える影響を調べるために, 正常Tfとシアル酸欠損TfのAl結合能を, Alの高感度分析が可能な高分解能(HR) ICP-MSを検出器とするHPLC法 (HPLC/HR-ICP-MS法)を用いて調べた. シアル酸の欠損及びシチュウ酸の存在により, Alへの結合能が増加することを明らかにした (科学技術振興費).

(3) 放射性物質試験法に関する調査研究

衛生試験法の放射性物質試験法に収載するための, ICP-MSを用いたウランの測定法の妥当性を調べた.

(4) 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

2000~2001年に公表された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を調査した (厚生科学研究, 医薬局食品保健部監視安全課).

食品衛生管理部

部 長 山 本 茂 貴

概 要

当部は, 平成14年4月1日付けで新設された. 当部の所掌は, 食品等の製造工程における微生物及び有害物質の制御, 安全性評価, 規格基準その他の食品等の衛生管理に関する情報の収集, 調査及び研究並びに食中毒に関連する微生物の試験及び検査並びにこれらに必要な研究で, 3室より構成されている.

山本茂貴部長は国立感染症研究所の旧食品衛生微生物部長より, 五十君静信第1室長, 春日文子主任研究官 (7月1日付けで第3室長に配置換え), 伊藤嘉典主任研究官, および鈴木穂高研究員は国立感染症研究所の旧食品衛生微生物部より, 町井研士第2室長および岡田由美子主任研究官は旧国立公衆衛生院衛生獣医学部より配置換えとして, 平成14年4月1日付けで就任した. 第1室では乳および食肉 (これらの食品を含む) の製造工程における微生物および有害物質の制御に関する調査および研究を, 第2室では水産食品その他の食品の製造工程における微生物および有害物質の制御に関する調査および研究を, 第3室においては, 食品等の衛生管理に関する情報の収集, 調査および研究, 並びに食中毒に関連する微生物の試験および検査並びにこれらに必要な研究を行っている.

衛 生 微 生 物 部

前部長 棚 元 憲 一
部 長 高 鳥 浩 介

概 要

平成13年度も医薬品, 食品等における微生物学的試験及び研究を発展させた. 業務関連では前年度に引き続き, 特別審査, 規格基準関連業務, さらには各種調査会等に貢献した. 研究業務は1) 内毒素に関する研究, 2) 赤痢菌, サルモネラ菌等食中毒菌に関する研究, 3) 真菌に関する研究, 等を行った.

人事面では国立試験研究機関の再編の影響で当部には大きな動きがあった. まず平成14年4月1日付けで棚元部長は食品添加物部長に配置替えとなり, 高鳥浩介第三室長が部長および第三室長 (併任) となった. さらに国立感染症研究所および国立公衆衛生院との微生物関連部門の再編の結果, 新規に第四室が設置され, 感染研より当研究所に配置換えとなった小西良子室長が担当することとなった. なお当部には小西室長に加え同じく感染研から加登通正, 工藤由起子両主任研究官が加わった. 平成12年4月より14年3月31日までヒューマンサイエンス流動研究員及び非常勤職員として研究に従事した台湾の洪志駿博士が2年間の研究を終え帰国した. また平成13年4月より掛谷知志博士, 同10月より相原真紀博士, さらに平成14年4月より志水美文博士をヒューマンサイエンス流動研究員として迎えた.

海外出張に関しては, 高鳥浩介室長が平成13年8月23日より25日まで, 第2回アジア・太平洋医真菌学会出席のため中国昆明に出張した. さらに同室長は平成14年3月3日より8日まで, 第5回国際クリプトコックス・クリプトコックス症会議出席のためオーストラリ

ア・パースに出張し、それぞれ研究発表を行った。

業務成績

1. 審査

合計6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(医薬局、HS財団)、医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究(医薬局)、腸炎ビブリオの検査法の設定に関する研究(医薬局食品保健部)、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、食品からの赤痢菌に関する研究(医薬局食品保健部)、生活環境中の汚染物質の測定マニュアル(公害健康被害補償予防協会)等が行われた。

3. その他

薬事・食品衛生審議会の各調査会(医薬局審査管理課、医薬局食品保健部)、HACCP技術者講習、食品保健特殊技術講習(医薬局食品保健部)、日米有毒微生物専門部会(UJNR)に協力した。

研究業績

1. 内毒素に関する研究

(1) 内毒素によるマクロファージ活性化における Toll 様受容体4 (TLR4) 結合蛋白 MD-2 の役割について検討し、MD-2の26番と114番目のアスパラギンがグリコシル化を受けていることを見出し、このグリコシル化が内毒素によるマクロファージ活性化に必須であることを証明した。

(2) 内毒素によるマクロファージ活性化に携わる分子群を同定するため、内毒素に非感受性の培養細胞に各種菌体成分認識に関わる分子を発現させ、内毒素によるマクロファージの活性化にはCD14、TLR4およびMD-2が必須であることを見出した。

(3) サルモネラリポドAがマウスマクロファージ細胞では強い活性を示すにもかかわらず、ヒトマクロファージ細胞では活性を示さないという動物種特異的反應の分子機構について解析し、TLR4も関与するものの、MD-2がこの種特異的反應の主因であることを突きとめた。

2. 食中毒菌に関する研究

(1) 食品からの *Vibrio parahaemolyticus* (TDH陽性) 検出法を検討した結果、魚介類を30℃で3時間培養後、アルカリペプトン水で前増菌(35℃・18時間)、食塩ポリミキシンブイオンで選択増菌(35℃・18時間)を2回繰り返してTCBS寒天平板培地で分離する方法が最も優れていることを見出した。

(2) 昨年11月に勃発した赤痢菌(*Shigella sonnei*)による食中毒事件は感染者は30都府県で187人に達したが、原因食材と疑われた生食用カキからの赤痢菌検出が出来

なかった。当部では、当該カキをBPW (Buffered Peptone Water) で前増菌(35℃・20時間好気培養)後、その培養液1 mlを *Shigella* broth に接種して44℃・20時間嫌気培養を行い、その培養液をマッコンキー寒天平板およびCHROMagarO157TAM寒天平板に画線塗抹し35℃・20時間培養するという新しい検査法を導入し、わが国で初めて食品から赤痢菌を検出することに成功するとともに、厚生労働省が行った原因食品(韓国産カキ)の輸入禁止措置をサポートすることができた。

(3) サルモネラ特に *Salmonella Enteritidis* (SE) の低温下での卵での増殖動態に関する研究を行った結果、6℃の低温でも、卵の卵黄成分の供給下ではSEは長く生き残ること、殻付き卵においてもSE接種後の10℃保存においては保存実験最長84日目でも106倍ものSEの増殖が見られた。従って殻付き卵では温度管理を怠れば、爆発的な増殖を起こして、食中毒の原因となりうることを明らかにした。

4. 真菌に関する研究

主に3課題について研究を実施してきた。

1) 真菌による健康被害研究: アレルギー、中毒、感染症と真菌の関連性について生物学的観点から研究を進めており、特に呼吸器系・感覚器系アレルギーと真菌に関する研究は外部研究機関と協力することによって多くの成果が得られ、報告してきた。

2) 真菌の生態および生物多様性研究: 生態および多様性研究として真菌分離および菌株の維持・保存(登録TSY)・分譲を行い、多くの真菌株を収集してきた。さらに研究生に対し真菌学の教育指導をおこなった。

3) 真菌試験の規格基準: 工業製品、食品、生活環境での真菌試験の規定に関しJISおよびISOの抵抗性試験および環境微生物測定基準マニュアル作成、さらに真菌毒素の規格基準に関わった。

有機化学部

部長 奥田晴宏
前部長 宮田直樹
合田幸広

概要

当部では主として医薬品等の各種化学物質の有効性・安全性に関する有機化学的試験・研究を行うとともに、生理活性物質の合成、構造、反応性、構造活性相関並びに生体分子との相互作用に関する有機化学的な研究を行っている。

有機化学部長として平成4年4月1日より10年間活躍された宮田直樹博士が平成13年11月30日をもって退職され、名古屋市立大学大学院薬学研究科教授へ転出され

た。平成13年12月1日より、合田幸広生薬部長が有機化学部長を併任されたが、平成14年4月1日付けをもって医薬品医療機器審査センター審査第一部審査管理官であった奥田晴宏が昇任した。また平成14年1月1日付けで理化学研究所基礎科学特別研究員であった袴田航博士が研究官として採用された。

平成13年度の研究業務として1) 有用生理活性物質の合成及び化学反応性に関する研究, 2) 有害物質の構造決定と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に関する研究, などを行った。主な研究プロジェクトとしては前年度から引き続き、厚生科学研究費補助金による「化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究」、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高度化とその有用性の実験的検証」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」、及び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。

国際会議のための外国出張としては、宮田前有機化学部長が、平成13年4月22日より4月29日までスイスに出張し、ジュネーブのWHOで開催された32th Consultation on Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (32回医薬品国際一般名 (INN) 策定委員会) に出席した。

研究員の受け入れに関しては、平成13年3月31日付けで退職された末吉祥子博士に客員研究員として引き続き研究に参画していただいた。また昨年度同様、流動研究員として中西郁夫博士 (科学技術振興事業団科学技術特別研究員) が抗酸化剤の健康影響にかかわる科学的解析に関する研究に従事した。また、寒水壽郎博士 (医薬品機構派遣研究員) は、核内レセプターのリガンド分子の合成研究を行った。さらに協力研究員として西尾俊幸博士 (日本大学生物資源科学部助教授) が引き続き核磁気共鳴装置を利用した生理活性糖誘導体の構造並びに機能解析に関する研究を行っている。また新たに協力研究員として田中直子博士 (帝京大学医学部助手) の参画を得た。

厚生労働省試験研究機関共同利用大型機器 (傾斜磁場型600MHz核磁気共鳴装置) 及び所内共同利用機器 (500, 400, 400MHz核磁気共鳴装置) の管理は、栗原第二室長及び福原第一室長が行った。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。

宮田前有機化学部長、末吉客員研究員及び栗原第二室長は厚生労働省日本薬局方部会名称調査会あるいは化学薬品委員会委員として、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。宮田前有機化学部長は更に名称調査会新薬名称分科会委員

として医薬品の一般名 (JAN) の決定に、また、世界保健機構/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。また末吉客員研究員は日本製薬団体連合会の製剤委員会医薬品添加物検討会に出席し、「医薬品添加物の記載名称リスト」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) 生理活性を有するポリアゼン類の無溶媒条件下合成法に関する研究: ポリアゼン類を無溶媒条件下で反応させる新規な合成法を確立した。(一般研究費, 平成11-13年度)

2) 機能性材料ライブラリー創製を目的とした固相精密合成法の開発: フラーレン結合ポリマーを用いた固相精密合成法により, フラーレンをアミノ酸残基とするオリゴペプチドの合成法を確立した。(科学技術庁振興調整費, 平成11-13年度)

3) 新規ヒドロキシルラジカルドナーの開発: N-オキシド化合物が還元条件下, 生成するラジカルアニオンをESRで明らかにした。さらにN-オキシド化合物からのヒドロキシルラジカル発生能と還元特性との相関について検討した。(文部省科学研究費補助金, 平成12-13年度)

4) 一酸化窒素・ヒドロキシルラジカル同時発生化合物の開発: 一酸化窒素・ヒドロキシルラジカル同時発生化合物を開発し, 活性種の発生過程を明らかにした。(文部省科研費補助金, 平成12-13年度)

5) 鑑識用麻薬等の標準品製造: シロシンおよびシロシビンの従来法を改良し効率的合成法を確立した。(厚生労働省移替予算, 平成13年度)

6) 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: HIVプロテアーゼとのドッキングスタディを基に分子設計した阻害剤の合成を行った。(国立医薬品食品衛生研究所特別研究, 平成9-14年度)

7) 光活性型NOドナーの開発: 昨年度合成したアントラセンのニトロ誘導体は, 光照射によって, NOを発生してアントラキノン誘導体が生成した。また, 同様の反応をDNA存在下行うと強力にDNA鎖が切断することが明らかとなった。(一般研究費, 平成11-14年度)

8) 光照射をトリガーとするエンジン分子の設計と合成: 化学計算を用いて, 光照射をトリガーとするエンジン分子の設計を行った。(科学研究費補助金, 平成13-14年度)

9) ヒドロキシルラジカル発生を利用したNOドナーの開発: シアノ誘導体をヒドロキシアミンと反応させてアミドキシム誘導体を合成し, 得られた化合物をフェントン試薬で酸化して, NOが遊離することを明らかにした。

(一般研究費, 平成13-14年度)

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) 化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究: キノンやニトロアレーンの活性酸素毒性が, 電気化学的手法を用いた活性酸素種 (スーパーオキシド) の定量化の手法によって予測できることが明らかとなった。(厚生科学研究費補助金, 平成11-13年度)

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: NADH存在下, キノンからの活性酸素生成機構について詳細な解析を行った。さらに, キノンの構造とDNA切断活性との相関を明らかにした。(一般研究費, 平成9-14年度)

3) 抗酸化剤の有効性と安全性に関する研究: カテキンが塩基性条件下, 活性酸素を発生することを明らかにした。さらに活性酸素生成機構について詳細な解析を行った。(一般研究費, 平成12-14年度)

3. 薬物と生体分子の相互作用の解析に関する研究

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検証: 高い生物活性を有していたレチノイド活性候補化合物を基にさらなる構造の最適化を行った。(医薬品機構基礎研究推進費, 平成9-13年)

2) 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: 転写調節因子のDNA結合ドメインのペプチドモチーフを導入するDNA切断活性を有するアミノ酸を合成した。(一般研究費, 平成9-13年度)

3) 光励起されたC60, C70の生体分子との反応に関する研究: シクロデキストリンで水溶化したC60を用いて, 生理的条件下での光励起C60の生体作用の活性種の生成と生成速度とを明らかにした。(一般研究費, 平成10-13年度)

4) NMRを用いたATP受容体の結合活性に関する研究: P2X受容体のATP結合部位を明らかにするため, 高分解能NMRを用い, 数種のオリゴペプチドあるいはポリペプチドとATPの結合能について検討した。(一般研究費, 平成13年度)

5) ナノテクノロジーを用いた分子のコンフォーメーション変化の解析: コンフォーメーション変化を起こす分子の解析をナノテクノロジーを用いて行うため, 人工超分子の合成を行った。(一般研究費, 平成13年度)

6) C60内包型新規超分子化合物の合成: 分子力場法を用いてC60と各種包接化合物のバインディングアフィニティーについて検討し, 新規包摂化合物をデザインし, 基本骨格を合成した。(文科省科研費補助金, 平成13-14年度)

7) MFタンパク質科学による創薬研究: 核内レセプターRAR, RXRのリガンド候補化合物を合成した。(医薬品機構基礎研究推進費, 平成13-17年)

以上の研究は, 島田知一実習生 (芝浦工業大学工学部応用化学科生物化学研究室: 浦野四郎教授), 秋野加美実習生 (日本大学生物資源科学部農芸化学科生物有機化学研究室: 奥忠武教授), 及び所内関連各部の協力を得て行った。

研究の成果は第23回磁気共鳴医学会・第5回SFRR Japan 合同学会 (横浜), 日本ビタミン学会第53回大会 (淡路島), 第79回有機合成シンポジウム (東京), CBI学会2001年大会 (東京), 18th International Congress of Heterocycle Chemistry (横浜), 26th International Symposium on Macrocyclic Chemistry (福岡), 8th International Conference on Environmental Mutagens (奈良), 第38回ペプチド討論会 (長崎), 第34回酸化反応討論会 (名古屋), Tateshina Conference on Organic Chemistry, 1st (蓼科), 第27回反応と合成の進歩シンポジウム (仙台), 第16回生体フリーラジカル研究会 (東京), 第18回日本薬学会九州支部大会 (熊本), 2002年度日本農芸化学会 (仙台), 日本化学会第81春年会 (東京), 日本薬学会第122年会 (千葉) で発表した。また論文発表としては, Methods in Enzymology, Mutation Research, Mutagenesis, J. Am. Chem. Soc., Chem. Lett., J. Mat. Chem., Chem. Biol., Helv. Chim. Acta., J. Org. Chem., Peptides, Nucleoside Nucleotides and Nucleic Acids, Heterocycles, 核磁気共鳴と医学, JCPE Journal等の学術誌並びに厚生科学研究報告書, 医薬品機構研究成果報告書, 科学技術庁科学技術振興調整費 (総合研究) 成果報告書, 文部科学省科学研究費報告書 (基盤研究) などに発表した。

機 能 生 化 学 部

部 長 澤 田 純 一

概 要

平成13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等を継続して行ったが, 主たる研究内容は, 薬物アレルギー, 食物アレルギー, 神経接着分子に関わるものであった。また, 薬剤反応性遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業を行うプロジェクトチームの核の一つとして, 遺伝子多型解析及び異型遺伝子の機能解析等を継続した。また, 手島第一室長を中心にRI管理に関する業務を行った。

人事面では, 平成13年7月1日付けで, 大阪支所薬品試験部より前川京子研究員を迎えた。また, 平成14年4月1日付けで, 中島治研究員が, 主任研究官に昇任した。

海外出張としては、澤田部長が第6回ICH会議（平成14年2月）に出席するために、ベルギーに出張した。

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化学物質（ダイオキシン等）による免疫毒性に関する調査研究を継続した。加えて、国際的動向を踏まえた医薬品等の新たな有効性及び安全性の評価に関する研究の中で、免疫毒性試験法の標準化に関する調査研究を行い、免疫毒性試験法ガイダンス中間案の作成を行った（厚生科学研究費）。また、含窒素系農薬をモデル系として、化学物質の複合投与によるアレルギー亢進の有無を検討した（厚生科学研究費）。

(ii) 環境化学物質並びに薬物による過敏症の安全性評価への応用を目的として、マスト細胞から遊離されるケモカイン等の種々の因子の測定を行うと共に、それら因子の産生を制御する物質の探索を行い、さらにDNAマイクロアレイを用いて細胞内遺伝子発現に関する検討を行った（特別研究費、文部科学省科学研究費）。また、食品及び遺伝子組換え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に、アレルゲンの調製、インビトロ分解性試験法の開発、動物モデルの開発、及びヒト血清を用いるインビトロでの抗原性の確認法に関する研究を行った（厚生科学研究費）。さらに、環境要因と小児のアレルギー発症との関係を調べるための疫学的調査研究を行った（厚生科学研究費）。

(iii) 薬物アレルギーの *in vitro* 試験法を開発する目的で、不活性薬物の代謝活性化に関する薬物代謝酵素の種類につき、その同定を行った。また試験法の条件検討を行った（国立機関原子力試験研究費）。

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) マウス細胞における成長ホルモン受容体の分解機構について解析を行った。

(ii) ウシ脳より OBCAM（オピオイド結合性細胞接着分子）を精製し、糖鎖解析を行った。

(iii) OBCAM 結合活性を有する蛋白質をラット脳 P2 画分からファーウェスタン法によって検出した。さらに改良を施した二次元電気泳動とファーウェスタン法を組み合わせ、その蛋白質の性質を詳細に検討した。

(iv) GPI アンカー型糖蛋白質の生合成に関与していると考えられている小胞体シャペロン・カルネキシンの機能を他のシャペロン蛋白である Bip と比較すると共に、リフォールディングへの関与につき検討した（文部科学省科学研究費）。

3. モノクローナル抗体の機能変換等に関する研究

(i) 血液脳関門透過性抗体を調製する目的で、抗モルヒネモノクローナル抗体の scFv と、血液脳関門透過性運搬体としての3種類のペプチドとの融合タンパクを大腸

菌中で発現させた。（国立機関原子力試験研究費）

4. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

ミレニアムプロジェクトの一環として、薬剤反応性遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業（医薬品機構基礎研究推進事業研究費）を遂行し、以下の研究を行った。

(i) 抗不整脈薬、ステロイド薬、抗てんかん薬等の薬剤反応性遺伝子につき、一塩基多型を主とする多型解析を行った。

(ii) 抗喘息薬ジプロピオン酸ベクロメサゾンの標的受容体であるグルココルチコイド受容体につき、新たに見いだした一塩基多型に関して機能変化を解析した。

(iii) 抗てんかん薬カルバマゼピンの解毒代謝に関与するエポキシド加水分解酵素につき、新たに見いだした一塩基多型に関して機能変化を解析した。

代 謝 生 化 学 部

部 長 澤 田 純 一

概 要

平成13年度の研究業務として、白血球の運動代謝制御に関する研究、刺激に対する細胞の情報伝達・機能発現機構に関する研究、脂質・脂溶性薬物の代謝・動態に関する研究、細胞内カルシウム動態の制御と循環器病態に関する研究、ならびに薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究等を行った。また、当部は、本年度より開始された厚生労働省のメディカルフロンティア・プロジェクトに参加することになり、核内受容体とそのリガンドに関する研究を開始した。人事に関しては、平成14年4月1日より、佐藤陽治主任研究官が遺伝子細胞医薬部へ異動した。

研究業績

1. 白血球の運動代謝制御に関する研究

(1) 血球の活性化時におけるFアクチン形成に対するLIMキナーゼ発現ベクターの影響を検討した。（ヒューマンサイエンス振興財団委託金）

(2) アクチン結合タンパク質コフィリンのアンチセンスオリゴヌクレオチドを利用し、白血球の機能発現とアクチン動態との関連について検討した。（ヒューマンサイエンス振興財団補助金）

(3) インテグリンCD18およびコフィリンの発現に対する内分泌攪乱物質の影響を検討した。（環境省公害予算）

2. 刺激に対する細胞の情報伝達、機能発現機構に関する研究

(1) 食細胞の機能蛋白発現に関与する転写因子PU.1の活性を測定するルシフェラーゼベクターを構築し、それを導入した安定細胞株を樹立した。（環境省公害予算）

(2) LIM キナーゼおよびそのドミナントネガティブ変異体の発現による細胞内蛋白のリン酸化変動を検討した。(ヒューマンサイエンス振興財団委託金)

(3) 心臓洞房結節単離細胞の形態的特徴の相違によりエンドセリンに対する電気生理学的反応が質的に大きく異なることを明らかにした。(試験一般)

(4) ラットを用いて、覚醒剤長期投与による脳内メッセンジャーRNAの発現変動をDNAチップを用いて一斉解析した。(ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究)

3. 脂質・脂溶性薬物の代謝・動態に関する研究

高脂血症の予防・治療薬の開発に関する研究として、肝ミクロゾームトリグリセリド転移タンパク(MTP)がVLDL形成中間体へのトリグリセリド積込過程に機能することを明らかにした。(ヒューマンサイエンス振興財団委託金)

4. 細胞内カルシウム動態の制御と循環器病態に関する研究

(1) 心筋小胞体機能不全と心肥大発症および心不全発症との関連をトランスジェニック動物を用いて検討した。(厚特研)

(2) 甲状腺ホルモンの血管平滑筋細胞における遺伝子発現制御作用を評価し、平滑筋細胞内カルシウム制御機能への影響の可能性を検討した。(文科研)

(3) 心筋細胞において甲状腺ホルモンとその誘導体の遺伝子発現効果を比較し、甲状腺ホルモン誘導体の遺伝子選択性を検討した。(ヒューマンサイエンス振興財団補助金)

5. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

抗癌剤イリノテカンとその代謝産物の分析法の確立、ならびにファーマコキネティクス(PK)解析法を検討し、イリノテカン投与患者の生体試料を用いたPK解析を開始した。(医薬品機構研究費)

6. 核内受容体とそのリガンドによる心筋梗塞病態及び動脈硬化の抑制研究

(1) 心筋細胞における核内受容体刺激による遺伝子制御作用を抑制するためにはRXRアンタゴニストが有効であることを示した。(医薬品機構研究費)

(2) HDL新生反応に必須の膜トランスポーターABCA1の発現促進にLXR/RXRならびにPPAR γ /RXRを活性化するRXRアゴニストが有効であることを示した。(医薬品機構研究費)

化学物質情報部

部 長 森 川 馨

概 要

化学物質のリスク評価に関連した国際協力研究、およ

び被害を想定した健康危機管理対応事業を継続すると共に、化学物質プロファイル等の安全性情報の作成・提供システム構築を進めた。当所の研究情報ネットワークを進展させるとともに、創薬と化学物質の安全性に関する分子レベルでの理論的研究を進めた。

支援業務(業務成績)

1. 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

第9回最終原案検討会議(オタワ, 2001年10月)に関沢室長が出席し、当所で作成したDiethyl phthalateのCICAD原案を含む8物質群のCICAD原案について、リスク評価と最終検討を行った。当所ホームページ上のこれまで出版されたCICADの和訳、及びCICAD作成の基礎となる国際機関や各国の評価文書リストに関するデータベースの内容を更新した。

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21物質のICSC原案を作成した。2001年10月(ポーランド)、2002年3月(カナダ)の原案検討会議に山本主任研究官が出席した。また、約480物質のICSCを日本語に翻訳し、ホームページ上で提供した。

3) 化学物質のリスク評価手法のハーモニゼーション

健康と環境へのリスクの統合的な評価手法開発のために2001年4月にIPCS(国際化学物質安全性計画)が主催したワークショップでの討議を基に検討を進め、成果をWHO(世界保健機関)の報告書としてまとめたほか、国際的な学術誌に投稿した。

4) 半導体産業で使用される化学物質の安全性データ集作成

IPCSにおける化学物質安全情報提供の一環として表記データ集を作成するためデータを収集し、説明文を作成した。

5) GINC(Global Information Network on Chemicals)プロジェクトの推進

GINCホームページの作成及び管理を継続した。また2001年4月にアジア地域の化学物質管理および農薬中毒に関する情報交換と協力についてのGINC東京会議を開催し、15ヶ国30数名が参加した。

2. 図書・情報サービス

1) 雑誌類の管理と相互貸借

雑誌18タイトルを中止、14タイトルを新規に購入し、単行本227冊を購入した。この結果、購入中の雑誌は309タイトル、管理している単行本は11,948冊となった。文献の相互貸借事業に関しては、外部から861件の依頼を受け、外部へ1,454件を依頼した。

2) 図書情報検索サービス

ネットワーク対応図書管理システムについてハードおよびソフトの更新を実施した。電子ジャーナルの採用を

増加させた。

3) 国立医薬品食品衛生研究所報告編集業務

当所の国立衛研報編集委員会に協力し、第119号の作成と配布に協力した。

3. 研究情報基盤の整備

全所的ネットワークのセキュリティ強化のため、ユーザ登録者の確認、所外からのPPP接続廃止、及びネットワークセキュリティ監査を実施した。また所内情報およびICHなど厚生労働省からの依頼情報を含めNIHSホームページを介して外部に発信する情報を充実した。

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

内分泌攪乱関連物質の構造データを含むデータベース、及び第十四改正日本薬局方英文版をWWW上で公開した。また日本薬局方及び日本医薬品一般的名称のデータベース化を継続して行った。

2. 新しい分子計算法の開発

タンパク質やDNAのような巨大分子系を計算できるフラグメント分子軌道法 (FMO法) プログラムの開発を継続し、核内受容体タンパク質とリガンド分子の結合性予測に適用した。

3. 生体分子の構造と機能に関する研究

受容体のデータベースと細胞内信号伝達に関する知識ベースの開発を継続し、酵素データベースの構築を開始した。これらの生体分子データベースと薬などの低分子化合物データベースを統合した。

4. 化学物質の安全性に関する研究

1) 内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究—特に低用量・複合効果作用機構について

内分泌かく乱化学物質による「低用量影響」に国民の関心が寄せられたため、研究班を組み文献を精査し、厚生労働省検討会の分担報告を作成した。低用量における生体影響の実験的事実は認められたが、影響の性質、作用メカニズム、用量-反応関係などを検討した結果、現時点で確認されたデータからは有害影響を及ぼしているとはいえず、たとえば人の曝露がもっとも大きい場合のひとつである血液透析チューブ樹脂製品からのビスフェノールA溶出については、適切な代替製品がない中で有益性に比べてリスクは無視しうるものと考えられた。(厚科研)

2) 環境中の複合化学物質による次世代影響リスクの評価とリスク対応支援

環境中に排出され、あるいは生体内に存在する化学物質が人と野生生物の次世代に及ぼす有害影響の可能性について、実測データとその解析から、従来のリスク評価を書き換える可能性を示す新しい知見を得た。(厚移替)

3) 「化学物質の毒性情報等提供システムの調査・検討」

として、フッ化水素、クロロピクリン、ジクロロメタンについて前年度に引き続き毒性情報に関する毒性プロファイルを含む化学物質プロファイルを作成した。(厚移替)

4) 「化学物質管理能力強化ネットワークのためのプロジェクトインベントリー」の構築を行った。(厚移替)

5. 化学分析と情報

化学物質の測定から得られる情報の量と質に関する研究を行った (HS委託)

医薬安全科学部

部 長 長谷川 隆 一

概 要

当部は、平成14年4月1日付けで新設された。当部の所掌は、医薬品の安全性に係わる情報の解析・評価に関する研究、薬剤疫学的手法を用いた医薬品の有効性、安全性に関する研究、副作用発現の予測・防止等医薬品の安全性確保に必要な試験研究で、3室より構成されている。

長谷川隆一部長は安全性生物試験研究センター総合評価研究室長との併任として、浦野勉第一室長は医薬品医療機器審査センター審査官と併任として、鹿庭なほ子第三室長は薬品部第三室長より、頭金正博主任研究官および黒瀬光一主任研究官は旧国立公衆衛生院衛生薬学部主任研究官より、高橋登主任研究官は厚生労働省医薬局審査管理課より配置換えとして平成14年4月1日付けで就任した。また、吉谷隆志氏および杉山永見子氏はミレニアムプロジェクト/薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業の研究補助員として、アデコ・キャリアスタッフ (派遣会社) より平成14年4月1日付けで派遣された。

安全性生物試験研究センター長

井 上 達

安全センターの試験・研究業務は、1) 医薬品 (麻薬、劇毒物を含む) 関連、2) 食品・食品添加物関連、3) 農薬・残留農薬関連、4) 生活化学物質関連、及び、5) 新規ならびに既存の諸々の化学物質の安全性評価などの諸課題からなる。

1) の医薬品関連については、安全センターは内部審査に協力する形で審査センター各部の担当する申請書類の事前審査等を進めてきた。現在審査は順調に行われているが、今後とも常に連絡を密にしてよりよい体制作りを目指したい。なお内部審査体制のあり方については、審

査センター及び安全センターの担当者間で引き続き迅速化と円滑討議のための協議が行われている。また本年度は、医薬品の非臨床試験ガイドライン解説書の改訂作業も進行した。麻薬、劇毒物については、毒性部において、系統的な点検作業が実施されており、詳細は当該項目を参照されたい。

2) の食品・食品添加物関連については、従来のいわゆる食検費にもとづく各種食品・食品添加物の変異原性試験（変異遺伝部）や、亜慢性試験（毒性部・病理部）が継続している。加えて本年度は、これらの課題に対して厚生科学研究の形での既存食品添加物のあらたな安全性点検事業を準備する方向で検討が始動した。「食品の安全性」巡る話題では、るい瘦効果をうたったいわゆる健康食品ガルシニアの2年間慢性毒性試験（毒性部）における精巢毒性所見を、厚生労働省が中間結果段階で公表したことが注目される（平成14年3月）。“その時点で知り得た限りでの情報のいち早い開示”というあらたに安全センターに求められている時代の要請に真摯に対峙して立ち向かう決意を新たにさせられた。

3) の農薬・残留農薬関連では、安全センターならびに食品部の各委員と、大学等の外部委員の協力による安全性評価（いわゆる農薬安評）が行われてきた。これと併せて既存審査品目の中から内分泌かく乱性の危惧の指摘されている物質を抽出して、文献調査を加味した現段階で可能な再審査の準備も始まった。

4) の生活化学物質関連では、フタル酸の安全性評価が進み、調理用手袋、おもちゃへ限定した規制など基準値の検討が進んでいる。

5) 最後に新規ならびに既存化学物質関連の化学物質安全評価については、安全センターが大学関係者と共に協力してきた化審法による化学物質の安全性審査作業に関連して、その電子化計画が進行している。また本年度は、残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs条約）の採択に伴って生じた、本邦で未規制であった2物質（トキサフェンおよびマイレックス）の第1種指定化学物質指定の検討が始まり、これにも参画している。

調査業務としては、種々の国際機関（ICH、OECD、JECFA、IPCS等）での各々の行政関連国際活動に対応したリスクアセスメント業務がある。OECDにおける内分泌かく乱関連や、皮膚刺激性関連の試験法の検討、JECFAの継続的な個別審議課題など取り扱い業務は膨大であるが、その詳細についてはここでは記録を割愛する。ICH（医薬品等国際ハーモナイゼーション促進事業）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）の安全性部門として、発がん性（S1B）、遺伝毒性（S2B）、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）などの4分野について、ガイドライン作成等専門家会合の開催・討論が行われている。なお、平成13年度からは引き続き新たな研究班が発足した。毒性関連のOECDテストガイドラインのコメント対応は、13項目のガイドライン項目に対してあらたなナショナルエキスパートを置くことで、その纏め役として国立衛研の14名、外部からの9名の専門家が協力する方向であらたな人選に入っている。

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る。このため安全センターの各部では、先端技術の導入をも含む安全性評価手法の改善を常に積極的に推進するよう努めるとともに、前述の「食品の安全性」を巡って象徴的に明らかになったような、ハザードとリスクの独立したいち早い情報開示というあらたな要請に真摯にこたえてゆくよう努力を傾けたい。

なお、昨年度指摘したcDNAマイクロアレイを応用したトキシコゲノミクスプロジェクト研究は、今般平成14年度をもって当所を中心としたプロジェクト研究として、新規発足の運びとなった。新世紀にふさわしい第一歩がいよいよ始動しようとしていることを慶びたい。

最後に安全センターの人事面では、平成13年7月、黒川雄二センター長の勇退後、空席となっていたセンター長職に井上 達が着任し、首藤所長による同、事務取扱が解除となった。なお、毒性部長は、井上 達の兼職。これに先立つ平成14年6月、安全センター変異遺伝部主任研究官松岡厚子は、療品部主任研究官への配置換え、病理部主任研究官の小野寺博志は、医薬品医療機器審査センター審査第一部への併任としてそれぞれ異動した。明くる平成14年は、4月1日付で、安全センター総合評価室長谷川隆一が、所の機構再編成に伴って発足した医薬品安全科学部の初代部長として、また安全センター変異遺伝部主任研究官鈴木孝昌は、遺伝子細胞医薬部第三室の室長としてそれぞれ異動した。尚、総合評価室長は長谷川部長の兼職。また、当所から厚生科学課への併任出向には、平成14年5月1日から安全センター薬理部の宮島敦子が対応することとなった。

以上により、平成14年5月末現在のセンターの構成は、4部、1省令室、16室となり、センター長1、部長3（欠員1）、省令室長（兼職）、室長16、主任研究官21、研究員7、動物飼育長1、で、総計49名（前々年度より5名欠員）で、この他、協力・流動研究員8、研究生・実習生17、および、技術・事務補助員20、客員研究官10が在籍する。尚、安全センターの組織については、毒性部動物管理室の省令室化、総合評価研究室の増員が、依然として安全センターの希求する将来へ向けての課題となっている。

海外出張としては今期も厚生労働省・文部科学省等の

関連予算による、種々の国際機関での行政関連会議 (ICH, OECD, JECFA, IPCS等) あるいは各種の学術関連集會等に対して、安全性生物試験研究センターを構成する研究員は積極的に貢献した。国際協力事業団 (JICA) による中国の医薬品審査事業の援助のための訪中も相互に数次にわたって行われている。それらの個々については、各部の業務報告を参照されたい。(センター長井上の海外出張等についても、毒性部長事務取扱としての業務と重複することが少なくないので、本年度については毒性部の項に一括して記載した。)

毒 性 部

部長事務取扱 井 上 達

概 要

7月1日にて毒性部長の井上 達は安全性生物試験研究センター長に着任、併せて毒性部長事務取扱併任となった。10月1日付で、梅村隆志主任研究官は、病理部主任研究官へと異動した。ヒューマンサイエンス財団流動研究員として平成11年4月より研究に従事していた北林あや博士は10月1日付けにて米国NIEHS博士研究員として転出し、同HS流動研究員としては、14年4月27日よりあらたにLi Guang-Xun博士が韓国の延世大学医学部より来日した。12年11月22日よりJICA派遣研究員として在籍した中国薬品生物製品検定所のHuo Yan (霍艶) 修士及びLi Bao Wen (李保文) 学士は、10月27日で研究を終了して帰国した。短期研修では、同じくJICA関係で、マラヤ連邦よりMurizal Zainol氏 (9月3日より10月12日)、タイ王国よりNavakanit Sachanonta氏 (10月15日～11月16日) ならびに中国よりWen-Ping Fan氏が在籍した。

農水省農業検査所からの本年度の研修には、佐々木隆氏が来所した (9月17日～12月12日)。また、科学技術振興調整費知的基盤研究に関連して特別研究員として研究に従事してきた鈴木幸子博士は、3月31日付けでこれを終了し、あらたに同科振費バイオストレス研究のために引き続き在籍することとなった。尚、非常勤、賃金職員あるいは派遣職員として國 豊博、松田菜恵、寺坂勝利、中村祐子、森田紘一、藤平千鶴子、宇佐美好子、相田貴美代、山内千春、見城美奈子、赤倉健嗣らの技術吏員及び、勝 紀子、長野葉子、村上由紀子の事務吏員があらたに業務に参加し、上野克典、上原 泉、新澤靖子、桜井玲子、和田郁子の各員が退職した。

業務関連での海外出張では、井上 達 部長は、欧州連合の招きによる内分泌障害性化学物質に関するワークショップへの出席 (6月17日～21日、スウェーデン王国バルスタ市)、IARC-WHO主催の栄養とがんに関する

欧州会議への出席 (6月21日～26日、フランスのリヨン市)、WHO/IPCSの内分泌かく乱化学物質に関するアセスメント文書出版運営委員会への出席 (7月14日～20日イタリア国オルタ・サン・ギリオ)、ギャップ結合国際会議の運営委員ならびに研究発表 (菅野、平林、両室長同行：8月4日～9日米国ハワイ州ホノルル)、ダイオキシン類による内分泌かく乱物質および細胞間連絡作用に関する研究交流 (9月6日～9日、韓国ソウル市)、またダイオキシン2001：第21回塩素化環境汚染物質に関する国際シンポジウムへの出席と発表 (菅野室長、金子室長、高木主任研究官ら同行：9月10日～14日、慶州市)、OECDにおける第33回化学品合同委員会特別課題「リスクアセスメントにおけるトキシコゲノミクスとプロテオミクス：その利用と意義」での講演 (2月5日～8日、パリ市)、“OECDの環境化学物質の生体障害性に対する新手法改良手法などの実効性確認と行政対応に関する専門家会議”での講演と討議 (菅野純室長、高木篤也主任研究官同行、3月4日～10日、ストックホルム市)、また、米国の代替試験法に関する各省間調整委員会 (ICCVAM) へのパネル専門家としての出席 (5月19日～24日、ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク市) 等のためそれぞれ出張した。菅野 純 第1室長は、その他、内分泌かく乱化学物質に関する OECD/EDTA 運営グループの第5回会議への出席 (5月28日～29日、パリ市へ)、米国NIEHSのトキシコジェノミクスセンターのレンモンドテナント所長らとの研究交流 (7月18日～21日、ノースカロライナ州リサーチトライアングルパーク市) の為それぞれ出張した。川崎 靖第3室長は、斎藤実主任研究官と共に、JICAの短期派遣専門家として中国・医薬品安全性評価管理センターにおける非臨床試験のGLP指導のために11月5～17日および平成14年3月18日～4月5日の2回にわたって北京へ出張した。平林容子機器試験室長は、マウス先端研究会議での発表 (7月31日～8月10日、米国メイン州バー・ハーバー) 引き続き国際ギャップ結合会議での発表 (8月4日～9日、ハワイ州ホノルル市)、また、幹細胞に関するキーストンシンポジウムでの聴講と発表 (3月16日～24日、コロラド州キーストン) などのためそれぞれ出張した。金子豊蔵動管室長は、先のダイオキシン国際シンポジウムの他、JICAの中国医薬品関連プロジェクトでの実験動物棟建設にあたっての援助のため10月18日～27日、北京市へ出張した。高橋 雄および北嶋 聡の両主任研究官は、マウス分子遺伝会議での発表のためハイデルベルグ市へ (8月22日～26日) 出張。高木篤也主任研究官は、既述の同行出張の他、FAO/WHO 合同残留農業専門家会議への出席 (9月17日～24日、ジュネーブ)、OECD第6回GLPトレーニングセミナーの受講 (3月18日～22日、ノースカロライナ州ローリー市) な

どの為それぞれ出張した。

試験業務

1. 既存化学物質（希土類元素など）の毒性試験

- 1) 希土類元素（Y, La, Eu, Gd）単回及び28日間投与試験を行い、血清および臓器内の希土類元素を測定した。
- 2) マラカイトグリーンについてラットによる28日間強制投与試験報告書を作成した。
- 3) 酸化的障害物質（パラコート）のマウスを用いた単回投与試験を行い終了した。（科学技術振興調整費 知的基盤整備推進制度）。

2. 食品及び食品添加物の毒性試験

健康食品の安全性に関して、プロポリス、ガルシニアエキス、セイヨウオトギリソウについて、ラットによる12ヶ月間の慢性毒性試験を行っている（食品保健部新開発食品保健対策室）。また、食品添加物として、コメヌカ抽出物について、ラットによる90日間反復投与毒性試験を実施した（食品保健部基準課）。

3. 医薬品及び医用材料の安全性に関する試験

1) 毒・劇物指定調査のための毒性試験

六塩化タングステン及びキシレノールの経口・経皮急性毒性試験及び皮膚刺激性試験を行った（医薬局審査管理課化学物質安全対策室毒物劇物係）。

調査業務

1. 化学物質及び食品などによる健康リスク評価

1) 放射線照射食品の安全性評価

頭記について、次の諸点について昨年度まとめた検討結果が報告書として提出された。すなわち照射食品では、放射化残留線量と放射線分解物の影響が検討対象となること。前者では問題になる線量に至らないという認識、後者では放射線分解物が、①食品の特定成分を欠失（もしくは欠乏）させる場合と、②何らかの生体障害性変性産物を生ずる場合が挙げられ、①ではビタミン類の破壊、アミノ酸の分解、また②では過酸化物質・ラジカルの生成などが変異原性・発がん性を示す可能性などが検討の対象となり得る。（食品保健部）。

2) 健康食品「アガリクス茸」に関する安全性の観点から、アガリクス属キノコに関する毒性関連の文献を調査した。現在商品販売されている「アガリクス茸」に関する毒性情報はなかった。

3) 内分泌関係

化学物質の内分泌かく乱作用を評価するための毒性試験法は未だ確立されておらず現在、OECDなどの国際機関との連携を取りつつ、あるいは、リードカントリー・リードラボラトリーとして、EDCsスクリーニング法の開発・評価プロジェクトの展開に参加してきている。High Throughput Prescreening(HTPS)、げっ歯類子宮増殖試験、Hershberger試験等の高次Screening試験などを含む諸試験を米国EPAや他の研究機関と協力体制の

もとに、化学物質の内分泌かく乱メカニズムに着眼したスクリーニング手法の開発を推し進めている。

内分泌かく乱作用は受容体原生毒性をその特徴とし、一般的に従来の毒性学の用量反応パターンが当てはまらないものであり、この特性において低用量問題は内分泌かく乱作用解明の核心問題である。当研究所は、これに関する研究を進めている。又、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」において、スクリーニング/テストングに関するスキーム作りに際しての科学的進言を行った。

4) 「タール色素」に関する安全性の観点から、皮膚感作性およびその代替法に関する文献を調査した。タール色素全83品目について、ヒトでの皮膚感作性の有無ならびに実験動物を用いた感作性実験に関する文献調査をおこなうとともに、両者の比較・検討をおこないその結果を示すとともに、さらに動物代替法に関する調査も検討し、その有用性について報告した（医薬局審査管理課）。

5) 既存化学物質の安全性評価

産業用途などに用いられている既存化学物質のうち、生産量が多く、これまでに安全性の評価が行われていない物質について、ラットにおける28日間試験および簡易生殖試験の結果より毒性の有無と無影響量をもとに、安全性の評価のための調査を行っている。

研究業務

1. 毒性試験法の開発に関する実験的研究

1) ヒト型免疫系再構築マウスの開発

これまで作製したHLA遺伝子座導入マウスES細胞をさらに改良し、よりHLA遺伝子座に局限したHLA遺伝子座導入マウスES細胞を用いて、トランスジェニックマウスを作製した。また、キメラマウス骨髄を他のマウスへ移植する条件を確立した。ヒト型免疫系再構築マウスについて、「ヒト6番染色体断片を含むキメラ動物」として特許を出願（平成13年11月2日出願，出願番号：特願2001-337829）した（医薬品機構基礎研究）。

2) 複合的に作用する毒物活性の評価系開発

複数の毒物が同時に作用する環境における毒性評価法の開発を検討する。平成13年度はH12年度に引き続き酸化的ストレス反応に関わる毒物として、シアン化ナトリウム（ミトコンドリア障害）、パラコート（活性酸素誘発）及び2-デオキシグルコース（解糖系障害）の3剤を組み合わせin vitroにおける毒性のメカニズム面からの評価を進めている。

3) 化学物質等の環境リスク対策の基盤研究としてのトキシコゲノム研究

日本におけるポストゲノム毒性学のセンター的役割を担うべく、基礎的研究から応用研究開発まで幅広い活動を行なっている。

既に内分泌シグナルや発生・分化、発がんにおける遺

伝子発現プロファイルを得、新たに見出された関連遺伝子情報などを元に基礎的研究を行なっている。また並行して行なっている既知毒物における情報を統合した知識データベースを構築し、今後問題になりうる未知の新規毒物に充分対応できる全ゲノムを網羅したマイクロアレイを志向した毒物検査解析システムの開発を検討している。

2. 発がん性研究や幹細胞系を含む分裂細胞系関連の研究

1) 化学物質や放射線による細胞障害機構、とくにテロメア及びテロメアーゼの変化に関する研究 (学振科研補助 基盤研究C, 科技庁国研原子力)

細胞寿命や発がんに関与するテロメアやテロメアーゼの変化を分子指標とした細胞障害評価系の構築のため、実験動物及び各種遺伝子改変マウスを用いて放射線や化学物質による細胞障害過程におけるテロメアの長さやテロメアーゼ活性の変化と障害発現機序との関連について解析をすすめている。

2) プロモデオキシユリジン投与 (BrdUrd) と近紫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 (特研・遺伝子発現班, 科技庁国研原子力)

BUUV法について、近紫外線照射装置を開発し、従来法で得た結果との比較検討を進めた。

3) 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)

本研究課題は発がん試験法の改良に当たり、特に遺伝子改変動物を導入することによる改善の可能性を探るのであり、遺伝子改変動物の病態生理面での特徴を明らかにし、それら遺伝子改変動物を用いた発がん性試験を行い、その結果のヒトへの外挿の可能性を原点に立ち返って検討し、もって、このものの短期発がん性アッセイ系としての可能性について再整理することを目的としている。

平成13年度の研究結果は、1) p53欠失マウスのフェノールフタレインに対する発がん特性の検討を含むp53欠失C3H系マウスの遺伝子傷害性化学物質に対する発がん検出系の樹立、2) 特異な遺伝子傷害性発がん様式を示すp53欠失でのベンゼン吸入暴露による白血病誘発と、C3H/HeとC57BL/6のp53欠失マウスにおける系統差について、および、3) マイクロアレイを用いたエピジェネティック発がんの遺伝子発現の特質についての3点からなる。

(1) p53ホモ欠失C3H系マウスの遺伝子傷害性化学物質に関する発がん検出系の樹立：p53欠失マウスは、遺伝子傷害の修復不全が発がん性を亢進させるものである。例外と考えられているフェノールフタレインについて、p53のホモ欠失およびヘテロ欠失の双方を用いて発がん

性を検討した。今回、ホモ欠失群での腫瘍発生が先行して観察され、少なくともホモ欠失については、おそらくフェノールフタレインの遺伝子傷害性の特性に基づく修復不全が関与して発がん性に至るものと考えられ、先に観察されているヘテロ欠失マウスにおける相反した結果は、この化学物質の特性にかかわる発がん性の修飾結果と推測している。

(2) C3H/HeとC57BL/6のp53欠失マウスにおける系統差：p53欠失マウスでは双方の系統とも遺伝子用量に反比例して高い白血病誘発感受性が放射線に対してもベンゼンに対しても観察されたが、C3H/He系の方が対照群における自然発生の発がんカーブとの乖離が顕著であった。

(3) マイクロアレイを用いたエピジェネティック発がんの遺伝子発現の特質：マイクロアレイを用いたエピジェネティック発がんの遺伝子発現の特質について調べると、p21/waf1のような遺伝子での発現の亢進が観察された。経時的に観察を行うと、サイクリン関連キナーゼなど細胞周期制御関連遺伝子の消長も観察された。

(4) c-Ha-ras遺伝子導入マウスを用いた2段階肺発がんモデルでプロモーターとしてBHTを組み合わせて肺発がん物質短期検出系rasH2/BHTモデルの樹立を目指し、種々被験物質についてその感受性を検索し、標準プロトコルを確立した。

4) 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 (学振科研補助 基盤研究C)

アリールヒドロカーボン受容体 (AhR) を介するシグナルが、造血並びに造血前駆細胞に与える影響について、解析する目的で、このAhR遺伝子欠失 (KO) マウスの造血幹細胞動態の解析を進めた。また、酸化ストレス機構をみるベンゼンを投与したAhR-KOマウスでは造血毒性が除去され、このときp21の発現がwild typeマウスでは上がるのに対して、AhR-KOではこの発現上昇が観察されないことを見いだした。さらにこのようなAhRシグナルの関与下でのベンゼンの酸化ストレスが、Trxの過剰発現系で、同じく、しかし別の機構をもって緩和されることを見いだした。

5) 発がんプロモーター作用の研究：特に細胞間連絡 (GJIC) の白血病発症への防護と促進の二面的役割 (学振科研補助 基盤研究B)

発がんなどに際して生じるGJIC阻害とapoptosis抑制が何らかの関連を持つものかの如何を念頭に置いて、ミシガン州立大学のJ. Trosko博士、ソウル国立大学のKS. Kang博士との国際交流の一環として研究を進めている。造血幹細胞の増殖制御は、上皮系の細胞と同様の機構が存在し、我々はTGF- β の抑制制御が、造血幹細胞に認められることを明らかにしてきた。細胞間連絡を司るギ

ヤップ結合分子, コネキシン (Cx) の造血機能への関与を示す知見は乏しいが, Cxの43についてはRosendaalらが, 32については我々が, いずれもそれらの欠失(KO) マウスで一端を明らかにしてきた。さらに, Cx32が白血病化学発がんへの防護と同時に促進という異なった二面性の作用を持つことを示唆する結果を得た。

6) 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, 大腸発がん剤であるアゾキシメタンをプロポリスと同時に投与し, 大腸上皮粘膜への細胞増殖活性等を検討している(食品保健部)。

3. 生殖・発生障害に関する基礎的研究

1) 初期中胚葉に発現するMesp1の心臓・血管形成における機能解析, ならびにCre-loxPシステムを利用した心臓中胚葉におけるMesp1発現細胞の細胞系譜解析を詳細に検討した。また体節形成に必須の転写因子Mesp2の役割について, Notchシグナル系及び分子時計との関係の遺伝学的解析, 相同遺伝子ノックインによる機能解析, サブトラクション法による下流遺伝子の探索とその完全長のクローニングに関する研究を行った。

4. 恒常性維持機構に関わる内分泌系・免疫系・神経系に関する研究

1) 薬物乱用と薬物依存性の強化効果の修飾並びに薬物依存性評価法に関する基礎的研究

薬物摂取経路が静脈内投与に限定されていたアカゲザルによる薬物自己投与試験法を, 経口投与も出来るような試験法に改善した。(監査指導・麻薬対策課)。

2) 内分泌障害性化学物質の作用機序と検出系の確立に関する研究

外来性エストロゲン様物質がエストロゲン受容体(ER)に作用することによって, 蛋白の誘導, そして最終的に障害の発現へと至るのであれば, 障害が発生する手前の段階, すなわちmRNAの発現の段階での変化を内分泌かく乱化学物質の評価の指標とする事が出来る可能性がある。今年度は, その足がかりとして, 卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験においてER α を介するエストロゲン応答遺伝子を整理し, エストロゲン作用を検出するための遺伝子マーカーを探索することを目的とした。内分泌かく乱化学物質による遺伝子発現変動パターンを網羅的に解析するため, 卵巣摘出マウスに17 β -estradiol (E2)を単回投与し, 遺伝子群発現の経時的変化を, GeneChipおよびガラス型マイクロアレイを用いて, 網羅的に解析した。更に, 変化のみられた遺伝子に関しては, 定量RT-PCRを行ない確認した。

(1) OECD/EDTAの押し進める子宮肥大試験及びHershberger試験法の適用に関する研究: 子宮肥大試験につい

ては, プレバリデーション第2ステップの終了を受け, 論文作成を進めた。

(2) ホルモン様活性化学物質のエストロゲン様活性の検出系として, レポーター遺伝子導入酵母による測定の高スループット化を進めた。

(3) 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目的で, 神経系発達の初期における内分泌かく乱物質の影響を検索すべく, マウス胎児より神経細胞を分離・初代培養して得られるニューロスフィア培養系によるDNAマイクロアレイ等の手段を加えた解析を引続き進めている。

3) 神経管閉鎖における性ホルモンとp53のシグナルクロストーク

p53欠失マウスの系に於いてエストラジオールがこの外脳症発生を亢進することを見出した。この系をモデルに用い, 発生初期中枢神経系における性ホルモンの作用点を検索し, 性ホルモンと発生調節機構との新たな生理的相互作用を葉酸などの外的要因を含め, 引続き検討している。

4) 表面プラズモン共鳴高速分析法

エストロゲンレセプターを介した内分泌かく乱作用が疑われる化合物について, これまでに開発した表面プラズモン共鳴装置による分析法を用いて, 個々の化合物の差異についてレセプター立体構造に与える影響を想定した検討を進めている。また, 他の核内レセプターについて同様のアッセイ系を構築するための開発研究を行った。

5) 3D-QSAR

内分泌かく乱化学物質の標的であるエストロゲン受容体とリガンド結合体の立体構造解析に基づく結合自由エネルギー計算によるコンピューターを用いたリガンド候補化合物の理論検索を行っている。今年度は5万余種の化学物質が登録されているデータベースよりアンタゴニスト作用が予測される化合物のバーチャルスクリーニングにより化合物の検索を行った。また, そのいくつかについてレポーター遺伝子アッセイにより実際のアゴニスト・アンタゴニスト活性の検討を行った。

6) 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。この細胞及びそれらから得られる胚葉体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方法を引続き開発している。

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, ダイオキシン類およびフタル酸エステル類の体内動態についての調査研究, 臨床薬物動態試験ガイダンス及び薬物相互作用検討ガイダンス作成に関する調査研究を行った。また, 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, 新規及び既存化学物質の安全性評価, GLP評価などの行政協力を行った。なお, 平成11年度より審査センターにおける新薬の承認審査について薬理学及び薬物動態学の面から大野部長, 井上室長, 中澤室長, 小澤室長及び紅林室長が中央薬事審議会臨時委員として協力している。

人事面では, 科学技術特別研究員および医薬品機構派遣研究員として平成10年よりATPと痛みの関係についての研究を行い, 大きな業績を上げてきた津田誠博士が3月31日付けで退任し, カナダ・トロント大学生理学教室に留学した。村山典恵博士は一昨年度より継続して医薬品機構派遣研究員として採用され, 引き続き薬物代謝酵素の遺伝多型についての研究に従事している。

平成13年度の長期海外出張としては, 宮島敦子技官は5月10日より10月9日までスコットランドのダンディー大学医学部の生物医学研究センターのC Roland Wolf教授とともに「薬物代謝酵素誘導に関わる核内受容体に関する研究」を行うために出張した。

国際会議のための短期海外出張としては, 大野部長がOECDの主催でドイツの動物実験代替法に関する研究機関であるZEBETの支援でベルリンで開催された「皮膚腐食性試験ガイドラインに関する拡大専門家会議」に出席し, 各国から寄せられたガイドライン案に対するコメントに基づく修正案の作成に関与した(11月1-2日)。また, 同様にOECDの主催でスウェーデン農林水産省支援でストックホルムで開催された「有害性評価のための新試験法および改訂試験法のバリデーションと行政的受け入れに関するOECD会議」に出席し, 主に動物実験代替法の行政的受け入れに関する討議に参画した(3月6-8日)。中澤室長は安全性薬理に関するICH作業グループ(S7B部門)に属しており, ICH-6およびその準備会議のために東京(平成13年5月21-24日), オタワ(平成13年8月21-23日), ブリュッセル(平成14年2月3-7日)で開催された会議に出席し, 安全性薬理試験の一環としてのQT延長評価試験方法について検討した。国際学会への出席としては, International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) と Canadian Council on Animal Care (CCAC) の共催でケベックで開催された「行政試験と動物福祉についての国際シンポジ

ウム(6月20日-6月24日)」に参加し, 「ICHの活動の動物実験代替への貢献」について講演した。また, 小澤室長はフランスのLa Grand Motteで開催された第12回国際チトクロムP450会議に参加するために出張し(9月11日-16日), ヒトを含めチトクロムP450の分子進化, 発現調節, 遺伝子多型やそれらの薬剤反応性等との関連に関する貴重な情報を収集した。また, 佐藤研究官はサンジェゴで開催された(11月9日-16日)北米神経科学学会第31回年会で「苔状繊維-CA3シナプスに対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用」について発表する予定であったが, ニューヨークでのテロ事件のため渡米できず, キャンセルした。また, 大野部長は米国, ボルチモアで開催された(12月9日-12月13日)国際薬物相互作用シンポジウムに参加し, 薬物相互作用に関する我が国の取り組みについて講演する予定であったが, 前項と同様の理由で渡米できず, 発表スライドと原稿を主催者に送付し, 代読していただいた。また, 大野部長はイギリスの倫理委員会制度について調査するために渡英した(5月7日-13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

(1) 遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究

ラット胚タンパクの二次元電気泳動による分析に必要なサンプルの前処理法及び泳動条件を確立した(厚特研)。

(2) インフォームドコンセントに基づいた外科手術切除ヒト組織のネットワーク体制の確立とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション研究

手術により摘出したヒト組織を適切に研究利用するためのスキーム(インフォームドコンセント, 保管, 輸送, 配分等)を確立した。また, 手術により摘出したヒト肝臓から肝細胞を調製するための方法について, ウサギおよびイヌ肝臓断片を用いて検討し, 長時間輸送された5g程度の断片からviabilityの良い肝細胞を調製できることを確認した(委HS)。

(3) 内分泌攪乱物質のヒトへの影響を指向した試験系の開発研究

脳機能維持型標本に対する各種内分泌攪乱化学物質の影響を検討し, その作用機序を解明した(厚科研)。

(4) 動物を用いたヒト型薬物代謝酵素誘導能検索法と薬物動態における変動巾を規定する因子に関する研究

2種のフッ化ピリミジン系抗腫瘍プロドラッグの代謝活性化に関与する分子種を同定した(委HS)。

(5) 化学物質の総合的安全性評価手法に関する研究

文献的な調査の結果, 医薬品のヒトにおける半減期はとラットの2-4倍, イヌの1-4倍であった。また, 中にはラットおよびイヌの30倍以上の薬物もあることが明

らかになった(厚移替)。

(6) 薬剤反応性とその作用機序に関する研究

糖尿病治療薬の薬物作用点の蛋白質をコードする遺伝子の多型につき調査的研究を行った(試一般)。

(6) 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

動物実験代替法学会の協力を得て代替法評価委員会を組織し、光毒性試験代替法について文献調査した。Balb/c 3T3細胞を用い、neutral redの細胞内取り込みを指標とする方法が施設間バリデーションにより評価された唯一の方法であったことから、これに関する文献についてデータの信頼性、再現性、in vivoデータとの相関性等について総合的に評価した。また、動物実験代替法を巡る欧米の状況について調査した。皮膚吸収性試験、光毒性試験代替法について実験的に検討した(厚科研)。

(7) 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

安全性薬理試験の一環としてのQT延長評価試験方法について検討した(厚科研)。

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

(1) 難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用研究

ATP誘発急性アロディニア発症にATP受容体P2X₂₊₃受容体ヘテロマーが深く関与していること、脊髄損傷モデルでP2X₃受容体mRNAが変化することが明らかとなった。また、ATP放出リアルタイム画像化の技術基盤を築いた(委HS)。

(2) 痛みの情報伝達におけるATP受容体の役割に関する神経・行動薬理学的研究

アンチセンスオリゴ法を用いて、ATP誘発アロディニアの責任受容体がP2X₃およびP2X₂のヘテロマーであることを明らかにした(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

(1) 受容体タンパク質における分子相互作用に関する研究

イオン・チャネル型ATP受容体の細胞外領域のモデルペプチドを設計し、これを合成した(試一般)。

(2) 分子可視化法応用による受容体構造-機能相関の研究

GFP連結型ATP受容体を作成し、この被修飾タンパク質が通常受容体チャネル機能を有することを確認した(文科研)。

4. 医薬品等のトキシコキネティクスに関する研究

1. 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

ジフェニル(DP)によるCYP4A酵素活性および蛋白質は、雌BDF1マウスにおいて強く誘導されたが、DP代謝に関しては、CYP2Bの関与が強いことを示した。また、ビフェニルの代謝をラット、サル及びヒトの凍結融

解肝細胞の浮遊培養法で検討したところ、主代謝物は4-hydroxy-DPのグルクロニドであることが示唆された(試一般)。

2. 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

トリアジン系農薬の代謝に関与するP450分子種について検討し、CYP1Aが関与することを確認した(厚科研)。

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

(1) 残留農薬の相乗毒性に関する薬物動態学的研究

MBI, 4-MMBI, 5-MMBIの代謝をラット肝ミクロソーム及びCYP抗体を用いて検討した結果、CYP2C分子種が関与していることを示した(厚科研)。

(2) 植物エストロゲン及び代謝物の細胞機能に及ぼす影響に関する研究

ビスフェノールAや植物エストロゲンの代表的化合物のエストロゲン作用は細胞毒性が発現する濃度より低い濃度で生じることを明らかにした(文科研)。

6. 薬物反応性の遺伝多型に関する薬理学的研究

1) 薬剤反応性遺伝子多型の解析に関する研究

抗癌剤及び循環器病薬等に関して、薬剤反応性遺伝子解析系を用いて新規薬剤反応性遺伝子多型を見出した(財公研)。

2) 多型性薬物代謝酵素の多型解析に関する研究

フッ化ピリミジン系抗癌プロドラッグの代謝活性化に関与する薬物代謝酵素機能を解析しうる培養細胞系を確立した(財公研)。

7. タンパク質科学による創薬研究

1) 遺伝子発現の制御による脳卒中発症後の神経機能障害防御研究

脳卒中後の神経機能障害予防に機能しうるATP受容体発現制御を担う核内受容体を、特にRARおよびRXRに的を絞って検討し、RAR及びRXRがATP受容体サブクラス、P2Y₁₁のmRNA及び受容体タンパクを増加させ、これがP2Y₁₁受容体の機能亢進を引き起こすことを明らかとした。また、ATP受容体サブタイプ全ての遺伝子について核内受容体結合部位の可能性サイトを検出した(財公研)。

8. 調査に関する業務

(1) ダイオキシン類の健康影響に関する総合的評価研究

ダイオキシン類のトキシコキネティクスに関する最近の文献を調査し、報告した。特に、妊娠ラットに単回投与した時の胎児の曝露量が慢性投与時とは異なるとのデータが示されたことから、この結果に基づいて過去の評価結果を見直した(厚科研)。

(2) フタル酸エステル類のトキシコキネティクスについての研究

ジブチルフタレートの内動態について調査した。投

与量の多くがモノエステル体として速やかに消化管吸収され、大部分が24時間以内に尿中に排出された。肝臓、腎臓、血漿、子宮、胎盤に多く分布した。胎児での分布は母体血漿の約半分程度であった。なお、他のフタル酸エステル類と同様にラットでペロオキシソーム増生作用を示した。

(3) 臨床薬物動態試験ガイドランスに関する調査研究

薬物動態学会、臨床薬理学会、および製薬協の協力を得て、厚生労働省の通知「医薬品の臨床薬物動態試験について」の英訳および解説書を作成した。

(4) 薬物相互作用検討ガイドランスに関する調査研究

薬物動態学会、臨床薬理学会、および製薬協の協力を得て、厚生労働省の通知「薬物相互作用の検討方法について」の英訳および解説書を作成した。

(5) 麻薬鑑定信頼性向上に関する研究

本省の担当部局及び麻薬取締官事務所と協力し、GLP基準を参考にした基準案を作成した。

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、古川文夫主任研究官が平成13年9月1日付けで、有村卓朗研究員が平成14年3月31日付けで退官した。また、食品衛生協会リサーチレジデントの高橋則行博士は平成14年3月31日付けで退所した。非常勤職員の佐藤奈美が平成14年3月31日付けで、賃金職員の松永弥智代が平成14年2月21日付けでそれぞれ退職した。代わって平成13年10月1日付けで梅村隆志主任研究官が毒性部より異動となり、非常勤職員として原綾乃が平成14年4月1日付けで、蓮村麻衣が平成14年5月1日付けで採用された。また、HS振興財団の流動研究員として小野瀬純一博士が平成14年4月1日付けで着任した。さらに賃金職員として伊勢山紀世佳が平成14年4月1日付けで採用された。

短期海外出張は、西川秋佳第一室長が、イタリア・ローマで開催された「第57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13年6月5日～14日)。また、フランス・パリで開催された「第6回腫瘍予知と介入法に関する国際シンポジウム」に出席し、討議を行った(平成14年2月9日～2月

12日)。

研究業績

1. ラットの自然発生に関する研究

LECラットの肝炎発症前後の肝細胞における熱ショック蛋白の細胞局在を免疫電顕的に検索した。

2. ダイオキシン類の健康影響に関する総合的評価研究(厚生科学研究費補助金)

コプラナーPCBやダイオキシン類(臭化ダイオキシンを含む)の発がん性に関する文献収集を行い、その発がん影響の可能性を調査・検討し、ダイオキシン類は非遺伝子傷害性機序により各種臓器に発癌性を示す化学物質であることを確認し、それらの最小発癌用量を中心に文献調査結果をまとめ、総合的に評価した。

3. 食品添加物の毒性並びに発癌性の研究(食品等試験検査費)

1) 12ヶ月間慢性毒性試験およびがん原性試験ではキシロースに癌原性のないことが明らかとなり、硫酸アンモニウム、塩化マグネシウムおよびアカネ色素は動物実験を終了した。N-アセチルグルコサミンで試験を開始した。

2) ラット・90日間反復投与毒性試験ではトウガラシ色素、モリン、レバミゾールで試験が終了し、最終評価を実施する。デュナリエラカロデン、カテキンおよび西洋わさび抽出物で試験を開始した。

3) コウジ酸の肝発がんプロモーション作用の有無を検討するため、ラット肝二段階発がんモデルで検索を行った結果、プロモーション作用を有することが明らかとなった。

4) ヒノキチオール的心臓毒性を解析するため、ラットを用いて2週間までの短期間投与を行ったが、明らかな心毒性は認められなかった。

4. 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究(厚生科学研究補助金)

1) 亜硝酸とエリソルビン酸ナトリウムあるいはヒドロキノンを複合投与したラットの前胃上皮を採取し、8-OHdGの測定などを開始した。

2) MNNGでイニシエーション後、亜硝酸と共に種々の用量のアスコルビン酸を投与した結果、用量相関的な前胃発がんプロモーション作用が認められた。

3) DHPNとアミトロールによるラット甲状腺発がんに対し、四塩化炭素による肝障害は影響せず、過塩素酸カリウムによる甲状腺障害は腫瘍の発生を増強することを明らかにした。ブロムエチルアミンによる腎障害は甲状腺障害を増強したが発がんには影響しなかった。

5. 内分泌かく乱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) ラット乳腺腫瘍に対する卵巣摘出、5FU、タモキシフェン、COX-2インヒビターであるニメスリドあるいは

はメカブ抽出物による増殖抑制，退縮のメカニズムを明らかにするための動物実験を開始した。

2) 内分泌攪乱物質の甲状腺発がん修飾作用の検出力をさらに高める実験法の改良のため，卵巣摘出ラットにDHPNでイニシエーション処置後，合成エストロゲンとプロピルチオウラシル，スルファジメトキシシン，過塩素酸カリ，ヨード欠乏食あるいは過塩素酸カリウムを併用する実験を行った結果，特にプロピルチオウラシルとの併用で甲状腺腫瘍の発生が顕著に促進されること明らかにした。

3) 幼若ラットに対する抗甲状腺剤であるサルファディメトキシシン，プロピルチオウラシルないし内分泌攪乱作用のあるゲニステイン，アトラジンと28日間投与し，病理組織学的に生殖器に対する影響を検索した結果，明らかな作用を認めなかった。

4) エストラジオールないしジェニステインの反復投与ラットでの $\alpha 2u$ -グロブリンの肝・腎における発現解析を行った結果，その発現量には用量依存性の変動は認めなかった。

5) ラットに対する14日間のテストステロンないしエストラジオール反復投与例の肝臓における網羅的遺伝子発現解析を行った結果，雌でテストステロンに反応する遺伝子が多数見出されたものの，雄でエストラジオールに反応する遺伝子は見出されなかった。

6. 内分泌かく乱化学物質の発達期脳に及ぼす影響に関する研究（厚生科学研究補助金）

1) エストラジオールを胎生期ないし授乳期ラットに混餌投与する実験を行い，脳の性分化臨界時期における視床下部性的二型核でのアポトーシスを解析した結果，対照と差は認められず，脳の性分化かく乱指標になりえないことが明らかとなった。

2) メトキシクロール，ジイソニルフタレート，ビスフェノールA，ノニルフェノール，ジェニステインの混餌投与による周産期曝露実験の結果，下垂体でのゴナドトロピン陽性細胞数の変動が性成熟後の内分泌影響に良く相関することが示された。

3) 餌中に含まれる植物性エストロゲンの，エチニルエストラジオールによる周産期曝露に対する修飾作用を検討した結果，植物性エストロゲンを含む飼料にエチニルエストラジオールを添加した場合に性成熟後の内分泌影響が強く現れる事が判明した。

7. 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

ヒトプロト型c-Ha-ras導入トランスジェニック(rasH2)マウス，p53ノックアウトマウス(p53KO)マウスやXPA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および文献を収集し，これらの試験系の有用性や問題点について検討した結果rasH2マウ

スとp53KOマウスが発がん物質の検出に有用であることを確認した。

8. 発癌メカニズム解明のための新手法に関する研究（文部科学省科学研究費）

1) ラット肝発がんモデルを用いて，フェノバルビタール投与により発現増加を示した遺伝子群をcDNA subtractionにより得，ノザン解析によるスクリーニングにより，プロモーション活性の短期検索指標として有効と考えられる12候補遺伝子を得たが，各種非遺伝子障害性発がん物質の短期投与例では，一定の発現パターンを示さなかった。また，二段階モデルにおいて，GST-P陽性肝細胞巣と局在が一致する遺伝子が見出された。

2) 肝中期発がん性試験法を用いて，各種非遺伝子障害性肝発がん物質を投与した動物での肝臓におけるp53遺伝子下流に位置する蛋白質の発現挙動を検索した結果，化学物質により発現パターンは多様で，非遺伝子障害性肝発がん物質に共通の傾向は認めなかった。

9. 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（厚生労働省がん助成金）

1) 非遺伝子傷害性発癌物質のin vivo短期スクリーニングを可能とする分子指標を探索する目的で肝臓を標的とした発現解析を行ったところ，ベルオキシゾーム増生剤投与に反応するポリペプチド性シグナルを得，その遺伝子産物を特定できなかったが，その発現特性から，ベルオキシゾーム増殖過程に関与するものの，その発がん過程には積極的に関与しない遺伝子産物である可能性が指摘された。

2) 各種非遺伝子障害性肝発がん物質の短期投与例での肝臓における網羅的遺伝子発現解析を行い，各発がん物質に共通した発現挙動を示す遺伝子群を得たが，投与1年目では発現挙動が遺伝子により異なっていた。

10. 非可逆的な細胞増殖過程を規定する細胞因子の発現解析

発がんプログレッションの指標を明らかにするため，DHPNとスルファジメトキシシンによる甲状腺発がんモデルを検索した結果，短期間で高頻度に浸潤性増殖を示す細胞が出現することを明らかにした。

11. がんの化学予防効果の検索モデルの検討に関する研究（厚生労働省がん助成金）

1) 開発した中期腫瘍発がんモデルを用い，従来の長期実験の結果との整合性を検討し，このモデルの有用性を検討した。既知の腫瘍発がん修飾因子を検出可能かどうか追究する。

2) 免疫組織化学的手法を用いて，ハムスター腫瘍発がんモデルにおける有用なマーカーを検討した結果，cyclinD1が初期腫瘍性病変に陽性であった。

12. in vivoでの突然変異と発がんの関連に関する研究（厚生労働省がん助成金）

1) gpt delta マウスを用いて、臭素酸カリウムの変異原性と発癌性を検討した結果、いずれも陰性であった。

2) gpt delta ラットにおいて、臭素酸カリウムは腎での変異原性を増加させた。

13. 導入遺伝子を生体内探索子とする内的発がん分子機構の解明

1) レポーター遺伝子導入ラット・マウスを用いて、脂質過酸化生成物の変異原性と発がん性を比較する実験を開始した。

14. 未規制化学物質の基準化に関する研究

gpt delta マウスを用いて塩素処理水副生成物MXの変異原性と発がん性を検討した結果、明らかな影響はなかった。

15. 喫煙関連発癌の制御機構と予防に関する研究 (喫煙財団委託研究費)

1) 喫煙の負荷はラットおよびハムスターの肝生体異物代謝酵素系に影響することを明らかにした。

2) DEN 投与ハムスターにおいてDNA付加体の経時的な発現パターンを明らかにした。

3) タバコ煙は肝薬物代謝酵素系に影響してMeIQxによるラットの肝発癌を促進することを明らかにした。

16. 食品の発癌抑制に関する研究

1) PhIP 投与終了後からカカオポリフェノールを与えた結果、乳腺腫瘍発生の抑制傾向が認められた。

2) ラット多臓器発癌モデルにおいて、カカオポリフェノールの投与により肺発がんが抑制された

3) PhIPを用いたラット二段階発がんモデルを用いて、リグナンの一つであるトラキロサイトをイニシエーション期あるいはプロモーション期に与え、その乳腺発がん修飾作用を調べる動物実験を終了した

4) DMH/DMBAを用いたラット二段階発がんモデルを用いて、共役リノレン酸の一つであるエレオステアリン酸をプロモーション期に投与した時の大腸/乳腺発がんに対する修飾作用を調べる動物実験を終了した。

5) ラット肝中期検索モデルを用いて、ビール乾燥粉末の修飾作用を検討した結果、影響は見られなかった。

17. 食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に関する実験的研究 (厚生科学研究費助成金)

1) ICRマウスの子宮腫瘍モデルを用い、内分泌攪乱作用のあるリグナンおよび合成エストロジェンの影響を検討する。

2) ラットDHPN甲状腺発癌モデルを用いて、ゲニステイン、ノニルフェノールおよびアトラジンの修飾作用を検討した結果、いずれにも影響はみられなかった。

3) ラットDHPN甲状腺発癌モデルを用いて、エストラジオールの修飾作用を検討した結果、低用量でも長期投与により促進影響を示すことを明らかにした。

4) ラットDMBA乳腺発癌モデルを用いて、アトラジン

の及ぼす影響を検討する実験を行った結果、発がんを増強する作用があることを明らかにした。

5) rasH2マウスにエチルニトロソ尿素を投与し、子宮腫瘍を誘発させ、ゲニステインとノニルフェノールの子宮腫に対する修飾作用を検討する実験を行った結果、そのような作用はみられなかった。

6) ラットDMBA乳腺発がんモデルを用い、乳腺腫瘍発生後に卵摘を行うと同時にゲニステインを投与し、乳腺腫瘍増殖に対する影響を検討した結果、弱いエストロゲン様作用をもつことが示唆された。

7) エチルニトロソエストラジオールを雌rasH2マウスに短期間投与後、エチルニトロソ尿素を単回投与し、子宮発がんに対するホルモン前投与の影響を検討した結果、そのような作用はみられなかった。

8) 雄p53欠損CBAマウスにジメチルニトロサミンでイニシエーション後、ジエチルヘプチルフタレートと26週間混餌投与した結果、肝発がん修飾作用はみられなかった。

9) 雌rasH2マウスにエチルニトロソ尿素を一回投与後、リセリンないしフェノールフタレインを26週間投与した結果、発がん感受性は増強されない事がわかった。

18. 食品による膀胱発癌に関する研究 (食品等試験検査費)

1) ベンジルイソチオシアネート (BITC) とアリルイソチオシアネート (AITC) のイニシエーション作用検索結果を考慮して、フェネチルエチルイソチオシアネート (PEITC) の投与期間を長くした膀胱発癌イニシエーション作用の有無を検索し、弱いながらもイニシエーション作用を認めた。

2) 低用量の遺伝毒性膀胱発がん物質と種々の用量のBITCの同時投与により、BITCの用量に相関した膀胱腫瘍発生の抑制がみられた。

3) 高用量の遺伝毒性膀胱発がん物質を与えた後、低用量の同発がん物質およびBITCを同時投与したとき、膀胱発がんを強く促進した。

19. 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

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継続した。

変 異 遺 伝 部

部 長 林 真

概 要

前年度に引き続き、生活関連化合物の安全性に関する研究、変異原性試験法の改良と新しい手法の開発に関する研究、突然変異誘発に関する基礎的研究、変異原性試

験のデータベースに関する研究、および培養細胞研究資源の収集、保存、開発のシステム構築に関する研究を行った。国際協力事業として、国際協力事業団に協力し、マレーシアおよび中国への遺伝毒性試験に関する技術移転のプロジェクトに参画した。

平成13年10月には4年に1度開催される国際環境変異原学会が我が国（静岡）で開催された。当部としては最も関連の深い国際学会であり、部を挙げてその開催に協力した。また、同学会のサテライト会議として、染色体異常に関する国際シンポジウムを主催した。ニューヨークでのテロの直後にも係わらず、海外からも多くの参加者があり、成功裏に終えることが出来た。別途サテライト会議として主催を予定していた「遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ」を、米国FDA関係者等がテロの影響で参加できなくなったために直前になって開催延期を余儀なくされた点は残念であった。なお、本ワークショップは平成14年の6月に英国プリモスで開催されることになった。

食品添加物である食用赤色2号が単細胞ゲル電気泳動法（コメット法）で陽性になったとの論文が公表され、当部を中心として再現性、およびトランスジェニックマウスを用いて生体内で遺伝子突然変異が誘発されるか否かについて検討を加えた。その結果、用いた試料では陰性の結果が得られ、試料のロット差と共に試験結果の解釈を如何に行うかの検討が必要である点が明らかになった。

1998年9月より開始されたHFSP（Human Frontier Science Program）国際共同研究が2002年2月をもって終了した。この間に大腸菌からヒトにいたる新しいDNAポリメラーゼ（Yファミリー）の存在を明らかにし、これが変異誘発において重要な役割をはたしていることを示した。これに代わり2001年より、ヒューマンサイエンス振興財団の国際研究グラント事業を開始した。

細胞バンク事業におけるヒト由来培養細胞のクロスコンタミネーションに関して検討を続けてきたが、STR-PCR法を使った解析で、多数の培養細胞がHeLa細胞のコンタミであるという事実が、JCRB細胞バンク、理研細胞バンク、ATCC（米国）、DSM（ドイツ）、ECACC（英国）などの研究で明らかになった。日本では、JCRB細胞バンク（当部第三室）が非常に大きな貢献をしており、実験手法、結果等非常に詳細な情報をホームページを通じて公開している。

また、ヒトゲノム研究の進展に象徴される急速な医学生物学研究の進歩は、生物界の一員である動物種としてのヒトという側面と、一見相反するよう思われるヒトのことはヒトでしか理解できないという結果を突きつけている。特にヒトゲノム研究の成果は、医療というマーケットを背景に、ヒトを研究するための環境を整えつつ

ある。科学的側面ではヒトという種に対応することと、市民を巻き込むという側面で倫理といわれるものに係わらざるをえない時代となりつつある。当部では国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会設立の準備段階から深く係わり、現在も当委員会の事務局として委員会の準備、議事要旨の作成等において中心的な役割を果たしている。

行政支援業務として薬事・食品衛生審議会臨時委員として、医薬品、食品関連物質、工業化学品等の生活関連物質の安全性を確保するための厚生行政に協力した。また、OECD毒性試験法ガイドラインの改訂に伴い、「新規化学物質にかかわる試験の方法について」（化審法ガイドライン）のうち、「げっ歯類を用いる小核試験」の改訂を検討会を組織して行った。その作業が完了し、平成13年11月21日付けで厚生労働省医薬局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名で「新規化学物質等に係る試験の方法について」の一部改正等について通知が出された。

人事面では、平成13年4月1日より松井道子元主任研究官を引き続き客員研究官として迎え、化審法に基づく新規化学物質の安全性評価のための予備審査で、細菌を用いる復帰突然変異試験の評価を担当していただいた。平成13年6月1日付けで第一室松岡厚子主任研究官が当所療品部第三室に配置換えとなった。第二室の山田雅巳主任研究官が平成13年4月1日から厚生労働省大臣官房厚生科学課へ9ヶ月間出向し、平成14年1月1日付で厚生科学課併任解除となり、業務に復帰した。第三室においては非常勤職員の飯塚了太氏が3月31日付で退職した。第一室の鈴木孝昌主任研究官が平成14年4月1日付で、新設の遺伝子細胞医薬部第三室長に配置換えとなった。

短期海外出張としては、能美室長は6月15日から6月20日までイタリアのトリノで開かれた第1回HFSP受賞者年会に出席し、引き続き21日から24日までナポリの国立生化学蛋白質酵素研究所を訪問しセミナーと打ち合わせを行った。本間室長は平成13年10月28日から11月3日まで中国上海に出張し、ICEMの上海サテライトミーティングに参加し、「ウェルナー症、ブルーム症患者由来Bリンパ球における染色体不安定性」について講演した。林部長は平成13年12月2日から8日までマレーシア・シャーラムに出張し、JICAが進めるマレーシア化学物質リスク管理プロジェクトにおける遺伝毒性試験に関する技術移転の短期専門家として指導を行った。増井主任研究官は平成14年1月20日から31日まで英国のロンドンおよびケンブリッジを訪問し、ヨーロッパと英国におけるゲノムを対象とした大規模コホートに関する倫理的、法的、社会政策的に関する意見交換を行った。本間室長は平成14年2月22日から3月9日まで中国北京

に出張し、国際協力事業団による中国医薬品安全性評価管理センタープロジェクトの一環として「第一回遺伝毒性ワークショップ」を主催した。能美室長と鈴木主任研究官は平成14年2月23日から2月27日まで米国ハワイに出張し、日米医学協力研究会ゲノミックス・発がん専門部会日米合同会議に出席し、講演、討論を行った。能美室長は引き続き2月28日から3月9日まで米国ロサンゼルスに出張し、カリフォルニア州立大学ロサンゼルス校を訪問し、分子毒性学セミナーで発表を行うと共に共同研究の打ち合わせを行った。山田主任研究官は、平成14年3月9日から16日までイタリアのナポリに出張し、HS国際研究 Grant 事業の分担研究者である Francesca M. Pisani 博士を訪れてセミナーおよび、研究打ち合わせを行った。林部長は平成14年3月13日から17日までカナダのオタワに出張し、Health Canada と ILSI が主催する化学物質の遺伝毒性によるクラス分けの戦略に関するパネル討論に参加した。引き続き、林部長は平成14年3月18日から22日までインドのラクノーに出張し、インド環境変異原学会において日本環境変異原学会会長として招待講演を行った。

研究業績

1. 食品添加物の変異原性に関する研究

天然添加物（アウレオバシジウム培養液）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。その結果、染色体異常を誘発しないことが明らかとなった（生活衛生局食品化学課）。

2. 既存天然添加物等の変異原性を中心とした安全性研究

アマシードガム、コメヌカ抽出物について、それぞれ小核試験、染色体異常試験を行った。また、食用赤色2号についてトランスジェニックマウス遺伝子突然変異試験を行った。その結果、全ての試験において遺伝毒性の誘発は認められなかった。

3. ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発

大腸菌 DNA ポリメラーゼ II および DNA ポリメラーゼ IV を発現するサルモネラ株を樹立し、その感度を従来からの株と比較した（HS財団受託研究費）。

4. ダイオキシン類の変異原性に関する研究

ダイオキシン類の毒性に関しては1997年に発行された IARC モノグラフに取り上げられており、その中に遺伝毒性に関しても詳しく述べられている。それ以降ダイオキシン類が直接 DNA に傷害を与えなかったとする報告はあるが、遺伝毒性を示唆する報告は殆どなされていないのが現状である。一部二次的な作用を示す報告がなされているが、現状においても当時の結論である「ダイオキシン類には直接的な遺伝子傷害性はないものと考えられる」を覆すような情報は得られていない。（厚生科学研究費補助金）。

5. ヘテロサイクリックアミンの新しいトランスジェニックマウスモデルに対する変異原性の分子解析

アミノフェニルノルハルマンの投与により誘発される突然変異を分子レベルで解析した（厚生省がん研究助成金）。

6. 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

腎障害で問題となった生薬の混在物であるアリストロキア酸の遺伝毒性についてトランスジェニックマウスを用いた変異原性試験を行い、生体内での遺伝子突然変異誘発性について検討した。その結果、腎臓、前胃および膀胱において強い突然変異誘発性が確認された。AT から TA へのトランスバージョン型変異が特徴的であった（厚生省がん研究助成金）。

7. トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験のバリデーションに関する研究

日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究の一環として、当部で開発した *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いる *in vivo* 突然変異誘発系のバリデーション研究を継続して行った。

8. 遺伝子変化を指標とした環境化学物質による発がんリスク評価および機構解明のための手法の開発に関する研究

突然変異解析のための標的遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（MutaTM Mouse）を用いて、ジベンゾ [*a, l*] ピレン等の環境化学物質により誘発される遺伝子変化の特徴を塩基配列レベルで明らかにした（環境省国立機関公害防止等試験研究費）。

9. DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変化を指標とした遺伝毒性の検索

ヒト培養細胞 TK6 およびその p53 変異体である WTK-1 細胞を用い、 γ 線照射後の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、p53 変異による影響について検討を行った。

10. 生殖細胞に対する遺伝毒性の評価法に関する研究

アリストロキア酸などトランスジェニックマウスを用いた試験で体細胞に変異原性を示したいくつかの化合物について、精巣における変異原性を解析したが、いずれも明らかな活性は認められなかった。

11. 多臓器小核試験に関する研究

日本環境変異原学会 MMS 研究会の共同研究の一環として、幼若ラットの肝臓を用いた小核に関する共同研究に参加し、本試験法の確立と普及をめざし、基礎的な検討を行った。被験物質として肝発がん物質であるジメチルニトロソアミンおよび麩酸を用い、肝臓における小核の誘発ならびに末梢血での小核誘発性を検討したところ、肝細胞においてジメチルニトロソアミンは用量依存的な小核の誘発が確認できたが麩酸の小核誘発性は確認できなかった。

12. In vivoでの突然変異と発がんの関連に関する研究

腎臓における腫瘍発生に種差(ラット>マウス)の認められる臭素酸カリウムによって誘発される突然変異をgpt deltaマウスおよびラットを用いて解析した。

13. 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における遺伝毒性の試験等に関するメンテナンスではin vitro小核試験が検討課題の1つとなっている。本試験法はin vitro染色体異常試験の代替法として関心が高まっているが、試験法の確立に至っていない。手法の問題として最も関心の高いサイトカラシンBの使用に関する検討を行った。その結果、サイトカラシンB処理の如何にかかわらず、陽性物質による小核誘発性は確認されたが、細胞毒性の指標に関する検討が必要であることが判明した(厚生科学研究)。

14. ヒトリンパ球細胞を基礎とした遺伝毒性試験系の構築

ヒトリンパ球細胞TK6, WTK-1を用いて、遺伝子突然変異、染色体異常、DNA損傷を総合的かつ同時に検討可能な多指標試験系を構築するため、共同研究を組織してモデル化合物を用いて検討を開始した。具体的な指標としては、チミジンキナーゼ部位の突然変異誘発性、小核誘発性、およびコメット法によるDNA損傷性を用いた。

15. 突然変異の誘発を促進する蛋白質の構造と機能に関する研究

DinBタンパク質とDNAとの結合について検討を行い、二本鎖DNAよりも単鎖DNAにより良く結合することを明らかにした。(原子力国立機関原子力試験研究費, 文部科学省)。

16. 好熱性誤りがちDNAポリメラーゼの結晶構造解析に関する基礎的研究

好熱古細菌*Sulfolobus solfataricus* P1由来のDinBホモログ(Sso DNA pol Y1)を精製し、そのポリメラーゼ活性がPCNAとRFCにより上昇することを明らかにした(HS財団受託研究費「国際研究 Grant 事業」)。

17. プラスミドを用いたin vitro突然変異検出系を用いた変異誘発機構に関する研究

M13一本鎖ファージを用いた変異検出系にラットS9による代謝活性化系を導入し、ベンツピレン等の変異原性の検出を試みたが、S9自身の毒性が強いために、さらに工夫が必要であることが判明した。

18. ほ乳類細胞におけるDNA 2本鎖切断修復に関する研究

ヒトリンパ球細胞の薬剤選択マーカー遺伝子にI-SceI制限酵素部位を導入し、DNAの2本鎖切断の修復を解析できる系を確立した。DNAの2本鎖切断を発生させ、その修復機構を解析した。

19. トランスジェニックマウスより得られる変異スペクトルデータベースの構築と公開

当研究室にて得られたMutaTMMouseおよびBig Blue[®]マウス由来のcII遺伝子突然変異体に関するデータを用いデータベースの構築を行い、WWWへの公開している。新しく得られたデータの追加を行い、現在までに、自然突然変異および化学物質処理による突然変異体を含め、1753個について、データベースへの登録を終え、インターネット上に情報を公開した。

20. 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

2001年度より、ヒト組織・細胞の公的研究資源化の問題について、これまでの研究を基礎として本格的に始めた。特に正常ヒト上皮細胞を細胞バンクへ提供していただく際の提供者への説明義務をどのように果たすかについて、ビデオ作成を含めた設計を行っている。2002年度は人による説明とビデオによる説明を組み合わせたものを完成させて、実際に病院での説明としての評価へ入ることを目標とする。(HS財団受託研究費)。

21. 生命科学研究に必須な培養細胞研究資源管理基盤の整備に関する総合的研究

STR-PCR法を利用したヒト培養細胞の相互混入(クロスコンタミネーション)の有無についての検討を平成11年度より実施してきたが、平成13年度末までに当該細胞バンクで保存している300種のヒト由来細胞について調査し、16種が他の細胞と同一のものであるという結果が確定した。また、この研究を通じてある種の細胞では培養の経過とともにSTR-PCRのパターンが変わることを発見し、その原因が細胞における染色体の変動と関連していることを明らかにした。

培養細胞保存管理のためのコンピュータシステムの再構築を継続して実施した。内部管理用ファイルサーバならびに情報公開用WWWサーバをLINUX化し、クライアントをWINDOWS98とした。新規受入細胞は49種。品質管理の実施は49種。(厚生科学研究費補助金事業)。

22. 上皮細胞の増殖停止機構の解析に関する研究

Eti遺伝子の細胞増殖抑制がp53遺伝子の発現状況に依存することが明らかになったことを受け、2001年度には抗体による染色法と、その組織での発現パターンをタックマンにより比較した。2002年はその結果を基礎にヒト組織の中での発現について解析する予定である。(文部省科学研究費補助金)。

23. 生物系研究資源データベース構築に関する研究

昨年に引き続き約500レコードの画像データを蓄積し、WWWサイトを通じて公開した。他の培養細胞研究資源機関との情報レベルの連携を確立するために、科学振興事業団の生物系研究資源データベースにおける情報収集ロボットが識別するためにBRnetタグを培養細胞

情報のファイルに追加するよう、データベース管理プログラムを修正した。WWWサーバをバックアップするシステムを改善し、細胞バンク情報サーバを2台のLINUXコンピュータを並行して運用するシステムに改善した(科学技術振興調整費, 科学技術庁)。

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。

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、また研究面では内分泌かく乱化学物質、環境化学物質および水道汚染物質の毒性評価ならびに新生児に対する毒性発現特性に関する研究を行っている。

人事面では、長谷川隆一室長は平成14年4月1日付けで、当所に新設された医薬安全科学部長に就任するとともに、総合評価研究室長との併任となった。鎌田栄一主任研究官は平成13年4月2日より継続して厚生労働省医薬局審査課化学物質安全対策室化学物質審査官との併任として、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。小泉睦子技術補助員は平成10年6月1日より継続してOECDの評価文書作成の補助を行っている。

海外出張としてはOECD関連で、長谷川室長が「第12回高生産量化学物質初期評価会議」(平成13年6月, フランス), 「第13回高生産量化学物質初期評価会議」(平成13年11月, スイス), また、長谷川室長および小泉技術補助員が「第14回高生産量化学物質初期評価会議」(平成14年3月, フランス)に出張した。長谷川室長は「ICH」(平成14年2月, ベルギー)および「第41回米国トキシコロジー学会」(平成14年3月, 米国)に出張した。広瀬明彦主任研究官が「第21回ダイオキシン国際シンポジウム」(平成13年9月, 韓国)および「第9回国際簡潔評価文書(CICAD)最終レビュー会議」(平成13年10月, カナダ)に出張した。

化審法GLPの査察には、当室から3カ所、延べ3名が参加した。

業務業績

1. OECD高生産量化学物質の初期評価文書の作成及び発表

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、本年度は日本政府担当

分として3物質の初期評価文書を作成し、2001年6月および2002年3月に開催された第12回および14回初期評価会議に提出・討議した。このうち、*o*-Phthalonitrileは産業界(BASF)が原案を作成し、日本政府が再評価して提出・討議し、*o*-Toluenesulfonamideおよび2-Methyl-2-propenenitrileは日本政府単独で作成・評価・提出した化学物質で、いずれの評価結果も合意された。また、2002年11月および2002年3月に開催された第13回および14回初期評価会議には、日本産業界が原案を作成し、日本政府がピアレビューした10物質、Docosanoic acid, 2,4-Diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine, 2-Hydroxyethyl methacrylate, 1,3-Bis(aminomethyl) benzene, 5-Ethylidene-2-norbornene, 1,3,5-tris(2-Hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 2-Dimethylaminoethyl methacrylate, 3,5,5-Trimethyl-1-hexanol, 2,2,6,6-Tetramethyl piperidin-4-ol, Tris(2-ethylhexyl) benzene-1,2,4-tricarboxylateを提出し、評価会議での討議を支援した結果、いずれも評価結果が合意された。

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を行うとともに、これら試験結果のデータベース化を行っている。平成13年度は計122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を行うとともに、これら試験結果のデータベース化を行っている。平成13年度は13物質についての56試験の試験計画書確認作業、16物質についての61試験のピアレビュー及び評価作業を行った。

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の電子化が進められており、それに伴う新規化学物質の届け出様式の電子化整備およびバリデーション作業、並びに評価作業に関わる電子化整備に協力した。

5. その他(各種調査会等)

薬事・食品衛生審議会の医薬品添加物調査会、化学物質調査会、PRTR対象物質調査会及び残留農薬安全性評

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、食品添加物調査会、生活環境審議会水道部会水道管理専門委員会、化学物質安全対策部会のダイオキシンの健康影響評価に関するワーキンググループおよび化学物質安全性評価検討会〔環境省〕の活動に協力した。

研究業務

1. 化審法における既存化学物質および新規化学物質の毒性評価に関する研究

新規に入手した既存化学物質の61試験データおよび新規化学物質の122試験データをデータベースに入力し、前年度までに入力したデータと共に解析した結果、シクロヘキシルシクルヘキシルベンゼンやアダマンタンを基本骨格とする新規化学物質には、その側鎖によって強い毒性を示す場合もあることが判明した。

2. 化学物質の乳幼児における毒性発現に関する研究

新規に確立した新生児試験法を用いて行った20種の化学物質の出生直後から21日目までの動物への投与試験のうち、*p*-(α,α -Dimethylbenzyl) phenol, 4-Nitrophenol, 2,4-Di nitrophenol, 2-Chlorophenol, 4-Chlorophenolおよび4,4-Isopropylidene bis(2,6-dibromophenol)について学会発表した。また、同じ化学物質を用いた新生児試験と幼若動物試験(同系6週齢の動物を用いた28日間投与試験)結果の第1回毒性比較解析を4-Nitrophenolおよび2,4-Dinitrophenolについて行い、学術論文誌への掲載ならびに米国トキシコロジー学会で発表した。

3. ラット α 2u-グロブリンの分析手法に関する研究

雄ラット尿から α 2u-グロブリンに対するウサギ抗血清を使用し、腎組織標本上で免疫組織学的に同定できる手法の汎用性を確認するために、腎障害がみられるが好酸性小体が見られない個体の組織標本にたいし本法を適用したところ、染色性のないことが確認され、本法の有用性が示された。

4. 内分泌かく乱化学物質の毒性評価に関する研究

内分泌かく乱化学物質のうち、Di(2-ethylhexylphthalate)(DEHP)およびDiisononyl phthalate(DINP)について、乳幼児が玩具を通して摂取した際の健康影響を懸念して一般毒性、エストロゲン様作用、生殖発生への影響を文献調査・評価し、1日耐容摂取量の提案を行い、厚生労働行政に貢献した。また、DINPについては、日本食品化学学会誌に投稿するため、代謝、発がん性、生殖、発生毒性、精巣毒性に関して、情報の収集・整理・再評価をおこなった。

また、内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究の“低用量問題に関する文献調査”の分担としてvom Saalらのグループによる5報告について、試験条件における問題点と、結果の解析における問題点に分けて検討

した。後者については、用量-作用曲線パターン、閾値の有無、反応オシレーション(逆U字現象など)の有無、反応における相加・相乗性の有無を中心に検討を加えた。〔厚生科学研究分担研究〕

5. 水道水に係わる毒性情報評価に関する研究

平成13年度は、近年内分泌かく乱作用の疑いのもたれている化学物質の内、Bisphenol A, Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)およびDinonyl phthalate (DINP)の内分泌系への毒性情報を中心に調査し、まとめると共にDEHPとDINPに関しては現時点での1日耐容摂取量(TDI)の算定を行い、Bisphenol Aについては特に低用量影響に関してまとめた。〔厚生科学研究分担研究〕

6. ダイオキシンの毒性評価に関する研究

平成13年度までに公表されたダイオキシン類(ポリ塩化ダイオキシン, ポリ塩化ダイベンゾフラン, コプラナーPCB及びポリ臭化ダイオキシン)の文献情報を収集し、評価した。また、平成10年の我が国のダイオキシン類のTDI再設定以後各国および国際評価機関で評価されたダイオキシン類の許容摂取量設定文書についての解析を行った。さらに、米国ナッシュビルで開催された「米国トキシコロジー学会第41回年会」(平成14年3月)に出席し、最新の情報の収集を行った。〔厚生科学研究主任研究〕

また、ダイオキシン類の健康影響、特にそのTEFを中心としたリスク評価の為の実験的基礎研究の分担研究として、リスク評価の国際的動向に関する調査のため、韓国慶州で開催された「第21回ダイオキシン国際シンポジウム: Dioxin2001」に出席し、最新の情報の収集を行った。〔厚生科学研究分担研究〕

医薬品医療機器審査センター

センター長 豊 島 聡

平成9年7月に設立された医薬品医療機器審査センター発足以来、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、平成13年度の審査センター業務はおおむね順調に推移した。7月の人事異動により浜田淳企画調整部長が出向し、後任に姫野孝雄企画調整部長が就任した。また、平成14年4月の人事異動により、山本弘史審査第二部長が出向し、後任に森和彦審査第二部長が就任した。増員も1名が認められ、定員は70名となった。4月中旬から下旬にかけて基礎研修を行った。

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が、平成14年度要求において2名の増員が認められたが、定員削減で1名減員となった。

また、平成11年11月に中央薬事審議会の審査関係の調査会は廃止され、平成12年度から①重要な問題点については、審査チームと薬事食品衛生審議会から指名された専門委員とで協議を行う（専門協議）、②申請企業との面接審査会を経て、承認の可否に関する基本的な方向性を検討する、③審査センターの承認の可否についての判断を審査報告書にまとめる、という一連の審査体制が整備され、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されたことから、一層気を引き締めて審査業務に当たっていききたい。企画調整部、審査第一部、審査第二部、審査第三部、審査第四部

企画調整部長	姫野孝雄
(前企画調整部長)	浜田淳
審査第一部長	平山佳伸
審査第二部長	森和彦
(前審査第二部長)	山本弘史
審査第三部長	橋爪章
審査第四部長(併)	豊島聰

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特別部会で審議が行われるが、特別部会への対応等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、審査第三部及び審査第四部において行い、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、化学療法剤などを、審査第二部は、医療用新医薬品のうち循環器官用薬、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、医療用新医薬品のうち生物学的製剤、血液製剤等、医療用後発医薬品、一般用医薬品、医薬部外品並びに化粧品を担当し、審査第四部は、医療用具の承認、再審査、再評価に必要な審査並びに体外診断用医薬品及び歯科用医薬品を担当した。

審査センターの設置に伴い、審査の仕方はかつての調査会中心の外部審査から内部審査へ重点を移すこととされており、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、審査結果は審査報告書に取りまとめている。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分野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が、治験は届出制であり、あくまでも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、必要に応じて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た参考情報として、適宜活用をはかっているところである。

以上のほか、後発品の審査、海外を含めた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13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。

製造また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14,495件に上る。これらは、更に本省において、必要なものは薬事食品衛生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。

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3,054件の届出があった。また、治験中の副作用報告として19,615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29ヵ所に対してGCP査察を、市販後調査に係るGPMSP査察を5ヵ所に対して実施した。

医薬品再審査については73品目、医薬品再評価については826品目の処理を行った。

大 阪 支 所

支所長 岡田敏史

平成13年度は、大阪支所の発展的改組による「医薬基盤技術開発研究所（仮称）」（基盤研）の創設に向けた動きが具体化した年となった。基本設計も終わり、現在、近畿整備局による工事着工の寸前まできている。第2次補正予算により前倒しで工事費が予算化されたこともあって、今後、建設に向けての動きの加速されることが予

測される。

こうした動きを踏まえ、平成16年3月、大阪支所改組に向けての準備作業を躊躇なく進めてゆく必要があることから、各部が法律又は行政通知等に基づいて行っている業務等について、整理の方向を示すとともに、必要に応じて、関連する行政部局又は担当課と相談することにより、それぞれの業務についての整理の方向を定めた。

試験検査業務については、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ほか、後発医薬品の再評価事業の一環として、指定医薬品に対する一斉取締り試験が行われた。また、標準品製造業務は、例年どおり行われたが、一方で、平成16年3月の改組に向けて、業務の委譲先を確定し、平成14年以降の委譲計画を定めた。

平成13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：食用タール色素の製品検査162件、一斉取締り試験58件について実施し、全品合格であった。また、標準品については、医薬品試験用標準品39品目につき、計7,236個を製造した。

平成13年度には、厚生科学研究費補助金による研究9課題、文部科学省科学研究費補助金による研究1課題、環境省地球環境研究総合推進費による研究1課題を実施したほか、食品等試験検査費による研究4課題を実施した。その他、薬品試験部及び生物試験部は、医薬局監視指導・麻薬対策課による「後発医薬品の再評価事業」への協力を行った。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。

なお、平成13年7月1日付けで宮崎玉樹薬品試験部主任研究官が本所薬品部へ、前川京子薬品試験部技官が本所機能生化学部へそれぞれ配置換えとなった。また、平成13年12月1日付けで四方田千佳子薬品試験部第一室長が本所食品添加物部第一室長へ配置換えとなった。平成13年10月1日付で石綿 肇食品添加物部第一室長が生物試験部長に、平成14年2月1日付で谷本 剛薬品試験部第二室長が薬品試験部長にそれぞれ昇任した。

平成14年4月1日付で村井敏美生物試験部第一室長が退職した。

薬 品 試 験 部

部 長 谷 本 剛
前部長（支所長事務取扱）岡 田 敏 史

概 要

平成13年度は研究面では、医薬品の品質規格及び試験法に関する研究、医薬品の品質確保に関する研究、リポソームの薬物輸送担体としての応用に関する研究、アポリポ蛋白質脂質膜結合機構に関する研究、熱帯病治療

薬の開発に関する研究、糖尿病合併症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などを行い、厚生科学研究費補助金による医薬安全総合研究事業の1課題に主任研究者及び分担研究者として参加し、それぞれに着実な成果をあげることができた。

業務面では、標準品製造、新規標準品の制定、一斉取締り試験、指定検査機関の技能試験などの業務を行った。標準品の需要は年々増加し、13年度も約7000個が交付され、海外からの問い合わせも増加してきている。医薬品の品質評価技術の進歩に伴って新規標準品の確立要望が増加してきているが、13年度はエンジンの品質試験用標準品2品目を制定した。酵素剤であるカリジノゲナーゼ製剤の一斉取締り試験を実施したが、すべて規格に適合していた。厚生大臣が指定する指定検査機関の医薬品試験検査技術の向上と検査結果の信頼性確保を図るための技能試験を実施した。また、2年後に予定されている大阪支所の閉鎖に伴う業務の整理、移管が検討されているが、当部が担当している標準品製造交付業務は厚生労働本省との協議により年次計画で日本公定書協会に移管されることが決定された。この決定に従い、移管全体計画及び平成14年度移管計画を策定し、関係機関との協議を開始した。

その他、薬事・食品衛生審議会の各種調査会における審議及び日本薬局方、日本薬局方外医薬品成分規格の改正作業、医薬品の承認審査に係わる専門協議等の行政への協力を行った。また、国際協力事業団の研修事業に協力した。

人事面では、平成13年4月1日付けで宮崎玉樹技官が主任研究官に昇格した。平成13年7月1日付けで宮崎玉樹主任研究官が薬品部に、前川京子技官が機能生化学部に配置換えとなり、同年12月1日付けで四方田千佳子第一室長が食品添加物部第一室長に配置換えとなった。平成14年2月1日付けで谷本剛第二室長が薬品試験部長に昇任し、同年4月1日付けで齊藤博幸技官が第一室長に昇任した。平成14年3月31日付けで田頭洋子技術補助員が退職し、同年5月20日付けで森田有紀子が技術補助員として採用された。米国ペンシルバニア大学に留学していた齊藤博幸技官はアポリポ蛋白質Eと脂質及び細胞表面レセプターとの相互作用に関する1年間の研究を終えて平成13年7月16日に帰国した。

短期海外出張では、齊藤博幸技官がアポリポ蛋白質Eとヘパリンの相互作用に関する共同研究で米国ペンシルバニア大学に出張した（平成14年2月24日～3月9日）。

業務成績

1. 一斉取締り試験

平成13年度の一斉取締り試験は、前年度に引き続き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。後発品の多いタンパク性医薬品であるカリジノゲナ

一ゼ製剤25検体（錠剤22検体，カプセル剤1検体，注射剤2検体）を収去し，定量試験及びキニン遊離活性試験を行った。定量試験及びキニン遊離活性試験はすべての検体が規格に適合した。また，各製剤に使用された原薬の適格性を確認する目的で，純度試験としてのキニナーゼの試験を実施したところ，いずれの検体も日局「カリジノゲナーゼ」の規定に適合し，各製剤には適切な原薬が使用されていることが推定された。

2. 標準品製造

医薬品試験用標準品35品目，合計4313個の製造を行い，6品目のロット更新を行った。また，ニンジンの品質評価に用いるギンセノシドRb1標準品及びギンセノシドRg1標準品の2品目を平成13年度の新規標準品として制定した。なお，これら標準品の官報告示は局方収載時に行われることになる。

3. 指定検査機関を対象とする技能試験

前年度に引き続き，厚生大臣が指定する指定検査機関の医薬品試験検査技術の向上と検査結果の信頼性確保を図るための技能試験を実施した。指定検査機関である都道府県薬剤師会附属試験検査センター53機関及び参加を希望する地方衛生研究所18機関を対象として，UV測定による医薬品分析の技能試験を実施した。また，後発医薬品の再評価事業の一環として，地方衛生研究所の溶出試験技術の向上を図るために，地方衛生研究所27機関及び参加を希望した薬剤師会試験検査センター26機関を対象として，溶出試験に限定した技能試験を実施した。

4. 国際協力

国際厚生事業団がWHOから依頼された「不正医薬品対策マニュアル」改訂事業への協力要請を受け，同マニュアルの改訂を行った。国際協力事業団の第12回必須医薬品製造管理研修（平成13年11月）に協力し，アジア諸国の薬事行政官等に対する研修を行った。

5. その他

薬事・食品衛生審議会の各種調査会における審議及び日本薬局方，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。また，中央薬事審議会臨時委員として医薬品の承認審査に協力し，これに係わる専門協議等に専門家として参加した。ISO/REMCO国内対策委員として標準物質規格に関する検討に協力した。

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「ビタミンA定量法」の改正案を作成した。この改正案にはビタミンAのHPLC法による定量法を取り入れ，薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール標準品及び薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール標準品に代えて酢酸レチノール標準品及びパルミチン酸レチノール標準品を使用するように改めた。また，昨年に引き続き，生物薬品の品質評価のための「アミノ酸分析法」の国際調和のための作業を行った。

(1)-2 医薬品試験への機器分析法の応用に関する研究：高分子物質の分子量評価法として，ウシ血清アルブミンを校正物質としたデュアル検出器によるタンパク質分子の分子量評価が有用であることをモデルタンパク質としてミズ環状ヘモグロビンを用いて明らかにした。

(1)-3 製剤原料の品質確保に関する研究：原薬GMPガイドラインがICHで調和されたことをうけ，製造工程管理への不純物プロファイルの適用を国内に導入するために，不純物プロファイルの作成方法や不純物プロファイルの同等性評価基準などを作成した（厚生科学研究費補助金）。

(1)-4 溶出試験の変動要因の解明とその制御に関する研究：内服固形製剤に対する溶出試験のデータの変動要因を指定検査機関による共同実験で得たデータの統計的解析によって検討した。その結果，溶出試験結果の施設間でのばらつきには，①UV測定に依存する要因が大きい場合がある，②溶出液の脱気状態が溶出率に影響を及ぼすことが明らかとなった（厚生科学研究費補助金）。

(1)-5 迅速分析法の作成に関する研究：ビタミンA及びビタミンD配合製剤の迅速分析法の確立を目的に検討を行い，HPLC法によるビタミンA及びDの同時分析法を確立し，迅速分析法案を作成した。

(2) 標準品の品質規格の設定に関する研究：(2)-1 ギンセノシドRb1標準品及びギンセノシドRg1標準品の各候補品について，生薬部及びその他の外部機関を含む複数機関での共同実験による品質評価を行い，ニンジンの品質試験用標準品として確立した。

(2) 標準品の品質規格の設定に関する研究：

(2)-2 脳下垂体後葉標準品はウシ脳を原料として製造していたが，BSE問題の発生によりウシ脳の入手が困難になったことなどのために，この標準品に代えてオキシトシン標準品及びバソプレシン標準品を新たに制定することとし，そのための基礎的な検討を開始した。

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) リポソームの薬物キャリアーとしての応用に関する研究

カチオニックリポソームとプラスミドとの複合体の物性について，リポソームの構成脂質の影響を比較検討した結果，コレステロールがプラスミドの発現効率を著しく上昇させることが明らかになり，そのメカニズムとして複合体と赤血球との相互作用が重要であることを見いだした。

3. 創薬基盤技術の開発に関する生物化学的研究

(1) 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

糖尿病合併症発症へのポリオール経路の関与を、RT-PCR法で明らかにした糖尿病合併症好発組織及びその他の組織におけるアルドース還元酵素 (AR) 及びソルビトール脱水素酵素の mRNA の発現量から推定し、AR阻害剤による糖尿病合併症治療は生体内 AR 量を指標として行うことが必要であることを示唆した。

(2) 熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究

リーシュマニア治療薬の開発を目的として、伝統的に南米で用いられている薬用植物、*Elephantopus mollis* より単離した抗リーシュマニア活性をもつセスキテルペン類の作用機序を検討し、これらセスキテルペン類の抗リーシュマニア活性がグルタチオンやシステインなどの SH 化合物で完全に阻害されたことから、細胞内 SH 基との相互反応が作用発現に関係していることが推測された。

(3) モデルペプチドを用いたアポリポタンパク質脂質膜結合機構に関する研究

前年度に引き続きアポ A-I ペプチドの脂質膜結合の分子論について、超遠心分離法、蛍光分光法、NMR 測定などを併用して検討した結果、アポ A-I ペプチドの両親媒性ヘリックスは、膜中心位から約 1 nm の距離に結合し運動性が束縛された状態にあるが、膜中にコレステロールが存在すると、さらに約 1 nm 水相側に押し出され、運動性が高い状態で結合することが明らかとなった (文部省科学研究費)。

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、輸入食品検査を行うと共に、食品添加物等の安全性に関する研究、残留農薬の分析等に関する研究、輸入食品検査に関する研究、特定保健用食材の安全性の確保に関する研究、内分泌かく乱物質の食品汚染実態及び摂取量に関する研究、食品用器具・容器包装の安全性確保に関する研究等を行った。人事面では平成 14 年 3 月末に開原亜樹子、海野有紀子両技術補助員が退職したのに伴い、同年 4 月から中野真希技術補助員が採用された。

海外出張では津村ゆかり主任研究官が平成 13 年 9 月 9 日から 13 日まで第 115 回 AOAC 国際会議 (米国ミズリー州カンザス市) に出席し、発表した。また、同主任研究官は平成 13 年 11 月 9 日に韓国ソウル市の食品医薬品安全庁で開催された内分泌かく乱物質シンポジウムに招待され、講演した。石光 進室長が平成 13 年 7 月 1 日か

ら 28 日まで、また吉井公彦研究官が 7 月 30 日から 8 月 24 日まで、それぞれマレーシア国食品衛生プログラム強化プロジェクトの短期専門家として、国際協力事業団を通じて派遣された。

業務成績

1. 製品検査

タール色素及びタール色素レーキ 162 検体 (平成 13 年 4 月 1 日～平成 14 年 3 月 31 日) について検査を行った。全検体が合格となった。

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
食用赤色 104 号 (R-104) 及び 105 号 (R-105) は、ダイオキシン類の先駆体の一つで第一種特定化学物質であるヘキサクロルベンゼン (HCB) を不純物として含有する可能性がある。第 7 版食品添加物公定書では HCB に対する規格は設けられていないので、平成 10～13 年度の R-104 及び R-105 の製品検査合格検体について HCB 含量実態調査を行った。その結果、R-104 及び R-105 の全検体から 0.16～32.86 $\mu\text{g/g}$ の HCB が検出された。実態調査から算出した色素由来 HCB の一日摂取量は、水質基準に基づいて算出した飲料水由来の HCB 摂取量と比較して、非常に少ない量 (約 1/1000) であり問題のない量であった。別に、平成 11 年度の不適検体食用青色 1 号アルミニウムレーキの付随色素を単離し、その構造を同定した。

(2) 食品中の添加物の分析法に関する研究

「第 2 版食品中の食品添加物分析法」によるフェノール系酸化防止剤 (BHA, BHT, TBHQ, PG, NDGA) は UV 検出 HPLC 法となっているが、試料によっては妨害の影響を受け、定性・定量のできない場合がある。カラムの選択、蛍光検出器の併用を検討した結果、UV 検出で妨害の多いオリーブ油、パスタソース、ピーナツバター、チューインガムなどについても良好に検出でき、BHA, BHT, TBHQ は GC-MS で PG, NDGA は LC-MS で確認する方法を作成した。また、既存法に C18 ミニカラムによる精製を追加することにより、抽出された油脂分の 97% を除去することができ、HPLC 分析時間を大幅に短縮すると共に、妨害ピークの少ないクロマトグラムを得ることができた。

(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

ブドウ種子抽出物の主要な有効成分はプロアントシアニジンを主体とするポリフェノールであるが、成分の化学種は多種多様であり分別定量は非常に困難である。そこで、カテキン類やプロアントシアニジン類等の 3-O-flavanol に極めて特異的なバニリン-塩酸法でブドウ種子抽出物中のポリフェノールを総フラバノール量として

カテキン換算で算出する方法について検討した。また、低分子のポリフェノールについてはHPLCにより定量した。ブドウ種子抽出物に含まれるポリフェノールの一部はgallic acidと結合してgalloyl化しているため、タンナーゼで加水分解することによりgalloyl化率の測定も行った。さらに、食品中のブドウ種子抽出物を定量する場合を想定して、その精製法についても検討した。

2. 残留農薬の分析等に関する研究

(1) 残留農薬基準告示分析法に関する研究

除草剤フェノキサプロップエチルの作物残留分析法を作成した。フェノキサプロップエチルは作物中でフェノキサプロップ、6-クロロ-2,3-ジヒドロベンゾオキサゾール-2-オン (CDHB) 等に分解することが知られている。本法では酸分解で全てCDHBとし、Sep-Pak Plus Alumina N ミニカラムで精製後、UV検出器付きHPLCで測定する方法を作成した。本法を各種残留基準設定対象農作物に適用し、添加回収率、精製度、検出下限ともほぼ良好な結果を得た。

(2) 残留農薬告示分析法見直しに関する研究

1) テクロフタラムの現行試験法は、試料調製後GC-ECDで測定するとなっているが、本農薬はインサートへの吸着があり再現性に問題があることから、HPLCへの適用性について検討した。試料調製法は現行の試験法を準用し、HPLC条件を種々検討した。その結果、玄米を対象農産物として0.2 ppm添加した時の回収率は95%以上であり、妨害もなくHPLCへの適用が可能との結論を得た。

2) ピリフェノックス試験法の共同試験による評価を行った。改良試験法 (GC-ECD法) に従い、きゅうり、トマト、りんご、いちごに各0.1 µg/g、茶に0.5 µg/g添加した場合の添加回収率は69.7~122.8%であった。試料については定量に妨害するような夾雑ピークは認められず、良好な結果が得られた。

(3) 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

柑橘類中の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、ジクロロメタンを用いずに同時に定量する方法を検討した。レモン、オレンジ、グレープフルーツ各20 gをアセトン抽出、次いで酢酸エチルで再抽出し、Supelclean ENVI-Carb及びMega Bond Elut SAXの2種のミニカラムを組み合わせて精製した。NMCはポストカラム反応蛍光検出HPLCで定量した。オレンジを試料とした場合は、すべてのNMCについて妨害ピークの影響を受けずに測定することができたが、レモン及びグレープフルーツでは、それぞれ8種または10種のNMCについて妨害ピークとHPLCの保持時間が一致し、正確な定量値が得られなかった。これらについては、LC/MS (SIM) を用いて定量した。その結果、ほとんどの場合に試料由来の妨害成

分の影響を受けることなくNMCの定量ができた。

3. 輸入食品検査に関する研究

小麦中マラチオンの酵素分解による生成物の同定と分解系の検索を行った。小麦中のマラチオンは小麦抽出液により主にα及びβ-マラチオンモノカルボン酸に分解し、同時に少量のデスメチルマラチオンとマラチオンジカルボン酸も生成することがLCMS等による分析で明らかとなった。α及びβ-マラチオンモノカルボン酸を小麦抽出液と反応した場合、マラチオンジカルボン酸が生成し、それ以上の分解は見られなかったことから、マラチオンジカルボン酸がこの分解系の最終産物であると考えられた。また、この系に関与する酵素はカルボキシルエステラーゼと推測された。

4. 特定保健用食材の安全性の確保に関する研究

1) タンニン酸をラットに経口投与し、その代謝について調べた。Wistar系雄性ラットに1g/kg/10 mLの用量でタンニン酸 (TA) を強制経口投与し、血清、尿及び糞中のTA代謝物濃度及び糞中へのTA排泄量の経時的变化を調べた。血清からはごく微量の4-O-methyl gallic acid (4-OMGA) 及びpyrogallol (PY) が検出されが1日以内に消失した。投与したTAのうち0.35%がTA代謝物、即ちgallic acid (GA), PY, 4-OMGAとしてほぼ24時間以内に尿中へ排泄され、糞中へは54時間以内に0.21%が代謝物即ちGA, PYとして、42.0%がTAとして未変化のまま排泄された。

2) ブドウ種子ポリフェノールを含有する健康食品中のプロシアニジン含量をバニリン-塩酸法により定量した。単純な組成の健康食品については表示量と同程度のプロシアニジンが検出された。しかし、共存エキスにより着色している場合や蛋白質を多く含む食品中のプロシアニジンの定量値は表示より低かった。特に高タンパク食品の場合、本法によるプロシアニジン分析は困難であり、ブドウ種子ポリフェノールが蛋白質と結合する可能性が示唆された。

5. 内分泌かく乱物質の食品汚染実態及び摂取量に関する調査研究

輸入瓶詰め食品103検体のキャップシーリングの材質試験及び同食品中可塑剤の汚染濃度を測定した。その結果、韓国産焼き肉のたれ、香港産豆板醬からDEHP、コロンビア産アンデスポテトからDBP等が比較的高濃度に検出されるケースが認められた。しかし、摂取量から勘案して、TDIに抵触するような食品は見られなかった。食品用PVC製手袋規制後の病院給食を用いたフタル酸エステル類の一日摂取量調査を、平成11年度手袋規制前に行った新潟、愛知、大阪3病院の給食 (各一週間分計63食) で再度実施した。その結果、DEHPの平均一日摂取量は160 µgであり、平成11年度の値519 µgに比して大幅に減少 (69%減) していた。このことは、DEHP

含有PVC製手袋の規制効果が現れたものと考えられた。
6. 食品用器具・容器包装等の安全性確保に関する調査研究

フタル酸エステル類以外の可塑剤について、日本国内で販売されている各種食品中濃度を、GC/MSにより測定した。測定対象はアジピン酸エステル類3種（DEHA, DINA, DAA）及びその他の可塑剤3種（DBS, ATBC, DALG）の計6種類である。市販のアルコール飲料11検体、油脂類17検体、乳製品9検体、菓子類9検体、ファーストフード9検体、即席食品14検体、乳児用粉ミルク6検体、ベビーフード18検体の計93検体を調査した。その結果、カップ入りの日本酒から最高7.30 $\mu\text{g/g}$ のATBCが検出された。この容器のふたに使用されているキャップライナーから、重量比で30～48%のATBCが検出され、これが日本酒に移行したものと考えられた。また、ベビーフード2検体から5.47及び4.76 $\mu\text{g/g}$ のDALGが検出された。これは原料の豆腐に消泡剤として使用された食品添加物グリセリン脂肪酸エステルと考えられた。

生物試験部

前部長（支所長事務取扱） 岡田 敏 史
部長 石 綿 肇

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、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、既存化学物質の生殖発生毒性に関する研究、ダイオキシン類の健康影響に関する総合評価研究、環境中の複合化学物質による次世代リスクの系統的評価と対応支援、内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究などを行った。また、厚生省特別研究「遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究」に参加し、それぞれ着実に成果を上げることができた。

人事に関しては、平成13年10月1日より石綿肇食品添加物第一室長が部長となった。また、平成14年4月1日付けで村井敏美第一室長が退官された。氏は長年にわたり当部において医薬品生物学とエンドトキシンの研究について成果を挙げられた。後任に江馬真第二室長が就任し、部長が第二室室長を併任した。

江馬 真室長は2001年ヨーロッパ毒性学会に参加し、トリフェニルスズの胚致死作用に対するプロゲステロンの抑制効果について研究発表を行った（平成13年9月13日～16日、トルコ）。また、第41回米国毒性学会でジフェニルスズによる着床阻害の作用機序について発表

した（平成14年3月17日～21日、米国）。さらに、同室長は国際協力事業団の中国医薬品安全性評価管理センタープロジェクトの短期派遣専門家として生殖発生毒性試験に関する調査を行った（平成14年3月28日～4月12日）。

業務成績

1. 一斉取締試験

前年度に引き続き、後発医薬品の再評価事業の一環として、後発品の多い注射剤のうち、輸液製剤（マルトース注射剤等）33件について無菌試験及び発熱性物質試験を実施した。その結果、全品目が各試験に適合することが認められた。

2. 標準品製造

エンドトキシン10000標準品ほか5品目、計2,923個の製造を行った。なお、エンドトキシン100標準品及びエンドトキシン10000標準品についてはロット更新を行った。

3. 国際協力

平成12年度より開始された国際協力事業団の中国医薬品安全性評価管理センタープロジェクトへの協力を行った。

4. その他

薬事・食品衛生審議会の新薬の承認審査における専門協議及び日本薬局方の改正作業（医薬安全局審査管理課）への協力を行った。また、残留農業安全性評価委員会、新開発食品調査部会、食品添加物調査会及び残留農業調査会（食品保健部）、並びに農業資材審議会飼料分科会等（農林省畜産部）の活動に協力した。

研究業績

1. 発熱性物質に関する研究

(1) エンドトキシン標準品に関する研究

日米各々の薬局方（JP及びUSP）エンドトキシン標準品の発熱活性を比較した結果、ウサギに対する発熱活性はJP標準品がUSP標準品の約1.5倍の活性を示すことが明らかとなったが、ヒトに対しては、両者はほぼ同等の発熱活性を示すことが示唆された。

(2) 微生物由来発熱性物質の免疫作用に関する研究

エンドトキシン以外の微生物由来発熱物質（ペプチドグリカン、 β クルカンなど）を同定・整理し、さらにヒトに対する免疫作用について検討した。その結果、ペプチドグリカンは非常に強いT細胞の機能抑制作用を示すことを明らかにした。

2. 医薬品等の有効性、安全性に関する研究

(1) 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

新規に開発したインビトロ発熱性物質試験法は、実際に医薬品や医療器具に汚染した発熱性物質を検出することが可能であり、さらにヒトに対する発熱活性を的確に評価できることが示唆され、非常に有意性、有用性が高

い試験法であることを明らかにした。

(2) 既存化学物質の生殖発生毒性に関する研究

トリブチルスズ及びジブチルスズはラットの妊娠初期に投与したとき著しい胚致死作用を示すが、これらの代謝物であるモノブチルスズ (butyltin trichloride) をラットの妊娠初期に投与したときには胚致死作用を示さないことを明らかにした (既存化学物質等の試験調査費)。

(3) ダイオキシン類の健康影響に関する総合評価研究

ポリクロロジベンゾダイオキシン、コプラナPCB及びペンタクロロジベンゾフランの生殖発生毒性に関する最新情報を収集し、これらの化学物質は実験動物において生殖発生毒性を示すことを明らかにした (厚生科学研究費補助金)。

(4) 環境中の複合化学物質による次世代影響リスクの系統的評価と対応支援

triphenyltin chloride (TPTCl) による脱落膜反応抑制及び着床阻害に対するプロゲステロンの影響を検討したところ、プロゲステロン投与によりTPTClによる脱落膜腫形成阻害が防御され、また、TPTClによる着床阻害が防御された。これらのことから、TPTClの着床阻害作用には子宮の脱落膜反応抑制とプロゲステロンレベル低下が関与していることが確認された (環境省地球環境研究総合推進費)。

3. 遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究

アトピー性皮膚炎のモデル動物であるNCマウス由来の培養ケラチノサイトが、対照系統Balb/cマウスケラチノサイトには認められないインターフェロン γ 感受性を示すことを明らかにした。これら2系統のマウスケラチノサイトにおける遺伝子発現を比較して、前者において強く発現する遺伝子を見いだした。アトピー性皮膚炎との強い関連が示唆されている。インターフェロン γ に対する細胞の感受性とこの遺伝子との関係について検討を進めている (厚労省特別研究費)。

4. 食品添加物の安全性評価に関する研究

(1) 日本人における一人一日当たりの食品添加物の推定摂取量

食品添加物の安全性評価の一環として、全国地方自治体の行政検査結果を基にした摂取量調査、及び国内の生産量統計を基にした摂取量調査を行った。摂取量で、ADIを超えるものはなかった (厚生科学研究費)。

北海道薬用植物栽培試験場

場 長 柴 田 敏 郎

概 要

施設整備としては、作業舎内側ドアのアルミサッシ化

工事、2号宿舍の屋根葺き替え工事並びに1号宿舍屋根への雪止め用小屋根設置工事を実施した。

研究業務としては、厚生労働省医薬局監視指導麻薬対策課の委託研究による「けしの直接抽出法に関する研究」、厚生科学特別研究事業による「薬用植物の栽培・品質評価指針作成に関する研究事業」、並びに厚生科学研究費によるヒトゲノム・再生医療等研究事業「薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究」を実施し、各々報告書及び薬用植物栽培指針案を提出した。

一般市民への啓発活動として、第3回薬用植物に関するワークショップ「北方先住民族の有用植物とその利用法について—その2」を、平成13年8月25日～26日の2日間にわたり名寄市北国博物館と共同開催し、4名の講師による講演会ならびに中川郡美深町松山湿原における野外薬用植物観察会を行い、合計約100名の参加のもと盛況の内に終了した。終了後記録集を作成し、希望者に配布した。また、アイヌ民族により利用されてきた有用植物遺伝資源の保存と来場者への啓発のため専用コーナーを整備し、100種類の植物の植栽とラベルの作成、及び文献収集を実施した。

研究生の受け入れについて、平成14年4月22日より1年間の予定で石井妙子氏 (名古屋大学) を受け入れた。

海外出張では、柴田敏郎が第10回韓国薬用作物学会年会・国際シンポジウム2001での講演、韓国国立作物試験場での薬用作物セミナー講師、並びに同国内薬用植物栽培研究状況視察のため、平成13年11月1日～7日まで韓国に出張した。

業務成績

1. 種子交換

採取 241種 (筑波試験場へ送付)

受け入れ 69件 241種

分譲 69件 150種

2. 指導業務

415名の来場者に薬用植物の情報提供と指導、並びに105件の栽培指導を行なった。中川郡美深町の薬草園設立の指導、名寄市及び上川郡風連町における薬草生産栽培指導、並びに名寄市漢方研究会、同市薬草研究会、上川郡当麻町における薬草栽培について各々指導を行った。また、平成13年8月23日にけし耕作者及び関連機関に、平成13年10月30日にけし耕作希望者に対する講習会を試験場内にて実施した。

研究業績

1. けしの直接抽出法に関する研究

さっ果の採取時期がアヘンアルカロイド収量に及ぼす影響を明らかにするべく、現在生産栽培が行われている品種である一貫種及びアヘン多収系統である緑一貫の2品種を用いて、開花後7日から5日毎に37日目まで検討

した。その結果、果穀中のモルヒネ含量は、一貫種においては開花後日数の経過とともに増加する傾向が認められ、37日目が最高となったが、緑一貫においては22～27日目に最高に達し、その後は低下することが判明した。

2. 薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験

1) ウイキョウの栽培研究

昨年度に引き続き、カリウム施用量（4水準）及び栽植密度（4水準、計16試験区）が生育3年目株の生育及び種子収量に及ぼす影響を圃場にて検討した。その結果、10a当たり1,000～1,250株の栽植密度、1株当たり10～15gのカリウム施用量で効率良い栽培が期待できると考えられ、本結果は生育2年目とほぼ同様であった。10a当たり種子収量は、約50kgと推定された。3年生株における10a当たり施肥量を、窒素10～12kg、リン酸8～10kg、カリウム15～20kg、カルシウム10～15kgと推定した。

2) モッコウの栽培研究

主根が良く発達し分枝根の発生の少ない生薬の、1年収穫栽培生産技術を確立するため、深耕栽培の効果及び栽植密度の影響について検討した。実験は、播種前にトラクターにて20cmの深さに耕起した区、トレンチャーにて播種溝部を40cm及び60cmに深耕した区の計3区、発芽後株間を5、10、15cmとする計3区の組み合わせ合計9試験区を設定した。その結果、主根伸長は土壤の硬さが強く影響し、分枝根の発生には土壤の硬さと栽植密度が影響することが確認され、膨軟な土壤下で主根の伸長は良好となり分枝根の発生が抑制されることが認められた。収量はトレンチャー60cm・株間5cm区で最高を示した。主根中のcostunolide及びdehydrocostuslactone含量共に土壤硬度が大きい区で高まる傾向が見られたが、有意差は認められなかった。また、希エタノールエキス含量は試験区間に一定の傾向を認めなかった。

3) ヨロイグサの栽培研究

セル苗を利用した1年生栽培における栽植密度の影響について検討した結果、生育は9月以降10月下旬にかけて急速に進むこと、株間が広がるに従い根重は有意に増加することが判明した。8種のフロクマリン類及び希エタノールエキス含量は試験区間に有意な差を認めなかった。

3. マオウの国内栽培に関する研究

筑波試験場で栽培中のマオウ（EP-13系統）より株分けした苗を1999年6月2日に北海道試験場の圃場に定植し、3年間生育を調査した。その結果、雪の下で越冬した株は地上部がすべて枯れ、春にシュートが新たに萌芽することが繰り返し観察されること、地上部の乾物重は8月から10月にかけて緩やかに増加し、以後生育が停止する傾向が認められること、3年目で1株あたり20～50gの乾燥生薬（10a当たり換算収量は100～240kg）が

得られること、無機成分含有率と乾物重から換算した10a当たり施肥量は、3年目で、窒素4.5～5.4kg、リン酸2.0～2.4kg、カリウム3.8～5.0kg、カルシウム3.2～4.0kg、マグネシウム0.8～1.0kgと推定されること等が判明した。また、モンゴル産野生マオウの無機成分含有率を比較した結果、カルシウムが著しく高く、マグネシウムも比較的高かったが、リン酸やカリウムは顕著に低い特徴が認められた。

筑波薬用植物栽培試験場

場 長 関 田 節 子

概 要

生物遺伝資源の整備の重要性が認識され、昨年3月に閣議決定された第2期科学技術基本計画において、2010年を目途に世界最高水準を目指して、生物遺伝資源をはじめとする知的基盤の整備を進めることとされた。このため、生物遺伝資源等知的基盤関係府省連絡会の下に中核的生物遺伝資源機関連絡会が設立され、当試験場が薬用植物の中核機関を担うこととなった。

人事面に関しては、平成13年10月1日付けで下村講一郎育種生理研究室長が退官し、平成13年8月1日付けで渕野裕之氏が主任研究官に採用された。また、平成14年4月1日付けで飯田 修伊豆薬用植物栽培試験場場長が栽培研究室長に、井上 修伊豆薬用植物栽培試験場圃場作業場長が圃場作業員に配置替えになった。高橋真理衣氏が平成14年4月1日よりヒューマンサイエンス研究財団ヒトゲノム・再生治療研究推進事業の支援研究員として採用された。研究生として別井史枝氏（筑波大学）、中根孝久氏（昭和薬科大学）、吉崎早矢香氏（東京理科大学）を受け入れた。

海外出張として、渕野裕之主任研究官がベトナムで開催された「第2回インドシナ薬学会議」に出席し、研究発表および討議を行った（平成13年10月19日～24日）。関田節子場長が韓国で開催された「生薬の規格に関する国際調和セミナー」において研究発表し討議した（平成13年11月1日～3日）。また、韓国で開催された「生薬の規格に関するWHO会議」（平成13年11月26日～12月1日）ならびに中国で開催された「薬局方生薬規格調和（FHH）設立準備会議」（平成14年3月7日～10日）に出席し意見交換、情報収集を行った。吉松嘉代主任研究官が、「乱用薬物の不正流通防止に関する研究」でオーストラリアの専門家と意見交換を行った（平成13年12月15日～21日）。施設関係では、平成13年度補正予算により資源保存棟の建設が決定した。

平成14年3月12日、筑波試験場会議室において、首藤所長・持田総務部長・合田生薬部長出席のもと、平成

13年度薬用植物栽培試験場業務打ち合わせ会議を開催し、13日に5場関係者により平成14年度研究計画を討議した。

また、平成13年7月12日に、薬用植物フォーラム：新世紀に求められる薬用植物2001をつくば市の文部科学省研究交流センターにて開催し、米谷民雄国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長・森田剛史厚生労働省食品保健部企画課新開発食品保健対策室専門官・鈴木建夫独立行政法人食品総合研究所理事長・西村弘行北海道東海大学工学部生物工学科教授・岩瀬久克三栄源エフ・エイ・アイ株式会社基礎研究部次長・本多泰揮花王株式会社スキンケア研究所主任研究員の招待講演と関田節子筑波薬用植物栽培試験場長の講演を行った。

業務成績

種子保管数 (貯蔵庫)

交換用種子保管数 (INDEX SEMINUM 記載分) 1,286点
 13年度入手種子数 335点
 分譲種子件数 5,146点
 種子目録配布数 75ヶ国 442機関

遺伝子資源保存

低温保存試験用種子 152種 1,634点
 低温保存交換導入種子 約5,600点 (昭和63年～平成13年, 継続)
 超低温保存培養体 40点

研究業績

1. 薬用植物の栽培に関する研究

(1) けしの直接抽出法に関する研究 (委託研究)

2001年3月27日に播種し、開花後朔果を収穫し、果殻収量及びアヘンアルカロイド収量を調査した。この結果、直接抽出に適した収穫時期は開花後10日目から可能であることが明らかになったが、種子の収穫や果殻の乾燥などを考慮すると、開花後27日目ごろが望ましいと判断した。

前2年の選抜試験により、けし直接抽出に適用可能な13系統を選抜した。この13系統から、果殻中のアヘンアルカロイド含有率及び成分組成に特徴がある系統を選抜し、「南広3号」、「トルコ4-2」及び「CxIZ-10」の3系統が直接抽出法に適した系統と判断した。

(2) クソニンジンの栽培に関する研究

artemisinin抽出原料に適したクソニンジンの栽培方法を検討した。4月23日に播種し、畦幅100cm一定、株間距離、収穫時期をそれぞれ3条件設定し、乾燥葉の収量、artemisinin含量を検討した。収量は、株間75cmで開花期の試験区が最大 (237.6g/plant) となり、生育期間と株間の増加により乾燥葉の収量は増加する傾向が認められた。artemisinin含量は、生育期及び最盛期では約20.0 mg/gであったが、開花期では減少した。これらの結果から、栽培条件としては、畦幅100cm、株間75cm、収

穫時期を8月中～下旬とすることが望ましいと判断した。

2. 薬用植物の組織培養に関する研究

(1) 北京紅芯ダイコン不定根培養系の確立とアントシアニン生産

無菌的に発芽させた北京紅芯ダイコン (*Raphanus sativus* L. cv peking koushin) の幼植物体の根をナフトレン酢酸 (NAA) およびインドール酪酸 (IBA) (0.1, 0.5 mg/L) 添加1/2 Murashige & Skoog (MS) 液体培地, 14時間照明下あるいは暗所, 25℃で巡回培養 (100 rpm) して不定根培養を確立した。HPLC分析により主な赤色色素はpelargonidin類であり、栽培根と不定根では色素パターンが酷似していることを確認した。色素の定量は、吸光度測定により行い、pelargonidin及びcyanidin-3-glucoside相当量として算出した。照明下培養により、0.5 mg/L IBA添加1/2 MS液体培地にて4週間培養後、良好な不定根の増殖および色素生産が認められた。一方、暗所では、不定根の生育は良好であったが色素生産量が低く、栽培根とは異なり、光により色素生産が誘導されることが明らかとなった。色素含量は、凍結乾燥した不定根は約0.15%で、栽培根は約0.11%であった。さらに、本不定根エキスは栽培根と同等のラジカル捕捉活性を示し、脂質過酸化活性においては栽培根の3倍以上の抗酸化力が認められた。

(2) ビャクダン不定胚の超低温保存 (厚生科学研究費)

ビャクダン (*Santalum album*) 不定胚を前培養し、ガラス化液 (PVS2, WP培地で調製) (25℃, 20または30分間) 処理後、液体窒素中 (-196℃) に8日間保存した。保存した不定胚を解凍後、再培養を行い、前培養培地の種類とガラス化液処理時間が超低温保存後の再生率に及ぼす影響について調べた。再生後の不定胚の生育が良好だった前培養培地-ガラス化液処理時間 (分) は、0.1 M ショ糖-20分および0.2 M ショ糖+1 M グリセリン-20分であった。超低温保存した不定胚からは、正常な植物体が分化し、この精油成分は、GC-MS分析により未保存のものと変化がないことを確認した。

3. 逆相固相抽出によるアルカロイドの精製とHPLC分析 (厚生科学研究費)

尿試料あるいは血液試料中の乱用薬物分析に用いられている固相抽出カラムのケシ属植物試料への適用について検討した。抽出溶媒、固相抽出カラムおよびカラムの洗浄・溶出条件を検討した結果、約50mgの乾燥植物試料を5%酢酸溶液で抽出し、陽イオン交換型MCXを用いて精製 (洗浄: 0.1N塩酸溶液およびメタノール, 溶出: 1.4%アンモニアを含む95%メタノール溶液) すると、HPLCクロマトグラム上の妨害ピークが少なく、目的のアルカロイドが収率よく回収できることが判明した。この手法は、従来法の液相-液相分配による精製過

程で失われていたテバイン、パバベリン、サンギナリン等のアルカロイドを損なうことなく分離精製が出来るので、より優れた方法と考えられる。

4. 人工光室で生育したケシ植物体の形態とアヘンアルカロイド

人工光室、温度20℃/明(14時間)、17℃/暗(10時間)で、鉢栽培したケシ(*Papaver somniferum*)の形態と各生育期のアルカロイド含量を調べた。国内の空港で押収されたケシ果中の種子から生育した植物(No. 13)からは、2種類の植物体が生育し、紫花のものは主アルカロイドがモルヒネであるのに対し、赤花の植物の主アルカロイドはテバインで、オリバピンが検出された。観賞用として誤って栽培されることが多い八重咲きのボタンゲシには、幼苗期(播種後56日)のときから、モルヒネおよびコデインが検出され、特に根における含量が高かった(T:モルヒネ0.173%, コデイン0.073%; K:モルヒネ0.228%, コデイン0.061%)。食用種子の品種となっているケシIndia-1は、果殻中のコデイン含量は0.21%でモルヒネ含量0.15%よりも高く、India-2は、モルヒネ0.26%でテバイン0.23%とほぼ等しく、オリバピンも検出された。Turkey果殻のアルカロイド含量はIndia-2と同程度であったが、テバイン含量が低くオリバピンを含まない点が異なっていた。Franceは、モルヒネ含量が最も高く(1.57%)、オリバピンを含み、他の植物では検出されたパバベリン、ノスカピンが検出されなかった。

5. ケシ属植物の形態とアルカロイド

オニゲシ*Papaver pseudo-orientale*と規制植物であるハカマオニゲシ*P. bracteatum*は花と葉の形態が酷似しているが、花びらの色が前者は濃いオレンジ色でその基部に濃紫色の斑点があるのに対し、後者は深紅色で基部には黒紫色の鮮明な斑点があることで区別している。また、含有アルカロイドのパターンは全く異なっていて、前者は多数のピークが検出されるがテバインを含まず、後者は高濃度のテバインを含む。

ロンドンから導入した*P. orientale*を人工光室で生育した幼苗中にはテバインとオリバピンが検出された。そこで圃場で保存している植物について検討したところ、*P. orientale*と*P. pseudo-orientale*は花の色は共にオレンジ系で良く似ているが、含有成分は異なっていて前者にはテバインが含まれていた。現在*P. orientale*と*P. pseudo-orientale*は同じ和名オニゲシが使用されているが、両者はアルカロイド成分に大きな違いがあることが明らかとなった。

別に持ち込まれた鑑定試料は*P. pseudo-orientale*と同様、サンギナリンを含みテバインを含まないことを未熟果殻と乳液の含有アルカロイドを測定し確認した。

6. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索(HS

研究国際グラント)

熱帯地方特有の感染症であるリーシュマニアに対して有効な化合物を植物成分から見つけるべく、多くの南米産薬用植物エキスの抗リーシュマニア活性を調べた。今年度はペルー産、ブラジル産、ボリビア産、ベトナム産の薬用植物について活性を検討した。またさらに植物以外にもカビ代謝産物についても検討を行った。その結果、植物からはペルー産のケシ科植物に強い活性が認められた。また、カビ代謝産物からは*Emericella striata*より得られたemestrinおよびemestrin B、*E. heterothallica*より得られたemethallicin AおよびB、さらに*E. nidulans*より得られたnidulalin Aに著しく強い抗リーシュマニア活性が認められた。

7. マオウ(*Ephedra distacya*)の栽培地及び時節変化にともなうエフェドリン、プソイドエフェドリンの含量(厚生科学研究費)

マオウの国内栽培の可能性を検討するために各栽培試験場(北海道、筑波、和歌山、種子島)において定植させた3年目の株を用い、月毎の総アルカロイド含量を検討した。北海道、筑波では1.5±0.4%であったが、種子島では0.8~1.6%と変動が大きく冬期に含量が高くなる傾向が見られた。また、3年生株では局方の基準値である総アルカロイド含量0.7%を充たす結果が得られ、国内栽培の可能性が示唆された。

8. ベトナム産牛膝*Achyranthes aspera*の成分について(厚生科学研究費)

ベトナム産*A. aspera*について成分を検索し、当栽培試験場にて栽培しているヒナタイノコズチ*A. fauriei* Leveille et Vaniotおよびマルバイノコズチ*A. fauriei* Leveille et Vaniot f. *rotundifolia* Ohwiとの成分の違いを検討した結果、*A. aspera*に含有されるecdysteroid類はecdysteroneであった。ヒナタイノコズチおよびマルバイノコズチに含有されるecdysteroid類は数種類含有されているが両者の間に大きな違いはなく、前者に最も含量の多いのはecdysoneであった。*A. aspera*は成分的には*A. fauriei*と重複しており、トウゴシツ*A. bidentata*等と同様、生薬牛膝として利用できる可能性が示唆された。

9. 生薬テンマ、キョウカツ、テンモンドウの確認試験の検討

テンマ、キョウカツ、テンモンドウに関して、日本薬局方収載のための確認試験の検討を行った。テンマはガストロジン了指標物質とし、抽出溶媒メタノール、抽出時間15分、シリカゲルTLC上展開溶媒酢酸エチル:メタノール:水(8:2:1)、10%硫酸噴霧後加熱しRf値0.4付近に赤紫色のスポットの検出を行うのが最適であった。キョウカツは、イソインペラトリンを指標物質とし、抽出溶媒ヘキサン、抽出時間10分、逆層TLC上展

開溶媒メタノール：水（9：1）、紫外線ランプ照射下でRf値0.5付近のスポットの検出を行うのが最適であった。テンモンドウは、指標物質を2種類のステロイドサポニンとし、抽出溶媒ブタノール：水（40：7）混液、抽出時間30分、シリカゲルTLC上、展開溶媒ブタノール：水：酢酸（10：6：3）とし10%硫酸噴霧後加熱しRf値0.42付近の赤褐色のスポットの検出を行うのが最適であった。

伊豆薬用植物栽培試験場

前場長 飯 田 修

概 要

伊豆薬用植物栽培試験場は平成14年3月31日を以て閉場となり、54年間に渡る業務を終了した。閉場に伴い、同年4月1日付けで飯田と井上修技官は筑波試験場に転任し、飯田は栽培研究室長を拝命した。また、山田和也技官と非常勤職員平山松子氏は、同年3月31日付けで退職した。伊豆試験場の物品等については、北海道試験場に備品を、筑波試験場に備品、植物・生薬の標本及び図書を、種子島試験場へは温室植物のほぼ全種類を移動することとし、5月下旬から6月上旬に各場へ荷を搬送する予定である。

平成13年11月10、11日の2日間に渡り、国立医薬品食品衛生研究所、伊豆薬用植物栽培試験場並びに南伊豆町役場の主催により薬用植物公開セミナー「薬用植物の宝庫 伊豆 IN 南伊豆町」を開催した。10日に講演会を、11日に観察会を行い、それぞれ300名、200名の参加者があった。会の開催に当たり、本所、大阪支所及び各栽培試験場から講師やスタッフとして多くの支援を頂いた。改めてここに感謝する次第である。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業「薬用生物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究」において、マオウの栽培に関する研究、伊豆半島の野生植物の採種並びに伊豆半島南端の走雲峡の植物に関する調査・研究を行い、厚生科学研究費補助金（特別研究事業）「薬用植物栽培・品質評価指針」では、アミガサユリの栽培指針を作成した。さら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」を行った。

業務成績

1. 種子交換

採種	261種（筑波試験場へ送付）
内訳	野生植物 170種
	標本植物 82種
	温室植物 9種

2. 薬用植物の自生地調査

伊豆半島各地の野生植物の分布調査、とくに今年度は伊豆半島南端の走雲峡における調査を重点的に行った。

研究業績

1. マオウの栽培に関する研究

2000年2～6月に根挿した幼苗を用い、2000年9～11月及び2001年2～4月に毎月1回、15～20日の間に圃場に定植し、2001年12月11～25日に収穫した。

定植苗は全て活着し、温暖地では上記期間における定植は可能であった。定植後1年目の地上部収穫量は定植時期が早く、また定植苗が大きいほど多かった。1株当たり地上部の最高乾燥重量は、9月植えの209.33gであった。

2. クコ新品種の育成に関する研究

クコ *Lycium chinense* Miller 5系統とナガバクコ *L. barbarum* L.（中国新疆産）1系統を用い、前者を全て母親とする人工交配を行い、F₁雑種種子を得た。F₁種子を温室内で1年間育成した後圃場に定植し、F₁個体の外部形態を観察した。

F₁世代では母親の形質が強く現れ、いずれの個体にもトゲが見られ、目標とするトゲ無し個体は出現しなかった。F₁世代を自殖し、F₂世代の分離を確認するとともに交配親を逆にした交雑を行うことも有用と推察された。

3. けしの直接抽出法に関する研究

けしの秋まき栽培における、1) 収穫期とけし果殻中のアヘンアルカロイド含量の関係及び2) 栽植様式について検討した。

1) について、果殻中のモルヒネ含量は開花後7日が最も高く、以後順次低下し、開花後27～32日に再度高くなった。果殻乾燥重量は開花後17日で最大に達し、以後ほぼ横這いに推移した。果殻5果当たりのモルヒネ見込み生産量は、開花後32日が最も高く、次いで27日であった。

2) では、密植栽培により果殻及びモルヒネ収量は高くなるが、同一密度で栽培する場合、株間を狭く、畝間を広くする栽培様式を用いるのが良いことが明らかとなった。

和歌山薬用植物栽培試験場

場 長 関 田 節 子

概 要

人事関係については変更はなく、出納員として大阪支所の中島一登会計課長補佐が、支出負担行為事務補助として大阪支所谷本 剛薬品試験部長が担当した。

業務成績

1. 種子（種苗）交換業務

採種 90種（筑波試験場に送付）

2. 栽培業務

前年度と同様に、当帰、芍薬、牡丹等を中心に57種の種子採取用薬用植物の栽培を行った。

オートムセージ *Salvia greggii* を、畝間50cm、株間30cm 畝数8本、一畝株数17株の条件で栽培し、草丈、生重量、乾燥重、枝数、開花日等について記録し、採取後乾燥し研究試料として供給した。

標本園植物91種、樹木園植物90種、温室植物110種の維持栽培を行った。

地域の薬用植物種の分布調査を行い、136種を記録した。見学者は、年間で106名を数えた。

地区のイベントに際しては薬用植物（10種）の鉢植えを貸し出した。

種子島薬用植物栽培試験場

場 長 香 月 茂 樹

概 要

人事面では野崎トモ子技官が6月4日から6日まで用賀へ出張した。

施設環境整備として、伊豆試験場の閉場による移動植物の植栽場所として第5圃場の西側に圃場を新設した。中央農道脇に列植していたオオバユウカリを安全上、また試験圃場の使命を維持するため伐採し、その後、場内に散在していたカユブテヤナツメヤシ等を移植し、まとめた。

研究関係では薬用植物栽培・品質評価指針作成に関する栽培試験を実施し、「テンダイウヤク」に関する原案を提出した。厚生労働省監視指導・麻薬対策課の委託研究「けしの直接抽出法に関する研究」、厚生科学研究費補助金により「薬用植物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究」、「マオウの国内栽培に関する研究」などを実施した。

鍋木絃一技官が平成13年3月9日～11日沖縄本島国頭村の山地植物、知念村の海岸植物の調査を行った。

気象面では、梅雨の期間は6月4日から7月18日の45日間で、総降雨量は403.5mmであった。最高気温の極値が8月9日35.2℃となり、従来の35.0℃を更新した。集中豪雨が9月2日にあり、16:00～17:00の1時間降雨量は125mmという強烈なもので、島内各所で大きな被害が発生したものの、試験場の被害は圃場の一部が若干崩壊した程度で軽微であった。台風関連の内容は下記のとおりである。いずれも、被害は栽培植物・樹木に生じただけで軽微であり、特に施設への被害はなかった。

8月19日～8月20日 11号

最大瞬間風速 29.9m/s・総降雨量 59.0mm

10月17日～10月18日 21号

最大瞬間風速 33.0m/s・総降雨量 69.0mm

業務成績

1. 種子交換

採種 443種（筑波試験場へ送付）

内訳 野生種 283種

栽培種 160種

露地 152種

温室 8種

受入 37件 81種

分譲 58件 263種

2. 指導業務

見学者 48件 153名以上

問い合わせ件数は69件以上あり、内訳（重複あり）は種苗の入手法23、栽培法18、鑑定20、薬効・用法15、その他（地域振興、薬用植物の自生地、販売先など）7件であった。

10月14日の漢方薬・生薬研修会薬草園実習で実習生2名を受け入れた。

研究業績

1. ケシの直接抽出法に関する研究

果実の生育段階と成分・収量の関係について検討した。1993年伊豆試験場より導入した「一貫種」の継代栽培した1996年産種子を、2000年12月22日に播種した。肥料条件は基肥として窒素、リン酸、加里を成分量でそれぞれ4.68kg/10aを施用した。追肥として化学肥料（6.5-6-19）1000倍液を3月19日、4月4日に条間に施用した。果実は開花後8日、12日、17日、22日、27日、32日、37日に収穫した。草高・果実は開花後17日頃まで生長した。モルヒネ、総アヘンアルカロイドの量も、開花後17日頃まで増加した。1果中のアヘンアルカロイド中のモルヒネ含有率は登熟（27日目頃）後にやや減少傾向が見られた。

2. 薬用植物の栽培・品質評価法に関する研究

1) ウツボグサの栽植密度試験（株間：20・30・40・50cm）1992年島内自生株を採取し、株分けにより増殖していたものを試験に供した。施肥量は基肥として堆肥300kg/10a、窒素、リン酸、加里を成分量でそれぞれ3kgを全面に施した。追肥は化学肥料（6.5-6-19）1000倍液を春2度施した。個体間の生育差が目立った。収量は20～40cm区で生体重約270g/m²（乾物重約85g）、50cm区では約160g（同約55g）であった。花穂の数は20～40cm区で約700個、50cm区で450個であった。

2) ヒキオコシの経年栽培株の収量試験

ヒキオコシの挿し木・種子繁殖の3年目、株分けによる2年目の収量試験を実施した。施肥は4月23日に堆肥1000kg/10a、窒素、リン酸、加里を成分量で3.5kgを、7月16日に2kgを側条に施した。7月9日収穫の1株当たりの生体重は635g、844g、644g、乾物重は176g、231g。

181gで生乾率は約28%であった。10月16日収穫では生体重は409g, 494g, 322g, 乾物重は132g, 150g, 104gで生乾率は約31%であった。

3) テンダイウヤクの栽培に関する研究

種子繁殖したものを密植(株間20cm)粗放栽培し、播種後10年で収穫した場合、乾燥根重で50~75kg/10aと想定された。

3. 野生・未栽培種の栽培化に関する研究

北海道試験場からスペインカンゾウとウラルカンゾウのストロンの送付があり、2001年5月14日定植した。スペインカンゾウは順調に生育しているものの、ウラルカンゾウは数株が残るのみで生育も不良である。

4. 希少植物の保存及び保護に関する研究

わが国における保護上重要な植物として危急種のタチバナ、コウライタチバナ、ナルトオウギ、ヤクタネゴヨウを導入し増殖した。タカクマムラサキなど希少種を導入し増殖した。北限種：タンゲブ、クサトベラ、南限種：クララ、種子島・屋久島固有種：ヤクシマツツブキを導入した。

5. マオウの国内栽培に関する研究

3年生株では隣接株との区別が困難な状態にまで生育し、開花する株もあるが結実はしていない。総アルカロ

イド量は春から夏にかけて減少傾向が見られた。

6. 薬用植物資源の種子保存法確立における研究基盤整備に関する総合的研究

平成7年から冷蔵保存している種子141科795種(内栽培種311種)の採種記録(時期・場所)、保存状況のリストを作成した。種子島は大隅諸島と奄美諸島の間に位置する生物分布の区分線である渡瀬線に接する場所に位置し、気候的にも亜熱帯に近い暖温帯という環境に属し、露地において温帯性(日本本土)植物と熱帯・亜熱帯性植物が生育している大変貴重な状況が再認識できた。自生種で個体が地理的に孤立し、しかも自家不和合性その他の原因のため、結実不良の植物があった(アケビ、ヤクタネゴヨウ)。栽培種において、よく開花はするものの、結実しないものや結実歩合が低いものが見られた(ハマナス、マンゴー、レイシ、リョウキョウ等)。隔年結果する状況が観察された(カンラン)。種間雑種と思われる個体が観察された(ヒロハヤブニッケイ、カシワ×コナラ?)。希少植物の生育地(野生・栽培)の確認ができた(カンアオイ属、コウライタチバナ、タチバナ、ヤクタネゴヨウ、タカクマムラサキ、オキナワツゲ、カンラン)。

平成13年度所外研究員等の受け入れ名簿

Researchers' List in Fiscal Year 2001

(客員研究員) 16名

平成14年3月31日現在

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
下村 祐子	東京薬科大学名誉教授	生薬部	4.10.1		女	
田中 悟	医薬品機構	生薬部	9.4.1		男	
福岡 正道	昭和薬科大学薬物動態学教授	生薬部	9.4.1		男	
松井 道子	元当所変異遺伝部	生薬部	9.4.1		女	
内藤 克司	元当所毒性部	生薬部	10.4.1		男	
降矢 強	医薬品機構	生薬部	12.6.1		男	
三門 森国	元当所病理部	生薬部	12.10.2	14.3.31	男	
石橋 無味	東京大学大学院医学研究科	生薬部	13.3.15		男	
岡安 無味	元当所薬品部	生薬部	13.4.1		男	
相賀 裕美	北里大学医学部病理学教室教授	生薬部	13.4.1		男	
末祥 二	元当所毒性部	生薬部	13.4.1		女	
神沼 吉	元当所有機化学部	生薬部	13.4.1		女	
西谷 孝	元当所化学物質情報部	生薬部	13.4.1	13.12.31	男	
横井 毅	慶応義塾大学医学部内科	生薬部	13.5.21	14.3.31	女	
黒川 雄	金沢大学大学院医学系研究科教授	生薬部	13.9.15		男	
	元安全性生物試験研究センター長	生薬部	13.12.1		男	

(協力研究員) 10名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
樽松 美治	ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	9.1.9		女	
鄭然 孫功	九州大学薬学部特別研究員	環境衛生化学部	9.10.1	13.8.31	女	
壺井 俊幸	日本大学医学部	毒物化学部	11.4.1		男	
西尾 利幸	日本大学生物資源科学部助教授	有機化学部	11.11.1		男	
太田 子誠	相模女子大学学芸学部助教授	衛生微生物部	11.12.1		女	
千野 茂	日本大学生物資源科学部	食品添加物部	12.8.1	13.7.31	男	
内山 直久	千葉市環境保健研究所	環境衛生化学部	13.4.1		男	
青木 孝直	帝京大学医学部	有機化学部	13.7.1		女	
原田 孝造	産業技術総合研究所	化学物質情報部	13.11.1	14.3.31	男	
	立教大学大学院	化学物質情報部	13.12.1		男	

(科学技術特別研究員) 5名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
市川 明	科学技術振興事業団	療品部	11.1.1	13.10.31	男	
長岡 恵	科学技術振興事業団	食品添加物部	11.1.1	13.12.31	女	
津田 誠	科学技術振興事業団	薬理部	11.1.1	13.9.30	男	
中西 郁夫	科学技術振興事業団	有機化学部	12.1.1	14.3.31	男	
王 文	科学技術振興事業団	変異遺伝部	13.1.1		男	

(重点支援協力研究員) 4名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
高木 加代子	科学技術振興事業団	機能生化学部	8.8.26		女	
秋山 晴代	科学技術振興事業団	機能生化学部	13.1.1		女	
渡邊 敬浩	科学技術振興事業団	機能生化学部	13.4.1	13.9.30	男	
張 替直輝	科学技術振興事業団	食品部	13.10.1		男	

(科学技術庁フェロー) 1名

氏名	国籍	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
M. S. Rahman	孟加拉国	Monowara Hospital (Pvt.) Limited	療品部	11.12.24	13.12.23	男	

(日本学術振興会外国人特別研究員) 1名

氏名	国籍	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
Jun Yang	中国	東京工業大学生命理工学研究科	療品部	13.10.1		女	

(医薬品機構・派遣研究者) 10名

氏名	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別	備考
村山典恵	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	薬理部	11.10.1		女	
寒水壽朗	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	有機化学部	12.1.1	14.3.31	男	
中島由起子	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	薬機部	12.4.1		女	
長野美千代	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	機能生化学部	12.4.1	14.3.31	女	
中金隆広	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	機能生化学部	12.4.1		男	
藤野智史	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	機能生化学部	13.4.1		男	
豊田淑江	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	代謝生化学部	13.4.1		男	
津田誠	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	生薬部	13.4.1		女	
鈴木琢雄	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	薬理部	13.10.1	14.3.31	男	
		生薬部	13.10.1		男	

(リサーチ・レジデント) 9名

氏名	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別	備考
高橋則行	(社) 日本食品衛生協会	病理部	11.11.1	14.3.31	男	
日向須美子	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	食品部	12.10.1	14.3.31	女	
五十鈴川和人	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	生食部	13.4.1	13.12.31	男	
掛谷知志	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	衛生微生物部	13.4.1	14.3.31	男	
櫻井文教	(財) 日本公定書協会	生物薬品部	13.10.1		男	
朴正雄	(財) 日本公定書協会	生薬部	13.10.1		男	
ハト サワデイン	(財) 日本公定書協会	療薬部	13.11.1		男	
長岡恵	(社) 日本食品衛生協会	食品添加物部	14.1.1	14.3.31	女	
和久井千世子	(社) 日本食品衛生協会	食品部	14.1.1	14.3.31	女	

(研究支援者) 3名

氏名	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別	備考
高橋真理衣	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	12.10.1		女	
櫻庭真弓	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	変異伝部	13.4.1		女	
伊藤さつき	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	13.4.1		女	

(流動研究員) 4名

氏名	所 属	受 入 部	入 所	退 所	性別	備考
Yasmin Banu	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	療薬部	13.10.1		女	
田中理恵	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	生薬部	13.10.1		女	
相原真紀	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	衛生微生物部	13.10.1		女	
M.S.Rahman	(財) ヒューマンサイエンス振興財団	療薬部	13.12.24		男	

(研究生) 46名

氏名	依 頼 者	受入部(室)	入 所	退 所	性別	備考
明谷早映子	東京大学教授	機能 1室	11.3.1	14.2.28	女	
武木田 薫	昭和女子大学大学院教授	衛微 3室	11.4.1	14.3.31	女	
小原 有弘	東京大学大学院教授	変異 1室	11.5.10	14.3.31	男	
稲田 知佳	共立女子大学教授	衛微 3室	11.7.26	14.3.31	女	
山岸 恵	昭和女子大学教授	病理 1室	11.10.1	13.9.28	女	
田中 光	東邦大学教授	生物 3室	12.4.1		男	
小泉 直也	昭和薬科大学教授	生物 遺伝子	12.4.1		男	
徐 志利	大阪大学大学院教授	生物 遺伝子	12.4.1		男	
石原島 栄二	栃木県保健環境センター所長	生薬	12.4.1		男	
渡辺 秀実	共立薬科大学学長	代謝 1室	12.4.1	14.3.31	男	
濱田 昌志	昭和薬科大学教授	薬理 3室	12.4.1	14.3.31	男	
瀧澤 保明	徳島大学医学部教授	病理 3室	12.4.6	14.3.31	男	
澤 英	明治薬科大学教授	薬理 2室	12.4.10	14.2.28	男	
清 水 雅	大妻女子大学教授	変異 2室	12.4.25		男	
星 野 真紀	昭和薬科大学教授	変異 2室	12.4.25	14.3.15	女	
橋井 貴	城西大学学長	療薬 1室	12.6.15		男	
岡崎 和志	岐阜大学教授	病理	12.7.3	14.7.2	男	
上田 誠	帯広畜産大学教授	病理	12.9.1	14.8.31	男	
佐藤 義隆	東京大学医学部助教授	機能	12.10.1	14.9.30	男	
松村 麻江	昭和薬科大学教授	環境	13.4.1	13.11.15	女	
土肥 友恵	お茶の水女子大学教授	衛微 3室	13.4.1		女	

畑高	尾木	史彦	東京大学大学院医学系教授	衛微		13. 4. 1			男	
宇多	多洋	美浩	東京農工大学教授	病理		13. 4. 1			男	女
字花	田克	美浩	昭和薬科大学教授	変異	2室	13. 4. 1			男	女
鈴鈴	田玲	浩央	東京大学大学院理学系教授	変異	2室	13. 4. 1	13.11.30		男	女
溝藤	木腰	加人	東京理科大学教授	環境	3室	13. 4.10			男	男
宮下	加朗	代子	九州大学大学院教授	薬理	1室	13. 4.27			男	女
田竹	加代	由美	九州大学大学院教授	薬理	1室	13. 4.27		14. 3.31	男	女
謝島	真由	美介	星薬科大学教授	薬理	1室	13. 4.27			男	女
三浦	春嘉	巳夫	東京理科大学教授	薬品	2室	13. 5. 7			男	女
酒井	信春	夫紀	東京農業大学学長	衛微	2室	13. 5.28	14. 3.31		男	女
真次	由紀	子昭	東邦大学薬学部教授	食品	3室	13. 7. 2	14. 3.31		男	男
細川	博安	晴志	千葉大学大学院薬学研究部長	食品	3室	13. 7. 2			男	女
水野	安博	隆鶴	千葉大学大学院医学薬学教育部長	食品	3室	13. 8. 6	14. 3.31		男	男
松宮	博志	隆鶴	岐阜県食肉衛生検査所長	食品		13. 9. 3	13. 9.28		男	男
佐々	千寛	子昭	農林水産省動物医薬品検査所長	食品		13. 9. 3	13. 9.28		男	男
木岡	千寛	子昭	栃木県保健福祉部長	食品	2室	13. 9. 3	13.11.30		男	男
西松	藤門	寛子	独立行政法人農薬検査所理事長	食品		13. 9.17	13.12.12		男	男
長石	顕樹	子昭	香川県衛生研究所所長	食品		13.10.29	13.11. 2		男	女
赤石	顕樹	子昭	日本大学生物資源科学部長	変異		13.11. 9	13.12.27		男	女
別野	史裕	枝之	栃木県保健福祉部長	食品	3室	14. 1. 7	14. 2. 1		男	女
中吉	根孝	久香	日本大学薬学部教授	薬理	2室	14. 3. 1			男	女
	崎佐	香	筑波大学教授	筑波		12. 2.14	13.11.30			女
			筑波理科大学教授	筑波		13. 4. 6	13. 7.31		男	男
			昭和薬科大学理事長	筑波		13. 4. 6			男	男
			東京理科大学薬学部教授	筑波		13.11. 1				女

(実習生) 33名

氏名	依頼者	受入部(室)	入所	退所	性別	備考
柳澤	真紀	昭和女子大学大学院教授	衛微 1室	12. 7.24	14. 3.31	女
長岡	陽由	日本大学生物資源科学部教授	生物	13. 2. 5	14. 3.10	女
原野	真由	日本大学生物資源科学部教授	生物	13. 2. 5	14. 3.10	女
秋島	和知	日本大学生物資源科学部長	有機 2室	13. 2. 6	14. 3.31	女
遠藤	正一	芝浦工業大学工業化学科主任教授	有機 1室	13. 2. 8	14. 2. 7	男
井上	かお	北里大学理学部教授	衛微 1室	13. 3. 1	14. 2.28	男
鈴木	健太	日本大学生物資源科学部長	食添 2室	13. 3.21	14. 3. 1	女
土山	亜由	東海大学教授	生物	13. 4. 1	14. 3.31	男
屋畑	幸子	昭和大学教授	生物	13. 4. 1	14. 3.31	女
泉生	貴裕	昭和大学教授	生物	13. 4. 1	14. 3.31	女
島上	真宏	東京医薬専門学校長	環境 3室	13. 4. 1	14. 2.28	女
澤田	いづ	明治薬科大学教授	薬理 2室	13. 4. 1	14. 3.31	女
片山	健士	昭和薬科大学学長	食品 3室	13. 4.17	13.11.30	男
山下	洋一	東京農業大学教授	食品 1室	13. 5. 7	13.12. 7	女
中本	義和	東京理科大学薬学部教授	食品 1室	13. 5. 7	14. 2.28	女
巴川	直樹	日本大学理工学部部長	薬品 2室	13. 5.10	13.12.21	男
中平	明子	日本大学理工学部部長	環境 1室	13. 5.21	14. 2.26	男
堀川	絵里	日本大学理工学部部長	環境 1室	13. 5.21	14. 2.26	男
高山	和子	共立薬科大学学長	代謝	13. 6. 4	13.12.28	女
原島	大里	共立薬科大学教授	代謝	13. 7. 1	13.12.28	女
館松	健太	東邦大学薬学部医療薬学教育センター教授	代謝	14. 2. 1		男
宮崎	健太	日本大学生物資源科学部教授	生物	14. 2. 1		女
中井	真由	日本大学生物資源科学部教授	生物	14. 2. 1		男
清若	賢仁	日本大学生物資源科学部長	生物	14. 2. 1		男
澤林	貴春	日本大学生物資源科学部長	有機	14. 2. 1		女
池田	春菜	芝浦工業大学工業化学科主任教授	有機 1室	14. 3. 1		男
		北里大学理学部教授	衛微 1室	14. 3. 1		男
		日本大学生物資源科学部長	生薬	14. 3. 1		女
		日本大学生物資源科学部長	生薬	14. 3. 1		男
		昭和薬科大学学長	食品	14. 3.11		女
		日本大学生物資源科学部長	食品	14. 3.18		男
		東洋大学教授	筑波	13. 4. 1	13. 8.31	女

Katori, N., Aoyagi, N., Kojima, S. : **The Study of the Applicability of Content Uniformity and Weight Variation Test-The State of Commercial Tablets and Capsules in Japan-**

Chem. Pharm. Bull., **49**, 1412-1419 (2001)

This study intends to determine the rational criteria (e.g., threshold value) for applying the weight variation test and to investigate the adequacy of the acceptance value for existing commercial products in Japan. The studied products were 489 lots (3 lots/163 products) of compressed tablets (plain, film-coated, sugar-coated) and 42 lots (3 lots/14 products) of hard capsules marketed in Japan. Product-specific intra-lot relative standard deviation of content (RSDD), weight (RSDW) and concentration (RSDC) were calculated. A good correlation was found between RSDD and RSDC but not between RSDD and RSDW. These findings indicate that 1) it is difficult to rationally set the threshold level for weight variation, especially regarding the dosage forms except for plain tablets, 2) the application of weight variation tests should, in principle, be decided on the mixing homogeneity that is RSDC. 3) Most (99.6%) of the tablets and all the capsules investigated met the requirement of content uniformity test of JP13.

Keywords: content uniformity; mixing homogeneity; Japanese Pharmacopoeia; International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)

Anchordoquy, T.J.* , Izutsu, K., Randolph, T.W.*¹, Carpenter, J.F.*¹: **Maintenance of quaternary structure in the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying**

Arch. Biochem. Biophys. **390**, 35-41 (2001)

Polymers often fail to inhibit protein unfolding during lyophilization because steric hindrance prevents effective hydrogen bonding of the polymer to the protein's surface. However, in certain cases, polymers have been shown to stabilize multimeric enzymes during lyophilization. Here we test the hypothesis that this protection is due to inhibition of dissociation into subunits during freezing using mixtures of lactate dehydrogenase isozymes that form electrophoretically distinguishable hybrid tetramers during reversible dissociation. We examined hybridization and recovery of catalytic activity during freeze-thawing and freeze-drying in the presence of polymers (dextran, Ficoll, and polyethylene glycol),

sugars, and surfactants. The surfactants did not protect LDH during freeze-thawing or freeze-drying. Polymers and sugars prevented dissociation of LDH during the freezing step of lyophilization, resulting in greater recovery of enzyme activity after lyophilization and rehydration. This beneficial effect was observed even in systems that do not form glassy solids during freezing and drying. We suggest that stabilization during drying results in part from greater inherent stability of the assembled holoenzyme relative to that of the dissociated monomers. Polymers inhibit freezing-induced dissociation thermodynamically because they are preferentially excluded from the surface of proteins, which increases the free energy of dissociation and denaturation.

Key words: freeze-drying, protein formulation, stabilization

*1 Center for Pharmaceutical Biotechnology, University of Colorado

伊豆津健一, 小嶋茂雄:

各種タンパク質と二糖類の凍結溶液中における混合性低温生物工学会誌, **47**, 106-108 (2001).

Miscibility of proteins and saccharides (monosaccharides to oligosaccharides) in aqueous frozen solutions was studied through thermal analysis to model freeze-dried protein formulations. Thermal transitions (glass transition temperature of maximally freeze-concentrated solutions: Tg's) of the frozen solutions showed varied solute miscibility depending on the combinations and concentration ratios. Many protein and saccharide combinations were freeze-concentrated into amorphous mixture phase in protein-rich to moderately saccharide-rich concentration ratios, whereas saccharide phase appeared besides the mixture phase above certain saccharide/protein concentration ratios. Some saccharide-rich combinations separated into individual phases in the freeze-concentrates.

Key words: phase separation, freeze-drying, protein formulation

Yoshioka S., Aso Y. and Kojima S.: **Usefulness of Kohlrausch-Williams-Watts Stretched Exponential Function to Describe Protein Aggregation in Lyophilized Formulations and Temperature Dependence Near the Glass Transition Temperature**
Pharm. Res., **18**, 256-260 (2001)

We studied the feasibility of using the Kohlrausch-

Williams-Watts stretched exponential function (KWW equation) to describe protein aggregation in lyophilized formulations during storage. Parameters representing "mean aggregation time" (τ_a) and stretched exponential constant (β_a) were calculated according to the KWW equation by assuming that the time required for protein molecules to aggregate (τ) varies due to the fact that protein aggregation occurs at a rate which depends on the degree of protein deformation resulting from stresses created during freeze-drying. The results indicate that the parameter β_a is reflective of physical changes within lyophilized formulations. The parameter τ_f was found to be useful in comparing the protein aggregation behavior of formulations having different τ_a and β_a values.

Key words: protein aggregation, KWW function

Aso, Y., Yoshioka S. and Kojima S.: Explanation of the Crystallization Rate of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital from Their Molecular Mobility as Measured by ^{13}C NMR Relaxation Time and the Relaxation Time Obtained from the Heating Rate Dependence of T_g

J. Pharm. Sci., **90**, 798-806 (2001)

In order to gain further insight into the effect of molecular mobility on the crystallization rate of amorphous drugs, the mean relaxation time of amorphous nifedipine and phenobarbital was calculated based on the Adam-Gibbs-Vogel (AGV) equation, using the parameters D and T_0 , and T_f , derived from the heating rate dependence of the glass transition temperature (T_g) of the amorphous drugs and heat capacity of the drugs in the amorphous and crystalline states. These relaxation times were compared with the crystallization rate of amorphous nifedipine and phenobarbital reported previously. The spin-lattice relaxation time (T_1) and the spin-lattice relaxation time in the rotating frame ($T_{1\rho}$) of phenobarbital and nifedipine carbons were also determined. The temperature dependence of the crystallization rate of nifedipine and phenobarbital around the T_g was coincident with that of the mean relaxation time calculated according to the AGV equation within experimental error, indicating that the crystallization of nifedipine and phenobarbital is largely correlated with molecular mobility at the temperatures studied. A ^{13}C NMR relaxation study indicated that the molecular motion of nifedipine and phenobarbital in the mid-kHz frequency range became significant at temperatures higher than $T_g - 20$ and T_g , respectively.

Keywords: Crystallization, Mobility, Relaxation Time

Aso Y., Yoshioka S. and Kojima S.: Feasibility of Using Isothermal Microcalorimetry to Evaluate the Physical Stability of Amorphous Nifedipine and Phenobarbital
Thermochimica Acta, **380**, 199-204 (2001).

Feasibility of microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous drugs was studied. Amorphous forms of nifedipine and phenobarbital were prepared by melting and subsequent cooling in a differential scanning calorimetry (DSC) sample pan, and their heats of crystallization were monitored by isothermal microcalorimetry. The time required for 10% of the amorphous drug to crystallize (t_{90}), a direct measure of the crystallization rate, could be obtained from a single microcalorimetric trace of the amorphous nifedipine or phenobarbital. The t_{90} values were also determined by conventional storage studies in which the heat of crystallization was determined by DSC. The t_{90} values obtained by microcalorimetry were consistent with those obtained by DSC, within experimental error, indicating that microcalorimetry is a useful method for evaluating the physical stability of amorphous drugs.

Keywords: Microcalorimetry, Crystallization, Stability

Toyo'oka, T.* , Yano, M.* , Kato, M.* and Nakahara, Y. : Simultaneous determination of morphine and its glucuronides in rat hair and rat plasma by reversed-phase liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry

Analyst, **126(8)**, 1339-1345 (2001)

The simultaneous determination of morphine and the glucuronide metabolites [morphine-3-beta-D-glucuronide (M3G) and morphine-6-beta-D-glucuronide (M6G)] in rat hair and rat plasma was carried out using reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The chromatographic separation of the analytes was achieved using a semi-micro-HPLC column (3 microm particle size; 100 x 2.0 mm id) by gradient elution with 50 mM ammonium acetate and acetonitrile as eluents. After separation, morphine and the glucuronides were determined by selected ion monitoring (SIM) of ESI-MS using the quasi-molecular ions $[M + H]^+$ at $m/z = 286$ and 462 , respectively. The calibration curves were linear between the concentration of the analytes and the deuterium-labelled morphine (M-d3) selected as internal standard. The method was applied for

the determination of the incorporation of morphine and the glucuronides into the hair shafts and hair roots of Dark Agouti rats after single intraperitoneal administration of morphine hydrochloride. Plasma concentrations of morphine and glucuronides were simultaneously determined after administration. Morphine and M3G were detected in the hair shafts and the hair roots. The concentrations of M3G in the hair root were lower than those of morphine in all sampling periods. In contrast, M3G concentrations in plasma were relatively higher at each sampling time. Small quantities of M6G were also identified in the plasma up to 4 h after administration. The concentration difference between the hair root and plasma seems to be due to the incorporation ratio of morphine and glucuronide into hair. As M3G was also identified in the hair shaft 1 week after administration, the incorporation of glucuronide metabolites into hair is obvious. This is the first report of the identification of morphine glucuronide in hair samples without the use of acid hydrolysis or enzyme digestion.

Keywords: Hair analysis, LC-ESI-MS, Morphine

*静岡県立大学薬学部

Toyo'oka, T. *, Kanbori, M. *, Kumaki, Y. * and Nakahara, Y. : Determination of triazolam involving its hydroxy metabolites in hair shaft and hair root by reversed-phase liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and application to human hair analysis

Anal. Biochem., **295**(2), 172-179 (2001)

A sensitive method using reversed-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry has been developed for simultaneous determination of triazolam and its hydroxy metabolites in hair. After the addition of deuterium-labeled 1-hydroxymethyltriazolam as an internal standard, the analytes in hair shaft and hair root samples were extracted with a basic medium, CH₂Cl₂:MeOH:28% NH₄OH (20:80:2) at room temperature overnight. The chromatographic separation of the analytes was achieved using a semimicro HPLC column (3-microm particle size; 100 x 2.0-mm i.d.) by gradient elution with acetonitrile in water containing 1% acetic acid as eluent. The mass spectrometer was operated in selected-ion monitoring mode at quasi-molecular ions [M+H]⁺ of triazolam and its metabolites. The method has been applied to determine the incorporation of triazolam and its metabolites into the hair shafts and hair roots of Dark Agouti rats

administered 3 or 6 mg/kg triazolam intraperitoneally twice a day for 5 days. Triazolam, 1-hydroxymethyltriazolam, and 4-hydroxytriazolam were incorporated into the hair shafts and the hair roots. The concentration of 4-hydroxytriazolam was the highest of all compounds detected. An unknown substance considered to be 1,4-dihydroxytriazolam also appeared in the hair samples. The structural elucidation was performed with online HPLC-MS after acetylation of the substance with acetic anhydride and pyridine. The time course studies of triazolam and the metabolites in both rat hair roots and plasma were carried out after single intraperitoneal administration of triazolam. The concentrations of triazolam and the metabolites in the hair roots reflected those in the plasma. The proposed method using selected-reaction monitoring was applied to the determination of triazolam and the metabolites in human hairs of a triazolam addict. Triazolam, 1-hydroxymethyltriazolam, and 4-hydroxytriazolam were identified in the black hair shafts, whereas only triazolam was detected in the hair roots and the white hair shafts. This is the first report on the detection of triazolam and its metabolites in human hairs.

Keywords: Hair analysis, LC-ESI-MS, Triazolam

*静岡県立大学薬学部

Kuroda, N. *, Sato, D. *, Ohyama, K. *, Wada, M. *, Nakahara, Y. and Nakashima, K. * : **Separation of sympathomimetic amines of abuse and related compounds by micellar electrokinetic chromatography**
Chem. Pharm. Bull., **49**(7), 905-908 (2001)

Separation of twelve sympathomimetic amines and related compounds by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with UV absorbance detection is described. These amines were well separated within 25 min using 50 mM sodium tetraborate solution containing 15 mM sodium dodecylsulfate (SDS) of pH 9.3 as a running solution and detected at 210 nm. MEKC was performed with an applied voltage of 13 kV at 25 degrees C using a fused-silica capillary (50 cm x 75 mm i.d.) with effective length of 37.5 cm. The detection limits of these compounds were in the range from 4 to 97 fmol/injection at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3. The reproducibility of the method expressed as relative standard deviation (RSD) for within-day (n=6) and between-day (n=5) assays was less than 4.8 and 8.8%, respectively. The proposed method could be applied to the determination of an anorectic drug, phentermine, in Chinese tea with a

detection limit of 99 microg/g (105 fmol/injection, S/N=3).

Keywords: Micellar electrokinetic chromatography, Sympathomimetic amines

*長崎大学薬学部

Saisho, K., Scott, K. S., Morimoto, S.* and Nakahara, Y.
: **Hair analysis for pharmaceutical drugs. II. Effective extraction and determination of sildenafil (Viagra) and its N-desmethyl metabolite in rat and human hair by GC-MS**

Biol. Pharm. Bull., **24(12)**, 1384-1388 (2001)

In order to study the incorporation of sildenafil (SDF) and its N-demethylated metabolite (norSDF) into hair, animal model experiments were carried out. After shaving the back hair, SDF was dosed to two sets of three male dark-agouti pigmented rats (5 weeks old) per each group at 25 mg/kg once a day for 5 successive days with intraperitoneal (i.p.) (set1) and oral administration (set2). The regrown back hair was collected 14 d after the first administration. Three typical extraction methods, using methanol-5 M hydrochloric acid, methanol-trifluoroacetic acid and 1 M sodium hydroxide, were evaluated using the rat hair samples containing SDF and norSDF. Methanol-5 M hydrochloric acid was the best extraction method in terms of high efficiency and reproducibility. The extract was purified using Bond Elut Certify columns and was derivatized with trimethylsilylimidazole: N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide): trimethylchlorosilane (3: 3: 2) at 90 degrees C for 30 min. The trimethylsilylated products were analyzed by GC-MS using selected ion monitoring. SDF and norSDF were simultaneously detected in the rat hair. The hair concentrations were 4.9-6.3 (av. 5.8) ng/mg and 15.6-20.3 (av. 17.6) ng/mg for SDF and norSDF, respectively, with i.p. administration, and 2.6-4.1 (av. 3.6) ng/mg and 8.1-10.4 (av. 9.1) ng/mg with oral administration. The hair concentrations of norSDF were about three times higher than those of SDF, and the ratios of both compounds showed no significant difference between i.p. and oral administrations. This method was applied to the scalp hair of two patients who orally took SDF at regular intervals for the treatment of penile erectile dysfunction. The hair concentrations of SDF and norSDF in the two patients were 19.8 and 55.9 ng/mg, and 1.7 and 5.6 ng/mg, respectively.

Keywords: Hair, Sildenafil, GC-MS

*市立岸和田市民病院

Eguchi, A.*¹, Akura, T.*^{2,3}, Okuyama, H.*^{2,4}, Senda T.*⁵, Yokoi, H.*^{2,6}, Inokuchi, H.*⁷, Fujita, S.*^{1,8}, Hayakawa, T., Takeda, K.*², Hasegawa, M.*², and Nakanishi, M.*¹:
Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells

J. Biol. Chem., **276**, 26204-26210 (2001)

The plasma membrane of mammalian cells is one of the tight barriers against gene transfer by synthetic delivery systems. Various agents have been used to facilitate gene transfer by destabilizing the endosomal membrane under acidic conditions, but their utility is limited, especially for gene transfer in vivo. In this article, we report that the protein transduction domain of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein (Tat peptide) greatly facilitates gene transfer via membrane destabilization. We constructed recombinant lambda phage particles displaying Tat peptide on their surfaces and carrying mammalian marker genes as part of their genomes (Tat-phage). We demonstrate that, when animal cells are briefly exposed to Tat-phage, significant expression of phage marker genes is induced with no harmful effects to the cells. In contrast, recombinant phage displaying other functional peptides, such as the integrin-binding domain or a nuclear localization signal, could not induce detectable marker gene expression. The expression of marker genes induced by Tat-phage is not affected by endosomotropic agents but is partially impaired by inhibitors of caveolae formation. These data suggest that Tat peptide will become a useful component of synthetic delivery vehicles that promote gene transfer independently of the classical endocytic pathway.

Keywords: gene transfer, Tat peptide, Tat-phage

*¹大阪大学微生物病研究所

*²DNAVEC

*³田辺製薬

*⁴住友製薬

*⁵藤田保健衛生大学

*⁶協和発酵工業

*⁷京都大学大学院理学部

*⁸大阪大学医学部

Hyuga, S., Kawasaki, N., Hyuga, M., Ohta, M., Shibayama, R., Kawanishi, T., Yamagata, S.* , Yamagata, T.* and Hayakawa, T.: **Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of**

c-MET

Int. J. Cancer, **94**, 328-334 (2001)

We previously reported that ganglioside GD1a, which is highly expressed in poorly metastatic FBJ-S1 cells, inhibits the serum-induced motility of FBJ-LL cells and that the metastatic potential of FBJ-LL cells is completely suppressed by enforced GD1a expression (Hyuga et al., *Int J Cancer* 1999; **83**: 685-91). We recently discovered that hepatocyte growth factor (HGF) induces FBJ-LL cell motility. In the present study, the HGF-induced motility of FBJ-S1 cells was found to be one-thirtieth that of FBJ-LL cells. This motility of GD1a-expressing transfectants, which were produced by transfection of FBJ-LL cells with GM2/GD2 synthase cDNA, decreased with increases in their GD1a expression and HGF induced almost no motility in GD1a-pretreated FBJ-LL cells, indicating that GD1a inhibits the HGF-induced motility of FBJ-LL cells. The expression of the HGF receptor c-Met on FBJ-S1 cells, FBJ-LL cells, transfectants and a mock-transfectant was almost the same. The level of tyrosine phosphorylation of c-Met after HGF stimulation in FBJ-S1 cells, GD1a-pretreated FBJ-LL cells and a GD1a-expressing transfectant was significantly lower than in FBJ-LL cells and a mock-transfectant. These findings suggested that GD1a inhibits the HGF-induced motility of FBJ-LL cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. HepG2 cells, a human hepatoma cell line, were used to investigate whether GD1a interferes with other cancer cells expressing c-Met. HepG2 cells did not express GD1a. HGF induced cell scattering of HepG2 cells and the scattering was inhibited by pretreating the cells with GD1a. The c-Met in the cells was autophosphorylated by stimulation with HGF, but after treating the cells with GD1a, the HGF-induced autophosphorylation of c-Met was suppressed. These results suggest that GD1a acts as a negative regulator of c-Met in cancer cells.

Keywords: GD1a, HGF, c-Met

*日本皮革研究所

Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S. and Hayakawa, T.: **Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin**
Glycobiology, **11**, 1043-1049 (2001)

We previously demonstrated that high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry (LC/MS) equipped with a graphitized carbon column (GCC) is useful for the structural analysis

of carbohydrates in glycoproteins. Using LC/MS with GCC, sulfated N-linked oligosaccharides were found in erythropoietin (EPO) expressed in baby hamster kidney cells. Sulfation occurs in a part of the N-linked oligosaccharides in the EPO. Sulfated monosaccharide residue in the sulfated N-linked oligosaccharide was determined by exoglycosidase digestion followed by sugar mapping by LC/MS. The linkage position and branch-location of the sulfate group in the tetraantennary oligosaccharide were analyzed by ¹H-nuclear magnetic resonance. It was suggested that sulfation occurs on the C-6 position of GlcNAc located in the GlcNAcβ1-4Manα1-3 branch.

Keywords: LC/MS, Sulfated oligosaccharide, erythropoietin

豊田淑江, 山口照英, 押澤 正, 内田恵理子, 早川堯夫:
好中球の機能分化と増殖の制御

炎症・再生, **21(3)**, 199-207(2001)

好中球は炎症の場で殺菌作用を示し, 重要な役割を演じている. この好中球分化の制御機構をHL-60細胞を用いて解析した. HL-60細胞をDMSOで分化すると増殖型トランスフェリン受容体陽性 (Trf-R⁺) 細胞と分化型の陰性 (Trf-R⁻) 細胞が出現し, 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) はTrf-R⁺細胞の増殖を, Trf-R⁻細胞の分化をそれぞれ促進した. これらのシグナルを解析したところ, Trf-R⁺細胞の増殖にはp70 S6キナーゼの活性化が, Trf-R⁻細胞の分化にはSTAT3のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることが示唆された. また, Trf-R⁺細胞のp70 S6キナーゼをラバマイシンで阻害すると分化型のTrf-R⁻細胞と同様の分化能を示すことから, p70 S6キナーゼが分化や増殖の方向性を決める重要な役割をもっていると考えられた. またp70 S6キナーゼの上流はフォスファチジルイノシトール3キナーゼであることを示した. 一方, 顆粒球・単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) はHL-60細胞のG-CSFによる好中球分化の促進作用を阻害した. このシグナル伝達の解析より, G-CSFによりチロシンリン酸化されたSTAT3の核移行が, GM-CSFによって活性化されるMAPキナーゼにより阻害されると考えられた.

Keywords: G-CSF, granulopoiesis, signal transduction

Kawanishi T, Kiuchi T*, Asoh H*, Shibayama R, Kawai H, Ohata H*, Momose K*, Hayakawa T: **Effect of Tributyltin Chloride on Release of Calcium Ion from Intracellular Calcium Stores in Rat Hepatocytes.**

Biochem. Pharmacol., **62**, 863-872 (2001)

The effects of tri-n-butyltin chloride (TBT) on release

of Ca^{2+} from intracellular stores were investigated in isolated rat hepatocytes. Images of Ca^{2+} concentration in the intracellular stores of primary cultured hepatocytes loaded with fura-2 was obtained after digitonin-permeabilization using digitalized fluorescence microscopy. The permeabilized hepatocytes that had been preincubated with $4.0 \mu\text{M}$ TBT for 30 min showed a very low fluorescence ratio of 340nm/380nm, suggesting that the stored Ca^{2+} was released. When the hepatocytes were treated with $4.0 \mu\text{M}$ TBT after digitonin-permeabilization, the decrease in the fluorescence ratio was very small. However, when the permeabilized hepatocytes were incubated with $4.0 \mu\text{M}$ TBT and $2.0 \mu\text{M}$ NADPH, the decrease was enhanced, raising the possibility that TBT might be metabolized to the active form(s) releasing Ca^{2+} from the stores. When the hepatocytes were preincubated with $0.1 \mu\text{M}$ TBT for 30 min and then permeabilized, the fluorescence ratio was almost the same as that in the control permeabilized hepatocytes. However, the InsP_3 -induced decrease in the fluorescence ratio was significantly suppressed in the permeabilized hepatocytes. These results suggest that TBT released Ca^{2+} from the intracellular stores at high concentrations, and suppressed the $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release at non-toxic low concentrations. It is probable that the latter effect was responsible for the previously reported suppression of Ca^{2+} response induced by hormonal stimulations.

Keywords: Hepatocyte, Tributyltin, Calcium

*昭和大学薬学部

Hisamitsua T^{*1}, Ohata H^{*1}, Kawanishi T, Iwamoto T^{*2}, Shigekawa M^{*2}, Amano H^{*3}, Yamada S^{*3}, Momose K: **A mechanism of Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores coupling to the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in cultured smooth muscle cells.**

Life Sciences, **69**, 2775-2787 (2001)

We previously observed Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores caused by reduction in extracellular Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_0$). The purpose of this study was to determine whether lowering $[\text{Na}^+]_0$ can elicit Ca^{2+} release from Ca^{2+} stores via the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and to elucidate the mechanisms related to the Ca^{2+} release pathway in cultured longitudinal smooth muscle cells obtained from guinea pig ileum. Low $[\text{Na}^+]_0$ -induced Ca^{2+} release was inhibited by antisense oligodeoxynucleotides for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type 1 (anti-NCX). Application of anti-NCX to cells attenuated both the number of Ca^{2+}

responding cells and the expression of the exchanger. Moreover, microinjection of heparin, a blocker of inositol I, 4,5-trisphosphate (IP_3) receptors, into the cells inhibited low $[\text{Na}^+]_0$ -induced Ca^{2+} release. These findings suggest that low $[\text{Na}^+]_0$ -induced Ca^{2+} release occurs through an IP_3 -induced Ca^{2+} release mechanism due to changes in the Ca^{2+} flux regulated by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger.

Keywords: Antisense, Sodium/calcium exchange, ileum

*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

Tanaka H^{*1}, Masumiya H^{*1}, Sekine T^{*1}, Kase J^{*1}, Kawanishi T, Hayakawa T, Miyata S^{*2}, Sato Y^{*2}, Nakamura R^{*3}, Shigenobu K: **Involvement of Ca^{2+} waves in excitation-contraction coupling of rat atrial cardiomyocytes.**

Life Sciences, **70**, 715-726 (2001)

Two-dimensional and line-scan analyses of the early phase Ca^{2+} transients in rat cardiomyocytes were performed with a rapid-scanning laser confocal microscope and fluo-3 to elucidate the mechanism of activation of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in atrial myocytes which lack a well developed T-tubular network. On electrical stimulation of ventricular myocytes, Ca^{2+} concentration began to rise earliest at the Z-line level and became uniform throughout the cytoplasm within about 10msec. In contrast, on stimulation of atrial myocytes, the earliest rise in Ca^{2+} occurred at the cell periphery and then spread to the cell interior; cytoplasmic Ca^{2+} became uniform after more than 30msec. The velocity of the propagation of rise in Ca^{2+} was $112 \pm 5.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ ($n=10$), which was similar to that of spontaneous Ca^{2+} waves observed in atrial and ventricular myocytes. No difference in frequency, amplitude and kinetics of spontaneous Ca^{2+} sparks was observed between the subsarcolemmal and central regions of atrial myocytes. Ryanodine concentration-dependently decreased the contractile force of isolated rat atrial and ventricular tissue preparations; the sensitivity was higher in atrial myocytes. The present study visualized the involvement of a propagated Ca^{2+} -induced- Ca^{2+} release mechanism in atrial but not ventricular myocytes. This difference may underlie some of the atrio-ventricular difference in response to physiological and pharmacological stimuli.

Keywords: Cardiomyocyte, Calcium, Atria

*1 東邦大学薬学部

*2 岩手医科大学

*3 ニコン

Masumiya H^{*1}, Kase J^{*1}, Kawanishi T, Hayakawa T, Miyata S^{*2}, Sato Y^{*2}, Nakamura R^{*3}, Tanaka H^{*1}, Shigenobu K^{*1} : **Effect of T-type and L-type Ca²⁺ Channel Blockade on Early Phase Ca²⁺ Transients in Rat Atrial and Ventricular Cardioiomyocytes.**

Bioimages, 9, 87-93 (2001)

Effects of L-type and T-type Ca²⁺ channel blockade on the early phase Ca²⁺ transients in rat cardiomyocytes were examined with a rapid-scanning laser confocal microscope and fluo-3. On electrical stimulation of ventricular myocytes, Ca²⁺ concentration was elevated uniformly throughout the cytoplasm within 8 to 12 msec. In contrast, on stimulation of atrial myocytes, the earliest rise in Ca²⁺ occurred at the cell periphery and then spread to the cell interior. T-type Ca²⁺ channel blockade by Ni²⁺ or mibefradil had no effect while L-type Ca²⁺ channel blockade by Cd²⁺ greatly inhibited the Ca²⁺ transient in both ventricular and atrial cells. The present study suggested the involvement of a propagated Ca²⁺-induced-Ca²⁺ release mechanism in atrial but not ventricular excitation-contraction coupling. In both the ventricle and atrium, the Ca²⁺ influx triggering Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum was shown to flow through L-type but not T-type Ca²⁺ channels.

Key Words: Cardiomyocyte, Calcium, T-type Ca²⁺ channel

*1 東邦大学薬学部

*2 岩手医科大学

*3 ニコン

Tanaka H^{*}, Ishii T^{*}, Fujisaki R^{*}, Moiyamoto Y^{*}, Tanaka Y^{*}, Aikawa T^{*}, Hirayama W^{*}, Kawanishi T, Shigenobu K^{*} : **Effect of Manganese on Guinea Pig Ventricle: Initial Depression and Late Augmentation of Contractile Force**

Biol. Pharm. Bull., 25, 323-326 (2002)

Effects of Mn²⁺ on isolated guinea pig ventricular myocardia were examined. In isolated papillary muscles, Mn²⁺ produced a transient decrease in contractile force followed by a late sustained augmentation. Mn²⁺ markedly increased the amplitude of post-rest contractions; the time course of potentiation was almost the same as that of the late augmentation of contractile force after Mn²⁺ application. Mn²⁺ also increased the amplitude of rapid-

cooling contractures. The negative inotropic effect of diltiazem and nifedipine was not affected by the presence of Mn²⁺. Mn²⁺ shortened the action potential duration under normal condition whereas it prolonged the duration under Ca²⁺ free conditions. Mn²⁺, when applied to fura-2-loaded ventricular myocytes, markedly quenched the cytoplasmic fluorescence excited at 360 nm wavelength. We concluded that Mn²⁺ not only causes a decrease in contractile force by blocking the L-type Ca²⁺ channel, but also enters the cytoplasm through the channel and produces late augmentation of the contractile force through enhancement of sarcoplasmic reticulum function.

Key words : manganese, myocardium, inotropism

*東邦大学薬学部

Niimi, S., Horikawa, M.^{*}, Seki, T.^{*}, Ariga, T.^{*}, Kobayashi, T., Hayakawa, T.: **Effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes.**

Biol. Pharm. Bull., 25, 437-440 (2002)

The effect of activins AB and B on DNA synthesis stimulated by epidermal growth factor (EGF) was studied in primary cultured rat hepatocytes and compared with the effect of activin A, a suppressor of DNA synthesis. Activin AB inhibited DNA synthesis as assessed by [³H] thymidine incorporation. The inhibition by activin AB was detected at 6 ng/ml, and the 12.5 ng/ml concentration produced almost maximal inhibition, approximately 40%, almost the same as that produced by activin A. Inhibition by activin A was detected at 3 ng/ml, and the 6 ng/ml concentration produced almost maximal inhibition. Activin B, on the other hand, had no effect on DNA synthesis up to 50 ng/ml. The increase in labeling index by EGF was also reduced to about 20% by 25 ng/ml activin A and activin AB, but not by activin B. Activin B, however, inhibited the binding of [¹²⁵I] activin A to hepatocytes, but had no effect on the inhibition of DNA synthesis by activin A, even at 3-fold excess concentrations. These findings suggest that activin AB may act in the same manner as activin A does in terms of EGF's inhibitory effect on DNA synthesis, although the effective concentration is higher than that of activin A. The findings also suggest that activin B receptors are present in hepatocytes but that they do not mediate signal transduction leading to the inhibition of DNA synthesis.

Key words: activin; cultured rat hepatocytes; DNA synthesis

*日本大学生物資源科学部

Niimi, S., Oshizawa, T., Naotsuka, M.*¹, Ohba, S.*¹, Yokozawa, A.*², Murata, T.*², Hayakawa, T.: **Establishment of a standard assay method for human thrombomodulin and determination of the activity of the Japanese reference standard**

Biologicals 30, 69-76 (2002)

This study was undertaken to establish a standard method for determination of the activity of human(h) thrombomodulin (TM). The reactions mainly consisted of formation of h-TM and h-thrombin complex, activation of h-protein C by the complex, and digestion of substrate by activated h-protein C. Linear time-dependent formation of *p*-nitroaniline from the substrate, S-2366, was observed up to 12 min during measurement of the activity of urinary h-TM (uh-TM) reference material by the standard method. Therefore, 10 min was established as the reaction time in the standard method. In the standard method, we defined the activity of h-TM forming 0.1 μ mol of *p*-nitroaniline per min in the reaction as 1 JRS Unit. Recombinant h-TM (rh-TM) and uh-TM reference material gave rectilinear dose-response curves within a certain range of specific activities by their original methods in the standard method. The validity of the standard method was assessed based on the coefficients of variation (CV) obtained in the various measurements of h-TM. Intra-batch precision (CV) of h-thrombin and h protein C was 2.90% and 6.57%, respectively, in the measurement of uh-TM activity. The intra-sample, inter-day, and inter-laboratory precision (CV) was 1.30%, 1.63%, and 5.02%, respectively, in the measurement of the first Japanese reference standard for h-TM coded TJRS1. In these assays, the activity of the first Japanese standard was also determined and found to be 205 JRS units per ampoule. When the stability of the Japanese reference standard was assessed by measuring of the standard stored under various thermal conditions, the predicted loss of activity assuming monomolecular degradation according to the Arrhenius equation was less than 3.0% during 103 years at -20°C. These results indicate that the standard method is appropriate for determination of the activity of h-TM and that the Japanese reference standard for h-TM, whose activity was determined in this study, can be stored at -20°C for long periods without loss of activity.

Key words: thrombomodulin, standard method, reference standard

*¹ 持田製薬 製剤研究室

*² 旭化成工業 ライフサイエンス総合研究所

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Enhanced anti-tumor effect and reduced vector dissemination with fiber-modified adenovirus vectors expressing herpes simplex virus thymidine kinase**

Cancer Gene Ther., 9, 236-242 (2002)

There are at least two hurdles confronting use of the adenovirus (Ad)-mediated herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk)/ganciclovir (GCV) system for the treatment of cancer. One is inefficient Ad vector-mediated gene transfer into tumor cells lacking the primary receptor, i.e., the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). The other is hepatotoxicity due to unwanted vector spread into the liver, even when Ad vectors are injected intratumorally. Herein, we present an attractive strategy for overcoming such limitations based on use of a fiber-modified Ad vector containing an RGD peptide motif in the fiber knob. Combination of fiber-modified vectors and a HSVtk/GCV system is a potentially useful and safe approach for the treatment of tumors lacking CAR expression, and that fiber-modified vectors could be of great utility for gene therapy and gene transfer experiments.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of foreign genes**

Gene, 285, 69-77 (2002)

Adenovirus (Ad) fiber proteins are responsible for the initial attachment of the virion to the cell membrane. Most Ad vectors currently in use are based on the Ad type 5 (Ad5), which belong to subgroup C, and use the coxsackievirus and adenovirus receptors (CAR) as the initial receptor. Ad35, which belong to subgroup B, recognizes unknown receptor(s) other than CAR. In this study, the feasibility of the Ad vector containing Ad5/35 chimeric fiber protein was examined in a wide variety of cell types, such as CAR positive or negative human tumor cells, rodent cells, and blood cells (a total of 20 cell types), and in mice in vivo. Inclusion of the Ad35 fiber protein into the Ad5-based vector could lead to an improved efficiency in gene therapy and in gene transfer experiments, especially for the cells lacking in sufficient CAR expression.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, targeting

Okada, Y.*¹, Okada, N.*², Nakagawa, S.*³, Mizuguchi, H., Takahashi, K.*¹, Mizuno, N.*¹, Fujita, T.*², Yamamoto, A.*², Hayakawa, T., Mayumi, T.*³: **Tumor necrosis factor α -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors**

Jpn. J. Cancer Res., **93**, 436-444 (2002)

Although adenovirus vectors (Ad) provide high-level transduction efficacy to many cell types, extremely high doses of Ad are required for sufficient gene transduction into several tumors, including melanoma. Here, we demonstrated that the expression of coxsackie-adenovirus receptor, a primitive Ad-receptor, was very low in murine and human melanoma cells. We also found that fiber-mutant Ad containing the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the fiber knob remarkably augmented gene transduction efficacy in melanoma cells by targeting α -integrins. In addition, intratumoral injection of RGD fiber-mutant Ad containing the tumor necrosis factor α gene (Ad-RGD-TNF α) revealed dramatic anti-tumor efficacy through hemolytic necrosis in an established murine B16 BL6 melanoma model. These results suggest that α -integrin-targeted Ad will be a very powerful tool for the advancement of melanoma gene therapy.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer

*¹ 武庫川女子大学薬学部

*² 京都薬科大学

*³ 大阪大学大学院薬学研究科

Nagayama, Y.*¹, Kita-Furuyama, M.*¹, Ando, T.*¹, Nakao, K.*¹, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Eguchi, K.*¹, Niwa, M.*¹: **A Novel murine model of graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor**

J. Immunol., **168**, 2789-2794 (2002)

In this work we report a novel method to efficiently induce a murine model of Graves' hyperthyroidism. Inbred mice of different strains were immunized by i.m. injection with adenovirus expressing thyrotropin receptor (TSHR) or beta-galactosidase and followed up to 8 wk after the third immunization. Fifty-five percent of female and 33% of male BALB/c (H-2d) and 25% of female C57BL/6 (H-2b) mice developed Graves'-like hyperthyroidism with elevated serum thyroxine (T4) levels and positive anti-TSHR autoantibodies with thyroid-stimulating Ig (TSI) and TSH-binding inhibiting Ig (TBII) activities. The highly efficient means that we

now report to induce Graves' hyperthyroidism in mice will be very useful for studying the pathogenesis of autoimmunity in Graves' disease.

Keywords: adenovirus vector, graves' disease

*長崎大学医学部

Omori, M.*¹, Mizuguchi, H., Ohsawa, K.*², Kohsaka, S.*², Hayakawa, T., Abe, K.*¹, Shibasaki, F.*³:

Modification of a fiber protein in an adenovirus vector improves in vitro gene transfer efficiency to microglial cell line

Neurosci. Lett., **324**, 145-148 (2002)

In microglia, it is difficult to introduce exogenous genes of interest even by recombinant adenovirus vectors (Ad) which can infect with high efficiency only to the cells expressing coxsackievirus and adenovirus receptors (CAR). We found a lack of CAR expression in primary cultured murine microglia (PCMG) and its immortalized cell line MG5 by reverse transcription-polymerase chain reaction. In order to improve the efficiency of gene transfer, we generated a novel Ad (Ad-RGD) by an incorporation of the Arg-Gly-Asp motif (RGD) containing peptide in the HI loop of the viral fiber knob domain, which enables the virus to contact target cells through V integrins which are known to be ubiquitously expressed on the surface of mammalian cells. Ad-RGD showed a remarkable improvement in the delivery of Escherichia coli LacZ gene in MG5 cells and a moderate increase in PCMG cells under the treatment with granulocyte/macrophage colony stimulating factor.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, targeting

*¹ 岡山大学医学部

*² 国立精神・神経センター

*³ 東京都臨床医学総合研究所

Takahashi, M.*¹, Seki, N.*³, Ozaki, T.*¹, Kato, M.*¹, Kuno, T.*¹, Nakagawa, T.*¹, Watanabe, K.*¹, Miyazaki, K.*², Ohira, M.*¹, Hayashi, S.*¹, Hosoda, M.*¹, Tokita, H.*¹, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Todo, S.*³, Nakagawara, A.*¹: **Identification of the p33ING1-regulated genes which include cyclin B1 and proto-oncogene DEK by using cDNA microarray in a mouse mammary epithelial cell line NmuMG**

Cancer Res., **62**, 2203-2209 (2002)

The candidate tumor suppressor p33(ING1) plays an important role in inducing growth arrest at G0-G1 phase of the cell cycle and/or promoting apoptosis in cancerous cells. Here we analyzed expression profiles in mouse

mammary epithelial cells (NMuMG) by using a cDNA microarray consisting of 2304 mouse cDNAs after inducing transformation with antisense inhibitor of growth 1 (ING1) in retrovirus vector. The subsequent confirmation of the altered expression levels of the selected genes demonstrated that overexpression of the antisense ING1 stimulated expression of 14 genes, whereas we have detected transcriptional repression of 5 genes. In addition, adenovirus-mediated overexpression of ING1 in NMuMG cells resulted in down-regulation of cyclin B1, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible sequence 11, DEK, and osteopontin, whereas the levels of TPT1 expression were increased. Thus, our cDNA microarray analysis suggested that p33(ING1) targets the multiple genes, including proto-oncogene DEK and cyclin B1, at least some of which are regulated in a p53-dependent manner, in the cells undergoing cell growth or apoptosis.

Keywords: microarray, tumor suppressor, oncogene

*1 千葉県がんセンター

*2 千葉大学医学部

*3 北海道大学医学部

Nakagawa, T.*¹, Takahashi, M.*¹, Ozaki, T.*¹, Watanabe, K.*¹, Todo, S.*², Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawara, A.*¹: **Autoinhibitory regulation of p73 by DNp73 to modulate cell survival and death through p73-specific target element within the DNp73 promoter** *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 2575-2585 (2002)

p73 is a p53-related tumor suppressor but is also induced by oncogene products such as E2F-1, raising a question as to whether p73 is a tumor suppressor gene or oncogene. Unlike p53, p73 has several variants, including Delta Np73, which lacks the NH₂-terminal transactivation domain. Although, in developing neurons, Delta Np73 is expressed abundantly and seems to inhibit the proapoptotic function of p53, the role of p73 and Delta Np73 and their regulatory mechanism in cell growth and differentiation are poorly understood. Here we report that p73, but not p53, directly activates the transcription of endogenous Delta Np73 by binding to the p73-specific target element located at positions -76 to -57 within the Delta Np73 promoter region. The negative feedback regulation of p73 by its target Delta Np73 is a novel autoregulatory system for modulating cell survival and death.

Keywords: tumor suppressor, oncogene

*1 千葉県がんセンター

*2 北海道大学医学部

Okada, Y.*¹, Okada, N.*², Nakagawa, S.*³, Mizuguchi, H., Kanehira, M.*¹, Nishino, N.*¹, Takahashi, K.*¹, Mizuno, N.*¹, Hayakawa, T., Mayumi, T.*³: **Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors**

Cancer Lett., **177**, 57-63 (2002)

In the present study, we investigated whether fiber-mutant Ad containing the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the fiber knob could promote gene delivery and anti-tumor effects in the murine B16 BL6 tumor model. B16 BL6 cells (in vitro) and tumors (in vivo) infected with RGD fiber-mutant Ad containing a tumor necrosis factor α gene (Ad-RGD-TNF α) produced more TNF α than those infected with conventional Ad-TNF α . In addition, Ad-RGD-TNF α required about one-tenth the dosage of Ad-TNF α for induction of equal therapeutic effects upon intratumoral injection into established B16 BL6 tumors. Furthermore, the combination of both TNF- α and interleukin 12-expressing RGD fiber-mutant Ads exhibited more effective tumor regression than the Ad expressing each alone. These results suggested that the fiber-mutant for altering Ad-tropism is a very potent technology for advancing gene therapy for melanoma.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer

*1 武庫川女子大学薬学部

*2 京都薬科大学

*3 大阪大学大学院薬学研究科

Maruyama, K.*¹, Akiyama, Y.*¹, Nara-Ashizawa, N.*¹, Hojo, T.*¹, Cheng, J. Y.*¹, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Yamaguchi, K.*¹: **Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into human blood-derived dendritic cells** *J. Immunother.*, **24**, 345-353 (2001)

In the current study, we made MUC1-expressing human dendritic cells (DCs) using recombinant adenovirus vector. Flow cytometric analysis showed that 30% to 40% of the transduced DCs expressed MUC1 protein. Adenovirus-mediated MUC1 gene transduction into DCs had no significant effect on DC surface marker expressions or functions such as mixed leukocyte reaction. Furthermore, MUC1-specific CD8⁺ CTLs could be induced from healthy donor blood lymphocytes using MUC1-expressing DCs as stimulators. These results suggested that MUC1 gene-transduced DCs are a

functional and potent tool for triggering a CTL response against MUC1 cancer cells.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer

*国立がんセンター

Okada, N.*¹, Saito, T.*¹, Masunaga, Y.*¹, Tsukada, Y.*², Nakagawa, S.*², Mizuguchi, H., Mori, K.*¹, Okada, Y.*³, Fujita, T.*¹, Hayakawa, T., Mayumi, T.*², Yamamoto, A.*¹: **Efficient antigen gene transduction using Arg-Gly-Asp fiber-mutant adenovirus vectors can potentiate anti-tumor vaccine efficacy and maturation of murine dendritic cells**

Cancer Res., **61**, 7913-7919 (2001)

In the present study, we compared immunological properties and vaccine efficacy of DC2.4 cells, an immature murine dendritic cells (DCs) line, transduced with an ovalbumin (OVA) gene by fiber-mutant Ad (Ad-RGD-OVA) or conventional Ad (Ad-OVA). Ad-RGD-OVA-infected DC2.4 cells could more efficiently present OVA peptides via MHC class I molecules in a vector particle-dependent manner and induce OVA-specific CTL response by vaccination than Ad-OVA-infected DC2.4 cells. Moreover, vaccination with Ad-RGD-OVA-infected DC2.4 cells could achieve an equal or greater antitumor effect against challenge with E.G7-OVA tumor cells with lower doses of Ad on infection or fewer cells for immunization than the vaccination procedure using Ad-OVA-infected DC2.4 cells. Flow cytometric analysis indicated enhanced expression of MHC class I and II molecules as well as CD80, CD86, CD40, and CD54. We propose that DC manipulation using the Arg-Gly-Asp fiber-mutant Ad system could advance the development of more effective vaccines and allow for more convenient administration of DC-based gene immunotherapy.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer

*¹ 京都薬科大学

*² 大阪大学大学院薬学研究科

*³ 武庫川女子大学薬学部

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system**

Biochim. Biophys. Acta, **1568**, 21-29 (2001)

Combination of recombinant adenovirus (Ad) vectors and tetracycline-controllable expression system is clearly advantage in gene therapy and gene transfer experiment. In this study, we examined the characteristics of Ad vector containing the tet-off or tet-on system. The Ad

vector containing the tet-off system showed tightly regulatable transgene expression even at low MOI (multiplicity of infection). In contrast, regulation of gene expression by the Ad vector containing the tet-on system was not tight at low MOI, while it showed moderate regulation at high MOI (MOI=100). The Ad vector-mediated tet-on system showed lower inducible and higher background (basal) luciferase production than that of the Ad vector-mediated tet-off system. Moreover, the former system required a concentration of doxycycline, a derivative of tetracycline, approximately 2- to 3-log orders higher than that of the latter system to switch the luciferase expression. These results suggest that the Ad vector containing the tet-off system is considered to be functionally superior to the vector containing the tet-on system.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, regulation

Koizumi, N.*¹, Mizuguchi, H., Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N.*¹, Watanabe, Y.*¹, Hayakawa, T.: **Efficient gene transfer by fiber-mutant adenoviral vectors containing RGD peptide**

Biochim. Biophys. Acta, **1568**, 13-20 (2001)

One of the hurdles to adenovirus (Ad)-mediated gene transfer is that Ad vectors mediate inefficient gene transfer into cells lacking in the primary receptors, Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). We previously developed a fiber-mutant Ad vector containing the Arg-Gly-Asp (RGD)-containing peptide motif on the HI loop of the fiber knob, and showed that the mutant vector had enhanced gene transfer activity to human glioma cells, which showed little CAR expression, compared to the vector containing wild type fiber. In this study, the feasibility of the Ad vector containing RGD peptide on the fiber knob was examined in a wide variety of cell types: CAR-positive or -negative human tumor cells, mouse cells, and leukemia cells. The mutant vector infected the cells, which lacked CAR expression but showed αv integrin expression, about 10-1000 times more efficiently than the vector containing wild type fiber via an RGD-integrin ($\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$)-dependent, CAR-independent cell entry pathway. The results of this study indicate that Ad vector containing RGD peptide on the fiber knob could be of great utility for gene therapy and gene transfer experiments.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, targeting

*昭和薬科大学

Xu, Z.L. *, Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. *, Hayakawa, T.: **Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors**

Gene, 272, 149-156 (2001)

In studies regarding both gene therapy and gene function, transgene expression by plasmid vectors benefits from the use of transcriptional regulatory elements which permit high-level gene expression. Therefore, with respect to transgene (luciferase) expression activity both in vitro (using HeLa, HepG2, and ECV304 cells) and in vivo (mouse liver and skeletal muscle), we investigated the effective combination of commonly-used regulatory elements, such as the promoter/enhancer, intron, and polyadenylation signal (P(A)) sequence by constructing a series of plasmids that differed only in the particular sequence element being evaluated. Of the several promoter/enhancers that were tested, hybrid CA promoter/enhancer containing human cytomegalovirus immediate-early 1 gene (CMV) enhancer and chicken beta-actin promoter with the beta-actin intron sequence, and the improved CMV promoter/enhancer containing the largest intron of CMV (intron A) produced the highest levels of expression both in vitro and in vivo. P(A) sequences were found to have significant effects on transgene expression. The effect of a multiple enhancer was also examined. Optimized plasmids of this study were pCASL3 (composed of CMV enhancer, beta-actin promoter, beta-actin intron, Simian virus (SV40) P(A) sequence and SV40 enhancer) and pCMVSL3 (composed of CMV enhancer, CMV promoter, intron A, SV40 P(A) sequence and SV40 enhancer). These comparative analyses could provide a systematic reference for the development of vector construction for gene therapy, vaccine development, and gene transfer experiments.

Keywords: gene therapy, transcriptional regulatory elements, plasmid

*大阪大学大学院薬学研究科

Xu, Z.L. *, Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T. *, Hayakawa, T.: **Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector**

J. Control. Release, 81, 155-63 (2002)

In studies of both gene function and gene therapy, transgene expression may be assisted considerably through the use of transcriptional regulatory elements

with high activity. In this study, we evaluated the strength of various transcriptional regulatory elements both in vitro (six types of cell line) and in vivo (mouse heart, lung, kidney, spleen, and liver) by adenovirus-mediated gene transfer. In the case of the promoter/enhancer (P/E), the activity of CMV P/E (from the human cytomegalovirus immediate-early 1 gene) and hybrid CA P/E (composed of the CMV enhancer and chicken beta-actin promoter) were investigated, both of which are known to be strong and widely used. While hybrid CA P/E showed a higher transgene expression activity than CMV P/E, the addition of the intron A sequence (the largest intron of CMV) to CMV P/E increased the activity of CMV P/E to the same or higher level than that of hybrid CA P/E. Concerning the polyadenylation signal (P(A)) sequence, one from the bovine growth hormone (BGH) gene was about two times more efficient than that from the Simian virus 40 (SV40) late gene, both in vitro and in vivo. In the context of the CMV P/E containing the intron A sequence, a further increase in transgene expression was obtained by the addition of a SV40 enhancer downstream from the P(A) sequence. The combination of the SV40 P(A) and a SV40 enhancer showed almost comparable activity to BGH P(A). This information would be helpful for the construction of adenovirus vectors for studies regarding both gene function and gene therapy.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, transcriptional regulatory elements

*大阪大学大学院薬学研究科

Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Involvement of a calcium-independent pathway in plasmin-induced platelet shape change**

Life Sci. 69, 945-960 (2001)

Plasmin-induced platelet activation is considered to be a cause of reocclusion after thrombolytic therapy with plasminogen activators. However, little is known regarding its mechanism and regulation, particularly with respect to the initial step shape change. We here demonstrate that a Ca^{2+} -independent pathway is involved in plasmin-induced human platelet shape change, and that Rho-kinase plays an important role in this pathway. When the increase in cytosolic Ca^{2+} was prevented by an intracellular Ca^{2+} chelator, 5,5'-dimethyl-BAPTA, plasmin-induced platelet shape change was partially inhibited but still occurred. In the presence of 5,5'-dimethyl-BAPTA, a specific Rho-kinase inhibitor, Y-27632, completely inhibited the shape change.

Phosphorylation of myosin light chain, a key regulator of platelet shape change, was completely inhibited by Y-27632 in 5,5'-dimethyl-BAPTA-treated platelets. Although plasmin caused tyrosine phosphorylation of the 80 kDa protein during the shape change, it did not seem to have a critical role. cAMP-elevating agents inhibited plasmin-induced shape change in 5,5'-dimethyl-BAPTA- or Y-27632-treated platelets with similar efficiency. These results indicated that plasmin causes platelet shape change by activating Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent-Rho-kinase-dependent pathways, both of which are sensitive to cAMP.

Keywords: platelet, plasmin, shape change

Matsuoka, T.* , Kuribara, H.* , Suefuji S.* , Akiyama, H., Miura, H.* , Kusakabe, Y.* , Goda, Y., Isshiki, K.* , Toyoda, M., Hino, A.* : **A detection method for recombinant DNA from genetically modified maize CBH351**

J. Food Hygienic Soc. Japan, **42**, 197-201 (2001)

A method using polymerase chain reaction (PCR) was designed for the detection of genetically modified maize CBH351, which has not authorized as safe for use in foods and feeds in Japan yet. We analyzed a recombinant DNA (r-DNA) sequence introduced into CBH-351 maize and designed specific primer pairs to amplify a segment including part of the r-DNA. The PCR products obtained by using the designed primer pairs are specific for CBH351 and should prevent false positive results caused by other maizes and other main cereal crops. The r-DNA introduced into CBH351 could be detected from maize samples containing 0.05~0.1% CBH351 maize. this sensitivity is theoretically equivalent to a level of several genome copies and so this technique is a very efficient means to detect CBH351 maize.

Keywords: genetically modified maize CBH351, detection method, PCR

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries

Ngang, E.* , Matsufuji, H.* , Chino, M.* , Goda, Y., Toyoda, M., Takeda, M.* : **Structural determination of subsidiary color in commercial food green No.3 (Fast Green FCF, FD&D Green No.3)**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **42**, 298-303 (2001)

HPLC analysis revealed that eight subsidiary colors existed in commercial Food Green No.3 (fast green FCF, FD & C Green No. 3). Among them, four subsidiary

colors C, F, G and H were isolated by using preparative HPLC and their structures were determined by MS and NMR. They were the disodium salt of 2-[[4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl)amino]phenyl][4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl)amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid (abbreviated as m-p-G-3), the sodium salt of 2-[(4-N-ethylamino)phenyl][4-[N-ethyl-N-(4-sulfophenylmethyl)amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid [abbreviated as HSBA-(EA) (m-EBASA)], the sodium salt of 2-[[4-N-diethylamino]phenyl][4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl)amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid [abbreviated as HSBA-(di-EA) (m-EBASA)], and the sodium salt of 2-[[4-[N-ethyl-N-(phenylmethyl)amino]phenyl][4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl)amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid [abbreviated as HSBA-(EBA) (m-EBASA)], respectively. HSBA-(di-EA) (m-EBASA) was a subsidiary color newly found in commercial Food Green No. 3.

Keywords: food green No.3, subsidiary color, structural determination

* College of Bioresource Science, Nihon University

山田真紀子*¹, 森本隆司*¹, 中村幹雄*¹, 合田幸広, 中澤裕之*² : **食用黄色5号製造時における副成色素 Trisodium salt of 6-hydroxy-7-(4-sulfophenyl)-5-(4-sulfophenylazo)-2-naphthalenesulfonic acid の生成条件**

日食化誌, **8**, 73-77 (2001)

Y5製造時における副成色素Y5-SAの生成条件を検討した。Y5-SAの生成実験より、以下の点が判明した。1) スルファニル酸のジアゾニウム塩とシェファー塩の比を変えて反応させたとき、Y5-SAの副成はスルファニル酸のジアゾニウム塩の量に依存して増加した。2) Y5にスルファニル酸のジアゾニウム塩を加えると、時間とスルファニル酸のジアゾニウム塩の量に依存してY5-SAが生成されることが明らかとなった。3) pHの影響について検討したところ、pH8.0~pH10.0では少なく、pH12.0のとき最も多く、pH 13.0では減少した。以上の結果より、Y5を製造する際は、スルファニル酸のジアゾニウム塩とシェファー塩を正確に等量でカップリング反応させるとともに、Y5-SAの副成を抑制し、Y5の生成時のカップリング反応が速やかであるpH10.0で反応を行う必要がある。また、Y5-SAはY5製造時のGMPマーカーとして利用可能であると考えられる。

Keywords: food yellow No.5, subsidiary color, Sunset Yellow FCF

*1 三栄源 FFI

*2 星薬科大学

合田幸広, 浅野卓哉, 渋谷雅明*1, 日野明寛*2, 豊田正武: 遺伝子組換えパパイヤからの組換え遺伝子の検知

食衛誌 42, 231-236 (2001)

日本で安全性審査未終了の GM パパイヤ (55-1 系統, Sunup) について, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた検知法を検討した. Papain 遺伝子を検知するプライマー対を陽性対照とした結果, 生食用パパイヤでは, シリカゲル膜タイプのキットで, 缶詰由来のパパイヤでは, イオン交換樹脂タイプのキットで, パパイヤ由来の遺伝子が良好に抽出精製され, 検知されることが明らかとなった. さらに, 生食用のものでは, GUS 遺伝子, NPTII 遺伝子のみを検知するプライマー対を含め 5 種のプライマー対で特異的に GM パパイヤが検知されることが判明した. 他方, 缶詰由来のパパイヤでは, 2 種類の生物に由来する連続した DNA 領域を増幅するプライマー対を用いた場合, 良好な検知結果が得られた.

Keywords: genetically modified papaya, detection method, PCR

*1 東京大学大学院薬学系研究科

*2 独立行政法人食品総合研究所

合田幸広, 柿原芳輝, 穂山 浩, 松岡 猛*, 日野明寛*, 豊田正武: トウモロコシ穀粒における非意図的組換え遺伝子の検知

食衛誌 43, 74-79 (2002)

品種 (系統) が明確な遺伝子組換えトウモロコシの穀粒及び非組換え穀粒について, PCR を用いた品種 (系統) 特定型の検知法を利用し, 当該穀粒で表示されている品種 (系統) と, 実際の検知結果の差違について検討した. その結果, Bt11 では 100 粒中 11 粒で, Event176 では, 30 粒中 5 粒で表示と異なった組換え品種 (系統) の遺伝子が検知された. また, 非組み換え品種では, 30 粒中 4 粒から組換え品種の遺伝子が検知された. 従って, 他殖性のトウモロコシでは, 穀粒では表示と異なった非意図的組換え遺伝子が検知される可能性があることが明らかとなった. また, 定量 PCR の結果より, GM 遺伝子がホモで存在する粒の遺伝子型はすべて表示の組換え品種 (系統) のもので, 他の組換え品種 (系統) の遺伝子はすべてヘテロな遺伝子型として観察され, これらの遺伝子が風媒により導入された可能性が非常に高いことが示された.

Keywords: genetically modified maize grain, unexpected recombinant DNA, quantitative-PCR

* 独立行政法人食品総合研究所

Ohtsuki, T. *, Matsufuji, H. *, Toyoda, M., Goda, Y., : Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.)

Phytochemistry, 60, 79-87 (2002).

Twelve acylated anthocyanins were isolated from the red radish (*Raphanus sativus* L.) and their structures were determined by spectroscopic analyses. Six of the anthocyanins were novel compounds, which were identified as pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-feruloyl-2-O-β-D-glucopyranosyl]-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside), pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-caffeoyl-2-O-(6-(E)-feruloyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside), pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-p-coumaroyl-2-O-(6-(E)-caffeoyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside), pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-feruloyl-2-O-(6-(E)-caffeoyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside), pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-p-coumaroyl-2-O-(6-(E)-feruloyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside), and pelargonidin 3-O-[6-O-(E)-feruloyl-2-O-(2-(E)-feruloyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranoside]-5-O-(β-D-glucopyranoside).

Keywords: red radish, acylated anthocyanin, structural determination

* College of Bioresource Science, Nihon University

Shoji, T. *, Goda, Y., Toyoda, M., Yanagida, A. *, Kanda, T. *: Characterization and structures of novel anthocyanin pigments generated in rose cider during vinification.

Phytochemistry, 59, 183-189 (2002)

Anthocyanin pigments, which are not found in apple juice, were detected in rosé cider. We confirmed by HPLC/DAD and LC/ESI-MS analyses that some of these anthocyanin pigments generated in rosé cider during the vinification corresponded to those formed in model cider containing anthocyanin and flavan-3-ol in the presence of acetaldehyde. To confirm their structures, two anthocyanin pigments formed in a model cider containing cyanidin-3-galactoside and (-)-epicatechin in the presence of acetaldehyde were isolated, and purified, and their structures were elucidated by high resolution FAB-MS and ¹H and ¹³C NMR analyses. These two pigments

were found to consist of cyanidin-3-galactoside and (-)-epicatechin linked by a CH₃-CH bridge at the 8-position. They were diastereomers that differed in the configuration of the asymmetric methine carbon.

Keywords: rosé cider, anthocyanin pigments, structural determination

*¹ Institute for Production Research and Development, Nikka Whisky Distilling Co., Ltd.

*² School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Kato, Y.*¹, Sato, H.*¹, Aoki, H.*¹, Goda, Y.: **Chemical structure of an anthocyanin pigment isolated from "Myoga" (*Zingiber mioga* Rosc.)**

Food and Food Ingredients Journal of Japan, **197**, 28-33 (2002)

Two anthocyanins were isolated from young inflorescence of "Myouga" (*Zingiber mioga* ROSC.), and the structure of the major anthocyanin was elucidated by means of spectroscopic analyses and chemical degradation techniques. The major pigment was malvidin 3-rutinoside (malvidin 3-O-(6-O-(α -rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside)).

Keywords: anthocyanin pigment, *Zingiber mioga*, structural determination

* San-Ei Gen FFI, Inc.

Hada, N.*¹, Sato, K.*¹, Sakushima, J.-i., Goda, Y., Sugita, M.*², Takeda, T.*¹: **Synthetic Studies on Glycosphingolipids from Protostomia Phyla: Synthesis of amphoteric glycolipid analogues containing a phosphocholine residue from the earthworm *Pheretima hilgendorfi***

Chem. Pharm. Bull., **49**, 1464-1467 (2001).

Two kinds of amphoteric glycosphingolipid analogues from the earthworm *Pheretima hilgendorfi* were synthesized as follows: The key reaction is a coupling of a phosphocholine group at the position C-6 of 1 and 6 which was attempted using 2-chloro-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane, followed by reaction of the resulting cyclic phosphate intermediate with anhydrous trimethylamine to give the compounds 2 and 7. Subsequent debenzoylation afforded target compounds (3, 8). Their ability to inhibit the histamine release in vitro was examined.

Keywords: amphoteric glycosphingolipid, chemical synthesis, histamine release

*¹ Kyoritsu College of Pharmacy

*² Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University

Kawahara, N., Masuda, K.*¹, Sekita, S., Satake, M.: **A new Secoiridoid Glucoside, Amaronitidin, from the Peruvian Folk Medicine "Hercampuri" (*Gentianella nitida*)**

Chem. Pharm. Bull., **49** (6), 771-772 (2001).

A new secoiridoid glucoside designated amaronitidin was isolated from the Peruvian folk medicine "Hercampuri" (*Gentianella nitida*) along with three known secoiridoid glucosides. Their structures were determined by extensive spectroscopic investigation.

Key words: amaronitidin, *Gentianella nitida*, Hercampuri, Gentianaceae, secoiridoid glucoside

* Showa Pharmaceutical University

Komatsu, H.*¹, Watanabe, M.*¹, Ohyama, M.*¹, Enya, T.*¹, Koyama, K.*¹, Kanazawa, T.*¹, Kawahara, N., Sugimura, T.*¹, Wakabayashi, K.*¹: **Phenanthroindolizidine Alkaloids as Cytotoxic Substances in a Danaid Butterfly, *Ideopsis similis*, against Human Cancer Cells**

Medicinal Chemistry **44** (11), 1833-1836 (2001).

In the present study, we isolated cytotoxic substances against a human gastric cancer cell line, TMK-1, in *Ideopsis similis* pupae, with an activity similar to that of the adult butterfly. The basic fraction, prepared from a methanol extract, accounted for 83% of the cytotoxic activity. Two major cytotoxic substances were purified by HPLC, and one was determined to be a new phenanthroindolizidine alkaloid, *trans*-(+)-3,14 α -dihydroxy-6,7-dimethoxyphenanthroindolizidine (1), and the other a known compound, *trans*-(+)-3,14 α -dihydroxy-4,6,7-trimethoxyphenanthroindolizidine (2). The IC₅₀ values for TMK-1 cells were 0.5 ng/mL and 0.7 ng/mL, respectively. These two compounds showed similar cytotoxic potential with four other cancer cell lines including cervical, lung, and colon carcinomas and leukemia. Quantitative analyses indicated the presence of each of the two phenanthroindolizidine alkaloids at levels of 11-74 μ g in each larva, pupa, or adult of *I. similis*. However, 1 was not detected in the leaves of *Tylophora tanakae*, a host plant for larvae of *I. similis*, and the level of 2 (2 μ g per gram of leaves) was far less than that in the larvae. Since the leaves of *T. tanakae* are known to contain various phenanthroindolizidines, compounds 1 and 2 are presumably metabolically converted from such alkaloids in larvae of *I. similis*.

Key words: phenanthroindolizidine alkaloid, cytotoxic

substance

* National Cancer Center Research Institute

Kuroyanagi, M.*¹, Seki, T.*², Hayashi, T.*³, Nagashima, Y.*³, Kawahara, N., Sekita, S., Satake, M.: **Anti-androgenic Triterpenoids from the Brazilian Medicinal Plant, *Cordia multispicata***

Chem. Pharm. Bull., **49** (8), 954-957 (2001).

6 compounds were isolated from the AcOEt soluble fraction of leaves of the Brazilian medicinal plant, *Cordia multispicata*, and their structures were elucidated to be 3 β , 25-epoxy-21 β -acetoxo-3 α , 22 β -dihydroxyurs-12-en-28-al, 3 β , 25-epoxy-28-acetoxo-3 α , 21 β , 22 β -trihydroxyurs-12-ene, 21 β -acetoxo-22 β -hydroxy-3-oxours-12-en-28-al, 28-acetoxo-6 β , 21 β , 22 β -trihydroxy-3-oxours-12-ene, 21 β , 22 β -dihydroxy-3-oxours-12-en-28-al and 3 β , 21 β , 22 β -trihydroxyurs-12-en-28-al, respectively, by means of spectral data, especially two dimensional NMR techniques. Triterpenes having the hemiketal structure at the A-ring, an acyloxy group at C-22 and/or ketone at C-3 showed potent anti-androgenic activity.

Key words : *Cordia multispicata*, ursan-type triterpene, anti-androgenic activity, hemiketal

*¹ School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

*² School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

*³ Lion Corporation

Hada, N.*¹, Totsuka, Y.*², Enya, T.*², Tsurumaki, K.*², Nakazawa, M.*², Kawahara, N., Murakami, Y.*³, Yokoyama, Y.*³, Sugimura, T.*², Wakabayashi, K.*²: **Structures of mutagens produced by the co-mutagen norharman with *o*- and *m*-toluidine isomers**

Mutation Research, **493**, 115-126 (2001).

Norharman, abundantly present in cigarette smoke and cooked foods, is not mutagenic to *Salmonella typhimurium* strains. However, norharman shows mutagenicity to *S. typhimurium* TA98 and YG1024 in the presence of S9 mix when coexisting with aromatic amines, including aniline, *o*- and *m*-toluidines. We previously reported that the mutagenicity from norharman and aniline in the presence of S9 mix was due to the formation of a mutagenic compound, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-*b*]indole (aminophenylnorharman). In the present study, we analyzed the mutagens produced by norharman with *o*- or *m*-toluidine in the presence of S9 mix. When norharman

and *o*-toluidine were reacted at 37°C for 20 min, two mutagenic compounds, which were mutagenic with and without S9 mix, respectively, were produced, and these were isolated by HPLC. The former mutagen was deduced to be 9-(4'-amino-3'-methylphenyl)-9H-pyrido[3,4-*b*]indole (amino-3'-methylphenylnorharman) on the basis of various spectral data, and this new heterocyclic amine was confirmed by its chemical synthesis. The latter mutagen was identified to be the hydroxyamino derivative. Amino-3'-methylphenylnorharman induced 41,000 revertants of TA98, and 698,000 revertants of YG1024 per μ g with S9 mix. Formation of the same DNA adducts was observed in YG1024 when amino-3'-methylphenylnorharman or a mixture of norharman plus *o*-toluidine was incubated with S9 mix. These observations suggest that norharman reacts with *o*-toluidine in the presence of S9 mix to produce amino-3'-methylphenylnorharman, and this compound is metabolically activated to yield its hydroxyamino derivative. After activation by *O*-acetyltransferase, it might bind to DNA and exert mutagenicity in *S. typhimurium* TA98 and YG1024. When norharman and *m*-toluidine were reacted in the presence of S9 mix, 9-(4'-amino-2'-methylphenyl)-9H-pyrido[3,4-*b*]indole (amino-2'-methylphenylnorharman) was identified as a mutagen. Thus, the mutagenicity of norharman with *m*-toluidine may follow a mechanism similar to that with *o*-toluidine.

Key words : norharman, toluidine isomers, amino-3'-methylphenylnorharman, amino-2'-methylphenylnorharman

*¹ Kyoritsu College of Pharmacy

*² National Cancer Center Research Institute

*³ School of Pharmaceutical Sciences, Toho University

Kawahara, N., Kurata, A.*¹, Hakamatsuka, T.*¹, Sekita, S., Satake, M.: **Two Novel Cucurbitacins, Neocucurbitacins A and B, from the Brazilian Folk Medicine "Buchinha" (*Luffa operculata*) and their Effect on PEBP2 α A and OCIF Gene Expression in a Human Osteoblast-like Saos-2 Cell Line**

Chem. Pharm. Bull., **49** (10), 1377-1379 (2001).

Two novel cucurbitacins designated as neocucurbitacins A, possessing inhibitory activity of polyoma enhancer binding protein 2 α A (PEBP2 α A) and osteoclastogenesis-inhibitory factor (OCIF) gene expression in human osteoblast-like cells, and B were isolated from the fruit of *Luffa operculata*. Their structures have been determined

by extensive spectroscopic investigation.

Key words : neocucurbitacin, *Luffa operculata*, Buchinha, cucurbitacin, bone formation

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo Science University

Chakravarty, A. K. *¹, Sarkar, T. *¹, Masuda, K. *², Shiojima, K. *², Nakane, T., Kawahara, N.: **Bacopaside I and II: two pseudojujubogenin glycosides from *Bacopa monniera*** *Phytochemistry*, **58** (4) 553-556 (2001).

Two saponins, designated as bacopaside I and II, have been isolated from *Bacopa monniera* Wettst. and their structures have been elucidated as 3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-sulphonyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- α -L-arabinopyranosyl pseudojujubogenin (1) and 3-*O*- α -L-arabinofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)] β -D-glucopyranosyl pseudojujubogenin (2) mainly on the basis of 2D NMR and other spectral analyses.

Key words : *Bacopa monniera*, Scrophulariaceae, Saponins, bacopaside I and II

*¹ Indian Institute of Chemical Biology

*² Showa Pharmaceutical University

Xiao, D. *¹, Kuroyanagi, M. *¹, Itani, T. *², Matsuura, H. *², Udayama, M. *², Murakami, M. *³, Umehara, K. *³, Kawahara, N.: **Studies on Constituents from *Chamaecyparis pisifera* and Antibacterial Activity of Diterpenes** *Chem. Pharm. Bull.*, **49** (11), 1479-1481 (2001)

In the course of our research for biologically active constituents from coniferous plants, a chromone derivative and an abietane derivative were isolated along with several diterpenes from *Chamaecyparis pisifera*. Structures of the new compounds were determined to be 5,7-dihydroxy-2-(1-acetyl-1-2-methoxycarbonyl)ethyl) chromone and *rel*-(8*R*, 10*R*, 20*S*)-8,10,20-trihydroxy-9(10 \rightarrow 20)-*abeo*-abietane-9,13-dien-12-one by means of spectral methods including two-dimensional NMR experiments. Some of these abietane-type compounds isolated from this plants showed antibacterial activity against the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*.

Key words : 2-substituted chromone, 9(10 \rightarrow 20)-*abeo*-abietane, *Chamaecyparis pisifera*, antibacterial activity, diterpene

*¹ School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University

*² Wakunaga Pharmaceutical Co. Ltd.

*³ School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

Wang, T. *¹, Shirota, O., Nakanishi, K. *¹, Berova, N. *¹, McDonald, L. A. *², Barbieri, L. R. *², and Carter, G. T. *²:

Absolute stereochemistry of the Spiroxins

Can. J. Chem., **79**, 1786-1791 (2001)

The absolute configuration of spiroxin A has been determined by exciton-coupled circular dichroism (CD). Namely, the difference CD between spiroxin A bis-methoxycinnamate, as well as spiroxin A bis-retinoate, both exhibit negative exciton couplings between the phenolic hydroxyl group chromophores. This establishes the absolute configuration as 2*S*, 3*R*, 4*S*, 2'*S*, 3'*R*, 4'*S*.

Keywords: circular dichroism, exciton coupling, spiroxins

*¹ Columbia University

*² Wyeth-Ayerst Research

Ozaki Y., Ono K., Sakaguchi I., * Kato Y. * : **Histological Study of the Accelerating Effect of Shikonin and Alkannin on the Proliferation of Granulation Tissue in Rats**

Natural Medicines, **56**, 29-33(2002)

紫根の成分で光学異性の関係にあるシコニンとアルカニンの肉芽組織増殖促進作用の作用発現機序をラット綿球法を用いて組織学的に解明し、さらに、その効力を比較検討した。シコニン及びアルカニンの局所投与は、綿球をラット背部に埋め込んだ後、5日目ごろから肉芽組織増殖を促進する傾向にあり、10日後には有意に促進作用を示した。この促進作用を示している時の肉芽組織周辺部を蛍光染色して毛細血管の状態を観察したところ肉芽組織周辺部には新生毛細血管の増殖の促進作用が観察された。これらのことから、シコニン及びアルカニンは肉芽組織周辺部の新生毛細血管の増殖を促進して、肉芽組織増殖の促進作用を発現していることが明らかとなった。

Keywords : shikonin, alkannin, granulation tissue

* Club Cosmetics Co., Ltd.

Tsuchiya, T., Itahashi, Y., Ichikawa, T., Ichikawa, A. * : **Studies on the biocompatibility of artificial organs and tissue engineered products**

Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, **12**, 253-256 (2002)

Representative biodegradable-polymers are assayed to clarify the property when used as the materials for the nerve regeneration using the midbrain cell differentiation systems. As for polyglycolic acid [PGA], both the

proliferation and differentiation of the midbrain cells were does-dependently inhibited by PGA3000 (Mw=3000). Poly(L-lactic acid)[PLLA]5000 (Mw=5000) showed slightly inhibitory effects on the proliferation and differentiation. In the case of the poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone)₂₅ 10000 [P(LA-CL)₂₅ 10000] (Mw=10000), the differentiation was inhibited at 7.5 μg/ml to the levels of about 50% of the controls. But, P(LA-CA)₅₀ 18000 (Mw=18000) showed weakly inhibitory action on the differentiation of midbrain cells in comparison with P(LA-CA)₂₅ 10000. The inhibitory activity of these polymers on neuronal cell differentiation were in the following order: P(LA-CA)₂₅ 10000 > PGA3000 > P(LA-CA)₅₀ 18000 = PLLA5000. The catalyst of SnCl₂ showed the strongest inhibitory action on the midbrain cell differentiation among test chemicals.

Keywords: midbrain, neuronal cell differentiation, biodegradable polymer

* Kyoto Institute of Technology

Ichikawa, A. *, Tsuchiya, T.: **Reversion of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection**

Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, **12**, 269-273 (2002)

Rat tumor cell line U41 is derived from rat malignant fibrous histiocytoma (MFHC) developed in the part of subcutaneous implantation of polyetherurethane (PEU) films. U41 cells is suppressed in gap junctional intercellular communication (GJIC). Western blot and RT-PCR analysis indicate that the expression levels of the gap junction protein connexin43 (Cx43) are decreased in this cell line. Rat Cx43 cDNA was transfected into U41 derived subclone U41-22. A stable Cx43 transfectant clone, which acquired high levels of Cx43 expression and the capacity of GJIC, was established and compared with mock transfectant control clone. Cx43 transfected clone U41-22/Cx43 showed reduced growth rate, recovery of contact inhibition and loss of colony formation ability in soft agar. These results strongly suggests that suppression of Cx43 expression play an important role in development of rat MFHC caused by PEU implantation, and Cx43 acts as tumor suppressor to PEU induced tumor.

Keywords: polyurethane, tumorigenesis, gap-junctional intercellular communication

* Kyoto Institute of Technology

Rahman, M.S., Tsuchiya, T.: **Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers**

Tissue Engineering, **7**, 781-790 (2001)

Biodegradable polymers are attractive candidates for chondrocyte embedding and transplantation in cartilage tissue engineering. In an attempt to determine the effects of a variety of biodegradable materials on cartilage proliferation and extracellular matrix production, poly-L-lactic acid (PLLA) with a molecular weight of 5000, polyglycolic acid (PGA) with a molecular weight of 3000, and copolymer of poly (L-lactic acid-glycolic acid) 50:50 (PLGA) with a molecular weight of 5000, were dissolved in DMSO and added into the medium for 4 weeks in vitro high-density micromass culture of multiplied human articular chondrocytes (HAC). PLLA with a molecular weight of 270000 (PLA03) was used as thin film. Cell proliferation and differentiation in these biomaterials were compared with tissue culture polystyrene (TCPS) as a control. Alamar blue and alcian blue staining were carried out to determine the chondrocyte proliferation and differentiation, respectively. Samples exposed to these biomaterials promoted cell proliferation in the range of 86-105% of the control proliferation, and a slight but significant increase in cell proliferation was noted only in the culture exposed to PLGA. The sample exposed to PGA elicited a significant 3.7-fold higher ($p < 0.01$) cell differentiation than controls and was significantly higher than that of the samples exposed to PLLA, PLA03, and PLGA. After 4 weeks of culture, the cell differentiation from most to least was in the following order PGA > PLA03 > PLGA = PLLA > Cont. = DMSO. Chondrocyte differentiation of the samples exposed to various biomaterials were significantly higher compared with controls. Thus, serially passage chondrocytes are competent for cell growth and quantifiable matrix production, and biodegradable polymers, especially PGA, hold promise as suitable substrates for scaffolding materials for human cartilage tissue engineering.

Keywords: human articular chondrocytes, chondrogenesis, biodegradable polymer

Park, J.U., Tsuchiya, T.: **Increase in gap-junctional intercellular communications (GJIC) of normal human dermal fibroblasts (NHDF) on surfaces coated with high-molecular-weight hyaluronic acid (HMW HA)**

J. Biomed. Mater. Res., **60**, 541-547 (2002)

Normal human dermal fibroblast (NHDF) cells were used to detect differences in gap-junctional intercellular communication (GJIC) by hyaluronic acid (HA), a linear polymer built from repeating disaccharide units that consist of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNa) and D-glucuronic acid (GlcA) linked by a β 1-4 glycosidic bond. The NHDF cells were cultured with different molecular weights (MW) of HA for 4 days. The rates of cell attachment in dishes coated with high-molecular-weight (HMW; 310 kDa or 800 kDa) HA at 2 mg/dish were significantly reduced at an early time point compared with low-molecular-weight (LMW; 4.8 kDa or 48 kDa) HA with the same coating amounts. HA-coated surfaces were observed by atomic force microscopy (AFM) under air and showed that HA molecules ran parallel in the dish coated with LMW HA and had an aggregated island structure in the dish coated with HMW HA surfaces. The cell functions of GJIC were assayed by a scrape-loading dye transfer (SLDT) method using a dye solution of Lucifer yellow. Promotion of the dye transfer was clearly obtained in the cell monolayer grown on the surface coated with HMW HA. These results suggest that HMW HA promotes the function of GJIC in NHDF cells. In contrast, when HMW HA was added to the monolayer of NHDF cells, the functions of GJIC clearly were lowered in comparison with the cells grown in the control dish or with those grown on the surface of HMW HA. Therefore it is concluded that the MW size of HA and its application method are important factors for generating biocompatible tissue-engineered products because of the manner in which the GJIC participates in cell differentiation and cell growth rate.

Keywords: normal human dermal fibroblasts, gap-junctional intercellular communication, hyaluronic acid

Park, J.U., Tsuchiya, T.: Increase in gap junctional intercellular communication by high molecular weight hyaluronic acid associated with fibroblast growth factor 2 and keratinocyte growth factor production in normal human dermal fibroblasts

Tissue Engineering, 8, 419-427 (2002)

The effects of the different molecular weights of hyaluronic acid (HA), a major component of extracellular matrix, on gap junctional intercellular communication (GJIC) in normal human dermal fibroblasts (NHDF cells) were investigated. NHDF cells were cultured for 4 days with different molecular weights of HA and then the extents of GJIC was assessed by the scrape-loading dye

transfer method, using Lucifer yellow. The area of dye transfer was greater in the dishes coated with HA than in those to which HA was added. Thus, NHDF cells cultured on surfaces coated with high molecular weight (HMW) HA (MW, 800 kDa) showed greatly enhanced GJIC. Furthermore, another aim of this study was to evaluate the effects of different molecular weights of HA on the production of FGF-2 and KGF, because both are important cytokines produced by NHDF cells. When FGF-2 and KGF protein levels of cell extracts and media were determined by ELISA, both levels were significantly enhanced when cells were grown on plates coated with HMW HA. This finding indicated that the function of gap junction channels in NHDF cells grown on plates coated with HMW HA may promote the biosynthesis of growth factors such as FGF-2 and KGF.

Keywords: bFGF, KGF, normal human dermal fibroblast

Rahman, M.S., Tsuchiya, T.: Effects of biomaterials and nutrient factors on chondrogenesis of human chondrocytes

Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, 12, 235-239 (2002)

The biocompatibility of poly-L-lactic acid (PLLA) and copolymer of poly (DL-lactic-co-glycolic acid) 50:50 (PLGA), and the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) and ferrous sulfate (FeSO_4) on human articular chondrocytes (HAC) proliferation and differentiation were investigated in a 4 weeks micromass culture system. Aliquots of 20 μ l (per well) containing 4×10^5 cells were spotted onto 24-well tissue culture plates and supplemented with the media containing dimethyl sulphoxide (as a vehicle), PLLA, PLGA, bFGF, or FeSO_4 , respectively. Cells cultured with medium only was used as a control. Alamar blue and alcian blue staining were done to determine the chondrocyte proliferation close to control level. The cultures exposed to PLLA, PLGA, bFGF and FeSO_4 increased HAC differentiations up to the levels of 1.2-, 1.6-, 1.3- and 2-fold of the control, respectively. These results suggested that both the PLLA and PLGA are suitable as scaffold for tissue-engineered cartilage, and bFGF and FeSO_4 also possessed the stimulatory activities on HAC chondrogenesis

Keywords: human articular chondrocytes, chondrogenesis, nutrient factors

Miura, T.*¹, Katakura, Y.*¹, Yamamoto, K.*¹, Uehara,

N.^{*1}, Tsuchiya, T., Kim, E.H.^{*2}, Shirahata, S.^{*1}: **Neural stem cells lose telomerase activity upon differentiating into astrocytes**

Cytotechnology, **36**, 137-144 (2001)

Serum-free mouse embryo (SFME) cells were established by D. Barnes et al., and are known to be a neural stem cell line, which differentiate into astrocytes upon treatment with TGF- β . Therefore, SFME cells are thought to be a model well suited to analyze the differentiation mechanism of neural stem cells. Until now, we have investigated the regulation mechanisms of telomerase activity and telomere length in human cancer and normal cells. Telomerase is the enzyme responsible for the synthesis and maintenance of telomere repeats located at chromosomal ends and is normally expressed in embryonic and germline cells, but not in most normal cells. Here, using SFME cells, we attempted to analyze the regulation mechanism of telomerase activity in neural stem cells and to detect a change upon differentiation into astrocytes. When SFME cells were cultured in the presence of TGF- β , cells showed an elongated morphology and decreased its growth to 50% of control culture. Cells also expressed the glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker for astrocytes, indicating that TGF- β induced differentiation in SFME cells from neural stem cells into astrocytes. At the same time, TGF- β also inhibited telomerase activity and repressed the expression of the mouse telomerase reverse transcriptase (*mTERT*), demonstrating that SFME cells was vested with a finite replicative life span upon treatment with TGF- β . To understand the mechanisms regulating *mTERT* levels during differentiation into astrocytes, we have estimated the expression level of *c-myc*, which is known to be a key molecule in activating the *TERT* promoter. As a result, TGF- β -treated SFME cells were shown to repress the expression of *c-myc*. Furthermore, promoter analysis, using the 5'-region of the *mTERT* gene, which possess two E-box elements bound to c-Myc/Max, demonstrated that *mTERT* promoter activity greatly decreased in TGF- β -treated SFME cells as compared to non-treated SFME cells. These suggest that *c-myc* might play a critical role in the expression of *mTERT*, and that down-regulation of *c-myc* dependent upon the astrocytic differentiation in SFME cells might cause the repression of *mTERT* in TGF- β -treated SFME cells.

Keywords: astrocytes, neural stem cells, telomerase

^{*1} Department of Genetic Resources Technology, Kyushu

University

^{*2} Graduate School of Biotechnology, Korea University

Hayashi, Y., Matsuda, R., Haishima, Y., Yagami, T., Nakamura, A.: **Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol-A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory**

J. Pharm. Biomed. Anal., **28**, 421-429 (2002)

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溶出量をGC-MSおよびHPLC分析により評価し、両測定系における分析精度をFUMI理論により解析した。その結果、同理論を使用して予測した両分析系の精度は実測値と良く一致し、分析法バリデーションの概念に基づく繰り返し測定を行わなくとも、精度管理が可能であることが明らかになった。

Keywords: bisphenol-A, FUMI theory, validation

Kitagawa, K.^{*1}, Aida, C.^{*1}, Fujiwara, H.^{*1}, Yagami, T., Futaki, S.^{*2}: **Facile solid-phase synthesis of sulfated tyrosine-containing peptides: Part II. Total synthesis of human big gastrin-II and its C-terminal glycine-extended peptide (G34-Gly sulfate) by the solid-phase segment condensation approach**

Chem. Pharm. Bull., **49**, 958-963 (2001)

Fmoc型固相合成を基盤とするセグメント縮合法を、硫酸化チロシン残基を含む大分子型ペプチドに適用できるかどうか、ヒトビッグガストリンIIの合成を通して検討した。硫酸化チロシン残基を有するC-末端フラグメントは、穏和な酸条件で切断できる2-クロロトリチル樹脂を用いて合成した。そして、各保護セグメントペプチドを、樹脂上のC-末端フラグメントにPyBOP法で順次導入した。最終的に得られた保護ビッグガストリンIIを硫酸化チロシン残基の分解が最小限に抑制される酸条件で処理し、脱保護と樹脂から遊離を同時に行い、14%の全収率で高純度の目的物を得た。この結果は、セグメント縮合法が大分子型硫酸化ペプチドの合成にも有効であることを示すものであった。

Keywords: peptide synthesis, tyrosine O-sulfate, segment condensation

^{*1} 新潟薬科大学

^{*2} 京都大学化学研究所

Futaki, S.^{*1}, Fukuda, M.^{*2}, Omote, M.^{*1}, Yamauchi, K.^{*1}, Yagami, T., Niwa, M.^{*2}, Sugiura, Y.^{*1}: **Alamethicin-leucine zipper hybrid peptide: A prototype for the design of artificial receptors and ion channels**

J. Am. Chem. Soc., **123**, 12127-12134 (2001)

チャンネル形成能を持つペプチドの膜内会合状態とそれ

に伴うチャンネル電流の変動を、膜外ドメインにより調節するという概念について検討した。イオンチャンネル形成性ペプチドであるアラメシチンは、膜と相互作用しつつ幾つかの会合状態をとる。安定なホモダイマーを形成することで知られるロイシンジッパーペプチドを、各アラメシチン単量体に膜外ドメインとして結合させた結果、チャンネルが単一の開口状態で安定化するようになった。このハイブリットペプチド会合体は、テンプレートに固定化したアラメシチン-ロイシンジッパー四量体のチャンネル電流との比較から、四量体であると推察された。ランダムな立体構造をとるペプチドを膜外ドメインとして結合させた場合は、より多くの電流を通す開口状態が安定化した。一連の結果は、膜外ドメインの立体構造を転換させることにより、チャンネル電流を調節できる可能性があることを示すものであった。

Keywords: peptide synthesis, artificial protein, ion channel

*1 京都大学化学研究所

*2 徳島大学薬学部

Yagami, T., Ballard, B.T.*¹, Padovan, J.C.*², Chait, B.T.*², Popowicz, A.M.*², Manning, J.M.*¹: **N-terminal contributions of the γ -subunit of fetal hemoglobin to its tetramer strength: Remote effects at subunit contacts**
Protein Sci., **11**, 27-35 (2002)

胎児型ヘモグロビン四量体 ($\alpha_2\gamma_2$) の二量体 ($\alpha\gamma$) への解離定数は、成人型ヘモグロビン ($\alpha_2\beta_2$) の70分の1ほどでしかない。この差異は、 γ 鎖と β 鎖のN-末端領域の違いによりもたらされることが既に明らかにされている。著者らは、具体的に γ 鎖のどのアミノ酸残基が安定化に寄与しているのかを調べるため、対応する成人型ヘモグロビンの β 鎖遺伝子に様々な部位特異的変異を導入し、得られた変異体の解離定数を測定した。その結果、 β 鎖1位のVal, 5位のProおよび7位のGlu残基を、相当する γ 鎖のGly, GluおよびAspにそれぞれ置換すると、成人型ヘモグロビンの解離定数が胎児型に近くなることがわかった。この結果は、各サブユニットが実際に接触する部位ではなく、遠く離れたN-末端のアミノ酸残基により相互作用の強さが調節されているという考えを実証するものであった。

Keywords: hemoglobin, long-range interaction, site-directed mutagenesis

*1 Department of Biology, Northeastern University

*2 The Rockefeller University

入江和夫*¹, 前田典子*¹, 吉田啓子*¹, 河野泰子*², 鹿庭正昭: ペンキ中の鉛から子供を守るための実験教材と授業実践

山口大学教育学部研究論叢, **51** (第3部), 161-174 (2001)

日本の家庭科教科書において、ペンキ中の鉛による中毒から子どもを守ることを目的として、鉛中毒について記載されたものはほとんどなかった。そこで、ペンキ中の鉛の簡易確認法を開発して、実際に授業において実験教材として実践した結果、実際にペンキ中の鉛を簡便に確認できることが証明できた。身の回りのペンキ中の鉛の実態を的確に把握することによって、鉛フリーのペンキでの塗装に切り替えたり、手洗いなどを励行させることによって、塗装された金属製遊具などで遊んだ際に子どもが受ける鉛への曝露量、翻って子どもの健康リスクを低減化させることへの関心が高められることが確認できた。

Keywords: lead, paint, experimental teaching material

*¹ 山口大学教育学部

*² 山口大学附属山口中学校

山崎典子*, 中田良子*, 上出良一*, 新村真人*, 鹿庭正昭: **眼鏡フレームの先セルによる接触皮膚炎の1例**

日本皮膚アレルギー学会雑誌, **10**, 8-12 (2002)

眼鏡フレームのプラスチック製の先セル部分による両耳介後部に発生した接触皮膚炎事例についてパッチテスト、化学分析を併用して検討した結果、先セルに配合されていた3種の着色剤に共通して配合されていたベリノン系油性染料 Solvent Orange 60が原因化学物質となっていたことを明らかにした。

Keywords: spectacle frame, contact dermatitis, Solvent Orange 60

*東京慈恵医科大学皮膚科

Mi, H.*¹, Hiramoto, K.*², Kujirai, K.*³, Ando, K.*⁴, Ikarashi, Y., Kikugawa, K.*: **Effect of food reductones, 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (DMHF) and hydroxy hydroquinone (HHQ), on lipid peroxidation and type IV and I allergy responses of mouse**

J. Agric. Food Chem., **49**, 4950-4995 (2001)

The effect of long-term supplementation of food reductones, DMHF (2%), detected in many foodstuffs including soy sauce, and HHQ (1.2%), detected in coffee, on mouse lipid peroxidation and allergy responses was investigated. Levels of thiobarbituric acid-reactive substances in lung were remarkably increased, and those in kidney and liver were slightly decreased by supplementation of DMHF or HHQ. The 2,4-dinitrochlorobenzene-induced lymph node cell proliferation was

remarkably enhanced by supplementation of DMHF or HHQ. Allergen-induced increases in IgE levels of mice were enhanced to greater extent by DMHF or HHQ. No additive effect of nitrogen oxide inhalation was observed. Both type IV and I allergy responses of mice may be enhanced by supplementation of food reductones, DMHF or HHQ.

Keywords: food reductone, nitrogen oxide, allergy

*東京薬科大学

Mi, H. *, Hiramoto, K. *, Kujirai, K. *, Ando, K. *, Ikarashi, Y., Kikugawa, K. *: **Effects of vitamin E-deficiency and/or nitrogen dioxide inhalation on allergen-sensitized type IV and type I allergy responses of mice**

J. Health Sci., **48**, 22-29 (2002)

Mice were fed a vitamin E-adequate diet (C group) or vitamin E-deficient diet (-E group), and exposed to air or NO₂ (5-6 ppm) (C+NO₂ and -E+NO₂ groups) for 1-2 weeks. The degree of lymph node cell proliferation induced by 2,4-dinitrochlorobenzene of mice of the C+NO₂ group was similar to that of mice of the C groups. While the proliferation of the -E group was lower than that of the C group, the response of the -E+NO₂ group was higher than that of C and C+NO₂ groups. While the trimellitic anhydride-sensitized IgE levels of mice of the -E group were similar to those of mice of the C group, the level of the C+NO₂ and -E+NO₂ groups were much higher. These suggest that allergen-sensitized type IV and I allergy responses of mice are enhanced by oxidative stress induced by vitamin E-deficiency and/or NO₂ inhalation.

Keywords: vitamin E-deficiency, nitrogen oxide, allergy

*東京薬科大学

Matsuoka, A., Tada, A. *¹, Terao, Y. *², Nukaya, H. *², Onofelt, A. *³, Wakabayashi, K. *¹: **Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (AZO DYES) and intermediates (non-C1PBTA) in two Chinese hamster cell lines**

Mutat. Res., **493**, 75-85 (2001)

We performed the in vitro micronucleus (MN) test on PBTA-1 and PBTA-2, which are newly identified water pollutants from the Nishitakase river in Kyoto, Japan, and on their possible mother compounds and intermediates, in two Chinese hamster cell lines CHL and V79-MZ. PBTA-2 induced the strongest responses among

chemicals tested. It was also a strong inducer of binucleate cells, which suggested that it induced polyploidy. PBTA-1 showed clear positive results only in V79-MZ cells, inducing aneuploidy. In CHL cells AZO DYE-1 significantly induced MN cells in the presence of S9 mix, and AZO DYE-2 induced MN and polynuclear cells. In V79-MZ cells, AZO DYE-1 and -2 induced primarily mitotic cells in the presence of S9 mix. The non-C1PBTA were a bit more cytotoxic than the other compounds and induced a slight increase in MN cells in both cell lines. Structure-activity relationships have been discussed.

Keywords: AZO DYE, benzotriazole derivatives, in vitro micronucleus test

*¹ National Cancer Center Research Institute

*² University of Shizuoka

*³ Stockholm University

Matsuoka, A., Furuta, A. *¹, Ozaki, M. *¹, Fukuhara, K., Miyata, N.: **Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line**

Mutat. Res., **494**, 107-113 (2001)

We tested the genotoxicity of resveratrol, a polyphenolic phytoalexin found in grapes. Resveratrol was negative in the bacterial reverse mutation assay. It induced structural chromosome aberrations and showed weak aneuploidy induction in CHL cells. It induced micronucleated cells after 48 h treatment. In the sister chromatid exchange (SCE) test, resveratrol caused a clear cell-cycle delay. Resveratrol induced SCEs dose-dependently at up to 10 µg/ml and the number was almost as large as mitomycin C, a strong SCE inducer. Cell cycle analysis by FACScan indicated that resveratrol caused S phase arrest, and 48 h treatment induced apoptosis. Our results suggest that resveratrol may preferentially induce SCE but not CA, that is, it may cause S phase arrest only when SCEs are induced.

Keywords: resveratrol, polyphenol, sister chromatid exchanges

*¹ BOZO Research Center Inc.

Isama, K., Tsuchiya, T.: **Effect of γ-ray irradiated poly(L-lactide) on the differentiation of mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells**

J. Biomater. Sci. Polymer Edn., **13**, 153-166 (2002)

マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の増殖及び分化に及ぼす、ガンマ線照射したポリ L-乳酸 (PLLA) の影響

を検討するために、微小集積培養を用いた評価法を確立した。ガンマ線照射によって、PLLAの分子量は低下した。また、ガンマ線照射したPLLAの上で培養したMC3T3-E1細胞は、増殖には影響がなく、分化が促進した。ガンマ線照射によるPLLAの分子量の低下が、MC3T3-E1細胞の分化促進をもたらすことが示唆された。さらに、低分子量PLLAも、MC3T3-E1細胞の増殖には影響せず、分化を促進させた。

Keywords: poly(L-lactide), γ -ray irradiation, osteoblastic MC3T3-E1 cells

Nakaoka, R., Tsuchiya, T., Sakaguchi, K., Nakamura, A.: **Studies on in vitro evaluation for the biocompatibility of various biomaterials: Inhibitory activity of various kinds of polymer microspheres on metabolic cooperation**

J. Biomed. Mater. Res., 57, 279-284 (2001)

Gap junctional intercellular communication is a function that plays an important role in maintaining cell and tissue homeostasis and in regulating cell growth, development and differentiation. Change in this function when contacting fibroblasts with various polymer microspheres was estimated using the metabolic cooperation assay system. When the cells were in contact with the microspheres after their adhesion onto a substrate, the function did not alter. However, when they were in contact with pre-coated microspheres on test dishes, the function was inhibited as the quantity of microspheres increased. Moreover, the inhibition level increased as the diameters of polyethylene and polystyrene microspheres decreased. However, no inhibition was observed if pre-coated microspheres were composed from poly(L-lactic acid). These findings suggest that the size and the material of microspheres, and how cells recognize the microspheres are factors affecting cell function of gap junctional intercellular communication. Therefore, estimating this function may provide valuable information about the biocompatibility of many kinds of materials even in the form of particles.

Keywords: gap junctional intercellular communication, polymer microspheres, metabolic cooperation assay

Nakaoka, R., Tsuchiya, T., Nakamura, A.: **The inhibitory mechanisms of gap junctional intercellular communication induced by polyethylene and the restorative effects by surface modification with various proteins**

J. Biomed. Mater. Res., 57, 567-574 (2001)

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is a function that plays an important role in maintaining cell and tissue homeostasis and in regulating cell growth, development and differentiation. Change in this function of V79 fibroblasts cultured on polyethylene films modified with albumin or collagen was estimated using fluorescence re-distribution after photobleaching (FRAP) analysis. The GJIC function of V79 cells on non-treated polyethylene was strongly inhibited in comparison with those on a glass coverslip. When the cells were culture on collagen-immobilized polyethylene film, this function was recovered to about 70% of the cells cultured on the coverslip. However, albumin immobilization did not recover the function as much as collagen immobilization. Western blotting analysis and immunostaining of connexin 43, which is a major protein constituting gap junctional channel of these cells, revealed its abnormal expression and distribution in the cells on non-treated PE, whereas its almost normal distribution was observed in the cells on collagen-immobilized polyethylene. This abnormal expression and distribution of connexin 43 induced by the surface of polyethylene may be ascribed to a strong inhibition of GJIC of V79 fibroblasts.

Keywords: gap junctional intercellular communication, surface modification, connexin 43

Nakaoka, R., Tsuchiya, T.: **Studies on the biocompatibility of biomaterials: Effect of various types of biomaterial particles**

Proc. Fourth Pacific Rim Int. Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM4), The Japan Institute of Metals, 189-191 (2001)

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is a function that plays an important role in maintaining cell and tissue homeostasis and in regulating cell growth and differentiation. In this study, change in this GJIC function of cells contacting with various microspheres prepared from biomaterials was estimated using different methods. It was observed that microspheres pre-coated before test cell adhesion inhibited the function more than those added after cell adhesion. In addition, the inhibition levels were affected by amounts, diameter, composition and time period of interaction of microspheres as well as cell type used in the study. These findings suggest that not only the way for cells to recognize the microspheres but also characteristics of the microspheres are important factors affecting the GJIC function. Interaction of microspheres with osteoblasts resulted in inhibition of

their differentiation, indicating microspheres are probable to disturb both cell differentiation and the GJIC function of the cells. These findings suggest the possibility that GJIC function can be used as an index that gives information of biocompatibility of many kinds of materials even in the forms of particles.

Keywords: gap junctional intercellular communication, biomaterial microspheres, cell function

Shintani, H., Hayashi, F.*: **HPLC validation of ameziniummetilsulfate in human plasma of uremia patient treated with dialysis**

Chromatographia, **53**, 574-578 (2001)

A high performance liquid chromatographic method using internal standard is validated for the determination of 4-amino-6-methoxy-1-phenyl-pyridinium methyl sulfate (ameziniummetilsulfate, AM) in uremia patient treated with artificial dialysis. The method involves liquid-liquid extraction and ion suppression reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) combined with endocapped C-18 column. There is no interference by plasma components or AM metabolites in HPLC analysis. Average recovery rate using liquid-liquid extraction was 88.7% and limit of determination was 2 ng mL⁻¹. This concentration was sufficient to determine AM in human plasma. Accuracy and precision was within 15% at 2 ng mL⁻¹ of limit of determination.

Keywords: column liquid chromatography, amezinium-metilsulfate, uremia

*Health care facility of Namiki hospital

Oishi, S., Nakagawa, J., Ando M.: **Effects of Ingestion of Cadmium-Polluted Rice or Low-Dose Cadmium-Supplemented Diet on the Endogenous Metal Balance in Female Rats**

Biological Trace Element Research, **84**, 155-167 (2001)

The concentrations of endogenous metal ions in liver, kidney, and bone tissues of female rats were measured after ingestion of cadmium polluted rice (1.24ppm as Cd) or cadmium-supplemented rice (1.24 and 4.96ppm) for 2 or 4 mo. The metal accumulated mainly in the kidneys of rats fed a 1.24-ppm Cd-supplemented diet was significantly higher than in the Cd-polluted rice group.

After 2 months, the levels of iron and sodium in the liver were elevated in the Cd-polluted rice group, but not in the 1.24-ppm Cd-supplemented group, as compared to controls. The zinc concentration in the Cd-polluted rice group was decreased. The concentration of copper in

the kidneys was increased for all Cd-containing diet groups. After 4 months, the effects of Cd on essential metals in the Cd-polluted and 1.24-ppm Cd-supplemented groups had almost disappeared, although several metal ions in selected organs in the 4.96-ppm Cd-supplemented group showed more prominent changes than in the group exposed for 2 months.

Keywords: Cadmium-polluted rice, female rats

Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T., Ando, M., Ozawa, S., Sawada, J.: **High-performance liquid chromatographic assay for glucuronidation activity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), the active metabolite of irinotecan (CPT-11), in human liver microsomes**

Biomed. Chromatogr., **15**, 328-333 (2001)

A simple and sensitive assay for glucuronidation activity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), the active metabolite of irinotecan (CPT-11), in human liver microsomes by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection is reported. The method was validated for the determination of SN-38 glucuronide (SN-38G) with respect to specificity, linearity, recovery, stability, precision, accuracy, and limits of detection and quantitation. The limit of quantitation for SN-38G was 5 nM (2.5 pmol/assay). The intra- and inter-day precision and accuracy were less than 7 and 4%, respectively. With this improved sensitivity, the kinetics of SN-38 glucuronidation in human liver microsomes could be determined more precisely. Therefore, this method is applicable to *in vitro* study on the side effects and drug interactions of CPT-11 using small amounts of biological sample.

Keywords: Irinotecan, SN-38, Glucuronidation

Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Ando, M., Saito, Y., Sawada, J.: **Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin**

Xenobiotica, **31**, 687-699 (2001)

The human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), the active metabolite of irinotecan (CPT-11), have been studied using microsomes from human liver and insect cells expressing human UGTs. The glucuronidation of SN-38 was catalyzed by UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6 and UGT1A9 as well as by liver microsomes. The ranking in order of

activity at low and high substrate concentrations was UGT1A1 > UGT1A9 > UGT1A6 > UGT1A3 and UGT1A1 > UGT1A3 > UGT1A6 > or = UGT1A9, respectively. The UGT isoforms involved in SN-38 glucuronidation could be classified into two types: low- K_m types such as UGT1A1 and UGT1A9, and high- K_m types such as UGT1A3 and UGT1A6, in terms of affinity toward substrate. These results demonstrate that at least four UGT1A isoforms are responsible for SN-38 glucuronidation in human livers, and suggest that the role and contribution of each differ substantially.

Keywords: Irinotecan, SN-38, UDP-glucuronosyl-transferase

Hanioka, N., Watanabe, K., Yoda, R., Ando, M.: **Effect of alachlor on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats**
Drug Chem. Toxicol., **25**, 25-37 (2002)

We examined the effects of alachlor on cytochrome P450 enzymes in rat liver microsomes. Among the cytochrome P450-dependent monooxygenase activities, 7-pentoxoresorufin O-depethylase, which is associated with CYP2B1, was dose-dependently increased by alachlor. The induction relative to control activity was 1.7-4.2-fold. The activities of CYP1A-dependent monooxygenases such as 7-ethoxyresorufin O-deethylase and acetanilide 4-hydroxylase were also significantly increased by alachlor at doses of 50 and 100 mg/kg (1.7-2.1-fold). Furthermore, immunoblotting showed that alachlor significantly increased CYP2B1/2 and CYP1A1/2 protein levels by 4.2-6.3- and 1.8-fold, respectively. However, there was no significant change in the protein levels of CYP2C11/6, CYP2D1, CYP2E1, CYP3A2/1 and CYP4A1/2/3. These results suggest that alachlor selectively induces cytochrome P450 isoforms of the CYP1A and CYP2B subfamilies in rat liver microsomes, and that the expression of these isoforms is closely related to the toxicity of alachlor.

Keywords: Alachlor, Cytochrome P450, Rat liver microsomes

Hanioka, N., Ozawa, S., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T., Ando, M., Sawada, J.: **Interaction of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) with human cytochrome P450 enzymes**
Drug Metab. Dispos., **30**, 391-396 (2002)

The inhibition and mechanism-based inactivation potencies of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite

(SN-38) for human cytochrome P450 (P450) enzymes were investigated to evaluate the potential for drug interactions involving CPT-11 using microsomes from insect cells expressing specific human P450 isoforms. CPT-11 and SN-38 competitively inhibited CYP3A4 activity with K_i values of 129 and 121 μM , respectively. CYP2A6 and CYP2C9 activities exhibited a mixed type of inhibition comprising competitive and noncompetitive components in response to SN-38, the K_i values being 181 and 156 μM , respectively. However, no inactivation of CYP2A6 and CYP2C9 by SN-38 was observed. These results mean that CPT-11 and SN-38 interact with human P450 isoforms, such as CYP2A6, CYP2C9, and CYP3A4, in vitro and imply that the significant drug interactions involving CPT-11 may be caused by a mechanism-based inactivation of CYP3A4 by SN-38 as an active metabolite of CPT-11 rather than competitive inhibition.

Keywords: Irinotecan, SN-38, Cytochrome P450

徳永裕司, 鄭 然孫, 内野 正, 安藤正典: **フタル酸ジエチルの *In Vitro* 経皮吸収に関する研究**
日本化粧品技術者会誌, **35**, 312-316(2001)

内分泌攪乱化学物質の一種として化粧品に含まれると想定されるフタル酸ジエチル (DEP) の経皮吸収的な試験をモルモットの腹部の剥離皮膚を用いて検討した。Franz型拡散セルに装着した後, 10 mM ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 10 mM 塩化ベンザルコニウム (BK) あるいは0.5%ポリオキシエチレン (10) オレイルエーテル (POE.OE) 溶液を donor 側に加え, 32°C で2時間放置した。donor 側の界面活性剤を除き, 0.05% DEP 溶液を donor 側に加えた。32°C で16~24時間でのDEPの receptor 側への透過量がHPLCで測定された。HPLC Unisil Q C₁₈ (4.6 mm × 150 mm) カラム, 移動相として, 水/アセトニトリル混液 (1:1) 及び255 nmの分光光度計を用いた。皮膚をSDS, BKあるいはPOE.OEで処理したとき, DEPの透過速度は, controlに対して190, 174あるいは110%と増加し, 使用された界面活性剤が皮膚角質層に影響を与えることが示唆された。また, フタル酸ジエチル溶液中にSDS, BKあるいはPOE.OEを共存させた場合, DEPのFluxは, controlに対して, それぞれ, 82.0, 105.7及び99.5%を示し, SDSが共存した場合, DEPの透過量が低下することが示唆された。24時間でのDEPの累積透過量は21.8 g/cm²であった。

Keywords: diethyl phthalate, skin permeation, Franz type diffusion cell

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: **化粧品に配合が禁止**

されている成分の分析法に関する研究：ビタミンL1
および塩酸ピロカルピンについて
粧技誌, 35, 305-311 (2001)

ビタミンL1および塩酸ピロカルピンは、昭和61年の厚生省通知（昭和61年3月12日薬審2第100号）により化粧品への配合禁止成分となっている。我々は配合禁止成分の有無を効率よく確認し、化粧品の安全性を確保するためにビタミンL1および塩酸ピロカルピンの高速液体クロマトグラフィーによる定量法を確立し、化粧品への応用について検討した。化粧水及び乳液中のビタミンL1及び塩酸ピロカルピンをメタノールで抽出し、ODSカラム（Shiseido CAPCELL PACKC₁₈, 4.6×250 mm）、移動相として50 mMリン酸塩緩衝液（pH 5）/アセトニトリル混液（37:3）又は（19:1）、検出器として紫外吸光度計（測定波長244 nm又は214 nm）を用い、高速液体クロマトグラフィーで分析した。この方法を用いることにより、化粧水及び乳液中のビタミンL1又は塩酸ピロカルピンを原料の影響もなく定量することが出来ることを明らかにした。

Keywords: vitamine L1, pilocarpine hydrochloride, HPLC

Uchino T., Tokunaga H., Onodera H. and Ando M. :
Effect of squalene monohydroperoxide on cytotoxicity
and cytokine release in a three-dimensional human
skin model and human epidermal keratinocytes
Biol. Pharm. Bull., 25, 605-610 (2002)

In order to clarify that squalene monohydroperoxide (SQOOH) correlates with changes in morphology through cytotoxicity and establish in vitro evaluation of the cytotoxicity of lipid hydroperoxide, the effect of SQOOH on cytotoxicity and morphology in normal human epidermal keratinocytes and the Gunze three-dimensional cultured human skin model was investigated. A concentration-dependent and protective effect on the increase in cytotoxicity and PCOOH content was observed. IL-2 release from the cells was enhanced by SQOOH and increased at a non-cytotoxic dose.

These results suggest that the increase in lipid hydroperoxides resulting from the auto-oxidation of lipids within cellular membranes in the presence of SQOOH correlates with changes in morphology due to cytotoxicity. SQOOH enhanced the IL-2 release from the cells at a non-cytotoxic dose. A method for assessing the protective effect on the cytotoxicity of lipid hydroperoxides using cells would be useful for in vitro evaluation of the cytotoxicity.

Key words: squalene monohydroperoxide, cytotoxicity, IL-2

Toyo'oka, T.* , Tanabe, J.* , Jinno, H.: Determination of
rat hepatocellular glutathione by reversed-phase liquid
chromatography with fluorescence detection and
cytotoxicity evaluation of environmental pollutants
based on the concentration change.

Biomed. Chromatogr. 15, 240-247 (2001)

Three methods for the determination of rat hepatocellular thiols by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection have been developed. The thiols in the cells were tagged with three fluorogenic reagents, SBD-F, ABD-F and DBD-F. These reagents could permeate into cells and effectively reacted with thiols to produce highly fluorescent derivatives. The five biological thiols tagged were perfectly separated by reversed-phase liquid chromatography and were sensitively and selectively detected without any interference from endogenous substances. The proposed procedures were applied to the determination of hepatocellular GSH after treatment of environmental pollutants such as volatile organic compounds and endocrine disrupting chemicals.

Keywords: Rat hepatocellular glutathione, HPLC with fluorescence detection, Environmental pollutants

* School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Japan.

佐々木久美子, 辰濃 隆*¹, 中村宗知*², 金子正堅*³,
後藤修宏*⁴, 近藤安昭*¹, 高畑 薫*⁵, 三浦嘉巳*⁶,
豊田正武：食品衛生法告示酸化フェンブタズ及びシ
ヘキサチン試験法の評価

食品衛生学雑誌, 42, 210-214(2001)

殺ダニ剤酸化フェンブタズ (FBTO) 及びシヘキサチン (CHT) の告示試験法評価のために6分析機関で共同実験を行った。玄米等6作物からのFBTO回収率の平均値は85.2～96.5%, CHTのそれは大豆を除いて83.5～89.2%であった。FBTO回収率の併行再現性及び室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ2.3～9.4%, 3.9～12.6%, CHTのそれらは3.2～6.3%, 8.3～12.9%であった。検出限界は0.015～0.05 µg/g (FBTO), 0.005～0.02 µg/g (CHT) であった。

Keywords: fenbutatin oxide, cyhexatin, method-performance study

*¹ (社) 日本食品衛生協会

*² (財) 日本食品分析センター

*³ (財) 日本穀物検定協会

*⁴ (社) 日本海事検定協会

*⁵ (社) 東京都食品衛生協会

*6 (財)千葉県薬剤師会検査センター

佐々木久美子, 辰濃 隆^{*1}, 中村宗知^{*2}, 穴沢 昭^{*3},
今澤 剛^{*4}, 宇都宮 領^{*5}, 寺澤真二^{*6}, 長田はるみ^{*7},
金子正堅^{*8}, 豊田正武: **食品衛生法告示イナベン
フィド試験法の評価**

食品衛生学雑誌, 42, 269-272(2001)

植物成長調整剤イナベンフィドの告示試験法評価のため
に共同実験を行った。6分析機関でイナベンフィドを
添加した玄米を分析したときの平均回収率は85.0%, 併
行再現性及び室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ
4.2%, 8.1%と良好な結果が得られた。検出限界は
0.002~0.01 µg/gであった。

Keywords: inabenfide, method-performance study

- *1 (社)日本食品衛生協会
- *2 (財)日本食品分析センター
- *3 (財)東京都予防医学協会
- *4 (財)東京顕微鏡院
- *5 (財)食品環境検査協会
- *6 (社)日本油料検定協会
- *7 (財)日本冷凍食品検査協会
- *8 (財)日本穀物検定協会

佐々木久美子, 辰濃 隆^{*1}, 中村宗知^{*2}, 穴沢 昭^{*3},
今澤 剛^{*4}, 宇都宮 領^{*5}, 大島辰之^{*6}, 長田はるみ^{*7},
金子正堅^{*8}, 豊田正武: **食品衛生法告示キノメチ
オネート試験法の評価**

食品衛生学雑誌, 42, 273-277(2001)

殺虫殺菌剤キノメチオネートの告示試験法評価のため
に共同実験を行った。6分析機関でキノメチオネートを
添加した玄米, キャベツ等5作物を分析したときの各作
物における平均回収率は90.2~100.5%, 併行再現性及
び室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ4.4~7.7%,
10.9~17.1%であった。検出限界は0.003~0.012 µg/g
であった。

Keywords: chinomethionat, method-performance study

- *1 (社)日本食品衛生協会
- *2 (財)日本食品分析センター
- *3 (財)東京都予防医学協会
- *4 (財)東京顕微鏡院
- *5 (財)食品環境検査協会
- *6 (社)日本油料検定協会
- *7 (財)日本冷凍食品検査協会
- *8 (財)日本穀物検定協会

佐々木久美子, 辰濃 隆^{*1}, 中村宗知^{*2}, 今澤 剛^{*3},
宇都宮 領^{*4}, 近藤安昭^{*1}, 長田はるみ^{*5}, 高畑 薫^{*6},
豊田正武: **食品衛生法告示クロフェンテジン試験**

法の評価

食品衛生学雑誌, 42, 278-282(2001)

殺ダニ剤クロフェンテジンの告示試験法評価のために
共同実験を行った。6分析機関でクロフェンテジンを添
加した小豆, りんご等7作物を分析したときの回収率の
平均値は78.4~85.2%, 併行再現性及び室間再現性の相
対標準偏差はそれぞれ2.2~4.6%, 4.8~10.3%と良好
な結果が得られた。検出限界は0.005~0.01 µg/gであ
った。

Keywords: clofentezine, method-performance study

- *1 (社)日本食品衛生協会
- *2 (財)日本食品分析センター
- *3 (財)東京顕微鏡院
- *4 (財)食品環境検査協会
- *5 (財)日本冷凍食品検査協会
- *6 (社)東京都食品衛生協会

遠藤和香子*, 勝村利恵子*, 鷹野祐子*, 安生孝子*,
福原克治*, 松木容彦*, 小野 宏*, 佐々木久美子,
合田幸広, 豊田正武: **残留農薬分析用市販標準品の化
学的性状に関する調査研究**

食品衛生研究, 52(4), 7-26(2002)

食品衛生法に基づく残留農薬の検査に使用する標準品
は, 法律で純度が定められている。検査機関は各メーカ
ーの提供する市販の標準品を購入して検査に使用してい
る。しかし, 市販の標準品には定められた純度基準を逸
脱しているものがあり, また, 純度は各メーカー独自の
方法でそれぞれ算出されており, 品質比較が出来ない。
そこで3メーカーから市販されている標準品29種につい
てHPLC及びGCを用いた同一の方法で品質評価を行い,
その結果について報告した。

Keywords: pesticide, standard compounds

* (財)食品薬品安全センター秦野研究所

根本 了, 小村麻子, 高附 巧, 佐々木久美子, 豊田
正武: **食品中の2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノール及
び関連化合物の分析**

食品衛生学雑誌, 42, 359-366(2001)

第一種特定化学物質である2,4,6-tri-tert-butylphenol
(TTBP)について, 食品中から水蒸気蒸留で抽出し
GC/MS (SIM) で測定する分析法を開発した。開発し
た方法は, di-tert-butylphenol (DTBP) の3種の異性
体 (2,4-DTBP, 2,6-DTBP及び3,5-DTBP) 及び2,4-
di-tert-pentylphenol (2,4-DTPP) の同時分析が可能で
あった。市販の食品101検体について汚染実態調査を行
った結果, TTBPは肉類, レバー及び魚介類(筋肉)か
らそれぞれ痕跡量(tr)~0.50 ng/g, 痕跡量及びtr~1.83
ng/g検出された。2,4-DTBPは野菜・精白米, 肉類, レ

バー, 魚介類 (筋肉) 及び魚介類 (内臓) からそれぞれ 1.4~10.6 ng/g, 2.7~26.4 ng/g, tr~34.2 ng/g, tr~21.6 ng/g 及び痕跡量検出された. 2,6-DTBP は魚介類 (筋肉) 及び魚介類 (内臓) からそれぞれ tr~3.9 ng/g 及び痕跡量検出された. 3,5-DTBP 及び 2,4-DTPP は分析したいずれの食品からも検出されなかった.

Keywords: 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol, steam distillation, GC/MS

高附 巧, 根本 了, 佐々木久美子, 豊田正武:
HPLC 及び LC/MS による果実中のエチクロゼート及び分解物の分析法

食品衛生学雑誌, 43, 30-34 (2002)

果実中のエチクロゼート (CIE) 及び分解物の 5-chloro-3(1H)-indazolylacetic acid (CIA) の HPLC 及び LC/MS による分析法を確立した. 試料から塩酸酸性下, CIE 及び CIA をアセトンで抽出後, エーテル-ヘキサン (2:1) で再抽出し, メタノール-4mol/L 水酸化カリウム溶液 (1:1) で CIE を CIA に加水分解した後, 塩酸酸性として CIA をエーテル-ヘキサン (2:1) で抽出した. これをシリカゲルカラムで精製し, HPLC-UV 及び LC/MS で測定した.

4 種の果実に CIE 又は CIA を 0.5 µg/g 添加し HPLC で測定したときの平均回収率は, それぞれ 77.2~83.2%, 71.2~89.2% であった. LC/MS で定量した時の値は, これらより 10~25% 高かった. CIA 標準液の検出限界は, 試料中の CIE に換算して 0.015 µg/g (HPLC), 0.009 µg/g (LC/MS:SIR) であった.

Keywords: ethychlozate, pesticide residue, LC/MS

Hori, T.*, Nakagawa, R.*, Tobiishi, K.*, Iida, T.*, Tsutsumi, T., Sasaki, K., Toyoda, M.: Effects of cooking on concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds in green leafy vegetable 'Komatsuna'

J. Food Hyg. Soc. Japan, 42, 339-342 (2001)

The effects of ordinary household cooking processes on concentrations of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs (dioxins) were investigated in 'Komatsuna', a green leafy vegetable popular in Japan. The concentrations of dioxins were compared using isomer-specific analyses of both uncooked and cooked edible parts of the plant. The mean total 2,3,7,8-chlorine substituted PCDD and PCDF concentrations were reduced from 46.53 pg/g and 0.714 pg/g to 8.301 pg/g and 0.210 pg/g by washing with tap water, and further reduced to 6.054 pg/g and 0.148 pg/g by subsequent boiling, respectively. The cooking processes markedly decreased the concentrations of

PCDD/Fs, while having little effect on those of dioxin-like PCBs. The mean total TEQ concentration was reduced from 0.058 pgTEQ/g to 0.026 pgTEQ/g by washing with tap water and further reduced to 0.019 pgTEQ/g by subsequent boiling. These results suggest that ordinary cooking processes provide a means of reducing the level of dioxins in green leafy vegetables.

Keywords: dioxin(s); vegetable; cooking

* Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

Tsutsumi, T., Yanagi, T.*¹, Nakamura, M.*¹, Kono, Y.*¹, Uchibe, H.*¹, Iida, T.*², Hori, T.*², Nakagawa, R.*², Tobiishi, K.*², Matsuda, R., Sasaki, K., Toyoda, M.: Update of daily intake of PCDDs, PCDFs, and Dioxin-like PCBs from food in JAPAN

Chemosphere, 45, 1129-1137 (2001)

Total diet study samples of fourteen food groups from sixteen locations in Japan, collected in 1999 and 2000, were analyzed for PCDD/Fs and dioxin-like PCBs to estimate of update of daily intake of these contaminants from food. The mean daily intake was estimated to be 2.25 pg TEQ/kg b.w./day (3.22 pg TEQ/kg b.w./day) calculated at ND=0 (ND=1/2 LOD). In the both estimates, the mean daily intakes were highest from fish and shellfish (76.9% at ND=0 and 53.9% at ND=1/2 LOD of the total TEQs), followed by that from meat and eggs (15.5% at ND=0 and 11.7% at ND=1/2 LOD of the total TEQs). Congener specific data revealed that these total TEQ levels were dominated by 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF and 3,3', 4,4', 5-PeCB in each case (71.7% at ND=0 and 63.1% at ND=1/2LOD of the total TEQs). The dioxin-like PCBs accounted for about 50% of these total TEQs. These data will be very useful in risk assessment of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs from food in Japan.

Keywords: dioxins, total diet study, dietary intake

*¹ Japan Food Research Laboratories, Tama Laboratory

*² Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

Tsutsumi, T., Iida, T.*¹, Hori, T.*¹, Nakagawa, R.*¹, Tobiishi, K.*¹, Yanagi, T.*², Kono, Y.*², Uchibe, H.*², Matsuda, R., Sasaki, K., Toyoda, M.: Recent survey and effects of cooking processes on levels of PCDDs, PCDFs and Co-PCBs in leafy vegetables in JAPAN

Chemosphere, 46, 1443-1449 (2002)

We report here the latest levels of PCDD/Fs and Co-PCBs in leafy vegetables in Japan as well as the effect of cooking processes on the reduction of these

contaminants. Three kinds of leafy vegetables from seven districts in Japan in 1998 were analyzed for PCDD/Fs and non-ortho PCBs. The mean total TEQ levels in the "komatsuna", lettuce and spinach were 0.094, 0.025 and 0.196 pg/g fresh weight, respectively. The TEQ levels are dominated by 2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 2,3,4,7,8-PeCDF and 3,3', 4,4', 5-PeCB in many of the samples. For one of these isomers, the 2,3,4,7,8-PeCDF TEQ levels showed good correlation with the total TEQ levels in the samples ($r=0.957$). This suggests that 2,3,4,7,8-PeCDF may be an indicator for dioxin contamination in the analysis of the leafy vegetables. Also, the effects of two cooking processes (washing and washing followed by boiling) on the dioxin levels in two types of spinach samples were investigated. On average, in both samples, the total concentrations of the PCDDs, PCDFs and Co-PCB were reduced to about 38%, 73% and 88% of the initial concentrations by washing, and to 21%, 35% and 61% of the initial concentrations by washing followed by boiling. The total TEQ levels were reduced to about 30% of the initial TEQ levels by washing followed by boiling. Thus, the cooking processes may reduce the risk of dioxin intake from the leafy vegetables.

Keywords: dioxins, cooking processes, vegetables

*¹ Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

*² Japan Food Research Laboratories, Tama Laboratory

Amakura, Y., Lou, H. *², and Yoshida, T *¹.: **Tannins and flavonol glycosides from the leaves of *Euphorbia pekinensis***

Natural Medicines, 55, 313 (2001)

The dried leaves of *E. pekinensis* collected in China were homogenized in 70% acetone and filtered. A concentrated solution was extracted successively with Et₂O, AcOEt and *n*-BuOH. Each extract was subjected to a combination of chromatography to give four flavonols and thirteen hydrolyzable tannins (7 monomers and 6 dimers). All of the dimeric tannins isolated had a characteristic feature of the Euphorbiaceae, which contains geraniin and related unit possessing a dehydrohexahydrodiphenoyl (DHHD) group, as a partial structure.

Keywords: *Euphorbia pekinensis*, Euphorbiaceae, tannins

*¹ 岡山大学

*² Department of Pharmacy, Shandong Medical University

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M. *¹, Kitagawa,

H. *¹, Fujino, J. *¹, Sasaki, K., Yoshida, T. *², and Toyoda, M.: **Preliminary screening of the inhibitory effects of food extracts on activation of the aryl hydrocarbon receptor induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin**

Biol. Pharm. Bull., 25, 272-274(2002)

A preliminary screening for the inhibitory effects on the activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) by applying AhR-based bioassays for dioxins, the Ah-Immunoassay and CALUX assay, was attempted. Thirty-nine food extracts including vegetables, fruits, herbs, and teas were initially screened *in vitro*. We first examined the application of both bioassay methods using green tea extracts and (-)-epigallocatechin gallate, reported antagonists of the AhR, since the results could reveal an inhibitory effect versus the control in both assays. Food extracts were then tested. Among the herbs, extracts of sage, among the vegetables, green leafy ones such as spinach, and among the fruit, citrus showed inhibitory effects on AhR activation by TCDD, although some tested samples did not show parallel behavior in both assays. Sage had a remarkable inhibitory effect (83% in the CALUX assay and 79% in the Ah-Immunoassay compared with control) and its effects were dose dependent. The results suggest that these assays might be applicable to the preliminary screening of antagonist activity against the AhR. Moreover, based on these results, the potential benefit of factors that function as dietary ligands of the AhR and are present in several foodstuffs is indicated.

Keywords: foods, aryl hydrocarbon receptor, dioxins

*¹ 株式会社日吉

*² 岡山大学

岩木和夫*, 大羽宏*, 勝峰万里*, 小澤さやか*, 松田りえ子, 林譲: **ダイオキシン類のGC/HRMS測定における検出下限の推定法の比較**

環境化学, 11, 173-180 (2001)

GC/HRMSによるダイオキシン類の検出下限を, くり返し測定に基づく方法, S/N比に基づく方法, FUMI理論による方法により求め, 比較した. ピーク高さのくり返し再現性から求めた検出下限は特に大きい値となったが, 他の方法による値はほぼ同程度であった. また, 検出限界を数回求めたとき, FUMI理論による方法が最も変動の少ない結果となった.

Keywords: limit of detection, dioxins, FUMI theory

* 荏原製作所

Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., *, Toyoda, M.: **Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up**

J. Chromatogr. A, **932**, 153-157 (2001)

A rapid and simple method using a multifunctional column, which contains lipophilic and charged active sites, was developed to analyse aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in various spices, such as red pepper and nutmeg. After extraction by acetonitrile: water (9:1) and clean-up using MultiSep #228 column, the aflatoxins and aflatoxin-TFA derivatives are determined using LC with fluorescence detection. Recoveries of each aflatoxin B1, B2, G1 and G2 spiked to red pepper, white pepper, black pepper, nutmeg and tear grass at the level of 10 ng/g were over 80-85% in all instances. The minimum detectable concentration for aflatoxins in red pepper was 0.5 ng/g

Keywords: Spices, Multifunctional column, Aflatoxins

* Kobe Institute of Health

Akiyama, H., Teshima, R., Sakushima, J., Okunuki, H., Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M.: **Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and thress strains of mice**

Immunology Letters, **78**, 1-5 (2001)

We studied the oral feeding of food allergens conditions needed to sensitize animals without induction of tolerance in order to investigate the allergenicity of orally ingested food proteins. BN rats were sensitized by daily OVA (ovalbumin)-gavage or by drinking water ad libitum and the ASA (active systemic anaphylaxis) response, as the immediate hypersensitivity response to antigen stimulation after oral sensitization, was examined. The oral administration of OVA by gavage produced a higher OVA-specific IgE response and an increase in serum histamine after antigen challenge, as compared to those produced by drinking water. Next, we examined the effect of murine age, the oral feeding technique and the oral feeding dose on sensitization using BALB/c, B10A and ASK mice. Twenty-week old mice show the strongest OVA-specific IgE and IgG1 responses and ASA-associated serum histamine contents increased with gavage in the three different age groups of BALB/c mice. Administering 0.1 mg of OVA by gavage daily for 9 weeks appeared to induce a higher response than administering 1 mg of OVA in terms of OVA-specific IgE and IgG1 antibody response and ASA responses. Among the three strains of mice, B10A mice exhibited the highest response

in terms of OVA-specific IgE and IgG1 antibody and ASA responses. These findings suggested BN rats and B10A mice to be suitable models for oral sensitization with antigen protein, and that oral sensitization in mice requires low dose, intermittent antigen intakes.

Keywords: ovalbumin, oral sensitization, B10A mice

穂山浩, 杉本和恵, 松本美佐緒, 五十鈴川和人, 渋谷雅明*, 合田幸広, 豊田正武: **遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus Potato) からの組換え遺伝子検知法の確立及びスナック菓子からの検知**

食品衛生学雑誌 **43**, 24-29 (2002)

日本で安全性審査未終了の遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Plus potato; NL-P) について, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた検知法を検討した. 陽性対照プライマー対は, Potato sucrose synthase 遺伝子を認識するものを用いた. ジャガイモ葉巻ウイルスの replicase (PLRV-rep) 遺伝子を認識するプライマー対により PCR を行った結果, NL-P に特異的なバンドが検出された. さらに擬陽性を避けるために, 2 生物種由来の連続した遺伝子領域を増幅するプライマー対を設計し, 特異的に NL-P が検知されることが明らかとなった. 確立した PCR 検知法をジャガイモ加工品 25 検体に応用したところ, スナック菓子 3 検体から NL-P が検出された.

Keyword: : genetically modified potato, recombinant DNA, NewLeaf Plus potato

* 東京大学大学院薬学系研究科

後藤典子*, 田辺 寛子*, 宮原 誠: **電子線照射牛生挽肉の炭化水素法による検知**

食品照射, 2001, **36**, 13-22

円柱状の牛挽肉に 5MeV の電子線を片面照射し, 中心軸に近い部分を深度方向に従って 1g ずつ試料を採取し, それぞれの深度における炭化水素の量を測定した. 炭化水素の量は表面から 7-10mm のところが最大になり, 深さ 25 から 30mm で不検出となった. この深度-生成量の関係は理論計算による深度-線量分布の関係に類似していた. しかし, この円柱の中心軸からはずれた, 外縁部においては, 深さ 20 から 30mm においても炭化水素の生成が認められた.

Keywords: identification by hydrocarbon detection, irradiated food, electron beam irradiation

* 東京都産業技術研究所 駒沢放射線利用施設

田辺 寛子*, 後藤典子*, 宮原 誠: **2-アルキルシクロブタノン法による照射鶏肉の検知**

食品照射, 2001, **36**, 26-32

定法により, 照射鶏肉より2-アルキルシクロブタノンを定量し, 照射の有無を検知した. 2-ドデシルシクロブタノン, 2-テトラデシルシクロブタノンを指標とした場合は3kGy, 2-(5-テトラデセニル)シクロブタノンを指標とした場合1kGyから検知が可能であった.

Key words: 1-cyclobutanones, identification, irradiated food

* 東京都産業技術研究所 駒沢放射線利用施設

Makoto Miyahara, Hitoshi Ito *, Kouji Ueno **, Yutaka Yamase **, Masatake Toyoda : **Evaluation of Several Dosimeters for Identification of Irradiated Foods Using a 5 MeV Electron Beam.**

J. Health Sci., **48**, 37-41(2002)

Electron-beam irradiation facilities are commercially utilized for food irradiation. This study investigates whether dosimeters used to detect gamma-rays can also be used to accurately detect electron-beam irradiation. The irradiation sources for gamma-ray at the Takasaki Institute were used throughout this study. Four kinds of dosimeters, RadiaChromic(RC), GammaChromic(GC), Amber3042 (AM), Radix(RX), and alanine(AL) were irradiated at doses from 0.1 to 60 kGy using a 5 MeV electron-beam(EB) at the Japan Irradiation Service Co. LTD. AL was submitted to the National Physics Laboratory in order to evaluate the doses that AL were absorbed. At low-level dose range, all dosimeters indicated correct values. This means those dosimeters were usable to accurately detect electron beam irradiation. But at higher range they all required correction due to either temperature effects or varying sensitivity to electron-beam exposure. Dose-depth profiles were obtained using ham and cheese samples, in order to check penetration of EB by the calibrated machine.

Keywords: electron-beam irradiation, dosimeter, food irradiation

* Japan Atomic Energy Research Institute Takasaki Establishment

** Japan Irradiation Service Co.

Makoto Miyahara, Taeko Nagasawa *, Tomomi Kamimura *, Hitoshi Ito **, Masatake Toyoda, and Yukio Saito : **Identification of irradiation of boned chicken by determination of o-tyrosine and electron spin resonance spectrometry**

J. Health Sci., **48**, 79-82(2002)

Ortho-tyrosine detection methods is used for detection

of irradiation of protein-rich foods. A new procedure determining o-tyrosine was examined in regard to the identification of food having undergone ionization treatment. A new fluorometric HPLC method allows the detection of irradiated foods at 10k Gy. This method was compared with an ESR method recommended by European countries recommended for the detection of irradiated foods. The method is applied only few food samples that contain bone or cellulose.

The dose response of the o-tyrosine production was linearly increased upto 30 kGy. ESR signals in chicken bone were recorded after being dried in desiccator. The dose response of the ESR signal was observed at two weeks after irradiation, and a linear relationship was observed. ESR signal intensity was correlated with the logarithm of o-tyrosine production to confirm the performance and a good relationship was observed.

Keywords: ESR, o-tyrosine detection, identification of irradiated foods

* School of Allied Health Sciences Kitasato University

** Japan Atomic Energy Research Institute Takasaki Establishment

Makoto Miyahara, Akiko Saito *, Hitoshi Ito **, and Masatake Toyoda: **Identification of Low-level gamma Irradiation of Meats by High Sensitivity Comet Assay**
Radia. Phys. Chem. **63**, 451-454 (2002)

Detection of low level irradiation in meats (pork, beef, and chicken) using a new comet assay was investigated in order to assess the capability of the procedure. The new assay includes a process to make it sensitive to irradiation and a novel evaluation system for each slide (influence score and distribution of comet type). Samples used were purchased at retailers and were irradiated at 0.5 and 2kGy at 0 °C. The samples were processed to obtain comets. Slides were evaluated by typing comets, and calculating the influence score and analyzing distribution chart of comet type shown on the slide. Influence scores of beef, pork, and chicken at 0 kGy were 287(SD=8.0), 305 (SD=12.9), and 320 (SD=21.0), respectively. Those at 500Gy, were 305 (SD=5.3), 347 (SD=10.6), and 364 (12.6), respectively. Irradiation levels in food were successfully determined. Sensitivity of the samples to irradiation was differed among them(chicken > pork > beef).

Keywords: comet assay, irradiated food, low level dose

* School of Allied Health Sciences, Kitasato University

** Japan Atomic Energy Institute Takasaki Establishment

Hiroko Tanabe*, Michiko Goto*, Makoto Miyahira
:Detection method of irradiated chicken by GC analysis
of 2-alkylcyclobutanones and hydrocarbons using
Soxhlet extraction and Florisil chromatography
Radioisotopes, 51, 109-119(2002)

A procedure was established for the detection of irradiated chicken by GC/FID analysis of 2-alkylcyclobutanones(RCB) and hydrocarbons (HC) using simultaneous cleanup by soxhlet extraction and florisil chromatography as stated following.

Fat extract was obtained from irradiated chicken by soxhlet apparatus. The concentrated fat extract which contains 200 mg of fat with 2 μ g of n-eicosane(IS) was applied to florisil column deactivated by adding 17 parts of water to 100 parts of adsorbent, and HC and RCB were separated from fat.

The HC were eluted in 60mL of the eluate. This eluate was concentrated and analyzed by GC/FID. After 150mL of n-hexane eluted from the same column, RCB were eluted with 120mL of 1% diethylether solution in n-hexane. This eluate was concentrated to 0.2mL and was added 0.1 μ g of 2-cyclohexylcyclohexanone (IS) and analyzed by GC/FID. This process made it possible to detect HC and RCB efficiently and simultaneously by one time operation of analysis.

In this study, HC and RCB were detected from chicken irradiated at 0.5kGy by GC/FID.

KeyWord: food irradiation, 2-alkylcyclobutanones(RCB), hydrocarbons (HC)

*Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute

田邊寛子*, 後藤典子*, 宮原 誠: 2-アルキルシクロブタンオンおよび炭化水素の同時分析 (GC/FID) による照射鶏肉の検知に関する考察
Radioisotopes, 51, 157-166(2002)

照射鶏肉の的確な検知のために脂肪の放射線分解によって生成する2-アルキルシクロブタンオンと炭化水素の同時分析を試みた。検出はGC/FIDで行った。0.5kGyから10kGy 0度, 照射において, これらの化合物の生成量は吸収線量に依存していた。しかし, 照射の判定基準として, 従来掲げられている方法に問題点があり, 新しい基準を提案した。

Keywords: food irradiation, 2-alkylcyclobutanone, radiolytic product

*東京都産業技術研究所 駒沢放射線利用施設

六鹿元雄, 太田久恵, 豊田正武, 合田幸広: 遺伝子組

換え及び非組換えパパイヤ中のカロテノイド成分の比較

食衛誌, 42, 367-373 (2001)

ウイルス抵抗性遺伝子組換えパパイヤ及び, 非組換えパパイヤに含有されるカロテノイド成分の構造決定とその含有量についての比較をおこなった。フォトダイオードアレイ検出LC/MSによる解析の結果, 主カロテノイドは β -カロテン, リコペン, β -クリプトキサンチン及び, そのカプロイル (C10), ラウロイル (C12) エステル体であった。これら5種の化合物について, 両パパイヤの含有量を比較検討した。果実の中央より可食部を取り出し, 凍結乾燥後, メタノールで抽出, その後, ヘキサンとメタノールで分配抽出し, ヘキサン抽出物をHPLCで分析した。その結果, 総カロテノイド量, 総 β -クリプトキサンチン量に有意な差は観察されなかった。

Keywords: genetic modified, papaya, carotenoid

Sugimoto N., Kikuchi H., Yamazaki T., Maitani T. :
Polyphenolic Constituents from Leaves of *Rubus suavisissimus*

Natural Medicines, 55, 219 (2001).

The hot water extract from the leaves of *R. suavisissimus*, named "tenryocha extract", is used as a natural sweetener. Seven peaks of compounds 1-7 were mainly observed in tenryocha extract by HPLC over SP-120-5-ODS-BP eluting with 2% HCO₂H/MeOH. The extract was chromatographed by prep. HPLC under the same conditions as described above, affording gallic acid (1), ellagic acid (2), 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (3), brevifolin carboxylic acid (4), sanguisorbic acid dilactone (5), caffeic acid (6), and 1- α -galloyl-2,3-(S)-hexahydroxy-diphenoyl-D-glucose (sanguin H-4) (7). This is the first report on the isolation and characterization of compounds 3, 4, and 7 from *R. suavisissimus*.

Keywords: *Rubus suavisissimus* S. LEE, 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid, Sanguin H-4

Yun, Y. S., Sugimoto, N., Sekita, S., Maitani, T., Satake, M.: A Cembrane-type diterpen from flue-cured burly tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves

Natural Medicines, 55, 262-264 (2001)

A new diterpene, named (1E, 3Z, 5E, 7Z, 11E)-1-isopropyl-4,8,12-trimethyl-1,3,5,7,11-cyclotetradecapentaene was isolated from an AcOEt extract of flue-cured burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves, and the structure was determined on the basis of spectral data.

Keywords: *Nicotiana tabacum* L., diterpene, cembrane

Sugimoto, N., Fukuda, J., Takatori, K., Yamada, T., Maitani, T.: **Identification of Principal Constituents in Enzymatically Hydrolyzed Coix Extract**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **42**, 309-315 (2001)

The structural elucidation of main constituents in enzymatically hydrolyzed coix extract, a natural food preservative, was carried out. After peracetylation, five compounds, namely peracetylated forms of glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, and maltopentaose were isolated. These structures were determined by PFG HMQC and HMBC experiments. In addition, by using HPLC with an RI detector, the main components of this coix extract were identified as a mixture of oligosaccharides having one to seven glucose units conjugated by α -(1→4) linkages. Since this extract showed no antimicrobial activity, its preservative effect may be caused by its covering of the food surface, which blocks the contact with air.

Keywords: enzymatically hydrolyzed coix extract, *Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen STAPF, natural preservative

Sugimoto, N., Kawasaki, Y., Sato, K., Aoki, H. *, Ichi, T. *, Koda, T. *, Yamazaki, T., Maitani, T.: **Structure of Acid-Stable Carmine**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **43**, 18-23 (2002)

Acid-stable carmine has recently been distributed in the U. S. market because of the acid stability. But it is not permitted in Japan. We analyzed and determined the structure of the major pigment in acid-stable carmine, in order to establish the analytical method for it. Carminic acid was transformed into a different type of pigment, named acid-stable carmine, through amination when heated in ammonia solution. The features of the structure were clarified using a model compound purpurin, whose orientation of hydroxyl groups on the A ring of an anthraquinone skeleton is the same as carminic acid. By spectroscopic means and the synthesis of acid-stable carmine and purpurin derivatives, the structure of the major pigment in acid-stable carmine was established as 4-aminocarminic acid, a novel compound.

Keywords: acid-stable carmine, carminic acid, 4-aminocarminic acid

* San-Ei Gen F. F. I. Inc.

Uno, Y. *, Omoto, T. *, Goto, Y. *, Asai, I. *, Nakamura, M. *, Maitani, T.: **Molecular weight distribution of**

carrageenans studied by a combined gel permeation/ inductively coupled plasma (GPC/ICP) method

Food Additives and Contaminants, **18**, 763-772 (2001)

Degraded carrageenan (poligeenan, 20-30 kDa) causes ulcerative colitis in experimental animals. The molecular weight (MW) distributions of 29 samples of refined carrageenans were studied by GPC/ICP method as well as GPC/refractive index (RI) detection. All samples had a major broad peak of high MW which eluted at around 6.5 min in both RI and ICP mode (sulphur and carbon). No obvious peak of poligeenan was detected (the detection limit was about 5%). The number average MWs of these carrageenans ranged from 193 to 324 kDa, and the weight average MWs from 453 to 652 kDa. Some samples had a few minor peaks at 10-12 min. These peaks came from ionic sulphate, sucrose or glucose. It was considered that if the data-sampling programme was improved, the GPC/ICP system would become a more powerful technique for evaluation of carrageenan samples containing ionic substances and sugar.

Keywords: carrageenan, GPC/ICP, molecular weight distribution

* San-Ei Gen F. F. I., Inc.

宇野喜貴*, 大本俊郎*, 後藤康慶*, 浅井以和夫*, 中村幹雄*, 米谷民雄: **ラットに混餌投与されたカラギナンの糞中への排泄量と分子量**

日本食品化学学会誌, **8**, 83-93 (2001)

ラットにλタイプ精製カラギナンを混餌投与し、糞中カラギナンの分子量と含量をGPC/ICP-AES法で測定した。7週齢SD系ラット雌雄各1匹に、一夜絶食後、5%のλタイプ精製カラギナンを含む混餌飼料を1日間自由に摂取させ、その後2日間基礎飼料を摂取させた。投与開始1日後までに糞中排泄されたカラギナンの平均分子量は、雌雄平均でMn = 355 kDa, Mw = 782 kDa, 投与翌日の糞では、Mn = 300 kDa, Mw = 718 kDaであった。検体カラギナンの平均分子量はMn = 308 kDa, Mw = 832 kDaであり、カラギナンはラット消化管中でほとんど分解されないと考えられた。糞中カラギナン量は、混餌投与当日で雄659 mg, 雌466 mg, 翌日で377 mgと329 mg, 3日後で10 mgと6.0 mgであった。投与と採糞のスケジュールを考慮すると、投与カラギナンは、ほぼ1日以内に糞中に排泄されると考えられた。一方、投与カラギナンの糞中からの回収率は3日間の合計で約90%であり、これには糞中からの抽出率が影響していることも考えられた。

Keywords: carrageenan, GPC/ICP, molecular weight distribution

*三栄源エフ・エフ・アイ(株)

河村葉子, 中島明子, 山田 隆: **食品用天然ゴム製品中の残存化学物質**

食衛誌, 42, 179-184 (2001)

天然ゴム製の乳首, パッキング, 手袋, ハム用ネットなど12検体中の残存化学物質を検索したところ, 加硫促進剤のジメチルジチオカルバミン酸亜鉛, ジエチルジチオカルバミン酸亜鉛 (EZ), ジ-*n*-ブチルジチオカルバミン酸亜鉛 (BZ) 及び2-メルカプトベンゾチアゾールが各数千 $\mu\text{g/g}$ 検出されたほか, 酸化防止剤のBHT, Irganox 1076, Yoshinox 2246R, 可塑剤のフタル酸ジブチル, フタル酸ジ(2-エチルヘキシル), 滑剤のパルミチン酸, ステアリン酸, さらに植物ステロイドのシタグマステロール, β -シトステロールなども検出された。水, 4%酢酸, 20%エタノールではいずれの溶出もみられなかったが, *n*-ヘプタンではBHT, Yoshinox 2246R, EZ, BZ, ステロール類などの溶出がみられた。

Keywords: natural rubber, vulcanization accelerator, β -sitosterol

河村葉子, 中島明子, 六鹿元雄, 山田 隆, 米谷民雄: **食品用シリコンゴム製品中の残存化学物質**

食衛誌, 42, 316-321 (2001)

ゴム製品のうち食品用に最も広範に使用されているシリコンゴム製のほ乳びんなどの乳首, 密閉容器や魔法びんなどのパッキング, 調理用ヘラの合計23検体について残存化学物質を検討した。材質中には酸化防止剤のBHT, 可塑剤のフタル酸ジブチル及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) が検出されたが, 検出頻度, 検出量ともにそれほど高くはなく, 乳首からはいずれも検出されなかった。一方, 全検体からシロキサンが6~25個程度結合した環状ポリジメチルシロキサン群が検出された。残存量の合計は3,310~14,690 $\mu\text{g/g}$ と概算され, 主に未反応原料または副生成物由来と推定された。溶出試験において, 20%エタノールではいずれの溶出も認められなかったが, *n*-ヘプタンではDEHP及び環状ポリジメチルシロキサンの溶出がみられた。

Keywords: silicone rubber, food contact use, polydimethylcyclosiloxane

和久井千世子, 河村葉子, 米谷民雄: **使い捨て手袋における溶出物及び残存アクリロニトリルの分析**

食衛誌, 42, 322-328 (2001)

各種素材の使い捨て手袋について, 蒸発残留物, 溶出金属等, 溶出化学物質及び材質中のアクリロニトリルを分析した。フタル酸エステル含有及び非含有の塩化ビニル製手袋では, 蒸発残留物が*n*-ヘプタン溶出で870~

1,300ppmと極めて高く可塑剤由来と考えられた。後者の可塑剤の中には, 従来食品用途では使用されていないものがあつた。ポリエチレン製手袋では溶出物は少なかったが, 抗菌表示手袋から銅及び亜鉛の溶出が見られた。一方, 天然ゴム及びニトリルゴム製手袋は, 製品毎に溶出物の種類や量に大きな差異が見られた。約半数では4%酢酸溶出時に蒸発残留物と共に亜鉛やカルシウムの溶出量も高く, ジチオカーバメイト系加硫促進剤も検出された。ニトリルゴム手袋のアクリロニトリル残存量は0.40~0.94 $\mu\text{g/g}$ であつた。

Keywords: disposable glove, polyvinyl chloride, nitrile-butadiene rubber

馬場二夫*¹, 渡辺悠二*², 河村葉子, 山田耕平*³, 藤井正美*⁴: **ポリカーボネート製食器から高濃度のビスフェノールAが検出された原因の解明に関する研究**

日本食品化学学会誌, 8, 121-127 (2001)

1997年抗菌剤を含有するポリカーボネート製幼児用食器から高濃度のビスフェノールAが検出され問題となった。そこで, ポリカーボネートに6種類の酸化金属と当該抗菌剤を添加しペレットを調製したところ, 添加量に比例してビスフェノールAの増加がみられ, 特に酸化亜鉛で顕著であつた。酸化防止剤を添加すると, Irgafos 168ではあまり変化がみられなかったが, P-EPQでは明らかに生成抑制がみられた。以上から, 高濃度ビスフェノールAの生成原因は, 食器に添加された抗菌剤中の酸化亜鉛によるポリカーボネートの酸化分解促進および酸化防止剤の選択ミスによると結論された。

Keywords: bisphenol A, polycarbonate, anti-bacterial agent

*¹ 東大阪短期大学

*² 東京都立衛生研究所

*³ ポリオレフィン等衛生協議会

*⁴ 神戸学院大学

新野竜大*¹, 石橋 亨*¹, 伊藤 武*¹, 坂井千三*¹, 杉田たき子, 石綿 肇, 山田 隆*², 小野寺祐夫*³: **ポリ塩化ビニル製玩具中の可塑剤フタル酸エステルの分析: 1998年以降の市販品含有量調査**

日本食品化学学会誌, 8, 194-199 (2001)

ポリ塩化ビニル (PVC) 製玩具中のフタル酸エステル類 (PAEs) の分析を行った。玩具からのPAEsの抽出はアセトンを用い, 室温, 3時間, 回転振とうした。定量はHPLCで行い, GC/MSで確認した。フタル酸ジイソノニル (DINP) 500 mg/g含有のPVCプレートからの回収率は92%であつた。1999年11月~2000年2月に購入した玩具22製品からは, DINPが196-449mg/g (7製品), フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) が63-453mg/g (5製品)

検出された。また、フタル酸ジブチル及びアジピン酸ジ(2-エチルヘキシル)が39-118mg/g(3製品)及び63-254mg/g(3製品)それぞれ検出された。乳幼児が口に入れるのを目的とした玩具からはPAEsは検出されなかった。

Keywords: phthalate ester, plasticizer, polyvinyl chloride toy

*1 東京顕微鏡院

*2 日本食品添加物協会

*3 東京理科大

Niino, T.*¹, Ishibashi, T.*¹, Itho, T.*¹, Sakai, S.*¹, Ishiwata, H., Yamada, T.*², Onodera, S.*³: **Monoester Formation by Hydrolysis of Dialkyl Phthalate Migrating from Polyvinyl Chloride Products in Human Saliva**
J. Health Sci., **47**, 318-322 (2001).

ポリ塩化ビニル製玩具のチューイングにより溶出したジアルキルフタル酸エステルについて検討した。フタル酸ジ-*n*-ブチル(DBP) 100 mg/g, 及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP) 185 mg/gを含有するボールAからの溶出量は人工唾液による振とうでは、339及び315 µg/10 cm²/hr, ヒトチューイングでは11.7, 44.4 µg/10 cm²/hr, フタル酸ジイソノニル 256 mg/gを含有するボールBでは人工唾液による振とうで535 µg/10 cm²/hr, ヒトチューイングでは78.0 µg/10 cm²/hrであった。チューイングしたヒト唾液中にはフタル酸モノ-*n*-ブチル及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)が存在することをGC/MSにより確認した。また、ヒト唾液にDBP及びDEHPを添加し、37℃で60分間インキュベートしたところ、これらのフタル酸ジエステル類は加水分解され対応するフタル酸モノエステルを生成した。

Keywords: dialkyl phthalate, monoalkyl phthalate, PVC

*1 Tokyo Kenbikyo-in Foundation

*2 Japan Food Additives Association

*3 Tokyo University of Science

佐々木次雄*, 棚元憲一: 「ろ過滅菌法」の日局導入に関する研究

医薬品研究, **32**, 814-819 (2001)

無菌操作法で製される医薬品の工程で、ろ過滅菌工程は最も重要なものである。本研究では日局「最終滅菌法及び滅菌指標体」から「ろ過滅菌法」を切り離し、国際規格(ISO/DIS 13408-2)を反映した「ろ過滅菌法」を日本薬局方参考情報に導入するための調査研究を行った。特にフィルターの孔径については、*B. diminuta*のように0.45 µmはもちろん、条件によっては0.20/0.22 µmフィルターを通過する可能性が指摘される一方、小

孔になるほど圧力損失も大きくなりろ過が困難になる製品も出てくることから問題となっている。この選択に関して品質保証、工程特性、日常管理等の観点から調査研究を行い、さらにろ過前液に対するバイオバーデン試験や測定頻度、疎水フィルターの規格等について検討を行った。これらの結果を元に「ろ過滅菌法」の日本薬局方参考情報導入を計る予定である。

Keywords: Filtration, Japanese Pharmacopoeia, Microbiological tests

*国立感染症研究所

Ohnishi, T., Muroi, M., Tanamoto, K.: ***N*-linked glycosylations at Asn²⁶ and Asn¹¹⁴ of human MD-2 are required for Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-κB by lipopolysaccharide.**
J. Immunol., **167**, 3354-3359 (2001)

MD-2 is physically associated with Toll-like receptor 4 (TLR4) and is required for TLR4-mediated LPS signaling. Western blotting analysis revealed the presence of three forms of human (h)MD-2 with different electrophoretic mobilities. After *N*-glycosidase treatment of the cellular extract prepared from cells expressing hMD-2, only a single form with the fastest mobility was detected. Mutation of either one of two potential glycosylation sites Asn²⁶ and Asn¹¹⁴ of MD-2 resulted in the disappearance of the slowest mobility form, and only the fastest form was detected in hMD-2 carrying mutations at both Asn²⁶ and Asn¹¹⁴. Although these mutants were expressed on the cell surface and maintained its ability to associate with human TLR4, these mutations or tunicamycin treatment substantially impaired the ability of MD-2 to complement TLR4-mediated activation of NF-κB by LPS. LPS binding to cells expressing CD14, TLR4, and MD-2 was unaffected by these mutations. These results demonstrate that hMD-2 undergoes *N*-linked glycosylation at Asn²⁶ and Asn¹¹⁴, and that these glycosylations are crucial for TLR4-mediated signal transduction of LPS.

Keywords: MD-2, Toll-like receptor 4, NF-κB

宮原美知子*, 小沼博隆: 輸入冷凍生カキより *Shigella sonnei* 赤痢菌の検出
防菌防黴, **30**, 299-302 (2002)

2001年11月下旬より、西日本では赤痢患者が急増した。各自治体の疫学調査等により、生カキが原因と考えられた。厚生労働省は、全国の自治体に対し、生カキの流通状況の調査などを通知した。2001年12月27日まで30都府県で159人の感染者が届け出られた。そのうち110人の便と、今回報告する方法により、検出された

Shigella sonnei の PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動) での DNA パターンが国立感染症研究所の細菌部によって一致することが確認された。MPN 法では 0.2 cfu/g の赤痢菌汚染であった。日本では、現在までに自然汚染した赤痢菌が食品から検出された報告はないことから、食品からの赤痢菌の検出は難しいこととされていた。今回の検査で、凍結生ガキより *Shigella sonnei* を分離検出することができたので、その概要を報告する。

Keywords: frozen oyster, *Shigella sonnei*, two-stepwise enrichment

村瀬 稔^{*1}, 木股祐子^{*1}, 仲西寿男^{*1}, 小澤一弘^{*2}, 赤羽荘資^{*2}, 浅川 豊^{*2}, 南沢仁志^{*3}, 上條茂徳^{*3}, 小沼博隆: 腸管出血性大腸菌 O157 分離培地 BD CHROM agar O157 の評価

日本食品微生物学会誌, 18, 75-81(2001)

現在、腸管出血性大腸菌 O157H:7 の分離培地としては、ソルビトールの分解能あるいは合成酵素基質による発色能を鑑別に利用したものが開発されている。しかしながら、両方法とも検出分離には満足のいくものではなかった。そこで、著者らは発色酵素基質を応用した BD CHROMagar O157 を改良した培地と改良前の BD CHROMagar O157 および CT-SMAC を比較検討した結果、改良 BD CHROMagar O157 は、食品中の雑菌を抑制し、腸管出血性大腸菌 O157: H7 を効率よく検出分離することができた。

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, chromogenic substrate, ground beef

*1 神戸市環境保健研究所

*2 株式会社中部衛生検査センター

*3 日本ベクトン・ディッキンソン

齋藤章暢^{*1}, 小野冷子^{*1}, 柴田 譲^{*1}, 濱田佳子^{*1}, 山口正則^{*1}, 小沼博隆: 炭疽菌芽胞に対する各種殺菌剤の有効性

感染症学雑誌, 76, 291-292(2002)

米国において炭疽菌がバイオテロリズムに利用され、多くの人々が死亡するなど重大な被害を受けた。そこで、著者らは炭疽菌によるテロに対する対応として適切な消毒方法を模索するため、炭疽菌芽胞を用いて 5 種薬剤 (グルタルアルデヒド, 過酢酸, 次亜塩素酸ナトリウム, 過酸化水素およびホルムアルデヒド) の殺菌効果を検討した。その結果、最も強い殺菌効果の認められた薬剤は、10%ホルムアルデヒド、次いで 0.3%過酢酸、2%グルタルアルデヒド等の順であった。しかし、各種薬剤はヒトに対する毒性や施設、器具・機材の腐食性などの問題点を持つものが多いことから、使用に際しては目的に適した薬剤を適切な濃度で使用することが望ましいと考え

られた。

Keywords: *Bacillus anthracis*, disinfectant, spore,

*1 埼玉県衛生研究所

Hara-Kudo, Y., Sakakibara, Y.^{*1}, Konuma, H. Sawada, T.^{*1} and Kumagai, S.^{*2}: Laying season and shell eggcracks on the growth of *Salmonella* Enteritidis in the egg albumen during storage

J. Food Prot., 64, 1134-1137 (2001)

We studied the effects of laying seasons and egg shell cracks on the ability of the egg albumen to support the growth of *Salmonella* Enteritidis (SE) in eggs. Hens eggs used were those laid in February, June and October in a farm in Japan and stored at 10°C, 20°C and 30°C, and at 30°C after storage at 10°C, immediately after receipt or after cracking the shell. At several days intervals during storage, the egg contents were poured into a dish and SE was inoculated into albumen, and then the growth of SE during 3 days incubation at 18°C was measured. The results demonstrated that storage temperature and laying season affected the growth of SE in the egg albumen. The proportion of eggs which albumen allowed the growth of SE was higher in the eggs stored at 30°C than those stored at 10°C. The growth of SE in eggs was lowest in the following order of laying; February, October and June. SE grew preferably in albumen of cracked eggs than intact eggs.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, egg, storage

*1 Nippon Veterinary and Animal Science University

*2 The University of Tokyo

Hara-Kudo, Y., Okubo, T.^{*1}, Tanaka, S.^{*1}, Chu, D.^{*1}, Juneja, L.^{*1}, R. Saito, N.^{*2} and Sugita-Konishi, Y.: Bactericidal Action of Green Tea Extract and Damage to the Membrane of *Escherichia coli* O157:H7.

Biocontrol Science, 6: 58-61 (2001)

The antibacterial activity of green tea extract was investigated on 36 isolates of pathogens. The minimum inhibitory concentration of the extract against some isolates such as *Escherichia coli* O157:H7 was less than 250 µg/ml. The growth of the organism in culture broth was completely inhibited with 500 µg/ml of the extract. The organism was not detected by culturing on agar plates after 6 h incubation in phosphate buffered saline with 1,000 µg/ml of the extract. It was observed by fluorescence microscopy and scanning electric microscopy that the cell membranes were damaged with 1,000 µg/ml of the extract.

Key words: *E. coli* O157:H7, Green tea, catechin

*1 Taiyokagaku, Co. Ltd.

*2 National Institute of Infectious Diseases

Hara-Kudo Y., Nishina, T.*¹, Nakagawa, H.*²,
Konuma, H. and Kumagai, S.*³: **Improved method for
detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods.**

Appl. Environ. Microbiol., 67, 5819-5823 (2001)

We have developed a new effective procedure for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods using enrichment and plating onto a chromogenic agar medium. Samples were cultured in salt trypticase soy broth, which is a nonselective medium, and then a portion of the culture was cultured with salt polymyxin broth, which is a selective medium for *V. parahaemolyticus*. This two-step enrichment was more effective than the one step enrichment in salt polymyxin broth alone. The enrichment cultures were then plated onto a new chromogenic agar containing substrates for beta-galactosidase. The *V. parahaemolyticus* colonies developed a purple color on this growth medium that distinguished it from other related bacterial strains. *V. parahaemolyticus* was isolated more frequently from naturally contaminated seafood samples using the chromogenic agar than thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS) agar medium which is currently used for the isolation of *V. parahaemolyticus*. Our findings suggest that this new enrichment and isolation scheme is more sensitive and accurate for identifying *V. parahaemolyticus* in seafood samples.

Keywords: seafood, *Vibrio parahaemolyticus*, detection

*1 Tokai University Junior College

*2 Tokyo Kenbikyoin Foundation

*3 The University of Tokyo

工藤由起子, 杉山寛治*¹, 斎藤章暢*², 仁科徳啓*³,
長谷川順子*³, 中川弘*⁴, 市原智子*⁵, 小沼博隆, 熊
谷進*⁶: **免疫磁気ビーズ法および酵素基質培地を用い
たTDH産生性腸炎ビブリオO3:K6の自然汚染貝から
の検出**

感染症学雑誌, 75, 955-960 (2001)

日本において主要な食中毒の原因である腸炎ビブリオの検出を, 1999年までにTDH産生性腸炎ビブリオ血清型O3:K6が海水またはアサリから分離されたことのある海域のアサリについて行った。方法は2%食塩加TSBでの6時間と食塩ポリミキシンブイオンでの18時間の2段階増菌培養を行った。この培養液1mlを用いて腸炎ビブリオK6抗原に対する免疫磁気ビーズ法を行い, 特に

血清型O3:K6の効率的分離を行った。また, 従来のTCBS培地に加え腸炎ビブリオ特異的分離用に開発された酵素基質培地を用いた。この結果, TDH産生性腸炎ビブリオO3:K6の自然汚染貝からの分離は66ロット中3ロット(4.5%)で陽性であった。また, 分離した腸炎ビブリオの4,265コロニー中6コロニーがTDH産生性O3:K6(0.14%)であった。

Keywords: seafood, *Vibrio parahaemolyticus*, detection

*1 静岡県環境衛生科学研究所

*2 埼玉県衛生研究所

*3 東海大短大

*4 (財)東京顕微鏡院

*5 (株)東京サラヤ

*6 東京大学大学院

長谷川順子*¹, 工藤由起子, 仁科徳啓*¹, 小沼博隆,
熊谷進*²: **酸性下における腸炎ビブリオO3:K6の生
残性**

食品衛生学雑誌, 43, 90-94 (2002)

腸炎ビブリオの血清型O3:K6株と他血清型株の酢酸, クエン酸および塩酸における生存性を研究した。その結果, これらの酸に対する耐性は血清型O3:K6株と他血清型株の間に差はなかった。クエン酸はpH5.6において酢酸よりも腸炎ビブリオの菌数減少に対してより効果的であったが, pH4.5においては酢酸はクエン酸よりも効果的であった。さらに, pH4.0であるワインビネガーと米酢において腸炎ビブリオの菌数変化を確認したところ, 菌数は急速に減少した。

Keywords: survival, *Vibrio parahaemolyticus*, acid

*1 東海大短大

*2 東京大学大学院

Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Iwamoto T.* and
Kondo, K.*: **Wine has activity against entero-
pathogenic bacteria in vitro but not in vivo.**

Biosci. Biotech. Biochem., 65, 954-957 (2001)

We studied the activity of wine against entero-pathogenic bacteria both in vitro and in vivo. The food-borne bacteria were killed in both red and white wine within 30min. However, the results of a *Salmonella* infection experiment using mice suggested that wine was not effective in preventing food-borne diseases in vivo.

Key words: polyphenol, *Salmonella enteritidis*,

*国立栄養・健康研究所

**お茶の水大学大学院

Sugita-Konishi, Y., and Pestka, J.J.*: **Differential
upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8**

production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model.

J. Toxicol Environ Health A, **64**, 619-636 (2001)

The effects of deoxynivalenol (DON or vomitoxin) and four closely related 8-ketotrichothecenes on proinflammatory cytokine and chemokine production were evaluated in a clonal human macrophage model. U-937 cells, which represent a human monocytelike histocytic lymphoma, were differentiated into macrophages by preincubation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Differentiated macrophages were incubated with DON in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS), and supernatant was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the proinflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and for the chemokine interleukin-8 (IL-8). In the absence of LPS, DON at 500 or 1,000 ng/ml upregulated TNF- α production as early as 3 h and up to 6 h, whereas 100 to 1,000 ng/ml of DON significantly increased production of IL-6 from 3 to 24 h and IL-8 from 6 to 48 h. In cells costimulated with 0.2 microg/ml LPS, DON at 500 or 1000 ng/ml markedly superinduced TNF- α and IL-8 production. Although 100 ng/ml of DON also potentiated LPS-induced IL-6 production, 500 or 1,000 ng/ml of the toxin suppressed the LPS-induced IL-6 response. Four other 8-ketotrichothecenes, fusarenon X, nivalenol, 3-acetyl DON, and 15-acetyl DON, were also capable of upregulating or suppressing TNF- α , IL-6, and IL-8 production at concentrations similar to that of DON. In total, the results suggest that DON and other 8-ketotrichothecenes have the potential to both directly induce and superinduce proinflammatory cytokine and chemokine expression in human macrophages, even at toxin concentrations that are cytotoxic.

Keywords: deoxynivalenol (vomitoxin), other 8-ketotrichothecenes, TNF- α , IL-6,

* Michigan State University

Yamashita, S.,* Sugita-Konishi, Y. and Shimizu, M.* :
In Vitro Bacteriostatic Effects of Dietary Polysaccharides.
Food Sci. Technol. Res., **7**, 262-264, (2001).

The antimicrobial action of dietary polysaccharides on eight food-borne pathogenic bacteria were examined. Among the polysaccharides, the carrageenans showed the most pronounced inhibitory effect, the growth of all the bacteria strains except *Listeria monocytogenes* being

significantly inhibited by them, particularly by iota carrageenan. A growth-inhibition experiment using *Salmonella enteritidis* showed that the inhibitory effect of the carrageenans was not bactericidal but bacteriostatic. The removal of sulfate residues eliminated the bacteriostatic effect of iota-carrageenan, suggesting that the sulfate residue(s) in carrageenan plays an essential role in the effect. The results of the present study suggest that dietary polysaccharides, and particularly carrageenans, may act as effective preservatives in various types of processed food.

Keywords, carrageenan antimicrobiol activity, *Salmonella enteritidis*

* 東京大学大学院

Sugita-Konishi, Y., Sakanaka, S.,* Sasaki, K.,* Juneja, L. R.,* Noda, T.** and Amano, F.**: **Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk**

J. Agric. Food Chem., **50**, 3607-3613 (2002)

The effects of an egg yolk-derived sialyloligosaccharide (YDS), asialo YDS and a sialylglycopeptide of YDS (SGP) on bacterial adhesion to intestinal epithelial cells and on *Salmonella* infection in BALB/c mice were examined. YDS, its derivative and SGP strongly inhibited the binding of *Salmonella enteritidis* but not *E. coli* K-88 to a human epithelial cell line Caco-2. In a *Salmonella* infection experiment using BALB/c mice, oral administration of these reagents effectively prevented the bacteria from proliferating in spleen as well as lethality. An experiment using radioactive SGP orally administered to mice revealed that the compound was absorbed from the intestine into blood and eliminated via urine within 8 hrs. However, these reagents did not influence the production of TNF- α or NO. in culture macrophages. The results suggest that they inhibit *Salmonella* infection not by activating macrophages but by inhibiting the entry of bacteria through the gut, suggesting that YDS and its derivatives are useful for preventing *Salmonella* infection when ingested continuously.

Key words: sialyloligosaccharides, sialyloligosaccharide-conjugated peptide, bacterial adhesion,

* 太陽化学 (株)

** 国立感染症研究所 細胞化学部

Kanayama, A.,* Inoue, J.,* Sugita-Konishi, Y., Shimizu, M.* and Miyamoto, Y.*: **Oxidation of**

IkappaB α at the 45th methionine is one cause of taurine chloramines-induced inhibition of NFkappaB.

J. Biol. Chem., 277, 24049-24056 (2002).

A band shift of IkappaB α was observed in Western blots with Jurkat cells treated with 1 mM taurine chloramines (Tau Cl) for 1 hour. TauCl treatment inhibited TNF- α -inhibited NFkappaB activation. TauCl did not inhibit either the upstream of IKK activation or IKK itself but NFkappaB activation induced by IKK overexpression. Deletion experiments showed that a TauCl modification site causing the band shift of IkappaB α is the 45th methionine (Met45). HPLC and mass spectrometry analyses of a small peptide containing Met45 revealed that TauCl oxidizes Met45. A mutant of IkappaB α whose Met45 was converted to alanine did not generate a band shift upon Tau Cl treatment and degraded in response to TNF- α stimulation. However, a reporter assay revealed that NFkappaB dependent luciferase expression was not fully recovered in cells transfer with this mutant. These results indicate that Met45 oxidation of IkappaB α is a molecular mechanism underlying in TauCl-induced inhibition of NFkappaB activation. A similar band shift was observed when HL-60 cells expressing myeloperoxidase were treated with 100 μ M hydrogen peroxide for 5 min. When rat neutrophils were incubated with bacteria, intracellular taurine decreased interleukin-8 production. Therefore, taurine may help suppress excessive inflammatory reaction in neutrophils.

Keywords: taurine, NFkappaB, neutrophils

*東京大学大学院 農学生命科学

Aihara, Maki, Tanaka, T.* and Takatori, K.: Cladosporium as the main fungal contaminant of locations in dwelling environments.

Biocontrol Science, 6: 49-52 (2001)

A total of 75 locations in 26 houses were examined for fungal contamination. Sixteen genera from 68 locations were detected. *Cladosporium* was the dominant contaminant. A high frequency of contamination was seen to involve *Cladosporium*, of which *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides* were detected most frequently at rates of 63.6% and 14.6%, respectively.

Keywords: *Cladosporium*, fungal contamination, dwelling environments

*Ochanomizu University

Jong-Chul, Park *, Han D-W, Park *, B-J Lee D-H *

K. Takatori and Hwal Suh *: Effective screening medium for the biodegradation of oleic acid by *Aspergillus niger*.

Biocontrol Science, 6: 37-41 (2001)

To investigate oleic acid biodegradation, 7 strains of *Aspergillus niger* were tested with 3 different types of Czapek-Dox broth (CzDB) medium containing oleic acid, and their metabolic abilities to decompose the fatty acid into carbon dioxide and water were compared. When the fungal strains were grown in the CzDB media with both ¹⁴C-labeled and non-labeled oleic acid, *A. niger* oxidized more than 58% of the supplied substrate within 72h. The addition of saccharose as an additional carbon source substantially reduced the biodegradation of oleic acid to the point that all the strains showed less than 4% degradation.

Keywords: oleic acid, biodegradation, saccharose

*韓国 延世大学

Makimura K*, Hanazawa R, Takatori K, Tamura Y*, Fujisaki R*, Nishiyama Y*, Abe S*, Uchida K*, Kawamura Y, Ezaki T** and Yamaguchi H*: Fungal flora on board Mir-space station, identification by morphological features and ribosomal DNA sequences.**

Microbiology and Immunology, 45(5): 357-363 (2001)

The morphological and molecular biological identification, using 18S- and ITS1-rDNA sequences of the space fungi is discussed. The six fungal strains were isolated from air by using an air sampler. Strains were identified as *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor* or *Penicillium* sp by both methods. The species of space fungi were common saprophytic fungi in our living environments. This study concluded that the environment on board the space station Mir allows the growth of potentially pathogenic fungi as true in residential areas on the earth.

Keywords: fungal flora, DNA sequences, Mir-space station

*帝京大学

**岐阜大学

Kosuke Takatori, Akemi Saito*, Hiroshi Yasueda* and Kazuo Akiyama*: The effect of house design and environment on fungal movement in homes of bronchial asthma patients.

Mycopathologia, 152(1): 41-49 (2001)

The effect of house building design and environment on

the fungal movement in houses of 41 bronchial asthma(BA) patients has been investigated by examining house dust. The presence and composition of fungi were determined and compared in relation to building structure, house age, size of living room, main flooring material, presence of a living room rug or air purifier, and frequency of vacuum cleaning. Among these elements, fungal CFU apparently varied only between building structure. Classification of the fungal types in the house dust of BA patients showed that, regardless of the building designs, there were high levels of osmophilic fungi that survive at relatively dry conditions, whereas fungi that survive in very wet conditions were present at low frequency.

Keywords: allergy, bronchial asthma, house design

*国立相模原病院

李 憲俊*, 長峰英之*, 武井康裕*, 宮島千鶴*, 高鳥浩介: **CO₂測定による抗カビ試験の評価**

防菌防黴, **29**: 367-370 (2001)

通常抗カビ試験は培養法により判定することであり, そのため培養日数を要するという欠点がある. 培養法では液体法, 寒天法があり, 特にカビの場合両者によって判定するが, 前者は菌糸発育, 後者は孢子および菌糸発育によって評価される特徴を有している. そこで, 迅速かつ客観的に評価できる試験法の改良が必要であり, ここでは培養により発生する微量のCO₂を指標として抗カビ試験の改良を試みたところ, CO₂の発生量で抗カビ活性の評価が可能であることを確認した.

Keywords: antifungal test, carbon dioxide, estimation

*衛生微生物研究センター

稲田知佳*, 工藤たか子*, 芳住邦雄*, 高鳥浩介, Alan Hedge **: **光照射による *Penicillium* 不活化の波長依存性**

防菌防黴, **29(12)**: 757-762 (2001)

光照射による不活化特性を波長および照射エネルギーの観点から明らかにすることを目的として波長別光照射が可能な大型スペクトログラフおよびB領域紫外線, A領域紫外線蛍光灯による *Penicillium implicatum* 不活化の作用スペクトルを検討した. 波長別による試料被曝実験から波長260nm紫外線では50J/m²の照射量で不活化した. また280nmでは300J/m², 300nmでは800J/m²であった. さらに長波長側では500nmまで不活化作用を認めた. 真菌の不活化を認めるには64kJ/m²程度の照射エネルギーを要することがわかった.

Keywords: light irradiation, fungi, action spectrum

*共立女子大学

** Cornell University

菊池裕, 高鳥浩介, 伊藤均*¹, 小沼博隆: **低線量放射線による微生物毒素産生能の変化に関する研究1 ベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7 に及ぼす影響**

食品照射, **36**, 23-25 (2001)

The effect of irradiation was examined on the sensitivity and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7, using 13 clinical isolates. All isolates were sensitive to gamma irradiation compared with normal type *E. coli*. D10 values of 0.05-0.1 kGy were obtained in 0.067 M phosphate buffer at room temperature in an air-equilibrium atmosphere. Irradiation at 0.1 kGy produced no noticeable effect on verotoxin production in any isolates.

Keywords: irradiation, verotoxin, *Escherichia coli* O157:H7

*¹ 日本原子力研究所高崎研究所

Hanna, A.N.*¹, Berthiaume, L.G.*¹, Kikuchi, Y., Begg, D.*¹, Bourgoin, S.*², Brindley, D.N.*¹: **Tumor necrosis factor-alpha induces stress fiber formation through ceramide production: Role of sphingosine kinase**
Mol. Biol. Cell, **12**, 3618-3630 (2001)

Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a proinflammatory cytokine that activates several signaling cascades. We determined the extent to which ceramide is a second messenger for TNF-alpha-induced signaling leading to cytoskeletal rearrangement in Rat2 fibroblasts. TNF-alpha, sphingomyelinase, or C2-ceramide induced tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and paxillin, and stress fiber formation. Ly 294002, a phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) inhibitor, or expression of dominant/negative Ras (N17) completely blocked C2-ceramide- and sphingomyelinase-induced tyrosine phosphorylation of FAK and paxillin and severely decreased stress fiber formation. The TNF-alpha effects were only partially inhibited. Dimethylsphingosine, a sphingosine kinase (SK) inhibitor, blocked stress fiber formation by TNF-alpha and C2-ceramide. TNF-alpha, sphingomyelinase, and C2-ceramide translocated Cdc42, Rac, and RhoA to membranes, and stimulated p21-activated protein kinase downstream of Ras-GTP, PI 3-K, and SK. Transfection with inactive RhoA inhibited the TNF-alpha- and C2-ceramide-induced stress fiber formation. Our results demonstrate that stimulation by TNF-alpha, which increases sphingomyelinase activity and ceramide formation, activates sphingosine kinase,

Rho family GTPases, focal adhesion kinase, and paxillin. This novel pathway of ceramide signaling can account for approximately 70% of TNF- α -induced stress fiber formation and cytoskeletal reorganization.

Keywords: Tumor necrosis factor- α ; Stress fibers; sphingosine kinase

*¹ University of Alberta, Canada

*² Laval University, Canada

Sera, N.^{*1}, Fukuhara, K., Miyata, N., Tokiwa, H.^{*2}:
Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1- and 3-nitroazabenz[a]pyrene and their N-oxides
Mutagenesis, **16**, 183-187 (2001)

Nitro-azabenz[a]pyrenes, 1- or 3-nitro-azabenz[a]pyrene and their N-oxides are nitrated derivatives of azabenz[a]pyrene (ABP) containing nitrogen in the 6-position of benzo[a]pyrene (B[a]P). The nitro-ABP-N-oxides (ABPOs) were formed by reaction of ABP with excess HNO₃. These derivatives were noteworthy as potent mutagens for Salmonella strains, and were present in fine particles of diesel particulates. In this study, micronucleus induction in mice and chromosomal aberrations due to means of Chinese hamster lung fibroblast (CHL) cells were investigated to determine genotoxicity in order to define the relationship with the mutagenic potency of these derivatives. The induction of micronucleus polychromatic erythrocytes (MNPCEs) was dependent on the dose response of 10-40 mg for 3-N-6-ABP, and of 10-40 mg for 1-N-6-ABP, and in addition, 1- and 3-N-6-ABPOs markedly induced MNPCEs in a dose range of 10-400 mg and from 1 to 80 mg, respectively, when the compound was intraperitoneally administered in two mice at each dose. The results show that of the four compounds, 3-N-6-ABPO demonstrated a marked increase in MNPCEs. On the other hand, chromosomal aberrations of the four compounds were investigated by the duplicate tests using CHLs. The results after a 48 h treatment induced aberrations of the chromatid type, chromatid breaks and exchanges for 1- and 3-N-6-ABP, and mainly chromatid exchanges for 1- and 3-N-6-ABPO. The frequency of chromosomal aberrations associated with nitro substitution on the ABPO structure. Chromosomal aberrations of nitro derivatives of ABPO substituted at the 3-position on the structure were more potent than those at the 1-position. N-oxide derivatives have been found to be reduced to anion radicals much more easily than azaB[a]P and its nitro derivatives. This suggest that the electrochemical

reduction of the chemicals plays an important role in the metabolic activation of nitrated B[a]P derivatives.

Keywords: benzo[a]pyrene, micronucleus induction, chromosomal aberration

*¹ Fukuoka Institute of Health and Environmental Science

*² Kyushu Women's University

Fukuhara, K., Kurihara, M., Miyata, N.: **Photochemical generation of nitric oxide from 6-nitrobenzo[a]pyrene**
J. Am. Chem. Soc., **123**, 8662-8666 (2001)

Photolabile, 6-nitrobenzo[a]pyrene (6-nitroBaP) released nitric oxide (NO) under visible-light irradiation. The generation of NO and the concomitant formation of the 6-oxyBaP radical were confirmed by ESR. BaPquinones were also detected as further oxidized products of the 6-oxyBaP radical. No such photogeneration was observed with other nitrated BaPs, such as 1-nitroBaP and 3-nitroBaP. DNA-strand breakage, caused by photoexcited 6-nitroBaP, was closely related to its NO-releasing activity. MO calculations of nitrated BaP suggest that the perpendicular conformation of the nitro substituent to the aromatic ring is important for the release of NO with light. These finding may be useful for the development of a new type of NO donor.

Keywords: nitric oxide, nitrobenzo[a]pyrene, DNA scission

Nakanishi, I., Fukuhara, K., Ohkubo, K.^{*1}, Shimada, T.^{*2}, Kansui, H., Kurihara, M., Urano, S.^{*2}, Fukuzumi, S.^{*1}, Miyata, N.: **Superoxide anion generation via electron-transfer oxidation of catechin dianion by molecular oxygen in an aprotic medium**
Chem. Lett. 1152-1153 (2001)

Superoxide anion (O₂^{•-}) was generated via an electron transfer oxidation of catechin dianion, which was produced in the reaction of catechin with two equivalents of methoxide anion, by molecular oxygen in acetonitrile. From the detailed spectroscopic and kinetic analysis was determined the rate constant for the formation of O₂^{•-} to be 5.8 x 10⁻² mol⁻¹dm³s⁻¹.

Keywords: catechin, superoxide anion, ESR

*¹ Osaka University

*² Shibaura Institute of Technology

Nishio, T.^{*1}, Hakamata, W., Kimura, A.^{*2}, Chiba, S.^{*2}, Takatsuki, A.^{*3}, Kawachi, R.^{*1}, Oku, T.^{*1}: **Glycon specificity profiling of α -glucosidases using monodeoxy**

and mono-*O*-methyl derivatives of *p*-nitrophenyl α -*D*-glucopyranoside

Carbohydr. Res., **337** 629-634 (2002)

Hydrolysis of probe substrates, eight possible monodeoxy and mono-*O*-methyl analogs of *p*-nitrophenyl α -*D*-glucopyranoside (*p*NP α -*D*-Glc), modified at the C-2, C-3, C-4, and C-6 positions, was studied as part of investigations into the glycon specificities of seven α -glucosidases (EC 3.2.1.20) isolated from *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus*, honeybee (two enzymes), sugar beet, flint corn, and *Aspergillus niger*. The glucosidases from sugar beet, flint corn, and *A. niger* were found to hydrolyze the 2-deoxy analogs with substantially higher activities than against *p*NP α -*D*-Glc. Moreover, the flint corn and *A. niger* enzymes showed hydrolyzing activities, although low, for the 3-deoxy analog. The other four α -glucosidases did not exhibit any activities for either the 2- or the 3-deoxy analogs. None of the seven enzymes exhibited any activities toward the 4-deoxy, 6-deoxy, or any of the methoxy analogs. The hydrolysis results, with the deoxy substrate analogs, demonstrated that α -glucosidases having remarkably different glycon specificities exist in nature. Further insight into the hydrolysis of deoxyglycosides was obtained by determining the kinetic parameters (k_{cat} and K_m) for the reactions of sugar beet, flint corn, and *A. niger* enzymes.

Keywords: α -Glucosidase, Substrate specificity, Glycon specificity profiling

*1 日本大学生物資源科学部

*2 北海道大学農学部

*3 理化学研究所

Fujishima, T.*¹, Konno, K.*¹, Nakagawa, K.*², Tanaka, M.*², Okano, T.*², Kurihara, M., Miyata, N., Takayama, H.*¹: **Synthesis and Biological Evaluation of 5,6-trans-2-Methyl-1,25-dihydroxyvitamin D₃ and their 20-Epimers: Possible Binding Modes of Potent A-Ring Analogues to Vitamin D Receptor**

Chem. Biol., **8**, 1011-1024 (2001)

The secosteroid 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃(1) has a wide variety of biological activities, which makes it a promising therapeutic agent for the treatment of cancer, psoriasis and osteoporosis. Insight into the structure-activity relationships of the A-ring of 1 is still needed to assist the development of more potent and selective analogues as candidate chemotherapeutic agents, as well as to define the molecular mode of action. Results: All

possible A-ring stereoisomers of 5,6-trans-2-methyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃(6a-h) and their 20-epimers (7a-h) were designed and efficiently synthesized. The dependence of the affinities for vitamin D receptor (VDR) and vitamin D binding protein (DBP), as well as the HL-60 cell differentiation-inducing activity, upon the stereochemistry of the A-ring and at C20 in the side chain was evaluated. Conclusions: The binding affinities and potency of the 5,6-trans and 5,6-cis analogues were enhanced by a 2-methyl substituent in a certain orientation. Molecular docking studies based upon the X-ray crystal structure of VDR suggested that the axial 2-methyl group would be accommodated in a pocket surrounded by hydrophobic amino acid residues in the ligand binding domain, resulting in enhanced interaction.

Keywords: 5,6-trans-2-methyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor, binding modes

*1 帝京大学薬学部

*2 神戸薬科大学

Suhara, Y.*¹, Nihei, K.*¹, Kurihara, M., Kittaka, A.*¹, Fujishima, T.*¹, Konno, K.*¹, Miyata, N., Takayama, H.*¹: **Efficient and Systematic Synthesis of Novel 2 α -Substituted 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Analogues and Docking Analysis to Vitamin D Receptor**

J. Org. Chem., **66**, 8760-8771 (2001)

Novel 2 α -substituted 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ analogues with 2 α -alkyl and 2 α -hydroxyalkyl groups were systematically synthesized from D-xylose. Their conformation on binding to the ligand binding domain (LBD) of the vitamin D receptor was analyzed. It has been found that the 2 α -hydroxypropyl group best fits the cavity of the LBD, and the binding activity is three times higher than that for the natural hormone.

Keywords: 2 α -substituted 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ analogues, docking analysis, vitamin D receptor

*1 帝京大学薬学部

Kurihara, M., T. Hayashi, T., Miyata, N.: **Enantioselective Radical Cross-coupling Reactions of Silyl Enol Ethers Using Chiral Oxovanadium**

Chem. Lett., **2001**, 1324-1325

Asymmetric induction was observed in radical cross-coupling reactions of silyl enol ethers using chiral oxovanadium generated in situ from 8-phenylmenthol and vanadium oxytrichloride in the presence of

MS4A(molecular sieves-4A).

Keywords: asymmetric synthesis, enantioselective radical cross-coupling reactions, chiral oxovanadium

Kittaka, A.^{*1}, Takayama, H.^{*1}, Kurihara, M., Horii, C.^{*2}, Tanaka, H.^{*2}, Miyasaka, T.^{*2}, J. Inoue, J.^{*3}: **DNA Sequence Recognition by NFκB p50 Homodimer: Strict and Obscure Recognition Sites in the Binding Sequence** *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **20**, 669-672 (2001)

5-Formyl- and 5-(formylmethyl)-2'-deoxyuridines are introduced into a κB site instead of thymidine(s) in order to understand target sequence specificity of NFκB. It was found that one thymidine in the κB site is particularly important for the sequence specific recognition by NFκB.

Keywords: NFκB, DNA sequence recognition

*¹ 帝京大学薬学部

*² 昭和大学薬学部

*³ 慶應義塾大学理工学部

Kurihara, M., Kondo, K., Toyoda, M., N. Miyata: **Antioxidation Mechanisms of Catechins: A Computational Study**

JCPE Journal, **13**, 255-262 (2001)

Catechins are a group of polyphenolic compounds abundantly contained in green tea. It is well known that catechins have multiple biological activities including anticarcinogenic and antiinflammatory effects. These protective effects are due to their antioxidative activities by scavenging free radicals. All C-H and O-H bond dissociation enthalpies (BDE's) in catechins ((-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate) were calculated by semiempirical molecular orbital method using SPARTAN program. The BDE's of benzyl hydrogens (C-2 position in catechins) are found to be quite low. This result suggests that abstraction of benzyl hydrogen is a crucial step for antioxidant activity. This is also supported by the reported results of LC/MS/MS and spectrophotometric analysis of reaction intermediate from catechins treated with AAPH.

Keywords: catechins, antioxidative activities, semiempirical molecular orbital calculation

Kurihara, M., Tanaka, M.^{*}, Oba, M.^{*}, Suemune, H.^{*}, Miyata, N.: **Conformation of Oligopeptides Containing Chiral alpha,alpha-Disubstituted Amino Acids:**

Computational Study

Peptide Science **2001**, 287-288 (2002)

We have shown conformational search calculations of oligopeptides prepared from alpha, alpha-disubstituted amino acids were in agreement with their conformational properties in the solid state determined by X-ray crystallographic analysis of oligopeptides. In this paper we show it can be predicted the helical screw sense of oligopeptides containing a chiral alpha, alpha-disubstituted amino acid by computational study.

Keywords: oligopeptides, conformational search calculation, helical screw sense

*九州大学薬学部

Tanaka, M.^{*}, Oba, M.^{*}, Kurihara, M., Demizu, Y.^{*}, Nishimura, S.^{*}, Hayashida, K.^{*}, Suemune, H.: **Asymmetric Synthesis and Conformational Analysis of alpha, alpha-Disubstituted alpha-Amino Acids and Their Peptides**

Peptide Science **2001**, 263-266 (2002)

We have developed a practical procedure for the preparation of various optically active alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acids using (S,S)- or (R,R)-cyclohexane-1,2-diol as a chiral auxiliary. Homo- and heteropeptides containing the chiral alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acids, such as (S)-butylethylglycine (Beg) and (S)-ethylleucine (EtLeu), have been prepared by solution-phase methods. The preferred conformations of (S)-Beg homopeptides, and the heteropeptides containing (S)-Beg or (S)-EtLeu within the sequence of Aib residues have been studied using X-ray crystallographic analysis, IR, ¹H NMR, and CD spectra.

Keywords: chiral auxiliary, alpha_alpha-disubstituted alpha-amino acid, asymmetric synthesis

*九州大学薬学部

Fujishima, T.^{*1}, Konno, K.^{*1}, Nakagawa, K.^{*2}, Okano, T.^{*2}, Kittaka, A.^{*1}, Kurihara, M., Takayama, H.^{*1}: **2-Methyl analogues of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃, the potent inducers of cell differentiation and apoptosis: synthesis and biological evaluation**

Anti-Cancer Drugs, **13**, 10 (2002)

The hormonally active metabolite of vitamin D, 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1), has a wide variety of biological activities, which makes it a promising therapeutic agent for the treatment of cancer, psoriasis and osteoporosis. Insight into the structure-activity

relationships of the A-ring of 1 is needed to assist the development of more potent and selective analogues, as well as to define the molecular mode of action. We have synthesized all eight possible A-ring stereoisomers of 2-methyl-1, 25-dihydroxyvitamin D₃, demonstrating that the introduction of a simple methyl group to the A-ring of 1 yields the analogues with unique activity profiles. In particular, 2 α -methyl-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (2) showed 4-fold higher affinity for bovine thymus VDR and 2-fold higher cell differentiation-inducing activity towards HL-60 cells in comparison with 1. The eight 2-methyl analogues, which differ in stereochemistry of the methyl group on C2 and the hydroxyl groups on C1 and C3, exhibited cell differentiation- or apoptosis-inducing activity towards HL-60 cells, depending on the A-ring structure. Further 20-epimerization of the 2-methyl analogues enhanced the VDR binding affinity and cell differentiation-inducing potency. The 20-epimer of 2, 20-epi-2 α -methyl-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (3), proved to be a 12-fold better binder to VDR and its cell differentiation-inducing activity was 590-fold higher than 1. Molecular docking studies based upon the X-ray crystal structure of VDR suggested the importance of the 2-methyl substitution in a certain orientation. The detailed biological activities and molecular docking studies of the analogues will be presented, together with the results of the 5,6-trans-2-methyl analogues.

Keywords: vitamin D₃, cell differentiation-inducing activity, molecular docking study

*¹ 帝京大学薬学部

*² 神戸薬科大学

Kittaka, A.* , Suhara, Y.* , Fujishima, T.* , Kurihara, M., Konno, K.* , Takayama, H.* : **The 2 α -positive motifs of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in VDR binding**

Anti-Cancer Drugs, 13, 14-15(2002).

The seco steroid hormone 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ (1) is the most potent metabolite of vitamin D₃ and regulates primarily calcium and phosphorus homeostasis, as well as proliferation and differentiation of cells. Some of synthetic analogues of 1 have been clinically used in the treatment of calcium and bone diseases, secondary hyperparathyroidism, and skin disorder psoriasis. Current frontiers of vitamin D research efforts also include oncology, especially breast cancer, prostate cancer, colon cancer, and leukemia to develop

new drugs for clinical applications.

Most of the biological actions of 1 are mediated through its specific receptor, the vitamin D receptor (VDR), which is a member of the nuclear receptor superfamily acting as a ligand-dependent transcription factor with coactivators. We believe that studies of structure-activity relationships on binding affinity and binding mode of the newly synthetic ligands for VDR, the latter would alter a 3-dimensional shape of the ligand-VDR complex and the change would ultimately affect selectivity of coactivators, are essentially important for finding novel vitamin D₃ analogues that show desired biological actions.

Recently, we have found several structural modifications at the 2 α -position on the A-ring of 1 that strengthen binding affinity for VDR. The representative positive motifs are 2 α -methyl (1a), 2 α -(3-hydroxypropyl) (1b), and 2 α -(3-hydroxypropoxy) (1c) groups.

Introduction of one of these motifs to 1 showed ca. 2- to 4-fold higher binding affinity for bovine thymus VDR than that of the natural hormone (1). We present effective synthetic routes to these vitamin D₃ analogues and binding affinity with computational binding modes for each derivative in the VDR ligand binding domain.

Keywords: vitamin D₃, vitamin D receptor, molecular docking study

*帝京大学薬学部

Yamakoshi, Y., Schlittler, R.R.*¹, Gimzewski, J.K.*¹ and Diederich, F.*² : **Mecanoreceptor: Synthesis of Molecular-Gripper-Type Dynamic Receptors and STM Imaging of Self-Assembled Monolayer on Gold**
J. Mat. Chem., 11, 2895-2897(2001)

Dynamic receptors capable of undergoing large temperature or pH-dependent conformational change were functionalized with dialkyl thioether legs and adsorbed on Au(111) single crystal surfaces to give self-assembled monolayers(SAMs). The SAMs were characterized by ellipsometry and contact angle measurements. Imaging by scanning tunneling microscopy(ATM) revealed well-ordered monolayers at molecular resolution.

Keywords: molecular gripper, dynamic receptor, scanning tunneling microscopy(STM), self-assembled monolayer (SAM)

*¹ IBM-Zürich Research Laboratory

*² Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zürich

Takahashi, T.* , Yamakoshi, Y., Ge, W.-Y.* , Sugita, J.* , Okayama, K.* and Koizumi, T.*: **High-Pressure Mediated Asymmetric Diels-Alder Reaction of Chiral Sulfinyl Acrylate Derivatives and Its Application to Chiral Synthesis of (-)-COTC and (-)-Gabosine C**

Heterocycles, **55**, 209-220(2002)

The asymmetric Diels-Alder reactions of chiral sulfinylacrylate derivatives with dienes were examined under high-pressure (1.2 Gpa) conditions. The *endo* cycloadduct obtained from sulfinyl acrylate and 2-methoxyfuran was converted to (-)-COTC and (-)-gabosine C.

*富山医科薬科大学薬学部

Nakamura, T., Saito, Y., Murayama, N., Saeki, M., Soyama, A., Ozawa, S., Sawada, J.: **Apparent low frequency of sequence variability within the proximal promoter region of the cytochrome P450 (CYP) 3A5 gene in established cell lines from Japanese individuals**

Biol. Pharm. Bull., **24**, 954-957 (2001)

The members of the cytochrome P450 (CYP) 3A subfamily play an important role in the metabolism of more than 50% of the drugs metabolized by CYPs. Among the CYP3As, CYP3A5 is known to exhibit polymorphic expression. We hypothesized that this might be caused by single nucleotide polymorphisms in the promoter region of CYP3A5 gene. Due to the existence of highly homologous sequence, CYP3A5P1, we carefully amplified and sequenced the CYP3A5 promoter region from 86 established cell lines derived from Japanese individuals. However, no SNP was detected in the region. These results suggest that other factors is involved in the polymorphism of CYP3A5 expression.

Keywords: CYP3A5, Promoter, Single nucleotide polymorphisms

Soyama, A., Saito, Y., Hanioka, N., Murayama, N., Nakajima, O., Katori, N., Ishida, S., Sai, K., Ozawa, S., Sawada, J.: **Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced paclitaxel metabolism**

Biol. Pharm. Bull., **24**, 1427-1430 (2001)

By sequencing genomic DNA from 73 established cell lines derived from Japanese individuals, we detected 9 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CYP2C8 gene. Of them, 3 exonic SNPs resulted in amino acid alterations (g416a, R139K; a1196g, K399R; c1210g,

P404A). To examine the effects of these amino acid alterations on CYP2C8 function, wild-type and four types of variant CYP2C8 cDNA constructs (R139K, K399R, R139K/K399R and P404A) were transfected into Hep G2 cells and their paclitaxel 6 α -hydroxylase activities were determined in vitro. The variant R139K/K399R showed reduced values for Vmax and clearance (Vmax/Km) similar to those of its single variant, R139K. The variant P404A also showed a significantly lowered clearance due to reduced level of protein expression. These results suggest that not only the double variant (R139K/K399R) but also our novel variant P404A in the CYP2C8 gene are less efficient in paclitaxel metabolism.

Keywords: CYP2C8, Paclitaxel, Single nucleotide polymorphism s

Stronge, V.*¹, Saito, Y., Ihara, Y.*², Williams, D.B.*¹: **Relationship between calnexin and Bip in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates**

J. Biol. Chem., **276**, 39779-39787 (2001)

Calnexin (CNX) is a lectin and chaperone protein of endoplasmic reticulum. We assess the relative contributions of the oligosaccharide- and polypeptide-binding sites of CNX to its in vitro chaperone function by comparing it with Bip. Both proteins were equally effective in preventing the aggregation of non-glycosylated citrate synthase, indicating the polypeptide-binding site of CNX is capable of functioning at a similar to that of Hsp70. But when confronted with glycoprotein substrates, the lectin site of CNX provided a significant advantage over Bip in suppressing aggregation. CNX also cooperated with Bip and J domain of Sec63 in the ATP-dependent refolding of glycoprotein and non-glycoprotein. The lectin site of CNX was essential for refolding of the glycoprotein.

Keywords: Bip, Calnexin, Folding

*¹ The University of Toronto

*² 長崎大学医学部

Nakamura, R., Teshima, R., Sawada, J.: **Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca²⁺ response of RBL-2H3 mast cells**

Immunol. Lett., **80**, 119-124 (2002)

We examined the effect of three dialkyl phthalates, di-n-butylphthalate (DBP), di-isobutylphthalate (DIBP) and di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), on antigen-induced degranulation of RBL-2H3 mast cells. Exposure

to 50–500 μM DBP, 50–500 μM DIBP, and 500 μM DEHP significantly potentiated antigen-induced β -hexosaminidase release. Without antigen stimulation, the phthalates did not cause any significant increase in degranulation. Next, we examined the Ca^{2+} response of RBL-2H3 cells after exposure to these phthalates. The cytosolic calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of the cells clearly increased when the cells were stimulated with 50–500 μM and 50–500 μM DIBP, and increased slightly when stimulated with 50–500 μM DEHP. Digital imaging fluorescence microscope analysis showed that the addition of DBP evoked Ca^{2+} oscillation in individual mast cells. Finally, we investigated the relationship between the DBP-sensitive Ca^{2+} stores and thapsigargin (TG)-sensitive Ca^{2+} stores. A rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ following challenge with DBP after TG was observed, and thus the DBP-sensitive and TG-sensitive Ca^{2+} stores in RBL-2H3 cells seem to be different. In conclusion, some dialkyl phthalates increase antigen-induced degranulation in RBL-2H3 cells dependent on the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Keywords: Dialkyl phthalates, Mast cells, Ca^{2+} response

Okunuki, H., Teshima, R., Shigeta, T., Sakushima, J., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Sawada, J.: **Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating**

J. Food Hyg. Soc. Japan., **43**, 68–73 (2002)

We performed in vitro digestion experiments of newly expressed proteins by SGF (simulated gastric fluid) and SIF (simulated intestinal fluid) to assess the allergenicity of foods derived from biotechnology. For newly expressed proteins, we chose CP4-EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium sp.* strain CP4) and Cry1Ab derived from *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* strain HD-1. The former is expressed in GM-soybeans and the latter is expressed in GM-corns. Both proteins were rapidly digested within 60 sec by SGF. By preheating, the digestibility by SGF was slightly increased. The digestion time of CP4-EPSPS and Cry1Ab by SIF was 240 min or more. However, digestibility of these proteins by SIF was dramatically increased by preheating and digestion time was less than 5 sec. Therefore, we suggest that the allergenicity of both proteins was extremely low because of the easy digestibility of these proteins by SGF and that by SIF by preheating.

Keywords: SIF, SGF, Digestibility

Takagi, K., Saito, Y., Sawada, J.: **Proteasomes are involved in the constitutive degradation of growth hormone receptors**

Biol. Pharm. Bull., **24**, 744–748 (2001)

In the mouse Ba/F3-hGHR cell line, which stably expresses human growth hormone receptors (hGHRs), constitutive degradation of hGHRs was inhibited by the proteasome inhibitors MG-132 and *clasto*-lactacystin β -lactone, or the vacuolar H^+ -ATPase inhibitor, bafilomycin A_1 . hGH-enhanced degradation and internalization of hGHRs were also inhibited by MG-132. Ubiquitinated hGHRs were detected in the cell lysate and increased by hGH-treatment. In the hGH-untreated cells, the ubiquitinated hGHRs were weakly detected. However, the ubiquitination of hGHR was not enhanced by MG-132. Thus, the ubiquitination of hGHR is unlikely to be involved, at least in the constitutive degradation.

Taken together, both the proteasome pathway and endosome/lysosome pathway are involved in the constitutive degradation of hGHRs.

Keywords: Human growth hormone receptor, Constitutive degradation, Proteasome inhibitor

Takagi, K., Saito, Y., Sawada, J.: **Proteasome inhibitor enhances growth hormone-binding protein release**

Mol. Cell. Endocrinol., **182**, 157–163 (2001)

We used murine Ba/F3 cells transfected with human growth hormone receptor (hGHR) cDNA to investigate the regulatory mechanisms of human growth hormone-binding protein (hGH-BP) release. The extracellular domain of hGHRs were cleaved and released as hGH-BPs. The hGH-BP release was enhanced by phorbol 12, 13-dibutyrate (PDBu), and suggested to be mediated by activation of PKC. The proteasome inhibitors MG-132 and *clasto*-lactacystin β -lactone also increased hGH-BP release from Ba/F3-hGHR cells, and MG-132 and PDBu synergistically increased hGH-BP release. The results obtained by using three PKC inhibitors Gö6976, GF109203X and Gö6983 suggest that the enhancement of hGH-BP release by MG-132 and PDBu is mediated by different mechanisms probably involving different PKC isozymes.

Keywords: Human growth hormone receptor, Human growth hormone-binding protein, Proteasome inhibitor

Prasad, S.S.*¹, Kojic, L.Z.*¹, Li, P.*¹, Mitchell, D.E.*², Hachisuka, A., Sawada, J., Gu, Q.*¹, Cynader, M.S.*¹:

Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity

Neuroscience, **111**, 35-45 (2002)

Plasticity represents an integrated set of developmental processes that coordinates the action of many genes. We examined gene expression patterns of 18371 non-redundant cDNAs in the visual cortex of cats at birth, at eye opening, at the peak of eye dominance plasticity and in the adult cat using filter-based cDNA arrays and software-based hierarchical cluster analysis. We identified a small set of genes that were selectively expressed during the peak of the critical period for plasticity. These plasticity candidate genes that have characterized functions include participants in second messenger systems, in cell adhesion, in transmitter recycling and cytokines, among others. Comparison of cDNA array quantitation with RPC reaction showed almost identical expression profiles for three genes. The expression pattern of one identified gene, opioid binding cell adhesion molecule, is also in agreement with immunocytochemical results. We conclude that the approach of high-density cDNA array hybridization can be used as a useful tool for examining a complex phenomenon of developmental plasticity.

Keywords: Development, Plasticity, Gene expression

*1 University of British Columbia

*2 Dalhousie University

Furukawa, Y. *, Furuno, T. *, Teshima, R., Nakanishi, M. *: **Calcium signals in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells primed with the neuropeptide substance P**

Biol. Pharm. Bull., **24**, 1060-1063 (2001)

Communication between nerves and mast cells is a prototypic demonstration of neuroimmune interaction. We have recently shown that direct nerve-mast cell cross-talk can occur in the absence of an intermediary transducing cell and that the neuropeptide substance P is an important mediator of this communication. Here we study the calcium signals in rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3; mucosal-type mast cells) primed with substance P. RBL cells responded only slightly to stimulation with compound 48/80, however they responded to the stimulation when the cells had been primed with substance P (0.5 microM) for one week. The present results provide a foundation to study the neuroimmune cross-talk in a co-culture system.

Keywords: RBL-2H3 cells, Substance P, Calcium signals

*名古屋市立大学薬学部

Yamaguchi, M. *¹, Hirai, K. *¹, Komiya, A. *¹, Miyamasu, M. *¹, Furumoto, Y. *¹, Teshima, R., Ohta, K. *², Morita, Y. *¹, Galli, S.J. *³, Ra, C. *⁴, Yamamoto, K. *¹: **Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone**

Int. Immunol. **13**, 843-851 (2001)

It is now clear that the mast cell's functional response to IgE-dependent stimulation can be influenced significantly by the level of expression of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on the cell's surface. Thus, modulation of Fc epsilon RI surface expression represents a potentially important mechanism for regulating mast cell activity in allergic reactions. In this study, we examined whether a glucocorticoid, dexamethasone (DEX), can influence levels of mast cell Fc epsilon RI expression either in the presence or absence of IgE, an up-regulator of the mast cell surface Fc epsilon RI level. In the absence of IgE, DEX decreased the surface Fc epsilon RI levels in mouse peritoneal mast cells, mouse bone marrow-derived cultured mast cells and a mouse mast cell line, Cl.MC/C57.1. Moreover, DEX also partially suppressed the ability of IgE to enhance surface expression of Fc epsilon RI in these cells. Three different glucocorticoids, DEX, methylprednisolone and hydrocortisone, suppressed Fc epsilon RI expression in mast cells. On the other hand, DEX did not affect levels of Fc epsilon RI alpha, beta or gamma mRNA, suggesting that its ability to decrease surface Fc epsilon RI reflects a post-transcriptional mechanism. These results show that mast cell surface Fc epsilon RI expression is suppressed by glucocorticoids in both the presence and absence of IgE, and suggest that reduction of mast cell surface Fc epsilon RI levels may be one of the favorable anti-allergic actions of glucocorticoids.

Keywords: Dexamethasone, IgE receptor, Mouse mast cell

*1 東京大学医学部

*2 帝京大学医学部

*3 Stanford University

*4 順天堂大学医学部

Matsui, S. *¹, Matumoto, S. *¹, Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A. *¹, Watanabe, H. *¹, Ohashi, K. *², Mizuno, K. *², Yamaguchi, T., Kasahara, T. *², and Suzuki, K.: **LIM Kinase 1 Modulates Opsonized Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. Possible Involvement of Phosphorylation of Cofilin and**

Reorganization of Actin Cytoskeleton*J. Biol. Chem.*, 277, 544-549 (2002)

In dormant phagocytes, the endogenous LIMK1 was diffusely distributed in the cytosol of macrophage-like U937 cells and, when activated by opsonized zymosan (OZ), it was translocated to plasma membranes. Green fluorescence protein (GFP)-conjugated LIMK was expressed in the phagocytes, and the GFP-positive cells were isolated by a fluorescence-activated cell sorter. The isolated wild-type LIMK-overexpressing cells produced superoxide at a rate that was 3.2-fold higher than that of only GFP-expressing control cells, while the respiratory burst of dominant negative LIMK1(D460A)-expressing cells decreased to 31% of that of the control cells. Phagocytic activity monitored by using Texas Red-labeled OZ was also decreased in the D460A-expressing cells. Phosphorylation of cofilin was dependent on the types of expressing LIMK1. Furthermore, in the wild-type LIMK1-expressing cells, OZ-evoked increase in filamentous actin was markedly enhanced, while in the dominant negative LIMK1-expressing cells, the total level of F-actin was strongly suppressed. These results suggest that LIMK1 regulates the functions of phagocytes through phosphorylation of cofilin and enhances the formation of filamentous actin.

Keywords: LIM kinase, Cofilin, Macrophage

*¹ Kyoritsu College of Pharmacy

*² Tohoku University

Ono, K., Masumiya, H.*¹, Sakamoto, A.*^{2,3}, Christie, G.*⁴, Shijuku, T.*¹, Tanaka, H.*¹, Shigenobu, K.*¹ and Ozaki, Y.: **Electrophysiological analysis of the negative chronotropic effect of endothelin-1 in rabbit SA node cells.**

J. Physiol., 537, 467-488 (2001)

Electrophysiological effects of endothelin-1 (ET-1) were studied in rabbit sinoatrial node (SAN) using conventional microelectrode and whole-cell voltage and current recordings. In rabbit SAN, RT-PCR detected ET_A endothelin receptor mRNA. ET-1 (100 nM) increased the cycle length of action potentials (APs) from 305 ± 15 to 388 ± 25 ms, which was antagonized by the ET_A receptor-selective antagonist BQ-123 (1 μM). ET-1 increased AP duration (APD₅₀) by 22 %, depolarized the maximum diastolic potential (MDP) by +6 mV, shifted the take-off potential by +5 mV and decreased the pacemaker potential (PMP) slope by 15 %. In the same experimental conditions, ET-1 caused a positive chronotropic effect in

guinea-pig SAN with a 13 % decrease in APD₅₀, a -4 mV shift in the take-off potential and an 8 % increase in the PMP slope. Rabbit SAN exhibited two major cell types, distinguished by both their appearances and electrophysiological responses to ET-1. Whereas spontaneous pacing rate and the PMP slope were similarly decreased by ET-1 (10 nM) in both cell types, ET-1 depolarized MDP from by +5 mV in spindle-shaped cells but hyperpolarized it by -8 mV in rod-shaped cells. ET-1 decreased APD₅₀ by 8 and 52 % and shifted the take-off potential by +5 and -9 mV in spindle- and rod-shaped cells, respectively. ET-1 decreased the high-threshold calcium current I_{CaL} by about 50 % in both cell types, without affecting its voltage-dependence, and decreased I_K, with significant shifts in its voltage-dependence by +4.7 and +14.0 mV in spindle- and rod-shaped cells, respectively. It was exclusively in rod-shaped cells that ET-1 activated a sizeable amount of time-independent inward-rectifying current. I_f, observed exclusively in spindle-shaped cells, was significantly increased by ET-1 at membrane potentials between -74.7 and -84.7 mV whereas it was significantly decreased at more negative potentials. ET-1 significantly decreased slope of the I-V relation of I_f tail without changing its half maximum voltage. The negative chronotropic response of the whole rabbit SAN to ET-1 would result from its diverse actions on spindle- and rod-shaped cells in this area.

Keywords: endothelin-1, sinoatrial node, chronotropic

*¹ Toho University School of Pharmaceutical Sciences

*² Form and Function, PRESTO

*³ Research Institute, National Cardiovascular Center

*⁴ University of Joseph Fourier, France

Sato, Y., Schmidt, A.G.*¹, Kiriazis, H.*¹, Hoit, B.D.*², and Kranias, E.G.*¹: **Re-evaluation of heart failure in transgenic mice with impaired SR Ca²⁺ release**

J. Mol. Cell. Cardiol. 33, 1757-1759 (2001)

Impaired Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum (SR) has been associated with cardiac morbidity in cardiac hypertrophy and cardiomyopathy. However, it is not currently clear whether a primary defect in SR Ca²⁺ release drives the progressive deterioration of function, leading to heart failure. Recently, transgenic mice with cardiac specific overexpression of dog (dCSQOE) and mouse (mCSQOE) calsequestrin were created by Jones et al. and our laboratory, respectively. In both models, SR Ca²⁺ loading capacity is enhanced, but SR Ca²⁺ release is

depressed leading to attenuation of Ca^{2+} transients and contractile parameters, compared to isogenic wild-types. The dCSQOE model is also characterized by dilated cardiomyopathy and premature death, suggesting that an increase in cardiac calsequestrin and/or concomitant defects in SR Ca^{2+} -release develop dilated cardiomyopathy. However, our recent studies indicate that cardiac overexpression of calsequestrin per se does not result in heart failure. Therefore, the heart failure phenotype of the dCSQOE model may not be related to the primary action of calsequestrin overexpression, but could rather be consequences of distinct etiologies. Thus, in establishing a link between alterations in cellular function and geometry with transgenesis, one must carefully distinguish between primary and secondary effects of the transgene, and evaluate the modifier alleles of the strain used.

Keywords: cardiac hypertrophy, heart failure, sarcoplasmic reticulum

*¹ University of Cincinnati

*² University Hospitals of Cleveland and Case Western Reserve University

Frank, K.F. *¹, Mesnard-Rouiller, L. *¹, Chu, G. *¹, Young, K.B. *¹, Zhao, W. *¹, Haghghi, K. *¹, Sato, Y., and Kranias, E.G. *¹: **Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene**

Basic. Res. Cardiol. **96**, 636-644 (2001)

Calsequestrin (CSQ) is a sarcoplasmic reticulum protein, which plays a predominant role in diastolic Ca^{2+} -storage in the mammalian heart. The present study was designed to define the gene structure, developmental and tissue specific expression of the murine, cardiac isoform of CSQ. Two sets of genomic libraries (lambda phage and PAC) were screened using the mouse cardiac CSQ cDNA, and several overlapping clones were isolated. These clones were characterized using restriction enzyme digestion, Southern blotting and partial sequencing. The cardiac CSQ gene consists of 11 exons and its 5' flanking region is characterized by the presence of a TATA-like box, muscle specific promoter elements such as 7 E-boxes, 1 MEF-2, 1 MCBF and 1 Repeat (musS) motifs, as well as several muscle non-specific transcriptional elements (AP-2A, NRE1, NRE2, p53, Sp1 and TFI-IIA). Expression of the cardiac isoform of CSQ was first detected on day 11 pre-birth and approached adult levels by day 4 post-birth. Expression of cardiac CSQ was also detected in adult fast-twitch skeletal muscle, thyroid,

testis and epididymis tissues. This genomic characterization of cardiac CSQ may form the basis for further evaluation of its regulatory role in Ca^{2+} homeostasis and contractility in the murine heart.

Keywords: calsequestrin, sarcoplasmic reticulum, promoter

*¹ University of Cincinnati

Kiriazis, H. *¹, Sato, Y., Kadambi, V.J. *², Schmidt, A.G. *¹, Gerst, M.J. *¹, Hoit, B.D. *³, and Kranias, E.G. *¹:

Hypertrophy and functional alterations in hyperdynamic phospholamban-knockout mouse hearts under chronic aortic stenosis

Cardiovasc. Res., **53**, 372-381 (2002)

Objective: To determine whether the hyperdynamic phospholamban-knockout hearts are capable of withstanding a chronic aortic stenosis. Methods: The transverse section of the aorta was banded in phospholamban-knockout (KO) and their isogenic wild-type (WT) mice, which were followed with echocardiography in parallel, along with sham-operated mice, before and at 2.5, 5 and 10 weeks after surgery. Results: Cardiac decompensation was evidenced by the presence of lung congestion in some banded KOs and WTs, giving rise to a subset of non-failing and failing hearts within each group. The incidence of heart failure was not genotype-dependent but rather associated with higher heart rates before surgery. The development of left ventricular hypertrophy was similar between KOs and WTs. Fractional shortening was reduced in failing KOs and WTs to a similar degree. In addition, fractional shortening was decreased in non-failing KOs but not WTs. Ejection times shortened after aortic banding particularly for failing hearts. Conclusion: The hyperdynamic phospholamban-knockout hearts are able to compensate against a sustained aortic stenosis similar to wild-types.

Keywords: cardiac hypertrophy, heart failure, sarcoplasmic reticulum

*¹ University of Cincinnati

*² Millennium Pharmaceuticals Inc.

*³ University Hospitals of Cleveland and Case Western Reserve University

Sai, K., Kanno, J., Hasegawa, R., Trosko, J.E. *, and Inoue, T.: **Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol**

Carcinogenesis, **21**, 1671-1676(2000)

Much evidence has been documented supporting the hypothesis that the down-regulation of gap junctional intercellular communication (GJIC) is a cellular event underlining the tumor-promotion process, and that treatment to prevent the down-regulation or to up-regulate GJIC is important for preventing the tumor promotion process. We explored the potential preventive effects of green tea against the promoting action of pentachlorophenol (PCP) in mouse hepatocarcinogenesis, examining whether drinking green tea prevents the down-regulation of GJIC-inhibition in the liver caused by tumorigenic doses of PCP. We used our modified *in vivo* GJIC-assay, the incision loading/dye transfer (IL/DT) method. Male B6C3F1 mice were given a green-tea infusion for one week and then PCP was then fed at doses of 300 and 600 ppm in their diet for the following 2 weeks along with green tea-treatment. A dose-related inhibition of GJIC in the hepatocytes was evident in the mice treated with PCP alone that was associated with a reduction in connexin 32 (Cx32) plaques in the plasma membrane and an increase in the index for cell proliferation. Drinking green tea significantly protected mice against GJIC-inhibition, the reduction in Cx32, and elevation of the labeling index. These findings suggest that green tea might act as an anti-promoter against PCP-induced mouse hepatocarcinogenesis via its ability to prevent the down regulation of GJIC.

Keywords: GJIC, pentachlorophenol, green tea

* Michigan State University, U.S.A.

Sai, K., Kang, K.-S.*¹, Hirose, A., Hasegawa, R., Trosko, J.*², and Inoue, T.: **Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication**

Cancer Letters, **173**, 163-174 (2001)

Pentachlorophenol (PCP), a promoter of murine hepatocarcinogenesis, inhibits gap junctional intercellular communication (GJIC) in rat liver epithelial cells *in vitro*. To test the hypothesis that both inhibition of GJIC and apoptosis contribute to tumor promotion, we investigated the effect of PCP on both GJIC and serum deprivation-induced apoptosis in v-myc-transfected rat liver epithelial cells. The results showed that PCP-inhibited apoptosis, as measured by the TUNEL assay and DNA ladder formation. Inhibition of apoptosis was associated with a decrease in GJIC. The study demonstrated that

PCP has a potential for inhibiting apoptosis and GJIC, supporting the hypothesis.

Key Words: Apoptosis, GJIC, pentachlorophenol

*¹ Seoul National University, Korea

*² Michigan State University, U.S.A.

Sai, K., Kaniwa, N., Ozawa, S., and Sawada, J.: **A new metabolite of irinotecan in which formation is mediated by human hepatic cytochrome P-450 3A4**

Drug Metabolism and Disposition, **29**, 1505-1513 (2001)

Irinotecan (CPT-11) is an anticancer prodrug. It is converted by carboxylesterase to yield an active metabolite, SN-38, that acts as a topoisomerase I inhibitor. Several oxidative metabolites of CPT-11 have been identified in humans, including APC and NPC, generated by CYP3A4. To further investigate the metabolism of CPT-11 in human liver, we analyzed metabolites of CPT-11 in human hepatic microsomes using an HPLC/MS system and detected a new metabolite that was the major one produced in the microsomal system. HPLC/MS/MS analysis indicated that this compound was an oxidation product formed by the loss of 2 hydrogen atoms from the terminal piperidine ring. Kinetic analyses indicated that the metabolite was generated by a single enzyme, and we have identified this enzyme in 2 *in vitro* systems. The formation of the new metabolite was significantly inhibited by SKF525A, ketoconazole, and an anti-CYP3A4 antibody and catalyzed specifically by CYP3A4 expressed in insect microsomes. A significant correlation was observed between the generation of this metabolite and the CYP3A4 content in individual human hepatic microsomes. These findings indicate that this newly detected metabolite is a CYP3A4-generated product that may be produced in hepatic microsomes of patients treated with CPT-11.

Keywords: CPT-11, CYP3A4, metabolites

Sai, K., Kaniwa, N., Ozawa, S., and Sawada, J.: **An analytical method for irinotecan (CPT-11) and its metabolites using a high-performance liquid chromatography: parallel detection with fluorescence and mass spectrometry.**

Biomedical Chromatography, **16**, 209-218 (2002)

Irinotecan (CPT-11) is an anticancer pro-drug used in the treatment of many types of cancer. We describe here the validation of an analytical method for CPT-11 and its metabolites, including an active metabolite, SN-38, its

glucuronidated form SN-38G, and several CYP3A-mediated products using an HPLC connected parallel to a fluorescence detector (FLD) and a mass selected detector (MSD). This method is characterized as follows: 1) simple extraction of the analytes from biomaterials with perchloric acid/methanol; 2) sensitive quantitation of major metabolites with FLD, where the limits of quantitation by FLD were 2.5 ng/ml for SN-38G and APC, 5 ng/ml for CPT-11 and 1 ng/ml for SN-38, respectively; 3) parallel selective monitoring of the metabolites including minor metabolites with MSD. There was no observed interference by other drugs expected to be co-administered. This method showed its usefulness by identifying a novel metabolite produced in human hepatic microsomes. The results indicate that this combination of FLD and MSD enables a highly selective analysis of CPT-11 and its metabolites, and is useful for studies both *in vivo* and *in vitro*.

Keywords: CPT-11, validation of analysis, HPLC/FLD & MSD

関澤 純：内分泌攪乱化学物質のリスクアセスメントとリスクコミュニケーション

最新医学, 57, 273-278(2002)

内分泌かく乱化学物質によるリスクを検討する際の課題と、リスクコミュニケーションのあり方について、筆者自身が行った研究成果を基に論じた。すなわち、前者については大豆中のエストロゲン物質による影響の可能性と、低用量曝露による影響の可能性についてはポリカーボネート樹脂から成型された血液透析器からのビスフェノールA溶出によるリスクを取り上げ、リスク評価における不確実性の扱いについても述べた。後者については市民の不安の要因を分析し、O157病原性大腸菌事故時のリスク対応を事故時のコミュニケーション例として取り上げ、平常時におけるコミュニケーションの問題のひとつとしてコミュニケーションへの要求の多様性とそれへの的確な対応について論じた。

Nakata, K., Takai-Igarashi, T.^{*1}, Nakano, T. and Kaminuma, T.: **Extension of The Receptor Database (RDB)**

Chem-Bio Informatics Journal, 1, 115-119 (2001)

Data on genetic polymorphisms particularly single nucleotide polymorphisms (SNPs) are now being rapidly accumulated and put on the Internet for public use. It is time consuming and cumbersome, however, for general researchers who are interested in certain groups of genes or proteins to collect and update genetic variation data for

these genes and proteins. An agent system is developed to search for and fetch SNPs data related to those genes and proteins pre-registered in the system. The system is tested and improved for collecting SNPs of different types of proteins, including certain drug target proteins.

Keywords: receptor structure, binding affinity, cell signaling, SNP, drug

^{*1} 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

Nakata, K., Tokunaga, M.^{*1}, Toda, K., Takai-Igarashi, T.^{*2}, and Kaminuma, T.: **An Agent System for Collecting SNPs Data on the Internet.**

Chem-Bio Informatics Journal, 1, 120-123 (2001)

The Receptor Database (RDB, <http://impact.nih.go.jp/RDB.html>) has been developed to help researchers retrieve various data related to receptors in a systematic manner. The system has been available on the Internet for public use since 1997. Recently, the RDB contents were updated and its links expanded to other Web sites and supplemented with additional database modules. The new RDB aims to support structural biologists and drug designers not only for the examination of receptor-ligand binding but also for the elucidation of post binding signal transduction pathways.

Keywords: Gene, nucleotide, polymorphisms, genetic variation

^{*1} アドイン研究所

^{*2} 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

Nakano T.^{*1}, Kaminuma T.^{*1}, Sato T.^{*2}, Fukuzawa K.^{*2}, Akiyama Y.^{*3}, Uebayasi M.^{*3} and Kitaura K.^{*3}: **Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential**

Chem. Phys. Lett. 351, 475-480 (2002).

Recently, we have proposed the fragment molecular orbital (FMO) method; an approximate MO method for calculating large molecules such as proteins. The method has been shown to reproduce ab initio total energies and geometries of molecules in good accuracy. The most time consuming part in the method, the calculations of environmental electrostatic potentials, were speeded up by employing the Mulliken approximation for two-electron integrals and a fractional point charge approximation. Numerical calculations on several polypeptides revealed that the approximations brought no significant loss of accuracy in the total energy of molecules and were of practical use.

^{*1} 国立医薬品食品衛生研究所

*2 富士総合研究所

*3 産業技術総合研究所

Yoon, B-I., Hirabayashi Y., Kaneko, T., Kodama, Y., Kanno, J., Yodoi J. *¹, Kim, D-Y. *² and Inoue, T.: **Transgene expression of thioredoxin (trx/adf) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (tcdd)-induced hematotoxicity.**

Arch Environ Contam Toxicol. **41**, 232-236 (2001)

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) has a variety of toxic effects on a number of organs including hematopoietic system. The importance of TCDD-induced oxidative stress has been evaluated in several target organs. However, its role in hematotoxicity remains poorly understood, although bone marrow is an organ known to produce reactive oxygen species. The aim of this study is to evaluate not only the contribution of oxidative stress to TCDD-induced hematotoxicity but also evaluate the protective function of TRX/ADF, a known anti-oxidative stress agent, on the hematotoxicity of TCDD in ADF wild-type (WT) and transgenic (Tg) mice. WT and Tg mice received a single intraperitoneal injection of 20 mg TCDD/kg. One day after the treatment, blood and bone marrow cellularity was measured and bone marrow levels of granulocyte/macrophage colony-forming units (CFU-GM) were determined in the in vitro colony assay. The expression of human TRX (hTRX) transgene by their bone marrow cells was analyzed by Western blot electrophoresis. Our results showed that overexpression of TRX/ADF protects TCDD-induced hematotoxicity, indicating that induction of oxidative stress which results in disruption of redox regulation may be an important mechanism in TCDD-induced bone-marrow toxicity. Moreover, we detected a significant decrease of AhR mRNA levels in bone marrow cells of Tg mice following TCDD treatment, suggesting a biological role of TRX/ADF in the AhR-mediated pathway through which TCDD induces oxidative stress.

Keywords: Ah receptor, hematotoxicity, thioredoxin.

*¹ Kyoto University

*² Seoul National University, Korea.

Yoon, B-I, Hirabayashi, Y., Ogawa, Y., Kanno, J., Inoue, T. and Kaneko, T.: **Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice**

Chemosphere. **43**, 819-822(2001)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is a

widely spread environmental pollutant. Homopoietic system is one of the targets of TCDD in laboratory animals including monkeys. The present study is the hemopoietic cell kinetics in mice, from the severe depression in cellularity of bone marrow and CFU-GM, to their recovery after the intraperitoneal injection of high dosage of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). The bone-marrow cellularity and CFU-GM were severely decreased to 37.8% and 48% of the control, respectively until day 1 after exposure to TCDD. They were, however, soon recovered, even overshoot the control value. Subsequently, they tended to show decrease and oscillation again to and under the control value. In conclusion, our cell kinetic study has proven the oscillation in bone-marrow cellularity and CFU-GM during the recovery period, of which the observation seems to be useful to extend our understanding in the hematotoxicity of TCDD.

Keywords: hematotoxicity, mice, TCDD, granulocyte-macrophage.colony forming unit (CFU-GM)

Tanaka, K. *, Watanabe, K. *, Mori, M. *, Kamisaku, H. *, Tsuji, H. *, Hirabayashi, Y., Inoue, T., Yoshida, K. * and Aizawa, S. *: **Cytogenetic and cellular events during radiation-induced thymic lymphomagenesis in the p53 heterozygous (+/-) B10 mouse.**

Int J Radiat Biol., **78**, 165-172(2002)

PURPOSE: Cellular and cytogenetic events in radiation-induced thymic lymphomagenesis were investigated in the p53 heterozygous (+/-) mouse following a single dose of whole-body irradiation. MATERIALS AND METHODS: The loss of the wild-type p53 allele and microsatellite markers of chromosome 11 in thymic lymphomas that developed in the p53 heterozygous (+/-) mouse after irradiation, and the stage at which prelymphoma cells appeared were analysed. RESULTS: The p53 heterozygous mouse developed thymic lymphomas in a dose-dependent manner. The loss of the wild-type p53 allele (loss of heterozygosity; LOH) occurred in almost all thymic lymphomas induced in the irradiated p53 heterozygous mouse. Cytogenetic analysis for the mechanism of LOH strongly suggested that the loss of the wild-type p53 gene in the lymphomas was caused by duplication of the disrupted allele through either homologous recombination or non-disjunctional chromosome duplication. The assay for prelymphoma cells suggested that a critical event in the development of prelymphoma cells occurred at least 3 weeks after

irradiation. CONCLUSIONS: The loss of the wild-type p53 gene in thymocytes of the p53 heterozygous mouse may precede the development of prelymphoma cells after irradiation and be a valuable marker of radiation-induced leukemogenesis.

Keywords: loss of heterozygosity, microsatellite repeats, p53

* National Institute of Radiological Sciences

Kanno, J., Onyon, L.*¹, Haseman, J.*², Fenner-Crisp, P.*³, Ashby, J.*⁴ and Owens, W.*⁵: **The OECD program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses Phase 1** *Environmental Health Perspectives*, **109**, 785-794 (2001)

The OECD has completed the first phase of an international validation program for the rodent uterotrophic bioassay. It is intended to identify the in vivo activity of compounds that are suspected agonists or antagonists for further testing. We tested and compared two model systems, the immature female rat and the adult ovariectomized rat. Data from 19 participating laboratories using ethinyl estradiol (EE), and an antagonist, ZM189,154, indicate no substantive performance differences between models. All laboratories and all protocols successfully detected increases in uterine weights using EE in phase 1. For the next phase of the OECD validation program, both models will be tested against a battery of weak, partial estrogen agonists.

Keywords: endocrine disruption, estrogen, rat uterus

*¹ Environment, Health and Safety Division, OECD

*² National Institute of Environmental Health Sciences, USA

*³ U.S. Environmental Protection Agency

*⁴ Syngenta Central Toxicology Laboratory, UK

*⁵ Procter & Gamble, USA

Haraguchi, S.*¹, Kitajima, S., Takagi, A., Takeda, H.*², Inoue, T. and Saga Y.*²: **Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: differential usage of enhancers during development**

Mech Dev., **108**, 59-69 (2001)

Mesp1 and Mesp2 encode bHLH-type transcription factors, Mesp1 and Mesp2, respectively. The expression of both genes is observed in the nascent mesoderm, and subsequently in the rostral presomitic mesoderm. To determine the regulatory mechanism for gene expression, we attempted to identify enhancer elements by transient transgenic analysis. At least two enhancers were

identified. Deletion studies indicate that either gene may use the same enhancer for early mesoderm development, whereas both genes may utilize separate enhancers to regulate their expression in the presomitic mesoderm.

Keywords: Mesp1, Mesp2, enhancer

*¹ Shiga University of Medical Science

*² National Institute of Genetics

Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H.*¹ and Saga, Y.*¹: **Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis.** *Development* **129**, 2473-2481 (2002).

A bHLH-type transcription factor, *Mesp2* plays an essential role on the somite segmentation in the mouse. To ask whether the zebrafish *mesp-b* represents functional homologue of the mouse *Mesp2*, zebrafish *mesp-b* was introduced into the mouse *Mesp2* locus by homologous recombination. Introduced *mesp-b* almost rescued the *Mesp2* deficiency in the homozygous *mesp-b* knockin mouse, indicating that *mesp-b* is a functional homologue of mouse *Mesp2*. Interestingly, however, the nature and dosage of *mespb* gene affected the rescue event. A mouse line, which has a hypomorphic *Mesp2* allele, gave rise to an epithelial somite, without normal rostro-caudal polarity within a somite. These results suggest that Mesp family transcription factor is involved in both segment border formation and establishment of RC polarity through different genetic cascades.

Keywords: somitogenesis, *Mesp2*, *Mespb*

*¹ National Institute of Genetics

Ueno, M.*¹, Igarashi, K., Kimura, N., Okita, K.*¹, Takizawa, M.*¹, Nobuhisa, I.*¹, Kojima, T., Kitamura, T., Samulowitz, U, Vestweber, D, Shimomura, T.*¹, Suda, T.*¹, Nakashima, K.*¹ and Taga, T.*¹: **Endomucin is expressed in embryonic dorsal aorta and is able to inhibit cell adhesion**

Biochem Biophys Res Commun, **287**, 501-6 (2001)

Recent studies have suggested the existence of progenitors common to hematopoietic and endothelial cells, called hemangioblasts, in, for instance, embryonic dorsal aorta. To identify a membrane-bound or secretory molecule regulating early hematopoiesis, we screened a cDNA library from dorsal aortas of embryonic day (E) 10.5 mice by a signal sequence trap method and obtained a clone encoding a sialoprotein, endomucin-1. Immunohistochemistry revealed that the endomucin-1

transcript was specifically expressed in the endothelial cells of dorsal aorta of E10.5 mouse embryo. Overexpression of endomucin -1 strongly inhibited adhesion and aggregation of cells, including cultured endothelial cells from E10.5 dorsal aorta. These data suggest that endomucin -1 may play a role in detachment of hematopoietic cells from endothelium during early hematopoiesis.

Keywords: endomucin, hematopoiesis

* Kumamoto University

Hikima, T. *, Ohno, Y., Maibach HI: **Metabolism of prednisolone 21-acetate in hairless mouse skin**

Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol., **14**, 203-209 (2001)

皮膚における21-酢酸プレドニゾロンの加水分解活性をヘアレスマウス皮膚を用いて検討し、ヒトでの結果と比較した。Km値は市販のエステラーゼとほぼ同じで14.2 μMであった。Cmax値は0.67nmol/mion/mg proteinであった。この活性は酵素阻害剤である3,4-dichloroisocoumarin (DCIC)で3割りほどしか抑制されなかった。この活性の66%はミクロソームに11%は可溶性分画に存在した。DCICは主にミクロソーム分画の活性を抑制したが、p-hydroxymercuribenzoic acid (HMBA)は可溶性分画の活性を主に阻害した。これらの結果から両分画に存在するエステラーゼは異なる分子種であることが示唆された。

Keywords: skin metabolism, prednisolone 21 acetate, hairless mouse, esterase

*九州工業大学

Tsuda, M., Koizumi, S. and Inoue, M.: **Role of endogenous ATP at the incision area in a rat model of postoperative pain**

Neuroreport, **12**, 1701-1704 (2001)

The aim of the present study is to characterize the role of endogenous ATP leaked from damaged cells in a rat model of postoperative pain. We found that systemic and local administration of a P2 receptor antagonist, PPADS before surgery significantly attenuated mechanical allodynia caused by an incision of the plantar surface of the hindpaw. Furthermore, PPADS significantly reduced the incision-evoked c-Fos protein expression in the dorsal horn of the spinal cord. The present findings suggest that excitatory signaling by endogenous ATP leaked from damaged cells via PPADS-sensitive P2 receptors is necessary for the induction of the postoperative pain characterized by mechanical allodynia.

Keywords: ATP, postoperative pain, PPADS

Inoue, K. and Koizumi, S.: **Mechanism of the inhibitory action of ATP in rat hippocampus**

Drug Development Research, **52**, 95-103 (2001)

We have already shown that ATP inhibits synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons. Using FM1-43 method and Ca²⁺ imaging technique, we show here that ATP acting on presynaptic P2Y receptors inhibits the bleaching of FM1-43 signals in the hippocampal neurons. This inhibition was presumably due to reduction of presynaptic N- or P/Q-type Ca²⁺ channels. Meanwhile, ATP stimulates GABA release and inhibits the excitable function of glutamate. Besides these actions, ATP is known to activate microglia to release some neuroprotective cytokines. Taken together, these data suggest that ATP may protect the hippocampal function from excess excitation.

Keywords: ATP, hippocampus, brain damage

Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Tsuda, M., Ohsawa, K. *, Kohsaka, S. * and Inoue, K.: **Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5**

J. Neurochem., **78**, 1339-1349 (2001)

The ATP-evoked production of interleukin-6 (IL-6) and its intracellular signals were examined using a mouse microglial cell line, MG-5. ATP but not its metabolites produced IL-6. Although ATP-activated p38 was involved in the IL-6 induction, its activation was not sufficient for the IL-6 induction. An agonist to P2X7 receptors failed to produce IL-6 in spite of the fact that it activated p38. Unlike in other cytokines in microglial cells, P2Y rather than P2X7 receptors seem to have a major role in the IL-6 production by the cells. The ATP-evoked IL-6 production was attenuated by G_i6976, an inhibitor of Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC). The P2Y receptor responsible for these responses was insensitive to pertussis toxin (PTX) and was linked to phospholipase C. Taken together, ATP acting on PTX-insensitive P2Y receptors activates p38 and Ca²⁺-dependent PKC, thereby resulting in the mRNA expression and release of IL-6 in MG-5.

Keywords: microglia, ATP, interleukin-6

*国立精神神経センター

Inoue, K. *, Koizumi, S., Fujiwara, S. *, Denda, S. *, Inoue, K. and Denda, M. *: **Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal**

keratinocytes

Biochem. Biophys. Res. Commun., **291**, 124-129 (2002)

Capsaicin receptor subtype 1, VR1, is an ion channel that serves as a polymodal detector of pain-producing chemicals such as capsaicin and protons in primary afferent neurons. Here we showed that both capsaicin and H⁺ produced elevations in [Ca²⁺]_i in cultured human epidermal keratinocytes (NHEK). The capsaicin- and acidification-evoked increases in [Ca²⁺]_i were inhibited by capsazepine, an antagonist to VR1. Expression of VR1 mRNA and protein were observed in the cells. VR1 functions as a sensor against noxious chemical stimuli such as capsaicin or H⁺ in NHEK.

Keywords: VR1, capsaicin, NHEK

*資生堂

Scalettar, B.A. ^{*1}, Rosa, P. ^{*2}, Taverna, E. ^{*2}, Maura Francolini, M. ^{*2}, Tsuboi, T. ^{*3}, Terakawa, S. ^{*3}, Koizumi, S., Roder J. ^{*4}, and Jeromin, A. ^{*4}: **Real-time imaging of neuronal calcium sensor-1 as a component of synaptic-like microvesicles in PC12 cells**

J. Cell Sci., **115**, 2399-2412 (2002)

The distribution, dynamics, and function of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) were studied using PC12. NCS-1 was associated with SLMVs in growth cones, enhanced recycling of regulated secretory organelles and increased levels of phosphoinositides. NCS-1 upregulated a population of PI4K that is associated with SLMVs, and influenced regulated exocytosis by enhancing phosphoinositide signaling. These results reveal novel attributes of SLMV dynamics in growth cones and interesting similarities and differences between protein trafficking to neurotransmitter-containing vesicles in neuroendocrine cells.

Keywords: NCS-1, PI4K, PC12 cells,

^{*1} Lewis & Clark College

^{*2} CNR-Cell. Mol. Pharmacol. Center

^{*3} Hamamatsu Medical College

^{*4} Mount Sinai Hospital

Nakazawa, K., Ohno, Y.: **Modulations by Estrogens and Xenoestrogens of Recombinant Human Neuronal Nicotinic Receptors**

Eur. J. Pharmacol., **430**, 175-183 (2001)

The effects of estrogens and xenoestrogens on human neuronal nicotinic acetylcholine receptor/channels were examined by expressing recombinant channels in *Xenopus* oocytes. When functional channels were

expressed with $\alpha 3$ and $\beta 4$ subunits, estrogens (17 β -estradiol, 17 α -estradiol, 17 β -ethynylestradiol and diethylstilbestrol) and xenoestrogens (bisphenol A, p-nonylphenol and p-octylphenol) inhibited an ionic current activated by acetylcholine at concentrations up to 100 μ M. When changed to $\alpha 4\beta 2$, diethylstilbestrol and the xenoestrogens inhibited the acetylcholine-activated current, but 17 β -estradiol or 17 β -estradiol did not inhibit the current. For 17 α -ethynylestradiol, the current through $\alpha 4\beta 2$ receptor/channel was inhibited at 1 μ M, but it was markedly enhanced at 10 and 100 μ M. Tamoxifen (10 μ M), an antiestrogen, itself inhibited the acetylcholine-activated current, but did not antagonize the current modulations induced by the estrogens and the xenoestrogens. These and additional results suggest that human neuronal nicotinic acetylcholine receptors are the targets of non-genomic actions of estrogens and xenoestrogens.

Keywords: human nicotinic receptor, estrogen, xenoestrogen

Sato, K., and Matsuki, N*: **A72 kilodalton-heat shock protein is protective against the selective vulnerability of CA1 neurons and is essential for the tolerance exhibited by CA3 neurons in the hippocampus**

Neuroscience, **109**, 746-756 (2002)

The correlation between the expression of 72 kilodalton-heat shock protein and vulnerability of hippocampal CA1, CA3 and dentate gyrus regions to glutamate toxicity was investigated using a highly specific antisense oligonucleotide technique. Glutamate (1 mM, 15 min) caused region-dependent neuronal damage in cultured hippocampal slices 24 hr after the exposure and the most severe damage was observed in CA1. When slices were heat-shocked (43.5 °C, 30 min) before the exposure to glutamate, the neuronal damage in CA1 was attenuated. The strongest protection was observed when the interval between the heat shock and the exposure to glutamate was 3 days, which coincided with that for the maximal induction of 72 kilodalton-heat shock protein in neurons. When the expression of 72 kilodalton-heat shock protein was suppressed by the antisense oligonucleotide, the protective effect of the heat shock was inhibited completely. Glutamate itself also induced 72 kilodalton-heat shock protein in neurons region-dependently 24 hr after the exposure. The signal of 72 kilodalton-heat shock protein in CA3 and dentate gyrus was significantly stronger than that in CA1. When the antisense

oligonucleotide was applied, the damage in CA3 and dentate gyrus was exaggerated dose-dependently and this effect was more remarkable in CA3 than in dentate gyrus. We concluded that: (i) HSP70 has a protective effect against the selective vulnerability of CA1 neurons, (ii) HSP70 is one of the essential factors for the tolerance of CA3 neurons, (iii) DG has some mechanism other than those mediated through HSP70.

Keywords : HSP70, hippocampal slice culture, antisense oligonucleotide

*東京大学

Murayama, N., Sai, K., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Ozawa, S., Ohno, Y. and Sawada, J.: **Expression of CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur**

Jpn.J.Cancer Res., **92**, 524-528 (2001)

To examine the role of cytochrome P450A6 (CYP2A6) in the cellular sensitivity to an anti-tumor prodrug, tegafur (FT), a CYP2A6 cDNA construct was transfected into cells of a colon cancer cell line, DLD-1 (DLD/CYP2A6 cells). The extent of growth inhibition of the DLD-1/CYP2A6 cells by FT was greater than that of DLD-1/null cells. Thus, intracellular expression of CYP2A6 can sensitize cells to FT.

Keywords: tegafur, CYP2A6, prodrug

Ui, A^{*}, Satoh, Y^{*}, Onoda, F^{*}, Miyajima, A., Seki, M^{*}. and Enomoto T^{*}. : **The N-terminal region of Sgs1, which interacts with Top3, is required for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyper-recombination in *sgs1* disruptants.**

Mol Genet Genomics., **265**, 837-850 (2001)

The *SGS1* gene is a yeast homologue of the genes affected in Bloom's syndrome, Werner's syndrome, and Rothmund-Thomson's syndrome. We demonstrate that the C-terminal conserved region, as well as the helicase motifs, of Sgs1 are essential for complementation of MMS sensitivity and suppression of hyper-recombination in *sgs1* mutants. In contrast, the highly charged acidic regions, the HRDC domain, and the C-terminal 252 amino acids were dispensable for the complementation of these phenotypes. Surprisingly, the N-terminal 45 amino acids of Sgs1 were absolutely required for the suppression of the above phenotypes.

Keywords: Sgs1, RecQ, Top3

*Tohoku University

Onodera, R^{*}, Seki, M^{*}, Ui, A^{*}, Satoh, Y^{*}, Miyajima, A., Onoda, F^{*}. and Enomoto, T^{*}. : **Functional and physical interaction between Sgs1 and Top3 and Sgs1-independent function of Top3 in DNA recombination repair.**

Genes Genet Syst., **77**, 11-21 (2002)

We found that several amino acids residues in the N-terminal region of Sgs1 between residues 4 and 33 were responsible for binding to Top3 and essential for complementing the MMS sensitivity of *sgs1* cells. Although disruption of the *SGS1* suppressed the semi-lethality of the *top3* mutant, the *sgs1-top3* mutant grew more slowly and was more sensitive to MMS than the *sgs1* mutant, indicating that Top3 plays some role independently of Sgs1. The DNA topoisomerase activity of Top3 was required for the function to repair DNA damages induced by MMS, as shown by the fact that the Top3 gene carrying a mutation (Phe for Tyr) at amino acid residue essential for its activity (residue 356) failed to restore MMS sensitivity of *sgs1-top3* to the level of that of the *sgs1* mutant.

Keywords: Top3, Sgs1, slow-growth

*Tohoku University

West, M.^{*1}, Blanchette, C.^{*2}, Dressman, H.^{*2}, Huang, E.^{*2}, Ishida, S., Spang, R.^{*1}, Zuzan, H.^{*1}, Olson, J.A. Jr^{*2}, Marks, J.R.^{*2}, Nevins, J.R.^{*2}: **Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles**

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **98**, 11462-11467 (2001)

Prognostic and predictive factors are indispensable tools in the treatment of patients with neoplastic disease. Gene expression assays have the potential to supplement what were previously a few distinct features with many thousands of features. We have developed Bayesian regression models that provide predictive capability based on gene expression data derived from DNA microarray analysis of a series of primary breast cancer samples. These patterns have the capacity to discriminate breast tumors on the basis of estrogen receptor status and also on the categorized lymph node status. The practical value of such approaches relies on the ability not only to assess relative probabilities of clinical outcomes for future samples but also to provide an honest assessment of the uncertainties associated with such predictive classifications on the basis of the selection of gene subsets for each validation analysis.

Keywords: breast cancer, gene expression profiling, DNA

microarray

*¹ Duke University*² Duke University Medical Center, U.S.A.

Ishida, S., Huang, E. *², Zuzan, H. *¹, Spang, R. *¹, Leone, G. *², West, M. *¹, Nevins, J.R. *²: **Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis.**

Mol. Cell. Biol., **21**, 4684-4699 (2001)

We have used high-density DNA microarrays to provide an analysis of gene regulation during the mammalian cell cycle and the role of E2F in this process. Analysis of cell cycle samples identified seven distinct clusters of genes that exhibit unique patterns of expression. Genes tend to cluster within these groups based on common function and the time during the cell cycle that the activity is required. The analysis of genes induced by E2F proteins identified genes not previously described as regulated by E2F proteins; surprisingly, many of these encode proteins known to function during mitosis. A comparison of the E2F-induced genes with the patterns of cell growth-regulated gene expression revealed that virtually all of the E2F-induced genes are found in only G(1)/S and G(2). The activation of the G(2) genes suggests a broader role for E2F in the control of both DNA replication and mitotic activities.

Keywords: cell cycle regulated genes, E2F target genes, DNA microarray

*¹ Duke University*² Duke University Medical Center, U.S.A.

Sakimura, M. *, Hanzawa, S. *, Tsukada, A. *, Yamamoto, I. *, Saito, N. *, Usami, M., Ohno, Y., Shimada K. *: **Effect of estradiol and nonylphenol on mRNA levels of vitellogenin II in the liver of chicken embryos**

J. Poultry Sci., **38**, 250-257 (2001)

Nonylphenol is one of the endocrine disrupting agents with estrogenic activity in some vertebrates. The present study was conducted to assess estrogenic activity of *p*-nonylphenol (NP) in chicken embryos by determining mRNA levels of liver vitellogenin II (VTGII). Fertile chicken eggs were incubated using standard conditions. In the group 1, the eggs were treated with a single injection of either NP or estradiol (E2) on day 16 of incubation. In the group 2, the eggs were treated with double injection of either NP or E2 on days 13 and 16 of incubation. On day 18 of incubation the liver was collected and total RNA was extracted. VTGII mRNA levels were

determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. No VTGII mRNA was detected in the control group, whereas distinct VTGII mRNA was revealed in the E2 treatment group where there was higher expression in the group 2 than in the group 1. Weak but distinct VTGII mRNA was detected in the NP treatment group. This study indicates that NP may have estrogenic activity in terms of liver VTGII mRNA assessed by RT-PCR assay in the chicken embryo.

Keywords: nonylphenol, estradiol, vitellogenin II

* Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Sakimura, M. *, Usami, M., Hanzawa, S. *, Tsukada, A. *, Saito, N. *, Ohno, Y., Shimada, K. *: **Suppressive effect of *p*-nonylphenol on male-specific mRNA expression in the embryonic gonad of chickens**

J. Poultry Sci., **39**, 91-99 (2002)

Effects of estradiol (E2) and *p*-nonylphenol (NP) on the mRNA expression of sex determination-related genes were examined in the embryonic gonad of chickens. Fertilized eggs were treated with either E2 (0.1 and 1.0 mg/egg) or NP (0.001, 0.01, 0.1 and 0.2 mg/egg) twice on days 13 and 16 of incubation. The mRNA expressions of anti-Müllerian hormone (AMH), SRY-related HMG box9 (SOX9), cytochrome P450 aromatase (P450arom) and steroidogenic factor 1 (SF-1) in the embryonic gonads were determined by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) on day 18 of incubation. AMH, SOX9 and P450arom, but not SF-1, showed sexually dimorphic expression in the control; AMH and SOX9 were male-specific while P450arom was female-specific. E2 had no effects on these expressions in either sex. In contrast, NP reduced the expressions of AMH and SOX9 only in the males but had no effects on the expressions of P450arom and SF-1. These results suggest that NP has endocrine disrupting effects on the mRNA expression of sex determination-related genes in the gonads of chicken embryos.

Keywords: *p*-nonylphenol, AMH, SOX9,

* Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Ikezaki, S. *¹, Nishikawa, A., Furukawa, F., Kudo, K. *¹, Nakamura, H., Tamura, K. *¹ and Mori, H. *²: **Chemopreventive effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine and sodium chloride in rats.**

Anticancer Res., **21**, 3407-3411 (2001)

The effects of curcumin on glandular stomach carcinogenesis were investigated in male Wistar rats. Rats were given N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanisine (MNNG) in their drinking water at a dose of 100 ppm and simultaneously fed a diet supplemented with 5% NaCl for 8 weeks. They were then fed a diet containing either 0.2% or 0.05% curcumin or kept on a basal diet alone for 55 weeks. The mean number of atypical hyperplasias or adenocarcinomas of the glandular stomachs was significantly ($p < 0.05$) reduced by the treatment of 0.05% curcumin. Thus, our results indicate that curcumin exerts chemopreventive effects, when given during the post-initiation phase of glandular stomach carcinogenesis in rats.

Keywords: curcumin, stomach carcinogenesis, rat

*¹ (株)ボゾリサーチセンター

*² 岐阜大学医学部

Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Son, H-Y., Imazawa, T. and Hirose M.: **Oral toxicity of a tocotrienol preparation in rats.**

Food Chem. Toxic., **39**, 799-805 (2001)

A 13-week oral toxicity study on tocotrienol preparation was performed in F344 rats of both sexes at dose levels of 0, 0.19, 0.75 and 3% in diet. Because of pathological changes such as slight hepatocellular hypertrophy in male livers and hematological changes in females, the NOAEL was concluded to be 0.19% in the diet (120 mg/kg body weight/day for male rats and 130 mg/kg body weight/day for female rats). As a decrease in MCV, an increase in A/G, elevation of alkaline phosphatase and increase in adrenal weight were observed in all treated males, the NOEL could not be determined in this examination.

Keywords: tocotrienol, oral toxicity, rat

Morimura, K.* , Hori, T.* , Kaneko, M.* , Nishikawa, T.* , Nishikawa, A., Wanibuchi, H.* , Takada, N.* , Osugi, H.* and Fukushima, S.*: **Promotion of chemically induced rat esophageal tumorigenesis with post-initiation ethanol modification.**

Teratog. Carcinog. Mutagen., **21**, 295-301 (2001)

Post-initiation ethanol modification on esophageal carcinogenesis model was investigated in male rats receiving NMBA for the first 5 weeks and then were treated with 0%, 3.3%, and 10% ethanol in the drinking water for up to 20 weeks. There were no statistical

differences in the incidence and multiplicity of esophageal tumors among the groups. However, the multiplicity of hyperplasias was statistically greater in the 10% ethanol group. BrdU-labelling indices of tumors and hyperplasias in NMBA-treated groups were essentially similar, although cyclin D1 was overexpressed to a greater extent in tumors and also hyperplasias of the 10% ethanol group. The results indicated ethanol to exert weak promotion effects through cyclin D1 overexpression on rat esophageal tumorigenesis initiated with NMBA.

Keywords: ethanol, esophageal tumorigenesis, rat

*大阪市立大学医学部

Nishikawa, A., Suzuki, T., Masumura, K., Furukawa, F., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H-Y., Nohmi, T., Hayashi, M. and Hirose, M.: **Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis.**

J. Exp. Clin. Cancer Res., **20**, 111-115 (2001)

Recently, transgenic animal models with reporter genes have been developed as a tool for assessing *in vivo* mutagenicity as well as carcinogenicity. DMN significantly increased *lacI* mutant frequency (MF) in the liver, kidneys and lungs, but not in other non-target organs. The spectrum of mutant plaques induced by DMN was characterized by deletions as well as GC to AT base transitions. The remaining mice receiving DMN proved to have liver adenomas after 78 weeks. Meanwhile, MeIQx significantly increased *lacI* and *gpt* MFs in the liver and colon. The characteristic spectrum of mutant plaques induced by MeIQx was a GC to TA base transversion in both the *lacI* and *gpt* mutations. Our results thus suggest that these reporter gene transgenic animal models could offer a useful tool for analyzing molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis.

Keywords: reporter gene, transgenic mice, molecular mechanism

Ikeda, T., Nishikawa, A., Son, H-Y., Nakamura, H., Miyauchi, M., Imazawa, T., Kimura, S.* and Hirose, M.: **Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation.**

Jpn. J. Cancer Res., **92**, 390-395 (2001)

The specificity and dose dependence of the synergistic effects of soybean intake with iodine deficiency on the induction of thyroid proliferation were investigated in

female F344 rats. In the first experiment, soybean feeding synergistically induced thyroid hyperplasias with iodine deficiency only at the 25% dose. In the second experiment, sulfadimethoxine (SDM) significantly ($p < 0.05$ or 0.01) increased the thyroid weights, but this increase rate was less prominent in the SDM + soybean group than in the SDM alone group. Phenobarbital (PB) was also associated with a similar tendency. Although the SDM or PB treatments reduced the serum T3 and T4 levels and consequently increased the serum TSH levels, the soybean feeding did not affect or rather attenuated these changes. Our results indicate that soybean feeding does not synergistically enhance the effects of SDM or PB on the rat thyroid.

Keywords: soybean, iodine deficiency, rat thyroid

*昭和女子大学

Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H-Y., Uchida, K.* and Hirose, M.: **Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis in WBN/Kob rats.**

Pancreas, **22**, 427-430 (2001)

To cast light on the mechanisms underlying development of spontaneous pancreatitis lesions, tissues from WBN/Kob rats at various ages were investigated with special reference to the existence of the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE), and malondialdehyde (MDA). Histopathological changes were observed in exocrine pancreatic tissue from rats at 10-15 weeks of age. In animals aged 20 weeks, the lesions had progressed remarkably and deposits of hemosiderin were apparent with fibrosis. Immunohistochemical examination for lipid peroxidation product-modified proteins showed HNE and MDA to be negative in all pancreatic tissues, but HHE was positive in the areas involving atrophy of acinar cells and fibrosis in the islets. Our results thus suggest that lipid peroxidation during spontaneous pancreatitis in WBN/Kob rats may possibly be involved in the development of diabetes.

Keywords: pancreatitis, lipid peroxidation, WBN/Kob rat

*名古屋大学農学部

Son, H-Y., Nishikawa, A., Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S.* and Hirose, M.: **Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet.**

Jpn. J. Cancer Res., **92**: 103-108 (2001)

In order to examine a possible contribution of soy isoflavone on thyroid tumorigenesis, female rats were given 0.2% soy isoflavone mixture (SI), 0.2% SI + iodine deficiency (ID), 0.04% SI, 0.04% SI + ID, 20% defatted soybean (DS) alone, 20% DS + ID, ID alone or basal diet alone for 5 weeks. Thyroid weight was not influenced by SI, but was increased by the ID and DS diets with a further significant increment in the DS + ID group ($p < 0.01$). Compared to the control value, serum T4 was significantly ($p < 0.01$) increased by 20% DS alone and decreased in all groups given the ID treatment ($p < 0.001$). Serum TSH level was increased by ID, and further enhanced by DS ($p < 0.01$) but not SI. Histopathologically, diffuse hypertrophy and/or hyperplasia of thyroid follicles were observed in the ID-treated groups, the severity being enhanced by DS but not SI. These results thus suggest that isoflavones may not be involved in the mechanisms underlying the synergistic goitrogenic effect of soybean with ID.

Keywords: soy isoflavone, rat thyroid, iodine deficiency

*昭和女子大学

Akaike N*, Murakami N*, Katsurabayashi S*, Jin YH*, Imazawa T.: **Focal stimulation of single GABAergic presynaptic boutons on the rat hippocampal neuron**
Neurosci Res., **42**, 187-195 (2002)

Evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) generated from a single GABAergic bouton were recorded and the functional properties were investigated. Native single boutons attached to mechanically dissociated rat hippocampal CA1 neurons, namely "synaptic bouton" preparation, were visualized with FM 1-43 dye and selectively stimulated by a glass pipette directed to a single bouton by focal stimulation. The GABAergic eIPSCs were elicited in like all-or-none fashion regarding both stimulus strength and pipette location, thus indicating that the eIPSCs result from the activation of a single bouton. As a result, this new experimental approach using both focal stimulation and a synaptic bouton preparation allows for a detailed study of the native synaptic machinery in nerve terminals measuring smaller than 1 micron in size in the CNS.

Keywords: Presynaptic terminal, GABA, Evoked IPSC

*Department of Psychosomatic Medicine, Faculty of Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Imazawa T, Nishikawa A, Shibutani M, Ogasawara H,

Furukawa F, Ikeda T, Suda K, Hirose M.: **Induction of pancreatic islet cell tumors in rats by repeated intravenous administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide**
Toxicol. Pathol., **29**, 320-327 (2001)

The inducibility of pancreatic islet cell tumors by administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO) was investigated in male SD rats. Rats were given 4HAQO intravenously at a weekly dose of 5 mg/kg 4 times (group 1) or a single dose of 10 mg/kg (group 2). Control rats received the vehicle alone (group 3). At fifty-six weeks, all surviving animals were killed and the pancreas was examined. The incidences islet cell tumors in groups 1, 2, and 3 were 52.3%, 19.2% and 0%, respectively. Islet cell carcinomas were induced only group 1, accounting for 26%. Islet cell tumors showed an increase in the number of insulin positive cells associated with cytological features indicative of enhanced insulin synthesis and secretion, and a decrease in the number of glucagon positive cells without ultrastructural signs of modified secretory activity. Thus our results indicate that repeated intravenous administration of 4HAQO to rats is useful for the induction of islet cell tumors at high incidence.

Keywords: Islet cell tumors, Immunohistochemistry, 4HAQO

Okazaki, K., Okazaki, S.*, Nishimura, S.*, Nakamura, H.*, Kitamura, Y.*, Hatayama, K.*, Nakamura, A.*, Tsuda, T.*, Katsumata, T.*, Nishikawa, A., Hirose, M.: **A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals**

Arch. Toxicol., **75**, 513-521(2001)

In association with the international validation project to establish an OECD Enhanced Test Guideline 407, we performed a 28-day repeated-dose toxicity study of methoxychlor. Seven-week-old Crj:CD(SD)IGS rats were given methoxychlor once daily by gavage at doses of 0 (control), 20, 100 or 500 mg/kg body weight per day. Effects of methoxychlor on endocrine-related organs were detected with regard to serum hormone, organ weights, histopathological examination in both sexes, estrus cycle in females and sperm examination in males. A no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in the present study was estimated to be below 20 mg/kg per day. In particular, the adverse effects were effectively detected in organ weights of accessory sex organs and

histopathological examination.

Keywords: Methoxychlor, Enhanced OECD test guideline 407, Endocrine disrupters

*Bozo Research Center Inc., Shizuoka, Japan

Umemura, T., Kodama, Y., Hioki, K.*¹, Inoue, T., Nomura, T.*¹, Kurokawa, Y.*²: **Butylhydroxytoluene (BHT) increases susceptibility of transgenic rasH2 mice to lung carcinogenesis.**

J. Cancer Res. Clin. Oncol., **127**, 583-590 (2000)

rasH2 mice and wild littermates were pre-treated with carcinogens [urethane (UR), 4-nitro-quinoline 1-oxide (4NQO) or diethylnitrosamine (DEN)], and, one day later, given a 400 mg/kg dose of BHT. Six weeks after the initiation, carcinogenicity could be detected in male and female rasH2 mice that had received UR doses of ≥ 250 mg/kg and ≥ 125 mg/kg, respectively, prior to exposure to BHT, whereas only 500 mg/kg of UR was sufficient to induce tumors in female rasH2 mice given the carcinogen alone. The carcinogenicity of 15 mg/kg of 4NQO and 60 mg/kg of DEN could be detected within 9 weeks in male rasH2 mice given the carcinogen followed by BHT. These results suggest that the use of BHT in rasH2 mice might lead to the establishment of a rapid in vivo assay for lung carcinogens.

Keywords: rasH2 mice, lung carcinogen, BHT

*¹ 実中研

*² 佐々木研

Shoda, T., Yasuhara, K., Moriyasu, M., Takahashi, T., Uneyama, C., Hirose, M., Mitsumori, K.: **Testicular toxicity of nitrofurazone causing germ cell apoptosis in rats**

Arch. Toxicol., **75**, 297-305 (2001)

Sequential observation of testes after a single gavage of NF to rats demonstrated that degeneration of pachytene spermatocytes in stages VII-VIII and vacuolation of Sertoli cells were first observed 12 h after treatment. By 24 h, degeneration of pachytene spermatocytes in stages VII-XII and diplotene spermatocytes were seen. On day 4, neither spermatocytes nor spermatids in stage VII were observed. Increase of serum testosterone and a decrease of progesterone at 6 h, and decreases of LH at 12 h and testosterone at 24 h were detected. PRL tended to decrease from 12 h and the decrease was significant at 48 h. The probability that NF damages germ cells by causing a hormonal imbalance is extremely low, since no pattern of hormonal imbalance that could be regarded as the

cause of the germ cell degeneration was observed until 12 h. The present experiments suggest that NF directly damages Sertoli cells and pachytene spermatocytes in stages VII-XII.

Keywords: nitrofurazone, testicular toxicity

Koujitani, T., Yasuhara, K., Tamura, T., Onodera, H., Takagi, H., Takizawa, T., Hirose, M., Hayashi, Y., Mitsumori, K.: **Lack of modifying effects of eugenol on development of lung proliferative lesions induced by urethane in transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene**

J. Toxicol. Sci., **26**, 129-39 (2001)

To investigate the modifying effects of eugenol (EUG), a component of cigarette smoke, on lung carcinogenesis, rasH2 mice and their non-transgenic littermates (non-Tg mice) were given an urethane (UR) injection, followed by EUG administration for 26 weeks. Alveolar/bronchiolar adenomas and carcinomas were observed in all UR-treated rasH2 groups. In non-Tg mice, similar lesions were sporadically observed in UR-treated groups. However, there were no significant differences in the incidence and multiplicity of these lesions between the UR alone and UR+EUG groups in both rasH2 and non-Tg mice. These results suggest that the EUG treatment does not exert modifying effects on lung carcinogenesis induced by UR in rasH2 and non-Tg mice.

Keywords: eugenol, lung carcinogenesis, rasH2 mice

Koujitani, T., Yasuhara, K., Toyosawa, K., Shimada, A., Onodera, H., Takagi, H., Tamura, T., Hirose, M., Mitsumori, K.: **Immunohistochemical and ultrastructural studies of 2,6-dimethylaniline-induced nasal proliferative lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine.**

Toxicol. Pathol., **29**, 300-307 (2001)

F344 rats received DMA in diet for 52 weeks after initiation with DHPN. Bowman's gland proliferation, glandular hyperplasias, dysplastic foci, adenomas, and carcinomas were observed. These nasal lesions mostly arose in the olfactory mucosa. They were positive for cytokeratin and/or collagen type IV. Ultrastructurally, intracytoplasmic dense secretory granules, identical to those in normal Bowman's glands, were observed in the lesions. Two morphological continua were evident, one from dysplastic foci to carcinomas and the other from Bowman's gland proliferation to hyperplasias and

adenomas. These results suggest that dysplastic foci arise from Bowman's glands and progress to carcinomas, while proliferation of Bowman's glands result in glandular hyperplasias and adenomas.

Keywords: dimethylaniline, nasal tumor, histopathology

Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., Hirose, M.: **Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine**

J. Toxicol. Sci., **26**, 85-94 (2001)

To evaluate the threshold dose of thyroid tumor-promoting effects of KA, rats received 0, 0.002, 0.008, 0.03, 0.125, 0.5 or 2%KA in diet for 20 weeks after DHPN initiation. The serum T4 levels were significantly decreased in the DHPN+0.125%KA or more. Thyroid weights were significantly increased in the DHPN+0.5 or 2%KA and in the 2%KA-alone group. Adenomas were observed in the DHPN+0.5 or 2%KA group, and carcinomas were observed in the DHPN+2%KA group. Only focal follicular cell hyperplasia was observed in 1/9 rats in the 2%KA-alone group. These results suggest that the no-observed-adverse effect for the thyroid tumor-promoting effect of KA is 0.03% (15.5 mg/kg/day) under the present experimental conditions, and that KA possesses weak tumorigenic activity in rats due to continuous serum TSH stimulation by a non-genotoxic mechanism.

Keywords: kojic acid, thyroid tumor, threshold

Tanakamaru, Z.^{*1}, Mori, I.^{*1}, Nishikawa, A., Furukawa, F., Takahashi, M. and Mori, H.^{*2}: **Essential similarities between spontaneous and MeIQx-promoted aberrant crypt foci in the F344 rat colon.**

Cancer Lett., **172**, 143-149 (2001)

Aberrant crypt foci (ACFs) in the rat colon, of control or MeIQx-treated groups, were compared morphologically, immunohistochemically, and at the molecular biological level in order to elucidate their biological characteristics. Male 3-week-old F344 rats were fed a diet supplemented with or without MeIQx at doses of 100 ppm or less for 16 weeks. There were no morphological differences between MeIQx-promoted and spontaneous ACFs. There were also no differences in labeling for PCNA and p53 protein between these ACFs. Dot blot hybridization revealed no c-K-ras mutations in codon 12 except in one ACF developing in a rat given 100 ppm MeIQx, in which a GGT

→ GAT single base substitution was detected. Our results thus suggest that most ACFs found in rats given 100 ppm MeIQx are essentially identical to their spontaneous counterparts.

Keywords: aberrant crypt foci, rat colon, MeIQx

*¹ 武田薬品工業(株)

*² 岐阜大学医学部

Yasuhara, K., Koujitani, T., Takegawa, K., Nasu, M., Onodera, H., Takagi, H., Hirose, M., Mitsumori, K.: **Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine and the mechanism of action** *Carcinogenesis*, **22**, 613-618 (2001)

To cast light on whether xylazine hydrochloride (XZ), a veterinary medicine commonly used as a sedative agent for food-producing animals, has any promoting potential for thyroid carcinogenesis, XZ was administered to rats for 52 weeks after initiation with DHPN. The incidence and multiplicities of thyroid tumors in the DHPN+XZ group were significantly increased as compared with the DHPN alone case. Decreased serum T3 and T4 and increased TSH were observed in rats treated XZ for 1 week. Thyroid iodine uptake showed significant decrease in rats treated XZ for 2 weeks. These results indicate that XZ has tumor-promoting effects on thyroid follicular cells, and suggest an involvement of alterations in thyroid-related hormone levels due to inhibition of thyroid iodine uptake.

Keywords: xylazine, thyroid tumorigenesis, TSH

Takagi, H., Mitsumori, K., Onodera, H., Nasu, M., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Hirose, M.: **Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine and sulfadimethoxine-induced thyroid carcinogenesis in rats** *J. Toxicol. Pathol.*, **14**, 121-128 (2001)

To clarify whether 17 β estradiol 3-benzoate (EB), methoxychlor (MXC), atrazine (ATR), or bisphenol A (BPA) have any modifying effects on relatively late stages of thyroid carcinogenesis, female castrated F344 rats received a single injection of N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine and, starting one week later, were given drinking water containing sulfadimethoxine for 8 weeks were used. They were treated with EB, MXC ATR or BPA for 25-27 weeks. The results of the present study suggest that EB with strong estrogenic activity, but not MXC and BPA with only weak estrogenic activity or ATR, exerts

promoting effects on thyroid carcinogenesis in rats.

Keywords: endocrine disrupter, thyroid carcinogenesis, rat

Ueda, M., Mitsumori, K., Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T., Hirose, M.: **Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted-ground soybean (kinako) on N-ethyl-N-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice**

J. Toxicol. Pathol., **14**, 129-134 (2001)

To clarify the effects of endocrine disrupting chemicals with weak estrogenic activity on development of uterine tumors, female p53(+/-) CBA mice received an injection of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) followed by the diet containing bisphenol A (BPA) or roasted-ground soybean (SB) for 26 weeks. Lower value in uterine weight was observed in BPA- or SB-treated groups compared to the ENU alone group, but no significant differences were observed in the incidence of uterine endometrial stromal sarcomas and their PCNA labeling indices among the groups. The results indicate that 1% BPA and 20% SB in diet have no modifying effects on uterine carcinogenesis in p53(+/-) CBA mice initiated with ENU.

Keywords: uterine carcinogenesis, bisphenol A, soybean

Takizawa, T., Mitsumori, K., Takagi, H., Onodera, H., Yasuhara, K., Tamura, T., Hirose, M.: **Modifying effects of flumequine on dimethylnitrosamine-induced hepato-carcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice**

J. Toxicol. Pathol., **14**, 135-143 (2001)

Flumequine (FL), a quinolone-antibiotic used for veterinary treatment of infections was found to elicit hepatocellular tumors in a conventional 18-month carcinogenicity study in mice. In the present study, heterozygous p53 deficient CBA [p53 (+/-)] mice and their wild-type littermates [p53 (+/+)] received an injection of dimethylnitrosamine (DMN) followed by the diet containing FL for 26 weeks were used. There were small numbers of hepatocellular adenomas (Ad) and carcinomas in the DMN+FL group of p53 (+/-) mice, Ad in the FL alone group of p53 (+/-) mice, and Ad in the DMN+FL group of p53 (+/+) mice. Induction of hepatocellular tumors in these mice within a relatively short period suggests that mechanisms such as direct or indirect damage to DNA might be responsible for the hepatocarcinogenesis of FL.

Keywords: flumequine, hepatocarcinogenesis, heterozygous *p53* deficient mice

Onodera, H., Mitsumori, K., Takagi, H., Yasuhara, K., Koujritani, T., Tamura, T., Imai, T., Hirose, M.: **Susceptibility of heterozygous *p53* deficient CBA mice to induction of liver proliferative lesions by Phenobarbital after dimethylnitrosamine initiation**

J. Toxicol. Pathol., **14**, 273-278 (2001)

To investigate the susceptibility of heterozygous *p53*-deficient CBA [*p53* (+/-)] mice to promotion of liver proliferative lesions in a two stage hepatocarcinogenesis model, CBA [*p53* (+/-)] mice and their wild type littermates [*p53* (+/+)] received an injection of N-nitrosodimethylamine (DMN), and from one week later, each group was given drinking water containing Phenobarbital (PB) for 26 weeks. The incidences of eosinophilic foci and hepatocellular adenomas in *p53* (+/-) mice were much higher than those in *p53* (+/+) mice in the DMN+BP groups. The present results suggest that *p53* (+/-) CBA mice are very susceptible to promotion of the development of liver proliferative lesions by PB after DMN initiation.

Keywords: hepatocarcinogenesis, Phenobarbital, heterozygous *p53* deficient mice

Uneyama, C., Shibutani, M., Nakagawa, K., Masutomi, N., Hirose, M.: **Methacarn, a fixation tool for multipurpose gene expression analysis from paraffin-embedded tissue materials.**

Current Topics in Biochem. Res. **3**, 237-242 (2000)

We examined various fixatives for expression analysis of RNA and protein as well as genomic DNA analysis using paraffin-embedded tissues. Among fixatives, methacarn fixation showed best performance in terms of yield of molecules from paraffin-embedded tissue samples. Furthermore, isolated molecules retained high quality enough for quantitative analysis in Western blotting, RT-PCR and DNA-direct sequencing.

Keywords: Methacarn, Molecular analysis, Paraffin-embedded tissue

Niho, N., Shibutani, M., Tamura, T., Toyoda, K., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: **Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats.**

Food Chem. Toxicol. **39**, 1063-1670 (2001)

Subchronic toxicity of gallic acid (GA) was investigated

in F344 rats by feeding diet containing 0.0, 0.2, 0.6, 1.7 and 5% GA for 13 weeks. Body weight gain in the 5% GA-treated animals of both sexes from week 1 was significantly lower than that of the untreated controls. Toxic effects following administration of 0.6% or more in males and 5% in females included reduction of hemoglobin concentration, hematocrit and red blood cell counts and increase in reticulocytes. Extramedullary hematopoiesis, hemosiderin deposition and congestion appeared in the spleens of 5% GA-treated animals, suggesting development of hemolytic anemia. Centrilobular liver cell hypertrophy, reflected in increase in liver weight, was observed in animals of both sexes from 1.7%. In the kidney, Berlin blue-negative brown pigment deposition in the proximal tubular epithelium was observed at 5% GA. 0.2% was determined to be a non-observed adverse effect level in rats. This level was translated into 119 and 128 mg/kg/day, respectively for male and female rats.

Keywords: Gallic acid, Subchronic toxicity study, hemolytic anemia

Masutomi, N., Toyoda, K., Shibutani, M., Niho, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: **Toxic effects of benzyl and allyl isothiocyanates and benzyl-isoform specific metabolites in the urinary bladder after a single intravesical application to rats.**

Toxicol. Pathol. **29**, 617-622 (2001)

To elucidate toxic effects of isothiocyanates (ITCs), benzyl isothiocyanate (BITC), allyl isothiocyanate (AITC), or BITC-metabolites conjugated either with GSH, Cys-Gly, Cys, or mercapturic acid were intravesically instilled into female F344 rats. Exposure to AITC and BITC at 2.8 mg/kg, and the same mol quantity of BITC-metabolites was for 2 hr. The animals were i.v. administered BrdU after 19 hr. and killed 1 hr. later. BITC caused more profound toxic damage than AITC. Among the BITC-metabolites, cytotoxicity was evident with intermediate glutathione or cysteinylglycine conjugates, while the mercapturic acid exerted little effects. BrdU labeling was essentially dependent on the degree of cytotoxic potential of each compound. The present results support that cytotoxic activity of orally administered ITCs is derived from free forms cleaved from conjugated metabolite(s) in urine.

Keywords: Isothiocyanates, Metabolites, Urinary bladder cytotoxicity

Shibutani, M., Mitsumori K., Satoh, S., Hiratsuka, H., Satoh, M., Sumiyoshi, M., Nishijima, M., Katsuki, Y., Suzuki, J., Nakagawa J., Akagi, T., Imazawa, T., Ando, M.: **Relationship between toxicity and cadmium accumulation in rats given low amounts of cadmium chloride or cadmium-polluted rice for 22 months.**

J. Toxicol. Sci. **26**, 337-358 (2001)

To clarify toxic effects of long-term oral administration of low dose cadmium (Cd) on the liver and kidney, six groups of female SD rats were fed diet containing Cd-polluted rice or CdCl₂ at concentrations up to 40 ppm, and killed after 12, 18, and 22 months. There was no evidence of Cd-related hepato-renal toxicity. Dose-dependent accumulation of Cd was observed in the liver and kidneys at 18 months in animals treated with 40 ppm CdCl₂. A dose-dependent increase in urinary Cd levels became evident with time. Induction of metallothionein (MT) was also observed in the liver and kidney with a high correlation to the corresponding Cd levels. The results demonstrated that renal toxicity is not induced by long-term oral administration of low amounts of Cd, although tissue accumulation does occur. Possible protective mechanisms may be operating.

Keywords: Cadmium, Low-dose long-term exposure, Renal toxicity

Hagiwara, A.*¹, Takesada, Y.*¹, Tanaka, H.*¹, Tamano, S.*¹, Hirose, M., Ito, N.*², Shirai, T.*²: **Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically.**

Toxicol. Pathol. **29**, 180-186 (2001)

The dose-dependent of catechol glandular stomach carcinogenesis was investigated in male F344 rats. Groups of 30 male animals were fed catechol at dietary levels of 0 (control), 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 % for up to 104 weeks. Five rats of each group were killed at 34 weeks and the remaining animals were sacrificed at the termination, all undergoing histopathological examination. Submucosal hyperplasias and adenomas of the pyloric glands developed in the 0.4 and 0.8 % group. Incidences of adenocarcinoma development in the pylorus were 4 and 8 % in 0.4 % and 0.8 % groups, respectively, and 0 in the 0.1 % and 0.2 % groups, at the termination. Adenomas and submucosal hyperplasias were found in nearly all animals fed 0.2 % catechol or more, the incidences of those in 0.1 % group being 0 % and 56 %, respectively. These results demonstrated that dietary

levels of 0.4 % and 0.8 % catechol long-term induce adenocarcinomas in the pyloric glands.

*¹ 大雄会

*² 名古屋市立大学

Hirose, M., Hoshiya, T.*¹, Mizoguchi, Y.*¹, Nakamura, A.*², Akagi, K.*¹, Shirai, T.*¹: **Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in amle F344 rats.**

Cancer Lett. **168**, 23-29 (2001)

Modifying effects of green tea catechins (GTCs) on the post-initiation stage of colon, lung and thyroid carcinogenesis were examined F344 male rats. Groups of 20 animals were given subcutaneous injections of 40 mg/kg body wt of 1,2-dimethylhydrazine twice a week for 2 weeks or oral administration of 0.1 % DHPN in the drinking water for 2 weeks for initiation. They then received diet containing 1 or 0.1 % green tea catechin or basal diet alone for 33 weeks. Although total incidence and multiplicity of colon tumors were not significantly different from controls, values for colon adenomas were decreased. Incidences and multiplicities of lung and thyroid lesions did not significantly vary among the DHPN-treated groups. These results indicate that GTCs do not inhibit, but rather may enhance colon carcinogenesis.

*¹ 名古屋市立大学

*² ボゾリサーチセンター

Kimoto, N.*¹, Hirose, M., Futakuchi, M.*¹, Iwata, T.*², Kasai*², M., Shirai, T.*¹: **Site-specific modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats.**

Cancer Lett. **168**, 15-21 (2001)

Modifying effects of dietary administration of conjugated fatty acids from safflower oil (CFA-S), rich in conjugated linoleic acids, on major organs were examined in the post-initiation stage of a two-stage carcinogenesis model in female rats. Groups of 21 or 22 F344 female rats were treated sequentially with DHPN (i.g.), DMBA (i.g.), DMH (s.c.) and BBN (in drinking water) during the first 3 weeks for initiation, and then administered diet containing 1 or 0.1 % CFA-S for 33 weeks. The 1 and 0.1 % CFA-S treatment significantly decreased the incidence and multiplicity of mammary carcinomas, though a clear

dose response was not observed. In the urinary bladder, the incidence of papillary or nodular hyperplasia was significantly increased in the 1% CFA-S-treated group. The results indicate that low dose CFA-S may find application as a potent chemopreventor of mammary carcinogenesis.

*¹ 名古屋市立大学

*² (株)リノールオイルミルズ

Ogawa, K. *, Hirose, M., Sugiura, S. *, Cui, L. *, Imaida, K. *, Ogiso, T. *, Shirai, T. *: **Dose-dependent promotion by phenylethyl isothiocyanate, a known chemopreventer, of two-stage rat urinary bladder and liver carcinogenesis.**

Nutr. Cancer **40**, 134-139 (2001)

The effects of PEITC on urinary bladder and liver carcinogenesis were analyzed in a rat model. Diets containing 0.1%, 0.05%, or 0.01% PEITC were administered for 32 wks to male F344 rats with and without pretreatment with an injection of DEN (200 mg/kg, i.p.) and 0.05% BBN in the drinking water for 4 weeks for initiation. In the initiated groups, PEITC administration significantly increased the incidences of papillary or nodular hyperplasia, dysplasia and transitional cell carcinomas at higher doses of 0.01%, 0.01% and 0.05 %, respectively. In the liver, induction of GST-P foci was dose-dependently enhanced by PEITC administration, but the incidences of liver tumors were not different among the groups. We can conclude that >0.01% PEITC enhances rat urinary bladder carcinogenesis, while weakly promoting hepatocarcinogenesis. In addition, it is suggested that >0.05% PEITC has tumorigenic potential.

*名古屋市立大学

Hamada, S. *¹, *², Yamasaki, K. *², Nakanishi, S. *², Omori, T., Serikawa, T. *², Hayashi, M.: **Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 strains**

Mutat. Res., **495**, 127-134 (2001)

To evaluate the general suitability of the rat for the micronucleus assay, we conducted the assay in males of 14 different strains, 13 inbred (ACI, BN, BUF, COP, DRH, F344, IS, LEW, RCS, SHR, WAG, WKYO, WTC) and 1 outbred (SD), using cyclophosphamide as the test chemical. Cyclophosphamide at 0 (vehicle), 5, 10, or 20 mg/kg/day was administered orally twice, 24-h apart, to 5 rats per dosage group. Bone marrow and peripheral blood were collected 24 h after the second treatment. All

14 strains showed a positive response to cyclophosphamide, with slight differences in sensitivity. We concluded that the rat is suitable for the micronucleus assay regardless of strain.

Keywords: Micronucleus assay, Strain differences, Cyclophosphamide

*¹ エスエス製薬中央研究所

*² 京都大学医学部

Nishikawa, T. *, Haresaku, M. *, Fukushima, A. *, Nakamura, T. *, Adachi, K. *, Masuda, M. *, Hayashi, M.: **Further evaluation of an in vivo micronucleus test on rat and mouse skin: results with five skin carcinogens**

Mutat. Res., **513**, 93-102 (2002)

In a previous paper, we presented a practical in vivo micronucleus (MN) test that used rat skin as the target organ. To evaluate the test, as well as to determine the reproducibility and applicability of the method to mice, we used it to test the effect of five skin carcinogens (*N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG), *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine (MNNG), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA), and benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P)) on rat and mouse skin. All five compounds significantly and dose-dependently increased the MN frequencies in the basal cells of the chemical-treated skin. These results indicated the reproducibility of the test results and also the applicability of the test to mice as well as rats.

Keywords: Skin micronucleus test, 2-methylbenz[*a*]anthracene, Benzo[*a*]pyrene

*ライオン安全性評価センター

Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T., Hayashi, M.: **Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction**

Mutat. Res., **493**, 101-114, 2001

Aneuploidy is an important contributor to reproductive failure and tumor development. Two spindle poisons, colchicine (COL) and vinblastine (VBL) are mutagenic in the mouse lymphoma assay (MLA), a gene mutation assay that targets the heterozygous thymidine kinase (tk) gene on chromosome 11 in mouse lymphoma L5178Y tk^{+/+}-3.7.2c cells. To investigate the mechanisms of spindle poison mutagenesis, we analyzed the COL- and VBL-induced TK mutants at the molecular and cytogenetic level. Loss of heterozygosity (LOH) analysis employing a microsatellite region within the tk locus revealed that almost all mutants had lost the functional tk allele. To

determine the extent of the LOH, we further examined LOH mutants for heterozygosity at nine microsatellite loci spanning the entire chromosome 11. Our present study indicates that spindle poisons induce mutations through mitotic non-disjunction without structural DNA changes and supports a possible mechanism in which a recessive mutation mediated by aneuploidy may develop tumors.

Keywords: spindle poisons, aneuploidy, mouse lymphoma assay (MLA)

Morimoto, S. *, Kato, T. *, Honma, M., Hayashi, M., Hanaoka, F. *, Yatagai, F. *: **Detection of genetic alterations induced by low-dose X rays: analysis of loss of heterozygosity for TK mutation in human lymphoblastoid cells**

Radiat. Res., 157, 533-538 (2002)

To elucidate the genetic influence of low-dose ionizing radiation at the chromosome level, we exposed human lymphoblastoid TK6-20C cells to 10 cGy of X rays. The TK mutation frequency was $5.7 \pm 1.3 \times 10^{-6}$ at the background level and $6.9 \pm 2.8 \times 10^{-6}$ after X irradiation. We applied multilocus analysis using 4 TK locus markers and 12 microsatellite loci spanning chromosome 17 for TK mutants exhibiting loss of heterozygosity (LOH). We observed radiation-specific patterns in the extent of hemizygous LOH in 14 TK mutants among the 92 mutants analyzed. Surprisingly, the radiation-specific LOH patterns were not observed among the 110 nonirradiated TK mutants in this study. They were identified previously in TK6 cells exposed to 2 Gy of X rays. We consider these hemizygous LOH mutants to be a result of end-joining repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks.

Keywords: loss of heterozygosity (LOH), p53, mutation

*理化学研究所

Noda, Y. *¹, Suzuki, T., Kohara, A., Hasegawa, A. *², Yotsuyanagi, T. *¹, Hayashi, M., Sofuni, T., Yamanaka, K. *², Okada, S. *³: **In vivo genotoxicity evaluation of dimethylarsinic acid in MutaTMMouse**

Mutat. Res., 513, 205-212 (2002)

The present study was conducted to evaluate whether arsenite or its metabolite, dimethylarsinic acid (DMA), could initiate carcinogenesis via mutagenic DNA lesions in vivo. When DMA was intraperitoneally injected into MutaTMMice at a dose of 10.6 mg/kg per day for 5 consecutive days, it caused only a weak increase in the mutant frequency (MF) of the *lacZ* gene in the lung, which was at most 1.3-fold higher than in the untreated

control animals. DMA did not appreciably raise the MF in the bladder or bone marrow. Further analysis of the *cII* gene in the lung, the organ in which DMA induced the DNA damage, revealed only a marginal increase in the MF. Following DMA administration, no change in the *cII* mutation spectra was observed. Administration of arsenic trioxide (arsenite) at a dose of 7.6 mg/kg per day did not result in any increase in the MF of the *lacZ* gene in the lung, kidney, bone marrow, or bladder. The peripheral blood micronucleus assay gave marginally positive results with arsenite, but not with DMA. These results suggest that the mutagenicity of DMA and arsenite might be too low to be detected in the MutaTMMouse

Keywords: MutaTMMouse, arsenic, dimethylarsinic acid

*¹ 名古屋市立大学薬学部

*² 日本大学薬学部

*³ 静岡県立大学薬学部

Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T. *, Hayashi, M. : **Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/*lacZ* transgenic mouse (MutaTMMouse)**

Mutat. Res., 515, 63-72 (2002)

Aristolochic acid (AA) is found in a plant that causes urothelial carcinomas in patients with Chinese herb nephropathy (CHN). To evaluate the in vivo mutagenicity of AA, we analysed the mutant frequency (MF) in the *lacZ* and *cII* gene of 10 organs of the lambda/*lacZ* transgenic mouse (MutaTMMouse) after intragastric treatment with AA (15mg/kg per week x 4). MFs in the target organs-forestomach, kidney, and bladder of AA-treated mice were significantly higher than those of control mice (forestomach 33- and 15-fold; kidney 10- and 9-fold; bladder 16- and 31-fold, for the *lacZ* and *cII*, respectively). The MFs in non-target organs, except the colon, showed only slight increases. Sequence analysis of *cII* mutants in target organs revealed that AA induced mainly A:T to T:A transversions whereas G:C to A:T transitions at CpG sites predominated among spontaneous mutations.

Keywords: *cII*, Aristolochic acid, Chinese herb nephropathy

* 東京大学大学院薬学系研究科

Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Oomori, T., Ohwada, T. *, Hayashi, M.: **Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/*lacZ* transgenic mouse (MutaTMMouse)**

Mutat. Res. 515, 73-83 (2002)

Dinitropyrenes (DNPs), 1,3-, 1,6- and 1,8-dinitropy-

rene, are carcinogenic compounds found in diesel engine exhaust. A commercially available mixture of DNPs (1,3-, 1,6-, 1,8-, and unidentified isomer(s)) was injected intragastrically at 200 and 400mg/kg once each week for 4 weeks. Seven days after the final treatment, liver, lung, colon, stomach, and bone marrow were collected for mutation analysis. Strongest increases in mutant frequencies (MFs) were observed in colon for both *lacZ* (7.5×10^{-5} to 43.3×10^{-5}) and *cII* (2.7×10^{-5} to 22.5×10^{-5}) genes. Three-four-fold increases were observed in stomach for both genes. A statistically significant increase in MFs was also evident in liver and lung for the *lacZ* gene, and in lung and bone marrow for the *cII* gene. The DNPs treatment increased the incidence of G:C to T:A transversion (2-43%) and decreased G:C to A:T transitions (70-22%). The present study showed a relevant use of the *cII* gene as an additional target for mutagenesis in the MutaTM Mouse and revealed a mutagenic specificity of DNPs in vivo.

Keywords: *cII*, dinitropyrene, diesel exhaust

* 東京大学大学院薬学系研究科

Fujita, K. *, Nakayama, K. *, Yamazaki, Y. *, Tsuruma, K. *, Yamada, M., Nohmi, T., Kamataki, T. * : **Construction of *Salmonella typhimurium* YG7108 strains, each coexpressing a form of human cytochrome P450 with NADPH-cytochrome P450 reductase**
Environ. Mol. Mutagen., **38**, 329-338 (2001)

A series of *S. typhimurium* YG7108 strains, each coexpressing a form of human cytochrome P450 (CYP) together with human NADPH-cytochrome P450 reductase (OR), was established. The parental *S. typhimurium* YG7108, derived from TA1535, lacks two O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase genes and is highly sensitive to alkylating agents. The expression levels of CYP holo-protein and the OR in the genetically engineered *S. typhimurium* YG7108 cells ranged from 62 nmol/L culture for CYP3A4 and from 214 to 1029 units/L culture, respectively. Each form of expressed CYP efficiently catalyzed the oxidation of a representative substrate. The OR was sufficiently expressed to support the catalytic activity of CYP.

Keywords: heterologous expression, enzyme activity, kinetic parameter

* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

Gruz, P., Pisani, F.M. *¹, Shimizu, M., Yamada, M.,

Hayashi, I. *², Morikawa, K. *², Nohmi, T.: **Synthetic activity of *Sso* DNA polymerase Y1, an archaeal DinB-like DNA polymerase, is stimulated by processivity factors proliferating cell nuclear antigen and replication factor C**

J. Biol. Chem., **276**, 47394-47401 (2001)

The recent discovery of DNA polymerase Y family raises a question of whether the DNA polymerase activities are modified by accessory proteins such as proliferating cell nuclear antigen (PCNA). In fact, the activity of DNA pol IV (DinB) of *E. coli* is enhanced upon interaction with the beta subunit, the processivity factor of DNA pol III. In this report, the activity of *Sso* DNA pol Y1 encoded by the *dbh* gene of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* is greatly enhanced by the presence of PCNA and replication factor C (RFC). *Sso* pol Y1 displayed a higher affinity for DNA compared with pol IV. The abilities of pol Y1 and pol IV to bypass DNA lesions and their sensitive sites to protease are also discussed.

Keywords: DNA polymerase, PCNA, bypass DNA lesion

*¹ Instituto di Biochimica delle Proteine ed Enzimologia, Italy

*² Biomolecular Engineering Research Institute

Abril, N. *, Luque-Romero, F.L. *, Yamada, M., Nohmi, T., Pueyo, C. *: **The effectiveness of the O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase encoded by the *ogt_{ST}* gene from *S. typhimurium* in protection against alkylating drugs, resistance to O⁶-benzylguanine and sensitisation to dibromoalkane genotoxicity**

Mutat. Res., **497**, 111-21 (2001)

Here we demonstrate that the *Ogt_{ST}* from *Salmonella typhimurium* is a highly efficient O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT) in affording protection against antitumour chloroethylating drugs (1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU)). In addition, *Ogt_{ST}* is refractory to O⁶-benzylguanine (BG) inactivation and its expression provides only minor sensitization to genotoxicity by environmental dibromoalkanes (DBE). Our observations indicate that the *Ogt_{ST}* AGT might be, under some circumstances, of potential use to improve cancer chemotherapy.

Keywords: O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase, Dibromoethane, Ara^r-assay

* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales (Spain)

Kim, S.-R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., Nohmi, T.: **Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli***

Mol. Genet. Genomics., **266**, 207-15 (2001)

This report presents that DNA pol IV is involved in -1 frameshift mutagenesis induced by 4-nitroquinoline N-oxide (4-NQO) and that the expression level of the chromosomal pol IV gene is 6-12 times higher than those for other SOS-inducible DNA polymerases in *E. coli*. Interestingly, the *dinB* gene is present not only on the chromosome but also on the F' plasmid in the *E. coli* CC108 strain. In this strain, 750 molecules of DNA pol IV are expressed from the F' *dinB* gene in the uninduced state and 250 molecules are expressed from the chromosomal gene. These cellular expression levels strongly affect -1 frameshifts induced by 4-NQO in runs of six guanine bases. The chromosomal *dinB* gene appeared to have little or no effect on the untargeted mutagenesis. These results suggest that DNA pol IV efficiently mediates targeted mutagenesis by 4-NQO, and that the expression levels substantially affect targeted and untargeted mutagenesis.

Keywords: *dinB*, 4-NQO, Targeted mutagenesis

Swiger, R.R.*, Cosentino, L.V.*, Maumura, K., Nohmi, T., Heddle, J.A.*: **Further characterization and validation of *gpt* delta transgenic mice of quantifying somatic mutations in vivo**

Environ. Mol. Mutagen., **37**, 297-303 (2001)

The utility of any mutation assay depends on its characteristics, which are best discovered using model mutagens. To this end, we report further on the characteristics of the lambda-based *gpt* delta transgenic assay first described by Nohmi et al. Our studies show that the *gpt* transgene responds similarly to other transgenic loci, specifically *lacZ* and *cII*, after treatment with acute doses of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU). Because genetic neutrality is an important factor in the design of treatment protocols for mutagenicity testing, as well as for valid comparisons between different tissues and the results indicate that the *gpt* transgene, like *cII* and *lacZ*, is genetically neutral in vivo. The sensitivities of the loci are also equivalent, as evidenced by spontaneous mutant frequency data and dose-response curves after acute treatment with ENU. The results are interesting in light of transgenic target size and location and of host genetic background differences. Based on these studies,

protocols developed for other transgenic assays should be suitable for the *gpt* delta. Additionally, a comparison of the *gpt* and an endogenous locus, *Dlb-1*, within the chronically treated animals shows differential accumulation of mutations at the loci during chronic exposure.

Keywords: *cII*, *lacZ*, preferential repair

* Department of Biology, York University, Canada

Tanabe, H., Müller, S.*¹, Neusser, M.*¹, von Hase, J.*², Calcagno, E.*², Cremer, M.*¹, Cremer, C.*², Cremer, T.*¹: **Evolutionary conserved 3D positioning of orthologous chromosomes and chromosome segments in primate lymphoblastoid cell nuclei**

Annales de Genetique, **44**, s120 (2001)

Human chromosome territories 18 and 19 show a different position in the human lymphocyte cell nucleus. The gene-poor, late replicating chromosome 18 territory is preferentially located at the nuclear periphery, while the gene-rich and early replicating chromosome 19 territory is found in the nuclear center. Here we examined whether this topology is evolutionarily conserved among primates. In a comparative 3D-FISH analysis we used painting probes specific for human chromosome 18 and 19 or corresponding probes for orthologous chromosomes/chromosomal segments from seven primates-great apes (human, chimpanzee, gorilla and orangutan), lesser apes (white-handed gibbon) and New World monkeys (cotton-top tamarin, marmoset and squirrel monkey). In all species light optical serial sections were recorded by confocal microscopy from hybridized, 3D preserved nuclei and used for 3D reconstruction. For quantitative evaluation we scanned 30 to 40 S-phase nuclei per species. The nucleus was divided from its center to the periphery into 25 shells and the cumulative hybridization signal for the painted chromosome territories or orthologous segments in each shell was calculated and plotted versus the radius of the shell. The results showed that the distribution of the orthologous chromosome materials was nearly identical, irrespective of their evolutionary conservation or multiple translocations. We conclude that the more peripheral or central 3D positioning of gene poor and gene dense chromosome materials ortholog to human chromosome 18 and 19 chromosome territories is evolutionarily conserved among primates. Further studies will reveal whether other gene dense and gene poor chromosome segments follow the same pattern.

Keywords: chromosome territory, primates, 3D-FISH (three-dimensional fluorescence in situ hybridization)

*¹ Institute of Anthropology and Human Genetics, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

*² Kirchhoff Institute of Physics, University of Heidelberg, Germany

Masters, J.R.^{*1}, Thomson, J.A.^{*2}, Daly-Burns, B.^{*1}, Reid, Y.A.^{*3}, Dirks, W.G.^{*4}, Packer, P.^{*5}, Toji, L.H.^{*6}, Ohno, T.^{*7}, Tanabe, H., Arlett, C.F.^{*8}, Kelland, L.R.^{*9}, Harrison, M.^{*10}, Virmani, A.^{*11}, Ward, T.H.^{*12}, Ayres, K.L.^{*13} Debenham, P.G.^{*1} : **Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 8012-8017 (2001)

Cross-contamination between cell lines is a longstanding and frequent cause of scientific misrepresentation. Estimates from national testing services indicate that up to 36% of cell lines are of a different origin or species to that claimed. To test a standard method of cell line authentication, 253 human cell lines from banks and research institutes worldwide were analyzed by short tandem repeat profiling. The short tandem repeat profile is a simple numerical code that is reproducible between laboratories, is inexpensive, and can provide an international reference standard for every cell line. If DNA profiling of cell lines is accepted and demanded internationally, scientific misrepresentation due to cross-contamination can be largely eliminated.

Keywords: STR (short tandem repeat) profiling, cross-contamination, human cell lines

*¹ Institute of Urology, University College London, United Kingdom

*² LGC, United Kingdom

*³ ATCC (American Type Culture Collection), University Boulevard, USA

*⁴ DSMZ (German Collection of Cell Cultures), Germany

*⁵ ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures), United Kingdom

*⁶ CIMR (Coriell Institute for Medical Research), USA

*⁷ RIKEN Cell Bank, Japan

*⁸ MRC (Medical Research Council) Cell Mutation Unit, University of Sussex, United Kingdom

*⁹ CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, United Kingdom

*¹⁰ ICRF (Imperial Cancer Research Fund), United Kingdom

*¹¹ Hamon Center for Therapeutic Oncology Research,

University of Texas Southwestern Medical Center, USA

*¹² Department of Drug Development, Paterson Institute for Cancer Research, United Kingdom

*¹³ Department of Applied Statistics, University of Reading, United Kingdom

Tanabe, H., Müller, S.^{*1}, Neusser, M.^{*1}, von Hase, J.^{*2}, Calcagno, E.^{*2}, Cremer, M.^{*1}, Solovei, I.^{*1}, Cremer, C.^{*2}, Cremer, T.^{*1} : **Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates**

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**, 4424-4429 (2002)

We demonstrate that the nuclear topological arrangement of chromosome territories (CTs) has been conserved during primate evolution over a period of about 30 million years. Recent evidence shows that the positioning of chromatin in human lymphocyte nuclei is correlated with gene density. For example, human chromosome 19 territories, which contain mainly gene-dense and early replicating chromatin, are located toward the nuclear center, whereas chromosome 18 territories, which consist mainly of gene-poor and later replicating chromatin, is located close to the nuclear border. In this study, we subjected seven different primate species to comparative analysis of the radial distribution pattern of human chromosome 18- and 19-homologous chromatin by three-dimensional fluorescence in situ hybridization. Our data demonstrate that gene-density-correlated radial chromatin arrangements were conserved during higher-primate genome evolution, irrespective of the major karyotypic rearrangements that occurred in different phylogenetic lineages. The evolutionarily conserved positioning of homologous chromosomes or chromosome segments in related species supports evidence for a functionally relevant higher-order chromatin arrangement that is correlated with gene-density.

Keywords: chromosome territories (CTs), evolutionary conservation, 3D-FISH (three-dimensional fluorescence in situ hybridization)

*¹ Department of Biology II-Human Genetics, University of Munich, Germany

*² Kirchhoff Institute of Physics, University of Heidelberg, Germany

Ishikawa, K.S.^{*}, Masui, T., Ishikawa, K.^{*}, Shiojiri, N.^{*} : **Immunolocalization of hepatocyte growth factor and its receptor (c-Met) during mouse liver development**

Histochem. Cell Biol., **116**, 453-462 (2001)

Although hepatocyte growth factor (HGF) was discovered as a potent hepatotrophic factor responsible for liver regeneration and may involve some organ development in embryogenesis, it remains to be revealed what roles HGF plays in liver development. The present study was undertaken to determine which cells express HGF and its receptor c-Met and when c-Met is activated in mouse liver development by using immunoblotting and immunohistochemical techniques. HGF was detected in hepatocytes and non-parenchymal cells, including biliary epithelial cells, periportal connective tissue cells, megakaryocytes, endothelial cells, and sinusoidal cells, throughout liver development. Positive HGF immunostaining in hepatocytes increased during postnatal development, and reached the maximal level in the adult stage. c-Met protein was also expressed in hepatocytes throughout liver development, but maximal staining was obtained in 1- or 2-week-old livers. Phosphorylation of tyrosine residues in the c-Met beta chain also occurred in these stages. These results suggest that HGF signaling is implicated in hepatocyte growth during postnatal liver development, and its action could be in a paracrine mode; HGF produced by non-parenchymal cells such as sinusoidal cells acts on hepatocytes expressing c-Met receptors. Positive immunostaining in adult and postnatal hepatocytes may be derived from their blood clearance of HGF.

Keywords: HGF, c-Met, hepatocytes

*Department of Biology, Shizuoka University

Iwashita, S.*¹, Itoh, T.*², Takeda, H.*², Sugimoto, Y.*², Takahashi, I.*³, Nobukuni, T.*⁴, Sezaki, M.*¹, Masui, T., Hashimoto, K.*³: **Gene organization of bovine BCNT that contains a portion corresponding to an endonuclease domain derived from an RTE-1 (Bov-B LINE), non-LTR retrotransposable element: duplication of an intra-molecular repeat unit downstream of the truncated RTE-1**

Gene, **268**, 59-66 (2001)

BCNT (a protein named after Bucentaur or craniofacial development protein 1) has a unique structure in Ruminantia. Bovine BCNT contains a region of the endonuclease domain derived from a truncated RTE-1 (previously called Bov-B LINE), a non-LTR retrotransposable repetitive element, and two repeat units (intramolecular repeat, IR) each with 40 amino acids in the C-terminal region. In contrast the human and mouse

BCNT proteins contain one repeat unit and lack the RTE-1-derived portion. The 3' UTR of bovine bcnt cDNA also contains an approximately 300-bp portion homologous to the 3'-part of RTE-1. We examined the bovine bcnt genomic DNA sequence to understand how the bovine bcnt gene has been organized. The sequence of 3' UTR homologous portion was found to more closely resemble the Art2 element than the bovine RTE-1. By PCR screening a bovine/hamster hybrid somatic cell panel, the bovine bcnt gene was mapped to chromosome 18, syntenic human chromosome 16q on which human BCNT is located. The bcnt genomic DNA sequence corresponding to the cDNA downstream of a RTE-1 derived portion reveals that each IR unit is flanked by both 5'-side and 3'-side introns and that 3'-UTR consists of one exon. The alignment of the above sequence with a bovine RTE-1 did not show any significant homology downstream of the endonuclease domain. On the other hand, the alignment of the intron sequences with each other revealed that the six sequential homologous segments ranging in size from 40 to 453 bp existed over a 1 kb long sequence between both the 5'- and 3'-side introns flanking each bovine IR unit. In addition, both the 174-bp of 5'-side intron and 80-bp of 3'-side intron neighboring each 120-bp IR exon are significantly homologous among the two bovine IRs, human IR and mouse IR. These results suggest that a truncated bovine RTE-1 was inserted into the intron upstream of an IR unit of an ancestor bcnt gene and that a duplication of a relatively long region that includes IR occurred in the bovine genome.

Keywords: BCNT, RTE-1 (Bov-B LINE), exon intron structure

*¹ Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences

*² Shirakawa Institute of Animal Genetics

*³ National Institute of Infectious Diseases

*⁴ The Institute of Medical Science, University of Tokyo

Koizumi M, Yamamoto Y*¹, Ito Y*¹, Takano M*², Enami T*², Kamata E and Hasegawa R: **Comparative study of the toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats**

J. Toxicol. Sci., **26**, 299-311 (2001).

The toxicities of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats was examined and the susceptibility of newborn rats was analyzed in terms of presumed unequivocally toxic and no observed adverse effect levels (NOAELs). In the 18-day repeated dose

newborn rat study, 4-nitrophenol was orally given from day 4 to day 21 after birth but did not induce any toxicity up to 160 mg/kg in the main study, although it induced death in one of six males at 160 mg/kg, and three of six males and one of six females at 230 mg/kg in a prior dose-finding study. In the 28-day repeated dose oral toxicity study starting at 6 weeks of age, 4-nitrophenol caused the death of most males and females at 1,000 mg/kg but was not toxic at 400 mg/kg except for male rat specific renal toxicity. As unequivocally toxic levels were considered to be 230 mg/kg/day in newborn rats and 600 to 800 mg/kg/day in young rats, and NOAELs were 110 mg/kg/day in newborn rats and 400 mg/kg/day in young rats, the susceptibility of the newborn to 4-nitrophenol appears to be 2.5 to 4 times higher than that of young animals. In the newborn rat study of 2,4-dinitrophenol, animals died at 30 mg/kg in the dose-finding study and significant lowering of body and organ weights was observed at 20 mg/kg in the main study. In the 28-day young rat study, clear toxic signs followed by death occurred at 80 mg/kg but there was no definitive toxicity at 20 mg/kg. As unequivocally toxic levels and NOAELs were considered to be 30 and 10 mg/kg/day in newborn rats and 80 and 20 mg/kg/day in young rats, respectively, the toxicity of 2,4-dinitrophenol in newborns again seems to be 2 to 3 times stronger than in young rats. Abnormalities of external development and reflex ontogeny in the newborn were not observed with either chemical. Based on these results, it can be concluded that the toxic response in newborn rats is at most 4 times higher than that in young rats, at least in the cases of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol.

Keywords: Toxic response in the newborn rat, 4-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol

*¹ Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

*² Bozo Research Center Inc.

御船正樹*, 寺西俊幸*, 岩藤章正*, 秋澤宏行*, 小崎由香里*, 本橋範子**, 斎藤 寛*, 岡田敏史: 日本薬局方参照赤外吸収スペクトルと異常スペクトルについて

医薬品研究, 33, 259-266 (2002)

日本薬局方収載医薬品の確認試験に参照赤外吸収スペクトル法が多用されているが, その試料調製法の多くに KBr 錠剤法が採用されている。塩酸塩などで KBr 錠剤法を適用した場合, Br⁻/Cl⁻間でのイオン交換反応が起こり, 薬物本来のスペクトルを与えないことがあることを

具体的に指摘した。したがって, 塩酸塩など塩の形をもつ薬物を IR 法により確認する場合, ヌジヨール法で得られるスペクトルと一致することを確認した後, 錠剤法を適用すべきであることを提案した。

Keywords: Japanese Pharmacopoeia, IR Reference Spectra, ion-exchange reaction

* 岡山大学薬学部

** 神戸薬科大学

Miyazaki, T., Yomota C., Okada S.: Ultrasonic depolymerization of hyaluronic acid

Polym. Degrad. Stab., 74, 77-85 (2001)

Hyaluronic acid (HA) was depolymerized by ultrasonication. Changes in molecular weight and molecular weight distribution were observed by size exclusion chromatography with a low-angle laser light scattering photometer. We investigated the influence of sonication intensity, temperature, HA concentration, coexisting cations and ionic strength. Results demonstrated that, with an increase of intensity, initial depolymerization rate (k) increased and ultimate depolymerized molecular weight (M_{lim}) converged to smaller size. The factors that change high-order structure of HA molecules had great influence upon the k , but not so much upon the M_{lim} . For example, continuous sonication with 55 W depolymerized the HA to almost the same M_{lim} (approximately 0.1×10^6), with a few exceptions. Where exceptions occurred, they were in concentrated monovalent cation solutions; the M_{lim} increased up to about 0.3×10^6 . Consequently, by regulating the sonication conditions, HA with the desired lower molecular weight and a narrow distribution could be prepared from high molecular weight samples.

Keywords: hyaluronic acid, ultrasonication, molecular weight

Miyazaki, T., Yomota C., Okada S.: Development and release characterization of hyaluronan-doxycycline gels based on metal coordination

J. Control. Release, 76, 337-347 (2001)

A simple mixing with hyaluronan (HA), doxycycline (DC) and divalent metal cation in an aqueous solution enabled a thermoreversible water-soluble gel to form. For the cross-linking, the two kinds of interactions were supposed. One was an electrostatic interaction between a positively charged group in DC and a negatively charged carboxyl function of HA. And the other was a chelation at the phenolic diketone moiety in DC. The hydrogel would

be formed holding water in the HA entanglement network when DCs on HA chains made coordinate bonds through metal chelation. By changing the mixing ratio, two types of gels with different characteristics in drug release could be prepared. One was a gel with zero-order release prepared by mixing the same amount of HA and DC in equivalent. And the other was a gel indicating Fickian diffusion-type release by mixing more DC than HA. Further, by controlling the absolute concentration of HA and DC, or the molecular weight of HA, some gels with desired release profiles could be prepared.

Keywords: hyaluronan, doxycycline, gel

Maekawa K., Tanimoto T., Okada S., Suzuki T.*¹, Suzuki T.*¹, Yabe-Nishimura C.*²: **Analysis of gene expression of the enzymes comprising polyol pathway in rat Schwann cells by competitive RT-PCR method using non-homologous DNA standards**

Brain Res. Protocols, **8**, 219-227 (2001)

Aldose reductase (AR) and sorbitol dehydrogenase (SDH) are the enzymes constituting the polyol pathway, an alternate route of glucose metabolism. A wealth of experimental data has indicated the involvement of the polyol pathway in the pathogenesis of diabetic complications. However, there has been surprisingly little research on the relative abundance of SDH to AR in the tissues affected in diabetes. We therefore developed a competitive RT-PCR system to simultaneously determine the mRNA levels of these two enzymes in small amounts of samples, and studied their expression in Schwann cells isolated from adult rat sciatic nerves. Although both AR and SDH mRNA were expressed in the Schwann cells, the levels of SDH cDNA were much lower than those of AR cDNA. The induction of AR mRNA expression in the Schwann cells under hyperosmotic conditions was similarly detected by Northern blot analysis and our competitive RT-PCR method. The RT-PCR system developed in this study may be a useful tool in ascertaining the relative contributions of AR and SDH to the metabolic derangements resulting from the acceleration of polyol pathway activity in the target organ of diabetic complications.

Keywords: Aldose reductase, Sorbitol dehydrogenase, Diabetic neuropathy, Hyperosmotic stress, Quantitative RT-PCR

*¹ 三和化学研究所

*² 京都府立医科大学

Maekawa K., Tanimoto T., Okada S.: **Gene expression of enzymes comprising polyol pathway in various rat tissues by competitive RT-PCR method**

Jpn. J. Pharmacol., **88**, 123-126 (2002)

The quantitative measurements of aldose reductase (AR) and sorbitol dehydrogenase (SDH) gene expression in various rat tissues were performed by competitive RT-PCR. AR mRNA was detectable in all tissues analyzed with pronounced differences in the amounts. SDH mRNA was most abundant in testes and liver, but was absent from lens. The estimation of the AR / SDH cDNA ratio showed that the relative abundance of SDH to AR differs among tissues. These results indicate that different tissues contain varying amounts of AR and SDH mRNA, that is, each tissue has its own polyol pathway activity.

Keyword: Aldose reductase, Sorbitol dehydrogenase, Diabetic complication

前川京子, 小出達夫, 斎藤博幸, 原園 景, 江馬 真, 谷本 剛, 岡田敏史: **エルカトニン製剤の含量評価 医薬品研究**, **32(7)**, 465-471 (2001)

エルカトニン製剤(注射剤: 9検体)の含量評価及び製造会社が有する自家エルカトニン標準品(5社: 5検体)の品質評価を日局エルカトニン標準品を対照にしてHPLC法及び生物検定法で行った。すべての製剤が高度に純化された原料エルカトニンを用いて製造されていることがHPLC法で示された。製剤9検体中1検体の含量はHPLC法及び生物検定法の両法で規格値以下であり、両法の値はよく相関していた。他の製剤の定量値は規格に適合し、両法の値はよく相関した。このことから、HPLC法は生物検定法の簡便な代替法になることが示された。自家エルカトニン標準品の品質をHPLC法と生物検定法で検討したところ、生物検定法では血中カルシウム低下作用を示すにも関わらず、エルカトニン分子がHPLCで検出できないものが存在し、各企業が有する自家標準品には適切でないものがあり、標準品には日局エルカトニン標準品を使用すべきであると思われる。

Keyword: Elcatonin, Elcatonin Reference Standard, Quantitative evaluation

谷本 剛, 八木澤守正*¹, 藤原 博*²: **日本抗生物質 医薬品基準の日本薬局方への移行における問題点とその対応 (その2)**

医薬品研究, **32(6)**, 423-431 (2001)

日抗基の廃止に伴う一般試験法の取扱いを検討するために、一般試験法の日局と日抗基の間での相違点を明らかにし、日局に規定される抗生物質医薬品の品質試験の実施に支障が生じないように対策を講じることを目的に

検討を行った。日抗基一般試験法の種類及びそれらと日局一般試験法との関係を調査し、日抗基独自の一般試験法である①アセチル基定量法、②グラジュエントクロマトグラフ法、③結晶性試験法、④バイオオートグラフ法、⑤ヒスタミンの5種の試験法の日抗基廃止後の取扱いについて方策を示した。また、日局試験法と一部を異にする日抗基試験法には、注射剤の不溶性異物検査法、発熱性物質試験法、プラスチック製医薬品容器試験法、無菌試験法、乾燥減量試験法、水分試験法、pH測定法の7種の試験法があるが、これらについても日抗基廃止後の対応の仕方を提示した。

Keyword: antibiotics, The Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan, The Japanese Pharmacopoeia, general tests

*¹ 日本抗生物質学術協議会

*² 国立感染症研究所

Kubo, E.*¹, Maekawa, K., Tanimoto, T., Fujisawa, S.*², Akagi, Y.*¹: **Biochemical and Morphological Changes during Development of Sugar Cataract in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) Rat** *Exp. Eye Res.*, 73, 375-381 (2001)

The relationship between the polyol pathway and sugar cataracts has been studied extensively using streptozotocin-induced diabetic rats and galactose fed rats as animal models for insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). In these models, sugar cataracts progress quickly, leading to rapid lenticular polyol accumulation in the early stages of cataract formation. In 1992, a new animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat, was established. In the present study, we examined both biochemical and morphological changes in the lenses of the OLETF rats to determine whether these changes reflect those associated with diabetic cataract formation and to clarify their relationship with the polyol pathway. For the biochemical analysis, we measured the enzyme activity of aldose reductase (AR) and sorbitol dehydrogenase (SDH) and the sorbitol levels using 20, 40 and 60 week old OLETF or control Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. Enzyme activities of AR and SDH, which were lower in 20 week old OLETF rats than in LETO rats, were increased in 60 week old OLETF rats. The lenticular sorbitol level of the OLETF rats was similar to the control level at 20 weeks of age, but it was markedly increased to 40 weeks of age, and slightly decreased at 60 weeks of age compared with rats at 40 weeks but not compared with

controls. Slight lens fiber swelling was observed in the anterior and/or posterior subcapsular regions of 40 week old OLETF rats, accompanying elevated sorbitol level and slightly increased SDH activity in the lens. Swelling and liquefaction of lens fibers were observed in the subcapsular and supranuclear region of 60 week old OLETF rats, as well as decreased lenticular sorbitol, and markedly increased SDH activity compared with rats at 40 weeks. AR activity was also increased causing the elevation of sorbitol in lenses of OLETF rats during the early stages of cataract formation. Despite differences in the etiology of diabetes mellitus, the strain of rat and the rate of disease progression in the OLETF rat model compared with other diabetic models, the present results support the theory that the polyol pathway via AR is a factor in the development of sugar cataracts.

Keywords: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, sugar cataract, sorbitol accumulation, polyol pathway, aldose reductase, sorbitol dehydrogenase

*¹ 福井医科大学

*² 大塚製薬赤穂研究所

Sakurai, F.*¹, Nishioka, T.*¹, Saito, H., Baba, T.*², Okuda, A.*¹, Matsumoto, O.*¹, Taga, T.*¹, Yamashita, F.*¹, Takakura, Y.*¹, and Hashida, M.*¹: **Interaction between DNA-Cationic Liposome Complexes and Erythrocytes is an Important Factor in Systemic Gene Transfer via the Intravenous Route in Mice: the Role of the Neutral Helper Lipid.**

Gene Ther. 8, 677-686 (2001)

We investigated the effect of binding and interaction between erythrocytes, a major constituent of blood cells, and the cationic liposome complexes, in relation to the role of the helper lipid, on the in vivo gene delivery to the lung following intravenous injection. Although all three types of vectors bind to murine blood cells in vivo and in vitro, cholesterol-containing complexes with a higher in vivo transfection activity do not induce fusion between erythrocytes, whereas DOPE-containing complexes, a less efficient vector in vivo, induce fusion between the erythrocytes after a short incubation period. The differences in the physicochemical and structural properties of these complexes could explain the differences in interaction with erythrocytes and subsequent gene expression. These results indicate that the interaction with erythrocytes depends on the properties of the cationic lipid vectors and this is an important factor for intravenous gene delivery using

cationic lipid vectors.

Keywords: Cationic liposome, Erythrocytes, Gene transfer

*¹ Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

*² National Institute of Material and Chemical Research

Komatsu, H., Saito, H., Okada, S., Tanaka, M. *, Egashira, M. *, and Handa, T. *: **Effects of the Acyl Chain Composition of Phosphatidylcholines on the Stability of Freeze-Dried Small Liposomes in the Presence of Maltose.**

Chem. Phys. Lipids **113**, 29-39 (2001)

The effects of the acyl chain composition of phosphatidylcholines (PCs) on the stability of small unilamellar vesicles during freeze-drying and rehydration in the presence of maltose were studied by monitoring the retention of a trapped marker, calcein, in the internal liposome compartment. In dipalmitoyl PC, beta-oleoyl-gamma-palmitoyl-PC and egg yolk PC liposomes, good or fair retentions (>50%) were observed in the presence of maltose, but maltose was ineffective in preserving retention in the dioleoyl PC (DOPC) liposomes (<10%). The extremely low retention in the DOPC liposome was ascribed to neither a formation of the inverted hexagonal phase of the liposomal membrane nor the fusion/aggregation of the liposomes in the drying-rehydration process. Differential scanning calorimetry measurements suggested that interactions of maltose with PC headgroups were essential to stabilizing the dry liposomes. These interactions were significant in the saturated or mixed chain liposomes but were markedly reduced in the DOPC liposomes.

Keywords: Freeze-dry, Saccharide, Differential Scanning Calorimetry

* Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Gorbenko, G. *¹, Saito, H., Molotkovsky, J. *¹, Tanaka, M. *², Egashira, M. *², Nakano, M. *², and Handa, T. *²: **Resonance Energy Transfer Study of Peptide-Lipid Complexes.**

Biophys. Chem. **92**, 155-168 (2001)

Resonance energy transfer involving tryptophan as a donor and anthrylvinyl-labeled phosphatidylcholine (AV-PC), 3-methoxybenzanthrone (MBA) and 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) as acceptors has been examined to obtain information on the structure of peptide-lipid systems consisting of 18A or Ac-18A-NH₂

peptides and large unilamellar phosphatidylcholine vesicles. The lower and upper limits for the tryptophan distance from the bilayer midplane have been assessed in terms of the models of energy transfer in two-dimensional systems, taking into account orientational effects. Evidence for the existence of preferential orientations of Ac-18A-NH₂ with respect to the lipid-water interface has been obtained.

Keywords: Resonance energy transfer, 18A peptide, Phosphatidylcholine vesicles

*¹ Department of Physics and Technology, Kharkov National University, Ukraine

*² Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Saito, H., Dhanasekaran, P. *¹, Baldwin, F. *¹, Weisgraber, K. H. *², Lund-Katz, S. *¹, and Phillips, M. C. *¹: **Lipid Binding-Induced Conformational Change in Human Apolipoprotein E. Evidence for Two Lipid-Bound States on Spherical Particles**

J. Biol. Chem. **276**, 40949-40954 (2001)

To better understand apoE-lipid interactions on lipoprotein surfaces, we determined the thermodynamic parameters for binding of apoE4 and its 22-kDa and 10-kDa fragments to triolein-egg phosphatidylcholine emulsions using a centrifugation assay and titration calorimetry. Our data suggest that at maximal binding, the binding behavior of intact apoE4 is different from that of each fragment and that the N-terminal domain of intact apoE4 does not contact lipid. At a low surface concentration of protein, the binding enthalpy of intact apoE4 (69 kcal/mol) was approximately equal to the sum of the enthalpies for the 22-kDa and 10-kDa fragments, indicating that both the 22-kDa and 10-kDa fragments interact with lipids. In a saturated condition, however, the binding enthalpy of intact apoE4 (39 kcal/mol) was less exothermic and rather similar to that of each fragment, supporting the hypothesis that only the C-terminal domain of intact apoE4 binds to lipid. We conclude that the N-terminal four-helix bundle can adopt either open or closed conformations, depending upon the surface concentration of emulsion-bound apoE.

Keywords: Apolipoprotein E, Emulsion, Isothermal titration calorimetry

*¹ The Children's Hospital of Philadelphia, USA

*² Gladstone Institute of Cardiovascular Diseases, UCSF, USA

Okamura, E.*¹, Kimura, T.*¹, Nakahara, M.*¹, Tanaka, M.*², Handa, T.*², and Saito, H.: **¹³C NMR Method for the Determination of Peptide and Protein Binding Sites in Lipid Bilayers and Emulsions**

J. Phys. Chem. B **105**, 12616-12621 (2001)

The natural abundance ¹³C NMR method was applied to directly determine the binding site of peptides and proteins in lipid bilayers and emulsions on the atomic level. Reliable NMR criteria for the location and depth of peptides and proteins in membranes were shown by the chemical shift and line width analyses, which reproduced not only the deep penetration of a transmembrane channel peptide gramicidin A but also the superficial binding of Ac-18A-NH₂, a synthetic model peptide of amphipathic helices of plasma apolipoprotein A-I (apoA-I). Membrane perturbation was most significant at EPC glycerol and ester carbonyl sites when apoA-I was bound to EPC small unilamellar vesicles. This indicates not deep but shallow penetration of apoA-I into the membrane interface whose polarity is intermediate between water and the hydrophobic core. Membrane structural modulation by apoA-I was, however, moderate at the bilayer headgroup and the alkyl chain region near the interface.

Keywords: ¹³C NMR, apolipoprotein A-I, binding site

*¹ Institute for Chemical Research, Kyoto University

*² Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Egashira, M.*¹, Gorbenko, G.*², Tanaka, M.*¹, Saito, H., Molotkovsky, J.*², Nakano, M.*¹, and Handa, T.*¹: **Cholesterol Modulates Interaction between an Amphipathic Class A Peptide, Ac-18A-NH₂, and Phosphatidylcholine Bilayers.**

Biochemistry **41**, 4165-4172 (2002)

Cholesterol (Chol) in phosphatidylcholine large unilamellar vesicles (PC LUV) modulated interaction of the bilayers with a class A amphipathic peptide, Ac-18A-NH₂: Chol increased the peptide binding capacity and reduced the affinity together with the peptide-induced leakage of calcein from LUV. The fluorescence spectral shift, quantum yield, anisotropy, and acrylamide-quenching of the peptide Trp indicated that in PC:Chol (3:2) LUV, Ac-18A-NH₂ was located in a more polar membrane environment with increased motional freedom and greater accessibility to the aqueous medium. Fluorescence energy transfer from the Trp indole ring to acceptors situated at different depths in the bilayers

revealed that the amphipathic peptide penetrated the hydrophobic interior of PC bilayers, while the peptide was located at the polar zwitterionic surface in PC:Chol LUV. These findings imply that Chol in membranes affects the binding and motional freedom of exchangeable plasma apolipoproteins containing class A amphipathic sequences.

Keywords: Cholesterol, Amphipathic peptide, Bilayers

*¹ Department of Physics and Technology, Kharkov National University, Ukraine

*² Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

小出達夫, 岩田美保, 前川京子, 齋藤博幸, 谷本 剛, 岡田敏史, 中根孝久, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉 *¹, 横田洋一*², 津野敏紀*², 鈴木英世*², 俣野 豊 *³, 山本恵一*³: **国立医薬品食品衛生研究所プエラリン標準品の新規設定のための品質評価**
医薬品研究, **33(2)**, 118-123 (2002)

プエラリン標準品の新規設定のための品質評価試験を行った。試験成績は以下のとおりである。1) 元素分析: 理論値と一致した。2) NMR: 構造を支持した。3) 紫外吸収スペクトル: 305.6, 249.4 nmに極大吸収が認められ, 比吸光度 $E_{1cm}^{1\%}$ はそれぞれ243.5 (306nm), 732.4 (250nm)。4) 赤外吸収スペクトル: 3364, 3236, 1634, 1515, 1060 cm^{-1} に特性吸収がみられた。5) 水分含量: 4.36%。6) 融点: 201.5°C 7) 液体クロマトグラフ法による純度試験: 複数個の類縁物質が検出され, 類縁物質総量は約0.93%であった。

以上の試験成績から, 本標準品原料は, 国立医薬品食品衛生研究所プエラリン標準品に適した品質を有することを認めた。

Key words: Puerarin, NIHS Reference Standard, Quality evaluation

*¹ 日本薬剤師研修センター

*² 富山県薬事研究所

*³ 鐘紡(株)

Koide T., Nose M.*¹, Ogihara Y.*¹, Yabu Y.*¹, Ohta N.*¹: **Leishmanicidal effect of curcumin in vitro.**

Biol Pharm Bull, **25(1)**, 131-3(2002)

From a study to find anti-parasitic agents from natural resources, we found that curcumin showed the cytotoxicity against leishmania in vitro. The LD50 value of this activity was 37.6+/-3.5 microM.

Key words: Leishmania, curcumin

*名古屋市立大学

Fuchino H., Koide T., Takahashi M., Sekita S., Satake M*.: **New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities.**

Planta Med., **67**(7), 647-53(2001)

The leishmanicidal compounds isolated from whole plants of *Elephantopus mollis* H.B.K. were identified as follows. Three new sesquiterpenoid lactones, 2,5-epoxy-2beta-hydroxy-8alpha-(2-methylpropenyloxy)-4(15),10(14),11(13)-germacatrien-12,6alpha-olide, (4betaH)-8alpha-(2-methylpropenyloxy)-2-oxo-1(5),10(14), 11(13)-guaiatrien-12,6alpha-olide and (4betaH)-5alpha-hydroxy-8alpha-(2-methylpropenyloxy)-1(10),11(13)-guaiadene-12,6alpha-olide, were isolated from Peruvian and Brazilian collections together with four known sesquiterpenoids, molephantin, elephantopin, isoelephantopin and 2-deethoxy-2beta-methoxyphantomolin. They exhibited potent in vitro leishmanicidal activities against *Leishmania major*. The alpha-methylene-gamma-butyrolactone moiety was found to be essential to the potent leishmanicidal effect observed.

Key words: *Leishmania*, sesquiterpenes, *Elephantopus mollis*

*日本薬剤師研修センター

Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y.: **Content and composition of isoflavonoids in mature or immature beans and bean sprouts consumed in Japan**

J. Health Sci., **47**, 394-406 (2001)

The content of 9 types of isoflavonoids (daidzein, glycitein, genistein, formononetin, biochanin A, coumestrol, daidzin, glycitin and genistin) in 34 domestic or imported raw beans including soybeans, 7 immature beans and 5 bean sprouts consumed in Japan were systematically analyzed. Each isoflavonoid was analyzed in total after acid hydrolysis to the aglycone, and intact individual isoflavonoids were also analyzed without hydrolysis. After the sample clean up, daidzein, glycitein, genistein, formononetin, biochanin A, daidzin, glycitin and genistin were determined by HPLC with a diode array detector and coumestrol was determined by spectrofluorimetry. The content and composition of isoflavonoids varied greatly between soybean sprouts, immature soybeans and mature beans of the same type but of different source. Isoflavonoid content was highest in mature soybeans. The composition of isoflavonoids differed in each growth stage of soybeans. In other

beans, the largest content of isoflavonoids was found in mature chickpeas, but this value was less than 1/27 of the isoflavonoid content in mature soybeans. Thus, the contribution of beans other than soybeans to the daily intake of isoflavonoids in a Japanese diet is negligible.

Keywords: isoflavonoids, beans, high performance liquid chromatography

中村優美子, 石光進, 津村ゆかり, 吉井公彦, 開原亜樹子, 外海泰秀: **HPLCによる農作物中フルスルファミド分析時におけるイオン交換系ミニカラムを用いた試料精製の工夫について**

食品衛生学雑誌, **42**, 398-403 (2001)

農産物中のフルスルファミド簡易分析法の改良を検討した。野菜試料をメタノールで抽出し、酢酸エチルで液-液分配を行った後、シリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、その溶出液をBond Elut^R SAX + Bond Elut^R PSAミニカラムに負荷し、20%アセトン含有n-ヘキサン溶液10 mL及びアセトン5 mLで洗浄後、アセトン35 mLで溶出後、HPLCで定量した。本法ではカロチノイド色素及びあぶらな科野菜に特有の夾雑ピークを除去することができ、回収率の向上を図ることができた。

Keywords: flusulfamide, HPLC, Bond Elut^R SAX-PSA

Tsuji, S., Amakura, Y., Umino, Y., Nishi, M.*, Nakanishi, T.,* Tonogai, Y.: **Structural Determination of the Subsidiary Colors in Food Blue No. 1 (Brilliant Blue FCF) Aluminum Lake Detected by Paper Chromatography**

J. Food Hyg. Soc. Japan, **42**, 243-248 (2001)

One of eight Food Blue No. 1 aluminum lakes (B-1Al) used in the official inspection of coal-tar colors in fiscal year 1999 had a violet sub-spot during paper chromatography and was rejected. To clarify the origin of the sub-spot, the violet subsidiary color (Sub-V) was isolated from the sample. On the basis of NMR and MS analyses and ion chromatography, the structure of the subsidiary color was elucidated to be 2-[[4-[N-ethyl-N-(3-sulphophenylmethyl)amino]phenyl][4-hydroxyphenyl]methyl]benzenesulfonic acid. The relative content of Sub-V to that of *m,m*-B-1 in the rejected sample was determined to be 39.5% by HPLC. The relative contents in other submitted samples of B-1Al were in the range of 1.1-3.6%.

Keywords: brilliant blue FCF aluminum lake, subsidiary color, NMR

*摂南大学薬学部

辻 澄子, 海野 有紀子, 天倉 吉章, 外海 泰秀: 食用赤色40号(アルラレッドAC)及び黄色5号(サンセットイエローFCF)のアルミニウムレーキ中有機性不純物のHPLC定量用試験液調製法の検討

食衛誌, 42, 379-384 (2001)

第7版食品添加物公定書に従った食用赤色40号アルミニウムレーキ(R-40Al)中の副成色素などの有機性不純物のHPLC定量では再現性などに問題があった。これは試験液に存在する高濃度のアルミニウムが原因と考えられた。そこで、R-40Alをアンモニアアルカリ性で煮沸し、水酸化アルミニウムのコロイド状沈殿を除去した上清を試験液とする試験液調製法を開発した。本法により、再現性のある定量結果が得られ、添加回収率も改善された。また、食用黄色5号アルミニウムレーキについても適用可能であった。

Keywords: allura red AC aluminum lake, sunset yellow FCF aluminum lake, subsidiary color

Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., Ito, H. *, Hatano, T. *, Yoshida, T. *, Tonogai, Y.: **Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive**

Food Chemistry, 77, 47-56 (2002)

The components of a natural food additive, "eucalyptus leaf extract", were isolated and identified in order to determine their structures and contents. The structures of eight major compounds, namely the gallic and ellagic acids, and eucalyptone and macrocarpals A-E, isolated from them were elucidated by spectroscopic methods. The antioxidative activity of these isolated compounds were estimated by several assays, and it appears that the antioxidant activity is mostly due to the gallic and ellagic acids. On the other hand, in the determined eucalyptus product, the content of 1,8-cineole, a major component of the eucalyptus oil, was lower than the isolated compounds, and its activity as an antioxidant was negligible.

Keywords: eucalyptus leaf extract, natural antioxidant, food additive

*岡山大学

Ishimitsu, S., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y.: **Determination of Clethodim and Its Oxidation Metabolites in Crops by Liquid Chromatography with Confirmation by LC/MS**

J. AOAC Int., 84, 1172-1178 (2001)

A method was developed for determination of the

herbicide clethodim(C0) and its oxidation metabolites clethodim sulfoxide(C1) and clethodim sulfone(C2) in agricultural products. Upon extraction, both C0 and C1 were oxidized to C2 by m-chloroperoxybenzoic acid, and C2 was determined by liquid chromatography(LC). The C2 peak was confirmed by liquid chromatography/mass spectrometry(LC/MS) with electrospray ionization(ESI). Recoveries of C0 from radish, tomato, onion, sweet potato, kidney bean, carrot, cabbage, and lettuce ranged from 91 to 118% following fortification at 0.05-1.0 ppm. The detection limit of C2 in crops was 0.01 ppm(S/N>3). The fortified samples of onion, sweet potato, kidney bean, and carrot were confirmed by LC/MS(ESI), and the peak of C2 was detected.

Keywords: clethodim, clethodim sulfoxide, clethodim sulfone, crops, liquid chromatography

Akiko Kaihara, Kimihiko Yoshii, Yukari Tsumura, Susumu Ishimitsu, and Yasuhide Tonogai: **Multi-residue Analysis of 18 Pesticides in Fresh Fruits, Vegetables and Rice by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry**

J. Health Sci., 48, 173-178, (2002)

A multi-residue screening method was developed for the determination of 18 pesticides in fresh fruits, vegetables and unpolished rice by supercritical fluid extraction (SFE), cleaned up with cartridge columns, and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray (LC/MS (ESI)). Comparing with our previous method, the number of fraction at purification was reduced to one fraction in order to reduce the preparation time, and detection limit and recovery value of almost pesticides were improved. The detection limits of the 18 pesticides were 0.04-148 ng/g in sample. Furthermore, in case of crops including many interfering peaks by UV detection, using a LC-MS (SIM) significantly improved the quantitative and qualitative analyses with less interfering peaks than UV detection.

Yoshii K, Kaihara A, Tsumura Y, Ishimitsu S, Tonogai Y.: **Simultaneous determination of residues of emamectin and its metabolites, and milbemectin, ivermectin, and abamectin in crops by liquid chromatography with fluorescence detection.**

J. AOAC Int., 84, 910-917 (2001)

A liquid chromatographic (LC) method was developed for the determination of emamectin and its metabolites

(8,9-Z-isomer, N-demethylated, N-formylated, and N-methylformylated emamectin) in various crops. The analytes were extracted with acetone, cleaned up on cartridge columns (C18 and NH₂), derivatized with trifluoroacetic anhydride and 1-methylimidazole, and determined by LC with fluorescence detection. Because radish inhibited the formation of the fluorescent derivatives, an additional Bond Elut PRS cartridge was used in the cleanup of Japanese radish samples. During sample preparation, N-formylated emamectin partially degraded to emamectin B1b and emamectin B1a, and the 8,9-Z-isomer partially degraded to N-demethylated emamectin. Therefore, emamectin and its metabolites were determined as total emamectin, i.e., their sum was estimated as emamectin benzoate. Their recoveries from most crops were approximately 80-110% with the developed method. The detection limits for the analytes in vegetables were 0.1-0.3 parts per trillion (ppt). The results for these compounds were confirmed by LC/mass spectrometry (LC/MS; electrospray ionization mode). Because the fluorescent derivative of emamectin was undetectable by LC/MS, the results for the analyte were confirmed by using a sample solution without derivatization. Limits of detection by LC/MS were similar to the fluorescence detection limits, 0.1-0.3 ppt in vegetables. In addition to the emamectins, milbemectin, ivermectin, and abamectin were also determined by the developed method.

Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Kaihara, A., Yoshii, K., Nakamura, Y., Tonogai, Y.: **Di (2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches caused by PVC gloves used in the preparation of foods**
Food Add. Contam., **18**, 569-579 (2001)

Plasticizers in retail packed lunch and set lunch in restaurants were determined by GC/MS. The phthalate esters were as follows: diethyl, dipropyl, dibutyl, dipentyl, dihexyl, butylbenzyl, dicyclohexyl, di(2-ethylhexyl), dioctyl, diisooctyl (mixture of isomers) and diisononyl (mixture). Di(2-ethylhexyl) adipate was also determined. Sixteen packed lunches and ten set lunches were analyzed, and in all samples the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) was highest, at 0.80 to 11.8 mg/kg in packed lunches and 0.012 to 0.30 mg/kg in set lunches. DEHP content in five packed lunches exceeded 1.85 mg, the EU TDI for a person of 50 kg body weight. Foodstuffs of the packed lunches at each step of preparation were taken from the factory and phthalates

were determined. For example, uncooked chicken contained 0.08 mg/kg DEHP, 13.1 mg/kg after frying and 16.9 mg/kg after packing. Disposable PVC gloves used in preparation were apparently the source of high DEHP. The gloves used during cooking or packing process were sprayed by 68% (w/w) ethanol for the purpose of sterilization. PVC gloves from the factory contained 22 or 41% by weight of DEHP. Boiled rice, croquette and boiled dry radish were handled with PVC gloves containing 30% w/w DEHP in the laboratory to confirm causality. DEHP migration was 0.05 mg/kg in rice or 0.33 mg/kg in croquette, and 11.1 mg/kg in radish. The alcohol sprayed on gloves increased migration of DEHP to 2.03 mg/kg in rice and 2.45 mg/kg in croquette, 18.4 mg/kg in radish.
Keywords: phthalate, DEHA, packed lunch, disposable glove, GC/MS, PVC

Niino, T.*¹, Ishibashi, T.*¹, Itho, T.*¹, Sakai, S.*¹, Ishiwata, H., Yamada, T.*², Onodera, S.*³: **Monoester formation by hydrolysis of dialkyl phthalate migration from polyvinyl chloride products in human saliva**
J. Health Sci., **47**, 318-322 (2001)

The migration of dialkyl phthalate was tested in volunteers who chewed polyvinyl chloride (PVC) toys containing 100 mg/g di-n-butyl phthalate (DBP) and 185 mg/g di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) (ball A), and 256 mg/g diisononyl phthalate (DINP) (ball B). The migration of dialkyl phthalate into simulated saliva was also examined in vitro by shaking toy pieces. Release of DBP, DEHP, and DINP in vivo from ball A was 11.7, 44.4, and 78.0 $\mu\text{g}/10 \text{ cm}^2/\text{h}$, respectively, and in vitro was 339, 315, 535 $\mu\text{g}/10 \text{ cm}^2/\text{h}$, respectively. The presence of mono-n-butyl phthalate (MBP) and mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in saliva collected during chewing ball A was confirmed by GC/MS-SIM. Saliva collected from volunteers was incubated with DBP and DEHP at 37 °C for 60 min. Monoesters of these dipthalates were detected in the collected saliva.

Keywords: dialkyl phthalate, hydrolysis, human saliva

*¹ 東京顕微鏡院

*² 日本食品添加物協会

*³ 東京理科大学薬学部

Ishiwata, H., Nishijima, M.*¹, Fukasawa, Y.*²: **Estimation of preservative concentrations in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1998**
J. Food Hyg. Soc. Japan, **42**, 404-412 (2001)

The mean concentration and daily intake of five preservatives were estimated based on the results of an analysis of 89,927 foods obtained in official inspections by Japanese local governments in fiscal year 1998. The mean concentrations of benzoic acid, dehydroacetic acid, p-hydroxybenzoic acid, propionic acid, and sorbic acid were 9.5%, 1.5%, 5.7%, 1.7%, and 23.9%, respectively, of the allowable limits. Daily intake per person was 6.23, 0.030, 1.02, 8.10, and 25.0 mg, respectively, and benzoic acid, p-hydroxybenzoic acid, and sorbic acid consumed were 2.5%, 0.2%, and 2.0% of their ADI, respectively. These results were similar to those obtained based on the results in fiscal years 1994 and 1996.

Keywords: preservative, concentration, daily intake

*1 実践女子大学家政学部

*2 山梨県衛生公害研究所

Ishiwata, H., Abe, Y., Kubota, H., Kawasaki, Y., Takeda, Y., Maitani, T., Nishijima, M.*¹, Fukasawa, Y.*²: **Estimation of concentrations of antifungal agents allowed as food additives in foods and their daily intake based on official inspection results in Japan in fiscal year 1998**

J. Food Hyg. Soc. Japan, 43, 49-56 (2002)

The mean concentration and daily intake of four antifungal agents were estimated based on the results of an analysis of 7,005 foods obtained in official inspections by Japanese local governments in fiscal year 1998. The mean concentrations of diphenyl, imazalil, o-phenylphenol, and thiabendazole were 0.0004%, 14.0%, 3.5%, and 5.7%, respectively, of the allowable limits. Daily intake per person was 0.000326, 1.89, 11.5, and 23.3 μ g, respectively, and these agents consumed were 0.000013%, 0.15%, and 0.12%, and 0.47% of their ADI, respectively. These results were similar to those obtained based on the results in fiscal years 1994 and 1996, except that the amount of diphenyl is much lower (1/100).

Keywords: antifungal agent, concentration, daily intake

*1 実践女子大学家政学部

*2 山梨県衛生公害研究所

Ema, M., Miyawaki, E.: **Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats**

Reprod. Toxicol., 15, 261-267 (2001)

Rats were given monobutyl phthalate (MBuP) by

gastric intubation at 250, 500, 750, or 1000 mg/kg on days 0-8 of pregnancy. The effects of MBuP on the uterine function, as a cause of early embryonic loss, were also determined in pseudopregnant rats, with an induced decidual cell response. The same doses of MBuP were given to pseudopregnant rats on days 0-8 of pseudopregnancy and the uterine weight on day 9 served as an index of the uterine decidualization. MBuP at 1000 mg/kg caused significant increases in the incidences of preimplantation loss in females successfully mated and of postimplantation loss in females having implantations. The uterine decidualization in pseudopregnant rats was significantly decreased at 1000 mg/kg. These findings suggest that early embryonic loss due to MBuP is mediated, at least in part, via the suppression of uterine decidualization, an impairment of uterine function.

Keywords: Monobutyl phthalate, early embryonic loss, decidual cell response

Ema, M., Miyawaki, E.: **Roles of progesterone on suppression of uterine decidualization and implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats**

Cong. Anom., 42, 106-111 (2001)

Although lower uterine weight was found in hormone-maintained ovariectomized rats given triphenyltin chloride (TPTCl) at 4.7 or 6.3 mg/kg on days 0-3 and induced decidual cell response on day 4, no statistical significance in the uterine weight was detected between the control group and the TPTCl-treated groups. The pregnancy rate and number of implantations in the groups given TPTCl at 4.7 or 6.3 mg/kg on days 0-3 of pregnancy and progesterone on days 0-8 of pregnancy were significantly higher than those in the groups given TPTCl alone. No significant differences in these parameters were found between the control group and the groups given TPTCl and progesterone. It can be concluded that the TPTCl-induced suppression of uterine decidualization is mediated, at least partially, via the ovarian hormones, and that progesterone protects against the TPTCl-induced implantation failure.

Keywords: Triphenyltin chloride, implantation failure, progesterone

Ema, M., Harazono, A.: **Toxic effects of butyltin trichloride during early pregnancy in rats**

Toxicol. Lett., 125, 99-106 (2001)

Following successful mating, rats were given BTCl by gastric intubation at 56, 226, or 903 mg/kg on days 0-3 or

on days 4-7 of pregnancy. The pregnancy outcome was determined on day 20 of pregnancy. The maternal body weight gain and food consumption were significantly decreased at 903 mg/kg on days 0-3 or on days 4-7. The pregnancy rate in the BTCl-treated groups was comparable to the control value. The incidence of preimplantation loss was not significantly affected after administration of BTCl on days 0-3 or on days 4-7. In females having implantations, the numbers of corpora lutea, implantations, and live fetuses and the incidences of pre- and postimplantation loss in the groups given BTCl on days 0-3 were comparable to the controls. A significant decrease in weight of female fetuses was found at 903 mg/kg on days 0-3 or on days 4-7. It could be concluded that BTCl during early pregnancy is maternal and developmental toxic at 903 mg/kg.

Keywords: Butyltin trichloride, embryonic loss, reproductive and developmental toxicity

Ema, M., Fujii, S.* , Furukawa, M.* , Kiguchi, M.* , Ikka, T.* , Harazono, A.: **Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A**

Reprod. Toxicol., 15, 505-523 (2001)

This study was conducted to determine the low-dose effects of bisphenol A (BPA) in a rat two-generation reproduction study. Male and female rats were given BPA at 0.2, 2, 20, or 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by gastric intubation throughout the study beginning at the onset of a 10- and 2-week pre-mating period, in F0 males and females, respectively, and continuing through the mating, gestation, and lactation periods, for two generations. There were adult (F0, F1, F2) and postnatal day 22 (F1, F2) necropsies; the oldest F2 males and females being killed in postnatal weeks 7 and 14, respectively. The data indicate that oral BPA of between 0.2 and 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ over 2 generations did not cause significant compound-related changes in reproductive or developmental parameters in rats.

Keywords: Bisphenol A, low-dose effects, development of reproductive system

* Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.

Ema, M., Miyawaki, E.: **Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy**

Reprod. Toxicol., 16, 71-76 (2002)

Rats were given butyl benzyl phthalate (BBP) by gastric intubation at 250, 500, or 1000 mg/kg on days 15-17 of

pregnancy. A significant decrease in maternal body weight gain and food consumption was found at 500 and 1000 mg/kg. A significant decrease in the number of live fetuses was found at 1000 mg/kg. The fetal weights were significantly lowered at 1000 mg/kg. A significantly increased incidence of fetuses with undescended testes was found at 500 and 1000 mg/kg. A significant decrease in the anogenital distance (AGD) and AGD/cube root of body weight ratio in male fetuses was detected at 500 and 1000 mg/kg. The AGD and AGD/cube root of body weight ratio of female fetuses in the BBP-treated groups were comparable to those in the control group. It was concluded that BBP on days 15-17 of pregnancy produced adverse effects on the development of the reproductive system in male offspring.

Keywords: Butyl benzyl phthalate, anogenital distance, undescended testes

Nakagawa, Y., Maeda, H., Murai, T.: **Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: Comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test**

Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9, 588-597 (2002)

The reliability of an in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytic cells was assessed by comparison with a test system using a human whole blood culture and also with the conventional rabbit pyrogen test. MM6-CA8 cells used as the pyrogen indicator cells, which were newly selected by subcloning of human monocytic Mono-Mac-6 cells, responded to various pyrogens including endotoxin, peptidoglycan (PG), *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC) and poly (I:C) with high sensitivity, and produced proinflammatory cytokines. The cytokine-producing responses of MM6-CA8 cells correlated significantly with the responses of cultured human whole blood. In terms of cytokine inducibility, the pyrogens were ranked in order endotoxin > PG > poly I:C > SAC in both culture systems which almost agreed with the rank of their pyrogenicity assessed by the rabbit pyrogen test. These results suggest that the in-vitro responsiveness of MM6-CA8 cells to various pyrogens is highly relevant for human pyrogenic reactions. Therefore, the in vitro test system is useful and reliable for detecting the presence of materials that are pyrogenic for humans.

Keywords: in vitro, pyrogen test, proinflammatory cytokine

Harazono, A., Ema, M.: **Effects of 4-tert-octylphenol on initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats**
Toxicol. Lett., **119**, 79-84 (2001)

4-tert-Octylphenol (OP) is an alkylphenol that is an intermediate in the production of alkylphenol ethoxylates. OP has been reported to be the most potent estrogenic alkylphenol in vitro. In the present study, the effects of OP on initiation and maintenance of pregnancy were investigated in rats. Inseminated female rats were orally given OP at 0, 15.6, 31.3, 62.5 and 125 mg/kg on day 0 through day 8 of pregnancy. Female rats were sacrificed on day 20 of pregnancy, and pregnancy outcome was determined. Decreases in body weight gain and food consumption on days 0-9 were found at 31.3 mg/kg and above, and at 15.6 mg/kg and above, respectively. The pregnancy rate was not adversely affected by OP administration during early pregnancy even at 125 mg/kg. The incidence of post-implantation loss per litter at 31.3 mg/kg and above was significantly higher than that in the control group. The body weights of live fetuses in the OP-treated groups were not significantly different from those in the control group. No increase in the incidence of fetuses with external malformations was found in any OP-treated group. We concluded that OP during early pregnancy caused post-implantation embryonic loss at doses that showed maternal toxicity.

Keywords: 4-tert-octylphenol, early pregnancy, rat

青柳光敏*, 姉帯正樹*, 林 隆章*, 柴田敏郎, 畠山好雄: **川芎の調製法と化学的品質評価 (第2報) 湯通しの条件が品質に及ぼす影響**

北海道立衛生研究所報告, **51**, 97-99 (2001)

生薬川芎は生根を湯で処理 (湯どおし) した後乾燥して仕上げる。湯どおしの温度及び時間が希エタノールエキス, 糖, エーテルエキス及びligstilide含量に及ぼす影響を検討した。その結果, 希エタノールエキスと糖含量ならびに, エーテルエキスとligstilide含量間にいずれも高い正の相関が認められ, いずれも60℃以上の処理で著しく減少した。

Keywords: Cnidii Rhizoma, blanching condition

*北海道立衛生研究所

Kraker, J. W.*¹, Franssen, M. C. R.*², Groot, A.*¹, Shibata, T., Bouwmeester, H. J.*²: **Germacrene from fresh costus roots**
Phytochemistry, **58**, 481-487 (2001)

Four germacrene were isolated from fresh costus roots (*Saussurea lappa*). Heating of (+)-germacrene A, germacra-1 (10), 4, 11(13)-trien-12-ol, germacra-1 (10), 4, 11(13)-trien-12-al, and germacra-1 (10), 4, 11(13)-trien-12-oic acid yields (-)- β -elemene, (-)-elema-1, 3, 11(13)-trien-12-ol, (-)-elema-1, 3, 11(13)-trien-12-al, and elema-1, 3, 11(13)-trien-12-oic acid respectively. Acid induced cyclisation of the germacrene yields selinene, costol, costal and costic acid respectively. It is highly probable that the elemenes reported in literature for costus root oil are artefacts.

Keywords: *Saussurea lappa*, sesquiterpene lactone biosynthesis, germacrene

*¹ Wageningen University, the Netherlands

*² Plant Research International, Wageningen, the Netherlands

Fuchino, H., Koide, T., Takahashi, M., Sekita, S. and Satake, M.: **New Sesquiterpene Lactones from *Elephantopus mollis* and Their Leishmanicidal Activities**.
Planta Medica, **67**, 647-653 (2001)

The leishmanicidal compounds isolated from whole plants of *Elephantopus mollis* H.B.K. were identified as follows. Three new sesquiterpenoid lactones, 2,5-epoxy-2 β -hydroxy-8 α -(2-methylpropenyloxy)-4(15), 10(14), 11(13)-germacratrien-12,6 α -olide, (4 β H)-8 α -(2-methylpropenyloxy)-2-oxo-1(5), 10(14), 11(13)-guaiatrien-12,6 α -olide and (4 β H)-5 α -hydroxy-8 α -(2-methylpropenyloxy)-1(10), 11(13)-guaidiene-12,6 α -olide, were isolated from Peruvian and Brazilian collections together with four known sesquiterpenoids, molephantin, elephantopin, isoelephantopin and 2-deethoxy-2 β -methoxyphantomolin. They exhibited potent *in vitro* leishmanicidal activities against *Leishmania major*. The α -methylene- γ -butyrolactone moiety was found to be essential to the potent leishmanicidal effect observed.

Keywords: Sesquiterpenes, *Elephantopus mollis*, leishmaniasis.

Li, S. Y.*¹, Fuchino, H., Kawahara, N., Sekita, S. and Satake, M.: **New Phenolic Constituents from *Smilax bracteata***.

Journal of Natural Products, **65**, 262-266 (2002)

From the methanol extract of *Smilax bracteata* rhizomes, six new phenolic compounds, (2S,3S)-5-O- β -D-glucopyranosyloxy-6-methyl-3'-methoxy-3,7,4'-trihydroxyflavan, (2S, 3S)-5-O- β -D-glucopyrano-

syloxy-6-methyl-4'-methoxy-3,7,3'-trihydroxyflavan, 3 β -(3', 5'-dihydroxyphenyl)-2 α -(4"-hydroxyphenyl)-dihydrobenzofuran-5-carbaldehyde, (1-*p*-O-coumaroyl-6-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside, (1-*p*-O-coumaroyl-3,6-di-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl- α -D-glucopyranoside and (6-O-feruoyl)- β -D-fructofuranosyl-(6-O-acetyl)- α -D-glucopyranoside were isolated together with five known compounds. Their structures were established by spectral data interpretation.

Keywords: *Smilax bracteata*, stilben, flavonoid.

* Guangzhou Institute for Drug Control

Jung, D.W.^{*1}, Sung, C.K.^{*1}, Touno, K., Yoshimatsu, K., Shimomura, K.: **Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification**

Journal of Plant Physiology, **158**, 801-805 (2001)

Auxin-independent adventitious root culture of *Hyoscyamus niger* was established, and the roots were successfully cryopreserved with a high regeneration rate of 93.3 % by vitrification method. The root tips cultured for 12 to 14 days in phytohormone-free Murashige and Skoog (MS) liquid medium were excised and precultured on Woody Plant (WP) solid medium supplemented with 0.3 M sucrose at 25 °C in the dark. After 1 day, they were treated with MS-based loading solution for 10 min followed by soaking in MS-based PVS2 for 10 min at 0 °C. The root tips treated were immersed into liquid nitrogen (-196 °C). For recovery, the root tips were thawed rapidly at 40 °C and washed with MS medium containing 1 M sucrose prior to plating onto WP solid medium. The regenerated roots were evaluated by their growth and tropane alkaloid production. The growth and alkaloid contents of the regenerated roots analyzed by HPLC were found to be almost the same as those of the non-treated roots.

Keywords: *Hyoscyamus niger*, adventitious root, cryopreservation

^{*1} College of Pharmacy, Chonnam National University, Yongbong-Dong 300, Kwangju, 500-757, Korea

Kojoma, M.^{*1}, Iida, O., Makino, Y.^{*2}, Sekita, S., and Satake, M.^{*3}: **DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* L. using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Amplification** *Planta Medica*, **68**, 60-63 (2002)

Chemical analysis of cannabinoid, and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting of DNA were used to identify different strains of *Cannabis sativa* L. for

forensic purposes. Three strains were classified into two types, tetrahydrocannabinol (THC) chemo-type and cannabidiol (CBD) chemo-type, using high performance liquid chromatography (HPLC). The two strains of the CBD type were not distinguished by their HPLC chromatograph patterns. ISSR fingerprinting identified the definitive polymorphic DNA patterns between these strains. The use of ISSR fingerprinting enabled a clear differentiation between *cannabis* strains that could not be achieved using HPLC analysis.

Keywords: *Cannabis sativa*, DNA profiling, ISSR

^{*1} 理化学研究所

^{*2} 関東信越地区麻薬取締官事務所

^{*3} 日本薬剤師研修センター

Kojoma, M.^{*1}, Kurihara, K., Yamada, K., Sekita, S., Satake, M.^{*2} and Iida, O.: **Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the *trnL-trnF* chloroplast DNA**

Planta Medica, **68**, 94-96 (2002)

Genetic identification among cinnamon species was studied by analyzing nucleotide sequences of chloroplast DNA from four species (*Cinnamomum cassia*, *C. zeylanicum*, *C. burmannii* and *C. sieboldii*). The two regions studied were the intergenic spacer region between the *trnL* 3'exon and *trnF* exon (*trnL-trnF* IGS) and the *trnL* intron region. We found nucleotide variation at one site in the *trnL-trnF* IGS, and at three sites in the *trnL* intron. With the sequence data from analysis of these regions, the four *Cinnamomum* species used in this study were correctly identified. Furthermore, single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR products from the *trnL-trnF* IGS and the *trnL* intron resulted in different SSCP band patterns among *C. cassia*, *C. zeylanicum* and *C. burmannii*.

Keywords: *Cinnamomum* spp., chloroplast DNA, SSCP analysis

^{*1} 理化学研究所

^{*2} 日本薬剤師研修センター

高上馬希重^{*1}, 飯田修, 関田節子, 佐竹元吉^{*2}, 牧野由紀子^{*3}: **大麻 *Cannabis sativa* L. における ISSR 解析 DNA 多型**, 9, 77-81, 東洋書店 (2001)

DNAによる大麻鑑定手法の開発を目的として, ISSR-PCR (Inter Simple Sequence Repeats PCR) 解析を用いて, 異なった系統間の識別を試みた. 国内外の11系統の大麻を実験材料とした. 各プライマーにおいて実験に用いた系統間で異なるバンドパターンを示し, 得られた

データ解析からこれらの系統は数個のクラスターに分けられた。さらに麻薬性成分カンナビノイド類の成分分析からは識別の困難な系統間の比較を行った結果、ISSR-PCRによって明らかにこれらの系統を区別することが可能であった。以上のことからISSR-PCRフィンガープリント分析は大麻の系統間の違いを識別する有効な手法であることが認められた。また、PCR反応時のアニーリン

グ温度を高く設定できることから実験結果の再現性も高く、大麻鑑定の初期スクリーニングに有効であると考えられた。

Keywords: *Cannabis sativa*, DNA, ISSR

*¹ 理化学研究所

*² 日本薬剤師研修センター

*³ 関東信越地区麻薬取締官事務所

小嶋茂雄：ICH Q6Aの課題とその進捗

PDA Journal of GMP and Validation in Japan, **3**, 1-7 (2001)

平成11年10月のワシントンでのICH会議において、化学合成医薬品の規格および試験方法のガイドライン(Q6A)が最終合意に達したが、このガイドラインに含まれる定期的試験/スキップ試験、工程内試験の利用、パラメトリックリリースなどの医薬品の品質保証に関する新しい考え方を我が国においてどのように実施していくかが課題となっている。本稿は、これらの考え方を巡る最近の動きについて、厚生科学研究として行われている feasibility study の進捗状況を中心に解説した。

小嶋茂雄：特集 第十四改正日本薬局方の改正点/医薬品各条の改正点/新収載医薬品(抗生物質医薬品、生物薬品および生薬を除く)

薬局, **52**, 1588-1596(2001)

平成13年4月1日に第十四改正日本薬局方(日局14)が公布された。本稿では、日局14に新収載の化学薬品各条について、審議方針ならびに各項目の記載の特徴を解説した。

小嶋茂雄：ICH/PDGにおける薬局方試験法調和の動向

医薬品研究, **32**, 627-638(2001)

日米欧3薬局方で組織されるPDG(薬局方検討会議)では、1990年以来、医薬品添加物や一般試験法などについて調和の作業を進めているが、この11年間の努力は必ずしも十分な成果を挙げてきているとは言い難い。この薬局方の国際調和は、ICH-Q6A専門家会議における5つの薬局方試験法の判定基準の合意がエポックとなって、新たな展開の段階に進みつつある。そこで、本稿では、PDGにおける薬局方試験法の調和の動向を、1) Q6A以前の模索状態、2) ICH-Q6A専門家会議における5つの薬局方試験法の判定基準の3極間での合意、3) Q6A後の新たな展開の兆しの3つの時期に分けて解説した。

小嶋茂雄：第十四改正日本薬局方について/医薬品各条(新収載品目)について

医薬品研究, **32**, 664-674(2001)

平成13年4月1日に公布された第十四改正日本薬局方に新収載の化学薬品各条について、審議方針ならびに各項目の記載の特徴を説明した。

小嶋茂雄, 島田弘康, 橋本正晴, 苗代一郎, 中島芳文, 門田利人, 三宅幸雄, 森田健, 若田明裕, 竹内正紀,

酒井喜代志, 鈴木専二, 松澤利明, 奥田秀毅, 井上達, 林真, 長谷川隆一, 奥田晴宏, 高田幸一: 原薬及び製剤中の不純物の安全性確認に関するQ&A
医薬品研究, **33**, 17-27(2002)

ICHの原薬及び製剤の不純物ガイドライン(Q3A&B)における不純物の安全性確認に関する記載が必ずしも具体的でないため、その解釈及び運用方法を巡って一定の混乱が生じていたことから、製薬協ではプロジェクトチームを編成して不純物の安全性確認に関するQ&Aの原案を作成した。このQ&Aを官民共通のものとするべく、国立衛研の品質及び安全性の専門家と製薬協との間で意見の折り合わせが続けられた結果、平成13年9月に最終案が作成された。そこで、このQ&A最終案の内容とその作成の経過について広く紹介するべく本稿を作成した。

小嶋茂雄：分析法バリデーション、特に室内再現精度の評価について—新薬承認申請資料における記載から—

ファームテクジャパン, **18**, 695-704(2002)

ICHの分析法バリデーションのテキスト(Q2A&B)が、我が国で施行となってから4年が過ぎようとしており、新薬の承認申請資料には分析法のバリデーションについて記載されるようになってきた。しかしながら、その記載の内容にはまだまだ不十分なものが多く、中でも分析法バリデーションの要である精度の評価が未だに併行精度の評価にウエイトを置いたものから脱却できずに、室内再現精度をベースとしたものに切り替わっていないことは問題である。本稿では、この室内再現精度の評価を中心に、新薬の承認申請資料に分析法バリデーションに関してどのような記載があり、これに対してどのような指摘がなされたかについて、いくつかの例を挙げて解説した。

青柳伸男：薬局方製剤試験の国際調和の動向

医薬品研究, **32** (11), 699-708 (2001)

薬局方製剤試験の国際調和の課題である溶出試験、崩壊試験、含量均一性試験、質量偏差試験、不溶性微粒子試験、注射剤の排出可能容量試験について、これまでの進捗状況と抱える問題点を紹介した。また、含量均一性試験、質量偏差試験は現在の日局の試験法が最適な標準試験法として認知され、採用される方向にあるが、それを例にとり、医薬品の品質向上を目指し、国際調和を良い方向に進展させるには、基礎となる科学的データが重要な役割を果たすことを示した。

Keywords: International harmonization, pharmacopoeia, dissolution test, content uniformity

吉岡澄江, 麻生伸一郎*1: 品質に関わるトピックの動向-Q1Eを中心として-

医薬品研究, 33, 28-46 (2002)

新有効成分含有医薬品のICH安定性試験ガイドラインについて, データ評価に関するガイドライン (Q1E) のステップ2に向けた国際調和の議論の解説を行った。特に, 長期保存試験および加速試験の成績に基づいてデータ評価を進めるフローチャートの詳細を紹介し, 共分散分析法などの統計解析法について解説した。

Keywords: Stability, Guideline, Pharmaceutical

*1 ノバルティスファーマ

Hayakawa, T.: Specifications For Biotechnological Substances

Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 121-128 (2001)

The specific area and main concept described in ICH Q6B 'Specifications' document are overviewed. These include: Scope, principles for consideration in setting specifications, characterization, reference standard or in-house reference material, heterogeneity and quality control, biological activity, immunochemical properties, purity, impurities, contaminants, process controls, justification of the specification, drug substance specification, potency assay of drug substance, and drug product specification. The impact of the document on the new topics e.g., the comparability of the protein products and quality control of transgenic animal-derived protein products is also discussed.

Keywords: specifications, biotechnological substances, ICH Q6B

Hayakawa, T.: Biotech Process Evaluation

Proceedings of the Fifth International Conference on Harmonization San Diego 2000, Ed. By M. Cone, Regulatory Affairs Journals LTD, pp. 73-77 (2001)

Some aspects of process evaluation regarding biotechnology products are described. These include: Differences between two terms 'process evaluation' and 'process validation', two categories of 'process evaluation study', definition of biotech process evaluation study, outline of biotech process evaluation study (clearance study), objective and experimental approach of biotech process evaluation study, justification of study, facility and scale, judgment, interpretation, limitation, re-evaluation, and impact of biotech process evaluation study.

Keywords: biotech process evaluation, clearance study, biotechnology products

Hayakawa, T.: Perspective on assessing comparability of biotechnology products—a view from Japan—

Dev Biol Stand., Basel, Karger, 109, 27-40 (2002)

Some aspects of the assessment of comparability of biotechnology products are described. These include: 1) Need for comparability assessment, 2) approaches for assessing the comparability of products, 3) heterogeneity and control of biotechnology products, 4) minimum qualification for further comparability assessment in the case of the candidate product whose "Desired product" is defined as the protein which has the expected structure, which is expected from the DNA sequence, which is expected from the DNA sequence and anticipated post-translational modifications, respectively, 5) crucial elements for determining the necessity and extent of further comparability assessments as well as for establishing the entire comparability to the pre-existing product, 6) possible major changes in the manufacturing process, 7) appropriate process evaluation and/or validation programs and criteria according to the nature and extent of changes in the manufacturing process, 8) factors which affect the extent and nature of preclinical and clinical comparability studies, 9) types of documents to be submitted along with applications, 10) product derived from manufacturing variation during product development within a single manufacturer, and 11) towards the future.

Keywords: comparability, biotechnology products, Japanese perspective

早川堯夫: 第十四改正日本薬局方について; 医薬品各条 (生物薬品) について

医薬品研究, 32(9), 597-603 (2001)

第十四改正日本薬局方のうち, 1) 生物薬品委員会関連の各条新規収載品目, 改正品目及び一般試験法, 2) 生物薬品の局方収載における各条審議のポイントと基本方針, 3) 収載品目別の概説と審議経緯の要点などについて解説した。

Keywords: Japanese pharmacopoeia, biologicals

早川堯夫: 薄層クロマトグラフ法

日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001, JPTI編集委員会編, pp.185-187 (2001), じほう, 東京

日本薬局方一般試験法として収載されている「薄層クロマトグラフ法」に関する技術情報として, 1) 適用, 2)

確認試験で用いる際の留意事項, 3) 純度試験で用いる際の留意事項, 4) 光の影響, 5) 溶媒, 6) 試験法及び規格の設定根拠などについて解説した。

Keywords: Japanese pharmacopoeia, general method, thin layer chromatography

早川堯夫: バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験

日本薬局方技術情報 (JPTI) 2001, JPTI編集委員会編, pp.278-284 (2001) じほう, 東京

日本薬局方の参考情報として記載されている「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」に関する技術情報として以下の事項について解説した。1) 目的, 2) 試験法の収載に至る経過, 3) 適用対象, 4) 日局収載マイコプラズマ否定試験法の概要, 5) 培養法(寒天及び液体培地法), 6) 指標細胞を用いたDNA染色法, 7) ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法, 8) 生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)を生産するための細胞基材についてのマイコプラズマ否定試験法の国際調和。

Keywords: Japanese pharmacopoeia, biotechnology/biological products, mycoplasma testing

早川堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質および安全性確保の評価科学

PDA Journal of GMP and Validation in Japan, 3, 57-64 (2001)

バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質および安全性確保の評価科学に関連して, 1) バイオテクノロジーによる各種の医薬品生産, 2) 組換え医薬品および細胞培養医薬品の品質・安全性確保にかかわるICHガイドライン, 3) 組換え医薬品およ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, 4) 製品の品質の恒常性を図る方策の一環としての製造方法の妥当性の検証および恒常性の維持, 5) 細菌, 真菌, マイコプラズマの混入否定, 6) 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, 7) 目的物質の構造解析, 特性解析, 品質評価, 8) 有害因子や不純物混入の可能性に関する検討, 9) プロセス評価/検証, プロセス・コントロール, 工程内管理試験, 10) 規格及び試験方法(ロット毎の品質試験), 11) 組換え医薬品や細胞培養医薬品の安定性試験, 12) 今後の課題などについて詳述した。

Keywords: biotechnology products, quality control, safety issues

早川堯夫: バイオ医薬品の規格及び試験方法, 安定性試験

PHARMSTAGE, 1(3), 9-17 (2001)

バイオ医薬品の規格及び試験方法, 安定性試験に関連して, 1) バイオ医薬品における品質, 有効性, 安全性の相互関係, 2) バイオ医薬品の品質管理の意義とそのあり方, 3) バイオ医薬品の製法及び物性面での特徴, 4) バイオ医薬品における構造・組成, 諸性質の解析の重要性, 5) 製造過程の評価/検証とその恒常性維持の重要性, 6) 規格及び試験方法の位置づけと一般的留意事項, 7) 規格及び試験方法に必要な項目と設定上の留意点, 8) タンパク質性バイオ医薬品の安定性試験などについて解説した。

Keywords: biotechnology products, specification, stability testing

Mizuguchi, H., Kay, M. A.*, Hayakawa, T.: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors
Adv. Drug. Deli. Rev., 52, 165-176 (2001)

Various methods have been developed to facilitate the generation of recombinant adenovirus vectors, and three commercially available methods have been most widely used: homologous recombination method in E1-complement cell lines, homologous recombination method in bacteria, and an in vitro ligation method based on simple routine plasmid construction. These methods can insert foreign genes not only into the E1 deletion region, but also into the E3 deletion region, thereby permitting the construction of a binary transgene expression system in which heterologous genes can be inserted into both the E1 and E3 regions. By modifying the latter two methods; fiber-mutant adenovirus vectors can be also constructed in order to modify vector tropism. In this paper, we review recent advances in the construction of first generation adenovirus vectors and fiber-modified adenovirus vectors.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy

* Stanford University

水口裕之: 遺伝子治療とDDS

Drug Delivery System, 17, 60-61 (2002)

遺伝子治療特にベクター開発研究とDDS (Drug Delivery System) 研究の関連性等について概説した。

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, drug delivery system

水口裕之, 早川堯夫: プラスミド構築に基づいた組換えアデノウイルスベクター作製技術

BIO INDUSTRY, 18, 5-14 (2001)

アデノウイルスベクターは既存の遺伝子導入ベクターの中では最も遺伝子導入効率に優れていることから、遺伝子治療用ベクターとしてだけでなく、ポストゲノムの各遺伝子の機能解析を目的とする研究の遂行にとって必要不可欠な道具となりつつある。本稿では、アデノウイルスベクターを簡便かつ迅速、高効率に作製できる技術、ならびに従来のアデノウイルスベクターに標的細胞親和性の制御能を付与したファイバーミュータントアデノウイルスベクターについて解説した。

Keywords: adenovirus vector, gene therapy

早川堯夫, 山口照英, 押澤正: **日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 —ウイルス安全性確保の基本要件—**

医薬品研究, **33**, 210-230 (2002)

生物薬品のウイルス安全性を確保するための基本方策, 原材料・医薬品製造基材における留意事項, 製造及びウイルス試験に係わる留意事項, ウイルスクリアランス試験などについて詳細に解説した。本稿の目的は, 日局の参考情報の作成に資することにある。

Keywords: biologicals, virus safety, viral clearance study

早川堯夫, 石井 (渡部) 明子: **生物薬品の開発の現状とトランスレーショナルリサーチへの条件**

医学のあゆみ, **200**, 539-543 (2001)

トランスレーショナルリサーチ (探索的臨床研究) は, 基礎研究の成果を効率的にかつ合理的に医療上の応用に結びつけていくための重要な段階かつ方策の一つであり, その究極の目的は有用な医薬品の開発である。本稿では, 生物薬品 (ペプチド・タンパク質性医薬品, 遺伝子治療薬, 核酸医薬品, 細胞治療薬等) の開発の背景と現状, トランスレーショナルリサーチへの科学的必要条件, 規制環境, 将来展望などについて論述した。

Keywords: biotechnology products, translational research

早川堯夫, 山口照英, 押澤正, 石井 (渡部) 明子: **核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディー**

医薬品研究, **33**, 275-284 (2002)

PCRをはじめとする核酸増幅法 (NAT法) は, 目的遺伝子の一部を試験管内で増幅することにより高感度に検出する手法として開発され, バイオテクノロジー技術の大きな柱となっている。また, 生物薬品の品質確保のための各種試験としても, ウイルスなどの感染性微生物の高感度検出などにNAT法が広く利用されている。本稿では, NAT法やその周辺手法の調査研究を行い, NAT法を生物薬品に適用する際の基本的事項について

論述した。

Keywords: NAT, virus safety, biologicals

合田 幸広: **ハーブ類は, 特定保健用食品になりうるか**

食品衛生研究 **52-2, 5** (2002)

食薬区分の見直しにともない, 保健機能食品制度があらたに制定された。同制度の中で, ハーブ類は, 比較的作用の穏和なものから強いものまで, また, 副作用の強いものまで広範囲に存在するため, 当面, 個別評価型の特定保健用食品で対応することが示された。この点に関し, ハーブ類を今後, 特定保健用食品として認可する場合, どのような取り込み方があるかどうか提言を行った。

Keywords: herb, food for specified health uses, natural medicine

土屋利江, 中岡竜介, 朴 正雄, 市川 明*: **細胞によるバイオマテリアルの評価法**

月刊バイオインダストリー, **18**, 81-93 (2001)

バイオマテリアルと接着した細胞の長期間安全性評価をする上で, コネキシン機能の果たす役割を明らかにし, その有用性が明らかになれば, 長期間の安全性評価を迅速に判断できる。その結果, 新医療用具に使用する材料の開発, 選別の段階で役立つばかりでなく, 試験法が簡便なため, 低コストで評価可能である。開発費のコストダウンと, 安全性と有効性の高い医療用具の市場化を促進することを目的として本研究に着手した。

Keywords: connexin, biomaterials, gap-junction

*京都工芸繊維大学

龍島由二, 松島 肇*: **TSE疾患と感染性廃棄物医療廃棄物研究, 14(2), 65-75 (2002)**

新課題医療廃棄物の一つであるTSE廃棄物の適正処理に資することを目的として, WHOガイダンス, 並びに関連文献・資料の調査を行い, TSE病原体の体内分布と感染リスク, TSE病原体の不活化法およびTSE廃棄物の取扱いなど, 医療廃棄物処理に関連する最新の知見を取りまとめた。

Keywords: TSE agent, guidance, inactivation

*浜松医科大学

矢上 健: **アレルゲンに関する研究の推進を治療学, 35, 479 (2001)**

国民病と言われ始めたアレルギー性疾患を克服するためには, 人間側の研究のみならず, 原因となるアレルゲン物質に関する研究を推進する必要があると提言した。

Keywords: allergy, allergen, cross-reactivity

Yagami, T.: Defense-related proteins as families of cross-reactive plant allergens

Recent Res. Devel. Allergy & Clin. Immunol., 1, 41-64 (2000)

Higher plants produce a series of defense-related proteins to protect themselves against various stresses. Because of their stress-alleviating activities, the defense-related proteins are attracting much attention among plant breeders. However, recent studies revealed that some defense-related proteins constitute families of cross-reactive plant allergens. Their conserved structures must be responsible for the potential of cross-reactivity. In this article, the biological characteristics of the defense-related proteins, including the so-called pathogenesis-related proteins, are concisely described. Their pertinence to plant-derived food allergies is then explained in reference to the latex-fruit syndrome and the pollen-food allergy syndrome (the oral allergy syndrome: OAS). A new pairing concept of complete food allergens and incomplete food allergens (non-sensitizing elicitors) becomes important with relation to the safety of novel plants that were artificially modified to constantly express defense-related proteins. The possible contribution of such protective proteins to the growing number of immediate-type plant allergies is also discussed.

Keywords: defense-related protein, allergen, cross-reactivity

新谷英晴：滅菌バリデーションならびに再現ある滅菌保証達成のために(3)－汚染菌／環境浮遊菌生育培地の選択ならびに培地性能の改良－3. 生物指標菌生育培地の性能の改良－*B. subtilis*ならびに*B. stearothermophilus*を中心として－

防菌防黴, 29, 345-351 (2001)

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。違いの現象については既に報告があるが、培地組成のどの成分が生物指標(BI)のD値の差に起因しているのか明らかにされていない。それが明らかにされなければ再現性のある滅菌保証は成功して達成されないことになる。著者はSCD液体培地(SCDB)ならびにSCD寒天固形培地(SCDA)の組成を個々に検討した。その結果D値の差を生じさせるのはSCD培地組成中のカルシウム(Ca)イオン量であることを同定した。SCDAでのD値はSCDBより顕著に高く、それはSCD培地中のCa量の差によることを確定した。

Keywords: sterility assurance, biological indicator, culture medium

新谷英晴, 数馬昂始*：日本に於ける滅菌保証達成に於ける問題点と解決法－第6報－

防菌防黴, 29, 637-650 (2001)

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)

Shintani, H.: Confirmation of the sterility of medical devices and changes in the characteristics of polymers upon sterilization

Biocontrol Sci., 6, 63-68 (2001)

医療用高分子として良く使用される種々の高分子素材に対して放射線滅菌, 化学剤滅菌, 高圧蒸気滅菌後の分解産物の定性, 定量ならびに安全性を比較して総説した。

Keywords: gamma-ray sterilization, autoclave sterilization, chemical sterilization

新谷英晴：医療用ポリウレタンに対する各種滅菌法の安全性評価

防菌防黴, 29, 707-713 (2001)

医療用高分子として良く使用されるポリウレタンに対して放射線滅菌, 化学剤滅菌, 高圧蒸気滅菌後の分解産物の定性, 定量ならびに安全性の観点から比較して解説した。

Keywords: gamma-ray sterilization, autoclave sterilization, chemical sterilization

新谷英晴：医療機関と損傷菌, 貧栄養菌, 静止菌, 院内感染菌

防菌防黴, 30, 95-103 (2002)

医療機関でのこれらの菌が医療機関の環境ならびに人的な面に与える影響について解説した。

Keywords: health care facility, injured microorganisms, nosocomial infection

黒須志のぶ*, 新谷英晴：滅菌バリデーションならびに再現ある滅菌保証達成のために(9)－汚染菌／環境浮遊菌生育培地の選択ならびに培地性能の改良－3-11) プラントでのバイオバーデン菌検出の経験から

防菌防黴, 30, 41-52 (2002)

製薬プラントでのバイオバーデン菌検出の実例について事例報告を行った。

Keyword: validation, plant, bioburden

*ミノファーゲン製薬(株)

新谷英晴：バリデーション，パラメトリックリリース
ならびにドシメトリックリリース

防菌防黴, 30, 153-164 (2002)

バリデーション，ルーチンコントロール，パラメトリックリリース，ならびにドシメトリックリリースについて具体例を示しながら総説した。

Keyword: validation, parametric release, dosimetric release

Shintani, H.: Effects of ionizing radiation sterilization treatment on medical use plastic materials

Biocontrol Sci., 7, 1-8 (2002)

Irradiation of medical-use polymers causes chemical and physical changes in plastic polymer materials. The effects of ionizing radiation on these materials have been studied; the respective literature is reviewed to provide the basis for a safety evaluation of plastics exposed with irradiation sterilization. Permeability of plastic films is generally not affected; deterioration of mechanical properties, that may occur with certain polymers, can usually be controlled with adequate stabilizers; and changes in infrared and UV/VIS spectra are observed in irradiation doses. Gaseous radiolysis products include hydrogen, methane, CO₂, CO, hydrocarbons, and for chlorine-containing polymers, hydrogen chloride. A range of volatile products, mainly hydrocarbons, alcohol, aldehyde, ketone, and carboxylic acids, has been characterized for low density polyethylene and polypropylene, other important materials, e.g., polystyrene and poly (vinyl chloride), are less well-investigated. Radiation-induced changes are shown to depend on the chemical structure of the polymer, on the composition (additives) and processing history of the plastic, and on the irradiation conditions.

Keyword: radiation sterilization, medical polymer, degradation

西村哲治, 内海英雄*：未知有害化学物質にどう対応するか—バイオアッセイによる有害負荷量の把握に向けて—

水環境学会誌, 24, 16-20 (2001)

水環境中に存在する未知の有害化学物質を把握し評価するための手法として，バイオアッセイの有効性と限界について述べた。環境有害負荷量の把握には，機器による分析と，有害応答を指標としたバイオアッセイの併用

の重要性を示した。バイオアッセイレイシステムの構築と環境化学物質の管理体系を提案し，将来に向けた展望を示した。

Keywords: bioassay, water, pollutants

*九州大学

松田りえ子：FUMI理論による機器分析の測定精度の予測

日本農薬学会誌, 26, 424-427(2001)

最近，分析値について，その信頼性を保証するために精度を明らかにすることが求められている。精度を求めるためには，同一の試料についてくり返し分析を行い，得られた結果の標準偏差 (SD) または相対標準偏差 (RSD) を計算するのが，一般的方法である。しかしながら，くり返し測定によって信頼性のある標準偏差を求めるためには，3回あるいは6回の測定では不十分である。くり返し測定では，回数が増えるに従って信頼性は向上する一方，コスト・時間が増大する。従って，くり返し測定に変わる迅速かつ簡便な，精度推定方法が必要である。FUMI理論は，機器測定に由来する分析値のばらつき，あるいは精度を予測するために開発された理論である。FUMI理論は多くの分析機器による測定に応用可能であるが，クロマトグラフィに関する研究が最も進んでいるので，これを例にして簡単に解説した。

Keywords: FUMI theory, precision

松田りえ子：食品中のダイオキシン類分析手法の精度管理

月刊フードケミカル 7, 84-87(2001)

食品中のダイオキシン類分析における，信頼性の確保にあたり，留意すべき点を「食品中のダイオキシン類およびコプラナーPCBの測定方法暫定ガイドライン」の内容を中心として解説する。

Keywords: quality assurance, dioxins

残留動物用医薬品試験法検討委員会 (豊田正武, 村山三徳)：畜水産食品に残留する動物用医薬品の試験法 (その8) —イベルメクチン, エプリノメクチンおよびモキシデクチン, セフチオフル, チルミコシン, レバミゾールの試験法—

食品衛生研究, 52(1), 43-57 (2002)

平成13年度食品衛生法の改正に伴い，新たに規格基準の設定された食品中の残留動物用医薬品，イベルメクチン, エプリノメクチンおよびモキシデクチン, セフチオフル, チルミコシン, レバミゾールの試験法について，試験法設定の経緯，試験実施にあたっての注意点などについて解説した。

Keywords: eprinomectin, ceftiofur, tilmicosin

穂山浩, 豊田正武: 遺伝子組換えばれいしょの検査法の概要

食品衛生研究, **52(3)**, 13-20(2002)

平成13年3月に厚生労働省医薬局食品保健部が通知した組換えDNA技術応用食品の検査法の遺伝子組換えばれいしょの検査法に関して解説した。

Keyword: genetically modified potato, recombinant DNA, NewLeaf Plus potato

Makoto Miyahara: Current Identification Methods for Irradiated Foods A Report of 12th IMRP at Avignon

Food irradiation, 2001, **36**, 42-48

The XII th International Meeting on Radiation Processing was held at Avignon March 25 to 30th, 2001. Many methods for identification of irradiated foods were presented in the meeting. The 5 standard methods issued by the British Standard Institutes (BSI) were effective since 1997. Most papers were related to the 5 standards. The papers reported 8 extended applications to foods that are not validated by BSI manuals. Comet assay is a new candidate for the standard. Six applications of comet assay and related assay for 17 foods are presented. Viscosity method for grains and nuts, impedance method for potato, and infrared method for milk products were also reported in the conference.

Keywords: International Meeting on Radiation Processing, irradiated food, detection

宮原 誠: 世界における放射線殺菌技術の展開と現状 防菌防黴, **30**, 233-248 (2002)

照射食品の国際的な現状を2001年時点まとめたものである。アメリカにおける照射食品の許可状況, 生産工場の実情, ヨーロッパでの許可状況と消費者の受け入れ状況とコーデックスを舞台に繰り広げられている検知法の評価, EU内での食品加工業者の照射食品に対する考えなどを解説した。さらに照射食品の検知法について詳しく総説し重要な検知法が整備されてきていること, 今後さらに検討が必要な検知法についても解説した。

Keywords: CODEX, food irradiation, detection methods

米谷民雄: 食品添加物の規格基準—食品添加物の化学的安全性確保—

食品衛生研究 **51(6)** 34-38 (2001)

筆者の厚生科学研究における3部門の研究, すなわち, 天然添加物の規格基準設定のための研究, 食品中の食品添加物分析法に関する研究, 摂取量推定法の研究につき, その概要を紹介した。

Keywords: food additives, standards and specifications, natural additives

米谷民雄, 秋山卓美, 佐藤恭子: 酵素反応により機能を付与された天然添加物

食衛誌, **42**, 343-353 (2001)

酵素反応を用いて新たな有用な機能(特長)を付与された天然添加物品目について, 酵素の使われ方, 生成物の化学構造, 品目の特徴などを, 著者らの研究成果を含めた89報の論文を引用してまとめた。

Keywords: natural food additives, enzymatic reaction

山崎 壮: プリオン病を知るための情報ガイド

食衛誌, **43**, J185-J190 (2002)

プリオン病, 特にウシ海綿状脳症(BSE)に関する正しい知識や情報をもって現在の事態を理解してもらうことを目的に, プリオン病に関する基本事項の解説と国内外の有用な情報源の紹介をした。

Keywords: prion disease, BSE, review

棚元憲一: 生物試験法の主な改正点

薬局, **52**, 29-34 (2001)

第十四改正日本薬局方に於いて, 国際調和を受けて「エンドトキシン試験法」が大きく改正された。国際調和の試験法で最初の完全調和であることから, その改正内容について従来法との比較をしつつ, 解説を行った。さらに生物試験法関連の一般試験法で改正が行われた「無菌試験法」, 「プラスチック製医薬品容器試験法」の改正点についても言及した。

Keywords: Japanese Pharmacopoeia, Bacterial endotoxin test, Microbiological tests

棚元憲一: エンドトキシンの生物活性を支配する要因

エンドトキシン研究, **4**, 89-95 (2001)

エンドトキシンの活性は, 由来する菌種によるLPS分子の活性中心リピドAの化学構造の多様性, エンドトキシン分子自体がヘテロであり, アゴニスト, アンタゴニスト構造体が混在していること, 感染下に於いては菌体として作用するためLPS以外の菌体成分との相互作用が起こること, サルモネラリピドAに代表されるような種特異性の問題, さらに血清(LBP分子)の存在等によって大きく左右されることを示し, エンドトキシンの活性発現は様々な要因によって支配されていることを示した。さらにそれらの発現の多様性について分子レベルでの解析を行った。

Keywords: Endotoxin, LPS, Structure/activity relationship

棚元憲一: 第十四局日本薬局方について—一般試験法

(生物試験法) について

医薬品研究, 32, 725-733 (2001)

第十四局に新規に導入された生物試験法関連の一般試験法について、解説を行った。特に一般試験法の「抗生物質の微生物学的力価試験法」、「生薬の微生物限度試験法」について、日局への導入の背景、試験法の特徴について説明した。一方「エンドトキシン試験法」、「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」は国際調和による改正であるが、前者は既に調和された最初の試験法としてその調和点を、後者については調和過程のものとして、現在の調和の問題点を述べた。

Keywords: Japanese Pharmacopoeia, International harmonization, Microbiological tests

小沼博隆：病院給食と食中毒

感染と消毒, 8, 47-48 (2001)

病院等の給食施設、設備、工程ならびに搬入原材料の微生物汚染実態を解説するとともに、調理施設由来の院内感染の可能性についても解説した。

Keywords: Vegetable, HACCP, MRSA

Sakai, A., Iwase, Y.*^{1,2}, Nakamura, Y.*³, Sasaki, K.*⁴, Tanaka, N.*⁴ and Umeda, M.*⁴: Use of a cell transformation assay with established cell lines, and a metabolic cooperation assay with V79 cells for the detection of tumor promoters: a review

ATLA, 30, 33-59 (2002)

Extensive studies on the safety evaluation of chemicals have indicated that a considerable number of non-genotoxic chemicals are carcinogenic. Tumor promoters are likely to be among these non-genotoxic carcinogens, and their detection is considered to be an important approach to the prevention of cancer. In this review, the results are summarized for *in vitro* transformation assays involving established cell lines, and for an assay for inhibition of gap junctional intercellular communication for the detection of tumor promoters, which involves V79 cells. These *in vitro* assays for tumor promoters are recommended as useful tools for the detection of non-genotoxic carcinogens.

Key words: tumor promoters, transformation assays, metabolic cooperation assay

*¹ 三菱東京製薬(株),*² 千葉大学*³ 静岡県立大学*⁴ 財食品薬品安全センター

工藤由起子：凍結食品における腸管出血性大腸菌

O157の損傷とその検出

防菌防黴 30, 111-115 (2002)

冷凍食品や冷凍保存検査から病原微生物を検出しなければならない機会は最近増加しているが、以前から凍結による菌の死滅や損傷による検出上の問題が指摘されている。しかし、死滅や損傷を起こす菌の比率および損傷菌を含む検体からの菌の検出方法に関し、実際の食品を用いた検討は少なく凍結損傷菌に関する研究が一層必要とされている。本稿では腸管出血性大腸菌 O157 の食品中での凍結損傷と損傷菌の検出方法について行った研究を紹介した。

Keywords: *Escherichia coli* O157, freeze, injury

高鳥浩介, 相原真紀, 村松芳多子*：食品の真菌試験と培地評価

NISSUI TECHNOMEDIA, 4: 15-21 (2001)

食品の真菌試験で規格基準として規定されている方法はない。しかし食品にみる真菌は、細菌同様に重視されるものであり、再現性、簡易性を考慮してさまざまな方法が試みられてきている。培養法として重視されることは、定量にあり、そのための培養条件の一つとして培地選択がある。その培地をどのように応用するかで試験成績に大きく影響をおよぼすとされ、その培地を試験に取り入れる時の考え方とその評価をまとめた。

Keywords: fungi, media, foods

*千葉県立栄養短期大学

高鳥浩介：真菌アレルギー 住環境にみる真菌とその生態

真菌誌, 42: 113-117 (2001)

真菌がアレルゲンとして重視されるようになってきたものの、そのアレルゲンの本体は依然と解明されていないのが現状である。そこで、真菌の生活環境での分布を含め、真菌の生態を知ることを目的として、生物学観点からまとめた。まず、生活環境での生息性と真菌の活性または不活性の関係を解析した。さらに、真菌の持つ生物学的特性を1) 発芽能、2) 菌体外酵素プロテアーゼ、3) 真菌の活性不活性をアレルゲンとしての観点で考察し、真菌アレルゲンの健康被害を防御するための方策についてまとめた。

Keywords: fungal allergen, biological activities, dwelling environments

高鳥浩介, 相原真紀, 太田利子*：環境微生物概論・測定と評価 環境の真菌

空気清浄, 39(3): 178-181 (2001)

生活環境として、住宅、事務所、学校、病院などがありそうした環境にみる微生物をどの程度理解しているか

はっきりしていない。また環境微生物の健康におよぼす影響やその指針および指標がほとんど示されていない。近年生活環境にみる微生物の存在は無視できない状況にあり、速やかな健康被害のための基準づくりを進めていく必要がある。そこで、生活環境にみる真菌の測定器準づくりに取りかかるための基礎データをまとめた。

Keywords: fungi, environment, ecology

*相模女子大学

澤田純一, 小澤正吾: 国立医薬品食品衛生研究所におけるミレニアム・プロジェクト—薬剤反応性遺伝子解析プロジェクト

ファルマシア, 38, 150-152 (2002)

厚生労働省のミレニアム・ゲノム・プロジェクトである「遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業」は、「疾患遺伝子プロジェクト」と呼ばれるが、全体の目標は痴呆等神経疾患, がん, 糖尿病・高脂血症等代謝性疾患, 高血圧等循環器疾患, 気管支喘息等免疫・アレルギー性疾患の遺伝子の解明に基づくオーダーメイド医療を実現し, 画期的な新薬の開発に着手することである。このミレニアム・プロジェクトの一環として国立医薬品食品衛生研究所が分担しているプロジェクトは、「薬剤反応性遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業」である。当所プロジェクトにおいては, 国立高度専門医療センター等と共同して, 投薬患者試料を対象に薬剤反応性遺伝子の多型解析並びに薬物動態解析を行い, 薬物応答の変化と相関する遺伝子多型を明らかにする。本稿では, 当所プロジェクトの概要を紹介した。

Keywords: Pharmacogenetics, Single nucleotide polymorphisms, Tailor-made drug therapy

小澤正吾, 澤田純一: オーダーメイド投薬と薬物代謝酵素の一塩基多型 (SNPs)

医薬品研究, 33, 1-7 (2002)

N-acetyl transferase, dihydropyrimidine dehydrogenase, cytochrome P-450等の薬物代謝酵素を例に, 遺伝子多型, 特に一塩基多型を中心に解説し, これらの遺伝子多型を利用するオーダーメイド投薬の可能性に関して概説した。

Keywords: Cytochrome P-450 enzymes, Single nucleotide polymorphisms, Tailor-made drug therapy

佐藤陽治: ホスホランバンは新規心不全治療ターゲットになるのか?

ファルマシア, 37, 1052-1053 (2001)

心不全においては心室の各单位心筋の収縮性が低下し, 全体の心機能も低下している。病態心筋では β アドレナリン受容体の脱感作と筋小胞体の Ca^{2+} 制御異常が高

頻度で観察され, これらが筋収縮異常および心不全の進行に密接に関わっていると考えられている。心筋小胞体 Ca^{2+} 制御異常に関連して, 細胞内 Ca^{2+} 制御を直接改善するような新しい治療法の開発が心不全治療の上でどのようなポテンシャルを持っているかについては今まで不明のままであった。筋小胞体 Ca^{2+} -ATPaseによる細胞質 Ca^{2+} の取り込みを阻害する心筋特異的タンパク質ホスホランバン (PLB) の機能を制限する戦略が病態の進行に有益かどうかを検討する目的で最近, PLB欠損マウスと心筋病態モデルマウスとの交配実験が行われており, 拡張型心筋症および肥大型心筋症モデルにおいてPLB欠損が心筋病態の発症を長期的に予防することが明らかとなった。これらの知見はPLB機能の阻害あるいは心筋小胞体 Ca^{2+} 取り込み機能改善によって病態心筋の機能的障害およびリモデリング過程を予防もしくは克服しうることを示唆している。PLB機能の阻害法としては阻害薬開発による薬理的手法およびアンチセンスやドミナントネガティブ体の導入による遺伝子治療的な手法が考えられる。これらの手法を駆使して各種心筋病態の発症後にPLB機能を阻害し, 予後の改善を確認することが今後最も重要な課題となるであろう。

Keywords: 筋小胞体, ホスホランバン, 心不全

関澤 純: 「環境ホルモン物質」についてあらためて考えてみよう

施設と園芸 114, 64-67 (2001)

国民の間で広く関心を呼んだ内分泌かく乱化学物質について, 最近の知見をもとに問題点を整理し検討した。すなわち, (1)影響と分析結果を定量的かつ試験条件の限界を明確にして検討する, (2)化学と生物の知見を総合し背景メカニズムを基に検討する, (3)人におけるリスクの可能性を探る, (4)生物学の基本と毒性学の接点において新たに提起された問題は何か, (5)予測の科学と方法としてのリスク評価における不確実性の検討の重要性, (6)リスクコミュニケーションのあり方の6点に整理して論じた。

関澤 純: 化学物質による健康のリスク評価

ケミカルエンジニアリング, 47(2), (2002)

健康影響評価の考え方について, 影響評価の枠組み, 有害性の判定とその中における人における知見・動物試験・in vitro試験の意義, 用量-反応評価における問題点としては種差と個体差の検討・閾値の有無による評価手法の選択, リスクの総合判定における問題点と不確実性評価について述べ, 今後の課題として, (1)内分泌かく乱化学物質に関連して生物学の基本と毒性学の接点において新たに提起された問題, (2)子供・高齢者・妊婦・障害者への配慮, (3)ゲノム科学が提供する新しい局面を論

じた。

Nakata, K.: Endocrine disruptors and environmental impact in Japan

Cadernos de Saude Publica/ Reports in Public Health **18**, 531-548, 2002

内分泌かく乱物質 (EDs) について国内で行われているプロジェクトの概略について記述した。EDsに関するデータベースやWWWサイトについて紹介し、国立衛研で開発した内分泌かく乱物質構造データベース、内分泌かく乱物質結合親和性データベース、受容体データベースについて例示して説明した。またWHO, ILO, UNEPなどの国際機関と国立衛研との共同プロジェクトである化学物質についての地球規模情報ネットワーク (GINC) について記した。EPAのEDsに関する報告 (EDSTAC) やOECDのEDs情報のWWW化による効果とともに、国際会議における情報交換などでEDs問題解決の方向づけを期待する。

頭金正博: LXRとFXRによる脂質代謝制御

Molecular Medicine, **39**, 294-300 (2002)

オキシステロールレセプターのLXRと胆汁酸レセプターのFXRはコレステロール異化代謝反応である胆汁酸合成における律速酵素のCYP7A1を正と負にそれぞれ制御している。これらの核内受容体の生理的な代謝制御機構の解明や特異的なリガンドの開発はコレステロールや胆汁酸代謝が関与した疾患の新たな治療薬の開発につながることを解説した。

井上 達: 提言「食品化学物質の新しい安全性指標 "トキシコゲノミクス"」

食品衛生研究, **51**, 5(2001).

食品衛生面での食品化学物質の安全性に関わる予測のための新たな安全指標として、トキシコゲノミクスが導入される可能性についての展望を述べた。

Keywords: toxicogenomics

五十嵐 勝秀, 井上 達: 「トキシコゲノミクス国際フォーラム2001」の開催とその将来展望

MEDICHEM NEWS, **12**, 18-20(2002)

筆者らが事務局を担当し、林裕造実験動物中央研究所 学術顧問を会長とする組織委員会が世話人会成为り、当研究所、日本トキシコロジー学会、環境省、経済産業省の後援団体によって開催された「トキシコゲノミクス国際フォーラム2001」の開催および、フォーラムの概要について紹介した。その際、本フォーラムに設けた4つのセッション、1. "Reverse Toxicology"とは何か?、2. テクニカルセミナー、3. 実験的応用と実践、4. リスク

アセスメントへの展望、について各講演のポイントを概説した。

Keywords: Toxicogenomics international forum 2001, Reverse Toxicology

井上 達, 五十嵐勝秀, 関澤 純: 内分泌攪乱物質最前線 ヒト健康影響はどこまで明らかになったか 「内分泌攪乱物質の作用機序から見たヒトへの健康障害」

日本医師会雑誌, **127**, 197-201(2002)

内分泌攪乱物質の作用機序からみたヒトへの健康障害の可能性について、現状における情報に基づいて認識を整理した。

Keywords: hormone-like effect, receptor-mediated toxicity, biological effect

Applied Genomics; A Tool in Toxicology

EDV/JM/RD **9**, 18-30(2002)

2002年2月にパリで開催された、障害、リスクアセスメントにおけるゲノミクスの適用に関するジョイントミーティングに於いて筆者が講演した際の内容である。トキシコロジーの定義を筆者の言葉で再確認した後、新たなテクノロジーであるトキシコゲノミクスの定義付けを行った。筆者らが詳細に解析を進めているベンゼン毒性を例に取り、網羅的遺伝子発現解析の実データを示し、そこにp53ノックアウトマウスを併用することで、ベンゼン毒性メカニズムを遺伝子発現という視点から解析することが可能であることを示した。その例を一般化し、網羅的遺伝子発現解析と遺伝子改変動物を併用することにより、毒性を遺伝子発現変動パターンから予知する「リバーストキシコロジー」が現実のものとなることを指摘し、そのリスクアセスメントへの展望を示した。

Keyword: Toxicogenomics, Benzen toxicity, reverse toxicology

菅野 純: 内分泌攪乱物質とトキシコゲノミクス

医学のあゆみ, **201**, 143-146(2002)

ヒトやマウスなどの全ゲノム解読が進み、それら遺伝子の発現状況が一挙に把握できるマイクロアレーなどの技術が我々の手中にある時代に突入した。そして「全遺伝子発現プロファイリング」が、体内の分子レベルの出来事を解明する一手段となる可能性がある。このプロファイリングの特徴は、形質発現を必ずしも必要としないことにある。従来は、ある所見を引き起こした原因と考えられる遺伝子発現を追いかける方法を採用してきたが、ここでは、全遺伝子をモニターするため、明瞭な形質発現がみられなくても、プロファイリングができるという特徴がある。形質発現に依存しないアプローチをリバー

ストキシコロジー, これに対して従来の形質発現に開始点をおく方法をフォワードトキシコロジーということが出来る。将来的な予測毒性学はこの両者によって形成されるバランスのよいインフォーマティクスにその基礎を置くことになろう。この手法は, 内分泌かく乱化学物質問題の生体側の標的の一つである恒常性維持機構の解析に威力を発揮すると考えられる。その理由は, フィードバック機構によって形質発現が抑制されていても, 体内で起こっている分子レベルの現象が正確に把握できると考えられるからである。

Keywords : toxicogenomics, reverse toxicology, foreword toxicology

大野泰雄: 薬物相互作用ガイダンス (案) について, イントロダクション (ガイダンス最終案の紹介と国際比較)

薬物動態, 16, 199-205 (2001)

薬物相互作用に関するガイダンスの最終案について紹介するとともに, EUと米国におけるガイドラインとの比較を行った。大きな相違は我が国では生理学的薬物動態学の進歩を踏まえ, *in vitro* の試験から *in vivo* を予測することについて詳細に述べたこと, また, 動物実験データが有用となる状況について述べたこと, および消化管吸収や組織分布におけるトランスポーターの重要性について触れたことにある。

Keywords : ガイドライン, 薬物相互作用, 国際比較

大野泰雄: 「医薬品の臨床薬物動態試験について」の厚生労働省通知

ファルマシア, 37, 1056-1057 (2001)

平成13年6月1日付けで通知された表題の通知で示された医薬品の臨床薬物動態試験における基本的な考えかたを要約し, 紹介した。特に, 経口投与薬剤の正確な吸収率を測定するために必要な静脈内投与試験, ヒトでのマスバランス試験, 最終製剤での臨床薬物動態試験が新たに必要となることを示した。また, 多数の患者を対象とすることにより1人1人の患者からは少量の血液採取のみで良い *population pharmacokinetics* 試験が紹介された。なお, 本通知が参考資料として通知されたものであり, 薬物の特性に応じて柔軟に利用されるべきことを強調した。

Keywords : 臨床薬物動態試験, ガイドライン

大野泰雄: 「薬物相互作用の検討方法について」の厚生労働省通知

ファルマシア, 37, 1135-1136 (2001)

平成13年6月4日付けで通知された表題の通知で示された医薬品の薬物相互作用の検討方法についての基本的

な考えかたを要約し, 紹介した。特に, ヒト肝組織を用いた *in vitro* の代謝阻害試験やヒト培養肝細胞を用いた酵素誘導試験などを行い, 無駄な臨床試験を実施しないことが要望されている。一方, *in vitro* 試験で相互作用の可能性を否定できなかった薬物については臨床で相互作用の可能性を検討することが重要であり, その有無を判断する基準が示された。

大野泰雄: 厚生労働省通知「医薬品の薬物相互作用の検討方法について」の概要

Pharm Stage, 1, 1-6 (2001)

医薬品の薬物相互作用の検討方法についての厚生労働省の通知に示された基本的な考えかたについて詳細に紹介した。また, それらの背景について解説を加えた。

Keywords: ガイドライン, 薬物相互作用

大野泰雄: 医薬品の臨床薬物動態試験および薬物相互作用の検討方法についての厚生労働省通知の解説

臨床評価, 29, 153-165 (2001)

薬物動態に関する我が国のガイドラインとしては平成3年に示された「薬物動態試験ガイドライン」が最初であったが, その後の分子生物学の進歩や「反復投与組織分布試験を行うべき状況」および「毒性試験における全身曝露の評価」, いわゆるトキシコキネティクスについてのICHでの合意を踏まえて, 平成10年に非臨床薬物動態試験ガイドラインが通知された。その後, 平成13年6月に「医薬品の臨床薬物動態試験について」および「薬物相互作用の検討方法について」の両ガイドラインが通知されたことから, これらを総合的に紹介するとともに, 医薬品開発における薬物動態試験の重要性について述べた。

Keywords: 薬物動態試験, ガイドライン, 薬物相互作用

中澤憲一: ATP受容体の構造と機能

生体の科学, 52, 152-157 (2001)

ATPの受容体はP2XとP2Yに大別されるがこの2種類の受容体は全く構造が異なる。P2X受容体は独特な構造を有するイオン・チャネル形成型受容体であり, その構造については主としてアミノ酸置換等による人為的変異導入による構造-機能相関の研究が進められているが, 三次元構造について決定的な情報はない。一方, P2Y受容体はGタンパク質結合受容体であり, 類縁受容体を基にかなり確かと思われる3次元構造が推定されている。しかし, 類縁受容体の構造-機能の研究結果が進んでいることもあって, P2Y受容体そのものに人為的変異を導入した研究はATP結合領域を除くとほとんど行われていない。

Keywords: P2X receptor, P2Y receptor, structure-function

relationship

小澤正吾：ヒト組織アリルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) の遺伝多型と薬物療法
医薬ジャーナル, 37, 2925-2930 (2001)

ヒト組織に存在するアリルアミンN-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) をコードする2種の遺伝子 (NAT1, NAT2) それぞれに遺伝子多型が存在する。異型対立遺伝子がコードする酵素は、酵素活性が大きく低下する場合が多く、薬物療法上問題が起こりうるので注意が必要である。

Keywords: arylamine N-acetyltransferase, genetic polymorphism, drug therapy

小澤正吾：薬物代謝酵素の遺伝子多型と疾病感受性・薬物反応性の個体差

Molecular Medicine, 38, 1146-1150 (2001).

薬物代謝能の個体差は結果的に薬効や副作用と関連する。チトクロムP450 (CYP) 2D6や2C19をはじめとして非常に多数のCYPについて異型対立遺伝子が見出された。これら遺伝子多型と疾病感受性・薬物反応性との関連を明確にすることが、現在最も重要な課題である。

Keywords: cytochrome P450, disease susceptibility, individual difference in drug efficacy

小澤正吾：創薬基盤技術の開発に関するシンポジウム
ミレニアムプロジェクト 薬剤反応性解析

大阪医薬品協会 会報, 634(11), 10-17 (2001)

国立医薬品食品衛生研究所で進められている厚生労働省ミレニアムプロジェクト・薬剤反応性プロジェクトの内容及び到達目標について解説した。

Keywords: Ministry of Health, Labour and Welfare, research project for pharmacogenetics, individual difference in drug efficacy

小澤正吾：遺伝子多型と抗癌剤の選択

臨床検査, 46, 63-67 (2002)

種々の癌種に用いられる抗癌剤の代謝動態に関わるタンパクをコードする遺伝子の多型と抗癌剤の反応性との関連について概説し、遺伝子多型に基づいて薬剤を選択する可能性について考察した。

Keywords: genetic polymorphism, drug metabolism and pharmacokinetics, anti-tumor drugs

小澤正吾：ゲノム薬理と薬物相互作用

臨床病理, 50, 146-150, 2002.

薬物相互作用は薬物の代謝の過程で起こることが多いと考えられてきた。近年、薬物のトランスポータのレベ

ルでの相互作用の例も明らかにされている。薬物相互作用のターゲットとなる酵素分子種をコードする遺伝子に多型が存在し、その結果酵素分子種が平均的なレベルに比べ量的、質的な差異を生じていると、薬物相互作用の程度の違いにつながると思われ、遺伝子多型を考慮する、あるいは別の言い方をすればゲノム薬理的な考え方を導入する必要が出てくる。

Keywords: drug interaction, drug metabolism and pharmacokinetics, genetic polymorphism

西川秋佳：動物実験データの解釈—イソチオシアナート類を例として—

日本がん予防研究会 News Letter 30 : 2-3, 2001.

Ohmori, H. ^{*1}, Friedberg, E.C. ^{*2}, Fuchs, R.P.P. ^{*3}, Goodman, M.F. ^{*4}, Hanaoka, F. ^{*5} ^{*6}, Hinkle, D. ^{*7}, Kunkel, T.A. ^{*8}, Lawrence, C.W. ^{*9}, Livneh, Z. ^{*10}, Nohmi, T., Prakash, L. ^{*11}, Prakash, S. ^{*11}, Todo, T. ^{*12}, Walker, G.C. ^{*13}, Wang, Z. ^{*14}, Woodgate, R. ^{*15}: The Y-family of DNA polymerases

Mol. Cell, 8, 7-8 (2001)

Based on phylogenetic relationships, DNA polymerases can be broadly classified into five families. The A-family is typified by *Escherichia coli* DNA polymerase I (pol I), the B-family by *E. coli* pol II, the C-family by the *E. coli* pol III alpha-catalytic subunit; the D-family by archeal polymerases; and the X-family by eukaryotic pol beta. Recently, a large number of new DNA polymerases have been identified, which although sharing significant amino acid sequence identity and similarity amongst themselves, exhibit little homology to any of the five previously identified polymerases families. This new family of polymerases has been described in the literature as the UmuC/DinB/Rev1/Rad30 superfamily. We formally propose that henceforth that these DNA polymerases be referred to as the "Y-family" of DNA polymerases.

Keywords: DNA polymerase, Y-family, phylogenetic tree

^{*1} Kyoto University

^{*2} University of Texas Southwestern Medical Center, U.S.A.

^{*3} CNRS, ESBS, France

^{*4} University of Southern California, U.S.A.

^{*5} Osaka University and CREST

^{*6} RIKEN

^{*7} Department of Biology, University of Rochester, U.S.A.

^{*8} NIEHS, U.S.A.

^{*9} School of Medicine and Dentistry, University of Rochester,

U.S.A.

*¹⁰ Weizmann Institute of Science, Israel

*¹¹ University of Texas Medical Branch, U.S.A.

*¹² Radiation Biology Center, Kyoto University

*¹³ MIT, U.S.A.

*¹⁴ University of Kentucky, U.S.A.

*¹⁵ National Institute of Child Health and Human Development, U.S.A.

水沢 博, 増井 徹, 田辺秀之: ヒト培養細胞: 科学と倫理のジレンマ

科学, 71, 1601-1608 (2001)

クロスカルチャーコンタミネーションとは, ある培養細胞が別の細胞といつの間に入れ替わってしまう現象で, ごく僅かに混入した増殖力の高い細胞が幾代かの継代を経て本来の細胞を駆逐してしまうために発生するものと考えられている。培養細胞は生命科学研究の要になる研究材料であるが, いつの間にか別の細胞に化けていたとしたらどうなるか。このあまりにもプリミティブな疑問について, これまで十分検討されずに来たが, 最近ようやく検討することが可能になってきた。1967年 Gartlerらは多数のヒト培養細胞についてHeLa細胞の混入の疑いがあると初めて指摘した。これ以後クロスカルチャーコンタミネーションに対して注意が払われるようにはなったが, ヒトに由来する多種類の培養細胞を確実に識別できる実験方法が確立されていなかったためにHeLa以外の細胞については十分な調査が行われなまま放置されてきた。ところが, 1985年にJeffreysらによって報告されたDNAフィンガープリント法は犯罪捜査に関連して法医学分野で強い関心が持たれ様々な改良が試みられ, その結果 Multiplex STR-PCR法が確立されるに至った。国立医薬品食品衛生研究所細胞バンク(JCRB)では, 初期のDNAフィンガープリント法の改良を行ってきたが, 最終的にSTR-PCR法の導入を決め, 細胞バンクに寄託された全てのヒト培養細胞についてクロスカルチャーコンタミネーションの有無を確認するシステムを確立した。その結果, 調査の済んだ約300種のヒト培養細胞のうち16種の細胞にクロスコンタミネーションが発生していることを明らかにした。しかしながら, これらのデータはヒトの個別識別を行うデータでありその識別能力の高さから, 今後数多くのヒト細胞が細胞バンクに寄託される時代になるとプライバシーの保護という観点から極めて重大な問題を引き起こす可能性があるのでは無いかということが懸念されるのである。本論文では, この方法が培養細胞のクロスコンタミネーションを防止するために極めて有力な実験方法であることを示すと同時に, プライバシーの問題について検討を加えた上で細胞バンクとしての利用限界を提案した。

Keywords: STR-PCR method, cross-culture contamination, privacy of human genetic identity

水沢 博: 厚生労働省研究資源バンク

ファルマシア, 38, グラビア (2002)

厚生労働省研究資源バンクは, 国立医薬品食品衛生研究所と国立感染症研究所において培養細胞ならびに遺伝子材料を収集して, ヒューマンサイエンス研究資源バンクを経由して分譲している。現在の分譲数は年間2000サンプルほどであるが, 徐々に上昇する気配がある。これらの研究材料は, 創薬研究に必須であることから, 研究資源バンクがどのようなものであるかについて興味を持たれている。そのため, ファルマシアに細胞バンクの現状を最新の情報をもとにビジュアルに伝えるために作成したのがこのグラビアである。ここではJCRB細胞バンク, JCRB遺伝子バンク, HS研究資源バンクの様子を紹介すると共に, 現在計画されている創薬基盤技術開発研究所建設予定地の様子もあわせて紹介した。

Keywords: JCRB Cell Bank, JCRB Gene Bank, HSRRB (Human Science Research Resources Bank)

Masui, T.: An outgrowth culture system of normal human epithelium: an in vitro model to study the coordination of cellular migration and proliferation
Methods in Molecular Biology, 188, 213-226 (2002)

In order to understand the coordination of cellular growth and proliferation, we established an outgrowth culture system of normal human cervical epithelial cells. The method is easy and reproducible with different donors and among explants generated from tissue from a donor. Therefore, the method would give us essential clues to understand the coordination mechanisms of cellular migration and proliferation.

Keywords: outgrowth, normal human epithelium, culture method

増井 徹: ヒト組織・細胞取扱いについての倫理医学のあゆみ, 197, 1061-1067 (2001)

ヒトゲノムプロジェクト等の進展に伴って, ヒト組織・細胞は重要な医学生物学の研究資源として位置付けられ, その需要が急増している。と同時に, 人に由来するということから, 試料取扱いに関して倫理問題が発生することが意識されるようになってきた。このような背景のもとに, この1年半ほどの間, 政府は多くのヒト試料取扱いに関する倫理指針を策定してきた。私は厚生労働省細胞バンクの一員として, ヒト由来研究試料の公的研究資源化における倫理問題の検討をしてきた。本稿においては組織・細胞と言われる「人間の断片」について,

それを研究に利用する場合の倫理的問題点を「科学的」という言葉をキーワードにして検討する。平成13年1月のゲノム・遺伝子解析研究指針の説明会で厚生労働省から指摘があったように、本来はヒト組織・細胞を取り扱うガイドラインがあって、その一部としてゲノム・遺伝子解析研究指針があるべきだということを考えると、今後このヒト組織・細胞取扱いの倫理問題検討が重要な役割を持つと考えている。

Keywords: human tissue/cells, science and ethics, biomedical research

増井 徹：ヒト由来資料の研究・開発利用と倫理

ファルマシア, **38**, 39-43 (2002)

最近のゲノム解析研究, 再生医療, 生殖工学, 組織工学等の研究分野では人体の一部, 例えば組織・細胞, 生殖細胞, ヒト胚, 遺伝物質が不可欠な研究資源である。人体の一部を提供していただき, 研究に利用する場合に, 倫理問題といわれるものを避けてとおることができないことも常識となりつつある。この研究の現在の状況を解析・解説してみたいと思う。「人体実験は道徳的に必要であり, 必然的に非道徳である。」J. ベルナル, にあるように, 結局両刃の剣となる科学の進歩を, ここでは, ゲノム研究と再生医療研究の重なりとして理解したいと考える。

Keywords: ethics, genomic research, regenerative medicine

増井 徹：資源となる人体

現代思想 特集 先端医療—資源化する人体, **30**, 194-210 (2002)

先端医療と関わりの深いヒトゲノム解析, ゲノム創薬, テーラーメイド医療, ヒト胚性幹細胞, 再生医療, 生殖工学などの研究分野では人体の一部を研究資源として利用することが不可欠である。これらの分野の厳しい国際競争に対応するために政府は人体の一部を研究・開発利用の際の倫理的対応を含む指針等を示して, 一定の効果を挙げていると考えられている。しかし, 「資源となる人体」の現状は大方の予想を越えるペースで進んでいる。この状況を作り出した科学的進歩と人・ヒトに対する見方の変化を検討する。

Keywords: human tissue/cells, research resources, ethics

増井 徹, 林 真, 田辺秀之, 水澤 博：ヒト資料の研究利用に関する政府等ガイドラインの現状

国立医薬品食品衛生研究所報告, **119**, 40-46 (2001)

Demand on the use of human materials and personal disease information for research and development comes on the stage of action. International competition in

biomedical and pharmaceutical research pushed the government and related societies about to release guidelines on the issue to ensure the protection of direct and indirect research participants. To work on human materials and information now requires ethical and scientific review by the research ethical committee and the guidelines set the stage of reviewing process. We should be aware of the overall view of situation around and of the guidelines before planning the experiments and analyses on human materials and personal information. In this review we summarized the related guidelines and put comments on them to help researchers to understand the situation.

Keywords: human materials, guidelines, biomedical and pharmaceutical research

長谷川隆一, 小泉睦子, 広瀬明彦, 菅原尚司*, 黒川雄二** : OECD化学物質対策の動向 (第4報)

J Toxicol Sci, **26**, app. 35-41 (2001).

OECDの高生産量化学物質プログラムでの安全性評価方法は“Learning by Doing”の考え方に基づいて変革して来た。特に, 国際化学工業協会協議会 (ICCA) が積極的にこの初期評価作業に加わることとなったため, 初期評価がリスク評価から有害性評価へと変わった。本稿では最新の初期評価文書の内容, 評価方法, ICCAの一員としての日本化学産業界の自主的協力体制について解説した。また, 第10回および11回の初期評価会議で結論および勧告の合意された化学物質名ならびに日本が担当し合意された初期評価文書 (Ethane, 1,1,2-trichloro- (79-00-5), p-t-Butyl phenol (98-54-4), Diacetone alcohol (123-42-2), Glycidyl methacrylate (106-91-2), 1,4-Butanediol (110-63-4), m-Toluidine (108-44-1), N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (4979-32-2), Citral (5392-40-5), 3-Methyl-1,5-pentandiol (4457-71-0), 1-Methoxy-2-propanol acetate (108-65-6), 6,6'-Di-tert-butyl-4,4'-dimethyl-2,2'-methylene- (119-47-1), 3,4-Dichloro-1-butene (760-23-6)) について, その健康影響部分の内容を紹介した。

Keywords: OECD, SIDS, SIAM, ICCA

* (財)日本化学工業協会

** 佐々木研究所

岡田敏史, 谷本 剛, 小嶋茂雄：不純物プロファイル PHARMSTAGE, **1**, 39-45 (2002)

ICH/Q7A の原薬 GMP ガイドラインが合意され, 原則としてすべての原薬について不純物プロファイルを確立し, それに基づいた製造工程管理が求められるようになっている。新薬のみならず, 既存の原薬を含めたすべての原

薬が対象となることから、影響する範囲は極めて大きく、その国内的運用にあたって慎重を期す必要がある。この国内運用にあたってどのような対応が可能なのか検討するため厚生科学研究班「医薬品製剤原料の品質確保に関する研究」(平成11～13年度、主任研究者：岡田敏史)が組織され、具体的な検討が行われた。本稿は、この厚生科学研究班での研究成果を概括し、不純物プロファイルに基づく製造工程管理を実施するにあたっての考え方及び具体的方策をまとめたものである。

Keywords: ICH/GMP Guideline, impurity profile, process control

谷本 剛：第十四改正日本薬局方について—医薬品各条(抗生物質医薬品)について—

医薬品研究, 32(10), 675-685 (2001)

第十四改正日本薬局方における抗生物質医薬品の収載に関して、次の事項について解説した。

1. 日本抗生物質医薬品基準の廃止後の受け皿について
2. 日本抗生物質医薬品基準収載原薬の日局への移行について
3. 日本抗生物質医薬品基準の日局移行における問題点
4. 抗生物質医薬品のフル規格による日局収載の基本方針
5. 抗生物質医薬品のミニマム規格による日局収載の基本方針
6. 日局抗生物質標準品について

Keyword: The Japanese Pharmacopoeia, general tests, The Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan, antibiotics

谷本 剛：第十五改正日本薬局方原案作成要領について

月刊薬事, 44(6), 1131-1143 (2002)

日本薬局方作成基本方針が平成13年11月に薬事・食品衛生審議会から厚生労働大臣に答申された。この基本方針を踏まえ、薬局方作成のための円滑な審議や薬局方全体の表記の整備を計る目的で、第十五改正日本薬局方原案作成要領(原案作成要領)がまとめられた。原案作成要領は第一部及び第二部から構成されている。第一部は第十五改正日本薬局方原案の作成に関する細則であり、薬局方の医薬品各条を改正するにあたり、必要とされる具体的な原案の作成方針及び記載方法を定めたものである。第二部は医薬品各条原案の提出資料とその作成方法に関するものであり、規定の様式による医薬品各条原案の作成及び提出ができるように注意事項等を定めたものである。本稿では、第一部に関して、日局15での医薬品各条の作成の要点及び従来からの原案作成方針や記載方法と大きく異なる点について解説した。

Keywords: The Japanese Pharmacopoeia

石綿 肇：日本人の食品添加物の摂取量：調査方法と推定摂取量

JAFAN, 21, 141-153 (2001)

食品添加物の摂取量調査は先進国で行われているが、わが国では特に進んでいる。各国で行われている調査方法の利点と欠点、調査結果についての考察を行った。わが国をはじめいくつかの国で硝酸塩の摂取量がADIを超えており、JECFAによる硝酸塩の摂取についての考え方を併せて紹介した。

Keywords: food additive, daily intake, ADI

石綿 肇：新規指定及び使用基準改正要請のあった食品添加物とその用途

食衛誌, 42, J337-J339 (2001)

最近新規指定の要請のあった食品添加物、電解水(次亜塩素酸水)、L-アスコルビン酸2-グルコシド、ピオチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、リン酸三マグネシウム、並びに使用基準改正の要請のあったステアロイル乳酸カルシウム、グルコン酸亜鉛、グルコン酸銅、酸化マグネシウム、炭酸マグネシウムについて性質や用途について解説した。

Keywords: new food additive, applying for designation, reversion of standard

柴田敏郎, 成家哲也*¹, 鈴木邦輝*¹, 三浦忠一*², 本間尚治郎*²：「第3回薬用植物に関するワークショップ-北方先住民族の有用植物とその利用法について-その2」記録集

北国研究集録, 6, 1-38 (2002)

北方先住民族の有用植物とその利用法について講演会と野外植物観察会を開催し、その時の講演内容、活動記録及び観察した植物のリストについて記載した。

Keywords: Aboriginal people, useful plants

*¹ 名寄市北国博物館

*² なよろ野の花の会

熊谷健夫, 柴田敏郎, 畠山好雄, 草野源次郎*, 芝野真喜雄*：甘草生産のための栽培および育種に関する研究

薬用植物研究, 2001年1号, 31-37 (2001)

甘草は医薬品あるいは食品添加物として需要の多い生薬であるが、中国政府から、甘草について乱獲や自由な販売は禁止する通知(2000.6.14)が出され、国内生産が急務とされる。甘草の基原植物に属する *Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis* を供試し、生育、収量および成分の系統間比較、生育・グリチルリチン含量に及ぼす無機成

分の影響, 生育・グリチルリチン含量に及ぼす土壌の種類の影響について報告した。

Kew words: *Glycyrrhiza glabra*, *Glycyrrhiza uralensis*,

glycyrrhizin

*大阪薬科大学

青柳伸男：“我が国の生物学的同等性試験と国際調和，**DDS研究の進歩**”，静岡DDS研究会編，バイオメディカルリサーチプレス，東京（2001）pp.63-69.

青柳伸男：“**日本薬局方技術情報 2001**”，日本公定書協会編，じほう，東京（1998），pp.235-239.

香取典子：“**日本薬局方技術情報 2001**”，日本公定書協会編，じほう，東京（1998），pp.92-97，pp.121-124.

吉岡澄江：“**凍結乾燥技術，第4節 高分子添加剤と凍結乾燥剤の保存安定性**” 技術情報協会（2001）pp.150-156

谷本 剛¹⁾，坂本知昭，荒川宣親²⁾，宮澤清治³⁾，伊藤裕二⁴⁾：“**Rapid Examination Methods against Counterfeit and Substandard Drugs (Supplement 1) (不正医薬品対策マニュアル追加事例集1)**”：WHO・国際厚生事業団（不正医薬品対策マニュアル追加事例集作業委員会）編，じほう，東京（2001.12）

¹⁾ 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

²⁾ 国立感染症研究所

³⁾ 日本製薬工業協会

⁴⁾ 東京医薬品工業協会

坂本知昭 訳：“**アブライドセラピューティックスー症例解析にもとづく薬物治療— 第5巻**”，L.Y. Young, M.A. Koda-Kinble編，緒方宏泰日本語版総編，じほう，東京（2002.1），pp.95(1-12)，pp.96(1-26)

早川堯夫：“**バイオテクノロジー製剤の特徴と品質上のポイント**” 医薬品開発評価の基礎と臨床，医薬品開発評価の基礎と臨床研究会編，pp.411-442（2001），デジタルプレス，東京

尾崎幸紘：“**生薬学（改訂第6版）**”，第VI章 生薬の特徴と使われ方，指田 豊，山崎和男編集，南江堂，東京（2002）pp.73-107

土屋利江：“**微粒子工学大系 第II巻応用技術**”，無機微粒子の安全性と生体適合性，フジ・テクノシステム，東京（2002）pp.743-748

鹿庭正昭，佐藤正彦：“**くらしの中の知らない化学物質，第7巻 せんい製品**”，くもん出版，東京（2002）

鹿庭正昭：“**消費者トラブルの実践知識と解決法**”，I.

食品・医薬品などの安全と消費者問題，VI. 生活のなかの化学物質の安全と消費者問題，及川昭伍監修，国民生活センター，東京（2002）pp.186-194，pp.231-239

鹿庭正昭：“**世界と日本の大図解**”，暮らしに広がる抗菌加工，中日新聞東京本社企画編集部編，総合情報アクセス，東京（2002）pp.158-159

安藤正典，西村哲治他：“**上水試験方法 2001版**”，日本水道協会 水質試験方法等調査専門委員会編，日本水道協会，東京（2001）

安藤正典，西村哲治他：“**突発水質汚染の監視対策指針 2002**”，日本水道協会 突発水質汚染の監視対策に関する研究会編，日本水道協会，東京（2002）

石綿 肇：“**食品の安全性・品質確保ハンドブック**”，小沢理恵子，一色賢司，丸山努，新宮和裕，日佐和夫，萩島太一，渡辺健介，渋谷洋一共著，日本農林規格協会，東京（2001），pp.34-44（第3章第8節）。

石綿 肇：“**食品添加物，食品安全性セミナー2 食品添加物**”，細貝祐太郎，松本昌雄監修，中央法規出版，東京（2001），pp.24-40，54-63，74-97，140-146，他（第2，3，5，7章）。

河村葉子，馬場二夫：“**食品添加物，食品安全性セミナー7 器具・容器包装**”，細貝祐太郎，松本昌雄監修，中央法規出版，東京（2002）

小沼博隆：“**医療食・介護食の調理と衛生**”，第2章ハイリスクグループ，第4章医療食・介護食の衛生管理，小沼博隆，横山理雄編，サイエンスフォーラム，東京（2002）pp.87-91，pp.121-135

小沼博隆：“**実践 調理業のHACCP**”，日本食品衛生協会，東京（2001）pp.1-32

小沼博隆：“**HACCP マニュアル（めん類）**”，第1章 HACCPマニュアルの目的～第4章 HACCPシステム導入への作業手順，財団法人食品産業センター，東京（2001）pp.1-19

櫻井治彦，梅田誠，酒井綾子，梶原美次，土屋敏行他：“**化学物質の癌原性を予測するためのBALB/c3T3細胞を用いる短期2段階形質転換試験**”，標準情報TR Z 0023，日本規格協会，東京（2002）

高鳥浩介：“環境微生物の測定と評価”，オーム社，東京 (2001) pp.29-56, pp.71-80

高鳥浩介：“かび検査マニュアル カラー図譜”，テクノシステム，東京 (2002)

最上 (西巻) 知子：“生物薬科学実験講座 第3巻 脂質 [Ⅲ] 中性脂質、リポタンパク質・血清脂質、過酸化脂質” 井上圭三／中川靖一編、廣川書店、東京 (2002), pp.59-68

Sekizawa J, Suter G., Birnbaum L.: "C. Tributyltin and triphenyltin compounds", In Integrated Risk Assessment, Report prepared for the WHO/UNEP/ILO International Programme on Chemical Safety, December 2001, WHO/IPCS/IRA/01/12, pp. 90-115

Frith CH *¹, Ward JM *², Harleman JH *³, Stromberg PC *⁴, Halm S *⁵, Inoue T, Wright JA *⁶: Hematopoietic System, In: International Classification of Rodent Tumors: The Mouse, Eds: Mohr U, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2001) pp.417-451.

*¹ Toxicology Pathology Associates, USA.

*² National Cancer Institute, USA.

*³ Novartis Pharma AG, Switzerland.

*⁴ Ohio State University, USA

*⁵ Knoll AG, Institut für Toxicologie, Germany

*⁶ Underhill Housen Limited, UK.

平林容子：幹細胞，第2版 免疫学事典，編：大沢利昭，小山次郎，奥田研爾，矢田順一，東京化学同人，東京 (2001), pp.144-145

小野 敦，橋本 せつ子，浅野 和信 “実験医学別冊 クローズアップ実験法総集編” 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法，羊土社，東京 (2002) pp.199-204

大野泰雄：“新薬開発評価の基礎と臨床 2. 新医薬品に求められる臨床的特性，その試験研究手法と表現”，非臨床試験と非臨床試験のタイミング，編集 新薬開発評価の基礎と臨床研究会，監修栗原雅直，デジタルプレス (2001) pp.43-53

大野泰雄：“新薬開発評価の基礎と臨床 2. 新医薬品に求められる臨床的特性，その試験研究手法と表現”，動物実験の意義，編集 新薬開発評価の基礎と臨床研究会，

監修栗原雅直，デジタルプレス (2001) pp.343-347

大野泰雄：“非臨床試験マニュアル”，非臨床安全性試験の実施時期，野村護，堀井郁夫，吉田武美編集，Life Science Information Center (2001) pp.278-288

大野泰雄，篠内桃子：“非臨床試験マニュアル” ヒト肝細胞の調製，保存，および代謝・毒性研究への利用，野村護，堀井郁夫，吉田武美編集，Life science Information Center (2001) pp.360-376

小泉修一，井上和秀：“脳機能の解明”，海馬 astrocyte によるダイナミックなシナプス伝達制御，赤池紀扶編，ガイア出版会，福岡 (2002) pp.91-98

Nakazawa, K.: "Encyclopedia of Molecular Medicine", ATP receptors, ed. Creighton, T., John Wiley & Sons (2001) pp. 282-284

Nakazawa, K.: "Encyclopedia of Molecular Medicine", Purinergic receptors, ed. Creighton, T., John Wiley & Sons (2001) pp. 2693-2695

小澤正吾，大野泰雄：“薬物動態・作用と遺伝子多型”，澤田康文企画・編集，医薬ジャーナル社，大阪 (2001), pp.228-236

Honma, M. and Sofuni, T.: "The mouse lymphoma assay (MLA) using the microwell method." In Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment, ed, Choy, W.N., Marcel Dekker, New York (2001) pp.141-161

岡田敏史他：“日本薬局方技術情報 2001”，(財)日本公定書協会編，(株)じほう，東京 (2001)

岡田敏史他：“改訂五版 分析化学便覧”，医薬品標準物質，日本分析化学会編，丸善 (2001), pp. 34-36

Tanimoto, T.: "Rapid Examination Methods for Counterfeit and Substandard Drugs — Supplement Data for Thin-layer Chromatography —", WHO/WPRO & JICWELS, 東京 (2001), pp.1-40

石綿 肇：“醸造・発酵食品の事典” 吉沢淑，石川雄章，蓼沼誠，長澤道太郎，永見憲三編，朝倉書店，東京 (2001), pp. 169-179

石綿 肇：“食品衛生学” 久保倉洋子，島田俊雄編，光

生館, 東京(2002), pp.83-105

江馬 眞, 峯島 浩: "非臨床試験マニュアル" 生殖
発生毒性試, 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美 編, エ
ル・アイ・シー, 東京 (2001), pp105-117

Yoshimatsu, K. and Shimomura, K.: "Cryopreservation of
Panax (Ginseng)" in Biotechnology in Agriculture and
Forestry, vol. 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II,
edited by Towill, L.E., Springer-Verlag Berlin Heidelberg
(2002) pp. 164-179

生物学的同等性試験の評価法：局所適用製剤の評価方法と溶出試験の適性化用カリブレータの開発：鹿庭なほ子，青柳伸男，香取典子，小嶋茂雄，東京医薬品工業協会，大阪医薬品協会，同一性評価調査研究（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月医薬品機構に報告

患者のクオリティオブライフの向上を目指した医薬品治療におけるリスク集団の検出方法：製薬企業での取り組み：鹿庭なほ子，委託研究（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月谷川原班長に報告

医薬品の迅速分析法ーキノロン系抗菌薬ー：坂本知昭，石橋無味雄，鹿庭なほ子，小嶋茂雄 委託研究（平成12年4月～平成13年5月），平成13年5月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告

モクツウ，モッコウ，ボウイ及びサイシンを含有する漢方・生薬製剤並びにそれら原料生薬に関するアリストロキア酸分析報告：川原信夫，鎌倉浩之，代田修，尾崎幸紘，江崎勝司，合田幸広 医療用後発医薬品品質確保対策事業経費（平成13年4月～平成14年3月）平成13年10月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告

無承認無許可医薬品買い上げ調査報告：合田幸広，川原信夫，鎌倉浩之，代田修 無承認無許可医薬品買い上げ調査経費（平成13年4月～平成14年3月）平成14年4月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告

枇杷葉の確認試験法：川原信夫，合田幸広 生薬における日本薬局方新規規程品目及び試験法の原案作成にかかる研究経費（平成13年4月～平成14年3月）平成14年3月厚生労働省医薬局審査管理課に報告

4-クロロ-3-メチルフェノール，4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール，クロロアセトアミド及びN-(シクロヘキシル)チオフタルイミドの細胞毒性：五十嵐良明，鹿庭正昭，土屋利江
家庭用品等調査研究費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室に報告。

抗菌剤ピリチオン亜鉛の分析法策定：五十嵐良明，鹿庭正昭，土屋利江
家庭用品等調査研究費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室に報告。

抗菌剤N,N'-ヘキサメチレンービス（4-カルバモイル-1-デシルピリジニウムブロマイド）の分析法策定：五十嵐良明，鹿庭正昭，土屋利江
家庭用品等調査研究費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室に報告。

家庭用品規制法の有害物質等基準における改定測定法設定 ホルムアルデヒド測定法の改定について：五十嵐良明，鹿庭正昭，土屋利江
家庭用品等調査研究費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室に報告。

生活安全総合研究事業ー室内空気中の化学物質に関する調査研究ー：安藤正典
厚生科学研究費補助金（平成10年4月～平成13年3月），平成13年4月厚生労働省医薬局食品保健部企画課に報告

国設自動車交通環境測定所における大気汚染測定調査：松村年郎，関田 寛，濱田実香，安藤正典
環境省環境保全費（平成13年4月～平成14年3月）平成14年5月環境省環境管理局自動車環境対策課に報告

カドミウムの健康影響に関する研究：安藤正典
（平成6年4月～平成12年3月）平成14年2月日本公衆衛生協会に報告

平成12年度環境測定分析統一精度管理調査結果ー模擬水質試料ー：西村哲治，山崎慎一*¹，稲葉一穂*²，今井登*³，富永衛*³，牧野和夫*⁴，山本貴士*²
平成13年9月環境省環境管理局総務課環境管理技術室に報告

*¹ 元東北大学

*² 国立環境研究所

*³ 産業技術総合研究所

*⁴ 環境省環境研修センター

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，豊田正武
食品等試験検査費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

ジチオカーバメート系農薬試験法：高附 巧，佐々木久美子，豊田正武
食品等試験検査費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

食品中のダイオキシン類分析試験データの解析用統計手法の検討：松田りえ子，豊田正武

食品等試験検査費（平成12年4月～平成13年3月），平成13年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

放射線照射の検知法に関する情報収集：松田りえ子，豊田正武

国際規格調和推進事業費（平成12年4月～平成13年3月），平成13年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

食品中のクロルデン，アルドリンの一日摂取量：松田りえ子，豊田正武

食品等試験検査費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

安全性未審査の遺伝子組換えジャガイモ及びそれを原料とする製品の調査（第1回）：穂山浩，豊田正武

厚生科学研究（平成13年4月～平成13年7月），平成13年7月厚生労働省食品保健部監視安全課に報告。

安全性未審査の遺伝子組換えジャガイモ及びそれを原料とする製品の調査（第1回）：穂山浩，豊田正武

厚生科学研究（平成13年4月～平成13年9月），平成14年9月厚生労働省食品保健部監視安全課に報告。

安全性未審査の遺伝子組換えパパイアの調査：渡邊敬浩，穂山浩，豊田正武

厚生科学研究（平成13年4月～平成14年1月），平成14年1月厚生労働省食品保健部監視安全課に報告。

安全性審査中遺伝子組換えジャガイモ（NewLeaf Y）の調査：渡邊敬浩，穂山浩，豊田正武

厚生科学研究（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省食品保健部監視安全課に報告。

遺伝子組換え加工食品の遺伝子検出の調査：和久井知世子，渡邊敬浩，穂山浩，豊田正武

厚生科学研究（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省食品保健部企画課に報告。

食品添加物使用量実態調査のためのアンケート調査票作成について：米谷民雄，四方田千佳子，山崎 壮

食品添加物規格基準策定費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課

に報告。

新規指定の食品添加物“次亜塩素酸水”の申請に伴う規格基準及び試験法の設定。強酸性次亜塩素酸水と微酸性次亜塩素酸水について：武田由比子，米谷民雄

食品添加物規格基準策定費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

高速液体クロマトグラフィーによる食品中のポリソルベートの分析法の検討。クリーミングパウダー及びレトルトパウチ食品について：武田由比子，米谷民雄

未指定添加物対策費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

食品中の添加物分析法の策定。パンに含まれる臭素酸塩の高感度分析法の開発：久保田浩樹，川崎洋子，阿部有希子，武田由比子，四方田千佳子，米谷民雄，石綿 肇

食品添加物規格基準策定費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

食品中の総リン酸塩の簡易定量法：川崎洋子，阿部有希子，久保田浩樹，四方田千佳子，米谷民雄，石綿 肇

食品添加物の一日摂取量調査費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

天然抗酸化剤の活性評価法の開発：杉本直樹，山崎 壮，米谷民雄

食品添加物規格基準策定費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

フタル酸エステルを含有するポリ塩化ビニル製器具・容器包装及びおもちゃの試験法の検討：河村葉子，六鹿元雄，米谷民雄

容器包装規格基準等作成費（平成13年4月～平成14年2月），平成14年2月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

医薬品，医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究：棚元憲一

厚生科学研究（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局審査管理課に報告。

環境中の複合化学物質による次世代影響リスクの評価と

リスク対応支援：関沢純，江間真，伊豆津健一，内山巖雄*1，松木容彦*2，堤治*3，長尾美奈子*4，東海明宏*5，安田峯生*6，浜田知久馬*7，有園幸司*8，松井三郎*9，田辺信介*10，吉岡義正*11，武田量雄*12

環境総合技術開発等推進費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月環境省総合環境政策局環境研究技術室に報告

- *1 国立公衆衛生院
- *2 財団法人食品薬品安全センター
- *3 東京大学医学部
- *4 東京農業大学応用生物学部
- *5 独立法人産業総合技術研究所
- *6 広島国際大学
- *7 京都大学医学部
- *8 熊本県立大学環境共生学部
- *9 京都大学工学部
- *10 愛媛大学沿岸環境科学研究センター
- *11 大分大学教育福祉科学部
- *12 三菱化学安全科学研究所

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究—特に低容量・複合効果作用機構について（低用量問題に関する文献調査）：井上 達，関沢 純，長谷川隆一，江馬真，中田 琴子，渋谷 淳，今井 清*1，福島昭治*2，長村義之*3，白井智之*4，三森国敏*5，鈴木勝士*6，井藤悦朗*7

厚生科学研究費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

- *1 財団法人食品薬品安全センター
- *2 大阪市立大学医学部
- *3 東海大学医学部
- *4 名古屋市立大学医学部
- *5 東京農工大学農学部
- *6 日本獣医畜産大学
- *7 社団法人日本化学物質安全センター

高感受性郡リスク評価委員会（平成13年度）報告書：

内山巖雄*1，関沢純，佐々木久美子，玉城英彦*2，堤治*3，常俊義三*4，遠山千春*5，森永謙二*6，五十嵐隆*7，渡辺知保*7，千葉百子*8，北條祥子*9

（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月環境省環境保健部環境リスク評価室に報告

- *1 国立公衆衛生院
- *2 北海道大学医学部
- *3 東京大学医学部
- *4 宮崎医科大学
- *5 国立環境研究所
- *6 大阪府立成人病センター

*7 東京大学大学院医学系研究科

*8 順天堂大学医学部

*9 尚けい女学院短期大学

平成13年度新エネルギー・産業技術総合開発機構受託

リスク評価システム開発研究成果報告書：松尾昌季*1，関沢純，林裕造*2，大前和幸*3，岩田光夫*4，古谷義夫*5，星川欣考*6

（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月新エネルギー・産業技術総合開発機構に報告

- *1 摂南大学薬学部
- *2 実験動物中央研究所
- *3 慶應義塾大学医学部
- *4 呉羽化学工業
- *5 社団法人日本化学物質安全センター
- *6 ケミカルリスク研究所

リスクコミュニケーションあり方検討委員会報告書：関

沢純，吉川肇子，柴田治，織朱實，後藤敏彦，石綿雅雄，平田淳一

（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月東京都環境局環境改善部に報告

- *1 慶應義塾大学医学部
- *2 国際基督教大学
- *3 ピー・ツー・ピーエー株式会社
- *4 環境監視研究会
- *5 日本化学工業協会化学物質総合安全センター
- *6 中小企業総合事業団情報・技術部

PCBの毒性評価に関するワーキンググループ報告書：

遠山千春*1，関沢純，内山巖雄*2，石井祐二*3，古賀哲也*4，丹野恵一*5，中野武*6，細見正明*7

（平成13年4月～平成14年3月），平成14年3月社団法人環境情報科学センターに報告

- *1 独立行政法人国立環境研究所
- *2 国立公衆衛生院
- *3 筑波大学社会医学系
- *4 九州大学医学部
- *5 神戸市立看護大学
- *7 兵庫県公害研究所
- *8 東京農工大学工学部

化学物質の毒性情報等提供システムに関する調査と検討：山本 都

家庭用品等試験検査費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生省生活衛生局生活化学安全対策室に報告

タール色素のうち赤色系の色素に関する皮膚感作性についての文献調査：井上 達，金子豊蔵，北嶋 聡
医薬品審査等業務庁費（平成11年4月～平成12年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課に報告

タール色素のうち赤色系以外の色素に関する皮膚感作性についての文献調査：井上 達，金子豊蔵，北嶋 聡
医薬品審査等業務庁費（平成12年4月～平成13年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課に報告

タール色素の皮膚感作性についての文献調査とその代替法に関する文献調査：井上 達，金子豊蔵，北嶋 聡
医薬品審査等業務庁費（平成13年4月～平成14年3月），平成14年4月厚生労働省医薬局審査管理課に報告

プロポリスのラットによる慢性毒性試験：井上達，関田清司，梅村隆志，斉藤実，小野敦，川崎靖，内田雄幸，松島裕子，金子豊蔵，小川幸男
健康食品安全性評価費（平成8年4月～平成14年3月），平成13年9月厚生労働省食品保健部新開発食品保健対策室に報告

3-ヨード-2-プロピニルブチルカーバメイトの28日間反復投与毒性試験：井上達，関田清司，梅村隆志，斉藤実，小野敦，川崎靖，内田雄幸，松島裕子，金子豊蔵，小川幸男
家庭用品等調査研究費（平成9年4月～平成14年3月），平成13年9月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

ガルシニア抽出物のラットによる慢性毒性試験：井上達，関田清司，菅野純，内田雄幸，北嶋聡，斉藤実，川崎靖，松島裕子，金子豊蔵，小川幸男
健康食品安全性評価費（平成10年4月～平成14年3月），平成14年2月厚生労働省食品保健部新開発食品保健対策室に報告

F344ラットによるクロー色素の90日間反復投与毒性試験：関田清司，梅村隆志，斉藤実，川崎靖，内田雄幸，松島裕子，金子豊蔵，小川幸男，井上 達
食品添加物安全性再評価費（平成10年4月～11年3月），平成13年12月厚生労働省食品保健部基準課に報告

F344ラットによるサバクヨモギシードガムの90日間反復投与毒性試験（除く病理組織検査）：関田清司，梅村隆志，斉藤実，川崎靖，内田雄幸，松島裕子，金子豊蔵，小川幸男，井上 達

食品添加物安全性再評価費（平成11年4月～12年3月），平成14年3月厚生労働省食品保健部基準課に報告

ゴム老化防止剤2,5-di-tert-amyhydroquinone(DAHQ)のラットを用いた単回投与毒性試験および28日間反復経口投与毒性試験：松島裕子，井上 達
平成14年3月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

ゴム老化防止剤N-(1,3-dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine (DMBPPD) のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験：松島裕子，井上 達
平成14年2月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

防腐防かび剤1,2-benzisothianolin-3-one (BIT) のラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験：松島裕子，井上 達
平成14年2月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

平成12年度劇毒物指定調査のための毒性文献調査：塩化ニトロシル (Nitrosyl Chloride)：松島裕子，井上 達
平成14年3月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

ピレスロイド系殺虫剤の共力剤2,3,3,3,2',3',3',3'-OCTACHLORODIPROPYLETHER (OCDPE) のラットを用いた急性毒性および28日間反復経口投与毒性試験：松島裕子，井上 達
平成14年3月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告

硫酸アンモニウムのF344ラットにおける慢性毒性・発がん性併合試験（中間報告）：蓮村麻衣，小野寺博志，上田 誠，三森国敏，今井俊夫，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14年5月 厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

塩化マグネシウムのF344ラットにおける慢性毒性・発がん性併合試験（中間報告）：今井俊夫，瀧澤 保，安原加壽雄，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14年5月 厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

カテキンのF344ラットにおける90日間反復投与毒性試

験 (中間報告): 蓮村麻衣, 上田 誠, 小野瀬淳一, 今井俊夫, 広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年5月 厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告.

アカネ色素の慢性毒性・発がん性併合試験 (中間報告): 高木広憲, 渋谷 淳, 有村卓朗, 畝山智香子, 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14年3月), 平成14年5月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告.

N-アセチルグルコサミンの慢性毒性・発がん性併合試験 (中間報告): 有村卓朗, 渋谷 淳, 高木広憲, 森川朋美, 畝山智香子, 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12年4月~平成14年3月), 平成14年5月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告.

ヒノキチオールによって雄性ラットに誘発される心毒性の解析 (中間報告): 有村卓朗, 渋谷 淳, 畝山智香子, 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13年4月~平成14年3月), 平成14年5月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告.

麴酸のF344ラットにおける肝発がん修飾作用 (最終報告書): 瀧澤 保, 上田 誠, 小野寺博志, 今井俊夫, 広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年2月 厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告.

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14年3月) 平成14年3月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室に報告.

化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定, ブドウ種子抽出物の定量法の検討: 中村優美子, 辻澄子, 海野有紀子, 外海泰秀.

食品添加物規格基準設定費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

食品添加物規格基準及び試験法の設定, 食用赤色104号及び105号中の不純物ヘキサクロロベンゼン含有量実態調査: 海野有紀子, 中村優美子, 辻澄子, 外海泰秀
食品等試験検査費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

食品中食品添加物の分析法の設定, フェノール系酸化防止剤の分析法について: 辻澄子, 海野有紀子, 中村優美子, 外海泰秀

食品等試験検査費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年4月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

食品残留農薬告示分析法検討 (農産物中に残留するフェノキサプロップエチル告示試験法についての検討): 石光 進, 開原亜樹子, 吉井公彦, 津村ゆかり, 外海泰秀
農薬衛生対策推進費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

残留農薬告示分析法見直し検討会報告 (テクロフタラム試験法, ビリフェノックス試験法の検討): 石光 進, 開原亜樹子, 吉井公彦, 津村ゆかり, 外海泰秀
残留農薬分析再評価検討費 (平成13年4月~平成14年3月), 平成14年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告

- N. Aoyagi: **Dissolution testing-relation with drug absorption**
 EUFEPS World Conference on Drug Absorption and Drug Delivery (2001. 6)
- 青柳伸男: 我が国の生物学的同等性試験と国際調和
 第10回 DDSカンフェランス (2001. 6)
- 伊豆津 健一, 小嶋 茂雄: **各種タンパク質と二糖類の凍結溶液中における混合性**
 低温生物工学会第47年会 (2001. 6)
- 香取典子, 青柳伸男, 小嶋茂雄: **含量均一性試験と質量偏差試験の適用—我が国における市販の錠剤およびカプセルについて—**
 平成13年度標準処方研究会 (2000. 10)
- 青柳伸男: **品質管理の新しい考え方: スキップ・工程内試験, パラメトリックリリース**
 平成13年度東北三県合同医薬品等製造管理者・責任技術者等講習会 (2001. 11)
- 青柳伸男: **溶出試験の変動要因と信頼性**
 平成13年度日本薬剤師会試験検査センター技術講習会 (2001. 11)
- 三原潔, 臺綾子, 石井文由, 青柳伸男, 緒方宏泰: **In vitro 溶出試験におけるラグ時間とヒト血中濃度との関連性の検討**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- 青柳伸男, 石井文由, 緒方宏泰: **In vivo 吸収の変動を予測しうる溶出試験の構築: ニフェジピン製剤**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- 伊豆津健一, 青柳伸男, 小嶋茂雄: **凍結溶液における各種タンパク質と糖類の相分離と高次構造安定化作用**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- Izutsu, K., Aoyagi, N., Kojima, S.: **Miscibility of proteins and saccharides in frozen solutions**
 American Association of Pharmaceutical Scientists
 Pharmaceutics and Drug Delivery Conference (2002. 4)
- 阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **凍結乾燥製剤の安定性に及ぼす水の影響**
 低温生物工学会第47回セミナー “生物・食品と水” (2001. 6)
- Yoshioka, S.: **Molecular mobility of lyophilized formulations as measured by NMR and DRS**
 The Conference on freeze-drying of pharmaceuticals and biologicals, Colorado (2001. 8)
- 吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: **^{13}C および ^1H -NMRによる凍結乾燥製剤の高分子添加剤における主鎖および側鎖の運動性の解析**
 第40回NMR討論会 (2001. 11)
- 阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **スピン拡散測定に基づく固体分散体におけるニフェジピンとPVPの分散状態の解明**
 第40回NMR討論会 (2001. 11)
- 吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: **タンパク質凍結乾燥剤中のデキストランおよびPVPの誘電緩和時間およびNMR緩和時間の比較**
 日本薬剤学会第17年会 (2002. 3)
- 阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **非晶質ニフェジピンの結晶化速度および構造緩和時間に及ぼすPVPの影響**
 日本薬剤学会第17年会 (2002. 3)
- 田島紳介, 吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄, 牧野公子, 大島広行: **凍結乾燥製剤中の β -Galactosidaseの失活および凝集のKWW式による解析**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- 阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: **凍結乾燥製剤中の塩基性リポソームの粒子径に及ぼす保存の影響**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- 吉岡澄江: **医薬品の有効期間の保証に関するレギュレーションの現状と未来**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)
- 鹿庭なほ子: **医薬品の分析法のバリデーション**
 Separation Sciences 2001・シンポジウム (2001. 6)
- Kaniwa, N.: **Japanese Perspectives on Pharmaceutical Product Release Rate Testing**
 DIA Workshop on Drug Dissolution Testing: Current Status and Future Challenges (2001. 6)

鹿庭なほ子：分析法のバリデーションについて
第21回医薬品GMP研究会 (2001. 10)

鹿庭なほ子, 佐井君江, 小澤正吾, 澤田純一：塩酸イリ
ノテカン及びその代謝物の分析法
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

Kikura-Hanajiri, R., Martin, R. S.* and Lunte, S. M.* :
**Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detec-
tion for the Simultaneous Determination of Nitrite and
Nitrate**

The Microfluidics, Microarrays and BioMEMS Confer-
ence (2001. 8)

*The University of Kansas, USA

Kikura-Hanajiri, R., Martin, R. S.* and Lunte, S. M.* :
**Microfabricated Electrophoresis Chip for Simultaneous
Bioassays of Nitrite and Nitrate**

2001 American Association of Pharmaceutical Scientists
(AAPS) Annual Meeting (2001. 10)

*The University of Kansas, USA

Martin, R. S., Kikura-Hanajiri, R., Lacher, N. A. and
Lunte, S. M. : **Studies to Improve the Performance of
Electrochemical Detection for Microchip Electrophoresis**
5th International Conference on Miniaturized Chemical
and Biochemical Analysis Systems (μ TAS 2001) (2001. 10)

Huynh, B., Kikura-Hanajiri, R., Martin, R. S. and Lunte, S.
M. : **Microchip Electrophoresis with Electrochemical
Detection for the Simultaneous Determination of Nitrite
and Nitrate II**

12th Annual Fredric Conference on capillary Electropho-
resis (2001. 10)

花尻(木倉)瑠理, 鹿庭なほ子, 小嶋茂雄, Martin, R. S.,
Lunte, S. M. : **マイクロチップ電気泳動/電気化学検出
による nitrite 及び nitrate のバイオアッセイ法の開発**
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

坂本知昭, 鹿庭なほ子, 小嶋茂雄：医薬品の迅速分析
法—キノロン系合成抗菌薬—
第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001. 11)

坂本知昭, 鹿庭なほ子, 小嶋茂雄：キノロン系抗菌薬の
簡易HPLC分析法の開発 (第II報)
日本薬学会第122年会 (2002. 03)

最所 和宏, 中原 雄二：NaBH₃CN還元反応を経由し
たTMS誘導体化によるGC/MSを用いた毛髪中のベンゾ
ジアゼピン系向精神薬の分析法
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

川西 徹, 河合 洋, 柴山理恵, 水口裕之, 田中 光*,
田中直子*, 重信弘毅*, 早川堯夫：生細胞の機能を視
るプローブ —その光と影—
日本電子顕微鏡学会第57回学術集会シンポジウム (2001.
5)

*東邦大学薬学部

Mizuguchi, H., Hayakawa, T. : **Enhanced Anti-tumor
Effect by Fiber-modified Recombinant Adenovirus
Vectors Expressing Herpes Simplex Virus Thymidine
Kinase**

American Society of Gene Therapy, 4th Annual Meeting
(2001. 5-6)

Kobayashi, T., Niimi, S., Hyuga, M., Hayakawa, T.: **Left
lobe-specific increase of HGF and follistatin mRNA in
relation to the rat liver regeneration**

14th International Congress of Developmental Biology
(2001. 6)

新見伸吾, 堀川麻衣*, 関泰一郎*, 有賀豊彦*, 小林
哲, 早川堯夫：初代培養ラット肝細胞においてアクチビ
ンABはEGFによるDNA合成促進を抑制するがアクチ
ビンBは抑制しない

第8回肝細胞研究会 (2001. 6)

*日本大学生物資源科学部

石井(渡部)明子, 内田恵理子, 水口裕之, 早川堯夫：プ
ラスミンによる血小板活性化の機構
第2回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2001. 6)

沢井 勇*, 斎藤芳郎*, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川
堯夫, 高橋和彦*：ヒトselenoprotein Pの糖鎖構造解析
第38回日本生化学会北海道支部例会 (2001. 7)

*北海道大学薬学部

豊田淑江, 山口照英, 押沢正, 内田恵理子, 早川堯夫：
HL-60細胞の好中球への分化・増殖におけるp70S6キ
ナーゼ (p70S6K) カスケードの役割についての研究
第22回日本炎症・再生医学会 (2001. 7)

水口裕之, 早川堯夫：ターゲティング能を有したアデ
ノウイルスベクターシステムの開発 —アデノウイルス

受容体 CAR を介して感染しないベクターシステムの開発

第17回日本DDS学会 (2001.7)

岡田裕香^{*1}, 中川晋作^{*2}, 井上暢子^{*2}, 岡田直貴^{*3}, 水口裕之, 高橋幸一^{*1}, 水野亘恭^{*1}, 早川堯夫, 真弓忠範^{*2}: **TNF- α 発現ファイバーミュータントアデノウイルスベクターによるマウスメラノーマの遺伝子治療**

第17回日本DDS学会 (2001.7)

^{*1} 武庫川女子大学薬学部^{*2} 大阪大学大学院薬学研究科^{*3} 京都薬科大学

斎藤友美^{*1}, 岡田直貴^{*1}, 飯山さやか^{*1}, 津田貴司^{*1}, 松原亜沙子^{*1}, 森直樹^{*1}, 水口裕之, 早川堯夫, 堤康央^{*2}, 中川晋作^{*2}, 真弓忠範^{*2}, 藤田卓也^{*1}, 山本昌^{*1}: **ファイバーミュータントアデノウイルスベクターにより抗原遺伝子導入した樹状細胞の免疫学的機能評価**

第17回日本DDS学会 (2001.7)

^{*1} 京都薬科大学^{*2} 大阪大学大学院薬学研究科

小泉直也^{*}, 水口裕之, 細野哲司, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 宇都口直樹^{*}, 渡辺善照^{*}, 早川堯夫: **標的細胞親和性を制御できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発 -NGR配列を付与したアデノウイルスベクターの開発-**

第17回日本DDS学会 (2001.7)

^{*} 昭和薬科大学

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Fiber-modified adenovirus vectors for Gene Therapy-Enhanced anti-tumor effects and reduced side effects obtained using fiber-modified adenovirus vectors expressing HSVtk and the development of a system for targeting adenovirus vectors-**

第7回日本遺伝子治療学会 (2001.7)

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Single adenovirus vector Containing a Tetracycline-Controllable Expression System Allows Regulated Transgene Expression In Vitro and In Vivo -Tet-Off System Shows Higher Regulation Than Tet-On System-**

第7回日本遺伝子治療学会 (2001.7)

Mizuguchi, H., Hayakawa, T.: **Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit expanded tropism and increase the size limit of foreign genes**

第7回日本遺伝子治療学会 (2001.7)

Hiranuma, T.^{*1}, Watanabe, A.^{*1}, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Matsukura, M.^{*2}, Miike, T.^{*2}, Shimada, T.^{*1}: **Specific gene expression system for vascular smooth muscle cells**

第7回日本遺伝子治療学会 (2001.7)

^{*1} 日本医科大学^{*2} 熊本大学医学部

早川堯夫: **米国と日本における薬剤開発の現状: 生物薬品の開発の現状**

がん分子標的治療研究会ワークショップ「トランスレーショナルリサーチ: 将来への提言」(2001.8)

水口裕之, 早川堯夫: **Fiber-modified adenovirus vectors for cancer gene therapy**

第2回文部科学省特定領域研究「がん」6領域若手研究者ワークショップ (2001.8)

水口裕之, 早川堯夫: **HSVtk発現ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いた抗腫瘍効果増強・副作用軽減**

第60回日本癌学会総会 (2001.9)

柴山理恵, 河合 洋, 水口裕之, 川西 徹, 田中 光^{*1}, 田中直子^{*1}, 重信弘毅^{*1}, 中村 竜^{*2}, 早川堯夫: **汎用アルゴンレーザーを励起光源として用いた Yellow Cameleonによる細胞内カルシウムイオンの共焦点画像化**

第10回日本バイオイメージング学会学術集会 (2001.10)

^{*1} 東邦大学薬学部^{*2} カールツァイス

川西 徹: **カルシウムイオンのマイクロダイナミクスの共焦点画像化**

レーザー顕微鏡研究会第24回講演会シンポジウム (2001.10)

川崎ナナ, 配島由二, 太田美矢子, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: **LC/MS及びNMRを用いたエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の構造解析**

第74回日本生化学会大会 (2001.10)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 日向須美子, 早川堯夫: **LC/MS及びLC/MS/MSを用いた組換え型ヒトフォリスチンの糖鎖構造解析**

第74回日本生化学会大会 (2001.10)

日向須美子, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: **BIACOREを用いたガングリオシド GD1aによるHGFシグナル抑制機構の解析**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

日向昌司, 川崎ナナ, 日向須美子, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: **GlcNAc転移酵素III遺伝子導入HepG2細胞のHGF誘導細胞分散運動の亢進**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

沢井 勇*, 斎藤芳郎*, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦*: **ヒトselenoprotein Pの糖鎖構造解析**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)
*北海道大学薬学部

新見伸吾, 風間宏美*, 稲川雅美*, 関泰一郎*, 有賀豊彦*, 日向昌司, 早川堯夫: **MRC-5細胞におけるTPA依存的なHGF産生促進に対するアクチビンの作用**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)
*日本大学生物資源科学部

豊田淑江, 山口照英, 押沢正, 内田恵理子, 早川堯夫: **HL-60細胞の好中球への分化・増殖のコミットメントにおけるPI3K-PKC-p70S6キナーゼ (p70S6K) カスケードの役割**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

水口裕之, 早川堯夫: **遺伝子機能解析に向けた発現制御型アデノウイルスベクターの開発**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

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形態変化の機構について**
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

後藤洋子*¹, 新見伸吾, 早川堯夫, 宮下徳治*²: **ラクトース修飾フィブロインの機能評価—レクチン及び肝細胞との相互作用**
第10回ポリマー材料フォーラム (2001. 11)

*¹ 生物資源研

*² 東北大学多元研

萩山裕之*, 上阪等*, 野々村美紀*, 水口裕之, 早川堯夫, 宮坂信之*: **慢性関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変の試み**
第29回臨床免疫学会 (2001. 12)

*東京医科歯科大学医学部

水口裕之, 早川堯夫: **遺伝子工学的手法によるアデノウイルスベクターの改変—ウイルスベクターのDDS-創剤フォーラム第7回若手研究会** (2001. 12)

川西 徹, 柴山理恵, 河合 洋, 鈴木琢雄, 早川堯夫, 中村 竜*: **細胞内小器官に特異的とされる蛍光プローブの評価**

第1回ニューマイクروسコープ研究会 (2001. 12)

*カールツアイス

田中 光*, 川西 徹, 重信弘毅*: **共焦点レーザー顕微鏡を用いた心筋細胞のカルシウムイメージング**
第75回日本薬理学会年会 シンポジウム (2002. 3)

*東邦大学薬学部

川西 徹, 柴山理恵, 河合 洋, 早川堯夫: **細胞内情報伝達系へのトリブチル錫, メチル水銀, クロルデコンの作用の比較**

第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)

柴山理恵, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: **初代培養肝細胞を用いた細胞内小器官解析用蛍光プローブの比較評価**

第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)

川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: **キャピラリーLC/MS及びLC/MS/MSによる微量糖タンパク質糖鎖の構造解析**
日本薬学会122年会 (2002. 3)

太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: **LC/MSを用いた糖ペプチドマッピング法による甲状腺刺激ホルモンの部位特異的な糖鎖の不均一性の解析**

日本薬学会122年会 (2002. 3)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: **LC/MSを用いたタイプの異なるN-結合型糖鎖の一斉分析**

日本薬学会122年会 (2002. 3)

日向須美子, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: **HGFで誘導されるc-Metにチロシンリン酸化に対するガングリオシドの効果**

日本薬学会122年会 (2002. 3)

日向昌司, 川崎ナナ, 日向須美子, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: **GlcNAc転移酵素IIIはHGFシグナル**

を亢進する

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

山口照英, 早川堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質及び安全性確保の評価科学

PDA 第 9 回年会及び併催シンポジウム, (2001. 11)

山口照英: 細胞・組織利用医薬品・医療用具の品質管理手法について

第 6 回関西バイオコンファレンス, (2002. 3)

櫻井文教, 水口裕之, 小泉直也*, 細野哲司, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 宇都口直樹*, 渡辺善照*, 早川堯夫: ファイバーミュータントアデノウイルスベクターを用いた Caco-2 細胞への遺伝子導入

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

*昭和薬科大学

徐志利*, 水口裕之, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 真弓忠範*, 早川堯夫: 各種転写活性化因子の系統的機能評価 -アデノウイルスベクターにおける検討-

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

*大阪大学大学院薬学研究科

吉川友章*, 山本陽子*, 形山和史*, 吉岡靖雄*, 水口裕之, 早川堯夫, 堤康央*, 中川晋作*, 真弓忠範*: アデノウイルスファイバー領域を提示したファージの構築とそのペプチドライブラリ化

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

*大阪大学大学院薬学研究科

関口文子*, 長谷和明*, 形山和史*, 林哲*, 堤康央*, 中川晋作*, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範*: Polyethylene Glycol を用いたバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの粒子設計

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

*大阪大学大学院薬学研究科

形山和史*¹, 和田孝一郎*², 中島淳*³, 吉田幸子*³, 立花雅史*¹, 水口裕之, 早川堯夫, 堤康央*¹, 中川晋作*¹, 上崎善規*², 門脇孝*⁴, 永井良三*⁴, 真弓忠範*¹: PPAR γ 発現アデノウイルスベクターによる炎症性腸疾患治療法の開発

日本薬学会 122 年会 (2002. 3)

*¹ 大阪大学大学院薬学研究科

*² 大阪大学大学院歯学研究科

*³ 横浜市立大学医学部

*⁴ 東京大学医学部

小泉直也*, 水口裕之, 細野哲司, 櫻井文教, 石井(渡部)明子, 内田恵理子, 宇都口直樹*, 渡辺善照*, 早川堯夫: 複数のペプチド配列を発現できるファイバーミュータントアデノウイルスベクターの開発

日本薬学会第 17 年会 (2002. 3)

*昭和薬科大学

井上暢子*, 形山和史*, 中川晋作*, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範*: インテグリン指向性ファイバーミュータントアデノウイルスベクターの改良とその評価

日本薬学会第 17 年会 (2002. 3)

*大阪大学大学院薬学研究科

津田育宏*¹, 形山和史*¹, 中山隆志*², 畑中豊*³, 水口裕之, 早川堯夫, 堤康央*¹, 中川晋作*¹, 谷洋一*³, 義江修*², 真弓忠範*¹: Cell Delivery による癌治療の開発 -新規ケモカイン ILC の in vivo における細胞遊走能評価と癌治療への応用-

日本薬学会第 17 年会 (2002. 3)

*¹ 大阪大学大学院薬学研究科

*² 近畿大学医学部

*³ DAKO

高橋亮子*, 魚谷茂雄*, 喜多篤志*, 大島勝也*, 山崎浩則*, 水口裕之, 早川堯夫, 永山雄二*, 山口義彦*, 江口勝美*: エストロゲンによるレプチンシグナルの調節機構

第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2002. 5)

*長崎大学医学部

喜多篤志*, 魚谷茂雄*, 大島勝也*, 山崎浩則*, 水口裕之, 早川堯夫, 永山雄二*, 山口義彦*, 江口勝美*: Orthovanadate によるレプチン依存性 STAT3 リン酸化の増強効果

第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2002. 5)

*長崎大学医学部

山崎浩則*, 大島勝也*, 喜多篤志*, 魚谷茂雄*, 高橋亮子*, 藤田成裕*, 桑原宏永*, 水口裕之, 早川堯夫, 永山雄二*, 山口義彦*, 江口勝美*: レプチンのインスリン信号伝達とレプチンの信号伝達に与える影響

第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2002. 5)

*長崎大学医学部

大島勝也*, 山崎浩則*, 魚谷茂雄*, 喜多篤志*, 高橋亮子*, 藤田成裕*, 桑原宏永*, 水口裕之, 早川堯夫, 永山雄二*, 山口義彦*, 江口勝美*: レプチンのインス

リン遺伝子発現に対する抑制効果

第45回日本糖尿病学会年次学術集会(2002.5)

*長崎大学医学部

合田幸広：厚生労働省通知の検査方法

組換え体検知技術に関するワークショップ(2001.5)

合田幸広, 穂山 浩, 豊田正武, 柿原芳輝*, 松藤寛*, 千野誠*, 武田明治*: 市販豆腐からの組換え体比率の推定

日本食品化学学会第7回総会・学術大会(2001.6)

*日本大学生物資源科学部

荒川史博*¹, 小笠原健*¹, 鈴木優子*¹, 小関良宏*², 合田幸広, 豊田正武: ダイズ加工による遺伝子の断片化と組換え体比率の変化の有無

日本食品化学学会第7回総会・学術大会(2001.6)

*¹三栄源FFI*²東京農工大学工学部小笠原健*¹, 荒川史博*¹, 鈴木優子*¹, 小関良宏*², 合田幸広, 豊田正武: 加工によるトウモロコシ中の内部標準遺伝子の減衰

日本食品化学学会第7回総会・学術大会(2001.6)

*¹三栄源FFI*²東京農工大学工学部

合田幸広：組換え食品の検査方法の現状

第7回天然薬物研究方法論アカデミー(2001.8)

合田幸広：食品及び食品素材の抗アレルギー活性の解析

日本生薬学会第48回年会(2001.9)

羽田紀康*¹, 佐藤孝治*¹, 大塚功*¹, 竹田忠紘*¹, 佐久嶋順一郎, 合田幸広, 杉田陸海*²: 無脊椎動物由来両性イオン型糖脂質の合成と生物機能

第13回天然薬物の開発と応用シンポジウム

*¹共立薬科大学*²滋賀大学教育学部

合田幸広：遺伝子組換え食品衛生検査指針1

組換えDNA技術応用食品の検査技術研修会(2002.1)

下村裕子, 関田節子, 合田幸広, 徳川斉正*¹, 徳川真木*¹, 佐竹元吉*²: 徳川家康の薬「烏犀圓」VI

日本生薬学会第48回年会(2002.3)

*¹水府明徳会彰考館徳川博物館*²日本薬剤師研修センター李宣融, 内山寛*¹, 飯田修, 合田幸広, 牧野由紀子*², 関田節子, 佐竹元吉*³, 小山鐵夫*¹: 種子導入した世界各地の *Cannabis sativa* L. の特性(6) *Cannabis sativa* L. のDNA量と形態形質との関連性について*¹日本大学生物資源科学部*²関東信越地区麻薬取締官事務所*³日本薬剤師研修センター川原信夫, 中根孝久, 増田和夫*¹, 関田節子, 佐竹元吉*²: ベルー産薬用植物 *Gentiana nitida* の成分研究(4).

日本生薬学会第48回年会(2001.9)

*¹昭和薬科大学*²日本薬剤師研修センター

川原信夫, 佐竹元吉*, 合田幸広: ビワヨウの成分研究(1).

日本生薬学会第122回年会(2002.3)

*日本薬剤師研修センター

袴塚高志*¹, 求野麻里子*¹, 倉田敦代*¹, 川原信夫, 関田節子, 佐竹元吉*²: 骨代謝関連遺伝子発現変動活性を有する Cucurbitacin B の細胞骨格系への作用.

日本生薬学会第122回年会(2002.3)

*¹東京理科大学薬学部*²日本薬剤師研修センター叶英樹*¹, 八百屋さやか*¹, 黒柳正典*¹, 梅原薫*², 川原信夫: アサガオ毛状根によるフェノール性化合物のグルコシル化.

日本生薬学会第122回年会(2002.3)

*¹広島県立大学私物資源学部*²静岡県立大学薬学部鎌倉浩之, 関田節子, 伊藤均*¹, 木村勝一*², 平野剛*², 合田幸広, 佐竹元吉*³: 生薬の滅菌法に関する研究(7)

日本生薬学会第122回年会(2002.3)

*¹原研高崎研*²三菱電機(株)通信機製作所*³日本薬剤師研修セ

代田 修, Jennifer M. Oribello*, 関田節子, 佐竹元吉: フィリピン産生薬の成分に関する研究

日本生薬学会第48回年会(2001.9)

*Bureau of Food and Drugs, Department of Health, Republic of the Philippines

代田 修, 中西香爾*, Nina Berova*: ファイトセラミ

D類の分光分析法による立体異性体識別

日本薬学会第122年会 (2002.3)

* Columbia University

上野美穂^{*1}, 鈴木英世^{*1}, 津野敏紀^{*1}, 相楽和彦^{*2}, 平山総良^{*2}, 尾崎幸紘, 佐竹元吉: サイコのメタノール抽出液に対するアンモニア処理について

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*¹ 富山県薬事研究所*² 大正製薬(株)田中理恵, 永津明人^{*1}, 畑野研一郎^{*1}, 水上元^{*1}, 荻原幸夫^{*1}, 榎原仁作^{*1}: Monensin二価誘導体のイオン輸送能とコンフォメーションに関する研究

第43回天然有機化合物討論会 (2001.10)

*¹ 名市大院・薬六鹿元雄, 坂野勇一^{*1}, 田中理恵, 菅沼大行^{*2}, 稲熊隆博^{*2}, 渋谷雅明^{*1}, 海老塚豊^{*1}, 豊田正武, 合田幸広: サトイモ中に含まれるヒト由来ラノステロール合成酵素阻害成分の検討

第13回天然薬物の開発と応用シンポジウム (2001.11)

*¹ 東大院・薬*² カゴメ総研白井直洋^{*1}, 畑野研一郎^{*1}, 田中理恵, 和佐田(筒井)祐子^{*2}, 小田嶋和徳^{*1}: ホモオキサリックス[3]アレーン類によるドーパミン選択的膜電位変化の基礎: 側鎖の種類によるホストゲスト錯体の構造解析

平成13年度日本薬学会東海支部例会 (2001.12)

*¹ 名市大院・薬*² 名市大・システム自然科学田中理恵, 坂野勇一^{*1}, 六鹿元雄, 大本俊郎^{*2}, 加藤喜昭^{*2}, 渋谷雅明^{*1}, 海老塚豊^{*1}, 合田幸広: 食品素材のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について

日本薬学会第122回年会 (2002.3)

*¹ 東大院・薬*² 三栄源 FFI小田嶋和徳^{*1}, 白井直洋^{*1}, 田中理恵, 村上由佳^{*1}, 尾作浩司^{*2}, 藤原禎多夫^{*2}, 雨宮成^{*3}: カリックスアレーン類による膜電位選択的分子認識の基礎研究(3) ドーパミン選択的膜電位変化とホストゲスト錯体の構造との関連

日本薬学会第122回年会 (2002.3)

*¹ 名市大院・薬*² 東京薬大・生命*³ 東大・理白井直洋^{*1}, 畑野研一郎^{*1}, 田中理恵, 和佐田(筒井)祐子^{*2}, 小田嶋和徳^{*1}: カリックスアレーン類による膜電位選択的分子認識の基礎研究(4) 非経験的分子軌道法によるホストゲスト錯体の構造解析

日本薬学会第122回年会 (2002.3)

*¹ 名市大院・薬*² 名市大・システム自然科学中村高敏, 合田幸広, 荻原幸夫^{*1}: AUTを用いた一般用漢方処方への有用性評価について

日本薬学会第122回年会 (2002.3)

¹ 名古屋市立大市川 明^{}, 土屋利江: 3-Methycholanthrene耐性 Balb 3T3A31-1-1細胞におけるCYP1A1/2発現抑制機構の解析

第14回日本動物細胞工学会 (2001.7)

* 京都工芸繊維大学

Ichikawa, A.^{*}, Tsuchiya, T.: Studies on the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Reversion of transformed phenotype of biomaterial-derives tumor cells 2001 International gap Junction Conference (2001.8)

* Kyoto Institute of Technology

土屋利江: 新しい生体適合性指標の開発に関する研究: コネキシン機能評価の有用性について

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001.10)

土屋利江, 大庭耕輔^{*}: 医療材料の生物学的試験の標準化に関する研究 (1) 感作性試験: 生食抽出, 綿実油抽出, 有機溶媒抽出物での試験結果の比較

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001.10)

* (財)食品農医薬品安全性評価センター

土屋利江, 松岡厚子: 医療材料の生物学的試験の標準化に関する研究 (2) 細胞毒性試験: コロニー法と Elution Test method (USP) を用いた各種抽出溶液での試験結果の比較

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001.10)

土屋利江, 松岡厚子, 市川 明^{*}: 生物解性高分子ポリ乳酸およびポリウレタン材料上で分離されたBALB/3T3細胞由来形質転換巢のDNAチップを用いる遺伝子発現解析

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001.10)

*京都工芸繊維大学

伊藤 博*, 土屋利江: **HMDIC架橋化コラーゲンの安全性評価: ギャップ結合細胞間連結機能に及ぼす影響を中心として**

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

* (株)高研

鈴木寿子*, 土屋利江, 吉原なみ子*: **ヒト皮膚モデルを用いた HIV-1 および HTLV-1 感染持続細胞の動態に関する研究 (1)**

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

*国立感染症研究所エイズ研究センター

朴 正雄, 土屋利江: **多糖類と増殖因子を利用した血管平滑筋細胞増殖抑制のためのモデル作製**

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

Rahman, M.S., Tsuchiya, T., Ichikawa, A. *: **Studies on the enhancement of mechanical strength and differentiation of human articular chondrocytes**

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

* Kyoto Institute of Technology

市川 明*, 土屋利江: **Balb 3T3A31-1-1細胞由来 3-methylcholanthrene耐性クローンにおけるリガンド依存的 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 発現抑制**

日本生化学会第74回大会 (2001. 10)

*京都工芸繊維大学

鈴木寿子*, 土屋利江, 吉原なみ子*: **バイオヒト皮膚モデル製品を用いた HIV-1 検出法の検討**

第15回日本エイズ学会学術集会・総会 (2001. 11)

*国立感染症研究所エイズ研究センター

市川 明*, 土屋利江: **ポリウレタンの発癌プロモーター作用機構: ポリウレタンのギャップ結合細胞間連絡阻害要因はコネキシンのチロシン磷酸化である**

2001年度コネキシン研究会 (2001. 12)

*京都工芸繊維大学

朴 正雄, 土屋利江: **コンタクトレンズ用 multi-purpose solution(MPS)の角膜実質細胞に及ぼす影響**

第1回日本再生医療学会総会 (2002. 4)

Rahman, M.S., Tsuchiya, T.: **Enhancement factors of chondrogenic differentiation of the human articular**

chondrocytes using the 3-dimensional scaffold under the dynamic culture condition

第1回日本再生医療学会総会 (2002. 4)

保科定頼*¹, 靄島由二, 松島 肇*²: **新課題医療廃棄物の処理システムの構築に関する研究**

第1回廃棄物処理科学研究シンポジウム (2001. 9)

*¹ 東京慈恵会医科大

*² 浜松医大

靄島由二, 村井敏美, 中川ゆかり, 平田陸正*, 長谷川千恵, 矢上 健: **創傷被覆材におけるエンドトキシン汚染の実態調査**

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

*岩手医科大

林 譲, 松田りえ子, 靄島由二, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江: **エンドトキシン試験法の分析バリデーション (1). 測定装置の併行再現性**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

靄島由二, 林 譲, 松田りえ子, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江: **エンドトキシン試験法の分析バリデーション (2). リムルス試験の精度予測**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

Kumada, H. *¹, Umemoto, T. *¹, Watanabe, K. *¹, Tamura, H. *², Murai, T., Nakagawa, Y., Tanamoto, K., Haishima, Y.: **Biological properties of the native and synthetic lipid A of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide**

80th General Session of the International and American Associations for Dental Research (2002. 3)

*¹ 神奈川歯科大

*² 生化学工業

靄島由二, 長谷川千恵: **FUMI理論によるリムルス試験の精度予測**

第75回日本細菌学会総会 (2002. 4)

杉浦真理子*¹, 早川律子*¹, 杉浦啓二*^{1,2}, 社本幹博*², 矢上 健: **ラテックス蛋白は遅延型接触アレルギーを誘発する**

第6回日本ラテックスアレルギー研究会 (2001. 7)

*¹ 名古屋大学医学部

*² 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

北川幸己*¹, 藤原英俊*¹, 関川由美*¹, 二木史郎*², 矢上 健: **2-クロロトリチル樹脂の特性を活用した大分**

子型硫酸化ペプチドの合成

第27回反応と合成の進歩シンポジウム (2001. 11)

*1 新潟薬科大学

*2 京都大学化学研究所

秋元留理*, 三嶋絵美*, 知念多恵子*, 阿部典子*, 鷺崎久美子*, 関東裕美*, 伊藤正俊*, 鹿庭正昭: ゴム膝ベルトによる接触皮膚炎の1例

第31回日本皮膚アレルギー学会 (2001. 7)

* 東邦大学医学部大森病院皮膚科

鹿庭正昭, 五十嵐良明: 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の原因究明: 染料アレルギー C.I. Solvent Orange 60 および C.I. Solvent Red 179

第38回全国衛生化学技術協議会 (2001. 11)

鹿庭正昭, 五十嵐良明: プラスチック製めがね部品における染料アレルギーの使用実態と交差アレルギー性に関する考察

第26日本接触皮膚炎学会 (2001. 12)

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 鎌田栄一: ホルムアルデヒドとパラジクロロベンゼン併用吸入暴露の毒性学のおよび免疫学的影響

第38回全国衛生化学技術協議会 (2001. 11)

Wakata, A. *1, Araki, H. *1, Hamada, S. *2, Kubo, K. *2, Matsui, A. *2, Matsuoka, A., Miura, M. *2, Miyajima, H. *2, Nishida, S. *2, Ozawa, S. *2, Senjyu, N. *2, Yamakage, K. *3, Yamamura, E. *2, Yoshida, J. *2: A SFTG collaborative international study on in vitro micronucleus test: Results in CHL/IU cells

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*1 Yamanouchi Pharmaceutical Co. Ltd.

*2 Genotoxicity Working Group of Japan Pharmaceutical Manufacturers Association

*3 Food and Drug Safety Center

Sofuni, T. *1, Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr. *2, Miura, K.F. *1, Shimizu, H. *3, Suzuki, Y. *3, Morimoto, K. *4, Mure, K. *4, Koshi, K. *5, Matsushima, T. *6: Micronucleus induction vs. chromosome aberration induction: Japanese MOL collaborative study using CHL/IU cells

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*1 Olympus Optical Co. Ltd.

*2 Chemical Safety Evaluation Center

*3 The Jikei University School of Medicine

*4 Osaka University School of Medicine

*5 National Institute of Industrial Health

*6 Japan Bioassay Research Center

Matsuoka A., Furuta, A. *1, Ozaki, M. *1, Takeshita, K. *2, Fukuhara, K., Miyata, N.: Structure-activity relationships among resveratrol and its analogues in cytogenetic activity 8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*1 BOZO Research Center Inc.

*2 Ube Scientific Analysis Laboratory, Inc.

Ohe, T. *1, Takata, T. *1, Maeda, Y. *1, Totsuka, Y. *2, Wakabayashi, K. *2, Matsuoka, A.: SCEs and chromosome aberrations in cultured mammalian cells induced by aminophenylnorharman formed by coupling of norharman and aniline

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*1 Kyoto Women's University

*2 National Cancer Center Research Institute

伊佐間和郎, 土屋利江: 金属塩の正常ヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

中岡竜介, 土屋利江: 種々の微粒子状物質によるヒト骨芽細胞の骨分化への影響と細胞間連絡機能との関連

第23回日本バイオマテリアル学会大会 (2001. 10)

新谷英晴: 医療機関と損傷菌, 貧栄養菌, 院内感染菌 日本防菌防黴学会秋季学術シンポジウム2001 (2001. 10)

新谷英晴: 滅菌, 殺菌操作で損傷を受ける菌の現状と微生物試験への影響

日本防菌防黴学会2001年度合同大会 (2001. 11)

新谷英晴: ガンマ線滅菌による医療用具素材の分解 第30回防菌防黴学会 (2002. 5)

佐藤道夫: 医療用具関連データベースの作成 (2) 第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001. 11)

埴岡伸光, 神野透人, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 安藤正典, 斎藤嘉朗, 小澤正吾, 澤田純一: SN-38のグルクロン酸抱合に関与するUGT分子種とその役割 第16回日本薬物動態学会年会 (2001. 10)

徳永裕司, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典: 化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究: ピチオノールおよびジクロロフェン

第48回日本化粧品技術者会研究討論会 (2001. 6)

徳永裕司, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典: 化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究: ピチオノールおよびジクロロフェン

第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001. 11)

H.Tokunaga, T.Roychowdhury, T.Uchino, M.Ando: Evaluation for the total exposure of arsenic in arsenic-affected area of West Bengal, India-Determination of arsenic species in human urines,

10th International Symposium on Natural and Industrial Arsenic Japan(2001. 11).

T.Roychowdhury, T.Uchino, H.Tokunaga, M.Ando: Arsenic and other heavy metals in soils and food stuffs from an arsenic-affected district of West Bengal, India

10th International Symposium on Natural and Industrial Arsenic Japan(2001. 11).

徳永裕司, 森 謙一郎*¹, 野坂富雄*², 土井佳代*³, 坂口 洋*⁴, 藤井まき子*⁵, 高野勝弘*⁶, 林 正人*⁷, 磯敏明*⁸, 西尾裕幸*⁹, 佐藤信夫*¹⁰: 化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究: resorcin, phenylsalicylate, phenoxyethanol及び2-(2-hydroxy-5-methylphenyl)benzotriazol

日本薬学会第122回年会 (2002. 3)

*¹ 都衛研

*² 埼玉衛研

*³ 神奈川衛研

*⁴ 北里大理学部

*⁵ 昭和薬大

*⁶ 粧工連

*⁷ 資生堂

*⁸ ポーラ

*⁹ カネボウ

*¹⁰ コーセー

徳永裕司, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典: RBL-2H3細胞の脱顆粒を用いた化粧品等に用いられる化学物質のアレルゲン性評価に関する研究

日本薬学会第122回年会 (2002.3)

内野 正: 生体試料中のPCOOH, PEOOH及びSQOOH

のCL-HPLC法による分析

第12回CL技術研究会 (2001. 6)

T.Uchino, T.Roychowdhury, H.Tokunaga, M.Ando: Evaluation for the total exposure of arsenic in arsenic-affected area of West Bengal, India: Arsenic and other elements in tube wells, human urine and hair

10th International Symposium on Natural and Industrial Arsenic Japan(2001. 11).

内野 正, 徳永裕司, 安藤正典: ヒトケラチノサイト(A431)からのサイトカイン(IL-1 β , IL-4)放出を指標とした接触皮膚炎の*in vitro*評価法

日本薬学会第122回年会 (2002. 3)

鈴木玲央*¹, 西村哲治, 埴岡伸光, 神野透人, 香川(田中)聡子, 安藤正典, 武田健*¹, 黒瀬光一*², 足立直樹*²: アフリカツメガエルの発生期におけるエストロゲン様物質の影響

第7回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同発表会 (2001. 8)

*¹ 東京理科大学

*² 国立公衆衛生院

岡知宏*^{1,2}, 足立直樹*¹, 林香織*³, 伊藤弓弦*³, 田代康介*³, 西村哲治, 佐久間慶子*², 黒瀬光一*¹: ビスフェノールAがツメガエル初期発生過程に及ぼす影響—マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析—

第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

*¹ 国立公衆衛生院

*² 女子栄養大学

*³ 九州大学

西村哲治, 泉貴子*¹, 吉田ひろみ, 埴岡伸光, 神野透人, 香川(田中)聡子, 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(Ⅲ)

第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001. 11)

*¹ 東京医薬専門学

Nishimura, T.: Environmental Assessment and Bioassay Environmental

SETAC; Asia Pacific Symposium 2001 (2001. 11)

足立直樹*¹, 岡知宏*^{1,2}, 林香織*³, 伊藤弓弦*³, 田代康介*³, 西村哲治, 黒瀬光一*¹: 発生期におけるエストロラジオール処理によって発現量に影響を受けるレクチン様遺伝子などの同定

第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

*1 国立公衆衛生院

*2 女子栄養大学

*3 九州大学

鈴木玲央*¹, 吉田ひろみ, 埴岡伸光, 神野透人, 安藤正典, 黒瀬光一*², 足立直樹*², 武田健*¹, 西村哲治:
アフリカツメガエルの発生期におけるエストロゲン様物質の影響

第122回日本薬学会 (2002. 3)

*1 東京理科大学

*2 国立公衆衛生院

森康明*¹, 内海英雄*², 大橋則雄*³, 鈴木俊也*³, 中室克彦*⁴, 西村哲治, 広瀬義文*⁵, 深澤喜延*⁶, 吹野秀亀*⁷:
環境試験法, 水質試験法, 多環芳香族炭化水素類 (PAHs)

第122回日本薬学会 (2002. 3)

*1 神奈川県衛生研究所

*2 九州大学

*3 東京都立衛生研究所

*4 摂南大学

*5 埼玉県衛生研究所

*6 山梨県公害衛生研究所

*7 元神奈川県環境センター

西村哲治, 内海英雄*¹, 大橋則雄*², 鈴木俊也*², 中室克彦*³, 広瀬義文*⁴, 深澤喜延*⁵, 吹野秀亀*⁶, 森康明*⁷:
環境試験法, 水質試験法, 1,4-ジオキサン

第122回日本薬学会 (2002. 3)

*1 九州大学

*2 東京都立衛生研究所

*3 摂南大学

*4 埼玉県衛生研究所

*5 山梨県公害衛生研究所

*6 元神奈川県環境センター

*7 神奈川県衛生研究所

神野透人, 埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 西村哲治, 安藤正典:
1,4-Dioxaneによるラット肝細胞薬物代謝酵素の誘導

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

香川(田中)聡子, 神野透人, 埴岡伸光, 安藤正典:
TaqMan MGBプローブを用いたアトピー性疾患関連遺伝子SNPsの簡易検出法

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

佐々木久美子: 食品中残留農薬の一斉分析について

第24回農薬残留分析研究会 (2001. 10)

佐々木久美子: 農薬残留基準の設定と Total diet study による化学物質摂取量調査

日本農薬学会第27回大会 (2002. 4)

Fujino, J.*¹, Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M.*², Kitagawa, H.*³, Yamamoto, T.*⁴, Sasaki, K., Toyoda, M.:
Application of the CALUX™ assay to the analysis of DXNs in fish (The First Report)

21th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPS (2001. 9)

* Hiyoshi Corporation

堤 智昭, 天倉吉章, 中村昌文*¹, 藤野潤子*¹, 北川宏子*¹, Brown, D. J.*², Clark, G. C.*², 佐々木久美子, 豊田正武: CALUX バイオアッセイによる市販魚中ダイオキシン類のスクリーニング法の開発

第4回環境ホルモン学会 (2001. 12)

*1 株式会社日吉

*2 Xenobiotic Detection Systems Inc.

伊東秀之*¹, Isaza, J. H.*², 天倉吉章, 吉田隆志*³: ノボタン科植物のエラジタンニンオリゴマーの構造

第43回天然有機化合物討論会 (2001. 10)

* 岡山大学

天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文*¹, 北川宏子*¹, 藤野潤子*¹, 佐々木久美子, 吉田隆志*², 豊田正武: ダイオキシンによるアリル炭化水素レセプターの活性化に対する食品の抑制効果

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

*1 株式会社日吉

*2 岡山大学

天倉吉章, 堤 智昭, 佐々木久美子, 豊田正武: 食品中のダイオキシン分析における前処理法の比較

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002. 5)

小谷明*¹, 林譲, 松田りえ子, 楠文代*²: 定量精度に基づく電気化学検出 HPLC システムの最適化

第62回分析化学討論会 (2001. 6)

* 東京薬科大学

小谷明*¹, 林譲, 松田りえ子, 楠文代*²: 測定精度予測に基づく電気化学検出 HPLC システムの最適化

第14回バイオメディカル分析化学シンポジウム (2001. 7)

*東京薬科大学

Matsuda, R. : **Uncertainty of instrumental measurement: a stochastic approach**
 ICAS2001 (2001. 8)

林譲, 松田りえ子, 伊藤克敏*, 前田昌子* : **酵素反応を用いた分析精度の基礎的検討**
 日本分析化学会第50年会 (2001. 11)

*昭和大学

松田りえ子, 林譲 : **FUMI理論により推定したピーク面積の標準偏差の信頼性について**
 日本分析化学会第50年会 (2001. 11)

小谷明*, 林 譲, 松田りえ子, 楠文代* : **計量化学的手法による電気化学検出HPLCシステム及び測定条件の最適化**
 第47回電気分析化学およびポーラログラフィ学会(2001. 12)

*東京薬科大学

植田泰輔*, 岩上猛*, 木村良夫*, 森本副吉*, 林譲, 松田りえ子 : **FUMI理論を適用した品質管理技術**
 第7回LCテクノプラザ (2002. 2)

*林純薬工業

松田りえ子, 林譲 : **クロマトグラムの積分方法の真度・精度への影響**
 日本薬学会第122年会 (2002. 3)

小谷明*, 林譲, 松田りえ子, 楠文代* : **電気化学検出HPLCの測定条件最適化におけるFUMI理論による分析精度と分析効率の解析**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

*東京薬科大学

北原進一*, 石塚恒雄*, 吉光寺敏泰*, 松田りえ子, 林譲 : **粉末X線回折測定におけるFUMI理論の応用**
 日本薬剤学会第17年会 (2002. 3)

*明治製菓

杉山英男*¹, 出雲義明*¹, 樋口英雄*², 河村日佐男*³, 平井保夫*⁴, 松浦賢一*⁵, 村山三徳, 高橋知之*⁶ : **原子力緊急時における食品の放射能測定と安全性評価**
 日本公衆衛生学会台9回総会 (2001. 11)

*¹ 国立公衆衛生院

*² 財・日本分析センター

*³ 放射線医学総合研究所

*⁴ 茨城県生活環境部

*⁵ 財・原子力安全技術センター

*⁶ 京都大学原子炉実験所

穂山浩 : **食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法について**

日本食品保全研究会シンポジウム (2002. 3)

穂山浩, 松本美佐緒, 杉本和恵, 合田幸広, 豊田正武, 梶原淳睦*¹, 紀雅美*², 中間昭彦*², 富岡千鶴子*³, 日野明寛*⁴, 松岡猛*⁵ : **リアルタイムPCRによる遺伝子組換え食品の定量分析について—ライトサイクラーシステムの適用—**

第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001. 11)

*¹ 福岡県保健環境研究所

*² 大阪市環境科学科研究所

*³ 群馬県衛生研究所

*⁴ 食品総合研究所

*⁵ 農林水産消費技術センター

穂山浩 : **食の安全性を取りまく諸問題に関する最近の知見と動向「遺伝子組換え食品の検知について」**

日本食品衛生学会特別シンポジウム (2002. 2)

穂山浩, 和久井千世子, 渡邊敬浩, 三浦嘉巳, 合田幸広, 豊田正武, 吉村倫彰*¹, 紀雅美*², 山本敦史*², 富岡千鶴子*³, 日野明寛*⁴, 酒井栄一*⁵, 松岡猛*⁶, 布藤聡*⁷, 小川真智子*⁷, 梶原淳睦*⁸ : **マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムによる遺伝子組換え食品の定量分析について**

日本薬学会122年会 (2002. 3)

*¹ アサヒビール

*² 大阪市環境科学環境研究所

*³ 群馬県衛生環境研究所

*⁴ 食品総合研究所

*⁵ 日本遺伝子研究所

*⁶ 農林水産消費技術センター

*⁷ ファスマック

*⁸ 福岡県保健環境研究所

穂山浩 : **遺伝子組換え食品の検知法**

日本薬学会第122年会ミニシンポジウム (2002. 3)

穂山 浩, 松本美佐緒, 杉本和恵, 合田幸広, 豊田正武, 渋谷雅明*¹ : **安全性未承認遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Plus 及びNewLeaf Y)からの組換え遺伝子の検知法の確立とスナック菓子からの検知**

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.10)

*1 東京大学大学院薬学系研究科

古庄義明*1, 矢尾 裕彦*2, 真次 由紀子*3, 穂山 浩, 豊田正武, 庄司 俊彦*4: **96-Well SPE/LC/MS/MSによるマウス血清中Procyanidin B2の測定**

日本薬学会122年会 (2002.3)

*1 ジーエルサイエンス(株)

*2 ABシステム(株)

*3 千葉大学薬学部

*4 アサヒビール(株)

庄司俊彦*1, 神田智正*1, 穂山浩, 佐久島順一郎, 安江正明*1, 中川圭一*1, 豊田正武, 合田幸広: **リンゴ由来プロシアニジン類の吸収動態**

日本農芸化学会2002年大会 (2002.3)

*1 アサヒビール未来研

酒井信夫*, 穂山浩, 豊田英尚*, 戸井田俊彦*, 今成登志男*, 豊田正武: **コンドロイチン硫酸のOVA感作マウス碑細胞に及ぼす影響**

日本薬学会122年会 (2002.3)

*千葉大学薬学部

渡邊敬浩, 張替直輝, 和久井千世子, 穂山浩, 豊田正武, 布藤聡*1, 小川真智子*1, 千葉良子*1: **PCR法を用いた食品中の特定原材料(落花生)検知法について**

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

*1(株)ファスマック

*2 昭和薬科大学

和久井千世子, 渡邊敬浩, 三浦嘉巳, 穂山浩, 豊田正武, 吉村倫彰*1, 紀雅美*2, 山本敦史*2, 富岡千鶴子*3, 日野明寛*4, 酒井栄一*5, 松岡猛*6, 布藤聡*7, 小川真智子*7, 梶原淳陸*8, 島津光伸*9: **マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムによる遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズの定量法**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002.5)

*1 アサヒビール

*2 大阪市環境科学科研究所

*3 群馬県衛生研究所

*4 食品総合研究所

*5 日本遺伝子研究所

*6 農林水産消費技術センター

*7 ファスマック

*8 福岡県保健環境研究所

*9 三菱ビーシーエル

日野明寛*1, 一色賢司*1, 吉村倫彰*2, 布藤聡*3, 松岡猛*4, 栗原秀夫*5, 穂山浩, 合田幸広: **トウモロコシ内在性遺伝子検出領域変更による加工食品中のGMOの定量**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002.5)

*1 食総研

*2 アサヒビール

*3 ファスマック

*4 農水省消技セ

宮原 誠, 後藤典子*, 田邊寛子*: **電子線を照射した牛挽肉の化学的検知法**

理工学における同位元素, 放射線研究発表会 第38回大会 (2001.7)

*東京都産業技術研究所 駒沢放射線利用施設

Makoto Miyahara, Hitoshi Ito*, Koji Ueno**, Yutaka Yamase**, Masatake Toyoda: **Evaluation of Several Dosimeters Using 5 MeV Electron Beam. Fundamentals for Identification of Irradiated Foods. Electron beam**
The 115th Annual AOAC International Meeting and Exposition (2001.9)

*Japan Atomic Energy Research Institute Takasaki Establishment

** Japan Irradiation Service Co.

宮原 誠, 齊藤顕子*, 長沢妙子*, 豊田正武: **シクロブタノン法による照射食品の検知 基礎的検討**

日本食品衛生学会第81回学術講演会 (2001.10)

*北里大学 医療衛生学部

宮原 誠: **検知法の開発と実用利用の現状**
第9回放射線プロセスシンポジウム (2001.12)

杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 米谷民雄, 青木宏光*, 市 隆人*, 香田隆俊*: **Acid stable carmine (耐酸性コチニール)の化学構造**

日本食品化学学会第7回学術大会 (2001.6)

*三栄源エフ・エフ・アイ(株)

菊地博之*, 杉本直樹, 井上かおり*, 千野口誠*, 松藤寛*, 武田明治*, 山崎 壮, 米谷民雄: **テンリョウウチャ抽出物の成分分析**

日本食品化学学会第7回学術大会 (2001.6)

*日本大学生物資源科学部

千野 誠*, 佐藤恭子, 米谷民雄: **日持向上剤ホコッシ抽出物の含有成分と食品中分析法について**

日本食品化学学会第7回学術大会(2001.6)

*日本大学生物資源科学部

宇野喜貴*, 大本俊郎*, 後藤康慶*, 浅井以和夫*, 中村幹雄*, 米谷民雄: **GCP/ICP-AES法によるミルクプリン中のカラギナン分析方法**

日本食品化学学会第7回学術大会(2001.6)

*三栄源エフ・エフ・アイ(株)

長岡(浜野)恵, 米谷民雄: **HPLC/高分解能ICP-MS法を用いた健常人血清におけるAlの存在状態の解析**

第62回分析化学討論会(2001.6)

杉田たき子, 松田りえ子, 河村葉子, 米谷民雄, 谷村雅子*¹, 新野竜大*², 石橋 亨*², 平林尚之*³, 松木容彦*³: **軟質PVC製玩具からのフタル酸エステル溶出と乳幼児のmouthing行動**

日本食品衛生学会第82回学術講演会(2001.10)

*¹ 国立小児病院

*² 東京顕微鏡院

*³ 食品薬品安全センター

阿部有希子, 杉田たき子, 和久井千世子, 石綿 肇, 米谷民雄: **軟質PVC製玩具中の可塑剤の調査—H10年度調査結果との比較—**

日本食品衛生学会第82回学術講演会(2001.10)

和久井千世子, 河村葉子, 米谷民雄: **ヘッドスペース法によるプラスチック中の揮発性物質の分析**

日本食品衛生学会第82回学術講演会(2001.10)

新野竜大*¹, 石橋 亨*¹, 伊藤 武*¹, 坂井千三*¹, 杉田たき子, 石綿 肇, 山田 隆*², 小野寺祐夫*³: **ヒト唾液中におけるフタル酸ジエステルのモノエステル体生成に関する研究**

フォーラム2001, 衛生薬学・環境トキシコロジー(2001.10)

*¹ 東京顕微鏡院

*² 日本食品添加物協会

*³ 東京理科大学

川崎洋子, 久保田浩樹, 濃野正典*, 石綿 肇, 米谷民雄: **魚肉中の一酸化炭素の分析法**

第38回全国衛生化学技術協議会年会(2001.10)

*横浜検疫所輸入食品・検疫検査センター

米谷民雄, 佐藤兼章*¹, 磯村公郎*², 渡辺 均*³, 手島玲子, 杉山英男*⁴, 池淵秀治*⁵, 佐治英郎*⁶: **放射性物**

質試験法 ICP/質量分析法によるウランの定量

日本薬学会第122年会(2002.3)

*¹ 日本分析センター

*² 兵庫県立衛生研究所

*³ 核燃料サイクル開発機構

*⁴ 国立公衆衛生院

*⁵ 日本アイソトープ協会

*⁶ 京都大学大学院薬学系研究科

六鹿元雄, 和久井千世子, 河村葉子, 米谷民雄: **ニトリルゴム製手袋からの溶出物の検討**

日本薬学会第122年会(2002.3)

六鹿元雄, 渡辺悠二*, 河村葉子, 米谷民雄: **ポリ塩化ビニル中のクレゾールリン酸エステルの直接分析法**

日本食品衛生学会第83回学術講演会(2002.5)

* (財)化学技術戦略推進機構

小川裕子, 河村葉子, 米谷民雄: **ノニルフェノール及びアジピン酸エステル類のポリ塩化ビニル製ラップフィルムから食品への移行に関する検討**

日本食品衛生学会第83回学術講演会(2002.5)

棚元憲一: **局方微生物試験法の現状, 国際調和と将来展望—第14改正日本薬局方を中心として—**

日本防菌防黴学会主催「第17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(2002.3)

棚元憲一: **一般試験法(生物試験法について)**

公定書協会主催「第十四改正局日本薬局方について」の研修会(2001.5)

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: **エンドトキシンの情報伝達におけるMD-2分子上のグリコシル化の役割**

第7回日本エンドトキシン研究会(2001.11)

室井正志, 棚元憲一: **サルモネラリピドAの動物種特異的反応の分子機構: MD-2の関与**

第7回日本エンドトキシン研究会(2001.11)

室井正志, 大西貴弘, 棚元憲一: **大腸菌およびサルモネラ由来のLPSに含まれるTLR2刺激活性を持つLPS様物質**

第75回日本細菌学会総会(2002.4)

室井正志, 棚元憲一: **サルモネラLPSのヒトTLR4活性化における糖鎖部分の関与**

第75回日本細菌学会総会(2002.4)

洪志駿, 室井正志, 大西貴弘, 黛(安住)聡子, 棚元憲一: **内毒素によるマクロファージからの一酸化窒素産生に与える内分泌かく乱物質の影響**

第75回日本細菌学会総会 (2002.4)

滝本博明, 若林靖貴, 矢野郁也, 室井正志, 熊沢義雄: **Trehalose 6, 6'-dimycolate (TDM) はTLR2を介してシグナルを伝達する**

第75回日本細菌学会総会 (2002.4)

宮原美知子, 小沼博隆, 増田高志^{*1}, 金子誠二^{*2}, 斉藤章暢^{*3}, 正木宏幸^{*3}, 後藤公吉^{*4}, 仁科徳啓^{*5}: **ほうれん草でのサルモネラ増殖動態**

第22回日本食品微生物学会 (2001.10)

^{*1} 静岡環境衛生科学研究所

^{*2} 東京都立衛生研究所

^{*3} 埼玉衛生研究所

^{*4} 新潟県食肉衛生検査所

^{*5} 東海大学短期大学部静岡校

増田高志^{*1}, 秋山真人^{*1}, 金子誠二^{*2}, 斉藤章暢^{*3}, 正木宏幸^{*3}, 後藤公吉^{*4}, 仁科徳啓^{*5}, 宮原美知子, 小沼博隆: **野菜汚染病原菌の野菜洗い水等における増殖態度**

第22回日本食品微生物学会 (2001.10)

^{*1} 静岡環境衛生科学研究所

^{*2} 東京都立衛生研究所

^{*3} 埼玉衛生研究所

^{*4} 新潟県食肉衛生検査所

^{*5} 東海大学短期大学部静岡校

長谷川順子^{*}, 仁科徳啓^{*}, 宮原美知子, 小沼博隆: **野菜および野菜洗い液中における汚染微生物の除菌方法に関する検討**

第22回日本食品微生物学会 (2001.10)

^{*} 東海大学短期大学部静岡校

宮原美知子, 小沼博隆, 熊谷進^{*}: **Salmonella Enteritidisの卵における増殖について**

日本食品衛生学会第82回学術講演会 (2001.10)

^{*} 東京大学院農生命

斉藤章暢^{*1}, 工藤由起子^{*2}, 杉山寛治^{*3}, 仁科徳啓^{*4}, 長谷川順子^{*4}, 中川弘^{*5}, 市原智^{*6}, 宮原美知子, 小沼博隆, 熊谷進^{*7}: **免疫磁気ビーズとクロモアガービリオ培地による貝からの腸炎ビブリオO3:K6の検出**

日本食品衛生学会第82回学術講演会 (2001.10)

^{*1} 埼玉衛生研究所

^{*2} 国立感染症研究所

^{*3} 静岡環境衛生科学研究所

^{*4} 東海大学短期大学部静岡校

^{*5} 財団法人東京顕微鏡院

^{*6} 東京サラヤ株式会社

^{*7} 東京大学院農生命

宮原美知子, 小沼博隆: **貝類から検出した腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒**

分子生物学会第24回年会 (2001.12)

宮原美知子, 小沼博隆: **腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の産生に及ぼす要因**

第75回日本細菌学会総会 (2002.4)

宮原美知子, 小沼博隆: **各種検出分離寒天平板培地におけるShigella sonnei集落の生育性状**

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

杉山寛治^{*1}, 大友良光^{*2}, 八柳潤^{*3}, 斉藤章暢^{*4}, 長野英俊^{*5}, 中川弘^{*6}, 仁科徳啓^{*7}, Ashrafuzzaman Chowdhury^{*8}, 西渕光昭^{*8}, 宮原美知子, 小沼博隆, 工藤由起子^{*9}, 熊谷進^{*10}: **国内産魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態**

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

^{*1} 静岡環境衛生科学研究所

^{*2} 青森県環境保険センター国立感染症研究所

^{*3} 秋田県衛生科学研究所

^{*4} 埼玉県衛生研究所

^{*5} 福岡県保険環境研究所

^{*6} 財団法人東京顕微鏡院

^{*7} 東海大学短期大学部静岡校

^{*8} 京都大学

^{*9} 国立感染症研究所

^{*10} 東京大学院農生命

長谷川順子^{*}, 仁科徳啓^{*}, 宮原美知子, 小沼博隆: **自動pH調整塩素水による野菜の除菌効果**

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

^{*} 東海大学短期大学部静岡校

宮原美知子, 小沼博隆: **輸入冷凍生カキから赤痢ソネ菌の検出**

日本防菌防黴学会第29回年次大会 (2002.5)

工藤由起子: **殻付卵および液卵からのSalmonella Enteritidisの検出方法**

第131回日本獣医学会 (2000.4)

工藤由起子：凍結食品における損傷菌とその検出

日本防菌防黴学会秋季学術シンポジウム2001「微生物制御におけるVNC（培養不能生存）菌と損傷菌の問題」
(2000.10)

工藤由起子, 仁科徳啓^{*1}, 中川弘^{*2}, 小沼博隆, 熊谷進^{*3}：二段階増菌方法および酵素基質培地を用いた腸炎ビブリオの検出方法の検討

第22回日本食品微生物学会 (2000.10)

^{*1} 東海大短大

^{*2} (財)東京顕微鏡院

^{*3} 東京大学大学院

堀坂知子^{*1}, 熊谷進^{*2}, 川澄俊之^{*1}, 工藤由起子：食品からの腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒素遺伝子検出のためのPCR法の改良

第131回日本獣医学会 (2000.4)

^{*1} 日本女子大学家政学部

^{*2} 東京大学大学院

梶谷英子^{*1}, 林谷秀樹^{*1}, Okatani A. Tomomitsu^{*1}, 工藤由起子, 熊谷進^{*2}, 金子賢一^{*1}：損傷を受けた病原性 *Yersinia enterocolitica* の免疫磁気ビーズ法による分離

第131回日本獣医学会 (2000.4)

^{*1} 東京農工大学農学部

^{*2} 東京大学大学院

S. Kumagai, ^{*1} Y. Sugita-Konishi, F. Kasuga, Y. Ito and Y. Hara-Kudo: Control of *Escherichia coli* O157:H7 Contamination in Food: Sprout as an Example

11th World Congress of Food Science and Technology (2000.4)

^{*1} 東京大学大学院

佐伯和美^{*1}, 木下寿和奈^{*1}, Okatani A. Tomomitsu^{*1}, 堀北哲也^{*1}, 堀坂知子^{*1}, 工藤由起子, 熊谷進^{*2}, 金子賢一^{*1}, 林谷秀樹^{*1}：病原性 *Yersinia enterocolitica* の熱抵抗性に関する研究

第132回日本獣医学会 (2000.10)

^{*1} 東京農工大学農学部

^{*2} 東京大学大学院

大河内美穂^{*1}, 平山和宏^{*1}, 工藤由起子, 熊谷進^{*1}：腸炎ビブリオの低浸透圧抵抗性

第22回日本食品微生物学会 (2000.10)

^{*1} 東京大学大学院

山崎亜希子^{*1}, 葉袋裕二^{*1}, 芳賀実^{*1}, 大久保勉^{*2}, 工藤由起子：カテキンの腸炎ビブリオおよび芽胞形成細菌に対する抗菌活性

第133回日本獣医学会 (2001.4)

^{*1} 玉川大学農学部

^{*2} (株)太陽化学

酒井美穂^{*1}, 仁科徳啓^{*2}, 熊谷進^{*3}, 川澄俊之^{*1}, 工藤由起子：耐熱性溶血毒素産生性腸炎ビブリオのコロニー形態変化とその増殖性

第133回日本獣医学会 (2001.3)

^{*1} 日本女子大学家政学部

^{*2} 東海大短大

^{*3} 東京大学大学院

松谷佐知子：RNAポリメラーゼⅢのプロモーター配列に作用する細菌転写因子

第24回日本分子生物学会年会 (2001.12)

酒井綾子, 謝 春, 吉川邦衛^{*}, 棚元憲一：BALB/3T3細胞においてTPAとオカダ酸によって共通して発現が変化する遺伝子

日本薬学会122年会 (2002.3)

^{*} 東京農業大学

酒井綾子：BALB/3T3細胞形質転換試験における *Np95* 遺伝子の発現上昇と細胞増殖

日本薬学会122年会 (2002.3)

篠田美玲^{*1}, 天野富美夫^{*2}, 小西良子, 中野有美子^{*2}, 清水誠^{*1}：ペロ毒素 (VT-1) のVero細胞への結合とタンパク合成阻害におよぼすGb3 liposomeの調節機構について

第43回 日本脂質生化学研究会 (2001.6)

^{*1} 東京大学大学院 農学生命科学

^{*2} 国立感染症研究所

志村純子^{*1}, 鈴木嘉彦^{*1}, 西川朝^{*1}, 天野富美夫^{*2}, 小西良子：非特異的生体防御システムにおよぼすビスフェノールの影響

第8回 日本免疫毒性学会大会 (2001.9)

^{*1} 麻布大学獣医学部

^{*2} 大坂薬科大学 薬学部

小西良子, 志村純子^{*1}, 鈴木嘉彦^{*1}, 天野富美夫^{*2}, 杉浦義紹^{*3}：非特異的生体防御システムにおよぼすビスフェノールの影響

第8回 日本免疫毒性学会大会 (2001.9)

*1 麻布大学獣医学部

*2 大坂薬科大学 薬学部

*3 神戸市環境保健研究所

Kanayama, A.*¹, Shimizu, M.*¹, Sugita-Konishi, Y., Inoue, J.*¹ and Miyamoto, Y.*¹: **Taurine Is Involved in Chlorination and Met45 Oxidation of IkappaBalpha and Consequent Inhibition of NFkappaB Activation in Neutrophils**

The American Society for Cell Biology 41th Annual Meeting (2001. 12)

*1 東京大学大学院 農学生命科学

Sugita-Konishi, Y., Amano, F.*¹ and Sugiura, Y.*²: **The effect of tributyltin on microbial infections of mice**
Society of Toxicology 41st Annual Meeting (2002. 3)

*1 大坂薬科大学 薬学部

*2 神戸市環境保健研究所

小松恵美*¹, 葉袋裕二*¹, 芳賀実*¹, 山本茂貴, 小西良子: **トリブチルスズの次世代への免疫毒性について**
日本農芸化学会大会 (2002. 3)

*1 玉川大学

塚崎 匡*¹, 薩 秀雄*¹, 小西良子, 清水 誠*¹: **トリブチルスズが腸管上皮細胞 Caco-2 の機能に与える影響**
日本農芸化学会大会 (2002. 3)

*1 東京大学大学院 農学生命科学

武木田薫*¹, 谷村顕雄*¹, 菊池裕, 山崎壮, 高鳥浩介, 棚元憲一, 澤田純一, 品川森一*²: **抗ウシ・プリオンペプチド抗体を用いた食品中のプリオン蛋白質検出法の開発**

日本食品衛生学会第82回学術講演会 (2001. 10)

*1 昭和女子大

*2 帯広畜産大

奥田晴宏: **ICH M4 CTD (品質分野) における国内対応の方針**

日本PDA第9回年会併催シンポジウム (2001. 11)

奥田晴宏, 荒戸照世, 小笠原弘道, 鹿野真弓, 嶋澤るみ子, 永井尚美, 長岡寛明, 永田龍二, 中村高敏, 本田二葉, 山田博章: **医薬品承認審査上の規格・安定性関連分野について一具体的事例を踏まえ一**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

K. Fukuhara, I. Nakanishi, M. Nagakawa, and N. Miyata :

Structural basis for DNA cleaving-activity of Resveratrol
8th International Conference on Environmental Mutagens
Nara Satellite Meeting (2001. 10)

I. Nakanishi, K. Fukuhara, T. Shimada*¹, S. Fukuzumi*², and N. Miyata : **Superoxide Anion Generation via Electron Transfer Oxidation of Catechin Dianion by Molecular Oxygen in an Aprotic Media**

8th International Conference on Environmental Mutagens
Nara Satellite Meeting (2001. 10)

*1 Osaka University

*2 Shibaura Institute of Technology

中西郁夫, 福原 潔, 島田知一*¹, 大久保 敬*², 栗原正明, 浦野四郎*¹, 福住俊一*², 宮田直樹: **カテキンジアニオンの酸化による活性酸素生成機構**
第34回酸化反応討論会 (2002. 11)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 中西郁夫, 内藤有紀, 佐藤由紀子, 島田知一*¹, 浦野四郎*¹, 宮田直樹: **キノン/NADHによる活性酸素生成機構の解析**

第34回酸化反応討論会 (2002. 11)

*1 芝浦工業大学

飯塚優子*¹, 稲見圭子*¹, 中西郁夫, 福原 潔, 宮田直樹, 望月正隆*¹: **塩素で置換した新規ビタミンE類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基の効果**

第34回酸化反応討論会 (2002. 11)

*1 共立薬科大学

島田知一*¹, 中西郁夫, 福原 潔, 大久保 敬*², 栗原正明, 浦野四郎*¹, 福住俊一*², 宮田直樹: **塩基性条件下におけるカテキンからの活性酸素生成**

第16回生体フリーラジカル研究会 (2002. 12)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 中西郁夫, 島田知一*¹, 永川真希, 浦野四郎*¹, 宮田直樹: **レスベラトロールによる酸化障害の解析一フェノール性水酸基からの活性酸素の生成一**

第16回生体フリーラジカル研究会 (2002. 12)

*1 芝浦工業大学応用化学科

飯塚優子*¹, 稲見圭子*¹, 中西郁夫, 福原 潔, 宮田直樹*², 望月正隆*¹: **塩素置換新規ビタミンE類縁体の抗酸化活性に及ぼす置換基効果**

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 共立薬科大学

*2 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫, 福原 潔, 大久保 敬*1, 島田知一*2, 浦野四郎*2, 福住俊一*1, 宮田直樹*3: フラボノイド類からの活性酸素生成機構

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 大阪大学大学院工学研究科

*2 芝浦工業大学応用化学科

*3 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫, 福原 潔, 大久保敬*1, 飯塚優子*2, 稲見圭子*2, 望月正隆*2, 島田知一*3, 浦野四郎*3, 福住俊一*1, 宮田直樹*4: ビタミンE類縁体ラジカルの金属イオンによる安定化とキャラクタリゼーション

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 大阪大学大学院工学研究科

*2 共立薬科大学

*3 芝浦工業大学応用化学科

*4 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 栗原正明, 宮田直樹*1: 光活性型NOドナー: 6-ニトロベンツ[a]ピレンからのNOの生成

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫, 丹野雅幸, 福原 潔, 大久保 敬*1, 福住俊一*1, 末吉祥子: ピリジン N-オキソド誘導体ラジカルアニオンの反応性

日本化学会第81春年会 (2002.3)

*1 大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫, 福原 潔, 島田知一*1, 大久保 敬*2, 浦野四郎*1, 飯塚優子*3, 稲見圭子*3, 望月正隆*3, 福住俊一*2, 宮田直樹*4: ビタミンE類縁体ラジカルの安定性に及ぼす金属イオンの効果

日本化学会第81春年会 (2002.3)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 大阪大学大学院工学研究科

*3 共立薬科大学

*4 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫, 福原 潔, 島田知一*1, 大久保 敬*2, 浦野四郎*1, 栗原正明, 福住俊一*2, 宮田直樹*3: カテキン類による活性酸素生成とラジカル中間体のキャラクタリゼーション

日本化学会第81春年会 (2002.3)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 大阪大学大学院工学研究科

*3 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 中西郁夫, 島田知一*1, 木村光宏*1, 杉山悦子, 寒水壽郎, 山口健太郎*2, 浦野四郎*1, 宮田直樹*3: 平面型カテキン誘導体の活性酸素消去能

日本化学会第81春年会 (2002.3)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 千葉大学分析センター

*3 名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮崎健太郎*1, 中西郁夫*2, 島田知一*1, 大久保 敬*3, 浦野四郎*1, 福住俊一*3, 宮田直樹*4, 福原潔: 塩基性条件下におけるフェノール性化合物からの活性酸素生成第24回日本フリーラジカル学会 (2002.5)

*1 芝浦工業大学応用化学科

*2 放射線医学総合研究所

*3 大阪大学大学院工学研究科

*4 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 中西郁夫*1, 島田知一*2, 木村光宏*2, 杉山悦子, 寒水壽郎, 山口健太郎*3, 浦野四郎*2, 宮田直樹*4: 平面型カテキンのラジカル消去能の評価

第24回日本フリーラジカル学会 (2002.5)

*1 放射線医学総合研究所

*2 芝浦工業大学応用化学科

*3 千葉大学分析センター

*4 名古屋市立大学大学院薬学研究科

袴田 航, 西尾俊幸*1, 奥 忠武*1, 室井 誠*2, 高月昭*2: 分子プローブを用いたプロセッシング・グルコシダーゼの基質特異性の解析

日本農芸化学会2002年度大会 (2002.3)

*1 日本大学生物資源科学部

*2 理化学研究所

小川真弘*, 袴田 航, 湯倉 忍*, 河内 隆*, 西尾俊幸*, 奥 忠武*: *Aspergillus niger* α -グルコシダーゼの修飾基質分解における pH 依存性について

日本農芸化学会2002年度大会 (2002.3)

*1 日本大学生物資源科学部

山本伸明*, 中島康介*, 柳井 啓*, 松石 紫*, 袴田航河内 隆*, 西尾俊幸*, 奥 忠武*: PNP α -D-アルドヘキソピラノシドの各種ジアステレオマーに対する α -グリコシダーゼの反応性 (2)

*1 日本大学生物資源科学部

橋高敦史*¹, 須原義智*¹, 平阪幸四郎*¹, 藤島利江*¹, 高山浩明*¹, 栗原正明, 宮田直樹, 新木敏正*², 中川公恵*², 岡野登志夫*²: 2α -置換- 1α , 25 -ジヒドロキシビタミン D_3 の合成と生物活性

第79回有機合成シンポジウム (2001. 6)

*¹ 帝京大学薬学部

*² 神戸薬科大学

栗原正明, 宮田直樹, 橋高敦史*, 藤島利江*, 須原義智*, 高山浩明*: A環修飾活性型ビタミン D_3 誘導体のVDR結合モデル

CBI学会2001年大会 (2001. 7)

*¹ 帝京大学薬学部

Kittaka, A.*¹, Takayama, H.*¹, Sugiyama, T.*², Kuroda, R.*², Kurihara M., Inoue, J.*³: Introduction of Formyl-bearing Uracil Bases into Oligonucleotides: Effects to Sequence Specific and Non-specific DNA Binding Proteins

18th International Congress of Heterocycle Chemistry (2001. 7)

*¹ 帝京大学薬学部

*² 東京大学教養学部

*³ 慶応大学理工学部

栗原正明, 田中正一*, 大庭 誠*, 末宗 洋*, 宮田直樹: キラル α , α -ジ置換アミノ酸を含むオリゴペプチドのコンフォメーション: 計算化学によるアプローチ

第38回ペプチド討論会 (2001. 10)

*九州大学薬学部

田中正一*, 大庭 誠*, 栗原正明, 出水庸介*, 西村晋*, 林田和裕*, 末宗 洋*: α , α -ジ置換アミノ酸とその含有ペプチドの不斉合成とコンフォメーション解析

第38回ペプチド討論会 (2001. 10)

*九州大学薬学部

田中正一*, 大庭 誠*, 栗原正明, 末宗 洋*: α -アルキル化ジ置換アミノ酸の不斉合成とその含有ペプチドのコンフォメーション解析

第27回反応と合成の進歩シンポジウム (2001. 11)

*九州大学薬学部

西村 晋*, 大庭 誠*, 田中正一*, 栗原正明, 末宗 洋*: 光学活性 α -エチル化ジ置換アミノ酸を含有するペプチドのコンフォメーション解析

第18回日本薬学会九州支部大会 (2001. 12)

*九州大学薬学部

出水庸介*, 田中正一*, 栗原正明, 末宗 洋*: 光学活性環状 α , α -ジ置換アミノ酸の合成とそのペプチド

第18回日本薬学会九州支部大会 (2001. 12)

*九州大学薬学部

Y. Demize*, M. Tanaka*, M. Kurihara, H. Suemune*: Synthesis of cyclic α , α -disubstituted α -amino acid

The 13th Japan-Korea Joint Seminar for Young Organic Chemists in Ube (2001. 11)

*九州大学薬学部

栗原正明, 田中正一*, 大庭 誠*, 末宗 洋*, 宮田直樹: キラル α , α -ジ置換アミノ酸を含むオリゴペプチドの化学計算によるコンフォメーション解析

薬学会年会第122年会 (2002. 3)

*九州大学薬学部

橋高敦史*, 平阪幸四郎*, 須原義智*, 藤島利江*, 吉田彰宏*, 栗原正明, 宮田直樹, 高山浩明*: 2α 位に芳香環を有する活性型ビタミン D_3 の合成とVDR結合活性

薬学会年会第122年会 (2002. 3)

*帝京大学薬学部

出水庸介*, 田中正一*, 栗原正明, 末宗 洋*: C_2 -対称性環状 α , α -ジ置換アミノ酸よりなるペプチドのコンフォメーション解析

薬学会年会第122年会 (2002. 3)

*九州大学薬学部

西村 晋*, 大庭 誠*, 田中正一*, 栗原正明, 末宗 洋*: 光学活性 α -エチル化ジ置換アミノ酸よりなるヘテロペプチドの合成とそのコンフォメーション解析

薬学会年会第122年会 (2002. 3)

*九州大学薬学部

橋高敦史*, 平阪幸四郎*, 須原義智*, 藤島利江*, 吉田彰宏*, 栗原正明, 宮田直樹, 高山浩明*: 2β -フェニル- 1α , 25 -ジヒドロキシビタミン D_3 の合成とVDR結合活性

日本ビタミン学会第54大会 (2002. 4)

*帝京大学薬学部

Fujishima, T.*¹, Konno, K.*¹, Nakagawa, K.*², Okano, T.*², Kittaka, A.*¹, Kurihara, M., Takayama, H.*¹: 2-Methyl analogues of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D_3 , the potent inducers of cell differentiation and apoptosis:

synthesis and biological evaluation

Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy
(2002, 5)

*¹ 帝京大学薬学部

*² 神戸薬科大学

Kittaka, A.*¹, Suhara, Y.*¹, Fujishima, T.*¹, Kurihara, M.,
Konno, K.*¹, Takayama, H.*¹: **The 2alpha-positive motifs
of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in VDR binding**

Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy
(2002,5)

* 帝京大学薬学部

丹野雅幸, 中西郁夫, 寒水壽朗, 末吉祥子: **アミドキシム
誘導体によるOHラジカル消去を利用したNO発生反
応**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

Yamakoshi, Y., Schlitter, R.R.*¹, Gimzewski, J.K.*¹ and
Diederich, F.*²: **Mecanoreceptor: synthesis and STM
image of a new mechanical receptor**

26th International Synposium on Macrocyclic Chemistry
(2001. 7)

*¹ IBM-Zürich Research Laboratory

*² Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zürich

Yamakoshi, Y., Schlittler, R.R.*¹, Gimzewski, J.K.*¹ and
Diederich, F.*²: **Synthesis and STM oimaging of tempera-
ture-dependent flexible receptor**

Tateshina Conference on Organic Chemistry 1st (2001.
11)

*¹ IBM-Zürich Research Laboratory

*² Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zürich

Yamakoshi, Y., Schlittler, R.R.*¹, Gimzewski, J.K.*¹ and
Diederich, F.*²: **グリッパー型人工レセプターの合成と
自己組織膜のSTM解析**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

*¹ IBM-Zürich Research Laboratory

*² Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zürich

斎藤嘉朗, 小澤正吾, 佐伯真弓, 村山典恵, 手島玲子,
澤田純一: **アレルギー発現要因としての薬物代謝**
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

祖山晃子, 斎藤嘉朗, 埴岡伸光, 村山典恵, 中島治, 香
取典子, 石田誠一, 佐井君江, 小澤正吾, 澤田純一:
CYP2C8 遺伝子多型に基づくバクリタキセル代謝能の変

化

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

奥貫晴代, 手島玲子, 重田輝子, 佐久嶋順一郎, 穂山浩,
合田幸広, 豊田正武, 澤田純一: **遺伝子組換え食品導入
蛋白質 (CP4-EPSPS等) の熱感受性並びに in vitro 分解
性試験**

日本食品衛生学会第81回学術講演会 (2001. 5)

手島玲子: **遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験**
第8回日本免疫毒性学会学術大会 (2001. 9)

吉田貴彦*¹, 伊藤俊弘*¹, 中木良彦*¹, 大沢基保*², 高
橋和子*², 大塚文徳*², 澤田純一, 手島玲子, 小島幸一
*³: **環境リスク評価のための免疫指標の有効性に関する
検討—3歳幼児での検証—**

第8回日本免疫毒性学会学術大会 (2001. 9)

*¹ 旭川医科大学医学部

*² 帝京大学薬学部

*³ 食品薬品安全センター 秦野研究所

中島治, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一: **OBCAM
結合タンパクの性質の検討**

第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

中村亮介, 石田誠一, 小澤正吾, 斎藤嘉朗, 手島玲子,
澤田純一: **RBL-2H3細胞の遺伝子発現プロファイル解
析**

第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

佐藤義隆*¹, 手島玲子, 木谷誠一*¹, 中村亮介, 森田寛
*¹, 佐々木信雄*², 澤田純一: **IgGを介した canine
mastocytoma由来の肥満細胞内情報伝達について**

第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

*¹ 東京大学医学部

*² 東京大学農学部

佐藤義隆*, 手島玲子, 中村亮介, 森田寛*, 澤田純一,
木谷誠一*: **IgGを介した canine mastocytoma由来の肥
満細胞内情報伝達について**

第51回日本アレルギー学会総会 (2001. 10)

* 東京大学医学部

奥貫晴代, 手島玲子, 佐久嶋順一郎, 五十鈴川和人, 穂
山浩, 豊田正武, 澤田純一: **W/W^vマウスにおける
OVA経口感作によるASA誘導**

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

高木加代子, 中村亮介, 渡邊敬浩, 手島玲子, 澤田純一: ヒト高親和性IgE受容体 α 鎖を発現するRBL-2H3細胞のアレルギー患者血清による脱顆粒
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

手島玲子, 中村亮介, 中島治, 蜂須賀暁子, 澤田純一: 肥満細胞からの脱顆粒反応への含窒素系農薬の影響
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

Li, P. *, Prasad, S. S. *, Hachisuka, A., Sawada, J., Gu, Q. * : Immunocytochemical study of OBCAM in cat primary visual cortex during postnatal development
Society for Neuroscience 31st Annual Meeting (2001. 11)
* University of British Columbia

Ohsawa, M. *¹, Otsuka, F. *¹, Takahashi, K. *¹, Teshima, R., Sawada, J., Shindo, T. *², Kanazawa, Y. *², Kojima, K. *², Yoshida, T. *³ : Immunological alterations in blood of toluene diisocyanate-sensitized mice
9th International Congress of Toxicology (2001. 7)

*¹ 帝京大学薬学部

*² 食品薬品安全センター秦野研究所

*³ 旭川医科大学医学部

Suzuki, K.: Essential roles of cofilin in phagocyte functions
10th International Symposium of Molecular Cell Biology of Macrophage (2001. 6)

Sato, Y., Schmidt, A.G. *¹, Kiriazis, H. *¹, Hoit, B.D. *², and Kranias, E.G. *¹ : Cardiac hypertrophy of aged transgenic FVB/N mice overexpressing caldesmon
The XVII World Congress of the International Society for Heart Research (2001. 6)

*¹ University of Cincinnati

*² University Hospitals of Cleveland and Case Western Reserve University

渡辺秀実*, 安達玲子, 楠井薫, 笠原忠*, 鈴木和博: 白血球細胞の分化に対する内分泌攪乱化学物質の影響
フォーラム2001: 衛生薬学・環境トキシコロジー(2001. 10)

* 共立薬科大学

松井幸子*¹, 松本幸子*¹, 安達玲子, 大橋一正*², 水野健作*², 笠原忠*¹, 鈴木和博: 食細胞の機能発現におけるLIM-キナーゼ系の役割
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

*¹ 共立薬科大学

*² 東北大学

渡辺秀実*, 安達玲子, 楠井薫, 笠原忠*, 鈴木和博: 白血球細胞の分化に対する内分泌かく乱物質の影響
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

* 共立薬科大学

安達玲子, 武内恒成*, 鈴木和博: 食細胞の反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)
* 名古屋大学大学院理学研究科

安達玲子, 武内恒成*, 鈴木和博: 食細胞の反応性に対するコフィリンアンチセンスの効果
第55回日本細胞生物学会大会 (2002. 5)
* 名古屋大学大学院理学研究科

阪本英二*, 小野景義: 心筋症ハムスターにおける第二原因遺伝子の同定
第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)
* 国立循環器病センター研究所

阪本英二*, 東方壮男*, 眞崎知生*, 小野景義: 心筋症ハムスターにおける第二原因遺伝子の同定
第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)
* 国立循環器病センター研究所

小野景義, Georges Christe *¹, 阪本英二*²: ウサギ洞房結節細胞における細胞タイプ毎のエンドセリン-1の電気生理学的作用の相違
第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)
*¹ University of Joseph Fourier, France
*² 国立循環器病センター研究所

藤野智史, 佐藤陽治, 最上(西巻)知子: VLDL分泌制御におけるコレステリルエステル合成の役割
第74回日本生化学会大会 (2001. 10)

藤野智史, 佐藤陽治, 最上(西巻)知子: ACAT阻害剤のVLDL分泌低下作用
日本薬学会第122年会 (2002. 3)

Sato, Y., Mori, S., Fujino, T., Nishimaki-Mogami, T., Inoue, K.: Selective gene expression by a thyroid hormone receptor agonist in cardiomyocytes
第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)

Sai, K., Kanno, J., Hasegawa, R., Trosko, J.E.* and Inoue, T.: **Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol**

2nd Congress of Asian Society of Toxicology (2000. 8)

*ミシガン州立大学

Sai, K., Kanno, J., Inoue, T. and Kaneko, T.: **Effects of TCDD on GJIC and cell growth in v-ras transfected rat liver epithelial cells**

20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPS (2000. 8)

Upham, B.L.* , Trosko, J.E.* , Hirose, A., Hasegawa, R., Kanno, J., Inoue, T. and Sai, K.: **Determination of structure-activity relationships of perfluorinated fatty acid on gap junctional intercellular communication and MAPK using in vivo and in vitro model**

Annual Meeting of the Society of Toxicology (2001. 3)

*ミシガン州立大学

Sai, K., Kaniwa, N., Ozawa, S. and Sawada, J.: **A new metabolite of irinotecan (CPT-11) whose formation is mediated by human hepatic cytochrome P-450 3A4.**

6th International ISSX meeting (2001, 10)

関澤 純：リスクアセスメントとは

全国消費者団体連絡会2001年夏期セミナー (2001. 8)

Sekizawa J : **Investigation on possible causes of the change in the sex ratio of live births in Japan: Putative relation to dioxin body burden**

21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (2001. 9)

関澤 純：リスクアセスメントの国際動向ととりまとめ

日本リスク研究学会化学物質リスクアセスメント基礎講習会 (2001. 9)

関澤 純, 土屋利江, 配島由二：ビスフェノールA重合樹脂成型血液透析器使用のリスク・ベネフィット分析
日本リスク研究学会第14回研究発表会要旨集, 63-76 (2001. 11)

Sekizawa J., Ohtake C., Matsui S.*¹, Uchiyama I.*², Ohya Y., Yanagida Y.: **Screening assessment of risks to humans and other organisms from exposure to pharmaceuticals and hormonally active agents in the environment of**

Japan

SETAC/Asia-Pacific Symposium (2001. 11)

*¹ Kyoto University

*² National Institute of Public Health

関澤 純, 広瀬明彦：フタル酸ジエチルの健康及び環境リスク評価

日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会 (2001. 12)

関澤 純：ダイオキシンのリスク評価の最新動向

日本水環境学会関西支部講演会 (2002. 1)

山本 都：リスクアセスメントのための情報調査

日本リスク研究学会化学物質リスクアセスメント基礎講習会 (2001. 9)

大竹千代子, 伊藤尚史*¹, 関澤純：臭素化ジフェニルエーテル (PBDEs) の生体・環境中濃度を基にした健康・環境のリスク評価について—日本の状況を欧州と比較して—

第10回環境化学討論会 (2001. 5)

*¹ 旭化成(株)

大竹千代子, 関澤 純：Diethylstilbestrolの低用量試験での陽性反応再現性確立への提案

日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会 (2001. 12)

中田琴子, 中野達也, 瀧明子, 福澤薫, 神沼二真：パラダイマティックな薬の標的知識ベースの開発

CBI学会第二回年会 (2001. 7)

中田琴子, 中野達也, 菊地啓陽, 瀧明子, 福澤薫, 神沼二真：パラダイマティックな薬の標的知識ベースの開発
第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

Nakata, K., Tokunaga, M., Toda, K., Takai-Igarashi, T., Kaminuma, T.: **An Agent System for Collecting SNPs Data.**

The 4th International Workshop on Advanced Genomics: From Genomics to Proteomics (2001. 11)

Nakano, K., Fukuzawa, K., Koyano, K., Yukawa, M., Komiyama, N., Toda, K., Nakata, K., Kaminuma, T.: **Computational Models and Databases for Studying Endocrine Disruptor Hypothesis.**

日本内分泌攪乱化学物質学会第4回研究発表会 (2001.

12)

林 譲：FUMI理論の基本的な考え方
第1回FUMI理論シンポジウム (2001.6)

林 譲：FUMI理論で求めた精度と統計的に求めた精度
の信頼性について
第2回FUMI理論シンポジウム (2001.12)

中野達也*¹, 瀧明子*¹, 長谷川式子*¹, 鈴木聡子*², 神
沼二真*¹, 宮田直樹*¹: 日本薬局方および日本医薬品一
般名称データベースの開発
CBI学会第二回年会 (2001.7)
*¹ 国立衛研
*² データインデックス

中野達也*¹, 上林正巳*², 古明地勇人*², 上野豊*², 神
沼二真*¹, 北浦和夫*³: フラグメント分子軌道法プログ
ラムABINIT-MPの現状と今後の発展
CBI学会第二回年会 (2001.7)
*¹ 国立衛研
*² 産総研
*³ 大阪府大

頭金 正博, C. Sinal*¹, 宮田 昌明*², F. J. Gonzalez *
¹: 核内受容体FXR/BARによるCyp7aの発現誘導機
構—FAR/BAR遺伝子欠損マウスを用いた解析
シトクロムP450シンポジウム (2001.6)
*¹ 米国NIH
*² 東北大薬

頭金 正博: 核内受容体による胆汁酸生合成の制御
第2回ホルモンと癌研究会 (2001.7)

Tohkin, M.: Regulation of bile acid homeostasis by
orphan nuclear receptor, FXR
2nd Bone Frontier Seminar (2002.2)

井上 達: Toxicogenomicsがトキシコロジー研究に果
たす役割
日本薬学会第122年会 (2002.3)

井上 達: トキシコゲノミックスの展望—ヒト肝細胞・
遺伝子発現解析からの副作用の予測
日本チャールスリバー(株)・ディ・スリー研究所共催
(2002.1)

Inoue, T.: Introductory Keynote Reverse Toxicology - a

new paradigm of toxicology
Toxicogenomics International Forum 2001 (2001.10)

井上 達: 「血液毒性」化学物質の造血組織に対する影
響とリバーストキシコロジー
第24回日本学会議トキシコロジー研究連絡委員会シ
ンポジウム (2001.12)

Inoue, T.: Life Science-based Future Toxicology
Lecture at the Seoul National University (2001.9)

Inoue, T.: Endocrine Disrupting Chemicals Hormonally
Active Compounds (HAC) and Endocrine Disruption (ED)
Possible mechanism of "low dose effect" in endocrine
disrupting chemicals
NITR/KFDA Seminar (2001.9)

井上 達: 会長講演—トキシコロジー管見
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Huo, Y., Igarashi, K.,
Kodama, Y., Kanno, J., Willecke, K. *, Inoue, T.: Role of
Connexin-32 on Chemical Leukemogenesis
KeyStone symposium "Stem Cells: Origins, Fates and
Functions" (2002.3)
* Bonn University

井上 達, 平林 容子, 尹 秉一, 川崎 靖, 児玉 幸夫, 相澤
慎一*¹, 北田 邦雄*², 堀井 郁生*², 菅野 純: ベンゼン白
血病: その遺伝子毒性発がんのエピジェネティック発が
ん
第24回日本分子生物学会年会 (2002.12)
*¹ 熊本大学・発生医学研究センター
*² 日本ロシュ研

平林容子, Yoon Byung-II, 児玉幸夫, 菅野 純, 井上
達: コネキシン32の白血病発症における役割
2001年度コネキシン研究会 (2001.12)

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Huo, Y., Kodama, Y., Kanno,
J., Otto, T. *, Willecke, K. *, Inoue, T.: Connexin-32
functions in the steady state hemopoiesis as well as in the
chemical leukemogenesis
American Society of Hematology Forty-third Annual
meeting (2001.12)
* Bonn University

平林容子, 尹 秉一, 霍 艶, 川崎 靖, 児玉幸夫, 菅

野 純, 井上 達: コネクシン欠失造血障害モデル
第18回日本疾患モデル学会総会 (2001. 11)

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Aizawa, S-I. *, Kaneko, T., Kanno, J., Inoue, T.: **genomics-array displays the differences in mechanism of benzene leukemogenicity between one in p53-deficiency and the other in the wild-type C57BL/6 mice.**

15th International Mouse Genome Conference (2001. 10)

* Kumamoto University

平林容子, 霍 艶, 児玉幸夫, 菅野 純, 黒川雄二*, 井上 達: **細胞間ギャップ結合コネクシン32の骨髄における機能的役割: 正常造血状態と障害後の再生状態について**

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

* 佐々木研究所

川崎 靖, 平林容子, 尹 秉一, 霍 艶, 金子豊蔵, 黒川雄二*, 井上 達: **ベンゼン (Bz) の実験白血病発症機構の研究: p53KO マウスに対する吸入暴露による白血病の好発**

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

* 佐々木研究所

井上 達, 平林容子, 尹 秉一, 川崎 靖, 児玉幸夫, 金子豊蔵, 菅野 純, 黒川雄二*¹, 相澤慎一*²: **ベンゼン白血病のp53欠失マウスと野生型マウスにおける異なった発症メカニズムについて**

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

*¹ 佐々木研究所

*² 熊本大学

Yoon, B-I., Hirabayashi, Y., Kanno, T., Kodama, Y., Kanno, J., Yodoi, J.*¹, Kim, D-Y.*², Inoue, T.: **Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (TCDD)-induced Hematotoxicity**

Dioxin 2001: 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (2001. 9)

*¹ Kyoto University

*² Seoul National University

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Hou, Y., Kodama, Y., Kanno, J., Inoue, T.: **Role of connexin-32 gap junction in normal and regenerating hemopoiesis.**

30th Annual Meeting of the International Society for

Experimental Hematology (2001. 8)

Inoue, T., Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kanno, J., Aizawa, S-I. *, Kaneko, T.: **Mechanism of benzene leukemogenicity: Genotoxic leukemogenesis in p53-deficiency vs. Epigenetic leukemogenesis in wild type.**

30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (2001. 8)

* Kumamoto University

Minehata, K.*¹, Sekine, K.*¹, Hara, T.*², Donovan, P.*³, Hirabayashi, Y., Inoue, T., Miyajima, A.*¹: **A role for OncostatinM in the bone marrow Hematopoietic microenvironment.**

Presidential Symposium

30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (2001. 8)

*¹ The University of Tokyo

*² The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

*³ Thomas Jefferson University

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Hou, Y., Kodama, Y., Kanno, J., Willecke, K. *, Inoue, T.: **Role of Connexin-32 gap junction: Normal hemopoiesis vs. regenerating state.**

2001 International Gap Junction Conference (2001. 8)

* Bonn University

Inoue, T., Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Hou, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Willecke, K. *: **Role of Connexin-32 on leukemogenesis: Genotoxic vs. Epigenetic.**

2001 International Gap Junction Conference (2001. 8)

* Bonn University

Hirabayashi, Y., Yoon, B-I., Huo, Y., Kodama, Y., Kanno, J., Willecke, K. *, Inoue, T.: **Role of connexin-32: Steady state hemopoiesis and leukemogenesis-a possible disease model lacked with connexin-32.**

Mouse Initiatives III: Modeling the Human Genome and Disease (2001. 8)

* Bonn University

Yoshida, K. *, Hirabayashi, Y., Inoue, T.: **Calorie restriction reduces the incidence of radiation-induced myeloid leukemia.**

European conference on Nutrition & Cancer (2001. 6)

* National Institute of Radiological Sciences

平林容子, 井上 達: チオレドキシシン過剰発現マウスの環境ストレス耐性シンポジウム1「酸化的DNA障害の分子機構」

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

霍 艶, 平林容子, 五十嵐勝秀, 尹 秉一, 川崎 靖, 児玉 幸夫, 金子 豊蔵, 菅野 純, 井上 達: **Is Nrf2 involved in benzene metabolic pathway?**

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

Tanaka, M.*, Sawada, U.*, Horie, T.*, Aizawa, S.*, Hiramoto, M.*, Aisaki, K. and Kanno, H.*: **Ineffective erythropoiesis in the mutant mice with deficiency of pyruvate kinase activity.**

30th Annual Meeting of International Society for Experimental Hematology, (2001. 8)

* Nihon University

松島裕子, 井上 達, 菅野 純: 子宮肥大反応の特性について

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

菅野 純, 松永信人, 吉村 功: 子宮肥大試験等, 実験動物を用いた相加相乗性の検討の際の統計解析

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

霍 艶, 平林容子, 川崎 靖, 児玉幸夫, 金子豊蔵, 菅野 純, 井上 達: **Is Nrf2 involved in benzene metabolic pathway?**

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質のリスク評価—受容体原生毒性としての考察—

第7回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会 合同研究発表会 (2001. 8. 27)

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質—受容体原生毒性としての考察

日本病理学会 (2001. 4)

平林容子, 淀井淳司, 菅野 純, 鈴木幸子, 尹秉一, 内田雄幸, 梅村隆志, 川崎 靖, 黒川雄二, 井上 達: **Trx/ADF 遺伝子改変マウスのパラコート抵抗性**

日本病理学会 (2001. 4)

菅野 純: 内分泌かく乱化学物質問題と飼料中ホルモン活性成分について

日本実験動物科学技術大会日本実験動物飼料協会 (共催団体シンポジウム) (2001. 5. 8)

Kanno, J., Matsunaga, N., Yoshimura, I.: **Evaluation Method for synergism and its application on in vivo studies for endocrine disruptor**

International Conference on Statistical Challenges in Environmental Health Problems (2001. 8)

Kanno, J.: **Reverse Toxicology as future predictive toxicology**

Toxicogenomics International Forum 2001 (2001. 10)

橋本せつ子*, 小野 敦, 浅野和信*, 大藤 努*, 井上 達, 菅野 純: 表面プラズモン共鳴センサーを用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法

第74回 日本生化学会大会 (2001. 10)

*ピアコア株式会社

Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.*: **Mesp1 and Mesp2 are required cell-autonomously for the cardiac precursor development in mice**

The 14th International Congress of Developmental Biology (2001. 7)

*国立遺伝学研究所

Kitajima, S., Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.*: **Mesp1 is the earliest sign of cardiovascular development in mice**

Mouse Molecular Genetics Meeting (2001. 8)

*国立遺伝学研究所

北嶋 聡, 高木篤也, 富田幸子*¹, 井上 達, 相賀裕美子*²: 転写因子 Mesp1 の発現を指標とした心臓形成における細胞系譜の解析

第24回日本分子生物学会 (2001. 12)

*¹ 東京女子医大

*² 国立遺伝学研究所

高木篤也, 菅野純, 井上達: ES細胞の分化に及ぼすTCDDの影響

第28回日本トキシコロジー学会 (2001. 6)

Takagi, A., Kitajima, S., Takahashi, Y., Inoue, T., Rawls, A., and Saga, Y.*: **Synergistic function of Mesp2 and Paraxis on the vertebral development.**

Somite meetings in Nara (2001. 7)

*国立遺伝学研究所

Takagi, A., Igarashi, K., Takahashi, Y., Kanno, J., and Inoue, T.: **Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in culture.**

The 21st International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs, Korea. (2001. 9)

Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H. and Saga, Y.*: **Dynamic change in Mesp2 expression is essential for modulating Notch signaling to form rostro-caudal polarity in somites.**

The 14th International Congress of Developmental Biology (2001. 7)

*国立遺伝学研究所

Takahashi, Y., Inoue, T. and Saga, Y.*: **Interactions between Dll1 and Mesp2 are essential for modulating Notch signaling to establish segmental pattern in somitogenesis.**

Somite meetings in Nara (2001. 7)

*国立遺伝学研究所

Takahashi, Y., Inoue, T. and Saga, Y.*: **Interactions between Dll1 and Mesp2 are essential for modulating Notch signaling to establish segmental pattern in somitogenesis.**

Mouse Molecular Genetics Meeting (2001. 8)

*国立遺伝学研究所

上野将也*, 五十嵐勝秀, 木村直紀*, 沖田圭介*, 滝沢牧子*, 下村泰三*, 高倉伸幸*, 須田年生*, 北村俊雄*, 信久幾夫*, 中島欽一*, 田賀哲也*: **造血幹細胞の起源であるマウス胎仔背側大動脈での endomucin の発現とその機能** (2001. 12)

*熊本大学

Koizumi, S., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Obama, T. and Inoue, K.: **P2Y receptor-mediated Ca²⁺ signaling in the capsaicin-sensitive dorsal root ganglion neurons.**

International Society for Neurochemistry (2001. 8)

小泉修一, 津田誠, 重本(最上)由香里, 井上和秀: **ATP を介する神経細胞-アストロサイト連関** Neuro2001 (2001. 9)

井上和秀, 津田誠, 小泉修一: **ATP と痛み** Neuro2001 (シンポジウム) (2001. 9)

Koizumi, S., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Obama, T. and Inoue, K.: **Involvement of P2Y receptors in capsaicin-sensitive rat dorsal root ganglion neurons.**

31st Society for Neuroscience (2001. 11)

溝腰朗人, 津田誠, 重本(最上)由香里, 小泉修一, 井上和秀: **神経因性疼痛モデル動物の脊髄内ミクログリアにおける p38MAPK の活性化**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

井上和秀, 津田誠, 重本(最上)由香里, 小泉修一: **A/J マウス P2X3 受容体発現制御変化と痛み**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

津田誠, 重本(最上)由香里, 溝腰朗人, 小泉修一, 井上和秀: **ミクログリアでの低用量ATP誘発Ca²⁺応答におけるP2X受容体サブタイプの関与と痛みにおける役割**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

小泉修一, 藤下加代子, 津田誠, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 井上和秀: **ATP を介した海馬アストロサイトの神経伝達制御**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

藤下加代子, 小泉修一, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 井上和秀: **ラット海馬初代培養アストロサイトにおける内在性ATP誘発細胞間Ca²⁺ wave 伝播の解析**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

宮竹真由美*, 小泉修一, 藤下加代子, 津田誠, 成田年*, 鈴木勉*, 井上和秀: **Dopamine による海馬初代astrocyte の細胞内calcium濃度上昇機構**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

*星薬科大学

井上かおり*, 小泉修一, 藤原重良*, 傳田澄美子*, 井上和秀, 傳田光洋*: **ヒト正常表皮角化細胞に vanilloid receptor subtype 1 が存在する**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

*資生堂

重本(最上)由香里, 小泉修一, 津田誠, 小濱とも子, 井上和秀: **サイトカインは無血清によるPC12細胞死を抑制する**

第75回日本薬理学会 (2002. 3)

Koizumi, S. and Inoue, K.: **A dynamic regulation by astrocytic ATP of synaptic transmission in the**

hippocampus.

The 3rd International Symposium for Brain Function
(2002. 5)

佐藤薫, 松木則夫*, 中澤憲一, 大野泰雄: 培養アストロサイトのグルタミン酸取り込みに対するエストロゲンおよびその類縁物質の作用

第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)

*東京大学

澤英明, 中澤憲一, 野沢玲子*, 竹内幸一*, 大野泰雄: ATP受容体チャネルの多価カチオン感受性

第75回日本薬理学会総会 (2002. 3)

*明治薬科大学

Sato, K. Tamuki, M., Nakazawa, K., Ohno, Y.: The effect of estrogen and the related compounds on mossy fiber-CA3 synapses

31st Society for Neuroscience (2001. 11)

小澤正吾: ミレニアムプロジェクト 薬剤反応性解析 創薬基盤技術の開発に関するシンポジウム (2001. 7)

小澤正吾: ゲノム薬理と薬物相互作用

第48回日本臨床検査医学会総会 (2001. 8)

小澤正吾: 薬剤反応性遺伝子多型に基づくゲノム医療への取り組み

第11回日本医療薬学会年会 (2001. 9)

小澤正吾, 中島由起子, 村山典恵, 佐井君江, 斎藤嘉朗, 澤田純一: エステル型吸入喘息ステロイドの活性化に関わる薬物代謝酵素

第16回日本薬物動態学会年会 (2001. 10)

小澤正吾: ミレニアムプロジェクト (薬剤反応性) の進展状況

日本学術会議生物系薬学研究連絡委員会シンポジウム (2002. 2)

岡崎 治*¹, 糸川健一*¹, 馬場隆彦*², 桐田史朗*², 吉村義信*³, 青山英嗣*³, 山田泰弘*⁴, 福田勝行*⁴, 石谷祥彦*⁵, 中川俊人*⁵, 嶋田 薫*⁶, 村瀬茂夫*⁶, 篠内桃子, 酒見和枝, 大野泰雄: 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・有効性評価法の確立に関する研究 (3) 非凍結ヒト肝細胞を用いたCYP3A4酵素の誘導評価法の検討

第16回薬物日本動態学会 (2002. 10)

*¹ 第一製薬(株) 創剤代謝研究所

*² 塩野義製薬(株) 新薬研究所

*³ 武田薬品工業(株) 薬物機能第一研究所

*⁴ 田辺製薬(株) 薬物動態ユニット

*⁵ 中外製薬(株) 薬物動態研究所

*⁶ ファイザー製薬(株) 薬物動態研究所

篠内桃子, 酒見和枝, 馬場隆彦*¹, 桐田史朗*¹, 岡崎治*², 糸川健一*², 吉村義信*³, 青山英嗣*³, 山田泰弘*⁴, 福田勝行*⁴, 石谷祥彦*⁵, 中川俊人*⁵, 嶋田 薫*⁶, 村瀬茂夫*⁶, 石塚恒雄*⁷, 菊池高光*⁷, 大野泰雄: 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・有効性評価法の確立に関する研究 (4) 非凍結ヒト肝細胞を用いたCYP1A酵素の誘導評価法の検討

第16回薬物日本動態学会 (2002. 10)

*¹ 塩野義製薬(株) 新薬研究所

*² 第一製薬(株) 創剤代謝研究所

*³ 武田薬品工業(株) 薬物機能第一研究所

*⁴ 田辺製薬(株) 薬物動態ユニット

*⁵ 中外製薬(株) 薬物動態研究所

*⁶ ファイザー製薬(株) 薬物動態研究所

*⁷ 明治製薬(株) 薬物動態研究所

紅林秀雄: ビフェニルの代謝的活性化におけるヒトと実験動物との差

ヒューマンサイエンス振興財団支援研究成果発表会 (2001. 6)

紅林秀雄, 大野泰雄: ビフェニルの代謝活性におけるヒトと実験動物との差

第75回日本薬理学会年会 (2002. 3)

宇佐見誠, 満長克祥*, 大野泰雄: ヒト組み替え受容体を用いたピアコアバイオセンサーによる化学物質のエストロゲン受容体結合能のスクリーニング

日本動物実験代替法学会第15回大会 (2001. 8)

*東邦大学

宇佐見誠: 化学物質の発生毒性のプロテオミクス的手法による解析の可能性と問題点

第2回生殖・発生毒性学東京セミナー (2001. 11)

大野泰雄: 創薬におけるヒト組織の利用: 動態・薬効・副作用/個人差・相互作用ガイドスに関するQ & A 第8回HAB協議会学術年会 (2001. 5)

大野泰雄: リスクアセスメントの新しい流れ 日本トキシコロジー学会教育講演 (2001. 6)

Ohno, Y.: ICH guidelines, Implementation of the Three Rs: Incorporating Best Scientific Practices into the Regulatory Process. ICLAS-CCAC International Symposium on Regulatory Testing and Animal Welfare International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)/Canadian Council on Animal Care (CCAC) 主催「行政試験と動物福祉についての国際シンポジウム」(2001.6)

大野泰雄, 泉二奈緒美*: イギリスの地域研究倫理委員会, ヒト組織の研究開発への利用(平滑筋・代謝研究及びヒト組織利用の倫理) ヒューマンサイエンス振興財団支援研究成果発表会(2002.6)

*生体科学研究所

大野泰雄: 薬の相互作用について 国立医薬品食品衛生研究所一般公開日市民講演会(2001.7)

大野泰雄: 「薬物相互作用の検討方法について」および「医薬品の臨床薬物動態試験について」 公定書協会講演(2001.8)

大野泰雄: “ヒトへの作用を知るには、やはりヒトの細胞か?” 眼粘膜刺激性試験-in vitroの立場から 日本動物実験代替法学会ディベート(2001.8)

大野泰雄: 動物実験代替法 第132回日本獣医学会学術集会(2001.10)

三浦 慎一*¹, 繁原 英治*¹, 森田 繁道*², 田端 滋*², 藤崎 浩*³, 有馬 徳行*³, 馬場 隆彦*⁴, 三瀬 雅史*⁵, 寺内 嘉章*⁵, 松本 茂樹*⁶, 大西 修平*⁶, 神山 佳輝*⁷, 野口 清*⁷, 紅林 秀雄, 大野 泰雄: 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・有効性評価法の確立に関する研究(5) 凍結ヒト肝細胞を用いた薬物代謝活性の施設間比較検討 第16回日本薬物動態学会(2001.10)

*¹ 三共

*² アベンティスファーマ

*³ ウェルファイド

*⁴ 塩野義製薬

*⁵ 大日本製薬

*⁶ 持田製薬

*⁷ 山之内製薬

藤崎 浩*¹, 有馬 徳行*¹, 森田 繁道*², 田端 滋*², 繁原 英治*³, 三浦 慎一*³, 馬場 隆彦*⁴, 寺内 嘉章*⁵, 三瀬 雅史*⁵, 松本 茂樹*⁶, 大西 修平*⁶, 神山 佳輝*⁷, 野口 清*⁷, 大野 泰雄: 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・有効性評価法の確立に関する研究(6) 凍結ヒト肝細胞を用いた薬物代謝データとin vivoデータとの比較 第16回日本薬物動態学会(2001.10.18)(神戸)

*¹ ウェルファイド

*² アベンティスファーマ

*³ 三共

*⁴ 塩野義製薬

*⁵ 大日本製薬

*⁶ 持田製薬

*⁷ 山之内製薬

大野泰雄: 凍結保存ヒト肝細胞の機能(薬物代謝活性を中心に) 第28回日本低温医学会総会(2001.11)

Ohno, Y.: New Japanese guidance for drug-drug interactions 5th International Conference on Drug-Drug Interactions. (2001.12)

大野泰雄: 臨床薬物動態ガイダンスから 生物系薬学研連シンポジウム(2002.2)

大野泰雄: 臨床試験との関係における非臨床試験実施タイミング 東大病院臨床試験セミナー(2002.3)

Ohno, Y. and Motoji, N.*: Ethics and ethics committee for use of human tissue to research purpose 第75回日本薬理学会年会(シンポジウム)(2002.3)

*生体科学研究所

古川文夫, 西川秋佳, 広瀬雅雄: ハムスターBOP発がんにおける発生部位の検討 第90回日本病理学会総会(2001.4)

西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄: LECラットの肝病変発症に及ぼす抗酸化物質の影響 第90回日本病理学会総会(2001.4)

古川文夫, 西川秋佳, 若林敬二*, 広瀬雅雄: COX-2 inhibitorによるハムスターBOP隣発がんの抑制 第8回日本がん予防研究会(2001.7)

*国立がんセンター研究所

山岸 恵, 西川秋佳, 古川文夫, 越阪部奈緒美*, 滝沢登志雄*, 広瀬雅雄: カカオポリフェノール (CLPr) のPhIP誘発ラット乳腺発がんに対する修飾作用
第8回日本がん予防研究会 (2001. 7)

*明治製菓(株)栄養機能研究所

西川秋佳, 孫 和永, 山岸 恵, 岡崎和志, 今沢孝喜, 古川文夫, 広瀬雅雄: カフェインと甲状腺刺激要因によるラット甲状腺発がんの相乗的促進
第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

山岸 恵, 西川秋佳, 岡崎和志, 古川文夫, 今沢孝喜, 越阪部奈緒美*, 広瀬雅雄: カカオポリフェノール (CLPr) の雄性ラット多臓器発がんに対する修飾作用
第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

*明治製菓(株)栄養機能研究所

李 仁善*, 李 成喜*, 孫 和永, 古川文夫, 西川秋佳: 韓国産 *Saururus chinensis* による抗癌および抗酸化効果

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

*韓国啓明大学理学部

Mori, Y.* , Koide, A.* , Kobayashi, Y.* , Nishikawa, A., Furukawa, F. and Hirose, M.: Influences of cigarette smoke and/or MeIQx on the metabolic activation of environmental carcinogens by rat liver,

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*岐阜薬科大学

Nakajima, M.*¹, Kikuchi, M.*¹, Masumori, S.*¹, Tanaka, J.*¹, Inagaki, S.*¹, Furuya, Y.*¹, Nishikawa, A. and Kinae, N.*²: Genetic response of 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) in several *in vivo* mutagenicity tests

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*¹ 食品農医薬品安全性評価センター

*² 静岡県立大学食品栄養科学部

Nishikawa, A., Furukawa, F., Okazaki, K., Yamagishi, M., Koide, A.* , Mori, Y.* and Hirose, M.: Enhancement by cigarette smoke exposure of MeIQx-induced liver and colon carcinogenesis in rats

8th International Conference on Environmental Mutagens

(2001. 10)

*岐阜薬科大学

Nishikawa, A., Suzuki, T., Masumura, K., Okazaki, K., Yamagishi, M., Furukawa, F., Nohmi, T. and Hirose, M.: Transgenic reporter genes in mice for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

Nishikawa, A.: Chemopreventive effects of a COX-2 inhibitor nimesulide on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP)-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters

1st International Symposium on Recent Progress in Biosciences and Its Industrial Application, Invited Lecture (2001. 11)

Nishikawa, A., Son, H-Y., Imazawa, T., Okazaki, K. and Hirose, M.: Modifying effects of 17 β -estradiol 3-benzoate on thyroid tumorigenesis in gonadectomized rats induced by *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine

6th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies (2002. 2)

Nishikawa, A., Furukawa, F., Okazaki, K., Umemura, T., Wakabayashi, K.* and Hirose, M.: Prevention by nimesulide of *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters

6th International Symposium on Predictive Oncology and Intervention Strategies (2002. 2)

*国立がんセンター研究所

岡崎和志, 岡崎修三*, 西村進*, 中村英明*, 北村泰樹*, 畠山和久*, 中村 厚*, 津田敏治*, 勝亦俱慶*, 西川秋佳, 広瀬雅雄: Enhanced OECD Test Guideline 407に基づくMethoxychlorの28日間反復投与毒性試験
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001. 6)

*(株)ボゾリサーチセンター

岡崎和志, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 山岸 恵, 中村英明, 広瀬雅雄: BITCの同時投与によるラットBBN膀胱発がんの抑制

第8回がん予防研究会 (2001. 7)

岡崎和志, 西川秋佳, 古川文夫, 今沢孝喜, 山岸 恵, 広瀬雅雄: MNNG誘発ラット胃発がんに対するアスコルビン酸と亜硝酸塩併用投与の用量相関性

第60回日本癌学会(2001.9)

岡崎和志, 西川秋佳, 増村健一, 孫 和永, 今沢孝喜, 梅村隆志, 能美健彦, 広瀬雅雄: *gpt delta* ラット及びマウスを用いた臭素酸カリウム12週間投与による腎遺伝毒性の検索

第18回毒性病理学会(2002.1)

梅村隆志, 児玉幸夫, 日置恭司^{*1}, 西川秋佳, 今沢孝喜, 岡崎和志, 広瀬雅雄, 井上 達, 野村達次^{*1}, 黒川雄二^{*2}: *rasH2* マウスにBHTを組み合わせた肺発がん物質早期検出モデル開発の試み

第18回毒性病理学会(2002.1)

^{*1} 実中研

^{*2} 佐々木研

今沢孝喜, 西川秋佳, 中村英明, 宮内 慎, 畝山智香子, 広瀬雅雄: ビンクリスチンの神経毒性に対するグルタミン酸の軽減効果

第60回日本癌学会総会(2001.9)

今沢孝喜, 西川秋佳, 曾根秀子*, 梅村隆志, 岡崎和志, 広瀬雅雄: LECラット肝におけるHNE 修飾蛋白およびHSP60 蛋白の発現について

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*国立環境研

上田 誠, 三森国敏*, 小野寺博志, 高木久宜, 安原加壽雄, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: *p53* ノックアウトCBA マウスを用いた子宮発癌モデルにおける内分泌攪乱化学物質の子宮発癌修飾作用について

第28回日本トキシコロジー学会学術年会(2001.6)

*東京農工大学

上田 誠, 仁保直子, 小野寺博志, 瀧澤 保, 渋谷 淳, 今井俊夫, 広瀬雅雄: GenisteinのDMBA誘発ラット乳腺腫瘍に対する修飾作用

第60回日本癌学会総会(2001.9)

今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤 保, 上田 誠, 広瀬雅雄: DHPN誘発ラット甲状腺腫瘍におけるEGF receptor, TGF- β の発現

第60回日本癌学会総会(2001.9)

瀧澤 保, 安原加壽雄, 三森国敏*, 今井俊夫, 小野寺博志, 上田 誠, 田村 啓, 高木久宜, 広瀬雅雄: CB6F1-Tg-rasH2マウスの胃粘膜に対するcatecholの発癌感受性

第60回日本癌学会総会(2001.9)

*東京農工大学

伊藤純子*, 三森国敏*, 安原加壽雄, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: ウレタンイニシエーション処置*rasH2* マウスにおけるグリセロールの肺発癌修飾作用

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*東京農工大学

峰村由貴恵*, 三森国敏*, 安原加壽雄, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: NNKイニシエーション処置*rasH2* マウスにおける2,6-dimethylanilineの鼻腔発癌修飾作用

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*東京農工大学

高橋明子*, 三森国敏*, 安原加壽雄, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: NNKイニシエーション処置*rasH2* マウスにおける2,6-dimethylanilineの肺腫瘍修飾作用

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*東京農工大学

今井俊夫, 瀧澤 保, 上田 誠, 小野寺博志, 広瀬雅雄: DHPN誘発ラット甲状腺腫瘍のプロGRESSION過程におけるEGF receptor, TGF- β 及びTSH receptorの関与

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

小野寺博志, 安原加壽雄, 梶谷高敏, 竹川 潔, 高木久宜, 上田 誠, 瀧澤 保, 今井俊夫, 三森国敏*, 広瀬雅雄: ベクチン分解物のF344ラットにおける癌原性試験

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*東京農工大学

上田 誠, 仁保直子, 今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤 保, 渋谷 淳, 広瀬雅雄: NonylphenolのDMH-DMBA誘発ラット乳腺および大腸腫瘍に対する修飾作用

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

瀧澤 保, 今井俊夫, 田村 啓, 上田 誠, 小野寺博志, 安原加壽雄, 高木久宜, 三森国敏*, 広瀬雅雄: 麩酸によるラット肝発癌修飾作用

第18回日本毒性病理学会(2002.1)

*東京農工大学

渋谷淳, 畝山智香子: PALMを用いたパラフィン包埋微量組織からのRNA, 蛋白質, DNAの解析について—メタカーン固定法の利用

第90回日本病理学会総会ランチョンセミナー (2001.4)

渋谷淳, 高橋則行, 広瀬雅雄: ラット肝発がんプロモーション過程に特異的に発現増加する遺伝子群の同定
第16回発癌病理研究会 (2001.8)

榊富直哉, 渋谷淳, 畝山智香子, 中川恵子, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: メトキシクロールの周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器系への影響について
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)

上田誠, 仁保直子, 小野寺博志, 瀧澤保, 渋谷淳, 今井俊夫, 広瀬雅雄: GenisteinのDMBA誘発ラット乳腺腫瘍に対する修飾作用
第60回日本癌学会総会 (2001.10)

高橋則行, 渋谷淳, 畝山智香子, 榊富直哉, 西川秋佳, 広瀬雅雄: ラット肝中期発がん試験法のプロモーション過程で恒常的に発現が上昇した遺伝子群の特性
第60回日本癌学会総会 (2001.10)

渋谷淳, 畝山智香子, 仁保直子, 高橋則行, 榊富直哉, 三森国敏, 広瀬雅雄: p53 (+/-) CBA マウスENU誘発子宮腫瘍モデルにおける ethinylestradiol による発癌促進作用下でのエストロジェン応答性遺伝子の発現
第60回日本癌学会総会 (2001.10)

畝山智香子, 渋谷淳, 榊富直哉, 高橋則行, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの多目的な遺伝子発現解析 (第三報)
第60回日本癌学会総会 (2001.10)

Makoto Shibutani, Takuro Arimura, Masao Hirose: **Molecular profiling of genes showing altered expression in the livers of rats treated with non-genotoxic carcinogens for 28 days.**

International Symposium of Environmental Endocrine Disruptors (2001.12)

高木広憲, 渋谷淳, 榊富直哉, 畝山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 三森国敏^{*1}, 広瀬雅雄: Diisononylphthalate および Genistein の周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器系への影響について
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)

^{*1} 東京農工大学

榊富直哉, 渋谷淳, 高木広憲, 畝山智香子, 高橋則行,

有村卓朗, 広瀬雅雄: エチニルエストラジオールの周産期曝露により誘発されるラット内分泌・生殖器系の変化に及ぼす実験動物用飼料の影響について
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)

有村卓朗, 渋谷淳, 高橋則行, 畝山智香子, 高木広憲, 石田誠一, 小澤正吾, 澤田純一, 広瀬雅雄: 非遺伝子傷害性肝発がん物質投与によって発現の変化する遺伝子群のカタログ化
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)

上田誠, 仁保直子, 今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤保, 渋谷淳, 広瀬雅雄: NonylphenolのDMH-DMBA誘発ラット乳腺および大腸腫瘍に対する修飾作用
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)

畝山智香子, 渋谷淳, 高橋則行, 有村卓朗, 高木広憲, 広瀬雅雄: ラット肝二段階発がんモデルにおける p53 関連遺伝子及び増殖関連遺伝子産物の変動について
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)

渋谷淳, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: 発がん性検出のための Toxicogenomics - ラットにおける非遺伝子傷害性肝発がん物質投与による発現遺伝子のプロファイリング (ミニシンポジウム)
日本薬学会 第122年会 (2002.3)

広瀬雅雄: がんと抗酸化物質
第22回油化学酸化セミナー (2001.4)

広瀬雅雄: 臓器毒性・毒性試験 (変異原性, 発がん性)
2001年度日本トキシコロジー学会講習会 (2001.7)

広瀬雅雄, 今井俊夫: DHPNラット甲状腺発がんのプログレーション過程における遺伝子発現
第91回日本病理学会総会 (2002.3)

広瀬雅雄: Effects of EDCs on Chemical Carcinogenesis
KFDA/NITR Endocrine Disruptors International Symposium (2001.11)

Takai, A.^{*1}, Watabe, Y.^{*1}, Ueno, K.^{*2}, Hayashi, M.: Fish micronucleus test using kidney, gill and erythrocytes
8th International Conference on Environmental Mutagens (2001.10)

^{*1} Osaka Shin-Ai College

^{*2} Kinki University

Hamada, S.*¹, Kukita, K.*¹, Nakajima, K.*², Serikawa, T.*², Hayashi, M.: **Evaluation of the micronucleus assay using rat: The sex related differences**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*¹ SSP Co., Ltd.

*² Graduate School of Medicine, Kyoto University

Sofuni, T.*¹, Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr.*², Miura, K.F.*¹, Shimizu, H.*³, Suzuki, Y.*³, Morimoto, K.*⁴, Shimizu, M.*⁴, Mure, K.*⁴, Koshi, K.*⁵, Matsushima, T.*⁶: **Micronucleus induction vs. chromosome aberration induction: A Japanese MOL collaborative study using CHL/IU cells**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*¹ Olympus Optical Co., Ltd.

*² Chemical Safety Evaluation Center

*³ The Jikei University School of Medicine

*⁴ Osaka University School of Medicine

*⁵ National Institute of Industrial Health

*⁶ Japan Bioassay Research Center

Hayashi, M.: **New attempts and establishment of evaluation systems for genotoxicity**

XXVII Annual Conf. Environ. Mutagen. Soc. India & Symposium on Environ. Genomics & Health Sci. (2002. 3)

山田勉也*, 小原有弘, 鈴木孝昌, 林 真, 水谷隆治*, 佐伯憲一*: **遺伝子導入マウス (MutaTMMouse) を用いた三環性含窒素芳香族化合物の *in vivo* 突然変異誘発頻度と変異スペクトルの検討**

第47回日本薬学会東海支部大会 (2001. 7)

*名古屋市立大学大学院薬学研究科

竹本育世*, 鈴木孝昌, 小原有弘, 山田勉也*, 林 真, 水谷隆治*, 佐伯憲一*: **キノリンの4位アルキル置換による *in vivo* 変異原性への影響**

第47回日本薬学会東海支部大会 (2001. 7)

*名古屋市立大学大学院薬学研究科

本間正充: **遺伝子変異とバイオリジカルリレバンス**

日本組織培養学会第74回大会・第15回日本動物実験代替法学会大会・合同学術大会 (2001. 8)

鈴木孝昌, 小原有弘, 本間正充, 大和田智彦*, 林真: **dibenzo[*a,l*]pyrene (DBP) および furylfuramide (AF-2) のマウスに対する遺伝子傷害性**

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

*東京大学大学院薬学系研究科

小原有弘, 鈴木孝昌, 大和田智彦*, 本間正充, 林真: **ジメチルアニリン異性体のマウスに対する遺伝子傷害性**

第60回日本癌学会総会 (2001. 9)

*東京大学大学院薬学系研究科

Wang, W., Seki, M.*¹, Narita, Y.*¹, Sonoda, E.*², Takeda, S.*², Yamada, K.*³, Honma, M., Hayashi, M., Enomoto, T.*¹: **Possible involvement of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*¹ 東北大学薬学部

*² 京都大学医学部

*³ 国立栄養研究所

Honma, M.*, Hakura, A.*, Miura, K.F.*, Morita, T.*, Nakayama, S.*, Oka, H.*, Sato, S.*, Sugiki, Y.*, Yamashita, Y.*, Wakata, A.*, Wakuri, S.*, Hayashi, M.*: **Establishment of a multiple-endpoint genotoxicity test system based on human cells**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*MMS研究会ヒト細胞共同研究会

Kohara, A., Suzuki, T., Honma, M., Ohwada, T.*, Hayashi, M.: **Mutagenic properties of aristolochic acid in the *lambda/lacZ* transgenic mice (MutaTMMouse)**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*東京大学大学院薬学系研究科

Asano, N.*¹, Nishikawa, T.*², Nakagawa, Y.*³, Haresaku, M.*², Suzuki, T., Hayashi, M.: **CSGMT collaborative study on rodent skin micronucleus assay**

8th International Conference on Environmental Mutagens (2001. 10)

*¹ 日東電工(株)

*² ライオン(株)

*³ (財)食品薬品安全性センター

Ali, R., Suzuki, T., Kohara, A., Honma, M., Kikuchi, Y., Hayashi, M.: ***In vivo* genotoxicity of mycotoxins; ochratoxin, nivarenol, T-2 toxin, and patulin, by comet, micronucleus and transgenic mouse mutation assays**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001. 10)

Suzuki, T., Kohara, A., Honma, M., Sakamoto, H.,
Hayashi, M.: Gene-expression analysis by the Atlas™
glass microarray after gamma-ray, 4NQO, and MMS
exposure to the human lymphoblastoid TK6 and WTK1
cells

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001. 10)

Honma, M.: Chromosomal instability in B-lymphoblastoid
cell lines from Werner's and Bloom's syndrome
patients

Shanghai Satellite Meeting for 8th ICEMS, 9th Alexander
Hollander Course (2001. 10)

後藤佐智子*^{1,2}, 泉雅子*¹, 本間正充, 鈴木啓司*², 渡
邊正巳*², 谷田貝文夫*¹: 自然突然変異誘発に関わる組
換え頻度上昇への変異 p53 蛋白の関与

日本放射線影響学会第44回大会 (2001. 10)

*¹ 理化学研究所

*² 長崎大学薬学部

森本茂子*¹, 加藤武司*¹, 本間正充, 後藤佐智子*¹, 泉
雅子*¹, 花岡文雄*¹, 谷田貝文夫*¹: 低線量電離放射線
照射によるヒト細胞での TK 突然変異

日本放射線影響学会第44回大会 (2001. 10)

*¹ 理化学研究所

後藤佐智子*^{1,2}, 泉雅子*¹, 本間正充, 鈴木啓司*², 渡
邊正巳*², 谷田貝文夫*¹: 自然突然変異誘発に関わる組
換え頻度上昇への変異 p53 蛋白の関与

第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

*¹ 理化学研究所

*² 長崎大学薬学部

Wang, W., Honma, M., Seki, M.*¹, Takao, N.*²,
Yamamoto, K.*², Hayashi, M., Enomoto, T.*¹: ATM
partly suppress increased homologous recombination
caused by BLM defect

第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

*¹ 東北大学薬学部

*² 金沢大学がん研究所

本間正充, 王文晟, 桜庭真弓, 田所聡, 泉雅子*, 谷田
貝文夫*, 林真: 制限酵素 I-SceI 発現系を用いたヒト細胞
における DNA 2本鎖切断修復の解析

第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

*理化学研究所

Kato, T.*¹, Honma, M., Morimoto, S.*¹, Yatagai, F.*¹: Fine
mapping of low events in spontaneous TK⁻ mutants of the
human lymphoblastoid cell line TK6

The 2nd International Workshop on Space Radiation
Research (2002. 3)

*理化学研究所

Honma, M., Wang, W., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Izumi,
M.*¹, Yatagai, F.*¹, Hayashi, M.: Repair of DNA double
strand breaks in human cells induced by restriction
enzyme I-SceI

The 2nd International Workshop on Space Radiation
Research (2002. 3)

*理化学研究所

山田勉也*, 鈴木孝昌, 小原有弘, 加藤隆明*, 加瀬朋
子*, 水谷隆治*, 林 真, 佐伯憲一*: 遺伝子導入マウ
ス (Muta™ Mouse) を用いた *in vivo* 変異原性試験系に
よる 3-benzoylaminoquinoline の抗変異原活性の評価

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

*名古屋市立大学大学院薬学研究科

竹本育世*, 鈴木孝昌, 小原有弘, 山田勉也*, 林 真,
水谷隆治*, 佐伯憲一*: 遺伝子導入マウスを用いた *in
vivo* 変異原性試験におけるサンプリングタイムの重要性

日本薬学会第122年会 (2002. 3)

*名古屋市立大学大学院薬学研究科

Honma, M., Wang, W., Sakuraba, M., Tadokoro, S., Izumi,
M.*¹, Yatagai, F.*¹, Hayashi, M.: Repair of DNA double
strand breaks in human cells induced by restriction
enzyme I-SceI

The 33rd Annual Meeting of Environmental Mutagen
Society (2002. 4)

*理化学研究所

Kato, T.*¹, Honma, M., Morimoto, S.*¹, Yatagai, F.*¹: Fine
mapping of low events in spontaneous TK⁻ mutants of the
human lymphoblastoid cell line TK6

The 33rd Annual Meeting of Environmental Mutagen
Society (2002. 4)

*理化学研究所

本間正充: ほ乳類細胞における DNA 2本鎖切断修復と,
p53 によるゲノム安定化機構

平成14年度日本環境変異原学会公開シンポジウム
(2002.5)

Kim, S.-R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P., Nohmi, T.:
**DNA polymerase IV (*dinB*) of *Escherichia coli* : Cellular
expression levels and their effects on targeted and
untargeted mutagenesis**

The 1st annual meeting of HFSP awardees (2001.6)

柴田敦史*^{1,2}, 鎌田宣夫*³, 野崎中成*¹, 藤原久子*¹,
増村健一, 能美健彦, 小林静子*², 杉村隆*¹, 中釜齊*¹,
鈴木宏志*³, 益谷美都子*¹: ***Parp-1*欠損マウス骨髓細胞の
*in vivo*における自然突然変異**

第60回日本癌学会総会 (2001.9)

*¹ 国立がんセンター

*² 共立薬大

*³ 中外製薬

能美 健彦: **変異原性試験で何がわかるか: 21世紀の展望**

日本環境変異原学会第30回大会特別講演 (2001.10)

Kondo, H.*¹, Hayashi, H.*¹, Senju, N.*¹, Ogawa, M.*¹,
Masumura, M., Shindo, Y.*¹, Nohmi, T.: **Organ variation
and time-course study of mutagenicity induced by *N*-
ethyl-*N*-nitrosourea in *gpt delta* rat**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001.10)

*¹ 明治製菓

Hayashi, H.*¹, Kondo, H.*¹, Masumura, K., Shindo, Y.*¹,
Nohmi, T.: **A novel transgenic rat mutagenesis assay
system using *Spi*⁻ and 6-thioguanine selections**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001.10)

*¹ 明治製菓

Hoshino, M.*¹, Masumura, K., Yatagai, F.*², Ochiai, M.*³,
Ueda, O.*⁴, Suzuki, H.*⁴, Nakagama, H.*³, Fukuoka, M.*¹,
Nohmi, T.: **X-ray-induced mutations in the brain and
the spleen of *gpt delta* transgenic mouse**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001.10)

*¹ 昭和薬科大学

*² 理化学研究所

*³ 国立がんセンター研究所

*⁴ 中外製薬

Masumura, K., Totsuka, Y.*¹, Wakabayashi, K.*¹, Nohmi,
T.: **Strong genotoxicity of aminophenylnorharman
(APNH) in the liver of *gpt delta* transgenic mouse**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001.10)

* 国立がんセンター研究所

Yajima, N.*¹, Hyogo, A.*², Tamura, H.*³, Nakajima, M.*⁴,
Nohmi, T.: **A collaborative validation study for *gpt delta*
mouse using diethylnitrosamine, chlorambucil, *N*-propyl-
N-nitrosourea and mitomycin C**

8th International Conference on Environmental Mutagens
(2001.10)

*¹ 雪印ラビオ

*² 三共

*³ 日本新薬(株)

*⁴ 食品農医薬品安全評価センター

Nohmi, T., Masumura, K.: **Spectrum of deletion mutations
in vivo induced by environmental mutagens**

8th International Environmental Mutagen Society (2001.
10)

Kim, S.-R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P. Nohmi, T.:
**Cellular expression levels of DNA polymerase IV (*DinB*) in
*Escherichia coli***

8th International Conference of Environmental Mutagen
(2001.10)

Gruz, P., Shimizu, M., Yamada, M., Hayashi, I.*¹,
Morikawa K.*¹, Nohmi, T.: **Purification and characteri-
zation of the archaeal *DinB* homologue**

8th International Conference of Environmental Mutagen
(2001.10)

*¹ 生物工学研究所

Gruz, P., Pisani, F.M.*¹, Shimizu, M.*², Yamada, M.,
Hayashi, I.*³, Morikawa, K.*³, Nohmi, T.: **Purification
and biochemical characterization of the archaeal
representative of Y-family DNA polymerases**

The 3rd 3R symposium (2001.11)

*¹ イタリア国立蛋白質酵素学生化学研究所

*² 大妻女子大院・家政

*³ 生物工学研究所

増村健一, 星野真紀子*¹, 古川文夫, 西川秋佳, 能美健彦:
**マウス個体に誘発される自然突然変異及びDMN誘
発突然変異への加齢による影響**

第24回日本分子生物学会年会 (2001. 12)

*1 昭和薬大

清水雅富*1, Petr Gruz, 山田雅巳, 菅家祐輔*1, 能美健彦: 古細菌DNAホモログ *Sso* DNA Pol Y1 (DBH) によるDNA損傷部位の乗り越え

第24回日本分子生物学会年会 (2001.12)

*1 大妻女子大院・家政

Gruz, P., Pisani, F.M.*1, Shimizu, M.*2, Yamada, M., Hayashi, I.*3, Morikawa, K.*3, Nohmi, T.: Purification and biochemical characterization of the archaeal representative of Y-family DNA polymerases

ワークショップ, DNA損傷の修復開始としての損傷認識: 計算科学のおよび実験的アプローチ, 日本原子力研究所 東海研究所 (2001. 12)

*1 イタリア国立蛋白質酵素学生化学研究所

*2 大妻女子大院・家政

*3 生物工学研究所

Nohmi, T.: Transgenic rat *gpt* delta: a tool to analyze the different susceptibility of rats and mice to environmental mutagens and carcinogens

U.S.-Japan panel on environmental genomics and carcinogenesis (2002. 2)

Nohmi, T.: Molecular analysis of deletion mutations in vivo

Molecular toxicology seminar in UCLA (2002. 2)

Masumura, K., Horiguchi, M.*1, Ikehata, H.*2, Ono, T.*2, Nohmi, T.: Molecular nature of ultraviolet B light-induced base substitutions and deletions in murine epidermis

Gordon Research Conference "Mutagenesis and Carcinogenesis" (2002. 3)

*1 大妻女子大院・家政

*2 東北大学理学部院

Tanabe, H., Müller, S.*1, Neusser, M.*1, von Hase, J.*2, Calcagno, E.*2, Cremer, M.*1, Cremer, C.*2, Cremer, T.*1: Evolutionary conserved 3D positioning of orthologous chromosomes and chromosome segments in primate lymphoblastoid cell nuclei

Third European Cytogenetics Conference (2001. 7)

*1 Institute of Anthropology and Human Genetics, Ludwig Maximilians University, Germany

*2 Kirchhoff Institute of Physics, University of

Heidelberg, Germany

田辺秀之, 飯塚了太, 北條麻紀, 高田容子, 川原善浩, 樽松美治*, 増井 徹, 水沢 博: STR-PCR法によるHeLa細胞とその亜株についての解析と染色体の性状

日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験動物代替法学会・合同学術大会 (2001. 8)

*ヒューマンサイエンス振興財団

増井 徹, 高田容子, 林 真, 水沢 博: 正常上皮細胞の密度依存性増殖停止 (topoinhibition) で誘導されるヒトEti-1とマウスEti-1の比較

日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験動物代替法学会・合同学術大会 (2001. 8)

高田容子, 飯塚了太, 峯岸大輔, 樽松美治*, 川原善浩, 田辺秀之, 増井 徹, 水沢 博: STR-PCR法によるヒト細胞株の品質管理データの標準化に関する検討

日本組織培養学会第74回大会・第15回日本実験動物代替法学会・合同学術大会 (2001. 8)

*ヒューマンサイエンス振興財団

水沢 博: シンポジウム; 培養細胞研究資源データベースの構築

平成13年度日本生物工学会大会 (2001. 9)

田辺秀之, Thomas Cremer*, 林 真, 水沢 博: 3D-FISH法による interphase cytogenetics: 染色体テリトリーの3次元解析

日本人類遺伝学会第46回大会 (2001. 10)

* Institute of Anthropology and Human Genetics, Ludwig Maximilians University, Germany

Tanabe, H., Müller, S.*1, Neusser, M.*1, Habermann, F.A.*2, von Hase, J.*3, Calcagno, E.*3, Solovei, I.*1, Cremer, M.*1, Cremer, C.*3, Cremer, T.*1: Radial arrangements of chromosome territories in chicken and primate cell nuclei by multicolor 3D-FISH: Evolutionary considerations The 5th International Symposium on Chromosomal Aberrations-Perspectives for the 21st Century-MMS 20th anniversary meeting (2001. 10)

*1 Institute of Anthropology and Human Genetics, Ludwig Maximilians University, Germany

*2 Chair of Animal Breeding, Technical University of Munich, Germany

*3 Kirchhoff Institute of Physics, University of Heidelberg, Germany

田辺秀之：3D-FISH法による染色体テリトリーの3次元解析：これからのinterphase cytogenetics
第109回染色体研究会 (2002.4)

飯塚了太，田辺秀之，高田容子，北條麻紀，樽松美治*，増井 徹，水沢 博：STRプロファイルの長期継代培養における安定性：HeLa関連4細胞株を用いた解析
日本組織培養学会第75回大会 (2002.5)
*ヒューマンサイエンス振興財団

秦 宏樹*，増井 徹：再生医療を支えるもの—考え方と現実と私たち研究者にできること—
日本組織培養学会第75回大会，シンポジウム (2002.5)
*東京通信病院 産婦人科

田辺秀之，Marion Cremer*，Thomas Cremer*，北條麻紀，林 真，水沢 博：3D-FISH法によるヒト18番および19番染色体のトポロジー：間期核における染色体テリトリーの解析
第55回日本細胞生物学会・第35回日本発生生物学会・合同大会 (2002.5)
*ミュンヘン大学 生物学科Ⅱ—人類遺伝学

山本 讓*，伊藤義彦*，小泉睦子，鎌田栄一，長谷川隆一：2,4-ジニトロフェノールの新生児および若齢ラットにおける発現毒性および無毒性量の比較検討
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
*畜産安全性研究所

鷹野正生*，榎並倫宣*，小泉睦子，鎌田栄一，長谷川隆一：4-ニトロフェノールナトリウムの新生児および若齢ラットにおける発現毒性および無毒性量の比較検討
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
*ボゾリサーチ

緒方英博*，浜村政夫*，古川浩美*，小泉睦子，鎌田栄一，長谷川隆一：クロロフェノールの新生児および若齢ラットにおける発現毒性および無毒性量の比較検討
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
*パナファーム

山口真樹子*¹，伊藤義彦*¹，三森国敏*²，鎌田栄一，長谷川隆一：テトラブロモフェノールAの新生児ラットにおける哺育期投与毒性試験
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
*¹ボゾリサーチ
*²東京農工大

広瀬明彦，鎌田栄一，西川秋佳，紅林秀雄，江馬 眞，黒川雄二*，長谷川隆一：ホルムアルデヒドの経口および吸入曝露による毒性評価と水道水におけるリスクアセスメント
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
*佐々木研究所

池崎信一郎*，西村信雄*，池谷政道*，梅村健夫*，若林佐知子*，工藤佳代子*，中村 厚*，田村一利*，鎌田栄一，長谷川隆一：パラクミルフェノールの新生児ラットにおける雌性生殖器に対する影響 (第2報)
第18回日本毒性病理学会 (2002.1)
*ボゾリサーチ

Koizumi M, Yamamoto Y*¹, Ito Y*¹, Takano M*², Enami T*², Kamata E, Hasegawa R: Comparative study of the toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in young and newborn rats
The 41th Annual Meeting Society of Toxicology (2002.3)
*¹ Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology
*² Bozo Research Center Inc.

四方田千佳子，田頭洋子，岡田敏史：平成12年度の医薬品分析の技能試験
第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001.11)

前川京子，小出達夫，斎藤博幸，原園 景，江馬 眞，谷本 剛，岡田敏史：エルカトニン製剤の含量評価における問題点
第38回全国衛生化学技術協議会 (2001.11)

谷本 剛：ICH/原薬GMPガイドラインの実施に伴う，不純物プロファイルに基づく原薬の製造工程管理及び品質管理
第38回全国衛生化学技術協議会 (2001.11)

山本真由美*，公文道子*，斎藤博幸，中野 実*，半田哲郎*：脂質エマルションの粒子径による血漿アポリポ蛋白質選択性とそのリポリシスへの効果
第23回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2001.11)
*京都大学大学院薬学研究科

田中将史*¹，斎藤博幸，岡村恵美子*²，木村智大*²，中原 勝*²，半田哲郎*¹：アポリポ蛋白質A-Iによる脂質膜表面構造の認識
膜シンポジウム 2001 (2001.11)
*¹京都大学大学院薬学研究科

*2 京都大学化学研究所

斎藤博幸, Sissel Lund-Katz*¹, Karl H. Weisgraber*²,
Michael C. Phillips*¹: 脂質膜結合によって誘起される
アポリポ蛋白質Eの構造変化

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*¹ The Children's Hospital of Philadelphia

*² Gladstone Institute of Cardiovascular Disease

斎藤博幸: 膜構造によるアポリポタンパク質の機能制御
日本膜学会第24年会 (2002.5)

小出達夫, 渕野裕之, 高橋真理依, 関田節子, 佐竹元吉*,
谷本 剛, 岡田敏史: 南米産薬用植物 *Elephantopus*
mollis 由来セスキテルペンの抗リーシュマニア作用に関
する研究

日本薬学会第122年会 (2002.3)

* 日本薬剤師研修センター

中村優美子, 辻 澄子, 外海泰秀: ラットにおけるタン
ニン酸及びブドウ種子ポリフェノールの代謝

日本薬学会第122年会 (2002.3)

辻 澄子, 海野有紀子, 中村優美子, 外海泰秀: 食用黄
色5号アルミニウムレーキの不適事例について
第38回全国衛生化学技術協議会年会 (2001.11)

海野有紀子, 辻 澄子, 中村優美子, 外海泰秀: 食用赤
色104号及び105号中の不純物ヘキサクロロベンゼン含
有量調査

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

石光 進, 開原亜樹子, 吉井公彦, 津村ゆかり, 中村優美
子, 外海泰秀: 農産物中テクロフタラムのHPLC法による
分析

日本薬学会第122年会 (2002.3)

吉井公彦, 開原亜樹子, 津村ゆかり, 石光 進, 外海泰秀:
農薬標準品の水分含量

日本食品衛生学会第82回学術講演会 (2001.10)

石綿 肇: 日本人の食品添加物の摂取量について
第18回食品添加物技術研究会 (2001.6)

松野伸広*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 伊藤 武*, 坂井
千三*, 石綿 肇: 保存料のパラオキシ安息香酸エステ
ル類およびヘプチルエステルのHPLC分析法

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

* (財)東京顕微鏡院

水野竹美*, 金子旬一*, 加藤文秋*, 石橋 亨*, 伊藤
武*, 坂井千三*, 石綿 肇: 亜硝酸のHPLCけい光分
析におよぼすアスコルビン酸の影響

日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

* (財)東京顕微鏡院

江馬 真, 宮脇英美子: モノブチルフタレート of 妊娠及
び偽妊娠ラットにおける生殖機能に対する影響
第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)

原園 景, 江馬 真: 二塩化ジブチルスズの偽妊娠ラッ
トにおける脱落膜反応に対する影響

第28回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)

江馬 真: フタル酸エステルの雄性性分化に及ぼす影響
第7回環境ホルモン学会講演会-内分泌攪乱とアンドロ
ゲン- (2001.6)

江馬 真, 宮脇英美子: ラット雄胎児の性分化に及ぼす
モノブチルフタレートの影響

第40回日本先天異常学会学術集会 (2001.7)

Ema, M. Miyawaki, E.: Effects of progesterone on
suppression of uterine decidualization and implantation
failure induced by triphenyltin chloride in rats
2001 EUROTOX (2001.9)

Ema, M. Miyawaki, E.: Roles of progesterone on
suppression of uterine decidualization and implantation
failure induced by diphenyltin dichloride (DPTCI) in rats
Society of Toxicology, the 41st Annual Meeting (2002.3)

熊谷健夫: 甘草生産のための栽培および育種に関する研
究

甘草に関するシンポジウム (2001.7)

柴田敏郎: 寒冷地における薬用植物栽培と将来展望
第7回薬用植物シンポジウム広島 (2001.9)

熊谷健夫, 柴田敏郎, 畠山好雄, 吉松嘉代, 下村講一
郎: ケシの直接抽出法に関する研究 (1) 北海道におけ
る栽培法とアヘンアルカロイド含量について
日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

柏田良樹*, 間瀬 泉*, 池城安正*, 柴田敏郎, 熊谷健
夫, 畠山好雄: 栽培ダイオウ地上部の成分研究

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*新潟薬科大学

柴田敏郎, 細川敬三, 菱田敦之, 飯田 修, 酒井英二, 香月茂樹, 近藤誠三*¹, 岡 賢治*¹, 南 基泰*², 佐竹元吉*³: 茵陳蒿の生産について (6) カワラヨモギの生育・成分含量に及ぼす栽培地域の影響

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 小太郎漢方製薬(株)

*² 中部大学応用生物学部

*³ 日本薬剤師研修センター

Toshiro SHIBATA: Present Status and Prospects of Medicinal Plants in Japan

Korean Society of Medicinal Crop Science International Symposium 2001 (2001.11)

中根孝久, 関田節子, 佐竹元吉*¹, 細川敬三*², 畠山好雄, 柴田敏郎, 飯田 修, 香月茂樹: マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフェドリン含量 II-国内栽培試験種及び国外野生種-

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 日本薬剤師研修センター

*² 兵庫大学

菱田敦之, 姉帯正樹*¹, 林 隆章*¹, 青柳光敏*¹, 関田節子, 細川敬三*²: ヒナタイノコズチ *Achyranthes fauriei* の栽培研究-摘心処理の効果-

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 北海道立衛研

*² 兵庫大学

下村裕子, 関田節子, 佐竹元吉*¹, 徳川齊正*², 徳川真木*²: 徳川家康の薬「烏犀圓」V

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 日本薬剤師研修センター

*² 水府明徳会彰考館徳川博物館

増田和夫*¹, 高野昭人*¹, 塩島憲治*¹, 川原信夫, 中根孝久, 関田節子, 佐竹元吉*²: 中国産芽根の新規トリテルペノイド

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 昭和薬科大学

*² 日本薬剤師研修センター

瀧野裕之, 菱田敦之, 細川敬三*¹, 関田節子, 佐竹元吉, Pham Thanh Ky*², Le Quan Toan*³: ベトナム産薬用植物 *Achyranthes aspera* の成分について-国内産

Achyranthes 属植物との比較-

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 兵庫大学

*² ハノイ薬科大学

*³ ハノイ薬化学センター

Fuchino, H., Ky, P. T.*¹, Toan, L.Q.*², Sekita, S.: Studies on the Chemical Constituents of *Achyranthes aspera*

The Second Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Pharma Indochina II (2001.10)

*¹ Hanoi College of Pharmacy

*² Center for Pharmaceutical Chemistry of Hanoi

瀧野裕之, 高橋真理衣, 川原信夫, 河合賢一*¹, 関田節子, 佐竹元吉*²: *Emericella* 属菌類代謝産物の抗リーシュマニア活性

第15回微生物シンポジウム 微生物化学の発展と感染症対策

*¹ 星薬大

*² 日本薬剤師研修センター

高橋真理衣, 瀧野裕之, 関田節子, 佐竹元吉*¹: 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*¹ 日本薬剤師研修センター

高橋真理衣, 瀧野裕之, 川原信夫, 河合賢一*¹, 関田節子, 佐竹元吉*²: 菌類代謝産物の抗リーシュマニア活性

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*¹ 星薬大

*² 日本薬剤師研修センター

関田節子: いま, 薬剤師が期待されていること「漢方薬・生薬薬剤師講座を実施して」

日本薬学会第122年会 (2002.3)

瀧野裕之, 高橋真理衣, 関田節子, 佐竹元吉*¹: 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物の探索

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*¹ 日本薬剤師研修センター

中根孝久, 増田和夫*¹, 川原信夫, 関田節子, 塩島憲治*¹, A.K.Chakravarty: インド産 *Bacopa monniera* の配糖体成分

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*¹ 昭和薬科大学

福島紀子*¹, 宮本法子*², 小島 尚*³, 関田節子: イン

ターネット販売等によるサプリメントに含有されるカフェインについて

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 共立薬大

*2 東京薬大

*3 神奈川衛研

野中貴子*1, 石原島栄二*1, 世取山守*1, 李 宜融, 関田節子, 佐竹元吉*2, 渡辺和人*3, 山本郁男*3: VIII大麻試験法(4) キャピラリーガスクロマトグラフィー

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 栃木保健環境センター

*2 日本薬剤師研修センター

*3 北陸大薬学部

三上栄一*1, 大野 勉*1, 松本 浩*1, 関田節子: 未規制薬物の乱用防止に関する研究(10) 健康食品中に含有するフェントラミンの分析

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 愛知県衛生研究所

小島 尚*1, 土井佳代*1, 関田節子: 未規制薬物の乱用防止に関する研究(11) セントジョーンズワートを含むサプリメントの品質に関する検討

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 神奈川県衛生研究所

中嶋順一*1, 安田一郎*1, 関田節子: 未規制薬物の乱用防止に関する研究(12) Dietary Supplementに含まれる医薬品成分とその作用量

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 東京都立衛生研究所

村瀬広恵*, 東野薫, 吉松嘉代, 藤伊正*, 福本亮平*, 下村講一郎: 絶滅危惧種ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et.Zucc.) の超低温保存に関する研究

第19回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2001.7)

* 東洋大学生命科学部

田中章江*1, 下村講一郎, 西川和孝*2, 石丸幹二*1: ヒマラヤヤマボウシ不定根のタンニン生産能(2)

第19回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2001.7)

*1 佐賀大学農学部

*2 鳴門教育大学教育学部

平野啓*, 下村講一郎, 山川隆*: *Atropa belladonna* に

よる芳香族有機酸添加に対する応答について

第19回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム (2001.7)

* 東京大学大学院農学生命科学研究科

東野薫*1, 福本亮平*1, 吉松嘉代, 矢崎一史*2, 藤伊正*1, 下村講一郎*1: 培養ムラサキシユートのシコニン誘導体形成に対するエチレンの影響

日本農芸化学会2002年度大会 (2002.3)

*1 東洋大学生命科学部

*2 京都大学大学院生命科学研究科

吉松嘉代, 中尾伸子, 関田節子, 下村講一郎*1, 牧野由起子*2: 逆相固相抽出によるケシ属植物体からのアルカロイドの精製とHPLC分析

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 東洋大学生命科学部

*2 関東信越厚生局麻薬取締部

高上馬希重*1, 吉田茂男*1, 飯田修, 関田節子, 佐竹元吉*2, 牧野由紀子*3: 大麻 *Cannabis sativa* L. の花成特性に関する研究

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*1 理化学研究所

*2 日本薬剤師研修センター

*3 関東信越厚生局麻薬取締部

高上馬希重*1, 吉田茂男*1, 飯田修, 栗原孝吾, 山田和也, 香月茂樹, 鍋木絃一, 野崎トモ子, 黒柳正典*2: 「有用植物資源のジーンバンク化」日本国内で保存栽培されているウコン (*Curcuma*) 属植物の評価について

日本香辛料研究会年会 (2001.11)

*1 理化学研究所

*2 広島県立大学生物資源学部

高上馬希重*1, 吉田茂男*1, 飯田修, 関田節子, 佐竹元吉*2, 牧野由紀子*3: 大麻 *Cannabis sativa* L. 識別のための AFLP マーカー

日本DNA多型学会第10回学術集会 (2001.11)

*1 理化学研究所

*2 日本薬剤師研修センター

*3 関東信越厚生局麻薬取締部

高上馬希重*1, 村中俊哉*1, 吉田茂男*1, 飯田修, 牧野由紀子*2, 関田節子, 佐竹元吉*3: 大麻 *Cannabis sativa* L. 識別のための AFLP マーカーの開発

日本薬学会第122年会 (2002.3)

*1 理化学研究所

*2 関東信越厚生局麻薬取締部

*3 日本薬剤師研修センター

(*Mallotus philippinensis*) の抗アレルギー成分の研究

日本生薬学会第48回年会 (2001.9)

*1 日本大学薬学部

大根谷章浩*1, 北中進*1, 香月茂樹: クスノハガシワ

会議名：ICH6準備会議

出席者：薬品部 小嶋茂雄, 吉岡澄江

開催場所, 時期：① ICH6準備会議：千葉(日本), 2001年5月21～24日

② :ブリュッセル(ベルギー), 2002年2月4～7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

会議の内容：原薬および製剤の不純物ガイドラインの改定(Q3A/B-R) [小嶋が参加]; ブラケットティング&マトキシリング(Q1D), 安定性試験データの統計的扱い(Q1E), 熱帯地域での安定性試験(Q1F) [吉岡が参加]

1. 原薬および製剤の不純物ガイドラインの改定(Q3A/B-R)

2001年4月のロンドンでの専門家会議でFDAから提案された0.1%に丸められた分析値が統計的にみて0.15%を超えていないことの保証を求める案は, 2001年5月の千葉での専門家会議において, 日常業務の中に位置づけるにはあまりに複雑で実行不可能な案として, 厚生労働省と3極の業界側が受入れ難いとの意見を表明したため, 合意に至らなかった。

もっとシンプルで実行可能な案を提示するようとの要請に応じて, 企業側が構造決定の閾値を0.1%から0.09%と低める案を示し, これに対してFDAが適切な修正提案を行うとともに, ラポーターが3度にわたるDiscussion Documentにより論点のとりまとめを入念に行ったことから, Q3Aの改定案は, 2002年2月のブリュッセルでの専門家会議においてようやく最終合意(ステップ4)に達することができた。合意の内容は次の通りである:

1) 下記の閾値とすること

1日最大服用量 ≤ 2g 1日最大服用量 > 2g

- 構造決定の閾値: >0.10% >0.05%
- 安全性確認の閾値: >0.15% >0.05%
- 報告の閾値: >0.05% >0.03%

2) 下記の規格を設定すること

- 構造既知の不純物の個別規格
- 構造決定の閾値を超える構造未知の不純物の個別規格
- 個別規格を設定しなかった不純物の一般的規格(限度値は構造決定の閾値以下とする)
- 不純物総量の規格

3) 試験結果の表記と数値の丸め方

- a) 個々の試験結果は小数第2位まで記載する(生データを報告する必要はない)。
- b) 試験結果を閾値と比べるとときには通常の数値の丸め方を適用する。
- c) 合計するときには, 個々の値を丸めずに合計し,

その合計値を四捨五入した上で記載する。

4) 小数第2位まで記載することとしたのは, この桁まで良好な精度で測定することを求めることを意味するものではない。

構造決定ならびに安全性確認の閾値を小数第2位までの値とするという方策の採用によりQ3Aの改定案がステップ4に達したことから, 残されたQ3Bの改定案についても, 同様の方策を基にすることにより, 2002年9月のワシントンでの専門家会議において合意に達するものと期待されている。

2. ブラケットティング&マトキシリング(Q1D), 安定性試験データの統計処理とその取り扱い(Q1E), 熱帯地域での安定性試験(Q1F)

ブラケットティング&マトキシリング(Q1D)については, 3極における内示を経て, 2002年2月のブリュッセルでの専門家会議において最終合意(ステップ4)に達した。また, 安定性試験データの統計処理とその取り扱い(Q1E)及び熱帯地域での安定性試験(Q1F)についても, 2002年2月のブリュッセルでの専門家会議においてステップ2に達した。

会議名：生薬の規格並びに規制方法の調和に関する作業部会

出席者：生薬部 合田幸広, 筑波薬用植物栽培試験場 関田節子

開催場所, 時期：ソウル, 大韓民国, 2001年11月27日～11月30日

参加者内訳, 人数：西太平洋地区6カ国7地域(日本, 中国, 韓国, ベトナム, シンガポール, オーストラリア, 香港)より temporary adviser 22人, observer 他11人

会議の内容：世界保健機構(WHO)西太平洋地域事務局が主宰した会議で, 西太平洋領域の伝統医療において互いに共通性の高い生薬・薬用植物について, 規格の調和が必要であることが議論され, その枠組みを作るために, 2002年3月に北京で新たな会合を持つことが決定された。

会議名：第1回生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会

出席者：生薬部 合田幸広, 川原信夫, 筑波薬用植物栽培試験場 関田節子

開催場所, 期間：北京(中国), 2002年3月8～9日

参加者内訳, 人数：日本, 中国, 韓国, ベトナム, シンガポール, オーストラリア, 香港の生薬・薬用植物の担当者・専門家

38名

会議内容：「生薬・薬用植物に関する国際調和のための西太平洋地区討論会」(FHH: Western Pacific Region Forum for the Harmonization of Herbal Medicines)は、西太平洋地区の6カ国7地域(日本、中国、韓国、ベトナム、シンガポール、オーストラリア、香港)の生薬・薬用植物の規制に関する関係者が、平成14年3月9日北京に集まり設立したフォーラムで、生薬・薬用植物の安全性、有効性及び品質に関する技術的な記録とコンセンサスを提供することを目的とする。本フォーラムは、Standing Committee(親委員会)の下部組織として、具体的な活動を行うSub-Committeeが組織されることになっており、2002年からの2年間は、Nomenclature and Standardizationと、Quality Assurance and Informationに関するSub-Committeeが組織された。日本からは、日本薬局方生薬等委員会が同フォーラムに参加し、佐竹元吉第14改正日本薬局方調査会生薬等委員会会長(日本薬剤師研修センター)がNomenclature and Standardizationに関するSub-Committeeの主催者(convenor)となることを受諾した。同Sub-Committeeは、平成14年5月21日から24日にかけて本所で開催され、(1) Recommended methods on nomenclature of herbsと(2) Methodology for quality controlに関する専門家作業部会(Expert workinggroup)が組織される予定である。

会議名：医療用具の生物安全性評価に関する会議(ISO/TC194)

出席者：療品部 土屋利江

開催場所、時期：ベルリン(ドイツ)、2002年3月11日～15日

参加者内訳：メンバー61名(米国15名、日本8名、ドイツ、英国各6名、オランダ5名、スウェーデン、中国各4名、ノルウエー、フランス各2名、アイルランド、デンマーク、オーストリア、オーストラリア、スイス各1名)

会議内容：今年は、12のワーキンググループが開かれた。WG4では、医療用具の臨床試験に関する国際基準の調和のための会議が開かれた。厚生労働省の医療用具GCPの法制化が予定されている中で、医薬品機構から上田慶二先生、医薬局審査管理課から古賀大輔技官、審査センターから鈴木由香審査官が出席し、会議場内外での積極的活動の結果、日本の立場を理解させることができた。今回の会議での特徴は、生物学的評価基準にリスクマネジメントの考え方を導入する動きがあったことである。スペインでの透析器による多数例からなる死亡事故を未然に防げなかったことへの教訓からであった。

このリスクマネジメントのfirst stepにあたるリスク分析では、ハザードの特定を行って初めてリスクの推定が可能となることから、医療用具の生物試験法にも少なからぬ影響を与えた。即ち、ハザードを特定可能なサンプル調製法および生物試験を選択することが重要であるとの国際的な共通認識ができた。このことを長年主張してきた我々にとっては、大きく前進した有意義な会議であった。

会議名：第57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：ローマ(イタリア)、2001年6月5日～14日

参加者内訳、人数：毒性グループ36名、規格グループ10名、摂取評価グループ4名、事務局4名の合計54名

会議内容：安全性評価の対象となったのは、乳化剤のキラヤ抽出物、酵素の*Saccharomyces cerevisiae*由来のインベルターゼ、着色料のクルクミン、*Blakeslea trispora*由来のβ-カロテン、保存料のナタマイシン、甘味料のD-タガトース、増粘安定剤のカラギーナン、カードラン、香料(ピラジン誘導体、第二級アルコール及びケトン、ベンジル誘導体など)等であった。また、それらを含む添加剤24品目及び香料約250品目について規格の新規作成または見直しが行われ、甘味料、増粘安定剤等の重金属規格が見直された。また、食品汚染物であるクロロプロパンジオール、ジクロロプロパンジオール、ダイオキシン類の安全性評価が行われ、クロロプロパンジオールについては暫定耐容摂取量が設定され、ダイオキシン類については改訂された。

会議名：第34回国際食品規格委員会食品添加物汚染物質部会(CCFAC)

出席者：食品添加物部 山崎 壮

開催場所、時期：ロッテルダム(オランダ)2002年3月11日～15日(8日～9日特別作業部会)

参加者内訳、人数：48の加盟国政府、48の国際機関・団体などから約300名。日本からは厚生労働省、農林水産省、環境省の関係者、業界団体関係者(テクニカルアドバイザー)ら計22名が参加。

会議内容：第57回JECFA会議(2001年6月)の概要報告とそこで決まった食品添加物規格の承認が行われた。CCFACとJECFAとの関係の原則、食品添加物一般基準(GSFA)と個別食品毎の基準との関係の原則、加工助剤とキャリアの規格原則が議論された。GSFAを設定するための食品分類システム食品添加物コード番号システム

の改訂及びいくつかの食品添加物の最大使用量が議論され合意を得た。安息香酸類の最大使用量では意見が対立した。活性塩素の使用基準及び食品への放射線照射規格が議論されたが、意見が対立した。

汚染物質とトキシンの暴露量評価の原則が議論されたが、意見が対立した。オクラトキシンAとパツリンの最大許容量 (ML) が議論され、意見が対立したままステップ8に移行した。海産物の鉛汚染ML、缶詰食品のすずのMLが議論されたが、意見が対立した。カドミウムのMLは、さらにリスクアセスメントを続けることになった。ダイオキシンとダイオキシン様PCBは、世界規模での汚染調査の必要性が確認された。醤油中のクロロプロパノール類のMLが議論されたが、意見が対立した。

JECFAに評価を依頼する食品添加物、汚染物質、トキシンの品目選定が行われた。23回CCMASの報告が承認された。ダイオキシンとダイオキシン様PCBの分析法の検討をCCMASに要請することになった。

会議名：第9回国際簡潔評価文書(CICAD)最終検討会議

出席者：化学物質情報部 関沢 純, 総合評価研究室 広瀬明彦

開催場所, 時期：オタワ (カナダ), 2001年10月29日～11月1日

参加者内訳：米国4名, 英国3名, カナダ, ドイツ, 日本各2名; インド, エジプト, 欧州連合, オーストラリア, オランダ, 韓国, 中国, ブラジル, ポーランド, 南アフリカ連邦, 各1名; 事務局: IPCS: 3名; オブザーバ 8名, 計: 34名

会議内容：国際簡潔評価文書 (Concise International Chemical Assessment Document: CICAD) は国際化学物質安全性計画 (IPCS) が作成する化学物質のリスク評価文書であり, 第9回目の最終検討会議では, 対象物質としてアクロレイン, エチレングリコール, 銀とその化合物, クロロアニリン, フタル酸ジエチル, 臭化エタン, ポリ塩化ビフェニル, 二硫化炭素の8物質のリスク評価について審議が行われ全8物質について, 今回の会議での審議結果に基づく修正を行った上で最終採択することが了承された。フタル酸ジエチルのCICAD原案は, 人の健康への影響については関沢が, 総合評価室広瀬主任研究官の, また野生生物への影響評価部分については英国生態学研究センターのドブソン博士の支援を得て作成した。

会議名：第1回INFOCAP (化学物質管理能力強化のための情報ネットワーク) 運営会議

出席者：化学物質情報部 関沢 純, 厚生労働省化学物

質安全対策室 吉田 淳補佐

開催場所, 時期：ボン (ドイツ), 2002年5月2日～4日

参加者内訳：ドイツ3人, 日本2人, 米国, スイス, アルゼンチン, ナイジェリア各1人
国際機関 (IFCS議長1人, 同事務局3人, UNITAR2人, EU2人, OECD1人, IPCS1人), 非政府機関 (環境NGO, IUPAC, 国際化学工業連合, 各1人): 計23人

会議内容：INFOCAPは, 各国における化学物質安全管理能力強化 (キャパシティー・ビルディング) のための重要な国際協力のひとつとして, 2000年の政府間化学物質安全性フォーラム (IFCS) 第3回会合で推進が決められ, 主としてネット経由で各国やNGO間でキャパシティー・ビルディングに必要なリソースについて情報を交換し, オープンで効率的に支援を達成してゆこうというものである。今回運営委員会は電話会議で進めてきた準備の成果を持ち寄り, 実施に踏み出すため総合検討の機会として開催された。関澤は, 2002年7月開催のGINC (Global Information Network on Chemicals) 会議で, アジア各国との協力強化に向けたGINCネットワークの新たな展開の提案をするため厚生労働省の要請を受けて参加した。

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：ウッチ (ポーランド), 2001年10月15日～19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。本検討会議は, 各国の担当者や化学・毒性の専門家が集まって原案を詳細に検討しICSC完成版とするものである。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数十物質のカード原案を検討した。日本は, 塩化チオニル, ブルシン, エチレンシアノヒドリンなど7物質の原案作成を分担した。

会議名：世界保健機関 (WHO): 化学物質による事故・事件・災害等への公衆衛生上の対応に係わる検討会

出席者：化学物質情報部 山本 都

開催場所, 時期：WHO本部 (ジュネーブ), 2001年12月3～5日

参加者内訳, 人数：WHO, OPCW, ILO, UNEP/OCHA, APELL等の関連国際機関/プロジ

エクト, 英国, ドイツ, オランダ, スイス, エジプト, ガーナ, 南アフリカ, 米国, カナダ, アルゼンチン, ニュージーランド, イラン, 中国, タイ, フィリピン, 日本の行政担当者や専門家約40名

会議内容: 輸送時の漏洩や工場からの漏出などの化学物質事故に加え, 2001年9月の米国同時テロ以降, 環境中や食品, 飲料水等への毒物や化学兵器の使用などテロの脅威が高まってきたことから, 公衆衛生上の観点から見た現在の不十分な点を明らかにし, WHOやメンバー国が化学災害に関する公衆衛生上の短期及び長期における適切な措置を講じるための検討を行った。これらの中には, 化学災害に対する国際的な対応強化が含まれる。

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: モントリオール (カナダ), 2002年3月4~8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。日本は, 臭化ベンジル, ヘキサメチレンテトラミン, 1,2,3-トリクロロベンゼンなど4物質の原案作成を分担した。

会議名: 中国医薬品安全性評価管理センター日中友好プロジェクト「一般毒性試験, 14日間反復投与試験に係るGLP管理対応の技術指導」

出席者: 毒性部 川崎 靖

開催場所, 時期: 中国 (北京市), 平成14年3月18日~平成14年4月5日

参加者: 中国医薬品安全性評価管理センター約20名, 日本人専門家3名

指導内容: 日本国際協力事業団 (JICA) の支援による中国国家薬品监督管理局の下に中国初のGLP対応施設として中国医薬品安全性評価管理センターが建設された。昨年12月から中国薬品生物製品検定所より約30名の研究員が移籍され, 動物飼育が始まった。今回は, ここでの毒性試験運用開始にあたり, 「一般毒性試験として, 14日間反復投与試験に係るGLP管理対応の技術指導」を目的として, 約3週間滞在した。

医薬品の安全性を保証するためには, 科学的根拠に基づいた最新の試験技術と, その試験データの信頼性を高めるための厳格なGLP管理が必要である。これまでに

各研究員は, 適切な施設・設備の整備等のハード面と試験の実施および職員・組織等のソフト面について, 机上で学んできた。これに対して今回, 報告者の指導の基, GLP管理対応の14日間反復投与試験を当施設として初めて実施した。「これがGLP管理か」ということが多少とも理解していただけたと考える。本プロジェクトの更なる成功に向けて, 理想と現実のバランスを取りながら, 技術指導や人材育成を進めていくことが重要である。今後, GLP管理対応での一般毒性試験として急性および亜急性試験の実施が予定されている。

会議名: 内分泌かく乱化学物質におけるOECD/EDTA運営グループの第5回会議

The fifth meeting of the Task Force Endocrine Disrupters on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA)

出席者: 毒性部 菅野 純

開催場所, 時期: 経済開発協力機構 (OECD) 本部 (2 rue Andre Pascal)・パリ・フランス, 2001年05月28日~29日

参加者内訳, 人数: 30名 (日米欧各国代表, うち日本から10名)

会議内容: 内分泌かく乱化学物質の諸課題に則した各種実験を国内諸機関との協調, あるいはOECDやEPA・EDSTAC (米国環境防護庁関係機関) などとの国際協調のもとで行う際, 速やかな体制作りと科学的・技術的な基盤を整える立場から, 基礎的実験の試行とそれらの改良, 新規開発などの研究を総合的に推進している。各国における研究状況の把握, 研究成果の検討を主体とした科学的知見の整理, 分析, それらに基づく試験法プロトコル作成に関わる議論の場がOECD/EDTAにおいて持たれ, 報告者は前年度までに実施したOECD対応試験研究等の結果と, その考察により新たに浮上した基礎的問題の内, 今後の内分泌かく乱化学物質の試験研究の本質に係わる事柄について報告した。具体的には投与経路の選択や動物種に関する問題 (子宮肥大試験), 陽性対象物質の濃度設定等の問題 (Hershberger試験), OECDガイドライン407 (28日間反復投与) 試験法の適用における観測項目の問題点等を検討した。当研究所は子宮肥大試験のリードラボラトリーとして関係各機関と連携を保ちながらその任務を遂行しており, 特にこの試験法に対する取り纏めに貢献した。

会議名: FAO/WHO合同残留農薬会議 (JMPR)

出席者: 毒性部 高木篤也

開催場所: スイス (ジュネーブ)

時期: 平成13年9月17~26日

参加者内訳, 人数: 各国より約30人

会議内容：農薬の Carbaryl, Diazinon, Diflubenzuron, Fenpropimorph, Imazalil, Imidacloprid, Mehomyl, Methoprene and S-methoprene, Phosalone, Phosalone, Prochloraz, Spinosad について作成された資料を討議し ADI を設定、および該当するものについては acute reference dose (ArfD) の設定も行った。

会議名：OECD 「in vitro 皮膚腐食性試験に関する専門家会合」

主催者：Berlin, Germany (世話人 Professor Spielman)

開催場所：ZEBET (ドイツ, ベルリン)

開催日：2001. 11. 1-11. 2

参加者：A. BOMAN (Sweden), J. CRAYFORD (英), R. Curren (米), I. GERNER (独), J.W. HARBELL (米), J.R. HEYLINGS (英), T. HOEFER (独), H-G HOLZHUETTER (独), A.C. JACOBS (米 FDA), M. LIEBSCH (独 ZEBET), J.F. NASH (米), Y. OHNO (日), H. SPIELMANN (独 ZEBET), S-K. SUH (韓 KFDA), A.V. IERSEL (蘭 Institute' Centre of Alt. to Animal Testing), C. WIEMANN (独), A. WORTH (伊 ECVAM), H. Koeter (OECD), Keri Aspegren (OECD)

会議内容：皮膚腐食性試験ガイドライン案について具体的な検討を行った。その結果、ラット皮膚の電気抵抗の変化を検討する TER 法とヒト皮膚モデル法が一緒のガイドラインに記載されていたが、分割し、別のガイドラインとすることとされた。また、OECD の試験法ガイドラインについては通常、毒物や劇物への指定に関する分類について記載されないことから「腐食性物質に分類される」とかの直接的な表現はなるべく避けることとされた。なお、腐食性、非腐食性の間のカットオフ値周辺の検体については、ヒトよりも感度の高いウサギでの結果と比較し、値を設定しているの、conservative なものであり、特に問題にはならない。また、市販のキットによる試験について、そのままガイドラインに記載することは行わず、参考として引用する程度にすることとされた。また、TER 法およびヒト皮膚モデル法についての記載の詳細について検討され、TER 法については、保存皮膚の利用や false positive なる事の機序に関する記述の追加や過ちの修正が行われた。ヒト皮膚モデルについては、市販の皮膚モデルの内容を直接示すのではなく、皮膚モデルに要求される物理的性状と機能について明確に記載され、それに則ったものであれば使用できるとされた。また、皮膚モデルは自分で作成あるいは購入する事ができると明記された。また、腐食性の有無の判定基準が明記された。その他、多くの表現が修正された。また、皮膚モデルの例として EpiDerm が示された。

会議名：有害性評価のための新試験法および改訂試験法のバリデーションと行政的受け入れに関する OECD 会議

開催場所：スウェーデン, ストックホルム

開催日：2002. 3. 6-8

参加者：厚生労働省関係では国立衛研の井上安全センター長、大野薬理部長、菅野室長、及び高木主任研究官、小野秦野研所長、環境省より武井技官、岡崎研より井口教授が参加した。その他、EU, US, Canada 等から多くの参加者があった。総数は OECD 事務局員も含め、約 100 人。

会議内容：会議は 1996 年に同国ソルナで開催された OECD の代替法のバリデーションと行政的受け入れの基準に関する会議の結果を踏まえ、行政目的のための有害性評価法のバリデーションと受け入れに関する基準とそのプロセスについての実際的なガイダンスを作成することを目的とした。具体的には OECD のガイダンス案 "The Development, Validation and Regulatory Acceptance of New and Updated Test Methods in Hazard Assessment" 1) 既存のバリデーションの結果の扱い、2) バリデーションのプロセスの行い方と運営方法、3) 妥当性の確認された試験法を行政的に受け入れ、4) 新しいあるいは改訂された試験法の独立した peer review と行政的な検討と実施のプロセスのそれぞれについて分科会に別れて検討した。この会議で合意された結果は OECD の前記ガイダンスの改定に反映される。報告者の参画した第 3 分科会では Dr Stizel が座長となり、与えられた課題について審議した。その主なものを以下に示す。1) 行政的な受け入れ基準として柔軟性が求められるが、科学的厳密性を損なうものであってはならないことを明確に述べるべき、2) バリデーションの形態は場合により変わるものである。例えば、通常のバリデーションに要求される被験物質数と catch up study のためのものとは異なり、後者の場合は少なくとも良い。3) peer review process の透明性は試験法の受け入れに重要である。4) 詳細なプロトコールと SOPs が入手できるべきである。5) 試験法の目的と強みと限界を明確にし十分に記述すべきとされた。6) 特許の取られた試験法であっても受け入れ基準を満たす物であれば科学的に妥当なものとなす。但し、当該試験法がガイドラインに記載されたならば、利用者に入手されやすくなってはならないこと、また、その方法の特性について記述し、類似法を開発しやすくしておくべきであることが指摘された。また、OECD の特許試験法についての policy を変えるべきとされた。また、第 3 分科会では各国の新試験法受け入れ手順が話題となり、欧米では ECVAM や ICCVAM 等の恒常的な機関が中心となって新試験法のバリデーションあるいは評価を行っているが、我が国では試験法毎

に学識経験者からなる検討班を省庁が設置し、検討している実状が説明された。

本会議では Prediction model の定義や取り扱いや GLP の適用の範囲等について議論があった。後者については GLP にきちんと従うべきとする者と GLP の原則にかなり近くまで対応すべきの二つの意見に分かれた。会議の結果はまとめて参加者に送付され、その後はいくつかの小グループに分かれて更に検討される予定である。

会議名：ICH-6 およびその準備会議 (S7B 部門)

出席者：薬理部 中澤憲一

開催場所 (開催日)：東京 (平成13年5月21-24日)、
オタワ (平成13年8月21-23日)、
ブリュッセル (平成14年2月3-7日)、
TV/teleconference (平成13年11月30日)

参加者：S7B 部門で日本から5人、欧米より約10人

会議内容：日米欧の医薬品に関する規制の国際的協調 (ICH) の S7B 部門は、ヒト医薬品の再分極過程に関連した頻脈性心室不整脈評価に関して討議を行なう部門であり、非臨床試験においてヒトへのリスクを評価するためのガイドラインを作成することを目的としている。すでに Step 4 に達している安全性薬理試験のガイドライン (S7A) の討議において心電図の Q-T 間隔延長を伴う心室性不整脈による突然死 (Torsade de Pointes) という重篤な副作用が問題となり、これに対応するため本年度より独立した部門としてワーキンググループが活動している。3回の会議および1回の TV/teleconference を行ない、ブリュッセルの会議で Step 2 のドラフト合意に達した。ドラフトにおいては、化合物の薬理/化学的クラス、イオン電流および活動電位幅への影響、心電図への影響について試験を行ない、総合的な評価を行なうよう推奨している。今後は、このドラフトに対する意見を求めるとともに、評価法の可否を定めるための基本的な実験データを集めることで合意している。

会議名：HFSP 第一回受賞者年会 (Human Frontier Science Program First Awardees Meeting)

出席者：変異遺伝部 能美健彦

開催場所、時期：イタリア、トリノ、2001年6月17日～20日

参加者内訳、人数：1998年の研究グラント受賞者 (HFSP Research Grant Awardees) ならびに1999年長期奨励研究員 (Long-term Fellows)、約100名

会議内容：ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム (HFSP; <http://jhfsp.jsf.or.jp/>) は1987年のベネチア・サミットにおいて日本政府が提唱して開始され

た国際研究プロジェクトであり、基礎科学に関する優れた国際共同研究を支援することを目的としている。1989年にフランス・ストラスブルグに HFSP 推進機構 (HFSP) が設置され、1990年からは国際共同研究に関する助成事業、フェローシップ事業、ワークショップ開催を支援している。研究グラントは主に脳機能解明をめざすプロジェクトと分子生物学的アプローチによる生体機能解明をめざすプロジェクトに分かれており、3年間継続して研究費の助成を受けることができる。今回は2001年に研究が終了する研究グラント受賞者と長期フェローを対象に、年會が開かれた。HFSP グラントの特徴は、研究チーム (通常2~4名で構成される) のメンバーが、異なった大陸に属していることであり、私の所属するチームも日本、フランス、米国の研究者で構成され、遺伝学、分子生物学、構造生物学的手法を用いて共通のテーマ (DNA damaged replication: 損傷 DNA の複製) に迫ることを特徴としている。年會では、各チームリーダーから口頭で発表があったほか、各参加者がポスターで研究成果の発表を行った。

会議名：遺伝毒性物質のカテゴリー化手法の検証のためのワークショップ

出席者：変異遺伝部 林 真

開催場所、時期：カナダ オタワ、2002年3月14-15日
参加者内訳：米国6名、英国2名、日本1名 (以上パネリスト)、事務局 (数名)、The Health Canada (約10名)

会議内容：カナダ政府の Canadian Environmental Protection Act (CEPA '99) により23,000種類の既存化学物質について2006年9月までにリスク評価をすることになっている。その評価項目の中に遺伝毒性も含まれており、カナダが提案している評価法を科学的に検証すると共に、よりよい戦略を見いだすために招集された会議である。カナダ政府の要請を受け、International Life Sciences Institute's Risk Science Institute (ILSI RSI) が遺伝毒性分野の専門家を集めてパネルディスカッション方式の会議を企画した。2日間の会議で、カナダ方式の評価と新しい提案について議論し、報告書の作成をおこなった。In vitro, in vivo と遺伝毒性の指標 (遺伝子突然変異、染色体異常誘発性、およびその他) の組み合わせを基に決定樹を作成し、CEPA'99における遺伝毒性評価の戦略を完成させた。

会議名：第12回 OECD SIDS 初期評価会議 (SIAM 12)

出席者：総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所：OECD 本部 (パリ、フランス)

時期：平成13年6月27日-29日

参加者内訳、人数：OECD 加盟国の約60名

会議内容：Dr. Jack Mooreの議長により会議が進行し、予定どおり終了した。

全審議14文書中12文書について、初期評価要約文書が合意された。合意文書のうち政府提出分は6文書で、その中で追加作業の不要なものは3文書（3物質）であった。国際化学工業協会（ICCA）物質文書は6文書で、その中で追加作業の不要なものは5文書（9物質）であった。

日本担当文書のo-Phthalodinitrile（91-15-6：JP+DE/ICCA）の健康影響部分についてはEDGでのコメントに基づいて回答し、以下の点について評価文書等を改訂することとなった。

- ・急性毒性および刺激性についての情報を追加する。刺激性の情報についてはBASFが提供する。
- ・MHW併合試験の雌での毒性発現情報および死亡原因についての考察等を追加する。
- ・2種の反復投与試験での雄腎毒性についての考察（ α 2U-G）は削除しない。
- ・遺伝毒性の用量設定理由並びに詳細情報を追加する。
- ・染色体異常で、polyploidyの意義についての考察を記載する。
- ・発がん性の項を新設し、情報はあるものの信頼性に欠けることを記載する。
- ・動物での急性毒性発現とヒトでの毒性発現との関連性についての考察を行う。

本物質は急性毒性値が85 mg/kgと低く、反復投与毒性のNOAELも3 mg/kg/dayと低いことから、曝露評価を含めたりスクアセスメントをとる提案があったが、現時点ではドイツの1社でのみの製造であること、管理が十分行われていることから、追加作業は不要となり、初期評価結果が合意された。

会議名：第13回OECD SIDS初期評価会議（SIAM 13）

出席者：総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所：ベルン（スイス）

時期：平成13年11月6日-9日

参加者内訳、人数：OECD加盟国の約100名

会議内容：再審議として日本のCitralを含め7物質、新規のICCA物質（日本から4物質）として23物質と1カテゴリー（4物質）、新規政府作成4物質、Post SIDS 4物質の合計42物質の審議が4日間に亘って行われた。審議の結果、数物質についてはSIAPの修正または再審議となった。なお、Carbonic acid dimethyl ester（616-38-6）については、生殖試験が進行中であるため、その試験が終了し、評価が終わってから再審議されることとなった。

日本から提出の文書については、CitralはExposure/Eco部分のみがSIAM 11で再審議とされた。審議の前に、

難溶解性物質の蓄積性に関して溶解補助剤を用いる適正について実験データを紹介し、了承された。また、評価文書についても合意された。日本企業が原案を作成し、政府がピアレビューしたのち、提出した4文書はS-Triazine, 2,4-diamino-6-phenyl-, Docosanoic acid, 2-Hydroxyethyl methacrylate, 1,3-Bis(aminomethyl) benzeneで、すべて評価文書が合意された。

その他関連事項として、生殖毒性データのない場合の対応について：SIDS manualによると90日試験で生殖器官の検索が十分行われ、発生毒性試験が行われている状況では、追加試験は必要ないと記載されている。そこで、この状況のreportに対してはSIAPでは例えば"OECD SIDSとしては追加の生殖試験は必要でない"との記載をすることになった。

Categoryの評価文書について：オランダが作成した4物質でCategoryとして作成されていたが、カテゴリーとしたことの明確な理由をSIARとSIAPに記載することが指示された。毒性発現機構の共通性、類似性と相違等についても記載することされた。

また、酸やアルカリなどの強い腐蝕性物質については、記載に注意を要する。これらの物質についてはdata gapがあっても特別の理由がない限り追加試験は要求しない。今回の例では日本の物質では1,3-Bis(aminomethyl) benzene、米国の物質ではEthylenediamine、Tetraethylenepentamineが、さらにベルギーの物質でPotassium hydroxideがあった。記載方法としてもこれらの物質に関する強制経口投与の試験結果の記載は、動物愛護の立場から今後は注意を要する。

会議名：第14回OECD SIDS初期評価会議（SIAM 14）

出席者：総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所：パリ（フランス）

時期：平成14年3月26日-28日

参加者内訳、人数：OECD加盟国の約80名

会議内容：再審議として2物質、新規審議として6物質、Categoryとして5物質が審議され、いずれも評価文書が合意された。このうち、日本からは新規物質としてo-Toluenesulfonamide（88-19-7）およびMethyl acrylonitrile（126-98-7）の2物質を提出・審議された。本2物質についても毒性試験情報は厚生労働省試験以外にもかなり多くの報告があったことから、EDGでは多数のコメントが寄せられたが、討議の結果特に大きな問題もなく審議が終了した。ICCA物質としては23物質の評価文書が提出されたが、日本企業担当の6物質を含む18物質について審議が行われた。審議の結果、いずれの評価文書についても合意が得られた。日本企業担当物質のうち、以下の2物質についての質疑応答を日本政府として支援した。2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-4-ol

(2403-88-5) については染色体異常試験の陽性結果の解釈及び最高濃度の設定理由について質問があり、本物質は強い増殖抑制が見られるものの、細胞分裂指数が高い値を示したため高濃度試験が行われた旨を回答し、了承された。Tris(2-ethylhexyl)benzene-1,2,4-tricarboxylate (3319-31-1) については、代謝試験での蓄積性について質問があり、出来る限り詳細情報を追加記載することで了承された。2-Dimethylaminoethyl methacrylate (2867-47-2), 3,5,5-Trimethyl-1-hexanol (3452-97-9), 5-Ethylidene-2-norbornene (16219-75-3), 1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxymethyl)- (839-90-7) については特段の問題もなく審議が終了した。残りの5物質についてはEDGで審議されることとなった。

OECD事務局よりICCA InitiativeのPilot phaseの成果について紹介され、今後、本SIAM 14の結果も含めて、本年11月に行われる合同会合でまとめが発表される旨報告があった。最後に、次回のSIAM 15は本年10月22-25日 米国ボストンで米国環境保護庁の支援により

開催されることが連絡された。

会議名: ICH 会合

出席者: 総合評価研究室 長谷川隆一

開催場所: ブリュッセル (ベルギー)

時期: 平成14年2月4-7日

審議内容: 残留溶媒審議グループ(Q3C EWG)は以下の事項について審議し、その合意結果をラポーターの長谷川(2001-2002年)が運営委員会に報告し、了承された。審議内容は、すでに合意されているN-methyl pyrrolidoneおよびtetrahydrofuranの改訂PDE値の妥当性について再確認されたが、FDAがまだパブリックコメントを出していなかったためStep 4には至らなかった。Ethylene glycolの新PDE案についてはデータ不十分との判断から不受理となった。最後に、残留溶媒維持管理に関する文書について討議し、改訂作業を行い、合意に達した。維持管理の文書は運営委員会です承されたことにより、自動的にStep 4となり、効力を発揮する。

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13年度に行った演題は次のとおりである。

第430回 (平成13年5月15日)

1. ヒト資料を用いた研究に関する政府等ガイドライン
変異遺伝部 増井 徹
2. コメットアッセイ法による照射牛肝の検知
食品部 宮原 誠
3. プリオン感染と検出法
食品添加物部 山崎 壮
4. 抗ペプチド抗体を用いたプリオン蛋白質の高感度検出法の開発
衛生微生物部 武木田 薫
菊池 裕
5. 転写因子 Mesp2 及び Pararis のダブルノックアウトマウスの解析
毒性部 高木 篤也
6. 毒性部の紹介
毒性部 井上 達

第431回 (平成13年7月10日)

1. ラット気管上皮粘膜層の電気生理学的パラメータにおけるストレスの影響
食品部 穂山 浩
2. Microdissection法を用いたパラフィン包埋微量組織からのRNA, 蛋白質, DNAの解析について—メタカーン固定法の利用—
病理部 渋谷 淳
3. 非経験的フラグメント分子軌道法を用いたエストロゲン受容体—リガンド結合エネルギーの理論計算
化学物質情報部 中野 達也
4. ホルムアルデヒドの経口および吸入暴露による毒性評価と水道水における暴露評価
総合評価研究室 広瀬 明彦
5. A環修飾活性型ビタミンD₃誘導体のVDR結合モデル
有機化学部 栗原 正明
6. 衛生微生物部の紹介
衛生微生物部 棚元 憲一

第432回 (平成13年9月11日)

1. 概略と研究体制
機能生化学部 澤田 純一
2. 遺伝子多型検出のストラテジー
薬理部 小澤 正吾
3. チトクロムP-450遺伝子の一塩基置換による機能変

化の解析

- 機能生化学部 斎藤 嘉朗
4. 抗癌剤イリノテカンの解毒代謝に関与するヒト肝UDP—グルクロン酸転移酵素分子種とその役割
環境衛生化学部 埴岡 伸光
神野 透人
5. CYP3A4による新規イリノテカン代謝物
代謝生化学部 佐井 君江
6. DNAChipを用いた遺伝子解析
薬理部 石田 誠一

第433回 (平成13年10月9日)

1. プリオン病とプリオン蛋白質の生化学
食品添加物部 山崎 壮
2. 培養細胞を用いた正常プリオン蛋白質発現機構の解析
衛生微生物部 菊池 裕

第434回 (平成13年11月13日)

1. 生体影響としての内分泌かく乱化学物質問題の現状と展開
毒性部 菅野 純
2. 白血球の分化に対する内分泌攪乱化学物質の影響
代謝生化学部 渡辺 秀実
鈴木 和博
3. ビスフェノールAの医療用具におけるリスク・ベネフィット解析
療品部 薮島 由二
化学物質情報部 関澤 純
林 譲
食品部 松田 りえ子
4. アフリカツメガエルの発生期における内分泌かく乱化学物質の影響
環境衛生化学部 西村 哲治
鈴木 玲央

第435回 (平成13年12月11日)

1. 細胞内情報伝達系に作用する南米産薬用植物の成分研究
生薬部 川原 信夫
2. HPLCによる食品中のポリソルベート分析法
食品添加物部 武田 由比子
3. 人工血小板の創製及び人工血管材料の血液適合性評価
療品部 土屋 利江
西谷 孝子
4. 療品部の紹介

療品部 土 屋 利 江

第436回 (平成14年1月15日)

1. 体験的創薬薬理学—in vivo から標的分子へ—

副所長 長 尾 拓

2. ATP受容体の生理・薬理機能研究：薬理部第一室の紹介

薬理部 井 上 和 秀

小 泉 修 一

小 濱 とも子

津 田 誠

重 本 由香里

(最 上)

3. 分子生物学的手法を利用した機能タンパク質発現系の薬理・毒性学的応用

薬理部 中 澤 憲 一

4. 薬理部の紹介

薬理部 大 野 泰 雄

第437回 (平成14年2月12日)

1. *gptdelta* ラット及びマウスを用いた臭素酸カリウム12週間投与による腎遺伝毒性の検索

病理部 岡 崎 和 志

西 川 秋 佳

広 瀬 雅 雄

2. *rasH2* マウスにBHTを組み合わせた肺発がん物質早期検出モデル開発の試み

病理部 梅 村 隆 志

3. 発がん性検出のためのToxicogenomics—ラットにおける非遺伝子傷害性肝発がん物質投与による発現遺伝子のプロファイリング—

病理部 洪 谷 淳

高 橋 則 行

有 村 卓 朗

4. Ethinylestradiol 周産期曝露によるラット新生児視床下部における遺伝子発現の検討

病理部 高 木 広 憲

榊 富 直 哉

畝 山 智香子

洪 谷 淳

5. DHPN誘発ラット甲状腺腫瘍のプロGRESSION課程におけるEGF/TSH receptorsの関与

病理部 今 井 俊 夫

6. 内分泌攪乱化学物質の卵巣摘出ラットにおける乳腺発がん修飾作用の検討

病理部 上 田 誠

今 井 俊 夫

7. 病理部の紹介

病理部 広 瀬 雅 雄

平成13年度 特別講演会開催状況

No.	開催年月日	講演者	所属	テーマ	経費
1	7月16日(月)	bruce blumberg,Ph.D	Univ of California Irvine USA	Retinoid Signaling in Vertebrate development	所予算
2	7月23日(月)	荻原 幸夫 教授	名古屋市立大学薬学部	What is "kanpo" medicine	"
3	9月25日(火)	松田 知成 助手	京都大学工学研究科附属環境質制御研究センター	ダイオキシン受容体に高親和性の生理的リガンドの同定	"
4	10月2日(火)	福島 昭治 教授	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学講座	環境発がん物質の低用量発がん性	"
5	10月16日(火)	赤池 敏宏 教授	東京工業大学生命理工学研究科生体分子機能工学講座	細胞マトリックス工学と肝臓組織工学	"
6	10月25日(木)	高井 貴子 助手	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターゲノムデータベース分野	機能ゲノム学とオントロジー	"
7	11月19日(月)	吉田 武美 教授	昭和大薬学部	薬毒物による酸化ストレスとその防御的応答としてのヘムオキシゲナーゼ誘導	"
8	11月22日(木)	正山 征洋 教授	九州大学大学院薬学研究院創薬科学専攻医薬化学講座薬用資源制御学分野	生薬の品質評価・鑑識とモノクローナル抗体の導入	"
9	1月28日(月)	Timothy R. Zacharewski	Michigan State University	内分泌かく乱物質とエストロゲン受容体の相互作用の分子機構とくに種差に注目して	"

支 所 例 会

第176回 (平成13年9月25日)

1. 脂質膜結合によって誘起されるアポEの構造変化
薬品試験部 斎藤博幸
2. 各種食品中のフタル酸エステル等プラスチック可塑剤の分析
食品試験部 津村ゆかり
3. マレーシアにおける食品衛生プログラムの強化プロジェクトへの参加
食品試験部 吉井公彦
4. 塩化ジブチルスズの偽妊娠ラットにおける脱落膜反応に対する影響
生物試験部 原園景

第177回 (平成13年10月23日)

1. 熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究
薬品試験部 小出達夫
2. 食用黄色5号アルミニウムレーキの不適事例について
食品試験部 辻澄子
海野有紀子
3. 可塑剤ブチルベンジルフタレート of ラット雄胎児の性分化に及ぼす影響
生物試験部 江馬真

第178回 (平成13年12月25日)

1. HPLCによる農産物中ハロスルフロンメチルの分析法の検討
食品試験部 石光進
2. 病原性真菌 *Candida albicans* 由来の β -(1 \rightarrow 3)-D-glucanの発熱活性および炎症性サイトカイン産生誘導活性
生物試験部 中川ゆかり

第179回 (平成14年1月29日)

1. ICH-Q7A: 原案GMPガイド

Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients

—製造工程管理への不純物プロファイルの適用—

- 薬品試験部 谷本剛
2. フタル酸エステル類 (プラスチック可塑剤) による食品汚染問題の全貌
—平成10年~13年度厚生科学研究のまとめ—
食品試験部 外海泰秀
3. NCマウスケラチノサイトにおけるインターフェロン γ の作用に関する研究
生物試験部 天野博夫
4. オリゴヌクレオチドの三重鎖形成能を利用した遺伝子発現制御
—アンチジーン法の有用性—
生物試験部 田中寿一

第180回 (平成14年2月26日)

1. 日局一般試験法「導電率測定法」の新規設定に関する研究
支所長 岡田敏史
2. ラットにおけるタンニン酸の代謝について
食品試験部 中村優美子
3. 黄色ブドウ球菌ペプチドグリカンによるI型ヘルパーT細胞機能の抑制について
生物試験部 村井敏美
中川ゆかり
那須功二

支所特別講演会

平成13年11月27日

「骨組織におけるエストロゲンおよびエストロゲン誘導体の役割」

東京薬科大学薬学部第一生化学助教授 宮浦千里

平成13年度に行った主な研究課題

Main Reseach Projects Carried Out in Fiscal Year 2001

特別研究（厚生労働省）

1. 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
2. 遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究（支生）
Studies on the methods of safety evaluation of chemicals based on the gene expression

国立機関原子力試験研究費（文部科学省）

1. 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）
Studies on the electron-beam sterilization of crude drugs and the detection methods for irradiated samples using gene analysis
2. 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
3. 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
4. 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.
5. 血液脳関門を透過する放射性組換え抗体の開発（機能）
Development of radiolabelled recombinant antibodies which can traverse blood brain barrier
6. γ 線照射による穏やかな重合を利用した精密な放出制御機能を有する刺激応答性薬物送達システムの設計（薬品）
Controlled Release of Drug Delivery Systems by low level γ -Irradiation
7. 新規ペプチド標識法を用いるアレルギー性試験法の開発に関する研究（機能）
Development of allergenicity test for chemicals using new peptide labeling method
8. 突然変異の誘発を促進する蛋白質の構造と機能に関する研究（変異）
Structure-function analysis of proteins that promote mutagenesis
9. 放射線照射を受けた天然医療材料の組織再生に及ぼ

す影響評価に関する研究（療品）

- Study on the effects of the gamma-ray irradiated natural biomaterials on the tissue Regeneration
10. 細胞周期特異的に応答する放射線トキシコゲノム手法による低線量放射線検知システム（毒性）
Radiation-toxicogenomics on low-dose ionizing radiation particularly in response to cell cycle specific gene-expression

科学技術振興調整費（文部科学省）

（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. オーガンリソースとしての中胚葉と器官形成クロックの研究（毒性）
Study of mesoderm as an organ resource and organogenic molecular clock
（知的基盤整備推進制度）
3. 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
4. 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.
（生活・社会基盤研究のうち生活者ニーズ対応研究）
5. アトピー性皮膚炎に関連する真菌の検索及び真菌による発症要因の研究（衛微）
Studies on fungal detection in the environments of atopic dermatitis (AD) patients and factors caused by AD
6. 生活環境からのアトピー性皮膚炎等の増悪化学物質の評価法の確立と検索に関する研究（環境）
Studies for protecting the human skin in general life
（固相精密合成法によるケミカルライブラリーの構築を基盤とする超機能性材料の創製と評価に関する研究）
7. 機能性材料ライブラリー創製を目的とした固相精密合成法の開発（有機）
Establishment of solid-state synthesis method useful

for the preparation of biologically active compounds
(重点基礎研究)

8. 天然医薬資源の国内導入とその利用に関する研究
(生薬)

Studies on the conservation of important medicinal plants

(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)(薬理, 病理, 食品, 食添)

9. 内分泌攪乱物質の食品用器具, 包装容器中の検索と食品への移行性, 並びに環境経由食品汚染の評価手法の開発(食品, 食添)

Screening of endocrine-disruptors in utensils containers and packages for foods and their migration into foods, and development of environmental risk assessment approach via food consumption.

国立機関公害防止等試験研究費(環境省)

1. 大気中多種化学物質暴露による疾病発生要因解明と寄与率評価に関する研究(環境)

The risk assessment and exposure assessment of multiple chemicals in outdoor air and indoor air

2. 遺伝子変化を指標とした環境化学物質による発がんリスク評価および機構解明のための手法に関する研究(変異)

Developments of screening methods for genetic changes relevant for a mechanistic cancer risk assessment of environmental chemicals

3. 水域環境における内分泌かく乱化学物質の次世代への影響評価法確立に関する分子遺伝子学的研究(環境)

Molecular-genetic research on effect evaluation method establishment to next generation of endocrine disrupting chemicals in the aquatic environment

4. 感染症に及ぼす内分泌かく乱物質の影響に関する研究(衛微)

Influences of endocrine disrupting agents on infectious disease

5. 水道水源水域等における親水性難分解有害物質の動態と水道リスク評価ならびに制御に関する研究(環境)

Research on behavior of hydrophilic hazardous chemicals with recalcitrance in the waters of drinking water source and on their risk assessment and control in water supply

6. 環境中の内分泌障害性物質が生体防御系に与える影響に関する研究(代謝)

Studies on the effects of endocrine disruptors on

immune system

地球環境研究総合推進制度(環境省)

1. 地下水利用に伴う広域的ヒ素汚染による生態影響及びヒト慢性中毒と金属汚染の低減化対策に関する予備的研究(環境)

Studies for plan to maintain the global environment protection on the widely arsenic-affected groundwater

未来環境創造型基礎研究推進制度(環境省)

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

2. 環境中の複合化学物質による次世代影響リスクの評価とリスク対応支援に関する研究(支生)

Assessment and control of risks to progeny from exposure to complex chemicals in the environment

厚生科学研究費補助金(厚生労働省)

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 fungi and parasitic fungi 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. 農産物の食中毒菌による汚染機序等に関する研究(衛微)

Studies on contamination mechanism of pathogenic bacteria for farm products

5. 調理施設と食品製造業における衛生管理に関する研究(衛微)

Studies on hygiene management for food preparation facilities and food manufacturers

6. 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

7. 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

8. 医薬安全総合研究の企画と評価に関する研究(副所)

- 長)
9. 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
 10. 生活安全総合研究の企画及び評価に関する研究 (所長)
 11. 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)
 12. ダイオキシン類の食品経由総摂取量調査研究 (食品)
Studies on the intake of dioxins from foods.
 13. 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
 14. 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
 15. 医薬品等の副作用又は医療用具の不具合情報の収集及び活用に関する研究 (情報)
Studies on the dissemination of adverse events of pharmaceuticals and medical devices
 16. 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 on health risks from exposure to environmental chemicals including endocrine disruptors
 17. 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
 18. 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
 19. 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, 情報, 支薬)
Development of network within provincial Institute of Health Sciences for
 20. 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
 21. フタル酸エステル類及びフェノール類の食品汚染実態及び摂取量に関する研究 (食品, 食添, 支食)
Studies on levels of phthalates and phenols in foods and estimation of daily intake
 22. 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
 23. 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
 24. 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, 情報, 支生)
Studies on test methods for evaluation of health effects by endocrine disruptors
 25. 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的研究 (薬理)
Drug interaction of thyroid toxic substances (Toxicokinetic studies)
 26. 新薬の有効性・安全性評価のためのヒト肝組織・細胞の利用法に関わる研究 (薬理)
Studies on the use of human liver tissues and hepatocytes for evaluation of new drugs
 27. 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
 28. 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
 29. 内分泌かく乱化学物質の発達期中枢神経障害に関する実験的研究 (病理)
Experimental study on the effect of endocrine disrupting chemicals for the developing nervous system
 30. 食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に関する実験的研究 (病理)
Experimental study on the carcinogenicity of endocrine disrupting chemicals in food
 31. 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する基礎研究 (生物, 療品)
Fundamental studies on quality and safety of cellular and tissue-based products
 32. 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究 (生物)
Fundamental Studies on the development of new generation gene therapy products
 33. 医薬品等の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究 (生物, 薬品, 審査センター)
Studies on the evaluation of quality and safety

- assurance of therapeutic products based on the international trends.
34. 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 (環境)
Research on toxicity, behavior and reduction of the chemical substance in water supply
35. 内分泌かく乱化学物質の水道水からの暴露等に関する調査研究 (環境)
Investigation and reaseach on exposure from tap water of the endocrine disrupting chemicals
36. ダイオキシン類等の試験・分析の信頼性確保に関する調査研究 (食品)
Studies on the reliability of the analytical methods of dioxins to ersure the reliability
37. 原子力施設の事故等緊急時における食品中の放射能の測定と安全性評価に関する研究 (食品)
Studies on analytical wethod and evaluation of radioactive contaminated foods in emergency
38. 食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究 (食品)
Studies on allergen and nonitering of food allergy
39. バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究 (食品)
Studies on the safety of the foods developed by biotechnology and development of highly functional foods
40. 照射食品の安全性について (食品)
Study on safty of airradiated fooads
41. 化学物質の活性酸素毒性の定量的評価手法に関する研究 (有機)
Development of quantitative analysis system for the evaluation of toxicity caused by reactive oxygen species generated from chemicals
42. プリオン病の診断技術の開発に関する研究 (衛徴)
Studies on the establishment of methodology for prion disease
43. ビル空気質と微生物汚染に関する研究
Studies on the air guality in building and the microbial contamination
44. 内分泌攪乱物質のヒトへの影響を指向した試験系の開発 (毒性)
Development of experimental systems for evaluation of the effects of endocrine disruptors on human
45. In vitro 染色体異常試験の代替としてのIn vitro 小核試験の評価
Studies on evaluation of in vitro micronucleus assay as an alternative method to the chromosomal aberration test
46. ダイオキシン類の健康影響に関する総合的評価研究 (機能, センター長, 毒性, 薬理, 病理, 変異, 評価, 支生)
Comprehensive assessment study on health effects by dioxins
47. 医薬品製剤原料の品質確保に関する研究
Studies on the quality assurance of active pharmaceutical ingredients and drug excipients (支薬)
48. ダイオキシン類の健康影響に関する総合的評価研究 (支生)
Couprenhensive assessment study on health effects by dioxius
49. 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
Uncertainty analysis for the risk assessment of the environmental chewicols icludiry endocrine disruptors
50. 分子運動性パラメーターの活用による次世代医薬品の安定性評価法の開発研究 (薬品)
Stability evaluation of novel pharmaceuticals by detemining molecular mobility
51. 溶出試験の変動要因の解明及びその制御に関する研究 (薬品)
Study on sources of variation in dissolution testing and their control
52. 癌への特異的標的化を可能とするアデノウイルスベクターシステムの開発 (生物)
Development of targeting adenovirus vector for tumor
53. バイオイメージングのためのチロシンリン酸化プローブの開発 (生物)
Fluorescent indicater for tyrosine phosphorylation
54. プラスチック製医療用具に係る溶出物質の曝露量の評価に関する研究 (療品)
Study on the evaluation of exposure amounts of chemicals leached from medical devices made of plastic materials
55. 医療用具の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究 (療品)
Studies on the evaluating method of effectiveness and quality of medical devices
56. 医療用具の有効性, 安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究 (療品)
Studies on the international harmonization for evaluating the effectiveness and quality of medical devices
57. WHO 飲料水水質ガイドライン改訂に対応する水道

- における化学物質等に関する研究（環境）
Research on the chemical substance in water supply in proportion to the WHO drinking water quality guideline revision
58. 食品用香料及び天然添加物の化学的安全性確保に関する研究（食添）
Studies on chemically ensuring the safety of food flavorings and natural food additives
59. 異常型プリオン蛋白質汚染のインビトロ高感度検出法の開発（食添，衛微）
Development of sensitive in vitro detection methods for infection prion proteins
60. 食品用器具，容器包装等の安全性確保に関する研究（食添，支食）
Studies on the safety of utensils and packages for food contact use
61. 医薬品，医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究（衛微）
Study on the methods for sterility assurance in drugs and medical devices
62. Toll-like receptor 4結合分子MD-2の機能解析と創薬への応用
Function analysis of MD-2, a novel accessory molecule for Toll-like receptor 4 and its application to pharmaceutical developments
63. 内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—（センター，毒性，情報，病理）
Studies on biological effect of endocrine disrupting chemicals with special emphasis on low dose effects, combined effects and their mechanism of action
64. ダイオキシン類の健康影響とくにTEFを中心としたリスク評価のための実験的研究（毒性，評価室，センター長）
Experimental studies on the health effect of dioxins, focusing on the evaluation of TEF in the process of risk assessment
65. 内分泌かく乱化学物質の作用機構に焦点を当てた新しいハイ・スルー・プットスクリーニング法の開発（毒性）
Studies on establishment of novel methods for high through put screening focused on mechanism of endocrine disruptors
66. 化学物質の内分泌かく乱性を確認する試験法の確立に関する研究（毒性，センター長）
Development of Testing strategy on the detection of Endocrine disrupting effects in chemicals
67. 食品中化学物質の毒性評価に及ぼす諸要因に関する調査研究（病理，毒性）
68. ガルシニア抽出物の安全性に関する研究（毒性）
Toxicity studies to evaluate effect of Garucinia extract on testes
69. 内分泌かく乱物質への影響評価を指向した試験系の開発（薬理）
Development of experimental systems for evaluation of the effects of endocrine disruptors on human
70. 生命科学研究に必須な培養細胞研究資源管理基盤の整備に関する総合的研究
Studies on establishing an infrastructural system of cell culture research resources
71. 特定保健用食材の安全性及び有用性に関する研究（支食）
Studies on the safety and usefulness of the specified health foodstuffs
72. 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究（支食）
Studies on the improvements of efficiency and precision in pesticide residue analysis
73. 1998年度（平成10年度）の食品中の食品添加物の行政検査結果を基にした防かび剤，無機塩類，酸化防止剤の摂取量の推定（食添，支食）
Estimation of the daialy intake of antifungal agents inorganic food additives and antioxidants based on the official inspection in fiscal year 1998
74. 生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定（食添，支食）
Estimation of the daialy intakes of food additives based on the production amount
- 科学研究費補助金（文部科学省）**
(特定A)
1. DES等内分泌攪乱物質の胎児神経幹細胞スフェア形成阻害の分子メカニズム解析（毒性）
Molecular mechanism of the inhibiting effect of diethylstilbestrol and endocrine disrupting chemicals on embryonic neuronal stem cell-derived neurosphere formation
2. 体節の繰り返し構造を生み出す分子機構（毒性）
Molecular mechanism of the metameric pattern formation in somitogenesis
(特定B)
3. 分子時計が刻む脊椎動物の分節パターン（毒性）
Segmental patterning controlled by a molecular clock
(基盤B)
4. 痛みの情報伝達におけるATP受容体群の役割に関する神経薬理学的研究（薬理）

- Neuropharmacological study for the role of ATP receptors in nociception and primary afferent transmission
5. 新規遺伝子治療薬創製のための発現調節機能を備えた安全な外来遺伝子発現系の開発 (生物)
Development of regulatable gene expression system with safety for gene therapy.
 6. 発がんプロモーター作用の研究：特に細胞間意義と相互関連
Prompter activity on carcinogenesis : relationship between GJIC and apoptosis
(基盤C)
 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. 単離心筋細胞を用いたエンゼリンA受容体脱感作機序の解明 (生薬)
Electrophysiological and pharmacological study on the mechanism for desensitization of ETA endothelin receptor, by using isolated single cardiomyocytes
 9. 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
 10. 環境化学物質によるマスト細胞からのケモカイン遊離機構の解析 (機能)
Study on the mechanism of chemokine release from mast cells by environmental chemicals
 11. 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 (毒性)
Signal cross-talk between AhR and hemopoietic stem cell
 12. 二次元電気泳動及びLC/MS/MSによる糖タンパク質糖鎖の構造と機能解析法の開発 (生物)
Application of two-dimensional gel electrophoresis and LC/MS/MS for the structural and functional analysis of the carbohydrates in glycoproteins.
 13. 光照射をトリガーとするエンジン分子の設計と合成
Molecular design and sythesis of a new class of triggerd endiyme
 14. 多因子乗算論に基づく薬物障害検知モデルとしての遺伝子改変促進加齢動物の作出と解析 (毒性)
Establish of biotechnology-derived recombinant mice expressing accelerated againg-a sensitive model for drug-induced epigenetic damages
(奨励A)
 15. 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
 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 (変異)
Studies on chromosomal rearrangements in cell lines by comparative genomic hybridization and whole chromosome painting.
 17. 発がんプロモーション時期に特異的に発現する遺伝子の解析 (病理)
Oncogenesis gene search specific for promotion stage in carcinogenesis
 18. 安全で高効率長期遺伝子発現を可能とするアデノーEBハイブリッドベクターの開発
Development of adeno-EB hybrid vector
 19. 一酸化炭素・ヒドロキシラジカル同時発生化合物の開発
Synthesis of NO generating compounds with hydroxyl radical releasing ability
 20. 新規ヒドロキシルラジカルドナーの開発
Studies on a new type of hydroxyl radical donor
 21. GPIアンカー型糖蛋白質の品質管理における小胞体シャペロンの役割 (機能)
Role of chaperone proteins on quality control of GPI-anchored glycoproteins
 22. 住宅の断熱材の位置とカビ発生に関する研究
Studies on the location of housing in sulator and the molod occurreuce
 23. アンタゴニスト利用によるエンドトキシンの機能的受容体分子の解明
Elucidation of the functional endotoxin receptor molecules by using antagoist structure of the lipidA
 24. 植物エストロゲンがヒトの健康増進に資する作用の機構に関する基礎的研究
Basic studies on mechanis ms of action that is boneficial for human health by phytoestrogens
 25. サイレントシナプスの画像化法を用いた神経可塑性に関する研究
Visualigation of silent synapses and its application for the study of neuronal plasticity
 26. モデルペプチドを用いたアポリポタンパク質脂質膜結合機構に関する研究 (支薬)
Studies on the binding mechauism of apolipoproteins and lipid-menbraue
 27. C60内包型新規超分子化合物の合成
Synthesis of novel supramolecular capsule for C60
(若手研究B)

28. 転写因子 Mesp1 を指標としたマウス心筋・血管内皮前駆細胞の単離と分化の解析 (毒性)

Analysis of molecular mechanisms on the differentiation of the precursor cell in cardiovascular system by tracing the Mesp1-expressing cells

29. 体節形成における Notch シグナリング遺伝子の相互作用の発生遺伝子学的解析 (毒性)

Analysis of genetic interaction among Notch signaling genes in somitogenesis

30. 分子生物学的手法と GFP 分子可視化法の併用による受容体構造—機能相関の研究 (薬理)

Studies on receptor structure-function relationship using molecular biology and GFP visualization

がん研究助成金 (厚生労働省)

1. 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

2. ヘテロサイクリックアミンの新しいトランスジェニックマウスモデルに対する変異原性の分子解析 (変異)

Molecular analysis of the mutagenicity of heterocyclic amines on novel transgenic mouse model

3. in vivo での突然変異と発がんの関連に関する研究 (病理, 変異)

Studies on the relationship between mutagenicity and carcinogenicity in vivo

4. 遺伝子改変動物の発がん特性研究

Characteristic of transgenic animal on carcinogenesis

5. がんの化学予防効果の検索モデルの検討 (病理)

Development of a hamster medium-term model for pancreatic cancer chemoprevention

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

4. 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

5. 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) (トウガラシ色素, アカネ色素, 塩化マグネシウム N-アセチルグルコサミン) (病理)

Chronic toxicity and carcinogenicity tests in rats (Ammonium sulfate, Madder color, Magnesium chloride)

6. 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

7. 食品添加物安全性再評価費・90日間投与試験 (ラット) (モリン, デュナリエラカロテン, ミアナット色素) (病理, 毒性)

Ninety-days toxicity studies of natural food additives

8. 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

9. 食品添加物安全性再評価費・催奇形性試験 (ラット) (支食)

Teratology study of hinokitiol in rats

10. 容器包装等試験検査費 (食添)

Studies on food package and container

11. 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

12. 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 (レバミゾール) (病理)

Mechanistic study on toxicity/carcinogenicity of some drug residues contained in food products of animal origin (levamisole)

13. 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)
14. 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.
 15. 水質試験検査 (水質管理調査・未規制物質基準化検討・水道水質分析に係る外部精度管理調査) (環境, 病理)
Standardization of analytical methods for drinking water
 16. 食品添加物規格策定費・既存添加物の規格基準の設定 (食添, 支食)
Establishment of standards and specifications of natural food additives
 17. 容器包装規格基準等作成費・フタル酸エステル類を有するポリ塩化ビニル製器具・容器包装及びおもちゃの試験法の設定 (食添)
Establishment of analytical methods for phthalates in polyvinyl chloride articles for food contact use and toys
- 家庭用品等試験検査費 (厚生労働省)**
1. 既存化学物質の安全性試験 (生殖毒性試験) (支生)
Reproductive and developmental toxicity study of butyltin trichloride in rats
 2. 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
 3. 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
 4. 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)
 5. 化学物質の毒性情報等提供システムの調査・検討
Studies on the dissemination system of chemical information
構造活性相関に関する調査
Studies on the structure activity relationships (SAR)
 6. 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
7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 化学物質の毒性情報等提供システムの調査・検討 (情報)
Studies on the dissemination system of chemical information
- 厚生労働本省庁費 (厚生労働省医薬局)**
1. 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
 2. アカゲザルの薬物自己投与試験法を用いた薬物依存性の基礎的研究 (毒性)
Studies on drug dependence using drug self-administration techniques in rhesus monkeys
- 厚生労働本省医薬品等審査業務庁費 (厚生労働省医薬局)**
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. 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
 3. 医療用後発品品質確保事業 (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) (支薬)
Quality control of generic drugs (Reliability of quality assurance on provincial health sciences institute)
 4. 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)
- 厚生労働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 (第三次) (北植, 筑植, 種植)
Study on direct extract method for opium alkaloid

from papaver somniferum

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 Guideline 407 enhanced" 案に基づくラットを用いた反復投与試験 (ジェニスタイン) (病理)

Validation study of proposed protocol for an "Enhanced OECD Test Guideline 407" using genistein

環境省庁環境保全調査費

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官民共同プロジェクト研究 (ヒューマンサイエンス基礎科学研究事業)

1. 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)

Andlysis of function of ATP receptors in CNS and its application to medication

2. 生殖細胞系列の完全連続培養系の開発
3. 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.

4. 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

5. 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 metabolic enzymes and evaluation of drugs used for high-risk patients

6. 薬用植物の開発研究 (生薬)

Studies on development of medicinal plants

7. 創薬における毒性回避のための戦略: cDNAマイクロアレイ解析による関連因子の探索と毒作用予見技術の確立 (毒性)

Tox-co-pharmaco-genetics for safety predicting system to identify the toxicogenesby cDNA microarray techmique

ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究事業

1. グリア・ニューロン・ネットワークにおけるATPの生理機能 (薬理)

Physiological function of ATP on glia-neuron-interaction

2. Mutagenesis protein の構造と機能に関する研究
Research on structure and function of mutagenesis proteins

ヒューマンサイエンス振興財団エイズ医薬品開発推進事業

1. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 (衛微)
Preliminary screening for antiviral AIDS drugs

ヒューマンサイエンス振興財団創薬科学総合研究事業

1. 神経伝達物質および内在ペプチドによる心筋イオンチャンネル調節の分子機序の解明 (生薬)

Electrophysiological and molecular biological studies on mechanisms by which neurotransmitters and endogenous peptides regulate cardiac ion-channels

2. シナプス伝達におけるP2プリン受容体群の機能の解明 (薬理)

Function of P2-purinoceptors on synaptic transmission

3. 情報理論に基づいた分析値信頼性評価手法の研究 (療品, 食品, 支薬)

A method for evaluating the reliability of measurements on the basis of information theory

4. ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発 (変異遺伝部)

Development of high throughput genotoxicity test

ヒューマンサイエンス振興財団国際研究グラント事業

1. 好熱性誤りがちDNAポリメラーゼの結晶構造解析に関する基礎的研究

Study on the analysis for crystal structure of error-prone hyper-thermophilic DNA polymerase

2. 天然薬物からのリーシュマニア治療薬リード化合物の探索と生体機能の解明

Studies on antileishmanial compounds from natural resources

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

1. 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

2. 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
3. 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
 4. 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
 5. ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用
Elucidation of mechanisms underlying the P2 receptor mediated nociceptin transmission and its practical application
 6. 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 (支葉)
Fundamental studies on the biomedical applications of anionic polysaccharides
 7. 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 invitro cell culture assay system for detecting pyrogenic contamination in pharmaceutical
 8. 非晶質の特異性を活かしたバイテク薬物及び超難溶性薬物の製剤化とその評価 (薬品)
Preparation and evaluation of amorphous dosage form for unstable proteins and highly hydrophobic pharmaceuticals
 9. DNA-カオチン性脂質複合体製剤の保存安定性の評価法に関する研究 (薬品)
Storage Stability of Lyophilized DNA-Cationic Liposome Complex
 10. 医薬品の分析法に関する研究 (薬品)
Development of analytical methods for medicines
 11. ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の開発研究 (生物)
Development of methods analyzing cellular functions oriented towards high-throughput screening
 12. バイオテクノロジー応用医薬品等の評価技術の開発 (生物)
Studies on the quality control of biotechnology products
 13. 外来遺伝子の発現調節能を有した高効率遺伝子導入・発現系の開発 (生物)
Development of efficient and regulated gene expression system
 14. 低酸素センサーを介する虚血性及び変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発 (生物)
Drug discovery on oxygen sensing mechanisms in ischemic and degenerative neuronal Diseases
 15. 生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究 (療品)
Development of the material and evaluation technology excellent in biocompatibility and Functionality
 16. 医薬品等における汚染菌および汚染菌体成分検出のための正当な評価と新試験法の開発に関する研究
Development of a new test method for properly evaluating contaminations of pharmaceuticals with bacteria and their products
 17. 新しい白血球の制御方法を適用したガン細胞の浸潤・転移抑制方法の開発研究 (代謝)
Application of new regulating methods for leukocytes to suppression of the metastasis of tumor cells
 18. 白血球機能制御を目的とするアンチセンス医薬品の開発と有効性評価に関する研究 (代謝)
Studies on development and evaluation of antisense drugs to regulate leukocyte functions
 19. 細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究 (代謝)
Role of cellular lipid transport systems in assembly and secretion of serum lipoproteins
 20. 覚せい剤易再燃性に関連する大脳辺縁系可塑性におけるチャンネルの分子薬理学解析 (代謝)
Molecular pharmacological analysis of ion channels involved in functional plasticity of limbic system responsible for sensitization antihypnotics
- 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)
 4. 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

5. 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
6. 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
7. 薬剤反応性遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業（機能，薬理，薬品，環境，代謝）
Pharmacogenetic studies on drug-responsive molecules and their clinical applications

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 bioequivalence of oral drug products by in vivo tests

国際協力事業団調査研究費

1. 不正医薬品対策に関する研究（薬品）
Studies on measures for counterfeit and substandard drugs

薬学研究奨励財団研究助成金

1. アポリポ蛋白質Eの構造と生理機能（支薬）
Structure and Function of Apolipoprotein E

メディカルフロンティア

1. 核内受容体リガンド候補化合物に対する転写活性化

用の検定法の開発（生物）

Development of screening methods using GFPs of ligands for nuclear receptors

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

製品検査等の処理状況

Survey of the Results of Food Coal-Tar Dyes

平成13年度の製品検査等の処理状況は次のとおりである。

区 分	平成13年度処理件数			対前年度	対前年度
	東 京	大 阪	合 計	増 減 数	増 減 率
	件	件	件	件	%
製 品 検 査	(0) 0	(176) 162	(176) 162	△ 14	92.00
特 別 審 査 試 験	(85) 64	(0) 0	(85) 64	△ 21	75.30
特 別 行 政 試 験	(276) 228	(0) 0	(276) 228	48	82.61
一 斉 取 締 試 験	(91) 260	(88) 58	(179) 318	139	177.70
輸 入 食 品 検 査	(0) 0	(0) 0	(0) 0	0	-
合 計	(452) 552	(267) 220	(719) 772	149	

() 内数字は平成12年度処理件数

製品検査等の処理実績（次頁以下に掲載）は
次のとおりである。

- 平成13年度製品検査品目別月別判定別件数実績表……367頁 ○平成13年度特別行政試験実績表……368頁
○平成13年度特別審査試験月別件数実績表……367頁 ○平成13年度一斉取締試験判定別件数実績表……368頁

平成13年度製品検査品目別月別判定別件数実績表

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	20	-	20	20	-	20	18	-	18	12	-	12	19	-	19	11	-	11
計	20	-	20	20	-	20	18	-	18	12	-	12	19	-	19	11	-	11

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
6	-	6	9	-	9	18	-	18	12	-	12	12	-	12	5	-	5	162	-	162
6	-	6	9	-	9	18	-	18	12	-	12	12	-	12	5	-	5	162	-	162

平成13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	1	3	3	7	7	3	3	-	-	5	5	3	40
生物薬品部	-	4	4	5	-	-	1	2	-	-	-	1	17
衛生微生物部	-	-	-	-	5	-	-	-	-	1	-	1	7
	1	7	7	12	12	3	4	2	-	6	5	5	64

平成13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	137	
		15	薬品部
		122	筑波試験場
	輸入生あへんのモルヒネ含有率試験について	91	薬品部
合 計		228	東 京 228件 大 阪 0件

平成13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	260	0	0	260
大 阪	58	0	0	58
合 計	318	0	0	318

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。

別表 日本薬局方標準品 (平成14年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	アルプロスタジル	10mg入り 1本	63,800 ^円	・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入り 1本	29,600	・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	ウリナスタチン	3600単位入り 1本	36,800	・ウリナスタチンおよびその製剤の定量法
4	ウロキナーゼ	1,000単位入り 1本	19,700	・ウロキナーゼおよびその製剤の定量法
5	エルカトニン	10単位入り 2本	44,400	・エルカトニンおよびその製剤の定量法
6	エルゴカルシフェロール	100mg入り 1本	20,800	・エルゴカルシフェロールの確認試験および定量法
7	塩化ベルベリン	30mg入り 1本	32,400	・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
8	エンドトキシン10000	10,000単位 1本	23,200	・エンドトキシン試験
9	エンドトキシン100	100単位 3本	17,800	・エンドトキシン試験
10	カリジノゲナーゼ	100単位入り 1本	16,900	・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
11	含糖ペプシン	5g入り 1本	25,300	・含糖ペプシンの定量法
12	ジトキシシン	20mg入り 1本	19,200	・ジトキシシン, 同錠, 同注射液の純度試験
13	グリチルリチン酸	30mg入り 1本	35,700	・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
14	血清性性腺刺激ホルモン	800単位入り 2本	42,200	・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
15	高分子量ウロキナーゼ	800単位入り 1本	25,000	・ウロキナーゼおよびその製剤の確認試験および定量法
16	コハク酸トコフェロール	150mg入り 1本	21,500	・コハク酸トコフェロールカルシウムの定量法
17	コレカルシフェロール	100mg入り 1本	20,500	・コレカルシフェロールの確認試験および定量法
18	酢酸トコフェロール	150mg入り 1本	21,500	・酢酸トコフェロールの確認試験および定量法
19	ジキタリス	1g入り 3本	18,900	・ジキタリス, 同末の定量法
20	ジギトキシシン	50mg入り 1本	18,900	ジギトキシ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

日本薬局方標準品

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
21	ジゴキシン	50mg入り 1本	18,900	・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
22	シュウ酸カルシウム一水和物	100mg入り 1本	22,000	・熱分析法・熱重量測定法における質量スケールの校正
23	ショ糖オクタ硫酸エステル カリウム	1g入り 1本	18,000	・スクラルファートの定量法
24	スウェルチアマリン	20mg入り 1本	34,100	・センブリ、センブリ末の定量法
25	セクレチン	100単位入り	38,400	・セクレチンの定量法
26	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位入り 1本	40,400	・胎盤性性腺刺激ホルモン、注射用胎盤性性腺刺激ホルモンの定量法
27	デスラノシド	100mg入り 1本	19,700	・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
28	トコフェロール	150mg入り 1本	21,600	・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
29	トリウムシノロン	100mg入り 1本	19,300	・トリウムシノロンの確認試験および定量法
30	トリウムシノロンアセトニド	100mg入り 1本	19,300	・トリウムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
31	トロンピン	500単位入り 2本	43,900	・トロンピンの定量法
32	ニコチン酸トコフェロール	150mg入り 1本	23,600	・ニコチン酸トコフェロールの確認試験および定量法
33	脳下垂体後葉	20mg入り 2本	19,000	・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
34	バイカリン	30mg入り 1本	29,000	・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
35	薄層クロマトグラフ用 酢酸レチノール	10,000単位入り 10カプセル	9,000	・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
36	薄層クロマトグラフ用 パルミチン酸レチノール	10,000単位入り 10カプセル	6,900	・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
37	ヒトインスリン	50mg入り 1本	32,400	・ヒトインスリンおよびその製剤の定量法
38	フルオシノニド	100mg入り 1本	20,800	・フルオシノニドの確認試験および定量法
39	フルオシノロンアセトニド	50mg入り 1本	19,100	・フルオシノロンアセトニドの定量法
40	フルオロメトロン	100mg入り 1本	19,700	・フルオロメトロンおよびその製剤の定量法
41	プロピオン酸テストステロン	50mg入り 1本	18,700	・プロピオン酸テストステロンおよびその製剤の定量法

日本薬局方標準品

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
42	プロピオン酸ベクロメタゾン	100mg入り 1本	19,700 ^円	・プロピオン酸ベクロメタゾンの確認試験および定量法
43	ベオニフロリン	20mg入り 1本	33,900	・ベオニフロリンの定量法 ・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
44	ヘパリンナトリウム	1,200単位 1本	34,900	
45	メシル酸 ジヒドロエルゴトキシン	100mg入り 1本	35,200	・メシル酸ジヒドロエルゴトキシンの定量法
46	メチルジゴキシン	50mg入り 1本	15,600	・メチルジゴキシンの確認試験および定量法
47	ラナトシドC	100mg入り 1本	19,100	・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
48	硫酸プロタミン	100mg入り 1本	34,300	・イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
49	リン酸ヒドロコルチゾン ナトリウム	100mg入り 1本	17,400	・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
50	リン酸ベタメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	17,800	・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14年4月1日現在)

号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	インドシアニングリーン	300mg入り 1本	18,100	・インドシアニンググリーンおよびその製剤の定量法
2	エストラジオール	50mg入り 1本	19,100	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
3	エストロン	50mg入り 1本	19,100	・エストロンおよびその製剤の確認試験及び定量法
4	塩酸チアミン液	1mg入り 10本	10,800	・チアミンおよびその製剤の定量法
5	下垂体性性腺刺激ホルモン	20mg入り 1本	45,300	・下垂体性性腺刺激ホルモンのバイオアッセイ
6	吉草酸ジフルコルトロン	100mg入り 1本	17,900	・吉草酸ジフルコルトロンおよびその製剤の定量法
7	酢酸デキサメタゾン	100mg入り 1本	18,600	・酢酸デキサメタゾンおよびその製剤の定量法
8	酢酸レチノール	10,000単位入り 5カ ⁷ セル	18,500	・酢酸レチノールおよびその製剤の定量法
9	シ克蘭デラート	300mg入り 1本	18,200	・シ克蘭デラートの定量法
10	G-ストロファンチン	100mg入り 1本	19,600	・G-ストロファンチンの定量法、同注射液の確認試験および定量法
11	センノシド	150mg入り 1本	25,600	・センノシドの定量
12	組織培養ウロキナーゼ	8,000単位入り 1本	25,200	・組織培養ウロキナーゼの定量法
13	低分子量ヘパリン	100mg入り 1本	34,500	・低分子量ヘパリンおよびその製剤の確認試験および定量法
14	テオプロミン	100mg入り 1本	13,900	・ベントキシフィリンの純度試験
15	パルミチン酸レチノール	10,000単位入り 5カ ⁷ セル	17,500	・パルミチン酸レチノールおよびその製剤の定量法
16	ヒアルロニダーゼ	500mg入り 1本	22,700	・注射用ヒアルロニターゼの定量法
17	ヒト成長ホルモン	4mg入り 1本	42,700	・ヒト成長ホルモンおよびその製剤の確認試験および定量法
18	フルドロキシコルチド	100mg入り 1本	23,100	・フルドロキシコルチドおよびその製剤の定量法
19	マレイン酸メチルエルゴメトリン	50mg入り 1本	18,600	・マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法
20	融点測定用 アセトフェネチン, カフェイン, アルファニルアミド, アルファピロリジン, リニリン	各1g入り 6本	60,700	・融点測定用温度計, 同装置の補正
21	酪酸ヒドロコルチゾン	100mg入り 1本	19,700	・酪酸ヒドロコルチゾンおよびその製剤の定量法
22	リゾチーム	500mg入り 1本	33,000	・リゾチーム製品の定量法
23	リン酸デキサメタゾンナトリウム	100mg入り 1本	17,300	・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
24	リン酸ヒスタミン	50mg入り 1本	16,000	・ヒスタミン試験
25	リン酸プレドニゾロンナトリウム	100mg入り 1本	17,400	・リン酸プレドニゾロンナトリウムおよびその製剤の定量法

国立医薬品食品衛生研究所標準品 (色素試験用標準品)

(平成14年4月1日現在)

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	アシッドバイオレット6B	1g入り 1本	3,850 ^円	・医薬品, 化粧品および製剤中のアシッドバイオレット6Bの確認試験
2	アシッドレッド	1g入り 1本	3,950	・食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアシッドレッドの確認試験
3	アゾルピンエキストラ	1g入り 1本	3,550	・粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のアゾルピンエキストラの確認試験
4	アマランス	1g入り 1本	3,650	・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	5,700	・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	3,700	・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	3,550	・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	3,550	・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	3,650	・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	3,400	・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	3,400	・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	3,400	・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	3,400	・粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のオイルレッドXOの確認試験
14	オレンジI	1g入り 1本	3,450	・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	3,450	・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	3,750	・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	3,400	・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	3,450	・食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のタートラジンの確認試験
19	テトラクロルテトラブロムフルオレセイン	1g入り 1本	3,550	・外用医薬品, 化粧品および製剤中のテトラクロルテトラブロムフルオレセインの確認試験
20	テトラブロムフルオレセイン	1g入り 1本	3,650	・外用医薬品, 化粧品および製剤中のテトラブロムフルオレセインの確認試験

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
21	トルイジンレッド	1g入り 1本	3,350 ^円	・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	3,500	・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	3,450	・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	パーマネントオレンジ	1g入り 1本	3,350	・外用医薬品,化粧品および製剤中のパーマネントオレンジの確認試験
25	ハンサエロー	1g入り 1本	3,400	・外用医薬品,化粧品および製剤中のハンサエローの確認試験
26	ファストグリーンFCF	1g入り 1本	4,550	・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	3,950	・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	3,750	・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	3,500	・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	3,550	・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	3,650	・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	3,550	・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	3,650	・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	リソールルピンBCA	1g入り 1本	3,650	・外用医薬品,化粧品および製剤中のリソールルピンBCAの確認試験
35	レーキレッドC	1g入り 1本	3,650	・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	3,650	・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	3,650	・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	3,550	・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13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
アルプロスタジル	36	0	25	0	11	
インスリン	41	0	7	1	33	
インドシアニングリーン	8	20	13	0	15	
ウリナスタチン	18	0	16	0	2	
ウロキナーゼ	9	100	9	0	100	
エストラジオール	53	50	84	0	19	
エストロン	34	0	25	0	9	
エルカトニン	96	0	58	0	38	
エルゴカルシフェロール	18	162	138	0	42	
塩化ベルベリン	19	200	191	2	26	
塩酸チアミン液	4	20	9	0	15	
エンドトキシシン10000	558	1,212	1,431	0	339	
エンドトキシシン100	167	1,558	1,487	2	236	
下垂体性性腺刺激ホルモン	36	53	62	0	27	
カリジノゲナーゼ	47	50	65	2	30	
含糖ペプシン	3	50	26	0	27	
甘草酸ジフルコルトロン	24	20	19	0	25	
ギトキシシン	27	10	32	0	5	
グリチルリチン酸	142	588	723	1	6	
血清性性腺刺激ホルモン	12	100	21	0	91	
高分子量ウロキナーゼ	0	100	79	0	21	
コハク酸トコフェロール	72	86	158	0	0	
コレカルシフェロール	103	128	177	1	53	
酢酸デキサメタゾン	15	0	2	0	13	
酢酸トコフェロール	28	1,000	1,001	1	26	
酢酸レチノール	26	0	22	0	4	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシシン	47	0	10	0	37	
シクランデラート	15	0	3	0	12	
ジゴキシシン	51	100	128	0	23	
シュウ酸カルシウム水和物	55	0	20	0	35	
ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	32	0	19	0	13	
G-ストロファンチン	24	0	0	0	24	
スウェルチアマリン	50	0	21	0	29	
セクレチン	28	50	11	0	67	
セノシド	54	0	15	0	39	
組織培養ウロキナーゼ	47	0	6	0	41	
胎盤性性腺刺激ホルモン	101	0	97	0	4	
低分子量ヘパリン	40	0	21	0	19	
テオブロミン	20	0	1	0	19	
デスラノシド	11	0	10	0	1	
トコフェロール	71	400	308	0	163	
トリアムシノロン	31	0	3	0	28	
トリアムシノロンアセトニド	39	0	6	0	33	
トロンピン	44	50	76	0	18	
ニコチン酸トコフェロール	34	0	17	0	17	
脳下垂体後葉	29	0	10	0	19	
バイカリン	19	50	48	0	21	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	25	50	25	0	50	
薄層クロマトグラフ用バルミチン酸レチノール	18	70	30	0	58	
バルミチン酸レチノール	20	100	81	1	38	
ヒアルロニダーゼ	52	0	1	0	51	
ヒトインスリン	52	0	26	0	26	
ヒト成長ホルモン	82	100	37	0	145	
フルオシノニド	27	20	17	0	30	
フルオシノロンアセトニド	39	0	15	0	24	

標 準 品 名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数 量	年 度 末 在庫数量	備 考
	個	個	個	個	個	
フルオロメトロン	33	30	49	0	14	
フルドロキシコルチド	33	0	6	0	27	
プロピオン酸テストステロン	33	0	3	0	30	
プロピオン酸ベクロメタゾン	20	80	62	0	38	
ベオニフロリン	10	217	186	0	41	
ヘパリンナトリウム	100	100	128	0	72	
マレイン酸メチルエルゴメト リン	8	0	2	0	6	
メシル酸ジヒドロエルゴトキ シン	34	0	3	0	31	
メチルジゴキシン	0	30	0	0	30	
融点測定用	40	20	56	0	4	
アセトアニリド [＊] , アセトフ エネチシ [＊] ン, カフェイン, スルファニルアミト [＊] , スル ファヒ [＊] リシ [＊] ン, ワニリン						
酪酸ヒドロコルチゾン	0	20	3	0	17	
ラナトシドC	12	20	15	0	17	
リゾチーム	89	192	246	0	35	
硫酸プロタミン	39	0	4	0	35	
リン酸デキサメタゾンナトリ ウム	46	0	15	0	31	
リン酸ヒスタミン	0	30	29	0	1	
リン酸ヒドロコルチゾンナト リウム	40	0	26	0	14	
リン酸プレドニゾロンナトリ ウム	32	0	20	0	12	
リン酸ベタメタゾンナトリウ ム	42	0	40	0	2	
計	3,379	7,236	7,835	11	2,769	

(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	63	0	0	0	63	
アシッドレッド	439	0	5	2	432	
アゾルビンエキストラ	66	0	6	0	60	
アマランス	379	0	2	0	377	
アルラレッドAC	280	0	6	0	274	
インジゴ	121	0	2	0	119	
インジゴカルミン	480	0	2	1	477	
エオシン	105	0	1	0	104	
エリスロシン	420	0	4	0	416	
オイルエローAB	208	0	1	0	207	
オイルエローOB	215	0	1	0	214	
オイルオレンジSS	218	0	2	0	216	
オイルレッドXO	192	0	1	0	191	
オレンジI	263	0	1	0	262	
オレンジII	143	0	2	0	141	
ギネアグリーンB	54	0	6	0	48	
サンセットエローFCF	426	0	5	0	421	
タートラジン	397	0	4	0	393	
テトラクロルテトラブROMフ ルオレセイン	141	0	1	0	140	
テトラブROMフルオレセイン	102	0	1	0	101	
トルイジンレッド	68	0	1	0	67	
ナフトールエローS	126	0	2	0	124	
ニューコクシン	430	0	3	2	425	
パーマネントオレンジ	18	0	1	0	17	
ハンサエロー	65	0	1	0	64	
ファストグリーンFCF	410	0	2	1	407	
ファストレッドS	188	0	1	0	187	
ブリリアントブルーFCF	362	0	9	0	353	
フルオレセイン	178	0	2	0	176	
フロキシシン	259	0	3	0	256	
ボンソーR	238	0	1	0	237	
ボンソーSX	138	0	2	0	136	
ボンソー3R	148	0	1	0	147	
リソールルビンBCA	348	0	4	0	344	
レーキレッドC	375	0	1	0	374	
レーキレッドCBA	112	0	1	0	111	
レーキレッドDBA	153	0	1	0	152	
ローズベンガル	394	0	5	0	389	
計	8,722	0	94	6	8,622	

国立医薬品食品衛生研究所報告第120号人名索引 (アルファベット順)

- A**
- Abe, Yukiko (阿部有希子) 274, 299, 316
 Adachi, Reiko (安達玲子) 242, 323
 Aihara, Maki (相原真紀) 234, 286
 Aisaki, Kenichi (相崎健一) 327
 Akiyama, Hiroshi (穠山 浩) 208, 209, 225, 241, 285, 299, 308, 314, 315, 322, 351
 Akiyama, Takumi (秋山卓美) 285
 Amakura, Yoshiaki (天倉吉章) 224, 271, 272, 313
 Amano, Hiroo (天野博夫) 354
 Ando, Masanori (安藤正典) 6, 219, 220, 221, 259, 295, 298, 311, 312, 313
 Aoyagi, Nobuo (青柳伸男) 279, 295, 298, 303
 Arato, Teruyo (荒戸照世) 319
 Arimura, Takuro (有村卓朗) 302, 333, 352
 Asano, Kazunobu (浅野和信) 296
 Asano, Takuya (浅野卓哉) 209
 Aso, Yukio (阿曾幸男) 196, 197, 303
 Azumi-Mayuzumi, Satoko (黛(安住)聡子) 317
- C**
- Chung, Youn-son (鄭 然孫) 220
- E**
- Ema, Makoto (江馬 眞) 267, 274, 275, 276, 297, 300, 338, 339, 354
 Ezaki, Katsushi (江崎勝司) 298
- F**
- Fuchino Hiroyuki (渕野裕之) 271, 276, 339, 340
 Fujino, Tomohiro (藤野智史) 323
 Fujishita, Kayoko (藤下加代子) 328
 Fukuhara, Kiyoshi (福原 潔) 217, 236, 311, 319, 320
 Fukuzawa, Kaoru (福澤 薫) 324
 Furukawa, Fumio (古川文夫) 252, 253, 254, 255, 256, 330, 331, 332, 336
- G**
- Goda, Yukihiro (合田幸広) 208, 209, 210, 222, 225, 227, 241, 282, 298, 308, 309, 314, 315, 322, 343
 Goto, Toshihiko (後藤敏彦) 300
- H**
- Hachisuka, Akiko (蜂須賀暁子) 241, 322, 323
 Haishima, Yuji (靑島由二) 200, 215, 282, 305, 310, 324, 339, 351
 Hakamata, Wataru (袴田 航) 236, 320
 Hamada, Mika (濱田実香) 298
 Hamano (Nagaoka) Megumi (長岡(浜野)恵) 316
 Hanioka, Nobumitsu (埴岡伸光) 219, 220, 240, 311, 312, 313, 322, 351
 Harazono, Akira (原園 景) 267, 274, 275, 276, 338, 339, 354
 Harigae, Naoki (張替直輝) 315
 Hasegawa, Chie (長谷川千恵) 310, 339
 Hasegawa, Ryuichi (長谷川隆一) 244, 245, 265, 279, 292, 300, 302, 324, 338, 348, 349, 350
 Hashimoto, Setsuko (橋本せつ子) 296
 Hashimoto, Masaharu (橋本正晴) 279
 Hasumura, Mai (蓮村麻衣) 301, 302, 276, 293, 339, 340
 Hatakeyama, Yoshio (畑山好雄) 276, 293, 339, 340
 Hayakawa, Takao (早川堯夫) 89, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 280, 281, 282, 295, 304, 305, 306, 307
 Hayashi, Makoto (林 眞) 253, 260, 261, 279, 292, 311, 333, 334, 335, 337, 338, 348
 Hayashi, Yuzuru (林 譲) 215, 224, 256, 310, 313, 314, 325, 351
 Higawa, maki (永川真希) 319
 Hirabayashi, Yoko (平林容子) 39, 247, 296, 325, 326, 327
 Hirata, Junichi (平田淳一) 300
 Hirose, Akihiko (広瀬明彦) 245, 292, 302, 324, 338, 345, 351
 Hirose, Masao (広瀬雅雄) 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 301, 302, 330, 331, 332, 333, 352
 Hishida, Atsuyuki (菱田敦之) 340
 Hojo, Maki (北條麻紀) 337, 338
 Hong, Chih-chun (洪 志駿) 317
 Honda, Futaba (本田二葉) 319, 260, 261, 296, 334, 335
 Honma, Masamitsu (本間正充) 260, 261, 296, 334, 335
 Hosokawa, Keizo (細川敬三) 340
 Hosono, Tetsuji (細野哲司) 206, 305, 307
 Huo, Yan (霍 艶) 325, 326, 327
 Hyuga, Masashi (日向昌司) 199, 200, 304, 305, 306
 Hyuga, Sumiko (日向須美子) 199, 200, 305, 306
- I**
- Ichikawa, Tomoko (市川朋子) 212
 Igarashi, Katsuhide (五十嵐勝秀) 248, 288, 325, 327, 328

Iida, Osamu (飯田 修) 277, 308, 340, 341, 342
 Iizuka, Ryota (飯塚了太) 337, 338
 Ikarashi, Yoshiaki (五十嵐良明) 216, 217, 298, 311
 Imai, Toshio (今井俊夫) 258, 301, 302, 332, 333, 352
 Imazawa, Takayoshi (今沢孝喜) 253, 254, 259, 331, 332
 Inoue, Kazuhide (井上和秀) 249, 296, 324, 328, 352
 Inoue, Tohru (井上 達) 39, 244, 245, 247, 248, 255, 279, 288, 296, 300, 301, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 332, 347, 351
 Isama, Kazuo (伊佐間和郎) 217, 311
 Ishibashi, Mumio (石橋無味雄) 298
 Ishida, Seiichi (石田誠一) 240, 251, 252, 322, 333, 351
 Ishii, Fumiyoshi (石井文由) 303
 Ishimitsu, Susumu (石光 進) 271, 272, 273, 302, 339, 354
 Ishiwata, Hajime (石綿 肇) 229, 230, 273, 274, 293, 295, 296, 299, 316, 339
 Isuzugawa, Kazuto (五十鈴川和人) 225, 322
 Itahashi, Yuka (板橋由佳) 212
 Itoh, Satsuki (伊藤さつき) 89, 200, 304, 305, 306
 Iwata, Miho (岩田美保) 112, 115, 119, 124, 270
 Izutsu, Kenichi (伊豆津健一) 196, 300, 303

J

Jennifer M. Oribello 340
 Jinno, Hideto (神野透人) 219, 220, 221, 311, 312, 313, 351

K

Kaburagi, Koichi (鍋木紘一) 341
 Kadota, Toshito (門田利人) 279
 Kaihara, Akiko (関原亜樹子) 271, 272, 272, 273, 302, 339
 Kajiwara, Yoshitugu (梶原美次) 295
 Kakihara, Yoshiteru (柿原芳輝) 209
 Kamakura, Hiroyuki (鎌倉浩之) 298, 308
 Kamata, Eiichi (鎌田栄一) 265, 302, 311, 338
 Kaminuma, Tsuguchika (神沼二真) 246, 324, 325
 Kaneko, Toyozo (金子豊蔵) 247, 301, 324, 326, 327
 Kaniwa, Masaaki (鹿庭正昭) 216, 295, 298, 311
 Kaniwa, Nahoko (鹿庭なほ子) 245, 251, 298, 303, 304, 324
 Kanno, Jun (菅野 純) 244, 247, 248, 288, 301, 324, 325, 326, 327, 328, 346, 351
 Kansui, Hisao (寒水壽朗) 236, 320, 322
 Kasuga, Fumiko (春日文子) 318
 Katori, Noriko (香取典子) 196, 240, 295, 298, 303, 322
 Katsuki, Shigeki (香月茂樹) 340, 341, 342
 Kawahara, Nobuo (川原信夫) 210, 211, 212, 270, 276,

298, 308, 340, 343, 351
 Kawahara, Yoshihiro (川原善浩) 337
 Kawai, Hiroshi (河合 洋) 200, 304, 305, 306
 Kawamura, Yoko (河村葉子) 229, 295, 299, 316, 344
 Kawanishi, Toru (川西 徹) 199, 201, 202, 304, 305, 306
 Kawasaki, Nana (川崎ナナ) 89, 199, 200, 304, 305, 306
 Kawasaki, Yasushi (川崎 靖) 228, 274, 301, 325, 326, 327, 346
 Kawasaki, Yoko (川崎洋子) 299, 316
 Kikuchi, Yutaka (菊地 裕) 235, 319, 334, 351, 227
 Kikuchi, Yoshiharu (菊地啓陽) 324
 Kikura, Ruri (木倉瑠理) 304
 Kim, Su-Ryang (金 秀良) 263, 336
 Kitabayashi, Aya (北林あや) 248
 Kitajima, Satoshi (北島 聡) 248, 301, 327, 328
 Ko, Reika (高 玲華) 312
 Kobayashi, Tetsu (小林 哲) 202, 304
 Kobayashi, Tuneo (小林恒雄) 333
 Kodama, Yukio (児玉幸夫) 255, 325, 326, 327, 332
 Kohara, Arihiro (小原有弘) 261, 334, 335
 Koide, Tatsuo (小出達夫) 112, 115, 119, 124, 267, 270, 271, 276, 338, 339, 354

Koizumi, Schuiichi (小泉修一) 249, 250, 296, 328, 329, 352
 Koizumi, Mutsuko (小泉睦子) 265, 292, 338
 Kojima, Shigeo (小嶋茂雄) 196, 197, 279, 292, 298, 303, 304, 343
 Kojitani, Takatoshi (梶谷高敏) 256, 257, 258, 332
 Komiyama, Naomi (小宮山直美) 324
 Komura, Asako (小村麻子) 222
 Kondo, Kazunari (近藤一成) 238
 Konishi, Yoshiko (小西良子) 318, 319
 Konuma, Hirotaka (小沼博隆) 230, 231, 232, 235, 286, 295, 317, 318

Koyano, Kazurou (小谷野和郎) 324
 Kubota, Hiroki (久保田浩樹) 274, 299, 316
 Kudo, Yukiko (工藤由起子) 231, 232, 286, 317, 318
 Kumagai, Takeo (熊谷健夫) 293, 339, 340
 Kumazawa, Yoshio (熊沢義雄) 317
 Kurebayashi, Hideo (紅林秀雄) 329, 330, 338
 Kurihara, Kogo (栗原孝吾) 341
 Kurihara, Masaaki (栗原正明) 236, 237, 238, 239, 277, 319, 320, 321, 322, 351

Kurokawa, Yuji (黒川雄二) 327
 Kusui, Kaoru (楠井 薫) 242, 323

L

Lee, I-Jung (李 宜融) 308, 341

M

Maeda, Hideko (前田秀子) 275

- | | | | | | |
|----------------------|---------|---|---------------------------|------------|--|
| Maekawa, Kyoko | (前川京子) | 267, 268, 270, 338 | Nagi, Naomi | (永井尚美) | 319 |
| Maitani, Tamio | (米谷民雄) | 227, 228, 229, 274, 285,
299, 315, 316 | Nahajima, Akiko | (中島明子) | 229 |
| Makino, Kimiko | (牧野公子) | 303 | Naito, Yuki | (内藤有紀) | 319 |
| Masui, Tohru | (増井 徹) | 264, 265, 291, 292, 337,
338, 351 | Nakagawa, Keiko | (中川恵子) | 258, 333 |
| Masumura, Kenichi | (増村健一) | 253, 331, 332, 336, 337 | Nakagawa, Yukari | (中川ゆかり) | 128, 131, 275, 310, 339,
354 |
| Masutomi, Naoya | (榑富直哉) | 258, 333, 352 | Nakahara, Yuji | (中原雄二) | 197, 198, 199, 304 |
| Matsmoto, Misao | (松本美佐緒) | 225, 314 | Nakajima, Osamu | (中島 治) | 240, 322, 323 |
| Matsuda, Rieko | (松田りえ子) | 215, 223, 224, 284, 299,
310, 313, 314, 316, 351 | Nakajima, Yoshifumi | (中島芳文) | 279 |
| Matsui, Keiko | (松井恵子) | 263, 336 | Nakajima, Yukiko | (中島由起子) | 329 |
| Matsumura, Toshiro | (松村年郎) | 298 | Nakamura, Akitada | (中村晃忠) | 215, 218 |
| Matsunaga, Nobuto | (松永信人) | 327 | Nakamura, Ryosuke | (中村亮介) | 240, 322, 323 |
| Matsuoka, Atsuko | (松岡厚子) | 217, 309, 311, 334 | Nakamura, Takatoshi | (中村高敏) | 240, 309, 319 |
| Matsushima, Yuko | (松島裕子) | 301, 327 | Nakamura, Yumiko | (中村優美子) | 271, 272, 273 |
| Matsutani, Sachiko | (松谷佐知子) | 318 | Nakamura, Hideaki | (中村英明) | 332 |
| Matsuzawa, Toshiaki | (松澤利明) | 279 | Nakamura, Yumiko | (中村優美子) | 101, 107, 271, 272, 273,
302, 339, 354 |
| Mihara, Kiyoshi | (三原 潔) | 303 | Nakane, Takahisa | (中根孝久) | 212, 270, 308, 340 |
| Minegishi, Daisuke | (峯岸大輔) | 337 | Nakanishi, Ikuo | (中西郁夫) | 236, 319, 320, 322 |
| Mineshima, Hiroshi | (峯島 浩) | 297 | Nakano, Tatsuya | (中野達也) | 246, 324, 325, 351 |
| Mitsumori, Kunitoshi | (三森国敏) | 255, 256, 257, 258, 259,
301, 333 | Nakao, Nobuko | (中尾伸子) | 341 |
| Miura, Yoshimi | (三浦嘉巳) | 314, 315 | Nakaoka, Ryusuke | (中岡竜介) | 218, 282, 311 |
| Miyahara, Makoto | (宮原 誠) | 75, 225, 226, 227, 285,
315, 351 | Nakata, Kotoko | (中田琴子) | 246, 288, 300, 324 |
| Miyahara, Michiko | (宮原美知子) | 75, 317 | Nakazawa, Kenichi | (中沢憲一) | 250, 289, 296, 329, 348,
352 |
| Miyajima, Atsuko | (宮島敦子) | 53, 251 | Nasu, Koji | (那須功二) | 354 |
| Miyake, Yukio | (三宅幸雄) | 279 | Nemoto, Satoru | (根本 了) | 222, 223 |
| Miyata, Naoki | (宮田直樹) | 217, 236, 237, 238, 311,
319, 320, 321, 325 | Niho, Naoko | (仁保直子) | 258, 332, 333 |
| Miyauchi, Makoto | (宮内 慎) | 253, 254, 332 | Niimi, Shingo | (新見伸吾) | 202, 203, 304, 306 |
| Miyaura, Senri | (宮浦千里) | 354 | Nishikawa, Akiyoshi | (西川秋佳) | 252, 253, 254, 255, 256,
290, 330, 331, 332, 333,
336, 338, 344, 352 |
| Miyawaki, Emiko | (宮脇英美子) | 274, 275, 339 | Nishimura, Tetsuji | (西村哲治) | 219, 220, 284, 295, 298,
311, 312, 313, 351 |
| Miyazaki, Tamaki | (宮崎玉樹) | 266 | Nisimaki (Mogami), Tomoko | (最上(西巻)知子) | 296, 323 |
| Mizokoshi, Akito | (溝腰朗人) | 328 | Nishiya, Takako | (西谷孝子) | 351 |
| Mizuguchi, Hiroyuki | (水口裕之) | 203, 204, 205, 206, 207,
281, 304, 305, 306, 307 | Nohmi, Takehiko | (能美健彦) | 253, 262, 263, 290, 331,
332, 336, 337, 348 |
| Mizusawa, Hiroshi | (水沢 博) | 291, 292, 337, 338 | Nozaki, Tomoko | (野崎トモ子) | 341 |
| Momose, Maki | (百瀬真希) | 260 | | | |
| Morikawa, Tomomi | (森川朋美) | 302 | O | | |
| Morita, Takeshi | (森田 健) | 279 | Obama, Tomoko | (小濱とも子) | 328, 352 |
| Murai, Toshimi | (村井敏美) | 128, 131, 275, 310, 339,
354 | Ogasawara, Hiromichi | (小笠原弘道) | 254, 319 |
| Murayama, Mitsunori | (村山三徳) | 284, 314 | Ogata, Hiroyasu | (緒方宏泰) | 303 |
| Murayama, Norie | (村山典恵) | 240, 251, 322, 329 | Ogawa, Yukio | (小川幸男) | 247, 301 |
| Muroi, Masashi | (室井正志) | 230, 316, 317 | Ogawa, Yuko | (小川裕子) | 316 |
| Mutsuga, Motoo | (六鹿元雄) | 227, 229, 299, 309, 315,
316 | Ohnishi, Takahiro | (大西貴弘) | 230, 316, 317 |
| | | | Ohno, Yasuo | (大野泰雄) | 249, 250, 251, 252, 289,
296, 329, 330, 347, 352 |
| N | | | Ohshima, Hiroyuki | (大島広行) | 303 |
| Naeshiro, Ichiro | (苗代一郎) | 279 | Ohta, Miyako | (太田美矢子) | 89, 199, 200, 305, 306 |
| Nagao, Taku | (長尾 拓) | 352 | Ohta, Hisae | (太田久恵) | 227 |
| Nagaoka, Hiroaki | (長岡寛明) | 319 | Ohtake, Chiyoko | (大竹千代子) | 324 |
| Nagata, Ryuji | (永田龍二) | 319 | Ohya, Yukie | (大屋幸江) | 324 |
| | | | Okada, Satoshi | (岡田敏史) | 266, 267, 269, 270, 292, |

Okazaki, Kazushi (岡崎和志) 296, 338, 339, 354
 Okuda, Haruhiro (奥田晴宏) 255, 331, 332, 352
 Okunuki, Haruyo (奥貫晴代) 279, 319, 225, 241, 322
 Ono, Atsushi (小野敦) 225, 241, 322
 Ono, Kageyoshi (小野景義) 296, 301, 327
 Onodera, Hiroshi (小野寺博志) 212, 243, 323
 Onodera, Hiroshi (小野寺博志) 221, 256, 257, 258, 301, 302, 332, 333
 Onose, Junichi (小野瀬淳一) 302
 One, Wenshend (王文晟) 335
 Oshizawa, Tadashi (押澤正) 200, 203, 282, 304, 306
 Ozaki, Yukihiro (尾崎幸紘) 212, 243, 295, 298, 309
 Ozawa, Syogo (小澤正吾) 219, 220, 240, 245, 251, 287, 290, 296, 304, 311, 322, 324, 329, 333, 351

P

Park, Jeongung (朴正雄) 213, 214, 282, 310
 Petr, Gruz (ピーター・グルーズ) 262, 263, 336, 337

R

Ramadan, Ali (ラマダン・アリ) 334

S

Saeki, Mayumi (佐伯真弓) 240, 322
 Sai, Kimie (佐井君江) 240, 244, 245, 251, 304, 322, 324, 329, 351
 Saisho, Kazuhiro (最所和宏) 199, 304
 Saito, Hiroyuki (斎藤博幸) 112, 115, 119, 124, 267, 268, 269, 270, 338, 339, 354
 Saito, Yoshiro (斎藤嘉朗) 219, 240, 241, 311, 322, 329, 351
 Saito, Minoru (斎藤実) 301
 Saito, Yukio (斎藤行生) 226
 Sakai, Ayako (酒井綾子) 286, 295, 318
 Sakai, Eiji (酒井英二) 340
 Sakai, Kiyoshi (酒井喜代志) 279
 Sakamoto, Hiroko (坂本浩子) 260, 335
 Sakamoto, Tomoaki (坂本知昭) 295, 298, 304
 Sakemi, Kazue (酒見和枝) 329
 Sakuraba, Mayumi (桜庭真弓) 335
 Sakurai, Fuminori (櫻井文教) 307
 Sakurai, Haruhiko (櫻井治彦) 295
 Sakushima, Junichiro (佐久嶋順一郎) 210, 225, 241, 308, 315, 322
 Sasaki, Kumiko (佐々木久美子) 221, 222, 223, 224, 298, 300, 313
 Satake, Motoyoshi (佐竹元吉) 210, 211, 227, 276, 309, 340
 Sato, Kyoko (佐藤恭子) 228, 250, 285, 315, 329
 Sato, Masahiko (佐藤正彦) 259, 295
 Sato, Yoji (佐藤陽治) 243, 244, 287, 323

Sato, Kaoru (佐藤薫) 329
 Sato, Michio (佐藤道夫) 311
 Sato, Yukiko (佐藤由紀子) 319
 Sawa, Hideaki (澤英明) 329
 Sawada, Junichi (澤田純一) 219, 220, 225, 240, 241, 245, 251, 287, 304, 311, 319, 322, 323, 324, 329, 333, 351
 Sekita, Hiroshi (関田寛) 298
 Sekita, Kiyoshi (関田清司) 210, 211, 227, 271, 276, 277, 301
 Sekita, Setsuko (関田節子) 270, 277, 308, 339, 340, 341, 342, 343
 Sekizawa, Jun (関澤純) 246, 287, 288, 296, 300, 324, 345, 351
 Shibata, Osamu (柴田治) 300
 Shibata, Toshiro (柴田敏郎) 276, 293, 339, 340
 Shibayama, Rie (柴山理恵) 199, 200, 304, 305, 306
 Shibutani, Makoto (渋谷淳) 254, 258, 259, 300, 302, 332, 333, 351, 352
 Shigemoto-Mogami, Yukari (重本(最上)由加里) 249, 328, 352
 Shigeta, Teruko (重田輝子) 241, 322
 Shikano, Mayumi (鹿野真弓) 319
 Shimada, Hiroyasu (島田弘康) 279
 Shimazawa, Rumiko (嶋澤るみ子) 319
 Shimizu, Masatomi (清水雅富) 262, 336
 Shimomura, Koichiro (下村講一郎) 277, 339, 341
 Shimomura, Yuko (下村裕子) 308, 340
 Shintani, Hideharu (新谷英晴) 219, 283, 284, 311
 Shiota, Osamu (代田修) 212, 298, 308, 340
 Sofuni, Tosio (祖父尼俊雄) 260, 261, 296
 Soyama, Akiko (祖山晃子) 240, 322
 Sueyoshi, Shoko (末吉祥子) 320, 322
 Sugimoto, Kazue (杉本和恵) 225, 314
 Sugimoto, Naoki (杉本直樹) 227, 228, 299, 315
 Sugita, Takiko (杉田たき子) 229, 316
 Sugiyama, Etsuko (杉山悦子) 320
 Sunouchi, Momoko (簾内桃子) 296, 329
 Suzuki, Kazuhiro (鈴木和博) 242, 323, 351
 Suzuki, Reo (鈴木玲央) 351
 Suzuki, Takuo (鈴木琢雄) 306
 Suzuki, Takayoshi (鈴木孝昌) 253, 261, 331, 334, 335
 Suzuki, Sachiko (鈴木幸子) 327
 Suzuki, Senji (鈴木専二) 279

T

Tadokoro, Satoshi (田所聡) 335
 Tagasira, Yoko (田頭洋子) 338
 Tajima, Shinsuke (田島紳介) 303
 Takada, Koiichi (高田幸一) 279
 Takada, Yoko (高田容子) 337, 338
 Takagi, Atsuya (高木篤也) 248, 327, 328, 346, 347, 351
 Takagi, Hironori (高木広憲) 256, 257, 258, 302, 333,

		352
Takagi, Kayoko	(高木加代子)	241, 323
Takagi, Hisanobu	(高木久宜)	332, 333
Takahashi, Marii	(高橋真理衣)	256, 271, 276, 339, 340
Takahashi, Noriyuki	(高橋則行)	258, 333, 352
Takahashi, Yu	(高橋 雄)	248, 327, 328
Takai-Igarashi, Takako	(高井(五十嵐)貴子)	324
Takatori, Kosuke	(高鳥浩介)	228, 234, 235, 286, 296, 319
Takatsuki, Satoshi	(高附 巧)	222, 223, 298
Takeda, Yuiko	(武田由比子)	274, 299, 351
Takekawa, Kiyoshi	(竹川 潔)	256, 257, 332
Takekida, Kaoru	(武木田薫)	351
Takeuchi, Masanori	(竹内正紀)	279
Taki, Meiko	(瀧 明子)	324
Takimoto, Hiroaki	(滝本博明)	317
Takizawa, Tamotsu	(瀧澤 保)	256, 257, 301, 302, 332, 333
Tamura, Toru	(田村 啓)	256, 257, 258, 332
Tanabe, Hideyuki	(田辺秀之)	263, 264, 291, 292, 337, 338
Tanaka (Kagawa) Satoko	(香川(田中)聡子)	220, 311, 312, 313
Tanaka, Hisakazu	(田中寿一)	354
Tanaka, Rie	(田中理恵)	309, 315
Tanamoto, Kenichi	(棚元憲一)	230, 285, 299, 310, 316, 317, 318, 319, 351
Tanimoto, Tsuyoshi	(谷本 剛)	112, 115, 119, 124, 267, 268, 270, 292, 293, 295, 296, 338, 339, 354
Tanno, Masaaki	(丹野雅幸)	320, 322
Teshima, Reiko	(手島玲子)	225, 240, 241, 242, 316, 322, 323
Toda, Kyoko	(戸田恭子)	246, 324
Tohkin, Masahiro	(頭金正博)	288, 325
Tokunaga, Hiroshi	(徳永裕司)	98, 220, 221, 312
Tonogai, Yasuhide	(外海泰秀)	101, 107, 271, 272, 273, 302, 339, 354
Touno, Kaoru	(東野 薫)	277, 341
Toyoda, Masatake	(豊田正武)	208, 209, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 238, 241, 284, 285, 298, 299, 308, 309, 313, 314, 315, 322
Toyoda, Toshie	(豊田淑江)	200, 304, 306
Tsuchiya, Toshie	(土屋利江)	212, 213, 214, 215, 217, 218, 282, 295, 298, 309, 310, 311, 324, 344, 351, 352
Tsuchiya, Toshiyuki	(土屋敏行)	295
Tsuda, Makoto	(津田 誠)	249, 328, 352
Tsuji, Sumiko	(辻 澄子)	101, 107, 271, 272, 302, 339, 354
Tsumura, Yukari	(津村ゆかり)	271, 272, 273, 302, 339, 354
Tsutsumi, Tomoaki	(堤 智昭)	223, 224, 313

U

Uchida, Eriko	(内田恵理子)	200, 206, 207, 304, 305, 306, 307
Uchida, Osayuki	(内田雄幸)	301, 327
Uchino, Tadashi	(内野 正)	220, 221, 312
Ueda, Makoto	(上田 誠)	257, 301, 302, 332, 333
Umeda, Makoto	(梅田 誠)	295
Umemura, Takashi	(梅村隆志)	255, 301, 327, 331, 332, 352
Umino, Yukiko	(海野有紀子)	101, 107, 271, 272, 302, 339, 354
Uneyama, Chikako	(畝山智香子)	255, 258, 302, 332, 333, 352
Usami, Makoto	(宇佐見 誠)	252, 329

W

Wakabayashi, Yasutaka	(若林靖貴)	317
Wakata, Akihiro	(若田明裕)	279
Wakui, Chiyoko	(和久井千世子)	229, 299, 314, 315, 316
Watabe(watabe), Akiko	(石井(渡部)明子)	206, 207, 282, 304, 305, 306, 307
Watanabe, Hidemi	(渡辺秀実)	351
Watanabe, Toshihiro	(渡邊敬浩)	299, 314, 315

Y

Yagami, Takeshi	(矢上 健)	215, 216, 282, 283, 310, 339
Yamada, Kazuya	(山田和也)	277, 341
Yamada, Masami	(山田雅巳)	262, 263, 336, 337
Yamada, Takashi	(山田 隆)	228, 229
Yamada, Hiroaki	(山田博章)	319
Yamagishi, Megumi	(山岸 恵)	331, 332
Yamaguchi, Teruhide	(山口照英)	200, 242, 282, 304, 306, 307
Yamakoshi, Yoko	(山越葉子)	239, 240, 322
Yamamoto, Miyako	(山本 都)	300, 324, 345, 346
Yamamoto, Shigeki	(山本茂貴)	1, 319
Yamazaki, Takeshi	(山崎 壮)	227, 228, 285, 299, 315, 319, 344, 351
Yanagida, Yoko	(柳田葉子)	324
Yano, Ikuya	(矢野郁也)	317
Yasuhara, Kazuo	(安原加壽雄)	255, 256, 257, 258, 301, 332, 333
Yodoi, Junji	(淀井淳司)	327
Yomota, Chikako	(四方田千佳子)	266, 299, 338
Yoon, Byung-I	(尹 秉一)	247, 325, 326, 327
Yoshida, Hiromi	(吉田ひろみ)	312, 313
Yoshii, Kimihiko	(吉井公彦)	271, 272, 273, 302, 339, 354
Yoshimatsu, Kayo	(吉松嘉代)	81, 85, 277, 339, 341
Yoshimura, Isao	(吉村 功)	327
Yoshioka, Sumie	(吉岡澄江)	196, 197, 280, 295, 303, 343

国立医薬品食品衛生研究所報告第120号キーワード索引 (アルファベット順)

A

aberrant crypt foci 257
 Aboriginal people 293
 acid 232
 acid-stable carmine 228
 action spectrum 235
 activin 202
 acylated anthocyanin 209
 adenovirus vector 203, 204, 205, 206, 207, 281, 282
 ADI 293
 adventitious root 277
 Aflatoxins 225
 Ah receptor 247
 Alachlor 220
 Aldose reductase 267, 268
 alkannin 212
 allergen 283
 allergy 217, 235, 283,
 allura red AC aluminum lake 272
 alpha_alpha-disubstituted alpha-amino acid 238
 aluminum lake 101
 amaronitidin 210
 ameziniummetilsulfate 219
 AMH 252
 amino-2'-methylphenylnorharman 211
 amino-3'-methylphenylnorharman 211
 Amphipathic peptide 270
 amphoteric glycosphingolipid 210
 anaerobic bacteria 75
 aneuploidy 261
 anogenital distance 275
 anthocyanain pigment 210
 anthocyanin pigments 210
 anti-androgenic activity 211
 anti-bacterial agent 229
 anti-tumor drugs 290
 antibacterial activity 212
 antibiotics 268, 293
 antifungal agent 274
 antifungal test 235
 antioxidative activities 238
 Antisense 201
 antisense oligonucleotide 251
 apolipoprotein A-I 270
 Apolipoprotein E 269
 Apoptosis 245
 applying for designation 293
 Arar-assay 262
 Aristolochic acid 261
 arsenic 261
 artificial protein 216

aryl hydrocarbon receptor 224
 arylamine *N*-acetyltransferase 290
 astrocytes 215
 asymmetric synthesis 238
 ATP 249
 Atria 201
 authorization 112, 115, 119, 124
 autoclave sterilization 283
 auxin 85
 AZO DYE 217

B

B10A mice 225
Bacillus anthracis 231
Bacopa monniera 212
 bacopaside I and II 212
 bacterial adhesion 233
 Bacterial endotoxin test 285
 BCNT 265
 beans 271
 Benzen toxicity 288
 benzo[*a*]pyrene 236, 260
 benzotriazole derivatives 217
 bFGF 214
 BHT 255
 Bilayers 270
 binding affinity 246
 binding modes 237
 binding site 270
 bioassay 284
 bioburden 284
 biodegradable polymer 213
 biodegradation 234
 biological activities 286
 biological effect 288
 biological indicator 283
 biologicals 280, 282
 biomaterial microspheres 219
 biomaterials 282
 biomedical and pharmaceutical research 292
 biomedical research 292
 biotech process evaluation 280
 biotechnological substances 280
 biotechnology products 280, 281, 282
 biotechnology/biological products 281
 Bip 240
 bisphenol A 215, 229, 257, 275
 blanching condition 276
 Bloom syndrome 53
 Bond Elut^R SAX-PSA 271
 bone formation 212
 brain damage 249

breast cancer 251
brilliant blue FCF aluminum lake 271
bronchial asthma 235
BSE 285
Buchinha 212
Butyl benzyl phthalate 275
Butyltin trichloride 275
bypass DNA lesion 262

C

c-Met 200, 265
Ca²⁺ response 241
Cadmium 259
Cadmium-polluted rice 219
Calcium 201, 202
Calcium signals 242
Calnexin 240
calsequestrin 244
cancer 203, 204, 205, 206
Cannabis sativa 277, 278
capsaicin 250
carbon dioxide 235
cardiac hypertrophy 244
Cardiomyocyte 201, 202
carminic acid 228
carotenoid 227
carrageenan 228
carrageenan antimicrobiol activity 233
catechin 236
catechins 238
Cationic liposome 269
ceftiofur 284
cell cycle regulated genes 252
cell differentiation-inducing activity 239
cell function 219
cell signaling 246
cembrane 228
Chamaecyparis pisifera 212
chatechin 232
chemical sterilization 283
chemical synthesis 210
Chinese herb nephropathy 261
chinomethionat 222
chiral auxiliary 238
chiral oxovanadium 238
chloroplast DNA 277
Cholesterol 270
chondrogenesis 213, 214
chromogenic substrate 231
chromosomal aberration 236
chromosome territories (CTs) 264
chromosome territory 264
chronotropic 243
cII 261, 262, 263
Cinnamomum spp. 277

circular dichroism 212
Cladosporium 234
clearance study 280
clethodim 272
clethodim sulfone 272
clethodim sulfoxide 272
clofentezine 222
Cnidii Rhizoma 276
CODEX 285
Cofilin 243
Coix lachryma-jobi L. var. ma-yuen STAFF 228
column liquid chromatography 219
comet assay 226
comparability 89, 280
concentration 274
conformational search calculation 238
connexin 282
connexin43 218
Constitutive degradation 241
contact dermatitis 216
content uniformity 196, 279
cooking 223
cooking processes 224
Cordia multispicata 211
CPT-11 245, 246
cream 98
crops 272
cross-contamination 264
cross-culture contamination 291
cross-reactivity 283
cryopreservation 277
Crystallization 197
cucurbitacin 212
culture medium 283
culture method 291
cultured rat hepatocytes 202
curcumin 253, 270
Cyclophosphamide 260
cyhexatin 221
CYP2A6 251
CYP2C8 240
CYP3A4 245
CYP3A5 240
Cytochrome P-450 enzymes 287
Cytochrome P450 220, 290
cytotoxic substance 210
cytotoxicity 221

D

daily intake 274, 293
decidual cell response 274
defense-related protein 283
degradation 284
DEHA 273
deoxynivalenol (vomitoxin) 233

detection 232, 285
detection method 208, 209, 285
Development 242
development of reproductive system 275
Dexamethasone 242
Diabetic complication 267
Diabetic neuropathy 267
dialkyl phthalate 230, 273
Dialkyl phthalates 241
Dibromoethane 262
diesel exhaust 262
dietary intake 223
diethyl phthalate 220
Differential Scanning Calorimetry 269
Digestibility 241
dimethylaniline 256
dimethylarsinic acid 261
dinB 263
dinitropyrene 262
dioxins 223, 224, 284
disease susceptibility 290
disinfectant 231
disposable glove 229, 273
dissolution test 279
diterpene 212, 228
DNA 278
DNA chip 39
DNA helicase 53
DNA microarray 251, 252
DNA polymerase 262, 290
DNA profiling 277
DNA scission 236
DNA sequence recognition 238
DNA sequences 234
DNA synthesis 202
docking analysis 237
dosimeter 226
dosimetric release 284
doxycycline 267
drug 246
drug delivery system 281
drug interaction 290
drug metabolism and pharmacokinetics 290
drug therapy 290
dwelling environments 234, 286
dynamic receptor 239

E

E. coli O157:H7 232
E2F target genes 252
early embryonic loss 274
early pregnancy 276
ecology 287
egg 231
Elcatonin 267

Elcatonin Reference Standard 267
electron beam irradiation 225
electron-beam irradiation 226
Electron-beam irradiation 75
Elephantopus mollis 271, 276
embryonic loss 275
Emulsion 269
enantioselective radical cross-coupling reactions 238
endocrine disruption 248
endocrine disrupter 257
Endocrine disrupters 255
endomucin 249
endothelin-1 243
endotoxin 128, 131
Endotoxin 285
Enhanced OECD test guideline 407 255
enhancer 248
environment 287
Environmental pollutants 221
enzymatic reaction 285
enzymatically hydrolyzed coix extract 228
enzyme activity 262
eprinomectin 284
Erythrocytes 269
erythropoietin 89, 200
Escherichia coli O157 286
Escherichia coli O157:H7 231, 235
esophageal tumorigenesis 253
ESR 226, 236
esterase 249
estimation 235
estradiol 252
estrogen 248, 250
ethanol 253
ethics 292
ethychlozate 223
eucalyptus leaf extract 272
eugenol 256
Euphorbia pekinensis 224
Euphorbiaceae 224
Evoked IPSC 254
evolutionary conservation 264
exciton coupling 212
exon intron structure 265
experimental teaching material 216

F

facultatively anaerobic bacteria 75
female rats 219
fenbutatin oxide 221
Filtration 230
flavonoid 277
flumequine 258
fluorometholone 112
flusulfamide 271

Folding 240
 food additive 272, 293, 285
 food color 101, 107
 food contact use 229
 food for specified health uses 282
 food green No.3 208
 food irradiation 226, 227, 285
 food reductone 217
 food yellow No.5 208
 foods 224, 286
 foreword toxicology 289
 Franz type diffusion cell 220
 freeze 286
 Freeze-dry 269
 freeze-drying 196
 frozen oyster 231
 FUMI theory 215, 224, 284
 fungal allergen 286
 fungal contamination 234
 fungal flora 234
 fungi 235, 286, 287

G

G-CSF 200
 GABA 254
 Gallic acid 258
 gamma ray irradiation 75
 gamma-ray sterilization 283
 gap junctional intercellular communication 218, 219
 gap-junction 282
 gap-junctional intercellular communication 213, 214
 GC/MS 107, 199, 223, 273
 GD1a 200
 gel 267
 Gene 246
 Gene expression 242
 gene expression profiling 251
 gene therapy 203, 204, 205, 206, 207, 281, 282
 gene transfer 199
 Gene transfer 269
 general method 281
 general tests 293
 genetic modified 227
 genetic polymorphism 290
 genetic variation 246
 genetically modified maize CBH351 208
 genetically modified maize grain 209
 genetically modified papaya 209
 genetically modified potato 225, 285
 genomic research 292
 Gentianaceae 210
 Gentianella nitida 210
 germacrenes 276
 GJIC 245
 Glucuronidation 219

Glycon specificity profiling 237
 Glycyrrhiza glabra 294
 Glycyrrhiza uralensis 294
 glycyrrhizin 294
 glycyrrhizinic acid 119
 GPC/ICP 228
 granulation tissue 212
 granulocyte-macrophage.colony forming unit (CFU-GM) 247
 granulopoiesis 200
 graves' disease 204
 Green tea 232
 green tea 245
 ground beef 231
 guidance 282
 Guideline 280
 guidelines 292

H

HACCP 286
 Hair 199
 Hair analysis 198
 hairless mouse 249
 hairy root 81
 health care facility 283
 heart failure 244
 heart failure 244
 helical screw sense 238
 hematopoiesis 249
 hematotoxicity 247
 hemiketal 211
 hemoglobin 216
 hemolytic anemia 258
 hepatocarcinogenesis 258
 Hepatocyte 201
 hepatocytes 265
 herb 282
 Hercampuri 210
 heterologous expression 262
 heterozygous p53 deficient mice 258
 hexachlorobenzene 107
 HGF 200, 265
 high performance liquid chromatography 271
 hippocampal slice culture 251
 hippocampus 249
 histamine release 210
 histopathology 256
 hormone-like effect 288
 house design 235
 HPLC 98, 221, 271
 HPLC with fluorescence detection 221
 HPLC/FLD & MSD 246
 HSP70 251
 HSRRB (Human Science Research Resources Bank) 291
 human articular chondrocytes 213, 214
 human cell lines 264

Human growth hormone receptor 241
Human growth hormone-binding protein 241
human materials 292
human nicotinic receptor 250
human saliva 273
human tissue/cells 292
hyaluronan 267
hyaluronic acid 214, 266
hydrocarbons (HC) 227
hydrolysis 273
Hyoscyamus niger 277
Hyperosmotic stress 267

I

ICCA 292
ICH Q6B 280
ICH/GMP Guideline 293
identification 226
identification by hydrocarbon detection 225
identification of irradiated foods 226
IgE receptor 242
IL-2 221
IL-6 233
ileum 201
Immunohistochemistry 255
implantation failure 274
impurity profile 293
in vitro 275
in vitro micronucleus test 217
inabefide 222
inactivation 282
individual difference in drug efficacy 290
Indoor Air Chemicals 6
Indoor Air Quality 6
injured microorganisms 283
injury 286
intropism 202
interleukin-6 249
International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) 196
International harmonization 279, 286
International Meeting on Radiation Processing 285
iodine deficiency 254
ion channel 216
ion-exchange reaction 266
IR Reference Spectra 266
Irinotecan 219, 220
irradiated food 225, 226, 285
irradiation 235
Islet cell tumors 255
isoflavonoids 271
Isothermal titration calorimetry 269
Isothiocyanates 258
ISSR 277, 278

J

Japanese perspective 280
Japanese Pharmacopoeia 196, 230, 266, 280, 281, 285, 286
JCRB Cell Bank 291
JCRB Gene Bank 291
JP Reference Standard 115

K

KGF 214
kinetic parameter 262
kojic acid 256
KWW function 197

L

Labour and Welfare 290
lacZ 263
LC/MS 89, 200, 223
LC-ESI-MS 198
lead 216
Leishmania 270, 271
leishmaniasis 276
light irradiation 235
LIM kinase 243
limit of detection 224
lipid peroxidation 254
liquid chromatography 272
long-range interaction 216
loss of heterozygosity 248, 261
low level dose 226
low-dose effects 275
Low-dose long-term exposure 259
LPS 285
Luffa operculata 212
lung carcinogen 255
lung carcinogenesis 256

M

Macrophage 243
manganese 202
Mast cells 241
MD-2 230
media 286
medical polymer 284
MeIQx 257
Mesp1 248
Mesp2 248
Mesp3 248
metabolic cooperation assay 218, 286
metabolites 245, 258
Methacarn 258
method-performance study 221, 222

Methoxychlor 255
 mice 247
 Micellar electrokinetic chromatography 199
 microarray 39, 205
 Microbiological tests 230, 285, 286
 Microcalorimetry 197
 microglia 249
 Micronucleus assay 260
 micronucleus induction 236
 microsatellite repeats 248
 midbrain 213
 Ministry of Health 290
 Mir-space station 234
 mixing homogeneity 196
 Mobility 197
 Molecular analysis 258
 molecular docking study 239
 molecular gripper 239
 molecular mechanism 253
 molecular weight 266
 molecular weight distribution 228
 monoalkyl phthalate 230
 Monobutyl phthalate 274
 Morphine 198
 mouse lymphoma assay (MLA) 261
 Mouse mast cell 242
 MRSA 286
 Multifunctional column 225
 Multiple Chemical Sensitivity 6
 mutation 261
 MutaTMMouse 261
 mycoplasma testing 281
 myocardium 202

N

nasal tumor 256
 NAT 282
 natural additives 285
 natural antioxidant 272
 natural food additives 285
 natural medicine 282
 natural preservative 228
 natural rubber 229
 NCS-1 250
 neocucurbitacin 212
 neural stem cells 215
 neuronal cell differentiation 213
 neutrophils 234
 new food additive 293
 NewLeaf Plus potato 225, 285
 NF- κ B 230, 234, 238
 NHEK 250
Nicotiana tabacum L. 228
 NIH Reference Standard 119, 124, 270
 nitric oxide 236

nitrile-butadiene rubber 229
 nitrobenzo[*a*]pyrene 236
 nitrofurazone 256
 nitrogen oxide 217
 NMR 271
 nonylphenol 252
 norharman 211
 normal human dermal fibroblasts 214
 normal human epithelium 291
 nosocomial infection 283
 nucleotide 246
 nutrient factors 214

O

o-tyrosine detection 226
 O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase 262
 OECD 292
 official inspection 101
 oil 98
 oleic acid 234
 oligopeptides 238
 oncogene 205
 oral sensitization 225
 oral toxicity 253
 osteoblastic MC3T3-E1 cells 218
 other 8-ketotrichothecenes 233
 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat 268
 outgrowth 291
 ovalbumin 225

P

p-nonylphenol 252
 P2Y receptor 289
 p53 248, 261
 packed lunch 273
 Paclitaxel 240
 paeoniflorin 124
 paint 216
 pancreatitis 254
 papaya 227
 Paraffin-embedded tissue 258
 parametric release 284
 PC12 cells 250
 PCNA 262
 PCR 208, 209
 pentachlorophenol 245, 245
 peptide mapping 89
 peptide synthesis 215, 216
 pesticide 222
 pesticide residue 223
 Pharmaceutical 280
 Pharmacogenetics 287
 pharmacopoeia 279
 phase separation 196

phenanthroindolizidine alkaloid 210
 Phenobarbital 258
 phloxine 107
 Phosphatidylcholine vesicles 269
 phthalate 273
 phthalate ester 230
 phylogenetic tree 290
Physochlaina physaloides 81, 85
 PI4K 250
 pilocarpine hydrochloride 221
 plant 284
 plasmid 207
 plasmin 208
 Plasticity 242
 plasticizer 230
 platelet 208
 pollutants 284
 poly(L-lactide) 218
 polycarbonate 229
 polydimethylcyclsiloxane 229
 polymer microspheres 218
 polymorphisms 246
 polyol pathway 268
 polyphenol 217
 polyphenol 232
 polyurethane 213
 polyvinyl chloride 229
 polyvinyl chloride toy 230
 postoperative pain 249
 PPADS 249
 precision 284
 prednisolone 21 acetate 249
 preferential repair 263
 preservative 274
 Presynaptic terminal 254
 primates 264
 prion disease 285
 privacy of human genetic identity 291
 process control 293
 prodrug 251
 production 101
 progesterone 274
 proinflammatory cytokine 275
 promoter 240, 244
 Proteasome inhibitor 241
 protein aggregation 197
 protein formulation 196
 proteomics 39
 Puerarin 270
 PVC 230, 273
 pyrogen test 275

Q

quality assurance 284
 quality control 281

quality evaluation 112, 115, 119, 124, 270
 Quantitative evaluation 267
 Quantitative RT-PCR 267
 quantitative-PCR 209

R

radiation sterilization 284
 radiolytic product 227
 rasH2 mice 255, 256
 rat 253, 257, 276
 rat colon 257
 Rat hepatocellular glutathione 221
 Rat liver microsomes 220
 rat thyroid 254
 rat uterus 248
 RBL-2H3 cells 242
 receptor structure 246
 receptor-mediated toxicity 288
 recombinant DNA 225, 285
 RecQ 251
 red radish 209
 reference standard 112, 128, 131, 203
 regenerative medicine 292
 regulation 206
 Relaxation Time 197
 Renal toxicity 259
 reporter gene 253
 reproductive and developmental toxicity 275
 research project for pharmacogenetics 290
 research resources 292
 Resonance energy transfer 269
 restricted ingredients 98
 resveratrol 217
 reverse toxicology 39, 288, 289
 reversion of standard 293
 review 285
 root culture 81, 85
 rose bengale 107
 rose cider 210
 routine control 283
 RTE-1(Bov-B LINE) 265
 Rubus suavissimus S. LEE 227
 Saccharide 269
 saccharose 234
 safety issues 281
 Salmonella enteritidis 231, 232, 233
 Sanguin H-4 227
 Saponins 212
 sarcoplasmic reticulum 244
Saussurea lappa 276
 scanning tunneling microscopy(STM) 239
 science and ethics 292
 Scrophulariaceae 212
 seafood 232
 secoiridoid glucoside 210

- segment condensation 215
self-assembled monolayer (SAM) 239
semiempirical molecular orbital calculation 238
sesquiterpene lactone biosynthesis 276
sesquiterpenes 271, 276
SGF 241
SGS1 53
Sgs1 251
shape change 208
Shigella sonnei 231
shikonin 212
sialyloligosaccharides 233
sialyloligosaccharide?conjugated peptide 233
SIAM 292
Sick Building Syndrome 6
Sick House Syndrome 6
SIDS 292
SIF 241
signal transduction 200
Sildenafil 199
silicone rubber 229
Single nucleotide polymorphisms 240, 287
sinoatrial node 243
sister chromatid exchanges 217
site-directed mutagenesis 216
skin metabolism 249
Skin micronucleus test 260
skin permeation 220
slow-growth 251
Smilax bracteata 277
SN-38 219, 220
SNP 246
Sodium/calcium exchange 201
Solanaceae 81, 85
Solvent Orange 60 216
somitogenesis 248
sorbitol accumulation 268
Sorbitol dehydrogenase2 67, 268
SOX9 252
soy isoflavone 254
soybean 254, 257
specification 280, 281
spectacle frame 216
sphingosine kinase 236
Spices 225
spindle poisons 261
spiroxins 212
spore 231
squalene monohydroperoxide 221
SSCP analysis 277
Stability 197, 280
stability testing 281
stabilization 196
standard compounds 222
standard method 203
standards and specifications 285
steam distillation 223
sterility assurance 283
stilben 277
stomach carcinogenesis 253
storage 231
STR (short tandem repeat) profiling 264
STR-PCR method 291
Strain differences 260
Stress fibers 236
structural determination 208, 209, 210
Structure/activity relationship 285
structure-function relationship 289
Subchronic toxicity study 258
subsidiary color 208, 271, 272
Substance P 242
Substrate specificity 237
sugar cataract 268
Sulfated oligosaccharide 200
Sunset Yellow FCF 208
sunset yellow FCF aluminum lake 272
superoxide anion 236
surface modification 218
survival 232
Sympathomimetic amines 199
- T**
- T-type Ca²⁺ channel 202
Tailor-made drug therapy 287
tannins 224
tar color 101
Targeted mutagenesis 263
targeting 203, 204, 206
Tat peptide 199
Tat-phage 199
taurin 234
TCDD 247
tegafur 251
telomerase 215
testicular toxicity 256
The Japanese Pharmacopoeia 293
The Japanese Pharmacopoeia, general tests 268
The Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan 268, 293
thin layer chromatography 281
thioredoxin 247
threshold 256
thrombomodulin 203
thyroid carcinogenesis 257
thyroid tumor 256
thyroid tumorigenesis 257
tilmicosin 284
TNF-alpha 233
tocopherol succinate 115
tocotrienol 253
Toll-like receptor 4 230

toluidine isomers 211
 Top3 251
 total diet study 223
 Toxic response in the newborn rat 266
 toxicogenomics 39, 288, 289
 transcriptional regulatory elements 207
 transformation assays 286
 transgenic mice 253
 translational research 282
 Triazolam 98
 Tributyltin 201
 Triphenyltin chloride 274
 tropane alkaloid 81, 85
 TSE agent 282
 TSH 257
 Tumor necrosis factor- α 236
 tumor promoters 286
 tumor suppressor 205
 tumorigenesis 213
 two-stepwise enrichment 231
 tyrosine O-sulfate 215

U

UDP-glucuronosyltransferase 220
 ultrasonication 266
 undescended testes 275
 unexpected recombinant DNA 209
 uremia 219
 Urinary bladder cytotoxicity 258
 ursan-type triterpene 211
 useful plants 293
 uterine carcinogenesis 257

V

validation 215
 validation 284
 validation of analysis 246
 validation study 283
 vegetable 223
 Vegetable 286
 vegetables 224
 verotoxin 235
 Vibrio parahaemolyticus 232
 viral clearance study 282
 virus safety 282
 vitamin D receptor 237, 239
 vitamin D3 239
 vitamin E-deficiency 217
 vitamine L1 221
 vitellogenin II 252
 VR1 250
 vulcanization accelerator 229

W

water 284
 WBN/Kob rat 254
 Werner syndrome 53

X

xenoestrogen 250
 xylazine 257

Y

Y-family 290
 yeast homologue 53

Z

Zingiber mioga 210

1-cyclobutanones 226
 ^{13}C NMR 270
 18A peptide 269
 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole 98
 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol 223
 2,4-Dinitrophenol 266
 2-alkylcyclobutanones(RCB) 227
 2-alkylcyclobutanone 227
 2-methylbenz[*a*]anthracene 260
 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid 227
 2-substituted chromone 212
 25-dihydroxyvitamin D3 237
 25-dihydroxyvitamin D3 analogues 237
 2 α -substituted 1 α 237
 3D-FISH (three-dimensional fluorescence in situ hybridization) 264
 4-aminocarminic acid 228
 4-Nitrophenol 266
 4-NQO 263
 4-*tert*-octylphenol 276
 4HAQO 255
 5,6-trans-2-methyl-1 237
 9(10 \rightarrow 20-*abeo*-abietane 212
 α -Glucosidase 237
 β -sitosterol 229
 γ -ray irradiation 218
 ガイドライン 289
 ホスホランバン 287
 筋小胞体 287
 国際比較 289
 心不全 287
 薬物相互作用 289
 薬物動態試験 289
 臨床薬物動態試験 289

国立医薬品食品衛生研究所報告への投稿について

投 稿 規 定

1. **投稿資格**：国立医薬品食品衛生研究所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. **内 容**：原稿は、特論、総説、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（日本語；26字×24行、英語；55字×ダブルスペース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（日本語及び英語の本文は、刷り上り1ページはA4用紙約4枚に相当する。また、表、図、写真は、約2枚が刷り上り1ページに相当する）。
 - 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。また、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

- 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。ただし，英文表現が不明瞭な場合には受理しないこともある。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がな用例集に従う。[参考：国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き（用語例）]
なお，学術用語については文部省学術用語集（化学編，植物学編，動物学編，数学編及び物理学編など）に従うことを原則とし，用語集にないものについては学会の慣例に従う。
- 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。
- 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）などとしなす。
- 句読点**：，．を用い，、。としない。
- 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）
- 繰り返し符号**：「々」，「ゝ」，「ゞ」は，原則として用いない。ただし，慣用語は用いても差し支えない。（例：徐々，各々）
- 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
- 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**：
 - 記載順序**：8.2～8.8の順に書く。
 - 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400 words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 引用文献：本文の引用箇所の右肩に1), 2,3), 4-6) のように記し、本文末尾に文献として引用順に出来る限り英文で記載する。なお、和文雑誌・単行本の場合は、ローマ字書きで記載する（ローマ字書きにすると意味が分かりづらい場合には、日本語で記載する）。雑誌名はChemical Abstracts及び日本化学総覧の略記法による。雑誌名はイタリック体（日本語記載の場合を除く）、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) Eiken, T. and Kousei, K.: *Eiken Zasshi*, **234** 456-467 (1998)

8.7 図：図 (Fig.) は提出された原稿を70%縮小して、そのまま版下に用いるので、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84 mm）か二段（幅175 mm）かを考慮し、刷り上がり一段の場合には原図幅120 mm、二段の場合には原図幅250 mmに収まるようにする。図には通し番号を付ける (Fig.1., Fig.2.,...). 図番号、表題、説明をまとめて別のA4用紙に、原則として英語で書く（表題は大文字ではじめ最後に「.」を付けない。また、説明は理解できるよう詳細に記載する）。

例：Fig.1. Influence of enzyme concentration on reductive suger production

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（カラー写真可）を用いる場合には、鮮明なものを使用する。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。表刷り上がり一段（幅84 mm）か二段（幅175 mm）かを考慮する。表には通し番号を付ける (Table 1., Table 2.,...). 表番号、表題、説明をまとめて別のA4用紙に、原則として英語で書く（表題は大文字ではじめ最後に「.」を付けない。また、説明は理解できるよう詳細に記載する）。

例：Table 1. Classical transgenic mice and carcinogenicity

表中の文章は、原則として英語で書き、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、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）を用い、刷り上がり一段の場合には原表幅120 mm、二段の場合には原表幅250 mmに収まるように作成し、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120回レギュラトリーサイエンス討論会（2000.3, 岐阜）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. 誌上发表などの記載要領：誌上发表，単行本，行政報告，学会発表については，別に定める記載要領及び例示に従う。

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14年5月1日

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	分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考	
ア	あかるい	明るい	明い	カ	おそらく	恐らく	恐れ, 畏れ おだやかに 落とし おのおの 自ら おもな 凡そ 終る	
	あきらかに	明らかに	明かに		おそれ	おそれ		
	あげる	上げる	上る		おだやかに	穏やかに		
	あたためる	→加温する			おとし	落とし		
	あたる	当たる	当る		おのおの	各々		
	あたらしい	新しい	新 <small>□</small> しい		おのずから	おのずから		
	あてる	当てる	当る		おびる	帯びる		
	あつかう	扱う	扱 <small>□</small> かう		おもな	主な		
	あつめる	集める	集る		およそ	およそ		
	あらかじめ	あらかじめ	予め		および	及び		
	あらたに	新たに	新 <small>□</small> たに		おわる	終わる		
	あらためる	改める						
	あらわす	表(現)す	表(現)わす 表→表面に出し 示す. 著わす 現→かくさずに 示す		かえす	返す		返 <small>□</small> す
	あらゆる	あらゆる	全る		かえって	かえって		却て
ある	ある	在る, 有る	かかわらず	かかわらず	拘らず			
あるいは	あるいは	或は	かける	欠ける	欠る			
あわ	あわ	泡	かさねる	重ねる				
あわす	合わす	合す	かつ	かつ	且つ			
イ	いう	いう	言う	かつしよく	褐色	かつ色		
	いくぶん	いくぶん	幾分	かならず	必ず	必 <small>□</small> ず		
	いずれ	いずれ	何れ	かねる	兼ねる	兼る		
	いちじるしい	著しい	著 <small>□</small> しい	～から	〇〇から作る. △△から再結晶 よりは使わない			
	いっかねん	一カ年	1箇年, 一ケ年	がらす	ガラス	硝子		
	いっそう	一層	いっそう	かわる	代わる	代る		
	いったん	一端	いったん	かわる	変わる	(代理・代人など) 変る(うつりかわ る, 変化)		
	いって	いって	行って	カ月	カ月	箇月		
	いる	いる	居る	10カ所	10カ所	10箇所, 10箇所		
	いる	入る		キ	きしゃく	希釈		
	いれる	入れる	入る	きめる	きめる	決る		
	いわゆる	いわゆる	所請	きりあげ	切り上げ	切りあげ		
	ウ	うしなう	失う		きわめて	極めて	きわめて	
		うすい(物)	薄い	薄 <small>□</small> い	ク	くふう	工夫	くふう
うすい(色)		うすい		くらい(助詞)	くらい	位		
うすめる		→希釈する	薄める	くらべる	比べる	比る		
うちに		うちに	内に, 中に	くりかえす	繰り返す	繰返 <small>□</small> す		
うながす		促す	促 <small>□</small> す	くみあわせ	組合せ(名詞) 組み合わせ(動詞)			
うる		うる	得る(can or may) →える	ケ	けんたく	懸濁	けんたく	
うるおす		潤す	潤 <small>□</small> す	コ	こえる	超える	越える	
エ		えがく	描く	画く	こげる	焦げる	焦る	
		えらぶ	選ぶ		ここ	ここ	此処	
	える	得る	(get)→うる	こころみる	試みる	試る		
オ	おいて	おいて	於いて	こたえ	こたえ	答え(表中)		
	おおう	覆う	被う	こたえる	こたえる	応える		
	おおきい	大きい	大い	こと	こと	事*		
	おおむね	おおむね	概ね	ごと	ごと	毎		
	おこなう	行う	行 <small>□</small> う	ことなる	異なる	異なる		
	おこる	起こる	起る	ことに	殊に			
				この	この	此の		

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考	分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考
コ	こまかい (洗い)こむ これ これら	細かい (洗い)込む これ これら	細い 之 此等, これ等	タ	たとえば ために	例えば ために	たとえば 為に
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	チ	ちいさい ちかづく ちようど ちよつと	小さい 近づく ちようど ちよつと	小さい 近づく, 近づく 丁度 一寸
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 しゆうまつてん じゆうぶん しょうじる じょうりゆう じよじよに 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) した後(に) しばしば 渋い しまう 示す 湿る 遮光 しやすい 一→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 湿める しゃ光 し易い, 仕易い 終末点 じゆうぶん 生ずる 蒸溜 調る	テ	ていする できる	呈する できる	出来る
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	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 ^な う
セ	せん せんじよう	栓 洗淨	せん, セン 洗滌	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
ソ	そう そうにゆう そこ その そのほか それぞれ	沿う 挿入 そこ その そのほか それぞれ	そう入 其処 其の 其の他 夫々	ニ	にかわじよう にごる にそう にゆうばち	にかわ状 濁る 二層 乳鉢	膠状 2層 乳ばち
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	大体 大抵 絶えず 互いに 確かめる だす ただ ただし 直ちに	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	ヌ	ぬぐう ぬらす	ぬぐう ぬらす	拭う 濡らす
				ネ	ねんちゆう	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 はじめて はじめの はじめる	はかり 量る 初めて 初めの 始める	秤 測る, 計る→当用 漢字 初て

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考
ハ	はやい	速い	
ヒ	ひどしい ひとつ ひとつづつ	等しい 一つ 一つずつ	
フ	ふきん ふくざつ ふたたび ふりまぜる ふれる	付近 複雑 再び 振り混ぜる 触れる	附近 振り混ぜる 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, 略ぼ
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 また まだ 全く まで まま	益々 混る 又, 亦, 復 未だ 迄 俣
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 むずぶ	むしろ 難しい 結ぶ	寧ろ 六ヶ数しい 結 <small>す</small> ぶ
メ	めづらしい	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 もつとも もつぱら もどす もとに もとづく もの もる	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 最も 専ら 戻す(もどす) 下に 基づく もの 漏る	燃る 若し 用る 勿論 以て もつぱら 許に 基く 物*, 者*
ヤ	やすい やはり やむをえず やや やわらかい	やすい やはり やむを得ず やや 柔 <small>ら</small> かい	易い 矢張り 止むを得ず 稍々 柔い, 軟かい
ユ	ゆえ ゆく	ゆえ 行く	故

分類	用 語	使 う 字	使わない字 備考
ヨ	よい よいいに 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 ようゆう よほど よる よる より	好い, 良い ようす 様だ(に) 漸く 熔融 余程 依る, 因る 比較するとき用いる. 例: ○○より△△が大きい
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 わかる 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	単位記号	量	単位の名称	単位記号
長さ	メートル	m	熱力学温度	ケルビン	K
質量	キログラム	kg	物質質量	モル	mol
時間	秒	s	光度	カンデラ	cd
電流	アンペア	A			

従来用いられてきた重量はほぼ質量に置き換えられるが、当面は用語を併用できる。

2. SI接頭語

SI単位の10の整数乗倍を表すために、SI接頭語が使われる。それら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	デン (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、10⁻²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	W
エネルギー、仕事、熱量	ジュール	J	磁束密度	テスラ	T
仕事率、電力	ワット	W	インダクタンス	ヘンリー	H
電荷	クーロン	C	セルシウス温度	セルシウス度	°C
電位	ボルト	V	平面角	ラジアン	rad
静電容量	ファラド	F	立体角	ステラジアン	sr
照度	ルクス	lx	光束	ルーメン	lm
吸収線量	グレイ	Gy	放射能線量当量	ベクレル	Bq
				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>t_r</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.	マスペクトル	MS
pK値	p <i>K</i>	筋肉投与	i.m.		

平成14年度図書委員

早川 堯夫 森川 馨 *安藤 正典 *阿曾 幸男
川崎 ナナ 江崎 勝司 *佐藤 陽治 *五十嵐 良明
内野 正 *村山 三徳 *山崎 壮 春日 文子
宮原 美知子 *福原 潔 *斎藤 善朗 *佐井 君江
関澤 純 高橋 登 関田 清司 *小泉 修一
*梅村 隆志 *山田 雅巳 鎌田 栄一 笠木 直一郎
*斎藤 博幸 淵野 裕之 *矢澤 達哉

(*印は編集委員)

国立医薬品食品衛生研究所報告 第120号

平成14年10月23日 印刷

平成14年10月30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 ショウワドウ・イープレス株式会社

- Copyright, 2001 by National Institute of Health Sciences, 18-1, Kamiyoga 1 Chome, Setagayaku-ku, Tokyo, Japan
- 本誌に掲載された論文等の著作権は、当研究所に帰属するものとする。