

ISSN 1343-4292  
CODEN : KISHFC

# 国立医薬品食品衛生研究所報告

平成 15 年

---

Bulletin of  
National Institute of  
Health Sciences

No.121

2003

---



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 15 年

---

Bulletin of  
National Institute of  
Health Sciences

No.121 2003

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121号第一部

## 特論

医薬品, 食品, 化学物質の安全性情報への取り組み

.....森川 馨・山本美智子・中野達也・春日文子・山本 都..... 1

## 研究論文

アヘンの収量および収量構成要素に及ぼす肥料の影響 .....熊谷健夫, 畠山好雄, 吉松嘉代, 下村講一郎..... 12  
ノート

有害物質含有家庭用品規制法のホルムアルデヒド試験方法の改定にかかわる検討

.....五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江..... 16

市販化粧水中のフェノキシエタノールおよびパラベン類の分析法に関する研究

.....徳永裕司, 竹内織恵, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典..... 25

ヒアルロン酸ナトリウム製剤のSEC-MALLSによる分子量評価 .....四方田千佳子..... 30  
組換え scFv 抗体の培養細胞への送達法の開発に関する研究

.....中島 治, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一..... 34

家庭用の蚊取線香, 電気蚊取等に広く使用されているピレスロイド系殺虫剤の共力剤である 2,3,3,3,2',3',3',3'-  
Octachlorodipropyl ether (S-421) のラットを用いた 28 日間反復強制経口投与毒性試験

.....松島裕子, 内田雄幸, 齊藤 実, 川崎 靖, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 井上 達, 菅野 純..... 40

## 研究に関する資料

海苔中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析

.....川崎洋子, 四方田千佳子, 棚元憲一..... 48

平成14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, 中野真希, 古川みずき, 中村優美子, 外海泰秀..... 51

## 標準品に関する資料

国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 031)

.....小出達夫, 村上美保, 森田有紀子, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 54

国立医薬品食品衛生研究所塩酸チアミン液標準品 (Control 021)

.....小出達夫, 村上美保, 森田有紀子, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 57

国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品 (Control 021)

.....小出達夫, 村上美保, 森田有紀子, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 59

国立医薬品食品衛生研究所エストロン標準品 (Control 021)

.....村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 62

国立医薬品食品衛生研究所コレカルシフェノール標準品 (Control 031)

.....村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 65

国立医薬品食品衛生研究所酢酸トコフェノール標準品 (Control 021)

.....村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 68

国立医薬品食品衛生研究所エルゴカルシフェノール標準品 (Control 031)

.....村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 71

国立医薬品食品衛生研究所トロンピン標準品 (日本薬局方トロンピン標準品) (Control 031)

.....関原亜樹子, 村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 村井敏美, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 74

国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品 (日本薬局方塩化リゾチーム標準品) (Control 031)

.....関原亜樹子, 村上美保, 森田有紀子, 小出達夫, 村井敏美, 斎藤博幸, 谷本 剛..... 76

薄層クロマトグラフ用色素標準品フラビアン酸について

.....辻 澄子, 古川みずき, 中野真希, 外海泰秀..... 78

8種の薄層クロマトグラフ用色素標準品について .....辻 澄子, 古川みずき, 中野真希, 外海泰秀..... 81

## 特別研究報告

生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明 (第二次) (平成12年度~平成14年度) ..... 86

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 (平成12年度~平成14年度) ..... 107

---

レギュラトリーサイエンス特別報告	
バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開 .....	早川堯夫..... 128
国立医薬品食品衛生研究所報告第121号第二部	
業務報告 .....	145
平成14年度所外研究員等の受入名簿 .....	205
誌上发表(原著論文) .....	208
誌上发表(総説・解説等) .....	302
単行本 .....	323
行政報告 .....	325
学会発表 .....	330
レギュラトリーサイエンス関連会議報告 .....	382
衛研例会 .....	390
平成14年度に行なった主な研究課題 .....	393
製品検査等の処理状況 .....	403
国立医薬品食品衛生研究所標準品 .....	406
国立医薬品食品衛生研究所報告第121号人名索引 .....	414
国立医薬品食品衛生研究所報告第121号キーワード検索 .....	420

## CONTENTS

## Bulletin of National Institute of Health Sciences, No.121, Part 1

## Special Report

Safety Information Project on drug, food and chemicals

..... Kaoru Morikawa, Michiko Yamamoto, Tatsuya Nakano, Fumiko Kasuga, Miyako Yamamoto ..... 1

## Originals

Influence of Fertilizers on Yield and Yield Components of Opium from *Papaver somniferum* LINN

.....Takeo Kumagai, Yoshio Hatakeyama, Kayo Yoshimatsu, Koichiro Shimomura ..... 12

## Notes

Examination related to revised test method for determination of formaldehyde, regulated by the law for the control of household products containing harmful substances

..... Yoshiaki Ikarashi, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya ..... 16

Studies for Analyzing Phenoxyethanol and Parabens in Commercial Lotions

.....Hiroshi Tokunaga, Ori Takeuchi, Reika Ko, Tadashi Uchino and Masanori Ando ..... 25

Evaluation of Molecular Weights of Hyaluronate Preparations by Multi-Angle Laser Light Scattering

.....Chikako Yomota ..... 30

Study on a method for delivering scFv recombinant antibody into cultured cells

.....Osamu Nakajima, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada ..... 34

Twenty-Eight Day Repeated Dose Oral Toxicity Test of Synergist of a pyrethroid insecticide, 2,3,3,3,2',3',3',3'-

Octachlorodipropyl ether (S-421) in Rats

.....Yuko Matsushima, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa,

.....Tohru Inoue, Jun Kanno ..... 40

## Technical Data

Determination of Six p-Hydroxybenzoic Acid Esters in Lavar(Nori) by HPLC

.....Yoko Kawasaki, Chikako Yomata, Kenichi Tanamoto ..... 48

Estimated Production by the Official Inspection of Tar Colors (Including Aluminum Lakes) in Fiscal Year 2002

.....Sumiko Tsuji, Maki Nakano, Mizuki Furukawa, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai ..... 51

## Reference Standard Data

Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

.....Tatsuo koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 54

Thiamine Hydrochloride Solution Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

.....Tatsuo koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 57

Paeoniforin Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

.....Tatsuo koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 59

Estrone Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

.....Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 62

Cholecalciferol Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

.....Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 65

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

.....Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 68

Ergocalciferol Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

.....Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto ..... 71

Thrombin Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

.....Akiko kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Toshimi Murai, Hiroyuki Saito

..... and Tsuyoshi Tanimoto ..... 74

Lysozyme Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

.....Akiko kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo koide, Toshimi Murai, Hiroyuki Saito

..... and Tsuyoshi Tanimoto ..... 76

---

Studies on Flavianic Acids as Color Reference Standard for Thin-layer Chromatography .....Sumiko Tsuji, Mizuki Furukawa, Maki Nakano and Yasuhide Tonogai .....	78
Studies on Eight Color Reference Standards for Thin-layer Chromatography .....Sumiko Tsuji, Mizuki Furukawa, Maki Nakano and Yasuhide Tonogai .....	81
<b>Report of Collaborative Study</b>	
The relationship between three dimensional structure and functional activity observed in the chemical compounds on biological system .....	86
Studies on safety evaluation of chemicals by the analysis of gene expression .....	107
<b>Special Regulatory Science Report</b>	
Potential Role of Regulatory Science in the Development of Novel Biologics .....	128
<b>Bulletin of National Institute of Health Sciences, No. 121, Part 2</b>	
Annual Reports of Divisions .....	145
Researchers List in Fiscal Year 2002 .....	205
Summaries of Papers Published in Other Journals (Original Papers) .....	208
Summaries of Papers Published in Other Journals (Review and Articles) .....	323
Title Scientific Books .....	325
Scientific Reports to Governmental Agencies .....	330
Titles of Speeches at Scientific Meetings etc .....	382
Meeting Reports Related to Regulatory Science .....	390
NIHS Seminars .....	390
Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 2002 .....	393
Survey of the Results of Food Coal-Tar Dyes .....	403
Reference Standards Prepared by the National Institute of Health Sciences .....	406
Author Index .....	414
Subject Index .....	420

## 医薬品、食品、化学物質の安全性情報への取り組み

森川 馨<sup>#</sup>・山本美智子・中野達也・春日文字・山本 都Safety Information Project on Drug, Food and Chemicals  
Division of Safety Information on Drug, Food and Chemicals  
National Institute of Health SciencesKaoru Morikawa<sup>#</sup>, Michiko Yamamoto, Tatsuya Nakano,  
Fumiko Kasuga, Miyako Yamamoto

Recent issues on BSE(Bovine Spongiform Encephalopathy) and health hazards caused by adverse reactions of medical drugs, have strongly emphasized the necessity for safety measures to secure public health. These issues have been attributed to the delay to obtain overseas information on safety and regulation, and the lack of an adequate system for acquirement and assessment of such information. In order to develop a system where domestic and international safety information is collected, analyzed, assessed and presented both scientifically and systematically, the Division of Chem-Bio Informatics of the National Institute of Health Sciences was reorganized to the Division of Safety Information on Drug, Food and Chemicals in April, 2003. Collection and evaluation of safety information on medical drugs, food and chemical substances is now centralized at the Division, which consists of 5 sections, the first, second and third sections being newly established. The first section assesses information on medical drugs, the second section deals with food microorganisms, and the third section focuses on chemicals in food. The fourth and fifth sections retain their previous functions, namely, chemical safety information research and information network infrastructure support within the institute, respectively.

The purpose of this paper is to describe how we will manage safety information on drug, food and chemicals, focusing on the role of the three new sections.

Key Words: safety information, adverse reaction of medical drugs, food microorganisms, chemicals in food, chemical safety, information system

## 1. はじめに

BSE(牛海綿状脳症)問題、医薬品の副作用による健康被害等を契機として、国民の健康確保のための安全対策がこれまでも増して強く求められている。これらの健康被害の問題点として、外国からの安全性情報や規制情報の入手の遅れや情報の収集、評価体制の不備が指摘されている。そのための対策として、国内外の安全性情報の体系的な収集、解析、評価及び提供体制の整備の必要性から、国立医薬品食品衛生研究所に医薬品、食品、化学物質の安全性に関する情報の一元的な収集、解析、評価を行うことを目的として安全情報部が新設された。

これまで、医薬品、食品、化学物質に関する安全情報

は、国や地方の行政当局や研究機関、保健所、関連法人などで個別に収集されている場合が多く、特定の機関、特に研究機関が、国内外の専門誌などの学術情報や外国の規制機関から情報等を常時チェックし、解析・評価して行政にフィードバックする仕組みはなかった。こうした現状から、今後の医薬品、食品、化学物質の安全性に関する情報の科学的、体系的な収集、解析、評価及び提供体制の重要性を踏まえ、国立医薬品食品研究所に安全情報部を設置し、医薬品、食品、化学物質の安全性確保に資することになった。これに伴い、平成15年4月に化学物質情報部が改組されて安全情報部となり、医薬品情報を扱う第1室、食品微生物を扱う第2室および食品中の化学物質を扱う第3室が新設され、第4室、第5室がこれまでの化学物質安全性情報と所内の情報基盤の業務を継続することとなった。ここでは、主に新設した3つの室の業務を中心に安全情報部で取り組む業務および研究内容について紹介する。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Kaoru Morikawa; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501,  
Japan: Phone: +81-3-3700-1141; Fax: +81-3-3707-6950;  
E-mail: morikawa@nihs.go.jp

## 2. 医薬品の安全性に関する情報

医薬品については厚生労働省において安全確保のためのさまざまな対策がとられ制度が整えられてきているが、それでも医薬品による健康被害の防止は必ずしも未だ十分とはいえ、安全対策のより一層の充実がもたれている。これら健康被害発生の要因のひとつとして、情報収集体制の未整備が指摘されている。こうした状況への対策として、国内外の主要な専門誌の医薬品副作用情報や外国機関の規制情報等を専門家が収集、解析、評価し、行政のリスク管理に反映させる医薬品の安全性確保のための科学的・体系的情報収集・評価体制の整備がもたれている。

### 2.1 医薬品による副作用

国内では、2002年の7月5日に新しいタイプの抗がん剤として、ゲフィチニブが承認されたが、間質性肺炎等の副作用で4月22日現在で246人が死亡し大きな社会問題となった<sup>1)</sup>。また、インフルエンザに対するNSAIDs(非ステロイド性抗炎症剤)使用によるインフルエンザ脳炎・脳症との関連が示唆されている<sup>2)</sup>。海外では、閉経後の女性でのHRT(エストロゲン+プロゲステロン併用療法)による疾患発症対策の評価のために、Women's Health Initiative 試験が行われたが、乳がん、冠動脈疾患、脳卒中のリスクが増加したとして2002年に中止になった。さらに、2003年には、同試験で、HRTによる痴呆、認知障害のリスクも明らかにされた<sup>3)</sup>。抗精神病薬オランザピンに続きフルマ酸クエチアピンでも糖尿病性ケトアシドーシスおよび糖尿病性昏睡が報告されている<sup>4)</sup>。また、繰り返し警告されているにもかかわらず、H2ブロッカーによる血液障害、塩酸チクロピジンによる血液障害や肝障害<sup>5)</sup>、高脂血症薬HMG-CoA還元酵素阻害剤による横紋筋融解症が報告されている<sup>6)</sup>。

医薬品は、臨床試験で有効性および安全性が確認されて承認されるが、臨床試験は比較的短期間で、少数の患者で行われる。したがって、稀な副作用や長期間服用後に現れる副作用は、市販後多くの人々に使われるようになってはじめて現れることが多く、市販後に報告される副作用事例に基づいて適切な対策を取ることが重要であると考えられる。

### 2.2 医薬品安全情報の収集・評価

国内外の医薬品関連学術文献等の総数は膨大なものであるが、ここで特に求められるのは重要な情報をできる限りもれなく収集し科学的に解析・評価することである。それには情報の収集にあたって、研究者が専門家の立場から国内外の主要な学術雑誌、国際機関や外国政府・研究機関の規制情報や医薬品の安全性に係わる最新情報を優先的にチェックすることが重要と考えられる。

また、外国政府や研究機関との情報交換・共同研究等の関係強化も迅速な情報収集・提供のために重要である。収集した学術情報等については、専門的立場から重要と思われる事例や疑わしい事例を抽出し、科学的に解析、評価を行う。具体的には、海外の原報データの詳細な検討、国内の状況や類似薬・関連医薬品情報の調査、海外の関連情報やデータベースの調査などを行う。さらにより専門的な検討を要すると思われる場合は外部の専門家の協力を得て検討を行う。これらの検討で得られた結果は厚生労働省に報告し行政施策に反映させる。現在は、海外の重要な副作用事例と規制情報を週報の形で厚生労働省に報告している。また、これらの情報をweb上でも公開するべく準備を進めている。こうして収集され抽出された情報や評価結果はデータベース化し、今後の検討あるいは施策に活用できる形で蓄積している。

こうした一連の医薬品副作用情報の体系的収集と科学的評価を支援するために、医薬品安全性情報システムの開発を同時に行っている。

安全情報の収集において、特に重要なのはFDAをはじめMHRA、EMAなどの海外規制機関の最新の安全性情報にアクセスし、それらの情報を評価していくことである。以下に主な海外の規制機関の医薬品安全情報のチェックサイトをまとめた。

#### ・米国 FDA

<http://www.fda.gov/>

- 1) FDA (Food and Drug Administration), Talk Paper
- 2) FDA, CDER (the Center for Drug Evaluation and Research) 医薬品情報
- 3) FDA, CBER (the Center for Biologics Evaluation and Research) 製品安全性情報
- 4) FDA, MedWatch  
医薬品等に関する安全性警告情報、安全性に関するラベリング変更、回収情報等

#### ・英国 MHRA

<http://www.mca.gov.uk/aboutagency/regframework/csm/csmhome.htm>

MHRA (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, CSM (Committee on Safety of Medicines))

- 1) Important safety messages (ドクターレター)
- 2) Current Problems in Pharmacovigilance (安全性評価情報)
- 3) Black Triangle list (重点的なモニターの対象となる新薬(ワクチン含む)、2年間モニター)

#### ・オーストラリア TGA

<http://www.health.gov.au/tga/adr/index.htm>

TGA (Therapeutic Goods Administration, ADRAC (Adverse Drug Reaction Advisory Committee))

Australian Bulletin Adverse Drug Reactions (副作用報

告の解説)

・カナダ Health Canada

[http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/index\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/index_e.html)

MHPD (Marketed Health Products Directorate), TPD (Therapeutic Products Directorate), BGTD (Genetic Therapies Directorate)

1) Canadian Adverse Reaction Newsletter

2) Advisories and Warnings

・WHO Drug Alert

<http://www.who.int/medicines/organizaion/qsm/activities/drugsafety/orgqsmalerts.shtml>

WHO (World Health Organization), EDM (Essential Drugs and Medicines Policy)

1) Drug Alert (各国から報告のあった警告情報)

2) WHO Adverse Reactions Database on-line システム (Uppsala Monitoring Centreで、加盟各国からの副作用報告をデータベース化し提供)

・EU EMEA

<http://www.emea.eu.int/>

欧州医薬品審査庁 EMEA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products), CPMP (the Committee for Proprietary Medicinal Products)

1) 公開医薬品審査報告書 (EPER)

2) ビジランス, 安全性情報

## 2.3 医薬品安全情報システム

医薬品安全情報システムは、国際機関や外国政府・研究機関、国内外の主要な学術雑誌から、医薬品の安全性に関わる情報を迅速に収集・整理・抽出し、医薬品による重篤な副作用の発生を防止することを目的にシステム開発を行っている。

### 2.3.1 システムの概要

本システムは、下記の4つのサブシステムから構成される。

1) 医薬品情報収集システム (国際機関および外国政府・研究機関)

国際機関や外国政府・研究機関から報告された規制情報や医薬品の安全性に関わる情報を収集・整理しデータベース化を行う。

2) 医薬品情報収集システム (学術雑誌等)

学会発表や国内外の主要な学術雑誌に掲載された学術論文から医薬品の安全性に関わる情報を収集・整理しデータベース化を行う。

3) 医薬品名称データベースシステム

医薬品安全性情報データベースの基礎となる、日本薬局方 (JP) 名称データベース、日本医薬品一般的名称

(JAN) データベースおよびTIP紙のCAPSULEデータベースの開発を行う。

4) 医薬品安全情報解析システム

データベース化された医薬品安全性情報をもとに、統計学的解析手法を用いて医薬品の安全性に関わる情報の抽出・評価を行う。

### 2.3.2 システムの詳細

1) 医薬品情報収集システム (国際機関および外国政府・研究機関)

国際機関や外国政府・研究機関から報告された規制情報や医薬品の安全性に関わる情報を収集・整理しデータベース化を行う。本システムは所内内部でwebシステムとして使用する。データベースは2) で収集される情報も収録する。システムとして次の機能を実現する。

i) 情報収集半自動化機能

収集した情報を半自動化でデータベース入力のための情報へ変換する機能。

ii) データベース作成インタフェース機能

収集した情報をデータベースへ入力するためのインタフェース機能。

iii) データベース検索インタフェース機能

データベースに収録された情報を検索し表示する機能。検索に関しては、医薬品一般名 (日本名, 英名), 専門用語 (副作用名) 等で検索可能な柔軟な検索機能を用意する。PDF, HTMLを全文検索する機能を含める。

ここで開発するシステム上のデータベースを構築するための情報収集対象機関の主なものは、2.2 に示した機関である。

2) 医薬品情報収集システム (学術雑誌等)

学会発表や国内外の主要な学術雑誌に掲載された学術論文から医薬品の安全性に関わる情報を収集・整理しデータベース化を行う。データベース検索機能は1) で開発したシステムを使用する。

情報ソースより収集しデータベースへ入力するための情報整理を行い、データベースを作成する。必要な情報は、サイトの内容をダウンロードし全文検索可能なようにする。また、サイトの内容を自動ダウンロードするシステムを用意する。

1次検索対象について医薬品の安全情報を検索し収集する。その内容より参照される情報を2次検索対象としてオンラインジャーナル等より取得する。

医薬品情報収集システム (国際機関および外国政府・研究機関) および医薬品情報収集システム (学術雑誌等) のシステム構成を図1に示す。

3) 医薬品名称データベースシステム

医薬品安全性情報データベースの基礎となる、日本薬局方 (JP) 名称データベース、日本医薬品一般的名称

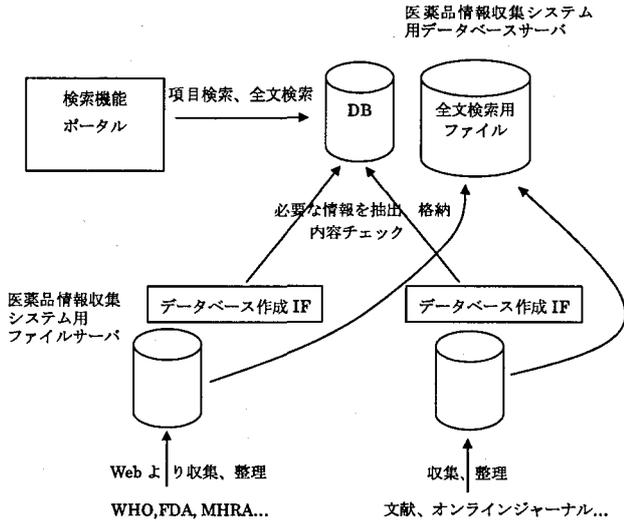


図1 医薬品情報収集システム（国際機関および外国政府・研究機関）および医薬品情報収集システム（学術雑誌等）のシステム構成概念図

(JAN) データベース, TIP (The Informed Prescriber) 紙のCAPSULEのデータベースから構成される。作成されたデータベースは外部に公開し, アクセスのためのweb機能を開発する。システムとして次の機能を実現する。

i) 名称情報の入力

日本薬局方, 日本医薬品一般名称, CAPSULEより新規の情報の収集を行い, データベースを作成する。

ii) データベース作成インタフェース機能

収集した情報をデータベースへ入力するためのインタフェース機能

iii) データベース検索インタフェース機能

データベースに収録された情報を検索し表示する機能。検索結果の情報元のリンクがある場合はその項目をクリックすることにより表示を行う。

iv) アクセスログ機能

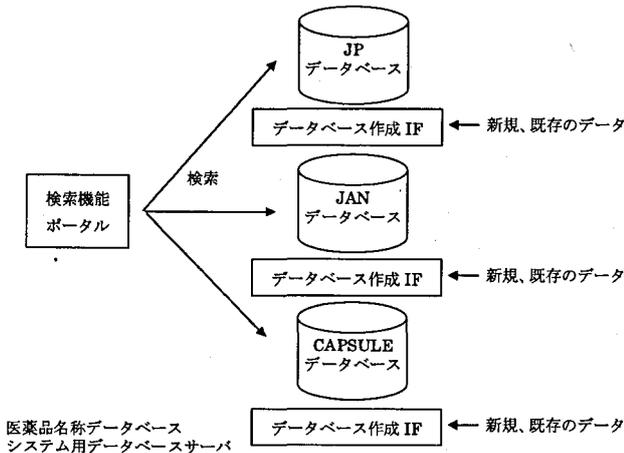


図2 医薬品名称データベースシステムのシステム構成概念図

データベースへのアクセス状況を収集, 表示する機能を作成する。

図2に, 医薬品名称データベースシステムの概念図を示した。

4) 医薬品安全情報解析システム

データベース化された医薬品安全性情報をもとに, 統計的手法等を用いて解析・評価し, 医薬品の安全性に関わる重要な情報の抽出を行う。SASなどの統計パッケージを用いて収集したデータを解析するシステムを開発する。

3. 食品の安全性に関する情報

3.1 食品の安全性に関する情報の収集, 解析, 評価及び提供

食品の安全性に関しては, ここ数年BSE (牛海綿状脳症), 外国産野菜の残留農薬, 無登録農薬や指定外食品添加物の違法使用, ダイエット用健康食品による健康被害など, 食の安全に係わる問題が多発し, 国民の食への信頼が大きく揺らいだ。こうした中で外国からの安全性情報や規制情報の入手の遅れや情報の収集, 評価体制の不備が問題点として指摘された。これまで, 食品中の残留農薬や有害化学物質, 食中毒情報, 国内外の食品添加物規制情報など食品の安全性に関するさまざまな情報を一元的に収集し, また国内外の関連機関や専門誌から, 食品の安全性に関する学術情報を専門的に評価している機関はほとんどなかった。こうした現状に対して, 食品の安全性を確保する上で食品安全性情報の重要性が指摘され, 国立医薬品食品研究所の安全情報部第2室, 第3室がこれらの課題に取り組むことになった。以下に現在進めている取り組みを示した。

1) 国内外の食品の安全性に関する情報の科学的収集・評価

国内外の文献, 学会記事, WHO, FAO, Codexなどの国際機関, 各国あるいはEUなどのwebページを定期的にチェックし, 食品安全に係わる緊急情報や新規情報を迅速に収集する。その中で重要と思われる情報についてさらに文献等を詳細に調査・評価する。

2) 収集情報及び評価結果のインターネット等による公開・提供, 行政への報告

収集した情報について重要性, 緊急性, 新規性等に関して一次判断を行い, 海外情報については必要に応じて簡略な翻訳を加える。その上で, 所のホームページ等を利用して, 情報を所内外へ発信する。わが国の情報を英訳して海外に紹介することも, 将来は業務としての比率が高まってくるものと思われる。緊急を要する情報については, 未確認の情報であっても, 速報という形で, 厚生労働省あるいは食品安全委員会へ通報する場合も想定される。

3) 収集情報及び評価結果のデータベース化

食品の安全に係わる問題が生じた時に迅速かつ適切に対応するためには、収集・評価した情報をデータベース化し、必要な時に目的の情報を容易に取り出せる形にしておくことが必須である。したがって、当部で収集し検討した情報はすべてデータベース化し、検索機能を付けてキーワードにより目的の情報を検索できるようにする。

安全情報部で行う食品の安全性情報の収集、解析、評価、提供に関する業務の概要を図3に示した。

食品安全に関する重要な新着情報やアラート情報が掲載されている主な国際機関や外国機関のサイトを以下に示した。

- ・ WHO (世界保健機関)  
WHO Food Safety : <http://www.who.int/fsf/>  
WHO Communicable Disease Surveillance & Response (CSR) : <http://www.who.int/csr/don/en/>  
JEMRA (FAO/WHO 合同微生物学的リスクアセスメント専門家会議) : <http://www.who.int/fsf/Micro/index.htm>
- ・ IPCS (国際化学物質安全性計画)  
JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会) : <http://www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm>  
JMPR (FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議) : <http://www.who.int/pcs/jmpr/jmpr.htm>

- ・ FAO (国連食糧農業機関)  
Food and Nutrition : [http://www.fao.org/es/ESN/index\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/index_en.stm)  
JECFA : [http://www.fao.org/es/ESN/Jecfa/index\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/Jecfa/index_en.stm)  
JEMRA (FAO/WHO 合同微生物学的リスクアセスメント専門家会議) : [http://www.fao.org/es/ESN/food/risk\\_mra\\_jemra\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/risk_mra_jemra_en.stm)
- ・ Codex Alimentarius (食品規格) : <http://www.codexalimentarius.net/>
- ・ EU (欧州連合)  
EU Food Safety: from the Farm to the Fork [http://europa.eu.int/comm/food/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/index_en.html)
- ・ Food Safety Gov (米国政府の食品情報ページ) : <http://www.foodsafety.gov/>
- ・ FDA (米国食品医薬品局) : <http://www.fda.gov/>  
CFR (食品安全応用栄養センター) : <http://www.cfsan.fda.gov/list.html>
- ・ FSIS (米国農務省食品安全検査局) : <http://www.fsis.usda.gov/index.htm>
- ・ CDC (米国疾病コントロールセンター) : <http://www.cdc.gov/>
- ・ Food Standards Agency (英国食品基準庁) : <http://www.food.gov.uk/>

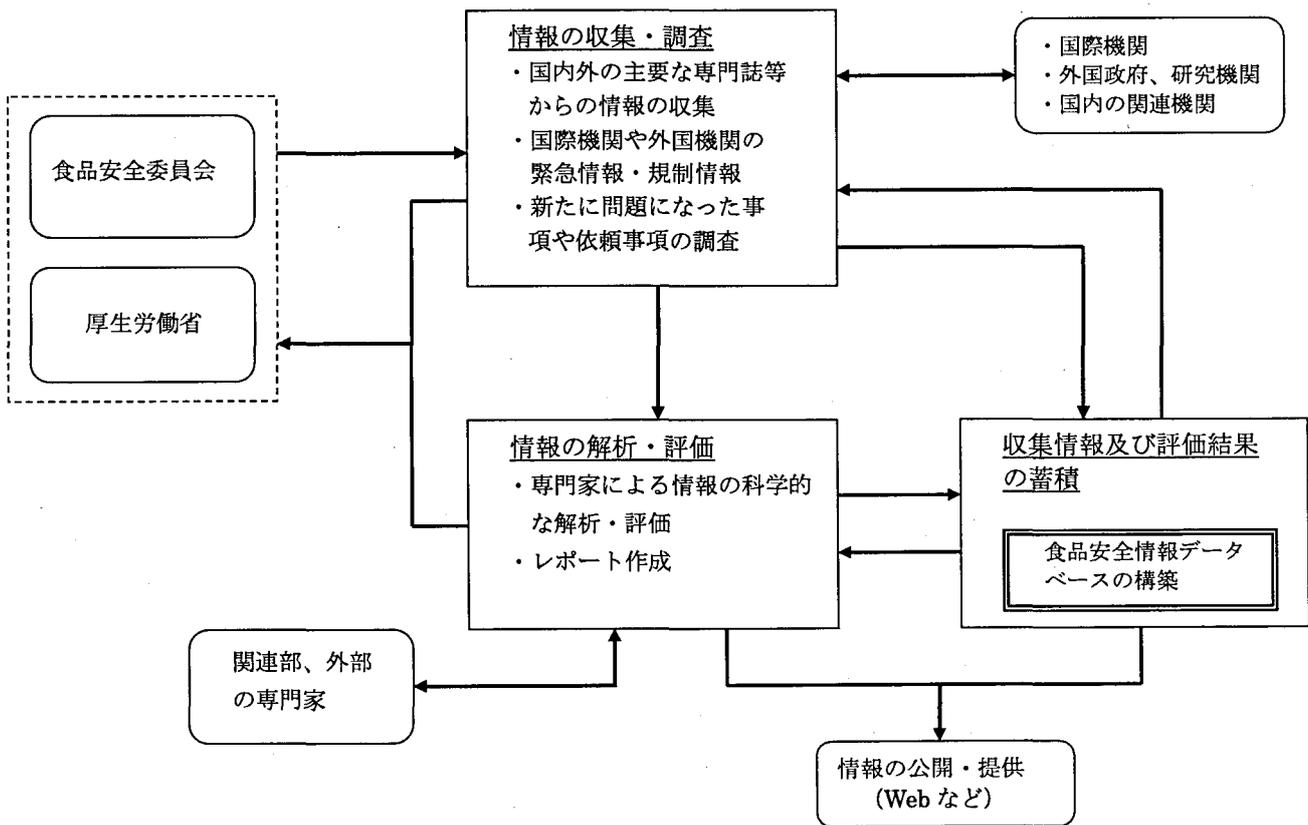


図3 食品の安全性に関する情報の収集、解析、評価

- ・Health Canada (ヘルスカナダ, 健康に関する国の機関): <http://www.hc-sc.gc.ca/english/index.html>
- ・Canadian Food Inspection Agency (カナダ食品検査局): <http://www.inspection.gc.ca/english/ops/secur/secure.shtml>
- ・Food Standards Australia New Zealand (オーストラリア及びニュージーランドの食品安全に関する政府の機関): <http://www.foodstandards.gov.au/>
- ・フランス食品衛生安全局 (AFSSA): <http://www.afssa.fr/>
- ・Acrylamide Infonet (アクリルアミド情報ネットワーク): <http://www.acrylamide-food.org/>

食品の安全情報を収集するには、これらの情報サイトの他に、学術文献、学会報告、シンポジウム、様々な食品安全情報サイトなどで常に新しい情報をチェックしておく必要がある。またこうした情報をさらに検討し評価するためには所内外の専門家との協力・連携が不可欠である。

### 3.2 食品中の化学物質に関する安全情報

食品中の化学物質は、残留農薬、食品添加物、ダイオキシン、内分泌かく乱物質、重金属、その他の有害化学物質、遺伝子組換え食品、新開発食品、アレルギー原因食品、照射食品など幅広く、食品の安全に係わる問題も範囲が広い。ここ数年の間に、人への被害が問題になったもの、新聞やテレビなどで話題になったもの、事故・事件等の原因になったもの、違法行為で取締の対象になったもの、なんらかの行政措置がとられたものなどその数や種類は非常に多い。主な事例を以下に示した。

#### 1) 農薬

外国産の野菜や冷凍野菜からの基準値を超えた残留農薬の検出(2002年, 2003年), 国内各地で果物等に無登録農薬(ダイホルタン, プリクトランなど)が違法使用・販売された(2002年)。

#### 2) 食品添加物

指定外添加物を使用した違反食品が相次ぎ、回収その他の措置がとられた。例)酸化防止剤t-ブチルヒドロキノン(TBHQ)を含む肉まん(2002年), n-プロパノール, n-ブタノール等を使用した香料を使用した食品(2002年), 「N-エチル-4-メンタン-3-カルボキサミド」を含む香料を使用した清涼飲料水や栄養飲料等(2003年)。

#### 3) ダイオキシン

ベルギー産の鶏卵や鶏肉から高濃度のダイオキシン検出(1999年, ダイオキシンを含んだ油が混入した家畜飼料が使用されたのが原因とみられる)。

#### 4) 内分泌かく乱物質

厚生省がポリ塩化ビニル製玩具等へのフタル酸エステ

ル類の一部の使用禁止について食品衛生法の規格基準改正を告示(2002年), 2003年8月より実施。規制対象となるのは、おしゃぶりや歯固め等に使われてきたフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)とフタル酸ジイソニル(DINP)だが、通常口にしない玩具や調理用具、食品保存容器などではDEHPのみが規制対象となる。

#### 5) 遺伝子組換え食品

トウモロコシ加工品の原料として日本で安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ「スターリンク」検出(2000年), 検疫所のモニタリング検査で輸入品から米国産遺伝子組換えパパイア検出(2002年)。

#### 6) 中国製ダイエット用健康食品等

2002年, 中国製ダイエット用健康食品により, 肝機能障害や甲状腺障害による被害が多発, 当該健康食品の分析の結果, N-ニトロソフェンフルラミン等が検出された。

#### 7) アレルギー物質

2001年厚生労働省の省令の一部が改正され, 食物アレルギーを引き起こすことが明らかになった食品のうち, 特に重要なものについてこれらを含む加工食品についての表示義務が定められた。

#### 8) 重金属

メチル水銀などの有機水銀化合物が胎児の神経系の発達に悪影響を及ぼす可能性について疫学調査も含めたさまざまな研究が行われている<sup>7,8)</sup>。

2003年6月厚生労働省は, 一部の魚介類に人の健康, 特に胎児に影響を及ぼす恐れがあるレベルの水銀が含有されているとして, 妊娠している女性またはその可能性がある女性に対して摂食に関する注意事項を出した。また2003年6月ローマで開かれた専門家会議(JECFA)で, メチル水銀, カドミウムについての評価が行われ, メチル水銀については暫定的耐容週間摂取量(PTWI)がこれまでの3.3 µg/kgから1.6 µg/kgに引き下げられた。カドミウムについては新たに入手したデータからPTWIを修正すべき十分な根拠は見当たらないとして現在のPTWIである7 µg/kgが維持された。

#### 9) その他の有害物質

2002年スウェーデンの研究所がポテトチップ, フライドポテト, ビスケット, パン等高温で調理する食品中でのアクリルアミドの生成について報告した。アクリルアミドはIARC(国際がん研究機関)の発がん性分類で2A(人に対しておそらく発がん性がある)となっている。WHOなどの国際機関及び各国で, 生成の原因, 食品中からの分析, 人の健康に与えるリスク等について現在研究が進められている<sup>9-13)</sup>。

食品由来化学物質による健康危害は, 顕在化するまで長期間を要することも多い。そうした危害を未然に防ぎ, あるいは最小限に抑えるためには, 国内外の新しい情報

や知見、特に国外の関連機関や学術雑誌を常にモニターして最新情報や緊急情報を迅速にキャッチし、その結果を行政のリスク管理等に反映させることがきわめて重要である。それと共に、こうした最新情報や緊急情報、国内外の規制情報、特定のテーマに関する詳細な調査結果などをホームページ等を通じてよりわかりやすく伝えることが食の安全についての理解を高め、被害を防止する上で重要である。これらをふまえ、3.1に記載したデータベースやホームページ構築も含めて、食品安全情報の体制整備を進めている。

### 3.3 食品微生物に関する安全情報

食品汚染病原微生物に起因する健康被害は、残念なことに常に発生しており、その発生実態をより正確に把握し、原因微生物、原因食品、そして食品が汚染された経緯に関する情報を収集・分析し、これらのデータを健康被害の低減化のために必要不可欠な基礎データとして活用することが重要である。したがって、食品の微生物に関する情報としては、緊急情報、最新情報に加え、国内の食中毒発生状況に関する疫学情報を取扱うことが重要なポイントであり、これら食品の微生物汚染の疫学情報を効率よく収集・分析するためのシステムを開発することが、これからの食品微生物に関する安全情報部の重要な業務の一つである。

具体的な疫学的アプローチとして、①実疾病発生数の把握、②Diffuse Outbreaks（広域散発的集団食中毒）の迅速な探知、そして③食中毒発生原因の分析を行なう。

実疾病発生数の把握は、食品衛生政策における優先度を検討する際に必要である。実疾病発生数把握の手段の1つとして、厚生労働省食品保健部監視安全課と協力し、食品衛生法に基づく食中毒報告、特に速報の監視を行う。保健所が食中毒として確定する以前に通報してくる情報であり、集団発生事例がほとんどであるが、疑われる健康被害状況をいち早く探知するために有効な手段である。一方、散発的な健康被害は、死亡例など被害が甚大であるか複数事例に関連が認められない限り、各保健所においても把握できないことが多い。散発的な健康被害の把握のためには、感染症法に基づいて集計が行われている病原体検出情報と感染症発生情報との連携を取ること、有効な手段と考えられるが、食品由来感染症の報告はそれほど多くないのが実情である。そこで、これら散発事例も含む食品汚染微生物に起因する被害実態を把握するために、欧米で先進的に取り入れられているActive Surveillance（能動的発生動向調査）に取り組む予定である<sup>14)</sup>。この調査は、対象地域内に設定した協力医療機関、ならびに協力検査機関に対し、調査者側から定期的に電話等による聞き取り調査を行い、病原微生物の検出事例数を集計し、その結果から当該地域全体の

住民当たり実発生者数を推計する方法であり、個々には保健所への届け出に上がってこない疾病の実発生状況を推定することが可能となる。実疾病発生数を把握することにより、集団食中毒事故を起こしやすい病原体がより多く報告されがちな食中毒統計の弱点を補うことが可能になると考えられる。

Diffuse Outbreaksは、食品流通の広域化と大型化に伴い、わが国でも増えつつある食中毒のタイプである。一つの地域内での発生は散発的あるいは小規模であっても、共通食品を原因とする患者が複数の自治体にまたがって発生する食中毒である。今年行われた食品衛生法の改正に当たっては、自治体の範囲を超えた広域集団食中毒発生に対して、国が調査や対応に主導権を持って当たれるような内容が盛り込まれた。迅速な対応ができるためには、このような広域型の食中毒発生をいち早く、正確に探知することが必要である。平成10年に7都府県で49名の感染者を出したイクラ醤油漬けによるE. coli O157食中毒<sup>15)</sup>、平成11年に乾燥イカ菓子へのSalmonella OranienburgとSalmonella Chesterの混合汚染により全国で1,505名もの患者が発生した事例<sup>16)</sup>、平成13年に関東各県で多数の被害者が発生した、牛タタキによるO157<sup>17)</sup>、和風キムチによるO157<sup>18, 19)</sup>の感染事例は、各都県ではそれぞれ散発事例としての認識から始まり、最終的に共通原因食品の特定に至るまでには、大変な困難があった。特に和風キムチ事例と同一な遺伝子パターンのO157は、同時期全国でも多数検出されたが、ついに共通の原因は特定されなかった。実疾病発生数の調査によって、定常状態での実疾病発生動向（ベースライン）が把握できていると、各疾病の異常な集積を迅速に探知すること、さらにはそのことにより散発事例と共通原因による広域散発的集団発生との識別が可能となる。実疾病発生数の調査を将来的にはより広範な自治体に拡大することにより、Diffuse Outbreaksの迅速な探知を達成することを目標としている。

食中毒発生原因の分析は、具体的な食品衛生対策立案に役立ち、同様の原因による食中毒の再発防止のために重要である。食中毒事例の中には、過去の教訓を生かせば防げるものも多い。平成8年に福岡で、また平成9年に熊本で起きたSalmonella Enteritidisによる食中毒は、どちらも学校給食において、洗浄消毒したつもり調理器具からの二次汚染により発生した。ミキサーの羽の基部に残った菌が、翌日以降に増殖したためであった。平成15年1月に、東京都と北海道で相次いで起きたパンに付着したSRSV（小型球形ウイルス）による食中毒は、当初パンが原因食品であることさえ考慮されにくかったが、同様の事例はすでに前年1月に福井県で起きていた。これらのケースのように、従来の常識では予測できなかった原因による食中毒が、繰り返し起こることがある。

それらを防ぐためには、担当した保健所の経験や知識が全国の担当者に一刻も早く共有されることが必要である。現在、各食中毒事例の調査、対応が終了すると、担当保健所によって食中毒詳細が作成され、厚生労働省に送付される。原因食品や食品が汚染された経緯に関する情報を、全国で食品衛生行政また研究に携わる人たちが共有し、各々の目的に応じて分析できるようにするために、食中毒詳細のデータベース化を行う。詳細を、個人情報を除いた上で電子ファイルとして送付してもらい、事後の集計や比較分析が可能な形態で保存し、データベース化し、それを、衛研のホームページで公開し、食中毒の予防に役立てる予定である。以上のような、食中毒発生状況に関する疫学情報の収集、解析業務に当たっては、本省食品保健部監視安全課との緊密な連携が必要であり、緊密な連携の基に新しい取り組みとして本業務を推進していくことになっている。

#### 4. 化学物質に関する安全情報と情報基盤

##### 4.1 化学物質に関する安全情報

化学物質の安全情報を扱う第四室では、化学物質の安全性に関する情報の収集、解析、蓄積、提供を行っている。主な業務のひとつは国際化学物質安全性計画 (IPCS) の国際簡潔評価文書 (CICAD) 及び国際化学物質安全性カード (ICSC) の原案作成及び日本語への翻訳である。

###### 1) CICAD (国際簡潔評価文書) について

CICAD は、各国で既にリスク評価が行われている物質について、その成果を国際的に共有することを目的として、1998年から作成が開始されている。インターネット上にはこれまでに最終検討委員会 (Final Review Board) で国際評価として承認された56物質と作成途上の24物質が公表されている。当部は日本の担当機関としてCICADの原案を作成のを行っている。

CICADの対象化学物質は医薬品、農薬を除き、工業化学物質、環境汚染物質などである。CICAD作成における対象化学物質は、(1) 有害性が証明されていること、(2) 国際的に関心が高いこと、(3) 広範な暴露が予測されること、(4) 国際的なリスク削減計画の対象になっているか、越境汚染が問題となっていること、(5) 信頼性の高い安全性評価資料があることが、CICAD作成の優先基準となっている。CICADの目的は、対象物質の健康と環境への影響評価に関する研究データを要約するとともに暴露評価とを組み合わせてリスク評価を行うことにある。当部が中心となりわが国が作成したCICADは13番のTriphenylin compounds、27番のDiphenylmethane diisocyanate (MDI) と52番のDiethylphthalateなどである。また、CICADの全訳およびIPCSで出版された評価文書である環境保健クライテリア (EHC) の要約を

翻訳し、当所のホームページに順次掲載している (<http://www.nihs.go.jp/hse/chemical/index.html>)。

###### 2) ICSC (国際化学物質安全性カード) について

ICSCはIPCSが作成しているドキュメント類のひとつであり、EC委員会の協力の下に1989年から作成が開始されている。当部は日本の担当機関として、毎年他の十数カ国と共にICSC原案の作成を分担している。EHCやCICADが専門家や行政担当者を主な対象として作成されているのに対し、ICSCは工場、農業、建設業、その他化学物質を扱う作業場で働く人々や雇用者など化学や毒性の専門家でない人を対象に作成されている。したがって、内容は化学物質の安全性に関する特に重要な情報 (物理的・化学的性質、短期及び長期の毒性影響、環境影響、急性症状、火災・爆発の危険性、貯蔵、漏洩物処理など) が分かりやすい表現で簡潔にまとめられている。これまで約1,300物質についてのICSCが作成されているが、新規物質の作成だけでなく既存のカードの更新作業も数年ごとに行われている。

ICSCは専門家でない人を利用対象としていることから、世界各国で利用されるためには各国語への翻訳が必須である。日本でも1992年より当部においてICSCの翻訳を開始し、ICSC日本語版として提供してきている。当初は印刷物だったが、印刷物は毎年追加・更新されるICSCへの迅速な対応が困難という短所があった。インターネットの普及により、現在は当所のホームページから提供しており、カードの追加・更新に随時対応している。現時点 (2003年5月) でのICSC日本語版の物質数は1,303物質である。ICSCの記載項目はMSDS (化学物質等安全データシート) に近いことから、MSDS作成の参考資料としても広く利用されており、ICSC日本語版ホームページへのアクセス件数は現在、月約20,000件のほっている (<http://www.nihs.go.jp/ICSC/>)<sup>20)</sup>。

##### 4.2 所内情報基盤とシステム開発

第5室は国立衛研における情報と計算のための基盤環境構築・維持・管理を担当し、全所的な研究情報ネットワーク基盤整備と活用のために、所外のインターネットへの接続、所外リソース活用支援、所内の大型プロジェクトにおけるネットワーク整備等で様々な支援を行っている。また、所内各部署で開発した医薬品や食品関連データベース等のwebによる公開を支援してきた。研究情報ネットワークを介した蔵書管理システム利用や図書情報検索のweb利用等についても所内ユーザにサービスを提供している。ネットワークサーバ機器の維持管理・端末の登録・削除、所内ユーザ登録・削除等の管理等の業務についてヘルプデスクと連携しながら対応している。

また、所内外のネットワーク基盤を用いて生体に影響に及ぼす化学物質についてのデータ・知識ベース

や関連するタンパク質の構造解析を行なっている。また、ミレニアムプロジェクト、メディカルフロンティアプロジェクト、トキシコゲノミクスプロジェクト等、所内プロジェクトと連携して研究を進めている。

## 5. 健康危機管理に関する情報

1990年代半ば以降、松本及び東京地下鉄サリン事件、重油流出事故、和歌山毒物カレー事件及びその後続発した毒物混入事件など、化学物質に関連した大きな事故や事件が相次いで発生したことから、こうした化学物質が原因となる事故や事件、すなわちケミカルハザードへの対応において、行政面、研究面、情報面などさまざまな分野で危機管理の重要性が指摘されてきた。また、米国の同時多発テロを契機として、国際機関などを中心に化学テロへの国際的な取組みも進められつつある。当所ではこれまで化学物質対策に関しては被害の未然防止のための対応が中心であったが、上記のような緊急の健康危機対策の観点から、事故や事件発生時の対応のための情報面での支援体制整備が重要となった。これをふまえ、化学物質による危害の防止や緊急時の対応に有用な知識情報基盤の構築をはかっている。

### 1) 化学物質による危害事例の調査・分析

化学物質に関しては、誤使用や物質に関する知識不足による同じような事故が毎年繰り返し起きており、過去の事例が教訓として十分に活かされていない。こうした事故の再発防止を目的として、消防や労働衛生などの資料を中心にこれまでの事故事例を調査し、事故発生の日時や場所、原因物質、被害者数、事故の概要を入力したデータベースを作成し、webページで提供している。また、和歌山のヒ素カレー事件を契機に有毒な化学物質による事件の防止及び発生時における適切な対応をはかるための対策の一環として、毒劇物等を用いた事件事例を調査・分析している<sup>21)</sup>。

### 2) 化学災害・化学テロに関する情報の調査と研究

事故事例の多い化学物質や被害の大きい化学物質、例えばクロロピクリンやフッ化水素酸等を中心に、各種毒性、物性、処理法、分析法など健康危機管理面で必要な詳細な情報を調査してまとめている。また神経剤、窒息剤、びらん剤などの化学剤についての情報を調査し、これらの情報をwebページから提供している<sup>22)</sup>。

### 3) 情報利用のための基盤構築

当所で作成した健康危機管理情報やデータベースの活用をはかるためwebページを構築すると共に、当所で作成した情報だけでなく、緊急時に必要な情報を迅速に効率よく探し出せるよう国内外の危機管理に関する機関や情報のwebガイドを作成している。

### 4) 薬毒物分析シミュレータ

化学物質が原因と疑われる事故や事件が発生した時に

基本的な薬毒物の分析を迅速に行うためには、分析関係者間における普段からの分析方法の周知と演習が不可欠である。これをふまえ広島大学医学部法医学教室と協力して、当教室が開発した薬毒物分析法のシミュレーションシステムの構築を進めている。

### 5) 化学物質による緊急危害対応のための情報に関する専門家会合

化学物質等による事故・事件発生時に適切に対応するためには、広い範囲の関係者や専門家の分野横断的な連携がきわめて重要であり、関係者が平素から緊急時対応に関するさまざまな問題について具体的に検討しておく必要がある。こうしたことから、救急医療、薬毒物分析、中毒情報等の専門家及び行政関連部署の担当者から成る専門家会合を開催し、さまざまな状況下における緊急時の対応等について検討している。

化学物質による事故・事件の発生時に迅速かつ適切に対応するためには、その化学物質に関する情報（毒性、物性、反応性等）および緊急時の対応に必要な情報（治療法、分析法、除染等）がタイムリーに提供されなければならない。また、化学物質による事故の多くは知識不足や誤使用によるものであり、化学物質を取り扱う人にその性質に関する正しい知識や適切な取扱い方法をいかに伝達するかが、事故防止のために重要である。化学物質に関する各種の情報は、国内外のさまざまな機関で調査・研究されており、その結果が公表されているものも多い。だが現実には、どこにあるかわからない、通常の検索システムでは抽出されない、検索に時間を要する、などさまざまな理由で、緊急時に迅速に入手できない例が非常に多い。当部の健康危機管理情報ホームページを含む基盤構築は、こうした状況の改善を目指して調査研究を行っている。

## 6. おわりに

国立医薬品食品衛生研究所では、平成14年度まで情報を扱う部門として化学物質情報部があり、化学物質の安全性情報に係わる仕事を行ってきたが、医薬品及び食品の安全性に係わる情報についてはこれまで組織的な対応はなされてこなかった。食品、医薬品の健康被害を契機として、医薬品、食品、化学物質を扱う研究所として、医薬品、食品、化学物質に関する安全性情報に関連する業務に専門的な立場から取り組むため安全情報部を新設し、国立医薬品食品衛生研究所として体制を整備し、医薬品、食品、化学物質の安全性情報に対する社会のニーズに応えることとなった。特に研究機関が、これから医薬品、食品の安全性に関する内外の学術情報等を常時チェックし専門的立場から評価を行い行政支援を行うことは、大きな意義があると言える。また、昨年発生した健康食品問題など食品及び医薬品の境界領域にあたるもの

に関する問題への対処の必要性など、安全性に係わる情報に関しては医薬品、食品、化学物質それぞれの区分を越えて学際的かつ分野横断的に科学的観点から対応することが必要である。医薬品、食品、化学物質の安全性に関する情報、そして健康危機管理（特に、当所では化学物質による危害の防止や緊急対策）に関する情報も含めて、安全情報の一元的な収集・評価体制を整備することは、リスク管理の観点から重要かつ効果的であり、またこれがリスク管理の基本的考え方でもある。

地球規模の情報化時代を迎え、世界で発信される大量の安全情報から、国の研究機関として、国民に真に役立つ安全情報を抽出し、科学的評価を加えて情報を発信することは重要な使命であり国民の健康に直接係わる重い仕事である。この重い責務に対して、所内また所外の多くの方々の協力を得て、この重要な分野を切り開いていきたいと願っている。社会に役立つ新しい科学を目指して、安全情報部のスタッフ一同協力して、この仕事に地道に取り組んでいきたいと考えている。

## 謝辞

本稿を執筆に当たり、ご協力頂いた安全情報部の石光進、中田琴子、窪田邦宏氏、および安全情報部の皆さんに深く感謝致します。

## 文 献

- 厚生労働省 報道発表資料 ゲフィチニブによる急性肺障害、間質性肺炎についての「緊急安全性情報」の発出について／緊急安全性情報 ゲフィチニブによる急性肺障害、間質性肺炎について（製薬会社）（2002.10.15）
- 厚生労働省 報道発表資料 インフルエンザの臨床経過中に発症した脳炎・脳症の重症化と解熱剤（ジクロフェナクナトリウム）の使用について／緊急安全性情報 インフルエンザ脳炎・脳症患者に対するジクロフェナクナトリウム製剤の使用について（2000.11.15）
- Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 May 28; 289 (20): 2651-62.
- Jin H, Meyer JM, Jeste DV. Related Articles, Links Phenomenology of and risk factors for new-onset diabetes mellitus and diabetic ketoacidosis associated with atypical antipsychotics: an analysis of 45 published cases. *Ann Clin Psychiatry*. 2002 Mar; 14 (1): 59-64. Review.
- 厚生労働省 報道発表資料 塩酸チクロピジン製剤による重大な副作用の防止について／緊急安全性情報 塩酸チクロピジン製剤による重大な副作用の防止について（製薬会社各社）（1999.6.30）,（2002.7.23）
- 医薬品情報提供ホームページ（医薬品機構） 副作用が疑われる症例報告に関する情報副作用報告一覧（1998-2002）
- Lyketsos, C.G.: Should pregnant women avoid eating fish? Lessons from the Seychelles, *Lancet*, 361 (9370), 1667-1668, 2003
- Gary J M, et al.: Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study, *Lancet*, 361 (Issue 9370), 1686-1692, 2003
- Mottram, D.S., Bronislaw, L.W. and Dodson, A.T.: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448-449, 2002.
- Stadler, R.H. et al.: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419, 449-450, 2002.
- Mucci, L.A. et al.: Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: Absence of an association in a population-based study in Sweden, *British Journal of Cancer*, 88, 84-89, 2003.
- Shaw, I. and Thomson, B.: Acrylamide food risk, *Lancet*, 361 (9355), 434. 2003.
- Sharp, D.: Acrylamide in food, *Lancet*, 361 (9355), 361-362, 2003.
- CDC: Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses-selected sites, United States, 2002. *CDC Morb Mortal Wkly Rep*. 52, 340-343 (2003)
- 北海道立衛生研究所食品科学部：イクラ醬油漬の腸管出血性大腸菌O157汚染に関する調査－北海道，病原微生物検出情報，19，225-226（1998）
- 辻英高，浜田耕吉，増田邦義：イカ菓子による全国的サモネラ流行が *Salmonella Oranienburg* と *Salmonella Chester* との混合感染である確証－兵庫県，病原微生物検出情報，20（1999）
- 厚生労働省食品保健部監視安全課：腸管出血性大腸菌による食中毒の対策について，薬事・食品衛生審議会食中毒部会，平成13年4月27日（2001）
- 埼玉県衛生研究所 斎藤章暢，大塚佳代子，倉園貴至，尾関由姫恵，山口正則，岸本 剛，青羽信次，埼玉県中央保健所，埼玉県大宮保健所，埼玉県鴻巣保健所：「和風キムチ」を原因食品とする腸管出血性大腸菌O157集団感染事例－埼玉県，病原微生物検出情報，22，290-291（2001）
- 田崎達明：和風キムチによるEHEC食中毒事例－東京都，病原微生物検出情報，23，139-141（2002）
- 山本都，横手規子，森田真理子，中野達也，石川恵

- 司，神沼二真：WWWによる国際化学物質安全性カード（ICSC）日本語版の提供，国立医薬品食品衛生研究所報告，115.161-165（1997）
- 21) 山本 都，神沼二真：過去の毒劇物事件等に関する調査と分析，国立医薬品食品衛生研究所報告，118, 37-44（2000）
- 22) 平成11年度厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）「化学物質による緊急健康危害対応のための情報に関する研究」（主任研究者：山本都）

## アヘンの収量および収量構成要素に及ぼす肥料の影響

熊谷健夫<sup>#</sup>, 畠山好雄<sup>\*1</sup>, 吉松嘉代<sup>\*2</sup>, 下村講一郎<sup>\*3</sup>Influence of Fertilizers on Yield and Yield Components of  
Opium from *Papaver somniferum* LINN.Takeo Kumagai<sup>#</sup>, Yoshio Hatakeyama<sup>\*1</sup>, Kayo Yoshimatsu<sup>\*2</sup>, Koichiro Shimomura<sup>\*3</sup>

The effect of fertilizer on the yield and yield components of opium from *Papaver somniferum* L. cv. Ikkanshu were investigated from 1993 to 1995. The weight of opium per one capsule was tendency to increase in the order of peat moss>pulverized charcoal>compound fertilizer, but the differences among the results were not significant. Furthermore, no difference in the capsule weight per 100 m<sup>2</sup> and the yields of opium and alkaloids per 100 m<sup>2</sup> were detected. The significant difference was only observed when the data were compared among the weights and yields of different years.

The difference among the yield of opium was mainly due to the weight of opium per one capsule. The weight of opium per one capsule showed a high correlation with capsule husk weight.

The alkaloids contents in opium obtained with a different fertilizer application showed no difference. Morphine content at the first lancing was about 11%, and the value decreased with the order of lancing. On the contrary, the codeine and the thebaine content did not change during lancing and the value were 6~7% and 3%, respectively. The papaverine and the noscapine content decreased in the order of lancing.

Key Words: *Papaver somniferum* L. opium yield, opium alkaloid, fertilizer, yield component

## 目 的

我が国における戦後のケシ栽培は1960年の作付面積200 ha (ヘクタール), 耕作者数1,330人をピークとし<sup>1)</sup>, 1963年以後減少が甚だしく, 1993年は各47 a (アール), 22人にすぎない<sup>2)</sup>. このように栽培が激減したのはその労働集約性と低収性が原因であろう. しかし, ケシから採れるアヘンは必要不可欠な医薬品であり, その供給を確保する必要がある.

暖地の秋播き栽培と異なり, 寒冷地におけるケシ栽培の最大の特長は春播き栽培にあり, 生育過程や栽培技術が異なる. そこで, 北海道におけるアヘン多収穫技術の確立を目的に1993年~1995年の3年間, 同一圃場に同一肥料または土壌改良剤を連用し, その施用効果を検討

し, アヘン収量および収量構成要素に及ぼす影響について検討した.

## 実験材料および方法

材料: 各試験年とも北海道試験場産の種子を用いた. 本種子は, 前年のアヘン採取株より一貫種 (*Papaver somniferum* L. cv. Ikkashu) の特性を備え, 病害がなく, アヘン分泌能が高い株を選定し, その株から採種したものである.

方法: 播種は1993年5月6日, 1994年5月2日, 1995年4月30日に行い, 毎年, 種子500 g/10 aを条播した. 栽植距離は条間60 cm, 株間20 cmとし, アヘン採取は宵切朝掻き法により, 1993年は8月2~5日に2回, 1994年は7月21~28日に3回, 1995年は7月20~26日に3回行った. 施肥はTable 1に示す通りで, 各肥料とも全量基肥で全層に施用し, 試験圃は毎年8月に株を抜き取り, 跡地は翌年の試験まで休耕した. 試験計画は乱塊法, 1区 (プロット) 30 m<sup>2</sup>, 1処理区は5反復とし, 毎年, 各プロットとも同一肥料を同量施用するよう設計した. アヘンアルカロイドの分析は既報の方法によった<sup>3)</sup>.

\*1 1-1-17 Higashimachi, Nanporo-cho, Sorachi-gun, Hokkaido, 069-0233, Japan;

\*2 1 Hachimandai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0843, Japan;

\*3 Faculty of Life Science, Toyo University, 1-1-1 Izumino, Itakura-machi, Oura-gun, Gunma, 374-0193, Japan;

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Takeo Kumagai; 108 Ohashi, Nayoro, Hokkaido 096-0065, Japan;

Tel: 01654-2-3605 Fax: 01654-2-3605

E-mail kumagai@nihs.go.jp

Table 1. Experimental design of fertilization application

Treatment	Fertilizer	Amount (kg/100m <sup>2</sup> )
A	Peat moss* <sup>1</sup> and compound fertilizer (14-4-14)* <sup>3</sup>	10: 5
B	Pulverized charcoal* <sup>2</sup> and compound fertilizer (14-4-14)	10: 5
C	Compound fertilizer (14-4-14)	10

\*1 Organic material made from sphagnum in high moor soil.

\*2 Soil conditioning material made from wood of Japanese larch.

\*3 Percentage of mineral nutrition (N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O)=14:4:14.

## 結果および考察

1993～1995年の3年間にわたり行われ、(A) ピートモス(有機質資材)+化成肥料、(B) 粉末炭素(土壌改良材)+化成肥料および(C) 化成肥料の連用が、アヘンの収量および収量構成要素に及ぼす影響について検討した。

アヘンの収量構成要素は果数・有効果歩合・1果当たりアヘン重量より計算される。1993～1995年の結果についてはTable 2に示した。果数については、1993年は条間60 cm、株間20 cmの栽植密度における所定数(833果/100 m<sup>2</sup>) が得られたが、1994～1995年は欠株が認められたため、所定数の95%、1995年は90%であった。しかし、各年とも区間差はみられなかったため、処理効果の比較には支障ないものと思われた。1果当たりアヘン重量は3年間ともA>B>C区の順で、有機質肥料施用区で大きかったが、有意差は認められなかった。

3年間の中では1995年のアヘン収量が最も多く、277 mg/株は適地のそれに匹敵する量である。第1回切傷時の有効果歩合は各年、各処理とも100%に近かった。これは凶作年でも、強い生育阻害処理を施しても変わらない

い普遍的現象である。そのため、密植1回切傷法を採用している国もある<sup>4,5)</sup>。第2回目は年によって相違がみられ、1994年と1995年は90%と高かったが、1993年は70～80%に低下した。第3回は1995年が70%以上と著しく高く、1994年が40～47%と平年並、1993年は著しく低いのでアヘン採取を中止したが、いずれも区間差はみられなかった。3要素の相乗積であるアヘン収量は1995年が最も高く、1993年がこれに次ぎ、1994年は最低を示したが、各年とも区間差はみられなかった。一方、100 m<sup>2</sup>当たりの蒴果重、果殻重、種子重についても各年とも区間差は認められなかった(Table 3)。

北海道では100 m<sup>2</sup>当たりの目標収量を300 gにおいているが、現実には平年の収量は100 g前後である。有機質資材あるいは土壌改良材の連用試験も、土壌環境の保全と共に、目標収量達成の一環として行ったが、必ずしも効果は高くなかった。

1995年に採取したアヘン中のアルカロイド含量と100 m<sup>2</sup>当たりアルカロイド収量についてモルヒネ、コデイン、テバイン、パパベリン、ノスカピンの5成分を調べた結果をTable 4に示した。モルヒネ含量はA, B, Cの施

Table 2. Yield and yield components of opium

Year	Treatment	No. of Capsule /100m <sup>2</sup>	Weight of Opium mg/plant	Percentage of capsules exuding opium* <sup>1</sup>			Yield of Opium (g/100m <sup>2</sup> )			
				First* <sup>2</sup>	Second	Third	First* <sup>2</sup>	Second	Third	Total
1993	A	837±21	185.0±95.7* <sup>3</sup>	99.2±1.1	67.2±14.5	-	65.1±8.9	43.7±19.0	-	108.8±27.6
	B	846±22	175.7±79.7	98.5±0.8	72.6±11.5	-	68.1±4.1	47.6±14.6	-	115.7±12.9
	C	859±24	161.5±58.5	98.8±0.6	82.6±15.9	-	63.2±7.0	52.6±18.7	-	115.9±23.8
	F-value* <sup>4</sup>	0.89(N.S.)* <sup>5</sup>	1.10(N.S.)	0.71(N.S.)	1.44(N.S.)		0.49(N.S.)	0.68(N.S.)		0.24(N.S.)
1994	A	800±36	152.9±70.2	99.3±0.5	91.3±3.1	40.3±11.3	30.6±6.0	42.0±7.7	11.0±4.1	83.6±16.3
	B	786±29	140.8±64.6	98.6±1.4	88.5±3.7	41.2±12.9	31.1±3.1	41.5±10.1	9.8±2.2	82.4±13.3
	C	778±29	127.3±55.9	98.7±1.2	88.3±8.7	47.5±22.5	28.2±6.5	41.8±11.1	12.6±6.5	82.6±17.1
	F-value	0.94(N.S.)	2.01(N.S.)	0.92(N.S.)	0.53(N.S.)	0.41(N.S.)	1.01(N.S.)	0.01(N.S.)	0.38(N.S.)	0.01(N.S.)
1995	A	744±48	277.9±78.5	97.7±2.2	91.5±4.0	76.2±3.4	93.5±10.9	23.7±3.0	39.6±4.6	156.9±11.3
	B	778±59	257.4±84.8	98.2±0.8	90.0±2.9	74.3±4.4	95.0±13.2	23.0±4.3	39.2±10.3	157.2±14.1
	C	708±47	244.0±91.6	98.1±1.2	92.6±5.2	77.2±11.3	85.8±4.7	21.2±3.1	34.8±6.2	141.9±12.1
	F-value	2.56(N.S.)	2.01(N.S.)	0.17(N.S.)	0.19(N.S.)	0.19(N.S.)	1.89(N.S.)	0.57(N.S.)	0.86(N.S.)	2.96(N.S.)

Each value represents the mean of 5 plots ± standard deviation (except weight of opium per plant).

\*1 Percentage of number of capsules exuding opium.

\*2 Order of lancing.

\*3 Values represent the mean of 50 plants ± standard deviation.

\*4 F-value in the analysis of variance.

\*5 No significant difference at the 5% level.

Table 3. Dry weight per 100 m<sup>2</sup> of capsule, capsule husk and seeds

Year	Treatment	Dry Weight/(kg/100m <sup>2</sup> )		
		Capsule	Capsule husk* <sup>1</sup>	Seeds
1993	A	6.99±1.48	4.67±1.16	2.31±0.39
	B	7.25±0.73	4.77±0.61	2.48±0.12
	C	7.32±1.35	4.96±1.11	2.36±0.32
	F-value* <sup>2</sup>	0.21(N.S.)* <sup>3</sup>	0.29(N.S.)	0.43(N.S.)
1994	A	4.92±0.28	3.58±0.45	1.34±0.20
	B	4.68±0.55	3.39±0.42	1.29±0.29
	C	4.77±0.67	3.59±0.54	1.18±0.34
	F-value	0.57(N.S.)	0.80(N.S.)	0.78(N.S.)
1995	A	6.32±0.30	5.02±0.26	1.30±0.07
	B	6.23±1.01	4.78±0.85	1.45±0.21
	C	6.32±0.58	5.09±0.46	1.22±0.14
	F-value	0.02(N.S.)	0.30(N.S.)	2.73(N.S.)

\*1 Capsule without seeds.

\*2 F-value in the analysis of variance.

\*3 No significant difference at the 5% level.

肥とも第1回目が11.0~11.5%, 2回目6.9~7.5%, 3回目4.5~5.6%前後の値を示し, 肥料の違いによる影響はなかった. 一方, コデイン含量は1回目6%弱, 2, 3回目6~7%の値を得た. 寒冷地のアヘンは通常, モルヒネ含量が低く, コデイン含量が高い傾向を持つが<sup>6, 7)</sup>, 第2回目からモルヒネとコデインの含量が逆転するのは珍しい<sup>8)</sup>. また, テバインは常に3%前後と安定した値を示し, パパベリン・ノスカピンはモルヒネ同様, 切傷回数が進むにつれて減少した. モルヒネ以外の成分も有

機質資材・土壌改良材の施用効果はみられなかった.

ケシ栽培では収量の年次間変動の大きいことが課題のひとつになっている. 1993~1995年の100 m<sup>2</sup>当たりの蒴果重, 果殻重, 種子重, アヘン収量について年次間と施用区間の分散分析を行った結果をTable5-1に, 1995年の第1回切傷のモルヒネ, コデイン, テバイン, パパベリン, ノスカピンの含量および100 m<sup>2</sup>当たりのモルヒネ収量, コデイン収量について分散分析を行った結果をTable5-2に示した. 本試験においては, アヘン収量ばかりでなく100 m<sup>2</sup>当たりの蒴果重, 各アルカロイド含量およびモルヒネ, コデイン収量も各施用区間に有意差が認められなかった. 一方, アヘン収量, 蒴果重, 果殻重および種子重に年次間で有意差が認められた.

アヘン収量構成要素の中, 果数は人為的に決定する要素であり, 発芽が悪くない限り, 毎年安定している. 有効歩合は, 切傷第1回目は100%であることが多く, 2回目以後は年による変動が大きい. 一方, 1果当たりのアヘン重量はTable 2に示したとおり年次間変動が大きく, アヘン収量の年次間変動の主要因になっていると思われる. 形態的にアヘン重量と関係が深いのは蒴果の大きさといわれる. そこで, 年毎に, 150個体について個体当たりのアヘン重と蒴果重, 果殻重, 種子重, 蒴果長(1993年のみ), 蒴果径(同)との相関を調べた結果を

Table 4. Contents (C) and Yield (Y) of opium alkaloids in 1995.

Treatment	Lancing	Morphine		Codeine		Thebaine		Papaverine		Noscapine	
		C (%)	Y (g/100m <sup>2</sup> )	C (%)	Y (g/100m <sup>2</sup> )	C (%)	Y (g/100m <sup>2</sup> )	C (%)	Y (g/100m <sup>2</sup> )	C (%)	Y (g/100m <sup>2</sup> )
A	1	10.954±0.989	10.19±0.91	5.882±0.308	5.48±0.42	2.994±0.237	2.80±0.40	1.460±0.118	1.37±0.21	4.285±0.250	4.01±0.50
	2	7.104±1.700	1.69±0.52	7.092±1.299	1.67±0.34	2.958±0.654	0.70±0.17	1.357±0.135	0.32±0.06	3.749±0.405	0.89±0.16
	3	4.474±0.795	1.78±0.46	6.051±0.562	2.39±0.32	3.338±0.467	1.31±0.14	0.896±0.029	0.35±0.04	2.821±0.193	1.12±0.12
	Total	-	13.67±1.29	-	9.55±0.56	-	4.81±0.59	-	2.05±0.23	-	6.01±0.55
B	1	11.277±1.783	10.50±2.49	5.665±0.790	5.30±1.08	2.739±0.351	2.67±0.68	1.394±0.211	1.32±0.33	4.164±0.671	3.90±0.99
	2	6.911±0.718	1.66±0.34	7.423±0.963	1.78±0.36	2.629±0.648	0.66±0.23	1.314±0.159	0.32±0.08	3.655±0.438	0.88±0.24
	3	4.672±0.591	1.85±0.76	6.132±0.373	2.43±0.65	3.006±0.544	1.20±0.22	0.882±0.057	0.35±0.08	2.700±0.168	1.04±0.22
	Total	-	14.00±2.94	-	9.51±1.46	-	4.52±0.90	-	1.99±0.39	-	5.82±1.23
C	1	11.509±1.079	9.88±1.08	5.923±0.398	5.09±0.55	2.679±0.238	2.31±0.31	1.479±0.032	1.27±0.08	4.066±0.138	3.49±0.29
	2	7.539±0.758	1.62±0.39	7.101±0.486	1.51±0.30	2.471±0.432	0.52±0.10	1.327±0.097	0.28±0.04	3.196±0.293	0.68±0.14
	3	5.565±0.418	1.95±0.45	6.884±0.469	2.41±0.53	3.075±0.370	1.07±0.23	0.997±0.061	0.35±0.06	2.607±0.212	0.91±0.20
	Total	-	13.44±1.81	-	9.01±1.29	-	3.89±0.61	-	1.90±0.17	-	5.08±0.60

Each value represents the mean of 5 plots ± standard deviation.

Table 5-1. Variance and F-value of opium yield and dry weight of capsule, capsule husk and seeds

Factor	D. F.	Variance				F-value			
		Capsule	Capsule husk* <sup>1</sup>	Seeds	Opium	Capsule	Capsule husk* <sup>1</sup>	Seeds	Opium
Replication	4	0.532	0.240	0.095	272.77	0.630	0.414	1.312	0.808
Fertilizer	2	0.025	0.199	0.090	133.48	0.029	0.343	1.242	0.396
Year	2	21.966	9.396	5.944	18543.56	25.970**	16.240**	82.410**	54.958**
Interaction	4	0.106	0.049	0.024	213.33	0.125	0.084	0.339	0.632
Error	32	0.846	0.579	0.072	337.41				

\*1 Capsule without seeds.

\*\* Significant difference at the 1% level.

Table 5-2. Variance and F-value of contents of opium alkaloids and yields of morphine and codeine in 1995

Factor	D. F.	Variance					F-value				
		Contents in the First Lancing					Contents in the First Lancing				
		Morphine	Codeine	Thebaine	Papaverine	Noscapine	Morphine	Codeine	Thebaine	Papaverine	Noscapine
Fertilizer	2	0.388	0.096	0.140	0.010	0.061	0.219	0.330	1.780	0.488	0.342
Error	12	1.774	0.292	0.079	0.020	0.177					

Factor	D. F.	Variance		F-value	
		Yield		Yield	
		Morphine	Codeine	Morphine	Codeine
Fertilizer	2	0.313	0.477	0.082	0.398
Error	12	3.822	1.197		

Table 6. Correlation coefficients among weight of opium, capsule, capsule husk and seeds and size of capsule

	Weight									Capsule				
	Opium (O)			Capsule (C)			Capsule husk (H)			Seeds (S)			Length (L)	Width (W)
	1993	1994	1995	1993	1994	1995	1993	1994	1995	1993	1994	1995	1993	1993
O	-	-	-	0.542**	0.193*	0.268**	0.651**	0.476**	0.434**	0.123	-0.043	0.020	0.393**	0.590**
C				-	-	-	0.773**	0.689**	0.664**	0.708**	0.891**	0.778**	0.615**	0.713**
H							-	-	-	0.099	0.285**	0.131	0.765**	0.887**
S										-	-	-	0.109	0.123
L													-	0.657**
W														-

Number of plant: 150.

\*, \*\* Significant difference at the 5% and the 1% level, respectively.

Table 6に示した。アヘン重は蒴果重、果殻重、蒴果長、蒴果径と正の有意な相関が認められ、その中で果殻重との相関が高かった。すなわち、アヘン重量を高めるには果殻重を大きくする必要があることが示唆された。伝統的な腋芽掻きとは蒴果を大きく果肉を厚く育てて果殻重を大きくする技術であり、それと生育期間中の環境条件とがあいまってアヘン重量が決定されるものと推察された<sup>9)</sup>。

## 結 論

1. 有機質資材あるいは土壌改良剤の施用はアヘン収量に有意な影響を与えなかった。一方、1果当たりのアヘン重量は3年間とも Peat moss(A) > Pulverized charcoal (B) > Compound fertilizer(C) を施用した順に大きく、有機質肥料施用区で大きかったが、有意差は認められなかった。
2. アヘン中アルカロイド含量については、モルヒネ含量が切傷第1回目11%、2回目7%、3回目5%と切傷回数とともに漸減した。コデイン含量は6~7%、テバイン含量は常に3%前後と安定した含量を示し、パバベリン・ノスカピン含量はモルヒネと同様、切傷回数が進むにつれて減少した。
3. 100 m<sup>2</sup>当たりアヘン収量、蒴果重およびモルヒネ・

コデイン収量とも肥料の種類間に差はなく、年次間で有意差が認められた。

4. アヘン収量の年次間変動は主として1果当たりアヘン重量に起因し、アヘン重量は果殻重と相関が高いことが明らかとなった。

## 引 用 文 献

- 1) 小島康平, 西孝三郎, 畠山好雄, 大野忠郎, 本間尚治郎, 大野昌子, 島峯望彦, 高橋一徳. : けしの直接抽出に関する研究報告書 (1973~1975), 1976
- 2) 厚生省麻薬課. : 平成5年度けし栽培者名簿 (1993)
- 3) Yoshimatsu, K., Shimomura K.: *Plant Cell Reports*, **11**, 132-136 (1992)
- 4) Hatakeyama, Y.: *Shoyakugaku Zasshi*, **35**, 316-325 (1981)
- 5) Kušević V.: *Buletin on Narcotics*, **12** (2), 5-13 (1960)
- 6) Ilinskaya T.N., Yosifova M.G.: *Bulletin on Narcotics*, **8** (3), 38-41 (1956)
- 7) Lee, C.K, Kim, H.K.: *Bulletin on Narcotics*, **22** (2), 41-46 (1970)
- 8) Anett H.E.: *Biochemical Journal*, **14**, 618-636 (1920)
- 9) Ohno, T, Kinoshita, K, Komine T.: *Shoyakugaku Zasshi* **31**, 44-56 (1977)

## 有害物質含有家庭用品規制法の ホルムアルデヒド試験方法の改定にかかわる検討

五十嵐良明<sup>#</sup>, 鹿庭正昭, 土屋利江

Examination related to revised test method for determination of formaldehyde,  
regulated by the law for the control of household products containing harmful substances

Yoshiaki Ikarashi<sup>#</sup>, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya

In Japan, the amount of formaldehyde in textile products was regulated by the law for the control of household products containing harmful substances. Formaldehyde was determined by measuring the optical density of acetylacetone derivative of formaldehyde extracted from textiles. The household products law stated that the increase in the optical density of color development of the extract from the textile products for babies or infants within 24 months after birth should not be more than 0.05. Collaborative study decided the amount of formaldehyde equivalent to the increase in absorbance described above, and the amount was 16 ppm. There are some reports that formaldehyde causes an allergic reaction even at a very low concentration, so continuous regulation for formaldehyde in the textiles was desirable using this level of amount. We developed HPLC method for the determination of formaldehyde in textile products. Formaldehyde was determined by the direct injection of acetylacetone derivative of samples into the system equipped with ODS column and UV-VIS detector (detection wavelength 413 nm) using the mixture of acetonitrile and water as mobile phase. The linearity was obtained between a peak area or height and the concentrations of formaldehyde solution in the range of 0.0625-2  $\mu\text{g/ml}$ . The regulation level was sufficiently detected by the present HPLC method. We recommended that the HPLC test was adopted as a reexamination method for the products may violate the regulation as well as a dimedone test.

Key Words: formaldehyde, regulation, acetylacetone, absorbance, HPLC

### 緒 言

ホルムアルデヒド (HCHO) は接着剤, 殺菌剤, 防黴加工剤として壁紙や建材, 様々な合成樹脂, 衣類などに使用されており, 吸入, 経口及び皮膚接触する機会が多い化学物質である。「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」では, HCHOによるアレルギー性接触皮膚炎の防止を目的として衣類加工剤としての使用を規制し, 繊維製品のうち下着, 寝衣, 手袋, くつした, たび, かつら, つけまつげ, つけひげ又はくつした止めに使用される接着剤中の含有量をアセチルアセトン法で 75 ppm 以下 (試料 1 g あたり 75  $\mu\text{g}$  以下) としている。また, 繊維製品のうちおしめ, おしめカバー, よだれ掛け, 下着, 寝衣, 手袋, くつした, 中衣, 外衣, 帽子,

寝具であって生後24ヶ月以下の乳幼児用のものに対しては, 検出しないこと (吸光度差  $A-A_0$  は 0.05 以下) としている<sup>1)</sup>。1975年に本法令が施行されてから我が国における HCHO に対する感作は減少し, 規制値を含めて有効であることが確かめられているが, 測定機器の性能が向上していること, 試験方法についていくつか意見が出ていることから, 2002年に閣議決定された規制改革推進3か年計画 (改定) に基づき, 繊維製品を対象とした HCHO の測定方法について見直しすることが決定された<sup>2)</sup>。同時に, 内閣府に設置されている市場開放問題苦情処理体制 (Office of trade and investment ombudsman, OTO) には<sup>3)</sup>, 外国では日本の乳幼児用繊維製品中の HCHO 量がゼロ規制であるとの認識が強いことから, 誤解を解消するような措置と国際的な整合性をもつ規制緩和を講ずるよう要望されている。本研究では, まず, 現行の HCHO 公定法に対しての問題点についてアンケート調査を行った。次に, 乳幼児用繊維製品の規制を吸光度差から ppm 単位で設定するため, いくつかの公的

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141, Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

機関と共同でクロスチェックするとともに、液体クロマトグラフ (HPLC) の試験法への採用について検討を行った結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

HCHOは和光純薬工業製の水質試験用ホルムアルデヒド標準液1 mg/mlのメタノール溶液 (Lot.No. 405F1464) を用いた。氷酢酸は非水滴定用をSigma-Aldrich社から購入した。アセトニトリルは和光純薬工業製液体クロマトグラフ用を、その他の試薬は市販特級品を用いた。アセチルアセトン試液は、酢酸アンモニウム15 g、氷酢酸0.3 ml、アセチルアセトン0.2 mlを精製水で用時溶解して100 mlとした。

### 2. 装置

紫外可視分光光度計：島津製作所製UV-160A  
液体クロマトグラフ装置：島津製作所製LC6AD型ポンプに島津製作所製CTO-10A型カラムオープン、相馬光学製S-3702型UV-VIS検出器を接続して用いた。島津製作所製CLASS-LC10システムを用いて、システム制御及びデータ処理を行った。

### 3. アンケート調査及び各国規制値の調査

2000年～2001年に、地方衛生研究所の実務担当者に対し、家庭用品規制法で規定されている全試験対象物質について試験方法や規制値、規制対象品目に関するアンケートを実施し、そのうち、HCHOに関する意見を集積した。

国内における他の法律などで採用されているHCHOの分析法を調査するとともに、諸外国の繊維製品に対するHCHO規制値について、インターネットなどを通じて調査した。

### 4. 試験溶液の調製

HCHO標準液を精製水で希釈して2 µg/mlのHCHO溶液を調製し、これを更に順次希釈して各種濃度のHCHO溶液を作製した。繊維製品の場合、検体2.5 gに精製水100 mlを加えて密栓し、40℃の水浴中でときどき振り混ぜながら1時間抽出した。ガラスろ過器を用いて温時ろ過して試験溶液とした。

### 5. アセチルアセトン吸光度法<sup>1)</sup>

試験溶液5 mlにアセチルアセトン試液5 mlを加え、40℃の水浴中で30分間加熱し、30分間放置したのち、精製水、または精製水5 mlに対して同様にアセチルアセトン試液を加えて操作したものを対照として、412～415 nmにおける吸光度を測定した (A)。試験溶液に対

しアセチルアセトン試液の代わりに精製水を加えて同様に操作したものについて、精製水を対照として吸光度 (A<sub>0</sub>) を測定した

### 6. クロスチェック

5つの機関に同一Lot. NoのHCHO標準液を配布した。各機関において標準液を精製水で希釈し、アセチルアセトン試液と反応させて412～415 nmの波長における吸光度を測定した。極大の吸収が認められる検出波長を求めた後、この波長におけるHCHO濃度と吸光度の間で検量線を作成した。これより、HCHO 0 µg/mlの反応液との吸光度差が0.05を示すHCHO濃度を求め、繊維製品中の含有量を換算して比較した。

### 7. HPLC法

試験溶液とアセチルアセトン試液の反応液10 µlをそのままHPLCに注入して得られたクロマトグラムのピーク面積を測定した。

#### HPLC条件

カラム：CAPCELL PAK C18 (4.6 mm i.d. × 150 mm, Shiseido)

カラム温度：35℃

移動相：アセトニトリル：水 (15：85)

流速：1.0 ml/min

検出波長：413 nm

## 結果と考察

### 1. 家庭用品規制法のHCHO試験に対するアンケート結果

現行試験法に対する問題点、意見として、以下の事項が上げられた。

(1) 製品からの抽出液が着色していたり、濁りがあったりした場合、分析値に誤差がでる。

(2) 試験によって基準値以上の吸光度が得られた場合、確認試験としてジメドンによるピーク形状の変化では定性に欠ける。

(3) 「検出せず」を数値 (ppm) として明確にできないか。限界値がはっきりしない。

(4) 試験溶液の調製の際に濁りを生じた場合の対照液の取り方に間違いがある。

(5) 再試験を行う際に、「繊維製品を硫酸デシケータ中に放置した後、行う」との記載は、その間にHCHOが空気中の水分を介しての移行もあるので、かえって誤差を生じやすい。

(6) ワイシャツ、ブラウス、ズボンなどホルムアルデヒドの加工がされ、直接皮膚と接触するという実情を考えると、規制対象品目にこれらの製品も追加した方がいいのではないか。

本研究では、このうち(1)～(3)について検討することと

した。まず、HCHOの試験法としてどのような方法があるか、日本薬学会編衛生試験法<sup>4)</sup>を調査した。飲食物試験法中の食品汚染物試験法として4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1,2,4-トリアゾール (AHMT) 法が、生活用品試験法の器具・容器包装および玩具試験でプラスチック用品、金属製品、ゴム製品、玩具、天然素材およびその加工品に対してアセチルアセトン法を適用することが記載されている。化粧品試験法では、アセチルアセトン法による定量に加え、アセチルアセトンポストカラム誘導体化検出法を用いるHPLC法がある。環境試験法の水質試験ではガスクロマトグラフ (GC) による定量、産業排水にはAHMT法、空気試験には2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) 含有シリカゲル捕集管に吸引してHCHOをヒドラジン誘導体として捕集、アセトニトリルで抽出してHPLCで定量する方法が記載されている。食品衛生法検査指針にはアセチルアセトン法が使用され、試験溶液の呈色は肉眼的観察で対照液の呈する色より濃くはならないとしてHCHO含有量が規制される。本方法によるHCHOの検出限界は、呈色液の吸光度が0.021、試験溶液中では4 ppmとされている<sup>5)</sup>。

乳幼児衣類について、過去に違反例がどれくらいあったか、いくつかの地方衛生研究所から報告してもらった。例えば、A地区では1999年から2001年まで27件の違反例があり、うち吸光度差が0.05は3例、0.06が6例あった。B地区では6年間に15の不適例が、C地区は平成12年度中乳幼児用検体151のうち5検体が違反となっている。D地区では平成12年度中、乳幼児用288検体中4件で違反があり、その吸光度差は0.06~0.08となっている。アンケートでは判定に困る事例があるとの意見が寄せられているが、こうした例は全体の中のごくまれと認識している。アセチルアセトン法は簡便でかつ多量の検体を試験するのに有用であり、したがって、現公定法の試験方法自体を大幅に変更する、あるいはアセチルアセトン法を他の試験法に変更する必要性はないと思われる。一方で、吸光度の測定では着色性物質による妨害や定性力が欠けるため、これを補う方法が望まれていることがわかった。

## 2. アセチルアセトン法における吸光度とHCHO量との関係

乳幼児用製品中のHCHO量を吸光度差から数値で規制するため、種々の濃度のHCHO溶液をアセチルアセトン法で操作して吸光度を測定し、HCHO濃度と吸光度との間の検量線を作成した。本検討は5機関で同一の標準液を用いてクロスチェックし、その結果を比較した (Table 1)。アセチルアセトン誘導体の極大吸収波長は413あるいは414 nmであった。検量線の作成に当たって

は、精製水を対照とした精製水 (HCHO 0  $\mu\text{g/ml}$ ) とアセチルアセトンの反応液の吸光度 $A_0$ として、アセチルアセトン溶液自体による吸収を除いた。なお、水を対照とした、HCHO標準溶液と精製水とを操作したものの吸光度は0.00であった。極大吸収を示す波長での0.0625~2  $\mu\text{g/ml}$ の濃度のHCHOと反応液の吸光度との間には、良好な直線関係が得られた (Fig. 1)。検量線から吸光度差 ( $A-A_0$ ) が0.05を示すHCHO濃度を求め、これを40倍 (試験方法の希釈操作から逆算) して繊維製品中の含量を換算した。例えば、Table 2は機関Aにおける検量線から求めた結果であるが、吸光度差0.05を示すときの繊維製品中のHCHO量は16 ppm、差が0.07のときが22 ppmであった。逆に、繊維製品中に30 ppm含有されているときの吸光度差は0.09を超えることとなり、この反応液はかなり黄色に色づき、はっきりHCHOがあることが確認できた。クロスチェックした結果のまとめをTable 3に示したように、吸光度差に相当するHCHO量はいずれの機関においても15~16 ppmとなった。したがって、最大値を採用すると、日本における乳幼児用製品中のHCHO量は、現行16 ppm未満で規制されていると見るのが妥当であると思われる。

## 3. 諸外国の規制基準との比較

ヨーロッパ共同体 (EU) の各国では、繊維製品などにエコラベル (eco-label) をつけるために化学物質の残存量などを規制している。UNEP-Textile Working Groupのエコラベルに関するホームページ<sup>6)</sup>を参考に、各国のHCHOに対する主な基準値をTable 4にまとめた。ドイツでは、皮膚に接触しない製品中は300 ppm、皮膚と接触する製品は75 ppm、乳幼児用衣類では20 ppmとしている。EU全体のEU ecolabelは各国の設定値の最大値が収まるような値が採用されていたが (大人用製品では75 ppm、乳幼児用衣類では30 ppm)、2002年に改定され、直接皮膚に接触する製品は一律30 ppm未満とする規制になっている<sup>7)</sup>。我が国における大人の繊維製品の基準値 (75 ppm) の根拠は、HCHOに感作したヒトに対するパッチテストでの最大無作用量がホルマリンとして0.2% (HCHO 740 ppm) であり、これに10分の1を乗じたことから決められた。乳幼児用製品に対しては、乳幼児が当外製品をなめることが予期されること、HCHOのアレルギー性強度の点、乳幼児の感受性の高さを考慮して、乳幼児用製品にはHCHOを使用させないという立場に立ちながらも、実際の繊維製品の抽出液には吸収が存在すること、並びにこの吸収がジメドン添加によって吸収が消失することを明確に判定するため等の理由から検出限界として従来の吸光度差による基準が決められていた<sup>1)</sup>。先のクロスチェックの結果、我が国における乳幼児用製品の規制値 (Table 3) はEUと

Table 1. Correlation between formaldehyde concentration and the absorbance: a comparison of results from 5 laboratories

## Laboratory A

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optical density (A)				$\Delta A (A-A_0)$
	415 nm	414 nm	413 nm	412 nm	413 nm
0	0.005	0.005	0.005	0.005	0 (= $A_0$ )
0.02	0.008	0.005	0.006	0.006	0.001
0.04	0.010	0.010	0.011	0.011	0.006
0.06	0.012	0.012	0.011	0.011	0.006
0.08	0.014	0.015	0.016	0.016	0.011
0.1	0.017	0.017	0.017	0.016	0.012
0.2	0.029	0.030	0.031	0.031	0.026
0.4	0.056	0.057	0.055	0.055	0.050
0.6	0.083	0.083	0.084	0.082	0.079
0.8	0.107	0.108	0.109	0.109	0.104
1	0.135	0.135	0.136	0.136	0.131
2	0.262	0.264	0.265	0.265	0.260

## Laboratory B

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optical density (A)				$\Delta A (A-A_0)$
	415 nm	414 nm	413 nm	412 nm	414 nm
0	0.011	0.011	0.012	0.012	0 (= $A_0$ )
0.05	0.019	0.020	0.020	0.020	0.009
0.1	0.026	0.026	0.026	0.026	0.015
0.2	0.040	0.040	0.040	0.041	0.029
0.4	0.068	0.068	0.068	0.068	0.057
0.8	0.122	0.122	0.122	0.122	0.111
1	0.147	0.148	0.148	0.148	0.137
2	0.282	0.282	0.282	0.282	0.271
4	0.546	0.546	0.547	0.546	0.535

## Laboratory C

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optical density (A)				$\Delta A (A-A_0)$
	415 nm	414 nm	413 nm	412 nm	413 nm
0	N.D. <sup>a)</sup>	N.D.	0.000	N.D.	0 (= $A_0$ )
0.1	N.D.	N.D.	0.009	N.D.	0.009
0.2	N.D.	N.D.	0.022	N.D.	0.022
0.4	N.D.	N.D.	0.049	N.D.	0.049
0.6	N.D.	N.D.	0.078	N.D.	0.078
0.8	N.D.	N.D.	0.094	N.D.	0.094
1	N.D.	N.D.	0.129	N.D.	0.129
2	N.D.	N.D.	0.266	N.D.	0.266

## Laboratory D

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optical density (A)				$\Delta A (A-A_0)$
	415 nm	414 nm	413 nm	412 nm	414 nm
0	0.001	0.001	0.001	0.001	0 (= $A_0$ )
0.0625	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009
0.125	0.018	0.018	0.018	0.018	0.017
0.25	0.034	0.034	0.034	0.034	0.033
0.5	0.067	0.068	0.067	0.067	0.067
1	0.135	0.135	0.135	0.135	0.134
2	0.269	0.269	0.269	0.269	0.268

## Laboratory E

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Optical density (A)				$\Delta A (A-A_0)$
	415 nm	414 nm	413 nm	412 nm	414 nm
0	0.072	0.072	0.069	0.069	0 (= $A_0$ )
0.0625	0.078	0.078	0.076	0.075	0.006
0.125	0.094	0.094	0.087	0.085	0.022
0.25	0.107	0.107	0.102	0.100	0.035
0.5	0.135	0.135	0.133	0.132	0.063
1	0.199	0.200	0.197	0.197	0.128
2	0.323	0.324	0.324	0.324	0.252

<sup>a)</sup> N.D. = not determined.

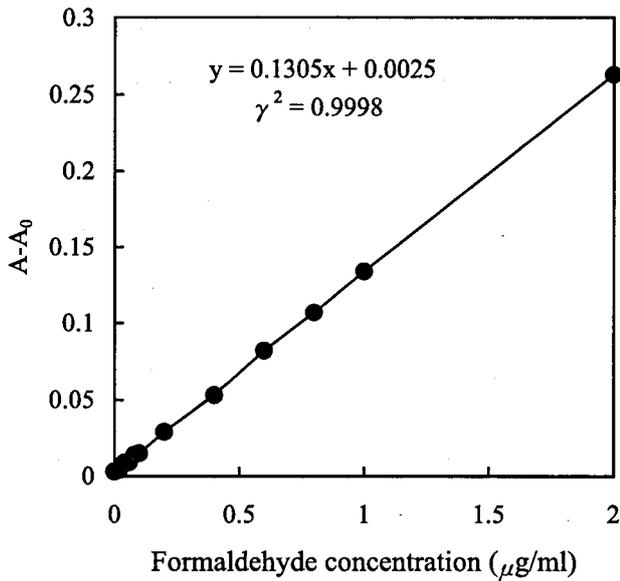


Fig. 1 Calibration curve for acetylacetone derivative of formaldehyde

比較するとかなり低い値であることがわかる。規制緩和、国際的整合性は必要であるが、現行の乳幼児用のHCHO規制値(16 ppmと仮定)をEUレベルに合わせるとした場合、大幅に基準が緩くなる。IPCSは1989年のEnvironmental Health Criteriaの中で、感作されたヒトであっても0.05%以下のHCHOではめったにアレルギー反応は起こらないこと、HCHOに対する感受性に地域差があること、日本では2%のHCHO溶液のパッチで

Table 2. Optical density of acetylacetone derivatives, concentrations and amounts of formaldehyde in products: calculation from results of laboratory A

Increase in optical density	Rate (%)	Concentration of formaldehyde (μg/ml)	Amount of formaldehyde in products (ppm)
0.05		→ 0.389	→ 15.5
0.055	10	→ 0.427	→ 17.1
0.06	20	→ 0.465	→ 18.6
0.07	40	→ 0.542	→ 21.7
0.08	60	→ 0.619	→ 24.8
0.09	80	→ 0.696	→ 27.8
0.048		← 0.375	← 15
0.065		← 0.500	← 20
0.081		← 0.625	← 25
0.097		← 0.750	← 30

2.62%のヒトに遅延型の反応が起こったという報告を取り上げている<sup>8)</sup>。また、IPCSは2002年のConcise International Assessment DocumentでHCHOに強く感作されたヒトは0.003%という低濃度の暴露でも皮膚炎を起こすとしている<sup>9)</sup>。したがって、惹起濃度の閾値は個人差が大きく安全値を設定することが困難なことを示しており、現行の乳幼児用の基準を緩和することは健康被害の発生防止の保証を維持するためにも望ましいことではないといえる。一方、直接皮膚に接触する大人用衣類等に関しては、対象品目や規制値など今後検討が必要になるかもしれない。

#### 4. HPLC法

HCHOの試験で最も問題となるのは抽出液の着色や濁りによる妨害であるが、基準値を超えているかどうか、

Table 3. A summary of interlaboratory trial of acetylacetone absorption method

Laboratory	UV spectrometer	Wavelength shows maximal absorption (nm)	Calibration curve	Formaldehyde concentration shows difference of 0.05 in absorbance (μg/ml)	Amount of formaldehyde textiles (calculated value, ppm)
A	Shimadzu UV-160A	413	$y = 0.1305x - 0.0005$	0.39	16
B	Hitachi U-1100	414	$y = 0.1333x + 0.0031$	0.35	14
C	Hitachi U-3000	413	$y = 0.1335x - 0.0042$	0.41	16
D	Shimadzu UV-2450	414	$y = 0.1339x + 0.0001$	0.37	15
E	Shimadzu UV-240	414	$y = 0.1249x + 0.0023$	0.38	15

Table 4. Limitation amount of formaldehyde in textile products to receive ecolabels in European Union

Countries	Ecolabelling standard	Products	Formaldehyde
European Union	EU Ecolabel	direct skin contact	30 ppm
Netherlands	Stichting Milieukeur	for garments	30 ppm
Germany	Toxproof	without skin contact	300 mg/l
	Toxproof	direct skin contact	75 mg/l
	Toxproof	baby clothing	20 mg/l
Germany	Oeko - Tex 103	without skin contact	300 ppm
	Oeko - Tex 103	direct skin contact	75 ppm
	Oeko - Tex 106	baby clothing	75 ppm
(Sweden, Norway, Iceland, Finland, Denmark)	Nordic Swan A,B	for garments	30 ppm

Data were quoted from the homepage of Textile Working Group (<http://www.emcentre.com/textile/Ecolabels.htm>).

試験で得られた値がHCHOによるものかどうかを確認するため、ジメドンによる吸収スペクトルの形状の変化を見ることとされている。近年ではHPLCなど定性及び定量的に優れた方法があり、こうした方法の採用が求められている。実際、空気中のHCHOはDNPH誘導体化してHPLCで定量するが、繊維製品にもこれを応用できるという報告もされている<sup>10)</sup>。ただ、別に反応溶液を調製する必要があること、従来の吸光度法と差が生じた場合に規制の判断に困ることが予想される。HCHOをアセチルアセトン誘導体化したものを直接HPLCに注入して分析できるとの報告<sup>11)</sup>があるが、この方法では吸光度法と対比が明らかになること、新たな試験溶液の調製が必要ないことなどの利点がある。そこで、このアセチルアセトン反応物のHPLC分析法について検討した。

#### 4.1 カラムの影響

移動相として、メタノール：水混液及びアセトニトリル：水混液について検討した。メタノール：水混液では目的物質のピークがすそを引いた形状となり、この形状を改善するため、塩の添加やpHを変化させたりしたが、十分な効果が得られなかった。一方、アセトニトリル：水混液では、塩の添加などしなくとも比較的良好的なピーク形状を示したため、以下、移動相としてアセトニトリル：水混液を用いることとした。次に、HCHO 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  溶液をアセチルアセトン誘導体化し、製造元の異なる4種のODSカラムで分析したときのHPLCクロマトグラ

ムを比較した (Fig. 2)。ピーク形状を比較した結果、カラムはエンドキャップがしっかり行われているCAPCELL PAK C18が最も適していると思われた。移動相としてアセトニトリル：水 (15 : 85 ~ 20 : 80) を用いた時に、HCHOのアセチルアセトン誘導体のピークは他のピークと分離して保持時間7~8分程度に溶出してくることがわかった。

精製水とアセチルアセトン試液との反応液のクロマトグラム上に、HCHOのアセチルアセトン誘導体のピーク付近 (わずかに後方) に小さなピークが見られる (Fig. 3)。本ピークはアセチルアセトン試液に由来しており十分な分離は困難であるが、乳幼児用の規制量のHCHOで得られるピークに比べ、はるかに小さく、判定には問題ないと考えた。

#### 4.2 検量線

種々の濃度のHCHOを反応させHPLCに10  $\mu\text{l}$  注入したときのピーク高さあるいは面積と濃度との関係から検量線を作製したところ、0.0625 ~ 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で良好な直線が得られた (Fig. 4)。定量限界については、FUMI理論を用いたソフトTOCOで、ピークのシグナルとベースラインのノイズとの関係SN比から求めた<sup>12)</sup>。今回は1濃度1回の注入のものであるが、SN比10をHCHO溶液の定量限界濃度とした場合、高さ測定で0.047  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、面積測定では0.091  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。

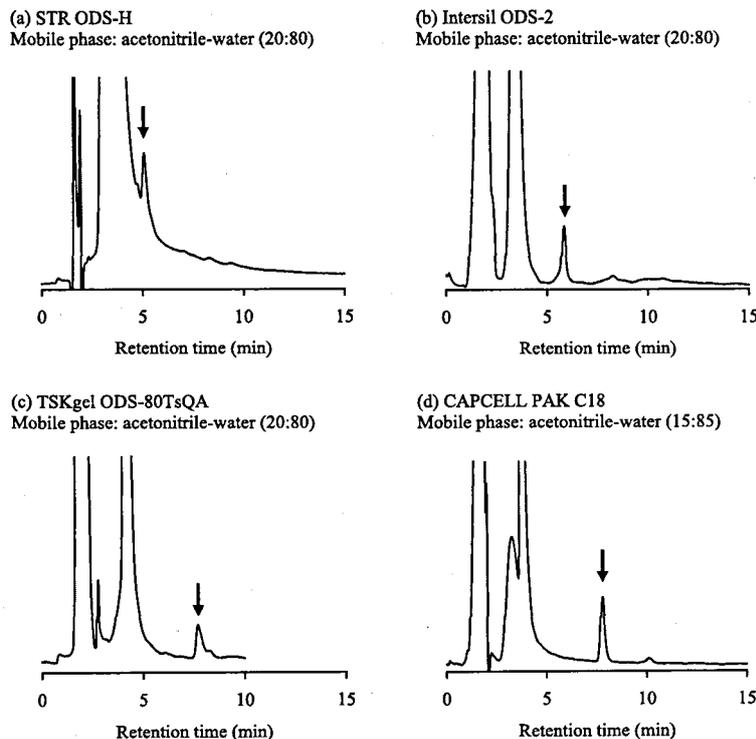


Fig. 2 Change in chromatogram of acetylacetone derivative of formaldehyde depending on the ODS column

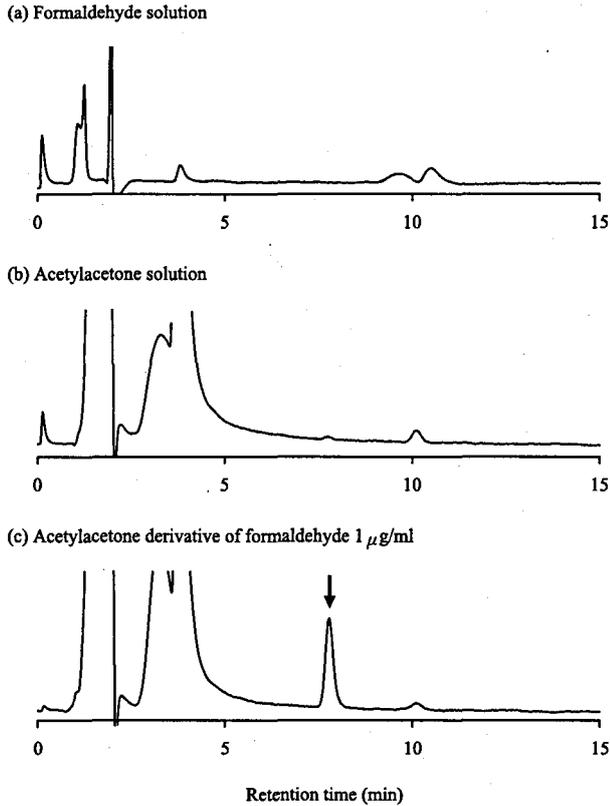


Fig. 3 HPLC chromatograms of formaldehyde solution (a), acetylacetone solution (b), and reaction mixture of formaldehyde and acetylacetone  
Arrow shows the peak of acetylacetone derivative of formaldehyde.

#### 4.3 市販製品への適用

市販繊維製品を公定法に従って抽出、アセチルアセトン試液と反応させたときのHPLCクロマトグラムをFig. 5に示した。今回試験した製品は大人用製品や規制対象外のものも含まれている。寝間着や毛布からの抽出液はピンクからオレンジに薄く色づいて吸光度法では規制値を超えるものもあったが、HPLCクロマトグラムからこれがHCHOによるものでないことを確認できた。このようにHPLC法では、規制レベルのHCHO量を妨害なく検出することができることがわかった。

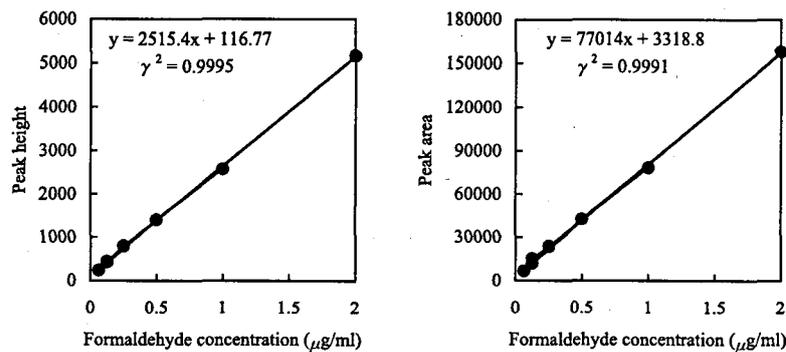


Fig. 4 Calibration curves for acetylacetone derivative of formaldehyde by HPLC

#### 5. アセチルアセトン誘導体の経時変化

公定法ではアセチルアセトンと反応させて30分間経過後、吸光度を測定する。アセチルアセトン誘導体の経時変化を見るため、HCHO-アセチルアセトン反応液を各時間放置した後、吸光度及びクロマトグラム上のピークの大きさを測定した。時間が経つにつれ、反応液の吸光度は増加した (Fig. 6)。増加の程度はHCHOを含まない水とアセチルアセトン試液の反応液の方が、HCHOとアセチルアセトン反応液よりも大きく、結果として試験溶液の吸光度差 ( $A-A_0$ ) は小さくなることがわかった。HPLC法については、反応放置して30分後のピークの大きさを100%としたところ、その後時間が経過するにつれてピーク高が減少した (Fig. 7)。HPLC法では吸光度法に比べ1検体あたりの分析時間がかかるので、吸光度法で規制値を超えたものや判定が困難な検体について、定量というよりはむしろ定性確認として行うのがよいと思われる。

#### 6. まとめ

家庭用品規制法による乳幼児用製品中のHCHOの基準として上げられているアセチルアセトン法での吸光度差 ( $A-A_0$ )0.05は、5機関のクロスチェックによって製品当たり16 ppmに相当することを確認した。EUにおける乳幼児製品に対するエコラベル添付の条件としてHCHOは30 ppm未満としているが、これと比較すると我が国は低いレベルで規制されている。近年の研究調査においてもHCHOがアレルギー反応を惹起する濃度はかなり低いことがわかっており、安全性の保障という意味でも、我が国は乳幼児用製品に対してこれまでと同じレベルで規制することが推奨される。HCHOのアセチルアセトン反応液をODSカラムとアセトニトリル溶液を移動相としたHPLCに注入して分析したところ、妨害なく分析できた。しかし、吸光度法に比べると、1検体あたりの分析時間がかかり、経時的に若干のピークの減少があった。また、これまで吸光度法で規制値を超えるものや妨害がある製品はわずかである。こうしたことから、本HPLC法は吸光度法で規制値を超える検体など

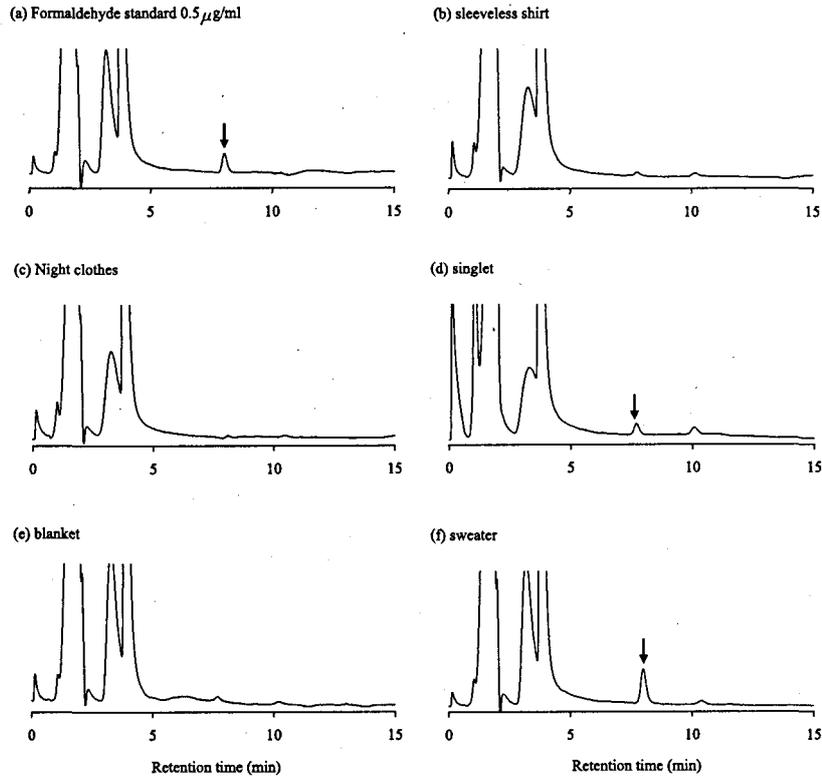


Fig. 5 Typical HPLC chromatograms of textile products

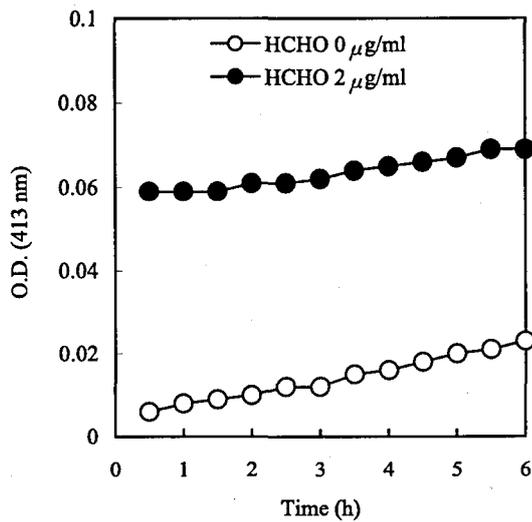


Fig. 6 Increase in absorbance of acetylacetone-formaldehyde reaction product with increasing in standing time

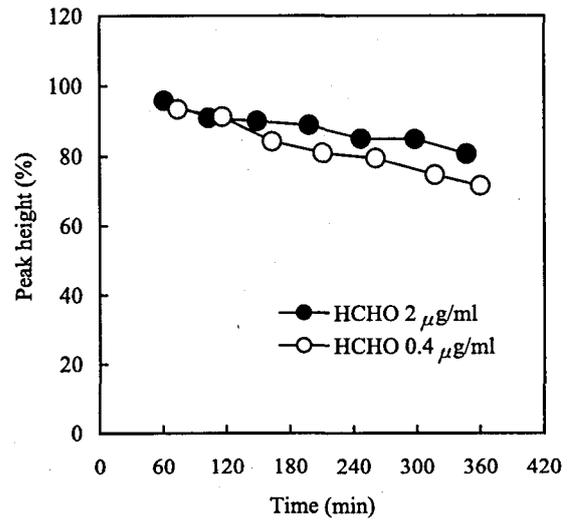


Fig. 7. Decrease in peak height of acetylacetone-formaldehyde reaction product with increasing in standing time  
For each concentration solution, peak height that observed after standing for 30 min was regarded as 100%.

に対する確認試験として、ジメドン法の別法としての採用が望ましいと考える。

謝 辞

家庭用品アンケート調査に協力していただいた大阪府立公衆衛生研究所、大阪市環境科学研究所、岐阜県保健環境研究所の家庭用品担当者の方々、さらにクロスチエ

ック試験に協力いただいた、東京都立衛生研究所 山野 辺秀夫氏、神奈川県衛生研究所 長谷川一夫氏、伏脇裕一氏、辻 清美氏、名古屋市衛生研究所 岩間雅彦氏、福岡市保健環境研究所 中尾朱美氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) 有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律 (昭和48年)
- 2) 平成14年3月29日閣議決定：規制改革推進3か年計画 (改定)  
<http://www8.cao.go.jp/kisei/siry0/020329/index.html>
- 3) OTO (Office of Trade and investment Ombudsman) Homepage  
[http://www5.cao.go.jp/access/japan/oto\\_main\\_j.html](http://www5.cao.go.jp/access/japan/oto_main_j.html)
- 4) "Methods of Analysis in Health Science 2000," ed. by the Pharmaceutical Society of Japan, Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, Japan
- 5) Inoue, T., Ishiwata, H., Yoshihira, K.: *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci.*, **105**, 101-103 (1987)
- 6) Textile Working Group Homepage: Ecolabels,  
<http://www.emcentre.com/textile/Ecolabels.htm>
- 7) Official Journal of the European Communities L133, 18.5.2002 Commission  
<http://www.tid.gov.hk/textonly/english/aboutus/tradecircular/cic/eu/2002/files/ci10902a.pdf>
- 8) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 89. Formaldehyde (1989)
- 9) International Programme on Chemical Safety (IPCS). Concise International Chemical Assessment Document 40. Formaldehyde (2002)
- 10) 赤木浩一, 西田政司：第38回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 204-205 (2001)
- 11) 田口 敏, 山本 潔, 吉田 優美, 吉村 千鶴, 広瀬 崇, 滝川 宏司：住友化学誌2000-II, 40-44 (2000)
- 12) Hayashi, Y., Matsuda, R.: "Precision of HPLC analysis," Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd. Osaka, 1999

## 市販化粧水中のフェノキシエタノールおよび パラベン類の分析法に関する研究

徳永裕司<sup>#</sup>, 竹内織恵, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典

### Studies for Analyzing Phenoxyethanol and Parabens in Commercial Lotions

Hiroshi Tokunaga<sup>#</sup>, Ori Takeuchi, Reika Ko, Tadashi Uchino and Masanori Ando

Both phenoxyethanol and parabens are kinds of preservatives in cosmetics and are nominated as the restricted ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Law. So the analytical methods for phenoxyethanol and parabens were investigated by HPLC. After adding methanol to phenoxyethanol and parabens in lotions, the testing solutions were analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C<sub>18</sub> column, 4.6x250 mm), the mixture either of 50 mmol/l phosphate buffer(pH3.5) and acetonitrile (7:3) for phenoxyethanol or of 50 mmol/l phosphate buffer(pH3.5) and acetonitrile (3:2) for parabens and the detection wavelength of either 270 nm for phenoxyethanol or 255 nm for parabens. The working curves from 0.5 to 5  $\mu$ g/ml passed through the origin. There were no interference of peaks of phenoxyethanol and parabens from the cosmetics. Eleven lotions out of 42 lotions did not have phenoxyethanol. Phenoxyethanol in thirty-one cosmetics ranged from 0.009 to 1.043% and those average was 0.264%. Parabens, especially methylparaben, were detected in all lotions. The amounts of parabens ranged from 0.016 to 0.267% and their average was 0.120%. There were 7 kinds of lotions whose contents of phenoxyethanol and methylparaben were below 0.1%.

Key Words: phenoxyethanol, paraben, preservative, Japanese Pharmaceutical Affairs Law, lotion

#### 1. 緒言

平成13年4月1日より、化粧品の承認・許可に当たっての規制緩和が行われ、化粧品に使用される成分のポジティブリスト、ネガティブリストの採用および製品に用いられた全成分の表示が義務付けられた。化粧品基準第4条の別表3<sup>1)</sup>に化粧品に使用することのできる防腐剤が定められている。この中でフェノキシエタノール(PE)およびパラベン類は化粧品100g中に1gまで使用することが認められている。PEあるいはパラベン類の医薬品あるいは化粧品中での分析法としては、医薬品の塩酸クロコナゾールを含む製品中のパラベン類の液体クロマトグラフ法<sup>2)</sup>、パラベン類, imidazolidinylurea, ascorbyl phosphateを含む化粧クリーム中の液体クロマトグラフ法<sup>3)</sup>、「無添加」表示化粧品中の液体クロマトグラフ法など<sup>4,5)</sup>が報告されている。

今回、著者らは、化粧品に使用が認められているPE

およびパラベン類の化粧水中での分析法としてCAPCELL PAK C<sub>18</sub>カラムを用いた液体クロマトグラフ法を検討し、市販化粧水中のPEおよびパラベン類の測定に応用したので報告する。

#### 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

PEおよびパラベン類は和光純薬製のものを用いた。化粧水は市販の化粧水42品目を用いた。

PE原液: PE約25mgを精密に量り、メタノールを加えて正確に100mlとした。(0.25mg/ml)

パラベン類(メチルパラベン(MP), エチルパラベン(EP), プロピルパラベン(PP), イソブチルパラベン(IBP)およびブチルパラベン(BP))原液: 各パラベン

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Hiroshi Tokunaga; 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501 Japan; Tel. 03-3700-1141; Fax; 03-3707-6950; E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

類約 50 mg を精密に量り、メタノールを加えて正確に 100 ml とした。(0.5 mg/ml)

リン酸試液：リン酸 4.90 g を水 1000 ml に溶かした。

リン酸二水素カリウム試液：リン酸二水素カリウム 6.80 g を水 1000 ml に溶かした。

50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5)：リン酸二水素カリウム試液 500 ml にリン酸試液を加え、pH を 3.5 に調整した。

### 2.3 定量法

化粧水約 0.1 g を精密に量り、50 ml のメスフラスコに入れた。メタノールにて 50 ml とし、試料溶液とした。沈殿物が析出する場合には、水 2 ml あるいは 10 ml を加え、メタノールにて 50 ml とし、試料溶液とした。この液 20  $\mu$ l を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料溶液中の PE あるいはパラベン類の濃度 A ( $\mu$ g/ml) を求め、次式により 100 g 中の含有量を算出した。

$$\text{試料 100 g 中の PE あるいはパラベン類の含有量 (g)} \\ = (A \times 50) / \text{試料採取量 (g)} \times 1/1000 \times 100$$

検量線の作成：PE あるいはパラベン類の標準溶液をメタノールで希釈し、1 ml 当たり 0.50, 1.0, 5.0  $\mu$ g を含む標準系列をつくり、各 20  $\mu$ l を液体クロマトグラフに注入し、得られたそれぞれのピーク面積と濃度から検量線を作成した。

### 2.4 HPLC 条件

PE の場合

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：270 nm)

カラム：CAPCELL PAK C<sub>18</sub> (4.6  $\times$  250 mm, 資生堂製)

移動相：50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液 (7 : 3)

カラム温度：35  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

流量：1 ml/min

パラベン類の場合

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：255 nm)

カラム：CAPCELL PAK C<sub>18</sub> (4.6  $\times$  250 mm, 資生堂製)

移動相：50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液 (3 : 2)

カラム温度：35  $^{\circ}$ C 付近の一定温度

流量：1 ml/min

### 3. 結果および考察

化粧水には、防腐剤として、PE とパラベン類が一緒に添加されている場合がある。化粧水中の PE とパラベン類を分析するため、カラムとしてオクタデシルシリル化シリカゲルカラムを、移動相として、リン酸塩緩衝液

とアセトニトリルの混液を、検出波長として、PE の場合は 270 nm (吸収極大波長)、パラベン類の場合は 255 nm (吸収極大波長) を用いる分析法を検討した。検討に用いた試料溶液は、PE あるいはパラベン類の各種原液の一定量をメタノールで希釈し、1 ml 当たり 5  $\mu$ g の濃度に調製し、その 20  $\mu$ l を用いた。その結果を以下に示した。

#### 3.1 アセトニトリルの影響

50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液中のアセトニトリル濃度を 25 ~ 60 % と変化させ、PE およびパラベン類の保持時間 ( $t_R$ ) の変化を測定した。その結果を Fig.1 に示した。

Fig.1 から分かるように、PE の場合には、化粧水中に同時に存在する MP との分離が必要であることが分かった。また、検量線を示した Fig.3 から分かるように PE の 5  $\mu$ g/ml を用いたときのピーク面積は 46791 であり、それに比べて MP の 5  $\mu$ g/ml を用いたときのピーク面積は 501172 であった。MP のピーク面積は PE のそれの約 10 倍も大きな値を持っており、吸収極大波長は PE と MP は 15 nm 異なるが、両者の分離が十分でない場合、PE が大きな影響を受けることが考えられた。そこで、分析時間を加味し、PE の分析には、50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液 (7 : 3) を用いることにした。また、パラベン類の分析には、50 mmol/l リン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液 (3 : 2) を用いることにした。

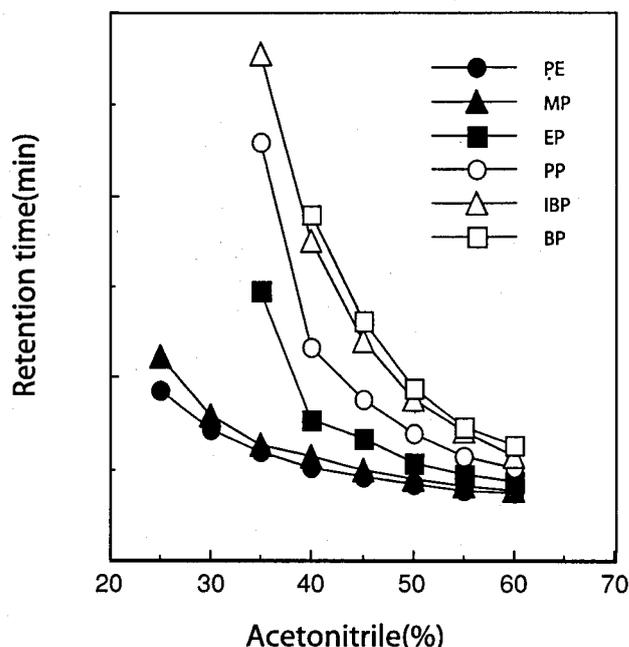


Fig.1 Effect of acetonitrile on retention times of phenoxyethanol and parabens.

### 3.2 pHの影響

移動相に用いた50 mmol/lリン酸塩緩衝液のpHを3.0~4.5に変更し、PEおよびパラベン類の $t_R$ への影響を検討した。

リン酸塩緩衝液のpHを3.0~4.5に変更した時、PEの $t_R$ は7.1分に、MPの $t_R$ は8.0分と変化がなかった。しかし、EP、PP、IBPおよびBPはpH3.0~4.0まで $t_R$ に変化がなかったが、pH4.5では、 $t_R$ の増加が観察された。その結果、リン酸塩緩衝液のpHを3.5とすることにした。

### 3.3 イオン強度の影響

移動相に用いたpH 3.5リン酸塩緩衝液のイオン強度を25~100 mmol/lに変更した。PE、EP、PP、IBPおよびBPの $t_R$ への影響は観察されなかったが、MPの $t_R$ は25と50 mmol/lとの間で低下し、100 mmol/lでは50 mmol/lの場合と同じ $t_R$ を示した。このことより、イオン強度50 mmol/lのリン酸塩緩衝液 (pH 3.5) を用いることにした。

### 3.4 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PEあ

るいはパラベン類の $t_R$ への影響を検討した。カラム温度の上昇に伴い、 $t_R$ はわずかに低下した。カラム圧を考慮して、カラム温度を35℃に設定した。

### 3.5 PEあるいはパラベン類のクロマトグラムおよび検量線

パラベン類を1 ml当たり5  $\mu$ g含有する溶液あるいはPEとMPを1 ml当たり5  $\mu$ g含有する溶液を調製し、2.4で示したHPLCの操作条件に従い、得られたクロマトグラムをFig.2に示した。

Fig.2から分かるように、今回検討したパラベン類あるいはPEとMPは十分に分析できることが明らかになった。

PEあるいはパラベン類の0.5、1.0および5.0  $\mu$ g/mlの溶液20  $\mu$ lを用い、検量線を作成し、その結果をFig.3に示した。

Fig.3から分かるように、使用したPEあるいはパラベン類の濃度とピーク面積の間には、良好な直線関係が成立することが分かった。

### 3.6 市販化粧水への応用

市販化粧水42品目中のPEおよびパラベン類を測定し、3回の測定値の平均値 (%) をTable 1に示した。

Table 1から分かるように、調査した全ての化粧水はパラベン類を含んでおり、特に、MPは全ての化粧水に0.012~0.204%の範囲で含まれ、それらの平均値は0.097%であった。パラベン類の範囲は0.016~0.267%であり、その平均値は0.120%であった。No.1, No.4, No.12等のようにMP、EP、PP、IBPおよびBPの5種類のパラベン類が同時に検出される製品の場合、パラベン類のプレミックスの原料の使用が示唆された。化粧品基

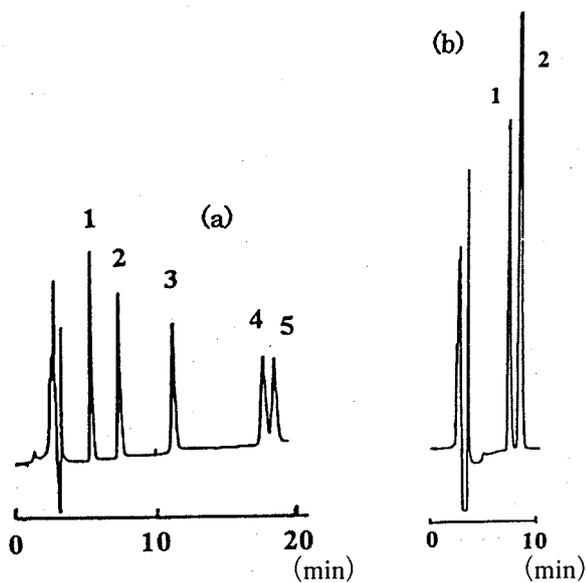


Fig.2 Chromatograms of parabens (a) and phenoxyethanol (b)

(a) : 1-MP, 2-EP, 3-PP, 4-IBP, 5-BP, (b) : 1-PE, 2-MP

#### HPLC conditions

(a) : column, CAPCELL PAK C<sub>18</sub>; mobile phase, a mixture of 50 mM phosphate buffer (pH 3.5) and acetonitrile (3:2); flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C; detection wavelength, 255 nm

(b) : column, CAPCELL PAK C<sub>18</sub>; mobile phase, a mixture of 50 mM phosphate buffer (pH 3.5) and acetonitrile (7:3); flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C; detection wavelength, 270 nm

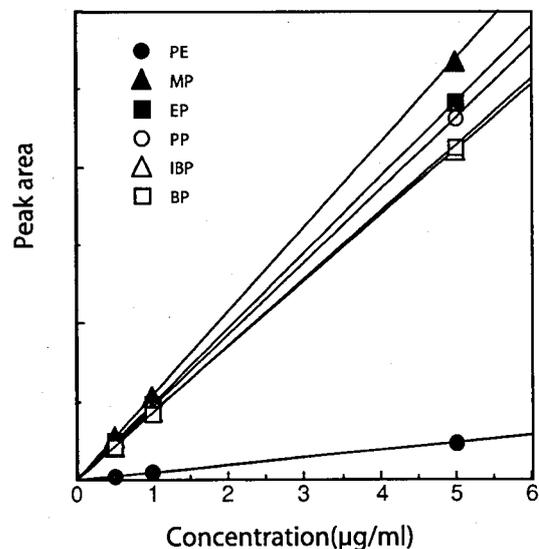


Fig.3 Working curves for phenoxyethanol and parabens

Table 1 Amounts of phenoxyethanol and parabens in lotions

	PE(%)	Total parabens(%)	MP(%)	EP(%)	PP(%)	IBP(%)	BP(%)
No.1	0.065	0.021	0.012	0.003	0.002	0.002	0.003
No.2	-	0.054	0.054	-	-	-	-
No.3	0.009	0.092	0.092	-	-	-	-
No.4	0.053	0.029	0.014	0.007	0.002	0.002	0.003
No.5	0.364	0.125	0.078	0.019	0.010	-	0.018
No.6	0.203	0.096	0.096	-	-	-	-
No.7	0.487	0.156	0.156	-	-	-	-
No.8	0.308	0.096	0.096	-	-	-	-
No.9	0.309	0.198	0.198	-	-	-	-
No.10	-	0.169	0.152	-	0.018	-	-
No.11	-	0.157	0.157	-	-	-	-
No.12	0.560	0.043	0.020	0.008	0.004	0.003	0.007
No.13	-	0.147	0.147	-	-	-	-
No.14	0.304	0.204	0.204	-	-	-	-
No.15	-	0.154	0.093	0.021	0.021	-	0.019
No.16	-	0.215	0.155	0.020	0.020	-	0.020
No.17	0.060	0.029	0.020	0.003	0.003	-	0.003
No.18	0.637	0.020	0.020	-	-	-	-
No.19	0.085	0.037	0.025	0.004	0.004	-	0.004
No.20	0.594	0.265	0.148	0.041	0.019	0.019	0.039
No.21	0.610	0.281	0.155	0.038	0.038	-	0.051
No.22	-	0.050	0.037	0.009	0.004	-	-
No.23	0.309	0.016	0.016	-	-	-	-
No.24	0.103	0.103	0.103	-	-	-	-
No.25	-	0.147	0.147	-	-	-	-
No.26	0.073	0.154	0.084	0.012	0.040	-	0.018
No.27	1.043	0.197	0.197	-	-	-	-
No.28	0.399	0.157	0.157	-	-	-	-
No.39	-	0.190	0.190	-	-	-	-
No.30	0.067	0.144	0.079	0.011	0.037	-	0.016
No.31	0.076	0.070	0.016	0.012	0.032	-	0.010
No.32	-	0.134	0.079	0.011	0.033	-	0.011
No.33	0.145	0.054	0.032	0.007	0.004	0.003	0.007
No.34	0.141	0.055	0.033	0.008	0.004	0.004	0.007
No.35	0.142	0.052	0.030	0.008	0.004	0.003	0.007
No.36	-	0.194	0.194	-	-	-	-
No.37	0.183	0.063	0.049	-	0.014	-	-
No.38	0.101	0.193	0.193	-	-	-	-
No.39	0.289	0.203	0.203	-	-	-	-
No.40	0.498	0.102	0.102	-	-	-	-
No.41	0.017	0.052	0.027	0.013	0.007	-	0.005
No.42	0.018	0.038	0.020	0.003	0.010	-	0.005
average	0.266	0.118	0.097	0.013	0.015	0.005	0.013
MAX	1.043	0.267	0.204	0.041	0.040	0.019	0.051
MIN	0.009	0.016	0.012	0.003	0.002	0.002	0.003

PE: phenoxyethanol, MP: methylparaben, EP: ethylparaben, PP: propylparaben,  
 IBP: isobutylparaben, BP: butylparaben  
 MAX: maximum value, MIN: minimum value  
 - : not detected

準第4条の別表3のポジティブリストで示されるパラベン類の使用上限は、化粧品100 g中に1 gまでである。化粧品中のパラベン類の量が増すと皮膚に対する「ヒリヒリ感」が増すとされている。皮膚に対しての作用を考慮し、パラベン類の配合の少ない処方設計がなされていることが示唆された。

検討した42品目の中で11品目がPEを含有していなかった。31品目中のPEの平均値は0.266%であり、その範囲は0.009~1.04%であった。製品中の含量が0.5~1.0%のものはNo.12, 18, 20, 21および27の5品目であった。PEの含有量が最も多い製品はNo.27の1.043%であり、化粧品への使用ができるPEの上限の値であった。また、含量の低い方を見てみるとNo.3の0.009%, No.4の0.053%というように0.1%以下の製品が10品目を占めており、PEのみでの防腐能力を考えた場合、製品の防腐に疑問が呈せられる製品であった。

製品の防腐効果は、使用された防腐剤とその他の防腐効果を持つ賦形剤の総合的な量で判断すべきである。防腐剤として、PEとパラベン類以外のものは製品に記載されていない。そこで、単純にPEとパラベン類の両者を含み、それぞれの含量が0.1%以下の製品を選択すると、No.1, 3, 4, 17, 19, 41および42の7品目であった。これらの製品はエタノールなどの防腐効果のある成分も含んでいなかった。製品の防腐力は、製品の防腐力試験の結果を見ることは当然のことであるが、防腐剤として記載される成分の含量から見た場合、防腐力が低いのではないのと考えられた。

#### 4. 結論

(1) 化粧水中のPEおよびパラベン類を分析する方法とし

て、ODSカラムおよび移動相として、50 mmol/lリン酸塩緩衝液 (pH 3.5) / アセトニトリル混液 (7 : 3) あるいは (3 : 2) 並びに検出波長として、270 nmあるいは255 nmを用いる液体クロマトグラフ法を確立した。化粧水42品目の他の賦形剤の影響もなく測定できることが分かった。

(2) 化粧水42品目中の31品目にPEが検出され、その範囲は0.009~1.043%であり、その平均値は0.266%であった。

(3) 化粧水42品目中の全ての製品にパラベン類が検出され、その範囲は0.016~0.267%であり、その平均値は0.120%であった。その中でMPは全ての製品中で検出され、その範囲は0.012~0.204%であり、その平均値は0.097%であった。

(4) 化粧水42品目中、PEとパラベン類を含み、それぞれの含有量が0.1%以下の製品が7品目あった。

#### 文 献

- 1) 厚生省告示第331号 (平成12年9月29日)
- 2) Akhtar, M.J., Khan, S., Roy, I.M. and Jafri, I.A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 1609-1613 (1996)
- 3) Sottofattori, E., Anzaldi, M., Balbi, A. and Tonello, G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 213-217 (1998)
- 4) 大森清美, 土井佳代, 岸美智子, 中岡正吉, 谷 孝之: 神奈川県衛研報告, **28**, 47-50 (1998)
- 5) 前田有美恵, 小和田和宏, 山本正利, 佐野智子, 増井俊夫: 静岡県衛生環境センター報告, **32**, 33-36 (1989)

## ヒアルロン酸ナトリウム製剤のSEC-MALLSによる分子量評価

四方田千佳子<sup>#</sup>

## Evaluation of Molecular Weights of Hyaluronate Preparations by Multi-Angle Laser Light Scattering

Chikako Yomota<sup>#</sup>

Hyaluronate (HA), a glycosaminoglycan polysaccharide, has been used for osteoarthritis, periarthritis of the shoulder and rheumatoid arthritis by intraarticular administration, and in ophthalmic surgery such as anterior segment surgery, and eye lotion.

In this study, the molecular weight (Mw) of HA preparations were estimated by size-exclusion chromatography (SEC) system consisted of a refractometer (RI) and a multi-angle laser light scattering (MALLS). From the results, it has been clarified that a successful characterization of HA samples with Mw up to  $2.3 \times 10^6$  g/mol was possible by multidetector system.

Keywords: hyaluronate; size-exclusion chromatography; multi-angle laser light scattering

## はじめに

ヒアルロン酸ナトリウム (HA) は、雄鶏の鶏冠からの抽出、あるいは連鎖球菌による生合成で製造される生体内多糖であり、変形性膝関節症、肩関節周囲炎及び関節リウマチに対する関節内注射剤、眼内レンズ挿入術、全層角膜移植時における手術補助剤及び目薬として使用されている。現在、HAの公定法としてはヨーロッパ薬局方<sup>1)</sup>のみにモノグラフが収載されており、分子量規格には極限粘度値が採用され、ラベル表示値の90~120%という範囲で規定されている。しかし、粘度測定は分子量の指標とはなるものの、分子量分布試験が含まれていない。EPのモノグラフの提案時に、改訂時には製造業者の同意を得て分子量分布試験が提案される可能性があることが但し書きされている<sup>2)</sup>。すでに、筆者は前報<sup>3)</sup>において、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) における標準品や、粘度補正を検討し、HA含有製剤の分子量測定の最適化を試みた。しかし、通常の示差屈折検出器を使用するSECのみでは、HAの100万以上の高分子量領域では、SECカラムの排除限界が十分に大きくないために、分子量は小さめに見積もられ、粘度補正を行うとかなり改善されるものの充分ではないことを示した。さらに、低角度光散乱光度計 (LALLS) を適用した

SEC-LALLSでの測定も試み、粘度平均分子量とほぼパラレルな値が得られることを示した。しかし、LALLSは現在我が国では入手困難であること、高分子量のポリマーでは、分子サイズが大きくなり、散乱光の角度依存性や、濃度依存性が無視できなくなり、5度の低角度の一点で測定しているLALLSでは分子量を実際より小さく見積もる可能性があること等から、本報では、SECの検出器として汎用されるようになってきた多角度光散乱検出器 (MALLS) の適用を試みた。前報で分子量測定を行ったHA製剤の一部について、MALLSにより重量平均分子量を、毛細管粘度計により極限粘度を測定し、LALLSによる結果と比較検討した。

## 実験方法

1. 試料 市販HA含有製剤として、変形性膝関節症等の関節内注入剤の4種、眼手術補助剤の4種の計8製剤を使用した。このうち眼手術補助剤のうちの3種及び変形性膝関節用剤の1種は極限粘度が24 (dl/g) 以上の高分子量のもので、残りの半数は極限粘度11.8-19.5 (dl/g) のものであった。

2. SEC測定装置 SEC装置は日本分光製のポンプ880-PO, オートサンプラーAS-2057i, カラムオープン865-CO, 示差屈折計 (RI) はSodexRI-71, 光散乱検出器 (MALLS) はWyatt technology社製DAWN-EOSを使用した。カラムはShodexSB-806HQ (8.0 mmIDx30 cm) とし、溶離液0.2 M NaNO<sub>3</sub>, 流速0.3 ml/min, カラム温度40℃で測定した。DAWNの装置定数はトルエンで、

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Chikako Yomota; Kamiyoga 1-22-1, Setagaya-ku, Tokyo  
158-8501, Japan; Tel:03-3700-1141 ext. 333;  
E-mail:yomota@nihs.go.jp

RI装置定数は食塩水で定め、18個の検出器の感度補正には昭和電工社製分子量標準品プルランP-50 (Mw: 47000) を使用した。試料溶液の調製では、試料0.1 gを量り、HAの極限粘度が11.8-19.5 (dl/g) の製剤では0.01%、極限粘度がそれ以上の場合には0.005%となるように溶離液を加えて希釈し、これらの液100  $\mu$ lにつき、SEC測定を行った。分子量解析には、Wyatt社のMALLS用の解析ソフトAstra Ver4.73.04を使用した。分子量解析では、HA水溶液の屈折率増分 $dn/dc$ は別途測定して0.153とし、第2ビリアル定数もあらかじめHA濃度を変化させて見積もり0.002  $\text{cm}^3 \text{mol/g}^2$ の一定値を用いた。これらの値は文献値と良く一致した<sup>4,5)</sup>。なお、分子量計算に使用する検出器は、高分子量側の4製剤では14.5度から60度の6個、低分子量4製剤では25.9度から69.3度の6個とし、散乱強度の角度依存性を考慮して重量平均分子量 (Mw) を求めた。

3. 極限粘度測定 ウペローデ希釈型粘度計を使用し、各HA製剤を0.2M NaClにより希釈して、極限粘度が11.8-19.5 (dl/g) の製剤では0.01%-0.025%の濃度範囲、極限粘度が24 (dl/g) 以上のものでは0.0025%-0.01%の濃度範囲のそれぞれ4濃度で流下時間を測定して、極限粘度を計算した。ここで、粘度計算における濃度は、SECにおけるRI測定により決定した。

## 結果及び考察

### 1. ヒアルロン酸製剤の重量平均分子量

Fig.1に、3種の製剤についてSEC-MALLSの測定結果を示した。クロマトグラムの縦軸はRIの応答によるもので、MALLSによる各溶出位置のMwを右軸としていっしょに図示した。各溶出位置の分子量は直線的に減少し、サイズ排除が適切に機能していることを示している

が、試料3のように高分子量のものでは、クロマトグラムが左右対称とならず、一部が排除限界に入っているものと思われ、溶出量-分子量曲線も低分子量の場合より若干高分子量側にずれることが示された。これらの傾向は他の5種についても同様であり、溶出量-分子量曲線は分子量の大きな4種では試料3とほぼ一致し、低分子量側の他の2種では試料7,8とほぼ一致した。ただし、MALLSによる分子量測定は、絶対測定法であるため、得られる分子量値への排除限界の影響はない。8種HA製剤のMALLSの90度におけるクロマトパターンをFig.2に示した。試料1~試料3ではややパターンが左右不均衡で、先端部分が排除限界に達している可能性が考えられたが、他の製剤では良好なパターンとなった。

光散乱法による分子量測定は、次式により求められる。

$$K^*c/R(\theta) = 1/M_w P(\theta) + 2A_2c \quad (\text{式1})$$

ここで、Kは光学定数、R( $\theta$ )は還元散乱強度、 $A_2$ は第2ビリアル係数、P( $\theta$ )は内部干渉因子である。Kは高分子の屈折率増分の二乗の関数である。P( $\theta$ )は $\text{Sin}^2(\theta/2)$ 項を含む散乱強度の角度依存性を示す関数で分子構造因子とも呼ばれるが、分子の広がりや光の波長の1/20程度を越えると分子は散乱点と見なせなくなり、分子から散乱される光が互いに干渉しあって散乱光強度が下がるようになる。1/P( $\theta$ )は、分子の慣性半径 $R_g$ の関数であり、散乱光強度の角度依存性からP( $\theta$ )を、すなわち $R_g$ を見積もることができる。ここで、 $R_g$ は分子サイズを表すパラメーターである。測定例として、試料3のピークトップ位置の1スライスにおける $K^*c/R(\theta)$ を $\text{Sin}^2(\theta/2)$ に対してプロットし、Fig.3に示した。式1のようにして、角度ゼロへの外挿値よりMwが、直線の傾きから $R_g$ が求められる。

8種HA製剤のそれぞれ3回の試料調製によるMw、

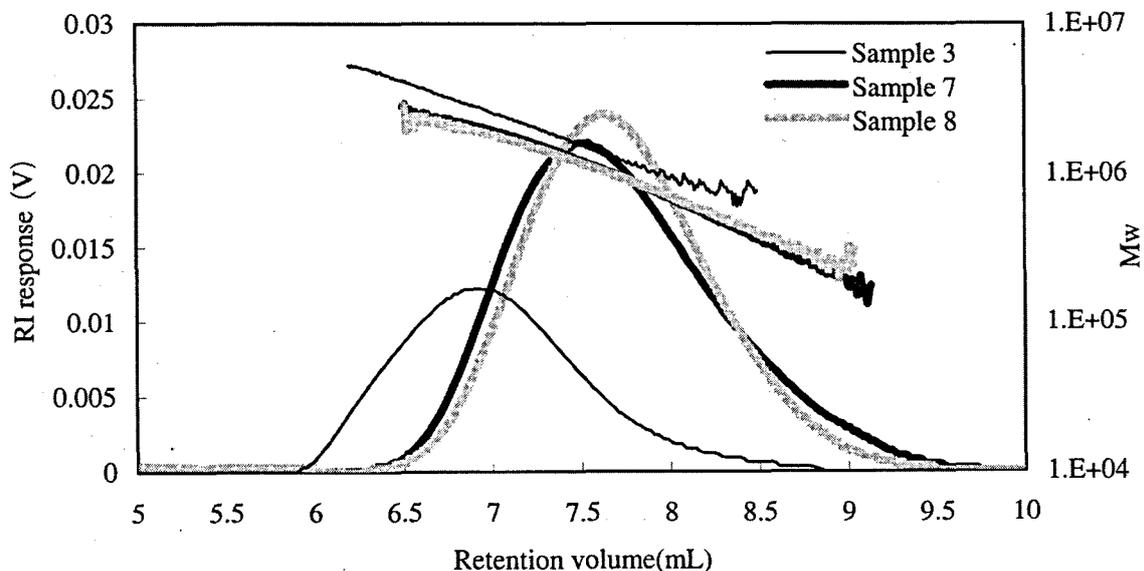


Fig.1 Typical chromatograms showing raw voltage traces for refractometer and calculated Mw at each retention volume.

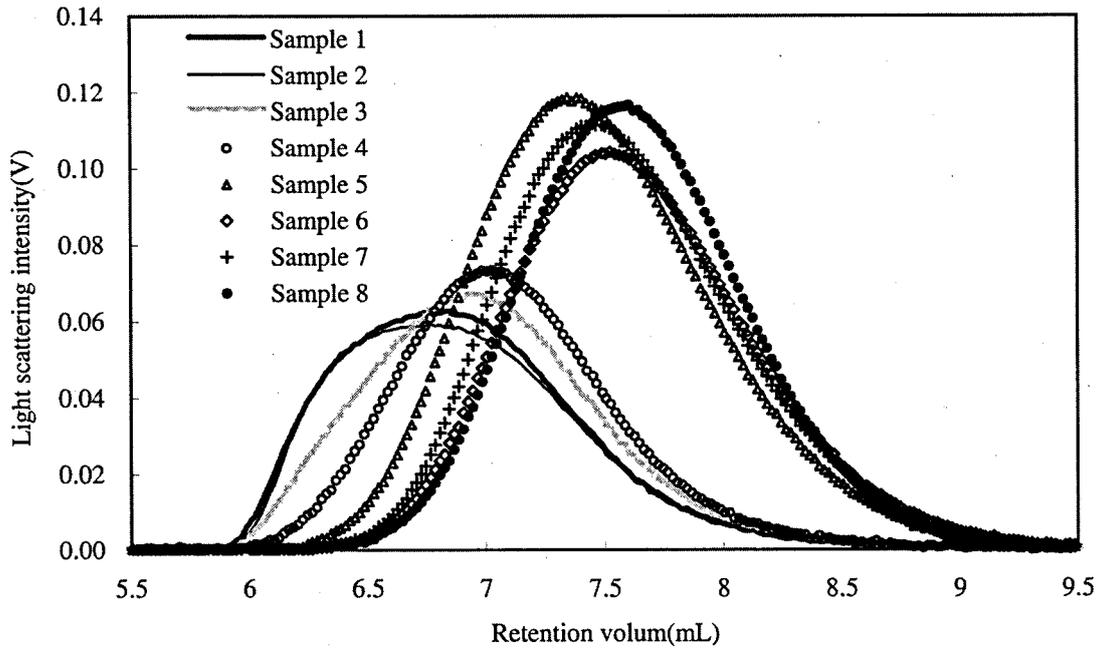


Fig.2 Chromatograms of 8 kinds of HA preparations showing raw voltage traces for light scattering.

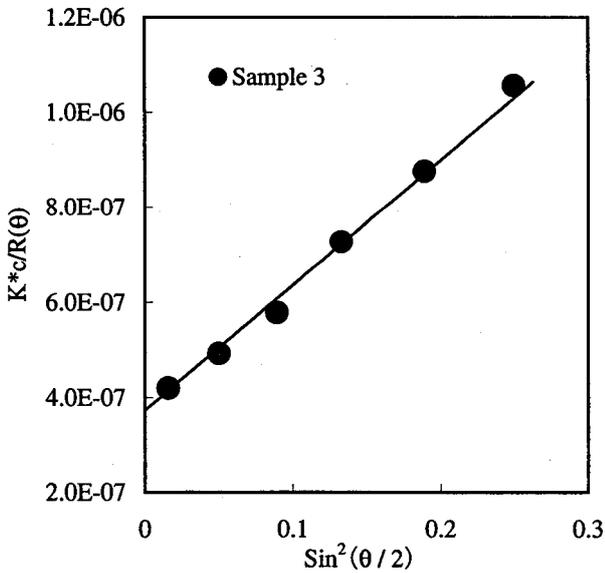


Fig.3 Relationship between  $K^*c/R(\theta)$  and  $\text{Sin}^2(\theta/2)$  at the peak top of Sample No.3

Rgの測定結果をTable 1にまとめた。ここで試料1, 2, 4, 5は眼手術補助剤であって分子量が大きく、試料3は関節内注入用の高分子量のHA製剤、試料6, 7, 8は低分子量の関節内注入用製剤である。得られたMw値のRSDは0.6-1.9%といずれも2%以下と小さく、再現性も良好で、MwとRgには良い相関が見られた。ここで得られた、RgとMwの関係を、高橋ら<sup>3)</sup>の自作の静的光散乱装置によるHAの分子量に関する詳細な報告と比較すると、ほぼ類似する結果であった。

3. SEC, SEC-LALLSの測定結果との比較

今回測定したHA製剤8種のうち7種は前報で使用した製剤であったが、ロット間の差を相殺するために、今回も極限粘度の測定を行い比較することとした。また、極限粘度からLaurentの式<sup>6)</sup>  $[\eta] = 0.00036 \cdot M^{0.78}$ を用いて粘度平均分子量 (Mv) を算出した。前報 (1999) の粘度報告値とMv, SEC-LALLSによるMw, 本法 (2003) の粘度測定値, Mv, SEC-MALLSによるMwをTable 2にまとめて示した。また、比較のためMvに対してMwをプロットして、Fig.4に示した。ここで、試料1の1999年における粘度測定値は、規格値の下限ぎりぎり小さく、図中×で示したように、LALLSのプロットから大きく外れている。また、水の流下時間が比較的速い粘度計を使用した記録があるため、試料1の1999粘度値を異常値と見なし、かわりに2003年の粘度測定値を用いてプロットした (○)。LALLSとMALLSにより得られたMw値を比較すると、分子量120万程度まではほぼ

Table 1. Weight average molecular weights and radius of gyration (Rg) for hyaluronate samples using SEC-MALLS

Sample	Mw $\times 10^{-4}$ (SEC-MALLS)				Average RSD (%)	Rg(nm)
	No.1	No.2	No.3	Average		
1	345	337	338	340	1.3	256 $\pm$ 0
2	359	349	346	351	1.9	260 $\pm$ 0
3	272	281	277	277	1.6	225 $\pm$ 1
4	232	232	226	230	1.5	192 $\pm$ 4
5	135	135	133	134	0.9	159 $\pm$ 2
6	102	101	102	102	0.6	132 $\pm$ 1
7	111	109	109	110	1.1	136 $\pm$ 1
8	102	101	101	101	0.6	126 $\pm$ 2

Sample No.1,2,4,5 : Ophthalmic use  
Sample No.3,6,7,8 : Intraarticular use

Table 2. Molecular weights of hyaluronate(HA) preparations

Sample No.	Intrinsic viscosity(dl/g)		Mvx10 <sup>-4</sup> ***		Mwx10 <sup>-4</sup>	
	1999*	2003**	1999*	2003**	LALLS	MALLS
1	26.4	33.0	173	230	250	340
2	35.6	31.8	254	219	244	351
3	-	29.1	-	196	-	277
4	26.2	26.7	171	175	180	230
5	19.4	18.4	117	109	121	134
6	14.9	16.1	83	92	95	102
7	14.6	16.1	81	92	109	110
8	13.3	15.7	72	89	109	101

\* The values obtained in 1999.

\*\* The values obtained in 2003.

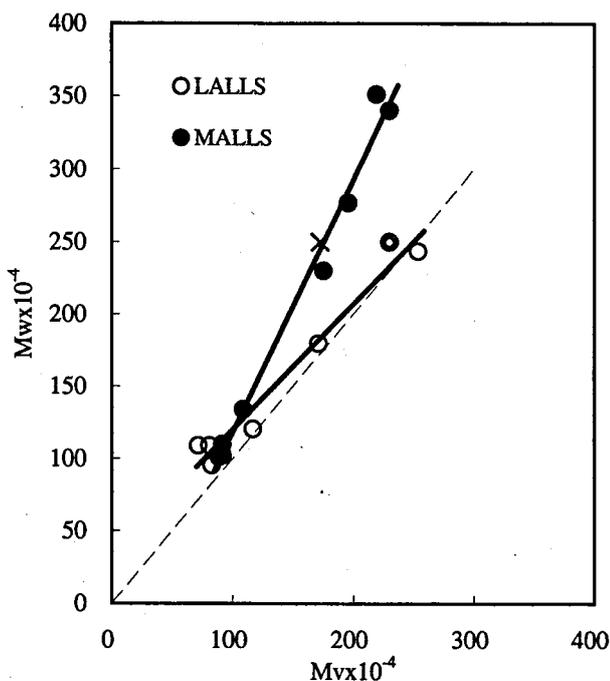
\*\*\* Viscosity average molecular weights calculated using Laurent's equation.<sup>6)</sup>

Fig.4 Relationship between molecular weight(Mw) of hyaluronate preparations obtained by SEC-LALLS and those by SEC-MALLS

類似した結果と言えるが、それ以上の分子量範囲ではMALLSではLALLSの30~40%大きな値を与えた。ここで、 $Mv = Mw$ の関係を波線で示したが、LALLSによるMwはMvに近い値を与えている。しかし、Laurentの式を求めるために使用されたHAの分画試料のMw値は、7.7万から170万の範囲であり、得られた粘度式は

必ずしも高分子領域にそのまま適用できない<sup>6)</sup>。すでに報告したように、通常のSECではカラムの排除限界の問題、標準物質の問題等で、粘度補正を実施しても分子量の大きなHAの分子量評価の誤差が大きい<sup>3)</sup>。また、SEC-LALLS測定では、分子サイズがある程度大きくなると、Fig.3のように縦軸の切片は5度の一点近似測定では角度依存性を無視できなくなり、実際より小さな分子量値が得られることになる。さらに、LALLSの解析では十分に希薄溶液で測定しているとして $A_2$ をゼロとして計算したが、実際にLALLSでバッチ法により散乱光の濃度依存性を測定したところ、0.002程度の値が得られており、これもLALLSで分子量値を小さめに見積もる要因となっていると思われる。一方で、Reed<sup>5)</sup>は、同じSECシステムにMALLSとLALLSを接続し、両者で比較的類似した分子量値が得られたと報告しているが、 $R_g$ ,  $A_2$ の値を何らかの形でLALLS解析に組み込んでいるのではないかと推測される。

以上の結果より、HAのMw測定では、粘度規格として11.8-19.5dl/g程度の分子量の比較的小さいものについては、通常のRI検出器によるSECでプルランを標準として粘度補正を行った場合、HAの分画試料を標準とした場合、SEC-LALLSによるもの<sup>3)</sup>、Viscotec社製トリプル検出器を用いた場合<sup>7)</sup>、いずれの場合にも、同程度の分子量評価が可能と考えられるが、粘度規格として20 dl/gを越えるものに関しては、SEC-MALLSによる分子量の絶対評価が有効と考えられた。

#### 文 献

- 1) European Pharmacopoeia, 4th Ed., 1915-1917 (2002)
- 2) Pharmeuropa, 9,2, 185-188 (1997)
- 3) 四方田千佳子, 宮崎玉樹, 岡田敏史: 衛研報告, **117**, 135-139 (1999)
- 4) R. Takahashi, K. Kubota, M. Kawada, A. Okamoto: Biopolymers, **50**, 87-98 (1999)
- 5) W.F. Reed: Macromol. Chem. Phys., **196**, 1539-1575 (1995)
- 6) T.C. Laurent, M. Ryan, A. Pietruszkiewicz.: B. B. A., **42**, 476-485 (1960)
- 7) 四方田千佳子, 宮崎玉樹, バイオポリマーの分子量評価法3, 製剤と機械, 264, 10-12 (2001)

## 組換え scFv 抗体の培養細胞への送達法の開発に関する研究

中島 治<sup>#</sup>, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一

## Study on a method for delivering scFv recombinant antibody into cultured cells

Osamu Nakajima<sup>#</sup>, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada

We try to develop a method for delivering antibody from blood circulation through blood brain barrier to brain. In order to achieve this goal, antibody has to cross cellular membrane of brain capillary endothelial cells twice. As a first step of our study, we examined the ability for scFv antibody to cross cellular membrane of RBL-2H3 cells once and be delivered into the inside of the cultured cells with the help of TAT peptide. TAT peptide was originally found in Tat protein from the HIV-1 virus and known as one of protein transduction domains. First, oligonucleotide encoding TAT peptide was linked to 5' terminal of gene fragment of scFv antibody by PCR technology. TAT-linked scFv gene fragment was subcloned into pET-23b vector and successfully expressed in *E. coli* as inclusion body. After solubilization and purification, TAT-linked scFv recombinant protein was added to the culture of RBL-2H3 cells. TAT-linked scFv delivered into RBL-2H3 cells was detected by means of immunocytochemistry using fluorescence microscopy. TAT-linked scFv crossed cellular membrane more efficiently than scFv without TAT peptide.

Key Words: blood brain barrier, drug delivery, scFv, TAT peptide

## 緒言

抗体は抗原と特異的かつ高い親和性で結合する。この性質を利用して抗体の医薬品としての応用が注目されている。

ところで、血液循環と脳の間には血液脳関門が存在し、血中から中枢神経系に様々な物質が自由に移行できなくなっている。この血液脳関門の存在は、脳が必要な物質だけを取り込み、かつ不要な物質の脳への侵入を抑制して、脳が微妙な化学的なバランスを保ちながら機能することを可能にしている。しかし、中枢神経の医療を目的として抗体を投与するときには、水溶性高分子である抗体はそのままでは血液脳関門を透過することができず、ドラッグデリバリーにおける問題点となる。

本研究では、連結させたタンパクを細胞内へ送達する能力を有し HIV ウイルス由来 TAT タンパク伝達領域として知られるペプチド<sup>1)</sup> を組換え scFv (短鎖可変部抗体) 抗体に連結させて、血液脳関門透過性運搬体としての利用を試みた。

本研究の成果によって、抗体を中枢神経系に送達でき

れば医療や研究に広範に応用できると期待される。

抗体が血液脳関門を透過して中枢神経系に到達するためには、脳毛細血管の内皮細胞を2回透過する必要がある。今回は本研究の最初の段階として、組換え scFv 抗体が培養細胞の細胞膜を1回透過して、細胞内へ送達されることを検証した。

## 実験方法

1) TAT ペプチドを連結させた組換え scFv 抗体遺伝子の調製

組換え scFv 抗体としては、抗モルヒネマウスモノクローナル抗体 (MOR131) から作成したものをを用いた。その遺伝子の構造は5'側にV<sub>H</sub>遺伝子断片、3'側にV<sub>L</sub>遺伝子断片を配置し、これらをセリンやグリシンに富む配列をコードするリンカーで連結させた。TAT ペプチドの配列を組換え scFv 抗体のN端に連結させるために、3段階のPCRを行った。センスプライマーの5'側にTAT ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを含ませて、3段階のPCRで配列を徐々に伸長させた後に、ヌクレオチド配列を確認した (Fig.1)。

2) TAT ペプチドを連結させた組換え scFv 抗体の大腸菌における発現

上記の遺伝子構築物を pET-23b ベクター (Novagen 社) の *EcoR* I サイトと *Xho* I サイトに連結した。これに

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed;

Osamu Nakajima; Kamiyouga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo  
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9437; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail; onakajim@nihs.go.jp

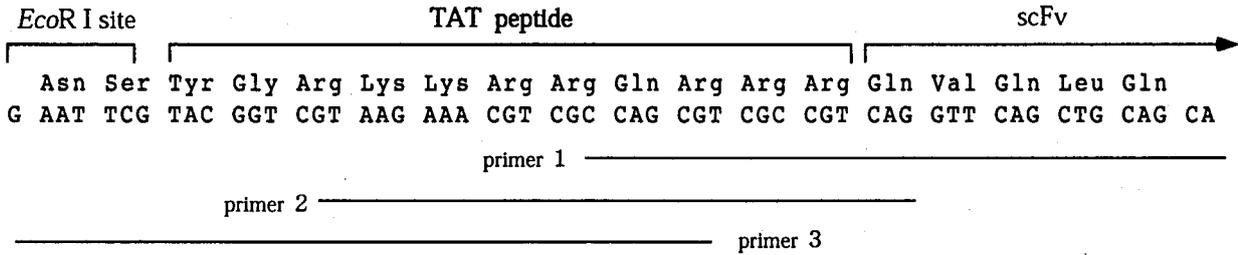


Fig.1 Addition of TAT sequence to scFv antibody by PCR

scFv gene fragment was subjected to 3-step PCR to add oligonucleotide encoding TAT peptide to the 5' terminal of scFv gene fragment. throughout the 3-step PCR the same anti-sense primer was repeatedly used. Sense primers were changed in the process: For the first, the second, the third step primer 1, 2, 3 were used, respectively. The three sense primers overlapped. At the 5' end of the oligonucleotide encoding TAT peptide, *EcoRI* site was introduced to facilitate subcloning into pET-23b vector. To adjust open reading frame of the recombinant protein to that of the vector one nucleotide G was added behind the *EcoRI* site.

より, TATペプチドと組換え scFv 抗体との融合タンパクに pET-23b ベクターに由来する T7 タグが N 端に, ヒスチジンタグが C 端に連結した (Fig.2). これを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS (Novagen 社) にトランスフォーメーションした. 組換え scFv 抗体の発現誘導は IPTG を最終濃度 0.4 mM になるように加えることで行った. インクルージョンボディとして発現された組換え scFv 抗体は洗浄後に 8 M 尿素を含む緩衝液に溶解して, まず 4 M 尿素を含む緩衝液に対して, 次に尿素を含まない緩衝液に対して透析を行い, 2段階で尿素を除いて可溶化させた.

対照実験として, TATペプチドを連結させていない組換え scFv 抗体単独でも同様に発現と可溶化を行った.

3) 培養細胞への組換え scFv 抗体の添加と細胞膜を透過した組換え scFv 抗体の蛍光免疫染色による検出

RBL-2H3 細胞をガラス製チャンバースライド上でコンフルエントになるまで培養した. 血清を含まない培地に交換してから, 組換え scFv 抗体を最終濃度 4 nM になるように培地に添加して 37°C で 15 分間 CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した. 細胞をすばやく洗浄した後に 3.7% ホルムアルデヒド-PBS 中で室温で 20 分間インキュベートすることによって固定した. 0.2% TritonX-100-PBS で室温で 2 分間インキュベートした後に, 10% ヤギ血清-PBS を用いてブロッキングした. 検出は以下の 2 つの条件で行った. 一番目の条件として, 一次抗体に 30,000 倍希釈したマウス抗 T7 タグ抗体 (Novagen 社),

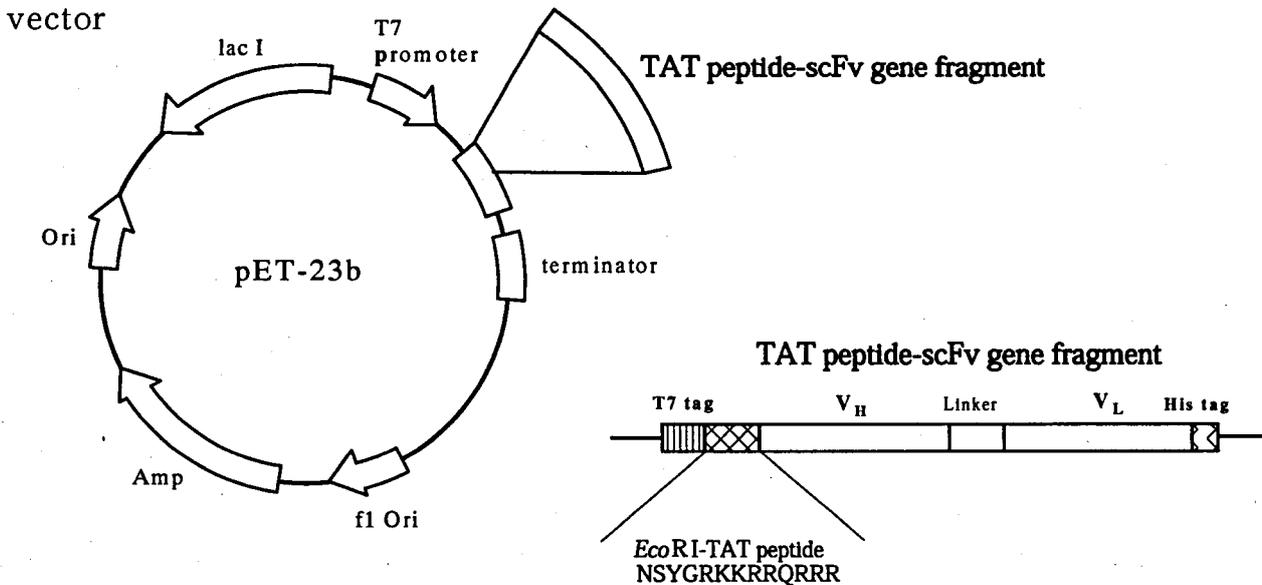


Fig.2 The structure of TAT-linked scFv antibody gene fragment in pET-23b

After addition of oligonucleotide encoding TAT peptide, scFv antibody gene fragment was subcloned into pET-23b. For subcloning *EcoRI* site was introduced to the 5' end of the oligonucleotide. The scFv gene fragment contained V<sub>H</sub> gene fragment at the 5' end, V<sub>L</sub> gene fragment at the 3' end and a linker between them. T7 tag and histidine tag were added to the recombinant protein at the N terminal and the C terminal, respectively, both of which were derived from pET-23b vector.

二次抗体に1,200倍希釈したアレクサー594標識ヤギ抗マウスIgG (Molecular Probe社)を用いた。二番目の条件として、一次抗体に500倍希釈したウサギ抗マウスラムダL鎖抗血清 (Organ Teknika Corporation製)、二次抗体に300倍希釈したFITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Sigma社)を用いた。一次抗体と二次抗体のインキュベーションの間、二次抗体のインキュベーションの後には0.05% Tween20-PBSを用いて洗浄した。マウントして、蛍光顕微鏡による観察を行った。

#### 4) 画像解析

蛍光の検出のための条件ごとに、シャッタースピードを一定にして写真撮影をした。デジタル化した画像をフォトショップバージョン6.0を用いてグレースケールに変換した後に階調を反転させた。この処理を施した画像について、NIHイメージ1.62FATを用いて蛍光の部分を選択して、単位面積当たりの蛍光強度を求めて、ヒストグラムを作成した(蛍光強度と面積の単位は任意である)。

## 結 果

### 1) TATペプチドを連結させた組換え scFv抗体の大腸菌における発現

TATペプチドを組換え scFv抗体に再現性よくかつ確

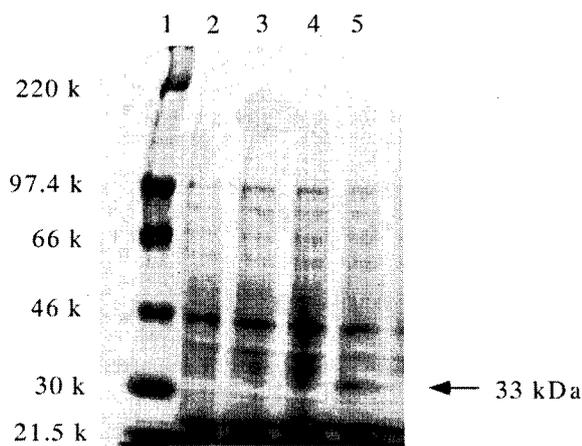


Fig.3 Expression of TAT-linked scFv antibody in *E. coli*

*E. coli* strain BL21(DE3)pLysS was transformed with pET-23b alone or TAT-linked scFv in pET-23b. Total proteins from *E. coli* described above were compared with or without 0.4 mM IPTG in SDS-PAGE (8-16 T% gel). The arrow indicated TAT-linked scFv antibody in lane 5.

lane 1: molecular weight marker  
 lane 2: BL21(DE3)pLysS transformed with pET-23b alone, without IPTG  
 lane 3: BL21(DE3)pLysS transformed with pET-23b alone, with IPTG  
 lane 4: BL21(DE3)pLysS transformed with TAT-linked scFv in pET-23b, without IPTG  
 lane 5: BL21(DE3)pLysS transformed with TAT-linked scFv in pET-23b, with IPTG

実に連結させるために、クロスリンクによるのではなく、PCR法を用いて遺伝子レベルで2つの配列を連結させた (Fig.1). TATペプチドをコードするオリゴヌクレオチドの設計は、後の大腸菌において、TATペプチドを連結させた組換え scFv抗体の発現を促進するために、大腸菌で使用頻度の高いコドンを形成するように考慮した。

そして、このTATペプチドを連結させた組換え scFv抗体を大腸菌中で大量に発現させることができた (Fig.3). TATペプチドを連結させた組換え scFv抗体はインクルージョンボディとして発現しており、8 M尿素で可溶化した後で透析により尿素を除去するとかなりの量が再び沈殿してしまった。一部の可溶化できたタンパクをSDS-PAGEとCBB染色で分析すると、TATペプチドを連結させた組換え scFv抗体はシングルバンドになるまで精製されていることが明らかになった (Fig.4).

### 2) TATペプチドを連結させた組換え scFv抗体のRBL-2H3細胞内への侵入の増加

RBL-2H3細胞に侵入したTATペプチドを連結させた組換え scFv抗体の検出は蛍光免疫染色によった。すなわち、細胞内に到達したTATペプチドを連結させた組

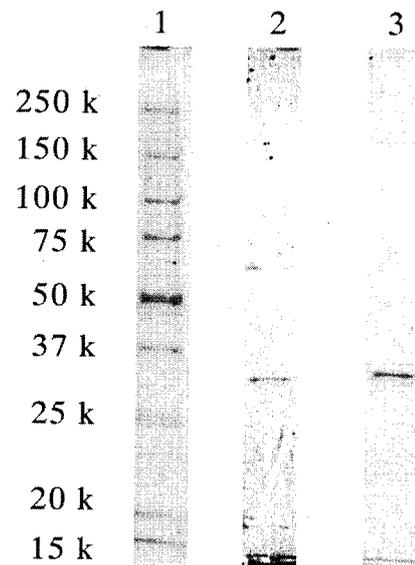


Fig.4 Solubilization and purification of scFv antibody and TAT-linked scFv antibody

scFv antibody and TAT-linked scFv antibody were expressed in *E. coli* as inclusion body. The inclusion body was washed and solubilized in buffer containing 8 M urea. After removal of urea by dialysis the recombinant proteins were obtained as a single band on SDS-PAGE (8-16 T% gel).

lane 1: molecular weight marker  
 lane 2: scFv antibody  
 lane 3: TAT-linked scFv antibody

換え scFv 抗体の量を蛍光強度に変換して計算する手法を採った。一次抗体と二次抗体の組み合わせは、実験方法に記した2通りで行った。画像解析を行ってみると、TATペプチドを連結させていない組換え scFv 抗体でも RBL-2H3 細胞内への侵入が検出された。また、蛍光の検出のための条件を一定にしたときでも、単位面積当たりの蛍光強度は一定の値にならず、ある幅を持った分布を示すことが明らかになった。そこで、横軸には画像解析の結果得られた単位面積当たりの蛍光強度 (単位は任意)、縦軸にはそれに対応する出現頻度を取り、ヒストグラムを作成して、その分布の状態を明らかにした。蛍光強度を測定した部位数 (細胞数) は 113 から 146 個である。

Fig.5 および Fig.6 のヒストグラムから、組換え scFv 抗体に TAT を連結させたときには単位面積当たりの蛍光強度の分布が右にシフトしていることが分かった。これにより、TAT を連結させることにより、組換え scFv 抗体の RBL-2H3 細胞内への侵入が増強されることが明らかになった。

## 考 察

筆者らは、抗体の中枢神経系への送達法の開発を試みている。抗体を中枢神経系に送達することができれば、中枢神経系の疾病に対して用いる治療薬として、さらには診断薬や毒性試験等の研究用試薬など広範な応用が期待される。

すなわち、中枢神経系に送達された抗体は、中枢神経系の疾病の際に異常を起こしたり、過度に発現しているタンパクの機能を阻害する治療薬となりうる。また、抗体を用いて中枢神経系に発現している分子の機能を阻害したときに、脳の形態や動物の行動にどのような変化が現れるかを調べるなど、中枢神経系に送達された抗体には研究用の試薬としても興味深い使用法が考えられる。

抗体を中枢神経系へ送達させるには、ヘキサメチレンジアミンと N-エチル-N'-[3-(ジエチルアミノ)プロピル]カルボジイミドを用いて抗体をカチオン化させる方法がこれまでに知られている<sup>2)</sup>。しかし、この方法には、抗体のコンフォメーションを乱してしまったり、または抗原結合部位の重要なアスパラギン酸残基やグルタミン

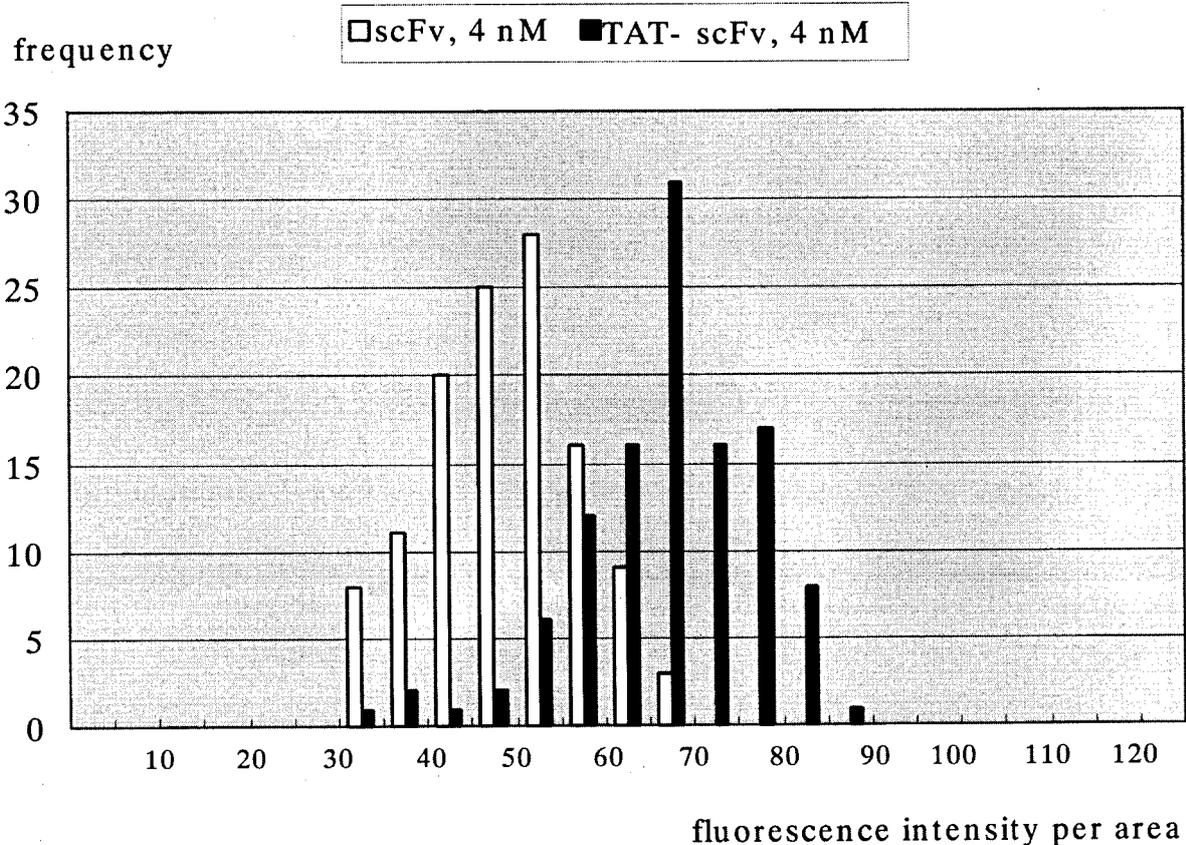


Fig.5 Detection of TAT-linked scFv antibody in RBL-2H3 cells by fluorescence microscopy (1)

scFv antibody or TAT-linked scFv antibody was added to the culture of RBL-2H3 cells. The recombinant antibodies delivered into the cells were detected immunocytochemically. Mouse anti T7 tag antibody was diluted 30,000 fold and used as the first antibody. Alexa 594-labeled goat anti mouse IgG antibody was diluted 1,200 fold and used as the second antibody. 120 and 113 areas were measured for fluorescent intensities for scFv antibody 4 nM and TAT-linked scFv antibody 4 nM, respectively.

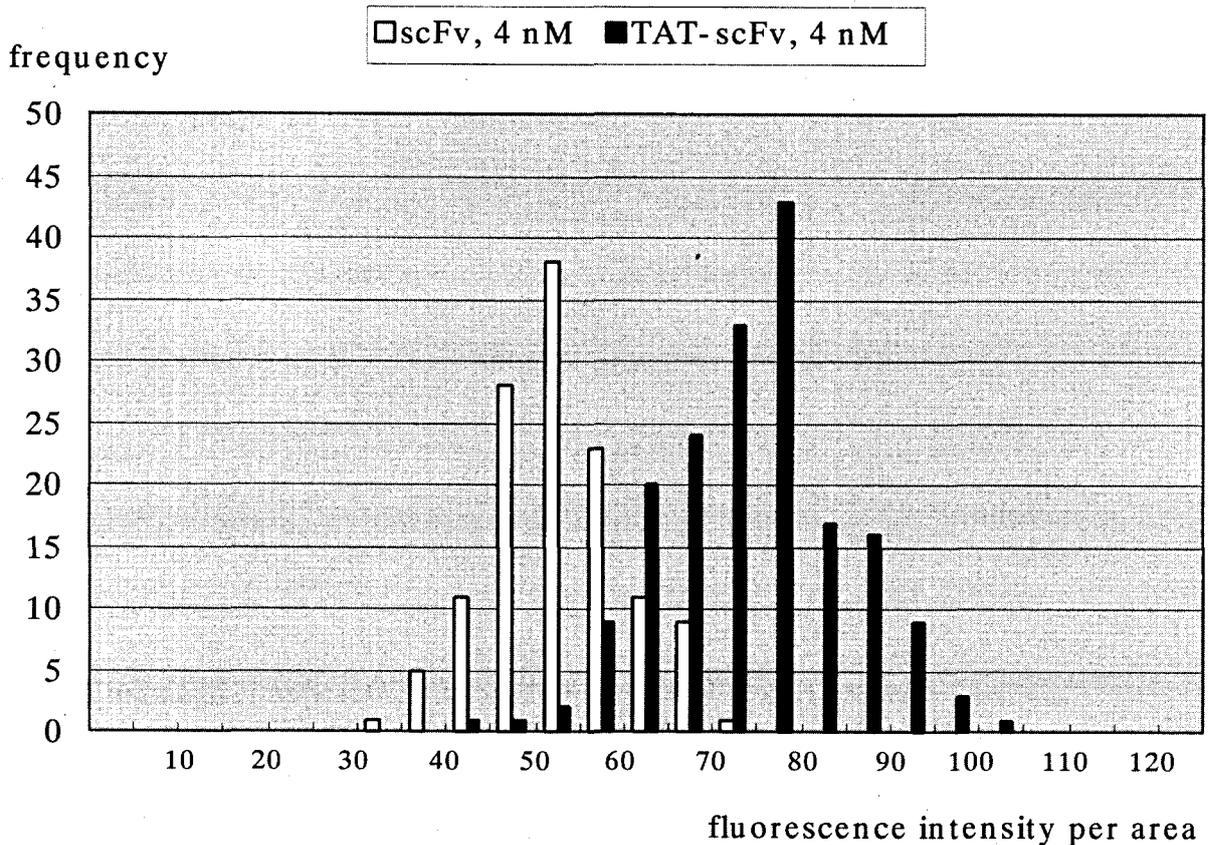


Fig.6 Detection of TAT-linked scFv antibody in RBL-2H3 cells by fluorescence microscopy (2)

scFv antibody or TAT-linked scFv antibody was added to the culture of RBL-2H3 cells. The recombinant antibodies delivered into the cells were detected immunocytochemically. Rabbit anti mouse lambda L chain antiserum was diluted 500 fold and used as the first antibody. FITC-labeled goat anti rabbit IgG antibody was diluted 300 fold and used as the second antibody. 127 and 146 areas were measured for fluorescent intensities for scFv antibody 4 nM and TAT-linked scFv antibody 4 nM, respectively.

酸残基を修飾してしまうなど、抗体の本来の性質を損なってしまう例が報告されていた<sup>3)</sup>。また、抗体を中枢神経系に送達する第2の方法論には、抗トランスフェリン受容体抗体と目的の抗体を結合させる方法がある。この方法では、トランスフェリンが血中に比較的高濃度で存在するために、抗トランスフェリン受容体抗体と目的の抗体の融合タンパクが血中のトランスフェリンと競合してしまい、効率よくトランスフェリン受容体に結合できない問題点が指摘されていた<sup>4)</sup>。

本研究では抗体を中枢神経系に送達させるための戦略として、TATペプチドを組換え scFv 抗体の末端に連結させる方法を検討している。TATペプチドは HIV ウイルス由来 TAT タンパク伝達領域として知られており、塩基性のペプチドを多く含むことが特徴的である。TATペプチドが結合されたタンパクを細胞内へ送達させる機構は十分明らかにされてはいないが、TATペプチド中のアルギニン残基のグアニジン基が有するプラスの電荷と細胞膜の脂質二重膜中のリン酸基が保持するマイナスの電荷が相互作用して、TATペプチドと連結したタンパクは

脂質膜の中を透過すると推定されている<sup>5)</sup>。TATペプチドを利用して組換えタンパクを細胞内へ送達させた例としては、細胞周期調節タンパクである Cdk2 が報告されている<sup>6)</sup>。

抗体が血液脳関門を透過して中枢神経系に到達するためには、脳毛細血管の内皮細胞の細胞膜を2回透過する必要がある。今回は本研究の最初の段階として、TATペプチドと連結させたときに組換え scFv 抗体が培養細胞の細胞膜を1回透過して、細胞内へ送達されることを検証した。

この段階での成果は細胞内免疫への応用が考えられる。例えば、抗 *ras* オンコジーン抗体が野生型のタンパクは認識せず、変異型のタンパクを認識するとの報告がある<sup>7)</sup>。したがって、本研究の成果を応用して細胞内に送達させた抗体が癌に対する新しい治療法につながることを期待される。

ところで、TAT以外にもタンパクを細胞内に送達させる能力を有するペプチドが知られている<sup>8, 9)</sup>。今後は、それらを組換え scFv 抗体に連結させたときの組換え

scFv 抗体の細胞内への送達能力を比較検討する予定である。また、TAT ペプチドを連結させた組換え抗体を放射標識して、動物に投与したときの脳への移行を検証する予定である。

#### 謝 辞

本研究は、原子力委員会の評価に基づき、文部科学省原子力試験研究費により実施されたものである。

#### 文 献

- 1) Vives, E., Brodin, P. and Lebleu, B. : *J. Biol. Chem.*, **272** (25) 16010-16017 (1997)
- 2) Triguero, D., Buciak, JB., Yang, J. and Pardridge, WM. : *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** 4761-4765 (1989)
- 3) Bickel, U. : *Advanced Drug Delivery Reviews* **15** 53-72 (1995)
- 4) Huebers, HA. And Finch, CA. : *Physiol. Rev.* **67** 520-582 (1987)
- 5) Rothbard, JB., Kreider, E., VanDeuson, CL., Wright, L., Wylie, BL. and Wender, PA. : *J. Med. Chem.* **45** 3612-3618 (2002)
- 6) Nagahara, H., Vocero-Akbani, AM., Snyder EL., Ho, A., Latham, DG., Lissy, NA., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, SA. and Dowdy, SF. : *Nature Medicine* **4** (12) 1449-1452 (1998)
- 7) La Vecchio, JA., Hamer PJ., Ng, SC., Trimple, KL. and Carney, WP. : *Oncogene* **5** 1173-1178 (1990)
- 8) Schwarze, SR. and Dowdy SF. : *TiPS* **21** 45-48 (2000)
- 9) Morris, MC., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. : *Nat. Biotechnol.* **19** 1173-1176 (2001)

家庭用の蚊取線香、電気蚊取等に広く使用されているピレスロイド系殺虫剤の  
共力剤である2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) の  
ラットを用いた28日間反復強制経口投与毒性試験

松島裕子<sup>#</sup>, 内田雄幸, 齊藤 実, 川崎 靖, 伊佐間和郎, 鹿庭正昭, 井上 達, 菅野 純

Twenty-Eight Day Repeated Dose Oral Toxicity Test of Synergist of a pyrethroid insecticide,  
2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (S-421) in Rats

Yuko Matsushima<sup>#</sup>, Osayuki Uchida, Minoru Saitoh, Yasushi Kawasaki, Kazuo Isama, Masaaki Kaniwa, Tohru Inoue, Jun Kanno

2,3,3,3,2',3',3',3'-Octachlorodipropyl ether (Abbreviation ; S-421) is originally developed as synergist of a pyrethroid insecticide. In recent years, S-421 is used widely at home, for a mosquito-repellent incense, electric mosquito-repellent, an insect-killing spray, a vacuum cleaner paper pack, etc. as well.

On the other hand, S-421 has been detected in vacuum cleaner dust samples as well as human milk samples in Japan indicating that our living environment is already contaminated by this compound. Long term toxicity studies including a carcinogenesis study have been performed and NOEL of chronic toxicity has been settled. However, it is clear that S-421 is used in close proximity so that acute or subacute exposure at relatively higher dose levels than chronic NOEL values are easily assumed, such as use of a spray in an ill-ventilated room, etc.

This study, 28 day repeated oral dose toxicity study of S-421 was performed to monitor the outcome of acute and subacute exposure assuming possible exposure accidents mentioned above. The protocol is as follows; Groups of 10 rats of each sex(5 week- old), were treated with intragastric administration of S-421 with a dose of 0 (olive oil, control), 10, 40, 160 or 640mg/kg body weight. For recovery test, 14 day after the last treatment, the control and 640mg/kg groups were examined, respectively.

All animals of all groups in both sexes survived. In the 640mg/kg groups of the both sexes, all animals were set to drowsiness from about 5 hours after administration, however, they recovered by the next morning. In the hematology examination, Hb, MCH, MCHC, WBC values were significantly decreased and MCV value was significant increased in the 640mg/kg group of both sexes. In the serum biochemistry, items increased in the 640mg/kg groups of both sexes returned to normal level after 14 days recovery period. Absolute and relative liver weight increase seen in the 160mg/kg and above also returned to control level after recovery. Histopathologically, slight hepatocellular swelling was observed in the 160mg/kg groups and severe hepatocellular swelling with vacuolization and slight necrosis was seen in the 640mg/kg group.

In conclusion, the no-observed-effect levels (NOEL) of S-421 under these conditions was judged to be 40mg/kg/day.

Key Words: a twenty-eight-day repeated oral dose toxicity test, rat, S-421, pyrethroid, insecticides, hepatotoxicity

#### はじめに

家庭用品の中には、さまざまな化学物質をそのまま又は希釈・混合して製品化した製品があり、これらの製品を総称して「家庭用化学製品」と呼んでいる。これらの製品は、現在では、私たちの日常生活のいろいろな場

で活用され、暮らしの中で欠くことのできないものとなっている。

一方、化学物質は、多かれ少なかれ人体に対して何らかの作用をもたらす側面を有しており、その利用法によっては思わぬ健康被害を引き起こすおそれがありうる。このため、国立衛研においては、「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（家庭用品規制法）」に基づき、家庭用品の安全性を点検するために生物試験等を継続して行っており、ここ数年は、近年需要の伸びてきた防菌・防かび・殺虫剤等を主体として毒性試験を実施してきている。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Yuko Matsushima; Division of Cellular & Molecular Toxicology,  
National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya,  
Tokyo 158-8501, Japan; Tel:03-3700-9672; Fax:03-3700-9647;  
E-mail: matsushi@nihs.go.jp

今回検討した2,3,3,3,2',3',3'-Octachlorodipropyl ether (以下S-421)は、ピレスロイド系殺虫剤の効果を増強する共力剤として主剤に対して2~10倍量添加され、近年家庭用の蚊取線香、電気蚊取、殺虫スプレー、衣料用防虫剤(樟脳)、カーペット、電気掃除機用紙パック等に繁用されている。更に、塵性ダニ、白アリに対して忌避、防虫効果を有することから、住宅用白アリ駆除剤として繁用されている<sup>1)</sup>。

S-421の汚染状況に関しては、調査母乳の半数以上から検出され<sup>2,3)</sup>、更に、一般家庭の屋内汚染調査として電気掃除機中の集塵袋内容を分析した結果、全試料から0.01~3.9 ppmの範囲で検出され<sup>4)</sup>、一般家庭においても広範囲な屋内汚染が進行していることが判明し、更にS-421は長期間残留することが確認された<sup>1)</sup>。このような状況から、S-421がヒトにどのような毒性作用があるのか注目されてきている。

S-421の毒性に関するこれまでの知見としては、遺伝子突然変異誘発性は直接法TA1535、代謝活性法TA100およびTA1535が陽性、染色体異常誘発性は直接法および代謝活性化法ともに陰性との報告<sup>5)</sup>がある。LD<sub>50</sub>値は、ラット単回経口投与で雌雄共に2800 mg/kgであった。関田らのラットを用いた3ヶ月亜慢性毒性試験では、肝臓および腎臓の重量増加がみられ、病理組織学的検査で肝細胞の空胞化あるいは肥大が認められている<sup>6)</sup>。慢性毒性・がん原性試験では、投与に起因する腫瘍の発生はみられず、最大無作用量(NOEL)は120 ppmと報告されている<sup>7)</sup>。

今回我々は、家庭用品に使用される化学物質の評価研究の一環として、すでに得られている慢性暴露における毒性情報に加えて、S-421の製造過程、散布現場での事故、家庭内にあつては誤飲や殺虫剤の多量散布等で生ずる害作用を推定し、単回投与致死量あるいは比較的多量に持続的に摂取した場合に生ずる害作用およびその回復を検討し、安全量の目安を得ることをことを目的とし、単回投与及び28日間反復投与を実施した。

## 試験材料および方法

### 1. 被験物質<sup>1,8)</sup>

化学名; Ether, bis(2,3,3,3-tetrachloropropyl)  
一般名; 2,3,3,3,2',3',3'-Octachlorodipropyl ether,  
Bis(2,3,3,3,-tetrachloropropyl)ether  
商品名; S-421  
分子式; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>8</sub>O  
化学構造式; CCl<sub>3</sub>-CHCl-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CHCl-CCl<sub>3</sub>  
分子量; 377.74  
CAS No.; 127-90-2  
純度; 98.5% (化学分析法)  
溶解性; 水に難溶、油脂に良く溶ける

性状; わずかな特異臭を有する無色あるいは淡黄色透明の液体

入手先; 三共化成工業(株)

### 2. 予備試験・投与方法・試料調整および安定性

予備試験の投与用量は、LD<sub>50</sub>値の半分の量から徐々に落とし、各群4匹に15日間反復強制経口投与をおこなった。その結果、体重の変化は、800 mg/kg以上の群で顕著な増加抑制がみられたが、600 mg/kg群は対照群と変わらなかったことから、本試験は、公比4で0(オリーブ油、対照群)、10、40、160および640 mg/kg B.W.の5群を設定した。更に、0および640 mg/kg群には14日間休薬による回復群を設けた。

投与方法は、5 ml/kg体重の容量となるようS-421をオリーブ油に溶解し、テフロン経口ゾンデを用いて、1日1回、28日間強制経口投与した。

調製被験物質の安定性の検討は、640 mg/kg(12.8w/v%)試料溶液について、調製当日のものと薬用冷蔵庫内あるいは室温暗所に1週間保存したものをヘキサソールで1000倍に希釈し、ガスクロマトグラフィーにて解析・定量した。その結果、どの条件下でも100%であることが確認された。

### 3. 動物・群分け・飼育環境

4週齢の雌雄Wistarラット(日本エスエルシー・株)各73匹の動物を購入し、1週間の馴化飼育後、5週齢で試験を開始した。動物の群分けは、ノルム値法により群分けした。

試験は、温度24±1℃、湿度55±5%、換気回数18回/時(オールフレッシュ)、照明12時間(5時~17時)に設定されたバリア方式の動物室で実施した。動物は、アルミ製金網ケージで5匹ずつ集団飼育し、F-2固型飼料(船橋農場・株)および水道水を自由に摂取させた。

### 4. 検査項目

一般状態および死亡の有無は毎日観察し、体重は3日毎に測定した。尿検査は雄は投与25日目、雌は24日目の投与直後に尿検査用試験紙を用いて行った。

動物は、採血に先立って16時間絶食し、エーテル麻酔下にて血液学的検査と血清生化学検査用の動物は眼窩静脈より、血液凝固能検査用の動物は頸静脈より採血した。血液採取後、動物は、エーテル麻酔下で、頸動脈切断により放血致死させ、全臓器に対して剖検し、臓器を採取後重量を測定した。

血液学的検査はRBC、HB、PCV、MCV、MCH、MCHC、Plt、WBCについて多項目自動血球計数装置で、白血球百分比はEDTA中に血液を滴下し遠心塗抹装置を用いてスライドグラスに塗抹後、ライト染色を施し血液

細胞自動分析装置で、血液凝固能検査は、クエン酸ナトリウム液を入れた注射筒で採取した血液を遠心分離し、PTとAPTTを血液凝固能測定装置で、血清生化学検査は採取した血液を遠心分離し、血清をTable 1に示す項目について臨床生化学自動分析装置で測定した。

病理組織学的検査は、臓器を10%ホルマリン溶液で固定し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E染色を行い、鏡検した。

## 5. 統計学的解析法

体重、飼料摂取量、尿検査、血液学的検査、血清生化学検査、血液凝固能検査および臓器重量の結果は、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定した。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、例数が等しければDunnett型で、また例数が異なればScheffe型でそれぞれ対照群と各投与群間との有意差検定を行った。回復試験の体重、飼料摂取量、血液学的検査、血清生化学検査、血液凝固能検査および臓器重量の結果はt検定を行った。尿検査の結果は、Pitman検定を行なった。

## 結 果

①一般状態と死亡の有無；雌雄全群とも試験終了時まで生存した。一般状態は、雌雄共に640 mg/kg群は、投与後約5時間から傾眠状態となったが、翌朝には回復した。

②体重の変化；雄の640 mg/kg群は投与期間後半に有意な体重増加抑制がみられ、休薬により回復しなかった。雌の640 mg/kg群は投与期間中は対照群と変わらなかったが、休薬期間中有意な増加抑制がみられた。

③尿検査；雄160 mg/kg以上の群でケトン体が有意に増加し、雌は、640 mg/kg群で蛋白とケトン体が有意に増加したが、休薬により回復した。

④血液学的検査；雌雄640 mg/kg群でHb、MCHおよびMCHCが有意に減少した。同群で白血球数の減少がみられたが休薬により回復した。

⑤白血球百分比；雌の640 mg/kg群でリンパ球が有意に増加したが、休薬により回復した。

⑥血液凝固能検査；雌雄共に全群において変化はみられなかった。

⑦血清生化学検査 (Table 1a, 1b)；雌雄共に、主に肝臓に関連する項目の上昇がみられたが、休薬によりほぼ回復した。

⑧臓器重量 (Table 2a, 2b)；雄は、160 mg/kg以上の群で肝臓および腎臓の重量が増加した。肝臓は休薬により回復したが、腎臓の相対重量は回復しなかった。雌は、160mg/kg以上の群で肝臓および腎臓の重量が増加し、

休薬により回復しなかった。

⑨病理学的所見 (Table 3)；雌雄10および40 mg/kg群は、被験物質に起因する所見はみられなかった。雌雄共に160 mg/kg群で肝細胞の軽度肥大および小壊死巣、640 mg/kg群で肝細胞の肥大、細胞質空胞変性、肝細胞壊死および核の大小不同がみられたが、休薬により回復した。

## 考 察

肝臓重量が雌雄共に160 mg/kg以上の群で用量依存的に顕著に増加した。これらの動物の病理組織学的検査で局所性壊死、肝細胞の肥大、空胞変性等がみられた。同群の血清生化学検査では肝実質細胞障害のマーカーとして用いられる $\gamma$ -GTおよびALT値に軽度な増加がみられ病理学的所見と血清生化学値がよく対応した。一方、これらの結果より、S-421を一生涯摂取し続けることによる肝機能障害の誘発が危惧されたが、ラットを用いた2年間の慢性毒性試験でそのような所見はみられなかったとの報告がある<sup>7)</sup>。

血清生化学検査で最も変動の大きかった項目は、脂質関係であり、TG値は対照群と同じであったが、TCho値は雌雄160 mg/kg以上の群で、PL値は雌雄640 mg/kg群で有意な増加がみられたことから、S-421投与により高脂血症が誘発される可能性がある。

雌雄共に160 mg/kg以上の群で腎臓の絶対および相対重量が用量依存的に増加したが、これを反映する血清生化学、病理組織学的所見はみられなかった。

血液学的検査で赤血球数は、雌雄共に対照群と投与群で差はみられなかったが、Hb、MCH、MCHCの軽度減少、MCVの軽度上昇より大球性低色素性貧血の傾向がみられた。

雌雄640 mg/kg群で白血球数の有意な減少がみられたが、白血球百分比からは減少した細胞を特定できず白血球全体が減少したのと考えられるが原因は不明である。

今回実施した28日間反復経口投与毒性試験のNOELは、肝臓および腎臓の臓器重量が雌雄ともに160 mg/kg以上の群で増加し、病理組織学的検査では同群で肝細胞の軽度肥大および小壊死巣がみられたのに対して、40 mg/kg/day以下の群では体重、臓器重量、血液学的検査、血清生化学検査、病理組織学的所見等すべての検査項目に変化はみられなかった事より、本条件下におけるNOELは雌雄ともに40 mg/kg/dayと考えられた。

ピレスロイド系の共力剤の一つであるピペロニルブトキサイドは、ラットに肝癌を発生させることが報告<sup>9)</sup>されてる。一方、S-421は2年間の慢性毒性試験では、検体に起因する腫瘍の発生および重篤な器質変化はみられておらず<sup>7)</sup>、ピペロニルブトキサイドの代替えとして適切であると考えられる。

Table 1a Serum chemistry in male rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group (mg/kg)	28 days dosing test						14 days recovery test					
	0	10	40	160	640	640	0	5	5	5	5	
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
TP g/dl	6.04±0.12	6.14±0.08	6.08±0.08	6.27±0.17	6.55±0.20**	6.43±0.03	6.50±0.13					
Alb g/dl	4.19±0.09	4.29±0.12	4.27±0.14	4.33±0.16	4.42±0.14	4.40±0.13	4.27±0.10					
A/G	2.28±0.07	2.32±0.18	2.38±0.23	2.24±0.14	2.08±0.12	2.17±0.22	1.93±0.13					
BUN mg/dl	9.7±0.5	9.9±0.4	9.8±0.9	10.2±0.8	10.1±0.4	12.4±0.7	13.8±1.4					
CRN mg/dl	0.27±0.02	0.25±0.02	0.22±0.02**	0.26±0.02	0.23±0.01*	0.23±0.02	0.22±0.02					
UA mg/dl	0.69±0.11	0.65±0.14	0.69±0.12	0.77±0.18	0.93±0.21	0.51±0.15	0.66±0.06					
Glc mg/dl	126±9	125±6	124±5	105±12**	85±12**	121±6	112±9					
PL mg/dl	106±8	116±5	118±5	118±7	197±23**	115±5	113±9					
TG mg/dl	83±11	135±25*	118±28	76±19	60±32	158±27	60±12**					
TCho mg/dl	49±3	52±4	52±4	58±3*	117±15**	51±6	60±9					
TBil mg/dl	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.06±0.00	0.04±0.00	0.05±0.01					
AIP mU/ml	357±32	393±34	348±23	335±36	305±9*	247±8	259±26					
ALT mU/ml	41±10	35±5	39±10	35±6	61±13*	41±9	54±11					
Amy mU/ml	6964±264	7120±129	7321±450	6421±370	6798±501	6661±299	5068±381**					
AST mU/ml	66±4	63±4	64±2	67±6	69±6	68±4	71±5					
ChE mU/ml	171±16	167±20	155±8	178±11	216±21**	167±17	175±15					
γ-GT mU/ml	1.04±0.16	0.98±0.34	0.90±0.32	0.97±0.21	7.57±2.17	0.15±0.14	0.23±0.15					
LPO nmol/ml	0.02±0.02	0.01±0.00	0.03±0.03	0.06±0.08	0.18±0.07**	0.00±0.00	0.00±0.00					
LAP mU/ml	46±2	45±2	44±2	46±2	59±5**	45±2	45±3					
LDH mU/ml	330±55	374±143	396±125	477±314	531±197	372±187	380±86					
Fe μg/dl	129±45	131±105	137±77	80±13	88±51	113±49	88±8					
Cu μg/dl	140±11	135±13	141±10	150±6	175±19**	123±9	137±9*					
Ca mg/dl	9.6±0.2	9.7±0.2	9.6±0.3	9.6±0.3	9.5±0.2	10.0±0.2	10.1±0.2					
Ng mg/dl	1.82±0.15	1.76±0.08	1.80±0.15	1.87±0.13	2.02±0.09	1.84±0.11	1.89±0.11					
P mg/dl	7.6±0.3	7.5±0.2	7.4±0.5	7.9±0.2	8.7±0.4**	7.1±0.2	7.7±0.3*					
Na mEq/l	136±1	136±0	137±1	137±1	136±0	137±1	136±1					
K mEq/l	4.6±0.4	4.5±0.3	4.4±0.2	4.6±0.4	4.4±0.4	4.4±0.2	4.4±0.3					
Cl mEq/l	101±1	101±1	102±1	101±1	103±1*	100±1	100±1					

Values represent mean ± S.D..

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

Table 1b Serum chemistry in female rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group (mg/kg)	28 days dosing test						14 days recovery test					
	0		10		40		160		640		640	
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
TP g/dl	6.00±0.17	6.07±0.13	6.13±0.29	6.49±0.09**	6.92±0.16**	6.48±0.11	6.76±0.25					
Alb g/dl	4.31±0.11	4.33±0.10	4.43±0.33	4.54±0.05	4.84±0.06**	4.38±0.11	4.66±0.14**					
A/G	2.56±0.15	2.50±0.16	2.62±0.36	2.34±0.19	2.33±0.14	2.08±0.09	2.24±0.19					
BUN mg/dl	11.4±1.1	10.4±0.9	11.1±1.4	9.8±0.5	9.1±1.6*	12.1±0.9	13.9±0.9*					
CRN mg/dl	0.20±0.03	0.19±0.02	0.16±0.03	0.16±0.02	0.18±0.02	0.22±0.03	0.16±0.02*					
UA mg/dl	0.51±0.19	0.55±0.22	0.48±0.20	0.68±0.19	0.83±0.11*	0.48±0.07	0.64±0.17					
Glc mg/dl	111±11	108±16	104±6	104±11	83±8**	111±13	113±11					
PL mg/dl	140±10	137±8	152±18	220±13	306±47**	176±26	205±14					
TG mg/dl	39±30	35±21	35±20	60±52	39±13	49±25	87±21*					
TCho mg/dl	80±11	79±3	89±11	143±8*	215±34**	99±16	126±8*					
TBiI mg/dl	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.00	0.04±0.01	0.07±0.01**	0.07±0.01	0.06±0.01					
ALP mU/ml	264±43	242±34	221±26	204±33	221±16	161±20	158±24					
ALT mU/ml	35±6	32±5	32±4	31±5	45±7*	34±4	32±5					
Amy mU/ml	3505±768	3334±522	3258±740	4740±1431	5744±248*	3383±954	3557±605					
AsT mU/ml	70±6	64±2	64±8	59±7	66±9	65±4	66±9					
ChE mU/ml	1464±232	1557±173	1371±294	962±114**	397±54**	1893±71	966±36**					
γ-GT mU/ml	0.21±0.40	0.02±0.03	0.02±0.01	0.37±0.36	24.66±8.32*	0.36±0.13	1.14±0.23**					
LP0 mU/ml	0.03±0.05	0.02±0.03	0.04±0.07	0.08±0.15	0.06±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00					
LAP mU/ml	49±3	47±3	46±3	49±5	53±2	46±3	45±5					
LDH mU/ml	658±656	380±246	326±240	407±315	559±478	390±111	472±185					
Fe μg/dl	183±8	187±24	237±78	116±31	48±19*	297±88	214±74					
Cu μg/dl	189±9	195±7	203±15	215±26	177±17	207±13	214±23					
Ca mg/dl	9.2±0.1	9.2±0.1	9.4±0.2	9.5±0.2*	9.5±0.1*	10.0±0.3	10.2±0.2					
Mg mg/dl	1.96±0.11	1.93±0.04	1.92±0.11	2.01±0.09	2.13±0.07*	1.97±0.05	2.09±0.07*					
P mg/dl	6.5±0.4	6.3±0.4	7.0±0.7	6.8±0.8	7.5±0.2*	5.8±0.6	6.7±0.3*					
Na mEq/l	137±1	138±0	138±1	138±1	137±1	135±1	136±2					
K mEq/l	4.5±0.4	4.3±0.4	4.2±0.5	4.4±0.2	4.4±0.3	3.9±0.2	4.1±0.3					
Cl mEq/l	101±1	101±2	102±2	102±2	102±2	102±1	101±2					

Values represent mean ± S.D..

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

Table 2a Absolute and relative organ weights in male rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group(mg/kg)	28 days dosing test						14 days recovery test					
	0	10	40	160	640	640	0	5	5	5	5	5
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight g	215±16	222±13	228±7.0	220±7.0	191±15**	258±13	232±18*					
Absolute organ weight												
Brain g	1.79±0.07	1.81±0.05	1.77±0.06	1.74±0.04	1.71±0.03*	1.83±0.04	1.77±0.03*					
Heart g	0.64±0.06	0.66±0.05	0.66±0.02	0.64±0.02	0.57±0.07	0.73±0.04	0.68±0.05					
Lung g	0.80±0.11	0.85±0.11	0.78±0.04	0.78±0.06	0.70±0.06	0.97±0.20	0.82±0.12					
Liver g	6.40±0.50	6.92±0.47	7.79±0.42	8.85±0.11**	13.73±0.78**	7.61±0.88	7.25±0.59					
Kidney g	1.48±0.14	1.53±0.13	1.65±0.12	1.75±0.09**	1.86±0.14**	1.55±0.09	1.65±0.13					
Spleen g	0.43±0.03	0.45±0.05	0.45±0.02	0.42±0.05	0.35±0.04**	0.51±0.02	0.45±0.03**					
Testis g	2.54±0.13	2.51±0.19	2.53±0.11	2.48±0.15	2.42±0.08	2.64±0.23	2.55±0.11					
Pituitary mg	5.9±0.5	6.9±0.8	6.3±1.0	7.2±1.2	5.3±1.2	7.4±1.2	7.0±0.8					
Adrenal gl. mg	32.4±3.7	30.9±4.5	31.2±2.4	29.5±3.6	26.0±1.9	33.6±3.8	27.3±1.8**					
Salivary gl. g	0.38±0.04	0.40±0.02	0.38±0.03	0.37±0.02	0.29±0.03**	0.41±0.02	0.37±0.04*					
Thymus g	0.33±0.05	0.37±0.05	0.38±0.05	0.33±0.05	0.32±0.04	0.32±0.03	0.29±0.07					
Relative organ weight												
Brain (g/100g B.W.)	0.83±0.04	0.81±0.04	0.78±0.02	0.79±0.02	0.90±0.07*	0.71±0.03	0.77±0.05*					
Heart (g/100g B.W.)	0.30±0.01	0.30±0.01	0.29±0.01	0.29±0.01	0.30±0.02	0.28±0.01	0.29±0.02					
Lung (g/100g B.W.)	0.38±0.04	0.38±0.04	0.34±0.02	0.36±0.02	0.37±0.04	0.37±0.08	0.35±0.04					
Liver (g/100g B.W.)	2.98±0.04	3.12±0.13	3.41±0.10	4.02±0.12**	7.23±0.51**	2.94±0.20	3.12±0.11					
Kidney (g/100g B.W.)	0.69±0.03	0.69±0.02	0.72±0.04	0.79±0.02**	0.98±0.07**	0.60±0.02	0.71±0.02**					
Spleen (g/100g B.W.)	0.20±0.02	0.20±0.02	0.20±0.01	0.19±0.02	0.19±0.02	0.19±0.01	0.19±0.01					
Testis (g/100g B.W.)	1.19±0.08	1.13±0.08	1.11±0.06	1.12±0.06	1.27±0.08	1.02±0.09	1.10±0.04					
Pituitary (mg/100g B.W.)	2.8±0.3	3.1±0.4	2.8±0.4	3.3±0.6	2.8±0.6	2.9±0.5	3.0±0.5					
Adrenal gl. (mg/100g B.W.)	15.1±1.3	13.9±2.1	13.7±1.0	13.4±1.5	13.7±1.3	13.0±1.3	11.8±0.6*					
Salivary gl. (g/100g B.W.)	0.17±0.01	0.18±0.00	0.17±0.01	0.17±0.01	0.15±0.01*	0.16±0.01	0.16±0.02					
Thymus (g/100g B.W.)	0.15±0.02	0.16±0.02	0.17±0.02	0.15±0.02	0.17±0.02	0.13±0.01	0.13±0.02					

Values represent mean ±S.D.

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

Table 2b Absolute and relative organ weights in female rats treated with S-421 for 28 days and 14 days recovery period

Group(mg/kg)	28 days dosing test					14 days recovery test				
	0	10	40	160	640	0	5	167±9	149±8	640
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight g	148±9	154±8	148±7	149±6	143±8	167±9	149±8	167±9	149±8	149±8
Absolute organ weight										
Brain g	1.64±0.06	1.68±0.02	1.65±0.06	1.62±0.04	1.65±0.06	1.70±0.07	1.63±0.08	1.70±0.07	1.63±0.08	1.63±0.08
Heart g	0.46±0.03	0.48±0.03	0.51±0.05	0.47±0.02	0.47±0.03	0.49±0.03	0.47±0.04	0.49±0.03	0.47±0.04	0.47±0.04
Lung g	0.60±0.04	0.64±0.09	0.62±0.05	0.64±0.04	0.61±0.03	0.74±0.12	0.59±0.06*	0.74±0.12	0.59±0.06*	0.59±0.06*
Liver g	4.16±0.49	4.22±0.28	4.55±0.32	6.61±0.39**	11.37±0.53**	4.62±0.88	5.49±0.37*	4.62±0.88	5.49±0.37*	5.49±0.37*
Kidney g	0.99±0.02	1.08±0.07*	1.07±0.04	1.20±0.09**	1.41±0.03**	1.07±0.10	1.12±0.07	1.07±0.10	1.12±0.07	1.12±0.07
Spleen g	0.32±0.03	0.34±0.03	0.34±0.05	0.35±0.04	0.29±0.03	0.35±0.04	0.35±0.03	0.35±0.04	0.35±0.03	0.35±0.03
Ovary mg	41.6±6.2	48.2±5.7	45.3±5.0	50.2±3.4	49.2±5.5	49.2±6.4	44.7±2.7	49.2±6.4	44.7±2.7	44.7±2.7
Pituitary mg	8.1±2.3	9.6±1.5	8.9±1.6	8.4±0.6	6.7±1.8	10.1±3.0	9.6±1.5	10.1±3.0	9.6±1.5	9.6±1.5
Adrenal gl. mg	38.5±2.8	38.8±2.2	40.6±2.1	43.1±1.6*	36.1±4.5	41.8±2.3	32.8±4.2**	41.8±2.3	32.8±4.2**	32.8±4.2**
Salivary gl. g	0.26±0.03	0.28±0.02	0.27±0.02	0.29±0.02	0.26±0.02	0.29±0.03	0.28±0.04	0.29±0.03	0.28±0.04	0.28±0.04
Thymus g	0.30±0.03	0.27±0.06	0.28±0.04	0.32±0.02	0.29±0.01	0.28±0.05	0.26±0.04	0.28±0.05	0.26±0.04	0.26±0.04
Relative organ weight										
Brain (g/100g B.W.)	1.11±0.05	1.10±0.05	1.12±0.03	1.09±0.04	1.16±0.08	1.02±0.02	1.10±0.06*	1.02±0.02	1.10±0.06*	1.10±0.06*
Heart (g/100g B.W.)	0.31±0.02	0.31±0.00	0.35±0.05	0.32±0.02	0.33±0.01	0.30±0.01	0.32±0.01**	0.30±0.01	0.32±0.01**	0.32±0.01**
Lung (g/100g B.W.)	0.41±0.03	0.42±0.04	0.42±0.04	0.43±0.03	0.43±0.02	0.44±0.07	0.40±0.04	0.44±0.07	0.40±0.04	0.40±0.04
Liver (g/100g B.W.)	2.80±0.18	2.74±0.07	3.08±0.15	4.43±0.26*	7.99±0.51**	2.74±0.40	3.70±0.37**	2.74±0.40	3.70±0.37**	3.70±0.37**
Kidney (g/100g B.W.)	0.67±0.03	0.70±0.02	0.72±0.01	0.81±0.08*	0.99±0.07**	0.64±0.03	0.75±0.03**	0.64±0.03	0.75±0.03**	0.75±0.03**
Spleen (g/100g B.W.)	0.22±0.02	0.22±0.01	0.23±0.03	0.23±0.03	0.21±0.02	0.21±0.01	0.23±0.02*	0.21±0.01	0.23±0.02*	0.23±0.02*
Ovary (mg/100g B.W.)	28.0±3.0	31.3±2.1	30.7±3.4	33.7±2.2*	34.5±3.8**	29.6±5.0	30.0±1.4	29.6±5.0	30.0±1.4	30.0±1.4
Pituitary (mg/100g B.W.)	5.5±1.6	6.2±1.0	6.0±0.8	5.6±0.4	4.7±1.2	6.0±1.6	6.5±1.0	6.0±1.6	6.5±1.0	6.5±1.0
Adrenal gl. (mg/100g B.W.)	26.1±3.3	25.3±1.9	27.5±0.8	29.0±2.0	25.3±2.3	25.0±1.0	22.2±3.6	25.0±1.0	22.2±3.6	22.2±3.6
Salivary gl. (g/100g B.W.)	0.18±0.02	0.18±0.02	0.18±0.01	0.19±0.02	0.18±0.01	0.17±0.01	0.18±0.02	0.17±0.01	0.18±0.02	0.18±0.02
Thymus (g/100g B.W.)	0.20±0.02	0.17±0.03	0.19±0.02	0.22±0.02	0.21±0.01	0.16±0.03	0.18±0.02	0.16±0.03	0.18±0.02	0.18±0.02

Values represent mean ±S.D.

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

Table 3 Summary for Histopathological Findings in Male and Female Rats Treated with S-421 for 28 days and 14 days Recovery Period

Group (mg/kg)	Male								Female							
	28 days dosing test					recovery			28 days dosing test					recovery		
	0	10	40	160	640	0	640	0	10	40	160	640	0	640		
Effective No.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5		
Liver																
degeneration	0	0	0	3	5	0	0	0	0	0	1	5	0	0		
swelling	±	0	0	0	3	3	0	0	0	0	1	3	0	0		
+ vacuolization	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0		
± vacuolization	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0		
+ vacuolization	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
microgranuloma	0	0	0	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2	1		
focal necrosis	±	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
+ focal necrosis	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0		
Anisonucleosis	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0		

±: slight, +: moderate.

しかし，近年S-421は，調査母乳の半数以上<sup>2,3)</sup>，屋内汚染指標の電気掃除機中の全集塵から検出され<sup>4)</sup>，広範囲な屋内汚染が進行していることが判明し，更に，土壌中の半減期は，約200～800日と長く，分解しにくく蓄積性である<sup>1)</sup>ことが確認された。更に，今回の試験の結果，比較的多量のS-421を継続的に摂取させた場合，肝臓の顕著な重量増加および軽度の局限性壊死および空胞変性がみられた。一方，ピレスロイド系殺虫剤は他の殺虫剤であるカーバメイト剤や有機リン剤と混合することにより相乗効果がみられ，この効果は，抵抗性解除ともいべき薬剤感受性の回復機構によるものである。しかし，この効果は，他方では動物に対しても種々の化学物質に対して毒性強化に転化する可能性が高い<sup>10)</sup>ことから，その意味では安全性に対して慎重に検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) S421 技術資料：三共化成工業株式会社
- 2) Miyazaki, T., Residues of the synergist S-421 in human milk collected from the Tokyo metropolitan area. *Bull Environ Contam Toxicol*, 29(5), 566-569 (1982)
- 3) Miyazaki, T., Kaneko, S., Horii, S., Yamagishi, T., Identification of the synergist bi (2,3,3,3,-tetrachloropropyl) ether in

human milk, *Bull Environ Contam Toxicol*, 26(3), 420-423 (1981)

- 4) Uno, M., Onji, Y., Sasaki, M., Tanigawa, K., Residual Pyrethroid Insecticides in the Interior of a House, *EISEI KAGAKU*, 30(4): 207-210 (1984)
- 5) (財)食品農薬品安全性評価センター報告，平成6年7月29日
- 6) Sekita, S., Kawasaki, Y., Matsumoto, S., Ochiai, T., Nakaji, Y., Kobayashi, K., Furuya, T., Kurokawa, Y., Tobe, M, Subacute Toxicity Study for Bis (2,3,3,3-tetrachloropropyl) ether, *Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences*, 106, 33-38, (1988)
- 7) 関田清司，行政報告，昭和56年7月13日
- 8) 試験報告書，三共化成工業株式会社平塚工場，平成6年6月13日
- 9) Takahashi, O., Oishi, S., Fujitani, T., Tanaka, T., Yoneyama, M., Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in F344 rats: induction of hepatocellular carcinoma. *Fundam. Appl. Toxicol*, 22, 293-303 (1994)
- 10) Hirose, C., Current trends and Topics of the Insecticide Market, *Journal of Pesticides Science*, 2, 187-200 (1977)

## 海苔中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析

川崎洋子<sup>#</sup>, 四方田千佳子, 棚元憲一Determination of Six *p*-Hydroxybenzoic Acid Esters in Laver (Nori) by HPLCYoko Kawasaki<sup>#</sup>, Chikako Yomota, Kenichi Tanamoto

A rapid and simple method was developed for simultaneous determination of methyl, ethyl, isopropyl, n-propyl, isobutyl and n-butyl *p*-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es) in laver by HPLC. Six PHBA-Es were extracted from laver with n-hexane-ethyl acetate (1:1) by shaking. The extract was evaporated. The residue was dissolved in methyl alcohol and determined by HPLC. Recoveries of six PHBA-Es spiked in laver were 93.6-101.2 % at the level of 2 µg/g.

Key Words: *p*-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es), HPLC, laver

## はじめに

化学的合成品の食品添加物は安全性確保の観点からその成分規格を定め、また、特定の添加物については使用基準を設けて使用されている。添加物の使用基準の設定に関する検討の一環として、海苔中のパラオキシ安息香酸エステル (PHBA-Es) 類の分析を行った。

5種のPHBA-Es類すなわちエチル (PHBA-Et), イソプロピル (PHBA-isoPr), プロピル (PHBA-Pr), イソブチル (PHBA-isoBu), ブチル (PHBA-Bu) はしょう油, 果実ソース, 清涼飲料水, シロップ, 酢, 果実又は果菜に対し許可されている保存料であるが、海苔には使用が認められていない。従って、使用が認められる食品からの分析例<sup>1-4)</sup>はあるものの海苔中からの分析法は確立されていない。そこで、わが国では不許可添加物であるパラオキシ安息香酸メチルエステル (PHBA-Me) を含めた6種類のPHBA-Es類の海苔中からの一斉分析法を検討し、市販海苔中のPHBA-Es類の測定を行った。

## 実験方法

## 1. 試料

都内のスーパーマーケットで購入した焼き海苔4検体, 味付け海苔1検体を用いた。

## 2. 試薬・試液

PHBA-Me, PHBA-Et, PHBA-Bu (和光特級),

PHBA-Pr (和光一級), PHBA-isoBu, PHBA-isoPr (東京化成特級)。

クエン酸緩衝液: クエン酸一水和物 7.0 g及びクエン酸三ナトリウム二水和物 6.0 gを水に溶かし, 1,000 mlとし用時水で10倍に希釈して用いた。

n-ヘキサン/酢酸エチル混液: n-ヘキサン (試薬特級) 及び酢酸エチル (試薬特級) を等容量混合した。

メタノール: HPLC用メタノール

その他の試薬は市販の試薬特級品を用いた。

## 3. HPLC装置及び測定条件

HPLC装置: LC-10A(株)島津製作所製

カラム: TOSOH TSK-GEL ODS-100S 4.6 i.d.×250 mm, 5 µm

カラム温度: 35℃

移動相: メタノール/5 mmol/l クエン酸緩衝液 (6:4)  
流速: 0.7 ml/分。

注入量: 10 µl

検出波長: 254 nm

## 4. 試験溶液の調製

試料を粉碎機で粉碎後, 1.0 gを採取し, n-ヘキサン/酢酸エチル混液 20 mlを加え, 1分間超音波で抽出した。静置後, 上清をろ紙 (5C) でろ過した。残渣にn-ヘキサン/酢酸エチル混液 10 mlを加えよく振り混ぜろ過した。更に同じ操作を繰り返し, ろ液を集め, 溶媒を減圧留去した。残留物にメタノールを加えて溶解し, 必要ならろ紙 (5A) でろ過後, メタノールで10 mlの定容とし, HPLC用試験溶液とした。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Yoko Kawasaki ;  
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501 Japan ;  
Tel; 03-3700-1141 ext. 267 Fax:03-3700-9403  
E-mail: yoko@nihs.gijp

## 結果及び考察

### 1. HPLC分析条件の検討

分析カラムに汎用性の高い逆相分配系のYMC J' sphere ODS-H80, YMC ODS-Ph, TOSOH TSK-GEL ODS-100Sを用いてPHBA-Es類の分離を検討した。移動相に粘度が比較的低いアセトニトリル/水混液(6:4)を用い、カラム温度40℃、流速0.7 ml/分の条件では、いずれのカラムもPHBA-Es類の分離が不十分であり、特にPHBA-isoPrとPHBA-Pr及びPHBA-isoBuとPHBA-Buは全く分離しなかった。

移動相にメタノールを使用したところ、YMC ODS-Phではクロマトグラムに変化は見られなかったが、YMC J' sphere ODS-H80ではPHBA-MeとPHBA-Etは良好に分離した。しかし、PHBA-isoPrとPHBA-Pr及びPHBA-isoBuとPHBA-Buの分離が不十分であり、またカラム圧が高かった。TOSOH TSK-GEL ODS-100Sでは、PHBA-isoPrとPHBA-Pr及びPHBA-isoBuとPHBA-Buの分離は完全では無かったが、カラム圧も低く、検討したカラムの中では最も良い分離が得られた。

次に、TOSOH TSK-GEL ODS-100Sを用い、カラム温度及び移動相について検討した。その結果、カラム温度35℃、移動相にメタノール/5 mmol/lクエン酸緩衝液(6:4)を使用し、流速0.7 ml/分の場合が6種類のPHBA-Es類を分離するのに最適条件であった(Fig.1)。

### 2. 試料溶液の調製

「食品中の食品添加物分析法」<sup>1)</sup>では食品中のPHBA-Es類は試料を水蒸気蒸留し、HPLCで測定する方法であるが、試料の採取量は50 gと多く、嵩高い海苔には不向

きであると考えられた。海苔は脂肪やタンパクが非常に少ない食品であり、簡便な溶媒抽出法<sup>2)</sup>を検討した。試料1 gから80%メタノールを用いて抽出したところ、抽出液は濃い緑色であり、海苔の原料である海草中のクロロフィル等が溶出されたと考えられた。OASIS HLBカートリッジ、カーボンカートリッジでクリーンアップを検討したが、HPLCでのPHBA-Me、PHBA-Etの保持時間付近に多くの夾雑物と思われるピークが出現し、PHBA-Me並びにPHBA-Etとの分離は困難であった。

Maeda<sup>5)</sup>は化粧品中のPHBA-Es類の分析にフロリジルカートリッジを用い、n-ヘキサン/酢酸エチル混液で溶出を行い、HPLCで測定し良好な結果を報告している。そこで、n-ヘキサン/酢酸エチル混液(1:1)を抽出溶媒として検討した。

抽出液の溶媒を減圧留去後、残留物をメタノールに溶解し、HPLCを行ったところ、PHBA-Es類の保持時間に妨害ピークは観察されなかった。また、カートリッジカラムによるクリーンアップ操作の必要は無いと考えられた。

### 3. 検量線

各種濃度のPHBA-Es類の標準液を調製し、検量線を作製したところ、0.5-5ppmの範囲で良好な直線性が得られた。

### 4. 添加回収実験

PHBA-Es類の保持時間にピークの見られなかった海苔に2 µg/g濃度にPHBA-Es類を添加し、本法に従ってn=5で添加回収実験を行ったところ、回収率は93.6%

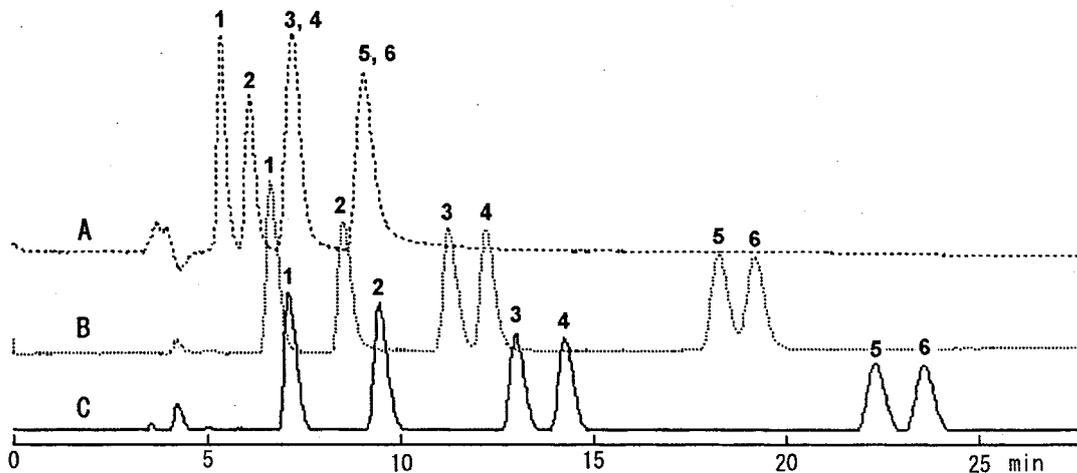


Fig.1 HPLC chromatograms of PHBA-Es

Column: TOSOH TSK-GEL ODS 100S (4.6 i.d. × 250 mm, 5 µm)

Mobil phase: A; acetone nitrile/water (6:4), B; methanol/water (6:4), C; methanol/5 mmol citric buffer (6:4).

Flow rate: 0.7 ml/min.

Column temp: A, B; 40 °C, C; 35 °C.

1: PHBA-Me 2: PHBA-Et 3: PHBA-isoPr 4: PHBA-Pr 5: PHBA-isoBu 6: PHBA-Bu

Table 1. Recoveries of PHBA-Es in laver

表1. 海苔中からの PHBA-Es 類の添加回収率

PHBA-Es <sup>1)</sup>	回収率(%) <sup>2)</sup>	変動係数(%)
メチルエステル	93.6	4.4
エチルエステル	100.0	4.5
イソプロピルエステル	95.5	4.6
プロピルエステル	97.1	4.4
イソブチルエステル	101.2	4.4
ブチルエステル	96.4	4.9

1) 添加量: 2 µg/g, 2) n=5

から101.2%であり、変動係数(CV%)も4.4%から4.9%と良好な結果が得られた。なお、検出限界は1 µ/gであった(Table.1)。

### 5. 市販海苔中の PHBA-Es 類の測定

本法に従い、市販品の焼き海苔4検体及び味付け海苔1検体に付き PHBA-Es 類の測定を行ったところ不許可添加物である PHBA-Me を含め、いずれの製品からも検出されなかった。

### まとめ

海苔中の不許可添加物の PHBA-Me を含む PHBA-Es

類の HPLC による一斉分析法を確立した。

本法は溶媒抽出による簡便で迅速な分析法であり、添加回収率、変動係数ともに良好であった。

本法を用いて、市販の海苔中の PHBA-Es 類の分析を行ったところ、PHBA-Es 類は検出されなかった。

### 文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品化学課監修：第2版 食品中の食品添加物分析法 p.17-20 (2000)
- 2) Kitada, Y., Tamase, K., Sasaki, M., Nisikawa, Y., Tanikawa, K.: J. Food Hyg. Soc. Japan, 21, 480-484 (1980).
- 3) Matsunaga, A., Yamamoto, A., Makino, M.: EISEI KAGAKU, 31, 269-273 (1985).
- 4) Okayama, A., Tanaka, K., Tamaki, M.: Jpn. J. Food Chem., 5, 153-158 (1998).
- 5) Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, T. Masui: HPLC Determination of six p-Hydroxybenzoic acid esters in Cosmetics Using Sep-pak Florisil Cartridges for Sample Pre-treatment, J. Chromatogr. 410, 413-415 (1987).

平成14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<sup>#</sup>・中野真希・古川みづき・中村優美子・外海泰秀

Estimated Production by the Official Inspection of Tar Colors  
(Including Aluminum Lakes) in Fiscal Year 2002

Sumiko Tsuji<sup>#</sup>, Maki Nakano, Mizuki Furukawa, Yumiko Nakamura and Yasuhide Tonogai

There were 157 official inspections of tar colors and their lakes in fiscal year 2002, and all of their samples were qualified.

Total production amount of tar colors that passed inspection in Japan in fiscal year 2002 reached 113.6 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 42.5% during this period.

Key Words: production, food color, tar color, official inspection, aluminum lake

化学的合成品である合成着色料の主たる食用タール色素はタール色素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ている。

わが国における食用タール色素の製品検査は、未だ、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。

各保健所からの申請手続き回数及び申請件数はTable.1に示したように、斬時減少傾向で<sup>1-4)</sup>14年度(F. Y. 2002)52回及び157件に減少した。

平成14年度(F. Y. 2002)に申請された検体数の内訳は、食用赤色2号(R-2), 6件; 食用赤色3号(R-3), 14件; 食用赤色40号(R-40), 6件; 食用赤色102号(R-102), 22件; 食用赤色104号(R-104), 1件; 食用赤色105号(R-105), 1件; 食用赤色106号(R-106), 10件; 食用黄色4号(Y-4), 39件; 食用黄色5号(Y-5), 20件; 食用青色1号(B-1), 20件; 食用青色2号(B-2), 3件; 食用赤色3号アルミニウムレーキ(R-3Al), 1件; 食用赤色40号アルミニウムレーキ(R-40Al), 1

件; 食用黄色4号アルミニウムレーキ(Y-4Al), 4件; 食用黄色5号アルミニウムレーキ(Y-5Al), 4件; 食用青色1号アルミニウムレーキ(B-1Al), 5件, 計157件であった。

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)<sup>5)</sup>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39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。平成14年度(F. Y. 2002)に申請され合格した157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,

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

Prefecture	F. Y. 2002		F. Y. 2001	
	Sample number	/Application times	Sample number	/Application times
Osaka	88	17	76	17
Saitama	33	10	59	15
Tokyo	28	18	12	11
Kanagawa	8	7	15	10
Total	157	52	162	53

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji;  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan;  
Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: tsuji@nihs.go.jp

Table.2 Monthly production amounts of tar colors (Unit:kg)

Food color	2002												F.Y.2001			
	Application month												F.Y.2002			
2001	April	May	June	July	August	September	October	November	December	January	February	March	Total	Ratio(%)	Total	Ratio(%)
R-2	990.5	—	650	—	114.925	—	—	—	—	—	—	300	2955.425	1.809	2020	1.50
R-3	1293.5	300	—	285	304.875	600	—	—	320	280	480	860	4723.375	4.157	6571.75	4.88
R-40	—	—	259	—	180.7	—	—	48	—	—	180	—	667.7	0.588	930.5	0.69
R-102	3560.5	1700	838	2390	745.8	2520	1450	3100	2560	1410.5	1900	2050	24224.8	21.320	29848.2	22.14
R-104	650	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	650	0.572	2580	1.92
R-105	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	99	99	0.087	300	0.22
R-106	600.5	380	51	—	300	100	—	380	—	—	107	398	2316.5	2.039	3889.425	2.89
Y-4	8036.5	2250	4654	3640	4270.4	870	4940	2864.5	4171	4150	4846	3545	48237.4	42.453	59112.5	43.85
Y-5	3770.5	1200	5003	2740	850	1210	1000	2150.5	—	—	1030	1078.5	20032.5	17.630	16141.5	11.97
G-3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0.000	100.25	0.07
B-1	1298.5	500	281	—	14.775	—	100	490	500	300	457.25	460	4401.525	3.874	5475	4.06
B-2	—	—	—	—	—	165	800	—	—	—	—	—	965	0.849	800	0.59
R-2A1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0.000	0	0.00
R-3A1	—	—	—	—	4.875	—	—	—	—	—	—	—	4.875	0.004	1952	1.45
R-40A1	—	—	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—	20	0.018	0	0.00
Y-4A1	—	—	—	320	881	—	—	—	—	—	—	600	1801	1.585	2002	1.49
Y-5A1	—	—	—	975	—	—	—	—	150	—	920.5	—	2045.5	1.800	1825	1.35
G-3A1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0.000	0	0.00
B-1A1	—	—	—	320	4.9	195	—	361	—	—	500	—	1380.9	1.215	910	0.68
B-2A1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0.000	336	0.25
F.Y.2002	20200.5	6330	11736	10670	7672.25	5680	8290	9394	7701	6140.5	10420.75	9390.5	113625.5	—	—	—
Total	17.78	5.57	10.33	9.39	6.75	5.00	7.30	8.27	6.78	5.41	9.17	8.26	—	100.00	—	—
Monthly ratio(%)	17.78	5.57	10.33	9.39	6.75	5.00	7.30	8.27	6.78	5.41	9.17	8.26	—	100.00	—	—
F.Y.2001	13368	12720.5	11889.95	13541.5	14951	11934	6790	8550.425	14040	13463.5	9485.25	4060	—	—	134794.125	—
Total	9.92	9.44	8.82	10.05	11.09	8.85	5.04	6.34	10.41	9.99	7.04	3.01	—	—	—	100.00
Monthly ratio(%)	9.92	9.44	8.82	10.05	11.09	8.85	5.04	6.34	10.41	9.99	7.04	3.01	—	—	—	100.00

Table.3 The production amounts of certified tar colors according to manufacturers

Food color	Manufacturer								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
R-2	1090.65	650	----	----	----	----	----	----	----
R-3	3268.5	300	300	----	850	----	----	----	----
R-40	427.7	60	180	----	----	----	----	----	----
R-102	5341.9	9778	6240	1160	600	1100	----	4.9	----
R-104	----	650	----	----	----	----	----	----	----
R-105	----	----	99	----	----	----	----	----	----
R-106	807.5	431	698	380	----	----	----	----	----
Y-4	15692.6	17704	8165	4686	480	1000	500	9.85	----
Y-5	8631	4983	2200	2068.5	1650	500	----	----	----
G-3	----	----	----	----	----	----	100.25	----	----
B-1	2459	101	1000	166.75	160	300	200	14.775	----
B-2	165	----	500	----	----	300	----	----	----
R-2A1	----	----	----	----	----	----	----	----	----
R-3A1	----	----	----	----	----	----	----	4.875	----
R-40A1	20	----	----	----	----	----	----	----	----
Y-4A1	1351	320	130	----	----	----	----	----	----
Y-5A1	1575.5	320	150	----	----	----	----	----	----
G-3A1	----	----	----	----	----	----	----	----	----
B-1A1	1056	320	----	----	----	----	----	----	----
B-2A1	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>F.Y.2002</b>									
<b>Total</b>	41886.3	35617	19662	8081.25	4120	3500	700	58.95	0
<b>Ratio(%)</b>	36.863	31.346	17.304	7.112	3.626	3.080	0.616	0.052	0.000
<b>F.Y.2001</b>									
<b>Total</b>	42406	48026	20090.5	15446.7	3640	3530	350	4.925	1300
<b>Ratio(%)</b>	31.460	35.629	14.905	11.459	2.700	2.619	0.260	0.004	0.964

製造者別製造量を Table.3 に示した。

総量は平成13年度 (F. Y. 2001) 134.8トンから平成14年度 (F. Y. 2002) 113.6トンに減少した。

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, ここ数年変化していなかった。平成13年度 (F. Y. 2001) 製造されていなかった R-40A1 が製造され, ここ毎年少量ではあるが製造されていた食用青色2号アルミニウムレーキ (B-2A1) が製造されなかった。また平成8年度 (F. Y. 1996) 製造<sup>6)</sup>以来5年ぶりに製造された食用緑色3号 (G-3) も平成14年度 (F. Y. 2002) は製造されなかった。さらに, ここ12年間製造されなかった<sup>4)</sup> 食用赤色2号アルミニウムレーキ (R-2A1) 及び食用緑色3号アルミニウムレーキ (G-3A1) もまた製造されなかった。

色素別製造量は, 第1位の Y-4 が 59.1 トン (色素別比率 43.9%) から 48.2 トン (42.5%), 第2位の R-102 も 29.8 トン (22.1%) から 24.2 トン (21.3%) と減少し, 第3位の Y-5 は 16.1 トン (12.0%) から 20.0 トン (17.6%) と僅かながら増加した。上位5色素の順位は変化せず, それらの製造量合計は 101.6 トンであり, 総製造量の 89.4% であった。

製造者別では平成13年度 (F. Y. 2002) 製造量が多かった B 社が平成14年度 (F. Y. 2002) は2位となり, 製造量の多い順に A, B, C, D, E 社であり, I 社は製造

しなかった。したがって申請製造者は平成14年度 (F. Y. 2002) は8社であった。

製造者別製造量は, A 社が 41.9 トン (製造者別比率 36.9%) とここ数年横ばいであったが, B 社は 12.5 トン減少の 35.6 トン (31.4%) であり, C 社は 19.7 トン (17.3%) とほぼ横ばいであり, D 社は 7.5 トン減少の 8.1 トン (7.1%) であった。

## 文 献

- 1) Tsuji, S., Okada, M., Matsumura, I., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **117**, 185-188 (1999)
- 2) Tsuji, S., Okada, M., Amakura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 135-138 (2000)
- 3) Tsuji, S., Umino, Y., Amakura, Y., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 70-73 (2001)
- 4) Tsuji, S., Umino, Y., Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **120**, 185-188 (2002)
- 5) "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)
- 6) Ishimitsu, S., Mishima, I., Tsuji, S. and Shibata, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **115**, 171-174 (1997)

## 国立医薬品食品衛生研究所グリチルリチン酸標準品 (Control 031)

小出達夫・村上美保・森田有紀子・斎藤博幸・谷本 剛\*

## Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, 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:  $\lambda$  max, 251 nm; and specific absorbance ( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) in ethanol at 251 nm, 146.4; IR spectrum, specific absorptions of raw material were consistent with those of Standard (Control 0221). 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 0.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Glycyrrhizic Acid Reference Standard (Control 031) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: glycyrrhizic acid, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十四改正日本薬局方 (日局) に記載されている「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 031)」 (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: 0.75%, 比吸光度 ( $\lambda$  max): 148.6, 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

日本薬局方グリチルリチン酸標準品 (Control 0221; 日局標準品と略称)<sup>1)</sup> を対照物質とした。試薬及び溶媒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 °C), その約 4 mg を精密に量り, 希エタノール 30 ml を加えて溶かした後, 希エタノールを加えて正確に 100 ml とし, 試料溶液とする。この液につき, 希エタノールを対照にして吸光度測定法により, 210 ~ 300 nm の波長範囲における吸収スペクトルを測定し, 吸収極大波長における吸光度より比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  を求める。

##### 2) 赤外吸収スペクトル

標準品原料をデシケーター中で 12 時間以上乾燥し (減圧 0.67 kPa 以下, 五酸化リン, 50 °C), その 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  $\text{cm}^{-1}$  の範囲で赤外吸収スペクトルを測定する。

##### 3) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

標準品原料 5 mg を希エタノール 2.5 ml に溶かし, 試料溶液とする。この液 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.5

\*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

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  $\mu$ 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薄層板シリカゲル60F 254 (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  $\mu$ 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 (TOSOH) ODS-80Ts

(4.6 mm $\phi$ ×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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、グリチルリチン酸の保持時間の3倍の範囲

試験の再現性：上記の条件で標準溶液につき、試験を5回繰り返すとき、グリチルリチン酸のピーク面積の相対標準偏差は1.5%以下である。

5) 水分

標準品原料約5 mgを精密に量り、電量滴定法による

カールフィッシャー水分測定法により本候補品中の水分含量を測定する。

5. 試験結果

1) 紫外吸収スペクトル

標準品原料の希エタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長251 nm付近に吸収の極大が観察され (Fig.1), 極大吸収波長における比吸光度  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (251 nm) は  $146.4 \pm 2.1$  (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

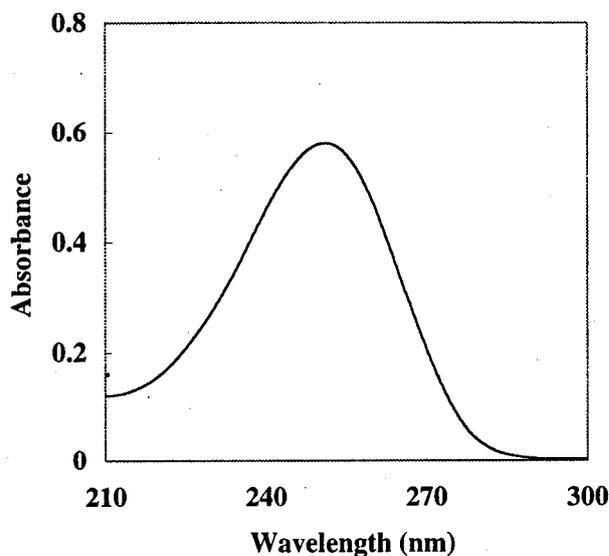


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 0211)

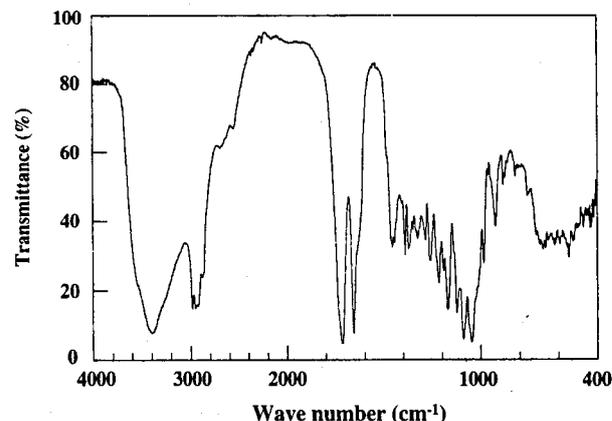


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 0211)

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、 $0.08 \mu\text{g}$  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  $0.17 \pm 0.01 \%$  ( $n = 3$ )、日局標準品で  $0.50 \%$  ( $n = 2$ ) 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  $1.85 \pm 0.07 \%$  ( $n = 4$ ) であった。

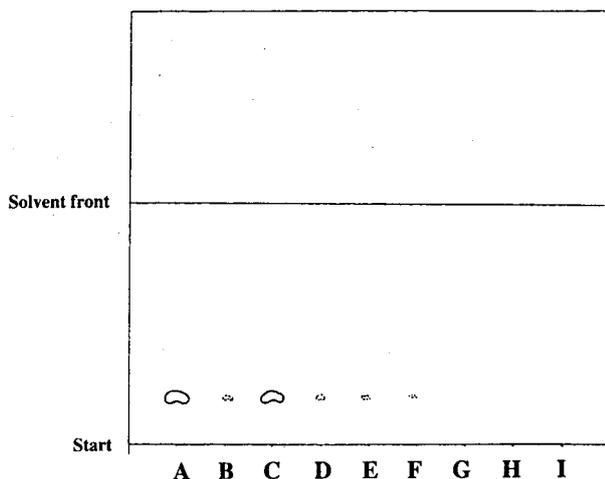


Fig.3 Thin-layer chromatograms of the raw material for Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 0211)

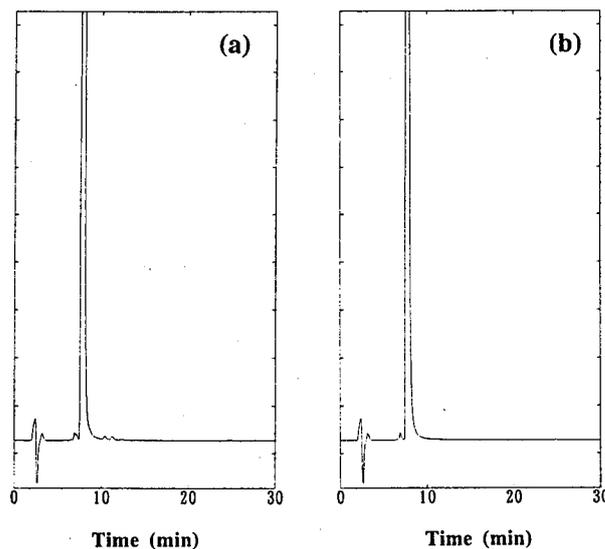


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (a) and Glycyrrhizinic Acid Reference Standard (Control 0221) (b)

#### 結 論

グリチルリチン酸標準品原料につき、日局標準品 (Control 0221) を対照にその品質を比較検討した結果、これら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 031 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.*, **120**, 119-123 (2002)

## 国立医薬品食品衛生研究所塩酸チアミン液標準品 (Control 021)

小出達夫・村上美保・森田有紀子・斎藤博幸・谷本 剛\*

### Thiamine Hydrochloride Solution Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto\*

The raw material of thiamine hydrochloride was examined for preparation of the "Thiamine Hydrochloride Reference Standard". The analytical data obtained were : assay by HPLC, 100.5% ; spectrophotometric assay 101.2%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 021) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: thiamine hydrochloride, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

チアミン及びその製剤の定量に用いられる国立医薬品食品衛生研究所“塩酸チアミン液標準品 (Control 021)”を製造したので報告する。

#### 1. 標準品原料

標準品原料は武田薬品工業株式会社より入手した。同社において、白色アンプルに 2 mL (500 µg/mL) ずつ小分け充填し、溶封されたものである。

#### 2. 参照物質及び試薬

塩酸チアミン液標準品 (Control 991 ; 衛研標準品と略称)<sup>1)</sup> 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.

液体クロマトグラフ装置：島津製作所製の LC-6A 型ポンプ, SPD-10A 型検出器, CTO-6A 型カラムオープン及び資生堂製データ処理装置 S-mc.

#### 4. 試験方法

##### 1) HPLC法による定量試験

標準品原料を試料原液とする。別に衛研標準品 (別途水分を測定しておく) 約 0.050 g を精密に量り、0.001 N 塩酸試液に溶かし、正確に 100 ml とし、標準原液とする。試料原液及び標準原液 5 ml を正確に量り、それぞれに内標準溶液 5 ml を正確に加え、試料溶液及び標準溶液とする。この液 10 µl につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行い、内標準物質のピーク面積に対するチアミンのピーク面積の比  $Q_T$  及び  $Q_S$  を求める。

$$\text{塩酸チアミンの量(\%)} = 100 \times Q_T / Q_S$$

内標準溶液：安息香酸メチルのメタノール溶液 (3 → 10000)

##### 操作条件

検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：TSK-GEL ODS-80T<sub>S</sub> (5 µm, 4.6 × 150 mm)

移動相：1-オクタンスルホン酸ナトリウム 1.1 g を薄めた氷酢酸 (1 → 100) 1000 ml に溶かす。この液 600 ml にメタノール/アセトニトリル混液 (3 : 2) 400 ml を加える。

流量：0.7 ml/min

カラム温度：30 °C

カラムの選定：標準溶液 10 µl につき、上記の条件で操作するとき、チアミン、安息香酸メチルの順序に溶出し、その分離度が 6 以上のものを用いる。

\*To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006  
Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716;  
E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

## 2) 吸光度測定法による定量試験

標準品原料 2 ml を正確に量り, 0.001 N 塩酸試液を加えて正確に 100 ml とし, 試料溶液とする. また 4.1) の標準原液 2 ml を正確に量り, 0.001 N 塩酸試液を加えて正確に 100 ml とし, 標準溶液とする. 試料溶液及び標準溶液につき, 0.001 N 塩酸試液を対照として吸光度測定法により試験を行い, 波長 246 nm における吸光度  $A_T$  及び  $A_S$  を測定する.

$$\text{塩酸チアミンの量(\%)} = 100 \times A_T/A_S$$

## 5. 試験結果

標準品原料及び衛研標準品につき, HPLC 法による定量で得られた液体クロマトグラムを Fig.1 に示した. HPLC 法での定量値は, 100.5 % ( $n=2$ ), 吸光度測定法での定量値は 101.2 % ( $n=2$ ) であった.

## 結 論

塩酸チアミン液標準品原料につき, 衛研標準品を対照に比較検討した結果, 国立医薬品食品衛生研究所標準品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・配布をすることとした.

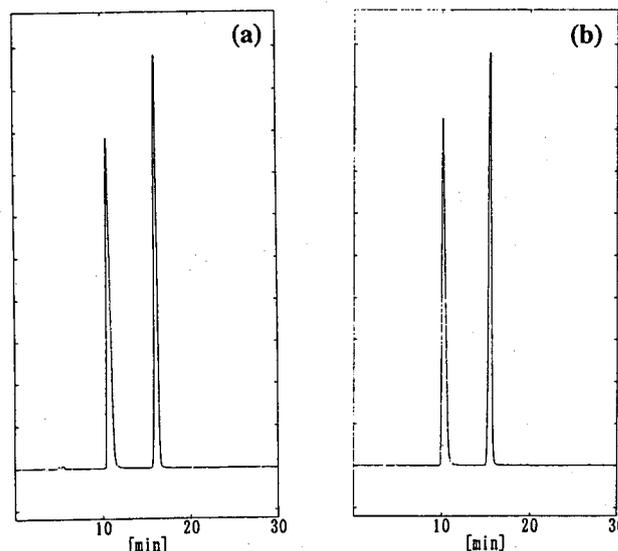


Fig.1 High-performance liquid chromatograms of the raw material for Thiamine Hydrochloride Reference Standard (a): The raw material (b): Thiamine Hydrochloride Reference Standard (Control 991)

## 文 献

- 1) Miho Iwata, Tatsuo Koide, Keiko Maekawa, Hiroyuki Saito, Tsuyoshi Tanimoto and Satoshi Okada: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 139-140 (2000)

## 国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品 (Control 021)

小出達夫・村上美保・森田有紀子・斎藤博幸・谷本 剛\*

## Paeoniflorin Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

Tatsuo Koide, Miho Murakami, Yukiko Morita, Hiroyuki Saito, and Tsuyoshi Tanimoto\*

The raw material of paeoniflorin was examined for the preparation of the "Paeoniflorin Reference Standard". The analytical data obtained were: UV spectrum,  $\lambda_{\max}$ , 231.9 nm; and specific absorbance ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) in methanol at 230 nm = 263.4; IR spectrum, specific absorptions of the raw material were consistent with those of the Paeoniflorin Reference Standard (Control 012); High-performance liquid chromatography (HPLC), several impurities were detected. The total amount of impurities was 0.86%.

Based on the above results, the candidate material was authorized as the Paeoniflorin Reference Standard (Control 021) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: paeoniflorin, quality evaluation, authorization, NIHS Reference Standard

第十四改正日本薬局方に記載されている「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 021)」（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): 258, 液体クロマトグラフ (HPLC) による純度試験: 純度 99.4%。

#### 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 012; 日局標準品と略称)<sup>1)</sup> を参照物質とした。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 LC-10AD 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 °C), その約 1 mg を精密に量り, 薄めたメタノール (1→2) に溶かして正確に 100 ml とし, 試料溶液とした。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, 200~300 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  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  を求めた。

##### 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 °C), 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, 打錠した。この臭化カリウム錠剤につき, 4000~400  $\text{cm}^{-1}$  の範囲で赤外吸収スペクトルを測定した。

##### 3) HPLC 法による純度試験

標準品原料約 2 mg を精密に量り, 移動相を加えて正確に 10 ml とし, 試料溶液とした。この液 1 ml を正確に量り, 移動相を加えて正確に 100 ml とし, 標準溶液とした。標準溶液 5 ml を正確に量り, 移動相を加えて正確に 100 ml とし, 希釈標準溶液とした。試料溶液, 標準溶液及び希釈標準溶液 20  $\mu\text{l}$  につき, 次の条件で HPLC 法により試験を行った。それぞれの液の各々のピ

\*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

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た。

#### 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 mmφ×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15分になるように調整した。  
 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以上のものを用いた。  
 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した。

#### 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した。

### 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231.9 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 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ （230 nm）は $263.4 \pm 4.5$ （ $n=3$ ）であった。

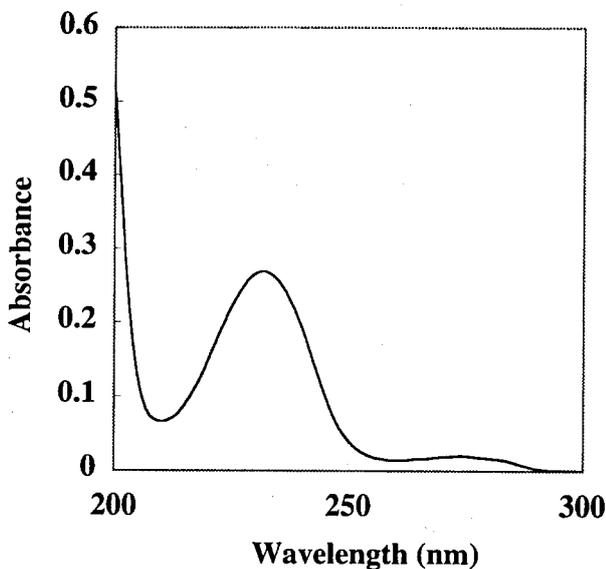


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Paeoniflorin Reference Standard

#### 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) 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 $0.86 \pm 0.03\%$ （ $n=3$ ）、日局標準品で0.16%（ $n=2$ ）と推定された。

#### 4) 水分

標準品原料のカールフィッシャー法による水分含量は $0.67 \pm 0.03\%$ （ $n=3$ ）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 012）を対照にその品質を比較検討した結果、

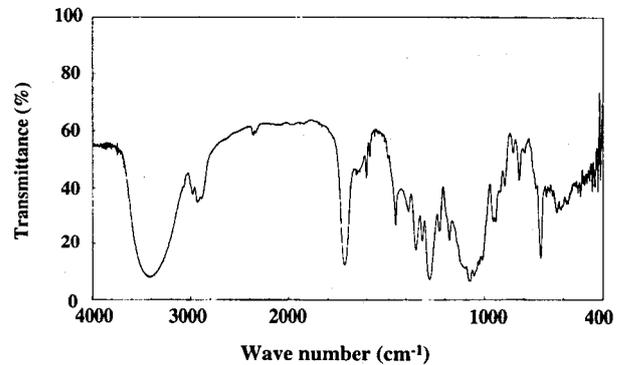


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Paeoniflorin Reference Standard

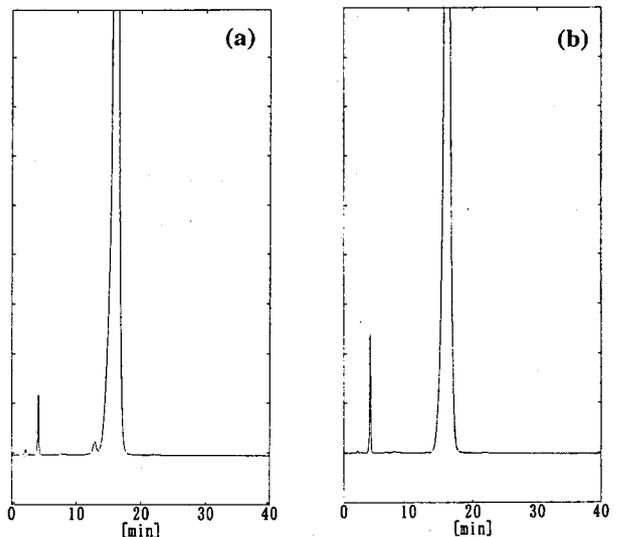


Fig.3 High-performance liquid chromatograms of the raw material (a) and Paeoniflorin Reference Standard (Control 012) (b)

両者の間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 021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.*, **120**, 124-127 (2002)

## 国立医薬品食品衛生研究所エストロン標準品 (Control 021)

村上美保・森田有紀子・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛\*

## Estrone Reference Standard (Control 021) of National Institute of Health Sciences

Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto\*

The raw material of estrone acetate was examined for the preparation of the "Estrone Reference Standard (Control 021)". The analytical data obtained were: UV spectrum,  $\lambda_{\max}$  of 281 nm and specific absorbance in ethanol at 281nm = 76.1; Melting point, 261.6 °C; IR spectrum, exhibited the specific absorptions at 3345, 2867, 1720, 1499 and 1055  $\text{cm}^{-1}$ ; thin-layer chromatography, 2 impurities were detected at 100 and 200  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities estimated to be less than 0.3 %.

Based on the above results, the raw material was authorized as Estrone Reference Standard (Control 021) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: estrone, quality evaluation, authorization, NIHS reference standard

エストロンの確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品“エストロン標準品 (Control 021)”を製造したので報告する。

#### 1. 標準品原料

標準品原料は三菱東京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： $[\alpha]_D^{20} = +164^\circ$ ，融点：263 °C，含量：99.5 %

#### 2. 試薬

試薬及び溶媒は特級品又は特級相当品を用いた。

#### 3. 装置

本標準品原料の品質試験にあたり、下記の装置を用いた。

自記分光光度計：島津製作所，UV2500PC

赤外分光光度計：日本分光，FT-IR VALOR-III

旋光度計：日本分光，

融点測定器：宮本理研，PA-30S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

特に記すもののほかは、第十四改正日本薬局方の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5.0 mgを正確に秤取り、無水エタノールを加えて正確に100 mlとする。

##### 2) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル60F<sub>254</sub> (厚さ，0.25mm)

展開溶媒：ベンゼン/酢酸エチル/アセトン混液 (16 : 3 : 1)

試料溶液の調製：標準品原料約5 mgを取り、アセトン1.0 mlを正確に加えて溶かし、試料原液とする。試料原液0.1 mlを取りアセトンを加えて正確に10 mlとし、試料溶液とする。

操作法及び検出法：試料原液20～40  $\mu\text{l}$  (エストロン100～200  $\mu\text{g}$ 相当量)及び試料溶液2～5  $\mu\text{l}$  (エストロン0.1～0.25  $\mu\text{g}$ 相当量)をシリカゲル薄層板にスポットし、約15 cm展開した後、風乾する。希硫酸を均等に噴霧し、110 °Cで15分間加熱した後、紫外線 (254 nm) 下で観察する。

##### 3) HPLC法による純度試験

標準品原料約0.010 gを正確に量り、メタノール20 mlに溶かし、試料原液とする。この液1 mlを取り、メタノールを加えて10 mlとし試料溶液とする。この液10 mlにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、全ピークの面積に対する相対面積百分率を求め

\*To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006  
Japan; Tel: 06-6941-1533; Fax: 06-6942-0716;  
E-mail: tanimoto@nihs.go.jp

る

操作条件

検出法：紫外吸光度計（波長：284 nm）  
 カラム：TSK-gel ODS-80Ts（4.6 mmφ×150 mm）  
 移動相：0.05 mol/lリン酸二水素カリウム溶液／アセトニトリル混液（1：1）  
 流量：エストロンの保持時間が約10分となるように調整する。  
 カラム温度：30℃付近の一定温度  
 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装置の分析パラメーターを設定する。  
 面積測定範囲：溶媒ピークの後、エストロンの保持時間の2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) 融点：261.6℃
- 3) 旋光度  
 標準品原料の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は $+164.9 \pm 0.8^\circ$  (n=3) (乾燥後, 0.15 g, ジオキサン, 15 ml, 100 mm) であった。
- 4) 紫外吸収スペクトル及び比吸光度  
 標準品原料のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長281 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 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (281 nm)は76.1であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルをFig.1に示す。

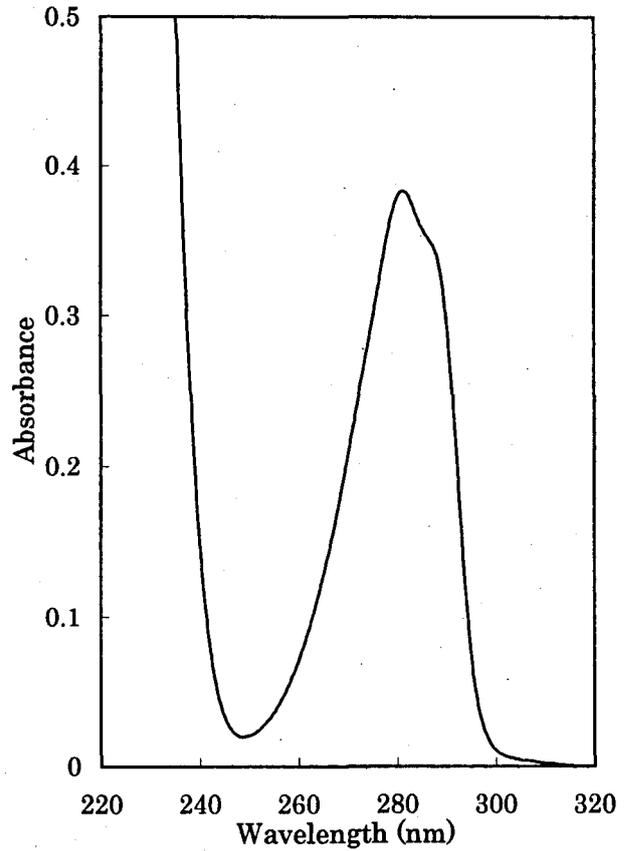


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Estrone Reference Standard

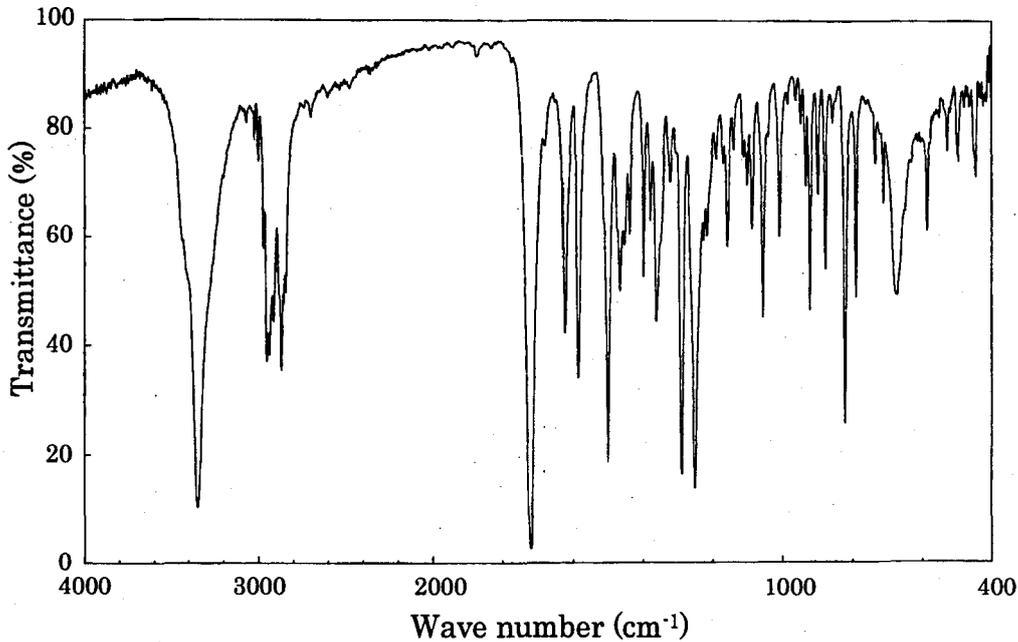


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Estrone Reference Standard

## 5) 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。3345, 2867, 1720, 1499 及び  $1055\text{ cm}^{-1}$  に特異吸収を認めた。

## 6) TLC法による純度試験

標準品原料について得られた薄層クロマトムを Fig.3 に示す。スポット量  $100\text{ }\mu\text{g}$  以上で2個の異種スポットを認めた。また、本品によるエストロンの検出限界は  $0.1\text{ }\mu\text{g}$  以下であった。

## 7) HPLC法による純度試験

標準品原料につき、HPLC法による純度試験で得られたクロマトグラムを Fig.4 に示す。2個の微量の不純物ピークが確認され、面積百分率法での不純物ピークの総

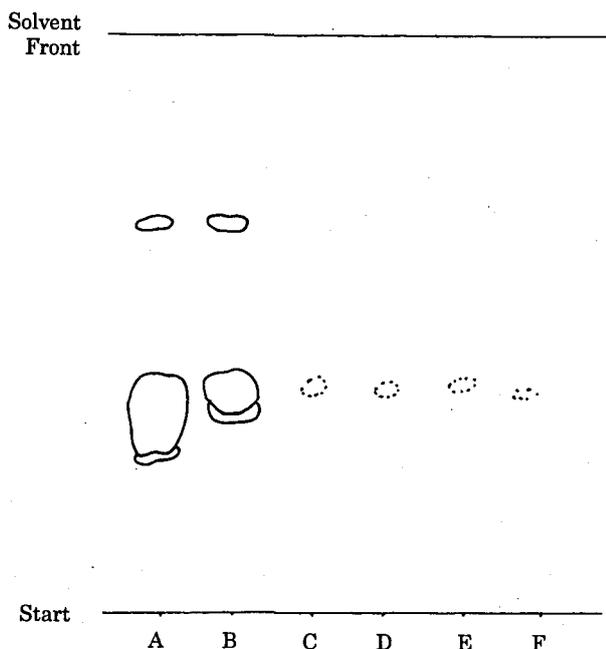


Fig.3 Thin-layer chromatogram of the raw material for Estrone Reference Standard  
Spot A to F are 200, 100, 0.25, 0.20, 0.15 and  $0.10\text{ }\mu\text{g}$  of the raw material

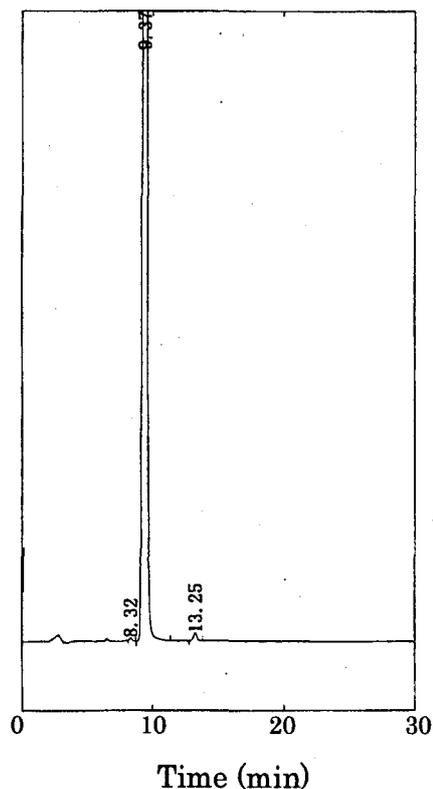


Fig.4 High-performance liquid chromatogram of the raw material for Estrone Reference Standard

和は、 $0.24 \pm 0.01\%$  ( $n=3$ ) と推定された。

## 8) 乾燥減量

本標準品原料の乾燥減量は  $0.02 \pm 0.02\%$  ( $n=3$ ) であった。

## 結 論

エストロン標準品原料につき、その品質を検討した結果、国立医薬品食品衛生研究所標準品として十分な品質を有するものと認定し、Control 021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レカルシフェロール標準品 (Control 031)

村上美保・森田有紀子・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛<sup>#</sup>

## Cholecalciferol Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>

The raw material of cholecalciferol was examined for the preparation of the "Cholecalciferol Reference Standard (Control 031)". The analytical data obtained were: melting point, 86.3 °C; UV spectrum,  $\lambda_{\max}$  of 264.6 nm and specific absorbance in ethanol at 265nm = 483.6; IR spectrum, same as that of the cholecalciferol Reference Standard (Control 003); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = 105.1^\circ$ ; thin-layer chromatography, one impurity was detected at 50  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities estimated to be less than 0.04 %.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Cholecalciferol Reference Standard (Control 031) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: cholecalciferol, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十四改正日本薬局方「コレカルシフェロール」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品「コレカルシフェロール標準品 (Control 031) (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

標準品原料は第一化成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。融点: 85.0 °C, 比吸光度:  $E_{1\text{cm}}^{1\%}(265\text{nm}) = 476.2$ , 旋光度:  $[\alpha]_D^{20} = +109.4^\circ$ , 含量: 99.3 %

## 2. 参照物質及び試薬

日本薬局方コレカルシフェロール標準品 (Control 003; 日局標準品)<sup>1)</sup>を参照物質とした。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。

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

融点測定器: 宮本理研工業, PA-30S型

液体クロマトグラフ装置: 島津製作所のLC-10AD型ポンプ, SPD-10AV型検出器, GL-サイエンスのModel 557型カラムオープン, ミリポア製のWatersTM717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「コレカルシフェロール」の試験法を準用した。

## 1) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板: メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル 60F<sub>254</sub> (厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒: シクロヘキサン/ジエチルエーテル混液 (1:1)

標準品原料及び日局標準品約 10 mg を精密に量り、それぞれにクロロホルム 1 ml を正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法: 試料溶液及び標準溶液の 5~10  $\mu\text{l}$  (コレカルシフェロール 50~100  $\mu\text{g}$  相当量) をシリカゲル薄層板に窒素ガスを吹き付けながらスポットし、暗所で約 15 cm 展開した後、風乾する。紫外線照射 (波長: 254 nm) 下で観察した後、薄層板に濃硫酸を均等に噴霧し、その後 100 °C で 5 分間加熱し、直ちに肉眼で観察する。

## 2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品約 5 mg ずつを精密に量り、

<sup>#</sup>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

それぞれをイソオクタン4 mlを正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液10  $\mu$ lにつき、次の条件で分析を行った。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

検出法：紫外吸光度計（波長：254 nm）

カラム：CHEMCOSORB 5si (4.0 mm $\phi$ ×150 mm)

移動相：n-ヘキサン/n-アミルアルコール (997:3)

流量：コレカルシフェロールの保持時間が約18分になるように調整する。

カラム温度：20℃付近の一定温度

カラムの選定：日局「コレカルシフェロール」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、得られる主ピーク的面積が検出されるように装置の分析パラメーターを設定する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、コレカルシフェロールの保持時間の2倍の範囲

## 5. 試験結果

- 1) 性状：白色の粉末でにおいはなかった。
- 2) 融点：86.3℃
- 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264.6 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 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (265 nm)は $483.6 \pm 3.8$  (n=3)であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルをFig.1に示す。

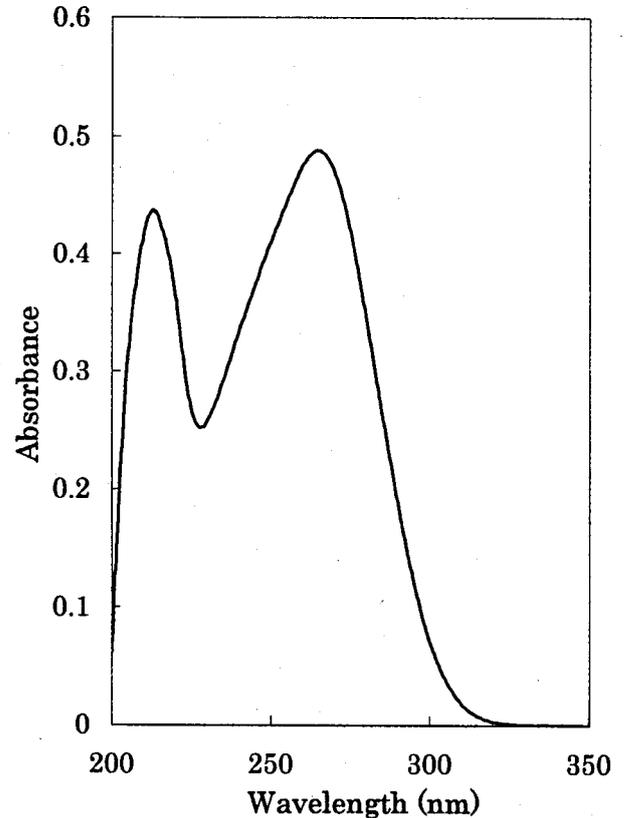


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

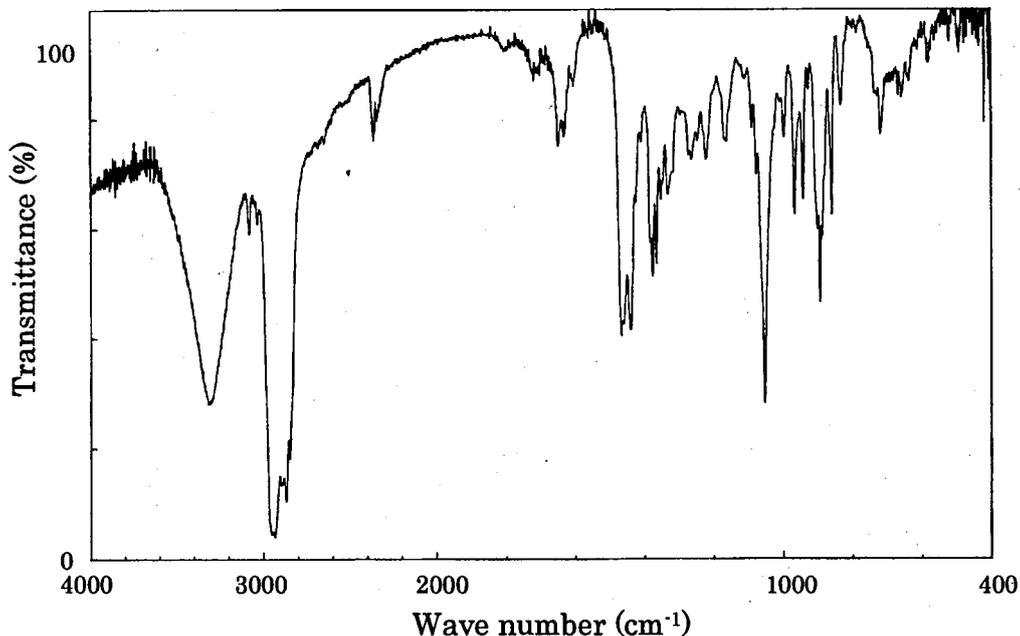


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Cholecalciferol Reference Standard

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) 旋光度

標準品原料の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は $+105.1 \pm 1.04^\circ$  (n=3) (0.1g, エタノール, 20 ml) であった。

6) TLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品について得られた薄層クロマトムを Fig.3 に示す。標準品原料及び日局標準品ともスポット量 50  $\mu\text{g}$  以上で1個の微量異種スポットを検出した。また、本品によるコレカルシフェロールの検出限界は紫外線照射下で0.06  $\mu\text{g}$ , 濃硫酸噴霧のもので0.1  $\mu\text{g}$

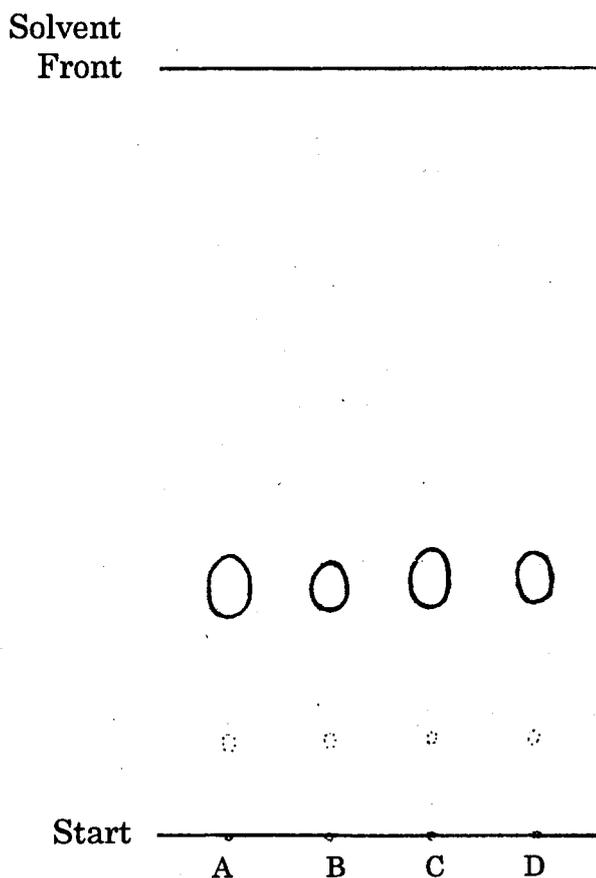


Fig.3 Thin-layer chromatogram of Cholecalciferol  
Spot: A and B are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of Cholecalciferol Reference Standard (Control 003)  
C and D are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of the raw material

であった。

7) 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.4 に示す。標準品原料で3~4個, 日局標準品で4個の微量の不純物ピークが観察された。面積百分率法での不純物ピークの総和は、標準品原料で $0.04 \pm 0.01\%$  (n=3), 日局標準品で $0.03 \pm 0.01\%$  (n=2) と推定された。

結論

コレカルシフェロール標準品原料につき、日局標準品 (Control 003) 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 031として製造・配布を開始した。

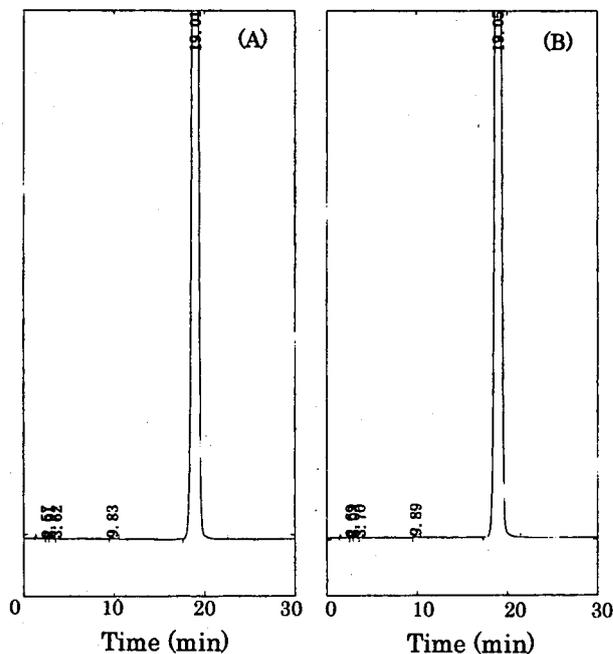


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Cholecalciferol Reference Standard (Control 003) (B)

文献

1) Iwata, M., Koide, T., Maekawa, K., Saito, H. and Tanimoto, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 107-109 (2001)

## 国立医薬品食品衛生研究所酢酸トコフェロール標準品 (Control 021)

村上美保・森田有紀子・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛<sup>#</sup>

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

Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>

The raw material of tocopherol acetate was examined for the preparation of the "Tocopherol Acetate Reference Standard (Control 021)". The analytical data obtained were: UV spectrum,  $\lambda_{\max}$  of 278.5 and 284.8 nm and specific absorbance in ethanol at 284nm = 42.9; IR spectrum, same as that of the Tocopherol Acetate Reference Standard (Control 001); thin-layer chromatography, no impurities were detected until 50  $\mu$ g; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities estimated to be less than 0.6 %.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Tocopherol Acetate Reference Standard (Control 021) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: tocopherol acetate, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十四改正日本薬局方「酢酸トコフェロール」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品「酢酸トコフェロール標準品 (Control 021) (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

標準品原料はエーザイ株式会社より入手した。同社において、分子蒸留法により精製され、褐色アンプル中に約0.15 gずつ小分け充填し、窒素置換した後、溶封されたものである。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  $\mu$ gまで他のスポットを認めない、液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験: 0.71 %, 比吸光度:  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  (284 nm) = 42.6, 定量 (HPLC): 99.78 %

### 2. 参照物質及び試薬

日本薬局方酢酸トコフェロール標準品 (Control 001; 日局標準品)<sup>1)</sup> 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。

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: 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「酢酸トコフェロール」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ッド薄層板シリカゲル60 (厚さ, 0.25 mm)

展開溶媒: トルエン

試料溶液及び標準溶液の調製: 標準品原料及び日局標準品約0.01 mgを取り、それぞれにヘキサン2.0 mlを正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法: 試料溶液及び標準溶液の2~10  $\mu$ lをシリカゲル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℃で15分間加熱し、直ちに白色光下で観察する。

#### 2) HPLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品約0.040 gずつを正確に量り、それぞれを無水エタノール5.0 mlに溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液10  $\mu$ lにつき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。それぞれの液の各々のピーク面積を自動積分法により測定し、

<sup>#</sup>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

全ピークの面積に対する相対面積百分率を求める。

操作条件

検出法：紫外吸光光度計（波長：284 nm）

カラム：ULTRON N-C18L（4.6 mmφ×150 mm）

移動相：メタノール／水混液（98：2）

流量：酢酸トコフェロールの保持時間が約10分になるように調整する。

カラム温度：35℃付近の一定温度

カラムの選定：日局「酢酸トコフェロール」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装置の分析パラメーターを設定する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、酢酸トコフェロールの保持時間の2倍の範囲

標準品原料の液膜法（NaCl板）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。

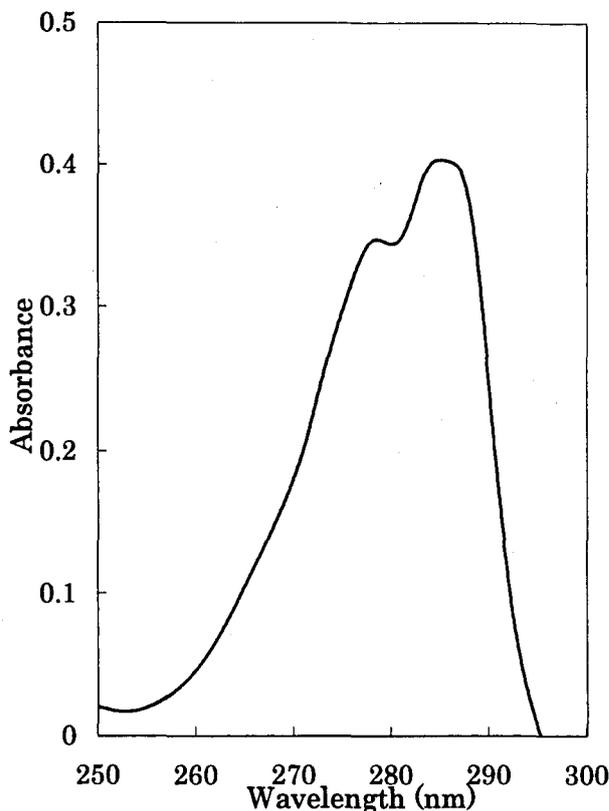


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Tocopherol Acetate Reference Standard

5. 試験結果

1) 性状：無色透明の粘性の液ではない。

2) 紫外吸収スペクトル

日局の方法で調整した標準品原料のエタノール溶液の紫外吸収スペクトルを測定するとき、波長278.5及び284.8 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  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  (284 nm) は42.9であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルをFig.1に示す。

3) 赤外吸収スペクトル

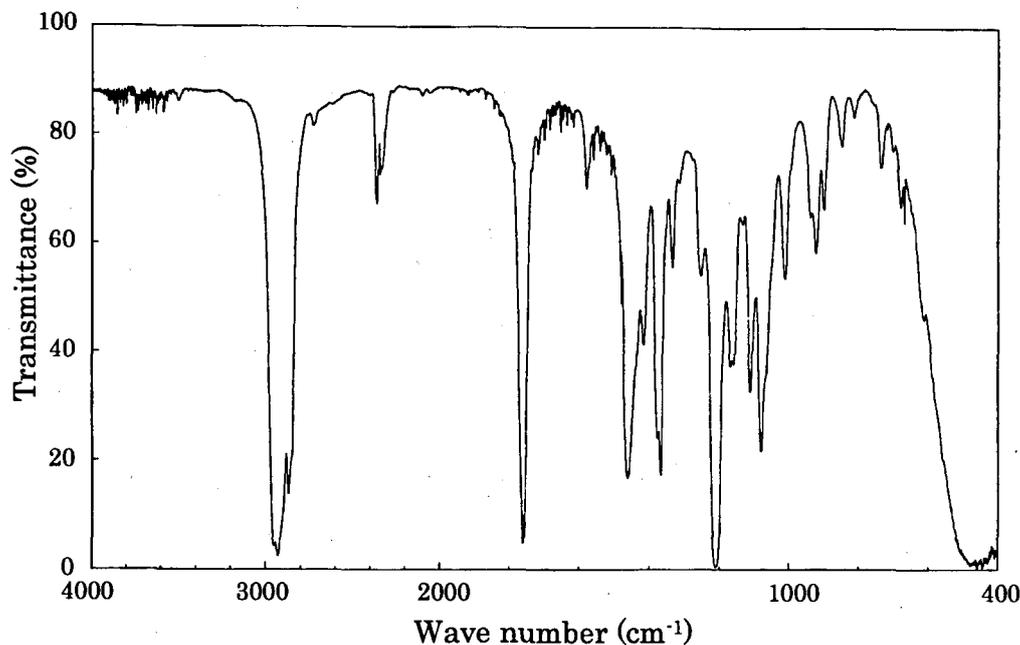


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Tocopherol Acetate Reference Standard

## 4) TLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品について得られた薄層クロマトムをFig.3に示す。標準品原料及び日局標準品ともスポット量50  $\mu\text{g}$ まで異種スポットは認められなかった。また、本品による酢酸トコフェロールの検出限界は0.15  $\mu\text{g}$ 以下であった。

## 5) HPLC法による純度試験

標準品原料及び日局標準品につき、HPLC法による純度試験で得られたクロマトグラムをFig.4に示す。標準品原料で2~3個、日局標準品で3個の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ピークの総和は、標準品原料で $0.55 \pm 0.01\%$  ( $n=3$ )、日局標準品で0.48%と推定された。

## 結 論

酢酸トコフェロール標準品原料につき、日局標準品(Control 001)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及び純度に差のないことを確認した。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 021として製造・配布を開始した。

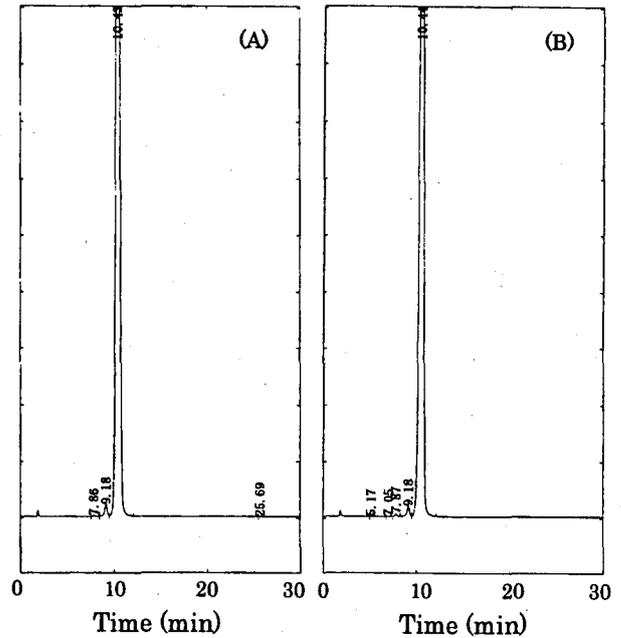


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Tocopherol Acetate Reference Standard (Control 001) (B)

## 文 献

- 1) Iwata, M., Koide, T., Maekawa, K., Saito, H. and Tanimoto, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **118**, 141-143 (2000)

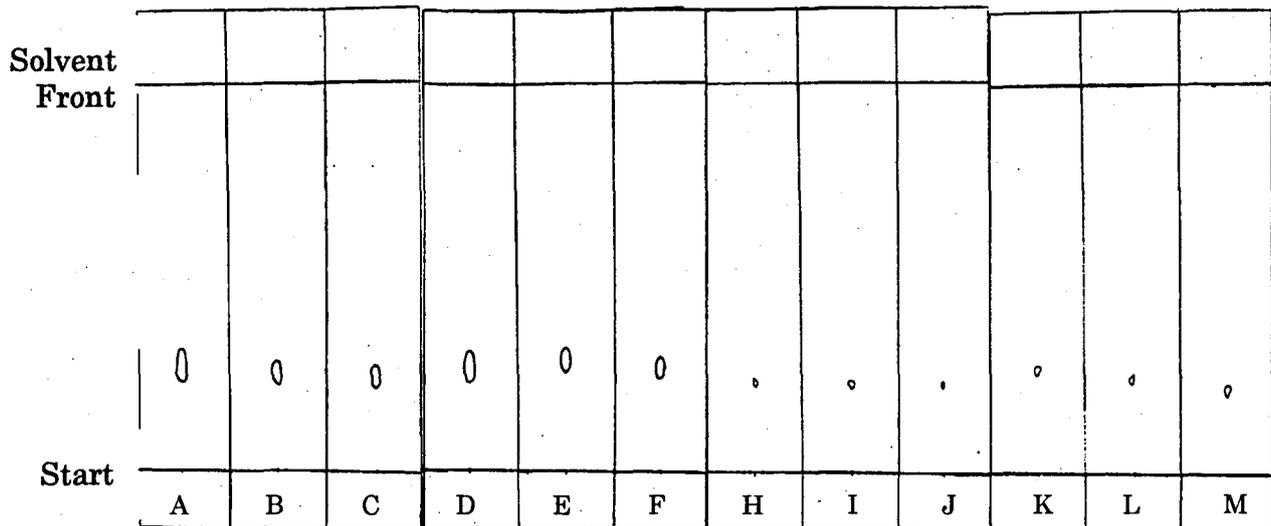


Fig.3 Thin-layer chromatograms of tocopherol acetate

Spot: A to C are 50, 25 and 15  $\mu\text{g}$  of Tocopherol Acetate Reference Standard (Control 001)

D to I are 50, 25, 15, 1.0, 0.5, 0.4, 0.25, 0.2 and 0.15  $\mu\text{g}$  of the raw material

## 国立医薬品食品衛生研究所エルゴカルシフェロール標準品 (Control 031)

村上美保・森田有紀子・小出達夫・斎藤博幸・谷本 剛\*

### Ergocalciferol Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Hiroyuki Saito and Tsuyoshi Tanimoto\*

The raw material of ergocalciferol was examined for the preparation of the "Ergocalciferol Reference Standard (Control 031)". The analytical data obtained were: melting point, 114.5 °C; UV spectrum,  $\lambda_{\max}$  of 264.8 nm and specific absorbance in ethanol at 265nm = 474.7; IR spectrum, same as that of the Ergocalciferol Reference Standard (Control 003); optical rotation,  $[\alpha]_D^{20} = +104.6^\circ$ ; thin-layer chromatography, two impurities were detected at 50  $\mu\text{g}$ ; high-performance liquid chromatography, total amount of impurities estimated to be less than 0.04 %.

Based on the above results, the raw material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Ergocalciferol Reference Standard (Control 031) of the National Institute of Health Sciences.

Key Words: ergocalciferol, quality evaluation, authorization, JP reference standard

第十四改正日本薬局方「エルゴカルシフェロール」の確認試験及び定量法に用いられる国立医薬品食品衛生研究所標準品「エルゴカルシフェロール標準品 (Control 031) (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

標準品原料は第一化成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。融点：116.5 °C，比吸光度：465.5，比旋光度： $[\alpha]_D^{20} = +105.7^\circ$ ，含量：99.2 %

#### 2. 参照物質及び試薬

日本薬局方エルゴカルシフェロール標準品 (Control 003；日局標準品)<sup>1)</sup>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。

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

融点測定器：宮本理研工業，PA-30S型

液体クロマトグラフ装置：島津製作所のLC-10AD型ポンプ，SPD-10AV型検出器，GL-サイエンスのModel 557型カラムオープン，ミリオア製のWaters<sup>TM</sup>717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「エルゴカルシフェロール」の試験法を準用した。

##### 1) 薄層クロマトグラフ (TLC) 法による純度試験

薄層板：メルク社製プレコートッド薄層板シリカゲル60F<sub>254</sub> (厚さ，0.25 mm)

展開溶媒：シクロヘキサン/ジエチルエーテル混液 (1：1)

標準品原料及び日局標準品約10 mgを精密に量り，それぞれにクロロホルム1 mlを正確に加えて溶かし，試料溶液及び標準溶液とする。

操作法及び検出法：試料溶液及び標準溶液の5～10  $\mu\text{l}$  (エルゴカルシフェロール50～100  $\mu\text{g}$ 相当量)をシリカゲル薄層板に窒素ガスを吹き付けながらスポットし，暗所で約15 cm展開した後，風乾する。紫外線照射 (波長：254 nm) 下で観察した後，薄層板に濃硫酸を均等に噴霧し，その後100 °Cで5分間加熱し，直ちに肉眼で観察する。

##### 2) 液体クロマトグラフ (HPLC) 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品約5 mgずつを精密に量り，

\*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

それぞれをイソオクタン4 mlを正確に加えて溶かし、試料溶液及び標準溶液とする。これらの液10  $\mu$ lにつき、次の条件で分析を行う。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、全ピーク的面積に対する相対面積百分率を求める。

#### 操作条件

検出法：紫外吸光度計（波長：254 nm）

カラム：CHEMCOSORB 5si (4.0 mm $\phi$ ×150 mm)

移動相：n-ヘキサン/n-アミルアルコール (997 : 3)

流量：エルゴカルシフェロールの保持時間が約16分になるように調整する。

カラム温度：20℃付近の一定温度

カラムの選定：日局「エルゴカルシフェロール」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、得られる主ピーク的面積が検出されるように装置の分析パラメーターを設定する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後、エルゴカルシフェロールの保持時間の2倍の範囲

## 5. 試験結果

- 1) 性状：白色の粉末ではない。
- 2) 融点：114.5℃
- 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264.8 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 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ (265 nm)は474.7であった。標準品原料の紫外吸収スペクトルをFig.1に示す。

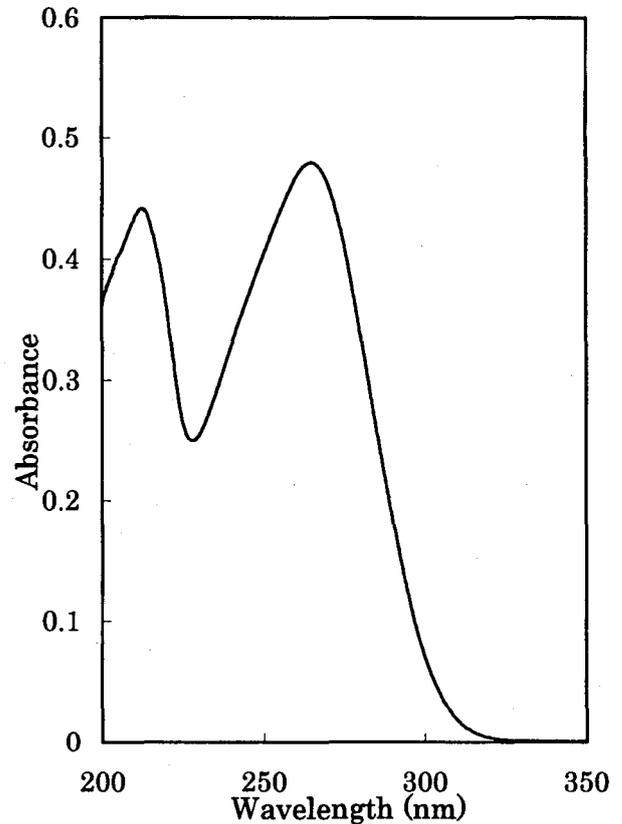


Fig.1 Ultraviolet absorption spectrum of the raw material for Ergocalciferol Reference Standard

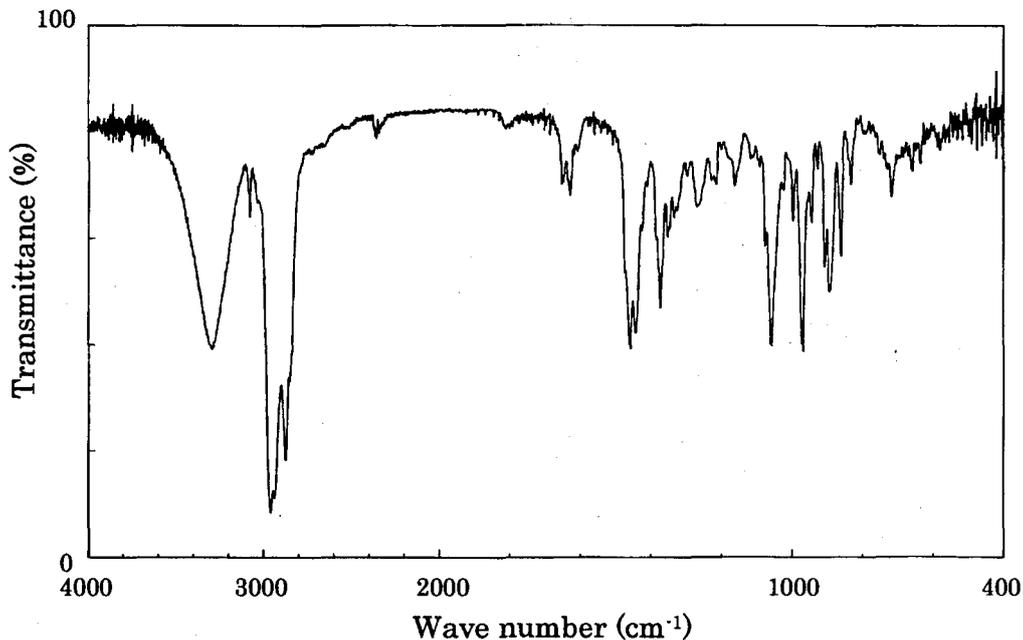


Fig.2 Infrared absorption spectrum of the raw material for Ergocalciferol Reference Standard

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) 旋光度

標準品原料の比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$ は $+104.6 \pm 0.51^\circ$  (n=3) (0.03 g, エタノール, 20 ml) であった。

6) TLC 法による純度試験

標準品原料及び日局標準品について得られた薄層クロマトムを Fig.3 に示す。標準品原料及び日局標準品ともスポット量  $50 \mu\text{g}$  以上で2個の微量異種スポットを検出した。なお、本品によるエルゴカルシフェロールの検出限界は紫外線照射下で  $0.06 \mu\text{g}$ 、濃硫酸噴霧のもので  $0.1$

Solvent  
Front

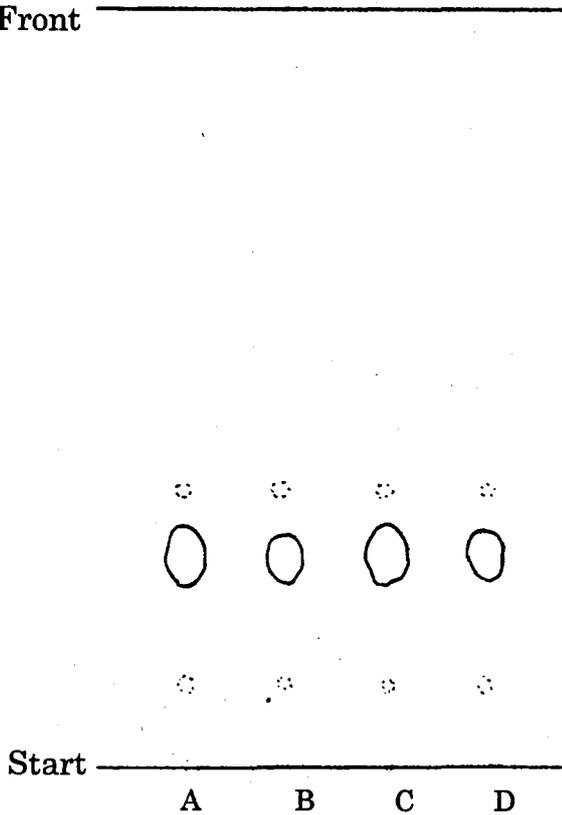


Fig.3 Thin-layer chromatogram of Ergocalciferol  
Spot: A and B are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of Ergocalciferol Reference Standard (Control 003)  
C and D are 100 and 50  $\mu\text{g}$  of the raw material

$\mu\text{g}$ であった。

7) 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.4 に示す。標準品原料で2~4個、日局標準品で4個の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ピークの総和は、標準品原料で  $0.4 \pm 0.01\%$  (n=3)、日局標準品で  $0.5 \pm 0.01\%$  (n=2) %と推定された。

結論

エルゴカルシフェロール標準品原料につき、日局標準品 (Control 003) 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 031として製造・配布を開始した。

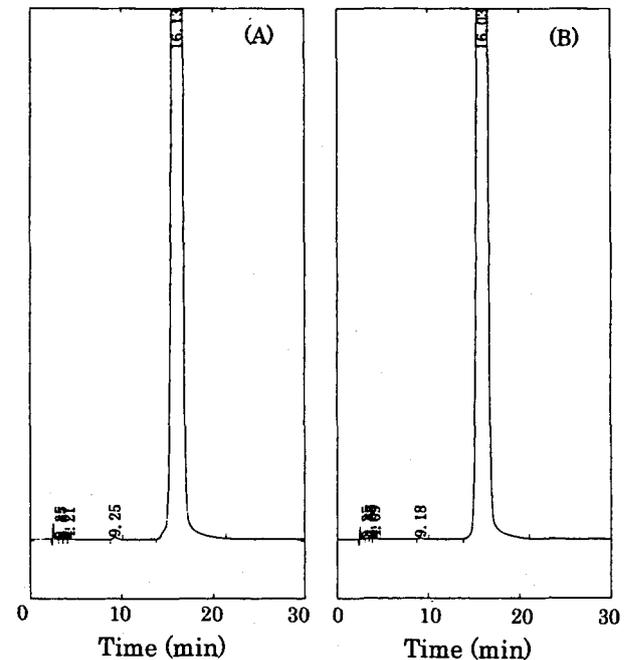


Fig.4 High-performance liquid chromatograms of the raw material (A) and Ergocalciferol Reference Standard (Control 003) (B)

文献

- 1) Maekawa, K., Iwata, M., Koide, T., Saito, H. and Tanimoto, T.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **119**, 101-103 (2001)

国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (Control)  
(日本薬局方トロンビン標準品) (Control 031)

開原亜樹子・村上美保・森田有紀子・小出達夫・村井敏美・斎藤博幸・谷本 剛\*

Thrombin Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Akiko Kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Toshimi Murai, Hiroyuki, Saito and Tsuyoshi Tanimoto\*

The "Thrombin Reference Standard (Control 031)", of National Institute of Health Sciences was prepared. The precision of filling into ampoule was about 11.5% as C.V. The content of  $\alpha$ -thrombin was about 89%. The thrombin potency of the standard material was assayed against the Thrombin Reference Standard (Control 961) according to the method of JP X IV and the potency was  $692 \pm 35$  units/ampoule. From the results, the potency of the proposed material for Thrombin Reference Standard was defined as 690 units per ampoule.

Key Words: thrombin, NIHS Reference Standard, potency

1962年に国立衛生試験所トロンビン標準品が新規に設定され、その後数次にわたるロット更新が行われてきたが、現行の標準品 (Control シリーズ) の在庫が僅少となったため、新ロットの標準品を製造することになった。以下、新ロット製造の結果を報告する。国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (日本薬局方トロンビン標準品) の新ロット (第3回標準品, Control 031) を製造したので、その試験成績を報告する。

## 実験方法

### 1. 標準品

トロンビン標準品用原料は、ウシの血液から得たプロトロンビンにカルシウムイオンの存在下でトロンボプラスチンを作用させて製したトロンビンを精製した後、トロンビン溶液690,000単位当たりウシ血清アルブミン1g及び乳糖10gを加え、1アンプル中にトロンビン約690単位ずつ分注し、凍結乾燥したものであり、持田製薬株式会社に依頼して調製した。

### 2. 充てん精度

標準品用原料の製造工程における充てん精度を知るために、10アンプルを用いて質量重量偏差試験及びたん白質含量の測定を行った。質量重量偏差試験は日局14質量重量偏差試験法に準じて試験した。たん白質量はウ

シ血清アルブミンを標準にしてLowry法<sup>1)</sup>で測定した。

### 3. ゲル電気泳動

Laemmliの方法<sup>2)</sup>に従って試料溶液を調製した。すなわち、標準品用原料1アンプルの内容物をサンプルバッファー0.5 mLに溶かし、沸騰水浴中で15分間加熱し、試料溶液とした。試料溶液1  $\mu$ Lを用いて、SDS-PAGE用12.5%ゲルで電気泳動した。泳動帯の量比は画像解析で算出した。

### 4. 力価測定法

標準品原料の力価は、第2回トロンビン標準品 (Control 961) を対照として、日局トロンビン定量法を一部改良した方法<sup>3)</sup>により試験した。

Table.1 Weight variation test and content of protein of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

Sample No.	Weight variation test (mg)	Content of protein (mg)
1	11.48	1.46
2	11.52	1.46
3	11.17	1.49
4	11.32	1.45
5	11.53	1.46
6	11.36	1.44
7	11.23	1.44
8	11.12	1.44
9	10.96	1.44
10	11.48	1.42
Mean $\pm$ S.D.	11.32 $\pm$ 0.19	1.45 $\pm$ 0.02
C.V.	1.71	1.30

\*To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; Hoenzaka 1-1-43 Hoenzaka, Chuo-ku, Osaka 540-0006, Japan; Tel:06-6941-4419; Fax:06-6942-0716; E-mail:tanimoto@nihs.go.jp

結果とまとめ

標準品用原料の質量重量偏差試験及びたん白質量の試験結果はそれぞれ  $11.32 \pm 0.19$  mg (CV: 1.71%) 及び  $1.45 \pm 0.02$  mg (CV: 1.30%) であり、製造工程での充てん量はよく管理されていた (Table.1)。トロンビンは製造工程中に自己消化によって一部低分子化するが、本標準品用原料の低分子化生成物 ( $\beta$ -トロンビン) の電気泳動で求めた含量は約 11% であった (Fig.1)。26 回の繰り返し測定で得られた標準品用原料 1 アンプルの

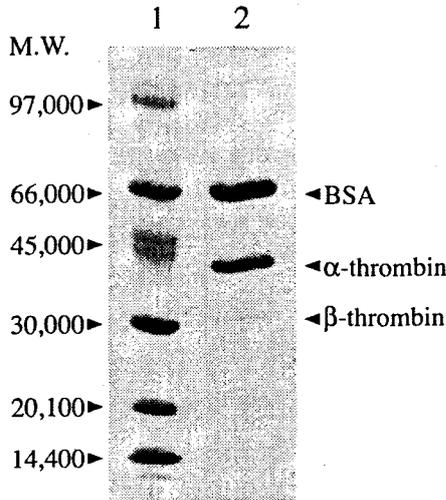


Fig.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

1: Standard proteins for molecular weight markers: phosphorylase b (M.W.: 97,000), bovine serum albumin (M.W.: 66,000), ovalbumin (M.W.: 45,000), carbonic anhydrase (M.W.: 30,000), trypsin inhibitor (M.W.: 20,100),  $\alpha$ -lactalbumin (M.W.: 14,400)  
 2: Sample (ca. 1 mg of thrombin/mL)

Table.2 Potency of the material prepared for "Thrombin Reference Standard"

Exp.No.	Potency (unit/ampoule)	Exp.No.	Potency (unit/ampoule)
1	670	14	758
2	682	15	708
3	713	16	717
4	678	17	694
5	647	18	690
6	659	19	698
7	642	20	692
8	618	21	689
9	700	22	694
10	700	23	696
11	708	24	692
12	667	25	692
13	797	26	691
Mean $\pm$ S.D.		692.1 $\pm$ 34.5	

平均含有力価は  $692.1 \pm 34.5$  単位であった (Table.2)。

以上の結果から、本標準品原料は 1 アンプル中に 690 単位のトロンビンを含むものと認定し、国立医薬品食品衛生研究所トロンビン標準品 (日本薬局方標準品) (Control 031) (日本薬局方標準品) として配布することにした。

文 献

- 1) Lowry, O.H., Rowebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 2) Laemmli, U.K.: *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 3) Tanimoto, T., Yokota, I., Hayakawa, T.: *Iyakuhiin Kenkyu*, **25**, 988 (1994)

国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品  
(日本薬局方塩化リゾチーム標準品) (Control 031)

開原亜樹子・村上美保・森田有紀子・小出達夫・村井敏美・斎藤博幸・谷本 剛<sup>#</sup>

Lysozyme Reference Standard (Control 031) of National Institute of Health Sciences

Akiko Kaihara, Miho Murakami, Yukiko Morita, Tatsuo Koide, Toshimi Murai, Hiroyuki, Saito, and Tsuyoshi Tanimoto<sup>#</sup>

The "Lysozyme Reference Standard (Control 951031)" of the National Institute of Health Sciences was prepared. The lysozyme potency of the standard material was assayed against the Lysozyme Reference Standard (Control 951) by turbidimetric method two turbidimetric methods using the dried ycells of *Micrococcus luteus* as a substrate. The potency of the standard material was in satisfactory agreement with that of Lysozyme Reference Standard (Control 951) and was defined as 1 mg [potency] per mg.

Key Words: lysozyme, Lysozyme Reference Standard, NIHS Reference Standard

国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品の新ロット (第14回標準品, Control 031) を製造したので, その試験成績を報告する.

## 1. 標準品原料

リゾチーム標準品原料として, 6回再結晶したニワトリ卵白リゾチームを生化学工業株式会社より購入した.

## 2. 試験方法

### 2.1 力価

標準品原料の力価を第13回リゾチーム標準品 (Control 951)<sup>1)</sup> を対照として, 第十四改正日本薬局方日局第一追補に記載された塩化リゾチームの定量法により試験を行った.

### 2.2 アミノ酸

試料を6 mol/L塩酸試液 (1%フェノール含有) 及び4 mol/Lメタンサルホン酸溶液 (0.2%トリプタミン含有) でそれぞれ18, 24, 30, 48時間, 加水分解した. 加水分解条件については, 加水分解溶液を蒸発乾固し, 残留物を0.05 mol/L塩酸試液に溶かし, L-8500型日立高速アミノ酸分析計で分析した.

### 2.3 SDS-ゲル電気泳動

ファルマシア社製の全自動ゲル電気泳動装置 (Phast System) を用いてSDS-ゲル電気泳動を行った. ゲルは本装置専用の既製ゲル (20%ポリアクリルアミドゲル) を用いた. 標準品原料の適当量を量り, 水に溶解し, 1 mL当たりそれぞれ125, 250, 500, 1000, 2000  $\mu\text{g}$  を含む液を調製し, それぞれの液20  $\mu\text{L}$  に10% SDS溶液20  $\mu\text{L}$  を加えて沸騰水浴中で5分間加熱し, 試料溶液とした.

### 2.4 乾燥減量

第十四改正日本薬局方第一追補に記載された塩化リゾチームの規格に従い, 標準品原料の約0.1 gを精密に量り, 105  $^{\circ}\text{C}$  で2時間乾燥した.

## 3. 試験の結果

### 3.1 力価

20回の繰り返し測定によって求めた試料1 mg中のリゾチーム量 [mg(力価)] は,  $1.003 \pm 0.041$  mg(力価) であった (Table.1). この結果より, 標準品原料の1 mgは1 mg(力価) のリゾチームを含有することが示された.

### 3.2 アミノ酸組成

標準品原料のアミノ酸分析の結果を理論値及びリゾチーム標準品 (Control 951) の測定結果とともにTable.2に示した. スレオニン及びセリンは塩酸加水分解の測定結果を0時に外挿して組成比も求め, トリプトファンの

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed:

Tsuyoshi Tanimoto; 1-1-43 Hoenzaka 1-1-43, Chuo-ku, Osaka  
540-0006, Japan; Tel:06-6941-4419; Fax:06-6942-0716;  
E-mail:tanimoto@nihs.go.jp

Table.1 Potency of the material for Lysozyme Reference Standard

Exp. No.	Potency [mg (potency)/mg]	Exp. No.	Potency [mg (potency)/mg]
1	0.965	11	0.948
2	0.971	12	0.979
3	0.995	13	1.010
4	0.927	14	1.039
5	1.001	15	1.113
6	0.980	16	1.005
7	1.018	17	1.018
8	1.015	18	0.983
9	0.998	19	1.008
10	1.076	20	1.010
Mean ± S.D.		1.003 ± 0.041	

Table.2 Amino acid composition of the material for Lysozyme Reference Standard

Amino Acid	Amino acid residues per mole of lysozyme		
	Material	Standard (Control 951)	Theoretical value <sup>2)</sup>
Asp	20.9	20.6	21
Thr	6.9	6.4	7
Ser	9.7	7.7	10
Glu	5.1	4.9	5
Pro	1.9	1.8	2
Gly	12.4	12.1	12
Ala	12.4	12.1	12
1/2Cys	3.8	2.0	8
Val	5.9	5.9	6
Met	2.0	2.0	2
Ile	5.8	5.8	6
Leu	8.1	8.1	8
Tyr	3.0	3.0	3
Phe	3.0	3.0	3
Lys	6.0	6.1	6
His	1.4	0.9	1
Trp	5.5	—	6
Arg	11.3	11.1	11

組成比はメタンスルホン酸加水分解で求めた。標準品原料のアミノ酸組成は、半シスチンを除いて文献値<sup>2)</sup>とよく一致しており、リゾチーム標準品 (Control 951) のそれともよく一致していた。

### 3.3 電気泳動的純度

試験方法に記した試料溶液の1 μLをPhast Systemで電

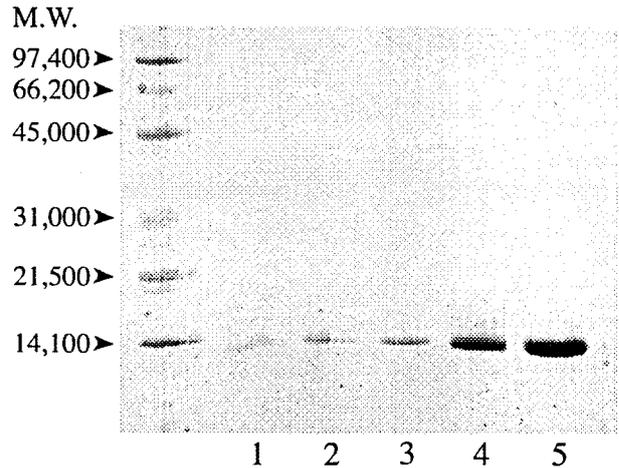


Fig.1 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the standard material 20% acrylamide gel (Homogenius 20, Pharmacia) was used. Applied amounts (ng) of the material were as follows; lane 1: 62.5 ng, lane 2: 125 ng, lane 3: 250 ng, lane 4: 500 ng, lane 5: 1000 ng. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

気泳動し、その結果をFig.1に示した。すべてのレーンにおいて単一のバンドが認められ、標準品原料は分子量的に均一な標品であることが示された。

### 3.4 乾燥減量

標準品原料の乾燥減量は3.72% (S.D.: ±0.05%, n=3)であった。また、同時に測定したリゾチーム標準品 (Control 951) の乾燥減量は5.87% (S.D.: ±0.25%, n=3)であった。

### まとめ

国立医薬品食品衛生研究所第14回塩化リゾチーム標準品 (日本薬局方塩化リゾチーム標準品) を製造するにあたり、標準品原料の力価を現行のリゾチーム標準品 (Control 951) を対照として測定したところ、標準品原料の1 mgは1.003 ± 0.041 mgであった。標準品原料は電気泳動的に均一であり、そのアミノ酸組成は理論値とよく一致し、リゾチーム標準品 (Control 951) のアミノ酸組成とも差がなかった。これらの結果から、本標準品原料を国立医薬品食品衛生研究所塩化リゾチーム標準品 (日本薬局方塩化リゾチーム標準品) (Control 031) とし、その1 mgはリゾチーム1 mg (力価) を含有するものと定めた。

### 文 献

- 1) Kitajima, A., Tagashira, Y., Maekawa, K., Tanimoto, T. and Okada, S.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **114**, 128-129 (1996)
- 2) R.E. Canfield: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2691 (1963)

## 薄層クロマトグラフ用色素標準品フラビアン酸について

辻 澄子<sup>#</sup>・古川みづき・中野真希・外海泰秀

## Studies on Flavianic Acids as Color Reference Standard for Thin-layer Chromatography

Sumiko Tsuji<sup>#</sup>, Mizuki Furukawa, Maki Nakano and Yasuhide Tonogai

Various flavianic acids were prepared and examined for the preparation for color reference standard for thin-layer chromatography (TLC). Their analytical data were: IR spectra, their specific absorptions were same; no impurities were detected; specific odor-free. It was clear that the prepared flavianic acids were useable as color reference standards for TLC.

Key Words: flavianic acid, color reference standard, thin-layer chromatography

化粧品など医薬部外品に用いるタール色素<sup>1)</sup>の確認試験として薄層クロマトグラフ (TLC) を用いる方法が日本化粧品工業連合会技術資料で提示され<sup>2)</sup>, それを基に省令改正案が議論されている。それらのTLC法の大半にフラビアン酸標準品を用いている。一方, フラビアン酸は2,4-ジニトロ-1-ナフトール-7-スルホン酸 (CAS No. 483-84-1) であり, そのナトリウム塩が黄色403号の(1) (ナフトールイエローS; C.I.10316, CAS No. 846-70-8) である。したがって, フラビアン酸標準品の調製にはナフトールイエローS国立衛生試験所 (現国立医薬品食品衛生研究所) 標準品を使用することが規定されている。今回はフラビアン酸調製原料として使用する場合において, ナフトールイエローS標準品だけでなく, 市販試薬などを用いて調製したフラビアン酸について品質を比較検討した結果, 若干の知見が得られたので報告する。

## 実験方法

## 1. 試薬及び溶媒

ナフトールイエローS標準品は国立医薬品食品衛生研究所標準品を, ナフトールイエローS試薬は和光純薬工業(株)製を, フラビアン酸試薬は東京化成(株)製の2水和物を用いた。その他の試薬及び溶媒はJIS試薬特級品を用いた。

## 2. フラビアン酸の調製

## 2.1 ナフトールイエローSからの調製

省令案に従ってフラビアン酸標準品 (F-St) を調製した。すなわち, ナフトールイエローS標準品100 mgに水2 mlを加え, 溶かした後, 塩酸50 mlを加え, 攪拌後約5℃にて約1時間放置した。析出した結晶をろ取し, これに水0.5 mlを加え約80℃の水浴上で加温溶解した後, 放置して室温に戻した後, 約5℃にて1時間放置し再結晶した。析出した結晶をろ取し, 風乾した後, デシケータ (減圧, シリカゲル) で2時間乾燥したものをを用いた。更に, ナフトールイエローS試薬10 gを, 省令案に準じてフラビアン酸を調製した (F-I)。

## 2.2 フラビアン酸からの調製

フラビアン酸試薬500 mgに水0.5 mlを加え, 約80℃の水浴上で加温溶解した後, 放置して室温に戻し, 約5℃にて1時間放置して再結晶した。析出した結晶をろ取し, 風乾した後, デシケータ (減圧, シリカゲル) で2時間乾燥したものをを用いた (F-II)。別にフラビアン酸試薬をデシケータ (減圧, シリカゲル) で2時間乾燥したものをを用いた (F-III)。

## 3. TLC

試料の水溶液 (1→1000) を試験溶液とした。試験溶液2 mlについて, 1-ブタノール, エタノール (95%) 及びアンモニア試液 (希) の混液 (6/2/3) を展開溶媒としてMerck製シリカゲル薄層板 (Merck 1.05724; Silica gel 60, ガラス製1.8×100×200 mm) を用いてTLCを行った。

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji;  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan;  
Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: tsuji@nihs.go.jp.

#### 4. 赤外吸収 (IR) スペクトル測定

日本分光(株)製赤外分光光度計 FT-IR 装置 JASCO FT-IR VALOR-III を用いて、KBr (錠剤) 法で試料の IR スペクトルを測定した。

#### 5. 融点測定

宮本理研工業(株)製融点測定器 PA-30S (薬局方準拠) を用いて融点を測定した。

### 結果及び考察

#### 1. フラビアン酸の分析結果

種々のフラビアン酸についての分析結果を Table.1 に示した。F-III のみ特異な臭いを持ち、他は臭わなかった。一方、F-St 及び F-I は融点が存在しなく徐々に分解していったが、F-II 及び III は融点が存在した。Merck Index, 9th ed.<sup>3)</sup> では、フラビアン酸は結晶水3分子を含んでいるため、100℃での融解を示し、再度結晶化して融点が存在することを明記されている。しかし、調製したフラビアン酸などはいずれも乾燥したものであり、結晶状ではなく、無水物であると考えられ、100℃での融

Table.1 Analytical data of various flavianic acids

Sample	Description	Melting point	Assay <sup>a)</sup>	pH (1% test solution)
F-St	Yellow needles and no odor	Did not melt and began to decompose about 170 °C	---- <sup>b)</sup>	----
F-I	Yellow needles and no odor	Did not melt and began to decompose about 170 °C	88.8%	2.38
F-II	Yellow needles and no odor	Melted between 142-147 °C and decomposed about 151 °C	----	----
F-III	Light-yellow needles and specific odor	Melted between 140-146 °C and decomposed about 150 °C	89.2%	1.75
Naphthol Yellow S Reagent	Yellow	-----	82.4%	9.74

<sup>a)</sup> The content of flavianic acid and naphthol yellow S in the samples were determined by the titanium trichloride method described in the Low<sup>1)</sup>

<sup>b)</sup> Not determined

解は存在しなかった。なお、試料量の多い F-I 及び F-III について、省令に記載しているナフトールイエロー S の三塩化チタン法による定量法<sup>1)</sup> を準用して行ったところ、いずれも 89% であった。

#### 2. IR

種々のフラビアン酸の IR スペクトルを KBr (錠剤) 法で測定した。Fig.1 に F-St の IR スペクトルを示したが、他のフラビアン酸 (F-I, II 及び III) の特異指紋領域と一致していた。しかし、ナトリウム塩であるナフトー

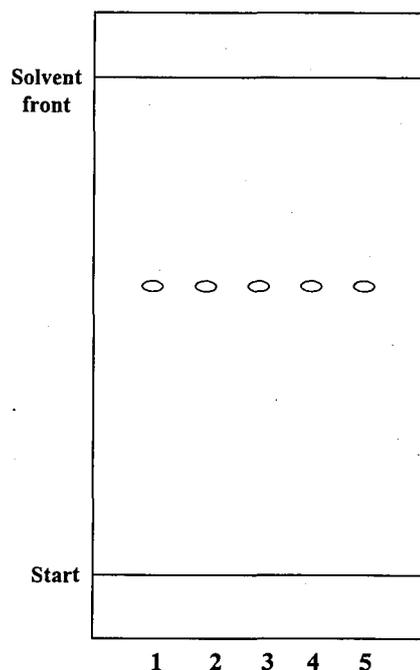


Fig.2 TLCs of various flavianic acid preparations

1: F-St, 2: F-I, 3: F-II, 4: F-III; see a footnote in Table 1. 5: Naphthol Yellow S NIHS Reference Standard

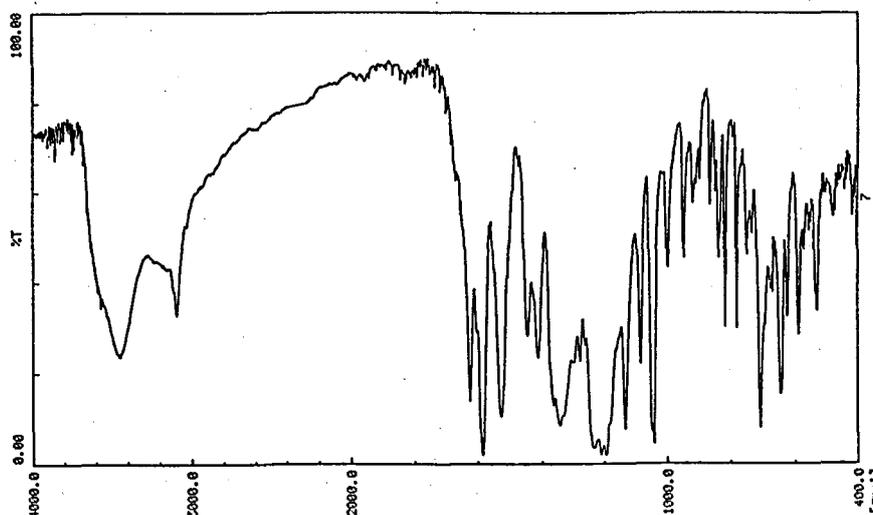


Fig. 1. IR spectrum of F-St (KBr Tablet)

F-St: see a footnote in Table.1.

ルイエローSの指紋領域<sup>4,5)</sup>とは類似していたが、パターンは若干異なっていた。

### 3. TLC

種々のフラビアン酸のTLCを行い、その結果をFig.2に示した。いずれのフラビアン酸もRf 0.6付近にスポットが得られた。また、ナフトールイエローS標準品についても、Rf 0.6付近にスポットが得られた。それらの10倍の濃度の溶液においても、F-Ⅲ以外他のスポットは得られなかった。したがって、試薬自身以外の調製フラビアン酸 (F-St, F-I 及び F-II) は全てTLC用標準品として使用可能であることが明らかになった。

### 文 献

- 1) 医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令：厚生省令第30号 (昭和41年8月31日)，改正：厚生省令第127号 (平成12年10月20日)
- 2) Color Technical Committee of Japan Cosmetic Industry Association: *Technical Report of Japan Cosmetic Industry Association*, 101-122 (1993)
- 3) "Merck Index" 9th ed., Merck & Co., Inc., U.S.A., pp. 531-532 (1976)
- 4) Fujii, S., Kamikura, M., and Oka, N. : *Eisei Shikennjyo Hokoku*, 83, 72-74 (1965)
- 5) "Hotei Shikiso Hand Book", eds., by Japan Cosmetic Industry Association, Yakuji Nippo Lim., Tokyo, pp.218-220 (1988)

## 8種の薄層クロマトグラフ用色素標準品について

辻 澄子<sup>#</sup>・古川みづき・中野真希・外海泰秀

## Studies on Eight Color Reference Standards for Thin-layer Chromatography

Sumiko Tsuji<sup>#</sup>, Mizuki Furukawa, Maki Nakano and Yasuhide Tonogai

Eight color NIHS reference standards were studied on IR spectra and thin-layer chromatography (TLC). Their IR spectra and TLCs were determined. They were also authorized as reference standards for TLC.

Key Words: color reference standard, thin layer chromatography, IR

化粧品など医薬品部外品に用いるタール色素<sup>1)</sup>の確認試験として薄層クロマトグラフ (TLC) を用いる方法が省令改正案で提示された<sup>2,3)</sup>。そのTLC用標準品としては多くは国立医薬品食品衛生研究所色素標準品を用いることが規定している。一方、アマランス (C.I. 16185, CAS No. 915-67-3), オイルイエロー AB (イエロー AB; C.I. 11380, CAS No. 85-84-7), オイルイエロー OB (イエロー OB, C.I. 11390, CAS No. 131-79-3), オイルレッドXO (C.I. 12140, CAS No. 3118-97-6), トルイジンレッド (C.I. 12120, CAS No. 2425-85-6), パーマネントオレンジ (C.I. 12075, CAS No. 3468-63-1), ハンサイエロー (C.I. 11680, CAS No. 2512-29-0), ポ

ンソーSX (C.I. 14700, CAS No. 4548-53-2) の8種の色素標準品は、定量値のみ添付資料に明記されているが、それらのIRスペクトル及びTLCについては報告されていない。そこで、今回、それらのIRスペクトル及びTLCを測定したので報告する。

## 実験方法

## 1. 試薬及び溶媒

アマランス標準品, イエロー AB 標準品, イエロー OB 標準品, オイルレッドXO 標準品, トルイジンレッド標準品, パーマネントオレンジ標準品, ハンサイエロー標準品, ポンソーSX標準品は国立医薬品食品衛生研

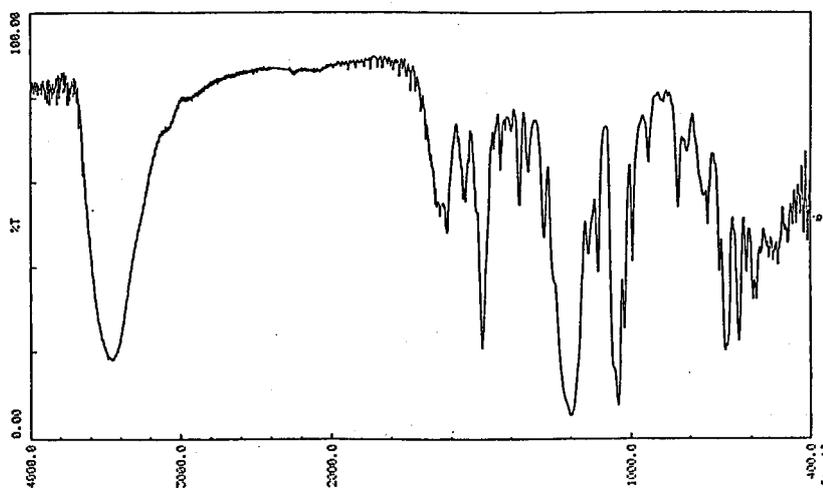


Fig.1 IR spectrum of Amaranth NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

<sup>#</sup>To whom correspondence should be addressed: Sumiko Tsuji;  
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan;  
Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3707-6950;  
E-mail: tsuji@nihs.go.jp

究所標準品を用いた。その他の試薬及び溶媒はJIS試薬特級品を用いた。

## 2. TLC

試料の試験溶液2 mlについて、各展開溶媒で、Merck

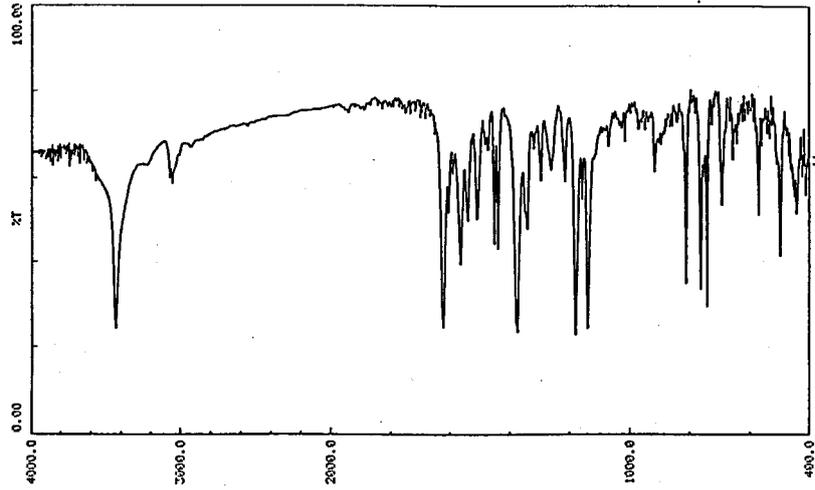


Fig.2 IR spectrum of Oil Yellow AB NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

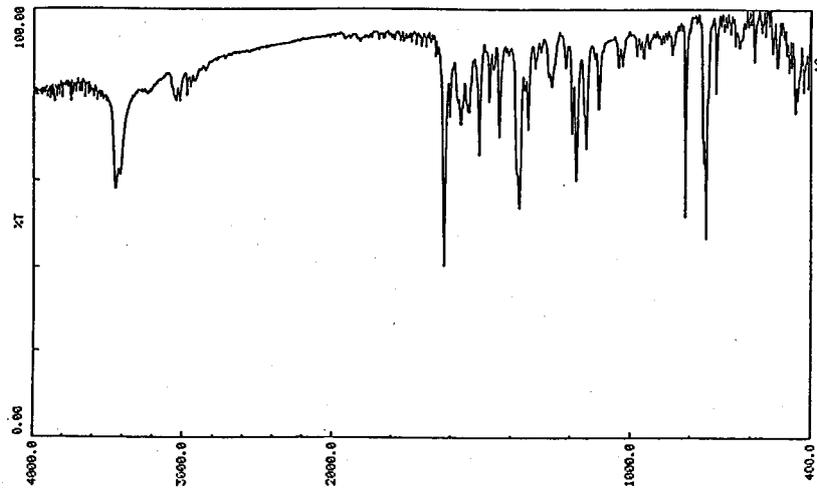


Fig.3 IR spectrum of Oil Yellow OB NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

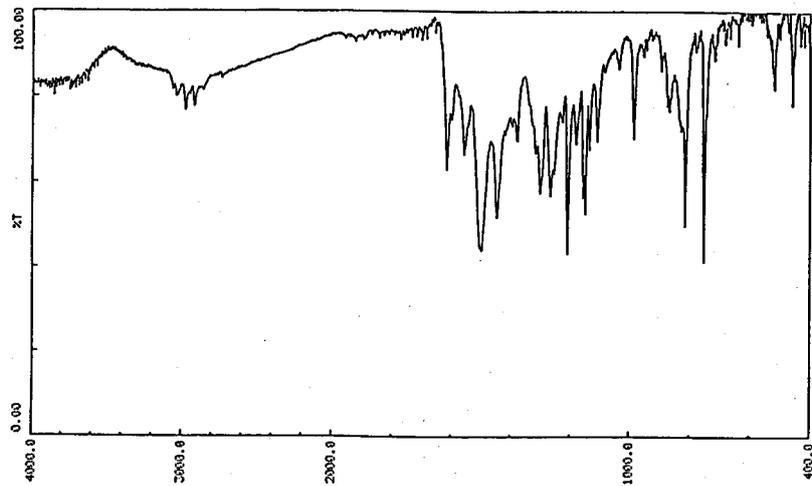


Fig.4 IR spectrum of Oil Red XO (KBr Tablet)

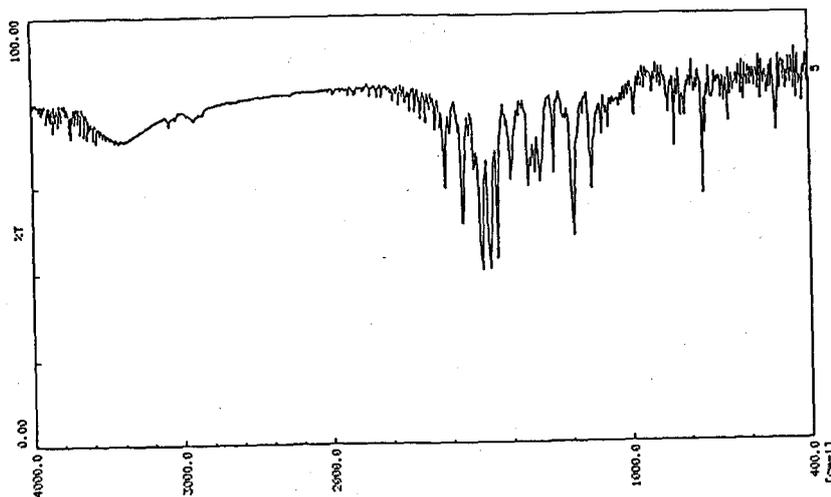


Fig.5 IR spectrum of Toluidine Red NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

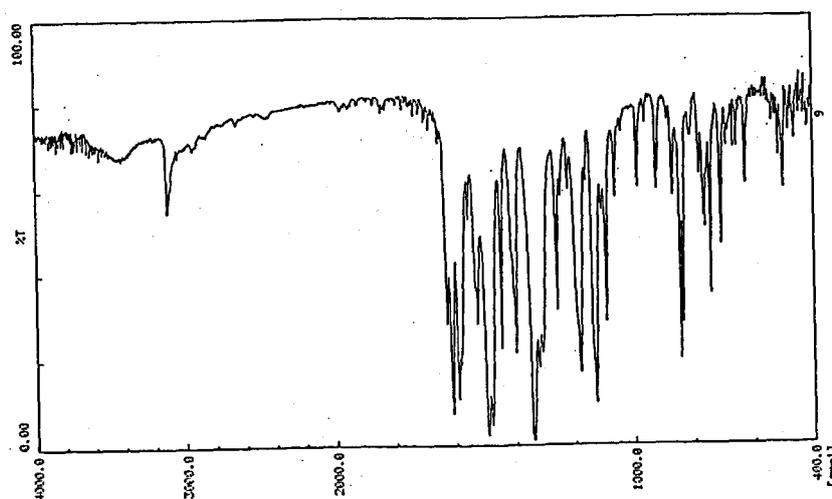


Fig.6 IR spectrum of Permanent Orange NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

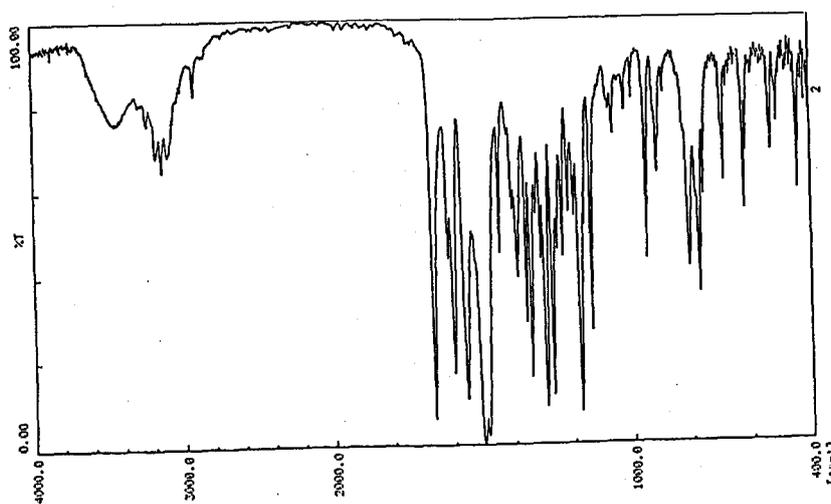


Fig.7 IR spectrum of Hanza Yellow NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

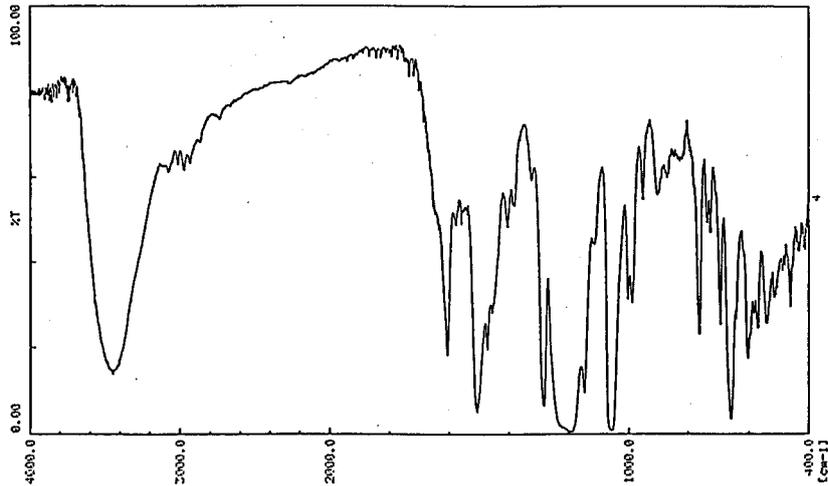


Fig.8 IR spectrum of Ponceau SX NIHS Reference Standard (KBr Tablet)

製シリカゲル薄層板 (Merck 1.05724; Silica gel 60, ガラス製 $1.8 \times 100 \times 200$  mm) Merck製シリカゲル薄層板 (ガラス製 $50 \times 200$  mm) を用いてTLCを行った。TLC条件については、試料の希釈溶媒及び濃度を ( ) に、展開溶媒はその後を示したものをを用いた。

アマランス (水, 0.1%) : 1-ブタノール, エタノール (95%) 及び酢酸 (3→100) の混液 (6 : 2 : 3); イエローAB及びイエローOB (クロロホルム, 0.1%) : 3-メチル-1-ブタノール, アセトン, 酢酸及び水の混液 (4/1/1/1); オイルレッドXO (クロロホルム, 0.1%) : クロロホルム, トルエン及び石油エーテルの混液 (3/2/1); トルイジンレッド (クロロホルム, 0.1%), クロロホルム及び1-ブタノールの混液 (16/1); パーマネントオレンジ (トルエン, 0.025%) : クロロホルム, トルエン及び石油エーテルの混液 (3/2/1); ハンサイエロー (クロロホルム, 0.1%) : クロロホルム; ポンソーSX (クロロホルム, 0.1%) : 1-ブタノール, エタノール (95%) 及び酢酸 (3→100) の混液 (6/2/3)。

### 3. 赤外吸収 (IR) スペクトル測定

日本分光(株)製赤外分光光度計FT-IR装置JASCO FT-IR VALOR-Ⅲを用いて、KBr (錠剤) 法で試料のIRスペクトルを測定した。

### 結果及び考察

#### 1. IR

8種の色素標準品のIRスペクトルをKBr (錠剤) 法で測定し、Fig.1～Fig.8に示した。各色素標準品の特異的指紋領域を示すIRスペクトルを示した。

#### 2. TLC

8種の色素標準品のTLCをFig.9に示した。各色素標準品はいずれも単一のスポットを得たので、薄層用クロ

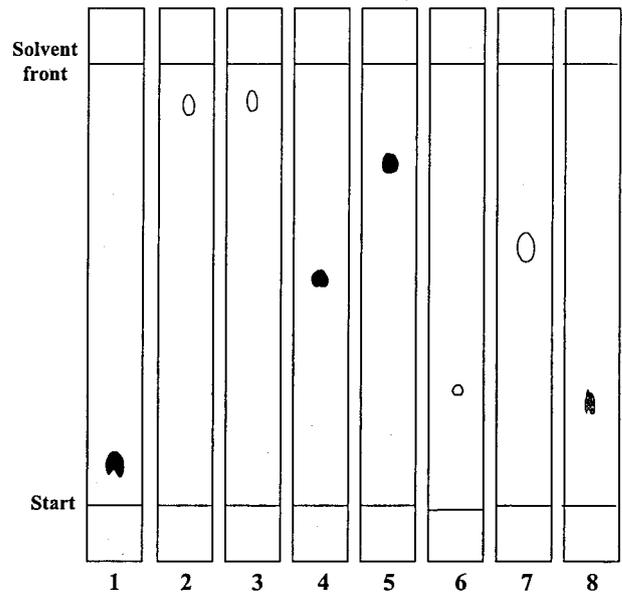


Fig.9 Thin-layer chromatograms of eight standards

Plate 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were spotted with 2ml of each test solution on silica gel plate, respectively. The TLC conditions (name of NIHS Reference Standard; concentration of test solution; dissolved solvents; development solvent system) are as follows:

- 1: Amaranth; water; 0.1%; a mixture of 1-buthanol, ethanol(95%) and acetic acid (3→100) (6/2/3).
- 2: Oil Yellow AB; chloroform; 0.1%; a mixture of 3-methyl-1-buthanol, acetone acetic acid and water (4/1/1/1).
- 3: Oil Yellow OB; chloroform; 0.1%; a mixture of 3-methyl-1-buthanol, acetone acetic acid and water(4/1/1/1).
- 4: Oil Red XO; chloroform; 0.1%; a mixture of chloroform, toluene and petroleum ether(3/2/1).
- 5: Toluidine Red; chloroform; 0.1%; a mixture of chloroform and 1-buthanol(16/1).
- 6: Permanent Orange; toluene; 0.025%; a mixture of chloroform, toluene and petroleum ether(3/2/1).
- 7: Hanza Yellow; chloroform; 0.1%; chloroform.
- 8: Ponceau SX; chloroform; 0.1%; a mixture of 1-buthanol, ethanol(95%) and acetic acid (3→100) (6/2/3).

マトグラフ用標準品としても使用可能であることが明らかになった。

#### 文 献

- 1) 医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令：厚生省令第30号（昭和41年8月31日），改正：厚生省令第127号（平成12年10月20日）
- 2) Color Technical Committee of Japan Cosmetic Industry Association: *Technical Report of Japan Cosmetic Industry Association*, 101-122 (1993)
- 3) "Hotei Shikiso Hand Book", eds., by Japan Cosmetic Industry Association, Yakuji Nippo Lim., Tokyo, pp. 1-3, 76-78, 109-111, 194-196, 197-199, 212-214, 221-226 (1988)

## 生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明 (第二次) (平成12年度～平成14年度)

世話人 奥田晴宏  
合田幸広

本研究は平成9年度～平成11年度特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明(第一次)」<sup>1)</sup>の研究成果を踏まえて実施されたものである。本第二次特別研究は、第一次特別研究と同様、本研究 所・生薬部、有機化学部、食品部・大阪支所食品試験部、衛生微生物部、環境衛生化学部(大阪大学大学院薬学系研究科との共同研究)の 研究員より構成される学際的研究であり、以下に記すように背景の基に化学物質と生体との作用を立体構造に立脚して解明することを目的として実施された。

化学物質が体内に取り込まれ生体に影響を及ぼす際には、医薬品や栄養物質などの有効作用であれ、劇毒物や環境汚染物質などの有害作用であれ、これらの化合物は生体構成タンパク等の高分子化合物との結合過程を経る。一方、化学物質の生体影響に関しては、特にタンパク質の詳細情報が十分でなかったために、化学物質とタンパク質の相互作用を分子レベルで解析を行うことには大きな困難があった。

しかし、近年の急速な科学技術の進歩は研究内容を大きく変化させた。即ち、①生体構成蛋白や受容体の精製技術、物理測定機器の精密化、高速化の発展に呼応して、種々の生体反応系が解明されはじめたこと、②最近コンピューターが高速化され高磁場核磁気共鳴装置や分子力場計算により分子の複雑な3次元構造の予測や解析が可能になりつつあること、③ポストゲノム時代の到来により、遺伝子解析による生体タンパクの情報が集積されつつあること、などである。

このような状況の変化を踏まえ、化学物質とタンパク質との相互作用を三次元的に解析することを目的として多角的に本特別研究は遂行された。

第一次特別研究においては、以下の研究を実施した。即ち、①強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析に関する研究として、代謝産物の構造と活性に多様性を有する *Trichoderma* 属の代謝産物の三次元構造解析及び HIV プロテアーゼ活性を有するサイトカラシン類のタンパクモデリングによる活性作用機構の解明、②緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析に関する研究として、ポリフェノ

ールのラジカル反応の分子軌道計算及び反応生成物分析による抗酸化作用機構の解明並びに天然に存在するポリフェノールの脂質代謝に及ぼす影響及びポリフェノール代謝経路の解明、③生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析に関する研究として、各種塩素化エチレン化合物を用いたこれら化合物群によるラット肝シトクローム P450 の変動と構造活性相関に関する研究並びに遺伝子発現変化解析による発癌プロモータの生化学作用と発癌プロモーション活性との相関に関する研究が実施された。

第二次特別研究は下記①～⑥の研究を実施した。

1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析

①高分解能 NMR を基盤とする天然化合物と生体タンパクの三次元構造解析に関する研究

②化学計算を用いた生理活性物質の構造と反応性に関する研究

2. 緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析

③カテキン類の三次元構造と抗アレルギー作用の解明

④フラボン類の構造と抗酸化活性に関する研究

3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析

⑤環境汚染物質と細胞内受容体との結合親和性と構造相関との研究

⑥化学物質の機能と細胞生物学的活性の間に介在する事象する研究

本第二次特別研究の対象は、化合物としては熱帯産薬用植物に含有される生理(薬理)活性天然物ならびに核受容体に作用する合成ビタミン類などの医薬品候補化合物、食品中に含まれる各種有用な効果が期待されているポリフェノール類、反対に安全性の観点からの研究が必要な発癌プロモーターあるいは内分泌系に影響が想定される各種塩素化合物等多岐にわたっている。本研究により得られた成果は生命活動の動的解析の基礎を与え、医薬品をはじめとする各種化学物質の有効性と安全性を評価する重要な知見を得ることに資することが期待される。

<sup>1)</sup> 国立医薬品食品衛生研究所報告 118, 178-196 (2000)

## 1. 強い生理活性を有する化合物の立体構造と受容体分子の三次元解析

### (1) 高分解能 NMR (核磁気共鳴装置) を基盤とする天然有機化合物の三次元構造解析

生薬部 代田 修, 合田幸広  
筑波薬用植物栽培試験場 関田節子

#### [目的]

植物や微生物, 海洋生物などが生産する天然有機化合物の構造は多種多様に富み, しばしば医薬品開発における重要なモチーフとなる. 特にその立体構造は, 単に合成的手法で任意に作り出す化合物 (コンビナトリアル・ケミストリー) と比べても, 天然物が有する奇抜な構造多様性の方が勝っている. さて, その様な天然有機化合物の立体構造を決定する手法には, 主に, NMR (核磁気共鳴) を用いるものと, CD (円二色性) を用いる手法がある. 前者は, 絶対構造既知のキラル補助剤を対象となる化合物に導入してジアステレオマーとすることで, ジアステレオマー間の NMR 化学シフトの差を用いて絶対構造を決定する方法が主流であり, Mosher らにより開発された  $\alpha$ -メトキシ- $\alpha$ -(トリフルオロメチル)フェニル酢酸 (MTPA) 法が度々用いられる<sup>2,3)</sup>. しかしこのキラル補助剤の適用は, 二級水酸基または二級アミノ基に限られる. 近年, 楠見らにより二級カルボン酸に導入するキラル補助剤である, フェニルグリシンメチルエステル (PGME) が報告されている<sup>4)</sup>.

我々は, 南米大陸をはじめ中国や東南アジアなどの国々から, 現地で薬として用いられている生薬・薬用植物を収集し, それらに含まれる多種多様な天然有機化合物の単離・構造決定に関する研究を行っている. その中で, フィリピンで利尿, 尿石症の治療薬, 関節炎薬および鎮咳薬として用いられる生薬である "Sambong" (*Blumea balsamifera*) から6種の新規化合物を単離した. 今回, その絶対立体構造を含めた構造解析において, 前述の NMR キラル補助剤, MTPA 及び PGME を用いて解析を行った. 特に PGME については, 今回はじめて  $\alpha$ -エポキシカルボン酸への適用を試みた.

#### [方法]

"Sambong" (*Blumea balsamifera*) の葉をメタノールにて抽出し, 得られたメタノールエキスを定法によりシリカゲル・オープンカラム, シリカゲル中圧カラムおよび逆相系 HPLC にて分離・精製を行い, 6種の新規化合物 (I~VI) を単離した. (Fig.1) これらの相対配置を含めた構造は, 各種二次元 NMR スペクトルを解析することにより決定した. 絶対立体配置の決定は, 化合物 I

を水酸化リチウムにて母核とカルボン酸部分とに加水分解し, それぞれキラル補助剤である MTPA 及び PGME を導入することにより行った. 又, カルボン酸部分の絶対配置決定においては, アンゲリカ酸より導いたジアステレオマー混合物を標品として用い, その PGME 誘導体と比較することで決定した.

#### [結果及び考察]

各種二次元 NMR スペクトルの解析により, 化合物 I~V はセスキテルペンである 1,9,10-trihydroxyguaian-4-en-6-one 骨格の9位水酸基にカルボン酸がエステル結合した構造であることが判明した. また, 化合物 VI は 9-hydroxyguaian-4-en-6,10-dione と決定された. 化合物 I~VI の母核は相対配置を含め同一で, 化合物 I, II 及び V は同一の平面構造を有しており, 化合物 I 及び II と V との違いは9位の立体が異なること, 化合物 I と II の違いはエステル結合している  $\alpha$ -エポキシカルボン酸の立体が異なるものと推定された. そこで, 化合物 I の絶対立体構造を決定することで, 他の化合物の絶対構造もしくは母核の絶対立体配置が決定できるものと考えた.

化合物 I の  $\alpha$ -エポキシカルボン酸部分の絶対構造決定を行うため, アンゲリカ酸より導いた  $\alpha$ -エポキシアンゲリカ酸のジアステレオマー混合物を (R)-PGME 誘導体とした. HPLC により両ジアステレオマーを分離し, NOESY スペクトルを含む各種 NMR スペクトルを解析することで, HPLC おいて最初に溶出されるジアステレオマーを 2R, 3R 体, 後に溶出されるジアステレオマーを 2S, 3S 体と推定した (Fig.2). 次に, 化合物 I を水

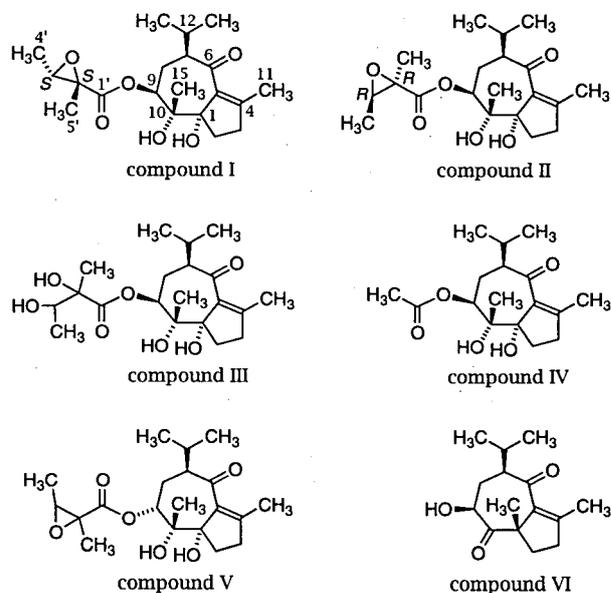


Fig.1 Structures of novel compounds isolated from Philippine medicinal herb "Sambong" (*Blumea balsamifera*)

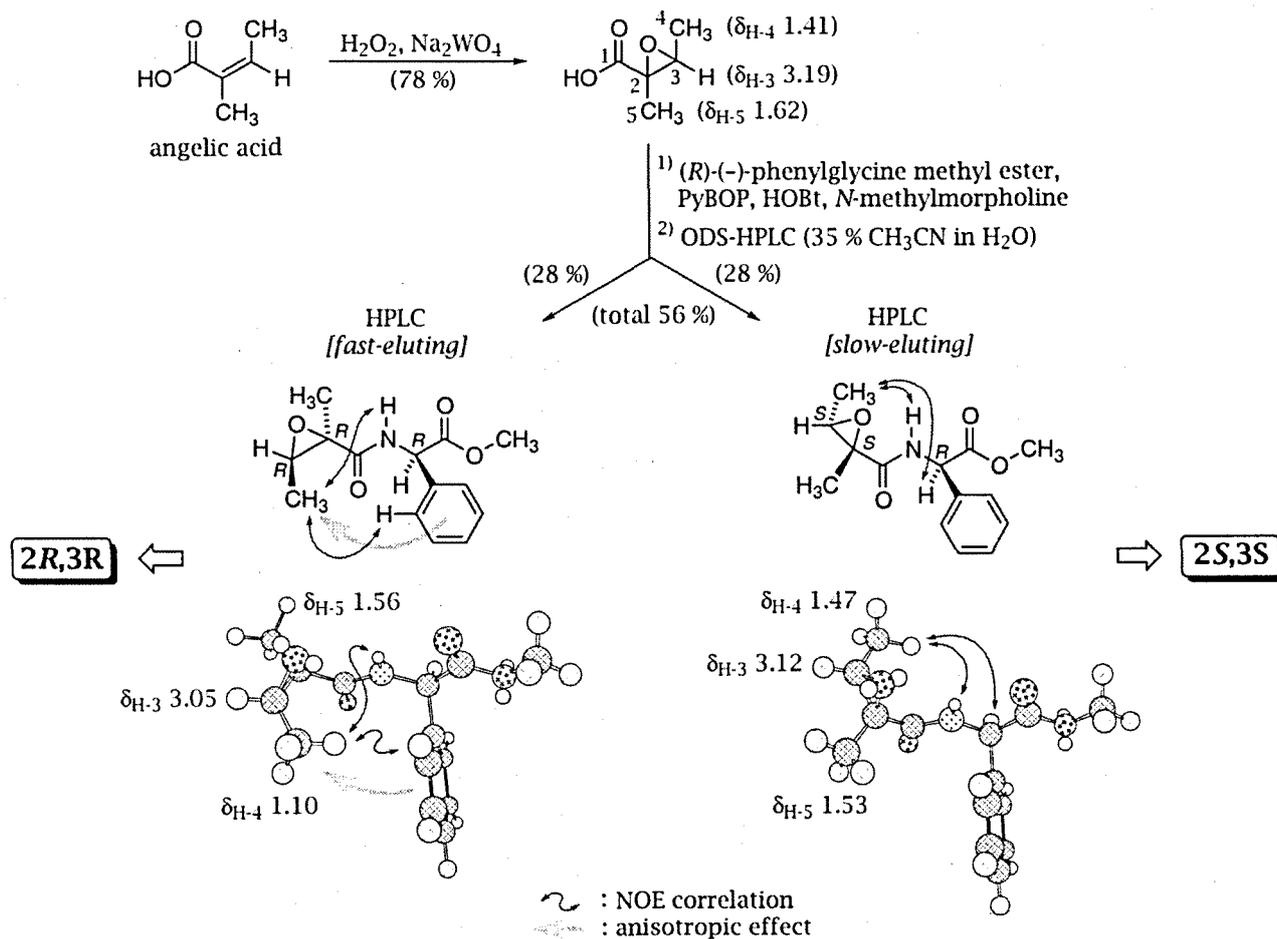


Fig.2 Stereochemistry of epoxyangelic acid

酸化リチウムにて加水分解し、セスキテルペン骨格とエポキシアンゲリカ酸とを得た。母核は(R)-及び(S)-MTPA誘導体とし、改良Mosher法<sup>3)</sup>によりその絶対配置を1S, 7S, 9S, 10Rと決定した。また、カルボン酸部分は(R)-PGME誘導体とし、先の両ジアステレオマー(R)-PGME誘導体とそのHPLC保持時間を比較した結果、後に溶出されたため2'S, 3'S体と決定した。(Fig.3)

またこのことにより、化合物IIは化合物Iとは逆の立体構造である2'R, 3'R体のエポキシアンゲリカ酸がエステル結合した構造と決定した。化合物Vはその量が少なかったためエポキシアンゲリカ酸の絶対配置決定には至らなかったが、全ての化合物の母核部分については化合物Iの絶対構造に類した絶対配置を取るものと推定した。

今回、 $\alpha$ -エポキシカルボン酸であるエポキシアンゲリカ酸の絶対配置決定にキラル補助剤であるPGMEをはじめ適用し、その有用性を明らかにした。天然には

$\alpha$ -エポキシカルボン酸類をその分子中に有する生理活性化合物が多く発見されているが、現在までにはNMRを用いてその絶対配置を決定することは為されていなかった。今後、今回用いたPGMEをキラル補助剤として用いる手法により、容易に決定されていくものと思われる。

#### [発表及び参考文献]

- 1) Shiota, O., Oribello, J. M., Sekita, S., Satake, M.: *in preparation*.
- 2) Dale, J. A., Mosher, H. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 512-519 (1973)
- 3) Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., Kakisawa, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991)
- 4) Nagai, Y., Kusumi, T.: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1853-1856 (1995)

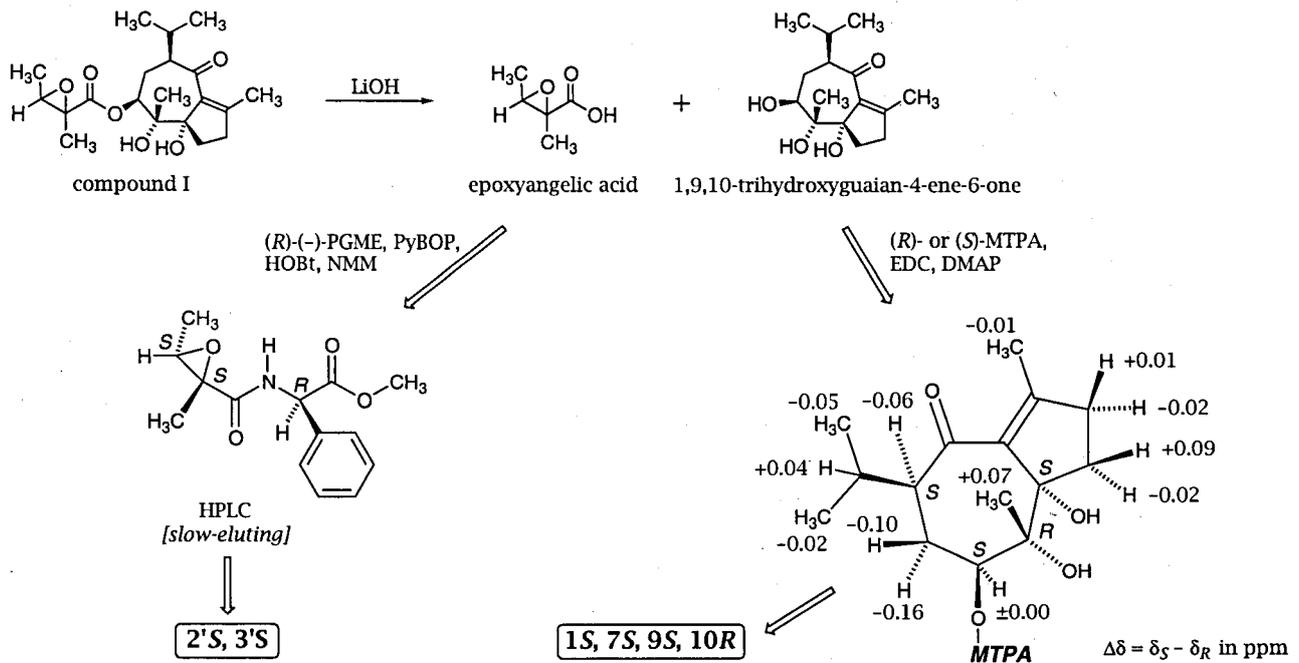


Fig.3 Determination of the absolute stereochemistry of compound I

## (2) A環修飾ビタミンDアナログのVDR結合モデル

有機化学部 栗原正明

### [目的]

活性型ビタミンD<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 1は核内受容体ビタミンDレセプター (VDR) と結合し、標的遺伝子群の発現を転写レベルで制御している。現在、ビタミンD誘導体は、抗腫瘍薬や骨粗しょう症薬等として研究、開発が行われている。また、最近VDRのX線構造解析が行われ、VDRの3次元構造および、VDRと活性型ビタミンD<sub>3</sub>との結合様式が明らかとなった。著者らはこれまでにビタミンDレセプターの3次元構造に基づいたビタミンD誘導体の設計と合成を行ってきた。その中で、活性型ビタミンD<sub>3</sub>のA環部分を修飾した2 $\alpha$ 置換体を合成し、天然体である活性型ビタミンD<sub>3</sub>よりVDRとの結合能や細胞分化活性が増強したものを見いだした。(Fig.1) ここでは、A環修飾ビタミンD誘導体と受容体の相互作用の解析を目的とし、VDRの3次元構造を基に、ビタミンD誘導体との結合モデルの構築を行った。

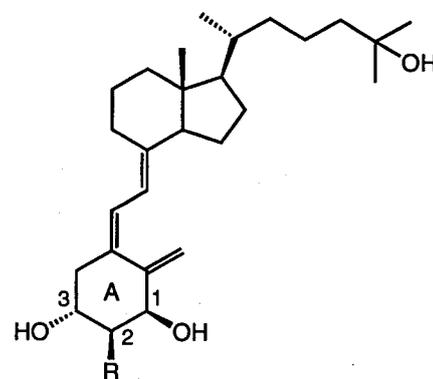
### [方法]

活性型ビタミンD<sub>3</sub>が結合したビタミンDレセプター (VDR) のX線座標 (Rochel, N. *et al.*, *Mol. Cell*, 2000, 5, 173) を基に、VDRのLBDのリガンド周りの残基 (32～71個) を切り出し、受容体のモデルとした。残基には constrain (100-10000kJ/A) をかけ、molecular dynamics

(MD) を行い、つづいてmolecular mechanics (MM) によるエネルギー最小化を行い、エネルギーの最も小さいものを、それぞれのリガンドとVDRの最安定結合モデルとした。力場はAMBER\*を用いた。プログラムはMacroModel (ver. 6.5及びver. 8.0) を用いた。

### [結果及び考察]

活性型ビタミンD<sub>3</sub>の3つの水酸基はそれぞれVDRの2つの残基と水素結合を形成している。すなわち、1位の



- 1: 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (100) R=H  
 2 $\alpha$ -substituted analogues  
 2: R= Me (400)  
 3: R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (300)  
 4: R=OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (180)  
 (VDR binding affinity)

Fig. 1. Structure of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 2 $\alpha$ -substituted analogues

水酸基は、Ser-237とArg-274と水素結合を形成している。3位の水酸基はTyr-236とSer-278と、25位の水酸基はHis-305とHis-397と、それぞれ水素結合を形成している。A環部のコンフォメーションは $\alpha$ -formと $\beta$ -formがあり、活性型ビタミンD<sub>3</sub>分子単独では両コンフォメーション間ではエネルギーの差はほとんどない。(Fig.2) X線解析によりこの天然形のコンフォメーション

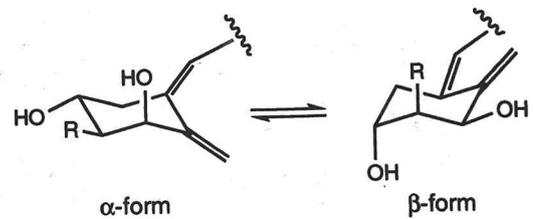


Fig.2 Conformers of A-ring

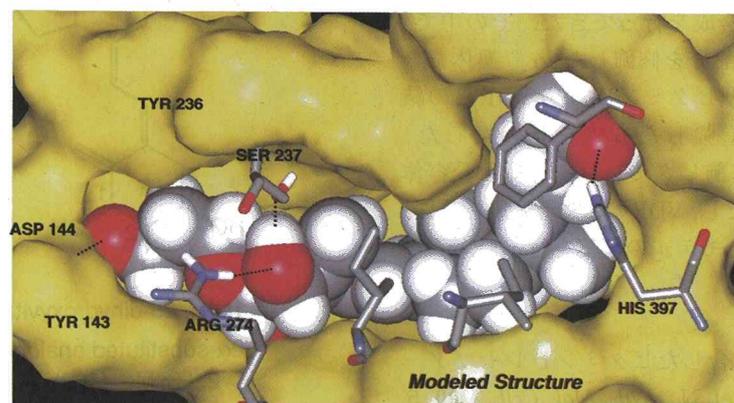
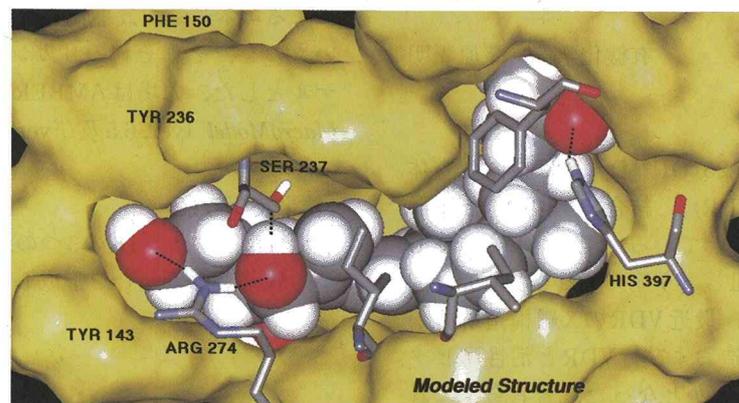
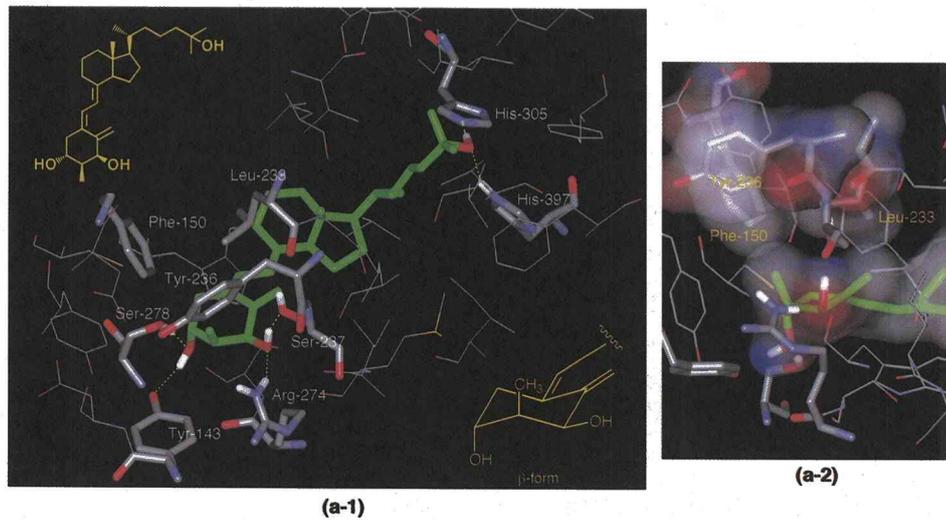


Fig.3 (a-1) Modeled Structure of 2 bound to VDR. (a-2) Side view of a-1. (b) Modeled Structure of 3 bound to VDR (c) Modeled structure of 4 bound to VDR

ンは、 $\beta$ -formであることが明らかとなった。モデリングにより、 $2\alpha$ アナログのコンフォメーションも $\beta$ -formであった。(2 $\alpha$ アナログでは $\alpha$ -formの方が安定であるにも関わらず) VDRのA環結合部位には比較的大きな空間がある。VDR結合部位のA環2位付近は疎水的環境にある(Phe-150, Leu-233, Tyr-236)。2 $\alpha$ メチル体1の結合能の上昇は、この領域とメチル基の疎水相互作用が大きな要因と考えられる。この領域にはメチル基の大きさが至適であり、エチル以上では立体反発が大きくなり結合能の低下を招く。しかし、さらに大きな置換基を持つ、2, 3の結合能が上昇するのは、水素結合の寄与が大きいと考えられる。すなわち、2のヒドロキシプロピル基、3のヒドロキシプロポキシ基の末端の水酸基は、ヒドロキシプロピル基ではArg-274と、ヒドロキシプロポキシ基ではAsp-144とそれぞれ水素結合を形成している。(Fig.3)の炭素のみでは3つ、炭素と酸素では炭素3酸素1が至適であることは、モデリングと良い一致を見た。

本研究は、帝京大学薬学部の高山浩明教授、橋高敦史助教授、藤島利江講師との共同研究である。

#### 発表論文

- Kittaka, A.; Suhara, Y.; Takayanagi, H.; Fujishima, T.; Kurihara, M.; Takayama, H. *Org. Lett.*, **2**, 2619-262 (2000)
- Konno, K.; Fujishima, T.; Maki, S.; Liu, Z.; Miura, D.; Chokki, M.; Ishizuka, S.; Yamaguchi, K.; Kan, Y.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Smith, C.; DeLuca, H. F.; Takayama, H. *J. Med. Chem.*, **43**, 4247-4265 (2000)
- Fujishima, T.; Konno, K.; Nakagawa, K.; Tanaka, M.; Okano, T.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Takayama, H. *Chem. Biol.*, **8**, 1011-1024 (2001)
- Suhara, S.; Nihei, K.; Kurihara, M.; Kittaka, A.; Fujishima, T.; Konno, K.; Miyata, N.; Takayama, H. *J. Org. Chem.*, **66**, 8760-8771 (2001)
- Suhara, Y.; Kittaka, A.; Ono, K.; Kurihara, M.; Fujishima, T.; Yoshida, A.; Takayama, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3533-3536 (2002)
- Kittaka, A.; Kurihara, M.; Peleg, S.; Suhara, Y.; Takayama, H. *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 57-358 (2003)
- Itoh, T.; Suzuki, T.; Uchida, K.; Kurihara, M.; Hayashi, M.; Miyata, N.; Hirose, M. *Cancer Lett.*, **148**, 81-86 (2000)
- Fukuhara, K.; Kurihara, M.; Miyata, N. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8662-8666 (2001)
- Tanaka, M.; Oba, M.; Imawaka, N.; Tanaka, Y.; Kurihara, M.; Suemune, H. *Helv. Chim. Acta.*, **84**, 32-46 (2001)
- Kurihara, M.; Hayashi, T.; Miyata, N. *Chem. Lett.*, 1324-1325 (2001)
- Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K. *Methods in Enzymology*, **335**, 203-217 (2001)
- Kurihara, M.; Kondo, K.; Toyoda, M.; Miyata, N. *JCPE Journal*, **13**, 255-262 (2001)
- Kittaka, A.; Takayama, H.; Kurihara, M.; Horii, C.; Tanaka, H.; Miyasaka, T.; Inoue, J. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, **20**, 669-672 (2001).
- Oba, M.; Tanaka, M.; Kurihara, M.; Suemune, H. *Helv. Chim. Acta.*, **85**, 3197-3218 (2002).
- Satoh, T.; Itoga, A.; Isogai, Y.; Kurihara, M.; Yamada, S.; Natori, M.; Suzuki, N.; Suruga, K.; Kawachi, R.; Arahira, M.; Nishio, T.; Fukazawa, C.; Oku, T. *FEBS letters*, **531**, 543-547 (2002).
- Kurihara, M.; Tanaka, M.; Oba, M.; Suemune, S.; Miyata, N. *Peptide Science 2001*, 287-288 (2002).
- Kurihara, M.; Hakamata, W. *J. Org. Chem.*, **68**, 3413-3415 (2003)
- Kurihara, M.; Tanaka, M.; Oba, M.; H. Suemune, H. *Peptides 2002*, 786-787 (2003)
- Kurihara, M.; Sato, Y.; Tanaka, M.; Oba, M.; Demizu, Y.; Suemune, H. Okuda H. *Peptide Science 2002*, 323-324 (2003)

## 2. 緩和な生理活性を有する化合物の構造と作用発現機構に関する解析

### (1) ポリフェノールの抗酸化作用機構と抗アレルギー作用

食品部 近藤一成, 米谷民雄

#### [目的]

本特別研究「生物システムに作用する化学物質の機能と3次元構造相関の解明」(第1次)において、カテキンおよびその重合体であるプロシアニジンの抗酸化作用(ラジカル消去作用)とそのメカニズムについて検討を行い、カテキンは他のフラボノイドとは異なるメカニズムで抗酸化作用を発揮すること、さらにその重合体であるプロシアニジンは極めて強い抗酸化作用を有することを明らかにした。その後ポリフェノール系化合物は、抗アレルギー作用を示すものが多いことから更に検討を行

#### 関連する発表論文

- Kondo, K.; Kurihara, M.; Fukuhara, K.; Tanaka, T.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Toyoda, M. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 485-488 (2000)
- Kobayashi, S.; Kobayashi, H.; Yamaguchi, T.; Nishida, M.; Yamaguchi, K.; Kurihara, M.; Miyata, N.; Tanaka, A. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 920-934 (2000)
- Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Kasahara, K.; Ikezaki, S.;

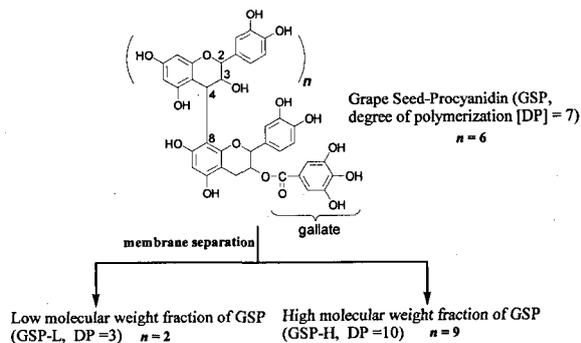
い、プロシアニジンがIgE依存性I型アレルギーの即時相反応の原因となるメディエーター遊離を効果的に抑制する事を見いだした。

フラボノイドの抗アレルギー作用に関する報告はこれまでにいくつか報告されており、肥満細胞株 (RBL-2H3, PT-18), mouse bone marrow derived mast cell (BMMC) を用いたアッセイ等の結果から、比較的脂溶性の高いフラボノイド Quercetin, Luteolin, Fisetin は低濃度 (数  $\mu\text{M}$ ) で histamine や IL-4, TGF- $\beta$  などメディエーター遊離を抑制するとされている。しかしながら、これらの化合物は kinase inhibitor として働くことや bolybasic な分泌促進剤 compound 48/80, substance P, somatostatin などによる histamine 遊離を促進する作用も有しているため、抗アレルギー作用物質として、あるいはそのリード化合物として展開するのは困難である。また、Quercetin は抗酸化物質であると同時にこの化合物が置かれた環境によっては逆に酸化促進剤として作用し、酸化的損傷の引き金にもなることが知られている。

そこで、これまでのポリフェノールの抗酸化作用およびその作用機構の検討結果から、強い抗酸化作用を示しかつ酸化促進剤としては働かない化合物としてプロシアニジンを見出し、これについて抗アレルギー作用を検討する目的で RBL-2H3 細胞を用い、メディエーター遊離抑制効果、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、種々の kinase (Syk, PLC $\gamma$ , MAPKs, FAK, Pyk2 など) に与える影響について検討した。

#### [方法]

1. 検討したサンプルは、ブドウ種子 (*Vitis vinifera* L.) により抽出したプロシアニジン画分 (GSP) を用いた (Fig.1)。また、この GSP から、平均分子量 3000 以下 (GSP-L) と 3000 以上 (GSP-H) の分画に分けた。さらに、プロシアニジン中のフェノール性水酸基をアセチル化したアセチル体も調整した。



\*GSP was extracted from *Vitis vinifera* L.

\*\*The degree of polymerization [DP] for GSPs was determined by  $^{13}\text{C}$ -NMR experiments.

Fig.1 Structure of procyanidins

2. メディエーター遊離抑制効果については、24穴プレートに anti-dinitrophenyl (DNP)-IgE を含む RBL-2H3 細胞を  $2 \times 10^5$  cell/well で播き、一晩インキュベートしたものをを用いた。サンプルで 10 分インキュベート後、DNP<sub>30</sub>-HSA (Ag) または thapsigargin (Tg) で刺激し、40 分後細胞内外の  $\beta$ -hexosaminidase 活性を測定し、脱顆粒を調べた。併せて LTC<sub>4</sub>, IL-4 も測定した (本報告では結果を省略)。

3. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は、RBL-2H3 cell suspension について指示薬として fluo-3 を用いて測定した。測定後、ionomycin, Triton を用いて calibration を行った。必要に応じて calibration buffer も用いた。

4. Kinase 活性化に与える影響は、目的とする一次抗体及び protein-A/G sepharose/agarose を用いて免疫沈降後、SDS-PAGE, Immunoblotting を行い AP 標識二次抗体により発色させた。

5. 細胞内活性酸素測定には、種々の活性酸素を検出するために DCFH, nitric oxide (NO) 測定用に DAF-2 を用いて、DNP30-HSA で刺激前後の変化について検討した。

#### [結果および考察]

GSP-L および GSP-H の  $\beta$ -hexosaminidase 活性を指標に脱顆粒に与える影響を検討したところ、抗原刺激 (Ag) ではプロシアニジン低分子分画である GSP-L には全く活性が認められず、高分子分画 GSP-H に脱顆粒抑制効果が認められた (Fig.2)。この結果は、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor である thapsigargin で刺激しても同様の結果が得られたことから、GSP-H は高親和性 IgE 受容体 (Fc $\epsilon$ RI) を介したシグナルの、PLC $\gamma$  より下流に作

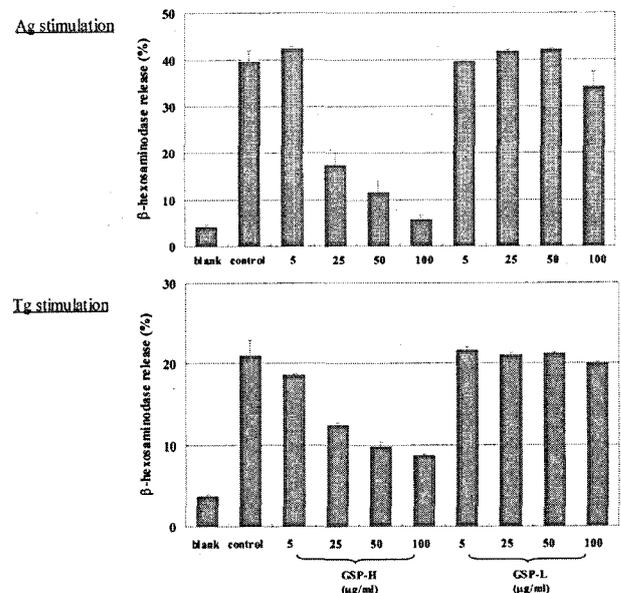


Fig.2 Inhibition of antigen-induced (Ag) and thapsigargin-induced (Tg) secretion from RBL-2H3 cells by procyanidins

用することが示唆された。また、脱顆粒抑制効果はGSP-HのOH基をアセチル化した場合には消失することから、このOH基が必修であると考えられた。さらに、GSP-Hは*in vivo*においても効果が認められた (data not shown)。

次に、脱顆粒抑制効果のあったGSP-Hについて細胞内Ca<sup>2+</sup>に与える影響を検討した。その結果、GSP-Hは25 μg/ml (8.7 μM) までは全く影響は与えなかったが、50 μg/ml (17.4 μM) 以上では抗原刺激 (Ag) に伴う細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を抑制し (Fig.3A), これは主に細胞外からの膜電位非依存性store-operated calcium (SOC) channelを介したCa<sup>2+</sup>の取り込み抑制の結果によるものであることが、同様の結果を示したMn<sup>2+</sup>-quenchingの結果 (data not shown) と併せて判った (Fig.3B)。

GSP-Hの細胞膜に与える影響についても検討した。これは、SOC channelの機能はそれが存在する膜の性質に影響するため、SOC channelを介した取り込み抑制がSOC channel自身の阻害によるものか膜機能の変化による間接的な効果かを明らかにするためである。検討の結果、25 μg/ml (8.7 μM) 以下の濃度では膜流動性には全く影響しなかったが、50 μg/ml (17.4 μM) 以上の濃度では若干この化合物が抗原刺激により起こる膜流動性亢進を抑制することが、さらに、Ca<sup>2+</sup>イオノフォアionomycin刺激による実験から膜機能に変化を与えることが判明した (Fig.4)。以上の結果は、先のCa<sup>2+</sup>の取り込み抑制作用はGSP-Hの膜の性質変化による間接的作

用であることが示唆された。一方で、細胞内Ca<sup>2+</sup>かつ膜の性質に全く影響を与えない25 μg/ml (8.7 μM) でも約50%脱顆粒を阻害することから、主たるGSP-Hの作用部位は他にあると推察された。

そこで、種々のkinase活性化に与える影響について検討した。その結果、src familyであるLynによるFcεRIβ,γリン酸化の直後活性化されるSykやPLCγ1, PLCγ2だけでなく、比較的下流にあるERK1/2 (以上Fig.5) やFAK, Pyk2の活性化にもGSP-Hは影響を与えないことが判った。このことは、GSP-HがFcεRIを介し脱顆粒に至るシグナルの末端exocytosisそのものを抑制する可能性を示唆していると考えられ、今後SNARE, syntaxin, Munc18などのexocytosisのtethering, fusionに関与する分子との関連から解明する必要がある。

細胞内活性酸素の関与については、肥満細胞は高親和性IgE受容体を抗原刺激した時に、NOを含め活性酸素の生成は認められなかった。この結果は、強い抗酸化作用を有するGSP-Hであるが、FcεRIを介したシグナルにおいてはGSP-Hの作用は抗酸化作用ではないと考えられた。

以上の結果から、ブドウ種子由来のプロシアニジン高分子画分GSP-Hは強い抗酸化作用を示すとともにそれとはことなる機構により肥満細胞からのメディエーター遊離を効果的に抑制することを明らかにすることができた。

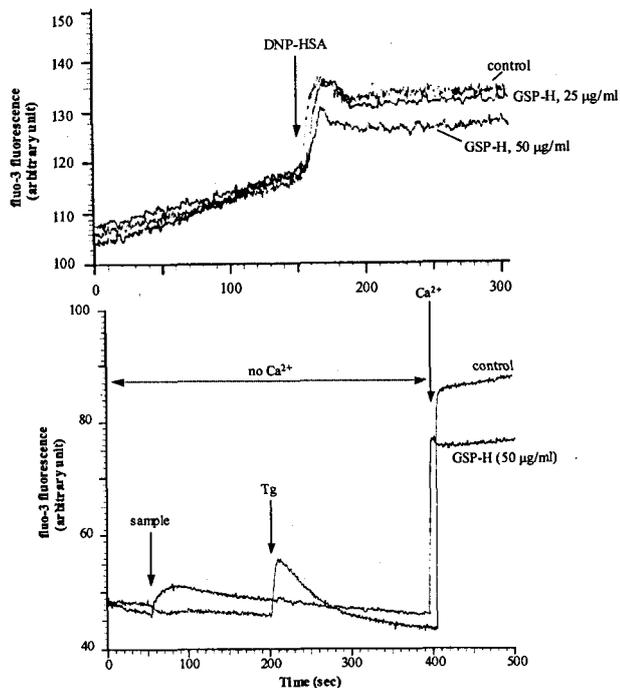


Fig.3 Effect of GSP-H on intracellular Ca<sup>2+</sup> (top) and SOC channels (bottom)

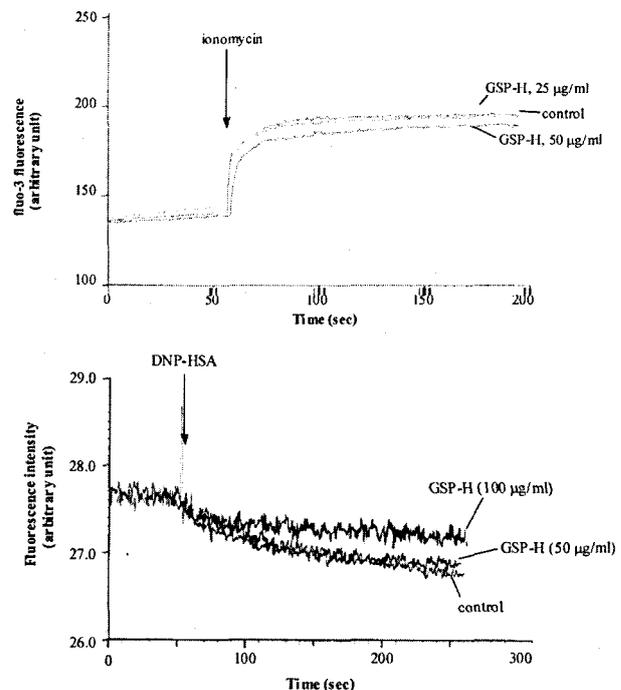
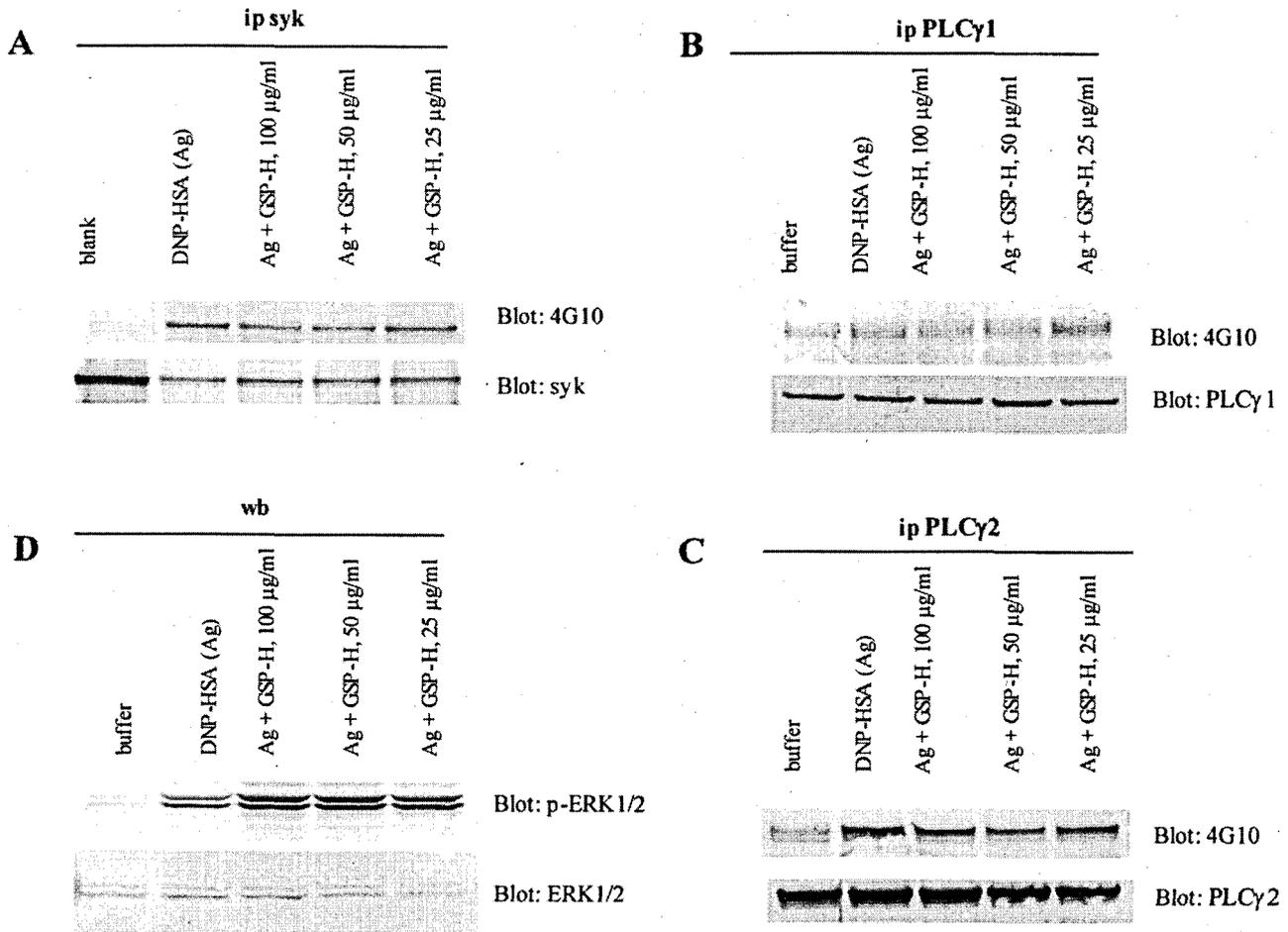


Fig.4 Effect of GSP-H on membrane fluidity. Top: Ca<sup>2+</sup> ionophore ionomycin Bottom: DCVJ

Fig.5 Effect of GSP-H on kinases, syk, PLC $\gamma$ 1, PLC $\gamma$ 2, ERK

## 特別研究での発表論文

- Kondo, K. et al, *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 79-86 (1999)
- Kondo, K. et al, *Free Radical Biol. Med.* **27**, 855-863 (1999)
- Kondo, K. et al, *Tetrahedron Lett.* **41**, 485-488 (2000)
- Kondo, K. et al, *Methods in Enzymology* **335**, 203-217 (2001)
- Kondo, K. et al, 磁気共鳴と医学 **12**, 91-94 (2001)

## (2) ポリフェノールのラットにおける代謝に関する研究

大阪支所食品試験部 中村優美子  
(現・高槻市保健所),  
外海泰秀

## [目的]

ポリフェノールは従来は非栄養素と考えられてきた。しかし、近年になって抗酸化作用、抗癌作用、抗高脂血症作用等さまざまな生理作用のあることが明らかとなり、健康食品素材として注目されるようになってきた。

ポリフェノールには単純フェノール誘導体のような分子量の小さいものから分子量30000Daを超えるタンニン

まで多種多様なものがある。タンニンを大別すると、タンニン酸等の加水分解性タンニンとプロアントシアニジン等の縮合型タンニンの2種がある。タンニン酸及びプロアントシアニジンの化学構造式をFig.1, 2に示す。

タンニンの毒性や有用な生理作用については

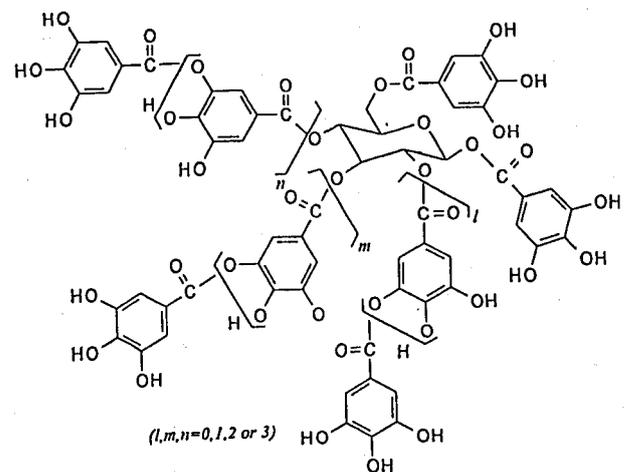


Fig.1 Chemical structure of tannic acid

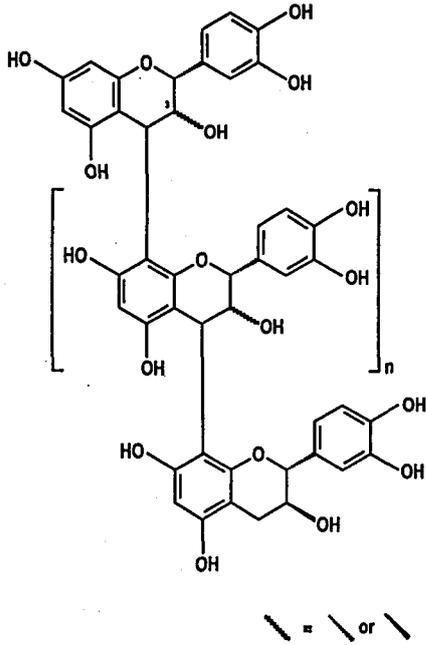


Fig.2 Chemical structure of proanthocyanidin

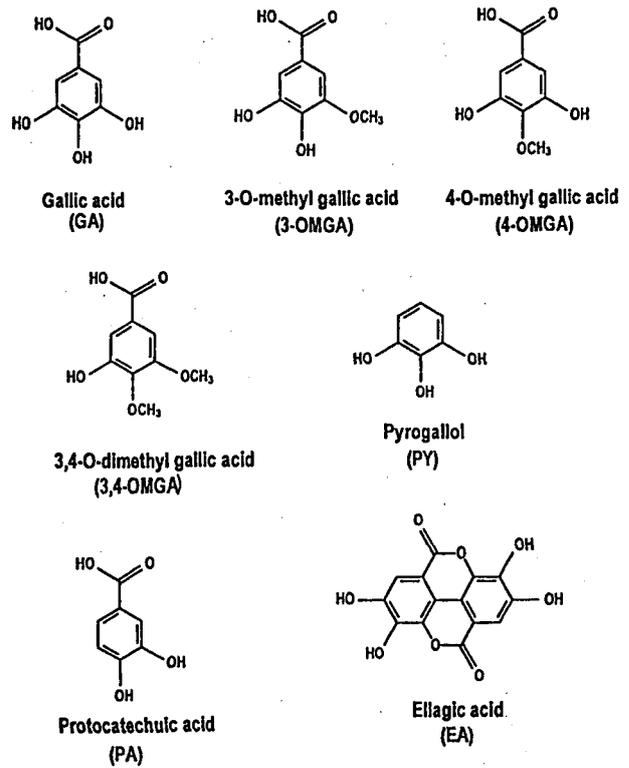


Fig.3 Chemical structures of the metabolites of TA and their related compounds

様々な報告があるが、タンニンの代謝については殆ど知られていない。

そこで、加水分解性タンニンとしてタンニン酸 (TA), 縮合型タンニンとしてブドウ種子ポリフェノール (GSP) の2種を選択し、ラットに経口投与してそれぞれの代謝を調べた。Fig.3にTA代謝物及びその関連化合物, Fig.4にGSP代謝物及びGSPに含まれる低分子化合物の化学構造式をそれぞれ示す。

[方法]

実験1. TAの代謝

体重252-282 gのWistar系雄性ラットを用い、1群5-6匹とし、TAを0.1 g/kgの用量で強制経口投与して実験を行った。先ず、0.5, 1, 1.5, 2, 4, 5, 6, 17, 24時間後にエーテル麻酔下で心臓より採血し、血清中のTA代謝物濃度の経時変化を調べた。次に、代謝ケージを用いて投与5.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのTA代謝物及びTA排泄量を調べた。

実験2. GSPの代謝

体重286-304 gのWistar系雄性ラットを用い、1群5-6匹とし、GSPを0.1 g/kgの用量で強制経口投与して実験を行った。先ず、投与0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5.5, 7, 20時間後にエーテル麻酔下で心臓より採血し、血清中の代謝物濃度の経時変化を調べた。次に、代謝ケージを用いて投与4.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのGSP代謝物排泄量を調べた。

さらにKantsら<sup>1)</sup>の方法を参考にしてGSPより低分子

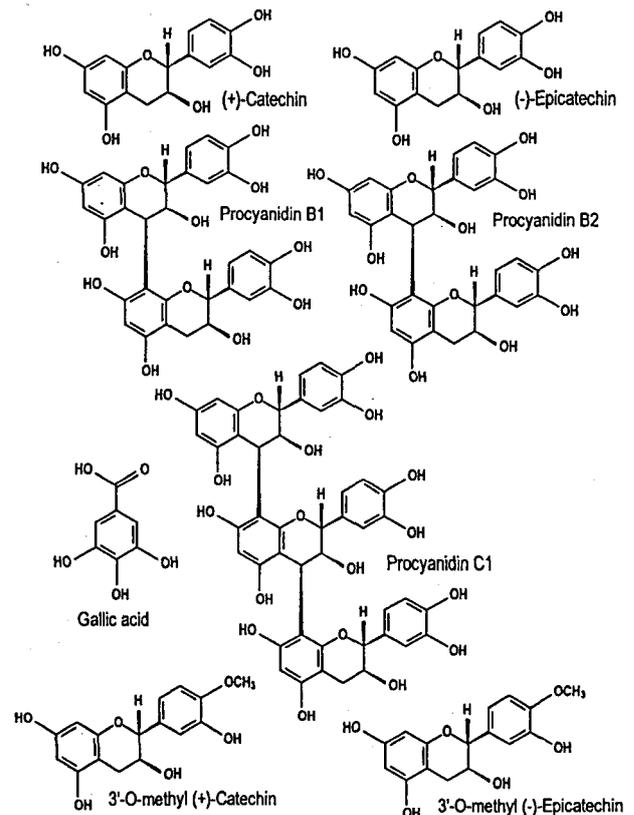


Fig.4 Chemical structures of some GSP components and GSP metabolites

量の (+)-catechin (CT) 及び (-)-epicatechin (EC) を殆ど含まない高分子画分 (GSPH) を調製した。1群4匹とし、GSPH 0.5 g/kg をラットに強制経口投与し、投与2.25時間後の血清中の代謝物濃度を調べた。また実験1及び2と同様に代謝ケージを用いて投与4.5, 24.5, 54時間後にそれぞれ尿及び糞を採取し、尿及び糞中へのGSPH代謝物排泄量を調べた。

#### 分析法

TA代謝物, TA及びGSP代謝物の分析は既報<sup>2,3)</sup>に従った。TA代謝物の分析にはprotocatechuic acidを内部標準とし、TA及びGSP代謝物の分析にはflavoneを内部標準として使用した。糞中TAは既報<sup>2)</sup>に従いタンナーゼを作用させて生ずるgallic acid (GA) を測定する方法で定量した。但し、尿中のGSP代謝物については、塩酸性下で酢酸エチル抽出を行う代わりにSep-pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub>ミニカートリッジにより精製を行った。

測定値は平均±SD (タンナーゼの検討) 或いは平均±SEM (動物実験の結果) で示した。

#### [結果]

##### 実験1. TAの代謝

タンナーゼの種々のポリフェノールに対する反応性についての検討結果をTable.1に示す。タンナーゼはTA等のgallotanninのみならずカテキン類のエステル結合部位に作用し、gallic acid (GA) を生じた。

血清中のTA代謝物濃度の経時的変化をFig.5に示す。血清からは4-O-methyl gallic acid (4-OMGA), pyrogallol

(PY) 及びresorcinol (RE) が検出され、それぞれ投与後1.5, 4, 17時間で血中濃度が最大となり、29時間後には殆ど消失した。

尿中のTA代謝物排泄量の経時的変化をFig.6に示す。尿中から検出された代謝物はgallic acid (GA), 4-OMGA, PY及びREの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は12.9-44.4%であった。

糞中のTA代謝物排泄量の経時的変化をFig.7に示す。糞中から検出された代謝物は4-OMGA, PY及びREの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は0-74.8%であった。糞中へのTA排泄量の経時的変化をFig.8に示す。メタノール可溶性画分のTAは総TA排泄量のうちのごく微量であった。

投与量に対する尿及び糞中へのTA及びTA代謝物の排泄率 (w/w%) をTable.2に示す。経口投与されたTAは投与後54時間以内に尿中へGAとして0.01%, 4-OMGAとして0.10%, PYとして0.24%, REとして2.06%, 糞中へTAとして62.74%, GAとして0.19%, PYとして0.02%, REとして0.76%が投与後54時間以内に排泄された。

##### 実験2. GSPの代謝

血清中のGSP代謝物濃度の経時的変化をFig.9に示す。血清からはCT, EC, 3'-O-methyl-(+)-catechin (3'-OMCT), 3'-O-methyl-(-)-epicatechin (3'-OMEC) の4種化合物が検出された。また殆どがグルクロン酸或

Table.1 Tannase reactivity towards various polyphenols

Compounds <sup>1)</sup>		Contents			Tannase reactivity <sup>2)</sup>	GA yield [w/w %]	Detected compounds
		MW	[µg]	[nmol]			
CG	Flavan-3-ol	442.4	191.2	432.2	○	32.59±0.28 <sup>3)</sup>	GA+CT
ECG	Flavan-3-ol	442.4	205.6	464.7	○	31.72±0.45	GA+EC
GC	Flavan-3-ol	306.3	179.6	586.4	×		GC
EGC	Flavan-3-ol	306.3	195.6	638.6	×		EGC
GCG	Flavan-3-ol	458.4	191.6	418.0	○	32.04±0.51	GA+GC
EGCG	Flavan-3-ol	458.4	185.6	404.9	○	32.31±0.50	GA+EGC
EA		338.1	135.5	400.8	×		
TGG	gallotannin	788.6	186.4	236.4	○	61.93±1.44	GA
PGG	gallotannin	940.7	234.4	249.2	○	61.47±1.36	GA
TA	gallotannin		1000		○	85.42±1.38	GA
Food additive TA 1	gallotannin		1000		○	82.68±3.62	GA
Food additive TA 2	gallotannin		1000		○	79.95±2.21	GA
Polyphenon-100	green tea polyphenol		204.4		○	23.58±1.28	GA+GC+EGC+CT+EC

1) Abbreviations are: CG, (-)-catechin gallate; ECG, (-)-epicatechin gallate; GC, (-)-gallocatechin; EGC, (-)-epigallocatechin; GCG, (-)-gallocatechin gallate; EGCG, (-)-epigallocatechin gallate; EA, ellagic acid; TGG, 1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucose; PGG, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose; TA, tannic acid; GA, gallic acid; CT, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin.

2) To the test tube containing each compounds, 5 mL of 0.05 M citrate buffer (pH 5.5) and tannase (50 U) were added, and the mixture was incubated at 30°C for 2 hrs. Tannase was inactivated by addition of 0.5 mL of 1.0 N HCl.

After evaporation to dryness, the residue was dissolved in 2 mL of methanol and the hydrolyzate was determined by HPLC.

3) Data are means±SD for 5 trials.

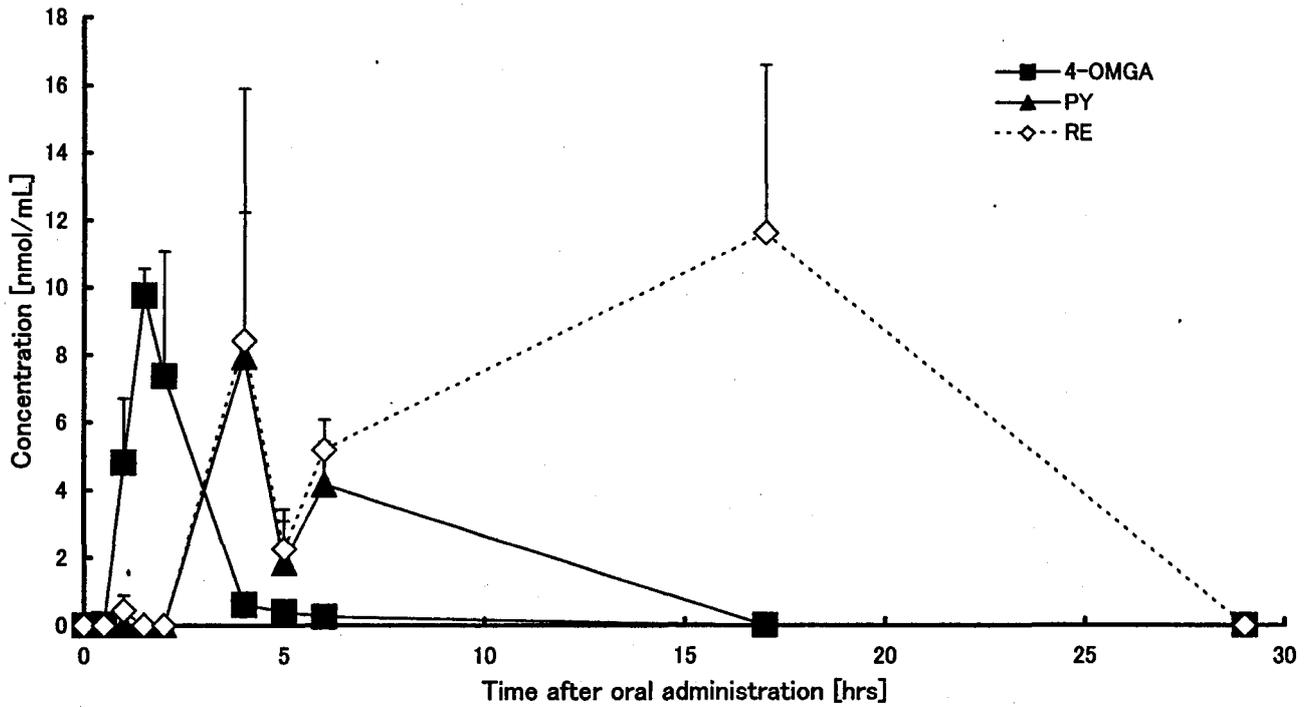


Fig.5 Serum concentration of TA metabolites as a function of time (TA 1.0/kg)

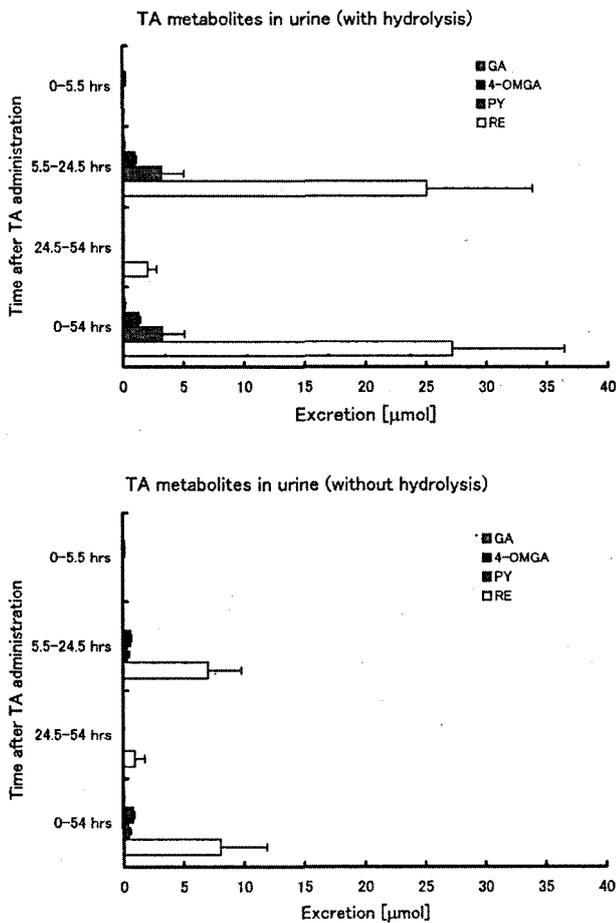


Fig.6 Urinary excretion of TA metabolites as a function of time (TA 1.0g/kg)

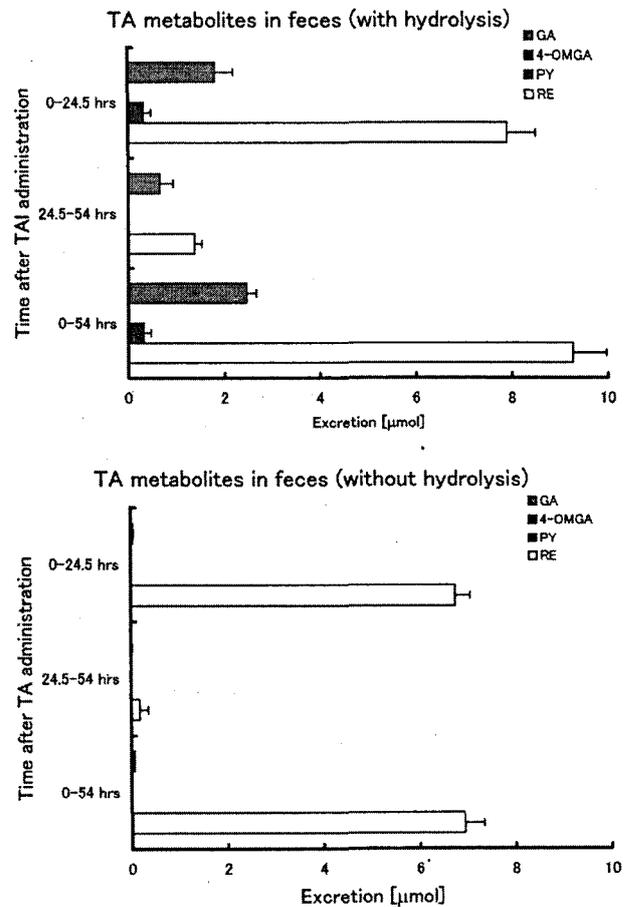


Fig.7 Fecal excretion of TA metabolites as a function of time (TA 1.0g/kg)

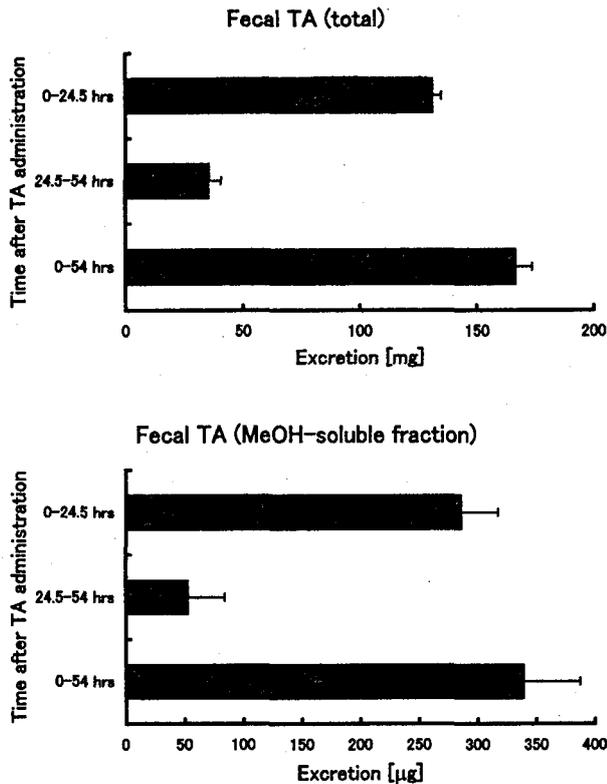


Fig.8 Fecal excretion of TA as a function of time (TA 1.0g/kg)

いは硫酸抱合されており、遊離型は殆ど検出されなかった。CT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECともに投与3時間後に血中濃度が最大となり、20時間後には殆ど消失した。

尿中のGSP代謝物排泄量の経時的变化をFig.10に示す。尿中から検出された主要な代謝物はCT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECの4種であった。投与後49時間以内に排泄された代謝物の一部は遊離型として存在し、遊離型の割合は27.5-49.1%であった。しかし、糞中からはこれらの代謝物は検出されなかった。

投与量に対する尿中へのGSP代謝物の排泄率(w/w%)をTable.3に示す。代謝物の排泄は投与後早い時間より始まり、検出された代謝物のうち投与後4.5時間以内に26.3-48.5%, 25時間以内に79.7-91.7%が排泄された。

一方、GSPH投与ラットの血清からはGSP代謝物は全く検出されず、尿中からもGSP代謝物は殆ど検出されなかった。

#### [考察]

タンナーゼはTable.1に示したように、TA等に含まれるGAのエステル結合を加水分解してGAを生ずる。我々はこの作用を利用してこれまで困難とされてきた糞中のTA分析を試みた。投与されたTAは66.12%が尿及び糞中へTA或いはその代謝物として排泄されることが明らかとなった。糞中へは62.74%がTAとして、0.97%がTA代謝物として排泄され、尿中へは2.41%がTA代謝物として排泄された。一方、投与したTAに含まれるGA含量は0.3%以下であることより、投与されたTAの一部が腸管内でタンナーゼの働きで加水分解され、生じたGAが腸管より吸収されてさらに代謝される、或いは腸管内でさらに代謝された化合物が吸収される可能性が考えられた。回収されなかった部分については、GAがさらに代謝されてTCA回路に組み込まれて呼気中にCO<sub>2</sub>として排気される可能性、或いは糞と結合しているTAの一部がタンナーゼを作用させても回収されなかった可能性の両方が考えられる。

一方、GSPの代謝に関しては報告が殆どない。糞中のGSP分析について、TAと同様タンナーゼを作用させる方法を試みたが、うまくいかなかった。また、GSP分析に一般的に適用されているバニリン-塩酸法<sup>4)</sup>は、糞抽出液そのものが着色しているため適用できなかった。糞中からのGSP分析法は今後の課題である。

GSPには元来少量のCT及びECが含まれているため、血中及び尿中のCT, EC, 3'-OMCT及び3'-OMECがGSPに含まれるCT及びECに由来するのか、或いはGSPの高分子化合物が一部消化管内で加水分解されて生ずるCT及びECにも由来するのか見極める必要があると思われる。そのため、GSPよりCT及びECを殆ど含まない高分子化合物GSPHを投与し、血中及び尿中の代謝物濃度を調べた。その結果、血中からも尿中からもCT, EC, 3'-OMCT, 3'-OMECが殆ど検出されなかつ

Table.2 Excretion rate of TA and its metabolites in urine and feces (% of total)

Compounds	Excretion rate [% of total]						
	In urine				In feces		
	0-5.5 hr	5.5-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr	0-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr
TA					49.48±1.47	13.26±1.88	62.74±2.36
GA	0.00±0.00 <sup>1)</sup>	0.01±0.00	ND <sup>2)</sup>	0.01±0.00	0.16±0.02	0.03±0.01	0.19±0.02
4-OMGA	0.02±0.00	0.07±0.01	ND	0.10±0.01	ND	ND	ND
PY	0.00±0.00	0.24±0.13	ND	0.24±0.13	0.02±0.01	ND	0.02±0.01
RE	0.00±0.00	1.87±0.65	0.18±0.05	2.06±0.70	0.65±0.04	0.10±0.01	0.76±0.04

Abbreviations are: TA, tannic acid; GA, gallic acid; 4-OMGA, 4-O-methyl gallic acid; PY, pyrogallol; and RE, resorcinol.

1) Data are means ±SEM for 6 rats.

2) ND, not detected.

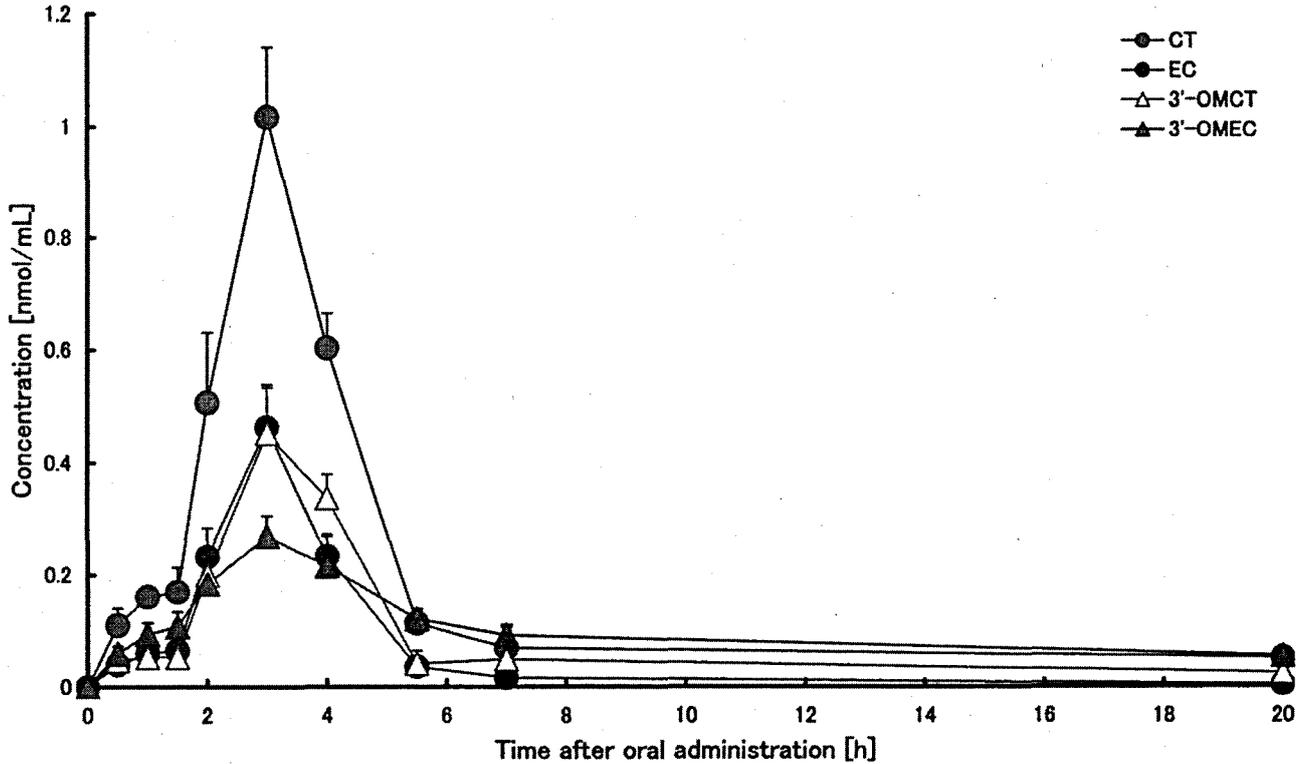


Fig.9 Serum concentration of GSP metabolites as a function of time (GSP 1.0/kg)

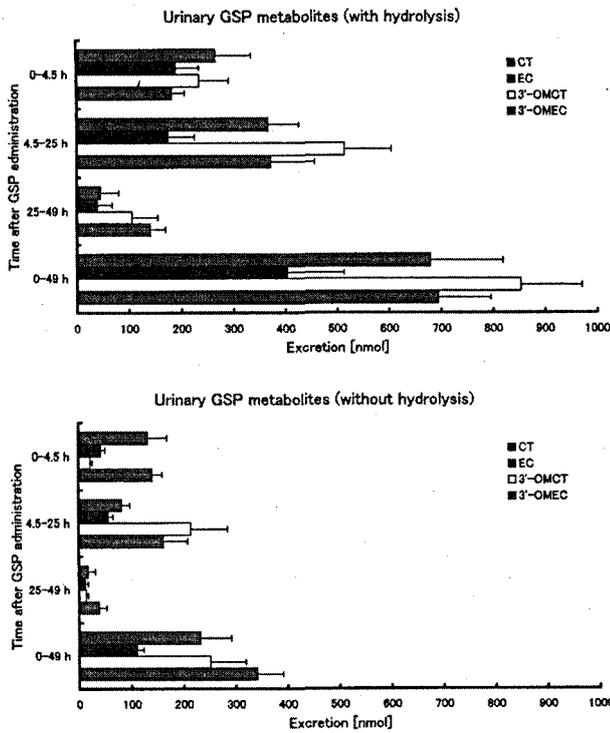


Fig.10 Urinary excretion of GSP metabolites as a function of time (GSP 1.0/kg)

た。そのことより、血中及び尿中に検出されたGSPの代謝物は、GSPが消化管内で加水分解されて生じるCT及びECに由来すると考えるよりも、寧ろGSPに少量含

Table.3 Excretion rate of GSP and its metabolites in urine (GSP 1.0 g/kg)

Compound <sup>b</sup>	Excretion rate <sup>a</sup> (w/w % of total) in urine			
	0-4.5 hr	4.5-25 hr	25-49 hr	0-49 hr
GSP				
CT	0.027±0.007	0.024±0.006	0.005±0.004	0.055±0.014
EC	0.019±0.005	0.017±0.005	0.004±0.003	0.040±0.011
3'-OMCT	0.024±0.006	0.053±0.009	0.011±0.005	0.088±0.013
3'-OMEC	0.019±0.003	0.038±0.008	0.015±0.003	0.071±0.010

<sup>a</sup> Data are means±SEM for 6 rats.

<sup>b</sup> Abbreviations: GSP, grape seed polyphenol; CT, (+)-catechin; EC, (-)-epicatechin; 3'-OMCT, 3'-O-methyl-(+)-catechin; 3'-OMEC, 3'-O-methyl(-)-epicatechin.

<sup>c</sup> ND, not detected.

まれているCT及びECに由来すると考える方が妥当であるように思われた。

【文 献】

- 1) Kantz, K., Singleton, V. L.: Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 223-228 (1990).
- 2) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 331-339 (2003)
- 3) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J. Health Sci.*, **49**, 45-54 (2003).
- 4) Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., Spranger, I.: Critical factors

of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4267-4274 (1998).

#### [発表論文]

- a) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 331-339 (2003)

#### [関連する発表論文]

- b) Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S. and Tonogai, Y.: Effects of the oral administration of green tea polyphenol and tannic acid on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in rats. *J. Health Sci.*, **47**, 107-117 (2001).
- c) Nakamura, Y. and Tonogai, Y.: Effects of grape seed polyphenols on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Health Sci.*, **48**, 570-578 (2002).
- d) Nakamura, Y., Tsuji, S. and Tonogai, Y.: Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J. Health Sci.*, **49**, 45-54 (2003).

### 3. 生体側から見た生理活性物質の構造と関連遺伝子の構造解析

#### (1) エストロゲン受容体結合化学物質の構造と親和性との関係

環境衛生化学部 西村哲治, 金子裕美,  
平川江美, 安藤正典

大阪大学大学院薬学研究科 西川淳一, 西原 力

#### [目的]

我々の生活環境には種々多様な合成化学物質が存在している。これらの化学物質は経口、経皮もしくは経気道により吸収されて、健康に影響を及ぼしていると考えられる。その中で、生体で産生されている内因性ホルモンの作用を促進もしくは阻害する化学物質は、内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体が恒常性を保つ機能をかく乱するだけでなく、次世代への影響も懸念され、大きな問題となっている。

内因性ホルモンは標的器官の細胞内特異的受容体と結合し、標的器官を特徴付ける遺伝子の転写発現を制御している。本研究では、この機構を利用して作製されたエストロゲン $\alpha$ 受容体遺伝子組換え酵母株を用いる内分泌かく乱化学物質評価試験系である Two-Hybrid System により、エストロゲン受容体との親和性を調べ、化学物

質の内分泌かく乱性と構造との関係について検討をおこなった。

酵母 Two-Hybrid System は、ヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体のリガンド結合部位と GAL4DNA 結合領域の融合タンパク質、GAL4 転写活性領域とヒトコアクチベーター TIF II 転写活性促進領域の融合タンパク質を発現し、GAL4 タンパク質の DNA 結合配列と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子およびそのプロモーターを含む構築プラスミドを持つ遺伝子組換え酵母株を用いる試験系である。細胞内に取り込まれた化学物質は、ヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体のリガンド結合部位と結合した結果、構築遺伝子の遺伝子産物である  $\beta$ -ガラクトシダーゼを誘導産生する。産生された  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定することにより化学物質のヒトエストロゲン $\alpha$ 受容体との親和性を評価する。

#### [方法]

試験方法は、従法に従って行った<sup>1)</sup>。対数増殖期にある試験酵母に、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した供試化学物質を DMSO の最終濃度が 1% になるように添加し、30℃で4時間曝露した。曝露後、細胞膜を破壊し、細胞質画分を遠心により分離回収し、2-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシドを発色基質として細胞質画分に含まれる  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定した。

#### [結果及び考察]

1. フェノール類のエストロゲン受容体への親和性と構造  
検討した11種のフェノール類 (Fig.1) については、5種類にエストロゲン様活性が認められた。4-*tert*-オクチルフェノールでは  $10^{-7}$  M 以上  $3 \times 10^{-5}$  M 以下の濃度範囲で、4-*tert*-ペンチルフェノールでは  $10^{-6}$  M 以上  $10^{-5}$  M 以下の濃度範囲で、4-*sec*-ブチルフェノールおよび4-*tert*-ブチルフェノールでは  $10^{-5}$  M 以上  $3 \times 10^{-4}$  M 以下の濃度範囲で、ビスフェノール A では  $10^{-6}$  M 以上  $3 \times 10^{-4}$  M 以下の濃度範囲でエストロゲン様活性が認められた (Table.1)。これらの結果から次の2点が推論される。(1) フェノール、3-*sec*-ブチルフェノール、2-*tert*-ブチルフェノールおよび2-*sec*-ブチルフェノールではエストロゲン様活性が検出されなかったことから、ベンゼン環に結合する水酸基に対してパラ位に何かが結合した構造をとることがエストロゲン $\alpha$ 受容体と親和性を持つための要素である。(2) 4-*n*-オクチルフェノールおよび4-*n*-ノニルフェノールでは活性が検出されなかったことから、パラ位に結合する側鎖の構造は直鎖のアルキル基ではエストロゲン $\alpha$ 受容体との結合親和性が低い。生理活性物質である17 $\beta$ -エストラジオールの構造上に類似の構造を当てはめることが出来ることから、これらの推論を支持することができるものと考えられる。水酸

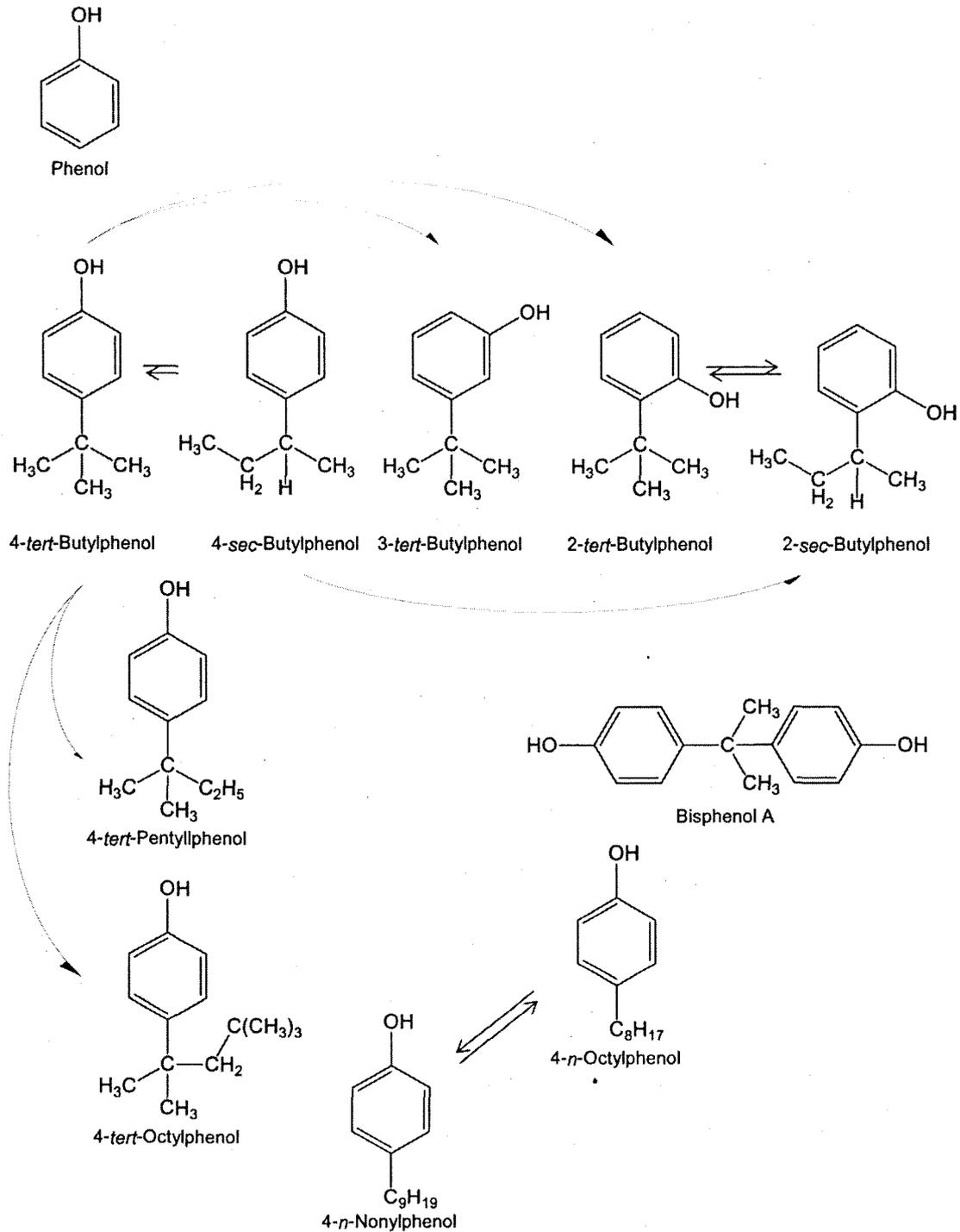


Fig.1 Structures of phenol derivatives

基に対してパラ位に分岐したアルキル基等の構造を持つ、エストロゲン様活性が認められた5物質については、4-*tert*-オクチルフェノールでは $10^{-5}$  M、4-*tert*-ペンチルフェノールでは $10^{-5}$  Mで、4-*sec*-ブチルフェノールでは $3 \times 10^{-4}$  M、4-*tert*-ブチルフェノールでは $10^{-4}$  MおよびビスフェノールAでは $10^{-5}$  Mの暴露濃度で、エストロゲン様活性が最大となった。エストロゲン様活性の最大活性が得られる濃度については、*sec*-ブチル基>

*tert*-ブチル基>*tert*-ペンチル基=*tert*-オクチル基の順に高い暴露濃度を必要とした。これは、分岐した側鎖の炭素数が $-\text{CH}_3\text{CHC}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ と増加するに従い、エストロゲン様活性が最大となる暴露濃度が低くなる傾向を示している。また、4-*sec*-ブチルフェノールと4-*tert*-ブチルフェノール比較すると、 $-\text{C}-2\text{C}-$ よりも $-\text{C}-3\text{C}$ と、4位に結合している炭素に結合する官能基によりエスト

Table.1 Estrogen-like Activities of Phenols

Compound	Concentration Induced Maximum Activity (M)	Induced Units	% of 17 $\beta$ -Estradiol (10 <sup>-8</sup> M)
Phenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
4- <i>tert</i> -Butylphenol	10 <sup>-4</sup>	95	17.3
4- <i>sec</i> -Butylphenol	3 × 10 <sup>-4</sup>	374	68.2
3- <i>tert</i> -Butylphenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
2- <i>tert</i> -Butylphenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
2- <i>sec</i> -Butylphenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
4- <i>tert</i> -Pentylphenol	10 <sup>-5</sup>	126	23.0
4- <i>tert</i> -Octylphenol	10 <sup>-5</sup>	170	31.0
4- <i>n</i> -Octylphenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
4- <i>n</i> -Nonylphenol	>10 <sup>-3</sup>	—	—
Bisphenol A	10 <sup>-5</sup>	164	29.9
17 $\beta$ -Estradiol	(10 <sup>-8</sup> )	548	100

ロゲン様活性の最大活性を示す暴露濃度が異なっていた。これらのことは、パラ位に結合するアルキル基は構造的に一定以上の空間を占めることが必要であることを示唆している。ビスフェノールAの場合にも、この推論が適合している。被験化学物質のエストロゲン様活性を、10<sup>-8</sup> Mの17 $\beta$ -エストロゲンを暴露した際のエストロゲン活性に換算すると、最大の活性を示した4-*sec*-ブチルフェノールでは30000倍の濃度で68%相当の活性であった。また、4-*tert*-ブチルフェノールでは10000倍の濃度で、17%相当の活性を示した。4-*tert*-オクチルフェノール、4-*tert*-ペンチルフェノールおよびビスフェノールAでは1000倍の濃度でそれぞれ31%、23%および30%相当の活性であった。側鎖が*tert*構造を持つこれらの化学物質の間では、結合・解離を総括した親和性として10倍の差が認められるながら、エストロゲン様活性には大きな差が認められない結果であった。これだけの結果からは結論を導き出すのは難しいが、側鎖の*tert*構造と空間的に占める体積が、エストロゲン $\alpha$ 受容体のリガンド結合領域がつくる空間と原子間の配位との関係で重要な要素であると推測される。また、側鎖の*sec*構造はエストロゲン $\alpha$ 受容体との親和性については低い、解離の程度が悪くエストロゲン様活性を誘導する能力を長期に維持する結果、エストロゲン様活性が高く出たのではないかと考えられる。

以上の結果から、エストロゲン様活性を示す化学物質は、酵母Two-Hybrid Systemで解析するかぎりでは、①フェノール骨格を持ち、②水酸基に対してパラ位に、③-C-3Cがとる立体空間を持ち、④分岐した炭素鎖を持つ構造を持つと考えられる。エストロゲン様活性が未知の化学物質について、エストロゲン様活性の有無を推測するには上記の要件は一つの指標となりうるであろう。ここでは生化学的な結果のみに基づく推論であるため、コンピュータなどによるエストロゲン受容体と化学

物質の立体構造相互作用シミュレーション解析を進めることによりさらに明確な結論が導かれるものと期待される。

また、ここで仮説を導く根拠とした試験結果は酵母細胞の試験系を用いており、対象とする化学物質の細胞膜透過性については考慮がなされていない。対象とした化学物質が膜を透過しないとエストロゲン受容体と結合できないことから、化学物質の膜透過性の程度が結果に影響していることも考慮しておかなければならない。また、ヒトを対象とする場合、酵母と哺乳動物細胞との膜の違いがあり、化学物質の構造上透過性に差があることも考えられ、哺乳動物の内分泌かく乱性を考えた場合、注意しておく必要があるであろう。

## 2. オクチルフェノールエトキシレート類およびノニルフェノールエトキシレート類のエストロゲン様活性

界面活性剤などの原料として使用されているオクチルフェノールポリエトキシレートやノニルフェノールポリエトキシレートは、環境中に排出された後、微生物などにより生分解されてジエトキシレートやモノエトキシレート体になることが知られている。そこで、4-*tert*-オクチルフェノールエトキシレート、4-*tert*-オクチルフェノールジエトキシレート、ノニルフェノールエトキシレートおよびノニルフェノールジエトキシレートのエストロゲン様活性を酵母Two-Hybrid Systemにより測定したが、有意な活性は検出されなかった。他の検出方法ではエストロゲン様活性が認められることから、酵母の系ではこれらの化学物質の膜透過性が低く細胞内に取り込まれずエストロゲン受容体と結合できなかったのではないかと推測された。

## 3. ビフェニル類のエストロゲン様活性

ビフェニル、*o*-ヒドロキシビフェニル、*m*-ヒドロキシビフェニル、*p*-ヒドロキシビフェニル、2,2'-ジヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルについてエストロゲン様活性を酵母Two-Hybrid Systemにより測定した (Fig.2)。ビフェニルおよび2,2'-ジヒドロキシビフェニルはエストロゲン様活性が認められなかったが、*p*-ヒドロキシビフェニルは10<sup>-6</sup> Mから3 × 10<sup>-4</sup> Mの濃度範囲で活性が見られ、3 × 10<sup>-5</sup> Mの濃度で最高活性を示した。17 $\beta$ -エストラジオールの10<sup>-8</sup> Mの活性に対して35.9%相当であった。*o*-ヒドロキシビフェニルおよび*m*-ヒドロキシビフェニルでは10<sup>-3</sup> Mから10<sup>-5</sup> Mの濃度範囲で、最高活性として10<sup>-4</sup> Mの濃度において極わずかであるが検出された。4,4'-ジヒドロキシビフェニルでは3 × 10<sup>-5</sup> Mから10<sup>-3</sup> Mの濃度範囲で、3 × 10<sup>-4</sup> Mの濃度で17 $\beta$ -エストラジオールの10<sup>-8</sup> Mの活性に対して55.9%相当の最高の活性を示した。水酸基に対して

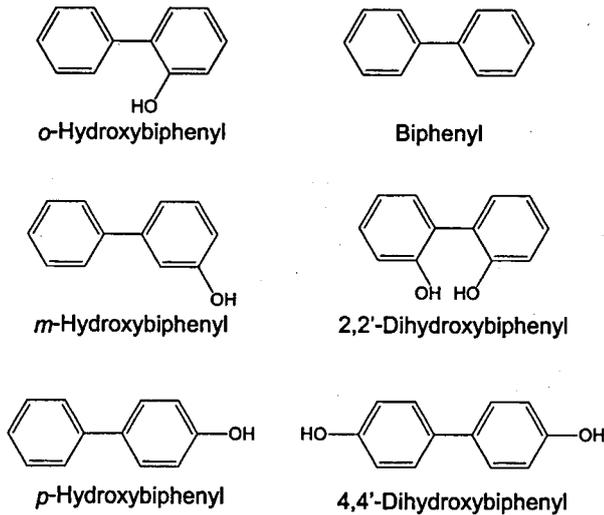


Fig.2 Structures of biphenyl derivatives

パラ位にベンゼン環がついた*p*-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルで強いエストロゲン様活性が認められた結果は、先に推論した仮説を支持するものであった。

さらに、これらのビフェニル類をラット肝ミクロソーム画分により代謝を行い、エストロゲン様活性を測定した。最終濃度として10% S9, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 16.5 mM KCL, 2.5 mM Glucose-6-phosphate, 2 mM NADPH, 2 mM MNADH, 50 mM Na-PO<sub>4</sub> (pH 7.4) の組成をもつ溶液を調整してエストロゲン様活性測定反応液に添加し、エストロゲン活性の反応時に代謝を同時に行った。S9は、5,6-ベンゾフランとフェノバルビタールを腹腔内投与し、酵素誘導をかけたラットの肝臓から調製したミクロソーム画分である。代謝することによりエストロゲン様活性が有意に増加する傾向が認められた (Table.2)。ビフェニルは代謝を行わない場合は活性が検出されなかったのに対し、代謝を行うと10<sup>-8</sup> Mの濃度の17β-エストラジオールを暴露した際の活性に換算すると33%相当の活性が見られるようになった。同様に、*m*-ヒドロキシビフェニル、*p*-ヒドロキシビフェニルおよび4,4'-ジヒドロキシビフェニルではそれぞれ、2.4%が24.4%、

35.9%が75.8%, 55.9%が107.1%相当の活性の増加が認められた。ここで行った代謝は主として酸化反応を促進するものであり、結果的に水酸基が付加する反応であることを考えると、代謝反応をおこなうことにより水酸基が付加したフェノール構造が生じて、エストロゲン様活性の増加が見られたと考えられる。代謝反応後の生成物の構造を同定していないため、結論を述べることは出来ないが、上記の仮説を支持する結果である。

4. おわりに

エストロゲンα受容体に結合親和性のある化学物質は、酵母Two-Hybrid Systemによる活性から推測するところでは、①フェノール骨格を持ち、②水酸基に対してパラ位に、③-C-3Cがとる立体空間を持ち、④分岐した炭素鎖を持つ構造であるとの推論を得た。したがって、このような構造を持つ化学物質は内分泌かく乱性を有する候補物質と推測される。

【参考文献】

1) J. Nishikawa, K. Saito, J. Goto, F. Dakeyama, M. Matsuo, T. Nishihara, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 76-83 (1999)

(2) 2段階形質転換試験のプロモーション期に認められる発がんプロモーターによるNP95 mRNAの過剰発現

衛生微生物部 酒井綾子, 高鳥浩介

【目的】

本研究は、発がんプロモーターが誘導する多様な遺伝子発現変化を分析し、化学物質による発がん促進の機序を解析するとともに、遺伝子発現変化を指標とする簡便な発がんプロモーター検出法を開発することを目的として行っている。BALB/3T3細胞2段階形質転換実験系を2段階発がんのin vitroモデル系として用いている。第一次で、作用機序の異なる3つの発がんプロモーター、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート

Table.2 Estrogen-like Activities of Biphenyls

Compounds	Excretion rate [% of total]						
	In urine				In feces		
	0-5.5 hr	5.5-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr	0-24.5 hr	24.5-54 hr	0-54 hr
TA					49.48±1.47	13.26±1.88	62.74±2.36
GA	0.00±0.00 <sup>1)</sup>	0.01±0.00	ND <sup>2)</sup>	0.01±0.00	0.16±0.02	0.03±0.01	0.19±0.02
4-OMGA	0.02±0.00	0.07±0.01	ND	0.10±0.01	ND	ND	ND
PY	0.00±0.00	0.24±0.13	ND	0.24±0.13	0.02±0.01	ND	0.02±0.01
RE	0.00±0.00	1.87±0.65	0.18±0.05	2.06±0.70	0.65±0.04	0.10±0.01	0.76±0.04

Abbreviations are: TA, tannic acid; GA, gallic acid; 4-OMGA, 4-O-methyl gallic acid; PY, pyrogallol; and RE, resorcinol.

1) Data are means ±SEM for 6 rats.

2) ND, not detected.

(TPA), オカダ酸, オルトバナジン酸塩によって, 共通してネズミ核タンパク質NP95の発現増強が形質転換プロモーション期に誘発されることをmRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ法 (DD法) によって示した. 第二次では, NP95 mRNAの発現上昇をRT-PCRとノーザンブロットによって確認するとともに, BALB/3T3細胞2段階形質転換試験のプロモーション期におけるNP95 mRNAの経時的発現変化や, NP95 mRNA発現増強の特異性について調べ, 形質転換促進との関連性を論じた. なお, オルトバナジン酸塩は, 実験動物における発がん促進作用を報告されていないが, 細胞形質転換を強く促進するのでin vitro発がんにおけるプロモーターとして用いている.

#### [方法]

##### 1. 細胞培養

マウス細胞株BALB/3T3クローンA31-1-1(JCRB0601)は, 国立医薬品食品衛生研究所細胞バンクより供与された. 形質転換株は, すべて我々の研究室においてBALB/3T3細胞の化学物質による形質転換によって生じたフォーカスから分離したものをを用いた.

##### 2. 細胞の化学物質による処理とRNAの抽出

BALB/3T3細胞の発がんプロモーターによる処理は, 2段階形質転換試験と同じ条件で行った. すなわち, 細胞を $10^4$ 個/dishの密度で播種し, 途中1回の培地交換を行って1週間培養した. TPA (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), オカダ酸 (0.015  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2回目以降は, 0.012  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) またはオルトバナジン酸ナトリウム (1.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた培地で培地交換を行って2週間プロモーション処理を行った. この間, 培地交換は, 0, 4, 7, 11日目に行った. 発がんプロモーターを加えない培地で同様の処理を施し, 対照細胞とした. プロモーション処理開始後, 0, 24時間, 3, 7, 14日目に全RNAを抽出した. RNA抽出には, TRIzol (ライフテックオリエンタル) 試薬を用い, さらにISOGEN試薬 (和光純薬) で精製してDD法, RT-PCR, ノーザンブロットによるNP95 mRNAの分析に供した.

典型的な発がん物質によってもBALB/3T3細胞を処理した. 処理は, 発がんプロモーターによる場合と同様に行い, ベンゾ [a] ピレン (BaP, 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) または3-メチルコラントレン (MCA, 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  または2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を加えた培地で培地交換を行って細胞を24時間処理した. 全RNAを抽出し, 定量的RT-PCR (RQ-RT-PCR) によるNP95 mRNAの分析に供した.

形質転換細胞は, confluenceに達した後さらに2日間培養して全RNAを抽出し, NP95 mRNAをRQ-RT-PCRによって分析した.

##### 3. mRNA・ディファレンシャル・ディスプレイ

全RNA 2.5  $\mu\text{g}$ とFITCラベルしたGT<sub>15</sub>VG 50 pmol (Vは, A, CまたはG) とから逆転写酵素反応によって第一鎖cDNAを調製した. この第一鎖cDNAの1/50量に5'側プライマー (OPA-09: 5'-GGGTAACGCC-3', Operon Technologies) 10 pmolとFITC-GT<sub>15</sub>VG 5 pmolを加えてlow stringencyでPCRを行った. PCR産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離させ, そのままあるいはSYBR Green Iで染色後, 蛍光イメージアナライザーでスキャンして可視化した.

##### 4. RT-PCR

発がんプロモーターによる処理を施した細胞から抽出したRNAから, DD法に用いた第一鎖cDNAとは別に新たに第一鎖cDNAを調整し, NP95遺伝子のオープンリーディングフレーム内に設定した特異的プライマーを用いてhigh stringencyでPCRを実施した. NP95特異的オリゴヌクレオチドプライマーは, 5'-GCAAGGATGATGAAAACAAACC-3'(5' primer) と 5'-CCAGCCAGGACCAATGAGTAGG-3'(3' primer) を用いた. PCR産物は, 3%アガロースゲル電気泳動で分離した.

典型的な発がん物質を作用させた細胞と形質転換細胞から抽出したRNAからは, ランダムプライマー (N<sub>6</sub>) を用いて第一鎖cDNAを調整し, NP95特異的プライマーとクァンタムRNAアルタネート18Sインターナルスタンダード (Ambion) を用いてRQ-RT-PCRを行った.

##### 5. ノーザンブロット

発がんプロモーターを作用させた細胞から抽出した全RNA 10  $\mu\text{g}$ を1.2%アガロース-0.66 Mホルムアルデヒドゲル電気泳動で分離してナイロンフィルターへブロットし, <sup>32</sup>Pでラベルしたプローブとハイブリダイズした. ナイロンフィルターを洗浄後, イメージングプレートへ暴露し, BAS 1500 (富士写真フィルム) を用いて分析した.

##### 6. 5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込み

BALB/3T3細胞を96穴プレートに播種し (250/well), 通常培地ではほぼconfluenceに達するまで (7日間) 培養した. 発がんプロモーターを加えた培地に交換して24時間培養した後, 培地にBrdUを添加してさらに1時間培養した. 細胞に取り込まれたBrdUは, セルプロリファレーションELISA-BrdUキット (Roche) によって測定した.

#### [結果]

NP95 mRNAは, DD法では, 約530bpのバンドを生じた. DD法に於ける530bpのバンドの濃さの経時的な

変化とRT-PCR並びにノーザンブロットに於けるNP95のバンドの濃さの変化は、よく一致した。DD法、RT-PCR、ノーザンブロットの結果から、NP95 mRNAの発現は、処理開始24時間後に対照細胞において増加すること、TPA、オカダ酸、オルトバナジン酸塩による処理を施した細胞では、対照細胞よりも大きな増加が認められること、増加の程度は、TPAで最も大きくついでオルトバナジン酸塩、オカダ酸の順であること、対照細胞のNP95 mRNAの発現増加は、3日以内に通常の水準に戻るが、発がんプロモーターによる処理を施した細胞では、3日後も対照細胞よりも高い水準を維持することが明らかになった。さらに、オカダ酸とオルトバナジン酸塩で処理された細胞では、処理開始7日後、14日後になっても対照より高いNP95 mRNAの発現があった。

NP95は、増殖に関係する95-kDaのマウス核タンパク質として同定された。そのcDNAは、782アミノ酸からなる蛋白質をコードしている。NP95は、ATP/GTP結合サイト、ジンクフィンガーモチーフ、サイクリンA/E cdk2リン酸化サイト、レチノプラストーム結合サイトと推定される構造を有している。NP95の生理学的な機能はまだ明らかになっていないが、NP95 mRNAと蛋白質は、静止期の細胞では極めて少なく、10%血清刺激により増加すること、大部分の増殖中の細胞では発現が増加していることが報告されている。対照細胞には、発がんプロモーターを含まない新鮮培地による培地交換が施されている。そこで、新鮮培地の代わりにexhausted mediumを用いて培地交換を行ったところ、NP95 mRNAの発現増加は誘導されなかった。さらに、exhausted mediumに新たに血清を添加して培地交換を行うと処理24時間後のNP95 mRNAの発現が増加した。このことから、対照細胞で認められたNP95発現増加は、血清刺激によるものであると考察した。血清刺激によるNP95の発現増加は、3日以内に通常の水準に戻るため、24時間後以外のRNAについては、抽出が培地交換の3日後に行われており、血清刺激によるNP95発現への影響は消失していると考えられる。

次に、TPA、オカダ酸、オルトバナジン酸塩による処理にともなう細胞のDNA合成活性の変化をBrdUの取り込みによって調べた。処理開始24時間後、対照細胞でBrdUの取り込みが増加した。発がんプロモーターによる処理を施した細胞では、対照細胞より大きい取り込み増加があり、増加の程度は、TPAで最も大きくついでオルトバナジン酸塩、オカダ酸の順であった。また、対照細胞に認められたDNA合成活性上昇は、exhausted mediumを用いる培地交換では、誘導されなかった。このようにNP95 mRNAの発現増加とDNA合成活性の上昇とは、全く同様の変化を示し、NP95の発現増加は、BALB/3T3細胞においても増殖に関連していることが示

唆された。

NP95 mRNAの発現増加が発がんプロモーション作用に関連するものであるかどうかを調べるために、BALB/3T3細胞を典型的な発がん物質の2つの濃度水準で24時間処理した。すなわち、BALB/3T3細胞形質転換においてイニシエーターとして活性があるが発がんプロモーターの助けなしには形質転換を誘発しないBaP 0.05  $\mu\text{g/ml}$  またはMCA 0.2  $\mu\text{g/ml}$  と、単独で形質転換活性を示すMCA 2  $\mu\text{g/ml}$  とによる処理を行った。BaP 0.05  $\mu\text{g/ml}$  またはMCA 0.2  $\mu\text{g/ml}$  を含む培地で培地交換を行った細胞のNP95 mRNAの発現増加は、対照細胞と同等であったが、MCA 2  $\mu\text{g/ml}$  を含む培地で培地交換を行った細胞では、対照細胞より高いNP95 mRNAの発現増加が認められた。このことは、NP95の発現増加は、発がんプロモーター特異的なものではなく典型的発がん物質によっても濃度が十分であれば誘導されることを示唆している。しかしながら、2段階発がん説では、化学発がんの達成にはイニシエーション作用とプロモーション作用の両方が必要であり、発がんプロモーターは、プロモーション作用のみを有し、イニシエーション作用を持たないため単独では発がんを起こさないが、完全発がん物質は、発がんプロモーション作用とイニシエーション作用の両方を持っているため単独で発がんを起こすことができるという説明されている。この説に従えば、MCA 2  $\mu\text{g/ml}$  が有するプロモーション作用がNP95の発現増加を誘導したと推定することができる。

BALB/3T3細胞由来の形質転換細胞のすべてにおいてNP95 mRNAの発現は、BALB/3T3細胞に比べて増加していた。NP95の発現増加は、形質転換の維持にも関係している可能性があると考えられる。

#### [まとめ]

この研究の結果は、NP95 mRNAの発現増加が発がんプロモーターによる形質転換の促進に特異的な役割を持っていることを示すものではない。しかしながら、この研究によって作用機序の異なるTPA、オカダ酸、オルトバナジン酸塩が共通してBALB/3T3細胞形質転換のプロモーション期に増殖に関連する遺伝子NP95 mRNAの発現を増強するとともにDNA合成活性をも上昇させることを明らかにすることができた。これによって、形質転換の促進には、少なくとも部分的には、細胞増殖が関係している可能性があることが示唆された。また、化学物質処理後にBALB/3T3細胞に誘導されるNP95 mRNAの発現増加を発がんプロモーター検出のための指標の1つとして利用できる可能性も示された。

#### 発表論文

- 1) Sakai, A., and Teshima, R.: 2,5-Di-tert-butyl-1,4-

- hydroquinone enhances cell transformation accompanied by an increase in intracellular free calcium ion concentration. *Cancer letters*, **168**, 183-190 (2001)
- 2) Sakai, A.: Nonylphenol acts as a promoter in the BALB/3T3 cell transformation. *Mutation Res.*, **493**, 161-166 (2001)
- 3) Sakai, A., Iwase, Y., Nakamura, Y., Sasaki, K., Tanaka, N. and Umeda, M.: 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)
- 4) Sakai, A., Kikuchi, Y., Muroi, M., Masui, T., Furihata, C., Uchida, E., Takatori, K. and Tanamoto, K.: Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 347-351 (2003)

## 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 (平成12年度～平成14年度)

世話人 大野 泰 雄

化学物質の安全性評価においては、分子レベルでの毒性発現機構解析が重要である。特に、従来の実験法では困難な内分泌攪乱化学物質等のような低濃度暴露による影響の評価においては、分子レベルでの毒性発現機構を迅速正確に解析できる方法の研究開発は急務である。しかし、分子生物学的手法の中心であるゲノム解析は、毒性発現の場である細胞の動的な生命活動の解析には不十分である。一方近年の実験技術の進歩は、特定の細胞において特定の時期に発現しているタンパクー式であるプロテオームと細胞の状態との関係の解析からタンパクの機能及び相互作用を明らかにするプロテオミクスにより、生命活動を動的に捉えることを可能にした。また、多数のmRNAを検出するジーンチップテクノロジーはmRNAレベルでの遺伝子発現を動的に解析することを可能にした。さらに、コンピューターサイエンスの進歩は、これらの実験から得られる膨大なデータのデータベース化及びデータ処理により情報を抽出するバイオインフォーマティクスを可能にした。これらの方法により、迅速正確な分子レベルでの毒性発現機構の解析が可能になることが期待されるが、実験技術としても発展段階の状態であり、化学物質の安全性評価法としては確立されていない。本研究では、遺伝子発現を指標とする分子レベルでの毒性発現機構に基づく化学物質の安全性評価法及びスクリーニング法の確立を目標として、タンパク発現及びmRNA発現の変化と毒性との関連、並びにデータベースとしての利用法としての可能性を調べることを目的とした。本研究により、信頼性の高い迅速な化学物質の安全性評価を可能にし、医薬品の開発、化学物質の安全性対策に大きく寄与することが期待される。

第一次研究期間（平成12年度～平成14年度）においては、化学物質の安全性評価に必須である実験方法の信頼性、迅速性及び有効性を高めるために、タンパク発現及びmRNA発現の解析法の検討及び解析する分子の選定を行う。さらに、毒性既知の化学物質を用いた実験によりタンパク発現及びmRNA発現の変化と毒性との関連づけを行いデータベース化し、基礎的な評価法を確立するために以下の研究を行った。

1. タンパク発現を指標とする安全性評価に関する研究
  - (1) ラット初期着床胚のプロテオーム解析による化学物質の安全性評価法に関する研究

- (2) 肝臓における細胞外基質分解に関与する因子のmRNAレベルの変動に着目した化学物質の安全性評価法に関する研究
- (3) 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
- (4) 遺伝子発現を指標とした心血管系における薬効および毒性の病理生化学的解析に関する研究
- (5) 細胞動態関連分子の発現変化を指標とする安全性評価法

### 2. mRNA発現を指標とする安全性評価に関する研究

- (1) 培養マウスケラチノサイトを用いた細胞毒性関連遺伝子に関する研究
  - (2) 化学物質によるアレルギー発症の指標としてのサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現の解析
3. 遺伝子発現データベースを利用した安全性評価に関する研究
    - (1) 化学物質の安全性評価のための遺伝子発現プロファイル解析システムの開発
    - (2) 化学物質による遺伝子発現プロファイル解析のための文献情報検索

第二次研究期間においては、種々の化学物質を用いた実験により評価法をさらに検討するとともにデータを蓄積し、タンパク発現及びmRNA発現の変化から毒性発現機構を推定できる安全性評価法及びスクリーニング法を確立する予定である。

### 1. タンパク発現を指標とする安全性評価に関する研究

- (1) ラット初期着床胚のプロテオーム解析による化学物質の安全性評価法に関する研究

薬理部 宇佐見誠, 大野泰雄

#### [目的]

近年、特定の細胞において特定の時期に発現しているタンパクー式であるプロテオームと細胞の状態との関係を調べるプロテオーム解析によりタンパクの機能及び相互作用を明らかにすることが可能になった。一方、発生毒性を有する化学物質には特有の胚発生異常をおこすものがあり、これらの化学物質はランダムな遺伝子突然変異ではなくmRNA発現、翻訳後修飾および活性阻害等

により、特定の胚タンパクの発現および機能に影響していると考えられる。しかし、主要な器官形成が始まる初期着床胚へのプロテオーム解析の応用は、胚が小さくかつ多様な組織を含むため解析が難しくほとんど行われていない。

本研究では、ラット初期着床胚におけるプロテオーム解析法を確立するとともに、化学物質への暴露による胚の異常とプロテオームの変化との関連を明らかにすることにより、プロテオーム解析を用いた化学物質の発生毒性評価法を確立することを目的とする。プロテオーム解析法として、ラット初期着床胚タンパクの二次元電気泳動法による解析法を検討した。また、胚発育に関与するタンパクと相互作用するタンパクを同定する方法として、アフィニティークロマトグラフィーで前処理したサンプルの二次元電気泳動法による解析法を検討した。

#### [方法]

胎齢11.5日または対応する培養時期のラット胚および卵黄囊膜のタンパクを、二次元電気泳動により分離・解析した。胚または卵黄囊膜を等電点電気泳動用サンプルバッファー中でホモジナイズしサンプルとした。一次元目は固定化pH勾配ゲルを用いた等電点電気泳動によりタンパクの等電点により分離を行い、二次元目はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパクの分子量により分離を行った。泳動終了後にゲルを銀染色し、二次元電気泳動解析装置で解析した。また、胚発育に関与するタンパクを固定したアフィニティークロマトグラフィーで卵黄囊膜サンプルを前処理して同様に解析した。いくつかのタンパクについては、クマシー染色したゲルからタンパクスポットを切り出してトリプシン消化した後、質量分析により同定した。

#### [結果と考察]

##### 1. ラット胚の二次元電気泳動法の検討

ラット胚および卵黄囊膜は、比較的塩を多く含むサンプルであるため、通常の等電点電気泳動ではタンパク沈殿などによる脱塩が必要であったが、胚および卵黄囊膜が小さいことおよび操作を簡略にするために、脱塩を必要としないサンプルバッファーと泳動条件を検討した。その結果、還元剤としてtributyl phosphineを含むサンプルバッファーおよび電極パッドの利用により一胚での胚および卵黄囊膜タンパクの二次元電気泳動解析が可能になった (Fig.1)。この方法ではラット初期着床胚は充分な大きさであるので、胚を形態異常の認められた部位ごとに解析することが可能である。

##### 2. サリチル酸のラット胚プロテオームに及ぼす影響

ラットにおいて発生毒性を示すことが知られているサリチル酸存在下で、24時間培養したラット胚タンパク

の二次元電気泳動像を対照のラット胚のものと比較した。その結果、Fig.2に示したように、サリチル酸存在下で2倍以上増加または減少したタンパクが認められた。現在のところ例数が少ないためこれらの差が単なる個体差である可能性があるが、胚は多様な組織が混在したサンプルであるので、胚組織ごとの発育の差によるのかもしれない。もしそうであれば、プロテオーム解析では一般にサンプルは均質な細胞集団であることが望ましいが、胚サンプルでは組織ごとの発育に及ぼす化学物質の影響を検出できる可能性がある。一方、これらの差が

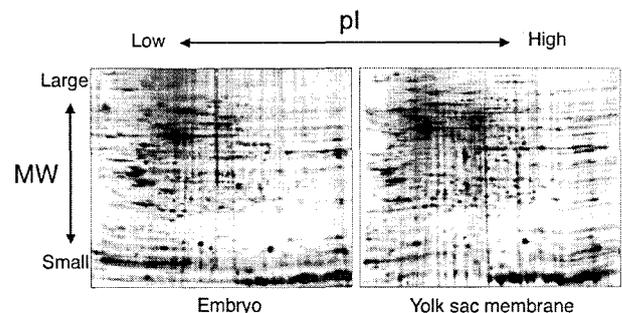


Fig.1. Two-dimensional gel electrophoresis of rat embryonic and yolk sac membrane proteins

Rat embryonic and yolk sac membrane proteins were isolated by isoelectric focusing for the first dimension and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis for the second dimension. After the electrophoresis, the gels were silver-stained for the visualization of protein.

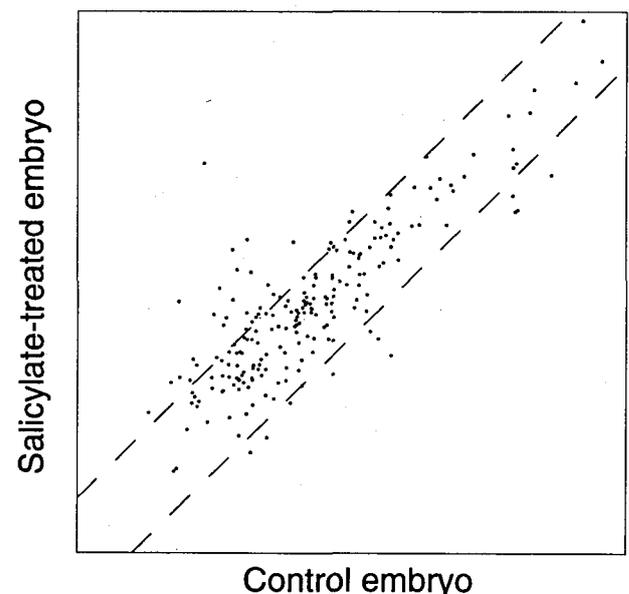


Fig.2. Scatter gram of spot quantity of rat embryonic protein isolated by two-dimensional gel electrophoresis

The quantity of each spot in the control embryo is plotted on a log scale against that in the salicylate-treated embryo. The spots outside the area between dashed lines have quantities different over the factor of two in the two embryos.

各細胞におけるタンパク発現または修飾の変化を表すものであれば、サリチル酸の発生毒性に関与するタンパクの同定につながると期待される。

### 3. 胚発育に関与するタンパクと相互作用するタンパクの同定

胚発育に関与するタンパクを固定したアフィニティゲルに結合したラット卵黄嚢膜タンパクを二次元電気泳動で解析した。その結果、胚発育に関与するタンパクに特異的に結合するタンパクのスポットが見いだされた (Fig.3)。質量分析の結果、このタンパクは胚発育に関与することが知られていない既知のタンパクとして同定された。

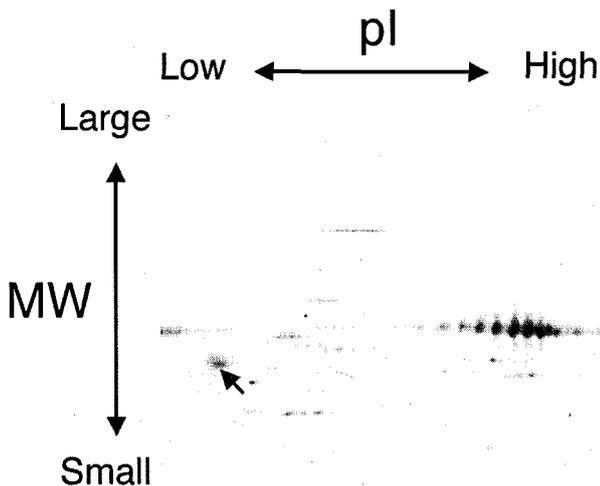


Fig.3. Identification of a yolk sac membrane protein that specifically binds to the embryotrophic factor

Yolk sac membrane protein treated with the embryotrophic factor-conjugated affinity gel was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The specifically bound protein is indicated by the arrow.

#### [発表論文]

- 1) Usami, M., Nakaura, S., Kawashima, K., Tanaka, S. and Takanaka, A.: Culture of postimplantation rat embryos in rabbit serum for the identification of the growth factor in fractionated rat serum. *J. Exp. Zool.*, **264**, 214-218 (1992)
- 2) Usami, M. and Ohno, Y.: Partial purification and characterization of serum embryotrophic factor required for early postimplantation growth of rat embryos in culture. *J. Exp. Zool.*, **276**, 403-414 (1996)

### (2) 肝臓における細胞外基質分解に関与する因子の mRNA レベルの変動に着目した化学物質の安全性評価法に関する研究

生物薬品部 小林 哲, 新見伸吾, 川西 徹, 早川堯夫

#### [目的]

本研究においては化学物質としてフタル酸エステルを用い、肝臓に対する安全性を評価する有用な指標として、細胞外基質成分の分解促進に関与する因子の変動に着目して検討を行った。フタル酸エステルは輸血用プラスチック容器などの医療用具をはじめとして、食品容器、家庭用品等、プラスチック製品で可塑剤として広く用いられている化学物質である。これらプラスチック製品から溶出あるいは蒸散されたフタル酸エステルの人体への摂取に対し、現在、安全性が懸念されている。肝臓はフタル酸エステルの代表的な受容体であるペロオキシゾーム活性化受容体 $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) が最も多く存在する、主要な標的臓器である。フタル酸エステルは肝臓においてペロオキシゾーム $\beta$ 酸化系に関与する酵素の遺伝子発現を促進することにより過酸化水素の産生を亢進し、げっ歯類では結果的に酸化ストレスによるDNAの損傷、さらには癌化を誘発することが知られている。癌の発生過程においては細胞外マトリックスの産生及び分解のバランスの破綻が生ずるが、細胞外マトリックスの分解はMMP-2, MMP-9をはじめとする各種MMPにより起こる。また、プラスミノゲンからプラスミノゲンアクチベーター (PA) による限定分解により生じるプラスミンは、細胞外マトリックスを分解するだけでなく、各種MMPを活性化させることも知られている。そこで本研究においては、フタル酸エステルとしてフタル酸ジ-n-ブチルエステル (DBP) を用い、ラット肝臓のMMP-2, MMP-9, ウロキナーゼタイプ-PA (u-PA), およびu-PA受容体 (u-PAR) mRNAレベルに及ぼす作用について検討を行った。

#### [方法]

##### 1. RNAの調製

雄性ウイスターラット (約200 g) を一群4匹としDBPを8.6 mmol/kg経口投与して、1~48時間後に肝臓を摘出し、市販のキットを用いてトータルRNAを調製した。

##### 2. cDNAの合成

一本鎖cDNAは市販のキットを用い、ランダムヘキサマーをプライマーとしてトータルRNAから合成した。

##### 3. PCR反応

cDNAを90℃, 5分処理後、プライマー及びTaq DNA polymeraseを含むPCR反応液を添加し、PCR反応 (変性: 95℃, 30秒, アニーリング: 55℃, 30秒, 伸長反

応：72℃，60秒）を各プライマーに応じ適切な回数行った。なお、用いるプライマーは各遺伝子に特異的な配列を参考に作成した。

#### 4. PCR産物の定量

PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動後、サイバークリーンで染色し、蛍光イメージアナライザーで定量した。各バンドの蛍光強度は同様に求めて常存性遺伝子であるグリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素のPCR産物の蛍光強度で補正し、無処置のラット肝臓における値に対する相対値として示した。

#### [結果と考察]

Fig.4に示すように、MMP-2 mRNAレベルはDBP投与後6時間でコントロールの約2倍に増加し、以降12時間でコントロールレベル以下に低下した。MMP-9 mRNAレベルも投与後6時間で上昇傾向を示した (Fig.5)。さらに、u-PA mRNAレベルも投与後6時間で約2倍に増加し、以降12時間でコントロールレベル以下に低下した (Fig.6)。一方、u-PAR mRNAレベルはDBP投与後1時間に約2倍増加後、6時間でさらにコントロールの4倍にまで増加し、12時間後にはコントロールのレベルにまで低下した (Fig.7)。

今回の実験においては、DBP投与後、毒性発現に先立ち変動する因子を探索するため、単回投与後短時間における各種mRNAの変動を調べた。その結果、細胞外マトリックスの分解の促進に関与する因子であるMMP-2、MMP-9、u-PA及びu-PARにおいてmRNAレベル

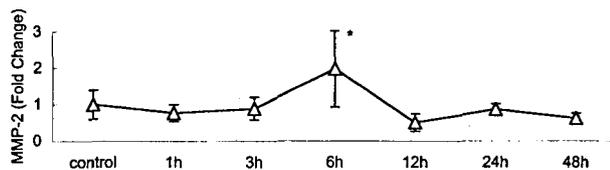


Fig.4. Time course of MMP-2 mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of four rats.

\* $P < 0.05$  compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

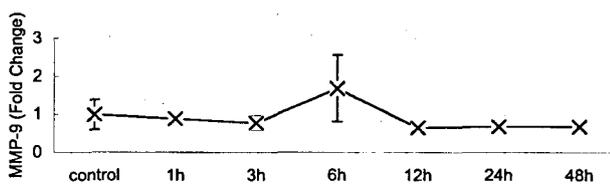


Fig.5. Time course of MMP-9 mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

の上昇がみられ、そのタイムコースはほぼ同様であった。同様な実験系においてPPAR $\alpha$ を介して作用する化合物は、肝臓におけるDNA合成を24時間後に促進することが明らかになっている。従って本結果はDBPによる増殖促進に先立ち、細胞外マトリックスの分解が亢進されることを示唆している。その後、恐らく肝臓において細胞外マトリックスの合成を伴う組織の再構築が起こると考えられる。慢性投与における癌化はこのような初期的作用に加えて、DNAの損傷による異常な表現型の発現及び細胞増殖亢進が複雑に相互作用することにより起こると考えられる。以上、本結果からMMP-2、MMP-9、u-PA及びu-PAR mRNAレベルが、フタル酸エステルの肝臓に対する安全性を評価する上で有用な指標となることが明らかになった。

#### [発表論文]

- 1) Kobayashi, T., Niimi, S., Fukuoka, M. and Hayakawa, T.: Regulation of inhibin beta chains and follistatin mRNA levels during rat hepatocyte growth induced by the peroxisome proliferator di-n-butyl phthalate. *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1214-1216 (2002)
- 2) Kobayashi, T., Niimi, S., Kawanishi, T., Fukuoka, M. and Hayakawa, T.: Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate. *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003)

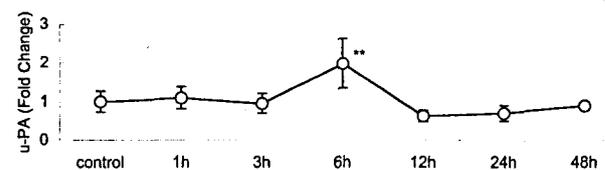


Fig.6. Time course of u-PA mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

\*\* $P < 0.01$  compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

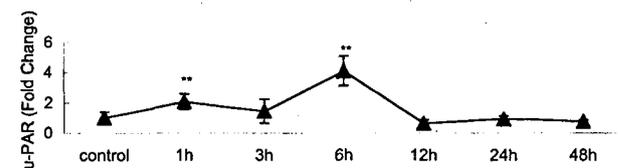


Fig.7. Time course of u-PAR mRNA level in the rat liver after single oral administration of DBP (8.6mmol/kg)

\*\* $P < 0.01$  compared with the respective controls; Dunnett-type mean rank test.

### (3) 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

療品部 伊佐間和郎, 土屋利江

#### [目的]

金属は現在用いられている医用材料の中でも最高の強度を有し, 人工関節や人工歯根のように高い強度が望まれる部位に用いる埋植医療用具の材料として不可欠である。金属製医用材料には, ステンレス鋼 (ニッケル・クロム・モリブデン鋼), コバルト・クロム合金, チタン合金などが用いられているが, 生体親和性及耐腐食性を高めるための研究が現在も進展している。埋植された医療用具が組織・構造的のみならず機能的にも生体組織の一部となり得るためには, 材料に接触する細胞がその機能を維持することが重要である。しかし, 金属材料については, 金属塩を用いた細胞毒性試験や感作性試験が行われているに留まり, 骨芽細胞の機能, 特に骨分化機能に及ぼす影響について十分な評価が行われていない。そこで本研究では, 骨芽細胞の骨分化機能を定量的に評価する方法を確立し, 金属材料の正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響を解析した。

生体内に埋入された金属製医用材料は, 溶出する金属イオン及び金属の材料表面が, それぞれ細胞の機能に影響を及ぼす。そこで本研究では, 初めに, 各種金属塩を培地に添加して, 正常ヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響を系統的に評価した。次に, 細胞毒性の異なる金銀パラジウム合金の上で培養した正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能を試験した。

#### [方法]

##### 1. 金属塩のヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響

金属塩には,  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MoCl}_5$ ,  $\text{NbCl}_5$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{TaCl}_5$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{VCl}_3$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{ZrCl}_4$  (和光純薬工業, 以下結晶水は省略) を用いた。また, 細胞には正常ヒト骨芽細胞 NHOst (BioWhittaker, Inc.) を用い, 培地には 5 mM  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム及び 10% 牛胎児血清を含有する  $\alpha$ -MEM 培地を用いた。細胞の培養は, コラーゲン Type I コート 24 ウェルプレートに 10,000 個の NHOst 細胞を播種し, 24 時間後に規定濃度の金属塩を含む培地 1 ml と交換した。以後, 同濃度の金属塩を含む培地を週 3 回の頻度で交換し, 2 週間培養した。

細胞の増殖度は, TetraColor ONE (生化学工業) を用いて測定した。分化指標として, アルカリホスファターゼ (ALP) 活性は, パラニトロフェニルリン酸を基質に用いてパラニトロフェノールの生成量として求め, カ

ルシウム量は, カルシウム C-テストワコー (和光純薬工業) を用いて定量した。

##### 2. 金銀パラジウム合金の細胞毒性と骨芽細胞機能影響

歯科鑄造用金銀パラジウム合金 ( $13\text{Au}-58\text{Ag}-21\text{Pd}$  及び  $10\text{Au}-62\text{Ag}-13\text{Pd}$ ) について, 「医療用具及び医用材料の基礎的な生物試験のガイドライン」に基づく細胞毒性試験を行った。細胞には V79 細胞を, 培地には M05 培地を用いた。また, 試料の培地による抽出は,  $6 \text{ cm}^2/\text{ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 24 時間の条件で行った。細胞の培養は, 24 ウェルプレートに 50 個の V79 細胞を播種し, 24 時間後に 100% 抽出液及び種々の濃度の抽出液と交換した。6 日間培養した後, ギムザ染色して各ウェルのコロニー数を数えた。コントロール群のコロニー数を 50% 阻害する抽出液の濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) をプロビット法で求めた。

金銀パラジウム合金の骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響は, 微小集積培養法で試験した。用いた細胞及び培地は, 1 の実験と同様である。滅菌した試料を, コラーゲン Type I コート 24 ウェルプレートに置き, その上に  $40,000 \text{ 個}/20 \mu\text{l}$  の NHOst 細胞をスポット状に播種した。細胞が試料に接着した後, 培地 1 ml を加え, 以後, 週 3 回の頻度で培地を交換した。2 週間培養した後, 細胞の増殖度及び ALP 活性, カルシウム量を測定した。

#### [結果と考察]

##### 1. 金属塩のヒト骨芽細胞の増殖及び分化に及ぼす影響

正常ヒト骨芽細胞の増殖における 50% 阻害モル濃度 ( $\text{pIC}_{50}$ ) は,  $\text{CdCl}_2 < \text{VCl}_3 < \text{CuCl}_2 < \text{CoCl}_2 < \text{NiCl}_2 < \text{TiCl}_4 < \text{TaCl}_5 < \text{MnCl}_2 < \text{ZnCl}_2 < \text{ZrCl}_4 < \text{FeCl}_2 < \text{FeCl}_3 < \text{NbCl}_5$  の順になった。なお,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{MoCl}_5$ ,  $\text{NbCl}_5$  は検討した最高濃度 (1 mmol/l) においても増殖を阻害しなかった。また, カルシウム量を指標とした分化における 50% 阻害モル濃度 ( $\text{dIC}_{50}$ ) は,  $\text{AlCl}_3 < \text{FeCl}_2 < \text{TiCl}_4 < \text{CdCl}_2 < \text{CrCl}_3 < \text{MnCl}_2 < \text{CuCl}_2 < \text{VCl}_3 < \text{ZnCl}_2 < \text{FeCl}_3 < \text{ZrCl}_4 < \text{NiCl}_2 < \text{CoCl}_2 < \text{MoCl}_5$  の順になった。なお,  $\text{NbCl}_5$  及び  $\text{TaCl}_5$  は, 分化を促進させた。 $\text{pIC}_{50}$  と  $\text{dIC}_{50}$  の間には相関関係は認められず,  $\text{pIC}_{50}$  と  $\text{dIC}_{50}$  の比から, 各金属塩は以下のように分類された。

- 増殖を阻害する金属塩 ( $\text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50} < 3$ ):  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{VCl}_3$
- 増殖阻害濃度より低濃度で分化を阻害する金属塩 ( $20 < \text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50} < 400$ ):  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{TiCl}_4$ ,  $\text{ZrCl}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$
- 分化を阻害する金属塩 ( $1,300 < \text{pIC}_{50}/\text{dIC}_{50}$ ):  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MoCl}_5$
- 分化を促進させる金属塩:  $\text{NbCl}_5$ ,  $\text{TaCl}_5$

これらの結果から, 骨芽細胞の増殖には影響しないが分化を阻害する金属塩 ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{CrCl}_3$ ,  $\text{MoCl}_5$ ) や, 骨

芽細胞の分化を促進させる金属塩 ( $\text{NbCl}_5$ ,  $\text{TaCl}_5$ ) のように、骨分化に特異的に影響を及ぼす金属塩が明らかになった。

## 2. 金銀パラジウム合金の細胞毒性と骨芽細胞機能影響

金銀パラジウム合金のV79細胞を用いた細胞毒性試験の結果をFig.8に示した。13Au-58Ag-21Pdは、100%抽出液でもコロニーの形成を阻害しなかった。しかし、10Au-62Ag-13Pdは、抽出液の濃度依存的にコロニーの形成を阻害した。なお、10Au-62Ag-13Pdの $\text{IC}_{50}$ は67.5%であった。さらに、抽出液中の金属イオンをキャピラリーゾーン電気泳動で分析したところ、 $\text{Cu}^{2+}$ の濃度が13Au-58Ag-21Pdでは23  $\mu\text{mol/l}$ であったのに対して、10Au-62Ag-13Pdでは160  $\mu\text{mol/l}$ であった。 $\text{CuCl}_2$ の $\text{IC}_{50}$ が200  $\mu\text{mol/l}$ であることと合わせて、13Au-58Ag-21Pdと10Au-62Ag-13Pdの細胞毒性強度の差は、抽出液中の $\text{Cu}^{2+}$ 濃度の差に因るものである。

金銀パラジウム合金の上で培養した正常ヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響をTable 1に示した。増殖度及びALP活性、カルシウム量のすべてにおいて、13Au-

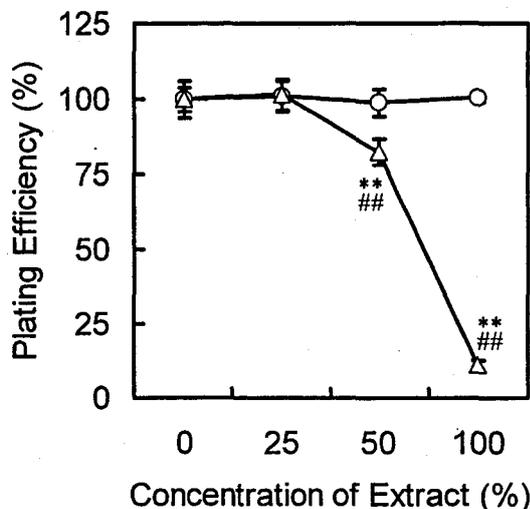


Fig.8. The plating efficiencies of V79 cells cultured with the medium extract of dental Au-Ag-Pd casting alloy

Medium extraction of 13Au-58Ag-21Pd (circles) and 10Au-62Ag-13Pd (triangles) with M05 medium at 6  $\text{cm}^2/\text{ml}$  for 24 h. Values are expressed as means  $\pm$  S.D. for 3 dishes. Significant difference compared with control at  $**P < 0.01$  and compared with 13Au-58Ag-21Pd at  $##P < 0.01$  by Tukey-Kramer test in two-way ANOVA.

Table 1. The proliferation and differentiation of NHOst cells cultured on the dental Au-Ag-Pd casting alloy

Sample	Proliferation (%)	ALP activity (%)	Ca amount (%)
13Au-58Ag-21Pd	36.8 $\pm$ 3.0	28.6 $\pm$ 4.9	27.6 $\pm$ 2.5
10Au-62Ag-13Pd	22.4 $\pm$ 6.3**	13.1 $\pm$ 4.8**	22.1 $\pm$ 2.1*

Values are % of the controls and expressed as means  $\pm$  S.D. for 4 dishes. Significant difference compared with 13Au-58Ag-21Pd at  $*P < 0.05$  and  $**P < 0.01$  by Tukey-Kramer test in one-way ANOVA.

58Ag-21Pdと10Au-62Ag-13Pdとの間には有意な差が認められた。1の実験で得られた $\text{CuCl}_2$ の $\text{pIC}_{50}$ は7.4  $\mu\text{mol/l}$ であり、 $\text{Cu}^{2+}$ は骨芽細胞の増殖を強く阻害する。V79細胞を用いた細胞毒性試験の結果と合わせて、10Au-62Ag-13Pdの骨分化機能阻害は、 $\text{Cu}^{2+}$ の増殖阻害に起因することが示唆された。

我々が確立した骨芽細胞の増殖及び分化を指標とする試験法は、細胞毒性の異なる金銀パラジウム合金の骨分化機能に及ぼす影響を明確に区別できた。また、増殖には影響しないで分化を阻害するような試料を評価することも可能であり、金属材料の骨分化機能評価法として有用である。

## 【発表論文】

- 1) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y. and Tsuchiya, T.: Proliferation and Differentiation of Normal Human Osteoblasts on Dental Au-Ag-Pd Casting Alloy: Comparison with Cytotoxicity to Fibroblast L929 and V79 Cells. *Materials Transactions*, **43**, 3155-3159 (2002)
- 2) Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y. and Tsuchiya, T.: *In vitro* toxicity test of dental casting alloy using normal human osteoblast: Comparison with L929 and V79 cytotoxicity tests. *Journal of Toxicological Sciences*, **27**, 382 (2002)

## (4) 遺伝子発現を指標とした心血管系における薬効および毒性の病理生化学的解析に関する研究

遺伝子細胞医薬部 佐藤陽治

## 【目的】

免疫抑制剤FK506や血管拡張薬Minoxidilのような薬物・化学物質の投与の副作用および毒性として心室筋に肥大がもたらされることが知られている。心室筋の肥大は心臓に対する液性環境変化および物理的負荷の増大に対する代償反応であると考えられるが、心肥大が持続することにより心不全発症のリスクが増大することが知られている。また最近、心筋収縮調節を行なうことを目的とした遺伝子治療的アプローチの可能性が着目されているが、人為的遺伝子発現が心筋細胞の分化・肥大におよぼす影響も未知数である。化学物質および人為的遺伝子発現による心肥大・心筋症といった病態発症の機序は多岐にわたると考えられている。また環境要因および遺伝的要因も病態を決定する重要な要素であることも最近明らかとなりつつあり、病態の理解を一層複雑化させている。心筋細胞の病態を制御する様々な経路のnodal pointとなりうるステップを特定することは病態およびその発症を理解するためだけでなく、薬物・化学物質の心筋に

おける副作用評価・毒性評価の効率化を図る上でも重要である。近年、肥大大心筋においては心筋カルシウム制御遺伝子の発現異常、特に心筋小胞体カルシウムポンプの遺伝子およびタンパク質発現の低下が高頻度で観察されることが明らかとなった。しかし、心筋小胞体カルシウム制御異常が心肥大の主原因であるかどうか、心筋小胞体カルシウム制御異常が心肥大の心不全への移行に関与しているかどうか、あるいは異常な心筋小胞体カルシウム制御を正常化することにより肥大大心筋の機能が改善するかどうかはこれまで明らかではなかった。そこで本研究では心血管系における副作用評価・毒性評価の指標としてのカルシウム制御系遺伝子の重要性を検討することを目的として、心肥大発症における心筋小胞体カルシウム制御の役割を評価した。

## [方法]

### 1. 動物

筋小胞体は心筋における細胞内カルシウムの恒常性と収縮性制御の上で鍵となる役割を担っている。心筋の弛緩においてカルシウムは細胞質から筋小胞体内腔に筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の働きにより取り込まれ、筋小胞体内のカルシウム結合タンパク質カルセクエストリンにより保持される。活動電位の発生に伴ってカルシウムが細胞外から細胞膜上のカルシウムチャンネルを通過して流入すると、これが刺激となって筋小胞体カルシウム放出チャンネルが開閉し、小胞体内腔に保持されたカルシウムの細胞質への放出 (CICR: Calcium-induced-calcium-release) が惹起され収縮が引き起こされる。筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase の活性はホスホランパンと呼ばれる心室筋細胞に比較的特異的な低分子量タンパク質により制御されている。ホスホランパンの量的低下もしくはホスホランパンのリン酸化は筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase のカルシウムに対する親和性の増大を引き起こし、結果として心筋収縮性の上昇をもたらす。αミオシン重鎖プロモーターにより心筋特異的にカルセクエストリンを20倍過剰発現したトランスジェニックマウス (CSQOE) では心筋小胞体のカルシウム容量が増加するものの、興奮収縮連関におけるカルシウム放出が著しく阻害され、収縮能が低下している。また同時に、CSQOE マウスは心肥大を呈することが知られている。一方、ホスホランパンを欠損したノックアウトマウス (PLBKO) においてはホスホランパンの機能消失により、心拍数の上昇なしに心筋小胞体カルシウムポンプ機能および心収縮性が大幅に上昇することが知られている。本研究ではCSQOE マウスを心筋小胞体機能不全モデル、PLBKO マウスを心筋小胞体機能促進モデルとして採用し、心筋小胞体カルシウムイオン制御異常を正常化することにより肥大大心筋の機能が改善するかどうかを検討する目的で、CSQOE マウ

スとPLBKO マウスを交配しF2世代として野生型、CSQOE型、およびホスホランパン欠損バックグラウンドにカルセクエストリンを過剰発現したマウス (CSQOE/PLBKO) を作成した。F2世代の遺伝型は尾部先端より抽出したゲノムDNAのPCRにより同定した。

### 2. 心機能解析

*In vivo*における心機能はAvertinによる麻酔下、頸動脈から挿入した1.4Fミラーカテーテルにより左心室圧を測定してその時間微分を解析することにより評価し、*ex vivo*における心機能は急性単離した心臓によりランゲンドルフ標本を作製し、心筋を定圧条件下で逆行性に灌流にした際の左心室圧を測定してその時間微分を解析することにより評価した。

### 3. 電気生理学的評価

成獣マウスより左心室筋細胞をコラゲナーゼ処理により急性単離し、ホールセルパッチクランプ法により活動電位、L-タイプカルシウム電流およびナトリウム/カルシウムエキスチェンジャー電流を測定した。

### 4. タンパク質発現および遺伝子発現解析

心筋小胞体タンパク質発現および遺伝子発現はそれぞれ心室筋ホモジェネートの定量性ウエスタンブロットティングおよび心室筋総RNAを用いたドットプロット法により解析した。総RNAはTRIzol試薬を用いて抽出した。

## [結果と考察]

### 1. CSQOEマウスの表現型の加齢による変化

心肥大の予後は多くの場合良好であるが、長期に症状が持続する場合は時として非代償性心筋拡張およびこれに伴う心不全を起こすことが知られている。本研究担当者の作製したCSQOEマウスモデルとは別にJones *et al.* (1998) によっても心筋カルセクエストリン過剰発現マウス (10倍) が作製されており、このモデルは本研究者のモデルよりもカルセクエストリン発現量が少ないにも関わらず、生後16週間までに心不全により死亡してしまう。対照的に、本研究者のモデルは3ヶ月令では死亡率増加は認められない。この相違点が単に病態の進行速度の差であるかどうかを検討するために、本研究者のモデルにおける心筋表現型の加齢 (2～3ヶ月 vs. 17ヶ月齢) による変化を形態学的、分子生物学的および生理学的側面から評価した。その結果、Jones *et al.* (1998) のモデルとは異なり本研究担当者のCSQOEマウスは最低17ヶ月齢まで外見上の異常は認められず、17ヶ月までの生存率も100%であった。また、心筋のカルセクエストリンタンパク質レベルは17ヶ月齢でも若齢期と同様、野生型と比べて20倍の過剰発現が維持されていた。重篤な病態心筋においては筋小胞体カルシウム-ATPase、ホスホランパンのタンパク質レベルが変化することがあるが、17ヶ月齢のCSQOEマウスと野生型マウスにおけ

る心筋小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase およびホスホランバン量には差が認められなかった。若齢 (2~3ヶ月齢) CSQOE マウスにおいては心肥大が報告されている。17ヶ月齢のCSQOE マウスにおいては左心房がほぼ全域にわたり石灰化・線維化していたものの、左右心室筋湿重量/体重比は若齢群と比べて有意な変化が見られなかった。また肺湿重量/体重比 (肺鬱血・心不全の指標) も加齢による変化および遺伝型の差による違いは認められなかった。若齢CSQOE マウスにおいては興奮収縮連関の心筋小胞体カルシウム制御系異常と、それに伴う低心筋収縮能が知られているが、2~3ヶ月齢および17ヶ月齢のCSQOE マウス心筋の収縮能・弛緩能を単離心筋灌流標本により検討したところ、若齢CSQOE マウスで観察された低収縮能および低弛緩能は加齢によってさらに悪化することのないことが明らかとなった。これらの知見より、心筋小胞体のカルシウム制御障害は心肥大の発症と持続に関わっていること、およびカルシウム制御障害は必ずしも心肥大の心不全への移行には必ずしも結びつかないことが示唆された。

## 2. 心筋小胞体機能改善によるCSQOE表現型の変化

心筋小胞体のカルシウム制御障害と深くかかわる心肥大病態が、心筋小胞体のカルシウム制御亢進によって回復するかを検討する目的でCSQOE マウスとPLBKO マウスの交配を行い、CSQOE/PLBKO マウスの表現型を検討したところ、*in vivo* および *ex vivo* においてもCSQOE 心筋の低収縮能はホスホランバン欠損によって野生型の心筋と同等以上にまで回復することが明らかとなった。単離心筋細胞にカフェイン (心筋小胞体カルシウムチャネル開口薬) を投与した際のナトリウム/カルシウムエクステンジャー電流を測定した結果から、CSQOE/PLBKO 心筋細胞では心筋小胞体のカルシウム容量がCSQOE 心筋細胞よりも上昇していることが明らかとなった。CSQOE/PLBKO 心筋細胞のL型カルシウムチャネル電流を測定したところ、電流の脱活性化がCSQOE 細胞よりも速くなっていることが明らかとなった。L型カルシウムチャネル電流の脱活性化速度はCICRによるカルシウム放出量と相関することから、この結果はCSQOE/PLBKO 細胞はCSQOE 細胞よりもCICRの効率が高いことを示している。野生型細胞と比べてCSQOE 細胞は長い活動電位持続時間をもつが、ホスホランバン欠損により活動電位持続時間も野生型細胞と同等まで回復した。さらに、PLB欠損によりCSQOE 細胞のサイズが正常化したと同時に、CSQOE 心筋において上昇する心房性ナトリウム利尿ペプチド遺伝子および骨格筋型 $\alpha$ アクチン遺伝子といった心肥大マーカー遺伝子の発現が低下して正常値に回復することが明らかとなった。これらの結果より、PLB機能の低下もしくは心筋小胞体カルシウム取り込み機能の亢進により心肥大の

低収縮能およびリモデリング過程が克服されることが示され、同時に心筋細胞肥大の発症において筋小胞体カルシウム制御機能および筋小胞体関連タンパク質遺伝子の発現が鍵となっていることが明らかとなった。また、筋小胞体機能改善をもたらす薬剤は心筋病態に対する新しい治療ターゲットとなることが示唆された。

## [発表論文]

- 1) Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin. *Mol. Cell. Biochem.*, **242**, 19-25 (2003)
  - 2) Carr, A.N., Schmidt, A.G., Suzuki, Y., Del Monte, F., Sato, Y., Lanner, C., Breeden, K., Jing, S.L., Allen, P.B., Greengard, P., Yatani, A., Hoit, B.D., Grupp, I.L., Hajjar, R.J., DePaoli-Roach, A.A. and Kranias E.G.: Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4124-4135 (2002)
  - 3) Kiriazis, H., Sato, Y., Kadambi, V.J., Schmidt, A.G., Gerst, M.J., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Hypertrophy and functional alterations in hyperdynamic phospholamban-knockout mouse hearts under chronic aortic. *Cardiovasc. Res.*, **53**, 372-381 (2002)
  - 4) Frank, K.F., Mesnard-Rouiller, L., Chu, G., Young, K.B., Zhao, W., Haghghi, K., Sato, Y. and Kranias, E.G.: Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res. Cardiol.*, **96**, 636-644 (2001)
  - 5) Sato, Y., Schmidt, A.G., Kiriazis, H., Hoit, B.D. and Kranias, E.G.: Re-evaluation of heart failure in transgenic mice with impaired SR  $\text{Ca}^{2+}$  release. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **33**, 1757-1759 (2001)
  - 6) Sato, Y., Kiriazis, H., Yatani, A., Schmidt, A.G., Hahn, H., Ferguson, D.G., Sako, H., Mitarai, S., Honda, R., Mesnard-Rouiller, L., Frank, K.F., Beyermann, B., Wu, G., Fujimori, K., Dorn, G.W. II and Kranias, E.G.: Rescue of contractile parameters and myocyte hypertrophy in calsequestrin overexpressing myocardium by phospholamban ablation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9392-9399 (2001)
- (5) 細胞動態関連分子の発現変化を指標とする安全性評価法

毒性部 平林容子

## [目的]

造血機構では恒常性の維持機構がよく作用するため、通常の毒性試験で観測する末梢血細胞数の変化をみても、それらの恒常性の範囲に隠れてしまうことが少なく

ない。ここで、特殊アッセイ系として、遅発性造血障害の標的と考えられる造血幹・前駆細胞数をコロニーアッセイなどの手法を使って細胞動態を計測すると、末梢血の回復とは裏腹に、しばしば回復の遅延ないしは障害の持続が観察される。このような障害発現パターンを示すものの中には、明らかに白血病リスクを伴った物質が含まれる。本研究では、こうした従来の末梢血のモニターだけではとらえきれない潜在的な前駆細胞に局限した障害性を予知し、ひいては安全性評価につながる指標として、コロニーアッセイ以上の効果の期待できる指標分子を検索するため、関連の遺伝子発現変化について、細胞動態関連遺伝子を中心に検索することを計画した。

対象化学物質として選択したベンゼンはヒトでの白血病誘発性が知られている化学物質である。ところが実験動物モデルでの白血病誘発性を証明することは容易ではなかった。即ち、ベンゼンの持続暴露ではむしろ貧血になって動物が死んでしまい、一般に白血病を誘発するに至らない。これを、職業暴露を念頭に、一日6時間、週5日の間歇的暴露として26週間繰り返すと、その後約300日を起点として、次第に白血病が誘発されることが明らかになった。この白血病誘発性の背景を探る目的で、これまで造血幹細胞動態に焦点をあてて研究をすすめている。その結果、これまで報告が錯綜していた細胞動態に関して、筆者らが開発した個体内造血幹細胞動態解析法 (BUUV法) を用いることで、ベンゼン暴露中、造血幹細胞の細胞回転が停止することを明らかとした。更に、この停止はp53欠失マウスでは観察されないことから、野生型ではp53もしくはp53依存性シグナル分子のいずれかが誘導されて細胞動態を停止させていることが想定され、事実野生型ではp21の蛋白量の増大が観察された。また、末梢血球数は、ベンゼン暴露を停止後速やかに回復するが、造血幹細胞数の回復には長時間を必要とし、その間、間歇的な増殖刺激がかかり続け、白血病発症の所謂プロモータ活性として作用することが発がん機構として想定されるに至った。こうした状態にあっては、増殖刺激への反応としての増殖促進因子の発現と同時に、恒常性維持のための抑制因子の発現とが拮抗していることが予想される。ここでは、これらの結果を踏まえ、細胞周期関連遺伝子群の発現変化について、網羅的な検索を行うことを企図した。これにより、発現量の変動は必ずしも大きくはなくても、比較的多数の遺伝子群の動態を観察することを通じて分子毒性メカニズムが解明され、そうした基盤の上に立った検討の延長線上で安全性評価に足りうる指標が獲得されるものと考えた。

[方法]

1. ベンゼン吸入暴露

ベンゼンの暴露は、職業暴露を念頭に置いた1日6時

間、週5日の、スケジュールで行った (Fig.9)。ベンゼン溶液 (和光純薬) は16℃に加熱して、蒸気として、縦層流式吸入曝露チェンバー内の還流空気に混入させた。チェンバー内のベンゼンの濃度は、30分ごとに、ガスクロマトグラフィー (GC-14A, 島津) にてモニターし、チェンバー内は、温度24±1℃、湿度55±10%、1日12時間毎の明暗周期を維持した。

被検マウスは、C57BL/6、8週齢のオスを用い、チェンバー内の金網ケージにて個別飼育し、飲料水は紫外線滅菌したものを自由摂取させた。飼料はCRF-1を用い、ベンゼン曝露中は絶食とした。尚、対照群 (sham曝露群) は、ベンゼンを含まない還流空気による金網ケージ、縦層流曝露チェンバー内飼育を行い、飲水、給餌などの条件は曝露群と同様とした。

2. Gene Chip解析

ベンゼン曝露中 (曝露開始5日目, D5; 曝露開始12日目, D12) ないし、曝露後 (曝露休止後3日, D+3) に、それぞれ曝露群とsham曝露群のマウスを屠殺して骨髓細胞を採取し、凍結保存した (Fig.9)。このものから、適宜セパゾール溶液並びにキアゲンのカラムを用いて、総RNAを抽出・精製した。各群から抽出した総RNA10 µgを鋳型として、Affymetrixのmouse U74 Chip (D12) 及びIncyteのGEM (gene expression microarray) system (D5, D12, D+3) による網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータはGene spring™にて解析した。

[結果と考察]

ベンゼン曝露12日後において、骨髓細胞におけるsham曝露群に対する発現遺伝子変化をAffymetrixのmouse U74 Chipを用いて比較検討した。結果の一部として、細胞回転関連遺伝子の発現変化をTable 2にまとめた。このうち曝露5日、12日及び、曝露中止後3日の、経時的な遺伝子発現変化の観察を行ったGEMでの結果

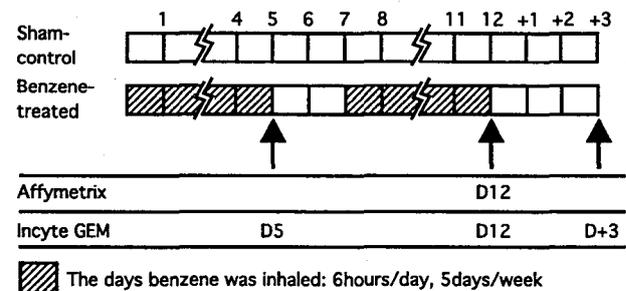


Fig. 9. Schedule of benzene inhalation for tissue sampling. Benzene was exposed on days shaded in the figure. Exposure started 10:00am and lasted 16:00. Tissue sampling was made at the day indicated by arrows, i.e., fifth (D5), twelfth (D12), and three days after termination of the last exposure (D+3). The sampling time was strictly made immediate after the exposure termination of the day.

Table 2. Expression changes in genes related to cell kinetics after 12-day intermittent exposure to 300ppm benzene (D12 ; ref. Fig.9) (Affymetrix, mouse U74 Chip)

Gene name	Accession No.	Fold change
cdc2 (cell division cycle protein 2)	U69555	1.04
cdk2 (Cyclin dependent kinase2)	NM_016756	1.17
cdk2L (39 kDa variant of cdk2)	AJ223732	0.83
Cyclin A2	X75483	0.88
Cyclin B2	X66032	1.11
Cyclin D1	M64403	0.64
Cyclin E	X75888	0.71
Cyclin E2	AF091432	0.93
Cyclin F	Z47766	0.94
Cyclin G1	L49507	1.67
Dmp1 (cyclin D-interacting myb-like protein)	U70017	2.26
E2F1	NM_007891	0.78
Mdm2	NM_010786	0.68
c-myc	AH005318	0.80
p16 INK4a (cyclin dependent kinase inhibitor/Cdkn2a)	AF044336	1.49
p18 (Cdk4 and Cdk6 inhibitor)	U19596	0.90
p19 (Cdk4 and Cdk6 inhibitor)	L01640	0.75
p21 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)	U09507	1.51
p53 (mutant, 181L->R)	AB021961	1.43
Retinoblastoma 1	M26391	0.91
Retinoblastoma-like 1 (p107)	U27177	1.02
Wig-1 (p53-inducible zinc finger protein)	AF012923	2.19

の代表例をFig.10に示す。

1. ベンゼン暴露によるp53及び関連遺伝子の発現変異  
p53及びその転写活性によって制御されることが知ら

れる Cyclin G1, p21, Wig-1 の発現量の増加と p53 の抑制因子である Mdm2 の減少が観察された。Cyclin G1 は DNA 障害時の G2/M arrest に関与することが知られている。また p21 は Cyclin A, E, G の抑制因子として知られる。ここで得られた結果は、先に示したベンゼンによる造血抑制には p53 関連の抑制シグナルが関与することを示す p53 欠失マウスでの解析結果や、p21 の蛋白量の増加等ともよく符号する結果であり、p53 そのものの発現量の増大は必ずしも多くはないものの、その転写活性化の結果が、下流に位置するとされる遺伝子群の発現変化としてとらえられたものと考えられる。但し、in vitro でのベンゼン曝露試験や、これまで観察された細胞回転の抑制に対して、p21 の増加の peak は曝露後 12 日目であり、むしろ遅い。これは、幹細胞動態停止に対して、p21 は全骨髓細胞で見ているため、個々の細胞、特に幹細胞でのそれを必ずしも反映していないことが考えられ、事実、本年の米国トキシコロジー学会では、ベンゼンを 100 ppm 曝露した場合、骨髓細胞では、p21 が増加するものの、白血病発症の母地と想定されている造血前駆・幹細胞分画では、それが見られないとの報告がなされた。ところがこのことは一方で、野生型マウスに 100 ppm の間歇吸入曝露を行っても白血病発症頻度は増加しないことから、100 ppm では、前駆・幹細胞分画の細胞回転は停止しない可能性があり、結果として、有意な白血病の発症が観察されないことを反映していることが想定され、逆に、300 ppm で観察した全骨髓細胞での p21 の発現増加は、幹細胞分画でも認められるとも考えられる。

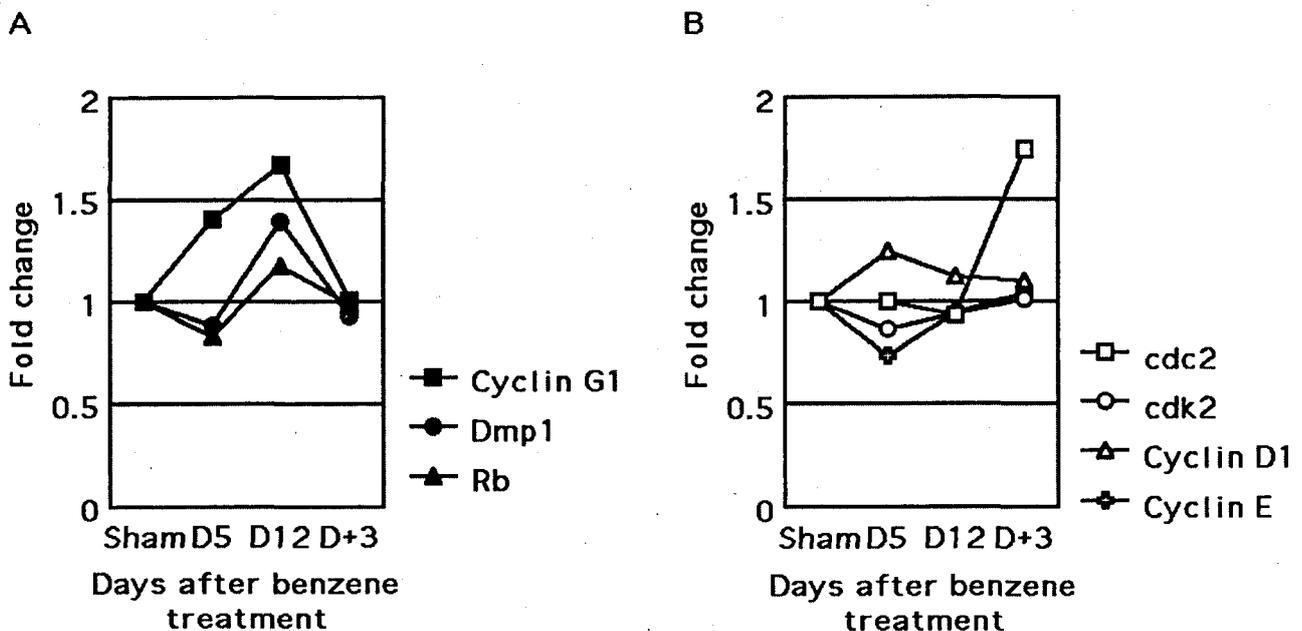


Fig.10. Sequential gene expression change from non-treated sham control, day 5 (D5), day 12 (D12) and 3 days after the last exposure (D+3) (GEM system) Ordinate indicates fold change to the sham control. Panel A shows genes suppressing cell kinetics, whereas panel B shows those accelerating cell kinetics.

## 2. ベンゼン暴露による細胞動態関連遺伝子の発現変異

p53 関連遺伝子群の発現変化に加えて、p16<sup>lnk4a</sup>や、Dmp1 といった p53 とは別経路の細胞回転抑制因子の発現量の増加も観察された (Table 2)。p16<sup>lnk4a</sup>は、Cyclin D1/cdk4 もしくは Cyclin D1/cdk6 の抑制因子として知られる。この Cyclin D1 は、Cyclin E/cdk2 を活性化し、ともに Rb をリン酸化することで不活化する。リン酸化された Rb は E2F を遊離し、この E2F は Cyclin E を活性化する、いわば positive feedback によって、G1 から S 期への移行が促される。今回の結果では、これら細胞回転促進関連分子の発現量はベンゼン暴露によっても sham 曝露群と差異を認めず、ベンゼン暴露による細胞動態の停止状態に一致するものと考えられる。尚、Cyclin D1 は、ベンゼン暴露後 5 日目には発現の増加傾向が認められる (Fig.10B)。他方、Cyclin E はむしろ減少傾向が見られる。これはベンゼン暴露による細胞回転の抑制という障害に対抗する増殖反応と、これを上回る抑制性障害との拮抗状態を垣間見る結果として興味深い。

Dmp1 は p19 を活性化することによって細胞回転を止めることが知られているが、暴露 12 日目の p19 の発現量は必ずしも多くはなかった。しかし、これまでの検討で、蛋白量については、曝露開始直後 (1 日, 3 日) に sham 曝露群に比べて 2 倍程度に上昇し、その後も 1.8 倍程度を維持するが、暴露 12 日目には sham 曝露群との差異が認められないことを報告している。一方、Dmp1 の発現は暴露 5 日目には必ずしも高くない (Fig.10A) ことから、詳細な機構は未だ明らかではないが、ベンゼンの造血抑制機構には、p53 及びその関連分子に加えて Dmp1-p19 も関与することが示唆された。

## 3. ベンゼン暴露中止による細胞動態関連遺伝子発現の変化

ベンゼンの曝露を休止すると、細胞回転の抑制に作用していた因子は、その発現量が減少した (Fig.10A)。このことは、曝露休止後速やかに造血細胞の回復性増殖が起こることや、p21 タンパク量が、曝露休止後速やかに sham 曝露群と差異のないレベルまで低下することなどもよく一致しているものと考えられる。同時に増殖促進因子として cdc2 の発現の増加が観察された (Fig.10B)。尚、すべての増殖促進因子が曝露直後から速やかに増加するとは限らない。末梢血数回復は速やかであるものの、白血病の母地とも考えられる造血前駆・幹細胞の増殖には時間がかかることなどからも、両者の差異を反映する事象たり得るのかの如何については、今後、幹細胞分画での解析を試行し、全骨髄細胞での結果との差異について検討を重ねることで明らかにしていきたい。同時に、併行して 100 ppm での幹細胞動態について BUUV 法を用いた解析を進めることで、得られている知見を一元的に統括することができるものと期待する。

## [発表論文]

- 1) Hirabayashi, Y., Matsuda, M., Aizawa, S., Kodama, Y., Kanno, J. and Inoue, T.: Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **227**, 474-4799 (2002)
- 2) Yoshida, K., Aizawa, S., Watanabe, K., Hirabayashi, Y. and Inoue, T.: Stem-cell leukemia: p53 deficiency mediated suppression of leukemic differentiation in C3H/He myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, **26**, 1085-1092 (2002)
- 3) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kim, D.Y., Fujii-Kuriyama, Y. and Inoue, T.: Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicol. Sci.*, **70**, 150-156 (2002)
- 4) Mitsui, A., Hamuro, J., Nakamura, H., Kondo, N., Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S., Hirakawa, T., Inoue, T. and Yodoi, J.: Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid. Redox. Signal.*, **4**, 693-696 (2002)
- 5) 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)
- 6) Yoshida, K., Hirabayashi, Y. and Inoue, T.: Calorie restriction reduces the incidence of radiation-induced myeloid leukaemia. *IARC Sci. Publ.*, **156**, 553-555 (2002)
- 7) 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**, 278-285 (2001)
- 8) Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kodama, Y., Kanno, J., Yodoi, J., Kim, D.Y. 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)
- 9) 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. mRNA発現を指標とする安全性評価に関する研究

### (1) 培養マウスケラチノサイトを用いた細胞毒性関連遺伝子に関する研究

大阪支所生物試験部 天野博夫

#### [目的]

ほ乳類の皮膚は個体と環境を隔てる組織である。バリアとしての皮膚機能は表皮角質層が担っているが、角質構造は、これを構成する角質細胞の前駆細胞である表皮ケラチノサイトの増殖と分化の動的平衡状態によりその恒常性が維持されている。配置の特性上、ケラチノサイトは環境中の多種多様な化学物質に暴露される可能性が高く、これら物質の直接作用、免疫系等内在性要因の介在、またはその両者により生じる増殖と分化のアンバランスが皮膚炎等病理の状態をもたらすと考えられている。

本研究第一期においては、培養化したマウスケラチノサイトを用いて、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を中心とする炎症性サイトカイン類の細胞毒性発現に関連する遺伝子を解析する目的で研究を行った。

#### [方法]

NC/Jic, BALB/cおよびC57BL/6各系統マウスの培養ケラチノサイトは鐘紡株式会社薬品探索研究所(現日本オルガノン株式会社研究開発本部)より提供を受けた。ケラチノサイトの培養にはkeratinocyte-SFMおよびDispase IIを用いた。免疫細胞化学 (ICC) 法およびウェスタンブロットティング (WB) 法による誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 検出にはモノクローナル抗マウス iNOS抗体を用いた。4種のサイトカイン (いずれもマウスリコンビナントの、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、インターロイキン-6 (IL-6))、エンドトキシン (LPS) および過酸化水素のケラチノサイトに対する作用を検討した。RNAフィンガープリント法にはニッポンジーン社製、mRNA Fingerprinting Kitを、mRNAの5'側配列解析にはInvitrogen社製、GeneRacer Kitを用いた。

#### 1. 細胞培養

各系統の培養マウスケラチノサイトはDispase IIを用いて分散し、K-SFM中37℃、5% CO<sub>2</sub>にて継代培養した。サブクローンの分離は、継代培養中のNC/Jicマウス皮膚由来培養ケラチノサイトをDispase IIを用いて分散し、コラーゲンコート96ウェルプレートに各ウェル細胞1個の密度にて播種し、K-SFM中37℃、5% CO<sub>2</sub>にて培養し、増殖が認められたウェルの細胞を順次大きな容器に継代してクローンを得た。

#### 2. RT-PCR解析

継代培養中の各系統ケラチノサイトから総RNAを抽出し、オリゴdTプライマーを用いた逆転写反応により1st cDNA鎖を調製した。目的遺伝子の配列に従って設計したプライマーセットを用いてPCRをかけ、予定サイズフラグメントの増幅を確認した。逆転写反応のコントロールとして、Glyceraldehyde 3phosphate dehydrogenase 遺伝子の発現を確認した。

#### 3. マウスケラチノサイトにおけるiNOS誘導の検討

IFN- $\gamma$ , LPS によるiNOS誘導効果を検討した。35mm $\phi$ ディッシュ内サブコンプレートの状態でIFN- $\gamma$  (5 ng/ml) and/or LPS (1  $\mu$ g/ml) 添加培地に交換し、24時間インキュベート後にWB法によりiNOSを検出した。

#### 4. 細胞増殖に対する諸種サイトカインの作用

マウスケラチノサイトの増殖に対する諸種サイトカインの作用は、細胞播種時にサイトカインを培地中に添加し72時間培養後の細胞数を、対照群と処置群とで比較して検討した。細胞数を直接計数する方法と、クリスタルバイオレット染色の比色定量を細胞数の指標とする方法 (CV染色法) の両者を用いた。

#### 5. RNAフィンガープリント法

NC/JicマウスケラチノサイトサブクローンNCK2-IGRおよびSGE(-)G12より抽出した総RNAから調製したcDNAに対して、キットのプライマーセットを用いたlow stringency PCRを行い、電気泳動後SYBR Gold染色、蛍光イメージアナライザーを用いて両系統の増幅パターンを比較した。両系統間で濃度に差のあるバンドを切り出し、DNAを熱水抽出後PCRにより再増幅し、得られたPCR産物をダイレクトシーケンスにより配列解析した。5'側配列は、キットを用いてSGE(-)G12の5'キャップサイトcDNAを調製し、キットの上流プライマー、3'側既知配列から設計した下流プライマーを組み合わせたPCR増幅をかけ、得られた5'フラグメントをダイレクトシーケンスにより配列解析した。

#### [結果と考察]

一般的に、近交系マウスは実験的皮膚炎症状を起こしにくい事が知られているが、本研究に用いたケラチノサイトの起源マウス3系統のうち、「アトピー素因」を持つと言われるNC/Jic系統マウスに起こる皮膚炎において、ラジカル性の細胞障害メデイエーターである一酸化窒素 (NO) とその合成酵素iNOSの関与が示唆されていることから、通常の継代培養条件下で増殖中の各系統ケラチノサイトにおけるiNOSおよび神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 遺伝子の発現を、RT-PCR法を用いて検討した。NC/Jic, BALB/c, C57BL/6いずれの系統に於いてもiNOS遺伝子の発現が認められたが、発現の強さは、NC/JicとC57BL/6のケラチノサイトにおいて

は同程度の発現が認められたのに対して、BALB/c系統では極めて弱い発現しか検出されなかった。nNOS遺伝子の発現はいずれの系統のケラチノサイトにおいても検出されなかった (Fig.11)。

ICC法WB法いずれを用いても、通常の増殖培養条件下ではどの系統のケラチノサイトに於いてもiNOS蛋白の発現量は検出限界以下であった。免疫系細胞に対するiNOS誘導効果が報告されているIFN- $\gamma$  (5 ng/ml)を加えた培地中で24時間培養すると、3系統中NC/Jicマウス由来のケラチノサイトにおいてのみ、iNOSの誘導が認められた。一方、LPS (1  $\mu$ g/ml)はいずれの系統に於いてもiNOSを誘導しなかったが、IFN- $\gamma$ が共存する実験条件下ではNC/Jic、C57BL/6の両者に於いてiNOS誘導が認められた。BALB/c系統のケラチノサイトでは、検討したいずれの条件においても蛋白レベルでのiNOS発現は認められなかった。iNOSタンパク発現に関しては、ICC法、WB法いずれの検出法を用いてもほぼ同様の成績が得られた。

NC/Jicマウスケラチノサイトの増殖に対する諸種サイトカインの作用を検討した。4種類のサイトカインのうちIFN- $\gamma$ のみが増殖抑制効果を示し、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、は有意な効果を示さなかった。

NC/JicマウスケラチノサイトでiNOS免疫染色を研究中、IFN- $\gamma$ によるiNOS発現誘導効果が細胞の継代数の増加に伴って減弱していく傾向を認めた。この現象の原因が、培養条件によるクローンのセレクションであろうとの仮定のもとに、IFN- $\gamma$ の増殖抑制作用に対する感受性を指標に、限界希釈法を用いてIFN- $\gamma$ 感受性の異なる2系統のサブクローン、NCK2-IGRおよびSGE(-)G12を分離した (Fig.12)。この2系統間には、IFN- $\gamma$ 感受性の他に、細胞増殖の上皮成長因子依存性 (NCK2-IGRが依存性大)、過酸化水素によるアポトーシス誘導に対する抵抗性 (SGE(-)G12が抵抗性大)などの性質の違いが認められている。

系統的に近くIFN- $\gamma$ 感受性の異なる2クローンが得られたことから、両者のIFN- $\gamma$ 感受性の差に関連する遺伝子が見つけられるのではと考え、RNAフィンガープリント法を用いて、両系統間の発現強度に差の認められ

る遺伝子を検索し、SGE(-)G12系統においてより強い発現を示す、仮称IGSR-1遺伝子mRNAを新たに同定した (Fig.13B)。RT-PCR法を用いて各系統マウスケラチノサイトにけるIGSR-1遺伝子の発現を検討したところ、NC/JicとC57BL/6のケラチノサイトに強い発現、BALB/c系統では弱い発現と、iNOS遺伝子の発現パターンとの類似性が認められた (Fig.11, Fig.13A)。IFN- $\gamma$ 単独ではiNOSが誘導されないC57BL/6系統においてIGSR-1の強い発現が認められたことから、IGSR-1はIFN- $\gamma$ 刺激の受容過程よりも、iNOSの誘導過程により深く関連している可能性が示唆される。

マウスの諸組織におけるIGSR-1遺伝子の発現を同じくRT-PCR法により検討したところ、胸腺、脳において強い発現が認められた一方、肝、精巣における発現は極めて弱かった。胸腺、脳は、アポトーシスの現象がよく観察される組織であり、NCK2-IGRとSGE(-)G12のアポトーシス抵抗性の違いをふまえると、IGSR-1とこの現象間に何らかの関連があるかも知れない。

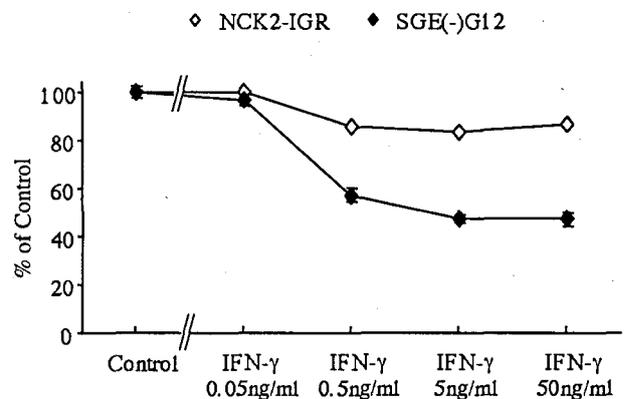


Fig.12. Effects of IFN- $\gamma$  on the cell growth of NC mouse keratinocyte subclone SGE(-)G12 (solid diamond) and NCK2-IGR (open diamond) in the presence of EGF (2.5ng/ml)

Cells were plated on the 96 well collagen coated plate at the density of 2500 cells/well. On day 4 of culture, cells were stained by crystal violet and the optical densities at 570/405 nm of extracted dye were measured as the indicator of cell number in wells. Data are expressed as means and standard errors of percentages relative to mean control (without IFN- $\gamma$ ) value of each subclone.



Fig.11. RT-PCR analysis of iNOS and nNOS gene expression in cultured keratinocytes from newborn mice of three strains (Nc/Jic, BALB/c and C57BL/6)

Lanes 1-5: iNOS (1: Size marker 2: NC/Jic 3: C57BL/6 4: BALB/c 5: Positive control (Rat ovary)), 6-10: nNOS (6. Size marker 7: NC/Jic 8: C57BL/6 9: BALB/c 10: Positive control (Rat cerebellum)).

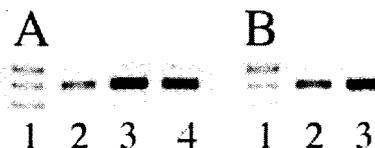


Fig.13. RT-PCR analysis of IGSR-1 gene expression in cultured keratinocytes from mice of three strains (A) and two subclones separated from Nc/Jic mouse keratinocyte culture (B)

A Lane 1: Size marker (100 base pair ladder) 2: BALB/c 3: C57BL/6 4: Nc/Jic. B Lane 1: Size marker 2: NCK2-IGR 3: SGE(-)G12.

マウスゲノムDNA配列をもとに設計した種々のプライマーを用いたRT-PCR実験の結果より、培養マウスケラチノサイトにおいては、オルターナティブプライミングによる少なくとも3種のIGSR-1遺伝子ホモログ (IGSR-2, IGSR-2', IGSR-4) の存在が予測された。4種のホモログ中IGSR-1 mRNAのみが、SGE(-)G12, NCK2-IGR両細胞での発現強度に差が認められた。この知見は、IGSR-1遺伝子の発現調節が転写終了後、スプライシングの段階で行われている可能性を示唆しており極めて興味深い。

4種のIGSR mRNAの配列から、理論上、C末部分に共通配列を持つ3種のタンパク (仮称MASP-1, MASP-2, MASP-3) が翻訳されることが予測される。IGSR-1遺伝子産物として予測されるMASP-1の配列中15アミノ酸の部分配列をペプチド抗原とする抗体を作成し、WB法を用いてNCK2-IGRおよびSGE(-)G12クローンにおけるMASP-1タンパクの発現を解析すると、約25キログルトンの鮮明なバンドが確認された。バンド濃度はSGE(-)G12においてより濃く、mRNAレベルでの発現を反映しているものと考えられる。

今後はケラチノサイトを用いた遺伝子のノックダウン実験などを行って、IGSR-1遺伝子とIFN- $\gamma$ 感受性、iNOS誘導との関連を解析し、MASP-1タンパクの生理的役割を明らかにしたいと考えている。

#### 【発表論文】

投稿準備中

### (2) 化学物質によるアレルギー発症の指標としてのサイトカイン及びケモカイン遺伝子発現の解析

機能生化学部 手島玲子, 中村亮介, 澤田純一

#### 【目的】

化学物質、薬物あるいは食物によるアレルギーはますます増加の傾向を呈しているが、その発症を高感度に測定する方法、また、アレルギー発症を予知する方法については開発が遅れているのが現状である。本研究課題においては、特に即時型アレルギーを高感度に測定するために、アレルギー担当細胞であるマスト細胞からのサイトカイン、ケモカイン等の遺伝子発現を指標にして、化学物質によるアレルギー発症のメカニズムの解析並びに検出法に関する検討を行うことを目的とした。

#### 【方法】

アレルギー担当細胞であるマスト細胞として、ラット由来の培養マスト細胞株、RBL-2H3細胞を用いた。細胞は10%のFCSを添加したDMEM培地を用い、5%の

CO<sub>2</sub>存在下、37℃で培養した。細胞の抗原刺激には抗DNP(di-nitrophenyl)IgE抗体と抗原(DNP-BSA)とを用いた。また、マスト細胞への影響が懸念される化学物質として、細胞内カルシウムイオン濃度上昇作用を持つ抗酸化剤DTBHQ(di-t-butyl hydro-quinone)を用いた。1×10<sup>5</sup>個のRBL-2H3細胞に1/800希釈のIgE抗体を添加した上でプラスチックプレートに一晩培養し、PIPESバッファーで洗浄後、10 μg/mlの抗原あるいは10 μMのDTBHQで37℃、30分間刺激した。上清を採取し、定法に則って細胞外に放出されたβ-hexosaminidaseの活性を指標としてマスト細胞の脱顆粒を測定した。また、細胞内Ca<sup>2+</sup>の蛍光指示薬fura-2 AMで細胞を標識し、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を蛍光分光光度計により測定した。

DNAチップによる遺伝子発現の網羅的解析は以下のように行った。1×10<sup>7</sup>個のRBL-2H3細胞を抗原またはDTBHQにより3時間刺激した。細胞を回収し、PBSで2回洗浄した後、TRIzol処理によりtotal RNAを抽出した。これを基に1st strand cDNAを調製し、二本鎖cDNAを得た。これをBioArray HighYieldにより*in vitro*で転写し、得たcRNAを加水分解処理により短い断片に調製した。これをAffymetrixのGeneChip (Rat Genome U34A array) にハイブリダイズさせ、Affymetrix Fluidics Stationにより洗浄及び染色を施した。蛍光をスキャンした画像からAffymetrix Microarray Suiteにより8799種の遺伝子発現量を数値化し、Silicon Genetics GeneSpring及びMicrosoft Excelを用いて遺伝子発現を解析した。発現の変化は、3回の実験に基づいたWelchの*t*検定 ( $p < 0.05$ ) により有意な発現上昇及び発現減少を決定した。

発現変化が顕著であった遺伝子に関しては、TaqMan PCR法によりABI PRISM 7700 Sequence Detector Systemを用いてmRNAの定量を行った。この時、内標準としては、TaqMan<sup>R</sup> Rodent GAPDH control reagentsを用い、GAPDHに対する目的遺伝子発現の比率を計算した。

次に、遺伝子発現と、タンパク質産生の関係を調べるために、ケモカインであるMCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) に関して、ELISAによるタンパク質の定量を行った。

#### 【結果と考察】

RBL-2H3細胞を抗原で刺激したところ、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、約20%の細胞内の分泌顆粒が放出(脱顆粒)された。一方、DTBHQにより刺激したときも、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇及び抗原刺激時と同程度の脱顆粒が観察された。これは、DTBHQが小胞体上のCa<sup>2+</sup>-ATPaseを阻害して小胞体からのCa<sup>2+</sup>の漏出を誘導するという我々の過去の知見<sup>1)</sup>とよく一致する。

以上の条件においてRBL-2H3細胞を3時間刺激し、GeneChipによりそのmRNA発現プロファイル調べたところ、未刺激の状態に比べ、抗原刺激では162種の遺伝子の発現が有意に増加、130種が有意に減少していた。またDTBHQ刺激では、248種が有意に増加、355種が有意に減少していた<sup>2)</sup>。中でも、両刺激において共通する67種の遺伝子発現が増加し、共通する60種の遺伝子発現が減少していた。様々なサイトカインや受容体、シグナル伝達分子などが発現変化していたが、中でもケモカインであるMCP-1の発現上昇が顕著であった。

Fig.14に、GeneChipにより同定されたマスト細胞の刺激に応じて発現変化する遺伝子のうち、代表的な4種についてTaqMan PCR法により定量した結果を示す。GeneChipの結果から予見されたとおり、ケモカインMCP-1の発現増加が著しかった。MCP-1の発現はタンパク質レベルでも確認し、抗原及びDTBHQにより、約100 pg/6hr/2 × 10<sup>5</sup> cellsのMCP-1が放出されることが分かった。MCP-1は単球・マクロファージの遊走を促すため、炎症反応に積極的に関与すると考えられている。抗原刺激だけでなく、抗酸化剤として使われている化学物質DTBHQ刺激がMCP-1の産生を強く誘導したことは、化学物質によるアレルギー促進のメカニズムを考える上で非常に重要であると思われた。

他のサイトカイン分子としては、IL(Interleukin)-3及びIL-4の発現増加が顕著であり、特にDTBHQ刺激の際により顕著であった。サイトカインの中でもIL-4は

体液性免疫を亢進させる働きが強いことから、DTBHQがIL-4の発現誘導を通じてアレルギー反応などの体液性免疫を増悪させる可能性が示唆された。また、両刺激において、ストレス応答遺伝子GADD45の発現が増加していた。GADD45は細胞がDNAに傷害を及ぼすストレスを受けた際に発現し、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)と共同してDNAの修復や細胞周期の停止などに関与する分子として知られている。特にDTBHQ刺激においてGADD45遺伝子の発現が顕著であることから、DTBHQ刺激はRBL-2H3細胞にとって非常に大きなストレスとなっていることが分かる。マスト細胞においてGADD45遺伝子の発現が誘導されることが示されたのは本研究が初めてである。

マスト細胞の抗原及びDTBHQ刺激において網羅的な遺伝子解析を行った結果、MCP-1を始めとする多くの特徴的に変動する遺伝子、すなわちアレルギー反応のマーカーとして利用できる可能性を持つ遺伝子が同定された。また、これらの遺伝子の中には多くのEST(Expressed Sequence Tag)も存在し、これらの中にはアレルギー反応の抑制制御に関与する新規遺伝子候補が含まれている可能性があると思われる。本研究のようなDNAチップ技術に基づく遺伝子発現の網羅的解析は、化学物質によるアレルギー発症のメカニズムを考える上で非常に有用であることが明らかになった。現在、含窒素系農薬やフタル酸エステルなどによる遺伝子発現変化についても、同様な網羅的解析をすすめている。

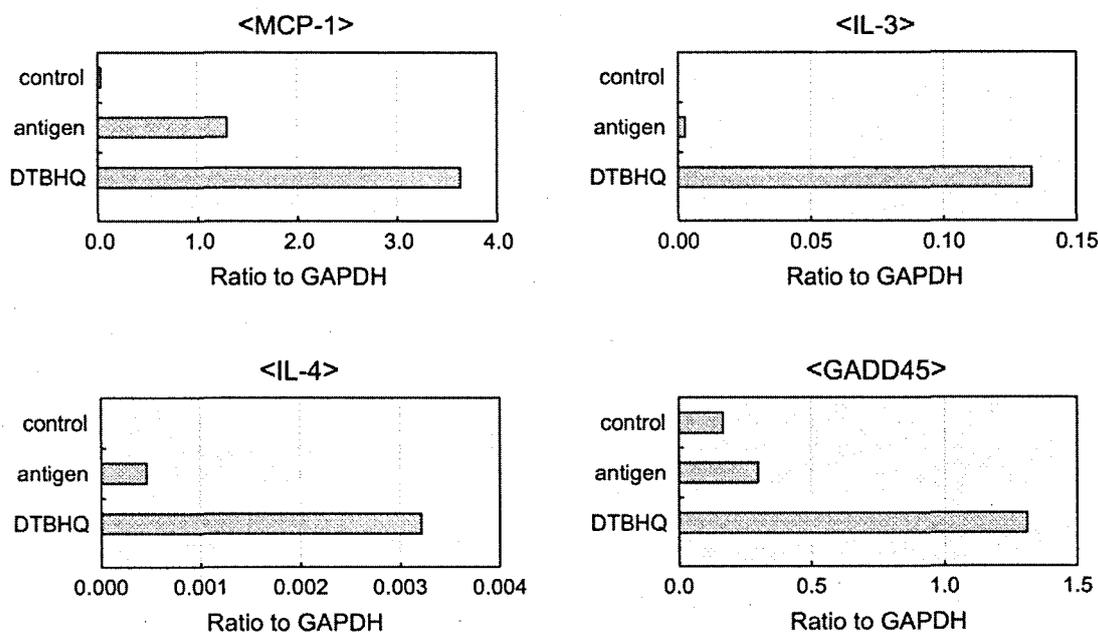


Fig.14. Quantitative PCR analysis for MCP-1, IL-3, IL-4, and GADD45 mRNA. The mRNA expression levels in resting RBL-2H3 cells and cells stimulated for 3 hours with 10 µg/ml antigen and 10 µM DTBHQ are shown as ratio to GAPDH mRNA.

## [発表論文]

- 1) Onose, J., Teshima, R. and Sawada, J.:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor induce IL-4 and MCP-1 production in RBL-2H3 cells. *Immunol. Lett.*, **64**, 17-22 (1998)
  - 2) Nakamura, R., Ishida, S., Ozawa, S., Okunuki, H., Teshima, R. and Sawada, J.: Gene expression profiling of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells. *Inflamm. Res.*, **51**, 611-618 (2002)
3. 遺伝子発現データベースを利用した安全性評価に関する研究

## (1) 化学物質の安全性評価のための遺伝子発現プロファイル解析システムの開発

安全情報部 戸田恭子, 高井貴子\*1, 林譲, 中田琴子  
\*1(現所属) 東京大学情報理工学系研究科

## [目的]

統計解析と生物学的知識を統合した、遺伝子発現プロファイル解析システムの開発を行い、化学物質の安全性評価という目的に適したシステムの開発を目的とする。DNAチップを使う上での現状の問題点、測定結果のバラツキや反復測定による弊害をなくすため、統計的判定方法に関するプログラムを開発する。DNAチップによる遺伝子発現変化の適切な判定と解析を試みる。

## [方法]

1. 市販の遺伝子解析ソフト Gene Spring を介したデータについて、情報部で既開発の細胞内シグナル伝達ネットワークデータベース (CSNDB) で解析する。
2. 胃粘膜上皮培養細胞系を用いて、(a) 無刺激分、(b) TNF- $\alpha$  添加群、(c) ヘリコバクター・ピロリ抽出液添加群、(d) ヘリコバクター・ピロリ抽出液添加+薬剤投与群について Gene Spring を用いて解析する。
3. チップ測定の精度・検出限界をもとめ、あらかじめ推定した測定値のSDを規準にして統計的判定を行うプログラム (MS EXCELマクロによるプログラム) を開発する。基本的考え方は機器分析の精度を求める理論 (FUMI理論) と同じであり、有意差検定は3つのステップから成る: (1) 同じ条件での測定値のバラツキが異常に大きいときは、この遺伝子データは解析から削除する; (2) 異なった条件での測定値の差が有意であれば、このデータは残す; (3) 異なった条件での測定値が、両方とも検出限界近辺の時は、このデータを削除する。最後に、データを増加と減少に分ける。(Fig.15)

## [結果と考察]

1. 平成12年度は、Affymetrix社のヒトDNAチップを用いて測定しGene Springで処理した、発癌剤 (TPA) 処理後EBウイルス初期抗原を発現したHuman B-Cell Raji細胞に対する抗プロモータ剤レチノイン酸の効果に

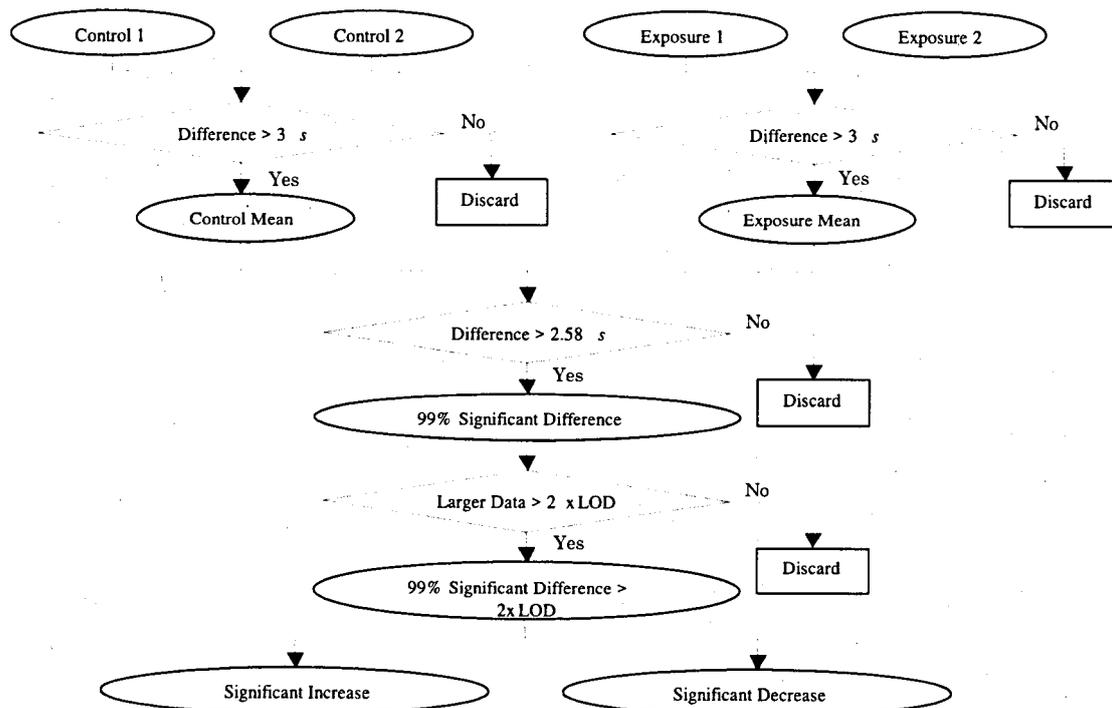


Fig.15. Flow chart for the significant difference test

Analysis of a single pair of experiments should be skipped and the test begins at Step 2.

ついて、細胞内シグナル伝達ネットワークデータベース (CSNDB) を用いて、シグナル伝達系と遺伝子発現プロファイルの関連の解析を試みた。CSNDB内の遺伝子の登録制度と、Gene Springにおける登録制度が異なっていたので、両者の対応をとるためにGene Springにおける登録制度をCSNDBに追加した。またGene Springの処理結果を一度にCSNDBで解析するために、これまで逐一処理であったインタフェースに、バッチ処理を可能とする機能を追加した。解析の結果、同時に発現抑制されている遺伝子の間に、3種類のシグナル伝達経路が見つかった。いずれも細胞増殖に関わるパスウェイであった (Fig.16)。また同時に発現促進されている遺伝子の中に、分化誘導のパスウェイに関与する遺伝子 (TGF-beta-3) があることを見出した。(遺伝子発現プロファイルデータは京都府立医科大学一石英一郎博士より提供された。)

2. 平成13年度はGene Springを用いて胃粘膜上皮培養細胞系を用いて、TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor) 添加における遺伝子発現変化とヘリコバクター・ピロリ菌による胃炎にて効果が期待される薬剤の影響についてGene Springを用いて解析し、遺伝子発現の型と信号伝達の関係づけを試みた。(b)~(d)の処理における発現の変化から関連があると期待される遺伝子を分類することはできたが、詳細な遺伝子発現パスウェイを特定するには至らなかった。もっと多くのDNAチップ実験デー

タを用いた解析が必要である。(DNAチップデータは京都府立医科大学一石英一郎博士より提供された。)

3. 平成14年度はDNAチップ測定の精度・検出限界について研究し、前もって実施した実験から得られた測定値のSDを規準にして、くり返し測定 (n) が1回または2回で統計的判定を行うためのプログラムを開発した。(DNAチップデータは当所薬理部の石田誠一主任研究官より提供された。)

この方法を用いたGeneChipデータの有意差検定の有用性については別途検討中である。

[発表論文]

- 1) Toda, K., Ishida, S., Hayashi, Y., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K. and Shudo, K.: A novel algorithm to test significant differences in microarray experiments. *Genome Informatics*, **13**, 274-275 (2002)
- 2) Nakata, K., Toda, K., Ichiishi, E. and Kaminuma, T.: A Network-Based Array Data Interpreter. *Genome Informatics*, **12**, 261-262 (2001)
- 3) Ichiishi, E., Yoshikawa, T., Takai, T., Tokuda, H., Yoshida, Y., Hanashiro, K., Kaminuma, T., Yoshida, N., Nishino, H.: Effect of retinoic acid on cell proliferation-related gene expression in Raji cells induced by 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **30**, 21-31 (2001)

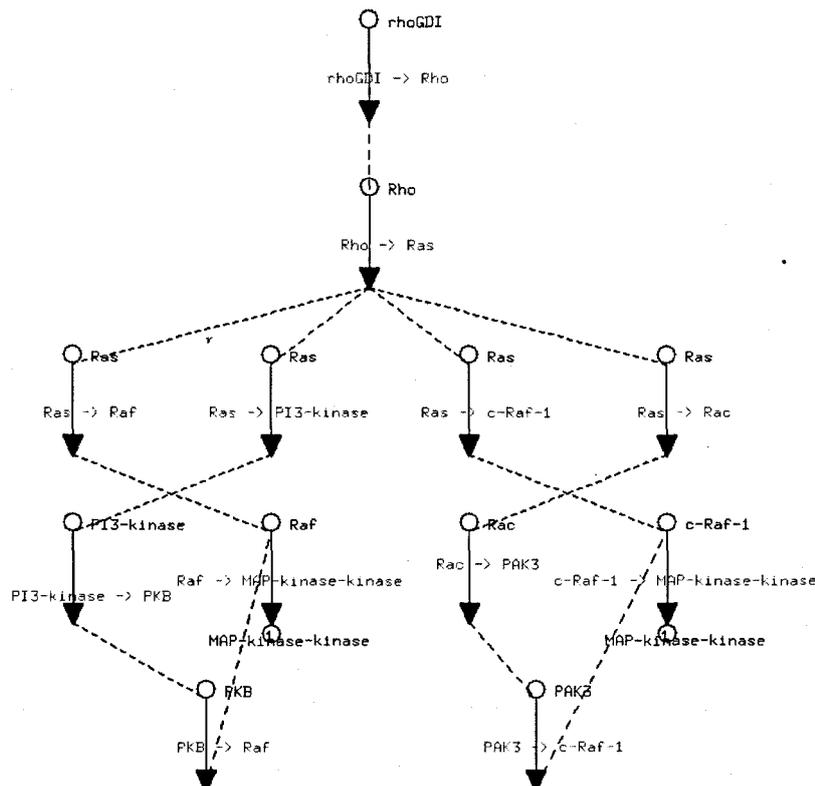


Fig.16. An example of signal pathway among simultaneously suppressed genes

## (2) 化学物質による遺伝子発現プロファイル解析のための文献情報検索

総合評価研究室 広瀬明彦, 江馬 眞  
医薬安全科学部 長谷川隆一

### [目的]

近年, ジーンチップ等を用いた遺伝子発現プロファイルリング技術のめざましい発展に伴い, 一度に何千もの遺伝子発現変化をとらえることができるようになったが, その膨大なデータ量のため, 未だに決定的な解析手法を見いだせない状況にあると思われる. 一般には, 遺伝子発現量と症状または毒性との相関関係を基にした統計学的手法が用いられるが, 生物学的パラメータを必ずしも反映していないのが現状である. そこで, 本研究では, 生体側の標的因子が同定されている内分泌かく乱物質について, そのレセプターを介した遺伝子発現指標と毒性発現量および暴露量との間の定量的な解析を行うことにより, 遺伝子発現を指標とした毒性評価への適用性について検証を行うことを目的としている.

### [方法]

内分泌かく乱物質としては, 近年その低用量影響が最も注目されているビスフェノールA (BPA) を取り上げ, *in vivo* と *in vitro* の内分泌かく乱作用を検証した報告, BPAの暴露量および体内動態に関する約80の情報をMEDLINEなどの文献情報検索や公表された各種報告書を収集し, それらの情報整理と評価を行った. これらの情報のうち, *in vitro* 系の反応性と血中濃度に関してはBPA濃度 (ng/ml) を, *in vivo* 系の毒性情報と暴露量情報は1日摂取量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を基準として定量的解析を行った. その結果を基にBPAによる低用量影響のヒトへの健康影響評価を行うと共に, 主に *in vitro* 系の実験から得られる遺伝子発現指標の化学物質の安全性評価への適用性について考察した.

### [結果と考察]

*In vitro* 系におけるエストロゲン様活性を調べた文献からは, BPAのエスラジオール (E2) に対する相対的なエストロゲン活性は1,000分の1~100,000分の1の範囲で, ほとんどの報告は, 数千分の1から1万分の1の間に集中していた. また, レポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性は, 概ね10  $\mu\text{M}$ ~10 mM (1  $\mu\text{M}$  = 0.229 ng/ml), エストロゲンレセプター (ER) へ結合阻害活性は100  $\mu\text{M}$  以上のBPA濃度で活性が現れることが示された.

また, *in vivo* 系の実験では, BPAによるエストロゲン作用や生殖期発生障害等の内分泌かく乱作用の有無に関し

て異なる結果が報告されている. 陽性結果を示す報告に限れば, 未成熟または卵巣摘出雌動物に対する子宮重量増加反応は, 最低用量は100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上から報告されているが, 多くは10 mg/kg 以上で認められている. 精子数減少, 前立腺重量増加や膣開口の遅延などの胎児期及び授乳期暴露による主に生殖器官の発生異常は, 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で認められている.

体内動態研究からは, ラットにおいてBPAは体内でほとんどがグルクロン酸抱合体化され10~30%が尿中に, 残りは胆汁排泄により糞中に排泄され, 体内消失半減期は20~40時間であると考えられる. また, 経口投与における未抱合体血中BPA濃度は投与後1時間前後と3~6時間後にほぼ同じ高さのピークを示す2相性の変化で, ピーク時の濃度は10 mg/kg 投与で31~40 ng/ml, 100 mg/kg 投与で134~150 ng/mlを示すことが報告されている. ヒトにおける代謝研究はほとんど報告されていないが, ヒト肝臓組織を用いた *in vitro* 研究では, げっ歯類と同様にヒトでも主代謝物はグルクロン酸抱合体であることが示されているほか, 要旨だけの限られた情報として経口摂取後の血中消失半減期は3.5時間であることが報告されている. その他, サルにおける経口投与時の尿中排泄の割合は約80%であることが報告されている.

一方, ヒトにおける暴露状況に関しては食事由来の平均摂取量調査で, 約0.03~1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と見積もられ, 未抱合体の血中濃度としては, 約0.1~2 ng/ml という値が報告されている. さらに尿中排泄量に関する報告では, 様々な単位が使用されているため, 報告値のままでは同一基準で定量化できなかった. そこで, ヒトの1日クレアチニン排泄量 (14~26 mg/kg/day) や総尿量 (1~1.5 L/day) の正常値を基に, 抱合体を含めたBPA排泄量を推定したところ, 約0.01~0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であると考えられた.

上記の結果を基に, まず *in vitro* 系研究でのBPA濃度を基準としたエストロゲン活性の発現状況とヒト血中濃度をFig.17にまとめてみた. 上段にはレポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性, 最下段にはエストロゲンレセプター結合阻害活性の認められたレンジを示した. なお, 同じ報告の中で陽性対照として用いたエスラジオールに対する活性レンジを左側に点線で示してある. また, 中段の上側には, ヒト及びラットにおける通常のエスラジオール血中濃度レンジを, 下側にはヒトで報告されているBPAの血中濃度レンジを示した. その結果, このFig.17からは, ヒトのBPA血中濃度の高い領域では, レポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性が現れる濃度領域に極めて近いものであることが示され, 血中濃度がそのまま標的組織中のBPA濃度を示すわけではないが, 現状のヒトのBPA暴露レベルでも, エストロゲン作用が発現する可能性を示唆しているように見える. しかし,

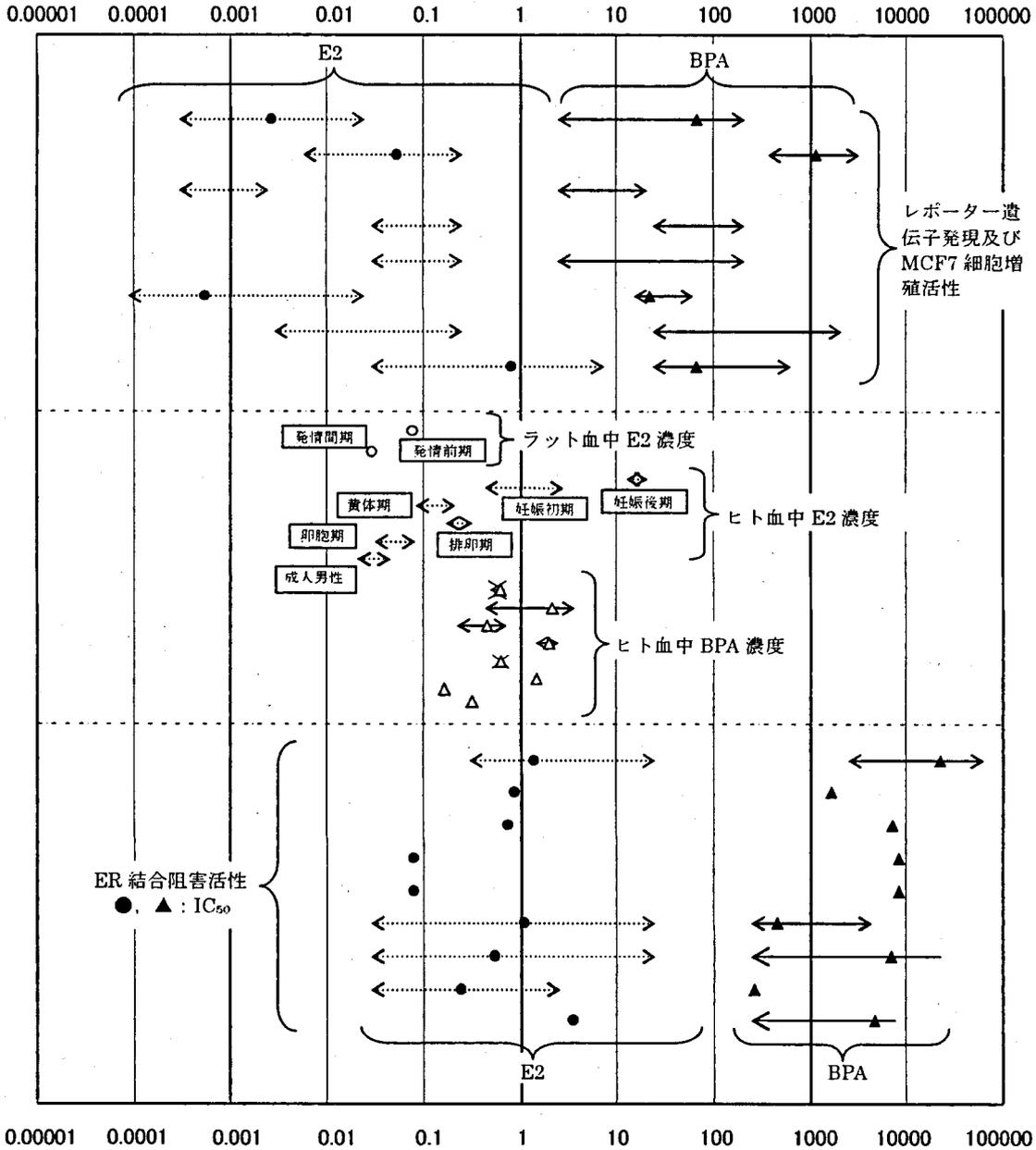


Fig.17. *In vitro* 試験系およびヒト血中のビスフェノール濃度の比較 (ng/ml)  
 上段と下段の矢印の範囲は用量反応シグモイド曲線の上端及び下端濃度を示し、  
 上段の"●"および"▲"はEC<sub>50</sub>を、下段の"●"および"▲"はIC<sub>50</sub>を示している。

通常の生体内エストロゲン濃度はビスフェノール濃度よりやや低い値でしかないことは、両者の相対的活性強度の比が1000倍以上であることからすると、現状のBPA暴露レベルにおける生体内でのエストロゲン作用発現には疑問が残る。このことは、標識エストロゲンを用いたBPAの結合阻害活性が、レポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性よりも高い濃度から示されていることから指示されると思われる。

次に、*in vivo* 系の実験結果とヒトのBPA摂取量を体重あたりの1日摂取量を基準としてFig.18にまとめた。上段には、胎児期及び授乳期暴露による影響、下段には

未成熟または卵巣摘出雌動物に対する子宮重量増加作用の現れる用量レンジを示した。なお、各実験の設定用量のうち影響の認められなかった用量は白抜きのシンボルで示した。また、中段にはヒトにおける摂取量調査の結果と尿中排泄量から逆算した1日摂取量を示した。経口摂取によるヒトの尿中排泄の割合は知られていないが、ラットで約10~30%、サルで約80%であることが報告されているので、安全性を見込んだ観点から尿中排泄の割合を10%として算出した。その結果は0.01~2 μg/kg/dayとなり、1日摂取量調査結果の値とオーバーラップするものとなった。このFigからは、齧歯類における

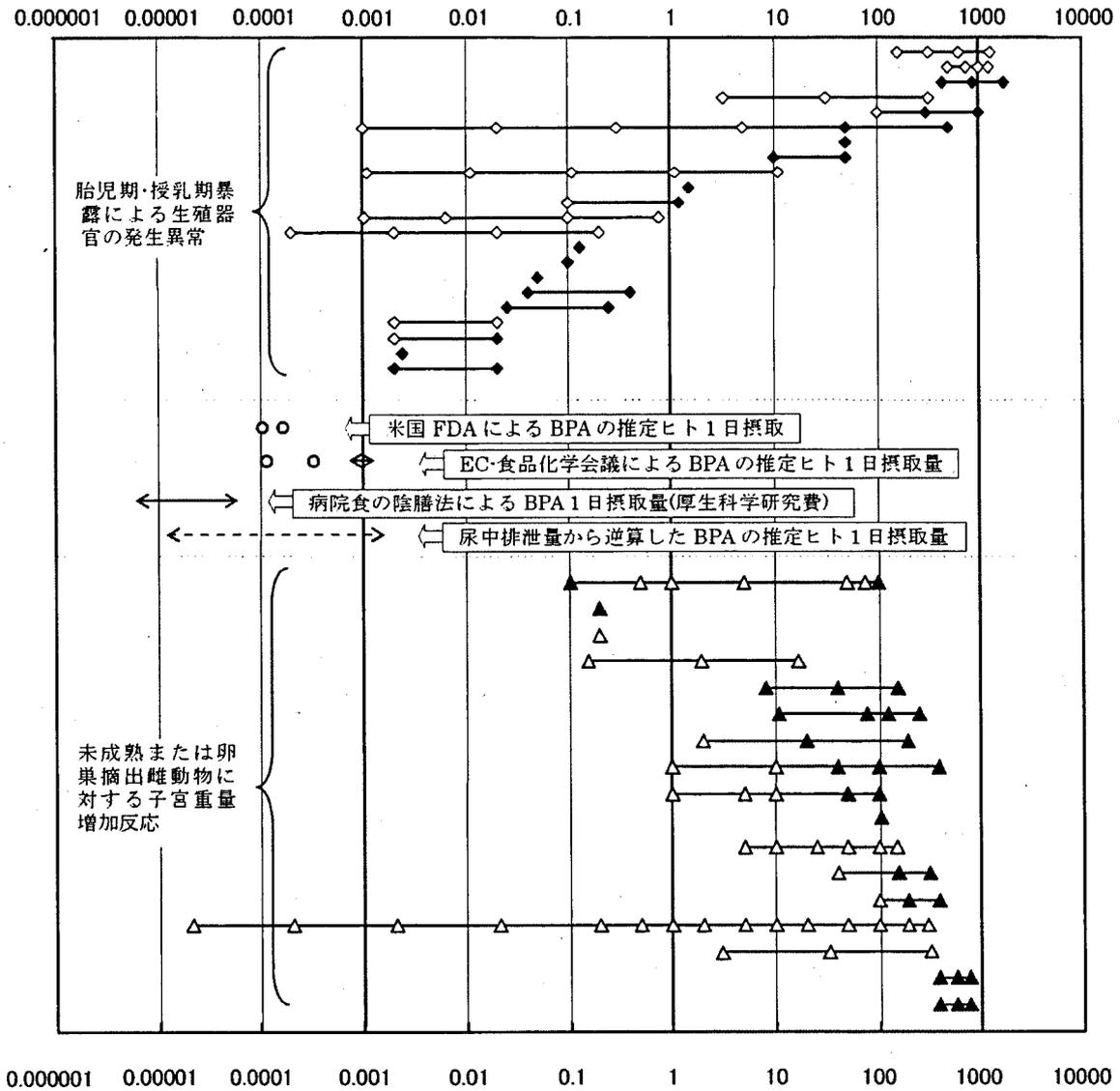


Fig.18. *In vivo* 試験系における投与量およびヒト摂取量の比較 (mg/kg/day)  
 上段及び下段の白抜きシンボル (◇, △) は有意差のある影響が認められなかった用量を示す。

胎児期及び授乳期暴露による最低影響用量とヒトで推定される摂取量がほぼ同じレベルであることが示され、現状のヒト暴露量においても内分泌かく乱作用が発現する可能性を示唆するものとなった。一方、*in vivo*系で直接エストロゲン活性を測定できると考えられている未成熟または卵巣摘出ラットの子宮重量増加に対する影響は、0.1~0.2 mg/kg/dayでも認められるとする報告もあるが、その他の結果を総合すると、概ね10 mg/kg/day以上の投与量で子宮重量増加が引き起こされると見ることができる。このエンドポイントに限れば、現状のヒト摂取量との間に十分なマージンのあることが示された。

これら2つのFigを比較すると、Fig.17における*in vitro*系でのレポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性発現濃度レンジとヒトBPA血中濃度レンジとの位置関係が、Fig.18における*in vivo*試験系での胎児期・授乳期

暴露による影響が表れる用量レンジとヒト摂取量との位置関係と相似しているように見える。このことは、BPAについては、エストロゲンレセプターを介する遺伝子発現を指標とした研究結果が、血中濃度との比較を行えば、直接*in vivo*における影響を予測し得ることを示唆しているとも考えられる。しかし、これにBPAに関する代謝研究から得られる情報を考慮するといくつかの矛盾が浮き彫りにされる。上述したように、10 mg/kgのBPAをラットに投与したときの最高血中濃度は30~40 ng/mlであることが示されているが、この濃度レンジは、ちょうどFig.17での*in vitro*系でのレポーター遺伝子発現やMCF7細胞増殖活性発現濃度レンジと重なる。また、この代謝研究の投与用量：10 mg/kgはFig.18における子宮重量増加反応が認められる最低投与量とほぼ同じである。つまり、エストロゲンレセプターの反応を見る*in*

*vitro* 及び *in vivo* の試験系が血中濃度を基準にすると同様の濃度レンジで発現していることを示唆することになる。この過程に基づくと、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の低用量から認められる胎児期・授乳期暴露による低用量影響は、 $\text{pg}/\text{ml}$  レベルの血中濃度で誘発されることになるが、*in vitro* 系において、この濃度レベルで検出できる指標は報告されていない。また、ヒトでは  $0.01 \sim 2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  のビスフェノールを摂取した結果、血中濃度が  $0.1 \sim 2 \text{ng}/\text{ml}$  となっていると考えられるが、このヒトにおける血中濃度は前述したラットの代謝研究から予想される濃度より著しく高いものになっていることも同時に示唆される。

今回の研究では、明確な定量的安全性評価を行うことはできなかったが、BPAの安全性評価を行うに当たり少なくとも2つの今後の検討項目を示すことができたと考えられる。まず一つには、BPAによる低用量影響を引き起こす原因は、今まで指標としてきた遺伝子発現よりも低濃度で惹起されている可能性が示唆されたことである。これには、ジーンチップ等を用いた遺伝子発現解析をより低濃度で行うことにより補足することが可能であ

るかもしれないし、その遺伝子の同定は、低用量発現メカニズムの解明や毒性学的意味合いの確定等に役立つと考えられる。二つ目には低用量摂取による体内動態研究を血中濃度のみならず標的臓器で行う必要があることも示された。今回は血中濃度レベルのみでの比較を行っているので、必ずしも影響発現との相関を示しているとは限らない。標的組織でのBPA濃度や低用量摂取における体内動態の情報があれば、上記の矛盾は解消されるかもしれない。

結論的に今回の研究では、化学物質の安全性評価において遺伝子発現指標を用いると、その定量的評価に対して十分な情報を提供できることが示されたが、今後さらなる指標探索や代謝研究などの基礎的研究の発展が望まれるところである。

#### [発表論文]

- 1) 広瀬明彦, 江馬 眞, 鎌田栄一, 小泉睦子, 長谷川隆一: ビスフェノールAの内分泌かく乱作用のヒトへの健康影響評価. 日本食品化学学会誌, 10, 1-12 (2003)

## バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開

早川堯夫

## Potential Role of Regulatory Science in the Development of Novel Biologics

Takao Hayakawa

ヒトゲノム配列の解読が終了し、これを基に画期的医薬品や革新的医療技術の開発を目指す研究が急速に進展している。ポストゲノム時代における創薬には、大きく分けて2つのステージがある。第一のステージは、新たな遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明である。その際のポイントは、いかに簡便、迅速、確実に新規遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明ができるかである。第二のステージは、明らかにした遺伝子やタンパク質の機能に基づく創薬である。その際、機能が明らかにされた新たな遺伝子、タンパク質、関連機能分子あるいはそれらの改変体そのものが創薬ターゲット分子となり、新たなバイオ医薬品として開発されるケースが考えられる。一方、新たに機能解明された遺伝子やタンパク質を分子標的として、これらを制御することのできるものが創薬ターゲット分子となるケースも多い。いずれにしてもポイントは、その時点の科学技術の進歩をふまえ、いかに効果的に創薬ターゲットを見つけ、合理的で適切な品質、安全性、有効性に関する試験や評価を行うかにある。バイオ創薬分野でのレギュラトリーサイエンスの主要な役割は、関連する生命科学技術の所産を最も望ましい形で有用な医薬品として結実させ、効率よく臨床の場に届けられるようにすることであり、上記のステージのさまざまな過程において有用な物質の探索や特性解析、必要な技術や製品評価法の創出、あるいはそれらの有効活用を図ることなどにある。

## 1. ポストゲノム時代における創薬とレギュラトリーサイエンス

ゲノム解読から創薬・革新的医療技術への応用に至る流れの一部を図1に示した。

キーポイントは、遺伝子やタンパク質の機能を明らかにして、これに基づき、各種医薬品や医療技術への開発につなげていくということである。具体的には、明らかにした遺伝子やタンパク質の機能に基づいて、タンパク質を制御する低分子薬、タンパク質性の医薬品、抗体医薬品、遺伝子治療薬、細胞治療薬、さらには遺伝子を制御する核酸医薬品などの開発を目指すということである。いわゆる再生医療の場合には、幹細胞などから話がスタートすることもあるが、新規遺伝子で改変された細胞が活用されることも確実に多くなってくると思われる。

ここで、レギュラトリーサイエンスの役割は、バイオ創薬のあらゆる過程において、科学技術の所産を最も望ましい形で、かつ迅速、効率的に医薬品や医療技術として臨床の場に届けられるようにすることにある。それには、①技術面、②物質面、③マネジメント面などから

の視点やアプローチがあるが、実際には、これらが相互に補完しあって目標を達成するということになる。別の表現をすれば、バイオ創薬の過程において、①技術面、②物質面、③マネジメント面などから、生命現象の解明や関連技術の進歩という科学技術の所産を最も望ましい形で、かつ迅速、効率的に医薬品や医療技術として臨床の場に届けられるようにするという目的を明確に意識し、かつ各々が担う個別の要素や活動が、医薬品や医療技術という諸科学の結晶に統合化される中でどのような位置づけにあるかを理解し、最も適正に統合化に寄与できることを目指したあらゆる科学的活動は、レギュラトリーサイエンスを体現するものであるといえる。この科学的活動の場は、行政に科学的根拠を提供し、行政を支援することを中心的役割とする公的な試験研究機関に必ずしも限らない。創薬に寄与する基礎研究や応用研究等を担う大学や優良な医薬品開発を目指す企業もまたその積極的な活動実践の場となることが期待される。その活動内容が、仮に一見、基礎研究や基盤研究、技術開発研究、あるいは製品開発研究といったもののように映ったとしても、その実践が明確に“より望ましいpublic health”を目指すものであること、医薬品や医療技術という諸科学の結晶を得るための科学的要素の統合化の過程を熟知し、その中で当該科学がどのような意義、位置づけにあるかを把握した上で、目標達成や統合化に向けてどのよ

本稿は、第123年会 日本薬学会でのレギュラトリーサイエンス部会創立関連ミニシンポジウム「レギュラトリーサイエンスはバイオ創薬の推進力になるか」における講演「レギュラトリーサイエンスの新展開」を要約加筆したものである。

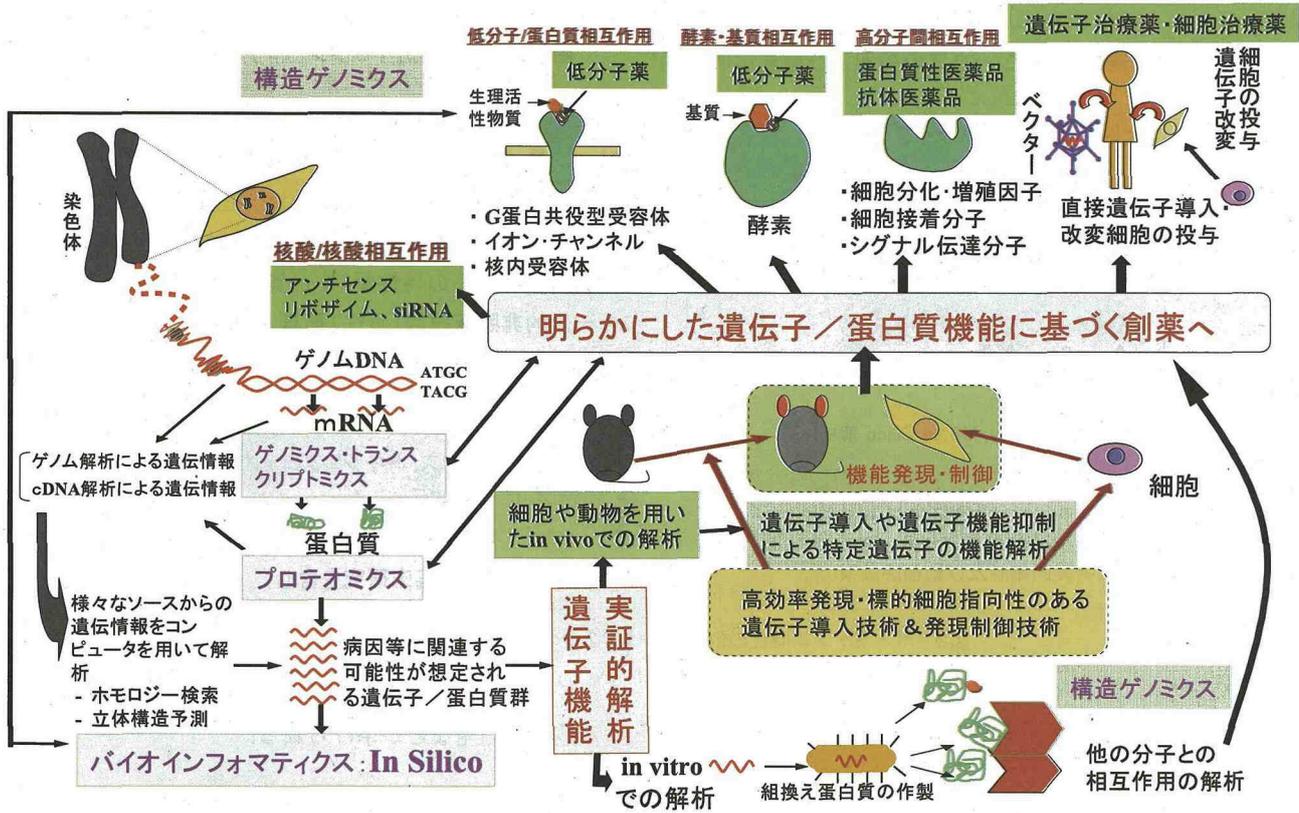


図1 ゲノム解読から創薬・革新的医療技術への応用

うにさらなる展開をすべきかの展望を明確に有している限り、レギュラトリーサイエンスの実践であるといえる。もとより、国立衛研が、そうした活動の中核を担うべきことは言うまでもない。

本稿では、1) 技術面の展開として、バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術の開発、評価、有効活用、2) 物質面からみた視点として、創薬ターゲットの探索や特性解析と評価の密接な関係づけ、3) マネージメント面からの視点として安全性・有効性の予測や設計の重要性及びトランスレーショナルリサーチの推進などに関して国立衛研で取り組んできた活動を中心にレギュラトリーサイエンスの新たな展開や役割について述べる。

**2. 技術面の展開：バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術の開発、評価、有効活用**

ポストゲノム時代における創薬に用いられる技術基盤と要素を図2に示した。

大きく分けて2つのステージがある。新たな遺伝子やタンパク質の探索とその機能解明という第1のステージと明らかにした遺伝子やタンパク質の機能の活用や制御に基づく創薬、すなわち創薬ターゲットの探索、選択と最適化、製造方法の検討、品質・有効性・安全性評価という第2のステージである。各ステージでは、従来用いられてきた創薬関連技術に加え、各種「ゲノミクス」

「プロテオミクス」、「バイオインフォマティクス」、及び「遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術」などの新技術が用いられるが、これらの技術を“いかに評価し、有効に活用するか、いかに技術的に進化させ活用するか”が、開発をスムーズに進行させ、創薬ターゲットの適正な評価に繋がるかを決めるキーポイントになると思われる。この中で、特に「遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術」が大きなポイントと思われるので、まずこの点を取り上げる。

**2.1 遺伝子・タンパク質機能の実証的解析技術**

バイオ創薬の第一ステージである遺伝子やタンパク質機能解明については、「ゲノミクス」、「プロテオミクス」、「構造ゲノミクス」、「バイオインフォマティクス」などの包括的・網羅的な研究展開が行われているが、これだけでは絞り込み、推定はできても遺伝子機能を最終的に実証し、医薬品開発や医療技術への応用にもっていくことはできない。絞り込まれた、「個別遺伝子の機能を実証的に解析する」必要がある。その際の実証的解析の手段のひとつは、“標的細胞や動物に候補遺伝子(群)を導入して発現させ、その機能を直接評価するか、あるいは生体系で機能している特定の遺伝子機能を抑制することにより逆に標的遺伝子機能を評価するという実証的解析”である。しかし、ゲノミクス、プロテオミクス、*in silico*

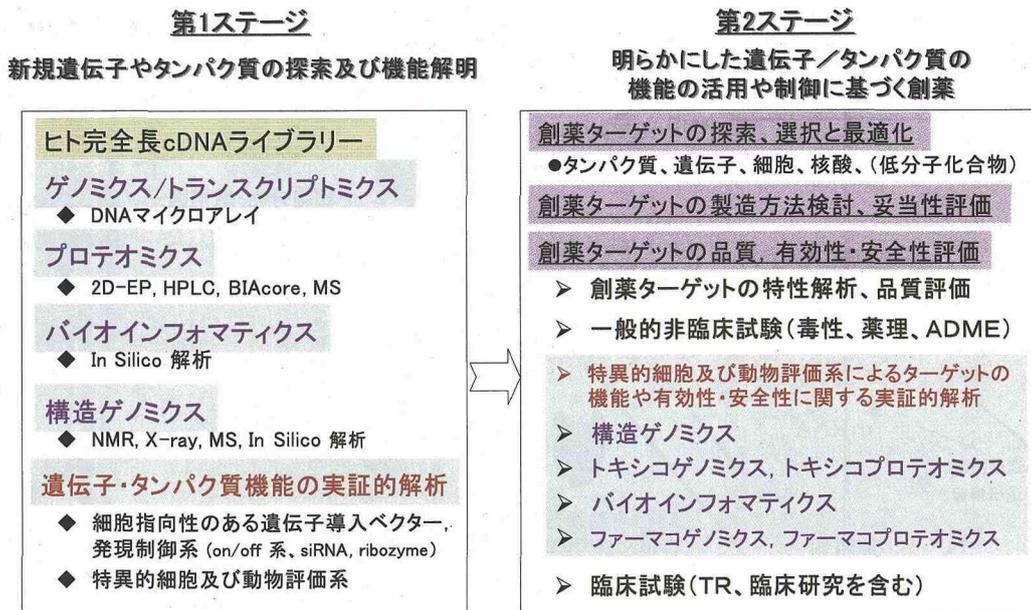


図2 ポストゲノム時代の創薬における2つのステージと技術基盤

等の急速な進展に比べて、実証的解析系の開発は極めて遅れている。

これは画期的な遺伝子導入技術と発現制御技術及び評価系の開発が遅れているためである。したがって、この分野のブレークスルーは、遺伝子機能解明研究にとって、非常に重要であると考えられる。

## 2.2 画期的遺伝子導入技術が充たすべき基本的条件

画期的遺伝子導入技術が充たすべき基本的条件としては、①遺伝子機能に関するスクリーニングにスピードが決定的要素であることを考慮すれば、簡便・迅速に目的遺伝子を組み込んだ導入系が構築できること、②目的遺伝子が核内に高効率で導入され、かつ目的遺伝子産物を高発現すること、③各種細胞(非分裂細胞や初代培養細胞を含む)や動物に高効率で目的遺伝子を導入できること、④標的細胞指向性の制御が可能なことなどが重要である。また、画期的遺伝子導入技術として開発が期待されるものとしては、⑤細胞内において複数のタンパク質を同時発現させ、共同作用や相互作用を伴う機能を解明するために、複数の目的遺伝子が導入可能な遺伝子導入系の作製技術、⑥特定の遺伝子発現産物の用量-反応をみながら機能解析ができるよう、目的遺伝子の発現程度を調節可能な遺伝子導入系の作製技術、⑦細胞の本来の遺伝情報系の機能を傷害することなく、目的遺伝子産物の機能を長期にわたり観察することを可能にする、染色体外で安定発現可能な遺伝子導入系の開発、⑧細胞分裂を伴っても目的遺伝子産物の機能を長期にわたり観察することを可能にし、かつ他の遺伝子に影響を及ぼさず特定の染色体の特定部位への目的遺伝子組み込みを可能と

する技術の開発などが挙げられる。

## 2.3 簡便・迅速な遺伝子導入系の作製技術

画期的遺伝子導入技術開発を行うため、筆者らは既存するベクター中では最も遺伝子発現効率が高く、プラスミドDNAと比較すると、10の5乗から8乗倍も効率が良いとされるアデノウイルスベクター(Adベクター)をベースに研究を進めている。Adベクターの問題は、目的遺伝子を組み込むのに、きわめて煩雑な手順と何ヶ月という期間を要することであった。この問題に関しては幸いなことに筆者らは、既に革新的ともいべき独自の「簡便・迅速な遺伝子導入系の作製技術」を開発し、自家薬籠中のものとしていた。そのポイントはAdベクターをプラスミドベクターとして扱う点であり、目的外来遺伝子を挿入するサイトに特異的な制限酵素部位を入れたAdベクターバックボーンを作製しておいて、目的外来遺伝子を含むプラスミドとのワンステップの*in vitro*ライゲーションで迅速、簡便に遺伝子導入コンストラクトを作製する、ということである。その1例を図3に示した<sup>1)</sup>。

## 2.4 汎用性又は特定標的細胞指向性の制御が可能な遺伝子導入構成体の作製技術開発

次の大きな課題は、汎用性又は特定標的細胞指向性の制御が可能な遺伝子導入構成体の、作製技術開発である。既存で汎用されるAdベクター5型は、そのファイバー部分がCAR(coxsackievirus-adenovirus receptor)と呼ばれるレセプターを介して細胞に入っていくことが知られている。したがって、Adベクターの標的細胞指

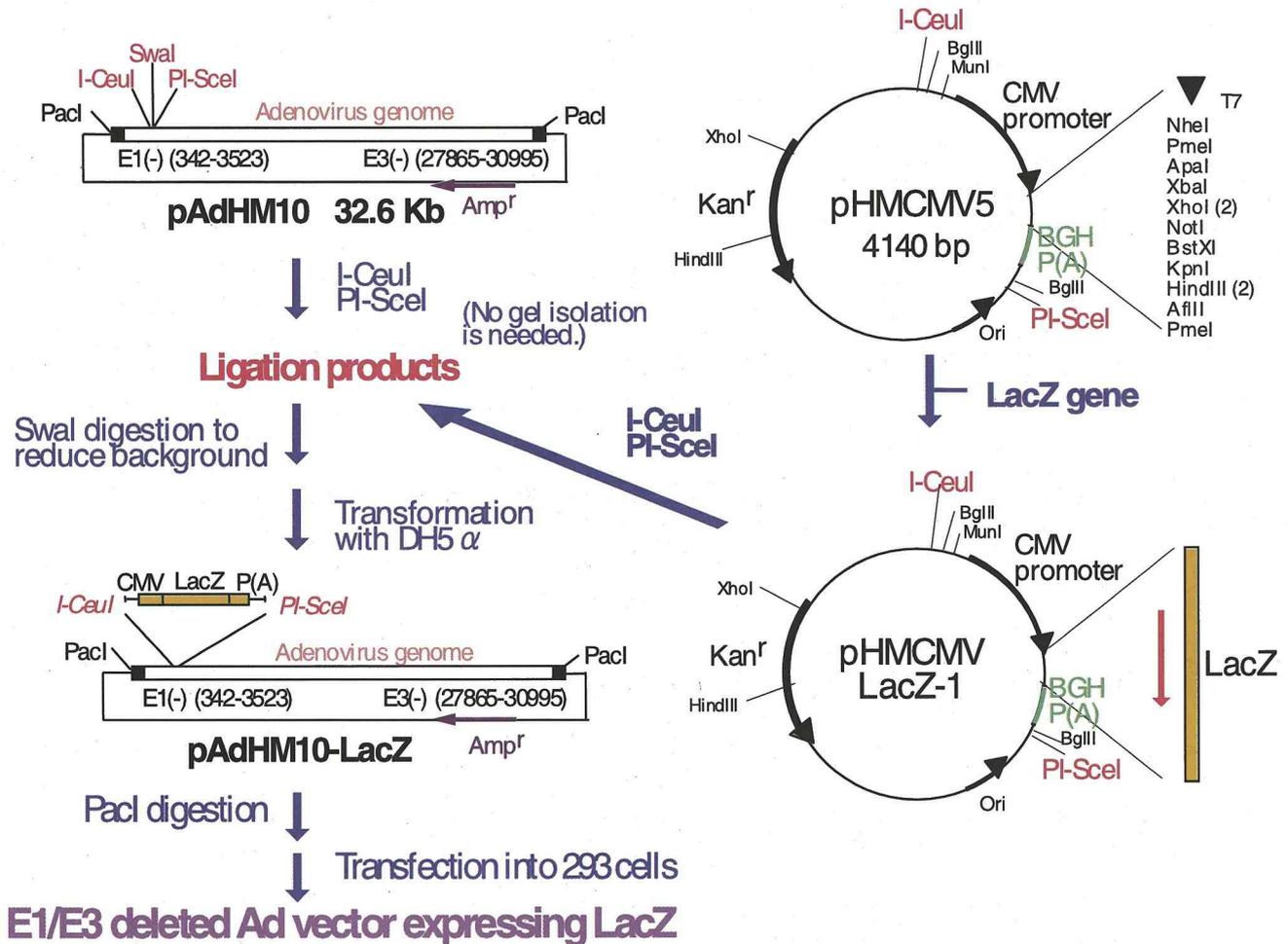


図3 ワンステップの *in vitro* ライゲーションに基づいたアデノウイルスベクター作製法

向性を制御するための大きなポイントの一つは、このファイバー部分の改変にあると考えた。そこで、例えば細胞表面のインテグリンを標的とするリガンドである RGD あるいはヘパラン硫酸を標的とするポリリジンペプチドでファイバー部分を改変した Ad ベクターを作製する技術開発を試みた。

その結果、図4の第1段階に示したように、CAR との結合に与るファイバータンパク質をコードする遺伝子配列部分に、挿入したい任意の外来ペプチド、ここでは RGD に相当するオリゴDNA を、ワンステップの *in vitro* ライゲーションでベクター DNA に導入し、ファイバーを改変する技術を開発した<sup>2)</sup>。本技術は、図4の第2段階に示した E1 欠損領域へのワンステップの目的外来遺伝子挿入技術とのセットで、極めて簡便に任意の細胞特異性を有するベクターの構築を可能にする。換言すれば、標的細胞指向性の制御を可能にする画期的なものである。

RGD 配列をファイバーに導入した Ad-RGD ベクターを、従来型ベクターと比較すると、CAR の発現が乏しいヒトやマウスの細胞では、100-1000 倍の遺伝子導入活性を示した (図5)<sup>2,3)</sup>。また、ヘパラン硫酸を標的と

するポリリジンペプチドでファイバー部分を改変した Ad ベクターでは、ヒトやマウスの細胞での遺伝子発現を 100 倍以上増加させることができた<sup>4)</sup>。

次に、従来用いられてきた Ad 5 型ベクターに代わり、Ad 35 型を用いればどのような性質の変化が現れるかという点に着目して、5 型 (Ad5L) に Ad 35 型のファイバーをつけたもの (Ad5F35L)、Ad 35 型そのもの (Ad35L) をベクタープラスミドとして構築して、その標的細胞指向性などについて検討してみた。その結果、Ad 35 型はとくに顕著に CD 34 陽性細胞への標的指向性があるというデータが得られた (図6)<sup>5,6)</sup>。

このように標的細胞指向性を自在にかつ迅速に変えられる遺伝子導入技術基盤がわが国独自に開発され、確立したことは、遺伝子機能解明にとって画期的であるばかりでなく、その技術の汎用性と応用面での広がりを考えると大きな意義を持つと思われる。

## 2.5 複数の目的遺伝子を搭載した遺伝子導入構成体の作製技術開発

複数の目的遺伝子を搭載した遺伝子導入構成体の作製

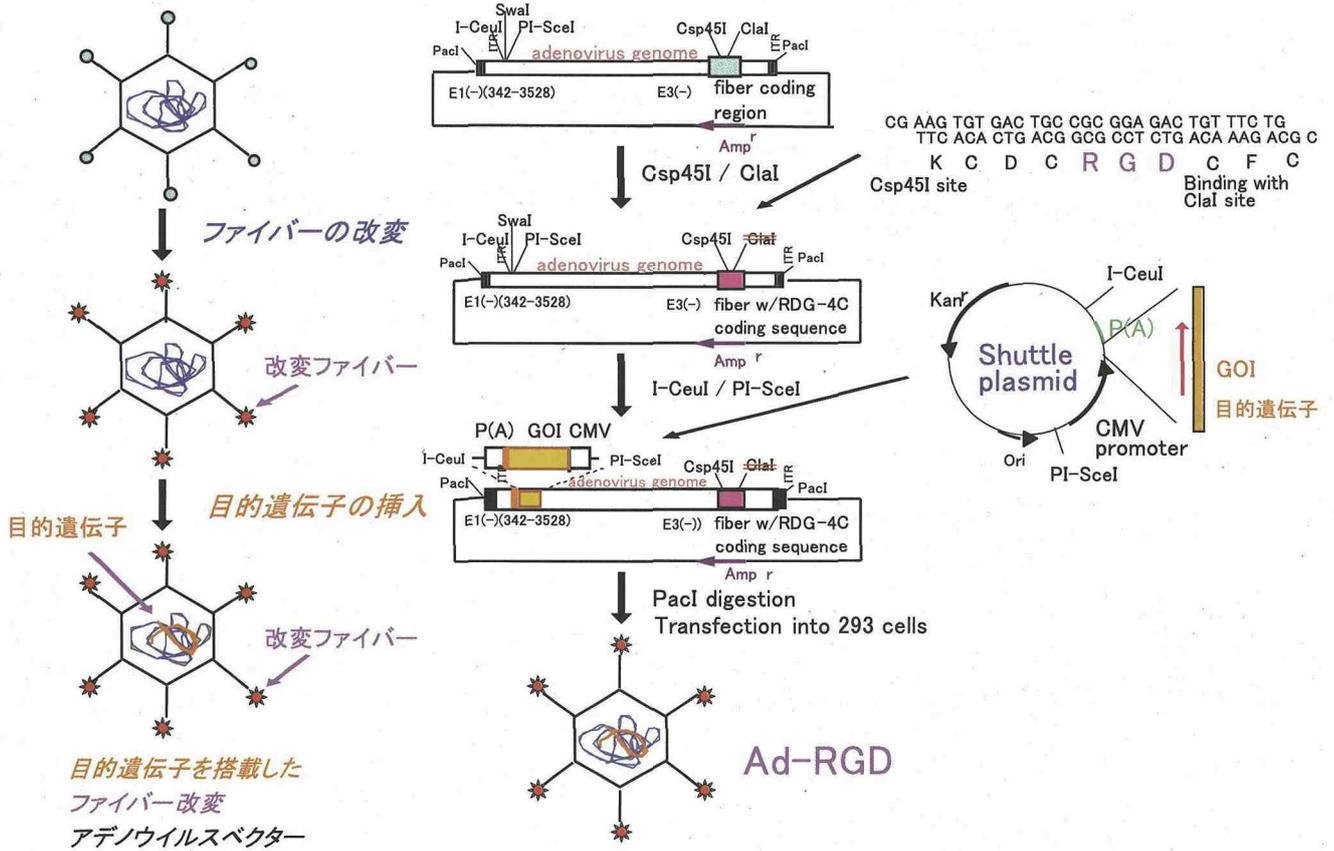


図4 標的細胞指向性を制御できるアデノウイルスベクターの開発

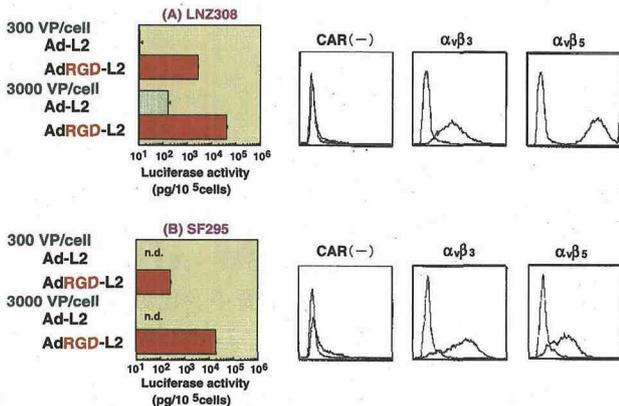


図5 RGD配列をファイバーに付与したアデノウイルスベクターによるCAR (-) 細胞への遺伝子導入活性の増強

技術が開発されると、1) 目的遺伝子の発現制御、2) 遺伝子機能の定量的解析、3) 複数の遺伝子を同時発現させて共同作業や相互作用を伴うタンパク質の機能解析が可能になると期待される。

検討の結果、図7に示すように、AdベクタープラスミドのE1及びE3欠損部位にそれぞれユニークな制限酵素サイトを導入したベクターバックボーンを基に、ワンステップの *in vitro* ライゲーションで単一のベクター内に複数の外来遺伝子 (GOI-1, GOI-2) を導入できる簡

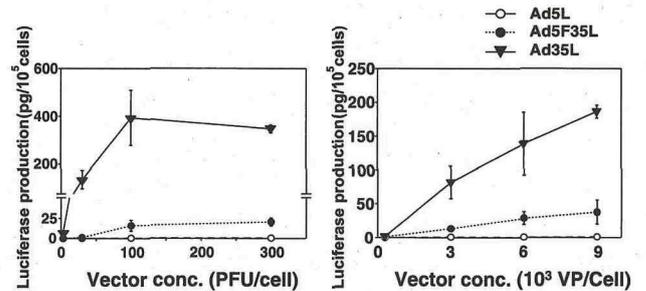
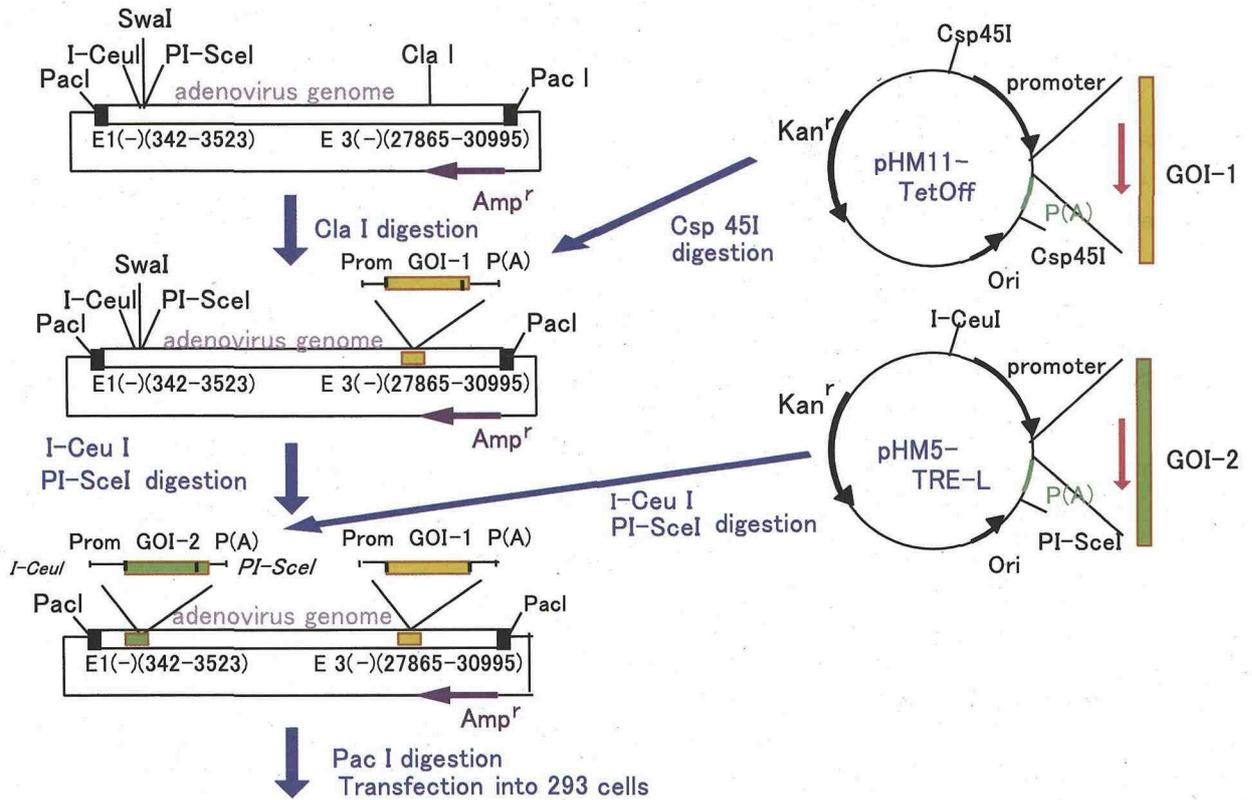


図6 35型アデノウイルスベクターによるヒトCD34陽性細胞への遺伝子導入活性の増強

便なAdベクター作製システムの開発に成功した<sup>7)</sup>。この作製法を利用して、一方に、目的遺伝子とテトラサイクリン応答性のプロモータ、他方に、転写活性化遺伝子を搭載して、ドキシサイクリンで用量依存的に発現をoffにしたり、onにできるシステムの構築にも成功した(図8)<sup>8,9)</sup>。onシステムでは、3番目の調節的遺伝子配列導入により、最高2500倍にわたる制御が可能になったという例を示している<sup>10)</sup>。これは *in vitro* での例であるが、*in vivo* でもこのシステムはきちんと機能することを確かめた。すなわち、Tet-offシステムではドキシサイクリン摂取に伴う顕著な発現抑制、Tet-onシステムでは摂取に伴う顕著な発現上昇と中止による減少が認めら



### 単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクター

図7 単一のベクター内に複数の外来遺伝子を搭載したアデノウイルスベクターの開発

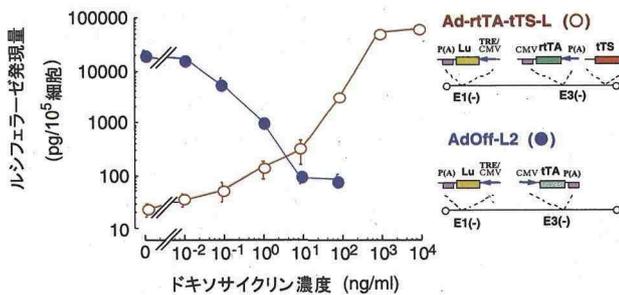


図8 発現制御型アデノウイルスベクターを導入したSK HEP-1細胞における遺伝子発現の制御

れた (図9)<sup>10</sup>。

### 2.6 成熟した細胞内や動物体内ですでに機能している特定遺伝子の機能発現を制御することにより標的遺伝子機能を評価し、遺伝子やタンパク機能を解明する技術開発

“成熟した細胞内や動物体内ですでに機能している特定遺伝子の機能発現を制御することにより逆に標的遺伝子機能を評価し、遺伝子やタンパク機能を解明する”というアプローチも考えられる。図10には、21塩基対からなる2本鎖RNA (siRNA) が配列特異的に細胞内の特

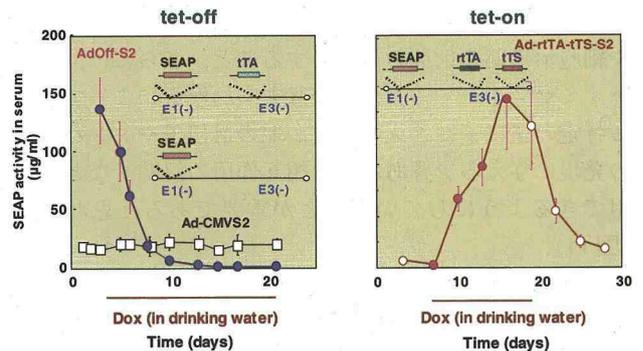


図9 tet-offあるいはtet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターによるマウスでの遺伝子発現制御

定のmRNAの分解を促進して遺伝子発現を阻害するという現象を利用して、Adベクターに搭載したルシフェラーゼに対するsiRNAにそのような作用を期待できるかどうかみた結果を示しているが、ルシフェラーゼの遺伝子発現を阻害することが示された (投稿準備中)。

### 2.7 新規遺伝子やタンパク質の探索や機能解析手法は、評価手法に繋がる

ここで注目すべきことは、上記に述べたような新規遺伝子やタンパク質の探索や機能解析手法の開発は、評価

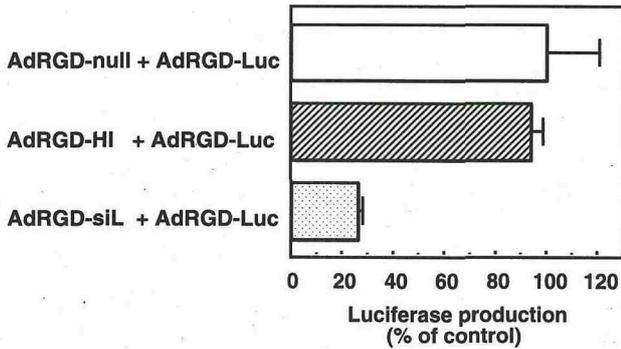


図10 siRNA発現アデノウイルスベクターによる遺伝子発現の抑制

手法の開発にも繋がるということである。すなわち、①成熟した細胞や動物個体での特定の遺伝子やタンパク質の発現あるいは機能発現抑制状態を簡便・迅速に創出する技術は、②任意の外來性の遺伝子やタンパク質を任意な程度に発現したり、内因性の遺伝子発現が抑制された細胞や動物（トランスジェニック/ノックダウン動物・細胞）あるいは疾患モデル動物の作製、という医薬品開発のための新たな評価系を作り出すことにも繋がることと期待される。

レギュラトリーサイエンスの役割の一つには、バイオ創薬の適正な推進に必要な新技術をいかに開発し、評価し、適正に位置づけていかに有効に活用していくか、ということがある。画期的遺伝子導入技術をそうした目でみると、機能の実証的解析、評価系作製ということに加えて、有効性、安全性の高い遺伝子治療用ベクター作製や細胞治療薬の創製の基盤とすること、さらには、プロテオミクスやゲノミクスとの双方向的解析によって、ある特定の遺伝子やタンパク質が他の遺伝子やタンパク質の発現に与える影響あるいは相互作用の解明、などに活用できるようにしていくことが重要であると思われる(図11)。

3. 物質面からみた視点：創薬ターゲットの探索や特性解析と評価の密接な関係づけ

バイオ創薬推進のもう一つの鍵は、創薬ターゲットの物質面でのバリデーション（創薬ターゲットの探索、選択と最適化、特性・品質・安全性等の実証的解析や評価）にあるが、レギュラトリーサイエンスとしては、その内容や手法は医薬品としての評価や評価手法に直接繋がる場合が多いという視点に立つことが重要である。

3.1 創薬ターゲットの探索のためのプロテオミクス/グライコミクス

現在、疾患関連プロテオームファクトリーというプロジェクトがスタートしようとしている。これは、高血圧、がん、痴呆症、喘息などの疾患や薬物等で変動するタン

パク質を探索、同定し、画期的医薬品のシーズとして活用するというものである。このプロジェクトそのものについては、計画を煮詰める段階にあるので、今後の展開に期待するとして、そのモデルとして衛研で始めたアプローチの一つの原理について紹介する<sup>11)</sup>。

起源の異なる2つの試料A及びB（例えば病態細胞や組織及び正常なもの）由来の糖タンパク質から、図12に示すような手順で得られた糖鎖を誘導体化、この場合はピリジルアミノ化（PA化）する。この際、一方を重水素置換されたPAで誘導体化して分子量が4Da大きい糖鎖とする。この二つの糖鎖を混合して、LC/MSを用いて糖鎖のプロファイルを作成する。マススペクトル上、4Da異なる一対のイオンが見つければ、それらは共通にある糖鎖であり、どちらか一方のイオンしか検出されない場合は、それは疾患の原因か結果に関連する糖鎖のイオンとみなして、さらにこれが、どのようなタンパク質に由来するのかを明らかにしていくという戦略である。この際、ペプチドを適当な試薬で標識化して解析するというアプローチも考えられる。

このような原理に基づいた結果の一例を図13及び図14に示す。囲みの中がmixtureの糖プロファイルであるが、この中で同位体の質量差だけ異なる一対のイオンが検出されないもの、すなわち、いずれか一方にしか存在しない糖鎖の例として、ピーク1, 2, 3のマススペクトルを示す。ピーク1からはm/z942の混成型糖鎖、ピ

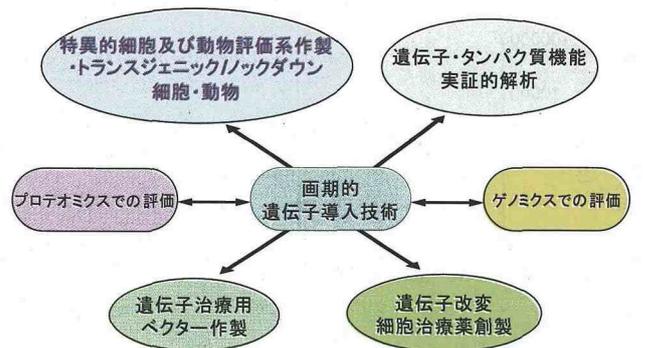


図11 画期的遺伝子導入技術はさまざまな局面で有効活用される基盤技術である

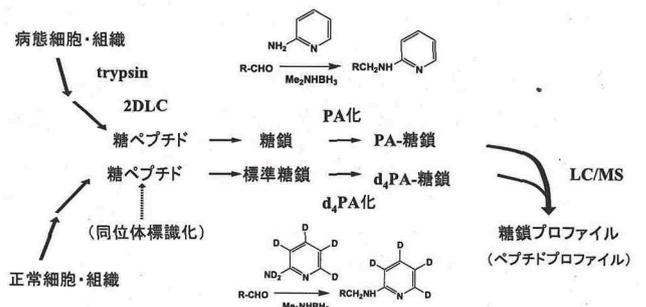


図12 同位体標識化とLC/MSを用いたプロテオミクス・グライコミクス

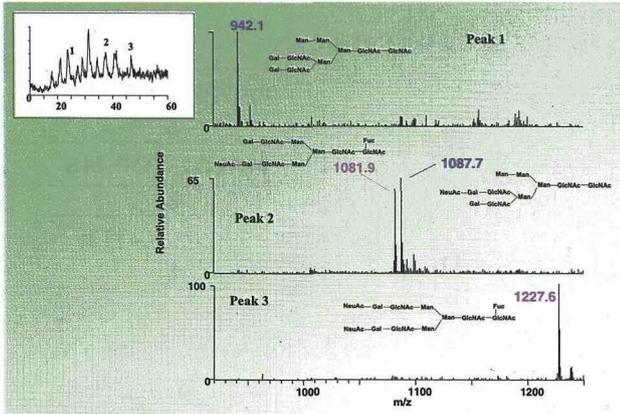


図13

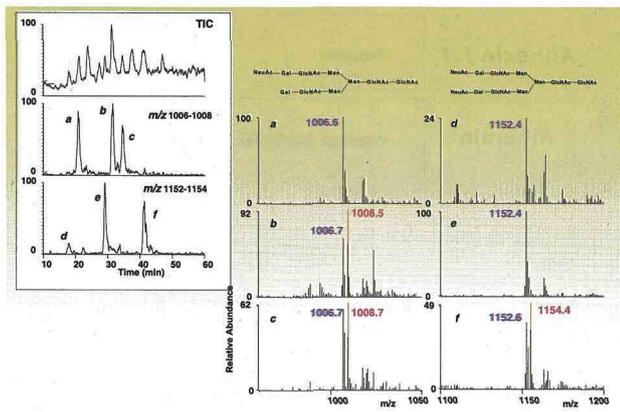


図14

ーク2からは、1081の試料B由来のフコシルモノシアロ複合型と1087の試料A由来のモノシアロ2本鎖糖鎖、ピーク3は1227の試料B由来のフコシルジシアロ2本鎖糖鎖が検出された。すなわちピーク1から1つ、ピーク2から2つ、ピーク3から1つ、いずれか一方にしか存在しない糖鎖が検出されたということになる(図13)。

さらに詳細に解析すると違いが見えてくるものもある。例えばm/z1006-1008(モノシアロ2本鎖糖鎖の2価イオン)のマスクロマトグラムをみると、3つの異性体(a, b, c)が存在するが、そのうち、異性体aは一方に特有の糖鎖であることがわかる。同様にm/z1152-1154(ジシアロ2本鎖糖鎖)についても異性体d, eが一方に特有の糖鎖であることがわかる(図14)。

一方のイオンしか検出されないものは、疾患の原因が結果に関連する糖鎖のイオンとみなしてさらに検討を進めることになる。糖タンパク質の解析については、国立衛研において独自に積み上げてきた技術的成果が数多くある<sup>11-22)</sup>。それらの蓄積を今後、検討対象となった糖タンパク質の構造と機能の解析手段としていかに活用していくか、必要に応じてさらに適切な解析法をいかに開発していくかが重要な課題になると考えられる。

### 3.2 創薬ターゲットの特性解析と評価のためのプロテオミクス/グライコミクス

一方、上記のような分析法は、糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価にも応用することができる。そのようなスキームで糖鎖プロファイルを作成すると、各ピークのマスマスペクトルから、試料やコントロール由来の糖鎖の種類や含量を明らかにすることができるので、糖鎖のcomparabilityや確認試験、あるいは恒常性を評価するのに有用な手段とすることができるということである(図15)。

### 3.3 細胞特性解析プロテオミクスと特性指標

図16には、細胞特性解析プロテオミクスの例を示す。肝臓の再生に使われると考えられる肝幹細胞として注目されている小型肝細胞と肝細胞について2次元電気泳動とTOF-MS等による解析を行い、小型肝細胞にアネキシンⅢが特異的に発現していることを見いだした<sup>23)</sup>。このようなタンパクプロファイルや、特性指標としてのアネキシンⅢに着目することが、同時に肝幹細胞の特性評価や品質等を確保する上で有用であるという視点を持つことが重要ということである。

### 3.4 プロテオミクス展望

プロテオミクスは、生体系のプレーヤーとしてのタンパク質群にスポットをあてた解析手法として、図17に示すように新規タンパク質の探索から創薬分子ターゲットの選択、最適化や創薬候補物質の薬効・安全性評価などを含みR&Dのさまざまな段階、バイオアッセイなど品質評価や管理のさまざまな局面、薬効判定や作用・副作用のモニターをはじめ臨床評価に関わるさまざまな局面に共通した最も基盤的な技術の一つになっていくと思われる。レギュラトリーサイエンスとしては、そうした視点でこれらをいかに効果的に活用するかをさらに研究していく必要がある。

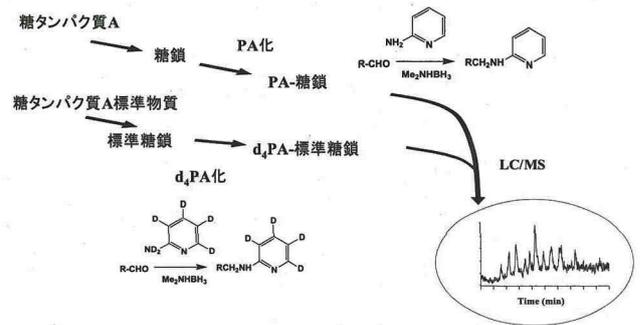


図15 PA同位体標識化とLC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法糖タンパク質性医薬品特性解析・品質評価法への応用

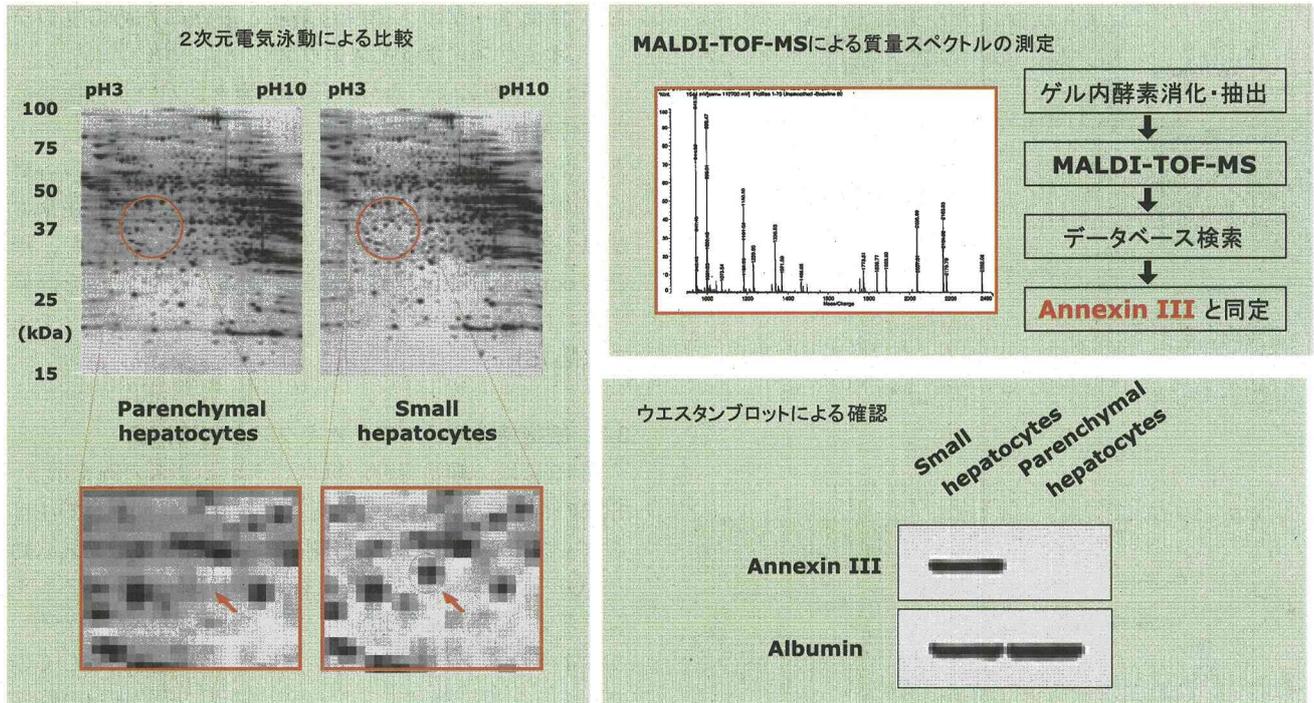


図16 小型肝細胞の特性指標の探索と特性・品質評価法への応用

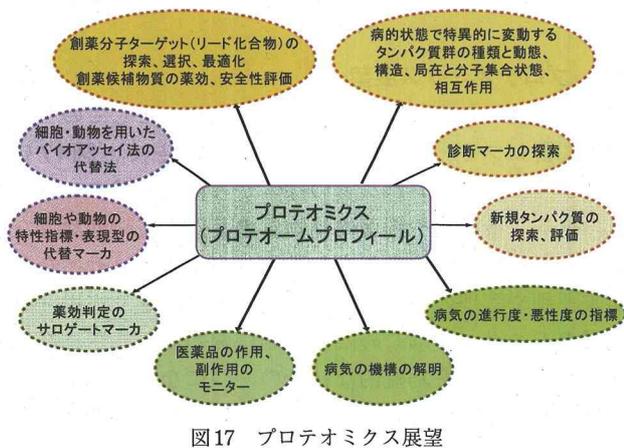


図17 プロテオミクス展望

4. マネージメント面からみたレギュラトリーサイエンスの役割

4.1 周到的安全性・有効性の予測や設計：ウイルス安全性

周到的安全性・有効性の予測や設計に関わることもレギュラトリーサイエンスの重要な役割である。そのことが製品レベルでの合理的で効率的な評価や安全性・有効性確保に繋がるからである。

その一つの例が、ウイルス安全性で、上流の適切な段階で安全性予測や設計をきちんとやればやるほど、製品レベルの評価や安全性確保が合理的で効率的にできるということである。具体的には、例えば、図18に示すように原材料及び人や動物の適格性の評価、そして医薬品の製造基材と定めた段階のものにおける徹底的なウイル

ス試験とその解析・評価が重要ということである。さらに、適切なウイルスクリアランス工程評価試験のようなコンセプト (図19) と実践も安全性予測や設計としては重要である<sup>24-27)</sup>。

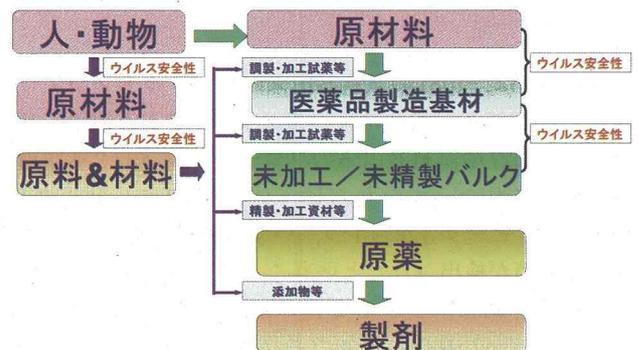


図18 人・動物由来原材料/製品が関係する医薬品製造のウイルス安全性

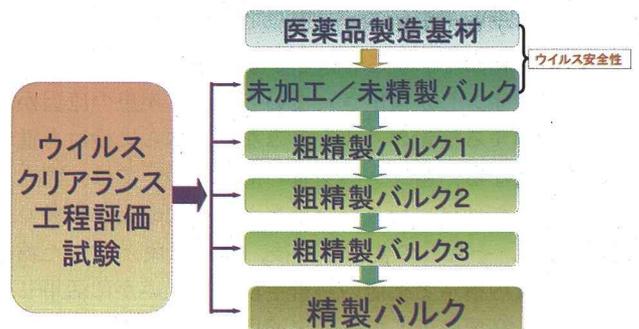


図19 ウイルスクリアランス工程評価試験

と同時に、レギュラトリーサイエンスとしては、ウイルス検出の高感度化など、さらに安全性を高める技術の開発も重要である。

最近、筆者らは、ポリエチレンイミン結合磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮とPCRを組み合わせると、各種ウイルス検出の高感度化にきわめて有効であるという結果を得ている(図20)<sup>28, 29</sup>。図21は、複数のウイルスが存在している試料を、磁気ビーズで10倍、100倍と濃縮すると、その度合いに応じて、検出感度が10倍あるいは100倍以上と上昇することを示したものである。表1は、各種のウイルスに試した結果で、いずれかのビーズを用いることにより、特にヒト問題となるHBV, HCV, HIVを含む検討した全てのウイルスが濃縮可能で高感度に検出できることが明らかに

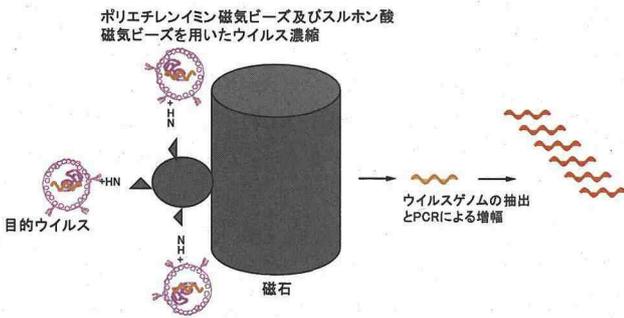


図20 ウイルス濃縮とPCRを組合わせたウイルス検出の高感度化

なった。さらに、図22のように従来の細胞変性法に変わって、感染性ウイルスをPCRで測定するという迅速、

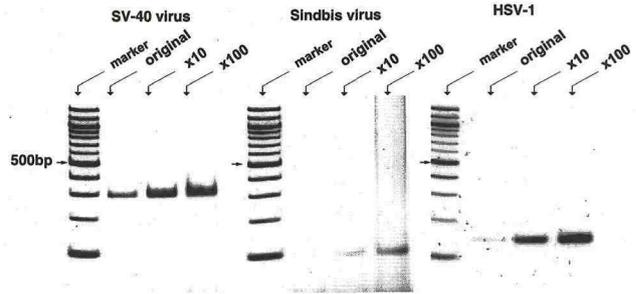


図21 3種混合ウイルスのPEIによる濃縮

表1 ウイルス濃縮結果

ウイルス	宿主	ウイルスゲノム	脂質膜	ポリエチレンイミン磁気ビーズ	スルホン酸磁気ビーズ
ヘルペスウイルス型	ヒト	DNA	有	+	+
ポリオウイルス	ヒト	RNA	無	-	+
ブタバルボウイルス	ブタ	DNA	無	-	+
水疱性口内炎ウイルス	ウシ	RNA	有	+	+
Sindbis ウイルス	ヒト	RNA	有	+	+
SV-40ウイルス	サル	DNA	無	+	+
サイトメガロウイルス	サル	DNA	有	+	ND
マウス白血病ウイルス	マウス	RNA	有	+	ND
アデノウイルス	ヒト	DNA	無	+	+
HBV	ヒト	DNA	有	+	+
HCV	ヒト	RNA	有	+	ND
HIV	ヒト	RNA	有	+	+
HAV	ヒト	RNA	無	-	+

<Classical Cell culture/CPE method>

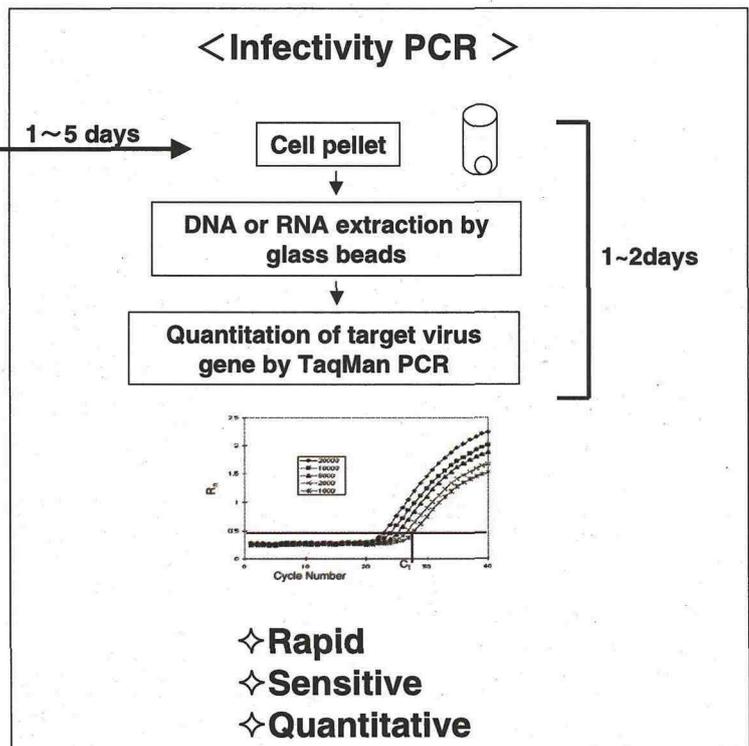
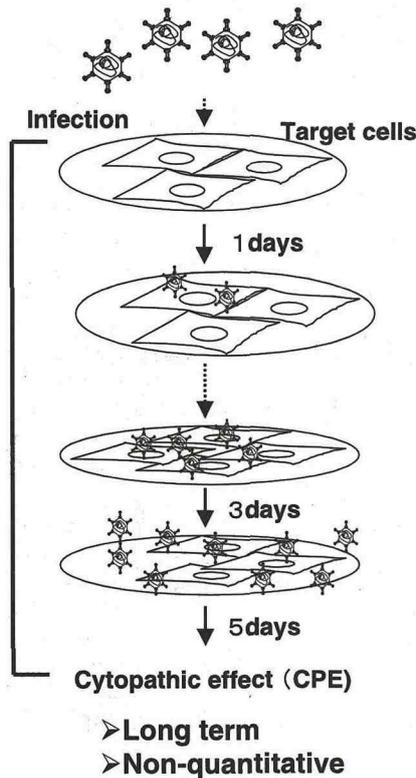


図22 細胞変性を指標としたウイルス感染価の測定と感染性 PCR

高感度及び定量的な手法の開発にも成功している。表2は結果の一例で、感染性PCRを利用することにより1pfuという非常に高感度でウイルスの感染性を迅速に検出することが可能であることを示したものである<sup>30)</sup>。感染性PCRを利用したウイルス感染性の検出は、HSV、ポリオウイルス、パルボウイルスなどのモデルウイルスについても適応可能であることを確認している。

4.2 周到的安全性・有効性の予測や設計：遺伝子治療用ベクター

遺伝子治療薬は、有効性・安全性面からみてまだ多くの課題を残しており、医薬品として一般的に実用化できる段階に至るまで技術がブレイクスルーできていない。

表2 細胞変性法及び感染性PCRによるアデノウイルスの検出  
Number of CPE or E1 DNA positive samples prepared from HeLa cells infected with Adenovirus (n=3)

<CPE method>					<Infectivity PCR>				
pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9	pfu/dish	Day1	Day3	Day6	Day9
10000	0/3	0/3	3/3	3/3	10000	3/3	3/3	3/3	3/3
1000	0/3	0/3	3/3	3/3	1000	3/3	3/3	3/3	3/3
100	0/3	0/3	0/3	3/3	100	3/3	3/3	3/3	3/3
10	0/3	0/3	0/3	0/3	10	0/3	2/3	3/3	3/3
1	0/3	0/3	0/3	0/3	1	0/3	1/3	2/3	2/3
0.1	0/3	0/3	0/3	0/3	0.1	0/3	0/3	0/3	0/3
0	0/3	0/3	0/3	0/3	0	0/3	0/3	0/3	0/3

Lower particle number of Adenovirus can be detected in earlier days by Infectivity PCR.

しかし、適切なベクターが一端開発されれば、目的遺伝子を搭載するだけで医薬品ができるという特異なバイオ創薬分野である。

そのために最も重要なことは、すでに判明している有効性・安全性に関する問題を克服するための設計図の作成とその実現である。図23には、アデノウイルスベクターの短所を克服して新世代ベクターに至るための設計図の例を示している<sup>31)</sup>。

改良の第一歩として、Adベクターの標的細胞指向性を変えることによって、担癌動物腫瘍内の遺伝子発現活性や腫瘍増殖抑制効果の顕著な増大を示す一方で、肝臓への漏れ、指向性は逆に減少するというデータが得られている<sup>32)</sup> (図24)。すなわち、Ad受容体発現が乏しいB16メラノーマ担癌マウスの腫瘍内への投与において、腫瘍内での遺伝子発現活性は従来型Adベクターの約40倍に増加し、逆に肝臓への漏れ、指向性は、1/8に減少していた。また、自殺遺伝子 (HSVtk) 搭載ベクター投与とGCV投与において、Ad-RGDベクターは顕著な腫瘍増殖抑制効果を示した。また、従来型Adベクターでは遺伝子導入が困難であったヒト正常樹状細胞において、標的細胞指向性を変えたAd-RGDベクターが約90%の遺伝子導入を達成できること、また、遺伝子発現効率が飛躍的 (約70倍) に向上するというデータ<sup>33,34)</sup> (図25) や、Ad-RGDベクターを用いると、樹状細胞に

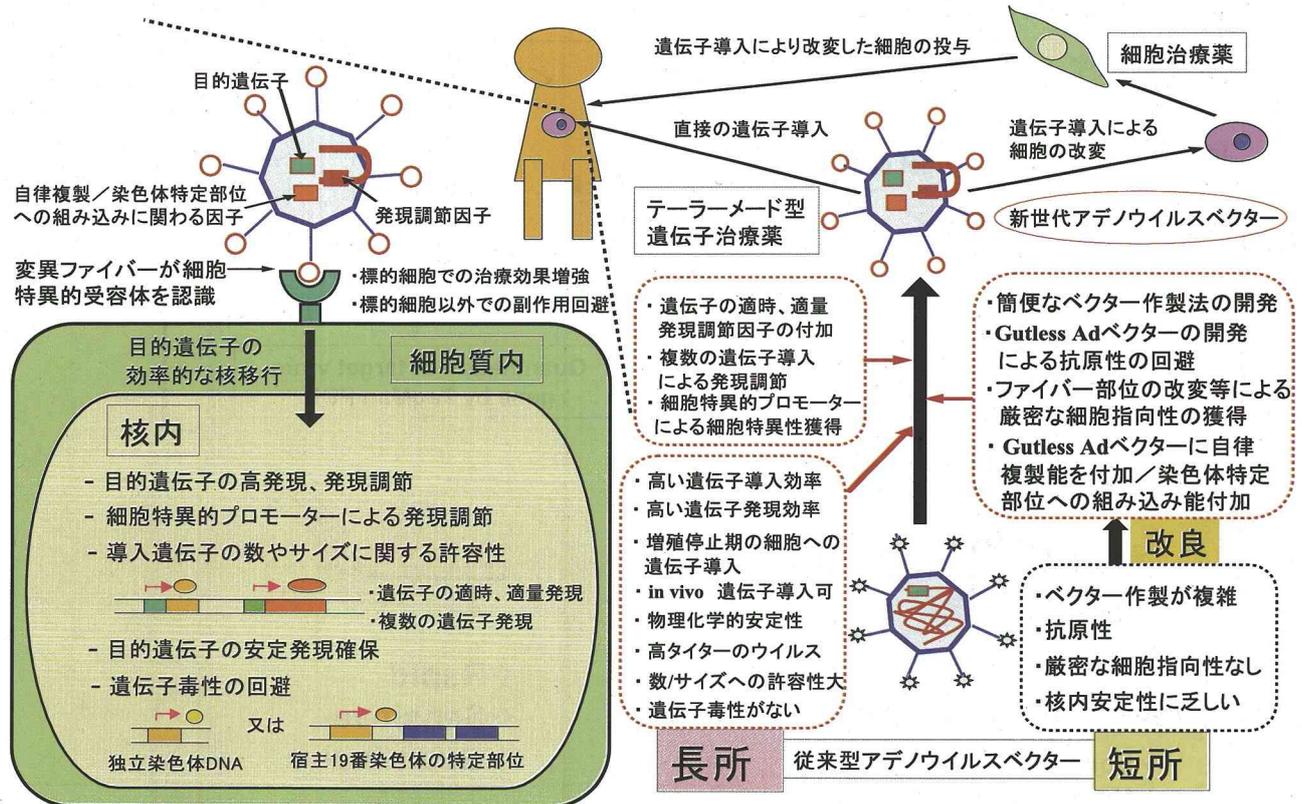


図23 新世代アデノウイルスベクターの開発

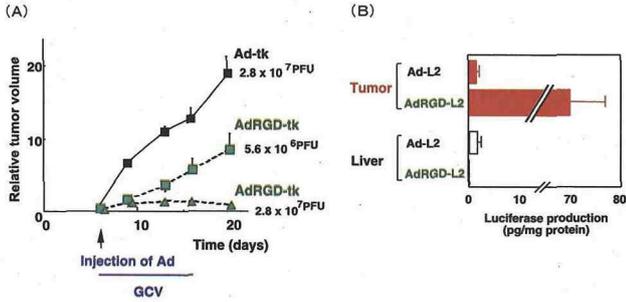


図24 RGD配列を付与した自殺遺伝子(HSVtk)発現アデノウイルスベクターによる抗腫瘍効果の増長(A)と癌組織及び肝臓での遺伝子発現(B)

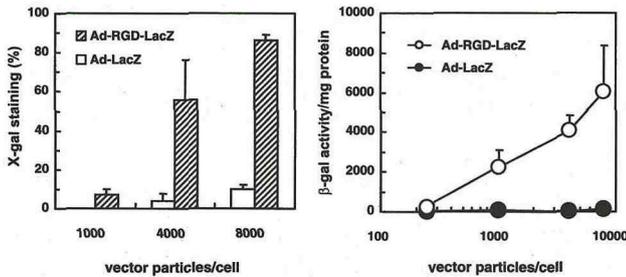


図25 従来型およびRGD配列を付与したアデノウイルスベクターによるヒト正常樹状細胞への遺伝子導入・発現効率

対して抗原遺伝子が効率よく導入され、抗原特異的なCTLの誘導能を顕著に亢進したという結果、すなわち、OVA発現Adを感染させたDC2.4(マウス樹状細胞)をマウスに免疫した際の、OVA特異的細胞傷害性T細胞活性を測定したところ、Ad-RGD-OVAを感染させたDC2.4を免疫した群では、E.G7-OVA(OVAトランスフェクタント)に対して著しい細胞傷害活性が検出されるという結果も得られている<sup>34, 35, 36)</sup>(図26)。さらに、Ad-RGDベクターの有用性は、サイトカイン(TNF $\alpha$ )やケモカイン(ILC, IL-11 receptor  $\alpha$ -locus chemokine)を用いた癌遺伝子治療モデルでも立証されている<sup>37~40)</sup>。

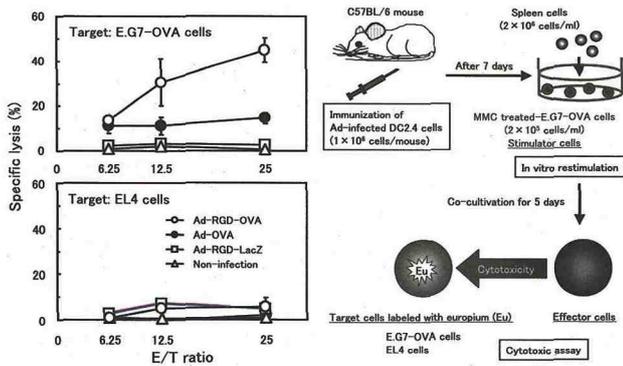


図26 従来型およびRGD配列を付与したアデノウイルスベクターによりOVA遺伝子導入したDC2.4細胞によるOVA特異的CTL誘導

### 4.3 トランスレーショナルリサーチの推進

バイオ創薬に必須なトランスレーショナルリサーチ(探索的臨床研究:TR)の推進にも、レギュラトリーサイエンスは重要な役割を担っている。

ポストゲノム時代において、有望なバイオ医薬品候補をより迅速・的確にピックアップし、効率的な開発の推進を図るためには、TRを適正に実施することが、きわめて重要な要素になるといわれている。

TRを適正に実施するために考慮すべき要素としては、科学的妥当性、倫理的妥当性、社会的理解や認知、及び規制環境の整備などがある。このうち、科学的妥当性については、結論的にいえば、それまでの基礎研究、開発研究などで得られた知見で当該医薬品の品質、安定性、安全性及び予想される有効性や性能の面から臨床試験を行うことの妥当性を明らかにすること、これにつぎと考えられる<sup>41)</sup>。

表3には、臨床応用(TR)開始に際して考慮すべき科学的要素の例を示した。製造方法から体内動態等までについて最少限必要と思われるデータを適切に集め、結果を総括してTRに入ることの妥当性を示す必要がある。しかし、もちろん、これは、医薬品承認申請時におけるようなフルセットのデータが必ずしも求められている訳ではない。また、ここで重要なポイントは、臨床応用開始に必要なデータの種類やその程度は個別製品毎に異なるということである。その際、個別製品毎に、必要なデータをいかに合理的に集め、いかに適正なタイミングで臨床応用の開始に持っていかかが肝要である。

バイオ創薬の結果、開発されてくると予測される先端的生物創薬には、①細胞基材より生産されるタンパク質性医薬品(ホルモン、酵素、サイトカイン類、分化・増殖・成長因子、血液凝固因子類、ワクチン類、抗体類等)、②遺伝子治療用医薬品、③細胞・組織利用医薬品・医療機器、④トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品、⑤トランスジェニック動物由来細胞・組織利用医薬品等、⑥トランスジェニック植物由来タンパク質性医薬品、⑦核酸医薬品(アンチセンス、リボザイ

表3 TR開始に際して考慮すべき科学的要素の具体的事項例

- ・ 医薬品の種類
- ・ 製造方法の妥当性
- ・ 分子特性/細胞特性解析
- ・ 品質評価・管理
- ・ 安定性評価
- ・ 安全性(感染性物質に対する安全性確保を含む)
- ・ 薬効の裏付け
- ・ 体内動態等
- ・ 臨床計画(臨床目的・適用法)
- ・ 学術的知見・経験の多寡
- ・ 臨床応用後の情報収集体制

ム, siRNA, デコイ, DNA ワクチン) などがある<sup>42)</sup>。これらのTRに特に焦点をあてた公的指針等はないが、既存のガイドライン等が参考になることも多い。

例えば、細胞由来のタンパク質性医薬品の開発に関しては、すでにレギュラトリーサイエンスの一つの活動成果であるICH国際調和文書が作製されているので、これらに盛り込まれたプリンシプルを参考にするのが、最も適切なアプローチであると思われる。図27には、どのような事項や過程が、どのようなICHガイドラインを参考にできるかを示している<sup>42,43)</sup>。

遺伝子治療用医薬品や細胞治療用医薬品などのTRについてはとりあえず表4に示したガイドラインが参考になる。遺伝子治療や細胞治療は、特に先端的な医療であるので、企業活動として研究用や治験用の遺伝子治療薬や細胞治療薬を製造し、これを臨床研究や治験に用いようとする場合、その品質・安全性につき、厚生労働大臣の確認を求められることができるということになっており、その際の基本的考え方や確認に必要な要件、資料等がこれらのガイドラインには示されている<sup>24,41,42,44,45)</sup>。これらのガイドライン作成の過程で、レギュラトリーサイエンスを標榜する当所が中心的役割を担ってきたことは言うまでもない。しかし、品質・安全性試験や評価に関する基盤技術はこれから鋭意開発、整備していく必要があり、レギュラトリーサイエンスにおけるさらなる重点的

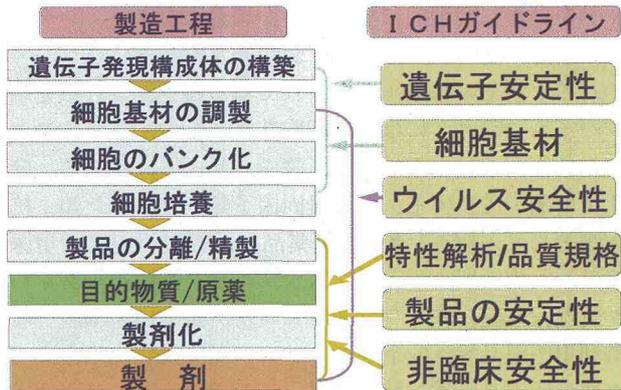


図27 細胞由来タンパク質性医薬品開発のためのICHガイドラインの活用

表4 バイオ創薬関連指針

- ・「遺伝子治療臨床研究に関する指針」  
(文部科学省・厚生労働省告示第1号 平成14年3月27日 文部科学大臣・厚生労働大臣)
- ・「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」  
(医薬発第0329004号 平成14年3月29日 厚生労働省医薬局長)
- ・「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方」  
(厚生労働省医薬局長通知, 医薬発第266号, 平成13年3月28日)
- ・「ヒト由来細胞・細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」  
(厚生労働省医薬局長通知, 医薬発第1314号, 平成12年12月28日)
- ・「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期についてのガイドライン」
- ・「医薬品の臨床試験の実施の基準 (GCP)」

取り組みが期待される。

はじめに述べたように、バイオ創薬は、生命科学分野での学問的解明や技術開発の進歩の延長線上にあるが、こうした基礎研究、基盤技術研究から臨床応用 (TR) にいかにもスムーズに、合理的に至るかというポイントは、図28に示したような要素をみたましながら、相互の連携をいかに効率よく行うかにかかっている。レギュラトリーサイエンスには、さまざまな局面で役割があるが、特に規制環境の整備という場面では当所を中心としたレギュラトリーサイエンスが中核となる必要がある<sup>24,41,42)</sup>。

5. バイオ創薬の適正かつ合理的な推進に必要な要素

バイオ創薬の適正かつ合理的な推進に必要な要素には、1) 生命科学の進歩、2) 創薬基盤技術開発、3) 基礎研究、基盤研究、開発研究の効率的連携、4) 科学的妥当性、倫理的妥当性、社会的理解・認知、経済的妥当性の確保と規制環境の整備、5) 産・学・官の連携、6) 国際共同活動と規制・基準の国際調和、7) 品質・有効性・安全性確保などが挙げられる。これらの要素のいずれにも、レギュラトリーサイエンスが果たすべき役割がある。

これからは医療技術的にも新しく、また、経済的妥当性、社会的理解・認知、倫理的妥当性の面でも予め用意された答えはない、いわば新たな挑戦となるものが次々と出てくることが予測される。これらについては、関係者がより優良な医薬品や適正な医療技術を患者さんに1日でも早く提供するという観点に立ち、英知を結集して、医療の進歩と課題の克服にあたることが重要であると思われる。こうした中でレギュラトリーサイエンスのコンセプトは、創薬の推進を目指す企業、学界、公的研究機関、規制当局いずれもが共有し、それぞれの立場において最も有効に活用し、それぞれの機能が最大限発揮されるようにすべきであるとともに、そのために必要な密接な連携を深めるべきものである。

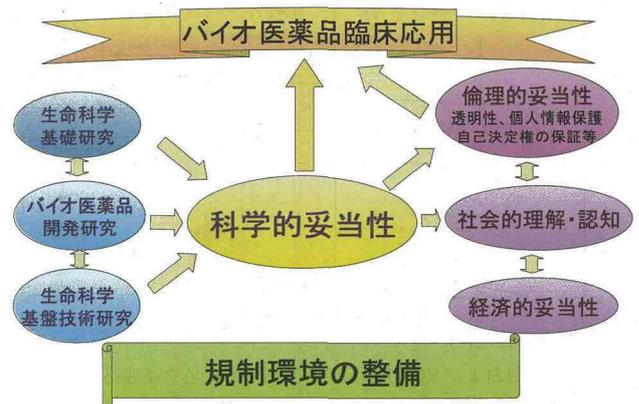


図28

## 謝 辞

本稿は、当所遺伝子細胞医薬部 水口裕之、櫻井文教、小泉直也、徐 志利、細野哲司、内田恵理子、押澤 正、山口照英各博士、及び生物薬品部 石井明子、太田美矢子、伊藤さつき、川崎ナナ、新見伸吾、川西 徹各博士による研究成果を基にしている。

## 参考文献

- 1) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: Approaches for generating recombinant adenovirus vectors, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 165-176 (2001)
- 2) Hiroyuki MIZUGUCHI, Naoya KOIZUMI, Tetsuji HOSONO, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob, *Gene Ther.*, **8**, 730-735 (2001)
- 3) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Tetsuji HOSONO, Akiko WATABE-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Efficient Gene Transfer by Fiber-Mutant Adenoviral Vectors Containing RGD Peptide, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1568**, 13-20 (2001)
- 4) Naoya KOIZUMI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Akiko WATABE-ISHII, Eriko UCHIDA, Naoki UTOGUCHI, Yoshiteru WATANABE and Takao HAYAKAWA: Generation of Fiber-Modified Adenovirus Vectors Containing Heterologous Peptides in both HI Loop and C-terminus of the Fiber Knob, *J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)
- 5) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Efficient gene transfer into human CD 34+ Cells by an Adenovirus type 35 vector, *Gene Ther.*, **10**, 1041-1048 (2003)
- 6) Fuminori SAKURAI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Teruhide YAMAGUCHI and Takao HAYAKAWA: Characterization of *in vitro* and *in vivo* gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector, *Mol. Ther.*, (in press)
- 7) Hiroyuki MIZUGUCHI, Mark A. KAY and Takao HAYAKAWA: *In vitro* ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector, *Bio Techniques*, **30**, 1112-1116 (2001)
- 8) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA : The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector, *J. Gene Med.*, **4**, 240-247 (2002)
- 9) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1568**, 21-29 (2001)
- 10) Hiroyuki MIZUGUCHI, Zhi-Li XU, Fuminori SAKURAI, Tadanori MAYUMI and Takao HAYAKAWA: Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing rtTA and tTS expression cassettes in separate genom regions, *Human Gene Ther.*, (in press)
- 11) Jin YUAN, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Isotope-tag method for quantitative oligosaccharide profiling by capillary LC/ESI-MS, (in preparation)
- 12) Jin YUAN, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Isotope-tag method for monosaccharide composition analysis of glycoproteins by capillary LC/ESI-MS, (in preparation)
- 13) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **316**, 15-22 (2003)
- 14) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**, 113-124 (2002)
- 15) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH and Takao HAYAKAWA: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)
- 16) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **968**, 89-100 (2002)
- 17) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin, *J. Chromatogr. A.*, **978**, 141-152 (2002)

- 18) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **910**, 1-11 (2001)
- 19) Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology*, **11**, 1043-1049 (2001)
- 20) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA and Takao HAYAKAWA: Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin, *Anal. Biochem.*, **285**, 82-91 (2000)
- 21) Takao HAYAKAWA, Miyako OHTA and Nana KAWASAKI: Current Analytical Procedures for Glycosylated Proteins, *Pharmaceutica Special Issue, Proceedings Biologicals Beyond 2000*, 87-102 (2000)
- 22) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA, Osamu HASHIMOTO and Takao HAYAKAWA: Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/ mass spectrometry with tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **269**, 297-303 (1999)
- 23) Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI and Takao HAYAKAWA: Specific Expression Of Annexin III In Rat Small Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2003)
- 24) 早川堯夫: バイオテクノロジーを応用した医薬品の特性解析, 品質及び安全性確保の評価科学-組換え医薬品, 細胞培養医薬品, 遺伝子治療用医薬品, 細胞治療用医薬品, トランスジェニック動物由来タンパク質性医薬品, トランスジェニック動物由来細胞治療医薬品-, *衛研報告*, **117**, 1-38 (1999)
- 25) 早川堯夫, 内田恵理子, 黒澤 努, 白倉良太: トランスジェニック動物由来細胞の品質・安全性確保に関する基礎的研究, *医薬品研究*, **31**(11), 791-817 (2000)
- 26) 早川堯夫: 感染性物質概論: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.101-122 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 27) 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一, *医薬品研究*, **33**, 210-230 (2002)
- 28) Kouei SATOH, Akiko IWATA, Mitsuhiro MURATA, Mikio HIKATA, Takao HAYAKAWA and Teruhide YAMAGUCHI: Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests, *J. Virol. Methods.*, (in press)
- 29) Akiko IWATA, Kouei SATOH, Mitsuhiro MURATA, Mikio HIKATA, Takao HAYAKAWA and Teruhide YAMAGUCHI: Virus Concentration Using Sulfated Magnetic Beads to improve Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1065-1069 (2003)
- 30) Akiko ISHII - WATABE, Eriko UCHIDA, Akiko IWATA, Ryuji NAGATA Kouei SATOH, Kejun FAN, Mitsuhiro MURATA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Teruhide YAMAGUCHI and Takao HAYAKAWA: Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR (in preparation)
- 31) 早川堯夫, 水口裕之: 遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて-一次世代アデノウイルスベクターの開発-, *医薬ジャーナル*, **37**(5), 1514-1546 (2001)
- 32) Hiroyuki MIZUGUCHI and Takao HAYAKAWA: 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)
- 33) Naoki OKADA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Tomomi SAITO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Efficient gene delivery into dendritic cells by fiber-mutant adenovirus vectors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 173-179 (2001)
- 34) Naoki OKADA, Tomomi SAITO, Yasushige MASUNAGA, Yukiko TSUKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kohei MORI, Yuka OKADA, Takuya FUJITA, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Akira YAMAMOTO: 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)
- 35) Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Yuka OKADA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Asako MATSUBARA, Naoki MORI, Hiroyuki MIZUGUCHI,

- Takao HAYAKAWA, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO: Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors, *Cancer Gene Ther.*, **10**, 421-431 (2003)
- 36) Naoki OKADA, Yasushige MASUNAGA, Sayaka IYAMA, Takashi TSUDA, Naoki MORI, Akinori SASAKI, Yuka OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Shinsaku NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takuya FUJITA and Akira YAMAMOTO : Murine Dendritic Cells Transduced with Human gp100 Gene by RGD Fiber-mutant Adenovirus Vectors Are Highly Efficacious in Generating Anti-melanoma *Cancer Gene Ther.*, (in press)
- 37) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Makiko KANEHIRA, Naoko NISHINO, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Fiber-mutant technique can augment gene transduction efficacy and anti-tumor effects against established murine melanoma by cytokine-gene therapy using adenovirus vectors, *Cancer Letter*. 2002 Mar 8, **177**(1), 57-63(2002)
- 38) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Shinsaku NAKAGAWA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Koichi TAKAHASHI, Nobuyasu MIZUNO, Takuya FUJITA, Akira YAMAMOTO, Takao HAYAKAWA and Tadanori MAYUMI: Tumor necrosis factor  $\alpha$ -gene therapy for an established murine melanoma using RGD (Arg-Gly-Asp) fiber-mutant adenovirus vectors, *Jap.J.Cancer Res.*, **93**, 436-444 (2002)
- 39) Yuka OKADA, Naoki OKADA, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Tadanori MAYUMI and Nobuyasu MIZUNO : An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF $\alpha$ -expressing adenovirus vector into established murine melanoma, *Gene Ther.* **10**, 700-705 (2003)
- 40) Jian-Qing GAO, Yasuhiro TSUDA, Kazufumi KATAYAMA, Takashi NAKAYAMA, Yutaka HATANAKA, Yoichi TANI, Hiroyuki MIZUGUCHI, Takao HAYAKAWA, Osamu YOSHIE, Yasuo TSUTSUMI, Tadanori MAYUMI and Shinsaku NAKAGAWA: Anti-tumor effect by interleukin-11 receptor  $\alpha$ -locus chemokine/CCL27, introduced into tumor cells through a recombinant adenovirus vector, *Cancer Res.*, **63**, 4420-4425 (2003)
- 41) 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 (2002)
- 42) 早川堯夫, 石井(渡部)明子: 先端的生物学的開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題, *医薬品研究*, **33**, 693-729 (2002)
- 43) Takao HAYAKAWA: Perspective on assessing comparability of biotechnology products- a view from Japan- Biologics 2000. Brown F, Lubiniecki A, Murano G (eds), *Dev. Biol. Stand., Basel, Karger*, **109**, 27-40 (2002)
- 44) 早川堯夫: 細胞・組織利用医薬品等の品質・安全性の確保, *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.397-419 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 45) 早川堯夫: 遺伝子治療用医薬品の品質, 安全性等の確保, *バイオ医薬品の品質・安全性評価*, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.341-350 (2001), エル・アイ・シー, 東京

## 平成14年度国立医薬品食品衛生研究所 業務報告にあたって

所長 長尾 拓

平成14年度は、厚生労働省研究機関の組織改編の一環として、3研究部を国立感染症研究所と旧国立公衆衛生院から受け入れ、当所は必要な組織改変とかなり大幅な人事異動を行った。プレハブではあるが機能的な新研究棟も稼働した。移って来られた研究者はご心配もあったと思うが、当所のメンバーとして十分力を発揮されている。

ミレニアムプロジェクト、メディカルフロンティアの各大型研究に続いて、トキシコゲノミクスプロジェクトが発足した。当所と製薬企業17社によるプロジェクトで、新研究棟の一部と当所に隣接する建物も借りて立ち上げることができた。将来大阪の新研究施設に移ることになっている。このプロジェクトの核になる技術は毒性部が主として開発したものである。一方で企業側の積極性も目立っており、初めての産官学プロジェクトは今後の良いモデルになるであろう。

BSE問題を始めとして食品の安全性は国民の強い関心事であり、行政も大きく変わることになる。15年度に予定される国の新組織に向けて、当所においても計画と予算面の手当も積極的になされた。特に、内閣府にできる食品安全委員会と当所の関係は密接である。当所の仕事は従来の実験中心から、情報提供も大きな仕事になるため、改組および人的準備がなされ、かなり充実した体制で新年度を迎えられたと思う。具体的な取り組みは本号の特論に述べられている。

レギュラトリーサイエンスは、約15年前に内山充名誉所長によって提唱された概念であり、当所の仕事の内容を的確に表している。平成14年度に日本薬学会は、我々の提案したレギュラトリーサイエンス部会の設立を承認し、長崎における第123回日本薬学会年会で部会として発足した。この1年間でレギュラトリーサイエンスという言葉は、周辺領域で我々の予想を超えて反響を呼び、定着しつつある。本年もその勢いは続いており、領域の拡大と、各種フォーラムも予定されている。さらに今後の発展に重要な大学における教育研究の拠点形成に続けていきたい。

大阪支所は平成16年3月をもって現在の仕事を終了する。まだ少なからぬ仕事の本業務報告に掲載されている。国立医薬品食品衛生研究所としては、歴史の大きな転換点であるが、用賀の研究所に移られた方、地元で就職さ

れた方など各人の決断と関係者の尽力に感謝したい。

また本年は、医薬品医療機器審査センターも最後の年になるが、14年度の外的活動の一部を初めて業務報告に載せることができた。

総務部

部長 谷田 修司  
(前部長 持田 秀男)

### 1. 組織・定員

#### (1) 組織

医薬品及び食品の安全性に関する情報の専門的、客観的、科学的な収集・評価体制を整備するため、平成15年4月1日付けで安全情報部が設置（化学物質情報部の振替新設）された。

また、「食品安全行政に関する関係閣僚会議」において、食品の安全性に関するリスク評価を行う食品安全委員会（仮称）を新たに設置することが提言され、同委員会事務局の組織財源として、医薬品医療機器審査センター企画調整部が、平成15年7月1日付で廃止されることとなった。

#### (2) 定員

平成15年度については、①安全情報部の設置に伴い、医薬品の安全性に関する情報の収集分析体制の強化に伴う増として1名、②食品の安全性に関する情報の収集分析体制の強化に伴う増として6名の増員が認められた。また、③食物アレルギー表示に伴う食品中の特定原材料検出法の開発に係る研究業務の強化に伴う増として1名、④天然系食品添加物の化学的安全性評価に係る研究業務の強化に伴う増として1名、の定員が認められた。また、⑤平成15年度見直し時期到来分の遺伝子治療薬の試験研究体制の強化に伴う定員1名の見直し解除が認められた。

一方、前述の食品安全委員会（仮称）事務局の設置に伴い、医薬品医療機器審査センター企画調整部長、主任研究官（研究職3級）、研究員（研究職2級）の3名が振替減とされた。また、第10次定員削減計画に基づき3名の定員が削減された。なお、14年度末の定員は指定職3名、行政職（一）49名、行政職（二）16名、研究職212名、専門行政職51名、医療職（一）11名、計342名である。

### 2. 人事異動

(1) 平成14年3月31日付で、首藤紘一所長、豊田正武食品部長が退職し、4月1日付で、長尾 拓副所長が所長に昇任した。また、3月31日付で早川堯夫生物薬品

部長が定年退職したが、4月1日付で副所長に就任し、米谷民雄食品添加物部長が食品部長に、棚元憲一衛生微生物部長が食品添加物部長に、森川 馨旧国立公衆衛生院衛生薬学部長が化学物質情報部長に、山本茂貴国立感染症研究所食品衛生微生物部長が食品衛生管理部長にそれぞれ配置換となり、川西 徹生物薬品部第三室長が生物薬品部長に、高鳥浩介衛生微生物部第三室長が衛生微生物部長に、奥田晴宏医薬品医療機器審査センター審査第一部審査管理官が有機化学部長に、山口照英生物薬品部第二室長が遺伝子細胞医薬部長に、長谷川隆一安全性生物試験研究センター総合評価研究室長が医薬安全科学部長にそれぞれ昇任した。

(2) 7月1日付で、菅野 純毒性部第一室長が毒性部長に、江馬 眞大阪支所生物試験部第一室長が総合評価研究室長にそれぞれ昇任した。

(3) 10月1日付で、井上和秀安全性生物試験研究センター薬理部第一室長が代謝生化学部長に昇任した。

(4) 15年3月31日付で、持田秀男総務部長が退職し、4月1日付で谷田修司医政局経済課首席流通指導官が総務部長に就任した。また、岡田敏史大阪支所長及び石綿肇大阪支所生物試験部長が退職し、外海泰秀大阪支所食品試験部長が大阪支所長に昇任した。また、森川 馨化学物質情報部長が安全情報部長に配置換となった。

### 3. 予算

平成14年度予算の概要は、別紙のとおりである。

施設費を除くと対前年度1億円強の増額となっているが、これは組織再編に伴う定員の振替増による人件費の増額や、プレハブ研究棟(28号館)相当分の光熱水料の増額が認められたことによるものである。

また、従来より研究職員の定員に応じて經常事務費の中に計上されていた人当研究費については、平成13年度をもって廃止されたが、競争的資金の確保が困難である基礎的・基盤的研究の実施に必要な経費として、基盤的研究費257,195千円が、これに代わるものとして新たに認められた。

一方、平成15年1月末に成立した補正予算は、機器の購入やシステム開発等に充てる費用として、生物遺伝資源研究事業費262,500千円、トキシコゲノミクス研究事業費106,050千円、食品安全性確保研究事業費264,295千円、医療技術リスク管理研究事業費90,431千円、医薬品開発基盤技術研究事業費(創薬プロテオームファクトリー)4,322,273千円が計上されたが、全事業について入札等の調達手続きに時間を要することから、予算を平成15年度に繰越して、執行することとなった。

### 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)に設置するため、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。

平成14年度は、施設整備工事費(約15億円)による建物本体工事に入ったところである。また、平成15年度予算で施設整備工事費約20億円が計上されたところであり、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

その他の施設整備は、平成14年度の補正予算で筑波薬用植物栽培試験場生物遺伝資源研究棟の新営工事に係る経費として947,396千円が認められ、翌年度に予算を繰越して、工事に着手することとなった。

### 6. 競争的研究費の機関経理

競争的研究費の経理に関する事務については、主任研究者及び分担研究者の事務負担の軽減を図るとともに、補助金の経理の透明化や早期執行を図る観点から、平成14年度からは全ての厚生労働科学研究費補助金及び文部科学省の科学研究費補助金等について、機関経理により行うこととなった。

平成14年度は、厚生労働科学研究費補助金2,278,438千円及び文部科学省所管の補助金92,800千円(いずれも他機関配分額を含む)は、機関経理を行ったところである。

### 7. 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14年度海外派遣研究者は、138名であった。内訳は留学が1名、二国間共同研究、学会への招聘又は参加延べ77名、JICA等のプロジェクトによる外国への技術指導等に7名のほか、行政に関する国際会議等への出席が延べ53名であった。国際会議等への出席内訳は、ICH 9名、IPCS 8名、OECD 6名、FAO/WHO合同会議5名、その他33名であった。

### 8. 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(178,971千円の歳入)である。

### 9. 移転関係

平成14年度においても、移転に関する諸問題の解決に向けて、関係機関である財務本省、関東財務局、東京都、府中市、厚生労働省と協議を進めてきた。また、東京都、府中市は跡地利用計画がないことから、当研究所が単独で計画を行なうことになるが、引き続き平成15年度も、関係機関との協議を進め、区割りの決定及び用途地域の変更等の手続に着手することとなる。

また、平成15年度予算では基本構想作成等経費が認められた。

## 平成14年度予算額

別紙

事 項	平成13年度	平成14年度	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)
	(A)	(B)	(千円)
	(千円)	(千円)	(千円)
(組織) 厚生労働本省試験研究機関	6,454,854	7,001,110	546,256
(項) 厚生労働本省試験研究所	4,606,955	4,756,110	149,155
国立医薬品食品衛生研究所に必要な経費	4,606,955	4,756,110	149,155
既定定員に伴う経費	3,160,730	2,939,492	△221,238
増員要求に伴う経費	0	8,676	8,676
振替定員に伴う経費	0	218,760	218,760
経常事務費	346,824	142,909	△203,915
基盤的研究費	0	257,195	257,195
特別研究費	16,048	16,048	0
標準品製造費	42,267	41,252	△ 1,015
安全性生物試験研究 センター運営費	183,643	179,826	△ 3,817
薬用植物栽培試験場運営費	95,996	82,164	△ 13,832
施設管理事務経費	106,398	105,850	△ 548
受託研究費	107,546	121,882	14,336
乱用薬物基礎研究費	17,023	17,023	0
総合化学物質安全性研究費	118,089	118,089	0
移転調査検討費	7,068	2,343	△ 4,725
共同利用型高額 研究機器整備費	90,324	165,996	75,672
培養生物資源保存管理 基盤整備費	37,800	37,435	△ 365
研究情報活動費基盤整備費	78,342	78,342	0
摘出埋植医療用具の適合性 解析法研究費	44,762	44,764	2
遺伝子治療薬の品質、安全性 等確保のための基盤研究費	33,881	33,881	0
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	28,171	△ 2,908
競争的研究事務経費	30,590	27,851	△ 2,739
競争的研究事務経費	58,545	88,161	29,616
(項) 血清等製造および検定費	697,899	657,214	△ 40,685
医薬品の国家検定及び 検査等に必要な経費	697,899	657,214	△ 40,685
一般事務経費	12,990	12,990	0
事業費	109,594	91,701	△ 17,893
医薬品医療機器審査センター に必要な経費	575,315	552,523	△ 22,792
(項) 厚生労働本省試験研究所施設費	1,150,000	1,587,786	437,786
国立医薬品食品衛生研究所 施設整備費経費	1,150,000	1,587,786	437,786
(移替予算)			
(組織) 厚生労働本省試験研究機関	218,928	220,560	1,632
(項) 地球環境保全等 試験研究費	132,236	138,040	5,804
(項) 国立機関原子力試験研究費	86,692	82,520	△ 4,172

\* 予算額については両年度とも当初予算額

## 薬品部

部長 小嶋茂雄

## 概要

平成14年度には、医薬品の品質規格に関する研究、製剤評価に関する研究、ならびに医薬品の品質管理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、公定書標準品のあり方ならびに整備の方策などについて検討を行った。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、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。医薬品の品質管理に関する研究では、医薬品の品質管理システムに関する研究ならびに Process Analytical Technology (PAT) の活用に関する研究を行った。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。

平成14年4月1日の厚生省試験研究機関の再編に伴い、従来、国立公衆衛生院衛生薬学部で行われてきたGMP関連の業務を薬品部第3室で引き継ぐこととなり、1年が経過した。これまで規格・試験方法の検討が中心であった薬品部の業務にGMP関連の業務が新しく加わることになり、医薬品の品質保証の両輪となる品質規格と製造管理の2つの側面を検討できるようになった点は評価できるが、第3室のわずか2名でこの両輪を十分にこなしていくことはなかなか難しいことを痛感している。現実には、新しく加わったGMP関連の業務〔国立保健医療科学院の薬事衛生管理コース（地方薬務課の薬事監視員のGMP研修のためのコース）の設計と運営、ならびに平成17年7月の改正薬事法施行に向けて我が国における医薬品の品質管理システムを整備するために厚生省医薬局監視指導・麻薬対策課との協力の下に行われている厚生労働科学研究など〕にかなりの時間を割かざるを得ない状況にある。従来からの品質規格に関する研究も決してないがしるにして良いものではなく、両者を医薬品の品質保証の両輪としてバランスよく遂行していくための方策を考えなくてはならない。

人事面では、平成14年度には大きな動きはなかった。なお、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。

短期の海外出張については、次のとおりである：坂本研究員は、経皮吸収に関する国際会議（平成14年4月）に参加のため、フランスへ出張した。阿曾主任研究官は、第29回コントロールリリース学会年会（平成14年7月）における研究発表のため、韓国に出張した。檜山室長は、FDAのGMPガイドライン運用に関する聞き取り調査のため、米国に出張した（平成14年9月）。

香取主任研究官は、第11回国際薬物動態学会（ISSX）北アメリカ大会（平成14年10月）に参加のため米国に出張した。吉岡室長は、米国薬剤学会年会（平成14年11月）における研究発表のため米国に出張した。青柳室長は、FDAにおける製法変更に関するガイドライン運用の実態を調査するため、米国に出張した（平成15年2月）。檜山室長は、WHOの医薬品規格専門家委員会（WHO Expert Committee On Specifications for Pharmaceutical Preparations）（平成15年3月）にアドバイザーとして出席のため、スイスへ出張した。

## 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

塩酸ジルチアゼム徐放錠 10品目。

## 3. 国立保健医療科学院特別課程薬事衛生管理コース（GMP研修コース）への協力

檜山室長および坂本研究員は、国立保健医療科学院からの委託を受け、当該コースの主任ならびに副主任として、医薬品製造所のGMP査察に当たっている薬事監視員の研修のためのコースの設計ならびに実際の運営に当たった（平成14年5月7日～6月7日）。

## 4. 国際協力

国際厚生事業団（JICWELS）の第18回アジア諸国薬事行政官研修（平成14年7月）および第13回必須医薬品製造管理研修（平成14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14年9月～平成15年3月の6ヶ月間、フィリピン食品医薬品局のRimando Annie Policarpio氏を同プロジェクトの研修員として薬品部に受け入れ、生物学的同等性および分析法バリデーションに関する指導を行った。また、フィリピン薬局方収載品目の分析法バリデーションに関する指導のための短期専門家として、坂本研究員を平成14年8月8日～9月21日の6週間にわたってフィリピンのBureau of Food and Drugs (BFAD) に派遣した。

## 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，医薬品添加物規格および殺虫剤指針の改正作業（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）ならびに日本工業規格（JIS）の改正作業（経済産業省）などに協力した。

皮膚適用製剤の生物学的同等性試験ガイドラインの第1次案に寄せられたコメントを検討し，第2次案を作成して公表した。地方衛生研究所が溶出試験の一斉取締り試験を行う際に使用する標準品79品目を用意し配布した。また，第14改正日本薬局方第1追補掲載の参照赤外スペクトル（80品目）を作成した。

国立衛研および全国の地方衛研の間の双方向ネットワーク（衛研薬事ネットワーク）を，平成14年度も引き続き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。

### 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リアメット錠および注射用アーテスネート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）。

#### 2. 日本薬局方の規格及び試験方法に関する研究

公定書標準品のあり方，整備の方策，その実施方法などについて検討を行い，標準品の定義，標準品整備の要件ならびに標準品整備に関する提言を取りまとめた。この中で，標準品関係者の中での標準品に関する共通理解を形成するため，日本薬局方調査会に標準品関連の事項を横断的に審議する常設組織（標準品委員会）を設けることを提案した（厚生労働科学研究／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，生物学的同等性評価における *in vitro/in vivo* 相関性の有用性について検討を行い，点推定しか与えない相関性のデータから生物学的に同等な溶出試験の条件，許容域を決めることは難しいことを示した。また，FDAにおける製法変更のガイドラインを運用の実態を調査し，最終的に製法の変更水準を3段階に分けた「通常製剤及び腸溶性製剤の製法変更に関する生物学的同等性試験ガイドライン案」を確立するとともに，ガイドラインの目的，変更水準，試験法等を

解説したQ&Aを作成した。更に，徐放性製剤の製法変更に関する同等性試験ガイドライン原案を作成した（厚生労働科学研究／医薬総合安全事業）。

生体異物排出機構の抑制を介した複合的影響の可能性を検討する目的でリコンビナントタンパク質を用いたP-gp薬物トランスポーター基質と阻害剤の検索を行い，医薬品や生活関連物質は個々の一般的な環境中濃度で機能に影響を与えないことが示された（環境省未来創造事業）。

凍結溶液中におけるタンパク質と低分子添加剤の混合性と高次構造安定化作用の関係を解明し，製剤設計への有用性を明らかにした。

#### 4. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

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して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

ポリビニルアルコールおよびメチルセルロース含有の $\beta$ -ガラクトシダーゼ凍結乾燥製剤について，タンパク質の変性および凝集をKWW関数に基づいて速度論的に解析し，保存安定性と分子運動性との関係を検討した。その結果，凝集および失活の速度の温度依存性は，NMR緩和時間から測定した分子運動性が大きく変化する温度である $T_{mc}$ 付近において大きく変化するを明らかにした（厚生労働科学研究／医薬安全総合研究事業）。

数nmのスケールで均一に分散しているニフェジピン-ポリビニルピロリドン固体分散体中のニフェジピンの結晶化速度は薬物単体の非晶質と比較して著しく減少することを明らかにした。わずかな量のPVPの添加によって非晶質ニフェジピンおよびフェノバルビタールを安定化することができた（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）。

ショ糖を添加剤として用いたカチオン性リポソーム凍結乾燥製剤は，凍結方法により保存安定性に差がみられた。その差は製剤のレオロジー特性に基づく分子運動性の違いによって説明することができた。レオロジー特性からみた製剤マトリックスの運動性は，凍結乾燥製剤の保存安定性を評価する上で有用な指標であることが明らかとなった（官民共同プロジェクト研究／創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

生分解性ポリマーであるポリアスパラギン誘導体を用い，温度応答性ハイドロゲルを調製することができた

(国立機関原子力試験研究費)。

ポリビニルピロリドン等の高分子添加剤と水との相互作用について、時間領域反射法を用いた誘電緩和測定を行ったところ、高分子との相互作用の強さが異なる2種類の水が存在することが示唆された。相互作用の強い水と弱い水との比は高分子および相対湿度によって異なること、相互作用の強い水の量は水分吸着等温線における単分子層吸着量とほぼ一致することを明らかにした。

#### 6. 医薬品の品質管理に関する研究

医薬品の開発、製造、流通、行政規制等を取り巻く状況や技術に相応した品質システムのあり方・手法をまとめ、グローバルに通用する指針として提供することを目的として、医薬品の品質管理システムに関する研究(品質システム、薬事法制・ガイドラインのあり方、技術移転・変更管理、試験室の管理・市販後安定性試験)を行った(厚生労働科学研究/医薬安全総合研究事業)。

医薬品原薬製造における科学的品質保証を推し進めるため、化学物質情報部と協力して、原薬の物性制御を目指した結晶形の探索方法の検討、動物試験・臨床初期・スケールアップの各開発段階における不純物コントロール、近赤外を用いた工程管理技術、分析法の開発・バリデーションなどを官民共同で研究した(創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)。

米国FDAが現在推し進めつつある Process Analytical Technology (PAT) を活用した医薬品の品質管理戦略に着目して、FDAによるPAT推進の背景や欧米製薬企業のPAT活用戦略を把握するとともに、医薬品の品質管理におけるPAT活用の意義ならびに問題点を考察した。また、日本におけるPATに関する研究事例を紹介し、今後の我が国におけるPAT活用の方向性についても考察した(厚生労働科学研究/医薬安全総合研究事業)。

## 生 物 薬 品 部

部 長 川 西 徹

### 概 要

最近の新しいタンパク質性医薬品の申請状況をみると、その大きな特徴としてハーセプチンに代表されるようなヒト化抗体を含めたヒトモノクローナル抗体、およびヒト生理活性タンパク質を大きく改変した新しいタンパク質性医薬品の出現があげられる。前者についてはアミノ酸配列ではヒトと同一であるものの、最新の組換えタンパク質生産技術を駆使して開発・製造され、さらには生産効率の改善等を目指し、生産へのトランスジェニック動植物の利用等もはかられている。したがって特に糖鎖の差異あるいは汚染物質の問題等、製法に応じた

品質評価が必要とされる。後者については天然のタンパク質中の数個のアミノ酸の変換、あるいはポリエチレングリコール等の付加にとどまらず、複数の生理活性タンパク質の機能を医薬品として利用するため、それらの部分構造を融合させた新たなタンパク質が製品として開発されている。このようなタンパク質の品質を評価し、さらにその品質を管理するには、製品に応じた品質評価・管理戦略が必要と考えられる。生物薬品部の役割としては、そのための基盤となる研究を行うことにある。即ち、構造体としてのタンパク質の解析技術(高次構造解析および糖鎖構造解析)、生理活性物質としてのタンパク質の機能解析技術(臨床効果に直結した生物活性解析)の高度化をめざした研究に重点をおきながら、さらに新たな生物薬品開発の基盤となるタンパク質を中心とする生理活性物質に関する基礎的研究を推進することにあると考え、研究をすすめている。

国際調和関係では、ICH-Q5E(製造方法の変更に伴う生物薬品の同等性/同質性評価ガイドライン)の作成にむけ全面協力し、コンセプトペーパーの作成に引き続き、ガイドライン本体の作成作業を精力的に進捗させている。薬局方の国際調和においては一般試験法で大きな進展がみられた。まず調和に達していたSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法を14局第一追補の参考情報に収載させるとともに、タンパク質量法、ペプチドマッピング法、アミノ酸分析法、等電点電気泳動法、キャピラリー電気泳動法の合計5つの試験法について調和に達し、現在局方参考情報収載をめざして翻訳作業を行っている。この結果、薬局方の生物薬品関係の一般試験法の整備が一挙に進むことになる。

21世紀に入り、バイオテクノロジーを利用して開発された遺伝子、タンパク質、細胞、組織製品等が本格的に医療に応用されようとしており、産業界においてもその期待が高まっている。このような背景の中、わが国における医療用の生体由来製品(バイオロジクス)の開発、規制について広く議論する場として、バイオロジクスフォーラムの設立がはかられ、遺伝子細胞医薬部とともに当部がその事務局となる予定である。今後バイオロジクスフォーラムが、バイオロジクスの開発情報、規制に関わる緒問題についてのオープンな討論の場として活用され、わが国における有用かつ安全なバイオロジクス開発に貢献できるように展開できればと考えている。

人事面では、平成14年11月1日付けで日向昌司氏が厚生科学課併任となった。平成15年3月31日付けで長きにわたり当部に多大な貢献をされた太田美矢子主任研究官が定年退職した。また新見伸吾第2室長が第3室長に配置換えになり、石井明子研究員が主任研究官に昇格した。さらに原園景研究員が大阪支所生物試験部から異動した。平成14年12月31日付けで非常勤職員柴山理

恵氏が退職した。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支援研究者として在籍していた伊藤さつき氏が平成15年1月1日付けで科学技術振興事業団重点研究支援協力員として採用された。平成15年3月31日付けで袁進氏は日中笹川医学研究者（中国医学研究生）として一年間の研修を終え帰国した。平成15年4月1日付けで橋井則貴氏がヒューマンサイエンス財団の流動研究員として採用された。

海外出張は以下のとおりであった。川西部長：製造方法の変更前後の生物薬品の同等性評価法に関する専門家研究グループ会議に出席（ワシントン：平成14年9月7日～9月14日）、生物薬品の同等性／同質性の科学的評価法に関する会議に出席・講演（プラハ：平成15年2月25日～3月2日）、石井研究員：創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業により米国スタンフォード大学医学部で細胞生物学的手法を用いたバイオテクノロジー応用医薬品の評価方法に関する研究に従事（平成14年9月23日～平成15年3月22日）。

#### 業務成績

1. 特別審査 新薬6件について審査した。
2. その他

薬事・食品衛生審議会の各種部会および約30品目の新薬および医療用具の承認審査に関わる専門協議（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）、日本薬局方規格および試験法の改正作業、国際調和作業（医薬局審査管理課）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特性解析及び品質評価技術の開発の一環として、安定同位体標識化合物を内部標準物質としたLC/MSによる糖タンパク質性医薬品の単糖組成分析法を開発した（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）。

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基盤研究の一環として、①LC/MSを用いた電気泳動ゲル内タンパク質の一次構造及び糖鎖を含む翻訳後修飾解析法を開発した。②細胞・組織由来目的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、各種FlAsH反応性タグペプチドをTNF- $\alpha$ に付加させる方法の検討を行い、タグペプチドの付加法の最適化を行った。③annexin IIIがラット小型肝細胞の特性指標として有用である可能性を免疫化学的検討から示唆した。（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遺伝子組換え型及び脳下垂体由来甲状腺刺激ホルモンを用いて、LC/MSを用いた糖鎖プロファイリング及び糖ペプチドマッピングの生

物薬品の特性・品質解析、品質評価法、及び同等性・同質性評価法としての有用性を評価した。②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について、最近の欧米の動向を調査するとともに、わが国に相応しい評価法を検討した。③多機能性バイオテクノロジー応用医薬品の標準品とバイオアッセイの設定について、肝細胞増殖因子を例として調査研究を行い、他の生物薬品にも適用できる共通の留意事項を明らかにした。④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、アデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスの迅速・高感度検出法について検討を行い、infectivity PCR法の有用性を示した（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) ウロキナーゼ受容体、組織プラスミノゲン活性化因子およびマトリックスメタロプロテアーゼ-9のmRNA発現は、肝障害の指標となりうることを示唆する結果を得た（厚生労働省特別研究費）。

2) ミトコンドリア機能、カスパーゼ活性化、一酸化窒素等の画像化による肝細胞、内皮細胞等の細胞障害解析法を開発を開始した（厚生労働省科学研究費補助金）。

3. 生体内活性物質の作用機序と細胞機能に関する生物学的研究

1) 糖鎖の異なる4種類のヒト型フォリスタチンを分離し、それぞれ生物活性が異なることを明らかにした。

2) グルココルチコイドによる特異的な遺伝子発現促進のプロテアソーム阻害剤による抑制は共役抑制因子として作用するAP-1の構成成分であるc-fosの分解抑制によることを示唆する結果を得た。

3) ピリジルアミノ化及びLC/MS/MSを用いた組織・細胞由来複合糖質の糖鎖プロファイリング及び構造解析法を開発した（文部科学省科学研究費補助金）。

4) トロンボモジュリンがマウス乳癌MMT細胞の浸潤を促進することを明らかにした。

5) 細胞死に関わるカスパーゼによって特異的に切断される各種ペプチドおよびGFP類を結合させた融合タンパク質を作製し、カスパーゼの活性化を色の変化で捉えるプローブを開発した（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究）。

6) GFP類とsrc homology domainを含むチロシンリン酸化反応検出用融合タンパク質を作製し、培養細胞に適用して発現させ、インビトロでチロシンリン酸化反応を蛍光変化で捉えることに成功した（文部科学省科学研究費補助金）。

4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品に関する基礎的研究

1) 哺乳類の機能性タンパク質を植物で発現させる方法

に関する調査を行った。

#### 5. MFタンパク質科学による創薬研究

1) 核内受容体 (RXR $\alpha$ , RAR, FXA) へのリガンド候補化合物の検索用レポータープラスミドを最適化させ、リガンド候補の検索を行い、複数種の新たなりガンド候補化合物を見出した。

## 生 薬 部

### 部 長 合 田 幸 広

#### 概 要

当部では生薬、生薬製剤の品質確保と有効性に関する試験・研究、生薬資源に関する研究、天然有機化合物の構造と生物活性に関する研究並びに、麻薬及び向精神薬等の乱用薬物に関する試験・研究を行っている。また、上記の業務関連物質について、日本薬局方をはじめとする公定医薬品規格の策定に参画するとともに、食薬区分に関する調査・研究並びに、天然薬物の規格に関する諸外国との国際調和を遂行している。さらに厚生労働省の共同利用型機器の管理・運営のとりまとめを行っている。平成14年度の組織再編により、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ため、当部の所掌業務が大きく広がった。

平成14年度当部の業務で特筆すべきことは、以下の二点である。まず、中国から輸入されたダイエットを目的とした未承認医薬品及び健康食品による健康被害の究明のため、部を上げて取り組んだこと、第二は、平成14年3月に西太平洋地区の5カ国6地域（日本、中国、韓国、ベトナム、シンガポール、香港）のregulatory authorities と the relevant research institutions の関係者により発足したWestern Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH) のNomenclature and Standardizationに関するFHH Sub-Committee (Sub-C) Meetingを、平成14年5月21日から24日にかけて主催したことである。

前者は、有機化学部、毒性部の協力を得て、N-ニトロソフェンフルラミン (NFF) が、肝障害の原因物質である可能性が非常に高いことを明らかにし、その概要は、平成15年2月12日、厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課から報道発表された。なお本研究は、厚生労働科学特別研究費「未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究」で遂行された。後者のFHH Sub-C Meetingは、当所28号館の会議室で開催し、参加者は、5カ国6地域、1国際機関33名（オブザーバー1名）であった。本会議では、お互いの局方について比較を行い、局方間の類似点と差違について、各国が良

く認識する必要があるが議論され、そのためのExpert working group (EWG) を設立することが了承された。さらに平成14年度の活動として、(1)各国の局方中に記載されている生薬の、名称と基原植物の比較、(2)各国の局方中の生薬のモノグラフ中の分析方法の比較、(3)各国の局方中の生薬及び、生薬分析に関する分析標準品のリスト化、(4)各国の局方中のvalidationされた生薬分析法のリスト化、(5)生薬の一般試験法に関する情報集積（局方収載、未収載を問わず）に関する5つのEWGが設立されることになり、各EWGの責任者と、各国のcontact personが決定された。さらに、本会議の決定に対応し、厚生労働科学特別研究として、生薬規格の国際調和に関する研究事業を遂行し、日本の薬局方の生薬規格等について国際的な発信を行った。

平成14年度の人事面の移動は衛研報告の120号に既に記載済みであり、退職者等はなかった。平成15年度では、4月1日付けで任期付きの연구원として、酒井信夫博士が採用された。所外연구원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연구원として受け入れた。同博士は引き続き、生薬の鑑定に関する研究を遂行されている。また、JICAのフィリピン薬局方プロジェクトの長期研修員として、Ms. Miores Caroline Imelda Bandayrelを受け入れた（平成14年8月12～9月19日）。

海外出張は、以下のとおりであった。合田幸広：韓国食品薬品安全庁で開催された、International Seminar on Harmonization of Oriental Herbal Medicinesでの講演（ソウル、大韓民国、平成14年9月25日～27日）、花尻瑠理：アメリカ薬剤学会で発表（トロント、カナダ、平成14年11月9日～16日）。

#### 業務成績

1. アリストロキア酸混入の恐れのある生薬（サイシン、ボウイ、モクツウ、モッコウ）を含有する生薬製剤並びに生薬類（80品目）についてアリストロキア酸の分析試験を行い、結果について医薬安全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、各都道府県より買い上げられたいわゆる脱法ドラッグ50品目50検体、瘦身用健康食品115品目117検体について、それぞれ、1-ベンジルピペラジン、 $\alpha$ -メチルトリプタミン、5-メトキシ-ジイソプロピルトリプタミン、 $\gamma$ -ブチロラクトン、1,4-ブタンジオール及び、ノルエフェドリン、エフェドリン、フェンフルラミン、N-ニトロソフェンフルラミン、脱エチルフェンフルラミン、シブトラミン、マジンドールの分析試験を行い、結果について医薬安全局監視指導麻薬対策課に報告した。またその際、試験検査用標準品として、脱エチルフェンフルラミンを製造した。

3. 健康食品中の未知成分の分析を行い、医薬安全局食品保健部新開発食品保健対策室に報告した。
4. 生薬分析用アリストロキア酸Iの準備調製を行った。
5. あへん（国産あへん16件、輸入あへん100件、計116件）中のモルヒネ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。
6. 新規鑑識用麻薬標準品として、塩酸 $\alpha$ -メチルトリプタミン（10g）及び1-ベンジルピペラジン（10g）を製造した。また、鑑識用麻薬標準品として75薬物を管理し、必要に応じて全国の鑑識機関に交付した。
7. 植物薬中の医薬品原料等について、承認内容に逸脱があるかどうか検討を行い、結果を医薬安全局監視指導麻薬対策課に報告した。
8. 医薬安全局監視指導麻薬対策課より依頼のあった約40品目について、食薬区分を目的として文献調査等を行った。
9. 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た。
10. 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。
11. 厚生労働省の共同利用型大型機器の管理、更新等のとりまとめを行った。

#### 研究業績

1. 未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因解明のための研究において、収去品の大量抽出並びに、*N*-ニトロソフェンフルラミンの大量分取を行った。さらに、他の未知成分について抽出エキスの成分検索及び単離化合物の構造解析を行った。（厚生労働科学研究費・特別研究事業）
2. 未承認医薬品中の医薬品成分（*N*-ニトロソフェンフルラミン、シブトラミン、チロキシン等）の分析法について検討した。（厚生労働科学研究費・特別研究事業）
3. 生薬規格の国際調和に関する研究において、将来的な国際調和を踏まえ、各国の薬局方について共通点と相違点を認識することを目的として、日本、中国、韓国、ベトナム4カ国の薬局方に収載された試験法並びに規格値について比較表を作成した。また、バリデーションされた分析法についても比較表の作成を行った。（厚生労働科学研究費・特別研究事業）
4. DNA配列の違いを利用した幻覚性キノコ（いわゆるマジックマッシュルーム）の鑑定法について検討を行った。各種幻覚性キノコ及び代表的な食用キノコ類のrDNA配列を解析し、国内に流通する幻覚性キノコの分類を行うと共に、TaqMan PCR法を利用した簡易鑑定法を開発した。（厚生労働科学研究費・医薬安全総合研究事業）
5. 幻覚性キノコの成分であるサイロシピンおよびサイロシンを免疫学的手法で検知するため、サイロシンをモチーフとしたハプテンを合成した。（厚生労働科学研究費・医薬安全総合研究事業）
6. 第14改正日本薬局方第二追補に新規収載予定生薬17種のうち、ジコッピについて確認試験法の検討を行い、TLCを用いた新規確認試験を設定した。（医薬局審査管理課に報告）
7. 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 *Canna angustifolia* の成分検索を行い、1種の新規 norkaurane 型 diterpenoid 及び1種の新規 sesquiterpenoid を含む数種の kaurane 型 diterpenoid を単離し、その構造を決定した。
8. ハーブの成分研究の一環としてオートムセージ (*Salvia greggii*) の成分検索を行い、新規化合物を含む数種の clerodane 型 diterpenoid を単離し、その構造を決定した。
9. 過去に宮内庁から移管された生薬標本を整理し、生薬標本日録との照合を行った。
10. 臨床で炎症の治療に用いられている漢方処方で抗炎症作用を示した桔梗湯の構成生薬のカンゾウの抗炎症作用を検討した。ラットを用い綿球に試料を直接浸潤する局所投与により、高感度で抗炎症作用を検討する方法を確立し、この方法によりカンゾウの含有成分のグリチルリチンに抗炎症作用が認められた。
11. 「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、210処方のかかえる問題点を整理するとともに、新規に、一般用に加えるべき漢方処方について調査した。また、漢方処方のATC分類 (Anatomical Therapeutic Chemical Classification) 作業に協力した。（厚生労働科学研究費・医薬安全総合研究事業）
12. 徳川家康の薬「烏犀圓」中の構成生薬について引き続き、形態学的に確認を行った。
13. 麻薬及び向精神薬、覚せい剤、大麻等の依存性薬物について、定性・定量分析法、生体試料分析法並びに各薬物の解説を記した鑑定法マニュアルを作成した。（医薬局監視指導麻薬対策課に報告）
14. マジックマッシュルーム中の麻薬成分であるサイロシン、サイロシピン及びそれらの代謝物について、血液、尿、毛髪等の生体試料中薬物分析法を検討した。（乱用薬物基礎研究費）
15. 薬物分析における頭髮以外の体毛利用の有用性について、実際の覚せい剤乱用者の試料を用いて基礎的検討を行うために、法規制薬物の中毒患者から体毛試料の提供を受けるにあたり生じる可能性のある倫理問題及びその対処法について、医療・科学・法律の専門家の意見をもとに検討を行い、本研究における試料採取のプロトコ

ールを作成した。(厚生労働科学研究費・医薬安全総合研究事業)

16. 患者から採取した血液中の薬物及びその代謝物濃度を測定するため、塩酸ゲムシタピンについて、生体試料中の分析法を確立し、そのバリデーションを行った。また、実際に患者から得られた血漿中薬物濃度を測定し、薬物動態解析を行った。(薬剤反応性遺伝子解析による疾病・創薬推進事業)

17. 輸入あへんの分析法バリデーションに関する研究として、日本薬局方及び英国薬局方の定量法の相違による定量値への影響、再現性等について検討を行った。

18. 抗高脂血作用成分としてサトイモから単離された、monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) 類及び、digalactosyl diacylglycerol (DGDG) 類を合成し、活性の検討を行った。(創薬等HS総合研究事業)

## 遺伝子細胞医薬部

部長 山口 照英

### 概要

2003年4月にヒトゲノム情報の完全版が発表され、ポストゲノムは新たな時代を迎えようとしている。ゲノム情報に基づく新規医薬品の開発やテーラーメイド医療の開発に加え、プロテオミクスやメタボノミクス等、今までにない発想に基づく医薬品創製や診断技術の開発が進んでいる。一方では、ゲノム情報解明の急速な進歩や幹細胞学、再生医学の急速な進展により、遺伝子治療、細胞治療薬、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、安全性等を確保することがこれらの医薬品が国民に受け入れられ、有用な医療技術として発展していくのに最も求められていることである。

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、遺伝子細胞医薬部が昨年4月に(生物薬品部を主な母胎として)新設され1年が経過した。この間、遺伝子治療に関する日米欧のハーモナイゼーションに関する取り組みとして、ICHに新たな検討グループが作られた。また、薬事法の改正を受けて、生物由来製品の安全性確保の新しい枠組みが作られようとしている。診断用医薬品についても、薬事法改正に伴って診断情報リスクに基づくクラス分類と分類されたクラス毎に適切な規制を行うとい

う新たな行政施策が採られようとしている。

ミレニアムプロジェクトの中のゲノム・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3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を行うことができた。また、後者の研究プロジェクトに関しては、ウイルス感染性を高感度に検出する感染性PCRの開発やヒト血管内皮前駆細胞の特性指標の探索が進んだ。

最近の遺伝子治療臨床研究に関する大きなニュースとして、レトロウイルスを用いたフランスでの遺伝子治療における2件の白血病発症が挙げられる。先天性免疫不全症の唯一の根治治療として良好な結果が得られていたことから、よりその衝撃は大きく、メディアにも大きく取り上げられた。しかし、このような致死的な先天性疾患に関して現時点では治療法として他の選択肢がない場合には、完治する可能性とその副作用とのリスク・便益を図りながら治療法開発を進めていくことが求められるであろう。一方、細胞・組織加工医薬品としては、現在まで5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得る可能性がある。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つて、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。国研として、このような革新的医療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、行政に科学的根拠を提供していくことが求められている。

人事面に関しては、水口裕之研究員が平成14年4月1日付で主任研究官に昇格されるとともに、平成14年7月に第7回日本遺伝子治療学会学会賞、9月に第2回万有薬剤学奨励賞、平成15年3月に平成15年度日本薬学会奨励賞を受賞された。平成14年12月1日付で審査センター審査第1部GCP査察官の永田龍二氏が当部主任研究官に配置換えとなった(審査センター兼任)。また日本公定書協会医薬安全総合研究事業リサーチ・レジデントとして研究に従事してきた櫻井文教氏が平成15年4月1日付で第1室の研究員として採用された。平成15年4月1日付で川端健二研究員が主任研究官に昇格した。また、平成15年1月1日付で非常勤職員の細野哲司氏が日本学術振興会の特別研究員として採用され、同日付で豊田淑江氏及び古田美玲氏が重点研究支援協力員として採用された。平成15年1月、機構派遣研究補助員森聡子氏が退職された。

海外出張は以下の通りであった。水口主任研究官：第5回アメリカ遺伝子治療学会で発表（米国；平成14年6月5日～6月9日）；山口部長：遺伝子治療国際シンポジウム及び専門家協議に出席（米国；平成14年9月7日～14日）；山口部長：遺伝子治療国際シンポジウムで発表（韓国；平成14年10月22日～24日）。

#### 業務報告

薬事・食品衛生審議会各種部会・専門協議などに協力した。

#### 研究業績

##### 1. 遺伝子治療薬及び細胞・組織利用医薬品の特性と品質評価に関する研究

1) 細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保にする基盤研究の一環として、①指向性細胞へのウイルス感染と感染細胞からポリスチレン球を用いた核酸抽出法を行い、さらに抽出したウイルスゲノムをPCRで検出する感染性PCRを開発した。②前年度に確立したG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手法の正常細胞への適用について検討した。③細胞由来タンパク質プロファイルの迅速・高感度解析法の開発として、培養上清に分泌される増殖因子等をイモビリン2次元電気泳動で分離し、MSを用いてその帰属を決定する方法を確立した。④昨年に引き続いて臍帯血由来AC133陽性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。多分化能を有するヒト及びマウス胚性癌細胞を用いて、効率よく神経細胞に分化する系を確立した。（厚生労働省科学研究費補助金）

2) 医薬品の品質規格に係わる国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、①ヒト由来の細胞・組織を用いた細胞治療用医薬品の製造と品質に関する米国、EU等の最近の動向を検討し今後とるべき方策を明らかにした。②遺伝子治療用医薬品の品質・安全性確保に関する国際的動向を踏まえた研究として、Infectivity PCR法によりアデノウイルスベクターに混入する増殖性アデノウイルスを従来法よりも迅速・高感度に検出可能であることを明らかにした。（厚生労働省科学研究費補助金）

3) ウイルス安全性に関する研究として、NAT法を医薬品のウイルス安全性試験に適用するための考慮すべき要素について検討した。

##### 2. 医薬品の有効性と安全性に関する生物化学的研究

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生化学的研究として、多形核白血球よりL-plastinを精製し、L-plastinの単クローン抗体の作製を行った。作製した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) 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として、HL-60細胞の好中球分化におけるG-CSF依存的な増殖促進のシグナル解析を行い、好中球分化・増殖にPKC $\delta$ の細胞内局在のダイナミックな変化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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として、心肥大の発症および維持をもたらす要因としての心筋小胞体カルシウム制御遺伝子の発現異常の役割を検討した。（厚生労働省特別研究）

3) 血管平滑筋細胞内カルシウム制御系遺伝子および細胞分化に対する甲状腺ホルモンの作用に関する研究として、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網羅的に評価し、甲状腺ホルモンの血管平滑筋機能および病態における役割を検討した。（文部科学省科学研究費補助金）

4) 新規心不全治療薬としての核内受容体作動性遺伝子制御薬剤の開発に関する研究として、心筋細胞において甲状腺ホルモンとその誘導体による遺伝子発現誘導作用を網羅的に解析し、甲状腺ホルモン誘導体の収縮関連遺伝子選択性を検討した。（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

5) 哺乳類細胞のDNAポリメラーゼ $\epsilon$ の機能に関する研究として、DNAポリメラーゼ $\epsilon$ 及び相互作用する因子の細胞内挙動を解析し、転写制御およびクロマチンの構造変換への役割を検討した。（文部科学省科学研究費補助金）

##### 4. 先端技術を利用した生体成分関連医薬品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として、①複数の外来遺伝子を挿入できるアデノウイルスベクターの開発を行い、その諸性質を検討した。②各種転写活性化因子の系統的機能評価を行い最適な発現効率をもつ遺伝子導入ベクターを開発した。③ファイバーのHIループ領域とC末端領域に同時に外来ペプチドを挿入できるファイバー改変アデノウイルスベクターの開発に成功した。（厚生労働省科学研究費補助金）

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を目指して、アデノウイルス受容体と結合できないアデノウイルスベクターの開発に成功し、その遺伝子導入特性を解析した。（文部科学省科学研究費補助金）

3) 外来遺伝子の発現調節能を有した高効率遺伝子導入・発現系の開発を目指して、発現を正に制御できる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の改良を行った。（HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）

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を目的として、マイクログリア細胞における各種改変アデノウイルスベクターの遺伝子導入活性を検討した。(HS財団創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)

#### 5. MFタンパク質科学による創薬研究

1) 核内受容体とそのリガンドによる心筋梗塞病態の抑制に関する研究として、甲状腺ホルモンの心筋芽細胞における non-genomic 作用の情報伝達系を解析し、心筋病態における役割を検討した。(医薬品機構受託研究費)

2) 遺伝子制御薬剤の効率的スクリーニング系の開発を目指して、ピアコア等を用いて核内受容体リガンドの効率的スクリーニング系の開発を行った。(医薬品機構受託研究費)

#### 6. 診断用医薬品に関する基礎的研究

1) プロテオミクス手法を応用した新しい診断指標の確立に関する研究として、網羅的タンパク質発現解析手法として、2次元電気泳動法に関して検討を行い、発現差の見られたスポットからの MALDI-TOF/TOF 型質量分析装置による同定に関する基礎検討を行った。

2) DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の有効性に関する研究として、Affymetrix社 GeneChip およびスライドタイプのオリゴDNAマイクロアレイを用いて、網羅的遺伝子発現解析を行うとともに、データ解析に関する基礎的検討を行った。

## 療 品 部

療品部長 土屋利江

### 概 要

平成17年度、大幅な薬事法改正が施行される。これは、医療機器関連にかかる安全対策の抜本的見直しに伴うもので、人体へのリスクに応じた安全対策を講じるための医療機器のクラス分類を行うとともに、低リスク医療機器にかかる第三者認証制度や、高リスク医療機器にかかる販売許可制度が導入される。

組織工学医療用具は、細胞組織医療機器として医療機器に分類される。また、生物由来の医療機器・医薬品は、ヒトや動物由来の原料を用いた製品によるエイズやヤコブ病感染問題の反省を受けて、生物由来製品というカテゴリーを新設し、感染防止対策を柱とした改正を行った。

細胞組織医療機器のみならず、新医療機器も健全に発展する上で安全性・有効性評価にかかわる基盤的技術の確立や、試験法・ガイドライン等の徹底は特に必要である。

また、医療機器の安全性・有効性・品質管理、GMP、

GCPなど医療機器に関するこれらの重要な領域での専門家の育成を行うことが安全で有効な医療機器の開発を加速する。

本年度からはじまる医療機器の基準・ガイドラインを作成するための17の検討委員会に、療品部からの部員が参画する。また、国立保健医療科学院で行われている薬事衛生管理コースへ医療機器関連コースの充実を目的として、今年度から、佐藤道夫埋植医療器具室長が副主任として参画している。1年ごとに、充実をはかっている。研究員の絶対数が不足している。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が平成16年4月に独立法人化すると共に、医療機器の審査体制が構造的にも人的にも充実がはかられている。医療機器審査の科学的評価の土台の一翼を担っている当部の充実は、急務であり、関係する方々へのご協力を御願いと共、療品部員が一丸となって、国内的にも国際的にもアピールする必要がある。

家庭用品では、化学物質審査規制法が改正され、環境中への動植物への影響評価、難分解・高蓄積性物質への規制の導入、事業者の有害性情報の報告義務付けなど化学物質の審査・規制制度の見直しが行われた。家庭用品の木材防腐処理品クレオソート油中に発がん性物質を高濃度検出し、厚生労働省では、現在、家庭用品規制法に基づく法規制を検討している。

人事面では、平成15年4月1日付けで、矢上健研究員は、主任研究官に昇任した。北海道大学薬学部助手高橋芳樹氏が生物薬品部との併任で採用された。松岡厚子主任研究官は平成14年1月から6ヶ月間、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、「染色体異数性誘発機構に関する研究」を終了し帰国した。朴正雄博士は、平成13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引き続き採用され、「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」を行い、平成14年10月多くの研究成果をあげ、韓国に帰国された。Md. Shahidur Rahman 博士は、平成13年12月25日付けでHS流動研究員として引き続き採用され「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、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、多くの研究成果をあげて平成15年1月カナダのマニトバ大学医学部で研究を行うこととなった。平成13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従事し、平成14年8月からカナダのマニトバ大学医学部で研究を行うこととなった。平成13年11月1日付けで Ahmed Saifuddin 博士は、医薬安全研究事業リサ

一チレジデントとして採用され、「医療用具有害事象に  
関連する遺伝子多型の同定に関する基礎研究」を引き  
続き研究している。平成13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、着実に研究成果をあ  
げている。平成14年9月からナノ流動研究員として柳  
樂 勤博士が採用され、「新規組織代替材料の有効性・  
安全性評価手法の開発に関する研究」に参画し、感染  
リスクがなく、安全で有効かつ温度応答性新規人工  
フィーダーとその評価手法の開発に着手している。平  
成15年1月1日付けでSusan Matthew博士が医  
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・安全性評価手法の開発に関する  
研究」に従事している。中岡竜介主任研究官は、平  
成15年4月14日より、ヒューマンサイエンス研  
究事業派遣研究者として、米国ミシガン大学歯学  
部David J. Mooney教授の研究室へ、「DDS組込  
型組織工学材料の開発と評価技術の開発に関する研究」  
で出張している。

## 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14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：防カビ剤の4-chloro-3-methylphenol  
(*p*-chloro-*m*-cresol, PCMC), 4-chloro-3,5-dimethylphenol  
(*p*-chloro-*m*-xylenol, PCMX)

細胞毒性試験：diethylene glycol mono-*n*-butyl ether  
acetate (DEGBEA), di-*n*-butyl sebacate (DBS), octylated  
diphenylamine (ODPA), styrenated diphenylamine (SDPA)

### 2. 国際調和, 国際基準, 細胞・組織医療機器

医療機器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 (Alexandria,  
2002.9, 土屋)

TC150WG11 (Tissue Engineered Implants) に出席  
した。日本側からは土屋、大串 (産業技術総合研  
究所 ティッシュエンジニアリング研究センター) 小川  
(旭光学株式会社) 堤 (京都大学再生医学研究所)、  
酒井 (東レ株式会社) が出席した。まず ASTM Com  
mittee F04 の取り組みの報告後、日本側から土屋  
が Reform of biological products regulation in  
Japan and Principle of good tissue practice (GTP)  
for cellular and tissue based products について、  
大串が骨関節の再生医療に関する日本側の取  
り組み、小川が骨再生材料ハイドロキシアパタイト  
の有効性についてそれぞれ講演し、わが国の存在  
感をアピールできた。WG11 だけで、8カ国、31  
名の出席し、わが国への関心は高かった。

米国試験材料規格協会 (ASTM F04) 「組織工  
学製品の標準化委員会」マイアミ会議 (Miami,  
2002.11, 土屋)、カンザス会議 (Kansas, 2003.  
5, 土屋)

平成14年11月の標準化会議では、シンポジウ  
ムが開催された。土屋は gap junction が製品の  
安全性において有用な指標となる内容の発表を行  
った。その結果、平成15年5月の標準化会議で、  
gap junction の標準化作業を開始する方針が  
コア委員会から伝えられたため、ドラフト案を  
作成した。標準化会議では、軟骨、皮膚、骨、心  
臓弁など重要な標準化作業が急ピッチではじま  
っている。

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) 細胞・組織利用医療用具技術の  
近い再生医療技術の把握と、諸外国における最  
近の規制、ガイドライン等について調査検討  
した。

### 3. 医療機器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試験  
ガイドライン改訂版作成検討会を平成14年度も  
開催し、生物学的安全性ガイドラインの part 1  
に相当する部分を生物学的安全性評価の基本的  
考え方について記載した文書と、part 2 以降  
の各試験法と分け、平成14年度内に全面的な  
改正作業を終えた。平成15年3月26日日本  
医療機器関係団体協議会主催で、ガイドライン  
改正内容の説明会を土屋、俵木、鈴木、(以上  
国立衛研、生物学的安全性) 東 (審査管理課、  
GLP) で行った。約700名の出席であった。

ISO/TC194 国内委員会は、委員長を中村から  
土屋へ交代し、各WG活動を強化するために2  
人体制にした。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 (土屋)、  
日本工業標準調査会 (JIS 関連：土屋、配島、  
伊佐間)、医療用具技術専門委員会 (土屋、  
伊佐間、中岡) 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. 医療機器・医療材料の力学的試験と安全性・  
生体適合性に関する研究

I-1. 整形インプラントの力学的試験のガイド  
ライン化に関する研究

整形インプラントの力学的試験のガイドライン  
化のために、8種の試験法に絞り込み、その草  
案作成のための試験内容の検討と会議を開催  
し、有用性等について議論した。国際的に優  
れた試験法のガイドラインを作成する (厚生科  
学研究費)。

I-2. 血液接触型プラスチック製医療用具から  
の可塑剤の溶出評価に関する研究

PVC製医療器具に適用する医薬品の物性を指標として、煩雑な溶出実験を行うことなく可塑剤 (DEHP) 溶出度を予測する簡易評価系の開発を行った (厚生科学研究費)。

#### I-3. 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

コラーゲンおよびアルギン酸塩製品から効率良くエンドトキシンを回収する新規前処理法を開発した。また、低濃度のアルカリ処理により、材料の物性を保持した状態で、混入しているエンドトキシンを特異的に不活化できる可能性を見出した (厚生科学研究費)。

#### I-4. 医用材料の免疫原性評価手法の開発に関する研究

医用材料による即時型アレルギーを評価する手法の確立を目的として、試験物質の投与方法の違いによる各種指標の変化について検討した。OVAの投与回数は3回として最終投与から1週間後に血清IgE抗体価を測定するのが最も適切と考えられた。その際にアジュバントと一緒に腹腔内投与した時が感度よく検出でき、免疫反応を起こすには1回当たり1~10 µg必要であった。感作の判定指標としては総IgE抗体価、抗原特異的血清IgE抗体価の他、抗原刺激による脾臓リンパ球のIL-4やIL-10産生量の測定も有効であった。Popliteal lymph node assay (PLNA)の可能性について、OVA及びcyclohexidine gluconateを用いて検討した (厚生科学研究費)。

#### I-5. 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

医用材料存在下でのガンマ線照射によるエンドトキシンの活性変化、照射材料の分子量変化と生体適合性に関する性状変化について検討した (原子力研究費)。

#### I-6. 医療用具・医療材料の有効性・安全性評価手法の開発に関する研究

遺伝毒性試験のためのモデル材料として4,4'-メチレンジアニリン (MDA) 含有ポリウレタンを作成し、その培地抽出液と有機溶媒抽出物の染色体異常試験を実施すると共に抽出物中のMDAおよびPTMGの定量を行った。その結果、溶出量の差はあるものの、添加したMDAだけでなく材料中の成分も溶出されてくることが明らかとなり、染色体異常試験ではそれらの物質の複合効果を検出していることが考えられた。

#### I-7. 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

可及的に少量の医療材料で、感作性試験を実施できるサンプル調製法をモデル材料を用いて明らかにし、新試験法に採用した。モデル材料を皮膚貼付や、皮下と筋肉内に埋植し、組織反応の違いを明らかにした。

合金材料からの抽出サンプル調製液について細胞毒性試験を行い、適切なサンプル調製方法を示した。

遺伝毒性物質含有材料について、ISOの方法に従って

試験した結果、検出系によってはサンプル調製方法を改善する必要性が明らかになった (厚生科学研究費)。

#### I-8. 発生毒性物質のin vitro試験に関する研究

金属触媒の種類により、軟骨分化や神経分化に及ぼす影響は著しく異なった。

#### I-9. 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

バナジウムを含まないチタン合金は、従来のTi-6Al-4V合金に比べて、正常ヒト骨芽細胞の増殖及び分化を促進させることを明らかにした (特別研究費)。

#### II. バイオ人工臓器に関する基礎的研究

#### II-1. 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

ヒト軟骨細胞分化は、添加した成長因子の違いにより、著しく異なった。ヒト軟骨細胞の力学的評価について、圧弾性率で測定した。正常ウシ軟骨組織の強度と比較した。ソフトコンタクトレンズ用ケア溶液は、ヒト眼組織の細胞 (角膜上皮、実質、内皮) に著しい細胞毒性やギャップ機能抑制を示した (HS受託研究費)。

#### II-2. 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

肝細胞株に各種コネキシン遺伝子を導入し、肝機能の発現変化を解析した結果、あるコネキシン分子種は、重要な肝機能に関係していることを明らかにした (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

生分解性高分子ポリマーからなる3次元スポンジでの感染細胞の動態とHIV-1の増殖動態はポリマーの種類により異なった (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

ラットに同系、異系ラット由来免疫担当器官を12週、24週埋入するin vivoモデル系を用いて、免疫隔離膜の評価と評価指標を示した (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

げっ歯類で発癌性が知られている医用材料上で形成された形質転換巣について、1176個の癌関連遺伝子を含めたDNAチップを用いる遺伝子発現解析を行い、最も顕著に発現亢進が認められたのは3種の癌遺伝子であることが判明した。また、発現変化を示した遺伝子群でその産生タンパクの機能に認められた共通点は骨形成への関与で、既に報告されているラットを用いた材料の埋植試験での骨肉腫を含む腫瘍発生を裏付けるものであった

(厚生科学研究)。

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

軟骨前駆細胞では、コラーゲンタイプⅡの発現と共に、軟骨型プロテオグリカン産生による分化誘導が認められた。トランスグルタミナーゼ活性は、軟骨分化との相関性が認められなかった(厚生科学研究費)。

Ⅳ. ナノレベルイメージングによる医療材料/細胞界面分子の機能と構造解析

Ⅳ-1. ナノテクノロジーを利用した材料の生体に対する影響解析

微細表面加工に利用されている自己組織化膜を利用して、まず単一の官能基のみを持つ表面を調製し、その表面との相互作用による細胞の変化を観察することで表面の性質が細胞に与える影響について考察した(厚生科学研究費)。

Ⅳ-2. プロテオーム解析に基づく材料界面細胞の発現分子イメージング

性質の異なる材料表面上で培養した細胞について、発現している蛋白質の差異をプロテオミクスの手法により解析する(厚生科学研究費)。

Ⅴ. 微生物および微生物由来物質に関する研究

Ⅴ-1. リムルス試験の分析法バリデーションに関する研究

到達時間法を利用した比濁法リムルス試験の分析精度を評価した。また、カインティック比色法リムルス試験データを用いたモデル解析により、到達時間法および反応速度法の分析精度を比較検討した(厚生科学研究費)。

Ⅵ. 医療用具の滅菌バリデーションにおけるバイオバーデン菌抵抗性の変動要因の究明ならびに滅菌後の品質の確保

医療用具に使用される素材に拠って滅菌に対する抵抗性が異なる。素材の極性と抵抗性との関係をオゾン滅菌ならびに過酸化水素滅菌について調べた結果、素材の接触角とバイオバーデン菌の抵抗値の間には良好な相関性が認められた( $r=0.9$ )。ポリサルフォンにオゾン滅菌した場合には、芳香族ハロゲン化合物ならびにbisphenol Sが形成され、これらの化合物は*Micrococcus luteus*に顕著な生育阻害作用を示した。

Ⅶ. インプラント用具の適合性解析法開発に関する研究

Ⅶ-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)。

Ⅶ-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, ステンットの埋植情報の追加入力, 眼内レ

ンズ摘出事例のデータベースの維持を各学会に依頼して行った(経常研究費)。

Ⅶ-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、摘出眼内レンズの試料収集法、標準的分析法をほぼ確立した。また、摘出金属材料の分析に着手した(経常研究費)。

Ⅶ-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)。

Ⅶ-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、接合材の国内文献収集を行うと共に、米国の不具合報告データの用具別・材料別・年度別集計解析を行った(厚生科学研究費)。

Ⅶ-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

医療材料埋植後6ヶ月では、1ヶ月と同様コネキシン遺伝子発現と発がん性に関連するサイトカインの産生量に変化が認められた。10ヶ月では、コネキシン遺伝子の発現に関しては対照群と差異はなかった(厚生科学研究)。

Ⅷ. 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

Ⅷ-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、日本における接触皮膚炎の発生状況、新たな接触皮膚炎アレルゲンに関する情報収集を進め、ゴム添加剤(チオウレア系加硫促進剤のdiethylthiourea)、接着剤成分(*p-tert-butylphenol formaldehyde resin*)、防ダニ剤(*dibutyl sebacate*)等について日本語版、英語版の作成・改定準備を行った(移替予算)。

Ⅷ-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

メーカーへの問い合わせ・ホームページ検索・市販製品の表示内容の調査等により、失禁ケア製品に使用されていた抗菌剤・消臭剤の種類、成分名等の製品情報について実態調査を行った(移替予算)。

Ⅷ-3. 木材防腐剤クレオソート及びクレオソート処理品の安全性に関する調査研究

消費者でのアンケート調査、木材防腐剤(缶入り)・木材防腐処理品の製品表示のチェック、分析調査等により、(1)クレオソート処理品として枕木や杭等が市販されていたが、ヒトが皮膚接触する可能性が高いプランター・ラティス等のガーデニング用品、遊具等としてはほとんど市販されていなかった。(2)木材防腐処理品による健康被害としては、臭気成分による化学物質過敏症・呼

吸器障害が主であり、皮膚障害の発症は少数であった。(3)木材防腐処理品には健康被害の原因となりうる防腐剤の成分表示、健康被害の症状、緊急の対処法等が具体的に記載されていない場合がほとんどであった。(4)健康被害が発生した場合、ほとんどの場合健康被害の原因化学物質はわからないままであった。(5)化学物質過敏症・呼吸器障害・皮膚障害等の健康被害に関して、製品表示、化学物質等安全データシート (MSDS) が健康被害防止のための情報提供の伝達手段として十分に活用されていなかったことを確認できた。(6)クレオソート含有の木材防腐剤 (缶入り) のほとんどが、「クレオソート中のベンゾ(a)ピレン濃度は50 ppm以下とする」というEUの新たな規制値を超えるベンゾ(a)ピレンを含有していた (厚生科学研究費)。

VIII-4. 家庭用品における製品表示と理解度との関連及び誤使用・被害事故との関連の検証に関する研究 (分担研究): 家庭用ゴム・プラスチック・繊維製品に起因するアレルギー性接触皮膚炎等の慢性的な健康被害に関する原因究明及び発生防止のための情報提供手段としての製品表示の評価に関する研究

消費者でのアンケート調査、製品表示のチェック、分析調査等により、(1)家庭用ゴム製品による健康被害としては、手袋によるアレルギー性接触皮膚炎 (ACD) が主で、ラテックスアレルギーは稀であった。(2)ほとんどの場合健康被害の原因はわからないままであった。(3)家庭用ゴム手袋では、ACD・ラテックスアレルギー等の慢性的な健康被害に関する情報が製品表示、ゴム添加剤の化学物質等安全データシート (MSDS) に具体的に記載されておらず、健康被害防止のための情報提供の伝達手段としてほとんど有効に活用されてこなかったことを確認できた (厚生科学研究費)。

IX. 家庭用品に含まれる化学物質の皮膚暴露の安全性に関する研究

膝装具のポリクロロブレンフォームラバー製パッドによる接触皮膚炎事例において、チオウレア系加硫促進剤の diethylthiourea が原因化学物質となっていたことを確認した (移替予算)。

ポリクロロブレンフォームラバー製ウェットスーツによる接触皮膚炎事例において、使用された接着剤成分の *p-tert-butylphenol formaldehyde resin* (PTBP-FR) が原因化学物質となっていたことを確認した (移替予算)。

衛生加工された敷き布団の綿布による接触皮膚炎事例において、防ダニ剤として使用された dibutyl sebacate が原因化学物質となっていたことを確認した (移替予算)。

手形採取用発色液による接触皮膚炎事例において、発色剤として配合された硫酸第二鉄により発色液の液性が pH 約 2.0 と強い酸性になっていたことにより刺激性皮膚炎が発症したものと推定できた (移替予算)。

X. 家庭用品に含まれる化学物質の分析化学的研究

防カビ剤の 4-chloro-3-methylphenol (*p*-chloro-*m*-cresol) と 4-chloro-3,5-dimethylphenol (*p*-chloro-*m*-xylenol) の GC-MS 及び HPLC での同時分析法を作成した。

家庭用品公定法の繊維製品中のホルムアルデヒド量を現行の吸光度差から濃度で規制することを受け、地方衛研とのクロスチェックを行うとともに、HPLC 法についても検討した (移替予算)。

11. 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細胞毒性強度を調べたところ、styrenated.diphenylamine (SDPA) は中程度、diethylene glycol mono-*n*-butyl ether acetate (DEGBEA)、di-*n*-butyl sebacate (DBS) 及び octylated diphenylamine (ODPA) はいずれも弱いことがわかった (移替予算)。

## 環境衛生化学部

部長 安藤正典

### 概要

平成14年3月に関田 寛主任研究官が定年退官した。また、千葉大学講師内山茂久氏を室内空气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。

当部が主任研究者として実施した他機関とのプロジェクト研究は、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气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。また、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」は、医学部、薬学部、工学部などの大学と化粧品企業等約30機関との共同プロジェクト研究を実施し、多くの成果を上げて終了した。

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

多型とアレルギーと発症の関係について研究を進めた。厚生科学研究「化学物質過敏症等室内空气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气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とを合わせて実施した。さらに、これを受けて、現在室内空气中化学物質としての総揮発性有機化合物（TVOC）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、水道水質基準の改正作業に伴う基準値設定情報の整理、検査体制や検査方法の開発、精度管理および精度保証体制の考え方などについて10回に及ぶ専門委員会や生活水道部会の資料の作成と審議を通して、水質基準の見直しの考え方を整理した。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、水道水質基準改訂のための研究を実施した。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、医薬部外品としての殺虫剤の等の改訂に関する暴露並びに指針についての考え方を整理した。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は終了した。

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・バングラディッシュ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・バングラディッシュ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

### 室内空気関係

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）。

### 化粧品・医薬部外品関係

平成14年度、環境第二室では、医薬品製造業等一斉

監視指導品目として、口紅中のタール色素類の定性試験を実施した。対象品目は、平成14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口紅165品目であった。調査した製品の内、1品目が表示異なるタール色素が用いられていた。また、6品目が、表示してある一部のタール色素を検出することが出来なかった。この結果を医薬局監視指導・麻薬対策課に報告した。

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ヘキサクロロフェン及びピロガロールの試験法を作成し、報告した。（厚生労働省医薬局審査管理課）

医薬部外品としての殺虫剤指針の改訂作業を行った。水道水関係

水道水質検査精度管理調査を厚生労働大臣指定検査機関158機関および一定規模以上の水道事業者等が所有する46項目の水質検査が可能な機関のうち協力頂いた155機関について行い、検査結果の統計的解析および評価を行い報告した（厚生労働省健康局水道課）。

## 研究成績

### 1. 室内空気関係

#### 1) 室内空気汚染物質の分析化学的研究

##### (1) 空気中のアルデヒド類の分析法に関する研究

ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）カートリッジを用いてアルデヒド類のHPLC一斉分析法を確立した。また、アクティブサンプリング法および拡散サンプリング法による屋内、屋外の測定結果は、ほぼ一致した良好な相関関係が得られた（厚生労働科学研究費）。

##### (2) 空気中の揮発性有機化合物（VOC）の分析法に関する研究

アクティブサンプリング法によるVOCの一斉分析法を検討した（厚生労働科学研究費）。

#### 2) 室内空气中の化学物質の安全性評価に関する研究

##### (1) 殺虫剤、防蟻剤のヒトにおける毒化反応および解毒反応に関する異物代謝酵素に関する研究

ヒトではフェニトロチオンはシトクロムP450によりフェニトロチオン-オキソンおよび3-メチル-4-ニトロフェノールに代謝されることを肝ミクロソームでのin vitro試験から明らかにした（産官学提携イノベーション創出事業費）。

##### (2) 防虫剤の代謝経路に関する異物代謝酵素系に関する研究

ヒトおよびラットにおけるp-ジクロロベンゼンの主代謝物は5-ヒドロキシ体であり、その代謝反応はCYP3Aサブファミリー分子種により行われることを肝ミクロソームでのin vitro試験から明らかにした（厚生労働科学研究費）。

##### (3) 肺に発現するCYP1B1に関する研究

ラット肺のCYP1B1 mRNAやタンパクレベルの定量法（RT-PCR法、ウエスタンブロッティング法）を確立した

(厚生労働科学研究費)。

(4) 有機溶剤のヒトにおける代謝に関する研究

トルエンはCYP2E1およびCYP2B6によりベンジルアルコール、*o*-クレゾールおよび*p*-クレゾールに代謝されることを*in vitro*試験(ヒト発現系シトクロムP450)から明らかにした(産官学提携イノベーション創出事業費)。

2. 化粧品・医薬部外品関係

1) 化粧品・医薬部外品原料の規格に関する研究

(1) 化粧品に用いられているタール色素の分離・分析法を薄層クロマトグラフ法、液体クロマトグラフ法で検討し、市販の口紅及び化粧水の実態調査を行った。

(2) 化粧品に用いられている紫外線吸収剤の分離・分析法の検討を行った。

2) 三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

三次元ヒト皮膚培養モデルのEPI-606及びVitrolife-skin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での結果と比較検討した。(厚生科学研究補助金)。

3) 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

前年度に引き続いて、インド西ベンガル州の地下水のヒ素汚染地域を対象に被害住民の尿、毛髪中あるいは食物中のヒ素汚染調査並びにヒ素汚染地下水を灌漑に用いている地域での土壌、農産物中のヒ素汚染調査を行った。(環境省地球環境総合推進費)。

4) 三次元皮膚培養細胞に対する各種化学物質の影響評価に関する研究

ヒト表皮角化細胞、ヒト樹状細胞、ヒト皮膚繊維芽細胞から成る三次元皮膚培養細胞を構築し、その形態や分化状態を観察した。

3. 水道水質関係

1) 水質基準及び試験方法の設定に関する研究

(1) 農薬類の分析について:

ウレア系農薬(シデュロン, ダイムロン, ジウロン)およびスルホニルウレア系農薬(ペンシルフロンメチル, イマゾスルフロン, ピラゾスルフロンエチル, フラザスルフロン, ハロスルフロンメチル), 8種類のLC/MS法による一斉分析法を設定した。(厚生労働科学研究「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) 有機物指標について

①特定物質の標準溶液を作成し、全国水道事業体に協力をしていただき過マンガン酸カリウム消費量と全有機炭素量として測定を行った、両手法による有機物質の把握に関して検討した結果、全有機炭素量の方が、理論計算

値との一致度が過マンガン酸カリウム消費量に比べ優れていることが明らかとなった。(厚生労働科学研究「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) 臭気について

標準物質の統一試料を全国11事業体に配布し(2回), 官能試験を実施していただいた。官能可能濃度, 感じる臭いの種類等, 個人差による相違が大きいことが明らかとなった。また, 時期によっても感じ方が異なる場合があることが認められた。カビ臭については比較的まとまった回答が得られたが, 化学物質については個人的ばらつきが大きかった。(厚生労働科学研究「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) 水道水の安全性評価に関する研究

(1) 環境汚染物質による健康影響評価に関する研究

核内レセプター依存的な転写活性化を引き起こす水域環境汚染物質のスクリーニング法を開発するために, hCARの機能発現に関与するコアクティベーター(PGC-1)のクローニングを行った。

(2) 環境汚染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

モノメチルヒ素還元酵素GSTO 1-1をクローニングし, 既知の一塩基多型を導入して機能解析を行った。

(3) アフリカツメガエルの初期発生期に対する内分泌かく乱化学物質の影響

17β-エストラジオール(E2), ビスフェノールA(BPA), 4-*tert*-オクチルフェノール(OP)の曝露により, 転写量が増減する12遺伝子を同定した。9遺伝子は増加し, 3遺伝子は減少した。作用は, OP>E2>BPAの順に影響が高かった。初期発生段階で3種の化学物質曝露による異常誘発に, エストロゲン受容体αの関与する経路と受容体の関与しない経路があることを明らかにした。OPやBPAで見られた異常誘発は受容体を介さない経路で起きている可能性が示唆された。これらの化学物質の曝露について, 四細胞期と神経胚期の間が感受性の高いことを明らかにした。(国立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」)

(4) ヒメダカの初期発生期に対する内分泌かく乱化学物質の影響(熊本県立大学との共同研究)

受精卵を用いた14日間の曝露においては, 孵化率の最大無作用濃度はOP>E2>BPAの順で, 影響が弱くなっていた。死亡率も同様の傾向が認められた。孵化後24時間の稚魚を用いた96時間曝露の死亡率の最大無作用濃度はOP>E2>BPAの順であった。(国立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]

(5) 親水性かつ難分解性有害化学物質の動態

LC/MS法によるアクリルアミドモノマーの分析方法を検討した。臭素酸の全国的な水道水源域の実地調査を行った。(国立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性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」)

(6) 浄水場汚泥および浮上物質のエストロゲン様活性の評価

10事業体11試料の浄水場汚泥および浮上物質から調製した抽出濃縮試料について、GC/MS法による含有物質の検索を行ったが、特異的な物質の同定は出来なかった。

浮上物質(1試料)および汚泥(3試料)に関して、エストロゲン受容体結合能と対応する誘導酵素活性を指標としてエストロゲン様活性の有無を評価した。(厚生労働科学研究「水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究」)

3) 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

(1) UDP-グルクロン酸の機能と発現制御に関する研究

UGT1A3, 1A4及び1A6をクローニングした。

COS-1細胞で発現させた変異型UGT1A9(D256N)及びUGT1A10(M59I及びT202I)の機能解析を行い、野生型と比較してUGT1A9 D256及びUGT1A10 T202Iではグルクロン酸抱合活性が低下することを明らかにした。

4) MFタンパク質科学による創薬研究

(1) 糖尿病等代謝疾患関連遺伝子の発現制御薬剤の探索と評価

PPAR $\gamma$ およびRXR $\alpha$ への親和性の差違と転写活性への作用を、合成化学物質のリガンドを用いて比較検討した。また、天然有機物質の受容体リガンドとしての活性スクリーニングを行った。

5) その他

(1) AOCの全国実態調査結果と有機物との関係:

阪神水道事業体と共同研究

(2) 1,4-ジオキサンおよびMTBEの全国実態調査の結果

6) 香川聡子博士がInternational Symposium on Bio-Trace Elements 2002でモノメチルヒ素還元酵素GSTO1-1に関する研究成果を発表し、Best Poster Award(YIES)を受賞した。

## 食 品 部

部 長 米 谷 民 雄

### 概 要

食の安全が注目されるなかで、当所食品部門の中心的

な部として、例年にもまして多数の業務を実施した。特に、昨年4月に報告された食品中のアクリルアミドの問題に対しては、迅速に対応した。組織に関しては、食品アレルギー業務の緊急性・重要性が総務省に認められ、平成15年10月に食品部第四室が増設されることになった。

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、アクリルアミド、有害重金属、放射性物質等の食品中有害物質の分析法の改良と実態調査、各種汚染物質の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、健康食品の有害物質の分析などである。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、空席であった食品部第三室研究員に長岡恵博士が平成15年4月1日付けで採用された。また、科学技術振興事業団重点支援協力研究員の張替直輝氏が平成14年7月31日付けで退職し、代わりに佐藤雄嗣氏が平成14年8月1日付けで科学技術振興事業団重点支援協力研究員として採用された。食品・化学物質安全総合研究事業リサーチ・レジデントの和久井千世子氏が平成15年3月31日付けで退職した。

海外出張としては、松田りえ子室長は第24回コーデックス分析法サンプリング部会に参加するため、ハンガリーに出張した(平成14年11月16日~24日)。穂山浩室長は、OECD第7回新規食品・飼料の安全性に関する会議に出席するため、フランスに出張した(平成15年2月11日~15日)。村山三徳主任研究官は、畜水産食品中残留動物用医薬品の日本の規格基準、試験法、検査体制について講演するため、台湾に出張した(平成14年9月17~21日)。

### 業務成績

(1) 厚生労働省食品衛生検査指定検査機関の協力の下に、食品衛生法の残留農薬試験法の見直しに関する研究を実施し、メトプレン、トリフルミゾール等の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農薬試験法への5農薬の追加を検討した。さらに動物性食品への残留農薬基準設定を目指し、50農薬のGC/MSによる測定条件を検討した(食品等試験検査費、医薬局食品保健部基準課)。

(3) 地方衛生研究所職員3名を対象に、食品中ダイオキシン分析法講習会(2週間)を実施した(医薬局食品保健部監視安全課)。

(4) 味噌、醤油、日本酒中のコウジ酸に関する調査報告

- を行った(食品等試験検査費, 医薬局食品保健部基準課).
- (5) 食品衛生検査施設信頼性確保部門責任者研修会(平成14年7月)において, 理化学検査手法の精度管理における留意点について講習を行った.
- (6) 保健医療科学院食品衛生化学コース(平成15年2月)において, コーデックスにおける分析法について講習を行った.
- (7) 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2名に対し技術研修を行った(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新規残留基準設定に伴い, 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.
- (9) 厚生労働省食品保健講習会(平成15年2月)において, 平成14年度に告示された残留動物用医薬品分析法について技術講習を行った(医薬局食品保健部).
- (10) 厚生労働省食品保健講習会(平成15年2月)において, 平成14年度に通知されたアレルギー物質特定原材料検出法について, 技術講習を行った(医薬局食品保健部).
- (11) HACCP連絡協議会主催第4回HACCP専門家講師フォローアップ講習会で技術講習を行った.
- (12) 国立保健医療科学院主催食品衛生管理コース(平成15年2月)で食物アレルギー及び遺伝子組換え食品の表示と検知法について講義を行った(国立保健医療科学院).
- (13) 遺伝子組換え食品の検査法について各地方衛生研究所から12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).
- (14) 横浜検疫所のモニタリングで検知した安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシの確認を行った(医薬局食品保健部監視安全課).
- (15) 横浜検疫所のモニタリングで, 分別流通管理されたトウモロコシに安全性審査済みの遺伝子組換えトウモロコシの5%以上混入が検出されたため, その確認を行った(医薬局食品保健部企画課).
- (16) 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤの定性試験法及び安全性審査済み遺伝子組換え大豆の定量試験法の外部精度管理を行った(医薬局食品保健部監視安全課).
- (17) アガリクス中の有害物質含有量の調査を行った(医薬局食品保健部基準課).
- (18) 厚生労働省食品保健講習会(平成15年2月)において, 食品中のアクリルアミドについて講習を行った(医薬局食品保健部).
- (19) 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).
- (20) ISO/TC69国内委員会第4分科会委員として協力した. 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(農林水産省)に協力した.

- (21) コーデックス第4回バイオテクノロジー応用食品特別部会に日本代表で参加した.
- (22) 薬事・食品衛生審議会の残留農薬部会, 添加物部会, ダイオキシン特別部会, 新開発食品調査部会, 残留農薬暴露評価調査会, 残留農薬調査会, 精度管理調査会, 組換えDNA技術応用食品評価調査会に協力した. また, 残留農薬安全性評価委員会, 残留農薬分析法検討委員会, 健康食品等健康危害管理実施連絡会議および同幹事に協力した(いずれも厚生労働省医薬局食品保健部). 他省庁関係では, 中央環境審議会土壌農薬部会, 農薬専門委員会, 農薬登録保留基準設定技術検討会分析法策定分科会, ダイオキシン類環境測定調査受注資格審査検討会(環境省), 農業資材審議会農薬分科会, 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, 動物用医薬品残留問題調査会(農林水産省), 農作物等有害物質総合調査検討会(重金属)(農林水産省委託), 化学物質魚介類汚染調査検討会(水産庁委託)に協力した.

#### 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)測定を用いたレバー中の残留農薬分析法を開発した. また, 市販の肉類, 動物内臓, 魚介類について汚染実態調査を行った(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究).

- (2) 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

残留農薬分析の効率化のためにGC/MSにおける昇温気化大量注入法の導入を検討し, 分析条件の最適化を行った(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究).

##### 2. 食品汚染物の調査, 監視および検知システムの確立とその応用

- (1) ダイオキシン類測定法の開発・改良に関する研究

市販魚中のダイオキシン類を検出する迅速法としてAhイムノアッセイを検討し, 従来法である高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HRGC/HRMS)の測定結果と比較した. また, 食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解の影響について評価を行った(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究).

- (2) 食品中ダイオキシン類のリスク低減化に関する研究

ダイオキシンの毒性発現に対する植物性食品抽出物の影響を検討するために先ず植物性食品成分自体のバイオアッセイ系への影響(アッセイ系活性化作用)を検討した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究).

- (3) ダイオキシン類の摂取量等に関する研究

トータルダイエツトスタディによって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, 1.63

pgTEQ/kgbw/日であることを明らかにした（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(4) 食品中アクリルアミドの含有量および調理加工による増減に関する研究

LC/MSおよびGC/MSによる食品中のアクリルアミド分析法をそれぞれ確立し、各種食品179試料のアクリルアミド含有量を調査した。さらに加熱調理によるアクリルアミド生成についてモデル試料、農産物粉体および生鮮農産物を用いて検討した（厚生労働科学特別研究）。

3. 食品中の残留動物用医薬品の分析法に関する研究

(1) 食品中の残留動物用医薬品の残留基準設定に伴い、ストレプトマイシン等3項目の残留試験法を開発した（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(2) 食品中の残留動物用医薬品のモニタリング拡充のため、アバメクチン等14項目の残留試験法を開発した。

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) 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

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45カ所での食品中汚染物検査データ20万件を収集し、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ット試料中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（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(2) 鉛摂取量の信頼性確保のために、食品中の鉛分析の技能試験を実施した（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(3) マグロ類からの水銀及びメチル水銀摂取量推定に関する研究

マグロ中の水銀およびメチル水銀濃度と、国民栄養調査から集計した年代別マグロ摂取量に基づき、マグロからの水銀およびメチル水銀の一日摂取量を推定した（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

5. 精度管理に関する研究

(1) 8機関についてダイオキシン分析の外部精度管理を行った。外部精度管理試料（茶）を作製した（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(2) HPLC分析における内部標準法の精度推定を行い、精度の観点から内部標準法を評価した。競合ELISA法の誤差構造を検討し精度予測を行った。（HS財団受託研究）。

(3) 遺伝子発現解析データにおける変化の有意性の評価法を検討し、コントロールとトリートメント各1回のデ

ータから、有意な発現変化を選択する方法を開発した。

6. 食品成分の構造と機能に関する研究

(1) ポリフェノールの抗アレルギー作用に関する研究  
ブドウ種子由来プロシアニジン高分子画分がキナーゼ活性化に影響することなしに、肥満細胞からのメディエーター遊離を抑制することを示した（特別研究）。

7. 新開発食品の安全性・有効性に関する研究

安全性未承認遺伝子組換えパパイヤの定性試験法および安全性審査済み遺伝子組換え大豆の定量試験法の外部精度管理を行った。

(1) 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究

(i) リンゴポリフェノールの腸管免疫担当細胞への影響を検討した（HS財団受託研究）。

(ii) コンドロイチン硫酸の抗アレルギー活性と活性構造相関を評価した（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

ソバアレルギーに関して、ソバアレルギー患者血清と反応する111 kDaのタンパク質の存在を明らかにした（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

8. 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

(1) 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発と評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewLeafならびにNewLeaf Plusのそれぞれについて、定量PCR法を用いた分析法確立のための検討を昨年度に継続して行い、定量用プライマー対、プローブセットに加え、定量用標準分子を開発した。さらにスクリーニングを目的とし、*Cry IIIA*を標的遺伝子とした定量系の開発も行った。また、ジャガイモを対象に既存法を用いた場合、定量分析法に供するのに適したDNAを抽出することが困難であったため、DNA抽出法の検討を行った。さらに、開発された定量分析法の評価を行うに当たり必要となる疑似混入試料についての検討を行った（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(2) 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発

遺伝子組換えジャガイモNewLeafならびにNewLeaf Plusに加え、平成15年2月現在、審査継続中であるNewLeaf Y3系統中2系統が承認の見通しとなった。このことを受け、NewLeaf Y系統別特異的定性検知法の開発を行った。またさらに、モニタリングを目的とし、上記NewLeafならびにNewLeaf Plusを含む安全性審査を終了した品種についても定量分析法の一部を準用し、定性分析法への適用可能性についての検討を行った（厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究）。

(3) 安全性審査が終了していない食品の簡易定性法の確立と評価

新たに抗ウイルス性遺伝子組換えパパイヤの簡易検知

法としてGUS ( $\beta$ -glucuronidase) アッセイによる組織化学的検知法を確立した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### (4) 遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価

現在までに開発されたトウモロコシ5品種を対象とした定量分析法の適用範囲は、穀物に限定されている。これは理論上、加熱等の加工を受けた食品においては測定対象であるDNAが変質し、真値を求めることが難しいと予想されるためである。この点について知見を深めることを目的に、遺伝子組換えトウモロコシGA21穀粒を原材料としたモデル加工食品を作製し、加工による定量値への影響を、原材料を対象とした場合に得られる定量値との比較として調査した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### (5) 新規遺伝子組換え食品の定量分析法の開発

平成15年2月現在、新たな遺伝子組換えトウモロコシとしてMON863, TC1507, NK603の3品種が安全性審査を終了し、法的に流通可能な状態となっている。このため、今後これら新品種が実際に国内流通することが予想され、それらをモニタリングする必要が生じる。そこで、新品種遺伝子組換えトウモロコシ3品種を対象にした定量分析法開発のための検討を行った(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### (6) 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

大腸菌で発現させたCry9Cタンパク質の人工胃液、人工腸液による分解性試験をおこなった(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### 9. 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

(1) 平成14年度の実績から通知法案を作成した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

(2) 食品中特定原材料のPCR法およびウエスタンブロット法のinter-laboratory validationを検討した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

(3) 食品中特定原材料のイムノクロマト検出法の開発を検討した。

#### 10. 天然有害化学物質に関する研究

食品中のパツリンの標準分析法を確立することに協力した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### 11. 必須アミノ酸製品等による健康影響に関する調査研究

2001～2002年度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およびアニリン添加なたね油による有毒油症に関する文献を調査した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### 12. 食品香料の規格および摂取量に関する研究

食品香料の規格のあり方を検討するために、18類の香料化合物約2000化合物に設定されている国内各社の規格を調査した。また、食品衛生法の別表第2の78品目について、年間使用量およびPCTT法による推定摂取量を求めた。さらに、一般食品添加物の確認試験に赤外吸収スペクトル法を採用する際の、参照スペクトルのあり方について検討した(厚生労働科学研究費食品・化学物質安全総合研究)。

#### 13. HPLC/HR-ICP-MS法による金属と食品成分・生体成分の結合の解析

マウス骨髄細胞中の必須金属および硫黄の存在状態を、HPLC/HR-ICP-MS法により解析した。また、ヒト血清中におけるバナジウムのトランスフェリンへの結合状態を解析した。

#### 14. 放射性物質試験法に関する研究

衛生試験法・注解の放射性物質試験法に記載するための、ICP-MSを用いたプルトニウム測定法の妥当性、特にウランとの分離法について検討した。

## 食品添加物部

部長 棚元 憲一

#### 概要

平成15年4月1日付で久保田浩樹研究員、杉本直樹研究員、秋山卓美研究員が主任研究官に昇格した。生活安全総合研究推進事業のリサーチ・レジデントとして研究に従事してきた長岡恵博士は、平成15年4月1日付で当研究所食品部に採用され、異動した。

海外出張としては、秋山卓美研究員が平成14年8月3日より一年間の予定で米国ワシントン州立大学生物化学研究所に留学中である。棚元憲一部長がPDA-USP 合同会議で招待講演のため米国(フロリダ、フォートマイヤーズ、平成14年5月19～24日)に、エンドトキシン国際学会での成果発表のため米国(ワシントン、平成14年7月17～23日)に、さらに薬局方国際調和の専門家会議出席のためフランス(ストラスブルク、平成15年1月12～17日)にそれぞれ出張した。河村葉子第三室長が第59回FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会に出席のためジュネーブ(平成14年6月3日～15日)に、またACS年会で招待講演のため米国(ボストン、平成14年8月17～25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。平成14年度は食品に関する社会問題が大き

く取り沙汰され、食品添加物関連においても、未指定添加物である香料使用による大量回収問題、同じく輸入食品中の未指定添加物フェロシアン化物事件、既存添加物のコウジ酸発ガン性疑惑等多数の問題に対する行政対応に追われた。これらの事件に対する行政対応措置として、それぞれ根本的な香料の安全性評価法の検討、国際的に安全と認められ、広く使用されている未指定添加物の国主導による指定化、さらに既存添加物の安全性の見直し、といった大きな政策が打ち出され、その流れに乗って今年度以降も引き続き当部はその対応に追われることになる。

### 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、食品中から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TBHQ及びサイクラミン酸を取り上げ、食品中の分析法を改良し、地方衛生研究所2機関、指定検査機関3機関の参加による共同実験を実施した（未指定添加物対策費、医薬局食品保健部監視安全課）。

(3) 新規指定食品添加物「フェロシアン化物」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) 小麦中の過酸化ベンゾイルのHPLCによる定量法及びLC/MSによる確認試験法を作成し、安息香酸と分別定量が可能であること、過酸化ベンゾイルは小麦に添加されると急速に分解して一部は安息香酸となることを示した（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日摂取量調査では、地方衛生研究所6機関の協力の基に、アセスルファムカリウム、スクラロース、キシリトール等の8種の甘味料の摂取量を求めた。また、添加物としての表示があった個別食品中含量も同時に測定して計算上の摂取量を求め、食品群として測定した値と比較検討した（食品添加物基準策定費、医薬局食品保健部基準課）。

(6) 健康食品素材としても用いられる天然甘味料テニリョウチャ抽出物中の加水分解型タンニンの構造について検討した。また同時に本抽出物の確認試験法を開発した（食品添加物基準策定費、医薬局食品保健部基準課）。

(7) 乳幼児用玩具へのフタル酸エステル類の使用規制に関連して、市販玩具の材質及びポリ塩化ビニル製品における可塑剤について調査を行った（容器包装規格基準等作成費、医薬局食品保健部基準課）。

(8) 薬事・食品衛生審議会における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）、新開発食品検討調査部会新開発食品評価第一調査会（医薬局食品保健部新開発食品保健対策室）、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、生物試験法委員会、総合委員会、PDG関連調整会議、伝達性海綿状脳症対策調査会、保険医療専門調査会（医薬局審査管理課）、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構技術評価委員会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) 食品香料の規格定量法及び不純物に関する研究

天然香料中の残留溶媒の分析法としてヘッドスペース-GC/FID (MS) 法による限度試験法を作成し、妥当性を検討した（厚生労働科学研究費、医薬局食品保健部基準課）。

##### (2) 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

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、天然添加物中のアレルギー物質検出法としてマウス膝窩リンパ節測定法を検討した。食品添加物公定書の中で有害試薬を使用している試験法の代替試験法案の適用可能性を調査した（厚生労働科学研究費、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) 行政検査を基にした摂取量の推定に関する研究

2003年度に実施予定としている地方公的機関による食品中の食品添加物含有量測定データのデジタル収集、データベース化のために、データ収集用ファイル、データベースファイル等のシステムを整備した（厚生労働科学研究費、医薬局食品保健部基準課）。

##### (2) 食品中の未許可添加物の分析法の開発

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（厚生労働科学研究費、医薬局食品保健部基準課）。

##### (3) 天然添加物の化学的安全性確保に関する研究

ラット90日間反復投与毒性試験実施品目のキダチアロエ抽出物、ジャマイカカシヤ抽出物等9品目の既存添加物の成分研究を行った（厚生労働科学研究費、医薬局食品保健部基準課）。

#### 3. 器具・容器包装等に関する研究

##### (1) 器具・容器包装の規格試験法の精度向上に関する研究

ポリ塩化ビニルのジブチルスズ化合物試験法について、安全性が高くしかも高精度である代替法を確立した（厚生労働科学研究費、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

合成樹脂製器具・容器包装の規格基準のうち、ポジティブリスト及び溶出試験法について、諸外国の調査を行い、欧米と我が国の比較を行い、我が国におけるこれら

の方向性を検討した（厚生労働科学研究費，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

米国，ドイツ及び欧州連合におけるリサイクル包装材の安全性確保のための法規制及びガイドラインを精査し，それらをもとに，我が国のリサイクルプラスチックの食品用途への使用に関する基本的な考え方をまとめた（厚生労働科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(4) 国際標準化機構における玩具の規格基準に関する研究

玩具からのヒ素，カドミウム，鉛，水銀等8元素の溶出限度を定めているISO 8124-3について，その内容，試験法の検討，我が国で流通する玩具の試験等を行った（厚生労働科学研究費，医薬局食品保健部基準課）。

(5) 紫外線吸収剤及びベンゾフェノン誘導体のエストロゲン活性に関する研究

食品用途の合成樹脂に使用される紫外線吸収剤及びベンゾフェノン誘導体について，酵母Two-Hybrid試験によりエストロゲン活性を調べたところ15化合物で検出された。また，構造活性相関についても検討した（文部科学省科学研究費）。

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株の作製を行った（厚生労働科学研究費，医薬局審査管理課）。

5. その他の研究

(1) 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

医薬品製造における無菌操作法で重要である，ろ過滅菌やSIP/CIPの無菌性検証を中心に，付随する微生物管理手法について研究を行った。各種無菌関連試験法，ガイドラインの作成，さらには微生物モニタリング法の開発等に大きな成果を得た。また製薬用水の現状分析を行い，局方整備及び国際調和の問題点を提示した。（厚生労働科学研究費，医薬局審査管理課）

(2) エイズ医薬品候補スクリーニング研究

企業および大学より提供された230検体についてマイクロプレート法，magic-5アッセイ，巨細胞形成による抗HIV活性スクリーニングを行った。magic-5アッセイでは14サンプルにおいて，マイクロプレート法ではそのうち13サンプルにおいて，巨細胞形成においてはさらにそのうちの11サンプルにおいて抗HIV活性が認められた。（厚生労働科学研究費，医政局研究開発振興課）

食 品 衛 生 管 理 部

部 長 山 本 茂 貴

概 要

平成14年度は，食品等製造工程における微生物制御のための研究，食品における微生物学的リスクアセスメントに関する研究を進展させた。業務関連では貝毒検査の制度管理，魚介類におけるサルモネラ属菌の汚染実態調査を行った。調査研究として，1) 食品由来リステリア症に関する研究，2) サルモネラ菌の制御に関する研究，3) 鶏卵におけるサルモネラ，貝類における腸炎ピブリオ，カキにおける小型球形ウイルスのリスクアセスメントに関する研究を行った。

人事面では，平成14年4月より，重松美加博士（国立感染研）を共同研究員として，奥谷博士を厚生科学研究補助金により流動研究員として，15年4月からは春日文子第3室長が安全情報部第2室長に配置換えとなった。また，山崎学博士を同補助金の流動研究員として迎えた。

海外出張に関しては，山本茂貴部長が平成14年5月27日から30日まで，FAO/WHOによる食品のバイオテロ対策に関する会議出席のためスイスジュネーブに出張した。さらに，平成14年11月10日から16日まで第37回UJNR有毒微生物部会日米合同会議出席のため米国サンフランシスコに出張した。五十君静信第1室長は平成14年部長と同じくUJNRで出張した。春日文子第3室長は2002年5月9～12日，中国，北京FAO（国連食糧農業機関）／WHO（世界保健機関）／ILSI（国際生命科学研究所）による微生物学的リスクアセスメントに関するワークショップでの講演（中国予防医学アカデミー栄養食品衛生研究所からの招聘）のため出張，2002年7月23～28日，アメリカ，メリーランド州アデルフィへ第1回微生物学的リスクアセスメントに関する国際学会での講演（FDAの食品衛生応用栄養部とメリーランド大学の合同研究所（JIFSAN）からの招聘）のため出張した。2002年11月1～15日，チリ，プコン国際食品微生物規格委員会（ICMSF）年次会議出席（国際食品微生物規格委員会（ICMSF）からの招聘）のため出張した。2003年1月6～11日，マレーシア，クアラルンプールへ国際協力事業団マレーシア食品衛生プロジェクト指導（国際協力事業団短期専門家としての派遣）のため出張した。

業務成績

乳等省令の改正の根拠となるQ熱病原体の死滅温度に関する検討

貝毒の精度管理に関する業務（第2室），青森県衛生研究所による貝毒検査の精度管理を行った。

## 研究業績

平成14年度は

### 1. 食品中の微生物のリスク評価に関する研究（厚生科学研究）

タイにおける赤貝消費に伴う腸炎ビブリオのリスク評価を行い、日本でのリスクアセスメントモデル構築の基礎とした。カキにおける小型球形ウイルス（ノーウォーク様ウイルス）のリスクプロファイルと汚染実態並びに食中毒実態調査を行い、汚染ウイルス量の実態および発症ウイルス量の実態を調査した。ここでの手法は今後食品微生物の規格・基準策定の科学的根拠を与える元となる。

### 2. ビブリオバルニフィカスによる重篤な疾病に関する研究（厚生科学研究）

汽水域に生息する魚介類はビブリオバルニフィカスに汚染されていることがあり、肝臓に肝硬変などの疾患を有する人が生の魚介類を喫食することにより、重篤な敗血症を発症し、死に至ることがある。14年度はこれまでの発生動向等疫学的調査と、食品からの検査法の検討および食品や患者由来株の遺伝子解析を行った。その結果、過去20年で100例ほどの患者発生が報告されており、十数%が死亡していた。死亡した患者はいずれも肝臓に疾患を有していた。遺伝子解析では、食品及び患者由来株を比較するためのPCRを開発した。また、食品からの菌株分離を効率よく行う方法を開発した。

### 3. 食品中のリステリアによる健康被害に関する（厚生科学研究）

全国2500カ所以上の病院にアンケート調査を行い、食品由来のリステリア症発生について調査を行った。リステリア症は年間約80例ほど発生しているが、食品との関連を示唆する症例は無かった。肉類、及び乳製品の一部及び生鮮魚介類の一部からはリステリアモノサイトゲネスが分離された。特に肉類の汚染率は高かった。

### 4. 食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究（HS財団）

サルモネラ菌の特定タンパク質を解析し、病原性発現の新たなメカニズムの解明に糸口を与えた。また、そのタンパク質を対象として免疫学的診断法の開発を行った。

### 5. 食中毒菌および毒素のレセプター結合能等を応用した検査法の開発とその評価法の確立（HS財団）

これまで、微生物の検査法として培養法や免疫学的方法が数多く開発されてきたが、食中毒菌に特有の糖鎖や毒素に結合するレセプターを応用して食品及び環境中の食中毒菌を検出する方法を開発するための基礎的研究を行った。

### 6. 食品中のアフラトキシン分析法に関する研究

多機能カラムを用いる分析法には、種々の欠点が指摘されていることから、イムノアフィニティークラム法及び

その他の方法のうちイムノアフィニティークラム法について検討した。

### 7. 牛乳及び乳製品中のアフラトキシンM1の汚染調査

昨年度分析した全ての牛乳からアフラトキシンM1が検出されたことから市販されている牛乳、或いは乳製品の全てがアフラトキシンM1汚染を受けている可能性が大である。その由来は輸入されたコーンなどの配合飼料と推定される事から、これらの因果関係をも明らかにするために牛乳中のアフラトキシンM1実態調査を行っている。

## 衛生微生物部

部長 高鳥浩介

### 概要

当部は、平成14年4月から4室体制となり、各室で所掌事務のうち医薬品、医薬部外品、化粧品、医療用具、食品等に関連する有害微生物およびその産物に関する試験研究を実施してきた。

人事では、平成14年7月酒井綾子主任研究官が第3室長に昇格し、高鳥浩介室長併任解除となった。また15年3月小沼博隆第2室長が退職、東海大学海洋学部教授として転出され、同年4月宮原美知子主任研究官が第2室長に昇格した。平成14年2月杉山圭一研究員が新たに加わった。また退職された東海大学小沼博隆教授は、客員研究員として承認され継続して食品微生物、特に食中毒細菌に関する研究に従事されることとなった。

高鳥部長は平成14年4月和光市に移転した国立保健医療科学院（旧国立公衆衛生院）との併任となり、食品衛生に関する自治体職員の指導を担当すること、および15年2月24日付けで岐阜大学大学院連合獣医学研究科の客員教授（併任）となった。

海外出張では、高鳥部長、小西室長は14年11月10～16日 毎年日米交互に開催している37回日米有毒微生物専門部会（UJNR）に出席するためカリフォルニア州（Emeryville）に出張し、日本における食品微生物およびマイコトキシンの実情を報告し、意見交換を行った。小西室長は、14年9月26～30日イラン国からの要請で輸出規制の対象となっているイラン産ピスタチオのアフラトキシン汚染の現状および視察でテヘランに出張した。室井室長および大西研究員は14年7月18～21日第7回国際エンドトキシン学会出席のため Washington DC に出張し、研究発表を行った。高鳥部長、工藤主任研究官は平成14年9月25～29日 チュニジア（Tunis）での27回世界獣医学会議に出席し、それぞれ研究発表を行った。小西室長は15年3月11～15日ソルトレイク（ア

メリカ)で開催されたアメリカ毒素学会で発表した。

## 業務成績

### 1. 審査

注射薬10件について特別審査を行った。

### 2. 規格・規準・行政試験研究など

平成14年5月に設定された小麦のデオキシニバレノールの暫定基準値を受けて発足した厚生厚生労働科学研究・特別研究「小麦等のデオキシニバレノールに係わる規格基準設定のための緊急調査」を分担して、分析法の設定と妥当性確認試験、小麦粉の実態調査、小麦製粉工程による減衰率、小麦製品調理工程による減衰率を行った。分析法の設定と妥当性確認試験を行い、多機能カラムおよびUV-HPLC法を用いる分析法において良好な成績が得られた。小麦粉の実態調査、小麦製粉工程による減衰率、小麦製品調理工程による減衰率を明らかにし、基準値設定のための知見を得ることができた。

厚生労働科学研究「調理施設と食品製造業における衛生管理に関する研究」として液卵製造業におけるサルモネラコントロールに関する研究を行った。

厚生労働科学研究「居住環境に基づく感染性疾患とその管理に関する研究」で感染性疾患を伴う環境性真菌による健康被害について文献調査を行った。

厚生労働科学研究「食品中の有害物質等の評価に関する研究」の分担研究「かび毒試験法の改良のための研究」をおこなった。パツリン、オクラトキシンの分析法の確立をおこなった。パツリンの分析法としてUV-HPLC法、オクラトキシンの分析法としてイムノアフィニティ法を確立した。

厚生労働科学研究「食品企業における健康危機管理に関する研究」に協力する調査研究を行い、地方自治体試験研究機関における真菌検査の状況を把握するとともに真菌による苦情・事故の年内変化や苦情・事故を起こしやすい菌種を明らかにした。

厚生労働科学研究(肝炎等克服緊急対策研究事業)「プリオン病の診断技術の開発に関する研究」の分担課題「Proteinase K処理抵抗性プリオン蛋白質の調製とELISA標準品への適用」を実施した。

厚生労働科学研究(肝炎等克服緊急対策研究事業)「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」の分担研究として「イムノアッセイの標準品として用いるProteinase K処理抵抗性プリオン蛋白質の調製」を実施した。

厚生労働科学研究「生活環境中の脂溶性化学物質の感染抵抗性に及ぼす影響」の主任研究者として、トリブチルスズの日和見感染抵抗性への影響および神経毒性を明らかにした。

ヒューマンサイエンス振興財団「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」および、「Toll-like receptor 4結合分子MD-2の機能解析と創薬への応用」を行った。

ヒューマンサイエンス振興財団「健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究」として住環境にみる有害生物として細菌、真菌、ダニを特定し、その生態を調査した。生態研究からさらに有害生物による被害とその制御に関する基礎研究を行った。

ヒューマンサイエンス振興財団「食中毒菌および毒素のレセプター結合能を応用した検査法の開発とその評価法の確立」の分担研究者として、食中毒菌と特異的に結合する糖ペプチドの検索を行い、病原大腸菌O-157と特異的に結合する有用な糖ペプチド2種を見出した。

### 3. その他

薬事・食品衛生審議会の調査会並びに臨時委員を務めた。

地方自治体職員(岡山県)に真菌検査法の研修を行った。

## 研究業績

### 1. 内毒素に関する研究

(1) 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の分子機構について解析し、MD-2の動物種による違いが主因であることを突きとめた。

(2) エンドトキシンの活性中心はリポドA部分にあるとする従来の定説とは異なり、サルモネラエンドトキシンのヒトマクロファージ細胞での活性には少なくとも2分子の糖が結合している必要があることを見出した。

(3) TLR4/MD-2またはTLR2を介するNF- $\kappa$ Bの活性化にはマウスCD14の異なる領域が必要であり、35-44, 151-153, 235-243および273-275のアミノ酸がエンドトキシンとの結合およびTLR4/MD-2へのエンドトキシンの受け渡しに重要な役割を果たしていることを明らかにした。

### 2. 食品微生物に関する研究

(1) 食品からの赤痢菌検出法の新方法について21カ所の試験研究所との協力でコラボレーション・スタディを行った。その結果、従来用いられていたアメリカBAM法に比して、検出感度が良好であることが確認された。さらに、赤痢菌に関して検出用分離平板寒天培地についての検討や、保存における挙動に関して検討を行った。

(2) 病原性細菌の腸管出血性大腸菌O157, O26, 腸炎ビブリオなどの検出法の検討や、それら病原細菌によって引き起こされる食中毒に対しての衛生管理法や殺菌法などについて検討を行った。

### 3. 真菌に関する研究

(1) 住宅の断熱材の位置とカビ発生に関する研究で住環境にみる真菌の生理活性を研究した。住環境にみる主要

真菌に限って、生物学的特性の研究を行った。

(2) ズーノース原因真菌の住環境生息性と分布拡大として住環境にみる病原性真菌の生態を知り、真菌による健康被害について調査研究した動物由来真菌の住環境生息性と病原性との関わりを研究した。

#### 4. 微生物毒に関する研究

(1) トータルダイエツスタディーの一環として、パツリンの摂取量についての基礎的研究をおこなった。

(2) パツリンの摂取量についての基礎的研究として、リング加工食品中のパツリンの抽出法を検討した。

#### 5. プリオンに関する研究

ヒト・グリオブラストーマ細胞株T98Gが蛋白質分解酵素処理抵抗性プリオン蛋白質(PrP<sup>res</sup>)産生し、Proteinase K消化等の前処理法を含めた食品試料のイムノアッセイに適用可能なことを見いだした。

#### 6. In Vitro 実験系を用いる発癌及び発癌促進・抑制に関する研究

異種の発がんプロモーターが、共通して細胞形質転換のプロモーション期に増殖に関連するネズミ核タンパク質NP95の発現増強を誘発することを明らかにし、その発現増強を発がんプロモーター検索のための指標の1つとして活用できる可能性を示した。

## 有 機 化 学 部

部 長 奥 田 晴 宏

### 概 要

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, 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」並びに本年度新たに開始したプロジェクトとして「プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤曝露, 遺伝子発現に関する研究」, 「紫外線照射における健康影響とその予防に関する研究」及び「未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明のための研究」等を実施した。また, 調査業務として無許可製造医薬品の特性解析を薬品部, 環境衛生部と協力して実施した。

国際会議のための外国出張としては, 奥田が, 平成14年9月9日より9月12日まで米国に出張し, ワシントンDCで開催された日米EU医薬品規制調和国際会議に出席した。また, 平成15年3月16日より3月20日まで英国に出張し, ABPI Japanese CMC/Quality Forumにお

いて現在の承認審査システムと品質に関する要求事項に関して講演した。また学会発表のために外国出張としては, 栗原室長が, 27th European Peptide Symposium (Sorrento, Italy) で研究発表するため2002年8月30日~9月9日イタリアに出張した。

研究員の受け入れに関しては, 昨年度から引き続き末吉祥子博士に客員研究員として, 研究に参画していただいた。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)及び田中直子博士(大妻女子大学家政学部助教授)が引き続きNMRを利用した研究に従事された。また新たに協力研究員として中西郁夫博士(放射線医学総合研究所研究員)及び治京玉記博士(勸乙卯研究所研究員)が参画され, それぞれ抗酸化剤の有効性と安全性に関する研究及びオキシコレステロールの研究に従事された。

所内共同利用機器である400 MHz核磁気共鳴装置の管理は, 栗原及び福原両室長が行った。

奥田, 末吉客員研究員及び栗原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。奥田はまた, 医薬部外品・化粧品部会の臨時委員あるいは新医薬品部会の専門委員として該当品目の審査に協力した。

### 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) サイトカラシン類L-696, 474構造を基に, 分子設計したHIVプロテアーゼ阻害剤の合成を行い活性を評価した。(厚生労働省特別研究費, 平成9~14年度)

2) 光照射下におけるアントラセンのニトロ誘導体のNO発生能は, ニトロ基の付加位置によって大きく異なった。また, NOの発生能とDNA切断活性は相関することを明らかにした。(一般研究費, 平成11~15年度)

3) 光照射をトリガーとするエンジン分子の設計と合成を行った。(文部省科学研究費補助金, 平成13~14年度)

4) 抗腫瘍活性化合物としてアミドキシム誘導体を合成した。(一般研究費, 平成13~16年度)

5) カテキンのラジカル消去能の増強を目的として, カテキンの立体構造を平面に固定した平面型カテキンを合成した。平面型カテキンは天然型カテキンと比べて非常に強力なラジカル消去能を有することがわかった。(文部省科学研究費補助金, 平成14~15年)

6) クマリンを母核とする機能性化合物を化学計算を用いて設計した。(一般研究費, 平成14~15年度)

7) 軟骨分化促進作用を有するフラーレンの誘導体を合成した。(一般研究費, 平成14~15年度)

8) 新規な医療材料を指向した機能性有機化合物としてジヒドロピリジン誘導体を合成したが, 種々の溶媒に難

溶性化合物であった。(一般研究費,平成14~16年度)  
9) ヒドロキシアミジン類の合成を行い, NOの発生を調べるにより生体内でNADPHを介した活性酸素種の作用機序を明らかにした。(一般研究費,平成14~16年度)

10) 標的タンパク質に対する結合性を評価するために, 1-amino-2, 6-anhydro-1-deoxy-D-glycero-D-ido-heptitol を骨格とし, かつ合成の効率化を考慮に入れた化合物群の分子設計を行った。(一般研究費,平成14~16年度)

11) タモキシフェン誘導体によるヒト肝培養細胞暴露時の遺伝子発現パターンの変動を検討することを目的として, タモキシフェン誘導体の簡易合成法を確立した。(厚生労働科学研究費補助金,平成14~16年度)

12) 芳香族ニトロ化合物などの環境化学物質や光アレルギー疾患に関連すると思われる食品や医薬品に紫外線を照射すると, ラジカルを発生して人への健康に影響を与える可能性が示された。(厚生労働科学研究費補助金,平成14~16年度)

13) 固相反応による18Fの導入反応を検討した。(文部科学省原子力研究費,平成14~17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) 水酸基の数および付加位置の異なるレスペラトロールのDNA損傷作用を解析した結果, 4-ヒドロキシスチルベン構造がDNA傷害に必須であることを明らかにした。(一般研究費,平成9~15年度)

2) カテキンのラジカル消去作用について金属イオン効果を検討した結果, カテキンはプロトン移動を伴う1電子移動反応によって活性酸素種を消去することを明らかにした。(一般研究費,平成12~15年度)

3) N-ニトロソフェンフルラミンの大量合成法を開発し, 毒性試験に供するため大量合成を実施した。(厚生労働科学研究費補助金,平成14年)

4) 加熱食品に含まれるアクリルアミドの生成機序とその生成に関する情報調査を実施し, 本化合物はアルギニンと糖とのメイラード反応で生成することが判明した。(厚生労働科学研究費補助金,平成14年度)

5) 光アレルギーが問題となっているニトロムスク系香料について毒性発現機構を検討した結果, 還元剤存在下, 光照射によって活性酸素を発生することを明らかにした。(一般研究費,平成14~15年度)

6) 代謝モデル反応を用いた乱用薬物の検出法のための予備的検討を行い, psilocinは活性酸素種と速やかに反応して数種類の酸化分解物を生成することを明らかにした。(厚生労働科学研究費補助金,平成14~15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) 転写調節因子のDNA結合ドメインモチーフに結合予

定のフェナジン骨格を有するアミノ酸は, 還元剤存在下, また, 銅イオン存在下, 強力なDNA切断活性を示した。(一般研究費,平成9~14年度)

2) 新規C60内包型化合物を設計合成し, C60との結合性等をNMRなどを用いて解析した。(文部科学省科学研究費補助金平成13~14年度)

3) 光照射によりコンフォーメーションが変化する分子のSTMによる観察を試み, 更に観察に適した分子の設計を行った。(一般研究費,平成13~15年度)

4) P2X受容体のATP結合部位と推定されているポリペプチドの立体構造変化について高分解能NMRを用いて二次元応用測定を用いて解析を試みた(一般研究費,平成13~15年度)

5) PPARのX線構造を基にリガンドの設計を行った。(医薬品機構基礎研究推進費,平成13~17年度)

6) 化学的な代謝モデル反応を利用してタモキシフェンの酸化代謝物を合成した。(一般研究費,平成14~15年度)

7) 分子シャペロンが認識するN結合型糖鎖のプロセッシング酵素を特異的に阻害する化合物として, glucopyranoside および arabino-hexopyranoside を有する化合物の分子設計を行った(一般研究費,平成14~16年度)

8) VDR(ビタミンDレセプター)の新規リガンドの設計を行った。(一般研究費,平成14~15年度)

9) 自己組織化し, ヘリックス構造をとるペプチドの設計と合成を行った。(一般研究費,平成14~15年度)

10) 酵素のリガンド結合部位などを元に包接化合物を設計した。(厚生労働科学研究費補助金,平成14~15年度)

以上の研究は, 宮崎健太郎(芝浦工業大学工学部:浦野四郎教授), 松崎亜香理(日本大学生物資源科学部:奥忠武教授), 小山裕孝(共立薬科大学薬学部:望月正隆教授), 古田奨(東京理科大学理学部:椎名勇講師)及び所内関連各部の協力を得て行った。

研究の成果はThe 10<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamidomonas (Canada), 第9回日本がん予防研究会(熊本), 第23回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム(松島), The 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (USA), 27th European Peptide Symposium (Italy), 応用糖質科学会創立50周年記念国際シンポジウム(東京), 第17回生体機能関連化学シンポジウム(大阪), 第52回錯体化学討論会(東京), 9th Annual Meeting of the Oxygen Society (USA), 第39回ペプチド討論会(神戸), 第46回日本薬学会関東支部総会・大会(東京), 第41回ESR討論会・第7回 in vivo ESR研究会連合討論会(東京), 日本癌学会第61回総会(東京), 第16回基礎有機化学連合討論会(東京), 第28

回反応と合成の進歩シンポジウム（東京），第35回酸化反応討論会（京都），日本環境変異原学会31回大会（東京），第19回日本薬学会九州支部大会（福岡），第17回日本フリーラジカル学会関東支部研究会（東京），第14回ビタミンE研究会（名古屋），日本薬学会第123年会（長崎），理化学研究所 基礎科学特別研究員成果発表会（和光），日本ビタミン学会第55回大会（島根），12th Workshop on Vitamin D (The Netherlands)，日本化学会第83春季年会（東京），日本農芸化学会2003年度大会（藤沢）等で発表した。

また論文発表としては，*Helv. Chim. Acta.*，*Bioorg. Med. Chem. Lett.*，*FEBS letters*，*Peptide Science*，*Anti-Cancer Drugs*，*J. Am. Chem. Soc.*，*J. Chem. Soc.*，*Perkin*，*J. Phys. Chem. A*，*Mutation Res.*，*Chem. Res. Toxicol.*，*Biol. Pharm. Bull.*，*Org. Biomol. Chem.*，*J. Org. Chem.*，*Chem. Pharm. Bull.*，*Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*，*FEMS Microbiology Ecology*，季刊フラレン，医薬品研究等の学術誌並びに科学技術研究費補助金報告書，厚生労働科学研究費補助金報告書等に発表した。

## 機能生化学部

部長 澤田 純一

### 概要

平成14年度の研究業務として，4つの大課題，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，薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究を継続して行った。

昨年度と同様に，内容的には，遺伝子組換え食品のアレルゲン性に関する研究及び薬剤反応性遺伝子の多型解析に大きな重点を置いて業務を行った。

遺伝子組換え食品の安全性に関しては，アレルゲン性評価のための種々の試験系の検討・開発を行うと同時に，組換え食品に発現されている導入タンパク質のアレルゲン性が低いことを明らかにする等，消費者の不安の解消のため，全力を注いできた。

薬剤反応性遺伝子の多型解析に関しては，「薬剤反応性遺伝子解析による疾病対策・創薬推進事業」を行うためのプロジェクトチームの中核として，多型解析及び機能解析を担当し，日本人の薬剤反応性遺伝子の詳細な遺伝子型を明らかにする等，今後の薬剤の適正使用に必要とされる多くの基盤的情報が得られつつある。

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が，本年度は，放射線障害防止法に基づく定期施設検査を受けた。

### 研究業績

#### 1. 免疫担当細胞の機能に関する研究

(i) 「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」の一環として，「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遺伝子発現の面から検討した（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，組換えCryIAbタンパクの大腸菌における大量発現等のアレルゲンの調製，インビトロ分解性試験法の開発及び国際的バリデーション試験への参画，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，重点支援研究費）。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，多摩市と旭川市の3歳児を対象に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，試験法の条件及び適応範囲につき検討を行った（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) 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。

#### 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ペプチドとの融合タンパクを培養細胞に添加し，細胞内への透過性を検討した（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，以下の研究を中心に行った。

(i) 前年度に引き続き，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。また，一部の遺伝子については，見出した一塩基多型をもとにハプロタイプ解析を行い，遺伝子型の同定並びに分析を行った。

- (ii) 心臓のナトリウムチャンネルSCN5Aにつき、新たに発見した一塩基多型に関して機能解析を開始した。
- (iii) グルクロン酸抱合酵素UGT1A1の遺伝子多型につき、タイピング法を開発した。

## 代謝生化学部

部長 井上 和 秀  
前部長 澤 田 純 一

### 概 要

平成14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、薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究、ならびにMFタンパク質科学による創薬研究等を行った。人事に関しては、平成13年4月1日より澤田純一機能生化学部長が代謝生化学部長を併任されていたが、平成14年10月1日より、薬理部第一室長であった井上和秀が部長に就任した。また、平成15年2月1日付けで、小野景義主任研究官が千葉大学大学院薬学研究院助教授として転出となった。

### 研究業績

1. 白血球の運動代謝制御に関する研究
  - (1) 白血球の運動活性に対するLIMキナーゼ(野生型および変異体)発現の影響を検討した。(ヒューマンサイエンス振興財団委託金)
  - (2) 白血球の分化(機能的成熟過程)におけるコフィリンの発現レベルの変動を検討した。(環境省公害予算)
  - (3) 白血球の機能蛋白の発現に対する内分泌攪乱物質の影響をDNAアレイ、リアルタイムPCR法で解析した。(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導入した安定細胞株を用いて、種々の内分泌攪乱物質の影響を検討した。(環境省公害予算)
  - (2) 情報伝達系チロシンキナーゼの食細胞機能発現における役割を解析するため、アンチセンスオリゴヌクレオチドを利用する実験系の構築を行った。(ヒューマンサイエンス振興財団補助金)
  - (3) インディルビンの食細胞分化に対する影響を活性酸素産生能を指標に検討した。(厚生労働科学研究)
  - (4) 心筋の虚血に伴う中間径フィラメントの挙動を免疫蛍光染色法により解析し、 $\alpha$ B-Crystallinの局在変化とその意義を明らかにした。(試験一般)

- (5) ラットを用いて、覚醒剤亜慢性投与による脳内各部位の主な伝達物質受容体蛋白の局在の変動を、免疫蛍光染色と共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて解析した。(ヒューマンサイエンス振興財団国際共同研究)

### 3. 脂質の代謝・動態の制御に関する研究

高脂血症の予防・治療薬の評価・開発に関する研究の一環として、コレステリルエステル合成阻害薬は肝からのVLDL分泌低下に有効であるが、細胞に過剰の脂肪酸が供給されるとその効果は失われ、逆にトリグリセリドに富むVLDLの分泌が促進され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. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

抗がん剤(イリノテカン)投与患者(約80名)の生体試料を用い、イリノテカン及び代謝産物の薬物動態解析結果と当薬剤の薬剤反応性遺伝子(薬物代謝酵素、薬物トランスポーター等)の遺伝子多型との関連を調べた。その結果、薬物動態異常(代謝率、腎排泄等)に相関する複数の薬物代謝酵素または薬物トランスポーターの遺伝子多型が明らかとなった。(医薬品機構研究費)

### 5. 核内受容体とそのリガンドによる動脈硬化の抑制研究

(1) RXRアゴニストPA024はマクロファージでのHDL新生の促進と細胞内コレステロール低下に極めて有効であることを見いだした。

(2) FXRリガンドの*in vitro*での新たな評価系として、表面プラズモン共鳴センサーを利用したレセプター・コアクチベーター結合アッセイ系を確立した。

(3) 胆汁酸の生合成中間体が強力なFXR内因性リガンドであることを見いだした。(医薬品機構研究費)

### 6. 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、神経系モデル細胞PC12細胞を用いて、特にRARおよびRXRに的を絞って検討した。RAR及びRXRを刺激する9-*cis*レチノイン酸がチャンネル型ATP受容体P2X2mRNA、受容体蛋白質を増加させ、このP2X2受容体チャンネルを介する、内向き電流、カルシウム流入、さらにこのカルシウム依存的神経伝達物質放出を増大させることを明らかとした。(医薬品機構研究費)

### 7. 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では、病態難治性疼痛モデルの神経因性疼痛、アロディニアの病態には、脊髄後角ミクログリアでのp38リン酸化が深く関与することが示された。(ヒューマンサイエンス振興財団委託金)

(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・行動薬理学的研究では、慢性神経疼痛モデルで

は脊髄内グリア細胞が活性化されることを明らかにした。(文部省科学研究費)

## 安 全 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事業、および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提供システムの構築を行った。当所の研究情報ネットワークを進展させると共に、化学物質の安全性評価のための基礎的研究および医薬品の適正使用のための医薬品情報に関する研究等を行った。

### 支援業務(業務成績)

1. 国際化学物質安全性計画(IPCS)の計画諮問会議(北京, 2002年7月)に森川, 関澤が出席し, IPCSの活動方針について討議した。

2. 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

CICADとして出版された化学物質の翻訳, 及びCICAD作成の基礎となる国際機関や各国の評価資料のデータベース化を行い, 当所ホームページに掲載した。第10回最終原案検討会議(モンクスウッド, 2002年9月)に関澤, 林が出席し, 7化学物質のCICAD原案について, リスク評価と最終検討を行った。

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6物質のICSC原案を作成した。また, 約120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) GINC(Global Information Network on Chemicals)プロジェクトの推進

2002年7月アジア太平洋地域の化学物質の安全性に関する情報交換と協力について, 第8回GINC東京会議をIPCSと共同開催し, 10ヶ国50数名が参加した。また, GINCホームページの内容を更新した。

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

化学物質安全情報の一環として半導体産業で使用される化学物質の安全性データ集の作成を行った。

3. 図書・情報サービス

1) 雑誌類の管理と相互貸借

雑誌4タイトルを中止し, 単行本148冊を購入した。この結果, 購入中の雑誌は305タイトル, 管理している単行本は12,096冊となった。文献の相互貸借事業に関しては, 外部から548件の依頼を受け, 外部へ1,720件を依頼した。

2) 図書情報検索サービス

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120号の作成と配布に協力した。

4. 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を行い, ネットワークセキュリティ対策を実施した。また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. 化学物質の安全性に関する研究

1) 化学物質の毒性情報等提供システムの調査研究

事故例の多い化学物質について詳細な毒性情報等を調査し, 化学物質プロファイルを作成した。また, 総合的な化学物質情報提供ポータルサイトを構築し, 化学物質に関する法規制データベースその他の化学物質関連情報を掲載した。

2) 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の研究

化学剤の物性・毒性情報を調査し, 健康危機管理情報webページに追加すると共に, 薬毒物分析に関するシミュレーションシステムの設計を検討し, 有機リン化合物, 覚醒剤, シアン化合物の分析法を掲載した試作版を構築した。また薬毒物分析, 救急医療, 中毒情報その他の専門家等による専門家会合を開催し, 化学災害や化学テロなど緊急時における対応について検討した。

3) 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生体影響, とりわけ低容量における影響のうち, 免疫系及び神経行動への影響を中心に検討した。

4) 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

環境中の複合化学物質による次世代影響リスクを評価するスキームを構築し, いくつかのグループの化学物質についてリスク評価を行った。

5) 内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究

アリルヒドロカーボンレセプターに対して強力なリガンドとして人体内に見出したインディルビンの生理的な機能の解明とダイオキシンとの相互作用について研究を行った。

2. 医薬品の適正使用および医薬品のプロセスバリデーションに関する研究

1) 医薬品安全性情報を支援する情報システムに関する研究

国際機関や外国政府・研究機関から公開される、医薬品の安全性に関わる情報のデータベース化についてプロトタイプを作成した。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) 日本における医薬品の適正使用に関する調査研究

日本で使われている主要な医薬品に関して、WHOのATC/DDDシステムを用いて日本における医薬品の使用実態を海外の使用実態と比較を行い、日本における医薬品使用の違いを明らかにすると共に適正使用に向けての提言を行った。

#### 3) 医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究

医薬品原料となる原薬のプロセスバリデーションに関する研究として、不純物プロフィール、結晶系や粒子径等の同等性保証に重点を置き、合成、晶析、精製工程等の原薬製造プロセスにおいて、研究開発段階にも重点を置き、どのようなデータに基づいてプロセスを構築し、またプロセスの妥当性を評価するかについて研究を行った(HS委託)。

#### 4) 医薬品製造工程等の変更が品質に与える影響及び品質確保のあり方に関する研究

徐放性固形製剤におけるスケールアップ及び処方変更等の製造工程の変更に伴う医薬品品質の同等性保証に関する研究を行なった。

#### 3. 生体分子の構造と機能に関する研究

医薬品の分子レベルでの作用メカニズムを解析するための非経験的フラグメント分子軌道(ab initio FMO)法プログラムについて開発を行った。また、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、酵素やトランスポーターについてのデータを収集した。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. 化学分析と情報に関する研究

分析法の評価法の検討として、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

当部新設初年の平成14年度は、各研究室の研究業務内容ならびに研究の方向性を明確化することを目的に各種の検討を行った。当部の所掌は医薬品の適正使用のための基礎的研究である。第1室は行政部門から出向した室長と主任研究官1名で構成される非実験系の室で、市販後医薬品の安全対策を支援する研究を行うことが期待

されている。しかしながら、この種の研究は当研究所にはなかったこと、情報の入手が容易でない上に、本来は本省業務であるとの指摘も受け、研究方針の決定に困難を窮めているのが現状である。医薬品の安全対策においては、科学的アプローチが非常に重要であることは議論の余地はなく、そのためには製薬企業からの副作用等臨床情報が必要である。ところが、これらの個々の情報は製薬企業の財産であること、さらにそれらの情報に基づいた行政対応は製薬企業との直接討議を通して成り立つもので、研究所の立場から容易に意見を挟める状況ではない。こうしたことから、現在は公開された情報(専門誌及び学会発表)に基づいた薬物代謝が関わる医薬品の相互作用解析に関する研究をテーマとすべく検討中である。第2室は室長、主任研究官1名及び研究協力者2名からなり、糖尿病治療薬の血中動態と代謝関連遺伝子の解析を行うための基礎的研究、並びに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・創薬推進事業の一環として、対象医薬品代謝関連遺伝子の1塩基置換解析および遺伝子発現調節領域の解析を行った。第3室は室長及び研究協力者2名からなり、同プロジェクト研究の一環として、抗がん薬及び抗てんかん薬の血中薬物濃度分析法の検討、患者における薬物血中濃度の測定、および薬物動態の解析を行った。また厚生労働科学研究の一環として、薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する予備的研究を行った。

人事面では浦野勉第1室長は平成14年7月1日付けで医薬品医療機器審査センター審査官との併任を解除されたが、本省医薬品安全対策業務との関係を密にするために平成14年10月1日付けで安全対策課との併任として業務している。頭金正博主任研究官は、平成14年7月1日付けで第2室長に就任した。また、池田仁子博士は平成14年8月1日付けで医薬品機構派遣研究員として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を行っている。吉谷隆志氏は平成14年9月17日に学位を取得したことにより、平成14年11月1日付けで医薬品機構派遣研究員となった。Todd J Stedeford博士は平成14年11月1日より日本学術振興会の外国人特別研究員として研究に従事していたが、平成15年5月末日をもって研究を終了し帰国した。高橋登主任研究官は平成15年4月1日付けで環境省環境管理局水環境部土壤環境課農薬環境管理室農薬専門官として出向となった。小泉睦子技術補助員は平成14年7月1日付けで総合評価研究室より当部に配置転換となり、医薬品安全対策支援研究の補助を行っている。

海外出張としては、次のとおりである。長谷川部長は長尾所長と共に米国食品医薬品局を表敬訪問した(平成14年7月、米国)。また、長谷川部長は「幼児の化学物質暴露におけるリスク評価のための科学的原則と方法

論」についてのWHO IPCS会合（平成14年10月、スイス）に出席し、長谷川部長及び小泉技術補助員は「42nd Annual Meeting of Society of Toxicology」（平成15年3月、米国）に出席し、それぞれ発表した。鹿庭第3室長は「American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting and Exposition」（平成14年11月、カナダ）に出席し、発表した。高橋主任研究官は「CIOMS Working Group on Pharmacogenetics and Pharmacoeconomics holds second meeting」（平成14年8月、ドイツ）、「WHO International Pharmaceutical Monitoring Meeting」（平成14年9月、スイス）および「CIOMS Working Group on Pharmacogenetics and Pharmacoeconomics holds third meeting」（平成15年2月、米国）に出席した。

プロジェクト研究としては、厚生労働科学研究補助金の特別研究事業として「諸外国における医薬品安全対策の緊急調査研究」、および、「薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究」、食品・化学物質安全総合研究事業として「フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究—発達期ないし有病時曝露による影響評価—」及び医薬安全総合研究事業として「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」、ヒューマンサイエンス基礎科学研究事業として「CYP2C9の遺伝的多型がグリメピリドの薬物動態に与える影響」、及び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を行った。

#### 業務成績

1. 医薬品・環境化学物質の安全性評価に関する業務
  - a) 薬事・食品衛生審議会医薬品等安全対策部会、中央環境審議会環境基準専門委員会、医薬品GLP評価委員会、新医薬品添加物専門協議に出席し、安全性の評価を行った。
  - b) ICH Q3C/M: Impurity: Residual Solvents (Maintenance) 専門家ワーキンググループにおけるラポータとして、維持管理文書の最終化、3種の残留溶媒の基準値改訂について討議し、2種の溶媒について改訂値の承認を行った (Pharmeuropa, 15, 365-372 (2003))。
  - c) ICH E2E: Pharmacovigilance Planningの専門家ワーキンググループ会合に参加し、討議した。
2. 皮膚適用製剤の生物学的同等性試験ガイドライン作成委員会に参加し、第二次案の作成およびQ & A案の作成に携わった。
3. 日本薬局方製剤委員会に参加し、改訂作業を行った。

#### 研究業績

1. 医薬品安全性情報の解析評価の方法に関する研究
  - a) 医薬品の安全対策規制に関する諸外国との比較研究  
米国及びEU, カナダ, オーストラリア, 日本の市販

後医薬品の安全対策に関する規制について調査し、副作用症例報告、安全性定期報告、報告期限等について比較検討した。各国共に基本的にICH E2A, E2Cの成果に基づき市販後の制度が定められており、報告の範囲や期限等で差異が見られた。

#### b) 諸外国における医薬品安全対策の調査研究

諸外国で副作用等安全性上の問題で販売中止された医薬品についてWeb情報等公表資料を基に調査し、当該医薬品が我国で販売されている場合、販売継続の理由を含め我国における医薬品の市販後安全対策上の状況について検討した。諸外国で問題となった点については、添付文書中での注意喚起や情報提供、当局からの継続理由の公表が行われており、国内での医薬品安全対策状況が明らかとなった。(厚労科学特別研究補助金)

#### 2. 科学・技術等の環境変化に対応する新たな行政戦略に関する研究—Pharmacogenomics (PGx)の活用に関する政策研究—

医薬品開発におけるPGxの利用について、CIOMS (国際医学協議会)における検討及び薬事規制当局が関与する海外及び国内における検討の進捗状況を比較し、我が国における医薬品開発にPGxを有効利用するために今後必要となる検討プロセスについて検討した。CIOMSは、2002年2月に産官学のメンバーから成るファーマコ・ジェネティクス/薬剤経済 ワーキンググループを設置し、用語の定義、規制の展望、倫理問題、経済的影響、データベース、関係者の教育等、PGxに関する諸問題について多角的な検討を進めている。米国においては、2002年5月にFDA (食品医薬品局)と製薬業界がPGxに関する公開ワークショップを共催し、PGxに関する問題点の把握を含め多角的な検討を行っており、薬事規制当局と製薬業界の間に共通認識を形成するためのプロセスを機能させている。一方、我国においては、PGxの有効利用に向けて薬事規制当局と関係者による多角的検討と共通認識形成のための場が存在していない。我国における医薬品開発へのPGxの有効利用に向けて、そのような場を早急に立上げる必要があると考えられた。

#### 3. グリメピリドの薬物動態に与えるCYP2C9遺伝的多型の影響

ヒトでのグリメピリドの薬物動態に与えるシトクロムヒトP450 2C9 (CYP2C9)の遺伝的多型の影響を調べるため、遺伝子組換え酵素を用いてグリメピリド水酸化活性を測定した。その結果、CYP2C9\*1とCYP2C9\*3とではグリメピリド代謝のKm値には大きな違いは見られないが、変異型による最大代謝速度は野生型に比べ、およそ4分の1に低下していることがわかった。このことは、CYP2C9の遺伝的多型がグリメピリドの体内動態に影響を与えている可能性を示唆している。スルフォニルウレア剤のプロトタイプであるトルブタミドもCYP2C9によ

って代謝されるが、トルブタミドの水酸化では、 $V_{max}$ には差はないものの $K_m$ には約10倍の差があると報告されている。従って、CYP2C9によるこれらスルホニルウレア剤の酸化反応の反応機構は異なっていることが示唆された。

#### 4. 薬物動態関連遺伝子多型の人種差に関する研究—UDP Glucuronyl Transferase 1 (UGT1) について—

白人、黒人、日本人各150人より得られた末梢血から抽出したDNAを用いて、UGT1A1\*28, UGT1A1\*27, UGT1A1\*6について、パイロシークエンス法で遺伝子型を測定し、各SNPの発現頻度の相違を検討した。UGT1A1\*6では、日本人において発現頻度が高く、一方、UGT1A1\*28では、黒人において変異型の頻度が高かった。このことから、主としてUGT1A1によって代謝される薬物では、有効性や安全性の面において、人種差が生じる可能性が示唆された。

#### 5. 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

##### a) 遺伝子多型の解析に関する研究

薬剤反応性遺伝子の発現調節に関わる因子である、ヒトPXR (Pregnane X Receptor) およびヒトCAR (constitutive androstane receptor) の遺伝子多型の解析を行った。アミノ酸置換を伴うPXR遺伝子の多型に関しては機能解析を行い、活性の低下を伴うことを見出した。また、PXR遺伝子の転写調節領域の解析を行い、PXRの発現に必要な領域を検討した。

##### b) 薬物の体内動態に関する研究

i 抗がん剤：塩酸イリノテカン (CPT-11) —平成13年度に引き続き、約80人の患者の血中イリノテカンおよび代謝物濃度を測定し、薬物動態と薬物代謝関連遺伝子多型との関連を検討している。UGTおよびMDRの遺伝子多型と薬物動態との間に関連が見られた。

ii 抗がん剤：塩酸ゲムシタピン (dFdC) —平成14年度から、患者の血中ゲムシタピンおよび代謝物濃度および血中シチジンデアミナーゼ活性の測定を開始した。約40人分の患者の測定が終了した。

iii 抗がん剤：パクリタキセル—平成14年度から、患者の血中パクリタキセルおよび2種の代謝物濃度の測定を開始した。約80人分の患者の測定が終了した。

iv 抗てんかん薬：カルバマゼピン (CBZ) 及びフェニトイン (DPH) —平成13年度に引き続き、血液中のカルバマゼピンおよびその代謝物の濃度およびフェニトイン濃度を測定した。カルバマゼピンの薬物動態とCYP3A4およびエポキシドヒドロレーズの多型との関連を検討した。

v 抗てんかん薬：バルプロ酸—LC/MSによるバルプロ酸およびその代謝物の定量法の検討を行い、LC/MSによって検出可能であることを確認した。

#### 6. その他の研究

##### a) シトクロームP450発現調節に関わるPXR, CAR, VDRの役割に関する研究

ヒトCYP3A4等の薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの誘導に重要な働きをしているpregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), vitamin D3 receptor (VDR) の恒常的発現細胞株の樹立を試みた。その結果、PXRおよびCARの恒常的発現細胞株の樹立に成功した。また、これらの細胞株ではヒトCYP3A4遺伝子の転写活性化が観察された。

##### b) 医薬品製造工程等の変更が品質に与える影響及び品質確保のあり方に関する研究

徐放性製剤について、製造工程等の変更の程度と品質に与える影響の程度について検討を行い、変更時に要求する生物学的同等性および安定性に関する試験項目を決定した。

##### c) 母集団薬物動態学試験の実施における問題点

製薬会社の臨床薬物動態担当者を対象にアンケート調査を行い、それに基づいて、母集団薬物動態試験の動向と同試験を実施する際の問題点を明らかにした。

##### d) 新生児における化学物質の毒性発現の感受性に関する研究

3-Aminophenol及び3-methylphenolについて、新生児試験と若齢動物試験(同系5週齢の動物を用いた28日間投与試験)の結果に基づいて毒性学的比較解析を行い、学術誌に公表(J. Toxicol. Sci., 27, 411-421 (2002), J. Toxicol. Sci. 28, 59-70 (2003))ならびに米国トキシコロジー学会(3月, ソルトレイクシティ, 米国)で発表した。

##### e) フタル酸/アジピン酸エステル類の生殖毒性に関する調査研究

フタル酸/アジピン酸エステルについての文献検索を実施し、発育期曝露による生殖系への影響並びに種差あるいは曝露時期による感受性の差に関する情報を収集・解析した。フタル酸エステルは主にDEHP及びDBPの研究が報告され、妊娠期-授乳期曝露による次世代雄生殖器への影響はテストステロンの合成低下によること、また若齢げっ歯類雄の精巣毒性はセルトリ細胞への影響であることの確認結果が報告された。また、DEHPはマーモセットでは精巣を含む如何なる臓器への影響も認められないとの確認実験もなされた。アジピン酸エステルに関しては2000年にDEHAのIARCが発刊され、発生毒性試験等で、高用量投与により妊娠率の低下、内臓奇形等が認められたが、生殖器系への明確な影響はないことから、フタル酸エステルの生殖系への影響と共通性は少ないと推定された。なお、DINPについては毒性解析評価を行い、学術誌に公表した(日本食品化学学会誌, 9, 39-45 (2002))。

## 安全性生物試験研究センター

センター長 井 上 達

安全センターの試験・研究業務は、1) 医薬品関連(麻薬、劇毒物などの物質、GLPの審査などを含む)、2) 食品・食品添加物関連、3) 農薬・残留農薬関連、4) 生活化学物質を含む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に協力している。現在審査は順調に行われており、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。昨年度は、医薬品の非臨床試験ガイドライン解説書の改訂が行われたが、今年度はこれにもとづいて、名古屋で開催された第29回日本トキシコロジー学会にM.E. Cosenza氏(アムジェン)やJ. Cavagnaro氏(元FDA・CEBR)らを招いて、バイオ医薬品の安全性試験での採るべき方策などについての討論会が開催された。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いるが、今年度は、後述4)の化学物質と併せて、トキシコジノミクスを用いた予知毒性学的探索研究へ向けての方策の検討が始動した。

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)などによる点検作業が継続してきた。しかし、現在、食品安全委員会の設置や食品安全法の大改正など、食品分野に於ける安全性措置について準備が進んでおり(平成15年5月国会通過)、今年度から来年度にかけて歴史的に大きな節目を迎えようとしている。安全センターは、これまでの食の分野に於ける諸方面での貢献について内閣府準備室のスタッフに説明をするなど、立ち上げに貢献している。今ひとつ特筆すべきできごととして、食品の調理・加工中に生成するアクリルアミドの問題が起こった。これに対しては米谷食品部長を主任研究者として緊急に成立した特別研究に対応し、当センターは事実の解明とリスク評価の方向性を明らかにすべく積極的に貢献した。食品関連ではこの他、今年度から香料についての食品添加物の安全性に関する検討が始まっている。

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。今年度は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が抽出され、文献調査も行った。これら残留農薬の安全評価についても、次年度には、前述の食品安全委員会のもとで新たな審査体制が構築されるものと想

定されている。

4) の生活化学物質関連で特記すべき事項としては、長年、経済産業、環境、および厚生労働の各省で個別に行われてきた新規化学物質の化審法評価が、経産・環境・厚労の三省合同審査の方向で準備が進んだことである。これには、各省における評価過程での“文化”の違いのようなものも見られないではなかったが、審査基準の客観化など各省の事務方による長時間にわたる検討により、遂に合同評価の運びに至った。内分泌かく乱化学物質に関する研究については引き続き進んでいるが、これについては、各部のそれを参照されたい。なお、これとの関連で、引き続きフタル酸の安全性評価が進み、医療用挿管チューブなどについての規制の検討が進んだ。

調査業務としては、種々の国際機関(ICH, OECD, JECFA, JMPR, 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行われている。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、平成13年度から引き続き新たな厚生科学研究：医薬品等国際ハーモナイゼーション促進研究推進班が発足し、そ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。毒性関連のOECDテストガイドラインのコメント対応業務について、今年度より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名の専門家の協力を求めることで、体制づくりが進行した。

当安全センターの試験・研究・調査の各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、前述の通り一昨年度来提案してきたcDNAマイクロアレイを応用した一般化学物質に標的をあてたトキシコゲノミクスのプロジェクト研究の、平成15年度からの発足が決まった。昨年開始した医薬品評価のためのトキシコゲノミクスプロジェクトとともに、新世紀にふさわしい動向と云えよう。また、医薬品機構による当所における初の大型プロジェクト(平成9～13年)「ヒト型試験系の樹立—その個体および細胞内発現系—」(主任研究者井上 達)が終了し、11

月末「ヒト型モデル動物」(シュプリングフェアラーク東京)が記念出版された。

最後に安全センターの人事と研究交流等行事について略記する。人事では、平成14年7月1日、菅野 純毒性部第一室長が毒性部長に昇任し、井上センター長による同事務取扱が解除となった。また同日付けにて、総合評価室長(政令室)に江馬 眞大阪支所室長が着任した。これに伴って長谷川隆一医薬安全科学部長の同室長併任が解除された。これに先立って、金子豊蔵動物管理室長37年2ヶ月に及ぶ勤務を終え、前日6月30日付けにて定年を前に勇退、JICA日中友好プロジェクト・医薬品安全性評価管理センターへの協力のために北京へと転出した。後任には配置換えにて川崎 靖毒性部第三室長が就任した(尚、金子前・動管室長には、永年勤続表彰が授与された)。10月1日には井上和秀薬理部長が安全センターを転出し、代謝生化学部長に昇任した(後任室長には小泉修一主任研究官が昇任)。また同日付けにて安全性情報科学部の拡充が断行され、これに伴って関係研究職員の配置換え(毒性部の項参照)が行われたほか、明るる3月31日付けには毒性部の機器試験室が廃止となった。なお翌4月1日にはトキシコジノミクス・プロジェクト研究の併任として、毒性部に漆谷徹郎博士が東京大学薬学部より赴任した。

以上により、平成15年5月末現在のセンターの構成は、4部、1省令室、15室(1室減)となり、センター長1、部長4、省令室長1、室長16(内1名併任)、主任研究官19、研究員8(内、1名併任)、動物飼育長1、で、総計50名(内2名は併任と任期付き：(昨年度より1名欠員)で、この他、協力・流動研究員11、研究生・実習生10、および、技術・事務補助員15、客員研究官8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。

研究交流等行事については、まず元動物管理室長を勤めた堀内茂友先生が日本実験動物学会の功労賞を受賞された(5月23日)。また中国医薬品評価管理センターより Rui-Chang Xing センター長(7月25日)、米国NCT副所長の J.K.Selkirk 博士(11月18日)、米国EPAの Gary Timm 氏および James Kariya 氏(11月22日)、Zebetの H.Spielmann 博士(12月6日)、ミシガン州立大学の T.Zacharewski 助教授(11月16~25日)らの各氏がセンターの招きで来所した。国内来所者として特記すべき事項には、阪大・動物センターの黒澤努助教授と、食薬センター小野宏所長の特別講演(それぞれ12月10日および2月5日)がある。10月23~24日には、当安全性生物試験研究センターも共催の形で、岡崎の基生研の講堂に内外270名の参加者を集めてトキシコゲノミクス国際フォーラム2002が開催された。また3月24日に

は懸案であった韓国毒性学研究センターと当安全センターの交流研究会が実現した。韓国側からは、Ki-Hwa Yang 所長をはじめ、Dong-Deuk Jang 病理部長、Kwang-Sik Choi 生殖発生毒性室長、Jae-Ho Shin 内分泌攪乱担当主任研究員(他、ソウル大学獣医学部より Woo-Suk Hwang 教授および Dae-Yong Kim 准教授)、当所からは、米谷食品部長の他、井上センター長、菅野毒性部長、大野薬理部長、廣瀬病理部長、林変異遺伝部長、江馬総合評価室長、川崎動管室長、および韓国語に堪能な児玉毒性部室長(動管兼務)が出席し、午前中・三田共用会議所、午後・用賀本所に分けて、研究の紹介と相互交流を行った。

当センターからの海外出張には、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, JMPR, IPCS 等)あるいは各種学術関連集会等に対して、安全性センター構成するメンバーは積極的に参加した。それらについては各部の報告に記載されるので省略する。なお、センター長は、米国代替法省庁調整会議(5月ノースカロライナ)、WHO/IPCS(6月ジュネーブ)、WHO(12月ロンドンおよび1月ジュネーブ)、JICA(1月北京)、SOT(3月ソルトレイクシティ)、およびカナダ、ニューオーリンズ、ワシントンD.C.での学術関連集会などのためにそれぞれ出張した。

## 毒 性 部

部 長 菅 野 純

### 概 要

安全性生物試験研究センター毒性部の所掌業務は、医薬品、医療用具、医薬部外品、毒物・劇物、生活関連化学物質、食品や食品添加物などに関する安全性評価のための毒性分野の諸試験、及び動物実験における機器試験法の開発、実験動物の開発と飼育管理、並びにこれらに必要な研究、時宜に応じた安全性調査・リスクアセスメント、毒性発現機構の解明と安全性予知技術の開発のための基盤研究、並びに必要な毒性試験法開発研究、等である。厚生労働省との連携のもと、6室体制でこれらの業務を遂行している。尚、平成15年3月31日付で、毒性部機器試験室が廃止され、平成15年度より5室体制へと移行することとなった。

人事面では、平成14年7月1日付けにて菅野純毒性部第一室長が毒性部長に就任し、それに伴い井上達センター長は毒性部長事務取扱を免じられた。また、金子豊蔵動物管理室長が医薬品安全性評価管理センター日中友好プロジェクト参画(国際協力事業団、JICA)のために勇

退（6月30日付）され、その後任に川崎靖第三室長が就任した。11月1日付にて、児玉幸夫第四室長が第三室長へ、平林容子機器試験室長が第四室長へと配置換え、また12月1日付にて小川幸男主任研究官が第一室長に昇任した。平成15年3月31日をもって内田雄幸主任研究官が定年退官され、先の金子博士とともに永年勤続表彰を受けた。9月30日～11月1日までPSG芸術科学大学（インド）Rajaguru Palanisamy博士をUICC（International cancer fellowships administered by International Union against Cancer）研究員として、また日本公定書協会流動研究員として平成15年1月より同Palanisamy博士及び2月より中津則之博士を迎え、トキシコゲノミクスを中心とした研究に従事している。当部に平成10年9月～12年12月まで滞在したことのあるソウル大学Byung-II Yoon博士を平成14年8月12日～平成15年1月31日の半年間、非常勤研究員として迎えた。平成15年3月3日より中国医薬品安全性評価管理センターのXie Yin（謝寅）学士がJICA派遣研究員として研修を開始した。短期研修では、同じく中国医薬品安全性評価管理センターのXing Rui Chang氏が在籍（7月25日～8月2日の研修期間の内の8月1日のみ）した。農水省農薬検査所からの本年度の研修には、横山央子氏が来所した（9月17日～12月12日）。また新たに食品農薬医薬品安全性評価センターより研修生として向井大輔博士が来所（10月1日～3月20日）。尚、非常勤、賃金職員等として吉木健太、安部麻紀らの技術吏員及び、木越恵子の事務吏員があらたに業務に参加し、赤倉健嗣技術吏員が退職した。

業務関連での海外出張では、菅野純部長は、環境化学物質の生体影響についてWHO/IPCS（ジュネーブ）を訪問し（8月8～10日）、担当者との情報交換、ダイオキシン2002：第22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（平林室長、高木主任研究官ら同行：8月11日～17日、スペイン・バルセロナ）、内分泌かく乱化学物質に関する学術年会（10月16～21日、米国ルイジアナ州ニューオーリンズ）への出席と発表、Affymetrix社を訪問（11月5～10日、米国アリゾナ州スコッツデール）しトキシコゲノミクス研究について最新の情報収集、韓国・国立毒性研究所の招聘による内分泌障害性化学物質に関する国際シンポジウム（12月2～4日、韓国・ソウル）における講演、OECD関連では内分泌かく乱化学物質におけるOECD/EDTA/VMG（運営グループ）の第5回会議に出席（3月16～19日）し本邦の現状について報告するとともに会議の議長を務めた。その他、平林容子機器試験室長（11/1付けにて第四室長に配置換え）は、第16回国際マウスゲノム会議に出席・発表（11月11～16日、米国テキサス州サンアントニオ）、第44回米国血液学会に出席発表（12月7～10日、米国ペンシルバニア州、フィラデルフィア）

及び関連情報交換のため米国ミシガン州立大学（12月11～13日、米国ミシガン州イストラランシング）を訪問した。高木篤也主任研究官は、既述の同行出張の他、第42回米国奇形学会（6月21～29日、米国アリゾナ州スコッツデール）への出席・発表、FAO/WHO合同残留農薬専門家会議（9月15日～27日、イタリア・ローマ）のため、それぞれ出張した。五十嵐勝秀主任研究官は、日本学術振興会日米がん研究協力事業による米国国立環境健康研究所・国立トキシコゲノミクスセンターとの共同研究のため、7月28日～9月28日まで米国ノースカロライナ州リサーチトライアングルに滞在し技術の習得に努めた。またクロマチンの修飾を介した転写制御に関するキーストンシンポジウム（3月10～17日、米国ニューメキシコ州サンタフェ）に参加し討議を行った。小野敦研究員は分子細胞生物学に関するシンポジウム（3月24日～4月1日、米国コロラド州キーストン）の聴講と討議のため出張した。高橋雄主任研究官はマウス分子遺伝会議での発表のため（8月27日～9月3日）、また北嶋聡主任研究官は心臓血管に関する会議での発表のため（5月29日～6月4日）、それぞれ米国ニューヨーク州コールドスプリングハーバーへ出張した。

## 試験業務

### 1. 既存化学物質の毒性試験

本年度は個別的な試験の実施はなかったが未検討の多数の既存化学物質を可及的速やかに評価するための基盤研究開発に向けての諸手法導入の検討を行った（平成15年度厚生労働科学研究費補助金への新規申請を行った）。

### 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、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い、また、ガルシニア抽出物の報告書を作成した。遺伝子組換えトウモロコシについて、ラットによる慢性毒性・発がん性併用試験を継続中である（食品保健部新開発食品保健対策室）。またガルシニア抽出物の主成分ヒドロキシクエン酸の精巢毒性について追加検討し、その報告書を作成した。

食品添加物として、ジャマイカカシヤ抽出物、サンダラック樹脂及びグレープフルーツ種子抽出物について、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）。

また、健康食品に混入していた未承認医薬品（N-ニトロソフェニフルラミン）のラットによる28日間反復投与毒性試験を行い、その報告書を作成した（医薬局監視指導・麻薬対策課）。

### 3. 医薬品及び医療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

1,3-ジクロロ-2-プロパノールの経口・経皮急性毒性

試験及び皮膚刺激性試験を行った。

#### 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) 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、特に子宮肥大試験のリードカントリー・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)、げっ歯類子宮肥大試験、Hershberger試験等の高次Screening試験など、米国EPAや他の研究機関と協働体制のもとに、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。特に子宮肥大試験については、そのOECDテストガイドライン化に向けての最終段階に入った。

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必ずしも当てはまらず、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継続している。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てきたが、本年度は詳細試験の概念的プロトコールとして「げっ歯類生涯試験」を含む「拡張試験スキーム」を提案した。

#### 2) 「タール色素」に関する安全性研究

いくつかのタール色素について、その構造式から予想されたところのアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) に対する反応性の可能性を、試験管内実験にて検討することを開始した。

#### 3) 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) 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14年度は平成13年度に引き続き酸化ストレス反応に関わる毒物として、シアン化ナトリウム (ミトコンドリア阻害)、パラコート (活性酸素誘発) 及び2-デオキシグルコース (解糖系阻害) の3剤を組み合わせ、アポトーシス指標の他、マイクロアレイを用いて *in vitro* における複合毒性の分子メカニズム評価を進めている。

#### 2) 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を元に基礎的研究を行っている。また並行して行っている既知毒物の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志向したマイクロアレイを用いた毒物検査解析システムの開発を検討している。平成14年度はマイクロアレイ解析精度の向上を図り、従来にないデータ標準化法の開発に成功した。今後この標準化法を用い、精度の高いデータを集め、データベース構築を行っていく。

#### 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 (科技庁国研原子力、特研・遺伝子発現班、HS振興財団)

造血細胞は、未分化な造血前駆細胞からさまざまな分化系列の細胞までを含む。このため、従来の末梢血のモニターだけでは、化学物質や特に低線量域の放射線による前駆細胞に局限した潜在的な障害性を予知することが困難である。こうした予知困難にして特殊なアッセイ系でのみ検出可能であったような、造血器、特に造血幹細胞での障害性を検知する為の指標として、特に細胞周期関連遺伝子を対象とした遺伝子チップによる、遺伝子の発現変異を取り上げ、下記2) の近紫外線を用いた新しい造血幹細胞の細胞周期測定法 (BUUV法) で得られる結果を踏まえた解析を進めている。

#### 2) プロモデオキシユリジン投与 (BrdUrd) と近紫外線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、ほぼ完成の域に達した。

#### 3) 遺伝子改変動物の発がん特性に関する研究 (学振科研補助 基盤研究C)

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ものであり、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14年度の研究結果は、a. 促進加齢モデルマウス

としての *klotho* 遺伝子変異マウスの発がん特性の骨髄移植系を用いた検討, b. 種々の DNA 障害の遺残と遺伝的不安定性を誘発することが知られる p53 欠失マウスの発がん態様への *klotho* 遺伝子変異の与える加算効果の検討, 及び, c. 酸化ストレス緩和モデルマウスであり, 個体レベルでの寿命延長が観察されている *thiore-doxin* 遺伝子過剰発現マウスにおけるベンゼン誘発白血病発症の緩和現象と, その分子背景基盤としての遺伝子発現変異の観察, d. エピジエネティック発がんの過程で機能的に発現が下降することの知られる細胞間結合単位を構成する *connexin* 分子の急性障害性と発がんにおける2面的な役割の *Connexin32* 欠失マウスを用いた検討, e. ダイオキシン受容体遺伝子欠失マウスの造血前駆細胞の BUUV 法を用いた細胞動態解析などを含む。

#### 4) 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。

#### 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, 正常胚と *Mesp2* 欠損胚によるキメラ解析, 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 cDNA 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

アカゲザルによる胃内薬物自己投与試験法の改善を検討した。(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

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  $17\beta$ -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, 子宮以外の臓器として, 肝臓, 腎臓, 海馬, 視床下部を選び, 同様に網羅的遺伝子発現変動検討を開始した。

(1) OECD/EDTA の推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, OECD におけるテストガイドライン化に供

すべきマウスの反応性データのとりまとめを行った。

(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化学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ェア培養系による DNA マイクロアレー等を用いた解析を進めている。

(4) エストロゲン受容体の生体機能に関する知見, 特に, エストロゲン受容体のスプライシングバリエーションの機能を個体レベルで調べ, 内分泌障害性化学物質の作用機序解明の一助とするため, エストロゲン受容体遺伝子改変マウスを作製し, 受容体遺伝子の発現機序の改変による生体影響を調べている。

#### 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, および葉酸投与によって p53 欠失マウスの外脳症発生が抑制されず, かえって増悪することを見出した。これら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化学物質の新規無細胞高速分析法としてこれまでに開発を進めてきた表面プラズモン共鳴分析法の確立と検証のため, *in silico* 解析により作用が予測された化合物を中心に約 100 種の活性未知化合物についてエストロゲン  $\alpha$  受容体 ( $ER\alpha$ ) 作用の解析を行い, 細胞を用いたアッセイ系と相関する結果を得た。あわせて,  $ER\beta$  受容体測定系構築に向けた基礎的検討を行った。

#### 5) 3D-QSAR

内分泌かく乱化学物質の計算探索と評価のためエストロゲン受容体  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) 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り,  $ER\alpha$  に結合する可能性のある化学物質各々の立体構造情報に基づいた理論的な結合定数 (RBA 値) の予測を行ったところ, 活性既知の化合物群では予測値と実測値の相関は良好であった。さらに, *in silico* 抽出された活性未知化合物について HTS スクリーニングデータをもとに, 予測精度の向上のための検討を進めた。

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様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。

7) 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ための実験的基盤研究の分担研究として種々のダイオキシン類の口蓋裂誘導能の比較並びに, その作用機序を明らかにするため, 胎児上顎部でダイオキシンにより影響を受ける遺伝子をマイクロアレイを用いて網羅的に検索した。

## 薬 理 部

部 長 大 野 泰 雄

### 概 要

有効性・安全性評価のための科学技術開発に関する研究, 医薬品等の中枢機能に及ぼす影響に関する薬理学的研究, 生体機能における情報伝達に関する薬理学的研究, 医薬品等のトキシコキネティクスに関する研究, およびメディカルフロンティア (MF) タンパク質科学による創薬研究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, 香料の安全性評価及び安全性薬理試験のGLP調査に関する調査研究を行った。また, 昨年に引き続き, 新医薬品の承認審査, 農薬のADI決定のための作業, 新規及び既存化学物質の安全性評価, 医薬品および一般化学物質の安全性試験に関する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, 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, 井上和秀第一室長が平成14年10月1日付けで代謝生化学部長に昇任した。これに伴い, 小泉主任研究官が11月1日付けで第一室長に昇任した。宮島敦子研究官が大臣官房厚生科学課に派遣され, 科学技術行政に協力した (平成14年5月1日～11月30日)。宮島敦子研究官は「プ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」に関する研究で東京大学より博士の学位を授与された。また, 平成14年7月1日付けで主任研究官に昇任した。流動研究員としては, 医薬品機構より平成12年度より派遣され, 薬物代謝酵素の遺伝多型についての研究に従事してきた村山典恵博士が上智大学生命科学研究所に就職することとなり, 平成14年9月一杯で退任した。また, 国立精神・神経センター免疫部に在籍していた多田 薫博士はHS流動研究員として平成14年4月1日付けで採用され, 「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」に関する研究に従事している。同様に中国北京大学の何晋徳博士は「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医学研究利用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」の研究のために

1年間の予定でHS財団より派遣され, ヒト肝臓組織の薬物代謝関連酵素の発現の個体差に関する研究を行っていた。しかし, SARSの流行に伴い, 北京大学附属人民医院での医療に従事するため急遽帰国することとなり, 平成15年4月30日付けで退任した。がんセンターに在籍していた久保 崇博士はミレニアムの流動研究員として採用され, 11月1日より薬理部で「遺伝子発現における, エクソン, イントロンSNPの意義」について研究を開始した。

平成14年度においては, 薬理部員の長期海外出張はなかった。国際学会のための短期海外出張としては, 大野部長が国際代替法会議 (8月11日～15日) のため米国ニューオーリンズに出張し, 日本における代替法研究について講演した。また, 分子生物薬剤学国際会議 (1月21日～25日) において我が国の薬物相互作用検討ガイドラインについて講演するため, 米国ホノルルに出張した。国際会議のための出張としては, 大野部長が3月4日～5日にパリのOECD事務局で開催された“Consultation between Members of the Working Group on GLP and ECVAM/ ICCVAM on the need for further guidance on the application of the Principles of GLP to in vitro studies”会議に参画するため, フランスへ出張した。また, 3月17日～18日に同OECD事務局で開催された“Meeting of the validation management group for non-animal testing (VMG non-animal) of the task force on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA)”, 引き続き3月19日～20日に開催されたOECD会議“Drafting working group meeting on the draft GD34 “The development, validation and regulatory acceptance of new and updated test methods in hazard assessment” に参画した。

### 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

手術により摘出された7例のヒト肝臓片から, 肝細胞を調製しCYP3A4酵素活性等を測定した。CYP3A4活性は十分高い値が得られ, 代謝研究への利用が可能となった。また, 各施設における倫理申請内容についてアンケート調査を行った。各施設において要求される倫理申請項目は, 施設の組織構成により申請先に違いが認められたが, 倫理申請項目はほぼ同様であることが判明し, プ

ロトコール修正時の取り扱いに実質的な差があることが判明した(委HS)。

(3) ヒト肝細胞の薬物動態研究における有用性に関する研究

ヒト初代培養肝細胞を用いたCYP1A活性誘導系について詳細な検討を行い、多施設におけるCYP1A誘導能評価のバリデーションのための試験プロトコルを確立した。また、CYP2D6のPoor metabolizer (PM) および Extensive metabolizer由来のヒト凍結肝細胞を用いて、Dextromethorphan代謝に関するバリデーションを行った結果、PM由来の肝細胞を用いることでPMの体内動態を予測することが可能であるとの結果を得た(委HS)。

(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種類の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複数の代謝酵素の寄与度を明確にした(委HS)。

(5) 化学物質の総合的安全性評価手法に関する研究

薬物代謝の反応系に細胞の可溶性分画や血清アルブミンを添加することにより、Km値やKi値が変化することが有ることを示し、蛋白と結合していないフリーの薬物濃度のみからの計算では必ずしもin vivoを予測できない可能性があることを示した(厚移替)。

(6) 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究

日本動物実験代替法学会と協力し、また、臨床医師や毒性学者の協力を得て、3T3細胞を用いneutral red取り込みを指標とする光毒性試験法(3T3-NR法)を詳細に検討した。その結果、この方法は光毒性の有無を判定する方法としては、再現性およびヒトでの結果との対応性が高く、行政試験法として適切であると考えられた。しかし、個々の評点については施設間のばらつきが大きいこと、その原因として不溶性被験物質の溶解方法の差が考えられること、また、3T3-NR法を実際に使用する際の問題点を明らかにした(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

ICHでの検討の基礎として、安全性薬理試験の一環としてのQT延長評価試験の実施について検討した(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

病態難治性疼痛モデルの神経因性疼痛、アロディニアの病態には、脊髄後角ミクログリアでのp38リン酸化が深く関与することを示した(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・行動薬理学的研究慢性神経疼痛モデルでは脊髄

内グリア細胞が活性化されることを明らかにした(文科研)。

(3) 発達期中枢神経系におけるエストロゲンの作用に関する研究

アストロサイトによる神経伝達物質グルタミン酸の取り込みがエストロゲンにより阻害されることを見出した。また、アルファタイプ膜エストロゲン受容体を介した作用であることを明らかにした。(試一般)

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の構造についてNMR解析を行なった(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連結型改変ATP受容体の細胞内分布を観察し、非機能型変異体が細胞膜上に発現していることを確認した。このことから、機能の失活が構造異常によるものと推定された(文科研)。

(3) 原子間力顕微鏡等を利用した受容体タンパク質の研究

原子間力顕微鏡観察の標本となるヒスチジンタグ付き受容体タンパク質を得るためのプラスミドを設計・作製した。

4. 医薬品等のトキシコキネティクスに関する研究

(1) 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究

PrometrynのラットおよびヒトミクロソームおよびCYP発現系を用いた代謝実験においてCYP1Aの他、3A4(ないしは2C)により代謝されることが示された(厚科研)。

(2) 環境汚染化学物質の安全性評価における代謝の役割に関する研究

ラット及びマウスでビフェニルの尿中代謝物2-および4-hydroxybiphenyl sulfateおよび4-および4,4'-dihydroxybiphenyl glucuronideをLC/MS等で確認した。また、農薬として使用されているLinuronはヒト初代培養肝細胞において、ラットと同様にCYP1A誘導作用を示したが、その細胞毒性は、ラットより弱いことが確認された(試一般)。

(3) 環境汚染化学物質の相乗毒性に関する薬物動態学的研究

ラットにおける、2-Mercaptobenzimidazole (MBI)、4-及び5-methyl-2-mercaptobenzimidazole (4-MMBI及び5-MMBI)の代謝について、肝ミクロソームを用いて検討した結果、代謝には、flavin-containing monooxygenase (FMO) および Cytochrome P450分子種が関与していることが示唆された。また、ヒト非凍結

肝細胞において5-MMBIはCYP3A4を誘導し、ラット *in vivo* 実験ではCYP2Bを誘導した結果と異なっていた(試一般)。

## 5 薬剤反応性遺伝子の多型解析に関する研究

### (1) 薬剤反応性遺伝子多型の解析

抗癌剤及び循環器病薬等に関して、薬剤反応性遺伝子多型の解析をした。昨年度中に見出した新規薬剤反応性遺伝子多型と薬剤反応性との関連づけられる多型を見出した(財公研)。

### (2) 多型性薬物代謝酵素の多型解析

フッ化ピリミジン系抗癌プロドラッグの主要代謝活性化酵素遺伝子を明確にし、その多型の判定法の確立を行った(財公研)。

## 6. MFタンパク質科学による創薬研究

### 1) 脳卒中発症後の神経機能障害防御に関する基礎研究

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、神経系モデル細胞PC12細胞を用いて、特にRARおよびRXRに的を絞り検討した。RAR及びRXRを刺激する9-cisレチノイン酸がチャンネル型ATP受容体P2X2mRNA、受容体蛋白質を増加させ、このP2X2受容体チャンネルを介する、内向き電流、カルシウム流入、さらにこのカルシウム依存的神経伝達物質放出を増大させることを明らかとした(財公研)。

## 7. 調査に関する業務

### (1) 香料の安全性評価に関する研究

香料の安全性評価における米国の方式について調査し、その妥当性について厚生労働省の担当部局にコメントした。

### (2) 安全性薬理へのGLP適用に関する研究

医薬品機構の担当部局とともに、安全性薬理試験実施機関へ実地調査し、GLP対応の安全性薬理試験を調査するためのチェックリストを作成した。

## 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、畝山智香子主任研究官が平成15年4月1日付けで安全情報部へ異動となった。一方、平成15年4月1日付けで曹永晩研究員が着任した。また、リサーチ

レジデントとして李京烈博士が平成14年9月16日より日本学術振興会外国人特別研究員として、瀧上周博士が平成14年12月16日よりトキシコゲノミクス・プロジェクトの公定書協会・流動研究員として、神吉けい太博士が平成15年1月1日より日本学術振興会特別研究員として着任した。さらに賃金職員として森川朋美が平成14年4月1日付けで、前田真智子が平成15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、スイス・ジュネーブで開催された「第59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14年6月4日～6月13日)。また、広瀬雅雄部長、渋谷淳第二室長が、中国・北京で開催された国際協力事業団の協力事業である中国医薬品安全性評価管理センター・プロジェクトの「病理組織評価および発がん性評価に関するシンポジウム」のシンポジストとして講演を行った(平成14年6月9日～6月15日)。広瀬雅雄部長は、スイス・ジュネーブで開催されたWHO/FAO専門家会合「食品中アクリルアミドについて」に出席し、討議を行った(平成14年6月25日～27日)。さらに、西川秋佳第一室長及び渋谷淳第二室長が米国・ソルトレークシティで開催された第42回米国トキシコロジー学会に出席し、発表及び討議を行った(平成15年3月9日～3月13日)。

## 研究業績

### 1. ラットの自然発生肝病変に関する研究

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内局在を免疫電顕的に検索し、HSP60は肝炎発症直前よりミトコンドリアに強発現することを明らかにした。

### 2. 食品中生成物質による臓器障害の抑制に関する研究(厚生科学研究費補助金)

アクリルアミドによりラットに誘発される精巣ないし神経障害に対する抗酸化物質の抑制効果を検討し、PEITCあるいはHTHQが部分的に障害を抑制することを明らかにした。

### 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、硫酸アンモニウムにはがん原性のないことが明らかとなり、トウガラシ色素・アカネ色素の慢性毒性試験、塩化マグネシウムのがん原性については実験を終了し最終評価中である。また、レバミゾールのがん原性試験を開始し、N-アセチルグルコサミンの試験は継続中である。

2) ラット・90日間反復投与毒性試験ではデユナリエラカロテンの試験が終了し、最終評価した。モリン・カテキン・ヒメマツタケ抽出物の90日試験については最終評価中である。

3) ヒノキチオールの心臓毒性を解析するため、ラットの16週間投与実験を行ったが、明らかな毒性はみられなかった。

4. 食品中化学物質の相互作用等に関する調査研究（厚生科学研究費補助金）

1) 亜硝酸とアスコルビン酸をラットに併用投与した結果、前胃及び腺胃上皮における8-OHdGの有意な増加がみられたが、エリソルビン酸ナトリウムあるいはヒドロキノンとの併用投与では顕著な変化はみられなかった。

2) 亜硝酸とアスコルビン酸などの抗酸化剤との反応によるNOなどのラジカル産生をESRにより検出した。

3) DHPNとアミトロールによるラット甲状腺発癌に対してインドメタシンによる小腸障害時には抑制的に働くことが示された。

4) ラットDHPN甲状腺発癌に対してパラアミノ安息香酸は血中TSH上昇を介して促進的に働くことを明らかにした。

5) DENとDMHによる肝・大腸発癌モデルに対してIQと亜硝酸を複合投与することにより、大腸発癌が促進された。

6) 胃酸分泌低下+小腸障害モデルラットにおいて、Bt蛋白質の反復投与による明らかな影響は認められなかった。

5. 内分泌かく乱物質の人体影響に関する調査研究（厚生労働省がん助成金，厚生科学研究費補助金）

1) ラット乳腺腫瘍モデルに対する5FU，タモキシフェン，ニメスリドなど各種化学物質の1週間処置により，細胞増殖抑制がみられたが，アポトーシスの関与は認められなかった。

2) 合成エストロジェンを授乳期・乳幼児期に投与したラットでは，DHPN甲状腺発癌に対する影響はみられなかったが，DMBA乳腺発癌の促進されることが示された。

3) エストラジオールを28日間反復投与したラット肝の網羅的遺伝子解析を行った結果，雌で用量依存的に発現上昇する遺伝子が多数得られ，エストロジェン作用の検出指標になり得ることが示された。

6. 化学物質による内分泌中枢かく乱作用の評価に関する研究（厚生科学研究費補助金）

1) フタル酸エステル類による脳の性分化障害を規定する遺伝子を網羅的に探索するため，エチニルエストラジオール，DEHPの周産期曝露実験とエストラジオール，フルタミドの新生児ラットでの単回投与実験を終了するとともに，メタカーン固定法を利用してパラフィン包埋した肝切片を用いてマイクロアレイ解析のバリデーションを行った。

2) メトキシクロール，ジイソノニルフタレート，ジェニスタインの周産期曝露例での，脳の性分化臨界時期に

おける視床下部性的二型核における，エストロジェン応答性遺伝子の発現解析を行った結果，メトキシクロール，ジイソノニルフタレートの曝露を受けた雄でGAT-1 mRNAの発現低下を認めた。エチニルエストラジオール曝露を受けた雄ではプロジェステロン受容体mRNAの発現低下を認めた。

3) 植物性エストロジェン非含有の基礎飼料にジェニスタインを添加し，エチニルエストラジオールの影響に対する修飾作用を検討した結果，明らかな修飾作用は認められなかった。

7. 発癌メカニズム解明のための新手法に関する研究

肝薬物代謝第Ⅱ相酵素群の転写因子であるNrf2を欠損したマウスにペンタクロロフェノールを投与した結果，毒性発現強度はホモ>ヘテロ>野生型となり，ペンタクロロフェノールの解毒機構に第Ⅱ相酵素群の関与が示された。

8. 動物による発がん性評価のための新手法確立とその意義に関する研究（文部科学省科学研究費）

各種非遺伝子障害性肝発がん物質の28日間，1及び2年間投与例での肝臓における網羅的遺伝子発現解析を行った結果，各発がん物質に共通した発現挙動を示す遺伝子群は殆ど得られず，投与1年目で発現挙動の変動を示す遺伝子が最も多いことを明らかにした。

9. 非可逆的な細胞増殖過程を規定する細胞内因子の発現解析研究（厚生労働省がん助成金）

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ンによる甲状腺発がんモデルを検索した結果，β-カテニンの異常局在が腺癌の浸潤性増殖に関与することを明らかにした。

10. 酸化的ストレスの発癌過程に及ぼす影響に関する研究

臭素酸カリウムをラットに4週間投与した結果，発がん用量以上で腎DNA中の8-OHdGが増加したことから，腎発がん過程への酸化的DNA損傷の関与が示された。

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) 独自に開発したハムスター中期睪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た結果，既知の睪発がん修飾因子を効率よく検出できることを明らかにした。

2) ラットに大腸発癌物質であるDMHと大腸炎誘発剤であるDSSを併用投与することにより，短期間で腫瘍性病変が誘発されることを明らかにした。

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）

gpt deltaラットにおいて，臭素酸カリウムによる腎での変異原スペクトラムは，通常の酸化的DNA障害とは

異なる可能性が示唆された。

### 13. 導入遺伝子を生体内探索子とする内的発癌分子機構の解明 (文部科学省科学研究費)

レポーター遺伝子導入ラットを用いて、種々の肝発がん物質の変異原性と発がん性を比較する実験を開始した。

### 14. 喫煙による発癌の修飾に関する実験的研究 (喫煙財団委託研究費)

1) ニコチンをラットに投与し、肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を検討した結果、CYP1A2が増加し、複数のヘテロサイクリックアミンの変異原性を上昇させることを明らかにした。

2) タバコ煙曝露によりハムスター肝CYP2A8 (ヒトCYP2A6に相当) が顕著に増加することを明らかにした。

3) 肺発癌物質短期検出系rasH2/BHTモデルを用いることにより、ベンツピレンの肺発がん性を9週間で検出することを可能にした。

### 15. 食品の発癌抑制に関する研究 (厚生科学研究費補助金)

1) 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た結果、明らかな乳腺発がん修飾作用はみられなかった。

2) 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リ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た。

3) ラットDMBA乳腺発癌モデルを用いて、リグナンの一種であるアークチンの及ぼす影響を検討した結果、明らかな発癌修飾作用は認められなかった。

### 16. 食品による膀胱発癌に関する研究

1) 高用量の遺伝毒性膀胱発癌物質を与えた後、低用量の同発癌物質およびBITCを同時投与すると、膀胱発癌が強く促進されることを明らかにした。

2) 3種の遺伝毒性膀胱発癌物質とBITCの短期間同時投与により、膀胱上皮の細胞増殖活性が亢進することを明らかにした。

### 17. 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。

### 18. 血管新生抑制物質のin vitro安全性評価予測システムの構築に関する研究 (厚生科学研究費補助金)

血管新生抑制物質のin vitro安全性評価予測システムを構築する目的で、腫瘍細胞と初代培養血管内皮細胞 (正常ヒト臍帯静脈由来のHUVECs) の共培養系を確立し、共培養することにより血管内皮細胞の増殖が加速されることを見出した。

## 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 (JICA) に協力し、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14年6月には前年度に日本で開催が予定されながら、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を延期した「遺伝毒性試験に関する国際ワークショップ」が英国のプリモスで開催され、当部からは林部長以下本間室長、能美室長、鈴木主任研究官 (現遺伝子細胞医薬部、第三室長) が出席し、それぞれの作業グループでの討議に参加した。

食品添加物である食用赤色2号、コウジ酸、パツリン等の遺伝毒性が問題となり、生体を用いる単細胞ゲル電気泳動法 (コメット法) の陽性の解釈等が議論を呼び、化学物質特に食品関連等の遺伝毒性をどのように評価し、解釈するかが重大関心事となった。これを受け、日本環境変異原学会の中に化学物質の遺伝毒性を考える戦略に関する臨時委員会を林部長を中心に組織し、検討を開始した。

平成10年9月より開始されたHFSP (Human Frontier Science Program) 国際共同研究の過程で見いだされた新しいDNAポリメラーゼ (ファミリーY) の機能に関する研究を進め、これがDNA上の損傷のみならず酸化されたヌクレオチドプールに由来する変異誘発にも関わることを見出した。この成果は能美室長により第1回日米DNA修復会議 (H14, 10) で発表され、EMBO reports誌に発表された。また原子力基盤クロスオーバー研究・放射線障害修復交流委員会主催の「放射線リスク研究の革新的技術に関する国際シンポジウム」 (H15, 3) においても発表された。遺伝毒性のリスク評価を行う際に障害となる動物種差の問題を克服するため、gpt deltaトランスジェニックマウスに組み込んだものと同じのレポーター遺伝子を導入した変異検出用トランスジェニックラットを、当部第二室と明治製菓安全性研究所が共同で開発した。この成果は日本学術会議トキシコロジー研連シンポジウム (H14, 12) において発表された。

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、いくつかの培養細胞株がクロスコンタミネーションを起こしていたという事実が、JCRB細胞バンク、理研細胞バンク、ATCC（米国）DSMZ（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STR-PCR法を使った解析により、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、一見相反するように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、化学物質のがん原性を*in vitro*で評価する細胞形質転換法のOECD毒性試験法ガイドライン化に向けた検討を検討会を組織して行った。また、化審法の改正作業に伴い、新規化学物質、既存化学物質の遺伝毒性関連事項ならびに定量的構造活性相関（QSAR）に関する事項の検討に協力した。

人事面では、平成14年4月1日付けで鈴木孝昌主任研究官が遺伝子細胞医薬部第三室長に配置換えとなった。平成14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員として迎え、化学物質の遺伝毒性に関する構造活性相関を検討するためのデータ入力等を担当していただいた。平成14年4月より、麻見安雄博士を第2室の流動研究員として迎えた。

短期海外出張としては、林部長、本間室長および能美室長は4月27日から5月2日まで米国のアンカレッジで開催された第33回米国環境変異原学会に出席した。林部長は6月3日から6月7日までスイスバーゼルで開催されたChemcon 2002に出席し、日本の化審法における遺伝毒性評価法に関する講演を行った。細胞バンクの業務に関連の深い米国のオーランドで開催されたインビトロバイオロジー学会に増井主任官が6月25日から29日まで出席し、ATCC、DSM等との情報交換をおこなった。田辺主任研究官は、6月25日から6月30日まで米国フロリダ州、ボークランドで開催されたWorld Congress for In

Vitro Biology 2002に出席し、発表を行った。林部長、本間室長および能美室長は6月29日から6月30日まで英国のプリモスで開催された第3回遺伝毒性試験に関する国際ワークショップに参加し、組織員、副座長としてワークショップを成功に導いた。また、本間室長は引き続き開催された第25回英国環境変異原学会に出席し、発表を行った。能美室長は第25回英国環境変異原学会に出席したのち、王立癌研究財団クレアホール研究所を訪問し、原子力基盤クロスオーバー研究の一環として酸化的DNA損傷と自然突然変異に関し打ち合わせを行った。能美室長とGruz研究員は、9月22日から26日までイタリアのナポリで開かれた第4回極限環境微生物国際会議に出席し、発表を行うと共に、国立生化学蛋白質研究所（ナポリ）を訪問しヒューマンサイエンス国際共同研究事業に関する共同研究の打ち合わせを行った。増井主任研究官は11月24日から11月30日まで英国ロンドンに出張し、英国におけるゲノム研究と医療・薬物副作用情報の収集のための倫理的・法的・社会的枠組みに関する調査研究を行った。引き続き、増井主任研究官は12月16日から12月21日まで英国ロンドンに出張し、英国におけるバイオバンクとゲノムコホート研究のための倫理的・法的・社会的枠組みに関する調査研究を行った。林部長は12月2日から4日まで中国深川で開催された毒性と薬理に関する日中合同国際会議に参加し、環境変異原に関するワークショップの座長をすると共に講演を行った。本間室長は平成15年1月19日から1月25日まで中国北京に出張し、「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」における運営指導（中間調査）を行った。本間室長は平成15年2月4日から3月9日まで米国ジェファーソンに出張し、萌芽の先端医療技術推進研究事業トキシコゲノミクス分野における外国への日本人研究者派遣事業として、DNAマイクロアレイ技術を用いた培養細胞における遺伝子発現解析技術の確立に関する研究を行った。林部長は2月6日から2月16日までインドに出張し、ラクノーで開催されたコメント試験に関する国際ワークショップで講演すると共に、引き続きコルカタで開催された第28回インド環境変異原学会に参加、講演を行った。増村研究員は2月20日から2月27日まで米国サンタフェで開催されたキーストンシンポジウムに参加し、発表を行った。林部長は3月30日から4月4日までイタリアミラノに出張し、OECD主催の第一回（定量的）構造活性相関に関する臨時専門家会議に出席した。

## 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（ブラジルカンゾウ抽出物）について哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を行った。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（医薬局

食品保健部基準課)。

## 2. 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IVを発現するサルモネラ株を樹立し、ベンツピレンに対する感度が従来からの株よりも優れていることを明らかにした (HS財団受託研究費)。

## 3. 個体レベルで見る遺伝子再編成と発がんに関する研究

p53を欠損した*gpt delta*トランスジェニックマウスにUVB照射を行った (厚生労働省がん研究助成金)。

## 4. ヒトがん発生に係わる環境要因及び感受性要因に関する研究

7種類の発がん性ニトロソ化合物についてサルモネラYG7108株に対する変異原性を検索した (厚生労働省がん研究助成金)。

## 5. *In vivo*での突然変異と発がんの関連に関する研究

臭素酸カリウムによって*gpt delta*ラットの腎臓に誘発される点突然変異のスペクトルを解析した (厚生労働省がん研究助成金)。

## 6. 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。

## 7. 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 (*Muta<sup>TM</sup>Mouse*) を用いて、ニトロソエタノールアミン、フラゾリド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)。

## 8. 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TK6細胞を用いて遺伝子発現解析における細胞同調の効果を、 $\gamma$ 線をモデルとして検討した。細胞の同調により誘発、もしくは抑制される遺伝子と放射線による細胞毒性、遺伝毒性誘発性の相関を明らかにした。

## 9. 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、基礎的な検討を行うと共に、これまでの共同研究によって得られたデータを論文として公表するための作業に着手した。

## 10. 遺伝子欠損マウスを用いた大気からの変異原性物質暴露の鋭敏な検出と影響評価

*gpt delta*マウスにディーゼル排ガスを暴露し、肺と肝臓における遺伝子突然変異を検出した (文部科学省科学

研究費)。

## 11. ヒトリンパ球細胞を基礎とした遺伝毒性試験系の構築

日本環境変異原学会MMS研究会の共同研究の一環としている研究の継続であり、今年度は、ヒトS9を導入することにより、ヒト型薬物代謝能を有し、遺伝子突然変異、染色体異常誘発性、DNA損傷性を総合的に評価可能な試験系を構築し、いくつかの代表的な変異原物質を用いたバリデーションスタディを行った。

## 12. *In vitro*小核試験の確立と結果の評価に関する研究

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のみならず、異数性誘発に関する検出系としての関心が高まっている。本年度は、化学物質の異数性の誘発に関する検討を行い、FISH法も含めた複数の試験法について比較検討を行った。その結果、*in vitro*と*in vivo*でかなりの差が認められ、染色体の数的異常誘発性を的確に検出できる試験系の確立が必要であることが判明した (厚生労働科学研究費)。

## 13. 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

ヒトDinBホモログであるDNAポリメラーゼ $\kappa$ 遺伝子のクローニングを行い、発現系の構築を行った (原子力国立機関原子力試験研究費、文部科学省)。

## 14. 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

鋳型鎖上のヒポキサンチン部位で好熱古細菌のBファミリーDNAポリメラーゼが複製を停止することを明らかにした (HS財団受託研究費 [国際研究グラント事業])。

## 14. ほ乳類細胞におけるDNA 2本鎖切断修復に関する研究

DNAの2本鎖切断の修復機構 (組換え型、再結合型) を解析し、それぞれの機構の寄与率を明らかにした。DNAの2本鎖切断によってもたらされる最終的なゲノム変化を塩基配列レベル、および染色体レベルで解析した。

## 15. 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

前年度に引き続き、当研究室にて得られた*Muta<sup>TM</sup>Mouse*および*Big Blue<sup>®</sup>*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った。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。

## 16. 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14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、18種について他の細胞と同一のものであるという結果が確定した。これ以外の細胞株はクロスコンタミネーションが無く安心して使える細胞であることを確定した。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。

STR-PCR実験は昨年度までに当該細胞バンクで保有しているヒト細胞株のうちおよそ400株について終了した。これらの結果はクロスコンタミネーションの排除に有効に利用できることからそのデータベース化を進めるため、細胞管理プログラムの改修を実施した。これを通じて、該当データを一般の研究者が利用できるように公開するシステムを確立した。

新規受入細胞はヒト由来細胞を中心に35種。品質管理の実施は65種（厚生労働科学研究費補助金事業）。

## 17. 培養細胞研究資源の整備に関する研究（基盤整備）

40-50種の培養細胞を新規に登録する。その際、マイコプラズマの汚染、DVDVによる汚染の除去を実施した。また、ヒト培養細胞については、STR-PCR法を利用して相互の汚染（クロスカルチャーコンタミネーション）の排除を検討し、培養細胞データベースの維持管理を実施した。また、ヒト培養細胞を扱う上での倫理問題を検討した。

## 18. ヒト組織の創業研究資源化に関する研究

ヒト組織を厚生労働省細胞バンク（JCRB）へ提供いただく際に、提供者の理解と意思決定を支援して、適切なインフォームド・コンセントが行なわれる必要がある。そこで、支援のための説明補助ビデオ、説明文書、説明項目チェックリスト、意思表示書を作成した。

## 総合評価研究室

室 長 江 馬 眞

## 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。

江馬室長は大阪支所生物試験部より配置換えとして平成14年7月1日付けで就任した。これに伴い平成14年4月1日から当室長との併任となっていた長谷川隆一医薬安全科学部長の併任が解除された。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省生活化学安全対策室化学物質専門官との併任として新規化学物質および既存化学物質の安全性試験結果の予備評価に従事している。

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に関する研究を行っている。

海外出張としてはOECD関連で、江馬室長が「第15回高生産量化学物質初期評価会議」（平成14年10月、米国）に出席した。また、江馬室長は「JICA：医薬品安全性評価管理センター日中友好プロジェクト運営指導（中間報告）調査団」（平成15年1月、中国）として北京に、「第60回食品添加物に関するFAO及びWHO合同専門家会議」（平成15年2月スイス）および「第42回米国トキシコロジー学会」（平成15年3月、米国）に出張した。

広瀬主任研究官は、「第22回ハロゲン化有機環境汚染物質とPOPSに関する国際シンポジウムDIOXIN 2002」（平成14年8月、スペイン）、「第3回IUCLIDユーザーグループ専門家会議」（平成14年9月、フランス）および「第10回国際簡潔評価文書（CICAD）最終レビュー会議」（平成14年9月、イギリス）に出席した。

化審法GLPの査察には、当室から2カ所、延べ2名が参加した。

## 業務業績

## 1. OECD高生産量化学物質の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、初期評価文書を作成し、2002年10月に開催された第15回初期評価会議に提出・討議し、DiisopropylbenzeneおよびCyclohexeneは健康影響と環境部分ともに合意された。日本産業界が作成した評価文書について日本政府はその原案作成に協力すると共に提出前の評価および評価会議での支援を行った。その結果、提出された2-Methyl-2-propenamide, m-Cresol, 6-tert-butyl-, Triacetone, Hydrochloric acid, Calcium chlorideおよび1,3-Isobenzofurandione, tetrahydromethylはいずれも合意された。また、日本政府はドイツ企業が作成したC.I. Pigment Yellow 53およびC.I. Pigment Brown 24の原案に日本政府の試験データを入れて修正・完成させた評価文書についても合意された。第16回初期評価会議は2003年5月末に開催されることになっており、Hexadecanoic acid, 2-sulfo-, 1-methylester, sodium saltおよびDisodium succinateの2

物質について文書を作成し、1,1,2-Trichloroethaneおよびp-tert-Butylphenolについては追加データを入れて文書を修正し、提出した。また、産業界の作成した4-Aminotoluene-3-sulfonic acid, N-tert-butylbenzothiazole-2-sulphenamide, 2-Dimethylaminoethylacrylate, o-Acetoacetotoluidideおよびm-Toluic acidに関する文書の原案作成、評価に協力支援を行った。

## 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14年度は計131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14年度は13物質についての32試験の試験計画書確認作業、16物質についての35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、化学物質調査会及び残留農薬安全性評価委員会、医薬品GLP評価委員会、食品衛生分科会 添加物部会食品添加物調査会、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、生活環境審議会水道部会水道管理専門委員会および化学物質安全性評価検討会[環境省]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35試験データおよび新規化学物質の131試験データをデータベースに入力し、今後、QSAR解析用にデータベースの構造の変更作業を行った。

### 2. 化学物質の乳幼児における毒性発現に関する研究

出生直後の動物に対し適切かつ可能な化学物質の投与方法や投与期間の設定等の検討を行い、新生児試験法の確定を行った。その結果に基づいて、14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、および同じ化学物質を同系の6週齢の動物の28日間投与試験を受託試験機関に依頼し、両者の試験結果を比較しながらピアレビューを行った。

### 3. ラット $\alpha$ 2U-グロブリンの分析手法に関する研究

雄ラット尿から $\alpha$ 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を開発中であるが、14年度はさらなる汎用性を確認するため、腎組織標本のプロテアーゼ処理の有無について検討し、プロテアーゼ処理によりコントラスト増強効果で視認性が上がることが確認された。

### 4. 内分泌かく乱化学物質の毒性評価に関する研究

フタル酸/アジピン酸エステル類の生殖期障害に関する調査研究において、最新のエストロゲン様作用、生殖発生毒性への影響や毒性発現メカニズムに関する文献調査および整理をおこなった[厚生科学研究分担研究]。また、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おいて、ビスフェノールAを取り上げ、in vivoとin vitroの内分泌かく乱作用を検証した報告やBPAの暴露量および体内動態に関する約80の文献情報を収集し、低用量影響に関する評価を行った。この成果は、日本食品化学学会誌に投稿・受理された。[特別研究分担研究]

### 5. 水道水に係わる毒性情報評価に関する研究

平成14年度は、WHO飲料水ガイドラインの改訂作業に伴い我が国の水道水質基準も改訂することになっているが、その作業過程において、基準項目等を設定する化学物質の選定と、それらの基準値等設定のための毒性情報収集及び評価を行い、基準値や目標値等の提案を行った。また、メチル-tert-ブチルエーテルの毒性情報について取りまとめを行い、水環境学会誌に投稿・掲載された。[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

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において、14年8月にスペインで行われたダイオキシンシンポジウム2003に出席し、海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集した[厚生科学研究分担研究]。内因性リガンドの存在を前庭とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究においては、雄生ラットの血中、尿中及び主要器官のインディルピンの分析と解析を行うための動物実験計画を策定した。[厚生科学研究主任研究]

また、平成9年に設定されたダイオキシン類に対するTDIの再評価を行うにあたり、厚生労働省内にダイオキ

シンの健康影響評価に関するワーキンググループが設置され、当室では主に最近の海外動向や生殖発生毒性に関する情報提供を行うと共に、その報告書の取りまとめに協力した。

## 医薬品医療機器審査センター

センター長 豊 島 聰

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は発足以来、国立医薬品食品衛生研究所各部や厚生労働省、医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構など各方面のご支援をいただき、平成14年度の審査センター業務はおおむね順調に推移した。

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い（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し、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たい。

なお、平成14年度の人事関係については、8月30日付異動により橋爪章審査第三部長が向出し、後任に辻村信正審査第三部長が就任され、定員については、増員2名・定員削減1名で71名となり、職員の資質向上のため4月中旬から下旬にかけて基礎研修を行った。

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
審査第一部長	平山 佳伸
審査第二部長	森 和彦
審査第三部長	辻村 信正
(前審査第三部長	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労働省への送付、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、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、泌尿生殖器官用薬等を、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14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、審査結果を厚生労働省に送付した品目数は、医薬品、医薬部外品及び医療用具の合計で11,600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3,038件の届出があった。ま

た、治験中の副作用報告として22,884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30カ所に対してGCP査察を実施した。

医薬品再審査については156品目、医薬品再評価については566品目の処理を行った。

## 大阪支所

支所長 外海 泰 秀  
前支所長 岡田 敏 史

### 概要

平成14年度は、大阪支所の発展的改組による「(独)医薬基盤研究所(仮称)」の創設に向けた動きが具体化して一部動き出し、建物の工事は着々と進んで来ているものの、中身について再度議論の戦わされた年でもあった。

こうした動きを踏まえ、平成16年3月末をもって大阪支所法円坂庁舎を完全に閉庁とするための諸作業を、躊躇なく進めた。具体的には医薬標準品の日本公定書協会への移管を進めたこと、色素標準品の移管準備を行ったこと、食用タール色素製品検査の委譲先を確定し、技術移転計画を作成するなど移管の具体化を進めたこと。また、図書の整理、重要物品である機器類の廃棄を極力行ったことなどがある。

試験検査業務については、食用タール色素の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通りに行われたが、一方で、平成15年度の委譲計画を定めた。

平成14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、次の通りである：食用タール色素の製品検査157件、一斉取締り試験19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43品目につき、計5,222個を製造した。

平成14年度の厚生労働科学研究費補助金による研究7課題、文部科学省科学研究費補助金による研究1課題を実施したほか、厚生労働省特別研究1課題、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通りである。

人事面において平成15年3月31日付けでの退職者は、

岡田敏史支所長、石綿 肇生物試験部長、中村優美子食品試験部主任研究官、中川ゆかり生物試験部主任研究官であり、4月1日付けでの本所への配置換え者は、辻澄子食品試験部室長(食品試験部併任)、石光 進食品試験部室長、原園 景生物試験部技官、松本竜希庶務課事務官、また、近畿厚生局への出向は津村ゆかり食品試験部主任研究官であった。また、外海泰秀食品試験部長が大阪支所長(食品試験部長及び生物試験部長事務取扱)に昇任し、漆谷徹郎氏が生物試験部第一室長(毒性部併任)に採用され、斎藤博幸薬品試験部室長は薬品部併任となった。

## 薬品試験部

部長 谷本 剛

### 概要

平成14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、日本薬局方の質的向上及び信頼性確保に関する研究、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、標準品の品質標準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、一斉取締り試験などの業務を行った。日本薬局方における標準品の充実に伴い標準品の需要は年々増加しているが、標準品製造業務が日本公定書協会に順次移管されていることから、14年度は約6,600個が交付された。BSE問題に対応した新規標準品の確立が必要となり、そのための基礎的検討を開始した。遺伝子組換え医薬品であるヒトインスリン製剤の一斉取締り試験を実施したが、収去検体すべてが規格に適合していた。また、来年度に予定されている大阪支所の閉鎖に伴う業務の整理・移管のうち、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となり、14年度は14品目を移管した。

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、国際厚生事業団の研修事業に協力した。

人事面では、平成14年10月1日付けで斎藤博幸第一室長が第二室長に配置換えとなり、谷本 剛の第二室長併任が解除された。

短期海外出張では、谷本剛が外国薬局方調査のためにフランス及び米国に出張した(平成14年12月8日～12

月18日)。

## 業務成績

### 1. 一斉取締試験

平成14年度の一斉取締試験は、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。国家検定が廃止され、2年間の国家検査期間を終了して1年を経た医薬品として、遺伝子組換えヒトインスリン製剤19検体(注射剤)を収去し、定量試験及び純度試験を行った。いずれの試験においてもすべての検体が規格に適合した。

### 2. 標準品製造

医薬品試験用標準品38品目、合計4902個の製造を行い、8品目のロット更新を行った。この内、センナ等の品質評価に用いるセンノシドA標準品及びセンノシドB標準品の2品目は日局14第一追補公布後の平成15年1月より交付を開始した。

### 3. 国際協力

国際協力事業団の第13回必須医薬品製造管理研修(平成14年10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。国際協力事業団のフィリピン薬局方制定プロジェクトに関連してフィリピン薬局方標準品の製造に関する研修のために、平成15年3月から6ヶ月間の予定で研修生1名を受け入れた。ICH舞浜会議のPDG会議にJP委員として谷本が出席した。

### 4. その他

薬事・食品衛生審議会の各種調査会において、日本薬局方の改正作業(医薬安全局審査管理課)や医薬品の承認審査(審査センター)に協力した。また、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、日局14第一追補に反映させた。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 動物組織を用いない医薬品品質試験法の確立に関する研究：BSE問題に関連して、ウシの脳及び全血を試薬として用いるヘパリン製剤の品質試験法の代替法として抗Xa活性測定法を基本原理とした生化学的試験法を確立した。

(2) 医薬品の最新品質管理技法の導入及び薬事法改正への対応等による日本薬局方の質的向上並びに信頼性確保に関する研究

(2)-1 薬事法改正を踏まえた日局の質的向上に関する研究：改正薬事法で承認内容の軽微な変更は届出や事後報告でよいとされ、日局等の公的基準書の作成にもこの法改正の趣旨を反映させていくために、製造施設、製造方法、成分及び分量又は本質、規格及び試験方法のそれぞれについて変更事項の届出や事後報告の範囲を検討し、変更重度区分と各区分における変更事項の試案を作成した。(厚生労働科学研究費)

(2)-2 日本薬局方作成基本方針を踏まえた日局の質的向上に関する研究：①収載品目の充実に関しては、わが国で使用されている医薬品の日局、局外規、USP及びEPへの収載状況を分析し、それに基づいて保健医療上重要な医薬品や繁用されている医薬品の収載品目選定指針(案)を作成した。また、これらの重要医薬品を日局に全面的に収載していくための新たな審議システムを構築した。②標準品の整備・充実に関しては、日本における標準品の整備状況を欧米のそれと比較検討した結果、日本の状況は欧米に比べて著しく立ち後れていることが明確となり、標準品整備体制の強化の必要性を厚生労働省に提言した。(厚生労働科学研究費)

(2)-3 先進諸外国における薬局方の作成等に関する調査研究：日局の質的向上に資する目的で、国際的な薬局方であるUSP及びEPの組織、運営形態、局方作成システムなどについて詳細に調査し、外国薬局方作成での長所を日局作成に反映させるための提言を行った。(厚生労働科学研究費)

### 2. 創薬基盤技術の開発に関する生物化学的研究

#### (1) 南米産薬用植物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

リーシュマニア治療薬の開発を目的として南米産薬用植物*Elephantopus mollis*より単離したセスキテルペンElephantopinの抗リーシュマニア活性は、構造活性相関試験などから活性化メチレン基が細胞内還元性物質と反応することにより引き起こされると考えられた。またDNAの分断化によるものと思われるリーシュマニア核内の変性が観察され、これらのことから細胞内還元性物質の枯渇によるアポトーシスであることが推測された。

#### (2) アポリポタンパク質Eの脂質及び細胞受容体結合の分子機構

血中や脳内でのコレステロール転送を担い、その遺伝子多型がアルツハイマー病発症に深く関わることが知られているアポEの脂質結合の分子論について、大腸菌発現系によって得た3種類のアポE分子多型、アポE2、E3、E4を用いて検討した。超遠心分離法、超高感度マイクロカロリメータなどによる測定によって、アポE4

が他の多型に比べて脂質親和性が高いことを見出した。さらにアポE4変異体を用いた検討から、アポE4のC末ドメインの構造が他の多型とは異なることが明らかとなり、アポE4による脂質代謝異常の分子機構に示唆を与えた(文部省科学研究費)。

### 3. 標準品に関する研究

脳下垂体後葉標準品はウシ脳を原料として製造しているが、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、それぞれの原料を入手し、力価の値付けのための国内共同検定を行った。

## 食品試験部

部長 外海 泰 秀

### 概要

昨年に引き続きタール色素及びレーキの製品検査、輸入食品検査を行うと共に、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、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15年4月1日付けで石光 進第一室長、辻 澄子第二室長が本所安全情報部へ配置換えとなり、辻室長は食品試験部併任となった。津村ゆかり主任研究官は近畿厚生局麻薬取締部へ出向し、中村優美子主任研究官は退職して、高槻市職員となった。また、平成15年3月から古川みづき技術補助員が採用された。

海外出張では外海泰秀部長が平成14年8月4日から9日まで第10回IUPAC農薬化学国際会議(スイス、バーゼル市)に出席し、発表した。

### 業務成績

#### 1. 製品検査

タール色素及びタール色素レーキ157検体(平成14年4月1日～平成15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

カラムスイッチングイオンクロマトグラフィーを用いて、食用タール色素アルミニウムレーキ(色素レーキ)中の水溶性塩化物及び水溶性硫酸塩測定法を検討した。溶離液、カラム温度設定等の条件を改良し、再現性の良い測定条件を作成した。この方法を用いて、平成10～

13年度の色素レーキ製品検査依頼検体合計82検体中の水溶性塩化物及び水溶性硫酸塩含有量を測定した。その含量が第6版食品添加物公定書(食添Ⅵ)規格値の上限である2.0%(両者の合計値)を越えた検体は4検体あった。しかし、第7版食品添加物公定書(食添Ⅶ)ではこの規格が削除されているため違反とはならず、国際規格も現存するため今後検討の余地を残していることが判明した。

##### (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)の①試験溶液調製法に安定剤としてアスコルビン酸(AsA)を加える方法を検討し、②LC/MSで昨年度の5種フェノール系酸化防止剤全てを定量・確認する方法を再検討した。更に、③TBHQ以外の未指定フェノール系酸化防止剤であるトリヒドロキシブチルフェノール(THBP)、ヒドロキシメチルブチルフェノール(HMBP)、没食子酸オクチル(OG)及び没食子酸ラウリル(DG)について、改良試験溶液調製法の適用並びにLC/MS及びGC/MSによる確認法を検討した。

試験溶液調製法の検討では抽出用混合溶媒に0.1% AsAを添加することが有効であることを明らかにし、新たに追加した4種の酸化防止剤についても適用できることを確認した。LC/MS(ESI)ではOG及びDGの[M-H]<sup>-</sup>が観察でき、GC/MS(EI)ではTHBP及びHMBPのフラグメントイオンが観察できた。

##### (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

タンナーゼの酵素活性測定の方法は、タンニン酸にタンナーゼを作用させ310 nmの波長での吸光度の減少によるものであるが、この方法は特異性が必ずしも高いとは言えない。そこで、より精度の高い方法としてタンニン酸にタンナーゼを作用させて生じる没食子酸をHPLCで測定する方法について検討を加えた。この方法での至適pHは5.0であり、pHが高くなると活性が減少した。至適温度は30℃であったが、45℃まで安定であった。タンニン酸の加水分解はタンナーゼ添加のごく短い時間から起こるが反応時間2時間で生ずる没食子酸量が最大となり、タンナーゼが充分存在する環境下では基質(タンニン酸)と生成物(没食子酸)との間に広い範囲で直線関係が成立した。

#### 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

除草剤チフェンスルフロメチル及びピラゾスルフロニエチルの作物残留分析法を作成した。両農薬はスルホニルウレア系でクロルスルフロメチルと同系統なので、4者の同時分析法を作成した。本法では試料からの抽出液をシリカゲル、フロリジル及び

SAXミニカラムで精製後、UV検出器付きHPLCで測定する方法とした。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) 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究

LC/MSは、目的化合物の特異的な $m/z$ をモニターすることにより、妨害ピークの少ないクロマトを得ることができるが、一方、作物由来成分によるイオン化抑制あるいは増強を受け易く、分析値がばらつくことがしばしば見られる。エマメクチン安息香酸塩をモデルとして、 $C_{18}$ カラムのみで簡便に精製後標準添加法を用いてLC/MSで測定する試験法を作成した。このことにより作物由来成分によるイオン化の妨害を効果的に相殺することができ、添加回収率において良好な結果を得た。また、蛍光誘導体化法とは異なり、本法ではエマメクチン $B_{1a}$ や8,9-Z異性体がアミノ体に、FA体がエマメクチン $B_{1b}$ に変化する現象が見られなかったため、代謝物それぞれの個別分析も可能であった。さらに、本法は同じマクロサイクリックラクトン系化合物であるミルベメクチン、アバメクチン及びイベルメクチンの同時分析も可能であった。

#### 3. 輸入食品検査に関する研究

マラチオンを分解する小麦由来酵素は、昨年度行った代謝物の結果から、カルボキシエステラーゼと考えられた。本年度は、カルボキシエステラーゼを非変成で電気泳動後ザイモグラフィを行い、本酵素の活性を観察した。分子量約4万5千前後にカルボキシエステラーゼ活性があり、これはカルボキシエステラーゼの単量体と考えられた。また、本酵素は凝集しやすく、多くのカルボキシエステラーゼ活性は、約12万から30万までの分子量帯に見られた。

#### (2) 中国産野菜等輸入食品中の残留物質の一斉分析法の開発に関する研究

国内の8検査機関の参加を得て、農作物中の104種農薬の残留スクリーニング分析に関わる試験技能評価を試みた。評価項目は、検出下限値・内部精度評価（添加回収試験）・外部精度評価とした。104項目の農薬に関して、GCの検出下限値及び添加回収率から、農作物中における一斉残留スクリーニングがまったく不可能であると考えられるものはなかった。一部の作物中で検出が難しいと考えられるものは6項目あった。ブラインドスパイク（添加量は残留基準値程度）による外部精度評価の結果、農薬の検出効率の推定値は、機関によって65%から100%までの開きがあった。また、含有されていない農薬を検出と判定した頻度は、5回の試験で15農薬の誤検出をした機関がある一方で、全く誤検出のない機関もあった。参加各機関の多成分農薬スクリーニング技能水準にはかなり開きがあることがうかがえた。今後の課

題として、妨害ピークを減らしてGCの状態を悪化させないための試験溶液精製過程の追加や、データ解析の自動化等が考えられた。また、モニタリングの大規模な実施に対応できる継続的な技能評価方法としては、食品分析技能評価スキーム（FAPAS<sup>R</sup>）への参加、あるいは国内で我が国の実状に応じた外部精度管理の枠組み整備等が有効と考えられる。

#### 4. 特定保健用食材の安全性の確保に関する研究

ブドウ種子ポリフェノール（GSP）の脂質代謝に及ぼす影響及びその代謝についてラットを用いて調べた。GSPは用量依存的に体重増加を抑制し、血清トリグリセライド濃度を低下させたが、血清及び肝臓コレステロール、糞中ステロイド排泄には顕著な影響を及ぼさなかった。GSP 1.0 g/kg投与時には血清及び尿中から（+）-catechin（CT）、（-）-epicatechin（EC）、3'-O-methyl-（+）-catechin（3'-OMCT）、3'-O-methyl-（-）-epicatechin（3'-OMEC）が検出された。これらの血清中濃度は投与3時間後に最大となった。尿中への排泄は大部分が投与25時間後に起こり、投与量に対する尿中への排泄率は投与49時間以内で0.040-0.088%（w/w）、合計0.254%（w/w）であった。さらに、GSPに含まれる低分子化合物（gallic acid, CT, EC）、GSP、GSP高分子分画（GSPH）をラットに投与し、投与2.25時間後の血清中の代謝物濃度及び尿中への排泄を調べた。GSPH投与ラットの血清からは代謝物は検出されず、投与量に対する尿中への排泄率は投与49時間以内で計0.017%（w/w）であった。

#### 5. 食品用器具・容器包装等の安全性確保に関する調査研究

新潟・愛知・大阪の3病院の給食（各一週間分）を試料として、器具・容器包装に由来すると考えられる3種類の可塑剤、すなわちアジピン酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHA）、アジピン酸ジイソノニル（DINA）及びO-アセチルクエン酸トリブチル（ATBC）による汚染実態を調査した。3病院における検出濃度の平均値は、DEHAは4.7～12.7 ng/gの範囲内であって大差がなかったが、DINAは2病院で10及び18 ng/gであったのに対し1病院で895 ng/g、ATBCは2病院で2.2及び3.8 ng/gであったのに対し1病院で956 ng/gであり、調理施設による差が見られた。DINAが高濃度で検出された給食の調理施設においてはポリ塩化ビニル製ラップフィルムが、ATBCが高濃度で検出された給食の調理施設においてはポリ塩化ビニリデン製ラップフィルムが使用されており、各々の調理過程で食材がこれらと接触することによる汚染の可能性が考えられた。各可塑剤の一日当たりの摂取量を3病院の平均として算出した場合、DEHA 12.4  $\mu$ g、DINA 459  $\mu$ g、ATBC 414  $\mu$ gとなり、高濃度の混入が見られた病院の結果を除外して算出した場合は、

DINA 20  $\mu\text{g}$ , ATBC 5.6  $\mu\text{g}$ となった。いずれの摂取量も、EUの暫定的な基準に照らして問題となる量ではなかった。

## 生 物 試 験 部

部長 (支所長事務取扱) 外 海 泰 秀  
前部長 石 綿 肇

### 概 要

前年度に引き続き、輸液製剤の一斉取締試験及び医薬品試験用標準品の製造を行うと共に、発熱性物質の規格及び分析法に関する研究、医薬品の有効性、安全性に関する研究、創薬研究及び創薬研究資源の開発に関する研究などを行った。また、厚生労働省特別研究「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あげることができた。

人事面では原園 景技官が本所生物薬品部へ配置換えとなり、漆谷徹郎氏が第一室長 (毒性部併任) に採用され、中川ゆかり主任研究官が退職した。

### 業務成績

#### 1. 一斉取締り試験

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) 19件について無菌試験を実施した。その結果、全品目が各試験に適合する事が認められた。

#### 2. 標準品製造

エンドトキシン10000標準品ほか4品目、計1,318個の製造を行った。

#### 3. その他

新開発食品調査部会、食品添加物調査会及び残留農薬調査会 (食品保健部)、並びに農業資材審議会飼料分科会 (農林水産省畜産部) 等の活動に協力を行った。

### 研究業績

#### 1. 発熱性物質に関する研究

エンドトキシンの発熱活性に対して増強作用を示す物質を含む医薬品について、エンドトキシン規格値の設定方法を検討した。

#### 2. 医薬品の安全性、有効性に関する研究

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と標準化に関する研究では、ヒト単球様細胞を指標細胞とするインビトロ発熱性物質試験法を確立し、その標準化に向けて、試験法の有意性、有用性を多角的に検討した。2) 既存化学物質の生殖毒性発現に関する研究では、butyl benzyl phthalateをラットの妊娠後期に投与したときの雄胎児の性分化に及ぼす影響について検討した。3) 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では、有機スズ化合物をラット

の妊娠初期に経口投与したときの影響を調べ、毒性影響の発現機序について検討した。

#### 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、NC/Jicマウス皮膚由来培養ケラチノサイトより、インターフェロン $\gamma$ の細胞増殖抑制作用に対する感受性の異なる2系統のクローンを分離した。RNAフィンガープリント法を用いて、両系統間での発現に差のある遺伝子を検索し、インターフェロン $\gamma$ 高感受性系統においてより高い発現を示す、仮称IGSR-1遺伝子mRNAを新たに同定した。培養マウスケラチノサイトにおいては、オルターナティブスプライシングによる少なくとも3種のIGSR-1遺伝子ホモログ (IGSR-2, IGSR-2', IGSR-4) の存在が予測される。また、これら4種のmRNAからは、C末部分に共通配列を持つ3種のタンパク (仮称MASP-1, MASP-2, MASP-3) が翻訳されることが予測される。予測されたMASPタンパクの部分配列を認識する抗血清を作成し、ウェスタンブロットリング法を用いてマウスケラチノサイトにおけるIGSR遺伝子の発現をタンパクレベルで確認した。

#### 4. 創薬研究及び創薬研究資源の開発に関する研究

ヒトc-erbB遺伝子の発現制御領域中に外来オリゴヌクレオチドと三重鎖を形成する部位が存在することを確認した。

## 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、2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」として、マオウの国内栽培に関する研究、セリ科植物分果の形態と分果中にみられる油管による識別研究並びに道北における野生薬用植物資源の分布調査を実施し、各々報告書を提出した。

一般市民への啓発活動として、第4回薬用植物に関するワークショップ「北方の薬草とその利用を考える(1)」を、平成14年7月27日～28日の2日間にわたり日本生薬学会北海道支部及び名寄市北国博物館と共同開催し、5名の講師による講演会ならびに名寄市ピヤシリ山における野外薬用植物観察会を行い、合計約130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。研究生として、平成14年4月22日より平成15年1月20日まで石井妙子氏（名古屋大学）を、平成14年9月9日より9月20日まで田中彰雄氏（富山県薬用植物指導センター）を受け入れた。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採取 229種（筑波試験場へ送付）

受け入れ 53件 272種

分譲 62件 98種

#### 2. 指導業務

440名の来場者へ薬用植物の情報提供と指導、並びに85件の栽培指導を行なった。中川郡美深町において薬草園管理指導、名寄市、上川郡風連町及び上川郡当麻町における薬草生産栽培者への栽培指導、並びに名寄市漢方研究会及び同市薬草研究会へ各々生薬、薬草に関する指導を行った。また、平成14年7月4日に道北ブロック保健所医療業務担当者15名に対するけし及び麻薬原料植物の講習会、並びに平成14年8月28日にけし耕作者及び関連機関に対するけし講習会を試験場内にて実施した。農業取締法の改正に伴う薬用植物等のマイナー作物の農業使用基準の適用を猶予する経過措置に関する指導を薬草生産者及び関係機関担当者へ行なった。

### 研究業績

#### 1. けしの直接抽出法に関する研究

年間合計施肥量を同一にして追肥の施用効果について検討した結果、一定量を追肥として分与した場合にさつ果長が有意に増加することが認められたが、さつ果収量には差は認めなかった。追肥時期として3時期を比較したが、全量基肥とした場合と差は認められなかった。

高モルヒネ含量系統の育成をはかるべく、これまで自殖・選抜を繰り返した10系統及びCPS生産用に育成されたオーストラリア産2系統の比較栽培を行った結果、オーストラリア産2系統は極めてモルヒネ含量が高い系統（1.6～1.3%）であることが判明した。

#### 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

本種の最適な収穫時期を設定するために、開花後の登熟期間が果実の色及び精油含量に及ぼす影響について、2年生600株を用いて検討した。その結果、登熟日数の経過とともにゆるやかに低下する傾向がみられ、生薬を目的とした分果の収穫は開花後50日目程度が好ましく、遅くとも56日目までには収穫を終了することが望ましいと考えられた。一方、増殖を目的とした果実の採取の場合には、完熟状態となる61日目以降が適当と考えられた。

生育や種子収量に及ぼす窒素の施用量や施用時期の影響について9試験区を設定して圃場試験により検討し

た。その結果、茎葉乾物重や窒素含有量でみられた窒素施用量の影響は、花房の数や乾物重には反映されておらず、本結果の範囲では、1株当たり10g程度が適量であり、施用方法として基肥と8月5日の追肥とに半量づつに分与する方法が効率的と考えられた。

##### 2) ヨロイグサの栽培研究

1年生ヨロイグサ生根を種々の条件で保存した後乾燥し、それらの条件の違いがフロクマリン類、糖及び希エタノールエキス含量に及ぼす影響を検討した。その結果、収穫後屋外での自然乾燥の過程でショ糖が生成し、希エタノールエキス含量が増加することが判明した。また、収穫後一時的な低温での貯蔵により、エキス含量が増加することも判明した。一方、ヨロイグサのストレス化合物であるフロクマリン類の産生能は小さく、調製条件の違いによる含量の変動は他のセリ科植物より小さいと考えられた。

#### 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、4年目の生育を調査した結果、これまでの3年間の生育に比べ4年目の生育の増加は著しく、特に茎数が3年目の3～4倍、地上部乾物重では約2倍となり、10a当たり収量は約414kgと推定された。4年目株の無機成分含有率と乾物重から計算した10a当たり施肥量は、窒素9.6～10.7kg、加里9.7～13.6kg、カルシウム7.6～8.3kg、マグネシウム2.0kgと推定された。また、モンゴル産栽培株の無機成分含有率は、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、この傾向はこれまでの野生株の結果と同様であり、生育地の土壤条件によるものと推定した。

#### 4. カンゾウの国内栽培に関する研究

*Glycyrrhiza uralensis* 及び *G. glabra* の2種5系統をストロンの切断により繁殖し、圃場で4年間栽培してグリチルリチン及び希エタノールエキス含量を調査した結果、いずれの種、系統における4年生株の根及びストロンにおいても、局方の基準値であるグリチルリチン含量2.5%を充たす結果は得られなかった。エキス含量は、*G. glabra* の1系統を除いて、局方の基準値を充たしていた。

#### 5. *Artemisia* 属植物に関する研究

生薬インテンコウの基原植物カワラヨモギについて、沖縄産カワラヨモギについて明らかにするべく石垣島での自生地調査を行い、4地点で株を採取し本土産、中国及び韓国産カワラヨモギとの比較を行った。その結果、頭花の大きさはいずれも本土産カワラヨモギに比べ大きい傾向にあり、2地点の個体の外部形態は、以前入手した久米島産に類似していた。ジメチルエスクレチン及びカピラリシン含量は共に極めて低く、生薬としては利用

できないものであることが判明した。葉緑体DNAの $rpl16$ とPS-ID領域の塩基配列を比較した結果、4地点の個体は2グループに分かれたが、以前入手した久米島産の個体やヨーロッパから導入したリュウキュウヨモギとはいずれも異なるタイプであり、また、沖縄産カワラヨモギやリュウキュウヨモギは、日本本土、中国、韓国産のカワラヨモギと比べ、PS-ID領域の395番目の塩基に置換が認められた。なお、本土産カワラヨモギ内でも、PS-ID領域の374及び492番目以降の塩基の反復配列に種内変異が認められた。

## 筑波薬用植物栽培試験場

場 長 関 田 節 子

### 概 要

薬用植物の栽培及び野生薬用植物の採取に関するガイドライン (Good Agriculture and field Collection Practice : GACP) 作成がWHOにより提唱されてから1年半が経過した。我が国は、約10年前から当時の厚生省薬務局により栽培研究が続けられ、その成果が「薬用植物栽培と品質評価」Vol.1～Vol.10として発刊されている。栽培研究は、生薬部、薬用植物栽培試験場5場、大学及び業界研究者が検討・実施し、次いで自治体薬務課を経て試験栽培が行なわれたものである。現在、これを基礎としてGACP日本案を作成すべく検討を行っている。また、平成14年12月に改正された農薬取締法の薬用植物への適用範囲と農薬使用指針作成の検討を含め、GACP検討会を医政局研究開発振興課と共に進めている。

人事面に関しては、平成14年9月1日付けで木内文之氏が育種生理研究室長に採用された (平成14年12月まで京都大学助教授を併任)。庶務係長の丸橋 弘氏が平成15年2月20日付けで退職し、平成15年4月1日に瀧田秀生氏が着任した。また、高橋真理衣氏が平成15年3月31日に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を退職し、技術補助員として採用された。研究生として受け入れを継続している中根孝久氏は平成14年12月1日よりお茶の水女子大学生活環境研究センター講師に採用された。

海外出張として、関田節子場長と渕野裕之主任研究官が韓国で開催された「Forum for Harmonization of Herbal medicines (FHH) sub-committee meeting (平成14年7月18～20日)」に出席し意見交換、情報収集を行った。関田節子場長は韓国で開催された「International Seminar on Harmonization of Oriental Herbal Medicines」(平成14年9月26日～27日)に出席し研究発表、意見交換を行った。また、WHOスイス本部で開催された

「Good Sourcing Practices (GSP) for Medicinal Plants」会議 (平成14年10月27日～11月2日)に出席しドラフト作成についての意見交換を行った。さらに中国で開催された「International Conference on Modernization of Traditional Chinese Medicine : 中医薬現代化国際科技大会」(平成14年11月3日～6日)において研究発表、意見交換を行った。渕野裕之主任研究官がイタリアで開催された「ICS-UNIDO Workshop on EÅRegulations for Production and Marketing of Medicinal Plant ProductsÉÇ」に出席し、研究発表および討議を行った (平成14年11月17日～22日)。木内文之育種生理室長が第33回韓国生薬学会にて招待講演「Anti-parasitic Natural Products」を行った (平成14年12月5日～8日)。

研究業務としては、厚生技術研究費補助金により「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」を総括し、分担研究として「乱用薬物の不正流通防止に関する研究」、「生薬類の有効性の評価及びその保健衛生的観点からの活用の適正化に関する研究」、「医薬品基準のグローバル化と化学技術の進展を視野に入れた日本薬局方の改正と国際調和に関する研究」、「生薬規格の国際調和に関する研究」、他に厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課の委託研究「けしの直接抽出法に関する研究」及び「あへんモルヒネ含有率試験」を実施した。HS振興財団の国際グラント研究として「天然薬物からのリーシュマニア治療用リード化合物の探索と生体機能の解明」を、同若手研究者奨励研究「DNA塩基配列とSNPsによる生薬基原植物の鑑別」を行った。また、「遺伝子発現制御薬剤の創薬技術に関する研究」のサンプル試験を受け持った。

平成14年3月3日、筑波試験場会議室において、長尾所長、早川副所長、持田総務部長、合田生薬部長出席のもと、平成14年度薬用植物栽培試験場業務打ち合わせ会議を開催し、平成14年度研究業務を報告した。次いで、4日に4場関係者により平成15年度研究実行計画を検討した。

また、平成14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2002」をつくば市の文部科学省研究交流センターにて開催し、早川堯夫副所長の開会講演に続いて、益山光一厚生労働省医政局研究開発振興課先端技術専門官、池田秀子日本栄養補助食品協会員、丸山由紀子WHO医薬品部伝統医学専門官、佐竹元吉日本薬剤師研修センター参与、飯田 修筑波薬用植物栽培試験場栽培室長、鈴木幸子東京都薬用植物園栽培担当係長の招待講演を行った。

施設関係では、平成13年度補正予算による資源保存棟が平成15年5月に竣工し、平成14年度補正予算により生物遺伝資源研究棟の建設が決定した。

### 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

14年度人手種子数 820点

分譲種子件数 4,240点

種子目録配布数 73ヶ国 447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6,100点

(昭和63年～平成14年, 継続)

超低温保存培養体 40点

研究業績

1. トウキ形質転換および非形質転換シュートの超低温保存に関する研究

薬用植物資源を極長期に保存するための超低温保存方法確立のため、ヤマトトウキ (*Angelica acutiloba*) 種子の形質転換及び非形質転換シュートを材料に、ガラス化法による超低温保存の基本操作における各種条件を検討した。解凍後再培養を行い再生率と成分のTLC及びGC-MS分析による評価を行った。その結果、非形質転換シュートでは、ショ糖とグリセリン (5% : 5%) を含むMS培地で前培養後、脱水前処理無しで20分間のガラス化液処理 (25℃) を行ったときに最も高い再生率 (46%) が得られた。一方、形質転換シュートにおいては、ショ糖とグリセリンを (7.5% : 7.5%) で行ったときに最も高い再生率 (18%) が得られた。いずれの再生シュートも健全な植物体に生育した。TLC分析では両者はほぼ同じパターンの成分が検出されたが、GC-MS分析を行った結果、ligustilideとbutylidencphthalideの構成比が若干異なっており、形質転換体では前者に対する後者の割合が非形質転換シュートよりも減少していた。超低温保存後再生した形質転換シュートは、未保存対照の形質転換シュートと同じパターンを示した。(厚生科学研究)

2. ケシ属植物の遺伝的・形態的・植物化学的特性に関する研究

2-1. いわゆるボタンゲシの形態・アルカロイド

観賞用に輸入され、関東信越厚生局麻薬取締部から供与されたいわゆるボタンゲシ (*Papaver somniferum* "Paeoniflorum") の種子試料には、薄茶の種子と濃茶の種子が含まれていた。選別して5寸鉢 (赤玉土-腐葉土-クレハ培養土-3 : 3 : 1) に播種し、ファイトロンで生育させたところ、発芽直後 (播種後21日) の葉からアルカロイドが検出され、幼苗期 (播種後44日) の根には、乾燥重量あたり約0.4%のモルヒネと約0.3%のコデインが検出された。開花は播種後100日目から始まり、一株に多数の花が付き、160日後にも開花する花が認められ、薄茶の種子からは桃～赤花の八重咲きが、濃茶の種子からは赤紫～濃紫花の八重咲が開花した。

完熟期に収穫した果殻には、高含量のモルヒネが認められ、特に赤紫～紫花で高く、その含量は、乾燥重量あたり0.7～1.2%であった。

2-2. オーストラリア産ケシの形態・アルカロイド

けしがら濃縮物 (Concentrate of Poppy Stew, CPS) の主生産国であるオーストラリアで食用種子として発売されているケシ (*Papaver somniferum*) (商品名: Mellow YellowおよびNATURES) (オーストラリア政府分析研究所から供与) の種子に含まれるアルカロイドを調査した結果、Mellow Yellowではアルカロイドが検出されなかった (同時に分析した伊豆試験場で2001年に採集した一貫種種子からも同様に検出されなかった) が、NATURESからは重量あたり0.008%のモルヒネが検出された。両者共にファイトロン内で発芽し正常に発育した。特に発芽率と生育が良好であったMellow Yellowの播種後1か月の葉は、モルヒネ含量が高く乾燥重量あたり (以下同) 0.16%でありコデイン及びテバインも検出された。更に、根ではモルヒネ0.25%、コデイン0.41%、テバイン0.15%でサンギナリンも検出された。12個体の花はいずれも薄紫一重で花弁の基部に紫の斑点があり背丈は67～91 cmであった。2個体以外は複数の果実 (2～4個) が付き、0.452～2.619%と高含量のモルヒネが検出されたが、根における含量は著しく低かった。圃場で春播き栽培を試みたところ、開花期が梅雨と重なったため果実が腐り正常果実が得られなかったが、北海道試験場では正常に開花結実し、いずれも一貫種よりはるかにモルヒネ含量が高く約1.0～2.0%であった。また、ファイトロンでの結果と同様に、一貫種に検出されるパパベリン、ノスカピンが検出されなかった。

2-3. パパウェル属植物の形態・アルカロイド

パパウェル属植物の鑑定は花の色等の外部形態が重要な要素となる。*P. orientale*としてUniversity of Londonから導入し保存栽培を行っている13株のうち12株は橙花で花弁に斑点がなく、花の下に茎葉が認められなかった。しかし、1株は朱花で他の株に比べて赤味が強く、花弁に斑点があり、花の下に茎葉が認められた。また、6株にはオリバピンとテバインの両方が検出されたが、花の色が朱色であった1株はオリバピンが検出されず、*P. bracteatum*に高含量に検出されたテバインと共に*P. pseudo-orientale*に多量に検出されるアルカロイドが含まれていた。これらのことから、この株は*P. orientale*ではなく、*P. bracteatum*と*P. pseudo-orientale*の交配種であると推察された。(以上 厚生科学研究)

3. ケシ植物試料に含まれるケシアルカロイドの分析に関する研究

北海道、筑波、種子島各薬用植物栽培試験場におけるけしがら抽出物 (CPS) の栽培条件がケシアルカロイド

収量に及ぼす影響について検討し、モルヒネ、コデイン、デバイン、パパペリン、ノスカピン、サンギナリンについてHPLC法により分析した。(委託研究)

#### 4. 種子保存に関する研究

薬用植物資源の保存を目的に、種子の収集、保存、品種改良、品種の維持管理等を研究することにより、種子バンクの充実を図っている。植物は、種毎にその特質が異なり、種子を保存する条件によっては発芽力を維持できなくなる。従って長期の保存に耐えるようにするために、貯蔵温度、貯蔵容器等の最適条件を求め、定期的に発芽実験を行った。(厚生科学研究)

#### 5. マオウ (*Ephedra distachya*) の国内栽培に関する研究

4年目の株について各場の経時変化を追った結果、個体差はみられるが、何れも局方の基準値である0.7%を十分越える値を示す結果を得た。北海道での栽培による越冬後のストロンと中国野生地のストロンでは形態的な差が観察され、馴化の可能性が推測された。モンゴルで栽培された*E. sinica*はそのほとんどが2%を越える高含量であり、植物の基原も局方収載品目に該当することから生産量と輸入経路が確保されれば日本で利用できる可能性が示唆された。(厚生科学研究)

#### 6. 抗リーシュマニア活性を有する薬用植物に関する研究

リーシュマニアに対する薬剤を開発することを目的とし、ペルー、ボリビア、ミャンマー産の生薬を入手しそのエキスを作成後抗リーシュマニア活性のスクリーニングを行った。その結果ペルー産の*Valeriana*およびミャンマー産の*Chyi Thee* (ともに現地名) に強い活性が見いだされた。それらの活性成分を各種クロマトグラフィーにて精製単離しその化学構造を決定した。現在それらのエキスのマウスを用いた*in vivo*での検討を行っている。前年度報告済みのペルー産植物*yanali* (*Bocconia pearcei* Hutchinson), *Lingua de vaca* (*Elephantopus mollis* H. B. & K.) についてはマウスにおける軟膏剤を用いた外用投与を検討したがいずれも強い活性はみられず、投与方法の改良を要することが明らかになった。(HS研究国際グラント)

#### 7. 生薬の局方試験法に関する研究

##### 7-1. 確認試験法に関する検討

*Benincasa cerifera* Savi を基原植物とするトウガシ (冬瓜子) についてTLC法の検討を行った。成分はisomultiflorenyl acetateが報告されているものである。指標物質の探索においてはまだ単離に至っていないが、現在日本に流通しているトウガシ9種類はすべて中国産であり(安徽省産2種類、河北省産2種類、四川省産1種類、広東省産2種類、浙江省産1種類、産地不明1種類)、各展開溶媒においてもいずれの試料もほぼ同様な

パターンを示すことから、指標物質を用いた確認試験法の確立は可能であると考えられた。

##### 7-2. ブシの薬局方収載に関する研究

現在流通しているさまざまなブシ製品はその製法、減毒法などが異なり、また基原も異なるためその定義等の整備が必要である。現在の市場調査から基原植物は*Aconitum carmichaeli* Debx.と*A. japonicum* Thunb. 2種に規定した。毒性の強いジエステルアルカロイドは修治を行うことにより低毒性のモノエステル体になる。HPLCでの定量試験においてジエステル体とモノエステル体8成分の同時定量は困難であることから、定量試験ではジエステル体で安全性を、有効性は比色定量法による総アルカロイド量を規定しさらにTLCによる確認試験でモノエステル体を検出することとして検討を進めている。(以上 厚生科学研究ならびに経常研究)

#### 8. DNA塩基配列とSNPsによる生薬基原植物の鑑定

塩基配列情報に基づくイノコズチ属植物の鑑別方法を開発するために、6種のイノコズチ属植物の葉緑体DNA *rpl16* 領域、*rpl16-rpl14* 及び *atpF atpA* 介入配列領域の塩基配列を決定した。これらの領域では、5ヶ所で塩基の配列が異なり、この結果から、6種のイノコズチ属植物は、塩基配列情報に基づく識別ができることを明らかにした。(HS若手研究者奨励研究)

## 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技官、出納員とも変更はなかった。

### 業務成績

#### 1. 種子(種苗)交換業務

採種 92種(筑波試験場に送付)

#### 2. 栽培業務

前年度と同様に、ジョチュウギク、カミツレ、ミシマサイコ、マオウ、コガネバナ等を中心に62種の種子採取用薬用植物の栽培を行った。

標本園植物95種、樹木園植物89種、温室植物118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、145種を記録した。見学者は、年間で132名を数えた。

和歌山県からの依頼により平成14年10月19日「薬草故郷づくりフェア」において筑波薬用植物栽培研究室飯田 修室長が講演し、志賀幸生技官が見学を案内した。

## 種子島薬用植物栽培試験場

場 長 香 月 茂 樹

## 概 要

施設整備関係では、老朽化していた収納乾燥庫（旧官舎：40.42 m<sup>2</sup>）を取り壊した。伊豆試験場の平成14年度閉場に伴い管理植物の収容場所として、ガラス室の建設工事を実施し、C棟（165.375 m<sup>2</sup>、高さ7.3 m）が9月2日に、D棟（141.75 m<sup>2</sup>、高さ4.7 m）が11月22日に完了した。

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」を実施した。伊豆試験場の閉場に伴い、植物の大きな移動が二度にわたって行われ、480点以上を受け入れた。

楠木絃一作業長が9月10日にヌマガエルを場内で捕獲した。専門家による同定で間違いなく、種子島における初の確認記録（九州本土と奄美諸島ではふつうに見られるものの、薩南諸島は未確認の空白域であった）となり、地元紙にも掲載された。個体は液浸標本とし、西之表市の種子島開発総合センター（通称：鉄砲館）に展示してある。

備品については、官用車（ステーションワゴン）を低公害車へ更新した。万能倒立顕微鏡、高速振動試料粉砕器を購入した。

鹿による被害が島内では以前より知られていたが、種子島試験場においても平成14年度から侵入があり、栽培植物の一部が食害を被る事態が生じている。

気象面では、梅雨の期間は6月10日から7月22日の43日間で、総降雨量は748 mmであった。1時間降水量は6月17日に77.5 mmが記録された。台風の接近・通過は5個あり、内容は下記のとおりである。短期間における度重なる襲来、降雨量の少ない風台風などの影響により、樹木の脱葉・落葉・枝先の枯死の著しいものが発生した。この影響を受け、島内のサクラが秋に異常開花し、新聞・テレビで報道された。

6月10日～11日 4号

最大瞬間風速24.4 m/s・総降雨量 7.5 mm

7月15日 7号

最大瞬間風速41.0 m/s・総降雨量 32.0 mm

7月25日～26日 9号

最大瞬間風速31.8 m/s・総降雨量149.0 mm

7月27日 11号

最大瞬間風速25.8 m/s・総降雨量 12.0 mm

8月28日～31日 15号

最大瞬間風速33.0 m/s・総降雨量 18.0 mm

## 業務成績

## 1. 種子交換

採種 325点（筑波試験場へ送付）

内訳 野生種 195点

栽培種 130点

露地 124点

温室 6点

受入 35件 96点+480点（伊豆試験場受入分）

分譲 41件 155点以上

## 2. 指導業務

見学者 69件 495名以上

問い合わせ件数は52件以上あり、内訳（重複あり）は種苗の入手法12、栽培法15、植物鑑定12、薬効・用法8、加工・調整3、その他（植物の所在地・文献・販売先など）18件であった。

## 研究業績

## 1. けしの直接抽出法に関する研究

種子島は自然災害・病虫害の多発地域であり、しばしば壊滅的被害を被ることさえある。健全な生育と被害からの早期回復を期待し、植物活力剤の使用による影響を検証した。使用・不使用の差異は得られず、例年よりアルカロイドの含量が全般的に低かった。

## 2. オミナエシの栽培に関する研究

—繁殖（実生と株分け）の相違と収量との関連に関する研究—

花卉としての栽培はあるものの、生薬 敗醬根の生産としての栽培は行われていない。このため、生薬生産目的での栽培として繁殖法の相違が収穫物に及ぼす影響について検討した。施肥条件は基肥のみとし、堆肥2000 kg/10 a、苦土石灰100 kgを全面施肥とし、IB化成（10-10-10）50 kgを作条施肥した。栽植密度は条間70 cm×株間30 cmとした。株分け苗は3月26日に定植。実生苗は3月25日播種、5月14日ポリポットに鉢上げ、6月19日に定植した。収穫は地上部が枯れた2003年2月に行い、地上部を除去し、洗浄した。抽苔は実生苗で0%、株分け苗で32%であった。根群の発達実生苗で著しく、抽苔株では貧弱であった。実生苗はばらつきが少なく良質な個体が多かったが、株分け苗ではばらつきが大きく、劣悪なものもあった。

## 3. サジオモダカの種子島における栽培に関する研究

中国での自然分布は東北部～東部～南西部であるが、暖温帯である四川省や福建省で大規模に栽培され良品の生薬が生産されている。このような背景から、環境が類似する種子島での栽培法を探ることを目的として栽培試験を実施した。秋田県自生株（A）とフランス（F）から導入し栽培した、両個体の株分け苗を用いた。ワグネルポット（a/2000）用い、基肥（乾燥鶏糞200 g）のみとし、2001年9月20日定植し、終日日照を得られる場所まで水を張り管理した。抽苔したものは花茎が軟らかい

うちに除去し、地上部が枯死した2月に収穫した。病虫害はアブラムシ以外特になく、一般作物と比較し、栽培管理が容易な植物であった。発芽と生育のむらが大きく、その二点が今後の栽培上の大きな問題点であった。抽苔はAが0%、Fが66.7%であった。1株あたりの収量（乾物重）はAが10.0 g ± 3.1 g、Fが9.2 g ± 4.4 gで大差なく、10 aあたりでは200 kgの収量が想定された。Fの塊茎の大きさ・重量とも抽苔株が未抽苔株より大で、重量では2倍以上であった。

#### 4. マオウ (*Ephedra distachya*) の栽培に関する研究

##### —生育の経年変化について—

春日部試験場由来で、筑波試験場で保存している個体の、1999年に導入してからの継続研究である。株毎の生育差が顕著であった。地下茎の伸長により生育域が拡大し、2002年1月以降、隣接株との領域が不明確となった。定植後、3年目（2001年）に開花株が見られた。成株の草丈は64.9 cm ± 7.7 cmであった。成株の乾燥歩留

は37.4% ± 1.7%で、季節による差異は認められなかった。種子島での生育の停止期間は、冬季の数ヶ月であった。

#### 5. 薬用植物に使用されている農薬に関する研究

薬用植物の栽培上の登録農薬は数少なく、未登録農薬を使用してきた経過がある。社会環境の変化に伴い、不正使用が大きな社会問題となっており、現状把握のため使用農薬の実態を調査した。2003年2月10日現在で取りまとめた。200品目の植物について調査し、農薬との結びつきは2600件あり、89品目については農薬使用の有無や使用農薬の特定はできなかった。病名・害虫名が総称名や通称名で表記されているものも多かった。使用農薬が商品名と薬品名が混在していることも多かった。対象植物への農薬の種類・施用時期・施用方法等が薬用として考慮されていない場合も多く、今後検討する必要があると思われる。収穫時期を考慮すると、問題ではないかと思われる品目があった。

## 平成14年度所外研究員等の受け入れ名簿

平成15年3月31日現在

## (客員研究員) 15名

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	生物薬品部	9.4.1		男	
松井 道子	元当所変異遺伝部	変異遺伝部	9.4.1		女	
内藤 克司	元当所毒性部	変異毒性部	10.4.1		男	
降門 強	医薬品機構	生薬部	12.6.1		男	
矢脇 孝	東京大学大学院医学研究科	薬理部	13.3.15		男	
石橋 無味雄	元当所薬品部	薬品部	13.4.1		男	
岡安 勲	北里大学医学部病理学教室教授	生薬部	13.4.1		男	
相賀 裕美子	元当所毒性部	生薬部	13.4.1		女	
横井 毅	元当所有機化学部	有機化学部	13.4.1		女	
横井 毅	金沢大学大学院医学系研究科教授	薬理部	13.9.15		男	
黒川 雄二	元安全性生物試験研究センター長	生薬部	13.12.1		男	
村井 敏美	元支所生物試験部室長	支所生物試験部	14.5.1		男	
小野 景義	元当所代謝生化学部	代謝生化学部	15.3.1		男	

## (協力研究員) 12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	
壺井 功	日本大学医学部	変異毒性部	11.4.1		男	
西尾 俊幸	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 利子	相模女子大学学芸学部助教授	衛生微生物部	11.12.1		女	
内山 茂久	千葉県環境保健研究所	環境衛生化学部	13.4.1		男	
田中 直子	帝京大学医学部	有機化学部	13.7.1		女	
原田 隆範	立教大学大学院	化学物質情報部	13.12.1		男	
丸山 典夫	(独)物質・材料研究機構	療育品部	14.4.1		男	
中西 郁夫	(独)放射線医学総合研究所	有機化学部	14.4.22		男	
重松 美加	ヒューマンサイエンス振興財団	食品衛生管理部	14.6.1		女	
服部 誠	東京農工大学農学部助教授	衛生微生物部	14.6.1		男	
治京 玉記	(財)乙卯研究所	有機化学部	15.3.1		女	

## (重点支援協力研究員) 6名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
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	
張替 直輝	科学技術振興事業団	食品部	13.10.1	15.3.31	男	
豊田 淑江	科学技術振興事業団	遺伝子細胞医薬部	15.1.1		女	
伊藤 さつき	科学技術振興事業団	遺伝子細胞医薬部	15.1.1		女	
古田 美玲	科学技術振興事業団	遺伝子細胞医薬部	15.1.1		女	

## (特別研究員) 3名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
王 文晟	日本学術振興会	変異遺伝部	13.1.1	14.8.21	男	
細野 哲司	日本学術振興会	遺伝子細胞医薬部	15.1.1		男	
神吉 けい太	日本学術振興会	病理部	15.1.1		男	

## (日本学術振興会外国人特別研究員) 3名

氏名	国名	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	療育品部	13.10.1		女	
李 京烈	韓国	大韓バイオリンク	病理部	14.9.16		女	
Stedefoed, T.J.	米国	南フロリダ大学神経学部	医薬安全科学部	14.11.1		男	

## (医薬品機構・派遣研究者) 11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	14.8.31	女	
中島 由起子	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	薬品部	12.4.1		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	15.3.31	男	
鈴野 淑江	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	遺伝子細胞医薬部	13.4.1	14.12.31	女	
池田 木琢	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	生物薬品部	13.10.1		男	
矢野 仁	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	機能生化学部	14.4.1		男	
久保 崇志	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	機能生化学部	14.8.1		女	
吉谷 隆志	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	薬理部	14.11.1		男	
吉谷 隆志	医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構	医薬安全科学部	14.11.1		男	

## (リサーチ・レジデント)8名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
櫻井文教	(財)日本公定書協会	遺伝子細胞医薬部	13.10.1	15.3.31	男	
朴正雄	(財)日本公定書協会	療製品部	13.10.1	14.10.31	男	
アハドサイフアディン	(財)日本公定書協会	療製品部	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	15.3.31	女	
和久井千世子	(社)日本食品衛生協会	食品衛生部	14.1.1	15.3.31	女	
奥谷晶子	(社)日本食品衛生協会	食品衛生管理部	14.4.1	15.3.31	女	
掛谷知志	(社)日本食品衛生協会	衛生微生物部	14.9.1	15.3.31	男	
スサンビシヨーマチュー	(財)日本公定書協会	療製品部	15.1.1		女	

## (研究支援者)4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	筑波試験場	12.10.1	15.3.31	女	
櫻庭真弓	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	13.4.1	15.3.31	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	14.12.31	女	
當麻陸歩	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	療製品部	14.4.1	15.3.31	女	

## (流動研究員)16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	療製品部	13.10.1	14.8.26	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	療製品部	13.12.24	15.1.30	男	
志水美文	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	衛生微生物部	14.4.1		女	
李光勳	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	セブツ	14.4.1		男	
多田薫	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬理一部	14.4.1		女	
小野瀬淳一	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬理部	14.4.1		男	
麻見安雄	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	変異遺伝部	14.4.1		男	
小林一夫	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	衛生微生物部	14.4.1		男	
柳晋徳	(財)ヒューマンサイエンス振興財団	薬理部	14.10.1		男	
柳楽勤	(財)医療機器センター	療製品部	14.10.1		男	
瀧上周	(財)日本公定書協会	研究所長	14.12.1		男	
宮城島利一	(財)日本公定書協会	研究所長	15.1.1		男	
ハラミラジャグ	(財)日本公定書協会	毒性部	15.1.1		男	
中津則之	(財)日本公定書協会	毒部	15.2.1		男	

## (日中笹川医学研究者)2名

氏名	所属	受入部	入所	退所	性別	備考
袁進(エンシン)	衛生部成都生物制品研究所基因工程室	生薬部	14.4.5	15.3.26	男	
詹立(センリツ)	成都市衛生庁防疫站環境衛生科	変異遺伝部	14.4.5	15.3.26	男	

## (研究生) 51名

氏名	依頼者	受入部	入所	退所	性別	備考
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	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	15.3.31	男	
石原島栄二	栃木県保健環境センター所長	生薬	12.4.1	15.3.31	男	
清水雅	大妻女子大学教授	変異	12.4.25		男	
橋井則和	城西大学学長	療製品	12.6.15	15.3.31	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		男	
土肥友恵	お茶の水女子大学教授	衛生微生物	13.4.1	15.3.31	女	
畑尾史彦	東京大学大学院医学系教授	衛生微生物	13.4.1		男	
高木広憲	東京農工大学教授	病理	13.4.1	15.3.31	男	
宇多洋美	昭和薬科大学教授	変異	13.4.1	15.3.31	女	
鈴木玲央	東京環境大学教授	環境	13.4.10	15.3.31	男	
溝腰朗人	九州大学大学院教授	代謝	13.4.27	15.3.31	男	
藤下加代子	九州大学大学院教授	代謝	13.4.27	15.3.31	女	
田島介	東京理科大学教授	薬品	13.5.7	15.3.24	男	
酒井信	千葉大学大学院薬学研究部長	食品	13.7.2	15.3.31	男	
赤井石樹	日本大学薬学部教授	薬理	14.3.1		男	
平山明子	共立薬科大学学長	代謝	14.4.1		女	
小久保清裕	大妻女子大学教授	変異	14.4.1		女	
生島裕	明治薬科大学教授	薬理	14.4.1		女	
渡辺圭子	昭和薬科大学教授	代謝	14.4.22	15.3.31	男	
八幡紋子	昭和薬科大学教授	薬理	14.5.1		女	
山崎	東京農工大学助教授	食衛	14.5.1	15.3.31	男	

浅井美里	井賀伊平	法政大学教授	食衛	1室	14.5.1		女
古中楡	庭大	帯広畜産大学助教授	衛微	4室	14.6.1	14.6.30	女
大小井	原上	東京農工大学教授	衛微	4室	14.6.1	15.3.31	男
北村	藤林	九州大学大学院教授	代謝	2室	14.6.3		男
佐藤	小溝	九州大学教授	有機	2室	14.6.10	14.7.12	男
藤林	山口	名古屋立大学教授	変異		14.6.17		男
小溝	横山	星薬科大学教授	代謝		14.7.1		女
横山	藤山	岐阜大学大学院教授	病理	1室	14.7.1		男
藤山	山本	日本大学生物資源科学部教授	食品	3室	14.7.1	14.7.31	男
山本	山本	九州大学大学院教授	遺伝	2室	14.8.1		男
山本	山本	岡山市長	食衛		14.9.2	14.9.30	男
山本	山本	(独)農薬検査所理事長	毒性	2室	14.9.17	14.12.12	女
山本	山本	東京大学大学院教授	機能	2室	14.10.1		男
山本	山本	岐阜県食肉衛生検査所所長	衛微	2室	14.10.2	14.11.1	男
山本	山本	食品農医薬品安全性評価センター理事長	毒性		14.10.1	15.3.20	男
山本	山本	東京医科歯科大学教授	衛微	2室	14.10.1	15.3.30	男
山本	山本	群馬県中央食肉衛生検査所所長	食品	2室	14.10.28	14.12.6	女
山本	山本	熊本市食肉衛生検査所所長	食品		14.10.29	14.11.22	女
山本	山本	栃木県保健福祉部長	食添		14.11.12	14.12.11	女
山本	山本	星薬科大学大学院院長	療品	1室	14.11.25	15.3.31	女
山本	山本	岡山県(保健所)知事	衛微	3室	15.1.21	15.2.10	女
山本	山本	日本冷凍食品検査協会理事長	食衛	1室	15.1.6	15.3.31	男
山本	山本	昭和薬科大学理事長	筑波		13.4.6		男
山本	山本	東京理科大学薬学部教授	筑波		13.11.1	14.10.31	女
山本	山本	名古屋大学大学院教授	北海道		14.4.22	15.1.20	女
山本	山本	富山薬事研究所所長	北海道		14.9.9	14.9.20	男

(実習生) 39名

氏名	依頼者	受入部	入所	退所	性別	備考
中山亮子	東邦大学薬学部医療薬学教育センター教授	代謝	14.2.1	14.9.30	男	
高島和子	日本大学生物資源科学部教授	生物	14.2.1	15.3.4	女	
原島大	日本大学生物資源科学部教授	生物	14.2.1	15.3.31	男	
館崎香介	日本大学生物資源科学部教授	生物	14.2.1	15.1.31	男	
松宮亜香里	日本大学生物資源科学部長	有機	14.2.1	15.3.31	女	
宮崎健太郎	芝浦工業大学工業化学科主任教授	有機	14.3.1	15.2.28	男	
中田佳介	北里大学理学部教授	衛微	14.3.1	15.2.28	男	
井上真由美	日本大学生物資源科学部長	生薬	14.3.1	15.2.28	女	
清水薫	日本大学生物資源科学部長	生薬	14.3.1	15.2.28	男	
若林貴仁	昭和健康科学学長	食品	14.3.11	14.10.30	女	
澤田費	日本大学生物資源科学部長	食品	14.3.18	15.3.17	男	
古田奨子	東京理科大学理学部部長	有機	14.4.1	15.3.13	男	
清平治子	北里大学学長	環境	14.4.1	15.3.31	女	
大野昌子	北里大学学長	環境	14.4.1	15.3.31	女	
丸山昌司	日本大学生物資源科学部長	食添	14.4.1	15.3.7	男	
加藤奈津美	星薬科大学教授	病理	14.4.1	15.3.31	男	
伊藤伸子	立教大学教授	病理	14.4.1	15.3.31	女	
桜井春奈	東京理科大学薬学部教授	薬品	14.4.10	14.12.31	女	
小山口裕孝	昭和大学薬学部教授	生物	14.4.22	15.3.24	女	
山崎真弓	共立薬科大学学長	有機	14.4.25	14.12.31	男	
藤井香子	東京家政大学教授	食衛	14.5.1	15.3.31	女	
宇佐美孝子	実践女子大学学長	食衛	14.5.1	15.3.20	女	
大門由佳	実践女子大学学長	食衛	14.5.1	15.3.20	女	
高峰幸加	共立薬科大学教授	食添	14.5.1	14.12.28	女	
佐々木穂	共立薬科大学教授	食添	14.5.1	14.12.28	女	
春日陽一郎	お茶の水女子大学教授	衛微	14.5.1	15.3.5	女	
坂田行佳	麻布大学教授	衛微	14.5.1	14.11.19	男	
宮田優	東京農工大学教授	衛微	14.6.1	15.3.31	男	
前川美有紀	共立薬科大学助教授	環境	14.6.1	14.12.13	女	
山田可南子	玉川大学教授	衛微	14.7.1	15.3.31	女	
木村希美子	玉川大学教授	衛微	14.7.1	15.3.5	女	
木村幸子	麻布大学教授	衛微	14.8.1	15.3.31	女	
堀江順子	麻布大学教授	衛微	14.8.1	15.3.31	女	
田中真理子	東京農業大学学長	衛微	14.9.1	15.3.31	女	
蒲野生	共立薬科大学学長	医薬	14.9.2	14.12.14	女	
野本哲史	日本大学生物資源科学部教授	生物	15.2.20		男	
増田雄	日本大学生物資源科学部教授	有機	15.3.1		男	
杉山由	日本大学生物資源科学部教授	有機	15.3.1		男	
	北里大学理学部教授	衛微	15.3.1		男	

Morihara, M., Aoyagi, N., Kaniwa, N., Katori, N., Kojima, S. : **Hydrodynamic flows around tablets in Different Pharmacopoeial dissolution tests**  
*Drug Dev. Ind. Pharm.*, **28**, 656-662 (2002)

We investigated the hydrodynamic flows around tablets during several pharmacopoeial dissolution tests: the rotating basket (RB), paddle (PD), flow-through cell (FT) and disintegration (DI) tests. The determination of hydrodynamic flow was based on the dissolution rate of United States Pharmacopoeial salicylic acid nondisintegrating calibrators, and showed that, compared with the PD and RB methods, the FT method produced a lower hydrodynamic flow value whereas the DI method produced a higher value. The hydrodynamic flows during the PD and RB tests appeared to be similar at the same rotational speed, although the flow patterns around the tablet differed; with the RB method, homogeneous dissolution occurred from all surfaces of the tablet, while with the PD method, dissolution from the lower surface was slower. The use of a sinker seemed to enhance dissolution from the lower surface. Such differences in hydrodynamic flow could explain the apparently different dissolution behaviors of disintegrating prednisone and nondisintegrating acetaminophen tablets when assessed by the PD and RB methods. These differences in hydrodynamic flow between in vitro tests should be considered when choosing dissolution tests for studying in vitro/in vivo relationships and for quality control purposes.

Keywords: dissolution test; hydrodynamic flow; salicylic acid tablet, USP calibrator

Katori, N., Aoyagi, N., Kojima, S. : **Mass Variation Tests for Coating Tablets and Hard Capsules: Rational Application of Mass Variation Tests**  
*Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1176-1180 (2002)

The mass variation test is a simplified alternative test version of the content uniformity test. In the case of coating tablets and capsules, the mass variation test is principally applied to test the inner cores or fillings containing the active ingredient. However, some exceptions exist in pharmacopoeias. The effects of tablet coating and capsule shell on the results of the mass variation test were studied. The mass variation of outer crusts (coatings, capsule shells) and inner cores (core tablets, fillings) was measured separately in several products. The effects of coating on weight variability were very large for sugar-coated tablets. The cause of the large RSD is the large variation the weight of sugar-coating. In the case of film-coated tablets, the effect of coating weight on the mass variation test was very small because the rate of coating in comparison to the whole weight was small. For all the dosage units, the mass variation test can principally be applied to determine which mass is

expected to be proportional to the content of the active ingredient. However, some modification of acceptance values enables application of the mass variation tests to inapplicable cases.

Keywords: mass variation; content uniformity; coating tablets; hard capsules; Japanese Pharmacopoeia

Izutsu, K., Kojima, S. : **Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying**  
*J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1033-1039 (2002)

The relationship between mannitol crystallization during freeze-drying and its effects on stabilizing protein structures was studied using lysozyme, bovine serum albumin, ovalbumin, beta-lactoglobulin and lactate dehydrogenase as model proteins. FT-IR analysis of the protein secondary structure indicated perturbation of both alpha-helix and beta-sheet regions in freeze-drying without cosolutes, whereas the proteins retained most of their native structure in co-lyophilization with sucrose. Mannitol protected the protein structure to different degrees depending on the crystallinity. The combination of mannitol with potassium phosphate buffer reduced the mannitol crystallinity and the structural changes occurring during freeze-drying, whereas mannitol by itself showed little stabilizing effect. Heat-treatment of the frozen solutions at -10 degrees C resulted in a higher mannitol crystallinity and a smaller stabilizing effect in freeze-drying. The secondary structure perturbation was mostly reversible in rehydrated solutions. The varied structure-stabilizing effects of mannitol paralleled its effects on maintaining lower concentrations of enzyme activity during freeze-drying. These results confirm the contribution of molecular interactions between amorphous excipients and proteins (e.g. hydrogen bonding) to structure stabilization during freeze-drying.

Key words: freeze-drying, protein formulation, stabilization

青柳伸男：日本版オレンジブックとは  
*医療*, **56**(8), 457-460 (2002)

FDAのオレンジブックは先発品と後発品の治療学的同等性を示しているが、日本版オレンジブックは溶出の同等性を示している。しかし、溶出が同等であれば、バイオアベイラビリティ、治療効果に著しい差を生じる可能性は少なく、治療学的同等性を保証しようとする目的は日本のオレンジブックも同じである。本論文では、溶出の同等性と生物学的及び治療学的同等性との関係について述べると共に、オレンジブック誕生までの経緯を紹介している。オレンジブックを参照すれば、品質再評価で溶出の同等性が確認された後発品を知ることができるが、溶出試験規格、再評価の進捗状況、そして生理学的pH範囲の溶出プロファイルをも知ることができる。特に、溶出プロファイルは、医薬品の品質、体内での溶出を知る上で有用な情報である。

Keywords: orange book; dissolution test; reevaluation of drug quality; bioequivalence

Yoshioka, S., Aso, Y. and Kojima S. : **Different molecular motions in lyophilized protein formulations as determined by laboratory and rotating frame spin-lattice relaxation times.**

*J. Pharm. Sci.*, **91**, 2203-2210 (2002)

The spin-lattice relaxation times in the laboratory and rotating frame ( $T_1$  and  $T_{1\rho}$ ) of protons and carbons in lyophilized bovine serum  $\gamma$ -globulin formulation containing dextran were determined by  $^1\text{H}$  solid-state pulsed NMR and high-resolution  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR. The temperature dependence of  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  of dextran protons in the lyophilized formulation suggests that the correlation time,  $\tau_c$ , of the methylene protons in dextran is around  $10^6$  s at  $-100^\circ\text{C}$  and 60% relative humidity, and decreases to  $10^7$  s at  $0^\circ\text{C}$ . When temperature is increased from  $0^\circ\text{C}$ , the increased motion of the methylene groups is reflected in  $T_1$ , but is too fast to be observed by changes in  $T_{1\rho}$ . Thus, the motion of the methine groups rather than the methylene groups begins to be reflected in  $T_{1\rho}$ . The correlation time of the methine protons as determined by  $T_{1\rho}$  was of the same order as that of the methine carbons as determined by  $T_{1\rho}$ . As the temperature is increased past the glass/rubber transition temperature, both the methylene and methine motions are greatly enhanced, resulting in much shorter  $T_1$  and  $T_{1\rho}$  relaxation times.

Key words: molecular mobility, lyophilized formulation, NMR relaxation time

Yoshioka, S., Aso, Y., Kojima, S. and Cappuccino N. F.\* : **A comparison of the analysis of covariance (ANCOVA) and range-based approaches for assessing batch-to-batch variability of the stability of pharmaceutical products.**

*Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 881-883 (2002)

Stability data were generated by the Monte Carlo method, and batch-to-batch variability was evaluated by analysis of differences in slope and intercept according to the ANCOVA approach recommended in the FDA Guidance. Using the same generated data, batch-to-batch variability was also evaluated by assessing the equivalence of shelf lives estimated for individual batches based on the range (Range-based approach) in order to compare the ability of the two approaches to detect stability differences among batches. The results of the study indicated that the Range-based approach can detect a 30% difference in the slope of degradation curves among batches with a similar b error as the ANCOVA approach, provided that degradation data are obtained with assay errors below 0.5. The range-based approach appears to be useful as an alternative method to ANCOVA, if it is modified such that the variance of estimates is taken into

account.

Key words: stability; shelf-life; ANCOVA

\* Apotex Inc. Canada

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**

低温生物工学会誌 **48**, 42-46 (2002)

凍結乾燥製剤に残存する水分は(1)反応物, (2)可塑剤, (3)反応の場として作用し, 製剤の保存安定性に影響を及ぼすと考えられているが, 保存安定性に及ぼす残存水分の影響を定量的に解析した例はほとんどない. 本研究において, セファロチンの加水分解反応速度に及ぼす水分の影響を解析することにより, 反応物としての水分の作用を明らかにすることができた. また, スルファジアジンからアスピリンへのアミノ基転移反応速度の解析から水分の可塑剤としての作用を明らかにすることができた.

Keywords: Stability, water, lyophilization

Aso, Y., Yoshioka, S., Zhang, J.\* and Zograf, G.\* : **Effect of water on the molecular mobility of sucrose and poly(vinylpyrrolidone) in a colyophilized formulation as measured by  $^{13}\text{C}$ -NMR relaxation time.**

*Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 822-826 (2002)

Individual molecular mobility of sucrose and poly(vinylpyrrolidone) (PVP) in a colyophilized mixture of 1:1 by weight has been determined by  $^{13}\text{C}$  spin-lattice relaxation times in the laboratory frame ( $T_1$ ) and in the rotating frame ( $T_{1\rho}$ ) for systems containing absorbed water at various levels. The  $T_1$  of the PVP pyrrolidone ring carbon increased with storage relative humidity (RH) in lyophilized PVP alone, indicating that the MHz-order motions of PVP side chain increased with storage RH. However, in the colyophilized mixture, the side chain motions of PVP did not change with storage RH, and showed similar mobility to sucrose. This may be caused by hydrogen bonding between the PVP ring carbonyl group and hydroxyl group of sucrose, as suggested by a previous FT-Raman study. The mid-kHz-order motions of sucrose in the sucrose-PVP mixture as determined by  $T_{1\rho}$  did not increase with storage RH as much as in lyophilized sucrose alone. This suggests that the molecular mobility of sucrose decreases in the presence of PVP due to hydrogen bonding between the hydroxyl group of sucrose and the carbonyl group of PVP. Inhibition of sucrose crystallization by PVP in the presence of water appears to be linked to the effect of PVP on the molecular mobility of sucrose.

Key words: Mobility, NMR, lyophilization

\* School of Pharmacy, University of Wisconsin-Madison, U.S.A.

坂本知昭, 石橋無味雄, 小嶋茂雄 : **日本薬局方の参照吸収スペクトルに関する研究 その3**

医薬品研究, **33**, 462-476 (2002)

The Japanese Pharmacopoeia (JP) serves as the

reference standard for the quality of medicinal drugs. Identification methods by comparing spectral patterns of samples to those of their reference spectra have been introduced to many monographs in JP14 not only for the methods using infrared (IR) spectra but also for the methods using ultraviolet and visible (UV) spectra. There are some problems in judging the identities by these methods. Therefore, in this paper, the authors try to point out the problems and make clear their causes, and also try to give some advises for carrying out the test precisely. For example, anion-exchange may occur when drugs of salt-type, such as croconazole hydrochloride, penbutolol sulfate and oxapium iodide, are mixed and grinded with potassium bromide (KBr) in the course of preparing tablets for the measurement of their IR spectra by KBr disc method. To avoid the confusion caused from the spectral change due to the anion-exchange, it is desirable to use potassium chloride (KCl) disc method to measure the IR spectra of drugs of chloride salt-type, and to use paste method using liquid paraffin to measure the IR spectra of drugs of other salt-type. Therefore, IR spectra measured by KCl disc method was adopted as reference spectra for 34 kinds of drugs of chloride type in JP14.

Kawasaki N, Itoh S, Ohta M, and Hayakawa T. : **Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry**

*Anal. Biochem.*, **316**, 15-22 (2003)

We have studied rapid and simple sugar mapping using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC/MS) equipped with a graphitized carbon column. The oligosaccharide mixture was separated on the basis of the sequence, branching structure, and linkage, and each oligosaccharide was characterized based on its molecular mass. In this study we demonstrated the usefulness of capillary LC/MS (CapLC/MS) and capillary liquid chromatography/tandem mass spectrometry (CapLC/MS/MS) as sensitive means for accomplishing the structural analysis of oligosaccharides in a low-abundance glycoprotein. The carbohydrate heterogeneity and molecular mass information of each oligosaccharide can be readily obtained from CapLC/MS of a small amount of glycoprotein. CapLC/MS/MS provided b-ion series, which is informative with regard to monosaccharide sequence. Exoglycosidase digestion followed by CapLC/MS elucidated a carbohydrate residue linkage. Using this method, we characterized N-linked oligosaccharides in hepatocyte growth factor produced in mouse myeloma NS0 cells as the complex-type bi-, tri-, and tetraantennary terminated with N-glycolylneuraminic acids and alpha-linked galactose residues. Sugar mapping with CapLC/MS and CapLC/MS/MS is useful for

monitoring glycosylation patterns and for structural analysis of carbohydrates in a low-abundance glycoprotein and thus will become a powerful tool in biological, pharmaceutical, and clinical studies.

Keywords: LC/MS, HGF, NS0 cell

Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T. : **Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products**  
*Biologicals*, **30**, 113-124 (2002)

We have previously reported that sugar-mapping by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) equipped with a graphitized carbon column (GCC) can be useful for structural analysis of carbohydrates in a glycoprotein. In this paper, we evaluated sugar-mapping with regard to its use in comparability assessment of glycoprotein products. Erythropoietins (EPO) produced from three different sources were chosen as models of the closely related glycoprotein products. The two-dimensional displays of sugar maps drawn by LC/MS with GCC clearly showed the differences in carbohydrate heterogeneity with regard to sialylation, acetylation, and sulphation patterns among three EPOs. Exoglycosidase digestion followed by sugar-mapping provided information regarding the structure of characteristic carbohydrates in each EPO. These results demonstrate that LC/MS with GCC can reveal the details of carbohydrate heterogeneity in order to distinguish between closely related glycoprotein products. Our method can thus be useful in comparability assessments of therapeutic glycoproteins.

Keywords: LC/MS, sugar-mapping, erythropoietin

Ohta, M., Kawasaki, N., Itoh, S., and Hayakawa, T. : **Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products**  
*Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)

We previously reported on glycopeptide mapping of erythropoietin (EPO) by liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS). Using this method, glycopeptides in proteolytic digestion can be eluted before peptides, and are further separated on the basis of the carbohydrate structure. The detailed glycosylation at each glycosylation site can be elucidated based on mass chromatography and mass spectroscopy. In this study, we evaluated glycopeptide mapping with regard to its use in comparability assessment of glycoprotein products possessing multiple glycosylation sites. Models of closely related glycoprotein products used in this study are EPOs produced from three different sources. We previously reported that there are differences in the carbohydrate heterogeneity of these EPOs with regard to sialylation, acetylation, and sulphation patterns, using sugar mapping

by LC/MS. In this paper, we demonstrated that glycopeptide mapping can distinguish site-specific glycosylation among these three EPOs and reveal the differences in acetylation, sialylation, and sulphation at each glycosylation site in one analysis. Our method can thus be useful in comparability assessment of therapeutic glycoproteins in terms of glycosylation.

Keywords: LC/MS, glycopeptide mapping, erythropoietin

Itoh, S., Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T. : **Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry**

*J. Chromatogr. A*, **968**, 89-100 (2002)

We previously reported that graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry (GCC-LC-MS) is very useful for the structural analysis of carbohydrates in a glycoprotein. In this study, GCC-LC-MS was adapted for the simultaneous microanalysis of oligosaccharides. A variety of oligosaccharide alditols prepared from fetuin, ribonuclease B, and recombinant human erythropoietin were used as model oligosaccharides. The use of microbore GCC-LC-MS was found to be successful for rapid, sensitive, and simultaneous analysis of high-mannose-type, desialylated fucosyl complex-type, sialylated complex-type, and sialylated fucosyl complex-type oligosaccharide alditols. Furthermore, we demonstrate that this method is applicable to the analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein that possesses diverse oligosaccharides. Microbore GCC-LC-MS was able to characterize high-mannose-type, hybrid-type, and complex-type oligosaccharides in tissue plasminogen activator produced from human melanoma cells in a single analysis

Keywords: LC/MS, microbore column, N-linked oligosaccharides

Itoh S., Kawasaki, N., Ohta, M., and Hayakawa, T. : **Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin**

*J. Chromatogr. A*, **978**, 141-152 (2002)

Using recombinant human thrombomodulin (rhTM) expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells, we studied the structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). First, we analyzed the structure of both the O- and N-linked glycans in rhTM by oligosaccharide mapping using LC-MS equipped with a graphitized carbon column (GCC-LC-MS). Major O- and N-linked glycans were determined to be core 1 structure and fucosyl biantennary containing NeuAc(0-2) respectively. Next, the post-

translational modifications and their heterogeneities, including the site-specific glycosylation, were analyzed by mass spectrometric peptide/glycopeptide mapping of trypsin-digested rhTM and precursor-ion scanning. Precursor-ion scanning was successful in the detection of five glycopeptides. Four N-glycosylation sites and their site-specific carbohydrate heterogeneity were determined by their mass spectra. O-Glycosylation could be estimated on the basis of its mass spectrum. We were able to identify partial beta-hydroxylation on Asn324 and Asn439, and O-linked glucose on Ser287 from the peptide/glycopeptide map and their mass spectra. We demonstrated that a sequential analysis of LC-MS and LC-MS-MS are very useful for the structural analysis of O- and N-linked glycans, polypeptides, and post-translational modifications and their heterogeneities, including site-specific glycosylation in a glycoprotein. Our method can be applied to a glycoprotein in biological samples.

Keyword: LC/MS, thrombomodulin, glycoprotein

Tanaka, H. \*, Nishimaru, K. \*, Makuta, R. \*, Hirayama, W. \*, Kawamura, T. \*, Matsuda, T. \*, Tanaka, Y. \*, Kawanishi, T., and Shigenobu, K. \* : **Possible Involvement of Prostaglandins F<sub>2α</sub> and D<sub>2</sub> in Acetylcholine-Induced Positive Inotropy in Isolated Mouse Left Atria**

*Pharmacology*, **67**, 157-162 (2003)

The inotropic action of prostaglandins PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> on isolated mouse left atria was characterized and compared with the positive inotropic action of acetylcholine, which has previously been shown to be mediated by prostaglandins released from the endocardial endothelium. PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> produced positive inotropic responses; the time course of the change in contractile force induced by PGF<sub>2α</sub> and PGD<sub>2</sub> was about the same as that by acetylcholine, while that by PGE<sub>2</sub> was slower. Fluprostenol and sulprostone, FP and EP receptor agonists, respectively, had positive inotropic effects while BW-245C, a DP receptor agonist, had no effect. AH6809, a DP receptor antagonist, had no inhibitory effect on the positive inotropic response to PGD<sub>2</sub>. Dimethylamiloride, an inhibitor of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, inhibited the positive inotropic response to PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> and acetylcholine, but not PGE<sub>2</sub>. Fluorometric pH measurement with carboxy-SNARF-1-loaded atrial myocytes revealed no change in intracellular pH on application of PGF<sub>2α</sub>. PGF<sub>2α</sub> and PGD<sub>2</sub> significantly prolonged the duration of the atrial action potential while PGE<sub>2</sub> had no significant effect. These findings suggest that prostaglandins induce positive inotropic response in mouse atria through FP and EP receptor stimulation and that the former mechanism mediates in part the positive inotropic response to acetylcholine.

Key Words: Prostaglandin, Acetylcholine, Cardiac muscle

\*東邦大学薬学部

Kobayashi, T., Niimi, S., Fukuoka, M. \*, and Hayakawa, T. : **Regulation of inhibin  $\beta$  chains and follistatin mRNA levels during rat hepatocyte growth induced by the peroxisome proliferator di-n-butyl phthalate**  
*Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1214-1216 (2002).

Peroxisome proliferators stimulate hepatocyte growth in rat liver in vivo. Activin A, a homodimer of inhibin  $\beta_A$ , inhibits DNA synthesis in hepatocytes. The inhibitory action of activin A is suppressed by follistatin, an activin-binding protein. In this paper, we investigated whether administration of di-n-butyl phthalate (DBP), a peroxisome proliferator, modifies the production of activin A and follistatin in rat liver by hourly monitoring of inhibin  $\beta_A$  and follistatin mRNA levels by reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. The mRNA levels of the other inhibin  $\beta$  chains (inhibin  $\beta_B$  and  $\beta_C$ ) were examined in a similar manner. The inhibin  $\beta_A$  mRNA level decreased to about 30% by 3 h after DBP administration (8.6 mmol/kg body weight), remained low until 12 h, and returned to its original level by 24 h. The follistatin mRNA level increased to about 2 times by 6 h, and returned to its original level by 24 h. The inhibin  $\beta_B$  mRNA had started to increase by 1 h, peaked at 6 h at about 4 times its initial level, and returned to its original level by 12 h. The inhibin  $\beta_C$  mRNA level had doubled by 6 h and it returned to its original level. These results indicate that the growth stimulatory action of peroxisome proliferators may be mediated via the decrease in activin A level and activity and suggest that the increases in follistatin as well as inhibin  $\beta_B$  and  $\beta_C$  chains may play a role in peroxisome proliferator-stimulated hepatocyte growth.

**Key words:** inhibin  $\beta$  chain, follistatin, peroxisome proliferator

\*昭和薬科大学

Kobayashi, T., Niimi, S., Kawanishi, T., Fukuoka, M. \*, and Hayakawa, T. : **Changes of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate**  
*Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225 (2003).

Changes in gene expression regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) and in gene expression related to the inhibin/activin-follistatin system in the rat testis induced by a single oral administration of di-n-butyl phthalate (DBP) (8.6 mmol/kg) were examined and compared with those in the control rats using reverse-transcriptase polymerase chain reaction. The increase in cytochrome P450 4A1 mRNA, which is regulated by PPAR $\alpha$ , was significant, but not so profound as the increase of P450 4A1 mRNA in the liver. In contrast, a remarkable increase in the mRNA level of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) was found in the testis,

suggesting the activation of PPAR  $\gamma$ . The substantial increase in PAI-1 may be related to the disruption of spermatogenesis. On the other hand, significant suppression of the mRNA level of inhibin  $\beta_B$  and elevation in the mRNA level of follistatin, an activin-binding protein, were observed after the DBP-administration. Activin B, a homodimer of inhibin  $\beta_B$ , is known to stimulate spermatogonial proliferation. The present results suggest that the suppression of spermatogenesis resulting from the changes in the expression of genes involved in the inhibin/activin-follistatin system is one of the mechanisms of the testicular atrophy induced by DBP.

**Key words:** di-n-butyl phthalate, testis, PPAR  $\gamma$

\*昭和薬科大学

Niimi, S., Hyuga, M., Kazama, H. \*, Inagawa, M. \*, Seki, T. \*, Ariga, T. \*, Kobayashi, T., Hayakawa, T. : **Activins A, AB, and B inhibit hepatocyte growth factor synthesis by MRC-5 human lung fibroblasts**  
*Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1405-1408 (2002)

The effect of activins A, AB, and B on hepatocyte growth factor (HGF) synthesis stimulated by 12-O-tetradecanoylphorbol  $\beta$ -acetate (TPA) was studied in MRC-5 human lung fibroblasts. Activins A, AB, and B inhibited the increase in HGF secretion induced by TPA in different dose-dependent manners and potencies. At 5 ng/ml, activins A and AB inhibited the increase approximately 30% and 10%, respectively, and at 25 ng/ml both activins produced almost maximal inhibition, *i.e.*, approximately 40%. Activin B caused 10% inhibition at 12 ng/ml, and at 25 ng/ml produced almost maximal inhibition, approximately 30%. Further analysis with activin A indicated that the inhibition was caused by decreased HGF mRNA levels, followed by decreased cellular HGF levels. At 25 ng/ml, activin A inhibited the increase in HGF in the cellular lysate and the increase in HGF mRNA level approximately 80% and 40%, respectively.

**Key words:** activin; HGF synthesis; TPA;

\*日本大学生物資源科学部

Niimi, S., Oshizawa, T., Yamacuchi, T., Harashima, M. \*, Seki, T. \*, Ariga, T. \*, Kawanishi, T., Hayakawa, T. : **Specific expression of annexin  $\beta$  in rat-small- hepatocytes**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 770-774 (2002)

Small hepatocytes are cells that express characteristic phenotypes such as a high growth potential and differentiation capacity. In order to identify rat-small-hepatocyte specific proteins, we separated the cellular proteins of isolated small and parenchymal hepatocytes by 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Comparison of their profiles revealed a protein with a molecular mass of 37 kDa in the small hepatocytes that was not present in the parenchymal hepatocytes. Proteolytic peptide mass fingerprinting was used to

identify the protein, and it was found to be annexin  $\beta$ . The validity of the identification was confirmed by Western blot analysis with anti-annexin  $\beta$  antibody.

Keywords: small hepatocytes; annexin  $\beta$ ; proteome analysis

\*日本大学生物資源科学部

Matsufuji, H.\*, Ngang, E.\*, Chino, M.\*, Goda, Y., Toyoda, M., Takeda, M.\*: **Identification and determination of unknown subsidiary colors in commercial Food Green No. 3 (Fast Green FCF, FD&D Green No. 3)**

*Jpn J. Food Chem.*, 9, 107-113 (2002)

Three subsidiary colors (Sub-A, Sub-B, and Sub-E) were isolated from commercial Food Green No. 3 (G-3) by using preparative HPLC and their structures were determined by MS and NMR. The structures of Sub-A, Sub-B, and Sub-E were the disodium salt of 2-[[4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl) amino]phenyl] [4-[N-(3-sulfophenylmethyl) amino] phenyl] methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid (abbreviated as HSBA-(m-BASA) (m-EBASA), the disodium salt of 2-[bis[4-[N-ethyl-N-(4-sulfophenylmethyl) amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid (abbreviated as p,p-G-3) and the disodium salt of 2-[[4-[N-ethyl-N-(2-sulfophenylmethyl) amino]phenyl] [4-[N-ethyl-N-(3-sulfophenylmethyl) amino]phenyl]methyl]-4-hydroxybenzenesulfonic acid (abbreviated as o, m-G-3), respectively. HPLC analyses revealed that the contents of seven subsidiary colors (Sub-A, B, C, E, F, G and H) including the four subsidiary colors (Sub-C, F, G, and H) reported previously in 4 commercial G-3 products were 0.45-1.20%, 0.19-2.60%, 8.49-27.0%, 0.05-1.52%, 1.15-2.37%, 0.05-0.22%, and ND-0.24%, respectively.

Key words: Food Green No.3, subsidiary color, structural determination

\* College of Bioresource Science, Nihon University

柿原芳輝\*, 合田幸広, 穂山 浩, 松藤 寛\*, 千野誠\*, 豊田正武, 武田明治\*: **市販豆腐からの組換え遺伝子の検知並びに原料ダイズ中の組換え体比率の推定** 日食化誌, 9, 60-66 (2002)

本研究では, 平成13年4月の表示義務制度試行前後に購入した豆腐についてPCRを利用した組換え遺伝子の検知を行い, 表示義務制度施行による検知結果の差異および表示と実際の検知結果の際について検討した. 表示義務制度施行以前に購入した30品中13品から組換え遺伝子が検知された. 組換え遺伝子が検知された13品中8品には「組換えダイズ不使用」等の表示があった. 表示義務制度施行後に購入した25品中7品から組換え遺伝子が検知され, その7品全てに「組換えダイズ不使用」等の表示があった. 「組換えダイズ不使用」等の表示があり組換え遺伝子が検知されたものについてABI 7700を用いた定量PCRを行い, 原料ダイズ中の組換え体含有率を推定した. その結果, 組換えダイズの混入は全て1%未満であることが明らかとなった. 表示義務制度で

は, 生産, 流通段階を通じてIPハンドリングされた非組換え農作物を原材料とする場合には, 任意に「遺伝子組換え体でない」等の表示を行って良いことを認めており, IPハンドリングされた作物への非意図的な混入は避けられないものとされている. 従って, 組換え遺伝子が検知された「組換えダイズ不使用」等の表示がある豆腐は, その含有率の低さから, 組換えダイズの非意図的な混入があった可能性が高いことが考えられた.

Key words: Tofu, genetically modified soybean, mandatory labeling system

\*日本大学生物資源科学部

合田幸広, 穂山 浩, 酢山恵美子, 高橋 敏\*<sup>1</sup>, 金城順英\*<sup>2</sup>, 野原稔弘\*<sup>2</sup>, 豊田正武: **遺伝子組換え, 非組換えダイズ中のソヤサポニン及びイソフラボン量の比較**

食衛誌 43, 3369-347 (2002)

遺伝子組換えダイズ後代交配品種6品種及びダイズ非遺伝子組換え品種6品種について, ダイズの主要な二次代謝産物であるソヤサポニン及びイソフラボンの含量比較を行った. まず, 抽出, 分画操作で得られる各画分の重量について比較したところ, 組換え, 非組換えダイズに関わらず, どのダイズにおいても, 各画分の重量は, ほぼ一定であった. さらに, 粗ソヤサポニン及び粗イソフラボン画分についてHPLC分析を行ったところ, 組換えダイズ, 非組換えダイズの各ソヤサポニン及びイソフラボンの平均含量には, 有意な差がないことが判明した. 従って, 組換えダイズ後代交配品種は非組換え品種に対し, 主要な二次代謝物含量において, 差異が認められないことが明らかとなった.

Key words: genetically modified soybean, soya saponin, isoflavone

\*<sup>1</sup> 富山県薬事研究所

\*<sup>2</sup> 熊本大学薬学部

Gao, H., Kuroyanagi, M., Wu, L., Kawahara, N., Yasuno, T., Nakamura, Y.: **Antitumor-Promoting Constituents from *Dioscorea bulbifera* L. in JB6 Mouse Epidermal Cells** *Biol. Pharm. Bull.*, 25 (9), 1241-1243 (2002)

An antitumor-promoting effect was found in the extracts/ingredients of a plant used as a traditional medicine in mainland China, using the neoplastic transformation assay of mouse epidermal JB6 cell lines. The ethyl acetate soluble fraction of 75% ethanol extract of the rhizomes of *Dioscorea bulbifera* L. showed an inhibitory effect against the tumor promotion of JB6 (Cl 22 and Cl 41) cells induced by a promoter, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Further investigation on the constituents of the EtOAc fraction from the rhizomes revealed the chemical structure to be kaempferol-3,5-dimethyl ether (1), caryatin (2), (1)-catechin (3), myricetin (4), quercetin-3-O-galactopyranoside (5), myricetin-3-O-galactopyranoside (6), myricetin-3-O-glucopyranoside (7) and diosbulbin B (8). Constituent antitumor-promoting activities were also examined in the

same way. Compounds 1-7, characterized as flavonoids with the two hydroxyl groups at C-7 and C-4, showed the most potent inhibitory effect, but there seemed to be differences in the inhibitory effect between flavonol aglycones and flavonol glycosides. Compared with (-)-epicatechin, (+)-catechin exhibited much stronger inhibitory activity which suggested that chemical stereo structures of compounds affect the efficiency of inhibition. Compound 8 showed moderate activity. The constituents with antitumor-promoting activity from this plant are reported for the first time.

Key words: antitumor-promoting activity; *Dioscorea bulbifera* L.; flavonoid glycoside

Totsuka, Y.\*<sup>1</sup>, Takamura-Enya, T.\*<sup>1</sup>, Kawahara, N., Nishigaki, R.\*<sup>1</sup>, Sugimura, T.\*<sup>1</sup>, Wakabayashi, K.\*<sup>1</sup>: **The structure of DNA adduct formed with aminophenylnorharman, being responsible for the co-mutagenic action of norharman with aniline**

*Chemical Research in Toxicology*, **15** (10), 1288-1294 (2002)

A mutagenic heterocyclic amine (HCA), 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole (aminophenylnorharman, APNH), is produced in the presence of S9 mix by the reaction of norharman and aniline, both of which are nonmutagenic and abundantly present in our environment. It has been previously reported that APNH-DNA adducts were detected in DNA of *Salmonella typhimurium* strain incubated with APNH and S9 mix. In the present study, we examined the structures of APNH-DNA adducts using the <sup>32</sup>P-postlabeling method and various spectrometry techniques. When the reaction mixture of *N*-acetoxy-APNH and 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate (3'-dGp) was analyzed, three adduct spots (two major and one minor) were observed by <sup>32</sup>P-postlabeling under modified-standard conditions. No adduct formation was observed for reaction mixtures of *N*-acetoxy-APNH with 3'-dAp, 3'-dTp, or 3'-dCp. The two major adduct spots (spots 1 and 2) detected by TLC were extracted and subjected to HPLC along with the standards 3',5'-pdGp-C8-APNH and 5'-pdG-C8-APNH, which were independently chemically synthesized. On the basis of the results of co-chromatography, spots 1 and 2 were identified to be 5'-monophosphate and 3',5'-diphosphate forms of dG-C8-APNH. When the extract of spot 2 (3',5'-pdGp-C8-APNH) was further digested with nuclease P1 and phosphodiesterase I, a spot corresponding to spot 1 (5'-pdG-C8-APNH) was newly observed on TLC. From these observations, both of the two major spots were concluded to be dG-C8-APNH. A similar DNA adduct pattern to that apparent in vitro was observed in various organs of F344 rats fed 40 ppm of APNH for 4 weeks. The levels of APNH-DNA adducts were highest in the liver and colon, with RAL values of  $1.31 \pm 0.26$  and  $1.32 \pm 0.11$  adducts/ $10^7$  nucleotides, respectively. Thus, APNH was demonstrated to form DNA adducts primarily at the C-8

position of guanine residues in vitro and in vivo, like other mutagenic and carcinogenic HCAs.

Key words: aminophenylnorharman; DNA adducts; mutagenic heterocyclic amine

\* 国立がんセンター研究所

Kawahara, N., Satake, M.\*<sup>1</sup>, Goda, Y.: **A New Acylated Flavonol Glycoside from the Leaves of *Eriobotrya japonica***

*Chem. Pharm. Bull.*, **50** (12), 1619-1620 (2002).

A new acylated flavonol glycoside was isolated from the leaves of *Eriobotrya japonica* along with two known flavonol glycosides. Their structures were determined by extensive spectroscopic investigation.

Key words: *Eriobotrya japonica*; Biwayo; flavonol glycoside

\* 日本薬剤師研修センター

Chakravarty, A. K.\*<sup>1</sup>, Sarkar, T.\*<sup>1</sup>, Nakane, T., Kawahara, N., Masuda, K.\*<sup>2</sup>: **New Phenylethanoid Glycosides from *Bacopa monniera***

*Chem. Pharm. Bull.*, **50** (12), 1616-1618 (2002).

Three new phenylethanoid glycosides, viz. monnierasides I-III (1-3) along with the known analogue plantainoside B were isolated from the glycosidic fraction of *Bacopa monniera*. Their structures were elucidated mainly on the basis of two dimensional (2D) NMR spectral analyses.

Key words: *Bacopa monniera*; phenylethanoid glycoside; monnieraside I

\*<sup>1</sup> Indian Institute of Chemical Biology

\*<sup>2</sup> 昭和薬科大学

Chakravarty, A. K.\*<sup>1</sup>, Garai, S.\*<sup>1</sup>, Nakane, T., Masuda, K.\*<sup>2</sup>, Kawahara, N.: **Bacopasides III-V: Three New Triterpenoid Glycosides from *Bacopa monniera***

*Chem. Pharm. Bull.*, **51** (2), 215-217 (2003).

Three new saponins, designated as bacopasides III, IV and V have been isolated from *Bacopa monniera* WETTST. and their structures have been elucidated as 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranosyl jujubogenin (1), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl jujubogenin (2) and 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl pseudojujubogenin (3) mainly on the basis of two dimensional (2D) NMR and other spectral analyses.

Key words: *Bacopa monniera*; saponin; pseudojujubogenin

\*<sup>1</sup> Indian Institute of Chemical Biology

\*<sup>2</sup> 昭和薬科大学

Kamakura, H., Hirano, T.\*<sup>1</sup>, Ito, H.\*<sup>2</sup>, Sunaga, H.\*<sup>1</sup>, Takizawa, H.\*<sup>1</sup>, Takatani, Y.\*<sup>1</sup>, Sekita, S. and Satake, M.\*<sup>3</sup>: **Studies on the sterilization methods for the crude drugs Possibility of EB machine for decontamination of crude drugs and influence on the components of crude drugs by irradiation**

*Radiat. Physic. Chem.*, **63**, 685-689 (2002)

As the sterilization method for crude drugs, irradiation

may be more advantageous method than general method with dry heat, steam under pressure, flowing steam or gases. Electron beam (EB) irradiation for crude drugs of various shapes and sizes may be effective method. T. Hirano et al. previously reported on the possible application of EB for plant quarantine treatment. In the case of the irradiation method for crude drugs, there have been only a few reports on the influence of components and the optimum irradiation conditions. To apply EB irradiation for the sterilization of crude drugs, it is necessary to investigate basic studies of the optimum irradiation conditions for crude drugs and influence on the components of crude drugs by irradiation. In this study, computer tomography (CT) was applied for measuring density distribution in the package for the purpose to estimate dose uniformity same as previous report and quantitative analysis of crude drugs was carried by GC-MS and HPLC. The density of crude drugs is usually much different by products and even in the part of a product. On the whole samples, it is difficult to obtain the same distribution of dose. However the cut of samples averages the density in the part of product. In this case, good dose uniformity was obtained. After irradiation, the contents of low-molecular components were little different from before irradiation. On the high molecular components, The PHELLODENDRON BARK showed clearly a decreased viscosity by irradiation. The chemical data of the polysaccharide fraction relate a phenomenon to a case.

Keywords: Sterilization method, Irradiation simulation, Computer tomography

\*1 Communication Systems Center, Mitsubishi Electric Corporation, Japan

\*2 Takasaki Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute, Japan

\*3 Japan Pharmacists Education Center

Maruyama T., Saeki D.\*, Ito M.\*, Honda G.\* :  
**Molecular cloning, functional expression and characterization of *d*-limonene synthase from *Agastache rugosa***

*Biol. Pharm. Bull.*, **25** (5), 661-665 (2002)

We cloned the gene of *d*-limonene synthase (ArLMS) from *Agastache rugosa* (Labiatae). The function of ArLMS was elucidated by the preparation of recombinant protein and subsequent enzyme assay. ArLMS consisted of 2077 nucleotides including 1839 bp of coding sequence that encodes a protein of 613 amino acids. This protein has a 60 kDa molecular weight, which is identical to that of *d*-limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia* (Labiatae). The deduced amino acid sequence of ArLMS shows high homology with the known *d*- and *l*-limonene synthases from Labiatae plants. Here, we discussed the amino acid residues responsible for the stereochemical regulation in limonene biosynthesis.

Keywords: *d*-limonene synthase, monoterpene biosynthesis, *Agastache rugosa*

\* Kyoto University

Ohta T.\*<sup>1</sup>, Maruyama T., Nagahashi M.\*<sup>1</sup>, Miyamoto Y.\*<sup>1</sup>, Hosoi S.\*<sup>1</sup>, Kiuchi F.\*<sup>1</sup>, Yamazoe Y.\*<sup>2</sup>, Tsukamoto S.\*<sup>1</sup> :

**Paradisins C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice**

*Tetrahedron*, **58**, 6631-6635 (2002)

A new furanocoumarin derivative, paradisins C, was isolated from grapefruit juice as an inhibitor of cytochrome P450 (CYP) 3A4. Its stereochemistry was elucidated by spectroscopic methods. The stereochemistries of 17,18-dihydroxybergamottin and 17-epoxybergamottin were also elucidated.

Keywords: grapefruit juice, furanocoumarin, CYP3A4 inhibition

\*<sup>1</sup> Kanazawa University

\*<sup>2</sup> Tohoku University

丸山卓郎, 代田 修, 川原信夫, 横山和正\*<sup>1</sup>, 牧野由紀子\*<sup>2</sup>, 合田幸広 : **内部転写スペーサー領域の塩基配列解析による幻覚性キノコ (いわゆるマジックマッシュルーム) の基原種分類**

*食品衛生学雑誌*, **44**, 44-48 (2003)

マジックマッシュルームは、幻覚性物質であるサイロシン及びサイロシピンを含有するキノコである。最近、これらのキノコ類は日本において麻薬原料植物として規制対象となった。他方、同キノコ類は多種にわたる上、粉末状態で流通する場合もあり、形態学的手法では同定が難しい場合が多い。本研究では、遺伝子情報を基にした同キノコ類の同定法開発を目的として、国内流通品の rRNA 遺伝子の内部転写スペーサー (internal transcribed spacer, ITS) 領域を解析し、その結果を基に国内流通品を 6 種に分類した。ついで、解析結果を標品及びデータベース中の塩基配列と比較することにより、流通品の基原種を明らかにした。さらに、LC を用いサイロシン含量を調べた結果、*Panaeolus cyanescens* が最も高い数値を示し、*Amanita* 属の 2 種では検出されなかった。

Keywords: magic mushroom, psilocin, internal transcribed spacer region

\*<sup>1</sup> 滋賀大学教育学部

\*<sup>2</sup> 関東信越厚生局麻薬取締部

Ozaki Y., Ono K. : **Antiinflammatory Effect of Glycyrrhizin Topically Applied to the Cotton Pellet by Granuloma Pouch Method in Rats.**

*Natural Medicines*, **56** (6), 261-263 (2002)

The present study was carried out to elucidate an antiinflammatory effect of the glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet granuloma pouch method in rats. Glycyrrhizin and indomethacin showed dose-dependent inhibition of the cotton pellet-induced granuloma formation. Glycyrrhizin and indomethacin, in

the doses in these experiments, were found to be free any apparent toxic symptoms, especially both compounds did not inhibit weight gain to the animals. From these experiments, it is suggested that glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet showed an antiinflammatory effect.

Keywords: antiinflammatory effect, glycyrrhizin, topically applied

Kikura-Hanajiri, R., Martin R. Scott<sup>\*1</sup> and Lunte Susan M.<sup>\*2</sup> : **Monitoring of Nitrate and Nitrite as an Indirect Measure of Nitric Oxide Production Using Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detection**

*Anal. Chem.*, **74** (24), 6370-6377 (2002)

An indirect method for monitoring nitric oxide (NO) by determining nitrate and nitrite using microchip capillary electrophoresis (CE) with electrochemical (EC) detection has been developed. This method combines determination of nitrite by direct amperometric detection following a microchip-based CE separation and conversion of nitrate to nitrite by chemical reduction using Cu-coated Cd granules. The amount of nitrate is quantified by calculating the difference in the amount of nitrite in the sample before and after the reduction of nitrate. Optimization of the separation, injection, detection, and reduction reaction conditions, as well as studies involving integration of the reduction reaction onto the microchip, are described. It was found that nitrite can be separated and detected in ~45 s by microchip CEEC. The reduction reaction was successfully integrated on-chip and carried out in ~1 min following activation of the Cd granules. The usefulness of this device was demonstrated by monitoring the amount of nitrate and nitrite produced from 3-morpholinosydnonimine, a NO-releasing compound.

Keywords: microchip electrophoresis, electrochemical detection, nitric oxide

<sup>\*1</sup> Department of Chemistry, The University of Iowa, USA

<sup>\*2</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry, The University of Kansas, USA

Kikura-Hanajiri, R., Kaniwa, N., Ishibashi, M., Makino Y.,\* and Kojima S. : **LC/APCI-MS analysis of opiates and their metabolites in rat urine after inhalation of opium**

*J. Chromatogr. B*, **789**, 139-150 (2003)

To examine the urinary excretion of opiates and their metabolites following inhalation exposure of opium to rats, analytical procedures for simultaneous determination of compounds in opium, the vapor derived by the volatilization of opium and the urine of rats exposed to the opium vapor were developed using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/APCI-MS). Six compounds were determined in the opium gum, namely morphine, codeine, thebaine, noscapine, papaverine and meconin. All six were

extracted with 2.5% acetic acid solution and subjected to LC/APCI-MS analysis. The separation was performed on an ODS column in acetonitrile-50 mM ammonium formate buffer (pH 3.0) by a linear gradient program and quantitative analysis was carried out in the selected ion monitoring mode ( $[M+H]^+$ ). For the analysis of the volatilization of opium, the opium (1 g) was added to a glass pipe, which was then heated at 300 degrees C for 20 min. Negative pressure (air flow rate; 200 ml/min) was used to draw the vapor through a series of glass wool and methanol traps. The total amount of each compound in the vapor was estimated by measurement of the compounds trapped in the glass wool and methanol. Wister rats (n=3) were exposed to the vapor derived from the volatilization system and the urinary amounts (0-72 hr) of the six opiates and metabolites including morphine-3-grucronide (M3G) and morphine-6-grucronide (M6G) were measured after solid-phase extraction. After inhalation exposure of opium to rats, M3G (5.45-14.38 micro g/ml), morphine (2.27-4.65 micro g/ml), meconin (0.54-1.85 micro g/ml), codeine (0.54-1.85 micro g/ml), noscapine (0.34-0.40 micro g/ml) and papaverine (0.01-0.04 micro g/ml) were detected in the urine. However, only trace levels of thebaine were observed despite it being one of the major alkaloids found in the opium. On the other hand, a relatively large amount of meconin was detected in the vapor and the urine as compared with the opium. It is suggested that the presence of meconin in biological fluids could be indicative of opium ingestion by inhalation.

Keywords: Opium inhalation, Urinary excretion of opiates, LC/APCI-MS

<sup>\*</sup> Narcotic control Department, Kanto-shin'etsu Regional Bureau of Health and Welfare

Sakai, S., Akiyama, H., Harikai, N., Toyoda, H.\* , Toida, T.\* , Maitani, T., Imanari, T.\* : **Effect of chondroitin sulfate on murine splenocytes sensitized with ovalbumin**

*Immunology Letters*, **84**, 211-216 (2002)

Chondroitin sulfate (CS) is a glycosaminoglycan that is widely present in animals organisms, and it has anti-inflammatory and chondroprotective properties. To examine the effects of CS on the immune system, splenocytes obtained from ovalbumin (OVA)-sensitized BALB/c mice were challenged with OVA in the presence of CS, and cytokine levels in the medium of the cultured cells were measured. CS induced secretion of Th1-type cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-12) by OVA-sensitized splenocytes but suppressed secretion of Th2-type cytokines (IL-5 and IL-10). Flow cytometric assay showed a significantly higher percentage of helper T cells (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells) among the splenocytes cultured with OVA and CS than with OVA alone. Analysis of the IFN- $\gamma$  mRNA level of the splenocytes by the real-time quantitative RT-PCR technique revealed higher levels in

the splenocytes cultured with OVA and CS than in the splenocytes cultured with OVA alone. This is the first demonstration that CS inhibits antigen-induced IgE production through induction of cytokine secretion by Th1 cells, and this finding suggests a potential use of CS in preventing IgE-mediated allergy.

Keywords: Chondroitin sulfate, Ovalbumin, Splenocyte

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Sakai, S., Kim, W. S.\*<sup>1</sup>, Lee, I. S.\*<sup>1</sup>, Kim, Y. S.\*<sup>1</sup>, Nakamura, A.\*<sup>2</sup>, Toida, T.\*<sup>2</sup>, Imanari, T.\*<sup>2</sup> : **Purification and characterization of dermatan sulfate from the skin of the eel, *Anguilla japonica*.**

*Carbohydrate Research*, **338**, 263-269 (2003)

Glycosaminoglycans were isolated from the eel skin (*Anguilla japonica*) by actinase and endonuclease digestions, followed by a  $\beta$ -elimination reaction and DEAE-Sephacel chromatography. Dermatan sulfate was the major glycosaminoglycan in the eel skin with 88% of the total uronic acid. The content of the IdoA2S $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4GalNAc4S sequence in eel skin, which shows anticoagulant activity through binding to heparin cofactor II, was two times higher than that of dermatan sulfate from porcine skin. The anti-IIa activity of eel skin dermatan sulfate was determined to be 2.4 units/mg, whereas dermatan sulfate from porcine skin shows 23.2 units/mg. The average molecular weight of dermatan sulfate was determined by gel chromatography on a TSKgel G3000SWXL column as 14 kDa. Based on <sup>1</sup>H NMR spectroscopy, the presence of 3-sulfated and/or 2,3-sulfated IdoA residues was suggested. The reason why highly sulfated dermatan sulfate does not show anticoagulant activity is discussed. In addition to dermatan sulfate, the eel skin contained a small amount of keratan sulfate, which was identified by keratanase treatment.

Keywords: Dermatan sulfate, *Anguilla japonica*, Anti-factor IIa activity

\*<sup>1</sup> College of Pharmacy, Seoul National University

\*<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

Uchida, E., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A. and Hayakawa, T. : **Comparison of the efficiency and safety of non-viral vector-mediated gene transfer into a wide range of human cells**

*Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 891-897 (2002)

Non-viral gene transfer into a wide range of human cells was examined in order to clarify the factors that affect the efficiency and safety of non-viral vectors and to optimize the conditions so that high efficiency and low toxicity could be achieved. Six non-viral vectors (Lipofectin, LipofectAMINE PLUS, SuperFect, Effectene, DMRIE-C and DOTAP) were used to transfect a mammalian

expression plasmid pCMV $\beta$  into 16 types of human primary cells and cultured cell lines. Transfection efficiency was quantified using a galactosidase assay. Cytotoxic effects were measured by LDH assay and WST-8 assay. In serum-free conditions, LipofectAMINE PLUS, Effectene and SuperFect, on average, transfected DNA more successfully than Lipofectin, DMRIE-C, and DOTAP, although the levels of gene expression with these vectors varied remarkably in different cells. The most effective vector also differed depending on the cell type. Serum was found to inhibit gene transfer and reduce the cytotoxicity of all of these vectors except Effectene. The efficiency and toxicity of the non-viral vectors used depended on the type of vector, the DNA/vector ratio, the type of cell, and the presence of serum. These results provided useful information for the optimization of transfer conditions of these non-viral vectors.

Keywords: non-viral vector, transfection efficiency, cytotoxicity

Kita, A.\* , Uotani, S.\* , Kuwahara, H.\* , Takahashi, R.\* , Oshima, K.\* , Yamasaki, H.\* , Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nagayama, Y.\* , Yamaguchi, Y.\* and Eguchi, K.\* : **Vanadate enhances leptin-induced activation of JAK/STAT pathway in CHO cells**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 805-809 (2003)

Leptin, the product of the ob gene, is an adipocyte-derived hormone that plays a key role in the control of food intake and energy expenditure. Leptin acts through receptors that belong to a member of the class I cytokine receptor family. It has been demonstrated that the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) negatively regulates STAT3-mediated transcriptional activation through long form leptin receptor (OBRb). Vanadate has been shown to be a potent and selective inhibitor of PTPase activity in vitro. In this study, we have demonstrated that vanadate increases leptin-induced JAK2 and STAT3 phosphorylation in CHO cells expressing OBRb. The increased leptin-dependent luciferase activity of SOCS3 gene was also seen in vanadate-treated cell. Furthermore, vanadate reversed the inhibitory effects of SOCS3 on leptin-induced STAT3 phosphorylation. The present findings suggest that PTP inhibitors including vanadate and vanadate-derived compounds could be used as a therapeutic agent in the treatment of obesity.

Keywords: adenovirus vector, leptin, JAK/STAT

\*長崎大学医学部

Xu, Z.L.\* , Mizuguchi, H., Mayumi, T.\* and Hayakawa, T. : **Regulated gene expression from adenovirus vectors: a systematic comparison of various inducible systems**

*Gene*, **309**, 145-151 (2003)

Positively and tightly regulated gene expression is

essential for gene function and gene therapy research. The currently-used inducible gene expression systems include tetracycline (Tet-on and T-REx), ecdysone, antiprogestin and dimerizer-based systems. Adenovirus (Ad) vectors play an important role in gene function and gene therapy research for their various advantages over other vector systems. Previously, we reported the inferiority of the Tet-on system as an inducible gene expression system in the context of Ad vectors in comparison with the Tet-off system. In this study, to identify an optimal system for regulated gene expression from Ad vectors, we made a rigorous direct comparison of these five inducible gene expression systems in three cell lines using the luciferase reporter gene. The highest sensitivity to the respective inducer was that of the dimerizer system, followed by the antiprogestin system. The lowest basal expression and the highest induction factor were both characteristic of the dimerizer system. Furthermore, the dimerizer and T-REx systems exhibited much higher induced expression levels than the other three systems. The elucidation of the characteristic features of each system should provide important information for widespread and feasible application of these systems. Overall, these results suggest the most appropriate inducible gene expression system in the context of Ad vectors to be the dimerizer system.

**Keywords:** adenovirus vector, gene therapy, regulation

\*大阪大学大学院薬学研究科

Nagayama, Y.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Niwa, M.\*<sup>1</sup>, McLachlan, S.M.\*<sup>2</sup> and Rapoport, B.\*<sup>2</sup> :

**Prevention of autoantibody-mediated graves'-like hyperthyroidism in mice with interleukin-4, a Th2 cytokine**

*J. Immunol.*, **170**, 3522-3527 (2003)

Graves' hyperthyroidism has long been considered to be a Th2-type autoimmune disease because it is directly mediated by autoantibodies against the thyrotropin receptor (TSHR). However, several lines of evidence have recently challenged this concept. The present study evaluated the Th1/Th2 paradigm in Graves' disease using a recently established murine model involving injection of adenovirus expressing the TSHR (AdCMVTSHR). Coinjection with adenovirus expressing IL-4 (AdRGDCMVIL-4) decreased the ratio of Th1/Th2-type anti-TSHR Ab subclasses (IgG2a/IgG1) and suppressed the production of IFN-gamma by splenocytes in response to TSHR Ag. Importantly, immune deviation toward Th2 was accompanied by significant inhibition of thyroid-stimulating Ab production and reduction in hyperthyroidism. However, in a therapeutic setting, injection of AdRGDCMVIL-4 alone or in combination with AdCMVTSHR into hyperthyroid mice had no beneficial effect. In contrast, coinjection of adenoviruses expressing IL-12 and the TSHR promoted the differentiation of Th1-

type anti-TSHR immune responses as demonstrated by augmented Ag-specific IFN-gamma secretion from splenocytes without changing disease incidence. Coinjection of adenoviral vectors expressing IL-4 or IL-12 had no effect on the titers of anti-TSHR Abs determined by ELISA or thyroid-stimulating hormone-binding inhibiting Ig assays, suggesting that Ab quality, not quantity, is responsible for disease induction. Our observations demonstrate the critical role of Th1 immune responses in a murine model of Graves' hyperthyroidism. These data may raise a cautionary note for therapeutic strategies aimed at reversing Th2-mediated autoimmune responses in Graves' disease in humans.

**Keywords:** adenovirus vector, Graves' disease

\*<sup>1</sup>長崎大学医学部

\*<sup>2</sup>カリフォルニア大学ロサンゼルス校

Morioka, T.\*<sup>1</sup>, Koyama, H.\*<sup>1</sup>, Yamamura, H.\*<sup>2</sup>, Tanaka, S.\*<sup>1</sup>, Fujimoto, S.\*<sup>1</sup>, Emoto, M.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kojima, I.\*<sup>3</sup>, Takahashi, K.\*<sup>2</sup> and Nishizawa Y.\*<sup>1</sup> : **Expression and its role of calponin in pancreatic AR42J cell differentiation into insulin-producing cells**

*Diabetes.*, **52**, 760-766 (2003)

Basic or h1-calponin is a smooth muscle-specific, actin-binding protein that is involved in the regulation of smooth muscle contractile activity. We found in this study the expression of mRNA and protein for h1-calponin in AR42J-B13 cells, which is a useful model for investigating islet beta-cell differentiation from pancreatic common precursor cells. Following treatment of AR42J cells with activin A and hepatocyte growth factor, the protein levels of h1-calponin decreased in a time-dependent manner during the course of the cell differentiation. When h1-calponin was continuously overexpressed by utilizing recombinant adenovirus-mediated gene transfer, the percentage of cell differentiation in h1-calponin overexpressing cells was markedly suppressed as compared with that in the cells without overexpression (6.7 +/- 2.5 vs. 28.6 +/- 3.2%, P < 0.001, Student's t test). Finally, overexpression of h1-calponin (65.6 +/- 3.4), or that lacking actin-binding domain (55.9 +/- 3.4%), significantly (P < 0.001) suppressed the activin A-stimulated transcriptional activity of activin responsive element (ARE), whereas calponin homology-domain disruption mutant did not (100.6 +/- 1.9%). These results suggest that regulation of h1-calponin is involved in the regulation of differentiation of AR42J cells into insulin-producing cells at least partly through modulating ARE transcriptional activity.

**Keywords:** calponin, insulin

\*<sup>1</sup>大阪市立大学医学部

\*<sup>2</sup>大阪成人病センター

\*<sup>3</sup>群馬大学

Nakano, R.\* , Nakagawa, T.\* , Imazu, S.\* , Katayama, K.\* , Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Tsutsumi, Y.\* , Nakagawa, S.\* and Mayumi, T.\* : **A novel T7 system utilizing mRNA coding for T7 RNA polymerase**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 974-978 (2003)

The T7 system does not require the relocation of a reporter gene to the nucleus for its gene expression in the cytoplasm, but relies on the co-localization of T7 RNA polymerase (T7 RNAP) enzyme and reporter gene DNA that is controlled by the T7 promoter. In the present study, we developed a new T7 system in that gene expression can occur at a higher level than those using conventional systems. Insertion of 5'- and 3'-untranslated regions (UTR) of beta-globin gene into a reporter gene enhanced the reporter gene expression, presumably due to the stability and efficient translation of the mRNA. Instead of the T7 RNAP protein used in conventional methods, moreover, transfection of cells with T7 RNAP mRNA, which has been modified by inserting beta-globin 5'- and 3'-UTR sequences as well as the cap and poly(A) tail structures, further enhanced the reporter gene expression. Thus, this novel T7 system using T7 RNAP mRNA may be powerful for the efficient gene expression of DNA exogenously provided in the cytoplasm.

**Keywords:** T7 RNA polymerase, gene therapy

\*大阪大学大学院薬学研究科

Koizumi, N.\* , Mizuguchi, H., Utoguchi, N.\* , Watanabe, Y.\* and Hayakawa T. : **Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob**

*J. Gene Med.*, **5**, 267-276 (2003)

**BACKGROUND:** Fiber-modified adenovirus (Ad) vectors can be effective in overcoming the limitations of conventional Ad vectors, specifically their inefficient gene transfer into cells lacking the primary receptor, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). Several types of fiber-modified Ad vectors have been developed. In this study, we evaluated the functionality of several fiber-modified Ad vectors. **METHODS:** We developed a simple method based on in vitro ligation to construct Ad vectors containing heterologous foreign peptides in both the HI loop and C terminus of the fiber knob. A functional comparison of Ad vectors containing RGD and/or K7 (KKKKKKK) peptide in the HI loop or C terminus of the fiber knob was performed in several types of human, mouse, and rat cells, including CAR-positive and -negative cells, and tumor cells in mice in vivo. **RESULTS:** In the case of the in vitro experiment, Ad vectors containing RGD peptide in the HI loop of the fiber knob showed a higher level of gene transfer than vectors containing RGD peptide at the C terminus of the fiber knob. Ad vectors containing K7 peptide at the C terminus of the fiber knob showed levels of gene transfer similar to those of Ad vectors containing RGD peptide in the HI loop of the fiber

knob, depending on the cell type. Ad vectors containing both peptides in the HI loop or C terminus of the fiber knob showed the highest levels of gene transfer and a broader tropism. For gene transfer into tumor cells in vivo, the Ad vectors containing RGD peptide were the most efficient. **CONCLUSIONS:** In the experiment using cultured cells, Ad vectors containing both RGD and K7 peptides were the most efficient with a broader tropism. In contrast, in the experiment in vivo, Ad vectors containing RGD peptide in the HI loop of the fiber knob were more efficient than the vectors containing K7 peptide (including double-modified vectors containing both the RGD and K7 peptides). These comparative analyses could provide a systemic reference for the use of fiber-modified Ad vectors. Our simple method, in which the peptide of interest can be expressed in Ad vectors in either the HI loop or the C terminus of the fiber knob, or both, could be a powerful tool for gene transfer into mammalian cells in studies of gene function as well as in gene therapy.

**Keywords:** adenovirus vector, gene therapy, fiber

\*昭和薬科大学

Okada, N.\*<sup>1</sup>, Masunaga, Y.\*<sup>1</sup>, Okada, Y.\*<sup>2</sup>, Iiyama, S.\*<sup>1</sup>, Tsuda, T.\*<sup>1</sup>, Matsubara, A.\*<sup>1</sup>, Mori, N.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Fujita, T.\*<sup>1</sup> and Yamamoto, A.\*<sup>1</sup> : **Gene transduction efficiency and the state of maturation in mouse dendritic cells infected with conventional or RGD fiber-mutant adenovirus vectors**

*Cancer Gene Ther.*, **10**, 421-431 (2003)

Since dendritic cells (DCs) play a critical role in establishing antigen-specific adaptive immune responses, in the past several years, therapeutic strategies using genetically modified DCs against cancer and infectious diseases have attracted increasing attention. In the present study, we demonstrated that RGD fiber-mutant adenovirus vector (AdRGD) exhibited markedly superior gene transduction efficiency in mouse bone marrow-derived DCs (mBM-DCs) compared to conventional adenovirus vector (Ad). Likewise, this vector exhibited superior major histocompatibility complex class I-restricted presentation of antigen derived from the delivered gene in mBM-DCs. In order to investigate the effect of Ad-infection on the DC-differentiation process (maturation), we used three types of AdRGD and three conventional Ad to transduce mBM-DCs. These vectors carried either no transgene, LacZ gene, or gp100 gene. Infection by any of the Ad vectors enhanced the expression of MHC class II molecules in mBM-DCs. CD80, CD86, and CD40 expression and IL-12 production were more efficient in AdRGD-infected mBM-DCs than in conventional Ad-infected cells. Contrary to our expectations, endocytotic activity of mBM-DCs decreased only slightly upon Ad-infection, whereas antigen uptake by lipopolysaccharide (LPS)-driven mature mBM-DCs

was significantly impaired. However, our reverse transcription-polymerase chain reaction analysis revealed that Ad-infection resulted in the upregulation of the chemokine receptor CCR7 and downregulation of CCR6 in mBM-DCs and LPS-stimulated cells. We, therefore, concluded that Ad-infection directly influenced DC-maturation, although the effects were milder than under LPS-stimulation. In addition, this change in the immunologic properties of DCs resulted primarily from an increase in the number of Ad-particles capable of invading the cells rather than from the expression of foreign genes. AdRGD-infection caused greater induction of maturation than conventional Ad-infection, irrespective of the type of transgene inserted.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer, dendritic cells

\*<sup>1</sup> 京都薬科大学

\*<sup>2</sup> 武庫川女子大学薬学部

Katayama, K.<sup>\*1</sup>, Wada, K.<sup>\*2</sup>, Nakajima, A.<sup>\*3</sup>, Yoshida, S.<sup>\*3</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawa, S.<sup>\*1</sup>, Kadowaki, T.<sup>\*4</sup>, Nagai, R.<sup>\*4</sup>, Kamisaki, Y.<sup>\*2</sup>, Blumberg, R.S.<sup>\*5</sup> and Mayumi T.<sup>\*1</sup> : **A novel PPAR $\gamma$ -gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease**

*Gastroenterology*, **124**, 1315-1324 (2003)

Background & Aims: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) is one of the nuclear receptors that plays a central role in adipocyte differentiation and insulin sensitivity. PPAR $\gamma$  has also recently been recognized as an endogenous regulator of intestinal inflammation. However, its levels are decreased during chronic inflammation in human and mice, thus limiting PPAR $\gamma$  ligand therapy during established disease. We sought to determine whether this decrease in PPAR $\gamma$  could be counteracted by a gene therapy approach. METHODS: We characterized PPAR $\gamma$  levels in experimental colitis associated with dextran sodium sulfate administration to mice. In this model, the therapeutic benefits of PPAR $\gamma$  gene therapy using a replication-deficient adenovirus vector expressing PPAR $\gamma$  (Ad-PPAR $\gamma$ ) was assessed. RESULTS: PPAR $\gamma$  protein levels were decreased in whole colonic tissue, lamina propria lymphocytes, and peritoneal exudate cells during the course of colitis. PPAR $\gamma$  gene delivery using Ad-PPAR $\gamma$  restored responsiveness to a PPAR $\gamma$  ligand, resulting in marked amelioration of tissue inflammation associated with the colitis, which included attenuation of intercellular adhesion molecule-1, cyclooxygenase-2 and tumor necrosis factor-alpha expression. CONCLUSIONS: Our results suggest that gene delivery of PPAR $\gamma$  can be used to restore and/or enhance endogenous anti-inflammatory processes that are normally operative in mammalian tissues such as in the colon.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, PPAR $\gamma$

\*<sup>1</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup> 大阪大学大学院歯学研究科

\*<sup>3</sup> 横浜市立大学医学部

\*<sup>4</sup> 東京大学大学院医学研究科

\*<sup>5</sup> ハーバード大学

Okada, Y.<sup>\*1</sup>, Okada, N.<sup>\*2</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mayumi, T.<sup>\*3</sup> and Mizuno N.<sup>\*1</sup> : **An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF $\alpha$ -expressing adenovirus vector into established murine melanoma**

*Gene Ther.*, **10**, 700-705 (2003)

We previously reported that RGD fiber-mutant adenovirus vector carrying human TNF $\alpha$  cDNA (AdRGD-TNF $\alpha$ ) could more effectively induce mouse B16 BL6 melanoma regression than conventional Ad-TNF $\alpha$  on intratumoral injection at less than 10(9) vector particles (VP). Although mice treated with either Ad type at 10(10) VP showed remarkable tumor regression due to hemolytic necrosis, severe adverse effects including extreme reduction in body weight were also induced by Ad treatment. Here, we attempted to elucidate the cause of the adverse effects to optimize the application of AdRGD-TNF $\alpha$ . More than 99% of systemically administered Ad accumulated in the liver, and the rate of Ad leakage into systemic circulation from the B16 BL6 tumors injected with AdRGD or conventional Ad at 10(10) VP was about 1% of the administered VP. Although the leaked Ad did not directly induce hepatotoxicity or body weight reduction, excessive TNF $\alpha$  produced in the tumors leaked into the blood at high concentrations and caused systemic inflammation, tissue denaturation, and body weight reduction in mice injected intratumorally with AdRGD-TNF $\alpha$  or Ad-TNF $\alpha$  at 10(10) VP. Our results demonstrated that an exact AdRGD-TNF $\alpha$  dosage must be determined to prevent TNF $\alpha$  leakage from tumors into systemic circulation, thereby enabling safe application of AdRGD-TNF $\alpha$  to clinical melanoma gene therapy in the future.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, cancer, TNF $\alpha$

\*<sup>1</sup> 武庫川女子大学薬学部

\*<sup>2</sup> 京都薬科大学

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

Kawamata, Y.<sup>\*1</sup>, Nagayama, Y.<sup>\*2</sup>, Nakao, K.<sup>\*1</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Sato, T.<sup>\*3</sup> and Ishii, N.<sup>\*1</sup> : **Receptor-independent augmentation of adenovirus-mediated gene transfer with chitosan *in vitro***

*Biomaterials.*, **23**, 4573-4579 (2002)

Recombinant adenovirus is one of the most widely used viral vectors for gene delivery. This study was designed to evaluate the ability of chitosan, a cationic, linear

polysaccharide composed of beta(1,4) linked glucosamine partly containing N-acetyl-glucosamine, to enhance the in vitro infectivity of adenovirus to mammalian cells. Wild type and a fiber-mutant replication-defective recombinant adenoviruses expressing beta-galactosidase were used. In the latter, an RGD peptide, the binding site for alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin, was introduced in the fiber knob enabling adenovirus receptor-independent viral infection. Enhanced effect of chitosan on the infectivity of both adenoviruses was observed in Chinese hamster ovary cells that do not express the receptor for adenovirus with beta-galactosidase activity assay and x-gal staining. These data indicate the receptor-independent mechanism(s) for this enhancement effect. In addition, we found that pH of the culture medium, and molecular mass and concentration of chitosan are also critical factors. Thus, the highest effect was obtained with 0.1-1 microg/ml of chitosan with molecular mass of 19K and 40K in the culture medium of pH 6.4; on the other hand, the effect was negligible with the higher chitosan concentrations (10 microg/ml or more), lower or higher molecular mass (11K and 110K) of chitosan, or at pH of 7.4. Studies using several cell lines with variable levels of adenoviral infectivity revealed that this enhanced effect is evident in the cells with poor infectivity to adenovirus. Since chitosan is biocompatible and inexpensive, these data indicate that chitosan may be a potential candidate for a non-viral vector to safely increase adenoviral infectivity to mammalian cells, particularly those with poor susceptibility to adenoviral infection.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, chitosan

\*1 長崎大学医学部

\*2 長崎大学薬学部

\*3 慶応大学生命工学部

Akuta, T.\*<sup>1</sup>, Eguchi, A.\*<sup>2</sup>, Okuyama, H.\*<sup>1</sup>, Senda, T.\*<sup>3</sup>, Inokuchi, H.\*<sup>4</sup>, Suzuki, Y.\*<sup>1</sup>, Nagoshi, E.\*<sup>5</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Takeda, K.\*<sup>1</sup>, Hasegawa, M.\*<sup>1</sup> and Nakanishi M.\*<sup>2</sup> : **Enhancement of phage-mediated gene transfer by nuclear localization signal**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 779-786 (2002)

The cell membrane and the nuclear membrane are two major barriers hindering the free movement of various macromolecules through animal cells. Nevertheless, some proteins can actively bypass these barriers by dint of intrinsic peptidic signals, so incorporation of these signals might improve the efficacy of artificial gene delivery vehicles. We examined the role of the nuclear localization signal (NLS) in gene transfer, using recombinant lambda phage as a model of the polymer/DNA complexes. We prepared a lambda phage displaying a 32-mer NLS of SV40 T antigen on its surface (NLS phage), and found that this NLS phage, delivered into the cytoplasm by appropriate devices, has higher affinity for the nucleus and induces the expression of encapsulated

marker genes more efficiently than does the wild-type phage. This suggests that the 32-mer NLS peptide will become a practical tool for artificial gene delivery vehicles with enhanced nuclear targeting activity.

Keywords: phage, gene therapy, nuclear localization signal

\*1 DNAVEC 研究所

\*2 産業技術総合研究所

\*3 藤田保健大学医学部

\*4 慶応大学理学部

\*5 Geneva 大学

Mizuguchi, H. and Hayakawa, T. : **The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector**

*J. Gene Med.*, **4**, 240-247 (2002)

BACKGROUND: Control of transgene expression in mammalian cells is desirable for gene therapy and the study of gene function in basic research. This study evaluates the functionality of single adenovirus (Ad) vectors containing a tetracycline-controllable expression system (tet-off or tet-on system). METHODS: An Ad-mediated binary transgene expression system was generated containing a tet-off or a tet-on system, which introduced the gene of interest with a tetracycline-regulatable promoter and the tetracycline-responsive transcriptional activator gene into the E1 and E3 deletion regions, respectively. The functionality of the Ad-mediated tet-off and tet-on systems was compared under various conditions in vitro and in vivo. RESULTS: The Ad vector containing the tet-off system provided negative control of gene expression ranging from 20- to 500-fold, depending on the cell type and condition. In contrast, the Ad vector containing the tet-on system increased gene expression by only 2- to 28-fold and required about two-log orders higher concentration of an inducer (doxycycline) to switch on the gene expression, compared with the Ad vector containing the tet-off system. CONCLUSION: Ad vectors containing the tet-off system are a better choice for regulated gene expression than Ad vectors containing the tet-on system. Single Ad vectors containing the tetracycline-controllable expression system will greatly facilitate in vitro and in vivo analyses of gene function and may be useful for gene therapy.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, gene regulation

Xu, Z.L.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T.\*<sup>2</sup> and Hayakawa, T. : **Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector**

*J. Control. Rel.*, **81**, 155-163 (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

Mizuguchi, H., Koizumi, N.\*, Hosono, T., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Utoguchi, N.\*, Watanabe, Y.\* and Hayakawa T. : **CAR- or  $\alpha v$  integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice**

*Gene Ther.*, **9**, 769-776 (2002)

Targeted gene delivery to the tissue of interest by recombinant adenovirus (Ad) vectors is limited by the relatively broad expression of the primary receptor, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR), and the secondary receptor,  $\alpha v$  integrin. This problem could be overcome by mutating the fiber and penton base, which bind with CAR and  $\alpha v$  integrin, respectively. In this study, we constructed CAR-binding ablated Ad vectors and  $\alpha v$  integrin-binding ablated Ad vectors by mutation in the FG loop of fiber knob and in the RGD motif of penton base, respectively, and compared the gene transfer properties of their vectors into various types of cultured cells and mice with conventional Ad vectors. We also generated Ad vectors containing RGD peptide in the HI loop of the fiber knob. CAR-binding ablated Ad vectors mediated about 1% of gene transfer activity into CAR-positive cultured cells, compared with conventional Ad vectors, while  $\alpha v$  integrin-binding ablated Ad vectors

maintained at least 76% of gene transfer activity into cultured CAR-positive cells. Inclusion of the RGD peptide into the HI loop of the fiber knob of CAR-binding ablated Ad vectors restored gene transfer activity in vitro. On the other hand, systemically administered CAR-binding ablated Ad vectors, as well as  $\alpha v$  integrin-binding ablated Ad vectors mediated similar levels of gene transfer into mouse liver with the conventional Ad vectors. These results suggest that continued interaction of either the fiber with CAR or the penton base with  $\alpha v$  integrin offers an effective route of virus entry into mouse liver in vivo. Inhibition of the interaction of both the fiber with CAR and the penton base with  $\alpha v$  integrin is likely to be crucial to the development of targeted Ad vectors.

Keywords: adenovirus vector, gene therapy, targeting

\*昭和薬科大学

Li, Y.\*<sup>1</sup>, Takemura, G.\*<sup>1</sup>, Kosai, K.I.\*<sup>1</sup>, Yuge, K.\*<sup>1</sup>, Nagano, S.\*<sup>1</sup>, Esaki, M.\*<sup>1</sup>, Goto, K.\*<sup>1</sup>, Takahashi, T.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, K.\*<sup>1</sup>, Koda, M.\*<sup>1</sup>, Kawase, Y.\*<sup>1</sup>, Maruyama, R.\*<sup>1</sup>, Okada, H.\*<sup>1</sup>, Minatoguchi, S.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Fujiwara, T.\*<sup>2</sup> and Fujiwara, H.\*<sup>1</sup> : **Postinfarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice**

*Circulation*, **107**, 2499-2506 (2003)

BACKGROUND: Hepatocyte growth factor (HGF) is implicated in tissue regeneration, angiogenesis, and antiapoptosis. However, its chronic effects are undetermined on postinfarction left ventricular (LV) remodeling and heart failure. METHODS AND RESULTS: In mice, on day 3 after myocardial infarction (MI), adenovirus encoding human HGF (Ad.CAG-HGF) was injected into the hindlimb muscles (n=13). As a control (n=15), LacZ gene was used. A persistent increase in plasma human HGF was confirmed in the treated mice: 1.0 +/- 0.2 ng/mL 4 weeks later. At 4 weeks after MI, the HGF-treated mice showed improved LV remodeling and dysfunction compared with controls, as indicated by the smaller LV cavity and heart/body weight ratio, greater % fractional shortening and LV +/- dP/dt, and lower LV end-diastolic pressure. The cardiomyocytes near MI, including the papillary muscles and trabeculae, were greatly hypertrophied in the treated mice. The old infarct size was similar between the groups, but the infarct wall was thicker in the treated mice, where the density of noncardiomyocyte cells, including vessels, was greater. Fibrosis of the ventricular wall was significantly reduced in them. Examination of 10-day-old MI revealed no proliferation or apoptosis but showed augmented expression of c-Met/HGF receptor in cardiomyocytes near MI, whereas a greater proliferating activity and smaller apoptotic rate of granulation tissue cells in the HGF-treated hearts was observed compared with controls.

**CONCLUSIONS:** Postinfarction HGF gene therapy improved LV remodeling and dysfunction through hypertrophy of cardiomyocytes, infarct wall thickening, preservation of vessels, and antifibrosis. These findings imply a novel therapeutic approach against postinfarction heart failure.

**Keywords:** adenovirus vector, hepatocyte growth factor, cardiomyocytes

\*<sup>1</sup> 岐阜大学医学部

\*<sup>2</sup> 京都女子大学

Wada, M.<sup>\*1\*3\*4</sup>, Miyazawa, H., Wang, RS.<sup>\*2</sup>, Mizuno, T.<sup>\*3</sup>, Sato, A.<sup>\*4</sup>, Asashima, M.<sup>\*4</sup> and Hanaoka, F.<sup>\*3</sup> :

**The second largest subunit of mouse DNA polymerase epsilon, DPE2, interacts with SAPI8 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA**

*J. Biochem.*, **131**, 307-311 (2002)

DNA polymerase epsilon is essential for cell viability and chromosomal DNA replication in budding yeast. In addition, DNA polymerase epsilon may be involved in DNA repair and cell-cycle checkpoint control. The enzyme consists of at least four subunits in mammalian cells as well as in yeast. The largest subunit of DNA polymerase epsilon is responsible for polymerase activity. To date, the functions of the other subunits have remained unknown. With a view to elucidating the functions of the second largest subunit of mouse DNA polymerase epsilon (DPE2), yeast two-hybrid screening was performed to identify mouse proteins that interact with this subunit. SAPI8, a polypeptide associated with co-repressor protein Sin3, was identified as an interacting protein. A part of the N-terminal region of DPE2 (comprising amino acids 85-250) was found to be responsible for the interaction with SAPI8. The interaction induced repression of transcription in reporter plasmid assays, which was inhibited by trichostatin A. These results indicate that DPE2 may recruit histone deacetylase (HDAC) to the replication fork to modify the chromatin structure.

**Keywords:** DNA polymerase epsilon, SAPI8, Histone deacetylase

\*<sup>1</sup> National Institute of Public Health

\*<sup>2</sup> National Institute of Industrial Health

\*<sup>3</sup> RIKEN

\*<sup>4</sup> The University of Tokyo

Minamisawa, S.\*<sup>1</sup>, Sato, Y., Tatsuguchi, Y.\*<sup>1</sup>, Fujino, T., Imamura, S.\*<sup>1</sup>, Uetsuka, Y.\*<sup>1</sup> and Matsuoka, R.\*<sup>1</sup> :

**Mutation of the phospholamban promoter associated with hypertrophic cardiomyopathy**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 1-4 (2003)

Phospholamban is an endogenous inhibitor of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase and plays a prime role in cardiac contractility and relaxation. Phospholamban may be a candidate gene responsible for cardiomyopathy.

We investigated genome sequence of phospholamban in patients with cardiomyopathy. PCR-based direct sequence was performed for the promoter region and the whole coding region of phospholamban in 87 hypertrophic, 10 dilated, and 2 restricted cardiomyopathic patients. We found a heterozygous single nucleotide transition from A to G at -77-bp upstream of the transcription start site in the phospholamban promoter region of one patient with familial hypertrophic cardiomyopathy. This nucleotide change was not found in 296 control subjects. Using neonatal rat cardiomyocytes, the mutation, -77A→G, increased the phospholamban promoter activity. No nucleotide change in the phospholamban coding region was found in 99 patients with cardiomyopathy. We suspect that the mutation plays an important role in the development of hypertrophic cardiomyopathy.

**Keywords:** phospholamban promoter, cardiomyopathy, mutation

\* 東京女子医科大学

Sato, Y., Schmidt, A.G.\*<sup>1</sup>, Kiriazis, H.\*<sup>1</sup>, Hoit, B.D.\*<sup>2</sup> and Kranias, E.G.\*<sup>1</sup> : **Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin**

*Mol. Cell. Biochem.*, **242**, 19-25 (2003)

Cardiac-specific overexpression of murine cardiac calsequestrin results in depressed contractile parameters and hypertrophy in transgenic mice. To determine the long-term consequences of calsequestrin overexpression, the cardiac phenotype of young (2-3-months old) and aged (17 months old) transgenic FVB/N mice was characterized. Ventricular/body weight ratios, which were increased in young transgenics compared with wild-types, were unaltered with age. Left atria of aged transgenics exhibited enlargement and mineralization, but their ventricles did not display fibrosis, mineralization and other injuries. Although echocardiography suggested a time-dependent change in ventricular geometry and loading conditions in vivo, as well as an age-dependent reduction of left ventricular fractional shortening in transgenic mice, Langendorff-perfused hearts of young and aged transgenics indicated that there were no age-related reductions of contractile parameters (+/-dP/dt). Furthermore, neither genotype nor age altered lung/body weight ratios. Thus, our findings suggest that left ventricular performance in calsequestrin overexpressing mice becomes apparently depressed with age, but this depression is not associated with progressive reduction of left ventricular contractility and heart failure.

**Keywords:** hypertrophic cardiomyopathy, sarcoplasmic reticulum, aging

\*<sup>1</sup> University of Cincinnati

\*<sup>2</sup> Case Western Reserve University

Carr, A.N.\*<sup>1</sup>, Schmidt, A.G.\*<sup>1</sup>, Suzuki, Y.\*<sup>2</sup>, del Monte,

F.<sup>\*3</sup>, Sato, Y., Lanner, C.<sup>\*2</sup>, Breeden, K.<sup>\*2</sup>, Jing, S.L.<sup>\*2</sup>, Allen, P.B.<sup>\*4</sup>, Greengard, P.<sup>\*4</sup>, Yatani, A.<sup>\*1</sup>, Hoit, B.D.<sup>\*5</sup>, Grupp, I.L.<sup>\*1</sup>, Hajjar, R.J.<sup>\*3</sup>, DePaoli-Roach, A.A.<sup>\*2</sup> and Kranias, E.G.<sup>\*1</sup> : **Type 1 Phosphatase, a Negative Regulator of Cardiac Function**

*Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4124-4135 (2002)

Increases in type 1 phosphatase (PP1) activity have been observed in end stage human heart failure, but the role of this enzyme in cardiac function is unknown. To elucidate the functional significance of increased PP1 activity, we generated models with (i) overexpression of the catalytic subunit of PP1 in murine hearts and (ii) ablation of the PP1-specific inhibitor. Overexpression of PP1 (threefold) was associated with depressed cardiac function, dilated cardiomyopathy, and premature mortality, consistent with heart failure. Ablation of the inhibitor was associated with moderate increases in PP1 activity (23%) and impaired beta-adrenergic contractile responses. Extension of these findings to human heart failure indicated that the increased PP1 activity may be partially due to dephosphorylation or inactivation of its inhibitor. Indeed, expression of a constitutively active inhibitor was associated with rescue of beta-adrenergic responsiveness in failing human myocytes. Thus, PP1 is an important regulator of cardiac function, and inhibition of its activity may represent a novel therapeutic target in heart failure.

Keywords: protein phosphatase, beta-adrenergic receptor, heart failure

\*1 University of Cincinnati

\*2 Indiana University

\*3 Harvard Medical School

\*4 The Rockefeller University

\*5 Case Western Reserve University

Yamada, K.<sup>\*1</sup>, Suzuki, T., Kohara, A., Hayashi, M., Hakura, A.<sup>\*2</sup>, Mizutani, T.<sup>\*1</sup> and Saeki, K.<sup>\*1</sup> : **Effect of 10-aza-substitution on benzo[a]pyrene mutagenicity in vivo and in vitro**

*Mutation. Res.*, **521**, 187-200 (2002)

In order to evaluate the effect of aza-substitution on in vivo genotoxicity of Benzo[a]pyrene (BaP), BaP and 10-azaBaP, in which a ring nitrogen is located in the bay-region, were assayed for their in vivo mutagenicity using the *lacZ*-transgenic mouse (MutaMouse). BaP was potently mutagenic in all of the organs examined (liver, lung, kidney, spleen, forestomach, stomach, colon, and bone marrow), as described in our previous report, whereas, 10-azaBaP was slightly mutagenic only in the liver and colon. The in vitro mutagenicities of BaP and 10-azaBaP were evaluated by the Ames test using liver homogenates prepared from several sources, i.e. CYP1A-inducer-treated rats, CYP1A-inducer-treated and non-treated mice, and humans. BaP showed greater mutagenicities than 10-azaBaP in the presence of a liver

homogenate prepared from CYP1A-inducer-treated rodents. However, 10-azaBaP showed mutagenicities similar to or more potent than BaP in the presence of a liver homogenate or S9 from non-treated mice and humans. These results indicate that 10-aza-substitution markedly modifies the nature of mutagenicity of BaP in both in vivo and in vitro mutagenesis assays

Keywords: aza-substitution, benzopyrene, human S9

\*1 名古屋市立大学大学院薬学研究科

\*2 エーザイ(株)

Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T., Kogi, M., Uchida, E. and Hayakawa, T. : **Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells - a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide or retinoic acid-treated HL-60 cells**

*Arch. Biochem. Biophys.*, **405**, 21-31 (2002)

In our previous paper (J. Biol. Chem. 36 p.25471), we suggested that p70 S6 kinase (p70 S6K) plays an important role in the regulation of neutrophilic differentiation of HL-60 cells; this conclusion was based on our analysis of transferrin receptor (Trf-R) positive (Trf-R<sup>+</sup>) and negative (Trf-R<sup>-</sup>) cells that appeared after treatment with dimethyl sulfoxide (Me<sub>2</sub>SO). In this paper, we analyzed the upstream of p70 S6K in relation to the differentiation and proliferation of both cell types. The G-CSF-induced enhancement of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activity in Trf-R<sup>+</sup> cells was markedly higher than that in Trf-R<sup>-</sup> cells. Wortmannin, a specific inhibitor of PI3K, partially inhibited G-CSF-induced p70 S6K activity and G-CSF-dependent proliferation, whereas rapamycin, an inhibitor of p70 S6K, completely inhibited these activities. The wortmannin-dependent enhancement of neutrophilic differentiation was similar to that induced by rapamycin. From these results, we conclude that the PI3K/p70 S6K-cascade may play an important role in negative regulation of neutrophilic differentiation in HL-60 cells. For the G-CSF-dependent proliferation, however, p70 S6K appears to be a highly important pathway through not only by a PI3K-dependent but also possibly by an independent cascade.

Keywords: p70 S6 kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, G-CSF

Kanayasu-Toyoda, T., Yamaguchi, T., Oshizawa, T. and Hayakawa, T. : **CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells**

*J. Cell. Physiol.*, **195**, 119-129 (2003)

To clarify the process of endothelial differentiation, we isolated AC133<sup>+</sup> cells and induced the in vitro differentiation of these cells into endothelial cells. AC133<sup>+</sup> cells efficiently differentiated into endothelial cells when the cells were cultured on fibronectin-coated dishes in the

presence of vascular endothelial growth factor. Time-course analysis of the alteration of endothelial markers on cultured AC133<sup>+</sup> cells revealed that the expression of CD31 (PECAM-1) on AC133<sup>+</sup> cells was the earliest marker among all of the tested markers. Based on the hypothesis that CD31 is an early indicator during the endothelial differentiation, we examined the relationship between CD31 expression and the ability to differentiate into endothelial cells in cells derived from AC133<sup>+</sup> cells. CD31-bright cells, which were sorted from cultured AC133<sup>+</sup> cells, differentiated more efficiently into endothelial cells than had CD31-positive cells or CD31-negative cells, suggesting that CD31-bright cells may be precursor cells for endothelial cells. In the present study, we identified CD31<sup>+</sup> cells derived from cultured AC133<sup>+</sup> cells that are able to differentiate to endothelial cells as precursor cells.  
Keywords: endothelial cell, CD31, cell therapy

**Sumide, T., Tsuchiya, T. : Effects of multipurpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on gap-junctional intercellular communication (GJIC) in rabbit corneal keratocytes**

*J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 57-64 (2003)

To ensure the effects of multipurpose solutions (MPS) for hydrogel contact lenses on the cornea, the inhibitory activity of three types of MPS on corneal cells has been evaluated with the use of scrape loading and dye transfer assay (SLDT assay) and Western blotting on rabbit corneal keratocytes (RC4). In SLDT assay, MPS-A and poloxamine showed dose-dependent inhibitory activity, suggesting the inhibitory action of MPS-A and poloxamine to gap junctional intercellular communication (GJIC) in the tested cells. Moreover, after treatment with MPS-A, the GJIC was initially inhibited within 4 h, and thereafter gradually turned to an approximately 60% level of the initial value. When MPS-A was removed from the incubation media after exposure of the cells, the recovery of GJIC was time dependent and returned to approximately initial levels at 8 h. Complete recovery was established after approximately 24 h. These findings suggested that the inhibitory action of MPS-A on corneal keratocytes was reversible. This inhibition was accompanied by a decrease in the quantity of connexin-43, which is a major protein constituting the gap junctional channel of these cells, and its change in the phosphorylation state. Taken together, it was suggested that MPS-A interacts with connexin-43, inducing an inhibitory action on GJIC.

Keywords: multipurpose solution, gap junctional intercellular communication, metabolic cooperation assay

Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Uchima, T.\*<sup>1</sup>, Doi, H.\*<sup>2</sup>, Nakamura, A., Ohshima, Y., Fujimaki, M.\*<sup>1</sup>, Toyoda, K., Kobayashi, E.\*<sup>2</sup>, Yoneyama, T.\*<sup>2</sup>, Hamanaka, H.\*<sup>2</sup> : **A method to monitor corrosion of chromium-iron alloys by monitoring the chromium ion concentration in urine**

*Materials Transactions*, 43, 3058-3064 (2002)

Binary alloys of chromium-iron (Cr-Fe) are no longer used in dental and orthopaedic applications, and were used only for comparative purposes in the present study. Four kinds of Cr-Fe binary alloys, namely, 10mass%, 15 mass %, 20 mass % and 30 mass % Cr in Fe, and 100% Cr and SUS316L were prepared. These metals were subcutaneously implanted into rats for four months. There was no significant difference in body weights and organ weights among control (sham-operation) and implant-groups, and no significant accumulation of Cr and Fe in the blood, liver or kidney of the alloy implant groups.

To clarify the usefulness of urinary monitoring, the Cr and Fe concentrations in rat urine after implantation were analyzed. Alloy implant groups, including the SUS316L group, intended to excrete higher urinary Cr amounts than the control group during the 3 weeks after implantation. Urinary Cr and Fe amounts of the 15%Cr-alloy group showed especially high values in comparison not only with the control level but also the other alloy groups. The visual corrosion extents of the retrieved implants showed the following order: 10%Cr > 15%Cr > 20%Cr > 30%Cr > 100%Cr, SUS316L, and did not always correlate with the levels of the urinary amounts of Cr and Fe.

From these findings, monitoring of urinary metal amounts is considered to be useful to monitor the in vivo elution property non-invasively.

Keywords: chromium concentration in urine, chromium-iron alloy, accumulation of chromium and ferrum in organs  
\*<sup>1</sup> Welfare Institute of Scientific Research

\*<sup>2</sup> Institute for Medical and Dental Engineering, Tokyo Medical and Dental University.

**Ichikawa, A.\*<sup>1</sup>, Tsuchiya, T. : Studies on the tumor promoting mechanism of hard and soft segment models of polyetherurethane: Tyr265 phosphorylation of connexin43 is a key step in the GJIC inhibitory reaction induced by polyetherurethane**

*J. Biomed. Mater. Res.*, 62, 157-62 (2002)

Gap junctional intercellular communication (GJIC) is inhibited by 4,4'-di(ethoxycarbonyl) diphenylmethane (MDU) and polytetramethylene oxide 1000 (PTMO1000), which are model chemicals of hard and soft segments of polyetherurethane (PEU), respectively. In our previous study, we suggested that the inhibition of GJIC induced by MDU and PTMO1000 may lead to accelerate promotion step by both segments after the initiation step by hard segment, MDU. To examine this hypothesis, we established connexin 43 overexpressed clones from Balb/c 3T3 A31-1-1 clones (A31-1-1 cells) by transfection. Here we show that these clones acquired much higher GJIC ability than parental A31-1-1 cells and kept them even if MDU or PTMO1000 was added to the culture. We

also found that Mutation of Cx43 at Tyr-265 resulted in reduced inhibition of GJIC induced by MDU and PTMO1000. These findings suggest that inhibition of GJIC by PEU may be caused by Tyr-265 phosphorylation of Cx43 molecule.

Keywords: Balb/c 3T3 A31-1-1 cells, connexin 43, gap junctional intercellular communication

\* Kyoto Institute of Technology

Park, J.U., Tsuchiya, T. : **Tumor-promoting activity of 48 kDa molecular mass hyaluronic acid**

*Materials Transactions*, 43, 3128-3130 (2002)

Hyaluronic acid (HA), glycosaminoglycan, has long been implicated in malignant transformation and tumor-promoting activity. We found that 48 kDa molecular mass HA in vitro promotes tumor cell growth and tumorigenesis. The increase of cell growth rate in human hepatoma cells (HepG2 cells, cancer cells) and normal human dermal fibroblasts (NHDF cells, normal cells) treated with 48 kDa HA at  $2 \times 10^{-4}$  kg/L concentration were  $110 \pm 0.9\%$  and  $103 \pm 0.5\%$ , respectively. Colony formation activity of 4.8 kDa HA in cultured Balb/3T3 clone A3111 cells was higher than that of 48 kDa HA. However, transforming activity of HA was significantly showed in 48 kDa HA but not in 4.8 kDa HA. These findings suggest that 48 kDa HA has a tumor-promoting activity stronger than 4.8 kDa HA, because the former increase the cell growth of cancer cells than the latter. The increase of cell growth rate in HepG2 cells (cancer cells) and NHDF cells (normal cells) were compared among various molecular masses of HA.

Keywords: hyaluronic acid, tumorigenesis, colony formation activity

Ichikawa, A. \*, Tsuchiya, T. : **A strategy for the suppression of tumorigenesis induced by biomaterials: Restoration of transformed phenotype of polyetherurethane-induced tumor cells by Cx43 transfection**

*Cytotechnology*, 39, 1-8 (2002)

Biomaterials such as polyetherurethans (PEUs) are the scaffolding, which is indispensable for the development of the bio-artificial organs. However, PEUs can induce tumors in subcutaneous implantation sites in rat. We have shown that the different inhibitory potential of gap junctional intercellular communication (GJIC) on the surface of the biomaterials, including PEUs, is a key step in determining the tumorigenic potential. Here we show that suppression of a gap junctional protein connexin 43 (Cx43) plays an important role in in vivo tumorigenesis induced by PEUs for the first time and that Cx43 transfection may be an effective strategy for preventing tumorigenesis induced by biomaterials. Rat tumor cell line U41 is derived from tumors in the subcutaneous implantation of PEU films. The GJIC and the expression of Cx43 were suppressed in U41. The restoration of normal phenotype, such as reduction of growth rate,

recovery of contact inhibition and loss of colony formation ability in soft agar, was achieved by Cx43 transfection. These results strongly suggest that suppression of Cx43 expression plays an important role in the development of rat malignant fibrous histiocytoma (MFHC) caused by PEUs and that Cx43 transfection is effective for prevention of tumorigenesis induced by PEUs.

Keywords: biomaterial, connexin 43, gap junctional intercellular communication

\* Kyoto Institute of Technology

Rahman, M.S., Tsuchiya, T. : **In vitro culture of human chondrocytes (1): A novel enhancement action of ferrous sulfate on the differentiation of human chondrocytes**

*Cytotechnology*, 37, 163-169 (2001)

Chondrogenic differentiation of mesenchymal cells is generally thought to be initiated by the inductive action of specific growth factors and depends on intimate cell-cell interactions. The aim of our investigation was to characterize the influences of basic fibroblast growth factor (bFGF) and ferrous sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ) on proliferation and differentiation of human articular chondrocytes (HAC). This is the first report of the effects of  $\text{FeSO}_4$  on chondrogenesis of HAC. Multiplied chondrocytes of hip and shoulder joints were cultured in chondrocyte growth medium supplemented with bFGF,  $\text{FeSO}_4$ , or both bFGF +  $\text{FeSO}_4$  for 4 weeks. A 20  $\mu\text{l}$  aliquot of a cell suspension containing  $2 \times 10^7$  cells  $\text{ml}^{-1}$  was delivered onto each well of 24-well tissue culture plates. Cells cultured with the growth medium only was used as a control. Alamar blue and alcian blue staining were done to determine the chondrocyte proliferation and differentiation, respectively, after 4 weeks. The samples exposed to bFGF,  $\text{FeSO}_4$ , and combination of both indicated sufficient cell proliferation similar to the control level. Differentiations of the HAC exposed to bFGF,  $\text{FeSO}_4$ , and bFGF +  $\text{FeSO}_4$  were 1.2-, 2.0-, and 2.2-fold of the control, respectively. Therefore, chondrocyte differentiation was significantly enhanced by the addition of  $\text{FeSO}_4$  and bFGF +  $\text{FeSO}_4$ . The combined effects of bFGF and  $\text{FeSO}_4$  were additive, rather than synergistic. These results suggest that treatment with ferrous sulfate alone or in combination with basic fibroblast growth factor etc, is a powerful tool to promote the differentiation of HAC for the clinical application.

Keywords: basic fibroblast growth factor, enhancement of chondral differentiation, ferrous sulfate

靱島由二, 松島 肇\* : **実験動物および病理系廃棄物処理に適した新技術 - WR2 Tissue Digester -**

医療廃棄物研究, 15(2), 107-117 (2003)

現在利用可能な多くの新処理技術装置は医療施設から排出される全感染性廃棄物の80%程度を処理できる能力を持つが、原理上、動物廃棄物、組織や臓器などの病理系廃棄物および多量の感染性液体廃棄物処理には適していない。近年、これらの各種廃棄物を容易かつ迅速に

処理する WR2 Tissue Digester が開発された。本技術と汎用型の新処理技術を組み合わせて使用することにより、医療施設から発生する全感染性廃棄物を焼却処理に頼ることなく安全化する処理システムを構築することが可能となった。本稿では、医療廃棄物の適正処理に資することを目的とし、WR2 Tissue Digester の有効性について詳述した。

**Keywords:** animal waste, TSE agent, inactivation

\*浜松医科大学

Nakagawa, Y., Murai, T., Hasegawa, C., Hirata, M., Tsuchiya, T., Yagami, T., Haishima, Y. : **Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials**

*J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, **66B** (1), 347-355 (2003)

天然由来医用材料から製造された市販創傷被覆剤のエンドトキシン (LPS) 汚染状況に関して調査した結果、3種類のアルギン酸塩製品が顕著なリムルス活性およびウサギ発熱活性を示したと共に、2種類のアルギン酸塩製品はヒト由来単球用 MM6-CA8 細胞に対する IL-6 誘導能を有していた。これらの各種活性は LPS 除去カラム処理または LPS アンタゴニストを併用することにより顕著に抑制された。顕著な発熱活性を示す一方、MM6-CA8 細胞に対する IL-6 誘導能を殆ど示さなかったアルギン酸塩製品はウサギ末梢血細胞およびマウス由来マクロファージ様 J774.1 細胞に対して顕著な TNF $\alpha$  誘導能を示したことから、本製品に混入している LPS はヒト細胞に対するアゴニストではないことが判明した。これらの成績から、創傷被覆剤への LPS 混入はリムルス試験により容易に検出できる共に、MM6-CA8 細胞を使用したサイトカインアッセイはヒトに対する実質的な発熱性を評価するために有益な方法であることが示唆された。

**Keywords:** wound dressings, natural biomaterials, endotoxin

Yagami, T, Osuna, H.\* , Kouno, M.\* , Haishima, Y., Nakamura, A., Ikezawa, Z.\* : **Significance of carbohydrate epitopes in a latex allergen with beta-1,3-glucanase activity**

*Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 27-37 (2002)

**BACKGROUND:** One of the latex allergens, Hev b 2, has beta-1,3-glucanase activity. The entire sequence of this allergen is already known. There is one potential N-glycosylation site in this molecule (27Asn). Heterogeneous glycosylation of this Asn residue could be a source of the multiplicity of natural Hev b 2. Possible participation of the carbohydrate epitopes of latex beta-1,3-glucanase isoenzymes in their IgE-binding capacity and cross-reactivity was investigated in this study. **METHODS:** beta-1,3-Glucanase isoenzymes were separated based on their affinities for concanavalin A. IgE-binding capacity and cross-reactivity were examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sequence heterogeneity among the isoenzymes was probed by

peptide mass mapping after lysyl endopeptidase digestion. To clarify the relation to Hev b 2, N-terminal sequencing was performed on a fragmented peptide common to the separated isoenzymes. **RESULTS:** Basic beta-1,3-glucanase was subdivided into two glycosylated isoenzymes (GI and GII) and one non-glycosylated isoenzyme (GIII). IgE antibodies in latex-positive sera chiefly recognized the glycosylated isoenzymes. Inhibition ELISA supported the significance of the carbohydrate epitopes for the IgE recognition and cross-reactivity. However, non-glycosylated GIII, as well as GI and GII, produced positive results in a skin prick test. The three beta-1,3-glucanase isoenzymes shared a partial sequence in common with Hev b 2. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that the carbohydrate epitopes in Hev b 2 homologues are relevant to an in vitro diagnosis of latex allergy and the accompanying cross-reactivity. Carbohydrate epitopes do not necessarily provoke allergic symptoms. Therefore, the actual allergenicity of Hev b 2 and its homologues should be carefully evaluated not only by in vitro IgE tests but also by in vivo tests.

**Keywords:** latex allergy, cross-reactivity, defense-related protein

\*横浜市立大学医学部

Sugiura, M.\*<sup>1</sup>, Hayakawa, R.\*<sup>1</sup>, Sugiura, K.\*<sup>1</sup>, Shamoto, M.\*<sup>2</sup>, Yagami, T. : **Latex protein induced delayed-type contact allergy**

*Environ. Dermatol.*, **9**, 53-62 (2002)

We reported 10 cases of latex allergy. We diagnosed that 5 out of 10 cases had immediate-type latex allergy, 3 out of 10 cases had immediate and delayed-type latex allergy and 2 out of 10 cases had delayed-type latex allergy. There have been many reports of immediate-type latex allergy. However, there were few reports of delayed-type latex allergy. Therefore, some researchers did not accept the existence of the delayed type latex allergy. In this study, we investigated delayed-type skin sensitization potential of latex protein using a guinea pig maximization test. Six animals were included in each sensitization group and in the negative control group. We conducted the induction procedure using the latex extract solution that included 405  $\mu$ g/ml of latex protein. We challenged the animals using the latex extract solution, the latex sheet and the hevein 7.5mg/ml. The positive reactions were observed in 2 out of 6 animals with the latex extract solution, 5 out of 6 animals with the latex sheet and 5 out of 6 animals with the hevein in the sensitization group. In the negative control group, the positive reactions were observed in 0 out of 6 animals with the latex extract solution, 1 out of 6 animals with the latex sheet and 0 out of 6 animals with hevein. We confirmed that the latex protein, at least hevein, had strong sensitizing material for the delayed-type in guinea pigs.

**Keywords:** latex allergy, allergenicity, maximization test

\*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

Hanai, H. \*, Baba, S. \*, Suzuki, H. \*, Kaniwa, M-A. :  
**Contact dermatitis induced by antibacterial agents**  
*Occup. Environ. Allergy*, 8(2), 43-47 (2001)

Our investigative studies revealed that two types of antibacterial agents, trichlocarban (3,4,4'-trichlorocarbanilide) and a similar compound to benzalkonium chloride, were identified as the causative chemicals in the two cases of allergic contact dermatitis due to chef uniforms.

Keywords: fabric product, allergic contact dermatitis, antibacterial agent

\* 日本大学医学部

Washimi, Y. \*<sup>1</sup>, Suzuki, K. \*<sup>2</sup>, Takeuchi, M. \*<sup>1</sup>, Matsunaga, K. \*<sup>1</sup>, Kaniwa, M-A. : **A case of contact dermatitis due to a knee brace**

*Environmental Dermatology*, 9 (2), 78-85 (2002)

膝装具のパッドによりアレルギー性接触皮膚炎を生じた事例において、ポリクロロプレソフォームラバー製のパッドに使用されていたチオウレア系加硫促進剤の diethylthiourea が原因化学物質であったことを明らかにした。

Keywords: knee brace pad, allergic contact dermatitis, thiourea-type accelerator

\*1 藤田保健衛生大学医学部

\*2 大同病院皮膚科

Ikarashi, Y., Kaniwa, M., Tsuchiya, T. : **Sensitization potential of gold sodium thiosulfate in mice and guinea pigs**

*Biomaterials*, 23, 4907-4914 (2002)

We examined the sensitization potential of gold sodium thiosulfate (GST) using mice and guinea pigs. In the guinea pig maximization test, 2 or 6 out of 10 animals showed positive skin responses, mainly edema, by challenge with 2% or 5% GST in 50% ethanol solution, respectively. In the mouse ear swelling test, positive ear swelling after challenge with GST was shown in 2 out of 5 mice those previously treated with GST. Topical exposure of mice to GST in 70% dimethylsulfoxide induced small increases in the lymph node weight and the lymph node cell (LNC) number in the murine local lymph node assay. A greater degree of LNC responses was observed, but the stimulation index of lymph node response was not strong. GST resulted in a statistically significant increase in the serum IgE antibody concentration. It may suggest that the sensitization response from gold would appear not only at the contact site but also systematically.

Keywords: gold sodium thiosulfate, metal allergy, IgE

Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., Toyoda, K. \*<sup>1</sup>, Kobayashi, E. \*<sup>2</sup>, Doi, H. \*<sup>2</sup>, Yoneyama, T. \*<sup>2</sup>, Hamanaka, H. \*<sup>2</sup> : **Tissue reactions and sensitivity to iron-chromium alloys**

*Materials Transactions*, 43, 3065-3071 (2002)

Various Cr-Fe binary alloys were subcutaneously implanted into rats for 4 months. There was rust on the surface of all 10% Cr-Fe alloys, three 15% Cr-Fe alloys and one 20% Cr-Fe alloys out of 4 specimens. No significant difference in the tissue response, such as extent of hemorrhage, frequency of inflammatory cells in or around the fibrous capsule, and the thickness of fibrous capsule, was found among the groups. Some animals exhibited positive skin reactions by challenge with  $K_2Cr_2O_7$  in 10%, 15% and 20% Cr-Fe alloy groups. This suggests that some animals were sensitized to Cr by the implantation of easily corroded Cr-Fe alloy, and the corrosion products of metallic devices in body fluid is likely responsible for development of metal hypersensitivity.

Keywords: tissue reaction, contact sensitization, iron-chromium alloy

\*<sup>1</sup> 日本たばこ産業

\*<sup>2</sup> 東京医科歯科大学

Ohe, T. \*<sup>1</sup>, Takata, T. \*<sup>1</sup>, Maeda, Y. \*<sup>1</sup>, Totsuka, Y. \*<sup>2</sup>, Hada, N. \*<sup>3</sup>, Matsuoka, A., Tanaka, N. \*<sup>4</sup>, Wakabayashi, K. \*<sup>2</sup> : **Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in cultured mammalian cells treated with aminophenylnorharman formed by norharman with aniline**

*Mutat. Res.*, 515, 181-188 (2002)

Aminophenylnorharman (APNH) is a newly identified mutagenic heterocyclic amine formed by coupling of norharman with aniline in the presence of S9 mix. The induction of sister chromatid exchanges (SCEs) by APNH was examined in Chinese hamster lung cells in vitro. A dose-dependent effect was found between 0.00125 and 0.01  $\mu\text{g/ml}$ . Because of its very strong SCE-causing ability, we further explored its genotoxicity by examining the induction of chromosome aberrations (CAs). A dose-dependent effect was found for CAs between 0.00125 and 0.04  $\mu\text{g/ml}$ . The potency of SCE induction and clastogenic activity of APNH is stronger than potent clastogens of Actinomycin D, Mitomycin C or 1,8-dinitropyrene.

Keywords: aminophenylnorharman, sister chromatid exchanges

\*<sup>1</sup> Kyoto Women's University

\*<sup>2</sup> National Cancer Center Research Institute

\*<sup>3</sup> Kyoritsu College of Pharmacy

\*<sup>4</sup> Hatano Research Institute

Matsuoka, A., Takeshita, K. \*<sup>1</sup>, Furuta, A. \*<sup>2</sup>, Ozaki, M. \*<sup>3</sup>, Fukuhara, K., Miyata, N. : **The 4'-hydroxy group is responsible for the in vitro cytogenetic activity of resveratrol**

*Mutat. Res.*, 521, 29-35 (2002)

We previously reported that 3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene (resveratrol), a polyphenolic phytoalexin found in grapes, induces a high frequency of sister chromatid

exchanges (SCE) in vitro. To investigate structure activity relationships, we synthesized six analogues of resveratrol differing in number and position of hydroxy groups, and we investigated their activity in chromosomal aberration, micronucleus and SCE tests in a Chinese hamster cell line. Two of the six analogues (3,4'-dihydroxy- and 4'-hydroxy-*trans*-stilbene) showed clear positive responses in a concentration-dependent manner in all three tests. They were equal to or stronger than resveratrol in genotoxicity. The 4'-hydroxy analogue had the simplest chemical structure and was the most genotoxic. The other analogues did not have a 4'-hydroxy group. These results suggested that a 4'-hydroxy group is essential to the genotoxicity of stilbenes.

**Keywords:** resveratrol, 4'-hydroxy group of stilbene

\*1 Ube Scientific Analysis Laboratory Inc.

\*2 Environmental Biological Life Science Research Center Inc.

\*2 Japan Tobacco Inc.

Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y., Tsuchiya, T. : **Proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on dental Au-Ag-Pd casting alloy: Comparison with cytotoxicity to fibroblast L929 and V79 cells** *Materials Transactions*, **43**, 3155-3159 (2002)

Normal human osteoblast NHOst cells were cultured on the dental Au-Ag-Pd casting alloy using the micromass culture, and the proliferation and differentiation of NHOst cells were determined. The proliferation and differentiation of NHOst cells cultured on 10Au-62Ag-13Pd were significantly decreased more than those on 13Au-58Ag-21Pd, respectively. Moreover, the cytotoxicity of the Au-Ag-Pd alloy was evaluated by the MEM elution assay and the colony assay using fibroblast L929 and V79 cells. 13Au-58Ag-21Pd showed no cytotoxicity to L929 and V79 cells in the MEM elution assay and the colony assay. However, 10Au-62Ag-13Pd showed extremely weak cytotoxicity to L929 cells and weak cytotoxicity to V79 cells in the colony assay, though 10Au-62Ag-13Pd showed no cytotoxicity to L929 cells in the MEM elution assay. NHOst cells expressed the toxicity to the proliferation and differentiation on 10Au-62Ag-13Pd clearly. The in vitro toxicity test based on the proliferation and differentiation of NHOst cells was useful to evaluate the toxicity of medical materials.

**Keywords:** dental Au-Ag-Pd casting alloy, normal human osteoblasts, cytotoxicity

Isama, K., Matsuoka, A., Haishima, Y., Tsuchiya, T. : **In vitro toxicity test of dental casting alloy using normal human osteoblast: Comparison with L929 and V79 cytotoxicity tests**

*Journal of Toxicological Sciences*, **27**, 382 (2002)

Normal human osteoblast NHOst cells were cultured on the dental Au-Ag-Pd casting alloy using the micromass

culture, and the proliferation and differentiation of NHOst cells were determined. The proliferation, ALP activity and calcium amount of NHOst cells cultured on 10Au-62Ag-13Pd were significantly decreased more than those on 13Au-58Ag-21Pd, respectively. Moreover, the cytotoxicity of the Au-Ag-Pd alloy was evaluated by the colony assay using fibroblast L929 and V79 cells. 13Au-58Ag-21Pd showed no cytotoxicity to L929 and V79 cells. However, 10Au-62Ag-13Pd showed weak cytotoxicity to L929 and V79 cells. 10Au-62Ag-13Pd contained Cu more than 13Au-58Ag-21Pd, and the medium extract of 10Au-62Ag-13Pd contained Cu<sup>2+</sup> of the sufficient quantity in order to show the cytotoxicity. It was suggested that the content of Cu caused the difference in the proliferation and differentiation between NHOst cells cultured on 13Au-58Ag-21Pd and that on 10Au-62Ag-13Pd.

**Keywords:** dental Au-Ag-Pd casting alloy, normal human osteoblasts, cytotoxicity test

Nakaoka, R., Tsuchiya, T. : **Biocompatibility of various kinds of polymer microspheres estimated from their effect on gap junctional intercellular communication of fibroblasts**

*Materials Transactions*, **43**, 3122-3127 (2002)

細胞間連絡機能は細胞や生体組織の恒常性維持や細胞の増殖、分化等の制御において重要な役割を担っている。本研究では種々の高分子からなる粒子状物質を複製あるいは用意し、これらと接触したマウス由来の繊維芽細胞の細胞間連絡機能がどのように変化するかを Fluorescence recovery after photobleaching 法を利用して評価した。繊維芽細胞と微粒子とを同時に培養したところ、そのサイズ、微粒子との接触方法、微粒子の組成等により細胞間連絡機能は影響を受けることを見出した。特に、その微粒子が細胞の付着前に予め培養皿に吸着させておいた場合にその細胞機能が阻害されることが明らかとなった。粒子径が 0.5 μm のものは特異な結果を示したが、粒子によるその細胞機能の阻害はその粒子のサイズが小さくなるに従って強くなること、微粒子を細胞付着後に添加した場合には培養時間が長くなるとともに機能が回復することが明らかとなった。また、細胞生存率も細胞同士の細胞間連絡機能への影響と同様に微粒子のサイズやその組成に影響を受けることを明らかにした。これらのことから、高分子からなる微粒子状物質に接触した細胞は、微粒子のサイズや物理化学的特性、さらには細胞が粒子を認識する方向に応じて、細胞の恒常性維持に重要な細胞間連絡機能が阻害され、細胞は正常な状態を保てなくなることが示唆された。すなわち、微粒子状のものであっても、バイオマテリアルの細胞間連絡機能への影響を評価することで、そのバイオマテリアルの生体適合性に関しての有用な情報が得られると考えられる。

**Keywords:** biocompatibility, gap junctional intercellular communication, polymer microspheres

Nakaoka, R., Tsuchiya, T., Nakamura, A. : **Neural differentiation of midbrain cells on various protein-**

**immobilized polyethylene films**

*J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 439-446 (2003)

Effect of surface modification of polyethylene (PE) film on differentiation of midbrain (MB) cells, which were obtained from embryos of rats, was determined by their micromass culture system. When the cells were cultured on untreated PE film, the differentiation was suppressed about two-thirds of that observed with a control culture dish. On the contrary, type-I collagen-immobilized PE film increased differentiated foci of the MB cells more than the untreated PE film. RGDS peptide immobilization onto PE film resulted in almost the same differentiation activity as the collagen-PE film. Bovine serum albumin immobilization onto PE film enhance the differentiation activity more than the untreated PE film, but not up to the levels of collagen- and RGDS-immobilized PE. The number of differentiated foci of the MB cells on untreated PE film were increased by the addition of the condition medium prepared from the collagen-immobilized PE film. However, the number of the foci were not increased by the addition of other condition media obtained from control dish, untreated, BSA-, and RGDS-immobilized PE. On the other hand, none of these condition media enhanced a differentiation of the neuronal cell line of PC12 cells. These suggested that some factors effective on the differentiation of midbrain cells, composed with neuronal epithelial and mesenchymal cells, but not on the differentiation of PC12 cells are secreted in the condition media prepared from collagen-immobilized PE. In addition, it is probable that neural growth factor was not secreted in these condition media since these could not induce the differentiation of PC12 cells.

Keywords: midbrain cells, cell differentiation, surface modification

三木亜希子\*<sup>1</sup>, 黒須志のぶ\*<sup>1</sup>, 谷合悦子\*<sup>1</sup>, 林 郁江\*<sup>2</sup>, 榊原靖久\*<sup>2</sup>, 並木祥代\*<sup>2</sup>, 並木 努\*<sup>2</sup>, 新谷英晴: 透析医療現場における空中浮遊菌ならびに落下菌測定防菌防黴, **31**, 77-84 (2003)

医療現場では院内感染菌が問題になっている, これらの菌は人由来と考えられているが, 医療機関内の浮遊菌, 落下菌, 付着菌が院内感染菌になる可能性は無視できない. それでエア-サンプラーを用いて空中浮遊菌測定をペタンチェックを用いて付着菌ならびに落下菌測定を行い, 菌種をBBLクリスタルならびにアピで生化学的に同定した, その結果, 人の介在の有無で浮遊菌が落下菌になる可能性が示唆された.

Keywords: airborne microorganisms, air sampler, dropping microorganisms

\*<sup>1</sup> ミノファーゲン(株)座間工場

\*<sup>2</sup> 医療法人並木会並木クリニック

Soyama, A., Hanioka, N., Saito, Y., Murayama, N., Ando, M., Ozawa, S., Sawada, J.: **Amiodarone N-deethylation by CYP2C8 and its variants, CYP2C8\*3**

**and CYP2C8 P404A**

*Pharmacol. Toxicol.*, **91**, 174-178 (2002)

Amiodarone is a potent Class III antiarrhythmic drug. The N-deethylation of amiodarone to desethylamiodarone is known to be catalyzed by cytochrome P450 (CYP) 2C8. In the present study, amiodarone N-deethylation by the CYP2C8s, CYP2C8\*1 (wild-type), CYP2C8\*3, and CYP2C8 P404A (Pro404Ala substitution in exon 8), was investigated by their transient expression in Hep G2 cells. The expression levels of CYP2C8\*1 and CYP2C8\*3 were similar, whereas the level of CYP2C8 P404A was 55.6% of that of CYP2C8\*1. The kinetic parameters of amiodarone N-deethylation were obtained by means of Lineweaver-Burk analysis. The intrinsic clearance ( $V_{max}/K_m$ , per mg of microsomal protein) of amiodarone by CYP2C8 P404A but not CYP2C8\*3 was significantly (48.7%) less than that of CYP2C8\*1. These results suggest that CYP2C8 P404A but not CYP2C8\*3 is less effective in the N-deethylation of amiodarone.

Keywords: Amiodarone, CYP2C8, Allelic variants

Hanioka, N., Saito, Y., Soyama, A., Ando, M., Ozawa, S., Sawada J.: **High-performance liquid chromatographic assay for amiodarone N-deethylation activity in human liver microsomes using solid-phase extraction** *J. Chromatogr. B*, **774**, 105-113 (2002)

A selective and sensitive assay for amiodarone N-deethylation activity in human liver microsomes by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection is reported. The extraction of desethylamiodarone from incubation samples was performed by means of an original solid-phase extraction (SPE) procedure using a polymeric reversed-phase sorbent (Oasis HLB). The method was validated for the determination of desethylamiodarone with respect to specificity, linearity, precision, accuracy, recovery, limit of quantitation and stability. Amiodarone N-deethylation activity from low to high substrate concentrations using human liver microsomes was precisely determined without a concentration step. This method is applicable to the study in vitro of the metabolism of amiodarone.

Keywords: Amiodarone, Desethylamiodarone, Cytochrome P450

Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ohno, A., Makino, Y., Matsushima, E., Hanioka, N., Ando M.: **Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants** *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 398-403 (2003)

Cytochrome P450 (P450) 2B6 is a hepatic enzyme of potential importance for the metabolism of clinically used drugs and environmental or abused toxicants. Genetic polymorphisms of CYP2B6 (CYP2B6\*2, CYP2B6\*3, CYP2B6\*4, CYP2B6\*5, CYP2B6\*6 and CYP2B6\*7; wild-type, CYP2B6\*1) were found previously in white and Japanese populations. In the present study, the goal was

to investigate the effects of amino acid substitutions on CYP2B6 function. Wild-type (CYP2B6.1) and all of the known variants of CYP2B6 (CYP2B6.2, CYP2B6.3, CYP2B6.4, CYP2B6.5, CYP2B6.6, and CYP2B6.7) were transiently expressed in COS-1 cells, and their 7-ethoxy-4-trifluoromethyl-coumarin O-deethylation activities were determined. The levels of the variant CYP2B6 proteins were relatively low compared with that of CYP2B6.1, although the differences were not significant. The activities of 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylation on the basis of the CYP2B6 protein level at low (0.5  $\mu$ M) and high (50  $\mu$ M) substrate concentrations varied among wild-type and variant CYP2B6 proteins. All CYP2B6 enzymes showed typical Michaelis-Menten kinetics. The  $K_m$  value of CYP2B6.6 was significantly higher than that of CYP2B6.1. Those CYP2B6 variants having a Lys262Arg substitution (CYP2B6.4, CYP2B6.6, and CYP2B6.7) showed increased values for  $V_{max}$  and  $V_{max}/K_m$ , whereas the kinetic parameters of CYP2B6.2 and CYP2B6.3 were not affected by the corresponding amino acid substitution. These results may mean that Lys262 in combination with other amino acid residues such as Gln172 and Arg487 is associated with the CYP2B6 function and that the genetic polymorphism of CYP2B6 leads to interindividual differences in xenobiotic metabolism. Keywords: CYP2B6, Allelic variants, 7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylation

Ohno, A., Shimizu, M. \*, Yamada, S. \* : **Fluorinated Vitamin D Analogs to Probe the Conformation of Vitamin D in Its Receptor Complex:  $^{19}$ F-NMR Studies and Biological Activity**

*Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 475-483 (2002)

To investigate vitamin D conformation, specifically the A-ring and seco-B ring parts, in its complex with the vitamin D receptor (VDR), we have previously suggested the use of  $^{19}$ F-NMR spectroscopy and have synthesized three fluorovitamin D derivatives to be used for the study, 4,4-difluoro-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (2a), and (10Z)- and (10E)-19-fluoro-1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (3a, 4a). In this paper, we examined the  $^{19}$ F-NMR spectra of these and related fluorovitamin D compounds in detail.

The affinity for VDR and the ability to activate gene transcription was evaluated. This biological information in combination with the NMR properties indicates that 2a and 4a are promising probes for studying the VDR-bound A-ring conformation of vitamin D.

Keywords: Fluorovitamin D, Conformation analysis, Vitamin D receptor.

\*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

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

日本化粧品技術者会誌, **36**, 111-118 (2002)

ピチオノール (BL) およびジクロロフェン (DF) は薬事法により化粧品への使用が禁止されている。BLあるいはDFを添加した化粧水, 乳液, ボデーソープ, シャンプーをメタノールで希釈した後, その抽出物について, カラムとしてUnisil Q C18カラム (4.6 mm i.d.×150 mm), 移動相としてアセトニトリル/50 mMリン酸 (pH 3.5) 混液 (13:7) (BLの場合) あるいは (1:1) (DFの場合), 検出波長として306 nm (BLの場合) あるいは227または286 nm (DFの場合) を用いてHPLC法で分析する方法を検討した。BL 1~10  $\mu$ g/mlあるいはDF 0.1~1.2または1~12  $\mu$ g/mlの範囲において検量線を作成したところ, 濃度とピーク面積の間に良好な関係が成立した。化粧水, 乳液, ボデーソープ, シャンプーに添加されたBLあるいはDFは乳液Dの場合を除いてHPLC法で完全に定量できた。乳液Dの場合, 乳液中の賦形剤がHPLCクロマトグラム上のDFのピークを妨害した。そこで, 短いシリカゲルカラムで前処理して妨害物を除いた後にDFをHPLC法で分析する方法を確立した。

Keywords: bithionol, dichlorofen, prohibited ingredients in cosmetics

Tokunaga, H., Chowdhury, T., Chandraskaran, N., Uchino, T., Ando, M : **Urinary arsenic species in an arsenic-affected area of West Bengal, India**

*Appl. Organometal. Chem.*, **16**, 406-414(2002)

In order to estimate the people's total exposure to arsenic, we visited 12 arsenic-affected families in that area during 4 to 7 December 2000 and collected 7 tubewell waters and 51 urines from those families. The arsenic concentrations in drinking waters were from 2.7 to 170 ppb. The concentrations of As (III), As (V), MMA and DMA in urines obtained from 51 persons ranged from 0 to 796.9, from 0 to 1635.2, from 2.1 to 411.0 and from 8.3 to 2017.5 ppb/mg creatinine/ml urine, respectively. The average concentration of total arsenic was 59.2 ppb/mg creatinine/ml urine. On comparison of the ratio of (MMA+DMA) to total arsenic, the average proportion of (MMA+DMA) was 83.2. The arsenic species in urines from people having the same food and life habits showed the same profile in both men and women. There was a good correlation ( $p < 0.05$ ) between the ages of 19 persons in A to E families and the value of (MMA+DMA) or total arsenic in urines.

Keywords: arsenic species, urine, tubewell water, HPLC-ICP/MS, West Bengal

Chowdhury, T., Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M : **Survey of arsenic in food composites from an arsenic-affected area of West Bengal, India**

*Food. Chem. Toxicol.*, **40**, 1611-1621(2002)

An investigation of total arsenic in food composites was carried out in arsenic-affected areas of the Murshibad district, West Bengal, India. The soil is arsenic-

contaminated (mean 11.35 mg/kg, n=36). The individual food composite and food groups containing the highest mean arsenic concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) are potato skin (292.62 and 104), leaf of vegetables (212.34 and 294.67), arum leaf (331 and 341), papaya (196.50 and 373), rice (226.18 and 245.39), wheat (7 and 362), cumin (47.86 and 209.75), turmeric powder (297.33 and 280.9), cereals and bakery goods (156.37 and 294.47), vegetables (91.73 and 123.22), spices (92.22 and 207.60) and miscellaneous items (138.37 and 137.80) for the Jalangi and Domkal blocks, respectively. Daily dietary intakes of arsenic ( $\mu\text{g}$ ) from the foodstuffs for adults are 171.20 and 189.13 and for children are 91.89 and 101.63 in the Jalangi and Domkal blocks, respectively.

Keywords: Groundwater arsenic contamination, agricultural irrigation, food samples

Chowdhury, T., Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M. : **Arsenic and other heavy metals in soils from an arsenic-affected area of West Bengal, India**

*Chemosphere*, 49, 605-618(2002)

Domkal is one of the 19, out of 26 blocks in Mursushdabad district where groundwater contains arsenic above 0.05 mg/l. So there is a possibility of soil contamination which can moreover affect the food chain, cultivated in this area. The mean concentrations (mg/kg) of As(5.31), Fe(6740), Cu(18.3), Pb(10.4), Ni(18.8), Mn(342), Zn(44.3), Se(0.53), Mg(534), V(44.6), Cr(33.1), Cd(0.37), Sb(0.29) and Hg(0.54) in fallow land soils are within the normal range. The mean As(10.7), Fe(7860) and Mg(733) concentrations (mg/kg) are only in higher side whereas Hg(0.17 mg/kg) is in lower side in agricultural land soils, compared to the fallow land soils. The total arsenic withdrawn and mean arsenic deposition per land by the 19 shallow tubewells per year are 43.9 kg and 8.04 kg/ha, respectively. A proper watershed management is urgently required to save the contamination.

Keywords: Groundwater arsenic contamination, Soils, Metals

Chowdhury, U.K.\* , Rahman, M.M.\* , Sengupta, M.K.\* , Lodh, D.\* , Chanda, C.R.\* , Roy, S.\* , Quamruzzaman, Q.\* , Tokunaga, H., Ando, M., Chakraborti, D.\* : **Pattern of excretion of arsenic compounds [arsenite, arsenate, MMA(V), DMA(V)] in urine of children compared to adults from an arsenic exposed area in Bangladesh**

*J. Environ. Sci. Health*, 38, 87-113(2003)

We collected 42 urine samples for exposed group from Datterhat village, Bangladesh and 27 urine samples for control group Badhadamil village, West Bengal, India. The average total urinary arsenic metabolites in children's urine is higher than adults. For arsenic species between adults and children, it has been observed that inorganic arsenic (In-As) in average is 2.36 % and MMA is 6.55 % lower for children than adults while DMA is 8.91 %

(average) higher in children than adults. The values of the MMA/In-As ratio for adults and children are 0.93 and 0.74, respectively. This may also explain why children do not show skin lesions compared to adults when both are drinking same contaminated water.

Keywords: arsenic species, methylating capacity, groundwater

\*Jadavpur University

Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M., Utsumi, H. : **Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by  $\text{TiO}_2$ -UVA treatment**

*Toxicol. In Vitro*, 16, 629-635 (2002)

Titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) has been reported to produce OH radical under UVA irradiation and to induce cytotoxicity. Various crystal forms and sizes of  $\text{TiO}_2$  with UVA irradiation from OH radical generation was analyzed spin trapping-X band ESR spectroscopy. The formation of OH radicals varied in both crystal size and form of  $\text{TiO}_2$ , irradiation of the anatase form of  $\text{TiO}_2$  produced large numbers of OH radical in  $\text{TiO}_2$  and UVA dose dependent manner. The crystal size had large influence on OH radical generation, but optimum size for OH radical generation was different between both forms. The UVA absorption spectrum of  $\text{TiO}_2$  differed in regard to crystal size and form of  $\text{TiO}_2$  but no relation was observed between UVA absorbance and OH radical formation. Cytotoxicity of  $\text{TiO}_2$ -UVA irradiation was determined against chinese hamster ovary (CHO) cells and significant relation was obtained between the cytotoxicity and the OH generation.

Keywords: Titanium dioxide, OH radical, cytotoxicity

\*九州大学大学院

Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Saeki, M., Ishida, S., Nishimura, T., Ando, M., Saito, Y., Ozawa, S., Sawada, J. : **Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D.**

*Drug Metab. Dispos.* 31,108-113 (2003)

SN-38, an active metabolite of antitumor agent irinotecan, is conjugated and detoxified to SN-38-glucuronide by UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. Genetic polymorphisms in UGT1A1 are thought to contribute to severe diarrhea and/or leukopenia caused by irinotecan. In the present study, wild-type (WT) and three variant (G71R, P229Q, and Y486D) cDNAs of human UGT1A1s were transiently expressed in COS-1 cells, and the kinetic parameters of these UGT1A1s were determined for SN-38 glucuronidation. WT UGT1A1 catalyzed SN-38 glucuronidation with an apparent  $K_m$  value of 11.5  $\mu\text{M}$ , whereas those of G71R, P229Q, and Y486D were 14.0, 18.0, and 63.5  $\mu\text{M}$ , respectively. The SN-38 glucuronidation efficiency ratio ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) normalized for the level of

expression was 1.4, 0.66 (47% of WT), 0.73 (52%), and 0.07 (5%)  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  of protein for WT, G71R, P229Q, and Y486D, respectively. The decreased SN-38 glucuronidation efficiency ratio of G71R and P229Q could be critical in combination with other polymorphisms in the *UGT1A1* gene.

Keywords: Irinotecan, UDP-glucuronosyltransferase 1A1, Polymorphism

Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Hasegawa, T. \*, Makino, Y., Seko, Y. \*, Hanioka, N., Ando, M. : **Functional characterization of two variant human GSTO 1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn).**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 516-520 (2003)

Glutathione-S-transferase class Omega (GSTO 1-1) belongs to a new subfamily of GSTs, which is identical with human monomethylarsonic acid (MMA(V)) reductase, the rate limiting enzyme for biotransformation of inorganic arsenic, environmental carcinogen. Recombinant GSTO 1-1 variants (Ala140Asp and Thr217Asn) were functionally characterized using representative substrates. No significant difference was observed in GST activity towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, whereas thioltransferase activity was decreased to 75% (Ala140Asp) and 40% (Thr217Asn) of the wild-type GSTO 1-1. For MMA(V) reductase activity, the Ala140Asp variant exhibited similar kinetics to wild type, while the Thr217Asn variant had lower  $V_{\text{max}}$  (56%) and  $K_m$  (64%) values than the wild-type enzyme. The different activities of the enzyme variants may influence both the intracellular thiol status and arsenic biotransformation. This can help explain the variation between individuals in their susceptibility to oxidative stress and inorganic arsenic.

Keywords: Arsenic, Glutathione-S-transferase class Omega, Polymorphism

\* Yamanashi Institute of Environmental Sciences

Jinno, H., Saeki, M., Tanaka-Kagawa, T., Hanioka, N., Saito, Y., Ozawa, S., Ando, M., Shirao, K. \*, Minami, H. \*, Ohtsu, A. \*, Yoshida, T. \*, Saijo, N. \*, Sawada, J. : **Functional characterization of wild-type and variant (T202I and M59I) human UDP-glucuronosyltransferase 1A10.**

*Drug Metab. Dispos.* **31**, 528-532 (2003)

We have previously reported two nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in exon 1 of human *UGT1A10* gene; 177G>A and 605C>T resulting in amino acid alterations, M59I and T202I, respectively. In the present study, wild-type (WT) and variant *UGT1A10* cDNAs were transiently expressed in COS-1 cells for functional characterization. Glucuronidation activities were assayed using 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HTFMC) and 17 $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) as substrates. WT and variant *UGT1A10*s catalyzed HTFMC glucuronidation

with similar apparent  $K_m$  values of 5  $\mu\text{M}$ , whereas the  $V_{\text{max}}$  value of T202I normalized by the expressed *UGT1A10* protein levels was nearly half of those of WT and M59I. Similarly, the three *UGT1A10*s catalyzed  $E_2$  3-*O*-glucuronidation with comparable apparent  $K_m$  values (2  $\mu\text{M}$ ), whereas the normalized  $V_{\text{max}}$  value of T202I was almost half that of WT and M59I. These results suggest that the lowered glucuronidation activity of T202I affects the gastrointestinal glucuronidation of orally administered chemicals and the enterohepatic circulation of biliary excreted metabolites.

Keywords: UDP-glucuronosyltransferase 1A10, Polymorphism, Kinetic analysis

\* National Cancer Center

山田信之\*, 高畑寿太郎\*, 佐々木久美子, 豊田正武, 中村隆二\*, 吉田菊喜\*: **GC-FPDによる農作物中のジクロロボス及びトリクロロホンの分析**  
食品衛生学雑誌, **43**, 196-201 (2002)

農産物中のジクロロボス (DDVP) 及びトリクロロホン (DEP) について, アセトン抽出, 酢酸エチル転溶, シリカゲル精製後, DEPを誘導体化してDDVPと同時にGC-FPDで定量する分析法を検討した. DEPの誘導体化は抽出精製液を乾固後, N-メチルピス (トリフルオロアセトアミド) と0.1%ピリジン-アセトン溶液を加え, 60°Cで2時間行った. 添加回収試験でDDVPは72.6~117.7%, DEPは86.2~106.6%の回収率であった. 定量限界値はDDVP及びDEPともに0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$ 以下 (抹茶は0.03  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) であった. さらに, 確立した試験法について6分析機関による共同評価を行い, 試験法の妥当性を評価し, 良好な結果を得た.

Keywords: dichlorvos, trichlorfon, method-performance study

\* 仙台市衛生研究所

佐々木久美子, 辰濃 隆\*<sup>1</sup>, 野村孝一\*<sup>2</sup>, 今澤 剛\*<sup>3</sup>, 宇都宮 領\*<sup>4</sup>, 金子正堅\*<sup>5</sup>, 近藤安昭\*<sup>6</sup>, 三枝晃次郎\*<sup>7</sup>, 戸田 聡\*<sup>8</sup>, 永山敏廣\*<sup>9</sup>, 豊田正武: **果実中のエトキシキン分析法の評価**

食品衛生学雑誌, **43**, 366-370 (2002)

日焼け防止剤エトキシキン (ET) の食品衛生法告示試験法を改良した分析法について共同実験を行って評価した. この分析法ではETの分解を抑制するために, ホモジナイズ時にチオ尿素を添加し, 試験溶液に酸化防止剤BHTを添加した. また, 抽出効率を上げるためにヘキサンに代えてアセトンを抽出溶媒とした. 6分析機関で0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ のETを添加したりんご, 洋なし, 日本なしを分析したときの平均回収率は83.0~85.3%, 併行再現性及び室間再現性の相対標準偏差はそれぞれ3.8~4.7%, 7.8~11.3%と良好な結果が得られた. 各機関での検出限界は0.001~0.025  $\mu\text{g}/\text{g}$ であった. ETを添加したりんご及びなしの試験溶液ではLC/MS及びGC/MSによるマススペクトルの確認が可能であった.

Keywords: ethoxyquin, method-performance study

\*<sup>1</sup> (株) 日本食品衛生協会

\*<sup>2</sup> (財) 日本食品分析センター

\*<sup>3</sup> (財) 東京顕微鏡院

\*<sup>4</sup> (財) 食品環境検査協会

\*<sup>5</sup> (財) 日本穀物検定協会中央研究所

\*<sup>6</sup> (社) 日本食品衛生協会食品衛生研究所

\*<sup>7</sup> (財) 広島県環境保健協会

\*<sup>8</sup> (財) 日本冷凍食品検査協会

\*<sup>9</sup> 東京都立衛生研究所

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

秦野研究所年報, 25, 8-16 (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

Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K., Maitani, T.: **Determination of acrylamide in foods by GC/MS using <sup>13</sup>C-labeled acrylamide as an internal standard**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, 43, 371-376 (2002)

A method was developed for the determination of trace amounts of acrylamide (AA) in foods. The method includes the addition of <sup>13</sup>C-labeled acrylamide-1-<sup>13</sup>C (AA-1-<sup>13</sup>C) as an internal standard, extraction with water, bromination, clean-up with Florisil cartridge column, dehydrobromination and GC/MS analysis in the selected ion monitoring (SIM) mode. Bromination of AA to 2,3-dibromopropionamide (2,3-DBPA) was done using potassium bromide and potassium bromate under an acidic condition. 2,3-DBPA was converted to 2-bromopropenamide (2-BPA) by dehydrobromination with triethylamine before GC/MS analysis. The recoveries of AA from spiked potato chips, corn snack, pretzel and roasted tea were 97-105 %, and their relative standard deviations were 0.8-3.9 %. The detection limit of AA in foods was 9 ng/g. The method was applied to thirty-one foods purchased from the retail markets. AA was found in the potato chips at the level of 466-3,340 ng/g, and in other foods at the level of ND-520 ng/g.

Keywords: acrylamide, bromination, GC/MS

Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K., Maitani, T.: **Determination of acrylamide in processed foods by LC/MS using column switching**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, 44, 89-95 (2003)

An LC/MS method was developed for the determination of acrylamide (AA) in processed or cooked foods. AA was extracted with a mixture of water and acetone from homogenized food samples after the addition of <sup>13</sup>C-labeled acrylamide (AA-1-<sup>13</sup>C) as an internal standard. The extract was concentrated, washed with dichloromethane for defatting, and cleaned up on Bond Elut C18, PSA and ACCUCAT cartridge-columns, and then AA was determined by LC/MS in the selected ion recording (SIR) mode. For the LC/MS analysis, four LC columns were connected in-line and the flow of the mobile phase was switched according to a time-program. Monitoring ions for AA were *m/z* 72 and 55, and those for AA-1-<sup>13</sup>C were *m/z* 73 and 56. AA and AA-1-<sup>13</sup>C were determined without interference from the matrices in all samples. The recoveries of AA from potato chips, corn snack, pretzel and roasted tea spiked at the level of 500 ng/g of AA were 99.5 ~ 101.0 % with standard deviations (SD) in the range from 0.3 to 1.6 %. The limits of detection and quantification of the developed method were 9 and 30 ng/g for AA in samples, respectively.

The method was applied to the analysis of AA in various processed or cooked food samples purchased from retail markets. High levels of AA were found in potato chips and French-fried potato (467 ~ 3,544 ng/g). Fried and sugar-coated dough cakes (karinto) contained 374 and 1,895 ng/g. Corn snacks contained 117 ~ 535 ng/g of AA. Roasted foods (such as roasted sesame seed, roasted barley (mugi-cha), roasted tea (hoji-cha), coffee beans and curry powder) contained 116 ~ 567 ng/g of AA. Foods made from fish, egg and meat contained lower levels of AA than the plant-based foods. Foods containing much water showed a tendency to have low levels of AA compared with dry foods.

The proposed method was applicable to the analysis of AA in variety of processed foods.

Keywords: acrylamide, LC/MS, column switching

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Toyoda, M. \*, Maitani, T.: **Comparison of sulfuric acid treatment and multi-layer silica gel column chromatography in cleanup methods for determination of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in foods**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, 43, 312-321 (2002)

Two typical cleanup methods, sulfuric acid treatment and multi-layer silica gel column chromatography, for the determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dioxin-like PCBs) in seventeen food samples were examined and compared. Vegetables, fruits, cereals, fish, meat and dairy foods were extracted by conventional methods (shaking with acetone/*n*-hexane or with *n*-hexane after alkaline treatment). The extracts were cleaned up by sulfuric acid treatment or multi-layer silica gel column chromatography, followed by several

column chromatographic steps. Of the samples treated, the vegetable, fruit and cereal samples could be directly applied to the multi-layer silica gel column after extraction. However, the samples containing fats and oils such as fish, meat and dairy foods needed to be treated several times with concentrated sulfuric acid before multi-layer column chromatography, because these samples plugged the column with oily residues. Both cleanup methods gave similar values of isomeric concentrations and showed similar efficiency of purification, and the recoveries ranged from 40 to 120%. These results are considered to provide useful data for the efficient analysis of dioxins in foods which have wide-ranging compositions.

**Keywords:** dioxins, sulfuric acid treatment, multi-layer silica gel column chromatography

\* Jissen Women's University

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Nakamura, M.<sup>\*1</sup>, Kitagawa, H.<sup>\*1</sup>, Fujino, J.<sup>\*1</sup>, Sasaki, K., Toyoda, M.<sup>\*2</sup>, Yoshida, T.<sup>\*3</sup>, Maitani, T. : **Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay**

*Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 532-539 (2003)

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that mediates the biological action of many aromatic environmental pollutants. In this study, we investigated the activation of the AhR by some vegetable constituents using the AhR-based bioassay for dioxins, i.e., the chemical activated luciferase gene expression (CALUX) assay. Ninety-five vegetable constituents, including flavonoids, tannins, saponins, and terpenes, were tested *in vitro*. Among them, isoflavones such as daidzein, resveratrol having a stilbene structure, and some flavonoids such as naringenin, hesperetin, and baicalein showed AhR activation.

**Keywords:** foods, aryl hydrocarbon receptor, dioxins

<sup>\*1</sup> Hiyoshi Corporation

<sup>\*2</sup> Jissen Women's University

<sup>\*3</sup> Okayama University

Amakura, Y., Tsutsumi, T., Sasaki, K., Toyoda, M.<sup>\*</sup>, Maitani, T. : **Cleanup of food samples with pre-packed multi-layer silica gel column for the analysis of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, **44**, 119-125 (2003)

The cleanup procedure for the determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in food samples using a disposable pre-packed multi-layer silica gel column (multi-layer dioxin tube; D-tube) was evaluated. The blank test showed the need for conditioning of the column with *n*-hexane. To compare the method with the D-tube and the conventional method for the analyses of actual food samples, seven food samples (spinach, komatsuna, rice, salmon, beef, egg and

butter) were extracted by shaking with acetone/*n*-hexane or *n*-hexane after alkaline treatment, and then the extracts were cleaned up by use of the D-tube or the prepared conventional column, followed by several column chromatographic steps. Both cleanup procedures gave similar values at each isomeric concentration level and showed similar efficiency with favorable recoveries. The results suggest that the D-tube is applicable to cleanup for the analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in foods.

**Keywords:** PCDD, PCDF, dioxin-like PCB

\* Jissen Women's University

Tsutsumi, T., Amakura, Y., Sasaki, K., Toyoda, M., Maitani, T. : **Evaluation of an aqueous KOH digestion followed by hexane extraction for analysis of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish**

*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375**, 792-798 (2003)

An aqueous KOH digestion followed by hexane extraction has been employed in the extraction of dioxins (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls) for biological samples, but there are no reports on its evaluation. Therefore, we report here the evaluation of this extraction for the analysis of dioxins in retail fish. The effect of the alkaline digestion on dioxins was evaluated by estimation of recoveries. The recoveries of dioxins after the alkaline digestion were good (79-106%) in various kinds of retail fish except tuna. In tuna, a loss of octachlorodibenzofuran (OCDF) was clearly observed, however, the loss was corrected by an internal quantification standard, <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-labeled OCDF, added before the alkaline digestion. Comparative study showed that alkaline digestion followed by hexane extraction provides extraction efficiencies of dioxins equal to the conventional Soxhlet extraction in fish. Additionally, as the result of analysis of a certified reference fish sample with this extraction, the obtained values for certified isomers were almost equal to the certified values. Since the present method is very simple and inexpensive, it would be useful for analysis of dioxins in retail fish.

**Keywords:** alkaline digestion, dioxins, fish

Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M.<sup>\*1</sup>, Brown, D.J.<sup>\*2</sup>, Clark, G.C.<sup>\*2</sup>, Sasaki, K., Toyoda, M., Maitani, T. : **Validation of the CALUX bioassay for the screening of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish**

*The Analyst*, **128**, 486-492 (2003)

The CALUX assay is a reporter gene assay that detects dioxin-like compounds based on their ability to activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR) and thus expression of the reporter gene. In this paper, the CALUX assay was examined for its application in the screening of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in retail fish. The sample extracts were cleaned up on a sulfuric acid-silica gel

column followed by an activated carbon column, and the AhR activity of the separated PCDD/F and dioxin-like PCB fractions was determined using the assay. The quantitative limit for 2,3,7,8-TCDD was 0.98 pg/ml (0.19 pg/assay) in the standard curve, corresponding to 0.16 pg/g of CALUX-based toxic equivalency in the tested sample. Recovery tests in which dioxins were added to fish samples resulted in acceptable recoveries (77-117%). The CALUX assay performed well in the analysis of dioxins in fish samples and a comparative study revealed a strong correlation between the CALUX assay and high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry analysis for the determination of PCDD/Fs ( $r = 0.89$ ) and dioxin-like PCBs ( $r = 0.91$ ) in retail fish ( $n = 22$ ). These data revealed that the CALUX assay would be a useful screening method for PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in retail fish.

**Keywords:** CALUX assay, dioxins, fish

\*1 Hiyoshi Corporation

\*2 Xenobiotic Detection Systems, Inc

Nakagawa, R. \*, Hori, T. \*, Tobiishi, K. \*, Iida, T. \*, Tsutsumi, T., Sasaki, K., Toyoda, M. : **Levels and tissue-dependent distribution of dioxin in Japanese domestic leafy vegetables from the 1999 national investigation** *Chemosphere*, **48**, 247-256 (2002)

In 1999, Japanese domestic leafy vegetables were successively investigated for levels of dioxins, including 17 dibenzo-*p*-dioxins/dibenzofurans (PCDD/Fs), four non-ortho co-planar PCBs (co-PCBs) and eight mono-ortho co-PCBs, all of which had been assigned toxic equivalency factors (TEFs) by WHO in 1997. The mean levels of dioxins in the edible portions were 0.07 (0.09) pg TEQ/g in spinach, 0.13 (0.14) pg TEQ/g in garland chrysanthemum, 0.01 (0.04) pg TEQ/g in mitsuba (marsh parsley) and 0.01 (0.03) pg TEQ/g in chingentsuai (*Brassica Campestris var. chinesis*), when non-detects were set to zero (and set to half the limit of detection). In order to understand the dioxin pollution of leafy vegetables in detail, a further investigation of dioxin levels in the tissues of spinach was conducted. As a result, the dioxin levels in the leaves were found to be higher than those in the stem and red collar, but they were much lower than those found in the primary and secondary roots, which are considerably affected by the soil, which is recognized as a sink of airborne dioxins. The dioxin levels in edible portions (leaves, stem and red collar) were obviously lower than those in non-edible portions (primary and secondary roots). In addition, from the finding that several lower-chlorinated PCDD/Fs and co-PCBs, namely 2,3,7,8-TCDD/F, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,7,8/2,3,4,7,8-PeCDFs, 1,2,3,7,8,9-HxCDD, 1,2,3,4,7,8-/1,2,3,6,7,8-HxCDFs, 3,3',4,4'-TCB, 2,3,3',4,4'-/2,3',4,4',5-PeCBs, and 2,3',4,4',5,5'-HxCB, were more highly represented in the dioxins in the leaves than in those in

the secondary roots, it was suggested that in leafy vegetables the deposition of gaseous, presumably moderately volatile dioxins in leaf wax is another pollution pathway in addition to the adhesion of dioxin-contaminated particles including soil.

**Keywords:** dioxins, vegetables, dioxin distribution

\* Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

岩上猛\*<sup>1</sup>, 植田泰輔\*<sup>1</sup>, 木村良夫\*<sup>1</sup>, 森本副吉\*<sup>1</sup>, 松田りえ子, 林 譲, 今井一洋\*<sup>2</sup>: **システム適合性における精度の推定**

薬学雑誌, **122**, 849-854 (2002)

高速液体クロマトグラフィーにおけるシステム適合性試験では、6回の測定の見測値のRSDを指標として、機器の性能を評価する。しかしながら、6回の測定で求めた標準偏差は変動が大きく、機器の性能の変化を確実に見いだすことは困難である。一方、測定回数を増やすことは実際の試験現場では実用的ではなく、性能の変化を的確に検出する適合性試験の方法が必要とされる。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り、これを用いたシステム適合性試験を評価するために、シミュレーションおよび実際の現場での適合性試験を実施した。この結果、FUMI理論を用いて効率の良いシステム適合性試験が行えることが明らかとなった。

**Keywords:** HPLC, system suitability test, FUMI theory

\*1 林純薬工業株式会社

\*2 東京大学薬学部

神田真軌\*<sup>1</sup>, 牛山慶子\*<sup>1</sup>, 井草京子\*<sup>1</sup>, 村山三徳, 堀江正一\*<sup>2</sup>, 広門雅子\*<sup>1</sup>, 宮崎奉之\*<sup>1</sup>: **HPLCによる鶏組織中の残留抗コクシジウム剤, ジクラズリル及びナイカルバジンの簡易同時分析法**

食品衛生学雑誌, **44**(2), 110-113 (2003)

鶏組織中に残留する抗コクシジウム剤, ジクラズリル (DCZ) 及びナイカルバジン (NCZ) の簡易同時分析法を開発した。鶏の肝臓, 筋肉, 脂肪組織をアセトニトリル (CH<sub>3</sub>CN) で抽出し, 抽出液を減圧乾固した後, 残さにCH<sub>3</sub>CN-メタノール (CH<sub>3</sub>OH) (1:1) 混液1.4 mLを加えて溶解した。溶解液に混液で飽和したn-ヘキサン1.0 mL及び水0.6 mLを順に加えて液-液分配を行った。下層のCH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>OH-水層中のDCZ及びNCZをHPLCで測定した。HPLC条件は, カラムにXterra RP-18, 移動相にCH<sub>3</sub>CN-0.5%酢酸アンモニウム (0.01 mol/L硫酸水素テトラ-n-ブチルアンモニウム含有) (43:57) を用いた。DCZ及びNCZを, 肝臓に3.0, 0.2 µg/g, 筋肉に0.5, 0.2 µg/g, 脂肪に1.0, 0.2 µg/gとなるように添加し, 回収実験を行った。DCZ及びNCZの回収率は, 92.0-95.6%, 87.3-89.4%, 検出限界は0.01 µg/g, 0.004 µg/gであった。

**Keywords:** anticoccidial drug, diclazuril, nicarbazin

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 埼玉県衛生研究所

Miyahara Makoto, Akiko Saito \*<sup>1</sup>, Tomomi Kamimura \*<sup>1</sup>,

Taeko Nagasawa<sup>\*1</sup>, Hitoshi Ito<sup>\*2</sup> and Toyoda Masatake : **Hydrocarbon production in hexane solutions of fatty acid methyl esters irradiated with gamma rays**  
*Journal Health Sciences*, **48**, 418-426 (2002)

Five fatty acid methyl esters in hexane were irradiated in order to obtain basic data regarding the detection of irradiation of fatty foods. Fifteen hydrocarbons which were formed by radiolysis of fatty acid methyl esters were detected using capillary gas chromatography accompanied by mass spectrometry. Dose response was observed at the range of 0.74 kGy to 10 kGy. The yields of the hydrocarbons increased as the dose increased. Clear dose rate effects were not observed at the range of 10 kGy/h to 500 Gy/h. Temperature effects on the formation of the hydrocarbons were observed at the range of -40 to 20 degrees Celsius. Their yields were increased as the temperature rose. The effects of oxygen level in the container were examined. The yields in the containers that contained oxygen absorbers were 5-41% of those under normal pressure. Eminent reduction of hydrocarbon yields were observed in the containers that contained oxygen absorbers. Remarkable solvent effects on the formation of the hydrocarbons were observed. The yields of hydrocarbons in benzene solution were reduced to 60-95% of those in hexane. Thus, radiolytic degradation of fatty acid methyl ethers were affected mainly by absorbed dose, irradiation temperature, oxygen pressure, and fatty acid components.

**Keywords** hydrocarbon detection method, irradiated food detection, capillary gas chromatography, mass spectrometric detection

<sup>\*1</sup> Faculty of Allied Health Sciences, Kitasato University

<sup>\*2</sup> The Japan Atomic Energy Research Institute Takasaki Radiation Establishment

穂山 浩, 田中敏嗣<sup>\*2</sup>, 中島正博<sup>\*3</sup>, 藤田和弘<sup>\*4</sup>, 里山俊哉<sup>\*5</sup>, 三浦嘉巳, 米谷民雄 : **厚生労働省通知アフラトキシン試験法の複数機関による評価研究**

*日本食品化学会誌*, **9**, 120-124 (2003)

通知アフラトキシン試験法の妥当性を評価するために, 5機関による inter-laboratory validation を行った. ピーナッツ, ピスタチオナッツ, トウモロコシ, 赤トウガラシ, ナツメグの5品目へ, アフラトキシン B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 及び B<sub>2</sub> を 10 ng/g になるように添加し, 5機関で回収率を算出した. その結果, アフラトキシン B<sub>1</sub> の回収率は 77.9~92.7% で, アフラトキシン G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 及び B<sub>2</sub> の回収率は各々 81.5~92.5%, 84.7~82.2% 及び 83.7~89.1% の範囲にあり, すべて良好な真度であった. アフラトキシン B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> 及び B<sub>2</sub> の回収率の併行再現性は各々 2.9~7.3%, 2.1~6.5%, 1.3~5.2% 及び 1.9~4.6% の範囲にあり, 室間再現性は各々 6.5~10.1%, 2.5~14.2%, 6.5~10.1% 及び 5.3~10.6% の範囲にあり, 良好な精度を示した. 従って本試験法はピーナッツ, ピスタチオナッツ, トウモロコシ, 赤トウガラシ, ナツメグの試料において, 良好な真度, 精度でアフラトキシ

ンの分析が可能であることが判明した.

**Keywords:** HPLC, multifunctional column, peanuts, Inter-laboratory validation

<sup>\*1</sup> 神戸市環境保健研究所

<sup>\*2</sup> 名古屋市衛生研究所

<sup>\*3</sup> 日本食品分析センター名古屋支所

<sup>\*4</sup> 日本食品分析センター大阪支所

Shindo, Y.<sup>\*1</sup>, Kuribara, H.<sup>\*2</sup>, Matsuoka, T.<sup>\*2</sup>, Futo, S.<sup>\*3</sup>, Sawada, C.<sup>\*4</sup>, Shono, J.<sup>\*5</sup>, Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.<sup>\*6</sup> : **Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules**

*JAOAC Int.*, **85**, 1119-1126 (2002)

Novel analytical methods based on real-time quantitative polymerase chain reactions by use of new reference molecules were validated in interlaboratory studies for the quantitation of genetically modified (GM) maize and soy. More than 13 laboratories from Japan, Korea, and the United States participated in the studies. The interlaboratory studies included 2 separate stages: (1) measurement tests of coefficient values, the ratio of recombinant DNA (r-DNA) sequence, and endogenous DNA sequence in the seeds of GM maize and GM soy; and (2) blind tests with 6 pairs of maize and soy samples, including different levels of GM maize or GM soy. Test results showed that the methods are applicable to the specific quantitation of the 5 lines of GM maize and one line of GM soy. After statistical treatment to remove outliers, the repeatability and reproducibility of these methods at a level of 5.0% were <13.7 and 15.9%, respectively. The quantitation limits of the methods were 0.50% for Bt11, T25, and MON810, and 0.10% for GA21, Event176, and Roundup Ready soy. The results of blind tests showed that the numerical information obtained from these methods will contribute to practical analyses for labeling systems of GM crops.

**Keywords:** real-time PCR, validation, genetically modified maize, genetically modified soybean,

<sup>\*1</sup> Asahi Breweries Ltd.

<sup>\*2</sup> Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services

<sup>\*3</sup> FASMAC Co., Ltd.,

<sup>\*4</sup> Japan Frozen Foods Inspection Corp.

<sup>\*5</sup> Somatech Center, House Foods Co.

<sup>\*6</sup> National Food Research Institute

Kuribara, H.<sup>\*1</sup>, Shindo, Y.<sup>\*2</sup>, Matsuoka, T.<sup>\*1</sup>, Takubo, K.<sup>\*1</sup>, Futo, S.<sup>\*3</sup>, Aoki, N.<sup>\*4</sup>, Hirao, T.<sup>\*5</sup>, Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., Hino, A.<sup>\*6</sup> : **Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean.**

*JAOAC Int.*, **85**, 1077-1089 (2002)

New quantitation methods based on a real-time polymerase chain reaction (PCR) technique were

developed for 5 lines of genetically modified (GM) maize, including MON810, Event176, Bt11, T25, and GA21, and a GM soy, Roundup Ready. Oligonucleotide DNA, including specific primers and fluorescent dye-labeled probes, were designed for PCRs. Two plasmids were constructed as reference molecules (RMs) for the detection of GM maize and GM soy. The molecules contain the DNA sequences of a specific region found in each GM line, universal sequences used in various GM lines, such as cauliflower mosaic virus 35S promoter and nopaline synthase terminator, and the endogenous DNA sequences of maize or soy. By using these plasmids, no GM maize and GM soy were required as reference materials for the qualitative and quantitative PCR technique. Test samples containing 0, 0.10, 0.50, 1.0, 5.0, and 10% GM maize or GM soy were quantitated. At the 5.0% level, the bias (mean-true value) ranged from 2.8 to 19.4% and the relative standard deviation was <5.2%. These results show that our method involving the use of these plasmids as RMs is reliable and practical for quantitation of GM maize and GM soy.

**Keywords:** real-time PCR, novel reference molecules, quantitation, genetically modified maize, genetically modified soybean

\*<sup>1</sup> Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services

\*<sup>2</sup> Asahi Breweries Ltd.

\*<sup>3</sup> FASMAC Co., Ltd.,

\*<sup>4</sup> Japan Food Research Laboratories.

\*<sup>5</sup> Somatech Center, House Foods Co.

\*<sup>6</sup> National Food Research Institute

穂山浩, 渡邊敬浩, 和久井千世子, 千葉良子\*<sup>1</sup>, 渋谷雅明\*<sup>2</sup>, 合田幸広, 豊田正武: 遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Y potato) からの組換え遺伝子の検知法  
食品衛生学雑誌, **43**, 301-305 (2002)

日本で安全性審査未終了 (平成14年6月現在) の遺伝子組換えジャガイモ (NewLeaf Y potato; NL-Y) 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。ジャガイモウイルスYが感染した加工食品の検知において, 擬陽性を避けるため特異的にNL-Yを検知するプライマー対を設計した。そのプライマー対を用いて0.05%NL-Yが検知可能であった。加えて, NewLeaf, NewLeaf Plus (NL-P), NL-Yを検知するためのCry III A遺伝子を認識するプライマー対とNL-P及びNL-Yを検知するためのp-FMV領域を認識するプライマー対を設計した。確立したPCR検知法をジャガイモ加工品26検体に応用した。その結果, どの検体からもNL-Yは検知されなかった。

**Keywords:** genetically modified potato, recombinant DNA, PCR, detection method, Newleaf Y potato

\*<sup>1</sup> 昭和薬科大学

\*<sup>2</sup> 東京大学大学院薬学系研究科

Matsuoka, T.\*<sup>1</sup>, Kuribara, H.\*<sup>1</sup>, Takubo, K.\*<sup>1</sup>, Akiyama,

H., Miura, H.\*<sup>2</sup>, Goda, Y., Kusakabe, Y.\*<sup>2</sup>, Isshiki, K.\*<sup>2</sup>, Toyoda, M., Hino, A.\* : Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*).

*J. Agric. Food Chem.*, **50** (7), 2100-2109 (2002)

Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques are increasingly used for the detection of genetically modified (GM) crops in foods. In this paper, recombinant DNAs introduced into the seven lines of GM maize, such as Event 176, Bt11, T25, MON810, GA21, DLL25, and MON802, are sequenced. On the basis of the obtained sequence, 14 primer pairs for the detection of the segments, such as promoter, terminator regions, and construct genes, were designed. To confirm the specificities of the designed primer pairs, PCR was performed on genomic DNAs extracted from GM and non-GM maize, GM and non-GM soy, and other cereal crops. Because the presence of the corresponding DNA segments was specifically detected in GM crops by the designed primer pairs, it was concluded that this method is useful for fast and easy screening of GM crops including unauthorized ones.

**Keywords:** *Zea mays*, genetically modified, PCR, detection technique, unauthorized GM crops

\*<sup>1</sup> Center for Food Quality, Labeling and Consumer Services

\*<sup>2</sup> National Food Research Institute

Okunuki, H., Akiyama, H., Teshima, R., Hino, A.\* , Goda, Y., Sawada, J., Toyoda, M., and Maitani, T. : Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, **44**, 77-82 (2003)

A liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method for determining the enzymatic activity of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase), an enzyme of the shikimate pathway, was developed. EPSP synthase catalyzes the formation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) from shikimate-3-phosphate (S-3-P) and phosphoenolpyruvate (PEP) in microorganisms and plants. The enzymatic activity of EPSP synthase was assessed by the determination of EPSP after a 30-min incubation with S-3-P and PEP using the LC/MS system. EPSP synthase activity is given in terms of the produced EPSP (pmol/min/mg protein). Glyphosate (*N*-phosphonomethyl glycine)-tolerant EPSP synthase from the *Agrobacterium* sp. strain CP4 (CP4-EPSP synthase) in genetically modified soybeans (GM-soybeans) was found to have an enzymatic activity of 736 EPSP pmol/min/mg protein in the presence of 3 nmol of S-3-P. In contrast, the enzyme activity of non-GM-soybeans was 21 EPSP pmol/min/mg protein. The EPSP synthase activity was markedly decreased in the non-GM-soybeans by the addition of glyphosate, but the enzyme activity of the GM-soybeans was only slightly decreased with this treatment. This

LC/MS system could also be applicable to the measurement of EPSP synthase activity in different plant species and the detection of herbicide-tolerant EPSP synthase in GM foods.

Keywords: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, LC/MS, genetically modified soybeans, shikimate-3-phosphate, glyphosate

\* National Food Research Institute

Nagaoka, M.H., Yamazaki, T., Maitani T. : **Binding patterns of vanadium ions with different valence states to human serum transferrin studied by HPLC/high-resolution ICP-MS.**

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296** (5), 1207-1214 (2002)

Vanadium (V) is an essential metal for mammals and has different valence states. In blood, V is bound to serum transferrin (Tf), a glycoprotein which has two metal-binding sites, and carbonate is generally required for the binding. In this study, the binding patterns of V(III), V(IV), and V(V) to human serum Tf (hTf) were analyzed using an HPLC system equipped with an anion-exchange column and directly connected to a high-resolution inductively coupled plasma-mass spectrometer for metal detection ( $^{51}\text{V}$ ). In affinity to hTf, the three ions were ranked V(III)>V(IV)>V(V) in the presence of bicarbonate and V(III) reverse congruent V(IV)>V(V) in the absence. Intermediates in the "open forms" binding to the respective sites were detected at the initial stage. V(IV) and V(V) were bound to the N-lobe site in the "closed form" and "open form," respectively. In the absence of bicarbonate, V ions with respective valence states were bound to hTf in the "open form." In terms of binding to hTf, tri-valent V was most favorable in the presence of bicarbonate.

Keywords: Transferrin, Vanadium, High-resolution ICP-MS

佐々木次雄\*, 棚元憲一: **遺伝子解析による微生物の迅速同定法**

医薬品研究, **33**, 763-769 (2002)

The JP Panel on Biological Tests is now preparing a new chapter on identification of bacteria and fungi based on partial sequences of divergent regions of their rRNA. This chapter is to be introduced into General Information of the JP and used for the identification of contaminants found in pharmaceutical products, processing areas, and so on. The evaluation research on the draft was carried out with the collaboration of 11 pharmaceutical companies in Japan. Five bacterial and 5 fungi species were used for the identification in blind style. The results showed that this method has the potential to be a highly reliable and practical identification method for bacteria and fungi.

Keywords: rapid identification method of microorganisms, Japanese Pharmacopoeia, microbiological tests

\*国立感染症研究所

梶村計志\*, 田頭洋子, 四方田千佳子, 岩上正蔵\*: **医薬品成分のメンブランフィルターへの吸着に関する研究**

医薬品研究, **33**, 413-422 (2002)

医薬品固形剤の溶出試験に使用されるメンブランフィルターに対する医薬品成分の吸着挙動を検討した。50種の医薬品成分について、7種の素材の異なるフィルターに対する吸着量を測定したところ、少なくとも1種類以上の膜に吸着する医薬品が、27種あることが明らかとなった。吸着しやすかった10成分につき、はじめに捨てる液量を変えたところ、液量を増やすに連れ吸着量は減るものの、捨てる量を20 mlまで増やしても、完全に吸着を防ぐことはできなかった。さらに、同一素材のフィルターであっても、メーカー間で吸着量が大きく異なることが明らかとなった。

Keywords: drug component, membrane filter, dissolution test

\*大阪府公衆衛生研究所

川崎洋子, 久保田浩樹, 四方田千佳子, 米谷民雄: **パン中の臭素酸塩の改良微量分析法**

食品衛生学雑誌, **43**, 221-224 (2002)

パン中の臭素酸塩の微量分析法を検討した。臭素酸塩は水で抽出し、遠心分離・ろ過後、ろ液を0.2 μm フィルター、脱塩素用銀カラム、陰イオン交換カートリッジ Oasis MAXの順に通過させた。MAXを20vol%酢酸及び水で洗浄し、0.5%硝酸ナトリウム溶液を臭素酸を溶出させ、o-ジアニシジンによる発色を利用したポストカラム HPLCで測定した。本法の定量限界は2 ng/gであり、2-10 ng/gにおける添加回収率は68-72%、変動係数は6.9%であった。

Keywords: bromate, anion exchange cartridge, post column reaction.

Akiyama, T., Yamanaka, M.\*, Date, Y.\*, Kubota, H., Nagaoka, M. H., Kawasaki, Y., Yamazaki, T., Yomota, C., Maitani, T. : **Specific Determination of Bromate in Bread by Ion Chromatography with ICP-MS**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, **43**, 221-224 (2002)

パン中に残存する臭素酸カリウムを、IC/ICP-MSを用いて高感度かつ特異的に分析する方法を検討した。臭素酸イオンを水で抽出し、ろ過、C18カラムによる脱脂、銀カラムによる陰イオン除去、限外ろ過によるタンパク質除去及び陽イオン交換カラムによる銀イオン除去を行った後、検液500 μLを分析した。本法の検出限界は臭素酸として検液中0.3 ng/mL、パン試料中2 ng/gであり、定量限界は検液中1.0 ng/mL、パン試料中5 ng/gであった。5 ng/gにおける添加回収率は約90%、変動係数は約2%であった。検液中の検出限界とパンからの回収率より、本法の検出限界を2 ng/gとした。

Key words: bromate, bread, ICP-MS

\*横河アナリティカルシステムズ(株)

川崎洋子, 杉本直樹, 佐藤恭子, 山崎 壮, 石綿 肇,

### 米谷民雄：輸入アップルシロップ製品中の耐酸性コチニールの同定

食品衛生学雑誌, 43, 191-195 (2002)

カナダから輸入申請されたアップルシロップ製品中の未知赤色素について検討した。その結果、わが国において食品への使用が認められていない耐酸性コチニールの主色素である4-アミノカルミン酸を初めて検出・同定した。また同時に、本色素の精製法について検討するとともに、HPLCの保持時間、紫外可視吸収スペクトル、TLC及び色素溶液の色調による確認法について検討した結果、4-アミノカルミン酸がコチニール色素の主色素成分であるカルミン酸と容易に区別可能であることがわかった。

Keywords: apple syrup, carminic acid, acid-stable carmine.

Sugimoto, N., Sato, K., Liu, H.-M. \*, Kikuchi, H., Yamazaki, T., Maitani, T.: **Analysis of rubusoside and related compounds in tenryocha extract sweetener**

*J. Food Hyg. Soc. Japan*, 43, 250-253 (2002)

The main and minor constituents of tenryocha extract product, a natural sweetener, were investigated as a part of an ongoing study to evaluate its quality and safety as a food additive. Four constituents, namely rubusoside, steviolmonoside, panicloside IV, and *ent*-16 $\alpha$ ,17-dihydroxy-kauran-19-oic acid were isolated. The concentration of rubusoside, the main sweet constituent, was quantified to 8.65% in the tenryocha extract product. In addition, it was confirmed that the origin of the extract was from the leaves of *Rubus suavissimus* S. LEE (Rosaceae) as determined by comparing TLC and HPLC profiles of the product and hot-water extract prepared from the leaves of *R. suavissimus*.

Keywords: natural sweetener, *Rubus suavissimus* S. LEE, rubusoside

\* Zhengzhou University

### 千野 誠\*, 佐藤恭子, 山崎 壮, 米谷民雄：天然添加物ホコッシ抽出物の含有成分と食品中の分析法

食品衛生学雑誌, 43, 352-355 (2002)

天然添加物のホコッシ抽出物について、その含有成分及び食品に使用された場合の分析法について検討した。ホコッシ抽出物の主成分をシリカゲルカラム及びODSカラムで分取し、TLC, LC-MS, NMR等によりbakuchiolと同定した。ホコッシ抽出物からはbavachinin Aも検出された。ホコッシ抽出物分析の指標となるbakuchiolについてSep-Pakカートリッジを用いたホコッシ種子からの調製についても検討した。食品中のbakuchiolは、60 vol%エタノールで希釈しSep-Pak C18カートリッジにより精製し、HPLCで分析した。粉末食品は、60 vol%エタノールを加えて超音波処理、遠心分離を行い、上清についてカートリッジ精製し、HPLC用試料液とした。市販食品にホコッシ抽出物を添加し、bakuchiolを指標として求めた回収率は72~99%、その検出限界は25  $\mu$ g/gであった。

Keywords: hokosshi extract, natural food additives, bakuchiol

\* 日本大学

### 佐藤恭子, 米谷民雄：クチナシ赤色素およびクチナシ青色素中のメタノールの分析

食品衛生学雑誌, 44, 73-76 (2003)

クチナシ赤色素 (GR) 及びクチナシ青色素 (GB) は、製造工程中のメタノールの生成が懸念される。規格設定の際にメタノールについての検討が必要になるため、標準添加法を用いたヘッドスペース-GC (HS-GC) による定量法を検討した。HS-GCのためには粉末試料を水に溶解するが、水溶液ではGBからメタノールが生成することが知られているため、HS-GCにおけるバイアル加熱条件の違いによるメタノール定量値の比較を行った。バイアルを加熱しない (A), 50℃で20分間保持 (B) あるいは80℃で20分間保持 (C) の3条件のうち、条件AとBではメタノール含量は変わらなかったが、条件Cで1.2倍となった。条件BでGR2検体及びGB3検体について分析を行ったところ、メタノール含量は、GRで8及び9  $\mu$ g/g, GBで25~34  $\mu$ g/gであった。

Keywords: headspace gas chromatography, standard addition method, gardenia blue

### 河村葉子, 六鹿元雄, 和久井千世子, 米谷民雄：非フタル酸エステル系可塑剤使用と表示されたポリ塩化ビニル製手袋中の未知化合物の同定

食品衛生学雑誌, 43, 215-220 (2002)

フタル酸ジ (2-エチルヘキシル) 含有ポリ塩化ビニル製手袋の食品用途への使用自粛が通知され、それに対応して非フタル酸エステル系可塑剤使用と表示したポリ塩化ビニル製手袋が製造されるようになった。これらの手袋からいくつかの未知化合物群を検出したので同定を行ったところ、可塑剤のジエチレングリコールジベンゾエート、トリエチレングリコールジベンゾエート、ジプロピレングリコールジベンゾエート及びアルキルスルホン酸フェニルエステルと確認された。既知のアジピン酸ジイソノニルを含む手袋中の可塑剤含有量は37.5~48.9%、*n*-ヘプタンへの溶出量は1,010~1,390 ppmと極めて高かった。今回同定された化合物はいずれも食品用ポリ塩化ビニル製品への使用実績がほとんどなく、業界自主基準にも収載されていなかった。

Keywords: diethyleneglycol dibenzoate, dipropylene glycol dibenzoate, alkylsulfonic acid phenyl ester

### 河村葉子, 六鹿元雄, 和久井千世子, 棚元憲一：ポリ塩化ビニル製品中のフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) 及びフタル酸ジイソノニル試験法

日本食品化学学会誌, 9, 101-106 (2002)

ポリ塩化ビニル (PVC) 製の脂肪性食品と接触する器具容器包装及び玩具中のフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) (DEHP) 及びフタル酸ジイソノニル (DINP) の試験法を開発した。材質試験ではアセトン-*n*-ヘキサン (3:7) 混液に37℃一晩浸漬して抽出し、アセトンで希釈してGC/MSまたはGC-FIDで定量した。PVC製品からのDEHP及びDINPの検出量は、抽出法と溶解法でほとんど同等であった。本法による添加回収率は94.9~

100.8%であった。DINP標準品にはCAS No.28553-12-0とNo.68515-48-0の2種類があり、玩具中には前者の方が汎用されている。また、溶出試験は*n*-ヘプタンを浸出液として25℃60分間溶出し、溶出液をそのままGC/MSまたはGC-FIDで分析した。もし、GC-FIDにより基準を超えて検出された場合には、GC/MSで確認しなければならない。

Keywords: polyvinyl chloride, di(2-ethylhexyl) phthalate, diisononyl phthalate

Mutsuga, M., Wakui, C., Kawamura, Y. and Maitani, T.: **Isolation and identification of some unknown substances in disposable nitrile-butadiene rubber gloves used for food handling**

*Food Additives and Contaminants*, **19**, 1097-1103 (2002).

We obtained six unknown compounds from one kind of nitrile-butadiene rubber (NBR) glove by *n*-hexane extraction, and isolated each by silica gel chromatography. We determined their structures as 1,4-dione-2,5-bis(1,1-dimethylpropyl)cyclohexadiene (1), 2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl)phenol(2), 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol(3), 2,4-bis(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol(4), 2-(1,1-dimethylethyl)-4,6-bis(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol(5) and 2,4,6-tris(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol(6). Compound 1 was observed in five out of the seven kinds of NBR gloves, and compounds 2, 3, 4 and 6, which are not listed in Chemical Abstract (CA), were present in four kinds of gloves.

Keywords: nitrile-butadiene rubber gloves, 1,4-dione-2,5-bis(1,1-dimethylpropyl)cyclohexadiene, 2,4,6-tris(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol

六鹿元雄, 河村葉子, 渡辺悠二\*, 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分析法**

食品衛生学雑誌, **44**, 26-31 (2003)

食品衛生法で定めるクレゾールリン酸エステル(TCP)の規格試験法は四塩化炭素を用いており、しかも操作が煩雑で長時間を要し、回収率や再現性がよくないことが指摘されている。そこでHPLCによるポリ塩化ビニル中のTCPの分析法について検討した。試料をアセトニトリルで抽出後、Sep-Pak C18に負荷してアセトニトリル-水(2:1)混液で溶出し、HPLCにより測定した。カラム及び移動相はInertsil Ph-3及び65%アセトニトリル/水を用い、すべてのTCP異性体を1本のピークとして定量した。TCPを規格値である1,000 µg/gとなるように添加した時の回収率は84.7%~98.6%と良好であり、定量限界は50 µg/gであった。さらにTCP含有量が明らかなPVCシートに適用したところ含有量の85%以上に相当する測定値が得られた。

Keywords: polyvinyl chloride, plasticizer, tricresyl phosphate

\* (財) 科学技術戦略推進機構

六鹿元雄, 河村葉子, 和久井千世子, 米谷民雄: **ニトリルブタジエンゴム製手袋からの溶出物の同定**

食品衛生学雑誌, **44**, 103-109 (2003)

ニトリルゴム製手袋からの溶出物について同定を行ってきたが、今回新たに可塑剤の2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate, 老化防止剤の4,4'-butylidene di(6-*tert*-butyl-*m*-cresol), 及び2-( $\alpha$ -methylbenzyl)phenol, 4-( $\alpha$ -methylbenzyl)phenol, 2,6-di( $\alpha$ -methylbenzyl)phenol, 2,4-di( $\alpha$ -methylbenzyl)phenol, 2,4,6-tri( $\alpha$ -methylbenzyl)phenolから成るスチレン化フェノール, 老化防止剤の分解物と推定される2,4-di-*tert*-butylphenolが確認された。2,4-di-*tert*-butylphenol, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate 及び4,4'-butylidenedi(6-*tert*-butyl-*m*-cresol)の*n*-ヘプタン25℃60分間への溶出量は1.68~4.22 µg/cm<sup>2</sup>, スチレン化フェノールの溶出量は46.08 µg/cm<sup>2</sup>, 含有量は6,900 µg/gであった。

Keywords: nitrile-butadiene rubber, disposable glove, styrenated phenol

杉田たき子, 河村葉子, 谷村雅子\*<sup>1</sup>, 松田りえ子, 新野竜大\*<sup>2</sup>, 石橋亨\*<sup>2</sup>, 平林尚之\*<sup>3</sup>, 松木容彦\*<sup>3</sup>, 山田隆, 米谷民雄: **乳幼児用軟質ポリ塩化ビニル製玩具からのフタル酸エステル暴露量の推定**

食品衛生学雑誌, **44**, 96-102 (2003)

我が国の乳幼児におけるポリ塩化ビニル製玩具由来のフタル酸エステルの暴露量を、mouthing時間と口腔内溶出試験によるフタル酸ジイソノニル溶出量を基に推定した。方法は点推定法、確率変数の積の誤差法則による方法およびMonte Carlo法によった。1日の総mouthing時間は105.3±72.1 min, おしゃぶりを除いた場合は73.9±32.9 minであった。口腔内溶出試験による唾液中への溶出量は、平均1時間当たり92.4±56.8 µg/10cm<sup>2</sup>であった。Monte Carlo法におけるフタル酸エステル暴露量の平均値及び95パーセントイル値は、総mouthing時間の場合は21.4 µg/kg/day及び65.8 µg/kg/day, おしゃぶりを除いた場合は14.8 µg/kg/day及び35.7 µg/kg/dayであった。

Keywords: toy, phthalate, exposure

\*<sup>1</sup> 国立成育医療センター研究所

\*<sup>2</sup> 東京顕微鏡院

\*<sup>3</sup> 食品薬品安全センター秦野研究所

Abe, K.\*<sup>1</sup>, Yamamoto, S., Shinagawa, K.\*<sup>2</sup>: **Economic impact of an Escherichia coli O157:H7 outbreak in Japan** *J. Food Prot.*, **65**, 66-72 (2002).

We estimated the economic impact of an outbreak of foodborne diseases occurring from elementary school lunches in 1996 in which 268 persons in Iwate prefecture, Japan were infected with Escherichia coli O157:H7. This study assessed the impact of direct economic losses and indirect economic consequences due to this outbreak. The economic impact of the outbreak was estimated to be about 82,686,000 yen. The laboratory costs, about 21,204,000 yen, showed the highest ratio of the total cost of this outbreak (about 26%). Also, the cost of foodstuffs that were not purchased during the suspension of the lunch service (about 19%), personnel expenses paid to

lunch service employees (about 17%), human illness costs (about 15%), and the repair costs of facilities (about 15%) showed up as a high ratio in the total cost, respectively. Because all patients were children, the productivity losses estimated were low as children were considered as dependants with no income. Instead, we estimated the lost income of the mothers of the children. The source of the contamination could not be identified. Therefore, no food industries suffered any setbacks where certain food items could not be used for daily consumption due to the outbreak.

**Keywords:** economic loss, *E. coli* O157:H7, outbreak

\*<sup>1</sup> 宮城県保健環境センター

\*<sup>2</sup> 岩手大学

Xin, K. Q. \*<sup>1</sup>, Hashino, Y. \*<sup>1</sup>, Toda, Y. \*<sup>1</sup>, Igimi, S., Kojima, Y. \*<sup>1</sup>, Jounai, N. \*<sup>1</sup>, Ohba, K. \*<sup>1</sup>, Kushiro, A. \*<sup>2</sup>, Kiwaki, M. \*<sup>2</sup>, Hamajima, K. \*<sup>1</sup>, Klinman, D. \*<sup>3</sup>, Okuda, K. \*<sup>1</sup> : **Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env**

*Blood*, Mar. 20 web (2003).

This study investigates whether genetically modified orally administered *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) could be used as an HIV vaccine. *L. lactis* is immunogenic and extremely safe when delivered orally. We created a recombinant *L. lactis* vector expressing the envelope protein of HIV on its cell surface. Oral immunization with this vector induced high levels of HIV-specific serum IgG and fecal IgA antibodies. Cell mediated immune responses were also generated in both the regional lymph nodes and the spleen. Dendritic cells are readily infected by *L. lactis* and appear to play a potential role in mediating the development of these immune responses. The protective efficacy of this vaccine strategy was demonstrated by challenging intraperitoneally with an HIV Env-expressing vaccinia virus. Their viral loads were 350-fold lower than those of control mice. These findings support the further development of *L. lactis*-based HIV vaccines.

**Keywords:** HIV, vaccine, *Lactococcus lactis*

\*<sup>1</sup> Yokohama City University School of Medicine

\*<sup>2</sup> Yakult Central Institute for Microbiological Research

\*<sup>3</sup> US Food and Drug Administration

Fukuyasu, T. \*<sup>1</sup>, Igimi, S., Uchida, K. \*<sup>2</sup>, Eguchi, M. \*<sup>3</sup>, Endo, T. \*<sup>4</sup>, Ooshima, K. \*<sup>5</sup>, Kuwano, A. \*<sup>6</sup>, Sawada, T. \*<sup>7</sup>, Tamura, Y. \*<sup>8</sup> : **Standards of the in vitro mutation frequency study and the antimicrobial activity study in gut**

*J. Antibiot.*, **56**, 191-196 (2003).

In view of the recent rapid increase in incidence of infection with antimicrobial resistant bacteria in human medicine, there is international controversy as to the medical risk that is created by transfer of antimicrobial resistant bacteria and antimicrobial resistant genes, which

may be produced through the processes of administration of antimicrobials to food-producing animals, via the food chain. Accordingly, International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products (VICH) provides the comprehensive guidelines for characterizing selection of antimicrobial resistance by bacteria which may adversely affect human health in order to establish the system of registry of antimicrobial drugs to be administered to food-producing animals. Currently, Japanese Society of Antimicrobials for Animals recognizes the lack of technical test standards in compliance with VICH guidelines in the world and has established the test standards for "in vitro mutation frequency studies" to evaluate the appearance frequency and resistant level of resistant bacteria and those for studies on the "antimicrobial activity in gut" to estimate the effects on intestinal flora from professional aspects.

**Keywords:** mutation study, antimicrobial activity, standard

\*<sup>1</sup> Azabu University

\*<sup>2</sup> Pfizer Pharmaceuticals Inc.

\*<sup>3</sup> National Institute of Animal Health

\*<sup>4</sup> Tanabe Seiyaku Co., Ltd.

\*<sup>5</sup> Japan Veterinary Pharmaceutical Association

\*<sup>6</sup> Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.

\*<sup>7</sup> Nippon Veterinary and Animal Science University

\*<sup>8</sup> National Veterinary Assay Laboratory

Yamasaki, M. \*<sup>1</sup>, Igimi, S., Katayama, Y. \*<sup>1</sup>, Yamamoto, S., Amano, F. \*<sup>2</sup> : **Effect of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni***

*Biosci. Microflora*, **22**, 21-25 (2003).

Survival responses to aerobic stress in the *Campylobacter jejuni* are highly influenced by preculturing conditions in either microaerobic or anaerobic environments before the stress is induced. In anaerobically precultured cells, culturability was maintained longer than that in microaerobically precultured cells under aerobic conditions, without significant concomitant damage to cellular components by aerobic stress, although the culturability finally fell below the level of detection. These results suggest a possibility that the survival of *C. jejuni* in natural aerobic environments is highly influenced by the environmental conditions, such as varied oxygen partial pressure, where the bacterium has resided.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, aerobic stress, coccoid forms

\*<sup>1</sup> Tokyo University of Agriculture and Technology

\*<sup>2</sup> Osaka University of Pharmaceutical Sciences

Takahashi, T. \*, Yoshida, Y. \*, Hatano, S. \*, Sugita-Konishi, Y., Igimi, S., Yajima, M. \*, Kojima, T. \*, Kanno, T. \*, Yonekubo, A. \*, Yajima, T. \*, Kuwata, T. \* : **Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens**

*Biol. Neonate*, **82**, 238-242 (2002).

The secretory IgA (sIgA) antibody response to 20 environmental antigens, including microorganisms, toxins, food, and inhaled allergens, was evaluated in the breast milk from 107 Japanese mothers 1-10 days after delivery. Specific sIgA antibody responses were detected in most milk samples against almost all of the antigens tested, although there was a wide variation in the specific sIgA antibody profiles of each individual's milk. With regard to twelve bacterial antigens, highly specific sIgA antibody responses were detected against *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Pseudomonas aeruginosa*. With regard to eight nonbacterial antigens, highly specific sIgA antibody responses were detected against rotavirus, cholera, and pertussis toxins. Similar sIgA antibody profiles were obtained when the 107 milk specimens were divided into colostrum (milk 1-5 days after delivery, n = 36) and transitional milk (milk 6-10 days after delivery, n = 71). This study provides information on the possible protective role of human milk sIgA antibodies and will serve as a baseline for future studies.

**Keywords:** Colostrum, Transitional milk, Microorganisms

\* Meiji Dairies Corp.

Okada, Y., Makino, S-I.\*<sup>1</sup>, Tobe, T.\*<sup>2</sup>, Okada, N.\*<sup>3</sup>, Yamazaki, S.\*<sup>4</sup> : **Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene**  
*Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1541-1547 (2002).

Transposon insertional mutants of *Listeria monocytogenes* were constructed to identify genes involved in osmotolerance, and one mutant that showed reduced growth under high osmotic pressure was obtained. The cloned gene from the transposon insertion site of the mutant, named *rel*, was 2,214bp in length and had very high homology to *relA* of *Bacillus subtilis*, which encodes guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp) [collectively designated (p)ppGpp] synthetase during stringent response. The mutant showed a deficiency in (p)ppGpp accumulation. In the parental strain, the amount of intracellular (p)ppGpp was not increased after an osmotic upshift but was slightly decreased compared with the level before the upward shift. The reduced osmotolerance of the mutant was restored to a level almost equal to that of the parent strain when the chromosomal region that included *rel* of *L. monocytogenes* was introduced into the mutant. After exposure to methyl glucoside, the *rel* mutant accumulated (p)ppGpp at a higher level than the basal level and partially restored the ability to grow in NaCl-supplemented brain heart infusion broth. The mutant was found to grow in chemically defined minimal medium supplemented with glycine betaine or carnitine, so-called compatible solutes, and 4% NaCl. Our results suggest that the appropriate intracellular concentration of (p)ppGpp is essential for full osmotolerance in *L. monocytogenes* and

that its mechanism is different from that for the accumulation of compatible solutes.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, *rel*, NaCl

\*<sup>1</sup> 帯広畜産大学

\*<sup>2</sup> 東京大学医科学研究所

\*<sup>3</sup> 北里大学

\*<sup>4</sup> 国立公衆衛生院

Suzuki, H., Jeong, K. I.\*<sup>1</sup>, Itoh, K.\*<sup>2</sup>, Doi, K.\*<sup>3</sup> : **Regional variations in the distributions of small intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free and specific pathogen-free mice**

*Exp. Mol. Pathol.*, **72**, 230-235 (2002).

Previously, we reported the regional variations in intraepithelial lymphocytes (IELs) in the small intestine of mice. To clarify the effects of intestinal bacteria on the distribution of IELs, regional variations in IELs were examined using germ-free (GF) and specific pathogen-free (SPF) BALB/cA mice. The small intestine was taken and divided equally into three parts (the proximal, middle and distal parts). IELs were isolated from each part of the intestine, and the total number of IELs in GF mice was about one seventh of that in SPF mice. The decreased number of IELs in GF mice suggests that intestinal bacteria may be essential for local expansion of IELs. On the other hand, the similar regional variations in IEL subsets were observed in both GF and SPF mice, except for some subsets. The similarity of regional variations in GF and SPF mice indicates that the regional variations in IEL subsets may not fundamentally depend on intestinal bacteria.

**Keywords:** intraepithelial lymphocytes (IEL), germ-free mice, regional variation

\* The University of Tokyo

Suzuki, H., Jeong, K. I.\*<sup>1</sup>, Doi, K.\*<sup>2</sup> : **Age-Related Changes in the Regional Variations in the Number and Subsets of Intraepithelial Lymphocytes in Mouse Small Intestine**  
*Dev. Comp. Immunol.*, **26**, 589-595 (2002).

Previously, we reported regional variations in the number and subsets of the small intestinal IELs of mice. In this study, we examined the age-related changes in the regional variations of IELs in mice from 2 to 11 weeks old. IELs were isolated from the proximal, middle and distal parts of the small intestine and analyzed by flow cytometry. The total number of IELs gradually increased with age and reached a plateau at 8 weeks old. As to IEL subsets, the percentage of abT cells was higher in the distal part at and after 2 weeks of age (before weaning). The percentage of the abT cell subset of extrathymic origin was higher in the proximal part while the percentages of abT cell subsets of thymic origin were higher in the distal part at and after 3 weeks (just after weaning). It appears that regional variations in IELs may be formed before the weaning period in mice.

Keywords: intraepithelial lymphocytes (IEL), Age-related change, regional variation

\*The University of Tokyo

Ojima, M.\*<sup>1</sup>, Toshima, Y.\*<sup>1</sup>, Koya, E.\*<sup>1</sup>, Ara, K.\*<sup>1</sup>, Tokuda, H.\*<sup>1</sup>, Kawai, S.\*<sup>1</sup>, Kasuga, F., Ueda, N.\*<sup>2</sup>:  
Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households

*J. Appl. Microbiol.*, **93**, 800-9 (2002).

AIMS: Effective household hygiene measures require that sources of bacterial contamination and the places to which contamination spreads be carefully identified. Therefore, a study was performed to examine the distribution of microorganisms throughout ordinary households in Japan, which has its own unique customs of daily life and food preparation. METHODS AND RESULTS: Using the stamping method, samples were taken from 100 different places and items in each of 86 households. This study found kitchens/dining rooms to have the greatest level of microbial contamination and bathrooms, the next highest level. Toilets (water closets) were found to have an unexpectedly low level of bacterial contamination. The largest bacterial counts were found on items such as drain traps, dish-washing sponges, counter towels, sinks, dish-washing tubs, and bathroom sponges. CONCLUSIONS: It is necessary to carefully identify both the items that can become instruments for spreading bacterial contamination and the places that easily become subject to secondary contamination, and then to take timely and effective disinfection/sanitizing measures. SIGNIFICANCE AND IMPACT OF THE STUDY: The data gathered in this study will be very valuable for anticipating the pathways over which bacteria are transported and prioritizing disinfection targets, to make effective disinfection possible.

Keywords: household hygiene, microorganisms, disinfection

\*<sup>1</sup>花王株式会社

\*<sup>2</sup>宇都宮大学

笹川伸之\*<sup>1</sup>, 梅津淳一\*<sup>2</sup>, 武士甲一\*<sup>3</sup>, 長野秀樹\*<sup>3</sup>, 久保亮一\*<sup>4</sup>, 牧野壮一\*<sup>5</sup>, 五十君静信, 清水條資\*<sup>6</sup>, 小熊恵二\*<sup>7</sup>, 田村正秀\*<sup>3</sup>: 食品細菌の自動検査装置「バクテクター」の開発

*食品工業*, **45**, 17-54 (2002)

食中毒の原因食品の決定については困難を伴うことが多く、原因究明のための調査が迅速な連携の元に動かないと食中毒の拡大が懸念される。食品細菌自動検査装置「バクテクター」は、試料をシャーレに塗抹したのち、培養から判定までを全自動化した装置である。対応検査項目は①一般生菌数、②大腸菌群、③大腸菌、④黄色ブドウ球菌、⑤腸炎ピブリオ、⑥セレウス菌、⑦腸管出血性大腸菌O157 (MUG(-))、⑧サルモネラ属菌(亜種1)、⑨リステリア・モノシトゲネス、の9項目でいずれも定量的解析が可能である(ただし、⑦、⑧、⑨の3項目は食品衛生検査指針に基づき、増菌培養後の定性検査とな

る)。1台の装置で9つの検査項目に対応した初の装置である。装置内にシャーレをセットし、マスターPCより培養開始を指示すると、培養開始後6時間後から24時間まで1時間毎に撮影と解析が自動的に行われて行く。この間に観測されたコロニーの状態により、菌数が確定される。検体や検査項目にもよるが、概ね18時間程度で菌数が求められることが可能である。

Keywords: bacterial test, automatic counter, CFU

\*<sup>1</sup>(株)プラムネット

\*<sup>2</sup>エア・ウォーター(株)応用技術研究所

\*<sup>3</sup>北海道立衛生研究所

\*<sup>4</sup>関東化学(株)

\*<sup>5</sup>帯広畜産大学畜産学部獣医学科

\*<sup>6</sup>北海道立食品加工研究センター

\*<sup>7</sup>岡山大学大学院医歯学総合研究科

五十君静信: 乳酸菌を抗原運搬体とするサルモネラ菌に対する粘膜ワクチンの開発-2

*ヤクルト・バイオサイエンス研究財団年報*, **10**, 41-45 (2002)

*Salmonella enteritidis* #40株のヒト腸管上皮由来Caco-2細胞への感染実験において、サルモネラ菌の腸管上皮細胞への接着・侵入に関与する分子を検討した。分子量52 kDのタンパクは、#40株のCaco-2細胞への接着侵入に関わり、それに対する抗体により菌の接着侵入が阻止されることを示した。このタンパクはN末のアミノ酸解析によりFliCと特定した。FliCを発現する乳酸菌組換え体は、ワクチンとしての効果が期待されることから、この遺伝子fliCを乳酸菌発現ベクターpLPM11プラスミドに単独あるいは膜アンカー遺伝子と共に組み込み、乳酸菌*Lactobacillus casei*への発現を試みた。得られた形質転換体を解析したところ、菌体表層に結合し発現していることが確認された。FliC発現株は、細胞への接着・侵入性には変化が認められなかったが、Caco-2細胞からIL-8産生を誘導することが示された。

Keywords: Salmonella, flagella antigen, IL-8

稲田知佳\*<sup>1</sup>, 芳住邦雄\*<sup>1</sup>, 高鳥浩介, Alan Hedge\*<sup>2</sup>: 生活環境における太陽光曝露時の真菌不活化

*防菌防黴*, **30**(10), 653-658 (2002)

太陽光下の*Penicillium*, *Cladosporium*の不活化特性を照射エネルギーに着目してA領域、B領域で検討した。またA領域紫外線を放射する蛍光灯を用いて照射実験を行った。太陽光放射特性は、8月A領域紫外線では50 W/m<sup>2</sup>程度であり、B領域紫外線では最大1.3 W/m<sup>2</sup>程度であった。太陽光暴露した場合の*Penicillium*不活化はB領域紫外線量が1.5 kJ/m<sup>2</sup>ですべて死滅した。太陽光照射効果の大部分はB領域紫外線に由来するといえた。太陽光照射およびB領域紫外線蛍光灯による*Cladosporium*の不活化に必要なとするエネルギー量は*Penicillium*と一致した。

Keywords: Solar irradiation, UVA and UV, fungal inactivation

\*<sup>1</sup> 共立女子大学

\*<sup>2</sup> コーネル大学, USA

木村千暁<sup>\*1</sup>, 田中辰明<sup>\*1</sup>, 高鳥浩介, 李憲俊<sup>\*2</sup>, 小林文香<sup>\*1</sup>: **居住環境にみる真菌の発育条件および抵抗性に関する研究**

空気調和・衛生工学会論文集, **86**, 67-76 (2002)

居住環境における真菌は, アレルギー性疾患や住宅の劣化など生活環境に影響を及ぼしている。居住環境にみる真菌の生物学的特性に関する報告例が少なく, こうした真菌の生態を把握するために居住環境に主要な22真菌について発育条件, 紫外線抵抗性および薬剤抵抗性を検討した。その結果, 居住環境にみる真菌はその生物学的特性を生かしながらそれぞれの環境に適応し生息していることが解明され, 今後の真菌制御研究に貴重な基礎資料を提供した。

Keywords: Dwelling environment, fungal growth, biological characteristics

<sup>\*1</sup> お茶の水女子大学

<sup>\*2</sup> 衛生微生物研究センター

小菅旬子<sup>\*1</sup>, 後藤義孝<sup>\*1</sup>, 新城敏晴<sup>\*1</sup>, 李憲俊<sup>\*2</sup>, 高鳥浩介: **Trichophyton verrucosumの発育および生存に及ぼす尿素, アンモニアおよび硝酸塩の影響**

医真菌学会誌, **43**, 99-102 (2002)

牛皮膚病巣部および飼育環境より分離した *Trichophyton verrucosum* はウレアーゼ試験陽性であったが, 尿素および硝酸塩を利用して発育することはなかった。さらに, 多量の尿素, アンモニアおよび硝酸塩を添加した培地では, すべての *T. verrucosum* は死滅した。これらに窒素化合物を多量に含む牛飼育環境の土壌は *T. verrucosum* の発育および生存に適しておらず, 土壌が本菌のレゼルポアとなる可能性は低いと推察された。

Keywords: *Trichophyton verrucosum*, urease test, nitrogen compounds

<sup>\*1</sup> 宮崎大学

<sup>\*2</sup> 衛生微生物研究センター

Han, Dong-Wook\*, Hwal Suh\*, Dong Hee Lee\*, Bong Joo Park\*, Kosuke Takatori and Jong-Chul Park\*:

**Detection of oleic acid biodegradation by fungi**  
*J. Microbiol. Biotechnol.*, **12** (3), 514-517 (2002)

To investigate oleic acid biodegradation, 47 fungal strains were tested with modified Cz broth media containing oleic acid, and their biodegradative activities were assayed by measuring the release of [<sup>14</sup>C]CO<sub>2</sub> from the <sup>14</sup>C-labeled oleic acid. After 72 hours of cultivation, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* and *Alternaria* sp. Metabolized approximately 25% to 35% of the supplied oleic acid. The relationship between the fungal degradation of oleic acid and the fungal growth was also examined using 7 strains of *Aspergillus niger*.

Keywords: Oleic acid, biodegradation, fungi

\*Yonsei University, Korea

Shoji Narutaki<sup>\*1</sup>, Kosuke Takatori, Hidekatsu Nishimura<sup>\*1</sup>, Hiroshi Terashima<sup>\*1</sup> and Tsuguo Sasaki<sup>\*2</sup>: **Identification of fungi based on the nucleotide sequence homology of**

**their internal spacer1 (ITS1)region.**

*PDA J. Pharmaceutical Sci. & Technol.*, **56** (2), 90-98 (2002)

In this study, we examined the identification of fungal based on the sequence homology of the internal transcribed spacer (ITS1) region. A newly designed primer pair could amplify the target region of all 42 strains tested. The PCR products were sequenced and the sequence homologies were searched by BLAST. It was demonstrated that this method is a reliable identification method at the genus or species level. At present, available databases are still insufficient to identify some fungi, but with the accumulation of further data in the ITS1 database, this method will be available for the identification of fungi.

Keywords: Fungal identification, sequence homology, ITS1 region

<sup>\*1</sup> 小野薬品(株)

<sup>\*2</sup> 国立感染症研究所

Tatsuaki Tanaka\*, Kosuke Takatori and Keiko Miura\*: **Hauptfungi in der Luft der japanischen Wohnumgebung**  
*Gesundheits Ingenieur*, **123**, 141-1441 (2002)

The fungal detection of portable PCI sampler (3L/min) with 3 kinds of particle sizes, PM<sub>10</sub>, PM<sub>10-2.5</sub> and PM<sub>2.5</sub> was investigated in indoor environments. Fungi were highly isolated from. PM<sub>10</sub>, and PM<sub>10-2.5</sub> On the contrary, fungi at PM<sub>2.5</sub> levels were scarcely isolated.

The fungal movement in indoor environment was shown by the predominant isolates of *Cladosporium* spp., and *Penicillium* spp. from PM<sub>10</sub>, and PM<sub>10-2.5</sub> level. By the direct method using microscope, the fungal cell form and sizes were compared with the PM of PCI sampler. The cell form was likely as spore that mostly taken in PM<sub>10</sub>, and PM<sub>10-2.5</sub> filters. The cell sizes were also related with the PM filter pore size. As the results of fungal detection in each PM were theoretical, it was concluded that PCI sampler was available to apply for the fungi.

Keywords: *Penicillium*, PCI sampler, indoor air

\* Ochanomizu University

Tatsuaki Tanaka\*, Kosuke Takatori and Aihara Maki\*: **Untersuchung uber die Schimmelpilzbelastung in Wohnbauten Japans**  
*Bauphysik*, **24** (5), 296-300 (2002)

Temperature and relative humidity (RH) of indoor environment in Japanese house were investigated for 2 years during 1996-1997. This dwelling environment was also studied on the mycological and ecological research. Indoor temperature was highest in summer season as 30C, on the contrary around 10C in winter season. RH differed from each room and season as 80% in May to July and 20-40% in October, 1996 to February, 1997. And also RH of each vertical point of wall was investigated on the fungal CFU. The examined vertical points were upper,

middle and low portion of room wall by the wipe method. The wall of low portion was extremely contaminated with *Cladosporium*, *Penicillium*, but the upper portion was not strongly contaminated. The difference of fungal contamination between low and upper portion of wall was plainly estimated the RH condition.

Keywords: Temperature and RH, Indoor environment, fungal load

\*お茶の水女子大学

Aihara Maki, Tatsuaki Tanaka\*<sup>1</sup>, Toshiko Ohta\*<sup>2</sup> and Takatori Kosuke : **Effect of temperature and water activity on the growth of *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides***

*Biocontrol Sci.*, **7**, 193-196 (2002)

The effects of temperature and water activity(Aw) were studied on the growth activity of *Cladosporium sphaerospermum* and *C. cladosporioides*. High growth was noted in *C. sphaerospermum* at high temperatures and in *C. cladosporioides* at low temperatures, but the growth activity of both *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides* was similar at 23-30°C. With regard to Aw, growth of *C. cladosporioides* was greater than that of *C. sphaerospermum* at 10-23°C. At 32–36°C, higher activities were shown in *C. sphaerospermum*. *C. sphaerospermum* and *C. cladosporioides* showed morphological changes such as dark brown hyphae with thick and cigar shaped cells, and irregularly swollen cells at low Aw. *C. sphaerospermum* showed a broader range of growth temperature and Aw than *C. cladosporioides*.

Keywords: *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, temperature and RH

\*<sup>1</sup> お茶の水女子大学

\*<sup>2</sup> 相模女子大学

Toshiya Mori\*, Kazuo Shin-ya\*, Maki Aihara, Kosuke Takatori and Yoichi Hayakawa\* : **Byssochlamysol, a new antitumor steroid against IGF-1-dependent cells from *Byssochlamys nivea* I Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity**

*J. Antibiotics*, **56** (1), 1-5 (2003)

A new antitumor steroid, byssochlamysol, was isolated from the mycelium of *Byssochlamys nivea* M# 5187. Byssochlamysol inhibited IGF-1-dependent growth of MCF-7 human breast cancer cells with IC<sub>50</sub> of 20 ng/ml, whereas serum-dependent cell growth was not inhibited by less than 10 µg/ml of byssochlamysol. This substance induced apoptosis in IGF-1-dependent Colo320DM human colon cancer cells.

Keywords: Byssochlamysol, antitumor steroid, taxonomy

\*東京大学 分子細胞生物学研究所

Toshiya Mori\*, Kazuo Shin-ya\*, Kosuke Takatori, Maki Aihara and Yoichi Hayakawa\* : **Byssochlamysol, a new antitumor steroid against IGF-1-dependent cells from**

***Byssochlamys nivea* II Physico-chemical properties and structure elucidation**

*J. Antibiotics*, **56** (1), 6-8 (2003)

The structure of byssochlamysol, a new antitumor metabolite against IGF-1-dependent cancer cells from *Byssochlamys nivea* M#5187, was determined to be a highly oxidized ergostane steroid as structure of byssochlamysol by NMR studies.

Keywords: Byssochlamysol, antitumor steroid, physicochemical properties

\*東京大学 分子細胞生物学研究所

Muroi, M, Ohnishi, T., Tanamoto, K. : **MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A.**

*Infect. Immun.*, **70**, 3546-3550 (2002)

*Salmonella* lipid A is inactive in human macrophages despite being potently active in murine macrophages. We investigated the molecular basis for this species-specific action of *Salmonella* lipid A. When murine CD14 (mCD14), TLR4 (mTLR4) and MD-2 (mMD-2) were all expressed in human monocytic THP-1 cells, these cells were capable of responding to *Salmonella* lipid A. Expressing each of these proteins separately did not impart such responsiveness. Expression of mTLR4 plus mMD-2, but not mCD14 plus mTLR4 or mCD14 plus mMD-2, conferred this responsiveness. In THP-1 cells expressing mCD14, mTLR4 and mMD-2, replacing mCD14 with human CD14 had no effect on responsiveness to *Salmonella* lipid A or synthetic *Salmonella*-type lipid A (compound 516). When mTLR4 was replaced with human TLR4, the responses to these lipid A preparations were decreased to half, and the replacement of mMD-2 decreased responsiveness to one third although the response to *E. coli* lipid A or synthetic *E. coli*-type lipid A (compound 506) was not affected. These results indicate that both TLR4 and MD-2 participate in the species-specific action of *Salmonella* lipid A.

Keywords: MD-2, Toll-like receptor 4, lipid A

Muroi, M., and Tanamoto, K. : **Polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF-κB through human Toll-like receptor 4.**

*Infect. Immun.*, **70**, 6043-6047 (2002).

We investigated the critical role of polysaccharide in *Salmonella* lipopolysaccharide (LPS)-induced activation of NF-κB. In a human monocytic cell line THP-1, *Salmonella* lipid A and synthetic *Salmonella*-type lipid A (516) did not induce NF-κB-dependent reporter activity up to 1 µg/ml, whereas strong activation was observed in response to *Salmonella* LPS. The activity difference between these lipid A and LPS was further examined in 293 cells expressing human CD14/Toll-like receptor (TLR) 4/MD-2, and similar results were obtained in these cells as well.

A polysaccharide preparation obtained from *Salmonella* LPS was inactive in 293 cells expressing human CD14/TLR4/MD-2 even in combination with 516. *Salmonella* Re LPS, whose structure consists of lipid A and two molecules of 2-keto-3-deoxyoctonic acid, but not its lipid A exhibited strong activity in THP-1 cells and 293 cells expressing human CD14/TLR4/MD-2. These results indicate that the polysaccharide portion covalently bound to lipid A plays the principal role in *Salmonella* LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B through human CD14/TLR4/MD-2.

Keywords: lipopolysaccharide, Toll-like receptor 4, lipid A

Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K. : **Regions of the mouse CD14 molecule required for Toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- $\kappa$ B.**

*J. Biol. Chem.*, **277**, 42372-42379 (2002).

Expression of wild-type CD14 enhanced LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent reporter activity in 293 cells expressing TLR4/MD-2, and deletion of amino acid regions 35-44, 144-153, 235-243, and 270-275 impaired the TLR4-mediated activation. Unlike human CD14, mouse CD14 truncated at amino acid 151 lost the activity. Deletion of amino acids 35-44 or 235-243 also abrogated TLR2-mediated activation of NF- $\kappa$ B, whereas mutants lacking 144-153 and 270-275 retained the activity. Deletion and alanine-substitution experiments revealed that amino acids 151-153 and 273-275 were required for the TLR4-mediated activation. Both alanine-substitution mutants in these regions and deletion mutants lacking amino acids 35-44 and 235-243 were expressed on the cell surface and retained the ability to associate with TLR4. A cross-linking study with photoreactive LPS showed that the labeling intensities to CD14 mutants/TLR4/MD-2 were paralleled by the ability of CD14 mutants to increase TLR4-mediated activation. These results indicate that different regions of mouse CD14 are required for TLR4- and TLR2-mediated activation of NF- $\kappa$ B, and suggest that amino acids 35-44, 151-153, 235-243 and 273-275 of mouse CD14 play an important role in LPS binding and its transfer to TLR4/MD-2.

Keywords: lipopolysaccharide, Toll-like receptor 4, CD14

宮原美知子, 後藤公吉\*<sup>1</sup>, 正木宏幸\*<sup>2</sup>, 齊藤章暢\*<sup>2</sup>, 金子誠二\*<sup>3</sup>, 増田高志\*<sup>4</sup>, 小沼博隆: **野菜・果物における病原微生物検出検査法の検討—腸管出血性大腸菌, サルモネラとリステリアの検出—**

日食微誌, **19**, 47-55 (2002)

Detection methods for three pathogenic bacteria (Enterohemorrhagic *E. coli* O157 (O157), *Salmonella* and *Listeria* from fresh vegetables and fruits were studied by enrichment culture procedure, PCR detection and selective detection. First step was enrichment by BPW (buffered peptone water) for 20-24 hrs at 36 °C. After 6 hrs during the enrichment, 1 ml of enrichment solution was

transferred to NmEC (EC broth with Novobiocin and bile acid) for separation of O157. After the enrichment for 20-24 hrs, 1 ml of enrichment solution was treated as PCR sample. Fewer than 10 cells of O157 or *Salmonella* per 25 g food samples could be detected by our methods. *Listeria* (1,000 cells/25 g) were also detectable by the methods. Criteria by the multiple PCR (O157, *Salmonella* and *Listeria*) were key factor for further testing (Limitations of No. detected were 2.3x10<sup>4</sup>, 2.7x10<sup>5</sup> and 2.2x10<sup>5</sup> cfu/ml, respectively). Selective cultures were used, when PCR showed positive for pathogenic bacteria.

These methods are economical and effective for detection of these pathogenic bacteria from fresh vegetables and fruits.

Keywords: *E. coli* O157, *Salmonella*, *Listeria*

\*<sup>1</sup> 新潟県食肉衛生検査センター

\*<sup>2</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>3</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>4</sup> 静岡県環境衛生科学研究所

Michiko Miyahara, Susumu Kumagai\*, and Hiroataka Konuma : **Shell Eggs and Salmonella Enteritidis in Various Seasons in Japan**

*Biocontrol Sci.*, **7**, 197-201 (2002)

We investigated the resistance of shell eggs stored under various conditions of temperature and storage periods in summer, autumn and winter in Japan to the growth of *Salmonella* Enteritidis (SE). SE (5-20 cells/egg) was inoculated at a point in the egg white near the egg yolk. In autumn and winter, stored shell eggs were more resistant to the growth of inoculated SE. Shell eggs inoculated with SE on d 0 of storage in these three seasons showed slight growth of SE at a high frequency. These results showed the necessity of controlling shell egg temperature and storage period in all seasons.

Keywords: Shell egg, *Salmonella* Enteritidis, Storage condition

\* 国立感染症研究所

Michiko Miyahara and Miyahara Makoto : **Effects of Gamma and E-beam Irradiation on Survival of Anaerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria**

*Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **120**, 75-80 (2002)

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 D<sub>10</sub>

value of *B. cereus* at 4 °C, was slightly more effective in that of *E. coli* O157, and was 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 D<sub>10</sub> 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 and facultatively anaerobic bacteria

Hara-Kudo Y., Ikedo, M.\*<sup>1</sup>, Komatsu, O.\*<sup>1</sup>, Yamamoto, S. and Kumagai, S.\*<sup>2</sup>: **Evaluation of a chromogenic agar medium for isolation of *Escherichia coli* O26.**

*Food Control*, **13**, 377-379 (2002)

CT-O26 medium, a chromogenic agar medium which has been recently developed for selective isolation of *Escherichia coli* O26, was evaluated isolating *E. coli* O26 from 25 g of food samples artificially contaminated with ca. 2 colony forming units of the organism. After food samples were cultured in modified *E. coli* broth with novobiocin at 42 °C for 18 h, the culture was streakily plated onto CT-O26 medium and rhamnose MacConkey agar medium with cefixime and tellurite (CT-RMAC) which has been reported as an effective medium for isolation of *E. coli* O26. CT-O26 medium was more effective than CT-RMAC for isolating *E. coli* O26 from ground beef, liver and alfalfa sprouts samples. *E. coli* O26 was isolated from all ground beef and liver samples in combination with plating onto O26 medium and immunomagnetic separation method.

Key words: *Escherichia coli* O26, medium, isolation

\*<sup>1</sup> Eiken Chemical Co. Ltd

\*<sup>2</sup> The university of Tokyo

Hara-Kudo Y., Nishina, T.\*<sup>1</sup>, Nakagawa H.\*<sup>2</sup>, Konuma H. and Kumagai S.\*<sup>3</sup>: **An Improved Detection Method of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods using Modified Enrichment and a New Chromogenic Agar Medium**

Proceedings of 27th World Veterinary Congress (2003)

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 tryptic 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 the chromogenic agar which was

developed specifically to differentiate *V. parahaemolyticus* from other bacteria, by using a chromogenic substrate. 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 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.

\*<sup>1</sup> Tokai University Junior College, Shizuoka

\*<sup>2</sup> Tokyo Kenbikyoin Foundation

\*<sup>3</sup> The University of Tokyo

田中啓子\*<sup>1</sup>, 竹谷光司\*<sup>1</sup>, 工藤由起子: **解凍ケーキ中の細菌増殖抑制と迅速品質評価法の検討**

食品衛生学会誌, **43**, 323-329 (2002)

冷凍して流通・販売され解凍後に冷蔵保存して喫食されるケーキの衛生管理を目的とし、ケーキ中の細菌増殖抑制と迅速品質評価法を検討した。モデル食品を冷凍保存した後に10 °C、72時間冷蔵保存した際の細菌数の変化について、冷凍温度およびエタノールまたは乳化剤の添加の有無の影響を検証した。その結果、一部の冷凍温度において添加物使用による細菌増殖抑制が認められた。また、10 °C、72時間後の一般生菌数を予測する迅速測定法を検討した。その結果、20 °C、24時間または Trypticase soy broth 中 35 °C、6時間培養の2方法いずれとも10 °C、72時間後の一般生菌数と高い相関があり(相関係数0.87, 0.83)、この方法により冷蔵保存後の微生物学的品質の迅速推定が可能であった。さらに、ATP-バイオルミネッセンス法を利用した一層の検査時間の短縮が可能であった。

\*<sup>1</sup> (株)日清製粉グループ本社 基礎研究所

Sakai, A., Kikuchi, Y., Muroi, M., Masui, T., Furihata, C.\*<sup>1</sup>, Uchida, E., Takatori, K., Tanamoto, K.: **Overexpression of NP95 mRNA by tumor promoters in the promotion phase of a two-stage BALB/3T3 cell transformation assay**

*Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 347-351 (2003)

We studied altered gene expressions in BALB/3T3 cells treated by different tumor promoters in the promotion phase of a transformation assay, an in vitro model of a two-stage carcinogenicity test, using mRNA differential display analysis. Expression of the NP95 gene, the gene of a murine nuclear protein associated with cell proliferation, was increased in the cultures treated by TPA, okadaic acid, and orthovanadate. The upregulation of NP95 mRNA was confirmed by RT-PCR, and Northern blot. TPA, okadaic acid, and orthovanadate enhanced cell proliferation as measured by a BrdU incorporation assay. The expression level of NP95 mRNA was not affected by the treatment with typical carcinogens at concentrations at which they act as initiators of cell transformation.

These facts may imply that the enhancement of cell transformation by these tumor promoters is due, at least in part, to the acceleration of cell proliferation. NP95 mRNA was also increased in the transformed BALB/3T3 cells. Overexpression of NP95 may also participate in the maintenance of the transformed phenotype.

**Key words:** cell transformation; tumor promoters; NP95

\*青山学院大学

Kikuchi, Y., Kakeya, T., Yamazaki, T., Takekida, K.<sup>\*1</sup>, Nakamura, N.<sup>\*2</sup>, Matsuda, H.<sup>\*2</sup>, Takatori, K., Tanimura, A.<sup>\*1</sup>, Tanamoto, K., Sawada, J. : **G<sub>1</sub>-Dependent Prion Protein Expression in Human Glioblastoma Cell Line T98G**

*Biol. Pharm. Bull.* **25**, 728-733 (2002)

Human glioblastoma cell line T98G produced a cellular form of prion protein (PrP<sup>C</sup>), and we confirmed expression of PrP mRNA by RT-PCR. Immunoblot analysis of whole cell lysate revealed one major (35 kDa) and two faint bands (31 and 25 kDa) that reacted with monoclonal anti-human PrP antibody 3F4. Cells treated with tunicamycin produced only a 25 kDa band, representing a deglycosylated form of PrP. Similarly, peptide: N-glycosidase F treatment of whole cell lysate altered the Asn-linked form to the deglycosylated form. When T98G cells were cultured for a longer period, the amount of PrP<sup>C</sup> per cell increased on Day 4 to 16 in a time-dependent manner. When the cells were cultured at high cell-density, the cells on Day 4 produced the same amount of PrP<sup>C</sup> as those on Day 16 of the usual culture. Moreover, in a serum-free medium, cells cultured at a low cell-density produced the same amount of PrP<sup>C</sup> as those cultured at the high cell-density. These results demonstrate that PrP<sup>C</sup> production in T98G cells was dependent on the phase of the cell cycle, probably the G<sub>1</sub> phase.

**Keywords:** cellular prion protein, T98G cell, cell density, cell cycle

\*<sup>1</sup> Showa Women's University, Japan

\*<sup>2</sup> Hiroshima University, Japan

Takekida, K.<sup>\*1</sup>, Kikuchi, Y., Yamazaki, T., Horiuchi, M.<sup>\*2</sup>, Kakeya, T., Shinagawa, M.<sup>\*2</sup>, Takatori, K., Tanimura, A.<sup>\*1</sup>, Tanamoto, K., Sawada, J. : **Quantitative Analysis of Prion Protein by Immunoblotting**

*J. Health Sci.* **48**, 288-291 (2002)

Transmissible spongiform encephalopathy (TSE) is a neurodegenerative disease characterized by spongiform degeneration and accumulation of an infectious isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of the prion protein in the central nervous system. PrP<sup>Sc</sup> originates from a ubiquitous cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>). We attempted to develop an easy method of quantitative analysis of PrP by immunoblotting based on densitometry data for PrP bands in immunoblots. Both PrP<sup>C</sup> and PrP<sup>Sc</sup> yield three bands in immunoblots, and

they correspond to PrP molecules carrying two, one, and no Asn-linked sugar chains. We used bovine PrP<sup>C</sup> as a model protein in the immunoblotting study. We removed the Asn-linked sugar chains from the PrP molecules with N-glycanase to convert all three glycoforms of PrP into a single band of the deglycosylated form and determined the PrP by densitometry calibrated with recombinant bovine PrP.

**Keywords:** prion protein, immunoblotting, quantification, bovine, PrP

\*<sup>1</sup> Showa Women's University, Japan

\*<sup>2</sup> Obihiro University of Agriculture and Veterinary medicine, Japan

武木田薫<sup>\*1</sup>, 菊池裕, 山崎壯, 掛谷知志, 高鳥浩介, 棚元憲一, 澤田純一, 谷村顕雄<sup>\*1</sup> : **Study on the detection of prion protein in food products by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay**

*日本食品衛生学雑誌* **43**, 173-177 (2002)

We developed a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect prion protein contained in materials derived from cattle, aiming at establishing a method to detect abnormal prion protein (PrP<sup>Sc</sup>) in food products. Rabbit polyclonal antibodies were raised against bovine prion peptides. Using these antibodies, we have established a competitive ELISA that is capable of detecting recombinant bovine prion protein (rBoPrP) in the range of 12 to 1,200 ng and we used it to determine prion protein contents in bovine cerebral cortex. This assay system was evaluated by spiking food products with various amounts of rBoPrP. The determination gave 2-fold higher values in minced meat homogenates and lower values in large intestine homogenates than the values expected from the spiked amounts. This assay provides a simple determination method of spiked rBoPrP, and therefore is expected to be useful for investigating sample pretreatment methods.

**Keywords:** anti-prion antibody, recombinant prion protein, competitive ELISA, bovine cerebral cortex homogenate

\*<sup>1</sup> Showa Women's University, Japan

Sugita-Konishi, Y., Sakanaka, S.<sup>\*1</sup>, Sasaki, K.<sup>\*1</sup>, Juneja, L. R.<sup>\*1</sup>, Noda, T.<sup>\*2</sup> and Amano, F.<sup>\*2</sup> : **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-alpha 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: sialyoligosaccharides, sialyoligosaccharide-conjugated peptide, bacterial adhesion

\*<sup>1</sup> 太陽化学(株)

\*<sup>2</sup> 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 IkappaBalpha at the 45th methionine is one cause of taurine chloramines-induced inhibition of NFkappaB.**

*J. Biol. Chem.*, **27**, 24049-24056 (2002).

A band shift of IkappaBalpha was observed in Western blots with Jurkat cells treated with 1 mM taurine chloramines (Tau Cl) for 1 hour. TauCl treatment inhibited TNF-alpha -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 IkappaBalpha is the 45th methionine (Met45). HPLC and mass spectrometry analyses of a small peptide containing Met45 revealed that TauCl oxidizes Met45. A mutant of IkappaBalpha whose Met45 was converted to alanine did not generate a band shift upon Tau Cl treatment and degraded in response to TNF-alpha stimulation. However, a reporter assay revealed that NFkappaB dependent iciferase expression was not fully recovered in cells transfer with this mutant. These results indicate that Met45 oxidation of IkappaBalpha 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 mM 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: taurin, NFkappaB, neutrophils

\*東京大学大学院 農学生命科学

Takahashia, T.\*<sup>1</sup>, Yoshida, Y.\*<sup>1</sup>, Hatano, S.\*<sup>1</sup>, Sugita-Konishi, Y., Igimi, S.\*<sup>2</sup>, Yajima, M.\*<sup>1</sup>, Kojima, T.\*<sup>1</sup>, Kanno, T.\*<sup>1</sup>, Yonekubo, A.\*<sup>1</sup>, Yajima, T.\*<sup>1</sup>, Kuwata, T.\*<sup>1</sup> : **Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from**

### 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens.

*Biology of the Neonate*, **82**, 238-242. (2002)

The secretory IgA antibody response to 20 environmental antigens, including microorganisms, toxins, food, and inhaled allergens, was evaluated in the breast milk from 107 Japanese mothers 1-10 days after delivery. Specific sIgA antibody responses were detected in tested, although there was a wide variation in the specific sIgA antibody profiles of each individual's milk. With antibody responses were detected against *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, and *Pseudomonas aeruginosa*. With regard to eight nonbacterial antigens, highly specific sIgA antibody responses were detected against rotavirus, cholera, and pertussis toxins. Similar sIgA antibody profiles were obtained when the 107 milk specimens were divided into colostrum (milk 1-5 days after delivery, n=36) and transitional milk (milk 6-10 days after delivery, n=71). This study provides information on the possible protective role of human milk sIgA antibodies and will serve as a baseline for future studies.

Keywords: human sIgA, bacteria, toxin

\*<sup>1</sup> 明治乳業(株)栄養研究所

\*<sup>2</sup> 国立衛研 食品衛生管理部

Sugita-Konishi, Y., Shimura, S.\* , Nishikawa, T.\* , Sunaga, F.\* , Naito, H.\* , Suzuki, Y.\* : **Effect of Bisphenol A on non-specific immunodefenses against non-pathogenic *Escherichia coli***

*Tox.Let.* **36**, 217-227, (2003)

We examined the effect of Bisphenol A (BPA) on non-specific defense in experiments with a non-pathogenic bacterium, *E. coli* K-12. Mice were pretreated by subcutaneous route with BPA (5 mg/kg body weight) for 5 consecutive days in the back and 3 days after the last treatment, injected by intra-peritoneal route. with *E. coli* K-12. BPA pretreatment caused a decrease of T and B cell populations in the spleen of treated mice. After the challenge with *E. coli*, the activity to eliminate bacteria from the peritoneal cavity in the early stage of infection (within 24 hours) was diminished compared with non-treated mice. BPA induced the migration of excess neutrophils into the peritoneal cavity, but a reduction in their phagocytic activity against *E. coli* K-12. For macrophages and lymphocytes, BPA reduced the population in the spleen and the accumulation at infection foci. The production of MCP-1 was enhanced by BPA treatment but that of IL-6 was suppressed after infection. These results suggest that BPA possessed immunotoxicity and reduced the non-specific host defense as an acute toxicity.

Keywords: Bisphenol A, non-specific defense, *E. coli* K-12

\*麻布大学獣医学部

Sugita-Konishi, Y., Kobayashi, K., Naito, H.\*<sup>1</sup>, Miura, K.\*<sup>2</sup>, Suzuki, Y.\*<sup>1</sup> : **Effect of lactational exposure to 2,3,7,8-**

**tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the susceptibility to *Listeria* infection.**

*Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 89-93, (2002)

We studied the effect of lactational exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the susceptibility to *Listeria* infection of offspring in C57BL/6NCj mice. The exposure did not affect the weights of immune organs and spleen or thymus cell population in dams, but it disrupted the regulation of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in serum after infection and clearance of *Listeria monocytogenes* from spleen in offspring.

**Keywords:** TCDD, *Listeria* infection, lactational exposure

\*<sup>1</sup> 麻布大学獣医学部

\*<sup>2</sup> 動物衛生研究所

Fukuhara, K., Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Kansui, H., Sugiyama, E.<sup>\*2</sup>, Kimura, M.<sup>\*3</sup>, Shimada, T.<sup>\*3</sup>, Urano, S.<sup>\*3</sup>, Yamaguchi, K.<sup>\*4</sup>, Miyata, N.<sup>\*5</sup> : **Enhanced radical-scavenging activity of a planar catechin analogue**

*J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5952-5953 (2002)

The protective role of antioxidants against free-radical associated diseases has been widely studied and this has prompted the development of new types of antioxidants. We herein report the synthesis and antioxidative abilities of a planar catechin analogue (1H<sub>2</sub>), in which catechol and chroman moieties in catechin are constrained to be planar. The 1H<sub>2</sub> was synthesized via an oxa-Pictet Spengler reaction using catechin and acetone with BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O. The radical-scavenging activities of 1H<sub>2</sub> were examined using galvinoxyl radical (G·), a stable oxygen-centered radical, showing that the hydrogen transfer reaction from 1H<sub>2</sub> to G· is 5-fold faster than that of hydrogen transfer from the native catechin to G·. The 1H<sub>2</sub> also showed an enhanced protective effect against the oxidative DNA damage induced by Fenton reaction without the pro-oxidant effect, which is usually observed in the case of the native catechin. The improved antioxidative properties of 1H<sub>2</sub> may be useful for the prevention and/or treatment of free-radical-associated diseases.

**Keywords:** catechin, antioxidant, radical

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 昭和女子大学

\*<sup>3</sup> 芝浦工業大学

\*<sup>4</sup> 千葉大分析センター

\*<sup>5</sup> 名古屋市立大学

Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Fukuhara, K., Shimada, T.<sup>\*2</sup>, Ohkubo, K.<sup>\*3</sup>, Iizuka, Y.<sup>\*4</sup>, Inami, K.<sup>\*4</sup>, Mochizuki, M.<sup>\*4</sup>, Urano, S.<sup>\*2</sup>, Itoh, S.<sup>\*5</sup>, Miyata, N.<sup>\*6</sup>, Fukuzumi, S.<sup>\*3</sup> : **Effects of magnesium ion on kinetic stability and spin distribution of phenoxyl radical derived from a vitamin E analogues: mechanistic insight into antioxidative hydrogen transfer reaction of vitamin E**

*J. Chem. Soc. Perkin 2*, 1520-1524 (2002)

The phenoxyl radical (1·) of a vitamin E analogue, generated by the reaction of 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-ol (1H) with 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH·) or galvinoxyl (G·), was significantly stabilized by the presence of Mg<sup>2+</sup>. Addition of Mg<sup>2+</sup> into a solution of 1· resulted in a red shift of the absorption band of 1· and Mg<sup>2+</sup>. The complexation between the phenoxyl radical and Mg<sup>2+</sup> significantly retards the disproportionation reaction of 1· by electronic repulsion between the metal cation and a generated organic cation (1<sup>+</sup>), leading to stabilization of the organic radical species. No effect of Mg<sup>2+</sup> on the rate of hydrogen atom transfer from 1H to DPPH· or to G· was observed, suggesting that the hydrogen-transfer reaction between 1H and DPPH· or G· proceeds *via* a one-step hydrogen atom transfer mechanism rather than electron-transfer followed by proton transfer.

**Keywords:** vitamin E, antioxidant, radical

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学

\*<sup>3</sup> 大阪大学

\*<sup>4</sup> 共立薬科大学

\*<sup>5</sup> 大阪市立大学

\*<sup>6</sup> 名古屋市立大学

Fukuhara, K., Naito, Y., Sato, Y., Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Miyata, N.<sup>\*2</sup> : **Generation of oxygen radicals and DNA-cleaving ability in quinone/NADH system**

*Magnetic Resonance in Medicine*, **13**, 139-142 (2002)

Quinones are a general term for a ubiquitous class of compounds, which are common in endogenous biochemicals or generated through metabolism of aromatic compounds. Some quinones are potent redox active compounds. They can undergo enzymatic and nonenzymatic redox cycling with their corresponding semiquinone radical and as a result reactive oxygen species (ROS). The DNA strand scission and the formation of 8-oxodeoxyguanosine by several types of quinones in the presence of NADH were investigated. In a series of chlorinated derivatives of para-benzoquinones, tetrachloro-benzoquinone (chloranil) induced efficient oxidative DNA damage, whereas only a little effect to DNA was afforded by benzoquinone, suggesting that the electrochemical ease of quinone to form radical anion is important for determining the ability of oxidative DNA damage. When NADH was added to the acetonitrile solution of chloranil, a characteristic absorption band of chloranil radical anion at 454 nm was increased. Introducing the molecular oxygen to the solution resulted in a decrease in the absorption, accompanied by an increase in the absorbance at 292 nm. This can be ascribed to one electron transfer from chloranil radical anion to molecular oxygen. UV and ESR also confirmed the participation of NAD radical for reduction of molecular oxygen. The generation of ROS was confirmed

using ESR spectrometry with spin-trapping reagent, showing that quinone with electrochemically ease for formation of radical anion was effective for generation of ROS, which could be the actual mediators of DNA destruction.

**Keywords:** quinone, superoxide, chloranil

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 名古屋市立大学

Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Miyazaki, K.<sup>\*2</sup>, Shimada, T.<sup>\*2</sup>, Ohkubo, K.<sup>\*3</sup>, Urano, S.<sup>\*2</sup>, Ikota, N.<sup>\*1</sup>, Ozawa, T.<sup>\*1</sup>, Fukuzumi, S.<sup>\*3</sup>, Fukuhara, K. : **Effects of metal ions distinguishing between one-step hydrogen- and electron-transfer mechanisms for the radical-scavenging reaction of (+)-catechin**

*J. Phys. Chem. A*, **106**, 11123-11126 (2002)

A kinetic study of a hydrogen-transfer reaction from (+)-catechin (**1**) to galvinoxyl radical ( $G\cdot$ ) has been performed using UV-vis spectroscopy in the presence of  $Mg(ClO_4)_2$  in deaerated acetonitrile (MeCN). The rate constants of hydrogen transfer from **1** to  $G\cdot$  determined from the decay of the absorbance at 428 nm due to  $G\cdot$  increase significantly with an increase in the concentration of  $Mg^{2+}$ . The kinetics of hydrogen transfer from **1** to cumylperoxyl radical has also been examined in propionitrile (EtCN) at low temperature with use of ESR. The decay rate of cumylperoxyl radical in the presence of **1** was also accelerated by the presence of scandium triflate [ $Sc(OTf)_3$  ( $OTf = OSO_2CF_3$ )]. These results indicate that the hydrogen-transfer reaction of (+)-catechin proceeds *via* electron transfer from **1** to oxyl radicals followed by proton transfer rather than *via* a one-step hydrogen atom transfer. The coordination of metal ions to the one-electron reduced anions may stabilize the product, resulting in the acceleration of electron transfer.

**Keywords:** catechin, antioxidant, radical

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学

\*<sup>3</sup> 大阪大学

Saeki, K.<sup>\*</sup>, Matsuda, T.<sup>\*</sup>, Kato, T.<sup>\*</sup>, Yamada, Y.<sup>\*</sup>, Mizutani, T.<sup>\*</sup>, Matsui, S.<sup>\*</sup>, Fukuhara, K., Miyata, N.<sup>\*</sup> : **Activation of the human Ah Receptor by aza-polycyclic aromatic hydrocarbons and their halogenated derivatives**

*Biol. & Pharm. Bull.*, **26**, 448-452 (2003)

Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor through which dioxins and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons cause altered gene expression and toxicity. Ten aza-polycyclic aromatic hydrocarbons (aza-PAHs), consisting of nitrogen substituted naphthalenes, phenanthrenes, chrysenes, and benzo[a]pyrenes (BaPs), were subjected to analysis of their structure-activity relationships as an AhR ligand by using a yeast AhR signaling assay, in which AhR ligand activity was evaluated as *lacZ* units. Most of the aza-PAHs

showed similar or more potent AhR ligand activities than the corresponding parent PAHs. About a 100-fold increased in ligand activity was observed in 10-azaBaP compared with BaP. Halogen-substitution effects on AhR ligand activity in aza-polycyclic aromatics were also investigated with quinoline, benzo[f]quinoline (BfQ), benzo[h]quinoline (BhQ) and 1,7-phenanthroline (1,7-Phe). Position-specific induction of AhR ligand activity was observed in aza-tricyclic aromatic compounds, BfQ, BhQ, and 1,7-Phe, and the ratio of the ligand activities (*lacZ* units/ $\mu M$ ) of monochlorinated and monobrominated aza-tricyclic aromatic compounds to those of the corresponding parent non-halogenated compounds ranged from 2.2- to 254-fold. Greatest enhancement of ligand activity was observed in 2-brominated BfQ (2-Br-BfQ), and its ligand activity was higher than that of BaP. These results suggest that even monohalogenation markedly enhances AhR ligand activity in aza-PAHs.

**Keywords:** Ah receptor, dioxin, benzo[a]pyrene

\* 名古屋市立大学

Fukuhara, K., Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Shimada, T.<sup>\*2</sup>, Ohkubo, K.<sup>\*3</sup>, Miyazaki, K.<sup>\*2</sup>, Hakamata, W., Urano, S.<sup>\*2</sup>, Ikota, N.<sup>\*2</sup>, Ozawa, T.<sup>\*2</sup>, Okuda, H., Miyata, N.<sup>\*4</sup>, Fukuzumi, S.<sup>\*3</sup> : **A planar catechin analogue as a promising antioxidant with reduced prooxidant activity**

*Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 81-86(2003)

A planar catechin analogue (**1H<sub>2</sub>**), in which catechol and chroman moieties in (+)-catechin are constrained to be coplanar, is an efficient radical scavenger compared to the native catechin, and nearly as effective as quercetin, a strong radical scavenger. The dianion ( $1^{2-}$ ) of **1H<sub>2</sub>** produced by the reaction of **1H<sub>2</sub>** with 2 equiv of tetramethylammonium methoxide reduced molecular oxygen ( $O_2$ ) to generate superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ). The resulting radical anion ( $1^{\cdot -}$ ) from **1H<sub>2</sub>** underwent intramolecular proton transfer to give an o-semiquinone radical anion form of  $1^{\cdot -}$ , which shows a characteristic ESR spectrum with *g* value of 2.0048. Although the same mechanism has also been shown for (+)-catechin, the rate constant of electron transfer ( $k_{et}$ ) from  $1^{2-}$  to  $O_2$  is about a half of that reported for (+)-catechin, indicating that the electron transfer from  $1^{2-}$  to  $O_2$  is slower than that from (+)-catechin dianion to  $O_2$ . Together with efficient protection against DNA strand breakage induced by the Fenton reaction, the small  $k_{et}$  value for **1H<sub>2</sub>** implies that, in physiologically relevant systems, there is less of a possibility of generating oxygen radicals responsible for prooxidant activity with  $1^{2-}$  than that with (+)-catechin. The strong radical scavenging ability and less-efficient generation of  $O_2^{\cdot -}$  suggest that the planar catechin analogue may be useful for the prevention and/or treatment of free-radical-associated diseases.

**Keywords:** catechin, antioxidant, prooxidant

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*2 芝浦工業大学

\*3 大阪大学

\*4 名古屋市立大学

Nakanishi, I.<sup>\*1</sup>, Uto, U.<sup>\*2</sup>, Ohkubo, K.<sup>\*3</sup>, Miyazaki, K.<sup>\*4</sup>, Yakumaru, H.<sup>\*2</sup>, Urano, S.<sup>\*3</sup>, Okuda, H., Ueda, J.<sup>\*1</sup>, Ozawa, T.<sup>\*1</sup>, Fukuhara, K., Fukuzumi, S.<sup>\*3</sup>, Nagasawa, H.<sup>\*2</sup>, Hori, H.<sup>\*2</sup>, Ikota, N.<sup>\*1</sup> : **Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism**

*Org. Biomol. Chem.*, **1**, 1452-1454(2003).

Artemillin C [3-(4-hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)phenyl)-2(E)-propionic acid], a major component (>5%) of Brazilian propolis, is a member of a class of 2,4,6-trisubstituted phenols that has recently been reported to show important biological activities, such as antitumor, apoptosis-inducing, immunomodulating, and antioxidative activities. We herein report rates of hydrogen transfer from artemillin C to cumylperoxyl radical determined by the EPR technique in propionitril at low temperature (203K). The effect of Sc<sup>3+</sup> on the hydrogen transfer rates was also examined to distinguish between one-step hydrogen- or electron-transfer mechanisms for the radical-scavenging reactions of artemillin. As a result, artemillin C shows an efficient radical-scavenging activity against cumylperoxyl radical in an aprotic medium, which is comparable to that of (+)-catechin. The absence of an effect of Sc<sup>3+</sup> on the kHT values demonstrates that the hydrogen transfer from artemillin C to cumylperoxyl radical proceeds via one-step hydrogen atom transfer than via an electron transfer followed by proton transfer.

Keywords: Artemillin C, propolis, antioxidant

\*1 放射線医学総合研究所

\*2 徳島大学

\*3 大阪大学

\*4 芝浦工業大学

Oba, M.<sup>\*</sup>, Tanaka, M.<sup>\*</sup>, Kurihara, M., Suemune, H.<sup>\*</sup> : **Conformation of peptides containing a chiral alpha-ethylated alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acid: (S)-EthylLeucine (= (2S)-2-amino-2-ethyl-4-methylpentanoic acid) within sequences of dimethylglycine and diethylglycine residues**

*Helv. Chim. Acta.*, **85**, 3197-3218 (2002)

An optically active (S)-alpha-ethylleucine ((S)-alpha-EtLeu) as a chiral alpha-ethylated alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acid was synthesized by means of a chiral acetal auxiliary of (R,R)-cyclohexane-1,2-diol. The chiral alpha-ethylated alpha,alpha-disubstituted amino acid (S)-alphaEtLeu was introduced into the peptides constructed from 2-aminoisobutyric acid (=dimethylglycine, Aib), and also into the peptide prepared from diethylglycine (Deg). The X-ray crystallographic analysis revealed that both right-handed (P) and left-handed (M) 310-helical structures exist in the

solid state of CF<sub>3</sub>CO-(Aib)<sub>2</sub>[(S)-alpha-EtLeu]-(Aib)<sub>2</sub>OEt (14) and CF<sub>3</sub>CO-[(S)-alpha-EtLeu]-(Deg)<sub>4</sub>OEt (18), respectively. The IR, CD, and 1H-NMR spectra indicated that the dominant conformation of pentapeptides 14 and CF<sub>3</sub>CO-[(S)-alpha-EtLeu]-(Aib)<sub>4</sub>OEt (16) in solution is a 310-helical structure, and that of 18 in solution is a planar C5 conformation. The conformation of peptides was also studied by molecular-mechanics calculations.

Keywords: alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acid, 310-helical structure, planar C5 conformation

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Suhara, Y.<sup>\*</sup>, Kittaka, A.<sup>\*</sup>, Ono, K.<sup>\*</sup>, Kurihara, M., Fujishima, T.<sup>\*</sup>, Yoshida, A.<sup>\*</sup>, Takayama, H.<sup>\*</sup> : **Design and efficient synthesis of new stable 1alpha,25-Dihydroxy-19-norvitamin D3 analogues containing amide bond**

*Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 3533-3536 (2002)

The design and synthesis of new 1alpha,25-dihydroxy-19-norvitamin D3 analogues 3a-c, which have an amide bond in the molecule instead of the diene, are described. The A-ring moiety was constructed by a (3S,5S)-3,5-dihydropiperidine derivative (9, 11, or 13) prepared from D-mannose, and a CD-ring carboxylic acid 16 was synthesized from Grundmann's ketone. Coupling those parts gave desired 3a-c in good yield. This strategy can be applied in combinatorial chemistry; therefore, those compounds would be applicable as useful tools in the development of new drugs.

Keywords: Design and Synthesis, 1alpha,25-dihydroxy-19-norvitamin D3 Analogues, combinatorial chemistry

\* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

Satoh, T.<sup>\*1</sup>, Itoga, A.<sup>\*1</sup>, Isogai, Y.<sup>\*2</sup>, Kurihara, M., Yamada, S.<sup>\*2</sup>, Natori, M.<sup>\*2</sup>, Suzuki, N.<sup>\*2</sup>, Suruga, K.<sup>\*2</sup>, Kawachi, R.<sup>\*2</sup>, Arahira, M.<sup>\*3</sup>, Nishio, T.<sup>\*2</sup>, Fukazawa, C.<sup>\*3</sup>, Oku, T.<sup>\*2</sup> : **Increasing the conformational stability by replacement of heme axial ligand in c-type cytochrome**

*FEBS letters*, **531**, 543-547(2002)

To investigate the role of the heme axial ligand in the conformational stability of c-type cytochrome, we constructed M58C and M58H mutants of the red alga *Porphyra yezoensis* cytochrome c(6) in which the sixth heme iron ligand (Met58) was replaced with Cys and His residues, respectively. The Gibbs free energy change for unfolding of the M58H mutant in water (DeltaG degrees (unf))=1.48 kcal/mol) was lower than that of the wild-type (2.43 kcal/mol), possibly due to the steric effects of the mutation on the apoprotein structure. On the other hand, the M58C mutant exhibited a DeltaG degrees (unf) of 5.45 kcal/mol, a significant increase by 3.02 kcal/mol compared with that of wild-type. This increase was possibly responsible for the sixth heme axial bond of

M58C mutant being more stable than that of wild-type according to the heme-bound denaturation curve. Based on these observations, we propose that the sixth heme axial ligand is an important key to determine the conformational stability of c-type cytochromes, and the sixth Cys heme ligand will give stabilizing effects.

Keywords: cytochrome, heme axial ligand, molecular orbital calculation

\*<sup>1</sup> College of Bioresource Sciences, Nihon University

\*<sup>2</sup> RIKEN

\*<sup>3</sup> National Food Research Institute

**Kurihara, M., Hakamata, W. : Convenient preparation of cyclic acetals using diols, TMS-source and a catalytic amount of TMSOTf**

*J. Org. Chem.*, **68**, 3413-3415(2003)

With use of diol, alkoxy silane, and a catalytic amount of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf), carbonyl compounds are converted to acetals in good yields under mild conditions. This procedure, which was carried out without synthesizing the silylated diols, is a more convenient adaptation of Noyori's method. This acetalization applies to not only simple but also conjugated carbonyl compounds. Moreover, various TMS compounds, including solid supported compounds, are effective for this method instead of alkoxy silane.

Keywords: acetal, diol, alkoxy silane

**Kittaka, A.\*<sup>1</sup>, Kurihara, M., Peleg, S.\*<sup>2</sup>, Suhara, Y.\*<sup>1</sup>, Takayama, H.\*<sup>1</sup> : 2alpha-(3-Hydroxypropyl)- and 2alpha-(3-hydroxypropoxy)-1alpha,25-vitamin D<sub>3</sub> accessible to vitamin D receptor mutant related to hereditary vitamin D-resistant rickets**

*Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 357-358 (2003)

Hereditary vitamin D-resistant rickets (HVDRR) is a genetic disorder caused by mutations in the vitamin D receptor, which lead to resistance to 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1alpha,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]. We found that the A ring-modified analogues, 2alpha-(3-hydroxypropyl)- and 2alpha-(3-hydroxypropoxy)-1alpha,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, (O1C3 and O2C3) can bind better than the natural hormone to the mutant VDR (R274A), which similar to the HVDRR mutant, R274L, had lost the hydrogen bond to the 1alpha-hydroxyl group of 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

Keywords: Hereditary vitamin D-resistant rickets, vitamin D receptor (VDR), a ring-modified analogues

\*<sup>1</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

\*<sup>2</sup> M. D. Anderson Cancer Center, The University of Texas

**Kurihara, M., Tanaka, M.\*, Oba, M.\*, Suemune, H.\* : Computational study on conformation of oligopeptides containing chiral alpha, alpha-disubstituted amino acids**  
*Peptides 2002*, 786-787(2003)

Conformational search of oligopeptides ( 1: CF<sub>3</sub>CO-[(S)-Beg]-[Aib]<sub>4</sub>-OEt, 2: CF<sub>3</sub>CO-(Aib)<sub>2</sub>[(S)-Beg]-[Aib]<sub>2</sub>-OEt, 3:

CF<sub>3</sub>CO-[(S)-EtVal]-[(S)-EtLeu]-[(S)-Epg]-Deg-[(S)-Beg]-OEt ), containing chiral alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acids was performed using the Monte Carlo method of MacroModel (ver. 6.5, Schrodinger, Inc) on SGI workstation. When AMBER\* was used as the force field, the global minimum energy conformations were 310-helix. In the case of peptide 2, the right-handed helix was more stable than the left-handed one. The difference in energy is 2.3 kcal/mol. But there is a small difference in energies between the right and left-handed helix in the case of 1. Global minimum energy conformation of peptide 3 by AMBER\* showed the right-handed 310-helix was more stable than the left-handed helix by 1.9 kcal/mol. These results are in agreement with their conformational properties in the solid state determined by X-ray crystallographic analysis of peptides 1, 2, 3. In the case of MMFF force field the global minimum energy conformations of 1 and 2 were 310-helix but the global minimum of 3 was a planar structure. The result of 3 calculated by MMFF force field is in agreement with its conformation in solution. Geometry optimization of semi-empirical molecular orbital calculations (PM3) of 1, 2 was carried out by SPARTAN. These results were in agreement with those of AMBER\* force field.

Keywords: alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid, oligopeptide, conformational search

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

**Tanaka, M.\*, Nishimura, S.\*, Oba, M.\*, Demizu, Y.\*, Kurihara, M., and Suemune, H.\* : Conformational study of heteropeptide prepared from chiral alpha-ethylated alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acids**  
*Peptides 2002*, 902-903(2003)

We synthesized the optically active alphaEtAAS by an asymmetric alkylation of the alpha-keto ester using (R,R)-cyclohexane-1,2-diol as a chiral auxiliary, and subsequent Schmidt rearrangement. We tried to synthesize the heteropeptides by the solution-phase method employing the coupling conditions of EDC in refluxing MeCN, and deprotection of the trifluoroacetyl group by NaBH<sub>4</sub> reduction. The coupling yields of peptides were not satisfactory because of the steric hindrance of alphaEtAA, but finally we prepared a sufficient amount of heterotetrapeptide and pentapeptide to analyze their conformation in solution and in the solid state.

Keywords: asymmetric synthesis, alpha, alphadisubstituted alpha-amino acid, oligopeptide

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

**Oba, M.\*, Tanaka, M.\*, Kurihara, M., Suemune, H.\* : Conformational Study of Peptides Containing (S)-Ethylleucine as a Chiral alpha,alpha-Disubstituted Amino Acid**

*Peptides* 2002, 242-243 (2003)

We prepared the chiral alpha-ethylated alpha, alpha-disubstituted amino acid, (S)-alphaEtLeu by asymmetric alkylation using (R,R)-cyclohexane-1,2-diol as a chiral auxiliary. We prepared the heteropeptides containing (S)-ceEtLeu as a guest molecule in the Aib sequence: CF<sub>3</sub>CO-(Aib)<sub>2</sub>-(S)-alphaEtLeu-(Aib)<sub>2</sub>-OEt (1), CF<sub>3</sub>CO-[(S)-oeEtLeu]-(Aib)<sub>4</sub>-OEt and in the Deg sequence: CF<sub>3</sub>CO-[(S)-alphaEtLeu]-(Deg)<sub>4</sub>-OEt by the solution-phase methods. The conformation of peptides in the solid state was studied using X-ray crystallographic analysis. Good crystals for X-ray analysis were obtained in the case of heteropeptides 1 and 3. The preferred conformation of both 1 and 3 in the solid state was diastereomeric right-handed (P) and left-handed (M) 3<sub>10</sub>-helix conformations. The conformation of peptides in solution was studied using FT-IR, IH-NMR, and CD spectra. The FT-IR and PH-NMR spectra of Aib heteropeptides 1 and 2 were similar to those of Aib homopeptide which prefers 3<sub>10</sub>-helical structure. On the other hand, those of Deg heteropeptide 3 were similar to those of Deg homopeptide which prefers the planar C5-conformation. The CD spectra of 1 and 2 implied that (M) 3<sub>10</sub>-helical structure existed in solution. The preferred conformation of Deg heteropeptide 3 was different between in the solid state and in solution.

Keyword: alpha, alpha-disubstituted amino acid, oligopeptide, 3<sub>10</sub>-helix

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Demizu, Y. \*, Tanaka, M. \*, Kurihara, M., Suemune, H. \* :

**Synthesis of chiral cyclic alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid and its peptides**

*Peptide Science* 2002, 321-322

Chiral cyclic lpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid, in which the quaternary carbon of the C $\alpha$ -position is achiral, was efficiently synthesized starting from dimethyl L-(+)-tartrate and dimethyl malonate. Homooligopeptides containing the optically active cyclic alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid were prepared using EDC as a coupling reagent by solution-phase methods, and the conformation of their peptides was studied.

Keywords: chiral cyclic alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid, oligopeptide, conformational search

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Kurihara, M., Sato, Y., Tanaka, M. \*, Oba, M. \*, Demizu, Y. \*, Suemune, H. \*, Okuda, H. : **Prediction of the helical screw sense of oligopeptides containing chiral alpha, alpha-disubstituted amino acids**

*Peptide Science* 2002, 323-324 (2003)

Alpha, alpha-Disubstituted amino acids have two alkyl substituents at the alpha-position of alpha-amino acids and are conformationally restricted. Peptides comprising

alpha, alpha-disubstituted amino acids are currently attracting attention mainly because of their stable secondary structures, especially 3<sub>10</sub>-helix. We shows computational simulation of oligopeptides prepared from alpha, alpha-disubstituted amino acids is in agreement with their conformational properties in the solid state determined by X-ray crystallographic analysis.

Keywords: alpha, alpha-disubstituted amino acid, oligopeptide, helical screw sense

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Kai, Y., Komazawa, Y., Miyajima, A., Miyata, N., Yamakoshi, Y. : **[60]Fullerenes as Novel Photoinduced Antibiotics.**

*Fullerene Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 11, 79-87 (2003)

ポリビニルピロリドン (PVP) を用いて可溶化したフラーレンを用いて、溶液法により抗菌活性を調べた。グラム陽性菌である *Bacillus subtilis* PCI219 を用いて試験を行ったところ、可視光線の照射下においてのみ、抗菌活性が見られた。光非照射下においては、微生物の増殖に対する C60 の影響は見られず、C60 が光触媒抗菌剤として有用であることが示唆された。

Keyword: fullerene, photosensitivity, antibacterial activity

Nisikawa, K. \*<sup>1</sup>, Yamakoshi, Y., Umeyama, I. \*<sup>2</sup>, Yominaga, N. \*<sup>1</sup> : **Ultrastructural Changes in *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyta) Induced by Heavy Metals and Polyphosphate Metabolism**

*FEMS Microbiology Ecology*, 44, 253-259 (2003)

クラミドモナスにおいてカドミウム、亜鉛、銅などの重金属や、ポリリン酸代謝により引き起こされる構造的変化について、<sup>31</sup>P-NMR、透過型電子顕微鏡、エネルギー散乱 X-ray を用いて、解析した。その結果、カドミウム、亜鉛、銅に暴露されたクラミドモナス細胞内では、液胞の増大が見られ、<sup>31</sup>P-NMR の解析により、ポリリン酸とリン酸の細胞内での分布動態とパラレルであることが示された。

Keyword: Chlamydomonas, heavy metal, polyphosphate, <sup>31</sup>P-NMR

\*<sup>1</sup> Ochanomizu University

\*<sup>2</sup> Department of Biology, Tokyo Metropolitan University

Saeki, M., Saito, Y., Nagano, M., Teshima, R., Ozawa, S., Sawada, J. : **mRNA expression of multiple cytochrome p450 isozymes in four types of cultured skin cells**  
*Int. Arch. Allergy Immunol.*, 127, 333-336 (2002)

Many drugs are known to induce allergic reactions in the skin. The metabolic activation of drugs resulting in the formation of protein adducts is thought to be a first step in the induction of these allergic reactions. We postulated that dermal tissue might be a site of drug activation by cytochrome P450 (CYP) isozymes. Messenger RNA was extracted from cultured Langerhans

cells, keratinocytes, fibroblasts and melanocytes from 6 individuals, and CYP mRNA expression was analyzed by RT-PCR. CYP1A1, 1B1 and 2E1 were found in all four cell types. CYP2A6, 2C, 2D6, 3A5, 3A7 and 4B1 mRNA was expressed in a cell-type- and/or individual-specific manner. CYP1A2, 2A7, 2B6 and 3A4 mRNA was not detectable. The mRNA for a variety of CYP isozymes was expressed in all four types of skin cells examined. These CYP enzymes may be involved in the pathogenesis of drug-induced allergic reactions in the skin.

Keywords: cytochrome P-450, skin, metabolic activation

Nagano, M., Nakamura, T., Niimi, S., Fujino, T., Nishimura, T., Murayama, N., Ishida, S., Ozawa, S., Saito, Y., Sawada, J. : **Substitution of arginine for cysteine 643 of the glucocorticoid receptor reduces its steroid-binding affinity and transcriptional activity.**

*Cancer Lett.*, **181**, 109-114 (2002)

To investigate the mechanism for glucocorticoid resistance in leukemic cells, we sequenced the coding region of glucocorticoid receptor (GR) gene in ten Japanese leukemic cells. We identified a novel heterozygous mutation (C643R) in the ligand-binding domain in P30/OHK cells. Western blot analysis for COS-7 cells transfected with the wild-type or C643R mutant GR plasmid revealed similar protein expression levels. In the ligand-binding assay, the dissociation constant of the C643R GR was six-fold higher than that of the wild-type GR. Moreover, the C643R GR showed no transcriptional activity in the luciferase reporter assay.

Keywords: glucocorticoid receptor, function, single nucleotide polymorphism

Nagano, M., Nakamura, T., Ozawa, S., Maekawa, K., Saito, Y., Sawada, J. : **Allele-specific long-range PCR/sequencing method for allelic assignment of multiple single nucleotide polymorphisms.**

*J. Biochem. Biophys. Methods.*, **55**, 1-9 (2003)

We report an allele-specific sequencing method using allele-specific long-range polymerase chain reaction (PCR) to determine if multiple (specifically, more than three) single nucleotide polymorphisms (SNPs) are located on the same allele. We sequenced the glucocorticoid receptor (GR) gene as a model and detected four nucleotide changes, including two novel variations, in intron 4 and exons 6, 8, and 9 $\alpha$  in four of the investigated cell lines. The terminal SNPs (intron 4 and exon 9 $\alpha$ ) were separated by 19 kb. Following SNP identification, the first round PCR allele-specific primers are designed at the both distal SNP sites (intron 4 and exon 9 $\alpha$ ), placing the SNP positions at the primer 3'-end. Using these first round PCR products as template, the second round PCR was performed to separately amplify exons 6 and 8. These second round PCR products were subsequently sequenced. The sequencing results

showed that the four SNPs were located on the same allele, i.e., forming a haplotype. This allele-specific long-range PCR/sequencing (ALP/S) method is rapid and applicable to the allelic assignment for more than three SNPs.

Keywords: glucocorticoid receptor, allele-specific sequencing method, single nucleotide polymorphism

Soyama, A., Saito, Y., Komamura, K. \*, Ueno, K. \*, Kamakura, S. \*, Ozawa, S., Sawada, J. : **Five novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2C8 gene, one of which induces a frame-shift.**

*Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**, 374-377 (2002)

Five novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in exon 3 and introns 1, 3, 7, and 8 in cytochrome P450 (CYP) 2C8 gene from 54 Japanese individuals, who were administered the anti-arrhythmic drug amiodarone. Among these SNPs, MPJ6\_2C8015 was expected to cause a frame-shift due to the deletion of adenine 471, resulting in amino acid alterations from codon 159 and an early stop codon at residue 177. Therefore, the variant enzyme is most likely to be inactive since it lacks 64% of the protein structure, including the heme-binding site and 5 out of 6 substrate recognition sites.

Key words: CYP2C8, frame-shift, single nucleotide polymorphism

\*国立循環器病センター

Saeki, M., Ozawa, S., Saito, Y., Jinno, H., Hamaguchi, T. \*, Nokihara, H. \*, Shimada, Y. \*, Kunitoh, H. \*, Yamamoto, N. \*, Ohe, Y. \*, Yamada, Y. \*, Shirao, K. \*, Muto, M. \*, Mera, K. \*, Goto, K. \*, Ohmatsu, H. \*, Kubota, K. \*, Niho, S. \*, Kakinuma, R. \*, Minami, H. \*, Ohtsu, A. \*, Yoshida, T. \*, Saijo, N. \*, Sawada, J. : **Three novel single nucleotide polymorphisms in UGT1A10**

*Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**, 488-490 (2002)

Three novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in the UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A10 gene from 24 Japanese patients with various cancers who were administered the anti-tumor drug, irinotecan (CPT-11).

All the three SNPs were located in exon 1 and their frequencies were all 0.021. Among these SNPs, 605C>T and 177G>A resulted in amino acid alterations, T202I and M59I, respectively. The third SNP, 693C>T, introduced a synonymous amino acid change (A231A).

Key words: UGT1A10, novel SNP, amino acid alteration, drug metabolism

\*国立がんセンター

Maekawa, K., Itoda, M., Hanioka, N., Saito, Y., Murayama, N., Nakajima, O., Soyama, A., Ishida, S., Ozawa, S., Ando, M., Sawada, J. : **Non-synonymous single nucleotide alterations in the microsomal epoxide**

**hydrolase gene and their functional effects***Xenobiotica*, **33**, 277-287 (2003)

By sequencing genomic DNA from 72 established cell lines derived from Japanese individuals, we detected 25 single nucleotide alterations in the microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) gene. Of them, 5 were exonic alterations resulting in amino acid alterations (77C>G, T26S; 128G>C, R43T; 337T>C, Y113H; 416A>G, H139R; 823A>G, T275A). To examine the effects of these amino acid alterations on EPHX1 function, EPHX1 cDNA constructs of wild-type and five variants were transfected into COS-1 cells, and their hydrolytic activities for cis-stilbene oxide were determined in vitro. Although all of the transfectants expressed EPHX1 mRNA and protein at similar levels, the variant H139R protein was expressed at a significantly higher level. Km values were not significantly different between the wild-type and variants. Increase in the enzymatic activity (Vmax) of the variant H139R was accompanied by the increased EPHX1 protein level without any significant change in the intrinsic EPHX1 activity. On the other hand, the variant R43T showed increased values for Vmax and clearance (Vmax/Km) both on a microsomal protein basis and on a EPHX1 protein basis. These results suggest that R43T as well as H139R increase epoxide hydrolase activity.

Key words: microsomal epoxide hydrolase, single nucleotide polymorphisms, Japanese

Sato, Y.\*<sup>1</sup>, Teshima, R., Nakamura, R., Sasaki, N.\*<sup>2</sup>, Morita, Y.\*<sup>1</sup>, Sawada, J., Kitani, S.\*<sup>3</sup> : **IgG-mediated signal transduction in canine mastocytoma-derived cells**  
*Int. Arch. Allergy Immunol.*, **129**, 305-313 (2002)

We have reported canine cutaneous mastocytoma-derived cells named CM-MC sensitized with monomeric IgG released histamine upon anti-IgG stimulation. However, IgG or IgE-mediated signal transduction in the cells remains to be examined. Abundant IgG-binding sites on the cell were detected by FACS analysis. Anti-IgG induced rapid protein tyrosine phosphorylation and  $[Ca^{2+}]_i$  elevation. When extracellular  $Ca^{2+}$  was excluded by EGTA, a mild and transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  was observed, indicating the release of  $Ca^{2+}$  from anti-IgG-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  stores. The constant  $Ba^{2+}$  entry from external environment proved the  $Ca^{2+}$  influx occurred mainly via a store-operated  $Ca^{2+}$  channel which was inhibited by  $Ni^{2+}$  and EGTA. Canine serum-sensitized cells showed a rapid and sustained increase in  $[Ca^{2+}]_i$  upon both anti-IgG and anti-IgE stimulation. The  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by anti-IgE was decreased in the cells sensitized with heat-inactivated serum. Histamine release from CM-MCs was absolutely dependent on extracellular  $Ca^{2+}$ , and reached equilibrium within 5 min. Staurosporine inhibited the tyrosine phosphorylation of 38-, 65-, 70-, 80-kD proteins. ER-27319 inhibited the tyrosine phosphorylation of 38- and 70-kD proteins. Staurosporine

also inhibited IgG-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  elevation and histamine release in a dose-dependent manner. In conclusion, CM-MC cells were activated by both IgG- and IgE-mediated mechanisms. IgG-mediated protein tyrosine phosphorylation and  $Ca^{2+}$  influx were similar to those mediated by IgE. CM-MC cells are useful for the study of allergic inflammation caused by IgG-dependent mechanisms.

Keywords: mast cells,  $Ca^{2+}$  signaling, histamine release

\*<sup>1</sup> 東京大学医学部

\*<sup>2</sup> 東京大学農学部

\*<sup>3</sup> 東京水産大学保健センター

Nakamura, R., Ishida, S., Ozawa, S., Saito, Y., Okunuki, H., Teshima, R., Sawada, J. : **Gene expression profiling of  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor DTBHQ and antigen-stimulated RBL-2H3 mast cells**

*Inflamm. Res.*, **51**, 611-618 (2002)

$Ca^{2+}$  signaling is critical for mast cell activation by antigen stimulation, and we previously described that the signaling can be mimicked by  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitors. We therefore investigated the effect of the  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor and antigen stimulation on the gene expression profiles of RBL-2H3 mast cells. A  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor, 2,5-di(tert-butyl)-1,4-hydroquinone (DTBHQ), an antigen (dinitrophenylated BSA), a high-density oligonucleotide microarray (Affymetrix GeneChip) technique, and a well-characterized rat mast cell line RBL-2H3 were used. RBL-2H3 cells were activated for 3 h with 10  $\mu$ M DTBHQ, which increases cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, or 10  $\mu$ g/ml antigen, which cross-links IgE receptors, and the mRNA expression profiles (8,799 genes) were analyzed with GeneChip arrays (n = 3). Expression levels were measured by GeneChip, and the differences were tested by Welch's t-test and P-values less than 0.05 were considered statistically significant. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. The genes, including MCP-1, GADD45, relaxin H1, CSF-1, c-jun-oncogene, Pyk-2, NKR-P2 and CREM, were significantly up-regulated by both DTBHQ and antigen stimuli, whereas the genes including interleukin (IL)-3, IL-4, IL-9, IL-13, GADD153, butyrate response factor, and Fas ligand, were up-regulated by DTBHQ alone. On the other hand, the expression of several genes, including GATA-1, were down-regulated by DTBHQ stimulation. These results suggest 1) that DTBHQ seems to induce proinflammatory responses by stimulating the production of several cytokines through the expression of several transcription factors, 2) that the changes in gene expression profile induced by DTBHQ and by IgE receptor cross-linking in mast cells were almost the same, but many more stress-inducible genes like GADD 153 were up-regulated by the former.

Keywords: mast cells, DNA microarray, antioxidants

Takagi, K., Nakamura, R., Teshima, R., Sawada, J. :

**Application of human FcεRI α-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE**

*Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 252-255 (2003)

We transfected the alpha-chain of human FcεRI into rat basophilic leukemia cell line RBL-2H3, established several stable transfected cells, and screened them by β-hexosaminidase release induced by sensitization with human IgE and stimulation with anti-human IgE antibody. A cloned cell line RBL-hE1a-2B12 was the strongest responder among the transfected cell clones. The concentrations of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentration in the human IgE-sensitized cells increased after stimulation with anti-human IgE antibody. Thus, it is suggested that the α-chain of human FcεRI is associated with the β-chain and/or γ-chain of rat FcεRI, and that they form functional high affinity IgE receptor complexes. The total IgE concentrations of the sera from allergic patients were determined by using the β-hexosaminidase release assay, where the transfected cells were sensitized with diluted and heat-inactivated (at 56 degrees C for 30 min) serum and stimulated with anti-human IgE antibody. The IgE concentration obtained correlated with those measured by an enzyme immunoassay method. β-Hexosaminidase release induced by stimulation with 5 times diluted serum was sometimes less than the release induced by the same serum; diluted 25 times or 125 times, suggesting that these serum contained factors that blocked IgE binding to FcεRI or cross-linking by anti-human IgE antibody. The results suggested that our system will be useful for detecting FcεRIα-bindable IgE in human serum.

Keywords: human IgE, high-affinity receptor for IgE, degranulation

Mori, N.\*<sup>1</sup>, Suzuki, R.\*<sup>1</sup>, Furuno, T.\*<sup>1</sup>, McKay, D.M.\*<sup>2</sup>, Wada, M.\*<sup>1</sup>, Teshima, R., Bienenstock, J.\*<sup>2</sup>, Nakanishi, M.\*<sup>1</sup> : **Nerve-mast cell (RBL) interaction: RBL membrane ruffling occurs at the contact site with an activated neurite**

*Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **283**, C1738-1744 (2002)

Mast cell-neurite interaction serves as a model for neuroimmune interaction. We have shown that neurite-mast cell communication can occur via substance P interacting with neurokinin (NK)-1 receptors on the mucosal mast cell-like cell, the rat basophilic leukemia (RBL) cell. Neurite (murine superior cervical ganglia) and RBL cell [expressing the granule-associated antigen CD63-green fluorescent protein (GFP) conjugate] cocultures were established and stimulated with bradykinin (BK; 10 nM) or scorpion venom (SV; 10 pg/ml), both of which activate only neurites. Cell activation was assessed by confocal imaging of Ca<sup>2+</sup> (cells preloaded with fluo 3), and analyses of RBL CD63-GFP+ granule movement were conducted. Neurite activation by BK or SV was followed by RBL Ca<sup>2+</sup> mobilization, which was inhibited by an NK-1 receptor antagonist (NK-1 RA).

Moreover, membrane ruffling was observed on RBL pseudopodial extensions in contact with the activated neurite, but not on noncontacting pseudopodia. RBL membrane ruffling was inhibited by NK-1 RA, but not NK-2 RA, and was accompanied by a significant increase in granule movement (0.13 +/- 0.04 vs. 0.05 +/- 0.01 microm/s) that was most evident at the point of neurite contact: many of the granules moved toward the plasmalemma. This is the first documentation of such precise (restricted to the membrane's contact site) transfer of information between nerves and mast cells that could allow for very subtle in vivo communication between these two cell types.

Keywords: neuroimmunity, substance P, CD63

\*<sup>1</sup> 名古屋市立大学薬学部

\*<sup>2</sup> McMaster University

Teshima, R., Watanabe, T., Okunuki, H., Isuzugawa, K., Akiyama, H., Onodera, H., Imai, T., Toyoda, M., Sawada, J. : **Effect of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice.**

*J. Food Hyg. Soc. Japan.*, **43**, 273-279 (2002)

Subchronic animal feeding studies to examine the effect on the immune system of genetically modified corn CBH351, which contains the Cry9C protein derived from *Bacillus thuringiensis* subspecies *tolworthi*, were conducted in female BN rats and B10A mice. The studies were designed to compare the effect of a line of genetically modified corn CBH351 (GM corn) with that of isoline corn (non-GM corn). Heat-treated corn meal was incorporated into the diets of the rats and mice at a concentration of 50%. The study duration was 13 weeks. Growth, food intake, and organ weights of the thymus, spleen, and liver were compared between animals fed the non-GM and GM lines. The histological findings in thymus, spleen, mesenteric lymph nodes, Peyer's patches, small intestines, liver, kidney, and bone marrow, and the presence of Cry9C-specific IgE, IgG, IgG1 and IgA antibodies in serum were also compared. The results showed no significant differences in growth, feeding value, or the histological findings in immunity-related organs between the animals fed the GM and non-GM lines. Production of Cry9 C-specific IgE and IgA was not detected in the serum of either group. Production of Cry9C-specific IgG and IgG1 was slightly increased in the 50% GM groups of BN rats. No Cry9C-specific IgG or IgG1 was detected in the serum of BN rats fed the diet containing 5% GM-corn. In conclusion, no immunotoxic activity was detected in the GM-corn-fed rats and mice in this subchronic dietary study.

Keywords: GM corns, Cry9C, immune system

Fujimoto, T.\*<sup>1</sup>, Sato, Y.\*<sup>1</sup>, Sasaki, N.\*<sup>2</sup>, Teshima, R., Hanaoka, K.\*<sup>1</sup>, Kitani, S.\*<sup>3</sup> : **The canine mast cell**

**activation via CRP.***Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 212-217 (2003)

We report here canine mastocytoma-derived cell (CMMC) activation via two pentraxin, limulus- and human-CRP. Mast cell chemotaxis was measured by Boyden's blindwell chamber. To confirm that the cell migration was chemotactic, "checkerboard" analysis was performed. We used Fura-2 to investigate CRP-mediated cytosolic calcium elevation. To examine whether CRP-induced stimulation is mediated through G-proteins, CMMC were incubated with pertussis toxin (PTx) before use in chemotaxis assay and Ca<sup>2+</sup> mobilization. CMMC migration in response to CRP was both chemokinetic and chemotactic. Limulus-CRP induced a transient Ca<sup>2+</sup>-mobilization dose-dependently. Preincubation of the cells with PTx inhibited CRP chemotaxis and Ca<sup>2+</sup>-mobilization, suggesting that G-proteins of the Gi-class are involved in the chemotaxis. We suggest that CRP may participate in the migration of mast cells to inflamed tissues during an acute-phase response. CRP-mediated recruitment of mast cells might play an important role in hypersensitivity and inflammatory processes.

**Keywords:** canine mast cell, C-reactive protein, chemotaxis

\*1 東京大学医学部

\*2 東京大学農学部

\*3 東京水産大学保健センター

Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Ueno, S., Koizumi, S., Ueda, H., Iwanaga T. and Inoue, K. : **Down-regulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain.**

*Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1444-1450(2002)

In the present study, to clarify the contribution of the sensory P2X3 signalling to strain-specific differences in tissue injury pain, we examined whether the P2X3-mediated in vivo and in vitro responses in dorsal root ganglion (DRG) neurones are changed in the A/J inbred mouse strain which is known to be resistant to tissue injury pain caused by formalin. We found that A/J mice exhibited a quite low magnitude of nocifensive behaviour caused by the P2X agonist  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha\beta$ meATP) into the hindpaw compared to C57BL/6J mice. This behaviour was blocked by P2X3 antisense oligodeoxynucleotide. The low magnitude of the in vivo pain sensation could be observed similarly in the in vitro response: the increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> increase by  $\alpha\beta$ meATP in capsaicin-sensitive DRG neurones from A/J mice was significantly lower than that from C57BL/6J mice. In A/J DRG neurones, the P2X3 protein level was significantly low compared with C57BL/6J DRG neurones. The change in P2X3 protein was selective because P2X2 protein was expressed equally in both strains. The present study suggests that the down-regulation of sensory P2X3 may be one of the molecular predispositions to low sensitivity to tissue injury pain in

A/J inbred mouse strain.

**keywords:** P2X3, ATP, Pain

Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K. and Denda, M. : **Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes.**

*BBRC*, **291**, 124-129 (2002)

これまで皮膚組織は外界刺激から生体を守るバリアーとしての機能に注目されてきたが、最近の研究では、さまざまな受容体やチャネルが皮膚に存在しており、多様な機能を担っているとの推測がなされている。今回の研究では、そのような機能チャネルのうち、唐辛子の主成分であるカプサイシンに感受性のあるパニロイド受容体の1サブタイプVR1 (現在ではTRPV1と呼ばれている)が、皮膚の細胞の一種であるケラチノサイトに発現していて、細胞内カルシウム上昇などや電気生理現象を引き起こす機能チャネルとして働いていることを明らかにした。その正確な生理的意義については今後の課題であるが、皮膚組織がかなり動的な役割を担って生体の恒常性維持等に係わっていることを示唆していて興味ぶかい。

**Keywords:** パニロイド受容体, 皮膚, 電気生理

Aihara, H. \*, Fujiwara, S. \*, Mizuta, I. \*, Tada, H. \*, Kanno, T. \*, Tozaki, H. \*, Nagai, K. \*, Yajima, Y. \*, Inoue, K., Kondoh, T. \*, Motooka, Y. \* and Nishizaki, T. \* : **Adenosine triphosphate accelerates recovery from hypoxic/hypoglycemic perturbation of guinea pig hippocampal neurotransmission via a P2 receptor.**

*Brain Research*, **952**, 31-37(2002)

ATP受容体の中枢神経系での生理機能については未だ不明の部分が多い。短期記憶の場として重要な海馬は、虚血などの傷害に非常に敏感に反応し機能障害を引き起こす部位としてよく知られている。その海馬におけるATP受容体の生理機能について研究した。モルモット海馬のスライス標本を実験に供した。低酸素・低血糖という虚血状態誘発還流液で海馬を処理すると、5分後から急速にシナプス伝達機能が低下し、10分以降では全くシナプス伝達は消失した。その後、還流液を正常の組成のものに戻すと、シナプス伝達は徐々に回復するが、還流液切り替え後30分ではシナプス伝達効率は正常レベルの30%程度にまでしか回復しない。一方、虚血還流液にATPを添加しておくこと、回復が極めて著明であり、切り替え後30分でもシナプス伝達効率は正常値の80%程度にまで達する。この効果はアデノシンでは全く認められなかった。また、この作用はGABAを介することも明らかとなった。ATPはGABA放出を促進することにより海馬保護作用を引き起こすことが示唆された。

**Keywords:** ATP, hippocampus, protection

\*兵庫医科大学

Chen, Y.H. \*<sup>1</sup>, Chen, S.H.M. \*<sup>1</sup>, Jong, A. \*<sup>1,2</sup>, Zhou, Z.Y. \*<sup>1,2</sup>, Li, W. \*<sup>3</sup>, Suzuki, K., and Huang, S.H. \*<sup>1,2</sup> : **Enhanced *Escherichia coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells is associated with alternations in cytoskeleton induced by nicotine.**

*Cell. Microbiol.* **4**, 503-514 (2002)

We have investigated the effects of nicotine, the major component of tobacco, on *E. coli* invasion of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC). Our studies showed that *E. coli* invasion of HBMEC was significantly enhanced by nicotine in a dose-dependent manner. The nicotine-mediated enhancement was associated with actin cytoskeleton rearrangement and morphological changes in the eukaryotic host cell that are essential for bacterial entry. The recombinant IbeA protein and  $\alpha$ -bungarotoxin (a nicotinic acetylcholine receptor antagonist) were able to efficiently block the nicotine-mediated cellular effects, suggesting the involvement of the IbeA and nicotinic receptors. Blocking of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) by LY294002 abolished the entry of *E. coli* in HBMECs treated with nicotine in a dose-dependent manner. Inhibition of PI3K was associated with decreased phosphorylation of Akt and actin cytoskeletal rearrangement. In contrast to PI3K, blockage of Rho kinase (ROCK) by Y27632 up-regulated both nicotine- and *E. coli*-mediated cellular responses. Thus, this study provides experimental evidence for the first time that the major component of tobacco, nicotine, enhances meningitic *E. coli* invasion of HBMEC through modulation of cytoskeleton.

Keywords: Bacterial invasion, PI3 kinase, Cofilin

\*<sup>1</sup> Children Hospital Los Angeles

\*<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Univ. of Southern California

\*<sup>3</sup> Department of Medicine, Univ. of Southern California

Adachi, R., Takeuchi, K.\* and Suzuki, K. : **Antisense oligonucleotide to cofilin enhances respiratory burst and phagocytosis in opsonized zymosan-stimulated mouse macrophage J774.1 cells**

*J. Biol. Chem.*, **277**, 45566-45571 (2002)

We have obtained a new line of evidence showing an important role of cofilin in phagocyte functions using the mouse macrophage cell line, J774.1, and an antisense oligonucleotide to cofilin. Upon stimulation with opsonized zymosan, cofilin was phosphorylated and accumulated around phagocytic vesicles. As the antisense oligonucleotide to cofilin, a 20-mer S-oligo corresponding to the sequence including the AUG translational initiation site was found to be effective. In the cells treated with the antisense oligonucleotide, the amount of cofilin was less than 30% of that in the control cells, and the level of F-actin was two or three times higher than that in the control cells before and throughout the cell activation. In the antisense oligonucleotide-treated cells, OZ-triggered superoxide production and phagocytosis of OZ was enhanced by the antisense. These results show that cofilin plays an essential role in the control of phagocyte function through regulation of actin filament dynamics.

Keywords: Macrophage, Cofilin, Antisense oligonucleotide

\* Graduate School of Science, Nagoya University

Higuchi, Y., Ono, K., Onodera, H., Mitsumori, K., Sekita, S., Satake, M. and Ozaki, Y. : **Prevention of stroke by a Japanese traditional medicine, Shichimotsu-koka-to, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats-a histopathological study.**

*Natural Medicines*, **57**, 12-17 (2003)

Effect of chronic administration of a Japanese traditional medicine, Shichimotsu-koka-to (SKT) on the incidence of apoplexy was investigated in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). SHRSP fed with SKT extract at 1.5 g/kg/day from 8 through 23 weeks of age showed significantly lower incidence of stroke, although the inherent age-dependent elevation of systolic blood pressure was hardly affected. SHRSP at 23 weeks of age showed hemorrhages, calcification, spongiosis, reticulating colligation, gliosis and large cysts in the brain. The area and incidence of these cerebral lesions were significantly less in SKT-treated animals. These observations suggest that the SKT-induced prevention of stroke contributes to the prolongation of the life span of SHRSP that we have previously reported.

Keywords: Shichimotsu-koka-to, Stroke-prone spontaneously hypertensive rat, stroke

Ono, K., Saito, A.\*<sup>1</sup>, Goto, K.\*<sup>1</sup>, Kasuya, Y.\*<sup>2</sup> and Shigenobu, K.\*<sup>3</sup> : **Elucidation with the protease  $\alpha$ -chymotrypsin of the inhibitory modulating action of endogenous neuropeptide Y over sympathetic neurotransmission in rat vas deferens.**

*J. Pharmacol. Sci.*, **91**, 113-124 (2003)

The physiological role of endogenous neuropeptide Y (NPY) in sympathetic neurotransmission was examined in rat and guinea pig vas deferens (VD), using alpha-chymotrypsin (alpha-CT). NPY-like immunoreactivity was detected in the longitudinal muscle layer of VD densely in rats but sparsely in guinea pigs, and it disappeared following surgical denervation. Under blockade of the prejunctional alpha(2)-adrenergic autoinhibition, alpha-CT potentiated the phasic contraction in rat, but not guinea pig, VD induced by trains of transmural nerve stimulation (TNS) in a frequency-dependent manner, which was reproducible during repeated applications and not affected by pretreatment with capsaicin. In contrast, alpha-CT did not potentiate the twitch response or contractions induced respectively by a single pulse TNS or by direct electrical stimulation to the smooth muscle. Exogenously applied NPY suppressed the twitch response, which was cancelled by alpha-CT, and excitatory junction potentials, although it affected neither spontaneous junction potentials nor the direct electrical stimulation-induced contraction. These observations provided further evidence to support that NPY is released endogenously by

TNS at high frequency, acting prejunctionally to suppress sympathetic neurotransmission. Thus, the protease alpha-CT proved itself to be a useful tool to reveal a functional role of endogenously released peptides.

Keywords: Neuropeptide Y, sympathetic neurotransmission,  $\alpha$ -chymotrypsin

\*1 Tsukuba University

\*2 Hoshi University of Pharmacy

\*3 Tosho University

**Ono, K. : Augmentation of the delayed rectifier potassium current by  $ET_A$  endothelin receptor in guinea pig atrial myocytes.**

*J. Pharmacol. Sci.*, **91**, 79-82 (2003)

The role of  $ET_A$  endothelin receptor ( $ET_A$  R) in the regulation of the delayed rectifier potassium current  $I_K$  was examined in guinea pig atrial myocytes. Application of ET-1 (10 nM) together with an  $ET_B$ -receptor-selective antagonist, BQ-788 (300 nM), significantly increased the voltage-dependent activation of  $I_K$  without affecting its half-activation voltage or the slope factor, while it suppressed the calcium current ( $I_{CaL}$ ) and displaced the time-independent background current to the outward direction. The data suggests that the augmentation of  $I_K$  contributes to the  $ET_A$ -receptor-mediated shortening of action potential duration, and hence to the negative inotropic response, in atria.

Keywords :  $ET_A$  endothelin receptor, delayed rectifier  $K^+$  current, atrium

**Ono, K., Imazawa, T. and Sakamoto, A. \*1 :  $\alpha$ B-Crystallin-like immunoreactivity localized at both the M- and Z-lines in isolated Syrian hamster ventricular myocytes.**

*Bioimages*, **10**, 75-79 (2002)

$\alpha$ B-Crystallin (CryAB) is a major stress protein in cardiac myocytes. Under pathological stress such as ischemia, it acts as a molecular chaperone to suppress protein aggregation at the Z-line and at the I-band region of myofibril and at the intercalated disk. We report here that CryAB-like immunoreactivity also exists as a relatively weak but distinct signal at the M-line in isolated Syrian hamster ventricular myocytes with using a new laser confocal immunofluorescence microscope with high resolution. Our electron microscopic examination revealed that mitochondria in the isolated myocytes carried an evidence of mild ischemia. Immunoblot analysis using a polyclonal antibody against CryAB detected a single protein with molecular mass of 21 kDa in Syrian hamster left ventricle. The novel localization of CryAB-like immunoreactivity in the cardiac myofibril and its possible relation to ischemia may shed light on a yet unraveled chaperonic functions of this stress protein in the heart.

Keywords :  $\alpha$ B-Crystallin, heart, ischemia

\*1 National Cardiovascular Center

**Ozaki, Y. and Ono, K. : Antiinflammatory effect of glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet by granuloma pouch method in rats.**

*Natural Medicines*, **56**, 261-263 (2002)

The present study was carried out to elucidate an anti-inflammatory effect of the glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet granuloma pouch method in rats. Glycyrrhizin and indomethacin showed dose-dependent inhibition of the cotton pellet-induced granuloma formation. Glycyrrhizin topically applied to the cotton pellet showed an anti-inflammatory effect induced by the cotton pellet.

Keywords: anti-inflammatory effect, glycyrrhizin, topical application

**Ozaki, Y., Ono, K., Sakaguchi, I. \*1 and Kato, Y. \*1 : Histological study of the accelerating effect of Shikonin and Alkannin on the proliferation of granulation tissue in rats.**

*Natural Medicines*, **56**, 29-33 (2002)

The present study was carried out to compare the histological changes induced by shikonin and alkannin on the proliferation of granulation tissue in rats. Shikonin and alkannin increased the ratio of CD11b<sup>+</sup> cells in the granulation tissue 5 d and 10 d after implantation of the cotton pellet, and new blood vessel cells and  $\alpha$ -smooth muscle actin were observed around the granulation tissue 5 d after implantation of the cotton pellet. Both compounds increased the expression of CD11b<sup>+</sup> cells with granulocytes such as macrophages, histiocytes and TGF- $\beta$ , and then accelerated the proliferation of fibroblasts and collagen fiber in the granulation tissue. On the other hand, neither compound increased the ratio of CD3<sup>+</sup> cells in the granulation tissue after 5 and 10 d. These results suggest that the accelerating effect of the proliferation of granulation tissue induced by the cotton pellet produced by shikonin and alkannin can be attributed to an increase in new blood vessel cells and in the expression of CD11b<sup>+</sup> cells and TGF- $\beta$ , and then the acceleration in the proliferation of fibroblasts and collagen fiber in the granulation tissue.

Key words: shikonin, alkannin, granulation tissue

\*1 Club Cosmetics Co., Ltd.

**Nishimaki-Mogami, T., Yao, Z. \*, & Fujimori, K : Inhibition of phosphatidylcholine synthesis via the phosphatidylethanolamine methylation pathway impairs incorporation of bulk lipids into VLDL in cultured rat hepatocytes**

*J. Lipid Res.*, **43**, 1035-1045 (2002)

Inhibition of phosphatidylcholine (PC) synthesis via the phosphatidylethanolamine (PE) methylation pathway was shown to decrease the secretion of very low density lipoproteins (VLDL) from primary rat hepatocytes. To understand further the role of PE methylation, we

determined the effect of bezafibrate, an inhibitor of PE methylation, on VLDL assembly within the microsomal lumen. Bezafibrate was shown to decrease VLDL (TG) secretion only when cellular PE methylation was active in the presence of methionine. Pulse-chase experiments showed that bezafibrate treatment did not impair the movement of labeled apoB48 from microsomal membranes into the lumen, but resulted in reduced VLDL-apoB48 and increased apoB48-containing particles in the HDL density range (HDL-apoB48) within the lumen. Inhibition of PE methylation by bezafibrate or 3-deazaadenosine after the completion of HDL-apoB48 assembly effectively decreased VLDL-apoB48 secretion with a concomitant increase in HDL-apoB48 secretion. These findings suggest that inhibition of PC synthesis via the PE methylation pathway impairs the stage of bulk TG incorporation during the assembly of VLDL.

**Keywords:** VLDL, phosphatidylcholine, bezafibrate

\* University of Ottawa Heart Institute

Vukmirica, J. \*, Nishimaki-Mogami, T., Tran, K. \*, Shan, J. \*, McLeod, R.S. \*, Yuan, J. \*, Yao, Z. \* : **The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL**

*J. Lipid Res.*, **43**, 1496-1507 (2002)

We determined the role of N-linked glycosylation of apolipoprotein B (apoB) in the assembly and secretion of lipoproteins using transfected rat hepatoma McA-RH7777 cells expressing three human apoB variants with different ability to recruit neutral lipids. Mutation (N-to-Q substitution) of all five N-linked glycosylation sites within apoB-37 or apoB-50 resulted in decreased secretion efficiency and decreased lipoprotein association. This was attributable to impaired assembly and was not due to the limitation of lipid availability. The decreased secretion of mutant apoB-17 and apoB-37 was due to increased degradation within cells. However, mutant apoB-50 accumulated within the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. These data imply that the N-glycans at the amino terminus of apoB play an important role in the assembly and secretion of lipoproteins containing the carboxyl terminally truncated apoB.

**Keywords:** apolipoprotein B, N-glycan, secretion

\* University of Ottawa Heart Institute

Sekizawa, J., Suter, G. \*, Birnbaum, L. \* : **Integrated human and ecological risk assessment : a case study of tributyltin and triphenyltin compounds**

*J. Human and Ecological Risk Assessment*, **9** (1), 325-342 (2003)

Tributyltin and triphenyltin (TBT and TPT) are biocides that have been used to prevent fouling of boats, kill molluscs, and other uses. Due to observed effects on oysters and snails, their use in boat paints has been banned in many nations. However, use on ships and some

uses other than as antifouling paints continue. These uses, their tendency to bioaccumulate, and their toxicity cause lingering concerns about risks to humans and non-human organisms. Based on prior human health and ecological assessments, this paper suggests that an integrated assessment that recognized common pathways of transport, fate and exposure, and common modes of action would be more efficient and complete than additional independent assessments. The presentation of risks in an integrated manner could also lead to better decisions by defining the various benefits of any management action.

**Keywords:** organotin compound, integrated risk assessment

\* National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, USA.

Suter, G. \*<sup>1</sup>, Vermeire, T. \*<sup>2</sup>, Munns, W.R. \*<sup>1</sup>, Sekizawa, J. : **Framework for the integration of health and ecological risk assessment**

*J. Human and Ecological Risk Assessment*, **9** (1), 281-302 (2003)

The World Health Organization's International Programme on Chemical Safety (IPCS), the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), and the U.S. Environmental Protection Agency have developed a collaborative partnership to foster integration of assessment approaches for human health and ecological risks. This paper presents the framework developed by that group. Integration provides coherent expression of assessment results, incorporates the interdependence of humans and the environment, uses sentinel organisms, and improves the efficiency and quality of assessments relative to independent human health and ecological risk assessments. The paper describes how integration can occur within each component of risk assessment, and communicates the benefits of integration at each point. The goal of this effort is to promote the use of this internationally accepted guidance as a basis for harmonization of risk assessment. **Keywords:** risk assessment, integration, health and ecological risk

\*<sup>1</sup> National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, USA.

\*<sup>2</sup> Toxicology Advisory Centre National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands.

Suter, G. \*, Munns, W.R. \*, Sekizawa, J. : **Types of integration in risk assessment and management and why they are needed**

*J. Human and Ecological Risk Assessment*, **9** (1), 273-280 (2003)

Risk-based decision making requires that the decision makers and stakeholders are informed of all risks that are

potentially significant and relevant to the decision. The International Programme on Chemical Safety of the World Health Organization has developed a framework for integrating the assessment of human health and ecological risks. However, other types of integration are needed to support particular environmental decisions. They are integration of exposure and effects, of multiple chemicals and other hazardous agents, of multiple routes of exposure, of multiple endpoints, multiple receptors, multiple spatial and temporal scales, a product's life cycle, management alternatives, and socioeconomics with risk assessment. Inclusion of all these factors in an integrated assessment could lead to paralysis by analysis. Therefore, it is important that assessors be cognizant of the decision process and that decision makers and those who will influence the decision (stakeholders) be involved in planning the assessment to ensure that the degree of integration is necessary and sufficient.

Keywords: integration, risk assessment, data quality objectives.

\* National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, USA.

Takao, Y.\*<sup>1</sup>, Yamashita, K.\*<sup>1</sup>, Kohra, S.\*<sup>1</sup>, Inudo, M.\*<sup>2</sup>, Nagase, M.\*<sup>1</sup>, Tominaga, N.\*<sup>3</sup>, Ishibashi, Y.\*<sup>4</sup>, Sekizawa, J., Miyairi, S.\*<sup>5</sup>, Arizono, K.\*<sup>2</sup>: **High sensitivity analysis of indirubin by silylation using GC/MS**  
*J. Health Sciences*, 49 (1), 88-90 (2003)

After adding the silylating agents BSTFA or MTBSTFA to the indirubin solution and leaving for 1 h at 60 °C, the color remained red. Indirubin could be measured by GC/MS after replacing the active hydrogen on the amino group with -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> or -Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> groups. However, peak tailing was observed and the quantitative and detection limits were not sensitive enough for practical use. Indirubin silylated at four sites was observed under the reaction conditions as follows; solvent dichloromethane: acetone (8:2), 80 °C reaction temperature, 1 h reaction time, BSTFA derivative, pyridine catalyst. The color of the solution changed from red to colorless. Retention time appeared to be faster and the peak shape improved. Under these conditions, the quantitative and detection limits of indirubin were 5 ppb and 0.1 ppb, respectively.

Keywords: indirubin, silylation, GC/MS, BSTFA, derivative

\*<sup>1</sup> 長崎大学環境科学部

\*<sup>2</sup> 熊本県立大学環境共生学部

\*<sup>3</sup> 国立有明高等専門学校化学生物工学

\*<sup>4</sup> 長崎大学環境保護センター

\*<sup>5</sup> 日本大学薬学部

関澤 純：リスクコミュニケーションの課題

農業と経済、「食品安全性確保の考え方—リスクアナリシスとは何か」臨時増刊号, 12, 79-90 (2002)

食品のリスクアナリシスが注目されているがリスクアセスメントからリスクマネジメントまでのすべてのプロセスにおいて必要とされるリスクコミュニケーションへの理解は不足している。危機管理や情報公開とリスクコミュニケーションはどう違うかからはじめ、FAO/WHO 合同の食品のリスクコミュニケーション諮問会議において関澤が主張し採択された原則と手法、また現在欧米で進められているリスクコミュニケーションの実態を検討し、わが国における今後の課題を示した。

Keywords: 食品のリスクアナリシス, 欧州食品安全庁, 米国食品医薬品庁

関澤 純：リスク評価の国際動向とわが国での課題

日本リスク研究学会誌, 14(1), 88-95 (2002)

わが国では透明性を確保したリスク評価の枠組みがようやく育ちつつあり、評価プロセスの明示と明文化した判断基準、そして評価討議の公開がなされるようになってきている。筆者は国際化学物質安全性計画 (IPCS) による国際的な専門家グループによる化学物質のリスク評価に関わっているが、リスク評価の目的とあり方をデータの組織化と解析手法の体系化、さらに最近IPCSが中心になって進めている健康と環境におけるリスクの統合的評価および、リスク評価における不確実性分析について、筆者の研究成果を踏まえて論じた。

Keywords: 統合的リスク評価, 不確実性分析, 透明性

大竹千代子, 関澤 純, 杉森伸吉\*<sup>1</sup>, 安部明美\*<sup>2</sup>, 鬼武一夫\*<sup>3</sup>, 鳥井哲史\*<sup>4</sup>: **化学品リスクの認知と行動についてのアンケートの解析**

日本リスク研究学会誌, 13(2), 92-100 (2002)

1995年に製造物責任法 (PL法) が施行され、これに伴って消費者製品の表示が見直された。これまで死亡も含む事故例のあった消費者製品について、PL法施行後に女子大生と一般市民を約500名を対象にアンケート調査を行った。内容は、当時問題化していたエイズウイルスや、無差別テロ、大地震と身近な危害についてのリスク認知、消費者製品の使用時における注意と表示への関心、表示に求める改善点などであった。国際的に標準化された危害の程度を示す用語である危険、警告、注意という言葉の示す危険度への理解が必ずしも良くはなく、表示の方法を改善するとともに、教育、キャンペーン、トレーニングなどにより表示が正しく理解されるよう社会的な取り組みの必要性が示された。

Keywords: 消費者製品, 製造物責任法, 表示

\*<sup>1</sup> 東京学芸大学

\*<sup>2</sup> 神奈川県環境科学センター

\*<sup>3</sup> 日本生活共同組合連合会

\*<sup>4</sup> 神戸女学院大学

関澤 純：IT化に伴う化学物質情報検索の容容

化学経済, 50(5), 94-100 (2003)

IT化に伴う化学物質情報環境の変化を背景に、現時点でのもっとも効果的な化学物質情報検索について検討した。雑多な情報源の中から目的に合致しかつ信頼性ある情報を選択する重要性を示し、その上で関澤が関わっ

てきた化学物質安全性評価の国際協力の原則と手法を基に信頼性ある情報の要件を示した。

Keywords: 国際化学物質安全性計画 (IPCS), インターネット, 情報検索

Kotani, A. \*, Hayashi, Y., Matsuda, R., Kusu, F. \* : **Prediction of measurement precision of apparatus using a chemometric tool in electrochemical detection of high-performance liquid chromatography**

*Journal of chromatography A*, **986**, 239-246 (2002)

The relative standard deviation (RSD) of measurements in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD) was predicted based on the 1/f fluctuation model which is made up of white noise and Markov process, called Function of Mutual Information (FUMI) theory. The FUMI theory can provide a precision and a reliable detection limit from a single measurement of noise and signal in HPLC-ECD. Since the predicted RSD exactly coincides with the observed RSD by repetitive measurements, the FUMI theory is useful for predicting the measurement uncertainty in HPLC-ECD. By use of the chemometric tool based on this theory, HPLC-ECD system and experimental conditions were optimized at only one try for each measurement.

Keywords: HPLC; Electrochemical detection; Precision; FUMI theory

\*東京薬科大学

Hayashi, Y., Matsuda, R., Ishikawa, M. \* : **Five methods for determining the limit of detection in instrumental analyses**

*American Biotechnology Laboratory*, **20** (2002) 20-22 (invited review)

The precision of measurements, as determined by standard deviation (SD) or relative standard deviation (RSD), is a straightforward indicator of the veracity of data in instrumental analyses. The limit of detection (LOD) is derived directly from the precision and has gained significance, especially in validation, GMP, and GLP. Consequently, a variety of LOD methods have been proposed. In this article, typical methods for LOD determination are compared, with special emphasis on the required time and statistical reliability of the LOD estimates. The same data set in the HPLC determination for sorbic acid is used for all the methods for the sake of exact comparison. Discussed are method A, referring to the SD of measurements; method B, based on the RSD; method C, using the residual of a calibration line; method D, using the signal-to-noise ratio (S/N);6 and method E, using the FUMI theory (Function of Mutual Information). Methods A-D are well-known, but the FUMI theory constitutes a new approach.

Keywords: FUMI theory, precision, limit of detection, HPLC

\*沼津保健所

Nakata, K., Takai-Igarashi, T. \*<sup>1</sup>, Nakano, T. and Kaminuma, T. \*<sup>2</sup> : **An Integrated Receptor Database (IRDB)**

*Data Science Journal*, **1**, 140-145.

Various receptor data were collected, edited and integrated into an Integrated Receptor Database (IRDB). The data stored includes structural data (amino acid sequences, their secondary-structure and three-dimensional structure), functional data, binding affinity, cell signaling data etc. The purpose of this database is to allow structural biologists, drug designers and toxicologists to analyse and elucidate receptor-ligand dockings and the resultant post-binding signal transduction pathways. IRDB is available on line (<http://impact.nihs.go.jp/RDB.html>)

Keywords: receptor structure, binding affinity, cell signaling, SNP, drug

\*<sup>1</sup> (現所属) 東京大学情報理工学系研究科

\*<sup>2</sup> (現所属) バイオダイナミクス

Nakata, K. : **Theoretical Approach to Endocrine Disruptors.**

*Frontiers in Bioscience*, **7**, c68-73

Endocrine disruptors are now of scientific and public concern, because there is increasing evidence of their adverse effects on the health of an intact organism or its progeny and on changes in endocrine function. Although numerous substances have been identified as such chemicals, a huge number of chemicals remain to be tested for their endocrine disrupting capabilities. Because of the time and costs required for animal tests, some theoretical or computer-based method for screening this large number of chemicals is needed to reduce the numbers requiring animal testing. Improved quantitative structure activity relationship (QSAR) models were used for screening in combination with other approaches. New receptor-ligand docking simulations were being tested. There was good correlation between experimental and theoretical binding affinities. A database complex system being developed, which enables one to trace cellular signals triggered by the interaction of receptors with xenobiotic chemicals. Perspectives of computer-based screening methods are discussed.

Keywords: endocrine disruptor, QSAR, database, binding affinity

Shimizu, T. \*<sup>1</sup>, Ochiai, H. \*<sup>2</sup>, Asell, F. \*<sup>2</sup>, Shimizu, H. \*<sup>2</sup>, Saitoh, R. \*<sup>2</sup>, Hama, Y. \*<sup>2</sup>, Katada, J. \*<sup>1</sup>, Hashimoto, M. \*<sup>1</sup>\*<sup>2</sup>, Matsui, H. \*<sup>1</sup>, Taki, K. \*<sup>3</sup>, Kaminuma, T., Yamamoto, M., Aida, Y. \*<sup>1</sup>\*<sup>2</sup>, Ohashi, A. \*<sup>1</sup>\*<sup>2</sup>, Ozawa, N. \*<sup>1</sup>\*<sup>2</sup> : **Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism I. Analysis on Frequencies of Mutant Alleles and Poor Metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19**

*Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18** (1), 48-70 (2003)

The enzyme activities of CYP2D6 and CYP2C19 show a genetic polymorphism, and the frequencies of poor metabolizers (PMs) of CYP2D6 and CYP2C19 on the enzymes depend on races. We analyzed the frequencies mutant alleles and PMs in each races based on information from some 200 published literatures. As a result, it was shown that the frequencies of PMs on CYP2D6 are 1.9% of Asians and 7.7% of Caucasians, and those of PMs on CYP2C19 are 15.8% of Asians and 2.2% of Caucasians. It was suggested that there would be racial differences in the frequencies of PM subjects whose blood concentrations might be higher for drugs metabolized by these enzymes. Additionally, enzyme activities would vary according to number of functional alleles even in subjects judged to be extensive metabolizers (EMs).

Keywords: inter-racial difference, poor metabolizer, genetic polymorphism

\*1 ファルマシア株式会社

\*2 早稲田大学理工学総合研究センター

\*3 日本ビジュアルサイエンス

Shimizu, T.<sup>\*1</sup>, Ochiai, H.<sup>\*2</sup>, Asell, F.<sup>\*2</sup>, Yokono, Y.<sup>\*2</sup>, Kikuchi, Y.<sup>\*2</sup>, Nitta, M.<sup>\*2</sup>, Hama, Y.<sup>\*2</sup>, Yamaguchi, S.<sup>\*1</sup>, Hashimoto, M.<sup>\*1\*2</sup>, Taki, K.<sup>\*3</sup>, Nakata, K., Aida, Y.<sup>\*1\*2</sup>, Ohashi, A.<sup>\*1\*2</sup>, Ozawa, N.<sup>\*1\*2</sup> : **Bioinformatics Research on Inter-racial Difference in Drug Metabolism II. Analysis on Relationship between Enzyme Activities of CYP2D6 and CYP2C19 and their Relevant Genotypes.**

*Drug Metabol. Pharmacokin.*, **18** (1), 71-78 (2003)

The enzyme activities of CYP2D6 and CYP2C19 show a genetic polymorphism, and the frequencies of poor metabolizers (PMs) on these enzymes depends on races. We have analyzed frequencies of mutant alleles and PMs based on the published data in previous study (Shimizu et al. 2003). In the present study, the correlation between genotypes and drug-metabolizing enzyme activities was investigated. The result showed that enzyme activities varied according to the genotypes of subjects even in the same race. On the other hand, if subjects had the same genotypes, almost no racial differences were observed in drug-metabolizing enzyme activities. From these results, it was supposed that the racial differences in activities of these enzymes could be explained by the differences in distribution of genotypes. It would be possible to explain the racial differences in drug-metabolizing enzyme activities based on the differences on individual pharmacogenetic background information, not merely by comparison of frameworks such as races and nations.

Keywords: enzyme activities, inter-racial difference, poor metabolizer, genetic polymorphism

\*1 ファルマシア株式会社

\*2 早稲田大学理工学総合研究センター

\*3 日本ビジュアルサイエンス

Yoshitani Takashi, Hitoshi Yagi<sup>\*1</sup>, Nobuo Inotsume<sup>\*1</sup> and Masato Yasuhara<sup>\*1</sup> : **Effect of experimental renal failure on the pharmacokinetics of losartan in rats**

*Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1077-1083 (2002)

The purpose of this investigation was to determine whether the pharmacokinetics of the angiotensin II receptor antagonist losartan is altered in renal failure. Male Wistar rats were pretreated with uranyl nitrate or subjected to bilateral ureteral ligation to produce acute renal failure (ARF). Saline-injected and sham-operated rats, respectively, served as controls. Uranyl nitrate-treated rats showed significantly higher serum concentrations of losartan after oral administration and the area under the serum concentration-time curve (AUC 0-24) of losartan increased about 3-fold compared to control rats. The systemic clearance of losartan significantly decreased from  $410 \pm 254$  mL/hr/kg in control to  $177 \pm 112$  mL/hr/kg in uranyl nitrate-treated rats. In order to investigate the mechanisms of reduced clearance of losartan associated with ARF, a hepatic microsome fraction was prepared from normal and ARF rats. No significant difference was found in the metabolism of losartan by hepatic microsomes prepared from ARF and control rats. In addition, the metabolic activity of microsomes was examined in the presence of uremic rat serum. The unbound clearance of losartan and the unbound clearance associated with the formation of EXP3174 in the presence of uremic serum were significantly lower than those in the presence of control serum. Furthermore, the metabolism of losartan was inhibited by indoxyl sulfate, a uremic toxin, in an uncompetitive manner. These results suggest that ARF is associated with reduced clearance of losartan due to the inhibition of hepatic metabolism by accumulated uremic toxin(s).

Keywords: losartan, renal failure, pharmacokinetics

\*1 Department of Hospital Pharmacy, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Koyano Satoru, Kurose Kouichi, Ozawa Shogo, Saeki Mayumi, Nakajima Yukiko, Hasegawa Ryuichi, Kazuo Komamura<sup>\*1</sup>, Kazuyuki Ueno<sup>\*1</sup>, Shiro Kamakura<sup>\*1</sup>, Toshiharu Nakajima<sup>\*2</sup>, Hirohisa Saito<sup>\*2</sup>, Hideo Kimura<sup>\*3</sup>, Yu-ichi Goto<sup>\*3</sup>, Osamu Saitoh<sup>\*3</sup>, Masaaki Katoh<sup>\*3</sup>, Teiichi Ohnuma<sup>\*3</sup>, Mitsuru Kawai<sup>\*3</sup>, Kenji Sugai<sup>\*3</sup>, Taisuke Ohtsuki<sup>\*3</sup>, Chieko Suzuki<sup>\*3</sup>, Narihiro Minami<sup>\*3</sup>, Saito Yoshiro, and Sawada Jun-ichi : **Eleven novel single nucleotide polymorphisms in the NR1I2 (PXR) gene, four of which induce non-synonymous amino acid alterations**

*Drug Metab. Pharmacokin.*, **17**, 561-565 (2002)

Eleven novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in the NR1I2 (PXR/SXR) gene from 205 Japanese subjects. The detected SNPs were as follows: (1) SNP, MPJ6\_1I2001; (2) SNP, MPJ6\_1I2004; (3) SNP,

MPJ6\_1I2007; (4) SNP, MPJ6\_1I2008; (5) SNP, MPJ6\_1I2010; (6) SNP, MPJ6\_1I2011; (7) SNP, MPJ6\_1I2013; (8) SNP, MPJ6\_1I2017; (9) SNP, MPJ6\_1I2018; (10) SNP, MPJ6\_1I2019; (11) SNP, MPJ6\_1I2021.

The frequencies were 0.0293 for MPJ6\_1I2021, 0.0073 for MPJ6\_1I2011, and 0.0024 for the other 9 SNPs. All SNPs were found as heterozygous. Among these SNPs, MPJ6\_1I2007, MPJ6\_1I2010, MPJ6\_1I2017 and MPJ6\_1I2019 induce non-synonymous amino acid alterations (R98C, R148Q, R381W and I403V, respectively, in PARI).

Key words: NR1I2 (PXR/SXR), novel SNP, amino acid alteration

\*<sup>1</sup> National Cardiovascular Center, Japan

\*<sup>2</sup> National Center for Child Health and Development, Japan

\*<sup>3</sup> National Center for Neurology and Psychiatry, Japan

Koizumi M, Nishimura N<sup>\*1</sup>, Enami T<sup>\*1</sup>, Sunaga M<sup>\*2</sup>, Horikawa H<sup>\*2</sup>, Kamata E, Hasegawa R : **Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats**

*J. Toxicol. Sci.*, 27, 411-421 (2002)

The repeated dose toxicity of 3-aminophenol was examined by oral administration in newborn and young rats and the susceptibility of newborn rats was analyzed in terms of no observed adverse effect level (NOAEL) and the unequivocally toxic level. In the 18-day newborn rat study starting at day 4 after birth, tremor and depression of body weight gain were observed as well as hypertrophy of thyroid follicular epithelial cells and increases of relative liver and kidney weights in 240 mg/kg. An increase of relative liver weight in males and a decrease of blood sugar in females without any histopathological changes at 80 mg/kg were considered not to be adverse effects. No chemical-related changes were observed in 24 mg/kg. Abnormalities of external development and reflex ontogeny in the newborn were not observed. In the 28-day study starting at 5 weeks of age, depression of body weight gain, tremor, anemia, liver, kidney and thyroid toxicity were observed at 720 mg/kg. Although a slight pigmentation in renal proximal tubular epithelium was observed in females at 240 mg/kg, this change at 240 mg/kg was not considered to be adverse effect because of no changes on the related toxicological parameters. It was concluded that NOAEL was 80 mg/kg/day in newborn rats and 240 mg/kg/day in young rats, and the unequivocally toxic level was 240 mg/kg/day in newborn rats and 720 mg/kg/day in young rats. Based on these two endpoints, the susceptibility of the newborn rats to this chemical was approx. 3 times higher than that of young rats, in consistence with our previous analysis of two chemicals, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol.

Keywords: 3-aminophenol, newborn toxicity, infant susceptibility

\*<sup>1</sup> Bozo Research Center Inc., Gotemba Laboratory

\*<sup>2</sup> Safety Research Institute for Chemical Compounds Co.

Koizumi M, Noda A<sup>\*1</sup>, Ito Y<sup>\*1</sup>, Furukawa M<sup>\*2</sup>, Fujii M<sup>\*2</sup>, Kamata E, Ema M, Hasegawa R : **Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol**

*J. Toxicol. Sci.*, 28, 59-70 (2003)

To determine susceptibility of infants to 3-methylphenol, a repeated dose toxicity study was conducted with oral administration to newborn and young rats. In a 18-day newborn study from postnatal days 4 to 21 at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, various clinical signs including deep respiration, hypersensitivity at handling and tremors under contact stimulus, and depressed body weight gain were observed at 300 mg/kg. At 100 mg/kg, hypersensitivity and tremors were also noted in a small number of males only on single days during the dosing period. No adverse effects were observed in the 30 mg/kg group. There were no abnormalities of physical development including sexual maturation and reflex ontogeny. The no observed adverse effect level (NOAEL) for newborn rats was considered to be 30 mg/kg/day and the unequivocally toxic level 300 mg/kg/day. In a 28-day study starting at 5 weeks of age, clinical signs and depression of body weight gain, as observed in the newborn rats, appeared in both sexes at 1000 mg/kg but not 300 mg/kg. The NOAEL and the unequivocally toxic level were 300 mg/kg/day and 1,000 mg/kg/day, respectively. From these results, newborn rats were concluded to be 3 to 10 times more susceptible to 3-methylphenol than young rats. However, the realistic no adverse effect dose for the newborn must be slightly lower than 100 mg/kg/day, at which the toxicity incidence was very low, rather than 30 mg/kg/day. Based on this speculation and the equal toxicity at unequivocally toxic levels, the differences in the susceptibility to 3-methylphenol could be concluded to be 3 to 4 times. This is consistent with the results of our previous comparative studies on 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol and 3-aminophenol, which showed 2 to 4 times differences in the susceptibility between newborn and young rats.

Keywords: 3-methylphenol, newborn toxicity, infant susceptibility

\*<sup>1</sup> Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

\*<sup>2</sup> Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.

Matsunaga, N.<sup>\*1</sup>, Kanno, J. and Yoshimura, I.<sup>\*2</sup> : **A statistical method for judging synergism: application to an endocrine disruptor animal experiment.**

*Environmetrics*, 14, 213-22 (2003)

This article proposes a statistical method for judging whether or not the combined action of chemicals is synergistic, being focused on the case in which two or

more endocrine disruptors are made to act simultaneously. After defining synergism, the synergistic relation of two chemicals is formulated for a higher response than that expected under an exchangeable relation between them. Using this formulation as a basis, we then rationalize the triangular design for an animal experiment in which all dose settings are controlled within a triangle domain that prescribes the sum of doses of simultaneously applied chemicals less than a certain level. In addition, a statistical test is proposed for judging the synergism among chemicals used in animal experiments, i.e. the test evaluates the discrepancy between the observed mean response from simultaneous administration groups of chemicals and an estimated response under the null hypothesis of zero interaction based on data from single administration groups. Finally, test performance is examined using a simulation study and a case study - the rodent uterotrophic assay. The simulation study revealed that the test is not superior in power to the standard analysis of variance test based on a linear model with interaction term, yet robust in the sense that type I errors under variance heterogeneity were better controlled using Welch correction than the analysis of variance test. The application of the proposed statistical test to an animal experiment is considered acceptable based on results.

Keywords: animal experiment, endocrine disruptor, design of experiment

\*<sup>1</sup> 協和発酵工業株式会社

\*<sup>2</sup> 東京理科大学

Kanno, J., Kato, H. \*<sup>1</sup>, Iwata, T. \*<sup>1</sup>, and Inoue T. :

**Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies.**

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3883-3885 (2002)

Hormonally active chemicals (HACs) that are capable of inducing adverse effects on wildlife as well as human beings are featured as "endocrine disruptors". Various animal studies conducted to clarify the characteristics of HACs, including the uterotrophic assay, are sufficiently sensitive to detect the effect of 17-beta-estradiol in micrograms per kilogram of body weight or lower. In such systems, a trace amount of HACs in the dietary pellets may interfere with the test results and thus can be a serious problem for the low-dose issue, which is now a major topic in the field of endocrine disruptor research. Here, the significance of the hormonal effects of phytoestrogen components in the NIH-07 diet is confirmed and a NIH-07-based open formula "phytoestrogen-low diet" (PLD) is proposed, which effectively reduces uterine weight as well as the uterine luminal epithelial labeling index in ovariectomized rats.

Keywords: phytoestrogen, genistin, daidzein

\*<sup>1</sup> 日本バイオリサーチセンター

Okayasu, I. \*<sup>1</sup>, Hana, K. \*<sup>1</sup>, Yoshida, T. \*<sup>1</sup>, Mikami, T. \*<sup>1</sup>, Kanno, J. and Fujiwara, M. \*<sup>2</sup> : **Significant increase of colonic mutated crypts in ulcerative colitis correlatively with duration of illness.**

*Cancer Res.*, **62**, 2236-8 (2002)

Mild periodic acid-Schiff (mPAS) staining can discriminate non-O-acetylated (mPAS positive) from O-acetylated (mPAS negative) epithelial sialoglycoproteins in human colonic mucosa, giving three haplotypes of expression of a single polymorphic autosomal gene (oat). Increase in mPAS-positive crypts in heterozygotes is an indication of mutations, and wholly mPAS-positive (stem cell mutated) crypts and clusters of two or more mPAS-positive crypts in heterozygotes of ulcerative colitis ( $P < 0.0001$ ) were found to be increased significantly, compared with controls. The observed correlation with ulcerative colitis duration ( $r = 0.892$  and  $0.853$ , respectively) supports a chronic inflammation-carcinoma sequence.

Keywords: ulcerative colitis, colonic mutated crypt

\*<sup>1</sup> 北里大学医学部

\*<sup>2</sup> 日本赤十字医療センター

Utsuyama, M. \*<sup>1</sup>, Kanno, J., Inoue, T., Hirokawa, K. \*<sup>1</sup> : **Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice.**

*Toxicol Lett*, **135**, 145-53 (2002)

High amounts of estrogens are known to suppress immune functions in both human and animal models. Our supportive data is that the immune functions were activated by gonadectomy in young adults mice. However, recent reports indicate that estrogen is required for the normal development of thymus. These findings lead us to an assumption that sex hormone status induces much more complex effects on immune functions depending on the host age/sex and dose ranges. Here, low doses of DES (diet containing 0.4 or 4.0 microg/kg diet) were given for 2 months to young adult and aged C57BL/6 mice, and thymic and splenic parameters including flow-cytometric subpopulation analyses, mitogenic responses and NK activity were monitored. This study revealed that the low dose effects of exogenous estrogen are strongly dependent on the age and sex of the recipients and many parameters show non-monotonous dose response effect. In conclusion, effect of exogenous estrogens on immune functions should be assessed for all age and sex, and in expectation of non-monotonous dose-response relationship.

Keywords: Thymus, immune functions mouse, Flow cytometry

\*<sup>1</sup> 東京医科歯科大学

Okayasu, I. \*<sup>1</sup>, Yamada, M. \*<sup>1</sup>, Mikami, T. \*<sup>1</sup>, Yoshida, T. \*<sup>1</sup>, Kanno, J and Ohkusa, T. \* : **Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model.**

*J. Gastroenterol Hepatol.*, **17**, 1078-83 (2002)

As an important mechanism underlying the increased risk of colorectal carcinoma development in patients with long-standing ulcerative colitis, promotion as a result of the regenerative process has been proposed. In the present study, a dysplasia-carcinoma sequence in a novel repeated colitis model in mice is documented. **METHODS:** Repeated colitis was induced by nine administration cycles of 3% dextran sulfate sodium (DSS; molecular weight, 54 000): each administration cycle comprised 3% DSS for 7 days followed by distilled water for the subsequent 14 days, to give conditions similar to the clinically observed active and remission phases in humans. **RESULTS:** Multiple colorectal tumors (nine low- and four high-grade dysplasias and two carcinomas) developed in 25 mice. These neoplastic lesions consisted of tubular structures, presenting as various types of elevated, flat and depressed tumor, similar to those in ulcerative colitis patients. A time-course study with assessment of the severity of colitis and in vivo bromodeoxyuridine uptake during a single 3% DSS administration cycle revealed a high level of regenerative activity in the colitis-affected mucosal epithelia.

**Keywords:** ulcerative colitis, Dextran sulfate, colon carcinoma

\*1 北里大学医学部

\*2 自治医科大学

Okada, Y.\*<sup>1</sup>, Osada, M.\*<sup>2</sup>, Kurata, S.\*<sup>1</sup>, Sato, S.\*<sup>1</sup>, Aisaki, K., Kageyama, Y.\*<sup>1</sup>, Kihara, K.\*<sup>3</sup>, Ikawa, Y.\*<sup>3</sup> and Katoh, I.\*<sup>3</sup> : **p53 gene family p51(p63)-encoded, secondary transactivator p51B(TAp63alpha) occurs without forming an immunoprecipitable complex with MDM2, but responds to genotoxic stress by accumulation.** *Exp. Cell Res.*, **276**, 194-200 (2002)

When cells were exposed to genotoxic stress by UV-C irradiation or by DNA-damaging drugs, including actinomycin D, bleomycin, and etoposide, the protein accumulated intracellularly without an increase in its mRNA. Unlike p53 and p51A(TAp63gamma), however, p51B(TAp63alpha) did not activate p21(waf1) gene expression, nor did it induce apoptosis or hemoglobin production. Without an interaction with MDM2, p51B(TAp63alpha) may be degraded by proteasome under normal cellular circumstances but stabilized under genotoxic stress by a posttranscriptional mechanism which might involve Ser/Thr phosphorylation.

**Keyword:** p51B(TAp63alpha), genotoxic stress, MDM2

\*1 Tokyo Medical and Dental University

\*2 The Johns Hopkins University School of Medicine

\*3 Ikawa Laboratory, RIKEN, The Institute of Physical and Chemical Research

関田清司, 梅村隆志, 齊藤 実, 小川幸男, 上野克典, 金子豊蔵, 内田雄幸, 松島裕子, 川崎 靖, 井上

達 : **F344 ラットによるクーロー色素の90日間反復混餌投与毒性試験**

食衛誌, **43**, 148-154 (2002)

食品添加物クーロー色素 (色価30, プロピレングリコール, 塩化カリウム, 塩素, カリウム及びナトリウムをそれぞれ79.9, 5.8, 0.8, 1.62及び0.06%含有) の0, 0.5, 1.5及び5.0%添加飼料を雌雄のラットに90日間投与する毒性試験を行った。その結果, 投与に関連すると思われる変化は認められなかった。5.0%添加飼料の投与から算出した平均クーロー色素摂取量, 雄で2,993 mg/kg/day, 雌で3,376 mg/kg/dayは, 毒性変化が認められない用量 (NOAEL) であると結論した。また, 高濃度の添加飼料の投与で毒性変化が認められなかったことより, クーロー色素に顕著な一般毒性は認められないものと考察された。

**Keywords:** kooroo color, 90-day toxicity study, food color

Mizukawa, Y., Nishizawa, T.\*<sup>1</sup>, Nagao, T., Kitamura, K.\*<sup>2</sup> and Urushidani, T. : **Cellular Distribution of Parchorin, a Chloride Intracellular Channel-Related Protein, in Various Tissues.**

*Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, C786-C795 (2002)

Parchorin, a new chloride intracellular channel family member, preferentially resides in the epithelium of the ducts of exocrine glands. In the trachea and lung, parchorin was found in the airway epithelium and type II alveolar cells. In the kidney, parchorin was distributed from the thick ascending limb to the distal convoluted tubule. In the eye, both pigment and nonpigment epithelia of the ciliary body were positive. Parchorin was also present in the cochlea and semicircular canal. The amount of parchorin in the gastric mucosa increased after weaning. In the mammary gland, parchorin expression was greater in a lactating rabbit compared with a pregnant rabbit. The cellular distribution and changes in expression indicate that parchorin plays an important role, possibly in chloride transport, in the cells that create an ion gradient for water movement.

**Keywords:** chloride channel, duct, immunohistochemistry

\*1 Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

\*2 School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Arakawa, Y.\*<sup>1</sup>, Nishijima, C.\*<sup>1</sup>, Shimizu, N.\*<sup>1</sup>, and Urushidani, T. : **Survival-promoting activity of nimodipine and nifedipine in rat motoneurons: implications of an intrinsic calcium toxicity in motoneurons.**

*J. Neurochem.*, **83**, 150-156 (2002)

L-type calcium channel antagonists, nimodipine and nifedipine, were tested for effects on the survival of purified rat motoneurons in culture. They showed significant activity, with maximum survival at 30 μM after 3 days in culture as high as 75%, which was comparable to the maximum effect obtained with brain-derived

neurotrophic factor, a potent neurotrophic factor for rat motoneurons. It was also found that depolarizing conditions with a high potassium concentration (30 mM) were toxic to motoneurons. This toxicity was blocked by co-treatment with nimodipine. These results implicate a pre-existing calcium burden through calcium channels in motoneurons; they may offer further insights into understanding the selective death of motoneurons and have therapeutic implications in amyotrophic lateral sclerosis.

**Keywords:** amyotrophic lateral sclerosis, L-type calcium channel motoneuron

\* Branch Hospital, University of Tokyo

Shanks, RA. \*<sup>1</sup>, Larocca, MC. \*<sup>1</sup>, Berryman, M. \*<sup>2</sup>, Edwards, JC. \*<sup>3</sup>, Urushidani, T., Navarre, J. \*<sup>1</sup> and Goldenring, JR. \*<sup>4</sup> : **AKAP350 at the Golgi apparatus.**

**II. Association of AKAP350 with a novel chloride intracellular channel (CLIC) family member.**

*J. Biol. Chem.*, **277**, 40973-40980 (2002)

Using a yeast two-hybrid screen with AKAP350, we obtained a full-length clone of CLIC1. All CLIC family members were able to bind AKAP350 through the conserved CLIC carboxyl termini. Antibodies against p64, immunoprecipitated AKAP350 from HCA-7 cell extracts. Antibodies against CLIC proteins recognized five CLIC species including a novel 46-kDa CLIC protein. We isolated the human homologue of p64, CLIC5B, from HCA-7 cell cDNA. A splice variant of CLIC5 corresponds to the molecular mass of the 46-kDa CLIC immunoreactive protein in HCA-7 cells. Antibodies against CLIC5B colocalized with AKAP350 at the Golgi apparatus. The results suggest that AKAP350 associates with CLIC proteins and specifically that CLIC5B interacts with AKAP350 at the Golgi apparatus in HCA-7 cells.

**Keywords:** CLIC, Golgi apparatus, AKAP350

\*<sup>1</sup> Medical College of Georgia

\*<sup>2</sup> Ohio University College of Osteopathic Medicine

\*<sup>3</sup> St. Louis Veterans Affairs Medical Center

\*<sup>4</sup> Vanderbilt University School of Medicine

Matsukawa, J. \*, Tashiro, K. \*, Nagao, T. and Urushidani, T. : **Role of small GTP-binding proteins and cytoskeleton in gastric acid secretion.**

*Inflammopharmacol.*, **10**, 333-341 (2002)

When parietal cell is stimulated, the tubulovesicles containing H,K-ATPase, the essential proton pump, fused with the apical membrane forming microvilli. In this procedure, small GTP binding proteins, Rab11, ARF, and Rho play important roles. Rab11 and ARF are considered to regulate the intracellular vesicular transport and fusion events, whereas Rho appears to conduct inhibitory signal via the regulation of actin cytoskeleton. The nature of F-actin is different between basolateral and apical membrane sites. The former plays a role to connect Ca<sup>2+</sup>

stores to plasma membrane making effective coupling between muscarinic receptor and IP3 receptor. The microfilaments supporting apical membrane appear to be negatively regulated by Rho/Rho-kinase in contrast to other secretory cells. For the elucidation of intracellular membrane traffic, which is the main issue of cell biology today, parietal cell is a good model for studying this mechanism.

**Keywords:** Arf, Rho, cytoskeleton

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

Kimura, N. \*<sup>1</sup>, Takizawa, M. \*<sup>2</sup>, Okita, K. \*<sup>2</sup>, Natori, O. \*<sup>2</sup>, Igarashi, K., Ueno, M. \*<sup>2</sup>, Nakashima, K. \*<sup>2</sup>, Nobuhisa, I. \*<sup>2</sup> and Taga, T. \*<sup>2</sup> : **Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse fetal haematopoietic tissues.**

*Genes Cells*, **7**, 435-446 (2002)

**BACKGROUND:** The precise mechanism governing the generation of haematopoietic stem cells still remains to be understood, partly because the molecules required for early haematopoiesis have not fully been identified. **RESULTS:** We have identified a novel gene expressed in embryonic haematopoietic tissues, designated ELYS (for embryonic large molecule derived from yolk sac), which has no significant homology with any other known molecules. Based on the cDNA sequence, mouse ELYS protein is composed of 2243 amino acid residues and contains an AT-hook DNA-binding domain, eight nuclear localization signals (NLSs) at the C-terminal region, three nuclear export signals (NESs) and two WD repeats at the N-terminal region. ELYS has a potential to shuttle between the cytoplasm and nucleus. When in the nucleus, ELYS is present in the nuclear matrix. Fusions of the yeast GAL4 DNA-binding domain and various ELYS mutants reveal the presence of transcriptional activation and inhibitory domains. The ELYS gene is predominantly expressed in embryonic haematopoietic tissues, i.e. foetal liver, spleen, and thymus, whereas the expression is down-regulated in the adult. In the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region of an 11.5 dpc mouse embryo, ELYS is expressed in the endothelium lining the dorsal aorta. In the adult bone marrow, ELYS is notably expressed in the Lin-/c-kit+/Sca-1+ population. **CONCLUSIONS:** We have reported the isolation and characterization of a novel molecule, ELYS. ELYS seems to be a nuclear transcription factor associated with both early and mature haematopoietic events.

**Keywords:** haematopoietic cell, stem cell

\*<sup>1</sup> Chugai Pharmaceutical Co., Ltd

\*<sup>2</sup> University of Kumamoto

Katoh, C. \*<sup>1</sup>, Kitajima, S., Saga, Y. \*<sup>2</sup>, Kanno, J., Horii, I. \*<sup>1</sup> and Inoue, T. : **Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of**

**testicular toxicity using cyclophosphamide- and ethinylestradiol-treated rats.**

*J. Toxicol Sci.*, 27 (2), 87-96 (2002)

In the drug discovery process, effects to the human spermatogenesis must be fully evaluated before the first human trial. To estimate testicular toxicity, histopathological evaluation has been recommended in addition to the traditional mating procedure. However, it is laborious and time-consuming. Flow cytometric analysis (FCM) has also been applied to estimate testicular toxicity because of its speed, simplicity, and the objectivity of the data. Using cyclophosphamide (CP)- and ethinylestradiol (EE)-treated rat testis, we attempted to validate our dual-parameter, DNA ploidy and cell-size FCM, in a high-throughput toxicity study. Our results demonstrate that this method is a very useful and powerful tool to assess testicular toxicity, especially in high-throughput toxicological studies.

**Keywords:** Testis, Toxicity, Cell-sorter

\*<sup>1</sup> 日本ロシユ株式会社

\*<sup>2</sup> 国立遺伝学研究所

**Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kitajima, S., Inoue, T., Takeda, H.\*<sup>1</sup> and Saga, Y.\*<sup>2</sup> : Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis**

*Development*, 129, 2473-2481 (2002)

マウス Mesp2 遺伝子座にゼブラフィッシュ mesp2 をノックインしたマウスを作製し、体節形成不全が救済されることを明らかにした。また、体節の最初の境界形成は、体節の前後極性が確立していなくても生じることを見出した。

**Keywords:** somitogenesis, segmentation, Mesp2

\*<sup>1</sup> Dept. of Biological Sciences, Univ. of Tokyo

\*<sup>2</sup> National Inst. of Genetics

**Rhee, J.\* , Takahashi, Y., Saga, Y., Wilson-Rawls, J.\* , Rawls, A.\* : The protocadherin papc is involved in the organization of the epithelium along the segmental border during mouse somitogenesis**

*Dev Biol*, 254, 248-261 (2002)

プロトカドヘリンファミリーに属する PAPC の発現が、分子時計と関連していること、Mesp2 の下流に位置することを見出した。また、マウス胚体節形成において上皮細胞の正常な配列に役割を果たすことを明らかにした。

**Keywords:** somitogenesis, papc, epithelialization

\* Dept. of Biology, University of Arizona

浅野和信\*, 小野 敦, 橋本せつ子\*, 井上 達, 菅野純: 表面プラズモンセンサーを用いる内分泌攪乱化学物質スクリーニング法

分析化学, 51, 389-396 (2002)

ホルモン受容体作用による内分泌かく乱物質のスクリーニング手法としてエストロゲン受容体の遺伝子転写メ

カニズムを応用した新規無細胞 HTS 系を構築した。

**Keywords:** endocrine disruptor, biosensor, estrogen receptor  
\* ビアコア株式会社

**Ono, A., Asano, K.\* , Hashimoto, S.\* , Inoue, T. and Kanno, J. : Rapid screening method of endocrine disrupting chemicals using surface plasmon resonance sensor**

*J. Toxicol Sci.*, 27, 347 (2002)

In order to assess the estrogenic/antiestrogenic potential of variety of chemicals, a rapid and reliable assay for the primary screening is required. We have developed a cell-free screening assay based on the mechanism of action of the hormone receptor by using Biacore. The results obtained by our assay were consistent with those obtained by the cell based assay. Additionally, our results suggested that the kinetic properties of the ER-ERE interaction might differ between agonists and antagonist. In conclusion, this study demonstrated that this Biacore assay system could be utilized as a rapid and quantitative screening for estrogenic chemicals.

**Keywords:** endocrine disruptor, biosensor, estrogen receptor  
\* Biacore K.K.

**Yoshida, K.\* , Aizawa, S.\* , Watanabe, K.\* , Hirabayashi, Y. and Inoue, T. : Stem-cell leukemia: p53 deficiency mediated suppression of leukemic differentiation in C3H/He myeloid leukemia**

*Leuk Res*, 26, 1085-92 (2002)

C3H/He mice produce myeloid leukemias after whole body irradiation of 1-3Gy as compared with non-irradiated controls that produce fewer than 1% of leukemia [Radiation Research 127 (1991) 146]. Thus, p53-deficient C57BL/6 strain, a malignant lymphoma prone, was crossed back into C3H/He strain. Lethally irradiated wild-type mice to which p53-deficient bone marrow cells were transplanted (transplantation assay) showed dramatic change in the propensity of leukemia of myeloid lineages, the cells lacking CD3, Thy1.2, sIgM, B220, Mac-1, Gr-1, but being positive for c-Kit and CD44. Furthermore, transplanted mice subjected to 3Gy irradiation gave rise to a faster development of leukemia and a higher frequency of double-lineage leukemias than the non-irradiated control.

**Keywords:** p53-deficient hemopoietic stem cells, Radiation induced myelogenous leukemia, stem cell differentiation  
\* NIRS

**Hirabayashi, Y., Matsuda, M., Aizawa, S.\* , Kodama, Y., Kanno, J. and Inoue, T. : Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential**

*Exp Biol Med (Maywood)*, 227, 474-9 (2002)

Thirty-five years ago, Siminovitch et al. (Siminovitch L, Till JE, McCulloch EA. *J Cell Com Physiol* 64:23-32, 1964),

using serially transplanted mouse spleens at 14-day intervals, observed a markedly progressive decline in the proliferative capacity of bone marrow (BM) cells, with the loss of clonogenicity by the fourth transplant generation. Using the same protocol, we assessed the proliferative capacity of p53-deficient mouse BM cells transplanted serially at the same 14-day intervals into lethally irradiated mice, which was a useful tool for understanding the characteristics of hemopoietic stem cells lacking solely the p53 gene function. BM cells from p53-deficient homozygous (p53(-/-)), p53-heterozygous (p53(+/-)), and wild-type (p53(+/+)) C57BL/6 mice were transplanted into lethally irradiated C57BL/6 recipients. Fourteen days later, the repopulated spleens were harvested, and 10(7) cells were retransplanted into secondary recipients. Serial transplantation was continued at 14-day intervals until hemopoietic repopulation failure. The number of heterozygous and homozygous p53-deficient spleen cells increased logarithmically up to the fourth and fifth passages, respectively, whereas wild-type spleen cells ceased to proliferate by the third passage. The number of macroscopic spleen colonies increased logarithmically until the third passage in recipients of heterozygous and homozygous p53-deficient cells, but ceased to grow by the second passage in recipients of wild-type cells. The numbers of heterozygous and homozygous p53-deficient colony forming units in spleen (CFUs-S) remained stable during the first four transplant generations, whereas that of wild-type CFUs-S decreased progressively from the first transplant generation onward. The clonogenicity of p53-deficient cells was lost when the number of CFUs-S per spleen decreased to below 10. This suggests that one out of 10 CFUs-S might be long-term repopulating cells (LTRCs), and that p53-deficient LTRCs may proliferate more rapidly than wild-type LTRCs. Longer passages that were possible in the p53-deficient groups were considered to be due to the faster cell cycle of the p53-deficient hemopoietic progenitor cells, as determined by bromodeoxyuridine incorporation with purging by UV light exposure, followed by hemopoietic colony assay (BUUV assay).

Keywords: p53-deficient hemopoietic stem cells, Serial bone marrow transplant, BUUV assay

\* Inst. of Dev. Biol, Kumamoto Univ.

Mitsui, A.\*<sup>1</sup>, Hamuro, J.\*<sup>1</sup>, Nakamura, H.\*<sup>2</sup>, Kondo, N.\*<sup>2</sup>, Hirabayashi, Y., Ishizaki-Koizumi, S.\*<sup>2</sup> and Hirakawa, T.\*<sup>2</sup> : **Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span** *Antioxid Redox Signal*, **4**, 693-6 (2002)

Transgenic (Tg) mice overexpressing human thioredoxin (TRX), a small redox-active protein, were produced to investigate the role of the protein in a variety of stresses. Bone marrow cells from TRX-Tg mice were more resistant to ultraviolet C-induced cytocide compared with those

from wild type (WT) C57BL/6 mice. TRX-Tg mice exhibited extended median and maximum life spans compared with WT mice. Telomerase activity in spleen tissues in TRX-Tg mice was higher than that in WT mice. These results suggest that overexpression of TRX results in resistance against oxidative stress and a possible extension of life span without apparent abnormality in mammals.

Keywords: thioredoxin, transgenic mice, oxidative stress

\*<sup>1</sup> Ajinomoto Co., Inc.,

\*<sup>2</sup> Institute for Virus Research, Kyoto University

Tanaka, K.\*<sup>1</sup>, Watanabe, K.\*<sup>1</sup>, Mori, M.\*<sup>1</sup>, Kamisaku, H.\*<sup>1</sup>, Tsuji, H.\*<sup>1</sup>, Hirabayashi, Y., Inoue, T., Yoshida, K.\*<sup>1</sup> and Aizawa, S. : **Cytogenetic and cellular events during radiation-induced thymic lymphomagenesis in the p53 heterozygous (+/-) B10 mouse**

*Int J Radiat Biol*, **78**, 165-72 (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: p53-deficient hemopoietic stem cells, Radiation induced myelogenous leukemia, stem cell differentiation, C3H/He strain

\* NIRS

Yoon, B.I., Hirabayashi, Y., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kim, D.Y.\*<sup>1</sup>, Fujii-Kuriyama, Y.\*<sup>2</sup> and Inoue, T. : **Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity**

*Toxicol Sci*, **70**, 150-6 (2002)

Benzene can induce hematotoxicity and leukemia in humans and mice. Since a review of the literature shows

that the CYP2E1 knockout mouse is not known to possess any benzene toxicity, the metabolism of benzene by CYP2E1 in the liver is regarded to be prerequisite for its cytotoxicity and genotoxicity, although the mechanism is not fully understood yet. Because it was found some years ago that benzene was also a substrate for CYP1A1, we investigated the involvement of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in benzene hematotoxicity using AhR wild-type (AhR(+/+)), heterozygous (AhR(+/-)), and homozygous (AhR(-/-)) male mice. Interestingly, following a 2-week inhalation of 300 ppm benzene (a potent dose for leukemogenicity), no hematotoxicity was induced in AhR(-/-) mice. Further, there were no changes in cellularity of peripheral blood and bone marrow (BM), nor in levels of granulocyte-macrophage colony-forming units in BM. This lack of hematotoxicity was associated with the lack of p21 overexpression, which was regularly seen in the wild-type mice following benzene inhalation. Combined treatment with two major benzene metabolites, phenol and hydroquinone, induced hemopoietic toxicity, although it was not known whether this happened due to a surprising lack of expression of CYP2E1 by AhR knockout, or due to a lack of other AhR-mediated CYP enzymes, including 1A1 (i.e., a possible alternative pathway of benzene metabolism). The former possibility, evaluated in the present study, failed to show a significant relationship between AhR and the expression of CYP2E1. Furthermore, a subsequent evaluation of AhR expression after benzene inhalation tended to show higher but less significant expression in the liver, and none in the BM, compared with sham control. Although this study failed to identify the more likely of the above-mentioned two possibilities, the study using AhR knockout mice on benzene inhalation presents the unique possibility that the benzene toxicity may be regulated by AhR signaling.

**Keywords:** Aryl hydrocarbon receptor, benzene, hematotoxicity

\*1 College of Vet Med, Seoul National Univ.

\*2 Dept of Chemistry, Tohoku Univ., Graduate School for Science

Kamikawa, Y. \*, Shibukawa A. \*, Uchida, K. \*, Sakuma, A. \*, Kubota, K. \*, Ohno, Y. : **Comparison of motor reactivity of the colonic muscularis mucosae isolated from human, guinea pig and rat in vitro.**

*Polish J. Pharmacol.*, **54**, 261-266 (2002)

ヒト、モルモット、及びラットの結腸より調製した粘膜縦走筋の平滑筋収縮薬の作用を検討した。ヒト由来標本はカルバコールにより持続的な収縮を示した。ヒト粘膜縦走筋に対する収縮の強さはneurokinin A, カルバコール, PGF2a, アセチルコリンの順であった。ヒスタミン, セロトニン, ブラジキンは収縮作用を示さなかった。一方、モルモットではヒスタミンも収縮作用を示した。ラットではneurokinin Aとブラジキニンによる収縮が強く現れ、カルバコール, アセチルコリン収縮は弱く、他

の薬剤によっては収縮しなかった。これらのことから結腸粘膜縦走筋の薬物反応性には大きな種差が有ることが判明した。

\*獨協医科大学

Baba, T. \*<sup>1</sup>, Touchi, A. \*<sup>1</sup>, Ito, K. \*<sup>2</sup>, Yamaguchi, Y. \*<sup>2</sup>, Yamazoe, Y. \*<sup>3</sup>, Ohno, Y., Sugiyama, Y. \*<sup>4</sup> : **Effects of serum albumin and liver cytosol on CYP2C9- and CYP3A4-mediated drug metabolism.**

*Drug Metabol. Pharmacokin.*, **17**, 522-531 (2003)

従来より薬物動態や酵素学に関する理論はいずれもフリーの薬物が酵素と相互作用を起こすことを前提に組み立てられている。一方、今回薬物の代謝キネティクスが細胞質液の添加により変化することを見いだした。即ち、CYP3A4によるterfenadineの代謝におけるフリー体でのKm, u値および2C9による代謝阻害のmiconazoleのフリー体でのKi, u値はいずれもラット可溶性分画の添加により小さくなった。ヒト血清アルブミンの添加によっても2C9によるdiclofenacやterfenadineの代謝の同Km, u値は小さくなった。3A4による代謝のketoconazoleによる阻害のKi, u値も小さくなった。一方、このような反応系への結合蛋白添加による代謝促進現象はトルブタミドでは認められなかった。今後、このような現象がin vivoでの代謝予測においてどのような意義があるか検討する予定である。

\*<sup>1</sup> 塩野義製薬

\*<sup>2</sup> 北里大学

\*<sup>3</sup> 東北大学

\*<sup>4</sup> 東京大学

Koizumi, S., Rosa, P. \*<sup>1</sup>, Willars, G.B. \*<sup>2</sup>, Challiss, R.A.J. \*<sup>2</sup>, Taverna, E. \*<sup>1</sup>, Francolini, M. \*<sup>1</sup>, Bootman, M.D. \*<sup>3</sup>, Lipp, P. \*<sup>3</sup>, Inoue, K., Roder, J. \*<sup>4</sup> and Jeromin, A. \*<sup>4</sup> :

**Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells.**

*J. Biol. Chem.* **277**, 30315-30324 (2002)

Neuronal calcium sensor-1 (NCS-1), or originally identified homologue frequenin, belongs to a superfamily of EF-hand calcium binding proteins. Although NCS-1 is thought to enhance synaptic efficacy or exocytosis mainly by activating ion channel function, the detail molecular basis for the enhancement is still a matter of debate. Here, mechanisms underlying the NCS-1-evoked enhancement of exocytosis were investigated using PC12 cells overexpressing NCS-1. NCS-1 was found to have a broad distribution in the cells being partially distributed in the cytosol and associated to vesicles and tubular-like structures. Biochemical and immunohistochemical studies indicated that NCS-1 partially colocalized with the light synaptic-vesicle marker synaptophysin. When stimulated with uridine 5'-triphosphate (UTP) or bradykinin, agonists to phospholipase C (PLC)-linked receptors, NCS-1 enhanced the agonist-mediated elementary and global Ca<sup>2+</sup> signaling and increased the levels of downstream signals of phosphatidylinositol 4-

kinase (PtdIns4K). NCS-1 enhanced the UTP-evoked exocytosis but not the depolarization-evoked  $Ca^{2+}$  responses or exocytosis, suggesting that the enhancement by NCS-1 should involve PLC-linked receptor-mediated signals rather than the  $Ca^{2+}$  channels or exocytotic machinery *per se*. Taken together NCS-1 enhances phosphoinositide turnover, resulting in enhancement of  $Ca^{2+}$  signaling and exocytosis. This is a novel regulatory mechanism of exocytosis that might involve the activation of PtdIns4K.

\*1 CNR-Cell. Mol. Pharmacol. Center

\*2 University of Leicester

\*3 The Babraham Institute

\*4 Mount Sinai Hospital

Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M. and Inoue, K. : **Neurone-to-astrocyte communication by endogenous ATP in mixed culture of rat hippocampal neurones and astrocytes.**

*Drug Development Research*, **59**, 88-94 (2003)

We demonstrate here that endogenous ATP could be an extracellular molecule for neurone-to-astrocyte communication in co-cultured rat hippocampal neurones and astrocytes. When co-cultured hippocampal neurones and astrocytes were depolarised electronically in the presence of glutamate-receptor antagonists, a transient elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  was observed in neurones, which was followed by a slowly initiated and small rise in  $[Ca^{2+}]_i$  in astrocytes. Apyrase or P2 receptor antagonists almost abolished the  $[Ca^{2+}]_i$  rises in astrocytes, suggesting that depolarisation-evoked ATP release from neurones should produce astrocytic  $[Ca^{2+}]_i$  elevation via P2 receptors.

Keywords: ATP, hippocampus, neuron-to-astrocyte communication

Koizumi, S., Saito, Y., Nakazawa, K., Nakajima, K. \*1, Sawada, J., Kohsaka, S. \*1, Illes, P. \*2 and Inoue, K. : **Spatial and temporal aspects of  $Ca^{2+}$  signaling mediated by P2Y receptors in cultured rat hippocampal astrocytes.**

*Life Sci.*, **72**, 431-442(2002)

ATP produces a variety of  $Ca^{2+}$  responses in astrocytes. To address the complex spatio-temporal  $Ca^{2+}$  signals, we analyzed ATP-evoked increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) in cultured rat hippocampal astrocytes using confocal  $Ca^{2+}$  imaging techniques. We found elementary  $Ca^{2+}$  release event "puffs" and  $Zn^{2+}$ -sensitive "capacitative  $Ca^{2+}$  entry", which were mediated by P2Y receptors. It should be noted that these  $Ca^{2+}$  signals and their modulation by  $Zn^{2+}$  could occur in the hippocampus *in situ* since both ATP and  $Zn^{2+}$  are rich in the hippocampus and could be released by excitatory stimulation.

Keywords: astrocytes, ATP,  $Ca^{2+}$

\*1 国立精神神経センター

\*2 University of Leipzig

井上和秀, 小泉修一: **細胞外 ATP を介したグリアーニューロン相互調節機構**

細胞工学, **22**, 397-401 (2003)

これまでのシナプス伝達,あるいは神経回路の研究はニューロン間の情報伝達に主眼がおかれてきた。しかし,各種グリア細胞の動的な機能が明らかになるにつれ,シナプス伝達機構の解明には,プレおよびポストシナプスニューロンの他に,アストロサイトやミクログリアを加えた,いわゆる tripartite synapse (三者間シナプス)という概念の導入が必要であることが分かってきた。ニューロン間,ニューロン-グリア間およびグリア間における情報伝達分子として ATP の役割を明らかにした。

Keywords: astrocytes, ATP, Neuron-to-glia communication

Nakazawa, K., Ojima, H., Ohno, Y. : **A highly conserved tryptophane residue indispensable for cloned neuronal P2X receptor activation**

*Neurosci. Lett.* **324**, 141-144 (2002)

The role of a tryptophane residue (Trp<sup>256</sup>) in the extracellular loop of a neuronal P2X receptor clone (P2X<sub>2</sub> receptor/channel) was investigated using site-directed mutagenesis and *Xenopus* oocyte expression. When Trp<sup>256</sup> was replaced with leucine, serine or phenylalanine (W256L, W256S or W256F), a current response to ATP mediated through P2X<sub>2</sub> receptor/channel was abolished. When replaced with tyrosine (W256Y), the response was not abolished, but a reduced current response to ATP was observed. The insertion of a tryptophane residue in W256L at positions close to the position 256 failed to recover the responsiveness to ATP. These results suggest that an amino acid residue with a large side chain including an aromatic ring (tryptophane or tyrosine) is necessary exactly at the position 256 for P2X<sub>2</sub> receptor/channel activation.

Keywords: P2X receptor, *Xenopus* oocyte, site-directed mutagenesis, amino acid side chain

Sato, K., Matsuki, N. \*, Ohno, Y., Nakazawa, K. : **Effects of 17 $\beta$ -estradiol and xenoestrogens on the neuronal survival in the organotypic hippocampal culture**

*Neuroendocrinology*, **76**, 223-234 (2002)

Xenoestrogens are man-made compounds that mimic the actions of estrogens through interactions with estrogen receptors (ERs). Although xenoestrogens have been received a great deal of attention as possible causes of brain disfunctions, little information concerning the effects of xenoestrogens on the central nervous system (CNS) is available. In this study, we investigated the effects of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and four xenoestrogens (17 $\beta$ -ethynylestradiol (EE), diethylstilbestrol (DES), p-nonylphenol (PNP) and bisphenol A (BPA)) on the neuronal survival using organotypic hippocampal slice culture. When the cultured hippocampal slices were exposed to glutamate (1 mM, 15 min), the CA1-selective

neuronal damage was induced. The pretreatment with E2 and the xenoestrogens (24 hr) selectively exacerbated the CA3 neuronal damage caused by glutamate. In spite of the marked difference of binding affinities to ERs, all of these compounds revealed the maximal effects at 1 nM. ER antagonists, tamoxifen and ICI 182,780 (ICI), did not affect the effect of E2 and the xenoestrogens, indicating that these effects are mediated through mechanisms other than ERs. In spite that BPA has little interaction with ERs at 1 nM, E2 and BPA equally increased the expression of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in CA3 and upregulated the spine density of the apical portion of CA3 dendrites at 1 nM. These compounds also enhanced the sprouting of mossy fibers to CA3 neurons. These results suggest that the exposure to E2 and xenoestrogens during developmental stage results in marked influence on the synaptogenesis and neuronal vulnerability through mechanisms other than ERs.

Keywords: estrogens, neuronal survival, hippocampal slice culture

\*東京大学

Nakazawa, K., Sawa, H., Ojima, H., Ishii-Nozawa, R. \*, Takeuchi, K. \*, Ohno, Y. : **Size of side-chain at channel pore mouth affects Ca<sup>2+</sup> block of P2X<sub>2</sub> receptor.**

*Eur. J. Pharmacol.* **449**, 207-211 (2002)

Effects of amino acid replacement at the channel pore mouth of P2X<sub>2</sub> receptor/channel on multivalent cation channel block were investigated. When Asn333 was replaced with various amino acid residues with neutral side chains (Gly, Ala, Val, Leu and Ile), the block by Ca<sup>2+</sup> was attenuated according to the sizes of the side chains. The block by La<sup>3+</sup> was also greatest with the Gly-substituted mutant, but this preference was not found for the block by other multivalent cations tested. The side chain at the channel pore mouth may interfere with the access of Ca<sup>2+</sup> block by steric hindrance.

Keywords: P2X<sub>2</sub> receptor, Ca<sup>2+</sup>, multivalent cation block, site-directed mutagenesis

\*明治薬科大学

Itoda, M., Saito, Y., Soyama, A., Saeki, M., Murayama, M., Ishida, S., Sai, K., Nagano, M., Suzukim H. \*, Sugiyama, Y. \*, Ozawa, S., Sawada, J. : **Polymorphisms in the ABCB2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals-An association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28**

*Drug Metab. Dispos.*, **30**, 363-364 (2002)

We found nucleotide variability in the 5'-upstream region and exonic sequences of a gene encoding canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT)/multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) by a polymerase chain reaction (PCR)-based sequencing using genomic DNA from 72 established cell

lines derived from 72 Japanese individuals. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) found were: 4 in the 5'-untranslational and 21 in the exonic regions. Of them, 14 were non-synonymous SNPs. One deletion of 7 consecutive adnines resulting in a frameshift variant was also found. Four SNPs, c-24t, g1249a (V417I), c2366t (S789F) and c3972t (I1324I) were the same as those recently reported Ito et al. (Ito, S. et al., *Pharmacogenetics* **11**, 175-184 (2001)).

Keywords: ABCB2, organic anion transporter, genetic polymorphism

\*東京大学

Ishida, S., Soyama, A., Saito, Y., Murayama, N., Saeki, M., Sai, K., Ozawa, S., Sawada, J. : **Determination of CYP2D6 gene alleles by the CYP450 probe array using the Affymetrix GeneChip system: Comparison with sequencing results**

*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 157-160 (2002)

We determined the CYP2D6 alleles in cell lines derived from 81 Japanese individuals with the CYP450 probe arrays using an Affymetrix GeneChip apparatus. Sequencing of the CYP2D6 exons from these same cell lines was performed to determine the accuracy of the allele calls by the Affymetrix probe array. Comparison of the results showed differences in the data from three cell lines for the CYP2D6\*10 alleles between these two methods. These results indicated that the CYP450 probe array must be utilized cautiously for typing CYP2D6\*10 alleles, which are frequently observed in the Japanese population.

Key words: CYP2D6 alleles, Affymetrix GeneChip, Sequencing

Itoda, M., Saito, Y., Komamura, K. \*, Ueno, S. \*, Kamakura, S. \*, Ozawa, S., Sawada, J. : **Twelve novel single nucleotide polymorphisms in ABCB1/MDR1 among Japanese patients with ventricular tachycardia who were administered amiodarone**

*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 566-571 (2002)

Twelve novel single nucleotide polymorphisms were found in the gene encoding ATP-binding cassette transporter, P-glycoprotein, from 60 Japanese patients who were administered the anti-arrhythmic drug, amiodarone.

Keywords: ABCB1, amiodarone, genetic polymorphism

\*国立循環器病センター

Murayama, N., Nakamura, T., Saeki, M., Soyama, A., Saito, Y., Sai, K., Ishida, S., Nakajima, O., Itoda, M., Ohno, Y., Ozawa, S., Sawada, J. : **CYP3A4 gene polymorphisms influence testosterone 6β-hydroxylation**

*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 150-156 (2002)

Three non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CYP3A4 gene were found in 34 cell lines

derived from Japanese individuals. These three SNPs (T185S, L293P, and T363M) have been previously reported, but little is known about the effect that these polymorphisms, especially T185S, have on catalytic activity. We measured testosterone hydroxylation in wild-type CYP3A4 and these three variants using a mammalian expression system. Testosterone 6 $\beta$ -, 2 $\beta$ -, and 15 $\beta$ -hydroxylations by the variant CYP3A4 forms T363M (<40%) and T185S (<60%) were reduced as compared with the wild-type in transient expression assays. L293P was similar to the wild-type in testosterone 6 $\beta$ - and 2 $\beta$ -hydroxylase activities. Western blot analysis confirmed lower amounts of CYP3A4 protein in the T363M and T185S variants than in the wild-type. Interestingly, Northern blot analysis showed no significant difference among mRNA levels between the wild-type and variants. These results suggest that the T363M and T185S substitutions in CYP3A4 affect either protein expression or stability. These established cell lines provided useful CYP3A4 SNP information in the Japanese.

Keywords: CYP3A4; Nonsynonymous single nucleotide polymorphism; Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation

Ozawa, S., Hamada, M. \*, Murayama, N., Nakajima, Y., Kaniwa, N., Matsumoto, Y. \*, Fukuoka, M. \*, Sawada, J., Ohno, Y. : **Cytosolic and microsomal activation of doxifluridine and tegafur to produce 5-fluorouracil in human livers**

*Cancer Chemother. Pharmacol.*, **50**, 454-458 (2002)

The enzymatic formation of 5-fluorouracil (5-FU) from two fluoropyrimidine prodrugs, doxifluridine (5'-DFUR) and tegafur (FT), was examined using the microsomal and cytosolic fractions of livers from 12 human individuals. The enzymatic activities were measured at a prodrug substrate concentration of 500  $\mu$ M. Liver microsomes catalyzed 5-FU formation from 5'-DFUR at rates of 10.0-160.1 pmol/min/mg protein and correlated well with CYP2A6-dependent coumarin 7-hydroxylase activity. The rates of microsomal 5-FU formation from FT ranged from 44.9 to 808.3 pmol/min/mg protein and also correlated with coumarin 7-hydroxylase activity. The cytosol fractions catalyzed 5-FU formation from 5'-DFUR at rates of 3164.6 to 6026.6 pmol/min/mg protein, almost two orders of magnitude higher than the rates of cytosolic 5-FU formation from FT (46.8-219.0 pmol/min/mg protein). The increased formation of 5-FU from 5'-DFUR might provide an answer to the question of why similar blood 5-FU levels were retained despite blood 5'-DFUR levels lower than blood FT levels.

Keywords: fluoropyrimidines, CYP2A6, Thymidine phosphorylase

\*昭和薬科大学

Ozawa, S., Katoh, T. \*<sup>1</sup>, Inatomi, H. \*<sup>2</sup>, Imai, H. \*<sup>1</sup>, Kuroda, Y. \*<sup>1</sup>, Ichiba, M. \*<sup>3</sup>, Ohno, Y. : **Association of**

**genotypes of carcinogen-activating enzymes, phenol sulfotransferase *SULT1A1* (*ST1A3*) and arylamine *N*-acetyltransferase *NAT2* with urothelial cancer in a Japanese population**

*Int. J. Cancer*, **102**, 418-421 (2002)

Carcinogenic aromatic amines such as 4-aminobiphenyl, which is contained in tobacco smoke, are one of the causal factors of urothelial epithelial cancers. *N*-Hydroxy-4-Aminobiphenyl formed by hepatic cytochrome (CYP) 1A2 is subsequently bioactivated through O-sulfation and O-acetylation by phenol sulfating sulfotransferase, *ST1A3* (*SULT1A1*), and arylamine *N*-acetyltransferase, *NAT2*, respectively. In combination of *ST1A3* and *NAT2* genotypes for analyses of urothelial cancer risk, the highest OR (95% CI) of 2.45(1.04-5.98) was obtained with *ST1A3*\*1 and *NAT2* slow genotype among the four combinations. Recombinant *ST1A3*\*1 enzyme showed tendency of catalyzing higher *in vitro* 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate-dependent DNA adduct formation than *ST1A3*\*2 (2.84  $\pm$  0.49 and 2.22  $\pm$  0.11 adducts/10<sup>8</sup> nucleotides). Combined analyses of different alleles of carcinogenic aromatic amine-activating phase II enzymes were applied to urothelial cancer risk for the first time.

Keywords: sulfation polymorphism, acetylation polymorphism, urothelial cancer

\*<sup>1</sup> 宮崎医科大学

\*<sup>2</sup> Munakata Suikoukai General Hospital

\*<sup>3</sup> 佐賀医科大学

Shimizu, M. \*, Ohta, K. \*, Matsumoto, Y. \*, Fukuoka, M. \*, Ohno, Y., Ozawa, S. : **Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells**

*Toxicol. in Vitro*, **16**, 549-556 (2002)

Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, is widely used in many consumer products. We previously showed the sulfoconjugation of bisphenol A catalyzed by a human thermostable phenol sulfotransferase, *ST1A3*. The estrogenic potency of bisphenol A sulfate was compared with that of bisphenol A by an E-screen assay using human breast cancer MCF-7 cells. An increase in the expression level of an estrogen-responsive pS2 gene was also examined using MCF-7 cells after exposure to bisphenol A and its sulfate for their estrogenicity. Bisphenol A sulfate did not exhibit estrogenic effects at 0.1  $\mu$ M (E-screen assay) and 1 mM (pS2 gene expression) compared with bisphenol A which exhibited the effects at 3 nM (E-screen assay) and 1  $\mu$ M (pS2 gene expression), respectively. We have therefore evaluated major roles of cytosolic phenol sulfotransferase in the human liver. Bisphenol A sulfation in human liver cytosols was inhibited by more than 90% by *p*-nitrophenol and quercetin, a typical substrate and specific inhibitor of phenol sulfotransferase, respectively. These results indicated that the estrogenicity of bisphenol A was

abolished through its sulfation catalyzed by a human hepatic thermostable phenol sulfotransferase.

Keywords: Bisphenol A and sulfate; Phenol sulfotransferase; Estrogenicity

\*昭和薬科大学

Soyama, A., Saito, Y., Kamakura, S. \*, Ueno, K. \*, Komamura, K. \*, Ozawa, S., Sawada, J. : **Novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2D6 gene associated with CYP2D6\*2 and/or CYP2D6\*10 alleles**

*Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 475-478 (2002)

Novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found in introns 1, 3, 4, 5, and 7 of the gene encoding cytochrome (CYP) 2D6 in 90 Japanese subjects. Some of these SNPs were associated with C2850T and/or C100T, which are key SNPs for CYP2D6\*2 and CYP2D6\*10, respectively. The SNPs in the CYP2D6 gene (ACCESSION NUMBER, M33388) were designated as follows: SNP, MPJ6\_2D6010 (IVS1-138C>G) associated with C2850T; SNP, MPJ6\_2D6012 (IVS1-41T>G) associated with C100T, C2850T and G4180C; SNP, MPJ6\_2D6016 (IVS3+32A>G); SNP, MPJ6\_2D6017 (IVS4-17C>G); SNP, MPJ6\_2D6018 (IVS4-17C>T); SNP, MPJ6\_2D6020 (IVS5+46G>A); SNP, MPJ6\_2D6021 (IVS5-49T>C); SNP, MPJ6\_2D6023 (IVS7+40A>C) associated with both C100T, C2850T and G4180C ; SNP, MPJ6\_2D6024 (IVS7+64T>C); and SNP, MPJ6\_2D6025 (IVS7-9C>T) associated with C2850T. These SNPs are convenient for allele typing and should be further investigated for their potential effects on transcription, such as splicing.

Keywords: Novel CYP2D6 SNP, Intron, Linkage disequilibrium

\*国立循環器病センター

Ishida, S., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Ando, M., Ohno, Y., Ozawa, S., Sawada, J. : **Characterization of human CYP1A1/1A2 induction by DNA microarray and alpha-naphthoflavone**

*Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 172-7(2002)

DNA microarrays and real time PCR were used to analyze the mechanism of gene induction by CYP1A1 inducers,  $\beta$ -naphthoflavone, and omeprazole, in the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. Reproducible and significant inductions were observed in a limited number of genes including CYP1A1 and CYP1A2. Genes induced by omeprazole included several protein tyrosine kinase targets. This result confirmed that omeprazole could modulate gene expressions through protein tyrosine kinase-mediated pathway. Induction ratios were considerably different from CYP1A1 and CYP1A2 (>10-fold) to other induced genes (<5-fold). alpha-Naphthoflavone, which is known as an antagonist to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, inhibited the inductions of heme oxygenase 1, glutamate-cysteine

ligase (modifier unit), and thioredoxin reductase by  $\beta$ -naphthoflavone but not those of CYP1A1 and CYP1A2. It unexpectedly enhanced the  $\beta$ -naphthoflavone-mediated CYP1A1 and CYP1A2 induction. These results suggest that the CYP1A1 and CYP1A2 genes, which share their 5' enhancer regions, are regulated differently from the other genes.

Keywords: CYP1A1/2, DNA microarray, omeprazole, naphthoflavone

Ishida, S., Shigemoto-Mogami, Y., Kagechika, H., Shudo, K., Ozawa, S., Sawada, J., Ohno, Y., Inoue, K. : **Clinically potential subclasses of retinoid synergists revealed by gene expression profiling**

*Mol. Cancer Ther.*, **2**, 49-58 (2003)

Retinoids have chemopreventive and therapeutic potency in oncology and dermatology, although their application is restricted by many undesirable side effects. For the development of more effective and less toxic retinoids, gene expression analyses using DNA microarrays have the potential to supplement conventional screening methods, which are based on the changes in cell morphology and/or function. In this study, we applied the class prediction algorithm, which was used in the molecular phenotyping of tumors, for the classification of synthetic retinoids (Am80 and Tp80) and retinoid synergists (HX630, TZ335, and PA024) as all-trans retinoic acid-like, 9-cis retinoic acid-like, and control-like classes. By analyzing the effects of all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid on the gene expressions in a human promyelocytic leukemia cell line, HL60, we successfully selected 50 marker genes whose expression pattern could distinguish these classes. Moreover, the classification revealed the existence of two subclasses among the retinoid synergists used with Am80. Close inspection of the DNA microarray analyses indicated that these two subclasses had different effects on the apoptosis of HL60 cells, and this was confirmed by in vivo experiments. These results indicate that the retinoidal activity of Am80, which has already been used in clinical trials, could be modulated differently by the two classes of retinoid synergists. Thus, these two subclasses of retinoid synergists have the potency to widen the usage of Am80. Our analyses demonstrated that the gene expression profiling could provide important information for developing useful retinoid synergists by compensating conventional screening methods.

Keywords: DNA microarray, retinoid, retinoid synergist

小澤正吾 : **Pharmacogenetics, Pharmacogenomics 研究の進歩**

*Cancer Frontier*, **4**, 49-54 (2002/2003)

抗癌剤の薬理作用を考慮し、抗癌剤応答性の個人差を解析する pharmacogenetics, 抗癌剤の薬理作用に関連する遺伝子発現につき網羅的解析を行う pharmacogenomics

研究につき概説した。前者は種々の薬物代謝動態関連遺伝子の多型と、薬物応答性の個人差を明らかにし、個別化薬物療法を目指す。後者は癌細胞の薬剤感受性と遺伝子発現プロファイルとの関連を調べ、抗癌剤に対する癌細胞側の感受性因子を明らかにする。

**Keywords:** Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, 抗癌剤

**小澤正吾：がん原物質代謝活性化・不活性化酵素遺伝子の多型と発がん感受性**

最新医学, 57, 641-649 (2002)

喫煙と肺癌との関連、加熱食品から癌原物質が多数発見されている。化学物質は生体内で代謝活性化を受けて、発癌のイニシエーションの過程に役割を果たし、ヒトに化学発癌を起こすが、その際の発がんリスクを評価することは重要である。反応を触媒する酵素の遺伝的個体差(遺伝的多型性)と、ヒトの発癌リスクとの関係性を評価するために極めて多くの研究がなされてきた。化学発癌の過程は、多くの場合ヒトが自然界より摂取する物質によって起こるものであり、従って、吸入や経口摂取が多いと思われる。化学物質を摂取後、肝で代謝を受け、構造が変換されたり、全身循環血中に入って標的組織に到達すると考えられるので、標的組織は全身ありとあらゆる組織が対象となりうるが、消化管、肺の癌に対する化学発癌と、化学物質およびその代謝能の個体差との関連が研究対象になることが多い。本稿では、「がん原物質の代謝酵素遺伝子の多型性とヒト発がん感受性」の膨大な研究の中から、比較的最近の研究結果をもとに本テーマにつき概説し、生活習慣の中で癌原性を有する物質の摂取による発がんリスクを修飾する「癌原物質の代謝多型」について述べてみたい。

**Keywords:** 癌原物質, 薬物代謝酵素遺伝子多型, 発がんリスク

**小澤正吾：抗癌剤：薬物治療と遺伝子多型-tailor made medicineは可能か-**

呼吸, 21, 663-667 (2002)

呼吸器系の癌、すなわち小細胞肺癌や非小細胞肺癌等に適用される抗癌剤としてイリノテカン、タキサン系抗癌剤、塩酸ゲムシタピン等が挙げられる。抗癌剤に対する反応性(応答性)を規定する因子としては、癌細胞の薬剤耐性の例があり看過しがたいが、本稿では以下の理由により、むしろ宿主側の因子について考察する。イリノテカン、タキサン系抗癌剤、塩酸ゲムシタピンのいずれも複数の代謝過程が知られている。特に、イリノテカン、塩酸ゲムシタピンでは、癌細胞に対する殺細胞効果を発揮する代謝物を生じるまでに複雑な代謝経路を経る。それら複雑な代謝経路は、解毒的代謝やより抗癌作用が強い化合物への変換の両方の経路から成り、ほとんどの経路に大きな個体差が認められる。以上、個々の代謝能の総計が薬剤反応性を規定している。このように薬物の代謝の観点から、これら薬剤の tailor made medicineの可能性を考察する。

**Keywords:** 個別化薬物療法, 抗癌剤, 薬物代謝多型

**小澤正吾：薬物代謝酵素遺伝子多型と抗癌剤の薬効・副作用**

臨床病理, 51, 168-173 (2003)

薬物、環境変異原癌原物質をはじめ、多くの化学物質の解毒的代謝過程に薬物代謝酵素が関与する。また、プロドラッグの場合は、薬物代謝酵素がその活性化反応を触媒して薬効が発揮される。薬物代謝酵素活性に個体差がなかったならば、薬物設計は遥かに簡単であったろうが、実際は薬物代謝活性には数十倍にのぼる個体差が存在し、薬物の中でも単一の代謝酵素で解毒排泄される場合は代謝活性の著しく低いヒトの場合は重篤な副作用が現れると思われる。実際、薬物代謝酵素遺伝子の塩基配列解析により、著しく活性低下を招く遺伝子多型が知られている。しかし、最近開発されている抗癌剤等の薬物は複数の代謝酵素や薬物トランスポーター等が薬物動態に影響を与える。また、著しい活性低下を招くには至らない遺伝子多型が大部分を占める薬物代謝・動態関連遺伝子も多く、薬物応答性を規定する遺伝子多型解析は十分に達成されているとは言えない。日本人薬物代謝酵素の遺伝子診断によりあらゆる薬物に対する応答性が予見できる段階まで達してはじめて「薬物代謝酵素遺伝子多型と抗癌剤の薬効・副作用」の間の関連が明確になると考えられる。

**Keywords:** genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and drug transporters, anti-cancer drugs, drug responsiveness

**Usami, M., Tabata, H., Ohno, Y. : Effects of methionine on selenium embryotoxicity in cultured rat embryos**

*Teratogenesis Carcinog. Mutagen.*, 22, 301-308 (2002)

Effects of methionine, an essential amino acid, on the embryotoxicity of selenium (Se) were examined using the rat embryo culture. Rat embryos at day 9.5 of gestation were cultured for 48 h in the presence of sodium selenite at 10 and 20  $\mu\text{M}$  or sodium selenate at 30 and 100  $\mu\text{M}$  with or without the addition of 1 mM DL-methionine. Selenite at 20  $\mu\text{M}$  or selenate at 100  $\mu\text{M}$  alone increased the incidence of embryonic malformation and inhibited the embryonic growth. The addition of methionine increased the incidence of embryonic malformation at 10  $\mu\text{M}$  of selenite but decreased the incidence of embryonic malformation at 100  $\mu\text{M}$  of selenate. On the other hand, the addition of methionine partially restored the inhibited embryonic growth at 20  $\mu\text{M}$  of selenite or at 100  $\mu\text{M}$  of selenate. It was considered from these results that the methionine availability in the embryonic environment and the oxidation state of Se are critical in Se embryotoxicity.

**Keywords:** Embryotoxicity, Selenium, Methionine

**Usami, M., Mitsunaga, K.\*, Ohno, Y. : Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor**

*J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 81, 47-55 (2002)

We have developed a simple assay method for the evaluation of estrogen receptor (ER) binding capacity of

chemicals without the use of radio- or fluorescence-labeled compounds. We used the solution competition assay by the BIACORE biosensor, a surface plasmon resonance biosensor, with estradiol as a ligand, human recombinant ER $\alpha$  (hrER $\alpha$ ) as a high molecular weight (hmw) interactant and test chemicals as analytes. For the ligand, aminated estradiol with a spacer molecule (E2-17PeNH) was synthesized and immobilized on a carboxymethyl dextran-coated sensor chip by the amine coupling method. The injection of the hmw interactant hrER $\alpha$  to the biosensor raised the sensorgram, indicating its binding to the ligand E2-17PeNH. The binding of test chemicals to hrER $\alpha$  was determined as a reduction in the hrER $\alpha$  binding to E2-17PeNH. The dissociation constant for the binding to hrER $\alpha$  was calculated for estrone ( $4.29 \times 10^{-9}$  M), estradiol ( $4.04 \times 10^{-10}$  M), estriol ( $8.35 \times 10^{-10}$  M), tamoxifen ( $2.16 \times 10^{-8}$  M), diethylstilbestrol ( $1.46 \times 10^{-10}$  M), bisphenol A ( $1.35 \times 10^{-6}$  M) and 4-nonylphenol ( $7.49 \times 10^{-6}$  M), by plotting the data according to an equation based on mass action law.

Keywords: Estrogen, Receptor binding, Surface plasmon resonance.

\*東邦大学薬学部

Sakimura, M. \*, Tsukada, A. \*, Usami, M., Hanzawa, S. \*, Saito, N. \*, Ohno, Y., Shimada, K. \* : Effects of estradiol and nonylphenol on mRNA expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ , and cytochrome P450 aromatase in the gonad of chicken embryos

*J. Poultry Sci.*, 39, 302-309 (2002)

Effects of estradiol-17 $\beta$  (E2) and p-nonylphenol (NP) on mRNA expression of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) and cytochrome P450 aromatase (P450arom) were examined in the early stage of chicken embryonic gonads. Fertilized eggs were treated with either E2 (1.0 mg/egg) or NP (0.01, 0.1 mg/egg) immediately before incubation (day 0 of incubation) and were incubated at 37.5 °C. On day 10 of incubation the gonad was collected and mRNA expression was determined by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. In the control group, ER $\alpha$  and P450arom mRNA showed higher expression in females than in males while ER $\beta$  mRNA showed no sexual difference. In the E2-treated group, the expression of ER $\alpha$  and P450arom mRNA markedly increased in males (about 4- and 16-fold, respectively). NP increased mRNA expression of ER $\alpha$  and P450arom (about twofold each) in males. These results suggest that NP induces some female-specific genes in the male gonads during the critical period of sex determination in chicken embryos.

Keywords: Chicken embryos, Estrogen receptors, Nonylphenol

\*名古屋大学大学院生命農学研究科

Sakemi, K., Ito, R., Umemura, T., Ohno, Y., and Tsuda,

M. : Comparative toxicokinetic/toxicodynamic study of rubber antioxidants, 2-Mercaptobenzimidazole and its methyl substituted derivatives, by repeated oral administration in rats

*Arch. Toxicol.* 76, 682-91 (2002)

2-Mercaptobenzimidazole (MBI), a rubber antioxidant, is known to exhibit potent thyroid toxicity in rats, while its methylated derivatives are much less toxic. To characterize this methyl substituent effect on the thyroid toxicity of MBI, comparative toxicokinetic analyses were conducted in the present study. MBI and the MMBIs (4-methylated and 5-methylated MBI, and a 1:1 mixture of these 4- and 5-methylated isomers) were repeatedly administered to male Wistar rats by gavage for 2 weeks. After repeated oral administration, the C<sub>max</sub> and AUC of MBI were markedly increased, while the MMBIs essentially were cleared from the blood within 10 hr. We suggest that the marked decrease of thyroid toxicity by methyl substitution of MBI is caused mainly by a decrease in systemic exposure to the compounds and partly by a decrease in inhibition of thyroid hormone synthesis.

Key Words: thyroid toxicity, 2-Mercaptobenzimidazole, 2-Mercapto-methylbenzimidazole

Kurebayashi, H., Betsui, H., Ohno, Y. : Disposition of a Low Dose of <sup>14</sup>C-Bisphenol A in Male Rats and Its Main Biliary Excretion as BPA Glucuronide

*Toxicol. Sci.* 73, 17-25 (2003)

The disposition of bisphenol A (BPA) in male F344 rats dosed orally (100 or 0.10 mg/kg) or intravenously (0.10 mg/kg) was studied. Smaller amounts of the dose appeared in the urine. The main excretion route was feces in rats irrespective of dose and administration route. The biliary excretion during 6 h was 58-66% after iv dosing and 45-50% after oral dosing at 0.10 mg <sup>14</sup>C-BPA/kg. Toxicokinetic parameters obtained from radioactivity in blood were  $t_{1/2\beta} = 39.5$  h, and  $CL_{tot} = 0.52$  l/h/kg after iv dosing of 0.10 mg <sup>14</sup>C-BPA/kg to male rats. The blood concentration reached its maximum of 5.5 ng-eq/ml at 0.38 h after oral dose.  $AUC_{(0-6 h)}$ ,  $AUC_{(0-48 h)}$ , and  $AUC_{inf}$  were 34, 118, and 192 ng-eq\*h/ml for the iv dose and 18, 102, and 185 ng-eq\*h/ml for the oral dose, respectively. The oral bioavailability of  $F_{(0-6 h)}$ ,  $F_{(0-48 h)}$ , and  $F_{inf}$  were 0.54, 0.86, and 0.97, respectively. From the bile of male rats orally dosed at 100 mg/kg, we have isolated and characterized BPA glucuronide (BPA-gluc) by ESI/MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. HPLC analysis showed that BPA-gluc was the predominant metabolite in bile and urine. Unchanged BPA was mostly detected in feces. These results suggest that BPA is mainly metabolized to BPA-gluc and excreted into feces through the bile and subject to enterohepatic circulation in rats.

Key Words: bisphenol A glucuronide, biliary metabolite, enterohepatic circulation

Kurebayashi, H., Harada, R. \*, Stewart, R.K. \*, Numata, H. \*, Ohno, Y. : **Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys**

*Toxicol. Sci.* **68**, 32-42 (2002)

Following a single oral or iv dose of 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [ $^{14}\text{C}$ ] bisphenol A ( $^{14}\text{C}$ -BPA) to male and female cynomolgus monkeys, 79-86% of the radioactivity was excreted in urine over 7 days, and most of them was recovered by 24 h. The fecal excretion over 7 days was minimal (1.8-3.1%). Toxicokinetic parameters obtained from plasma radioactivity were  $C_{\text{max}} = 104\text{-}107$  ng-eq/ml between 0.25 and 2 h, and  $\text{AUC}_{\text{oral}} = 244\text{-}265$  ng-eq\*h/ml after oral dosing. In the iv dose,  $\text{AUC}_{\text{iv}}$  was 377-382 ng-eq\*h/ml, and the bioavailability was 0.66-0.70. The terminal elimination half-life was larger post-iv dose ( $t_{1/2\text{iv}} = 13.5\text{-}14.7$  h) than post-oral dose ( $t_{1/2\text{oral}} = 9.63\text{-}9.80$  h). After iv dose, the fast-phase half-life ( $t_{1/2\text{f}}$ ) of radioactivity was 0.61-0.67 h. The  $t_{1/2\text{f}}$  of unchanged  $^{14}\text{C}$ -BPA for females (0.39 h) was smaller than that for males (0.57 h). These results suggested the distribution of lipophilic  $^{14}\text{C}$ -BPA in adipose tissue after iv dose, in contrast to first pass metabolism after oral dose. Radio-HPLC analysis suggested the predominant plasma and urinary metabolites were mono- and diglucuronide of  $^{14}\text{C}$ -BPA and unchanged  $^{14}\text{C}$ -BPA was very low. These results indicate that the intestinal absorption and metabolism of BPA was rapid, and the major metabolites, glucuronide of  $^{14}\text{C}$ -BPA, were rapidly excreted into urine in monkeys.

**Key Words:** bisphenol A, monkeys, toxicokinetics

\* ITR Laboratories Canada Inc., Canada

Kurebayashi, H., Nambaru, S., Fukuoka, M. \*, Yamaha, T., Tanaka, A. \* : **Metabolism and excretion of 2-nitro-p-cresol in rats**

*Arch. Toxicol.* **76**, 676-681 (2002)

Metabolism of 2-nitro-p-cresol (NPC) was studied in female Sprague-Dawley rats, using  $^{14}\text{C}$ -NPC. It was found that NPC was rapidly absorbed and excreted after an oral dose of 250 mg/kg. Approximately 90% of the administered dose was excreted into urine and less than 10% of the dose into feces for 5 days. Urinary and fecal excretion were the same extent after 48 h. Bile excretion amounted to approximately 25% for 2 days. Blood levels of  $^{14}\text{C}$ -NPC reached the maximum concentration (39.4  $\mu\text{g}\text{-eq}/\text{g}$ ) within 1 h, and decreased bi-exponentially. The apparent half-lives of  $^{14}\text{C}$ -NPC were 3.8 h for the rapid phase and 37 h for the slow phase. From studying the distribution in organs at 1.5, 6, 24, 72 and 120 h, we found that the concentrations of radioactivity in various tissues of rats were relatively high in the stomach, intestine, liver, kidney, blood, ovary and uterus. Most organs showed the maximum concentrations at 1.5 h, except for intestine, kidney, ovary, and uterus at 6 h. There was no specific tissue retention after 72 h. Two main conjugate

metabolites, glucuronide and sulfate of NPC, were detected with free NPC and 2-acetyl-amino-p-cresol (AAPC) in the urine. NPC was rapidly absorbed and excreted mainly into urine as the conjugate metabolites. A part of NPC was reduced to 2-amino-p-cresol, followed by acetylation to give AAPC.

**Keywords:** 2-nitro-p-cresol, female rat, excretion

\* Showa Pharmaceutical University, Japan

Futakuchi, M. \*, Hirose, M., Imaida, K. \*, Takahashi, S. \*, Ogawa, K. \*, Asamoto, M. \*, Miki, T. \*, Shirai, T. \* : **Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP)-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) after initiation with 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in F344 rats.**

*Carcinogenesis*, **23**, 283-287 (2002)

The aim of this study is to investigate the chemopreventive effects of the synthetic phenolic antioxidant HTHQ on PhIP-associated colon carcinogenesis in rats after initiation with DMH in male F344 rats. Treatment with HTHQ dose-dependently decreased the multiplicity of colon adenocarcinomas. This treatment similarly reduced atypical hyperplasias of the ventral prostate. Immunohistochemically, HTHQ was revealed to suppress PhIP-DNA adduct formation in the epithelial cells of the colon and prostate in a separate 2 weeks experiment. The present results clearly showed that HTHQ has chemopreventive potential for PhIP-associated colon and prostate carcinogenesis. The observed inhibition may largely be due to interference with PhIP-DNA adduct formation.

**Keywords:** HTHQ, colon cancer, rat

\* 名古屋市立大学医学部

Futakuchi, M. \*, Cheng, J.L. \*, Hirose, M., Kimoto, N. \*, Cho, Y.M. \*, Iwata, T. \*, Kasai, M. \*, Tokudome, S. \*, Shira, T. \* : **Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP).**

*Cancer Lett.*, **178**, 131-139 (2002)

Chemopreventive effects of conjugated fatty acids derived from safflower oil (CFA-S), which contains large amounts of conjugated linoleic acid, and from perilla oil (CFA-P) with abundant conjugated alpha-linolenic acid were examined in a PhIP-induced rat mammary carcinogenesis model. Data for final incidence of mammary tumors, indices of proliferating cell nuclear antigen positive cells in mammary adenocarcinomas and PhIP-DNA adduct formation were revealed that CFA-P and CFA-S may retard development of PhIP-induced mammary tumors with inhibition of PhIP-DNA adduct formation, and decreased mammary carcinogenesis in the post-initiation period with inhibition of cell proliferation.

**Keywords:** conjugated fatty acids, mammary tumors, rat

\*名古屋市立大学医学部

Suzuki, S. \*, Takahashi, S. \*, Asamoto, M. \*, Inaguma, S. \*, Ogiso, T. \*, Hirose, M., Shirai, T. \* : **Lack of modification of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline (MeIQx)-induced hepatocarcinogenesis in rats by fenbendazole - a CYP1A2 inducer.**

*Cancer Lett.*, **185**, 39-45 (2002)

Fenbendazole (FBZ) is an anthelmintic drug known to be a potent CYP1A2 inducer. Combined effects of FBZ on 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced hepatocarcinogenesis in rats were investigated using a medium-term liver bioassay system. No modifying influence was found in terms of glutathione S-transferase placental-form positive foci development although CYP1A2 protein expression in the livers of rats that were given MeIQx and FBZ was 2.3-fold higher than with MeIQx alone. NAT2 mRNA expression did not differ among the groups as revealed by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. These results suggest that elevated CYP1A2 expression is not sufficient to enhance MeIQx-induced hepatocarcinogenesis.

**Keywords:** fenbendazole, MeIQx, hepatocarcinogenesis

\*名古屋市立大学医学部

Uehara, T. \*, Kashida, Y. \*, Watanabe, T. \*, Yasuhara, K., Onodera, H., Hirose, M., Mitsumori, K. \* : **Susceptibility of liver proliferative lesions in heterozygous p53 deficient CBA mice to various carcinogens.**

*J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 551-556 (2002)

To investigate liver tumorigenic sensitivity to carcinogens in heterozygous p53 deficient CBA mice [p53(+/-)], a single dimethylnitrosamine (DMN) injection or dietary flumequine (FL), di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) or phenolphthalein (PhP) administration was performed. In the FL groups, the incidences and multiplicities of altered hepatocellular foci (AHF) in p53(+/-)/p53(+/+) were increased as compared to the corresponding controls. The incidences and multiplicities of AHF in the DMN groups were higher than those in the controls in p53(+/-) and p53(+/+), but no differences were indicated between the groups. There were no differences in the parameters for AHF in the FL or DMN groups between p53(+/-) and p53(+/+). There were no differences in the incidences and multiplicities of AHF between the DEHP or PhP and control groups. In conclusion, p53 gene knocked out heterozygously suggested not to enhance the chemical hepatocarcinogenesis in CBA mice.

**Keywords:** p53 deficient CBA mice, hepatocarcinogenesis

\*東京農工大学農学部

Watanabe, T. \*, Ueda, M., Yasuhara, K., Onodera, H., Hirose, M., Mitsumori, K. \* : **Modifying effects of genistein, nonylphenol and methoxychlor on N-ethyl-N-**

**nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in rasH2 transgenic mice harboring a human prototype c-Ha-ras gene.**

*J Tox Pathol.*, **15**, 145-151 (2002)

To clarify the modifying effects of genistein (GE), 4-nonylphenol (NP), and methoxychlor (MXC) on uterine endometrial carcinogenesis, female rasH2 mice received an intraperitoneal injection of ENU, followed by no further treatment, diet containing GE, NP or MXC for 24 weeks. Uterine proliferative lesions that were observed in treated groups were composed of endometrial hyperplasias, atypical hyperplasias of the endometrium, and adenocarcinomas. The incidence of adenocarcinomas in the ENU alone, ENU+GE, ENU+NP, and ENU+MXC groups was 55.6, 57.1, 47.1, and 0%, respectively. The incidence of atypical hyperplasias in the ENU+MXC group was also decreased. The results in the present study suggest that MXC, but not GE and NP, shows an inhibitory effect on the development of uterine adenocarcinomas in rasH2 mice initiated with ENU.

**Keywords:** rasH2 mice, uterine carcinogenesis, methoxychlor

\*東京農工大学農学部

Hirose, M., Yamaguchi, T. \*, Mizoguchi, Y. \*, Akagi, K. \*, Futakuchi, M. \*, Shirai, T. \* : **Lack of inhibitory effects of green tea catechins in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat intestinal carcinogenesis model - comparison of the different formulations, administration routes and doses.**

*Cancer Lett.*, **188**, 163-170 (2002)

Differences in the effects of GTC on intestinal carcinogenesis by different formulations and administration routes were investigated in DMH-pretreated rats. They were given GTC [Mitsui Norin (M) or Taiyo Kagaku (T)] either in the diet (D) or the drinking water (W). In the large intestine, although the multiplicity/incidences of adenomas showed tendencies for decrease in all GTC groups, and the tumor volume tended to be decrease in the MGTC(W) and TGTC(W), the multiplicity of carcinomas rather being increased in the MGTC(D) and TGTC(W). In the small intestine, the tumor incidence/multiplicity in all GTC groups had a tendency to decrease, but the volume was increased in MGTC(W) and TGTC(W). Thus it can be concluded that GTC does not exert chemopreventive effects on intestinal carcinogenesis irrespective of its formulation or route of administration.

**Keywords:** green tea catechins, intestinal carcinogenesis

\*名古屋市立大学医学部

Fukushima, S. \*<sup>1</sup>, Wanibuchi, H. \*<sup>1</sup>, Morimura, K. \*<sup>1</sup>, Wei, M. \*<sup>1</sup>, Nakae, D. \*<sup>2</sup>, Konishi, Y. \*<sup>2</sup>, Tsuda, H. \*<sup>3</sup>, Uehara, N. \*<sup>3</sup>, Imaida, K. \*<sup>4</sup>, Shirai, T. \*<sup>4</sup>, Tatematsu, M. \*<sup>5</sup>, Tsukamoto, T. \*<sup>5</sup>, Hirose, M., Furukawa, F., Wakabayashi, K. \*<sup>3</sup>, Totsuka, W. \*<sup>3</sup> : **Lack of a dose-response relationship**

**for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline or N-nitrosodiethylamine.**

*Jpn J Cancer Res.*, **93**, 1076-1082 (2002)

For a long period, it has been generally considered that carcinogens, particularly genotoxic ones, have no threshold in exerting their potential for cancer induction. Here we show that 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline forms DNA adducts at low doses, but does not induce glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive foci or 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat liver. Moreover N-nitrosodiethylamine, at low doses was also found not to induce GST-P-positive foci in rat liver. These results imply that there is a no-observed effect level for hepatocarcinogenesis by these genotoxic carcinogens.

**Keywords:** genotoxic carcinogens, threshold, liver

\*1 大阪市立大学医学部

\*2 奈良県立医科大学医学部

\*3 国立がんセンター研究所

\*4 名古屋市立大学医学部

\*5 愛知県がんセンター研究所

Watanabe, T. \*, Kashida, Y. \*, Yasuhara, K., Koujitani, T., Hirose, M. and Mitsumori, K. \* : **Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea.**

*Cancer Lett.*, **188**, 39-46 (2002)

To clarify whether uterine tumors can be induced in rasH2 mice that are very susceptible to genotoxic carcinogens, rasH2 mice and their wild-type littermates received an injection of ENU followed by no further treatment for 22 weeks. Eighteen and 94% of ENU-treated rasH2 mice had uterine endometrial adenocarcinomas and atypical hyperplasias, respectively. Other malignant and benign tumors such as lung alveolar/bronchiolar adenomas and carcinomas, forestomach squamous cell papillomas and carcinomas, splenic hemangiomas/sarcomas, skin papillomas, malignant lymphomas and harderian gland adenomas were also observed in ENU-treated rasH2 mice. The result in the present study suggests that female rasH2 mice are very susceptible to uterine carcinogenesis, providing a useful model for ENU-induced uterine epithelial tumors.

**Keywords:** rasH2 mice, N-ethyl-N-nitrosourea, uterine tumor

\* 東京農工大学農学部

Yada, H. \*, Hirose, M., Tamano, S. \*, Kawabe, M. \*, Sano, M. \*, Takahashi, S. \*, Futakuchi, M. \*, Miki, T. \*, Shirai, T. \* : **Effects of antioxidant 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ) or ascorbic acid on carcinogenesis induced by administration of aminopyrine and sodium nitrite in a rat multi-organ carcinogenesis model.**

*Jpn J Cancer Res.*, **93**, 1299-1307 (2002)

The effect of antioxidant, HTHQ or ascorbic acid (AsA), on aminopyrine (AP) and/or sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>)-induced carcinogenesis was examined using a rat multi-organ carcinogenesis model. Hepatocellular adenomas and hemangiosarcomas were induced in the AP+NaNO<sub>2</sub> group, and simultaneous HTHQ or AsA administration decreased the incidences. In the AP+NaNO<sub>2</sub> and the NaNO<sub>2</sub>-alone groups, when HTHQ, but not AsA, was simultaneously administered, the incidence of forestomach carcinomas significantly increased. The results suggest that HTHQ can prevent tumor production induced by AP and NaNO<sub>2</sub> more effectively than AsA. A possible carcinogenic effect on the forestomach of simultaneous administration of HTHQ and NaNO<sub>2</sub> is suggested, while treatment with the AsA and NaNO<sub>2</sub> may not be carcinogenic to the forestomach or other organs.

**Keywords:** HTHQ, hepatocellular tumor, forestomach tumor

\* 名古屋市立大学医学部

Itoh, J. \*<sup>1</sup>, Kashida, Y. \*<sup>1</sup>, Watanabe, T. \*<sup>1</sup>, Yasuhara, K., Takizawa, T., Ueda, M., Yoshimura, H. \*<sup>2</sup>, Hirose, M., Mitsumori, K. \*<sup>1</sup> : **Lack of modifying effects of glycerol in pulmonary carcinogenesis in rasH2 mice induced by urethane or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone.**

*J Toxicol Pathol.*, **15**, 215-220 (2002)

To investigate the modifying effects of glycerol on the development of lung tumors induced by UR or 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), transgenic CB6F1 mice carrying the human proto-type c-Ha-ras gene (rasH2 mice) were given a single injection of UR or NNK followed by glycerol administration in drinking water for 26 weeks. In rasH2 mice, alveolar/bronchiolar hyperplasias, adenomas, and carcinomas were induced in UR alone, UR + glycerol, NNK alone, and NNK + glycerol groups, but there were no significant differences in the incidences and multiplicity between UR alone and UR + glycerol groups or NNK alone and NNK + glycerol groups. These results suggest that glycerol does not have a promoting effect in pulmonary carcinogenesis in rasH2 mice induced by urethane or NNK.

**Keywords:** rasH2 mice, lung tumors, glycerol

\*1 東京農工大学農学部

\*2 日本たばこ産業

Nishikawa, A., Furukawa, F., Miyauchi, M., Son, H.-Y., Okazaki, K., Koide, A. \*, Mori, Y. \*, Hirose, M. : **Enhancement by cigarette smoke exposure of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-induced rat hepatocarcinogenesis in close association with elevation of CYP1A2**

*Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 24-31 (2002)

The modifying effects of cigarette smoke (CS)

exposure on a heterocyclic amine (HCA) 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced carcinogenesis were investigated in male F344 rats. Groups 1 and 2 were fed MeIQx at a dose of 300 ppm, and simultaneously received CS and sham smoke (SS) for 16 weeks, respectively. Groups 3 - 5 were given the MeIQx diet for 4 weeks, and simultaneously exposed to CS for 4 weeks (group 3), exposed to CS for 12 weeks after the MeIQx treatment (group 4) or received SS for 16 weeks (group 5). Groups 6 and 7 were fed basal diet and respectively received CS and SS for 16 weeks. In terms of the mean number or area, the development of glutathione S-transferase placental form-positive (GST-P+) liver cell foci was significantly ( $P<0.01$ ) greater in group 1 than in group 2. The mean number of colonic aberrant crypt foci (ACFs) per animal was increased by continuous CS exposure regardless of MeIQx feeding, the differences between groups 4 and 5 ( $P<0.05$ ), and between groups 6 and 7 ( $P<0.05$ ) being significant. Immunoblot analysis confirmed that the hepatic CYP1A2 level in group 6 was remarkably increased as compared to that in group 7. In addition, liver S9 from rats in group 6 consistently increased the mutagenic activities of six HCAs including MeIQx as compared to those in group 7. Thus, our results clearly indicate that CS enhances hepatocarcinogenesis when given in the initiation phase via increasing intensity of metabolic activation for MeIQx and possibly colon carcinogenesis when given in the post-initiation phase in rats induced by MeIQx.

**Keywords:** cigarette smoke, MeIQx, CYP1A2

\*岐阜薬科大学

Furukawa, F., Nishikawa, A., Chihara, T.\*<sup>1</sup>, Shimpo, K.\*<sup>1</sup>, Beppu, H.\*<sup>1</sup>, Kuzuya, H.\*<sup>1</sup>, Lee, I-S.\*<sup>2</sup>, Hirose M. : **Chemopreventive effects of *Aloe arborescens* on *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters**

*Cancer Lett.*, **178**, 117-122 (2002)

The modification effects of freeze-dried aloe (*Aloe arborescens*) whole leaf powder during the initiation phase of carcinogenesis were investigated in hamsters treated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP). Female Syrian hamsters were given four weekly subcutaneous injections of BOP at a dose of 10mg/kg and then given 0, 1 or 5% aloe in their diet for 5 weeks. At week 54 of the experiment, all surviving animals were sacrificed and development of neoplastic and preneoplastic lesions was assessed histopathologically. The incidences of pancreatic adenocarcinomas, atypical hyperplasias or total atypical hyperplasias plus adenocarcinomas were significantly ( $P<0.05$ ) decreased with BOP+5% aloe, and that of adenocarcinomas were also significantly ( $P<0.05$ ) reduced in the BOP+1% aloe as compared to the BOP alone group. Multiplicities of pancreatic adenocarcinomas, atypical hyperplasias or total lesions were also significantly

( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ) lower in the BOP+5% aloe group than with the BOP alone. Quantitative data for neoplastic lesions in the lung, liver, gall bladder, kidney and urinary bladder of hamsters were not significantly different among the three groups. In a satellite experiment, pretreatment with aloe significantly ( $P<0.01$ ) reduced the formation of O6-methyldeoxyguanosine in epithelial cells of pancreatic ducts as compared to the BOP alone value. Our results thus indicate that aloe prevents BOP-induced pancreatic neoplasia in hamsters in relation to decreased DNA adduct formation in the target tissue.

**Keywords:** aloe, pancreatic carcinogenesis, chemoprevention

\*<sup>1</sup> 藤田保健衛生大学

\*<sup>2</sup> 韓国啓明大学

Miyauchi, M., Nakamura, H., Furukawa, F., Son, H-Y., Nishikawa, A., Hirose, M. : **Promoting effects of combined treatment of antioxidants with sodium nitrite on forestomach carcinogenesis in rats after initiation with *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine**

*Cancer Lett.*, **178**, 19-24 (2002)

The effects of sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ), in combination with one of three antioxidants, *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), alpha-tocopherol (alpha-Toc) and propyl gallate (PG), on *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) stomach carcinogenesis were investigated in F344 rats. Groups of 15 male rats were treated with an intragastric dose of 150 mg/kg body weight of MNNG, and starting 1 week later, were treated with 0.5% TBHQ, 1% alpha-Toc, 1% PG or basal diet with or without 0.2%  $\text{NaNO}_2$  in their drinking water until they were killed at the end of week 36. Macroscopically, in MNNG-treated animals, combined administration of alpha-Toc or PG with  $\text{NaNO}_2$  significantly increased the areas and numbers of forestomach nodules as compared with the respective antioxidant alone values. Microscopically, in MNNG-treated animals, treatment with TBHQ significantly increased the incidence and multiplicity of forestomach papillomas as compared with basal diet alone value. Combined administration of alpha-Toc with  $\text{NaNO}_2$  significantly raised the multiplicity of forestomach papillomas, with a tendency to elevation in the incidence as compared with the group given alpha-Toc alone. Incidences of forestomach moderate and/or severe hyperplasias were significantly higher in the TBHQ or PG plus  $\text{NaNO}_2$  groups than in the single compound groups. In rats without MNNG treatment, combined treatment of antioxidants with  $\text{NaNO}_2$  significantly increased the incidences of mild or moderate hyperplasia. In the glandular stomach, although the incidence of atypical hyperplasia showed a non-significant tendency for decrease with TBHQ treatment, additional administration of  $\text{NaNO}_2$  caused significant increase. These results indicate that co-administration of  $\text{NaNO}_2$  with alpha-Toc, TBHQ or PG and particularly the first, promotes

forestomach carcinogenesis. Concurrent alpha-Toc, TBHQ or PG treatment with NaNO<sub>2</sub> is likely to induce forestomach tumors in the long term.

Keywords: antioxidant, sodium nitrite, forestomach carcinogenesis

Okazaki, K., Imazawa, T., Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A., Hirose, M. : **A repeated 28 days oral dose toxicity study of 17alpha-methyltestosterone in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals**

*Arch. Toxicol.*, **75**, 635-642 (2002)

As part of the international validation project to establish the Enhanced OECD Test Guideline 407, we performed a 28-day repeated-dose toxicity study of 17 $\alpha$ -methyltestosterone, an exogenous androgen agonist. Special attention was paid to the sensitivity of additional parameters for detecting endocrine-related effects of endocrine-disrupting chemicals, based on the existing Test Guideline 407. Seven-week-old Crj:CD(SD)IGS rats were allocated to one of four groups, each consisting of ten males and ten females, and 17 $\alpha$ -methyltestosterone was administered daily by gavage at doses of 0 (control), 5, 20 and 80 mg/kg body weight per day. Male rats were killed on the day after the 28th administration and females on the day of the diestrus stage during the 4 day period after the 28th administration. Male rats receiving 80 mg/kg 17 $\alpha$ -methyltestosterone demonstrated decreases in testis and epididymis weights, atrophy of seminiferous tubules and Leydig cells, and degenerated pachytene spermatocytes in the testes and degenerated germ cells in the epididymides as major alterations. Female rats showed abnormal estrous cycles, decreases in ovary and adrenal weights, increase in immature follicles with decreased corpus lutea in the ovaries at doses of 5 mg/kg and higher, as well as atrophy of zona reticularis in the adrenals and increase in mammary gland secretion at 20 mg/kg and above. Dilatation of the lumina and apoptosis of endometrial cells in the uterus, mucinification in the vagina and increase in serum follicle-stimulating hormone were seen with 80 mg/kg. Among the parameters examined in the present experimental system, effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on endocrine-related organs were detected in organ weights and histopathological examination of both sexes, and in serum hormones and estrous cycle of females. Based on these results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in the present study was estimated to be below 5 mg/kg per day. In particular, effects were most sensitively detected by organ weights and histopathological examination of sexual organs.

Keywords: 17 $\alpha$ -methyltestosterone, enhanced OECD guideline, endocrine disruptor

Nakamura, H., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara,

K, Miyauchi, M, Okazaki, K., Imazawa, T., Uchida, K. \*, Hirose, M. : **Enhancing effects of oltipraz on the development of spontaneous hepatic lesions in LEC rats**  
*Toxicol. Pathol.*, **30**, 173-177 (2002)

Oltipraz, developed as an antischistosomal agent, protects against the hepatotoxicity of many xenobiotics and is known to be an effective inhibitor of experimental carcinogenesis in rodents. In the present study, we investigated its effects on the development of lesions in LEC rats, established as a mutant strain characterized by a hereditary predisposition for hepatic damage with severe jaundice. A total of 35 male 6-week-old LEC rats were divided into 2 groups, one administered diet supplemented with oltipraz at a dose of 400 ppm, and the other fed basal diet alone. Animals in each group were sequentially sacrificed at 10, 15, and 25 weeks after commencement of the oltipraz administration. Eight animals died or became moribund in the oltipraz group during weeks 10 and 11 of the treatment, whereas only one rat in the nontreatment group died after 16 weeks. All dead or moribund animals showed severe or moderate jaundice. The treatment caused a decrease in body weight gain from 9 to 13 weeks, and an increase in relative liver weight at each sacrifice point. Serum biochemical assays performed at week 25 revealed elevated levels of serum AST, ALT, LDH, ALP,  $\gamma$ -GTP, and Cu in the treated animals. The glutathione level in the livers of oltipraz-treated animals was significantly higher than that in the control rats. Histopathologically, enlarged hepatocytes with large nuclei, focal necrosis, pigment granule-laden Kupffer cells and hypertrophy of renal tubule cells were observed in both groups, but the severity of these changes was greater in the oltipraz group. Our results thus indicate that spontaneous hepatic damage in LEC rats is enhanced by oltipraz, by a mechanism that remains to be elucidated.

Keywords: oltipraz, LEC rat, hepatic lesions

\*名古屋大学農学部

Kasahara, K., Nishikawa, A., Furukawa, F., Ikezaki, S., Tanakamaru, Z., Lee, I-S. \*, Imazawa, T., Hirose, M. : **A chronic toxicity study of josamycin in F344 rats**  
*Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1017-1022 (2002)

The chronic toxicity of josamycin was examined in Fischer 344 (F344) rats. Groups of 10 males and 10 females were given the test compound in the diet at concentrations of 0 (control), 0.02, 0.1, 0.5 or 2.5% for 52 weeks. Daily intake of josamycin was 0, 10, 50, 260 and 1310 mg/kg body weight in males and 0, 10, 60, 290 and 1460 mg/kg body weight in females, respectively. Body weight gain was significantly ( $P < 0.05$ ) reduced in the male 2.5% group but no noticeable changes were found in food intake. In hematological examination, the platelet count was significantly ( $P < 0.01$ ) lower in the male groups given 0.02% or more of josamycin and in the 2.5% female group

as compared with the control group values in a dose-dependent manner. In serum biochemical examination, blood urea nitrogen was significantly ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively) higher in males given 0.5 and 2.5% and total bilirubin was significantly ( $P < 0.05$ ) higher in females receiving 2.5% as compared with those of the control group. No death occurred at any dose levels during the dosing period. At necropsy, with the exception of cecal enlargement in the groups given more than 0.1% josamycin and a significant ( $P < 0.01$ ) increase in the relative liver weight of females in the 2.5% group, no particular findings related to the administration were observed. Histopathologically, the incidence and severity of liver bile duct proliferation in female 2.5% group were significantly ( $P < 0.01$ ) greater than those of the control group. Other histological changes found in the treated and control groups were similar to the spontaneous lesions in this strain of rats in terms of the incidence and severity. Interestingly, the josamycin treatment reduced the development of altered liver cell foci in females in a dose-dependent manner. Thus, it is concluded that, under the present experimental conditions, josamycin induces bile duct proliferation in female F344 rats at a high dose of 1460 mg/kg body weight. Based on the decrease of platelet count found in males given 10 mg/kg body weight or more, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was estimated to be less than 10 mg/kg body weight.

Keywords: josamycin, chronic toxicity, rat

\*韓国啓明大学

Furukawa, F., Nishikawa, A., Kitahori, Y. \*, Tanakamaru, Z., Son, H-Y., Hirose, M. : Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats

*J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 21, 197-201 (2002)

Aberrant crypt foci (ACF) have been proposed as intermediate biomarkers for colon carcinogenesis on the basis of many rodent studies. Although molecular analyses have indicated that these lesions in experimental animals are related to early events in colon carcinogenesis, their preneoplastic nature has yet to be fully elucidated. In the present study, one hundred and thirty 19-week-old male Fischer 344 rats were examined. The biological characteristics of spontaneous ACF were analyzed histopathologically, immunohistochemically and with molecular biological techniques, and compared with colon tumors found in control groups used for carcinogenicity tests. The incidences of spontaneous ACF consisting of 1, 2, 3 and 4 or more crypts were respectively 27.7%, 32.5%, 16.8% and 22.8%. Most ACF were distributed in the lower middle and upper distal colon, and proximal colon ACF was rare. Likewise, ACF frequently (42.5%) developed in untreated animals, whereas the incidence of spontaneous colorectal tumors was extremely low (0.68%) in control male rats. In addition, spontaneous ACF did not show apparent proliferative activity or c-K-ras point mutations.

Our results thus suggest that spontaneous ACF rarely progress to colon tumors although long-term sequential observation might be necessary to conclude the significance of ACF.

Keywords: aberrant crypt foci, colon, F344 rat

\*奈良県衛生研究所

Okazaki, K., Yamagishi, M., Son, H-Y., Imazawa, T., Furukawa, F., Nakamura, H., Nishikawa, A., Masegi, T., Hirose, M. : Simultaneous treatment with benzyl isothiocyanate, a bladder promoter, inhibits rat urinary bladder carcinogenesis by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine

*Nutr. Cancer*, 42, 211-216 (2002)

Effects of benzyl isothiocyanate (BITC) on urinary bladder carcinogenesis were examined in rats simultaneously treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN). Groups of 20 6-wk-old Fischer 344 male rats were given 10, 100, or 1,000 ppm BITC in the diet or a basal diet with 50 ppm BBN in the drinking water for 40 wk and then killed for autopsy. Additional groups consisting of 10 or 9 rats were similarly given BITC or the basal diet alone without BBN treatment. With BBN treatment, dysplasia, papilloma, and carcinoma incidences and multiplicities were dramatically decreased by simultaneous treatment with BITC in a clear dose-dependent manner. In contrast, epithelial hyperplasia was induced in rats treated with 100 and 1,000 ppm BITC without BBN. These results clearly indicate that although BITC may have weak carcinogenic potency, it is a potent chemopreventive agent against bladder tumor induction by BBN.

Keywords: benzyl isothiocyanate, bladder carcinogenesis, rat

Okazaki, K., Okazaki, S. \*, Nakamura, H. \*, Kitamura, Y. \*, Hatayama, K. \*, Wakabayashi, S. \*, Tsuda, T. \*, Katsumata, T. \*, Nishikawa, A., Hirose, M. : A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals

*Arch. Toxicol.*, 76, 553-559 (2002)

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 genistein, which is known as a phytoestrogen. Attention was paid to the sensitivity of certain additional parameters, such as histopathology observations and organ weights of endocrine related organs, sperm characteristics, serum hormone levels and estrous cycle, for detecting endocrine-related effects of endocrine-disrupting chemicals based on the existing TG 407. Seven-week-old Crj:CD(SD)IGS rats were assigned to one of four groups, each consisting of ten males and ten females, and genistein was administered once daily by

gavage at doses of 0 (control), 120, 400 or 1000 mg/kg body weight per day. Male rats were killed on the day after the 28th administration. Female rats were killed on the day of the diestrus stage during the 4 days after the 28th administration. Endocrine-disrupting effects of genistein were detected in females by histopathology. The changes included vacuolation and mucinification of the vaginal epithelium in the 400 and 1000 mg/kg groups; however, the incidences of the lesion were very low. Although increased serum prolactin levels were recorded in the males of the 1000 mg/kg group, we could not determine whether this was indeed induced by genistein. General toxicological effects of genistein were detected in blood chemistry, such as increased triglycerides and total protein and a decreased albumin/globulin ratio, as well as increased liver weight and glycogen deposition in the periportal hepatocytes. Based on these results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) in the present study was estimated to be 120 mg/kg per day. In particular, endocrine-related effects were most sensitively detected by histopathology examination of sexual organs. However, the findings indicate that chemicals with weak endocrine-disrupting potential like genistein must be evaluated taking into consideration the results of other test systems.

Keywords: genistein, enhanced OECD guideline, endocrine disruptor

\*ボゾリサーチセンター

Yamagishi, M., Natsume, M. \*, Osakabe, N. \*, Nakamura, H., Furukawa, F., Imazawa, T., Nishikawa, A., Hirose, M. : **Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis *in vitro*, and *in vivo* mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats**

*Cancer Lett.*, **185**, 123-130 (2002)

The effects of cacao liquor proanthocyanidins (CLPr) on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mutagenesis *in vitro* and on *in vivo* carcinogenesis in female Sprague-Dawley (SD) rats were investigated. In the Ames assay using *Salmonella typhimurium* TA98, CLPr showed strong antimutagenic effects against PhIP when assayed in the presence of S-9 mixture. For determination of the influence on initiation and subsequent development of lesions, CLPr (0.025% or 0.25%) were fed during the period of PhIP application (100 mg/kg given to rats via gastric tubes eight times over 4 weeks), or thereafter until the termination at 48 weeks. CLPr treatments did not affect body or organ weights. The incidences, multiplicities and volumes of mammary tumors in the 0.25% CLPr (post-initiation) group showed a tendency to decrease as compared to PhIP alone group values, although without statistical significance. The incidences of preneoplastic eosinophilic foci in the exocrine pancreas were significantly ( $P < 0.05$ ) decreased

in a dose-dependent manner when CLPr were given during the initiation period. These results indicate that CLPr inhibit *in vitro* mutagenicity of PhIP, as well as rat pancreatic carcinogenesis in the initiation stage, but not mammary carcinogenesis induced by PhIP.

Keywords: cacao liquor, PhIP, tumorigenesis

\*明治製菓

Umamura, T., Kodama, Y., Hioki, K. \*<sup>1</sup>, Nomura, T. \*<sup>1</sup>, Nishikawa, A., Hirose, M., Kurokawa, Y. \*<sup>2</sup> : **The mouse rasH2/BHT model as an *in vivo* rapid assay for lung carcinogens**

*Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 861-866 (2002)

In the present study, to ascertain appropriate conditions for BHT administration in this model, the effects of exposure on proliferation of alveolar type II cells in male rasH2 mice were examined. Additionally, use of BHT was validated for promotion of urethane (UR) carcinogenesis in male and female rasH2 mice. In a time-course study of a single intragastric administration of BHT at a dose of 400 mg/kg, increased bromodeoxyuridine-labeling index (LI) reached a maximum 3 days after treatment and was still observed after 7 days. In a dose-response study, effects were dose-dependent, the dose of 400 mg/kg causing eight fold elevation as compared to the control. With repeated administration, whereas the LI was increased dramatically at first, effects gradually diminished with further exposure, and finally six BHT treatments failed to induce cell proliferation. In a two-stage model using UR as the initiator, although up to five consecutive doses of BHT were able to exert continued enhancing effects in terms of adenoma yield, no increment was evident with further treatments. The data overall indicate that a rasH2/BHT model with five weekly administrations of BHT at a dose of 400 mg/kg is most efficacious.

Keywords: rasH2 mice, butylhydroxytoluene, *in vivo* assay

\*<sup>1</sup> 実中研

\*<sup>2</sup> 佐々木研

Niho, N., Shibutani, M., Toyoda, K., Sato, H., Hirose, A., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Hirose, M. : **Dose- and time-response studies of sodium *o*-phenylphenate urinary bladder carcinogenicity in rats.**

*Food Chem. Toxicol.*, **40**, 715-722 (2002)

Dose- and time-response studies of urinary bladder carcinogenesis by sodium *o*-phenylphenate (OPP-Na) were performed using male F344 rats given diets containing 0, 2500, 5000, 10,000, 15,000 or 20,000 ppm OPP-Na for 104 weeks (experiment 1). In addition, rats received diets containing 20,000 ppm OPP-Na for 0, 12, 24, 52 or 104 weeks (experiment 2). In experiment 1, the dose-response curve was steep with many tumors occurring only at the high doses. The VSD at a risk level of  $10^{-6}$  for transitional cell carcinomas (TCCs) and

papillomas was estimated to be 144 ppm, a high value similar to that for sodium saccharin. In experiment 2, the time-response curve was steep with the majority of lesions occurring after longer exposure periods. Based on the observed steepness in dose- and time-responses, any implied cancer risk of OPP-Na at the low doses of interest to man must be considered to be very small.

Keywords: Sodium *o*-phenylphenate, Urinary bladder carcinogenicity, VSD

Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, C., Masutomi, N., Nishikawa, A., Hirose, M. : **Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital treatment in a medium-term rat liver bioassay.**

*Carcinogenesis*, **23**, 1047-1055 (2002)

In search of genes that are steadily up-regulated during the promotion stage in carcinogenesis, suppression PCR subtractive hybridization and following northern blot screening were performed using a phenobarbital (PB)-promotion model based on a medium-term liver bioassay. Fragments of a total of 67 different genes were isolated from the up-regulated gene population in the liver at day 10 of PB. Sixteen genes showed up-regulation in the livers at week 8 of promotion, common to the PB and 1 ppm ethinylestradiol (EE) treatments. The majority of these genes were also up-regulated at week 8 by 3000 ppm butylated hydroxytoluene treatment, and were also constitutively expressed in the uninitiated rat livers. Among them, six genes showed overexpression in PB-promoted hepatocellular carcinomas. These genes might be candidates for biomarkers in screening of non-genotoxic hepatocarcinogens by analysis in two-stage carcinogenesis models.

Keywords: Gene expression profiling, Suppression PCR subtractive hybridization, Non-genotoxic hepatocarcinogenesis

Arai, K. \*, Shibutani, M., Matsuda, H. \* : **Distribution of the class II beta-tubulin in developmental and adult rat tissues.**

*Cell Motil Cytoskeleton*, **52**, 174-182 (2002)

During a screen of monoclonal antibodies raised against a cytoskeletal preparation of neonatal rat cerebrum, we have identified a monoclonal antibody, MAb58A, that is specific for the class II beta-tubulin isotype. Immunoscreening of a rat brain cDNA library using MAb58A yielded the cDNA retaining a class II-specific nucleotide sequence. The specificity of MAb58A to the class II beta-tubulin isotype was confirmed by immunoreactivity to synthetic peptides. Further, antibody epitope was found to be Glu-Glu-Glu-Glu-Gly-Glu-Asp. Immunohistochemically, MAb58A reacted predominantly with components of the developing rat nervous system. In adults, the immunoreactivity was remarkably diminished. Together, our results demonstrate that MAb58A is

specific for the class II beta-tubulin isotype, which may retain an embryonic nature.

Keywords: Class II beta-tubulin, Monoclonal antibody, Embryonic expression

\*Tokyo University of Agriculture and Technology

Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M. : **Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens.**

*J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 1237-1245 (2002)

We investigated the performance of methacarn for genomic DNA analysis using microdissected rat tissues, and found that a 522-bp fragment from a single cell could be amplified in 20% of cresyl violet-stained cells by nested PCR, and the minimal number of cells required, as estimated using hippocampal neurons, was on the order of 10-20. Although HE staining affected the PCR, amplification of a 522-bp fragment was successful, with 150-270 cells by 35 cycles of single-step PCR. Although immunostaining resulted in a substantial decrease of yield and degradation of extracted DNA, a 184-bp fragment could be amplified with 150-270 cells. The results thus demonstrate the superior performance of methacarn to that reported with formalin in genomic DNA analysis using microdissected PET specimens.

Keywords: Methacarn, Microdissection, DNA analysis

Imai, T., Yasuhara, K., Tamura, T., Takizawa, T., Ueda, M., Hirose, M., Mitsumori, K. \* : **Inhibitory effects of cinnamaldehyde on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung carcinogenesis in rasH2 mice**

*Cancer Lett.*, **175**, 9-16 (2002)

We evaluated cinnamaldehyde (CNMA) effects using CB6F1-TgHras2 (rasH2) mice and non-transgenic littermates (non-Tg) initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). Lung tumors were induced by NNK in both rasH2 and non-Tg males and females at incidence ranging from 63 to 100%. CNMA treatment significantly reduced the combined incidence of adenomas and carcinomas from 86 to 31% in rasH2 males ( $P < 0.05$ ), but no significant influence was evident in females. The multiplicity was also significantly reduced in rasH2 males given CNMA ( $P < 0.01$ ). Similar effects were also observed in non-Tg females given CNMA after NNK initiation. The results of our study strongly indicate that CNMA is capable of inhibiting development of NNK-initiated pulmonary tumorigenesis in rasH2 and non-Tg mice.

Keywords: cinnamaldehyde, lung cancer, mice

\*東京農工大学農学部

Takizawa, T., Imai, T., Mitsumori, K. \*, Takagi, H., Onodera, H., Yasuhara, K., Ueda, M., Tamura, T.,

Hirose, M. : **Gonadal toxicity of an ethanol extract of Psoralea Corylifolia in a rat 90-day repeated dose study.** *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 97-105 (2002)

An extract of *Psoralea corylifolia* was dietary administered at concentrations of 0.375 to 3.0% to F344 rats for 90 days to evaluate its toxicity. Body weight gain, food consumption and food conversion efficiency were lower in the extract-treated animals as compared to the control. Testes weights in the 1.5 and 3.0 groups and ovary weights in the 3.0% group were significantly ( $p < 0.01$ ) lower than the control group. Seminiferous tubular atrophy and Leydig cell atrophy in the testes, and epithelial cell atrophy in the seminal vesicles and prostate were observed in the 1.5 and 3.0% males. Decreased number of corpora lutea associated with frequent necrotic follicles in the ovaries in the 1.5 and 3.0% females and less frequent endometrial glands in the uterus in the 3.0% were also detected. These results might suggest disruption of the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in *Psoralea corylifolia*-treated rats as possible mechanisms underlying this gonadal toxicity.

Keywords: *Psoralea corylifolia*, gonadal toxicities, rats

\*東京農工大学農学部

Ueda, M., Takagi, H., Onodera, H., Yasuhara, K., Takizawa, T., Imai, T., Mitsumori, K.\*, Matsui, T.\*, Hirose, M. : **Enhancing effects of beta-estradiol 3-benzoate but not methoxychlor on the promotion/progression stage of chemically-induced mammary carcinogenesis in ovariectomized rats.**

*Jpn. J. Cancer Res.*, **93**, 752-759 (2002)

Modifying effects of beta-estradiol 3-benzoate (EB) and methoxychlor (MXC), a pesticide which possesses weak estrogenic activity, on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary carcinogenesis were investigated in ovariectomized or intact female Sprague-Dawley rats. Although EB treatment stimulated the tumor growth, MXC did not show any effect except that the multiplicity of tumors was significantly decreased by MXC treatment in some rats. The results of our study suggest that MXC has no promotion / progression effect, but rather possesses a weak inhibitory effect, whereas the strongly estrogenic substance EB clearly enhanced DMBA-induced mammary tumorigenesis.

Keywords: methoxychlor, mammary tumors, rats

\*岐阜大学大学院連合獣医学研究科

Imai, T., Yasuhara, K., Matsui, H., Maruyama, S.\*<sup>1</sup>, Fujimoto, N.\*<sup>1</sup>, Mitsumori, K.\*<sup>2</sup>, Hirose, M. : **Iron lactate induction of pancreatic and endometrial proliferative lesions and a lack of increased tumors in a 104-week carcinogenicity study in F344 rats.**

*Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1441-1448 (2002)

Fischer 344 rats were fed basal diet containing 0, 1 or 2% of iron lactate for 104 weeks. No iron lactate-induced

tumors were observed in any groups, although the incidences of pancreatic acinar cell and endometrial gland hyperplasias were increased in males and females, respectively, in the 2% group. Thus our *in vivo* animal data indicate that iron lactate lacks carcinogenicity in male and female F344 rats. However, estrogenic effects might be concluded based on the data for endometrial lesions. An estrogen responsive rat pituitary tumor cell line, MtT/Se, and a human breast cancer cell line, MCF-7, were therefore employed to examine the estrogenic potential of iron lactate with regard to receptor binding affinity and ERE-reporter gene activation. Results in both cases were negative.

Keywords: iron lactate, carcinogenicity, estrogenic potentials

\*<sup>1</sup> 広島大学原爆放射線医科学研究所

\*<sup>2</sup> 東京農工大学

Onodera, H., Imai, T., Takagi, H., Tamura, T., Ueda, M., Mitsumori, K.\*, Hirose, M. : **Difference in the types of uterine tumors between heterozygous p53-deficient and wild type CBA mice treated with ethinylestradiol after N-ethyl-N-nitrosourea initiation.**

*J. Toxicol. Pathol.*, **15**, 203-207 (2002)

To cast light on the mechanisms of rapid induction of endometrial stromal sarcomas in p53-deficient CBA mice [p53(+/-) mice] treated with ethinylestradiol (EE) after a single injection of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), p53(+/-) and CBA/JNCrj mice [CBA mice] were given diet containing 2.5 ppm EE for 26 and 50 weeks, respectively, after ENU-initiation, and the types of uterine tumors induced were compared. Endometrial adenocarcinomas (AC) and stromal sarcomas (SS) were induced in 7 and 73%, respectively, of the p53(+/-) mice given ENU followed by EE. In contrast, the CBA mice demonstrated incidences of AC and SS of 100 and 25%, respectively. These results suggest that the uterine stromal cell is a major target of ENU-initiation in p53(+/-) mice. The uterine epithelial cell is another target but subsequent long-term EE treatment appears prerequisite for the development of AC.

Keywords: ENU, uterus, p53-deficient mice

\*東京農工大学農学部

Ohyama, W.\*<sup>1</sup>, Gonda, M.\*<sup>1</sup>, Miyajima, H.\*<sup>2</sup>, Kondo, K.\*<sup>2</sup>, Noguchi, T.\*<sup>3</sup>, Yoshida, J.\*<sup>4</sup>, Hatkeyama, S.\*<sup>5</sup>, Watabe, E.\*<sup>5</sup>, Ueno, Y.\*<sup>5</sup>, Hayashi, M., and Tokumitsu, T.\*<sup>1</sup> : **Collaborative validation study of the *in vivo* micronucleus test using mouse colonic epithelial cells**

*Mutat. Res.*, **518**, 39-45 (2002)

The *in vivo* micronucleus test using mouse colon epithelial cells was evaluated as the 11th collaborative study organized by the Collaborative Study Group on the Micronucleus Test (CSGMT/MMS · JEMS) with 3 model chemicals that were known to induce chromosome

damage in mouse colon cells. Five laboratories participated in this validation study. All 3 model chemicals, *i.e.*, 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, and mitomycin C, induced micronucleated colon epithelial cells in a 4-day exposure protocol in all participating laboratories. We confirmed that the present single cell suspension method could be used to detect the model chemicals as micronucleus inducers in mouse colon epithelial cells. Advantages of this method are that experiments are easy to perform and that intact cells are able to be analyzed. The present study suggested that the colon micronucleus assay proposed here is useful for mechanistic studies of colon carcinogenesis.

Keywords: collaborative validation, micronucleus assay, mouse colon epithelial cells

\*<sup>1</sup> Yakult Central Institute for Microbiological Research

\*<sup>2</sup> Developmental Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

\*<sup>3</sup> Japan Bioassay Research Center

\*<sup>4</sup> Safety Research, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.

\*<sup>5</sup> Nisshin Kyorin Pharmaceutical Co. Ltd.

Kusakabe, H.\*<sup>1</sup>, Yamakage, K.\*<sup>1</sup>, Wakuri, S.\*<sup>1</sup>, Sasaki, K.\*<sup>1</sup>, Nakagawa, Y.\*<sup>1</sup>, Watanabe, M.\*<sup>1</sup>, Hayashi, M., Sofuni, T.\*<sup>2</sup>, Ono, H.\*<sup>1</sup> and Tanaka, N.\*<sup>1</sup> : **Relevance of chemical structure and cytotoxicity to the induction of chromosome aberrations based on the testing results of 98 high production volume industrial chemicals** *Mutat. Res.*, **517**, 187-198 (2002)

During a 6-year period (1991-1996), we have tested 98 high production volume (HPV) industrial chemicals for cytogenetic activity according to OECD HPV testing program and the national program in Japan. Chemicals were tested for cytotoxicity, clastogenicity, and polyploid induction using Chinese hamster lung (CHL/IU) cells. 39 chemicals (40%) induced chromosomal aberrations (CAs), however, 8 of them due to unphysiological culture condition (lowering of pH of the culture medium). 28 chemicals induced structural chromosome aberrations and anilines, aromatic sulfons or halides, and phenols consisted of this group. Polyploid was induced by 15 chemicals, *e.g.*, *p*-*tert*-Butylphenol (PTBP) induced polyploidy at a markedly high frequency (93.2%). Unexpectedly, up to 12 chemicals induced both structural CAs and polyploidy. Methacrylate compounds belong to this group. The majority of the organic phosphates, ethers, alcohols, benzenes carrying only hydrocarbon residue and non-cyclic alkanes had no clastogenic activity. Thirty six CA-positive chemicals were also evaluated by bacterial gene mutation assay. 27 chemicals (75.0%) of them induced CAs at weak cytotoxic (50% or less) concentration. Among 27 chemicals 5 were mutagenic and 22 were not. Nine chemicals induced CAs at only cytotoxic concentration, of which 3 were mutagenic and 6

were not. The results suggested there was not obvious correlation between cytotoxicity, at which concentrations CAs were induced, and mutagenicity.

Keywords: industrial chemicals, chromosomal aberrations, cytotoxicity

\*<sup>1</sup> Food and Drug Safety Center

\*<sup>2</sup> Olympus Optical Co., Ltd.

Wakuri, S.\*<sup>1</sup>, Takahashi, A.\*<sup>1</sup>, Hayashi, M., and Tanaka, N.\*<sup>1</sup> : **Cytotoxicity test with waters from Sakawa river and its tributaries**

*J. Japan Soc. On Water Environment*, **25**, 669-674 (2002) (in Japanese)

The waters from the Sakawa River and its tributaries were tested on colony forming ability with Balb 3T3 A31-1 and Vero cells, both of which showed good sensitivities to the test water and some pesticides as positive control. The sample water was also subjected to the standard water analysis, such as counting the numbers of bacteria, concentration of nitrate and nitrite nitrogens, COD, and electric conductivity in the water. The river waters were collected at 7 times at 13 points from August, 1995 to July, 1997. Relative plating efficiencies at maximum concentration of the river waters (net river water in the medium was 81%) were used to compare the cytotoxicity of each water. The ranking of each water in various parameters was determined according to the plating efficiency or each parameter of chemical analysis, then in cells (total ranking of cytotoxicity) or in the standard water analysis (total ranking of standard water analysis). These rankings were compared between one another. On the whole, the results of total ranking of cytotoxicity and total ranking of standard water analysis were highly correlated. However, some waters showed strong cytotoxicity even though they were judged as 'clean waters' from the standard water analysis. That suggests that biological test is possible to detect the complex pollutants in the environmental water.

Keywords: cytotoxicity test, complex pollutants, environmental water

\* Food and Drug Safety Center

Saotome, K.\*<sup>1</sup>, and Hayashi, M. : **Application of a sea urchin micronucleus assay to monitoring aquatic pollution: influence of sample osmolality** *Mutagenesis*, **18**, 73-76 (2003).

We improved our sea urchin micronucleus assay for aquatic samples and used it to evaluate marine pollution. We found that the water samples we had collected for two years from the bay coast of Tokyo, an industrial megalopolis, were positive due to the hypoosmotic water sample rather than to chemical pollutants. The evidence was as follows: 1) the osmolality and salinity of the samples were about half that of sea water, 2) the micronucleus frequency induced in the water sample

decreased to the control level when the osmolality was increased to that of sea water, and 3) artificial sea water diluted with distilled water induced micronuclei dilution-dependently. Since micronucleus induction in the sea urchin assay is influenced by sample osmolality, the osmolality must be adjusted to that of sea water for the assay, and osmotic pressure must be considered when evaluating water pollution.

**Keywords:** micronucleus assay, marine pollution

\*Yokohama City Institute of Health

Hamada, S. \*, Nakajima, K. \*, Serikawa, T. \* and Hayashi, M. : **The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay**

*Mutagenesis*, **18**, 273-275 (2003)

We conducted the micronucleus assay in 3-, 5-, 7-, 9-, 11-, and 13-week-old male rats to see if the results varied with age. We administered cyclophosphamide orally at 0 (vehicle), 5, 10, or 20 mg/kg, twice, 24 h apart, to 5 rats per dosage group and collected bone marrow and peripheral blood 24 h after the second treatment. We observed an age-related decrease in micronucleus-inducing activity in both polychromatic erythrocytes and reticulocytes, which we attributed to an age-related decrease in hematopoiesis. In spite of the age-related decrease in sensitivity, all age groups tested showed positive responses. We concluded that the rat is suitable for the micronucleus assay regardless of age.

**Keywords:** micronucleus assay, cyclophosphamide, hematopoiesis

\*Central Research Laboratory, SSP Co., Ltd.

Morimoto, S. \*, Honma, M., Yatagi, F. \* : **Effect of p53 codon 237 mutation on X-ray induced HPRT mutation.**

*Environ. Mutag. Res.*, **24**, 17-21 (2002)

To determine the influence of mutant p53 on HPRT mutations induced by ionizing radiation, we irradiated human lymphoblastoid cell line TK6 (wild-type p53) and WI-L2-NS (mutant p53 at codon 237) with X-rays. X-ray enhanced the HPRT mutation frequency, yielding values that were 6 times the spontaneous level in TK6 and 6.8 times that level in WI-L2-NS. The proportion of complete deletions was increased by X-ray in both TK6 and WI-L2-NS, but no difference observed between them, suggesting that mutation of codon 237 in p53 gene did not influence the spectrum of HPRT mutation.

**Keywords:** HPRT mutation, X-ray exposure, p53

\*理化学研究所

Morimoto, S. \*, Honma, M., Yatagi, F. \* : **Sensitive detection of LOH events in a human cell line after C-ion beam exposure.**

*J. Radiat. Res.* **43 suppl**, S163-S167 (2002)

A molecular analysis of the loss of heterozygosity (LOH) events in human cells after low-dose heavy-ion

exposure could contribute to the sensitive detection of the genetic influences caused by high-LET radiation. We exposed human lymphoblastoid TK6-20C cells to 10 cGy of an accelerated C-ion (22 keV/ $\mu\text{m}$ ) beam, and observed 3.1-fold increase in the mutation frequency (MF) at the heterozygous TK locus over the background level. Almost mutants were hemizygous LOH, which was considered to be result of the end-joining repair of DNA double strand breaks (DSBs). C-ion may efficiently induce DSBs than low-dose X-rays.

**Key words:** LOH, C-ion, double strand breaks (DSBs)

\*理化学研究所

Honma, M., Tadokoro, S., Sakamoto, H., Tanabe, H., Sugimoto, M. \*<sup>1</sup>, Furuichi, Y. \*<sup>1</sup>, Satoh, T. \*<sup>2</sup>, Sofuni, T. \*<sup>2</sup>, Goto, M. \*<sup>3</sup>, Hayashi, M. : **Chromosomal instability in B-lymphoblastoid cell lines from Werner and Bloom syndrome patients.**

*Mutat. Res.* **520**, 12-24 (2002)

Werner's syndrome (WS) and Bloom's syndrome (BS) are rare autosomal genetic diseases that predispose to cancer and are associated with genomic instability. We analyzed and compared the cytogenetics of B-lymphoblastoid cell lines (LCLs) from WS and BS patients and healthy donors. Although similar spontaneous frequencies of micronuclei (MN) and sister chromatid exchanges (SCE) were observed in LCLs from WS patients and healthy donors, they were much higher in BS-LCLs. BS-LCLs but not WS-LCLs tended to be resistant to cytotoxicity and sensitive to MN induction by 4NQO and MMC. Spectrum karyotyping analysis revealed that most WS- and BS-LCLs generated "variegated translocation mosaicism" at high frequencies during cell culture. These findings support the idea that the basis of genomic instability in WS is different from that in BS.

**Keywords:** Werner syndrome, Bloom syndrome, chromosomal instability

\*<sup>1</sup> ジーンケア研究所

\*<sup>2</sup> オリンパス光学ライフサイエンス研究センター

\*<sup>3</sup> 都立大塚病院

Hayashi, H. \*<sup>1</sup>, Kondo, H. \*<sup>1</sup>, Masumura, K., Shindo, Y. \*<sup>1</sup> and Nohmi, T. : **A novel transgenic rat for *in vivo* genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi selection.**

*Environ. Mol. Mutagen.*, **41**, 253-259 (2003)

We report here the establishment of a novel transgenic rat for genotoxicity analysis. In this model, about 10 copies of lambda EG10 DNA carrying the *gpt* gene of *E. coli* and the *red/gam* genes of lambda phage are integrated per haploid genome of Sprague-Dawley rats at position 4q24-q31. After recovery of lambda EG10 phage, point mutations in the *gpt* gene and deletions in the *red/gam* genes are identified by 6-thioguanine and Spi

selection, respectively. To examine the suitability of these rats for performing *in vivo* mutagenicity assays, rats were treated with single intraperitoneal injections of ethylnitrosourea (ENU; 100 mg/kg) or benzo[a]pyrene (B[a]P; 62.5 and 125 mg/kg), and the mutant frequencies (MFs) in the liver were determined 7 days after the treatment. ENU enhanced the *gpt* MF about 7-fold over the control while it did not significantly increase the Spi<sup>-</sup> MF. B[a]P increased both the *gpt* and Spi<sup>-</sup> MFs several-fold in a dose-dependent manner. The *gpt* MF in the liver (50 mg ENU/kg/day for 5 successive days) increased to 8-fold and 13-fold over the control at 7 and 35 days, respectively, after the last injection and then slightly declined at 70 days. This novel transgenic rat could be useful for investigating species differences between rats and mice in their response to genotoxic agents.

Keywords: *gpt* delta rat, 6-thioguanine selection, deletion mutation

\*1 明治製菓(株)

Shimizu, M. \*<sup>1</sup>, Gruz, P., Kamiya, H. \*<sup>2</sup>, Kim, S.-R., Pisani, F. M. \*<sup>3</sup>, Masutani, C. \*<sup>4</sup>, Kanke, Y. \*<sup>1</sup>, Harashima, H. \*<sup>2</sup>, Hanaoka, F. \*<sup>4</sup> and Nohmi, T. : **Erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by Y-family DNA polymerases.** *EMBO reports*, **4**, 269-273 (2003)

We report here that two Y-family DNA polymerases of the archaeon *Sulfolobus solfataricus* strains P1 and P2 incorporate oxidized dNTPs into nascent DNA in an erroneous manner: the polymerases exclusively incorporate 8-OH-dGTP opposite adenine in the template, and incorporate 2-OH-dATP opposite guanine more efficiently than opposite thymine. The rate of extension of the nascent DNA chain following on from these incorporated analogues is only slightly reduced. These DNA polymerases have been shown to bypass a variety of DNA lesions. Thus, our results suggest that the Y-family DNA polymerases promote mutagenesis through the erroneous incorporation of oxidized dNTPs during DNA synthesis, in addition to facilitating translesion DNA synthesis. We also report that human DNA polymerase  $\eta$  incorporates the oxidized dNTPs in a similar erroneous manner.

Keywords: erroneous incorporation, oxidized DNA, Y-family DNA polymerase

\*<sup>1</sup> 大妻女子大学院 家政学研究科

\*<sup>2</sup> 北海道大学院 薬学研究科

\*<sup>3</sup> Istituto di Biochimica delle Proteine, Consiglio Nazionale delle Ricerche

\*<sup>4</sup> 大阪大学院 生命機能学科

Takeiri, A. \*<sup>1</sup>, Mishima, M. \*<sup>1</sup>, Tanaka, K. \*<sup>1</sup>, Shioda, A. \*<sup>1</sup>, Ueda, O. \*<sup>1</sup>, Suzuki, H. \*<sup>1,2</sup>, Inoue, M. \*<sup>1</sup>, Masumura, K. and Nohmi, T. : **Molecular characterization of mitomycin C-induced large deletions and tandem-base substitutions in the bone marrow of *gpt* delta transgenic mice**

*Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 171-179 (2003)

We report here the molecular nature of deletions as well as base substitutions induced by antitumor antibiotic mitomycin C (MMC) in the bone marrow using a novel transgenic mouse, *gpt* delta. In this mouse model, deletions and point mutations in lambda DNA integrated in the chromosome are individually selected as Spi<sup>-</sup> (sensitive to P2 interference) phages and 6-thioguanine-resistant bacterial colonies, respectively. The mice were treated with MMC (1 mg/kg/day) for five consecutive days. The mutant frequency of Spi<sup>-</sup> with large deletions increased more than 20-fold over that of the control. Molecular sizes of the large deletions were mostly more than 2000 base pairs. The large deletions frequently occurred between two short direct repeat sequences from 2 to 6 base pairs, suggesting that they are generated during the end-joining repair of double-strand breaks induced by interstrand cross-links in DNA. In 6-thioguanine selection, tandem-base substitutions, such as 5'-GG-3' to 5'-AT-3', were induced. It highlights the relevance of intrastrand cross-links as genotoxic lesions. Previous *in vitro* studies report the induction of single-base substitutions and single-base deletions by MMC. However, no such mutations were identified *in vivo*. Thus, our results strongly caution that *in vitro* mutation spectra do not necessarily reflect genotoxic events *in vivo* and emphasize the importance of transgenic rodent genotoxicity assays to examine the roles of DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis.

Keywords: deletion mutation, mitomycin C, *gpt* delta

\*<sup>1</sup> 中外製薬(株) 富士御殿場研究所

\*<sup>2</sup> 帯広畜産大学 原虫病センター

Masumura, K., Kuniya, K. \*<sup>1</sup>, Kurobe, T. \*<sup>2</sup>, Fukuoka, M. \*<sup>1</sup>, Yatagai, F. \*<sup>2</sup> and Nohmi, T. : **Heavy-ion-induced mutations in the *gpt* delta transgenic mouse: Comparison of mutation spectra induced by heavy-ion, X-ray and  $\gamma$ -ray radiation.**

*Environ. Mol. Mutagen.*, **40**, 207-215 (2002)

To evaluate the genetic damage induced by heavy particle radiation, *gpt* delta transgenic mice were exposed to carbon particle irradiation and the induced mutations were compared with those induced by reference radiations, i.e., X-rays and gamma-rays. In the transgenic mouse model, deletions and point mutations were individually identified as Spi<sup>-</sup> and *gpt* mutations, respectively. Two days after 10 Gy of whole-body irradiation, the mutant frequencies (MFs) of Spi<sup>-</sup> and *gpt* were determined. Carbon particle irradiation significantly increased Spi<sup>-</sup> MF in the liver, spleen, and kidney but not in the testis, suggesting an organ-specific induction of mutations by heavy-ion irradiation. In the liver, the potency of inducing Spi<sup>-</sup> mutation was highest for carbon particles (3.3-fold increase) followed by X-rays (2.1-fold increase) and gamma-rays (1.3-fold increase), while the

potency of inducing *gpt* mutations was highest for gamma-rays (3.3-fold increase) followed by X-rays (2.1-fold increase) and carbon particles (1.6-fold increase). DNA sequence analysis was also carried out. The results suggest that heavy-ion beam irradiation is effective at inducing deletions via DNA double-strand breaks but less effective than X-ray and gamma-ray irradiation at producing oxidative DNA damage by free radicals.

Keywords: heavy-ion radiation, *gpt* delta transgenic mice, deletion

\*<sup>1</sup> 昭和薬科大学

\*<sup>2</sup> 理化学研究所 RI

Yatagai, F.\*<sup>1</sup>, Kurobe, T.\*<sup>1</sup>\*<sup>2</sup>, Nohmi, T., Masumura, K., Tsukada, T.\*<sup>1</sup>, Yamaguchi, H.\*<sup>3</sup>, Kasai-Eguchi, H.\*<sup>4</sup> and Fukunishi, N.\*<sup>5</sup> : **Heavy-ion induced mutations in transgenic mouse *gpt* delta: Effect of *p53* gene knockout.** *Environ. Mol. Mutagen.*, **40**, 216-225 (2002)

The influence of the loss of *p53* gene on heavy-ion-induced mutations was examined by constructing a new line of transgenic mice, *p53* knockout (*p53*<sup>-/-</sup>) *gpt* delta. Mice were exposed to 10 Gy of whole-body carbon-ion irradiation. The carbon ions were accelerated to 135 MeV/u by the RIKEN Ring Cyclotron. The *p53* defect markedly enhanced the Spi<sup>-</sup> mutant frequency (MF) in the kidneys of mice exposed to C-ion irradiation: the Spi<sup>-</sup> MF increased 4.4- and 2.8-fold over the background level after irradiation in *p53*<sup>-/-</sup> and *p53*<sup>+/+</sup> mice, respectively. There was no significant difference in the background Spi<sup>-</sup> MF between *p53*<sup>-/-</sup> and *p53*<sup>+/+</sup> mice. Sequence analysis of the Spi<sup>-</sup> mutants indicated that the enhancement of kidney Spi<sup>-</sup> MF in *p53*<sup>-/-</sup> mice was primarily due to an increase in complex or rearranged-type deletions. In contrast to the kidney, the *p53* defect had no effect on the Spi<sup>-</sup> MF in liver: Spi<sup>-</sup> MF increased 3.0- and 2.7-fold after the irradiation in *p53*<sup>-/-</sup> and *p53*<sup>+/+</sup> mice, respectively. Our results suggest that *p53* suppresses deletion mutations induced by heavy-ion irradiation in an organ-specific manner.

Keywords: *p53* knockout, heavy-ion exposure, transgenic mice *gpt* delta

\*<sup>1</sup> 理化学研究所 RI

\*<sup>2</sup> 早稲田大学

\*<sup>3</sup> 福山大学 工学部

\*<sup>4</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>5</sup> 理化学研究所 サイクロトロンセンター

Tanabe, H., Habermann, F.A.\*<sup>1</sup>, Solovei, I.\*<sup>2</sup>, Cremer, M.\*<sup>2</sup> and Cremer, T.\*<sup>2</sup> : **Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications** *Mutat. Res.*, **504**, 37-45, 2002

In the nucleus of animal and plant cells individual chromosomes maintain a compartmentalized structure. Chromosome territories (CTs), as these structures were

named by Theodor Boveri, are essential components of the higher-order chromatin architecture. Recent studies in mammals and non-mammalian vertebrates indicate that the radial position of a given CT (or segments thereof) is correlated with its size, its gene-density and its replication timing. As a representative case, chicken cell nuclei show highly consistent radial chromatin arrangements: gene-rich, early replicating microchromosomes are clustered within the nuclear interior, while gene-poor, later replicating macrochromosomes are preferentially located at the nuclear periphery. In humans, chromosomes 18 and 19 (HSA18 and 19) territories that are of similar size show a distinctly different position in the cell nuclei of lymphocytes and lymphoblastoid cells: the gene-rich and early replicating HSA19 CTs are typically found close to the nuclear center, while the gene-poor and later replicating HSA18 CTs are preferentially located at the nuclear periphery. Recent comparative maps between human and chicken chromosomes revealed that the chicken macrochromosomes 2 and Z contain the genes homologous to HSA18, while the genes on HSA19 are located onto the chicken microchromosomes. These data lend tentative support to the hypothesis that differences in the radial nuclear positions of gene-rich, early replicating and gene-poor, later replicating chromatin have been evolutionarily conserved during a period of more than 300 million years irrespective of the evolution of highly divergent karyotypes between humans and chicken.

Keywords: chromosome territories (CTs), evolutionary considerations, 3D-FISH (three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization)

\*<sup>1</sup> Chair of Animal Breeding, Technical University of Munich, Germany

\*<sup>2</sup> Department of Biology II-Human Genetics, University of Munich, Germany

Sharma, S.\*<sup>1</sup>, Oomizu, S.\*<sup>1</sup>, Kakeya, T.\*<sup>1</sup>, Masui, T., Takeuchi, S.\*<sup>1</sup> and Takahashi, S.\*<sup>1</sup> : **Gene expression and the physiological role of transforming growth factor- $\alpha$  in the mouse pituitary** *Zoological Sci.*, **20**, 83-89, 2003

Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), a member of the epidermal growth factor (EGF) family, is produced within the mouse anterior pituitaries. However, the cell types of TGF- $\alpha$ -expressing cells and the physiological roles of TGF- $\alpha$  mRNA-expressing cells within mouse pituitary glands remain unclear. The aim of the present study was to localize TGF- $\alpha$  mRNA-expressing cells, and to clarify the involvement of TGF- $\alpha$  in estrogen-induced DNA replication in mouse anterior pituitary cells. Northern blot analysis demonstrated TGF- $\alpha$  mRNA expression in adult male and female mouse anterior pituitaries. In situ hybridization analysis of the pituitaries in these mice showed that TGF- $\alpha$  mRNA-expressing cells in the anterior pituitary are round, oval, and medium

sized. TGF- $\alpha$  mRNA was co localized in most of the growth hormone (GH) mRNA-expressing cells, while only some of the prolactin (PRL) mRNA-expressing cell. DNA replication in the anterior pituitary cells was detected by monitoring the cellular uptake of a thymidine analogue, bromodeoxyuridine (BrdU) in a primary serum-free culture system. Estradiol-17 $\beta$  (E2) and TGF- $\alpha$  treatment increased the number of BrdU-labelled mommotrophs, indicating that E2 and TGF- $\alpha$  treatment stimulates the DNA replication in manmnotrophs. Immunoneutralization of TGF- $\alpha$  with anti-TGF- $\alpha$ -antibodies nullified the E2-induced increase in DNA replication. RT-PCR analysis of TGF- $\alpha$  mRNA expression in ovariectomized female mice revealed that E2 increases TGF- $\alpha$  mRNA levels. These results indicate that the TGF- $\alpha$  produced primarily in the somatotrophs mediated the stimulatory effects of estrogen on the DNA replication of pituitary cells in a paracrine or autocrine manner.

Keywords: pituitary, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), estrogen

\*Department of Biology, Faculty of Science, Okayama University

増井 徹：人のことはヒトでという時代の中で  
*Clinical Evaluation*, 30, 71-82 (2002)

This article provides an overview of the use of human materials and information (human derivatives) in biomedical research in the current context, especially as it relates to the progress of the human genome project. The outcome of the genome project has brought biomedical research to a new stage. In a sense, humanity has been drastically reduced to an array of DNA sequences that can be universally used in comparing living things. The argument is founded on the basic requirements of science – no one gets the final say and no one has personal authority, and on the nature of the use of human derivatives. This demands a re-examination of the concept of donation from research participants. Currently the concept of informed consent (IC) has been applied here, but it has been developed more in the areas of medical treatment and human experimentation. It seems reasonable to develop a new concept and a system that would support donation of human derivatives for research. Generic consent (GC) has been used in the current discussion and the essential supporting systems for GC should be different from those for IC. In this context, the studies of UK Biobank and the information policy of NHS will give important clues to building the infrastructure in Japan, i.e. data protection, protection of research participants, independent oversight organization, reframing of research ethical committees, etc. A strong initiative is needed to involve the public not only in participation but also in sharing the responsibilities and benefit of biomedical research and its outcome.

Keywords: human materials and information, informed

consent and generic consent, UK Biobank

Sadykov, M. <sup>\*1</sup>, Asami, Y., Niki, H. <sup>\*2</sup>, Handa, N. <sup>\*1</sup>, Itaya, M. <sup>\*3</sup>, Tanokura, M. <sup>\*4</sup>, Kobayashi, I. <sup>\*1</sup> : **Multiplication of a restriction-modification gene complex**  
*Mol Microbiol*, 48, 417-427 (2003).

Previous works have suggested that some gene complexes encoding a restriction (R) enzyme and a cognate modification (M) enzyme may behave as selfish mobile genetic elements. RM gene complexes, which destroy 'non-self' elements marked by the absence of proper methylation, are often associated with mobile genetic elements and are involved in various genome rearrangements. Here, we found amplification of a restriction-modification gene complex. *Bam*HI gene complex inserted into the *Bacillus* chromosome showed resistance to replacement by a homologous stretch of DNA. Some cells became transformed with the donor without losing *Bam*HI. In most of these transformants, multiple copies of *Bam*HI and the donor allele were arranged as tandem repeats. When a clone carrying one copy of each allele was propagated, extensive amplification of *Bam*HI and the donor unit was observed in a manner dependent on restriction enzyme gene. This suggests that restriction cutting of the genome participates in the amplification. Visualization by fluorescent in situ hybridization revealed that the amplification occurred in single cells in a burst-like fashion that is reminiscent of induction of provirus replication. The multiplication ability in a bacterium with natural capacity for DNA release, uptake and transformation will be discussed in relation to spreading of RM gene complexes.

Keywords: restriction-modification, selfish mobile genetic element, genome rearrangements

<sup>\*1</sup> Institute of Medical Science, University of Tokyo,

<sup>\*2</sup> Radioisotope Center, National Institute of Genetics,

<sup>\*3</sup> Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences,

<sup>\*4</sup> Department of Applied Biological Chemistry, University of Tokyo

Emm, M. and Miyawaki, E. : **Suppression of uterine decidualization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats**  
*Reprod Toxicol*, 16, 309-317 (2002)

In our previous study, diphenyltin dichloride (DPTCl) at 16.5 mg/kg and higher on days 0-3 of pregnancy was found to induce preimplantation embryonic loss in rats. In the present study, the effects of DPTCl on uterine decidualization in pseudopregnant rats, effects of ovarian hormones on uterine decidualization in ovariectomized rats, and effects of progesterone on the DPTCl-induced preimplantation embryonic loss in pregnant rats were determined. Female rats were given DPTCl by gastric

intubation at 4.1, 8.3, 16.5, or 24.8 mg/kg on days 0-3 of pseudopregnancy and the decidual cell response was induced on day 4 of pseudopregnancy. The uterine weight on day 9 of pseudopregnancy served as an index of uterine decidualization. A significant decrease in uterine weight, which indicates suppression of uterine decidualization, was detected at 16.5 and 24.8 mg/kg. Ovarian weight and number of corpora lutea in the DPTCl-treated groups were comparable to the controls. A significant decrease in the serum progesterone levels was found at 16.5 and 24.8 mg/kg in pseudopregnant rats. The hormonal regimen consisting of progesterone and estrone-supported decidual development in ovariectomized rats given DPTCl. Pregnancy rate and number of implantations were significantly lower in the intact mated groups given DPTCl at 16.5 and 24.8 mg/kg on days 0-3 of pregnancy than in the control group and significantly higher in the groups given DPTCl plus progesterone than in the groups given DPTCl alone. These results show that reduction in serum progesterone levels is correlated with suppression of uterine decidualization and progesterone protects against preimplantation embryonic loss induced by DPTCl.

Keywords: diphenyltin, preimplantation embryonic loss, decidual cell response

Ema, M. : **Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats**  
*Cong Anom Kyoto*, **42**, 297-308 (2002)

Developmental toxicity following administration of dibutyl phthalate (DBP) and its major metabolite, monobutyl phthalate (MBuP), by gavage was determined in Wistar rats. DBP on days 0-8 of pregnancy induced an increase in the incidence of preimplantation loss at 1250 mg/kg and higher and postimplantation loss at 750 mg/kg and higher. MBuP on days 0-8 of pregnancy produced an increase in the incidence of pre- and postimplantation loss at 1000 mg/kg. DBP on days 7-15 of pregnancy caused an increase in the incidence of fetuses with malformations at 750 mg/kg. MBuP on days 7-15 of pregnancy produced an increased incidence of fetuses with malformations at 500 mg/kg and higher. DBP on days 15-17 of pregnancy resulted in a decrease in the anogenital distance (AGD) of male fetuses and increase in the incidence of fetuses with undescended testes at 500 mg/kg and higher. MBuP on days 15-17 of pregnancy caused a decreased male AGD and increased incidence of fetuses with undescended testes at 250 mg/kg and higher. No effect of DBP and MBuP on the AGD was found in female offspring. The spectrum of fetal malformations, dependence of gestational days of treatment on the manifestation of teratogenicity, and alterations in development of the male reproductive system observed after administration of DBP were in good agreement with those observed after administration

of MBuP. These findings suggest that MBuP may be responsible for the induction of developmental toxic effects of DBP. The doses that produced a decrease in the AGD and undescended testes in male offspring were lower than those producing maternal toxicity, fetal malformations after administration during major organogenesis, and embryonic loss. The male reproductive system may be more susceptible than other organ systems to DBP and MBuP toxicity after maternal exposure.

Keywords: dibutyl phthalate, monobutyl phthalate, male reproductive system

Ema, M., Harazono, A., Hirose, A. and Kamata, E. :  
**Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats**  
*Toxicol Lett*, **143**, 233-238 (2003)

We previously showed that dibutyltin dichloride (DBTCl) at 7.6 mg/kg and higher on days 0-3 of pregnancy caused implantation failure and a decline in serum progesterone levels in rats and hypothesized that the decline is responsible for the implantation failure. This study was conducted to determine the protective effects of progesterone on the DBTCl-induced implantation failure in rats. Rats were given oral DBTCl at 0, 7.6, or 15.2 mg/kg on days 0-3 of pregnancy and/or subcutaneous progesterone at 2 mg/rat on days 0-8 of pregnancy. The reproductive outcome was determined on day 9 of pregnancy. No effects of administration of progesterone alone on the pregnancy rate and number of implantations were found. The pregnancy rate and number of implantations were significantly decreased after administration of DBTCl alone. The pregnancy rate and number of implantations were higher in the groups given DBTCl and progesterone than the groups given DBTCl alone. The present data indicate that progesterone protects, at least in part, against the DBTCl-induced implantation failure and support our hypothesis that the decline in progesterone levels is a primary mechanism for the implantation failure due to DBTCl.

Keywords: dibutyltin chloride, implantation failure, progesterone

広瀬明彦, 西川秋佳, 江馬 眞, 紅林秀雄, 山田雅巳,  
長谷川隆一: **メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE)  
の毒性情報**

*水環境学会誌*, **25**, 491-496 (2002)

MTBE (methyl-tert-butyl ether) は、オクタン価を上げるためにガソリンへの添加剤として使用されているが、米国において地下タンクからのガソリン漏洩によるMTBEの地下水汚染が顕在化して以来、飲料水中への混入による人の健康への影響が懸念されている。そこで、MTBEの発がん性を含む各種の毒性について情報を収集・整理したところ、MTBEはげっ歯類に対して肝臓および腎臓傷害を引き起こし、発がん性を除いた一般毒性

に対する無毒性量は、吸入暴露で259 mg/m<sup>3</sup>、経口暴露では100 mg/kg/dayと考えられた。一方、高用量のMTBE暴露はげっ歯類に対して発がん性を示すが、この発がん作用のヒトへの外挿性に関しては数々の疑問点が提示されており、未だ解決していない。米国EPAのDrinking Water Advisoryでは、味や臭いを感じる閾値から求められた水質勧告値：20～40 µg/Lの各種MTBE毒性に対するmargin of exposureを評価して、安全性を保証している。より適切にリスクアセスメントを行うためには、広範な測定調査の実施が望まれる。

Keywords: formaldehyde, disinfectant by-product, risk assessment

浦山隆雄：国立病院・療養所における治験の現状  
医療, 57, 7-9 (2003)

国立病院・療養所における治験の状況を見ると、平成10年の新GCP完全施行以後、実施数はいったん減少したが、その後増加傾向にある。契約金額で、平成11年度が25億6千万円、平成12年度が27億7千万円、平成13年度34億2千万円となっており、平成13年度における伸びが顕著である。このような治験実施数の増加の要因は、1つではなく、いくつかの複合であると考えられるが、平成12年10月から本格的に配置された治験薬剤師・治験看護師(CRC)の果たした役割が大きいのではないかと推測される。

Keywords: clinical trials, national hospitals, clinical research coordinator

Ishiwata, H., Yamada, T. Yoshiike, N.\*<sup>1</sup>, Nishijima, M.\*<sup>2</sup>, Kawamoto, A.\*<sup>3</sup> & Uyama, Y. : **Daily intake of food additives in Japan in five age groups estimated by the market basket method.**

*Eur Food Res Technol*, 215, 367-374 (2002)

The daily intake of 106 food additives (measured as 43 compounds) by five age groups (small children, children, youths, adults, and aged) was estimated. The estimation was based on the concentrations of the compounds in the food mixtures of seven categories consisting of 246 foods by the market basket method. The daily intake of most food additives increased with age. The daily intake of xylitol, however, was approximately ten times higher in small children and children than in the aged. It was clearly shown that the daily intake of food additives differed among the age groups, and that the differences are attributable to different food consumption patterns. None of the food additives exceeded the ADI, except nitrate, whose intake was 1.1-2.2 times higher than the ADI. The source of most of the nitrate was food in category VII (fruits, vegetables, and seaweed) where nitrate is mostly present as a natural component and the benefit of fruit and vegetable intake is well known as stated by JECFA.

Keywords: Food additive, Daily intake, Market basket method, ADI, Age group

\*<sup>1</sup> National Institute of Health and Nutrition

\*<sup>2</sup> Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

\*<sup>3</sup> Japan Food Additive Association

Kodama, Y., Kodama H.\*<sup>2</sup>, Kuranari, M.\*<sup>3</sup>, Tsutsumi, K.\*<sup>3</sup>, Ono, S.\*<sup>4</sup>, Yamaguchi, T.\*<sup>5</sup>, Fujimura, A.\*<sup>1</sup> : **Protein binding of valproic acid in Japanese pediatric and adult patients with epilepsy.**

*Am. J. Health-Syst. Pharm.*, 59, 835-840 (2002)

The binding of valproic acid to serum proteins in pediatric and adult patients was studied. Serum samples were obtained from 48 Japanese pediatric patients with epilepsy (group A) and 48 Japanese adult patients with epilepsy (group B) receiving valproic acid monotherapy. The patient's age ranged from 1 to 15 years for the pediatric patients and from 18 to 44 years (group B-younger) and 45 to 63 years (group B-older) for the adult patients. No significant differences between groups A and B were observed in the binding of valproic acid to serum proteins. Furthermore, there were no significant differences in binding between group A and groups B-younger and B-older. However, there was a significant difference in binding between groups B-younger and B-older. The serum protein binding of valproic acid was similar in pediatric and adult patients with epilepsy, but binding characteristics differed between younger and older adults.

Keywords: Valproic acid, Serum protein binding, Age

\*<sup>1</sup> Jichi Medical School

\*<sup>2</sup> Miyazaki Medical College

\*<sup>3</sup> Oita Medical University

\*<sup>4</sup> National Institute of Health Sciences

\*<sup>5</sup> University of Tokyo

Omori, T., Honma, M., Hayashi, M., Honda, Y.\*<sup>1</sup>, Yoshimura, I.\*<sup>2</sup> : **A new statistical method for evaluation of L5178Ytk+/- mammalian cell mutation data using microwell method**

*Mutation Research*, 517, 199-208(2002)

A statistical method to evaluate data from the mouse lymphoma L5178Y/tk assay (MLA) using microwell method is proposed. This proposed method is designed for data obtained from a single culture protocol instead of the duplicate culture recommended by United Kingdom Environmental Mutagen Society (UKEMS). The proposed method enables us to evaluate data from the microwell MLA with a single culture protocol.

Keywords: Dose-response, Downturn, Validation study

\*<sup>1</sup> 日本シェーリング

\*<sup>2</sup> 東京理科大学経営工学部

Nishiyama, H.\*<sup>1</sup>, Omori, T., Yoshimura, I.\*<sup>2</sup> : **A composite statistical procedure for evaluating genotoxicity using cell transformation assay data**

*Environmetrics*, 14, 183-192(2003)

This study proposes a statistical procedure for

evaluating data from the BALB/c 3T3 cell transformation assay (CTA). Three steps are applied: (i) a Dunnett type test for identifying clear negativity, (ii) a Margolin procedure for detecting and eliminating downturn data, and (iii) a maximum contrast method for evaluating the dose-dependent increase of the response. Evaluation of CTA data by the proposed procedure satisfied participating researchers.

**Keywords:** cell transformation assay, dose-response relationship, maximum contrast method

\*<sup>1</sup> アベンティスファーマ

\*<sup>2</sup> 東京理科大学経営工学部

Ono, S., Shibata, T., Morikawa, T.\*<sup>1</sup>, Uesaka, H.\*<sup>2</sup>, Nagasawa, T.\*<sup>3</sup> : **Choice of control group in efficacy-showing clinical trials in Japan: Does the ICH-E10 guideline change conventions?**

*International Journal of Pharmaceutical Medicine*, **16**, 79-86 (2002)

We analysed the possible impact of a new international guideline (ICH-E10) that focuses on the intrinsic defects of active control trial. An economic model suggested that the guideline's introduction could lead to more placebo-control and that the extent of such shift would depend on the increase in cost for active-control trials and possible changes in the requirements for approval. Future patients seem to be major beneficiaries from the new guidelines' introduction, considering the history of Japanese efficacy evaluation.

**Keywords:** clinical trials, control group, ICH guideline

\*<sup>1</sup> 武田薬品工業

\*<sup>2</sup> 日本イーライリリー

\*<sup>3</sup> 杏林大学医学部

Nagaoka H., Toyoshima S. and Takeda K.\* : **Spectrofluorimetric determination of catechins with 1,2-diphenylethelenediamine.**

*Anal. Sci.*, **18**, 951-953 (2002)

緑茶の渋み成分であるカテキン類には、発がん抑制作用、抗腫瘍作用、血中コレステロール低下作用、血糖上昇抑制作用、抗菌作用などが認められ、緑茶が栄養機能に加えて、生体調節機能を有する食品として注目されるようになった。カテキン類の体内動態に興味を持たれるが、従来の測定法は繁雑で時間がかかる。そこで我々は検討にカテキン (CA)、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EG)、エピカテキンガレート (ECG)、エピガロカテキンガレート (EGCG) を用い、簡易にできるカテキン類の蛍光定量法の開発を行った。

**Keywords:** catechin, fluorescent determination, high performance liquid chromatography

\* Department of Pharmaceutical Science, Tokyo University of Science

青木泰子\*, 岩田敏\*, 荘司路\*, 小坂諭\*, 佐藤淳子:  
血液培養陽性例を target とした感染症サーベイラン

スー1年間の成績および市中感染症と病院感染症の比較

感染症学雑誌 **77**, 211-218 (2003)

国立病院東京医療センターにおいて血液培養陽性症例を対象とした感染症サーベイランスを行った。2000年11月から2001年10月までの1年間に219例、252エピソードを集積し、市中感染例と病院感染例の比較検討を行った。各々の特徴について明らかにすると同時に、血液培養の重症感染症診断における有用性、および病院感染症のサーベイランスとしての意義が確認された。

**Keywords:** bacteremia, surveillance

\*国立病院東京医療センター

Hasuike, Y.\*<sup>1</sup>, Nakanishi, T.\*<sup>1</sup>, Otaki, Y.\*<sup>1</sup>, Nanami, M.\*<sup>1</sup>, Tanimoto, T., Taniguchi, N.\*<sup>2</sup>, Takamitsu, Y.\*<sup>1</sup> : **Plasma 3-deoxyglucosone elevation in chronic renal failure is associated with increased aldose reductase in erythrocytes**

*Am. J. Kidney Diseases*, **40**, 464-471 (2002)

Serum concentrations of 3-deoxyglucosone (3DG), a highly reactive dicarbonyl compound, are elevated in uremic patients. Aldose reductase (AR) is an enzyme involved in both the detoxification of 3DG and producing precursors of 3DG. We examined the relationship between plasma 3DG and erythrocyte AR content in uremic patients. Patients were divided into three groups: (1) progressive renal disease without hemodialysis (HD; chronic renal failure [CRF] group), (2) patients without diabetes mellitus (DM) treated with maintenance HD (HD group), and (3) patients with DM treated with maintenance HD (DM-HD group). High-performance liquid chromatography was used to measure 3DG, and erythrocyte AR was measured by means of enzyme-linked immunosorbent assay. Both 3DG and erythrocyte AR levels were significantly greater in the CFR, HD, and DM-HD groups than in healthy controls. These results did not change after HD session in HD or DM-HD groups. Serum creatinine levels correlated with 3DG and erythrocyte AR levels in the control and CFR group (3DG;  $r = 0.67$ ,  $P < 0.001$ , erythrocyte AR;  $r = 0.71$ ,  $p < 0.001$ ). Both erythrocyte AR and 3DG levels in all groups ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.001$ ), and between plasma osmolality and erythrocyte AR level ( $r = 0.46$ ,  $P < 0.001$ ). Both erythrocyte AR and 3DG levels are increased in uremic patients, and these increases could possibly contribute to the development of uremic symptoms.

**Keywords:** Chronic renal failure, 3-deoxyglucosone, aldose reductase

\*<sup>1</sup> 兵庫医科大学

\*<sup>2</sup> 大阪大学医学部

Oishi, N.\* , Kubo, E.\* , Takahashi, Y.\* , Maekawa, K., Tanimoto, T., Akagi, Y.\* : **The correlation between erythrocyte aldose reductase level and human diabetic retinopathy**

*Br. J. Ophthalmol.*, **86**, 1363-1366 (2002)

To examine the relation between aldose reductase (AR) and the development and progression of diabetic retinopathy by comparing the erythrocyte AR levels with the prevalence of diabetic retinopathy in NIDDM patients. A clinic based cross sectional study was used. 611 NIDDM patients and 73 controls were enrolled. Erythrocyte AR levels were determined by ELISA. These AR levels were then correlated with patient age, duration of diabetes, and HbA1c levels. AR levels were also correlated with the prevalence of diabetic retinopathy in the entire NIDDM patient group and in three subgroups formed by separating the NIDDM patients by their duration of diabetes. The prevalence of diabetic retinopathy significantly increased with increased erythrocyte AR levels in patients with duration of diabetes of less than 10 years. A similar, but non-significant correlation between the prevalence of retinopathy and increased erythrocyte AR levels were observed in patients with a diabetes duration of 10-20 and  $\geq 20$  years. The prevalence of diabetic retinopathy increased with increased erythrocyte AR levels in NIDDM patients with a duration of diabetes of less than 10 years. It was suggested that the inhibition of AR in patients with early NIDDM may be beneficial in reducing the development of diabetic retinopathy.

Keywords: Erythrocyte, Aldose reductase, diabetic retinopathy

\*福井医科大学

Morita, S.\*, Okuhira, K.\*, Tsuchimoto, N.\*, Vertut-Doi, A.\*, Saito, H., Nakano, M.\*, and Handa, T.\* : **Effects of sphingomyelin on apolipoprotein E- and lipoprotein lipase-mediated cell uptake of lipid particles.**

*Biochim. Biophys. Acta*, **1631**, 169-176 (2003)

It has been reported that human plasma sphingomyelin (SM) levels are positively and independently related to coronary artery disease. The lipoprotein surface is mainly formed by phosphatidylcholine (PC) and SM together with cholesterol and apolipoproteins. However, the influence of SM on the cell uptake of triglyceride-rich lipoproteins and remnants is poorly understood. To clarify the role of SM in lipoprotein uptake, we prepared lipid emulsions containing triolein, PC and SM as model particles of lipoproteins. Apolipoprotein E (ApoE) binding studies revealed that incorporation of SM into the emulsion surface reduced the binding capacity of apoE without changing the affinity. Surface SM reduced apoE-mediated uptake of emulsions by HepG2 cells because of the decreased amount of binding apoE. Apolipoproteins C-II and C-III inhibited the apoE-mediated uptake of SM containing emulsions more effectively. The stimulatory effect of lipoprotein lipase (LPL) on emulsion uptake was decreased by replacing surface PC with SM. These results suggest that SM-induced changes in the binding

properties of apolipoproteins and LPL correlate with decreased hepatic uptake of lipid particles.

Keywords: Sphingomyelin, Apolipoprotein E, Lipoprotein lipase

\* Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Saito, H., Dhanasekaran, P.\*<sup>1</sup>, Nguyen, D.\*<sup>1</sup>, Baldwin, F.\*<sup>1</sup>, Weisgraber, K. H.\*<sup>2</sup>, Wehrli, S.\*<sup>1</sup>, Phillips, M. C.\*<sup>1</sup>, and Lund-Katz, S.\*<sup>1</sup> : **Characterization of the heparin binding sites in human apolipoprotein E**

*J. Biol. Chem.*, **278**, 14782-14787 (2003)

To understand the molecular details of the apolipoprotein (apoE)-heparin interaction, we defined the microenvironments of all 12 lysine residues in intact apoE3 and examined their relative contributions to heparin binding. Nuclear magnetic resonance measurements showed that, in apoE3-dimyristoyl phosphatidylcholine discs, Lys-143 and -146 in the N-terminal domain and Lys-233 in the C-terminal domain have unusually low pK(a) values, indicating high positive electrostatic potential around these residues. Binding experiments using heparin-Sepharose gel demonstrated that the lipid-free 10-kDa fragment interacted strongly with heparin and a point mutation K233Q largely abolished the binding, indicating that Lys-233 is involved in heparin binding and that an unusually basic lysine microenvironment is critical for the interaction with heparin. With lipidated apoE3, it is confirmed that the Lys-233 site is completely masked and the N-terminal site mediates heparin binding. In addition, mutations of the two heparin binding sites in intact apoE3 demonstrated the dominant role of the N-terminal site in the heparin binding of apoE even in the lipid-free state. These results suggest that apoE interacts predominately with cell-surface heparan sulfate proteoglycans through the N-terminal binding site.

Keywords: Apolipoprotein E, Heparin, Nuclear magnetic resonance

\*<sup>1</sup> The Children's Hospital of Philadelphia, USA

\*<sup>2</sup> Gladstone Institute of Cardiovascular Diseases, UCSF, USA

Nakamura, Y., Tonogai, Y. : **Effects of grape seed polyphenols on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats**

*J. Health Sci.*, **48**, 570-578 (2002)

The effects of grape seed polyphenol (GSP) administered orally at doses of 0.01-1.0 g/kg per day to normal and hypercholesterolemic rats for 28 and 36 days, respectively, was evaluated by measuring changes both in the concentrations of serum and hepatic lipids and in fecal steroid excretion. GSP seems to affect lipid metabolism in rats by lowering the concentrations of serum and hepatic triglycerides rather than by altering the metabolism of

cholesterol.

Keywords: grape seed polyphenol, hypercholesterolemic, triglycerides, fecal steroid excretion

Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. : **Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat**

*J. Agric. Food Chem.*, **51**, 331-339 (2003)

A new analytical method for measuring tannic acid (TA) using tannase was developed and applied to the investigation of TA metabolism in the rat following oral administration at a dose of 1.0 g/kg. The proposed method for TA determination was based on the enzymatic hydrolysis of TA to gallic acid (GA) and subsequent determination by HPLC. TA metabolites were determined by HPLC. 4-O-methyl gallic acid (4-OMGA), pyrogallol (PY), and resorcinol (RE) were detected in serum. TA was excreted into urine as GA (0.01%), 4-OMGA (0.10%), PY (0.24%), and RE (2.06%) and into feces as TA (62.74%), GA (0.19%), PY (0.02%), and RE (0.76%) within 54 h after oral administration. It was suggested that >60% of TA remained unchanged but that some was hydrolyzed to GA by tannase in the intestine and further metabolized to 4-OMGA, PY, and RE.

Keywords: tannic acid, tannase, metabolism, gallic acid, rat

Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y. : **Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils**

*J. Health Sci.*, **49**, 45-54 (2003)

Grape seed extract (GSE) is one of Japan's natural food additives, and is recommended for use as an antioxidant. The component of interest is polyphenol, mainly proanthocyanidins, with are condensed tannins. A vanillin-hydroxychloric acid (HCl) assay is specific for flavan-3-ol. The sensitivity of GSE components to the vanillin-HCl assay differed accordingly to the chemical structure. We applied this assay to the determination of proanthocyanidin content in GSEs and health foods containing GSEs and grape seed oils. The percentage of low molecular weight compounds, including gallic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidins B1, B2 and C1 was estimated to be 5.5-12.2% (w/w).

Keywords: grape seed extract, proanthocyanidins, vanillin-hydrochloric acid assay

Ishimitsu, S., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Nakamura, Y., Tonogai, Y. : **Simultaneous determination of azimsulfuron, flazasulfuron and halosulfuron-methyl in grains, seeds, vegetables and fruits by HPLC**

*J. Health Sci.*, **48**, 335-340 (2002)

A method was developed for the simultaneous determination of 3 sulfonylurea herbicides in agricultural products. The herbicides were extracted with acetone, re-

extracted with ethyl acetate. The herbicides were cleaned up using Sep-Pak® Plus Alumina N and Bond Elut® SAX cartridge columns. The 3 sulfonylurea herbicides were determined by HPLC. The fortified peaks were confirmed by LC/MS with electrospray ionization (ESI). The recoveries of the 3 sulfonylurea herbicides from 14 agricultural products ranged from 77.0 to 112.3% following fortification at 0.05-0.5 mg/g.

Keywords: sulfonylurea herbicide, HPLC, Sep-Pak® Plus Alumina N, Bond Elut® SAX

Okano, Y.\* , Nagasawa, K.\* , Ishimitsu, S., Tonogai, Y., Fujimoto, S.\* : **Photostability of food tar colors in the presence of protein and lipid**

*Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, **208**, 126-132 (2003)

We investigated the photostability of the twelve food tar colors and effects of food constituents such as protein, lipid and starch on their photostability. Of the food colors examined, the colors that do not contain halogens in their structure were unaffected by light, but xanthene colors such as Food Red No.3, Food Red No.104 and Food Red No.105, which have halogens in their structure, were degraded by exposure to a visible light at 28,000 lux in a time-dependent manner. These findings indicated that these colors are carefully used as a food additive on the basis of the nature discovered and demonstrated in this study.

Keywords: food tar colors, photostability, protein, lipid

\*京都薬科大学

津村ゆかり, 石光 進, 平山クニ\*<sup>1</sup>, 藤巻照久\*<sup>1</sup>, 中澤裕之\*<sup>2</sup>, 外海泰秀: **食品製造用ポリ塩化ビニル製ホースからのフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) の溶出**  
食品衛生学雑誌, **43**, 254-259 (2002)

DEHPを12~41%含有する3種のPVC製品(ホース2検体及び延伸フィルム1検体)について, 食品衛生法の溶出試験法に準じて溶出試験を行った。その結果, 水, 4%酢酸, 20%エタノールを浸出用液とした場合, DEHPの溶出量はいずれも0.1 ppm未満であった。一方, *n*-ヘプタンによる溶出試験においては, ホース2検体で容器包装の蒸発残留物濃度限度である150 ppmを超えていた。器具に対しては*n*-ヘプタンによる溶出限度が定められていないが, これらの製品は, 油脂及び脂肪性食品への使用には適さない可能性があると考えられた。

Key words: di(2-ethylhexyl) phthalate, migration, food simulant, polyvinyl chloride, tube, stretched film

\*<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 星薬科大学

Yukari Tsumura, Susumu Ishimitsu, Akiko Kaihara, Kimihiko Yoshii, Yasuhide Tonogai : **Phthalates, Adipates, Citrate and Some of the Other Plasticizers Detected in Japanese Retail Foods: a Survey**

*J. Health Sci.*, **48**, 493-502 (2002)

Plasticizers in Japanese retail foods were determined by GC/MS (SIM). The plasticizers tested were as follows: dibutyl phthalate, butylbenzyl phthalate, di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisononyl phthalate, di(2-ethylhexyl) adipate, diisononyl adipate (DINA), dialkyl adipate, dibutyl sebacate, O-acetyl tributyl citrate (ATBC) and diacetylalauroyl glycerol (DALG). A total of 93 samples were analyzed. For the analysis, each sample was extracted by a method suitable to its nature and cleaned using Florisil® and Bondesil PSA® dual layer columns. The recovery of plasticizers from fortified food samples was 62.0 - 131.0 %, except in the case of DINA. The limit of detection (LOD) was different for each sample species and plasticizers. For example, the LOD for plasticizers in retort-pouched baby food was 0.0004-0.037 µg/g. A retort-pouched baby food sample was found to be contaminated by DEHP at the Japanese TDI level, 40 µg/kg/day. The source of contamination was presumed to be disposable gloves because the baby food was produced before the prohibition of DEHP-containing PVC gloves by the Japanese government. After that prohibition, products generally contained much lower levels of DEHP. A higher level of DALG was detected in the other baby food samples, although it became clear that DALG did not originate as contamination from plastics but was added as a food additive. ATBC was detected in bottled sake samples at levels of around 3-7 µg/g, having migrated from the gasket of the bottle cap. ATBC and DALG levels in the above foods were quite low compared with their NOAEL or guideline levels as food additives.

Key words: plasticizer, food, survey, phthalate, adipate

津村ゆかり, 吉井公彦, 石光進, 外海泰秀: HPLCによるかんきつ類中のN-メチルカルバメート系農薬及びそれらの代謝物の含ハロゲン溶媒不使用同時分析  
食品衛生学雑誌, 43, 330-338 (2002)

かんきつ類中の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分別定量する方法を検討した。レモン, オレンジ, グレープフルーツをアセトン抽出, 次いで塩化ナトリウムを添加後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はポスタラム反応蛍光検出HPLC (以下HPLC) で定量した。HPLCの保持時間が妨害ピークと一致したNMCは, LC/MS (SIM) を用いて定量した。HPLCとLC/MSの双方で定量したNMC (83例) について定量値の一致度を計算した結果,  $r^2=0.9178$ とよく一致していた。添加回収率 (0.1 ppm添加) は一部のNMCを除き, 60.1~97.8%であった。

Key word: N-methylcarbamate pesticide, HPLC, LC/MS, avoidance of dichloromethane, citrus fruit, Supelclean ENVI-Carb, Mega Bond Elut SAX

津村ゆかり, 開原亜樹子, 石光進, 吉井公彦, 外海

泰秀: 瓶詰め食品のキャップシーリング中の可塑剤使用実態及び食品への移行

食品衛生学雑誌, 43, 377-384 (2002)

国産23試料, 輸入80試料, 合計103試料の瓶詰め食品のキャップシーリング中の可塑剤の種類及び含有量を調査した。103試料中93試料から炎色反応により塩素を検出した。そのうち62試料からフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) (DEHP), フタル酸ジイソデシル, アジピン酸ジ (2-エチルヘキシル), フタル酸ジイソノニル, フタル酸ジシクロヘキシル, クエン酸アセチルトリブチル, ジアセチルラウロイルグリセロールのいずれかまたは複数が見出された。DEHPが見出されたもののうち12試料については, 瓶内容物中の可塑剤含有量も調査した。油脂分の含まれる流動性の高い食品に対して, DEHPの移行が認められたが, 一回の摂取で耐容一日摂取量を超えるものはなかった。またDEHPが最も多く見出された食品について, 種々の保存条件における移行量を検討した結果, 振とうによってキャップシーリングから食品へのDEHPの溶出が促進されることが示唆された。

Key words: plasticizer, cap-sealing, GC/MS, migration, bottled food, DEHP, polyvinyl chloride

Tsumura, Y., Ishimitsua, S., Saito, I.\*<sup>1</sup>, Sakai, H.\*<sup>2</sup>, Tsuchida, Y.\*<sup>2</sup>, Tonogai, Y.: Estimated daily intake of plasticizers in 1-week duplicate diet samples following regulation of DEHP-containing PVC gloves in Japan  
*Food Additives. & Contaminants*, 20, in press (2003)

Duplicate hospital diet samples obtained over 1 week in 2001 were analysed to estimate daily intake of plasticizers and the results were compared with those obtained in 1999. The plasticizers quantified in this study were as follows: dibutyl phthalate, butylbenzyl phthalate (BBP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), diisononyl phthalate (DINP), di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA), diisononyl adipate (DINA) and O-acetyl tributyl citrate (ATBC). Dipropyl, dipentyl, dihexyl and dicyclohexyl phthalate were also analysed but not detected. The analytical procedure for this follow-up study was essentially the same as in the previous one. Detection limits were 0.1 to 15.6 ng/g for each plasticizer. One-week duplicate diet samples provided by three hospitals in three remote prefectures of Japan were analysed as individual meals. DEHP was detected at the levels of 6 to 675 ng/g in 62 meals out of 63, significantly lower levels than detected in 1999. Levels of DEHA and DINP also decreased. The mean intake of plasticizers estimated from all samples was 160 µg DEHP/day, 12.5 µg DEHA/day, 4.7 µg DINP/day, and 3.4 µg BBP/day. Levels of DINA were relatively high in meals from one of the hospitals. In those meals, the average daily intake of DINA was 1338 µg/day. Those of ATBC were also higher in meals from another hospital, average daily intake was 1228 µg/day in them. The sources of DINA and ATBC can be cling-film or sausage packaging.

Keywords: plasticizer, phthalate, adipate, intake, duplicate

diet sample, hospital food, GC/MS.

\*<sup>1</sup> 愛知県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 新潟県保健環境科学研究所

姉帯正樹\*<sup>1</sup>, 増田隆広\*<sup>2</sup>, 高杉光雄\*<sup>2</sup>, 柴田敏郎, 畠山好雄: 当帰の調製法と化学的品質評価 (第5報) 調製過程におけるストレス化合物の産生

北海道立衛生研究所報告, 52, 12-18 (2002)

生薬当帰の生産における調製法の違いが植物のストレス化合物であるフロクマリン類 (psoralen, xanthotoxin 及び bergapten) の産生に及ぼす影響について検討した。その結果, これらの化合物は生根にはほとんど含有されず, 調製加工過程における乾燥, 加熱, 保存などの処理がストレスとなり産生し, 蓄積されることが明らかとなった。

Keywords: *Angelica Radix*, preparation, stress compounds

\*<sup>1</sup> 北海道立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 北海道大学大学院地球環境科学研究科

姉帯正樹\*, 柴田敏郎, 菱田敦之, 畠山好雄: 当帰の調製法と化学的品質評価 (第7報) 収穫時期の違いによる希エタノールエキス, 糖及びデンプン含量の変化

北海道立衛生研究所報告, 52, 78-80 (2002)

ホッカイトウキの収穫時期の違いが, 生薬当帰の希エタノールエキス, 糖及びデンプン含量に及ぼす影響を明らかにするべく, 9月中旬から11月上旬にかけて1週間ごとに収穫し, 各々3週間自然乾燥させた後50℃で温風乾燥させて検討した。その結果, 根重は収穫時期が遅くなるほど増加するが, 10月上旬までは根重の増加に伴ってデンプン含量は増加したがそれ以降は減少し, 一方, 希エタノールエキス及びシヨ糖含量には増減の変化は認められなかった。また, 収穫後の自然乾燥中に酵素反応によるデンプン含量の低下と希エタノールエキス及びシヨ糖含量の増加 (糖化) が認められ, 10月上旬に収穫した場合に速やかに糖化が進行し, 希エタノールエキス及びシヨ糖含量が増加しやすいことが判明した。

Keywords: *Angelica Radix*, harvest time, chemical evaluation

\*北海道立衛生研究所

青柳光敏\*, 姉帯正樹\*, 柴田敏郎, 畠山好雄: 川芎の調製法と化学的品質評価 (第3報) 湯通しの条件がフェルラ酸及びアデノシン含量に及ぼす影響

北海道立衛生研究所報告, 52, 81-82 (2002)

生薬川芎は生根を湯で処理 (湯通し) した後乾燥して仕上げるが, 湯通しの温度及び時間がフェルラ酸及びアデノシン含量に及ぼす影響を検討した。その結果, フェルラ酸含量は処理温度が高くなるに従い増加したが, アデノシン含量は処理温度が高くなるに従い減少し, 特に, 蒸した場合に著しく低下することが判明した。

Keywords: *Cnidii Rhizoma*, ferulic acid, adenosine

\*北海道立衛生研究所

姉帯正樹\*, 熊谷健夫, 柴田敏郎: 白芷の調製法と化学的品質評価 (第4報) 保存及び乾燥条件の違いによ

る成分含量の変動

北海道立衛生研究所報告, 52, 86-88 (2002)

1年生ヨロイグサ生根を種々の条件で保存した後乾燥し, それらの条件の違いがストレス化合物 (フロクマリン類), 糖及び希エタノールエキス含量に及ぼす影響を検討した。その結果, ヨロイグサのストレス化合物産生能は小さく, 調製条件の違いによるストレス化合物含量の変動は他のセリ科植物より小さいと考えられた。一方, ヨロイグサの生根は乾燥に加え, 低温処理によってもシヨ糖が生成し, 希エタノールエキス含量の増加となることが明らかとなった。

Keywords: *Angelica Dahurica* Root, preparation, chemical evaluation

\*北海道立衛生研究所

Minami, M., Hosokawa, K., Mia, Md. W., Sakai, E., Satake, M., Kondo, S.\*<sup>1</sup>, Oka, K.\*<sup>1</sup>, Koga-Ban, Y.\*<sup>2</sup>, Kayano, T.\*<sup>2</sup>, Tanaka, H.\*<sup>2</sup> and Shibata, T.: Morphological, chemical and molecular biological comparison among *Artemisia capillaris*, *A. japonica* and their natural hybrids

*Natural Medicines*, 58, 1-6 (2003)

As hybrid plants between *A. capillaris* and *A. japonica* are often found in the crude drugs, observation on flowering dates, ten morphological characters of flower heads and contents of capillarisin (CAP) and 6,7-dimethylesculetin (DME), as well as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis were carried out among *A. capillaris*, *A. japonica* and their natural hybrid plants. The results showed that hybrid plants were similar to *A. japonica*, and when flower heads from the hybrid plants were mixed in the crude drugs, quality of the crude drug could decline because of trace of CAP and DME.

Keywords: *Artemisia capillaris*, capillarisin, 6,7-dimethylesculetin

\*<sup>1</sup> Kotaro Pharmaceutical Co., LTD.

\*<sup>2</sup> National Institute of Agrobiological Resource

Asaruddin, M. R.\*<sup>1</sup>, Honda, G.\*<sup>1</sup>, Tsubouchi, A.\*<sup>2</sup>, Nakajima-Shimada, J.\*<sup>2</sup>, Aoki, T.\*<sup>2</sup>, Kiuchi, F.: Trypanocidal constituents from *Michelia alba*

*Natural Medicines*, 57, 61-63 (2003)

The AcOEt extract of the bark of *M. alba* D. C. (Magnoliaceae) exhibited killing activity against *Trypanosoma cruzi*. Column chromatographic separation of the extract guided by trypanocidal activity afforded eight trypanocidal constituents; caryophyllene oxide, costunolide, dihydro-costunolide, parthenolide, dihydroparthenolide, 11,13-dehydrolanuginolide, santamarine and a new monoterpene (8). The structure of monoterpene 8 was determined to be dehydrolinalool oxide on the basis of spectroscopic analyses. The minimum lethal concentrations of these compounds against epimastigotes of *T. cruzi* were 61 μM, 7 μM, 27 μM, 0.04 μM, 0.78 μM, 0.16 μM, 25 μM, and 5 μM,

respectively.

Keywords: *Michelia alba*, *Trypanosoma cruzi*, sesquiterpene lactone

\*<sup>1</sup> 京都大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup> 順天堂大学医学部

Yagura, T.\*<sup>1</sup>, Ito, M.\*<sup>1</sup>, Kiuchi, F., Honda, G.\*<sup>1</sup>, Shimada, Y.\*<sup>2</sup>: **Four new 2-(2-phenylethyl)chromone derivatives from withered wood of *Aquilaria sinensis***  
*Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 560-564 (2003)

Four new chromone derivatives, 5-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone, 6-hydroxy-2-(2-hydroxy-2-phenylethyl)chromone, 8-chloro-2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone, 6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone were isolated from the MeOH extract of withered wood of *Aquilaria sinensis*, together with seven known constituents of agarwood.

Keywords: *Aquilaria sinensis*, agarwood, chromone derivative

\*<sup>1</sup> 京都大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup> 三星製薬(株)

Toda, Y.\*<sup>1</sup>, Aoki, T.\*<sup>2</sup>, Yoshimatsu, K., Shimomura, K.\*<sup>3</sup>: **Photosynthetic activity in green hairy roots: Ultrastructure of plastid and correlation of chlorophyll and secondary metabolites**  
*Natural Medicines*, **56**, 173-177 (2002)

Ultrastructure of the plastid and photosynthetic activity in green hairy roots of *Amsonia elliptica*, *Lippia dulcis* and *Digitalis lanata* were investigated. Plastids observed in *A. elliptica* were not like normal chloroplasts in leaves or leucoplasts in roots, but an amyloplast-like structure, containing large starch granules with thylakoid membranes around them. In contrast the plastids in *D. lanata* were chloroplast-like, and just intermediate in *L. dulcis*. The photosynthetic oxygen evolution activity on chlorophyll basis of *L. dulcis* and *D. lanata* were almost equal to the level generally known in leaves. In *D. lanata*, cardenolide contents in the hairy roots were directly proportional to the chlorophyll contents.

Keywords: green hairy roots, plastid, photosynthetic activity

\*<sup>1</sup> National Institute for Materials Science, Japan

\*<sup>2</sup> Department of Applied Biological Sciences, Nihon University

\*<sup>3</sup> Faculty of Life Science, Toyo University

瀨野裕之, 中根孝久, 高橋真理衣, 関田節子: **テンモンドウの TLC による確認試験について Methods for Chemical Identification of ASPARAGI Tuber by using TLC**

*Natural Medicines*, **57**, 27-30 (2003)

Methods for chemical identification of Asparagus Tuber were examined for the detection of saponins. Two steroidal saponins, protodioscin and asparasaponin I, were

shown to be applicable for the TLC marker compounds of Asparagus Tuber. The extraction method and the developing solvent for TLC were established.

Keywords: *Asparagus cochinchinensis*, Asparagi tuber, marker compound

香月茂樹, 坂崎信之\*: **匍匐性ピーナッツ (*Arachis repens* Handro) の栽培と利用**

日本植物園協会誌, **37**, 86-90 (2003)

近年導入したラッカセイ属の匍匐する *Arachis repens* の種子島での栽培により, 新知見が得られた。多年生で, 繁殖は暖かい時期の挿し木で容易であり, 現在目立った病虫害もなく, 生育が旺盛であること。無霜地帯の排水良好でやや乾燥気味で十分な日照が得られる場所で良好な生育をする。その応用として, 西南暖地での屋上や裸地の緑化, 果樹園での草生栽培などが考えられる。降霜地帯では暖かい季節の露地での利用は可能なこと。結実はあるが, 粒が小さく, しかも結実歩合が低く, 子実の利用は期待できないことなどが分かった。

Keywords: *Arachis repens*, creeping peanut, cultivation

\* 名誉会員

香月茂樹, 坂崎信之\*<sup>1</sup>, 岡村隼人\*<sup>2</sup>, 滝川忠明\*<sup>2</sup>: **希少植物カンラン (*Canarium album* Raeusch.) の日本史と栽培**

日本植物園協会誌, **37**, 103-112 (2003)

かつては古文書に魚介類の中毒の際の妙薬として収載されるなど, 九州南部の漁業関係の都市に大切に植栽されていたカンランは, 現在確認できた成木は国立衛研種子島薬用植物栽培試験場の6株と串木野市の1株の計7株の状態になってしまっていた。種子島試験場の個体の観察により, その生態や形態を調査し, 栽培法を明らかとし, 現存株の保存と平行し, 全滅寸前の串木野市の系統の今後の維持・増殖について詳述した。

Keywords: *Canarium album*, Chinese olive, cultivation

\*<sup>1</sup> 名誉会員

\*<sup>2</sup> 会員

橋本悟郎\*<sup>1</sup>, 尾崎章\*<sup>2</sup>, 香月茂樹, 清水秀男\*<sup>3</sup>, 花城良廣\*<sup>4</sup>, 坂崎信之\*<sup>5</sup>: **アメリカハマグルマ (ウエデリア) について**

日本植物園協会誌, **37**, 166-171 (2003)

世界中の熱帯で, 地被植物として広く利用されているアメリカハマグルマの学名の変遷, 日本への導入の歴史の調査結果を記した。現在栽培されている地域での栽培環境やその方法を分析し, 今後の活用について検討した。軽い降霜地帯では越冬可能であり, 潮風・乾燥にも耐えるため暖地の海岸地帯や屋上緑化の地被植物として推奨できる。寒い地域では春か秋の戸外の緑化植物に利用できる。繁殖は暖かい季節に挿し木を行えば容易である。

Keywords: *Wedelia trilobata*, ground cover, cultivation

\*<sup>1</sup> サンパウロ博物研究会・植物標本館

\*<sup>2</sup> 個人会員

\*<sup>3</sup> 熱川バナナワニ園

\*<sup>4</sup> (財) 海洋博覧会記念講演管理財団

\*<sup>5</sup> 名誉会員

Daikonya, A.<sup>\*1</sup>, Katsuki, S., Wu, J.-B.<sup>\*2</sup>, Kitanaka, S.<sup>\*1</sup> :

**Anti-allergic Agents from National Source(41): Anti-allergic Activity of New Phloroglucinol Derivatives from *Mallotus philippensis***

*Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1566-1659(2002)

Two new phloroglucinol derivatives, mallotophilippen A(1) and B(2) were isolated from the fruits of *Mallotus philippensis*. These compounds were identified, using chemical and spectral data, as 1-[5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-(2,4,6-trihydroxy-3-isobutyryl-benzyl)-2H-chromen-8-yl]-2-methyl-butan-1-one and 1-[6-(3-Acetyl-2,4,4-trihydroxy-5-methyl-benzyl)5,7-dihydroxy-2,2-

dimethyl-2H-chromen-8-yl]-2-methyl-butan-1-one, respectively. They inhibited nitric oxide (NO) production and inducible No synthase (iNOS) gene expression by a murine macrophage-like cell line (RAW 264.7), which was activated by lipopolysaccharide (LPS) and recombinant mouse interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Furthermore, they inhibited histamine release from rat peritoneal mast cells induced by Compound48/80. These results suggest that the novel phloroglucinol derivatives have anti-inflammatory effects.

**Keywords:** *Mallotus philippensis*, macrophage, nitric oxide

<sup>\*1</sup> College of Pharmacy, Nihon University

<sup>\*2</sup> Institute of Pharmaceutical Chemistry, China Medicinal University

小嶋茂雄：医薬品規制の国際基準化と品質担保のあり方

ファルマシア, 39, 199-203 (2003)

国際化の波の中で生き抜くには、医薬品の開発、承認申請、実際の製造と品質管理にあたる企業側の者であろうと、承認審査やGMP査察にあたる行政側の者であろうと、直面する課題にどう対応するかを自分の頭で考え、その対応の妥当性について論拠となるデータに基づいて他の人が納得するようにきちんと説明する〔アカウントビリティ(説明責任)を果たす〕ことができる力を身に付ける必要がある。行政側の者の言ったことを金科玉条にしてその枠を守っていれば良いとする、行政側に寄りかかった考え方は国際化の波の中で随所において破綻を来しており、もう通用しなくなっている。ミニマムで良い、他と横並びで良いとするのではなく、それを超えて一歩踏み出す気構えが求められる時代がやって来ている。牛肉の偽装表示事件では、みんなで渡れば怖くないとばかりに、雪印食品や日本ハムなどの大手食品メーカーがこぞって偽装表示に手を染めていたことが発覚したが、アカウントビリティに基づいて責任のある態度を貫くことは、今広く日本社会全体にわたって求められていると言っても過言ではないであろう。

吉岡澄江：医薬品の安定性予測と分子運動性

ファルマシア, 39, 225-228 (2003)

固体医薬品の安定性と分子運動性の関係を考察し、分子運動性に基づく安定性予測の可能性を解説した。固体医薬品の分子運動性を測定する方法を概説するとともに、非晶質医薬品の結晶化、化学的分解、タンパク質医薬品の変性/凝集など、分子運動性と密接に関連した医薬品の品質変化の例を紹介した。

Keywords: Stability, Molecular mobility, Degradation

吉岡澄江, 麻生伸一郎\*: 安定性試験へのブラケットティング法及びマトリキシング法の適用に関するガイドライン

医薬品研究, 33, 561-567 (2002)

2001年5月に通知されたガイドライン「原薬及び製剤の安定性試験へのブラケットティング法及びマトリキシング法の適用について」の概要を解説し、これらの方法を適用する際の留意点などを考察した。ブラケットティング法及びマトリキシング法について、それぞれ、減数試験としての特性、適用範囲、組み合わせる要因、潜在するリスク、試験計画の代表例についての解説を行った。

Keywords: Stability, Guideline, Pharmaceutical

\*ノバルティスファーマ

吉岡澄江, 麻生伸一郎\*: 品質に関わるトピックの動向-Q1DおよびQ1Eを中心として-

医薬品研究, 33, 515-545 (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、ブラケットティング法及びマトリキシング法の適用に関するガイドライン(Q1D)とデータ評価に関する

ガイドライン(Q1E)の国際調和に関する議論の進捗状況を解説した。Q1Dについては、ステップ2ドキュメントに対して収集されたコメントを取り入れてステップ4の合意に至った経緯を解説した。また、Q1Eについては、ステップ2の合意の経緯を解説し、特に、appendixとして付け加えられたデータ評価の流れを分かりやすくするためのdecision treeについての詳細を紹介した。

Keywords: Stability, Guideline, Pharmaceutical

\*ノバルティスファーマ

早川堯夫, 石井明子: 先端的バイオロジクス開発の現状と新たなバイオ創薬に向けての課題

医薬品研究, 33, 693-729 (2002)

先端的バイオロジクスの開発の背景と現状をふりかえるとともに、基礎研究の成果を効率的かつ合理的に医療上の応用に結びつけていくために不可欠なトランスレーショナルリサーチ(探索的臨床研究)を効率よく進めるための科学的必要条件、規制環境の整備を含む新たなバイオ創薬に向けての課題や将来展望などについて概説した。

Keywords: biologics, translational research

内田恵理子, 早川堯夫: ヒトGHの化学(構造, アイソフォーム, 化学的性質)

内分泌・糖尿病科, 15(suppl.1), 10-18 (2002)

ヒトGH(hGH)は下垂体前葉で産生・分泌される代表的ホルモンの一つで、肝臓でのIGF-I産生を介して、あるいは組織のGH受容体に直接作用して身体の成長促進に働くほか、組織レベルでは糖、脂質代謝、蛋白同化、細胞増殖や分化等に関与するなど、幅広く多彩な作用を示すことが知られている。1984年以降、遺伝子組換え技術を用いて製造されたhGHが小人症等の治療に用いられている。hGHの活性構造や受容体との結合様式は1990年前後に蛋白質工学的手法を用いて極めて詳細に解明された。一方、hGHは下垂体や血液の中で分子多様性を示すことが明らかになっているが、その実態についてはいまだ不明な点が多い。本稿では最近の知見をふまえ、hGHの構造と活性、物理化学的性質および分子多様性についてまとめた。

Keywords: growth hormone, structure, isoform

内田恵理子: 遺伝子治療薬開発を巡る規制

Cancer Frontier, 4, 137-143 (2002/2003)

遺伝子治療臨床研究が医療上の有用性及び倫理性を確保しつつ適正に実施されるために遵守すべき事項等を定めた「遺伝子治療臨床研究に関する指針」が平成14年4月1日より施行された。それに伴い、遺伝子治療薬の品質、安全性等の確保に必要な基本的事項を定めた「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」も改正された。本稿では、これら指針の制定、改正の背景と趣旨、各指針の内容を紹介した。

Keywords: gene therapy, guideline

水口裕之, 早川堯夫: *In vitro* ライゲーションを利用

**したアデノウイルスベクターの作製・増殖法**実験医学, **20**, 1799-1804 (2002)

アデノウイルスベクターの作製・増殖法について概説した。

Keywords: adenovirus vector, gene therapy

**水口裕之, 早川堯夫: アデノウイルスベクター: 最近の進歩**分子細胞治療, **2**, 200-207 (2003)

遺伝子治療のためのアデノウイルスベクター開発の進歩について解説した。

Keywords: adenovirus vector, gene therapy

橋田充\*<sup>1</sup>, 五十嵐理慧\*<sup>2</sup>, 岡田純一\*<sup>3</sup>, 原島秀吉\*<sup>4</sup>, 米谷芳枝\*<sup>5</sup>, 松村保広\*<sup>6</sup>, 水口裕之, 山下富義\*<sup>1</sup>, 横山昌幸\*<sup>7</sup>: **21世紀のDDS: 発展を担う立場から Drug Delivery System**, **18**, 7-20 (2003)

今後のDrug Delivery System研究について誌上座談会を行った。

Key words: Drug Delivery System

\*<sup>1</sup> 京都大学大学院薬学研究科\*<sup>2</sup> 聖マリアンナ医科大学\*<sup>3</sup> 三共(株)\*<sup>4</sup> 北海道大学大学院薬学研究科\*<sup>5</sup> 星薬科大学\*<sup>6</sup> 国立がんセンター研究所\*<sup>7</sup> 東京女子医科大学**鈴木孝昌: 環境変異原研究の光と陰: これから進むべき道**Environ. Mutagen. Res., **24**, 179-84 (2002)

これまでの環境変異原研究の歴史を振り返り, 現状における問題点, 今後に残された課題について提言した。今後は変異原研究をいかにヒトに対するリスク評価に結びつけるかが課題であり, その意味で, より定量的な評価, メカニズムに基づいた研究, ヒト材料の利用などが重要である。

Keywords: mutagenicity test, risk assessment

**豊田淑江: 好中球の分化増殖の制御**理大 科学フォーラム, **5**, 27-31 (2003)

好中球の分化過程でのG-CSFの役割と情報伝達を解説した。

Keywords: p70 S6 kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, G-CSF

**山口照英: ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について**ファルマシア, **38**, 523-525 (2002)

急速に開発が進んでいるヒト由来細胞・組織利用医薬品の品質や安全性確保の方策について, 特にヒト由来細胞を用いる場合について, 採取から製造にわたってキーポイントと思われる点について概説した。

Keyword: Cell Therapy, Biotechnology Products, Quality

**土屋利江: 生分解性高分子材料の軟骨分化機能等への影響**バイオインダストリー, **19**, 30-37 (2002)

生分解性高分子材料を足場として製品化されるバイオ軟骨の培養製造工程や, 治療用具として体内へインプラントした過程で, 分解し生成するオリゴマーの影響を中心に評価した。更に, 組織工学材料と, ヒトやラットから採取した細胞との相互作用の結果, 軟骨分化過程での両細胞系での顕著な応答性の違いについて述べる。

Keywords: biodegradable polymer, chondrogenesis

**矢上 健: アレルゲンの交叉反応性と Class 2 Food Allergy**日本ラテックスアレルギー研究会誌, **6**, 6-11 (2002)

90年代に入ると, 分子生物学的な手法がアレルゲンの研究にも応用されるようになり, 即時型アレルギー反応の原因となる蛋白質の構造が次々と明らかにされてきた。そして, この10年ほどの間に得られた知見は, 従来のアレルゲンに関する常識を覆すものであった。本稿では, 食物アレルギーの原因となる蛋白質抗原に関する新しい概念について, 交叉反応性という面を中心に簡潔に解説する。

Keywords: cross-reactivity, allergenicity, incomplete food allergen

**Yagami, T.: Allergies to cross-reactive plant proteins. Latex-fruit syndrome is comparable with pollen-food allergy syndrome**Int. Arch. Allergy Immunol., **128**, 271-279 (2002)

Both latex-fruit syndrome and oral allergy syndrome concomitant with pollinosis (pollen-food allergy syndrome) are considered to be caused by cross-reactivity between sensitizers and symptom elicitors. The cross-reactive food allergens relevant to these syndromes are mostly sensitive to heat and digestive enzymes. Such a vulnerable antigen cannot sensitize people perorally but provokes allergic reactions in already sensitized patients based on its cross-reactivity to the corresponding sensitizer. These types of food allergens are often called incomplete food allergens or nonsensitizing elicitors. Their features contrast with those of complete food allergens that have the capacity for peroral sensitization as well as symptom elicitation. Although highly antigenic and cross-reactive, carbohydrate epitopes do not generally elicit allergic reactions and often disturb in vitro IgE tests. Recent research has revealed that some of the cross-reactive allergens responsible for the two syndromes are proteins related to the defense responses of higher plants. Plant defense-related proteins are relatively conserved in the course of evolution and can supply cross-reactive epitopes. It is important to note that various stresses can stimulate the expression of these proteins, which implies that allergens increase in plants under stressful conditions like severe growing situations and exposure to some kinds of chemicals. Because defense-related proteins

usually provide a plant with resistance to stresses, varieties that are apt to intensively induce such proteins are agriculturally valuable. Less toxic substances that cause crops to express defensive proteins are being investigated as a new type of agrochemical. Moreover, some defense-related proteins are going to be constantly produced in genetically modified plants. Even though these proteins can be useful agriculturally, their allergenicity should be evaluated carefully.

Keywords: allergen, allergenicity, cross-reactivity

Yagami, T.: **Features and mode of action of cross-reactive plant allergens relevant to latex-fruit syndrome** *Food Agric. Immunol.*, **14**, 241-253 (2002)

Immediate-type reactions to articles made from natural rubber latex are collectively referred to as latex allergy. Some latex-sensitized patients also experience allergic reactions to various fruits and vegetables. This phenomenon is called latex-fruit syndrome. Recent research revealed that several proteins related to the defense mechanisms of plants are responsible for latex allergy and the accompanying cross-reactivity. Protective systems of higher plants are relatively conserved in the course of evolution, and therefore homologous defense-related proteins are produced regardless of the species. Once sensitized by such a conserved protein, the patient is expected to cross-react to taxonomically unrelated plants. Remarkably, cross-reactive antigens in the causative foods are generally sensitive to heat and digestive enzymes. Per-oral sensitization is not commonly established by such food antigens. They are instead considered to elicit allergic reactions in latex-sensitized patients based on their cross-reactivity to the corresponding sensitizers. Defense-related proteins in higher plants are agriculturally useful, and various environmental stresses up-regulate their production. These proteins are also suspected to be relevant to the increasing allergies to plants.

Keywords: allergenicity, cross-reactivity, class 2 food allergy

鹿庭正昭：特集 接触皮膚炎2002—基礎と臨床—プラスチック染料ソルベントオレンジ60による接触皮膚炎

細胞, **34**(12), 474-477 (2001)

皮膚障害について、原因製品と原因化学物質（接触アレルギー）の関連性を確認するために、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事例を例として、ソルベントオレンジ60を新たな染料アレルギーとして特定するために用いた取り組みの実際について概説した。

Keywords: plastic eyeglass frame, allergic contact dermatitis, Solvent Orange 60

鹿庭正昭：講義 化学物質の安全管理—健康被害の原

#### 因究明と分析—

ぶんせき, **6**, 303-308 (2002)

身近な化学製品（家庭用品）による皮膚障害を例に、化学分析の役割に注目しながら、原因製品と原因化学物質の関連性を確認するために確立した、原因究明の取り組みの現状と今後の課題について概説した。

Keywords: household product, skin damage, cause elucidation

鹿庭正昭：ミニファイル 公定分析法 家庭用品

ぶんせき, **5**, 19-20 (2003)

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」（家庭用品法）における公定分析法の概要を示すとともに、公定分析法における問題点と今後の課題、家庭用品法と業界自主基準（ガイドライン）との関連性、家庭用品による健康被害の原因究明における化学分析の果たす役割について概説した。

Keywords: household product, legislative regulation, official analytical method

松岡厚子：葡萄果皮中の天然ポリフェノール・レスベラトロールの細胞遺伝学的活性とその活性部位

*Food and Food Ingredients Journal of Japan*, **200**, 12-18 (2002)

天然ポリフェノール・レスベラトロール (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene) は、抗酸化作用、脂質代謝の調節、抗血小板凝固作用、抗炎症作用、抗発癌性、およびエストロゲン様作用などの多彩な薬理作用が報告されてきている。著者はレスベラトロールが興味深い細胞遺伝学的作用を有していることを発見した。すなわち、レスベラトロールは10 µg/mlまで濃度依存的に姉妹染色分体交換 (SCE) を増加させ、最高濃度では陰性対照の6倍もの頻度であり、これはSCE誘発の陽性対照物質マイトマイシンCに匹敵する程であった。SCEはこれまで、遺伝毒性試験の一つとして化学物質等のDNA傷害を検出する指標として使われてきている。レスベラトロールは化学構造が比較的単純であることから、その強いSCE誘発活性と構造の相関を調べるため、スチルベン骨格をもち水酸基の数と位置が異なる誘導体6種を合成し、そのSCE誘発活性を測定した。その結果、誘導体はSCE活性が陰性か、高頻度にSCEを誘発するかの2群にわけられ、その違いは4位に水酸基を有しているか否かであった。4位に水酸基を有するスチルベン化合物が強いSCE誘発活性を有していることを発見した。

Keywords: resveratrol, sister chromatid exchanges, 4-hydroxy group

伊佐間和郎, 五十嵐良明, 土屋利江：γ線照射ポリ乳酸の表面解析と骨芽細胞機能影響

バイオインダストリー, **19**, 21-29 (2002)

γ線滅菌は、熱に弱い材料やタンパク質などの生体由来材料にも使用でき、組織工学材料の滅菌法として期待できる。生分解性材料として組織再生に利用されているポリL-乳酸 (PLLA) の、γ線照射による物性変化と、γ線照射したPLLAが、骨芽細胞の骨形成機能に及ぼす影

響を解析した。γ線照射による分解性のため、今まで PLLA 製医療用具にはγ線滅菌を適用できないと考えられていた。しかし、(1) あらかじめ分子量の大きな PLLA を選択すれば、安全なγ線滅菌の適用が可能であること、(2) γ線照射は、表面修飾のために新たな化合物を付加することなしに、PLLA に骨形成促進効果を付与できること、の2点を明らかにした。現在、PLLA 製医療用具はエチレンオキサイドガス滅菌されているが、毒性のあるエチレンオキシドの残留は避けられない。エチレンオキサイドガス滅菌からγ線滅菌への切り替えが可能であると考えている。

Keywords: poly(L-lactide), γ-ray irradiation, osteoblasts

中岡竜介, 土屋利江: 微粒子状物質の骨分化機能影響  
バイオインダストリー, 19, 14-20 (2002)

人工股関節などのインプラントにおいて、長期間の磨耗により生じた磨耗粉による副作用が問題となっている。モデル磨耗粉として種々の微粒子を用いて、それらのヒト骨芽細胞の分化能への影響とギャップ結合機能評価法とから、微粒子が細胞へ与える影響として骨分化を中心に検討し、ギャップ結合との関連性を考察した。

Keywords: gap-junctional intercellular communication, human osteoblast, wear debris

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7報(上)—

防菌防黴, 30, 749-758 (2002)

使用者が滅菌保証を行う実際に行う際の問題点について質疑—応答の形式で解説した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

\*K2 インターナショナル(株)

新谷英晴, 数馬昂始\*: 日本に於ける滅菌保証達成に於ける問題点と解決法—第7報(上)—

防菌防黴, 30, 825-831 (2002)

使用者が滅菌保証を行う実際に行う際の問題点について質疑—応答の形式で解説した。

Keywords: validation study, routine control, sterility assurance

\*K2 インターナショナル(株)

新谷英晴: 放射線滅菌によるポリエチレン, ポリプロピレンならびに酸化防止剤の分解

防菌防黴, 30, 677-682 (2002)

医療用高分子として良く使用されるポリエチレン, ポリプロピレンならびにそれらの高分子素材に含まれる酸化防止剤に対して放射線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解説した。

Keywords: gamma-ray sterilization, polyethylene, polypropylene

新谷英晴: 医療用品業界ならびに食品業界で使用される滅菌剤, 殺菌剤, 消毒剤

防菌防黴, 30, 491-500 (2002)

医療用品業界ならびに食品業界で使用される滅菌剤, 殺菌剤, 消毒剤の種類特性, 安全性などについて総説的に解説した。

Keywords: sterilization, disinfection, sanitization

新谷英晴, 黒須志のぶ\*: 微生物の迅速ならびに自動化同定法

防菌防黴, 31, 37-44 (2003)

医療機関の浮遊菌, 付着菌, 医療用具に存在するバイオバーデン菌などの検出, 自動同定について解説した。

Keywords: identification, automation, bioburden

\*ミノファージェン製薬(株)

西村哲治: バイオモニターと情報のオンライン処理  
エンバイオ No.2 p28-33 (2002)

米谷民雄: 食品添加物の安全性確保

公衆衛生情報, 32(9), 18-21 (2002)

海外で広く使用され安全性評価も終了しているにもかかわらず、わが国では使用が認められていない食品添加物について、違反事例が相次いだ。そのため、厚生労働省は急遽これまでの方針を変更して対応にのりだした。本稿では、その対応策や食品添加物の指定手順について解説した。さらに、食品用香料化合物に対する今後の検討課題、食品添加物の安全性確保に重要な摂取量調査法について解説した。

Keywords: food additive, food flavoring, daily intake

米谷民雄: 英国食品基準庁など食品安全のための新組織

食品衛生学雑誌, 43, J319-J320 (2002)

欧州諸国ではBSE問題を契機に、リスク管理機関から独立したリスク評価機関を設置することが潮流となり、食品の安全性確保にむけた組織改革が実施された。そこで、諸外国やEUにおける組織改革を、英国食品基準庁を中心に解説し、さらに、わが国における動きについても述べた。

Keywords: Food Standards Agency, risk assessment, risk management

米谷民雄: 食品添加物の分析法

ぶんせき, 2002, 691-696 (2002)

食品添加物には使用基準が設定されている品目が多く、それが遵守されているかを調べるための食品中食品添加物分析法が必要となる。また、食品に使用した食品添加物は、原則的にすべて表示が義務づけられているため、表示が正しいかを確認するためにも、食品中食品添加物の分析法が必要となる。このような行政的意味合いもあり、国内においても食品中の食品添加物分析法の研究は、継続して実施されてきた。本稿では、食品中食品添加物分析法に関して、1999年から2002年前半までに発表された論文について、甘味料, 保存料, 酸化防止剤, 着色料, 漂白剤, 防かび剤, 発色剤, その他の用途剤, 不許可添加物の項目にわけて、分析法の内容を概説した。

Keywords: food additive, analysis, new method

### 米谷民雄：食品中のアクリルアミド

食品衛生学雑誌, 43, J348-J351 (2003)

平成14年4月24日, ストックホルム大学とスウェーデン食品庁の共同研究により, ポテトチップスやフライドポテト等の食品中にアクリルアミド (AA) が高濃度に含まれている事実が公表された。AAはIARCで, Group 2A (probably carcinogenic to humans) に分類されている。そこで, 食品中のAAに対するその後の各国の対応について解説した。また, AAの代謝と毒性について, 既存の情報をまとめた。AAは, 食材中のアスパラギンとグルコースなどの糖が高温で加熱されることにより生成する。スウェーデンの発表では, ポテトチップで2 ppm以上検出された製品があるが, 同じ食品でも濃度に大きな差があることから, 製造方法による差も大きいと考えられた。わが国では, スウェーデンの情報を入手後ただちに, AAの分析法の開発と国内食品の実態調査が開始された。また, 厚生労働科学特別研究班が組織された。分析法としてはGC/MS法とLC/MS法が開発され, それらを用いて国内市販食品の分析が実施された。スウェーデンの発表と同程度のAAが検出された。

Keywords: acrylamide, food, analysis

### 米谷民雄：食品添加物行政の動き

Health Sciences, 19, 80-81 (2003)

食品添加物に関する最近の行政の動きを解説した。2002年に, 違反香料による大規模な製品回収事件が起きたが, 続いて起きた食塩中のフェロシアン化物の問題が, 従来からの厚生労働省の食品添加物指定の方針を一変させた。厚生労働省は従来, 指定添加物の数が増えないように措置してきたが, 逆に, 欧米で広く使用され安全性審査が終了しているが, わが国では未許可の食品添加物が多くなる結果となった。食塩中フェロシアン化物の問題が加工食品全体に広がる可能性があったため, 急ぎフェロシアン化物が指定され, 同時に, 欧米で広く使用され安全性審査が終了している品目を, 今後は国が職権で指定していく方針が打ち出された。香料化合物については, EUがポジティブリスト化を予定しており, JECFAでも安全性評価が積極的に実施されている。それに対応すべく, わが国においても香料化合物の安全性評価を実施するための具体的検討が開始された。既存添加物に対しては, 食品衛生法を改正し, 安全性に問題のあることが判明したあるいは既に使用実態のない既存添加物の使用を禁止できるようにした。天然添加物においても, 安全性評価の終了した品目のみを使用する方向に向かっている。以上について詳述した。

Keywords: food additive, food flavoring, natural food additive

### 米谷民雄：アクリルアミド

からだの科学, 230, 113 (2003)

2002年4月にスウェーデンの研究者らが, 炭水化物が多い食材を焼いたり揚げたりした食品から, IARCがグループ2Aに分類しているアクリルアミド (AA) を検出した。ポテトチップスでは330-2300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , フライド

ポテトでは300-1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。国内製品からも, 同程度のAAが検出された。本稿では, 食品中のAAの生成機構, 吸収・代謝, 毒性について概説した。ヒトの発がんに関してはデータがほとんどない。食事に関する提言としては, 食品加熱による過度の調理は避けるべきだが, 一方で, 特に肉製品の場合には病原体を殺すために完全に調理すべきとされている。また, バランスのとれた種々の食品を摂り, フライや脂肪の多い食品を減らすように勧められている。

Keywords: acrylamide, food, toxicity

### 米谷民雄：食品用香料および天然添加物の安全性

食品衛生研究, 53(4), 24-29 (2003)

食品の安全性と信頼性を確保するために, 食品添加物行政では大きな変化が起きている。国際的に汎用されているがわが国では未指定の品目を国が指定していく方針や, 天然添加物品目の使用禁止措置がとれるようになる方針が打ち出された。また, 食品用香料においても国際的動向にそった安全性評価や指定が実施される。一方, 食品用香料や天然添加物の安全性を化学的に確保するために, 厚生労働科学研究において, 種々の観点から研究が実施されている。本稿では, 食品用香料化合物および天然添加物について, 厚生労働科学研究においてどのような研究が現在実施されているかについて解説した。天然添加物は多くの場合に多成分の混合物であり, 原料由来の種々の不純物が製品に混入してくる可能性があるため, 合成添加物の場合以上に, 種々の観点から研究することが必要である。また, 国内で使用されている食品用香料化合物の数は二千をこえるため, 今後これらの規格をどう設定していくのか, 香料規格のあり方を含めて, 研究中である。

Keywords: food flavoring, natural food additive, safety

### 米谷民雄：魚中の水銀という古くて新しい問題

食品衛生学雑誌, 44, J189-J191 (2003)

魚の中に含まれる水銀の問題は, 水俣病との関連で記憶されている古い問題であるが, 一方, 最近になっても, 欧米諸国において特に妊婦等に対して勧告が出されるなど, 現在の新しい問題でもある。この欧米での動きに連動して, 国内においては厚生労働省, 環境省, 水産庁などが緊急の調査に乗り出したところである。また, 魚類ではないが, クジラ類の中には高濃度の水銀を含む種類があり, 注意喚起がなされている。そこで, 魚介類中の水銀問題に関して, 米国FDA, 米国EPA, カナダ保健局, 英国食品基準庁などによる勧告の具体的内容と, その影響評価の基礎になった疫学調査について解説した。さらに, コーデックス基準やJECFAの動き, わが国各省庁の具体的な行政的対応について述べた。一方, クジラ類中の水銀問題については, これまでの推移および厚生労働省の今後の対応策について解説した。

Keywords: mercury, fish, whale

残留動物用医薬品試験法検討委員会 (松田りえ子, 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9)ーゲンタマイシン, スペクチノマイシンお

**よびネオマイシン, シロマジンの試験法—**

食品衛生研究, 53(5), 39-45 (2003)

平成14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, ゲンタマイシン, スペクチノマイシンおよびネオマイシン, シロマジンの試験法について, 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: gentamicin, neomycin, spectinomycin

**宮原 誠: 食品照射検知法の現状**

食品照射, 37, 29-47, 2002

ガンマ線等の電離放射線を食品に照射し, 殺菌, 改質, 昆虫の防除等を行うとする食品照射について, 検知法の立場から, その現状について最近の進捗状況をまとめた。とくに, 反対の強いヨーロッパの検査結果等をふまえ, これら検知法の有用性を実証的に論じた。

Key words: irradiated foods, detection methods, survey

**稲山 浩, 豊田正武: 食物アレルギー表示に伴う特定原材料検出法の概要**

食品衛生研究, 52(6), 65-73 (2002)

近年, アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害を防止するため, 表示による情報提供が求められている。平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い, 平成14年4月より本格的にアレルギー物質を含む食品の表示が義務付けられた。厚生労働省では食物アレルギー研究班の調査報告に基づき, 発症数, 重篤度等から勘案し, 省令で定める特定原材料5品目(卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生)については, 全ての流通段階での表示を義務付け, 通知で定める特定原材料19品目(あわび, いか, いくら, えび等)については表示を推奨することとなった。これに伴い, 国立医薬品食品衛生研究所を中心に産官学の支援研究機関が協力して, 省令で定めた特定原材料5品目についてELISA法, PCR法, イムノクロマト法, ウエスタンブロッティング法による検出法に関して検討している。それらの方法について解説した。

Keywords: food allergy, allergic substances, detection method

**稲山 浩, 米谷民雄: 遺伝子組換え食品検知法**

食品衛生研究, 52(7), 54-65 (2002)

平成14年3月に行われたCODEX第3回バイオテクノロジー応用食品特別部会の第2回ワーキンググループと特別部会本会議の遺伝子組換え検知法の内容に関して解説した。

Keywords: CODEX, genetically modified foods, detection method

**稲山 浩, 米谷民雄: アレルギー物質を含む食品の検査方法の概要 (I)**

食品衛生研究, 53(2), 25-33 (2003)

近年, アレルギーを誘発する物質を含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになり, 表示による情報提供の必要性が高まったため, 平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い, 平成13年4月よりアレルギー

を含む食品の表示が義務付けられた(平成14年4月より全面施行)。厚生労働省では, 発症数・重篤度から判断して, 省令で定める特定原材料の5品目(卵, 牛乳, 小麦, そば, 落花生)については, 全ての流通段階での表示を義務付け, 通知で定める特定原材料に準ずる19品目(あわび, いか, いくら, えび等)については表示を推奨することとした。

これに併せて, 平成13年度より厚生労働科学研究費補助金による「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班(主任研究者:丸井英二)」では「特定原材料検出法検討会」を組織した。この検討会では, 国立医薬品食品衛生研究所を中心に, 大学, 企業, 検査機関及び試験研究機関が協力して, 省令で定めた特定原材料5品目の検出法に関して検討された。平成14年11月6日には, 特定原材料の表示を監視する目的で, この検討会で開発・評価された検出法をもとに, 医薬局食品保健部長通知として「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)において, 特定原材料5品目の検査法が定められた。本稿では, 通知で示された検査法について解説する。

Keywords: food allergy, allergic substances, detection method

**一瀬 篤, 稲山 浩, 米谷民雄: アレルギー物質を含む食品の検査方法の概要 (II)**

食品衛生研究, 53(2), 34-35 (2003)

アレルギー物質を含む食品については, 特定のアレルギー体質を持つ方の健康危害の発生を防止する観点から, 平成13年4月に食品衛生法関連法令が改正され, 平成14年4月から特定原材料5品目の表示が義務化された。

アレルギー物質を含む食品に関する表示に係る監視については, 当初, 製造, 販売等に係る関係書類によることとされていたが, 平成14年11月6日付で厚生労働省医薬局食品保健部長から都道府県知事, 政令市市長, 特別区区長に宛てて検査法が通知された(食発第1106001号)ことによって科学的な監視を行うことが期待されている。ここでは「判断樹」, 「判断樹について」及び「偽陽性又は偽陰性を示す食品リスト」について留意点等について解説した。

Keywords: labeling, allergic substances, detection method

**稲山 浩: 食品中のアレルギー物質検出試験法について (特定原材料検出法について)**

日本小児アレルギー学会誌, 17(1), 23-30 (2003)

現在, 我が国では少なくとも人口の1~3%の人が何らかの食物アレルギーを持っていると考えられている。有効なアレルギー治療法がないため, アレルギーを誘発する物質(アレルギー)を含む食品を避けることが, 最も一般的な予防・治療法となっている。近年, アレルギーを含む食品に起因する健康危害が多く見られるようになり, 表示による情報提供の必要性が高まったため, 平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い, 平成14年4月より本格的にアレルギーを含む食品の表示が義務付けられている。これに併せて, 国立医薬品食品衛生研究所を中心に産官学の支援研究機関が協力して, 省令

で定めた特定原材料5品目の検出法に関して検討された。平成14年11月6日には、特定原材料の表示を監視する目的で、特定原材料検出法検討会で開発及び評価された検出法を基に、医薬局食品保健部長通知として「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)が特定原材料5品目の検査法が定められた。本稿では、上記の特定原材料検出法の内容に沿って紹介した。

**Keywords:** food allergy, allergic substances, detection method

#### 穂山 浩：食物アレルギー表示に伴う特定原材料の検出と表示について

日本食品保全研究会報, 8(1), 1-5 (2002)

平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い、アレルギー物質を含む食品の表示が義務付けられた。厚生労働省では食物アレルギー研究班の調査報告に基づき、発症数、重篤度等から勘案し、省令で定める特定原材料5品目については、全ての流通段階での表示を義務付け、通知で定める特定原材料19品目については表示を推奨することとなった。これに伴い今年度より厚生労働省食品表示研究班では「特定原材料検出法検討会」を発足させた。この検討会で特定原材料5品目についてのELISA法、PCR法、イムノクロマト法、ウエスタンブロッティング法による検出法に関して検討している。その内容について紹介した。

**Keywords:** labeling, allergic substances, detection method

#### 穂山 浩：アレルギー 何をどのように測定するか

保健の科学, 45(3), 184-189 (2003)

現在、我が国では少なくとも人口の1~3%の方が何らかの食物アレルギーを持っていると考えられているが、有効なアレルギー治療法はなく、アレルギーを誘発する物質(アレルギー)を含む食品を避けることが、最も一般的な治療・予防法となっている。平成13年4月の食品衛生法関連法令の改定に伴い、平成14年4月より本格的にアレルギーを含む食品の表示が義務付けられている。本特集では、アレルギーに関して何をどのように測定するかを、特定原材料検出法の開発に沿って紹介した。なおアレルギーという言葉は、広義な意味において、卵や牛乳といった食品や原材料を示し、狭義な意味において、食物アレルギーを引き起こす各タンパク質を示すが、後者の意味のタンパク質は無限に存在するため、ここでは、前者の意味でとらえることにする。

**Keywords:** allergen, allergic substances, detection method

#### 穂山 浩：アレルギー物質を含む食品の検査方法について

食品衛生学雑誌 44(2), J-168-J177 (2003)

これまでの表示方法では、消費者が食品中のアレルギー物質の有無を知るには不十分と考えられていた。平成12年7月に食品調査会表示特別部会が厚生省(現厚生労働省)に対してアレルギー物質を含む旨の表示を義務付けることが必要とする報告を行った。その後、平成13

年3月の食品衛生法(施行規則および乳糖省令)の改定に至り、平成13年4月よりアレルギーを含む食品の表示が義務付けられた。厚生労働省では、発症数・重篤度から判断して、省令で定める特定原材料の5品目(卵、牛乳、小麦、そば、落花生)については、全ての流通段階での表示を義務付け、通知で定める特定原材料に準ずる19品目(あわび、いか、いくら、えび等)については表示を推奨することとした。

これに伴い、平成13年度より厚生労働科学研究費補助金による「食品表示が与える社会的影響とその対策及び国際比較に関する研究班」では「アレルギー表示検討会」と「特定原材料検出法検討会」を発足し研究を開始した。前者では、医療従事者、製造業者、販売業者、患者団体の代表者により、アレルギー表示の方法および問題点の抽出、分析に関して検討され、後者では、国立医薬品食品衛生研究所を中心に、大学、企業、検査機関及び試験研究機関が協力して、省令で定めた特定原材料5品目の表示を監視する目的で、科学的検証としての検出法に関して検討された。平成14年11月6日には、特定原材料検出法検討会で開発・評価された検出法をもとに、都道府県知事、政令市市長、特別区区長に宛てて厚生労働省医薬局食品保健部長通知として「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」(食発第1106001号)が公表された。本講座では、この通知検査法に内容について解説した。

**Keywords:** food allergy, allergic substances, notified detection method

#### 日野明寛, 穂山 浩, 栗原秀夫：遺伝子組換え農産物の最新検知技術

日本食品科学工学会誌, 50(3), 107-114 (2003)

遺伝子組換え技術を利用して開発された遺伝子組換え(genetically modified; GM)作物が米国、カナダを中心に栽培されるようになり、我が国でも安全性審査を終了したGM作物が食品等に利用されるようになってきている。科学者、行政は従来の食品と同様に、食べて安全であると説明しているが、一部の消費者は、安全性が証明されていないと考え、何が起きるか分からないと反論している。このため消費者は、GM食品に対して漠然とした不安を拭いきれずにいる。このような社会全般に広がっている混乱を解決するための一つの手段として、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律」(JAS法)に定める品質表示制度の下に組換え農産物を原料とする食品(GM食品)の品質表示基準が2001年4月から実施されている。また、食品衛生法においても、安全性審査の義務化と一体のものとして、食品の内容を消費者に明らかにするために、同じ内容の表示制度が実施されている。このような消費者の声に押されるようにして、食品企業は油などの一部の食品を除き、GM作物を食品原料として使用しない状況になっており、技術は日々進歩しているにもかかわらず、この技術の社会的な受入れが進んでいない状態となっている。正確な表示を行うために必要となる最新の検知技術について、GM作物に関する様々な背景も含めて紹介する。

**Keywords:** labeling, genetically modified foods, detection

## method

\*1 (独) 食品総合研究所

\*2 (独) 農林水産消費技術センター

棚元憲一：局方微生物試験法の現状，国際調和と将来展望—第十四改正日本薬局方を中心として—

防菌防黴誌，**31**，19-25 (2003)

第十四改正日本薬局方に伴い新規に導入された「生薬の微生物限度試験法」，非無菌医薬品の微生物学的品質特性」，国際調和を受けて全面改正された「エンドトキシン試験法」を中心に解説するとともに，局方微生物試験法の現状，現在の国際調和状況と問題点，さらには第十五局に向けての展望について述べた。

Keywords: Japanese Pharmacopoeia, microbiological limit test, microbiological tests

河村葉子：フタル酸ビス (2-エチルヘキシル) およびフタル酸ジイソノニル試験法について

食品衛生研究，**52**(11) 17-25 (2002)

平成14年8月2日付け厚生労働省食品保健部基準課長通知に収載された，器具・容器包装及び玩具におけるフタル酸ビス (2-エチルヘキシル) 及びフタル酸ジイソノニル試験法について，その概要と試験を実施する上での留意点を解説した。

Keywords: bis(2-ethylhexyl) phthalate, diisononyl phthalate, test method

山本茂貴，五十君静信，中澤宗生\*：UJNR有毒微生物専門部会第36回日米合同部会 第9回国際シンポジウム バクテリア・バクテリアトキシンセッション

食品衛生研究，**52**，10-23 (2002)

UJNR有毒微生物専門部会第36回日米合同部会に合わせて開催された，第9回国際シンポジウムのバクテリア・バクテリアトキシンセッションの発表の内容をまとめ報告した。

Keywords: risk assessment, food poisoning, public health

\*動衛検

山本茂貴：UJNR有毒微生物専門部会第36回日米合同部会 日米合同会議の概要

食品衛生研究，**52**，7-9 (2002)

UJNR有毒微生物専門部会第36回日米合同部会の日米合同会議の概要を紹介した。

Keyword: UJNR

山本茂貴：最新報告 現在，懸念される感染症と感染経路

ヘルスケア・レストラン，**10**，20-21 (2002)

食中毒について概説した。

Keyword: food-borne diseases

山本茂貴：特集 事故と安全：食品の微生物学的リスクアセスメント

保健の科学，**44**，195-198 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴：微生物学的リスクアセスメント

食品衛生研究，**52**，39-44 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて概説した。

Keyword: microbiological risk assessment

五十君静信：バクテリア・バクテリアトキシンセッション

UJNR有害微生物専門部会第37回日米合同部会食品衛生研究，**53**，12-14 (2003)

UJNR有毒微生物専門部会第37回日米合同部会に合わせて開催された，バクテリア・バクテリアトキシンセッションの発表から，演題番号4-7の以下の4演題につきその内容をまとめ報告した。4. 農務省西部地域研究センター食中毒物質研究部門の研究概要。5. 農務省西部地域研究センター安全生産と微生物研究部門の研究概要。6. 米国食品医薬品局北東地域研究所の概要。7. 毒性アセスメントへのDNAアレイ摘要の可能性。

Keywords: USDA, FDA, CDC

五十君静信：食品由来のリステリア菌による健康被害

食品衛生研究，**53**，19-23 (2003)

わが国におけるリステリア症の発症状況を掌握すると共に，本菌の食品への汚染状況をまとめ，リステリア症の発生と食品汚染との相関について考察を行った研究の結果を報告し，今後の本菌の食品衛生上の立場につき解説した。

Keywords: *Listeria monocytogenes*, surveillance, food contaminant

五十君静信：ブドウ球菌検査法

月刊HACCP，**9**，27-29 (2003)

食品企業に求められる微生物検査法として，黄色ブドウ球菌検査法について解説した。黄色ブドウ球菌を食品から分離することの意義とエンテロトキシンの証明を如何に行うかにつき，説明を行った。

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxin, detection

五十君静信：細菌を抗原運搬体とする経口ワクチンによる腸管感染症の予防

総合臨床，**51**，2944-2949 (2002)

これまでのワクチン研究から，一般に，ある感染症に対するワクチンはその感染症の感染経路に従って投与するのが最も効果的であると考えられている。従って，腸管感染症を予防するワクチンは，経口投与による腸管粘膜上皮からの粘膜免疫が必須である。これにより腸管粘膜局所の特異的なIgA抗体産生の増強による病原体の侵入ブロックに加え，全身性免疫の誘導による二重の感染防御が可能となる。近年，経口ワクチンに抗原運搬体の考えが導入され，遺伝子組換えによる経口粘膜ワクチンの研究が盛んに行われている。本稿では，代表的な腸管感染症であるコレラのワクチンの問題点について述べ，腸管感染症のワクチンは経口ワクチンが必須であることを示し，腸管感染症に対する粘膜ワクチンの現状と，注目されている組換え乳酸菌の経口粘膜ワクチンの話題につ

いて解説した。

Keywords: vaccine, recombinant, lactic acid bacteria

五十君静信：食品由来耐性菌の問題

獣医公衆衛生研究, 5, 10-11 (2002)

ヒトにおける薬剤耐性菌の出現と食用動物への抗菌性物質の使用との因果関係はまだ明確に示されていないという議論もあるが、いくつかの製剤によって耐性菌が増加したという指摘もある。食用動物への抗菌性物質の使用は、畜水産食品に係わる動物用医薬品の残留の問題と飼料添加物に使用される抗生物質や合成抗菌剤によると考えられる薬剤耐性菌の出現といった点で議論されている。そこで、食品に関係する耐性菌のうち、特に話題となっている細菌について、具体例を示しながら、その問題点をまとめた。

Keywords: drug resistance, antibacterial agent, forage

五十君静信：バクテリア・バクテリアトキシンセッション5-7 UJNR有害微生物専門部会第36回日米合同会議～第9回国際シンポジウム～

食品衛生研究, 52, 15-20 (2002)

UJNR有害微生物専門部会第36回日米合同部会に合わせて開催された、第9回国際シンポジウムのバクテリア・バクテリアトキシンセッションの発表から、演題番号5-7の以下の3演題につきその内容をまとめ報告した。5. FDA/FSIS *Listeria monocytogenes* リスクアセスメント。6. 生カキ中の腸炎ピブリオの公衆衛生衝撃リスクアセスの概要。7. 日本の家庭における生卵摂取に伴うサルモネラ・エンテリティディス感染を対象としたリスクアセスメント。

Keywords: risk assessment, food poisoning, public health

Savage D. C.\*著, 五十君静信訳：21世紀の腸内細菌学 腸内細菌学会誌, 16, 105-113 (2002)

腸内菌叢は、通性嫌気性および絶対嫌気性の細菌や古細菌の数十の属におよぶ数百の菌種で構成されている。その菌数は $1 \times 10^{14}$ を上回る。そして、腸内容物の半分を占めている。宿主動物に生理的あるいは免疫的な影響を与える。このことは、以下の2つの考え方を支持している。1. 腸内細菌叢は、自然界で人間が生存するのに必須の器官である。2. ヒトは、高等な動物細胞と細菌や古細菌からなる細菌叢の共生体である。このような考え方は、21世紀に行われるヒトを対象とした生物学や進化論、健康の推進、病気の診断や治療に関する研究に重要な影響を与える。これらの研究の多くは、分子生物学と遺伝学的手法により行われる。このレビューは、どの様にしてこのような技術を利用しわれわれの能力を高めてゆけば、細菌叢の有用な影響を増強し有害な影響を抑えることができるかに主眼をおいている。

Keywords: Intestinal flora, molecular biology, genetics

\* University of Tennessee

Kasuga, F., Yamamoto, A.\*<sup>1</sup>, Iwahori, J.\*<sup>2</sup>, Tsutsui, T.\*<sup>3</sup>, Fujikawa, H.\*<sup>4</sup>, Yunokawa, T.\*<sup>5</sup>, Hirota, M., Kumagai, S.\*<sup>6</sup>, Yamamoto, S.: Risk assessment of *Salmonella*

Enteritidis infection associated with raw egg consumption in Japan

*Pathogenic Microorganisms and Their Toxins: A Global Perspective of Their Risk, The Ninth International Symposium on Toxic Micro-organisms*, 60-68 (2002)

確率論を用いた我が国初の微生物学的リスクアセスメントの試行例として、家庭で消費される生卵に起因するサルモネラ・エンテリティディスのリスクアセスメントについて、日米天然物資源会議(UJNR)有毒微生物部会のシンポジウムで講演した内容をProceedingsにまとめたものである。殻付き卵の生産、流通、消費段階における入力変数として、どのデータを使いどの確率分布関数を適用したか、順を追って記述した。また、年間発症率の分布や適用可能なシナリオの結果を推定した。主な入力変数、確率分布関数、菌の増殖関数は、アメリカ農務省のモデルに準じた。データ収集が系統的ではなく、リスクコミュニケーションもほとんど行っていないため、公式なリスクアセスメントとは言えないが、今後のモデルとなることを目指した。

Keywords: microbiological risk assessment, *Salmonella* Enteritidis, eggs

\*<sup>1</sup> 兵庫県立健康環境科学研究所

\*<sup>2</sup> 高知医科大学

\*<sup>3</sup> 動物衛生研究所

\*<sup>4</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>5</sup> 東海北陸厚生局

\*<sup>6</sup> 東京大学大学院

柴田和顯\*<sup>1</sup>, 木島秀雄\*<sup>1</sup>, 森川保二\*<sup>1</sup>, 近田泰一\*<sup>1</sup>, 杓名昂一\*<sup>2</sup>, 栄賢司\*<sup>3</sup>, 高橋正夫\*<sup>3</sup>, 岡田和嘉\*<sup>4</sup>, 松井珠乃\*<sup>5</sup>, 鈴木里和\*<sup>5</sup>, 泉谷秀昌\*<sup>5</sup>, 渡辺治雄\*<sup>5</sup>, 工藤由起子, 春日文子, 高橋 央\*<sup>5</sup>, 大山卓昭\*<sup>5</sup>, 岡部信彦\*<sup>5</sup>: 市内一円で発生した *Salmonella* Enteritidis 食中毒の集団発生事例—豊橋市

病原微生物検出情報, 23, 94-96 (2002)

愛知県豊橋市で起きた、学校給食による *Salmonella* Enteritidis 食中毒の調査概要である。豊橋市保健所と国立感染症研究所FETPによる調査に協力した。市内に同時期に複数の血清型の *Salmonella* Enteritidis 感染が起き、そのうちの一つが学校給食に由来していた。しかも汚染菌数が非常に少なかったことから、発症率も少なく、潜伏期間も通説よりもかなり長く、暴露日や原因食材の究明が大変だった事例である。

Keywords: food borne outbreak investigation, *Salmonella* Enteritidis, eggs

\*<sup>1</sup> 豊橋市保健所

\*<sup>2</sup> 豊橋市教育委員会

\*<sup>3</sup> 愛知県衛生研究所

\*<sup>4</sup> 豊橋市医師会

\*<sup>5</sup> 国立感染症研究所

春日文子：微生物学的リスクアセスメント—その現状とマネジメントにおける役割

獣医公衆衛生研究, 5, 4-7 (2002)

微生物学的リスクアセスメントの国内外の現状, 具体

例, リスクマネージメントの概要とそれがリスクアセスメントに果たす役割について概説した。

Keywords: microbiological risk assessment, risk management

山本茂貴, 春日文子, 豊福肇\*: 食品の微生物学的リスクアセスメント

フードケミカル, 2002年11月号, 34-36 (2002)

微生物学的リスクアセスメント導入の背景, 国際機関の動向, コーデックスによるガイドラインの内容等について概説した。

Keywords: microbiological risk assessment, Codex, international organizations

\* WHO Department of Food Safety

春日文子: 海外におけるリスクアセスメントの実例紹介—カキにおける腸炎ビブリオのリスクアセスメント: FDA—

獣疫学会誌, 6, 65-66 (2002)

微生物学的リスクアセスメントにおける先進国で行われている具体例を詳説し, 手法と利点, 限界などに関する理解を深めるために, 米国FDAにより行われた, 生カキの消費に伴う腸炎ビブリオのリスクアセスメントについて, 解説した。

Keywords: microbiological risk assessment, *Vibrio parahaemolyticus*, US FDA

春日文子, 宮崎晴久\*1, 斎藤麻美\*1, 村松ミネ子\*1, 中原理善\*1, 小林昌子\*1, 貞永明彦\*1, 波多野義純\*1, 河原 章\*1, 坂本卓雄\*1, 中村 実\*1, 金児克忠\*1, 牧島満利子\*1, 佐野暁男\*1, 片山三重子\*1, 角田光淳\*2, 皆川武人\*1, 森田師郎\*3: 保育室の清潔と感染防御 保育と保健, 9, 14-21 (2003)

保育所の各保育空間における微生物汚染実態を調査し, 保育所内での感染症伝搬の危険因子を明らかにし, 有効な対策を提言することを目的として, 平成12~13年度に行った厚生科学研究をまとめたものである。乳児室の細菌汚染が高く, 保育士のおむつ交換に関わる手順や行動に注意が必要であることがわかった。また, 保育室での金魚や昆虫飼育箱の外側は汚染が高度であるため, それらペットと遊んだ後の手洗い指導が不可欠であること, さらに手洗いに関して, 水道の蛇口から再汚染を受ける可能性が高いために, 蛇口の交換か保育士の補助が必要であることなどが, 明らかになった。

Keywords: daycare centers, hygiene, microorganisms

\*1 杉並保健所

\*2 関東学院大学

\*3 杉並区環境清掃部

山本茂貴: 食品のリスクアセスメント

ILIS, 73 (2003).

食品の微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴: 食品の微生物学的リスクアナリシス

ソフトドリンク技術資料, 138 (2002)

微生物学的リスクアナリシスについて解説した。

Keyword: microbiological risk analysis

山本茂貴: 微生物学的リスクアセスメントの現状—インタビュー—

月刊 HACCP, 2002年6月号, 23-28 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴: 微生物学的リスクアセスメントの現状—インタビュー—

鶏卵肉情報, 2002年5月号, 18-22 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴: 食品の微生物学的リスクアセスメント

日本検疫医学会誌, 4, 3-7 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴: 厚生サイドから見た HACCP の進展 (シンポジウム)

日本食品微生物学会誌, 19, 96-99 (2002)

高度衛生管理システムの現状について紹介した。

Keyword: HACCP

山本茂貴: 食品の安全性に関する研究動向—微生物学的リスクアセスメント—

Techo Innovation, 46, 21-22 (2002)

微生物学的リスクアセスメントについて解説した。

Keyword: microbiological risk assessment

山本茂貴: 食品テロの驚異: 防御対抗システムの確立と強化のためのガイダンス—食品テロの脅威に関する WHO 専門家会議報告

食品衛生研究, 52, 27-31 (2002)

食品テロの脅威に関する WHO 専門家会議報告の内容をまとめ報告した。

Keywords: WHO, food terrorism

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

エンドトキシン研究, 5, 60-66 (2002)

大腸菌およびサルモネラ由来のエンドトキシンはヒトおよびマウスにおいて共に強い生物活性を示すが, その中心構造であるリピド A は大腸菌由来のものはヒトおよびマウスにおいて共に強い活性を示すにもかかわらず, サルモネラ由来のリピド A はマウスでは強い活性を示すがヒトでは活性がなく, 逆にアンタゴニストとして作用するという動物種特異的反応を示す。本稿ではこの種特異的反応の分子機構について解説した。

Keywords: MD-2, Toll-like receptor 4, lipid A

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  
エンドトキシン研究, 5, 50-55 (2002)

マクロファージ細胞表面でのエンドトキシンの認識にはCD14が関与することは古くから知られていたが, そのシグナルを細胞内に伝達する分子は明らかになっておらず, 最近, Toll-like receptor 4 (TLR4) がシグナル伝達分子として同定された。しかし, TLR4は単独では機能せず, MD-2という分子の共存下でシグナル伝達が始まる。MD-2がどのような役割を果たしているのかは明らかになっていないが, 本稿では, このシグナル伝達におけるMD-2分子の26番と114番目のアスパラギンのグリコシル化の重要性について解説した。

Keywords: MD-2, Toll-like receptor 4, glycosylation

寺嶋 淳\*, 田村和満\*, 広瀬健二\*, 泉谷秀昌\*, 渡辺治雄\*, 宮原美知子, 小沼博隆: <特集>細菌性赤痢 2001~2002

病原微生物検出情報 (IASR), 275, 1-3 (2003)

平成13年11月下旬から14年3月に起きた広域食中毒事件例について解説した。患者から分離された *Shigella sonnei* と輸入カキから分離された *Shigella sonnei* の PFGE パターンと薬剤耐性パターンが一致したことにより, 赤痢の発生は韓国産カキを原因とするものであることが強く示唆された。

Keywords: 広域食中毒, 赤痢, カキ

\*国立感染症研究所

Richard J. Roberts<sup>\*1</sup>, Marlene Belfort, Timothy Bestor, Ashok S. Bhagwat, Thomas A. Bickle, Jurate Bitinaite, Robert M. Blumenthal, Sergey Kh. Degtyarev, David T.F. Dryden, Kevin Dybvig, Keith Firman, Elizaveta S. Gromova, Richard I. Gumport, Stephen E. Halford, Stanley Hattman, Joseph Heitman, David P. Hornby, Arvydas Janulaitis, Albert Jeltsch, Jytte Josephsen, Antal Kiss, Todd R. Klaenhammer, Kobayashi Ichizo, Huimin Kong, Detlev H. Kruger, Sanford Lacks, Martin G. Marinus, Miyahara Michiko, Noreen E. Murray, Valakunja Nagaraja, Andrzej Piekarczyk, Alfred Pingoud, Elisabeth Raleigh<sup>\*1</sup>, Desirazu N. Rao, Norbert Reich, Vladimir E. Repin, Eric U. Selker, Pang-Chui Shaw, Daniel C. Stein, Barry L. Stoddard, Waclaw Szybalski, Thomas A. Trautner, James L. Van Etten, Jorge M.B. Vitor, Geoffrey G. Wilson<sup>\*1</sup>, Shuang-yong Xu<sup>\*1</sup>: A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes

Nucleic Acid Res., 31, 1805-1812 (2003)

A nomenclature is described for restriction endonucleases, DNA methyltransferases, homing endonucleases and related genes and gene products. It provides explicit categories for the many different Type II enzymes now identified and provides a system for naming the putative genes found by sequence analysis of microbial genomes.

Keywords: nomenclature, restriction endonuclease, DNA

methyltransferase

<sup>\*1</sup> New England Biolabs, Beverly, MA 01915 USA

奥田晴宏: 新医薬品等の承認申請資料等に関する留意事項について一品質・非臨床分野を中心として一  
医薬品研究, 33, 736-745 (2002)

平成14年1月28日に「新医薬品等の承認申請資料等に関する留意事項について」が厚生労働省医薬局審査管理課から事務連絡された。本事務連絡は新医薬品等の承認審査における審査のポイントを列記したものである。その中から品質分野・非臨床分野の留意事項についてその要点を解説した。

Key words: new drug, quality, application

山越葉子: 単分子ナノマニピュレーションを目指した超分子化学とナノテクノロジーを用いた解析—機能性人工レセプター Molecular Gripper の設計合成および画像化—

季刊フラーレン, 11, 169-177 (2003)

新規機能性人工レセプター “Mecanoreceptor” を設計・合成し, 機能性をNMRなどの分光学的手法および走査型トンネル顕微鏡 (STM) を用いて解析した。本レセプターは温度感受性の包接部分と, 菌表面に吸着するチオエーテル部分およびリンカーとしてのアルキル基を有する。このレセプターに単結晶金表面 (Au(111)) 上に自己組織化膜 (SAM) を形成させ, 原子レベルでの分子の画像化に成功した。このレセプターはナノレベルでの単分子ナノマニピュレーションに用いる可能性が示唆された。

Keyword: supramolecule, single molecular manipulation, nano technology, SAM, STM

井上和秀: ミクログリアにおけるATP受容体の発現と脳内生理機能。

神経研究の進歩, 46, 533-542 (2002)

ATP受容体は大きく2つのファミリー (P2XおよびP2Y) に分類される。P2Xファミリー (P2X1からP2X7までの7種類) はイオンチャネル型ATP受容体である。P2YファミリーはGタンパク共役型受容体スーパーファミリーに属し, 現在までにP2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y8, P2Y11, P2Y12, P2Y13が報告されている。これらの受容体のうち, ミクログリアに発現していると報告されているのは, P2XファミリーではP2X7, P2YファミリーではP2Y2およびP2Y12様受容体である。ミクログリアは, 正常時にはramified型として静止状態にあるが, 脳炎症時あるいは虚血時には何らかのシグナルで活性化されameboid型へ形態変化を起こし, その部位へ遊走し, 様々なサイトカインや生理活性物質を放出し, 相手方細胞に対して障害性となる生理反応を引き起こさせ, かつ障害細胞断片を貪食する。最近, ミクログリアから, 神経細胞保護作用あるいは突起伸展作用を有するプラスミノゲン (Inoue et al., 1998), IL-6 (Shigemoto-Mogami et al., 2001) などが放出されることが明らかになってきた。また, これまでにミクログリア活性化因子ならびに遊走因子は種々報告されていたが, 神経系の情

報をミクログリアへ伝えるような低分子神経伝達物質は未だ報告されていなかった。我々は、ミクログリアの生理機能の方向性を決定付け、あるいは神経系からの情報伝達を担う物質の一つとしてATP分子を想定して研究を続けている。本編では、その一端を紹介しつつ、ミクログリアにおけるATP受容体の生理機能を概観してみた。

Keywords: ミクログリア, ATP, 神経機能

#### 井上和秀：ATP受容体と慢性疼痛

*Clinical Neuroscience*, 20, 1119-1121 (2002)

ATPと痛みとの関係については、1959年にHoltonが知覚神経から刺激に応じたATP放出を報告して以来示唆されてきた。ATPが痛みを引き起こすことを初めてヒトで証明したのは1977年のことであった。その後Jahr & Jessellがラット培養後角ニューロンで、Salter & Henryがネコ後角ニューロンでATP誘発電位を測定した。1995年、後根神経節ニューロンおよび三叉神経節ニューロンに局限して発現するATP受容体サブタイプ(P2X3)がクローニングされたことにより、ATPによる痛みはその分子基盤を得て、それ以降研究は爆発的に発展している。本稿では、特にATP受容体と慢性疼痛との関係について現在までに明らかになっていることをまとめてみた。

慢性疼痛として神経因性疼痛および炎症性疼痛を取り上げ、それとATP受容体との関わりについて記述した。また、その前に急性痛とATP受容体との関係について概略した。

Keywords: ATP, 神経因性疼痛, 慢性疼痛

#### K. Inoue : Microglial activation by purines and pyrimidines

*Glia*, 40, 156-163.(2002)

Microglial activation by purines and pyrimidines is reviewed through the actions of ATP on chemotaxis or releases of plasminogen and cytokines from microglia. ATP activated microglia to cause morphological change with membrane ruffling. Activated microglia exhibit chemotaxis to ATP. The microglia are first stimulated by a low concentration of ATP (around 30-50  $\mu$ M), and release plasminogen acutely (within 5-10 min) which may protect neurons. Next step, microglia stimulated by a higher concentration of ATP release TNF- $\alpha$  2-3 hr after the stimulation and IL-6 6 hr after ATP-stimulation. There are several hours between onsets for TNF- $\alpha$  release and IL-6 release. It is reported that TNF- $\alpha$  stimulation causes an increase of IL-6 receptor mRNA and expression in neuronal cells. IL-6 receptor becomes mature after binding with GP130 to accept IL-6 molecules. It is speculated that neurons may require several hours to prepare for the full reception of IL-6 to induce a more efficient protective effect of IL-6 after the stimulation of TNF- $\alpha$ . Neurons are ready for full reception of IL-6, then microglia release IL-6 to neurons. Stronger and longer stimulation by ATP may change the function of microglia

causing cell death. The condition evoking the heavy stimulation should result from serious accident or injury. Activated microglia act as scavenger cells that induce apoptosis in damaged neurons by releasing toxic factors including NO and remove dead cells, their remnants or dangerous debris by phagocytosis.

Keywords: microglia, ATP, IL-6, TNF- $\alpha$

#### 井上和秀：ATPと痛み：危機管理分子ATP

脳21, 6, 16-21 (2003)

ATP分子は細胞内ではその生死を決めるほど重要な生理機能を担っている。この貴重な分子が細胞外に出て、P2X3あるいはP2X2/3受容体を介して痛み発現に関与していることが明らかとなってきた。P2X3ノックアウトマウスの疼痛反応は、ホルマリン誘発疼痛反応以外、正常のマウスとほとんど変わらない。従って、P2X3などは普段の急性痛にはさほど関与せず、物理・化学的力で細胞が破壊されるような重大な危機に直面したとき、細胞外にあってはならないATP分子が傷害部位から漏出してしまい、ATP受容体はそれを感知し、痛みとして脳に認識させ、生体に防御態勢を取らせる。ATPはいわば危機管理分子とも言える役割を担っているのではないかと想像させる。さらに、グリア細胞はATP分子等の介在により慢性痛発生・維持に関与する可能性が指摘されてきた。ATP受容体は痛み研究のブレークスルーとなるのか？

Keywords: ATP, アロディニア, 神経因性疼痛, 炎症, 危機管理分子

#### 井上和秀, 小泉修一：細胞外ATPを介したグリア?ニューロン相互調節機構。

細胞工学, 22, 397-401 (2003)

シナプス伝達機構の解明には、プレおよびポストシナプスニューロンの他に、アストロサイトやミクログリアを加えた、三者間シナプスという概念の導入が必要である。そして三者間シナプスにおける情報伝達分子としてATPの役割に注目すべきである。

Keywords: ATP, tripartite synapse, astrocyte, microglia

#### 関澤 純：化学物質対策とレギュラトリ・サイエンス

日本リスク研究学会誌, 13(2), 17-22 (2002)

化学物質対策と安全性評価の考え方の歴史的な変遷をわが国の化学物質安全関連規制からひもとくとき、最近の化学物質安全性評価の考え方の進展について分析した。最近の新たな問題のひとつとして、「環境ホルモン物質」をめぐる安全性評価、「PRTR法」をめぐる化学物質対策の新展開と問題点の例をあげ、リスクへの理解とコミュニケーションをめぐる課題が重要となっており、評価プロセスと外部意見の反映が必要とされることを示した。レギュラトリ・サイエンスをめぐる21世紀の課題として化学物質安全性の国際協力から評価プロセスのあり方について、安全性評価の新しい動き、および科学と社会の新しいあり方の関係を展望した。

Keywords: 化学物質安全関連規制, リスク, レギュラトリ・サイエンス

関澤 純：化学物質の安全性とリスクコミュニケーション

安全工学, 42(1), 36-43 (2003)

化学物質の安全をめぐるリスクコミュニケーションが注目されつつあるが、人により理解がさまざまな実状にある。「リスク」と「コミュニケーション」について、基本的な考え方とその歴史的な背景を欧米や国際機関における経験の蓄積から説きおこし、わが国のこれまでの実態と比較しつつ解説した。リスクコミュニケーションをマニュアルに沿ったテクニックとしてではなく、現実の問題解決のために、問題点の抽出、科学的なリスクアセスメント、アセスメント結果をベースにしたリスクマネジメントの意思決定と実施、実施結果の再評価というサイクリックなプロセスとしてとらえ、そのすべてのプロセスに利害関係者が直接関与してゆくことの意味と重要性を強調した。また関澤らの調査結果を基に、「表示」を通して消費者と商品提供者が対話する可能性を検討した結果を紹介した。

Keywords: 透明性と批判的検討, 利害関係者, 表示

関澤 純：食の安全とリスクコミュニケーション  
予防時報, 212(2003-winter) 6-7 (2003)

食の安全におけるリスクコミュニケーションの特異性と重要性について検討し示した。すなわち食は人が毎日生き、活動する源泉であり、男女、幼児から高齢者まですべての人にとり欠くことのできないものである。しかるに食をめぐる環境は戦後大きく変化し現在わが国では食糧のほぼ3分の2を海外に依存し、かつこれまでなかったような豊富で多様な食文化を享受している。しかし大多数の国民は毎日摂る食材がどこでどのように作られ手元に届けられているか知らない。わが国で食の安全におけるリスクコミュニケーションは特別に重要と考えられる。

Keywords: 食糧輸入, 食の安全管理, 食品安全委員会

関澤 純：「食の安全とリスクへの対応」2002年日本  
リスク研究学会第15回春季シンポジウム

日本リスク研究学会誌, 14(1), 3, 44-50

従来の残留農薬や食品添加物に加えて、狂牛病、乳製品の黄色ぶどう球菌汚染、O157病原大腸菌や黄色ぶどう球菌による食中毒、ダイオキシンなど、食の安全をめぐる話題は事欠かない。リスク対応のまずさにより、健康への不安を拡大、食の安全管理全般への信頼を失墜させ、農家を窮地に追い込む事態を招いている。化学物質、病原菌・組み替え食品、食品の品質保証について、専門家や食品企業関係者、弁護士、消費者代表の食の安全への要望につき提案と討論をし、食の安全確保に向けたリスク評価とコミュニケーションの改善方向を探った。

Keywords: リスクアナリシス, 狂牛病(BSE), 品質保証

山本美智子：インターネットによる実務に役立つ情報  
検索—検索のための情報源と使い方

日本病院薬剤師会雑誌, 139, 17-25 (2003)

医薬品が適正に用いられるためには、有効性、安全性、

薬物動態、理化学的性質などの情報が必要である。このような医薬品情報は、その医薬品の開発から市販後調査までの情報が集積されており、臨床の場で、必要不可欠な情報であるといえる。IT化が進む中、インターネットは医薬品情報の収集、検索に大変有効な手段である。また、世界的なハーモナイゼーション (ICH) により臨床試験等のデータの相互受け入れが実現し、収集対象となる情報は多岐にわたり、国内はもとより、海外からの情報にも速やかな対応が求められている。その中で、薬剤師の業務にとって、有用と思われる主なインターネット上の情報源とその利用法を紹介した。

Keywords: Internet, Drug Information, database system

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誌, 14, 80-87 (2002)

化学物質の物性、毒性等に関して国内外の機関や媒体から提供されている情報量は膨大であり、その中からいかに適切な情報を抽出し収集するかが重要である。また有害性分類や表示など化学物質の適正管理に関する国際的な取り組みが進められており、こうした国際的な動向を常にフォローしておく必要がある。IPCS (国際化学物質安全性計画) のドキュメント原案作成に携わっている経験から、化学物質の安全性に関して国際的に信頼性が高いとされており、かつ入手が容易な情報源を中心に紹介した。

Keywords: chemicals, safety information, risk assessment

山本 都：化学物質の毒性データの検索—Web情報  
を中心に

医学のあゆみ, 203, 1035-1039 (2002)

インターネットの普及と共にWebから得られる化学物質の毒性情報は非常に範囲が広がっている。かつては通常の販売ルートにのっていないため入手が困難だった国際機関や外国公的機関などの化学物質の安全性に関するドキュメント類なども今ではその多くがWebから容易に得られる。こうした機関の化学物質関連情報には質の高い有用な情報が多い。したがって化学物質の毒性情報を検索する場合は、従来からの文献検索やデータベースの利用に加えて、こうした関連機関のWeb情報をいかに有効に活用するかがポイントである。ここではWebで提供されている主な化学物質関連機関や毒性に関する情報源、化学剤や生物剤に関する情報等を紹介した。

Keywords: chemicals, safety information, risk assessment

Kaniwa Nahoko : Japanese perspectives on pharmaceutical product release rate testing

Drug Inform. J., 36, 407-415 (2002)

The current recommendations for dissolution testing in the Japanese Pharmacopoeia (JP) are discussed. The use of dissolution tests and bioequivalence studies in the Japanese drug regulatory process is also briefly introduced.

The JP is unique in stating that a major purpose of dissolution testing is to prevent significant bioinequivalence. To achieve this, and to allow for the high incidence of

achlorhydria in Japan, the JP recommends testing in a buffer solution at pH 6.8 or in water, especially for sugar-coated and film-coated tablets. These are often tested in 0.1M HCl in the USP. Parallel dissolution and disintegration tests using pH 1.2 and pH 6.8 solutions are also recommended by the JP for enteric coated tablets due to the high in vitro-in vivo correlation compared with sequential tests. Adopting rational acceptance criteria, developing calibrators, and the application of release testing to semi-solid non-oral dosage forms are future issues for the JP.

Keywords: dissolution test, Japanese Pharmacopeia, bioequivalence

Connelly, J.\*<sup>1</sup>, Osterberg, RE.\*<sup>2</sup>, Tucker, ML.\*<sup>3</sup>, Hasegawa R: **ICH Guideline Residual Solvents: Update *Pharmeuropa*, 52, 365-372 (2003)**

The ICH Residual Solvents Guideline was signed off in December 1997. In support of the Guideline, a summary of the toxicity data and 'permitted daily exposure' (PDE) for each solvent was published in *Pharmeuropa* (Vol 9, No.1 - Supplement, April 1997). Since then, review of additional toxicity data for some solvents has resulted in changes in the PDEs. These data and the derivation of the new PDEs are given in this paper. The following changes have been made: Tetrahydrofuran: moved from Class 3 to Class 2, as a result of revision of the PDE to 7.2 mg/day based on evidence of non-genotoxic carcinogenicity. N-Methylpyrrolidone: revised PDE of 5.3 mg/day on the basis of developmental neurotoxicity. Ethylene glycol (Class 2): revised PDE of 6.2 mg/day, based on additional information about teratogenicity (this revision was included in the document signed off at Step 4; the toxicity data underpinning the new PDE are reviewed here). A maintenance document describing the procedure for introduction of further revisions to solvent PDEs and addition of new solvents was signed off in February 2002. This document is also presented here.

Keywords: tetrahydrofuran, methylpyrrolidone, ethylene glycol

\*<sup>1</sup> Metabometrix Ltd, RSM, Prince Consort Road, London

\*<sup>2</sup> US Food and Drug Administration, USA

\*<sup>3</sup> Glaxo Wellcome R&D, Medicines Safety Evaluation, Ware, UK

小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬雅雄, 大野泰男, 井上 達, 長谷川隆一: **DINPの無毒性量と耐容1日摂取量の算定**

日本食品化学学会誌, 9, 39-45 (2002)

Di-isonyl phthalate (DINP) は玩具の可塑剤として使用されているため, 乳幼児の健康への影響が懸念されている。そこで, 本稿ではDINPの毒性情報を評価し, 耐容1日摂取量 (TDI) を算定した。一般毒性および発がん性に関しては, ペルオキシソーム増殖を伴わない肝臓への影響 (肝細胞肥大および巣状壊死など) がラット

を用いた2年間混餌投与試験で観察され, 反復投与毒性の無毒性量は肝障害を根拠に15 mg/kg bw/dayが適切と考えられた。遺伝毒性試験では陰性の結果が得られている。生殖毒性試験では交配, 受胎および出産率等の生殖指標にはいかなる影響も認められなかった。催奇形性試験では胎児で骨格変異および腎盂拡張の発症率の有意な増加が観察され, また世代試験では児の離乳前生存率および体重の低下が認められたことから, 発生毒性の無毒性量は100 mg/kg bw/dayと考えられた。その他, 受容体結合試験, 酵母およびヒト乳がん由来の培養細胞株を用いた試験, 子宮肥大試験では陰性の結果が得られており, また, げっ歯類及び霊長類で精巣毒性は認められなかったが, ラットの妊娠後期投与で雄新生児に軽度の生殖器異常が引き起こされた。以上の結果, DINPのTDIは無毒性量15 mg/kg bw/dayに不確実係数の100を適用し150 μg/kg bw/dayが適切であると考えられた。

Keywords: DINP, TDI, Phthalate Esters

長谷川隆一: **化学物質の安全性評価の現状**

塩ビ食品衛生協議会会報, 142, 5-18 (2003)

化学物質のリスクアセスメントは有害性の確認に続いて用量反応性評価を行い, ヒトが一生摂取し続けても健康に有害影響が起きないと推定される最大1日摂取量を算定する。一方で, 暴露評価としてマーケットバスケット法や陰膳法を用いて, 1日摂取量を推定する。最後にリスク判定として, 1日許容摂取量 (ADI), 1日耐容摂取量 (TDI), または実質安全量 (VSD) に基づいて基準値を決め, その基準値と推定摂取量を比較する。経済協力開発機構ではその活動の一つとして, 高生産量化学物質の初期評価作業を行っているが, 現在は有害性の確認に留まっている。化学物質のリスクアセスメントの実例として, 新医薬品中の残留溶媒の基準値設定があり, 最近, N-メチルピロリドン及びテトラヒドロフランの基準値が改定された。また, フタル酸エステル類については, その精巣毒性, 生殖毒性, 発生毒性, 慢性毒性を注意深く分析し, フタル酸ジエチルヘキシルおよびフタル酸ジイソニルの日本の基準値が決められた。

Keywords: 化学物質のリスクアセスメント, 残留溶媒の基準値, フタル酸エステルの毒性評価

鹿庭なほ子: **溶出試験の変動要因と適格性評価**

*Pharm Tech Japan*, 18, 105-111 (2002)

溶出試験を行うことは, 著しい生物学的非同等を防ぐための有用な手段であるが, 溶出試験は変動要因が多いことで知られている。本総説では, 溶出試験の変動要因をリストアップし, それらが製剤の溶出速度に及ぼす影響を示した。また, これらの変動要因を適正に保つ適格性の評価方法には, 機器を用いる物理学的な校正法とカリブレータを用いる化学的な校正法とがある。本総説では, 両者の利点と欠点について紹介した。

Keywords: 溶出試験, 適格性評価, カリブレータ

Inoue, T., Igarashi, K. and Sekizawa, J.: **Health hazards of endocrine-disrupting chemicals on humans as examined from the standpoints of their mechanisms of**

**action.**

*JMAJ (Japan Medical Association Journal)*, **46**, 97-102, 2003.

内分泌攪乱物質の作用機序からみた、あり得るヒトへの健康障害について、その生物学的蓋然性の問題点を列挙した。すなわち1. ホメオスタシス（生体影響の恒常性）との拮抗、2. 受容体発現の down regulation、3. 女性ホルモン作用に関するデータギャップ、4. 多世代試験と胎児影響、など。また、低用量域における生体影響について考察した。最後に、ヒトへの生体障害の危惧された諸点、1. ダイオキシン類の生体障害、2. 乳癌等成熟女性に与える影響、3. 子宮内膜症、等について現状での認識をまとめた。

Keywords: endocrine disruptors, effect on human, low dose

**井上 達：序章 化学物質と健康-低用量問題**

井口泰泉監修、環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発、pp. 3-10、東京：株式会社シーエムシー出版、2003.

化学物質と健康について、低用量問題を軸に考察した。低用量作用の認識について、1. 生体反応の限度幅、2. “適応反応”と傷害性、3. 薬理と“毒性”の continuum、など概説するとともに、1. 閾値の有無、2. 相乗性・相加性の有無、3. 反応の線形-非線形用量相関問題などについて述べた。

Keywords: threshold, synergy and/or additive relationship, linear-non-linear dose response relationship

**井上 達：内分泌攪乱物質**

小児科、**44**, 634-635 (2003)

内分泌攪乱物質の現状について、小児科領域に関連する現状認識を辞書的に記載した。

Keywords: anomaly, morphogenesis and hormonal receptor, fetal window

**井上 達：ほ乳類などへの影響を公式に指摘 WHO が380頁の報告書を発表**

日経エコロジー Vol. 2002年8月号, pp.11 (2002)

WHO/IPCSのグローバルアセスメントの刊行に際して、その概要を解説した。そのウェブサイトは次の通り。  
<http://ehp.niehs.nih.gov/who/>

Keywords: WHO/IPCS, Global Assessment, endocrine disruptors

**井上 達：巻頭言「WHO/IPCSのグローバルアセスメントの出版を終えて」**

*Endocrine Disrupter News Letter*, **5**, 1, 2002.

WHO/IPCSのグローバルアセスメントの刊行に際して、その概要を解説した。

Keywords: WHO/IPCS, Global Assessment, endocrine disruptors

**北嶋 聡：私の学会聞き歩き「心血管研究の今後の展望-ゼブラフィッシュとマウスとの連携の時代へ-」**

細胞工学, **21**, 1224-1227 (2002)

第67回コールドスプリングハーバーシンポジウム「循環器系」の発表内容を要約するとともに、心血管研究の今後の展望として、1) ゼブラフィッシュを用いたフォワードジェネティクスとマウスを用いたリバースジェネティクスとを効率良く連携させること、2) リバースジェネティクスの方は上記1)と平行し、シグナルカスケードや進化面を考慮した解析を、あくまでもマウス個体を用いて (*in vivo*の系で) 検証していくこと、以上の2つの視座が重要となるという私見を述べた。

Keywords: Cardiovascular system, Forward Genetics, Reverse Genetics

菅野 純：内分泌かく乱化学物質試験法スキーム解説  
日本内分泌攪乱化学物質学会 NEWS LETTER, **5**, 2 (2002)

生体に有害作用を及ぼすもの、即ち受容体原性の毒性を発揮し、その内分泌かく乱性を検討する必要がある数万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立を進め、次の段階に当る詳細試験に資する優先順位リストの作成及び詳細試験の開発を平行して行う。これらのスクリーニングによる物質のホルモン活性の評価は、新たな科学的知見や、或いは将来的な手法の増強により変動することが科学的に予想される。

keywords: 内分泌かく乱化学物質, スクリーニング試験, 詳細試験

Ohno, Y.: ICH guidelines-Implementation of the 3Rs (Refinement, Reduction, and Replacements): Incorporating best Scientific practices into regulatory process.

*ILAR (Institute for laboratory animal research, National Research Council)*, vol. **43**, supplement, S95-98 (2002)

日米欧3極のICHによる試験法ハーモナイゼーション作業は必ずしも動物愛護を主として意図したものではなかったが、安全性評価のための実験動物を用いた毒性試験法の国際的なハーモナイゼーションの結果として試験の意味のない繰り返しを削減することに成功した。例えば、単回投与毒性試験においては、概略の致死量の測定のみで良いとされ、また、従来2種動物での試験が要求されていたがん原性試験は1種と短期発癌試験法との組み合わせで良いとされたことにより、使用動物数の大幅な削減が達成された。また、げっ歯類については6ヶ月以上の反復投与毒性試験を行っても6ヶ月試験結果以上の新たな結果は得られないとして、1年間の反復投与毒性試験が削除された。

Keywords: ICH, alternative methods, toxicity study

大野泰雄：動物実験代替法の現状と課題

バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 551-555 (2002)

動物愛護運動の高まりとともに、医学研究や教育、安全性試験、生産等の目的のための動物を使用する方法を他の方法に置き換えること (Replacement) や、動物使用数の削減 (Reduction)、あるいは動物に与える苦痛を

削減 (Refinement) することが社会的に求められている。しかし、動物実験代替法を受け入れることにより国民に不当なリスクを負荷することは許されない。安全性評価のレベルを下げないことを前提に動物愛護運動に答えていく必要がある。本稿ではまず、代替法を行政的に受け入れるための基準、代替法評価の枠組み、ついで我が国における状況について述べた。また、欧米においては ECVAM と ICCVAM という代替法の開発と評価に関する専門の機関が設立され、代替法を取り入れている。また、OECD においても、*in vitro* の皮膚腐食性試験や光毒性試験など、幾つかの代替法が取り入れられている。一方、日本においては代替法研究や評価を専門とする機関は無く、限界がある。

Keywords: alternative methods, OECD

大野泰雄, 加藤隆一: 薬物相互作用の検討方法について, 医薬品の臨床薬物動態試験について

医薬品研究, 33, 423-439 (2002)

厚生労働省より通知された「薬物相互作用の検討方法について」のガイドラインについて解説した。また、「医薬品の臨床薬物動態試験について」のガイドラインについての質問に答えた。

Keywords: drug interaction, guidelines, clinical pharmacokinetics

大野泰雄: 化粧品安全性とその試験法 -代替法を含めてその現状と将来-

皮膚と美容, 35, 2-8 (2003)

規制緩和の一環として2000年の厚生省医薬安全局長通知により多くの化粧品の安全性評価における責任が企業にゆだねられた。一方、動物を用いた安全性試験については、動物愛護の立場からの配慮が強く求められている。ECVAM, ICCVAM, OECDではRussel and Burtch (1959)の提唱した3Rを推進するために急性毒性試験法の改善や皮膚腐食性試験, 光毒性試験, 皮膚吸収性試験代替法の導入が進んでいる。一方、EUでは化粧品の安全性評価のための安全性試験について反復投与毒性試験, 生殖毒性試験, 及び薬物動態試験を除き, 2009年までに全面禁止することが決まった。

Keywords: safety assessment, alternative methods, cosmetics, international trend

石田誠一: DNAチップ解析事始

医薬品研究, 33, 195-202 (2002)

DNAチップを用いた研究の進め方に関して、筆者の経験に基づき解説をした。

Keywords: DNA Chip

Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T.\*: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats.

*Environ. Mol. Mutagen.*, 39, 271-278 (2002)

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) is one of the most prevalent carcinogenic heterocyclic amines in the environment, targeting the

colon, prostate, pancreas, and mammary gland in rodents. Chemopreventive effects of synthetic and naturally occurring compounds on PhIP-induced rat mammary carcinogenesis were investigated in a series of experiments. In a PhIP feeding model, groups of 20-21 female F344 rats each, were treated with 0.02% PhIP alone or PhIP plus 0.5% 1-*O*-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone (HTHQ), 1% green tea catechins, 1%  $\alpha$ -tocopherol, 0.1% ellagic acid, or 1% chlorophyllin, each in the diet, or 0.1% caffeine in drinking water for 52 weeks. To assess the mechanism of HTHQ and caffeine inhibition of PhIP-induced carcinogenesis, effects of these compound on the *in vitro* metabolic activation of PhIP were examined in the presence of S9 mix. In the next series of experiments, the PhIP intragastric dose model was applied to allow separate investigation of the effects of chemicals during the initiation and postinitiation periods. In these experiments, female Sprague-Dawley rats were given eight intragastric doses of 100 mg/kg body weight during the first 4-8 weeks for initiation. Either during initiation or after initiation, or only after initiation, animals were treated with either corn or perilla oil at doses of 5 and 20%, conjugated fatty acid derived from safflower oil (CFA-S) or perilla oil (CFA-P) at a dose of 1%, arctiin at doses of 0.02 and 0.2% in the diet, or sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) at a dose of 0.2% in drinking water. In the PhIP feeding model, administration of PhIP alone for 52 weeks induced adenocarcinomas in 40% of rats, but the incidence was remarkably reduced to 5% by the simultaneous treatment with 0.5% HTHQ, a strong lipophilic phenolic antioxidant, or to 10% by 0.1% caffeine. Administration of 1% chlorophyllin exerted similar, albeit weaker, effects.  $\alpha$ -Tocopherol at a dose of 0.5% only reduced the multiplicity of carcinomas, and 1% green tea catechins only the mean size of mammary tumors. In a metabolic activation study of PhIP, HTHQ and caffeine clearly inhibited the formation of metabolites. In the PhIP gastric dose model, among the naturally occurring compounds examined, a plant lignan arctiin, perilla oil, which contains a large amount of *n*-6- $\alpha$ -linolenic acid, and CFA-S or CFA-P inhibited mammary tumor development, particularly in the postinitiation period, although a clear dose response was not observed. Treatment with 0.2% NaNO<sub>2</sub> in the initiation period was found to lower the volume of mammary tumors. The present results indicate that a number of compounds may be candidate chemopreventive agents against PhIP-induced mammary carcinogenesis, acting through different mechanisms and depending on the stage of carcinogenesis.

Keywords: chemoprevention, heterocyclic amine, mammary carcinogenesis

\*名古屋市立大学医学部

Dai, N.\*, Umemura, T., Kurokawa, Y.\*: Reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress, a

**major intrinsic factor involved in carcinogenic processes and a possible target for cancer prevention**

*Asian Pacific J. Cancer Prev.*, **3**, 313-318 (2002)

Reactive oxygen and nitrogen oxide species and their inducing stress are involved in a variety of physiological and pathological phenomena in aerobes, including humans. For multistage carcinogenic process, reactive oxygen and nitrogen oxide species-induced stress (RONOSS) serves as a major intrinsic factor and is involved in every step. This means that free radicals, RONOSS and their inducing downstream events may be targets for cancer prevention. It is therefore of importance to elucidate the mechanisms underlying the participation of RONOSS in carcinogenesis and to apply the obtained results for establishment of strategies to control cancer development. Despite the large body of accumulated knowledge due to worldwide efforts dealing with this research field, there still remain numerous uncertainties. In this mini-review, we introduce two examples of such efforts, one concerning a renal carcinogen KBrO<sub>3</sub> and the other dealing with hepatocarcinogenesis caused by a choline-deficient, L-amino-defined diet, in order to give some idea about the current understanding of the roles of RONOSS in carcinogenesis.

Keywords: Reactive oxygen species, 8-hydroxydeoxyguanosine, potassium bromate

\*佐々木研

**本間正充：ほ乳類細胞におけるDNA二本鎖切断修復と、p53によるゲノム安定化機構**

*Environ. Mutagen. Res.*, **24**, 161-167 (2002)

Chromosomal double strand breaks (DSBs) occurring in mammalian cells can initiate genomic instability. They are usually repaired through either of two pathways: end-joining (EJ) or homologous recombination (HR). We demonstrate here that the deficiency of wild-type p53 protein may allow unrepaired DSB to initiate chromosomal instability, and mutant-type p53 protein promotes illegitimate recombination leading to translocation. These results support a model in which p53 protein contributes to the maintenance of genomic integrity through recombinational repair. We also developed a system to trace the fate of DSBs occurring in a single copy gene of human genome using restriction endonuclease I-SceI. This system should be useful for understanding of mechanisms of DSB repair as well as a model of DNA damage induced by low-dose irradiation.

Keywords: genomic instability, p53, double-strand break (DSB), end-joining (EJ), homologous recombination (HR)

**能美健彦，変異原性試験で何がわかるか：21世紀の展望**

*Environ. Mutagen. Res.*, **24**, 75-80 (2002)

The year 2001 was the 30<sup>th</sup> anniversary of the Japanese

Environmental Mutagen Society. This is a good opportunity to look back over the development of genotoxicity assays during that period and envision the future perspective. At the beginning of the Society, the most important issue appeared to be the establishment of efficient screening systems to identify potential mutagens in the environment where millions of chemicals were present. Microbial gene mutation assays, such as the Ames test, and chromosome aberration tests using cultured mammalian cells were developed in the era. The mutagenicity and carcinogenicity of AF<sub>2</sub>, a food additive, and the heterocyclic amines in burnt food were discovered and these findings caused heated debate in the Society. In the 1980s and 90s, the genotoxicity assays seemed to have evolved mainly in two directions. The first one is the development of assays whose sensitivities were enhanced by genetic engineering. Examples include sensitive bacterial strains, such as *Salmonella typhimurium* YG1024 and YG1021, which are highly sensitive to mutagenic aromatic amines and nitroarenes, and *Salmonella typhimurium* YG7108 which is sensitive to the mutagenicity of alkylating agents. The second direction was the development of assays using experimental animals. Examples include transgenic assays, in vivo micronucleus assay and comet assay. The rodent assays are less sensitive than the microbial assays but may be more appropriate to evaluate the potential risks of chemicals to humans. At present, we still face a number of unsolved problems, such as how to evaluate the risk of exposure to multiple chemicals. Establishment of the molecular bases for the risk assessment of chemicals is a major challenge in the 21<sup>st</sup> century. Current topics for the development of genotoxicity assays are presented and future directions are discussed.

Keywords: genotoxicity, transgenic assays, Y family DNA polymerases

**能美健彦：微生物由来のトランスリージョンDNAポリメラーゼ**

*Environ. Mutagen. Res.*, **24**, 153-159 (2002)

DNA is continuously exposed to endogenous and exogenous genotoxic agents. To counteract genotoxicity, cells rely on a number of defense mechanisms, such as DNA repair. However, if DNA is damaged more than the capacity of defense mechanisms, damaged DNA will be used as a template for DNA replication. Bypass replication across DNA lesions is referred to as translesion DNA synthesis, which has been regarded as a key mechanism of mutagenesis. However, since most DNA polymerases responsible for chromosome replication have poor ability to bypass the lesions, the mechanism of how lesions are bypassed has remained enigmatic. Recent discovery of Y-family DNA polymerase offered clues to the molecular basis of mutagenesis: this family of DNA polymerases efficiently bypasses a variety of DNA

lesions, and appears to be involved in mutagenesis and DNA damage tolerance. Here, I report the roles of DNA polymerase IV (DinB), a proto-type of Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*, in targeted and untargeted mutagenesis, and discuss the possible mechanism by which DNA polymerase IV promotes mutagenesis.

Keywords: Y-family DNA polymerase, DNA polymerase IV, *dinB*

田辺秀之：染色体テリトリー：間期核における染色体の核内配置と核高次構造に関する最近の研究

*Environ. Mutagen. Res.*, 25, 11-22, 2003

The individual chromosomes in animal and plant interphase cell nuclei are discretely highly compartmentalized called "chromosome territories" that are visualized by 3D-FISH techniques. The chromosome territories are mutually exclusive without mixing each other, formed in essential components of the higher order chromatin architecture. Here I reviewed historical aspects of studies on the chromosome territory and recent advancement of studies on the chromosome positioning in relation to nuclear architecture. Chromosome positioning in the interphase cell nuclei has been investigated with regard to the following two aspects: radial positioning or relative positioning. It has been generally considered that the former radial positioning of a given chromosome territory is correlated with its size, its gene-density, and replication timing, namely comprehended as non-random distribution. From a series of 3D-FISH studies on the primate and chicken cell nuclei, the topology of the radial positioning of human chromosomes 18 and 19 homologs shows highly evolutionarily conserved during the evolution, but its functional significance is still within the speculation. On the other hand, the relative positioning has much affects to the translocation frequencies between adjacent two chromosomes, that was experimentally indicated by the mouse lymphoma cell nuclei, but in human lymphocytes the majority of reports suggested the random organization without particular patterns except for some clusters formed between homologous chromosomes. In future studies higher order nuclear achitecture in relation to chromosome territory will be more elucidated by 3D-FISH techniques combined with living cell (*in vivo*) approaches by means of visualizing various nuclear molecules.

Keywords: chromosome territory, interphase cell nucleus, nuclear architecture

増井 徹：人のことはヒトでという時代の中で—ゲノムコホート研究の役割 (I)

*News Cast*, 72, 1-2 (2003) (日本がん疫学研究会)

ポストシーケンスの時代を支えるゲノム疫学の考え方について、社会の理解の必要性について論考する。

Keywords: medical records, ELSI (ethical, legal, and

social issues), post-sequencing era

増井 徹：人のことはヒトでという時代の中で—ゲノムコホート研究の役割 (II) イギリスのUK Biobankの試み

*News Cast*, 73, 1-4 (2003) (日本がん疫学研究会)

諸外国が大規模ゲノムコホート研究をはじめようとしている。このような中で、UK Biobankの動きについてまとめ、日本における分子疫学の位置付けについて論考を試みる。

Keywords: genome cohort study, parliamentary control, epidemiology

増井 徹, 高田容子：ゲノム研究の倫理的, 法的, 社会的側面—新しいゲノム研究は病歴など個人情報の利用枠組みなしには成り立たない

薬学雑誌, 123, 107-119 (2003)

This article provides an overview of the use of human materials and information (human subject) in biomedical research in the current context, especially as it relates to the progress of the human genome project. The outcome of the genome project has brought biomedical research to a new stage. In a sense, humanity has been drastically reduced to an array of DNA sequences that can be universally used in comparing living things. The argument is founded on the basic requirements of science—no one gets the final say and no one has personal authority, and on the nature of the use of human derivatives. This demands a re-examination of the concept of donation from research participants. Currently the concept of informed consent (IC) has been applied here, but it has been developed more in the areas of medical treatment and human experimentation. It seems reasonable to develop a new concept and a system that would support donation of human derivatives for research. Generic consent (GC) has been used in the current discussion and the essential supporting systems for GC should be different from those for IC. In this context, the studies of UK Biobank and the information policy of NHS will give important clues to building the infrastructure in Japan, i.e. data protection, protection of research participants, independent oversight organization, reframing of research ethical committees, etc. A strong initiative is needed to involve the public not only in participation but also in sharing the responsibilities and benefit of biomedical research and its outcome.

Keywords: medical records, ELSI (ethical, legal, and social issues), human subject

増井 徹：新しいゲノム研究は個人の病歴を保護し利用できる社会基盤の上に育つ

*Medical Tribune*, 74 (2003) (1月2日号)

ヒトゲノム研究の終結を控えて、新しいゲノム研究をどのように進めるのか、欧米各国は知恵を絞っている。その中で、突出した動きを示しているイギリスの活動に

ついて紹介する。

**Keywords:** UK Biobank, ELSI (ethical, legal and social issues), health information

**増井 徹：今、医学研究を支える人体由来のモノと情報**

法学セミナー, 578, 58-63 (2003)

人間を生物(いきもの)としてまるのままで研究対象にすることは、医療の場における初歩的観察からはじまり、人体実験までを含む。そして現在、まるのままの人間に介入することなく、例えばその個人に由来する「一滴の血」を利用して、ゲノム研究の成果として得られた物差しを用いて、その個人を研究対象とできる道具立てがそろってきたのである。そのような流れから考えると、2000年10月のヘルシンキ宣言の改訂において、「人体由来のモノと情報」を利用する研究を「医学研究」と位置付けたことは、象徴的な出来事であった。医学研究の枠がこのように広げられ、研究対象となっている個人が、痛くも痒くも、また、知覚もできない、そして、その個人の生が終わったずっと後に、「生物としての個人」が研究対象となる現代の医学研究のあり方は、人体実験ほどのインパクトはないのだが、しかし、それだけに、個人を対象とした研究活動として厄介な問題を提起している。本稿では、広範な市民の研究参加なしには成り立たない、ゲノム研究の新展開を例にとりて解説し、未来的、予測的、想像的な問題としての医学研究と今ここで護られるべき人間の尊厳との折り合いについて、素描を試みる。

**Keywords:** post-sequencing genome research, ELSI (ethical, legal and social issues), data protection

**増井 徹：医学研究と個人情報保護**

毎日新聞, 2002年8月26日, 日刊, 5, 2002

ゲノム研究の進展がもたらした新しい研究体制では、患者の病歴が社会的信用を担保して利用できる枠組みが大切である。個人情報保護法案の枠組みでの利用に関する議論を紹介する。

**Keywords:** data protection, parliamentary discussion, medical information

**鎌田栄一：子供に対する化学物質の安全性評価について —評価手法の現状とリスク管理について—**  
化学と工業, 55, 640-644 (2002)

私たちの身の回りにある化学製品を全て取り除いた生活は想像できません。赤ちゃんからお年寄りまで年齢に関係なく、更に、この世に生を受けた全ての生物は、知らず知らずのうちに種々の化学物質に暴露されています。次世代を担う子供たちの為にも、暴露量を減らし、より安全な化学物質を使った製品の使用が望まれます。そのための化学物質安全性評価の現状をご紹介します。

**Keywords:** risk assessment, infant

西村(鈴木)多美子\*, 豊島 聡, 宇山佳明, 山田博章, 細木るみ子, 藤森勘之助\*, 長尾 拓: 新医薬品承認申請において必要とされる薬理学の役割

日薬理誌, 120, 187-194, 2002

新医療用医薬品(新医薬品)の承認審査は、平成9年に医薬品医療機器審査センター(審査センター)が設立されてから医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構、審査センター、厚生労働省医薬局審査管理課でそれぞれ役割を分担し、科学的な判断に基づく承認審査が進められている。申請資料には、非臨床試験データと臨床試験データが求められるが、臨床での有効性及び安全性の評価の際には、非臨床試験のデータによる裏付けも重要であり、リスク・アンド・ベネフィットを考慮して承認の可否が判断される。そこで、新医薬品承認申請において必要とされる薬理学の役割について、レギュラトリーサイエンスの観点に立って、1) 開発中の治験相談の立場から、2) 申請後の承認審査の立場から、3) 安全性薬理ガイドラインの立場から、及び、4) 基礎薬理学の立場から、最近の承認審査に関わる薬理学の役割、基礎研究との関連性等について個人的意見を述べる。

**Keyword:** non-clinical test, regulatory sciences, NDA

\*医薬品機構

宇山佳明 & 鳥海互\*: 遺伝子治療医薬品

医薬品研究, 34, 168-172, (2003)

ICHの中で遺伝子治療及び遺伝子治療用医薬品に関する共通のガイドラインを作成する必要性等を検討するため、遺伝子治療用医薬品についてのディスカッショングループが発足し、これまでにwork shopが開催され遺伝子治療に関する知識がICHメンバーの中で共有されるとともに、アデノウイルス標準品の作製、ウイルスシェディング、次世代への影響等についても検討が進められている。本報告はディスカッショングループのこれまでの活動についてまとめたものである。

**Keyword:** ICH, gene therapy, adenovirus vector

\*田辺製薬株式会社

宇山佳明: 最近の新薬承認審査における論点と今後の課題, [1] 新医薬品等の承認申請資料等にかかわる留意事項について(臨床分野), [2] 第三分野医薬品の事例について, [3] 抗うつ薬の臨床試験

医薬品研究, 34, 306-321 (2003)

新薬の審査を行う上での留意事項については平成14年1月28日に公表され、この中では、申請資料について確認すべき点、記載すべき事項、評価方法等が記載されている。本稿では、臨床分野に関する留意事項について説明するとともに、最近承認された第三分野の医薬品を事例として、審査センターにおける審査の時点でのような検討が行われたのかを具体的に説明するとともに、抗うつ薬の臨床試験についても、最近の知見を踏まえて考え方を整理してみたい。

**Keywords:** Clinical trial, anti-depressant, drug evaluation

紀平哲也, 平野隆\*: 最近の抗癌剤の開発—分子標的治療薬と抗体医薬

バイオサイエンスとインダストリー, 60, 762-765 (2002)

癌細胞に特異的な分子あるいは抗原を標的とする選択

的な治療薬として新しいコンセプトで設計・開発された分子標的治療薬や抗体製剤について概説した。

Keywords: molecular-targeting drug, anti-cancer drug

\* (独) 産業技術総合研究所

鹿野真弓：細胞・組織を利用した医療用具・医薬品開発を巡る規制

*Cancer Frontier*, 4, 133-136 (2002)

人・動物の細胞や組織を培養、加工した医療用具・医薬品の実用化を目指した研究開発に関連する規制について説明した。

Keywords: cell therapy, regulatory guidance, biologics

鹿野真弓：バイオ医薬品のコンパラビリティ

医薬品研究, 33, 609-614 (2002)

ICHにおいて具体的検討が開始されたバイオ医薬品のコンパラビリティガイドライン作成に向けての動向と、現時点での日本におけるコンパラビリティの考え方を説明した。

Keyword: ICH, biocomparability, biological/biotechnological products

鹿野真弓：生物薬品等の品質について

医薬品研究, 33, 788-799 (2002)

バイオテクノロジー応用医薬品、生物起源由来医薬品の生産過程の特徴及び品質を評価する上での留意点等について説明した。

Keyword: quality, biocomparability, biological/biotechnological products

鹿野真弓, 松木滋\*: 品質に関わるトピックの動向 — Q5E —

医薬品研究, 34, 111-115 (2003)

ICHにおけるコンパラビリティガイドライン作成の動向を、非公式ワークショップによるブレインストーミング、各極の考え方の違い、今後の論点等を含めて説明した。

Keyword: ICH, biocomparability, biological/biotechnological products

\*キリンビール株式会社

柴田大朗：審査センター提出資料作成時の留意事項

薬理と治療, 30, 439-443 (2002)

医薬品医療機器審査センターにおける新医薬品の承認審査の現状と問題点、審査の過程で見られた問題事例を紹介し、よりスムーズな承認審査、医薬品の評価を可能とするために必要な承認申請資料作成時の留意点について解説した。

Keywords: medical writing, new drug application

小野寺博志：毒性 Q & A

医薬品研究, 34, 136-137 (2003)

臨床試験実施中に動物で発がん性が疑われた場合、以降の臨床試験の進め方について考え方を述べた。

Keywords: carcinogenicity test, clinical trial

小野寺博志：毒性 Q & A

医薬品研究, 34, 272-273 (2003)

非臨床毒性試験での毒性の考え方と、実験結果の解釈について解説した。

Keywords: non-clinical study, explanation of toxicology

森 和彦, 上坂浩之\*: E5ガイドラインの運用の動向  
医薬品研究, 34, 268-271 (2003)

外国臨床データの受け入れに関するICHガイドラインとしてE5ガイドラインが1998年2月に合意に達し、日・米・EU三極で運用されて来ている。このガイドラインに示された考え方に基づき、外国臨床データを我が国に外挿する目的で多くのブリッジング試験が日本において計画・実施されて来た。こうしたガイドラインの運用を通して製薬業界からは数多くの疑問や要望が出されており、これに答えるべく、新たにICHの枠組みで検討を行った結果、新たにE5ガイドラインの運用に関するQ & Aを作成することとなった。このQ & Aには、これまで日本で積み重ねられたブリッジング試験での経験とこれからの世界同時並行臨床試験に関する事も含まれる予定である。

Keywords: E5 guideline, bridging study, implementation working group

\*日本イーライリリー株式会社臨床開発部

森 和彦：ICH E-11を踏まえた治験相談の現状

日本小児臨床薬理学会雑誌, 15, 86-90 (2002)

小児用医薬品開発の関するICHガイドラインとして、E-11ガイドラインが2000年に公表され、我が国における小児用医薬品開発は国際的な促進の機運の高まりとも相まって、次第に増加していると考えられる。近年の小児用医薬品開発の動向を医薬品機構において実施している治験相談における小児臨床開発の相談実績を通して分析を試みた。1997年には0件であった小児臨床開発に関する相談申し込みが2000年には18件に増加していた。ガイドライン公表により臨床開発のポイントが明確にされた。治験相談における議論の例を通じて既存データの活用の方策や小児固有の治験の難しさが明らかとなっている。また、小児用医薬品開発において薬物動態データの活用も非常に重要である。

Keywords: E11 guideline, pediatrics, clinical trial consultation

長岡寛明, 大谷淑郎\*: 品質に関わるトピックの動向 — Q3B(R) —

医薬品研究, 34, 116-135 (2003)

ICH EWGのワシントンでの会議において、Q3B(R)に関しては下記事項の合意がなされた。1. 報告の閾値が一日最大投与量において1 gから2 gに変更された。2. 構造確認の閾値が、一日最大投与量1 mg未満の場合、1%から1.0%に、また、2 gを超える場合、0.1%から0.10%に変更になった。3. 安全性確認の閾値が、一日最大投与量10 mg未満の場合、1%から1.0%に、100 mgを超えて2 g以下の場合2 mgから3 mgに、2 gを超えた場合は、0.1%から0.15%にそれぞれ変更となった。4.

四捨五入に関しては、閾値との比較、規格値との適否の判定などすべての場合で適用する。5. 分析結果については、「適合」、「限度値以下」などの表現ではなく、測定値を四捨五入後、数値で記載する。

**Key Word:** ICH, Q3B(R)

\* 科研製薬株式会社

楠 博文：毒性Q & A

医薬品研究, 34, 63-64 (2003)

バイオ医薬品を中心に医薬品の毒性試験を実施する意義について解説を行った。

**Keywords:** toxicological test, bio

茂野雄城：毒性Q & A

医薬品研究, 34, 207-208 (2003)

バイオ医薬品の遺伝毒性試験を実施する意義と具体的な実施方法について解説を行った。

**Keywords:** mutagenicity, bio, method

楠 博文：毒性Q & A

医薬品研究, 34, 332-333 (2003)

ワクチンの毒性試験実施方法について欧州のガイドラインを参照しつつ解説を行った。

**Keywords:** toxicological test, vaccine

佐藤淳子：【抗菌薬の特徴と使い方のコツ】 後発医薬品

*JIM*, 12, 1047-1051 (2002)

後発医薬品は、先発医薬品のコピーではない。先発医薬品から、後発医薬品へ切り替える際には、主薬含量のみならず十分な検討が必要である。

**Keywords:** Anti-infective drugs, generic drugs

佐藤淳子：我が国における抗菌化学療法50年の功罪  
抗菌薬適正使用を目指して 厚生労働省の立場から

日本化学療法学会雑誌, 50, 618-619 (2002)

厚生労働省として、抗菌薬適正使用のための施策として、①市販後臨床試験・特別調査等の結果を利用した高齢者や小児への至適用量の設定、②再評価による効能・効果の見直し、などを実施してきた。また、適応外使用されている医薬品については、一定の条件を満たせば新たな臨床試験の実施なしに適応の取得が可能となるシステムの構築なども行っている。優れた医薬品をより早く上市させると同時に、既存の医薬品のより適切な姿を浮き彫りにする、すなわち、いかに医薬品を育てていくかが重要である。

**Keywords:** Anti-infective drugs, regulatory science

谷本 剛：原薬の製造工程管理における不純物プロファイル

*Pharma Tech Japan*, 18, 1399-1407 (2002)

原薬GMPガイドラインがICHで合意され、このガイドラインでは製造工程上の不測の事態や製造工程の変更を不純物プロファイルの利用によって品質面から確認することが重要であるとされている。わが国においては製

造工程管理への不純物プロファイルの適用という概念が十分に確立されておらず、特に既承認原薬では不純物プロファイルを有しないものも少なくないのが現状である。そのため、原薬GMPガイドラインが新薬及び既承認薬を含めたすべての医薬品原薬に適用されることを踏まえて、不純物プロファイルの確立方法や不純物プロファイルの同等性評価基準などについて解説した。

**Keywords:** GMP, impurity profile, process control

柴田敏郎, 成毛哲也\*<sup>1</sup>, 鈴木邦輝\*<sup>1</sup>, 三浦忠一\*<sup>2</sup>, 坪井宏實\*<sup>2</sup>, 本間 尚治郎\*<sup>2</sup>：「第4回薬用植物に関するワークショップ、北方の薬草とその利用を考える(1)」記録集

北国研究集録, 7, 1-48 (2003)

伝統医薬品や健康食品をめぐる最近の動向や寒冷地に生育する薬用植物の栽培、有効性、利用法に関する講演会と野外植物観察会を開催し、その時の講演及び活動記録について記載した。

**Keywords:** medicinal plants, useful plants

\*<sup>1</sup> 名寄市北国博物館

\*<sup>2</sup> なよろ野の花の会

木内文之：エッセンシャルオイルの基礎物質としてみたエッセンシャルオイル

医学のあゆみ, 204, 527-530 (2003)

近年、アロマセラピーが病気の治療や症状の緩和だけでなく、看護領域や介護領域でも注目されてきている。本稿では、アロマセラピーに用いられる精油を物質としての観点でとらえ、その製法、成分の特徴及びその生合成、取り扱い上の注意などを解説した。

**Keywords:** essential oil, terpenoid, biosynthesis

木内文之：エッセンシャルオイルの化学

化学と教育, 51, 178-181 (2003)

エッセンシャルオイル(精油)は、芳香を持つ植物の花や葉を水蒸気蒸留して得たオイルであり、古くから香料や食品フレーバー、更には医薬品として利用されてきた。本稿では、植物の香気成分の抽出について述べると共に、精油に含まれる成分を構造によって分類し、その生合成経路を概説する。更に、水蒸気蒸留に際して起こる成分の変化の例についても触れる。

**Keywords:** essential oil, biosynthesis, steam distillation

香月茂樹：薬用植物の栽培と利用 一今、話題のウコンとその仲間一

宮崎県薬会誌, 120, 6-13 (2003)

現在、健康食品としてウコン属植物の加工品が数多く販売されている。また、業界のみならず一般市民の間でも栽培し、利用することが広く行われているにもかかわらず、種の特定がなされていないのが実態である。そのような現状を是正するためにも、流布している種について、日中の差異、形状・成分、関連法規等について記した。また、ウコンの栽培についても記載した。

**Keywords:** *Curcuma* spp., Zingiberaceae, cultivation

Takao HAYAKAWA : "10th International conference of drug regulatory authorities (ICDRA), Hong Kong" Regulating biotechnology products. -Comparability of biotechnology products and cell substrates-, WHO, Geneva (2002), pp.65-67

早川堯夫：“臨床試験2003”，バイオテクノロジー応用医薬品，内藤周幸編，薬事日報社，東京（2003），pp.155-179

Izutsu, K. and Kojima, S. : "Miscibility of components in frozen solutions and amorphous freeze-dried protein formulations." In Amorphous Food and Pharmaceutical Systems, ed., Levine, H., Royal Society of Chemistry, Cambridge (2002), pp. 216-219

青柳伸男：“医薬品の品質確保：スキップ試験やパラメトリックリリースなどの実施に向けて”，小嶋茂雄編，エル・アイ・シー，東京（2002），pp290-302

青柳伸男：“医薬品の品質確保：薬局方試験法の調和の進展”，小嶋茂雄編，エルアイシー，東京（2002），pp304-313

Murase, N., Ruike, M., Yoshioka, S., Katagiri, C. and Takahashi, H. : "Glass transition and ice crystallization of water in polymer gels studied by oscillation DSC, XRD-DSC simultaneous measurements and Raman spectroscopy", In "Amorphous Food and Pharmaceutical Systems", Edited by Levine, H., Roy. Soc. Chem., (2002), pp.339-346

飯田 修，川原信夫，香月茂樹，佐竹元吉，柴田敏郎，西孝三郎，畠山好雄他：“新しい薬用植物栽培法”，第2版，佐竹元吉，飯田 修，川原信夫編，廣川書店，東京（2002）

安藤正典：“室内空気汚染と化学物質”，化学工業日報社（平成14年10月）

安藤正典：“住まいと病気ーシックハウス症候群・化学物質過敏症を予防する”，丸善（平成14年11月）

Ando, M., Takeda, K. and Harada, S : "Functional Cosmetology" YAKUJINIPPO, LTD (平成15年)

西村哲治：“生物薬科学実験講座8遺伝子Ⅱ”，名取俊二，中西義信編集，廣川書店，（平成15年3月），p.361-372

安藤正典（監修）：“突発水質汚染の監視対策指針2002”，(株)日本水道協会（平成14年4月）

佐々木久美子：“分析試料前処理ハンドブック，超臨界流体抽出”，中村 洋監修，丸善，東京（2003），pp.148-151

Yomota, C., Okada, S : "Polymer Gels", Various interaction of drugs with cross-linked hyaluronate gel, ed. Bohinder, H. B., American Chemical Society, Washington, DC (2003), pp.326-338.

河村葉子他：“環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発”，井口泰泉監修，シーエムシー出版，東京（2003），pp.134-138

山本茂貴：“いまを読み解く保健活動のキーワード”，食の微生物学的リスクアセスメント，尾崎米厚，鳩野洋子，島田美喜編集，医学書院，東京（2002），pp.205-207

山本茂貴：“食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！”，ここまできた微生物の簡易検査法，伊藤武監修，佐藤順編集，サイエンスフォーラム，東京（2002），pp.13-14

五十君静信：“図説食品汚染病原微生物”，12. 黄色ブドウ球菌，丸山務，熊谷進監訳，廣川書店，東京（2002），pp.235-265

五十君静信：“動物由来感染症 その診断と対策”，15. リステリア症，神山恒夫，山田章雄編，真興交易(株)医書出版部，東京（2003），pp.21-222

山本茂貴：“教育ビデオ 洗浄殺菌の実践ノウハウ”，サイエンスフォーラム，東京（2002）

高鳥浩介他：“動物の感染症”，清水悠紀他編集，近代出版，東京（2002），pp.151-155, pp.197-199, pp.241-242, pp.283-284, pp.378

高鳥浩介他：“カラーアトラス 環境微生物”，山崎省二編，オーム社，東京（2002），pp.50-121

井上和秀：“痛みとその制御機構-分子メカニズムと治療の最前線”，疼痛制御におけるATP受容体の役割，土肥修司編，医歯薬出版，東京（2002），pp34-37

井上和秀：“麻酔管理”ATP受容体，大下修造編，真興交易(株)医書出版部，東京（2003），pp.163-167

井上和秀：“麻酔管理”アデノシン受容体，大下修造編，真興交易(株)医書出版部，東京（2003），pp.158-162

Sekizawa J. ed. : "Concise International Chemical Assessment Document No.52, Diethylphthalate", International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva (2003)

井上 達，関澤 純：“内分泌かく乱化学物質問題の現状と今後の取組”，低用量問題および「低用量」影響文

- 献についての調査, 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会, 化学工業日報社, 東京 (2002)
- 関澤 純: “環境リスクマネジメントハンドブック”, 用量・反応関係の算出, 朝倉書店, 東京 (2003)
- 山本美智子: “薬剤師の臨床業務における情報活用法”, 折井孝男監修, エルゼビア・ジャパン, 東京 (2002), pp.130-171
- 鹿庭 なほ子: “医薬品の品質確保, 第2章 分析法バリレーション (Q2), 第一節, 第二節, 第四節”, 奥田秀毅, 小嶋茂雄, 綱川延孝編, エル・アイ・シー, 東京 (2002.6), pp.123-152, 164-175
- 鹿庭 なほ子: “医薬品の臨床薬物動態試験, 通知解説”, 臨床薬物動態試験・薬物相互作用ガイドライン検討班編, じほう, 東京 (2003.1), pp.61-81
- Inoue, T. Introduction: “**Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology.**” In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.
- 井上 達, 野田哲生, 野本明男 編: “ヒト型モデル動物”, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 (2002), p. 221
- Kanno, J.: “**Reverse toxicology as a future predictive toxicology**”, T. Inoue, W.D.Pennie Eds, *Toxicogenomics*, Springer-Verlag Tokyo (2002), pp.213-218
- 菅野 純, 板井昭子: “ドッキングモデルを用いた構造活性相関, 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発”, CMC出版 (2003)
- Urushidani, T.: “**Mechanisms And Consequences of Proton Transport**”, Kluwer Academic, Boston (2002), pp.209-220
- Mizukawa, Y., Nishizawa, T, Nagao, T., Kitamura, K. and Urushidani, T.: “**Mechanisms And Consequences of Proton Transport**”, Kluwer Academic, Boston (2002), pp.279-283
- 高木篤也, 北嶋聡, 相賀裕美子: “ヒト型モデル動物”, シュプリンガー・フェアラーク東京, 東京 (2002), pp.79-82
- Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Tsuboi, I., Huo, Y., Kodama, Y., Otto, T., Kanno, J., Willeck, K., Trosko, JE., Inoue, T.: “**Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellula**”, Institute for Environmental Sciences, Aomori (2003), pp.143-149
- Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Kawasaki, Y., Li, GX., Kanno, J., Inoue, T.: “**Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellula**”, Institute for Environmental Sciences, Aomori (2003), pp.110-116
- 平林容子: “ヒト型モデル動物”, シュプリンガー・フェアラーク株式会社, 東京 (2002), pp.1153-160
- Yoshida, K., Hirabayashi, Y., Sado, T., Inoue, T.: “**Radiation and Homeostasis: Proceedings of the Inte**”, Elsevier, Oxford (2002), pp.455-458
- Yoshida, K., Hirabayashi, Y., Inoue, T.: “**Nutrition and Lifestyle: Opportunities for Cancer**”, IARC Sci Publ, Lyon (2002), pp.553-5
- Ohno, Y.: “**A draft of Japanese guidance for drug interactions (DI); In vitro and in vivo Assessment (version #13)**”, In “**Preclinical and clinical evaluation of drug-drug interactions.**” Ed. By Li, A.P. and Sugiyama, Y., *Advances in drug development*, ISE Press, Chapter 18, (2002) pp.296-313
- Shibutani, M., Uneyama, C.: “**Methacarn a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues**” In: *Methods in Enzymology*, Vol. 356, ed, Conn, M., Academic Press, New York (2002) pp. 114-125
- Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: “**Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens**”, In: *Toxicogenomics*, ed, Inoue, T., Pennie W.D., Springer, Berlin (2002) pp. 100-106
- 水澤 博: “バイオデータベースとウェブツールの手とり足とり活用法”, 第5章 マテリアル系, 2セル・遺伝子バンク, No.23 厚生労働省研究資源バンク情報, No.24 BrNet, No.25 ATCC, 中村保一・磯合 敦・石川淳編, 羊土社, 東京 (2003), pp.170-182
- 児玉庸夫: “**GCP (Good Clinical Practice)**”, 日本臨床薬理学会認定CRCのための研修ガイドライン準拠 CRCテキストブック, 日本臨床薬理学会編集, 医学書院, 東京 (2002), pp 32-37
- 児玉康夫, 臨床薬物動態試験・薬物相互作用ガイドライン検討班メンバー: “**医薬品の臨床薬物動態試験—通知解説: 医薬品の臨床薬物動態試験について, 母集団薬物動態試験法, 薬物相互作用の検討方法について—**”, 臨床薬物動態試験・薬物相互作用ガイドライン検討班編集, じほう, 東京 (2003)
- 辻 澄子: “**食品衛生検査指針 食品添加物編**”, 厚生労働省監修, 日本食品衛生協会, 東京 (2003), pp.53-61, 71-78, 86-94, 142-154, 575-576

医薬品の最新の品質保証システムのあり方・手法に関する研究 品質試験室の管理及び市販後安定性：只木晋一<sup>\*1</sup>、坂本知昭、香取典子、井崎正夫<sup>\*2</sup>、佐川智子<sup>\*3</sup>、檜山行雄

厚生労働科学研究事業、平成15年3月厚生労働省監視指導・麻薬対策課に報告。

<sup>\*1</sup> 埼玉県衛研

<sup>\*2</sup> 三菱ウェルファーマ

<sup>\*3</sup> 帝人

医薬品の最新の品質保証システムのあり方・手法に関する研究 品質保証システムに関わる研究：西畑利明<sup>\*1</sup>、坂本知昭、橋本茂人<sup>\*2</sup>、今井昭生<sup>\*3</sup>、柳原義彦<sup>\*4</sup>、寺本正己<sup>\*4</sup>、石井勇司<sup>\*5</sup>、齋藤明男<sup>\*6</sup>、原 芳明<sup>\*7</sup>、西岡和幸<sup>\*1</sup>、檜山行雄

厚生労働科学研究事業、平成15年3月厚生労働省監視指導・麻薬対策課に報告。

<sup>\*1</sup> 参天製薬

<sup>\*2</sup> 千代田化工

<sup>\*3</sup> エーザイ

<sup>\*4</sup> 大阪府庁

<sup>\*5</sup> 静岡県庁

<sup>\*6</sup> 群馬県庁

<sup>\*7</sup> ザルトリウス

医薬品の最新の品質保証システムのあり方・手法に関する研究 薬事法制とガイドライン：小山靖人<sup>\*1</sup>、伊井義則<sup>\*2</sup>、石井勇司<sup>\*3</sup>、香川一浩<sup>\*4</sup>、片山博仁<sup>\*5</sup>、紀伊良明<sup>\*6</sup>、小林弘兵衛<sup>\*7</sup>、寺本正己<sup>\*8</sup>、道野浩志<sup>\*9</sup>、原 芳明<sup>\*10</sup>、松寺栄一<sup>\*11</sup>、山田博忠<sup>\*12</sup>、柳原義彦<sup>\*8</sup>、和田征夫<sup>\*9</sup>、檜山行雄

厚生労働科学研究事業、平成15年3月厚生労働省監視指導・麻薬対策課に報告。

<sup>\*1</sup> 日本イーライリリー

<sup>\*2</sup> 小野薬品

<sup>\*3</sup> 静岡県庁

<sup>\*4</sup> 東京都庁

<sup>\*5</sup> 藤沢薬品

<sup>\*6</sup> メルシヤン

<sup>\*7</sup> 塩野義製薬

<sup>\*8</sup> 大阪府庁

<sup>\*9</sup> 田辺製薬

<sup>\*10</sup> ザルトリウス

<sup>\*11</sup> 大日本製薬

<sup>\*12</sup> 住友製薬

医薬品の最新の品質保証システムのあり方・手法に関する研究 医薬品の研究開発から生産にいたる必要な情報とその流れ：森川 馨、齋藤 泉<sup>\*1</sup>、池田一史<sup>\*2</sup>、大池敦夫<sup>\*3</sup>、川上良一<sup>\*3</sup>、木村行彦<sup>\*4</sup>、三川正明<sup>\*5</sup>、渡辺恵市郎<sup>\*6</sup>、檜山行雄

厚生労働科学研究事業、平成15年3月厚生労働省監視指導・麻薬対策課に報告。

<sup>\*1</sup> 塩野義製薬

<sup>\*2</sup> 田辺製薬

<sup>\*3</sup> 藤沢薬品

<sup>\*4</sup> 中外製薬

<sup>\*5</sup> ファルマシア

<sup>\*6</sup> 日揮

フィリピン薬局方プロジェクトフェーズ2に関する協力事業 フィリピン薬局方制定に係る分析技術・試験法及びデータ評価に関する技術移管：坂本知昭  
平成14年9月国際協力事業団に報告。

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の溶出試験 アリストロキア酸に関する分析報告：川原信夫、合田幸広  
医療用後発医薬品品質確保対策事業経費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3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（瘦身用健康食品中の医薬品成分検査、同定）：合田幸広、鎌倉浩之、代田 修、川原信夫  
医薬品審査等業務庁費無承認無許可医薬品買い上げ調査経費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3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（無承認無許可医薬品）：合田幸広、花尻瑠理、最所和宏  
医薬品審査等業務庁費無承認無許可医薬品買い上げ調査経費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

ジコッピの新規確認試験法原案作成に係る研究報告書：川原信夫、合田幸広  
医薬品審査等業務庁費生薬における日本薬局方新規収載品目及び試験法の原案作成にかかる研究経費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3月厚生労働省医薬局審査管理課に報告。

ダイエット食品の成分分析：合田幸広、鎌倉浩之  
食品等試験検査費（健康食品に係る試験検査）（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部に報告。

乱用薬物鑑定マニュアルの作成：花尻瑠理、最所和宏、合田幸広  
向精神薬分析法作成経費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年1月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

鑑識用麻薬等標準品の製造報告（塩酸 $\alpha$ -メチルトリブタミン及び1-ベンジルピペラジン）：花尻瑠理、最所和宏、合田幸広  
標準品製造費（平成14年4月～平成15年3月）、平成15年3月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

**あへん中のモルヒネ含量試験**：花尻瑠理，最所和宏，合田幸広

あへん等取扱業務庁費（平成14年4月～平成15年3月）平成14年10月（国産あへん），同年11月（インド産あへん），平成15年3月（インド産あへん）厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

**薬事法違反疑い医薬品原料植物の検査**：合田幸広，下村裕子，徳本廣子

平成15年9月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

**ジエチレングリコールモノ-*n*-ブチルエーテルアセテート，セバシン酸ジ-*n*-ブチル，オクチル化ジフェニルアミン，スチレン化ジフェニルアミンの細胞毒性**：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14年4月～平成15年3月），平成15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。

***p*-クロロ-*m*-クレゾール及び*p*-クロロ-*m*-キシレノールの分析法策定**：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14年4月～平成15年3月），平成15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。

**家庭用品規制法におけるホルムアルデヒド試験法の見直しについて**：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14年4月～平成15年3月），平成15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。

**国設自動車交通環境測定所における大気汚染測定調査**：埴岡伸光，大野彰子，松島江里香，関田 寛，安藤正典  
環境省環境保全費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年4月環境省環境管理局自動車環境対策課に報告。

**ヘキサクロロフェン及びピロガロールの試験法**：徳永裕司，内野 正，安藤正典

平成14年4月～平成15年3月，平成15年3月厚生労働省医薬局審査管理課に報告。

**タール色素類の口紅への使用実態調査**：徳永裕司，内野正，安藤正典

平成14年4月～平成15年3月，平成15年1月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

**水道水質検査精度管理調査**：安藤正典，西村哲治，神野透人

平成14年4月～平成15年3月，平成14年12月厚生労働省健康局水道課に報告。

**残留農薬告示分析法の見直しに関する研究**：佐々木久美子，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年5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5農薬の試験法**：高附 巧，佐々木久美子，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**動物性食品残留農薬に関する検討**：根本 了，佐々木久美子，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**味噌，醤油，日本酒中のコウジ酸に関する調査結果**：村山三徳，近藤一成，松田りえ子，合田幸広，米谷民雄  
食品等試験検査費（平成14年9，10月），平成14年10月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

**安全性審査未承認遺伝子組換えトウモロコシCBH351の調査**：渡邊敬浩，穂山 浩，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成14年12月厚生労働省食品保部監視安全課に報告。

**安全性審査済み遺伝子組換えトウモロコシの確認試験結果**：渡邊敬浩，穂山 浩，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年2月厚生労働省食品保部監視安全課に報告。

**遺伝子組換え食品の検査法の外部精度管理調査結果**：穂山 浩，渡邊敬浩，米谷民雄

食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省食品保部監視安全課に報告。

**新規指定食品添加物フェロシアン化ナトリウム，カリウム及びカルシウムの規格基準及び試験法の策定**：久保田浩樹，大西有希子，川崎洋子，棚元憲一

食品添加物規格基準策定費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**海苔中のパラオキシ安息香酸エステル類の分析**：川崎洋子，久保田浩樹，大西(阿部)有希子，四方田千佳子，棚元憲一

食品添加物規格基準策定費（平成14年12月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**食塩中のフェロシアン化ナトリウム，カリウム及びカルシウムの分析法の設定**：久保田浩樹，大西(阿部)有希子，川崎洋子，棚元憲一

食品添加物規格基準策定費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**小麦中の過酸化ベンゾイルのHPLCによる分析法の設**

定：四方田千佳子，大西有希子，杉本直樹，久保田浩樹，棚元憲一  
食品添加物規格基準策定費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

マーケットバスケット方式による8種甘味料の一日摂取量の推定：四方田千佳子，大西(阿部)有希子，棚元憲一，相澤博<sup>\*1</sup>，大澤テイ子<sup>\*2</sup>，宮崎奉之<sup>\*3</sup>，毛利孝明<sup>\*4</sup>，大和康博<sup>\*5</sup>，玉那覇康二<sup>\*6</sup>  
食品添加物の一日摂取量調査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

<sup>\*1</sup> 札幌市衛生研究所

<sup>\*2</sup> 仙台市衛生研究所

<sup>\*3</sup> 東京都健康安全研究センター

<sup>\*4</sup> 香川県環境保健研究センター

<sup>\*5</sup> 九州市環境科学研究所

<sup>\*6</sup> 沖縄県衛生環境研究所

未指定添加物サイクラミン酸の分析法の改良と共同実験によるバリデーション：四方田千佳子，久保田浩樹，川崎洋子，大西(阿部)有希子，棚元憲一，笹尾忠由<sup>\*1</sup>，宮崎奉之<sup>\*2</sup>，石橋亨<sup>\*3</sup>，西村正美<sup>\*4</sup>，久井伸治<sup>\*5</sup>  
未指定添加物対策費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

<sup>\*1</sup> 横浜市衛生研究所

<sup>\*2</sup> 東京都健康安全研究センター

<sup>\*3</sup> (財)東京顕微鏡院

<sup>\*4</sup> (財)日本食品分析センター

<sup>\*5</sup> (財)日本冷凍食品検査協会

未指定添加物TBHQの分析法の改良と共同実験によるバリデーション：四方田千佳子，久保田浩樹，川崎洋子，大西(阿部)有希子，棚元憲一，笹尾忠由<sup>\*1</sup>，宮崎奉之<sup>\*2</sup>，石橋亨<sup>\*3</sup>，西村正美<sup>\*4</sup>，久井伸治<sup>\*5</sup>  
未指定添加物対策費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

<sup>\*1</sup> 横浜市衛生研究所

<sup>\*2</sup> 東京都健康安全研究センター

<sup>\*3</sup> (財)東京顕微鏡院

<sup>\*4</sup> (財)日本食品分析センター

<sup>\*5</sup> (財)日本冷凍食品検査協会

天然甘味料テンリョウチャ抽出物の確認試験法に関する研究：杉本直樹，佐藤恭子，山崎壯，棚元憲一  
食品添加物規格基準策定費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

コウジ酸の食品中分析法の開発に関する研究：佐藤恭子，杉本直樹，山崎壯，棚元憲一  
食品添加物規格基準策定費（平成14年4月～平成15年3

月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

市販乳幼児用玩具の材質及び可塑剤に関する調査：河村葉子，六鹿元雄，棚元憲一  
容器包装規格基準等作成費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

コレラ菌検査法の修正に関する研究成果：五十君静信，廣田雅光，山本茂貴  
（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

組換え微生物のマーカ遺伝子のマウス腸管内における移行に関する知見：長尾拓，吉倉廣<sup>\*</sup>，五十君静信  
厚生労働科学研究費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

<sup>\*</sup> 国立感染症研究所

2002年度対EU輸出ホタテガイ貝毒検査機関における貝毒検査のcomparative test及びverification実施報告：町井研士  
食品等試験検査費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省食品保健部監視安全課に報告。

食品由来のリステリア菌の研究被害に関する研究報告書：五十君静信，山本茂貴，岡田由美子，奥谷晶子，廣田雅光，牧野壯一<sup>\*1</sup>，本藤良<sup>\*2</sup>，神保勝彦<sup>\*3</sup>  
厚生労働科学研究費（平成14年4月～平成15年3月），平成15年4月厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課に報告。

<sup>\*1</sup> 帯広畜産大学

<sup>\*2</sup> 日本獣医畜産大学

<sup>\*3</sup> 東京都衛生研究所

国内製造されたサリドマイドの検査について：小嶋茂雄，奥田晴宏，安藤正典，福原潔，袴田航，徳永裕司，内野正，檜山行雄，坂本知昭  
（平成14年10月～平成14年11月），平成14年11月厚生労働省医薬局監視指導・麻薬対策課に報告。

内因性リガンドの存在を前提とするダイオキシンリスクの再評価に関する研究：関澤純，松田知成<sup>\*1</sup>，宮入伸一<sup>\*2</sup>，佐伯憲一<sup>\*3</sup>，秋葉澄伯<sup>\*4</sup>，安田峯生<sup>\*5</sup>，北村繁幸<sup>\*6</sup>，有蘭幸司<sup>\*7</sup>，加藤茂明<sup>\*8</sup>，菅野純，鈴木和博，江馬眞  
平成14年度厚生労働科学研究（平成14年4月～平成15年3月），平成15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。

<sup>\*1</sup> 京都大学地球環境学大学院

<sup>\*2</sup> 日本大学薬学部

<sup>\*3</sup> 名古屋市立大学薬学研究科

<sup>\*4</sup> 鹿児島大学公衆衛生学講座

\*<sup>5</sup> 広島国際大学保健医療学部

\*<sup>6</sup> 広島大学医学部

\*<sup>7</sup> 熊本県立大学環境共生学部

\*<sup>8</sup> 東京大学分子細胞生物学研究所

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：関澤 純，江馬 眞，手島玲子，松木容彦\*<sup>1</sup>，長尾美奈子\*<sup>2</sup>，東海明宏\*<sup>3</sup>，内山巖雄\*<sup>4</sup>，安田峯生\*<sup>5</sup>，浜田知久馬\*<sup>6</sup>，有菌幸司\*<sup>7</sup>，吉田喜久雄\*<sup>8</sup>，松井三郎\*<sup>9</sup>，田辺信介\*<sup>10</sup>，吉岡義正\*<sup>11</sup>，武田量雄\*<sup>12</sup>

平成14年度環境技術開発等推進研究（平成14年4月～平成15年3月），平成15年3月環境省総合環境政策局総務課環境研究技術室に報告。

\*<sup>1</sup> 食品薬品安全センター(財)

\*<sup>2</sup> 東京農業大学応用生物学部

\*<sup>3</sup> 北海道大学大学院工学研究科

\*<sup>4</sup> 国立公衆衛生院労働衛生部

\*<sup>5</sup> 広島大学医学部

\*<sup>6</sup> 京都大学大学院医学研究科

\*<sup>7</sup> 熊本県立大学環境共生学部

\*<sup>8</sup> 工業技術院資源環境技術総合研究所安全工学部

\*<sup>9</sup> 京都大学大学院工学研究科

\*<sup>10</sup> 愛媛大学沿岸環境研究センター

\*<sup>11</sup> 大分大学教育福祉科学学部

\*<sup>12</sup> 三菱化学安全科学研究所

残留農薬基準データ整理，解析調査：関澤 純，加藤保博\*

平成14年度残留農薬基準データ整理・解析調査（平成15年3月～平成15年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部食品基準課に報告。

\*財団法人残留農薬研究所

フッ化ナトリウムについての文献調査：菅野 純，児玉幸夫，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15年5月厚生労働省医薬局化学物質安全対策室に報告。

3,4-ジニトロトルエンについての文献調査：菅野 純，児玉幸夫，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15年5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 Styrenated Phenol のラットを用いた90日間経口投与による亜慢性毒性試験：松島裕子，高田幸一，斉藤 実，伊佐間和郎，川崎 靖，門馬純子，鹿庭正昭，中村晃忠，津田充宥，井上 達，菅野 純  
家庭用品等試験研究費，平成15年5月厚生労働省医薬局安全対策課に報告。

殺虫剤 Isobornyl Thiocyanacetate (IBTA) 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，内田雄

幸，斉藤 実，鹿庭正昭，中村晃忠，川崎 靖，金子豊蔵，井上 達，菅野 純

家庭用品等試験研究費（平成8年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局安全対策課に報告。

材木用防腐・防かび剤 p-chlorophenyl-3-iodopropargylformyl (CPIP) のラットを用いた単回経口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，斉藤 実，鹿庭正昭，中村晃忠，川崎 靖，金子豊蔵，井上 達，菅野 純

家庭用品等試験研究費（平成9年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局安全対策課に報告。

チオグリコールについての文献調査：松島裕子，菅野 純

厚生労働省医薬品審査等業務庁費（平成13年4月～平成15年3月），平成15年5月厚生労働省医薬局安全対策課に報告。

F344ラットによるガルシニアパウダーの1年間反復投与毒性試験による長期投与効果：小川幸男，関田清司，北嶋 聡，内田雄幸，斎藤 実，川崎靖，松島裕子，菅野 純，井上 達

健康食品安全性評価費，平成14年12月厚生労働省食品保健部新開発食品保健対策室に報告。

1,3-ジクロロ-2-プロパノールのラットにおける急性経口毒性試験・急性経皮毒性試験および急性皮膚刺激性試験：斉藤 実，井上 達

医薬品審査等業務庁費（平成12年4月～平成14年3月），平成14年6月厚生労働省医薬安全局安全対策課に報告。

D-キシロースのF344ラットにおける慢性毒性・癌原性試験（中間報告）：今沢孝喜，梅村隆志，西川秋佳，広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費（平成9年4月～平成12年3月），平成15年3月厚生労働省生活衛生局食品化学課へ報告。

デュナリエラカロテンの90日間反復投与毒性試験（最終報告）：今沢孝喜，梅村隆志，西川秋佳，広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費（平成12年4月～平成13年3月），平成15年3月厚生労働省生活衛生局食品化学課へ報告。

レバミゾールのF344ラットにおける癌原性試験（中間報告）：今沢孝喜，梅村隆志，西川秋佳，広瀬雅雄

容器包装，規格基準，乳肉水産基準費（平成13年4月～平成16年3月），平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告。

トウガラシ色素（パプリカ色素）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）：梅村隆志，西川秋佳，今沢孝喜，広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費（平成12年4月～平成15年3

月),平成14年7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):** 渋谷 淳, 森川朋美, 高木広憲, 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15年3月), 平成15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):** 渋谷 淳, 森川朋美, 高木広憲, 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15年3月), 平成15年5月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ヒノキチオールの雄F344/DuCrjラット心臓に対する影響に関するメカニズム解明試験:** 渋谷 淳, 畝山智香子, 森川朋美, 高木広憲, 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15年3月), 平成15年6月厚生省生活衛生局食品化学課へ報告。

**ルチン酵素分解物のWistarラットにおける90日間反復投与毒性試験(最終報告):** 安原加壽雄, 今井俊夫, 田村 啓, 小野寺博志, 三森国敏, 広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費(平成11年4月~平成12年3月), 平成14年7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, 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15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告。

**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(最終報告):** 蓮村麻衣, 今井俊夫, 小野寺博志, 上田 誠, 三森国敏, 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15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告。

**セイヨウワサビ抽出物の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, 蓮村麻衣, 上田 誠, 小野瀬淳一, 曹 永晩, 広瀬雅雄

食品添加物安全性再評価費(平成13年4月~平成16年3月), 平成15年5月厚生労働省医薬局食品保健部基準課へ報告。

**化学物質の複合作用と発がん予防効果の可能性に関する実験的研究報告書:** 岡崎和志, 西川秋佳, 梅村隆志, 今沢孝喜, 広瀬雅雄

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5月厚生労働省医薬局審査管理課化学物質安全対策室へ報告。

**OECD/HPV点検化学物質安全性調査:** 江馬 眞, 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。

**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報告書:** 黒川雄二\*<sup>1</sup>, 江馬 眞, 大野泰雄, 豊田正武\*<sup>2</sup>, 広瀬明彦, 広瀬雅雄, 安田峯生\*<sup>3</sup>, 首藤 紘一\*<sup>4</sup>

平成14年6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。

\*<sup>1</sup> 財佐々木研究所

\*<sup>2</sup> 実践女子大学生生活科学部

\*<sup>3</sup> 広島国際大学保健医療学部

\*<sup>4</sup> 財日本医薬情報センター

**食品添加物規格基準設定及び試験法の設定, 食用タール色素中の水溶性塩化物及び硫酸塩について:** 辻 澄子, 中野真希, 中村優美子, 外海泰秀

食品添加物規格基準設定費(平成14年4月~平成15年3月), 平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**食品中の食品添加物分析法の設定, 未指定を含む9種フェノール系酸化防止剤の改良分析法について:** 辻 澄子, 中野真希, 中村優美子, 外海泰秀

食品添加物規格基準設定費(平成14年4月~平成15年3月), 平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

**化学的合成品以外の食品添加物の規格基準の設定, タンナーゼに関する検討:** 中村優美子, 辻 澄子, 中野真希, 外海泰秀

食品添加物規格基準設定費(平成14年4月~平成15年3月), 平成15年3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チフェンスルフロンメチル及びピラゾスルフロンエチル告示試験法についての検討):** 石光 進, 吉井公彦, 津村ゆかり, 外海泰秀

農業衛生対策推進費(平成14年4月~平成15年3月), 平成15年3月厚生労働省医薬局食品保健部基準課に報告。

## 学会発表

## Titles of Speeches Scientific Meetings etc.

Takao HAYAKAWA : **Regulating biotechnology products.- Comparability of biotechnology products and cell substrates.**

10th International conference of drug regulatory authorities (ICDRA) (2002. 6)

早川堯夫：バイオ創薬へのアプローチ  
慶応義塾大学リサーチパークシンポジウム (2002. 12)

早川堯夫：医薬品製造とウイルス安全性確認の基本的考え方  
第1回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム (2002. 12)

早川堯夫：バイオロジクスフォーラムに期待するもの  
第1回バイオロジクスフォーラム (2003. 2)

早川堯夫：バイオ創薬におけるレギュラトリーサイエンスの新展開  
日本薬学会123年会 (2003. 3)

早川堯夫：バイオ医薬品の製法変更における諸問題  
日本動物細胞工学会研究会 (2003. 4)

青柳伸男：我が国の生物学的同等性試験  
平成14年度薬事衛生管理コース (2002. 5)

伊豆津健一：凍結乾燥によるタンパク質の構造変化と添加剤による安定化  
低温生物工学会第48年会 (2002. 5)

N.Aoyagi : **Requirements for New and Generic CR product in Japan**  
Controlled Release Society Workshop (2002. 7)

伊豆津健一, 青柳伸男, 小嶋茂雄：水溶液の凍結濃縮相における溶質混合性 - 凍結相分離現象とその制御 -  
日本化学会コロイドおよび界面化学討論会 (2002. 9)

青柳伸男：薬局方試験法の国際調和の現状と将来展望  
第39回全国薬事指導協議会 (2002. 10)

青柳伸男：日本の後発品の品質について  
第3回医薬ビジランスセミナー (2002. 10)

Izutsu, K., Aoyagi, N., Kojima S. : **Relationship between protein and excipient molecular weights and their miscibility in frozen solutions.**  
American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting (2002. 11)

青柳伸男, 香取典子, 伊豆津健一, 小嶋茂雄：溶出試験の変動要因：ピーカー間の溶出速度の差  
日本薬学会第123年会 (2002. 3)

伊豆津健一, 青柳伸男, 小嶋茂雄：凍結溶液中における溶質の分子量と混合性  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

吉谷隆志, 香取典子, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 小澤正吾, 小島茂雄, 長谷川隆一, 澤田純一：パクリタキセル並びにその代謝物の同時定量法の開発  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

青柳伸男：経口固形製剤の製法変更の生物学的同等性試験ガイドラインについて  
製剤機械技術研究会平成15年度特別講演会 (2003. 4)

Aso, Y., Yoshioka, S. and Kojima S. : **Prediction of protein release rate from cross-linked biodegradable hydrogel based on gel mesh size as determined by NMR relaxation time**  
29th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2002. 7)

Yoshioka, S., Tajima, S., Aso, Y., and Kojima, S. : **Inactivation and aggregation of  $\beta$ -galactosidase in lyophilized formulation analyzed by Kohlraush-Williams-Watts equation.**  
American Association of Pharmaceutical Scientists, Annual Meeting, (2002. 11)

吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄：凍結乾燥製剤中の高分子の $^1\text{H}$ について測定した $T_1$ および $T_{1\rho}$ の帰属と分子運動性の解析  
第41回NMR討論会 (2002. 11)

阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄：ニフェジピンと水溶性高分子の分散状態に関する固体スピン拡散NMR解析  
第41回NMR討論会 (2002. 11)

吉岡澄江：ブラケットティングおよびマトリキシングによる安定性試験の省力化  
第12回固形製剤処方研究会 (2002. 11)

吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄：非晶質医薬品の保存安定性を支配する分子運動性のNMR緩和による測定  
日本薬学会第123年会 (2003. 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\*：インスリン凍結乾燥製剤の保存安定性及び分子間相互作用の検討  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*東京理科大

阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄：スピン-格子緩和時間の平均化からみたニフェジピン-水溶性高分子固体分散体の分散状態

日本薬学会第123年会 (2003.3)

宮崎玉樹, 吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: 誘電緩和測定による水-高分子間の相互作用の検討

日本薬学会第123年会 (2003.3)

吉岡澄江, 阿曾幸男, 小嶋茂雄: グルコース含有凍結乾燥剤のガラス転移温度の分子動力学法による推定

日本薬剤学会第18年会 (2003.4)

阿曾幸男, 吉岡澄江, 小嶋茂雄: PVPとの固体分散体におけるニフェジピンの結晶化速度のAdam-Gibbs-Vogel式に基づく解析

日本薬剤学会第18年会 (2003.4)

坂本知昭, 檜山行雄, 森川 馨, 小嶋茂雄: 国立保健医療科学院及び国立医薬品食品衛生研究所によるGMP査察官を対象とした薬事衛生管理コースの紹介

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002.10)

坂本知昭, 檜山行雄, 小嶋茂雄: 品質試験におけるデータ評価 その1

日本薬学会第123年会 (2003.3)

檜山行雄, 西畑利明\*<sup>1</sup>, 小山靖人\*<sup>2</sup>, 森川 馨, 只木晋一\*<sup>3</sup>: 厚生労働科学研究 (H14-医薬-04) 医薬品の品質保証システムのあり方

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*<sup>1</sup> 参天製薬

\*<sup>2</sup> 日本イーライリリー

\*<sup>3</sup> 埼玉県衛研

檜山行雄: 医薬品GMPにおける品質試験室管理 第165回液体クロマトグラフィー研究懇談会 (2003.3)

片山博仁\*<sup>1</sup>, 和田 力\*<sup>2</sup>, 小川昌幸\*<sup>2</sup>, 小山靖人\*<sup>1</sup>, 徳永雄二\*<sup>1</sup>, 檜山行雄, 森川 馨: 無菌換気回数とグレードBゾーン気流滞留域の清浄度回復能

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*<sup>1</sup> 藤沢薬品

\*<sup>2</sup> 大気社

小山靖人\*, 片山博仁\*, 徳永雄二\*, 檜山行雄, 森川馨: 無菌室の三次元気流解析によるワーストスポット推定

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\* 藤沢薬品

鈴木倫典\*, 菊池弘和\*, 小林一三\*, 播磨 武\*, 檜山行雄, 森川 馨: 熱負荷によるガラスバイアルのフレークス発生に関する検討

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\* ファイザー製薬

石井(渡部)明子, 内田恵理子, 水口裕之, 川崎ナナ, 川

西 徹, 早川堯夫: プラスミンによる血小板形態変化の機構 -Ca<sup>2+</sup>依存性およびCa<sup>2+</sup>非依存性経路の存在- 第3回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2002.6)

日向須美子\*, 川崎ナナ, 日向昌司, 花輪嘉彦\*, 早川堯夫: HGFにより誘導される細胞分散とc-Metのチロシンリン酸化に対する各種ガングリオシドの効果およびc-Metへの結合解析

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\* 北里研究所東洋医学総合研究所

川崎ナナ, 伊藤さつき, 袁 進, 太田美矢子, 石井明子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MSによる糖タンパク質糖鎖の微量分析法の開発

第75回日本生化学会大会 (2002.10)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MS/MSを用いた微量糖タンパク質の構造解析

第75回日本生化学会大会 (2002.10)

原島 瑞\*, 新見伸吾, 長岡陽子\*, 関 泰一郎\*, 有賀豊彦\*, 早川堯夫: 初代培養肝細胞においてプロテアソーム特異的阻害剤であるラクタシスチンはグルコシルコイド依存的なチロシンアミノトランスフェラーゼの誘導を阻害する

第75回日本生化学会大会 (2002.10)

\* 日本大学生物資源科学部

川西 徹, 柴山理恵, 河合 洋, 鈴木琢雄, 小林 哲, 早川堯夫, 田中 光\*<sup>1</sup>, 重信弘毅\*<sup>1</sup>, 大幡久之\*<sup>2</sup>, 百瀬和享\*<sup>2</sup>, 中村 竜\*<sup>3</sup>: カルシウムの動きを追いかけるバイオイメージング学会公開講座 (2002.10)

\*<sup>1</sup> 東邦大学薬学部

\*<sup>2</sup> 昭和大学薬学部

\*<sup>3</sup> カールツァイス

柴山理恵, 河合 洋, 鈴木琢雄, 小林 哲, 川西 徹: ミトコンドリア蛍光プローブの光と影

第11回日本バイオイメージング学会学術集会 (2002.11)

川西 徹, 河合 洋, 鈴木琢雄, 柴山理恵, 早川堯夫, 大幡久之\*, 百瀬和享\*: 心筋細胞・肝細胞等のマルチカラーイメージングと分子機能解析 -カスパーゼ活性化の画像化-

公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」(2003.2)

\* 昭和大学薬学部

Toru KAWANISHI: Japanese Regulatory Perspective PDA/IABs Conference "Scientific Considerations or Comparability of Biologicals" (2003.2)

河合 洋, 鈴木琢雄, 柴山理恵, 小林 哲, 川西 徹, 早川堯夫: GFPを用いた融合タンパク質によるチロシ

### ンリン酸化の検出

第76回日本薬理学会年会 (2003. 3)

川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 袁 進, 川西 徹, 早川堯夫: **LC/MS/MSを用いたN結合糖鎖のプロファイリング及び糖配列解析**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

伊藤さつき, 川崎ナナ, 蜂須賀暁子, 太田美矢子, 袁 進, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: **Capillary LC/MSによる電気泳動法で分離された糖タンパク質のN結合型糖鎖解析**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

Yuan, J., Kawasaki, N., Itoh, S., Ohta, M., Kawanishi, T., and Hayakawa, T.: **Monosaccharide composition analysis of glycoproteins by pyridylation and capillary LC/MS.**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

河合 洋, 鈴木琢雄, 柴山理恵, 小林 哲, 早川堯夫, 川西 徹: **細胞死におけるカスパーゼ活性化およびミトコンドリア膜電位の時間変化の解析**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

小林 哲, 新見伸吾, 川西 徹, 福岡正道\*, 早川堯夫: **フタル酸ジ-n-ブチルエステル投与後のラット肝臓におけるインヒビン $\beta_A$ およびホリスタチン mRNA レベルの調節**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*昭和薬科大学薬学部

合田幸広: **食品及び食品素材の抗アレルギー活性の解析**  
国立健康栄養研究所セミナー (2002. 6)

合田幸広: **食薬区分と規制**

日本薬学会関東支部第27回学術講演会 (2002. 9)

Goda, Y.: **Health damaged diet pills imported from China and studies on their analyses**

International Seminar on harmonization of oriental herbal medicines (2002. 9)

近藤誠三\*<sup>1</sup>, 佐々木 博\*<sup>1</sup>, 山本恵一\*<sup>1</sup>, 山本藤輔\*<sup>1</sup>, 武田修己\*<sup>1</sup>, 中田孝之\*<sup>1</sup>, 磯見幸夫\*<sup>1</sup>, 合田幸広, 関田節子, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>: **アリストロキア酸純度試験法について**  
第18回生薬に関する懇談会 (2002. 12)

\*<sup>1</sup>日本漢方生薬製剤協会・技術委員会

\*<sup>2</sup>日本薬剤師センター

合田幸広: **脱法ドラッグに関する最近の話題**

九州大学大学院薬学研究院特別講演会 (2003. 1)

柿原芳輝\*<sup>1</sup>, 合田幸広, 穂山浩, 松藤寛\*<sup>1</sup>, 千野誠\*<sup>1</sup>, 豊田正武\*<sup>1</sup>, 武田明治\*<sup>1</sup>: **市販豆腐からの組換え遺伝子**

**の検知並びに原料ダイズ中の組換え体比率の推定**

酵素法による食品分析研究会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>日本大学生物資源科学部

下村裕子, 関田節子, 合田幸広, 徳川齊正\*<sup>1</sup>, 徳川真木\*<sup>1</sup>, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>: **徳川家康の薬「烏犀圓」VII**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>水府明徳会彰考館徳川博物館

\*<sup>2</sup>日本薬剤師研修センター

合田幸広, 川原信夫, 代田修, 酒井英二\*<sup>1</sup>, 瀧野裕之, 関田節子, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>: **「FHH」とその取り組み**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>岐阜薬科大学

\*<sup>2</sup>日本薬剤師研修センター

酒井英二\*<sup>1</sup>, 合田幸広, 関田節子, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>, 田中俊弘\*<sup>1</sup>: **FHH局方生薬の基原植物**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>岐阜薬科大学

\*<sup>2</sup>日本薬剤師研修センター

佐竹元吉\*<sup>1</sup>, 瀧野裕之, 飯田 修, 川原信夫, 合田幸広, 関田節子: **日本のGACPとWHO及びFHHにおける国際調和**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>お茶女大

中村高敏, 合田幸広, 荻原幸夫\*<sup>1</sup>: **一般用漢方処方の見直しについて**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>名城大薬

川原信夫, 袴塚高志\*<sup>1</sup>, 合田幸広, 関田節子, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>: **骨代謝関連遺伝子の発現変調活性を有するブラジル産薬用植物 *Canna angustifolia* の成分研究 (2)**

日本生薬学会第49年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup>東京理科大学薬学部

\*<sup>2</sup>日本薬剤師研修センター

高 慧媛\*<sup>1</sup>, 黒柳正典\*<sup>1</sup>, 川原信夫, 中根孝久, 梅原薫\*<sup>2</sup>, 中村好志\*<sup>2</sup>: **カリンの抗発癌プロモータ物質の研究**

日本生薬学会第49年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup>広島県立大学生物資源学部

\*<sup>2</sup>静岡県立大学薬学部

大竹 寛\*<sup>1</sup>, 増田和夫\*<sup>1</sup>, 塩島憲治\*<sup>1</sup>, 中根孝久, 川原信夫, Kuber J. Malla\*<sup>2</sup>: **シダ植物成分: ネパール産 *Adiantum philippense* のトリテルペノイド**

日本生薬学会第49年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup>昭和薬科大学

\*<sup>2</sup>ネパール植物資源局

川原信夫, 代田 修, 鎌倉浩之, 江崎勝司, 尾崎幸紘,

関田節子, 佐竹元吉\*, 合田幸広: 漢方・生薬製剤のアリ  
リストロキア酸分析について

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

\*日本薬剤師研修センター

多田敦子\*, 糠谷東雄\*, 飯島奈月\*, 川原信夫, 杉村  
隆\*, 若林敬二\*: トリプトファンとグルコースの反応に  
より生成する変異原物質の単離・構造解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*国立がんセンター研究所

川原信夫, 井上真由美, 河合賢一\*, 関田節子, 佐竹元  
吉\*, 合田幸広: オータムセージの成分研究 (1)

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 星薬科大学

\*2 日本薬剤師研修センター

石川真孝\*, 増田和夫\*, 高野昭人\*, 塩島憲治\*, 中  
根孝久, 川原信夫, Kuber J. Malla\*: シダ植物成分:  
*Aleuritopteris* 属のケモタキソノミー

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 昭和薬科大学

\*2 ネパール植物資源局

叶 英樹\*, 八百屋さやか\*, 黒柳正典\*, 猪谷富雄\*,  
川原信夫: アサガオ毛状根によるフェノール性化合物の  
glucosyl化

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*広島県立大学生物資源学部

黒柳正典\*, 石井宏美\*, 梅原薫\*, 川原信夫, 沖原清  
司\*, 杉本広之\*, 山田英生\*: ミカンモラセスからの  
フラボノイドおよびリモノイドの分離

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 広島県立大学生物資源学部

\*2 静岡県立大学薬学部

\*3 山田養蜂所

鎌倉浩之: 試験操作とその問題点

平成14年度食品衛生指定検査機関協会健康食品試験説  
明会 (2002. 9)

鎌倉浩之, 代田 修, 川原信夫, 合田幸広: 無承認無許  
可医薬品の買い上げ調査について

第39回全国衛生化学協議会 (2002. 10)

鎌倉浩之, 代田 修, 川原信夫, 合田幸広: 未承認医薬  
品の成分分析について

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

斉藤君枝\*, 加藤 大\*, 豊岡利正\*, 代田 修, 合田幸  
広: シロシン, シロシビンのHPLC分析

第15回バイオメディカル分析科学シンポジウム(2002. 8)

\*静岡県立大学薬学部

Caroline Imelda B. Biases\*, 近藤健児\*, 山路弘樹\*,  
寺林 進\*, 雨谷 栄\*, 代田 修, 合田幸広, 佐竹元  
吉\*: フィリピン薬局方収載生薬の形態学的研究

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*1 Department of Health, Bureau of Food and Drugs,  
Philippine

\*2 (株)ツムラ 生薬・資源研究所

\*3 浴用剤工業会

代田 修, 関田節子, 佐竹元吉, 森田博史\*, 糸川秀治\*,  
竹谷孝一\*: 南米産 *Maytenus* 属生薬より得られるトリテ  
ルペンダイマーの構造多様性について

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*東京薬科大学薬学部

代田 修, 袴田 航, 牧野由紀子\*, 合田幸広: サイロ  
シンおよびサイロシビンの簡易大量合成

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*関東信越厚生局麻薬取締部

斉藤君枝\*, 加藤 大\*, 豊岡利正\*, 代田 修, 合田幸  
広: 蛍光標識化による psilocin, psilocybin の高感度分  
析

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*静岡県立大学薬学部

丸山卓郎, 代田 修, 合田幸広, 横山和正\*, 牧野由紀  
子\*: ITS 遺伝子の塩基配列解析による幻覚性キノコ  
(いわゆるマジックマッシュルーム) の基原種の分類

食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

\*1 滋賀大学教育学部

\*2 関東信越厚生局麻薬取締部

丸山卓郎, 横山和正\*, 牧野由紀子\*, 合田幸広:  
TaqMan PCR 法を用いた幻覚性キノコの鑑定

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 滋賀大学教育学部

\*2 関東信越厚生局麻薬取締部

太田富久\*, 富瀬杏子\*, 長橋実\*, 車 培天\*, 宮本康  
世\*, 宮川慶子\*, 丸山卓郎, 木内文之\*, 細井信造\*,  
塚本佐知子\*, 阿部孝政\*, 濱田季之\*, 廣田 洋\*:

食品に由来する薬物相互作用物質の化学

第44回天然有機化合物討論会 (2002. 10)

\*1 金沢大学薬学部

\*2 理研

\*3 横浜市立大学

尾崎幸絃: 川芎の薬理作用

第18回生薬懇談会 (2002. 12)

江崎勝司, 佐竹元吉\*, 合田幸広: 宮内庁より移管を受  
けた生薬標本について (1)

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 日本薬剤師研修センター

花尻(木倉)瑠理：医薬品分析におけるHPLC法のバリデーション  
分析化学会LC研究懇談会(2002.5)

Kikura-Hanajiri, R., Kaniwa, N., Ishibashi, M. and Kojima, S.: LC/APCI-MS analysis of opiates and their metabolites in rat urine after inhalation of opium  
The International association for Forensic Toxicologists (TIAFT) Annual Meeting (2002.8)

Kikura-Hanajiri, R., Kaniwa, N., Kojima, S., Hasegawa, R., Goda, Y., Ueno, H. \*, Ozawa, S. and Sawada, J.: Development and validation of an analytical method of gemcitabine and its metabolite in plasma using LC-ESI-MS  
American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting (2002.11)  
\*国立がんセンター

花尻(木倉)瑠理：乱用薬物の合成について(フェネチルアミン系薬物を中心に)  
東京税関講演(2002.12)

花尻(木倉)瑠理, 鹿庭なほ子, 石橋無味雄, 小嶋茂雄, 合田幸広, 牧野由紀子\*: あへん喫煙ラットにおけるあへん成分の尿中排泄に関する研究  
日本薬学会第123年会(2002.3)  
\*関東信越厚生局麻薬取締部

最所和宏, 花尻瑠理, 合田幸広：日本薬局方及び英国薬局方によるあへん中のモルヒネ定量  
日本薬学会第123年会(2002.3)

酒井信夫, 穂山 浩, 豊田英尚\*, 戸井田敏彦\*, 米谷民雄, 今成登志男\*: コンドロイチン硫酸の免疫化学的活性について  
第15回バイオメディカル分析科学シンポジウム(2002.8)  
\*千葉大学大学院薬学研究院

酒井信夫, 穂山 浩, 高橋真弓\*, 豊田英尚\*, 戸井田敏彦\*, 米谷民雄, 今成登志男\*: コンドロイチン硫酸糖鎖構造と免疫化学的活性の構造活性相関  
日本薬学会123年会(2003.3)  
\*千葉大学大学院薬学研究院

田中理恵, 坂野勇一\*, 六鹿元雄, 菅沼大行\*, 稲熊隆博\*, 渋谷雅明\*, 海老塚豊\*, 豊田正武, 合田幸広：Monogalactosyl diacylglycerolのヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について  
日本食品化学学会第8回総会・学術大会(2002.6)  
\*1 東大薬  
\*2 カゴメ総研

小田嶋和徳\*, 白井直洋\*, 西條亮介\*, 田中理恵, 和佐田(筒井)祐子\*, 雨宮 成\*: ホモオキサリックス

[3]アレーン誘導体によるドーパミン選択的膜電位変化の基礎解析とホスト-ゲスト錯体の安定構造  
日本分析化学会第51年会(2002.9)

\*1 名市大薬  
\*2 名市大システム自然科学  
\*3 ピッツバーグ大化

NAGATSU, A. \*, TANAKA, R.: Chemical Modification of Naturally Occurring Monovalent Ionophore, Monensin, to Divalent Ionophores, Their Ion Transport Activity and the Conformations in the Solvents International Symposium on Biotechnology, Metal Complexes and Catalysis (2002.11)

\*1 名市大薬

田中理恵, 坂野勇一\*, 六鹿元雄, 菅沼大行\*, 稲熊隆博\*, 永津明人\*, 渋谷雅明\*, 海老塚豊\*, 合田幸広：糖脂質MGDG, DGDG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123年会(2003.3)

\*1 東大薬  
\*2 カゴメ総研  
\*3 名市大薬

内田恵理子, 日方幹男\*, 村田充弘\*, 佐藤功栄\*, 岩田明子, 石井(渡部)明子, 山口照英, 早川堯夫：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高感度検出法の開発  
第75回日本生化学会(2002.10)  
\*1 JSR-KK筑波研究所  
\*2 埼玉県赤十字血液センター

高 建青\*, 形山和史\*, Soares, A.L.\*1, 水口裕之, 早川堯夫, 中山隆志\*, 義江 修\*, 堤 康央\*, 真弓忠範\*, 中川晋作\*: ケモカイン及びサイトカイン発現アデノウイルスベクターの併用による癌遺伝子治療の最適化  
日本薬剤学会第19年会(2003.4)  
\*1 大阪大学大学院薬学研究科  
\*2 近畿大学大学院医学研究科

小泉直也\*, 増山 茜\*, 近藤昌夫\*, 藤井まき子\*, 水口裕之, 早川堯夫, 中島恵美\*, 宇都口直樹\*, 渡辺善照\*: ヒト胎盤由来細胞へのアデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討  
日本薬剤学会第19年会(2003.4)  
\*1 昭和薬科大学  
\*2 共立薬科大学  
\*3 帝京大学薬学部

水口裕之：次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究  
日本薬学会123年会(2003.3)

徐 志利\*, 水口裕之, 山口照英, 真弓忠範\*, 早川堯夫：遺伝子発現ユニットの最適化による高効率遺伝子発

## 現アデノウイルスベクターの開発

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*大阪大学大学院薬学研究科

小泉直也\*, 水口裕之, 山口照英, 渡辺善照\*, 早川堯夫: マウス静脈内投与後の組織移行性を抑えたアデノウイルスベクターの開発

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*昭和薬科大学

細野哲司, 水口裕之, 石井(渡部)明子, 山口照英, 早川堯夫: siRNA 発現ベクターの標的配列に関する検討

日本薬学会123年会 (2003. 3)

櫻井文教, 水口裕之, 山口照英, 早川堯夫: 35型アデノウイルスを基本骨格とした新規アデノウイルスベクターの開発および遺伝子発現効率の検討

日本薬学会123年会 (2003. 3)

浅野長祥\*<sup>1</sup>, 近藤昌夫\*<sup>1</sup>, 増山 茜\*<sup>1</sup>, 小泉直也\*<sup>1</sup>, 藤井まき子\*<sup>1</sup>, 中西 剛\*<sup>2</sup>, 伊藤徳夫\*<sup>2</sup>, 田中慶一\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 石村隆太\*<sup>3</sup>, Soares, M.J.\*<sup>4</sup>, 渡辺善照\*<sup>1</sup>: 胎盤の亜鉛輸送に関する研究-In vitro 細胞系への遺伝子導入効率の基礎検討-

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>昭和薬科大学\*<sup>2</sup>大阪大学大学院薬学研究科\*<sup>3</sup>国立環境研究所\*<sup>4</sup>カンサス大学

立花雅史\*, 形山和史\*, 古木理恵\*, 大橋興三\*, 堤康央\*, 中川晋作\*, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範\*: 改良型アデノウイルスベクターを用いた胎盤への遺伝子導入

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*大阪大学大学院薬学研究科

関口文子\*<sup>1</sup>, 衛藤佑介\*<sup>1</sup>, 高 建青\*<sup>1</sup>, 形山和史\*<sup>1</sup>, 堤康央\*<sup>1</sup>, 前田光子\*<sup>2</sup>, 川崎紘一\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範\*<sup>1</sup>, 中川晋作\*<sup>1</sup>: RGDペプチドを付与したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの機能評価

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科\*<sup>2</sup>神戸学院大学薬学部岡田直貴\*<sup>1</sup>, 飯山さやか\*<sup>1</sup>, 西田雅也\*<sup>1</sup>, 舛永安繁\*<sup>1</sup>, 岡田裕香\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作\*<sup>3</sup>, 真弓忠範\*<sup>3</sup>, 藤田卓也\*<sup>1</sup>, 山本 昌\*<sup>1</sup>: RGD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とIL-12遺伝子を共導入した樹状細胞の特性

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>京都薬科大学\*<sup>2</sup>武庫川女子大学薬学部\*<sup>3</sup>大阪大学大学院薬学研究科岡田裕香\*<sup>1</sup>, 喜多村紗千子\*<sup>1</sup>, 野尻宣仁子\*<sup>1</sup>, 岡田直貴\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 高橋幸一\*<sup>1</sup>, 早川堯夫, 真弓忠範\*<sup>3</sup>, 水野亘恭\*<sup>1</sup>: 腫瘍特異的プロモーターを搭載したRGDファイバーミュータントアデノウイルスベクターの構築とその遺伝子発現特性

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>武庫川女子大学薬学部\*<sup>2</sup>京都薬科大学\*<sup>3</sup>大阪大学大学院薬学研究科森 直樹\*<sup>1</sup>, 岡田直貴\*<sup>1</sup>, 舛永安繁\*<sup>1</sup>, 山中美由紀\*<sup>1</sup>, 岡田裕香\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作\*<sup>3</sup>, 真弓忠範\*<sup>3</sup>, 藤田卓也\*<sup>1</sup>, 山本 昌\*<sup>1</sup>: RGD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メラノーマ関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞の腫瘍免疫誘導機序の解析

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>京都薬科大学\*<sup>2</sup>武庫川女子大学薬学部\*<sup>3</sup>大阪大学大学院薬学研究科佐々木明德\*<sup>1</sup>, 岡田直貴\*<sup>1</sup>, 大久保米起\*<sup>1</sup>, 岡田裕香\*<sup>2</sup>, 中山隆志\*<sup>3</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作\*<sup>4</sup>, 真弓忠範\*<sup>4</sup>, 藤田卓也\*<sup>1</sup>, 山本 昌\*<sup>1</sup>: ケモカイン発現RGDファイバーミュータントアデノウイルスベクターを応用した新規樹状細胞免疫療法の開発に関する基礎的検討

日本薬学会123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>京都薬科大学\*<sup>2</sup>武庫川女子大学薬学部\*<sup>3</sup>近畿大学大学院医学研究科\*<sup>4</sup>大阪大学大学院薬学研究科

Nakamura, T. \*, Vongpunsawad, S. \*, Peng, K-W. \*, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Cattaneo, R. \* and Russell, S.J. \*: Cytoreductive cancer gene therapy: targeted adenoviral delivery of a targeted therapeutic gene Vector Targeting Therapeutic Strategies for Gene Therapy Cold Spring Harbor (2003. 3)

\* Mayo Foundation, Minnesota, USA

形山和史\*<sup>1</sup>, 和田孝一郎\*<sup>2</sup>, 中島 淳\*<sup>3</sup>, 立花雅史\*<sup>1</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 有山輝子\*<sup>1</sup>, 中川晋作\*<sup>1</sup>, 門脇孝\*<sup>4</sup>, 上崎善規\*<sup>2</sup>, Blumberg R.S.\*<sup>5</sup>, 真弓忠範\*<sup>1</sup>: PPARgammaをターゲットとした炎症性腸疾患の遺伝子治療

第76回日本薬理学会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>大阪大学大学院薬学研究科\*<sup>2</sup>大阪大学大学院歯学研究科\*<sup>3</sup>横浜市立大学医学部\*<sup>4</sup>東京大学大学院医学研究科\*<sup>5</sup>ハーバード大学

水口裕之, 櫻井文教, 徐 志利\*, 山口照英, 真弓忠範\*, 早川堯夫: 発現制御型アデノウイルスベクターの開発

## 第7回遺伝子医療研究会 (2003.3)

\*大阪大学大学院薬学研究科

水口裕之, 小泉直也\*, 細野哲司, 櫻井文教, 山口照英, 渡辺善照\*, 早川堯夫: 標的細胞指向性の制御を目的としたファイバー改変アデノウイルスベクターの開発

第7回遺伝子医療研究会 (2003.3)

\*昭和薬科大学

Jian-Qing, Q. \*, Tsuda, Y. \*, Tsutsumi, Y. \*, Mayumi, T. \*, Mizuguchi, H., Hayakawa, T. and Nakagawa, S. \*: Antitumor effect of the CC chemokine, ILC using recombinant adenovirus vector

Molecular Biopharmaceutics (2003.1)

\*大阪大学大学院薬学研究科

水口裕之, 早川堯夫: 改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子デリバリー

科学研究費特定領域研究「新しい材料システム構築のための分子シンクロナイゼーション」ミニシンポジウム (2002.12)

水口裕之: 改変アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入系の開発

文部科学省振興調整費知的基盤「組換えウイルス・コアバンクの創設とその高度利用のための基盤技術に関する研究」シンポジウム (2002.11)

小泉直也\*<sup>1</sup>, 水口裕之, 細野哲司, 宇都口直樹\*<sup>2</sup>, 渡辺善照\*<sup>1</sup>, 山口照英, 早川堯夫: 感染受容体との結合性を除去したアデノウイルスベクターの静脈内投与による組織集積性の検討

第17回動態学会 (2002.11)

\*<sup>1</sup> 昭和薬科大学\*<sup>2</sup> 帝京大学薬学部

黒田正幸\*, Nasimuzzaman, M. \*, 堂野純孝\*, 脇口宏\*, 水口裕之, 山本剛伸\*, 松崎茂展\*, 木村 右\*, 今井章介\*: Fiber mutant adenovirusによるEBウイルス関連リンパ球系腫瘍細胞株への遺伝子導入効率の改善

第50回日本ウイルス学会 (2002.10)

\*高知医科大学

黒田正幸\*, Nasimuzzaman, M. \*, 堂野純孝\*, 脇口 宏\*, 水口裕之, 山本剛伸\*, 松崎茂展\*, 木村 右\*, 今井章介\*: EBNA1 dominant-negative変異体によるEBウイルス陽性腫瘍細胞株からの高率なウイルス脱落クローンの分離

第50回日本ウイルス学会 (2002.10)

\*高知医科大学

Abiru, N. \*, Sun, F. \*, Kawasaki, E. \*, Yamasaki, H. \*, Ohshima, K. \*, Nagayama, Y. \*, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Liu, E. \*, Eisenbarth, G.S. \* and Eguchi, K. \*: Adenovirus expressing covalent B:9-23 peptide/ I-Ag7

gene: *in vivo* activation of anti-insulin autoimmunity in NOD mice

6th International Congress of the Immunology of Diabetes Society and American Diabetes Association Research Symposium (2002.10)

\*長崎大学医学部

岡田直貴\*<sup>1</sup>, 岡田裕香\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作\*<sup>3</sup>, 真弓忠範\*<sup>3</sup>: p100遺伝子を導入したマウス樹状細胞の免疫学的特性と腫瘍免疫誘導効果

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\*<sup>1</sup> 京都薬科大学\*<sup>2</sup> 武庫川女子大学薬学部\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

徐 志利\*, 水口裕之, 真弓忠範\*, 早川堯夫: 各種遺伝子発現制御系を搭載させたアデノウイルスベクターの系統的機能評価

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\*大阪大学大学院薬学研究科

櫻井文教, 水口裕之, 早川堯夫: アデノウイルス serotype35を基本骨格とした遺伝子導入用ベクターの開発およびヒトCD34+細胞への遺伝子導入

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

伊藤 章\*<sup>1</sup>, 岡田尚巳\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 水上浩明\*<sup>2</sup>, 久米晃啓\*<sup>2</sup>, 花園 豊\*<sup>2</sup>, 小澤敬也\*<sup>2</sup>: アダプター分子によるアデノウイルスベクターの標的細胞指向性の変換

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\*<sup>1</sup> 旭化成\*<sup>2</sup> 自治医科大学

岡田裕香\*<sup>1</sup>, 岡田直貴\*<sup>2</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範\*<sup>3</sup>: TNF $\alpha$ 発現アデノウイルスベクターを用いたマウスメラノーマ遺伝子治療における副作用発現機序の解析

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\*<sup>1</sup> 武庫川女子大学薬学部\*<sup>2</sup> 京都薬科大学\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

水口裕之: 改良型アデノウイルスベクターによる高効率遺伝子導入・発現系の開発

第17回21世紀を拓く京都シンポジウム (2002.10)

水口裕之: 次世代遺伝子治療用ベクターシステムの開発-ウイルスベクターのDDS-

第4回製剤研究フォーラム (2002.9)

Sakurai, F., Mizuguchi, H. and Hayakawa, T. : Efficient Gene Transfer into Human CD 34+ Cells by an Adenovirus Type 35 Vector

第8回日本遺伝子治療学会 (2002.7)

Koizumi, N.\* , Mizuguchi, H., Utoguchi, N.\* , Watanabe, Y.\* and Hayakawa, T. : **Generation of fiber-modified adenovirus vector containing heterologous peptides in both the HI loop and C terminal of the fiber knob**

第8回日本遺伝子治療学会 (2002. 7)

\*昭和薬科大学

Mizuguchi, H., Sakurai, F. and Hayakawa, T. : **Single adenovirus vector containing both rtTA and tTS expression cassettes provides tight regulation of transgene expression in a positive manner**

第8回日本遺伝子治療学会 (2002. 7)

Nagayama, Y.\* , Nakao, K.\* , Mizuguchi, H. and Hayakawa T. : **Therapeutic efficacy of combined replicative adenovirus and non-replicative adenovirus expressing IL-12 in an immunocompetent mouse model**

第8回日本遺伝子治療学会 (2002. 7)

\*長崎大学医学部

Itoh, A.\*<sup>1</sup>, Okada, T.\*<sup>2</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H.\*<sup>2</sup>, Kume, A.\*<sup>2</sup>, Hanazono, Y.\*<sup>2</sup> and Ozawa, K.\*<sup>2</sup> : **Soluble CAR-SCF fusion proteins improve adenoviral vector-mediated gene transfer to human hematopoietic cells.**

第8回日本遺伝子治療学会 (2002. 7)

\*<sup>1</sup> 旭化成

\*<sup>2</sup> 自治医科大学

水口裕之, 早川堯夫 : **改良型アデノウイルスベクターの開発**

Cell Biology Summer Meeting 2002 (2002. 7)

水口裕之, 櫻井文教, 早川堯夫 : **改良型 tet-on システムを搭載したアデノウイルスベクターによる効率の良い目的遺伝子の発現制御システムの開発**

第18回日本DDS学会 (2002. 6)

関口文子\*, 形山和史\*, 林 哲\*, 津田育宏\*, 堤 康央\*, 水口裕之, 早川堯夫, 真弓忠範\*, 中川晋作\* : **遺伝子治療の最適化を目指したアデノウイルスベクターの Polyethylene Glycol 修飾と遺伝子発現活性**

第18回日本DDS学会 (2002. 6)

\*大阪大学大学院薬学研究科

榎永安繁\*<sup>1</sup>, 岡田直貴\*<sup>1</sup>, 斎藤友美\*<sup>1</sup>, 飯山さやか\*<sup>1</sup>, 津田貴司\*<sup>1</sup>, 松原亜沙子\*<sup>1</sup>, 森 直樹\*<sup>1</sup>, 水口裕之, 早川堯夫, 中川晋作\*<sup>2</sup>, 真弓忠範\*<sup>2</sup>, 藤田卓也\*<sup>1</sup>, 山本昌\*<sup>1</sup> : **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メラノマ関連抗原遺伝子を導入した樹状細胞の腫瘍免疫誘導効果**

第18回日本DDS学会 (2002. 6)

\*<sup>1</sup> 京都薬科大学

\*<sup>2</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

Hiranuma, T.\*<sup>1</sup>, Watanab, A.\*<sup>1</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Matsukura, M.\*<sup>2</sup>, Miike, T.\*<sup>2</sup> and Shimada, T.\*<sup>1</sup> : **Vascular smooth muscle cell specific gene expression by the targeted adenoviral vector**

Xth INTERNATIONAL CONGRESS ON NEUROMUSCULAR DISEASES (2002. 7)

\*<sup>1</sup> 日本医科大学

\*<sup>2</sup> 熊本大学医学部

Katayama, K.\*<sup>1</sup>, Wada, K.\*<sup>2</sup>, Nakajima, A.\*<sup>3</sup>, Yoshida, S.\*<sup>3</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Tachibana, M.\*<sup>1</sup>, Nakagawa, S.\*<sup>1</sup>, Kadowaki, T.\*<sup>4</sup>, Kamisaki, Y.\*<sup>2</sup>, Blumberg, R.S.\*<sup>5</sup> and Mayumi, T.\*<sup>1</sup> : **A novel direction for gene therapy of inflammatory bowel disease (IBD)**

Controlled Release Society 29th Annual Meeting Seoul (2002. 7)

\*<sup>1</sup> 大阪大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup> 大阪大学大学院歯学研究科

\*<sup>3</sup> 横浜市立大学医学部

\*<sup>4</sup> 東京大学大学院医学研究科

\*<sup>5</sup> ハーバード大学

小山英則\*, 門田真砂世\*, 森岡与明\*, 市井拓哉\*, 田中新二\*, 福本真也\*, 塩井 淳\*, 水口裕之, 早川堯夫, 西沢良記\* : **WD repeat protein-1 (WDR1) による血管平滑筋細胞のアクチン繊維形成と細胞遊走の調節**

第34回日本動脈硬化学会総会 (2002. 7)

\*大阪市立大学医学部

Morioka, T.\* , Koyama, H.\* , Yamamura, H.\* , Tanaka, S.\* , Emoto, M.\* , Imamura, T.\* , Miyazono, K.\* , Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Kojima, I.\* , Takahashi, K.\* and Nishizawa, Y.\* : **Expression and its role of calponin in pancreatic AR4J cell differentiation into insulin-producing cells**

American Diabetes Association 62nd Annual meeting (2002. 6)

\*大阪市立大学医学部

Itoh, A.\*<sup>1</sup>, Okada, T.\*<sup>2</sup>, Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mizukami, H.\*<sup>2</sup>, Kume, A.\*<sup>2</sup>, Hanazono, Y.\*<sup>2</sup> and Ozawa K.\*<sup>2</sup> : **Highly Efficient Adenoviral Gene Transfer into Human Hematopoietic Cells with Novel Soluble Hybrid Adapter Polypeptides That Link Viral Fibers and Hematopoietic Specific Surface Antigens**

American Society of Gene Therapy, 5th Annal Meeting (2002. 5-6)

\*<sup>1</sup> 旭化成

\*<sup>2</sup> 自治医科大学

Mizuguchi, H., Sakurai, F. and Hayakawa, T. : **Single adenovirus vector containing both rtTA and tTS expression cassettes provides tight regulation of transgene expression in a positive manner**

American Society of Gene Therapy, 5th Annal Meeting (2002. 5-6)

荒 敏昭\*<sup>1</sup>, 糸井マナミ\*<sup>2</sup>, 川端健二, 柴川 健\*<sup>3</sup>, 杉山立樹\*<sup>1</sup>, 雨貝 孝\*<sup>2</sup>, 長澤丘司\*<sup>1</sup>: 胎仔および成体のTリンパ球発生におけるSDF-1/PBSFおよびCXCR4の生理的役割

日本免疫学会総会 (2002. 12)

\*<sup>1</sup> 京都大学再生医科学研究所

\*<sup>2</sup> 明治鍼灸大学大学院鍼灸学研究科

\*<sup>3</sup> Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University

柳原雅樹\*<sup>1</sup>, 和田賢人\*<sup>1</sup>, 水野武\*<sup>1</sup>, 宮澤宏, 浅島誠\*<sup>2</sup>, 花岡文雄\*<sup>1</sup>: ヒストンデアセチラーゼ複合体とDNAポリメラーゼはSAP-p58間相互作用を通じて結合する。

第55回日本細胞生物学会大会 (2002. 5)

\*<sup>1</sup> 理研

\*<sup>2</sup> 東大総合文化

嶋澤るみ子, 荒戸照世, 小笠原弘道, 奥田晴宏, 鹿野真弓, 豊島 聡, 永井尚美, 長岡寛明, 永田龍二, 中村高敏, 星 隆弘, 本田二葉, 前田大輔, 山田博章: 医薬品承認審査上の規格・安定性分野について一審査報告書の事例を踏まえ一

第123年会日本薬学会 (2003. 3)

荒戸照世, 永田龍二, 小笠原弘道, 奥田晴宏, 鹿野真弓, 嶋澤るみ子, 豊島 聡, 永井尚美, 長岡寛明, 中村高敏, 星 隆弘, 本田二葉, 前田大輔, 山田博章: 生物薬品承認審査上の規格・安定性分野について一審査報告書の事例を踏まえ一

第123年会日本薬学会 (2003. 3)

Watanabe, K., Ono, K., Miyazawa, H., Kiuchi, Y.\*, Yamaguchi, T., Shimizu, S.\* and Sato, Y.: Myosin isoform expression in murine embryonal carcinoma cells after cardiac differentiation

第76回日本薬理学会年会 (2003. 3)

\*昭和大学薬学部

Nakamura, R., Satoh, M.\*, Mori, S., Inoue, K. and Sato, Y.: Thyroxine-induced ERK1/2 phosphorylation through tyrosin kinase in H9C2 cells

第76回日本薬理学会年会 (2003. 3)

\*東邦大学薬学部

Mori, S., Ishida, S., Shinozaki, Y., Sawada, J., Miyazawa, H., Yamaguchi, T., Inoue, K. and Sato, Y.: Microarray analysis of thyroid hormone actions in rat aortic smooth muscle cells

第76回日本薬理学会年会 (2003. 3)

Sato, Y., Minamisawa, S.\*, Tatsuguchi, Y.\*, Fujino, T., Imamura, S.\*, Uetsuka, Y.\* and Matsuoka, R.\*: A newly identified mutation in the phospholamban promoter is associated with hypertrophic cardiomyopathy

Therapeutic Horizons in Heart Failure-The La Jolla-Rome-Yamaguchi Research Conferences on Cardiac Function (2002. 12)

\*東京女子医科大学

Nakamura, R., Mori, S., Satoh, M.\*, Inoue, K. and Sato, Y.: Activation of ERK1/2 by thyroxine via PI3 kinase in H9C2 cells

The 19th Annual Meeting, Japanese Section of the International Society for Heart Research (2002. 10)

\*東邦大学薬学部

Suzuki, T.: Gene-expression analysis by the Atlas™ glass microarray after gamma-ray, 4NQO, and MMS exposure to the human lymphoblastoid TK6 and WTK1 cells

U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Environmental Genomics and Carcinogenesis Panel (2002. 3)

Suzuki, T., Kohara, A., Honma, M., Sakamoto, H. and Hayashi, M.: Gene-expression analysis by the Atlas™ glass microarray after gamma irradiation to the human lymphoblastoid TK6 cells; Effect of cell-cycle synchronization

25th Anniversary Meeting of the United Kingdom Environmental Mutagen Society (2002. 6)

鈴木孝昌: 環境変異原研究の光と陰: これから進むべき道

日本環境変異原学会MMS研究会第31回定例会 (2002. 7)

鈴木孝昌, 小原有弘, 本間正充, 林 真: トランスジェニックマウス (MutaMouse) を用いたニトロソジェタノールアミンの遺伝子傷害性の検出とその特徴

第61回日本癌学会総会 (2002. 10)

鈴木孝昌, 小原有弘, 小泉朋子, 本間正充, 林 真: トランスジェニックマウスを用いたAF2および赤色2号の変異原性の再評価

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

鈴木孝昌: トランスジェニックマウス変異原性試験の有用性に関する研究

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

鈴木孝昌, 中嶋圓\*, 稲垣成憲\*, 兵庫淳志\*, 田中剛太郎\*, 浜田修一\*, 降旗千恵\*: DNAマイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究: ガラスアレイを用いたDEN投与後のマウス肝臓における遺伝子発現解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*JEMS/MMSマイクロアレイ共同研究グループ

兵庫淳志\*, 長谷川智子\*, 三井田由紀子\*, 鈴木孝昌, 中嶋 圓\*, 田中剛太郎\*, 浜田修一\*, 降旗千恵\*:

**GeneChipを用いたDEN投与後のマウス肝臓における遺伝子発現解析**

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*JEMS/MMSマイクロアレイ共同研究グループ

大内田昭信, 田中剛太郎\*, 鈴木孝昌, 中嶋 圓\*, 兵庫淳志\*, 浜田修一\*, 降旗千恵\*: **GeneChip**を用いたDEN投与後のラット肝臓における遺伝子発現解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*JEMS/MMSマイクロアレイ共同研究グループ

山田勉也\*<sup>1</sup>, 鈴木孝昌, 小原有弘\*<sup>2</sup>, 林 真, 羽倉昌志\*<sup>3</sup>, 水谷隆治\*<sup>1</sup>, 佐伯憲一\*<sup>1</sup>: ベンツピレンの*in vivo*及び*in vitro*変異誘発性に対する10位窒素置換の影響

日本薬学会東海支部例会 (2002. 12)

\*<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup>第一化学薬品(株)

\*<sup>3</sup>エーザイ(株)

小原有弘\*, 鈴木孝昌, 林 真, 菅野 純, 二宮真一\*, 須藤哲司\*: プライマリーヒト肝細胞のGeneChipによる遺伝子発現解析 (Toxicogenomicsへの応用を目指して)

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*第一化学薬品(株)

山田勉也\*<sup>1</sup>, 羽倉昌志\*<sup>2</sup>, 竹本育代\*<sup>1</sup>, 鈴木孝昌, 水谷隆治\*<sup>1</sup>, 佐伯憲一\*<sup>1</sup>: ベンツピレンの10位窒素置換体の変異原性に関わるヒトP450分子種

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科

\*<sup>2</sup>エーザイ(株)

Suzuki, T.: **An overview of the toxicogenomics project at NIHS Japan**

U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, Environmental Genomics and Carcinogenesis Panel (2003. 3)

押澤 正, 豊田淑江, 内田恵理子, 山口照英, 早川堯夫: HL-60細胞の好中球様細胞への分化に関するタンパク質の解析

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

豊田淑江, 山口照英, 押澤 正, 早川堯夫: AC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析

第1回日本再生医療学会 (2002. 4)

豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 早川堯夫: ヒト末梢血におけるAC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析

第23回日本炎症・再生医学会 (2002. 7)

豊田淑江, 押澤 正, 内田恵理子, 早川堯夫, 山口照英: G-CSFによるHL-60細胞好中球分化亢進と増殖促進におけるPKC $\epsilon$ の役割

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

豊田淑江, 押澤 正, 鈴木孝昌, 早川堯夫, 山口照英: 臍帯血におけるAC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析

第2回日本再生医療学会 (2003. 3)

Yamaguchi, T.: **Quality and Safety Evaluation of Gene Therapy Products in Japan**

The Fifth Annual KFPA International Symposium (2002. 10)

山口照英: 生物由来製品, ウイルスを巡る話題  
第31回JAPIC医薬情報講座 (2003. 3)

土屋利江: 医療用具の安全性試験と細胞毒性試験の意義  
第5回医療用具試験セミナー (2002. 7)

土屋利江: 医療用具の安全性

第33回バイオメディカルカリキュラム (2002. 8)

土屋利江: ナノ・再生医工学材料との相互作用解析  
ナノ再生医工学研究会 (2002. 10)

土屋利江: 非変異原性医療材料の発がん性と評価法に関する研究

第14回非変異・がん原性物質への対策研究会 (NGCS) 定例会 (2002. 11)

土屋利江: 再生医療製品の安全性と標準化: 再生医療材料・製品の安全性と標準化

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

Rahman, M.S., Tsuchiya, T.: **Remarkable enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by the cytokines**

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

Ahmed, S., Tsuchiya, T.: **Studies on the indentification of the molecules causing the foreignbody-reaction: Different expression of gap junctional proteins and cytokines between high and low responder strain mice**

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

Yang, J., Ichikawa, A. \*, Tsuchiya, T.: **Studies on the cellular function of a hepatoma cell line transfected with connexin 32 expression vector**

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

\* Kyoto Institute of Technology

土屋利江, 林 達也\*<sup>1</sup>, 片岡丈弘\*<sup>2</sup>, 松岡哲也\*<sup>3</sup>, 佐藤秀隆\*<sup>4</sup>, 大場耕輔, 中田和彦\*<sup>1</sup>: 医療用具の生物学的試験の標準化に関する研究: 医療材料の感作性試験 (その2)

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

\*1 (株)メニコン総合研究所

\*2 (財)民生科学協会

\*3 (株)ボゾリサーチセンター

\*4 (財)食品農医薬品安全性評価センター

朴 正雄, 土屋利江: 多糖類と増殖因子を用いた三次元培養による人工肝臓モデル作製

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

土屋利江, 鈴木寿子\*<sup>1</sup>, 増田茂樹\*<sup>2</sup>, 吉原なみ子\*<sup>1</sup>: 細胞組織医療用具製品での HIV-1 検出法の検討 (その2): 多孔質体を足場としたヒト皮膚モデルでの HIV-1 感染細胞の動態

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 国立感染症研究所

\*<sup>2</sup> 鐘淵科学工業株式会社

Tsuchiya, T.: Studies on the development of evaluation method for chondrogenesis and the biocompatible biomaterials for human chondrocyte differentiation

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

Tsuchiya, T.: Biocompatible biomaterials for the human chondrocyte differentiation estimated by RT-PCR method  
The 15th JAACT Meeting (2002. 11)

Ahmed, S., Tsuchiya, T.: Different expression of gap junctional protein of connexin 43 in two strains of mice after one-month implantation of POLY-L-LACTIC ACID  
The 15th JAACT Meeting (2002. 11)

Rahman, M.S., Banu, Y., Matsuoka, A., Ichikawa, A\*, Tsuchiya, T.: Evaluation of the immuno-protective effects of the new-type of bags using elisa and facscan analysis  
The 15th JAACT Meeting (2002. 11)

\* Kyoto Institute of Technology

Yang, J., Ichikawa, A\*, Tsuchiya, T.: Change of the cellular function by connexin 32 transfection in a hepatoma cell line  
The 15th JAACT Meeting (2002. 11)

\* Kyoto Institute of Technology

Park, J., Tsuchiya, T.: Evaluation of the cornea cells affected by multipurpose solutions for contact-lens  
The 15th JAACT Meeting (2002. 11)

鈴木寿子\*, 土屋利江, 吉原なみ子\*: 生体解性ポリマーを用いたバイオヒト皮膚モデルにおける HIV-1 検出法の検討

第16回日本エイズ学術集会 (2002. 11)

\* 国立感染症研究所

Tsuchiya, T.: A useful marker for evaluating the safety and efficacy of tissue engineered products  
ASTM TEMPs 2002 Symposium (2002. 11)

Tsuchiya, T., Isobe, S.: Reform of biological product regulation in Japan: Revision of pharmaceutical affairs law (PAL) and principles of good tissue practice (GTP) for cellular and tissue based products

ASTM TEMPs 2002 Symposium (2002. 11)

Yang, J., Ichikawa, A\*, Tsuchiya, T.: Change of the cellular function by connexin gene transfection in a hepatoma cell line

5th INTERNATIONAL MEETING OF TESI (2002. 12)

\* Kyoto Institute of Technology

Tsuchiya, T., Nakaoka, R.: A useful marker for evaluating the tissue engineering products: gap junctional communication for assessment of the tumor-promoting action and disruption of cell differentiation in the tissue engineering products

5th INTERNATIONAL MEETING OF TESI (2002. 12)

土屋利江: 最近の医療用具に関連する制度について  
第35回医工学フォーラム (2003. 1)

土屋利江: 金属材料の安全性

京都大学再生医科学研究所特別講演会 (2003. 3)

靱島由二: 感染性廃棄物中間処理における新処理技術—Tissue Digester WR2を中心に—

医療廃棄物研究会第21回研究講演会 (2002. 6)

靱島由二, 長谷川千恵, 矢上 健, 鳥鷹幸弘\*<sup>1</sup>, 伊藤博\*<sup>2</sup>, 片倉健男\*<sup>3</sup>, 土屋利江: 天然医用材料に混在するエンドトキシンの不活化法の開発

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> ダイキン環境研究所

\*<sup>2</sup> 高研

\*<sup>3</sup> テルモ

靱島由二, 長谷川千恵, 矢上 健, 伊藤 博\*<sup>1</sup>, 片倉健男\*<sup>2</sup>, 田村弘志\*<sup>3</sup>, 土屋利江: 天然医用材料からのエンドトキシン回収法の開発

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 高研

\*<sup>2</sup> テルモ

\*<sup>3</sup> 生化学工業

靱島由二: 感染性廃棄物中間処理新技術とガイドライン  
第2回日本バイオセーフティ学会学術集会 (2002. 11)

長谷川千恵, 松田りえ子, 林 譲, 矢上 健, 土屋利江, 靱島由二: 比濁法リムルス試験の分析精度とその保証  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

靱島由二, 松田りえ子, 林 譲, 矢上 健, 土屋利江: 血液接触型プラスチック製医療用具からの可塑剤溶出と

## 安全性評価

日本薬学会第123年会 (2003.3)

樋口多恵\*<sup>1</sup>, 井之上浩一\*<sup>1</sup>, 岡田文雄\*<sup>1</sup>, 井口博文\*<sup>2</sup>, 齋島由二, 佐藤温重\*<sup>3</sup>, 吉村吉博\*<sup>1</sup>, 中澤裕之\*<sup>1</sup>: ポリ塩化ビニル製医療用具からの可塑剤 Di(2-ethylhexyl)

phthalate 溶出に関する動態評価

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*<sup>1</sup> 星葉大

\*<sup>2</sup> 横浜市大病院

\*<sup>3</sup> 昭和大

齋島由二: 医療用具と環境ホルモン

第11回医療廃棄物研修会 (2003.3)

齋島由二, 長谷川千恵: カイネティック比濁法リムルス試験の精度保証

第76回日本細菌学会総会 (2003.4)

矢上 健: アレルゲンの交叉反応性と Type II Food Allergy

第7回日本ラテックスアレルギー研究会 (2002.7)

矢上 健, 大砂博之\*<sup>1</sup>, 河野真純\*<sup>1</sup>, 齋島由二, 土屋利江, 池澤善郎\*<sup>1</sup>:  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ活性を有するラテックスアレルギーの交叉反応性糖鎖エピトープ

第52回日本アレルギー学会総会 (2002.11)

\*<sup>1</sup> 横浜市立大学医学部

中出伸一\*<sup>1</sup>, 鹿庭正昭, 池田尚之\*<sup>2</sup>, 対馬恭吾\*<sup>3</sup>, 金丸英次\*<sup>4</sup>, 富樫博靖\*<sup>5</sup>, 市川直哉\*<sup>6</sup>, 神原昭夫\*<sup>7</sup>, 花田安弘\*<sup>8</sup>, 志野木達也\*<sup>9</sup>, 西松忠夫\*<sup>10</sup>, 金沢哲也\*<sup>11</sup>, 山際裕一\*<sup>12</sup>: 天然ゴム製品の対ラテックスアレルギー安全性について

2002年日本ゴム協会年次大会 (2002.5)

\*<sup>1</sup> ラテックスアレルギーフォーラム

\*<sup>2</sup> 三興化学工業

\*<sup>3</sup> オカモト

\*<sup>4</sup> 不二ラテックス

\*<sup>5</sup> 花王

\*<sup>6</sup> 住友ゴム工業

\*<sup>7</sup> ダンロップホームプロダクツ

\*<sup>8</sup> エステー化学

\*<sup>9</sup> ジェクス

\*<sup>10</sup> 広野化学工業

\*<sup>11</sup> 東レメディカル

\*<sup>12</sup> トップ

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叉アレルギー性に関する考察

第39回全国衛生化学技術協議会 (2002.10)

鹿庭正昭, 五十嵐良明: 失禁ケア製品における抗菌・消臭加工の実態と情報伝達

第39回全国衛生化学技術協議会 (2002.10)

鹿庭正昭: シンポジウムI 身近な生活用品と皮膚炎 4. 家庭用品による皮膚炎と原因化学物質

第27回日本接触皮膚炎学会 (2002.11)

福田直純\*<sup>1</sup>, 原 弘之\*<sup>2</sup>, 花井 博\*<sup>2</sup>, 鈴木啓之\*<sup>2</sup>, 鹿庭正昭: 手形採取用発色液による接触皮膚炎

第27回日本接触皮膚炎学会 (2002.11)

\*<sup>1</sup> 埼玉県立小児医療センター

\*<sup>2</sup> 日本大学医学部

近藤 恵\*, 高橋さなみ\*, 高橋一夫\*, 杉田泰之\*, 相原道子\*, 池澤善郎\*, 鹿庭正昭: 衛生加工された, 敷き布団の綿布による接触皮膚炎の1例

第27回日本接触皮膚炎学会 (2002.11)

\* 横浜市立大学医学部

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江: マウスを用いた天然由来材料のアレルギー性の評価: 種々の投与条件下での即時型アレルギー反応性

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002.6)

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江: 抗菌剤ピリチオン亜鉛の分析

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002.10)

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江: ホルムアルデヒド公定法の改定に向けた検討について

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002.10)

五十嵐良明, 鹿庭正昭, 土屋利江: 医用材料の即時型アレルギー性の検出: マウスモデルでタンパクアレルギーを検出するための投与方法と判定指標

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002.11)

Matsuoka, A., Lundin, C.\*, Johansson, F.\*, Fukuhara, K., Jenssen, D.\*, Onfelt, A.\*: Are sister chromatid exchanges formed by homologous recombination?

日本環境変異原学会第31回大会 (2002.11)

\* Stockholm University, Sweden

中村 哲\*, 高野智好\*, 松岡厚子, 加藤幸彦\*: In vitro 小核試験における数的異常誘発物質処理による異常細胞出現パターンの相違

日本環境変異原学会第31回大会 (2002.11)

\* キヤノン株式会社

松岡厚子, 土屋利江: 医療用具の生物学的試験の標準化に関する研究: 医療材料の染色体異常試験

第24回日本バイオマテリアル学会 (2002.11)

松岡厚子, 土屋利江: ポリ乳酸およびポリウレタンフィルム上で誘発されたBALB/3T3細胞由来形質転換巢の遺伝子発現プロファイリング

第2回日本再生医療学会 (2003. 3)

伊佐間和郎, 松岡厚子, 靄島由二, 土屋利江: 歯科鑄造合金の正常ヒト骨芽細胞を用いる毒性試験: L929及びV79細胞毒性試験との比較

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6)

伊佐間和郎, 靄島由二, 土屋利江: 歯科鑄造用金銀パラジウム合金のin vitro毒性評価—JIS不適合品の細胞毒性と骨芽細胞機能影響—

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

伊佐間和郎, 松下富春, 土屋利江: 正常ヒト骨芽細胞を用いたチタン合金の骨組織適合性の評価

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

伊佐間和郎, 土屋利江: MC3T3-E1細胞の骨分化に及ぼすPLLAとrhBMP-2の相乗作用

第2回日本再生医療学会総会 (2003. 3)

中岡竜介, 土屋利江: 材料と相互作用したヒト骨芽細胞でのコネキシン遺伝子発現変化

第24回日本バイオマテリアル学会大会 (2002. 11)

Nakaoka, R., Tsuchiya, T.: Study on a relationship between effect of biomaterials on gap junctional intercellular communication and differentiation of osteoblasts

5th International Meeting of the Tissue Engineering Society International (2002. 12)

新谷英晴, 櫻井美栄\*: オゾンガスと過酸化水素ガス滅菌に対する金属触媒の作用機序の相違について

第30回防菌防黴学会 (2003. 5)

\*石川島播磨重工業(株)

山村隼志\*, 櫻井美栄\*, 福永 栄\*, 塩見茂史\*, 新谷英晴: オゾンガス発生装置による室内殺菌試験結果

第30回防菌防黴学会 (2003. 5)

\*石川島播磨重工業株式会社

三木亜希子\*<sup>1</sup>, 黒須志のぶ\*<sup>1</sup>, 林 郁江\*<sup>2</sup>, 榊原靖久\*<sup>2</sup>, 並木祥代\*<sup>2</sup>, 並木 努\*<sup>2</sup>, 新谷英晴: 紫外線/二酸化チタン膜光触媒装置の病院内汚染菌に対する有効性について

第30回防菌防黴学会 (2003. 5)

\*<sup>1</sup> ミノファーゲン製薬(株)座間工場

\*<sup>2</sup> 医療法人並木会並木クリニック

出口統也\*, 丸山真由美\*, 小久保 護\*, 新谷英晴: 過酸化水素蒸気滅菌における滅菌検証と生物指標

第30回防菌防黴学会 (2003. 5)

\*渋谷工業株式会社

数馬昂始\*, 新谷英晴: GMPの観点から見たバイオロ

ジカルインジェクターの輸送場の問題点

第30回防菌防黴学会 (2003. 5)

\*K2 インターナショナル(株)

佐藤道夫: シンポジウム「インプラント・データシステムの現況から」日本と海外におけるシステムの現況

第17回日本眼内レンズ屈折手術学会 (2002. 6)

佐藤道夫: 教育研修講演「人工関節の埋植摘出データシステム」

第29回日本臨床バイオメカニクス学会 (2002. 9)

徳永裕司, 竹内織恵, 高 玲華, 内野 正, 安藤正典: 市販化粧品水中のフェノキシエタノールに関する研究

第50回日本化粧品技術者会研究討論会 (2002. 6)

大野彰子, 内山茂久, 埴岡伸光, 安藤正典: 室内環境におけるカルボニル化合物の特性

第43回大気環境学会年会 (2002. 9)

内山茂久, 伊藤洋介\*, 大野彰子, 埴岡伸光, 青柳象平\*, 安藤正典: 室内環境におけるホルムアルデヒドの挙動とモニタリング期間について

第43回大気環境学会年会 (2002. 9)

\*千葉大学

鈴木玲央\*<sup>1</sup>, 黒瀬光一, 吉田ひろみ, 綾野絵理, 西村哲治, 安藤正典, 武田 健\*<sup>1</sup>, 田代康介\*<sup>2</sup>: 内分泌擾乱化学物質のアフリカツメガエル発生期に及ぼす影響

第8回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 東京理科大学

\*<sup>2</sup> 九州大学

綾野絵理, 岡田裕司\*<sup>1</sup>, 坂本千賀子\*<sup>1</sup>, 金澤秀子\*<sup>1</sup>, 菊池明彦\*<sup>2</sup>, 岡野光夫\*<sup>2</sup>, 西村哲治, 安藤正典: 機能性高分子を用いた分離システムの環境分析への応用

日本分析化学会第51年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 共立薬科大学

\*<sup>2</sup> 東京女子医科大学

神野透人, 香川(田中)聡子, 長谷川達也\*, 牧野悠子, 瀬子義幸\*, 埴岡伸光, 安藤正典: 変異型Human Omega Class Glutathione S-Transferase (GSTO1-1) の機能解析

フォーラム2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2002. 10)

\*山梨県環境科学研究所

香川(田中)聡子, 神野透人, 牧野悠子, 埴岡伸光, 安藤正典: 環境汚染物質に対する感受性を規定する遺伝的要因に関する研究—TaqMan MGBプローブを用いるSNPsの簡易検出法—

フォーラム2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2002. 10)

徳永裕司, 竹内織恵, 内野 正, 安藤正典: **化粧水中の防腐剤に関する研究**

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002.10)

西村哲治, 鈴木玲央<sup>\*1</sup>, 吉田ひろみ, 綾野絵理, 黒瀬光一, 田代康介<sup>\*2</sup>, 武田 健<sup>\*1</sup>, 安藤正典: **アフリカツメガエルの胚・幼生を用いた内分泌かく乱物質の影響評価**

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002.10)

<sup>\*1</sup> 東京理科大学

<sup>\*2</sup> 九州大学

岡田祐司<sup>\*1</sup>, 坂本千賀子<sup>\*1</sup>, 金澤秀子<sup>\*1</sup>, 菊池明彦<sup>\*2</sup>, 岡野光夫<sup>\*2</sup>, 綾野絵理, 西村哲治, 安藤正典: **温度応答性クロマトグラフィーにおける温度グラジエントの効果**

第13回クロマトグラフィー科学会議 (2002.10)

<sup>\*1</sup> 共立薬科大学

<sup>\*2</sup> 東京女子医科大学

Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Hasegawa \*, T., Makino, Y., Seko, Y. \*, Hanioka, N., Ando, M. : **Functional characterization of human monomethylarsonic acid (MMA<sup>V</sup>) reductase variants**

International Symposium on Bio-Trace Elements 2002 (2002.11)

<sup>\*</sup> Yamanashi Institute of Environmental Sciences

許春蓮<sup>\*1</sup>, 千葉信男<sup>\*1</sup>, 西村 修<sup>\*1</sup>, 秋葉道宏<sup>\*2</sup>, 西村哲治, 安藤正典: **釜房ダム湖流域におけるAOCの測定について**

日本水処理生物学会年会 (2002.11)

<sup>\*1</sup> 東北大学大学院

<sup>\*2</sup> 国立保健医療科学院

徳永裕司, 森 謙一郎<sup>\*1</sup>, 野坂富雄<sup>\*2</sup>, 土井佳代<sup>\*3</sup>, 坂口 洋<sup>\*4</sup>, 藤井まき子<sup>\*5</sup>, 高野勝弘<sup>\*6</sup>, 林 正人<sup>\*7</sup>, 磯敏明<sup>\*8</sup>, 西尾裕幸<sup>\*9</sup>, 佐藤信夫<sup>\*10</sup>: **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: orthophenyl-phenol, benzalkonium chloride**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup> 都衛研

<sup>\*2</sup> 埼玉衛研

<sup>\*3</sup> 神奈川衛研

<sup>\*4</sup> 北里大理学部

<sup>\*5</sup> 昭和薬大

<sup>\*6</sup> 粧工連

<sup>\*7</sup> 資生堂

<sup>\*8</sup> ポーラ

<sup>\*9</sup> カネボウ

<sup>\*10</sup> コーセー

徳永裕司, 竹内織恵, 内野 正, 安藤正典: **インド西ベンガル州の広域的ヒ素汚染地域での尿中ヒ素化合物に関する研究**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

内野 正, 竹内織恵, 徳永裕司, 安藤正典: **より生体に近い3次元培養ヒト皮膚モデルの構築及びそのin vitro評価法に関する研究**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

埴岡伸光, 香川(田中)聡子, 宮田優佳\*, 与田玲子\*, 大野彰子, 松島江里香, 牧野悠子, 神野透人, 安藤正典: **アミノ酸置換を伴う変異型ヒトCYP2E1の機能解析**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

<sup>\*</sup> 共立薬大

大野彰子, 神野秀人, 香川(田中)聡子, 牧野悠子, 松島江里香, 埴岡伸光, 安藤正典: **変異型CYP2B6の機能解析**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

鈴木玲央\*, 吉田ひろみ, 綾野絵理, 安藤正典, 武田健\*, 西村哲治: **内分泌攪乱化学物質のアフリカツメガエル初期発生過程に及ぼす影響**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

<sup>\*</sup> 東京理科大学

森田久男<sup>\*1</sup>, 西村哲治, 大橋則雄<sup>\*2</sup>, 小林規矩夫<sup>\*3</sup>, 菅谷なえ子<sup>\*4</sup>, 鈴木俊也<sup>\*5</sup>, 永瀬久光<sup>\*6</sup>, 中室克彦<sup>\*7</sup>, 深澤嘉延<sup>\*3</sup>, 福島 実<sup>\*8</sup>: **環境試験法, 水質試験法, アルキルフェノール類およびビスフェノールA**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup> 埼玉県衛生研究所

<sup>\*2</sup> 都立衛生研究所

<sup>\*3</sup> 山梨県公害衛生研究所

<sup>\*4</sup> 横浜市衛生研究所

<sup>\*5</sup> 都立衛生研究所多摩支所

<sup>\*6</sup> 岐阜薬科大学

<sup>\*7</sup> 摂南大学

<sup>\*8</sup> 大阪市環境研究所

西村哲治, 大橋則雄<sup>\*1</sup>, 鈴木俊也<sup>\*2</sup>, 深澤嘉延<sup>\*3</sup>, 小林規矩夫<sup>\*3</sup>, 菅谷なえ子<sup>\*4</sup>, 永瀬久光<sup>\*5</sup>, 中室克彦<sup>\*6</sup>, 福島 実<sup>\*7</sup>, 森田久男<sup>\*8</sup>: **環境試験法, 水質試験法, フタル酸エステル**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup> 都立衛生研究所

<sup>\*2</sup> 都立衛生研究所多摩支所

<sup>\*3</sup> 山梨県公害衛生研究所

<sup>\*4</sup> 横浜市衛生研究所

<sup>\*5</sup> 岐阜薬科大学

<sup>\*6</sup> 摂南大学

<sup>\*7</sup> 大阪市環境研究所

<sup>\*8</sup> 埼玉県衛生研究所

岡田裕司<sup>\*1</sup>, 綾野絵理, 坂本千賀子<sup>\*1</sup>, 金澤秀子<sup>\*1</sup>, 西村哲治, 安藤正典, 菊池明彦<sup>\*2</sup>, 岡野光夫<sup>\*2</sup>: **温度応答性クロマトグラフィーを用いたチトクロームP450プロトタイプ薬物およびその代謝物の分離**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

\*1 共立薬科大学

\*2 東京女子医科大学

西川加穂子\*1, 内野 正, 徳永裕司, 富永典子\*2: **好酸性藻 *Chlamydomonas acidophila* の重金属蓄積能とポリリン酸代謝の解析**

日本農芸化学会2003年度大会(2003.4)

\*1 お茶の水女子大学大学院

\*2 お茶の水女子大学環境センター

西村哲治, 安藤正典, 相澤貴子\*1, 浅見真理\*1, 島崎大\*1, 国包章一\*1, 眞柄泰基\*2: **水道水源水域における1,4-ジオキサンの実態**

第37回日本水環境学会年会(2003.3)

\*1 国立保健医療科学院

\*2 北海道大学大学院

相澤貴子\*1, 西村哲治, 安藤正典, 浅見真理\*1, 島崎大\*1, 国包章一\*1, 眞柄泰基\*2: **水道水源水域におけるMTBEの実態調査**

第37回日本水環境学会年会(2003.3)

\*1 国立保健医療科学院

\*2 北海道大学大学院

西村哲治: **生物活性を利用した環境モニタリング法**

日本水環境学会関東支部講演会(2003.3)

神野透人, 佐伯真弓, 香川(田中)聡子, 牧野悠子, 埴岡伸光, 斎藤嘉朗, 小澤正吾, 安藤正典, 白尾国昭\*, 南博信\*, 大津 敦\*, 吉田輝彦\*, 西條長宏\*, 澤田純一: **変異型UGT1A10 (M59IおよびT202I) の機能解析**

日本薬学会第123年会(2003.3)

\* 国立がんセンター

西村哲治, 中川順一\*1, 高木博夫\*2, 沖 恒二\*3, 宇田川富男\*4, 加藤信弥\*5, 塩出貞光\*6, 嶋津治希\*7, 鈴木宏行\*8, 中野淑雄\*9, 中野康晴\*10, 安藤正典: **1,2-ブタジエン, 1,3-ブタジエン, 酢酸ビニルモノマー及びN,N-ジメチルアニリンの分析方法**

第54回全国水道研究発表会(2003.5)

\*1 東京都立衛生研所

\*2 国立環境研究所

\*3 横浜市水道局

\*4 東京都水道局

\*5 仙台市水道局

\*6 大阪市水道局

\*7 広島市水道局

\*8 千葉県水道局

\*9 福岡地区水道企業団

\*10 大阪府水道部

宮川徹也\*1, 安藤正典, 西村哲治, 秋葉道宏\*2: **水道水における同化性有機炭素の調査**

第54回全国水道研究発表会(2003.5)

\*1 阪神水道企業団

\*2 国立保健医療科学院

許春蓮\*1, 金 志勲\*1, 千葉信夫\*1, 西村 修\*1, 秋葉道宏\*2, 西村哲治, 安藤正典: **釜房ダム湖流域におけるAOCの測定**

第54回全国水道研究発表会(2003.5)

\*1 東北大学大学院

\*2 国立保健医療科学院

米谷民雄: **食品の安全性に関連する規格基準**

第254回ガスクロマトグラフィー研究会(2002.12)

米谷民雄, 福嶋浩人\*1, 渡辺 均\*2, 手島玲子, 磯村公郎\*3, 杉山英男\*4, 池淵秀治\*5, 佐治英郎\*6: **放射性物質試験法 ICP/質量分析法によるプルトニウムの定量**

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*1 日本分析センター

\*2 核燃料サイクル開発機構

\*3 兵庫県立健康環境科学研究所

\*4 国立保健医療科学院

\*5 日本アイソトープ協会

\*6 京大薬

佐々木久美子, 高附 巧, 根本 了, 米谷民雄: **食品中のアクリルアミド**

日本薬学会第123年会(2003.3)

外海泰秀, 堀伸二郎\*1, 田中敏嗣\*2, 岡 尚男\*3, 中村好志\*4, 永山敏廣\*5, 佐々木久美子, 前川吉明\*6, 村上りつ子\*7, 松木宏晃\*8: **ガスクロマトグラフィー/質量分析法による食品中の残留農薬多成分一斉分析法**

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*1 大阪府公衆衛生研究所

\*2 神戸市環境保健研究所

\*3 愛知県衛生研究所

\*4 静岡県立大学薬学部

\*5 東京都立衛生研究所

\*6 (財)日本食品分析センター

\*7 茨城県水戸保健所

\*8 サントリー(株)

辰巳 治\*, 清水菜穂子\*, 北原由美\*, 野村孝一\*, 小松一裕\*, 佐々木久美子, 米谷民雄: **食品中のトキサフェンの分析について**

日本食品衛生学会第85回学術講演会(2003.5)

\* (財)日本食品分析センター

清水菜穂子\*, 辰巳 治\*, 北原由美\*, 野村孝一\*, 小松一裕\*, 佐々木久美子, 米谷民雄: **食品中のミレックスの分析について**

日本食品衛生学会第85回学術講演会(2003.5)

\* (財)日本食品分析センター

根本 了, 鈴木良宏, 佐々木久美子, 豊田正武\*, 米谷民雄: **農産物中の残留農薬分析に対する超臨界流体抽出**

## の適用—野菜・果実試料について—

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

\*実践女子大学

天倉吉章, 堤 智昭, 中村昌文<sup>\*1</sup>, 北川宏子<sup>\*1</sup>, 藤野潤子<sup>\*1</sup>, 佐々木久美子, 豊田正武<sup>\*2</sup>, 吉田隆志<sup>\*3</sup>, 米谷民雄: 植物性食品成分のアリル炭化水素レセプター活性化に関する検討

フォーラム2002: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2002. 9)

\*1 (株)日吉

\*2 実践女子大学

\*3 岡山大学

天倉吉章, 堤 智昭, 佐々木久美子, 豊田正武\*, 米谷民雄: 食品中のダイオキシン類分析における前処理法の検討—プレパックカラムの適用—

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

\*実践女子大学

天倉吉章, 堤 智昭, 佐々木久美子, 米谷民雄: ダイオキシンのAhR結合活性に対する植物性食品成分の抑制効果

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

天倉吉章, 堤 智昭, 佐々木久美子, 米谷民雄: 各種市販野菜中のダイオキシン類レベルとその異性体分布

日本食品衛生学会第85回学術講演会 (2003. 5)

堤 智昭, 天倉吉章, 佐々木久美子, 豊田正武, 米谷民雄: 食品中のダイオキシン類分析におけるアルカリ分解の影響

第11回環境化学討論会 (2002. 6)

Yabushita, H. <sup>\*1</sup>, Tsutsumi, T., Amakura, Y., Nakamura, M. <sup>\*1</sup>, Fujino, J. <sup>\*1</sup>, Murata, H. <sup>\*1</sup>, Sasaki, K., Maitani, T., Toyoda, M. <sup>\*2</sup>: Application of the CALUX<sup>TM</sup> assay to the analysis of DXNs in fish (The second report)

22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants & POPs (2002. 8)

\*1 Hiyoshi Corporation

\*2 Jissen Women's University

Tsutsumi, T., Amakura, Y., Sasaki, K., Maitani T.: Levels of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in foods and their dietary intake in Japan

International workshop on "Effects of dioxins on agriculture, forestry and fisheries and their mechanisms of action on animals and fishes" (2002. 12)

奥山 亮<sup>\*1</sup>, 竹中宏志<sup>\*1</sup>, 西 和人<sup>\*1</sup>, 水上春樹<sup>\*1</sup>, 堤智昭, 天倉吉章, 滝上英孝<sup>\*2</sup>, 佐々木久美子, 米谷民雄, 小崎俊司<sup>\*3</sup>, 切畑光統<sup>\*3</sup>, 宮武和孝<sup>\*3</sup>, 酒井伸一<sup>\*2</sup>, 森田昌敏<sup>\*2</sup>: コプラナーPCBスクリーニング用ELISAシステムの開発

第5回環境ホルモン学会 (2002. 11)

\*1 (株)エンバイオテック・ラボラトリーズ

\*2 国立環境研究所

\*3 大阪府立大学大学院

堤 智昭, 飯田隆雄<sup>\*1</sup>, 堀 就英<sup>\*1</sup>, 中川礼子<sup>\*1</sup>, 飛石和大<sup>\*1</sup>, 柳 俊彦<sup>\*2</sup>, 中村宗知<sup>\*2</sup>, 河野洋一<sup>\*2</sup>, 内部博泰<sup>\*2</sup>, 豊田正武<sup>\*3</sup>, 天倉吉章, 佐々木久美子, 米谷民雄: 日本における市販食品中のダイオキシン類汚染

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 福岡県保健環境研究所

\*2 (財)日本食品分析センター

\*3 実践女子大学

松田りえ子, 石田誠一, 戸田恭子, 中田琴子, 米谷民雄, 林 譲: 遺伝子発現解析データにおける変化の有意性の評価法

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

近藤一成, David M.Cauvi <sup>\*1</sup>, Bettina Arbrecht <sup>\*1</sup>, Michael W. Robertson <sup>\*1</sup>: 高親和性IgE受容体FcεRI α-chainのER retention/retrieval motifは細胞内ドメインarginine, lysine-rich regionである

第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12)

\*1 The Scripps Research Institute

近藤一成, David M.Cauvi <sup>\*1</sup>, Michael W. Robertson <sup>\*1</sup>, 米谷民雄: 高親和性IgE受容体α-chainの小胞体保持シグナルについて

日本薬学会第123年会

\*1 The Scripps Research Institute

林 譲, 松田りえ子, 伊藤克敏\*, 前田昌子\*: 17α-hydroxyprogesteroneの競合ELISA法による分析の不確かさの推定

第63回分析化学討論会 (2002. 5)

\*昭和薬

林 譲, 松田りえ子, 伊藤克敏<sup>\*1</sup>, 前田昌子<sup>\*1</sup>, 今井一洋<sup>\*2</sup>: ELISA法の分析値の信頼性について

第15回バイオメディカル分析化学シンポジウム (2002. 8)

\*1 昭和薬

\*2 東大院薬

小谷 明\*, 林 譲, 松田りえ子, 楠 文代\*: FUMI理論に基づく電気化学検出HPLCの測定条件の最適化

第6回分析化学東京シンポジウム・2002機器分析東京討論会

\*東京薬科大学

西村和香<sup>\*1</sup>, 伊藤克敏<sup>\*1</sup>, 前田昌子<sup>\*1</sup>, 今井一洋<sup>\*2</sup>, 林 譲, 松田りえ子: 17α-hydroxyprogesteroneの競合ELISA法の精度: 理論と実践

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 昭和大薬

\*2 東大院薬

宮原 誠, 齊藤顕子<sup>\*1</sup>, 長沢妙子<sup>\*1</sup>, 伊藤 均<sup>\*2</sup>, 豊田  
 正武: **照射食肉等生鮮食品の炭化水素法による検知**  
 理工学における同位元素, 放射線研究発表会 第39回  
 大会 (2002. 7)

\*1 北里大学医療衛生学部

\*2 日本原子力研究所 高崎研究所

Makoto Miyahara, Taeko Nagasawa<sup>\*1</sup>, Akiko Saito<sup>\*1</sup>,  
 Hitoshi Ito<sup>\*2</sup>, Masatake Toyoda: **Detection of hydrocarbons  
 in some irradiated foods**

The 116th Annual AOAC International Meeting and  
 Exposition (2002. 9)

\*1 Faculty of Allied Medical Sciences, Kitazato University

\*2 Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI)

宮原 誠, 齊藤顕子<sup>\*1</sup>, 長沢妙子<sup>\*1</sup>, 上村智美<sup>\*1</sup>, 伊藤  
 均<sup>\*2</sup>, 米谷民雄: **照射食品の炭化水素法による検知の実  
 際**

日本食品照射研究協議会 第38回大会 (2002. 12)

\*1 北里大学医療衛生学部

\*2 日本原子力研究所 高崎研究所

宮原 誠, 増水章季<sup>\*1</sup>, 小林泰彦<sup>\*2</sup>, 米谷民雄: **ESR法  
 による照射食品の検知 その1 照射骨付き食品等につ  
 いて**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 日本電子応用研究所

\*2 日本原子力研究所 高崎研究所

M. Miyahara, T. Mashimizu<sup>\*1</sup>, Y. Kobayashi<sup>\*2</sup> and T.  
 Maitani: **Detection of Irradiated Foods Containing Bone  
 or Shell Using ESR Spectroscopy: A preliminary study 2.**  
 9th FDA Science Forum 2003 United States of Food and  
 Drug Administration (2003. 4)

\*1 Japan Electron Optics Laboratory (JEOL)

\*2 Japan Atomic Energy Research Institute (JAERI)

宮原 誠, 上村智美<sup>\*1</sup>, 齋藤顕子<sup>\*1</sup>, 小林泰彦<sup>\*2</sup>, 米谷  
 民雄: **DNA法による照射食品の検知 基礎的検討**  
 食品衛生学会第85回学術講演会 (2003. 5)

\*1 北里大学医療衛生学部

\*2 日本原子力研究所 高崎研究所

穂山 浩: **食品中のアレルギー物質検出試験法について**  
 日本小児アレルギー学会 (2002. 11)

穂山 浩: **食品のアレルギー表示義務化(5品目)に伴  
 うアレルギー食品検知法の実際とリスク評価**  
 第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

穂山 浩, 坂田こずえ, 張替直輝, 米谷民雄, 山本美保<sup>\*1</sup>,  
 渡井正俊<sup>\*1</sup>, 境 雅寿<sup>\*2</sup>, 村岡嗣朗<sup>\*2</sup>, 本庄 勉<sup>\*2</sup>, 高

畑能久<sup>\*3</sup>, 森松文毅<sup>\*3</sup>, 中村健人<sup>\*4</sup>, 小川真智子<sup>\*4</sup>, 布  
 藤聡<sup>\*4</sup>: **ウエスタンプロット法を用いた食品中の特定原  
 材料(卵及び乳)の検知法について**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 10)

\*1 (財)日本食品分析センター

\*2 (株)森永生科研

\*3 日本ハム(株)

\*4 (株)ファスマック

穂山 浩: **食品中のアレルギー物質検出試験法の現状と  
 課題**

第20回食品添加物技術フォーラム (2002. 7)

穂山 浩: **原因食品中アレルギー誘発物質の解明に関す  
 る研究**

第3回食物アレルギー研究会 (2003. 2)

高畑能久<sup>\*1</sup>, 浦島浩司<sup>\*1</sup>, 土岐真治<sup>\*1</sup>, 宮澤いづみ<sup>\*1</sup>,  
 森松文毅<sup>\*1</sup>, 穂山 浩, 米谷民雄, 柴田瑠美子<sup>\*2</sup>:  
**FASTKIT エライザシリーズによる特定原材料の検査事  
 例**

第3回食物アレルギー研究会 (2003. 2)

\*1 日本ハム(株)中央研究所

\*2 国立療養所南福岡病院小児科

Amano Hiroo<sup>\*1</sup>, Akiyama Hiroshi, Ishikawa Osamu<sup>\*1</sup>,  
 J. Bienenstock<sup>\*2</sup>: **Rat epithelial response to water  
 avoidance stress**

The 12th Japan-Korea Joint Meeting of Dermatology  
 (2001. 11)

\*1 Gunma University School of Medicine

\*2 McMaster University

和久井千世子, 渡邊敬浩, 穂山 浩, 米谷民雄, 千葉良  
 子<sup>\*1</sup>, 内川誠司<sup>\*2</sup>, 紀 雅美<sup>\*3</sup>, 高橋邦彦<sup>\*4</sup>, 藤井明  
 美<sup>\*5</sup>: **GUS試験法を用いた遺伝子組換えパパイヤ(55-  
 1)の検知法について**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 10)

\*1 昭和大薬大学

\*2 神戸検疫所輸入食品検疫検査センター

\*3 大阪市立環境科学研究所

\*4 埼玉県衛生研究所

\*5 横浜検疫所輸入食品検疫検査センター

田端節子<sup>\*1</sup>, 中島正博<sup>\*2</sup>, 伊藤嘉典, 穂山 浩, 田中敏  
 嗣<sup>\*3</sup>, 砂川紘之<sup>\*4</sup>, 長南隆夫<sup>\*4</sup>, 芳澤宅實<sup>\*5</sup>, 熊谷 進  
<sup>\*6</sup>: **市販国産牛乳のアフラトキシンM1汚染実態調査**  
 第53回マイコトキシン研究会学術講演会 (2002. 8)

\*1 東京都立衛生研究所

\*2 名古屋市衛生研究所

\*3 神戸市環境保健研究所

\*4 北海道立衛生研究所

\*5 香川大学農学部

\*6 東京大学農学研究科

中島正博\*<sup>1</sup>, 田端節子\*<sup>2</sup>, 穂山 浩, 伊藤嘉典, 田中敏嗣\*<sup>3</sup>, 砂川紘之\*<sup>4</sup>, 長南隆夫\*<sup>4</sup>, 芳澤宅實\*<sup>5</sup>, 熊谷進\*<sup>6</sup>:  
我が国における牛乳中アフラトキシンM1汚染実態調査  
およびリスクアセスメント

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 名古屋市衛生研究所

\*<sup>3</sup> 神戸市環境保健研究所

\*<sup>4</sup> 北海道立衛生研究所

\*<sup>5</sup> 香川大学農学部

\*<sup>6</sup> 東京大学農学研究所

穂山 浩, 澤口貴仁, 佐藤雄嗣, 酒井信夫, 渡邊敬浩,  
庄司俊彦\*<sup>1</sup>, 神田智正\*<sup>1</sup>, 合田幸広, 米谷民雄: リンゴ  
未熟果由来ポリフェノールの全身性免疫系に及ぼす影響  
第123年会日本薬学会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> アサヒビール未来研究所

渡邊敬浩, 和久井千世子, 穂山 浩, 米谷民雄, 笠間菊  
子\*<sup>1</sup>, 松木容彦\*<sup>1</sup>: 遺伝子組換え食品定性検査法の外部  
精度管理について

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> (財)食品薬品安全センター秦野研究所

吉村倫彰\*<sup>1</sup>, 栗原秀夫\*<sup>2</sup>, 松岡 猛\*<sup>2</sup>, 児玉貴志\*<sup>2</sup>, 布  
藤 聡\*<sup>3</sup>, 小川真智子\*<sup>3</sup>, 渡辺 聡\*<sup>4</sup>, 青木信太郎\*<sup>5</sup>,  
飯塚太由\*<sup>6</sup>, 吉川礼次\*<sup>6</sup>, 渡邊敬浩\*<sup>7</sup>, 和久井千世子\*<sup>7</sup>,  
穂山 浩\*<sup>7</sup>, 米谷民雄\*<sup>7</sup>, 砂川美佐緒\*<sup>8</sup>, 日野明寛\*<sup>8</sup>,  
一色賢司\*<sup>8</sup>: ダイズ及びトウモロコシ加工食品中の遺伝  
子組換え体の定量

日本食品衛生学会85回学術講演会 (2003. 5)

\*<sup>1</sup> アサヒビール(株)

\*<sup>2</sup> (独)農林水産消費技術センター

\*<sup>3</sup> (株)ファスマック

\*<sup>4</sup> ハウス食品(株)

\*<sup>5</sup> (財)日本食品分析センター

\*<sup>6</sup> (財)食品環境検査協会

\*<sup>7</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

\*<sup>8</sup> 食品総合研究所

栗原秀夫\*<sup>1</sup>, 松岡 猛\*<sup>1</sup>, 吉村倫彰\*<sup>2</sup>, 井上真以子\*<sup>3</sup>,  
古井 聡\*<sup>4</sup>, 正野仁慈\*<sup>5</sup>, 布藤 聡\*<sup>6</sup>, 小川真智子\*<sup>6</sup>,  
大島慎司\*<sup>7</sup>, 渡邊敬浩\*<sup>8</sup>, 和久井千世子\*<sup>8</sup>, 穂山 浩\*<sup>8</sup>,  
米谷民雄\*<sup>8</sup>, 砂川美佐緒\*<sup>9</sup>, 日野明寛\*<sup>9</sup>, 一色賢司\*<sup>9</sup>:  
遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタ  
ディ-I-ABI PRISM 7700, 7900HT (96及び384 ウェル)  
ならびに7000を用いた内標比測定試験

日本食品衛生学会85回学術講演会 (2003. 5)

\*<sup>1</sup> (独)農林水産消費技術センター

\*<sup>2</sup> アサヒビール(株)

\*<sup>3</sup> 飼料作物研究所

\*<sup>4</sup> (株)ニッポンジーン

\*<sup>5</sup> ハウス食品(株)

\*<sup>6</sup> (株)ファスマック

\*<sup>7</sup> (財)日本穀物検定協会

\*<sup>8</sup> 国立医薬品食品衛生研究所

\*<sup>9</sup> 食品総合研究所

児玉貴志\*<sup>1</sup>, 西山武夫\*<sup>1</sup>, 栗原秀夫\*<sup>1</sup>, 松岡 猛\*<sup>1</sup>, 日  
野明寛\*<sup>2</sup>, 渡邊敬浩, 穂山 浩\*<sup>3</sup>, 米谷民雄\*<sup>3</sup>: 表示対  
象加工食品からのDNA抽出法の検討

日本食品衛生学会84回学術講演会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> (独)農林水産消費技術センター

\*<sup>2</sup> 食品総合研究所

渡邊敬浩, 穂山 浩, 米谷民雄, 山川宏人\*<sup>1</sup>, 飯島賢\*<sup>1</sup>,  
布藤聡\*<sup>2</sup>, 小川真智子\*<sup>2</sup>, 吉田篤史\*<sup>3</sup>, 渡井正俊\*<sup>3</sup>:  
PCR法を用いた特定原材料(小麦, そば, 落花生)検  
知法のバリデーションについて

日本食品衛生学会84回学術講演会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> (株)日清製粉グループ本社

\*<sup>2</sup> (株)ファスマック

\*<sup>3</sup> (財)日本食品分析センター

渡邊敬浩, 和久井千世子, 穂山 浩, 米谷民雄, 栗原秀  
夫\*<sup>1</sup>, 松岡猛\*<sup>1</sup>, 太田順司\*<sup>2</sup>, 青木信太郎\*<sup>2</sup>, 渡井正俊\*<sup>2</sup>,  
澤田千尋\*<sup>3</sup>, 森 曜子\*<sup>3</sup>, 重松万由\*<sup>4</sup>, 大峽太郎\*<sup>5</sup>, 梶  
野敏彦\*<sup>6</sup>, 砂川美佐緒\*<sup>7</sup>, 日野明寛\*<sup>7</sup>, 一色賢司\*<sup>7</sup>: 遺  
伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディ  
ーII. ABI PRISM 7700, 7900HT (96及び384 ウェル),  
ならびに7000を用いたブラインドテスト及び機種間差  
試験

日本食品衛生学会85回学術講演会 (2003. 5)

\*<sup>1</sup> (独)農林水産消費技術センター

\*<sup>2</sup> 日本食品分析センター

\*<sup>3</sup> (財)日本冷凍食品検査協会

\*<sup>4</sup> (株)日清製粉グループ本社

\*<sup>5</sup> 海外貨物検査株式会社

\*<sup>6</sup> 森永製菓株式会社

\*<sup>7</sup> 食品総合研究所

長岡(浜野)恵, 山崎 壮, 米谷民雄: HPLC/高分解能  
ICP-MS法を用いたバナジウム(Ⅲ), (Ⅳ), (Ⅴ)のト  
ランスフェリンに対する結合親和性の解析  
第13回日本微量元素学会 (2002. 7)

米谷民雄, 長岡(浜野)恵: HPLC-高分解能ICP-MSの  
生体試料への応用—トランスフェリンへの金属(Fe, Al)  
の結合状態の解析—

'02筑波セミナー(プラズマ分光分析研究会) (2002. 7)

長岡(浜野)恵, 山崎 壮, 棚元憲一, 米谷民雄: マウス  
膝窩リンパ節測定法 (popliteal lymph node assay: PLNA)  
による水溶性物質の抗原性評価の試み  
第123年会日本薬学会 (2003. 3)

Tanamoto, K.: Microbiological Tests in JP and  
Pharmacopoeial harmonization  
PDA-USP Joint Conference (2002. 5)

久保田浩樹, 川崎洋子, 阿部有希子, 秋山卓美, 武田由比子, 四方田千佳子, 米谷民雄: **パンに含まれる臭素酸塩の高感度分析法の開発**

日本食品化学学会第8回学術大会 (2002. 6)

川崎洋子, 阿部有希子, 久保田浩樹, 米谷民雄, 石綿肇\*: **食品中のリン酸塩類の簡易分析法**

日本食品化学学会第8回学術大会 (2002. 6)

\*国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

杉本直樹, 山崎 壮, 米谷民雄, 菊地博之\*, 井上かおり\*, 大田昌紀\*, 松藤 寛\*, 千野 誠\*, 武田明治\*: **テリョウチャ抽出物の加水分解型タンニンについて**

日本食品化学学会第8回学術大会 (2002. 6)

\*日本大学生物資源科学部

Kawamura, Y.: **Effects of Gamma Irradiation on Polyethylene, Polypropylene and Polystyrene, Mainly Concerning General Antioxidants**

224th American Chemical Society National Meeting (2002. 8)

久保田浩樹, 川崎洋子, 秋山卓美, 阿部有希子, 四方田千佳子, 米谷民雄, 棚元憲一, 大石充男\*<sup>1</sup>, 鈴木\*<sup>1</sup>仁\*<sup>1</sup>, 原田尚子\*<sup>2</sup>, 鈴木 忍\*<sup>2</sup>, 村上隆之\*<sup>3</sup>, 山田雄司\*<sup>3</sup>: **市販パン及びパン食材中の臭素酸塩の残留実態調査**

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> (財)日本食品分析センター

\*<sup>3</sup> 山崎製パン(株)中央研究所

梶村計志\*, 田頭洋子, 四方田千佳子, 岩上正蔵\*: **医薬品成分のメンブランフィルターへの吸着に関する研究**

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

\*大阪府立公衆衛生研究所

杉本直樹: **HPLC法による違反コチニール色素(耐酸性コチニール)の分析**

日本食品化学学会第14回食品化学シンポジウム (2002. 11)

四方田千佳子, 久保田浩樹, 阿部有希子, 川崎洋子, 棚元憲一: **臭素酸のHPLCによる検出限界**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

阿部有希子, 杉田たき子, 四方田千佳子, 石綿 肇\*, 米谷民雄, 棚元憲一: **軟質ポリ塩化ビニル製玩具中の可塑剤含有量と溶出量**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

\*国立医薬品食品衛生研究所大阪支所

佐藤恭子, 植松洋子\*, 棚元憲一, 米谷民雄: **標準添加ヘッドスペースGCによる天然香料中の残留溶媒分析法**

日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002. 11)

\*東京都立衛生研究所 (名称変更後: 東京都健康安全研

究センター)

Kawamura, Y.: **Migration of Nonylphenol from Polyvinyl Chloride Stretch Film**

SCOP/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances and Supplementary Workshop (2002. 11)

河村葉子, 小川裕子, 西村哲治, 菊池 裕, 西川淳一\*, 西原 力\*, 棚元憲一: **酵母Two-Hybrid試験による食品用プラスチックの紫外線吸収剤およびベンゾフェノン誘導体のエストロゲンレセプター結合活性**

環境ホルモン学会第5回研究発表会 (2002. 11)

\*大阪大学大学院薬学研究科

河村葉子: **食品用器具・容器包装中の残留化学物質の分析**

第254回ガスクロマトグラフィー研究会 (2002. 12)

河村葉子: **食品用器具・容器包装からの環境ホルモンの暴露**

第10回環境ホルモン学会講演会 (2003. 1)

大高怜子\*<sup>1</sup>, 前田昌子\*<sup>1</sup>, 岩上 猛\*<sup>2</sup>, 植田泰輔\*<sup>2</sup>, 木村良夫\*<sup>2</sup>, 今井一洋\*<sup>3</sup>, 四方田千佳子, 松田りえ子, 林讓: **HPLCにおける内部標準法の精度について**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 昭和大学薬学部

\*<sup>2</sup> 林純葉(株)

\*<sup>3</sup> 東京大学大学院薬学系研究科

河村葉子, 伊藤 誠\*<sup>1</sup>, 大野浩之\*<sup>2</sup>, 金子令子\*<sup>3</sup>, 河野政美\*<sup>4</sup>, 辰濃 隆\*<sup>5</sup>, 中村好志\*<sup>6</sup>, 馬場二夫\*<sup>7</sup>, 平山クニ\*<sup>8</sup>, 藤枝秀嘉\*<sup>9</sup>, 堀江正一\*<sup>10</sup>, 渡辺悠二\*<sup>11</sup>: **フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)およびフタル酸ジイソノニルの定性および定量**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 東洋製罐(株)

\*<sup>2</sup> 名古屋市衛生研究所

\*<sup>3</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>4</sup> 昭和ゴム(株)

\*<sup>5</sup> (財)日本食品衛生協会

\*<sup>6</sup> 静岡県立大学薬学部

\*<sup>7</sup> 武庫川女子大学

\*<sup>8</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>9</sup> (財)日本食品分析センター

\*<sup>10</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>11</sup> (財)化学技術戦略推進機構

大野浩之\*<sup>1</sup>, 河村葉子, 伊藤 誠\*<sup>2</sup>, 金子令子\*<sup>3</sup>, 河野政美\*<sup>4</sup>, 辰濃 隆\*<sup>5</sup>, 中村好志\*<sup>6</sup>, 馬場二夫\*<sup>7</sup>, 平山クニ\*<sup>8</sup>, 藤枝秀嘉\*<sup>9</sup>, 堀江正一\*<sup>10</sup>, 渡辺悠二\*<sup>11</sup>: **ジブチルスズ化合物: ガスクロマトグラフィー/質量分析による定量**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

- \*<sup>1</sup> 名古屋市衛生研究所
- \*<sup>2</sup> 東洋製罐(株)
- \*<sup>3</sup> 東京都立衛生研究所
- \*<sup>4</sup> 昭和ゴム(株)
- \*<sup>5</sup> (財)日本食品衛生協会
- \*<sup>6</sup> 静岡県立大学薬学部
- \*<sup>7</sup> 武庫川女子大学
- \*<sup>8</sup> 神奈川県衛生研究所
- \*<sup>9</sup> (財)日本食品分析センター
- \*<sup>10</sup> 埼玉県衛生研究所
- \*<sup>11</sup> (財)化学技術戦略推進機構

棚元憲一：局方収載微生物試験法の現状と国際調和  
日本防菌防黴学会主催「第18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 (2003.3)

大西(阿部)有希子, 杉本直樹, 久保田浩樹, 四方田千佳  
子, 棚元憲一：小麦粉及び小麦製品中の過酸化ベンゾ  
イルと安息香酸の分別定量  
日本食品衛生学会第85回学術講演会 (2003.5)

杉本直樹：天然添加物中の主成分の構造決定に関する研  
究  
日本食品衛生学会第85回学術講演会 (2003.5)

細涸和成\*, 棚元憲一：水系でのエンドトキシンの不活  
化  
日本防菌防黴学会第30回年次大会 (2003.5)  
\*東京都立産業技術研究所

浅井美里, 佐藤英一\*, 山崎 学, 山本茂貴, 五十君静  
信：Listeriolysin O関連遺伝子を発現させた組換え乳酸  
菌によるマウスへの免疫  
第75回日本細菌学会総会 (2002.4)  
東京農大

岡田由美子, 牧野壮一\*<sup>1</sup>, 岡田信彦\*<sup>2</sup>, 戸辺 亨\*<sup>3</sup>, 山  
崎省二\*<sup>4</sup>：Listeria monocytogenesにおけるrel遺伝子の  
発現調節機構  
第75回日本細菌学会総会 (2002.4)  
\*<sup>1</sup> 帯広畜産大学畜産学部  
\*<sup>2</sup> 北里大学薬学部  
\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院医学系研究科  
\*<sup>4</sup> 国立公衆衛生院衛生獣医部

河野享子\*, 五十君静信, 加納康正\*：Bifidobacterium  
longumに導入した志賀毒素1型Bサブユニット(Stx1B)  
遺伝子の発現  
第75回日本細菌学会総会 (2002.4)  
\*京都薬科大

Kelly, L. A.\*<sup>1</sup>, Fazil, A.\*<sup>2</sup>, Anderson, W.\*<sup>3</sup>, Kasuga, F.,  
Lammerding, A.\*<sup>2</sup>：WHO/FAO Risk Assessment for  
Salmonella in Broilers  
Third International Symposium on Salmonella and

salmonellosis (2002.5)

- \*<sup>1</sup> University of Strathclyde and Veterinary Laboratories  
Agency, UK
- \*<sup>2</sup> Health Canada
- \*<sup>3</sup> Food Safety Authority of Ireland

広田雅光, 伊藤嘉典, 春日文子：冷凍保存時における  
Vibrio parahaemolyticusの致死動態  
日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)

齊藤麻美\*<sup>1</sup>, 牧島満利子\*<sup>1</sup>, 佐野暁男\*<sup>1</sup>, 片山三重子\*<sup>1</sup>,  
角田光淳\*<sup>2</sup>, 森田師郎\*<sup>3</sup>, 中原理善\*<sup>1</sup>, 小林昌子\*<sup>1</sup>, 村  
松ミネ子\*<sup>1</sup>, 貞永明彦\*<sup>1</sup>, 波田野義純\*<sup>1</sup>, 宮崎晴久\*<sup>1</sup>,  
坂本卓雄\*<sup>1</sup>, 金子克忠\*<sup>1</sup>, 河原 章\*<sup>1</sup>, 皆川武人\*<sup>1</sup>, 春  
日文子：保育園における真菌の分布実態調査  
日本防菌防黴学会第29回年次大会 (2002.5)

- \*<sup>1</sup> 杉並保健所
- \*<sup>2</sup> 関東学院大学
- \*<sup>3</sup> 杉並区環境清掃部

宮崎晴久\*<sup>1</sup>, 森田師郎\*<sup>1</sup>, 中原理善\*<sup>1</sup>, 村松ミネ子\*<sup>1</sup>,  
貞永明彦\*<sup>1</sup>, 波田野義純\*<sup>1</sup>, 河原章\*<sup>1</sup>, 坂本卓雄\*<sup>1</sup>, 小  
林昌子\*<sup>1</sup>, 中村 実\*<sup>1</sup>, 金子克忠\*<sup>1</sup>, 皆川武人\*<sup>1</sup>, 齊藤  
麻美\*<sup>1</sup>, 牧島満利子\*<sup>1</sup>, 佐野暁男\*<sup>1</sup>, 片山三重子\*<sup>1</sup>, 角  
田光淳\*<sup>2</sup>, 春日文子：保育園の環境保健的対応に関する  
実地調査結果(続報)  
日本防菌防黴学会第29回年次大会 (2002.5)

- \*<sup>1</sup> 杉並保健所
- \*<sup>2</sup> 関東学院大学

春日文子, 広田雅光, 山本茂貴, 岩堀淳一郎\*<sup>1</sup>, 山本昭  
夫\*<sup>2</sup>, 横山理恵子\*<sup>3</sup>, 筒井俊之\*<sup>4</sup>, 大森牧子\*<sup>5</sup>, 藤川  
浩\*<sup>6</sup>：生卵摂取に伴うサルモネラ・エンテリティディス  
感染のリスクアセスメント対策案の効果の比較  
日本食品衛生学会第83回学術講演会 (2002.5)  
\*<sup>1</sup> 高知医科大学  
\*<sup>2</sup> 兵庫県立健康環境科学研究センター  
\*<sup>3</sup> 動物検疫所  
\*<sup>4</sup> 動物衛生研究所  
\*<sup>5</sup> 栃木県保健環境センター  
\*<sup>6</sup> 東京都衛生研究所

小島みゆき\*<sup>1</sup>, 都島康彦\*<sup>1</sup>, 小屋えな子\*<sup>1</sup>, 山田博之\*<sup>2</sup>,  
新井麻奈美\*<sup>3</sup>, 中川 弘\*<sup>3</sup>, 伊藤 武\*<sup>3</sup>, 春日文子：生  
活者視点に立ったキッチンの衛生対策  
日本防菌防黴学会第29回年次大会 (2002.5)  
\*<sup>1</sup> 花王株式会社  
\*<sup>2</sup> (財)栃木県保健衛生事業団  
\*<sup>3</sup> 東京顕微鏡院

五十君静信, 近藤美佳\*<sup>1</sup>, 浅井美里, 村上和雄\*<sup>1</sup>, 佐藤  
英一\*<sup>2</sup>, 山崎 学, 天野富美夫\*<sup>3</sup>, 山本茂貴：乳酸菌の  
菌体表層に発現したリステリオリジンOのJA-4細胞の  
食作用に与える影響  
第6回腸内細菌学会 (2002.5)

\*1 東京家政大

\*2 東京農大

\*3 大阪薬科大

大石金成\*, 渡辺正明\*, 斉藤美佳子\*, 松岡英明\*, 五十君静信: 蛍光グルコース・蛍光アミノ酸による食中毒菌の検出

第29回日本防菌防黴学会 (2002.5)

\*東京農工大

村松ミネ子\*, 坂本卓雄\*, 貞永明彦\*, 河原章\*, 皆川武人\*, 春日文字: 区立保育園における保育環境実態調査

東京都・特別区環境衛生職員研究会研究発表会 (2002.7)

\*杉並保健所

Kasuga, F.: Archiving of food samples from restaurants and caterers

1st International Conference on Microbiological Risk Assessment: Foodborne Hazards (2002.7)

五十君静信: サルモネラの病原性についての話題

第4回感染研・国立衛研・都衛研・動薬研技術連絡会議 (2002.7)

伊藤嘉典: 最近のマイコトキシンの現状

第29回カビ毒研究連絡会 (2002.8)

Strachan, N. J. C.\*, Kasuga, F., Ogden, I. D.\*: Application of a Dose Response model for *Escherichia coli* O157 to help explain foodborne outbreaks

Food Micro 2002 (2002.8)

\*University of Aberdeen, UK

福田賢\*, 辰巳宏樹\*, 五十君静信: 生物発光酵素免疫測定法を用いたサルモネラ検査キットの開発

第23回食品微生物学会学術総会 (2002.9)

\*キッコーマン(株)研究本部

山崎学, 天野富美夫\*<sup>1</sup>, 片山葉子\*<sup>2</sup>, 山本茂貴, 五十君静信: *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響

第23回食品微生物学会学術総会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 大阪薬科大

\*<sup>2</sup> 東京農工大

田中康仁\*<sup>1</sup>, 滝澤万紀子\*<sup>1</sup>, 五十君静信, 天野富美夫\*<sup>2</sup>: リポ多糖による RAW 264.7 マクロファージ細胞の PGHS-2 誘導に及ぼす各種非ステロイド系抗炎症剤の誘導促進効果とプロスタグランジン合成の阻害について

第75回日本生化学会大会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 国立感染研

\*<sup>2</sup> 大阪薬科大

渡辺正明\*, 小曾根郁子\*, 斎藤美佳子\*, 松岡英明\*, 五十君静信: バイオセルアッセイ法による食中毒菌の迅速測定

日本化学会バイオテクノロジー部会 (2002.9)

\*東京農工大

春日文字: 食中毒対策のツールとしての微生物学的リスクアセスメント

第134回日本獣医学会学術集会 (2002.9)

山本茂貴: 厚生サイドから見た HACCP の進展 (シンポジウム)

第23回日本食品微生物学会学術総会 (2002.9)

鈴木穂高, 土井邦雄\*: リンパ節欠損 (*aly/aly*) マウスにおける小腸上皮細胞間リンパ球 (IEL) subset の部位差

第134回日本獣医学会 (2002.9)

\*東京大学農学部

春日文字: 海外におけるリスクアセスメントの実例紹介—カキにおける腸炎ビブリオのリスクアセスメント: FDA

第11回獣疫学会学術集会 (2002.9)

永田貴之\*, 鈴木穂高, 黒澤明日香\*, ポアポラテップ・アムナート\*, 上塚浩司\*, 中山裕之\*, 土井邦雄\*: T-2 トキシン経口投与マウスのリンパ系組織におけるリンパ球サブセットの変動

第134回日本獣医学会 (2002.9)

\*東京大学農学部

奥谷晶子, 五十君静信: リステリアの薬剤感受性および国内の食品別汚染状況実態調査について—一文献調査報告—

第5回感染研・動薬検・都衛研・国衛研技術連絡会議 (2002.10)

岡田由美子, 山本茂貴, 五十君静信: リステリアの高食塩濃度耐性機構について

第5回感染研・動薬検・都衛研・国衛研技術連絡会議 (2002.10)

山崎学, 天野富美夫\*, 山本茂貴, 五十君静信: 好気ストレスが嫌気条件下で培養した *Campylobacter jejuni* に及ぼす影響

日本細菌学会関東支部会 (2002.11)

\*大阪薬科大

岩堀淳一郎\*<sup>1</sup>, 山本昭夫\*<sup>2</sup>, Vuddhakul, V.\*<sup>3</sup>, Kalnawakul, S.\*<sup>3</sup>, Chowdhury, A.\*<sup>4</sup>, 重松美加\*<sup>5</sup>, 小坂健\*<sup>5</sup>, 豊福肇\*<sup>6</sup>, 春日文字, 山本茂貴, 西淵光昭\*<sup>4</sup>: タイ南部における赤貝の摂食に伴う腸炎ビブリオ感染の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における国際協力

日本リスク研究学会研究発表会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 高知医科大学

\*<sup>2</sup> 兵庫県立健康環境科学研究センター

\*<sup>3</sup> Prince of Songkla University, Thailand

\*<sup>4</sup> 京都大学

\*<sup>5</sup> 国立感染症研究所

\*<sup>6</sup> WHO Department of Food Safety

Yamamoto, A. \*<sup>1</sup>, Iwahori, J. \*<sup>2</sup>, Shigematsu, M. \*<sup>3</sup>, Osaka, K. \*<sup>3</sup>, Toyofuku, H. \*<sup>4</sup>, Kasuga, F., Nishibuchi, M. \*<sup>5</sup> : **Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrio arahaemolyticus* in southern Thailand**

The 37th Joint Conference of U.S. - Japan Cooperative Medical Science Program, Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel (2002. 12)

\*<sup>1</sup> 兵庫県立健康環境科学研究センター

\*<sup>2</sup> 高知医科大学

\*<sup>3</sup> 国立感染症研究所

\*<sup>4</sup> WHO Department of Food Safety

\*<sup>5</sup> 京都大学

五十君静信, 天野富美夫\* : **サルモネラのDNA結合タンパクの性質について**

第6回感染研・動薬検・都衛研・国立衛研技術連絡会議 (2003. 1)

\*大阪薬科大

春日文子 : **FAO/WHOならびにCodexの動向ーリスクアナリシス**

日本防菌防黴学会微生物制御システム研究部会公開講演会 (2003. 2)

五十君静信 : **コレラ菌の検出法**

地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会 (2003. 2)

五十君静信 : **乳酸菌を応用した感染症対策**

第135回日本獣医学会微生物学分科会ワークショップ (2003. 3)

岡田由美子, 牧野壮一\*, 五十君静信, 山本茂貴 : **高食塩濃度下における *Listeria* の遺伝子発現について**

第76回日本細菌学会総会 (2003. 4)

\*帯広畜産大学畜産学部

奥谷晶子, 岡田由美子, 山本茂貴, 五十君静信 : **日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベイランス**

第76回日本細菌学会総会 (2003. 4)

山崎 学, 天野富美夫\*, 山本茂貴, 五十君静信 : ***Campylobacter jejuni* の酸化ストレス応答タンパク質の同定**

第76回日本細菌学会総会 (2003. 4)

\*大阪薬科大

梶川揚申\*, 五十君静信, 佐藤英一\* : **Intiminを抗原とする組換え乳酸菌の経口ワクチンモデル**

2003年度日本農芸化学会大会 (2003. 4)

\*東京農大

Kumazawa Y. \*, Takimoto H. \*, Kawahara K. \*, Muroi M., Tanamoto K. : **Different responses of macrophages via TLR4 to tetrasaccharide-type glycosphingolipids from *Sphingomonas***

7th Conference of the International Endotoxin Society (2002. 7)

\*北里大学

Muroi, M., Ohnishi, T., and Tanamoto, K. : **MD-2 is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A**

7th Conference of the International Endotoxin Society (2002. 7)

Ohnishi, T., Muroi, M., and Tanamoto, K. : **The function of N-linked glycosylations at Asn<sup>26</sup> and Asn<sup>114</sup> of human MD-2 on Toll-like receptor 4-mediated signal transduction**

7th Conference of the International Endotoxin Society (2002. 7)

畑尾史彦\*, 比企直樹\*, 小川利久\*, 小島淳一\*, 三村芳和\*, 上西紀夫\*, 室井正志, 棚元憲一 : **Endotoxin tolerance に対する交感神経β受容体刺激の影響**

第39回日本外科代謝栄養学会 (2002. 7)

\*東京大学

室井正志, 大西貴弘, 棚元憲一 : **Toll-like receptor を介するNF-κBの活性化に必須なCD14分子の機能的部位の探索**

第8回日本エンドトキシン研究会 (2002. 11)

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一 : **Toll-like receptor 4の膜発現に重要なN-グリコシル化におけるMD-2の役割**

第8回日本エンドトキシン研究会 (2002. 11)

畑尾史彦\*, 比企直樹\*, 小島淳一\*, 小川利久\*, 三村芳和\*, 上西紀夫\*, 室井正志, 棚元憲一 : **Endotoxin tolerance に対する交感神経β受容体刺激の影響**

第8回日本エンドトキシン研究会 (2002. 11)

\*東京大学

杉山圭一, 室井正志, 棚元憲一 : **LPSによるマクロファージ活性化に与える内分泌かく乱物質の影響**

第76回日本細菌学会総会 (2003. 4)

志水美文, 室井正志, 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化学物質の作用機序**

第76回日本細菌学会総会 (2003. 4)

室井正志, 大西貴弘, 棚元憲一 : **Toll-like receptor を**

介するシグナル伝達に必須なマウス CD14 分子の機能的部位の解析

第76回日本細菌学会総会 (2003.4)

大西貴弘, 室井正志, 棚元憲一: Toll-like receptor 4 の膜発現における MD-2 の役割

第76回日本細菌学会総会 (2003.4)

宮原美知子, 松下 秀\*<sup>1</sup>, 甲斐明美\*<sup>1</sup>, 柳川敬子\*<sup>2</sup>, 沖津忠行\*<sup>3</sup>, 内村眞佐子\*<sup>4</sup>, 田中廣行\*<sup>5</sup>, 中川 弘\*<sup>6</sup>, 佐々木 直\*<sup>7</sup>, 小林一寛\*<sup>8</sup>, 小川博美\*<sup>9</sup>, 村瀬 稔\*<sup>10</sup>, 片山 淳\*<sup>11</sup>, 安形則雄\*<sup>12</sup>, 斉藤紀行\*<sup>13</sup>, 山内昭則\*<sup>14</sup>, 尾崎延芳\*<sup>15</sup>, 八柳 潤\*<sup>16</sup>, 村上光一\*<sup>17</sup>, 大友良光\*<sup>18</sup>, 山口仁孝\*<sup>19</sup>, 小笠原邦敏\*<sup>20</sup>, 宮城和文\*<sup>21</sup>, 仁科徳啓\*<sup>22</sup>, 寺嶋 淳\*<sup>23</sup>, 田村和満\*<sup>23</sup>, 小沼博隆: 赤痢菌検査法の設定に関する研究 1. コラボレーティブスタディ結果について

第23回日本食品微生物学会学術総会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>3</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>4</sup> 千葉県衛生研究所

\*<sup>5</sup> (財)日本食品分析センター

\*<sup>6</sup> (財)東京顕微鏡院

\*<sup>7</sup> (財)日本冷凍食品検査協会

\*<sup>8</sup> 大阪府公衆衛生研究所

\*<sup>9</sup> 広島県保健環境センター

\*<sup>10</sup> 神戸市環境保健研究所

\*<sup>11</sup> 山口県環境保健研究センター

\*<sup>12</sup> 名古屋市衛生研究所

\*<sup>13</sup> 宮城県保健環境センター

\*<sup>14</sup> 三重県科学技術振興センター

\*<sup>15</sup> 福岡市保健環境研究所

\*<sup>16</sup> 秋田県衛生研究所

\*<sup>17</sup> 福岡県環境保健研究所

\*<sup>18</sup> 青森県環境保健センター

\*<sup>19</sup> 長崎県衛生公害研究所

\*<sup>20</sup> 輸入食品・検疫検査センター (横浜)

\*<sup>21</sup> 輸入食品・検疫検査センター (神戸)

\*<sup>22</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>23</sup> 国立感染症研

宇田川藤江\*, 田中廣行\*, 高須一重\*, 丹野憲二\*, 宮原美知子, 小沼博隆: 自動PCR細菌検査システムによるサルモネラの迅速検出法に関する検討

第23回日本食品微生物学会学術総会 (2002.9)

\* (財)日本食品分析センター

長谷川順子\*<sup>1</sup>, 仁科徳啓\*<sup>1</sup>, 三輪憲永\*<sup>2</sup>, 増田高志\*<sup>2</sup>, 宮原美知子, 小沼博隆: Enterohemolysin 培地での *Shigella* spp. の溶血活性

第23回日本食品微生物学会学術総会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>2</sup> 静岡県環境衛生科学研究所

宮原美知子, 小沼博隆: 赤痢菌の保存における消長について

第123回日本薬学会 (2003.3)

宮原美知子, 小沼博隆: 赤痢菌と大腸菌のPCRによる同定法の検討

第76回日本細菌学会総会 (2003.4)

宮原美知子, 小沼博隆: 食品からの赤痢菌検出感度  
日本食品衛生学会第85回学術講演会 (2003.5)

宮原美知子, 小沼博隆: 腸管出血性大腸菌とサルモネラの野菜での増殖挙動

第30回日本防菌防黴学会年次大会 (2003.5)

松谷佐知子: IS1 遺伝子の転写制御機構

Workshop for Lateral DNA Transfer-From DNA conjugation to evolution (2002.10)

松谷佐知子: 細菌の挿入因子 IS1 の転写装置と進化

第25回日本分子生物学会年会 (2002.12)

工藤由起子: 食品中における腸管出血性大腸菌の凍結損傷とその検出

第29回日本防菌防黴学会 (2002.5)

工藤由起子: 腸炎ビブリオ食中毒防止のための1999年以降の対策とその効果

第134回日本獣医学会 (2002.9)

HARA-KUDO, Y., NISHINA\*<sup>1</sup>, T., NAKAGAWA\*<sup>2</sup>, H., KONUMA, H. AND KUMAGAI, S.\*<sup>3</sup>: An Improved Detection Method of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods using Modified Enrichment and a New Chromogenic Agar Medium

27th World Veterinary Congress (2002.9)

\*<sup>1</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>2</sup> 財団法人東京顕微鏡院

\*<sup>3</sup> 東京大学院農生命

工藤由起子, 杉山寛治\*<sup>1</sup>, 西淵光昭\*<sup>2</sup>, Ashrafuzzaman Chowdhury\*<sup>2</sup>, 大友良光\*<sup>3</sup>, 八柳 潤\*<sup>4</sup>, 中川 弘\*<sup>5</sup>, 仁科徳啓\*<sup>6</sup>, 斎藤章暢\*<sup>7</sup>, 長野英俊\*<sup>8</sup>, 宮原美知子, 小沼博隆, 熊谷 進\*<sup>9</sup>: 国内産魚介類におけるTDH産生性腸炎ビブリオ菌数の定量と分離菌株の解析

第36回腸炎ビブリオシンポジウム (2002.12)

\*<sup>1</sup> 静岡環境衛生科学研究所

\*<sup>2</sup> 京都大学

\*<sup>3</sup> 青森県環境保健センター国立感染症研究所

\*<sup>4</sup> 秋田県衛生科学研究所

\*<sup>5</sup> 財団法人東京顕微鏡院

\*<sup>6</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>7</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>8</sup> 福岡県保健環境研究所

\*<sup>9</sup> 東京大学院農生命

工藤由起子, 杉山寛治\*<sup>1</sup>, 西渕光昭\*<sup>2</sup>, Ashrafuzzaman Chowdhury\*<sup>2</sup>, 大友良光\*<sup>3</sup>, 八柳 潤\*<sup>4</sup>, 中川 弘\*<sup>5</sup>, 仁科徳啓\*<sup>6</sup>, 斎藤章暢\*<sup>7</sup>, 長野英俊\*<sup>8</sup>, 宮原美知子, 小沼博隆, 熊谷 進\*<sup>9</sup>: **国内産魚介類からのTDH産生性腸炎ビブリオの検出と分離菌株の解析**

日本食品衛生学会第85回学術講演会 (2003.5)

\*<sup>1</sup> 静岡環境衛生科学研究所

\*<sup>2</sup> 京都大学

\*<sup>3</sup> 青森県環境保険センター国立感染症研究所

\*<sup>4</sup> 秋田県衛生科学研究所

\*<sup>5</sup> 財団法人東京顕微鏡院

\*<sup>6</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>7</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>8</sup> 福岡県保険環境研究所

\*<sup>9</sup> 東京大学院農生命

大河内美穂\*<sup>1</sup>, 工藤由起子, 平山和宏\*<sup>1</sup>, 熊谷 進\*<sup>1</sup>: **腸炎ビブリオの低浸透圧耐性**

第29回日本防菌防黴学会 (2002.5)

\*<sup>1</sup> 東京大学大学院

林谷秀樹\*<sup>1</sup>, 佐伯和美\*<sup>1</sup>, 木下寿和奈\*<sup>1</sup>, 野村義宏\*<sup>1</sup>, OKATANIA.TOMOMITSU\*<sup>1</sup>, 堀北哲也\*<sup>1</sup>, 堀坂知子\*<sup>1</sup>, 工藤由起子, 熊谷 進\*<sup>2</sup>, 金子賢一\*<sup>1</sup>: **病原性 *Yersinia enterocolitica* の熱抵抗性ならびに菌体脂肪酸組成に関する研究**

第83回日本食品衛生学会 (2002.5)

\*<sup>1</sup> 東京農工大学農学部

\*<sup>2</sup> 東京大学大学院

杉山寛治\*<sup>1</sup>, 大友良光\*<sup>2</sup>, 八柳 潤\*<sup>3</sup>, 斎藤章暢\*<sup>4</sup>, 長野英俊\*<sup>5</sup>, 中川 弘\*<sup>6</sup>, 仁科徳啓\*<sup>7</sup>, Ashrafuzzaman Chowdhury\*<sup>8</sup>, 西渕光昭\*<sup>8</sup>, 宮原美知子, 小沼博隆, 工藤由起子, 熊谷 進\*<sup>9</sup>: **国内産魚介類の腸炎ビブリオ汚染実態**

第83回日本食品衛生学会 (2002.5)

\*<sup>1</sup> 静岡環境衛生科学研究所

\*<sup>2</sup> 京都大学

\*<sup>3</sup> 青森県環境保険センター国立感染症研究所

\*<sup>4</sup> 秋田県衛生科学研究所

\*<sup>5</sup> 財団法人東京顕微鏡院

\*<sup>6</sup> 東海大学短期大学部静岡校

\*<sup>7</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>8</sup> 福岡県保険環境研究所

\*<sup>9</sup> 東京大学院農生命

林谷秀樹\*<sup>1</sup>, 佐伯和美\*<sup>1</sup>, 野村義宏\*<sup>1</sup>, Okatani Alexandre Tomomitsu\*<sup>1</sup>, 堀北哲也\*<sup>1</sup>, 堀坂知子\*<sup>1</sup>, 金子賢一\*<sup>1</sup>, 工藤由起子, 熊谷進\*<sup>2</sup>: **病原性 *Yersinia enterocolitica* の熱抵抗性と菌体脂肪酸組成に関する研究**

第134回日本獣医学会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 東京農工大学農学部

\*<sup>2</sup> 東京大学大学院

Tsuchiya, T.\*<sup>1</sup>, Umeda, M.\*<sup>2</sup>, Nishiyama, H.\*<sup>3</sup>, Yoshimura, I.\*<sup>3</sup>, Sakai, A., Tanaka, N.\*<sup>3</sup>, and co-authors: **The 2nd validation study in Japan on the modified two-stage transformation assay employing BALB/c 3T3 cells**

Fourth World Congress: Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2002.8)

\*<sup>1</sup> 萬有製薬(株)

\*<sup>2</sup> (財)食品薬品安全センター

\*<sup>3</sup> 東京理科大学工学部

大森清美\*<sup>1</sup>, 梅田 誠\*<sup>2</sup>, 高木弘毅\*<sup>3</sup>, 吉村 功\*<sup>4</sup>, 佐々木澄志\*<sup>2</sup>, 浅田 晋\*<sup>2</sup>, 田中憲穂\*<sup>2</sup>, 酒井綾子, 中村好志\*<sup>5</sup>, 大石英俊\*<sup>6</sup>, 鷺塚昌隆\*<sup>7</sup>, 荒木春美\*<sup>8</sup>, 鬼頭暢子\*<sup>8</sup>, 矢島 聡\*<sup>9</sup>, 浅倉眞澄\*<sup>10</sup>, 中村 哲\*<sup>11</sup>, 嶋田佐和子\*<sup>12</sup>, 宇野芳文\*<sup>13</sup>, 馬場 博\*<sup>13</sup>, 山本康人\*<sup>14</sup>, 伏脇裕一\*<sup>1</sup>, 土屋敏行\*<sup>15</sup>: **発癌プロモーター簡易検出法 Bhas assay の研究室間バリデーション・スタディー (その1)**

日本環境変異原学会第31回大会 (2002.11)

\*<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>2</sup> (財)食品薬品安全センター

\*<sup>3</sup> アベンティスファーマ(株)

\*<sup>4</sup> 東京理科大学工学部

\*<sup>5</sup> 静岡県立大学薬学部

\*<sup>6</sup> 大日本製薬(株)

\*<sup>7</sup> ゼリア新薬工業(株)

\*<sup>8</sup> 富山化学工業(株)

\*<sup>9</sup> 高砂香料工業(株)

\*<sup>10</sup> 日本バイオアッセイセンター

\*<sup>11</sup> キャノン(株)

\*<sup>12</sup> (財)食品農医薬品安全性評価センター

\*<sup>13</sup> 三菱ウエルファーマ(株)

\*<sup>14</sup> ライオン(株)

\*<sup>15</sup> 萬有製薬(株)

高木弘毅\*<sup>1</sup>, 吉村 功\*<sup>2</sup>, 大森清美\*<sup>3</sup>, 梅田 誠\*<sup>4</sup>, 佐々木澄志\*<sup>4</sup>, 浅田 晋\*<sup>4</sup>, 田中憲穂\*<sup>4</sup>, 酒井綾子, 中村好志\*<sup>5</sup>, 大石英俊\*<sup>6</sup>, 鷺塚昌隆\*<sup>7</sup>, 荒木春美\*<sup>8</sup>, 鬼頭暢子\*<sup>8</sup>, 矢島 聡\*<sup>9</sup>, 浅倉眞澄\*<sup>10</sup>, 中村 哲\*<sup>11</sup>, 嶋田佐和子\*<sup>12</sup>, 宇野芳文\*<sup>13</sup>, 馬場 博\*<sup>13</sup>, 山本康人\*<sup>15</sup>, 伏脇裕一\*<sup>3</sup>, 土屋敏行\*<sup>15</sup>: **バリデーション研究の泣き所 施設間差は実験手技から?**

第16回日本動物実験代替法学会大会 (2002.12)

\*<sup>1</sup> アベンティスファーマ(株)

\*<sup>2</sup> 東京理科大学工学部

\*<sup>3</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>4</sup> (財)食品薬品安全センター

\*<sup>5</sup> 静岡県立大学薬学部

\*<sup>6</sup> 大日本製薬(株)

\*<sup>7</sup> ゼリア新薬工業(株)

\*<sup>8</sup> 富山化学工業(株)

\*<sup>9</sup> 高砂香料工業(株)

\*<sup>10</sup> 日本バイオアッセイセンター

\*<sup>11</sup> キャノン(株)

\*<sup>12</sup> (財)食品農医薬品安全性評価センター

\*13 三菱ウエルファーマ(株)

\*14 ライオン(株)

\*15 萬有製薬(株)

土屋敏行\*1, 梅田 誠\*2, 西山 智\*3, 吉村 功\*4, 酒井綾子他: BALB/c 3T3細胞を用いる改良形質転換試験の有用性評価: 第2回共同研究報告

第16回日本動物実験代替法学会大会 (2002. 12)

\*1 萬有製薬(株)

\*2 (財)食品医薬品安全センター

\*3 アベンティスファーマ(株)

\*4 東京理科大学工学部

大森清美\*1, 梅田 誠\*2, 高木弘毅\*3, 吉村 功\*4, 佐々木澄志\*2, 浅田晋\*2, 田中憲穂\*2, 酒井綾子, 中村好志\*5, 大石英俊\*6, 鷲塚昌隆\*7, 荒木春美\*8, 鬼頭暢子\*8, 矢島 聡\*9, 浅倉真澄\*10, 中村 哲\*11, 嶋田佐和子\*12, 宇野芳文\*13, 馬場 博\*13, 山本康人\*14, 伏脇裕一\*1, 土屋敏行\*15: 発がんプロモーター簡易検出法 Bhas assayの開発・応用と研究室間バリデーション・スタディー

第16回日本動物実験代替法学会大会 (2002. 12)

\*1 神奈川県衛生研究所

\*2 (財)食品医薬品安全センター

\*3 アベンティスファーマ(株)

\*4 東京理科大学工学部

\*5 静岡県立大学薬学部

\*6 大日本製薬(株)

\*7 ゼリア新薬工業(株)

\*8 富山化学工業(株)

\*9 高砂香料工業(株)

\*10 日本バイオアッセイセンター

\*11 キヤノン(株)

\*12 (財)食品農医薬品安全性評価センター

\*13 三菱ウエルファーマ(株)

\*14 ライオン(株)

\*15 萬有製薬(株)

菊池 裕, 掛谷知志, 高鳥浩介, 中村尚登\*1, 松田治男\*1, 山崎 壮, 棚元憲一, 澤田純一: ヒト・グリオーマ細胞の蛋白質分解酵素抵抗性プリオン蛋白質産生機構の解析

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

\*1 広島大学

掛谷知志, 菊池裕, 高鳥浩介, 山崎壮, 棚元憲一, 澤田純一: ヒト・グリオブラストーマ細胞株 T98G における熱ショックによるプリオン蛋白質の発現

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

小西良子, 小林一夫, 鈴木嘉彦\*1: 授乳を介したダイオキシンの曝露がリステリア感染に及ぼす影響

第9回日本免疫毒性学会 (2002.9)

\*1 麻布大学獣医学部

Sugita-Konishi, Y., Poapolathep, A.\*1, Yamamoto, S.\*2,

Doi, K.\*1 and Kumagai, S.\*1: Comparison of the fates of nivalenol and fusarenon-X in mice

37<sup>th</sup> Joint Panel Meeting, United states-Japan cooperative program on development and utilization of natural resources (2002. 11)

\*1 東京大学大学院

\*2 国立衛研食品衛生管理部

Takatori, T., Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T.\*1, Sunagawa, H.\*2, Yoshizawa, T.\*3, Kumagai, S.\*4: Provisional level of deoxynivalenol (DON) in wheat in Japan

37<sup>th</sup> Joint Panel Meeting, United states-Japan cooperative program on development and utilization of natural resources. (2002. 11)

\*1 神戸市環境保健研究所

\*2 北海道衛生研究所

\*3 香川大学農学部

\*4 東京大学大学院

小西良子, Pestka, J.J.\*1: ディオキシニバレノールのヒトマクロファージにおける炎症性サイトカインの産生に及ぼす影響

日本食品衛生学会 (2002. 11)

\*1 ミシガン州立大学

小西良子: 感染症防御システムとトリコテセンマイコトキシン

マイコトキシン研究会 第53学術講演会 (2003. 1)

塚崎 匡\*1, 薩 秀夫\*1, 小西良子, 清水 誠\*1: 腸管上皮細胞 Caco-2 におけるトリブチルスズ (TBT) に透過・吸収の食品成分による制御

日本農芸化学会大会 (2003. 4)

\*1 東京大学大学院

小林一夫, 服部 誠\*1, 工藤由起子, 山本茂貴\*2, 小西良子: 食中毒菌に対するオボムチン由来糖ペプチドの結合能

日本農芸化学会大会 (2003. 4)

\*1 東京農工大学

\*2 国立衛研 食品衛生管理部

中島 耕平\*1, 小西良子, 小林一夫, 好田 正\*1, 服部誠\*1: 牛乳グリコマクロペプチドの腸管感染予防効果

日本農芸化学会大会 (2003. 4)

\*1 東京農工大学

Poapolathep, A.\*1, Sugita-Konishi, Y., Doi, K.\*1 and Kumagai, S.\*1: Changes in lymphocyte subsets and apoptosis in lymphoid tissues of nivalenol-treated mice

42nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, March 9-13, 2003 at the Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah. (2003. 3)

\*1 東京大学大学院

奥田晴宏：新医薬品等の承認申請資料等に関する留意事項について—品質・非臨床分野を中心に—  
第13回新薬審査部門定期説明会 (2002. 6)

Okuda, H. : Current Approval system & Requirement for Quality Information  
ABPI Japanese CMC/Quality Forum (2003. 3)

福原 潔, 中西郁夫\*<sup>1</sup>, 袴田 航, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 寒水壽郎, 島田知一\*<sup>2</sup>, 木村光宏\*<sup>2</sup>, 山口健太郎\*<sup>3</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 宮田直樹\*<sup>3</sup>, 奥田晴宏：抗酸化作用の増強を目的とした平面型カテキンの開発

第9回日本がん予防研究会 (2002. 7)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 千葉大学分析センター

\*<sup>4</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫\*<sup>1</sup>, 福原 潔, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 田草川光子\*<sup>1</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 小西利史\*<sup>4</sup>, 藤塚 守\*<sup>5</sup>, 伊藤 攻\*<sup>4</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 宮田直樹\*<sup>6</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>：フラレン内包 $\beta$ -および $\gamma$ -シクロデキストリン錯体の光DNA切断活性

第23回フラレン・ナノチューブ総合シンポジウム (2002. 7)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

\*<sup>4</sup> 東北大学多元物質科学研究所

\*<sup>5</sup> 大阪大学産業科学研究所

\*<sup>6</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 福原 潔：抗酸化剤に由来するフェノキシラジカルと金属イオンとの相互作用

第52回錯体化学討論会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 福原 潔：抗酸化剤ラジカル中間体のキャラクタリゼーション

第17回生体機能関連化学シンポジウム (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 袴田 航, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 奥田晴宏, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 福原 潔, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>：抗酸化剤ラジカル中間体のスピン分布

第41回ESR 討論会・第7回In vivo ESR研究会連合討論

会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

宮崎健太郎\*<sup>1</sup>, 中西郁夫\*<sup>2</sup>, 島田知一\*<sup>1</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 浦野四郎\*<sup>1</sup>, 奥田晴宏, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 福原 潔, 伊古田暢夫\*<sup>2</sup>, 小澤俊彦\*<sup>2</sup>：カテキンのラジカル消去機構  
第41回ESR 討論会・第7回In vivo ESR研究会連合討論会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>2</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

小山裕孝\*<sup>1</sup>, 袴田 航, 福原 潔, 永川真希\*<sup>1</sup>, 望月正隆\*<sup>1</sup>, 宮田直樹\*<sup>2</sup>, 奥田晴宏：スチルベン骨格を有する化合物のDNA切断活性

第46回日本薬学会関東支部大会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 共立薬科大学

\*<sup>2</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 袴田 航, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>, 宮田直樹\*<sup>4</sup>, 奥田晴宏：フラボノイド系抗酸化剤のラジカル消去能とプロオキシダント効果

第46回日本薬学会関東支部大会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

\*<sup>4</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 福原 潔：フラボノイド類の水素移動反応機構

第16回基礎有機化学連合討論会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 奥田晴宏, 宮田直樹\*：平面型カテキンの抗酸化作用の評価

日本癌学会第61回総会 (2002. 10)

\* 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 中西郁夫\*<sup>1</sup>, 宮崎健太郎\*<sup>2</sup>, 島田知一\*<sup>2</sup>, 袴田 航, 大久保 敬\*<sup>3</sup>, 浦野四郎\*<sup>2</sup>, 福住俊一\*<sup>3</sup>, 伊古田暢夫\*<sup>1</sup>, 小澤俊彦\*<sup>1</sup>, 宮田直樹\*<sup>4</sup>, 奥田晴宏：フェノール性抗酸化剤からの活性酸素生成

環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所

\*<sup>2</sup> 芝浦工業大学応用化学科

\*<sup>3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

\*<sup>4</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

福原 潔, 袴田 航, 奥田晴宏: ムスク系香料の光照射による活性酸素生成  
環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

村田真理子<sup>\*1</sup>, 大西志保<sup>\*1</sup>, 宮田直樹<sup>\*2</sup>, 福原 潔, 川西正祐<sup>\*1</sup>: 発がん性大気汚染物質ニトロピレン類による酸化的DNA損傷  
環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)  
<sup>\*1</sup> 三重大学医学部  
<sup>\*2</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮崎健太郎<sup>\*1</sup>, 中西郁夫<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 袴田 航, 浦野四郎<sup>\*1</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*2</sup>, 小澤俊彦<sup>\*2</sup>, 奥田晴宏, 福原 潔: ビタミンE類縁体アニオンの酸化反応機構  
第35回酸化反応討論会 (2002. 11)  
<sup>\*1</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*2</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*2</sup>, 袴田 航, 島田知一<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 浦野四郎<sup>\*2</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 小沢俊彦<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏: 平面型カテキンのラジカル消去能とプロオキシダント効果  
第35回酸化反応討論会 (2002. 11)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宇都義浩<sup>\*2</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*3</sup>, 福原 潔, 奥田晴宏, 浦野四郎<sup>\*3</sup>, 田草川光子<sup>\*1</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 永沢秀子<sup>\*2</sup>, 堀 均<sup>\*2</sup>: アルテピリンCの酸化反応機構  
第35回酸化反応討論会 (2002. 11)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 徳島大学工学部  
<sup>\*3</sup> 芝浦工業大学応用化学科

福原 潔, 中西郁夫<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏, 宮田直樹<sup>\*2</sup>: フェノール性化合物による酸化的DNA損傷  
第17回日本フリーラジカル学会関東支部研究会 (2002. 12)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

長江 修<sup>\*</sup>, 福原 潔, 宮田直樹<sup>\*</sup>: 光照射によるニトロベンゼン誘導体からの一酸化窒素 (NO) の発生  
平成14年度日本薬学会東海支部例会 (2002. 12)  
<sup>\*</sup> 名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 飯塚優子<sup>\*4</sup>, 稲見圭子<sup>\*4</sup>, 浦野四郎<sup>\*2</sup>, 奥田晴宏, 望月正隆<sup>\*4</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 福原 潔, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>: ビタミンE類縁体の金属イオン存在下におけるラジカル消去反応

第14回ビタミンE研究会 (2003. 1)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科  
<sup>\*4</sup> 共立薬科大学

宮崎健太郎<sup>\*1</sup>, 中西郁夫<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 袴田 航, 浦野四郎<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 福原 潔, 小澤俊彦<sup>\*2</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*2</sup>: ビタミンE類縁体アニオンの酸化反応挙動  
第14回ビタミンE研究会 (2003. 1)  
<sup>\*1</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*2</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

宮崎健太郎<sup>\*1</sup>, 中西郁夫<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 袴田 航, 浦野四郎<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*2</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*2</sup>, 宮田直樹<sup>\*4</sup>, 福原 潔: 平面型カテキン類縁体のペルオキシラジカル消去能  
日本化学会第83春季年会 (2003. 3)  
<sup>\*1</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*2</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科  
<sup>\*4</sup> 名古屋私立大学大学院薬学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宇都義浩<sup>\*2</sup>, 薬丸晴子<sup>\*2</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*3</sup>, 大久保 敬<sup>\*4</sup>, 浦野四郎<sup>\*3</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 福住俊一<sup>\*4</sup>, 福原 潔, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 永沢秀子<sup>\*2</sup>, 堀 均<sup>\*2</sup>: 4-ヒドロキシケイ皮酸誘導体のラジカル消去機構  
日本化学会第83春季年会 (2003. 3)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 徳島大学工学部  
<sup>\*3</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*4</sup> 大阪大学大学院工学研究科

宮崎健太郎<sup>\*1</sup>, 中西郁夫<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 浦野四郎<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*2</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*2</sup>, 福原 潔: 塩基性条件下におけるフラボノイド系抗酸化剤による活性酸素生成  
日本化学会第83春季年会 (2003. 3)  
<sup>\*1</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*2</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 浦野四郎<sup>\*2</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 福原 潔, 上田順市<sup>\*1</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>: フラボノイド系抗酸化剤の酸化還元挙動  
日本化学会第83春季年会 (2003. 3)  
<sup>\*1</sup> 放射線医学総合研究所  
<sup>\*2</sup> 芝浦工業大学応用化学科  
<sup>\*3</sup> 大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 中西郁夫<sup>\*1</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏, 宮田

直樹<sup>\*2</sup>：芳香族ニトロ化合物の光分解：NOの生成を伴う酸化的DA鎖切断反応

日本化学会第83春季年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>放射線医学総合研究所

<sup>\*2</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科

袴田 航, 福原 潔, 奥田晴宏：合成低分子プローブを用いたグリコシダーゼの基質認識機構の解析と阻害剤設計への応用

日本薬学会第123年会, 長崎 (2003.3)

小山祐孝<sup>\*</sup>, 袴田 航, 福原 潔, 望月正隆<sup>\*</sup>, 奥田晴宏：スチルベン骨格を有する化合物 (タモキシフェンおよびそれらの誘導体) のDNA切断活性

日本薬学会第123年会, 長崎 (2003.3)

<sup>\*</sup>共立薬科大学

長江 修<sup>\*</sup>, 福原 潔, 宮田直樹<sup>\*</sup>：NO放出化合物としてのニトロベンゼン誘導体の合成

日本薬学会第123年会 (2003.3)

<sup>\*</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宇都義浩<sup>\*2</sup>, 薬丸晴子<sup>\*2</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*3</sup>, 大久保 敬<sup>\*4</sup>, 浦野四郎<sup>\*3</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 福原 潔, 福住俊一<sup>\*4</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 永沢秀子<sup>\*2</sup>, 堀均<sup>\*2</sup>：アルテピリンCのラジカル消去反応に及ぼす金属イオンの効果

日本薬学会第123年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>放射線医学総合研究所

<sup>\*2</sup>徳島大学工学部

<sup>\*3</sup>芝浦工業大学応用化学科

<sup>\*4</sup>大阪大学大学院工学研究科

中西郁夫<sup>\*1</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 浦野四郎<sup>\*2</sup>, 奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 福原 潔, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>：電子移動を経由する(+)−カテキンのラジカル消去反応機構

日本薬学会第123年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>放射線医学総合研究所

<sup>\*2</sup>芝浦工業大学応用化学科

<sup>\*3</sup>大阪大学大学院工学研究科

福原 潔, 中西郁夫<sup>\*1</sup>, 袴田 航, 寒水壽郎, 島田知一<sup>\*2</sup>, 宮崎健太郎<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 山口健太郎<sup>\*4</sup>, 浦野四郎<sup>\*2</sup>, 小澤俊彦<sup>\*1</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 宮田直樹<sup>\*5</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*1</sup>, 奥田晴宏：平面型カテキン誘導体の合成とラジカル消去能

日本薬学会第123年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>放射線医学総合研究所

<sup>\*2</sup>芝浦工業大学応用化学科

<sup>\*3</sup>大阪大学大学院工学研究科

<sup>\*4</sup>千葉大学分析センター

<sup>\*5</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科

宮崎健太郎<sup>\*1</sup>, 中西郁夫<sup>\*2</sup>, 大久保 敬<sup>\*3</sup>, 浦野四郎<sup>\*1</sup>,

奥田晴宏, 小澤俊彦<sup>\*2</sup>, 伊古田暢夫<sup>\*2</sup>, 福住俊一<sup>\*3</sup>, 福原 潔：Quercetinとその誘導体のPeroxy radical消去に対する構造活性相関

日本薬学会第123年会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>芝浦工業大学応用化学科

<sup>\*2</sup>放射線医学総合研究所

<sup>\*3</sup>大阪大学大学院工学研究科

Ogawa, M.<sup>\*1</sup>, Hakamata, W., Nakajima, K.<sup>\*1</sup>, Matsuishi, Y., Hoshino, S.<sup>\*1</sup>, Kawachi, R.<sup>\*1</sup>, Nishio, T.<sup>\*1</sup>, Oku, T.<sup>\*1</sup>：Glycon specificity profiling of  $\alpha$ -glycosidase using partially modified analogs of p-nitrophenyl  $\alpha$ -D glycopyranoside

International Symposium: New Approaches in Starch Science and Carbohydrate-Active Enzyme

<sup>\*1</sup>Nihon University

袴田 航, 高月 昭<sup>\*1</sup>：グリコシダーゼに関する構造生物学と特異的阻害剤の創製

理化学研究所 基礎科学特別研究員成果発表会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>理化学研究所

袴田 航, 福原 潔, 奥田晴宏：グリコシド結合開裂をトリガーとした活性酸素種発生型阻害剤の開発

日本農芸化学会2003年度大会 (2003.3)

小川真弘<sup>\*1</sup>, 和田昌人<sup>\*1</sup>, 中島康介<sup>\*1</sup>, 星野重樹<sup>\*1</sup>, 松石 紫<sup>\*1</sup>, 袴田 航, 河内 隆<sup>\*1</sup>, 西尾俊幸<sup>\*1</sup>, 奥 忠武<sup>\*1</sup>：基質糖水酸基が *Aspergillus niger* 由来  $\alpha$ -glucosidase の作用に与える影響について

日本農芸化学会2003年度大会 (2003.3)

<sup>\*1</sup>日本大学

Fujishima, T.<sup>\*1</sup>, Konno, K.<sup>\*1</sup>, Nakagawa, K.<sup>\*2</sup>, Okano, T.<sup>\*2</sup>, Kittaka, A.<sup>\*1</sup>, Kurihara, M., Takayama, H.<sup>\*1</sup>：2-Methyl analogues of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, the potent inducers of cell differentiation and apoptosis: synthesis and biological evaluation

First International Symposium Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy (2002.5)

<sup>\*1</sup>帝京大学薬学部

<sup>\*2</sup>神戸薬科大学

Kittaka, A.<sup>\*</sup>, Sahara, Y.<sup>\*</sup>, Fujishima, T.<sup>\*</sup>, Kurihara, M., Konno, K.<sup>\*</sup>, Takayama, H.<sup>\*</sup>：The 2 $\alpha$ -positive motifs of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in VDR binding

First International Symposium Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy (2002.5)

<sup>\*</sup>帝京大学薬学部

Fujishima, T.<sup>\*1</sup>, Kittaka, T.<sup>\*1</sup>, Yamaoka, K.<sup>\*2</sup>, Takeyama, K.<sup>\*2</sup>, Kato, S.<sup>\*2</sup>, Kurihara, M., Takayama, H.<sup>\*1</sup>：2,2-Dimethyl Analogues of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: The A-ring structure of the ligands differentiates activity profiles of the natural hormone

The 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 帝京大学薬学部

\*<sup>2</sup> 東京大学分子細胞生物学研究所

Kittaka, A.\*<sup>1</sup>, Suhara, Y.\*<sup>1</sup>, Shinki, T.\*<sup>2</sup>, Fujishima, T.\*<sup>1</sup>, Kurihara, M., Takayama, H.\*<sup>1</sup>: **The novel 2alpha-substituted 1alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogues as superagonists: Evaluation of VDR-binding and remarkable calcemic activity**

The 24th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 帝京大学薬学部

\*<sup>2</sup> 昭和大学歯学部

Kurihara, M., Tanaka, M.\*, Oba, M.\*, Suemune, H.\*: **Computational study on conformation of oligopeptides containing chiral alpha,alpha-disubstituted amino acids**

27th European Peptide Symposium (2002. 9)

\*九州大学薬学部

Tanaka, M.\*, Nishimura, N.\*, Oba, M.\*, Demizu, Y.\*, Kurihara, M., Suemune, H.\*: **Conformational study of heteropeptide prepared from chiral alpha-ethylated alpha,alpha-disubstituted alpha-amino acids**

27th European Peptide Symposium (2002. 9)

\*九州大学薬学部

Oba, M.\*, Tanaka, M.\*, Kurihara, M., Suemune, H.\*: **Conformational study of peptides containing (S)-ethylleucine as a chiral alpha,alpha-disubstituted amino acid**

27th European Peptide Symposium (2002. 9)

\*九州大学薬学部

出水庸介\*, 田中正一\*, 栗原正明, 末宗 洋\*: **キラルな環状 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸とそのペプチドの合成**

第39回ペプチド討論会 (2002. 10)

\*九州大学薬学部

栗原正明, 佐藤由紀子, 田中正一\*, 大庭 誠\*, 出水庸介\*, 末宗 洋\*, 奥田晴宏: **キラル $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸を含むオリゴペプチドのヘリカル構造の解析**

第39回ペプチド討論会 (2002. 10)

\*九州大学薬学部

須原義智\*, 小野啓一郎\*, 橘高敦史\*, 栗原正明, 藤島利江\*, 吉田彰宏\*, 高山浩明\*: **新規アミド型1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-19-norvitamin D<sub>3</sub>誘導体の分子設計と合成**

第46回日本薬学会関東支部大会 (2002. 10)

\*帝京大学薬学部

橘高敦史\*, 須原義智\*, Martin J. Calverley\*, 藤島利江\*, 栗原正明, 齋藤 望\*, 岸本成史\*, 二瓶賢一\*, 紺野勝弘\*, 杉浦隆之\*, 和久敬蔵\*, 高山浩明\*: **活性型ビタ**

ミンD<sub>3</sub>のA環2位の化学修飾を基盤とするCD環側鎖20位の同時修飾: ビタミンDレセプター結合親和性の増強と高い細胞分化誘導作用

第28回反応と合成の進歩シンポジウム (2002. 11)

\*帝京大学薬学部

出水庸介\*, 田中正一\*, 阿南浩輔\*, 栗原正明, 末宗洋\*: **光学活性 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸からのフォールドマ**

ーの設計

第19回日本薬学会九州支部大会 (2002. 12)

\*九州大学薬学部

橘高敦史\*, 須原義智\*, Martin J. Calverley\*, 栗原正明, 藤島利江\*, 齋藤 望\*, 岸本成史\*, 杉浦隆之\*, 和久敬蔵\*, 高山浩明\*: **2 $\alpha$ 置換-double side chain-活性型ビタミンD<sub>3</sub>の合成と細胞分化誘導能の評価**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*帝京大学薬学部

藤島利江\*, 小島義教\*, 橘高敦史\*, 栗原正明, 東屋功\*, 高山浩明\*: **アンタゴニスト活性を有する2 $\alpha$ 位メチル活性型ビタミンDのデザインと合成**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*帝京大学薬学部

本澤 忍\*, 山本康弘\*, 橘高敦史\*, 藤島利江\*, 栗原正明, 平阪幸四郎\*, 高山浩明\*: **2 $\alpha$ 位に芳香環を有する活性型ビタミンD<sub>3</sub>誘導体の合成と生物活性相関**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*帝京大学薬学部

本澤 忍\*, 須原義智\*, 橘高敦史\*, 齋藤 望\*, 岸本成史\*, 藤島利江\*, 栗原正明, 杉浦隆之\*, 和久敬蔵\*, 高山浩明\*:  **$\alpha$ 位アルキル置換20-epi-ビタミンD<sub>3</sub>誘導体の合成と生物活性評価**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*帝京大学薬学部

栗原正明, 松崎亜香里, 佐藤由紀子, 橘高敦史\*, 藤島利江\*, 須原義智\*, 高山浩明\*: **ビタミンD誘導体のVDR結合モデル**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*帝京大学薬学部

大庭 誠\*, 田中正一\*, 末宗 洋\*, 佐藤由紀子, 栗原正明: **N末プロリンによるアキラルなジ置換アミノ酸ペプチド二次構造の制御**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*九州大学薬学部

林田和裕\*, 出水庸介\*, 大庭 誠\*, 栗原正明, 田中正一\*, 末宗 洋\*: **光学活性二環性 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸とそのペプチドの合成**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*九州大学薬学部

出水庸介\*, 田中正一\*, 阿南浩輔\*, 栗原正明, 末宗洋\*: 光学活性環状 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸を用いたヘリカル構造の構築

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*九州大学薬学部

栗原正明, 佐藤由紀子, 松崎亜香里, 田中正一\*, 大庭誠\*, 出水庸介\*, 末宗洋\*: キラル $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸を含むオリゴペプチドのヘリカル構造の予測

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*九州大学薬学部

栗原正明, 袴田航, 丹野雅幸, 奥田晴宏: 種々なTMS化合物をシリル源とするアセタール化反応

日本薬学会第123年会 (2003.3)

Nishikawa, K.\*<sup>1</sup>, Tominaga, N.\*<sup>1</sup>, Yamakoshi, Y., Otomo, R.\*<sup>2</sup>: Change of the Ultrastructure and Accumulation of Polyphosphate in *Chlamidomonas acidophila*

The 10<sup>th</sup> International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamidomonas* (Vancouver 2002.6)

\*<sup>1</sup> Ochanomizu University

\*<sup>2</sup> National Institute of Livestock and Grassland Science

山越葉子, 宮島敦子, 甲斐陽子, 土屋利江: フラーレン(C60)の微生物増殖阻害について

日本薬学会第123年会 (長崎2003.3)

斎藤嘉朗, 佐伯真弓, 長野美千代, 手島玲子, 小澤正吾, 澤田純一: mRNA expression of multiple cytochrome P450 isozymes in four types of cultured skin cells

14th International Symposium on microsomes and drug oxidations (2002.7)

斎藤嘉朗, 祖山晃子, 埴岡伸光, 村山典恵, 石田誠一, 小澤正吾, 澤田純一: Reduced in vitro paclitaxel metabolism caused by non-synonymous nucleotide substitutions in the CYP2C8 gene

2003 AAPS Annual Meeting and Exposition (2002.11)

佐伯真弓, 中村隆広, 村山典恵, 金秀良, 斎藤嘉朗, 小澤正吾, 駒村和雄\*<sup>1</sup>, 上野和行\*<sup>1</sup>, 鎌倉史郎\*<sup>1</sup>, 中島敏治\*<sup>2</sup>, 斎藤博久\*<sup>2</sup>, 澤田純一: 日本人におけるCYP3A5遺伝子の一塩基多型の同定及び頻度解析

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*<sup>1</sup> 国立循環器病センター

\*<sup>2</sup> 国立成育医療センター

前川京子, 井戸田昌也, 埴岡伸光, 斎藤嘉朗, 村山典恵\*, 中島治, 祖山晃子, 石田誠一, 小澤正吾, 安藤正典, 澤田純一: ヒトミクロソーム型エポキシドヒドロラーゼの遺伝子多型の検出及び機能解析

日本薬学会第123年会 (2003.3)

\*上智大学生命科学研究所

中島治, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一: 組換えscFv抗体の培養細胞内への送達法の開発

日本薬学会第123年会 (2003.3)

蜂須賀暁子, 中島治, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAM (オピオイド結合性タンパク)の精製と糖鎖構造解析

第74回日本生化学会大会 (2002.10)

Li, P.\*<sup>1</sup>, Prasad, S. S.\*<sup>1</sup>, Mitchell, D.E.\*<sup>1</sup>, Hachisuka, A., Sawada, J., Gu, Q.\*<sup>2</sup>: Opioid binding cell adhesion molecule is a candidate for visual cortex plasticity

Society for Neuroscience 32nd annual meeting (2002.11)

\* Wake Forest University Health Sciences, NC, U.S.A.

蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島治, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAMの各糖鎖結合部位における糖鎖構造解析

日本薬学会第123年会 (2003.3)

中村亮介, 石田誠一, 小澤正吾, 奥貫晴代, 斎藤嘉朗, 手島玲子, 澤田純一: 抗原刺激およびDTBHQ刺激によるRBL-2H3細胞の遺伝子発現変化

第9回日本免疫毒性学会 (2002.9)

手島玲子, 高木加代子, 奥貫晴代, 中村亮介, 蜂須賀暁子, 澤田純一: 食物アレルギー誘発性試験の一環としてのin vitro分解性試験

第9回日本免疫毒性学会 (2002.9)

中村亮介, 石田誠一, 小澤正吾, 斎藤嘉朗, 奥貫晴代, 手島玲子, 澤田純一: RBL-2H3細胞の遺伝子発現に及ぼすdexamethasoneの影響

第74回日本生化学会大会 (2002.10)

佐藤義隆\*<sup>1</sup>, 手島玲子, 中村亮介, 佐々木信雄\*<sup>2</sup>, 澤田純一, 木谷誠一\*<sup>3</sup>: Human IgGを介した犬肥満細胞腫由来細胞の活性化情報伝達

第74回日本生化学会大会 (2002.10)

\*<sup>1</sup> 東京大学医学部

\*<sup>2</sup> 東京大学農学部

\*<sup>3</sup> 東京水産大保健センター

中村亮介, 奥貫晴代, 石田誠一, 小澤正吾, 斎藤嘉朗, 手島玲子, 澤田純一: マスト細胞の活性化に及ぼすステロイドホルモンの影響

日本薬学会第123年会 (2003.3)

高木加代子, 奥貫晴代, 中村亮介, 手島玲子, 澤田純一: 食物抗原の人工胃腸液分解性に及ぼす加熱処理の影響

日本薬学会第123年会 (2003.3)

奥貫晴代, 手島玲子, 張替直輝, 酒井信夫, 穂山浩,

米谷民雄, 澤田純一: **W/W<sup>v</sup>マウスにおけるOVA経口感作によるASA誘導と $\gamma\delta$ -T細胞の減少**  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

手島玲子: **遺伝子組換え食品並びに食品のアレルギ-のリスク評価について**  
第39回全国衛生化学技術協議会 (2002. 10)

手島玲子, 奥貫晴代, 澤田純一: **W/W<sup>v</sup>マウスの卵白アルブミン (OVA) 経口投与によるASA誘導について**  
第52回日本アレルギー学会総会 (2002. 11)

佐藤 義隆<sup>\*1</sup>, 手島 玲子, 中村 亮介, 澤田 純一, 木谷 誠一<sup>\*2</sup>: **Human IgGを介したイヌ肥満細胞腫由来細胞の活性化**  
第52回日本アレルギー学会総会 (2002. 11)

<sup>\*1</sup> 東京大学医学部

<sup>\*2</sup> 東京水産大保健センター

手島玲子, 渡邊敬浩, 奥貫晴代, 穂山 浩, 今井俊夫, 澤田純一, 豊田正武: **遺伝子組換えとうもろこしCBH-351のラット並びにマウスへの90日間混餌投与による免疫系への影響**  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

鈴木昭夫\*, 鈴木 亮\*, 手島玲子, 中西 守\*: **骨髄由来マスト細胞と神経初代培養細胞の相互作用の研究**  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*名古屋市立大学薬学部

手島玲子, 佐藤義隆<sup>\*1</sup>, 中村亮介, 高木加代子, 佐々木信雄<sup>\*2</sup>, 澤田純一, 木谷誠一<sup>\*3</sup>: **イヌマスト細胞のIgG受容体を介する情報伝達機構**  
第24回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2002. 11)

<sup>\*1</sup> 東京大学医学部

<sup>\*2</sup> 東京大学農学部

<sup>\*3</sup> 東京水産大学保健センター

鈴木 亮\*, 森 尚子\*, 古野忠秀\*, 手島玲子, 中西守\*: **免疫・神経クロストークの局所相互作用の解析**  
第24回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2002. 11)

\*名古屋市立大学薬学部

吉田貴彦<sup>\*1</sup>, 松井利仁<sup>\*1</sup>, 伊藤俊弘<sup>\*1</sup>, 中木良彦<sup>\*1</sup>, 大澤基保<sup>\*2</sup>, 手島玲子, 小島幸一<sup>\*3</sup>: **免疫指標による環境リスク評価の試み—3歳幼児での検証—**  
第73回日本衛生学会総会 (2003. 3)

<sup>\*1</sup> 旭川医科大学

<sup>\*2</sup> 帝京大学薬学部

<sup>\*3</sup> 食品薬品安全センター

Inoue, K., Tsuda, M., Koizumi, S.: **ATP induced three types of pain behaviors including allodynia**  
第7回国際アデノシンおよびアデニンヌクレオチドシンポジウム (2002. 5)

井上和秀, 津田 誠, 溝腰朗人, 重本-最上由香里, 小泉修一, 高坂新一\*: **Involvement of microglia activation and p38 phosphorylation in rat neuropathic pain**  
第45回日本神経化学学会大会 (2002. 7)

\*国立精神神経センター

井上和秀, 津田 誠, 溝腰朗人, 重本由香里, 小泉修一, 高坂新一\*: **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**  
平成14年度生理学研究所研究会「痛みの基礎と臨床」(2002. 9)

\*国立精神神経センター

Tsuda, M., Mizokoshi, A., Mogami, Y., Koizumi, S. and Inoue, K.: **Activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) in the spinal microglia in a rat model of neuropathic pain**  
Society for Neuroscience 31st Annual Meeting (2002. 11)

井上和秀, 重本(最上)由香里, 小泉修一: **ATPによるミクログリアからのTNFおよびIL-6遊離の生理的意義: 神経保護作用**  
グリア研究会 (2002. 11)

重本(最上)由香里, 小泉修一, 津田 誠, 佐々木 洋\*, 大澤圭子\*, 石田誠一, 溝腰朗人, 高坂新一\*, 井上和秀: **ミクログリアにおけるP2Y6受容体の発現及び機能解析**

グリア研究会 (2002. 11)

\*国立精神神経センター

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におけるMAPK系の活性化**  
グリア研究会 (2002. 11)

井上和秀: **ATP受容体を介したミクログリアの機能調節, そして痛み**  
神経組織培養研究会 (2003. 2)

井上和秀: **細胞外ATPおよびアデノシンの生理機能研究の現状と展望**  
日本薬理学会 (シンポジウム) (2003. 3)

津田 誠\*, 小泉修一, 井上和秀: **Neuropathic pain and spinal glial cells: controlling by ATP receptors**  
日本薬理学会 (シンポジウム) (2003. 3)

\*トロント大学

藤下加代子, 小泉修一, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 井上かおり\*, 井上和秀: **ATPによるヒト表皮ケラチノサイトの細胞間Ca<sup>2+</sup>wave伝播の解析**  
日本薬理学会 (2003. 3)

\*資生堂

溝腰朗人, 津田 誠, 重本(最上)由香里, 井上和秀: 神経因性疼痛モデル動物のアロディニア発現は p38MAPキナーゼ阻害薬で抑制される

日本薬理学会 (2003. 3)

檜楨大介, 小泉修一, 溝腰朗人, 津田 誠, 重本(最上)由香里, 井上和秀: UTPによるアロディニア誘発機序の解明

日本薬理学会 (2003. 3)

宮竹真由美\*, 成田 年\*, 小泉修一, 井上和秀, 鈴木勉\*: メタンフェタミン誘発性運動亢進におけるアストロサイト役割

日本薬理学会 (2003. 3)

\*星薬科大学

篠崎陽一, 小泉修一, 石田誠一, 井上和秀: ATPにより誘発されるアストロサイトの遺伝子発現パターンの解析

日本薬理学会 (2003. 3)

戸崎秀俊, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 小泉修一, 井上和秀: レチノイドによる P2X2 遺伝子発現亢進

日本薬理学会 (2003. 3)

重本(最上)由香里, 小泉修一, 津田 誠, 佐々木 洋\*, 大澤圭子\*, 石田誠一, 高坂新一\*, 井上和秀: ミクログリア P2Y6 受容体の生理機能

日本薬理学会 (2003. 3)

\*国立精神神経センター

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

平山明子\*<sup>1</sup>, 松井幸子\*<sup>1</sup>, 松本幸子\*<sup>1</sup>, 笠原 忠\*<sup>1</sup>, 安達玲子, 鈴木和博, 大橋一正\*<sup>2</sup>, 水野健作\*<sup>2</sup>: LIMキナーゼ1によるマクロファージ様 U937 細胞の機能修飾について

第3回 Pharmacology-Hematology シンポジウム (2002. 6)

\*<sup>1</sup> 共立薬科大学

\*<sup>2</sup> 東北大学

渡辺秀実\*, 安達玲子, 平山明子\*, 笠原 忠\*, 鈴木和博: 白血球の遺伝子発現に対する内分泌攪乱化学物質の影響

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

\*共立薬科大学

平山明子\*, 安達玲子, 笠原 忠\*, 鈴木和博: LIMキナーゼ1によるマクロファージ様 U937 細胞の機能修飾について

第32回日本免疫学会総会・学術集会 (2002. 12)

\*共立薬科大学

小野景義, 門田 健\*<sup>1</sup>, 門田朋子\*<sup>2</sup>: 覚醒剤の垂慢性投与による大脳辺縁系の組織学的変化

第76回日本薬理学会年会 (福岡市) (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 千葉市環境保健研究所

\*<sup>2</sup> 千葉大学

門田 健\*<sup>1</sup>, 小野景義, 門田朋子\*<sup>2</sup>: 覚醒剤に対する匂い嗅ぎ常同行動の感受性亢進: その発達と維持に対する行動学的組織化学的検討

第76回日本薬理学会年会 (福岡市) (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 千葉市環境保健研究所

\*<sup>2</sup> 千葉大学

藤野智史, 佐藤陽治, 沢田純一, 井上和秀, 最上(西巻)知子: ACAT阻害剤のVLDL分泌低下作用はトリグリセリド合成により影響される

第34回日本動脈硬化学会総会 (2002. 7)

最上(西巻)知子, 藤野智史, 佐藤陽治, 石田誠一, 西村哲治, 堂前純子\*, 横山信治\*, 井上和秀: RXRアゴニストによる ABCA1 の発現誘導

第34回日本動脈硬化学会総会シンポジウム (2002. 7)

\*名市大医

藤野智史, 宇根瑞穂\*, 豊田淑江, 山口照英, 井上和秀, 最上(西巻)知子: 表面プラズモン共鳴センサーを用いた核内受容体 FXR リガンド結合の測定

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*広島大医歯薬

最上(西巻)知子, 藤野智史, 佐藤陽治, 影近弘之\*, 堂前純子\*\*, 横山信治\*\*, 井上和秀: RXRアゴニストによる ABCA1 発現と HDL 新生の促進

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*東大薬

\*\*名市大医

山本美智子, 小野寺理恵\*, 平山晃久\*, 森川 馨: WHO ATC/DDD システムを用いた医薬品使用における国際比較調査-呼吸器系, 降圧, 抗高脂血症薬剤領域において-

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*京都薬科大学

小野寺理恵\*, 平山晃久\*, 山本美智子, 森川 馨: WHO ATC/DDD システムを用いた医薬品使用における国際比較-抗生物質・消化器用剤領域において-

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*京都薬科大学

森川 馨: 無菌製剤製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証

医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証

質保証に関する研究成果報告シンポジウム(平成14年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究推進事業 研究成果普及事業)(2002.11)

檜山行雄, 西畑利明<sup>\*1</sup>, 小山靖人<sup>\*2</sup>, 森川 馨, 只木晋一<sup>\*3</sup>: 厚生労働科学研究(H14-医薬-04) 医薬品の品質管理システムのあり方

日本薬学会第123年会(2003.3)

<sup>\*1</sup> 参天製薬

<sup>\*2</sup> 藤沢薬品

<sup>\*3</sup> 埼玉衛研

小野道由\*, 清水佳織\*, 相良敏夫\*, 渡辺恵市郎\*, 小島一也\*, 山内仁史\*, 森川 馨: 無菌操作アイソレータのマウスホールにおける気流挙動の評価と設計への適用  
日本薬学会第123年会(2003.3)

\*日揮

夏山 晋\*, 長門琢也\*, 高嶋武志\*, 森川 馨: CFD(Computational Fluid Dynamics)によるクリーンブース内気流解析と微粒子滞留現象に関する研究

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*パウレック

片山博仁<sup>\*1</sup>, 和田 力<sup>\*2</sup>, 小川昌幸<sup>\*2</sup>, 小山靖人<sup>\*1</sup>, 徳永雄二<sup>\*1</sup>, 檜山行雄, 森川 馨: 無菌室換気回数とグレードBゾーン気流滞留域の清浄度回復能

日本薬学会第123年会(2003.3)

<sup>\*1</sup> 藤沢薬品

<sup>\*2</sup> 大気社

小山靖人\*, 片山博仁\*, 徳永雄二\*, 檜山行雄, 森川馨: 無菌室の三次元気流測定結果に基づく環境ファーストスポット推定

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*藤沢薬品

池田かおり\*, 柏木英二\*, 鴻池敏郎\*, 森川 馨: 無菌製剤の直接容器設計: 適切なゴム栓選定のための品質評価法に関する研究

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*塩野義製薬

鈴木倫典\*, 菊田弘和\*, 小林一三\*, 神谷明良\*, 播磨武\*, 檜山行雄, 森川 馨: 熱負荷によるガラスバイアルのフレークス発生に関する検討

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*ファイザー製薬

小内克巳\*, 野村晃子\*, 山口武宏\*, 加藤晃良\*, 大脇孝行\*, 岩本 清\*, 森川 馨: ガラス転移点やコラプス温度を活用した凍結乾燥条件の最適化とスケールアップ

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*エーザイ製剤研

竹内雅子<sup>\*1</sup>, 石川茂行<sup>\*2</sup>, 伊藤千鶴子<sup>\*3</sup>, 斎藤 泉<sup>\*1</sup>, 堀口和巳<sup>\*4</sup>, 三川正明<sup>\*5</sup>, 田崎武信<sup>\*1</sup>, 森川 馨: プートストラップ法の品質管理データへの適用における有用性と問題点

日本薬学会第123年会(2003.3)

<sup>\*1</sup> 塩野義製薬

<sup>\*2</sup> 田辺製薬

<sup>\*3</sup> 持田製薬

<sup>\*4</sup> 日本化薬

<sup>\*5</sup> ファルマシア

出口 裕\*, 船塚政男\*, 園田雅樹\*, 山田 博\*, 西田孝司\*, 河嶋洋一\*, 檜山行雄, 森川 馨: スクリューキャップ点眼容器の完全性評価に関する研究

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*参天製薬

上野誠二\*, 藤本一郎\*, 酒井康行\*, 森川 馨: アイソレータ使用グローブのピンホール試験検出限界とピンホールのアイソレータ内部に及ぼす影響に関する研究

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*中外製薬

石川茂行<sup>\*1</sup>, 伊藤千鶴子<sup>\*2</sup>, 堀口和巳<sup>\*3</sup>, 三川正明<sup>\*4</sup>, 斎藤 泉<sup>\*5</sup>, 竹内雅子<sup>\*5</sup>, 田崎武信<sup>\*5</sup>, 森川 馨: 医薬品製造管理への管理図法の適用に対する考察

日本薬学会第123年会(2003.3)

<sup>\*1</sup> 田辺製薬

<sup>\*2</sup> 持田製薬

<sup>\*3</sup> 日本化薬

<sup>\*4</sup> ファルマシア

<sup>\*5</sup> 塩野義製薬

園田智之\*, 成澤真治\*, 林 公明\*, 大澤 孝\*, 沼波憲一\*, 森川 馨: 懸濁注射剤の物性評価と品質に及ぼす原料の影響

日本薬学会第123年会(2003.3)

\*田辺製薬

山本 都, 森田真理子, 森川 馨: 化学物質に起因する事事故例の調査及びWeb上でのデータベース構築

日本薬学会第123年会(2003.3)

関澤 純, 高橋美加: AhRの内在性リガンドを考慮に入れたダイオキシシンリスクの再評価

日本内分泌かく乱物質学会第5回研究発表会(2002.11)

関澤 純, 村山武彦<sup>\*1</sup>: 食品安全のリスクコミュニケーションはいかにあるべきか

日本リスク研究学会第15回研究発表会(2002.11)

<sup>\*1</sup> 早稲田大学理工学部

関澤 純: 次世代リスク評価におけるバイオアッセイの役割

第8回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性研究会合同

シンポジウム (2002. 9)

関澤 純：化学物質の人への健康影響リスク  
第22回農業環境シンポジウムおよび第2回有機化合物研究会合同シンポジウム (2002. 9)

Sekizawa, J. and Matsuda, T. \* : **Endogenous Ligands of Arohydrocarbon Receptor and Interaction with Dioxins**  
22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (2002. 8)

\* 京都大学地球環境学大学院

Sekizawa, J. : **Is sex ratio decline of offspring in Japan related to dioxin body burden?**  
e-hormone 2002 symposium (2002. 10)

関澤 純：食の安全におけるリスクアナリシスの役割  
**ILSI Japan**  
第1回リスクアナリシス・ワークショップ (2002. 11)

Sekizawa, J. : **Risk communication in food safety Annual Meeting of the Society for Risk Management in Preventive Medicine**  
Workshop-2 Safety Management in Food (2003. 3)

関澤 純：化学物質・環境問題のリスクコミュニケーション  
化学物質アドバイザー・パイロット講習会 (2002. 7)

関澤 純：リスクの考え方  
化学物質アドバイザー・パイロット講習会 (2002. 7)

三井沙恵\*<sup>1</sup>, 武井亜樹\*<sup>1</sup>, 児島伸枝\*<sup>1</sup>, 高畠 亮\*<sup>1</sup>, 松田知成\*<sup>2</sup>, 関澤 純, 宮入伸一\*<sup>1</sup> : **ダイオキシン受容体結合性を有する indirubin の酵素イムノアッセイ法の開発**  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 日本大学薬学部

\*<sup>2</sup> 京都大学地球環境学大学院

高尾雄二\*<sup>1</sup>, 山下浩平\*<sup>1</sup>, 高良真也\*<sup>1</sup>, 犬童真紀子\*<sup>2</sup>, 長江真樹\*<sup>1</sup>, 富永伸明\*<sup>3</sup>, 石橋康弘\*<sup>4</sup>, 関澤 純, 宮入伸一\*<sup>5</sup>, 有蘭幸司\*<sup>2</sup> : **GC/MS 分析のためのインディルビンのトリメチルシリル化**

日本内分泌かく乱化学物質学会第5回研究発表会 (2002. 12)

\*<sup>1</sup> 長崎大学環境学部

\*<sup>2</sup> 熊本県立大学環境共生学部

\*<sup>3</sup> 有明工高専物質工学科

\*<sup>4</sup> 長崎大学環境保全センター

\*<sup>5</sup> 日本大学薬学部

中野達也, 原田隆範\*<sup>1</sup>, 古明地勇人\*<sup>2</sup>, 福澤 薫\*<sup>3</sup>, 青木孝造, 田中成典\*<sup>4</sup>, 上林正巳\*<sup>2</sup>, 北浦和夫\*<sup>2</sup> : **フラグメント分子軌道法プログラム ABINIT-MP の開発**  
CBI学会第3回年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 立教大

\*<sup>2</sup> 産総研

\*<sup>3</sup> 富士総研

\*<sup>4</sup> 東芝研究開発センター

Nakata, K., Tokunaga, M.\*<sup>1</sup>, Shirai, Y.\*<sup>2</sup>, Nakano, T. and Kaminuma, T.\*<sup>3</sup> : **A Paradigmatic Drug Target Database for Nuclear Receptors**  
16th Symposium of the Protein Society (San Diego, 2002. 8)

\*<sup>1</sup> アドイン研究所(株)

\*<sup>2</sup> 情報計算化学生物学会

\*<sup>3</sup> バイオダイナミクス(株)

戸田恭子, 石田誠一, 林 譲, 中田琴子, 松田りえ子, 重本(最上)由香里, 藤下加代子, 小沢正吾, 澤田純一, 井上和秀, 首藤紘一\*<sup>1</sup> : **先験的SDを用いた GeneChip データの有意差検定**

CBI学会第3回年会 (東京, 2002. 9)

\*<sup>1</sup> 日本医薬情報センター

中田琴子, 徳永雅彦\*<sup>1</sup>, 愛澤昌宏\*<sup>2</sup>, 中野達也, 神沼二真\*<sup>3</sup> : **核内受容体に結合する薬の標的知識ベース**

CBI学会第3回年会 (東京, 2002. 9)

\*<sup>1</sup> アドイン研究所

\*<sup>2</sup> 東京大学生産技術研究所

\*<sup>3</sup> バイオダイナミクス

Nakata, K., Tokunaga M.\*<sup>1</sup>, Tnakano, T., Yukawa, M.\*<sup>2</sup>, Komiyama, N.\*<sup>2</sup> and Kaminuma, T.\*<sup>3</sup> : **A Toxicogenomic Knowledge Base That Integrates Receptor, CYP and Transporter Databases.**

Toxicogenomics International Forum 2002 (Okazaki, 2002. 10)

\*<sup>1</sup> アドイン研究所

\*<sup>2</sup> 情報計算化学生物学会

\*<sup>3</sup> バイオダイナミクス

Toda, K., Ishida, S., Hayashi, Y., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K., Shudo, K.\*<sup>1</sup> : **A novel algorithm to test significant differences in microarray experiments.**

Toxicogenomics International Forum 2002 (Okazaki, 2002. 10)

\*<sup>1</sup> 日本医薬情報センター

中田琴子, 中野達也, 福澤 薫\*<sup>1</sup>, 湯川真澄\*<sup>2</sup>, 小宮山直美\*<sup>2</sup>, 神沼二真\*<sup>3</sup> : **内分泌かく乱作用解析のためのパスウェイとネットワーク**

第5回日本内分泌かく乱化学物質学会 (環境ホルモン学会), (広島, 2002. 11)

\*<sup>1</sup> アドバンスソフト

\*<sup>2</sup> 情報計算化学生物学会

\*<sup>3</sup> バイオダイナミクス

Nakata, K., Yukawa, M.\*<sup>1</sup>, Komiyama, N.\*<sup>1</sup>, Nakano, T., Kaminuma, T.\*<sup>2</sup>: **A Nuclear Receptor Database that Maps Pathways to Diseases.**

Genome Informatics 2002 (Tokyo, 2002. 12)

\*<sup>1</sup> 情報計算化学生物学会

\*<sup>2</sup> バイオダイナミクス

Toda, K., Ishida, S., Hayashi, Y., Nakata, K., Matsuda, R., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K., Ozawa, S., Sawada, J., Inoue, K. and Shudo, K.\*<sup>1</sup>: **A novel algorithm to test significant differences in microarray experiments.**

Genome Informatics 2002 (Tokyo, 2002. 12)

\*<sup>1</sup> 日本医薬情報センター

Nakata, K., Tokunaga, M.\*<sup>1</sup>, Nakano, T. and Kaminuma, T.\*<sup>2</sup>: **A Paradigmatic Drug Target Database**

Biophysical Society 47th Annual Meeting (San Antonio, 2003. 3)

\*<sup>1</sup> アドイン研究所

\*<sup>2</sup> バイオダイナミクス

愛澤昌宏\*<sup>1</sup>, 岩澤義郎\*<sup>2</sup>, 中野達也, 中田琴子: **核内受容体とそれに結合する薬の知識ベースの構築**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 東京大学生産技術研究所

\*<sup>2</sup> アドバンスソフト

戸田恭子, 石田誠一, 林 讓, 中田琴子, 松田りえ子, 小澤正吾, 澤田純一, 井上和秀, 首藤紘一\*<sup>1</sup>: **先験的SDを用いたGeneChipデータの有意差検定の有用性**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 日本医薬情報センター

林 讓, 松田りえ子, 伊藤克敏\*, 前田昌子\*: **17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneの競合ELISA法による分析の不確かさの推定**

第63回分析化学討論会 (2002. 5)

\* 昭和大薬

林 讓, 松田りえ子, 伊藤克敏\*<sup>1</sup>, 前田昌子\*<sup>1</sup>, 今井一洋\*<sup>2</sup>: **ELISA法の分析値の信頼性について**

第15回バイオメディカル分析化学シンポジウム (2002. 8)

\*<sup>1</sup> 昭和大薬

\*<sup>2</sup> 東大院薬

小谷 明\*, 林 讓, 松田りえ子, 楠 文代\*: **FUMI理論に基づく電気化学検出HPLCの測定条件の最適化**

第6回分析化学東京シンポジウム・2002機器分析東京討論会

\* 東京薬科大学

西村和香\*<sup>1</sup>, 伊藤克敏\*<sup>1</sup>, 前田昌子\*<sup>1</sup>, 今井一洋\*<sup>2</sup>, 林讓, 松田りえ子: **17 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneの競合ELISA法の精度: 理論と実践**

日本薬学会第122年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 昭和大薬

\*<sup>2</sup> 東大院薬

林 讓: **エンドトキシン試験法の分析精度**  
第3回FUMI理論シンポジウム (2002. 5)

浦野 勉, 小泉睦子, 長谷川隆一: **諸外国で副作用等安全性の問題により販売中止された医薬品並びにそれらに対する国内の安全対策状況の調査研究**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

高橋 登, 長谷川隆一: **医薬品開発におけるファーマコ・ジェネティクス/ファーマコ・ゲノミクスの有効利用に向けた国内外の検討状況の解析**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

頭金正博: **FXRによる胆汁酸ホメオスタシスの維持機構**

第26回日本医学会総会 (2003. 4)

鹿庭なほ子, 小嶋茂雄, 長谷川隆一: **患者を対象とした薬物動態試験の実施に関するアンケート調査**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

杉山永見子, 花尻瑠理, 鹿庭なほ子, 長谷川隆一, 奥坂拓志\*<sup>1</sup>, 上野秀樹\*<sup>1</sup>, 池田公史\*<sup>1</sup>, 山本 昇\*<sup>1</sup>, 小澤正吾, 澤田純一: **血漿中ゲムシタピン及び代謝物のLC-ESI-MSを用いた分析法**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 国立ガンセンター

吉谷隆志, 香取典子, 中島由起子, 鹿庭なほ子, 青柳伸男, 小澤正吾, 小嶋茂雄, 長谷川隆一, 澤田純一: **パクリタキセル並びにその代謝物の同時定量法の開発**

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

Koizumi, M., Nishimura, N.\*<sup>1</sup>, Enami, T.\*<sup>1</sup>, Sunaga, M.\*<sup>2</sup>, Horikawa, H.\*<sup>2</sup>, Kamata, E., Hasegawa, R.: **Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats**

The 42nd Annual Meeting Society of Toxicology (2003. 3)

\*<sup>1</sup> Bozo Research Center Inc., Gotemba Laboratory

\*<sup>2</sup> Safety Research Institute for Chemical Compounds Co.

Hasegawa, R., Koizumi, M., Noda, A.\*<sup>1</sup>, Ito, Y.\*<sup>1</sup>, Furukawa, M.\*<sup>2</sup>, Fujii, M.\*<sup>2</sup>, Kamata, E., Ema, M.: **Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young rats**

The 42nd Annual Meeting Society of Toxicology (2003. 3)

\*<sup>1</sup> Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

\*<sup>2</sup> Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd.

Inoue T.: **WS1-3 Risk Management in Drug & Food**

International Conference of Risk Management for Preventive Medicine (2003. 3. 28)

井上 達：バイオ医薬品についての安全性評価  
慶応義塾大学 信濃町キャンパスリサーチパークシンポジウム 効率的な医薬品開発を目指して：医薬品の安全評価と薬物動態 (2002. 12. 4)

T. Inoue : **Introductory Note: Practical approaches for toxicogenomics**  
Toxicogenomics International Forum 2002 (2002. 11. 23)

T. Inoue : **Workshop 6: Hormonally active agents and plausible relationships to adverse effects on human health**  
SCOPE/IUPAC International Symposium on Endocrine Active Substances (2002. 11. 21)

T. Inoue : **Symposium 1: Current progress of endocrine disruptor research**  
5th Scientific Congress Federation of Asian & Oceanian Physiological Societies (FAOPS) (2002. 9. 24)

T. Inoue : **Low-dose effect in endocrine disruptors: Strategy for testing and assessment**  
Satellite Symposium on Endocrine Disruptors: Impact on Reproductive Health (2002. 9. 27)

T. Inoue : **Practical approaches to testing and validation for possible endocrine disruptors with respect to a mechanism of action**  
4th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2002. 8. 11-15)

井上 達：ワークショップ1 バイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価—現状と将来—  
第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6. 20)  
[名古屋]

Kanno, J. : **Toxicogenomics in Pharmacology/ Physiology studies by functional genomics technology**  
The 76th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society (2003. 3)

Kanno, J. : **Reverse toxicology and data normalization/standardization**  
Toxicogenomics International Forum (2002. 10)

菅野 純：内分泌攪乱化学物質とトキシコジェノミクス  
第5回日本水環境学会シンポジウム (2002. 9)

菅野 純：トキシコジェノミクスの展望  
薬物動態談話会特別例会 (2002. 10)

Kanno, J. : **Toxicogenomicsの現状**  
ゲノム創薬フォーラム ゲノム創薬へのパラダイムシフト

(2002. 11)

菅野 純：創薬とトキシコジェノミクス研究戦略  
第94回基礎研究部総会 (2003. 2)

Kitajima, S., Miyagawa-Tomita, S.\*<sup>1</sup>, Takagi, A., Inoue, T. and Saga, Y.\*<sup>2</sup> : **Cell-lineage analysis of *Mesp1*-expressing mesodermal cells in the developing murine heart.**  
The 67<sup>th</sup> Cold Spring Harbor Symposium: The Cardiovascular System (2002. 5)

\*<sup>1</sup> 東京女子医大

\*<sup>2</sup> 国立遺伝学研究所

北嶋 聡, 富田幸子\*<sup>1</sup>, 井上 達, 相賀裕美子\*<sup>2</sup> : **転写因子 *Mesp1* の発現を指標とした心臓中胚葉の細胞系譜解析**  
第35回日本発生生物学会 (2002. 6)

\*<sup>1</sup> 東京女子医大

\*<sup>2</sup> 国立遺伝学研究所

北嶋 聡：ワークショップ「創薬と疾患モデル」：マウス個体を用いた遺伝子機能の解析-転写因子 *Mesp1*, *Mesp2* ノックアウトマウスを中心に-  
第19回日本疾患モデル学会 (2002. 11)

松島裕子, 井上 達, 菅野 純：卵巣摘出マウスの子宮肥大試験を用いた農薬 *o,p'*-DDT と Methoxychlor のエストロゲン様相互作用の検討  
環境ホルモン学会 (日本内分泌攪乱化学物質学会) 第5回研究発表会 (2002. 11)

川崎勝義\*<sup>1</sup>, 中島宙美\*<sup>1</sup>, 関田清司, 小山高正\*<sup>2</sup>, 寺尾恵治\*<sup>3</sup>, 山海 直\*<sup>3</sup>, 吉川泰弘\*<sup>4</sup> : **コカイン自己投与カニクイザルの線条体ドーパミン・マイクロダイアリシス**  
第32回日本神経精神薬理学会年会 (2002. 10)

\*<sup>1</sup> 星薬科大学

\*<sup>2</sup> 日本女子大心理学部

\*<sup>3</sup> 国立感染研霊長類センター

\*<sup>4</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科

Urushidani, T., Matsukawa, J.\* , Tashiro, K.\* and Nagao, T. : **Role of small GTP-binding proteins and cytoskeleton in gastric acid secretion**

*Advances in GI Pharmacology* (2002. 7)

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo.

Matsukawa, J.\* , Nagao, T., Urushidani, T. : **Possible role of ADP-ribosylation factor 6 and phospholipase D in acid secretion of isolated rabbit gastric glands**

*Advances in GI Pharmacology* (2002. 7)

\* Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo.

石井 絢\*, 長尾 拓, 一條秀憲\*, 漆谷徹郎 : **Parchorin**

のリン酸化部位の決定及び未知のキナーゼの同定

第106回日本薬理学会関東部会 (2002.10)

\*東京大学薬学部

田代啓一郎\*, 一條秀憲\*, 長尾 拓, 漆谷徹郎: ウサギ培養壁細胞における Rho の役割の解析

第106回日本薬理学会関東部会 (2002.10)

\*東京大学薬学部

松川 純\*<sup>1</sup>, 中山和久\*<sup>2</sup>, 長尾 拓, 一條秀憲\*<sup>1</sup>, 漆谷徹郎: ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) およびホスホリパーゼDの胃酸分泌への関与

第25回日本分子生物学会年会 (2002.12)

\*<sup>1</sup> 東京大学薬学部

\*<sup>2</sup> 京都大学薬学部

大森聡子\*, 長尾 拓, 一條秀憲\*, 漆谷徹郎: 水分泌細胞特異的に発現する蛋白質 parrorin のマウスホモログのクローニング

第25回日本分子生物学会年会 (2002.12)

\*東京大学薬学部

水川裕美子, 一條秀憲\*, 長尾 拓, 漆谷徹郎: 細胞内塩素イオンチャンネル (CLIC) 関連蛋白質 parrorin のMDCK細胞における膜移行

第76回日本薬理学会年会 (2003.3)

\*東京大学薬学部

高橋 雄, 井上 達, 相賀裕美子\*: 体節形成における分子時計と前後極性の関係: Mesp2 の役割

日本発生生物学会第35回大会 (2002.5)

\*国立遺伝学研究所

Takahashi, Y., Inoue, T. and Saga, Y.\*: Notch ligands Dll1 and Dll3 play distinct roles in establishment of stripe pattern in somitogenesis

Mouse Molecular Genetics 2002 (2002.8-9)

\*National Institute of Genetics

Saga, Y.\*, Takahashi, Y. and Inoue, T.: Molecular events leading to the establishment of rostro-caudal polarity of a somite

Mouse Molecular Genetics 2002 (2002.8-9)

\*National Institute of Genetics

小野 敦, 浅野和信\*, 橋本せつ子\*, 井上 達, 菅野純: 表面プラズモン共鳴センサーを用いた迅速内分泌かく乱物質スクリーニング法

第29回日本トキシコロジー学会 (2002.6)

\*ピアコア株式会社

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75回日本生化学会 (2002.10)

\*ピアコア株式会社

高木篤也, 五十嵐勝秀, 金子豊蔵, 井上 達, 菅野純: ES細胞の遺伝子発現に及ぼす TCDD の影響

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002.6)

Takagi, A., Kaneko, T., Igarashi, K., Kanno, J. and Inoue, T.: Effects of TCDD and polychlorinated terphenyls (PCTs) on the development of cleft palate in mouse embryos.

The 22st International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. (2002.8)

Takagi, A., Matuda, N., Kaneko, T., Kanno, J. and Inoue, T.: Effects of TCDD on the gene expression in mouse embryonic stem cells in Culture

Teratology 2002 (2002.6)

平林容子, 尹 秉一, 李 光勲, 金子豊蔵, 内田雄幸, 川崎 靖, 淀井淳司\*, 菅野 純, 井上 達: Trx/ADF 遺伝子改変マウスの酸化ストレス抵抗性 ダイオキシン 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 暴露に対する影響について

第92回日本病理学会総会 (2003.4)

\*京都大学ウイルス研

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Li, GX., Yoshida, K.\*, Kanno, J., and Inoue, T.: The BUUV method? New tool to measure stem cell kinetics for the hemopoietic progenitors. Keystone symposium (2003.3)

\*Radiation Hazards Research Group, NIRS, Chiba

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Li, GX., Kawasaki, Y., Kodama, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Aizawa, S.\* and Inoue, T.: Mechanistic differences of benzene-induced leukemogenesis: genotoxic in p53-deficiency vs. Epigenetic in the wild type. Society of Toxicology, 42nd Annual Meeting & ToxExpo (2003.3)

\*Lab. for Vertebrate Body Plan, Riken Center for Developmental Biology

田中 稔\*<sup>1</sup>, 平林容子, 井上 達, 勝木元也\*<sup>2</sup>, 宮島篤\*<sup>1</sup>: オンコスタチンM受容体ノックアウトマウスの造血機能の解析

第25回日本分子生物学会年会 (2002.12)

\*<sup>1</sup> 東大・分生研

\*<sup>2</sup> 基生研

平林容子, 尹 秉一, 李 光勲, 川崎 靖, 淀井淳司\*, 菅野 純, 井上 達: Thioredoxin/ADF の過剰発現による発がんの分子抑制

第25回日本分子生物学会年会 (2002.12)

\*京都大学ウイルス研究所

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Li, GX., Kawasaki, Y., Kodama,

Y., Kaneko, T., Yodoi, J.\* , Kanno, J. and Inoue, T. : **Study of experimental model for leukemia-prevention by over-expression of non-transcription factor related gene: Attenuation of spontaneous and benzene-induced leukemias by absorption of reactive oxygen species (ROS) using thioredoxin over-expression mo**

The 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology (2002. 12)

\* Institute of Virus Research, Kyoto Univ.

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Tsuboi, I., Huo, Y., Kodama, Y., Otto, T.\*<sup>1</sup>, Kanno, J., Willecke, K.\*<sup>1</sup>, Trosko, JE.\*<sup>2</sup> and Inoue, T. : **Cx32 knockout mouse and keukemogenesis**  
16th International Mouse Genome Conference (2002. 11)

\*<sup>1</sup> Inst fur Genetik, Bonn Univ, Bonn, Germany

\*<sup>2</sup> Dept of Ped and Human Dev, Michigan State Univ, College of Human Med, East Lansing, Michigan, U.S.A.

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 (2)**  
第19回日本疾患モデル学会 (2002. 11)

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Kawasaki, Y., Li, GX., Kanno, J., and Inoue, T. : **On the mechanistic differences of benzene-induced leukemogenesis between wild type and p53 knockout mice**

International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation (2002. 11)

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Tsuboi, I., Huo, Y., Kodama, Y., Otto, T.\*<sup>1</sup>, Kanno, J., Willecke, K.\*<sup>1</sup>, Trosko, JE.\*<sup>2</sup> and Inoue, T. : **Connexin 32 (Cx32) plays double functions, a promotion and a protection, For the chemically induced leukemogenesis**

International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation (2002.10)

\*<sup>1</sup> Inst fur Genetik, Bonn Univ, Bonn, Germany

\*<sup>2</sup> Dept of Ped and Human Dev, Michigan State Univ, College of Human Med, East Lansing, Michigan, U.S.A.

平林容子, 尹 秉一, 川崎 靖, 李 光勲, 霍 艶, 金子豊蔵, 黒川雄二\*<sup>1</sup>, 淀井淳司\*<sup>2</sup>, 菅野 純, 井上 達 : **Thioredoxin過剰発現によるベンゼン誘発白血病の抑制**

第61回日本癌学会総会 (2002. 2)

\*<sup>1</sup> 佐々木研

\*<sup>2</sup> 京大ウイルス研

吉田和子\*, 相沢志郎\*, 渡辺恵子\*, 平林容子, 井上 達 : **p53ヘテロ欠失B10マウスに放射線で誘発されるリンパ腫は副腎皮質ホルモン投与により抑制される**  
日本放射線影響学会 第45回大会 (2002. 9)

\*放医研

相沢志郎\*, 渡辺恵子\*, 田中 薫\*, 吉田和子\*, 平林

容子, 井上 達 : **p53ヘテロ欠失マウスからの放射線誘発胸腺リンパ腫発生過程におけるp53ホモ欠失マウス胸腺細胞の出現の解析**

日本放射線影響学会 第45回大会 (2002. 9)

\*放医研

平林容子, 尹 秉一, 壺井 功, 霍 艶, 李 光勲, 井上 達 : **コネクシン32の骨髄の造血における機能と実験白血病の誘発における防護と促進の二面的役割**

第64回日本血液学会総会 (2002. 9)

峯畑健一\*, 竹内真樹\*, 平林容子, 井上 達, 宮島篤\* : **新生児の造血におけるオンコスタチンMの役割**

第64回日本血液学会総会 (2002. 9)

\*東大・分生研

Hirabayashi, Y., Miyajima, A.\*<sup>1</sup>, Yokota, T.\*<sup>2</sup>, Arai, K-I.\*<sup>2</sup>, Li, GX., Yoon, BI., Kaneko, T., Kanno, J. and Inoue, T. : **Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on B cell differentiation in mouse pre-B colonization model regulated by artificially introduced human IL-3 receptors**

22nd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutant and POPs (Dioxin 2002) (2002. 8)

\*<sup>1</sup> 東大・分生研

\*<sup>2</sup> 東大・医科研

Hirabayashi, Y., Yoon, BI., Kawasaki, Y., Yodoi, J.\* and Inoue, T. : **Thioredoxin overexpression mouse is less sensitive to benzene hematotoxicity and leukemogenesis**  
31st Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (2002. 7)

\* Institute of Virus Research, Kyoto Univ.

Yoon, BI., Hirabayashi, Y., Kanno, J., Fujii-Kuriyama, Y.\* and Inoue, T. : **Aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates benzene-induced hematotoxicity**

31st Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (2002. 7)

\* Department of Chemistry, Tohoku University, Graduate School for Science.

Minehata, K-I.\*<sup>1</sup>, Takeuchi, M.\*<sup>1</sup>, Sekine, K.\*<sup>1</sup>, Hara, T.\*<sup>2</sup>, Donovan, P.\*<sup>3</sup>, Hirabayashi, Y., Inoue, T. and Miyajima, A.\*<sup>1</sup> : **Role of OncostatinM for the expansion of erythroid progenitors in bone marrow and spleen during the embryogenic and neonatal stages**

31st Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology (2002. 7)

\*<sup>1</sup> IMCB, Univ. of Tokyo

\*<sup>2</sup> Tokyo Metropolitan Institute

\*<sup>3</sup> Thomas Jefferson Univ., USA

平林容子, 尹 秉一, 川崎 靖, 児玉幸夫, 金子豊蔵, 菅野 純, 井上 達 : **アリルハイドロカーボン受容体を**

### 介したベンゼンの造血毒性発現

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002.6)

平林容子, 川崎 靖, 尹 秉一, 児玉幸夫, 菅野 純, 淀井淳司\*, 井上 達: ADF過剰発現による老化遅延マウスでの遺伝子毒性発がんエピジェネティック発がん日本基礎老化学会第25回大会 (2002.5)

\*京都大学ウイルス研究所

相沢 信\*<sup>1</sup>, 平本正樹\*<sup>1</sup>, 相崎健一, 藤井寿一\*<sup>2</sup>, 菅野仁\*<sup>2</sup>: ビルビン酸キナーゼ異常症における無効造血第64回日本血液学会総会 (2002.9)

\*<sup>1</sup> 日本大学医学部

\*<sup>2</sup> 東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部

大野泰雄: 薬物相互作用・臨床薬物動態試験: 実施その解釈と留意点

日本薬物動態学会ワークショップ (2002.5)

Yasuo Ohno: Japanese Regulatory Requirements for Clinical Pharmacokinetics

Microsome and Drug Oxidation (2002.7)

Yasuo Ohno: Validation & Regulatory Acceptance of Alternative Methods. Regulatory Acceptance in Japan 4th World Congress on Alternatives to Animal Experimentation (2002.8)

大野泰雄: 薬物相互作用

創薬薬理フォーラム (2002.9)

大野泰雄: 安全性薬理コアバッテリー試験のGLP適合性調査

医薬品機構主催シンポジウム, 東京 (2002.9.18), 大阪 (2002.9.20)

岡崎 治\*<sup>1</sup>, 糸川健一\*<sup>1</sup>, 山田泰弘\*<sup>2</sup>, 松本茂樹\*<sup>3</sup>, 中村明生\*<sup>4</sup>, 藤崎 浩\*<sup>5</sup>, 寺内嘉章\*<sup>6</sup>, 馬場隆彦\*<sup>7</sup>, 嶋田薫\*<sup>8</sup>, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞のバリデーション (1) 凍結ヒト肝細胞を用いた薬物代謝評価

第17回日本薬物動態学会, 東京 (2002.11)

\*<sup>1</sup> 第一製薬

\*<sup>2</sup> 田辺製薬

\*<sup>3</sup> 持田製薬

\*<sup>4</sup> 日本新薬

\*<sup>5</sup> アベンティスファーマ

\*<sup>6</sup> 大日本製薬

\*<sup>7</sup> 塩野義製薬

\*<sup>8</sup> ファイザー製薬

東郷克彦\*, 後藤 洋\*, 中村明生\*, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞のバリデーション (2) 凍結ヒト肝細胞を用いたエトドラクの代謝検討

第17回日本薬物動態学会, 東京 (2002.11)

\* 日本新薬

藤崎 浩\*, 有馬德行\*, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞バリデーション (3) 凍結ヒト肝細胞を用いたアザセトロン代謝評価

第17回日本薬物動態学会 東京 (2002.11)

\*三菱ウエルファーマ

三瀬雅史\*, 寺内嘉章\*, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞バリデーション (4) 凍結ヒト肝細胞を用いたゾニサミドの代謝評価

第17回日本薬物動態学会 東京 (2002.11)

\*大日本製薬

戸内 明\*, 佐藤隼人\*, 山口嘉隆\*, 桐田史郎\*, 馬場隆彦\*, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞バリデーション (5) 凍結ヒト肝細胞を用いたリルマザホン及びニトラゼパムの代謝

第17回日本薬物動態学会 東京 (2002.11)

\*塩野義製薬

高島忠之\*, 村瀬茂夫\*, 嶋田 薫\*, 大野泰雄: 代謝研究のためのヒト肝細胞バリデーション (6) CYP2D6 PM/EM凍結ヒト肝細胞を用いたデキストロメトルファン代謝評価

第17回日本薬物動態学会 東京 (2002.11)

\*ファイザー製薬

大野泰雄: Mass Balance試験の意義.

第17回日本薬物動態学会. フォーラム2002 (2002.11.22)

大野泰雄: 臓器移植法の改定とヒト組織の研究利用. イントロダクション

第16回日本動物実験代替法学会シンポジウム (2002.12)

大野泰雄: 「Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価」

厚生科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班及び日本動物実験代替法学会代替法評価委員会主催公開シンポジウム (2002.12)

大野泰雄: OECDガイドライン・皮膚吸収 (427, 428) および皮膚腐食性 (430, 431) について. 最近のOECD毒性試験・ガイドラインの動向について

国立衛研, 特別講演会 (2003.2)

大野泰雄: ヒト肝 (細胞, ミクロゾーム) を用いた薬物動態試験

第二回ヒューマンサイエンス研究資源バンク技術講習会, 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団主催 (2003.2)

Koizumi, S. and Inoue, K.: A dynamic regulation by astrocytic ATP of synaptic transmission in the hippocampus

The 3<sup>rd</sup> International symposium of brain function (2002. 5)

Koizumi, S., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Fujishita, K. and Inoue, K. : **Regulation by astrocytic ATP of synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons** 7<sup>th</sup> International Symposium for Adenine & Adenine Nucleotide (2002. 5)

Koizumi, S., Rosa, P.\*<sup>1</sup>, Willars, G.B.\*<sup>2</sup>, Challiss, R.A.J.\*<sup>2</sup>, Taverna, E.\*<sup>1</sup>, Francolini, M.\*<sup>1</sup>, Bootman, M.D.\*<sup>3</sup>, Lipp, P.\*<sup>3</sup>, Roder, J.\*<sup>4</sup>, Jeromin, A.\*<sup>4</sup> and Inoue, K. : **P2Y受容体を介する開口放出増強機序の解明**

日本神経科学会 (2002. 7)

\*<sup>1</sup> CNR-Cell. Mol. Pharmacol. Center

\*<sup>2</sup> University of Leicester

\*<sup>3</sup> The Babraham Institute

\*<sup>4</sup> Mount Sinai Hospital

小泉修一, 井上和秀 : **ATPによる細胞間Ca<sup>2+</sup>wave**  
日本神経化学会 (2002. 7)

小泉修一, 井上和秀 : **グリア細胞のシナプス伝達への関与**

ATP研究会 (2002. 8)

Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., and Inoue, K. : **Characterization of intercellular calcium wave propagation in by endogenous ATP in cultured hippocampus**

Society for Neuroscience 31<sup>st</sup> Annual Meeting (2002. 11)

小泉修一, 井上和秀 : **アストロサイト由来ATPは恒常的にシナプス伝達を制御している**

岡崎生理研研究会 (2002. 11)

小泉修一, 井上和秀 : **目で見るアストロサイトのATP放出とCa<sup>2+</sup>wave伝播**

神経科学領域における分子モニタリング (2002. 11)

小泉修一, 井上和秀 : **ATPによるアストロサイト-神経連関**

グリア研究会 (2002. 11)

小泉修一, 井上和秀 : **ATPとグリア細胞による神経伝達調節**

クロマフィン研究会 (2002. 12)

小泉修一 : **P2Y受容体と痛み**

ATP・アデノシン研究会第8回学術シンポジウム (2003. 3)

小泉修一, 井上和秀 : **ATPによるグリア-神経細胞クロストーク**

日本薬理学会 (2003. 3)

小泉修一, 井上和秀 : **アストロサイトからのATP放出と神経細胞機能**

日本薬理学会 (シンポジウム) (2003. 3)

津田 誠\*, 小泉修一, 井上和秀 : **Neuropathic pain and spinal glial cells: controlling by ATP receptors**

日本薬理学会 (シンポジウム) (2003. 3)

藤下加代子, 小泉修一, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 井上かおり\*, 井上和秀 : **ATPによるヒト表皮ケラチノサイトの細胞間Ca<sup>2+</sup>wave伝播の解析**

日本薬理学会 (2003. 3)

溝腰朗人, 津田 誠, 重本(最上)由香里, 井上和秀 : **神経因性疼痛モデル動物のアロディニア発現はp38MAPキナーゼ阻害薬で抑制される**

日本薬理学会 (2003. 3)

檜楨大介, 小泉修一, 溝腰朗人, 津田誠, 重本(最上)由香里, 井上和秀 : **UTPによるアロディニア誘発機序の解明**

日本薬理学会 (2003. 3)

宮竹真由美\*, 成田 年\*, 小泉修一, 井上和秀, 鈴木勉\* : **メタンフェタミン誘発性運動亢進におけるアストロサイト役割**

日本薬理学会 (2003. 3)

\*星薬科大学

篠崎陽一, 小泉修一, 石田誠一, 井上和秀 : **ATPにより誘発されるアストロサイトの遺伝子発現パターンの解析**

日本薬理学会 (2003. 3)

戸崎秀俊, 重本(最上)由香里, 小濱とも子, 小泉修一, 井上和秀 : **レチノイドによるP2X<sub>2</sub>遺伝子発現亢進**

日本薬理学会 (2003. 3)

重本(最上)由香里, 小泉修一, 津田 誠, 佐々木 洋\*, 大澤圭子\*, 石田誠一, 高坂新一\*, 多田 薫, 井上和秀 : **ミクログリアP2Y<sub>6</sub>受容体の生理機能**

日本薬理学会 (2003. 3)

\*国立精神神経センター

Nakazawa, K. : **Effects of amino acid substitution at external channel pore mouth on multivalent cation block of P2X<sub>2</sub> receptor**

7<sup>th</sup> International Symposium on Adenosine & Adenine Nucleotides (2002. 5)

Sato, K., Matsuki, N., Ohno, Y., Nakazawa, K. : **Effects of 17β-estradiol and xenoestrogen on the glutamate uptake in primary cultured rat astrocytes**

32<sup>nd</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience (2002. 11)

中澤憲一, 生島裕恵, 大野泰雄: **P2X<sub>2</sub>受容体の細胞外領域のATP感受性に関わるアミノ酸残基**  
ATP・アデノシン研究会第8回学術シンポジウム (2003. 3)

佐藤 薫, 松木則夫\*, 中澤憲一, 大野泰雄: **エストロゲンによる培養アストロサイトのグルタミン酸取り込み阻害の作用メカニズム**  
第76回日本薬理学会年会 (2002. 3)

\*東京大学

生島裕恵, 中澤憲一, 野澤(石井)玲子\*, 竹内幸一\*, 大野泰雄: **P2X<sub>2</sub>受容体活性化における細胞外ループ内ジスルフィド結合近隣アミノ酸の役割**  
第76回日本薬理学会年会 (2002. 3)

\*明治薬科大学

中澤憲一, 生島裕恵, 野澤(石井)玲子\*, 竹内幸一\*, 大野泰雄: **P2X<sub>2</sub>受容体細胞外領域の高保存性トリプトファン残基のチャネ活性化における必要性**  
第76回日本薬理学会年会 (2002. 3)

\*明治薬科大学

小澤正吾: **第Ⅱ相薬物代謝酵素: 機能, 遺伝的多型性, および発現調節**  
第20回生物薬剤学研究会 (2002. 6)

石田誠一, 重本(最上)由香里, 影近弘之, 首藤紘一, 小澤正吾, 澤田純一, 大野泰雄, 井上和秀: **遺伝子発現プロファイリングによって見出されたレチノイドシナージストの新しいサブクラスとその治療薬として可能性**  
第13回日本レチノイド研究会 (2002. 11)

石田誠一: **DNA Chipの神経薬理学への応用**  
第7回「神経科学領域における分子モニタリング」シンポジウム (2002. 11)

小澤正吾: **投薬日本人患者の遺伝子多型解析**  
第17回日本薬物動態学会 (2002. 11)

小澤正吾: **薬物代謝酵素遺伝子多型と抗癌剤の薬効・副作用**  
第49回日本臨床検査医学会総会 (2002. 11)

小澤正吾: **日本人臓器の研究利用の必要性について: 日本人特異的なSNPとその機能について代謝酵素を材料として**  
第16回日本動物実験代替法学会大会 (2002. 12)

八幡紋子\*, 金 秀良, 斎藤嘉朗, 久保 崇, 中島由起子, 大野泰雄, 松本宜明\*, 福岡正道\*, 小澤正吾, 澤田純一: **チミジル酸合成酵素遺伝子の5'-非翻訳領域(UTR)のくり返し配列多型**

第123回日本薬学会年会 (2003. 3)

\*昭和薬科大学

篠内桃子, 森田繁道\*<sup>1</sup>, 繁原英治\*<sup>2</sup>, 馬場隆彦\*<sup>3</sup>, 二宮真一\*<sup>4</sup>, 岡崎 治\*<sup>5</sup>, 寺内嘉章\*<sup>6</sup>, 山田泰弘\*<sup>7</sup>, 名淵義明\*<sup>8</sup>, 中村明生\*<sup>9</sup>, 安盛俊雄\*<sup>10</sup>, 嶋田 薫\*<sup>11</sup>, 藤崎浩\*<sup>12</sup>, 奥平典子\*<sup>13</sup>, 大西修平\*<sup>14</sup>, 大野泰雄: **代謝研究のためのヒト肝細胞バリデーション (7) 倫理委員会への承認申請の現状**

第17回日本薬物動態学会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup>アベンティスファーマ(株)薬物動態研究所

\*<sup>2</sup>三共(株)薬剂動態研究所

\*<sup>3</sup>塩野義製薬(株)新薬研究所

\*<sup>4</sup>第一化学薬品(株)薬物動態研究所

\*<sup>5</sup>第一製薬(株)創剤代謝研究所

\*<sup>6</sup>大日本製薬(株)薬物動態研究所

\*<sup>7</sup>田辺製薬(株)薬物動態ユニット

\*<sup>8</sup>中外製薬(株)動態物性研究所

\*<sup>9</sup>日本新薬(株)開発研究所

\*<sup>10</sup>萬有製薬(株)生物医学研究所

\*<sup>11</sup>ファイザー製薬(株)中央研究所

\*<sup>12</sup>三菱ウエルファーマ(株)開発研究所

\*<sup>13</sup>明治製薬(株)薬物動態研究所

\*<sup>14</sup>持田製薬(株)薬物動態研究所

紅林秀雄, 大野泰雄: **除草剤 prometryn のヒトおよびラット肝ミクロソームにおける代謝**  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

宇佐見誠, 大野泰雄: **培養ラット胚の発育に及ぼす補体成分C3フラグメントの効果に関する検討**  
第42回日本先天異常学会学術集会 (2002. 7)

宇佐見誠, 大野泰雄: **培養ラット胚における補体成分C3の胚栄養因子活性と膜受容体との結合に関する研究**  
日本動物実験代替法学会第16回大会 (2002. 12)

西川秋佳, 古川文夫, 広瀬雅雄: **BOP誘発ハムスター膀胱がんにおけるCOX-2の発現とnimesulideによる修飾**  
第91回日本病理学会総会 (2002. 3)

西川秋佳, 広瀬雅雄: **強力なin vivo変異原物質MXのマウスにおける発がん性の検討**  
第91回日本病理学会総会 (2002. 3)

広瀬雅雄, 岡崎和志, 西川秋佳: **Benzyl isothiocyanateによるラットBBN膀胱発がんの修飾作用**  
第9回日本がん予防研究会 (2002. 7)

西川秋佳, 古川文夫, 梅村隆志, 岡崎和志, 神吉けい太, 若林敬二\*, 広瀬雅雄: **中期膀胱発がんモデルにおけるCOX-2阻害剤nimesulideの抑制効果**  
第9回日本がん予防研究会 (2002. 7)

\*国立がんセンター研究所

西川秋佳, 岡崎和志, 中嶋 圓\*<sup>1</sup>, 木苗直秀\*<sup>2</sup>, 能美健彦, 広瀬雅雄: **gpt deltaマウスにおけるMXの変異原**

## 性・がん原性検索

第61回日本癌学会総会ワークショップ (2002.10)

\*1 安評センター

\*2 静岡県立大

今沢孝喜, 西川秋佳, 孫 和永, 岡崎和志, 梅村隆志, 神吉けい太, 広瀬雅雄: **DHPN誘発ラット甲状腺発がんモデルにおける atrazine または tamoxifen の影響**  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

岡崎和志, 西川秋佳, 今沢孝喜, 梅村隆志, 神吉けい太, 丸山覚司, 広瀬雅雄: **Benzyl isothiocyanate (BITC) のラット膀胱発がんに対する多様な修飾作用**  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

神吉けい太, 岡崎和志, 西川秋佳, 今沢孝喜, 梅村隆志, 丸山覚司, 広瀬雅雄: **Benzyl isothiocyanate (BITC) の同時投与によるラットBBN膀胱発がんの抑制**  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

丸山覚司, 岡崎和志, 西川秋佳, 今沢孝喜, 梅村隆志, 神吉けい太, 中澤裕之\*, 吉村吉博\*, 広瀬雅雄: **アスコルビン酸と亜硝酸塩併用投与によるラット前胃発がん促進作用のメカニズム**  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\* 星薬科大

梅村隆志, 児玉幸夫, 今沢孝喜, 岡崎和志, 神吉けい太, 丸山覚司, 西川秋佳, 広瀬雅雄, 黒川雄二\*: **肺発がん物質短期検出系 (rasH2/BHTモデル) の開発**  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\* 佐々木研究所

増村健一, 西川秋佳, 岡崎和志, 梅村隆志, 広瀬雅雄, 能美健彦: **臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) による種特異的腎発がん**と突然変異誘発の解析  
第61回日本癌学会総会 (2002.10)

Sung-Hee Lee \*, In-Seon Lee \*, Sung-Hee Lee \*, Syngook Lee \*, Akiyoshi Nishikawa: **Apoptosis induction by *Artemisia princeps* var. *orientalis* in human leukemia U937 cells**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\* Keimyung Univ.

西川秋佳: **化学発がんの修飾機構とがんの予防**  
第3回岐阜シンポジウム・日本癌学会シンポジウム (2002.11)

神吉けい太, 西川秋佳, 古川文夫, 岡崎和志, 梅村隆志, 北村泰樹, 今沢孝喜, 広瀬雅雄: **MNNGラット二段階膵胃発がんにおける選択的COX-2阻害剤Nimesulideの影響**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

今沢孝喜, 西川秋佳, 曾根秀子\*, 梅村隆志, 北村泰樹, 神吉けい太, 広瀬雅雄: **LECラットにおけるメタロチオネイン, HNE修飾蛋白およびHSP60の免疫電顕的観察**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\* 国立環境研究所

梅村隆志, 児玉幸夫, 神吉けい太, 北村泰樹, 今沢孝喜, 西川秋佳, 広瀬雅雄: **DEN低濃度長期投与により生じるマウス肝内胆管嚢胞状過形成に対するペンタクロロフェノールの促進効果**  
第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

北村泰樹, 西川秋佳, 神吉けい太, 梅村隆志, 今沢孝喜, 増村健一, 能美健彦, 広瀬雅雄: **MeIQxのgpt deltaマウスにおけるin vivo変異原性とがん原性の比較**  
第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

Nishikawa, A., Furukawa, F., Umemura, T., Kanki, K., Wakabayashi, K. \*, Hirose, H.: **A COX-2 inhibitor inhibits post-initiation phase of *N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine*-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters**

42<sup>nd</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (2003.3)

\* 国立がんセンター研究所

Uneyama, C., Shibutani, M., Masao, H.: **Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens**

The third international symposium on the study of brain function (2002.6)

榎富直哉, 渋谷 淳, 高木広憲, 畝山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: **内分泌かく乱化学物質の周産期暴露による児動物下垂体前葉のゴナドトロピン陽性細胞数の変動について**

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002.6)

渋谷 淳, 有村卓朗, 畝山智香子, 高木広憲, 広瀬雅雄: **非遺伝子傷害性肝発がん物質投与ラットにおける発現遺伝子群のプロファイリング**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

高木広憲, 渋谷 淳, 岡崎和志, 畝山智香子, 広瀬雅雄: **Phenylethyl isothiocyanate (PEITC) のラット膀胱二段階発癌モデルにおけるイニシエーション作用**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 有村卓朗, 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解析 (第四報)**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

渋谷 淳: **マイクロダイセクション法の基礎と毒性病理学への応用, メタカーン固定材料を用いた解析方法について**

日本毒性病理学会主催 平成14年度毒性病理教育セミナー (2002.11)

加藤奈津美\*, 渋谷 淳, 高木広憲, 眞島恵介\*, 畝山智香子, 井上弘子, 藤田春香, 広瀬雅雄: **Ethinylestradiol 28日間反復投与時のラット肝臓における遺伝子の網羅的発現解析**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*立教大学理学部

畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 加藤奈津美, 藤田春香\*, 井上弘子\*, 広瀬雅雄: **メタカーン固定・免疫染色後 microdissection により採取した微小組織領域での突然変異解析**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*第一製薬研究技術センター

井上弘子\*, 渋谷 淳, 高木広憲, 加藤奈津美, 李 京烈, 有村卓朗, 畝山智香子, 藤田春香\*, 広瀬雅雄: **非遺伝子傷害性肝発がん物質長期間投与によって発現の変化する遺伝子群のカタログ化**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*第一製薬研究技術センター

藤田春香\*, 高木広憲, 渋谷 淳, 畝山智香子, 井上弘子\*, 加藤奈津美, 広瀬雅雄: **メタカーン固定・パラフィン包埋切片における laser microdissection, real-time RT-PCR を用いた微小細胞領域における mRNA 発現解析法の開発**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*第一製薬研究技術センター

高木広憲\*<sup>1</sup>, 渋谷 淳, 畝山智香子, 李 輝哲\*<sup>2</sup>, 西原真杉\*<sup>2</sup>, 三森国敏\*<sup>1,3</sup>, 広瀬雅雄: **Ethinylestradiol 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 genistein の修飾作用の検討**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*<sup>1</sup> 岐阜大連合獣医

\*<sup>2</sup> 東京大学

\*<sup>3</sup> 東京農工大

Shibutani, M., Arimura, T., Kobayashi, T., Takahashi, N., Takagi, H.\*, Uneyama, C., Hirose, M.: **Molecular profiling of genes showing altered expression in the livers of rats treated with non-genotoxic carcinogens for 28 days**

42th Annual Meeting of Society of Toxicology (2003.3)

\*United Graduate School of Veterinary Sciences

Takagi, H.\*<sup>1</sup>, Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K.\*<sup>1,2</sup>, Hirose, M.: **Effects of perinatal exposure of five putative endocrine disrupting chemicals (EDCs), methoxychlor, genistein, diisononylphthalate, 4-nonylphenol and bisphenol A, on endocrine/reproductive systems in rats**

42th Annual Meeting of Society of Toxicology (2003.3)

\*<sup>1</sup> United Graduate School of Veterinary Sciences

\*<sup>2</sup> Tokyo University of Agriculture and Technology

上田 誠, 今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤 保, 高木久宜, 三森国敏\*, 広瀬雅雄: **Atrazine の卵巣摘出ラットに対する乳腺発がん修飾作用の検討**

第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002.6)

\*東京農工大学

今井俊夫: **各種臓器における二段階発がんモデルの応用**

第134回日本獣医学会学術集会シンポジウム (2002.9)

瀧澤 保, 今井俊夫, 上田 誠, 広瀬雅雄: **エストラジオールのラット甲状腺発がんプロモーション作用に対する抗甲状腺剤の増強作用**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

蓮村麻衣, 瀧澤 保, 上田 誠, 小野瀬淳一, 今井俊夫, 広瀬雅雄: **DHPN-sulfadimethoxine 誘発ラット甲状腺発がんの被膜浸潤過程**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

上田 誠, 今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤 保, 高木久宜, 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 三森国敏\*, 広瀬雅雄: **Atrazine の卵巣摘出ラットに対する乳腺発がん修飾作用の検討**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

\*東京農工大学

小野瀬淳一, 上田 誠, 蓮村麻衣, 今井俊夫, 広瀬雅雄: **DMBA 誘導ラット乳腺腫瘍に対する各種化学物質の増殖抑制効果**

第61回日本癌学会総会 (2002.10)

瀧澤 保, 今井俊夫, 田村 啓, 上田 誠, 安原加壽雄, 三森国敏\*, 広瀬雅雄: **コウジ酸の p53 ノックアウトマウスおよびラットにおける肝発がん作用**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

\*東京農工大学

上田 誠, 今井俊夫, 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: **化学物質によるラット乳癌退縮時におけるアポトーシスの関与**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

小野瀬淳一, 今井俊夫, 蓮村麻衣, 上田 誠, 広瀬雅雄: **腫瘍性病変を指標としたラット中期大腸発がん試験法の開発**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

蓮村麻衣, 今井俊夫, 小野瀬淳一, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: **パラアミノ安息香酸のラット甲状腺発がん促進作用**

第19回日本毒性病理学会 (2003.1)

今井俊夫, 小野瀬淳一, 蓮村麻衣, 上田 誠, 瀧澤 保, 広瀬雅雄: **DHPN-Sulfadimethoxine 誘発ラット甲状腺浸**

## 潤癌の発生過程

第19回日本毒性病理学会 (2003. 1)

林 眞：日本環境変異原学会に何が求められているのか  
日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)Hayashi, M. : Asian Environmental Mutagen Societies  
(AAEMS)-The Japanese Environmental Mutagen Society  
(JEMS)-

日本環境変異原学会第31回大会フォーラム (2002. 11)

浜田修一\*<sup>1</sup>, 芹川忠夫\*<sup>2</sup>, 林 眞：ラット小核試験結果  
に影響を及ぼす因子と造血機能との関係

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> エスエス製薬中央研究所\*<sup>2</sup> 京都大学医学部鈴木 洋, 鈴木孝昌, 白鳥 孝, 池田直弘, 小林一男,  
島田 康, 萩原利行, 長岡孝子, 畠山茂樹, 吉田純一,  
林 眞：幼若ラット肝細胞小核試験一げっ歯類肝がん原  
物質等による検討一

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

JEMS・MMS研究会, 多臓器小核試験, 肝臓小核試験グ  
ループ浅野哲秀\*<sup>1</sup>, 西川貴史\*<sup>2</sup>, 晴佐久満\*<sup>2</sup>, 鈴木孝昌, 林  
眞：げっ歯類の皮膚組織を用いる小核試験法の開発と検  
証 第2報

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 日東電工\*<sup>2</sup> ライオン(株)安全性評価研究所Hayashi, M. : The potential and limitation of the comet  
assay-an example of genotoxicity assessment of amaranth  
Workshop on comet assay: Application in toxicology and  
molecular epidemiology (2003. 2)Hayashi, M. : International current of the genotoxicity  
testingXXVIII Annual Conf. Environ. Mutagen. Soc. India &  
Symposium on Environ. Genomics & Helth Sci. (2003. 2)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 cells25<sup>th</sup> Anniversary Meeting of the United Kingdom  
Environmental Mutagen Society (2002. 6)本間正充, 王 文晟\*<sup>1</sup>, 桜庭真弓, 泉 雅子\*<sup>2</sup>, 谷田貝  
文夫\*<sup>2</sup>, 林 眞：ほ乳類細胞におけるDNA2本鎖切断の  
運命

日本放射線影響学会第45回大会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> ロチェスター大学\*<sup>2</sup> 理化学研究所RI谷田貝文夫\*, 森本茂子\*, 加藤武司\*, 本間正充：p53  
欠損によるLOHパターンの変化からDNA2本鎖切断修  
復経路についての示唆が可能か？

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*理化学研究所RI

本間正充：ヒト細胞を基礎とした新しい*in vitro* 遺伝毒  
性評価系の構築

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

岡 宏昭\*, 吉村宏美\*, 大内田昭信\*, 本間正充：マウ  
スおよびヒト由来細胞種間における5-Fluorouracilの遺  
伝毒性に対する感受性の検討

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*大鵬薬品工業

Zhan, Li.\* , Suzuki, T., Sakamoto, H., Koizumi, T.,  
Sakuraba, M., Hayashi, M., Honma, M. : Genotoxicity of  
mrococystin-LR *in vitro* and *in vivo*

第31回日本環境変異原学会 (2002. 11)

\*四川大学公衆衛生学院

小原有弘\*, 鈴木孝昌, 小泉朋子, 本間正充, 林 眞：  
アクリジンマスタードICR-170, ICR-190のトランスジ  
ェニックマウスにおける変異原性

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*第一化学薬品

坂本浩子, 桜庭真弓, 小原有弘\*, 鈴木孝昌, 林 眞,  
本間正充：ヒト肝由来培養細胞株を用いた小核試験と,  
遺伝子突然変異試験に有用なトランスジェニック細胞の  
作成

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*第一化学薬品

Honma, M., Kato, T.\* , Yatagai, F.\* , Hayashi, M. :  
Characterization of the genomic instability in mismatch  
repair deficient human lymphoblastoid cell lines34<sup>th</sup> Annual Meeting of Environmental Mutagen Society  
(2003. 5)

\*理化学研究所RI

能美健彦：微生物のトランスリージョンDNAポリメ  
ラーゼ

日本環境変異原学会公開シンポジウム (2002. 5)

Nohmi, T. : Y-family DNA polymerases as the dynamics  
of evolution

日本進化学会東京大会 (2002. 8)

グルーズ・ピーター, 清水雅富\*<sup>1</sup>, ピサーニ フラン  
チェスカ\*<sup>2</sup>, デフェリス マリアリタ\*<sup>2</sup>, 菅家祐輔\*<sup>1</sup>, 能  
美健彦：YファミリーDNAポリメラーゼによるDNA損

## 傷部位の複製と突然変異

日本放射線影響学会第45回大会 (2002. 9)

\*1 大妻女子大学院家政学研究所

\*2 イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

増村健一, 星野真紀子\*1, 谷田貝文夫\*2, 落合雅子\*3,  
上田乙也\*4, 鈴木宏志\*4,5, 中釜 齊\*3, 福岡正道\*1,  
能美健彦: DNA PKcsに依存しない誤りがち非相同的組  
換え経路と放射線誘発突然変異

日本放射線影響学会第45回大会 (2002. 9)

\*1 昭和薬科大学

\*2 理化学研究所RI

\*3 国立がんセンター研究所

\*4 中外製薬(株)探索研究所

\*5 帯広畜産大学原虫病センター

齋藤祐介\*1, 上原芳彦\*1, 竹田直樹\*1, 鈴木 操\*1, 能  
美健彦, 関 政幸\*3, 榎本武美\*3, 野田哲生\*1, 小野哲  
也\*1: ミスマッチ修復酵素チミンDNAグリコシラーゼ  
のマウス発生過程における機能

日本放射線影響学会第45回大会 (2002. 9)

\*1 東北大学医学部

\*2 熊本大学

\*3 東北大学薬学部

堀 昌樹\*1, 張秋梅\*1, 能美健彦, グルーズ・ピーター,  
杉山 弘\*2, 米井脩治\*1: 大腸菌DNAポリメラーゼIV  
(DinB)の酸化損傷塩基を含むDNAに対する合成能の  
解析

日本放射線影響学会第45回大会 (2002. 9)

\*1 京都大学理学部

\*2 東京医歯大生体材料工学研究所

増村健一, 西川秋佳\*, 岡崎和志\*, 梅村隆志\*, 広瀬雅  
雄\*, 能美健彦: 臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>)による種特  
異的腎発がん突然変異誘発の解析

日本癌学会61回総会 (2002. 10)

\*病理部

柴田淳史\*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, 中釜 齊\*1, 杉村  
隆\*1, 鈴木宏志\*3,4, 益谷美都子\*1: *gpt delta/Parp-1*欠  
損マウスにおける*N-nitrosobis(hydroxypropyl)amine*投  
与後の突然変異

日本癌学会第61回総会 (2002. 10)

\*1 国立がんセンター研究所

\*2 共立薬科大学

\*3 中外製薬(株)探索研究所

\*4 帯広畜産大学原虫病センター

能美健彦: トランスジェニック動物を用いる遺伝毒性試  
験

信州実験動物研究会 (2002. 10)

能美健彦: 古細菌のYファミリーDNAポリメラーゼ

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

Nohmi, T.: Misincorporation of oxidized dNTPs by Y-  
family DNA polymerases

第1回日米DNA修復会議 (2002. 10)

能美健彦: 突然変異の誘発に関与するYファミリー  
DNAポリメラーゼ

埼玉大学生命科学講演会 (2002. 11)

小久保清子, 山田雅巳, 松井恵子, 菅家祐輔\*1, 能美健  
彦: Ames試験菌株におけるY-ファミリーDNAポリメ  
ラーゼ欠損株の作製と性状解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*1 大妻女子大学院家政学研究所

落合雅子\*1, 小林悠子\*1, 瀬尾友子\*1, 飯塚祐子\*1, 上  
田乙也\*2, 鈴木宏志\*2, 増村健一, 能美健彦, 杉村  
隆\*1, 中釜 齊\*1: SCIDマウスにおける自然発生及び  
*azoxymethane*誘発の欠失型突然変異の解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*1 国立がんセンター研究所

\*2 中外製薬(株)探索研究所

宇多洋美\*1, 増村健一, 岡崎和志\*2, 梅村隆志\*2, 林  
宏行\*3, 近藤 宏\*3, 神藤康弘\*3, 福岡正道\*1, 広瀬雅  
雄\*2, 西川秋佳\*2, 能美健彦: 臭素酸カリウム誘発突然  
変異の*gpt delta*トランスジェニックラット, マウスを用  
いた解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*1 昭和薬科大学

\*2 病理部

\*3 明治製菓(株)薬理安全性研究所

増村健一, 松井恵子, 山田雅巳, 高村岳樹\*, 若林敬二\*,  
能美健彦: アルキル化剤高感受性サルモネラ株を用いた  
肺炎がん物質検索系の開発

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*国立がんセンター研究所

竹入 章\*, 三島雅之\*, 田中健司\*, 塩田明文\*, 原田  
麻子\*, 井上 誠\*, 増村健一, 能美健彦: *gpt delta*マウ  
ス由来の不活化細胞株の樹立と, *in vivo*遺伝子突然変異  
検出系への応用

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*中外製薬(株)富士御殿場研究所

林 宏行\*, 千手奈美\*, 小川真由美\*, 江刺家恵子\*,  
長沢美恵子\*, 神藤康弘\*, 能美健彦: 新規変異原性試験  
用*gpt delta*トランスジェニックラットを用いた*N-ethyl-  
N-nitrosourea*による突然変異誘発の経時的変化及び変  
異スペクトラム解析

日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

\*明治製菓(株)薬理安全性研究所

柴田淳史<sup>\*1,2</sup>, 益谷美都子<sup>\*1</sup>, 野崎中成<sup>\*1</sup>, 鎌田宣夫<sup>\*3</sup>, 藤原久子<sup>\*1</sup>, 増村健一, 中釜 斉<sup>\*1</sup>, 杉村 隆<sup>\*1</sup>, 小林 静子<sup>\*2</sup>, 鈴木宏志<sup>\*3,4</sup>, 能美健彦: *gpt delta* マウスにおける変異検出系としてのSpi-assayの改良—ブランク形成時のマグネシウムイオン添加の影響—  
日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

<sup>\*1</sup> 国立がんセンター研究所

<sup>\*2</sup> 共立薬科大学

<sup>\*3</sup> 中外製薬(株)探索研究所

<sup>\*4</sup> 帯広畜産大学原虫病センター

松井恵子, 金秀良, 山田雅巳, 能美健彦: 多環芳香族炭化水素に対して交換受精を示すAmes試験菌株の開発  
日本環境変異原学会第31回大会 (2002. 11)

増村健一, 星野真紀子<sup>\*1</sup>, 谷田貝文夫<sup>\*2</sup>, 落合雅子<sup>\*3</sup>, 上田乙也<sup>\*4</sup>, 鈴木宏志<sup>\*4,5</sup>, 中釜 斉<sup>\*3</sup>, 福岡正道<sup>\*1</sup>, 能美健彦: SCID マウスにおける放射線誘発突然変異と誤りがち非相同的組換え  
第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12)

<sup>\*1</sup> 昭和薬科大学

<sup>\*2</sup> 理化学研究所RI

<sup>\*3</sup> 国立がんセンター研究所

<sup>\*4</sup> 中外製薬(株)探索研究所

<sup>\*5</sup> 帯広畜産大学原虫病センター

堀 昌樹<sup>\*1</sup>, 張秋梅<sup>\*1</sup>, 能美健彦, グルーズ・ピーター, 杉山 弘<sup>\*2</sup>, 米井脩治<sup>\*1</sup>: 大腸菌DNAポリメラーゼVI (DinB) の酸化損傷塩基の複製機構  
第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12)

<sup>\*1</sup> 京都大学理学部

<sup>\*2</sup> 東京医歯大生体材料工学研究所

清水雅富, Petr Gruz, 紙谷浩之<sup>\*1</sup>, Francesca M. Pisani<sup>\*2</sup>, 金秀良, 菅家祐輔<sup>\*3</sup>, 原島秀吉<sup>\*1</sup>, 能美健彦: Y-ファミリーDNAポリメラーゼによる酸化損傷塩基の複製機構  
第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12)

<sup>\*1</sup> 北海道大院 薬学研究科

<sup>\*2</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

<sup>\*3</sup> 大妻女子大院家政学研究科

Petr Gruz, Masatomi Shimizu, Francesca M. Pisani<sup>\*</sup>, Mariarita De Felice<sup>\*</sup>, Takehiko Nohmi: Processing of heat-induced DNA modifications by the Y and B family DNA polymerases from archaeon *Sulfolobus solfataricus*  
第25回日本分子生物学会年会 (2002. 12)

<sup>\*</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

能美健彦: 個体レベルで見るゲノムの安定性と不安定性: トランスジェニックマウス動物を用いた突然変異の解析  
日本学術会議トキシコロジー研連シンポジウム (2002. 12)

Nohmi, T.: Novel Y-family DNA polymerases and their

roles in mutagenesis

国立遺伝学研究所 Biological Symposia (2003. 2)

Masumura, K., Nishikawa, A.<sup>\*</sup>, Okazaki, K.<sup>\*</sup>, Umemura, T.<sup>\*</sup>, Hirose, M.<sup>\*</sup>, Nohmi, T.: Analysis of different susceptibility of rat and mouse in mutagenesis induced by potassium bromate

Keystone Symposium: Functional Genomics: Global Analysis of Complex Biological Systems (2003. 2)

<sup>\*</sup> 病理部

Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H.<sup>\*1</sup>, Kim, S.-R., Pisani, F.M.<sup>\*2</sup>, Kanke, Y.<sup>\*3</sup>, Harashima, H.<sup>\*1</sup>, Nohmi, T.: Misincorporation of oxidized dNTPs by archaeal Y-family DNA polymerases

International Workshop on Modeling of Radiation Effects at Molecular and Cellular level (2003. 2)

<sup>\*1</sup> 北海道大院薬学研究科

<sup>\*2</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

<sup>\*3</sup> 大妻女子大院家政学研究科

Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H.<sup>\*1</sup>, Kim, S.-R., Pisani, F.M.<sup>\*2</sup>, Kanke, Y.<sup>\*3</sup>, Harashima, H.<sup>\*1</sup>, Nohmi, T.: Misincorporation of oxidized dNTPs by archaeal Y-family DNA polymerases

International Workshop on Modeling of Radiation Effects at Molecular and Cellular level (2003. 2)

<sup>\*1</sup> 北海道大院薬学研究科

<sup>\*2</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

<sup>\*3</sup> 大妻女子大院家政学研究科

清水雅富, Petr Gruz, 紙谷浩之<sup>\*1</sup>, Francesca M. Pisani<sup>\*2</sup>, 金秀良, 益谷央豪<sup>\*3</sup>, 菅家祐輔<sup>\*4</sup>, 原島秀吉<sup>\*1</sup>, 花岡文雄<sup>\*3</sup>, 能美健彦: YファミリーDNAポリメラーゼによる酸化的損傷ヌクレオチド(8-OH-dGTPと2-OH-dATP)の誤りがちな取り込み

ワークショップ「DNA Repair, Recombination and Mutagenesis 2003」(2003. 2)

<sup>\*1</sup> 北海道大学院薬学研究科

<sup>\*2</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

<sup>\*3</sup> 大阪大学院生命機能研究科

<sup>\*4</sup> 大妻女子大院家政学研究科

能美健彦: 突然変異の誘発とDNAポリメラーゼ

ワークショップ「ゲノム維持におけるDNAポリメラーゼの役割」(2003. 2)

清水雅富, Petr Gruz, 紙谷浩之<sup>\*1</sup>, 金秀良, Francesca M. Pisani<sup>\*2</sup>, 菅家祐輔<sup>\*3</sup>, 原島秀吉<sup>\*1</sup>, 能美健彦: 放射線などによる酸化損傷ヌクレオチドに対する古細菌YファミリーDNAポリメラーゼの取り込み

放射線リスク研究の革新的技術に関する国際シンポジウム—量子生命科学時代の技術— (2003. 3)

<sup>\*1</sup> 北海道大学院薬学研究科

<sup>\*2</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

## \*3 大妻女子大院家政学研究科

小久保清子\*, 山田雅巳, 松井恵子, 菅家祐輔\*, 能美健彦: ネズミチフス菌DNAポリメラーゼ遺伝子破壊株の各種変異原に対する感受性

ワークショップ「大腸菌ゲノミクスのさらなる発展に向けて: リソースの開発と今後」(2003. 3)

\*大妻女子大院家政学研究科

橋本顯子\*<sup>1</sup>, 天沼喜美子\*<sup>1</sup>, 日吉孝子\*<sup>1,2</sup>, 高野裕久\*<sup>1</sup>, 増村健一, 能美健彦, 青木康展\*<sup>1</sup>: *gpt delta* トランスジェニックマウスを用いた Benzo(a)pyrene の気管内投与による突然変異の解析

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 国立環境研究所

\*<sup>2</sup> 筑波大学人間総合科学部

Shimizu, M. \*<sup>1</sup>, Gruz, P., Kamiya, H. \*<sup>2</sup>, Kim, S.-R., Pisani, F.M. \*<sup>3</sup>, Masutani, C. \*<sup>4</sup>, Kanke, Y. \*<sup>1</sup>, Harashima, H. \*<sup>2</sup>, Hanaoka, F. \*<sup>4</sup>, Nohmi, T.: **Incorrect incorporation of oxidized dNTPs by Y-family DNA polymerases**  
34th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society (2003. 5)

\*<sup>1</sup> 大妻女子大院家政学研究科

\*<sup>2</sup> 北海道大学院薬学研究科

\*<sup>3</sup> イタリア国立中央研究機構蛋白質酵素生化学研究所

\*<sup>4</sup> 大阪大学院生命機能研究科

Nohmi, T.: **Molecular nature of genome rearrangements induced by crosslinker mitomycin C in vivo**  
Columbia University, Center for Radiological Research, Seminar (2003. 5)

能美健彦: 遺伝子導入動物を用いた遺伝毒性試験の開発  
第50回日本実験動物学会総会 (2003. 5)

Tanabe, H., Iizuka, R., Hojo, M., Kurematsu, M. \*, Takada, Y., Masui, T. and Mizusawa, H.: **Identification system for cross-contamination in cultured cell lines by combined methods with STR-PCR and molecular cytogenetics in JCRB**

World Congress on In Vitro Biology 2002 (2002. 6)

\* Japan Health Sciences Foundation

増井 徹: 人体由来の「もの」と「情報」の研究利用を支える枠組み—科学的, 倫理的, 社会的問題について  
日本環境変異原学会 MMS研究会第41回定例会 (2002. 7)

田辺秀之, Felix A. Habermann \*<sup>1</sup>, Stefan Muller \*<sup>2</sup>, Marion Cremer \*<sup>2</sup>, Johann von Hase \*<sup>3</sup>, Christoph Cremer \*<sup>3</sup>, Thomas Cremer \*<sup>2</sup>, 北條麻紀, 林 真, 水沢 博: 染色体テリトリーの核内配置: ヒト18番および19番染色体ホモログの核内配置はニワトリ, 霊長類細胞において進化的に保存されている

第4回日本進化学会東京大会 (2002. 8)

\*<sup>1</sup> ミュンヘン工科大学 動物育種学

\*<sup>2</sup> ミュンヘン大学 生物学科II—人類学/人類遺伝学

\*<sup>3</sup> ハイデルベルグ大学 キルヒホフ物理学研究所

増井 徹, 高田容子, 林 真, 田辺秀之, 水沢 博: ヒト組織・細胞の公共性のある研究用バンク提供における拒諾意思決定を支えるプロセスの設計  
第61回日本癌学会総会 (2002. 10)

増井 徹: 次世代医療を支えるヒト組織・病歴等のバンク構築  
第64回臨床外科学会 (2002. 11)

増井 徹, 高田容子, 田辺秀之, 水沢 博: 科学の性質に注目した人体由来資料の研究利用  
第14回日本生命倫理学会年次大会 (2002. 11)

田辺秀之, 石田誠一, 篠崎陽一, 北條麻紀, 首藤絏一\*, 井上和秀, 林 真, 水沢 博: HL60関連3細胞株の核型分析とレチノイン酸による分化誘導  
日本人類遺伝学会第47回大会 (2002. 11)  
\* 日本医薬情報センター

田辺秀之: 3D-FISH法による染色体のトポロジー解析: **interphase cytogenetics**について  
日本環境変異原学会第31回大会 FISH懇談会 (2002. 11)

Tanabe, H., Hojo, M., Hayashi, M. and Mizusawa, H.: **Chromosome territory arrangement in interphase cell nuclei by 3D-FISH technique**  
International Workshop on Nuclear Dynamics (2002. 12)

増井 徹: 臓器移植法の改定とヒト組織の研究利用: ヒト組織の分類  
日本実験動物代替法学会 (2002. 12)

田辺秀之, Marion Cremer \*<sup>1</sup>, Stefan Muller \*<sup>1</sup>, Felix A. Habermann \*<sup>2</sup>, Johann von Hase \*<sup>3</sup>, Christoph Cremer \*<sup>3</sup>, Thomas Cremer \*<sup>1</sup>, 北條麻紀, 林 真, 水沢 博: 染色体テリトリー: 3D-FISH法による核内配置の解析  
第20回染色体ワークショップ (2003. 1)

\*<sup>1</sup> ミュンヘン大学 生物学科II—人類学/人類遺伝学

\*<sup>2</sup> ミュンヘン工科大学 動物育種学

\*<sup>3</sup> ハイデルベルグ大学 キルヒホフ物理学研究所

Masui, T.: **On the characterization of consent required by medical research**  
International symposium on "patients" right to self-determination and informed consent (2003. 2)

増井 徹: ゲノム研究と薬学の倫理  
日本薬学会第123年会 (2003. 3)

Masui, T.: **Taming genome information**

A Japanese and American dialogue on the ethical and social issues facing researchers, community groups, and ethics committees (2003. 5)

増井 徹：病歴の二次利用を支えるシステム  
第4回日本がん分子疫学研究会 (2003. 5)

大野泰雄, 増井 徹 (オーガナイザー)：移植不適合臓器の研究利用環境を作るために何をすべきか  
HAB学術機構年会 (2003. 5)

田辺秀之, Johann von Hase\*, Christoph Cremer\*, 北條麻紀, 林 真, 水沢 博：染色体再編成を伴うヒト培養細胞株 T98G における染色体テリトリーの核内配置  
日本細胞生物学会第56回大会 (2003. 5)  
\*ハイデルベルグ大学 キルヒホフ物理学研究所

田辺秀之, 北條麻紀, 榎松美治\*, 安田留菜, 水沢博：培養細胞株ムービーファクトリー作成の試み：生きている細胞の姿をみる  
日本組織培養学会第76回大会 (2003. 5)  
\*ヒューマンサイエンス振興財団

北條麻紀, 安田留菜, 田辺秀之, 高田容子, 榎松美治\*, 増井 徹, 水沢 博：長期継代培養で観察された STR ピークの変化と染色体構成の変化との関連性：HeLa AG クローン株を用いた FISH 法による解析  
日本組織培養学会第76回大会 (2003. 5)  
\*ヒューマンサイエンス振興財団

増井 徹, 高田容子, 水沢 博, 田辺秀之, 榎松美治\*, 北條麻紀, 安田留菜, 林 真：公的細胞バンク (JCRB) への組織提供に関する意思決定を支援するビデオ及び文書の作成  
日本組織培養学会第76回大会 (2003. 5)  
\*ヒューマンサイエンス振興財団

西 義介\*, 増井 徹 (オーガナイザー)：生命科学ビジネスの将来と企業化のための特許戦略：特にヒト細胞におけるビジネスの展望と知的所有権の問題について  
日本組織培養学会第76回大会 (2003. 5)  
\*日本たばこ産業(株)

江馬 眞, 宮脇英美子, 原園 景：可塑剤 butyl benzyl phthalate のラット雄胎児における生殖器系発生に及ぼす影響  
第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6)

江馬 眞：ジブチルフタレート及び代謝物モノブチルフタレートの抗アンドロゲン作用  
第42回日本先天異常学会学術集会シンポジウム (2002. 7)

江馬 眞, 宮脇英美子：偽妊娠ラットの子宮脱落膜反応に及ぼすジフェニルスズの影響

第42回日本先天異常学会学術集会 (2002. 7)

江馬 眞：内分泌かく乱化学物質問題の現状と将来  
第23回 in vitro 発生毒性研究会 (2002. 8)

Ema, M. and Miyawaki, E. : Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy  
Society of Toxicology, 42th Annual Meeting (2003)

江馬 眞：可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響  
第5回生殖発生毒性東京セミナー (2003. 3)

和泉宏幸\*<sup>1</sup>, 和田 肇\*<sup>1</sup>, 小泉睦子, 鎌田栄一, 長谷川隆一：2,4,6-トリニトロフェノールの新生児反復投与毒性および若齢動物毒性試験結果との比較  
第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6)  
\*<sup>1</sup> パナファーム・ラボラトリーズ

西村信雄\*<sup>1</sup>, 須永昌男\*<sup>2</sup>, 小泉睦子, 鎌田栄一, 長谷川隆一：3-アミノフェノールの新生児反復投与毒性および若齢動物毒性試験結果との比較  
第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6)  
\*<sup>1</sup> ボゾリサーチセンター  
\*<sup>2</sup> 化合物安全性研究所

野田 篤\*<sup>1</sup>, 山口真樹子\*<sup>1</sup>, 山本 譲\*<sup>1</sup>, 伊藤義彦\*<sup>1</sup>, 小泉睦子, 鎌田栄一, 長谷川隆一：3種アルキルフェノールの新生児ラットにおける発現毒性および若齢ラットとの比較検討  
第29回日本トキシコロジー学会学術年会 (2002. 6)  
畜産生物科学安全研究所

粟屋智一, 花岡英樹, 藤原康弘\*, 平山佳伸：最近の糖尿病治療薬を中心とした医薬品の承認申請について  
第40回日本糖尿病学会中国・四国地方会 (2002. 11)  
\*国立がんセンター中央病院

宇山佳明：遺伝子治療用医薬品  
第7回 ICH 即時報告会 (2002. 10)

宇山佳明：最近の新薬承認審査における論点と今後の課題 (1) 新医薬品等の承認申請資料等に関する留意事項について (臨床分野), (2) 第三分野医薬品の事例について  
第14回新薬審査部門定期説明会 (2002. 10)

宇山佳明：新医薬品承認審査の現状と課題  
星薬科大学公開セミナー (2002. 11)

花岡英紀, 宇山佳明, 柴田大朗, 永井尚美, 今川正紀 & 森 和彦：関節リウマチ治療薬の承認申請における最近の問題点, 海外臨床試験成績の利用を巡って  
第47回日本リウマチ学会総会 (2003. 4)

日高慎二\*<sup>1</sup>, 永井尚美, 小林史明\*<sup>1</sup>, 荒戸照世, 榎本博雄\*<sup>1</sup>, 柴田大朗, 奥田晴宏: **新医薬品承認審査資料における薬物相互作用情報**

第17回日本薬物動態学会年会 (2002. 11)

\*<sup>1</sup> 医薬品機構

小林史明\*<sup>1</sup>, 榎本博雄\*<sup>1</sup>, 永井尚美, 日高慎二\*<sup>1</sup>, 荒戸照世, 柴田大朗, 奥田晴宏: **新医薬品承認審査資料における臨床薬物相互作用情報**

第23回日本臨床薬理学会年会 (2002.12)

\*<sup>1</sup> 医薬品機構

Kihira, T.: **Electronic Common Technical Document MHLW's Current Status**

DIA 3rd Annual Workshop in Japan for Medicinal Information Processing (2002. 4)

Kihira, T.: **Implementation of eCTD in MHLW**

DIA 38th Annual Meeting (2002. 6)

紀平哲也: **CTD 申請と薬物動態の審査について**

第18回Population PK研究会 (2002. 11)

Kihira, T.: **Japanese Module 1**

DIA 4th Annual Workshop in Japan for Medicinal Information Processing (2003. 2)

Kihira, T.: **Reviewer's Experience and Prospect of CTD/eCTD Review**

DIA 4th Annual Workshop in Japan for Medical Writing (2003. 5)

紀平哲也: **Life Cycle Management と審査プロセスについて**

eCTD シンポジウム (2002. 5)

紀平哲也: **今後の本邦における eCTD の導入に向けて**

医薬電子標準研究会シンポジウム (2002. 11)

戸高浩司: **新薬の承認審査—医師の役割**

第65回日本循環器学会総会・学術集会 (2003. 3)

戸高浩司: **新薬の承認審査—医師の役割**

第26回日本医学会総会 (2003. 4)

荒戸照世, 永田龍二, 小笠原弘道, 奥田晴宏, 鹿野真弓, 嶋澤のみ子, 豊島聡, 永井尚美, 長岡寛明, 中村高敏, 星隆弘, 本田二葉, 前田大輔, 山田博章: **生物薬品承認審査上の規格・安定性分野について—審査報告書の事例を踏まえ—**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

児玉庸夫: **医薬品の承認審査における臨床薬理試験**

第23回日本臨床薬理学会シンポジウム (臨床薬理試験

における非侵襲的生体機能評価法の位置づけ) (2002. 12)

細木るみこ, 大室弘美, 児玉庸夫: **日本におけるブリッジング試験の現状**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

鹿野真弓: **CTDモックアップ(バイオ医薬品)について**

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

鹿野真弓: **バイオ医薬品のウイルス安全性確保と薬事法改正の動向**

ウイルス安全性シンポジウム (2003. 5)

Ando Yuki, Taro Shibata, Takashi Omori: **The CPMP Points to Consider on Statistical Topics, Part 2: Meta-Analyses, and One Pivotal Study**

Drug Information Association(DIA) 38th annual meeting, Chicago (2002. 6)

大森崇: **規制当局で働くある担当者が思う医薬品開発における外国臨床データの使用の現状と課題**

大分統計談話会 第26回大会 (2002. 10)

柴田大朗: **規制側から見た医薬品開発における母集団薬物動態解析の意義**

第16回日本計算機統計学会シンポジウム (2002. 11)

豊島 聡, 大森 崇: **医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討**

国際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 平成13年度班会議 (2002. 1)

森 和彦: **世界中のデータを活用した審査に向けて**

第5回治験の国際化シンポジウム (2002. 9)

森 和彦: **新薬開発におけるGlobal Studyの課題とその克服: 抗がん剤開発における国際共同治験に対する期待と課題**

第40回日本癌治療学会総会 (2002. 10)

森 和彦: **医師・患者・モニターがCRCに希望すること: 規制側がCRC期待すること**

第2回CRCと臨床試験のあり方を考える会議 (2002. 10)

森 和彦: **感染症治療のための抗菌薬療法のサイエンス: 新薬承認の最近の動向**

第51回日本化学療法学会総会 (2003. 5)

豊島 聡, 大森 崇: **医薬品等有効性評価法の生物統計学的検討**

国際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 平成14年度班会議 (2002. 12)

西條 薫\*<sup>1</sup>, 加藤麻矢子\*<sup>1</sup>, 大森 崇, 吉村 功\*<sup>2</sup>: 担

当者を泣かせるバリデーション研究：守ってほしいポイント

第16回日本動物実験代替法学会 (2002. 12)

\*1 理化学研究所細胞開発銀行

\*2 東京理科大学経営工学部

佐藤真理\*1, 大森 崇, 吉村 功\*1: 光毒性試験代替法におけるカットオフ値決定のための一検討

第16回日本動物実験代替法学会 (2002. 12)

\*1 東京理科大学経営工学部

中川雅生: 研究者(医師)主導の臨床研究に向けて  
滋賀医科大学治験推進説明会 (2003. 2)

上田達也\*1, 井上久子\*1, 渡邊格子\*2, 神谷 博\*2, 藤野英俊\*2, 中川雅生, 宇野正章\*3: 川崎病発症より1か月後に再発した1女児例

第27回近畿川崎病研究会 (2003. 3)

\*1 野洲病院小児科

\*2 滋賀医科大学小児科

\*3 湖南メディカルセンター三愛小児科

中川雅生: 最近の治験の動向

第3回神戸市医師会共同治験セミナー (2003. 5)

長岡寛明, 豊島 聡, 武田 健\*: 1,2-Diphenylethylenediamineを用いた尿中遊離カテキン類の蛍光分析法の開発

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\* 東京理科大学

嶋澤るみ子, 荒戸照世, 小笠原弘道, 奥田晴宏, 鹿野真弓, 豊島聡, 永井尚美, 長岡寛明, 永田龍二, 中村高敏, 星 隆弘, 本田二葉, 前田大輔, 山田博章: 医薬品承認審査上の規格・安定性分野について—審査報告書の事例を踏まえ—

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

楠 博文, 高鳥浩介, 植村 興\*: イヌにおける腸管出血性大腸菌O157感染疾患モデル作成の検討

第19回日本疾患モデル学会総会 (2002. 11)

\* 大阪府立大

Sato, J.: Updated Regulatory Environment in Japan. DIA Workshop (2003. 2)

Chung, S. M.\*1, Sato, J., Venitz, J.\*2, Wei, X.\*1, Malinowski, H.\*1, and Ahn, H.\*1: Effects of Drug Treatment on Osteoporosis Using a Disease Progress Model. American Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics (2003. 4)

\*1 Food and Drug Administration, USA

\*2 Virginia Commonwealth University

佐藤淳子: FDAの医薬品審査について

第77回日本感染症学会総会 (2003. 4)

佐藤淳子: 市販抗菌薬その後の操業

第51回日本化学療法学会総会 (2003. 5)

村上美保, 谷本 剛, 斎藤博幸, 小出達夫: カリジノゲナーゼ製剤の新しい品質評価法

第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2002. 10)

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Eの構造変化

第34回日本動脈硬化学会総会 (2002. 7)

\*1 The Children's Hospital of Philadelphia

\*2 Gladstone Institute of Cardiovascular Disease

斎藤博幸, 谷本 剛, Sissel Lund-Katz\*1, Karl H. Weisgraber\*2 and Michael C. Phillips\*1: Isothermal Titration Calorimetryによる脂質-アポリポタンパク質相互作用の解析

第75回日本生化学会大会 (2002. 10)

\*1 The Children's Hospital of Philadelphia

\*2 Gladstone Institute of Cardiovascular Disease

田中将史\*1, 小森 洋\*1, 中野 実\*1, Sissel Lund-Katz\*2, Michael C. Phillips\*2, 半田哲郎\*1, 斎藤博幸: アポリポ蛋白質A-Iと脂質エマルションとの結合性に対するC-末端ドメインの影響

第24回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2002. 11)

\*1 京都大学大学院薬学研究科

\*2 The Children's Hospital of Philadelphia

斎藤博幸, 谷本 剛, Sissel Lund-Katz\*1, Michael C. Phillips\*1: アポリポタンパク質A-Iの水溶液構造

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 The Children's Hospital of Philadelphia

田中将史\*1, 斎藤博幸, 中野 実\*1, 半田哲郎\*1: 蛍光プローブ標識によるアポEの脂質結合構造の評価

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*1 京都大学大学院薬学研究科

外海泰秀, 堀伸二郎\*1, 田中敏嗣\*2, 岡尚男\*3, 中村好志\*4, 永山敏廣\*5, 佐々木久美子, 前川吉明\*6, 村上りつ子\*7, 松木宏晃\*8: ガスクロマトグラフィー/質量分析法による食品中の残留農薬多成分一斉分析法

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*1 大阪府公衛研

\*2 神戸市環保研

\*3 愛知県衛研

\*4 静岡県大

\*5 東京都衛研

\*6 日本食品分析センター

\*7 茨城県水戸保健所

\*8 サントリー

堀 伸二郎\*<sup>1</sup>, 田中敏嗣\*<sup>2</sup>, 外海泰秀, 岡 尚男\*<sup>3</sup>, 中村好志\*<sup>4</sup>, 永山敏廣\*<sup>5</sup>, 佐々木久美子, 前川吉明\*<sup>6</sup>, 村上りつ子\*<sup>7</sup>, 松木宏晃\*<sup>8</sup>: **食品中のアフラトキシン分析法**

日本薬学会第123回年会 (2003.3)

- \*<sup>1</sup> 大阪府公衛研
- \*<sup>2</sup> 神戸市環境保研
- \*<sup>3</sup> 愛知県衛研
- \*<sup>4</sup> 静岡県大
- \*<sup>5</sup> 東京都衛研
- \*<sup>6</sup> 日本食品分析センター
- \*<sup>7</sup> 茨城県水戸保健所
- \*<sup>8</sup> サントリー

石光 進, 吉井公彦, 津村ゆかり, 外海泰秀: **HPLCによる農産物中フェノキサプロプエチルの分析法の開発**  
日本薬学会第123回年会 (2003.3)

Y. Tonogai, Y. Tsumura, K. Yoshii and S. Ishimitsu : **Simultaneous determination of N-methylcarbamates in citrus fruits by HPLC(FL) and LC/MS(SIM)**  
10th IUPAC International Congress on the Chemistry of Crop Protection (2002.8)

中野 真希, 辻 澄子, 中村優美子, 外海泰秀: **食用タール色素アルミニウムレーキ中の水溶性塩化物及び水溶性硫酸塩について**  
第39回全国衛生化学技術協議会年会 (2001.10)

辻 澄子, 中野真希, 中村優美子, 寺田久屋\*, 田村征男\*, 外海泰秀: **食品中のフェノール系酸化防止剤の確認方法について**  
日本食品衛生学会第84回学術講演会 (2002.11)  
\*名古屋市衛生研究所

柴田敏郎, 成瀬ひとみ, 畠山好雄, 青柳光敏\*, 姉帯正樹\*: **栽培圃場の土壌硬度及び栽植密度がモッコウの生育, 収量, 生薬の品質に及ぼす影響**  
日本生薬学会北海道支部第26回例会 (2002.6)  
\*北海道立衛生研究所

姉帯正樹\*, 柴田敏郎, 熊谷健夫: **白芷の調製法と化学的品質評価**  
日本生薬学会北海道支部第26回例会 (2002.6)  
\*北海道立衛生研究所

Toshiro Shibata : **Studies on Cultivation of Glycyrrhizae Radix in Hokkaido, Japan**  
The 1-st Medicinal Plants International Symposium in Xinjiang, China (2002.8)

山岸 喬\*<sup>1</sup>, 船木 稔\*<sup>1</sup>, 中村賀香\*<sup>1</sup>, 柴田敏郎, 石田正彦\*<sup>2</sup>, 本田優子\*<sup>3</sup>: **蝦夷地の薬物, アイヌのアタネについて**

日本薬学会123年会 (2003.3)

- \*<sup>1</sup> 北見工業大学
- \*<sup>2</sup> 東北農業研究センター
- \*<sup>3</sup> 北海道立アイヌ民族文化研究センター

南 基泰\*<sup>1</sup>, 近藤誠三\*<sup>2</sup>, 菱田敦之, 細川敬三\*<sup>3</sup>, 佐竹元吉\*<sup>4</sup>, 柴田敏郎: **茵陳蒿の生産について (7) 沖縄産カワラヨモギ (*Artemisia capillaris*) 及びリュウキュウヨモギ (*A. campestris*) の頭花形態, 成分及び葉緑体DNAのrpl16及びrpl14遺伝子間領域の比較**

日本薬学会123年会 (2003.3)

- \*<sup>1</sup> 中部大学応用生物学部
- \*<sup>2</sup> 小太郎漢方製薬(株)
- \*<sup>3</sup> 兵庫大学健康科学部
- \*<sup>4</sup> 日本薬剤師研修センター

山下 浩\*<sup>1</sup>, 高橋宣明\*<sup>1</sup>, 坂東英雄\*<sup>1</sup>, 畠山好雄\*<sup>2</sup>, 柴田敏郎: **ニシキギ科植物コマユミの成分研究 (2) -アイヌ有用植物から-**

日本薬学会123年会 (2003.3)

- \*<sup>1</sup> 北海道薬科大学
- \*<sup>2</sup> ゆにガーデン

柴田敏郎, 成瀬ひとみ, 沢井清道, 中根孝久, 関田節子: **寒冷地におけるマオウ (*Ephedra distachya*) の生育, アルカロイド及び無機成分含量について**  
日本生薬学会北海道支部第27回例会 (2003.5)

Sekita, S. : **The study of standard compounds of crude drugs on Japanese Pharmacopoeia**  
International Seminar on Harmonization of Oriental Herbal Medicines (2002.9)

Sekita, S. : **Aristolochic acids assay in Japanese Pharmacopoeia**  
International Conference on Modernization of Traditional Chinese Medicine (2002.10)

Kiuchi, F. : **Anti-parasitic natural products**  
The 33th Annual Meeting of the Korean Society of Pharmacognosy (2002.12)

松尾健児\*<sup>1</sup>, 木内文之, 伊藤美千穂\*<sup>1</sup>, 本多義昭\*<sup>1</sup>, Qui, T. K.\*<sup>2</sup>, 嶋田淳子\*<sup>3</sup>, 青木 孝\*<sup>3</sup>: **ベトナムで用いられる生薬に含まれる抗トリパノソーマ活性成分 - *Pogostemon cablin* について -**

日本薬学会第123年会 (2003.3)

- \*<sup>1</sup> 京都大学大学院薬学研究科
- \*<sup>2</sup> University of Ho Chi Min City
- \*<sup>3</sup> 順天堂大学医学部

吉松嘉代, 関田節子, 山川 隆\*<sup>1</sup>: **トウキ形質転換及び非形質転換シュートの超低温保存**

日本生薬学会第49回年会 (2002.9)

- \*<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科

磯貝里子\*, 吉松嘉代, 東野 薫\*, 下村講一郎\*: 培養トコンシュートの生育及びアルカロイド生産に及ぼすジベレリンの影響

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*東洋大学生命科学部

吉松嘉代, 飯田 修, 木内文之, 関田節子, 牧野由起子\*: 国内でみられたケシの実態といわゆるボタンゲシの形態・アルカロイド

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*関東信越厚生局麻薬取締部

瀧野裕之, 中根孝久, 高橋真理衣, 関田節子: テンマ, キョウカツ, テンモンドウの確認試験法について

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

高橋真理衣, 瀧野裕之, 関田節子, 佐竹元吉\*: 抗リシューマニア活性を有する薬用植物の探索 (その3)

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*日本薬剤師研修センター

瀧野裕之, 高橋真理衣, 関田節子, 佐竹元吉\*: 抗リシューマニア活性を有する薬用植物の探索 (その4)

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*お茶の水女子大学

高橋真理衣, 瀧野裕之, 関田節子, 佐竹元吉\*: 抗リシューマニア活性を有する薬用植物の探索 (その5) ペル一産生薬 Yanali の活性成分について

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*お茶の水女子大学

菱田敦之, 瀧野裕之, 飯田 修, 関田節子, 森田ゆかり\*, 細川敬三\*: クソニンジン *Artemisia annua* の栽培研究—収穫時期と栽植密度—

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*兵庫大学健康科学部

菱田敦之, 姉帯正樹\*<sup>1</sup>, 瀧野裕之, 飯田 修, 関田節子, 香月茂樹, 細川敬三\*<sup>2</sup>: 葉緑体遺伝子 (*rpl16-rpl14* 及び *atpF-atpA*) spacer 領域の塩基配列解析に基づく *Achyranthes* 属植物の識別

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 北海道立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 兵庫大学健康科学部

中根孝久, 菱田敦之, 柴田敏郎, 飯田 修, 香月茂樹, 関田節子, 佐竹元吉\*: マオウ科 *Ephedraceae* 植物のエフェドリン含量Ⅲ—国内栽培試験種及び国外野生種—

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*日本薬剤師研修センター

中根孝久, Javier, L. R.\*<sup>1</sup>, Alim, C. V.\*<sup>1</sup>, Oribello, J.\*<sup>1</sup>, 石橋無味雄\*<sup>2</sup>, 佐竹元吉\*<sup>3</sup>, 関田節子: フィリピン薬局方における生薬のTLC法を用いた確認試験の設定

日本薬学会第123回年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> BFAD

\*<sup>2</sup> JICA

\*<sup>3</sup> お茶の水女子大学

高上馬希重\*<sup>1</sup>, 村中俊哉\*<sup>1</sup>, 吉田茂男\*<sup>1</sup>, 飯田 修, 関田節子, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>, 牧野由起子\*<sup>3</sup>: バイオリソースのデータベース化 大麻 (*Cannabis sativa* L.) におけるDNA多型情報

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*<sup>1</sup> 理化学研究所

\*<sup>2</sup> 日本薬剤師研修センター

\*<sup>3</sup> 関東信越厚生局麻薬取締部

飯田 修: 薬用植物の栽培・品質評価指針 Part10

薬用植物フォーラム2002 (2002. 7)

尹永淑\*<sup>1</sup>, 井上麻里絵\*<sup>1</sup>, 功刀彰\*<sup>1</sup>, 佐竹元吉\*<sup>2</sup>, 香月茂樹: 食用カンナ (*Canna edulis*) のスーパーオキシド消去活性成分について

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*<sup>1</sup> 東京薬科大学

\*<sup>2</sup> 日本薬剤師研修センター

大根谷章浩\*, 香月茂樹, 北中 進\*: クスノハガシワ (*Mallotus philippensis*) の抗アレルギー成分の研究 (4)

日本薬学会第123年会 (2003. 3)

\*日本大学薬学部

香月茂樹, 坂崎信之\*: 匍匐性ピーナッツ (*Arachis repens* Handro) の栽培と利用

日本植物園協会第37回大会 (2002. 5)

\*名誉会員

香月茂樹, 坂崎信之\*<sup>1</sup>, 岡村隼人\*<sup>2</sup>, 滝川忠明\*<sup>2</sup>: 希少植物カンラン (*Canarium album* Raeusch.) の日本史と栽培

日本植物園協会第37回大会 (2002. 5)

\*<sup>1</sup> 名誉会員

\*<sup>2</sup> 会員

大根谷章浩\*, 北中 進\*, 香月茂樹: クスノハガシワ (*Mallotus philippensis*) の抗アレルギー成分の研究 (3)

日本生薬学会第49回年会 (2002. 9)

\*日本大学薬学部

## レギュラトリーサイエンス関連会議報告

## Meeting Reports Related to Regulatory Science

**会議名：**第38回WHO医薬品規格専門家会議

**出席者：**薬品部 檜山行雄

**開催場所，時期：**スイス，ジュネーブ，平成15年3月10日～14日

**参加者内訳，人数：**WHO各地域代表10名，アドバイザー8名，UNICEF, IAEAなど国際機関代表2名，EMAなどの政府機関代表3名，製薬関連団体などNGO代表5名，薬局方代表2名，WHO職員約20名

**会議内容：**この専門家会議はWHOの医薬品供給事業の政策決定機関である。WHO事務局側から先回の専門家会議(2001 Oct 22～26開催)から、事業の進捗状況、第三世界での医薬品流通に関する重要課題、および重点領域がHIV、結核、マラリアであることの説明を受けた。主な議題はWHOによる10数種のGMP関連のガイドライン、世界薬局方の各条であった。今後のガイドラインの審議はドラフトが出来次第e mailにより行われる。過去3年間は1. 医薬品のavailability/affordability 2. 品質/安全性 3. 適正使用 4. GMPなどの基準設定と実際の運営に重点をしぼりWHOは事業を進めたものの、各国レベルでは偽薬の流通、重大なGMP違反、及び政府機関による不正証明など課題は山積している。このため、2004年マドリードで開催のICDRAではにせ薬撲滅のための特別会議を開催予定である。医薬品品質保証の問題はWHOに直接関与する団体のみならず医薬品製造、流通に関与するすべての個人・団体の問題であることを痛感した会議であった。

**会議名：**PDA/IABs主催生物薬品の同質性/同等性についての科学的評価法に関する会議

**出席者：**生物薬品部 川西 徹

**開催場所，時期：**プラハ(チェコ)2003年2月27日～2月28日

**参加者内訳，人数：**日本公的機関1名，日本企業関係者1名，米国公的機関5名，米国企業関係者20名，カナダ公的機関2名，欧州公的機関8名，欧州企業関係者35名，韓国公的機関1名

**会議内容：**バイオテクノロジーを応用して生産される生物薬品は、認可後および開発中においても、製品の品質の向上あるいは製造の効率化等のため、製造方法の変更が求められることが多い。その場合、変更の申請にあたって新薬と同様の審査をすることは合理的ではない。本会議はこのような場合の新旧製法の製品についての同質性/同等性評価法に関する会議である。討議内容は1) 日米欧加の同質性/同等性評価に関する現状、および2) 既に行われた同等性/同質性評価の事例報告、3) 同等性/同質性評価に用いられる試験法について、である。強調されたトピックとしては、1) 免疫原性の変化の評価、2) 同等性/同質性評価における臨床試験の位置付け、であった。現在までのところ同等性/同質性評価においてヒトにおける免疫原性の微細な変化を適切に予測する事は困難なものの、会場の雰囲気はその重要性を強

調する意見が強く、日本の雰囲気との落差は大きいものであった。

**会議名：**Nomenclature and Standardizationに関するWestern Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH) Subcommittee Meeting

**出席者：**生薬部 合田幸広，川原信夫，代田 修，筑波薬用植物栽培試験場 関田節子；淵野裕之

**開催場所，時期：**国立医薬品食品衛生研究所，2003年5月21日～5月24日

**参加者内訳，人数：**西太平洋地区5カ国6地域1国際機関(日本，中国，韓国，ベトナム，シンガポール，香港，WHO)より33名(他オブザーバー1名)

**会議内容：**4カ国(日本，中国，韓国，ベトナム)の局方中の生薬について比較を行い、局方間の類似点と差違について、各国が良く認識する必要が議論され、そのためのExpert working group (EWG)を設立することが了承された。さらに平成14年度の活動として、①各国の局方中に記載されている生薬の、名称と基原植物の比較、②各国の局方中の生薬のモノグラフ中の分析方法の比較、③各国の局方中の生薬及び、生薬成分に関する分析標準品のリスト化、④各国の局方中のvalidationされた生薬分析法のリスト化、⑤生薬の一般試験法に関する情報集積(局方収載、未収載を問わず)に関する5つのEWGが設立されることになり、各EWGの責任者と、各国のcontact personが決定された。

**会議名：**医療用具インプラント会議：Tissue Engineered Implants班会議(ISO/TC150, WG11)

**出席者：**療品部 土屋利江

**開催場所，時期：**アレキサンドリア(米国)，2002年9月9日～13日

**参加者内訳，人数：**EU各国，米国，カナダ，日本等8カ国31名

**会議内容：**日本側から土屋が「Reform of biological products regulation in Japan and principle of good tissue practice (GTP) for cellular and tissue based products」、大串(産業技術総合研究所)が「骨関節の再生医療に関する日本側の取り組み」、小川(旭光学株式会社)が「ハイドロキシアパタイトの骨再生における有効性」について各々講演し、日本の規制環境と研究状況について説明した。また、米国試験材料規格協会(ASTM)のメンバーが、組織工学製品標準化委員会の最近の活動状況について講演した。欧州での組織工学に対する取り組みの状況については、欧州各国の代表による説明の後、WG11で標準化すべき内容について討議された。主に、欧州側の代表からの提案で、General requirements for safety, marking and for information to be provided by the manufacturerに関する文書を作成することとなった。

**会議名：**第59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,  
安全性生物試験研究センター長 井上 達

**開催時期, 場所:** ジュネーブ (スイス), 2002年6月4  
日~13日

**参加者内訳, 人数:** 毒性グループ22名, 規格グループ  
9名, 摂取評価グループ5名, 事務局  
6名の合計42名

**会議内容:** アリテーム, 架橋カルボキシメチルセルロース  
ナトリウム, ミネラルオイル (低及び中粘度), 硝酸,  
亜硝酸, サラトリン, 香料 (脂環式第一級アルコール類,  
フェニルアルコール類, 含硫ヘテロ環化合物, 硫化フ  
ラン誘導体など) の安全性評価を行った。また, それら  
を含む添加剤7品目及び香料約200品目について規格の  
新規作成及び見直しが行われ, 着色料及びpH調整剤の  
重金属規格が削除され鉛等の規格に置き換えられた。

**会議名:** PDG (Pharmacopoeial Discussion group) 専門  
家会議

**出席者:** 食品添加物部 棚元憲一

**開催時期, 場所:** ストラスブルク (フランス), 2003年  
1月14~15日

**参加者内訳, 人数:** EP: 5人, USP: 4人, JP: 3人, 計

**会議内容:** 生菌数試験法及び特定微生物試験法から成り  
立つ微生物限度試験法, それに関連して第14局から参  
考情報に新たに導入され, 非無菌医薬品の微生物限度値  
が記されている「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」  
は国際調和が進行中である。現在調和作業のStage 3に  
あり, 今回の会議はこれをStage 4にステップアップす  
ることを目的として開かれた。日局としては約3ヶ月に  
わたり業界 (13社) 代表とのメール会議で集約された  
意見を基に調和会議に臨み, 菌株, 培地, 試験操作・手  
順, 適用範囲, 判定基準, さらに限度値等についてEP,  
USPとの意見調整を行い, それらをまとめたStage 4文  
書を作成した。なお生薬に関しては日局では一般医薬品  
とは別の独立した試験法と, 参考情報に限度値が記載さ  
れているが, 調和会議においては多くの問題点を包含す  
るために各局間の調整は困難との判断から, 生薬は独自  
の試験法を作成することとした。

**会議名:** 微生物学的リスクアセスメントに関するFAO/  
WHO/ILSI ワークショップ

**出席者:** 食品衛生管理部 春日文子

**開催場所, 時期:** 北京 (中国), 2002年5月10~11日

**参加者内訳, 人数:** イギリス, カナダ, 日本各1名, 中  
国2名 (以上パネリスト), 事務局  
(FAO, WHO, ILSI 数名), その他参  
加者中国約60名, アジア各国から  
各1名

**会議内容:** FAO/WHO による微生物学的リスクアセ  
スメントに参加した作業グループメンバーならびに事務局  
から, 微生物学的リスクアセスメントの実際やリスクマ  
ネージメントとの関係についての解説を行い, アジア各  
国からの参加者との間で相互討論を行った。春日は, 日  
本が過去2年間にFAOとWHOによる微生物学的リスク  
アセスメントに関するプロジェクトやコーデックスの中

で行ってきた作業, 担ってきた役割について, 解説した。

**会議名:** 食品のバイオテロ対策

**出席者:** 食品衛生管理部 山本茂貴

**開催場所, 時期:** ジュネーブ (スイス), 2002年5月27  
~29日

**参加者内訳, 人数:** 日本, 米国, カナダ, EU5カ国, ロ  
シア, WHO, FAO 総員20名

**会議内容:** WHOからの勧告の形式で各国政府に送付す  
るため, 食品のバイオテロ対策に関するドキュメントに  
ついて議論した。すでにバイオテロについて文章が作成  
されており, それに習って構成された。バイオテロを防  
止するためには, 食中毒の発生状況の監視体制の強化,  
HACCPを中心とする衛生管理の強化, さらに食品企業  
がバイオテロ対策を行っていることを明確に意思表示す  
ることなどが, 対策として重要であり, 各国政府は食品  
企業に対し, 注意喚起することなどが盛り込まれた。

**会議名:** ICMSF (国際食品微生物規格委員会) 年次会議

**出席者:** 食品衛生管理部 春日文子

**開催場所, 時期:** プコン (チリ), 2002年11月3日~13日

**参加者内訳, 人数:** ICMSFメンバー15名, コンサルタ  
ント3名

**会議内容:** ICMSF (The International Commission on  
Microbiological Specifications for Foods) は, 食品の微  
生物規格に関する科学的な情報収集と情報提供, 国際的  
な規格基準や検査方法の整合性の確立を目的に1962年  
設立され, 以来, WHOやFAOの専門家会議やコーデ  
ックス食品衛生部会において活動してきた団体である。  
今回の年次会議では, 1. Microorganisms in Foods 6の  
改訂作業, 2. 微生物学的リスクアセスメントのリスクマ  
ネージメントにおける利用のあり方に関する討議, 3. 微  
生物学的リスクアセスメントにおける疫学データの役割  
に関するposition paperの作成, 4. リステリア・モノサ  
イトジェネスの食品中の規格に関する議論などが行われ  
た。

**会議名:** UJNR有毒微生物専門部会第37回日米合同部  
会, 科学会議及びスタディーツアー

**出席者:** 食品衛生管理部 山本茂貴, 五十君静信, 衛生  
微生物部 高鳥浩介, 小西良子

**開催場所, 時期:** サンフランシスコ (米国), 2002年11  
月10~16日

**参加者内訳, 人数:** 日本側7名, 米国側6名, 科学会議  
には部会員の他10名程度が参加し  
た。

**会議内容:** 日本におけるボツリヌス症の発生状況, フグ  
とサキシトキシンについて, 日本における食品テロ対策  
について, 米国のアフラトキシンの発生状況について,  
リステリアのケースデフィニションについて, 日本にお  
けるBSE問題について, 日本の食中毒の発生状況, 食  
品安全委員会について情報交換が行われた。11, 12日  
には科学会議が開催され, バクテリア, マリントキシン,  
マイコトキシンに関する研究発表及び行政関連プロジェ  
クトについて報告された。

**会議名：**第35回FAO/WHO合同食品規格委員会食品衛生部会

**出席者：**食品衛生管理部 山本茂貴

**開催場所，時期：**オランダ（米国），2003年1月27日～2月1日

**参加者内訳，人数：**43カ国，14国際機関等，総数約250名

**会議内容：**コーデックスの部会の中でも議題数が最も多く実質的なものだけでも10議題あり，議題の中心は微生物学的リスクアセスメントの結果とリスクマネジメントへの適用，さらにリスクマネジメントとアセスメントの関係について議論された。今回，HACCPシステムの適用のためのガイドライン修正案はステップ7となり，また，乳及び乳製品に関する衛生的取り扱い規範案はステップ5となり，総会に提出されることとなった。その他の議題は，ステップは進められず，ステップ3もしくはディスカッションペーパーとして次回議論されることとなった。

**会議名：**CODEXバイオ特別部会

**出席者：**食品衛生管理部 山本茂貴，五十君静信，春日文子，その他大勢

**開催場所，時期：**横浜（日本），2003年3月11日～14日

**参加者内訳，人数：**参加多数

**会議内容：**組換えDNA微生物利用食品の安全性評価の実施に関するガイドライン作りとトレーサビリティに関する話し合いを行った。

**会議名：**ICH6準備会議

①ワシントン会議

**出席者：**有機化学部 奥田晴宏，医薬品医療機器審査センター 鹿野真弓，長岡寛明

**開催場所・時期：**ワシントンDC（米国），2002年9月9日～12日

②舞浜会議

**出席者：**有機化学部 奥田晴宏，薬品部 檜山行雄，医薬品医療機器審査センター 鹿野真弓，嶋澤るみ子

**開催場所・時期：**千葉（日本），2003年2月3日～6日

**参加者内訳，人数：**日米欧3極の医薬品規制当局及び製薬団体関係者など多数出席（①及び②）

**会議内容：**日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）において「医薬品の承認申請のための国際共通化資料コモンテクニカルドキュメント（CTD）-品質に関する文書の作成要領に関するガイドライン」（以下CTD-Qガイドライン）が2000年11月に合意し，各極で施行されつつある。CTD-Q implementation working group（IWG）はCTD-Qガイドラインを施行するに際して各極で生じる問題に対応することを目的として組織された専門家グループである。CTD-Q IWGでは円滑なCTD-Qガイドラインの運用のために，ワシントンDC及び舞浜（千葉）で開催された会議において主として下記に関して議論を行った。

①「コモン・テクニカル・ドキュメントCTD-品質に関する文書-Q&A/記載箇所に関する事項」の作成

本文書の目的は，CTD-Qガイドラインに関して一般的事項（品質文書の定義，文書のページ割付け及び分割，目次の書式，どのような場合に項目の分割あるいは繰り返し返しが適切か，複数の容器及び複数の含量（力価），生物分析法，ドラッグマスターファイル），異なる項目の多重リンク，及び原薬及び製剤の記載箇所に関する事項（CTD文書のどこに品質に関する報告書を記載するか）を明確にすることである。本文書に関してはワシントン会議でstep 2に達したが，米国におけるpublic commentの収集が遅れたことから，舞浜会議においても実質的な検討は行われなかった。2003年7月開催予定のブラッセル会議でstep 4を目指すこととされている。舞浜会議では各極のCTD-Q実施状況に関して情報交換すると共に，ワシントン会議以降で新たに生じたnon-viral adventitious agentに関する報告の記載位置の問題等について討論し，本文書に反映させることとした。

②新規トピック「製剤開発」のconcept paperの作成

CTD-Qガイドラインに記載されている項目ではあるが，ICHガイドラインが作成されていない事項がいくつか存在する。これらの事項に関してガイドラインを作成することが以前から検討されていた。この中からワシントン会議で「製剤開発」が選択され，ICHの新規トピックとして立ち上げることを目的として米国製薬協が舞浜会議に向けてconcept paperを作成することとなった。舞浜会議においてconcept paperが議論され，本ガイドラインはhigh level（包括的：必要項目を列挙するところにとどめ，その方法論には触れない）なものとされた。運営委員会でFDAがQuality initiativeが公表された直後であることを理由に採択を拒否したため，本concept paperはさらに詳細版を作成の上，次回ブラッセル会議でさらに議論することとされた。

**会議名：**幼児の化学物質暴露におけるリスク評価のための科学的原則と方法論についてのIPCS会合

**出席者：**医薬安全科学部 長谷川隆一

**開催場所，時期：**ジェックス（フランス），平成14年10月22～23日

**参加者内訳，人数：**カナダ1，米国3，ポーランド1，日本1，スウェーデン1，中国1，フィリピン1，タイ1，南アフリカ1，OECD1，WHO/IPCS事務局2：合計14名

**会議内容：**本会議は幼児の化学物質暴露におけるリスク評価のための科学的原則と方法論についてのEnvironmental Health Criteria（EHC）を作成するためのbrain streaming会合である。最初に，ヒトの発育期（胎児期から思春期）の各段階並びにその期間の定義設定について討議した。現時点では10段階とされたが，各種の考え方があり，多少流動的な面がある。続いて本EHCで用いる用語の定義について討議したが，設定する用語数は最低の数とし，その定義もworking definitionとして本EHCのみに適用することが確認された。事前に用意された用語：16に加えて，susceptibility/sensitivity，

mode of action, toxicokinetics, toxicodynamics, cumulative exposure, TDIなどが追加された。次に曝露および健康影響の項目名やその内容, conceptについて, 各委員からの提案, 分類, 整理を行った。EHCのアウトライン原案をたたき台に, 各章の項目名, 小項目並びにその順番について, 多くの意見が交わされた。最後に, 各大・小項目の執筆者リストを作成するための候補者の提案が依頼された。提案者は後日その連絡先所属を含め, 事務局に10月中に提出することが依頼された。日本からは数名の候補者が上げられ, 帰国後にそのほかの候補者も含め連絡することとなった。事務局では各提案者からの候補者について発表論文の検索をおこない, その適性を判断してマスターリストを作成する。そのリストから原稿執筆の可能性について交渉をおこなう。

今後の予定は, 10月中にマスターリストを作成し, 11月10~12日頃までに全体の執筆割当原案を作成するとともに, 第1章, 2章の原案を事務局で作成する。11~12月に執筆者の確定と, 原稿依頼を行う。2003年3月末に第一原案を, それに基づいて不足の項目を抽出し, 追加原稿の依頼を行う。6月に修正原案を回収し, peer reviewを行う。これに関しては, 会議を開催できるかどうか未定であり, 予算的に不可能となれば電磁媒体によるreviewとなる。

**会議名:** 世界保健機関/国際化学物質安全計画, トキシコゲノミクスにかかる打合せ  
Scientific Research information exchange on Toxicogenomics with Dr. Tim Meredith et al. at WORLD HEALTH ORGANIZATION/International Programme on Chemical Safety.

**出席者:** 毒性部 菅野 純

**開催場所, 時期:** 世界保健機関/国際化学物質安全計画 (WHO/IPCS) ジュネーブ (スイス), 2002年8月9日~10日

**参加者内訳, 人数:** 16名 (WHO 15名, 日本1名)

**会議内容:** WHOのThe Advisory Committee on Health Researchによる「Genomics and World Health」が刊行された際に今後の課題として問題となったWHO/IPCSのToxicogenomicsに対する取り組みについて, WHO/IPCSの要望により, 当方のトキシコゲノミクスに対する考え方及び実現性についての現状を提示し, WHOとしての取り組みと共同プロジェクトの立ち上げの可能性について討議した。1) WHO/IPCSメンバーに対して, リバーストキシコロジーの概念, 必要性, 例として内分泌かく乱化学物質問題およびリスク評価の近代化 (LD50およびSafety factorの概念の近代化) を挙げて, そして, 現在国立衛研と参加企業の共同で進行中のトキシコゲノミクスの現状について講演を行った。2) 長期及び短期のNIHS/MHLWとの共同研究の立ち上げに関する討議を行った。WHOとして適切な課題の守備範囲と, 現時点におけるNIHSのトキシコゲノミクスの進捗状況には, 考慮すべき隔りがあり, 即座に明快な関連性を築くことは困難であることが判明した。今後, 適切な課題の設定に向けて継続的に連絡を取り合うことを申し合わせた。3) Children's programについて, 殊に内分

泌かく乱化学物質問題とChildren's programの関係及びToxicogenomicsの役割について, 共同研究を目的として打ち合わせを行った。

**会議名:** EDTAタスクフォースの非動物試験バリデーション管理小委員会 (VMG-NA) の第一回会合  
1<sup>st</sup> MEETING OF THE VALIDATION MANAGEMENT GROUP FOR NON-ANIMAL TESTING (VMG NON-ANIMAL) OF THE TASK FORCE ON ENDOCRINE DISRUPTERS TESTING AND ASSESSMENT (EDTA)

**出席者:** 毒性部 菅野 純

**開催場所, 時期:** 経済開発協力機構本部 (OECD) (2 rue Andre Pascal), パリ (フランス), 2003年3月17日~18日

**参加者内訳, 人数:** 31名 (日米欧各国代表, うち日本から10名)

**会議内容:** EDTA第6回会合 (2002. 6. 24~25東京) において, 動物を必要としない比較的安価で迅速なスクリーニングと試験の必要性と重要性が確認されたこと, およびIn vitro試験及び非動物試験のため, 第三のVMGとして, VMG-NAが設置された。任務は, OECD内分泌かく乱化学物質試験評価概念枠組に従い, 既存情報に基づくソート及び優先順位付け, 解析データに提供すIn vitro試験での作業への事項提供である。これを受け, OECD試験法ガイドラインまたはガイダンス文書として採用するとの観点から, 既存の試験法を把握し, または新規の試験法を提案すること, ならびに, 見込みのある試験法について必要なバリデーション等の作業を提案することを目的として, VMGNAの第一回会合が開催された。また主たる5つの分野 (①HTPS: 受容体結合試験 ②HTPS: アロマトラーゼ及びステロイド産生試験 ③HTPS: レポーター遺伝子転写活性試験 ④QSARSその他In silico試験 ⑤In vitro細胞/組織試験) について個別に討議時間を設けた。尚, 当出席者は議長に選任され, その任務を遂行した。

**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, 時期:** イタリア (ローマ), 平成14年9月16日~25日

**参加者内訳, 人数:** 各国より約30人

**会議内容:** 農薬のAcephate, Carbofuran, Esfenvalerate, Ethephon, Fenamiphos, Flutolanil, Lindane, Metalaxyl-M and Metalaxyl(T), Methamidophos, Oxamyl, Oxydemeton-methyl, Tolyfluanid, Triazophosについて作成された資料を討議し, ADI and/or Acute reference dose (RfD) の設定を行った。また, Acute RfDのガイダンス作成のための討議を行った。会議の結果は, Pesticide residues in food-2002, FAO PLANT PRODUCTION AND PROTECTION PAPER 172 (2002) として刊行された。

**会議名:** Consultation between Members of the Working Group on GLP and ECVAM/ ICCVAM on the need for further guidance on the application of the Principles of

GLP to *in vitro* studies

主催者：OECD

開催場所，時期：OECD事務局，パリ（フランス），  
2003年3月4日～5日

参加者内訳，人数：OECDのGLP作業グループ（独：  
○Mr Hans-Wilhelm Hembeck，豪：Dr Helen Liddy，  
ベルギー：Mr Hedwig Beernaert，米：Ms Francisca  
Liem，Mr. James McCormack，フィンランド：Ms  
Katariina Rautalahti，仏：Dr Christophe Rousselle，  
ハンガリー：Dr Eva Ivan，日：△中西良文博士，オ  
ランダ：Mr. Theodorus Helder，Prof. Jan Stetkiewicz，  
スイス：Mr Jurg Seiler，EC：Mr Maik Schmahl）  
○：座長，△：副座長

ECVAM/ICCVAM関係者（米FDA：Mr Leonard  
Schectman，米NIEHS：Mr William Stokes，  
ECVAM：Ms S. Coecke，Mr T. Hartung）

その他のGLP関係者（米：Ms Rispin Amy，伊：Mr  
Sergio Caroli，日：大野泰雄，大谷勝己，ポーラ  
ンド：Mr Maciej Stepnik，英：Mr Roger Alexander）

OECD事務局（Mrs Dian Turnheim，Mr Herman  
Koeter，Mr 高江慎一，Ms Tiffany Larsen）

会議内容：新しい試験法のバリデーションへのGLP適  
応の必要性及び*in vitro*試験へのGLP原則の適応につ  
いて更にガイダンス等の文書が必要であるかについての  
ICCVAM/ECVAMの提案についてOECDの作業グル  
ープおよび関係者で検討した。その結果，バリデーション  
へのGLP適用については，バリデーションはGLP精神  
を尊重して行うべしとの1996年のソルナ会議で示され  
た内容が特に変更されなかった。一方，*In vitro*試験に  
特化したガイダンスの必要性については，当初短期試験  
についてのGLPガイダンスがあるので，それに対応す  
べしとの考えもあったが，その問題点，*in vitro*試験に  
特徴的なGLP上の考慮点，および近い将来*in vitro*の安  
全性試験がさらに増加することが予想されることにつ  
いてのICCVAMおよびECVAMの代表の説明があり，そ  
れに基づいた議論の結果，*In vitro*試験に特化したガイ  
ダンスを作成するとされ，OECDのGLPワーキンググ  
ループが作業を行うことになった。

会議名：Meeting of the validation management group for  
non-animal testing (VMG non-animal) of the task  
force on endocrine disrupters testing and  
assessment (EDTA)

主催者：OECD

開催場所，時期：OECD事務局，パリ（フランス），  
2003年3月17日～18日

参加者内訳，人数：Prof. Daniel DIETRICH (BIAC,  
Konstanz University), Mr. R Thomas ZOELLER (Canada,  
University of Massachusetts, Biology)\*, Ms. Anne Marie  
VINGGAARD (Denmark, Danish Veterinary and Food  
Administration, Institute of Food Safety and Toxicology),  
Mr. Andrew WORTH (European Commission-JRC,  
Institute for Health & Consumer Protection), M. Jean  
Claude NICOLAS (France, Endocrinologie Moleculaire et  
Cellulaire des Cancers), Mr. Manfred LIEBSCH (独,

Zebet), Dr. Hasso SEIBERT (独, Institute Experimental  
Toxicology, University Clinic), Dr Chris ATTERWILL  
(International Council on Animal Protection in OECD  
Programmes: ICAPO\*, Mr. Robert COMBES (FRAME),  
Ms. Gill LANGLEY, Mr. Alberto MANTOVANI (Italy,  
Laboratory of Comparative Toxicology and Ecotoxicology,  
Istituto Superiore di Sanita), Mr. Hiroyuki HORI (環境  
省), 井口泰泉 (岡崎研), ○菅野純 (国立衛研), 松  
尾まさとし (大阪大), 美濃部安史, 中井誠, 武吉正浩  
(Chemicals Evaluation and Research Institute), 大野泰雄  
(国立衛研), Ms. Sujung Lee (KFDA), A BROUWER (オ  
ランダInstitute for Environmental Studies), Mr. Rodger  
CURREN (米, Institute for In Vitro Sciences), Mr. Gary  
TIMM (EPA), ○：座長

会議内容：国立衛研の菅野毒性部長が座長として選出さ  
れた。主に，日本及び米国で検討してきた内分泌かく乱  
化学物質のスクリーニング法について説明され，検討さ  
れた。検討された方法は以下のとおり。1) 受容体結合  
試験：エストロゲン受容体，アンドロゲン受容体，甲状  
腺ホルモン受容体，およびAh受容体等，2) 酵素への作  
用を検討する方法：AromataseおよびSteroidogenesis  
Assays, 3) 遺伝子発現法：Reporter Gene and  
Transcriptional Activation Assays, 4) 定量的構造活性相  
関法 (QSARS), 5) *In Vitro* Cell/Tissue Assays

会議名：Drafting working group meeting on the draft  
GD34 "The development, validation and regulatory  
acceptance of new and updated test methods in  
hazard assessment

主催者：OECD

開催場所，時期：OECD事務局，パリ（フランス），  
2003年3月19日～20日

参加者内訳，人数：6人，Mr. Manfred LIEBSCH (独，  
Zebet)，大野泰雄 (国立衛研)\*，  
Mr. Kimmo Louekari (Finland,  
Product Control Agency for Welfare  
and Health), Mr Mark Chamberlain  
(UK, SEAC, Unilever Colworth), Mr  
Martin Stephens (US, Humane  
Society of the US)

OECD事務局：Mr Patric Amcoff

会議内容：1996年にスウェーデンのソルナで開催された  
OECD会議で作成されたガイダンス案No 34 "Develop-  
ment, Validation and regulatory Acceptance of New and  
Updated Internationally Acceptable Test Methods in  
Hazard assessment" の改訂のための起草のための会議  
である。なお，この件に関しては2002年にストックホル  
ム会議で議論されており (ENV/TG/A (2003) 2)，こ  
の報告を基に作業が進められるものである。今回の会議  
ではOECD事務局のAmcoff博士が座長を勤め，事前の  
電話会議で定めたhot topicsについて論議した。また，  
作業の分担を定めた。なお，委員の多くが出席できな  
かったことから，後日電話会議を行うとした。また，5月  
末のNational coordinator会議までにある程度のdraftを  
まとめる必要があり，まず，4月末までにコメントを提

出することとされた。

QSARについては困難な作業であり、3月31日よりQSARについての専門家会議が開催されることから、その報告を待つこととされた。なお、評価のばらつきの原因を同定すること、*in vitro*試験結果との整合するように努力すること、QSARを使用する目的を明確にすべきこと、行政の立場からの決定に使用するためには、透明性が必要があること、及びGLP適用などのコメントが出された。

Data interpretation procedureに関しては、以前はPrediction Modelとして試験結果から行政的な判断を行う作業と基準を示したものであるが、前者がまだなじんでいないことから、両方の用語を用いるべきとの意見がでた。この他、ヒトデータや既存のデータの使用、試験法の開発、最適化、プレバリデーションの区別、後ろ向きバリデーション及び会議によるバリデーション、試験法ガイドラインとプロトコル作成、について担当者を決めるとともに、それぞれの課題に関連して、GD34について若干の修正提案があった。

**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、時期：**ワシントン (米国)、平成14年9月9日～12日)、舞浜、平成15年2月2日～6日)

**参加者内訳、人数：**S7B部門で日本から5～6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昨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おり昨年2月にStep 2に達している。本年度は2回の会議を行ない、Step 3 Draft 2に達した。本年度より、非臨床だけでなく、臨床試験のガイドラインもICHのワーキンググループにより国際協調化を目指すこととなり、舞浜の会議では合同会議も行なわれた。

**会議名：**第60回食品添加物に関するFAO及びWHO合同専門家会議

**出席者：**総合評価研究室 江馬 眞

**開催場所、時期：**ジュネーブ (スイス)、平成15年2月6日～12日

**参加者内訳、人数：**米国、カナダ、英国、オーストラリア、ドイツ、タンザニア、フランス、コスタリカ、イスラエル、南アフリカ、アルゼンチン、日本からの専門家24名

**会議内容：**Carbadox：新たなデータについて検討した結果、carbadox及び代謝物のdesoxycarbadoxの発がん

性は遺伝毒性による機序で作用することを示唆するデータを検討した結果、ADIの設定はできないと結論された。carbadox及び代謝物のdesoxycarbadoxの残存量は決定できず、第36回会議で決定された最大残存限界(MRL)を取り下げることとなった。

Deltamethrin：第52回会議の結果が支持され、MRLの変更はなされなかった。

Dicyclanil：第44回会議において最初の評価が行われ、今回再評価が行われた。毒性データからADIは0～0.007 mg/kgとなり、最大1日摂取量は0.42 mg/60 kg personとなる。獣医領域での使用からのdicyclanil残存の最大1日摂取量は0.13 mg/kgと算定された。

Flumequine：新たなデータについて検討した結果、flumequineは遺伝毒性発がん性を有することが示唆され、第48回会議で設定されたADIを取り下げることとなった。この結果、先の会議で設定された全ての種におけるMRLを取り下げることが合意された。

Imidocarb：第50回会議で設定されたMRLの見直しが行われた。ウシの筋肉、肝、腎、脂肪、ミルクのMRL値が勧告された。第50回会議で勧告されたヒツジの腎、肝、筋肉、脂肪のMRLは取り下げることとなった。

Neomycin：第43回会議で設定されたADI 0～30 ug/kgが支持された。MRLにも変更の必要なしとされた。

Trichlorfon：ADIの見直しが行われた。データの見直しにより、ADIは0～20 ug/kgから、0～2 ug/kgと結論された。

**会議名：**第15回OECD高生産量化学物質初期評価会議

**出席者：**総合評価研究室 江馬 眞

**開催場所、時期：**ボストン (米国)、平成14年10月22日～25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6物質、新規審議として26物質、2カテゴリーとして7物質の計39物質が審議された。再審議物質についてはEDGに掲載されたコメントに回答する形で、新規物質については簡単にSIAPの内容を紹介したのち、同様にEDGに掲載されたコメントに回答する形で審議が行われた。その結果、33物質については、追加の対応は必要なしとされたが、6物質(1カテゴリーを含む)については追加の作業が必要との合意がなされた。日本政府としては新規審議として2物質を提出して合意された。またJP/ICCAが作成した初期評価文書が提出・審議された。日本からは8評価文書が8企業(2外国企業を含む)により作成され、政府各担当部署(健康影響部分については厚生省が担当)による事前評価および政府全体としての最終評価行われた後、当室からOECD事務局に提出された。8文書ともに合意が得られた。

**【再審議物質】** 90387-57-8: Formaldehyde, reaction products with sulfonated 1,1'-oxybis [methylbenzene], sodium salts, 107-06-2: 1,2-Dichloroethane (ドイツ/ICCA), 121-91-5: Isophthalic acid, 528-44-9: Trimellitic acid, 552-30-7: Trimellitic anhydride (米国/ICCA), 79-34-5: Ethane, 1,1,2,2-Tetrachloro- (フランス/ICCA)

**【新規審議物質】** 74-87-3: Chloromethane (米国/ICCA),

79-39-0: 2-Methyl-2-propenamide (日本/ICCA), 88-60-8: m-Cresol, 6-tert-butyl- (日本/ICCA), 92-70-6: 2-Hydroxy-3-naphthoic acid (ドイツ+日本), 94-36-0: Benzoyl Peroxide (韓国), 98-92-0: Nicotinamide (スイス/ICCA), 100-00-5: Benzene, 1-chloro-4-nitro- (ドイツ/ICCA), 100-37-8: Ethanol, 2-(diethylamino)- Ethanol, 2-(diethylamino)- (ドイツ/ICCA), 102-76-1: Triacetin (日本/ICCA), 106-63-8: Acrylic acid, iso-butyl ester (米国/ICCA), 110-83-8: Cyclohexene (日本), 115-86-6: Triphenyl phosphate (ドイツ/ICCA), 120-83-2: Phenol, 2,4-dichloro- (フランス/ICCA), 135-19-3: 2-Naphthol (ドイツ+日本), 141-32-2: Butyl acrylate (米国/ICCA), 144-55-8: Sodium hydrogencarbonate (ベルギー/ICCA), 497-19-8: Sodium carbonate (ベルギー/ICCA), 1330-20-7: Xylenes (ハンガリー), 2432-99-7: Undecanoic acid, 11-amino- (フランス/ICCA), 7647-01-0: Hydrochloric acid (日本/ICCA), 7791-25-5: Sulfuryl dichloride (ドイツ/ICCA), 8007-18-9: C.I. Pigment Yellow 53 (日本/ICCA), 10043-52-4: Calcium chloride (日本/ICCA), 11070-44-3: 1,3-Isobenzofurandione, tetrahydromethyl (日本/ICCA), 25321-09-9: Diisopropylbenzene (日本), 68186-90-3: C.I. Pigment Brown 24 (日本/ICCA)

【カテゴリー】 High Boiling Ethylene Glycol Ethers (143-22-6: Triethyleneglycol, monobutylether 1559-34-8: 3,6,9,12-Tetraoxahexadecan-1-ol 23783-42-8: 2,5,8,11-Tetraoxatridecan-13-ol (米国/ICCA)), Menthols (89-78-1: D/L-Menthol 1490-04-6: Menthol 2216-51-5: L-Menthol 15356-60-2: D-Menthol (ドイツ/ICCA)

今後の予定について、2003年5月27～30日にSIAM 16としてパリで、また2003年11月11～14日にSIAM 17としてアロナで開催することとなった。

会議名：第3回IUCLIDユーザーグループ専門家会議

出席者：総合評価研究室 広瀬明彦

開催場所、時期：パリ（フランス）、平成14年9月9日～10日

参加者内訳、人数：OECD加盟国、化学工業界、IPCSおよび事務局の22名

会議内容：現在OECDのHPV Chemicals ProgrammeにおけるSIAMレポートの作成に関して、そのデータ交換有用性やレポート作成補助プログラムとしてスタンドアロンのIUCLIDデータベースが使用されているところがあるが、開発元のEUのECB (Environmental Chemical Bureau) では、IUCLIDシステムを新規化学物質にも適用できる新規のREACH-ITシステムへの発展的移行を計画している。今回のユーザーグループ専門家会議では、このREACH-ITシステムの概略の説明と共に、OECDプログラム上でのREACH-ITシステムの取り扱いや、IUCLIDからのデータ移行に関する問題点、さらに移行の前段階としてSIAMレポートデータのECBにあるIUCLIDシステム本体へ統合の有用性について討議された。

1. "Entering Robust Study Summaries: needs for further guidance" では、non-SIDSエンドポイントである慢性魚毒性、土壌生物毒性、免疫毒性、神経毒性における

Robust Summary作成ガイダンスの作成や、IUCLIDバージョン4に対する入力ガイダンスのアップデートの必要性が確認された。2. "Training course material: adequacy and further needs" では、上記ガイダンスなどのトレーニングドキュメントをOECD事務局とECBが協力して目録化し、インターネット上などで容易に入手できるようにすべきであることが同意された。3. "Improving the user-friendliness"では、将来のREACH-ITシステムへの移行を見据えて、テキストデータ入力の補強やテーブル入力などの追加などの改良希望リストを作成することが必要であるとされた。同時に4. "Technical issues to be resolved" では、現在のIUCLIDシステム上でのシステムバグなどの回収すべき項目リストの作成も必要であるとされた。5. "Submission of approved IUCLID data sets from the OECD HPV Chemicals Programme to the central database" については、SIAM会議においてIUCLIDフォーマットで提出されたSIDSのDossiersデータを、ECBのIUCLIDシステムに統合することは、OECD加盟各国間でのデータ共有やデータ収集に有用であることが確認された。

会議名：ICH運営会議及び専門家会議

出席者：①豊島 聡、森 和彦、鹿野真弓、楠 博文、宇山佳明、佐藤淳子、長岡寛明、前田大輔、紀平哲也、②豊島 聡、平山佳伸、森 和彦、鹿野真弓、楠 博文、荒戸照世、野村由美子、宇山佳明、嶋澤るみ子、長岡寛明、紀平哲也、高松昭司

開催場所、時期：①ワシントンDC (米国)、2002年9月8～12日 ②千葉 (日本)、2003年2月2日～6日

参加者内訳、人数：日米欧3極の医薬品規制当局及び製薬団体関係者多数

会議内容：日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH) の各トピックについて、ガイドライン作成・運用のための検討が行われた。

Q3B(R) (長岡)：ステップ4ドキュメントの合意に至った。

Q5E (荒戸)：ステップ2ドキュメントの作成作業が行われた。

S7B (宇山)：Integrated risk assessmentの概念を確立し、ヒトにおけるQT延長のリスクは、in vitro及びin vivoの試験結果から評価でき、そのリスクには、「強い」ものから「なし」のものまで様々な徴候があることを明確化した。また、臨床及び非臨床での考え方についてE14と意見を交換した。

E14 (平山)：新薬の開発過程で、副作用である催不整脈の有無を明らかにする臨床部分の方策を検討した。非臨床分野のS7Bと協議しながら検討を進めている。

V1 (高松)：PSUR作成のためのガイダンス策定を目的として議論を行った。

V3 (野村)：市販後安全対策に関して、Pharmacovigilanceのガイドライン策定に関する議論を行い、適用範囲、構造及び主たる内容の大筋について合意が得られた。

CTD-ICG (鹿野、楠、紀平)：CTDの各分野について

現状・進捗状況を報告した。また、CTD全体に関するQ&Aについて検討した。

CTD-Q (鹿野, 嶋澤) : Q&A作成の他, 運用に際して見られた問題点への対応, 新しい品質ガイドラインの必要性について議論した。

CTD-S (楠) : ガイドラインの内容を再度確認し, Q&Aを作成した。

M2(eCTD) (紀平) : eCTDの仕様書について3極合意(Step 4)に達した。また, 変更管理の手順及びQ&Aの作成を検討した。

Immunotox (楠) : ICHにおけるトピック化に向けての準備作業として, 3極合同のアンケート調査により実態を把握することになり, 集計結果はICH-6において日本より報告することとされた。

Gene Therapy (宇山) : ワークショップを開催し, 遺伝子治療に関する知識の共有化をはかった。また, Adenovirus reference materialを作成し, 標準品として使用できる可能性を探るとともに, ウイルスシェディング, 次世代への影響等について今後検討を進めることを合意した。

所員の研究，試験および検査に関する発表を主とする「衛研例会」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14年度に行った演題は次のとおりである。

第438回（平成15年3月11日）

1. 変異遺伝部とレギュラトリーサイエンス

変異遺伝部 林 真

2. 新しいヒト型遺伝毒性試験系の構築と，targetted mutagenesisによる突然変異誘発機構の解明

変異遺伝部 本間正充

3. 遺伝毒性試験に用いるトランスジェニックラットの開発

変異遺伝部 能美健彦

4. 細胞バンクの18年

変異遺伝部 水澤博

5. 染色体テリトリーの間期核における3次元核内配置の解析

変異遺伝部 田辺秀之

6. 形質転換試験の発癌プロモーター検出への適用と形質転換プロモーション期に認められる遺伝子発現変化

衛生微生物部 酒井綾子

7. ペンタクロロフェノールのマウス肝発がん修飾機構の検討

病理部 梅村隆志

8. DNAヘリカーゼ原因遺伝子疾患と，酵母DNAヘリカーゼSgs1の機能解析

薬理部 宮島敦子

## 支 所 例 会

## 第181回 (平成14年10月29日)

1. 日本薬局方の第十五改正に向けての方針  
薬品試験部 谷 本 剛
2. 食用タール色素アルミニウムレーキ中の水溶性塩化物及び水溶性硫酸塩について  
食品試験部 中 野 真 希
3. ラット妊娠初期に投与した塩化トリブチルスズの着床および黄体機能に対する影響  
生物試験部 原 園 景

## 第182回 (平成14年12月24日)

1. ヘリックス型タンパク質アポA-Iの水溶液構造  
薬品試験部 斎 藤 博 幸
2. 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
3. 食品中のフェノール系酸化防止剤の定量・確認試験について  
食品試験部 辻 澄 子
4. ブドウ種子抽出物, ブドウ種子抽出物を含む健康食品及びブドウ種子油中のプロアントシアニジンの分析について  
食品試験部 中 村 優 美 子

## 第183回 (平成15年1月28日)

1. HPLCによる農産物中のフェノキサプロップエチルの分析法の検討  
食品試験部 石 光 進
2. 農作物中のエマメクチン安息香酸塩およびその代謝

物, アバメクチン, ミルベメクチンおよびイベルメクチンのLC/MSによる迅速分析法

- 食品試験部 吉 井 公 彦
3. 食品添加物の摂取量調査  
生物試験部 石 綿 肇
4. アンチジーン法によるヒトEGF receptor遺伝子の発現制御に関する基礎的研究  
生物試験部 田 中 寿 一

## 第184回 (平成15年2月25日)

1. 日局「有機体炭素試験法」の改正について  
支 所 長 岡 田 敏 史
2. 培養マウスケラチノサイトにおいて新たに同定されたIGSR-1遺伝子はプロセシング段階での発現調節を受けている  
生物試験部 天 野 博 夫
3. 最近の食品衛生における諸問題と食品衛生法の改正について  
食品試験部 外 海 泰 秀
4. HPLCによるかんきつ類中のN-メチルカルバメート系農薬及びそれらの代謝物の含ハロゲン溶媒不使用同時分析  
食品試験部 津 村 ゆ かり
5. TヘルパーI型細胞の機能に及ぼす黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) ペプチドグリカンの抑制作用について  
生物試験部 中 川 ゆ かり

## 平成14年度 特別講演会開催状況

No.	開催年月日	講演者	所属	講演名	経費
1	7月26日(金)	堤 定実	京都大学再生医科学研究 所 教授	軟骨と歯根膜の動的力学解析と 再生の研究状況	所予算
2	9月11日(水)	岩田 久人	愛媛大学沿岸環境科学 研究センター 助教授	水圏野生生物における内分泌攪 乱物質レセプターとチトクロームP 450	"
3	9月17日(火)	井川 洋二	理化学研究所 特別招 聘研究員(井川特別研 究室)	細胞の守護神p53の先祖型ホモ ログの発見と生理機能の探索	"
4	10月10日(木)	山本 順子	九州大学大学院医学研 究院成長発達医学 医 員	ダイオキシン毒性の客観的評価法 に向けたダイオキシン受容体関連 遺伝子群の定量系の確立	"
5	10月11日(金)	今成 登志男	千葉大学大学院薬学研 究院生体分析化学研究 室 教授	生体内グリコサミノグリカンの分析 法の開発とその機能解明	"
6	10月22日(火)	小松 かつ子	富山医科薬科大学和漢 薬研究所附属薬効解析 センター 助教授	分子生物学的手法を応用した生 薬の同定	"
7	11月 7日(木)	平塚 明	東京薬科大学 助教授	グルタチオンによる活性酸素の消 去	"
8	12月10日(火)	黒澤 努	大阪大学医学部動物実 験施設 助教授	国際ルールを基盤としたバイオメ ディカルサイエンスの発展:実験動 物福祉の観点から	"
9	2月 5日(水)	小野 宏	食品薬品安全センター 所長	OECDガイドライン・急性経口毒性 401の歴史と廃止および 403,420,423,425等のガイドライン	"

## 平成14年度に行った主な研究課題

## Main Research Projects Carried Out in Fiscal Year 2002

## 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（生物，薬品，支食）  
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. 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
2.  $\gamma$ 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）  
Release of Drugs from Delivery Systems controlled by  $\gamma$ -Irradiation
3. 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
4. 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
5. 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（薬品）  
Study on the effects of the gamma-ray irradiated natural biomaterials on the tissue regeneration
6. 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
7. 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  
Study on the effects of the gamma-ray irradiated natural biomaterials on the tissue regeneration
8. 電子線照射新鮮食品等の検地に関する研究（食品）  
Study on detection procedures for electron-beam-Irradiated Foods
9. 超短半減期核種の新規導入反応の開発及びPET用イメージング剤への応用（有機）  
Design and synthesis of new drugs for clinical PET

## 科学技術振興調整費（文部科学省）

（総合研究）

1. オーガニ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

（生活・社会基盤研究のうち生活者ニーズ対応研究）

2. 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

## 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
7. ノリ加工海水の浄化・再生に関する研究  
Purification and reuse of seawater for sea weed processing（衛微）

## 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. 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

**厚生労働科学研究費補助金 (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. 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
3. 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
4. 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
5. 医薬安全総合研究の企画と評価に関する研究 (副所長)
6. 生活安全総合研究の企画及び評価に関する研究 (所長)
7. 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)
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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

16. 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)
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 次世代遺伝子治療薬の開発基盤研究 (遺細)  
Fundamental Studies on the development of new generation gene therapy products
22. 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.
23. 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 ensure the reliability
24. 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 monitoring of food allergy
25. 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, 機能, 毒性)  
Studies on the safety of the foods developed by biotechnology and development of highly functional foods
26. 照射食品の安全性について (食品)  
Study on safety of irradiated foods
27. プリオン病の診断技術の開発に関する研究 (衛微)  
Studies on the establishment of methodology for prion disease
28. ビル空気質と微生物汚染に関する研究  
Studies on the air quality in building and the microbial contamination
29. 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
30. 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(変異)  
Studies on evaluation of in vitro micronucleus assay as an alternative method to the chromosomal aberration test
  31. 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
  32. 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 based on molecular mobility
  33. 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
  34. 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(遺細)  
Development of targeting adenovirus vector for tumor
  35. 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
  36. 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
  37. 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
  38. 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(食品, 食添)  
Studies on chemically ensuring the safety of food flavorings and natural food additives
  39. 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 infectious prion proteins
  40. 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
  41. 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(食添)  
Study on the methods for sterility assurance in drugs and medical devices
  42. 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
  43. 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
  44. 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
  45. 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・ブ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
  46. 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
  47. 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, 薬理, 食品)  
Studies for modifying factors on toxicological evaluations of chemicals in food
  48. 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
  49. 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
  50. 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
  51. 残留農薬分析の効率化と精度向上に関する研究(食品, 支食)  
Studies on the improvements of efficiency and precision in pesticide residue analysis
  52. 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, 支生)  
Estimation of the daialy intake of antifungal agents inorganic food additives and antioxidants based on the official inspection in fiscal year 1998
  53. 生産統計を基にした食品添加物の摂取量の推定(食添, 支生)  
Estimation of the daialy intakes of food additives based on the production amount
  54. 医薬品の最新の品質管理システムのあり方・手法に関する研究(薬品, 有機, 情報)  
Studies on Modern Quality Assurance System for

## Pharmaceutical Products

55. 肝細胞・内皮細胞等のマルチカラーイメージングによる分子機能解析 (生物)  
Analysis of molecular function using multicolour imaging in hepatocyte, endothelial cell, etc
56. 生薬規格の国際調和に関する研究 (生薬, 筑波)  
Studies on international harmonization of herbal medicine in Pharmacopoeias
57. 乱用薬物の不正流通防止に関する研究 (生薬, 筑波)  
Chemical study for illegal drugs control
58. 未承認医薬品及び健康食品による健康被害の原因究明の為の研究 (生薬・有機・毒性)  
Studies on health damaged diet pills imported from China and their toxicity
59. ナノレベルイメージングによる医療材料/細胞界面分子の機能と構造解析 (療品)  
Function and configuration analysis of biomaterials/cell interface molecules by nano level imaging
60. 適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療用具に使用される可塑剤の溶出度の相関性に関する研究 (療品)  
Study on the relationship between elution amounts of plasticizer from plastic medical devices and liposolubility of medicines applied to the devices
61. 木材防腐剤クレオソート及びクレオソート処理品の安全性に関する調査研究 (療品)  
Studies on safety of wood preservative creosote and creosote-treated wood products
62. 家庭用品における製品表示と理解度との関連及び誤使用・被害事故との関連の検証に関する研究: 家庭用ゴムに起因するアレルギー性接触皮膚炎等の慢性的な健康被害に関する原因究明及び発生防止のための情報提供手段としての製品表示の評価に関する研究 (療品)  
Studies with household products on verification on relationship of consumer understanding of product indication to incidence of misuse and/or hazardous accidents: Studies with household rubber products on cause elucidation on chronic health damages such as allergic contact dermatitis, and on evaluation of product indication as preventive information delivery measure against health damages
63. 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 (療品)  
Fundamental studies on quality and safety of cellular and tissue-based products
64. 医療用具の有効性・安全性評価の手法に関する研究 (療品)  
Studies on the evaluating methods of effectiveness and quality of medical devices
65. 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
66. 水道におけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの濃縮機構等に関する研究 (環境)  
Research of diethylhexyl phthalate on the concentration mechanism in water supply
67. 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (環境)  
Studies on development and utilization for alternatives to animal testing and experimentation
68. 加工食品中のアクリルアミドの測定・分析及びリスク評価等に関する研究 (食品, センター長, 毒性, 病理, 変異, 有機)
69. 食物アレルギー表示に伴う特定原材料の検出法の開発に関する研究 (食品)  
Studies on the development of analytical methods for allergic substances in foods
70. ダイオキシンの汚染実態の把握及び摂取低減化に関する研究 (食品)  
Studies on dioxin levels in foods and reduction method of dioxin intake
71. 既存添加物の安全性確保上必要な品質問題に関する研究 (食添, 毒性, センター長)  
Studies on quality problems in ensuring safety of existing food additives in Japan
72. エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究 (食添)  
Preliminary screening for antiviral AIDS drugs
73. 食品に付着・汚染する真菌の調査研究 (衛微)  
Studies on fungous flora and contamination in foods
74. プライマリーヒト肝・腎細胞を用いた薬剤暴露・遺伝子発現に関する研究 (遺細, 有機)  
Study on gene expression in human primary hepatocytes and renal cells exposed to chemicals
75. 紫外線照射による健康影響とその予防に関する研究 (有機)  
Studies on the biological effect of UV irradiation and its prevention
76. 反復投与毒性や発がん性試験等の実施による既存添加物の安全性評価に関する研究 (病理)  
Safety assessment of existing food additives by means of repeated dose toxicity and carcinogenicity studies
77. フタル酸/アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究—発達期ないし有病時暴露による影響評価— (病理, 評価)  
Assessment of the exposure effect of phthalate/adipate esters on the reproductive system. Evaluation of the exposure effects during development or with organ dysfunction conditions
78. 遺伝子解析研究, 再生医療等分野において用いられるヒト由来資料に関する法的・論理的研究 その体系的あり方から適正な実施の制度まで (変異)  
Legal and Ethical issues on Human materials in the use of genome and stem cell research—Its systematic regulatory frame and appropriate code of practice

79. 医薬品の最新品質管理技法の導入及び薬事法改正への対応等による日本薬局方の質的向並びに信頼性確保に関する研究 (支葉)  
Studies on Qualitative improvement and reliability assurance the Japanese Pharmacopoeia by introduction of the latest quality control technique of medicine and correspondence to revision of the Pharmaceutical Affairs Law
80. 食品中の微生物のリスク評価に関する研究 (食管)  
Study for microbiological risk assessment in foods
81. ビブリオバフニフィカスによる重篤な疾病に関する研究 (食管)  
Study for severe acute disease by *Vibrio vulnificus*
82. 食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究 (食管)  
Active surveillance of food-borne *Listeria monocytogenes* infection
83. 食品製造の高度衛生管理に関する研究 (衛微)  
Studies on developed food control of food manufacture

科学研究費補助金 (文部科学省)  
(特定A)

1. 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
2. 食品用器具・容器包装関連化学物質の内分泌攪乱作用の検索と残存実態の解明 (食添)  
Estrogenic activities of chemicals related with food contact plastics and their residual levels
- (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. 単離心筋細胞を用いたエンドセリンA受容体脱感作機序の解明 (代謝)  
Electrophysiological and pharmacological study on the mechanism for desensitization of ETA endothelin receptor, by using isolated single cardiomyocytes
8. 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
9. 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.
10. 光照射をトリガーとするエンジン分子の設計と合成 (有機)  
Molecular design and sythesis of a new class of triggerd endiyne
11. 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 ageing-a sensitive model for drug-induced epigenetic damages
12. サルモネラリピドAのマクロファージ活性化における種特異性を支配する分子機構の解明 (食添)  
Elucidation of the molecular mechanism for species-specificity of the macrophage activation by Salmonella lipid A
13. 形質転換実験系における発がんプロモーターによる遺伝子発現変化の解析 (衛微)  
Analysis of altered gene expression by tumor promoters in cell transformation
14. 次世代型フラボノイド系抗酸化剤の開発 (有機)  
Studies on the flavonoid derivative as a new type of synthetic antioxidant
15. 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 (病理)  
Analysis of endogenous molecular mechanisms on carcinogenesis using reporter genes
16. ズーノーシス原因真菌の住環境生息性と分布拡大 (衛微)  
Habitat of zoonotic fungi in dwelling environment (奨励A)
17. 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
18. 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 insulator and the mold occurreuce
19. 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 bonificial for human health by phytoestrogens
20. 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
21. 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 (支葉)  
Studies on the binding mechauiism of apolipoproteins and lipid-menbrae
22. C60内包型新規超分子化合物の合成  
Synthesis of novel supramolecular capsule for C60

23. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒素の検出における遺伝子増幅法を用いた新規システムの開発 (衛微)  
Establishment of new system using PCR technique for the detection of the most stable direct hemolysin (若手研究B)
24. 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学的解析 (毒性)  
Analysis of genetic interaction among Notch signaling genes in somitogenesis
25. 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
26. 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 indicator for tyrosine phosphorylation
27. ヒト由来資料の収集・保存・分譲・利用等における生命倫理に関する調査研究 (変異)  
Research on bioethical issues on collection, storage, providing, and use of human materials and information
- がん研究助成金 (厚生労働省)**
1. 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
  2. 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
  3. 個体レベルでの発がん予知と予防に関する基盤的研究 (病理, 変異)  
Fundamental studies for prediction and prevention of carcinogenesis using whole animal models
  4. 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 (変異)  
Studies on efficacy and safety of pharmaceutical drugs based on international movement
  5. 個体レベルで見る遺伝子再編成と発がん (変異)  
Genetic rearrangement and carcinogenicity in whole animals
  6. 突然変異を指標とした変異原・がん原性の検索系の開発に関する研究 (変異)  
Development of experimental systems for evaluation of the mutagenicity and carcinogenicity by mutational analysis
- その他**
- 喫煙科学研究財団研究助成金**
1. 喫煙による発がんの修飾に関する実験的研究 (病理)  
Experimental studies on modifying effects of cigarette smoke on carcinogenesis
- 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. 食品添加物安全性再評価費・変異原性試験 (Chromosome試験) (変異)  
Mutagenicity of food additives
  4. 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
  5. 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
  6. 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)
  7. 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.
  8. 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
  9. 食品添加物規格策定費・食品添加物の規格基準及び試験法の設定, 改良 (食添, 支食)  
Establishment and improvement of specifications and standards of food additives
  10. 食品添加物基準策定費・食品中の添加物分析法の設定 (食添, 支食)  
Establishment of analytical methods for food additives in foods
  11. 食品添加物一日摂取量調査費・マーケットバスケット法による食品添加物の一日摂取量調査 (食添)  
Estimation of daily intake of food additives by the market basket method
  12. 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 specifications and standards of natural food additives
  13. 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
  14. アガリスク中の有害物質であるアガリチンの実態調査 (食品)

- Actual survey for agaritine concentration of *Agaricus blazei* Murill
15. 遺伝子組換え食品の検査法の外部精度管理について (食品)  
Proficiency test for the detection methods of genetically modified foods
16. 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, N-アセチルグルコサミン, セイヨウワサビ抽出物) (病理)  
Chronic toxicity and carcinogenicity tests in rats (Paprika colour, Madder colour, N-acetylglucosamine, Horseradish extract)
17. 食品添加物安全性再評価費・90日間投与試験 (ラット) (デュナリエラカロテン, シアナット色素, カテキン) (病理)  
Ninety-days toxicity studies of natural food additives (Dunaliella carotene, Shea nut colour, Catechin)
18. 2002年度対EU輸出ホタテガイ貝毒検査機関における貝毒検査のcomparative test及びverification実施報告 (食管)  
Report on the results of comparative tests and verification of the performance in the laboratory which tests marine biotoxins in scallops for exportation to the EU countries (financial year 2002)

#### 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. 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
5. 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. 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
8. 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
3. 向精神薬の分析法に関する研究 (生薬)  
Standardization of analytical methods for psychotropic drugs

#### 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*

#### 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)  
Analysis of function of ATP receptors in CNS and its application to medication
2. 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
3. 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

4. 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 toxicogenes by cDNA microarray technique

## 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

## 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. 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

2. 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

3. ハイ・スループット遺伝毒性試験系の開発(変異)

Development of high-throughput genotoxicity test

4. 高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性, 安全性評価法の確立(変異)

Establishment of evaluating efficacy and safety of pharmaceutical drugs using human derived liver cell lines with extra function

## 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(変異)

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. 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

2. 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

3. 酸性多糖類の医用材料としての応用に関する基礎的研究(支薬)

Fundamental studies on the biomedical applications

of anionic polysaccharides

4. 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

5. 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 forms for unstable proteins and highly hydrophobic pharmaceuticals

6. 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

7. 医薬品の分析法に関する研究(薬品)

Development of analytical methods for medicines

8. 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

9. 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

10. 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(遺種)

Development of efficient and regulated gene expression system

11. 低酸素センサーを介する虚血性及び変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

12. 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

13. 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(食添)

Development of a new test method for properly evaluating contaminations of pharmaceuticals with bacteria and their products

14. 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

15. 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

16. 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

17. 覚せい剤易再燃性に関連する大脈辺縁系可塑性におけるチャ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

18. 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 biocompatibility and functionality
19. Toll-like receptor 4結合分子MD-2の機能解析と創薬への応用 (衛微)  
Functional analysis of MD-2, a novel accessory molecule for Toll-like receptor 4, and its application to pharmaceutical developments
20. 組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立 (病理)  
Establishment of animal models for safety evaluation of genetically modified organism products by their chronic oral administration
21. ヒト組織の創薬研究資源化に関する研究 (変異)  
Studies on the use of human tissues for research and development
22. 食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する高感度検出法に関する研究 (食管)  
High sensitive detection methods for food-borne pathogens in food and environment
23. 健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究 (衛微)  
Studies on the biological control of harmful organisms
24. 新機能素材の食品化学的評価と分析に関する研究 (生薬, 食品)  
Evaluation of functional activity new food materials and their analyses

**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. 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
2. 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)  
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
4. 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
5. 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
6. 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, 医安)

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作用の検定法の開発 (生物)  
Development of screening methods using GFPs of ligands for nuclear receptors

**産学官連携イノベーション創出事業費補助金**

(独創的革新技術開発研究提案公募制度)

1. DNAチップを用いた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 (環境)  
Risk Assessment for Environmental Chemicals using method of single nucleotide polymorphisms(SNPs)

**部 名 略 称**

薬品部	薬品
生物薬品部	生物
生薬部	生薬
遺伝子細胞医薬部	遺細
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
食品衛生管理部	食管
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
安全情報部	情報
医薬安全科学部	医安
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

和歌山薬用植物栽培試験場……和植  
種子島薬用植物栽培試験場……種植

平成14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14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	( 162 ) 156	( 162 ) 156	△ 6	96.30
特 別 審 査 試 験	( 64 ) 65	( 0 ) 0	( 64 ) 65	1	101.60
一 斉 取 締 試 験	( 260 ) 254	( 58 ) 19	( 318 ) 273	△ 45	85.85
輸 入 食 品 検 査	( 0 ) 0	( 0 ) 0	( 0 ) 0	0	-
合 計	( 324 ) 319	( 220 ) 175	( 544 ) 494	△ 50	

( ) 内数字は平成13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14年度製品検査品目別月別判定別件数実績表 --- 頁

○平成14年度特別審査試験月別件数実績表 --- 頁

○平成14年度一斉取締試験判定別件数実績表 --- 頁

## 平成 1 4 年 度 製 品 検 査 品 目 別

区 分	4 月			5 月			6 月			7 月			8 月			9 月		
	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
大 阪	28	-	28	8	-	8	14	-	14	13	-	13	22	-	22	9	-	9
計	28	-	28	8	-	8	14	-	14	13	-	13	22	-	22	9	-	9

## 平成 1 4 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	-	16	1	2	5	-	6	4	10	3	3	-	50
生 物 薬 品 部	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	6
衛 生 微 生 物 部	-	-	-	-	-	-	-	1	8				9
	-	16	1	8	5	-	6	4	10	3	3	-	65

月別判定別件数実績表

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計		
合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計	合 格	不 合 格	計
8	-	8	14	-	14	8	-	8	5	-	5	14		14	13		13	156		156
8	-	8	14	-	14	8	-	8	5	-	5	14	-	14	13	-	13	156	-	156

平成14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 大	京	247	0	7	254
	阪	19	0	0	19
合 計		266	0	7	273

## 国立医薬品食品衛生研究所標準品

## Reference Standard Prepared by National Institute of Health Sciences

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15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 <sup>円</sup>	・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	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
5	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
6	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
7	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
8	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
9	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
10	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
11	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
12	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
13	酢酸レチノール	10,000単位入 5カプセル	18,500	・酢酸レチノールおよびその製剤の定量法
14	ジキタリス	1g入り 3本	18,900	・ジキタリス, 同末の定量法

日本薬局方標準品

番号	標準品名	包装単位	価格	使用目的
15	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
16	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
17	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
18	セクレチン	100単位入り	38,400	・セクレチンの定量法
19	センノシドA	20mg入り 1本	32,800	・センナおよびセンナ末の定量法
20	センノシドB	20mg入り 1本	31,600	・センナおよびセンナ末の定量法
21	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
22	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
23	トリアムシノロン	100mg入り 1本	19,300	・トリアムシノロンの確認試験および定量法
24	トリアムシノロンアセトニド	100mg入り 1本	19,300	・トリアムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
25	トロンピン	500単位入り 2本	43,900	・トロンピンの定量法
26	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
27	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
28	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
29	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
30	薄層クロマトグラフ用 パルミチン酸レチノール	10,000単位入り 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
31	パルミチン酸レチノール	10,000単位入り 5カプセル	17,500	・パルミチン酸レチノールおよびその製剤の定量法
32	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
33	プエラリン	20mg入り 1本	34,800	・カッコンの定量法
34	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
35	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
36	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
37	ペオニフロリン	20mg入り 1本	33,900	・ペオニフロリンの定量法
38	ヘパリンナトリウム	1,200単位 1本	34,900	・ヘパリンナトリウム、同注射液の定量法。硫酸プロタミンおよび同注射液の抗ヘパリン試験
39	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
40	リゾチーム	500mg入り 1本	33,000	・リゾチーム製品の定量法
41	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

## 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15年4月1日現在)

号	標準品名	包装単位	価格 円	使用目的
1	インドシアニングリーン	300mg入り 1本	18,100	・インドシアニングリーンおよびその製剤の定量法
2	ウロキナーゼ	1,000単位入り 1本	19,700	・ウロキナーゼおよびその製剤の定量法
3	エストラジオール	50mg入り 1本	19,100	・エストラジオールおよびその製剤の純度試験
4	エストロン	50mg入り 1本	19,100	・エストロンおよびその製剤の確認試験及び定量法
5	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
6	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
7	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
8	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
9	シクランデラート	300mg入り 1本	18,200	・シクランデラートの定量法
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	10mg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	・ペントキシフィリンの純度試験
15	ヒアルロニダーゼ	500mg入り 1本	22,700	・注射用ヒアルロニダーゼの定量法
16	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
17	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
18	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
19	融点測定用 アセトフェネチン、カフェイン、 メトフェネチン、メトフェネチン、 メトフェネチン、メトフェネチン、 メトフェネチン、メトフェネチン	各1g入り 6本	60,700	・融点測定用温度計、同装置の補正
20	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
21	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
22	リン酸ヒスタミン	50mg入り 1本	16,000	・ヒスタミン試験
23	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15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 <sup>円</sup>	・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	アゾルビンエキストラ	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ビ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	1 g入り 1本	3,350	・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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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	リソールルビンBCA	1 g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ビンBCAの確認試験
35	レーキレッドC	1 g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	1 g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	1 g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	1 g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14年度国立医薬品食品衛生研究所標準品出納状況

(医薬品試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量	製造数量	売払数量	自家消費等 数量	年度末 在庫数量	備考
	個	個	個	個	個	
アルプロスタジル	11	156	119	0	48	
インスリン	33	0	14	0	19	
インドシアニングリーン	15	25	20	0	20	
ウリナスタチン	2	50	20	0	32	
ウロキナーゼ	100	0	1	1	98	
エストラジオール	19	144	121	0	42	
エストロン	9	65	32	0	42	
エルカトニン	38	100	106	1	31	
エルゴカルシフェロール	42	212	151	0	103	
塩化ベルベリン	26	40	43	23	0	
塩酸チアミン液	15	20	9	9	17	
エンドトキシン10000	339	400	696	43	0	
エンドトキシン100	236	600	820	16	0	
下垂体性性腺刺激ホルモン	27	122	60	0	89	
カリジノゲナーゼ	30	95	82	0	43	
含糖ペプシン	27	0	10	17	0	
吉草酸ジフルコルトロン	25	35	47	0	13	
ギトキシシン	5	10	7	8	0	
グリチルリチン酸	6	1,090	1,062	1	33	
血清性性腺刺激ホルモン	91	0	19	0	72	
高分子量ウロキナーゼ	21	40	35	0	26	
コハク酸トコフェロール	0	201	162	1	38	
コレカルシフェロール	53	149	176	0	26	
酢酸デキサメタゾン	13	0	5	0	8	
酢酸トコフェロール	26	1,073	1,029	0	70	
酢酸レチノール	4	50	24	0	30	
ジギタリス	15	0	0	0	15	
ジギトキシシン	37	0	11	26	0	
シ克蘭デラート	12	0	2	0	10	
ジゴキシシン	23	0	17	6	0	
シュウ酸カルシウム水和物	35	0	20	0	15	
ショ糖オクタ硫酸エステルカリウム	13	20	17	0	16	
G-ストロファンチン	24	0	0	0	24	
スウェルチアマリン	29	55	53	14	17	
セクレチン	67	0	38	5	24	
センノシド	39	0	17	0	22	
センノシドA	0	30	6	0	24	
センノシドB	0	30	7	0	23	
組織培養ウロキナーゼ	41	0	0	0	41	
胎盤性性腺刺激ホルモン	4	180	122	0	62	
低分子量ヘパリン	19	30	40	0	9	
テオプロミン	19	0	0	0	19	
デスラノシド	1	0	1	0	0	
トコフェロール	163	200	310	0	53	
トリアムシノロン	28	0	2	0	26	
トリアムシノロンアセトニド	33	0	11	0	22	
トロンビン	18	60	59	0	19	
ニコチン酸トコフェロール	17	15	16	0	16	
脳下垂体後葉	19	16	6	5	24	
バイカリン	21	47	33	2	33	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	50	0	14	0	36	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	58	0	24	0	34	
パルミチン酸レチノール	38	80	62	0	56	
ヒアルロニダーゼ	51	0	10	0	41	
ヒトインスリン	26	35	41	3	17	
ヒト成長ホルモン	145	0	12	1	132	

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	
プエラリン	0	30	4	0	26	
フルオシノニド	28	0	5	0	23	
フルオシノロンアセトニド	24	0	11	0	13	
フルオロメトロン	16	55	60	0	11	
フルドロキシコルチド	27	0	3	0	24	
プロピオン酸テストステロン	30	0	0	30	0	
プロピオン酸ベクロメタゾン	38	0	6	32	0	
ペオニフロリン	41	132	138	1	34	
ヘパリンナトリウム	72	100	139	0	33	
マレイン酸メチルエルゴメト リン	6	0	2	0	4	
メシル酸ジヒドロエルゴトキ シン	31	0	3	0	28	
メチルジゴキシン	30	0	9	21	0	
融点測定用	4	70	56	0	18	
アセトアニリト <sup>*</sup> , アセトフ エネチシ <sup>*</sup> ン, カフェイン, スルファニルアミト <sup>*</sup> , スル ファビ <sup>*</sup> リシ <sup>*</sup> ン, ワニリン						
酪酸ヒドロコルチゾン	17	0	2	0	15	
ラナトシドC	17	0	1	16	0	
リゾチーム	35	301	273	0	63	
硫酸プロタミン	35	0	5	0	30	
リン酸デキサメタゾンナトリ ウム	31	0	22	0	9	
リン酸ヒスタミン	1	25	12	0	14	
リン酸ヒドロコルチゾンナト リウム	14	0	5	9	0	
リン酸プレドニゾロンナトリ ウム	12	17	17	2	10	
リン酸ベタメタゾンナトリウ ム	2	15	4	13	0	
計	2,769	6,220	6,598	306	2,085	

(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	1	0	62	
アシッドレッド	432	0	8	0	424	
アゾルビンエキストラ	60	0	2	0	58	
アマランス	377	0	8	120	249	
アルラレッドAC	274	0	7	0	267	
インジゴ	119	0	2	0	117	
インジゴカルミン	477	0	9	0	468	
エオシン	104	0	4	0	100	
エリスロシン	416	0	11	0	405	
オイルエローAB	207	0	2	50	155	
オイルエローOB	214	0	2	50	162	
オイルオレンジSS	216	0	2	0	214	
オイルレッドXO	191	0	2	50	139	
オレンジI	262	0	3	0	259	
オレンジII	141	0	3	0	138	
ギネアグリーンB	48	0	3	0	45	
サンセットエローFCF	421	0	11	0	410	
タートラジン	393	0	14	0	379	
テトラクロルテトラプロムフル ルオレセイン	140	0	2	0	138	
テトラプロムフルオレセイン	101	0	3	0	98	
トリジンレッド	67	0	2	50	15	
ナフトールエローS	124	0	3	5	116	
ニューコクシン	425	0	11	0	414	
パーマネントオレンジ	17	0	2	12	3	
ハンサエロー	64	0	2	50	12	
ファストグリーンFCF	407	0	5	79	323	
ファストレッドS	187	0	3	0	184	
ブリリアントブルーFCF	353	0	22	0	331	
フルオレセイン	176	0	2	0	174	
フロキシシン	256	0	8	1	247	
ボンソーR	237	0	3	0	234	
ボンソーSX	136	0	3	50	83	
ボンソー3R	147	0	4	0	143	
リゾールルビンBCA	344	0	3	1	340	
レーキレッドC	374	0	1	0	373	
レーキレッドCBA	111	0	2	0	109	
レーキレッドDBA	152	0	1	0	151	
ローズベンガル	389	0	8	1	380	
計	8,622	0	184	519	7,919	

## 国立医薬品食品衛生研究所報告第121号人名索引 (アルファベット順)

## A

- Abe-Onishi, Yukiko (大西(阿部)有希子) 326, 327, 348, 349  
 Adachi, Reiko (安達玲子) 260, 361  
 Ahmed, Saifuddin (アーメッドサフディン) 339, 340  
 Aihara, Maki (相原真紀) 245, 246  
 Aisaki, Kenichi (相崎健一) 268, 368  
 Akiyama, Hiroshi (穠山 浩) 213, 216, 237, 238, 258, 307, 308, 326, 332, 334, 346, 347, 359, 360  
 Akiyama, Takumi (秋山卓美) 239, 348  
 Amakura, Yoshiaki (天倉吉章) 234, 235, 345  
 Amano, Hiroo (天野博夫) 118, 391  
 Ando, Masanori (安藤正典) 25, 100, 230, 231, 232, 233, 256, 276, 323, 326, 327, 342, 343, 344, 359  
 Ando, Yuki (安藤友紀) 378  
 Aoyagi, Nobuo (青柳伸男) 208, 323, 330, 364  
 Arato, Teruyo (荒戸照世) 338, 378, 379, 388  
 Arimura, Takuro (有村卓朗) 371, 372  
 Asai, Misato (浅井美里) 349  
 Asami, Yasuo (麻見安雄) 292  
 Aso, Yukio (阿曾幸男) 209, 330, 331  
 Awaya, Tomokazu (粟屋智一) 377  
 Ayano, Eri (綾野絵理) 342, 343

## B

- Banu, Yasmin (バヌーヤスミン) 340  
 Betsui, Hiroshi (別井弘始) 278

## C

- Cho, Young-Man (曹 永晩) 329

## E

- Ema, Makoto (江馬 眞) 124, 266, 292, 293, 315, 327, 328, 329, 364, 377, 387  
 Ezaki, Kathushi (江崎勝司) 332, 333

## F

- Fuchino, Hiroyuki (渕野裕之) 300, 332, 381, 382  
 Fujimori, Kan-nosuke (藤森観之助) 261  
 Fujishita, Kayoko (藤下加代子) 273, 360, 363, 364, 369  
 Fukuhara, Kiyoshi (福原 潔) 228, 251, 252, 253, 327, 355, 356, 357  
 Furukawa, Fumio (古川文夫) 280, 281, 282, 283, 284, 285, 370, 371

- Furukawa, Mizuki (古川みずき) 51, 78, 81

## G

- Goda, Yukihiro (合田幸広) 86, 87, 213, 214, 215, 234, 237, 238, 325, 326, 332, 333, 334, 382  
 Gruz, Petr (ピーターグルーズ) 290, 373, 374, 375, 376

## H

- Hachisuka, Akiko (蜂須賀暁子) 34, 332, 359  
 Hakamata, Wataru (袴田 航) 254, 327, 333, 355, 356, 357, 359  
 Hanajiri (Kikura) Ruri (花尻(木倉)瑠理) 216, 325, 326, 334, 364  
 Hanaoka, Hideki (花岡英紀) 377  
 Hanioka, Nobumitsu (埴岡伸光) 230, 232, 233, 256, 326, 342, 343, 344, 359  
 Harazono, Akira (原園 景) 293, 377, 391  
 Harikai, Naoki (張替直輝) 216, 346, 359  
 Hasagawa, Chie (長谷川千恵) 227, 340, 341  
 Hasegawa, Ryuichi (長谷川隆一) 124, 265, 266, 293, 315, 330, 364, 377  
 Hasumura, Mai (蓮村麻衣) 329, 372  
 Hatakeyama, Yoshio (畠山好雄) 12, 299, 323, 380  
 Hayakawa, Takao (早川堯夫) 109, 128, 128, 210, 211, 212, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 224, 302, 303, 323, 330, 331, 332, 334, 335, 336, 337, 339  
 Hayashi, Makoto (林 眞) 224, 287, 288, 289, 294, 338, 339, 373, 376, 377, 390  
 Hayashi, Yuzuru (林 譲) 122, 236, 264, 285, 340, 345, 348, 363, 364  
 Higuchi, Yukito (樋口行人) 260  
 Himaki, Daisuke (檜楨大介) 361, 369  
 Hirabayashi, Yoko (平林容子) 114, 270, 271, 324, 366, 367, 368  
 Hirata, Michimasa (平田陸正) 227  
 Hirayama, Yoshinobu (平山佳伸) 377, 388  
 Hirose Akihiko (広瀬明彦) 124, 285, 293, 329, 388  
 Hirose, Masao (広瀬雅雄) 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 315, 317, 328, 329, 370, 371, 372, 374, 375  
 Hirota, Masamitsu (廣田雅光) 310, 327, 349  
 Hishida, Atsuyuki (菱田敦之) 299, 380, 381  
 Hiyama, Yukio (檜山行雄) 325, 327, 331, 362, 382, 384  
 Hojo, Maki (北條麻紀) 376, 376, 377

Honda, Futaba (本田二葉) 338, 378, 379  
 Honma, Masamitsu (本間正充) 289, 294, 318, 338, 373, 390  
 Hoshi, Takahiro (星 隆弘) 338, 378, 379  
 Hosokawa, Keizo (細川敬三) 299  
 Hosoki, Rumiko (細木るみ子) 320, 378  
 Hosono, Tetsuji (細野哲司) 222, 335, 336  
 Huo, Yan (霍 艶) 367  
 Hyuga, Masashi (日向昌司) 210, 211, 212, 331  
 Hyuga, Sumiko (日向須美子) 210, 211

## I

Igarashi, Katsuhide (五十嵐勝秀) 269, 315, 366  
 Igimi, Shizunobu (五十君静信) 242, 244, 250, 309, 310, 323, 327, 349, 350, 351, 383, 384  
 Iida, Osamu (飯田 修) 323, 332, 381, 381  
 Iizuka, Ryota (飯塚了太) 376  
 Ikarashi, Yoshiaki (五十嵐良明) 16, 225, 228, 304, 326, 341  
 Imai, Toshio (今井俊夫) 258, 286, 287, 317, 329, 360, 372  
 Imawaza, Takayoshi (今沢孝喜) 261, 283, 283, 284, 285, 328, 329, 371  
 InoueMayumi (井上真由美) 333  
 Inoue, Kazuhide (井上和秀) 259, 272, 273, 276, 312, 313, 323, 338, 360, 361, 363, 364, 368, 369, 370, 376  
 Inoue, Tohru (井上 達) 40, 267, 268, 269, 270, 271, 315, 316, 323, 324, 328, 364, 365, 366, 367, 368, 383  
 Isama, Kazuo (伊佐間和郎) 40, 111, 229, 304, 328, 342  
 Ishibashi, Mumio (石橋無味雄) 209, 216, 334  
 Ishida, Seiichi (石田誠一) 232, 256, 257, 274, 276, 317, 345, 359, 361, 363, 364, 369, 370, 376  
 Ishii-Watabe, Akiko (石井(渡部)明子) 217, 221, 222, 302, 331, 334, 335  
 Ishimitsu, Susumu (石光 進) 297, 298, 329, 380, 391  
 Ishiwata, Hajime (石綿 肇) 239, 391  
 Isuzugawa, Kazuto (五十鈴川和人) 258  
 Ito, Rieno (伊藤理恵乃) 278  
 Itoda, Masaya (井戸田昌也) 256, 274, 359  
 Itoh, Satsuki (伊藤さつき) 210, 211, 331, 332, 359  
 Itoh, Yoshinori (伊藤嘉典) 346, 347, 349, 350  
 Iwata, Akiko (岩田明子) 334  
 Izutsu, Ken-ichi (伊豆津健一) 208, 323, 330

## J

Jinno, Hideto (神野透人) 230, 232, 233, 256, 276,

326, 342, 343, 344

## K

Kai, Yoko (甲斐陽子) 255, 359  
 Kaihara, Akiko (開原亜樹子) 74, 76, 297, 298  
 Takeya, Tomoshi (掛谷知志) 249, 354  
 Kamakura, Hiroyuki (鎌倉浩之) 325, 332, 333  
 Kamata, Eiichi (鎌田栄一) 266, 293, 320, 329, 364, 377  
 Kaminuma, Tsuguchika (神沼二真) 264  
 Kanayasu-Toyoda, Toshie (豊田淑江) 224  
 Kaneko, Toyozo (金子豊蔵) 268, 271, 328, 366, 367  
 Kaniwa, Masa-aki (鹿庭正昭) 16, 40, 228, 304, 326, 328, 341  
 Kaniwa, Nahoko (鹿庭なほこ) 208, 216, 275, 314, 315, 324, 330, 334, 364  
 Kanki, Keita (神吉けい太) 370, 371  
 Kanno, Jun (菅野 純) 40, 266, 267, 269, 270, 271, 316, 324, 327, 328, 339, 365, 366, 367, 368, 385, 386  
 Kansui, Hisao (寒水壽朗) 251, 355, 357  
 Kasahara, Ken-ichiro (笠原健一郎) 283  
 Kasuga, Fumiko (春日文子) 1, 244, 310, 311, 349, 350, 351, 383, 384  
 Kato, Natsumi (加藤奈津美) 372  
 Kato, Ryuichi (加藤隆一) 317  
 Katori, Noriko (香取典子) 208, 325, 330, 364  
 Katsuki, Shigeki (香月茂樹) 300, 301, 322, 323, 381  
 Kawabata, Kenji (川端健二) 338  
 Kawahara, Nobuo (川原信夫) 213, 214, 215, 323, 325, 332, 333, 382  
 Kawai, Hiroshi (河合 洋) 331, 332  
 Kawamura, Yoko (河村葉子) 240, 241, 309, 323, 327, 348, 383  
 Kawanishi, Toru (川西 徹) 109, 211, 212, 331, 332, 382  
 Kawasaki, Nana (川崎ナナ) 210, 211, 331, 332, 359  
 Kawasaki, Yasushi (川崎 靖) 40, 268, 328, 366, 367, 368  
 Kawasaki, Yoko (川崎洋子) 48, 239, 326, 327, 348  
 Kikuchi, Yutaka (菊池 裕) 248, 249, 348, 354  
 Kim, Su-Ryang (金 秀良) 290, 359, 370, 375, 375, 376  
 Kitajima, Satoshi (北嶋 聡) 270, 316, 324, 328, 365  
 Kitamura, Yasuki (北村泰樹) 371  
 Kiuchi, Fumiyuki (木内文之) 299, 300, 322, 380, 381  
 Kobayashi, Kazuo (小林一夫) 354, 373  
 Kobayashi, Tetsu (小林 哲) 109, 212, 286, 331, 332, 372  
 Kodama, Yasuo (児玉庸夫) 270, 271, 285, 294, 324, 366, 378  
 Kodama, Yukio (児玉幸夫) 328, 367, 368, 371  
 Kohara, Arihiro (小原有弘) 338  
 Koide, Tatsuo (小出達夫) 54, 57, 59, 62, 65, 68,

- 71, 74, 76, 391
- Koizumi, Mutsuko (小泉睦子) 266, 315, 364, 377
- Koizumi, Syuichi (小泉修一) 259, 272, 273, 313, 360, 361, 368, 369
- Koizumi, Tomoko (小泉朋子) 338
- Koizumi, Tomoko (小泉朋子) 373
- Kojima, Shigeo (小嶋茂雄) 208, 209, 216, 302, 327, 330, 331, 334, 364
- Kokubo, Kiyoko (小久保清子) 374
- Kondo, Kazunari (近藤一成) 91, 326, 345
- Konishi, Yoshiko (小西良子) 242, 249, 250, 354, 383
- Konuma, Hiroataka (小沼博隆) 247, 248, 312, 352, 353
- Kou, Reika (高玲華) 25, 231, 342
- Kubo, Takashi (久保崇) 370
- Kubota, Hiroki (久保田浩樹) 239, 326, 327, 348, 349
- Kudoh, Yukiko (工藤由起子) 248, 310, 352, 353, 354
- Kumagai, Takeo (熊谷健夫) 12, 299, 380
- Kurebayashi, Hideo (紅林秀夫) 278, 279, 293, 370
- Kurihara, Masaaki (栗原正明) 89, 253, 254, 255, 357, 358, 359
- Kurose, Kouichi (黒瀬光一) 265, 342, 343
- Kusunoki, Hirofumi (楠博文) 322, 379, 388
- L**
- Lee, Kyoung-youll (李京烈) 372
- Li, Guang-xun (李光勳) 324, 366, 367
- M**
- Machii, Kenji (町井研士) 327
- Maeda, Daisuke (前田大輔) 338, 378, 379, 388
- Maekawa, Keiko (前川京子) 256, 295, 359
- Maitani, Tamio (米谷民雄) 91, 216, 234, 235, 237, 238, 239, 240, 241, 305, 306, 307, 326, 334, 344, 345, 346, 347, 348, 360
- Makino, Yuko (牧野悠子) 230, 233, 342, 343, 344
- Maruyama, Satoshi (丸山覚司) 371
- Maruyama, Takuro (丸山卓郎) 215, 333
- Masui, Tohru (増井徹) 248, 291, 292, 319, 320, 376, 377
- Masumura, Ken-ichi (増村健一) 289, 290, 291, 371, 374, 375, 376
- Masutomi, Naoya (榑富直哉) 286, 371, 372
- Matsuda, Rieko (松田りえ子) 236, 241, 264, 306, 326, 340, 345, 348, 363, 364
- Matsui, Keiko (松井恵子) 374, 375, 376
- Matsuoka, Atsuko (松岡厚子) 228, 229, 304, 340, 341, 342
- Matsushima, Erika (松島江里香) 230, 326, 343
- Matsushima, Yuko (松島裕子) 40, 268, 328, 365
- Matsutani, Sachiko (松谷佐知子) 352
- Matsuzaki, Akari (松崎亜香里) 358, 359
- Minami, Motoyasu (南基泰) 299
- Mitsumori, Kunitoshi (三森国敏) 260, 329
- Miura, Yoshimi (三浦嘉巳) 237
- Miyahara, Makoto (宮原誠) 236, 247, 307, 346
- Miyahara, Michiko (宮原美知子) 247, 312, 352, 353
- Miyajima, Atsuko (宮島敦子) 255, 359, 390
- Miyata, Naoki (宮田直樹) 228, 255
- Miyauchi, Makoto (宮内慎) 281, 282, 283
- Miyawaki, Emiko (宮脇英美子) 292, 377
- Miyazaki, Tamaki (宮崎玉樹) 331
- Miyazawa, Hiroshi (宮澤宏) 223, 338, 338
- Mizokoshi, Akito (溝腰朗人) 360, 361, 369
- Mizuguchi, Hiroyuki (水口裕之) 217, 218, 219, 220, 221, 222, 302, 303, 331, 334, 335, 336, 337
- Mizukawa, Yumiko (水川裕美子) 268, 324, 366
- Mizusawa, Hiroshi (水澤博) 324, 376, 377, 390
- Monma, Junko (門馬純子) 328
- Mori, Kazuhiko (森和彦) 321, 377, 378, 388
- Mori, Satoko (森聡子) 338
- Morikawa, Kaoru (森川馨) 1, 325, 331, 361, 362
- Morikawa, Tomomi (森川朋美) 329
- Morita, Yukiko (森田有紀子) 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 76, 362
- Murai, Toshimi (村井敏美) 74, 76, 227
- Murakami, Miho (村上美保) 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 76, 379
- Murayama, Mitsunori (村山三徳) 236, 274, 306, 326
- Murayama, Norie (村山典恵) 230, 256, 274, 275, 359
- Muroi, Masashi (室井正志) 246, 247, 248, 311, 312, 351, 352
- Mutsuga, Motoh (六鹿元雄) 240, 241, 327, 334
- N**
- Nagai, Naomi (永井尚美) 338, 377, 378, 379
- Nagano, Michiyo (長野美千代) 255, 256, 274, 359
- Nagao, Taku (長尾拓) 268, 269, 320, 324, 327, 365, 366
- Nagaoka, Hiroaki (長岡寛明) 295, 321, 338, 378, 379, 384, 388
- Nagaoka, Megumi (長岡恵) 347
- Nagata, Ryuji (永田龍二) 338, 378, 379
- Naito, Yuki (内藤有紀) 251
- Nakagawa, Masao (中川雅生) 379
- Nakagawa, Yukari (中川ゆかり) 227, 391
- Nakajima, Osamu (中島治) 34, 256, 274, 359
- Nakajima, Yukiko (中島由起子) 265, 275, 364, 370
- Nakamura, Akitada (中村晃忠) 225, 227, 229, 328
- Nakamura, Hideaki (中村英明) 282, 283, 284, 285
- Nakamura, Ryosuke (中村亮介) 120, 257, 338, 359, 360
- Nakamura, Takatoshi (中村高敏) 332, 338, 359, 378, 379
- Nakamura, Yumiko (中村優美子) 51, 94, 213, 296, 297, 329, 380, 391
- Nakane, Takahisa (中根孝久) 214, 300, 332, 333, 380, 381
- Nakano, Tatsuya (中野達也) 1, 264, 363, 364
- Nakano, Maki (中野真希) 51, 78, 81, 329, 380,

391  
 Nakaoka, Ryusuke (中岡竜介) 229, 305, 340, 342  
 Nakata, Kotoko (中田琴子) 122, 264, 265, 345, 363, 364  
 Nakazawa, Ken (中澤憲一) 273, 274, 369, 370, 387  
 Nemoto, Satoru (根本 了) 234, 326, 344  
 Niho, Naoko (仁保直子) 285  
 Niimi, Shingo (新見伸吾) 109, 212, 256, 331, 332  
 Nishikawa, Akiyoshi (西川秋佳) 281, 282, 283, 284, 285, 286, 293, 317, 328, 329, 370, 371, 374, 375, 383  
 Nishimaki-Mogami, Tomoko (最上(西巻)知子) 261, 262, 361  
 Nishimura, Tetsuji (西村哲治) 100, 232, 256, 305, 323, 326, 342, 343, 344, 348, 361  
 Nohmi, Takehiko (能美健彦) 289, 290, 291, 318, 370, 371, 373, 373, 374, 375, 376, 390  
 Nomura, Yumiko (野村由美子) 388

**O**

Obama, Tomoko (小濱とも子) 360, 361, 369  
 Ogasawara, Hiromichi (小笠原弘道) 338, 378, 379  
 Ogawa, Yukio (小川幸男) 268, 328  
 Ogawa, Yuko (小川裕子) 348  
 Ohnishi, Takahiro (大西貴弘) 246, 247  
 Ohno, Akiko (大野彰子) 230, 231, 326, 342, 343  
 Ohno, Yasuo (大野泰雄) 107, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 315, 316, 317, 324, 329, 368, 369, 370, 377, 386  
 Ohshima, Yuichi (大島雄一) 225  
 Ohta, Miyako (太田美矢子) 210, 211, 331, 332  
 Ohtake, Chiyoko (大竹千代子) 263  
 Ojima, Hiloe (生島裕恵) 370  
 Okada, Satoshi (岡田敏史) 323, 391  
 Okada, Yumiko (岡田由美子) 243, 327, 349, 350, 351  
 Okazaki, Kazushi (岡崎和志) 281, 283, 284, 329, 370, 371, 374, 375  
 Okuda, Haruhiro (奥田晴宏) 86, 253, 255, 312, 327, 338, 355, 356, 357, 359, 378, 379, 384  
 Okunuki, Haruyo (奥貫晴代) 238, 257, 258, 359, 360  
 Okutani, Akiko (奥谷晶子) 327, 350, 351  
 Omori, Takashi (大森 崇) 294, 378, 379  
 Omuro, Hiromi (大室弘美) 378  
 Ono, Atsushi (小野 敦) 270, 366  
 Ono, Kageyoshi (小野景義) 215, 260, 261, 338, 361  
 Onodera, Hiroshi (小野寺博志) 258, 260, 280, 286, 287, 321, 329, 372  
 Onose, Jun-ichi (小野瀬淳一) 329, 372  
 Oonishi, Takahiro (大西貴弘) 312, 351, 352  
 Oshizawa, Tadashi (押澤 正) 212, 224, 339  
 Ozaki, Yukihiro (尾崎幸紘) 215, 260, 261, 332

Ozawa, Shogo (小澤正吾) 230, 232, 233, 255, 256, 257, 265, 274, 275, 276, 277, 330, 344, 359, 363, 364, 370

**P**

Park, JeongUng (朴 正雄) 226, 340, 340

**R**

Rahman, MuhammadShahidur (ラーマンムハマドサイド) 226, 339, 340

**S**

Saeki, Mayumi (佐伯真弓) 232, 233, 255, 256, 265, 274, 344, 359  
 Saisho, Kazuhiro (最所和宏) 325, 326, 334  
 Saito, Hiroyuki (斎藤博幸) 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 76, 296, 379, 391  
 Saito, Yoshiro (斎藤嘉朗) 230, 232, 233, 255, 256, 257, 265, 273, 274, 276, 344, 359, 370  
 Saitoh, Minoru (斉藤 実) 40, 268, 328  
 Sakai, Ayako (酒井綾子) 103, 248, 353, 354, 390  
 Sakai, Eiji (酒井英二) 299, 216, 217, 334, 347, 359  
 Sakamoto, Hiroko (坂本浩子) 289, 338, 373  
 Sakamoto, Tomoaki (坂本知昭) 209, 325, 327, 331  
 Sakemi, Kazue (酒見和枝) 278  
 Sakuraba, Mayumi (櫻庭真弓) 373  
 Sakurai, Fuminori (櫻井文教) 335, 336, 337  
 Sasaki, Kumiko (佐々木久美子) 233, 234, 235, 236, 323, 326, 344, 345, 379, 380  
 Satake, Motoyoshi (佐竹元吉) 260, 299, 323, 333  
 Sato, Junko (佐藤淳子) 295, 322, 379, 388  
 Sato, Kaoru (佐藤 薫) 369, 370  
 Sato, Kyoko (佐藤恭子) 239, 240, 327, 348  
 Sato, Michio (佐藤道夫) 342  
 Sato, Yoji (佐藤陽治) 112, 223, 224, 338, 361  
 Sato, Yuji (佐藤雄嗣) 347  
 Sato, Yukiko (佐藤由紀子) 251, 255, 358, 359  
 Sawada, Jun-ichi (澤田純一) 34, 120, 230, 232, 233, 238, 249, 255, 256, 257, 258, 265, 273, 274, 275, 276, 330, 332, 344, 354, 359, 360, 361, 363, 364, 370  
 Sekita, Kiyoshi (関田清司) 268, 328, 365  
 Sekita, Setsuko (関田節子) 87, 124, 260, 300, 332, 333, 380, 381, 382  
 Sekizawa, Jun (関澤 純) 262, 263, 313, 314, 315, 323, 324, 327, 328, 362, 363

- Shibata, Taro (柴田大朗) 321, 377, 378  
 Shibata, Toshiro (柴田敏郎) 299, 322, 323, 380, 381  
 Shibayama, Rie (柴山理恵) 331, 332  
 Shibutani, Makoto (渋谷 淳) 285, 286, 317, 324, 329, 371, 372  
 Shigemoto-Mogami, Yukari (重本(最上)由香里) 259, 276, 360, 361, 363, 364, 369, 370  
 Shigeno, Katsushiro (茂野雄城) 322  
 Shikano, Mayumi (鹿野真弓) 321, 338, 378, 379, 384, 388  
 Shimazawa, Rumiko (嶋澤るみ子) 338, 378, 379, 384, 388  
 Shimizu, Masatomi (清水雅富) 375  
 Shimizu, Mihumi (志水美文) 351  
 Shimomura, Koichiro (下村講一郎) 12  
 Shinozaki, Youichi (篠崎陽一) 361, 369, 376  
 Shintani, Hideharu (新谷英晴) 230, 305, 342  
 Shirota, Osamu (代田 修) 87, 215, 325, 332, 333, 382  
 Shudo, Koichi (首藤紘一) 276, 370  
 Simomura, Hiroko (下村裕子) 326, 332  
 Son, Hwa-Young (孫 和永) 281, 282, 284, 371  
 Soyama, Akiko (祖山晃子) 230, 256, 274, 276, 359  
 Sugimoto, Naoki (杉本直樹) 239, 240, 327, 348, 349  
 Sugita, Takiko (杉田たき子) 241, 348  
 Sugiyama, Emiko (杉山永見子) 364  
 Sugiyama, Keiichi (杉山圭一) 351  
 Sumide, Taizo (角出泰造) 225  
 Sunouchi, Momoko (簾内桃子) 370  
 Suzuki, Hodaka (鈴木穂高) 243, 350  
 Suzuki, Kazuhiro (鈴木和博) 259, 260, 327, 361  
 Suzuki, Takayoshi (鈴木孝昌) 303, 338, 338, 339, 373  
 Suzuki, Takuo (鈴木琢雄) 224, 331, 332
- T**
- Tabata, Hirobumi (田畑洋文) 277  
 Tagasira, Yoko (田頭洋子) 239, 348  
 Takada, Youko (高田容子) 319, 376, 377  
 Takada, Youko (高田容子) 376  
 Takagi, Atsuya (高木篤也) 324, 365, 366, 385  
 Takagi, Hironori (高木広憲) 286, 287, 329, 371, 372  
 Takagi, Hisayoshi (高木久宜) 372  
 Takagi, Kayoko (高木加代子) 257, 359, 360  
 Takahashi, Marii (高橋真理衣) 285, 300, 381  
 Takahashi, Noboru (高橋 登) 364  
 Takahashi, Noriyuki (高橋則行) 371, 372  
 Takahashi, Yu (高橋 雄) 270, 366  
 Takamatsu, Shoji (高松庄司) 388  
 Takatori, Kousuke (高鳥浩介) 103, 244, 245, 246, 248, 249, 323, 354, 379, 383  
 Takatsuki, Satoshi (高附 巧) 234, 326, 344  
 Takeda, Yuiko (武田由比子) 348  
 Takeuchi, Ori (竹内織恵) 25, 342, 343  
 Takizawa, Tamotsu (瀧澤 保) 281, 286, 287, 372  
 Tamura, Toru (田村 啓) 286, 287, 329, 372  
 Tanabe, Hideyuki (田辺秀之) 289, 291, 319, 376, 376, 377, 390  
 Tanaka, Rie (田中理恵) 334  
 Tanaka, Toshikazu (田中寿一) 391  
 Tanaka-Kagawa, Toshiko (香川(田中)聡子) 230, 232, 233, 276, 342, 343, 344  
 Tanamoto, Kenichi (棚元憲一) 48, 239, 240, 246, 247, 248, 249, 309, 311, 312, 326, 327, 347, 348, 349, 351, 352, 354, 383  
 Tanimoto, Tsuyoshi (谷本 剛) 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 76, 295, 322, 379, 391  
 Tanno, Masayuki (丹野雅幸) 359  
 Teshima, Reiko (手島玲子) 34, 120, 238, 255, 257, 258, 328, 332, 344, 359, 360  
 Tetsunari, Kihira (紀平哲也) 320, 378, 388  
 Toda, Kyoko (戸田恭子) 122, 345, 363, 364  
 Todaka, Koji (戸高浩司) 378  
 Tohkin, Masahiro (頭金正博) 364  
 Tokunaga, Hiroshi (徳永裕司) 25, 231, 232, 296, 326, 327, 342, 343, 344  
 Tonogai, Yasuhide (外海泰秀) 51, 78, 81, 94, 297, 298, 329, 344, 379, 380, 391  
 Toyoda, Kazuhiro (豊田和弘) 225, 285  
 Toyoda, Masatake (豊田正武) 213, 233, 234, 236, 237, 238, 258, 307, 334  
 Toyoda, Toshie (豊田淑江) 303, 339, 361  
 Toyoshima, Satoshi (豊島 聡) 295, 320, 338, 378, 379, 388  
 Tozaki, Hidetoshi (戸崎秀俊) 361, 369  
 Tozaki, Hidetoshi (戸崎秀俊)  
 Tsuchiya, Toshie (土屋利江) 16, 111, 225, 226, 227, 228, 229, 303, 304, 305, 326, 339, 340, 341, 342, 359, 382  
 Tsuda, Makoto (津田 誠) 259, 273, 278, 360, 361, 369  
 Tsuda, Mitsuhiro (津田充宥) 328  
 Tsuji, Sumiko (辻 澄子) 51, 78, 81, 297, 324, 329, 380, 391  
 Tsumura, Yukari (津村ゆかり) 297, 298, 329, 380, 391  
 Tsutsumi, Tomoaki (堤 智昭) 234, 235, 236, 345  
 Tuboi, Isao (壺井 功) 324, 367
- U**
- Uchida, Eriko (内田恵理子) 217, 221, 222, 224, 248, 302, 331, 334, 339  
 Uchida, Osayuki (内田雄幸) 40, 268, 328, 366  
 Uchino, Tadashi (内野 正) 25, 231, 232, 326, 327, 342, 343, 344  
 Uchiyama, Shigehisa (内山茂久) 342  
 Ueda, Makoto (上田 誠) 280, 281, 286, 287, 329,

Umemura, Takashi (梅村隆志) 372  
 268, 278, 285, 317, 328,  
 329, 370, 371, 374, 375,  
 390  
 Uneyama, Chikako (畝山智香子) 286, 324, 329, 371, 372  
 Urano, Tsutomu (浦野 勉) 364  
 Urayama, Takao (浦山隆雄) 294  
 Urusidani, Tetsuro (漆谷徹郎) 268, 269, 324, 365, 366  
 Usami, Makoto (宇佐見 誠) 107, 277, 278, 370  
 Uyama, Yoshiaki (宇山佳明) 294, 320, 377, 388

## W

Wakui, Chiseko (和久井千世子) 238, 240, 241, 346, 347  
 Watanabe, Kei (渡邊 圭) 338  
 Watanabe, Takahiro (渡邊敬浩) 238, 258, 326, 346, 347,  
 360

## Y

Yagami, Takeshi (矢上 健) 227, 303, 304, 340, 341  
 Yamada, Hiroaki (山田博章) 320, 338, 378, 379  
 Yamada, Masami (山田雅巳) 293, 374, 375, 376  
 Yamada, Takashi (山田 隆) 241  
 Yamagishi, Megumi (山岸 恵) 284, 285

Yamaguchi, Teruhide (山口照英) 212, 224, 303, 334, 335,  
 336, 338, 339, 361  
 Yamakoshi, Yoko (山越葉子) 255, 312, 359  
 Yamamoto, Michiko (山本美智子) 1, 264, 314, 324, 361  
 Yamamoto, Miyako (山本 都) 1, 314, 362  
 Yamamoto, Shigeki (山本茂貴) 241, 242, 248, 309, 310,  
 311, 323, 327, 349, 350,  
 351, 383, 384  
 Yamasaki, Manabu (山崎 学) 349, 350, 351  
 Yamazaki, Takeshi (山崎 壮) 239, 240, 249, 327, 347,  
 348, 354  
 Yang, Jun (楊 軍) 339, 340  
 Yasuda, Runa (安田留菜) 377  
 Yasuhara, Kazuo (安原加壽雄) 280, 281, 286, 287, 329,  
 372  
 Yomota, Chikako (四方田千佳子) 30, 48, 239, 323, 326,  
 327, 348, 349  
 Yoon, Byung-II (尹 兼一) 271, 324, 366, 367, 368  
 Yoshida, Hiromi (吉田ひろみ) 342, 343  
 Yoshii, Kimihiko (吉井公彦) 297, 298, 329, 380, 391  
 Yoshimatsu, Kayo (吉松嘉代) 12, 300, 380, 381  
 Yoshioka, Sumie (吉岡澄江) 209, 302, 323, 330, 331  
 Yoshitani, Takashi (吉谷隆志) 265, 330, 364  
 Yuan, Jin (袁 進) 331, 332

## 国立医薬品食品衛生研究所報告第121号キーワード索引 (アルファベット順)

## A

- a ring-modified analogues 254  
a twenty-eight-day repeated oral dose toxicity test 40  
a-chymotrypsin 261  
ABCB1 274  
ABCC2 274  
aberrant crypt foci 284  
absorbance 16  
accumulation of chromium and ferrum in organs 225  
acetal 254  
acetylacetone 16  
acetylation polymorphism 275  
Acetylcholine 211  
acid-stable carmine 240  
acrylamide 234, 306  
activin 212  
adenosine 299  
adenovirus vector 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 303, 320  
ADI 294  
adipate 298  
adverse reaction of medical drugs 1  
aerobic stress 242  
Affymetrix GeneChip 274  
agarwood 300  
Age 294  
Age group 294  
Age-related change 244  
aging 223  
agricultural irrigation 232  
Ah receptor 252  
air sampler 230  
airborne microorganisms 230  
AKAP350 269  
aldose reductase 295, 296  
alkaline digestion 235  
alkannin 261  
alkoxysilane 254  
alkylsulfonic acid phenyl ester 240  
allele-specific sequencing method 256  
Allelic variants 230, 231  
allergen 304, 308  
allergenicity 227, 303, 304  
allergic contact dermatitis 228, 304  
allergic substances 307, 308  
aloe 282  
alpha 254, 255  
alpha, alpha-disubstituted alpha-amino acid 253  
alpha-disubstituted alpha-amino acid 254, 254  
alpha-disubstituted amino acid 255  
alternative methods 316, 317  
aluminum lake 51  
amino acid alteration 256, 266  
amino acid side chain 273  
aminophenylnorharman 228  
aminophenylnorharman 214  
amiodarone 230, 274  
amyotrophic lateral sclerosis 269  
anaerobic and facultatively anaerobic bacteria 248  
analysis 305, 305  
ANCOVA 209  
Angelica Dahurica Root 299  
Angelica Radix 299  
*Anguilla japonica* 217  
animal experiment 267  
animal waste 227  
anion exchange cartridge 239  
annexin  $\beta$  213  
anomaly 316  
anti-cancer drug 277, 321  
anti-depressant 320  
Anti-factor IIa activity 217  
Anti-infective drugs 322  
anti-inflammatory effect 261  
anti-prion antibody 249  
antibacterial activity 255  
antibacterial agent 228, 310  
anticoccidial drug 236  
antiinflammatory effect 216  
antimicrobial activity 242  
antioxidant 251, 252, 253, 257, 283  
Antisense oligonucleotide 260  
antitumor steroid 246  
antitumor-promoting activity 214  
apolipoprotein B 262  
Apolipoprotein E 296  
apple syrup 240  
application 312  
*Aquilaria sinensis* 300  
*Arachis repens* 300  
Arf 269  
Arsenic 233  
arsenic species 231, 232  
*Artemisia capillaris* 299  
Artepillin C 253  
aryl hydrocarbon receptor 235, 272  
Asparagi tuber 300  
*Asparagus cochinchinensis* 300  
astrocyte 273, 313  
asymmetric synthesis 254  
ATP 259, 273, 313  
atrium 261  
authorization 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71  
automatic counter 244

automation 305  
avoidance of dichloromethane 298  
aza-substitution 224

**B**

*Bacopa monniera* 214  
bacteremia 295  
bacteria 250  
bacterial adhesion 250  
Bacterial invasion 260  
bacterial test 244  
bakuchiol 240  
Balb/c 3T3 A31-1-1 cells 226  
basic fibroblast growth factor 226  
benzene 272  
benzo[a]pyrene 252  
benzopyrene 224  
benzyl isothiocyanate 284  
beta-adrenergic receptor 224  
bezafibrate 262  
biliary metabolite 278  
binding affinity 264  
bio 322  
bioburden 305  
biocomparability 321  
biocompatibility 229  
biodegradable polymer 303  
biodegradation 245  
bioequivalence 209, 315  
biological characteristics 245  
biological/biotechnological products 321  
biologics 302, 321  
biomaterial 226  
biosensor 270  
biosynthesis 322  
Biotechnology Products 303  
bis(2-ethylhexyl) phthalate 309  
bisphenol A 250, 279  
Bisphenol A and sulfate 276  
bisphenol A glucuronide 278  
bithionol 231  
Biwayo 214  
bladder carcinogenesis 284  
blood brain barrier 34  
Bloom syndrome 289  
Bond Elut<sup>®</sup> SAX 297  
bottled food 298  
bovine 249  
bovine cerebral cortex homogenate 249  
bread 239  
bridging study 321  
bromate 239  
bromination 234  
BSTFA 263  
butylhydroxytoluene 285

BUUV assay 271  
Byssochlamysol 246

**C**

C-ion 289  
C-reactive protein 259  
C3H/He strain 271  
Ca<sup>2+</sup> 273, 274  
Ca<sup>2+</sup> signaling 257  
cacao liquor 285  
calponin 218  
CALUX assay 236  
*Campylobacter jejuni* 242  
*Canarium album* 300  
cancer 220  
canine mast cell 259  
cap-sealing 298  
capillarisin 299  
capillary gas chromatography 237  
carcinogenicity test 321  
carcinogenicity 287  
Cardiac muscle 211  
cardiomyocytes 223  
cardiomyopathy 223  
Cardiovascular system 316  
carminic acid 240  
catechin 251, 252, 295  
cause elucidation 304  
CD14 247  
CD31 225  
CD63 258  
CDC 309  
cell cycle 249  
cell density 249  
cell differentiation 230  
cell signaling 264  
cell therapy 225, 303, 321  
cell transformation 249  
cell transformation assay 295  
Cell-sorter 270  
cellular prion protein 249  
CFU 244  
chemical evaluation 299  
chemical safety 1  
chemicals 314  
chemicals in food 1  
chemoprevention 282, 317  
chemotaxis 259  
Chicken embryos 278  
Chinese olive 300  
chiral cyclic alpha 255  
chitosan 221  
Chlamydomonas 255  
chloranil 252  
chloride channel 268

- cholecalciferol 65  
chondrogenesis 303  
Chondroitin sulfate 217  
chromium concentration in urine 225  
chromium-iron alloy 225  
chromone derivative 300  
chromosomal aberrations 288  
chromosomal instability 289  
chromosome territories (CTs) 291  
chromosome territory 319  
Chronic renal failure 295  
chronic toxicity 284  
cigarette smoke 282  
cinnamaldehyde 286  
citrus fruit 298  
*Cladosporium cladosporioides* 246  
class 2 food allergy 304  
Class II beta-tubulin 286  
CLIC 269  
clinical pharmaco-kinetics 317  
clinical research coordinator 294  
clinical trial 320, 321  
clinical trial consultation 321  
clinical trials 294, 295  
Cnidii Rhizoma 299  
coccoid forms 242  
CODEX 307, 311  
Cofilin 260  
collaborative validation 288  
colon 284  
colon cancer 279  
colon carcinoma 268  
colonic mutated crypt 267  
colony formation activity 226  
color reference standard 78, 81  
Colostrum 243  
column switching 234  
combinatorial chemistry 253  
competitive ELISA 249  
complex pollutants 288  
Computer tomography 215  
Conformation analysis 231  
conformational search 254, 255  
conjugated fatty acids 280  
connexin 43 226  
contact sensitization 228  
control group 295  
cosmetics 317  
creeping peanut 300  
cross-reactivity 227, 303, 304  
Cry9C 258  
*C. sphaerospermum* 246  
cultivation 300, 322  
*Curcuma* spp. 322  
cyclophosphamide 289  
CYP1A1/2 276  
CYP1A2 282  
CYP2A6 275  
CYP2B6 231  
CYP2C8 230, 256  
CYP2D6 alleles 274  
CYP3A4 275  
CYP3A4 inhibition 215  
cytochrome 254  
cytochrome P-450 256  
Cytochrome P450 230  
cytoskeleton 269  
cytotoxicity 217, 229, 232, 288  
cytotoxicity test 229, 288
- D**
- daidzein 267  
daily intake 294, 305  
data protection 320  
data quality objectives 263  
database 264  
database system 314  
daycare centers 311  
decidual cell response 293  
defense-related protein 227  
Degradation 302  
degranulation 258  
DEHP 298  
delayer rectifier K<sup>+</sup> current 261  
deletion 291  
deletion mutation 290  
dendritic cells 220  
dental Au-Ag-Pd casting alloy 229  
derivative 263  
Dermatan sulfate 217  
Desethylamiodarone 230  
Design and Synthesis 253  
design of experiment 267  
detection 309  
detection method 238, 307, 308  
detection technique 238  
Dextran sulfate 268  
di(2-ethylhexyl) phthalate 241, 297  
di-n-butyl phthalate 212  
diabetic retinopathy 296  
dibutyl phthalate 293  
dibutyltin chloride 293  
dichlorofen 231  
dichlorvos 233  
diclazuril 236  
diethyleneglycol dibenzoate 240  
diisononyl phthalate 241, 309  
*dinB* 319  
DINP 315  
diol 254  
*Dioscorea bulbifera* L. 214

dioxin 252  
 dioxin distribution 236  
 dioxin-like PCB 235  
 dioxins 235, 236  
 diphenyltin 293  
 dipropylene glycol dibenzoate 240  
 disinfectant by-product 294  
 disinfection 244, 305  
 disposable glove 241  
 dissolution test 208, 209, 239, 315  
 DNA adducts 214  
 DNA analysis 286  
 DNA Chip 317  
 DNA methyltransferase 312  
 DNA microarray 257, 276  
 DNA polymerase epsilon 223  
 DNA polymerase IV 319  
 Dose-response 294  
 dose-response relationship 295  
 double strand breaks (DSBs) 289  
 double-strand break (DSB) 318  
 Downturn 294  
 drag resistance 310  
 dropping microorganisms 230  
 drug 264  
 drug component 239  
 drug delivery 34  
 Drug Delivery System 303  
 drug evaluation 320  
 Drug Information 314  
 drug interaction 317  
 drug metabolism 256  
 drug responsiveness 277  
 duct 268  
 duplicate diet sample 298  
 Dwelling environment 245

**E**

*E. coli* K-12 250  
*E. coli* O157 247  
*E. coli* O157:H7 242  
 E<sub>TA</sub> endothelin receptor 261  
 E5 guideline 321  
 E11 guideline 321  
 economic loss 242  
 effect on human 316  
 eggs 310  
 electrochemical detection 216, 264  
 Electron-beam irradiation 248  
 ELSI (ethical, legal and social issues) 319, 320  
 Embryonic expression 286  
 Embryotoxicity 277  
 end-joining (EJ) 318  
 endocrine disruptor 264, 267, 270, 283, 285, 316  
 endothelial cell 225

endotoxin 227  
 enhanced OECD guideline 283, 285  
 enhancement of chondral differentiation 226  
 enterohepatic circulation 278  
 enterotoxin 309  
 ENU 287  
 environ-mental water 288  
 enzyme activities 265  
 epidemiology 319  
 epithelialization 270  
 ergocalciferol 71  
*Eriobotrya japonica* 214  
 erroneous incorporation 290  
 Erythrocyte 296  
 erythropoietin 210, 211  
 Escherichia coli O26 248  
 essential oil 322  
 estrogen 278, 292  
 estrogen receptor 270, 278  
 Estrogenicity 276  
 estrogens 274  
 estrone 62  
 ethoxyquin 233  
 ethylene glycol 315  
 evolutionary considerations 291  
 excretion 279  
 explanation of toxicology 321  
 exposure 241

**F**

F344 rat 284  
 fabric product 228  
 FDA 309  
 fecal steroid excretion 297  
 female rat 279  
 fenbendazole 280  
 ferrous sulfate 226  
 fertilizer 12  
 ferulic acid 299  
 fetal window 316  
 fiber 219  
 fish 235, 236, 306  
 flagella antigen 244  
 flavianic acid 78  
 flavonoid glycoside 214  
 flavonol glycoside 214  
 Flow cytometry 267  
 fluorescent determination 295  
 fluoropyrimidines 275  
 Fluorovitamin D 231  
 follandin 212  
 food 298, 306  
 food additive 294, 305, 306  
 food allergy 307, 308  
 food borne outbreak investigation 310

- food color 51, 268  
 food contaminant 309  
 food flavoring 305, 306  
 Food Green No.3 213  
 food microorganisms 1  
 food poisoning 309, 310  
 food samples 232  
 food simulant 297  
 Food Standards Agency 305  
 food tar colors 297  
 food terrorism 311  
 food-borne diseases 309  
 foods 235  
 forage 310  
 forestomach carcinogenesis 283  
 forestomach tumor 281  
 formaldehyde 16, 294  
 Forward Genetics 316  
 frame-shift 256  
 freeze-drying 208  
 fullerene 255  
 FUMI theory 236, 264  
 function 256  
 fungal growth 245  
 Fungal identification 245  
 fungal inactivation 244  
 fungal load 246  
 fungi 245  
 furanocoumarin 215
- G**
- G-CSF 224, 303  
 gallic acid 297  
 gamma ray irradiation 248  
 gamma-ray sterilization 305  
 gap junctional intercellular communication 225, 226, 229, 305  
 gardenia blue 240  
 GC/MS 234, 263, 298, 299  
 Gene expression profiling 286  
 gene regulation 221  
 gene therapy 218, 219, 220, 221, 222, 302, 303, 320  
 generic drugs 322  
 genetic polymorphism 265, 274  
 genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and drug transporters 277  
 genetically modified 238  
 genetically modified foods 307, 308  
 genetically modified maize 237, 238  
 genetically modified potato 238  
 genetically modified soybean 213, 237, 238, 239  
 genetically modified soybean 213  
 genetics 310  
 genistein 285  
 genistin 267
- genome cohort study 319  
 genome rearrangements 292  
 genomic instability 318  
 genotoxic carcinogens 281  
 genotoxic stress 268  
 genotoxicity 318  
 gentamicin 307  
 germ-free mice 243  
 Global Assessment 316  
 glucocorticoid receptor 256  
 Glutathione-S-transferase class Omega 233  
 glycerol 281  
 glycyrrhizin 216  
 glycopeptide mapping 211  
 glycoprotein 211  
 glycosylation 312  
 glycyrrhizin 261  
 glycyrrhizinic acid 54  
 glyphosate 239  
 GM corns 258  
 GMP 322  
 gold sodium thiosulfate 228  
 Golgi apparatus 269  
 gonadal toxicities 287  
*gpt* delta 290  
*gpt* delta rat 290  
*gpt* delta transgenic mice 291  
 granulation tissue 261  
 grape seed extract 297  
 grape seed polyphenol 297  
 grapefruit juice 215  
 Graves' disease 218  
 green hairy roots 300  
 green tea catechins 280  
 ground cover 300  
 Groundwater arsenic contamination 232  
 growth hormone 302  
 guideline 302, 317
- H**
- HACCP 311  
 haematopoietic cell 269  
 harvest time 299  
 headspace gas chromatography 240  
 health and ecological risk 262  
 health information 320  
 heart 261  
 heart failure 224  
 heavy metal 255  
 heavy-ion exposure 291  
 heavy-ion radiation 291  
 helical screw sense 255  
 hematopoiesis 289  
 hematotoxicity 272  
 heme axial ligand 254

Heparin 296  
 hepatic lesions 283  
 hepatocarcinogenesis 280  
 hepatocellular tumor 281  
 hepatocyte growth factor 223  
 hepatotoxicity 40  
 Hereditary vitamin D-resistant rickets 254  
 heterocyclic amine 317  
 HGF 210  
 HGF synthesis 212  
 high performance liquid chromatography 295  
 high-affinity receptor for IgE 258  
 High-resolution ICP-MS 239  
 hippocampal slice culture 274  
 hippocampus 259, 273  
 histamine release 257  
 Histone deacetylase 223  
 HIV 242  
 hokosshi extract 240  
 homologous recombination (HR) 318  
 hospital food 299  
 household hygiene 244  
 household product 304  
 HPLC 16, 48, 236, 237, 264, 297, 298  
 HPLC-ICP/MS 231  
 HPRT mutation 289  
 HTHQ 279, 281  
 human IgE 258  
 human osteoblast 305  
 human S9 224  
 human sIgA 250  
 human subject 319  
 hyaluronate 30  
 hyaluronic acid 226  
 hydrocarbon detection method 237  
 hydrodynamic flow 208  
 hygiene 311  
 hypercholesterolemic 297  
 hypertrophic cardiomyopathy 223

## I

ICH 316, 320, 321, 322  
 ICH guideline 295  
 ICP-MS 239  
 identification 305  
 IgE 228  
 IL-6 313  
 IL-8 244  
 immune functions mouse 267  
 immune system 258  
 immunoblotting 249  
 immunohistochemistry 268  
 implantation failure 293  
 implementation working group 321  
 impurity profile 322

inactivation 227  
 incomplete food allergen 303  
 indirubin 263  
 indoor air 245  
 Indoor environment 246  
 industrial chemicals 288  
 infant 320  
 infant susceptibility 266  
 information system 1  
 inhibin  $\beta$  chain 212  
 insulin 218  
 intake 298  
 integrated risk assessment 262  
 integration 262, 263  
 Inter-laboratory validation 237  
 inter-racial difference 265  
 internal transcribed spacer region 215  
 international organizations 311  
 international trend 317  
 Internet 314  
 interphase cell nucleus 319  
 intestinal carcinogenesis 280  
 Intestinal flora 310  
 intraepithelial lymphocytes (IEL) 243, 244  
 Intron 276  
*in vivo* assay 285  
 IR 81  
 Irinotecan 233  
 iron lactate 287  
 iron-chromium alloy 228  
 irradiated food detection 237  
 irradiated foods 307  
 Irradiation simulation 215  
 ischemia 261  
 isoflavone 213  
 isoform 302  
 isolation 248  
 ITS1 region 245

## J

JAK/STAT 217  
 Japanese 257  
 Japanese Pharmaceutical Affairs Law 25  
 Japanese Pharmacopeia 315  
 Japanese Pharmacopoeia 309  
 josamycin 284  
 JP reference standard 65, 68, 71

## K

Kinetic analysis 233  
 knee brace pad 228  
 kooroo color 268

## L

L-type calcium channel motoneuron 269  
 labeling 307, 308  
 lactational exposure 251  
 lactic acid bacteria 310  
*Lactococcus lactis* 242  
 latex allergy 227  
 laver 48  
 LC/APCI-MS 216  
 LC/MS 210, 211, 234, 239, 298  
 LEC rat 283  
 legislative regulation 304  
 leptin 217  
 limit of detection 264  
 linear-non-linear dose response relationship 316  
 Linkage disequilibrium 276  
 lipid A 246, 247, 311  
 lipopolysaccharide 247  
 Lipoprotein lipase 296  
*Listeria monocytogenes* 243, 309  
*Listeria* 247  
*Listeria* infection 251  
 liver 281  
 LOH 289  
 lipid 297  
 losartan 265  
 lotion 25  
 low dose 316  
 lung cancer 286  
 lung tumors 281  
 lyophilization 209  
 lyophilized formulation 209  
 lysozyme 76  
 Lysozyme Reference Standard 76

## M

macrophage 260, 301  
 magic mushroom 215  
 male reproductive system 293  
*Mallotus philippensis* 301  
 mammary carcinogenesis 317  
 mammary tumors 280, 287  
 mandatory labeling system 213  
 marine pollution 289  
 marker compound 300  
 Market basket method 294  
 mass spectrometric detection 237  
 mast cells 257  
 maximization test 227  
 maximum contrast method 295  
 MD-2 246, 311, 312  
 MDM2 268  
 medical information 320  
 medical records 319  
 medical writing 321

medicinal plants 322  
 medium 248  
 Mega Bond Elut SAX 298  
 MeIQx 280, 282  
 membrane filter 239  
 mercury 306  
 Mesp2 270  
 metabolic activation 256  
 metabolic cooperation assay 225  
 metabolism 297  
 metal allergy 228  
 Metals 232  
 Methacarn 286  
 Methionine 277  
 method 322  
 method-performance study 233  
 methoxychlor 280, 287  
 methylating capacity 232  
 methylpyrrolidone 315  
 mice 286  
*Michelia alba* 300  
 microbiological limit test 309  
 microbiological risk analysis 311  
 microbiological risk assessment 309, 310, 311  
 microbiological tests 309  
 microbore column 211  
 microchip electrophoresis 216  
 Microdissection 286  
 microglia 313  
 micronucleus assay 288, 289  
 microorganisms 243, 244, 311  
 microsomal epoxide hydrolase 257  
 midbrain cells 230  
 migration 297, 298  
 mitomycin C 290  
 Mobility 209  
 microglia 313  
 molecular biology 310  
 molecular mobility 209, 302  
 molecular orbital calculation 254  
 molecular-targeting drug 321  
 monkeys 279  
 monnieraside I 214  
 monobutyl phthalate 293  
 Monoclonal antibody 286  
 morphogenesis and hormonal receptor 316  
 mouse colon epithelial cells 288  
 multi-angle laser light scattering 30  
 multi-layer silica gel column chromatography 235  
 multifunctional column 237  
 multipurpose solution 225  
 multivalent cation block 274  
 mutagenicity 322  
 mutagenic heterocyclic amine 214  
 mutagenicity test 303  
 mutation 223

mutation study 242

## N

N-ethyl-N-nitrosourea 281  
N-glycan 262  
N-linked oligosaccharides 211  
N-methylcarbamate pesticide 298  
NaCl 243  
nano technology 312  
naphthoflavone 276  
national hospitals 294  
natural biomaterials 227  
natural food additive 240, 306  
natural sweetener 240  
NDA 320  
neomycin 307  
neuroimmunity 258  
neuron-to-astrocyte communication 273  
neuronal survival 274  
Neuropeptide Y 261  
Neuton-to-glia communication 273  
neutrophils 250  
new drug 312  
new drug application 321  
new method 305  
newborn toxicity 266  
Newleaf Y potato 238  
NFkappaB 250  
nicarbazin 236  
NIHS Reference Standard 54, 57, 59, 62, 74, 76  
nitric oxide 216, 301  
nitrile-butadiene rubber 241  
nitrile-butadiene rubber gloves 241  
nitrogen compounds 245  
NMR 209  
NMR relaxation time 209  
nomenclature 312  
non-clinical study 321  
non-clinical test 320  
Non-genotoxic hepatocarcinogenesis 286  
non-specific defense 250  
non-viral vector 217  
Nonsynonymous single nucleotide polymorphism 275  
Nonylphenol 278  
normal human osteoblasts 229  
notified detection method 308  
Novel CYP2D6 SNP 276  
novel reference molecules 238  
novel SNP 256, 266  
NP95 249  
NR112 (PXR/SXR) 266  
NS0 cell 210  
nuclear architecture 319  
nuclear localization signal 221  
Nuclear magnetic resonance 296

## O

OECD 317  
official analytical method 304  
official inspection 51  
OH radical 232  
Oleic acid 245  
oligopeptide 254, 255  
oltipraz 283  
omeprazole 276  
opium alkaloid 12  
Opium inhalation 216  
orange book 209  
organic anion transporter 274  
organotin compound 262  
osteoblasts 305  
outbreak 242  
Ovalbumin 217  
oxidative stress 271  
oxidized DNA 290

## P

P2X receptor 273  
P2X<sub>2</sub> receptor 274  
P2X<sub>3</sub> 259  
p51B (TAp63alpha) 268  
p53 289, 318  
p53 deficient CBA mice 280  
p53-deficient hemopoietic stem cells 270, 271  
p53-deficient mice 287  
p53 knockout 291  
p70 S6 kinase 224, 303  
p-hydroxybenzoic acid esters (PHBA-Es) 48  
paeoniflorin 59  
Pain 259  
pancreatic carcinogenesis 282  
*Papaver somniferum* L. opium yield 12  
papc 270  
paraben 25  
parliamentary control 319  
parliamentary discussion 320  
PCDD 235  
PCI sampler 245  
PCR 238  
PDDF 235  
peanuts 237  
pediatrics 321  
Penicillium 245  
peroxisome proliferator 212  
pesticide 234  
phage 221  
Pharmaceutical 302  
Pharmacogenetics 277  
Pharmacogenomics 277

pharmacokinetics 265  
 Phenol sulfotransferase 276  
 phenoxyethanol 25  
 phenylethanoid glycoside 214  
 PhIP 285  
 phosphatidylcholine 262  
 phosphatidylinositol 3-kinase 224, 303  
 phospholamban promoter 223  
 photosensitivity 255  
 photostability 297  
 photosynthetic activity 300  
 phthalate 241, 298  
 Phthalate Esters 315  
 physicochemical properties 246  
 phytoestrogen 267  
 PI3 kinase 260  
 pituitary 292  
 planar C5 conformation 253  
 plastic eyeglass frame 304  
 plasticizer 241, 298  
 plastid 300  
 poly(L-lactide) 305  
 polyethylene 305  
 polymer microspheres 229  
 Polymorphism 233  
 polyphosphate 255  
 polypropylene 305  
 polyvinyl chloride 241, 297, 298  
 poor metabolizer 265  
 post column reaction 239  
 post-sequencing era 319  
 post-sequencing genome research 320  
 potassium bromate 318  
 potency 74  
 PPAR $\gamma$  212  
 PPARgamma 220  
 precision 264  
 preimplantation embryonic loss 293  
 preparation 299  
 preservative 25  
 prion protein 249  
 proanthocyanidins 297  
 process control 322  
 production 51  
 progesterone 293  
 prohibited ingredients in cosmetics 231  
 prooxidant 252  
 propolis 253  
 Prostaglandin 211  
 protection 259  
 protein 297  
 protein formulation 208  
 protein phosphatase 224  
 proteome analysis 213  
 PrP 249  
 pseudojubilogenin 214

psilocin 215  
 Psoralea corylifolia 287  
 public health 309, 310

## Q

Q3B(R) 322  
 QSAR 264  
 quality 303, 312, 321  
 quality evaluation 54, 57, 59, 62, 65, 68, 71  
 quantification 249  
 quantitation 238  
 quinone 252

## R

Radiation induced myelogenous leukemia 270, 271  
 radical 251, 252  
 rasH2 mice 280, 281, 285  
 rat 40, 279, 280, 284, 287, 297  
 Reactive oxygen species 318  
 real-time PCR 237, 238  
 Receptor binding 278  
 receptor structure 264  
 recombinant 310  
 recombinant DNA 238  
 recombinant prion protein 249  
 reevaluation of drug quality 209  
 regional variation 243, 244  
 regulation 16, 218  
 regulatory guidance 321  
 regulatory science 320, 322  
*rel* 243  
 renal failure 265  
 resitricition-modification 292  
 restriction endonuclease 312  
 resveratrol 229, 304  
 retinoid 276  
 retinoid synergist 276  
 Reverse Genetics 316  
 Rho 269  
 risk assessment 262, 263, 294, 303, 305, 309, 310, 314, 320  
 risk management 305, 311  
 routine control 305  
 rubusoside 240  
*Rubus suavissimus* S. LEE 240

## S

S-421 40  
 safety 306  
 safety assessment 317  
 safety information 1, 314  
 salicylic acid tablet 208  
*Salmonella* 244, 247  
*Salmonella* Enteritidis 247, 310

- SAM 312  
sanitization 305  
SAP18 223  
saponin 214  
sarcoplasmic reticulum 223  
scFv 34  
secretion 262  
segmentation 270  
Selenium 277  
selfish mobile genetic element 292  
Sep-Pak® Plus Alumina N 297  
sequence homology 245  
Sequencing 274  
Serial bone marrow transplant 271  
Serum protein binding 294  
sesquiterpene lactone 300  
shelf-life 209  
Shell egg 247  
Shichimotus-koka-to 260  
shikimate-3-phosphate 239  
shikonin 261  
sialyloligosaccharides 250  
sialyoligosaccharide-conjugated peptide 250  
silylation 263  
single molecular manipulation 312  
single nucleotide polymorphism 256, 257  
sister chromatid exchanges 228, 304  
site-directed mutagenesis 273, 274  
size-exclusion chromatography 30  
skin 256  
skin damage 304  
small hepatocytes 213  
SNP 264  
Sodium *o*-phenylphenate 286  
sodium nitrite 283  
Soils 232  
Solar irradiation 244  
Solvent Orange 60 304  
somitogenesis 270  
soya saponin 213  
spectinomycin 307  
Sphingomyelin 296  
Splenoocyte 217  
stability 209, 302  
stabilization 208  
standard 242  
standard addition method 240  
standard compounds 234  
*Staphylococcus aureus* 309  
steam distillation 322  
stem cell 269  
stem cell differentiation 270, 271  
sterility assurance 305  
sterilization 305  
Sterilization method 215  
STM 312  
Storage condition 247  
stress compounds 299  
stretched film 297  
stroke 260  
Stroke-prone spontaneously hypertensive rat 260  
structural determination 213  
structure 302  
styrenated phenol 241  
subsidiary color 213  
substance P 258  
sugar-mapping 210  
sulfation polymorphism 275  
sulfonyleurea herbicide 297  
sulfuric acid treatment 235  
Supelclean ENVI-Carb 298  
superoxide 252  
Suppression PCR subtractive hybridization 286  
supramolecule 312  
surface modification 230  
Surface plasmon resonance 278  
surveillance 295, 309  
survey 298, 307  
sympathetic neurotransmission 261  
synergist of pyrethroid 40  
synergy and/or additive relationship 316  
system suitability test 236
- T**
- T7 RNA polymerase 219  
T98G cell 249  
tannase 297  
tannic acid 297  
tar color 51  
targeting 222  
TAT peptide 34  
taurin 250  
taxonomy 246  
TCDD 251  
TDI 315  
temperature and RH 246  
terpenoid 322  
test method 309  
testis 212, 270  
Testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation 275  
tetrahydrofuran 315  
thiamine hydrochloride 57  
thin layer chromatography 78, 81  
thioredoxin 271  
thiourea-type accelerator 228  
threshold 281, 316  
thrombin 74  
thrombomodulin 211  
Thymidine phosphorylase 275  
Thymus 267  
thyroid toxicity 278

tissue reaction 228  
 Titanium dioxide 232  
 TNF- $\alpha$  313  
 TNF $\alpha$  220  
 tocopherol acetate 68  
 Tofu 213  
 Toll-like receptor 4 246, 247, 311, 312  
 topical application 261  
 topically applied 216  
 toxicity 270, 306  
 toxicity study 316  
 toxicokinetics 279  
 toxicological test 322  
 toxin 250  
 toy 241  
 TPA 212  
 transcriptional regulatory elements 222  
 transfection efficiency 217  
 Transferrin 239  
 transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 292  
 transgenic assays 318  
 transgenic mice 271  
 transgenic mice *gpt* delta 291  
 Transitional milk 243  
 translational research 302  
 trichlorfon 233  
*Trichophyton verrucosum* 245  
 tricresyl phosphate 241  
 triglycerides 297  
 tripartitesynapse 313  
*Trypanosoma cruzi* 300  
 TSE agent 227  
 tube 297  
 tubewell water 231  
 tumor promoters 249  
 tumorigenesis 226, 285

## U

UDP-glucuronosyltransferase 1A1 233  
 UDP-glucuronosyltransferase 1A10 233  
 UGT1A10 256  
 UJNR 309  
 UK Biobank 320  
 ulcerative colitis 267, 268  
 unauthorized GM crops 238  
 undergroundwater 232  
 urease test 245  
 Urinary bladder carcinogenicity 286  
 Urinary excretion of opiates 216  
 urine 231  
 urothelial cancer 275  
 US FDA 311  
 USDA 309  
 useful plants 322  
 USP calibrator 208

uterine carcinogenesis 280  
 uterine tumor 281  
 uterus 287  
 UVA and UV 244

## V

vaccine 242, 310, 322  
 validation 237  
 validation study 294, 305  
 Valproic acid 294  
 Vanadium 239  
 vanillin-hydrochloric acid assay 297  
 vegetables 236  
*Vibrio parahaemolyticus* 311  
 vitamin D receptor (VDR) 254  
 Vitamin D receptor. 231  
 vitamin E 251  
 VLDL 262  
 VSD 286

## W

water 209  
 wear debris 305  
*Wedelia trilobata* 300  
 Werner syndrome 289  
 West Bengal 231  
 whale 306  
 WHO 311  
 WHO/IPCS 316  
 wound dressings 227

## X

X-ray exposure 289  
 Xenopus oocyte 273

## Y

Y-family DNA polymerase 290, 318, 319  
 yield component 12

## Z

Zea mays 238  
 Zingiberaceae 322

1,4-dione-2,5-bis(1,1-dimethylpropyl)cyclohexadiene 241  
 17 $\alpha$ -methyltestosterone 283  
 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-19-norvitamin D3 Analogues 253  
 2,4,6-tris(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol 241  
 2-Mercapto-methylbenzimidazole 278  
 2-Mercaptobenzimidazole 278  
 2-nitro-p-cresol 279

- 3-aminophenol 266  
3-deoxyglucosone 295  
3-methylphenol 266  
3<sub>10</sub>-helix 255  
3<sub>10</sub>-helical structure 253  
3D-FISH (three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization) 291  
4-hydroxy group 304  
4-hydroxy group of stilbene 229  
5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 239  
6,7-dimethyl-esculetin 299  
6-thioguanine selection 290  
7-Ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin O-deethylation 231  
8-hydroxydeoxy-guanosine 318  
90-day toxicity study 268  
αB-Crystallin 261  
γ-ray irradiation 305  
アロディニア 313  
インターネット 264  
カキ 312  
カリブレータ 315  
スクリーニング試験 316  
バニロイド受容体 259  
フタル酸エステルの毒性評価 315  
ミクログリア 313  
リスク 313  
リスクアナリシス 314  
レギュラトリ・サイエンス 313  
炎症 313  
欧州食品安全庁 263  
化学物質のリスクアセスメント 315  
化学物質安全関連規制 313  
癌原物質 277  
危機管理分子 313  
狂牛病 (BSE) 314  
個別化薬物療法 277  
広域食中毒 312  
抗癌剤 277  
国際化学物質安全性計画 (IPCS) 264  
残留溶媒の基準値 315  
消費者製品 263  
詳細試験 316  
情報検索 264  
食の安全管理 314  
食品のリスクアナリシス 263  
食品安全委員会 314  
食糧輸入 314  
神経因性疼痛 313  
神経機能 313  
製造物責任法 263  
赤痢 312  
適格性評価 315  
電気生理 259  
統合的リスク評価 263  
透明性 263  
透明性と批判的検討 314  
内分泌かく乱化学物質 316  
発がんリスク 277  
皮膚 259  
表示 263, 314  
品質保証 314  
不確実性分析 263  
米国食品医薬品庁 263  
慢性疼痛 313  
薬物代謝酵素遺伝子多型 277  
薬物代謝多型 277  
溶出試験 315  
利害関係者 314

# 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

1. 文体、用語：常用漢字を用い、現代かなづかい、新おくりがなの、口語文とし、簡潔で理解しやすい表現にする。全文を英語で書いてもよい。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。
2. 物質名、化学名：文中では物質はその名称を漢字、カタカナあるいは英語（アルファベット）で記し、化学式は用いない。例えば塩酸と書き、HClとしない。英語で書く場合、文中では原則として小文字で始める。
3. 単位、記号、略号、略記：単位は原則として国際単位系（SI）を用いる。  
[参考：国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き（単位、記号、略号）]  
数字と単位記号の間は、必ず半角1文字あける。  
また、物質名あるいは分析法などを略記するときは、和文、英文とも最初は正式な名称とともに示す。例えば、イソニコチン酸（INA）、示差熱分析法ーガスクロマトグラフィー（DTA-GC）と書き、（以下INAと略す）などとしなす。
4. 句読点：，．を用い、，．としない。
5. 数字：算用数字（アラビア数字）を用いる。千の単位にコンマを付ける。また、必要に応じてローマ数字を用いることができ、慣用語などについては和数字を用いる。  
（例：一般、二酸化イオウ）
6. 繰り返し符号：「々」、「ゝ」、「ゞ」は、原則として用いない。ただし、慣用語は用いても差し支えない。（例：徐々、各々）
7. 字体の指定：文字の下に赤で次のように記す。  
ゴシック体 ~~~~~ 例：見出しなど 試薬  
イタリック体 ————— 例：学名など Papaver somniferum L.  
スモールキャピタル = = = = = 例：L-ascorbic acid
8. 特論、総説、研究論文、ノート、資料、ステートメントの記載要領：
  - 8.1 記載順序：8.2～8.8の順に書く。
  - 8.2 題名、著者名：次の例に従い、表紙（用紙1枚全部）をこれに当てる。なお、所外の共著者の所属は著者名の右に\*印（複数のときは\*1、\*2…）を記して脚注とする。

例：医薬品の確認試験法に関する研究（第2報）

鎮痛剤のクロマトグラフィー  
用賀衛<sup>#</sup>・世田一郎<sup>\*1</sup>・東京子<sup>\*2</sup>  
Studies on the Identification of Drugs II  
Chromatographic Methods for the Analgesics  
Mamoru Yoga<sup>#</sup>, Ichiro Seta<sup>\*1</sup> and Kyoko Azuma<sup>\*2</sup>

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<sup>a)</sup>, <sup>b)</sup>, ...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。表の中に構造型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. 誌上発表などの記載要領：誌上発表，単行本，行政報告，学会発表については，別に定める記載要領及び例示に従う。

## 校 正

初校は著者が行う。人名，化学名，数値，文献などは特に綿密に校正する。内容の追加，行数の増加は認めない。

平成15年5月1日

国立医薬品食品衛生研究所図書委員会



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 しめず 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 じょじょに しらべる	しかし し難い 刺激 したがう 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 共せん 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 伴う
セ	せん せんじょう	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	にかわじょう 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 絶えず 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	ひとしい 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 ほぼ	ほか ほど ほとんど ほぼ	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 又は まだ 全く まで まま	益々  混る 又, 亦, 復  未だ  迄 俛
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 六ヶ敷しい 結 <sup>す</sup> ぶ
メ	めずらしい	珍しい	珍しい
モ	もうしこみ  もえる もし もしくは もちいる もちろん もって 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 柔らかい	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 ように ようす ようだ(に) ようやく ようゆう よほど よる より	よい 容易に 様子 ようだ(に) ようやく 一融解 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 わける わずかに わたって	わかる 分ける わずかに わたって	分る, 判る, 解る 分る 僅かに 互って

## 国立医薬品食品衛生研究所報告記載の手引き(単位, 記号, 略号)

### 1. SI基本単位の名称と記号

量	単位の名称	単位記号	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	$10^{-1}$	デシ (deci)	d
$10^2$	ヘクト (hecto)	h	$10^{-2}$	センチ (centi)	c
$10^3$	キロ (kilo)	k	$10^{-3}$	ミリ (milli)	m
$10^6$	メガ (mega)	M	$10^{-6}$	マイクロ (micro)	$\mu$
$10^9$	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 $10^3$ 倍はkm、 $10^2$ 倍はcm、 $10^3$ 倍はmm、 $10^{-6}$ 倍は $\mu$ m、 $10^{-9}$ 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 $\mu$ kg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	$\Omega$
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	ジュール	J	磁束密度	テスラ	T
仕事、熱量			インダクタンス	ヘンリー	H
仕事率、電力	ワット	W	セルシウス温度	セルシウス度	$^{\circ}\text{C}$
電荷	クーロン	C	平面角	ラジアン	rad
電位	ボルト	V	立体角	ステラジアン	sr
静電容量	ファラド	F	光束	ルーメン	lm
照度	ルクス	lx	放射能	ベクレル	Bq
吸収線量	グレイ	Gy	線量当量	シーベルト	Sv

### 4. SIと併用されるSI以外の単位の例

量	単位の名称	単位の記号	量	単位の名称	単位の記号
時間	分	min	質量	トン	t
	時	h	圧力	バール	bar
	日	d	エネルギー	電子ボルト	eV
体積	リットル	l, L	平面角	度	$^{\circ}$

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	$Pa \cdot s$	動粘度	$m^2/s$
質量百分率	%	質量百万分率	ppm	質量十億分率	ppb
体積百分率	vol%	湿度百分率	%	回転速度	r/s
エンドトキシン単位	EU				

## 6. よく用いられる記号, 略号

融点	mp	ミハエリス定数	$K_m$	標準偏差値	S.D.
分解点	mp(dec.)	Rf値	$R_f$	標準誤差	S.E.
沸点	bp	保持時間	$t_r$	紫外吸収	UV
凝固点	fp	50%致死量	$LD_{50}$	赤外吸収	IR
比重	$d$	50%有効量	$ED_{50}$	核磁気共鳴	NMR
屈折率	$n$	経口投与	p.o.	電子スピン共鳴	ESR
施光度	$\alpha$	静脈投与	i.v.	施光分散	ORD
吸光度	$A$	腹腔投与	i.p.	円偏光二色性	CD
水素イオン指数	pH	皮下投与	s.c.	マススペクトル	MS
pK値	pK	筋肉投与	i.m.		

## 平成15年度図書委員

早川 堯 夫 森川 馨 \*奥田 晴 宏 阿曾 幸 男  
\*川崎 ナ ナ \*江崎 勝 司 佐藤 陽 治 五十嵐 良 明  
\*西村 哲 治 宮原 誠 山崎 壯 \*鈴木 穂 高  
\*宮原 美知子 \*福原 潔 斎藤 嘉 朗 佐井 君 江  
\*中野 達 也 \*浦野 勉 \*関田 清 司 \*小泉 修 一  
今井 俊 夫 山田 雅 巳 \*鎌田 栄 一 松元 典 男  
\*天野 博 夫 飯田 修 \*大橋 正 広

(\*印は編集委員)

国立医薬品食品衛生研究所報告 第121号

平成15年10月31日 印刷

平成15年10月31日 発行

発行所 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部  
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, 2003 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。