



ISSN 0077-4715  
CODEN: ESKHA 5

# 衛生試験所報告

第 104 号

昭和 61 年

---

**BULLETIN**  
**OF**  
**NATIONAL INSTITUTE OF**  
**HYGIENIC SCIENCES**

No.104 1986

---

国立衛生試験所

衛生試験所  
Eisei Shikenjo Hokoku

# 衛生試験所報告

第 104 号

昭和 61 年

---

**BULLETIN**  
**OF**  
**NATIONAL INSTITUTE OF**  
**HYGIENIC SCIENCES**

No. 104 1986

Published by  
National Institute of Hygienic Sciences  
Tokyo, Japan

---

国立衛生試験所

## 目 次

巻頭言	
衛生試験所報告・日本薬局方発刊百年を迎えて	鈴木郁生…………… i
総 説	
抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成と作用発現機構に関する化学的研究	神谷庄造…………… 1
報 文	
フェノチアジン誘導体における置換基と逆相系充填剤に対する親和性の関係	松田りえ子・内山 充……………21
固形製剤の分析自動化の試み・ラボラトリーロボットを用いた自動分析の精度について	……………香取典子・松田りえ子・武田 寧・内山 充……………25
セファレキシム製剤の安定性	……………香取典子・吉岡澄江・内山 充……………30
マルチ CPU システムで制御された簡易型化学発光測定装置の試作	……………岩田恵助・林 譲……………35
酵素製剤の品質に関する研究 (第7報)ーセラペプターゼ製剤	……………谷本 剛・福田秀男・山羽 力……………38
家庭用品に使用されている化学物質の急性毒性試験 (その3)	……………会田喜崇・池田康和・鎌田栄一・内藤克司・鈴木康雄・戸部満寿夫……………45
F344 ラットによる Naphthol-AS の急性毒性および亜急性毒性試験について	……………高田幸一・内藤克司・内田雄幸・安原加寿雄・大場 栄・佐藤千百合・ 下温湯シヅ・スキルノ・中路幸男・小林和雄・戸部満寿夫……………51
Sorbitan monostearate の妊娠全期間投与におけるラットの胎仔および出産仔に及ぼす影響	……………高田幸一・門馬純子・堀内茂友・鈴木康雄・戸部満寿夫……………58
メチルヘスペリジンの妊娠期投与によるラット胎仔の発生に及ぼす影響	……………川島邦夫・中浦慎介・宇佐見 誠・山口 恵・田中 悟・高仲 正・大森義仁……………64
クロルデンのラット胎仔発生に及ぼす影響	……………宇佐見 誠・川島邦夫・中浦慎介・山口 恵・田中 悟・高仲 正・大森義仁……………68
脳長の測定によるラット胎仔小頭症の検出	……………宇佐見 誠・川島邦夫・中浦慎介・山口 恵・田中 悟・高仲 正・大森義仁……………73
ハムスター臍における島内・島外の内分泌細胞の免疫組織化学的特性とその分布	……………古川文夫・豊田和弘・長谷川良平・佐藤秀隆・張 子俊・内藤善哉・高橋道人・林 裕造……………77
毒性試験の眼球標本作製における Davidson 固定法の有用性ーラット galactose 白内障をモデルとしてー	……………豊田和弘・古川文夫・長谷川良平・佐藤秀隆・張 子俊・高橋道人・林 裕造……………82
アドリアマイシン毒性の発現とその進展に関する病理学的研究ー腎病変の進展と尿細管酵素活性の変動ー	……………佐藤秀隆・豊田和弘・長谷川良平・古川文夫・張 子俊・高橋道人・林 裕造……………87
患者由来 <i>Salmonella</i> の産生する制限酵素	……………松井道子・三瀬勝利・吉田洋子・石館 基……………92
ディーゼル・エンジン排出物の細胞遺伝学的影響について	……………祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基……………97
GITC 試薬を用いたピンドロールおよびプロプラノールの光学異性体の分割定量法	……………榎谷真美・長谷川隆一・小室徹雄・加納晴三郎・伊阪 博…………… 103
ノ ー ト	
Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate 公定分析法において誤認されやすい二物質について	……………中村晃忠・小嶋茂雄・鹿庭正昭…………… 109
マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第15報) 輸入穀類, 乳幼児食品および加工食品 (菓子類)	
中の Nivalenol と Deoxynivalenol の分析	……………五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生…………… 113
ラットの組織酵素の分布	……………中路幸男・斎藤 実・鈴木幸子・戸部満寿夫…………… 119
ウコン ( <i>Curcuma longa</i> L.) の栽培に関する研究 (第1報) 根茎収量とクルクミン類含量との 品種間差異	……………葵 一八・錦木紘一・関寅一郎・戸畑トモ子・佐竹元吉・黒柳正典…………… 124

## 資料

国立衛生試験所リン酸ヒスタミン標準品 (Control 841).....	木村俊夫・太田美矢子・田中 彰...	129
国立衛生試験所パラアミノベンゾイルグルタミン酸標準品 (Control 801) .....	太田美矢子・木村俊夫・田中 彰...	131
国立衛生試験所マレイン酸エルゴメトリン標準品 (Control 851).....	徳永裕司・木村俊夫・田中 彰...	133
天然有害物質に関する研究 (第3報) 高速液体クロマトグラフィーによる綿実中のゴシボールの定量 .....	鈴木英世・近藤龍雄・内山 充・原田正敏...	135
マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第13報) 食用油中の Aflatoxin B <sub>1</sub> について .....	五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生...	138
マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第14報) 乳幼児食品中の Zearalenone の実態調査 .....	五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生...	142
マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第16報) 食品の加熱調理ならびに自然汚染小麦の精麦および 製粉調理による Nivalenol と Deoxynivalenol の消長について.....	五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生...	144
野菜・果実における有機リン農薬の残留実態調査.....	河村葉子・武田明治・内山 充・斎藤行生...	147
韓国産輸入玄米中のイソプロチオランの残留分析.....	石坂 孝・鈴木 隆・斎藤行生...	151
リン酸塩製剤処理によるサツマイモ表皮の赤味増強について .....	山崎 壮・尾張恭子・川崎洋子・山田 隆・義平邦利...	154
高速液体クロマトグラフィーにおけるトコフェロール類の分離条件とその性能表示 .....	加藤三郎・有泉純男...	157
昭和56~60年度日本産あへんのモルヒネ含量について .....	岡田敏史・中原 裕・四方田千佳子・柴田 正・持田研秀・伊阪 博...	163
業務報告.....		165
誌上发表.....		198
学会発表.....		234
衛試例会.....		247
昭和60年度に行った主な研究課題.....		252
国家検定および検査等の処理状況.....		255
国立衛生試験所標準品.....		265

## CONTENTS

## Opening Article

- Ikuo SUZUKI: On the centenary of the publication of the Bulletin of the National Institute of Hygienic Sciences and the Japanese Pharmacopoeia ..... i

## Review

- Shozo KAMIYA: Synthesis of Antitumor Nitrosourea Derivatives and Chemical Studies on Their Action Mechanism ..... 1

## Originals

- Rieko MATSUDA and Mitsuru UCHYAMA: Relationship between Substituents of Phenothiazine Derivatives and their Affinity to Reversed Phase Column Packing .....21
- Noriko KATORI, Rieko MATSUDA, Yasushi TAKEDA and Mitsuru UCHYAMA: Laboratory Automation for Analysis of Solid Pharmaceuticals. Precision of Automated Analysis by Laboratory Robot System .....25
- Noriko KATORI, Sumie YSHIOKA and Mitsuru UCHYAMA: Stability of Pharmaceuticals of Cephalexine .....30
- Keisuke IWATA and Yuzuru HAYASHI: A Simple Chemiluminescence Measurement Apparatus equipped with Multi-CPU Controller System.....35
- Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA and Tsutomu YAMAHA: Studies on the Quality of Enzyme Preparations(VII)-Serrapeptase Preparation.....38
- Yoshitaka AIDA, Yasukazu IKEDA, Eiichi KAMATA, Katsushi NAITO, Yasuo SUZUKI and Masuo TOBE: Acute Toxicity of Chemicals for Household Goods (III) .....45
- Koichi TAKADA, Katsushi NAITO, Osayuki UCHIDA, Kazuo YASUHARA, Sakae OHBA, Chiyuri SATO, Shizu SHIMONURI, SUKIRNO, Yukio NAKAJI, Kazuo KOBAYASHI and Masuo TOBE: Oral Acute and Subacute Toxicity Studies for Naphthol-AS in F344 rat .....51
- Koiche TAKADA, Junko MOMMA, Shigetomo HORIUCHI, Yasuo SUZUKI and Masuo TOBE: Effect of Oral Administration of Sorbitan Monostearate on Prenatal and Postnatal Developments in Rat.....58
- Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Makoto USAMI, Megumi YAMAGUCHI, Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI: Effect of Methyl Hesperidin on Prenatal Developments of Rats .....64
- Makoto USAMI, Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Megumi YAMAGUCHI, Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI: Effect of Chlordane on Prenatal Developments of Rats.....68
- Makoto USAMI, Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Megumi YAMAGUCHI, Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI: Identification of Microcephaly of the Rat Fetus by Measuring the Brain Length *in Situ*.....73
- Fumio FURUKAWA, Kazuhiro TOYODA, Ryohei HASEGAWA, Hidetaka SATO, Ja June JANG, Zenya NAITO, Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASHI: Immunohistochemical localization of pancreatic endocrine cells in the hamster .....77
- Kazuhiro TOYODA, Fumio FURUKAWA, Ryohei HASEGAWA, Hidetaka SATO, Ja June JANG, Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASHI: The Diagnostic Value of Davidson Fixation Method on Toxicological Evaluation of Eye Lesion—histopathological findings of cataract formation following galactose diet intake in rats.....82
- Hidetaka SATO, Kazuhiro TOYODA, Ryouhei HASEGAWA, Fumio FURUKAWA, Ja June JANG, Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASI: Enzyme Histochemical Study on the Adriamycin Nephropathy in Rats.....87
- Michiko MATSUI, Katsutoshi MISE, Yoko YOSHIDA and Motoi ISHIDATE, Jr.: Production of Restriction Endonucleases from Various *Salmonella* Strains of Human Origin.....92
- Toshio SOFUNI, Makoto HAYASHI, Atsuko MATSUOKA, Minoru SAWADA, Midori HATANAKA and Motoi ISHIDATE, Jr.: Cytogenetic Effects of Diesel Engine Exhausts on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*.....97

Mami KUSHIYA, Ryuichi HASEGAWA, Tetsuo KOMURO, Seizaburo KANO and Hiroshi ISAKA: Quantitative Determination of Optical Isomers of Pindolol and Propranolol Using a GITC Reagent .....	103
<b>Notes</b>	
Akitada NAKAMURA, Shigeo KOJIMA and Masa-aki KANIWA: The Structures of Two Chemicals Sometimes Misunderstood as Tris (2,3-dibromopropyl) Phosphate in the Official Analytical Method .....	109
Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO: Studies on Chemical Analysis of Mycothoxin (XV)—Analysis of Nivalenol and Deoxynivalenol in Imported Cereals, Baby Foods and Processed Foods (Confectioneries) .....	113
Yukio NAKAJI, Minoru SAITOH, Sachiko SUZUKI and Masuo TOBE: Distribution of Tissue Enzymes in Rat .....	119
Kazuya AOI, Kōichi KAEURAGI, Torachiro SEKI, Tomoko TOBATA, Motoyoshi SATAKE and Masanori KUROYANAGI: Studies on the Cultivation of Turmeric ( <i>Curcuma longa</i> L.) I— Varietal Differences in Rhizome Yield and Curcuminoid Content .....	124
<b>Technical Data</b>	
Toshio KIMURA, Miyako OHTA and Akira TANAKA: Histamine Phosphate Reference Standard (Control 841) of National Institute of Hygienic Sciences .....	129
Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Akira TANAKA: Paraaminobenzoylglutamic Acid Reference Standard (Control 801) of National Institute of Hygienic Sciences .....	131
Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Akira TANAKA: Ergometrine Maleate Reference Standard (Control 851) of National Institute of Hygienic Sciences .....	133
Hideyo SUZUKI, Tatsuo KONDO, Mitsuru UCHIYAMA and Masatoshi HARADA: Studies on Naturally Occurring Toxic Substances (III)—Determination of Gossypol in Seed Kernels of Cotton Plants by High Performance Liquid Chromatography .....	135
Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO: Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XIII)—Determination of Aflatoxin B <sub>1</sub> in Edible Oil .....	138
Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO: Studies of Chemical Analysis of Mycotoxin (XIV)—Analytical Results on Zearalenone in Baby Foods .....	142
Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO: Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XVI)—Fate of Nivalenol and Deoxynivalenol in Foods and Contaminated Wheat during Cooking, Cleaning and Milling Processes .....	144
Yoko KAWAMURA, Mitsuharu TAKEDA, Mitsuru UCHIYAMA and Yukio SAITO: Survey of Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables and Fruits .....	147
Takashi ISHIZAKA, Takashi SUZUKI and Yukio SAITO: Isoprothiolane Residue in Unpolished Rice Grain Imported from South Korea .....	151
Takeshi YAMAZAKI, Kyoko OWARI, Yoko KAWASAKI, Takashi YAMADA and Kunitoshi YOSHIHIRA: Study on Red Color Development of Sweet Potato Epidermis by Treatment with Phosphate Preparations .....	154
Saburo KATO and Sumio ARIIZUMI: Retentions and Resolutions of the Tocopherols with Various Conditions by High-performance Liquid Chromatography and Their Digital Expression .....	157
Satoshi OKADA, Hiroshi NAKAHARA, Chikako YOMOTA, Tadashi SHIBATA, Kenshu MOCHIDA and Hiroshi ISAKA: Morphine Content of Japanese Opium Harvested during 1981 to 1985 .....	163
<b>Annual Reports of Divisions</b> .....	165
<b>Summaries of Papers Published in Other Journals</b> .....	198
<b>Titles of Speeches at Scientific Meetings</b> .....	234
<b>Seminars</b> .....	247
<b>Main Research Projects Carried Out in 1985</b> .....	252
<b>Survey of The Results of National Tests</b> .....	255
<b>Reference Standards Prepared by National Institute of Hygienic Sciences</b> .....	265

## 衛生試験所報告・日本薬局方の発刊百年を迎えて

所長 鈴木 郁生

衛生試験所報告は明治19年（1886年）5月、当時の内務省衛生局より第1号が衛生試験彙報として発刊された。

第1号の例言には『衛生局試験所（設立当時は司薬場、のちに衛生試験所）の設立以来何年かが過ぎたが、ここで得た検査報告を当局内に留めず、逐次集め発行し広く官及び人々に公示し役立てようとするものである。それは学問の成果は人々皆がその恩恵に浴すべきだからである』と記されている。彙報とは報告を集め分類したものの意味である。

衛生試験彙報は第9号が明治28年（1895年）に出版されたあと明治41年（1908年）まで中断されている。明治42年から続刊され、18号（大正11年、1922年）から衛生試験所彙報と改名され、第二次大戦の終る前年の昭和19年（1944年）に再び中断されるまで続く。戦後の昭和23年（1948年）66号が復刊、昭和25年の67号からは衛生試験所報告として刊行今日に至っている。前後2回の中断は日清、日露戦争と第二次大戦による経費不足などのためと想像される。

昭和35年（1960年）は司薬場創立から数えて85周年にあたりその記念事業の一つとして39号以降77号までの総索引が作成された。38号までは既に昭和6年（1931年）にまとめられている。また昭和58年（1983年）1月に100号（昭和57年11月発刊）を記念して78号から100号までの索引が発行された。

発刊当時の第1号、第2号は食品分析成績をまとめ、第3号には上水、灯用ガス、醤油、酒中のサリチル酸の試験成績などが既に報告され、表題だけみると現在のことかと錯覚する。時代が進むにしたがって内容は変化し、医薬品の製造、薬用植物の栽培研究、さらに細菌に関する研究などが収載されるようになる。100号までの逐次目次を概観するとまさに時代の移り変わりと衛生試験所の業務の歴史的変遷がよくわかる。また昭和45年（1970年）発行の88号あたりから現在のスタイルになり、報文、資料などはか所長をはじめ各部長の業務報告、紙上発表、学界発表、衛試例会、その年度内に行った主な研究課題及び特別研究の報告なども収載し広く業務の内容を周知するようつとめている。

記念すべき衛生試験所報告発刊百年を迎え、その歩みを振り返り、先輩の残された多くの貴重な業績に敬意を表するとともに課せられた使命の重さを感じ一層の研鑽を積み試験研究業務を充実させてその成果を本書に永く止どめるよう努力したいと考えている。

本年はまた当所に深く関係する日本薬局方が初めてわが国において公布されてから百年の記念すべき年である。

明治維新後、政府は医制の確立、不良医薬品取り締り機関である司薬場の設立及びそれに必要な試験・規格基準である薬局方の編纂公布を3本の柱として公衆衛生対策を進めた。前2者について

は明治7年(1874年)にそれぞれ解決をみたが薬局方だけはそれより12年を経た明治19年(1886年)6月25日によりやく公布の運びとなった。

薬局方の制定は司薬場の業務に必須のものであったので時の衛生局は明治8年にオランダ人ヘールツ(ゲールツ A. J. C. Geerts)にその草案を起草させている。しかし実際に政府が薬局方の編纂を開始したのは初版薬局方公布の約5年前のことであった。司薬場(のちに東京試験所)ではそれまでは日本薬局試験法というものを制定して主としてこれにより医薬品の試験を行っていたようである。薬局方は日本人、オランダ人、ドイツ人の手によって完成公布されたのだが、その編纂に時の司薬場(東京試験所)はどれくらい関わっていたのか現在は余りよく解っていない。しかし当所に残っている古文書、本省本局往復書編冊をひもといてみると初版薬局方と関係していると考えられる文書として時の衛生局長長与専斎より東京試験所長宛に薬局方公布の前年明治18年3月9日付の次の文書が残っている。『予テ中央衛生会ニ於テ選定相成候日本薬局方草案脱稿候ニ付キ一応其所之意見及諮問候条来月十日ヲ期シ復申可致此旨相達候事』

これに対し明治18年4月10日付で返事を提出しているように見受けられるが、その文書の写は残っておらず、したがって内容も不明である。一方別に明治18年3月31日付で中央衛生会(今の審議会)から東京試験所宛に日本薬局方に関して『別紙の件』について調査を依頼している文書がある。『別紙の件』とはキナルカロイドの定量法、苦扁桃油中のニトロベンゾールの検出法、橙花の色・香などの3つの質問である。これに対して正式な解答文は見当たらないが、司薬部長内務技手中太一郎の名前のメモが残っていて、しかるべき解答がなされている。その他この古文書の中からは初版薬局方発刊に関する文書は発見されない。これらの事実だけで、初版の作成に当時の司薬場がほとんど関係していなかったと断定はできない。前記のように衛生局から薬局方の草案を示し、これの検討を依頼していること、初版ではヘールツ、エーキマン(J. F. Eijkman)などの外人の司薬場教師が編纂に名を連ね、第二版では長井長義、辻岡精輔、田原良順など司薬場に関係する人達が参加していることなどから、当然のことながら薬局方と司薬場、試験所との関係は深く、現在と同様の状況にあったものと思われる。現在も薬局方の制定作業は中央薬事審議会が行っているが、そこに衛生試験所の所員が多く加わっている。衛生試験所が実験データ、技術などについて沢山の情報をもっていること、また局方改正のための実験は医薬品規格基準の研究と関係が深く、そのための機構が衛生試験所にあることなどにより薬局方の制定、編纂に当所の業務は緊密に関係している。薬局方公布百年を迎え、思いをその制定の昔に戻し少しく考察を加えてみたが、百年の伝統を大切に、いつも新しい学問を背景とし最新にして水準の高い薬局方が制定されるよう努力することが必要であると思う。

## 抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成と作用発現機構に関する化学的研究

神谷庄造

Synthesis of Antitumor Nitrosourea Derivatives and  
Chemical Studies on Their Action Mechanism

Shozo KAMIYA

わが国の悪性腫瘍（がん）による死亡率は、昭和56年に脳血管系疾患をついに追い越し、死亡順位第一位となった。高齢化社会を背景にして悪性腫瘍死は確実に増加しており、今や悪性腫瘍は多くの成人病のなかで最も重大な疾患となっている。

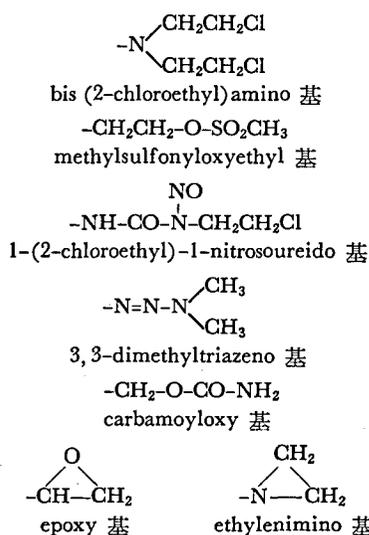
悪性腫瘍の治療法としては、現在免疫療法など多くの新しい試みがなされているが、手術療法、放射線療法、化学療法の三種が治療の中心となっている。このうち、最も有効な療法は手術療法であるが、手術によって腫瘍組織を切除しても少量の腫瘍組織が残存しているおそれのある場合、あるいは手術ができない場合などには、全身療法として化学療法を行うことになる。最近の化学療法の進歩、特に多剤併用療法の著しい進歩により、5年生存あるいは完全治癒のみられる悪性腫瘍は、小児の急性リンパ性白血病、ホジキン病、鞏丸腫瘍、ウィルムス腫瘍、絨毛癌、網膜芽腫などがある。しかしながら、胃癌、大腸癌、肝癌、乳癌、子宮癌、肺癌、などの固形腫瘍に対しては、有効な薬剤が少ないのが現状で、今後、固形腫瘍に有効でしかも低毒性の化学療法剤の開発が切に望まれている。

現在、臨床で用いられている抗腫瘍剤を分類すると、1 アルキル化剤、2 代謝拮抗剤、3 抗生物質、4 植物成分、5 ホルモン剤、6 免疫賦活化剤、の6種に大別できる。これらの治療薬のなかで、アルキル化剤は副作用の問題はあるが、白血病や悪性リンパ腫などはもちろん、消化器癌や肺癌に対しても広く用いられている。

アルキル化剤は化学的にはいずれも carbonium ion 原であり、腫瘍細胞レベルにおいて主に DNA の求核中心 (nucleophilic center) をアルキル化し、DNA の切断を含め DNA の鋳型活性を損ね、核酸合成を阻害することにより腫瘍細胞に致死的效果を与えるものとされている。

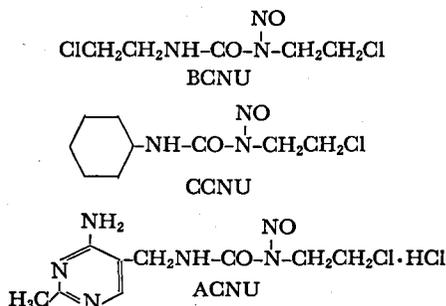
各種のアルキル化剤の化学構造をみると、分子

中に次のような反応中心、すなわち、抗腫瘍性化学官能基を一個または二個有している。



これらの抗腫瘍性化学官能基のなかで、1-(2-chloroethyl)-1-nitrosoureido 基を有するニトロソ尿素系抗腫瘍剤は、従来用いられていたアルキル化剤と異なる抗腫瘍スペクトルを示すので大いに注目され、多くの研究が行われてきた<sup>1,2,3)</sup>。

現在、臨床に用いられているニトロソ尿素系抗腫瘍剤としては、1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea



(BCNU)<sup>1,2)</sup>, 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU)<sup>1,2)</sup>, 3-[(4-amino-2-methyl-5-pyrimidyl)methyl]-1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea hydrochloride (ACNU)<sup>4)</sup> などが、ヒトの白血病、悪性リンパ腫、胃癌、悪性黒色腫、脳腫瘍などの治療に用いられている。

これらのニトロソ尿素系抗腫瘍剤の共通する最も重大な副作用として、遅発性の骨髄抑制 (delayed bone marrow suppression) が多かれ少なかれすべての薬剤にみられるので、臨床の場では投与方法の難しい薬剤である<sup>5)</sup>。しかしながら、ニトロソ尿素系抗腫瘍剤はその高い脂溶性のために脳血管関門 (blood-brain barrier) を通過することのできる数少ない化合物であるので、ヒトの脳腫瘍に対しては大変有用な薬剤である<sup>6)</sup>。一方、ニトロソ尿素誘導体は、水に難溶で、しかも安定性の低いものが多いので、物性面での改良も必要である。

当合成化学研究部においては、ここ5年間、低毒性の、しかも安定性の高いニトロソ尿素系抗腫瘍剤を開発する目的で各種のニトロソ尿素誘導体を合成し、その抗腫瘍性のスクリーニングを実施してきた。化合物の分子設計としては、ニトロソ尿素骨格 [R'NHCON(NO)R] の反応性を高め、さらに R' 部分より生成する活性化学種も反応が高いものであるよう強力な電子吸引基の pyridylmethyl 基や pyrazinylmethyl 基を有するニトロソ尿素誘導体を中心として合成した。また、ピリジン核窒素を N-oxide とすることにより分子の安定性と反応性を高め、また、塩とすることにより水溶性を高めることができるはずである。さらに、これらの新化合物の抗腫瘍スペクトルより化合物を分類し、それぞれの群の代表化合物と各種生体高分子のモデル化合物との化学反応を行い、その反応様式より各群化合物の腫瘍細胞レベルにおける作用発現機構を示すことができた。

このように、ある生理活性物質を各種生体高分子の簡単なモデル化合物と反応させ、得られる複数の化合物の構造を決定し、その生理活性物質の反応様式を解析することにより、細胞レベルにおける活性化学種の生成と作用発現機構を示すことができる。

今回、合成化学研究部における研究を中心として標題の総説をまとめた。

### I 各種ニトロソ尿素誘導体の合成

尿素誘導体 [R'NHCON<sup>1</sup>HR] のニトロソ化は、1 N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup> の置換基 R, R' の立体効果、2 N<sup>1</sup>, N<sup>3</sup> の置換基 R, R' の電子効果、3 ニトロソ化剤の種類、の三

要素によって支配される。その結果、1 N<sup>1</sup> ニトロソ体 [R'NHCON(NO)R] のみを生成する、2 N<sup>3</sup> ニトロソ体 [R'N(NO)CONHR] のみを生成する、3 N<sup>1</sup> ニトロソ体と N<sup>3</sup> ニトロソ体の混合物を生成する、4 ニトロ化や閉環反応となる、など四様の反応となる。

尿素誘導体のニトロソ化の方向については次のような一般則がいえる。ニトロソ基は、1モノ置換尿素誘導体においては置換基が結合した窒素に導入される。

- 1,3ジ置換尿素においては negativity の高い方の窒素に、また立体障害の小さい方の窒素に導入される。
- 強い電子吸引性基および立体障害のある置換基の結合した 1,3ジ置換尿素誘導体においては、N<sup>1</sup> ニトロソ体と N<sup>3</sup> ニトロソ体の混合物を生成する場合が多い。
- 1,3ジ置換尿素誘導体においてはメチル基の結合した窒素に最優先に導入される。

次に各種のニトロソ化剤とニトロソ化の例をあげる。

1 亜硝酸ナトリウム-塩酸 試料の 5~10% 塩酸溶液に、氷冷・攪拌下、1~2モル相当量の亜硝酸ナトリウム液を滴加する。

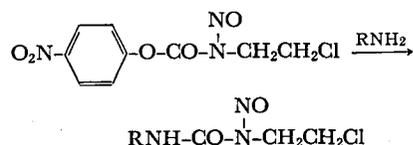
2 亜硝酸ナトリウム-ギ酸 試料のギ酸溶液に、氷冷・攪拌下、1.5~2モル相当量の亜硝酸ナトリウムの粉末、あるいは水溶液を加える。亜硝酸ナトリウムを粉末で加えるか、水溶液で加えるかによってはニトロソ異性体が生成する場合がある。ニトロソ体が折出しない場合は、氷水を加えて反応液を希釈すると折出する場合が多い。

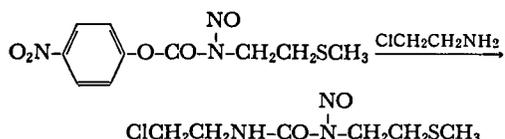
3 ガス状ニトロソ化剤 試料の四塩化炭素、chloroform あるいは dimethylformamide 溶液に、-5°~-10° で dinitrogen trioxide (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) あるいは dinitrogen tetroxide (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) の四塩化炭素溶液を加える。nitrosyl chloride (NOCl) も強力なニトロソ化剤である。この場合、生成するニトロソ体が不安定であれば、脱プロトン剤として無水酢酸ナトリウムを加えておくことよい。

以上、いずれのニトロソ化剤を選ぶかは、収率、生成するニトロソ体の安定性、分離操作の難易による。

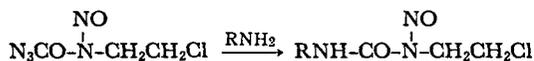
これらのニトロソ化剤で目的とするニトロソ尿素が得られない場合は、次のような易脱離基や carbamoylazide を利用した合成法がある。

1. *p*-nitrophenyl N-(2-chloroethyl)-N-nitrosocarbamate に相当するアミンを反応させる<sup>4,7,8)</sup>。





2. N-nitroso-N-(2-chloroethyl) carbamoylazide に相当するアミンを反応させる<sup>9)</sup>.



(1) 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridyl-methyl)urea および関連化合物の合成

Table 1 に、1 置換 3-(3-pyridylmethyl)urea 類 (Ia-f) を 10% 塩酸溶液中、亜硝酸ナトリウム液でニトロソ化した場合の生成物と収率を示す<sup>10,11)</sup>.

すなわち、R が methyl, ethyl の場合は 1 ニトロソ体 (IIa, b) のみを 96% 以上の高収率で生成するが、R が 2-chloroethyl, isopropyl, isobutyl, cyclohexyl のようにバルキーな置換基の場合は N<sup>1</sup> ニトロソ体と N<sup>3</sup> ニトロソ体の混合物が得られる。R が isopropyl と cyclohexyl の場合は明らかに立体障害のために N<sup>3</sup> ニトロソ体の方が多く生成している。IIc・IIIc および IIe・IIIe の混合物はエーテルより数回結晶することにより分離できるが、IIId・IIIId および IIe・IIIe の混合物の場合、また、いずれの場合でも 1g 以上を取扱う場合は、氷水還流冷却下でのシリカゲル・クロロホルムによるカラムクロマトグラフィーがよい分離手段である<sup>11)</sup>.

Table 1. Nitrosation of 1-substituted 3-(3-pyridylmethyl)ureas (Ia-f) with sodium nitrite and 10% hydrochloric acid

$\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}_5\text{H}_4-\text{CH}_2\text{NH}-\overset{1}{\text{C}}\text{O}-\overset{3}{\text{N}}\text{HR} \xrightarrow[2. \text{NaHCO}_3]{1. \text{NaNO}_2-10\% \text{ HCl}} \text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}_5\text{H}_4-\text{CH}_2\text{NH}-\overset{1}{\text{C}}\text{O}-\overset{\text{NO}}{\text{N}}-\text{R} + \text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{C}_5\text{H}_4-\text{CH}_2-\overset{\text{NO}}{\text{N}}-\overset{1}{\text{C}}\text{O}-\text{NHR}$			
No.	R	Yield (%)	Yield (%)
Ia	CH <sub>3</sub>	98	0
Ib	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	96	0
Ic	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	59	29
Id	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	21	71
Ie	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	59	9
If		22	49

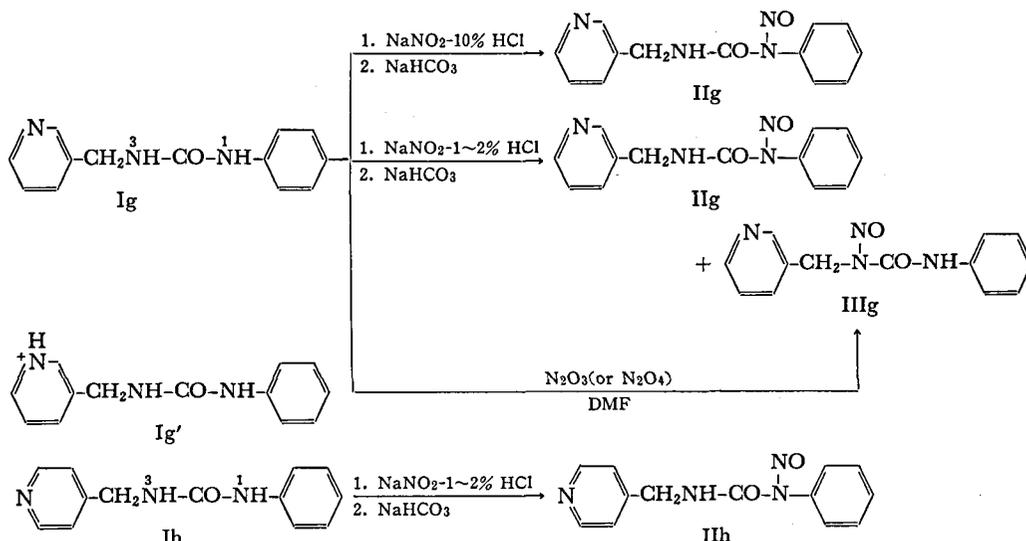


Chart 1. Nitrosation of 1-phenyl-3-(3-pyridylmethyl)urea (Ig) and the 4-pyridylmethyl derivative (Ih)

一方, R が phenyl の場合は導入されるニトロソ基の位置が用いるニトロソ化剤の種類によって影響される. Chart 1 に示すように, 1-phenyl-3-(3-pyridylmethyl) urea (Ig) を亜硝酸ナトリウム-10%塩酸によりニトロソ化すると, 90%以上の収率で N<sup>1</sup> ニトロソ体 IIg のみが得られるが, 1~2% 塩酸中でニトロソ化すると IIg とともに 3 ニトロソ体 IIIg も得られる<sup>12)</sup>. この事実は, 10% 塩酸中では Ig は強電子吸引性の pyridinium ion Ig' として存在するため, N<sup>3</sup> 位の negativity は低くなり, そのためニトロソ基は N<sup>1</sup> 位のみ導入されるが, 希い塩酸中では protonation の程度が低いため N<sup>3</sup> 位にもニトロソ基が導入されるのであろう. 10% 塩酸中ではおそらく少量ではあるが N<sup>3</sup> ニトロソ体も生成しているのであろうが, 一般に N<sup>3</sup> ニトロソ体の方が N<sup>1</sup> ニトロソ体より不安定である事実より, 少量生成する N<sup>3</sup> ニトロソ体は, 10% 塩酸中で脱ニトロソ化され, 生成する原料尿素は存在する NO<sup>+</sup> によって再びニトロソ化され, N<sup>1</sup> ニトロソ体を優先的に生成する. このようにして, 10% 塩酸中でのニトロソ化においては N<sup>1</sup> ニトロソ体のみが得られる (III-2).

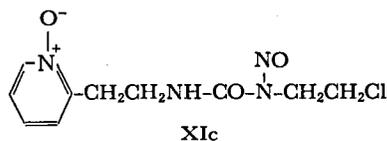
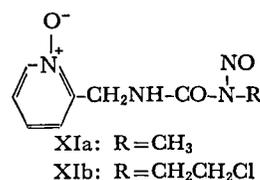
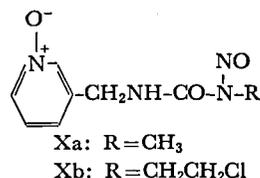
Ig を dimethylformamide あるいは chloroform 中で dinitrogen trioxide か dinitrogen tetroxide でニトロソ化すると 80%以上の収率で IIIg のみが得られる.

1-phenyl-3-(4-pyridylmethyl) urea (Ih) の亜硝酸ナトリウム-10%塩酸によるニトロソ化においては, N<sup>1</sup> ニトロソ体 IIh のみが得られる<sup>13)</sup>.

Chart 2 に 1 置換 3-(2-pyridylmethyl) urea 類 (IV a-d) および 1 置換 3-(2-pyridylethyl) urea 類 (VII a-d) の亜硝酸ナトリウム-10%塩酸によるニトロソ化の結果を示す. N<sup>3</sup> 置換基は最も強力な電子吸引

基である 2-pyridylmethyl 基であるので, R が 2-chloroethyl 基でも N<sup>1</sup> ニトロソ体 Vb のみしか得られないが, メチレン二個の VIIb では N<sup>3</sup> 位の 2-pyridylmethyl 基の影響が遮へいされるため N<sup>3</sup> 位ニトロソ体 IXb も得られる. 一方, R が isopropyl の IVc および VIIc のニトロソ化では, N<sup>1</sup> 位の立体障害が大きく, 両異性体得られる<sup>15)</sup>.

これらの pyridylmethylnitrosourea 誘導体は, chloroform 中, m-chloroperbenzoic acid により安定な N-oxide (Xa, b, XIa, b, XIc) となる. Xb および XIb は, 本研究のなかで得られた有望な抗腫瘍剤候補化合物である.



1-(2-chloroethyl)-3-(2-pyrazinylmethyl) urea の亜硝酸ナトリウム-10%塩酸によるニトロソ化においては, N<sup>1</sup> ニトロソ体と N<sup>3</sup> ニトロソ体の 1:1 混合物を, また, 1-(2-chloroethyl)-3-(2-furylmethyl)-

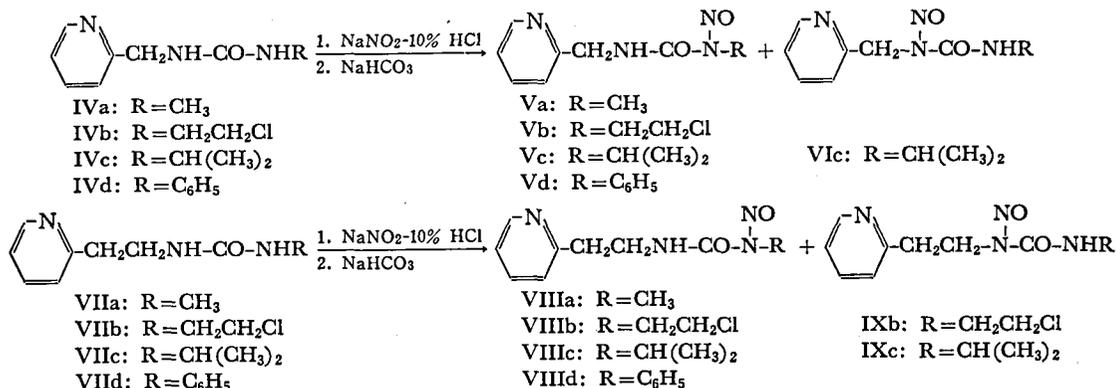
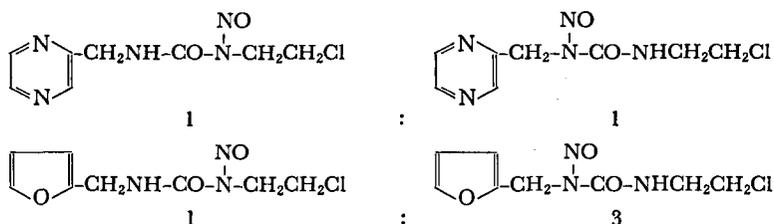


Chart 2. Nitrosation of 1-substituted 3-(2-pyridylmethyl) ureas (IVa-d) and the 2-pyridylethyl derivatives (VIIa-d)



urea の亜硝酸ナトリウム-ギ酸によるニトロソ化においては 1 : 3 の混合物が生成する<sup>14)</sup>。

尿素誘導体の nujol 中の IR スペクトルは、1620 ~ 1650  $\text{cm}^{-1}$  に ureido CO にする吸収を示すが、ニトロソ尿素となると ureido CO は 1700 ~ 1730  $\text{cm}^{-1}$  に 100  $\text{cm}^{-1}$  前後も特異的にシフトする。また、ニトロソ基がいずれの窒素に導入されたかは、その NMR スペクトルによって容易に決定できる。例えば、IIc [3PyCH<sub>2</sub>NHCON(NO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl] のように 2-chloroethyl 基側にニトロソ基が入ると二つの CH<sub>2</sub> は triplet の対となり、pyridine 側の CH<sub>2</sub> は doublet となる。一方、IIIc [3PyCH<sub>2</sub>N(NO)CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl] のように pyridine 側にニトロソ基が入ると CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl ははっきり分離せず、PyCH<sub>2</sub> は当然 singlet となる。

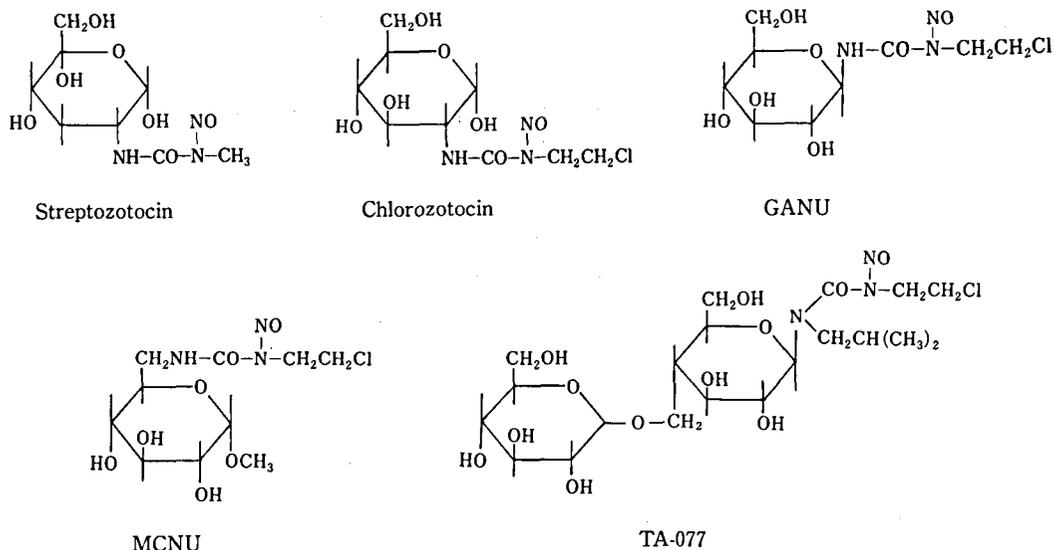
(2) 種々の Carrier Group を有する 1-(2-Chloroethyl)-1-nitrosourea 誘導体の合成

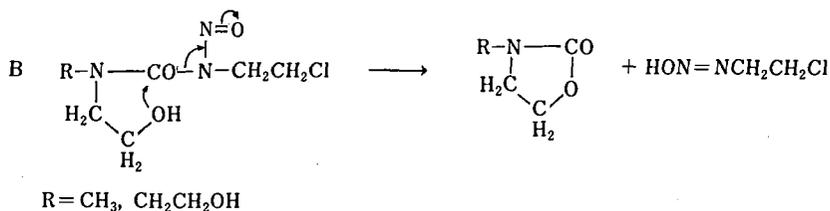
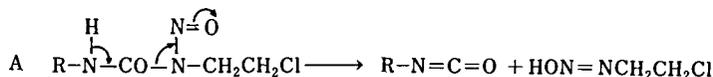
(1) において、抗腫瘍性化学官能基、-NHCON(NO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl を有する pyridine など複素環誘導体の合成について述べたが、他の研究グループによっても種々の carrier group の化合物が合成されているので次に紹介する。

水溶性ニトロソ尿素誘導体を目指して、piperidine<sup>17)</sup> や morpholine<sup>18)</sup> などが、また毒性軽減を目指してカルボン酸誘導体<sup>19)</sup> や disulfide<sup>20)</sup> などが carrier group として設計されている。また、薬効相乗作用を考えて、N<sup>3</sup> 位が nucleoside 置換<sup>21)</sup>、estrone の 17 $\beta$  置換<sup>22)</sup>、麦角アルカロイド ergoline の 8 位置換<sup>23)</sup>、などの誘導体が合成されている。

Streptozotocin は *Streptomyces achromoges* の産生する 1-methyl-1-nitrosourea 基 [-NHCON(NO)CH<sub>3</sub>] を有する抗腫瘍性抗生物質で、その 2-chloroethyl analog として、Chlorozotocin, GANU, MCNU, TA-077 などが合成された。これらの糖置換ニトロソ尿素誘導体の骨髄毒性は、BCNU や CCNU に比べてかなり低いので、その後多数の糖誘導体が合成された<sup>24)</sup>。たしかに、糖誘導体は骨髄毒性が軽減されているが、一方脳血管関門の通過性は低くなってしまふ。例えば、GANU は L1210 を脳内移植したマウスに対してはあまり効果を示さない。

一般にニトロソ尿素系抗腫瘍剤の分解は、A式のように first step として N<sup>3</sup>H の脱プロトンによって開始される。辻原ら<sup>25)</sup> は、もし B式に示したような N<sup>3</sup> 位に脱離すべきプロトンが無く、その  $\beta$  位に OH を





有する N<sup>3</sup> 三置換体の場合は、OH の CO への攻撃によって活性化され、相当する 2-oxazolidinone と活性化学種としては 2-chloroethyl diazohydroxide のみを生成するので、B 式の N<sup>3</sup> 三置換体の方が A 式の N<sup>3</sup> 二置換体よりも強い効果と毒性の軽減を示すはずと予想した。合成された R=CH<sub>3</sub>, R=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH の二化合物は、mouse lymphoid leukemia L1210 細胞と Ehrlich ascites carcinoma 細胞に強い効果を示したが、両者は油状で、不安定な化合物であった<sup>25)</sup>。さらに、glucopyranosyl, manopyranosyl, galactopyranosyl などを carrier group とした N<sup>3</sup> 三置換体が多数合成された<sup>25,26)</sup>。

### (3) 1,3-Diphenyl-1-nitrosourea 類の合成

一般に 1,3-diphenylurea 類は溶解性が乏しいので、ニトロ化剤として亜硝酸ナトリウム-塩酸の系ではうまく行かない。この場合、dimethylformamide に溶かし、nitrosyl chloride, dinitrogen trioxide, dinitrogen tetroxide などを加えることにより、Table 2 に示したような高収率で N=ニトロソ体 (XIIIa-e) が得られる<sup>27,28)</sup>。

XIIa の酢酸溶液に、亜硝酸ナトリウム液に希塩酸

を滴加することによって発生する亜硝酸ガスを通ずることによっても XIIIa が得られる。

一方、1,3-bis(4-methoxyphenyl)urea (XIV) を DMF 中、dinitrogen tetroxide でニトロ化すると、N=ニトロソ体は得られず、その IR および NMR スペクトルより 1,3-bis(4-methoxyphenyl)-1-nitrosourea (XV) と予想される不安定な化合物が得られる。

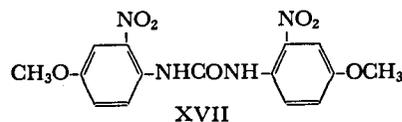
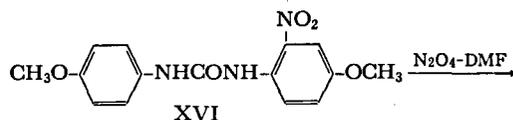
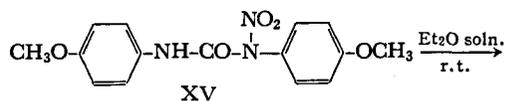
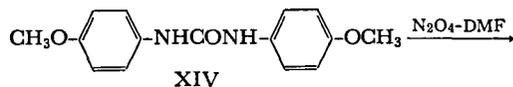


Table 2. Nitrosation of 1,3-diphenylureas (XIIa-e) with gaseous nitrosating reagents

No.	R	Yield (%)		
		NOCl	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
XIIa	H	96	70	75
XIIb	CH <sub>3</sub>	94	96	85
XIIc	Cl	75	59	80
XIId	F	91	81	78
XIIe	NO <sub>2</sub>	78	68	91

このもののエーテル溶液を室温に放置すると、1-(4-methoxy-2-nitrophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)urea (XVI) となる。

XIV を大過剰の nitrogen tetroxide で処理すると、1,3-bis(4-methoxy-2-nitrophenyl)urea (XVII) が得られる。

II 抗腫瘍スペクトルおよび作用発現機構

当部における抗腫瘍性化合物の合成研究の対象が主として bis(2-chloroethyl)amine 誘導体やニトロソ尿素誘導体であったので、第一次スクリーニングシステムとしては、アルキル化剤に感受性の高いラット腹水肝癌 AH13 細胞-ドンリュウラットならびにマウスリンパ性白血病 L1210 細胞-CDF<sub>1</sub> マウスの二系を用い、腹腔内移植-腹腔内移植 (ip-ip) の方法でスクリーニングした<sup>29)</sup>。

AH13 細胞は、hybride Japanese albino rat に7か月間 4-dimethylaminoazobenzene を投与し、その肝臓に形成された肝臓癌を細切し、腹腔内に移植する操作により腹水型化した移植腫瘍である。AH13 細胞はアルキル化剤に対して感受性が強く、代謝拮抗剤には耐性があることが特徴である<sup>30,31)</sup>。

L1210 細胞は、DAB/2 mouse の皮膚に 3-methyl-choranthrene を塗布することにより脾臓やリンパ節に発生した白血病細胞を腹水型化した移植細胞で、比較的臨床効果の予言性が高いと評価されている。L1210 は、現在、Sarcoma 180 や Ehrlich carcinoma などとともに世界的に広く使用されている。CDF<sub>1</sub> マウスはウィルス感染に強いことが知られている。

AH13 および L1210 細胞によるスクリーニングの効果判定基準は次のようである。

AH13: AH13 細胞 10<sup>6</sup>/ラットを ip 移植し、3日後、腹水中に AH13 細胞が純培養状態になったことを確かめ、同日に化合物を ip 投与する。以後、移植7日目まで一日一回化合物を ip 投与し、移植60日目での生存率で判定する。1群6匹とし、評価は60日生存率により次のように定めた。

- : 0/6 (無効)            ±: 1/6 (やや有効)
- +: 2/6~3/6 (有効)        †: 4/6~6/6 (著効)

L1210: L1210 細胞 10<sup>5</sup>/マウスを ip 移植し、2および6日後に化合物を ip 投与する。1群3匹とし、評価は T/C% (T: 処置群の平均生存日数, C: 対照群の平均生存日数) により次のように定めた。

- : T/C% > 120 (無効)
- ±: T/C% 120~124 (やや有効)
- +: T/C% 125~200 (有効)
- †: T/C% > 200 (著効)

AH13 と L1210 二系で構成した第一次のスクリーニングにより、合成新化合物約 180 種の抗腫瘍性を検討した<sup>32,33)</sup>。得られた抗腫瘍スペクトルより化合物を分類すると、次のように ABC の三群に分けることができ、それぞれの群はその化学構造に特徴があることがわかる。

すなわち、A 群は各化合物に -NHCON(NO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl 部分を有し、AH13 と L1210 両系に有効であり、B 群は -NHCON(NO)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> 部分を有し、AH13 にのみ有効であり、また、C 群は -NHCON(NO)CH<sub>3</sub> 部分を有し L1210 にのみ効果を示す。これら三群の

Table 3. Group A compounds active against AH 13 and L 1210 cells

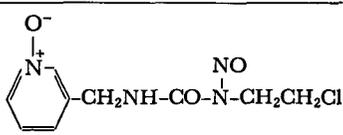
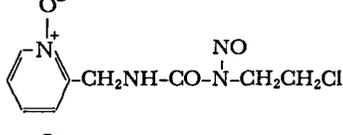
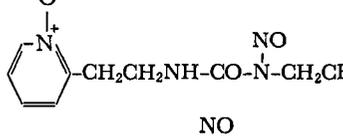
Compound	No.	Anti-AH 13 activity	Anti-L 1210 activity
	Ia	+	†
	Ib	†	†
	Ic	+	†
	BCNU	+	†

Table 4. Group B compounds active against AH 13 cells

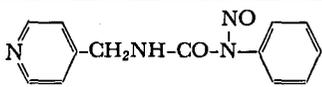
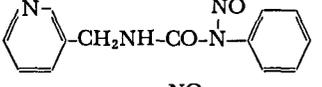
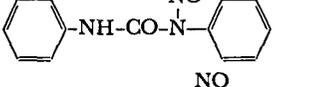
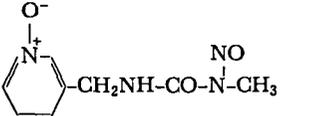
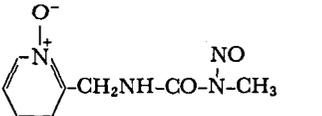
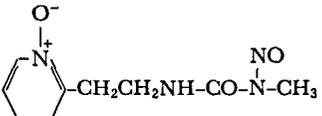
Compound	No.	Anti-AH 13 activity	Anti-L 1210 activity
	IIa	+	-
	IIb	+	-
	IIc	+	-
$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{NH-CO-N(CH}_2\text{CH}_2\text{Cl)}$	BCNU	+	-

Table 5. Group C compounds active against L 1210 cells

Compound	No.	Anti-AH 13 activity	Anti-L 1210 activity
	IIIa	-	+
	IIIb	-	±
	IIIc	-	±
$\text{H}_2\text{N-CO-N(CH}_3\text{)}$	MNU	-	+

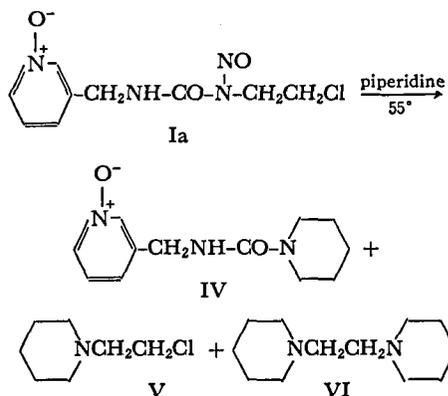
化合物のなかで、それぞれの系に対し高い抗腫瘍性を示し、また、安定性の高い三化合物を Table 3, 4, 5 のように各群の代表化合物とした。各群の代表化合物と DNA および蛋白質のモデル化合物との化学反応を行い、得られる反応生成物の構造と生成機構を検討することにより、各群化合物の腫瘍細胞レベルにおける活性化学種の生成と作用発現機構を推定した。

核酸塩基のモデル化合物としては、piperidine, piperidine-4-carboxylic acid, adenine, guanine などを、また、酵素蛋白質を含む蛋白質のモデル化合物としては、εアミノ基を有する lysine や Nα-acetyllysine を、また、メルカプト基を有する Nα-acetylpenicillamine を用いた。

#### (1) A群化合物の作用発現機構

A群代表化合物 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea N-oxide (Ia) と piperidine を acetone 中、55° で反応させると、次に示すように

carbamoyl 化体の 1, 1-pentamethylene-3-(3-pyridylmethyl)urea N-oxide (IV), 2-chloroethyl 化体の N-(2-chloroethyl)piperidine (V) およびエチレン架橋体の 1, 2-bis(N, N-pentamethylenepiperidino)ethane (VI) が得られる。2-chloroethyl 化体と piperidine を



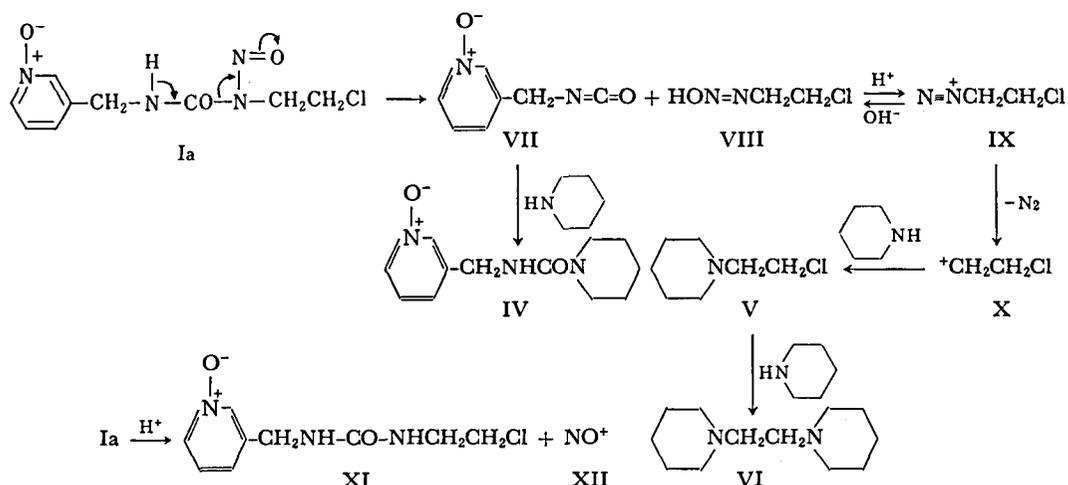


Chart 3. Formation of active chemical species from 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea N-oxide (Ia)

同様に反応させるとエチレン架橋体 VI を与える<sup>34)</sup>。

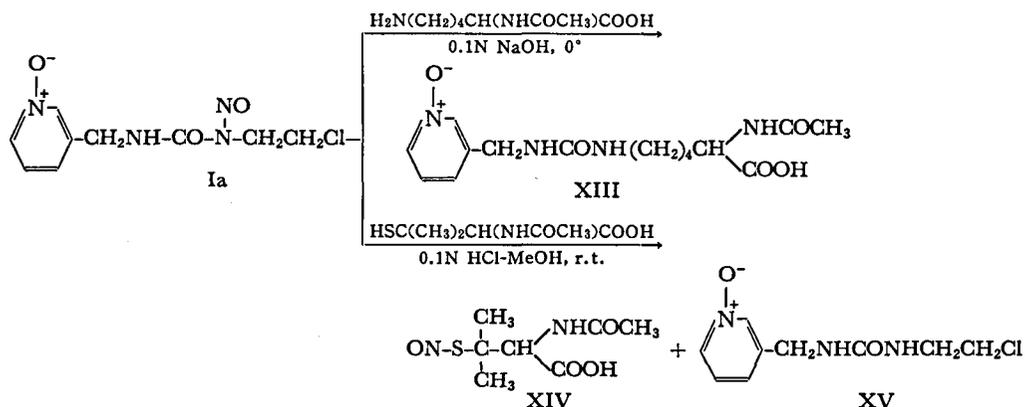
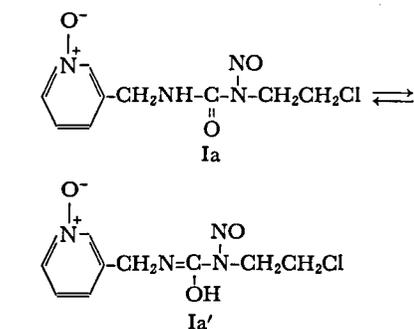
これらの反応の機構を Chart 3 に示す。すなわち、Ia は pyridine 核の強い電子吸引性により N<sup>3</sup>H は脱離し易く、N<sup>3</sup>H の脱離に続いて C-N<sup>1</sup> 結合が切れて N-(1-oxido-3-pyridylmethyl)isocyanate(VII) と 2-chloroethyldiazohydroxide(VIII) となる。VIII は 2-chloroethyldiazonium ion(IX) となる。VIII あ

るいは IX は脱窒素を経て 2-chloroethyl carbonium ion(X) となり、X は piperidine と反応して 2-chloroethyl 化体となる。V はさらに piperidine と反応してエチレン架橋体 VI となる。一方、isocyanate VII は、piperidine を carbamoyl 化し IV を与える。

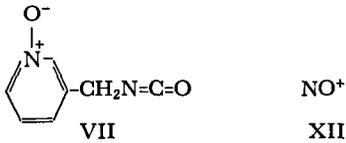
N<sup>3</sup> 位に電子吸引性基を有する Ia のような尿素は、イソ尿素型 Ia' の寄与がある程度存在する。

次に、Ia と酵素蛋白質のモデル化合物としての N $\alpha$ -acetyllysine および N-acetylpenicillamine との反応を示す。Ia と N $\alpha$ -acetyllysine を微アルカリ性下に反応させると、carbamoyl 化体の N $\alpha$ -acetyl-N $\epsilon$ -(1-oxido-3-pyridylmethyl)lysine(XIII) を生成する。また、Ia と N-acetylpenicillamine を微酸性下に反応させると S ニトロソ体の S-nitroso-N-acetylpenicillamine(XIV) と脱ニトロソ体 XV を生成する<sup>34)</sup>。

これらの反応の機構については、Chart 3 に示した機構によって生成した活性化学種の isocyanate(VII)



が *N*-acetyllysine の  $\epsilon$  アミノ基を carbamoyl 化することにより XIII を生成し、また、活性化学種の nitrosonium ion(XII) が *N*-acetylpenicillamine のメルカプト基をニトロソ化することにより XIV を生成する。



以上のような Ia と各種モデル化合物との化学反応より、A 群化合物の腫瘍細胞レベルにおける活性化学種の生成と作用発現機構を、Chart 4 のように示すことができる。

すなわち、Ia より生成する活性化学種は、2-chloroethyl carbonium ion (X), *N*-(1-oxido-3-pyridylmethyl)isocyanate (VII) および nitrosonium ion (XII) である。X は DNA の活性点の NH や OH と反応し 2-chloroethyl 化 DNA(XVI) とし、XIV は適当な距離にある他の DNA 鎖の活性点と反応し、DNA 鎖間に XVII のようにエチレン橋、すなわち cross-link を作る。このようにして DNA に障害を及ぼし、腫瘍細胞に致死的な効果を与える。おそらく、2-chloroethyl 化体 XVI の生成段階では十分な細胞毒性を示さず、生成する XVI のかなりの量が DNA 修復酵素により除去修復されてしまうが、エチレン橋が DNA 鎖間に架橋されることによりさらに強い効果となり、AH13 細胞および L1210 細胞に致死的效果を発揮するものと考えられる。加うるに、isocyanate VII は酵素蛋白質の活性アミノ基、例えばリジン

残基の  $\epsilon$  アミノ基を carbamoyl 化することにより XVIII とし、また、nitrosonium ion(XII) はそのメルカプト基をニトロソ化することにより Sニトロソ化体 XIX としてしまう。このようにして、酵素蛋白質、特に DNA 修復酵素の活性に影響を及ぼすことにより DNA 修復を阻害し、腫瘍細胞死を加速すると考えられる。また、エチレン橋形成反応は、DNA と蛋白質との間にもおきる。

細胞内 DNA のエチレン橋形成反応が二段階に進むことは、DNA および細胞レベルでの研究によって確認されている<sup>35,36</sup>。また、1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea [ $\text{H}_2\text{NCON}(\text{NO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ] の DNA 鎖間エチレン橋を形成する求核部位については、cytosine の 4 位 N と guanine の 6 位 O との間、guanine の 1 位核 N と cytosine の 3 位 N 核との間、thymine の 4 位 O と adenine の 6 位 N との間などが可能性としてあげられている<sup>37</sup>。

ニトロソ尿素系抗腫瘍剤の抗腫瘍性発現においては、DNA のアルキル化が最も意義があるものといわれているが、ニトロソ尿素系抗腫瘍剤のアルキル化速度は他のタイプのアルキル化剤に比べてかなり遅いことが特徴である。もう一方の活性化学種である isocyanate としては、実際、各種の isocyanate 類が DNA polymerase II の抑制、RNA processing の抑制、障害を受けた DNA の修復阻害などが確認されている<sup>38</sup>。

抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の抗腫瘍活性と毒性は、その脂溶性 (lipophilicity)、安定性 (stability)、アルキル化能 (alkylating activity)、カルバモイル化能 (carbamoylating activity) の四要素によって決定される<sup>39</sup>。

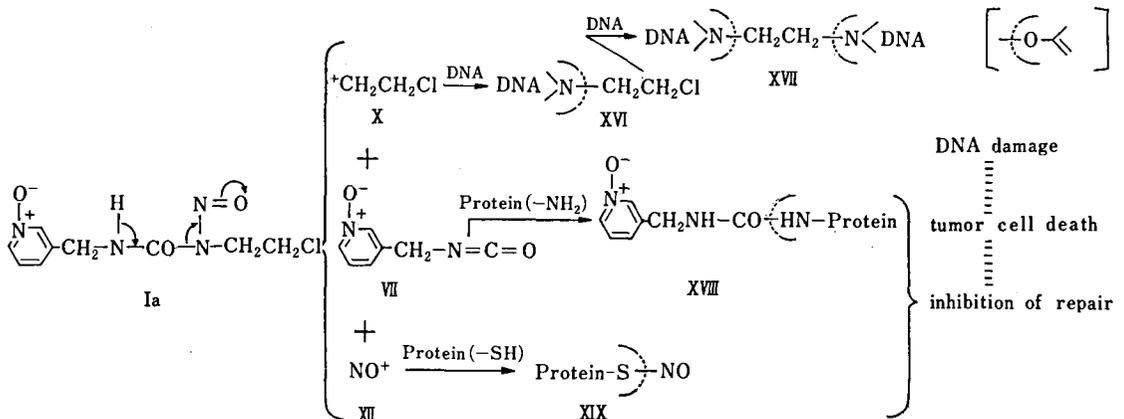


Chart 4. Antitumor action mechanism of Group A compounds having a 1-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea group

抗腫瘍性ニトロソ尿素の細胞レベルでの核酸類に対するアルキル化率は、他のタイプのアルキル剤に比べるとかなり低く、一方、塩基性蛋白質に対するカルバモイル化率は高い。しかしながら、DNA へのアルキル化が抗腫瘍性発現のための第一義的反応であると考えるならば、活性化学種の 2-chloroethyl diazohydroxide ( $\text{HON}=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ )あるいは2-chloroethyl diazonium ion ( $\text{N}=\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ )は、そのまま細胞膜を通過できるほど安定な化学種でないで、ニトロソ尿素分子として細胞膜を通過しなければならない。このことは、これらの抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体のなかで、アルキル化能の高いものが必ずしも抗腫瘍活性が高くない事実を裏付けるものである。だから、ニトロソ尿素分子は細胞内に到達できる程度に物理的にも化学的にも安定でなければならない。抗腫瘍性ニトロソ誘導体の抗腫瘍活性の程度は、このように多くの要素が複雑にかみあった結果である。

細胞レベルで生成する活性化学種は、腫瘍細胞のみならず正常細胞の反応活性点をも攻撃するので、アルキル化剤はすべて程度の差こそあれ正常細胞にも障害を与えてしまう。低毒性のアルキル化剤の開発研究の

原点がここにある。

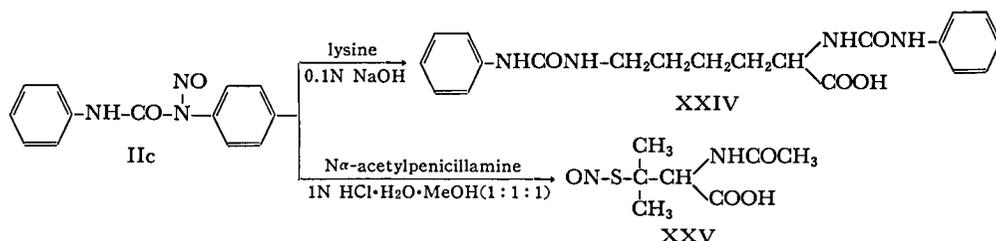
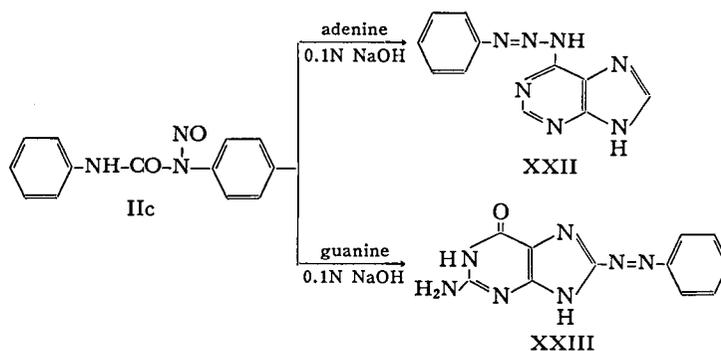
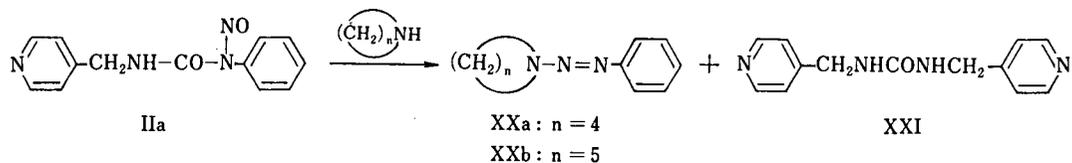
(2) B群化合物の作用発現機構

B群化合物は 1-nitroso-1-phenylureido[-NHCON(O)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]誘導体である。1-nitroso-1-phenyl-3-(4-pyridylmethyl) urea (IIa) を pyrrolidine あるいは piperidine と反応させると 1-phenyl-3,3-tetramethylenetriazene (XXa) および 1-phenyl-3,3-pentamethylenetriazene (XXb) が生成する。いずれの場合も 1,3-bis(4-pyridylmethyl)urea (XXI) を副生する<sup>13)</sup>。

B群のもう一つの代表化合物である 1,3-diphenyl-1-nitrosourea (IIc) は、adenine と微アルカリ性下、0°で反応し 6-(3-phenyl-1-triazeno)purine (XXII)、すなわち phenyldiazo adenine を、また、guanine とは同様条件下に反応し 8-phenylazoguanine (XXIII) を与える。

また、IIc と lysine を同条件下で反応させると N $\alpha$ , N $\epsilon$ -diphenylcarbamoyllysine (XXIV) を生成する。N $\alpha$ -acetylpenicillamine とは微酸性下に反応し、N $\alpha$ -acetyl-S-nitrosopenicillamine (XXV) を生成する<sup>34)</sup>。

以上の反応より、腫瘍細胞レベルにおいて、IIa, b, c



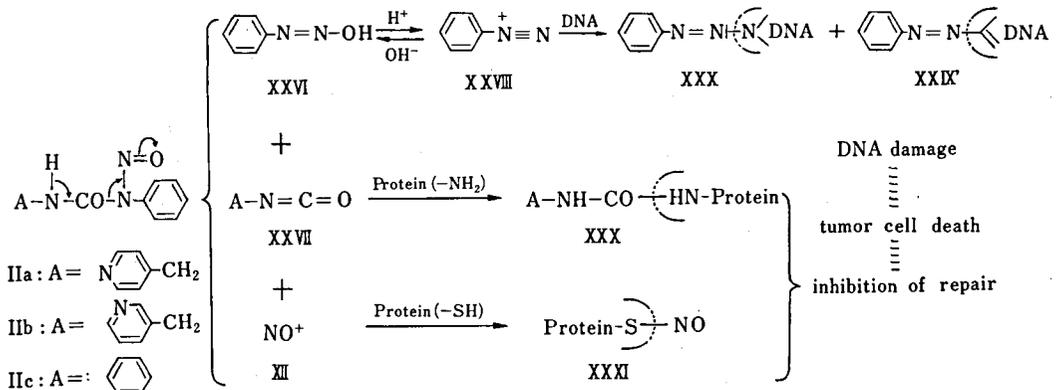


Chart 5. Antitumor action mechanism of Group B compounds having a 1-phenyl-1-nitrosoureido group

より生成が考えられる活性化学種は Chart 5 に示すように、phenyldiazohydroxide(XXVI)、相当する isocyanate (XXVII) および nitrosonium ion (XII) である。phenyldiazohydroxide (XXVI) は phenyldiazonium ion (XXVIII) となる。

phenyldiazohydroxide(XXVI) あるいは phenyldiazonium ion(XXVIII) は、DNA の活性点の HN< や HC< と反応し、phenyldiazo 化体(XXIX, XXIX') とし DNA の分断をひきおこす。また、isocyanate (XXVII) は、酵素蛋白質の活性アミノ基を carbamoyl 化し XXX とし、また、nitrosonium ion (XII) は、そのメルカプト基と反応し S=トロン化体 XXXI とすることなどにより、特に DNA 修復酵素の働きを阻害する。このように phenyldiazo 化によってひきおこされた DNA 障害は、DNA 修復酵素の阻害によって固定化され、腫瘍細胞死に進み、AH13 担癌動物の

life span を延長する。

このように B 群化合物の作用発現機構において、phenyldiazo 化と carbamoyl 化の両反応が関与していることは、次のような phenyldiazonium 塩と phenylisocyanate の併用投与実験によっても明らかにされた<sup>40)</sup>。

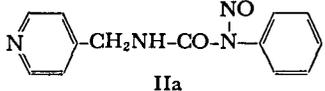
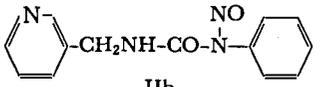
Table 6 に示すように、AH13 担癌ラットに phenyldiazonium hexafluorophosphate (XXXII) および phenylisocyanate(XXXIII) をそれぞれ単独投与しても延命効果はほとんどみられないが、両化合物の併用投与によって明らか延命効果が認められる。同様に、4-nitrophenyldiazonium tetrafluoroborate (XXXIV) と cyclohexylisocyanate (XXXV) の併用投与によっても延命効果が認められる。

IIc の投与後 1 時間で採取した AH13 細胞を顕微鏡下に観察すると、細胞核の障害が認められるが、その

Table 6. Combination therapy experiments with diazonium salts and isocyanates for AH 13 bearing rats

Compound	No.	Dose(mg/kg)	60 Days survivors	T/C %
<chem>c1ccccc1[N+]#N.[PF6-]</chem>	XXXII	10	0/6	125
<chem>c1ccccc1N=C=O</chem>	XXXIII	20	0/6	117
XXXII + XXXIII		10+20	1/6	>194
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc(N=[N+])cc1.[B-](F)(F)(F)F</chem>	XXXIV	50	0/6	132
<chem>C1CCCCC1N=C=O</chem>	XXXV	10	0/6	135
XXXIV + XXXV		50+10	1/6	>186

Table 7. Comparison of the antitumor activities of 1-phenyl-1-nitroso-3-(4-pyridylmethyl)-urea (IIa) and the 3-pyridylmethyl derivative (IIb) against AH 13 cells

Compound	Day 3 MTD(mg/kg)	Day 3-7 dose(mg/kg)	T/C %	60 Days survivors
 IIa	50	5	210	0/6
		10	190	1/6
		20	>413	5/6
		25	>629	1/6
		50	toxic	0/6
 IIb	100	5	141	0/6
		10	>332	2/6
		20	>317	2/6

障害像はこれらの diazonium 塩投与の場合と同じである<sup>40)</sup>.

4-pyridyl 体 IIa と 3-pyridyl 体 IIb の AH13 担癌ラットに対する抗腫瘍性の比較を Table 7 に示す。

IIa は 1 位核窒素の影響を強く受けているので IIb に比べてはるかに反応性に富んだ化合物である。しかしながら、Table 7 に示したように、IIa の方が IIb よりもわずかに高い抗腫瘍性を示しているにすぎない。この事実は、carrier group の電子効果の 4 位と 3 位という決定的な差が抗腫瘍活性にそれほど影響していないことを示している (III-1)。

(3) C 群化合物の作用発現機構

C 群化合物は 1-methyl-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)-urea (NO)CH<sub>3</sub> 誘導体であり、L1210 にのみ有効である。代表化合物 1-methyl-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)-

urea N-oxide<sup>15,41)</sup> (IIIa) と piperidine を含水アセトン中、室温に 3 日間放置すると、1% 以下の低収率ではあるが N-methylpiperidine (XXXVI) と 85% 以上の収率で carbamoyl 化体の 1,1-pentamethylene-3-(3-pyridylmethyl)urea N-oxide (XXXVII) が得られる。

IIIa は腫瘍細胞中で次のような機構で分解し、活性化学種として (1-oxido-3-pyridyl)methylisocyanate (XXXVIII), methyl diazohydroxide (XXXIX) および nitrosonium ion (XII) を生成する。XXXIX は methylcarbonium ion (XXXX) となる。これらの活性化学種は、A 群化合物の場合と同じように、DNA をメチル化し、また、修復酵素の活性を阻害する。このようにして腫瘍細胞死に進み、L1210 マウスの life span を延長する。

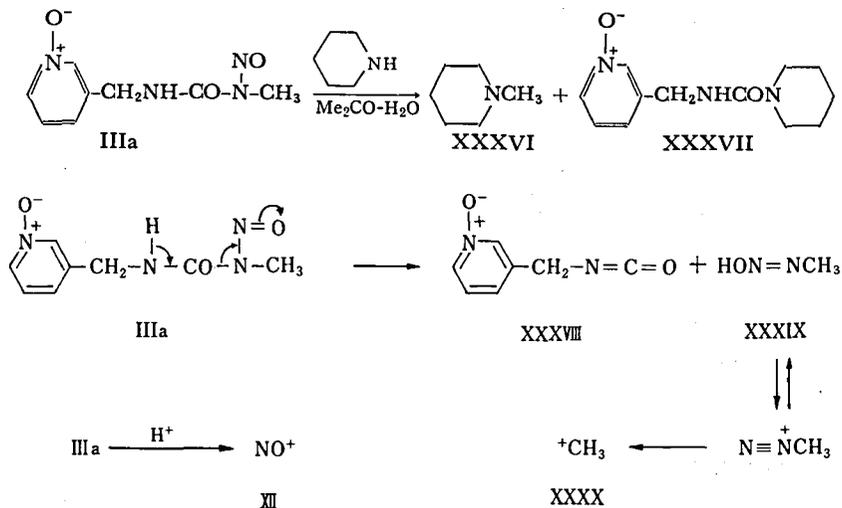


Table 8. Toxicity and anti-AH 13 activity (ip-ip system)

Compound No.	MTD (mg/kg)	MED (mg/kg)	MTD/MED	Anti-AH 13 activity	Solubility (mg/10 ml water)
Ia	100	2.5	40	+	105
Ib	50	10	5	++	30
Ib·tosylate	50	5	10	+	65
Ic	25	1	25	+	115
ACNU	50	5	10	+	

Toxic effect on Donryu rats and cytological effect on AH 13 cells were examined in one experiment to roughly estimate maximum tolerated dose (MTD) and minimum effective dose (MED). MTD was estimated by the observation for 1 week after a single injection. MED was determined by the minimum dose which caused abnormal mitotic figures in more than 50% of the cells in mitosis.

II-1,2,3 において、各群化合物とモデル化合物との化学反応様式より腫瘍細胞における各群化合物の作用発現機構を示した。一方、各群化合物の腫瘍細胞の DNA 障害を alkaline elution assay によって確認した。すなわち、ミリポアフィルターを用いて腫瘍細胞をのせ、細胞膜を溶かし DNA のみをフィルター上に残す。これにアルカリ液を流してアルカリに対し不安定になっている修飾 DNA 部分のみを分断し、その断片が pore から流出したところでその DNA 断片を検出する。本法によって三群化合物の腫瘍細胞への DNA 障害を比較すると、それぞれの化合物の作用様式、時間的経過、程度などに特徴がみられる<sup>42)</sup>。

#### (4) 抗腫瘍剤候補化合物の選出

次の A 群化合物 4 種のなかより、抗腫瘍活性が高く、薬剤としての安定性が高く、水溶性のある化合物を抗

腫瘍剤の候補として選出するため、ACNU を positive control として検討した<sup>16)</sup>。

Table 8 に示すように、Ia, Ib, Ib·tosylate, Ic の 1 回投与における最大耐量 (MTD)/最少有効投与量 (MED) 比を AH13 系で求めると、Ia が最大値を示した。このことは Ia が最も有効で、安全な投与量域を有していることになる。

Table 9 に ip-ip 系での投与 2 回のデータを、

Table 9. Anti-L 1210 activity (ip-ip system)

Compound No.	Treated on days		Survivors
	2 and 6		
Dose (mg/kg)	T/C (%)		
Ia	10	159	0/3
	20	>270	1/3
	40	>344	3/3
	80	>344	3/3
Ib	12.5	>262	1/3
	25	>365	3/3
	50	>321	2/3
	100	98	0/3
Ib·tosylate	6.25	177	0/3
	12.5	189	0/3
	25	>337	2/3
	50	>383	3/3
Ic	2.5	190	0/3
	5	213	0/3
	10	>365	2/3
	20	>431	3/3
ACNU	5	181	0/3
	10	>251	1/3
	20	>344	3/3
	40	>344	3/3

T/C % and survival were examined at 30 days after inoculation all experiments.

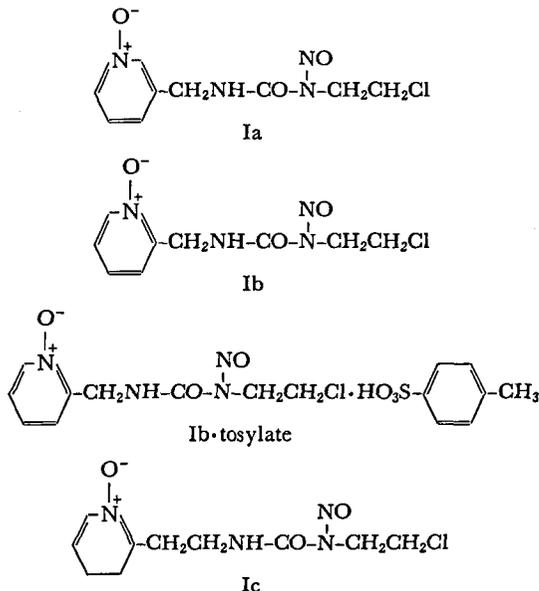


Table 10. Anti-L 1210 (ip-ip system)

Treated on days	I			1, 5, 9		
	Compound No.	Dose (mg/kg)	T/C (%)	Survivors	Dose (mg/kg)	T/C (%)
Ia	20	>300	2/6	9	174	0/6
	30	>413	6/6	13.5	203	0/6
	45	>413	6/6	20	>271	3/6
	66	>413	6/6	30	>326	6/6
	100	>357	5/6	45	>326	6/6
Ib	18	183	0/6	8	263	0/6
	27	>298	3/6	12	>371	5/6
	40	>311	4/6	18	>388	6/6
	60	>373	6/6	27	>388	6/6
	90	>225	1/6	40	>388	6/6
Ib-tosylate	20	>413	6/6	9	192	0/6
	30	>413	6/6	13.5	>305	5/6
	45	>413	6/6	20	>326	6/6
	66	>413	6/6	30	>326	6/6
	100	>211	2/6	45	>326	6/6
Ic	8	171	0/6	4	222	0/5
	12	231	0/6	6	>344	4/6
	18	>388	6/6	9	>378	6/6
	27	>388	6/6	13.5	>378	6/6
	40	>196	2/6	20	>378	6/6
ACNU	13.5	>335	5/6	6	183	0/6
	20	>373	6/6	9	>269	2/6
	30	>373	6/6	13.5	>373	6/6
	45	>373	6/6	20	>373	6/6
	66	>120	6/6	30	>373	6/6

Table 10 に ip-ip 系での投与 1, 3 回のデータを、Table 11 に ip 移植での iv (静脈内) や po (経口) 1 回投与におけるデータを示す。いずれの化合物も ACNU と同程度に著効を示したが、化学療法上および安定性が高いこと、また、水溶性があることなどより、Ia を抗腫瘍剤候補として選出し、さらに検討を進めることになった。

### III ニトロソ尿素誘導体の分解反応

#### (1) 細胞内反応と熱分解反応

II で述べたように、抗腫瘍性ジ置換ニトロソ尿素誘導体の腫瘍細胞中における分解反応は、脱プロトンによって開始される次の機構で進み、活性化学種を生成する。本反応はアルカリの存在によって促進される。

II-2, Table 7 に示したように、1-phenyl-1-nitroso-3-(4-pyridylmethyl)urea (IIa) の AH13 細胞に対する抗腫瘍活性は、その 3-pyridylmethyl 誘導体 (IIb) よりわずかに高い。しかしながら、IIa と IIb の化学反応性に関しては決定的な差がある。例えば、IIa を

methanol と加温すると窒素を放出しながら分解し、定量的収率で methyl N(4-pyridylmethyl)carbamate (IV) が得られる。この際、benzene, formaldehyde など生成する<sup>13)</sup>。

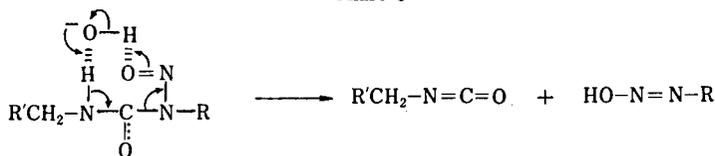
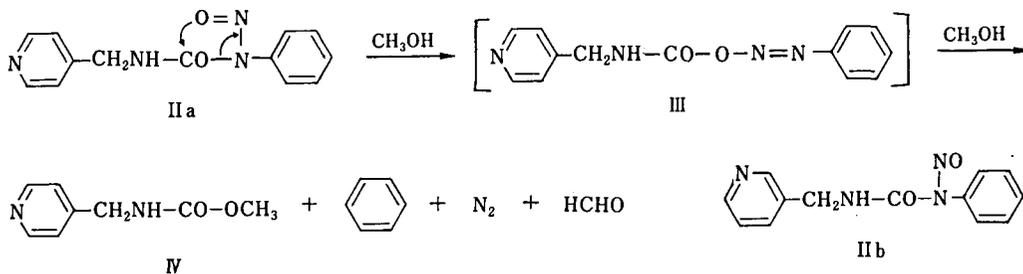
一方、3-pyridylmethyl 誘導体 (IIb) は methanol より再結晶ができるほど安定である。

すなわち、pyridine の 1 位核窒素によって活性化された IIa は、methanol 中で上に示した活性中間体、phenyldiazo N(4-pyridylmethyl)carbamate (III) に転位し、さらに分解が進む機構をとっていると考えられる。同様な転位機構が 1,3-diphenyl-1-nitroso-urea [ $C_6H_5NHCON(NO)C_6H_5$ ] の benzene 中の熱分解についても示された<sup>27)</sup>。(Chart 6)

methanol や benzene 中の IIa の熱分解は、相当する phenyldiazo carbamate への転位を経て進む機構をとるが、水や親水性基の多い腫瘍細胞中では、IIa は IIb と同様に脱プロトン機構で分解し活性化学種を生成するため、IIa と IIb の抗腫瘍活性にわずかの差しか出ないと考えられる。(Chart 7)

Table 11. Anti-L 1210 activity (ip-iv and ip-po system)

Treatment	Single iv on day 1			Single po on day 1			
	Compound No.	Dose (mg/kg)	T/C (%)	Survivors	Dose (mg/kg)	T/C (%)	Survivors
Ia		20	>177	1/6	30	137	0/6
		30	154	0/6	45	137	0/6
		45	>283	2/6	66	177	0/6
		66	>358	6/6	100	>247	2/6
		100	>319	4/6	150	>330	5/6
Ib		18	186	0/6	30	>286	3/6
		27	>376	5/6	45	>346	5/6
		40	>397	6/6	66	>358	4/6
		60	>397	6/6	100	>367	4/6
		90	>368	3/6	150	>220	2/6
Ib-tosylate		13.5	>229	2/6	27	201	0/6
		20	>288	2/6	40	>280	3/6
		30	>388	6/6	60	>340	5/6
		45	>388	6/6	90	>269	3/6
		66	>388	6/6	135	>322	4/6
Ic		12	155	0/6	18	>241	2/6
		18	185	0/6	27	>289	4/6
		27	>338	4/6	40	>340	5/6
		40	153	0/6	60	>347	4/6
		60	104	0/6	90	>213	2/6
ACNU		13.5	199	0/6	20	118	0/6
		20	>397	6/6	30	146	0/6
		30	>394	5/6	45	161	0/6
		45	>372	5/6	66	>301	4/6
		66	87	0/6	100	>356	6/6



また、I-2 で述べた抗腫瘍性トリ置換ニトロソ尿素誘導体 [一般式:  $R'R''CON(NO)R$ ] の、水や親水性基の多い場である腫瘍細胞中の分解反応では、おそらく、path A のように  $OH^-$  による加水分解型の機構を経て活性化学種を生成し、path B のような活性中

間体、phenyldiazo carbamate への転位を経る機構は通らないと考えられる。(Chart 8)

(2) ニトロソ尿素誘導体におけるニトロソ基の転位  
抗腫瘍性化学官能基、 $-NHCON(NO)CH_2CH_2Cl$  を有するニトロソ尿素は、酸によってその一部が加水

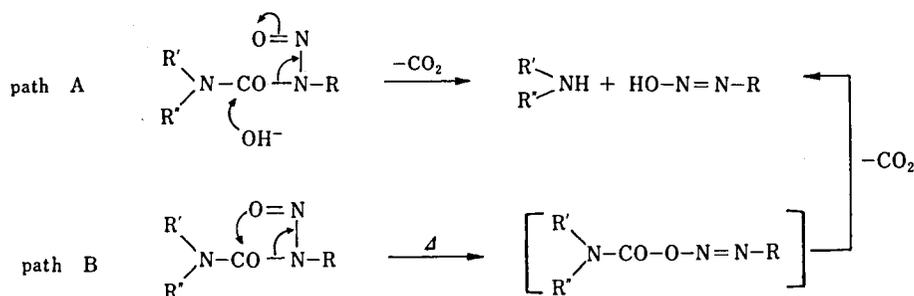


Chart 8

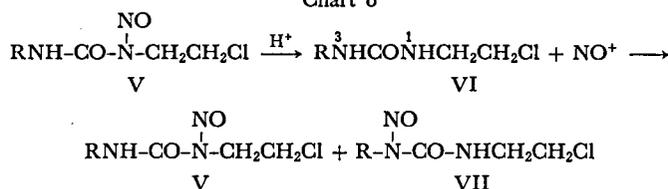


Chart 9

分解され、原料尿素 VI と nitrosonium ion となる。この nitrosonium ion は生成した原料尿素 VI をニトロソ化し、原料尿素的構造によっては N<sup>1</sup> ニトロソ体 V と N<sup>3</sup> ニトロソ体 VII を生成し、結局、N<sup>1</sup> ニトロソ基が N<sup>3</sup> 位に転位したこととなる。N<sup>3</sup> ニトロソ体 VII についても、N<sup>3</sup> ニトロソ基の N<sup>1</sup> 位への転位が起きうる。(Chart 9)

Table 12 に、1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea (IIb) を種々の media 中に放置した際の転位 3 ニトロソ体 VIII、回収 1 ニトロソ体 IIb および脱ニトロソ体 IX の収率を示す<sup>13)</sup>。

すなわち、10%塩酸、10%硫酸、ギ酸など強い酸の

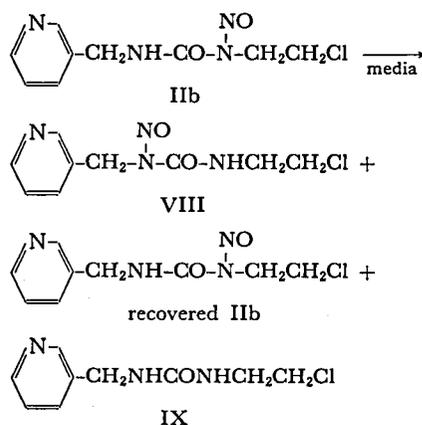
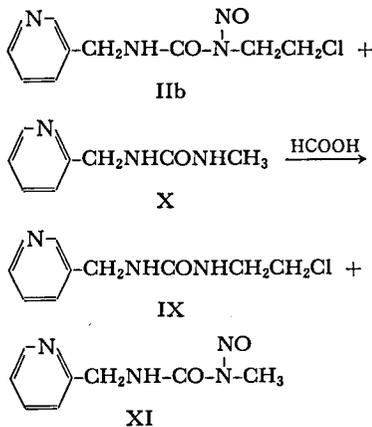


Table 12. Yields of the products in the rearrangement of 1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea (IIb) in various media

IIb (mg)	Media	Reaction <sup>a)</sup> conditions	Product (mg)	Yields (%)			
				Isomer (VIII)	Recovery (IIb)	Denitrosated compound (IX)	
200	10% HCl	0.5 ml	rt 2 d	183	28	49	16
200	10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 ml	rt 2 d	144	28	37	8
100	HCl in MeOH	0.5 ml	rt 2 hr	93	11	30	59
120	HCl in MeOH	1 ml	rt 2 d	65	—	—	62
80	AcOH	0.5 ml	rt 2 d	77	7	72	21
300	SOCl <sub>2</sub>	0.2 g	rt 2 d	226	11	41	26
100	SOCl <sub>2</sub>	0.2 g	rt 18 hr	95	16	65	16
400	POCl <sub>3</sub> (0.3 g) in CHCl <sub>3</sub>	5 ml	rt 2 d	320	—	80	—
360	POCl <sub>3</sub>	0.7 g	40° 1 hr	270	—	75	—
120	HCO <sub>2</sub> H	0.2 g	8—10° 1 d	117	14	71	14
120	HCO <sub>2</sub> H	0.2 g	40° 1 d	114	34	34	30
120	HCO <sub>2</sub> H (0.2 g) in CHCl <sub>3</sub>	0.4 ml	40° 1 d	114	40	40	21
60	HCO <sub>2</sub> H (50 mg) in CDCl <sub>3</sub>	0.5 ml	rt 2 d	—	3	97	—

なかでは転位が起きるが, phosphorus oxychloride 中では起きない. この種の転位反応は, N<sup>1</sup> および N<sup>3</sup> 置換基の立体効果によって支配される.

次に transfer-nitrosation の例をあげる. IIb と 1-methyl-3-(2-pyridylmethyl)urea(X) をギ酸に溶かし, 室温に放置すると, 脱ニトロソ体 IX と新しいニトロソ体の 1-methyl-1-nitroso-3-(2-pyridylmethyl)urea(XI) がそれぞれ 70% の収率で得られる. 同様に, 3ニトロソ体 VIII についても, X との transfer-nitrosation がある.



また, IIb と尿素をギ酸に溶かし放置しておく, 脱ニトロソ体 IX を 48% の収率で与える. これらの反応は, ニトロソ尿素がギ酸中で nitroso formate (HCOONO) を生成し, この nitroso formate が, 共存するよりニトロソ化され易い尿素誘導体をニトロソ化するもので, 酸による分子間転位反応と考えられる.

したがって, ニトロソ尿素系抗腫瘍剤の経口投与の場合, 胃中でその一部が脱ニトロソ化されるか, または, その原料尿素の構造によっては, その一部が無効な N<sup>3</sup> ニトロソ体に変わる.

以上, 三章にわたって合成化学研究部で実施した抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成と作用発現機構に関する化学的研究を中心として述べたが, 本研究の過程でこれらニトロソ尿素誘導体の新しい変換反応や閉環反応を多数見出した. これらの新反応については, 別に総説として発表するつもりである.

## 文 献

- 1) J. A. Montgomery: *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 651 (1976)
- 2) R. J. Weikam, Huey-Shin Lin: "Advances in Pharmacology and Chemotherapy," Vol. 19, p.

- 1, (Academic Press, Inc., 1982)
- 3) 神谷庄造: LIFE-CHEM, No. 2, p. 54 (1979)
- 4) 中尾秀雄, 福島正美, 清水総明, 荒川順生: 薬誌, **94**, 1032 (1974)
- 5) 横山正和: 癌と化学療法, **8**, 847 (1981)
- 6) 北原聡樹, 末吉貫爾, 馬島 尚: 癌と化学療法, **3**, 235 (1976)
- 7) J. Martinez, J. Oiry, J. L. Imbach, F. Winternitz: *J. Med. Chem.*, **25**, 178 (1982); T. P. Johnston, C. L. Kussner, R. L. Carter, J. L. Frye, N. R. Lomax: *J. Med. Chem.*, **27**, 1422 (1984)
- 8) J. C. Madelmont, D. Godeneche, et al.: *J. Med. Chem.*, **28**, 1346 (1985)
- 9) G. Eisenbrand, H. H. Fiebig, W. J. Zeller: *Z. Krebsforsch.*, **86**, 279 (1976)
- 10) 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1121 (1977)
- 11) 末吉祥子, 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1267 (1981)
- 12) 宮原 誠, 神谷庄造: 日本薬学会第 105 年会, 講演要旨集, p. 565 (1985, 金沢)
- 13) 神谷庄造, 宮原 誠, 宮原美知子: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 385 (1986)
- 14) 神谷庄造: 衛生試験, **101**, 119 (1983)
- 15) 神谷庄造, 末吉祥子: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1738 (1983)
- 16) 宮原美知子, 神谷庄造, 前川昭彦, 小田嶋成和: *Gann*, **70**, 731 (1979)
- 17) A. M. Criddle, R. Lamey, R. L. Heinz, H. G. Floss, J. M. Cassady: *J. Med. Chem.*, **23**, 848 (1980)
- 18) M. Berger, W. J. Zeller, G. Eisenbrand, Z. Lin: *Arzneim-Forsch-Drug Res.*, **32**, 481 (1982)
- 19) T. P. Johnston, G. S. McCalab, S. D. Clayton, J. L. Frye, C. A. Krauth: *J. Med. Chem.*, **20**, 279 (1977)
- 20) J. C. Madelmont, D. Godeneche, D. Parry, J. Duprat, J. L. Chabard, R. Plagne, G. Mathe, G. Maynie: *J. Med. Chem.*, **28**, 1346 (1985)
- 21) J. A. Montgomery, H. J. Thomas: *J. Med. Chem.*, **22**, 1109 (1979); T. P. Johnston, G. S. McCaleb, J. A. Montgomery: *J. Med. Chem.*, **6**, 669 (1963); 佐藤章, 和田 正, 今井良二, 中溝喜博: 日本薬学会第 98 年会, 講演要旨集, p. 240 (1978, 岡山)
- 22) Hing-Yat P. Lam, A. Begleiter, G. T. Goldenberg: *J. Med. Chem.*, **22**, 200 (1979)
- 23) A. M. Crider, K. L. Catherine, H. G. Floss, J. M. Cassady: *J. Med. Chem.*, **22**, 32 (1979)
- 24) 塚越 茂: "Experimental Studies on Nitrosourea Derivatives in Japan—A Review; 辻原健二, 大関正勝, 森川民雄: 第 39 回日本癌学会記事, 1980, p. 195; T. Suami, K. Tadano, W. T. Bradner: *J. Med. Chem.*, **22**, 314 (1979)
- 25) 辻原健二, 大関正勝, 森川民雄, 新井 淑久: *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2509 (1981)
- 26) 辻原健二, 大関正勝, 森川民雄, 赤地幸夫, 新井淑久: *J. Med. Chem.*, **25**, 441 (1982)
- 27) 宮原 誠, 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3466

- (1982)
- 28) 宮原 誠, 神谷庄造, 中館正弘: *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 41 (1983)
- 29) 宮原美知子, 学位論文 (1986, 東北大学)
- 30) 佐藤 博: *ファルマシア*, **14**, 219 (1978)
- 31) 佐藤 博, 市村宏子: *日本臨床*, **29**, 170 (1971)
- 32) 宮原美知子ほか: *衛生試報*, **96**, 91 (1978); **97**, 107 (1979); **98**, 123 (1980); **99**, 111 (1981)
- 33) 神谷庄造, 宮原美知子, 末吉祥子, 鈴木郁生, 小田嶋成和: *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3884 (1978)
- 34) 宮原美知子, 末吉祥子, 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5557 (1985)
- 35) K. W. Kohn: *Cancer Res.*, **37**, 1450 (1978)
- 36) R. A. G. Euig, *et al.*: *Cancer Res.*, **38**, 3197 (1978);
- L. C. Erickson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 467 (1980)
- 37) L. C. Erickson: *Nature*, **288**, 727 (1980); P. Robin, *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7743 (1983)
- 28) J. M. Heal, B. R. Franza, R. S. Schein: "Pharmacology of nitrosourea antitumor agents in clinical pharmacology of antineoplastic drugs," Ed. by H. M. Pinedo, p. 263 (Elsevier, 1978)
- 39) H. E. Kann, Jr.: *Cancer Res.*, **38**, 2363 (1978)
- 40) 宮原美知子, 宮原 誠, 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 564 (1984)
- 41) 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 2744 (1975)
- 42) 宮原美知子, 末吉祥子, 神谷庄造: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 188 (1986)

## フェノチアジン誘導体における置換基と逆相系充填剤に対する親和性の関係

松田りえ子・内山 充

## Relationship between Substituents of Phenothiazine Derivatives and their Affinity to Reversed Phase Column Packing

Rieko MATSUDA and Mitsuru UCHIYAMA

The structural retention relationship for phenothiazine derivatives was analyzed quantitatively by the multiple regression method. The capacity factor were measured on an octylsilanized silica column. Significantly high values of multiple regression R and ratio of variance F obtained with acetonitrile-water mobile phase. On the other hand, the values of R and F in the case of methanol-water were not significant. This suggests that the interaction between the two substituents must be taken into account in the latter case.

(Received May 31, 1986)

先に著者らは、多数のフェノチアジン誘導体およびフェノチアジン類の三環構造をもつ薬物について、逆相系充填剤における溶出挙動について報告した<sup>1)</sup>。そして、それらの置換基と充填剤への親和性との間に定性的な関係を見出した。今回は、置換基が比較的単純なものを数種選び、キャパシティーファクター( $k'$ )と部分構造の関係について定量的な解析を試みた結果を報告する。

## 実 験

## 試料および試薬

実験に用いた薬物は、それぞれ各社の自社規格品を

そのまま使用した。それらの構造を Fig. 1 に示す。

液体クロマトグラフ用の移動相の調製には、特級または液体クロマトグラフ用のメタノール、アセトニトリルを用いた。その他の試薬は特級のものをを用いた。

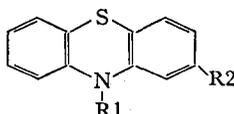
## 装 置

液体クロマトグラフの装置は日本分光 TRIROTOR、および UVIDEC II を使用し、カラムは LiChrosorb RP-8 (Merck, 5  $\mu$ m, 4 mm  $\times$  25 cm) を用いた。

$pK_a$  の測定には、Metrohm 社製、E336 電位差測定装置を使用した。

キャパシティーファクターの測定

各試料はそれぞれ 1 mg/ml のメタノール溶液とし、



	R1	R2
phenothiazine	-H	-H
fenethazine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{H}(\text{CH}_3)_2$	-H
promethazine	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-H
promazine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-H
alimemazine	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{H}(\text{CH}_3)_2$	-H
chlorpromazine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-Cl
levomepromazine	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	-OCH
prochlorperazine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NCH}_3 \end{array}$	-Cl
perphenazine	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	-Cl
dimethothiazine	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{N}(\text{CH}_3)_2$	$-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Fig. 1. Structure of phenothiazine derivatives

5  $\mu$ l を液体クロマトグラフに注入した。カラム温度 40°C, 移動相流速 0.8 ml/min で, 保持時間を測定した。移動相は 0.1% のリン酸を加えて pH をほぼ 2 とした 5 mM リン酸-アンモニウム溶液とメタノールまたはアセトニトリルの混液を用いた。メタノールの含量は 70, 80, 90%, アセトニトリルの含量は 50, 60, 70% とした。検出は 254 nm で行った。

試料の保持時間を  $t_R$ , 硝酸カリウムの保持時間を  $t_0$  とし, (1) 式によりキャパシティーファクター  $k'$  を求めた。

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

#### 解離定数 ( $pK_a$ ) の測定

本実験に用いたフェノチアジン誘導体は塩酸塩の状態では水に溶け易いが, 塩基の状態では水に不溶であるので, 塩酸塩の水溶液をアルカリで滴定すると, 沈澱を生じる。したがって水溶液中での滴定により  $pK_a$  を求めることは難しい。そこで Chatten ら<sup>2)</sup> の方法にしたがい, 水・メタノール混液中で滴定する方法で  $pK_a$  を求めた。操作法は以下のとおりである。約 300 mg の試料を水に溶かし, 5N 水酸化ナトリウム 1 ml を加えクロロホルムで抽出する。クロロホルムを減圧下で留去し, 残渣をメタノール 100 ml に溶かす。この液 10 ml に水とメタノールを加えて 100 ml とし, メタノール含量の 40~80% の溶液を調製する。25 ml をガラス電極で pH 測定しながら 0.01 N 塩酸で滴定し, 滴定曲線から, みかけの解離定数を求める。試料溶液中のメタノール濃度に対してみかけの  $pK_a$  をプロットし, ゼロに外挿して  $pK_a$  を求める。

#### 置換基の寄与の計算

分子の部分構造と  $k'$  の関係を解析するため, Chen<sup>3)</sup> らにしたがって, (2) 式のような線形モデルを仮定した。

$$\log k' = \sum_{i=1}^n b_i s_i + b_0 \quad (2)$$

$b_i$  は各置換基の  $\log k'$  への寄与を示すパラメータ,  $s_i$  は各置換基の置換状態を表すパラメータで, 分子中にその置換基が存在しないときにはゼロ, 置換しているときにはその個数の値を持つ。n は系の中に含まれる置換基の種類の数である。

$b_i$  を要素とするベクトルを  $B$ ,  $s_i$  を要素とするベクトルを  $S$  とすれば, (2) 式は次のように表される。

$$\log k' = B \cdot S + b_0 \quad (3)$$

k 個の試料 ( $k > n$ ) についてそれぞれ  $\log k'$  を求めれば, 多重相関の方法により,  $b_i$  の最適値を推定することができる。

計算は NEC PC-9801 マイクロコンピュータを用いて行った。

#### 結果および考察

Table 1 に各種の移動相で求めた  $\log k'$  の値を示す。逆相系カラムで一般的に見られるように, プロクロロペラジン, ベルフェナジンのように側鎖の炭素数が多くなるほど溶出は遅くなっており, またジメトチアジンのようにスルホンアミド基などの極性の置換基を持つものは溶出が早くなった。しかし, メタノールを含む移動相と, アセトニトリルを含む移動相で溶出順序が異なるものがあった。例えば 70% アセトニトリルでは, フェネタジン, プロメタジン, プロマジン, アリメマジンの順に溶出するが, 70% メタノールではプロメタジンとアリメマジンの溶出が相対的に早くなっている。この 2 種の化合物は側鎖に分岐したメチル基を持っているのが特徴である。通常メチレン基またはメチル基と分岐したメチル基の  $\log k'$  への寄与の違いについて明らかにするため以下の計算を行った。

置換基の  $\log k'$  への寄与を計算するためのモデルを

Table 1. Log  $k'$  values of phenothiazine derivatives

Compound	Eluent					
	Acetonitrile-water			Methanol-water		
	50%	60%	70%	70%	80%	90%
phenothiazine	0.6978	0.3948	0.1677	0.2562	-0.1165	-0.3776
fenethazine	0.7656	0.5928	0.4300	0.4367	0.2535	0.1065
promethazine	0.8428	0.6327	0.4410	0.3900	0.2096	0.0364
promazine	0.8558	0.6514	0.4529	0.5245	0.3151	0.1519
alimemazine	0.9219	0.6899	0.4866	0.4210	0.2135	0.0340
chlorpromazine	0.9972	0.7543	0.5292	0.5626	0.3424	0.0980
levomepromazine	0.9217	0.6907	0.4867	0.4132	0.1513	-0.0109
prochlorperazine	1.2499	1.0142	0.6775	0.8605	0.6629	0.4736
perphenazine	0.9705	0.7138	0.4676	0.4684	0.3097	0.2192
dimethothiazine	0.7498	0.5338	0.3356	0.0937	-0.1370	-0.2201

Table 2.  $S_i$  values for phenothiazine derivatives

Compound	$S_i$							
	1	2	3	4	5	6	7	8
phenothiazine	0	0	0	0	0	0	0	0
fenethazine	2	0	1	0	0	0	0	0
promethazine	2	1	1	0	0	0	0	0
promazine	3	0	1	0	0	0	0	0
alimemazine	3	1	1	0	0	0	0	0
chlorpromazine	3	0	1	0	0	1	0	0
levomepromazine	3	1	1	0	0	0	1	0
prochlorperazine	3	0	0	1	0	1	0	0
perphenazine	3	0	0	0	1	1	0	0
dimethothiazine	2	1	1	0	0	0	0	1

## Keys

- 1:  $-\text{CH}_2-$  or  $-\text{CH}<$     2:  $-\text{CH}_3$     3:  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$   
 4:  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_3$     5:  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$   
 6:  $-\text{Cl}$     7:  $-\text{OCH}_3$     8:  $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Table 2 に示す。  $-\text{CH}_2-$  または  $>\text{CH}-$  はすべて同等のものを見なしたが、分岐した  $-\text{CH}_3$  は別のものとして扱った。その他の置換基は  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_3$ ,  $-\text{Cl}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$  で置換基の数  $n$  は 8, 化合物の数  $k$  はフェノチアジンを含めた 10 で計算した。

Table 3 に計算の結果を示す。アセトニトリルを含む移動相ではどの混合比においても、寄与率  $R$  は 0.9999 以上、危険率 5% 以下で有意の結果が得られた。各化合物の  $\log k'$  の計算値と実測値はよく一致した。一方、メタノールを含む移動相から得られた結果では、寄与率  $R$ , 分散比  $F$  共にアセトニトリルの場合よりも低くなった。特に、分岐したメチル基を持つ化合物については計算値と実測値が一致しなかった。

Fig. 2 に各置換基の  $\log k'$  への寄与について、移動相中の有機溶媒の含量による変化を示した。  $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$  基はいずれの移動相においても大きな負の値を持ち、有機溶媒の含量にも影響を受けない。これに対し、  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ,  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_3$ ,  $-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  の寄与は有機溶媒の含量の少ない場合には負の値を持つが、有機溶媒の増加とともに値が増加して正の値を持つようになる。これは、移動相中の水の量が減少するとアミノ基のプロトン化が抑制され、極性が低下するためと考えられる。  $-\text{Cl}$  の寄与はアセトニトリル中では  $-\text{CH}_2-$  よりも大きい、メタノール中では  $-\text{CH}_2-$  と同程度の値を与えた。

メチル、メチレン基については、アセトニトリルを含む移動相中では、  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$  共に正の寄与を持ち、アセトニトリルの増加と共に値は減少した。しかし、メタノールを含む移動相中では  $-\text{CH}_3$  の寄与は負であった。これは溶出挙動から予想されることであるが、  $-\text{CH}_3$  が置換すると溶出が遅くなるという逆相系カラム一般の現象とは矛盾している。

この原因として、側鎖末端のアミノ基のメタノール・水中での解離状態が、分岐した  $-\text{CH}_3$  基の存在により変化していることが考えられる。これを確かめるため、実験の部に示した方法により、メタノール・水中でのみかけの  $pK_a$  の測定を行った。測定結果およびゼロに外挿した値を Table 4 に示す。メタノール含量ゼロに外挿した値は、フェノチアジン環の N 原子とアミノ基の間に 3 個の C 原子を持つもの（プロマジン、アリメマジン）が 2 個の C 原子を持つもの（フェネタジン、プロメタジン）よりも  $pK_a$  がほぼ 0.5 大きく、メタノールを加えた状態でもこの関係は同じであ

Table 3. Value of calculated substituent contribution

	Eluent					
	Acetonitrile-water			Methanol-water		
	50%	60%	70%	70%	80%	90%
0	0.698	0.395	0.168	0.256	-0.117	-0.378
1	0.084	0.058	0.034	0.059	0.030	0.022
2	0.071	0.039	0.031	-0.075	-0.075	-0.094
3	-0.098	0.083	0.183	0.076	0.328	0.453
4	0.155	0.343	0.332	0.374	0.648	0.828
5	-0.125	0.043	0.122	-0.018	0.295	0.574
6	0.144	0.103	0.075	0.052	0.041	-0.042
7	-0.003	0.001	0.001	-0.022	-0.075	-0.057
8	-0.090	-0.098	-0.115	-0.282	-0.333	-0.244
R	0.9999	1.0000	1.0000	0.9989	0.9993	0.9994
F	838	29964	2825	55	85	103

keys are the same as those in Table 2

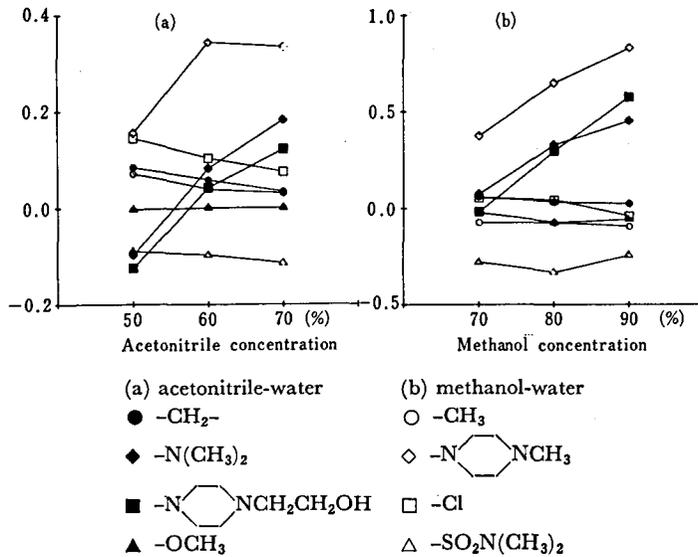


Fig. 2. Effect of the composition of eluent on the substituent contribution

Table 4. Apparent  $pK_a$  values of phenothiazine derivatives in methanol-water mixture and the extrapolated values

	Methanol content (%)					
	80	70	50	40	30	0*
fenethazine	7.40	7.61	7.87		8.25	8.70
promethazine	7.53	7.70	8.01	8.19		8.80
promazine	7.96	8.08	8.45	8.65		9.33
alimemazine	7.78	8.03	8.31	8.57		9.31

\* extrapolated value

った。したがって $-\text{CH}_3$ のアミノ基の解離状態への影響はないと考えられ、 $-\text{CH}_3$ 基の置換による $\log k'$ の減少については、別の機構を考える必要がある。

### 結 論

逆相液体クロマトグラフィーにおける、フェノチアジン誘導体の置換基と $\log k'$ の関係を線形モデルを仮定して解析する方法は、アセトニトリル・水系の移動相では良い結果を得た。個々の置換基について得られた値はカラム特性の比較、移動相の最適化等を行うときの有用なパラメータとなると思われる。しかし、メタノール・水の移動相では有意な結果が得られず、

$\log k'$ と置換基の関係を線形結合モデルで表わすことは不適切であると考えられる。おそらく、2つの置換基と移動相溶媒の間の相互作用を表わすパラメータを導入することが必要であろう。

### 文 献

- 1) R. Matsuda, M. Tatsuzawa and A. Ejima: *Iyakuhin Kenkyu*, **16**, 136 (1985)
- 2) L. G. Chatten and L. E. Harris: *Anal. Chem.*, **34**, 1495 (1962)
- 3) B.-K. Chen and C. Horvath: *J. Chromatogr.*, **171**, 15 (1979)

固形製剤の分析自動化の試み。  
ラボラトリーロボットを用いた自動分析の精度について

香取典子・松田りえ子・武田 寧・内山 充

Laboratory Automation for Analysis of Solid Pharmaceuticals,  
Precision of Automated Analysis by Laboratory Robot System

Noriko KATORI, Rieko MATSUDA, Yasushi TAKEDA and Mitsuru UCHIYAMA

Diazepam tablets were analyzed automatically by a laboratory robot system and the precision and accuracy studied. The robot system was programmed to weight the tablet and prepare a sample solution. The diazepam in the sample solution was determined by HPLC. Data were processed by a personal computer after transference from the robot and HPLC via a RS232C interface. The reproducibility of dispensing solvent and weighing tablets was about 0.1% (CV), and total reproducibility of analysis was 0.7—1.2% (CV). These results showed that the robot system is applicable in weight variation and content uniformity tests.

(Received May 31, 1986)

製剤分析において、分析試料の前処理は、その手順の煩雑さと処理過程の複雑さから、これまで自動化のほとんどされていない分野であった。今回著者等は近年開発されたラボラトリーロボットを使用し、煩雑で画一的な固形製剤の前処理の自動化を試みた。使用したのはザイマーク社のザイメイトシステムで、ロボットアーム、分注装置、ボルテックスミキサー、入出力制御装置およびこれらを制御するコントローラーなどから構成されており、人間の動作をシミュレートするようにプログラム可能である。また、各種インターフェースを用いることにより、天秤、外部コンピュータ等とデータのやり取りを行うことができる。また、分析の自動化に際し、必然的に生じる大量の実験データを迅速に誤りなく処理するため、データを一括してパーソナルコンピュータに転送し処理することとした。

今回、ジアゼパム錠の重量偏差試験および含量均一性試験の自動化を行い、またそのさい秤量および分注の再現性、またそれら全てを含めた定量分析の精度について検討した。なおジアゼパムの定量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。

## 実験の部

### 1. 装置 (Fig.1 参照)

#### I ザイメイトシステム

- 1) ロボットアーム
- 2) コントローラー

- 3) リモートコントローラー
- 4) ゼネラルパーパスハンド (G.P. ハンド)
- 5) シリンジハンド (S. ハンド)
- 6) マスターラポステーション (MLS)
- 7) パワー & イベントコントローラー
- 8) ボルテックスステーション
- 9) リモートディスペンサー

#### II 天秤

メトラー AE100

(入出力用インターフェース付)

#### III パーソナルコンピュータ

NEC PC9801

NEC PC-8801-mk-II

#### IV ハンドヘルドコンピュータ

エプソン HC20

#### V ポケットコンピュータ

シャープ PC-1350

#### VI HPLC

ポンプ：島津 LC6A, UV 検出器：島津 SPD-6A,  
オートサンプラー：島津 SIL-6A, カラム恒温槽：島津 CTO-6A, データ処理装置：島津 C-R3A (RS232C  
インターフェース付), コントローラー：島津 SCL-6A

### 2. 測定条件

カラム：Unicil C8

移動相：アセトニトリル・0.05M リン酸

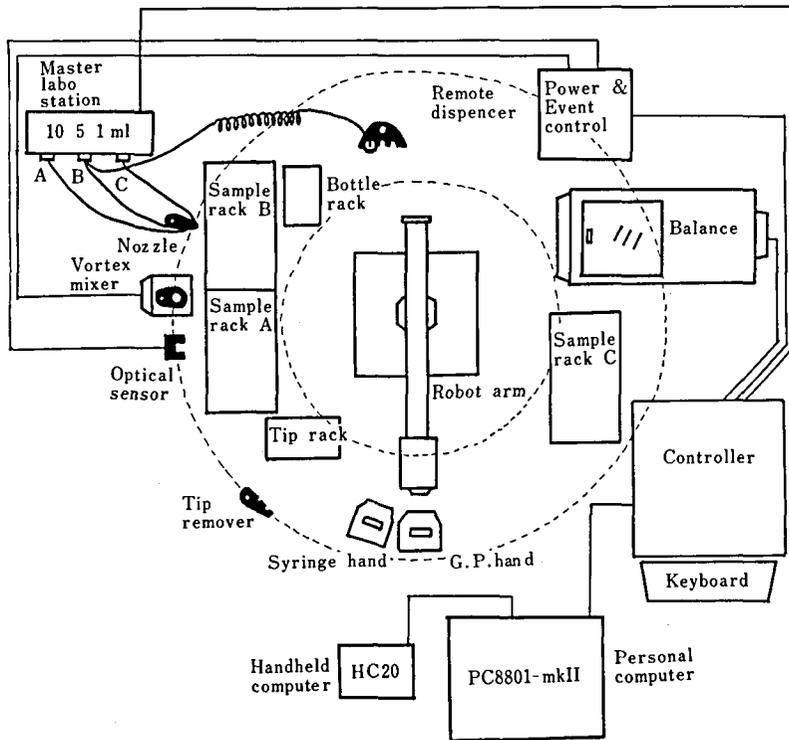


Fig. 1. Layout of laboratory robot for weight variance and content uniformity test of diazepam tablets

アンモニウム (4:6)

流速: 1 ml/min

検出: 260 nm

内部標準: プロピルパラベン

注入液量: 2~5  $\mu$ l

### 3. 試料の調製

あらかじめ試験管の空重量を測定しておき、次に、錠剤を入れた試験管の重量を測定し、差を錠剤重量とする。錠剤の入った試験管に水 1 ml を加え、錠剤が完全に崩壊するまで断続的に攪拌し、必要があれば超音波を照射する。次に内部標準液 (プロピルパラベン, 1 mg/ml, エタノール) 1 ml およびエタノール 5 ml を加え、超音波を約 2 分間照射した後良く攪拌する。これを遠心分離し、上清を取り、試料溶液とする。標準溶液は、試料および水の代わりにジアゼパム溶液 (2 mg/ml, エタノール) 1 ml, 内部標準液 1 ml およびエタノール 5 ml を加え、良く攪拌しこれを用いた。

### 4. データの転送および処理

データの転送および処理の方法は Fig. 2 に、またその際使用したインターフェースを Fig. 3 に示した。

本来ならば測定データは直接ホストコンピュータである PC9801 に転送するのが望ましいが、それらが近接した場所がないことと、PC9801 を他の用途にも用いることがしばしばあるため、中間媒体として手持ちのハンドヘルドおよびポケットコンピュータを用い、データを一時格納した。

#### 1) 秤量データ転送

データは天秤からカレントループインターフェース (CL) を通じザイメイトシステムのコントローラーに送られた後、RS232C インターフェース (RS232C) を通じて PC8801-mk-II へ送られ、試料名と共にフロッピーディスクに一旦格納される。その後、ハンドヘルドコンピュータを介して PC9801 へ転送した。

#### 2) HPLC から得られる定量データの転送

データ処理装置により計算された定量値、サンプルナンバーおよびレポートナンバーは、RS232C を通じていったんポケットコンピュータに格納後、さらに PC9801 へ転送した。

#### 3) データの処理

PC9801 に転送されたデータは、計算・作表用ソフ

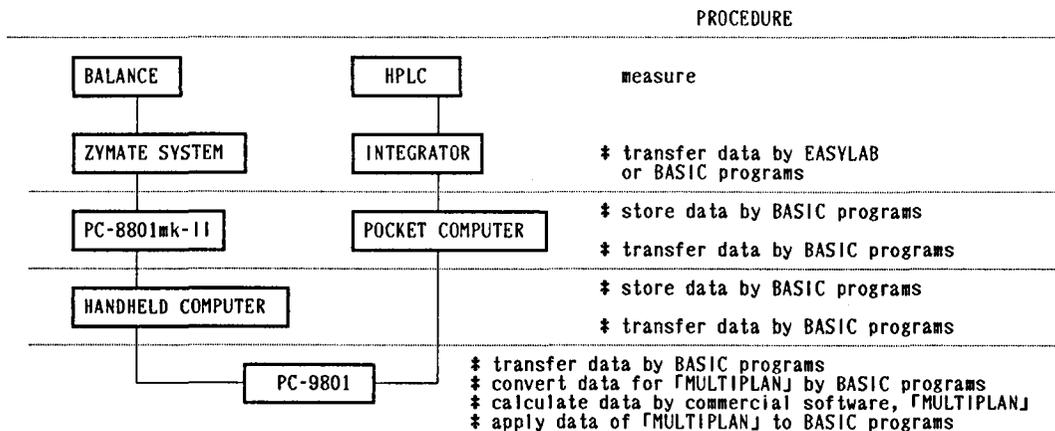


Fig. 2. Procedure of data transferring and processing

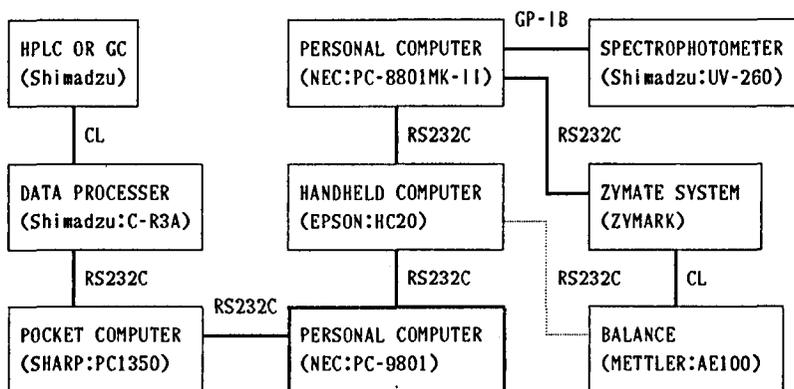


Fig. 3. Interface used to transfer data

「マルチプラン」用に変換され処理された。また、「マルチプラン」上のデータを利用するために、MS-DOS/N88BASIC(86)を用いて開発した統計処理およびグラフ作成用ソフトを用い、データの処理を行った。

### 結果および考察

ザイメイトシステムの再現性

#### I 分注精度

##### 1) MLS の分注精度

3種の溶媒、水、エタノールおよびクロロホルムの分注精度を重量法により試験した。MLSには1,5および10mlのシリンジを装着した。それぞれのシリンジをフルにストロークさせたときの水の分注精度をTable 1に、また5ml(B)のシリンジを用いて1mlずつを押し出していったときの1往復毎の再現性と目盛り毎の再現性の比較をTable 2に示した。1mlを分注する際は、1mlのシリンジを用いるよりもむしろ5mlのシリンジを用い、いつも同じ目盛りを往復

Table 1. Precision of dispensing water by syringe unit (MLS)

syringe volume	by syringe unit (MLS)		
	A 10ml (ml)	B 5ml (ml)	C 1ml (ml)
No. 1	9.8647	5.0113	0.9952
2	9.8630	5.0069	0.9922
3	9.8645	5.0069	0.9913
4	9.8628	5.0058	0.9988
5	9.8639	5.0071	0.9922
6	9.8667	5.0076	0.9964
7	9.8646	5.0090	0.9964
8	9.8665	5.0084	0.9950
9	9.8656	5.0094	0.9961
10	9.8740	5.0088	0.9952
AVERAGE	9.8656	5.0081	0.9949
MAX	9.8740	5.0113	0.9988
MIN	9.8628	5.0058	0.9913
CV(%)*	0.03	0.03	0.23

\* coefficient of variance

Table 2. Precision of dispensing water by 5 ml syringe (B)

position	No.	1 (ml)	2 (ml)	3 (ml)	4 (ml)	AVERAGE (ml)	CV (%)
5-4		0.9120	0.9305	0.9523	0.9511	0.9365	2.04
4-3		1.0057	1.0053	1.0043	1.0052	1.0051	0.06
3-2		1.0068	1.0043	1.0035	1.0020	1.0041	0.20
2-1		1.0054	1.0052	1.0046	1.0037	1.0047	0.08
1-0		1.0742	1.0455	1.0222	1.0222	1.0410	2.37
AVERAGE		1.0008	0.9982	0.9974	0.9968		
CV(%)		5.77	4.18	2.65	2.69		

Table 3. Precision of dispensing solvents by syringe unit (MLS)

syringe volume n	A 10ml 10	B 5ml 10	B 1ml* 4	C 1ml 10
water				
x (ml)	9.8659	5.0081	1.0051	0.9949
CV(%)	0.03	0.03	0.06	0.23
ethanol				
x (ml)	9.9616	5.0132	1.0057	0.9897
CV(%)	0.02	0.02	0.03	0.49
chloroform				
x (ml)	9.8032	4.9366	0.9908	0.9775
CV(%)	0.69	0.16	0.03	0.1

\* dispensed with 5ml syringe

しているほうが変動係数が小さいことが示された (Table 3). 10 ml および 5 ml を分注する際の変動係数は水 0.03%, エタノール 0.02%, クロロホルム 0.16~0.69% と非常に良いことが分かった (Table 3). クロロホルムの分注精度が他の溶媒に比べて悪いのは蒸発による誤差が大きいためと推察される。

## 2) S. ハンドの分取精度

溶液分取の再現性を色素の水溶液を用いて検討した。S. ハンドには 1 ml のシリンジを装着してあり、先にピペットチップを付け液体を採取できるようになっている。採取容量の正確さを検討するため、0.05 ml から 0.45 ml まで 0.05 ml ずつ容量を変えブromクロゾールグリーン溶液を分取し、5.0 ml に希釈してその吸光度を測定した。その結果設定した容量と吸光度の相関係数は 0.9999 以上 (Fig. 5) と高い精度が示された。また、重量法により 0.5 ml を採取したときの再現性を検討したが、変動係数 0.3% (Table 4) と良い値が得られた。

## II 秤量精度

秤量は 5 個の錠剤につき行った。天秤は 0.1 mg まで測定できるものを用い、測定値は 2 秒毎に検出し、前に送られたデータと 0.1 mg の桁まで一致したところで秤量値として外部コンピュータへ転送した。測定方法は、まず空の試験管重量を測定し、次に試料の入

Table 4. Precision of syringe hand

No.	volume (ml)	% average
1	0.5012	99.55%
2	0.5036	100.02%
3	0.5044	100.18%
4	0.5026	99.82%
5	0.5031	99.92%
6	0.5053	100.36%
7	0.5037	100.04%
8	0.5030	99.90%
9	0.5025	99.80%
10	0.5036	100.02%
11	0.5053	100.36%
12	0.5056	100.42%
13	0.5039	100.08%
14	0.5070	100.70%
15	0.5030	99.90%
16	0.5032	99.94%
17	0.5022	99.74%
18	0.5028	99.86%
19	0.5019	99.69%
20	0.5018	99.67%
AVERAGE	0.5035	100.00%
MAX	0.5070	100.70%
MIN	0.5012	99.55%
CV		0.29%

った試験管の重量を測定しその差を試料重量とした。その結果、秤量の変動係数は 0.04~0.3% であった (Table 5)。測定値の安定するまでの時間が長いとき

ONE TABLET

- ↓ WEIGH
- ↓ ADD 1ml OF H<sub>2</sub>O
- ↓ DISINTEGRATE
- ↓ ADD 1ml OF IS.
- ↓ ADD 5ml OF EtOH
- ↓ MIX
- ↓ ULTRASONICATE FOR 2min
- ↓ MIX
- ↓ CENTRIFUGE FOR 5min
- SUP
- ↓ TRANSFER 0.8ml TO TUBE
- ↓ HPLC

Fig. 4. Procedure for preparation of sample solution for content uniformity test

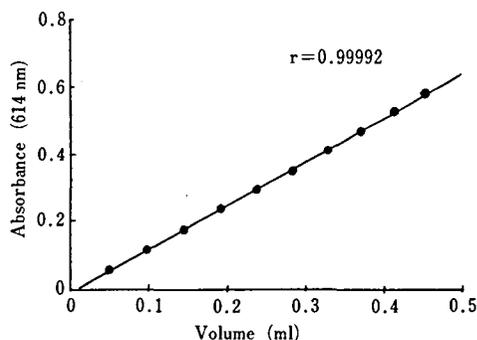


Fig. 5. Precision of syringe hand

Table 5. Reproducibility of measurement of tablets weight

No.	TAB 1 (g)	TAB 2 (g)	TAB 3 (g)	TAB 4 (g)	TAB 5 (g)
1	0.1484	0.1495	0.1484	0.1484	0.1491
2	0.1483	0.1496	0.1483	0.1485	0.1489
3	0.1483	0.1497	0.1482	0.1483	0.1491
4	0.1483	0.1490	0.1475	0.1483	0.1490
5	0.1483	0.1490	0.1475	0.1483	0.1490
6	0.1483	0.1490	0.1475	0.1483	0.1494
7	0.1484	0.1490	0.1475	0.1484	0.1487
8	0.1482	0.1497	0.1475	0.1484	0.1489
9	0.1483	0.1496	0.1476	0.1484	0.1490
-----					
AVERAGE	0.1483	0.1493	0.1478	0.1484	0.1490
MAX	0.1484	0.1497	0.1484	0.1485	0.1494
MIN	0.1482	0.1490	0.1475	0.1483	0.1487
CV(%)	0.041	0.22	0.27	0.05	0.13

Table 6. Reproducibility of assay of diazepam tablets

sample No.	n	average weight (mg)	drug content (mg/g)	CV (%)
1	20	111.2	18.48	1.17
2	20	186.4	11.38	1.13
3	20	222.0	28.79	0.64

は、変動も大きいことから、水分の吸着などが精度悪化の原因になると考えられる。

Ⅲ 定量精度

ジアゼパム錠20錠をとり粉末とした後その一部をとり Fig. 4 の方法で20回定量を行った。その結果、全過程を通じての定量精度は、変動係数0.7~1.2%であった (Table 6)。

ま と め

化学分析にラボラトリーロボットシステムを用いる

試みは、近年幾つか報告されている<sup>1-4)</sup>。今回ジアゼパム錠の重量偏差試験および含量均一性試験を自動化する目的で、ラボラトリーロボットシステムの使用を試みた。固形製剤を分析するためには単純で煩雑な手作業が必要であるが、ロボットを用いることによりこれらの作業を自動化することに成功した。ロボットの利点は、分析精度が良いことと、他の全自動フローシステムなどより、作業内容の変更が比較的容易でプログラミングが簡単なことである。また、手持ちの実験機器を接続して使用することも可能である。欠点は力

仕事のできないことと、本体および付属品の価格が高価なことである。コントローラーのメモリが小さいため複雑な計算を行ったり、大量のデータを格納することはできないが、コンピュータインターフェースを通じて外部コンピュータとデータをやり取りすることで、この問題は解消できる。高速液体クロマトグラフや天秤等から得られるデータをオンラインまたはオフラインで一括処理することにより、手入力によるミスと時間のロス無くすることができた。各種機器を接続し、データの転送を行うためには、RS232C が最も汎用性があり、プログラミングも容易であった。計算および作表は、市販のソフトを使用した。計算結果を他のプログラムに流用できることで、自作の作図あるいは

統計処理プログラムが十分に活用できた。

## 文 献

- 1) Advances in laboratory automation-robotics 1984, edited by J. R. Stirimaitis and G. L. Hawk, Zymark Corporation, Hopkinton, MA., USA (1984)
- 2) Advances in laboratory automation-robotics, vol. 2, 1985, edited by J. R. Stirimaitis and G. L. Hawk, Zymark Corporation, Hopkinton, MA., USA (1985)
- 3) C. H. Lochmuller, K. R. Lung, M. R. Cushman: *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 429 (1985)
- 4) 清水礼治, 松尾賢明, 宮本尚明, 島岡幸男, 真野秀幸, 伴野 清, 藤川芳己: 医薬品研究16(5)1124, (1985)

## セファレキシン製剤の安定性

香取典子・吉岡澄江・内山 充

### Stability of Pharmaceuticals of Cephalexine

Noriko KATORI, Sumie YOSHIOKA and Mitsuru UCHIYAMA

Cephalexine (CEX) is one of the most popular antibiotics and is used as tablets, capsules and dry syrups. In this paper, the stability of commercial preparations; seven capsules, three tablets and four dry syrups were studied. The results indicated that the stability of CEX preparations was seriously effected by humidity. Dry syrup C, which only contains a citrate mixture, showed rapid CEX decomposition accompanied by an increase in water content, suggesting that the citrate acted not as a catalyst but as a water absorbent. The degradation pattern of CEX in dry syrup C at 75% RH was S-shaped. Two degradation products of CEX were isolated and identified. The formation of degradation products in the solid state was remarkably different from that in the aqueous solution, suggesting that the mechanism of CEX degradation in the solid state differs from that in solutions.

(Received May 31, 1986)

固形製剤の品質上の問題点である主薬の安定性を論ずるには、固体状態での安定性を検討する事が必須である。製剤の固体状態の安定性に影響を与える要因の主なものとしては、温度、湿度、酸素分圧および共存する添加物などが上げられる。

セファレキシン (CEX) は  $\beta$ -ラクタム環を有する抗生物質で、錠剤、カプセル剤およびシロップ剤として常用されている。溶液状態における CEX を含むセファロsporin類の安定性については詳細な報告が幾つかなされている<sup>1-6)</sup>。しかしながら、固体状態における安定性、とくに分解機構についてはほとんど報告されていない。

今回、著者等は CEX の固体状態における分解対

する湿度および賦形剤の分解速度に与える影響について検討を行った。

## 実 験 の 部

### 1. 試 料

結晶 CEX は武田薬品工業より供与されたものをそのまま用いた。錠剤は3社 (250 mg 錠, 500 mg 錠)、カプセル (250 mg) は5社、ドライシロップ (10%) は4社より提供されたものを用いた。他の試薬は市販の特級品を用いた。

### 2. 定量法

CEX およびその分解物は液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。装置はポンプ: 日立 655,

UV 検出器：日立 638, 注入器：レオダイン製, 定量は絶対検量線法により行い, 検量線は毎回作成した。

### HPLC 条件

カラム：TSK gel-410, 4×200 mm

移動相：A：12% アセトニトリル/0.05M リン酸緩衝液 (pH 3.7)

B：40% メタノール

流速：1 ml/min

検出：260 nm

注入量：20  $\mu$ l (ループ)

### 試料溶液の調製

カプセル剤および錠剤はカプセルを取り去るかまたは粉碎して粉末状にした後, 水・メタノール (1:1) 混液を加えよく攪拌したのち超音波処理を行い, 遠心分離した上清をとり CEX 濃度が 10~20  $\mu$ g/ml となるよう希釈し試料溶液とする。シロップおよび結晶は水およびメタノールを用い溶解したのち同様に処理した。

### 3. 安定性試験

錠剤およびカプセル剤はジャーレに入れ, 飽和塩溶液を用いて調湿したデシケーター中に置く。ドライシロップおよび結晶は, その 200~500 mg を厚さが均

一になるよう秤量瓶へ入れ, 前報<sup>7)</sup>と同様の装置を用いて試験を行った。溶液は密封できる蓋付き試験管へ入れ, 恒温槽中に放置した。試料はサンプリング後, すみやかに氷冷し 4°C で保存した。なお, 水分含量はサンプリング後, 直ちにカールフィッシャー法により測定した。

## 結果および考察

### 1. 市販の CEX 製剤の安定性

市販の CEX カプセルおよび錠剤を, 温度 60°C, 湿度 60 または 80% 相対湿度 (RH) 下で 3 カ月保存したときの CEX 残存量を Table 1 に示した。湿度が 60% RH の場合には, CEX の分解はほとんど起こらなかったのに対し 80% RH ではすべての製剤について 10~80% 程度の CEX の含量減少が観察された。この時の CEX の分解率は製剤間で著しく異なり, 配合された賦形剤の湿度に対する性質の差が, CEX の安定性に影響を与えることが示唆された。また, 市販のドライシロップを温度 60°C, 湿度 75% RH で 7 日間放置した結果, Table 2 に示したとおり 1 製剤 (C) のみが水分増加を伴う著しい CEX 分解を示した。このことから, 吸着した水分が CEX 分解に大きな

Table 1. Degradation of CEX in commercial preparations in the solid state

sample	dose (mg)	percent remaining	
		60°, 60%RH 3month (%)	60°, 80%RH 3month (%)
capsule			
a	250	99.0	69.3
b	250	101.2	85.9
c	250	99.0	18.0
d	250	95.1	66.0
e	250	96.6	65.9
f	125	96.7	28.0
g	500	95.3	62.3
tablet			
h	250	98.3	41.7
i	250	97.6	65.4
j	500	98.6	78.1

Table 2. Degradation of CEX in commercial dry syrup at 75% RH, 60°

sample	percent remaining			water content		
	2days (%)	4days (%)	7days (%)	2days w/w (%)	4days w/w (%)	7days w/w (%)
dry syrup						
A	100.7	93.9	79.7	6.34	7.57	8.20
B	101.9	99.7	90.0	1.23	1.19	2.17
C	86.1	67.0	36.8	7.99	10.85	21.24
D	104.5	97.8	94.8	1.38	1.10	1.24

Table 3. Composition of dry syrups (%)

material	formulation		
	A	B	C
CEX	10	10	10
sucrose	90	-	88.2
lactose	-	90	-
citrate	-	-	0.6
sodium citrate	-	-	1.2

影響を与えることが推察された。

## 2. ドライシロップの固体状態における安定性

### 1) 賦形剤の影響

ドライシロップには主薬として10%の CEX と、賦形剤として85~90%の糖(ショ糖または乳糖など)が含まれるが、他に配合剤としてアラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロース、シリコン、ポリソルベートおよびクエン酸塩等が含まれる。著しい分解を示した製剤Cには、他と比べ特にクエン酸類の含量が多かった(約1.8%)。このクエン酸類はクエン酸とクエン酸ナトリウム 1:2 の混合物で、シロップ溶液の pH を約 4.2 に保つための pH 緩衝液として加えられている。そこでクエン酸類をも含めた配合剤の影響を調べるため、組成の異なるドライシロップを調製しその安定性を検討した。用いたドライシロップの組成を Table 3 に、結果を Fig. 1~3 に示した。その結果ドライシロップのうちクエン酸類を配合したもののみが著しい CEX 分解を示した (Fig. 1)。分解率はクエン酸類配合量に比例して高くなった (Fig. 2)。また、水分含量の変化を観察すると、クエン酸類を配合したシロップ

のみが水分含量増加が著しく (Fig. 1)、初期の水分吸着率は配合されたクエン酸類量に比例した (Fig. 3, 4)。乳糖を賦形剤としたドライシロップには試験開始時から約 5% の水分が含まれているが、試験終了時に水分含量に変化はなかった。この水分は乳糖の結晶水と考えられるが、CEX の分解には影響を与えなかった。

### 2) 温度の影響

次に湿度 75% RH 下で、ドライシロップ製剤Cの固体状態での安定性の温度依存性を検討した。80, 70, 60 および 50°C においてドライシロップ中の CEX 分解は S 字型を示した (Fig. 5)。すなわち、初期には

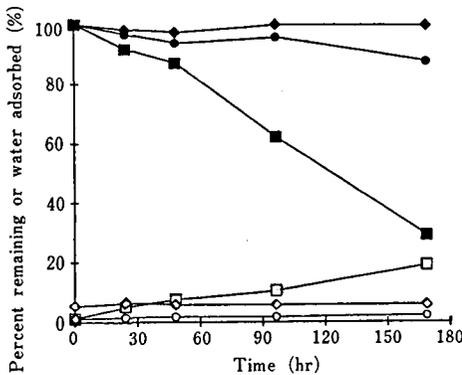


Fig. 1. Effect of excipients on the decomposition (◆, ●, ■) and water adsorbed (◇, ○, □) of dry syrups in Table 3

◆, ◇: lactose ●, ○: sucrose ■, □: citrate

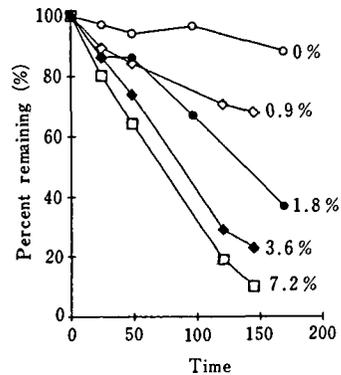


Fig. 2. Effect of citrate on the stability of CEX in dry syrups

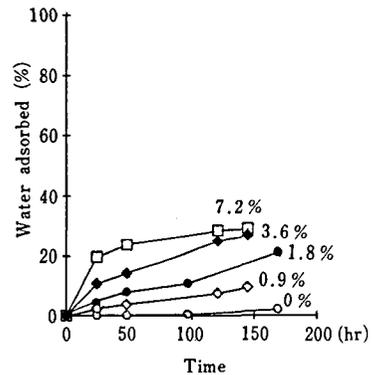


Fig. 3. Effect of citrate on water adsorption of dry syrups

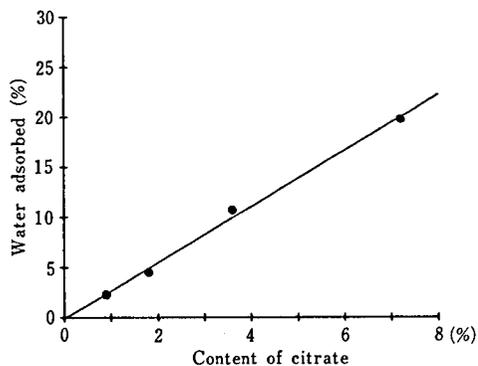


Fig. 4. Initial water adsorption rate of dry syrups (%/day)

CEX の分解は遅いが, 吸着水分量が10%を超えるあたりから分解速度が急激に大きくなる傾向がみられた。このことから, CEX の分解に水分吸着が大きく寄与することが示された。

### 3. ドライシロップの溶解状態における安定性

水分以外の要因が CEX 分解に与える影響を調べるため溶液状態での CEX 分解を検討した。水溶液中での CEX 分解は擬一次反応を示し, Arrhenius plots より算出した CEX の見かけの分解活性化エネルギーは約 30 kcal/mol (Fig. 6) であった。4種のドライシロップを溶解した溶液においても同一の分解速度が観察され, 溶液での安定性に対する賦形剤の影響は見られなかった。CEX と同じ  $\beta$ -ラクタム化合物であるペニシリン類に対して, 糖が分解促進作用を持つという報

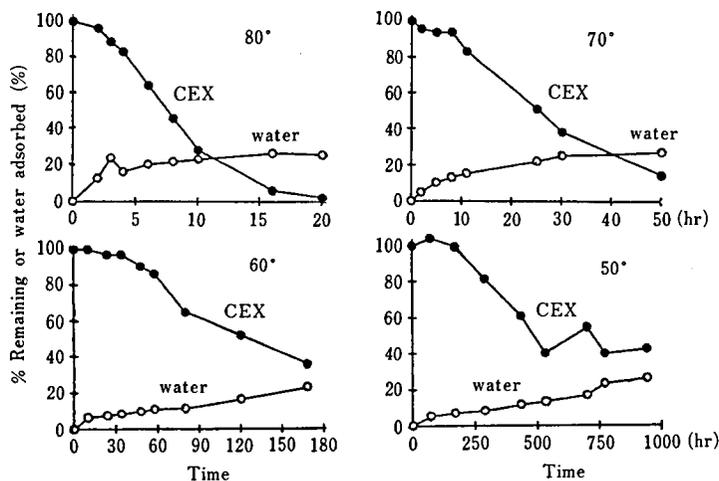


Fig. 5. Degradation of CEX in dry syrup C at 75% RH

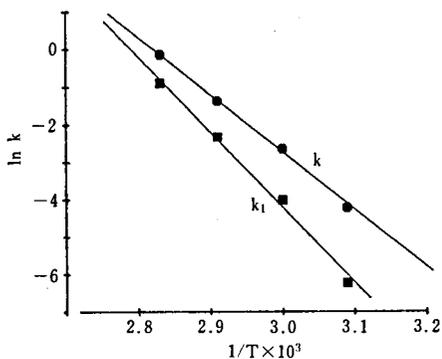


Fig. 6. Arrhenius plots of degradation rate constant of CEX ( $k$ ) and formation rate constant of I ( $k_1$ ) in syrup solution at 60°C

告<sup>9)</sup>が有るが, CEX に対しては糖の影響は観察されなかった。また, CEX の分解速度に対し, イオン強度の増大は負の, クエン酸塩濃度の増大は正の若干の影響をおよぼしたが, いずれも低い程度に留まった。

### 4. 分解物の生成について

ドライシロップの固体状態における分解では, 2つの分解生成物が HPLC クロマトグラム上に見いだされた。この分解物を単離し IR, UV, NMR および MS 等の分析結果を比較したところ, Fig. 7 に示す化合物であると推定された。化合物 I は先に辻等<sup>3)</sup>がセフトロキシム分解物として単離した, チオールラクトン化合物と一致した。これらの分解物は, 次のような機構により生成すると推定される。すなわち I は, CEX の 6 員環の開裂の結果生じたチオールと, 遊離のカルボキシル基が, 酸触媒によりチオールラクトンを生成

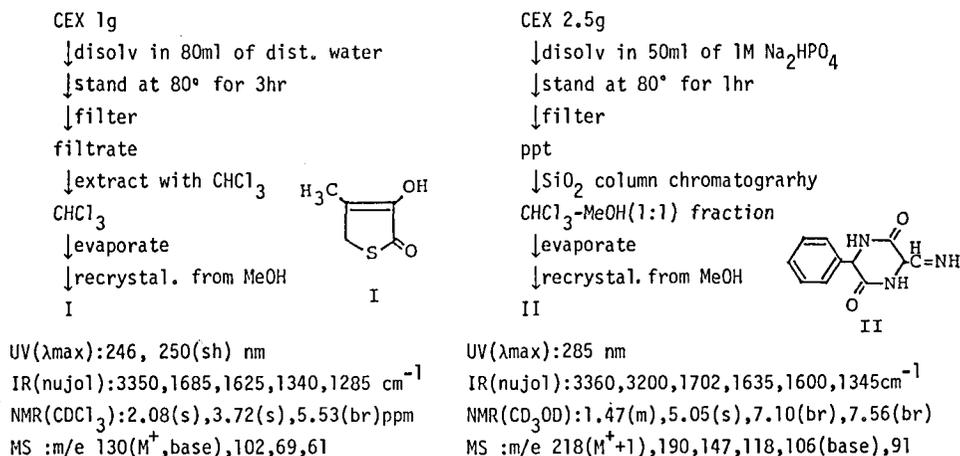


Fig. 7. Isolation and identification of degradation products of CEX

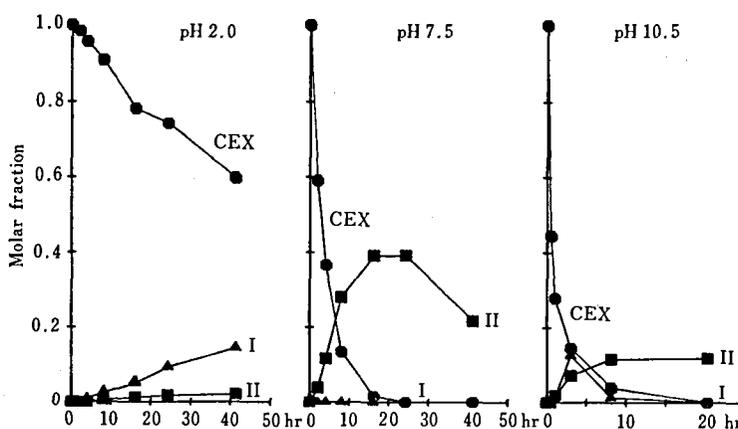


Fig. 8. Degradation of CEX and formation of I and II in aqueous solution at 60°

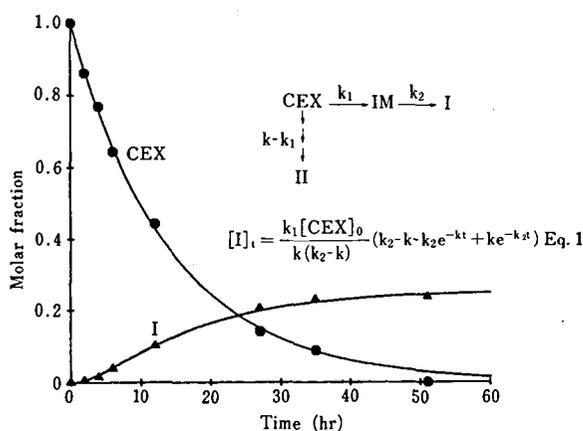


Fig. 9. Degradation of CEX and formation of I in syrup solution at 60°

Theoretical curves were calculated by non-linear least square method with simplex method ( $k=0.07$  hr<sup>-1</sup>,  $k_1=0.018$  hr<sup>-1</sup>,  $k_2=0.22$  hr<sup>-1</sup>)

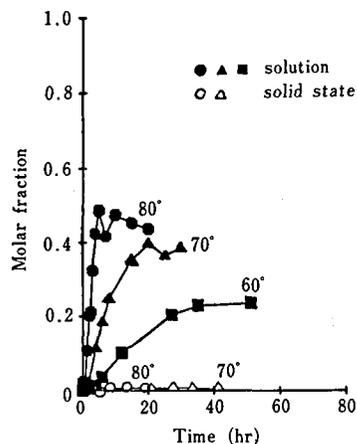


Fig. 10. Formation of I in dry syrup (75% RH) and syrup solution (10%)

した結果生じ、またⅡは CEX の遊離アミンの分子内攻撃の結果生じると報告されているジクトピペラジン化合物<sup>3,6)</sup>を経由して生成される。酸性、中性および塩基性の水溶液中における CEX の分解および、化合物ⅠそしてⅡの生成を検討した結果 (Fig. 8), Ⅰは酸性条件下で、またⅡは中性条件下で生成率が高く、上に述べた分解機構と矛盾しないことが示された。

ドライシロップの水溶液状態における分解では、液性は弱酸性 (pH 4.0~4.5) であり、Fig. 9 に示すようにⅠが主に生成された。ここでⅠの生成に際して中間体を経ると仮定し、水溶液中でのⅠの生成率を Eq. 1 にしたがって、非線形最小二乗法によりシミュレートして求めたⅠの生成速度定数  $k_1$  は、Arrhenius plots において直線を示した (Fig. 6)。ドライシロップの固体状態におけるⅠの生成率は、水溶液中に比べ著しく低く、特に 60° 以下では全く生成されなかった (Fig. 10)。このことは固体状態での CEX 分解機構が、

溶液中での分解機構と著しく異なることを示唆している。

## 文 献

- 1) T. Yamana, A. Tsuji: *J. Antibiot.*, **27**(12), 1000 (1974)
- 2) T. Yamana, A. Tsuji: *J. Pharm. Sci.*, **65**(11), 1563 (1976)
- 3) T. Yamana, A. Tsuji: *J. Pharm. Sci.*, **70**(10), 1120 (1981)
- 4) L. J. Ravin, E. S. Rattie, J. J. Zimmerman: *J. Pharm. Sci.*, **68**(11), 1369 (1979)
- 5) A. I. Cohen, M. S. Puar, P. T. Funke: *J. Pharm. Sci.*, **62**(9), 1559 (1973)
- 6) E. E. Roets, H. Vanderhaeghe, A. J. Vlietinck: *J. C. S. Chem. Comm.*, 484 (1973)
- 7) S. Yoshioka, T. Shibazaki, A. Ejima: *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(10), 3734 (1982)
- 8) S. L. Hem, R. S. Levi, E. J. Russo, S. M. Bahal: *J. Pharm. Sci.*, **62**(2), 267 (1973)

## マルチ CPU システムで制御された簡易型化学発光測定装置の試作

岩田恵助\*・林 譲

### A Simple Chemiluminescence Measurement Apparatus equipped with Multi-CPU Controller System

Keisuke IWATA and Yuzuru HAYASHI

A chemiluminescence measurement system was devised which consisted of a light detection unit and two CPU's. A personal computer based on Z-80 CPU controls the overall system and a single board computer (Z-80 CPU) the temperature of reaction vessels. This multi-CPU system allows us to observe time-dependent variations in emitted light easily and to analyze the raw data immediately and flexibly.

(Received May 31, 1986)

## ま え が き

先に、著者らは化学発光自動分析装置を開発し<sup>1)</sup>、自作の自動注入装置を用いた再現性の検討<sup>2)</sup>、コンピュータを用いたデータ処理システムにおけるフーリエ変換による雑音除去、および迅速測定の検討<sup>3)</sup>を行った。さらに、この測定システムを酵素による血中コレステロールの定量に応用した<sup>4)</sup>。しかし、このシステムは再現性や迅速測定の点では満足できるものであるが、扱いがやや不便であるために、一般に使用される

ためには改良が必要である。著者らは、パーソナルコンピュータで全体をコントロールし、上記のシステムよりも扱い易いマルチ CPU システムの装置を試作した。

## 実験方法および結果

### 基本構成

図 1 は、本化学発光測定システムの基本構成を示すブロック図である。主要部は、測定部 (CL measurement system)、全システムをコントロールするホストコンピュータと測定部の温度コントロールをするシングルボードコンピュータの 3 点からなっている。ホス

\* 極東製薬工業株式会社

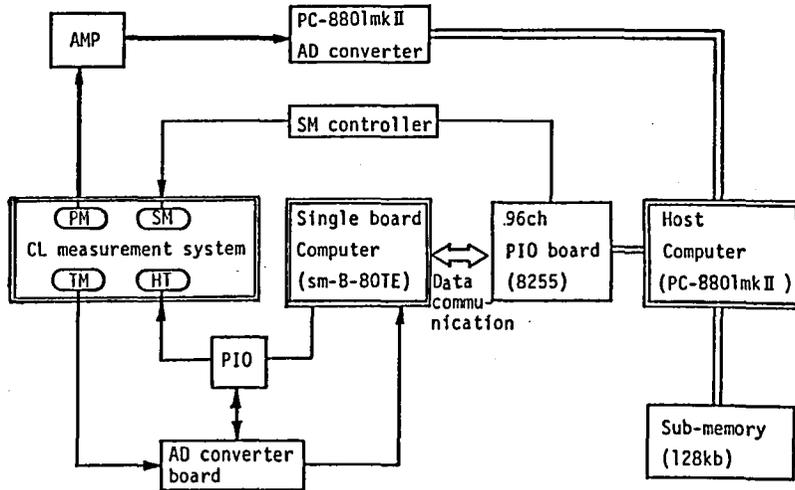


Fig. 1. Block diagram of the total luminescence analyzing system

PM represents photomultiplier; SM stepping motor; TM thermistor; HT heater; AMP amplifier.

トコンピュータには、NECのPC-8801 mk IIを用い、シングルボードコンピュータは、シャープのsm-B-80TE (CPU Z-80)を用いた。8801 mk IIの拡張スロットに次の市販インターフェイスを取り付けて使用した。1) サブメモリー (128 kB), NEC-14T, PC-8801-02N; 2) ADコンバーター, エルメック EC-2320-N; 3) 96チャンネルPIOボード, アドテック AB81-04.

8801 mk IIのメモリーは64 kBだけなので、測定データを記憶しておくサブメモリーが必要である。ADコンバーターは、11 bitの分解能と50  $\mu$ sの変換時間をもつボードであり、フォトマルからの信号を変換するのに用いた。なお、このボードに収められているADコンバーターチップは、アナログ・デバイゼスのAD-574である。PIOボードには、8255が4個装着されていて、これで、シングルボードコンピュータとのプログラムや温度データの平行通信を行う。このPIOボードの8255を1つはずして、CPUのデータバス、システム制御線、チップイネーブルなどを外部に取り出して、ステッピングモーターコントローラー (三栄電機, BOX-SMID-515A)につないだ。データ通信や温度コントロールのプログラムは、全システムをONにした時に、ホストコンピュータからシングルボードコンピュータに送られるので、プログラムの変更は、ホストコンピュータでアセンブラを用いて行える。

#### 測定部

図2は、測定部の断面図である。主に、セル室 (a)、セル室カバー (b)、モーターカバー (c)の3点からなる。全体は、ちょうど、円柱形の茶筒を横に倒した形をしている。直径が150 mmで、長さが320 mmである。セル室は、ステッピングモーター (g)とボールネジ (dとe)により、図では左右に動くように設計してある。セル室は円筒形なので、動くときに回転しないように軸 (h)が取り付けられている。なお、図では、セル室は右いっばいに位置して、測定が行える状態を描いている。測定終了時には、セル室がセル (k)を交換できる位置まで自動的に左に動く。

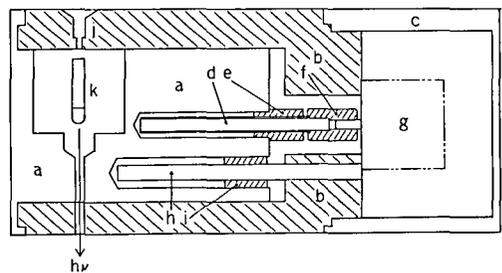


Fig. 2. Cross section of the light detection unit

A letter a represents a cell chamber; b cell chamber cover; c motor cover; d and e ball screw; f coupling; g stepping motor; h shaft; i linear bearing; j injection port; k reaction vessel.

光測定のセル室を設計する場合、遮光の問題は重要である。上記の3つの部分 (a, b, c) は、アルミの丸棒を施盤加工して作ったものであり、継ぎ目が少ないので、遮光は非常によい。

反応セルは、適当な形のアルミブロックで支えられている。このブロックはセルから発せられた光が下方方向に反射するような形にしてあり、ニクロム線を巻きつけて温度コントロールを行う。j は、反応開始試薬を注射器でセルに注入するための穴で、ゴム製のセプタムで遮光してある。

図2の下に、フォトマルを収めるための箱が取り付けられている。フォトマルは、電子式冷却装置 (浜松ホトニクス, C-659S) を用いて使うようになっている。なお、箱の中には、フォトマルの信号をアンプに送るための反転増幅器 ( $\mu A741$ )<sup>5)</sup> も収められている。測定データは、基本的には1024点としたがこれは変えることができる。

温度コントロール部

温度コントロールのヒーターを ON-OFF するためには、Z-80 PIO や 8255 などのインターフェイス用 LSI が必要である。用いたシングルボードコンピュータは、PIO を1個増設できるが、これはホストコンピュータとのデータ通信に用いる。そこで、PIO を含

めた、温度コントロールのためのボードを作製した<sup>6)</sup> (図3, 図1では、PIO と AD converter board)。温度データは次のように伝わる。サーミスター (図3の IN につながる) →ローパスフィルター→マルチプレクサー (MP) →サンプル & ホールド (S/H) →AD コンバーター (ADC) →sm-B-80TE のCPU。

MP は8チャンネルのディジタル MX-808, S/H はディジタル SHM-IC-1, ADC は変換時間 100  $\mu s$ , 分解能 8 bit のディジタル ADC-830 である。この MP により、8 点の温度データが得られるが、実際には1チャンネルだけを使用した。図3で、J1 は100ピンの sm-B-80TE の外部入力端子である。図の PIO は、ヒーターの ON-OFF の他に、MP, S/H, ADC のコントロールを行う。温度は、20~50°C において  $\pm 0.12^\circ C$  の誤差でコントロールできる設計である。

図4は、温度測定用のサーミスター回路<sup>7)</sup> である。サーミスターは YSI 44006, ソリッドステートリレー (SSR) はオムロン G3FD-X03S, 基準電圧設定用 IC は AD 589 を使用した。SSR は PIO の B ポートにつないであり、システムを初めに ON した状態では OFF になっている。

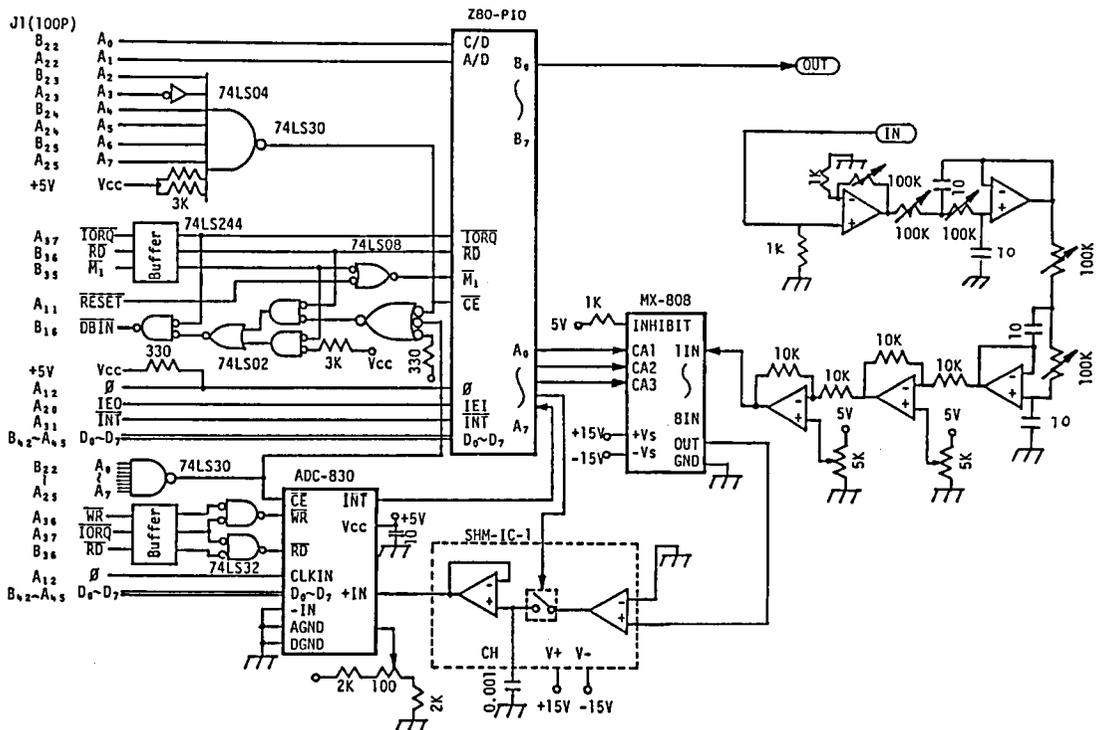


Fig. 3. Logic circuit of temperature controlling unit

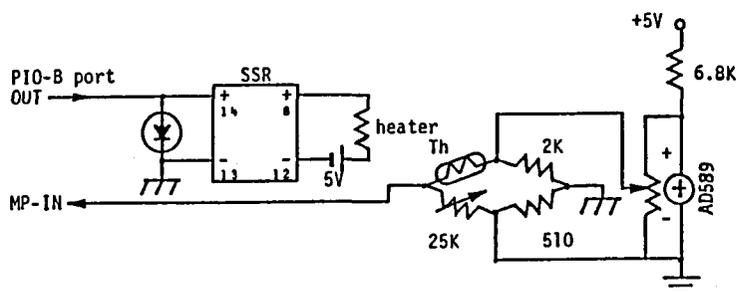


Fig. 4. Circuit of thermistor

## 考 察 文 献

以上で、システム全体をホストコンピュータで制御する発光測定システムが出来上がった。ホストコンピュータで、測定用プログラムを起動すると、システムは ON 状態になり、アンプ、フォトマルなどすべての電源が ON になる。測定時間、設定温度などはすべてホストコンピュータから入力する。セル室の開閉は自動であり、すべての測定が終了すると電源は自動的に切れる。なお、このシステムは、生物発光の測定にも適用できるものと考えられる。

終わりに、由岐英剛教授（東邦大学）、内山充薬品部長、柴崎利雄第2室長に感謝します。

- 1) Y. Hayashi and H. Yuki: *Chem. Pharm. Bull. Jpn.*, **32**, 3079 (1984)
- 2) A. Taniguchi, Y. Hayashi and H. Yuki: *Chem. Pharm. Bull. Jpn.*, **34**, 3475 (1986)
- 3) Y. Hayashi, M. Ikeda and H. Yuki: *Anal. Chim. Acta*, **167**, 81 (1985)
- 4) A. Taniguchi, Y. Hayashi and H. Yuki: *Anal. Chim. Acta*, in press
- 5) 藤井信生, 「Op アンプの基礎と応用」 p. 39 (1982) オーム社
- 6) 日本ソフトバンク編「Oh! PC」**2**, 170 (1984)
- 7) トランジスタ技術編集部編「センサ・インターフェーシング」No. 1~3, (1982) CQ 出版

### 酵素製剤の品質に関する研究 (第7報)

—セラペプターゼ製剤—

谷本 剛・福田秀男・山羽 力

### Studies on the Quality of Enzyme Preparations (VII)

—Serrapeptase Preparation—

Tsuyoshi TANIMOTO, Hideo FUKUDA and Tsutomu YAMAHA

Serrapeptase preparations were investigated with a view to comparing their quality by pharmaceutical and enzymological methods. These studies were carried out on 16 kinds (29 samples) of commercially available serrapeptase preparations. The potency of all preparations were found to be within the range of permissible content. Weight variation tests of the preparations showed all preparations to be within the permissible J. P. X deviation range for "tablets." Peptide mapping by high performance liquid chromatography was carried out to study the enzymological identity of the preparations. The proteolytic specificities of the enzymes in all preparations were identical since all of the peptide maps were the same. In order to investigate the specificity of serrapeptase, the proteolytic digestion of reduced hen egg lysozyme was carried out. The enzyme catalyzed the hydrolysis of various peptide bonds in protein. However, the peptide bonds of the carboxyl group side of acidic amino acid, aspartic acid and glutamic acid, were completely not hydrolyzed, while the bond of arginine was relatively well hydrolyzed.

(Received May 31, 1986)

セラペプターゼはセラチア属細菌の産生するタンパク分解酵素であり、これを主成分とする製剤は手術後、外傷後あるいは各種炎症の消炎または喀痰咯出不全などに経口投与で臨床的に広く使用されている。

今回、セラペプターゼを含有する製剤を入手する機会を得たので、これら製剤の薬剤学的品質の検討を行った。また、高速液体クロマトグラフィーによるペプチドマッピング法によって各製剤に含有される主成分が酵素学的に同等であるか否かの検討もあわせ行うとともに、セラペプターゼの特異性についても検討した。

## 実験方法

### 1. 試料・試薬・試液

i) 試料：今回入手した試料は16品目、29検体であり、同一品目でロットの異なるものが含まれている。これらの検体はすべて腸溶性製剤であり、このうち単味錠剤は13品目25検体、単味顆粒剤は1品目1検体、配合錠剤は2品目3検体であった。

ii) 試薬：乳製カゼインはメルク社製を使用し、可溶性還元リゾチームは生化学工業株式会社から購入した。セラペプターゼ原末は武田薬品工業株式会社から供与された。

iii) ホウ酸塩-塩酸緩衝液：ホウ酸ナトリウム 19.0 g に水 900 ml を加えて溶かし、1N 塩酸試液を加えて pH 9.0 に調整した後、水を加えて 1000 ml とする。

iv) 基質液：乾燥物として 1.20 g に対応する乳製カゼイン（ハンマーステン法による精製カゼイン）を正確に量り、ホウ酸ナトリウム (19→1000) 160 ml を加え、水浴中で加熱して溶かす。冷後、ホウ酸塩-塩酸緩衝液を加えて正確に 200 ml とする。用時製する。

v) トリクロル酢酸試液：トリクロル酢酸 1.80 g および無水酢酸ナトリウム 1.80 g に 6N 酢酸試液 5.5 ml および水を加えて溶かし、100 ml とする。

vi) 炭酸ナトリウム溶液：無水炭酸ナトリウム 60 g を水に溶かして 1000 ml とする。

vii) チロジン標準液：チロジン標準品 27.5 mg を精密に量り、0.1N 塩酸試液を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。この液 1 ml を正確に量り、ホウ酸塩-塩酸緩衝液 5 ml およびトリクロル酢酸試液 5 ml をそれぞれ正確に加えてチロジン標準液とする。

### 2. 重量偏差試験

日局10, 重量偏差試験法、錠剤の項に準じて試験した。

### 3. 定量法

i) 試料溶液の調製：表示量に従って各製剤の

100,000単位に対応する量を乳鉢に取り、ホウ酸塩-塩酸緩衝液 5 ml を加えて粥状にすりつぶした後、さらにホウ酸塩-塩酸緩衝液を加えて正確に 100 ml とする。この液の 1 ml を正確に取り、ホウ酸塩-塩酸緩衝液を加えて正確に 100 ml とし、これを試料溶液とする。なお、配合製剤は外層を水で崩壊させて取り出した腸溶性内核錠を試料溶液調製用の検体とした。

ii) 測定操作法：試料溶液 1 ml を試験管に正確に量り取り、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で5分間予温する。これに同温度に保った基質液 5 ml を正確に加え、直ちによくふり混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に放置する。正確に20分間経過した後、トリクロル酢酸試液 5 ml を正確に加えてふり混ぜ、さらに  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で30分間放置する。その後、東洋ろ紙 No. 4A を用いてろ過し、ろ液を得る。このろ液 2 ml を正確に量り取り、炭酸ナトリウム溶液 5 ml を正確に加えてふり混ぜ、次いで薄めたフォリン試液 (1→3) 1 ml を正確に加え、よくふり混ぜ、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  で30分間放置する。この液につき水を対照として波長 660 nm における吸光度  $A_1$  を測定する。別に、試料溶液 1 ml を正確に量り取り、トリクロル酢酸試液 5 ml を正確に加えてふり混ぜた後、基質溶液 5 ml を正確に加え、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  に30分間放置し、以下前記と同様に操作して吸光度  $A_2$  を測定する。また、チロジン標準液 2 ml を正確に量り取り、炭酸ナトリウム溶液 5 ml を正確に加えてふり混ぜた後、薄めたフォリン試液 (1→3) 1 ml を正確に加え、よくふり混ぜ、以下試料溶液と同様に操作して吸光度  $A_3$  を測定し、別に 0.1N 塩酸溶液 2 ml を正確に量り、同様に操作して吸光度  $A_4$  を測定する。

### iii) 力価の算出

本品1錠または1g当たりのセラペプターゼ単位

$$= \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 50 \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{B} \times 10000$$

B：採取した試料の個数または重量(g)

ただし、上記条件下で1分間にチロジン 1  $\mu\text{g}$  相当量を生成する酵素量を1セラペプターゼ単位とする。

### 4. ペプチドマッピング法

各試料の10,000単位に対応する量を取り、0.1M 炭酸水素アンモニウム液 25 ml で抽出した後、水で 50 ml とする。これをメンブランフィルターでろ過し、得たる液の 1 ml に 0.1M 炭酸水素アンモニウム液 1 ml を加えて試料液とする。可溶性還元リゾチーム 10mg を水 2 ml に溶かし、その 0.1 ml に上述の試料液 0.1 ml および水 0.3 ml を加えて、 $40^\circ\text{C}$  で4時間反応する。この反応液 10  $\mu\text{l}$  について Synchronpak RP-R カラム (25 cm  $\times$  4.1 mm I. D.) を用いて、温

度：25~27°C，流速：1 ml/min でアセトニトリル濃度が0~35%となるグラジエント溶出で高速液体クロマトグラフィーを行った。

### 5. アミノ酸分析

高速液体クロマトグラフィーで得た各分画を試験管に取り，エバポレーターで濃縮乾固した後，Liu ら<sup>1)</sup>の方法に準じて，0.2%の3-(2アミノエチル)インドールを含む4Nメタンсульホン酸0.5 mlを加え，減圧封管し，110°Cで24時間加水分解する。この加水分解物を3.5N水酸化ナトリウム液でpH 3に調整し，その50 µlを用いて日立アミノ酸自動分析計835型で分析した。

## 結果と考察

### 1. 重量偏差試験

セラペプターゼ製剤はフィルムコーティングを施した腸溶性製剤である。日局には剤皮を施した製剤につ

いては重量偏差試験法の規定はないが，剤皮を施した製剤の重量偏差の実態を把握する目的で過去の研究<sup>2)-5)</sup>においてもこの試験を実施してきた。そこで今回も日局の試験法に準じて試験した。錠剤である15品目28検体について試験した結果をTable 1に示したが，すべての検体において偏差の基準を越えるものはまったく存在しなかった。また，変動係数は2検体で2%台を示したものの，他の26検体では1%台あるいはそれ以下であった。

今回入手したセラペプターゼ製剤は剤皮を施した製剤であるにもかかわらず，その重量偏差はよく管理されていることが明らかになった。

### 2. 定量試験

セラペプターゼ製剤の定量試験結果をTable 2に示した。含量規格は各品目によって異なるものもあるが，いずれの検体においてもその定量値はそれぞれの含量規格に適合していた。ただし，検体番号10-2の例

Table 1. The weight variation test for Serrapeptase preparations

Sample No.	Average weight (mg)	Range of weight (mg)	Number of tablet having the deviation of more than 5, 7.5 or 10%	C.V. (%)
1-1	167.9	160.0-174.2	0 (>7.5%)	2.35
1-2	163.9	161.4-167.5	0 (>7.5%)	1.03
2-1	159.1	151.4-168.3	0 (>7.5%)	2.87
2-2	160.8	157.3-164.4	0 (>7.5%)	1.23
2-3	160.1	155.7-168.7	0 (>7.5%)	2.21
3-1	149.4	146.4-152.3	0 (>7.5%)	1.09
4-1	111.2	109.2-113.1	0 (>10%)	1.27
4-2	112.4	109.7-114.7	0 (>10%)	1.28
4-3	110.5	107.9-115.2	0 (>10%)	1.43
5-1	255.3	249.1-262.3	0 (>7.5%)	1.68
5-2	256.1	245.3-263.0	0 (>7.5%)	1.64
6-1	391.2	383.2-399.0	0 (>5%)	1.21
7-1	150.0	146.1-154.8	0 (>7.5%)	1.26
7-2	151.0	146.0-157.5	0 (>7.5%)	1.68
7-3	149.1	145.1-153.3	0 (>7.5%)	1.54
8-1	149.4	145.3-154.8	0 (>7.5%)	1.75
8-2	149.7	145.1-152.1	0 (>7.5%)	1.33
9-1	153.4	149.4-157.0	0 (>7.5%)	1.26
9-2	151.6	148.7-154.9	0 (>7.5%)	1.26
10-1	155.7	152.7-158.3	0 (>7.5%)	1.04
10-2	149.8	147.8-152.5	0 (>7.5%)	0.89
11-1	148.6	143.2-152.5	0 (>7.5%)	1.62
11-2	149.1	147.0-150.8	0 (>7.5%)	0.83
12-1	150.4	147.5-157.0	0 (>7.5%)	1.23
13-1	99.8	97.4-103.0	0 (>10%)	1.52
15-1	147.3	143.0-151.6	0 (>7.5%)	1.50
16-1	88.2	86.4-89.4	0 (>10%)	1.03
16-2	88.5	86.9-91.0	0 (>10%)	1.26

にみられるように、規格値の下限に近い定量値を示すものが2～3検体あった。これは経時変化によるものなのか、それとも製造時にすでにこのような含量を示していたのか明らかではないが、いずれにしてもこれらがその使用期限をなお約2年有していることを考えたとき、これらの使用期限内における品質維持にまったく問題がないとは言えない。

### 3. 酵素学的同索性

主成分を同じくする多種の製剤の品質を比較することは臨床の場における選択において極めて重要なことである。この際の品質比較には定量試験や溶出試験などの薬剤学的試験法が一般には適用されるものと考え

られる。しかし、酵素製剤の場合、その主成分である酵素が生物体内で生合成されたタンパク質であることから、その基原が異なれば酵素の物質としての性状や酵素学的性状は当然異なってくるので、単に薬剤学的試験のみではその品質を比較するには不十分である。酵素製剤はその触媒としての機能をその薬効に期待するのであるから、その特異性が品質における一つの重要な因子となる。タンパク分解酵素の基質特異性を調べる一つの方法としてペプチドマッピング法があるので、還元リゾチームを基質にした高速液体クロマトグラフィーによるこの法を今回入手した製剤の酵素学的同索性の検討に適用した。

Table 2. Contents of enzyme activity in Serrapeptase preparations

Sample No.	Labeled amount (unit)	Range of permissible content (%)	Enzyme activity (%)
1-1	10000/T	100-130	112.6
1-2			127.1
2-1	10000/T	80-130	87.2
2-2			94.4
2-3			91.1
3-1	10000/T	90-120	98.1
4-1	10000/T	90-110	95.4
4-2			97.2
4-3			93.3
5-1	10000/3T	80-130	96.8
5-2			104.2
6-1	10000/3T	80-130	95.6
7-1	10000/T	80-130	94.4
7-2			92.6
7-3			105.7
8-1	10000/T	80-130	102.6
8-2			104.8
9-1	10000/T	80-130	103.6
9-2			108.1
10-1	10000/T	80-130	88.0
10-2			82.1
11-1	10000/T	80-120	96.1
11-2			93.6
12-1	10000/T	90-110	95.8
13-1	10000/T	80-130	106.0
14-1	20000/g	80-130	99.1
15-1	10000/T	90-130	101.9
16-1	10000/T	80-130	104.6
16-2			100.1

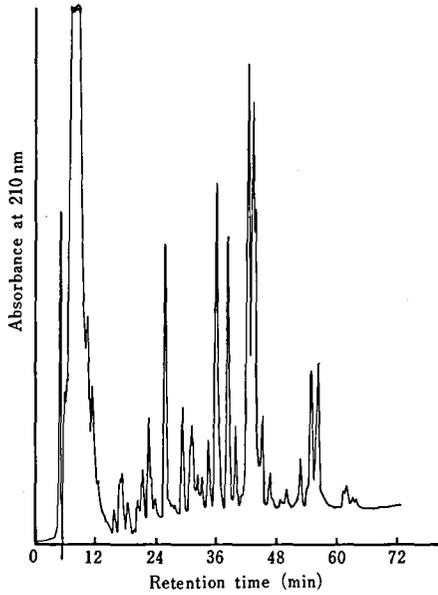


Fig. 1. Peptide map of digest of reduced hen egg white lysozyme by serrapeptase in the preparation

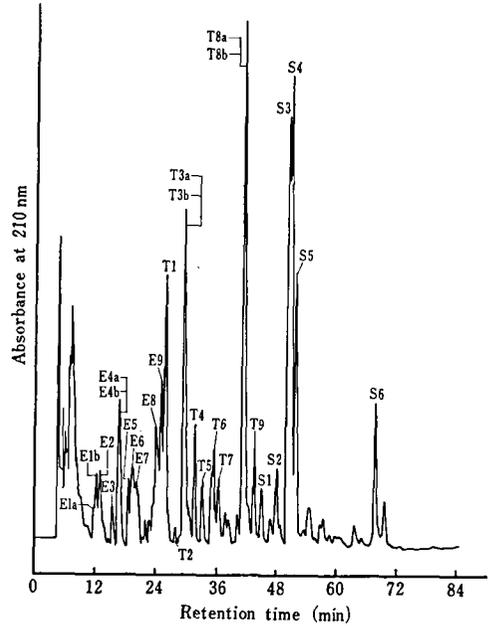
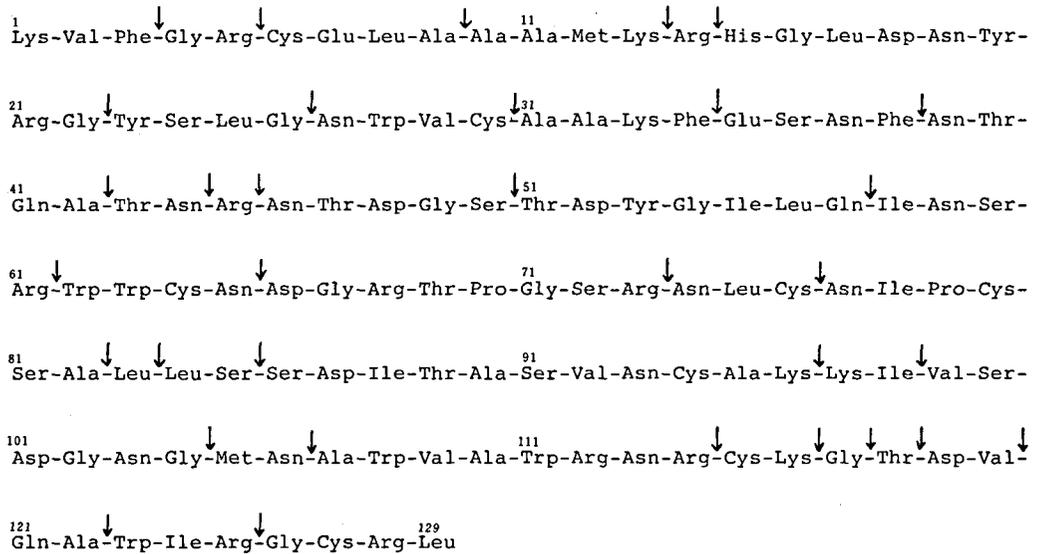


Fig. 2. Peptide map of digest of reduced hen egg white lysozyme by serrapeptase



Arrows indicate the bonds susceptible to serrapeptase.

Fig. 3. Sequence of hen egg white lysozyme and the bonds susceptible to serrapeptase

Fig. 1 に実験方法の部に述べた条件下での逆相高速液体クロマトグラフの一例を示したが、入手した16品目の製剤のいずれにおいてもこれと同様の溶出パターンを示した。このことから、今回入手した製剤は酵素学的にも同等のものであると推察された。

#### 4. セラペプターゼの基質特異性

セラペプターゼが作用するタンパク質分子中のペプチド結合についての知見は酸化インスリンB鎖について若干得られているにすぎない。インスリンB鎖は30個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、しかも数種のアミノ酸を欠いているためにタンパク分解酵素の

Table 3. Amino acid composition of the peaks in Fig. 2

Peak name	E1a	E1b	E2	E3	E4a	E4b	E5
Lys	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	1.1 (1)	0.0 (0)
His	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Arg	1.9 (2)	0.9 (1)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)	0.7 (1)	0.9 (1)
Trp	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Asp	1.0 (1)	2.2 (2)	0.8 (1)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.4 (0)	0.4 (0)
Thr	0.8 (1)	0.8 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.3 (0)
Ser	0.9 (1)	0.9 (1)	0.3 (0)	0.3 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.2 (0)
Glu	0.0 (0)	0.4 (0)	0.1 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	1.0 (1)	1.2 (1)
Pro	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Gly	2.0 (2)	1.0 (0)	0.2 (0)	0.1 (0)	1.1 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)
Ala	0.0 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.5 (1)	1.2 (1)
Cys	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)	1.1 (1)
Val	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	1.1 (1)	0.2 (0)
Ile	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Leu	0.3 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.8 (1)
Tyr	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Phe	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)
Positions in sequence	66-73	45-50	74-76	6-9	126-129	1-9	4-9

Peak name	E6	E7	E8	E9	T1	T2	T3a
Lys	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)
His	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Arg	0.1 (0)	1.3 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.1 (0)
Trp	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)
Asp	1.1 (1)	0.2 (0)	1.1 (1)	2.0 (2)	2.3 (2)	1.0 (1)	1.2 (1)
Thr	0.1 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ser	1.0 (1)	0.2 (0)	1.0 (1)	1.9 (2)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.2 (0)
Glu	0.4 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)
Pro	0.8 (1)	0.0 (0)	0.8 (1)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Gly	0.3 (0)	1.4 (1)	0.1 (0)	0.4 (0)	3.1 (3)	0.4 (0)	0.2 (0)
Ala	1.1 (1)	0.4 (0)	1.0 (1)	1.4 (1)	0.2 (0)	0.0 (0)	0.2 (0)
Cys	1.0 (1)	0.0 (0)	1.0 (1)	2.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)
Val	0.1 (0)	1.0 (1)	0.1 (0)	0.3 (0)	0.2 (0)	1.0 (1)	1.0 (1)
Met	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ile	0.9 (1)	0.2 (0)	0.9 (0)	1.4 (1)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)
Leu	1.3 (0)	0.3 (0)	0.1 (0)	3.1 (3)	2.0 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)
Tyr	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.0 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)
Phe	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Positions in sequence	77-83	1-5	77-82	74-85	15-26	119-120	27-30

作用部位に関する情報を得るには必ずしも十分とはいえない。そこで、20種類の全アミノ酸から構成される一次構造の明らかな還元リゾチーム<sup>6)</sup>を用いてセラペプターゼの作用部位についての検討を試みた。還元リゾチーム 1mg をセラペプターゼ 10 $\mu$ g で4時間消化した後、高速液体クロマトグラフィーで消化物を分画

し、各分画についてアミノ酸分析を行い、そのアミノ酸組成からリゾチームのアミノ酸配列中の位置を推定した。Fig. 2 に消化物のクロマトグラフを示し、各ピークのアミノ酸組成および推定したリゾチームのアミノ酸配列中の位置を Table 3 に示した。また、Fig. 3 にはこれらの結果から推定されるリゾチームの一次構

Table 3. Continued

Peak name	T3b	T4	T5	T6	T7	T8a	T8b
Lys	0.2 (0)	0.8 (1)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.3 (0)	0.0 (0)
His	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Arg	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Trp	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	2.1 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)
Asp	2.0 (2)	2.3 (2)	1.1 (1)	1.8 (2)	1.1 (1)	0.8 (1)	0.3 (0)
Thr	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.7 (1)	0.0 (0)
Ser	0.0 (0)	2.4 (2)	1.1 (1)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.3 (0)
Glu	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	2.0 (2)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.9 (1)
Pro	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Gly	1.8 (2)	0.0 (0)	0.2 (0)	0.2 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	0.4 (0)
Ala	0.0 (0)	2.0 (2)	0.0 (0)	0.8 (1)	0.0 (0)	1.3 (1)	1.0 (1)
Cys	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)
Val	0.0 (0)	1.2 (1)	0.2 (0)	1.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)
Met	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ile	0.0 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Leu	1.0 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Tyr	1.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Phe	0.0 (0)	0.0 (0)	1.3 (1)	1.3 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Positions in sequence	15-22	86-96	35-38	35-42	62-65	117-122	121-122

peak name	T9	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Lys	0.2 (0)	1.1 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.2 (0)
His	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Arg	0.2 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)	1.9 (2)	0.8 (1)	0.0 (0)
Trp	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	2.2 (2)	0.9 (1)	0.0 (0)
Asp	3.1 (3)	0.0 (0)	1.9 (2)	1.0 (1)	0.8 (1)	1.0 (1)	1.3 (1)
Thr	2.1 (2)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)
Ser	1.2 (1)	0.0 (0)	1.1 (1)	0.3 (0)	0.0 (0)	0.3 (0)	0.0 (0)
Glu	1.3 (0)	1.0 (1)	0.0 (0)	1.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)	1.0 (1)
Pro	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Gly	2.3 (2)	0.0 (0)	2.5 (2)	0.3 (0)	0.3 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)
Ala	0.0 (0)	2.9 (3)	0.0 (0)	1.3 (1)	2.2 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)
Cys	0.0 (0)	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Val	0.2 (0)	0.0 (0)	1.0 (1)	1.0 (1)	1.2 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)
Met	0.0 (0)	0.6 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ile	0.9 (1)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.8 (1)	0.0 (0)	0.7 (1)	0.0 (0)
Leu	0.9 (1)	1.2 (1)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)	0.1 (0)	0.0 (0)
Tyr	1.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Phe	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
positions in sequence	46-57	6-13	99-104	118-125	107-114	117-125	119-122

造上の切断部位を矢印で示した。ここで得た結果は13種類のアミノ酸残基のカルボキシル基側が作用を受けたことを示しており、タンパク分子中のペプチド結合に対するセラペプターゼの特異性はあまり高いものではないことが推察された。しかし、アスパラギン残基やグルタミン残基のカルボキシル基側は切断されているが、アスパラギン酸やグルタミン酸の酸性アミノ酸残基のカルボキシル基側はまったく作用を受けず、またアルギニン残基のカルボキシル基側は11カ所のうち7カ所が作用をうけていることから、これらの部位に

ある程度の特異性を示すことが推察された。

## 文 献

- 1) R. J. Simpson, M. R. Neuberger and T.-Y. Liu: *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936 (1976)
- 2) 谷本 剛ら: 衛生試験報, **99**, 84 (1981)
- 3) 谷本 剛ら: 衛生試験報, **100**, 114 (1982)
- 4) 谷本 剛ら: 衛生試験報, **101**, 88 (1983)
- 5) 谷本 剛ら: 衛生試験報, **101**, 92 (1983)
- 6) R. Canfield and A. K. Liu: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1997 (1965)

## 家庭用品に使用されている化学物質の急性毒性試験（その3）

会田喜崇・池田康和・鎌田栄一・内藤克司・鈴木康雄・戸部満寿夫

### Acute Toxicity of Chemicals for Household Goods (III)

Yoshitaka AIDA, Yasukazu IKEDA, Eiichi KAMATA, Katsushi NAITO,  
Yasuo SUZUKI and Masuo TOBE

The acute toxicity of 8 fluorescein in brightening agents (FBA-52 Salt type, FBA-52 Free type, FBA-85, FBA-90, FBA-135, FBA-225, FBA-260, FBA-351) used as household goods was studied by gavage in male and female ddY mice.

The LD<sub>50</sub> values of stilbene compounds were found to be over 15 to 20 g/kg for except FBA-85 (11,100 mg/kg in male and 10,700 mg/kg in female mice). The toxicity of FBA-52 Free type (5,230 mg/kg in male and 3,890 mg/kg in female mice) was lower than the sulfuric salt type (1,780 mg/kg in male and 1,890 mg/kg in female mice). The LD<sub>50</sub> values of FBA-351 were 5,600 mg/kg in male and 4,920 mg/kg in female mice.

(Received May 31, 1986)

家庭用品に使用されている化学物質の安全性評価のために、各種の毒性試験を実施している。すでに防炎加工剤2種、殺菌剤1種、蛍光増白剤1種、柔軟剤4種についてのラットでの急性毒性の成績<sup>1)</sup>および防炎加工剤1種、防虫加工剤2種、界面活性剤4種などについてマウスを用いた急性毒性の成績<sup>2)</sup>について報告した。今回は、8種類の蛍光増白剤についてマウスを用いて経口急性毒性試験を実施した。蛍光増白剤の毒性に関する研究、特に急性毒性に関するものはThomann<sup>3)</sup>およびKeplinger<sup>4)</sup>などの報告があり、FBA-52 Free type, FBA-90, FBA-135, FBA-260のLD<sub>50</sub>値についての記載はある。しかし、投与後の中毒徴候、死亡経過ならびに肉眼的な変化についての記載は見られない。

そこで今回我々は、同一動物種、同一溶媒を用いて各蛍光増白剤の急性毒性について明らかにするとともに

に、各検体における毒性の比較についても若干の検討を加えたのでその結果について報告する。

## 実験方法

1. 動物: Slc-ddy マウス (静岡県実験動物農業協同組合) 雄, 雌を4週齢で購入し, 動物室で馴化した後, 5週齢で, 体重雄 20~25 g, 雌 18~23 gを各々1群10匹とした。なお, 動物はコンベンショナルな動物室で飼育し, 環境条件は, 室温 22±2°C, 湿度 60±10%, 照明は点灯12時間, 消灯12時間で行った。

2. 被験物質: 検体として用いた蛍光増白剤は, 7-diethylamino-4-methylcoumarin sulfuric acid salt, (FBA-52 Salt type, 純度 99%, 新日曹化工), 7-diethylamino-4-methylcoumarin, (FBA-52 Free type, 純度 99%, 新日曹化工), 4,4'-bis[[4-anilino-6-(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazine-2-yl]amino]



Table 2. Mortality of Mice administered Orally 7-diethylamino-4-methylcoumarin (FBA-52 Free type)

Doses (mg/kg)	No. of mice	No. of deaths												Total No. of deaths			
		Hours				Days											
		1	3	6	10	1	2	3	4	5	6	7	14				
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3900	10	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
5070	10	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
6590	10	0	0	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1780	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2310	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3000	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3900	10	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
5070	10	0	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
6590	10	0	2	2	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10

mg/kg 以上の群では 30 分以降に歩行失調および腹這い状態が認められる。また、一部の動物では跳躍や四肢の硬直をとまなう歩行失調が散見される。死亡する動物は横転や振顫、強直性痙攣が認められた後、四肢を伸ばして死亡する。死亡経過は Table 2 に示す通りで、雄では 3 時間 30 分目、雌では 1 時間 30 分目より始まり、いずれも 2 日目には終了する。雄の 3000 mg/kg 群、雌の 1780 mg/kg 群では 1 日目には回復し、その他の群の生存動物では 3 日目には回復を示す。死亡動物では雄、雌に肝退色、肝小葉の明瞭化、胃の出血、小腸上部の暗赤色化および皮下の血管拡張が認められる。

2 週間生存動物の雄、雌に前胃部粘膜の糜爛形成が見られるほかに変化は認められない。

2 週間の死亡動物数より計算した LD<sub>50</sub> 値とその信頼限界は雄では 5230 (4460~6130) mg/kg、雌では 3890 (3320~4550) mg/kg である。

### 3. FBA-85

雄、雌のすべての検体投与群では、投与後 15 分で自発運動の亢進が認められ、数例に跳躍も認められる。その後 1 時間目から鎮静、閉眼および排泄物による被毛の汚れが認められる。なお雄の 9205, 10586 mg/kg、雌の 8576, 9863 mg/kg 群では 3 時間目より閉眼を伴ううずくまりの徴候が認められ、さらに、雄では 12174 mg/kg 以上、雌では 11342 mg/kg 以上の群で 2 時間目より閉眼を伴ううずくまりの徴候が、3 時間目より失調性歩行、両側後肢麻痺および体温下降が認められる。動物の死亡は Table 3 に示すように雄、雌とも 2 時間目より始まり、2 日目には終了する。動物は腹這い状態のまま死亡し、死を免れた動物は雄では 2 日目より 4 日目までに、雌では 2 日目より 3 日目

までには回復を示す。雄、雌とも 9 時間以内の死亡動物では腺胃部ならびに小腸上部の出血、皮下の血管拡張、肺の鬱血および肝で軽度な退色が認められる。9 時間以後の死亡では、上記所見に加え胆のう内に黄色絮状物の貯留が認められる。

7 日間生存した動物の剖検では全例に変化は認められない。

7 日間の死亡動物数より計算した LD<sub>50</sub> 値とその信頼限界は、雄 11100 (9737~12654) mg/kg、雌 10700 (9554~11984) mg/kg である。

### 4. FBA-90

雄、雌の検体投与群および対照群は、投与後 30 分頃より肛門周囲の汚れが、さらに 2 時間目以降全身に汚れが広がり、自発運動の軽度な抑制が認められる。なお 20000 mg/kg 群の雄、雌の数例に、5 時間以降体温の下降が認められ、うち 1 例の雄は、腹這い状態のまま 2 日目に死亡する。死亡動物の 1 例を除いた動物の徴候は、排泄物に起因すると思われる全身の油汚れを除き 1 日目には正常に回復する。この全身の油汚れは雄、雌ともに、10000 mg/kg 群では 3 日目、15000 mg/kg 群は 5 日目、さらに 20000 mg/kg 群でも 7 日目には回復する。

雄の 20000 mg/kg 群で死亡した 1 例は腺胃部と小腸上部の出血、腸間膜の血管拡張および肝退色が認められる。

動物の死亡は Table 4 に示すように、雄の 20000 mg/kg 群の 10 匹中の 1 例のみであり雄、雌の LD<sub>50</sub> 値は算出されない。したがってその LD<sub>50</sub> 値は雄、雌ともに 20000 mg/kg 以上と推測される。

### 5. FBA-225

検体投与群の雄、雌とも 45 分後より、全例に肛門周





Table 8. Mortality of Mice Administered Orally Disodium-4, 4'-bis (2-sulfostyryl) biphenyl (FBA-351)

Sex	Dose (mg/kg)	No. of mice	No. of deaths										No. of Total Death				
			Hours				Days										
			1	3	6	8	1	2	3	4	5	6		7			
Male	Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3600	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4320	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	5184	10	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	6221	10	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
	7465	10	0	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	8958	10	0	4	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Female	Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3600	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4320	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	5184	10	0	0	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	7465	10	0	4	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10

## 考察およびまとめ

家庭用品に使用される化学物質のうちから8種類の蛍光増白剤を選び、経口投与による急性毒性試験をマウスを用いて行った。その結果を Table 9 にまとめて示した。

今回実施したスチルベン系の蛍光増白剤は、いずれもその急性毒性は弱く、そのなかで最も強かった FBA-85 でも、その LD<sub>50</sub> 値は雄 11100 mg/kg、雌 10700 mg/kg であった。Thomann は、FBA-90 についてラットの経口投与での LD<sub>50</sub> 値を 15000 mg/kg 以上と報告しており、今回のマウスの成績でもその LD<sub>50</sub> 値は 20000 mg/kg 以上であった。Keplinger は FBA-260 について、ラットでの経口投与での LD<sub>50</sub> 値を 5000 mg/kg 以上、マウスでも 5000 mg/kg 以上

と報告している。一方、Thomann は同じ検体についてラットでの LD<sub>50</sub> 値を 10250 mg/kg 以上と報告している。今回のマウスでの LD<sub>50</sub> 値は 20000 mg/kg 以上であった。その他の2種類のスチルベン系蛍光増白剤ではいずれもその LD<sub>50</sub> 値は雄、雌ともに 15 g/kg あるいは 20 g/kg 以上であった。また、FBA-85 では投与初期に中枢興奮が認められたが、その他の3種類のスチルベン化合物では終始中枢抑制徴候が認められた。

一方、クマリン系蛍光増白剤である FBA-52 Free type について、Thomann らはラットで経口投与による LD<sub>50</sub> 値を 5000 mg/kg と報告している。また、RTECS<sup>6)</sup> によればその Salt type (FBA-52 Salt type) ではラットで 1600 mg/kg と記載されている。今回のマウスの LD<sub>50</sub> 値は、Free type では雄 5230 mg/kg、

Table 9. Summary of Acute Oral Toxicity of Fluoresein Brightening Agents in Mice

Material	Concentration and vehicle	Observation period	Sex	LD <sub>50</sub> with 95% confidence limits (mg/kg)	Time of death	Toxic signs
FBA-52 Salte type	12.5% olive oil	14 days	male	1780 (1590-1990)	1 hr.-3 days	Depression of spontaneous movement, hematuria, jumping, ataxia, convulsion
			female	1890 (1670-2140)	3 hr.-3 days	
FBA-52 Free type	25% olive oil	14 days	male	5230 (4460-6130)	6 hr.-2 days	Depression of spontaneous movement, jumping, ataxia, convulsion
			female	3890 (3320-4550)	3 hr.-2 days	
FBA-85	20% olive oil	7 days	male	11100 (9737-12654)	3 hr.-2 days	Acceleration of spontaneous movement, jumping, sedation, piloerection, ataxia, hypothermia
			female	10700 (9554-11894)	3 hr.-2 days	
FBA-90	20% olive oil	14 days	male	> 20000	2 days	Depression of spontaneous movement, hypothermia
			female	> 20000	-	
FBA-225	15% olive oil	7 days	male	> 15000	-	No change
			female	> 15000	-	
FBA-260	20% olive oil	7 days	male	> 20000	-	Depression of spontaneous movement
			female	> 20000	-	
FBA-135	20% olive oil	7 days	male	> 20000	-	Piloerection, sedation
			female	> 20000	-	
FBA-351	20% olive oil	7 days	male	5600 (4370-6440)	3 hr.-24 hr.	Depression of spontaneous movement
			female	4920 (4278-5658)	3 hr.-24 hr.	

雌 3890 mg/kg であり、その硫酸塩では雄で 1780 mg/kg、雌は 1890 mg/kg であり、文献値とほぼ同様の成績が得られた。また、クマリンとその誘導体の急性中毒徴候には強い中枢抑制作用が知られている。今回の FBA-52 Free type とその Salt type の中毒徴候は胃、小腸への刺激と中枢興奮が特徴であった。これらの徴候は、Free type よりも Salt type で強く認められた。なお Free type と Salt type の中毒徴候の差は、これら検体の溶解性および pH (Salt type 飽和液 = 11.4%, pH 1.2, Free type 飽和液 = 0.3%, pH 6.4) が大きく関与していると思われる。また、クマリン化合物に血液の抗凝固作用を有するものが知られているが、この作用は、肝でのビタミンKの合成阻害によって生ずるとされている<sup>7)</sup>。今回のマウスの所見で、腺胃部の限局的な出血、Salt type での血尿、皮下の血管拡張などが認められたが、他の器官・組織での出血像は認められず、今回のクマリン化合物に抗凝固作用があるか否かは明らかではなかった。

Thomann らは、FBA-135 について、ラットでの

経口投与で LD<sub>50</sub> 値を 10000 mg/kg 以上と報告している。今回のマウスの成績では雄、雌とも LD<sub>50</sub> 値は 20000 mg/kg 以上であった。また FBA-135 についても、Thomann らはその LD<sub>50</sub> 値をラットで 5580 mg/kg と報告している。今回のマウスの成績では雄で 5600 mg/kg、雌で 4920 mg/kg であり、類似した成績であった。

## 文 献

- 1) 鈴木康雄ら：衛生試験所報告, 101, 152 (1983)
- 2) 池田康和ら：衛生試験所報告, 103, 37 (1985)
- 3) P. Thomann *et al.*: Environmental Quality and Safety, Supplement Volume IV, "Fluorescent Whitening Agents", 193 (1975)
- 4) M. L. Keplinger *et al.*: *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 27, 494 (1974)
- 5) J. T. Litchfield, F. Wilcoxon: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 96, 99 (1948)
- 6) NIOSH: Registry of Toxic Effect of Chemical Substance, 1 (1981-1982)
- 7) 北川晴雄ら：薬学雑誌, 83, 1124 (1962)

## F344 ラットによる Naphthol-AS の急性毒性および亜急性毒性試験について

高田幸一・内藤克司・内田雄幸・安原加寿雄・大場 栄・佐藤千百合  
下温湯シヅ・スキルノ・中路幸男・小林和雄・戸部満寿夫

### Oral Acute and Subacute Toxicity Studies for Naphthol-AS in F344 rat

Koichi KAKADA, Katsushi NAITO, Osayuki UCHIDA, Kazuo YASUHARA, Sakae OHBA, Chiyuri SATO,  
Shizu SHIMONURI, Sukirno, Yukio NAKAJI, Kazuo KOBAYASHI and Masuo TOBE

Acute and subacute toxicity test of Naphthol-AS were carried out in F344 rats.

In the acute toxicity test, Naphthol-AS suspended in arabic gum was administered orally to a group consisting of 5 male and 5 female rats at dose levels of 0 (control) and 5 g/kg. Toxic symptoms, deaths and changes in body weight were not observed. The LD<sub>50</sub> values of Naphthol-AS were found to be over 5 g/kg.

In the subacute toxicity test, a group consisting of 10 male and 10 female rats was fed a commercial diet containing 0.56%, 1.67% and 5.0%, respectively of Naphthol-AS for 92 days. Body weight gain was suppressed slightly in both sexes at 5.0%. Biochemical examination of male rats showed that the serum levels of CK and GOT decreased in a dose-dependent manner at 0.56% and over, and T-GLY decreased in dose-dependent manner at 1.67% and over. In the treated groups, no significant change was observed in organ weight, hematological and histological examinations.

(Received May 31, 1986)

## 緒 言

Naphthol-AS [2-hydroxy-3-naphthoic acid anilide; C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>(OH)CONHC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>] は、1911年ドイツのク

リッセンハイム社で開発され、繊維の染色下漬剤として広く使用されてきた。最近、衣類による色素沈着性接触皮膚炎(黒皮症)が問題となり、その原因について追求したところ、繊維の染色下漬剤として使用され

ている Naphthol-AS が検出<sup>1-4)</sup>された。Naphthol-AS による皮膚炎については、1976年 Alayon ら<sup>5)</sup>によって初めて報告され、我が国においては、1983年に河内ら<sup>1)</sup>によりヒトのアレルギー性皮膚炎は Naphthol-AS によっても起こることが報告された。また、モルモットを用いての Maximization test においても感作作用がみとめられている。しかし、Naphthol-AS の経口毒性についての報告はほとんど見当たらない。

今回、我々は F344 ラットを用いて急性および亜急性毒性試験 (92日間) を行ったので、その結果について報告する。

### 実験材料および方法

検体：東京化成製の Naphthol-AS (LOT: AU 01, H 313) 純度 98% で、その性状は、クリーム色の微粉末で軽度の臭気があり、ニトロベンゼン、強アルカリ液には可溶、水、アルコール、ベンゼンに不溶である。

なお、急性および亜急性試験ともに本品を用いた。

動物：日本チャールスリバー社より4週令で購入した F344 ラット雌雄 (SPF) を、室温 23±1°C、湿度 55±5%、12時間照明 (午前6時～午後6時)、換気回数 18/hr (オールフレッシュ) の飼育室で、ハンガー式架台を用いてアルミケージ (寸法：W23×L21×H16 cm) にて2週間馴化飼育して実験に供した。動物は体重により層別化し、急性毒性試験では雌雄各々2群 (1群5匹)、また、亜急性毒性試験では雌雄各々4群 (1群10匹) に分けた。

急性毒性試験：Naphthol-AS に 5% アラビアゴム液を加え、40 W/V % の懸濁液になるように調製した。投与は、金属製胃管を用いて、1回強制経口投与を行った。なお、投与量の決定は、本試験に先立ち、1群2匹を用いて 5g/kg および 10g/kg を投与したところ、すべての群で死亡例はみられず、また体重を測定したところ検体による影響はみられなかった。そのた

Table 1. Hematological and Biochemical Examinations

	Items of measurement	Abbreviation	Kit
Hematology	[ Coulter Counter Model SP ]		
	Red blood cell	RBC	
	Hemoglobin	HGB	
	Hematocrit	HCT	
	Mean corpuscular volume	MCV	
	Mean corpuscular hemoglobin	MCH	
	Mean corpuscular hemoglobin concentration	MCHC	
	White blood cell	WBC	
Biochemistry	[ Gensac Auto Analyzer Type IV ]		
	Total protein	T-PRO	WAKO
	Albumin	ALB	WAKO
	Albumin-globulin ratio	A/G	Calculation
	Blood urea nitrogen	BUN	SHINOTEST
	Creatinine	CRN	BMJ
	Uric acid	UA	BMJ
	Glucose	GLU	BMJ
	Non-esterified fatty acids	NEFA	EIKEN
	Phospholipids	PL	WAKO
	Triglycerides	T-GLY	BMJ
	Total cholesterol	T-CHO	BMJ
	Alkaline phosphatase	ALP	WAKO
	Cholinesterase	CHE	BMJ
	Creatine kinase	CK	BMJ
	Aspartate aminotransferase	GOT	EIKEN
	Alanine aminotransferase	GPT	EIKEN
	$\gamma$ -Glutamyltransferase	$\gamma$ -GTP	BMJ
	Glutamate dehydrogenase	GLDH	BMJ
	Dipeptidyl-aminopeptidase	GPDP	FUJIZOKI
	Laccine aminopeptidase	LAP	WAKO
	Lactate dehydrogenase	LDH-P	SHINOTEST
	Calcium	Ca	WAKO
Phosphorus.inorganic	Pi	WAKO	
Sodium	Na	DAIICHI	
Potassium	K	DAIICHI	
Chlorine	Cl	DAIICHI	

BMJ:Boehringer Mannheim Yamanouchi. EIKEN:Eiken Kagaku Co.,Lat.  
 DAIICHI:Daiichi Pure Chemicals Co.,Lat. SHINOTEST:Shinotste Laboratory  
 WAKO:Wako Pure Chemical Industries. FUJIZOKI:Fujizoki Co.,Lat.

め、本試験の投与量は、OECD のガイドライン<sup>7)</sup>に従って 5 g/kg 用量 1 群とそのほかに対照群 1 群を設け限度試験を行った。なお、対照群には検体投与群と同容量の 5% アラビアゴム液を投与した。検体投与後の症状観察、死亡動物の有無および体重測定は 14 日間行った。さらに、14 日間の観察を終了した時点で、すべての動物を屠殺解剖して肉眼的に観察を行った後、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および卵巣について重量を測定した。

**亜急性毒性試験：**急性毒性試験の結果に基づき、OECD のガイドライン<sup>7)</sup>を参考として最高用量を 5% (2.5 g/kg 相当) として、これより公比 3 で 2 段階、すなわち 5%、1.67% および 0.56% の 3 用量を設けた。検体は船橋農場製のラット飼育用粉末飼料 (F-2) にそれぞれの割合で添加混合し、成型・乾燥して検体飼料を調製した。また、投与および観察期間は 92 日間とした。

一般状態の観察および死亡の有無については毎日、体重および摂餌量の測定は、週に 1 回行った。また、実験終了時には解剖に先立って 16 時間前に除餌を行い、その後すべての動物について、下記に示す各種検査を行った。

**血液学的検査：**頸静脈より採血し、Table 1 に示す項目を Coultercounter-SP (Coulter 社製) で測定した。

**血清生化学的検査：**頸静脈より採取した血液を 3000 rpm で 15 分間遠心分離し得られた血清を用いて、Table 1 に示す項目について測定した。なお、測定は臨床生化学自動分析機 Gemsac IV 型 (米国 Electro Nucleonic 社製) を用いて行った。また、ナトリウムおよびカリウムは、日立 702 型電解質オートアナライザーで測定した。

**臓器重量の測定：**動物は生化学的検査のための血液採取を行った後、頸静脈切断により屠殺した。すべての動物について肉眼的に観察を行った後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、胸腺、下垂体、甲状腺および副腎を摘出し、直ちに重量を測定し、さらにそれぞれの 100 g 体重比を算出した。

**病理組織学的検査：**重量測定を行った器官のほかに、顎下腺、胸腺、脾臓、胃、小腸、大腸、骨髄 (胸骨および大腿骨)、膀胱、精巣上部、精囊、背髄、坐骨神経、舌、食道、腸間膜リンパ節、子宮および大腿部筋肉、さらに肉眼的に変化を認めた組織および器官を摘出し、10% 中性ホルマリン液で固定した後、薄切片標本を作製し、常法に従いヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E) を施して鏡検した。なお、腎については、H-E 染色の他に PAS、アザン、ヘモグロビン、リボ

フスチン染色を実施した。

**統計処理：**血液学的検査、血清生化学的検査および臓器重量の成績は、等分散を 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、等分散でない場合は、Kruskal-Wallis の方法によって順位和検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は、例数が揃っている場合、Dunnett 型で、不揃いな場合は Scheffe 型で、それぞれ対照群と各処置群の有意差検定を行った。

## 実験成績

### 1. 急性毒性試験

一般状態は、検体投与 2 時間後に、5 g/kg 群で検体と同じクリーム色を呈した糞の排泄がみられた以外、雌雄ともに、特に変化は認められなかった。

動物の死亡は、対照群および 5 g/kg 群の雄、雌ともに認められなかった。

体重の推移は Fig. 1 に示すように、雄、雌ともに対照群と検体投与群との間に差はみられなかった。

実験終了時の肉眼所見および臓器重量は、雄、雌ともに検体投与による影響は認められなかった。

### 2. 亜急性毒性試験

#### 1) 一般状態および死亡

一般状態では、検体と同様のクリーム色を呈した糞便の排泄がみられた以外、雌雄ともに各群いずれも変化は認められなかった。

死亡は、対照群および各検体投与群の雌雄ともに認められなかった。

#### 2) 体重および摂餌量

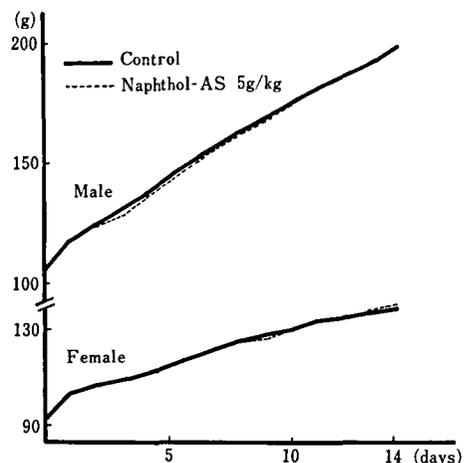


Fig. 1. Growth curves of male and female rats given orally Naphthol-AS (acute)

体重の推移は、Fig. 2,3 に示すごとく雄、雌ともに群間にはほとんど差を認めなかった。

摂餌量は、雄、雌ともに群間に差が認められなかった。

3) 血液学的検査

Table 2 に示すごとく、いずれの指標においても、雌雄ともに対照群と各検体投与群との間に差は認めら

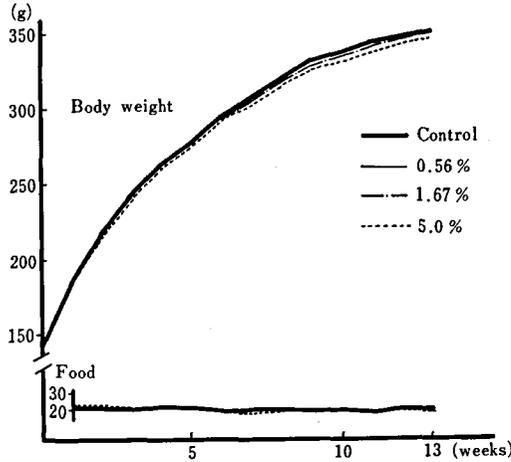


Fig. 2. Body weight and food consumption of male rats fed Naphthol-AS (subacute)

れなかった。

4) 血清生化学的検査

Table 3,4 に示すごとく、雄では 0.56% 群で CK および GOT の有意な減少および A/G の有意な増加、1.67% 群では T-GLY, CK および GOT の有意な減少、A/G の有意な増加、5.0% 群では T-GLY, CK および GOT の有意な減少、Na および Cl の有意な増加が認められた。また、有意ではないが LDH-P の減少が各群に認められた。雌では、0.56% 群では変化は認められなかった。1.67% 群では A/G および Ca の有意な減少、5.0% 群では A/G および Ca の有

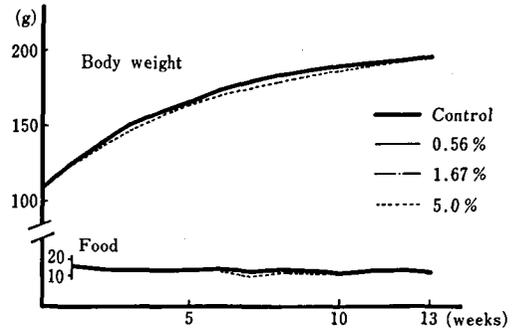


Fig. 3. Body weight and food consumption of female rats fed Naphthol-AS (subacute)

Table 2. Hematological Findings of Male and Female Rats Administered with Naphthol-AS

Test	Units	Dose (%)				
		0	0.56	1.67	5.0	
	No. of animals	10	10	10	10	
Male	RBC	6 3 x10 /mm	9.16 ± 0.35	8.90 ± 0.36	8.87 ± 0.32	8.94 ± 0.33
	HGB	g/dl	15.5 ± 0.7	15.6 ± 0.5	15.7 ± 0.7	15.6 ± 0.5
	HCT	%	43.6 ± 1.5	42.6 ± 1.7	42.4 ± 1.8	42.8 ± 1.5
	MCV	fl	47.6 ± 1.5	47.8 ± 0.7	47.7 ± 0.7	47.8 ± 0.5
	MCH	pg	17.1 ± 0.5	17.6 ± 0.3	17.6 ± 0.4	17.4 ± 0.5
	MCHC	%	38.2 ± 0.8	36.7 ± 0.7	36.8 ± 0.7	36.4 ± 1.0
	WBC	3 3 x10 /mm	4.8 ± 1.2	4.9 ± 0.9	4.1 ± 0.6	3.9 ± 0.9
Female	RBC	6 3 x10 /mm	8.14 ± 0.41	8.06 ± 0.26	8.14 ± 0.42	8.31 ± 0.40
	HGB	g/dl	14.3 ± 1.4	14.6 ± 0.6	15.2 ± 1.1	15.2 ± 0.7
	HCT	%	41.8 ± 2.1	41.1 ± 1.4	41.7 ± 2.4	42.4 ± 1.7
	MCV	fl	51.4 ± 0.5	51.0 ± 0.3	51.2 ± 0.5	51.4 ± 0.4
	MCH	pg	17.5 ± 1.4	18.1 ± 0.3	18.6 ± 0.5	18.5 ± 0.4
	MCHC	%	34.7 ± 2.4	35.7 ± 1.0	34.0 ± 1.0	36.6 ± 0.8
	WBC	3 3 x10 /mm	3.3 ± 0.2	3.5 ± 0.9	3.3 ± 0.8	3.0 ± 0.3

Results are given as mean ± S.D.

Table 3. Biochemical Findings of Male Rats Administered with Naphthol-AS

Test	Units	Dose (%) No. of animals	0	0.56	1.67	5.0
			8	8	8	8
T-PRO	g/dl		7.75 ± 0.20	7.60 ± 0.20	7.66 ± 0.28	7.87 ± 0.36
ALB	g/dl		4.78 ± 0.09	4.81 ± 0.13	4.85 ± 0.13	4.91 ± 1
A/G			1.62 ± 0.07	1.73 ± 0.06 **	1.73 ± 0.07 **	1.67 ± 0.08
BUN	mg/dl		19.3 ± 1.5	18.6 ± 1.4	18.6 ± 1.4	18.9 ± 1.7
CRN	mg/dl		0.63 ± 0.06	0.63 ± 0.04	0.68 ± 0.03	0.65 ± 0.05
UA	mg/dl		2.15 ± 0.05	1.78 ± 0.20	1.58 ± 0.30	1.42 ± 0.21
GLU	mg/dl		129 ± 27	125 ± 12	121 ± 8	115 ± 7
NEFA	meq/l		0.64 ± 0.15	0.65 ± 0.13	0.69 ± 0.15	0.62 ± 0.16
PL	mg/dl		158 ± 7	156 ± 9	154 ± 12	157 ± 5
T-GLY	mg/dl		193 ± 41	195 ± 44	124 ± 30 **	118 ± 17 **
T-CHO	mg/dl		74 ± 5	71 ± 6	72 ± 11	72 ± 6
ALP	mu/ml		243 ± 24	245 ± 32	242 ± 14	246 ± 20
CHE	mu/ml		594 ± 131	633 ± 90	473 ± 98	408 ± 72
CK	mu/ml		672 ± 130	397 ± 74 **	334 ± 77 **	292 ± 94 **
GOT	mu/ml		93 ± 10	74 ± 6 **	73 ± 11 **	71 ± 14 **
GPT	mu/ml		34 ± 4	33 ± 3	34 ± 5	36 ± 8
γ-GTP	mu/ml		0.12 ± 0.30	0.05 ± 0.11	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
LAP	mu/ml		47 ± 2	46 ± 2	47 ± 2	48 ± 2
LDH-P	mu/ml		1589 ± 523	917 ± 208	733 ± 231	446 ± 213
CLDH	mu/ml		24.3 ± 4.0	21.2 ± 3.6	26.3 ± 7.8	18.6 ± 3.5
CPDAP	mu/ml		1.53 ± 0.49	1.98 ± 0.69	1.59 ± 0.41	1.47 ± 0.33
Ca	mg/dl		10.8 ± 0.5	10.9 ± 0.5	10.7 ± 0.3	10.8 ± 0.6
Pi	mg/dl		8.2 ± 0.8	7.6 ± 0.4	7.5 ± 0.4	7.9 ± 0.7
Na	meq/l		144 ± 1	143 ± 1	145 ± 1	146 ± 1 **
K	meq/l		5.0 ± 0.3	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2	5.1 ± 0.3
Cl	meq/l		100 ± 1	101 ± 1	101 ± 1	103 ± 1 **

Results are given as mean ± S.D.

\*\* : Significant at 1% level as compared with cont.

Table 4. Biochemical Findings of Female Rats Administered with Naphthol-AS

Test	Units	Dose (%) No. of animals	0	0.56	1.67	5.0
			8	8	8	8
T-PRO	g/dl		7.27 ± 0.34	7.20 ± 0.24	7.44 ± 0.32	7.49 ± 0.27
ALB	g/dl		4.80 ± 0.19	4.64 ± 0.12	4.59 ± 0.08	4.77 ± 0.13
A/G			1.94 ± 0.10	1.82 ± 0.10	1.62 ± 0.11 **	1.76 ± 0.13 *
BUN	mg/dl		16.0 ± 1.2	16.7 ± 1.4	15.4 ± 0.8	15.8 ± 0.5
CRN	mg/dl		0.64 ± 0.04	0.69 ± 0.05	0.70 ± 0.07	0.68 ± 0.03
UA	mg/dl		2.01 ± 0.29	2.08 ± 0.21	1.78 ± 0.36	1.64 ± 0.35
GLU	mg/dl		111 ± 14	121 ± 8	131 ± 16	120 ± 6
NEFA	meq/l		0.49 ± 0.11	0.49 ± 0.18	0.47 ± 0.05	0.53 ± 0.06
PL	mg/dl		167 ± 7	165 ± 7	172 ± 9	168 ± 7
T-GLY	mg/dl		53 ± 12	49 ± 10	43 ± 3	42 ± 2
T-CHO	mg/dl		91 ± 8	91 ± 9	96 ± 12	90 ± 8
ALP	mu/ml		179 ± 15	168 ± 12	184 ± 21	176 ± 15
CHE	mu/ml		2209 ± 109	2206 ± 155	1977 ± 66	2074 ± 274
CK	mu/ml		168 ± 31	184 ± 24	234 ± 81	210 ± 49
GOT	mu/ml		75 ± 12	74 ± 9	76 ± 4	76 ± 8
GPT	mu/ml		31 ± 3	28 ± 4	27 ± 3	30 ± 4
γ-GTP	mu/ml		0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
LAP	mu/ml		44 ± 2	43 ± 2	42 ± 2	45 ± 2
LDH-P	mu/ml		291 ± 108	329 ± 95	569 ± 237	594 ± 219 *
CLDH	mu/ml		19.3 ± 5.8	19.3 ± 6.6	17.2 ± 3.0	17.7 ± 6.7
CPDAP	mu/ml		0.77 ± 0.24	0.74 ± 0.23	0.44 ± 0.13	0.70 ± 0.31
Ca	mg/dl		10.4 ± 0.6	10.0 ± 0.3	9.3 ± 0.3 **	9.6 ± 0.5 *
Pi	mg/dl		6.7 ± 1.0	6.5 ± 1.6	6.3 ± 0.8	6.4 ± 0.9
Na	meq/l		143 ± 5	142 ± 3	146 ± 4	149 ± 5
K	meq/l		5.5 ± 0.8	4.8 ± 0.4	4.8 ± 0.2	5.5 ± 0.2
Cl	meq/l		101 ± 3	101 ± 2	103 ± 2	106 ± 3

Results are given as mean ± S.D.

\* : Significant at 5% level as compared with cont.

\*\* : Significant at 1% level as compared with cont.

意な減少, LDH-P の有意な増加が認められた。

%群の肝臓の比重量が有意の減少を示した。

## 5) 臓器重量

雌では, 対照群と各検体投与群ともに変化は認めら

Table 5, 6 に示すごとく, 雄では 1.67% および 5.0

れなかった。

Table 5. Organ Weights of Male Rats Administered with Naphthol-AS

Organs	Dose (%)	No. of animals			
		0	0.56	1.67	5.0
Body weight	g	332.1 ± 8.8	330.6 ± 11.3	332.2 ± 19.5	327.0 ± 11.9
Absolute Organ weight					
Brain	g	1.91 ± 0.04	1.91 ± 0.04	1.92 ± 0.03	1.91 ± 0.05
Heart	g	1.06 ± 0.08	1.01 ± 0.05	1.04 ± 0.07	0.97 ± 0.08
Lung	g	1.05 ± 0.08	1.00 ± 0.04	1.04 ± 0.06	1.02 ± 0.11
Liver	g	9.00 ± 0.68	8.61 ± 0.42	8.52 ± 0.47	8.42 ± 0.54
Kindney	g	2.11 ± 0.12	2.11 ± 0.17	2.12 ± 0.12	2.17 ± 0.15
Spleen	g	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.05	0.57 ± 0.09	0.55 ± 0.05
Testis	g	2.99 ± 0.08	2.93 ± 0.09	2.90 ± 0.10	2.90 ± 0.11
Pituitary	mg	8.0 ± 1.2	7.1 ± 1.5	7.8 ± 1.5	7.7 ± 1.3
Thyroid	mg	18.7 ± 4.2	16.7 ± 3.3	18.6 ± 5.2	17.4 ± 5.1
Adrenal	mg	43.9 ± 5.0	42.3 ± 4.1	42.0 ± 4.7	42.6 ± 4.2
Thymus	g	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.10	0.29 ± 0.08	0.25 ± 0.07
Relative Organ Weight					
Brain	g%	0.57 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.02
Heart	g%	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Lung	g%	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.04
Liver	g%	2.71 ± 0.15	2.60 ± 0.08	2.57 ± 0.07 *	2.58 ± 0.11 *
Kindney	g%	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.66 ± 0.04
Spleen	g%	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02
Testis	g%	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.04	0.87 ± 0.03	0.89 ± 0.03
Pituitary	g%	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.4
Thyroid	mg%	5.6 ± 1.3	5.1 ± 1.0	5.7 ± 1.7	5.3 ± 1.5
Adrenal	mg%	13.2 ± 1.5	12.8 ± 1.3	12.6 ± 1.1	13.0 ± 1.2
Thymus	g%	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02

Results are given as mean ± S.D

\* : Significant at 5% level as compared with cont.

Table 6. Organ Weights of Female Rats Administered with Naphthol-AS

Organs	Dose (%)	No. of animals			
		0	0.56	1.67	5.0
Body weight	g	189.0	188.2 ± 11.2	188.5	188.3 ± 8.6
Absolute Organ weight					
Brain	g	1.73 ± 0.03	1.74 ± 0.04	1.76 ± 0.05	1.75 ± 0.04
Heart	g	0.61 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.62 ± 0.03	0.60 ± 0.04
Lung	g	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.70 ± 0.03	0.73 ± 0.04
Liver	g	4.51 ± 0.17	4.37 ± 0.25	4.41 ± 0.42	4.55 ± 0.33
Kindney	g	1.27 ± 0.09	1.23 ± 0.11	1.20 ± 0.11	1.23 ± 0.07
Spleen	g	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.35 ± 0.03
Ovary	mg	60.6 ± 5.3	59.6 ± 7.4	60.3 ± 8.4	59.6 ± 5.6
Pituitary	mg	10.2 ± 1.8	9.7 ± 2.4	9.1 ± 1.2	9.8 ± 1.8
Thyroid	mg	13.5 ± 3.0	15.7 ± 3.9	12.4 ± 3.6	15.6 ± 3.9
Adrenal	mg	50.0 ± 3.2	49.0 ± 2.4	49.7 ± 4.0	49.3 ± 3.4
Thymus	g	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
Relative Organ Weight					
Brain	g%	0.92 ± 0.05	0.93 ± 0.06	0.93 ± 0.04	0.93 ± 0.04
Heart	g%	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Lung	g%	0.38 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.02
Liver	g%	2.39 ± 0.13	2.33 ± 0.15	2.32 ± 0.17	2.42 ± 0.17
Kindney	g%	0.67 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.65 ± 0.03
Spleen	g%	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Ovary	mg%	32.0 ± 2.1	31.8 ± 5.0	32.0 ± 4.7	31.7 ± 2.7
Pituitary	g%	5.4 ± 0.8	5.2 ± 1.5	4.8 ± 0.7	5.2 ± 0.9
Thyroid	mg%	7.1 ± 1.6	8.4 ± 2.2	6.6 ± 2.0	8.3 ± 1.9
Adrenal	mg%	26.5 ± 1.6	26.1 ± 1.8	26.4 ± 2.6	26.2 ± 1.6
Thymus	g%	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.00

Results are given as mean ± S.D

## 6) 肉眼的所見

雄の5%群で腎臓の色調変化(軽度の帯黒色)が2例に認められたほかは、特記すべき所見は認められなかった。また、雌ではすべての群で変化はみられなかった。

## 7) 病理組織学的所見

雄では、対照群を含むすべての群に、腎の近位尿細管上皮細胞あるいは尿細管内に H-E 染色でエオジンに好染する大小不同の滴状物(Fig. 4) および尿細管上皮細胞の再生が認められた。この滴状物はアザン染色では赤褐色に染色されたが、ヘモグロビンおよびリポフスチン染色では一部陽性、PAS 染色では陰性であった。また、この滴状物の出現頻度は群間に差はみられなかった。

雌では、対照群を含むすべての群において腎尿細管内に石灰沈着がみられた。

## 考 察

Naphthol-AS の経口投与による急性毒性は、5 g/kg の投与でも動物の死亡が認められず、その急性毒性値(LD<sub>50</sub>)は5 g/kg 以上と推察された。また、検体投与による影響としては、一般状態にはほとんど異常は認めなかったが、投与後2時間目頃より検体と同じクリーム色の糞が多量に排泄された。福岡ら<sup>8)</sup>は、Na-

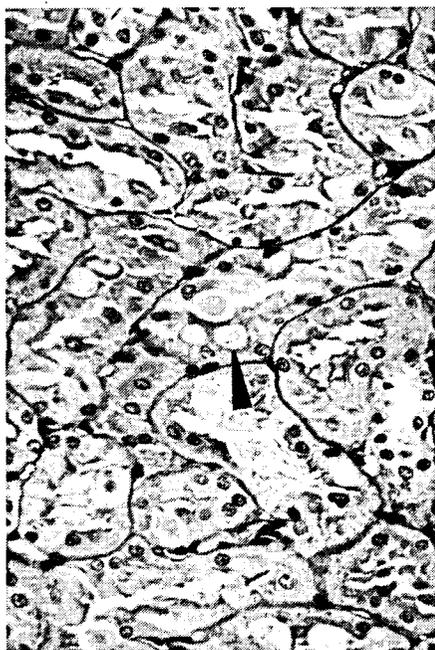


Fig. 4. Eosinophilic body (arrow) was observed in the cytoplasm of the proximal renal tubules of control rats (PAS stain,  $\times 100$ )

phthol-AS の腸管からの吸収は非常に悪く、約97%が糞中に排泄されることを報告している。

亜急性毒性では、急性毒性試験の結果、その毒性が弱いことが予測されたので OECD の化学物質の毒性試験指針<sup>7)</sup>を参考にして、飼料中の最高濃度を5%とし、そのほかに1.67%および0.56%の群を設け実験を行った。

血清生化学的検査で有意に減少を示したものは、雄で CK, GOT, T-GLY および LDH-P, 雌で A/G および Ca であった。また有意に増加を示したものは、雄で A/G, Na および Cl, 雌で LDH-P であった。しかし、病理組織学的には、これらの変化と関連づけられるような所見は得られなかった。臨床検査における生化学的検査値の変化と組織学的変化の一致性は、一般的に生化学的検査値の増加(上昇)の場合の意義が示されているが、低下(減少)と組織変化との関係については不明である。なお、鈴木<sup>9)</sup>は、ラットに Blasticidin S を3カ月間投与したとき、著明な ALP の減少を認め、腸由来の ALP 減少に起因することを確認した。しかし、腸の光顕的検査では異常が認められなかったと報告している。このように、血清中酵素の減少と組織学的変化については、今後更に検討する必要があるものと考えられる。

組織学的検査では、対照群を含む雄の各群で、近位尿細管上皮細胞および尿細管内に、エオジンおよびアザンに好染し、リポフスチンおよびヘモグロビン染色で一部陽性、PAS 染色で陰性の大小不同の滴状物が認められ、eosinophilic body (好酸性小体)として報告<sup>10-12)</sup>されている像と一致した。この滴状物の出現頻度は対照群を含めて群間に差はなく、検体投与に起因するものではないと思われる。小野寺ら<sup>13)</sup>は、この変化を電顕的に検索し、この滴状物はライソゾームと推定され、細胞内での合成、分泌された物質ではなく、何らかの機転による物質の再吸収、あるいは貯留像であろうと報告している。そのほかに、解剖時に小腸および大腸に少量の検体の残留がみられたが、充鬱血、出血あるいは潰瘍などの所見は認められず、また組織学的検査においても変化が認められなかった。

以上のことから、経口投与による Naphthol-AS の生体への影響は弱いものと考えられる。

## ま と め

Naphthol-AS の急性毒性を調べる目的で、雌雄の F344 ラット(6週令)に5 g/kg を1回強制経口投与し、一般状態、死亡発現および体重などについて調べた。その結果、検体投与に起因する中毒症状および

死亡例の発現は認められず、体重にも変化が見られなかった。また観察終了時の剖検所見でも変化は認められなかったことから、Naphthol-ASのLD<sub>50</sub>は5g/kg以上であり、またその急性毒性は弱いことが示唆された。

亜急性毒性試験では、雌雄1群10匹のF344(6週令)に0, 0.56, 1.67%および5.0%添加飼料を92日間与えた。その結果、雌雄ともに一般状態、体重に変化は認められず、死亡例も認められなかった。

血清生化学的検査では、雄の0.56%群以上でCKおよびGOT、1.67%群以上でT-GLYの有意な減少が、雌では1.67%群以上でA/GおよびCaの有意な減少が認められた。

病理組織学的検査では、雌雄ともに検体投与による変化は認められなかった。

これらの結果から、Naphthol-ASの経口急性およ

び亜急性毒性は弱いことが示唆された。

## 文 献

- 1) 河内繁雄ら: 第47回日本皮膚科学会抄録, (1983)
- 2) 早川律子ら: 皮膚, 27, (4) 831 (1985)
- 3) 早川律子ら: 日本皮膚科学雑誌, 95, (13), 1441 (1985)
- 4) A. Hayakawa *et al.*: *Contact Dermatitis*, 13, 20 (1985)
- 5) A. Alayon *et al.*: *Contact Dermatitis*, 2, 129 (1976)
- 6) 岡田富雄ら: 日本皮膚科学雑誌, 95, (13) 1487 (1985)
- 7) OECD 化学物質毒性試験指針, (1985)
- 8) 福岡正道ら: 厚生省報告, (1986)
- 9) 鈴木幸子: 東邦医学雑誌, 24, (5,6) 877 (1977)
- 10) 内田和美ら: 実験動物, 29, 45 (1980)
- 11) 尾上正治ら: 実験動物, 27, 405 (1978)
- 12) 河合清之ら: 実験動物, 29, 181 (1980)
- 13) 小野寺博志ら: 衛生試験, 103, 15 (1985)

## Sorbitan monostearate の妊娠全期間投与におけるラットの胎仔および出産仔に及ぼす影響

高田幸一・門馬純子・堀内茂友・鈴木康雄・戸部満寿夫

### Effect of Oral Administration of Sorbitan Monostearate on Prenatal and Postnatal Developments in Rat

Koichi TAKADA, Junko MOMMA, Shigetomo HORIUCHI, Yasuo SUZUKI and Masuo TOBE

Effects of sorbitan monostearate (Span 60) on prenatal and postnatal development of Slc:Wistar rat were examined. The material was administered by gavage during the whole gestation stage at dose levels of 500 and 1000 mg/kg/day.

The results were as follows

- 1) Effects on the dams: In the treated groups, no significant changes were observed in their general appearance, fertility index, and number of corpora lutea and implants.
- 2) Effects on the fetuses: In the treated groups, no significant changes were observed in the number of live fetuses and dead fetuses, sex ratio, body weight, external findings and skeletons.
- 3) Effects on the offspring: Body weight gain of offspring was suppressed slightly at a dose level of 1000 mg/kg. However, no alterations were observed in litter size, viability index on the 4th day, lactation index, external findings and skeletons.

It is concluded that Span 60 has no teratogenic effect in rat under the present experimental conditions.

(Received May 31, 1986)

## 緒 言

非イオン系界面活性剤の1つである、Sorbitan monostearate (以下: Span 60)はW/O型乳化剤であり、食品、化粧品および医薬品などの乳化剤として、また

繊維の柔軟剤として広く使用されている。

Span 60は、多方面に使用されているにもかかわらず、催奇形性に関する成績はほとんど見当たらない。そこで一連の界面活性剤に対する毒性試験の一環として Span 60 について催奇形性試験を行ったので、そ

の成績を報告する。

## 実験材料および方法

### 1. 検体

本試験で用いた Span 60 (東京化成工業製：純度95%) は淡黄色、ろう状で冷水、石油エーテル、アセトンにほとんど溶けず、トルエン、四塩化炭素、エーテル、アルコールおよびスクワランなどに溶解する。

### 2. 動物

Slc: Wistar 系ラット (静岡県実験動物農業協同組合産) を雌11週令、雄12週令で購入し、2週間馴化飼育した後、雌1:雄1の割合で繁殖ケージ内にて、終夜(約16時間)同居させ、翌朝、膣垢中に精子を認めたラットを妊娠動物とみなし、当日を妊娠0日と定めた。妊娠動物は各群に順次配分し、個別飼育を行った。なお、動物は室温  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、点灯6時、消灯17時の照明を施したコンベンショナルな動物室でラット・マウス繁殖用固形飼料(NMF, オリエンタル酵母製)と水を自由に与え飼育した。

### 3. 検体調製および投与方法

実験に先立ち、スクワラン、オリーブ油およびエタノールを用いて Span 60 の溶解性を調べた結果、スクワラン (Squalane,  $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ : 性状は液体で粘性が低い) が最も高い溶解率を示したので、スクワランを検体調製に使用した。なお、スクワランに Span 60 を20%以上溶解すると粘稠度を増し、投与が難しくなるので、Span 60 の最大希釈濃度を20%とした。

投与用量は、Span 60 の溶解性およびラットに対する投与容量を考慮して高用量を 1000 mg/kg、低用量を 500 mg/kg とした。検体は20%およびその半量の10%溶液を調製し、それぞれラット体重 100 g 当たり 0.5 ml を投与した。また、溶媒対照群にはスクワランを投与し、さらにスクワランの影響をみるために蒸留水対照群を設けた。投与量は、検体投与と同様にラット体重 100 g 当たり 0.5 ml とした。検体は、各群20匹の妊娠ラットに妊娠全期間1日1回、胃管を用いて強制経口投与した。

### 4. 観察および測定

#### 1) 母体の観察

母体の一般状態の観察および体重の測定は、妊娠0日目より妊娠20日目まで毎日行った。また、哺乳母体は、分娩時より3週目まで週1回、体重を測定した。

なお、妊娠末期(20日目)に帝王切開した母体については主要臓器を肉眼的に観察した。

#### 2) 末期胎仔の観察

各群12~13匹の妊娠母体は分娩予定日の前日(妊娠

20日目)にエーテル麻酔下で帝王切開して子宮を摘出し、黄体数、着床数、死亡胎仔数(胎盤遺残数および浸軟胎仔数)および生存胎仔数を調べた。

生存胎仔数については、口腔内観察を含む外形検査を行い、さらに体重を測定した後、胸腔および腹腔内の臓器を摘出し、70%エタノール液で固定し、以後 Dawson 法<sup>1)</sup>に準じてアリザニン Red-S 染色の骨標本を作製し、骨格検査を拡大鏡下で行った。

なお、化骨状態は中手骨、中足骨および仙・尾椎の化骨数によって調べた。

#### 3) 出産仔の観察

1群5匹の母体を自然分娩させ、出産仔数、生死仔数、出産仔の外形異常を調べた。その後、出産仔は、3週令時まで母体に哺育させ哺育率を算出した。出産仔は、週1回1腹ごとに体重を測定し、さらに生後の身体発育に及ぼす影響を調べる目的で耳介展開日、歯牙萌出日、発毛日、眼瞼開裂日および耳穴開孔日を観察した。

なお、出産仔は分娩後3週目にエーテル麻酔下で屠殺し、外形を観察し、さらに胎仔の骨格検査と同様の方法にて骨格標本作製し、骨格検査を行った。

#### 4) 統計処理

妊娠率、哺育率は  $\chi^2$  検定<sup>2)</sup>、出産仔の生存率、性比、胎仔死亡率、骨格異常の出現率については Wilcoxon の順位和検定<sup>3)</sup>、母体の体重および摂餌量、黄体数、着床数、生存胎仔数、胎仔体重、出産仔数および出産仔の体重は等分散を 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、等分散でない場合は Kruskal-Wallis の方法によって順位和検定を行った。群間に有意性が認められた場合の多重比較は、例数が揃っている場合は Dunnett 型で、不揃いな場合は Scheffe 型で、それぞれ対照群と各処置群の有意差検定<sup>4)</sup>を行った。

## 結 果

### 1. 母体に及ぼす影響

#### 1) 一般状態および死亡

蒸留水群、スクワラン群および Span 60 投与群ともに試験期間中の一般状態に変化は観察されず、死亡例も認められなかった (Table 1 参照)。

#### 2) 体重の推移

妊娠期間中における各群の母体の体重増加量の推移を Fig. 1 に示した。蒸留水対照群を含む各群間に特に大きな差は認められなかった。

#### 3) 摂餌量の推移

Fig. 2 に示すごとく、群間に差は認められなかった。

## 4) 妊娠率

妊娠率は、各群で85~90%を示し、蒸留水対照群を含む各群間に差は認められなかった (Table 1 参照).

## 5) 剖検所見

各群の母体を妊娠20日目に屠殺して得られた成績を Table 2 に示す。子宮重量、黄体数および着床数では蒸留水およびスクワラン対照群と Span 60 投与群との間に有意な変化は認められなかった。母体の主要

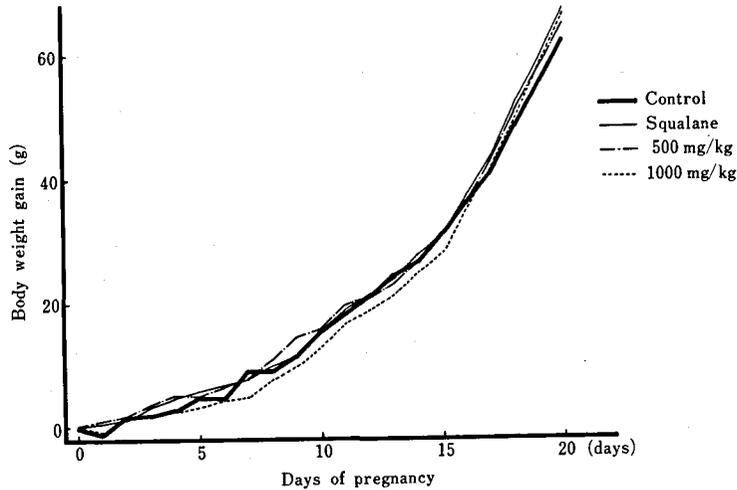


Fig. 1. Effect of oral administration of Span 60 on body weight gain of pregnant rat

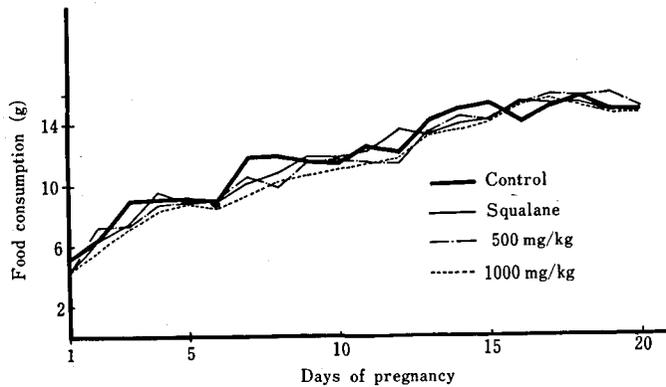


Fig. 2. Effect of oral administration of Span 60 on food consumption of pregnant rat

Table 1. Effect of oral administration of Span 60 on pregnant rats

Dose (mg/kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/kg	1000mg/kg
No. of dams examined	20	20	20	20
No. of pregnant dams (Fertility index)	18 (90.0)	18 (90.0)	17 (85.0)	17 (85.0)
No. of dead dams	0	0	0	0
No. of dams with live fetuses	18	18	17	17
No. of dams for fetal examination	13	13	12	12
No. of dams for postnatal examination	5	5	5	5

臓器の肉眼所見では、各群ともに著変は認められなかった。

2. 胎仔に及ぼす影響

1) 生存胎仔数, 性比, 体重および死亡胎仔数

Table 3 に示すごとく, 平均生存胎仔数, 性比, 胎仔体重および胎仔死亡率では蒸留水およびスクワラン対照群と Span 60 投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 外形検査

胎仔の外形異常は, すべての群において1例も認められなかった。なお, 1000 mg/kg 群で発育遅延胎仔(体重 1.5 g) 1匹を認めた (Table 3 参照)。

3) 骨格検査

生存胎仔の骨格検査の成績を Table 4 に示す。骨格の奇形は各群ともに認められなかった。骨格の変異としては, 後頭骨の形成不全が蒸留水対照群で1例 (1.1%), 頸椎椎弓の形成不全が 500 mg/kg 群で2例

(2.2%) および 1000 mg/kg 群で1例 (0.9%), 頸肋が蒸留水対照群で1例 (1.1%), 500 mg/kg 群で4例 (4.3%) および 1000 mg/kg 群で3例 (2.8%), 胸骨核の非対称が両対照群を含む各群に3例 (2.6%)~5例 (5.8%), 胸骨核形成不全が両対照群を含む各群に27例 (29%)~39例 (44%), 腰肋がスクワラン対照群で3例 (2.6%) および 500 mg/kg 群で1例 (1.0%), それぞれ観察された。しかし, 蒸留水およびスクワラン対照群と Span 60 投与群との間に有意差は認められなかった。なお, 中手骨, 中足骨および仙・尾椎の化骨数にて化骨状態を調べたが, 各群間に有意の差は認められなかった。

3. 出産仔に及ぼす影響

1) 分娩数, 生存率, 哺育率および外形検査

各群5匹の妊娠母体を自然分娩させ, 出産仔の生後発育に及ぼす影響を調べた。Table 5 に示すごとく, 分娩数, 4日令時生存率および哺育率では蒸留水およ

Table 2. Effect of oral administration of Span 60 on pregnant rats

Dose (mg/Kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of dams	13	13	12	12
Uterine weight with fetuses	35.58±15.17	43.00±10.30	40.08±9.99	42.33±11.09
No. of corpora lutea (mean ± S.D.)	139 (10.69±2.29)	135 (10.38±1.32)	120 (10.00±2.37)	124 (10.33±0.98)
No. of implants (mean ± S.D.)	93 ( 7.15±3.02)	121 ( 9.31±1.80)	96 ( 8.00±3.02)	110 ( 9.17±2.41)

Table 3. Effect of oral administration of Span 60 to pregnant rats on fetal development

Dose (mg/Kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of dams	13	13	12	12
No. of total implants	93	121	96	110
No. of live fetuses (mean ± S.D.)	87 (6.69±3.15)	116 (8.92±2.06)	93 (7.75±3.02)	107 (8.92±2.39)
Sex ratio (Male/Female)	1.12 (46/41)	1.21 (63/52)	1.07 (48/45)	0.81 (48/59)
Body weight (g)				
Male (mean ±S.D.)	3.38±0.14	3.41±0.36	3.35±0.51	3.37±0.11
Female (mean ±S.D.)	3.00±0.21	3.29±0.33	3.21±0.15	3.13±0.18
No. of dead fetuses (%)	6 (6.54)	5 (4.13)	3 (3.13)	3 (2.73)
Early death	6	5	3	3
Late death	0	0	0	0
No. of retardations	0	0	0	1
No. of fetuses with external anomaly	0	0	0	0

Table 4. Effect of oral administration of Span 60 to pregnant rats on skeletal development of the fetuses

Dose (mg/Kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of fetuses examined	87	116	93	106
Malformation	0	0	0	0
Incompletely ossified occipital bone	1 (1.10)	0	0	0
Incompletely ossified cervical vertebral arches	0	0	2 (2.15)	1 (0.94)
Cervical rib	1 (1.10)	0	4 (4.30)	3 (2.83)
Asymmetry of sternebrae	5 (5.75)	3 (2.59)	4 (4.30)	5 (4.72)
Incompletely ossified sternebrae	39 (44.34)	39 (33.62)	27 (29.03)	39 (36.79)
Lumber rib	0	3 (2.59)	1 (1.08)	0
Average number of metacarpus (mean $\pm$ S.D.)	2.56 $\pm$ 0.90	3.40 $\pm$ 1.59	3.04 $\pm$ 0.79	3.08 $\pm$ 0.73
Average number of metatarsus (mean $\pm$ S.D.)	0	0.51 $\pm$ 1.74	0	0
Average number of sacral and caudal vertebrae (mean $\pm$ S.D.)	8.94 $\pm$ 0.23	9.15 $\pm$ 0.99	8.93 $\pm$ 0.38	8.80 $\pm$ 0.20

Numerals in parentheses indicate the average of the incidence (%) in each litter.

Table 5. Effect of oral administration of Span 60 to pregnant rats on postnatal development of the offspring

Dose (mg/Kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of dams	5	5	5	5
No. of newborns at birth (Mean $\pm$ S.D.)	51 (10.2 $\pm$ 1.64)	47 (9.4 $\pm$ 2.70)	42 (8.4 $\pm$ 2.41)	48 (9.6 $\pm$ 1.67)
No. of offspring at 4 days (Mean $\pm$ S.D.)	46 (9.2 $\pm$ 2.86)	47 (9.4 $\pm$ 2.70)	41 (8.2 $\pm$ 2.59)	48 (9.6 $\pm$ 1.67)
Viability index	90.2	100	97.6	100
No. of offspring at 3 weeks (Mean $\pm$ S.D.)	42 (8.4 $\pm$ 2.51)	34 (6.8 $\pm$ 3.56)	41 (8.2 $\pm$ 2.59)	44 (8.8 $\pm$ 1.92)
Lactation index	91.3	72.3	100	91.7

$$\text{Viability index} = \frac{\text{No. of offspring at 4 days}}{\text{No. of newborns at birth}} \times 100$$

$$\text{Lactation index} = \frac{\text{No. of offspring at 3 weeks}}{\text{No. of offspring at 4 days}} \times 100$$

ビスクワラン対照群と Span 60 投与群との間に有意差は認められなかった。また、出産時における外形検査では、各群とも1例の異常も認められなかった。

#### 2) 体重の推移

出産仔の平均体重の推移を Fig. 3 に示す。1000 mg/kg 群で極軽度の増加抑制を認められたが、両対照群との間に有意差は認められなかった。また、他の群間も差は認められなかった。

#### 3) 身体発育

発育については、Table 6 に示すごとく、耳介展開

日、発毛日、歯牙萌出日、耳穴開孔日および眼瞼開裂日では各群間に差は認められなかった。

#### 4) 外形異常

3週令時における外形検査では、両対照群を含む各群で1~2例の曲尾をみたが、両対照群と比べ有意の差は認められなかった。

#### 5) 骨格検査

出産仔の骨格変異としては、Table 7 に示すごとく、頸肋が蒸留水対照群で1例(2.4%)、スクワラン対照群で1例(2.9%)、500mg/kg で5例(12.2%) およ

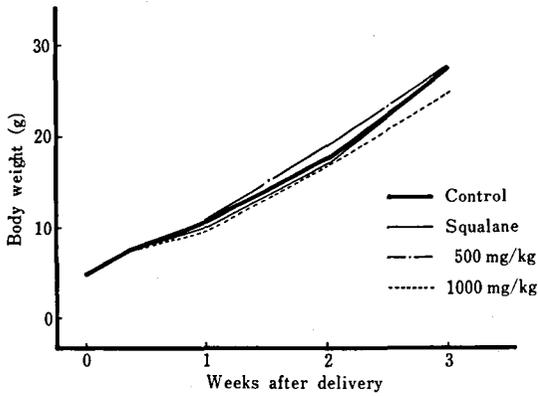


Fig. 3. Effect of oral administration of Span 60 to pregnant on body weight of the offspring

び 1000 mg/kg 群で 3 例 (6.3%) に観察されたが、両対照群と比べ有意の差は認められなかった。また尾椎の弯曲は、両対照群を含む各群で 1~2 例みられたが、両対照群と比べ有意差は認められなかった。仙・尾椎数は各群間に差は認められなかった。

## 考 察

妊娠ラットに Span 60 を 500 および 1000 mg/kg の用量で投与した。

母体については、体重の抑制、毒性の徴候および死亡は認められず、毒性が弱いことが考えられる。また、妊娠率、子宮重量、黄体数および着床数に Span 60 の影響を示唆する結果は得られなかった。

胎仔については、生存胎仔数、性比、体重および死亡胎仔数に差はなく、外形異常も認められなかった。なお、1000 mg/kg 群で 1 例の發育遅延胎仔を認めたが、その発生率は低く、Span 60 に起因するものとは考えられない。また、胎仔の骨格変異として、頸椎椎弓の形成不全、頸肋、胸骨核の非対称、胸骨核形成不全などが各群に散見されたが、当研究室のバックグラウンドデータならびに自然発生奇形に関する報告<sup>5)</sup> との比較において、この発生頻度および形状ともに Span 60 に起因したものとは考えられない。

出産仔については、分娩数、生存率、哺育率および出生時の外形検査に差は認められなかった。体重の推移では、1000 mg/kg 群で出産仔体重の軽度の増加抑

Table 6. Effect of administration of Span 60 to pregnant rats on postnatal differentiation of the offspring

Dose (mg/kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of offspring examined	42	34	41	44
Separation of ear auricula (days)	3.6±0.55	3.0±0.0	3.2±0.45	3.0±0.0
Emergence of abdominal hair (days)	8.0±0.71	7.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0
Eruption of incisor tooth (days)	10.6±0.55	10.4±0.89	10.4±0.55	10.6±0.55
Opening of external auditory meatus (days)	15.0±1.22	14.8±0.84	15.4±0.55	16.4±0.89
Opening of eyelids (days)	17.8±0.45	17.4±0.89	17.0±0.71	17.4±1.40

Table 7. Effect of oral administration of Span 60 to pregnant rats on skeletal development of the offspring

Dose (mg/kg)	Normal Cont. (distilled water)	Vehicle Cont. (Squalane)	500mg/Kg	1000mg/Kg
No. of offspring examined	42	34	41	44
Cervical rib (%)	1 (2.4)	1 (2.9)	5 (12.2)	3 (6.3)
Flexure of the tail (%)	1 (2.4)	1 (2.9)	2 (4.9)	1 (2.3)
Average number of sacral and caudal vertebrae	38.81±0.19	32.94±0.08	33.13±0.33	32.80±0.13

制が認められたが、両対照群と比較して有意差は認められなかったことから Span 60 の影響とは考え難い。3週令時の外形検査で各群1～2例に曲尾がみられたが出産時には認められなかった。この変化は、骨格検査における尾椎の弯曲と判定されたものであり、発育によって顕著になったものと思われる。骨格検査では、頸肋が Span 60 投与群でやや多くみられたが、有意の差は認められず、この発生頻度は Span 60 に起因したものとは考えられない。

### ま と め

Span 60 をラットの妊娠全期間、連続強制経口投与し、胎仔および出産仔に対する影響を検討した。Span 60 は、スクワランに溶解し、500 mg/kg/day および 1000 mg/kg/day を投与した。対照としては、蒸留水およびスクワランを投与した。

#### 1. 母体に及ぼす影響

各群で一般状態、体重、黄体数、着床数および子宮重量にも変化は認められなかった。

#### 2. 胎仔に及ぼす影響

Span 60 投与群では胎仔数および胎仔体重、胎仔死亡率に有意な変化は認められず、外形、骨格の検査においても、特に Span 60 によると考えられる異常は認められなかった。

#### 3. 出産仔に及ぼす影響

1000 mg/kg/day 群では、出産仔の体重に極軽度の増加抑制がみられた他、分娩仔数、4日令生存率、哺育率、発育分化に変化は認められず、外形検査および骨格検査においても異常は認められなかった。

以上の結果より本実験条件下では Span 60 は、着床、化骨および発育分化に影響はみられず、催奇形性は有しないものと思われる。

### 文 献

- 1) A. B. Dawson: *Stain. Technol.*, **1**, 123 (1926)
- 2) 佐久間昭: 生物検定法, p. 234 (1975) 東大出版
- 3) 佐久間昭: 簡便統計手法, p. 5 (1965) 日本レダリー
- 4) 畑村又好 共訳: スネデカー, コ克蘭の統計的方法, (1983) 岩波書店
- 5) 安田峯生ら: 先天異常, **13**, 25 (1973)

## メチルヘスペリジンの妊娠期投与によるラット胎仔の発生に及ぼす影響

川島邦夫・中浦楨介・宇佐見 誠・山口 恵  
田中 悟・高仲 正・大森義仁

### Effect of Methyl Hesperidin on Prenatal Developments of Rats

Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Makoto USAMI, Megumi YAMAGUCHI,  
Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI

Methyl hesperidin was given to pregnant rats by oral intubation during days 7 to 17 of gestation at dose levels of 0, 2, 4 and 8 g/kg, and its teratogenic effect was examined in the fetuses.

No changes in maternal body weight gain, food consumption and general symptoms were found in the all methyl hesperidin treated groups. There was no evidence of an increase in fetal death or of malformation attributable to the treatment with methyl hesperidin in any of dose levels examined.

It is concluded that methyl hesperidin had no teratogenic effect in rats under the present experimental conditions.

(Received May 31, 1986)

我々は、食品添加物に用いられている化学物質の安全性評価に関する研究の一環として、催奇形性について検討している。此れまでにフリルフラマイド<sup>1)</sup>、没食子酸プロピル<sup>2)</sup>、チアベンタゾール<sup>3)</sup>などの成績をそれぞれ報告した。

今回は、栄養強化剤として使用されているメチルヘスペリジンを妊娠ラットに投与し、胎仔発生に及ぼす影響について検索したので、その成績を報告する。

メチルヘスペリジンは昭和32年に食品添加物に指定され、ジュースに 50 ppm 程度使用されており<sup>4)</sup>、急

性毒性も弱いことが知られている<sup>5)</sup>。しかし、催奇形性に関する報告は認められない。

## 実験方法

動物はウィスター系ラット（日本ラット、12～13週齢）を用いた。妊娠ラットを得るために未経産雌を雄と終夜同居させ、翌朝膣垢中に精子が認められた雌ラットを実験に供し、この日を妊娠0日として起算した。妊娠ラットはアルミ製ケージ（夏目製作所製）に1匹ずつ収容し、固形飼料（オリエンタル酵母，MF）および水道水を自由に摂取させた。動物飼育室は温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 5\%$ 、換気回数15/hr、明暗交代12時間（明期6:00～18:00）とした。

メチルヘスペリジンは食品添加物公定書規格品（浜理薬品工業，Lot. No. TO8PG-177）を用いた。メチルヘスペリジンは蒸留水に溶解して投与した。投与量はメチルヘスペリジンの毒性が極めて弱いことから<sup>4,5)</sup>、その溶解性およびラットに対する投与液量を考慮して、投与可能な最大量と考えられる $8\text{ g}/16\text{ ml}/\text{kg}$ を最高用量と定め、以下公比2で除し、 $4\text{ g}/8\text{ ml}/\text{kg}$ および $2\text{ g}/4\text{ ml}/\text{kg}$ の3段階とした。各群19～20匹の妊娠ラットに胎仔の器官形成期を含む妊娠7～17日の間毎日1回胃ゾンデを用いて強制経口投与した。なお、対照群のラットには蒸留水 $16\text{ ml}/\text{kg}$ を同様に経口投与した。妊娠ラットは毎日一般状態を観察し、体重および摂餌量を測定した。妊娠20日目にエーテル麻酔下で帝王切開して子宮を摘出し、黄体数、着床数および胎仔死亡を調べた。生存胎仔については肉眼触手による外表異常の検索を行い、体重を測定した。各母体について生存胎仔数の約1/3はブアン液で約2週間固定したのち、ウィルソンの方法<sup>6)</sup>にしたがって内部器官の検査を行った。残り約2/3の胎仔は90%エタノール液

で固定後、アリザリン赤染色骨格標本を作製して骨格系の異常を拡大鏡下で調べた。

実験成績は母体を評価の単位として、 $\chi^2$ 検定（母ラットの死亡率）、t検定（母ラットの体重、摂餌量、黄体数、着床数、胎仔数、胎仔体重）および順位と検定（胎仔の死亡率、形態異常発生頻度、骨化数）を用い、 $P<0.05$  および  $P<0.01$  の水準で対照群と比較した。なお、t検定では等分散の場合にはStudentの方法を、不等分散の場合にはAspin-Welchの方法を用いた。

## 実験成績

### I 妊娠母体に及ぼす影響

#### 1) 摂餌量、体重および一般症状

妊娠期間中における各群母ラットの平均摂餌量の推移をFig.1に、平均体重の推移をFig.2にそれぞれ示した。各メチルヘスペリジン投与群とも全投与期間をとおして摂餌量に特に変化はみられず、体重の増加も順調であった。一般症状にも異常は認められなかった。

#### 2) 黄体数、着床数および着床率

全例の同腹仔が死亡していた母ラットが $4\text{ g}/\text{kg}$ 群に1例認められたが、発生率に有意差は認められなかった。平均黄体数、平均着床数および着床率において対照群とメチルヘスペリジン投与群との間に有意な変化は認められなかった（Table 1）。

### II 胎仔に及ぼす影響

#### 1) 生存仔数、性比、体重および死亡率

Table 2に示したように平均胎仔数、性比、平均胎仔体重および胎仔死亡率とも対照群とメチルヘスペリジン投与群との間に有意差は認められなかった。

#### 2) 外表検査成績

対照群を含め、各群に異常例は1例も観察されな

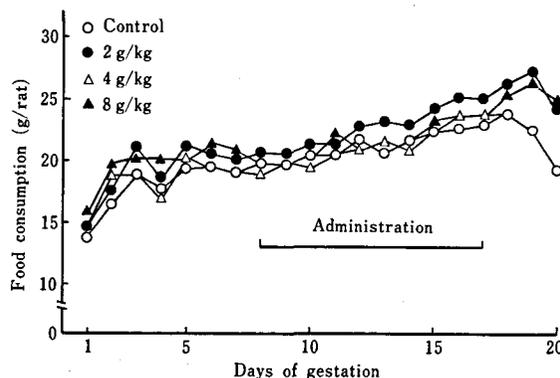


Fig. 1. Effect of oral administration of methyl hesperidin on food consumption of pregnant rats.

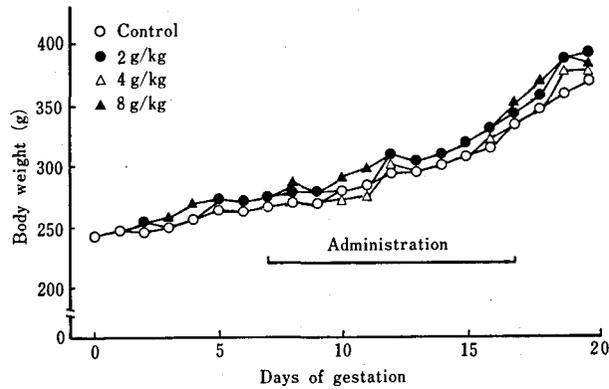


Fig. 2. Effect of oral administration of methyl hesperidin on body weight gain of pregnant rats.

Table 1. Effect of oral administration of methyl hesperidin on pregnant rats

Dose(g/kg/day)	0	2	4	8
No. of dams	20	19	20	20
No. of dams with totally dead fetuses	0	0	1(5%)	0
No. of dams with live fetuses	20	19	19	20
No. of corpora lutea (mean±S.D.)	287 (14.3±2.5)	285 (15.0±3.1)	281 (14.0±2.2)	291 (14.5±1.7)
No. of implants (mean±S.D.)	249 (12.4±3.7)	258 (13.5±3.2)	255 (12.7±3.0)	268 (13.4±1.9)
Implantation ratio(%)	85.8	92.8	89.5	92.3

Implantation ratio is the average of the incidence in each litter.

Table 2. Effect of oral administration of methyl hesperidin to pregnant rats on fetal development

Dose(g/kg/day)	0	2	4	8
No. of dams	20	19	20	20
No of total implants	249	258	255	268
No. of live fetuses (mean±S.D.)	238 (11.9±3.8)	236 (12.4±2.5)	247 (12.3±3.4)	261 (13.0±1.9)
Sex ratio(male/female)	125/113	105/131	124/123	100/161
Body weight(g) male (mean±S.D.)	3.8±0.3	3.7±0.2	3.9±0.4	3.8±0.5
female (mean±S.D.)	3.5±0.3	3.5±0.3	3.7±0.4	3.7±0.4
No. of dead implants	11	22	8	7
Early death	11	22	7	7
Late death	0	0	1	0
Mortality(%)	5.4	8.8	6.8	2.7
No. of fetuses with external malformation	0	0	0	0

Mortality is the average of the incidence in each litter.

った (Table 2).

### 3) 内部器官検査成績

胎仔の内部器官の検査成績を Table 3 に示した。腎盂の拡張が対照群を含む各群に1.7~4.9%観察されたが、発生率に有意差は認められなかった。

### 4) 骨格検査成績

骨格検査成績を Table 4 にまとめて示した。

#### a) 骨格奇形

骨格奇形として仙椎前の椎骨が27個の胎仔が4g/kg群に1例(0.7%)観察されたが、発生率に有意差は認

Table 3. Effect of oral administration of methyl hesperidin to pregnant rats on the internal organ development of the fetuses

Dose(g/kg/day)	0	2	4	8
No. of dams	20	19	19	20
No. of fetuses examined	93	86	91	96
Dilatation of renal pelvis	1(1.7)	3(3.3)	2(1.9)	5(4.9)

Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

Table 4. Effect of oral administration of methyl hesperidin to pregnant rats on the skeletal development of the fetuses

Dose(g/kg/day)	0	2	4	8
No. of dams	18	19	19	20
No. of fetuses examined	145	150	156	161
No. of fetuses with malformation	0	0	1(0.7)	0
27-presacral vertebra	0	0	1(0.7)	0
No. of fetuses with variation	113(79.0)	112(76.0)	132(78.8)	139(79.8)
Cervical rib	4(2.7)	3(1.7)	6(3.4)	5(3.0)
Varied cervical arch	0	0	0	1(0.6)
Varied thoracic centrum	25(17.1)	28(18.6)	25(16.4)	24(14.2)
Varied sternebra	98(61.2)	65(43.2)	88(54.4)	93(58.1)
Lumbar rib	42(31.0)	61(42.0)	51(33.3)	64(38.6)
rudiimentary extra	37(25.9)	61(42.0)	50(32.6)	62(37.3)
	5(5.1)	0	1(0.7)	2(1.3)
Ossification state(average number)				
Sacro-caudal vertebrae	7.3	7.7	7.8	7.6
Metacarpus	7.6	7.8	7.7	7.7
Metatarsus	8.0	8.0	8.0	8.0

Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

められなかった。

#### b) 骨格変異

骨格変異を有する胎仔が対照群に113例 (79.0%)、2 g/kg 群に112例 (76.0%)、4 g/kg 群に132例 (78.8%) および 8 g/kg 群に139例 (79.8%) 観察された。対照群に比べて、各メチルヘスベリジン投与群の発生率には有意な差は認められなかった。観察された骨格変異の種類とその発生率は以下の通りである。頸肋が対照群を含む各群に1.7~3.4%観察された。頸椎弓の変形が 8 g/kg 群に0.6%、胸椎体の異常 (変形, 分離) が対照群を含む各群に14.2~18.6%観察されたが、それらの発生率に有意差は認められなかった。また胸骨核の異常 (変形, 分離, 欠損) が対照群を含む各群に43.2~61.2%観察された。腰肋 (痕跡状を含む) が対照群を含む各群に31.0~42.0%観察された。しかし、それらの発生率に有意差は認められなかった。

#### c) 骨化状態

骨化状態については中手骨, 中足骨および仙・尾椎

骨の骨数を調べて判定したが、いずれの骨数においても対照群との間に有意差は認められなかった。

## 考 察

妊娠ラットにメチルヘスベリジンを11日間連日経口投与したが、投与可能な最大量である 8 g/kg 用量でも一般症状の異常、摂餌量の減少および体重増加の抑制などの毒性徴候は認められなかった。また死亡例もなく、妊娠は順調に維持され、メチルヘスベリジンの妊娠ラットに対する影響はきわめて弱いものと考えられる。メチルヘスベリジンを投与した妊娠ラットから得られた胎仔に外表異常は1例も観察されなかった。内部器官の異常として腎盂の拡張が観察されたが、対照群との間に有意差は認められなかった。骨格奇形として仙椎前の椎骨数が27個の胎仔が 4 g/kg 群に1例 (0.7%) 観察された。しかし本実験の対照群、我々の研究室のバックグラウンドデータおよび自然発生奇形に関する報告<sup>7,8)</sup> との比較において、発生頻度および

形状ともにメチルヘスベリジンに起因したものと考  
えられない。骨格異常として頸肋、頸椎弓の変形、胸  
椎体の異常、胸骨核の異常が観察されたが、いずれも  
対照群との間に有意差はなく、メチルヘスベリジン投  
与の影響とは考えられない。一方、サリチル酸などの  
催奇形因子を妊娠ラットに投与した場合、腰肋の発生  
頻度が増加することが報告されている<sup>9-11)</sup>。本実験で  
は腰肋の発生頻度がメチルヘスベリジン投与群におい  
て特に高くなるという成績は得られなかった。

### ま と め

メチルヘスベリジンの2, 4および8g/kgを妊娠  
ラットに胎子の器官形成期を含む妊娠7日から17日ま  
で毎日1回強制経口投与し、妊娠の維持および胎仔発  
生に及ぼす影響を検索した。

1) 妊娠母体について、いずれのメチルヘスベリジ  
ン投与群においても死亡例、摂餌量および体重増加に  
変化は認められなかった。

2) 妊娠20日目の胎仔について、いずれのメチルヘ  
スベリジン投与群とも平均胎仔数、性比および胎仔死  
亡率に有意な変化は認められなかった。外表、骨格お  
よび内部器官の検査においてメチルヘスベリジン投与

によると考えられる異常例は観察されなかった。

以上、本実験条件下では、メチルヘスベリジンが催  
奇形性物質であるとの結論は得られなかった。

### 文 献

- 1) S. Tanaka *et al.*: *J. Toxicol. Sci.*, **2**, 149 (1976)
- 2) S. Tanaka *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **20**, 378 (1979)
- 3) S. Tanaka *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **23**, 468 (1982)
- 4) 石館守三監修: 食品添加物公定書解説書第四版. p. B-952 (広川書店)
- 5) 荒蒔義知ら: 診療, **10**, 727 (1957)
- 6) J. G. Wilson: *Teratology* "Principles and techniques," edited by J. G. Wilson and J. Warkany, p. 262—277, The University of Chicago Press, Chicago and London, 1965.
- 7) 江崎孝三郎, 谷岡功邦: 先天異常, **10**, 216 (1970)
- 8) A. K. Palmer: in "Drugs and Fetal Development," Klingberg, M. A. *et al.*, eds., *Adv. Exp. Biol. Med.*, **27**, 45 (1972)
- 9) C. A. Kimmel, J. G. Wilson: *Teratology*, **8**, 309 (1973)
- 10) 安田峰生, 前田広由: 先天異常, **13**, 25 (1973)
- 11) S. Tanaka *et al.*: *Cong. Anom.*, **13**, 73 (1973)

### クロルデンのラット胎仔発生に及ぼす影響

宇佐見 誠・川島邦夫・中浦楨介・山口 恵  
田中 悟・高仲 正・大森義仁

#### Effect of Chlordane on Prenatal Developments of Rats

Makoto USAMI, Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Megumi YAMAGUCHI,  
Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI

Chlordane was given to pregnant rats by oral intubation during days 7 to 17 of gestation at dose levels of 0, 20, 40 and 80 mg/kg, and its teratogenic effect was examined in the fetuses.

Significant suppressions in maternal food consumption in the 40 and 80 mg/kg groups and in maternal body weight gains in the 80 mg/kg group were observed. At the dose level of 80 mg/kg, some toxic signs such as piloerection and fighting (boxing posture), were observed, and 50% of the pregnant rats died. However, there was no evidence of an increase in fetal death and of malformation, attributable to the treatment with chlordane in any of the treated groups.

It is concluded that chlordane has no teratogenic effect in rats, although toxic signs were observed in the treated dams.

(Received May 31, 1986)

我々は、食品添加物、環境汚染物質などの化学物質  
の安全性評価に関する研究の一環として、諸種化学物

質の催奇形性について検討している。

クロルデンは、有機塩素系殺虫剤で、わが国では白

蟻防除のために土壌、木材および合板に用いられている<sup>1)</sup>。近年 Miyazaki らはクロルデンおよびその関連化合物を魚類、犬あるいは猫から検出し、環境汚染を指摘している<sup>2-4)</sup>。さらにクロルデン関連化合物が人の乳汁あるいは脂肪組織から検出され<sup>5-7)</sup>、白蟻防除従事者のみならず、一般人への影響が危惧されている。

今回我々は、クロルデンを妊娠ラットに投与し、胎仔発生に及ぼす影響について検索したので、その成績を報告する。

## 実験方法

動物は、ウィスター系ラット（日本ラット、12~13週齢）を用いた。妊娠ラットを得るために未経産雌を雄と終夜同居させ、翌朝腔垢中に精子が認められた雌ラットを実験に供し、この日を妊娠0日として起算した。妊娠ラットはアルミ製ケージ（夏目製作所製）に1匹ずつ収容し、固形飼料（オリエンタル酵母，MF）および水道水を自由に摂取させた。動物室は温度 25±2°C，相対湿度 55±5%，換気回数 15/hr，明暗交代12時間（明期 6:00~18:00）とした。

クロルデンは工業用クロルデン（ベルシコル，Batch No. B-9192A）を用い、投与にあたってはオリーブ油で1.6%溶液を調製した。投与量は急性毒性試験成績（雌ラット，経口，LD<sub>50</sub>，320 mg/kg<sup>8)</sup>）に基づいて高用量を LD<sub>50</sub> の 1/4 量（80 mg/kg）と定め、以下公比 2 で除し 40 及び 20 mg/kg の 3 段階とした。各群 8~20 匹の妊娠ラットに胎仔の器官形成期を含む妊娠 7~17 日の間毎日 1 回胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

妊娠ラットは毎日一般状態を観察し、体重および摂餌量を測定した。妊娠 20 日目にエーテル麻酔下で帝王切開して子宮を摘出し、黄体数，着床数および胎仔死亡を調べた。生存胎仔については肉眼触手による外表

異常の検査を行い、体重を測定した。各母体について生存胎仔数の約 1/3 はブアン液で約 2 週間固定したのち、ウィルソンの方法<sup>9)</sup>にしたがって内部器官の異常の検査を行った。残り約 2/3 の胎仔は 90% エタノール液で固定し、アリザリン赤染色骨格標本作製して骨格系の異常を拡大鏡下で調べた。

実験成績は母体を評価の単位として、 $\chi^2$  検定（母ラットの死亡率），t 検定（母ラットの体重，摂餌量，黄体数，着床数，胎仔数，胎仔体重）および順位と検定（胎仔の死亡率，形態異常発生頻度，骨化数）を用い、 $P < 0.05$  および  $P < 0.01$  の水準で対照群と比較した。なお，t 検定では等分散の場合には Student の方法を，不等分散の場合には Aspin-Welch の方法を用いた。

## 実験成績

### I 妊娠母体に及ぼす影響

#### 1) 摂餌量

妊娠期間中における各群母ラットの平均摂餌量の推移を Fig. 1 に示した。20 mg/kg 群は対照群と特に大きな差を示さなかった。40 および 80 mg/kg 群では投与期間をとおして摂餌量の低下が認められ、特に 80 mg/kg 群において顕著であった。また、80 mg/kg 群では立毛，闘争様行動および衰弱が認められ、8 例中 4 例が死亡した（Table 1）。なお、80 mg/kg では投与期間中に母ラットの死亡が高頻度で認められたので、例数の追加は行わなかった。

#### 2) 体重

妊娠期間中における各群母ラットの平均体重の推移を Fig. 2 に示した。20 および 40 mg/kg 群では対照群とほぼ同様な体重増加が認められた。80 mg/kg 群では投与開始翌日（妊娠 8 日目）から著明な体重減少

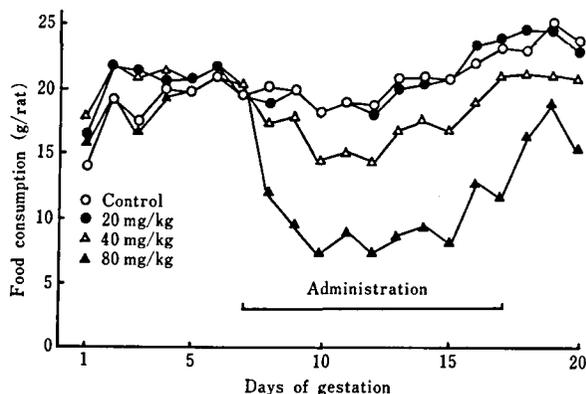


Fig. 1. Effect of oral administration of chlordane on food consumption of pregnant rats.

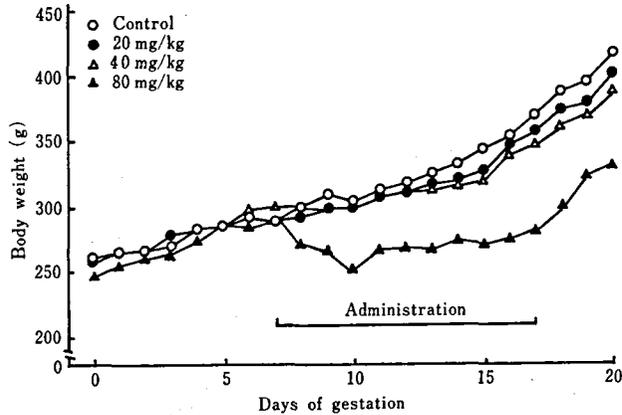


Fig. 2. Effect of oral administration of chlordane on body weight gain of pregnant rats.

Table 1. Effect of oral administration of chlordane on pregnant rats.

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of dams	22	19	21	8
No. of dead dams	0	0	0	4
Mortality (%)	0	0	0	50%
No. of dams with live fetuses	22	19	21	4
No. of corpora lutea (mean±S.D.)	347 (15.7±3.1)	277 (14.5±2.3)	329 (15.6±3.4)	48 (12.0±0.8)*
No. of implants (mean±S.D.)	290 (13.1±3.5)	246 (12.9±2.4)	284 (13.5±2.8)	43 (10.7±2.0)
Implantation ratio (%)	84.0	88.8	87.3	89.0

Implantation ratio is the average of the incidence in each litter.

\*:  $P < 0.01$

Table 2. Effect of oral administration of chlordane to pregnant rats on the fetal developments

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of dams	22	19	21	4
No. of implants	290	246	284	43
No. of live fetuses (mean±S.D.)	284 (12.9±3.4)	240 (12.6±2.1)	275 (13.0±2.9)	42 (10.5±1.7)
Sex ratio(male/female)	136/148	129/111	136/139	19/23
Body weight(g) male(mean±S.D.)	3.7±0.3	3.7±0.3	3.7±0.4	3.9±0.3
female(mean±S.D.)	3.4±0.3	3.5±0.3	3.5±0.4	3.6±0.3
No. of dead implants	6	6	9	1
Early death	6	5	9	1
Late death	0	1	0	0
Mortality(%)	1.9	2.0	3.4	1.9
No. of fetuses with external malformation	1(0.4%)*	0	0	0

Mortality is the average of the incidence in each litter.

\* : Multiple malformation accompanied with cleft lip, microphthalmia and umbilical hernia. Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

が認められた。この体重減少は投与終了後も対照群の水準まで回復しなかった。

3) 黄体数, 着床数および着床率

平均黄体数の有意な減少が 80 mg/kg 群に認められた以外, 黄体数, 着床数および着床率において対照群とクロルデン投与群との間に有意な変化は認められなかった (Table 1)。

II 胎仔に及ぼす影響

1) 生存仔数, 性比, 体重および死亡率

Table 2 に示したように平均胎仔数, 性比, 平均胎仔体重および胎仔死亡率とも対照群とクロルデン投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 外表検査成績

対照群に口唇裂と小眼球症および臍帯ヘルニアの複合奇形胎仔が 1 例観察された以外, 各クロルデン投与

群に異常例は 1 例も観察されなかった (Table 2)。

3) 内部器官検査成績

胎仔の内部器官の検査成績を Table 3 に示した。脳室の拡張と副腎および精巣の位置異常を合併した胎仔が対照群に 1 例 (0.9%) 観察された。腎盂の拡張が対照群, 20 および 40 mg/kg 群に 3.4~4.6% 観察されたが, 発生率に有意差は認められなかった。

4) 骨格検査成績

骨格検査成績を Table 4 にまとめて示した。

a) 骨格奇形

骨格奇形と考えられる異常は 1 例も認められなかった。

b) 骨格変異

骨格変異と考えられる種々の異常が認められた。それらの種類と発生率は次のとおりであった。後頭骨の

Table 3. Effect of oral administration of chlordane to pregnant rats on the internal organ developments of the fetuses

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of dams examined	22	19	21	4
No. of fetuses examined	106	91	104	15
Dilatation of the renal pelvis	7(4.6%)	4(4.5%)	4(3.4%)	0
Dilatation of the ventricles	1(0.9%)	0	0	0
Displacement of the adrenals	1(0.9%)	0	0	0
Displacement of the renals	1(0.9%)	0	0	0
Displacement of the testis	1(0.9%)	0	0	0

Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

Table 4. Effect of oral administration of chlordane to pregnant rats on the skeletal developments of the fetuses

Dose (mg/kg)	0	20	40	80
No. of dams	18	19	21	4
No. of fetuses examined	178	149	171	27
Varied occipital bone	3(1.7%)	0	1(0.6%)	0
Varied cervical arches	4(3.2%)	0	1(0.6%)	0
Cervical ribs	11(7.0%)	7(4.5%)	5(2.8%)	3(10.7%)
Varied thoracic centra	28(17.7%)	17(10.9%)	25(16.0%)	4(15.7%)
Varied sternbrae	114(60.8%)	71(46.2%)	117(69.8%)	14(54.9%)
Lumbar ribs	81(46.8%)	70(48.3%)	102(60.2%)	25(90.0%)*
rudimentary	80(46.2%)	67(46.0%)	97(56.9%)	25(90.0%)
extra	1(0.6%)	3(2.4%)	5(3.4%)	0
Varied lumbar arches	4(2.3%)	0	1(0.6%)	0
Varied lumbar centra	0	0	2(1.1%)	1(3.6%)
Varied sacral arches	4(2.3%)	0	0	0
Varied pubic bone	0	0	1(0.6%)	0
Ossification state (average number)				
Metacarpus	7.7	7.8	7.7	8.0
Metatarsus	8.0	8.0	8.0	8.0
Sacro-caudal vertebrae	7.8	7.9	7.8	8.1

Occurrence rate(%) in parenthesis is the average of the incidence in each litter.

\*: P<0.01

異常(変形)が対照群に1.7%, 40 mg/kg 群に0.6%, 頸椎弓の異常(変形, 癒合, 分離)が対照群に3.2%, 40 mg/kg 群に0.6%それぞれ観察された。頸肋が対照群を含む各群に2.8~10.7%, 胸椎体の異常(変形, 分離)が対照群を含む各群に10.9~17.7%, また胸骨核の異常(変形, 分離, 欠損)が対照群を含む各群に46.2~69.8%観察された。しかし, 対照群に比べて, これら骨格異常の発生率に有意差は認められなかった。腰肋(痕跡状を含む)が対照群を含む各群に46.8~90.0%観察され, 80 mg/kg 群は有意に高い発見率を示した。腰椎弓の異常(変形)が対照群に2.3%, 40 mg/kg 群に0.6%, 腰椎体の異常(変形)が40 mg/kg 群に1.1%, 80 mg/kg 群に3.6%, 仙椎弓の異常(形成不全)が対照群に2.3%, 恥骨の異常(変形)が40 mg/kg 群に0.6%それぞれ観察されたが, 各クロルデン投与群の発生率に有意差は認められなかった。

### c) 骨化状態

骨化状態については中手骨, 中足骨および仙・尾椎骨の骨数を調べて判定したが, いずれの骨数においても対照群とクロルデン投与群との間に有意差は認められなかった。

## 考 察

妊娠ラットにクロルデンを経口投与した場合, 40 mg/kg 群では摂餌量の減少が認められた。80 mg/kg 群では立毛, 闘争様行動, 摂餌量の減少および体重増加の抑制が認められ, 50%の母体が死亡した。これらの成績から80 mg/kg 用量は妊娠ラットに対して中毒致死量であることが明らかにされた。Boyd と Taylor<sup>10)</sup> はクロルデンの20 mg/kg を幼若ラットに28日間経口投与した場合, 投与24時間後から摂餌量の減少および体重増加の抑制が惹起されたと報告している。本実験の40 mg/kg 群では摂餌量の減少が認められたにもかかわらず, 体重の増加率には影響が認められなかったことから, 80 mg/kg 群で観察された体重増加抑制は, 摂餌量の低下に起因するのみならず, クロルデンの直接的な毒性効果によるものとも考えられる。

80 mg/kg 群において平均黄体数の低下が観察されたが, クロルデンは卵の着床後に投与されており, クロルデン投与に起因した変化とは考え難い。

クロルデンを投与した妊娠ラットから得られた胎仔に外表異常は1例も観察されなかった。工業用クロルデンの60 mg/kg を飼料に添加してラットに3世代にわたって与えた場合, 奇形発生は認められないことが報告されている<sup>11)</sup>。また, クロルデンの1, 5および15 mg/kg をウサギに妊娠6~18日の間経口投与した

場合においても, 母体および胎仔に対する悪影響は無く, 催奇形性は認められていない<sup>12)</sup>。内部器官の異常として腎盂の拡張が20および40 mg/kg 群に観察されたが, 対照群との間に有意差は認められず, クロルデン投与の影響とは考えられない。なお, 対照群に観察された脳室の拡張と副腎, 腎臓および精巣の位置異常を有した胎仔は, 外表的にも口唇裂, 小眼球症および臍帯ヘルニアを合併した胎仔であった。

骨格異常として後頭骨の異常, 頸椎弓の異常, 頸肋, 胸椎体の異常, 胸骨核の異常, 腰椎弓の異常, 腰椎体の異常, 仙椎弓の異常および恥骨の異常が観察されたが, いずれの異常の発生率も対照群との間に有意差は認められなかった。一方, サリチル酸などの催奇形因子を妊娠ラットに投与した場合, 腰肋の発生頻度が増加することが報告されている<sup>13-14)</sup>。本実験の80 mg/kg 群において痕跡状を含めた腰肋の発生率が有意に増加したが, 外表奇形および内部器官に異常は観察されず, クロルデンが催奇形物質であるとは結論しがたい。

以上の成績はクロルデンの安全性評価に資するものとする。

## ま と め

クロルデンの20, 40および80 mg/kg を妊娠ラットに胎仔の器官形成期を含む妊娠7日から17日まで毎日1回強制経口投与し, 妊娠の維持および胎仔発生に及ぼす影響を検索した。

1) 妊娠母体について, 20および40 mg/kg 用量では摂餌量の減少が40 mg/kg 用量で認められたのみで, 一般症状および体重増加に変化は認められなかった。80 mg/kg 用量では立毛, 闘争様行動などの一般症状, 摂餌量の低下, 体重増加の抑制が認められ50%の母体が死亡した。

2) 妊娠20日目の胎仔について, いずれのクロルデンの投与量でも平均胎仔数, 平均胎仔体重, 性比および胎仔死亡率に有意な変化は認められなかった。外表奇形の発現は認められず, 内部器官の検査においてもクロルデン投与によると考えられる異常例は観察されなかった。骨格検査において腰肋を有した胎仔の発生率が増加した以外, クロルデン投与によると考えられる異常例は観察されなかった。

以上, 本実験条件下では, クロルデンが催奇形性物質であるとの結論は得られなかった。

## 文 献

- 1) 化学物質と環境(昭和60年版). p.136. 環境庁環

- 境保健部保健調査室 (1985)
- 2) T. Miyazaki *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **23**, 631 (1979)
  - 3) S. Horii *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **26**, 254 (1981)
  - 4) T. Yamagishi *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **26**, 254 (1981)
  - 5) T. Miyazaki *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **25**, 518 (1981)
  - 6) W. Takahashi *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **27**, 506 (1981)
  - 7) J. Mes *et al.*: *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **28**, 97 (1982)
  - 8) 高仲 正ら, クロルデンの毒性に関する研究: 厚生省薬務局安全課57年度報告書 (1983)
  - 9) J. G. Wilson: "Teratology 'principles and techniques,'" edited by J. G. Wilson and J. Warkany, p. 262-277, The University of Chicago Press, Chicago and London, 1965.
  - 10) E. M. Boyd and F. I. Taylor: *Industrial medicine.*, **3**, 434 (1969)
  - 11) IPCS (1984). *Chlordane.: Environmental health criteria*, **34**, Geneva, World health organization, 34 pp.
  - 12) IRDC (1972). *Chlordane, teratology study in rabbits*, Mattawan, Michigan, International research and development corporation.
  - 13) 安田峰生, 前田広由: 先天異常, **13**, 25 (1973)
  - 14) S. Tanaka *et al.*: *Cong. Anom.*, **13**, 73 (1981)

### 脳長の測定によるラット胎仔小頭症の検出

宇佐見 誠・川島邦夫・中浦慎介・山口 恵

田中 悟・高仲 正・大森義仁

#### Identification of Microcephaly of the Rat Fetus by Measuring the Brain Length *In Situ*

Makoto USAMI, Kunio KAWASHIMA, Shinsuke NAKAURA, Megumi YAMAGUCHI,  
Satoru TANAKA, Akira TAKANAKA and Yoshihito OMORI

By measuring the length of the brain *in situ*, microcephaly of the rat fetus was identified feasibly at the term of gestation. Microcephaly was induced by the subcutaneous injection of MAM (methylazoxymethanol) acetate (0, 10, 20, 40 mg/kg) to pregnant rats on the 13th day of gestation. On the 20th day, the cerebral length (A) and the cerebellar length (B) were measured on the fetal brains left on the incised skulls without excising; the total length was calculated as A+B, and the cerebral length ratio, A/(A+B)×100. The brain weight was also measured. Of these parameters, the cerebral length and the cerebral length ratio were reduced significantly by MAM at the doses of 10 mg/kg or more in both sexes with dose dependency. The latter is superior to the former as an indicator because it takes the total length of the brain into account. It was concluded that of all the parameters measured, the cerebral length ratio was the best indicator for fetal microcephaly.

(Received May 31, 1986)

#### はじめに

胎仔期に作用した場合に、小頭症を惹起する環境因子は多い。ラットでは、X線<sup>1)</sup>, methylazoxymethanol (MAM)<sup>2)</sup>, procarbazine<sup>3)</sup>, pyridyl-dimethyltriazene<sup>4)</sup>などが小頭症を惹起することが知られている。こうしたラットの小頭症は、大脳の特異的な低形成を特徴としている。

しかし、通常の催奇形性試験において小頭症を検出することは容易ではない。すなわち、ラットやマウス

胎仔の脳の検査に汎用されている粗大切片法<sup>5)</sup>では、脳の大きさの客観的な観察は困難である。また、小さく壊れやすい胎仔の脳を、摘出し、その重量を測定することは、時間と労力を要するため、実用的ではない。

そこで、脳を摘出しないで、脳の長さを測定することにより、妊娠末期におけるラット胎仔の小頭症を検出することを試みた。

#### 実験方法

動物は、ウイスター系ラットを用いた。未経産雌

(19週胎) を、雄と終夜同居させ、翌朝臍垢中に精子が確認されたものを妊娠ラットとした。妊娠日は、精子確認日を妊娠0日とした。妊娠ラットは、アルミ製ケージに1匹ずつ収容し、固形飼料および水道水を自由に摂取させた。動物室内の環境は、温度  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 15/hr、明暗交代12時間(明期 6:00~18:00)とした。

小頭症は、妊娠ラットに MAM を投与することにより誘発した。MAM acetate (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, USA) を生理食塩液に溶解 (20 mg/ml) し、10、20 および 40 mg/kg を妊娠13日目に1回、皮下注射した。対照群には生理食塩液 2 ml/kg を同様に投与した。1群の動物数は3ないし5匹とした。

妊娠20日目に、胎仔の小頭症を観察した。母動物をエーテルで屠殺し胎仔を摘出した。胎仔は、性別を調べ、体重を測定したのち、肩部で切断した。その頭部を、頭蓋骨が露出するように皮膚をはがした状態で、10%ホルマリン液で10日間固定したのち、脳の長さおよび重量を測定した。

脳の長さは、脳を頭蓋に固定したまま測定した。頭蓋骨を、後部から矢状縫合線に沿って眼科剪刀で切開したのち、ピンセットで取り除いた。露出した脳を摘出することなく、大脳の長さ(大脳長)および小脳の長さ(小脳長)をノギスで測定した (Fig. 1)。また、脳全体の長さ(全脳長)および大脳の、脳全体の長さに占める割合(大脳比長)を次の式によって求めた。

$$\text{全脳長} = \text{大脳長} + \text{小脳長}$$

$$\text{大脳比長} = \text{大脳長} / \text{全脳長} \times 100$$

脳の長さを測定したのち、脳を摘出し、その重量を測定した。

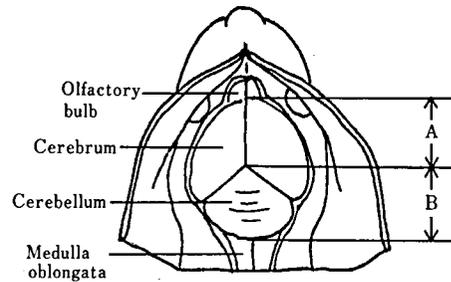


Fig. 1. Dorsal aspect of the fetal head representing the brain lengths measured

A: cerebral length, B: cerebellar length.

The total length was calculated as  $A+B$ , and the cerebral length ratio,  $A/(A+B) \times 100$ .

有意差の検定は、母体数を標本の単位として行った。母体重については、妊娠日ごとに、全群まとめて分散分析を行い、 $P < 0.05$  で有意であった場合に、Dunnettの方法で対照群と各 MAM 投与群の平均値の差を検定した。胎仔体重、脳の長さおよび脳重量については、Kruskal-Wallis の検定を行い、 $P < 0.05$  で有意であった場合に、Dunnettの方法により対照群と各 MAM 投与群の順位の平均値の差を検定した。胎仔死亡率については、 $\chi^2$  検定を行った。

### 実験結果および考察

#### 1) 母動物について

MAM 40 mg/kg 投与によって、体重増加の抑制および立毛が観察されたが、10および20 mg/kg では MAM の影響は認められなかった (Table 1)。

#### 2) 胎仔発育について

MAM の胎仔発育に及ぼす影響は、20 mg/kg 以上の用量で認められた (Table 2)。すなわち、40 mg/kg

Table 1. Body weights of the pregnant rats injected with MAM

Gestation days	Dose (mg/kg)			
	0 (n=4)	10 (n=4)	20 (n=3)	40 (n=5)
0	324.8 ± 36.2	335.3 ± 10.9	326.0 ± 23.0	333.2 ± 25.3
6	345.8 ± 40.1	357.0 ± 11.1	343.3 ± 20.0	352.4 ± 23.6
13(MAM) <sup>a</sup>	376.3 ± 43.1	389.0 ± 11.6	371.3 ± 22.1	384.6 ± 30.0
16	398.5 ± 44.5	410.5 ± 11.6	394.3 ± 27.1	379.6 ± 35.3
20	453.0 ± 53.0	466.3 ± 13.1	443.0 ± 36.5	392.2 ± 28.9*

The values shown are means ± standard deviations in gram.

<sup>a</sup> MAM acetate diluted with saline (20 mg/ml) was injected subcutaneously on the 13th day of gestation.

\* Significantly different from the control of the same day at  $P < 0.05$  level.

Table 2. Fetal development in the pregnant rats injected with MAM

Dose (mg/kg) <sup>a</sup>	0	10	20	40
No. of pregnant rats	4	4	3	5
Death of all the implants	0	0	0	1 (20%)
No. of implants (Mean±S.D.)	49 (12.3±2.2)	53 (13.3±1.0)	44 (14.7±1.2)	61 (14.2±1.9)
No. of fetuses survived (Mean±S.D.)	43 (10.8±2.8)	49 (12.3±1.5)	42 (14.0±0.0)	22 (4.4±3.9)
No. of fetuses malformed	0	1 (0.2%) <sup>c</sup>	0	0
Fetal mortality	6 (13.1%)	4 (7.7%)	2 (3.0%)	49 (66.7%)**
Fetal body weight (g)				
Male (mean±S.D.)	3.8 ± 0.3	3.6 ± 0.3	3.3 ± 0.2*	2.1 ± 0.4**
Female (mean±S.D.)	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.3	3.1 ± 0.3*	1.9 ± 0.3**

<sup>a</sup> MAM acetate was injected to the pregnant rats on the 13th day of gestation.

<sup>b</sup> The fetuses were examined on the 20th day of gestation.

<sup>c</sup> The combination of exencephaly and spina bifida.

\* Significantly different from the control at P<0.05 level.

\*\* Significantly different from the control at P<0.01 level.

で、すべての胎仔が死亡した母体1例を含め、胎仔死亡率の有意な増加が認められた。また、20および40 mg/kg で、雌雄ともに、胎仔体重が有意に低下した。10 mg/kg では、外脳症と脊椎裂<sup>6)</sup>を併発した胎仔1例が認められた。

### 3) 脳の長さについて

脳の長さを測定した結果を Table 3 に示した。大

脳長は、最低用量の 10 mg/kg から、雌雄ともに有意にかつ用量依存的に減少し、小頭症の指標となり得ることが示された。小脳長には、いずれの用量にも、小頭症による変化は認められなかった。全脳長は、用量依存的に減少したが、最低用量の 10 mg/kg の雄では対照群との有意差が認められず、大脳長にくらべ小頭症に対する感度は低いと考える。大脳比長は、大脳長

Table 3. Brain lengths of the fetuses of the pregnant rats injected with MAM

Dose (mg/kg) <sup>a</sup>		0	10	20	40
Cerebral length (mm)	Male	4.96 ± 0.25	4.27 ± 0.27**	3.11 ± 0.38**	1.83 ± 0.18**
	Female	5.00 ± 0.32	4.12 ± 0.31**	3.03 ± 0.39**	1.88 ± 0.42**
Cerebellar length (mm)	Male	4.74 ± 0.35	4.99 ± 0.26	4.74 ± 0.32	4.51 ± 0.40
	Female	4.67 ± 0.54	4.90 ± 0.27	4.71 ± 0.24	4.43 ± 0.34
Total length (mm) <sup>b</sup>	Male	9.71 ± 0.48	9.26 ± 0.40	7.86 ± 0.39**	6.34 ± 0.47**
	Female	9.67 ± 0.54	9.03 ± 0.43**	7.75 ± 0.45**	6.30 ± 0.71**
Cerebral length <sup>c</sup> ratio (%)	Male	51.2 ± 2.00	46.1 ± 1.93**	39.6 ± 3.92**	28.9 ± 2.44**
	Female	51.7 ± 2.34	45.7 ± 2.24**	39.0 ± 3.38**	29.5 ± 4.01**

The values shown are means ± standard deviations.

<sup>a</sup> MAM was injected to the pregnant rats on the 13th day of gestation.

<sup>b</sup> Cerebral length + cerebellar length.

<sup>c</sup> Cerebral length / total length × 100.

\* Significantly different from the control at P<0.05 level.

\*\* Significantly different from the control at P<0.01 level.

Table 4. Brain weights of the fetuses of the pregnant rats injected with MAM

Dose (mg/kg) <sup>a</sup>		0	10	20	40
Absolute weight (mg)	Male	199.1 ± 18.2	181.3 ± 10.5*	142.4 ± 10.1**	94.6 ± 11.2**
	Female	194.6 ± 14.7	175.6 ± 13.4	134.2 ± 10.3**	99.0 ± 5.1**
Relative weight (mg/g)	Male	53.3 ± 5.0	50.0 ± 3.7**	43.9 ± 4.9**	46.7 ± 6.1**
	Female	56.6 ± 3.4	51.2 ± 3.4**	44.2 ± 5.1**	51.8 ± 7.3**

The values shown are means ± standard deviations.

<sup>a</sup> MAM was injected to the pregnant rats on the 13th day of gestation.

\* Significantly different from the control at P<0.05 level.

\*\* Significantly different from the control at P<0.01 level.

と同様に、10 mg/kg から雌雄ともに有意にかつ用量依存的に減少し、小頭症の指標となり得ることが示された。

大脳長と大脳比長を比較した場合、大脳比長は、脳全体の大きさが考慮される点で、大脳長よりも指標として意義が大きい。すなわち、大脳比長は、大脳長の全脳長に対する比率であるので、全身の発育の低下による見かけの小頭症を検出しないこと、および、胎仔小頭症の特徴である大脳の特異的な低形成をより反映することが期待できる。

#### 4) 脳重量について

脳重量は、小頭症の指標としては、感度あるいは用量依存性において、大脳比長に劣っていた (Table 4)。すなわち、絶対重量は、用量依存的に減少したが、最低用量の 10 mg/kg では雌に有意な減少は認められず、感度において大脳比長に劣っていた。また、比重量は、10 mg/kg から有意に減少したが、40 mg/kg の値は 20 mg/kg の値より大きく、用量依存性がなかった。

以上のように、脳の長さあるいは脳の重量を測定することによって、胎仔の外観からは判定し得ない小頭症を検出することができた。測定した指標の中では、用量依存性、感度、指標としての意義および測定の容易さを考慮して、大脳比長が小頭症検出のもっとも優れた指標であると結論された。

一般に、ラットの小頭症は、出産後の仔動物につ

いて、その脳重量の低下を指標として調べられている<sup>2,3,7)</sup>。また、procarbazine による小頭症では、生後3週から脳重量の低下がより明らかとなる<sup>2)</sup>。しかし、妊娠末期の胎仔において小頭症を検出し得ることは、動物の育成に要する経費および時間の節約になる。

また、本実験における脳の長さの測定では、脳を摘出しないうえ、脳の長さを測定した胎仔について粗大切片法による脳の観察も可能であり、通常の催奇形性試験で容易に実施することができる。

以上、ラット胎仔の大脳比長を測定することにより、早期かつ簡便に、しかも定量的に小頭症を検出し得ることを明らかにした。本検査法は、一般の催奇形性試験へも応用可能であり、その意義は大きいと考える。

## 文 献

- 1) S. P. Hicks *et al.*: *J. Comp. Neurol.*, **113**, 435 (1959)
- 2) M. Spatz, G. L. Laquer: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **129**, 705 (1968)
- 3) J. M. Johnson *et al.*: *Teratology*, **32**, 203 (1985)
- 4) H. Druckrey: *Xenobiotica*, **3**, 271 (1973)
- 5) J. G. Wilson: "Teratology, Principles and Techniques," p. 262 (1965), The University of Chicago Press, Chicago and London
- 6) M. Spatz *et al.*: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124**, 476 (1967)
- 7) 永吉道子ら: 日本生理誌, **48**, 14 (1986)

## ハムスター膵における島内・島外の内分泌細胞の免疫組織化学的特性とその分布

古川文夫・豊田和弘・長谷川良平・佐藤秀隆  
張子俊・内藤善哉・高橋道人・林裕造

## Immunohistochemical Localization of Pancreatic Endocrine Cells in the Hamster

Fumio FURUKAWA, Kazuhiro TOYODA, Ryohei HASEGAWA, Hidetaka SATO,  
Ja June JANG, Zenya NATTO, Michihito TAKAHASHI and YUZO HAYASHI

The distribution of glucagon, insulin, somatostatin and pancreatic polypeptide was studied immunohistochemically in hamster pancreas. The pancreas of hamster consists of 4 parts, including a head and three well-defined segments, i.e., the duodenal, gastric and splenic lobes. The islets of Langerhans distribute throughout the entire pancreas, but relatively more in the splenic and gastric lobes. The present study revealed that the glucagon-producing cells (A cell) occupied the most peripheral area of the islet, the somatostatin-producing cells (D cell) formed a sparser layer in close proximity to the outer A cell sheath, and centrally-located majority of islet cells was composed of B cells. A few pancreatic polypeptide-producing cells (PP cell) were found specifically in most islets of the duodenal lobe, but rarely in the splenic and gastric lobes. These findings may be interesting in relation to its embryological and functional features. Based on these findings, the islet of hamster may be divided in two subunits similarly as the man, rat and rabbit; namely a peripheral heterocellular unit type composed of A, B and D cells, and a centrally-located homocellular unit composed mostly of B cells.

(Received May 31, 1986)

## はじめに

膵臓は、内分泌・外分泌の両機能を備えた臓器である。内分泌腺として Langerhans 氏島(膵島)が存在するが、その膵島内の各種内分泌細胞は insulin, glucagon などを分泌することはよく知られている。その他に島外の内分泌細胞の役割や、腸管のホルモンに関する研究の進歩はめざましい。中でも基礎的技術としての免疫組織化学的手法の進歩に負うところが大きく、組織学的検索に際して幅広く用いられるようになってきた。最近、この手法を用いて、種々の動物の膵島が比較検討され、動物種により膵島における内分泌細胞の分布、配列に違いがあることが判明した。すなわち、ウマ、サル等に見られる B 細胞辺縁型、ヒト、ウサギ、ラットなどに見られる B 細胞中心型などである<sup>1,2,3)</sup>。このような内分泌細胞の分布の違いは、膵島内、膵島外の血管構築などに関係があると言われて<sup>1,4)</sup>。また、内分泌ホルモンは相互に分泌刺激ないしは抑制に影響を及ぼし、その結果、外分泌腺にも何らかの影響を与えているものと考えられている<sup>1,4)</sup>。

最近、発癌研究の分野では、実験モデルを用いて膵癌の研究が目覚ましいが、組織学的に人間の膵癌と類

似性の高い膵管由来の膵癌の発生はハムスターに特異的に現われることが知られている<sup>5,6)</sup>。このような外分泌系の癌発生が内分泌系に影響を与えたり、与えられたりする可能性は容易に想像され、ハムスターにおける膵の内分泌細胞の分布、配列を検索することの意義は大である。しかし、このようなハムスターに関する基礎的な報告はほとんどない。

本研究ではハムスター膵の内分泌細胞に関する基礎データを得ることを目的とし、ハムスターの膵を用いて免疫組織化学的染色を施し、各種内分泌細胞の膵内膵外における分布や配列、各葉における膵島の特性などを検討した。

## 実験および方法

5週齢の Syrian golden hamster (三協ラボサービス) 雌30匹を用い固型飼料(オリエンタル MF)および飲料水は自由に摂取させた。その後4週毎に5匹ずつ、9, 13, 17, 21, 25, 29週齢に、エーテル麻酔下にて放血屠殺後、膵臓を十二指腸、脾とともに摘出し、濾紙上に伸展し、10%リン酸中性緩衝ホルマリン液にて48時間固定した。膵は胃葉、脾葉、十二指腸葉、頭部の4部位に分けて切り出しアルコール系列にて脱水

Table 1. Immunostaining procedure of ABC\* technique

- 
- Step 1. Deparaffinize and hydrate tissue sections through xylene and graded alcohol series.
- Step 2. Rinse in tap water for 5 min.
- Step 3. Incubate the sections in 0.5% periodic acid for 7 min.
- Step 4. Wash in 0.01M phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 for 20 min at room temperature.
- Step 5. Incubate sections with 16% normal non-immune serum of the species from which the secondary antibody is obtained, for 20 min. Dilute serum with PBS, 0.01M, pH 7.2.
- Step 6. Blot excess serum from sections.
- Step 7. Incubate sections with primary antiserum in PBS for 60 min at room temperature.
- Step 8. Wash slides in PBS for 30 min.
- Step 9. Incubate sections with biotin-labeled secondary antibody diluted with PBS 1:200 or 1:400 for 60 min at room temperature.
- Step 10. Wash slides in PBS for 30 min.
- Step 11. Incubate sections with avidin-biotin-peroxidase complex for 60 min at room temperature.
- Step 12. Wash slides in PBS for 20 min.
- Step 13. Incubate sections in 0.017% hydrogen peroxide and 0.02% diaminobenzidine tetrahydrochloride in PBS for 5 min at room temperature.
- Step 14. Wash sections in tap water for 5 min.
- Step 15. Counterstain with methyl green.
- 

\* ABC, avidin-biotin-peroxidase complex.

後、各葉毎にパラフィン包埋し、hematoxylin & eosin 染色を施した。その他、免疫組織化学染色として insulin, glucagon, somatostatin, pancreatic polypeptide に対する特異抗体血清を用いて各種内分泌細胞の染色を施し、病理組織学的に検索した。免疫組織化学的染色法を Table 1 に示す。特異抗体の濃度は、抗ヒト insulin, 抗ヒト glucagon, 抗ヒト somatostatin (いずれも DAKO PATTS) が400倍にて、抗ブタ pancreatic polypeptide (フナコシ薬品) は200倍にて使用した。

また胃葉、脾葉の総面積を TAS plus (ライツ社製) にて測定し、glucagon 染色標本を用いて膵島数を計測し、単位体積当たりの膵島数を諏訪の方法で推定し

た<sup>7)</sup>。

## 結 果

ハムスターの正常膵の形態を Fig. 1 に示す。膵は図のように頭部、胃葉、脾葉、十二指腸葉の4つに分け検索した。頭部において膵管は膵の後面を下行してきた総胆管と合流し胆膵共通管を形成して十二指腸に開口する。胃葉は十二指腸背部下側から胃幽門前庭部大彎前面に沿って走行する。脾葉は胃の後面に接し十二指腸起始部背面から脾臓に向かい走り、十二指腸葉は最も小さく十二指腸下行部の内縁に沿って走る。

組織学的には外分泌系は複合管状腺でわずかな結合組織よりなる被膜で覆われており、この被膜から連続性

に臓器被膜を形成している。腺房細胞は角錐形をなし多面体で、基底部に丸い大型の核をもっている。核の周囲および基底側の細胞質は好塩基性に濃染し、内腔側の細胞質は好酸性で顆粒状である。膵管は、立方ないし扁平な上皮からなり、周囲の結合織は、主膵管に近いほど厚くなる。また胆膵共通管は、1～3層の円柱上皮よりなり、杯細胞が散在して見られる。結合織は厚く、腺の深部増生は見られない。膵島は膵組織内

に散在性に見られ、細胞成分に富み、細胞は互いに密に配列し、時には索状構造が認められる。膵島は毛細血管に富み、その配列には規則性が認められない (Fig. 2)。以上の組織学的所見は、各週齢のいずれの動物にも認められた。しかし、週齢が進むにつれて膵島内中心部の毛細血管が拡張する傾向が認められた。

胃葉および脾葉に於ける単位体積当たりの膵島数

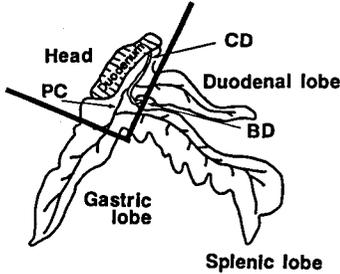


Fig. 1. Anatomy of hamster pancreas

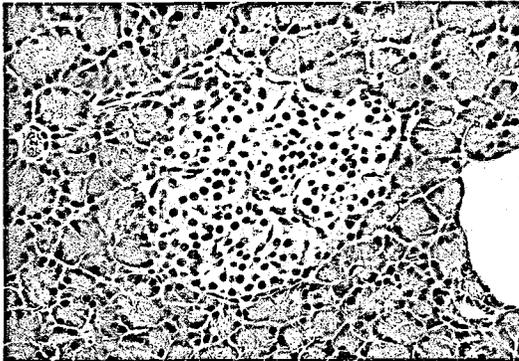
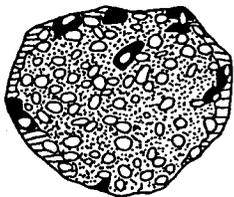


Fig. 2. Normal islet of Langerhans in gastric lobe of the pancreas.



- ▬ A cells (Glucagon)
- ▨ B cells (Insulin)
- D cells (Somatostatin)

Fig. 3. Schematic representation of an islet of hamster

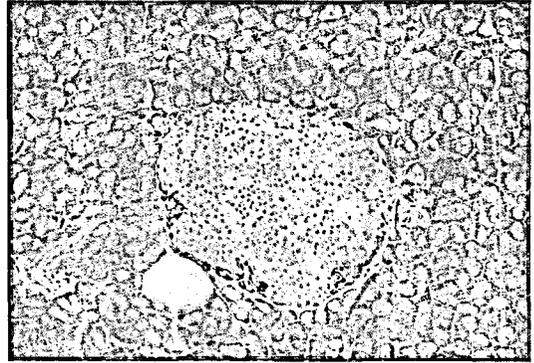


Fig. 4. A-cells in normal pancreatic islets.

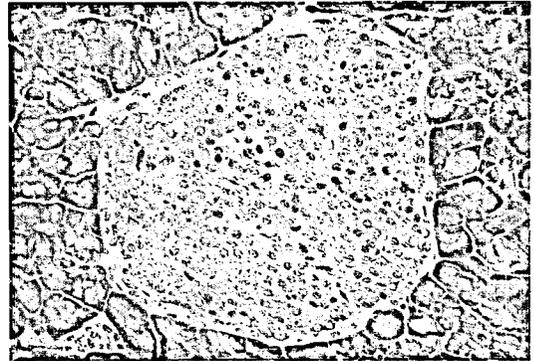


Fig. 5. B-cells in normal pancreatic islet.

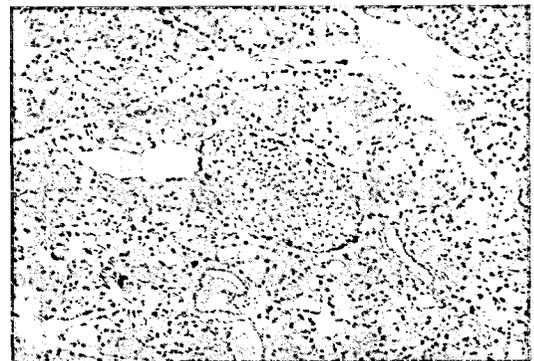


Fig. 6. D-cells in normal pancreatic islet.

Table 2. Density of islet of Langerhans in the hamster pancreas by morphometrical analysis.

	Experimental weeks		
	9	13	17
Splenic lobe	2961±1023*	3557±1123	2817±1003
Gastric lobe	2312±964	2378±982	2737±1058
	Experimental weeks		
	21	25	29
Splenic lobe	2567±956	4172±1217	2372±922
Gastric lobe	2291±958	2987±1097	1572±801

\* No. of islet of Langerhans/cm<sup>3</sup> ± 95% confidence limit

を Table 2 に示した。単位体積当たりの膵島数は、脾葉の方が多し。また、個体差があるものの胃葉、脾葉ともに20週目に最大となり、24週ではやや減少する傾向を示した。体重も20週目に最大を示し、膵島数と相関がみられた。

### 免疫組織学的所見

#### glucagon

glucagon を分泌する A 細胞は、膵島の周縁部に環状に1~3層の細胞層として並び、膵島の約10~20%を占めている (Fig. 3)。しかし、週齢が進むにつれて A 細胞層が厚くなった (Fig. 4)。glucagon 陽性細胞は膵島以外に膵管上皮にも出現するが主膵管には認められなかった。しかし、外分泌腺内には2~3個位の細胞単位で出現していたが頻度は極めて少なく加齢による変動は明らかではなかった。膵島内の A 細胞の形態は三ヶ月形でやや背の低い細胞が多く見られたが、膵島外の glucagon 陽性細胞は丸みをもった円形または楕円形の細胞であった。

#### insulin

insulin を分泌する B 細胞は、膵島中心部に存在し、多数の細胞は円形~楕円形の集簇をなしており、膵島のほぼ70~80%を占めている (Fig. 5)。週齢が進むにつれ、insulin 陽性細胞の集簇がくびれ等により不定

形を示すような膵島が増加する傾向を示した。B 細胞の占める面積は加齢とともにむしろ減少した。膵島以外の insulin 陽性細胞は膵管上皮、外分泌細胞間に散在性に認められ、特に外分泌細胞内における insulin 陽性細胞は1~数個の細胞単位よりなり週齢が進むにつれて数の増加傾向を示していた。

#### somatostatin

somatostatin を分泌する D 細胞は、膵島の約10~20%を占め、9~13週齢では膵島周縁や内側に馬蹄型に散在するが、21~25週齢で、D 細胞は、膵島周縁を環状に取り囲むようになり、細胞数は増加傾向を示していた (Fig. 6)。D 細胞は三角形から三ヶ月形の背が低い細胞であり、膵島以外では、血管周囲の結合織内に数個の細胞単位よりなる陽性細胞が認められ、また膵管上皮においてもまれに単一細胞でありながら立方上皮が陽性を呈するものもあった。

#### pancreatic polypeptide (PP)

pancreatic polypeptide (PP) を分泌するとされる PP 細胞は、十二指腸葉における膵島では約10~20%を占め、膵島の周辺から中心部にかけてむしろ散在性に孤立性して存在していた。しかし、他の葉においては、比較的大きな膵島でも非常に少数の PP 細胞を認めるにすぎず、多くの膵島では全く認められなかった。膵島以外においては、まれに膵管上皮に立方形の陽

性細胞が単一細胞として認められたほか、外分泌腺においても比較的まれに陽性細胞が1~3個の細胞単位で散在して認められた。しかし、主膵管においては認められず、週齢差によるPP細胞の増減はなかった。

## 考 察

膵島は1869年に Langerhans らによって発見された。形態学的には球形、卵円形又は不規則な形をした内分泌細胞の集合で膵腺房細胞内に散在性に分布している。

ハムスターの膵は Fig. 1 に示すように3葉1頭部に分かれ、肉眼的にはヒトの膵とはやや異なるが、組織学的レベルでは膵島および外分泌組織ともに比較的よく類似している<sup>8)</sup>。膵島の内分泌細胞として現在知られているのは、A細胞、B細胞、D細胞、そしてPP細胞である。A細胞は、glucagon、B細胞は insulin、D細胞は somatostatin、PP細胞は pancreatic polypeptide を分泌している<sup>9)</sup>。最近では免疫組織学的手法により vasoactive intestinal polypeptide (VIP) を産生する D<sub>1</sub>細胞がわずかながら膵島内に存在することが明らかとなった<sup>10)</sup>。これらの内分泌細胞の膵島内分布に関しては、Orci によればヒトでは A : B : D の内分泌細胞比は 30 : 60 : 10 と言われている。また、ヒト胎児膵では A : B の細胞比も、1 : 1 に近く、爬虫類、両生類、魚類などの下等脊椎動物では 1 : 1 に近いと言われている<sup>11,12)</sup>。一方、ヒトでは PP細胞の分布は膵の部位により異なるとされ、頭部の膵島に多く分布すると報告されている<sup>11,13,14)</sup>。今回、我々が検索したハムスターでは、正確な計測が試みられているわけではないが A : B : D 細胞比は 10 : 80 : 10 と思われる。しかしヒトでも A : B : D の細胞比が 20 : 75 : 5 であるとする報告があるなど一定しているわけではない<sup>12,15)</sup>。これらは、膵内の部位や加齢などにより膵島を構成する細胞に変動がみられることによるものと考えられる。ハムスターの内分泌細胞の構成比はヒトの細胞構成比に類似しているものと考えられる。ハムスターの PP細胞は、ほとんどが十二指腸葉の膵島に集中し、その他の葉の膵島にはほとんど認められていない。この PP細胞の分布は、ヒト膵では頭部に多く存在することからハムスターの十二指腸葉は発生学的にヒトの膵の腹側原基由来と関連があるものと考えられる。一方、上記の膵島内に於ける内分泌細胞の分布部位は、動物種により異なり、ウマ、サルでは膵島辺縁部にB細胞が環状に配列しており、中心部の大部分はA細胞が、そしてA、B両細胞群の中間部位にD細胞が配列している。その他、ヒト、ウサギ、ラットでは、B細胞が膵島の中心部を占領し、A細胞は辺縁部

に、D細胞はA、B両細胞群の間に位置している<sup>1,2,3)</sup>。ハムスターの膵島は、A細胞は辺縁部に環状に認められ、B細胞は中心部、A、B細胞群の間にD細胞が位置していた。これらの所見は、ヒト、ウサギ、ラットに類似しているものと考えられる。この膵島内分泌細胞の配列は膵島内毛細血管の血液の流れに関係しており、ラットやヒトでは、膵島辺縁部のA細胞領域を灌流した後、次第に中心部へと向かい、途中のD細胞領域を流れながら、ついで中心部B細胞領域を灌流することが推測されている。よって、同様にハムスター膵島の内分泌細胞の分布、配列が同じであることから同じ血液循環が考えられるが、逆にラットにおける血流は、B細胞領域を灌流し、D細胞、A細胞へ流れるとする考え方もある<sup>3,16)</sup>。

膵島外の外分泌腺組織内や膵管に出現した insulin 陽性細胞は、週齢が進むにつれて若干増加する傾向が認められた。これらの細胞は、渡らの報告によると、アロキサン、ビタミンA投与マウスなどの膵においても増加するとされている<sup>17,18)</sup>。出現意義については、内外両分泌細胞の移行説 (balancement theory)、細胞融合説などが考えられているが、現在のところ定説はない<sup>19)</sup>。しかし、今回の我々の実験での insulin 陽性細胞の加齢による若干の増加傾向は加齢による膵島数の減少や毛細管の拡張などによる内分泌細胞（特にB細胞）の保有面積の減少により内分泌腺のホルモンバランス不均衡が生じ、膵島外 insulin 陽性細胞数の増加が反映されたものと考えられた。

## 結 語

今回の検索ではハムスターは、ヒト、ウサギ、ラットと同様にB細胞が膵島の中心部に、A細胞は辺縁部にD細胞はA、B両細胞層の間に位置し、PP細胞は、十二指腸葉の膵島に集中していた。このほかに、膵島外の内分泌陽性細胞が膵島上皮や、外分泌腺に出現し、特に insulin 陽性細胞は、加齢とともに若干増加する傾向が認められた。

## 文 献

- 1) T. Fujita: *Ach. Histol. Jpn.*, **35**, 161 (1973)
- 2) L. Orci *et al.*: *Lancet II*, 1243 (1975)
- 3) 永田和之: *慈恵医大誌*, **96**, 673 (1981)
- 4) T. Fujita *et al.*: *Arch. Histol. Jpn.*, **35**, 255 (1973)
- 5) M. Takahashi *et al.*: *Cancer Res.*, **37**, 4602 (1977)
- 6) P. Pour: *The Pancreas*, p. 111 (1980), Williams & Wilkins, Baltimore/London
- 7) 諏訪紀夫: *定量形態学*, p. 12 (1977)
- 8) M. Takahashi *et al.*: *Lab. Animal Sci.*, **27**, 336 (1977)

- 9) L. Orci: *Lancet I*, 1243 (1975)  
 10) R. Buffa *et al.*: *Histochemistry*, **50**, 217 (1977)  
 11) 渡 仲三: 睥の形態と機能, p. 23 (1982) 宇宙八木書店  
 12) 須田孝一: 睥の形態と機能, p. 5 (1982) 宇宙八木書店  
 13) L. Orci *et al.*: *Lancet II*, 1200 (1978)  
 14) L. Orci *et al.*: *Lancet I*, 615 (1979)  
 15) 渡 仲三: 睥—その内分泌, 医学のあゆみ, **103**, 261 (1977)  
 16) S., Bommer-Weir *et al.*: *Diabetes*, **31**, 883 (1982)  
 17) N. Watari *et al.*: *J. Electron Microsc.*, **11**, 143 (1972)  
 18) N. Watari *et al.*: *J. Electron Microsc.*, **21**, 40 (1972)  
 19) 馬淵良生ら: 名市大医誌, **34**, 486 (1981)

## 毒性試験の眼球標本作製における Davidson 固定法の有用性

—ラット galactose 白内障をモデルとして—

豊田和弘・古川文夫・長谷川良平・佐藤秀隆  
 張 子俊・高橋道人・林 裕造

The Diagnostic Value of Davidson Fixation Method on  
 Toxicological Evaluation of Eye Lesion  
 —histopathological findings of cataract formation following  
 galactose diet intake in rats—

Kazuhiro TOYODA, Fumio FURUKAWA, Ryohei HASEGAWA, Hidetaka SATO,  
 Ja June JANG, Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASHI

The effects of two different fixatives on ocular tissue preparations for histological examination were tested. The ocular tissues were obtained from the eyes of non-treated and 50% galactose-fed male and female rats, fixed in Davidson solution or 10% buffered formalin for 2 weeks, and routinely processed for paraffin-embedded blocks. The most apparent difference between the two fixatives was found during the tissue cutting process of the blocks. The ocular tissues fixed in the Davidson fixative were more easily cut into thin sections, and examination of the lens could be performed more clearly. On the other hand, the formalin-fixed samples did not show detailed architecture of the lens. Thus, the Davidson fixative method was found to be more suitable than the formalin fixative method. Also better stainability for special histochemical techniques, such as Masson trichrome staining was obtained with the Davidson fixation. Using this method, ocular lesions in various toxicological fields could be more precisely examined.

(Received May 31, 1986)

### はじめに

各種毒性試験において、眼球の病理組織学的検索は極めて重要である。しかし眼球が軟硬様々な組織で構成される特殊な器官であるため、従来のホルマリン固定による組織標本作製法では良好な組織標本を得ることが難しく、詳細な検索の妨げとなっていることが多い。

今回 F344 ラットを用いて作成した galactose 白内障の眼球を用いて、10%中性緩衝ホルマリン固定法と Davidson 固定法とを比較検討した。その結果、Davidson 固定法において比較的良好な眼球組織標本を

得ることができたので、その一般的方法を報告すると共に今後の改良点について考察を加え、併せて galactose 白内障水晶体の病理組織学的所見についても言及する。

### 実験材料および方法

#### 1. galactose 白内障の作成

動物は SPF の F344 ラット4週齢、雌雄各6匹(静岡実験動物)を用い、一週間馴化した後、それぞれ3群に分け実験に供した。

galactose は東京化成の D-(+)-Galactose を用い、オリエンタル酵母社製M粉末飼料に50%の割合に添加

Table 1. Davidson fluid<sup>1)</sup>

Buffered 10% formalin	200 ml
Absolute ethanol	300 ml
Acetic acid	100 ml
Distilled water	300 ml

した。

動物の飼育は、温度  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  に空調管理された動物室にて行った。

第一群（雌雄各 4 匹）には 50% galactose 添加飼料を 40 日間与え、第二群（雌雄各 1 匹）は無処置対照群として同期間基礎飼料で飼育した。第三群（雌雄各 1 匹）は 50% galactose 添加飼料を 40 日間投与した後、基礎飼料に戻し、更に 40 日間飼育した。

実験期間中、飼料および飲料水は自由に摂取させ、また各動物の眼球の変化を肉眼的に観察した。

実験期間終了後エーテル麻酔下で屠殺剖検し、眼球を摘出して以下の方法に従って標本作製した。

## 2. 眼球標本の作製

眼球周囲組織を鈍的に剝離し、直ちに右眼を Davidson 液 (Table 1)、左眼を 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸し、振盪機 (エイト振盪機 model 8-20, (株) ヤヨイ, 東京) にて一晩振盪させた。

各眼球はそれぞれの固定液中に 2 週間浸漬後、常法により水洗、アルコール脱水を経てパラフィンブロックを作製し、マイクロームにて眼球の前後極方向に薄切して、眼軸を通る  $4\mu\text{m}$  の切片を得た。

組織切片は脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (H & E) 染色のほか、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色、pH 2.5 および pH 1 のアルシアン青染色、PAS-アルシアン青重染色、マッソンのトリクロム染色を施した。

## 結 果

### 1. ホルマリン固定法と Davidson 固定法の比較

中性緩衝ホルマリン液にて固定後作製したパラフィンブロックでは、眼球組織内部へのパラフィン浸透が不十分で、かつ水晶体が眼球腔内で遊離した状態となり、そのために網膜を含む周囲組織と水晶体との同時薄切は極めて困難であった。

Davidson 液にて固定したブロックでは、内部まで十分パラフィンが浸透し、全眼球組織の薄切が容易であった。ただし無処置対照群の水晶体では、薄切切片の伸展の際、標本に皺ができ、伸展器の温度の調節によっても完全に伸展することはできなかった。また Davidson 液にて固定した眼球の光顕的観察において、

アーティファクトとして角膜固有層線維が解離して水腫状を呈し、網膜外顆粒層細胞核には萎縮による金米糖様の変形が認められた。

### 2. 水晶体の病理学的検索

#### <肉眼的所見>

実験経過中、50% galactose 含有食投与群に 2 週目より肉眼的な瞳孔の混濁を認め、3 週目には 2 匹の片眼に、4 週目にはすべての動物の両眼に水晶体中心部の白濁を認めた。

また第三群において、galactose 投与終了後、水晶体の白濁の範囲が徐々に縮小し、中心部に限局する傾向がみられた。

#### <組織学的所見>

##### 1) 水晶体の正常組織<sup>2-5)</sup>

ラットの水晶体は、ヒトと異なりほぼ球形を呈する。その全周は一層の薄い被膜に被われ、前極側の被膜直下には一層の立方から扁平細胞による上皮が認められる。上皮は赤道部において水晶体線維細胞へと分化を始める。線維細胞はやがて核を失い、水晶体の本体である水晶体線維へと分化する (Fig. 1)。

水晶体中心部は古い線維が凝集して硬い核部を構成し、その周囲のやや軟らかな線維層である水晶体皮質と区別される。

##### 2) 50% galactose 40 日間投与群

###### 水晶体上皮の変化

水晶体前極の表層では上皮細胞の局所的な脱落がみられ、一部では過形成による多層化が認められた。過形成を示す部位では、上皮細胞内および細胞外に PAS 反応陽性物質が認められた (Fig. 2)。以上の細胞増殖傾向は特に雌で強くみられた。

また一部の上皮細胞において空胞形成および核融解等がみられ、過形成部位では一部紡錘形を呈する細胞も認められた。

###### 水晶体皮質及び核部の変化

皮質では、前極側上皮直下および後極側被膜直下より中層域全周にわたって液化がみられ、その中に断裂した線維片および微細顆粒状物質が認められた (Fig. 3)。

赤道部浅層皮質では膨化した線維細胞が認められ、紡錘形から楕円形を呈する有核の細胞が前後極方向へ向って増殖しており、水晶体上皮の線維細胞への正常な分化は抑制されていた (Fig. 4)。また上記の細胞の増殖傾向は特に後極側で顕著であり、中には後極部まで達しているものもみられた。

それらの細胞の細胞質は微細顆粒状を呈し、空胞を有するものもみられた。核形は様々であり、また一つ

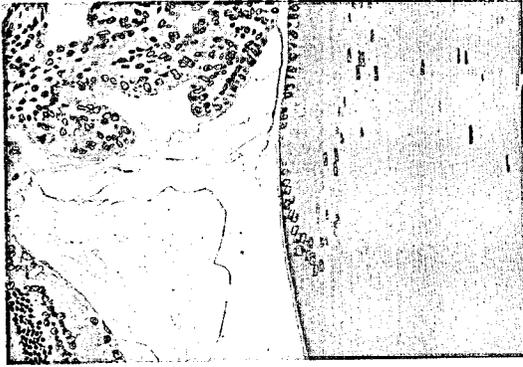


Fig. 1. Equatorial area of the lens in a control rat (group 1). Cortex of the lens consists of circulating fibers.; H&E stain  $\times 80$

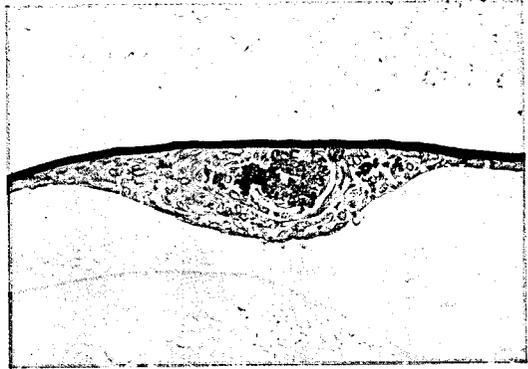


Fig. 2. Epithelial cell proliferation of the lens and PAS-positive deposits in galactose-treated rat (group 2); PAS stain  $\times 100$

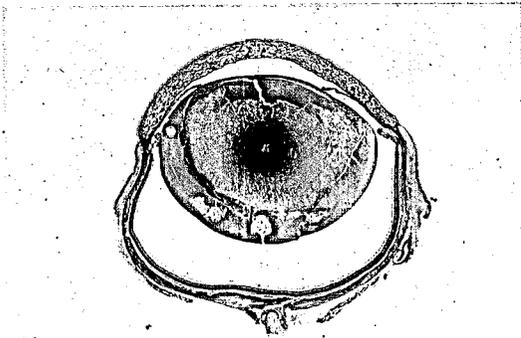


Fig. 3. Degeneration of the lens in galactose-treated rat (group 2); Masson trichrome stain  $\times 4$

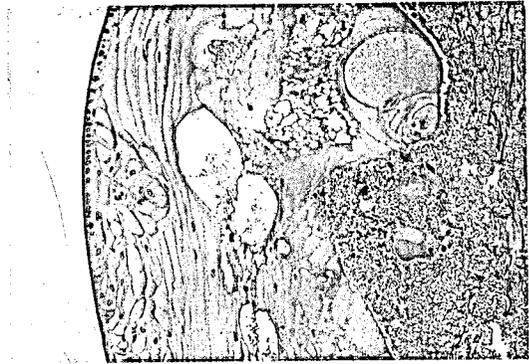


Fig. 4. Degeneration in the equatorial area of lens in galactose-treated rat (group 2); Masson trichrome stain  $\times 50$

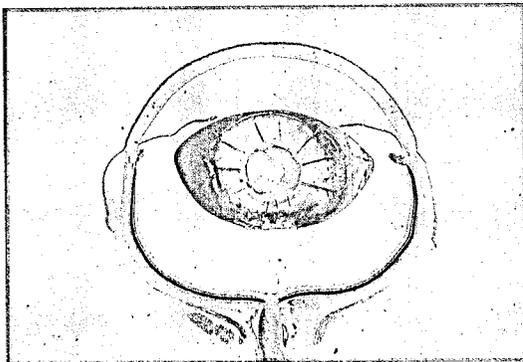


Fig. 5. Contraction of the lens of rat fed galactose for 40 days and then fed on the basal diet for 40 days (group 3); H&E stain  $\times 4$

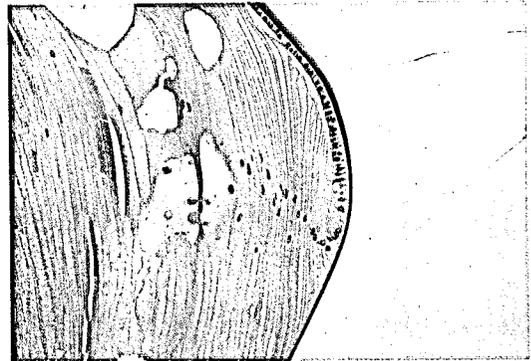


Fig. 6. Cyst formation in the equatorial area of lens of rat fed galactose for 40 days and then fed on the basal diet for 40 days (group 3); Masson trichrome stain  $\times 100$

の細胞内に2~8個の複数の核を認めるものもあった。ところどころに融解した線維細胞の跡であろうと思われる空隙がみられ、嚢胞状を呈する部位も認められた。

深層皮質では、線維の断裂などの変化が認められるものの、線維の層構造は保たれ、また核部には著変を認めなかった。

### 3) 50% galactose 40日間+基礎食40日間投与群

水晶体は全体的に収縮し、特に前後極方向での収縮が著しく、レモン形を呈した (Fig. 5)。

水晶体上皮細胞は過形成部位を含め紡錘形を呈するものが多くなっていた。

浅層皮質においては部分的に空隙を有する線維や、細胞間の空隙が認められるものの、水晶体線維細胞の分化は正常に近い状態に回復していた (Fig. 6)。

浅層から中層にかけてみられた液化層は吸収され、局所的にわずかにみられるのみであったが、後極部付近では比較的残存する傾向がみられた。

中層皮質から核にかけての領域はほぼ無構造となり、スリガラス様を呈していた。

また中層部に、ヘマトキシリンに青紫色に染まる顆粒が散見され、濃縮した核と思われた。

### 4) 特殊染色による観察

PAS 染色：水晶体被膜が赤く陽性を示したほか、上皮細胞内、特に上皮の過形成部位に陽性物質が認められた。また水晶体被膜は無処置対照群では一層の無構造の被膜であるが、galactose 投与群では上皮細胞側に薄くもう一つの層が確認された。galactose 投与後基礎食を与えた動物では被膜は三層構造をなし、部分的に線維状を呈し、また一部に肥厚および蛇行が認められた。

アルシアン青 pH 2.5：いずれの部位においても陰性であった。

アルシアン青 pH 1：水晶体被膜および上皮過形成部位の PAS 反応陽性物質が薄い青色に弱陽性を呈し、PAS 染色に一致する結果であった。

PAS-アルシアン青重染色：PAS 反応のみ陽性であった。

マッソンのトリクロム染色：水晶体被膜および上皮の PAS 反応陽性物質がアニリン青で青色に、その他は酸性フクシンで赤色に染まったが、上皮細胞、線維細胞、液化巣、核部等組織の変化に伴って微妙に色が染め分けられていた。

今回行った染色の中でマッソンのトリクロム染色は H & E 染色で観察し難い水晶体被膜をアニリン青によって青色に染め出し (PAS 染色による陽性部位と一

致)、その他の水晶体上皮および水晶体線維細胞などの水晶体内の細胞成分も組織の変化に合わせて赤紫色から赤色に酸性フクシンによって微妙に染め分けている点で、水晶体の変化を観察する染色法としては、非常に有効であると思われた。

## 考 察

### 1. 眼球標本の作製について

眼球固定の際よく用いられる固定液としてブアン液、ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合液、ホルマリン液などがある<sup>6-9)</sup>。しかし、ブアン液についてはピクリン酸によるアルコール脱水系列や組織の汚染、染色性の低下などの問題があり好まない人が多い<sup>10)</sup>。グルタルアルデヒドを用いる固定法は比較的良好な結果が得られるとされているがコストが高く、取り扱いに注意を要するなど毒性試験のように多数の標本を処理したい場合には制約がある。ホルマリン液については眼球に割を入れないでパラフィン包埋処理を行った場合、眼球内部へのパラフィンの浸透が悪く標本作製は困難となる。また割を入れても一般に水晶体の薄切は極めて難しく、良好な組織切片は得られない。今回使用した Davidson 液は、調製が容易で染色性も良く、コスト、処理の簡便さを考慮すると、毒性試験の眼球検索をルーチンに行うためには、より適切な固定法といえる。

なお、今回 Davidson 液の処理によって角膜固有層、網膜外顆粒層にみられたアーティファクトは浸透圧の影響によるものと思われ、固定時間の短縮、固定後の中和処理、固定液のホルマリン濃度を上げるなど条件を検討することによりある程度防ぐことができるのではないと思われる。

また眼球標本の作製技術において眼球内への固定液の注入や眼球に割を入れることの重要性を説くものもみられるが<sup>6-12)</sup>、網膜剝離や眼球の変形、眼球内組織の流出などの組織破壊を招く可能性が高く、推められない。特にラット、マウスなどの小動物を対照とする場合は、今回の結果でもパラフィンの浸透は十分であり、眼球をそのまま包埋しても構わないであろう。

その他、視神経は包埋、薄切の際、位置確認の目印となるので 1~2mm ほどつけておくことと便利である。

### 2. galactose 白内障について

galactose 白内障の原因は、細胞内に蓄積された dulcitol であるといわれている<sup>13-16)</sup>。dulcitol は galactose がアルドース還元酵素によって還元された糖アルコールであり、極性を有するため一旦細胞内で形成されると細胞外へは透過し難く、細胞内の浸透圧が

高まって今回みられたような水晶体線維細胞の膨化をきたす。

今回の実験で galactose 投与群にみられた水晶体上皮の水晶体線維細胞への分化抑制は, galactose 投与を中止することにより消失し, 正常の分化が始まることが確認された。これは細胞内での dulcitol の形成が止まったことによると思われる。ただし, まだこの段階では水晶体上皮および皮質にみられた変性は完全に消失しておらず, また核部についても器質的変化の有無を確認できなかった。さらに皮質液化巣の吸収により水晶体の変形も認められ, 基礎食による飼育を続けることにより, 白内障が完全に治癒するか否かは, 今回の実験だけから推測することはできない。また, 過熟白内障への移行も否定できない<sup>17)</sup>。

水晶体上皮の増殖については, 遺伝性白内障を有する CWS ラットにおいても H<sup>3</sup>-チミジンを用いたオートラジオグラフィーで前極部上皮に標識細胞が多数認められたとの報告がある<sup>18,19)</sup>。

また PAS 染色で確認された上皮細胞内の PAS 陽性物質や水晶体被膜の多層化は, 上皮細胞の水晶体被膜成分の合成能が高まっていることを示唆しているものと思われる。

## 結 語

今回の実験により, 各種毒性試験での眼球標本の作製において Davidson 固定液の有用性が確認され, 今後積極的にこの方法が用いられ, 普及することが望ましい。また染色法としてマッソンのトリクロム染色を用いると, 良い結果が得られることをラット白内障モ

デルによって示した。

## 文 献

- 1) 和田 功ら: 毒性病理研究会第2回学術集会講演要旨集, p. 21 (1986)
- 2) 高橋日出彦: 統・くすりの毒性, p. 1 (1976) 南江堂
- 3) 伊東信行: 図説実験用小動物組織学, p. 178 (1974) 新宿書房
- 4) 山田英智, 市川 厚, 黒住一昌: プルームフォーセット組織学 [II], p. 964 (1979) 廣川書店
- 5) L. Weiss, R. O. Greep: Histology, p. 1145 (1977) McGraw-Hill Inc., New York
- 6) 佐野 豊: 組織学研究法, p. 733 (1965) 南山堂
- 7) 尾崎善孝: 実験動物組織標本作製上の Q & A, p. 3 (1985) 実験動物病理組織標本作製技術懇話会
- 8) 阿部 寛ら: 衛生検査, 31, 479 (1982)
- 9) 榎本 真, 林 裕造, 田中寿子: 実験動物の病理組織, p. 492 (1980) ソフトサイエンス社
- 10) 日本病理学会編: 病理技術マニュアル 3 病理組織標本作製技術 (上), p. 32 (1981) 医歯薬出版
- 11) 榎本 真, 林 裕造, 田中寿子: 実験動物の病理組織, p. 200 (1980) ソフトサイエンス社
- 12) E. Prophet: *Histo-Logic*, 5(1), 73 (1977)
- 13) R. V. Heyning: *Nature*, 184, 194 (1959)
- 14) A. W. Hayes: *Toxicology of the Eye, Ear, and Other Special Senses*, p. 1 (1985) Raven Press, New York
- 15) 尾羽沢 大: 眼科臨床医報, 80 (4), 1 (1986)
- 16) 福士 克: 眼科, 28, 409 (1986)
- 17) 矢島保道, 沖坂重邦: 眼科, 28, 258 (1986)
- 18) 川俣順一, 松下 宏: 疾患モデル動物ハンドブック No. 2, p. 254 (1982) 医歯薬出版
- 19) R. Shoji et al.: *Teratology*, 19, 47A (1979)

アドリアマイシン毒性の発現とその進展に関する病理学的研究  
—腎病変の進展と尿細管酵素活性の変動—

佐藤秀隆・豊田和弘・長谷川良平・古川文夫  
張子俊・高橋道人・林裕造

Enzyme Histochemical Study on the Adriamycin  
Nephropathy in Rats

Hidetaka SATO, Kazuhiro TOYODA, Ryouhei HASEGAWA, Fumio FURUKAWA,  
Ja June JANG, Michihito TAKAHASHI and Yuzo HAYASHI

Enzyme histochemical techniques were utilized to examine the tubular injury of the kidney during the progress of adriamycin-induced nephropathy in rats. Seven-week old male Sprague-Dawley rats were given a single administration via the lateral tail vein at a dose level of 8 mg/kg body weight of adriamycin. At 6 hr, and at 1, 2, 4, 8, 16 and 32 days following the treatment, animals were sacrificed for pathological and enzyme histochemical examination of the kidney. In non-treated rats  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP) activity was shown mainly on the brush borders of the proximal tubules and also weakly on the crus ascendens of Henle, and alkaline phosphatase (ALP) activity was strongly positive on the brush borders of the proximal tubules and also weakly positive at the basal area of the proximal tubules. In the treated group the tubular epithelial cells revealed no remarkable change on these 2 enzymes within 8 days. However, at the 16th day dilated proximal tubules showed decreased activities of  $\gamma$ -GTP and ALP, and these findings more advanced at 32nd day. Colloidal casts in the tubules, which occurred on 16 days after the injection of adriamycin, also showed  $\gamma$ -GTP and ALP activity. The present results suggested that the injured epithelium of renal tubules leaked these 2 enzymes into the urine.

(Received May 31, 1986)

アドリアマイシン (ADR) は, *Streptomyces peucetius* var. *caesius* より得られた抗腫瘍薬<sup>1)</sup>で白血病, lymphoma や固形腫瘍の治療薬<sup>2)</sup>として広く用いられている。その作用は, DNA にインターカレートして DN-A-RNA ポリメラーゼ活性を阻害し細胞機能を低下させることによるとされている<sup>3-6)</sup>。ADR の腎臓に対する障害は Bertazzoli ら<sup>7)</sup>が報告して以来その病理発生に興味が持たれている。Bertani<sup>8)</sup>は ADR 投与による腎病変の発生原因が糸球体基底膜の陰性荷電物質の減少であるとした。一方, Michels ら<sup>9)</sup>は size selective filter の機能不全によるとしている。林ら<sup>10)</sup>は ADR を投与したラットの腎糸球体上皮細胞に nucleolar segregation を証明し, DNA へのインターカレーションに伴う上皮細胞の機能不全が糸球体基底膜の変性, 糸球体血管壁の透過性亢進を来し結果的に蛋白尿を誘発する可能性を示した。以上のように ADR による腎病変については, 主に糸球体障害について検索されているが<sup>8-11)</sup>, 腎不全に至るまでの腎尿細管酵素に関する知見はみられない。今回, 我々は ADR の毒

性, 特に腎病変と, その進展に伴って生じる腎尿細管の変化について酵素組織化学的に検討した。

### 実験方法

50日令の雄 Sprague-Dawley ラットを日本チャールスリバー社より購入し, バリヤンシステムの動物室にて室温  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 換気回数 18/hr (オールフレッシュ), 明暗サイクル各 12 時間の人工照明下で飼育した。動物は, プラスチックケージに各 3 匹ずつ収容し, 床敷は三協ラボサービス(株)のソフトチップを用い, これを週 2 回交換した。飼料は, 日本チャールスリバー社製の固型飼料 CRF-1 を用い, 飲料水は水道水を与え, 実験期間中, 自由に摂取させた。

ADR は, 協和発酵工業(株)より購入し, 生理食塩水に溶解した後, 8 mg/kg の濃度で尾静脈より一回投与した。投与後, 6 時間目に 2 匹, 1, 2, 4, 8, 16, 32 日目に各 3 匹ずつ屠殺した。コントロールとして生理食塩水を 0.6 ml 投与し, 1, 32 日目に各 2 匹屠殺した。腎臓は二分割し, 一方は 10% 緩衝ホルマリンに

て、他方はアセトンにて固定した。固定後、常法どおりパラフィン包埋し、薄切片を H & E, PAS, PAM 染色し観察した。また、腎糸球体の陰性荷電の変化を知るためアルシアン青 (pH 2.5) 染色を行った。アルシアン青染色は、ヒアルロン酸、シアル酸など複合糖質の陰性荷電を組織化学的に検出するのに用いられる。アセトン固定標本については、 $\gamma$ -グルタミルトランスベプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP)<sup>12)</sup>、アルカリフォスファターゼ (ALP)<sup>13)</sup> 染色を行った。また、腎病変の進展と抗体および補体との関連を知るために、抗ラット IgG 抗体および抗ラット C<sub>3</sub> 抗体 (Bethyl Laboratories 社製) を用い、アビチン-ビオチン法 (ABC 法) による免疫染色を行った。その他の臓器、すなわち心臓、胸腺、骨髄、肝臓、肺臓、精巣、副腎、唾液腺、膵臓については、常法どおり 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋し、H & E 染色した。

## 結 果

ADR 投与動物は、コントロールに比べて著しい体重増加の抑制が認められた (Fig. 1)。肉眼的に各臓器についてみると、腎臓は、8日目解剖時までは、肉眼的著変を認めなかったが、16日目以降腫大して淡褐色を呈し、重量も増加した (Fig. 2)。この時、唾液腺、膵臓、皮下に水腫を認め、腹腔内には透明な腹水が少量存在し、血清は乳び様を呈した。胸腺は 4および8日目では萎縮し重量も減少したが、16日目より回復を示し32日目にはコントロールと差を認めなかった。精巣は、8日目より次第に重量を減じた。その他の臓器には肉眼的に異常を認めなかった。

病理組織学的に腎臓において最初に認められた変化は、投与後4日目に腎糸球体上皮細胞内に認められた PAS 陽性顆粒であり、この変化は時間の経過とともにその数、大きさともに増加した。投与後8日目以降では、糸球体上皮細胞の膨化・剝離、尿細管の拡張、尿細管上皮の扁平化、尿細管上皮細胞内への PAS 陽性顆粒の沈着、管腔内への PAS 陽性の尿円柱の出現、また拡張した尿細管の上皮細胞に分裂像などが認められた (Fig. 3)。32日目では、さらに、糸球体構造の破壊、ボーマン氏嚢と糸球体血管壁との癒着、ボーマン氏嚢および尿細管基底膜の肥厚、尿細管の萎縮が認められた。しかし、糸球体基底膜の肥厚・剝離やメサングウム細胞または基質の増加などは実験全期間を通じて認められなかった。糸球体血管壁のアルシアン青染色性の低下は、4日目 PAS 陽性顆粒の糸球体上皮細胞への出現と同時に認められ、糸球体障害の進展に伴って減少した。また、糸球体係蹄壁は IgG, C<sub>3</sub> とともに陰

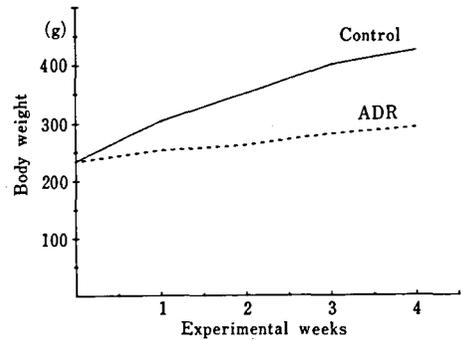


Fig. 1. Effect of adriamycin on body weight

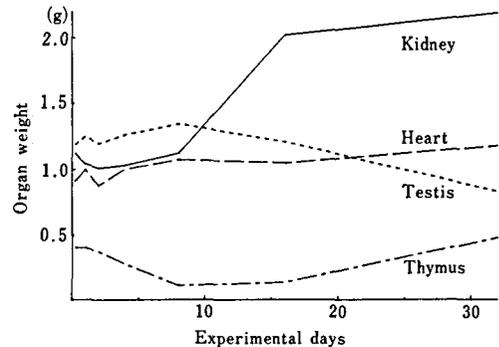


Fig. 2. Effect of adriamycin on organ weight

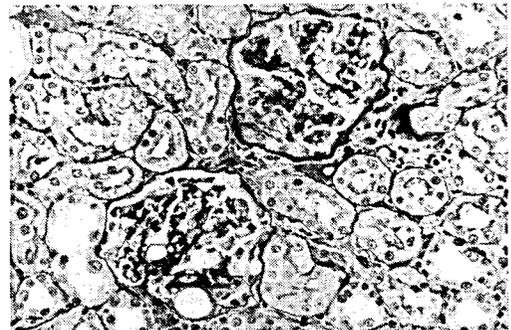


Fig. 3. Glomerulus from ADR treated rat at 32th day. Note thickening of Bowman's capsule, vacuolization of glomeruli and numerous PAS positive droplets in glomerular epithelium. ( $\times 100$ )

性であったが、PAS 陽性の尿円柱は、C<sub>3</sub> 陽性であった (Table 1)。

酵素組織化学的には、近位尿細管刷子縁での  $\gamma$ -GTP 活性、ALP 活性、PAS での染色性は、16日目以降、尿細管の拡張、尿細管の萎縮が著明になるに当たって病変部位で著しく減少した (Fig. 4, 5)。また、尿細管基底膜側に認められた ALP 活性は尿細管病変

Table 1. Histological Changes of the Glomerular Epithelium in Rats

	Intensity			
	PAS droplets	Vacuoles in GE	of AB on GBM	GBM thickening
Control	-	-	+++	-
6 hr	-	-	+++	-
1st day	-	-	+++	-
2nd day	-	-	+++	-
4th day	+	-	++	-
8th day	++	+	++	-
16th day	+++	++	++	-
32th day	+++	++	++	-

AB : Alcian Blue  
 GBM: Glomerular Basement Membrane  
 GE : Glomerular Epithelium  
 -:negative ±:slight +:mild ++:moderate +++:severe

Table 2. Histological Changes of the Tubular Epithelium in Rats

	Tubular dilatation	Intensity of		Peritubular BM thickening	PAS droplets in TE
		r-GTP	ALP		
Control	-	+++	+++	-	-
6 hr	-	+++	+++	-	-
1st day	-	+++	+++	-	-
2nd day	-	+++	+++	-	-
4th day	+	+++	+++	-	-
8th day	++	+++	+++	±	+
16th day	+++	++	++	+	+
32th day	++	++	++	++	+

BM : Basement Membrane  
 TE : Tubular Epithelium  
 -:negative ±:slight +:mild ++:moderate +++:severe

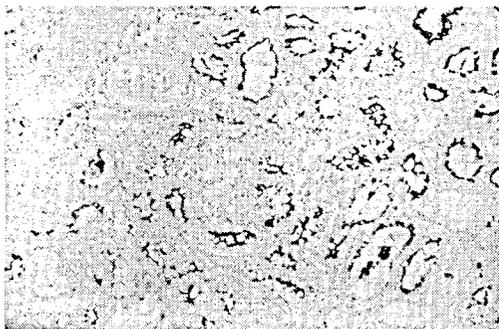


Fig. 4. ALP activity in tubular epithelium is decreased at dilated sites. (×40)

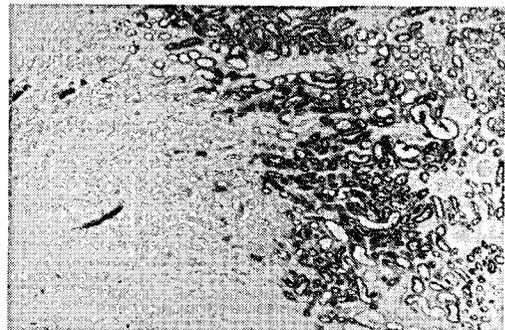


Fig. 5.  $\gamma$ -GTP activity on brush borders of the proximal tubules at 16th day is decreased at dilated sites. Casts in tubules show enzyme activity. (×10)

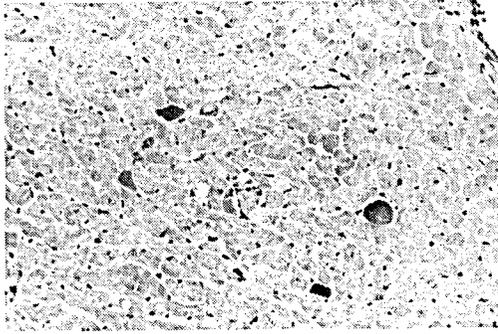


Fig. 6. Heart of ADR treated rats at 16th day. Several cardiac muscle fibers show eosinophilic degeneration and vacuolization. ( $\times 80$ )

部位で消失し、一部の尿円柱に ALP 活性、 $\gamma$ -GTP 活性を認めた (Table 2)。

精巣では、徐々に精子形成の減少を認めるとともに、精子頭部の好塩基性も減少した。基底膜側に局在する精祖細胞は、時間経過にしたがって減少し、32日目には、精細管中に精子と Sertoli 細胞のみ残存して精祖細胞、精娘細胞は認められず、間質には Leydig 細胞の軽度増殖が認められた。

骨髄では、2日目より赤芽球や骨髓球の減少とうっ血が認められ、4日目には赤芽球と骨髓球は脱落して少数の造血細胞のみ残り細網細胞およびその線維が明瞭となったが、8日目より再生像がみられ16日目には組織学的にコントロールと差を認めなかった。

胸線の変化は骨髄と平行しており8日目には大部分のリンパ球が脱落し細網細胞と線維がめだつが、32日目には組織学的に異常を認めなかった。

心筋には、投与16日目以降空胞化、局所的な横紋の消失、変性、壊死を示す細胞を認めた (Fig. 6)。

## 考 察

ADR は、DNA 鎖特に G : C 塩基対部位にインターカレートし、DNA-RNA ポリメラーゼ活性を阻害することにより抗腫瘍性、殺細胞性を発現すると考えられている<sup>3-62</sup>。一方、生体に投与した場合、血中からすみやかに組織に移行し<sup>14,15</sup>特にその核に分布する<sup>16</sup>。吸収された ADR は、一部は尿中に、一部は胆汁中に排泄され、その10%が腸管より再吸収される<sup>17-21</sup>。副作用としては脱毛、心電図異常、血小板減少、白血球減少、貧血、赤血球減少が報告されている<sup>22</sup>。実験的には、腎障害、心筋の変性および線維化、造血機能低下、造精子機能低下、後肢痲痺などが報告されており<sup>7,23-27</sup>、また、5 mg/kg の投与で雌ラ

ットに乳腺腫瘍を発生させることが知られている<sup>28</sup>。ADR 投与による糸球体障害の発生原因としては Bertani<sup>9</sup> の糸球体基底膜の陰性荷電物質の減少説や Michelsら<sup>9</sup> の size selective filter の機能不全説、その他に免疫複体の関与<sup>29</sup>などが想定されている。ADR を投与した動物の腎糸球体アルシアン青染色性は、糸球体病変の進展に伴って低下を示し、また、同一腎標本内でも糸球体病変の著しい部位ほど著明な減少を認めた。この結果は、陽性荷電物質の減少説を支持するものと考えられる。また、実験全期間を通じて、糸球体血管壁は IgG、C<sub>3</sub>とも陰性であり、糸球体血管壁の肥厚、解離とも認められず、腎症発生に免疫複体の関与はないと考えられた。このほか、ADR 腎病変の進展には、腎糸球体中のヒスタミン<sup>30</sup>、トロンボキサン A<sub>2</sub><sup>31</sup>などの関与が示されており、また、細胞内の微小線維の変性も考えられている<sup>32</sup>が、その詳細については不明な点が多い。

薬物投与による尿中酵素活性の変動については、主として尿細管障害物質を用いて検索されている。HgCl<sub>2</sub><sup>33</sup> やシスプラチン<sup>34</sup>のように近位尿細管に障害を与えるものは、蛋白尿のみられる以前に尿中の種々の酵素活性が上昇すると報告されている。腎乳頭部に限局した壊死を起こすような条件下では、ライソゾーム酵素である N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase や cathepsin D の排出が特異的に上昇することが示されている<sup>35-37</sup>。大野ら<sup>38</sup>は腎糸球体障害物質である puromycin を投与したラットで、尿中 ALP 活性は上昇したが  $\gamma$ -GTP 活性には変化を認めなかった。戸部ら<sup>39</sup>は puromycin 投与により尿中の ALP 活性の上昇、腎臓中の ALP、 $\gamma$ -GTP 活性と血清中の ALP 活性の減少を報告した。しかし我々は ADR 投与によっては組織化学的に近位尿細管刷子縁の ALP、 $\gamma$ -GTP 活性の減少を、一方、尿円柱内に ALP、 $\gamma$ -GTP 活性を認めた。このことは、大野、戸部らの報告とは異なり、尿中への酵素の逸脱を示唆していると考えられた。尿円柱内の ALP 活性が近位尿細管刷子縁に由来するのか、血清中酵素に由来するのかは明らかでないが、尿円柱は、C<sub>3</sub>陽性で血清成分由来であること、ADR により糸球体血管壁の透過性が亢進すること、および近位尿細管上皮の ALP 活性が低下することや尿円柱内に  $\gamma$ -GTP 活性もあることを考えると、尿円柱内の ALP 活性は両者に由来すると考えられる。他の薬物による拡張部尿細管で、ALP 活性、Na-K ATPase 活性が低下することは既に報告されており<sup>40,41</sup>、ADR 投与でみられた ALP、 $\gamma$ -GTP 活性の低下は、尿細管の拡張にともなう上皮細胞の非特異的な変性の結果で

あると考えられた。

## 結 語

ADR 腎病変の進展に伴う尿細管酵素の変化は、主として拡張部または萎縮部に限局され、その変化の原因は、拡張に伴う上皮細胞の変性によるものと推察され、HgCl<sub>2</sub> やシスプラチンなどによる尿細管障害とは異なるものと考えられた。ADR は、腎臓に進行性、不可逆性の変化を引き起こし、その他の臓器では、胸腺・骨髄に可逆的な、心臓、精巣には不可逆的な変化を引き起こした。この事実は、ADR の毒性発現を考えるうえで興味深い。

## 文 献

- 1) F. Arcamone, et al.: *Biotechnol. Biog.*, **11**, 1101 (1969)
- 2) R. S. Benjamin et al.: *Cancer*, **33**, 19 (1974)
- 3) S. C. Barramco et al.: *Cancer Res.*, **33**, 11 (1973)
- 4) W. D. Meriwetehr et al.: *Cancer Res.*, **32**, 1137 (1972)
- 5) D. G. Dalbow et al.: *Cancer Res.*, **42**, 79 (1982)
- 6) H. Sinpkins et al.: *Cancer Res.*, **44**, 614 (1984)
- 7) C. Bertazzoli et al.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **21**, 287 (1972)
- 8) T. Bertani: *Lab. Invest.*, **46**, 16 (1982)
- 9) L. D. Michels et al.: *Kidney Int.*, **22**, 246 (1983)
- 10) Y. Hayashi et al.: *Toxicol. Lett.*, **20**, 105 (1984)
- 11) P. O. Michael et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **106**, 62 (1985)
- 12) A. M. Rutenburg et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 517
- 13) 武内・小川 編: 新酵素組織化学; p. 282, 朝倉書店
- 14) 藤田ら: *Oncologia*, **7**, 92 (1983)
- 15) B. K. Chang: *Bull. Cancer (Paris)*, **69**, 172 (1982)
- 16) I. Mazzanti et al.: *Drugs Exptl. Clin. Res.*, **9**, 797 (1983)
- 17) N. Tavoloni et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **169**, 41 (1982)
- 18) S. Takanashi et al.: *Drug Metab. Dispos.*, **4**, 79 (1976)
- 19) C. E. Riggs et al.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **22**, 234 (1977)
- 20) L. M. Glode et al.: *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **4**, 639 (1977)
- 21) R. S. Benjamin et al.: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **14**, 592 (1973)
- 22) M. N. G. Duker: *Meyler's side effects of drugs*, 9th ed., Excerpta Medica
- 23) 大黒ら: 基礎と臨床; **7**, 1052 (1973)
- 24) 大黒ら: 薬物療法; **6**, 1093 (1973)
- 25) C. Bertazzoli et al.: *Experientia*, **26**, 389 (1970)
- 26) J. V. Moor et al.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **21**, 991 (1985)
- 27) Eun-Sook Cho: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **36**, 907 (1977)
- 28) E. Bucciarelli: *JNCI*, **66**, 81 (1981)
- 29) 奥田ら: 腎臓学会抄録; 337 (1985)
- 30) M. R. Bristow et al.: *Lab. Invest.*, **45**, 157 (1981)
- 31) G. Remuzzi et al.: *J. Clin. Invest.*, **75**, 94 (1985)
- 32) I. Kinji et al.: *Acta Pathol. Jpn.*, **36**, 253 (1986)
- 33) C. Josepovitz et al.: *Lab. Invest.*, **52**, 375 (1985)
- 34) T. W. Jones et al.: *Toxicol. Path.*, **13**, 296 (1985)
- 35) B. G. Ellis et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 995 (1973)
- 36) 大野ら: 衛生試報; **97**, 56 (1979)
- 37) P. H. Bash and T. L. Hardy: *Kidney Int.*, **28**, 605 (1985)
- 38) 大野ら: 衛生試報; **97**, 49 (1979)
- 39) 戸部ら: 衛生試報; **103**, 51 (1985)
- 40) J. E. M. McGeoch et al.: *Br. J. Exp. Path.*, **54**, 555 (1973)
- 41) J. E. M. McGeoch et al.: *J. Path.*, **119**, 221 (1976)

患者由来 *Salmonella* の産生する制限酵素

松井道子・三瀬勝利・吉田洋子\*・石館 基

Production of Restriction Endonucleases from Various *Salmonella* Strains of Human Origin

Michiko MATSUI, Katsutoshi MISE, Yoko YOSHIDA\* and Motoi ISHIDATE, Jr.

Using a safe procedure for the detection of restriction endonuclease-producing strains, 21 restriction-positive strains were found among 120 *Salmonella* strains of human origin. The designation of the restriction endonucleases and their producers was *Sin* I and *Sin* II in *Salmonella infantis* (11 strains), *Sbl* I in *Salmonella blockley* (3 strains), *Stm* I in *Salmonella typhimurium*, *Sba* I in *Salmonella bareilly*, *Ssc* I in *Salmonella schwarzengrund*, *Sth* I in *Salmonella thompson*, *San* I in *Salmonella anatum*, *Sis* I in *Salmonella isangi* and *Sbr* I in *Salmonella bredeney*. Activity of all the endonucleases was very high. No *Hsd\*\** plasmids has been isolated from these restriction endonuclease-producing strains in spite of several trials, indicating that the *hsd*<sup>+</sup> gene might be carried on chromosomal DNA.

(Received May 31, 1986)

## はじめに

1970年代の初頭に開発された組み換え DNA 技術の発展を可能にした最大の要因は、制限酵素の発見にある。事実、この理由がゆえに、1978年度のノーベル医学賞は、W. Arber ら3人の制限酵素研究者に与えられた。遺伝子操作技術の急速な発展とともに、今や制限酵素の研究と応用は、医学、薬学、生物学などの先端技術研究にたずさわる科学者達の、最大の関心事の一つとなっている。現在まで、認識部位の異なる約100種の制限酵素が、種々の細菌で見い出されている<sup>1,2)</sup>。しかし、これらの制限酵素のかなりのものは、高価であり、その上、制限酵素産生菌に病原性のあるものが多いという難点を持っている。一方 *Eco* RI 制限酵素に代表されるように、大腸菌で作られる制限酵素は非常に安価であるという長所がある。すなわち、大腸菌は生育が早く、かつ生育に特別な装置や培地を必要とせず、また非病原性大腸菌 K-12 に、制限酵素遺伝子を導入して、生産できるという利点がある。我々はまた、偶然大腸菌とチフス菌から、制限酵素を大量に産生する多数コピー *Hsd* (Host specificity for DNA) プラスミドを発見し、それを大腸菌 K-12 に導入して、大腸菌で制限酵素を安全かつ大量に産生する方法を確立した<sup>3,4,5)</sup>。このように、大腸菌を含む腸

内細菌科の細菌での制限酵素産生菌のスクリーニングは、遺伝子操作に有用な手段を提供することが期待される。

我々は本研究において、大腸菌と遺伝学的に関連性の強い種々の *Salmonella* から、制限酵素産生菌をスクリーニングする試みを行った。その結果、複数の特異性の異なる制限酵素産生菌を見出すことができた。我々は、これらの制限酵素の遺伝子座を決定することはできなかったが、その遺伝的類似性がゆえに、近い将来、これら *Salmonella* 由来の制限酵素遺伝子を大腸菌に導入して、大腸菌で制限酵素を大量生産することが可能になると考えられる。

## 実験方法

## 1. 使用菌株、ファージおよびプラスミド

制限酵素産生性をテストした120株の *Salmonella* は、東京都下において発生した食中毒患者から、独立に分離されたものである<sup>6)</sup>。 *Escherichia coli* WA 921<sup>7)</sup> は W. Arber 博士より分与されたもので、*Eco* K 遺伝子の活性を欠く0(ゼロ)株<sup>8)</sup>である。 *Salmonella typhimurium* CC4415<sup>9)</sup> は C. Colson 博士より分与された。使用した R プラスミドは、S-a (Cm Sm Su Km)<sup>10)</sup> と pBR 322 (Tc Ap)<sup>11)</sup> である。λファージは、W. Arber 研究室由来のものである。

## 2. 制限酵素切断解析

制限酵素切断には TA buffer<sup>12)</sup> を使用した。切断条件は前報<sup>4)</sup> に従った。

\* 国立公衆衛生院・衛生微生物学部

\*\* Abbreviations used: *Hsd* (phenotype) or *hsd* (genotype), *host specificity for DNA*

Table 1. Summary of safety method for detection of restriction endonuclease-producing strains of *Salmonella*<sup>a</sup>

Step	Procedures
1	Several colonies of <i>Salmonella</i> were suspended in 0.5ml of TN buffer ( 10mM Tris-HCl pH 7.5, 30mM NaCl ).
2	After vortexing, 0.5ml of LES buffer ( 10mM Tris-HCl pH 7.5, 30mM NaCl, 200 $\mu$ g/ml of lysozyme, 6mM EDTA, 40% sucrose ) was added to the suspension, and the mixture stored at 0°C for at least 3 hrs.
3	The mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatant tested for the restriction endonuclease activity in the presense of $\lambda$ phage DNA ( 0.1 $\mu$ g ) and <i>E. coli</i> tRNA ( $1 \times 10^{-5}$ M ).
4	The occurrence of restriction fragments was observed by electrophoresis in 1% agarose gel.

a : The safety method is a slight modification of the method described in ref. 16.

Table 2. Type II restriction endonuclease-producing strains of enteropathogenic *Salmonella* isolated from affected humans

Serotypes	No. of strains tested	No. of restriction endonuclease-producing strains	Designation of restriction endonucleases
<i>S. typhimurium</i>	23	1	<i>Stm</i> I
<i>S. infantis</i>	16	11 (two types)	<i>Sin</i> I (1) <sup>a</sup> <i>Sin</i> II (10) <sup>a</sup>
<i>S. bareilly</i>	11	1	<i>Sba</i> I
<i>S. derby</i>	10	0	-
<i>S. schwarzengrund</i>	10	1	<i>Ssc</i> I
<i>S. enteritidis</i>	9	0	-
<i>S. thompson</i>	8	1	<i>Sth</i> I
<i>S. blockley</i>	6	3 (one type)	<i>Sbl</i> I
<i>S. give</i>	5	0	-
<i>S. anatum</i>	4	1	<i>San</i> I
<i>S. sofia</i>	4	0	-
<i>S. agona</i>	2	0	-
<i>S. senftenberg</i>	2	0	-
<i>S. meleagridis</i>	2	0	-
<i>S. livingstone</i>	2	0	-
<i>S. isangi</i>	1	1	<i>Sis</i> I
<i>S. bredeney</i>	1	1	<i>Sbr</i> I
<i>S. kottbus</i>	1	0	-
<i>S. montevideo</i>	1	0	-
<i>S. panama</i>	1	0	-
<i>S. heidelberg</i>	1	0	-

a : Figures in parentheses show the number of restriction endonuclease-producing strains.

### 3. 制限酵素産生菌検出法

通常制限酵素存在の有無は、細胞を音波処理後、抽出液を精製して活性を測定する方法が取られている。しかし *Salmonella* は病原性を持っており、音波処理すると、病原菌が実験室内外に散乱することになり好ましくない。幸い制限酵素は perienzyme に属するものであり、lysozyme 処理で細胞壁を溶かすと、細胞外に溶出して来る。具体的な制限酵素産生菌の検出法を Table 1 に示した。表中で使用した tRNA は、制限酵素とともに溶出してくる endonuclease I の活性を抑制するために加えられている。

### 4. プラスミドの形質転換

*Salmonella* からのプラスミドの抽出は、Maniatis ら<sup>13)</sup> の方法に従った。*Salmonella* 由来のプラスミドと R プラスミドの形質転換は、前報<sup>5)</sup> に従った。Competent cells の作成は、R. Curtiss ら<sup>14)</sup> の方法に従った。*hsd+* 遺伝子の存在は、 $\lambda$  ファージを使用した Wood の cross-streak method<sup>7)</sup> に従った。

## 実験成績

### I. *Salmonella* の産生する II 型制限酵素

Table 1 に記した方法に従って、合計 120 株の食中毒由来 *Salmonella* から、21 株の制限酵素産生株を見出すことができた (Table 2)。Table 1 で示した方法は感度は高くないが、バイオハザード防止の観点からは良いものと考えている。このため、Table 2 の中には、制限酵素は産生するが、活性が低いものが見逃されている可能性がある。合計 21 株の制限酵素はすべて活性が高く、かつ安定なものが多かった。また、 $\lambda$  ファージ DNA の切断パターンから、*S. infantis* の制限酵素は、2 つのタイプに分けられた。このうち *Sin I* は *Ava II* の isoschizomer であった。この知見は、とりたてて新しいものではなく、すでに Lupker と Dekker<sup>15)</sup> によって報告されている。

### II. 制限酵素産生菌の薬剤耐性パターン

制限酵素の産生が確認された合計 21 株の *Salmonella* について、その薬剤耐性パターンを調べた (Table 3)。

Table 3. Drug resistance patterns of restriction endonuclease-producing strains of *Salmonella*

Strains	Drug resistance patterns <sup>a</sup>				
	Sm	Cm	Tc	Km	Ap
<i>S. infantis</i> YY163	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY17	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY106	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY197	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY200	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY209	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY217	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY224	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY225	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY228	+	-	-	-	-
<i>S. infantis</i> YY247	+	-	-	-	-
<i>S. blockley</i> YY175	+	-	+	+	-
<i>S. blockley</i> YY156	+	-	-	-	-
<i>S. blockley</i> YY242	+	-	-	-	-
<i>S. anatum</i> YY195	+	-	-	-	-
<i>S. thompson</i> YY148	+	-	-	-	-
<i>S. bareilly</i> YY271	+	-	-	-	-
<i>S. schwarzengrund</i> YY291	+	-	-	-	-
<i>S. bredeney</i> YY304	+	-	-	-	-
<i>S. isangi</i> YY362	+	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> YY317	+	-	+	-	-

a: Sm, streptomycin; Cm, chloramphenicol; Tc, tetracycline; Km, kanamycin; Ap, ampicillin.

Table 4. The presence or absence of small plasmids in restriction endonuclease-producing strains of *Salmonella*

Strains	The occurrence of small plasmids (>40 Kb)
<i>S. thompson</i> YY148	-
<i>S. bareilly</i> YY271	-
<i>S. blockley</i> YY156	-
<i>S. blockley</i> YY175	+
<i>S. blockley</i> YY242	-
<i>S. infantis</i> YY17	-
<i>S. infantis</i> YY106	-
<i>S. infantis</i> YY163	-
<i>S. infantis</i> YY197	+
<i>S. infantis</i> YY200	+
<i>S. infantis</i> YY209	-
<i>S. infantis</i> YY217	+
<i>S. infantis</i> YY224	+
<i>S. infantis</i> YY225	-
<i>S. infantis</i> YY228	-
<i>S. infantis</i> YY247	+

Table 5. Cotransformation of R plasmids and small plasmids of *Salmonella* origin to *CaCl*<sub>2</sub>-treated *E. coli* WA921 strain<sup>a</sup>

Expt.	Origin of donor DNA	Selected marker for transformation of R plasmid	No. of Hsd transformants/ no. of R transformants tested
1	<i>S. blockley</i> YY175+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
2	<i>S. blockley</i> YY175+CC4415 (pBR322)	Tc	0 / 100
3	<i>S. infantis</i> YY197+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
4	<i>S. infantis</i> YY200+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
5	<i>S. infantis</i> YY200+CC4415 (pBR322)	Tc	0 / 100
6	<i>S. infantis</i> YY217+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
7	<i>S. infantis</i> YY224+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
8	<i>S. infantis</i> YY224+CC4415 (pBR322)	Tc	0 / 100
9	<i>S. infantis</i> YY247+WA921 (S-a)	Cm	0 / 100
10	<i>S. infantis</i> YY247+CC4415 (pBR322)	Tc	0 / 100
11	<i>E. coli</i> H304+WA921 (S-a)	Cm	7 / 96 <sup>b</sup>

a The experiments were carried out as described by reference 4 and 5.

b Data from reference 5.

いずれも Sm (streptomycin) に耐性を示すが、これは多くの *Salmonella* に特徴的な現象である。Cm (Chloramphenicol) と Ap (Ampicillin) に耐性を示す菌株は見い出されていない。

### III. 制限酵素産生菌の小型プラスミド

上記の制限酵素産生菌の中で、制限酵素遺伝子座が小型プラスミド上にあるか否かを検討するために、プラスミドの分離を行った。Table 4 に示すように、調

べた約4割の制限酵素産生菌が、40 kb (kilo bases) 以下の小型プラスミドを保持していた。40 kb 以上の大型プラスミドは、Maniatis らの方法<sup>13)</sup> では、存在していても検出されないことがあり、Table 4 の対象からはずされている。

### IV. 小型 Hsd プラスミドの検索

Table 4 で分離された小型プラスミド上に制限酵素遺伝子の座が存在するか否かを決定する目的で、小型

プラスミドと R プラスミドを同時に *E. coli* WA 921 に対して形質転換させ、transformants の中から Hsd<sup>+</sup> の性質を示すものを調べた。Table 5 に示すごとく、調べた 6 株の小型プラスミドからは、いずれも Hsd<sup>+</sup> transformant を検出することができなかった。

### 考 察

120 株の食中毒患者由来 *Salmonella* から、21 株の活性の高い II 型制限酵素産生株を見出すことができた。λ フェージ DNA の切断パターン等から判断すると、これら制限酵素のうちで、*Sin* I, *Sin* II, *Sbl* II, *Sth* I および *Sba* I は、いずれも既知の制限酵素の isoschizomer のように思われる。また、*Sin* II と *Sth* I も互いに isoschizomer のように思われる。*Ssc* I, *Sbr* I, *Sis* I, *Stm* および *San* I については、制限酵素の存在は確認されているが、酵素の部分精製は未完了で、認識部位の特異性に関する検討はされていない。

我々はすでに *Salmonella*, *Shigella* および *E. coli* から、複数の小型 Hsd プラスミドを見出している<sup>3,4,5)</sup>。今回の実験では、こうした Hsd プラスミドを見出すことができなかった。これは、Table 2 で示した制限酵素産生菌の遺伝子座の大部分が、染色体上にあることを示唆している。なお、*Salmonella* と *E. coli* の遺伝学的類縁性がゆえに、近い将来、これら遺伝子が大腸菌に導入され、大腸菌で制限酵素が製造されるようになると思われる。

*Salmonella infantis* では、*Ava* II の isoschizomer である *Sin* I 型と、*Sth* I の isoschizomer と思われる *Sin*

II 型に分かれるのは興味深い。*S. infantis* に関して更に詳細な制限酵素産生性を検討することが必要と考えられるが、上記の知見は、制限酵素の種類の違いから、*S. infantis* の分類が可能かも知れないと思われる。

### 文 献

- 1) R. J. Roberts: *Nucl. Acid Res.*, **13**, r165 (1985)
- 2) C. Kessler et al.: *Gene*, **33**, 1 (1985)
- 3) K. Mise and K. Nakajima: *Gene*, **30**, 79 (1984)
- 4) K. Mise and K. Nakajima: *Gene*, **33**, 357 (1985)
- 5) Y. Yoshida and K. Mise: *J. Bacteriol.*, **165**, 357 (1986)
- 6) R. Nakaya et al.: *Drug Resistance in Bacteria*, p. 393 (1981), Japan Scientific Societies Press
- 7) W. B. Wood: *J. Mol. Biol.*, **16**, 118 (1966)
- 8) W. Arber and S. Linn: *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 467 (1969)
- 9) C. Colson and A. Van Pel: *Mol. Gen. Genet.*, **129**, 325 (1974)
- 10) T. Watanabe et al.: *J. Bacteriol.*, **96**, 1971 (1968)
- 11) F. Bolivar et al.: *Gene*, **2**, 95 (1977)
- 12) P. H. O'Farrell et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **179**, 421 (1980)
- 13) T. Maniatis et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, p. 368 (1982), Cold Spring Harbor Laboratory
- 14) R. Curtiss III et al.: *Cloning of Recombinant DNA*, p. 99 (1977), Academic Press
- 15) H. S. C. Lupker and B. M. M. Dekker: *Biochim. Biophys. Acta*, **654**, 297 (1981)
- 16) K. Mise et al.: *Gene*, in press.

## ディーゼル・エンジン排出物の細胞遺伝学的影響について

祖父尼俊雄・林 真・松岡厚子・沢田 稔・畑中みどり・石館 基

Cytogenetic Effects of Diesel Engine Exhausts on Mammalian Cells *In Vitro* and *In Vivo*Toshio SOFUNI, Makoto HAYASHI, Atsuko MATSUOKA, Minoru SAWADA,  
Midori HATANAKA and Motoi ISHIDATE, Jr.

The extract of diesel exhaust particles was examined in a chromosomal aberration test with cultured Chinese hamster cells (CHL), and induced chromosomal aberrations in both the presence and absence of S9 mix. The induction of sister chromatid exchanges (SCEs) was also examined in the same test substance, and positive results were obtained in both the presence and absence of S9 mix.

The micronucleus tests on rats exposed to diesel engine exhaust for 3, 6 and 24 months were carried out using bone marrow cells and peripheral blood. There was no significant increase in the frequencies of micronucleated erythrocytes in both the bone marrow and peripheral blood. In addition, when chromosomal aberrations in alveolar macrophages of mice exposed to the diesel exhaust for 1 to 21 days were examined, a tendency toward a slight increase in frequencies of chromosomal aberrations in alveolar macrophages was found with the length of the exposure period. The significance of the comparative cytogenetic effects of diesel engine exhaust on *in vitro* and *in vivo* experiments in mammalian cells was discussed.

(Received May 31, 1986)

近年、先進工業国において呼吸器系の癌による死亡率が年々増加していることから、喫煙との関連性が大いに注目されているが、一方、大気汚染の影響も論議されている。大気汚染源としては種々の要因が考えられるが、自動車の普及が著しい先進国では自動車の排出ガスによる汚染、特に最近大型車のみならず一般車にまで普及してきたディーゼル・エンジンの排出ガスによる汚染が問題視されている。ディーゼル車の排出粒子の抽出物が微生物を用いる突然変異試験において陽性の結果が報告されて以来 (Claxton<sup>1)</sup>, 1983を参照)、ディーゼル車の排ガスの人体に対する影響が問題視されてきた。我々はこれまでディーゼル・エンジン排出物の哺乳動物細胞に対する細胞遺伝学的影響について検討を行ってきたので、その結果について報告する。

## 試験方法

## 1. 哺乳動物培養細胞による染色体異常試験

ディーゼル排出ガス中の粒子状物質より抽出された試料について、哺乳動物培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検討した。抽出試料は国立公衆衛生院、松下秀鶴部長より供与されたもので、排出ガス中より捕集された浮遊粉じんについてエタノール・ベンゼン

によるソックスレー抽出を行ったものである。抽出法などの詳細については国立公衆衛生院による報告書<sup>2)</sup>を参照されたい。

用いた細胞はチャイニーズ・ハムスターの培養細胞株 (CHL) で、抽出物の染色体異常誘発性について、直接法<sup>3)</sup>並びに代謝活性化法<sup>4)</sup>を用いて検討した。直接法ではジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した検体を数段階の濃度で、24および48時間処理した後に、通常の空気乾燥法で染色体標本作製し、ギムザ染色を行った。代謝活性化法は PCB 前処理ラット肝より調製した S9 に補酵素などを添加した S9 mix を用いて行った。検体および S9 mix をシャーレに加えて6時間処理した後、新しい培養液と交換し、さらに18時間培養した。染色体標本は直接法と同様に作製した。各濃度毎に100個の分裂中期像を観察し、染色体構造異常をもつ細胞と倍数性細胞の出現頻度を求めた。

## 2. 哺乳動物細胞による姉妹染色分体交換 (SCE) 試験

染色体異常試験に供したものと同一の試料について SCE 誘発性の有無を検討した。用いた細胞は染色体異常試験に用いた CHL で、ラット肝 S9 mix 共存下、非共存下において試験を実施した。S9 mix を用いない場合には、DMSO に溶解した検体と 10  $\mu$ M のブ

ロモデオキシウリジン (BrdU) で30時間処理した後、染色体標本を作製した。S9 mix を用いる時には、S9 mix と検体と BrdU で6時間処理した後、PBS で軽く洗い、RrdU を含む新しい培養液でさらに18時間培養し、染色体標本を作製した。姉妹染色分体の分染には 1.0 M の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を用い、75°C で2分間処理し、水洗後2%のギムザ液で10分間染色した<sup>5)</sup>。SCE の観察は顕微鏡下で1濃度当たり30個の分裂中期像について行い、分裂中期像当たりの平均数を算出した。

### 3. 小核試験

ディーゼル・エンジンの排出ガスの生体内における染色体異常誘発性の有無を検討するために、マウスおよびラットの骨髄または末梢血液を用いて小核試験を行った。

#### 1) 排ガス曝露

ディーゼル・エンジンの排出ガスの曝露実験はすべて財団法人結核予防会結核研究所において行われた。曝露条件などの詳細については結核研究所による報告書<sup>6)</sup>を参照されたい。

##### a. 短期曝露実験

ディーゼル・エンジンは回転数 1,000 rpm、負荷率 80% で運転し、希釈トンネルの定められた10倍という希釈率で排ガスを希釈した (全ガスと称す)。予備の実験として全ガスのみにて短期間、すなわち1日、4日および7日間の連続曝露を行った。使用動物は生後6週の ddY 雄マウスで、各群6匹使用した。

##### b. 長期 (3, 6, 24カ月) 曝露実験

エンジンの運転および希釈トンネルの希釈率は短期曝露実験と同一であるが、曝露時間は日中8時間とした。3カ月曝露では全ガスの5倍希釈および全ガスより粒子成分を除去した除粒子群に加えて、清浄空気の対照群を設けて行った。6カ月および24カ月曝露では5倍希釈群を除く3群について行った。使用動物は10週齢の雌フィッシャー344ラット (日本チャールスリバー) で、3カ月および24カ月曝露では各群5匹、6カ月曝露では各群4匹を小核試験した。

#### 2) 骨髄および血液標本の作製

いずれの曝露実験においても骨髄標本を作製すると共に、さらに長期曝露では末梢血液標本も作製した。マウスの骨髄細胞の塗抹標本およびラットの血液標本はメタノールで5分間固定後、3%ギムザ液にて染色した。ラットの骨髄標本は固定後、0.24 mM のアクリジン・オレンジ溶液で染色し、蛍光顕微鏡下で観察した<sup>7)</sup>。

1個体当たり1000個あるいは2000個の多染性赤血球 (polychromatic erythrocyte, PCE) を観察し、小

核を有する PCE (micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE) の出現頻度を求めた。また、全赤血球に対する PCE 比率 (%) も求めた。さらに、ラットの血液標本では2000個の赤血球を観察し、小核をもつ細胞 (micronucleated erythrocyte, MNE) の出現率を求めた。

### 4. マウス肺胞マクロファージによる染色体異常試験

全ガスに一日8時間ずつ、1日、2日、3日、7日、14日および21日間曝露されたマウスの肺胞マクロファージにおいて染色体異常誘発性の有無を検討した。マウスは生後8週齢の ICR 雄 (チャールス・リバー) で、各群5匹を用い、対照としての非曝露群には合計10匹用いた。最終曝露の翌日コルセミドを 0.3 mg/マウス腹腔に注射し、2時間後に屠殺した。

マクロファージの採取は Cornner ら<sup>8)</sup> の方法に準じ、次のように行った。気管をつけたまま肺を傷つけないように取り出し、細い管を気管の分岐近くまで挿入した後、細管に注射筒をつけて、Ca と Mg を含まないハンクス液を注入し、注入を数回繰り返して、マクロファージを採取した。0.075 M KCl 溶液で低張処理後、酢酸・メタノールで固定し、空気乾燥法を用いて染色体標本を作製した。

## 結 果

### 1. 哺乳動物培養細胞による染色体異常試験

直接法ならびに代謝活性化法による結果を Table 1 および 2 に示す。直接法の24時間処理では 0.5 mg/ml より染色体異常の出現頻度が増加し、1.5 mg/ml では 38% の細胞に染色体異常が観察された。一方、48時間処理では24時間処理よりも細胞毒性が強く現れ、1.0 mg/ml 以上では染色体分析ができず、0.5 mg/ml ではわずかに染色体異常が増加したにすぎなかった。

代謝活性化法では検体処理時間が6時間であるが、S9 mix を添加しない場合でも染色体異常の誘発が認められた。ただし、24時間処理に比べると出現頻度は低く、1.5 mg/ml では 23% であった。S9 mix を添加すると染色体異常誘発性はさらに著しくなり、しかも S9 の割合が増えるにつれて、より強い効果が認められた。5% の S9 を含む場合には 0.5 mg/ml で 60% の細胞に染色体異常がみられ、10% の S9 ではさらに低い濃度の 0.125 mg/ml で 62% に異常が観察された。これらの結果は、ディーゼル排ガス中には培養細胞に対して直接染色体異常を誘発する物質と、S9 mix によって代謝活性化されて効果を示す物質とが混在していることを示唆している。

Table 1. Chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells (CHL) treated with diesel exhaust extract in the absence of S9 mix

Dose (mg/ml)	Polyploid (%)		Frequency (%) of aberrant cells*														
			24h treatment							48h treatment							
			ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge	ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge	
0	-	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.125	0.0	2.0	2.0	1.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	1.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.0	-	-
0.25	1.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	4.0	-	-
0.5	0.0	2.0	4.0	7.0	4.0	0.0	0.0	13.0	+	2.0	6.0	4.0	0.0	0.0	9.0	+	+
1.0	1.0	TOX**	3.0	25.0	10.0	0.0	0.0	33.0	+	-----TOX-----							
1.5	0.0	TOX	6.0	31.0	4.0	0.0	0.0	38.0	+	-----TOX-----							
2.2	TOX	TOX	-----TOX-----							-----TOX-----							

\* ctg: chromatid gaps, ctb: chromatid breaks, cte: chromatid exchanges, csg: chromosome gaps, csb: chromosome breaks, cse: chromosome exchanges.  
 \*\* TOX: Almost no survival cells.

Table 2. Chromosomal aberrations in cultured Chinese hamster cells (CHL) treated with diesel exhaust extract in the presence of S9 mix

Dose (mg/ml)	Polyploid (%)		Frequency (%) of aberrant cells*														
			S9-							S9+							
			ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge	ctg	ctb	cte	csb	cse	total	Judge	
0**	-	0.0	-	-	-	-	-	-	-	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0	-	-
0.125**	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	10.0	38.0	50.0	0.0	0.0	62.0	+	+
0.125	4.0	7.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	-	2.0	2.0	10.0	0.0	0.0	12.0	+	+
0.25	2.0	4.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	-	1.0	3.0	11.0	0.0	0.0	13.0	+	+
0.5	6.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	2.0	-	5.0	30.0	50.0	0.0	0.0	60.0	+	+
1.0	3.0	TOX***	3.0	4.0	6.0	0.0	0.0	12.0	+	-----TOX-----							
1.5	7.0	TOX	1.0	14.0	12.0	0.0	0.0	23.0	+	-----TOX-----							
2.2	TOX	TOX	-----TOX-----							-----TOX-----							

\*, \*\*\*: See the footnotes in Table 1.  
 \*\*: The final concentration of S9 in the reaction mixture was 10%.

Table 3. Sister chromatid exchanges (SCEs) in cultured Chinese hamster cells (CHL) treated with diesel exhaust extract in the presence or absence of S9 mix

S9 mix	Time* (h)	Dose (mg/ml)	Number of SCEs per metaphase			
			Mean	Range	S.D.**	Ratio
-	30-0	0	11.7	5-24	4.6	1.0
		0.0125	12.7	3-29	5.9	1.1
		0.025	13.1	4-33	6.7	1.1
		0.05	13.0	5-23	5.1	1.1
		0.1	14.9	7-23	4.2	1.3
		0.2	17.9	11-28	4.7	1.5
		-	6-18	0	13.1	5-28
0.01	13.7			6-22	4.4	1.0
0.025	13.6			5-23	4.6	1.0
0.05	14.2			6-23	4.4	1.1
0.1	14.7			8-24	5.2	1.1
0.25	19.8			9-27	5.4	1.5
0.5	21.2			9-36	7.0	1.6
+	6-18	0	12.8	4-20	3.8	1.0
		0.005	11.7	5-26	3.9	0.9
		0.01	14.1	7-21	3.2	1.1
		0.025	14.7	5-29	5.2	1.0
		0.05	18.1	7-32	4.4	1.4
		0.1	22.0	11-38	6.9	1.7

\* Treatment time - recovery time, \*\* Standard deviation, \*\*\* Ratio to control value.

2. 哺乳動物培養細胞による姉妹染色分体交換 (SCE) 試験

SCE 試験結果を Table 3 に示す。S9 mix を添加しない 30 時間処理では最高濃度の 0.2 mg/ml でのみ SCE の有意な増加がみられたにすぎないが、6 時間

の短時間処理では 0.25~0.5 mg/ml とさらに高い濃度で明らかな SCE の誘発が認められた。これに対し、S9 mix を添加すると逆により低い濃度 (0.05~0.1 mg/ml) でより高い出現頻度を示した。これらの結果は、ディーゼル排出物中には直接 SCE を誘発する物

質が含まれているが、さらに代謝活性化されてより強く SCE を誘発する物質が含まれていることを示している。

### 3. 小核試験

#### 1) マウスによる短期曝露実験

ディーゼル排ガス (全ガス) の1日, 4日, および7日間曝露における小核試験の結果を Table 4 に示す。MNPCE の出現頻度は曝露日数の増加と共にわずかずつであるが, 増加の傾向がみられた。短期曝露実験は予備試験として行ったため対照群を設定しなかったが, 当研究室での ddY マウスにおける対照群の MNPCE の平均値は  $0.20 \pm 0.13$  であり, これと比較すると4日目と7日目の MNPCE の値は明らかに高かった。ただし, 同じ ddY マウスでも, 今回の実験に用いたものは船橋農協より入手したもので, 当研究室で従来用いていたものが静岡協より入手したものである点については評価に際して考慮する必要がある。さらに, 動物の飼育状況の差異, つまり通常の飼育室における場合と, 曝露チェンバー内の清浄空気による飼育との差異についても留意すべきであろう。

全赤血球に対する PCE の比較をみると, いずれも60%前後で正常値を示しており, 骨髄細胞に対する増殖抑制はみられなかった。このことから, PCE にみられる小核がそのまま正染性赤血球 (normochromatic erythrocyte, NCE) に移行し, 徐々に小核を有

する NCE (micronucleated normochromatic erythrocyte, MNNCE) の割合が上昇していくことが推定されるが, 曝露日数とともに MNNCE の値が上昇する傾向はみられなかった。

#### 2) ラットによる長期曝露実験

##### a. 3カ月曝露

3カ月間曝露されたラットの骨髄での結果を Table 4 に示す。対照群の MNPCE の出現頻度は0.10%であるのに対し, 全ガス群では0.19%, 5倍稀釈群では0.15%, 除粒子群では0.08%という値を示し, いずれも有意な差異はみられなかった。しかし, 対照群, 5倍稀釈群, 全ガス群と濃度が高くなるにつれてほんのわずかずつではあるが MNPCE の値が上昇していた。また, 除粒子群が対照群と同じ値を示しているのに対し, 全ガス群は除粒子群の約2倍の値を示しており, 排ガス中の粒子状物質の影響が現われているのかもしれない。

一般に小核試験では単回投与で数日以内に観察が行われており, このような長期間の連続曝露の場合には小核をもつ PCE が NCE へと移行し, 最終的には末血中に蓄積されることが想定される。このようなことから, 3カ月曝露については末梢血液についても小核出現頻度を検討した (Table 4)。しかし, いずれの曝露群においても小核の出現頻度の増加は認められなかった。

Table 4. Micronucleus tests on mice and rats exposed to diesel exhaust

Animal	Sex	No. of animal	Organ	Exposure condition	Exposure period	MNPCE* (%)	MNNCE* (%)	MNE* (%)	PCE* (%)
Mouse (ddY)	Male	6	Bone marrow	Total	1 day	0.32±0.17	0.13±0.10	-	59.4±4.0
				exhaust	4 days	0.42±0.23	0.22±0.08	-	64.1±4.4
					7 days	0.50±0.21	0.18±0.18	-	61.6±6.4
Rat (Fischer)	Female	5	Bone marrow	Control	3 months	0.10±0.03	-	-	-
				Filtered		0.08±0.08	-	-	-
				Diluted		0.15±0.05	-	-	-
			Total		0.19±0.11	-	-	-	
		5	Peri-peripheral blood	Control	3 months	-	-	0.0	1.3±0.2
				Filtered		-	-	0.01±0.02	1.2±0.2
				Diluted		-	-	0.01±0.02	1.4±0.3
			Total		-	-	0.0	1.5±0.3	
		4	Bone marrow	Control	6 months	0.03±0.10	-	-	35.8±2.2
				Filtered		0.25±0.17	-	-	34.3±11.0
				Total		0.25±0.21	-	-	46.0±8.8
		4	Peri-peripheral blood	Control	6 months	-	-	0.0	1.8±0.2
Filtered				-	-	0.0	1.4±0.5		
Total				-	-	0.025±0.05	0.9±0.3		
5	Bone marrow	Control	24 months	0.10±0.12	-	-	41.7±6.6		
		Filtered		0.53±0.7	-	-	34.5±18.1		
		Total		0.20±0.14	-	-	46.9±3.6		

\* MNPCE: Micronucleated polychromatic erythrocytes, MNNCE: Micronucleated normochromatic erythrocytes, MNE: Micronucleated erythrocytes, PCE: Ratio (%) of polychromatic erythrocytes to total erythrocytes.

## b. 6カ月曝露

6カ月間曝露したラット骨髄での MNPCE の出現頻度は対照群では0.03%であるのに対し、全ガス群では0.25%、除粒子群では0.25%といずれもいくぶん高い値を示した (Table 4)。3カ月曝露の結果と比較すると、全ガス群、除粒子群ともに6カ月曝露の方がわずかながら高い傾向を示したが、いずれも統計的には有意な差異ではなかった。なお、末梢血液においても小核の出現頻度に有意な増加が認められなかった。

## c. 24カ月曝露

24カ月曝露群では除粒子群で MNPCE の出現率の平均が0.53%であり、対照群に比較して明らかに高い値が得られた。しかし、個体別にみると1個体のみが1.5%と著しく高く、他の個体ではそれほど高い値は得られなかった (平均値0.20%)。全ガス群でも0.20%と対照群 (0.10%) との間に有意な差異はみられなかった。

以上の結果から、ディーゼル排ガス曝露群では小核の出現頻度がいくぶん上昇する傾向にあったが、明らかに有意な小核の誘発は認められなかった。

## 4. マウス肺胞マクロファージによる染色体異常試験

排出ガスに出来るだけ直接曝露されている組織を対象にするために、全ガスに曝露されたマウスの肺胞マクロファージを用いて染色体を検索した (Table 5)。1日および3日曝露群ではそれぞれ5個体中1個体については分裂細胞が少なく、染色体観察ができなかった。観察細胞数は各群においてかなりばらついているが、対照群よりも曝露群の方がより多くの細胞を観察できる傾向にあった。さらに、個体間での観察細胞数のばらつきも著しく、マクロファージを採取する際の技術的な点に問題があるようである。

染色体異常についてみると、対照群で11.4%の出現率が得られた。これは骨髄細胞に比べて明らかに高い

Table 5. Chromosomal aberrations in alveolar macrophages of mice exposed to diesel exhaust

Exposed period (days)	No. of mice	No. of cells observed	Polyploid (%)	Frequency (%) of aberrant cells*						
				ctg	ctb	cte	csg	csb	cse	Total
0	10	185	0.0	7.0	4.9	0.0	0.5	0.0	0.0	11.4
1	4	40	0.0	7.5	7.5	0.0	2.5	2.5	0.0	20.0
2	5	239	0.0	10.9	8.4	0.0	0.4	0.4	0.0	16.7
3	4	150	0.0	9.3	5.3	0.0	0.7	0.0	0.0	14.7
7	5	310	0.0	10.0	8.7	0.0	1.0	0.0	0.0	17.4
14	5	459	0.4	9.2	5.4	0.0	0.4	0.2	0.2	14.8
21	5	489	0.4	18.0	9.4	0.4	0.8	0.4	0.0	26.2

\* ctg: chromatid gaps, ctb: chromatid breaks, cte: chromatid exchanges, csg: chromosome gaps, csb: chromosome breaks, cse: chromosome exchanges.



Fig. 1. Representative metaphases of alveolar macrophages of mice.

a: 40 chromosomes without any structural aberrations, obtained from a non-exposed control mouse.  
b: 40 chromosomes with a chromatid break (arrow), obtained from a mouse exposed to diesel engine exhaust for 21 days. In this metaphase, many exhaust particles were extensively observed.

値であり、常時外気と接しているという特殊な状況を反映しているのかもしれない (Fig. 1a)。1日曝露群では20.0%と対照群の約2倍の値を示したが、この群では観察細胞数がかなり少ないことから、これに起因する偏りが影響しているであろう。2日および3日曝露群では16.7%、14.7%とこれらの群でも対照群よりいくぶん高い値を示した。7日間曝露群では17.4%と再び増加の傾向を示したが、14日曝露群では14.8%といくぶん出現頻度が低下した。しかし、21日曝露群では26.6%と対照群の約2.5倍の値を示した (Fig. 1b)。

異常の種類別にみると、特定の異常が増加しているということはなく、全般にいずれの異常も増加している傾向にあった。さらに、曝露群では染色体切断や交換型異常がわずかながらみられており、これらは対照群ではみられなかったものである。

今回は長期曝露実験ができなかったが、短期間曝露においても曝露日数の増加につれて染色体異常の出現頻度が上昇する傾向にあり、ディーゼル排出ガスの影響が現われているものと考えられる。

## 考 察

今回供試されたディーゼル・エンジン排出粒子の抽出物は、哺乳動物培養細胞による染色体異常試験および姉妹染色分体交換 (SCE) 試験において直接法および代謝活性化法とともに陽性の結果を示した。SCEを誘発する物質と染色体異常を誘発する物質が同一であるか否かについては現時点では言及できないが、ディーゼル排出物質の中には、直接染色体異常や SCEを誘発する物質が含まれており、さらに代謝活性化されて染色体異常および SCE をより効果的に誘発するものが含まれていることが示された。

ディーゼル・エンジンの排出粒子の抽出物についての染色体異常試験の報告はこれまでほとんどみられていない。しかし、SCE についてはいくつかの報告がなされている。S9 mix を添加しない時は SCE の頻度がわずかしか上昇しないが<sup>9,10</sup>、S9 mix を添加すると明らかな SCE の増加が認められている<sup>10</sup>。これらは本研究の結果に良く一致する。

培養細胞による試験では陽性の結果が得られたのに対し、動物個体による小核試験では明らかな陽性結果は得られなかった。マウスの予備的な短期曝露では小核誘発の兆しがみられたが、ラットによる長期曝露では小核出現頻度の有意な増加は認められなかった。

ディーゼル排ガスに7週間、1カ月あるいは3.5、8.5カ月曝露されたマウスあるいはチャイニーズ・ハムスターでの小核試験ではいずれも陰性の結果が報告

されており<sup>11,12</sup>、今回の我々の結果と一致する。ただし、チャイニーズ・ハムスターへの6カ月曝露でわずかながら小核の出現頻度が上昇したという報告<sup>13</sup>があるが、染色体異常の誘発はみられておらず、その有意性には疑問が残る。

ディーゼル排ガス曝露では上述のように陰性の結果が得られる傾向にあるのに対し、排ガス粒子や粒子抽出物を直接動物に投与した場合には、一般に陽性の結果が報告されており<sup>12,14,15</sup>、粒子状物質の中には動物個体に対して染色体異常や SCE を誘発する物質が含まれていることには間違いのないようである。

本研究での肺胞マクロファージを用いる染色体異常試験においても短期間曝露ではあるが染色体異常が増加する傾向が得られており、ディーゼル排ガス曝露によって動物個体レベルで染色体異常が誘発される可能性を支持している。小核試験において陰性の結果となった理由の一つとして、肺より吸収された排ガス中の物質あるいはその代謝産物のうち、染色体異常誘発物質が十分に骨髄にまで到達し得なかったことに起因する可能性が考えられる。今後、特にガス状曝露実験などでは小核試験に骨髄以外の臓器を用いて検索する方法を組入れることを考慮する必要がある。

## 謝 辞

ディーゼル排出粒子の抽出物を供与下さいました国立公衆衛生院、松下秀鶴部長、およびマウス曝露実験に協力して頂くとともに、小核試験のためにラット骨髄を提供して下さいました財団法人結核予防会結核研究所、岩井和郎所長、ならびに関係職員の方々に深謝申し上げます。

本研究は環境庁大気保全局、ディーゼル排出ガス影響調査 (健康影響調査) 委託研究費の援助を受けた。

## 文 献

- 1) L. D. Claxton: *Environ. Mutagen.*, **5**, 609 (1983)
- 2) 松下秀鶴, 久松由東: 昭和55年度環境庁委託業務結果報告書, ディーゼル排出ガス影響調査, 65 (1981)
- 3) M. Ishidate, Jr. and S. Odashima: *Mutat. Res.*, **48**, 337 (1977)
- 4) 祖父尼俊雄, 松岡厚子: 環境変異原研究, **5**, 4 (1984)
- 5) S. Sakanishi and S. Takayama: *Proc. Japan Acad.*, **53**, 143 (1977)
- 6) 岩井和郎: 昭和55年度環境庁委託業務結果報告書, 43 (1981)
- 7) M. Hayashi et al.: *Mutat. Res.*, **120**, 241 (1983)
- 8) M. K. Conner et al.: *Chromosoma*, **74**, 51 (1979)
- 9) A. L. Brooks: *Annu. Rep. Inhalation Toxicol.*

- Res. Inst., 248 (1979)
- 10) A. D. Mitchell *et al.*: *Environ. Int.*, **5**, 393 (1981)
- 11) M. A. Pereira *et al.*: *Environ. Int.*, **5**, 435 (1981)
- 12) M. A. Pereira *et al.*: *Toxicological Effects of Emission from Diesel Engines*, No. 10, p. 265 (1982), Elsevier Science Publishing Co.
- 13) M. A. Pereira *et al.*: *Environ. Int.*, **5**, 439 (1981)
- 14) M. A. Pereira *et al.*: *Environ. Mutagen.*, **4**, 215 (1982)
- 15) R. R. Guerrero and D. E. Rounds: Department of Commerce, National Technical Information Service PB-81 173817, 951 (1980)

## GITC 試薬を用いたピンドロールおよびプロプラノロールの光学異性体の分割定量法

榎谷真美・長谷川隆一・小室徹雄・加納晴三郎・伊阪 博

### Quantitative Determination of Optical Isomers of Pindolol and Propranolol Using a GITC Reagent

Mami KUSHIYA, Ryuichi HASEGAWA, Tetsuo KOMURO, Seizaburo KANO and Hiroshi ISAKA

The diastereometric thiourea derivatives of pindolol or propranolol with 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl isothiocyanate (GITC) were prepared to determine the S(-)- and R(+)-isomers quantitatively by the reverse phase HPLC. The S(-)- and R(+)-isomer-GITC were eluted separately on HPLC and the calibration curve for the each isomer was completely linear. Each isomer-GITC isolated from preparative HPLC was analysed by EI/MS, FAB/MS,  $^1$ H-NMR and elementary analysis, which data supported the presumed structures of the diastereometric derivatives.

The recoveries of racemic pindolol or propranolol added to human plasma were approximately 70% for both pindolol isomers and more than 95% for both propranolol isomers. The limited detectable concentration in the plasma by this method is 5 ng/ml for pindolol and 6 ng/ml for propranolol.

This method could be useful to investigate the behavior of S(-)- and R(+)-isomers of chiral  $\beta$ -blockers biopharmaceutically and clinically.

(Received May 31, 1986)

本態性高血圧や不整脈治療に広く用いられている $\beta$ -ブロッカーは、不斉中心を有するため、R(+)-体とS(-)-体の2つの異性体が存在する。その薬理作用はS(-)-体がR(+)-体より数倍から数十倍強いとされているが<sup>1,2)</sup>、経口投与されたプロプラノロールの生物学的利用率は犬ではR(+)-体が<sup>3-5)</sup>、ヒトではS(-)-体が高く<sup>6,7)</sup>、また共にS(-)-体の方がグロクロン酸抱合を受けやすい等<sup>3-6)</sup>、両者は異なった体内挙動を示す。

しかし、治療薬としての $\beta$ -ブロッカーはラセミ体として市販、投与されているため、それぞれの異性体の体内挙動を把握する必要があり、そのためには高感度で簡便な分割定量法が必要であった。

プロプラノロールの分別定量に関してはすでに多くの試みがなされている。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法は直接的なイオンペアー HPLC<sup>8)</sup>や、光

学活性カラムを用いる方法<sup>9)</sup>が報告されている。また、N-トリフルオロアセチル-S(-)-プロピルクロリド<sup>4,6,10)</sup>、S(-)-1-フェニルエチルイソチオシアネート<sup>11)</sup>、tert-ブトキシカルボニル-L-アラニンアンヒドリド<sup>12)</sup>およびtert-ブトキシカルボニル-L-ロイシンアンヒドリド<sup>12)</sup>などの誘導体化試薬を用いてジアステレオマーとして逆相 HPLC で分割定量する報告がある。しかし、操作の複雑さ、試薬の問題等で良好な結果は得られていない。

一方、二村ら<sup>13)</sup>は最近アミノ酸およびカテコールアミンについて、2,3,4,6-tetra-O-アセチル- $\beta$ -D-グルコピラノシルイソチオシアネート (GITC) および 2,3,4-tri-O-アセチル- $\alpha$ -D-アラビノピラノシルイソチオシアネート (AITC) 試薬を用いて誘導体とした後、逆相 HPLC で分割している。

本実験では $\beta$ -ブロッカーとして、ピンドロールと

プロプラノロールを選び、前記の GITC 試薬を用いてジアステレオマー誘導体とした後、逆相 HPLC を行い、分割定量を行った。また、ヒト血漿からの添加回収実験によって血中濃度の測定への応用を試みた。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 標品および試薬

ピンドロールのラセミ体は日本・サンド(株)より、S(-)およびR(+ )体は、サンド(株)(パーゼル、スイス)より分与された。またプロプラノロールのラセミ体はシグマ(株)(St Louis, MO., USA)より購入し、S(-)およびR(+ )体は日本アイ・シー・アイ・ファルマ(株)より分与された。GITC 試薬は二村らの方法<sup>14)</sup>により、 $\alpha$ -アセトプロモグルコースから合成した。1-ニトロナフタレン(内部標準物質)は東京化成工業(株)より購入した。使用した溶媒はすべて HPLC 用を用いた。

#### 2. 分析装置

液体クロマトグラフは Waters Assoc. Model 440 に日本分光(株) model UVIDEC 100 II 紫外検出器を連結して用い、カラムは東洋曹達 TSK-LS 410AK (ODS-SIL) (4×300 mm)、分取用には TSK-LS 410 AKS (7.5×300 mm) を用いた。移動相はアセトニトリル:10mM リン酸緩衝液 (pH 3.4) (1:1)、流速は 0.9 ml/min (ピンドロール) および 1.2 ml/min (プロプラノロール)、注入量は 40  $\mu$ l で行った。検出波長は 258 nm (ピンドロール)、256 nm (プロプラノロール) で行った。

#### 3. 誘導体の解析

ピンドロールおよびプロプラノロールの S(-) GITC および R(+ ) GITC のピーク部分を分取用 ODS カラムを用いて集め、それぞれ約 60 mg の純品を単離調製し、質量分析 (MASS) および元素分析にかけた。

#### 4. ヒト血漿中からの添加回収

ピンドロールの場合は血漿 2 ml にラセミ体 20~110 ng を含む 0.1 N 塩酸 100  $\mu$ l を添加、4 N 水酸化ナトリウム 0.2 ml、硫酸ナトリウム 0.6 g およびエーテル 7 ml を加え、20分間振とう、遠心 (3000 rpm, 15分間) 後エーテル層 6 ml を取り、0.1 N 塩酸 2 ml を加え 15分間振とうした。遠心後水層を凍結してエーテル層を捨て、解凍後 4 N 水酸化ナトリウム 0.2 ml、硫酸ナトリウム 0.6 g およびエーテル 7 ml を加え、20分間振とうした。遠心後、エーテル層 6 ml を取り、窒素気流下蒸発乾固させ、GITC 誘導化反応に供した。

プロプラノロールの場合は血漿 2 ml にラセミ体 25~200 ng を含む 0.1 N 塩酸 100  $\mu$ l を添加、1 N 塩酸 0.3 ml およびイソアミルアルコールの 1.5% *n*-ヘキサン溶液 6 ml を加え、15分間振とう、遠心後有機層を捨てる操作を 3 回繰り返した。残った水層に 1 N 水酸化カリウム 0.35 ml および酢酸エチル 0.5 ml を加えて 20分間振とうした。遠心後有機層を取り窒素気流下蒸発乾固し、GITC 誘導化反応に供した。

GITC 誘導体化は 0.2% GITC 50  $\mu$ l を添加し、室温で 20分間反応させた。なお、ピンドロール誘導体化の場合は反応終了後、0.1% 抱水ヒドラジンを 10  $\mu$ l 添加した。

### 実験結果

#### 1. GITC 試薬による $\beta$ -ブロッカーの誘導体化条件の検討

ラセミ体ピンドロールを用いて誘導体化の反応条件を検討した。ラセミ体ピンドロール 20~250 ng を、内部標準として 1-ニトロナフタレン 64 ng を含む 0.2% GITC 50  $\mu$ l と反応させ、生成する誘導体をアセトニトリル:10mM リン酸緩衝液 (pH 3.4) (1:1, v/v) を移動相とする HPLC により測定した。誘導体の生成量は、反応溶媒の種類 (ジメチルホルムアミド (DMF), アセトニトリル, ジオキサンおよびジメチルスルフォキシド (DMSO)) により異なった。アセトニトリルおよびジオキサンは DMF に比べ反応性が低く、また DMSO は反応性は DMF と同程度であったが、溶媒中の不純物のピークが多いため定量上不適であった。反応時間により誘導体の生成量は変動したが、反応は Fig. 1 に示すように 10~20 分でほぼ平衡に達した。

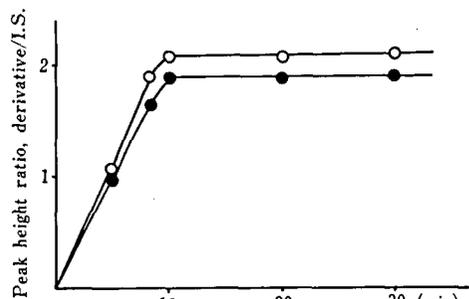


Fig. 1. Time course of thiourea derivative formed from pindolol with GITC. The reaction was carried out in DMF with 0.2% GITC at room temperature. Open circle indicates S(-)-isomer-GITC and closed circle indicates R(+)-isomer-GITC.

一方、クロマトグラム上では未反応の誘導体化試薬 GITC 自体のピークが定量の妨害となるため、抱水ヒドラジンの 0.1% (v/v) DMF 溶液を添加して処理した。しかし、抱水ヒドラジン存在下では R(+)-GITC は安定であったが、S(-)-GITC は 2 時間で約 9% 減少したので、処理後速やかに HPLC により分析した。

ラセミ体プロプラノロールの場合の誘導体化反応はピンドロールと同様であったが、未反応 GITC のピークは測定障害にならなかったため、抱水ヒドラジン処理は施さなかった。

2. GITC 誘導体の HPLC による分析条件

Table 1 にピンドロールの場合の移動相の組成、pH 変化に伴う k', α および Rs を示した。65% メタノール移動相では良好な k', α および Rs が得られたが、GITC と抱水ヒドラジンの反応生成物のピークとの分離が悪くなった。一方、50% アセトニトリルの場合は両者の点で良好な結果を得た。今回の実験条件下では移動相の pH を変化させても k' はほとんど変化しなかった。プロプラノロールの場合は移動相としてアセトニトリル：リン酸緩衝液 pH 3.4 (6 : 4, v/v) を用いることにより、他の溶媒系より良好な結果を得ることができた。

上記の最適条件下で生成した GITC 誘導体のクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

3. 誘導体の構造確認

高分解能 EI/MS および FAB/MS により求めたピンドロールの誘導体の分子組成式は C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>O<sub>11</sub>N<sub>3</sub>S であり推定式と一致した。またその構造式は、EI/MS で脱水ピークが現れること、および <sup>1</sup>H-NMR でイソプロピルのメチン基プロトンの化学シフトがピンド

ロールのそれよりも低磁場にシフトすることから、Chart 1 に示すようにイソチオンアネート基がピンドロールのイミノ基と反応した構造であると決定した。

プロプラノロールに関してはその元素分析値は下記

	H	C	N	S
Calcd.	6.22%	57.40%	4.32%	4.93%
Obsd. S(-)体	6.21	57.51	4.25	4.83
R(+ )体	6.20	57.27	4.25	4.86

の様に理論値と良く一致した。また NMR スペクトルの結果から、芳香環のプロトン以外はほぼピンドロールの化学シフトと同じ値を示したことからプロプラノロールもピンドロールと同様に Chart 1 に示したようにイミノ基と結合した構造であると決定した。

4. GITC による反応収率と定量性の検討

上記分析条件下での反応収率を、分取した誘導体を用いて検討した。得られた結果を Table 2 に示した。収率は光学活性体、ラセミ体のいずれも約 70% にとどまったが、再現性は変動係数 4% (n=6) と良好であった。

次に定量性について検討した。その結果を Fig. 3 に示した。いずれも相関係数 0.996 以上であった。検出限界 (S/N=2) はピンドロール約 4 ng, プロプラノロール約 5 ng であった。

5. ヒト血漿中からの添加回収

ヒト血漿 2 ml にラセミ体のピンドロールあるいはプロプラノロールを添加した試料中からのそれぞれの薬物の回収率を求めた。得られた結果を Table 3 に示した。ピンドロールの場合は S(-)体, R(+ )体ともに 75~80% であり、プロプラノロールの場合はいず

Table 1. Separation of diastereometric thiourea derivatives formed from pindolol with GITC

Mobile phase	R.T.(min)		k'		α	Rs	
	S(-)	R(+)	S(-)	R(+)			
MeOH(%)	60	16.38	21.88	6.12	8.51	1.39	3.60
	65	9.32	11.50	3.05	4.00	1.31	2.91
	70	6.10	7.00	1.65	2.04	1.24	1.18
CH <sub>3</sub> CN(%)	45	26.08	32.28	10.34	13.03	1.26	3.73
	50	13.54	15.92	4.89	5.92	1.21	2.22
	55	8.48	9.58	2.69	3.17	1.18	1.57
CH <sub>3</sub> CN (50%)	pH 2.1	13.80	16.20	5.00	6.04	1.21	2.22
	3.4	13.54	15.92	4.89	5.92	1.21	2.21
	4.4	13.30	15.50	4.78	5.74	1.20	2.21
	5.5	13.56	15.86	4.90	5.90	1.20	2.21



Table 2. Reaction yield of the diastereometric thiourea derivatives from pindolol or propranolol with GITC

Pindolol			Propranolol		
Material	Yield(%)		Material	Yield(%)	
S(-)-pindolol	S(-)-der	70.4	S(-)-propranolol	S(-)-der	71.5
(±)-pindolol	S(-)-der	68.3	(±)-propranolol	S(-)-der	72.5
	R(+)-der	67.2		R(+)-der	72.7
R(+)-pindolol	R(+)-der	71.7	R(+)-propranolol	R(+)-der	71.4

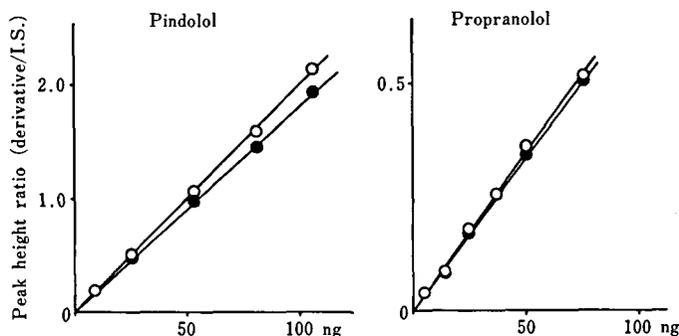


Fig. 3. Calibration curves of S(-)- and R(+)-isomers of pindolol or propranolol. Open circle indicates S(-)-derivative and closed circle indicates R(+)-derivative.

Table 3. Recovery of pindolol and propranolol from human plasma

Pindolol			Propranolol		
Addition(ng)	Recovery(%)		Addition(ng)	Recovery(%)	
	S(-)	R(+)		S(-)	R(+)
108.8	77.5 ± 5.0	75.8 ± 6.2	203.6	99.7 ± 5.7	93.7 ± 5.5
65.3	75.3 ± 6.1	78.9 ± 4.6	152.7	101.0 ± 8.9	99.7 ± 7.5
43.5	74.8 ± 5.6	75.8 ± 7.7	101.8	104.4 ± 6.4	103.4 ± 3.5
32.6	75.2 ± 7.6	76.0 ± 5.5	76.3	102.6 ± 1.5	98.2 ± 8.1
21.8	75.5 ± 5.7	79.4 ± 6.9	58.0	104.5 ± 4.9	100.0 ± 6.7
			25.5	105.4 ± 7.5	101.0 ± 6.6

Each value indicates mean ± standard deviation from triple experiments.

れも90%以上と良好な結果を得た。

本実験条件下での検出限界はピンドロールの場合血漿 1 ml 当たり約 5 ng, またプロプラノロールの場合血漿 1 ml 当たり約 6 ng であった。

### 考 察

β-ブロッカーの HPLC による分割定量法に GITC を適用した方法は初めて著者らが日本薬学会第 103 年会 (東京1983年4月) において報告したが, 同年に

Sedman と Gal<sup>15)</sup> も同様の報告をした。しかし, 彼らの実験は分割のみを目的としたものであるのに対して, 著者らは分割定量することを目的として条件を検討し, さらにヒト血漿中の分割定量への適用をも可能とした。

ヒトに投与した時の最高血漿濃度はピンドロール (10~15 mg, p.o.) で 20~100 ng/ml<sup>16,17)</sup>, プロプラノロール (80 mg, p.o.) で 30~200 ng/ml<sup>18,19)</sup> であり, 本法の検出限界以上の濃度であることから本法は十分

適用できると考える。さらに GITC は現在市販されていること、化学的に安定であり、本法は実験操作が簡便であることから、他の方法に比較して優れた分割定量法であると考ええる。

### 謝 辞

ビンドロール GITC 誘導体の MASS スペクトルの測定に際し御協力を頂いた三共株式会社分析代謝研究所に深謝致します。

### 文 献

- 1) L. T. Potter: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **155**, 91 (1967)
- 2) A. M. Barret, V. A. Cullum: *Brit. J. Pharmacol.*, **34**, 43 (1968)
- 3) T. Walle, U. K. Walle: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **23**, 453 (1979)
- 4) B. Silber, S. Riegelman: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **215**, 643 (1980)
- 5) S. A. Bai *et al.*: *Fed. Pro.*, **41**, 1336 (1982)
- 6) B. Silber *et al.*: *J. Pharm. Sci.*, **71**, 699 (1982)
- 7) C. von Bahr *et al.*: *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, **14**, 79 (1982)
- 8) C. Petterson: *J. Chromatogr.*, **204**, 179 (1981)
- 9) W. H. Pirkle: *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3964 (1981)
- 10) J. Hermansson, C. von Bahr: *J. Chromatogr.*, **221**, 109 (1980)
- 11) J. A. Thompson *et al.*: *J. Chromatogr.*, **238**, 470 (1982)
- 12) J. Hermansson: *J. Chromatogr.*, **227**, 113 (1982)
- 13) N. Nimura *et al.*: *J. Chromatogr.*, **213**, 327 (1981)
- 14) N. Nimura *et al.*: *J. Chromatogr.*, **202**, 375 (1980)
- 15) A. J. Sedman, J. Gall: *J. Chromatogr.*, **278**, 199 (1983)
- 16) H. J. Schwarz: *Am. Heart J.*, **104**, 357 (1982)
- 17) B. Diquet: *J. Chromatogr.*, **311**, 430 (1984)
- 18) T. Walle *et al.*: *Clin. Pharmacol. Ther.*, **27**, 22 (1980)
- 19) J. Meier: *Am. Heart J.*, **104**, 364 (1982)

Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate 公定分析法において  
誤認されやすい二物質について

中村晃忠・小嶋茂雄・鹿庭正昭

The Structures of Two Chemicals Sometimes Misunderstood as Tris-  
(2,3-dibromopropyl) phosphate in the Official Analytical Method

Akitada NAKAMURA, Shigeo KOJIMA and Masa-aki KANIWA

Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TDBPP), a flame retardant, was banned by Ministry of Health and Welfare of Japan in 1978. The official analytical method for the regulation employs gas chromatography with flame photometric detection (FPD-GC) and OV-1 as a liquid phase.

The present paper is concerned with the identification of two sulfur-containing compounds found in commercial polyester fabrics by gas chromatography-mass spectrometry. These compounds, 2,5-bis-(benzoxazol-2-yl)thiophene (FBA-185) and dilauryl disulfide, are sometimes misunderstood as TDBPP in the official method because of closeness of their retention times and the sensitive characteristics to FPD.

(Received May 31, 1986)

防火剤の一種である tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TDBPP) は発癌性を理由に使用が禁止されたが<sup>1)</sup>、その規制のための公定分析法(著者らによる)では無極性の OV-1 を液相とする炎光光度型検出器付ガスクロマトグラフ (FPD-GC) を使用している。ガスクロマトグラフィーによって化合物を同定するには、通常、二種類の液相(無極性、極性)で保持時間が一致することが求められる。しかし、TDBPP は難揮発性で、しかもバックドカラムでは高温で分解するので適当な極性液相が見付からなかった<sup>2)</sup>。そこで、リン(P)フィルターによる特異性と OV-1 での保持時間の一致の二つで、定性条件としては十分であろうとしたものであった。

ところが、昭和58年暮れに、監視業務を行っている衛生研究所から“2 ppm の TDBPP がポリエステル製品から検出された”という報告を受けた。TDBPP を防火剤として使用するときの濃度は製品中に数%というのが普通であって、2 ppm では全く意味をなさない。また、当該製品の製造者からも TDBPP は使用していないという情報を得たので、なにか別の化合物を誤認した可能性が考えられた。

種々、検討した結果、やはりそのピークは TDBPP ではなく蛍光増白剤の一種の FBA-185 であることが分った。また、収集したポリエステル地について他に

も類似の例がないかを検討したところ、さらに、もう一つの TDBPP 擬似物質として dilauryl disulfide が見つかった。

以下に、それらの擬似物質同定の経過について報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

ポリエステル・レース地 A : アルダント・カーテン(白色), 近藤忠商事。なお、本品は某衛生研究所(地方衛研)から違反の疑いで送付されてきたものである。

ポリエステル・レース地 B : SDF-301 レースカーテン(白色), 東レ

### 2. 標準物質

tris(2,3-dibromopropyl)phosphate (TDBPP) : 東京化成製。

2,5-bis(benzoxazol-2-yl)thiophene (FAB-185) : CIBA-GEIGY 社の蛍光増白剤 Uvitex EBF を水で希釈し、ジクロロメタンで抽出。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去。残渣をシリカゲルカラムにロードし、ジクロロメタン・エタノール(100:5)で溶離。青色蛍光バンドをあつめ、溶媒を留去し、残渣をジクロロメタン・エタノールから再結晶した。黄色鱗片状結晶。mp 219~221°C。

dilauryl disulfide (DLDS): 2.02 g (0.01 mole) の lauryl mercaptan を 10 ml の DMSO に溶かし, sulfur trioxide pyridine complex 2.39 g (0.015 mole) を加え, 沸騰水浴上で時々ふりまぜながら 3 時間加熱. 反応液を氷水にあげ, エーテルで抽出した. 抽出液をよく水洗し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を除去. 残渣 (オイル) をヘキサンに溶かし, シリカゲルカラム (10 g) にロードし, ヘキサンで溶離. ヘキサンを除去. 残渣を減圧で乾燥. ワックス様の無色の結晶 1.8 g (90%) を得た. mp 32~33.5°C.

シリカゲルカラム: kieselgel 60, 10 g をヘキサンを用いて内径 1 cm のカラムに詰めた.

### 3. 布地からの抽出および精製

細切した試料 10 g を 2 個の 400 ml のナスフラスコにとり, それぞれにメタノール 200 ml を加え, 1 時間還流. 熱時, グラスフィルターでろ過し, ろ液を合わせ, エバポレーターで除去した. 残渣をメタノール 10 ml に溶かし陰イオン交換カラムに注ぎこみ, メタノール 200 ml で溶離し, 溶離液をエバポレーターで除去した. この残渣を 10 ml のジクロロメタン・エタノール (100:5) 混液に溶かし, シリカゲルカラムに注ぎこみ, 同混液 50 ml で溶離した. 溶離液をエバポレーターで除去し, 残渣を 1 ml のアセトンに溶かしてガスクロマトグラフィー (GC) およびガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) 用試料溶液とし, その 1  $\mu$ l を注入した.

陰イオン交換カラム: 内径 1 cm のカラムに Amberlite CG-400-I (100~200 mesh) Cl 型 1 g を水に懸濁して詰め, よく水洗した後, 1N 塩酸 50 ml で洗い, 次に水で溶離液が中性になるまで洗った. さらに, 50%メタノールおよびメタノール各 50 ml ずつで洗ったものを用いた.

シリカゲルカラム: Kieselgel 60, 2 g をジクロロメタン・エタノール (100:5) 混液を用いて内径 1 cm のカラムに詰めた.

### 4. GC および GC-MS 条件

#### 4.1 GC 条件

15% OV-1 on Gas Chrom Q (100~120 mesh), 50 cm l., 0.8 mm i.d., column oven temp.: 220°C; inj. temp.: 240°C; キャリアガス: 窒素 (20 ml/min); 検出器: FPD (P および硫黄 (S) フィルター), 温度: 240°C

4.2 GC-MS 条件: 日本電子 DX-300 型質量分析計; GC カラム: Hewlett Packard 製シリーズ 530  $\mu$  Methyl Silicone メガポアカラム (5 m); キャリアガス: ヘリウム (40 ml/min); column oven temp.:

245°C (試料 A), 180~245°C (8°C/min) (試料 B); inj. temp.: 260°C; イオン化電圧: 70 eV

## 結 果

### 1. 試料 A について

試料 A の P-フィルターによるガスクロマトグラムには TDBPP と保持時間 ( $t_R$ ) の一致するピークが見られた (Fig. 1-(b)). しかし, S-フィルターに交換して測定したところピーク高さは約 160 倍になったので (Fig. 1-(c)), このピークはリン含有物質というよりも硫黄を含む化合物ではないかと思われた.

GC-MS 測定結果を Fig. 2 に示した. 左側は TDBPP を注入したときのトータルイオンクロマトグ

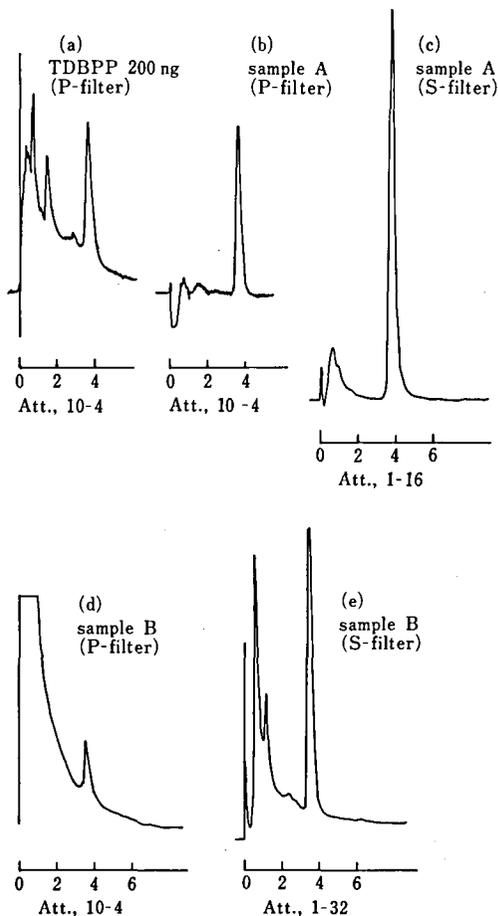


Fig. 1. Gas chromatograms by flame photometric detection

Condition: 15% OV-1 on Gas Chrom Q (100~120 mesh), 50 cm l., 0.8 mm i.d., N<sub>2</sub> 20 ml/min, Column temp., 220°C.

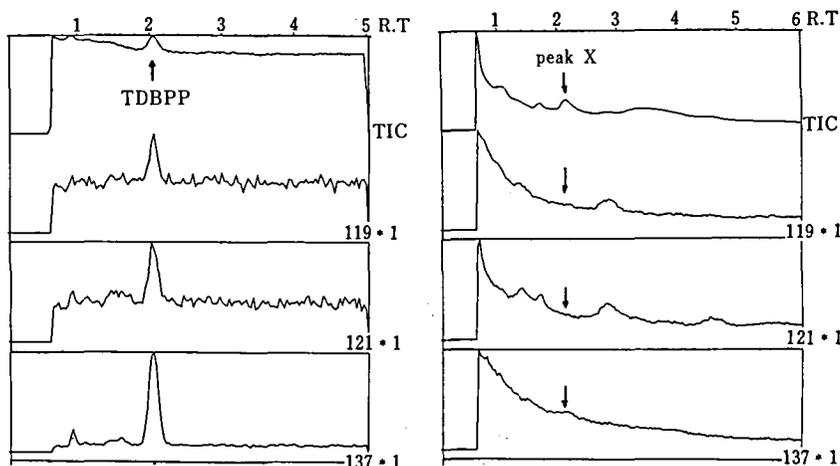


Fig. 2. Mass chromatograms of TDBPP and sample A

Left: TDBPP (20 ng); Right: sample A (1  $\mu$ l). Gas chromatographic condition: 530  $\mu$  Methyl Silicone Megabore column (Hewlett-Packard) 5 m; carrier gas: He 40 ml/min; column oven temp.: 245°C.

ラム (TIC) とマス chromatogram (MC) であり、右側は試料Aの試料液を注入したときのものである。なお、地方衛研からは“公定法によれば試料Aは2 ppmのTDBPPを含有している”と報告されていたので、TDBPP 20 ngに相当する試料液量 (1  $\mu$ l) を注入して、標準のTDBPP 20 ngのクロマトグラムと対比させた。TICでは、両者とも  $t_R$  約2分にピークが見られた。ところが、そのピークのマスペクトル (MS) は Fig. 3 に示したように全く異なっていた。TDBPP (Fig. 3-(a)) では  $m/z$  119, 121, 217, 219, 257, 259の臭素を含むフラグメントイオンやリン酸エステルに特異的な  $m/z$  99, 137のイオンのピークが見られるのに対し、試料AのMSは非常に単純で (Fig. 3-(b)),

$m/z$  318に強い分子イオンピーク (P) を示す他には強いイオンピークはない。なお、後者において  $m/z$  320 (P+2) が7.5%であることも当該ピークが硫黄を含む化合物であろうとした先の推定を裏付けるものである。

著者らは、従来から家庭用品に使用される化学物質のMSを測定してきた経験から、蛍光増白剤が単純なMSを示すことを記憶していたので、分子量318の蛍光増白剤を調べたところ、FBA-185が該当し、しかも、それはチオフェン骨格をもつものであることが判明した。そこで、メーカーから取り寄せた標準品と比較した結果、 $t_R$  およびMSともに試料Aのそれと一致したので、試料Aの擬似TDBPPピークはFBA-185によることが明らかとなった。なお、繊維中にFBA-185の量に比べてごく少量のTDBPPが共存している可能性もあるので、 $m/z$  119, 121, 137によるMCを測定したところ、Fig. 2のように試料Aでは全くピークを示さなかった。したがって、その可能性は極めて薄いことが分った。

## 2. 試料Bについて

以上のように、TDBPPと極めて似た挙動を示す物質がポリエステル製品から見つかったので、S-フィルター付FPD-GCで手持ちのポリエステル製品をスクリーニングしたところ、擬似TDBPPピークを示す製品として新たに試料Bが見いだされた。

試料BのFPD-GCでの擬似TDBPPピークもP-フィルターの場合よりS-フィルターのほうが格段高いピークを示したので、やはり含硫黄化合物と考えられた (Fig. 1-(d), (e)). そのMSは Fig. 3-(c) のようであって、TDBPPおよびFBA-185とも全く異なっ

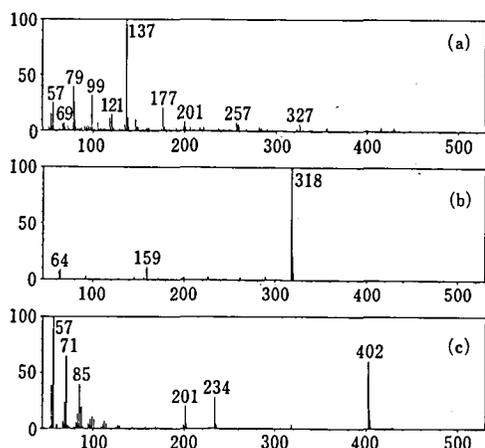


Fig. 3. Mass spectra of TDBPP (a) and TDBPP-like peaks of sample A (b) (FBA-185) and sample B (c) (dilauryl disulfide)

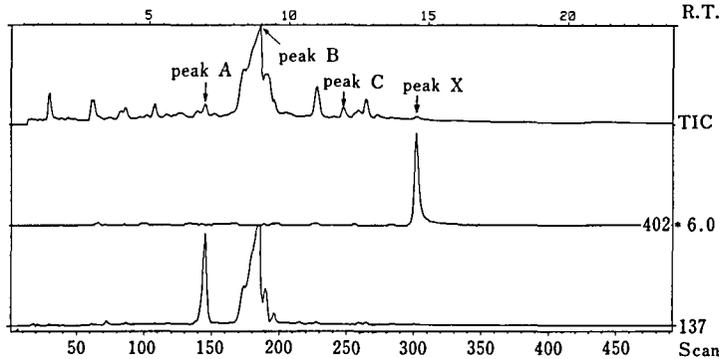


Fig. 4. Mass chromatograms of sample B

Gas chromatographic condition: 530 $\mu$  Methyl Silicone Megabore column (Hewlett-Packard) 5 m; carrier gas: He 40 ml/min; column oven temp.: 180~245°C (8°/min). peak A: a component of commercial tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate (TDCPP); peak B: TDCPP; peak C: 1,2-bis(5-methylbenzoxazol-2-yl)ethylene (FBA-135); peak X: dilauryl disulfide

ていた。分子イオン (P) は  $m/z$  402 であり、 $P+2$  ( $m/z$  404) が 13.3% と強い (硫黄の寄与)。分子イオン ( $m/z$  402) の 1/2 の質量の  $m/z$  201, それより 33 大きい  $m/z$  234 (201+SH) の存在からジスルフィドではないかと考えた<sup>3)</sup>。また、 $m/z$  113 以下の一連のイオンはアルキル鎖の存在を示している。ジスルフィドとして分子量 402 に相当するのは dilauryl disulfide である。別途合成した標準物質の  $t_R$  と MS は試料 B の擬似 TDBPP ピークのそれと良く一致した。

試料 A の場合と同様に、 $m/z$  137 による MC (Fig. 4) でピークを示さないことから、試料 B も微量の TDBPP の混在のないことが明らかである。

なお、Fig. 4 には同定された幾つかのピークの化合物名を一緒に記してある。同定の詳細は別に報告する予定である。

## 考 察

P-フィルターによる FPD-GC において、硫黄化合物がプラスの妨害を与えることは常識でさえある。しかし、“合成ポリマー製品から一連の前処理を経て、なお TDBPP のように分子量の大きいものと GC で  $t_R$  の一致するものはまさかあるまい”、と考えたのが誤りであった。FBA-185 と dilauryl disulfide は硫黄元素を持ち、クロマト上でも TDBPP とよく似た挙動を示した (dilauryl disulfide はシリカゲルカラムからヘキサンで溶離されるので、他の二つとは分離できる)。OV-1 による GC での TDBPP の  $t_R$  を 1 としたときの相対保持時間は、FBA-185 (1.01), dilauryl disulfide (1.04) であった。

著者らは、既に述べたように、擬似 TDBPP 物質を見付けるために手許にあるポリエステル製品 10 数点の分析を行ったが、その際、蛍光増白剤の分析も同時に行った。また、辻らは広く繊維製品中の蛍光増白剤の分析を行っている<sup>4)</sup>。これらの限定された調査の範囲では、ポリエステル、アクリル、ナイロン等の合成繊維のレース地に使用されている蛍光増白剤は benzoxazol タイプの FBA-135 と naphthalimide タイプの FBA-162 が多いようであり、FBA-185 の使用頻度は比較的少ないように思える。

dilauryl disulfide の起源については、はっきりしたことは分らない。著者らの得た情報では、lauryl mercaptan がポリ塩化ビニルの重合調整剤として使用されていることが分っている<sup>5)</sup>。あるいは、ポリエステルにおいても類似の用途があって、その酸化体が検出されたのかもしれない。

どんな化合物が使われているかを完全に調査することは不可能であるので、もし、監視業務での誤認を無くそうとするなら、公定分析法に GC-MS を導入せねばなるまい。しかし、それは無理である。したがって、この場合には二つの疑似物質と TDBPP とを分離する方法や三者を区別する確認試験を設定するか、全く異なった原理の TDBPP 定量法を考えねばならない。

## 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第二条第二項の物質を定める政令の一部を改正する政令および有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律施行規則の一部を改正する省令の制

- 定について（昭和53年9月27日，環企第145号）  
2) A. Nakamura *et al.*: *J. Chromatogr.*, **196**, 133 (1980)  
3) R. M. Silverstein and G. C. Bassler: 荒木 峻，益子洋一郎：有機化合物のスペクトルによる同定

- 法，p. 17 (1965)，東京化学同人  
4) 辻 清美，内藤昭治，第19回全国衛生化学技術協議会講演集，p. 108，1982  
5) 花王石鹼 (lauryl mercaptan のメーカー) からの情報

マイコトキシンの化学分析に関する研究（第15報）  
輸入穀類、乳幼児食品および加工食品（菓子類）中の  
Nivalenol と Deoxynivalenol の分析

五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生

Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XV)  
Analysis of Nivalenol and Deoxynivalenol in Imported Cereals,  
Baby Foods and Processed Foods (Confectioneries)

Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SARRO

An analytical method for nivalenol and deoxynivalenol proposed by a working group organized for the "Studies of Toxicological Properties of Trichothecenes produced by *Fusarium* Species" was thoroughly studied and partially modified. This improved method was found to be applicable for any kind of food. Deoxynivalenol was detected in 21 out of 46 samples of cereals imported in 1983, but no deoxynivalenol or nivalenol was detected in 27 baby foods and 7 cereal products.

(Received May 31, 1986)

麦類に多大の被害を与える赤かび病の原因菌として発見された *Fusarium* 属のかびは、有毒代謝物であるトリコテセン系マイコトキシンを産生する<sup>1)</sup>。トリコテセン系マイコトキシンは動物実験で、放射線照射様の障害、蛋白合成、DNA 合成阻害、脂質の代謝異常の惹起等が報告されている<sup>2)</sup>。

赤かびによる食品汚染は穀類、豆類、動物用飼料、果物、野菜の報告がある<sup>3)</sup>。今回は食品の赤かび毒汚染の実態を明らかにする事を目的として、汚染実態が報告されている nivalenol (NIV) と deoxynivalenol (DON) に焦点を当て、次の2項目について検討した。

1 分析手段には穀類に DON, NIV 標準液を添加した試料と自然汚染穀類について、ワーキンググループが作成した方法<sup>4)</sup>について検討した。すなわち、濃縮過程で発泡する試料の分析法、GC 用検液の調製法、GC 分析で NIV あるいは DON のピークを認めた場合の確認法について検討し改良を加えた。

2 本報告の改良法を用い、輸入穀類、乳幼児食品、穀類加工品、政府管理倉庫保管古々米の実態調査を行った。

## 実験方法

### 1. 実験材料

#### 1.1 実態調査食品

昭和59年に輸入された穀類 (Corn, Soybean, Wheat, Pearl barley, Rye, Buckwheat, Corn) を横浜港駐在の厚生省食品衛生監視員が採取し、当所に送付された検体 (54検体)、昭和60年1月～昭和61年1月に東京都世田谷区内のマーケットにおいて購入した、乳幼児 (生後2カ月頃から8カ月) を対象にして作られた食品類 (27検体)、菓子類 (6検体) および政府管理倉庫に保管されていた古々米 (1検体)

#### 1.2 添加回収実験試料

1.2.1 DON と NIV を 0.5 ppm 添加した Corn, Soybean, Wheat, Pearl barley, Rye

1.2.2 DON と NIV を 1.0 と 1.3 ppm 添加した Corn.

#### 1.3 NIV と DON 産生菌の生産能試験

供試菌: *Fusarium* 3株, NHL-F1374, F1186, F1378

## 2. 試薬と試液

2.1 試薬と有機溶媒は市販試薬特級品を使用。ただしクロロホルム類は用時蒸留する。

2.2 シリル化剤：N-トリメチルイミダゾールおよびトリメチルクロロシラン（いずれも和光純薬製・試薬特級品）。N-トリメチルイミダゾール 1 ml にトリメチルクロロシラン 0.2 ml を加えた後、酢酸エチルで全量を 10 ml とし褐色瓶に貯える。

2.3 フロリジル：60～100メッシュを 120～130°C で2時間活性化して使用。

2.4 標準液：DON 標準液；DON 4 mg をはかり採りクロロホルムを加えて 50 ml とする。

NIV 標準液；NIV 3.25 mg をはかり採りクロロホルムを加えて 50 ml とする。

## 3. 装置

3.1 ガスクロマトグラフィー (GC)：島津 GC-5A (ECD 付) ガスクロマトグラフ装置，島津 C-R1A データ処理装置；YHP 5710 (ECD 付)，controller (5719 A)。

3.2 薄層クロマトグラフィー (TLC)：Schoeffel Spectro Densitometer SD-3000

TLC スポット装置：自家製

コンディショントレー：CAMAG 販売品

## 4. 実験操作

4.1 抽出：細切均一化した試料 20 g を 300 ml のフラスコにはかり採りアセトニトリル-水 (3-1) 200 ml を加え20分間振とう抽出する。全量を 300 ml のメスシリンダー中にろ過し，その 125 ml を採り 300 ml の分液漏斗に移し，ヘキサン 50 ml を加え10分間振とうする。上層のヘキサン層は捨てる。アセトニトリル層に硫酸アンモニウム 5 g を加え，分離した水層は除去する。アセトニトリル層は更に無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて水分を除いた後ろ過する。ろ液は注意して減圧下で濃縮する（発泡する試料はエタノール処理を加える）。残渣はメタノール 5 ml に溶解し，カラムクロマトグラフィー用検液とする。

4.2 カラムクロマトグラフィー：フロリジルを120～130°C で2時間活性化し，内径 2 cm 長さ 30 cm のガラス製カラムにクロロホルム-メタノール (9-1) で湿式充填する。フロリジルの上下に無水硫酸ナトリウムを 5 g 充填する。

メタノール 5 ml に溶解した検液中 4 ml を30分間充填剤に付加した後，クロロホルム-メタノール (9-1) で溶出させる。溶出液は減圧下で濃縮後メタノール 2 ml に溶解し，TLC および GC 用の検液とする。

### 4.3 TLC 分析

Merck 製薄層板：シリカゲル60（濃縮ゾーン付），高性能薄層プレート RP8（蛍光剤入り）RP18（蛍光剤無し），シリカゲル60（蛍光剤無し）；展開液：1次ベンゼン-エタノール (20-2)；2次クロロホルム-メタノール (97-3)

富士ゲル社製薄層板：シリカゲル C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>，展開液：メタノール-水 (4-6)

検出：Merck 製および富士ゲル製の薄層板はいずれも展開後20%塩化アルミニウム・エタノール試液を噴霧して80°C 30分間加熱する。

4.4 GC 分析：カラムクロマトグラフィーで得られた検液 1.0 ml を採り，30 ml の茄子型フラスコに移し，減圧濃縮して溶媒を除去した後，一夜デシケーター中に放置する。残渣に実験方法 2.2 で調整したシリル化剤 0.5 ml を加え充分混和し，15分間室温に放置する。シリル化が完了した後，酢酸エチル 4.5 ml を加える。酢酸エチル溶液は 3000 rpm で遠心分離し，その上澄液を GC 用の検液とする。GC 用検液の濃度を調整する必要があるときはその一定量を採り酢酸エチルで希釈する。

GC 条件：Column：2% OV-17 (100～120 mesh) 2 m，メガポア DB-17 (film thickness 1.0 μm) 15 m。

検出器温度：250°C，注入口温度：200°C。

カラムオープン：200°C。

キャリアガス：N<sub>2</sub>。

4.5 NIV, DON 生産能実験の条件：Table 7 に示す。

## 結果と考察

### 1. NIV と DON の分析

#### 1.1 TLC 分析

1.1.1 検液の溶媒として，ベンゼン-アセトニトリル (98-2) とクロロホルムについて検討したがクロロホルムの方が良い結果を与えた。

#### 1.1.2 増蛍光条件

DON, NIV の検出感度を上げるため20%塩化アルミニウム・エタノール試液を噴霧し，薄層板を加熱する。加熱時間は NIV は 80°C～110°C で1～2時間，DON は 80°C～110°C で30分間以上の加熱が必要である。それ以下では当該物質の確認を見誤る。

#### 1.1.3 R<sub>f</sub> 値と定量限界

4種類の TLC プレートの R<sub>f</sub> 値を Table 1 と 2 に示す。標準液の場合 DON と NIV は 50 ng が確認できる。したがって HPTLC のスポット量は最高 10 μl であるから，分析の最終検液を 200 μl にすると，定量限界は 200 ppb となる。しかし食品に添加したも

Table 1. Comparison of *R<sub>f</sub>* values and quantitative limits of Nivalenol and Deoxynivalenol by use of three kinds of TLC plates

Plate (Merck)	Mycotoxin	<i>R<sub>f</sub></i> value* <sup>3</sup>	Quantitative limit	
RP-8	DON	0.63	50 ng	0.2 ppm
(Art. 13725, F254S)	NIV	0.38	100 ng	0.4 ppm
RP-18	DON	0.46 (0.42* <sup>2</sup> )	50 ng	0.2 ppm
(Art. 5914, F254S)	NIV	0.37 (0.58* <sup>2</sup> )	100 ng	0.4 ppm
Silicagel 60	DON	0.13	50 ng	0.2 ppm
(Art. 11845)	NIV	0.09	100 ng	0.4 ppm
	FX(*1)	0.20		

Developing solvent: 1st, Benzene-Ethanol (20-2)  
 2nd, Chloroform-Methanol (97-3)  
 (two dimensional technique)

\*1 Fusarenon x

\*2 *R<sub>f</sub>* value after 1st development

\*3 *R<sub>f</sub>* value after 2nd development

のは肉眼による検出限界が 400 ng であるため, 実際の食品から分析した場合の定量限界は 1.6 ppm である。

## 1.2 GC 分析

### 1.2.1 定量限界

3種類のカラムを使用した GC (ECD) の定量限界を Table 3 に示す。

1は 2% OV-17 カラムによる GC (ECD) で, データ処理装置を用いて, ピーク面積法により定量値を求めたものである。Fig. 1 に示す検量線から, NIV は 0.01~0.20 ng, DON は 0.01~0.25 ng において直線性が得られる。

2は1と同じカラムを用いピーク高さ法により定量値を算出したものである。3は2と同じ装置による GC で, 近年開発されたメガボアカラムである DB-17 (50% フェニルメチルシリコン, 中極性) を使用しピーク高さ法で定量値を求めたものである。

2と3においてデータ処理装置を用いると検出感度が上がり, 5 ppb と 1 ppb になると考えられる。

### 1.2.2 DON および NIV シリル化体の安定性

Table 2. Comparison of detection limits of Nivalenol and Deoxynivalenol by use of three kinds of TLC plates

Plate (Fji-gel)	Mycotoxin	<i>R<sub>f</sub></i> Value
C <sub>2</sub>	DON	0.78
	NIV	0.88
C <sub>8</sub>	DON	—
	NIV	—
C <sub>18</sub>	DON	0.7
	NIV	0.91

Developing solvent: Methanol--Water (4-6)

a) DON, NIV 標準液をシリル化し, 褐色メスフラスコに貯え, 乾燥剤を入れた容器に入れ, 冷蔵庫に保存し5時間, 1年, 1年7カ月後に DON と NIV を定量したところ, 6カ月までは DON と NIV ともに GC 上に現れるピーク高さは同じ値を示した。1年後 DON, NIV ともに定量値は20%減少し, 1年7カ月後両トキシンの50%減少した。

b) DON 1.28 ppm, NIV 1.3 ppm を添加した Corn,

Table 3. Comparison of detection limits of Nivalenol and Deoxynivalenol by use of three kinds of GC systems

column	NIV (ng)	DON (ng)	GC detector and Recorder
2% OV-17 (packed)	0.01 (5 ppb)	0.01 (5 ppb)	Simazu GC-5A (ECD) C-RIA
2% OV-17 (packed)	0.04 (20 ppb)	0.04 (20 ppb)	YHP-5710 (ECD) Recorder (50 μV/cm)
DV-17 (megabore)	0.01 (5 ppb)	0.01 (5 ppb)	YHP-5710A Recorder

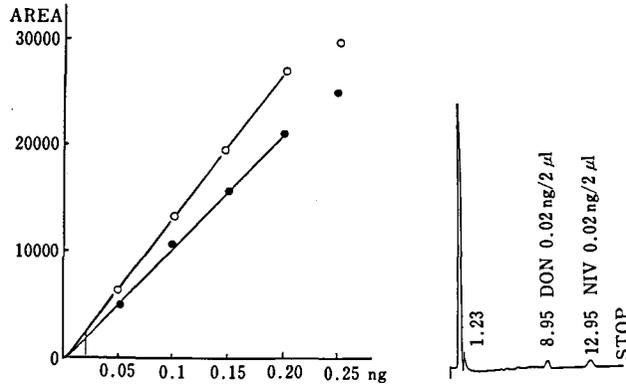


Fig. 1. Calibration curve and chromatogram for Nivalenol and Deoxynivalenol by GC

GC conditions

Column: silicone OV-17 (100~120 mesh, 2%) ○—○ NIV ●—● DON  
 Detector: Shimazu GC-5A, Range ( $\times 0.01$  V) 1, Sensitivity 10  
 Col. T. 200°C, Inj. port. T. 240°C, Oven. T. 200°C, N<sub>2</sub> 30 ml/min

Barley, Wheat を実験方法 4 にしたがって処理して得た検液を褐色のメスフラスコに入れて冷蔵庫中に 5 日間保存した場合、検液中の DON と NIV 量は最高 26.3% 減少した。

### 1. 2. 3 添加回収

DON, NIV を 0.5 ppm 添加した Corn, Soybean, Wheat, Pearl barley, Rye につき実験方法 4 にしたがって分析したときの回収率を Table 4 に示す。

## 2. 食品類における実態調査

2.1 輸入穀類の実態調査結果を Table 5 に示す。

21 検体に NIV が検出された。Buckwheat は GC (ECD) において、明らかに NIV のピークを認めた

Table 4. Recovery of Nivalenol and Deoxynivalenol added to cereals

	Recovery (%)		
	added (ppm)	NIV	DON
Corn	0.5*	104	100
	1.0	92	95
	1.3	68	88
Soybean	0.5	68	70
Wheat	0.5	70	70
Pearl barley	0.5	50	76
Rye	0.5	68	84
NIV+DON	0.5	74	104
Barley	1.0	37	90

\* NIV or DON

Table 5. Analytical results of Nivalenol and Deoxynivalenol in imported cereals

Sample	NIV (ppb)	DON (ppb)	Sample	NIV (ppb)	DON (ppb)
Corn 1	n. d.*1	n. d.*2	Wheat 1	18.0	n. d.
2	42.0	n. d.	2	35.3	n. d.
3	6.5	n. d.	3	18.0	n. d.
4	19.3	n. d.	4	8.8	n. d.
5	34.0	n. d.	5	19.3	n. d.
6	50.7	n. d.	6	6.0	n. d.
7	30.0	n. d.	7	12.5	n. d.
8	20.7	n. d.	8	12.8	n. d.
9~12	n. d.	n. d.	9~12	n. d.	n. d.
Soybean 1	n. d.	n. d.	Malt 1~13	n. d.	n. d.
2	12.0	n. d.	Rye 1	6.7	n. d.
3	11.2	n. d.	2	17.3	n. d.
4	8.7	n. d.	Pearl barley 1~2	n. d.	n. d.
5~9	n. d.	n. d.	Buckwheatchaff	n. d.	n. d.
Buckwheat 1~4	n. d.	n. d.			

\*1 Detection limit: 5 ppb

\*2 Detection limit: 5 ppb

Table 6. Analytical results of Nivalenol and Deoxynivalenol in commercial baby food and fruits juice

Sample	NIV	DON
Rice sticks containing vegetables*1	n. d.*2	n. d.*3
Rice stick*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing egg*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing cheese*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing honey*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing lemon oil*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing soybean protein*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing oatmeal*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing vegetables*1	n. d.	n. d.
Biscuit containing skim milk powder*1	n. d.	n. d.
Rice gruel*1	n. d.	n. d.
Rice gruel*1	n. d.	n. d.
Rice gruel*1	n. d.	n. d.
Thin rice gruel	n. d.	n. d.
Mixed gruel*1	n. d.	n. d.
High protein gruel*1	n. d.	n. d.
Rice cake containing wheat bran*1	n. d.	n. d.
Chinese gruel*1	n. d.	n. d.
Bread gruel*1	n. d.	n. d.
Apple juice*1	n. d.	n. d.
Apple juice	n. d.	n. d.
Vegetable soup*1	n. d.	n. d.
Mixed fruits juice*1	n. d.	n. d.
Mixed fruits juice	n. d.	n. d.
Tomato juice	n. d.	n. d.
Peach juice	n. d.	n. d.
Mandarine orange juice	n. d.	n. d.

\*1 Foods for babies more than 2~8 month-old

\*2 Detection limit: 5 ppb

\*3 Detection limit: 5 ppb

Table 7. Production of nivalenol and Deoxynivalenol from 3 strains of Fusarium

Strain no.	Medium	Condition for cultivation	Found (ppm)	
			NIV	DON
NHL-F-1374	Rice	25°C- 4 week	100	n. d.
NHL-F-1374	Rice	25°C-15 week	100	n. d.
NHL-F-1186	Rice	25°C- 4 week	250	n. d.
NHL-F-1186	Rice	25°C-15 week	200	n. d.
NHL-F-1378	Rice	25°C- 2 week	n. d.	75~79
NHL-F-1378	Barley	25°C- 2 week	n. d.	3.5
NHL-F-1374	Rice	25°C- 2 week	138~160	n. d.
NHL-F-1374	Barley	25°C- 2 week	42	n. d.

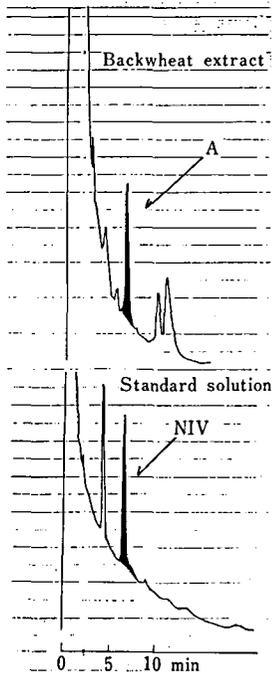


Fig. 2. Gas chromatograms of Nivalenol, Deoxynivalenol standard solution and Baby food extract

GC conditions

Column: Silicone OV-17 (100~120 mesh, 2%)  
 Detector: YHP 5710A. sensitivity 8  
 Col. T. 200°C, Inj. port T. 250°C, Oven T. 200°C,  
 N<sub>2</sub> 30 ml/min

が、TLCにより確認した結果 NIV は n.d. であった。

2.2 乳幼児食品の実態調査

市販の生後2~8カ月の乳幼児食品の実態調査を行った。総ての食品に両 toxin は検出されなかった。一部小麦粉を使ったビスケット中に OV-17 の column を使用した GC (ECD) で Fig. 2 に示すような NIV の保持時間と一致するピーク (A) がみられ、また TLC による確認でも、NIV の 1 ppm に相当する蛍光スポットみられたが、R<sub>f</sub> 値は NIV 標準液のそれよりも低くまた DB-17 の column による GC (ECD) で確認した結果 NIV と一致しなかった。実態調査の結果

を Table 6 に示す。

2.3 穀類加工品の実態調査

穀類加工品として市販の菓子を選び実態調査を行った。同時に政府管理倉庫に4年間保管されていた古々米1検体も分析した。総ての検体から DON, NIV は検出されなかった。

3. 菌株の DON, NIV 生産能

菌株3種類の DON, NIV の分析をして生産能をみた結果を Table 7 に示す。

ま と め

われわれのグループが作成した食品中の DON と NIV の分析法を穀類について検討したところ、さらに4つの改良と処理方法の追加が必要であった。

1. GC 用検液の最終液の全量をこれまでの 10 ml から 5 ml にする。
2. GC 用の検液はシリル化完了後 3000 rpm で遠心分離する。
3. 常法で NIV あるいは DON のピークを認めた場合は、メガボア DB-17 による GC 分析あるいは順相 (シリカゲル)、逆相 (シリカゲル C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) のいずれかの TLC 分析で確認する。

1 では GC 測定に支障なく感度を2倍に上げることができる。

2 では検液を湿気から避けて暗所で低温保存すると6カ月は安定である。

3 では NIV と DON の誤認が避けられる。

以上あらたに検討した部分を追加することによりワーキンググループ法の感度を上げ、検液の安定性、再現性および回収率につきはほぼ満足できる結果が得られた。

文 献

- 1) H. R. Burmeister *et al.*: *Appl. Microbiol.*, **21**, 673 (1971)
- 2) Y. Ueno *et al.*: *Appl. Microbiol.*, **25**, 699 (1973)
- 3) 農林水産省特別研究報告, **25**, 699 (1971)
- 4) 昭和59年度厚生科学研究 (特別研究事業報告)

ラットの組織酵素の分布

中路幸男・斎藤 実・鈴木幸子・戸部満寿夫

Distribution of Tissue Enzymes in Rat

Yukio NAKAJI, Minoru SAITOH, Sachiko SUZUKI and Masuo TOBE

The activities of seventeen kinds of clinically useful enzymes found in twenty different organ-tissues and in serum of Wistar rats were measured. The enzymes were present in all organ-tissues, but there was a large difference in their activities depending on where they were found.

The most active values were found in the brain for ALD, in the heart for HBDH, ICDH and GOT, in the liver for GLDH and GPT, in the pancreas for  $\gamma$ -GTP, CHE and AMY, in the ileum for AC-CHE, in the colon for NAG, in the adrenal for G6PDH, in the kidney for ALP, LAP and GPDAP and in the skeletal muscle for LDH and CK.

Since the enzyme activity levels in the serum are affected by the enzymatic activity of injured organ-tissue, there is the possibility of diagnosing organic damages by determining the enzymatic activities in the serum and by knowledge of the order of these activities in the individual organ-tissue.

Received May 31, 1986)

血清中には血液から産生されるはずのないさまざまな酵素が見出される。この血清酵素の活性レベルは、正常動物では年齢に従いほぼ一定しており、生体維持のため細胞の分裂と崩壊が恒常的に繰り返される中で、主として崩壊した細胞に由来するものであろう。それに対して、活性レベルの上昇あるいは低下は障害を受けた組織細胞に由来し、その影響の大きさは組織酵素の含有量に左右されるものと考えられる。そこで正常動物の組織酵素の含有量を調べ、組織障害の一つの指標としての意義を考察した。

実験方法

1. 実験動物

ウイスター系の9週令雄ラット(静岡実験動物組合)6匹を使用した。

2. 酵素活性の測定

2.1 血液の採取および酵素活性の測定

無麻酔下に動物の頸動脈より血液4mlを採取し、室温に5分間放置後、氷冷し、3000rpmで10分間遠心し、その上清について蛋白含量および17種の酵素の活性をTable 1の試薬キットにより多項目自動分析装置(GEMSAEC IV型, Electro Nucleonics社)および用手法(NAG活性)により即日測定した。酵素の活性値は30°Cあるいは37°C(NAG活性)におけるミリ単位/lmg蛋白として表した。

2.2 組織ホモジネートの調製および酵素活性の測

定

採血を終了した動物の頸動脈を切断して放血し、脳、顎下腺、胸腺、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胃、十二指腸(幽門部より10cmを使用し空腸を含む)、空腸(幽門部より10cmの位置から15cmを使用)、回腸(回盲部より幽門方向に15cmを使用)結腸、腎臓および精巣のそれぞれ適量を切り取り、秤量し(0.2~1.3g)、直ちに-80°Cで保存し、また下垂体、甲状腺、副腎および骨髄は6匹分を合わせ、標量し、直ちに-80°Cで保存した。

5週間以内に、これらに氷冷等張塩化カリウム液をそれぞれの重量の3倍量を正確に加え、テフロン軸ガラスホモジナイザー(Potter型)でホモジナイズした。そのホモジネートを10000×gで20分間冷却遠心し、上清について2.1と同様にして組織の酵素の活性を測定した。

血清および組織の酵素の活性値は動物6匹の平均値±標準偏差あるいは臓器重量の小さなものでは6匹の平均値として表し、さらに各酵素につき、最も活性の高い組織を100として各組織の相対値を算出した。

結果および考察

各組織中の酵素活性をTable 2に示した。

LDH: 糖質代謝の解糖系に関与するこの酸化還元酵素は、嫌氣的組織において乳酸を産生し、別に乳酸を取り込みTCA回路を介してATPを産生、あるいは

Table 1. Tests and kits for enzyme Assay

Test (Abbreviation)	Manufacturer (Code number)	Test (Abbreviation)	Manufacturer (Code number)
Total protein (T-PRO)	Wako (274-24301)	Dipeptidyl-aminopeptidase IV (GPDAP)	Fuji rebio (FS 113)
Aldorase (ALD)	BMJ (123838)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	BMJ (124672)
Alkaline phosphatase (ALP)	Wako (277-64191)	Glutamic-pyruvic transaminase (GPT)	SKI (89049)
$\alpha$ -Amylase (AMY)	Beckman (AU-3203)	$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GTP)	BMJ (158208)
Acetylcholinesterase (AC-CHE)	BMJ (124117)	2-Hydroxybutyrate dehydrogenase (HBDH)	BMJ (124800)
Pseudocholinesterase (CHE)	BMJ (124125)	Isocitrate dehydrogenase (ICDH)	BMJ (125989)
Creatine kinase (CK)	BMJ (126322)	Leucine aminopeptidase (LAP)	Wako (279-64391)
Glutamic dehydrogenase (GLDH)	BMJ (124311)	Lactate dehydrogenase (LDH)	Shinotest (403020)
Glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT)	SKI (89049)	N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)	Meiji (NAG)

Beckman : Beckman Instruments. BMJ : Boehringer Mannheim Yamanouchi. Fuji Rebio Pharmaceutical Co., Ltd..  
Meiji : Meiji seika kaisha Ltd.. Shinotest : Shinotest Laboratory. SKI : Smith Kline Instruments Inc..  
Wako : Wako Pure Chemical Industries Ltd..

は糖新生の盛んな組織に強く分布しており、骨格筋(赤筋繊維<sup>1)</sup>)に最も高く、次いで心筋に高く、さらに空腸、肝臓(肝細胞<sup>1)</sup>)、十二指腸(小腸の絨毛上皮表層<sup>1)</sup>)および脳も比較的高い。

HBDH : LDH のイソエンザイムの一つ(LDH1)であり、好氣的組織において乳酸をピルビン酸に転換し、TCA 回路を介して ATP 産生に寄与する酸化還元酵素で、心筋に最も高く、次いで骨格筋に高く、さらに脳に比較的高い。

ICDH : ミトコンドリアに局在する NAD を補酵素とする ICDH に協調して、TCA 回路の回転速度およびクエン酸の流れの方向を制御している細胞質中の NADP を補酵素とする酸化還元酵素で、心筋に最も高い。

G6PDH : ステロイドホルモン、コレステロール、および脂肪酸合成に必要な NADPH の供給、あるいは核酸合成に必要なリボース-5-リン酸の供給に寄与する酸化還元酵素で、副腎(皮質<sup>1)</sup>)に最も高く、次いで骨髄、脳、結腸、胸腺および下垂体に高く、さらに胃、肺および脾臓も比較的高い。

GLDH : アミノ酸から脱離したアンモニアを介して種々の化合物に窒素原子の供給あるいは尿素として排出すべくアミノ窒素処理機構に関与しているミトコンドリア局在の酸化還元酵素で、肝臓に最も高く、腎臓(尿細管<sup>1)</sup>)および脳に比較的高い。

$\gamma$ -GTP : 物質輸送に関与する膜結合酵素であり、アミノ酸代謝において  $\gamma$ -グルタミル結合を加水分解し、

その  $\gamma$ -グルタミル基を他のペプチドやアミノ酸に転位する転位酵素で、膵臓(膵腺細胞<sup>1)</sup>)に最も高く、次いで腎臓(尿細管、特に主部直部とヘンレ係蹄上行脚上皮<sup>1)</sup>)に高い。

GOT : アミノ酸と TCA 回路との接点において、アミノ酸代謝の最初の段階である脱アミノ反応に関与する転移酵素で、心臓に最も高く、骨格筋、脳(神経細胞、小脳のプルキンエ細胞<sup>1)</sup>)および肝臓(小葉周辺帯の肝細胞<sup>1)</sup>)に比較的高い。

GPT : アミノ酸代謝の中で糖質代謝と最も関連の深いアラニン・グルコース回路で糖新生に寄与する転移酵素で、肝臓に最も高く、次いで空腸および回腸に高く、さらに胃、骨格筋、顎下腺、精巣および結腸に比較的高い。

CK : 解糖系等によって生成された ATP はクレアチニンリン酸の形で組織内に貯蔵される、従って迅速な ATP 産生が要求される筋収縮に関与するこの転位酵素は、骨格筋に最も高い。

AC-CHE : 神経興奮の化学的伝達物質としてのアセチルコリンを分解するこの加水分解酵素は主に神経系に分布し、回腸次いで空腸および十二指腸(消化管の内輪走筋<sup>1)</sup>)に高く、さらに脳(神経細胞<sup>1)</sup>)に比較的高い。

CHE : プチリルコリン等の長鎖脂肪酸のアシルコリン類に作用する加水分解酵素で、膵臓(外分泌細胞<sup>1)</sup>)に最も高く、回腸、空腸および十二指腸(消化管の外縦走筋<sup>1)</sup>)に比較的高い。

Table 2. Activities of some enzymes in Wistar male rat tissues

	LDH	HRDH	ICDH	CSDPH	GLDH	$\gamma$ -GTP	GOT	GPT	CK
Brain	2685 $\pm$ 211 (25)	1348 $\pm$ 75 (31)	54 $\pm$ 4 (6)	55 $\pm$ 2 (72)	228 $\pm$ 32 (28)	2.0 $\pm$ 0.3 (1)	1245 $\pm$ 171 (30)	33 $\pm$ 3 (12)	4307 $\pm$ 482 (4)
Pituitary	777 (7)	261 (6)	30 (3)	43 (56)	34 (4)	2.5 (1)	623 (15)	21 (8)	1209 (1)
Submandibular gland	827 $\pm$ 83 (8)	201 $\pm$ 14 (5)	123 $\pm$ 15 (13)	6.9 $\pm$ 3.0 (9)	35 $\pm$ 3 (4)	1.7 $\pm$ 0.4 (1)	435 $\pm$ 31 (11)	90 $\pm$ 10 (33)	365 $\pm$ 56 (0.3)
Thyroid	1238 (12)	336 (8)	26 (3)	15 (20)	33 (4)	0.39 (0.2)	181 (4)	15 (5)	2506 (2)
Thymus	1856 $\pm$ 267 (18)	545 $\pm$ 63 (12)	47 $\pm$ 8.4 (5)	47 $\pm$ 6 (61)	30 $\pm$ 7 (4)	3.2 $\pm$ 0.4 (2)	657 $\pm$ 149 (16)	9.5 $\pm$ 1.4 (3)	657 $\pm$ 149 (0.6)
Heart	7874 $\pm$ 412 (74)	4371 $\pm$ 201 (100)	941 $\pm$ 127 (100)	8.8 $\pm$ 1.2 (12)	140 $\pm$ 26 (17)	1.5 $\pm$ 1.3 (0.9)	4121 $\pm$ 527 (100)	49 $\pm$ 4 (18)	12200 $\pm$ 1240 (11)
Lung	886 $\pm$ 49 (8)	243 $\pm$ 12 (6)	51 $\pm$ 6 (5)	29 $\pm$ 2 (37)	51 $\pm$ 9 (6)	1.8 $\pm$ 0.6 (1)	276 $\pm$ 26 (7)	42 $\pm$ 2 (15)	481 $\pm$ 24 (0.4)
Liver	3494 $\pm$ 231 (33)	716 $\pm$ 38 (16)	156 $\pm$ 14 (17)	9.6 $\pm$ 1.9 (13)	815 $\pm$ 102 (100)	0.78 $\pm$ 0.2 (0.5)	1179 $\pm$ 78 (29)	277 $\pm$ 16 (100)	66 $\pm$ 8 (0.06)
Pancreas	329 $\pm$ 186 (3)	77 $\pm$ 50 (2)	44 $\pm$ 31 (5)	9.0 $\pm$ 7.0 (12)	34 $\pm$ 44 (4)	172 $\pm$ 84 (100)	428 $\pm$ 78 (10)	48 $\pm$ 32 (17)	51 $\pm$ 39 (0.05)
Spleen	1263 $\pm$ 75 (12)	338 $\pm$ 41 (8)	30 $\pm$ 5 (3)	28 $\pm$ 1 (36)	44 $\pm$ 10 (5)	4.4 $\pm$ 2.1 (3)	161 $\pm$ 21 (4)	4.3 $\pm$ 1.2 (17)	386 $\pm$ 33 (0.4)
Stomach	1751 $\pm$ 339 (17)	534 $\pm$ 90 (12)	149 $\pm$ 21 (16)	32 $\pm$ 5 (41)	82 $\pm$ 24 (10)	6.9 $\pm$ 8.2 (4)	590 $\pm$ 6 (14)	135 $\pm$ 22 (49)	1754 $\pm$ 195 (2)
Duodenum	3293 $\pm$ 545 (31)	800 $\pm$ 111 (18)	37 $\pm$ 14 (4)	0.16 $\pm$ 0.08 (0.2)	11 $\pm$ 2 (1)	14 $\pm$ 5 (8)	582 $\pm$ 43 (14)	3.3 $\pm$ 1.0 (1)	590 $\pm$ 614 (0.5)
Jejunum	4510 $\pm$ 957 (43)	1070 $\pm$ 229 (24)	114 $\pm$ 53 (12)	12 $\pm$ 7 (15)	111 $\pm$ 75 (14)	4.0 $\pm$ 1.3 (2)	507 $\pm$ 431 (12)	188 $\pm$ 120 (68)	1860 $\pm$ 559 (2)
Ileum	2456 $\pm$ 236 (23)	598 $\pm$ 58 (14)	118 $\pm$ 47 (13)	14 $\pm$ 9 (18)	167 $\pm$ 92 (20)	4.3 $\pm$ 1.0 (2)	431 $\pm$ 35 (10)	163 $\pm$ 90 (59)	2190 $\pm$ 415 (2)
Colon	2382 $\pm$ 155 (23)	582 $\pm$ 52 (13)	130 $\pm$ 11 (14)	54 $\pm$ 6 (71)	139 $\pm$ 37 (17)	1.7 $\pm$ 1.7 (1)	424 $\pm$ 42 (10)	71 $\pm$ 8 (26)	2773 $\pm$ 319 (3)
Adrenal	644 (6)	163 (4)	95 (10)	77 (100)	61 (7)	ND	650 (16)	16 (6)	142 (0.1)
Kidney	1513 $\pm$ 192 (14)	672 $\pm$ 76 (15)	229 $\pm$ 39 (24)	11 $\pm$ 1 (14)	330 $\pm$ 42 (40)	106 $\pm$ 16 (62)	778 $\pm$ 87 (19)	18 $\pm$ 6 (6)	286 $\pm$ 37 (0.3)
Testis	1094 $\pm$ 92 (10)	486 $\pm$ 32 (11)	27 $\pm$ 2 (3)	1.2 $\pm$ 0.1 (2)	43 $\pm$ 3 (5)	0.5 $\pm$ 0.2 (0.3)	152 $\pm$ 12 (4)	81 $\pm$ 6 (29)	123 $\pm$ 132 (0.3)
Bone marrow	644 (6)	242 (6)	6.1 (0.6)	62 (82)	9.2 (1)	0.49 (0.3)	102 (2)	12 (4)	349 (0.3)
Skeletal muscle	10570 $\pm$ 1390 (100)	2183 $\pm$ 111 (50)	79 $\pm$ 11 (8)	0.57 $\pm$ 0.35 (0.7)	18 $\pm$ 5 (2)	0.49 $\pm$ 0.7 (0.3)	1651 $\pm$ 101 (40)	113 $\pm$ 11 (41)	107500 $\pm$ 11200 (100)
Serum	5.4 $\pm$ 1.4 (0.05)	1.4 $\pm$ 0.3 (0.03)	0.07 $\pm$ 0.01 (0.007)	1.3 $\pm$ 0.3 (2)	0.13 $\pm$ 0.01 (0.02)	ND	0.96 $\pm$ 0.06 (0.02)	0.43 $\pm$ 0.07 (0.2)	7.7 $\pm$ 2.1 (0.007)

Tissues of six animals were homogenized in Teflon homogenizer with the addition of 0.15M KCl. The enzyme activities were measured in the supernatant fluid after centrifugation at 10000 Xg for 20 min. The figures indicate the activities of enzyme, means  $\pm$  S.D. or means (milliunits per milligram protein) at 30 °C, except NAG(37°C), and the numbers in parenthesis show relative values to the most active tissue, which is shown as 100. ND : Not detected.

Table 2. Activities of some enzymes in Wistar male rat tissues (concluded)

	AC-CHE	CHE	ALP	AMY	NAG	LAP	GPDAP	ALD
Brain	67 ± 21 (43)	11 ± 2 (6)	28 ± 4 (5)	ND	30 ± 2 (17)	7.9 ± 0.3 (14)	1.8 ± 0.4 (1)	197 ± 12 (100)
Pituitary	28 (18)	27 (14)	38 (6)	4.6 (0.5)	102 (56)	11 (19)	2.8 (2)	39 (20)
Submandibular gland	7.2 ± 0.9 (5)	6.6 ± 0.6 (3)	158 ± 21 (27)	80 ± 108 (8)	109 ± 7 (60)	7.8 ± 0.5 (13)	7.1 ± 0.5 (5)	9.3 ± 2.8 (5)
Thyroid	7.0 (5)	8.0 (4)	31 (5)	3.3 (0.3)	138 (76)	4.6 (9)	4.4 (3)	3.8 (2)
Thymus	11 ± 2 (7)	7.9 ± 1.9 (4)	24 ± 3 (4)	1.4 ± 0.1 (0.1)	36 ± 6 (20)	6.5 ± 1.1 (11)	24 ± 3.6 (15)	29 ± 5 (15)
Heart	31 ± 6 (20)	19 ± 3 (10)	84 ± 9 (14)	212 ± 236 (21)	9.4 ± 1.1 (5)	2.5 ± 0.3 (4)	1.7 ± 0.6 (1)	16 ± 4 (6)
Lung	14 ± 1 (9)	8.0 ± 0.6 (4)	190 ± 23 (32)	119 ± 285 (12)	20 ± 2 (11)	6.7 ± 0.9 (12)	37 ± 8 (24)	2.1 ± 1.2 (1)
Liver	6.5 ± 1.1 (4)	8.8 ± 1.0 (5)	3.5 ± 0.8 (0.6)	5.2 ± 0.9 (0.5)	29 ± 4 (16)	4.9 ± 0.5 (8)	12 ± 2 (8)	14 ± 2 (7)
Pancreas	5.9 ± 1.9 (4)	195 ± 44 (100)	11 ± 5 (2)	998 ± 421 (100)	5.6 ± 0.7 (3)	3.5 ± 0.9 (6)	4.9 ± 2.0 (3)	0.33 ± 0.08 (0.2)
Spleen	15 ± 0.6 (9)	8.8 ± 0.5 (5)	15 ± 1 (3)	ND	29 ± 4 (16)	8.3 ± 0.8 (14)	24 ± 1.7 (15)	2.5 ± 0.2 (1)
Stomach	19 ± 2 (12)	6.7 ± 1.0 (3)	31 ± 5 (5)	23 ± 43 (2)	40 ± 6 (22)	2.4 ± 0.9 (4)	2.3 ± 0.8 (1)	11 ± 5 (5)
Duodenum	99 ± 10 (64)	49 ± 5 (25)	307 ± 96 (52)	701 ± 212 (70)	96 ± 2 (53)	9.3 ± 0.8 (16)	12 ± 2 (8)	0.54 ± 1.73 (0.3)
Jejunum	119 ± 19 (77)	57 ± 11 (29)	220 ± 71 (37)	110 ± 74 (11)	141 ± 26 (78)	16 ± 17 (27)	20 ± 4 (12)	4.5 ± 2.5 (2)
Ileum	155 ± 12 (100)	70 ± 6 (36)	180 ± 80 (31)	15 ± 12 (2)	101 ± 15 (56)	17 ± 5 (30)	21 ± 6 (13)	2.7 ± 1.0 (1)
Colon	34 ± 6.4 (22)	13 ± 4 (7)	44 ± 10 (6)	84 ± 108 (8)	181 ± 16 (100)	6.8 ± 0.8 (12)	8.9 ± 1.1 (6)	11 ± 1 (6)
Adrenal	8.0 (5)	6.7 (3)	70 (12)	0.63 (0.06)	7.8 (4)	4.4 (8)	6.1 (4)	26 (13)
Kidney	2.0 ± 0.6 (1)	3.8 ± 0.4 (2)	588 ± 83 (100)	3.0 ± 1.8 (0.3)	130 ± 21 (72)	58 ± 8 (100)	158 ± 16 (100)	11 ± 1 (5)
Testis	6.2 ± 1.4 (4)	5.8 ± 1.8 (3)	170 ± 16 (29)	2.0 ± 0.3 (0.2)	23 ± 2 (13)	4.7 ± 0.5 (8)	2.2 ± 0.1 (1)	45 ± 16 (23)
Bone marrow	9.9 (6)	5.4 (3)	72 (12)	1.8 (0.2)	30 (16)	3.6 (6)	23 (15)	1.8 (0.9)
Skeletal muscle	3.6 ± 1.9 (2)	3.2 ± 2.9 (2)	8.2 ± 1.0 (1)	64 ± 7 (6)	6.5 ± 0.9 (4)	3.9 ± 0.6 (7)	0.69 ± 0.55 (0.4)	126 ± 9 (64)
Serum	11 ± 1 (7)	7.4 ± 1.4 (4)	11 ± 1 (2)	6.5 ± 0.5 (0.6)	0.63 ± 0.06 (0.3)	0.85 ± 0.03 (1)	0.67 ± 0.32 (0.4)	0.30 ± 0.03 (0.2)

Tissues of six animals were homogenized in Teflon homogenizer with the addition of 0.15M KCl. The enzyme activities were measured in the supernatant fluid after centrifugation at 10000 Xg for 20 min.

The figures indicate the activities of enzyme, means ± S.D. or means (milliunits per milligram protein) at 30 °C, except NAG(37°C), and the numbers in parenthesis show relative values to the most active tissue, which is shown as 100. ND: Not detected.

ALP：細胞膜の膜結合酵素としてリン酸等の物質輸送の機能を有するこの加水分解酵素は、腎臓（近位尿管の刷子縁<sup>1)</sup>）に最も高く、次いで十二指腸に高く、さらに空腸（粘膜上皮の微絨毛<sup>1)</sup>）、肺（肺胞壁の毛細血管、肺胞上皮の2型細胞<sup>1)</sup>）、回腸（粘膜上皮の微絨毛<sup>1)</sup>）、精巣（精細胞<sup>1)</sup>）および顎下腺に比較的高い。

AMY：多糖類の $\alpha$ -1,4グリコシド結合をランダムに切断する加水分解酵素で、膵臓（腺房細胞<sup>1)</sup>）に最も高く、次いで十二指腸（<sup>2)</sup>）に高い。

NAG：糖蛋白質等の非還元末端にある $\beta$ -N-アセチル-D-グルコサミニドを切断する加水分解酵素で、結腸に最も高く、次いで空腸、甲状腺（上皮<sup>2)</sup>）、腎臓（近位尿管上皮<sup>1)</sup>）、顎下腺（明細胞<sup>2)</sup>）、下垂体、回腸および十二指腸（小腸粘膜上皮<sup>2)</sup>）に高い。

LAP：N末端にロイシンを持つペプチドに作用する加水分解酵素で、腎臓（尿管上皮細胞<sup>2)</sup>）に最も高く、回腸および空腸に比較的高い。

GPDAP：N末端にプロリンを含むコラーゲン由来のペプチドに作用する加水分解酵素<sup>3)</sup>）で、腎臓に最も高い。

ALD：糖質代謝の解糖系において唯一のC-C結合の切断・合成に関与する反応を触媒する脱離酵素で、脳（大脳および小脳の皮質、海馬、脈絡叢および脳幹の核、神経細胞体と神経網<sup>1)</sup>）に最も高く、次いで骨格筋に高い。

組織障害の指標として血清酵素の動態を調べることは有力な手段の一つである。血清中に存在する酵素の起源は細胞であり、血清酵素の活性レベルの変動は何らかの機転で細胞から放出された酵素に由来するものと思われ、それは一般に次の四つの機構によるものと考えられている<sup>4)</sup>。

- 1) 細胞における酵素産生量あるいは細胞数の変化
- 2) 細胞膜透過性の亢進
- 3) 細胞の損傷、壊死による遊出
- 4) 酵素の異化あるいは排泄機構の異常

この実験で得られた結果は、組織酵素が各組織に普遍的に分布しており、活性は血清レベルの約14~14000倍を示し、組織酵素が部位により存在量の異なることを示した。各酵素の組織間の活性順位はDixonらの調査<sup>5)</sup>）との比較で、LDH、GLDH、GOT、GPT、CK、ALPおよびALDでほぼ同様であり、ICDH、G6PDH、AC-CHEおよびNAGで順位が異なっている。この違いは、例えばWistarとF344のラットでは血清酵素の濃度に大きな差はないが、特にGPDAPに著しい差があることから、系統差によるものかも知

れない。

各酵素の活性に組織間で著しい差のある組織酵素に次のようなものがある。

CK（骨格筋：100、心臓：11、他組織：<4）

$\gamma$ -GTP（膵臓：100、十二指腸：8、他組織：<14）

ICDH（心臓：100、肝臓：17、他組織：<14）

これらの中で、CKは心筋以下の組織酵素の活性が低いため血清レベルに影響を与えないと思われないので、骨格筋障害に極めて特異的な酵素といえる。また同様の理由からALDおよびAMYもそれぞれ脳および膵臓に比較的特異的でありそうである。

一方、組織間で活性の差が大きい組織酵素に次のようなものが挙げられる。

NAG（結腸：100、空腸：78、甲状腺：76等）

G6PDH（副腎：100、骨髄：82、脳：72等）

AC-CHE（回腸：100、空腸：77、十二指腸：64）

GPT（肝臓：100、空腸：68、胃：49等）

LDH（骨格筋：100、心筋：74、空腸：43等）

血清中にTable 1に示されるような比率で組織酵素が常に存在するとすれば、単純に考えて、逸脱酵素の起源は、組織酵素の活性の高いものほど血清酵素の活性レベルに大きく反映することになる。今ここに、代謝過程で何らかの重大な欠陥を生じ、ある酵素が血流中に正常値の2倍量漏出したと仮定し、血清の活性レベルの増加が明確に分かる平常値 $\pm 20\%$ の点を求めてみると、例えばLDHでは骨格筋および心筋由来のLDH共存下に空腸由来のLDHが2倍の変化量を示す点は最高活性値（骨格筋）のほぼ1/2の活性順位にあり、同様にしてそれぞれの最高活性値に対しG6PDH、NAG、GPTおよびAC-CHEではほぼ1/2、HBDH、GOTおよびCHEではほぼ1/3、GLDHおよびALDではほぼ1/4ならびにICDHではほぼ1/6の点の活性順位の組織の異常を検出することができそうである。しかしながら、正常あるいは異常な生理的環境下であらゆる組織細胞から分子の大きさが著しく異なる全ての酵素が一様に漏出することは考えられず、また単一の組織のみが障害を受けることも稀であり、血清酵素の活性レベルを変化せしめる起源組織が複数であれば前記の起源組織の検出はますます不確かなものになる。

組織の障害の程度が大となり、細胞の崩壊による酵素の遊出が生じている場合は細胞の内容物の全てあるいはその一部が究極的に血中に流入するわけであり、多くの種類の酵素が血清レベルで著しい増加を示すことになる。

上記の細胞膜透過性の亢進あるいは細胞の壊死によ

るものであれ、血清の電気泳動によるイソエンザイムのパターンから起源組織の推定も可能であるが、すべての酵素にイソエンザイムが見出されているわけではない。

また酵素の排泄機構の異常によって血中に逆流してくると考えられる酵素がある。ALP, LAP および  $\gamma$ -GTP は腎臓に活性が高く、腎障害ではその他の酵素と共に尿中に多く排出され、血清レベルに大きな変化はもたらさない<sup>6)</sup>。むしろこれらのものは、肝酵素として極めて活性は低いが毛細胆管付近に局在するため、閉塞性の胆管障害により胆汁中への排泄が阻止され血清レベルを高めると考えられている<sup>7)</sup>。

血清酵素の活性レベルの変動は前記の他に様々な要因があるが、それらすべての要因が組み合わさった結果であり、いずれにしても組織酵素の活性の順位を

考慮することは標的組織を推定する上で参考となり得るものと考えられる。

## 文 献

- 1) 武内忠男, 小川和郎: 新酵素組織学, (1982) 朝倉書店
- 2) 武内忠男, 清水信夫, 小川和郎: 酵素組織学, (昭和49年) 朝倉書店
- 3) 永津俊治, 永津郁子, 榊原俊平: 医学のあゆみ, 101, 679 (1977)
- 4) 市原 明, 白井昭雄: 代謝, 5, 94 (1968)
- 5) M. Dixon *et al.*: Enzymes, 3rd Ed., p. 634 (1979), Longman Group Ltd., London
- 6) 戸部満寿夫ら: 衛生試験報, 103, 51 (1985)
- 7) 織田敏次, 鈴木 宏, 山中正己: 代謝, 5, 125 (1968)

## ウコン (*Curcuma longa* L.) の栽培に関する研究 (第1報) 根茎収量とクルクミン類含量との品種間差異

葵 一八・鎚木紘一・関寅一郎・戸畑トモ子・佐竹元吉・黒柳正典\*

### Studies on the Cultivation of Turmeric (*Curcuma longa* L.) I Varietal Differences in Rhizome Yield and Curcuminoid Content

Kazuya AOI, Kōichi KABURAGI, Toraichiro SEKI, Tomoko TOBATA,  
Motoyoshi SATAKE and Masanori KUROYANAGI

To clarify the varietal differences in yield and curcuminoid content, four varieties of turmeric, *Curcuma longa* L., were investigated at Tanegashima Station of N.I.H.S. It was found that these varieties could be classified into two groups. One group contained two strains; Tanegashima and Rep. China which were characterized by large plant size and low content of curcuminoid in the rhizome. The other group contained two Indonesia strains which were of small size and had a high content of curcuminoid. A definite correlation was found between the size of the rhizome and the curcuminoid content.

(Received May 31, 1986)

ウコン (*Curcuma longa* L. = *C. domestica* Valetton) はインド東部原産<sup>1)</sup>で、ショウガ科の多年生草本であり、熱帯アジア・アフリカ・オーストラリアで広く栽培されている。本邦における栽培は1675年、麻布御薬園の栽培記録<sup>2)</sup>があり、鹿児島県下では、1866年吉野御薬園に植付けの記録<sup>3)</sup>がある。屋久島では、藩政時代から第二次大戦まで栽培されたという記録<sup>4)</sup>からみて、琉球を経て薩摩に伝播され、主に南西諸島では古くか

ら栽培されてきたものと推測している。

ウコン (日本薬局方外生薬規格、鬱金) は、芳香性健胃薬および天然着色料として利用されている。ウコンの需要量は近年増加してきたため、ウコンの良質・多収性の品種・系統を育成することが要求されている。

しかし、国内におけるウコン栽培が伸びない原因として、宮崎<sup>5)</sup>はわが国で栽培されている系統は、いずれも根茎断面の色が薄く、品質の劣ることを指摘している。

\* 静岡薬科大学

そこで、当場では数年前から、種子島で古くから栽培されているウコンと、入手し得た2, 3の外国産ウコン品種とを栽培し、その根茎収量とクルクミン類含量との品種間差異について比較試験を実施し、若干の知見を得たので報告する。

### 供試材料および試験方法

供試したウコンの4品種は、Table 1に示した。

供試圃場は、防風用雑木林に囲繞された場内の砂質壤土畑で、栽植密度は畦幅0.8m×株間0.3mで、1畦当たり33株として、1983年5月9日に植付けた。施肥量(kg/a)は、硫酸3.6、過磷酸石灰3.7、塩化カリ1.1、その他鶏糞30.0、油粕8.0、骨粉8.0、を全量基肥とし、追肥はしなかった。

調査項目は、草丈、葉数、葉鞘長、葉身長、葉幅長、1株出芽数および1次根茎重〔母根茎(植付け時の種イモ)から肥大分岐した根茎の重量)と2次根茎重(1次根茎から肥大分岐した根茎の重量)について調査した。

供試4品種についての根茎成分(クルクミン類)の含量は、1次と2次根茎とに分別して、それぞれについて成分定量を行った。

方法は、市販のウコンのメタノール抽出エキスから、

シリカゲルカラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより、curcumin, monodesmethoxycurcumin, didesmethoxycurcumin の3種類の化合物(Fig. 1)を単離して、標品として用いた。各標品の一定濃度の溶液を作り、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)における濃度とピークの高さとの関係を調べたところ(Fig. 2)、良好な直線関係が得られた。抽出方法は、各サンプルを約200mg精秤し、30mlのメタノールを加えて1時間加熱還流して、冷後ろ過、濃縮乾固して、この残渣をメタノールに溶かし、正確に10mlとして、これをHPLC用試験溶液とした。条件は、Fig. 2に示した。

HPLCはShowdexのC-18カラムを用い、溶媒はアセトニトリル-水-酢酸=10:10:1を用いて行った。

### 結果および考察

#### 1. 品種間の地上部の形質

供試品種の地上部の形質を比較すれば、Table 2に示すとおりである。

草丈、葉鞘長および葉身長の3形質の大きさは、種子島産>台湾産>インドネシア産>ジャワNo.2の傾向を示し、明らかに種子島産や台湾産のものは、インドネシアやジャワNo.2のものに比較して大型である。

Table 1. Introduction Records of Investigated Varieties

Strain Name of Variety	Collected Country	Collected Date	Collection Notes
Tanegashima	Tanegashima, Japan	Mar. 1978	Farmers' Field
Taiwan	Rep. China	Apr. 1979	Toho Farm
Indonesia	Indonesia	Apr. 1978	Market in Indonesia
Java No.2	Indonesia	Apr. 1971	Transported from Izu Stn. N.I.H.S.

Note: All varieties here were cultivated in Tanegashima station

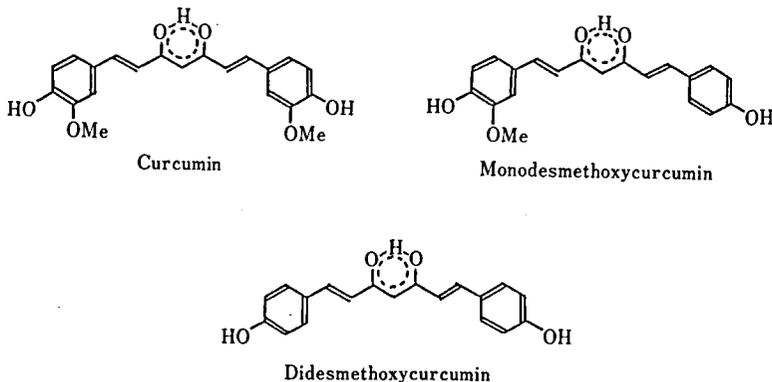
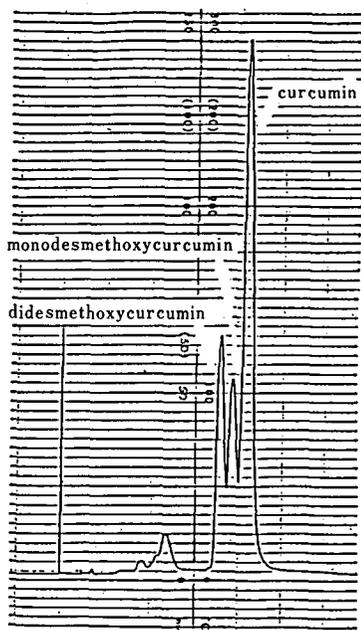


Fig. 1. Structure of Curcuminoid



HPLC condition:  
 column; Showdex ODSpak, 4.6 × 150 mm  
 solvent; CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O-AcOH=10:10:1  
 1.5 ml/min  
 ditect; 420 nm

Fig. 2. H. P. L. C. Chart of three curcuminoids of MeOH ext. from Turmeric

他の形質の葉数および1株出芽数は、全品種とも変動係数が大きいことからみて、環境要因に支配され易い形質であると思われた。しかし、葉幅長は全品種とも、20 cm 範囲で比較の変動係数も小さく、品種間には有意差は認められない。また、種子島産および台湾産は出穂するが、インドネシア産およびジャワ No. 2 は出穂が認められない。

一般に、ウコンは耐寒性が比較的強いので、降霜の少ない地域では容易に越冬する。当該における4品種の耐寒性<sup>6)</sup>には、若干の強弱はあるが、全品種とも生育、収量に悪影響を及ぼす程の差異は認められない。

## 2. 収量性

4品種の根茎収量は、Table 3 に示すとおりである。根茎収量(生)でみれば、種子島産および台湾産はm<sup>2</sup>当たり2.4~3.0 kg の範囲内の収量であるのに対し、インドネシア産およびジャワ No. 2 は1.5 kg 範囲の収量である。

また、1次根茎および2次根茎の風乾率は、種子島産および台湾産がインドネシア産およびジャワ No. 2 よりも、若干ながら高い傾向が認められた。すなわち、根茎収量(生)および風乾物収量とも、多収品種(種子島産・台湾産)と少収品種(インドネシア産・ジャワ No. 2)とに明らかに分別できる。

一方、1次および2次根茎のそれぞれの割合は、種子島産32.1:67.9, 台湾産31.1:68.9, インドネシア産61.4:38.6, ジャワ No. 2 60.0:40.0である。つまり、根茎収量(生)および風乾物収量とも、少収品種に属するインドネシア産およびジャワ No. 2 が、多収品種の種子島産および台湾産よりも、1次根茎の割合が約2倍比である。

また、根茎断面の色では、黄色系の種子島産および台湾産と、橙黄色系のインドネシア産およびジャワ No. 2 とに類別することができる。

## 3. 根茎成分

4品種の根茎成分含量は、Table 4 に示すとおりである。

この表からも明らかなように、1次根茎および2次根茎とも、3種類のクルクミン類の総含量には、1%水準で品種間に有意差が認められる。すなわち、高含

Table 2. Characteristics of Top among Four Varieties

	Tanegashima	Taiwan	Indonesia	Java No.2
Number	20	20	20	20
Plant Height, cm	176.9 ± 11.3* (6.4)**	165.6 ± 7.7 (4.7)	144.0 ± 6.6 (4.6)	131.6 ± 24.1 (18.3)
Number of Leaves, /Plant	15.7 ± 4.9 (31.4)	20.9 ± 7.0 (35.0)	24.3 ± 6.4 (26.1)	25.7 ± 4.2 (16.2)
Length of Leaf-sheath, cm	61.9 ± 7.2 (11.7)	54.5 ± 2.7 (4.9)	45.2 ± 2.3 (5.1)	41.5 ± 6.2 (14.8)
Length of Leaf-blade, cm	123.5 ± 6.2 (5.0)	112.8 ± 5.1 (0.8)	103.5 ± 6.3 (6.1)	93.8 ± 17.6 (18.8)
Width of Leaf-blade, cm	17.6 ± 1.4 (8.0)	16.8 ± 1.2 (6.9)	17.1 ± 1.4 (8.2)	16.2 ± 2.6 (15.9)
Number of Sprouted buds, /Plant	3.0 ± 2.0 (66.7)	3.0 ± 1.0 (33.3)	2.7 ± 0.6 (21.4)	3.0 ± 1.0 (33.3)

Note : \* mean ± S.D.

\*\* mean( ) : C.V.

Table 3. Differences in color and yield of rhizome

Variety	Inner Color of Rhizome	Fresh weight, Kg/m <sup>2</sup>		Dry Matter Percentage*	
		Pri. Rhizome	Sec. Rhizome	Pri. Rhizome	Sec. Rhizome
Tanegashima	Yellowish Red	0.77 <sup>Kg</sup>	1.64 <sup>Kg</sup>	19.02 <sup>%</sup>	18.00 <sup>%</sup>
Taiwan	Reddish Yellow	0.92	2.03	21.52	20.18
Indonesia	Yellowish Orange	1.09	0.68	18.00	14.58
Java No.2	Yellowish Orange	0.87	0.58	17.39	13.66

Note: \* Air dried

Table 4. Content of Curcuminoid in Variety of the Turmeric

Variety	Plant No.	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	Average	
Tanegashima	Pri. Rhizome	curcumin	0.90 %	0.59 %	0.52 %	0.43 %	0.18 %	0.52 %
		mo-des-MeO	0.58	0.47	0.46	0.26	0.14	0.38
		di-des-MeO	0.11	0.032	0.024	0.040	0.008	0.043
	Sec. Rhizome	curcumin	0.83	0.42	0.53	0.37	0.19	0.47
		mo-des-MeO	0.39	0.21	0.27	0.17	0.09	0.23
		di-des-MeO	0.069	0.016	0.020	0.033	0.006	0.029
Taiwan	Pri. Rhizome	curcumin	0.63	0.85	0.74	1.02	0.45	0.74
		mo-des-MeO	0.39	0.58	0.53	0.64	0.19	0.47
		di-des-MeO	0.066	0.063	0.058	0.081	0.022	0.058
	Sec. Rhizome	curcumin	0.80	0.73	0.83	0.70	0.56	0.72
		mo-des-MeO	0.38	0.38	0.36	0.26	0.25	0.33
		di-des-MeO	0.059	0.059	0.066	0.038	0.041	0.053
Indonesia	Pri. Rhizome	curcumin	5.46	6.26	6.22	6.38	4.66	5.80
		mo-des-MeO	2.48	3.24	3.12	2.94	2.28	2.81
		di-des-MeO	1.68	2.06	2.00	1.88	1.50	1.82
	Sec. Rhizome	curcumin	6.04	6.50	4.96	5.52	3.88	5.38
		mo-des-MeO	2.68	3.18	2.42	2.50	2.06	2.57
		di-des-MeO	1.58	1.72	1.32	1.30	1.24	1.43
Java No.2	Pri. Rhizome	curcumin	4.52	5.50	5.02	5.01	3.63	4.74
		mo-des-MeO	2.50	3.91	3.26	3.59	2.43	3.14
		di-des-MeO	1.76	1.23	1.55	1.61	1.07	1.44
	Sec. Rhizome	curcumin	4.26	4.07	4.88	5.15	3.81	4.43
		mo-des-MeO	2.50	2.85	3.19	3.26	2.49	2.86
		di-des-MeO	1.40	1.05	1.31	1.26	0.98	1.20

Note: the MeOH extract of Commercial Turmeric  
Curcumin : 2.20% mo-des-MeO : 1.20% di-des-MeO : 0.58%

Table 5. Classification of Investigated Varieties

Characteristic		Tanegashima	Taiwan	Indonesia	Java No.2
Plant Size	Plant Height	High	High	Fairy low	Low
	Length of Leaf sheath	Long	Fairly long	Short	Short
	Size of Leaf blade	Large	Fairly large	Fairly small	Small
	Size of Top	Large	Large	Fairly small	Small
Rhizome Yield	Total Yield	Fairly high	High	Low	Low
	Percentage of Pri. Rhizome	Low	Low	High	High
Inner Color of Rhizome		Yellowish Red	Reddish Yellow	Yellowish Orange	Yellowish Orange
Curcuminoid Content		Low	Low	High	High
Group		Low Curcumin Group		High Curcumin Group	

量品種（インドネシア産・ジャワ No. 2）と低含量品種（種子島産・台湾産）とに類別できる。また、クルクミン類の相対含量にも有意差を認めたが、各品種内の1次根茎と2次根茎とのクルクミン類総含量には、有意差は認められなかった。

一方、市販生薬のウコンの成分を定量したところ、クルクミンの含量は3.98%で、インドネシア産とジャワ No. 2 より、やや低い含量を示した。

### ま と め

ウコン (*Curcuma longa* L.=*C. domestica* Valetton) 4 品種間の根茎収量とクルクミン類含量とについて実験した結果を総括すれば、Table 5 に示すとおりのが明らかになった。

1. 地上部（草丈・葉鞘長・葉身長）の大きい種子島産および台湾産は、小さいインドネシア産およびジャワ No. 2 に比較して、根茎収量（生・風乾物）は大である。

2. しかし、根茎収量（生）中に占める1次根茎収量比は、インドネシア産およびジャワ No. 2 が種子島産および台湾産よりも大であることを認める。

3. 根茎断面の色は、黄色系の種子島産および台湾産と橙黄色系のインドネシア産およびジャワ No. 2 とに類別することができる。

4. 根茎中のクルクミン類総含量は、地上部、地下

部とも大きい種子島産および台湾産は、小さいインドネシア産およびジャワ No. 2 よりも著しく低含量であり、両者間には1%水準で有意差を認めた。

以上の諸結果から、地上部ならびに地下部のそれぞれの大きさと根茎成分含量に、系統間の差が認められる。

したがって、成分含量の高い品種は生薬原料として利用し、一方、根茎収量の高い品種は天然着色料として用いることが得策であると考えられる。

しかし、今後の試験研究の推進方向としては、根茎収量ならびにクルクミン類含量ともに高い品種の作出しないし、このような立場からの栽培法を確立することが緊要課題である。

### 文 献

- 1) W. Woodville: *Medical Botany*, 2, 362 (1742), London
- 2) 上田三平: 日本薬園史の研究, p. 34 (1972) 渡辺書店
- 3) 上田三平: 日本薬園史の研究, p. 167 (1972) 渡辺書店
- 4) 上尾久町郷土誌編集委員会: 上尾久町郷土誌, p. 33 (1984)
- 5) 日本公定書協会編: 新しい薬用植物栽培法, p. 49 (1980) 広川書店
- 6) 鍋木紘一, 葵 一八ほか: 日本作物学会九州支部会報, 51, p. 64 (1984)

## 国立衛生試験所リン酸ヒスタミン標準品 (Control 841)

木村俊夫・太田美矢子・田中 彰

### Histamine Phosphate Reference Standard (Control 841) of National Institute of Hygienic Sciences

Toshio KIMURA, Miyako OHTA and Akira TANAKA

“Histamine Phosphate Reference Standard (Control 841)” was prepared. The material of the Standard contains 99.4% of histamine phosphate when calculated from nitrogen content, and 5.58% of water which corresponds to 1 mol of crystalline water per mol of the material. Infrared spectrum and melting profile on heating (DSC) were the same as the former batch of the standard (Control 761). These results show that the material is suitable to serve as the reference standard for histamine phosphate.

(Received May 31, 1986)

本標準品は、主として各種の生物製剤中に含まれる恐れのある血圧下降性物質（ヒスタミン様物質）の試験に用いられている。第10改正日本薬局方では、注射用コルチコトロピンの中で使われていたが、同製剤が再評価の結果削除となったため、日本薬局方標準品からは除かれた。しかしながら今後も引き続き国立衛生試験所標準品として配布される。昭和51年に製造した第3回 (Control 761-767) 標準品の在庫がなくなったため、第4回 (Control 841) 標準品を製造したので報告する。

1. 標準品原料 東京化成工業株式会社の製品を購入した。

2. 試薬 アミノ酸分析用標準品としては宝興産株式会社製の標準アミノ酸混合溶液を用いた。その他は特級試薬を用いた。

#### 3. 装置および試験方法

1) 熱分析 島津 DT30 形微熱分析装置 SG30 形示差走査熱量計を付加したものをを用いた。試料は未乾燥のまま粉末とし、アルミニウム製セル中にクリンブールし、毎分 2°C で昇温して示差走査熱量 (DSC) 曲線を記録した。

2) 水分 平沼 AQ-1 形微量水分測定装置を用いた。試料は粉末とした後、約 30~40 mg を精密に量り、投入し、抽出時間10分、待ち時間20秒で測定した。

3) 赤外吸収スペクトル 日立 IR 270-30 形赤外吸収分光光度計を用い、臭化カリウム錠剤法により測定した。

4) アミノ酸分析 日立 835 形アミノ酸分析計を用いた。試料 40 mg を正確に量り、0.02N 塩酸に溶かし 10 ml とし、その 50  $\mu$ l (リン酸ヒスタミンとして 610 nmol) を注入した。標準溶液は、標準アミノ酸混合溶液を 0.02N 塩酸で希釈し、その 50  $\mu$ l (各アミノ酸 3 nmol、ただしプロリンは 6 nmol を含む) を注入した。

5) 窒素 コールマン 29 形窒素分析装置を用いて測定した。

#### 4. 試験成績

1) 性状 無色の結晶で、においはない。

2) 熱分析 DSC 曲線を Fig. 1 に示す。120°C 付近から徐々に分解し、128°C ではさらに激しく分解した。前回標準品 (Control 761) も同様の曲線を示した。なお、115°C 付近の吸熱ピークは、結晶水の揮散によるもので、USP あるいは BP における乾燥減量測定条件 (105°C, 6時間) では、結晶水は充分除かれなことがわかった。

3) 水分 5.58%であった。結晶水を 1 分子含むとすれば、理論値は 5.54% であり、測定値と一致した。

4) ヒスタジン アミノ酸分析計により測定した結果では、標準溶液の 200 倍の濃度までの範囲で全く検出されなかった。ヒスタジン以外にシスチンに相当するピークが検出されたが、0.05% 以下であった。

5) 赤外吸収スペクトル Fig. 2 にスペクトルを示す。前回の標準品 (Control 761) と比較するとき、各吸収は同一波長のところで認めた。

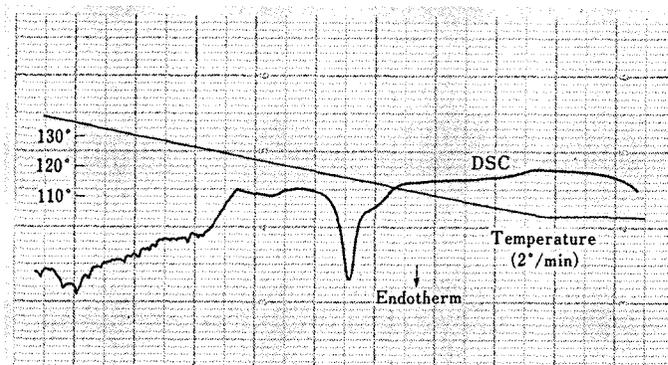


Fig. 1. DSC curve of the material for Histamine Phosphate Reference Standard (Control 841)

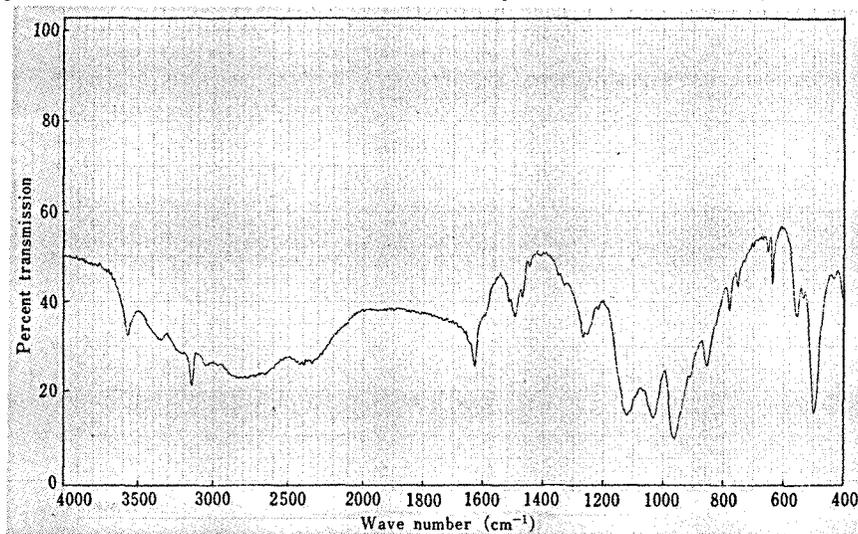


Fig. 2. Infrared spectrum of the material for Histamine Phosphate Reference Standard (Control 841)

6) 窒素 13.60% (n=4) であった。理論値 (13.68%) に対し 99.4% であった。

### 結 論

今回製造した第4回リン酸ヒスタミン標準品 (Control 841) は、不純物が少なく、水分量および窒素定量

値は理論値と良く一致した。また、DSC 曲線、赤外吸収スペクトルも前回標準品と良く一致したので、標準品として適当な品質を有するものと認め、84シリーズとして昭和60年8月から配布を開始した。

なお、本標準品 1 mg はヒスタミン塩基として 0.32 mg を含むことを表示した。

## 国立衛生試験所パラアミノベンゾイルグルタミン酸標準品 (Control 801)

太田美矢子・木村俊夫・田中 彰

Paraaminobenzoylglutamic Acid Reference Standard (Control 801)  
of National Institute of Hygienic Sciences

Miyako OHTA, Toshio KIMURA and Akira TANAKA

“Paraaminobenzoylglutamic Acid Reference Standard (control 801)” for the Japanese Pharmacopoeia was prepared. The following analytical data were obtained; loss on drying: 0.1%, optical rotation:  $[\alpha]_D^{25} + 29.1^\circ$ , melting point:  $173.3^\circ\text{C}$ , infrared spectrum: same as the Japanese Pharmacopoeia Standard (control 711), nitrogen: 10.4%, Thin-layer chromatography: no contaminant, assay: 100.6% by colorimetric method, 99.5% by UV method (273 nm) and 100.3% by titrimetry. On the basis of these results, this material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard (control 801).

(Received May 31, 1986)

第11改正日本薬局方 (JPXI) 葉酸の純度試験中の遊離アミンの定量に用いる国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) “パラアミノベンゾイルグルタミン酸標準品” (Control 801) を製造したので報告する。

1. 標準品原料 武田薬品工業株式会社より購入した (JPRS-M)。

2. 参照物質および試薬 日本薬局方標準品 (Control 711, JPRS), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板はメルク社製プレコートッドシリカゲル 60F 254 を用いた。

3. 装置 島津 QV-50 型分光光度計, 日立 557 型二波長分光光度計, 堀場 SEPA-200 型高速旋光光度計, 日立 270-30 型赤外分光光度計, コールマン 29 型窒素分析計, 平沼 レポートティング タイトレータ COM-TITE-7 型を用いた。

4. 試験方法 特に記すものの他は, JPXI 一般試験法を準用した。中和滴定法の終点は電位差法により決定した。

1) 薄層クロマトグラフ法: JPRS-M および JPRS を乾燥し, その約 50 mg を精密に量り, メタノールを加えて溶かし, 正確に 10 ml とする。この液 30  $\mu\text{l}$  ずつを薄層板にスポットする。次に, 無水エタノール・*n*-プロパノール・強アンモニア水混液 (1:2:2) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後, 薄層板を風乾する。短波長紫外線 (254 nm) を照射し検出する。

2) 窒素: JPRS-M 約 7 mg を精密に量りアルミポットに入れ, 窒素分析計にて窒素の定量を行なう。

3) 吸光度法: JPRS-M および JPRS を乾燥後約

16 mg を精密に量り, 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えて溶かし正確に 200 ml とする。この液 5 ml ずつを正確に量り, 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で 50 ml とし, 273 nm における吸光度を測定し定量する。

4) 比色法: JPRS-M および JPRS を乾燥後約 10 mg を精密に量り, 薄めたエタノール (2 $\rightarrow$ 5) に溶かし正確に 100 ml とする。この液 5 ml ずつを正確に量り, 水を加えて正確に 50 ml とした液 4 ml ずつを正確に量り, それぞれに水 1 ml, 希塩酸 1 ml および亜硝酸ナトリウム溶液 (1 $\rightarrow$ 1000) 1 ml を加え, 混和した後 2 分間放置する。次にスルファミン酸アンモニウム溶液 (1 $\rightarrow$ 200) 1 ml を加え混和後 2 分間放置した後, シュウ酸-N-(1ナフチル)-N'-ジエチルエチレンジアミン溶液 (1 $\rightarrow$ 1000) 1 ml ずつを加え振り混ぜながら 10 分間放置し, 水を加えて正確に 20 ml とする。これらの液の波長 550 nm における吸光度を測定し定量する。

## 5. 試験成績

1) 性状: 白色の結晶性粉末で, においはない。

2) 乾燥減量: 0.1% (1 g,  $105^\circ\text{C}$ , 2 時間)

3) 旋光度:  $[\alpha]_D^{25} = +29.1^\circ$  (0.5 g, 2 N 水酸化ナトリウム溶液, 10 ml, 100 mm)

4) 融点:  $173.3^\circ\text{C}$  ( $n=7$ , 変動係数 0.20%), なお, JPRS は  $173.7^\circ\text{C}$  ( $n=7$ , 変動係数 0.20%) であった。

5) 溶状: JPRS-M 0.5 g をエタノール 100 ml に溶かすとき, 無色澄明であった。

6) 赤外吸収スペクトル: KBr 錠剤法で測定した JPRS-M の赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。こ

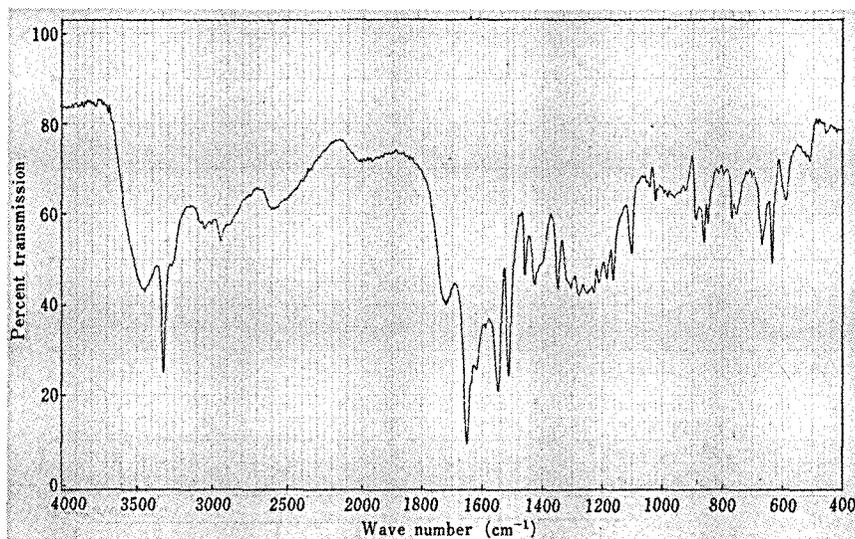


Fig. 1. Infrared Spectrum of the Material for Paraaminobenzoylglutamic Acid Reference Standard (Control 801)

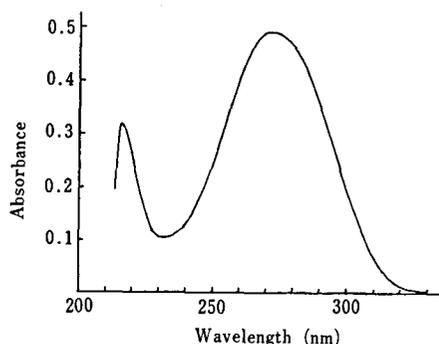


Fig. 2. Ultraviolet Spectrum of the Material for Paraaminobenzoylglutamic Acid Reference Standard (Control 801)

れを JPRS のスペクトルと比較するとき、両者の吸収は同一波数のところで認め、それらの吸収強度は等しかった。

7) 紫外吸収スペクトル: JPRS-M の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示す。極大波長は 273 nm であった。

8) 窒素: 10.4% (n=3, 変動係数 0.49%, 理論値 10.25%)

9) 薄層クロマトグラフ法: Fig. 3 に示すように、主スポットのみで不純物スポットは認めなかった。

10) 定量: JPRS-M は比色法, 吸光度法および中和滴定法により定量を行うとき、それぞれ 100.6% (n=8, 変動係数 0.88%), 99.5% (n=6, 変動係数 0.49%) および 100.3% (n=6, 変動係数 0.35%) で

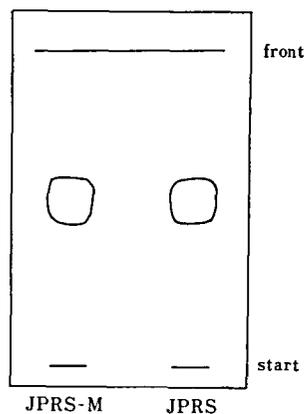


Fig. 3. Thin-layer Chromatogram of Paraaminobenzoylglutamic Acid

Conditions; TLC plate: silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, precoated, 0.25 mm), developing solvent: a mixture of dehydrated ethanol, n-propanol and strong ammonia water (1:2:2), detected under UV light (254 nm), applied amount: 150 μg.

JPRS-M: material for paraaminobenzoylglutamic acid, JPRS: Japanese pharmacopoeia standard (control 711)

あった。ただし、比色法および吸光度法は JPRS を 100% としたときの値である。

## 結 論

標準品原料として入手したパラアミノベンゾイルグ

ルタミン酸を日本薬局方標準品 (Control 711) と比較検討した。その結果、薄層クロマトグラフ法では原料中に不純物は認められず、その定量値は標準品と良く一致し、その他の測定結果も良好であった。これらの結果より、今回入手した標準品原料は国立衛生試験所

標準品 (日本薬局方標準品) に適した品質を有することを認め、Control 801 として配布を開始した。

終りに、標準品の製造にあたり協力いただいた武田薬品工業株式会社に感謝いたします。

## 国立衛生試験所マレイン酸エルゴメトリン標準品 (Control 851)

徳永裕司・木村俊夫・田中 彰

### Ergometrine Maleate Reference Standard (Control 851) of National Institute of Hygienic Sciences

Hiroshi TOKUNAGA, Toshio KIMURA and Akira TANAKA

Ergometrine maleate was tested for the preparation of an "Ergometrine Maleate Reference Standard." Analytical data obtained were as follows; loss on drying: 0.67%, optical rotation:  $[\alpha]_D^{20} = +52.5^\circ$ , melting point: 188.1°C (decomposition), infrared spectrum: same as Ergometrine Maleate International Chemical Reference Substance, thin-layer chromatography: two contaminants, assay: 100.5% by UV absorption method, 100.8% by colorimetry, 99.6% by non-aqueous titrimetry, and 100.8% by high-performance liquid chromatography.

This material was authorized as the Japanese Pharmacopoeia Standard.

(Received May 31, 1986)

第十一改正日本薬局方 (JPXI) マレイン酸エルゴメトリンの純度試験、定量法、同錠の含量均一性試験、定量法、および同注射液の定量法、JPXI マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法および同錠の含量均一性試験、定量法に用いる国立衛生試験所標準品 (日本薬局方標準品) "マレイン酸エルゴメトリン標準品 (Control 851) を製造したので報告する。

1. 原料 サンド薬品株式会社より購入した。

2. 参照物質および試薬 国際化学参照物質 (Control 277012), 日本薬局方標準品 (Control 755), 試薬は試薬特級品を用いた。薄層板は、薄層クロマトグラフ用シリカゲルおよび水酸化ナトリウム試薬を用いて調製した。

3. 装置 島津 QV-50 型分光光度計, 日立 270-30 型赤外分光光度計, 平沼 COMTITE-7 型自動滴定装置, および日立 638-41 型波長可変 UV モニター, 島津 C-R1B 型クロマトパックを用いた。

4. 試験方法 特に記すもののはかには、JPX の一般試験法および医薬品各条 "マレイン酸エルゴメトリン" の試験法を準用した。

i) 薄層クロマトグラフ法：原料、国立衛生試験所

標準品 (JP), および国際化学参照物質 (ICRS) を乾燥し、その約 5 mg を精密に量り、メタノール 1.0 ml に溶解する。各溶液 40  $\mu$ l ずつを 1 cm の巾にスポットした後、風乾する。クロロホルム・メタノール混液 (4:1) を展開溶媒として、約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに p-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を均等に噴霧し、赤紫色のスポットを観察する。

ii) 非水滴定法：本品を乾燥し、その約 0.04 g を精密に量り、非水滴定用水酢酸 50 ml を加え、溶かす。0.01 N 過塩素酸で滴定する (電位差滴定)。同様の方法で空試験を行い補正する。

0.01 N 過塩素酸 1 ml = 4.415 mg  $C_{19}H_{23}N_3O_2 \cdot C_4H_4O_4$

iii) 紫外吸収測定 (UV) 法：本品および ICRS を乾燥し、その約 20 mg を精密に量り、水を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。この液 10 ml を正確に量り、水にて正確に 100 ml とし、試料溶液および標準溶液とする。この液につき、312 nm における吸光度  $A_T$  および  $A_s$  を測定する。

マレイン酸エルゴメトリンの量 (mg) = 標準品の量

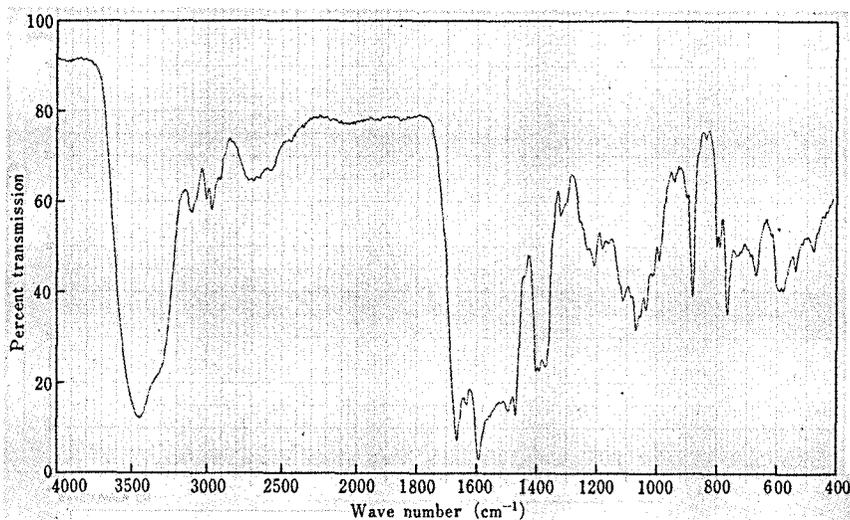


Fig. 1. Infrared spectrum of the material for Ergometrine Maleate Reference Standard

(mg)  $\times$  Ar/As

iv) 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法: 測定条件—カラム, Unisil C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m), 250  $\times$  4 mm i.d.; 移動相, 0.5 mM トリエチルアミン含有のアセトニトリル・50 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 混液 (1:1); 流量, 1 ml/分; 検出波長, 254 nm; カラム温度, 30°C; 検出感度, 0.16 AUFS.

操作法—本品および ICRS を乾燥し, その約 20 mg を精密に量り, 水を加えて溶かし, 正確に 100 ml とする. この液, それぞれ, 5.0 ml に内標準溶液 (17  $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン 20 mg をメタノール 100 ml に溶解する) 2.5 ml を加え, メタノールにて正確に 10 ml とし, 試料溶液および標準溶液とする. 試料溶液および標準溶液 10  $\mu$ l を HPLC カラムに注入し, ピーク面積比  $Q_T$  および  $Q_S$  を求める.

マレイン酸エルゴメトリンの量 (mg) = 標準品の量 (mg)  $\times$   $Q_T/Q_S$

### 5. 試験結果

- i) 性状: 白色の粉末で, においはない.
- ii) 乾燥減量: 0.67% (0.2 g, シリカゲル, 4 時間).
- iii) 旋光度:  $[\alpha]_D^{20} = +52.5^\circ$ .
- iv) 融点: 188.1°C (分解).
- v) 赤外吸収スペクトル: Fig. 1 に示すとうり, ICRS と同一のスペクトルを示す.
- vi) 薄層クロマトグラフ法: Fig. 2 に示すように, 2 個の不純物のスポットを観察した.
- vii) 定量: UV 法—100.5%, 比色定量法—100.8%,

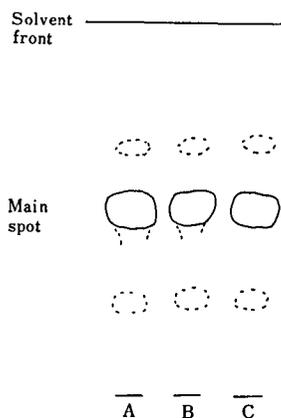


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of ergometrine maleate

A: material 200  $\mu$ g, B: Japanese Pharmacopoeia Standard 200  $\mu$ g, C: International Chemical Reference Substance 200  $\mu$ g.

非水滴定法—99.6%, HPLC 法—100.8%.

### 結 論

標準品原料として入手したマレイン酸エルゴメトリンを国際化学参照物質と比較検討した. 薄層クロマトグラフ法により, 原料中には, 2 個の不純物が検出され, UV 法, 比色定量法, 非水滴定法, および HPLC 法による定量値は, それぞれ, 100.5, 100.8, 99.6, および 100.8% であった. その他の測定結果より, 今回入手した標準品原料は国立試験所標準品 (日本薬局

方標準品)に適した品質を有することを認めた。  
終りに、標準品の製造にあたり協力いただいたサン

ド薬品株式会社に感謝いたします。

## 天然有害物質に関する研究（第3報） 高速液体クロマトグラフィーによる棉実中のゴシポールの定量

鈴木英世・近藤龍雄・内山 充・原田正敏

### Studies on Naturally Occurring Toxic Substances (III) Determination of Gossypol in Seed Kernels of Cotton Plants by High Performance Liquid Chromatography

Hideyo SUZUKI, Tatsuo KONDO, Mitsuru UCHIYAMA  
and Masatoshi HARADA

Nomeir *et al.*'s determination method of gossypol in cottons by high performance liquid chromatography was modified, especially in the point of extraction and applied to glanded and glandless as well as to prepared cottonseed kernels. As compared to the glanded material, the latter two showed a very low concentration of gossypol as expected.

(Received May 31, 1986)

棉実は従来、脂肪油を抽出して石けん原料や食用油とされてきたが、最近になってそれに含まれるたんぱく質を有効に利用しようとする試みが頻繁に行われている。棉実には黄色のビスセステルベンであるゴシポール (1, 1', 6, 6', 7, 7'-hexahydroxy-5, 5'-diisopropyl-3, 3'-dimethyl [2, 2'-binaphthalene]-8, 8'-dicarboxaldehyde) (Fig. 1) が含まれている。

ゴシポールについては、最近中国で避妊の目的に使用された報告がある<sup>1)</sup>。それによると同国の4,000人以上の成人男子を対象に与えて、99.89%の避妊効果が確かめられたが、そのメカニズムは精子形成を妨げることによるといわれている。このようなゴシポールによる不妊作用の問題や各種毒性の問題について、広範な生物学的研究が現在活発に行われている。

一方、棉実の他の成分を利用することから考えると、ゴシポールの混在は好ましくないことになり、このため、ゴシポールがアルカリ溶液に溶けやすく、また熱により分解されやすいという性質を利用してゴシポー

ルを棉実から除く処理が実用上行われている。また、ゴシポールは主に種子の色素腺に存在するので、品種改良により種子の色素腺を無くし、ゴシポールを含まない棉 (*Gossypium* 属植物) の作出も行われている。

そこで我々は、棉実のうち腺の有無、調製処理の有無によってゴシポール含量がどの程度変化するかを知る目的で以下の定量実験を実施した。

### 実験方法

棉実からのゴシポールの抽出は、最近よく引用される簡便な Nomeir らの高速液体クロマトグラフ法<sup>2)</sup>に準じて行うことにした。

#### 1. 試料

昭和58年11月厚生省食品衛生課 (59年7月に食品保健課に改組改称) より依頼のあった米国产棉実4検体を用いた。

A: リンター (長繊維) 付きで腺がある棉種子 (種子部97%+繊維3%の重量組成)

B: 腺あり生棉実

C: 腺なし生棉実

D: 腺なし炒り棉実

#### 2. 試薬・器具

1) ゴシポール: Sigma 社製 ゴシポール-酢酸 (ゴシポール含量 89.6%)。

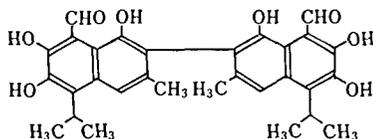


Fig. 1. Structure of gossypol

2) ゴンポール標準原液：ゴンポール-酢酸 11.2 mg をアセトニトリルに溶解して 100 ml とした (ゴンポール 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

3) ゴンポール標準溶液：ゴンポール標準原液を適宜アセトニトリルで希釈して用いた。

4) 混合抽出溶媒：95%エタノール 715 ml, 水 285 ml, エチルエーテル 200 ml, 酢酸 0.2 ml を混合したもの。

5) セライト：和光純薬(株)製 No. 545 を用いた。

6) ミリポアフィルター：Millipore 社製ポアサイズ 0.45  $\mu\text{m}$ 。

7) ミキサー：松下電気産業(株)製職業用ミキサー MX-120 S。

8) ホモジナイザー：ワーリングブレンダー型の日本精機製作所(株)製ユニバーサルホモジナイザーを用いた。

### 3. 高速液体クロマトグラフィー

本体は Varian 社製 5000 型高速液体クロマトグラフを用い、検出器は日立製作所(株)製波長可変流動光度計を用いた。カラム： $\mu\text{Bondapak C}_{18}$  (長さ 30 cm  $\times$  直径 4 mm, Waters 社製)。カラム注入量；5  $\mu\text{l}$ 。移動相；メタノール・水 (9 : 1) の混液にリン酸を 0.1% 溶かしたもの。流速；1.0 ml/min。感度；0.04 AUFS。測定；波長 254 nm で検出されるゴンポールのピーク高を測り、絶対検量線法でその含量を求めた。

### 4. 抽出・試験溶液の調製

試料をミキサーで粉砕して粗切粉末とした。その粉末 1 g とセライト 2 g と混合抽出溶媒 50 ml をカップにとり、これをあらかじめ外側を氷水で冷やしたホモジナイザーにセットして 4 分間ホモジナイズした。ホモジネートをガラスフィルター (3G3) 中にあげ吸引ろ過した。フィルター上の残渣はさらに混合抽出溶媒で洗浄ろ過し、ろ液量を 50 ml とした (吸引で溶媒は揮散しやすいので追加洗浄ができる)。この残渣をカップに移し、先と全く同様な抽出をさらに 3 度繰り返した。合わせた全ろ液 (200 ml) の一部をミリポアフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィー用試験溶液とした。

## 結果および考察

### 1. 抽出について

棉実粉末 1 g に添加したゴンポール-酢酸 5 mg は 1 回だけの抽出で 94.0% が回収されるが、棉実粉末だけの抽出では Fig. 2 に示したように抽出操作を繰り返すとさらにゴンポールが抽出され、4 回操作まで続いた。従って、抽出回数は 4 回とした。棉実中のゴン

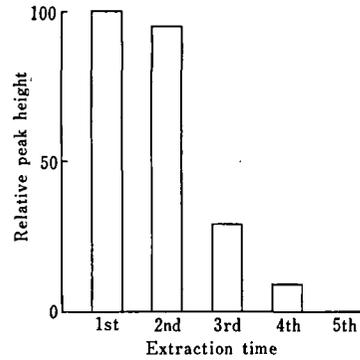


Fig. 2. Relation between extraction time and recovery of gossypol

The peak height produced by injection of the test solution at the 1st extraction is taken as 100.

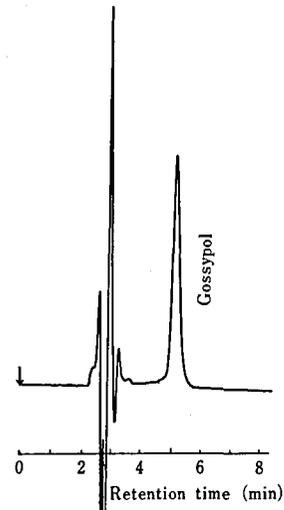


Fig. 3. High performance liquid chromatogram of test solution of glanded cottonseed kernels

Chromatographic condition: Column;  $\mu\text{Bondapak C}_{18}$  (length 30 cm  $\times$   $\phi$  4 mm), Mobile Phase; 0.1% phosphoric acid in mixed soln. of methanol and water (9:1), Flow rate; 1.0 ml/min, Detection; 254 nm.

ポールは遊離型のものとしてリン脂質などについた結合型のものがある<sup>3)</sup>が、今回の抽出で用いた溶媒は、Smith の比色法<sup>4-5)</sup>で遊離型のゴンポールの抽出に用いられているものと同じであり、しかも氷冷条件下での抽出であるので本試験法では遊離型を測定していることになる。今回は、結合型ものは問題にできなかったが、今後は、結合型の存在形態とその生物活性の研究さらに、その定量研究が重要と考えられる。

Table 1. Contents of gossypol in cottonseed kernels

Sample	Content (%)
A Undelinted glanded cottonseed*	0.042
(Linter)	0.018
(Seed)	0.043
B Raw glanded cottonseed kernels	0.44
C Raw glandless cottonseed kernels	0.007
D Roasted glandless cottonseed kernels	0.005

\*Weight ratio of linter and seed: 3% + 97%

## 2. クロマトグラフィーについて

棉実中のゴシポールを測定した実例を Fig. 3 に示した。ゴシポール最大吸収波長は 235 nm 付近であったが、低波長領域での妨害を考慮にいれ、254 nm で測定した。この波長ではゴシポール以外に主要ピークの出現はなかった。本測定での検出限界は、注入量 5  $\mu$ l のときゴシポール含量 0.004% であり、注入量 20  $\mu$ l のときは 0.001% であった。

## 3. 試験結果

各種タイプの棉実について本定量法を適用してゴシポールを測定した結果を Table 1 に一覧した。腺付きのものには最高 0.44% 含まれていた。腺なしのものや腺なし炒り棉実にも少量のゴシポールが含まれていた。なお試料 A は腺付きの表示であったが、その縦断切片には色素腺を肉眼上ほとんど認めなかった。

## ま と め

棉実中のゴシポールの定量を高速液体クロマトグラ

フ法により行った。操作は Nomeir らの方法を参考にし、主として抽出法に改良を加えた。対象とした試料は、色素腺付きのもの、色素腺のないもの、炒り処理のものを用いた。腺のないものや処理済みのものは、腺付きのものに比べゴシポールの含量は少なかった。

最後に、本研究を実施するに当たり、厚生科学研究費の助成を受けた。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) National Coordinating Group on Male Antifertility Agents: *Chinese Med. J.*, **4**, 417 (1978)
- 2) A. A. Nomeir, M. B. Abou-Domia: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 546 (1982)
- 3) L. C. Berardi, L. A. Goldblatt: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, Second Edition, Chapter 7, p. 183 (1980), Academic Press, Inc.
- 4) F. H. Smith: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 267 (1966)
- 5) F. H. Smith: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 903 (1968)

マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第13報)  
食用油中の Aflatoxin B<sub>1</sub> について

五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生

Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XIII)  
Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Edible Oil

Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO

A survey of the contamination of edible oils by aflatoxin B<sub>1</sub> and the removal of aflatoxin B<sub>1</sub> during oil-refining processes was carried out. Aflatoxin B<sub>1</sub> in edible oils can be determined by the Japanese official method for analysis of aflatoxins (Kanshoku No 128). The recovery rate of aflatoxin B<sub>1</sub> spiked to oils was from 96 to 100%. In the case of sesame oil, however, this could not be determined due to the presence of oily residues. After refining the crude oils spiked with aflatoxin B<sub>1</sub>, no detectable aflatoxins remained in the edible oils. Aflatoxins were not detected in 11 kinds of retailed edible oils.

(Received May 31, 1986)

1984年10月21日付毎日新聞の記事に掲載された「食用油から禁止のかび毒-最強発がん物質 Aflatoxin B<sub>1</sub>-」に端を発し、食用調合油中の aflatoxin B<sub>1</sub> の有無の確認が必要となった。そこで市販の調合油を用いて Aflatoxin B<sub>1</sub> の分析法を検討した。さらに食用調合油の精製工程中の減衰を追跡し、市販調合油中の Aflatoxin B<sub>1</sub> を定量した。

## 実験方法

### 1. 試料

添加回収実験用として市販のS社製食用調合油(食用菜種油, 食用大豆油, 食用とうもろこし油), N社製食用調合油(食用ひまわり油, 食用とうもろこし油, 食用綿実油), 調合ごま油および食用オリーブ油(原産国, イタリア)と, これら各食用油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液 10 ppb と 20 ppb を添加した試料。

市販のN社製ヤン油と, この油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液 100 ppb を添加した試料。

精製大豆油(日本油脂協会提供)と精製大豆油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 0.01, 0.1, 1.0 および 100 ppb 添加した試料。

以上のほか市販のA社製大豆油, 菜種油およびとうもろこし油, N社製大豆油および綿実油, S社製とうもろこし油およびピーナツ精製油をそのまま調査試料とした。

精製工程中の減衰実験用として粗原油, 脱ガム油,

脱酸油および脱色油(日本油脂協会提供)に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 100 ppb 添加した試料。

### 2. 試薬・試液

試薬および有機溶媒類: 市販の試薬特級品を使用。ただしクロロホルムのみは用時蒸留して使用。

薄層板: HPTLC plates, silica gel 60, 10×10 cm (Merck) Art 5631。

Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液: メタノール 1 ml に Aflatoxin B<sub>1</sub> が 10 μg 含まれるように調整。

### 3. 装置

#### 3.1 TLC

Schoffel Spectrodensitometer SD-3000。

TLC スポット用装置: 自家製。

#### 3.2 HPLC

ポンプ: 日立655形。

検出器: UV・日立655型, 蛍光・日立650-10型。

#### 3.3 イムノアッセイ (ELISA)

コロナ2波長マイクロプレート光度計 (MTP-22)。

### 4. 実験操作

4.1 公定法(厚生省通達環食第128号)に従い, 試料油 10 g を 300 ml の分液ロートにはかり採り, メタノール-1%食塩液 (55-45) 200 ml とヘキサソール 100 ml を加え20分間激しく振とうする。分離したヘキサソール層はさらにメタノール-食塩液 (55-45) 50 ml を加え10分間振とうする。メタノール層は先のメタノール-食塩液と合わせる。メタノール-食塩液はクロロホルム

50, 30, 20 ml にて3回抽出する。抽出液は無水硫酸ナトリウム 10 g で脱水後減圧で濃縮し、TLC または HPLC 用の検液とする。TLC あるいは HPLC において多くの妨害物質を認め定量が困難な場合は、カラムクロマトグラフィー(1)を行う。

4.2 試料油 10 g を 100 ml のビーカーにはかり採り、クロロホルム約 30 ml に溶解させカラムクロマトグラフィー(2)を行う。

溶離液は減圧下で約 1 ml に濃縮し 5 ml のバイアル瓶に移した後、濃縮乾固させる。残渣にトリフルオロ酢酸 (TFA) 100  $\mu$ l と水 100  $\mu$ l を加え 50°C で 30 分間加熱後溶媒を除き、水-メタノール-アセトニトリル (75-30-20) 100  $\mu$ l に溶解し HPLC 用の検液とする。

#### 4.3 カラムクロマトグラフィー (1)

厚生省通達環食第128号の方法に準ずる。

#### 4.4 カラムクロマトグラフィー (2)

内径 10 mm のガラス製カラム管に、ガラス綿、無水硫酸ナトリウム 3 g, Florisil (100~200 mesh) 10 g, 無水硫酸ナトリウム 1 g の順にクロロホルムを用いて湿式充填によりカラムを作成する。

試料油をカラム管にクロロホルムで洗い込み暫時カラム管に保持された後、クロロホルム-ヘキサン (1-1) 30 ml, クロロホルム-メタノール (9-1) 20 ml の順で毎分 2~2.5 ml の流速でカラム内を洗浄する。次に溶離液にアセトン-水 (99-1) を用い毎分 1.5 ml の流速で Aflatoxin B<sub>1</sub> を溶出させる。

#### 4.5 薄層クロマトグラフィーの条件

水を入れたコンディショントレー中に30分間保存した薄層板を使用。

展開溶媒:

- 1) クロロホルム-アセトン-*n*-ヘキサン(85-15-20)
- 2) クロロホルム-アセトン-イソプロパノール(85-12.5-5)

#### 3) エーテル-メタノール-水(96-3-1)

2. に示す薄層板 2 枚を水を入れたコンディショントレー中に30分間保存させた後、2 枚の薄層板にそれぞれ 4.1 または 4.2 で調整した TLC 用検液を左端にスポットし、右端に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液をスポットし、展開溶媒 1) で 8 cm 程度一次展開させる。展開終了後、薄層板を反時計方向に 90° 転回し薄層板の右端に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液をスポットして展開溶媒 3) で 8 cm 展開させる。別の 1 枚の薄層板は一次展開した後反時計方向に 90° 転回し、薄層板の右端に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 2 個スポットし、その 1 個のスポットと、検液を展開して得られた Aflatoxin B<sub>1</sub> と同一 R<sub>f</sub> 値付近にトリフルオロ酢酸 (TFA) を重ねてスポットし、

Millititer GV with 96 wells

BSA-0.02M Na-P(PH 7.4)70  $\mu$ l

anti Af B<sub>1</sub> IgG in 0.1%BSA-0.02M Na-P 20  $\mu$ l

Sample in MeOH or buffer

store for 1 hr at room temp.

Af B<sub>1</sub>-POD 50  $\mu$ l

store for 1 hr

goat anti rabbit IgG beads 100  $\mu$ l

store for 1 hr

aspirate

wash with 0.05% tween 20-PBS(-)

OPD reagent 100  $\mu$ l

store for 10 min at room temp.

5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l

transfer to another plate

read at 500nm

Fig. 1. Enzyme immunoassay procedure for the determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>

展開溶媒 2) で展開させる。

#### 4.6 高速液体クロマトグラフィー条件

##### 4.6 a) カラム: $\mu$ -polasil 4 mm $\phi$ × 25 cm

移動相: クロロホルム-シクロヘキサン-アセトニトリル-イソプロパノール (75-22.5-3-15)

検出波長: UV 360 nm, 蛍光 Ex 365 nm, Em 425 nm

##### 4.6 b) カラム: $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>

移動相: 水-メタノール-アセトニトリル(75-30-20)

検出波長: 蛍光 Ex 366 nm, Em 431 nm

#### 4.7 EIA 条件

上野ら<sup>1)</sup>の方法に従い Fig. 1 のとおり行った。

## 実験結果

### 1. 添加回収

1.1 市販のサラダ油およびオリーブ油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 10 ppb と 20 ppb, ヤシ油に 100 ppb 添加した試料を 4.1 に従い分析した結果, Table 1 に示すとおり Aflatoxin B<sub>1</sub> は 84~100% 回収された。使用したサラダ油とオリーブ油からは Aflatoxin B<sub>1</sub> は検出

Table 1. Recoveries of Aflatoxin B<sub>1</sub> added to several kinds of edible oils

	Aflatoxin B <sub>1</sub> (%)							
	Method							
	4-1				4-2			
	added (ppb)				added (ppb)			
	0	10	20		0	0.01	0.1	1.0
Salad oil (S)	n. d.*1	95	95	Soybean oil	n. d.	100	90	98
Salad oil (N)	n. d.	100	95					
Sesame oil (N)	*2	*2	*2					
Olive oil (N)	n. d.	84	90					
Coconut oil (N)	n. d.		97*3					

\*1 Detection limit by TLC: 1 ppb.

\*2 Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> was interfered by residual oil.

\*3 Addition level: 100 ppb.

されなかった。ゴマ油はクロロホルム抽出液の濃縮時に油状の残渣が残り、本方法では分析できなかった。

1.2 精製大豆油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 0.01, 0.1, 1.0 ppb 添加し 4.2 に従い分析したところ、Aflatoxin B<sub>1</sub> の回収率は Table 1 のとおりであった。

1.3 市販の大豆油、菜種油ととうもろこし油を 4.2 に準じて分析したところ、いずれの検体からも Aflatoxin B<sub>1</sub> は検出されなかった (Table 2)。

検出限界: 0.01 ppb

## 2. 油脂の精製と Aflatoxin B<sub>1</sub>

油脂精製工程における Aflatoxin B<sub>1</sub> の減衰を調査する目的で二通りの実験を行った。なお、本課題はすでに油脂業界においては JAOCs など<sup>2,3)</sup> で報告されているが、確認のため行ったものである。

2.1 粗原油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液 100 ppb を添加し各精製工程後の Aflatoxin B<sub>1</sub> の残存量を定量した。全工程終了後、Aflatoxin B<sub>1</sub> は Table 3 に示すごとく検出されなかった。

検出限界: 0.01 ppb

2.2 油脂の精製における各精製工程ごとの Afla-

Table 2. Results of the surveillance of Aflatoxin B<sub>1</sub> contamination in retailed edible oils

Kind of oil	Aflatoxin B <sub>1</sub> contamination (ppb)	Analytical method
Salad oil (S)	n. d.*1	4-1
Salad oil (N)	n. d.	4-1
Sesame oil (N)	n. d.	4-1
Olive oil (N)	n. d.	4-1
Soybean oil (A)	n. d.	4-2
Soybean oil (N)	n. d.	4-2
Rapeseed oil (A)	n. d.	4-2
Corn oil (A)	n. d.	4-2
Corn oil (S)		
Cottonseed oil (N)	n. d.	4-2
Peanut oil (S)	n. d.	4-2
Purified soybean oil*2	n. d.	4-2

\*1 Detection limit: 0.01 ppb.

\*2 Offered from Japan Oil Association.

Table 3. Residual amounts of Aflatoxin B<sub>1</sub> spiked to crude oil in oil-refining processes

Oil-refining process	Residual amounts of Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)	Reduction ratio (%)	Remark
Crude oil*1 + Af B <sub>1</sub> 100 ppb			
Degumming process	n. d.*2	100	Removal of phospholipid
Neutralizing process	n. d.	100	Removal of free fatty acids
Decolorizing process	n. d.	100	Removal of colorings
Deodorizing process	n. d.	100	Removal of organic components

\*1 Crude oil: Soybean oil and Coconut oil.

\*2 Detection limit: 0.01 ppb.

Table 4. Effect of each oil-refining process on decontamination of Aflatoxin B<sub>1</sub>

Oil-refining process	Residual amounts of Aflatoxin B <sub>1</sub> (ppb)	Reduction ratio (%)	Acid value (%)	Water contents (%)	Phospholipid (%)
Crude oil*1			1.4	0.05	1.9
Crude oil + Af B <sub>1</sub> 100 ppb	75	25	0.61	0.07	0.4
Af B <sub>1</sub> 100 ppb →					
oil + Af B <sub>1</sub> 100 ppb	0.17	99.83	0.04	0.05	3.0~3.5*2
Af B <sub>1</sub> 100 ppb →					
Neutralized oil + Af B <sub>1</sub> 100 ppb	n. d.	100	0.08	0.03	1.6~16*3
Af B <sub>1</sub> 100 ppb →					
Decolorized oil + Af B <sub>1</sub> 100 ppb	94	6	0.10	0.2	0.2~2
Af B <sub>1</sub> 100 ppb →					

\*1 Crude oil: soybean oil

\*2 Soap fraction in neutralized oil: 11 ppm of Aflatoxin B<sub>1</sub>

\*3 Soap fraction in decolorized oil: trace

toxin B<sub>1</sub> の減衰を見る目的で、各工程処理前の油に Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を 100 ppb 添加し、工程処理後の油中の Aflatoxin B<sub>1</sub> の残存量を定量したところ、脱ガム油を脱酸する工程と脱酸油を脱色する工程が Table 4 に示すごとく最も著しい減衰を示した。

### 3. TLC

Aflatoxin B<sub>1</sub> の検出法は従来法の薄層クロマトグラフィ（TLC）法で充分であるが、食用調合油中には Aflatoxin B<sub>1</sub> 類似蛍光物質が存在するものもあるので、TLC 法の場合は特に一次展開した Aflatoxin B<sub>1</sub> をさらに誘導体化して二次展開を行い誤認を避ける必要がある。本実験に用いた食用調合油および食用油は 4.1 または 4.2 に準じて得られた TLC 用検液を 4.5 の 1) の条件で処理すると、いずれの検体も Aflatoxin B<sub>1</sub> の R<sub>f</sub> 値付近に蛍光が確認されるが、4.5 に示す 2 種類の二次展開による方法を用いた場合、いずれの方法でもそれらの蛍光物質は Aflatoxin B<sub>1</sub> とは異なる挙動を示した。なお、TLC 法の検出限界は 0.5 ppb であった。

### 4. HPLC

食用調合油および食用油は 4.1 に準じて処理して得られた HPLC 用検液を TFA で処理し、4.6 a) に従

い HPLC を行い、Aflatoxin B<sub>1</sub> の保持時間のピークを分取し、4.6 b) による HPLC を行ったところ、いずれの検液からも Aflatoxin B<sub>1</sub> は検出されなかった。

なお、精製大豆油 200 g に Aflatoxin B<sub>1</sub> 4 μg を加えた試料および Aflatoxin B<sub>1</sub> 標準液を対照試料にしたものについて、4.1 処理および 4.6 a) による HPLC 分取を行って回収率を調べたところ、HPLC (column: μ-porasil) による定量ではそれぞれ 68% および 98% であり、TLC では 98% および 93% であった。さらに HPLC によって Aflatoxin B<sub>1</sub> を分取し、TFA 処理を行い 4.6 b) で得られた Aflatoxin B<sub>1</sub> の回収率は HPLC (column: μ-Bondapak C<sub>18</sub>) ではそれぞれ 85% および 96%、TLC では共に 80% であった。

一方、食用調合油と食用油を 4.2 に準じて処理して 4.6 b) による HPLC で分析した結果も Aflatoxin B<sub>1</sub> は検出されなかった。なお HPLC 法での検出限界は 0.01 ppb であった。

### 5. ELISA

食用調合油と食用油を 4.1 に準じて処理し、得られた抽出液を 4.7 の要領で ELISA による Aflatoxin B<sub>1</sub> の確認を行ったがいずれの検液からも Aflatoxin B<sub>1</sub> は検出されなかった。本方法は最も感度の高く特異性の

ある方法として利用されており、0.2 ng の Aflatoxin B<sub>1</sub> の存在が確認できる。検体中の Aflatoxin B<sub>1</sub> の検出限界は 0.2 ppb であり、再現性の得られる定量範囲は 0.2~0.5 ppb であった。本方法の検出に要する時間は96検体が2~3分で測定可能であることから大量の試料を処理する上で非常に有効な分析手段であった。

## 考 察

食物における油脂の重要性は、1) エネルギー源として、2) 細胞構造と膜の機能のため、3) 脂溶性ビタミン媒介物として、4) 血中脂質調整など重要な機能を持つが、一方食品の旨味を増したり、また調理や加

工貯蔵上欠かすことのできない役割がある。そこでこうした食物として需要の多い油脂の安全性について注意することはわれわれ食品の衛生行政を扱うものの使命であろう。今回の検討の結果では、Aflatoxin B<sub>1</sub> は国内で精製された食用調合油にはほぼ混入されていないものと思われるが、それ以外の食用油すなわち輸入品、不適切な扱いを受けた油脂原料などについてはさらに調査が必要であろう。

## 文 献

- 1) 上野ら: マイコトキシン, 21, 24 (1985)
- 2) W. A. Parker *et al.*: *J. AOCS*, 43, 635 (1966)
- 3) AOCS Annual Meeting: *J. AOCS*, 60, 9 (1983)

## マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第14報) 乳幼児食品中の Zearalenone の実態調査

五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生

### Studies of Chemical Analysis of Mycotoxin (XIV) Analytical Results on Zearalenone in Baby Foods

Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SAITO

A survey of zearalenone contamination in baby foods on the market was carried out in 1985. Zearalenone was extracted from the food by acetonitrile-water (3-1), and determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and confirmed by thin layer chromatography (TLC). Each detection limit in these methods was 0.5 ng and 10 ng, respectively. Zearalenone contamination was not detected in any of the 27 samples of baby foods tested.

(Received May 31, 1986)

Zearalenone は *Fusarium* 属のかびが生産するマイコトキシンであり、非ステロイド系エストロゲン様の生理活性が注目されている<sup>1)</sup>。一方、zearalenone の自然汚染例としては家畜飼料から最高 306 ppm の範囲で検出されている<sup>2)</sup>。また、zearalenone 生産菌は北海道、秋田、福島、和歌山、高知、大分、熊本における麦、粟、米、野菜(ピーマン、メロン)から分離されている<sup>3)</sup>。そこで、これらの穀類や野菜、果実を原料として作られた乳幼児用食品を対象に zearalenone 汚染の実態調査を行ったのでその結果を報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

東京都世田谷区周辺において購入した生後2~8カ

月の乳幼児用に市販されている米菓、ビスケット、米粥、果汁、野菜スープ類27検体。

### 2. 実験操作

細切し均一化した試料 20g にアセトニトリル-水 (3-1) 200 ml を加えて30分間振とうし、ろ過する。ろ液 125 ml をヘキササン 50 ml で脱脂後、硫酸アンモニウムで水層を分離し、次に無水硫酸ナトリウムで水分を除去する。減圧下で溶媒を濃縮乾固し、残渣をメタノール 5 ml に溶解してカラムクロマトグラフィー用の検液とする。カラムクロマトグラフィーによりクレンジアップした試料は、再び減圧下で濃縮し、残渣をメタノール 2 ml に溶解する。その 1 ml をとり、さらに濃縮しメタノール 0.5 ml に溶解後、検液を 10000 rpm で遠心分離し高速液体クロマトグラフィーによ

り zearalenone を定量する。

Zearalenone の存在が認められた場合は、高速液体クロマトグラフィーによって得られた当該ピーク部分を分取し薄層クロマトグラフィーにより zearalenone の確認を行う。

2.1 高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム：Yanapak ODS-T 4 mmφ×250 mm

移動相：アセトニトリル-水-酢酸 (55-45-2)

流量：0.7 ml/min (μ-Bondapak C<sub>18</sub> の場合は流速を 0.5 ml/min とする)

測定波長：280 nm

検出器：日立655型 検出感度×0.005

2.2 薄層クロマトグラフィーの条件

薄層板：シリカゲル 60 (HPTLC) 10×10 cm

展開液：クロロホルム-メタノール (97-3)

増蛍光試液：20%塩化アルミニウム・エタノール試液。

2.3 カラムクロマトグラフィーの条件

120~130°C で活性化したフロリジル (60~100 mesh) 10 g を内径 2.2 cm のガラス製のカラムにクロロホルム-メタノール (9-1) で湿式充填する。フロリジルの上下には無水硫酸ナトリウム 5 g を充填する。試料はカラム中に 30 分間保持させた後、クロロホルム-メタノールで溶出させる。

結果および考察

1. 抽出溶媒の検討

細切均一化したとうもろこし 20 g に zearalenone を 1 および 5 ppm 添加した試料を用い、Table 1 に示す抽出溶媒について回収率を比較したところ、メタノール-2%食塩液による抽出で 87.5%、アセトニトリル-水 (3-1) による抽出で 95%以上であった (Table 1)。したがって、本実験では抽出溶媒としてアセトニトリル-水 (3-1) を用いた。

2. 検出限界と定量限界

2.1 高速液体クロマトグラフィーによる定量

Zearalenone 標準液 (0.001 μg/ml) を用いた高速液

Table 1. Extraction of zearalenone by four kinds of solvent systems

	MeOH- 2% NaCl (55-45)	CH <sub>3</sub> CN- Water (3-1)	2-PrOH- CHCl <sub>3</sub> (3-1)	EtOAc
	87.5	95.0	46.1	57.8
Recovery*	96.8	104.2	46.9	60.9
(%)	95.0	97.0	47.0	58.0

\* Each 5 ppm of zearalenone was added to corn.

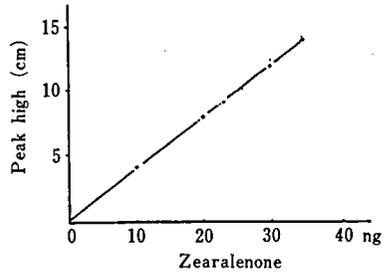


Fig. 1. Calibration curve of zearalenone by HPLC

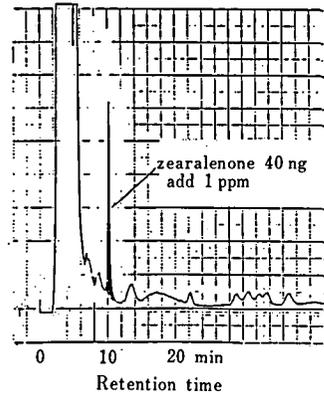


Fig. 2. HPLC of zearalenone spiked to corn

Table 2. Analytical results of zearalenone in commercial baby foods

Sample	Zearalenone (ppb)
Rice sticks containing vegetables* <sup>1</sup>	n. d.* <sup>2</sup>
Rice stick* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing egg* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing cheese* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing honey* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing lemon oil* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing soybean protein* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing oatmeal* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing vegetables* <sup>1</sup>	n. d.
Biscuit containing skim milk powder* <sup>1</sup>	n. d.
Rice gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Rice gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Rice gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Thin rice gruel	n. d.
Mixed gruel* <sup>1</sup>	n. d.
High protein gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Rice cake containing wheat bran* <sup>1</sup>	n. d.
Chinese gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Bread gruel* <sup>1</sup>	n. d.
Apple juice* <sup>1</sup>	n. d.
Apple juice	n. d.
Vegetable soup* <sup>1</sup>	n. d.
Mixed fruits juice* <sup>1</sup>	n. d.
Mixed fruits juice	n. d.
Tomato Juice	n. d.
Peach juice	n. d.
Mandarine orange juice	n. d.

\*<sup>1</sup> Foods for babies more than 2~8 month-old.

\*<sup>2</sup> Detection limit: 25 ppb.

体クロマトグラフィーの検量線は Fig. 1 に示すとおりであり、定量限界は 1 ng で、検出限界は 0.5 ng であった。クロマトグラム上には、zearalenone の保持時間 (10分) 付近に妨害になるピークはみられない (Fig. 2)。

## 2.2 薄層クロマトグラフィー

シリカゲルプレートによる zearalenone の定量限界は 60 ng であり、20%塩化アルミニウム・エタノール試液により増蛍光した場合は 10 ng であった。

## 3. 市販の乳幼児用食品の調査結果

Table 2 に示すごとく、今回調査の対象にした乳幼児用食品中に zearalenone は検出されなかった。

## 文 献

- 1) D. Brewer *et al.*: *Can. J. Microbiol.*, **18**, 1129 (1972)
- 2) O. L. Shotwell: *Mycotoxins in Human and Animal Health*, p. 403 (1977), Pathotox, Illinois
- 3) 石井賢二ら: *食衛誌*, **13**, 479 (1972)

# マイコトキシンの化学分析に関する研究 (第16報) 食品の加熱調理ならびに自然汚染小麦の精麦および製粉調理による Nivalenol と Deoxynivalenol の消長について

五十畑悦子・豊田正武・斎藤行生

## Studies on Chemical Analysis of Mycotoxin (XVI) Fate of Nivalenol and Deoxynivalenol in Foods and Contaminated Wheat during Cooking, Cleaning and Milling Processes

Etuko ISOHATA, Masatake TOYODA and Yukio SARTO

The effects of cooking on the contents of deoxynivalenol (DON) in several kinds of foods were investigated. The contents of DON in "Udon", rice, cookies and croquette spiked with DON (2.5 ppm) decreased by 15~37% from that before cooking. In the case of "Udon", however, it was found that a substantial amount of DON was released into the boiling water. The fate of nivalenol (NIV) and DON in naturally contaminated wheat during the cleaning, milling and cooking processes was pursued. In all cases after cooking, 88~97% of DON and 57~95% of NIV in raw wheat were eliminated, especially after the boiling process.

(Received May 31, 1986)

## 緒 言

前報<sup>1)</sup>において、赤かび毒による汚染が報告されている食品群の Nivalenol (NIV) および Deoxynivalenol (DON) の実態調査結果を報告したが、今回はヒトが実際に摂食する状態での赤かび毒の実態を把握する目的で以下の実験を行った。DON 市販食品における調理過程での減衰を、実状に即した料理手順で加工して調べた。次いで赤かび病の発生した畑から、採取した小麦 (健全粒) に明らかに自然汚染した小麦 (汚染粒) を混入した試料を調整し、調理食品に至るまでの DON と NIV の消長をみた。また、この自然汚染小麦を精麦、製粉して作った小麦粉を用いて調理したうどん中の DON と NIV 量の変化を調べた。

## 実 験 方 法

### 1. 実験材料

1.1 市販の小麦粉、塩、米、ホットケーキミックス、食用油、バター、マーガリン、スパイス、ベーキングパウダー、卵、砂糖、パン粉および乾燥ポテト

1.2 赤かび病の発生した畑の健全粒の小麦と赤かび病被害小麦 (自然汚染小麦)

### 2. 試薬および試液

2.1 試薬および有機溶媒類は市販の試薬特級品

2.2 シリル化剤の調整

N-トリメチルイミダゾール 1 ml にトリメチルクロルシラン 0.2 ml を加え酢酸エチルで全量を 10 ml とし褐色瓶に貯える。

2.3 フロリジル: 60~100メッシュを 120~130°C 2

時間活性化

2.4 標準液：クロロホルム 1 ml 中に NIV および DON を 0.01  $\mu\text{g}$ , 0.1  $\mu\text{g}$ , 0.25  $\mu\text{g}$  含まれるように調整する。

3. 装置

3.1 ガスクロマトグラフィー (GC)

島津 GC-5A (ECD 付) ガスクロマトグラフ装置, 島津 C-R1A データ処理装置, YHP 5710 (ECD 付), controller (5719A)

4. 実験操作

4.1 カラムクロマトグラフィー：前報<sup>1)</sup>に準ずる。

4.2 シリル化：前報<sup>1)</sup>に準ずる。

4.3 ガスクロマトグラフィーの条件：前報<sup>1)</sup>に準ずる。

4.4 調理加工と試料の調整

うどん：①小麦粉 20 g, 水 20 g で生麺を作り沸騰した水中に 2 時間入れる。

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加した小麦粉 20 g に水 20 g を加え, ①の要領で作る。

炊飯：①押麦 20 g に水 30 g を加え, 30 分間炊飯

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加した押麦に水 30 g を加え, ①の要領で炊飯

粥飯：①米 20 g に水 200 g を加え, 2 時間加熱

②DON 50  $\mu\text{g}$  添加した米 20 g に水 200 g を加え, ①の要領で加熱

ホットケーキ：①ホットケーキミックス 20 g に牛乳 50 ml を加え, 110°C 50 分間加熱

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加したホットケーキミックス 20 g に牛乳 50 ml を加え①の要領で加熱

クッキー：①小麦粉 20 g に水 20 g と牛乳 10 ml を加え, 170°C 15 分間加熱

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加した小麦粉 20 g に水 20 g と牛乳 10 ml を加え, ①の要領で加熱

ケーキ：①小麦粉 20 g に水 20 g と牛乳 10 ml および卵 1/2 個を加え, 180°C 10 分間加熱

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加した小麦粉 20 g に水 20 g と牛乳 10 ml および卵 1/2 個を加え, ①の要領で加熱

コロッケ：①乾燥馬鈴薯 20 g に水 20 g を加え天ぶ

ら油で揚げる。

②DON 50  $\mu\text{g}$  を添加した乾燥馬鈴薯 20 g に水 20 g を加え, 天ぶら油で揚げる。

4.5 自然汚染小麦試料の調整

4.5.1 自然汚染小麦は Table 1 に示す産地の赤かび病が発生した畑で採取した小麦 (健全粒) に明らかに赤かび汚染された小麦粒を 0.3, 0.5, 1.5, 2.0% 混入した。

4.5.2 小麦粉は Table 1 に示す小麦を精麦し, ビューラー型粉砕機を用いて粉砕する。得られた小麦粉の歩留りは 1. 宮城県 68.3%, 2. 宮城県 68.7%, 3. 群馬県 66.5%, 4. 埼玉県 70.5% であった。

4.5.3 小麦粉に水を当量加えて生麺を作り, 沸騰水中で 30 分間加熱調理した。

実験結果

1. DON の調理食品からの添加回収実験と調理加工による消長

調理食品 (うどん, 炊飯米, 粥飯, ホットケーキ, 天ぶら, クッキー, ケーキ, コロッケ) にそれぞれ DON を 2.5 ppb 添加した試料からの DON の回収実験を行った結果, 回収率は 40~80% であった (Fig. 1)。

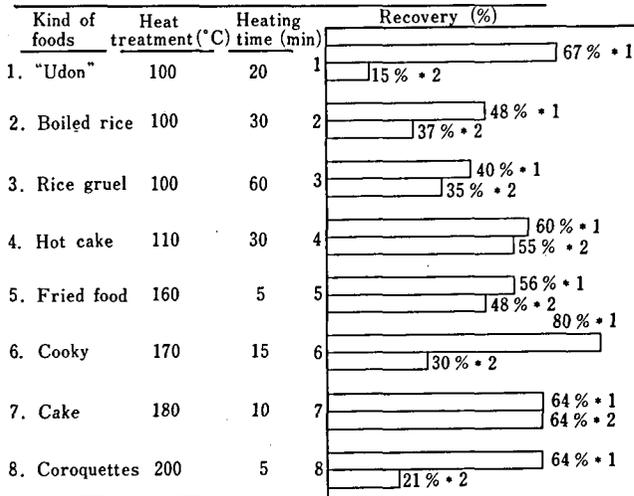
調理食品中には大量の水, 油, 蛋白質等が含まれており前報の食品原料について示されたような十分な回収率は得られなかった。分析に先立ち試料の乾燥が必要であると考えられる。

別に食品の加熱調理が原因で減衰する DON の量を知る目的で, 調理前の食品に DON 標準液を添加し, 実状に沿った方法で加熱調理した後の食品について, 回収率をもとめたところ, Fig. 1 に示すように, DON は通常の料理過程ではそれ程容易に減衰しない事が判った。170°C および 200°C の高温で加熱調理したクッキーおよびコロッケに目立った減衰がみられた。一方 180°C で 10 分間加熱調理したケーキでは減衰は見られない。この原因は食品の成分内容によるものと思われる。

うどんは 100°C 20 分の加熱調理で 77.6% と極端な

Table 1. Qualitital properties of wheat used in the experiment

Place of Production	Species	Grade	Contamination ratio of wheat grain (%)
1. Miyazaki prefecture	Asakaze	First grade	0.3
2. Miyazaki prefecture	Asakaze	Out of grade	0.5
3. Gunma prefecture	Nourin	Second grade	1.0
4. Saitama prefecture	Nourin	Out of grade	2.0



\* 1 Recovery of DON (2.5 ppm) in cooked foods.  
 \* 2 Recovery of DON (2.5 ppm) from final product after cooking of spiked foods

Fig. 1. Recovery of DON added to cooked foods and recovery of DON from final product after cooking of spiked foods

減衰をみた。うどんから失われた DON の70%が煮汁中に存在した。したがって長時間 100°C の水で加熱調理すると DON は水に移行すると考えられる。

食品の調理加工による減衰を論ずるには、当然のことだが、先ず目的の食品についての添加回収率を忘れずに考慮しなければならない。調理食品からの DON の回収率を加味した調理加工による真の減衰率は Table 2 のとおりであった。

2. DON と NIV の自然汚染小麦の精麦、製粉と調理加工による消長

実験材料の水分量を Table 3 に示した。実験材料は調整後約4ヶ月冷蔵庫に保管されていた為、かなり乾燥していた。小麦と小麦粉の水分は通常値の15~26%、生麺は68%、うどんは80%であった。

玄麦を精麦してふすまを除き更に製粉して小麦粉にし、DON および NIV の含有量を定量しその結果を Table 4 に示した。

DON と NIV の含有量は玄麦より小麦粉に高い傾向がみられている。この事から DON と NIV の汚染部位は胚乳部と考えられる。しかし今回の実験では汚染部位の正しい評価は難しい。本実験は DON, NIV で汚染された農作物(小麦)から実際にヒトが摂食する食品の段階までの消長をみる目的で行ったので、小麦の精麦、製粉工程で除かれる部分は、実験に供されず、分析の対象外として扱った。したがって DON, NIV の汚染部位を正しく評価することは出来ないが、

Table 2. Actual reduction ratio of DON after cooking of spiked raw foods adjusted by recovery of DON from cooked foods

Foods	Reduction ratio of Don (%)*
"Udon"	77.6
Boiled rice	22.9
Rice gruel	12.5
Hot cake	8.3
Fried food	14.3
Cooky	62.5
Cake	0
Coroquettes	67.2

\* Reduction ratio (RE) was calculated as follows:

$$RE(\%) = 100 - \frac{\text{Recovery of DON from final products after cooking of spiked raw foods}}{\text{Recovery of DON added to cooked foods}} \times 100$$

Table 3. Content of water in wheat and wheat products

Sample No.	Content of water (%)			
	Wheat	Wheat flour	Raw noodle	Bioled noodle
1.	3.21	3.63	23.72	56.55
2.	3.30	3.44	24.52	58.14
3.	3.87	3.75	20.51	62.20
4.	2.06	3.57	22.91	60.86

Table 4. Effect of cleaning and milling on the content of DON and NIV in contaminated wheat

Sample No.	Mycotoxin	Wheat (ppb)	Wheat flour (ppb)
1.	DON	200	205
	NIV	100	80
2.	DON	192	420
	NIV	100	210
3.	DON	100	75
	NIV	167	180
4.	DON	1420	3000
	NIV	920	2500

Table 5. Comparison of DON and NIV contents between raw noodle and boiled noodle

Sample No.	Mycotoxin	Raw noodle (ppb)	Boiled noodle (ppb)
1.	DON	199	37
	NIV	83	21
2.	DON	384	79
	NIV	103	22
3.	DON	81	42
	NIV	86	29
4.	DON	1609	42
	NIV	1660	42

小麦生育期の気象条件を含めて考えると、今回の実験に使用した小麦は、赤かび病による DON, NIV 汚染が小麦の胚乳部まで侵入していることが示唆される。

自然汚染小麦を用いて調製したうどんの調理加工による DON, NIV の消長は Table 5 に示すように 1.1

の実験における DON 標準液を添加した調理食品の加熱調理加工における減衰に類似した傾向を示した。

## 文 献

- 1) 五十畑ら：衛生時報, 104, 113 (1986)

## 野菜・果実における有機リン農薬の残留実態調査

河村葉子・武田明治・内山 充・斎藤行生

### Survey of Organophosphorus Pesticide Residues in Vegetables and Fruits

Yoko KAWAMURA, Mitsuharu TAKEDA, Mitsuru UCHIYAMA and Yukio SAITO

From 1982 to 1984, 109 samples of vegetable and fruit on the market were tested for 43 kinds of organophosphorus pesticide residues. Prothiophos was detected in sweet pepper and many kinds of vegetable. Chlorpyrifos and cyanophos were the major pesticides found in fruits. The residue levels of most sample were found to be less than 0.1 ppm, but exceeded 0.1 ppm in fifteen samples. The frequency of pesticides was higher in fruits than in vegetables, while higher residue levels were found in vegetables.

(Received May 31, 1986)

BHC・DDT 等の有機塩素農薬の使用が禁止された昭和46年以降、殺虫剤の使用動向の中心は、有機リン農薬およびカルバメート農薬へと移行した。しかし、有機リン農薬は厚生省の食品残留基準が未設定のものが多く、また分解がはやく、食品への残留が低いと考えられていたため、食品中の残留実態は充分には調査されていなかった。我々は先に食品汚染物モニタリングプログラム<sup>1)</sup>に全国から集積された資料を用いて、有機リン農薬の残留実態の解析を試み、いくつかの知見を見出した<sup>2)</sup>。しかし、その分析対象農薬は食品残

留基準の設定されているものが大部分であり、それ以外の多くの有機リン農薬の残留実態を明らかにするにはいたらなかった。

一方、昭和52年度以降、食品中の汚染物摂取量調査計画<sup>1)</sup>に参加し、食品中の各種汚染物の摂取量を調査した。この調査において、数種の食品群から見出された有機リン農薬が、小麦に収穫後散布された貯穀害虫用農薬に由来する汚染であることを明らかにした<sup>3)</sup>。ところが、これらとは別の食品群において、しばしば有機リン農薬の検出がみられるようになった。汚染原

因の調査により、野菜・果実中の有機リン農薬残留に由来することが判明し、農作物中の有機リン農薬が、必ずしも残留の極めて低いものとばかりはいきれないことが明らかになった。そこで、今後の農薬残留について正確に把握するためにも残留実態の解明が必要となった。

今回、食品残留基準未設定の農薬も加え、43種類の有機リン農薬について残留分析を行い、野菜・果実中の残留実態を明らかにしたので報告する。

## 実験方法

### 1. 分析対象農薬

有機リン農薬のうち、既に厚生省食品残留基準が設定されている12種類、および未設定の31種類の合計43種類を選び、分析対象とした (Table 1)。

### 2. 分析試料

昭和57年4月より昭和59年2月に、市販の野菜および果実18種類、109検体を東京都内で購入し分析試料とした。内訳は、ピーマン18、春菊5、小松菜6、ト

Table 1. The list of organophosphorus pesticides and summary of residues

Org.p	Tolerance (ppm)	Detection limit(ppm)	Number of detected samples
BEBP		0.001	0
Chlorfenvinphos	0.2	0.001	0
Chlorpyriphos	0.5	0.001	7
Chlorpyriphos methyl		0.001	0
Cyanophenphos		0.002	3
Cyanophos		0.001	6
DAEP		0.005	0
Dialifor		0.02	1
Diazinon	0.1	0.001	4
Dichlofenthion		0.001	1
Dichlorvos	0.1	0.001	0
Dimethoate	1.0	0.001	0
Dimethylvinphos		0.002	0
Disulfoton		0.001	1
Edifenphos		0.02	0
EPBP		0.001	0
EPN	0.1	0.001	2
Ethion		0.001	0
Ethoprophos		0.001	0
Fenitrothion	0.2	0.001	9
Fenthion	0.05	0.001	0
Formothion		0.003	0
IBP		0.001	0
IPSP		0.001	0
Isouthioate		0.001	0
Isoxathion		0.01	0
Leptophos		0.003	0
Malathion	0.5-2.0	0.001	2
Mecarbam		0.001	0
Methidathion		0.005	1
Methylisoxathion		0.02	0
Methylparathion		0.001	0
Parathion	0.3	0.001	0
Phenthoate	0.1	0.001	3
Phosalon	0.1	0.01	2
Phosmet		0.1	0
Propaphos		0.002	0
Prothiophos		0.001	18
Pyridaphenthion		0.01	0
Pirimiphos methyl		0.001	0
Salithion		0.001	0
Tetrachlorvinphos		0.01	0
Thiometon		0.001	0

Total number of analyzed samples was 109.

マト7, ほうれんそう7, 白菜5, レタス8, さやいんげん6, ブロッコリー3, きょうり6, キャベツ6, さやえんどう2, りんご6, なし6, もも5, ネクタリン1, ぶどう6およびいちご4検体であった。分析には, りんご・なしは果梗およびしんを除去し, もも・ネクタリンは果皮をむき, 他は可食部を洗浄することなく用いた。

### 3. 試薬

農薬標準品は, 和光純薬より購入, または日本農薬工業会より供与を受けた。

### 4. 分析試料の調製

分析試料の調製は食品衛生法<sup>4)</sup> および前報<sup>5)</sup> に準じた。野菜・果実は細切後均一化し, その100gにアセトン100mlおよびベンゼン150mlを加え振とう抽出した。抽出を繰り返した後, ベンゼン層を2%塩化ナトリウム溶液300mlで2回水洗し, 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 40°C以下で減圧濃縮し5mlとした。内径1.5cmのクロマト管にガラスウールおよび無水硫酸ナトリウム10gをつめ, 活性炭-微結晶セルロース(1:10)混合物5gをベンゼンで湿式充てんし, 更に無水硫酸ナトリウム10gを層積した。このカラムに試料抽出液を注入し, ベンゼン120mlで溶出させた。これを5mlに濃縮し, ガスクロマトグラフィー用試験溶液とした。

### 5. ガスクロマトグラフィーによる定量

試験溶液3 $\mu$ lを下記の条件でガスクロマトグラフに注入し定量を行った。

装置：島津製作所製 GC-4BM-PF (FPD付)

注入口および検出器温度：250°C

キャリアーガス：窒素 1.0 kg/cm<sup>2</sup>

ガラスカラム：3 mm $\times$ 1.5 m

カラム充てん剤およびカラム温度：

①4% OV-101/Gaschrom Q (60-80メッシュ)

220°C

②10% QF-1/Gaschrom Q (60-80メッシュ)

220°C

③2% DEGS+0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Gaschrom Q (60-80メッシュ), 180°C

### 結果および考察

今回調査した43種類の有機リン農薬について, 一般名, 厚生省食品残留基準値, 定量限界およびそれが検出された検体数を, Table 1に示した。43種類の有機リン農薬のうち, 検出された農薬は14種類であった。検出回数が最も多い農薬は prothiophos 18検体 (検出率16.5%) であり, 次いで fenitrothion 9検体 (8.3%), chlorpyrifos 7検体 (6.4%) および cyanophos 6検体 (5.5%) であった。検出された農薬のうち7種類は食品残留基準が設定されているが, 7種類は未設定であった。

Table 2に示すように, 同一検体より検出された有機リン農薬数は1種類のものが多いが, 3種類検出されたものも4検体あった。3種類検出された頻度は野菜と果実でほぼ等しいものの, 1種類および2種類検出された頻度は果実の方がはるかに高く, 有機リン農薬の残留が果実に広範なことを示している。Table 3に検出された農薬と残留量を作物別に示した。野菜では, ピーマンから農薬6種類を検出したが, そのうち prothiophos は11検体から見出され, その残留量も高いものが多かった。春菊では4種類の農薬が1検体ずつ, 小松菜も4種類であるが, そのうち dialifor の残留量が高かった。トマト, ほうれんそう, 白菜, レタス, いんげんおよびブロッコリーから各1種類ずつ検出されたが, きょうり, キャベツおよびさやえんどうからは検出されなかった。prothiophos はピーマンを含め7種類の野菜から検出されたが, いずれも適用外作物であった。果実では, りんごから chlorpyrifos など4種類, なしから fenitrothion など3種類, ももから chlorpyrifos と cyanophos, ネクタリンから cyanophos が検出された。しかし, ぶどうおよびいちご

Table 2. Variety of organophosphorus pesticides detected in one sample

	Number of samples	Number of varieties			
		0	1	2	3
Vegetable	81	54	18	6	3
Fruit	28	13	10	4	1
Total	109	67	28	10	4

Table 3. Residues of organophosphorus pesticides in vegetables and fruits

Sample	Number of samples	Org. P	Number of detected samples	Residue data	
				Max.(ppm)	Mean(ppm)
Sweet pepper	20	Dichlofenthion	1	0.001	0.000
		EPN	1	0.100	0.005
		Fenitrothion	3	0.146	0.008
		Malathion	1	0.034	0.002
		Phosalon	2	0.327	0.025
		Prothiophos	11	3.97	0.310
Shungiku	5	Diazinon	1	0.189	0.038
		Disulfoton	1	0.013	0.003
		Fenitrothion	1	0.019	0.004
		Phenthoate	1	0.900	0.180
Komatsuna	6	Cyanophenphos	1	0.002	0.000
		Dialifor	1	6.30	1.05
		Fenitrothion	1	0.001	0.000
		Prothiophos	1	0.001	0.000
Tomato	7	Fenitrothion	1	0.002	0.000
		Phenthoate	1	0.010	0.001
		Prothiophos	1	0.002	0.000
Spinach	7	Cyanophenphos	1	0.003	0.000
		EPN	1	0.132	0.019
		Prothiophos	1	0.002	0.000
Chinese cabbage	5	Diazinon	1	0.001	0.000
		Prothiophos	1	0.029	0.006
Lettuce	8	Prothiophos	2	0.020	0.003
Kidney bean	6	Phenthoate	1	0.004	0.001
Broccoli	3	Prothiophos	1	0.003	0.001
Apple	6	Chlorpyrifos	4	0.039	0.014
		Cyanophenphos	1	0.003	0.001
		Cyanophos	2	0.001	0.000
		Diazinon	2	0.005	0.001
Pear	6	Fenitrothion	3	0.388	0.069
		Malathion	1	0.003	0.001
		Methidathion	1	0.011	0.002
Peach	5	Chlorpyrifos	3	0.091	0.020
		Cyanophos	3	0.009	0.003
Nectarine	1	Cyanophos	1	0.001	0.001

Organophorus pesticides were not detected in cucumber(6 samples), cabbage(6), garden pea(2), grape(6) and strawberry(4).

Table 4. Distribution of residues in vegetables and fruits

	Number of samples	Residue level			
		- 0.01	- 0.1	- 1.0	- 10 ppm
Vegetable	81	15	10	12	2
Fruit	28	15	5	1	0

からはいずれも検出されなかった。

残留量は Table 4 に示すように大部分が 0.1 ppm 以下であったが、0.1 ppm 以上も15検体あった。最高は小松菜中の dialifor 6.30 ppm 次いでピーマン中の prothiophos 3.97 ppm であった。また、15検体中1検体のみ果実で、他はすべて緑色野菜であった。

今回の有機リン農薬残留実態調査において、果実の方が検出頻度は高いが、残留量の高いものは野菜に多くみられた。この傾向は食品汚染物モニタリングの解析結果<sup>2)</sup>とよく一致しており、有機リン農薬の残留実態、散布実態をよく反映していると考えられる。つまり、果実は一般に結実から収穫までの期間が長く、ま

た害虫の被害を受けやすいため、有機リン農薬による防除が広範に、しかも繰り返し実施され、一方、野菜類では有機リン農薬以外のより廉価な農薬が範囲されるが、病害虫の発生時期などには集中的に農薬が散布され、効果の高い有機リン農薬も多用されるのであろう。このため、野菜類の検出頻度は低いが、時に高レベルの残留がみられたと推定される。

厚生省食品残留基準を超えたものは109検体中6検体(検出率5.5%)であり、基準が設定されていないもののうち環境庁登録保留基準を超えたものは9検体(8%)であった。基準を超えた検体も基準値に近いものが多く、残留値は比較的良好な状態にあるといえる。

しかし、食品残留基準の設定されていない農薬の中に残留量の特に高いものが検出されたり、適用外作物から検出されたことは留意する必要がある。今後、食品残留基準の拡大、農薬安全使用基準の徹底、さらには残留実態の十分な監視等が望まれる。

## 文 献

- 1) 内山 充: 衛生試報, 97, 1 (1979)
- 2) 河村葉子ら: 衛生試報, 101, 138 (1983)
- 3) 河村葉子ら: 食衛誌, 21, 70 (1980)
- 4) 厚生省食品保健課・乳肉衛生課・食品化学課: 食品衛生関係法規集, p. 1333 (1986)
- 5) 河村葉子ら: 食衛誌, 19, 518 (1978)

## 韓国産輸入玄米中のイソプロチオランの残留分析

石坂 孝・鈴木 隆・斎藤行生

### Isoprothiolane Residue in Unpolished Rice Grain Imported from South Korea

Takashi ISHIZAKA, Takashi SUZUKI and Yukio SAITO

The investigation of Isoprothiolane residues in unpolished rice grain imported from South Korea in 1984 was performed by gas chromatograph with ECD. From the results of the analysis, isoprothiolane was detected in all of the 4 rice grain samples. The detected isoprothiolane was further confirmed by gas chromatography-mass spectrometry.

(Received May 31, 1986)

イネの病害の一つであるいもち病は毎年全国的に発生し、イネの病気のうちで最も被害が大きく、過去にしばしば凶作の原因となった。

イソプロチオラン (diisopropyl 1,3-dithiolan-2-ylidene-malonate, Fig. 1) はいもち病防除薬として用いられる抗菌剤であり、登録保留基準値 2 ppm が定められている<sup>1)</sup>。本剤は毒性が低く、またウンカ類の防除効果も合わせ持つために毎年多量に用いられている<sup>2-4)</sup>。

今回、日本と同様の気候風土の韓国から輸入した玄米についてイソプロチオランの使用、残留が考えられ

たので、本剤の分析ならびにガスクロマトグラフ・マススペクトロメトリー (GC/MS) による確認を行ったので報告する。

## 試 験 方 法

### 1. 分析試料

昭和59年7月厚生省食品保健課検疫所業務管理室を通じて当所に送付された韓国産(1981年産)輸入玄米4検体および世田谷区内で購入した国産玄米2検体。

### 2. 試薬・器具

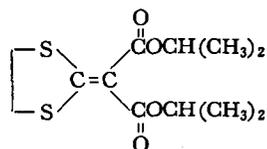
有機溶媒ならびに蒸留水は残留農薬試験用に適格するものを使用した<sup>5)</sup>。

塩化ナトリウム: 市販の試薬特級品。

無水硫酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用。

フロリジル: フロリジン社製の残留農薬試験用に130°Cで16時間以上加熱活性化したものを使用した。

フロリジルカートリッジ: Waters社製セップパ



$C_{12}H_{18}O_4S_2$ : 290.40

Fig. 1. Structure of Isoprothiolane

クフロリジルカートリッジ.

粉碎機: 西独 Retsch 社製 Retsch KG 型.

振とう機: イワキ(株)製 KM シェーカー.

濃縮器: ヤマト科学(株)製ロータリー・エバポレーター (N型).

### 3. 抽出・精製

後藤らの方法<sup>6)</sup>をもとに Chart 1 に示した方法で抽出ならびに精製を行った。なお、精製操作の省力化のため市販のフロリジルカートリッジを使用した。Fig. 2 にフロリジルカートリッジからのイソプロチオラン

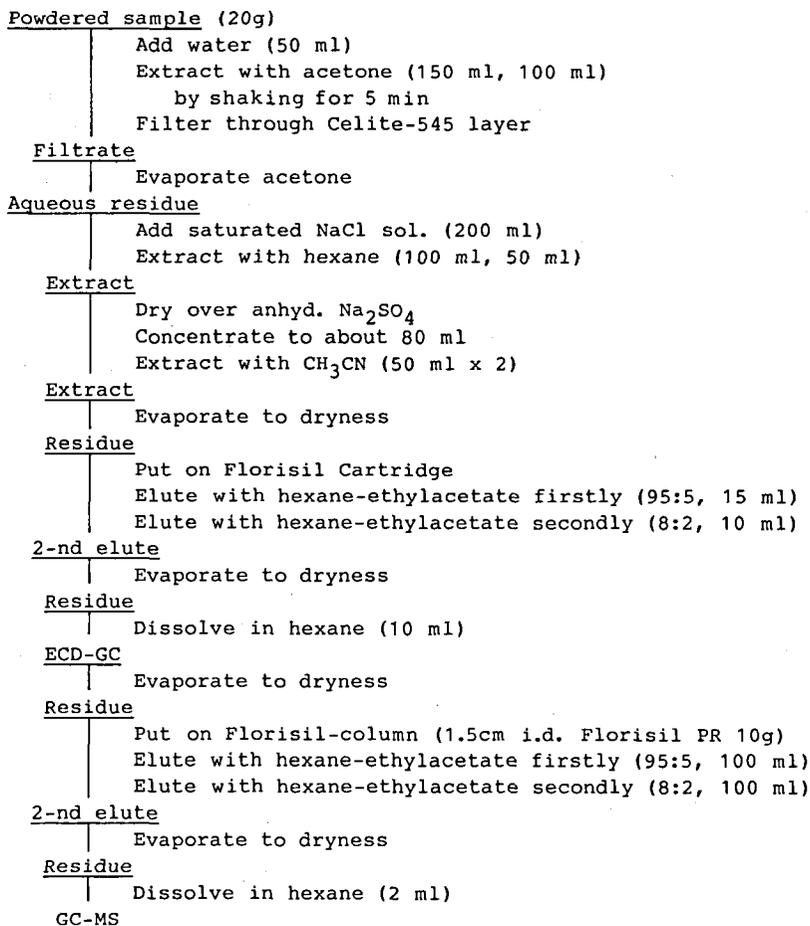


Chart 1. Analytical procedure of Isoprothiolane residue in unpolished rice grain samples

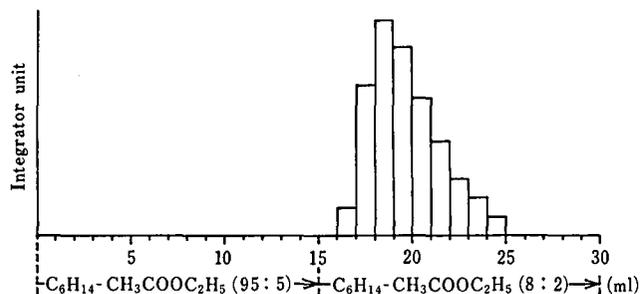


Fig. 2. Elution profile of Isoprothiolane from Florisil Cartridge  
Each fraction volume is 1 ml. Elution profile was analyzed by peak height method on ECD-GC. Recovery was 96%.

の溶出パターンを示した。GC/MS による分析にはフ  
ロリジルカートリッジによる精製では不十分だったの  
でさらに精製を行った。

#### 4. ガスクロマトグラフィーの条件

機種：(株)島津製作所 GC-4MB 型 (ECD 付き) に  
データ処理装置として同社製クロマトパック C-R1B  
型を接続。

カラム：1) 3 mm i.d.×1.5 m (ガラス製)

2) 2.6 mm i.d.×2 m (ガラス製)

充てん剤：1) 1% OV-225, 2) 2% XE-60

担体：1) クロモソルブ W-HP (80~100 mesh)

2) ガスクロム Q (80~100 mesh)

カラム温度：1) 200°C, 2) 220°C

注入口・検出器温度：250°C

キャリアガス流量：窒素 40 ml/min

注入量：2  $\mu$ l

定量法：2点標準，絶対検量線法。定量は 1) のカ  
ラムで行い，2) のカラムにより確認を行った。

#### 5. ガスクロマトグラフ・マススペクトロメトリ の条件

機種：日本電子(株)製 DX-300 型

カラム：Hewlett-Packard 社製溶融シリカキャピラ

Table 1. Isoprothiolane residues in the unpolished rice grain

Sample No.	residues (ppm)	Region*
1	0.128	South Korea, A
2	0.148	South Korea, B
3	0.133	South Korea, C
4	0.093	South Korea, D
5	0.049	Japan
6	N.D.	Japan

Limit of detection: 0.02 ppm N.D.: not detected

\*: A, 忠清北道 B, 忠清南道 C, 全羅北道 D, 全羅南道

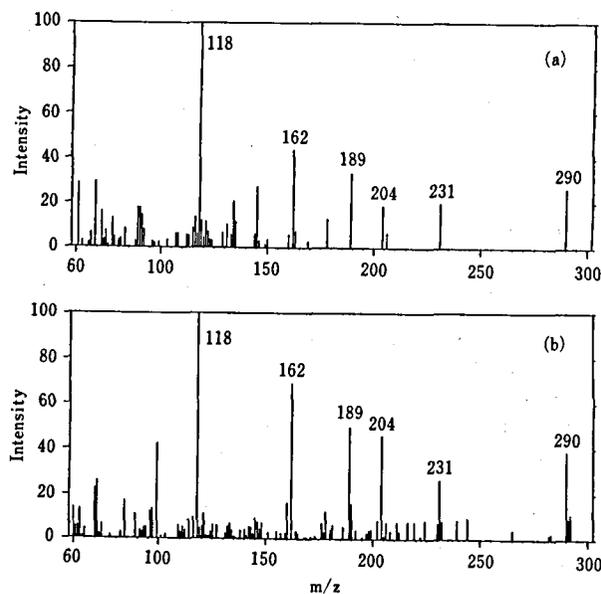


Fig. 3. Mass spectra (EI) of Isoprothiolane

(a) Isoprothiolane standard (DI)

(b) Isoprothiolane in rice grain (GC/MS)

リーカラム, メチルシリコン 0.53 mm i.d. × 10 m  
 カラム温度: 220°C  
 注入口温度: 240°C  
 イオン源温度: 240°C  
 キャリアガス流量: ヘリウム, 15 ml/min  
 イオン化電圧: 70 eV  
 イオン化電流: 300 μA

### 結果および考察

韓国から輸入された玄米および国内産玄米についてイソプロチオランの残留分析を行った結果を Table 1 に示した。

韓国産玄米からはすべての検体についてイソプロチオランが検出された。国内産玄米については1検体からは検出されたが、もう1検体からは検出されなかった (検出限界 0.02 ppm)。

イソプロチオランが検出された検体については GC/MS により確認を行った。その結果すべての検体についてガスクロマトグラフの保持時間およびマススペクトルによりイソプロチオランであることを確認し

た。Fig. 3 に直接導入法によるイソプロチオランのマススペクトルと、韓国産玄米から検出されたイソプロチオランの GC/MS によるマススペクトルを示した。

今回調査した韓国産玄米すべてについて 0.1 ppm 前後の残留が認められ、韓国においてイソプロチオランが使用されていることが判明した。残留量は平均 0.121 ppm であり、登録保留基準値 2 ppm を下回るものであった。本剤は動物体内に入ると速やかに代謝、分解、排泄されるので<sup>2)</sup> 食品衛生上なら問題はないと思われる。

### 文 献

- 1) 加藤正男, 岩永恵夫: 農薬誌, 5, 271 (1980)
- 2) 杉本達芳, 荒木不二夫, 谷中国昭: 農薬誌, 2, 505 (1977)
- 3) 農薬要覧—1985—, 日本植物防疫協会
- 4) 農薬ハンドブック1985年版, 日本植物防疫協会
- 5) 武田明治: 農薬科学, 2, 129 (1974)
- 6) 後藤真康, 加藤誠哉: 残留農薬分析法, p. 162 (1980) ソフトサイエンス社

### リン酸塩製剤処理によるサツマイモ表皮の赤味増強について

山崎 壮・尾張恭子・川崎洋子・山田 隆・義平邦利

#### Study on Red Color Development of Sweet Potato Epidermis by Treatment with Phosphate Preparations

Takeshi YAMAZAKI, Kyoko OWARI, Yoko KAWASAKI,  
 Takashi YAMADA and Kunitoshi YOSHIHIRA

Sweet potatoes are treated with phosphate preparations as color fixing agents at some farms in order to make the epidermis more reddish and to improve the appearance. Phosphate preparations on the market contain phosphoric acid, sodium pyrophosphate, sodium metaphosphate and alum.

Sweet potatoes were treated with diluted solutions of commercially available phosphate preparations, and the red color development of the epidermis was observed. Higher concentrations of phosphate preparation solutions made the epidermis more reddish than lower concentrations.

The pigment extracted with water from sweet potato epidermis was pale reddish purple in neutral solutions and deep pink in acidic solutions. The red color development of the pigment due to the increase in absorbance at about 520 nm resulted from the transformation of the pigment into an acidic form at low pH. Lower pH made the pigment solutions more reddish. Neither the concentration of phosphate ion nor the kind of acids in the solutions influenced the red color development.

These results show that the effect of phosphate preparations on the red color development of sweet potato epidermis is due to the acidity of phosphate preparations.

(Received May 31, 1986)

サツマイモをリン酸塩製剤で処理し、表皮の赤味を増して見ばえをよくした商品が、一部のサツマイモ生産農家から出荷されていた<sup>1)</sup>。市販のサツマイモ用リン酸塩製剤は、リン酸、リン酸塩類、ミョウバンを成分としており、各成分は食品添加物として許可されている品目である。しかし、リン酸塩類をこのように発色剤として使用する例はこれまで一般的には知られていなかった。そこで、このリン酸塩製剤によるサツマイモの発色現象を検討した。

## 実験方法

### 1. 市販のリン酸塩製剤

市販品の成分表示は以下のようであった。

製品A：リン酸30%，ピロリン酸ナトリウム(結晶)10%，メタリン酸ナトリウム15%，ミョウバン10%，天然物35%。

製品B：リン酸20.0%~32.7%，メタリン酸ナトリウム20.0%~10.0%，メタリン酸カリウム5.2%~3.3%，ポリリン酸ナトリウム10.0%~5.0%，天然物44.8%~49.0%。

製品C：リン酸38%，ピロリン酸ナトリウム2%，メタリン酸ナトリウム5%，ミョウバン10%，天然物45%。

なお、天然物とは水道水であるとのことだった。

### 2. サツマイモ

宮崎市近郊で1985年11月末に収穫した紅高系品種の宮崎紅を、宮崎県衛生研究所の吉富堅一郎食品部長から御提供いただいた。

### 3. サツマイモ表皮色素の抽出

サツマイモの表層を薄くむき、得た表層を水を加えてフードプロセッサーで粉碎した。水面に浮いた表皮小片を集めた。さらに、水を交換しては粉碎することをくり返して、表皮片を集めた。表皮片を十分に水洗後、デシケーター内で乾燥させた。表皮片0.2gを少量の水と共に乳ばちですりつぶした後、2500 rpm 5分間遠心して上清を分取した。沈澱に水を加え、遠心し、上清を分取する操作をさらに3回繰り返した。分取した上清をろ紙(No. 5C)を用いてろ過し、色素抽出液12 mlを得た。

### 4. リン酸塩製剤処理によるサツマイモの色調変化

市販のリン酸塩製剤の希釈溶液にサツマイモを3分間浸し、風乾後、その色調を肉眼で観察し、リン酸塩製剤に浸していない試料の色調と比較した。

### 5. リン酸塩製剤処理によるサツマイモ表皮片の色調変化

市販のリン酸塩製剤の希釈溶液5 mlにサツマイモ表皮片50 mgを10分間浸し、風乾後、その色調を肉

眼で観察した。

### 6. 各種試験溶液中での抽出色素の色調の測定

試験溶液1 mlにサツマイモ色素抽出液100  $\mu$ lを加え、直ちに紫外・可視吸収スペクトルを測定した。

## 結果

### 1. 市販リン酸塩製剤処理によるサツマイモの色調変化

市販のリン酸塩製剤A, B, Cの各々1%, 5%, 10%, 20%溶液に浸したサツマイモは、浸していないサツマイモ(対照群)と比べて、いずれの製剤でも製剤濃度が5%以上の群で濃度が高いほど強く赤味を帯びた色調になった。10%ミョウバン溶液に浸した試料の色調は対照群と差がなかった。

### 2. 市販リン酸塩製剤処理によるサツマイモ表皮片の色調変化

サツマイモ表皮片をリン酸塩製剤Aの5%溶液(pH 1.9)に浸すと、水に浸した試料(対照)の茶色よりもわずかに赤味が増した。希釈塩酸(pH 1.9)に浸した試料でもわずかに赤味が増した。

### 3. サツマイモ表皮からの抽出色素のリン酸緩衝液中での色調

30 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0~12.4)に抽出色素を加え、その色調を調べた。色素を水に加えたときの溶液(対照)の色が赤紫色だったのに対して、色素を緩衝液に加えたときには各緩衝液のpHに依存して色調が変化した：桃色(pH 2.0)、淡桃色(pH 3.3)、赤紫色(pH 5.3)、淡青紫色(pH 7.2)、深緑色(pH 9.8, pH 11.3)、黄緑色(pH 12.4)。その時の紫外・可視吸収スペクトルをFig. 1に示す。

次に、抽出色素の酸性色とpHとの関係を調べた。0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 1.8~3.1)に抽出色素を加えると、pHが低いほど桃色が濃かった。紫外・可視吸収スペクトルは516 nm(pH 1.8)~520 nm(pH 3.1)に吸収極大を持ち、pHが低いほど吸収極大波長がわずかず短波長側にずれていた。516 nmの吸光度はpHが低いほど高かった(Fig. 2)。

また、抽出色素の酸性色とリン酸塩濃度との関係を調べた。3.1 mM~200 mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0)に抽出色素を加えると、各溶液の紫外・可視吸収スペクトルがパターン、吸光度ともに互いに一致した。したがって、溶液のpHが一定のとき、色調はリン酸イオン濃度には関係しなかった。

### 4. サツマイモ表皮からの抽出色素の各種酸水溶液中での色調

0.1 Mの各種酸溶液に抽出色素を加え、516 nm(pH

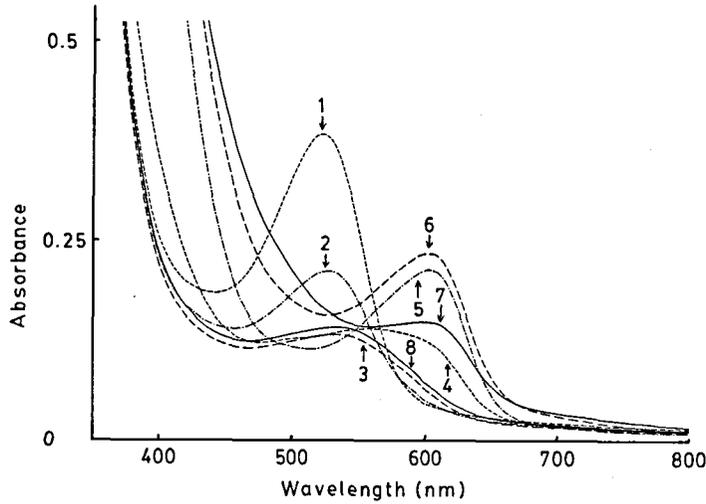


Fig. 1. Absorbance spectra of extracted pigment from sweet potatoes in phosphate buffers of various pH

line 1, pH 2.0; line 2, pH 3.3; line 3, pH 5.3; line 4, pH 7.2; line 5, pH 9.8; line 6, pH 11.3; line 7, pH 12.4; line 8, in water (control)

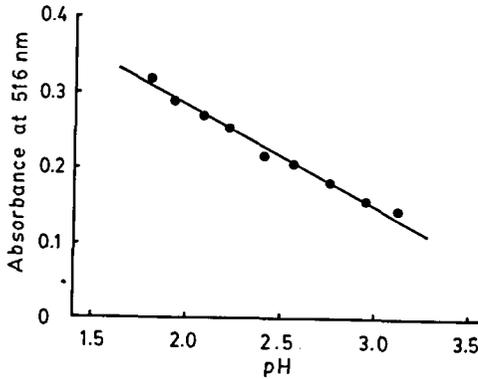


Fig. 2. Change of absorbance at 516 nm of extracted pigment from sweet potatoes with pH

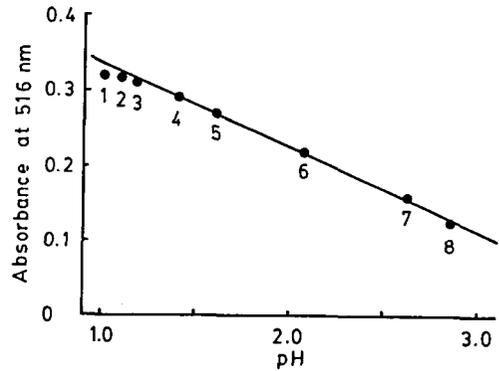


Fig. 3. Red color development of extracted pigment from sweet potatoes in various acid solutions

- 1, 0.1 M sulfuric acid;
- 2, 0.1 M nitric acid;
- 3, 0.1 M perchloric acid;
- 4, 0.1 M hydrochloric acid;
- 5, 0.1 M phosphoric acid;
- 6, 0.1 M citric acid;
- 7, 0.1 M L-ascorbic acid;
- 8, 0.1 M acetic acid

1.1 の溶液に加えたときの吸収極大波長)の吸光度を測定した。溶液のpHが低いほど吸光度が高かった (Fig. 3)。つまり、酸性条件下での桃色の発色程度は溶液のpHに依存し、酸の種類には関係しないことがわかった。

#### 5. サツマイモ表皮からの抽出色素の市販リン酸塩製剤溶液中での色調

市販リン酸塩製剤 A, B, C の各々 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10% 溶液に抽出色素を加え、溶液の pH と色調との関係を調べた。いずれの製剤でも、溶液中の製剤濃度が高いほど pH が低く、また桃色の発色が濃かった。吸収極大波長は 520 nm (10% 溶液)

~525 nm (0.05% 溶液) であった。520 nm の吸光度と pH との関係を示すが、成分組成の違う 3 種のリン酸塩製剤の結果が 1 本の曲線上にのった。したがって、桃色の発色程度は製剤の希釈溶液の pH によって決まるといえる。

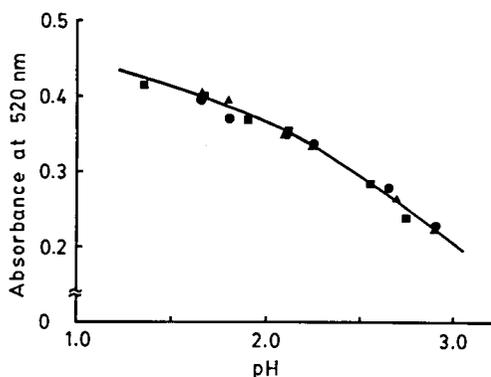


Fig. 4. Red color development of extracted pigment from sweet potatoes in diluted solutions of commercially available phosphate preparations as color fixing agents for sweet potatoes  
●, preparation A; ▲, preparation B;  
■, preparation C

をリン酸塩製剤溶液に加えたときの桃色発色とは整合性があった。したがって、抽出色素を用いた検討結果は丸のままのサツマイモにもあてはまるものと考えられる。

サツマイモをリン酸塩製剤で処理すると表皮の赤味が増すのは、リン酸塩製剤の酸性によって表皮中の色素が酸性型になり、520 nm 付近の吸収が大幅に増加して赤色化するためと考えられる。色素を酸性型にすれば赤変するのであり、用いる酸はリン酸でなくてもかまわない。しかし、実際のサツマイモに適用する場合、不揮発性で無臭のリン酸は有利であると思われる。そのため、市販のリン酸塩製剤はリン酸を主成分としていたと思われる。なお、市販リン酸塩製剤のピロリン酸塩、メタリン酸塩、ミョウバンの添加目的については、それらが発色の主作用物質とは考えられなかったため、今回は検討しなかった。

## 考 察 文 献

サツマイモをリン酸塩製剤で処理したときの表皮の色の赤味の増加と、サツマイモ表皮から抽出した色素

1) 朝日新聞東京版1985年12月9日朝刊11版9面。

## 高速液体クロマトグラフィーにおけるトコフェロール類の分離条件とその性能表示

加藤三郎・有泉純男\*

### Retentions and Resolutions of the Tocopherols with Various Conditions by High-performance Liquid Chromatography and Their Digital Expression

Saburo KATO and Sumio ARIZUMI

The retention behavior of tocopherol homologs was investigated under various conditions by high-performance liquid chromatography. The results were showed as chromatograms and digital expressions calculated from the retention data and the peak widths.

The efficiency of the columns used in the present study is shown in Table 1. As in Table 2 shows, the resolution of  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherol by the normal phase chromatography with silica gel columns were increased by the use of  $\text{NH}_2$ -modified silica gel and the addition of isopropyl ether into the mixture of isopropanol and n-hexane as mobile phases.

(Received May 31, 1986)

トコフェロール同族体 (Toc) の分離定量には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が最もすぐれているといわれ<sup>1)</sup>、公定法など<sup>2-5)</sup>にも採用される傾向にあ

り、さまざまな試料に応用されている。しかしその HPLC 条件は多岐多様であって、実際の応用に際して選択に迷わされる。そこで著者らは、天然 Toc 製剤の分析にさきだって、まず4種の標準 Toc について報告されている順相および逆相にわたり数種のカラ

\* 陸上自衛隊衛生補給処

ムを用い、移動相組成と  $T_{oc}$  の保持挙動あるいは分離の傾向について基礎的調査を行った。

またこれらの分離に関与するカラム性能は理論段数などにより、また2物質間の分離は分離度などによって数値表示されるが、このような性能表示も公定法<sup>4,5)</sup>に採用される傾向にあることから、本実験結果にもこれらの適用を試みて参考に供した。

## 実験方法

### 1. 試料および試薬

$d$ - $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -T)、 $d$ - $\beta$ -トコフェロール ( $\beta$ -T)、 $d$ - $\gamma$ -トコフェロール ( $\gamma$ -T) および  $d$ - $\delta$ -トコフェロール ( $\delta$ -T) : 各標準品 (エーザイ (株) 提供, 1978)。

メタノール (MeOH)、イソプロパノール (iPrOH)、イソプロピルエーテル (iPE)、ジオキサンおよび  $n$ -ヘキサン (ヘキサンと略す) : 試薬特級 (和光純薬 (株) 製)。カラム用シリカゲル (マリンクロット (株) 製)。

内部標準物質 (IS) : 2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル-6-ヒドロキシクロマン (常法<sup>3)</sup> により合成した)。

### 2. 装置

高速液体クロマトグラフ : 島津 LC-3A, 検出器 : 島津蛍光検出器 RF-530 (励起波長 295 nm, 蛍光波長 325 nm, 原則として感度 L, レンジ 8 で使用), 記録計 : 島津 R-112 (フルスケール 21.5 cm, 原則としてチャートスピード 10 mm/min で使用)。

### 3. HPLC カラム

3.1 逆相用カラム :  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  ( $\phi 3.9 \times 300$  mm, ウォーターズ社製バックドカラム), Lichrocart RP-18 ( $\phi 4 \times 250$  mm, メルク社製 Lichrosorb RP-18 (5  $\mu$ ) のバックドカートリッジ型), Nucleosil  $_5C_{18}$  ( $\phi 4 \times 250$  mm, M & N 社製充てん剤を常法<sup>6)</sup> により充てん)。

3.2 順相用カラム : Zorbax SIL ( $\phi 4.6 \times 250$  mm, デュボン社製バックドカラム), Lichrocart  $NH_2$  ( $\phi 4 \times 250$  mm, メルク社製 Lichrosorb  $NH_2$  (5  $\mu$ ) のバックドカートリッジ型), Lichrosorb SI 100 ( $\phi 4 \times 250$  mm, メルク社製充てん剤), Nucleosil 100-5 ( $\phi 4 \times 250$  mm, M & N 社製充てん剤), Nucleosil  $_5NH_2$  ( $\phi 4 \times 250$  mm, M & N 社製充てん剤), Nucleosil  $_5CN$  ( $\phi 4 \times 250$  mm, M & N 社製充てん剤) (以上4種は常法<sup>6)</sup> により充てん)。

### 4. HPLC 操作

カラム温度は室温, 試料は各  $T_{oc}$  がフルスケールの30~80%のピーク高さになるようにヘキサンに混合溶解した溶液の1~2  $\mu$  l を, 同程度になるような量の

IS のヘキサン溶液を加えて注入した。

### 5. イソプロピルエーテルの精製

20% iPE/ヘキサン溶液を, あらかじめヘキサンにより充てんしたカラム用シリカゲル (120°C で1時間乾燥したもの) のカラム ( $\phi 2 \times 10$  cm) に流して, 初流約 100 ml を捨て, その後の流出液を20% iPE として用いた。必要によりヘキサンで希釈した。

### 6. 測定と数値化

記録紙上のクロマトグラムから, 保持時間 ( $t_R$ ), ピーク高さ (h) およびそれぞれのピーク高さにおけるピーク幅 (W) を目測し, この測定値より, USP<sup>4)</sup>, 日局 11<sup>5)</sup> および Kirkland の著書<sup>6)</sup> を参考としてカラムの理論段数, 相対保持値 ( $\alpha$ ) あるいは分離度 (R) およびテーリング係数 (T) を算出した。また  $\alpha$ -T あるいは  $\delta$ -T の保持容量 ( $v_R = t_R \times$  流速) を  $v_\alpha$  あるいは  $v_\delta$  とした。

## 実験結果および考察

本報告においては, 逆相クロマトグラフィーでは MeOH に水を, 順相クロマトグラフィーではヘキサンに極性溶媒 (iPrOH および iPE) を配合したが, その添加比率は一般に低いためわかり易いよう%で記したが, 例えば1%とは (1:99) を意味する。

### 1. 逆相クロマトグラフィー

逆相型 HPLC では  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T は分離難しいといわれている<sup>7)</sup>。  $\beta$ -T は一般に微量でありとくに分離を必要としない領域ではしばしば用いられ, 局方<sup>5)</sup> にも採用されている。

著者らの用いた ODS カラムはいずれも個々の  $T_{oc}$  は良好なピークを示したが, 4種の混合物から分離した3ピークのみがあらわれた。MeOH を移動相としたときの Nucleosil  $_5C_{18}$  (1) および Lichrocart RP-18 (2) の結果を Fig. 1 に,  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (3) の場合を Fig. 2-A に示したが, 保持値に若干の差がみられ  $v_\alpha$  は (1) 10.3, (2) 9.3, (3) 7.9 ml であった。保持値の大きいカラムではテーリング部分が重なるものの各ピークはかなり分離した。

(3) はテーリングは小さい ( $T=1.059$ ) が MeOH ではよく分離せず, 2% 水/MeOH によって完全分離し, 水の増率によってさらに分離した (Fig. 2-B, C)。

これらの条件では IS はほぼ  $t_0$  に溶出した。また, Fig. 2 の B および C で検出器を高感度にして示した部分は, 元来の不純物と酸化成績体<sup>9,10)</sup> と思われるが確認はしなかった。

### 2. 順相クロマトグラフィー

#### 2.1 シリカゲルカラム

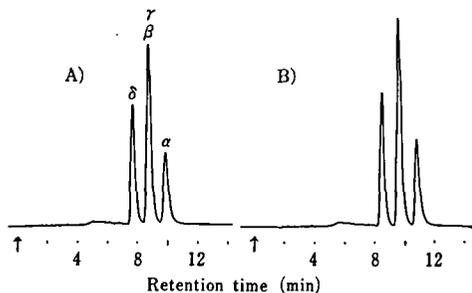


Fig. 1. Chromatograms of tocopherols with the reversed phase column and methanol as mobile phase

Column:  $\phi$  4  $\times$  250 mm, A) Lichrocart RP-18, B) Nucleosil  $\mu$ C<sub>18</sub>  
 Mobile phase: methanol, 1.0 ml/min  
 Detector: Shimadzu fluorescence spectromonitor RF-530 (Ex wavelength 295 nm, Em wavelength 325 nm, sens L, range 8)  
 Chart speed: 10 mm/min

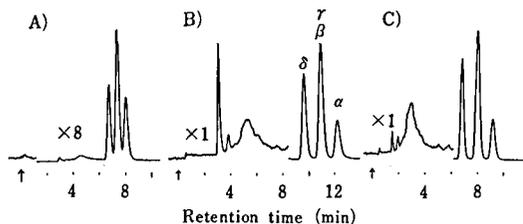


Fig. 2. Variation of the chromatograms of tocopherols by the addition of water into the mobile phase

Column:  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> ( $\phi$  3.9  $\times$  300 mm)  
 Mobile phase: A) methanol 1 ml/min, B) water + methanol (2: 98) 1 ml/min, C) water + methanol (5: 95) 2.2 ml/min

4種のトコフェロールの全分離がはじめて達せられたのは<sup>12)</sup>この系のカラムであり、移動相は iPE/ヘキサンがしばしば用いられている<sup>1-3,13)</sup>。最近では低濃度の MeOH あるいは iPrOH/ヘキサンがよく用いられる<sup>14,15)</sup>。

著者らは数種のシリカゲルカラムについて検討したが、いずれも iPrOH/ヘキサンにおいて1%以上では  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T が分離せず、0.5% 以下で近接しているが概ね分離して IS を含む5種の分離が達せられた。しかしいずれのカラムもテーリングがみられ、その部分の重なりが起り易いので、Nucleosil において0.3% iPrOH としたところさらに分離して ( $R=2.143$ ) 重なりもわずかになったが、全分析の時間が増大した ( $v_R$  約 25 ml) (Fig. 3-A)。この時間を短縮するために

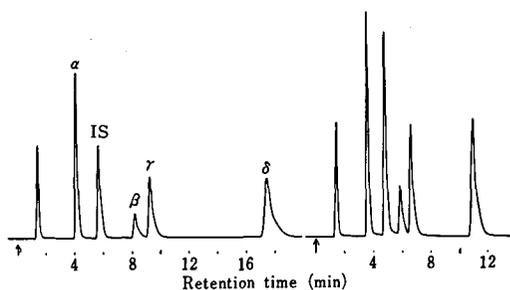


Fig. 3. Effect of additions of isopropanol and then isopropyl ether into the mobile phase with silica gel column

Column: Nucleosil (100-5),  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
 Mobile phase: 2.0 ml/min; A) isopropanol + *n*-hexane (0.3: 99.7), B) isopropanol + isopropyl-ether + *n*-hexane (0.3: 2: 97.7)  
 \* IS (internal standard): 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxychromane)

iPE を添加した結果を Fig. 3-B に示した。

報告されている移動相としての iPE/ヘキサンの組成比はさまざまであるが<sup>1)</sup>、協定法<sup>2,3)</sup>では Zorbax SIL において2% iPE を用いており、これを著者らが Lichrosorb SI および Nucleosil に適用したところかなり長時間を要したので、iPE を増率し、Nucleosil において10% iPE とした結果を Fig. 4 に示した。iPE は  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T の分離に効果的 ( $R=2.941$ ) であるが、IS が  $\beta$ -T に接近しさらにはその後方にあらわれるようになる。Fig. 4 では IS は別に注入して示した。このことから、Fig. 3 に示したように0.3% iPrOH にさらに2% iPE 添加したとき分析時間が半減されながら IS、 $\beta$ -T および  $\gamma$ -T の分離が十分に維

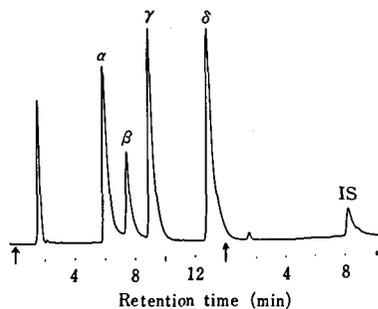


Fig. 4. Separation of tocopherols with addition of isopropyl ether into the mobile phase by normal phase chromatography

Column: Nucleosil (100-5),  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
 Mobile phase: isopropyl ether + *n*-hexane (10: 90), 2.0 ml/min

持されたことが理解できる。

なお兼松ら<sup>16)</sup>は0.3% iPrOH—1% ジオキサンを移動相としているが、ジオキサンに同様な効果を求めていると思われる。著者らはこのジオキサンについてはあとのNH<sub>2</sub>系カラムにおいてのみ検討した。

## 2.2 CN系カラム

CN修飾したシリカゲル系のカラムによるTocの報告はみられない。著者らはNucleosil CNにおいて若干の検討をしたが、個々のピークは良好であり $\alpha$ -T、

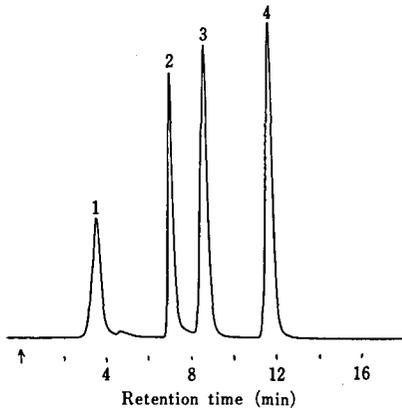


Fig. 5. Chromatogram of tocopherols by normal phase chromatography with CN-modified silica gel column

Column: Nucleosil  $\gamma$ CN,  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
Mobile phase: isopropyl ether + *n*-hexane (10:90), 1.0 ml/min  
Peak: 1 unknown, 2  $\alpha$ -tocopherol, 3  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherol (IS was same retention time), 4  $\delta$ -tocopherol

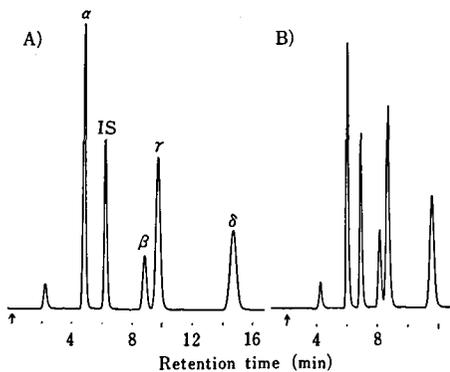


Fig. 6. Chromatograms of tocopherols by normal phase chromatography with NH<sub>2</sub>-modified silica gel column

Column: Lichrocart NH<sub>2</sub>,  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
Mobile phase: 1.3 ml/min, isopropanol + dioxane + *n*-hexane A) (1:3:96), B) (1:5:94)

$\gamma$ -Tおよび $\delta$ -Tの3者はよく離れて溶出するけれども、 $\beta$ -Tと $\gamma$ -Tはまったく分離せず、0.5% iPrOHではISが $\alpha$ -Tと、10% iPEではISと $\gamma$ -Tと重なった (Fig. 5).

## 2.3 NH<sub>2</sub>系カラム

NH<sub>2</sub>で修飾したシリカゲルのカラムは順相に用いてTocの分離に推奨されており<sup>7)</sup>最近よく用いられる傾向がみられる<sup>15)</sup>。

Lichrocart NH<sub>2</sub>において1% iPrOH/ヘキサンにより5ピークはよく分離したが、分析時間が大 ( $v_R$  約38 ml)であったので、これにジオキサンを添加してFig. 6-Aの結果を得た。しかしさらにジオキサンを増率して1% iPrOH—5% ジオキサンとすると $\beta$ -Tと

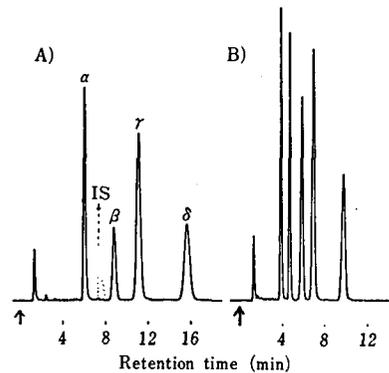


Fig. 7. Typical and modified chromatograms of tocopherols with NH<sub>2</sub>-modified silica gel column

Column: Lichrocart NH<sub>2</sub>,  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
Mobile phase: 2.3 ml/min, A) isopropyl ether + *n*-hexane (50:50), B) isopropanol + isopropyl ether + *n*-hexane (0.5:25:74.5)  
Chart speed: 5 mm/min

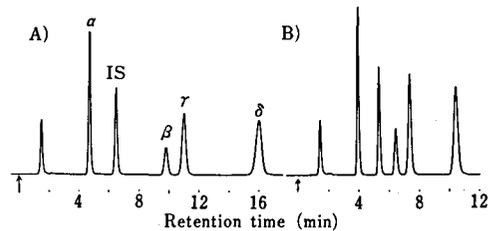


Fig. 8. Typical and modified chromatograms of tocopherols with NH<sub>2</sub>-modified silica gel column

Column: Nucleosil  $\gamma$ NH<sub>2</sub>,  $\phi$  4  $\times$  250 mm  
Mobile phase: 2.0 ml/min, A) isopropanol + *n*-hexane (1:99), B) isopropanol + isopropyl ether + *n*-hexane (1:5:94)

Table 1. Number of theoretical plate and tailing factor of the columns used in the present study

column	theoretical plate*1			T*2
	N	N <sub>h/2</sub>	N <sub>4.4</sub>	
(reversed phase)*3				
Lichrocart RP-18	4565	5489	4111	1.262
Nucleosil <sub>5</sub> C <sub>18</sub>	4096	6771	3787	1.357
μ-Bondapak C <sub>18</sub>	3283	3891	3312	1.059
(normal phase)*4				
Nucleosil 100-5	3821	5292	2822	2.639
Nucleosil <sub>5</sub> CN	5453	7318	4680	1.325
Lichrocart NH <sub>2</sub>	5142	5658	5403	1.105
Nucleosil <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	7465	9558	7464	1.160

\*1  $N=16(t_R/W)^2$ ,  $N_{h/2}=5.54(t_R/W_{h/2})^2$ ,  $N_{4.4}=25(t_R/W_{4.4})^2$ \*2 tailing factor  $T=W_5/2f$ (W: width of peak measured by extrapolating the relatively straight sides to the baseline,  $W_{h/2}$ : width of peak at half height,  $W_{4.4}$ : width of peak at 4.4% height,  $W_5$ : width of peak at 5% height.)\*3 measured with the peak of  $\alpha$ -tocopherol\*4 measured with the peak of  $\delta$ -tocopherol

$\gamma$ -T の分離は不完全となった (Fig. 6-B).

NH<sub>2</sub> 系カラムにおいて iPE+ヘキサン (1:1) を移動相とした例<sup>14)</sup> にならない, これを Lichrocart NH<sub>2</sub> に適用した結果を Fig. 7-A に示したが, 分析時間が長く ( $v_R$  約 35 ml), IS と  $\beta$ -T が近接しているため, 1% iPrOH と等量混合して移動相としたところ時間も短縮されて 5 ピークの分離は極めて良好であった (Fig. 7-B) (ただし Fig. 7 のみチャートスピード 5 mm/min).

Nucleosil NH<sub>2</sub> においても類似したよりよい結果が得られた. このカラムにおいては 1% iPrOH/ヘキサンを移動相として  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T はかなり離れて ( $R=2.50$ ) いるが, 長時間を要する ( $v_R$  約 32 ml) (Fig. 8-A). そこで 1% iPrOH—5% iPE として時間も短縮し,  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T の分離も良好な ( $R=2.90$ ) 結果を得た (Fig. 8-B). さらに iPE を増率して 10% にすると IS は  $\beta$ -T に接近して分離不完全となり, 20% では IS は  $\beta$ -T の直後にあらわれて IS が実用に適しない.

## ま と め

逆相クロマトグラフィーは簡便で安定した結果が得られるので,  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T の分離を必要としない分析に応用され, 移動相は MeOH に水 2~5% 添加するとき 3 ピークがよく分離する.

4 種の Toc の分離には順相クロマトグラフィーが適し, 移動相としてのヘキサンに添加する極性溶媒と

しては, iPE が  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T の分離には効果的であるが, IS の分離を考察するとき iPrOH との共存が必要であり, 分析時間も短縮できる. 使用したカラムのなかでは, シリカゲル系は若干テーリングがみられ, NH<sub>2</sub> 系カラムの方がすぐれていた. Lichrocart NH<sub>2</sub> において 0.5% iPrOH—20% iPE, Nucleosil <sub>5</sub>NH<sub>2</sub> において 1% iPrOH—5% iPE により 5 種の試料物質はすぐれた分離を示した.

使用したカラムの性能を 3 方式の理論段数<sup>7)</sup> およびテーリング係数<sup>4,5)</sup> として Table 1 に示した. 条件検討の主要な経過はクロマトグラムによって示したが, これらを含めて最も問題であった  $\beta$ -T と  $\gamma$ -T の分離について分離度 ( $R$ ) を測定して Table 2 に示した. なお記録紙上の測定ではピーク幅の測定は接線法による底辺幅が簡便であると思われたが, 半値幅の測定も行って参考に附した.

## 文 献

- 1) 勝井五一郎: 油化学, 32, 411 (1983).
- 2) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解, p. 206 (1980) 金原出版.
- 3) 日本食品工業学会編: 食品分析法, p. 486 (1982) 光琳
- 4) USP XXI (1985)
- 5) 日本薬局方第11版 (1986)
- 6) 武藤義一編: カラム充填剤の選択と使い方, p. 26 (1983) 講談社

Table 2. Resolution of  $\beta$ - and  $\gamma$ -tocopherols with various conditions by normal phase chromatography

column mobil phase*1	$\alpha$ *2	resolution*3		reference	
		R	$R_S$		
Nucleosil 100-5 ( $\phi$ 4×250 mm)					
iPrOH+H	(1 : 99)	1.119	0.644	0.657	
	(0.5 : 99.5)	1.136	1.154	1.177	
	(0.3 : 99.7)	1.154	2.143	2.287	Fig. 3
iPrOH+iPE+H	(0.3 : 2 : 97.7)	1.170	1.875	1.891	Fig. 3
	(0.5 : 1 : 98.5)	1.160	1.143	1.176	
	(0.5 : 2 : 97.5)	1.149	1.155	1.206	
	(0.5 : 2.5 : 97)	1.171	1.371	1.470	*4
	(0.5 : 5 : 94.5)	1.214	1.250	1.279	*5
iPE+H	(10 : 90)	1.254	2.941	2.941	*5, Fig. 4
Lichrocart NH <sub>2</sub> ( $\phi$ 4×250 mm)					
iPrOH+H	(2 : 98)	1.102	1.272	1.373	
	(1.5 : 99.5)	1.108	1.400	1.471	
	(1 : 99)	1.123	1.778	1.889	
iPrOH+Dioxane+H	(1 : 3 : 96)	1.127	1.619	1.563	Fig. 6
	(1 : 5 : 94)	1.143	1.400	1.401	Fig. 6
	(0.5 : 5 : 94.5)	1.149	1.777	1.882	
iPrOH+iPE+H	(1 : 20 : 79)	1.191	2.033	2.078	
	(0.5 : 25 : 74.5)	1.238	2.571	2.443	Fig. 7
	(0.5 : 20 : 79.5)	1.167	2.301	2.472	
	(0.5 : 10 : 89.5)	1.179	2.143	2.167	
iPE+H	(50 : 50)	1.232	2.308	2.371	*6, Fig. 7
	(25 : 75)	1.236	2.600	2.781	*6
Nucleosil 5NH <sub>2</sub> ( $\phi$ 4×250 mm)					
iPrOH+H	(2 : 98)	1.123	1.639	1.756	
	(1 : 99)	1.145	2.500	2.353	Fig. 8
iPrOH+iPE+H	(1 : 5 : 94)	1.191	2.898	3.056	Fig. 8
	(1 : 10 : 89)	1.205	2.539	2.659	*4
	(1 : 20 : 79)	1.243	2.347	2.647	*5

\*1 iPrOH: isopropanol, H: *n*-hexane, iPE: isopropyl ether.

\*2 relative retention (selectivity):  $\alpha = (t_R^I - t_0) / (t_R^{\beta} - t_0)$

\*3  $R = (t_R^I - t_R^{\beta}) / \frac{1}{2}(W^{\beta} + W^I)$ ,  $R_S = (t_R^I - t_R^{\beta}) / \frac{1}{2}(W_{h/2}^{\beta} + W_{h/2}^I)$ .

\*4 Separation of IS and  $\beta$ -T was incompletely ( $t_R$ : IS <  $\beta$ -T).

\*5 Separation of  $\beta$ -T and IS was incompletely ( $t_R$ :  $\beta$ -T < IS).

\*6 Separation of  $\alpha$ -T and IS was incompletely ( $t_R$ :  $\alpha$ -T < IS).

- 7) J. J. Kirkland: High Performance Liquid Chromatography, p.10 (1982), John Wiley & Sons Inc.
- 8) 阿部皓一, 大前雅彦, 阿部 靖, 勝井五一郎: ビタミン, 53, 385 (1979).
- 9) A. P. DeLeenheer et al.: J. Chromatog., 162, 408 (1979)
- 10) S. K. Howell, Y. Wang: J. Chromatog., 227, 174 (1982)
- 12) 阿部皓一, 勝井五一郎: ビタミン, 49, 259(1975)
- 13) 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正: 日食工誌, 31, 459 (1984).
- 14) J. Cillard, J. Gabaille, P. Cillard: J. Chromatog., 347 (1985)
- 15) 寺田志保子, 増井俊夫, 渡辺圭一郎: 食衛誌, 26, 73 (1985)
- 16) 兼松 弘ら: 油化学, 31, 456 (1982)

## 昭和56～60年度日本産あへんのモルヒネ含量について

岡田敏史・中原 裕・四方田千佳子・柴田 正・持田研秀\*・伊阪 博

## Morphine Content of Japanese Opium Harvested during 1981 to 1985

Satoshi OKADA, Hiroshi NAKAHARA, Chikako YOMOTA,  
Tadashi SHIBATA, Kenshu MOCHIDA\* and Hiroshi ISAKA

Morphine contents of Japanese opium harvested during 1981 to 1985, were examined according to JP X. Morphine contents were ranged from 8.03 to 17.20%, and the average content was 13.07%.

(Received May 31, 1986)

あへん法32条により、昭和56～60年度に収納された和歌山県、岡山県および香川県産あへん57検体中のモルヒネ含量について報告する。

研究用に栽培したけしより得られたあへんについて、第十改正日本薬局方「アヘン末」定量法<sup>1)</sup>にしたがってモルヒネの定量を行った。

## 実験材料および方法

和歌山県、岡山県および香川県のけし耕作者より収納されたあへん、ならびに和歌山県甲種栽培研究者が

## 結果および考察

年次別、県別収納あへんの平均モルヒネ含量とその範囲について Table 1 にまとめて示した。また、

Table 1. Morphine content of Japanese opium harvested from 1981 to 1985

Crop season	Prefecture	Number of samples	Aver.morphine content (%)	Range of morphine content (%)
1981	Wakayama	1	15.17	
	Wakayama*	1	12.46	
	Okayama	6	14.30	11.49-17.20
	Kagawa	4	14.48	10.92-17.62
1982	Wakayama	1	15.07	
	Wakayama*	1	12.57	
	Okayama	4	11.22	9.16-13.21
	Kagawa	4	14.54	13.86-15.18
1983	Wakayama	1	15.58	
	Wakayama*	1	13.87	
	Okayama	5	12.61	9.41-13.90
	Kagawa	4	9.84	8.03-11.71
1984	Wakayama	1	13.80	
	Wakayama*	1	10.55	
	Okayama	6	13.76	10.46-16.77
	Kagawa	4	13.17	11.76-14.99
1985	Wakayama	1	14.71	
	Wakayama*	1	14.67	
	Okayama	6	12.53	10.41-13.79
	Kagawa	4	11.72	11.64-11.82
		Total 57	Aver. 13.07	Range 8.03-17.20

\* Samples cultivated only for research works

\* 現フナイ薬品工業(株)

Table 2. Classification of Japanese opium samples according to morphine content harvested from 1981 to 1985

Prefecture	Morphine content(%) and number of samples										
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	Total
Wakayama			1		2	2	2	3			10
Okayama		2	2	5	3	8	4		2	1	27
Kagawa	2		1	8	1	1	4	1		2	20
Total	2	2	4	13	6	11	10	4	2	3	57

Table 2 にはモルヒネ含量による頻度分布を示した。

昭和56～60年度に和歌山県，岡山県，香川県のけし耕作者および甲種栽培研究者より収納されたあへんのモルヒネ含量は平均 13.07% であり，その範囲は8.03～17.20%であった (Table 1)。モルヒネ含量の頻度をみると11～14%の間に集中しており，8%以下あるいは17%以上という試料は極めて少なく例外的であった (Table 2)。

昭和51～55年度産あへんの収納試験成績<sup>2)</sup>と比較すると平均含量は1.5%低下しており，頻度分布も低含

量側へシフトしている。すなわち昭和51～55年度産あへんではモルヒネ含量15%以上の試料が全62検体中27検体 (44%) であったのに対し，昭和56～60年度産あへんでは57検体中9検体 (16%) へと低下している。

## 文 献

- 1) 厚生省編：第十改正日本薬局方，p. 876 (1981)。
- 2) 持田研秀，岡田敏史，中原 裕，四方田千佳子，野口 衛，岡 恒：衛生試験，101，159 (1983)。

# 業 務 報 告

## Annual Reports of Divisions

### 昭 和 60 年 度 業 務 概 況

所 長 鈴 木 郁 生

科学技術の振興が話題となっている一方、行革審から行政改革の推進方策に関する答申が出され、その中には科学技術行政の在り方について、特に国の研究機関の活性化について言及されている。また科学技術会議は科学技術政策大綱について答申し、21世紀に向けての科学技術振興の方針を示したが、次いで国立試験研究機関の中長期的在り方についての諮問が科学技術会議に提出され、調査審議が始まろうとしている。このような状況の中で当所の自主点検は全所員の協力により昨年度一杯で成案を得、200頁に及ぶ自主点検報告書としてまとめられ、年度当初に関係機関に対する説明が行われ、一応その了承を得ることができた。点検の結果、明確になった課題等に具体的に対応していくため、現実に業務内容、組織の見直しをしていくことが今後の課題となった。このため本年度は将来計画委員会を中心に組織改革を含む業務の再検討について論議が精力的になされ、その結果委員会は一応の基本的な考え方として以下の事項を中心に具体化を進めることとした。①国家検定業務の縮小、先端技術利用など新たな課題へ対応するため、室の新設統廃合並びに部名等の整備。②毒性に関する分野の研究強化。③大阪支所の今後の在り方。④薬用植物栽培試験場の整理統合。

しかしこれらの改革を具体化していくためには老朽化が激しく、かつ、分散している施設の問題を始め、今後さらに細部にわたって調整を進めていかねばならない問題が多く、1つ1つ解決していく必要がある。また昭和60年7月には貿易摩擦解消のため「市場開放の行動計画（アクション・プログラム）」が政府決定され、医薬品の国家検定対象品目も予想以上に早いペースで縮小されていく等、当所としても緊急を要する課題もあり、全所員の協力を得てできるだけ早い機会

に上記事項の実現を図って行きたい考えである。

昭和60年10月1日より変異原性部に細胞開発研究室が新設され、昨年度完成した3号館の細胞バンク施設で業務を開始している。これにより新しい細胞開発の研究が促進されていくのみならず「対がん10か年総合戦略」の一環として昭和59年10月から(財)がん研究振興財団の受託を受けて実施している細胞バンク事業の管理体制も確立強化され、がん制圧に関する研究の一層の推進に寄与していくものと期待している。なお細胞バンクでは本年度、がん研究者に対し300件を超すがん研究用細胞の供給を行っており、発足以来この事業は着実な歩みを示している。

また、これらの研究に関連して当所における組換えDNA実験の安全性を確保していくため、昭和60年9月「組換えDNA実験安全管理規則」を制定した。

厚生省では厚生科学技術研究の長期的、総合的な振興発展を推進していくため厚生科学会議を設置し、官民共同研究の推進による振興方策を策定した。当所においても今後は民間機関等との共同研究を拡大していくべく、61年度予算には新たな受託研究費を計上するとともに9月には「国立衛生試験所受託研究取扱規程」を制定した。以上述べたように科学技術の急速な進歩は当所の業務にもかなりの影響を与えつつあるが、慎重な対応が必要であると思う。

国際関係業務については、本年度もWHOの国際化学物質安全性評価計画(IPCS)、特定地域における有害物質の人体暴露評価計画(HEALS)への積極的な協力を中心に数々の国際交流技術協力等が実行された。当所の指導のもとに昨年度末に完成したインドネシアの医薬品食品管理試験所の実験棟の開所式には小職、戸部毒性部長、田中悟室長も現地滞在中の石関忠一室長、会田喜崇技官とともに参加した。この計画では引

続き各種の試験法や標準品の研究、実験動物の飼育法等の技術指導を行って来た結果、試験技術の向上は著明であり、一部実験用小動物の自給が可能になってきている。このほかスリランカ国必須医薬品製剤センター建設計画基本計画調査に原田生薬部長が参加している。

本年は筑波学園都市で科学万博が開催されたが、この催しについて筑波薬用植物栽培試験場が積極的に参加し博覧会に貢献している。

施設関係の整備については、筑波薬用植物栽培試験場に薬用植物遺伝子資源貯蔵室を設置した。これにより薬用資源の効率的な保存確保のための有効な途が開けたものと思う。また安全性生物試験研究センター設立以来の懸案であったボイラーの増設ができ、一応不安は解消することができた。

全国衛生化学技術協議会の第22回年会は10月8日、9日名古屋市衛生研究所主催により、名古屋市で開催された。当所からも原田生薬部長の「生薬製剤の諸問題について」と題する特別報告が行われたほか、例年どおり盛会で多数の報告が発表され実り多き会合であった。

本年は第11改正日本薬局方編纂の大詰めの年であり、いつものことながら担当者は多忙であった。そのほか職員各位にはそれぞれ忙しい年であったと思うが、小職も各省直轄研究所長連絡協議会（直研連）の代表幹事を務めることとなり、国立試験研究機関全体にかかわる共通問題等の解決のため各省の研究所長との会合、関係方面への折衝等に時間を割かれることが多い年であった。また直研連の仕事は平常業務に加え事務量を多くしたが、積極的にこれを支援した総務部庶務課の労を謝したい。

直研連の全体会議では「科学技術と人間及び社会とのかかわり」と題して討論会を催し、例年になく好評であった。今後ますます進展する科学技術に遅れないよう努力する一方、科学技術だけがひとり歩きしないよう、その人間とのかかわりも重視することを忘れてはならないと考える。

## 総 務 部

部 長 池 上 忠 義

### 1. 組 織

昭和60年10月1日から、安全性生物試験研究センター変異原性部に室の新設が認められたことに伴い国立衛生試験所組織細則の一部改正（細胞開発研究室の新

設）が行われた。

### 2. 定 員

昭和59年度末の定員は296名であったが、第6次定員削減計画に基づき行政職（二）3名、研究職1名、計4名の定員削減と細胞開発研究室の新設に伴う研究職1名（6ヵ月）の増員により、昭和60年度末の定員は、指定職2名、行政職（一）49名、行政職（二）33名、研究職209名となった。

なお、昭和61年度は、増員が認められなかった。

### 3. 予 算

昭和60年度予算総額は、2,740,838千円で前年度の2,769,383千円に比較して28,545千円の減額となった。

増額の主な内容としては、①変異原性部研究職1名の増員および昇給源資、給与改善等による人件費の増額23,601千円、②標準品製造費の原価計算所要額改定および吉草酸ベタメタゾン他5品目の追加による増額2,078千円、③施設管理事務経費の上下水道水道料単価改定に伴う光熱水料の増額5,570千円、④医薬品等の国家検定および検査等に必要経費に係る原価計算所要額改定による検定検査材料費の増額13,686千円が認められた。

新規予算額としては、対がん10か年総合戦略経費の細胞バンク受託研究事業66,992千円および施設管理事務経費のメンテナンス所要額（電気技師1名）4,968千円が認められた。

減額の主な内容としては、対がん10か年総合戦略経費の試験研究所設備整備費121,359千円が減額となっている。

移替予算については、昭和60年度予算は138,236千円で前年度の148,941千円に比較して10,705千円の減額となっている。

新規テーマとしては、国立原子力試験研究費において3課題（①薬用植物の優良品種の選抜法の開発に関する研究10,740千円、②標識化合物と細胞工学的手法の利用による医薬品、生活関連物質等のアレルギー感作性およびその安全性評価法の確認に関する基礎的研究6,091千円、③医薬品の生体利用率等に及ぼす製剤材料の影響判定に用いる標準標識化合物の作成とその評価8,437千円）、国立機関公害防止等試験研究費において2課題（①脂溶性環境汚染物質に関するヒューマンモニタリング手法の開発とその応用に関する研究27,767千円、②環境汚染物質の低濃度レベルにおける生体内変異原活性検出法の開発に関する研究9,532千円）が認められた。

なお、昭和60年度事項別予算額は別表のとおりである。

## 資料 昭和60年度予算額

事 項	昭和59年度 (A)	昭和60年度 (B)	対前年度差 引増△減額 (B)-(A)	備 考
	(千円)	(千円)	(千円)	
(組織)厚生本省試験研究機関	2,620,442	2,602,602	△17,840	
(項)厚生本省試験研究所	2,380,770	2,361,709	△19,061	
国立衛生試験所運営費	2,380,770	2,361,709	△19,061	
人 件 費	1,626,153	1,649,754	23,601	
人 当 経 費	7,587	7,521	△66	
一般事務経費	38,711	38,640	△71	
研 究 費	222,884	222,280	△604	
特別研究費	16,247	16,386	139	1. 遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究 (9,137千円) 2. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究 (7,249千円)
標準品製造費	8,359	10,437	2,078	
安全性生物試験研究センター運営費	215,292	215,292	0	
薬用植物栽培試験場運営費	104,133	104,151	18	
情報活動運営費	13,466	13,139	△327	
施設管理事務経費	6,579	17,117	10,538	
対がん10か年総合戦略経費	121,359	66,992	△54,367	
(項)血清等製造及び検定費	151,181	164,867	13,686	
医薬品等の国家検定及び検査費	151,181	164,867	13,686	
一般事務経費	12,415	12,415	0	
事 業 費	138,766	152,452	13,686	
(項)厚生本省試験研究所施設費	88,491	76,026	△12,465	
国立衛生試験所施設整備費	88,491	76,026	△12,465	1. 筑波薬用植物遺伝資源貯蔵室設置工事(44,089千円) 2. 安全性生物試験研究センターボイラー増設工事(31,937千円)
(組織)厚生本省試験研究機関	148,941	138,236	△10,705	
(項)国立機関原子力試験研究費	53,745	64,538	10,793	
(項)放射能調査研究費	5,789	1,593	△4,196	
(項)国立機関公害防止等試験研究費	89,407	72,105	△17,302	
計	2,769,383	2,740,838	△28,545	

## 4. 施設整備費等

## (1) 厚生本省試験研究所施設整備費

昭和60年度は、筑波薬用植物遺伝資源貯蔵室設置工事44,089千円および安全性生物試験研究センターボイラー増設工事31,937千円を行った。

## (2) 各所修繕費(特別修繕費)

本所研究庁舎(2号館)昇降階段補修工事2,253千円を行った。

## 5. 手数料等の改正

## (1) 国家検定手数料

当所が検定することとされている医薬品(21品目)

の国家検定手数料は、昭和60年3月29日付厚生省告示第51号で改正され、同年4月1日から適用されることとなった。

なお、当所が検定することとされている国家検定品目は、昭和60年11月5日付厚生省告示第179号で新たに4品目が追加され、昭和61年3月1日付厚生省告示第22号で14品目が削除された。

## (2) 標準品交付手数料

当所が製造し、申請者に交付している医薬品試験用標準品(57品目)および色素試験用標準品(37品目)の手数料は、昭和60年3月29日付厚生省告示第52号で

改正され、同年4月1日から適用されることとなった。

なお、医薬品試験用標準品7品目が、昭和61年3月28日付厚生省告示第61号で追加された。

### (3) 試験検査依頼手数料

当所が依頼を受けて行う試験検査手数料は、昭和60年3月29日付厚生省告示第53号で改正され、同年4月1日から適用されることとなった。

## 6. その他

昭和60年度における部長職以上の人事異動は次のとおりである。

(60.4.1付)

辞 職 渡邊 登(総務部長)

(61.3.31付)

辞 職 加納晴三郎(大阪支所長)

辞 職 山羽 力(生物化学部長)

## 合成化学研究部

部 長 神 谷 庄 造

### 概要

宮原美知子技官は4月1日付をもって衛生微生物部第一室に配置換えになった。宮原美知子技官は、入所以来12年間当部において、主として「合成抗腫瘍剤のスクリーニングおよび作用機作に関する研究」に従事し、当部の歴史に残る立派な業績をあげた。当部での経験と実績をもとに、新分野での発展を期待している。

宮田直樹室長は NIH への出張を終え、1月28日に帰国した。また、4月1日付で福原 潔技官が採用になった。

### 研究業績

本年度は、継続のものとして、ホルムアルデヒド、パラジクロロベンゼン、多環芳香族炭化水素などの環境汚染物質の毒性発現機構に関する化学的研究、抗腫瘍剤の作用発現機構に関する化学的研究、標識化合物やモデル化合物の合成(他部との協力研究)、高分子医薬品添加物の構造特性と安全性に関する調査研究、各種公定書・基準書の作成、などを行った。以下に各項目について簡単に述べる。

#### 1. 生理活性物質の作用発現に関する化学的研究

(1) ラットやマウスに対するホルムアルデヒドの吸入試験によって鼻腔癌が発生することが毒性部で見出されているが、当部では、環境汚染物質としてのホルムアルデヒドの発癌機構についての化学的研究を行っ

ている。本年度は、ジベプチドのカルノシンとホルムアルデヒドの反応成績体の構造を決定することができた。水の存在下におけるホルムアルデヒドと各種生体高分子のモデル化合物との反応を行い、その多様な反応様式を整理し、細胞レベルにおける作用機構を推定できるようにしたい。

(2) ニトロソ尿素系抗腫瘍剤の合成研究において、carrier group としてピリジン、ピラジン、フランなどの複素環を有する化合物を多数合成し、その抗腫瘍性をスクリーニングしてきた。本研究のなかで有望な抗腫瘍剤候補を二、三見出している。これらの化合物をその抗腫瘍スペクトルによって分類すると次の A, B, C の三群となる。A 群 [PyCH<sub>2</sub>NHCON(NO)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]: AH-13 および L-1210 に有効、B 群 [PyCH<sub>2</sub>NHCON(NO)C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>]: AH-13 のみに有効、C 群 [PyCH<sub>2</sub>NHCON(NO)CH<sub>3</sub>]: L-1210 のみに有効。各群の化合物と DNA や酵素蛋白質のモデル化合物との反応成績体を解析することにより、腫瘍細胞レベルにおける活性化学種の生成と作用発現機構について推定した。また、各群の DNA 障害の様式をアルカリリユージョンの手法によって検討した。以上の成果を、本年秋の「構造・活性シンポジウム」および「反応と合成の進歩シンポジウム」で発表する。

#### 2. 生理活性物質の合成と化学反応に関する研究

(1) 汚染大気中に含まれる発癌性ニトロ多環芳香族化合物の化学的研究の一環として、多環芳香族炭化水素類のニトロ化における一般則(配向性)を解明するための基礎研究を行っている。また、これらのニトロ化合物の変異原性と毒性発現機構についての研究を変異原性部と共同研究している。

宮田は NIH に出張中、以前から発癌性が報告されていたが、その構造の複雑さのために、発癌機作が不明であったベンツ [c] クリセンの代謝物質を数種合成し、同時にベンツ [c] クリセンのチトクローム P-450 系での代謝研究を行い、発癌に関する究極的活性物質として Bay 領域のジオールエポキシドの存在を予測し、これを合成した。

(2) 昨年に続いて、抗腫瘍性ニトロソ尿素誘導体の合成研究の途中で得られた化合物について、次のような新反応を見出し、反応機構についてさらに展開することができた。i. 1-aryl-1-nitroso-3-(4-pyridylmethyl)urea 類のカルバミン酸エステル誘導体への変換、ii. 3,3-ジ置換 1-aryl-1-nitrosourea 類のトリアゼン誘導体への変換、iii. N-nitrosourea 類におけるニトロ基の転位、iv. 尿素誘導体のニトロ化における新閉環反応三種。

(3) 薬用植物の優良品種の選抜法の開発に関する研究(原子力試験研究費)のなかで、当部はハンシドコロ(ナス科)の有効成分であるスコポラミンの標識化合物の合成を分担した。各種誘導体の合成を検討した結果、nor-(−)-scopolamine-N-β-propionic acid が合成できたので放射線化学部へ提供した。

3. 当部より2名が委員として、日本薬局方、日本薬局方外医薬品成分規格〔第一部：医薬品原料、第二部：医薬品添加物〕、化粧品原料基準などの作成に当たっている。本年度は「第11改正日本薬局方」および「日本薬局方外医薬品成分規格1985」が発行された。

11局では構造式の記載法を、また、局外規については「日本薬局方外医薬品成分規格 原案作成要綱」をまとめた。

## 薬 品 部

部 長 内 山 充

### 概要

最近では医薬品の製造や試験の技術が急速に進歩すると同時に、剤形や製剤設計の改良による安定性や利用能の向上、あるいは体内動態の制御などの試みが多く見られるようになった。当部の業務も、薬事行政の動向や需要とも相まって、国家検定業務が縮小され、それに代わって新試験法の開発を柱に、GMPへの技術的支援、安定性の予測法の検討、生物薬剤学的評価法の確立、麻薬・覚醒剤を巡る技術開発などが拡充されている。

60年度当初に、武田 寧第三室長が第一室長に配置換えとなり、第三室長に石橋無味雄主任研究官が任命された。60年9月に林 譲技官が第二室に採用され、香取典子技官が第一室に配置換えとなった。61年3月31日大野昌子麻薬室長が定年退官し、4月1日に石上曉子技官が麻薬室に新規採用された。

### 業務成績

#### 1. 国家検定

ブドウ糖注射液 356件(うち1件はpH不適)、リンゲル液 5件、避妊薬21件を試験した。なお60年度末をもってリンゲル液と避妊薬は検定品目から削除された。

#### 2. 特別審査試験

新薬99件、かぜ薬・解熱鎮痛薬 102件の計 201件につき試験した。

#### 3. 一斉取締試験

塩酸エタンプトール錠、アクリノールガーゼ、乳酸

プレニラミン錠を対象に、計49品目につき試験を行った。

#### 4. 特別行政試験

あへんの試験国産25件、輸入60件、けしのアルカロイド(モルヒネ、コデイン)定量試験延 428件、けしからのアルカロイド定量試験延 200件、大麻の試験1件を行った。新薬承認申請の安定性試験に係る薬事法違反事件の収去検体19品目を試験した。また、無承認医薬品の疑いに係るいわゆる健康食品6種類につき試験した。

#### 5. 標準品の製造

向精神剤サイロシビン 0.25g、テノシクリジン 20gを合成し行政当局に供給した。

#### 6. 国際協力

インドネシア医薬品品質管理センターからの Ibrahim Koatma に対し約6ヵ月間生物薬剤学の研修を行った。フィリピン食品医薬品局との技術協力に参加した。

#### 7. その他

第11改正日本薬局方の改定作業には、中央薬審局方部会所属の委員幹事を初め多くの部員が参画した。このほか局外規作成、無承認医薬品監視指導マニュアルの作成、麻薬覚醒剤に関する技術情報の収集、MOSS協議関連の室温不安定医薬品の加速試験の標準的条件の設定、承認申請に係る徐放性製剤の評価、大蔵省税関技術者の研修、地方衛研技術者講習会などに協力した。

### 研究業績

#### 1. 医薬品の規格および分析法に関する研究

##### i) 日本薬局方に関連した規格および試験法

固形製剤の溶出試験法の設定基準と試験条件に関して、市販塩酸クロルプロマジン糖衣錠の溶出と崩壊の銘柄間変動を検討した(厚生科学研究, 薬務局安全課)。製剤中のエタノールの純度試験ヘッドスペース法の妨害成分の検索、グリセリンの定量法の開発、第2部製剤の薄層クロマトグラフィーの展開溶媒の検討などを行った(薬務局安全課)。高分子膜透過法によって製造された注射用水の品質評価と規格試験法に関して、総有機炭素の検出限度や他の化学分析指標との相関を調べ、さらに市販注射用蒸留水の実態値を測定した(厚生科学研究, 薬務局経済課)。局方収載麻薬製剤のHPLCによる定量法を検討した。

##### ii) 医薬品の分析化学的研究とその応用

光学活性移動相を用いたHPLCによりドーバの光学異性体を分離定量した。カルボキシル基を有する医薬品製剤の迅速分析法を確立した(薬務局監視指導

課). かぜ薬・解熱鎮痛剤の試験法の改定原案を策定した(厚生科学研究, 薬務局審査第二課). ラボラトリーロボットを用いた製剤分析の前処理の自動化およびデータ処理のオンライン化を行った.

2. 医薬品の物理的・化学的動態および安定性に関する研究

i) 固形医薬品の分解および異性化

臭化プロバンテリンと塩酸メクロフェノキサートの加水分解の温湿度依存性を速度論的に検討し, アスピリンの分解に及ぼす配合成分の影響を検索した. 動物飼料中のエテンザミド, ケルセチンの含量変化を分析した(厚生省がん研究). 塩酸ピロカルピンおよびドーバについて光学異性体相互の安定性を検討した. ビタミン K<sub>1</sub> 錠をモデルとして安定性の予測法としての加速試験の条件を解析した.

ii) 医薬品と各種成分との相互作用

エステル化合物とリポソームあるいは血液成分との反応による加水分解を解析した. セオライトのアンモニウムイオン吸着に関する特異性について既存の吸着剤と比較検討した.

3. 医薬品の有効性, 安全性に関する薬剤学的研究

i) 経口固形薬剤の生物学的利用能とそれに関連する *in vitro* 試験

イソニアジド腸溶錠の溶出速度の測定を行い, 利用能の同等性を試験する際の検出力向上に安定同位体標識化合物の利用を検討した. またデータ解析プログラム NONMEM を改良し, Population Pharmacokinetics について検討した.

ii) 生物学的利用能試験に用いる実験動物の検討

胃内容排出速度調整家兎におけるインドメタシンカプセルの生物学的利用能を検討した. さらにビーグル犬, ミニプタ, 家兎の胃内容排出速度を測定しヒトとの関連で評価した.

iii) 経口固形薬剤の生体利用性を変動させる要因の検討と評価

胃液酸度簡易検査用剤「GA テスト」を用いてヒトの胃液酸度分布を調査し, ヒトの試験データ解析と, *in vitro* 試験条件設定とにおける問題点を考察した. 医薬品添加物で処方変更により主薬の吸収に影響を与える可能性のないものの種類と量につき検討した(厚生科学研究, 薬務局審査第一課). また, 影響のある添加物を検知するのに役立つモデル薬物を検索した(原子力研究).

iv) 非経口薬剤の生物薬剤学的検討

インドメタシンの油脂性坐剤からの放出試験を検討し標準法を提案した. さらに家兎, プタにおける生物

学的利用能と放出速度との関連を検討した(厚生科学研究, 薬務局安全課).

4. 麻薬および習慣性薬物に関する研究

i) 覚醒剤およびその代謝物の分析

メタンフェタミンをサルに投与し, 毛への蓄積, 分布を経時的に追跡した. 覚醒剤代謝物のキャピラリー GC 分析法を確立し, 塩酸エチレフリン, メチルエフェドリンにつきヒトとサルの尿中代謝物の動態を比較検討し, ジメチルプロバミン, メタンフェタミンはサルの尿中での代謝物の消長を検討した(厚生科学研究, 薬務局麻薬課).

ii) 向精神薬の微量分析

フェンサイクリジンとその関連化合物 PGE および PCPy との鑑別法を確立した.

iii) 大麻, けしおよびコカ葉に関する研究

北海道, 筑波, 和歌山の各栽培試験場で採取された多系統のあへんおよびけしがら中のモルヒネ, コデイン含量を測定し, 前年度との比較検討を行った. HPLC によるコカインの分析法を検討した.

## 生物化学部

部長 田中 彰

### 概要

昭和61年3月31日付で山羽力部長が定年退官され, 佐藤浩第一室長も同日付で退官された. 後任の部長には田中彰医化学部長が配置換えとなった. 第一室長の後任には福田秀男第二室長が配置換えとなり, 第二室長には谷本剛主任研究官が昇任した. また, 4月1日付で神田ナナ技官が採用され, 第二室に配属された. JICA の依頼によりインドネシア国立薬品食品品質管理試験所の食品微生物室長 Dr. Virginia W. Kadarsan が標準品に関する業務の研修のため, 4月以来当部に留学中である. 福田第一室長は2月23日より3月2日まで製薬技術援助のためラオスへ出張し, 次いで5月9日よりインドネシアの上記の試験所へ技術指導のため3箇月間出張中である.

### 業務成績

1. 国家検定

インシュリン製剤 106 件および脳下垂体後葉関係62 件 (オキシトシン注射液46件, パソブレン注射液3 件, フェリブレン注射液12件について検定を行い, 全件合格であった.

2. 一斉取締試験

セラペプターゼを含有する内服固形剤29件について

試験を行い、その結果はいずれもそれぞれの含有規格に適合した。

### 3. 特別審査試験

ホルモン製剤など34件について審査を行った。

### 4. 標準品製造

昭和60年度の標準品製造品目およびその出納状況については、巻末の表を参照されたい。

### 5. その他

日本薬局方第11改正に伴う業務(業務局安全課)、医薬品原料規格整備に関する検討(厚生科学研究、業務局審査第一課及び第二課)、高分子膜透過法によって製造された注射用水の品質評価と規格に関する研究(厚生科学研究(鈴木班)、業務局経済課)、国家検定対象医薬品および検定規準の改善に関する研究(厚生科学研究、業務局監視指導課)などを行った。

また第11改正日本薬局方収載医薬品の試験法、遺伝子組換え、細胞培養を応用して生産される医薬品の評価などについて協力した(日本薬剤師会および医薬品先端技術振興協会)。

## 研究業務

### 1. 医薬品の規格および試験法に関する研究

#### i) ステロイドホルモンの定量法

ヒドロコルチゾンとピロールとによる呈色物質の分離、精製を試みた。

#### ii) ジギタリス配糖体の定量法に関する研究

高速液体クロマトグラフ法によるジゴキシン製剤の定量法および含量均一性試験法を検定した。

iii) オキシトシン、レセルピンの定量法に関する研究

高速液体クロマトグラフ法による上記化合物の定量法について検討した。

#### iv) 医薬品製剤の迅速分析法作成に関する研究

塩化リゾチーム製剤の試験法を検討した。

v) 生物活性試験等を必要とする医薬品の規格および試験法に関する研究

合成基質を用いた塩化リゾチーム製剤の試験法、ブラジキニンエンザイムイムノアッセイ(EIA)を用いたカリジノゲナーゼ製剤の試験法について検討した。

vi) 遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究(特研)

① 遺伝子組換えにより生産されるヒトインシュリンと混入の予想される類縁物質との同時分析法について検討した。

② ヒト成長ホルモンの高速液体クロマトグラフ法による分析法について検討を加えた。

③ ヒト成長ホルモンの標的細胞としての肝細胞、

白血球細胞について、培養条件、測定マーカーの検索を行った。

2. 医薬品の有効性および安定性に関する生化学的研究

i) ペプチドおよび蛋白質製剤の純度に関する研究  
高速液体クロマトグラフ法により、溶液中でのインシュリンの安定性および分解物を検討した。

ii) 多形核白血球機能の分子機構ならびに各種薬剤の有害作用発現に関する生化学的研究  
モルモット腹腔内浸出多形白血球の食作用に伴う水酸化ラジカルの測定法について検討した。

iii) バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質確保に関する研究

組換え DNA 技術や細胞培養法を応用して生産される医薬品の品質確保上留意すべき点を検討した(厚生科学研究(野島班)、業務局審査第一課)。

iv) バイオテクノロジーにより生産される医薬品の試験的製造とその性状に関する研究

化学合成したヒト成長ホルモン遺伝子の発現蛋白質の精製とその蛋白質の化学的性質および生物活性について検定した。

v) 標識化合物の利用による医薬品等の生体免疫機能に及ぼす影響に関する研究

ヒトリンパ球の芽球様細胞への転換反応に対する各種解熱、鎮痛、消炎剤の影響について検討を行った。

### 3. 生体内活性物質の作用機序に関する研究

#### i) 糖尿病合併症の発症に関する酵素化学的研究

① ケトヘキソースキナーゼの関与について考察した。またアルドース還元酵素の反応機構を明らかにした。

② 水晶体アルドース還元酵素阻害剤の合成と構造活性相関に関する研究

ベンジル 5-フェニル-2-オキサゾールカルバメートの阻害効果における構造と活性の相関について検討した。さらに阻害剤が作用しうる酵素側の構造について検討した。

### 4. 標準品に関する研究

#### i) 化学分析用標準品の品質規格に関する研究

副腎皮質ステロイド類標準品の品質規格の設定を行った。

#### ii) 生物活性等試験用標準品の設定に関する研究

インシュリン、オキシトシンの標準品につき、生物活性と同時に理化学的試験にも適用するための品質規格の検討を行った。

iii) マレイン酸エルゴメトリン、リン酸ヒスタミンおよびレセルピンの各標準品の新ロットへの更新を行

った。

## 放射線化学部

部長 寺尾 允 男

### 概要

昭和60年度は試験業務として放射性医薬品の特別審査試験, 研究業務として 1) 放射性医薬品に関する研究, 2) 重金属, 特に鉛の生体内動態に関する研究, 3) 免疫担当細胞の機能に関する研究, 4) 生体膜の機能と構造に関する研究, 5) 遺伝子組換え等を利用して生産される医薬品に関する研究, などを行った。

### 業務成績

#### 1. 放射性医薬品の特別審査試験

体内適用および体外適用放射性医薬品について試験あるいは書類審査を行った。その結果, 1品目について表現等の問題が認められ, 再検討することが要求された。

審査の対象となった製品別品目数は次のとおりである。

体内診断用放射性医薬品	1品目
体外診断用放射性医薬品	1品目

### 研究業務

#### 1. 放射性医薬品に関する研究

i) 放射性医薬品の標的臓器の生化学的機能に及ぼす影響について検討した。昭和60年度は副腎診断薬として用いられている  $^{131}\text{I}$ -アドステロールの副腎機能に及ぼす影響を, カテコールアミンの生成面から検討した。 $^{131}\text{I}$ -アドステロールをラットに常用量および50倍量投与したが, いずれも対照群と比べて有意の差は認められなかった(原子力試験研究費)。

ii) モノクローナル抗体を用いるラジオイムノアッセイの臨床分析への応用研究の一環として, ヒト成長ホルモンおよび  $17\alpha$ -ヒドロキシprogesteron に対するモノクローナル抗体を調製し, それらの免疫化学的性質を明らかにするとともに, それらを用いたアッセイ法を検討した(原子力試験研究費)。

#### 2. 重金属, 特に鉛の生体内動態に関する研究

Pb-チオネインの生成機序, 免疫化学的性質ならびに生理的意義について研究した。鉛化合物の投与により, ラット肝臓中で誘導合成される Pb-チオネインは, ポリクローナル抗体を用いた実験では, 抗原的に他の重金属で誘導されるチオネインと差は見いだされない。鉛の胆汁排泄は, 大部分 Pb-チオネインに依存して起こることが明らかとなった。

#### 3. 免疫担当細胞の機能に関する研究

化学物質の免疫毒性試験法について検討した。IL-1, IL-2, IL-3 の活性を, 種々の培養細胞株などを用いて測定する方法を検討した。また, 抗体産生活性の簡便かつ短時間測定法を確立した。さらに, 即時型アレルギー反応を *in vitro* で解析するため, ラット好塩基球細胞株を用いる測定法を確立した(科学振興調整費)。

#### 4. 生体膜の構造と機能に関する研究

i) 即時型アレルギー発症の生化学的機構を解明する目的で, タンパクリン酸化と脱顆粒反応の関連を検討した結果, 脱顆粒反応には IgE レセプターの  $\beta$  サブユニットおよびミオシン軽鎖のリン酸化が必須の反応であることが判明した(科学技術振興調整費)。

ii) 脳のモルヒネレセプターの同定, 単離およびその機能について検討した(科学技術振興調整費)。

iii) ヒト成長ホルモンレセプターの同定, 単離およびその機能について検討した。

#### 5. 遺伝子組み換え等を利用して生産される医薬品に関する研究

i) ヒト成長ホルモンに対するモノクローナル抗体の抗原決定部位などの性質を検討した(特別研究)。

ii) 融合細胞などの培養細胞を用いて生産される高分子医薬品の品質に関する問題点の調査を行った(厚生科学研究(野島班), 業務局)。

## 生 薬 部

部長 原田 正 敏

### 概要

昨年度に引き続き, 生薬・生薬製剤の規格試験法の基礎的研究および生薬, 薬用植物, 天然有害物質の化学的・薬理的研究を行った。また, 検定検査として, 特別審査試験と医薬品一斉取締試験を行った。

### 業務成績

1. 特別審査 従来と同様, 生薬または漢方エキス剤を含む製剤(かぜ薬97件)について審査を行った。前年度指摘した添付実験資料の内容不備は試験方法も含めて改善のあとがみられた。

2. 医薬品一斉取締試験 局方生薬110件(カッコン, カンゾウ, シャクヤク)および局方粉末生薬19件(カンゾウ末, シャクヤク末)の計129件について局方試験を行い, 全件適品であった。これらは局方規定により管理製造されているので, 全件適品であったことは当然といえよう。しかし, 粉末生薬は形態鑑別

が困難であるため、不適品が出やすいことが従来から懸念されている。今回の粉末生薬19件のうち、カンゾウ末2件に多少の注意を払わせるものがあった。日局11にはカンゾウ末、シャクヤク末をはじめ15種に新たに薄層クロマトグラフ法の試験が導入されたが、今後この確認試験も品質評価に役立つと考えられる。

#### 研究業績

##### 1. 生薬および生薬製剤の規格試験法の基礎研究

###### i) 生薬の規格試験法の研究

前年度に引き続き、枳実、栝楼根、山椒、桃仁、杏仁、五味子、厚朴などの品質評価法について検討を行った。また、局方改正に伴い、その原案作成のため、各種生薬の薄層クロマトグラフ法について検討した。

###### ii) 漢方製剤の薬理学的研究

桂皮配合漢方製剤のうち、五苓散の品質評価のためにケイヒ酸が指標成分となり得ることを認めた（厚生科学研究，薬務局審査第二課）また、麻黄配合漢方製剤中の麻黄アルカロイドの定量を行うため、高速液体クロマトグラフ法を検討した（厚生科学研究，薬務局安全課）。

漢方製剤の生物学的試験法の作成を目的として、五苓散につき構成生薬5種のLD<sub>50</sub>を調べた。また、甘草中のグリチルリチンの消化管吸収を研究するため、その定量法を検討した。

##### 2. 植物資源の医薬的利用に関する研究

###### i) 薬用植物の化学的品質評価

カノコソウ属植物の優良系統種選抜を目的とし、有効成分テルペン類の分析方法を確立した。

ii) 有用な薬理活性を持つ新たな植物の検索とその利用

昨年度に引き続き、今年度はインドネシア産薬用植物メタノールエキスにつき薬理活性を検討した。その結果4種のショウガ科植物に胆汁分泌促進作用、またこれらの植物、キツネノマゴ科植物1種、ニクズク科植物1種に抗炎症作用が認められた。この研究の一環として、バンドン工科大学薬学部の Dr. Asep Gana Suganda が当研究室で薬理試験を担当し（昭和61年1月15日～2月28日）、また関田節子主任研究官が同大学薬学部へ出張し、共同研究の打合せ、研究材料の収集を行った（2月16日～3月14日）（科学技術振興調整費，科学技術庁研究調整局総合研究課へ報告）。

###### iii) 繁用生薬の成分検索とその生物活性の研究

女性用薬として重要なシャクヤク、センキュウを中心に薬理活性を検討した。シャクヤクについては3種類の種のメタノールエキスがラット子宮運動を亢進または抑制することを認めた。またセンキュウ配合剤の

エキスのラット血中ホルモン濃度に及ぼす影響を検討した。

##### 3. 天然有害物質の化学的研究

i) マイコトキシンの検索・分離・同定・構造決定および生物活性の検討

前年度に引き続き、cytochalasin 類の研究を行った。天然由来物23種、その誘導体、合成中間体16種を用い、C3H-2K 細胞でのアクチンケーブルの収縮、fibroblastic cell の円形化、リンパ球の capping 阻害、ConA によるリンパ球の興奮阻害、アクチンフィラメントの延長阻害につき活性を比較し、構造活性相関を検討した。

###### ii) オゴノリ類海藻の生物活性成分の研究

昨年までに得られた日本産オゴノリの成分知見に基づき、材料的に多量確保することのできたチリー産オゴノリの成分比較を行った。

###### iii) 新開発食品の安全評価に関する研究

コンフリー含有ピロリチジンアルカロイドの検索を行い、その分析法について検討した。

###### iv) 食品中有害物質の検索に関する研究

食品中の有害物質のデータベース化推進のために前提となる諸条件を明らかにした（厚生科学研究，生活衛生局生活保健課へ報告）。

## 療 品 部

部 長 中 村 晃 忠

#### 部内消息

叶多謙蔵室長は、スペースシャトル/スペースラブに日本が搭載する実験装置に対して NASA によって規定されているオフガス試験のうちの質量スペクトルを解析するため、昭和60年12月より月1回ずつ筑波へ出張している（宇宙開発事業団の委託事業）。

新谷英晴技官は、イオンクロマトグラフィーに関する研究のため米国テキサス工科大学へ出張した（昭和61年1月15日から1年間）。

北九州市環境衛生研究所・石橋正博氏は昭和61年3月に家庭用品室で3週間の研修を行った。

中村は、昭和60年9月から厚生省研究機関コンピューター在り方研究班の座長として報告のとりまとめを行い、厚生省ライフサイエンス室へ報告書を提出した（昭和61年4月9日）。また、中村は厚生科学研究「有害物質の健康リスク評価システムに関する研究班」（鈴木武夫班）に参加し、“non-criteria substances の優先順位付け”を分担した（生活衛生局・家庭用品安

全対策室)。

### 業務成績

#### 1. 医療用具関係

歯科鑄造用銀合金64検体の一斉取縮試験を行った(不適なし)。

日本薬局方移植試験用対照プラスチックの溶出試験を実施した。

#### 2. 家庭用品関係

貿易摩擦や全体的な規制緩和ムードのためか、昭和60年度も新しい規制基準の設定はなかった。年度計画に従って、ジエチレングリコールモノブチルエーテル(溶剤)、2,2'-メチレンビス-(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール)(ゴム老化防止剤)、ナフトールAS(アゾック染料)の分析法を作成した。

#### 3. 理化学試験室関係

FX-200型NMR装置の利用状況はほぼ飽和状態にあって、土、日曜日とも休日にも利用されており、少しこみいった測定はできにくい状況にある。炭素<sup>13</sup>-NMRの測定が多いため、プロトン専用利用できるFT-NMR装置が必要と思われる。DX-300質量分析計の稼動状況は良好である。負イオン測定附属装置が61年3月に導入された。また、遠からずFABによる測定も可能となる。微量の塩素系化合物の分析や揮発性物質の測定に威力を発揮することが期待される。

依頼測定件数は、NMR: 80件; MASS: 16件であった。

### 研究業績

#### 1. 歯科用コンポジットレジンの安全性に関する研究

本研究はコンポジットレジンによる歯髄刺激などの安全性の評価に関するものである。前年度は硬化したレジンからのモノマーの溶出挙動を研究し、溶出モノマー量は硬化前のレジン中のモノマー配合量と相関することを見いだしたが、今年度は歯質へのモノマーの移行量について研究した。その結果、Bis-GMAとTri-EDMAの歯質への移行傾向に明らかな差を見いだした(厚生科学研究、東京医歯大などと共同、薬務局審査二課)。

#### 2. イオンクロマトグラフィーによる血清成分の定量に関する研究

昨年までに確立したイオンクロマトグラフィーによる血清カチオン(K, Na, Ca, Mg)の定量法を臨床応用し、イオン選択電極法による結果と比較した。限外ろ過後の血清については良い相関が得られた。

#### 3. イオン交換樹脂混床による尿毒症成分の除去に

#### 関する研究

尿素を含む血清を固定化ウレアーゼ・カラムに通し、生成したアンモニアを樹脂によって除去することを試みた。前処理なしでは30%であった尿素除去率はほぼ100%に向上した。同時に、Naのイオンバランス保持面でも改善が見られた(科学技術振興調整費(国武班)、科学技術庁)。

#### 4. 新材料の放射線滅菌による材質変化と生体適合性に関する研究

ポリサルフォン中空糸を使った透析器の放射線滅菌による影響を調べた。充填液のある場合(製品はこの形)は、ない場合に比べて放射線の影響が大きいことが分った(原子力試験研究費)。

#### 5. 家庭用品による接触皮膚炎の原因究明研究

ナフトールASによる色素沈着型接触皮膚炎例は依然として発生しており、全国の皮膚科医と共同してその原因を明らかにし対策を立てるために研究を続けている。11病院から19症例について26種のネル寝間着の提供を受け、その分析を実施すると同時に、パッチテスト用の各種材料の提供を行った。

ゴム製品によるアレルギー性接触皮膚炎の原因物質研究の一環として、メルカプトベンゾチアゾール系加硫促進剤の系統分析法を確立し、主にゴム靴について調査を行った。

塩ビ製手袋による皮膚炎の原因究明を続けているが、まだ不明のままである。その一環として、原因になりうると思われる無水フタル酸の定量法を確立し、各種の塩ビ製品中の無水フタル酸量を調査したところ、ごく微量検出された。

#### 6. 家庭用品中の有害物質の分析化学的研究

チオシアン酸第二水素を主体とする玩具花火「うちんち人形」(輸入)から発散する水銀、シアン、二酸化イオウを調査した(生活衛生局・家庭用品安全対策室)。

#### 7. 機器分析に関する研究

プロトンNMRスペクトル・データベースに新規測定スペクトルを加えるために、デジタイザーを利用した入力プログラムを開発した。また、これに伴ってデータベースのシステム全体の管理を容易にするために、統合プログラムを開発した。

NMRスペクトルの二重試料管測定法(当部開発)の応用として、内管キャピラリーを試料管として微量試料を積算効率よく測定する手法を示した。

## 環境衛生化学部

部長 武田 明治

## 概要

本年度の主要業務のうち環境関連分野として前年度から継続として居住空間に存在する各種汚染物の分析法の確立および個人曝露量調査に関する基礎研究、天然核種の環境基礎調査、水道水質基準改定のための水質に関する調査研究、水質評価のための微量物質のプライオリティリスト作製のための調査、水利用のための衛生的基礎研究などを行った。

一方、化粧品関連分野としてアクションプログラムの一環として化粧品許可承認制度に包括的許可制度の導入に伴う基準作成作業の協力、化粧品原料基準追加品目に対する規格作成を行うと共に、化粧品中の不許可化合物の監視に関連した試験を地方自治体試験研究機関と協力のもとに実施した。さらに化粧品の安全性に関する基礎研究を行った。

## 業務成績

## 1. 空気関係

前年度に引続き東京都内3ヶ所の国設自動車排ガス測定所で各種自動測定機器を用いて大気汚染物質（一酸化炭素、一酸化窒素、二酸化窒素、全窒素酸化物、二酸化硫黄、オゾン、ホルムアルデヒド、浮遊粒子状物質、メタン、非メタンおよび全炭化水素）ならびに交通量の常時測定を実施した（環境庁大気保全局自動車公害課）。

## 2. 化粧品関係

昭和60年7月「アクションプログラムの骨格」の中で化粧品の包括的許可制度を導入することとし、それに伴う化粧品の包括許可基準作成のための基礎調査および規格統一など基準案作成に従事した（薬務局審査第二課）。

化粧品原料基準の追加品目の規格作成のための内外公定書の調査および40品目の原料規格を作成した（薬務局審査第二課）。

化粧品中のホルモン剤の試験を薬務局監視指導課および地方自治体試験研究機関と協力のもとに試験方法などの評価を行った（薬務局監視指導課）。

化粧品中のホルムアルデヒドの分析法につき検討し、ホルムアルデヒド含有の疑義製剤につき試験した（薬務局監視指導課）。

二液式コールドパーマメント用剤中のシアンの有無につき、JIS 試験法の適用性について基礎検討を実施

した（厚生科学研究，薬務局審査第二課）。

## 3. 水質関係

水道水質基準の追加・改定などの基準資料を得るために水道中のスズ、ニッケルの分析法を検討した（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

水道原水中の特定化学物質に関する検索調査を地方自治体試験研究機関および水道事業体との協力のもとに実施した（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

水質評価に関する基礎資料を得るための水中微量化学物質のプライオリティリストを作成した（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

## 研究業務

## 1. 建築物内空気質の衛生管理基準の設定に関する研究

空気中の二酸化窒素およびホルムアルデヒドの同時定量法を確立し、本法を用いて各種居住環境下に居住する人々の二酸化窒素およびホルムアルデヒドの個人曝露量の実態を明らかにした。

## 1) 大気汚染物質の分析法に関する研究

呼吸器疾患の原因物質の一つである大気中の硫酸ミストの GC-FPD による分析法を確立した。

## 2) 環境試料中の天然放射性物質の調査に関する研究

大気中の  $^{210}\text{Pb}$  分析法を検討し、都市大気における  $^{210}\text{Pb}$  の季節的変動を調査した（放射能調査研究，科学技術庁）。

## 2. 化粧品等の分析及び安全性に関する研究

## 1) 高速液体クロマトグラフ法によるシャンプーおよびリンス中のピリチオン亜鉛の試験法を確立した。

2) パーマネントウェーブ用剤中のチオグリコール酸およびジチオグリコール酸の分析法を高速液体クロマトグラフ法を用いて確立した。またパーマメントウェーブ用剤中使用時にシアン化合物が発生するとの指摘があるため、これについての検討も併せて行った（厚生科学研究，薬務局審査第二課）。

3) アゾ系色素（R-205, 206, 207, 208, 220 および 506 号）中の安全性に問題があると考えられるナフトールおよびナフチルアミンスルホン酸誘導体の分析法を高速液体クロマトグラフ法を用いて確立した。

4) 繁用されている永久染毛剤の成分である芳香族アミン化合物の安全性に関する調査に関連して経皮吸収における問題点および染毛剤中の微量分析法を検討した（厚生科学研究（石原班），薬務局審査第二課）。

## 3. 化粧品の許可基準作成に関する研究

化粧品特に基礎化粧品などの許可基準作成とそれに伴う品質の安全性について検討した（厚生科学研究

(松本班), 業務局審査第二課)。

#### 4. 水道用薬品または水道用品に関する研究

1) 家庭用浄水器からの銀の溶出試験: 銀蒸着-活性炭浄水器を通過した水道水質成分の変化について検討した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

2) コールタール中多環芳香族化合物の性質および毒性に関する研究: タールエポキシ樹脂塗料中に含まれるコールタールおよびその含有物質の概要と毒性を文献学的に検討した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

#### 5. 汚染物質の分析法に関する研究

1) メチレンジアニリンの分析法の検討: 管更生工法に使用する硬化剤メチレンジアニリンの分析法を確立した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

2) 水中汚染物質の分析法に関する研究: 水中クロルデンの分析法を確立した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

#### 6. 水利用に関する衛生化学的研究

1) 水域環境変異原物質の生物評価に関する研究: オゾン処理中の有機物質の濃縮等について検討した(生活衛生局水道環境部水道整備)。

2) アオコが生成する毒性物質に関する研究: アオコ中に含有する毒性物質の分離精製を検討した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

3) 水中ベンゾ(a)ピレンの塩素処理時における挙動と変異原性: ベンゾ(a)ピレンの塩素処理に伴って生成する塩素化ベンゾ(a)ピレンの処理条件における挙動と変異原性について検討した(厚生省がん研究(松下班))。

4) 給水管赤水防止に係る新技術適用性評価に関する研究: 新技術による赤水防止処理水の変異原性につき検討した(生活衛生局水道環境部水道整備課)。

## 食 品 部

部 長 齋 藤 行 生

### 概要

西ドイツにおけるワイン中毒事件に端を発し、世界的な規模で、オーストリア産ワインのジエチレングリコール混入事件が明らかとなった。我が国にも、この偽和物混入ワインが多量に輸入されていることが判明し、ただちに検査態勢がしかれ、当所においては、緊急に分析法の設定作業が行われた。さらに、多くの関係機関の協力を得てこの問題の解決への努力が払われ、中毒事故を起こすことなく一応の決着をみた。

人事面ではスタンフォード大学に出張していた河村葉子技官が昭和60年6月30日無事帰国し、昭和60年7月1日より食品部第二室において任務についた。また、食品部第三室の武田由比子主任研究官は食品添加物部へ配置換えとなり(昭和61年4月1日付)、大阪支所食品部より小林加代子技官が食品部第三室に着任した。また、部長室において食品中の汚染物モニタリング、トータルダイエットスタディーおよび関連業務に携わっていた高村きよみ技術補助員が退職し、新たに、高野敦子技術補助員が採用された。

齋藤は HEAL プロジェクト食品部門の委員会に出席のため米国ワシントンに出張した(昭和60年8月18日~8月26日)。

### 業務成績

1. 輸入食品検査: 冷凍フライドチキン3検体, ニーダーフワイン2検体の分析を実施した(生活衛生局食品保健課)。

#### 2. 特別行政試験

① 新形態食品(エアゾールタイプ食用油脂)5検体の酸価, 過酸化価の測定, 並びに重金属(Cd, Pb, As)の分析を行った(生活衛生局食品保健課)。

② 食品中の汚染有害物調査の一環として, 食品(陰膳食品63食分)中のクロロホルム, 市販乳幼児食品(27検体)中のゼアラレノン及び市販食品17検体中のペニシリン酸並びにパツリンの分析を実施した(生活衛生局食品保健課)。

③ 食品の規格基準設定に関する試験検査として食品325検体中のニパレノールおよびデオキシニパレノールの分析を実施した(生活衛生局食品保健課)。

④ 残留農業実態調査の一環として, 48食品中の9農薬について分析調査を行った(生活衛生局食品化学課)。

### 研究業績

#### 1. 食品中の人工汚染物質

##### i) 分析および試験法

① 食品中の6農薬の分析法を設定した(生活衛生局食品化学課)。

② 残留有機リン農薬16種の一斉分析法を確立した。

③ 食品中の微量クロロホルムの定量法につき改良を加えた(対癌10年戦略, 鈴木武夫班)。

④ 食品中のクロルデン類の残留実態及び分析法につき考察した。

##### ii) 代謝, 動態および作用

① ベンズピレンの吸収に及ぼす食品成分の影響を調べたところ食品の種類により吸収様態に違いのある

ことが判明した(厚生省がん研究費(松下班))。

② 広範な環境汚染が憂慮される一群の難燃剤, リン酸トリエステル類のワキンによる代謝につき検討した。その結果代謝パターンは化学構造により大きな変化を示した。またジエチルマレート暴露によるリン酸トリエステルの体内蓄積性も化学構造により多様性を示した。

③ Cdによる毒性発現機構を(Cd+シスチン)系および(Cd-シスチン)系の二系を用いて検討した結果、遊離のCdが腎障害の原因であることが推測された。またp-アミノ馬尿酸の取り込みは腎障害の指標として有用であることが示された。

④ エンドトキシンによる亜鉛チオネインの誘導をトキシン高感受性および低感受性のマウスを用いて検討した結果、従来の報告とは異なり低感受性のマウスに肝亜鉛チオネインの誘導が小さいことが判明した。また肝亜鉛チオネインの誘導量は肝中Ca量の上昇と相関していた。

⑤ 酢酸鉛を三種の投与方法—静注(iv)腹腔(ip)および皮下(SC)によるマウスに投与し、メタロチオネイン誘導を調べたところ、iv投与による方法がメタロチオネイン誘導量が最も高かった。また臓器中Pbの濃度が高い場合はCd濃度も高かった。

⑥ N-ニトロジブチルアミンおよびN-ニトロブチルアミンのラットにおける代謝につき検討した結果8種の代謝産物が同定された。これからブチル化剤としてのN-ニトロジブチルアミンはN-ニトロブチルアミンを経てその作用を示すことが明らかとなった。

## 2. 食品中の天然汚染物質

### i) 分析および試験法

① オゴノリ中の中毒原因物質の検索にHPLC法による三次元表示法が有用であるか否かを検討し全国衛生化学技術協議会に提示した。

② フェオフォルバイドおよびピロフェオフォルバイドの分析法(HPLC法)につき追試を行い衛生試験法—日本薬学会—として承認された。また、食品中の上記化合物の存在実態につき考察も加えた。

③ ヒ素の毒性はその化学形に依存しているので海藻中のヒ素の化学形差による分別定量につき検討を加え自働分析法への第一歩としてのHPLC—還元気化原子吸光直結法を完成させた。

④ 食品異物としての昆虫の混入時期の判定に酵素化学的方法及びATP法を検討しその有用性を示した。

⑤ 発癌性マイコトキシンであるオクラトキシンは蛋白質と比較的強く結合することが明らかとなった。

そこでその結合の様式を明らかにするために種々検討したところ、イオン結合が両者の結合に最も大きく寄与していることが強く示唆された。

## 3. 食品汚染物の検知, 実態, 人体暴露

### i) 未検知汚染物の検知システム

① 清浄海域より捕集したイガイを3ヵ所の汚染海域で飼育し、イガイに取り込まれた汚染物を分析したところ、分析上の汚染物のパターンはその海域に生育しているイガイのそれに酷似していた。このことは各海域の特徴を把握しておくことにより新たな海域の変化が検知できることを示している(国立機関公害防止等試験研究費、環境庁企画調整局研究調整課)。

② かび毒、ニバレノールおよびデオキシニバレノールの国内汚染実態を調査し外国食品の汚染例と比較検討した(日米合同マイコトキシン専門家会議発表)。またステリグマトシスチン類の分析法につきLST学会で発表した。

③ 農薬、食品中の有害成分と食品衛生並びに食品中の亜鉛及びカドミウムの化学形と吸収等につき概観した。

### ii) 食品汚染物の実態に関する研究

全国から集計されたモニタリングデータベースは総計891,038件に達し、衛生行政のためのアウトプットデータを全国地研へ提供した。また日常食中の汚染物摂取量調査(total diet study)を行い、全国11機関のデータ解析も行った。

## 食品添加物部

部長 義平 邦利

### 概要

昭和61年1月1日付で合田幸広技官が採用された。昭和61年4月1日付で酒井綾子主任研究官が衛生微生物部へ配置換になった。また、同日付で武田由比子主任研究官が食品部より当部へ配置換になった。

本年度の主な業務は恒常的な業務の他には本年度に公布が予定されている第5版食品添加物公定書の検討を引続き行っている。

### 業務成績

#### 1. 製品検査

食用色素：検査件数325, 合格325, 不合格0。

#### 2. 食品添加物について

i) 乳酸, カルボキシメチルセルロースカルシウム, グリセリン脂肪酸エステル規格設定のための試験法を検討した(生活衛生局食品化学課)。

ii) 天然甘味料ステビオサイド及びそのアグリコンであるステビオールの突然変異原性試験を TA98, TA97, TA100, TA102 を用いて行った。ステビオサイド, ステビオール共に4菌株において突然変異原性は認められなかった(厚生科学研究, 生活衛生局食品化学課)。

iii) 天然着色料の原植物およびその成分を調査した(厚生科学研究, 生活衛生局食品化学課)。

iv) リン酸塩製剤によるサツマイモの発色, レンコンの漂白について検討を行ったところ, サツマイモの発色は, 製剤の酸性によって表皮中の色素が赤変することが確かめられた(生活衛生局食品化学課)。

v) 器具の規格基準の設定等のために, 銅製食品からの銅をはじめとする重金属の溶出について検討を行った(食品等試験検査費, 生活衛生局食品保健課)。

vi) 容器包装の安全性再評価等のために, メラミン樹脂製品からのメラミンの溶出について検討した(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

vii) 家庭用浄水器に用いられる活性炭素中の重金属について検討した(厚生科学研究, 生活衛生局食品化学課)。

#### 研究業務

##### 1. 食品添加物等に関する研究

###### i) 食品添加物の1日総摂取量調査

生鮮食品を用いて調製した試料を対象として酢酸, 乳酸, グルコン酸の摂取量を調査した。1日総摂取量は平均値で酢酸 36.3 mg, 乳酸 2682 mg, グルコン酸 49.2 mg であった(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

###### ii) 天然添加物に関する研究

天然着色料につき HPLC, TLC による色素成分ならびに混在成分の分析を行った。

###### iii) 着色料に関する研究

食用色素に含まれる中間体, 反応副生成物, 付随色素につき, TLC, HPLC による分析法を確立した。

iv) ウサギ腎髄質ミクロソーム画分のプロスタグランディン(PG)<sub>2</sub>E<sub>2</sub> 合成系に対する合成着色料の影響について研究を行い PGE<sub>2</sub> 合成を促進又は阻害する色素を明らかにした(原子力試験研究費)。

###### v) 天然着色料の突然変異原性試験

着色料を阻ヘスベリジナーゼで加水分解したものと加水分解しないものとの両方について TA98, TA100 を用いて, Ames テストを行った(原子力試験研究費)。

vi) 天然着色料の PGE<sub>2</sub> 合成系に対する影響について検討した(原子力試験研究費)。

###### vii) HPLC による分析法について

ステビオサイド, ステビオール, アミノ酸の D, L 分割についての検討を行った(生活衛生局食品化学課)。

##### 2. 食品用容器包装に関する研究

i) 食器の塗装に用いられるポリウレタンおよびポリウレタンで塗装した食器からのトルエンジアミンの溶出について, 測定法と共に溶出量について検討を行った(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

ii) メラミンの定量法の検討と, メラミン樹脂製品からのメラミン及びホルムアルデヒドの溶出の相関性について検討を行った(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

##### 3. ニトロソ化合物に関する研究

i) 動物胃内におけるニトロソメチル尿素(NMU)の生成について

モルモットの胃内における NMU の消失およびメチル尿素(MU)と NaNO<sub>2</sub> からの NMU の生成について検討を行った。血管をさけ, 噴門部と幽門部を結ぶ胃に NMU を注入した時 NMU の残存率は50分後に約30%だった。NMU は血液中からは非常に速やかに消失した。また動物胃内においても MU と NaNO<sub>2</sub> から NMU が容易に生成した(厚生省がん研究費)。

ii) ペプチド結合部分の N-ニトロソ化と生成物の DNA との反応の可能性について検討した。ペプチド由来 N-ニトロソアミドの簡単なモデルとして, N-アセチルアミノ酸, ジペプチドの N-ニトロソ化合物を調整した。N-アセチル N-ニトロソグリシンと DNA との反応を検討したが明確な結果が得られなかった(厚生省がん研究費)。

iii) ニトロソアミン生成に対する野菜, 果実汁の促進および抑制について検討を行ったところリンゴ汁に抑制作用があることがわかった(厚生省がん研究費)。

#### 衛生微生物部

部長 三瀬 勝利

#### 概要

倉田浩前部長の退官後, 1年3ヵ月にわたって, 谷村顕雄副所長が衛生微生物部長を兼任されていたが, 昭和61年4月1日付けで, 変異原性微生物変異研究室長の三瀬が部長に昇任した。また同日付けで, 酒井綾子主任研究官が食品添加物部から, 宮原美知子研究員が合成化学研究部から配置換えとなり, それぞれ細菌

第二室と第一室に配属された。なお、石関忠一細菌第一室長は、昭和60年4月から3ヵ月間、薬品品質管理技術援助のために、インドネシアに出張し、現地で指導を行った。また、小沼博隆主任研究官も、昭和60年10月より同国に出張し、インドネシア国立医療薬品研究所で、微生物学の指導を行っている（一年間の出張予定）。一方、インドネシア側から、昭和59年12月より来所されていた Basyuni Sudarta 氏は、昭和60年7月に、衛生細菌学全般の研修を修了し、無事帰国された。

長年にわたって、衛生微生物部の発展に貢献されてきた柳町きみゑ主任研究官が、昭和60年12月31日付けで、坂部フミ主任研究官と河西勉主任研究官が、昭和61年3月31日付けで、それぞれ退職された。

### 業務成績

#### 1. 国家検定

ブドウ糖注射薬、リンゲル注射薬、インシュリン製剤など総計1077件（細菌試験548件、真菌試験529件）について無菌試験を行ったが、不適品はなかった。

#### 2. 一斉取締試験

グルタチオンを含有する注射剤（細菌、真菌ともに33件）について無菌試験を行ったが、不適品は見い出されなかった。

#### 3. 輸入食品検査

乳製品22件を検査したが、すべて合格品であった。

#### 4. 規格・基準試験、行政試験など

微生物規格基準設定の基礎資料集積のため、未殺菌ミネラルウォーターに関する細菌検査、植物蛋白や冷凍・冷蔵野菜に関する真菌検査が行われた。

### 研究業績

当部の研究テーマは、その対象によって、真菌と細菌に大別される。また、細菌関係は衛生細菌学を中心に研究を遂行する研究者と、微生物遺伝・遺伝子操作等の研究を行うグループに大別される。

#### 1. 真菌に関する研究

例年に引き続き、多数の新種の真菌が発見された。これら新種の真菌は、国内だけでなく、イラクで分離されたものも含まれる。1984年山口県で発生した和牛の細気管支真菌症の原因菌として分離された真菌は、新種のもつと判明し、*Scytilidium japonicum* と命名された。この真菌の発見は、その病原性の故に、今後の研究に重要な役割を演ずると考えられる。真菌の分類を見直す作業も平行して行われている。また、マイコトキシンの検索や汚染実態に関する研究も行われた。

*Fusarium* に関する研究も引き続き行われ、興味あ

る知見が得られた。東日本、中部日本のムギ類のトリコセシン産生 *Fusarium* の分布状態等の調査研究により、赤かび病菌 *F. graminearum* が、最も広く分布していることが判明した。また、種々の *Fusarium* とそれが産生するマイコトキシンの種類、鶏胚に対する毒性などが研究された。赤かび病原菌に対する防禦法も研究され、チオフェネートメチルの有効性が確認された。原発性浅在皮膚アスペルギルス症に関する研究も、九州大学等と協同で行われた。

#### 2. 細菌に関する研究

前年に引き続き、医薬品、化粧品は無菌試験の改良に関する研究、植物構成成分の抗菌活性に関する研究（静岡薬科大と協同）が行われた。また、輸入肉のサルモネラ汚染や、セレウス菌の食中毒発症機構に関する研究（岩手大学等と協同）も行われた。食品や水の微生物制御に関する研究、黄色ブドウ球菌の生化学的研究（千葉県衛生研究所等と協同）、酵母・細菌による魚介類の腐敗に関する研究（大阪支所・食品部と協同）も行われ、それぞれ成果が発表された。

微生物遺伝・遺伝子操作関連の研究としては、テトラサイクリン耐性プラスミドを持つある種のストレプトマイシン依存性大腸菌が N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトログアニジンなどのメチル化剤に対して高い変異原性を示すという知見を得た。また、チフス菌と大腸菌から、組み換え DNA 技術に有用な二種類の制限酵素が精製された。これら酵素の遺伝子の座は、多数コピープラスミド上に存在する事が証明された。

## 医 化 学 部

部 長 高 橋 惇

### 概要

人事面では昭和61年4月1日付で田中 彰医化学部長が生物化学部長として転出し、その後任に同日付で薬理部 高橋 惇室長が発令された。

前年度に引き続き、食品添加物、既存化学物質、家庭用品に含まれる化学物質等の代謝に関する試験ならびにそれに伴う基礎研究を行った。田中前部長は昭和60年9月8日から17日まで国際化学物質安全性計画による Principles of Toxicokinetic Studies のドラフト作成のための会議に出席のためノルウェー国、オスロに出張した。

### 研究業績

1. 食品添加物の安全性に関する生化学的研究（食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課）

1) オルトフェニルフェノール (OPP) およびそのナトリウム塩 (OPP-Na) に関する研究

OPP を含む餌で飼育したラットの尿中の代謝物の分離同定を経目的に行った。また、OPP-Na の膀胱上皮細胞の DNA 損傷とその修復を測定するための基礎的検討を行った。

2) チアベンダゾール (TBZ) に関する研究

TBZ の胎仔胚芽におけるプロテオグリカン合成阻害は ATP 含量の低下に伴う硫酸基供与体の減少が一因と考えられた。

3) ソルビン酸に関する研究

高濃度のソルビン酸を投与した際に腸内で生成する変異原物質は速やかに吸収され、代謝されるものと考えられた。

4) デヒドロ酢酸 (DHA) に関する研究

ラットとマウスでの DHA の代謝物の生成に差異のあることを認めた。

5) 赤色 3 号に関する研究

赤色 3 号を投与すると甲状腺機能に影響を及ぼすことを認めた。

6) 赤色 105 号に関する研究

赤色 105 号含有飲料水を与えたマウスの甲状腺機能の変化を調べた。

2. 家庭用品の安全性に関する生化学的研究 (家庭用品等試験検査費, 生活衛生局家庭用品安全対策室)

1) 2-エチルヘキシルジフェニルホスフェート (EHDPP) に関する研究

EHDPP を経口投与したラットの尿中代謝物の検索を行い、数種の代謝物を同定した。

2) ナフトール AS に関する研究

ナフトール AS を経口投与または静注した場合、共に主として糞中へ排泄された。また、マウスとラットで種差が認められた。

3) 2-(Morpholiniothio)-benzothiazole (MTBT), 2-mercaptobenzothiazole (MBT) および 2,2'-dibenzothiazylsulfide (BTDS) に関する研究

これら三者の <sup>35</sup>S 標識化合物を合成し、それらの代謝を調べ、生体内で、SH 化合物で一部置換されることを認めた。また、MTBT はシステインと結合して、尿中に排泄されることを証明した。

4) イルガサン DP 300 の代謝試験に関する文献調査を行った。

3. 既存化学物質の安全性に関する生化学的研究 (薬務局安全課)

1) 2-ニトロバラクレゾール (NPC) に関する研究

NPC のラット尿中代謝物の構造を推定した。また、

ラットとマウスにおける NPC の吸収、分布、排泄を比較検討した。

2) ムスクキシレンに関する研究

<sup>3</sup>H-標識化合物の合成を検討した。また、ラットにおける糞中代謝物の同定を行った。

3) 水素化トリフェニールに関する研究

<sup>3</sup>H-標識化合物の合成を検討した。

4. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究 (特別研究)

1) 催奇形性物質を検索するための、胚芽間葉細胞, human embryonic cells を用いた *in vitro* 試験法について検討した。

2) Tris (2,3-dibromopropyl) phosphate 等を投与したラットの尿の NMR を測定し、乳酸とブドウ糖が排泄されることを認めた。

5. 異物代謝に関する酵素等の研究

1) 脂環族一級アミンの酸化的脱アミノ機構に関する研究

1位D化シクロヘキシルアミンの酸化的脱アミノ化の反応速度をウサギ肝ミクロソームを用いて検討した。

2) 各種化合物の脂肪酸代謝系への影響に関する研究

ソルビン酸食を与えたマウスの肝でペルオキシゾームが増殖していることを認めた。

3) 化学物質の毒性発現に関する細胞膜成分の研究

モデル実験として、リボゾームを用いて Tris-BP などの作用を調べた。

6. 遺伝子の損傷とその修復機構に関する生化学的研究

1) 遺伝子損傷の修復に関する分子機構の研究

ラット, 大腸菌, HeLa 細胞の O<sup>6</sup>-alkyl-DNA alkyltransferase (AGT) によるアルキル化 DNA の修復機構を調べた。

7. 標識化合物と細胞工学的手法の利用による医薬品, 生活関連物質等のアレルギー感受性および安全性評価法の確立に関する基礎的研究 (原子力試験研究費, 科学技術庁)

1) 皮膚アレルギーの *in vitro* assay 法の開発に関する研究

ナフトール AS による遅延型アレルギー反応をマウスでの foot pad 反応で検出することが出来た。

8. 脂溶性環境汚染物質に関するヒューマンモニタリング手法の開発とその応用 (国立機関公害防止等試験研究費, 環境庁企画調整局研究調整課)

## 1) ヒト皮脂成分の分析法に関する研究

皮脂の脂質成分、構成脂肪酸の化学構造は他組織には認められない特殊なものであることを確認し、皮脂は体内脂質に由来するものではなく、皮脂腺内で合成されると推定した。

## 化学物質情報部

部長 竹 中 祐 典

## 概要

当部設置以来、国際化学物質安全性計画への協力として環境保健基準の作成を進めてきたが、「トリコセチン」、「シベルメトリン」および「ジクロロボス」の第1次ドラフトが加盟国の関連機関に回覧される段階に至った。「トリコセチン」は「麦角」および「オクラトキシン」との合冊とされ、「シベルメトリン」は外国人専門家によって改変されたためかなりの遅れをみたが、一応出版へのスケジュールにのったと云えよう。また、国際有害化学物質登録制度に関しては、そのリーガルファイルの磁気テープを入手し統計情報部と当部との間でのオンライン検索が可能となった。

一方、バイオロジカルデータベース作成・検索システムの研究は4年目の実施計画を終えたが、このシステムに対して WHO 癌研究機関を初め国際的な関心が寄せられている。

関沢純情報第二室長は、国際化学物質安全性計画 (IPCS) の環境保健基準「有機リン系農薬総論」および「カーバメイト系農薬」のタスクグループへの出席と国際有害化学物質登録制度 (IRPTC) 本部訪問のため昭和60年9月30日から10月7日までジュネーブに出張した。

## 業務成績

## 1. IRPTC

IRPTC リーガルファイルにわが国の化学物質規制データを提供するとともに、25件におよぶ質問回答業務を行った。なお、リーガルファイルの磁気テープを入手し統計情報部のコンピュータを用いてオンライン検索ができるようにした。地球規模の環境に有害とみなされる化学物質およびプロセスのリストに関する UNEP のレポートに対し、わが国のコメントを集約し IRPTC 本部に送付した。

昭和60年度 IRPTC 国内協力委員会を昭和61年2月27日に開き IRPTC 関連業務の年次報告をするとともに、関連情報の流通促進について協議した。

## 2. IPCS

環境保健基準「シベルメトリン」および「ジクロロボス」の第1次ドラフトが完成し IPCS 本部から加盟国関連機関のコメントを得るために回覧されるとともに、既に作成を行っていた他の合成ピレスロイドおよび「トリクロロホン」のドラフトの最終的修正を終えた。

また新たに、合成ピレスロイド系家庭用殺虫剤3種について環境保健基準のプレミナリドラフトを作成した。

外国機関が作成し回覧に供された環境保健基準第1次ドラフトは18種におよび、それらに対して国内コメントを集約し IPCS 本部に送付した。

## 3. オンライン検索と情報誌発行

オンライン検索は JOIS が97件、DIALOG が172件、NIH/EPA/GIS が4件で、いずれも前年度より検索件数は減っているが、1回の検索で複数のデータベースを利用する例が増えている。

情報室ニュースは No. 37 から No. 43 までを作成し所内に配布した。

## 4. 図書係業務と衛生試験所報告の発行

## i) 図書係業務

昭和60年度の図書購入状況は次のとおり。

( ) 内は前年度分

外国雑誌	14,802千円	(14,169千円)
外国図書	1,410	(1,895)
国内雑誌	1,046	(1,015)
製本費	104	(0)
合計	17,362	(17,079)

外来閲覧者は148人、外部からの文献複写依頼は58ヶ所から310件に達した。

3回におよぶ図書委員会の事務局を担当した。

## ii) 衛生試験所報告編集業務

衛生試験所報告編集委員会に協力し、同報告第103号を発行し、所員ならびに所外、外国の関連機関に配布した。

## 研究業績

## 1. バイオロジカルデータベース作成・検索システムの研究

前年度のプログラム詳細設計にもとづくプログラムのコーディング、コーディングを終了した一部のプログラムの単体テスト、構造活性相関検索システムのプログラム詳細設計と一部プログラムのコーディング、および変異原性、発癌性、催奇形性のテストデータ約15,000件の収集を行った(科学技術振興調整費、変異原性部、薬理部、病理部と共同、科学技術庁振興局)。

## 2. 知識ベースシステム開発のための調査研究

化学物質設計等支援のための知識ベースシステムに関する調査に協力し、特性予測システムの手法の確立に関する調査を分担した（科学技術振興調整費、科学技術庁振興局）。

### 3. 小規模データベースの開発

#### i) 農薬の安全性評価データベース

農薬の安全性についての国際機関の評価情報（特に発癌性および生殖毒性データ）の検索システム確立のための基本、詳細設計を行い、一部データの入力を行った。

#### ii) 医薬品国際一般名検索用データベース

医薬品の国際一般名をコンピュータを介して検索するシステムを確立するため、名称、CAS登録番号、WLN線型表記、ステム、薬効、化学名、分子式からなる約700件のデータを入力したデータベースをLANFILE 3を用いて開発した。

### 4. 化学物質の安全性に関する調査研究

#### i) 食品添加物のアレルギー性に関する調査研究

わが国で未指定でFAO/WHO A (I) リストに記載されている食品添加物の安全性に関する情報の検索、情報検索方法の検討、およびA (I) リストの6品目についての文献要約集の作成を行った（厚生科学研究、食品部、食品添加物部、毒性部と共同、生活衛生局食品化学課）。

#### ii) 化学物質の急性毒性評価のための簡易スクリーニング法等に関する研究

各種致死量データの収集とそのデータの一定条件下での関連性の検討、簡易スクリーニング試験の被験対象として選ばれた8物質の文献記載各種致死量データとその試験条件についての情報の整備、および国連危険物輸送基準リスト収載物質についての急性毒性値の検索とわが国の毒物劇物取締法での毒劇物相当物質の抽出を行った（厚生科学研究、東京歯科大学と共同、薬務局安全課）。

#### iii) 有害物質の健康リスク評価システムに関する研究

有害物質の健康リスク評価における情報処理の在り方の調査を分担した（生活衛生局家庭用品安全対策室）。

#### iv) 環境化学物質の安全性の調査研究

a) 化学物質の環境調査（環境庁企画調整局環境保健部保健調査室）、b) 化学物質の優先的評価に必要な情報の検討（環境庁企画調整局環境保健部保健調査室）、c) 化学物質による水質および土壌汚染の未然防止に関する基本的検討（環境庁水質保全局企画課）、d) 農薬中の不純物にもとづき農薬登録を保留する基

準設定にかかわる技術的検討（環境庁水質保全局土壌農業課）を分担した。

### 5. データベースの有効利用に関する調査研究

IRPTC データベースの特徴の検討の一環として収録物質の類別ならびにデータ収載基準とりわけ農薬データの情報源の選択などについて検討した。

## 安全性生物試験研究センター

センター長 大森 義 仁

医薬品・食品・食品添加物やその他の化学物質の安全性評価と、その基礎となる試験研究実施業務は、増加の傾向が年々大きくなっている。

本年度においてもセンターの人員に一部の増減があったが、各部の職員の努力が実り、業務の実施は順調に進められた。

国家検定においては来年度の変換を反映してか、処理件数がやや減少したが、厚生省薬務局や生活衛生局その他科学技術庁、環境庁、文部省関係の試験、調査、研究課題もより多くなり、対がん10年総合戦略関連の業務も安定し、所期の業績をあげることができた。

医薬品のGLP関連の査察への協力は増加の傾向を示し、さらに化学物質面での査察も開始された。

各種のプロジェクトへの参加協力の伴い、内外の研究者がセンター各部における研究業務に参加する者が増え、今後ますます増加することが見込まれている。

外国の政府機関や大学、研究所との交流も活発となり、10月には中華医学会の招きにより指導教官として北京、南京および広州の医学者と交流を行った。さらに、各部の部長・室長も欧米の学会や研究集会に出席した。

日米毒性研究の協力は順調に行われ、例年通り、日米双方で2名の研究員の相互交換によりセミナーの開催、討論や視察、情報の伝達を行い、日米協力ががん研究でも学術集会に参加した。

インドネシア国立薬品食品管理試験技術協力事業では、当センター2部からの研究指導者の派遣とインドネシア側からの長期研修員の受け入れを今年も継続して行った。

IPCS および IARC 主催の国連関係の各種専門委員会へのセンター要員の出席も年々増加し、とくにWHO/FAO 合同の食品添加物、残留農薬や化学物質評価のための試験法確立会議に参加し、また Environmental Health Criteria のうち有機リン農薬やピレスロイド等のドキュメントの作製とレビューに、各部

長・室長が協力した。

本年度は国外でのシンポジウムやセミナーにセンター各部の室長が招待を受けて参加したものが多く、従来からの業績が評価されたものと考え、4月に韓国毒科学会創立に際し、ソウル大学における特別講演に招かれ、また国内では、第12回日本毒科学会を主催した。

本年度は変異原性部に一室を加え、研究員の充実もはかられつつあるが、一方においては定員削減が進行しており、日常業務の増加を考えると、当センターにおいても業務遂行のための効率化と活性化をはかるべく組織と人員にわたる全般的な補強と改革を考慮すべき時期にあると考える。

## 毒 性 部

部 長 戸 部 満 寿 夫

### 概要

業務は全般的に順調に遂行された。日米毒性研究協力事業に関連して、60年9月に来訪された米国NIEHSのDr. Melnickは、毒性部で進展した薬物のマイクロカプセル化技術を利用しての長期毒性試験の成果を伝え、日米の実質的協力の1つの実りを例示した。

インドネシア薬品食品管理試験所技術協力関連では、Mrs. Sangariwatiが60年9月より6ヵ月間、またMr. Sukirnoが61年3月より6ヵ月間の予定で来所した。当方から出張していた会田技官は1年間の精力的な技術指導を終え、無事帰国し、引継いで関田技官が出発した。

60年8月、11年間を共にした池田康和技官が退官した。

61年4月1日に、第3室に梅村隆志君が採用された(第3室所属)。

### 研究業績

#### 1. 医薬品

##### i) 注射剤の安全性に関する研究

ヒトの静脈注射の際に静脈炎をおこすことがあるので、注射剤の局所障害性に関する研究の一環として、実験的に動物に静脈炎をおこしうるか否かを検討した(厚生科学研究, 業務局安全課)。

##### ii) 放射性医薬品の毒性試験

骨髄診断薬の塩化インジウム( $^{111}\text{In}$ )のラットによる毒性試験を行った(原子力試験研究費)。

##### iii) 歯科材料の安全性評価法の確立に関する研究

歯科材料についての一般毒性試験法(亜急性毒性試

験)を検討する目的で、歯科用レジンにラットに投与し検討した(厚生科学研究, 業務局審査第二課)。

#### 2. 食品添加物

##### i) dl- $\alpha$ -トコフェロールおよびエリソルビン酸ナトリウムの併用毒性に関する研究

ラットを用いて、dl- $\alpha$ -トコフェロール、エリソルビン酸ナトリウムの2ヵ月間併用毒性試験を継続して実施した(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)。

#### 3. 家庭用品

i) ゴム添加剤のメルカプトベンゾチアゾール、ジフェニルグアニジン、メルカプトイミダゾリン、2-(モルホリノチオ)ベンゾチアゾールおよびN-シクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのマウスによる慢性毒性試験を継続して実施した。また、2,2'-メチレンビス(4-エチル-6-tert-ブチルフェノール)のラットによる急性および亜急性の経口毒性試験、モルモットによる光毒性および光感作性の検討を行った(家庭用品等試験検査費, 生活衛生局家庭用品安全対策室)。

ii) 防燃加工剤のトリス(2,3-ジクロロプロピル)ホスフェートのマウスによる経口および経皮慢性毒性試験を継続して行い、最終報告を作成した。また、テトラプロモビスフェノールAの皮膚一次刺激試験および皮膚感作法を行った。ヘキサプロモシクロドデカンの経口癌原性試験を実施した(家庭用品試験検査費, 生活衛生局家庭用品安全対策室)。

iii) ジクロロメタンのラットによる慢性吸入毒性試験を引続き実施した。

##### iv) ナフトールASの毒性に関する研究

ラットによる亜急性毒性試験を行い、次いで慢性毒性試験を開始した(業務局安全課)。なお、別に光毒性および光感作性試験を開始した(家庭用品等試験検査費, 生活衛生局家庭用品安全対策室)。

#### v) 溶剤

1,1,1-トリクロロエタンの光毒性および光感作性を引続き実施し、新たにジエチレングリコールモノブチルエーテルの光毒性および光感作性の検討を行った。

#### 4. 既存化学物質

ビス(2,3,3,3-テトラクロロプロピル)エーテル、パラ-pec-ブチルフェノール、2,4,6-トリ-tert-ブチルフェノールおよび水素化トリフェニルのラットによる慢性毒性試験を継続して実施した。また、ヘプタクロールの亜急性毒性試験を開始し、新たにジイソプロピルベンゼンの急性毒性試験を実施した(業務局安全課)。

#### 5. その他

i) フザリウム属が産生するトリコテセン系かび毒

についての毒性的作用等に関する研究

トリコセチン系かび毒のニパレノールの急性および亜急性経口毒性試験を行った(厚生科学研究, 生活衛生局食品保健課)。

ii) 小型霊長類の実験動物化と特性に関する研究(科学技術振興調整費)。

iii) 覚せい剤およびその代謝物の分析に関する研究  
メタンフェタミンおよび塩酸ジメチルプロパミンをサルに投与し, その尿中排泄経過について検討した。

iv) 小型ウサギ目動物の実験動物化とバイオメディカル研究分野における有用性の探索

—ナキウサギの有用性・薬物感受性について—(文部省科学研究)。

v) タール色素の毒性に関する研究

—赤色207号, だいたい403号の急性毒性および皮膚刺激性について—(薬務局審査第二課)。

vi) 農薬中毒の解毒剤に関する研究

農薬中毒の解毒法研究の一環として, 有機リン系農薬による中毒に対するパムあるいはアトロピンによる治療の効果について, アンケート調査を行った(厚生科学研究(福岡班), 薬務局安全課)。

vii) 脂溶性環境汚染物質に関するヒューマンモニタリング手法の開発とその応用(公害防止等試験研究費, 環境庁企画調整局研究調整課)。

viii) 化学物質の急性毒性評価のための簡易スクリーニング法等に関する研究(厚生科学研究(西村班), 薬務局安全課)。

ix) 実験動物施設における滅菌, 消毒作業マニュアルの作成(文部省科学研究(前島班))。

x) 医薬品の急性毒性試験のあり方に関する調査研究(厚生科学研究(福田班), 薬務局審査第一課)。

xi) ラットの組織酵素分布に関する研究

## 薬 理 部

部 長 高 仲 正

### 概要

末梢薬理研究室井上和秀技官は科学技術庁の長期在外研究員として, 8月12日より1年の予定で米国FDA, 医薬品生物製剤センター細菌製剤部細胞生理研究室J. G. Kenimer博士のもとへ, 培養神経細胞の電気生理学および薬理学的研究のため出張した。また, 後世代影響研究室中浦楨介主任研究官は国際協力事業団の委嘱により専門家として, インドネシア共和国国立薬品食品品質管理試験所における医薬品, 抗生物質, 生

物学的製剤の発熱性物質試験の指導のため, 9月26日より3ヵ月間ジャカルタへ出張した。その他, 短期海外出張は, 藤森室長: プタの医学生物学的研究シンポジウム(米国, 6月15日~25日), 高仲: 残留農薬FAO/WHO 合同会議(スイス, 9月21日~10月4日), 田中室長・高仲: 国立薬品食品品質管理試験所技術協力第4回合同会議(インドネシア, 1月18日~26日), 高橋室長: GLP 査察(英国, 3月10日~18日)の延5件であった。

国内のGLP 査察には6名が参加した。

今年度は3課題について研究を終了し, 新たに4課題について研究を開始した。なお, 経常研究費以外の研究として, 今年度は厚生省関係7, 環境庁関係1, 科学技術庁関係3, 文部省関係3および特別研究1課題について研究を行った。

### 業務成績

昭和60年度はブドウ糖注射液356件, リンゲル液5件について発熱性物質試験を行い, ブドウ糖注射液1件が不適となった他は, すべて適と判定された。

### 研究業績

1. 医薬品等の薬理作用に関する研究

i) 繁用生薬の薬理学的研究

本年度より研究を開始した。

ii) 放射性医薬品の生体解毒機能におよぼす影響に関する研究

本年度で研究を終了した(原子力試験研究費, 科学技術庁)。

iii) 医薬品等の中枢作用に関する基礎的研究

iv) 注射剤の溶血性に関する研究(厚生科学研究, 薬務局安全課)

v) ジチオカルバメート系化合物による赤血球障害に関する研究

vi) 腎における薬物代謝活性を変動させる要因に関する研究

vii) 腎単離細胞を用いた毒性試験法開発に関する研究(文部省科学研究)

viii) 肝単離細胞を用いた化学物質の毒性発現機構解明に関する研究

ix) ジチオカルバメート系化合物の肝薬物代謝能に及ぼす影響に関する研究

本年度より2年計画で研究を開始した。

x) 医薬品の *in vivo* におけるニトロソ化に関する研究(厚生省がん研究)

xi) ニトロソアミン類の臓器障害及び毒性発現機序に関する研究(文部省科学研究)

2. 医薬品, 食品添加物等の後世代に及ぼす影響に

## 関する研究

i) 各種化合物の神経系の発生・分化と発達に及ぼす影響に関する研究

本年度で研究を終了した。

ii) 胎仔期を含む発生の肝薬物代謝酵素の特性とその役割に関する研究

本年度で研究を終了した。

iii) 胎仔肝及び疾病誘発臓器の薬物代謝酵素系の特性(文部省科学研究)

iv) 食品添加物の次世代に及ぼす影響に関する研究(食品等試験検査費, 生活衛生局食品化学課)

v) 家庭用品に用いられる化学物質の次世代に及ぼす影響に関する研究(家庭用品等試験検査費, 生活衛生局家庭用品安全対策室)

vi) 既存化学物質の次世代に及ぼす影響に関する研究(家庭用品等試験検査費, 薬務局安全課)

vii) Behavioral teratology に関する研究

本年度より研究を開始した。

3. 安全性評価のための科学技術開発に関する研究

i) 遺伝子組換えの新技术により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究

本年度より第二次3年計画により研究を開始した(特別研究)。

ii) 環境汚染物質の生体機能障害性に関する研究(公害防止等試験研究費, 環境庁企画調整局研究調整課)

iii) 薬物代謝酵素系における種差の研究

本年度より2年計画で研究を開始した。

## 病 理 部

部 長 林 裕 造

## 概要

人事異動として、昭和60年7月1日より長谷川良平技官が一般病理研究室に着任した。同技官は、名古屋市立大学大学院医学研究科修了後アメリカ、ネブラスカ大学医学部の講師として3年間勤務していた。対がん10年総合戦略プロジェクトのリサーチレジデントとして、昭和60年4月1日より菅野純博士が東京医科歯科大学大学院医学研究科修了後、病理部において甲状腺癌の研究に従事している。また、昭和61年3月1日より、韓国、原子力病院の張子俊博士が同プロジェクトの外国人招へい研究者として病理部において共同研究している。

海外出張では、林部長が、スイスで開かれたJECFAの会議に出席し「食品添加物ならびに食品汚染物質の

毒性ならびに安全性評価」について討議し(昭和60年6月1~14日)、ベルギーのEC本部において「食品添加物の安全性の評価基準」に関して日本とEC間の情報交換を行った(昭和60年11月2~9日)。また、スイスのWHO本部での「化学物質の安全性評価基準ドラフトの作成」に協力し、フランス、リヨンのIARC本部における「発癌性のリスクアセスメント」のセミナーに出席した(昭和60年12月7~19日)。黒川腫瘍病理室長は、アメリカ、オハイオ州で開かれた「第2回水道用殺菌剤の人体への影響に関する会議」に出席した(昭和60年8月27~29日)。また、学術振興会派遣によりアメリカのテキサス癌センターなど3か所を訪れ米癌研究者と意見交流を行った(昭和60年12月8~19日)。前川病理組織診断室長は、アメリカ・NIEHSで開かれた「比較卵巣病理学カンファレンス」に参加した(昭和60年9月23~25日)。高橋一般病理室長は、日米毒性研究協力事業の一環として、アメリカのNIEHS, NIHなど4か所を訪れ意見を交換した(昭和61年2月24日~3月6日)。

国際シンポジウムでは、高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム「食物、栄養と癌」において、林部長は「食物中の発癌物質のリスク評価」について、高橋一般病理室長は、「実験的胃発癌における食塩のプロモーター作用」について講演した(昭和60年11月12~14日)。高橋一般病理室長は、日米がん協力研究セミナー「消化器発癌における修飾因子」を日本側オーガナイザーとして国立がんセンター研究所佐藤生化学部長とともに主宰し、「膀胱癌発生における修飾」について講演した(昭和61年3月12~14日)。

## 研究事業

1. 厚生省がん研究助成金関係(国立がんセンター運営部企画課)

a. 長期動物試験による環境化学物質の発がん性評価に関する研究

i) 5FUの慢性毒性ならびに癌原性試験

ii) フェニトインの慢性毒性ならびに癌原性試験

iii) 乳酸カルシウムの慢性毒性ならびに癌原性試験

iv) ナリジクスの慢性毒性ならびに癌原性試験

v) 6MPの慢性毒性ならびに癌原性試験

vi) トリエタノールアミンの慢性毒性ならびに癌原性試験

b. ヒトがんの第一次予防に関する基礎的・臨床的研究

i) 皮膚発癌2段階モデルによるヘテロサイクリックアミンのイニシエーター作用

c. ヒト多重癌の実態と要因に関する研究

- i) 多重癌発生に関する実験的研究
- d. 日常食品成分の発癌プロモーター作用の研究
- i) 膀胱癌発生におけるエタノールの効果
- ii) 膀胱癌発生におけるカフェインの効果
- 2. 厚生省科学研究費・対がん戦略研究事業関係 (国立がんセンター運営部会計課)
  - a. 発癌リスクの評価に関する研究
  - i) ヒト癌発生に対するリスクの評価を目的とした動物実験
    - ii) 甲状腺発癌のプロモーターに関する研究
  - b. ヒト癌発生における重要な促進物質の研究
    - i) アルコールの食道癌プロモーター作用の研究
    - ii) 食塩の胃発癌プロモーター作用とその用量相関
- 3. 文部省がん特別研究費関係
  - a. 発癌プロモーターとその抑制要因に関する研究
    - i) 膀胱癌発生におけるメチオニン食およびエチオニン食の抑制効果
    - ii) 膀胱癌発生におけるプロスタグランディン合成阻害剤の抑制効果
  - b. 胃癌の発生に関する研究
    - i) 胃癌発生におけるホルムアルデヒド, メタ重亜硫酸カリウムの促進作用
  - c. 低濃度における発癌物質のリスク評価 (将来検討班)
- 4. 食品添加物安全性再評価費関係 (生活衛生局食品化学課)
  - i) コハク酸ナトリウムの慢性毒性ならびに癌原性試験
  - ii) 食用黄色4号の慢性毒性ならびに癌原性試験
  - iii) OPP ナトリウムの癌原性試験ならびに用量相関
  - iv) 塩化第2鉄の慢性毒性ならびに癌原性試験
  - v) ピロリン酸カリウムの慢性毒性ならびに癌原性試験
  - vi) マスクキシロールの慢性毒性ならびに癌原性試験
- 5. 医薬品等調査研究委託費関係
  - a. 既存化学物質毒性試験ならびに調査 (薬務局安全課)
    - i) ジエチルジフェニールの急性ならびに亜急性毒性試験
    - ii) N-フェニル 1-ナフチルアミンの毒性調査
    - iii) 1,1-ビスパラクロルフェニル-2,2,2-トリクロエタノール (デコフォール) の癌原性試験ならびにその用量相関
- 6. 国立機関原子力試験研究費関係 (科学技術庁原

子力局技術振興課)

- a. 体内適用放射性医薬品の安全性に関する研究
  - i) 副腎診断薬としてアドステロール I-132の組織に与える影響
- 7. がん研究振興財団助成金関係
  - i) 酸化剤の発癌性: プロモーター作用および毒性に関する実験病理学的研究
- 8. 日米医学協力研究会突然変異・癌原専門部会事業費関係
  - i) 環境化学物質の発癌性評価に関する研究
- 9. その他
  - i) 抗悪性腫瘍剤 (アドリアマイシン) の安全性に関する研究
  - ii) 癌研究の基礎資料としてのラット自然発生腫瘍の評価に関する研究
  - iii) 異種の動物および遺伝的背景を異にする動物における複数癌原因子その相互比較検討に関する研究
  - iv) N-ニトロソ化合物の標的臓器に関する実験病理学的研究
  - v) フェニールブタゾンの癌原性およびプロモーション作用に関する研究
  - vi) 各種化学物質の甲状腺発癌促進作用に関する研究
  - vii) パルピタールの癌原性に関する研究
  - viii) 臭素酸カリウムの慢性毒性試験ならびに癌原性試験

## 変異原性部

部長 石 館 基

### 概要

前年度に引続き、食品添加物、医薬品、環境汚染物質その他の生活関連諸物質の安全性評価の一環として微生物および哺乳動物を用いる変異原性試験を実施した。特に、本年度においては、食品添加物部その他所内各部との共同実験の推進をはかった。また、従来当部内で蓄積されたデータは、化学物質情報部に提供することによって、化学物質の安全性評価に関する情報システムの確立に協力してきた。

昭和59年度より発足した対がん10ヵ年総合戦略に基づく細胞バンク事業については、昭和60年10月より当部に細胞開発研究室が新設され、従来リサーチ・レジデントであった水沢博技官を室長として迎えた。細胞の保存、品質管理、研究者への供給は、極めて順調に運営されつつある。本業務の遂行にあたっては、2名

のリサーチ・レジデントのほか、米国のマリオン・ハルノイ博士の協力を得ている。

昭和61年4月、当部の微生物変異研究室長であった三瀬勝利技官は、当所衛生微生物部長に昇任した。同研究室の能美健彦技官は、昭和60年7月東京薬科大学より薬学博士の学位を受けた。当部細胞変異研究室の林真技官は、4月より主任研究官に昇任した。

国際協力としては、昭和60年5月、WHO/IPCS主催の発がん性物質の短期試験法の評価に関する合同会議（フランス）に部長および林真主任研究官が出席した。部長は細胞バンク事業および日米毒性試験協力事業のため、昭和60年8月および昭和61年3月に、それぞれ米国に出張した。また、昭和60年10月には韓国薬学会の特別講演に招待された。さらに、林真主任研究官は昭和60年10月より3ヵ月間、フランス、リヨンの国際癌研究機関（IARC）に出向し、共同研究を分担した。また、昭和61年3月には、水沢博室長がアメリカの American Type Culture Collection (ATCC) を訪問し、細胞株の収集を行い、祖父尼俊雄室長は同年4月に、医薬品の GLP 査察のためスコットランドに出向した。現在、当部ではアメリカの National Toxicology Program (NTP) 事業に関連して、一連の化学物質の変異原性試験につき、国立環境保健科学研究所 (NIEHS) と共同実験を開始している。

#### 研究業績

##### 1. 食品添加物の変異原性に関する研究

i) 13種類の天然添加物について培養細胞を用いる染色体異常誘発試験を行った（生活衛生局食品化学課）。

ii) 59年度試験において陽性の結果が得られたもの中4種についてマウス骨髄を用いる小核試験を行った（生活衛生局食品化学課）。

##### 2. 放射性医薬品の突然変異原性に関する研究

アドステロール-I 131 注射液について、微生物による変異原性試験ならびに哺乳動物細胞による染色体異常誘発試験を行った（原子力試験研究費）。

##### 3. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態並びに毒性発現機構に関する研究

ステリグマトシスチンについて、代謝活性化法を用いて微生物による突然変異試験を実施した。

##### 4. 環境汚染化学物質の変異原性試験

i) ディーゼル排ガス中に含まれるニトロ化合物について代謝活性化法を併用して培養細胞による染色体異常誘発試験を行った（環境庁大気保全局自動車公害課）。

ii) 水道水中における微量有機化合物および関連物

質10種について、サルモネラ菌による変異原性試験および培養細胞を用いる染色体異常誘発試験を行った（生活衛生局水道環境部水道整備課）。

iii) 低濃度レベルにおける環境汚染物質の作用を検出するために、マウスを用いる小核試験法の機械化を行い、小核検出の感度を高めるための測定条件を確立した（環境庁企画調整局研究調整課）。

iv) 新規化学物質の有害性評価のために培養細胞による染色体異常試験を用いて4種の化学物質について検討を行った（労働省化学物質情報課）。

##### 5. 培養細胞の染色体異常による発がん物質短期検査法の改善と評価

発がん物質その他の環境汚染物質の培養細胞における染色体異常誘発性とその他の変異原性試験の結果について定量的比較を試みた。

##### 6. マウスを用いる小核試験法の開発に関する研究

i) 連続投与による小核誘発機構の解明を行った。

ii) 小核試験の機械化についてフローサイトメトリー法等の導入のための基礎的な検討を行った。

##### 7. 活性酸素の染色体異常誘発機構に関する研究

放射線照射による染色体異常誘発における活性酸素の関連性を検討した。

##### 8. 新型制限酵素開発に関する研究

サルモネラ、赤痢および大腸菌から新型制限酵素産生菌を見出し、制限酵素の精製と特徴づけを行った。

##### 9. 変異原物質の代謝活性化機構に関する研究

ハムスター肝臓由来のチトクローム P-450 を用いた再構成ミクロソーム系を使用して、フェナセチンの代謝活性化機構に検討を加えた。

##### 10. 微生物を用いる変異原性試験の開発および改良に関する研究

ニトロアレン類の代謝活性化に関与する、バクテリアの酵素の遺伝子について検討した。

##### 11. 変異原物質の情報収集

i) バイオロジカルデータベースのテストデータの収集を行った。

ii) 染色体異常誘発試験および小核試験のデータの集積を行った。

##### 12. 細胞株の収集、保存、開発に関する研究

i) 所内、国内および国外よりおよそ250株の細胞株を収集し、品質検査を行い、保存した。

ii) マイコプラズマ検査法について、蛍光染色法に加え、より高感度な培養法およびDNAプローブ法などの技術的検討を行った。

iii) 保存中の細胞株について、アイソザイム分析を

実施し、生物種の同定を行った。アイソザイム分析のため glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), Lactate dehydrogenase (LD), Purine nucleotide phosphorylase (NP) など7種類を対象酵素として検討を加えたが、G6PD, LD, NP の3種で十分に種の同定が可能ことが判明した。

iv) オンコジーン ras をマウス細胞 BALB/3T3 に導入した細胞株を樹立した。この細胞株は、TPA (プロモーター) により形態変化が誘導されたが、詳細は検討中である。

## 大阪支所

支所長事務代理 伊 阪 博  
前支所長 加 納 晴三郎

昭和61年3月31日付をもって、加納晴三郎支所長は多くの業績を残して退官され、伊阪 博大阪支所薬品部長が支所長事務代理を命ぜられた。

大阪支所においては、国家検定、製品検査、一斉取締試験、輸入食品検査および特別行政試験などを行っているが、輸入食品検査を除いてはほぼ例年なみの件数を処理している。

これらの業務のほかに、国立機関公害防止等試験研究、国立機関原子力試験研究、特別研究、厚生科学研究およびその他の研究については、薬品部、食品部および薬理微生物部に述べるような内容のものが採りあげられ、それぞれに成果を挙げている。

以下各部別に詳述する。

## 薬 品 部

部 長 伊 阪 博

### 概要

昭和61年4月1日付をもって、伊阪 博が薬品部長のまま、支所長事務代理を命ぜられた。西独国に1年間留学していた小室徹雄薬品第一室長は昭和60年10月7日に帰国した。

当部の研究体制を整備しつつ、新技術により開発されつつある新製品の基礎研究および評価法の試験研究に対処した。昭和60年度から、国立機関原子力試験研究および厚生科学研究(経済課)のプロジェクト研究に参加し、医薬品製剤における医薬品添加物の有用性、安全性の評価および医薬用水の評価法の検討等に精力を傾注した。

### 業務成績

#### 1. 国家検定

検体数はブドウ糖注射液が723件、リンゲル液は6件で、全品が合格であった。

#### 2. 一斉取締試験

ニフェジピンを含有する内服固形剤18件につき試験を行い、その結果はいずれも合格品であった。

#### 3. 特別行政試験

国内産収納あへん12件(和歌山県1件、岡山県6件、香川県4件、甲種研究栽培1件)について、モルヒネ含量の定量試験を実施した。

#### 4. その他

医薬品原料および添加物の規格整備に関する研究(厚生科学研究, 薬務局審査課), 坐剤の安全性確保に関する研究(厚生科学研究, 薬務局安全課)を行った。  
**研究業績**

#### 1. 医薬品の分析化学的研究

i) 光学異性体の HPLC, GC による分離法は引き続き検討中である。確立した分離法により、ピンドロール投与ラットの血中濃度測定を実施した。

ii) プロカインとその加水分解物 p-アミノ安息香酸の水と種々の溶媒中との分配における溶媒の役割を、極性、プロトン供与性/受容性、溶媒和の観点より検討した。

#### 2. 医薬品と高分子物質との相互作用

i) 従来、塩基性薬物と糖類の相互作用を検討してきたが、国立機関原子力試験研究の分担研究として、結晶セルロースへの種々の薬物の吸着の変化をみることにし、結晶セルロースと薬物の相互作用を明らかにしようとした。アクリノールの吸着は極めて著しく、フェノチアジン系薬物の吸着もかなり大きく、いずれの場合も Freundlich 型の吸着等温線がえられた。種々の条件のもとでの吸着性の検討から、イオン交換的吸着が大きな役割を果していることを明らかにした(原子力試験研究費)。

ii) プタ酸性カリジノゲナーゼ製剤のエンザイムイムノアッセイと酵素活性測定による定量値は比較的良好に一致したことを報告したが〔衛生試報 103, 103 (1985)〕, 両方法間で差が認められる測定試料を HPLC で分離精製後、測定したところその定量値はより良く一致し、その有用性について考察した。

iii) 坐薬の安定性確保に関する研究ではインドメタシン油脂性坐剤の放出試験法の検討を行った。村西法およびトーマス法で内筒保定位置、温度条件その他検討の結果、放出率の変動が大きいかかわらず、各市販製剤の放出速度の差異を検出した。また各基剤の

融点測定を行い、坐剤中でのインドメタシンの結晶形の顕微鏡観察も行った（厚生科学研究，薬務局安全課）。

iv) 高分子膜分離の方法による注射用原料水の製造に関する研究は医薬用水の規格・試験法設定を当面の目標として分担した。高分子膜分離装置が分担研究機関の膜協会から貸与され、製造した精製水、逆浸透水、限外ろ過水と当該製造装置に使用する原水および硬質ガラス製蒸留装置で製造した蒸留水の5種類の水について、過マンガン酸カリウム消費量、紫外外部吸収および全有機・体炭素（TOC: Shimadzu TOC-500 使用）を測定し、比較検討した。TOC による評価は各製造工程での精製効果の判定に有効であり、今後の検討課題でもある膜分離による製造工程管理研究に有用な方法であると考えられた。研究班の成果は日局11「精製水」の製造の項の新記載に寄与した（厚生科学研究，薬務局経済課）。

3. 環境汚染物質と細菌内毒素との生体系における相互作用に関する研究

支所三部協同の国立機関公害防止等試験研究の生化学的研究を当部分担とし、四塩化炭素と細菌内毒素（LPS）同時投与マウスの肝リソソーム酵素、肝過酸化脂質の変化を昨年度報告したが、昭和60年度は *in vitro* での肝リソソーム膜の不安定化は四塩化炭素の直接的作用あるいは過酸化脂質量の蓄積により誘起されることを明らかにした。また、LPS と Tris (2-chloroethyl) phosphate あるいは Polychlorinated biphenyl のマウス肝における相互作用を昨年度同様に検討した。同時投与によって過酸化脂質の著しい蓄積がみられるなど、毒性増強効果の一因と推定した（公害防止等試験研究費，環境庁企画調整局研究調整課）。

従来、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法がリボ多糖の分離に繁用されてきたが、解離能の大きいデオキシコール酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により、明確な分離が困難とされたサルモネラ菌由来のリボ多糖（SR, Ra ~ Re 型）の精密な分離像が得られた。これらは、マックスプランク免疫生物学研究所における成果であり、婦朝後、完結された。

## 食 品 部

部 長 伊 藤 誉 志 男

### 概要

小林加代子技官が昭和61年4月1日付で本所食品部

第三室へ配置換えとなった。

### 業務成績

#### 1. 製品検査

食用タール色素 483 検体について、各々9項目の検査を行った結果、いずれも不合格品は認められなかった。

#### 2. 輸入食品検査

葛粉中の有機溶剤 5 件、ゼラチンキャンディ中の銅クロロフィル 4 件、ワイン中のジエチレングリコール 3 件および冷凍フライドチキン中のリン酸アルミニウムナトリウム 10 件などの化学検査を行った。

#### 3. 特別行政試験

安全性動物試験に用いる食用赤色105号（ローズベنگル）の成分試験を行った（生活衛生局食品化学課）。

#### 4. 研修について

国際協力事業団による昭和60年度、輸出入食品検査コース（研修生 6 名）の研修を11月に、農薬利用コース（研修生 8 名）の研修を61年4月に行った。

また60年10月より3ヵ月間京都薬科大学から1名、61年1月より2ヵ月間、農林規格検査所から1名、大阪港、神戸港および大阪空港検疫所から3名に対する研修を行った。

### 研究業績

#### 1. 食品・添加物などの安全性に関する研究

##### i) 食品中の添加物の分析法に関する研究

① 食品中の合成添加物の多成分分析法：食品中の安息香酸、ソルビン酸など9種保存料のガスクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる2種類の系統的同時分析法を考案した（厚生科学研究，生活衛生局食品化学課）。

② 輸入食品検査に関する簡易分析法：前年度に引き続き、パソクプロイン錯体生成による食品中の総 EDTA の比色定量法および 2,6-ジクロロキノクロロイミドを用いた食品中 BHA の迅速比色定量法についてさらに詳細な検討を行った。また今年度は食品中の BHT の *o*-ジアニジンによる簡易比色法、ナタマイシンおよびパラオキシン安息香酸エステル類の簡易吸光光度測定法を作成した（厚生科学研究（田辺班），生活衛生局食品保健課）。

③ 昭和58年追加指定食品添加物の食品中からの分析：クエン酸イソプロピルおよび EDTA について分析法作成に引き続き、下記のような検討を行った。前者は標準品として合成単離して得たクエン酸モノイソプロピルおよびジイソプロピルについて本所医化学部と協力して、異性体の化学構造について  $C^{13}$ -NMR スペクトルを用いて解明した。後者はカラム条件などに

について検討した。

ii) 食品添加物の1日摂取量に関する研究

① 調査研究：昨年に引き続き、本所食品添加物部および地方衛研8機関と協力し、マーケットバスケット方式による調査研究を行った。

サッカリン、タール色素のように天然に存在しない添加物をA群とし、有機酸、ビタミン、ミネラル、安息香酸のように天然に存在するものをB群として区分した。今年はB群食品添加物の自然含有量(Background)を調べる目的で、生鮮食品を対象に選び、当部は有機酸およびアルギル酸ナトリウムを分担した。各々の分析法を作成し、これらの方法を用い定量後、日本人の1日平均摂取量を試算した(厚生科学研究(吉野班)、生活衛生局食品化学課)。

② 分析法：昨年調査品目の糊料および乳化剤について詳細な検討を行った。

③ 食品由来成分(Background)の含有量調査研究：B群食品添加物の各種食品のBackground値調査を行った。今年は亜硫酸について行い、ニラ、ネギ、タマネギ、ニンニクなど含硫化合物を含む食品から、微量の亜硫酸が検出された。また、このような含硫化合物に由来する亜硫酸と添加された亜硫酸の定性的判別法を考案した(食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課)。

iii) 食品添加物の物性研究および代謝研究

① 代謝研究：過酸化水素および亜硫酸のシロネズミの各種臓器での *in vitro* における挙動を調べ、いずれも肝臓および腎臓で著明な分解が認められ、過酸化水素の分解は非常に速かった(特別研究)。

② 物性研究：アラビアゴムと陽イオン界面活性剤との相互作用を検討した。またこの反応性を利用して各種天然乳化剤の判別の可能性を示唆した。

iv) 食用タール色素の製品検査方法に関する研究

食用タール色素の主色素の定量には、従来三塩化チタン滴定法および重量法が用いられてきたが、副色素も同時に測定されている危険性があることから、HPLC法の利用を考え、Zorbax C<sub>8</sub>カラムを用いる方法を検討した(厚生科学研究、生活衛生局食品化学課)。

v) 食品中の残留農薬分析法に関する研究

① PCNB・クロロタロニル(有機塩素系殺菌剤)、アラクロール(酸アミド系除草剤)、トリフルラリン(ジニトロアニリン系除草剤)、プロボキスル、BPMC(カルバメート系殺虫剤)、ジスルホトン、エディフェンホス(有機りん系殺虫剤)、IBP(有機りん系殺菌剤)のシリカゲルカラムおよびECD-GC、FTD-GCを

用いる系統的試験法を作製した。また20数種類の有機リン系農薬、プロパニル、リニユロン、ジフェナミドなどについて食品中からの多成分試験法について検討した(食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課)。

② 農薬の一斉分析を指向するためには、広範な農薬について適用でき、かつ、適合性の良い物理的指標の開発が望まれる。そこで、炭化水素などの基本物質について、1、2種の指標について検討した。

vi) 化粧品成分の分析法に関する研究

昨年に引き続き、口紅、チーク、ポマードなどの化粧品に使用される天然ワックスおよび各種乳化剤をクロマトグラフィーにより分画し、GCにより定量する系統的分析法をそれぞれについて検討した。

vii) その他の調査研究

① トリコセセン：関西地域の食品(岩おこし、およびパン類各々10検体ずつ)中のトリコセセン系カビ毒(ニパレノールおよびデオキシニパレノール)の汚染状況を調べた結果、いずれの検体からも検出されなかった。なお、検出感度は10ppbであった(食品等試験検査費、生活衛生局食品化学課)。

② 各種輸入果実の市販品のEDBの含有量：国別のグレープフルーツ、オレンジ、マンゴー、パパイヤおよびさやいんげん中のEDB(Ethylene Dibromide)含有量をECD-GCで測定した。いずれも暫定的残留許可限度(0.130ppm)以下であった(生活衛生局食品化学課)。

2. 食品中の有害作用物質に関する研究

i) 魚介類の腐敗機構に関する研究

魚介類より単離した数種の酵母および細菌を滅菌したサバなどに接種し、各種温度で一定時間放置後の軟化度、腐敗臭、pH変動、揮発性アミン、アンモニア生成量および脂肪分解率を本所衛生微生物部と共同で調べた。

3. 環境汚染物質と細菌内毒素との生体系における相互作用に関する研究

支所3部共同研究で、当部は昨年度に引き続き魚類について行った。

ヒメダカにおいて細菌内毒素の致死作用に対する緩和効果が認められたAgNO<sub>3</sub>およびCuCl<sub>2</sub>、増強作用が認められたHgCl<sub>2</sub>およびn-アミルアルコールについて、濃度作用曲線を調べ、さらに環境汚染物の魚体内濃度を測定した。緩和作用は魚体内濃度の減少に起因する事を明らかにした。増強作用では環境汚染物質の魚体内濃度に変化がないことより、今後細菌内毒素の魚体内濃度を測定する予定である(公害防止等試験研究費、環境庁企画調整局研究調整課)。

## 薬理微生物部

部長 川崎 浩之進

## 概要

昭和61年3月末日をもって前薬理微生物部長であった加納晴三郎支所長が定年退官された。23年間激務に耐えつつ数々の研究業績をあげられ、多数の研究者の育成および、支所のレベルアップに尽力された偉大な指導者の退官に際して、部員一同協力して覚悟新たに再出発を期している。

60年10月1日より61年9月30日まで江馬 真技官がニューヨーク州立大ダウンステート医学センターに留学中である。また61年4月1日付で江馬 真技官が主任研究官に昇格した。

60年9月14日、伊丹孝文主任研究官が、西ベルリンにおける国際シンポジウムにおいて「A possible mechanism for the potentiation of the fetal toxicities of salicylates by bacterial pyrogen」と題して講演を行った。

## 業務成績

国家検定として、ブドウ糖およびリンゲル注射液729件の無菌試験および発熱性物質試験を行い、全件合格した。輸入食品の細菌試験は1件もなかった。

## 研究業績

当部の一貫した研究テーマである発熱物質に関する研究と胎生薬理学に関する研究の他に、環境庁公害防止等試験研究（昭和58年～60年）が最終年度を迎え、また厚生科学研究の一環として、坐剤の安全性評価に関する研究について、本所薬品部と協力して研究を行った。

## 1. 発熱物質に関する研究

細菌性発熱物質（LPS）による発熱反応には動物による種属差が認められるが、それは大脳プロテオリビッド・アポプロテインによるLPSの結合能の動物間差異に起因することを示した。さらにLPSとAH-Sephrose 4Bをカップリングさせたアフィニティクロマトによりウサギ大脳プロテオリビッド・アポプロテインよりLPSを特異的に結合する蛋白画分を分離精製した。また高分子膜による限外ろ過によるLPSおよびその加熱分解物の分画分子量分析とカルボシアニン色素による比色定量法およびリムラステストによるそれらの活性との相関性について検討した。すなわち、LPSは分子量限界 $3 \times 10^4$ のPM30膜を通過し得ないが、 $100^\circ\text{C}$ 、30分あるいは $121^\circ\text{C}$ 、30

分加熱されたLPSはPM30はもちろん $10^4$ のPM10膜すら通過し、リムラス活性は $10^4 \sim 3 \times 10^4$ の加熱LPSでは、元の活性の1/100に、 $10^4$ 以下では1/100,000に低下することを示した。また、カルボシアニン色素による比色分析では、元のLPSの吸収極大が470nmであったものが、加熱により、より短波長の450nm附近にシフトし、何らかの構造変化があったことを示唆する成績を示した。さらに、それらの成績を含めてLPSの除去あるいは不活化の機構とLPSの滅菌法との関連について示した。

このような発熱物質とリムラステストとの関係について、発熱物質による発熱反応の機構やリムラステストにおけるゲル化反応の機構および発熱性物質試験とリムラステストとの相関性に関する諸々の問題点を明らかにした。

## 2. 農薬、食品添加物等の毒性に関する研究

## i) 胎仔毒性の発現機構に関する研究

アスピリン（ASA）およびその代謝産物サリチル酸（SA）によるラットにおける胎仔毒性は、LPSの投与により胎仔死亡、吸収、発育不全、骨格の変異等が著しく増強され、この時、胎仔内SA濃度は著明に増加し、母体血清中の総蛋白やアルブミン（Alb）濃度は低下、遊離脂肪酸（FFA）は増加することが判明した。これらのことからASAおよびSAの胎仔毒性のLPSによる増強は、母体血中のFFAの増加およびAlbの減少により非結合性SAが増加し、胎仔への移行が促進されたことによることを明らかにした。

## ii) 殺虫剤および食品添加物などのラットにおける胎仔毒性に関する研究

エリソルビン酸ナトリウムは、5、0.5および0.05%、メタ重亜硫酸カリウムは10、1および0.1%、グリチルリチン酸二ナトリウムは2、0.4および0.08%およびヘキサプロモサイクロドデカン1、0.1および0.01%、これらをそれぞれ飼料に混合してラットに与えて、胎仔毒性について検討したところ、いずれもその範囲内では胎仔に対する毒性は認められず、催奇形性はないことを示した。

## 3. 坐剤の有効性と安全性に関する研究

まず、解熱坐剤の効力をウサギを用いて検討するためのサーミスター式体温計の感温部を改良し、有用な直腸温測定部品を創作した。さらにこれを用いてインドメタシン（IM）坐剤の解熱効果をウサギを用いて検討し、IM坐剤は直腸内投与により静注に劣らない強い解熱効果を示すことを明らかにした。ついで、IMの解熱機構をLPS、白血球性発熱物質（LP）および2,4-ジニトロフェノール（DNP）で発熱させたウサギ

を用いて検討し、LPS および LP で発熱させたウサギでは IM による解熱効果は著明であったが、DNP では認められず、IM を大槽内に投与すると強い解熱効果が認められることから、IM は中枢性の発熱機構を抑制することを示した（厚生科学研究，薬務局審査第二課）。

#### 4. 環境汚染物質と細菌内毒素との生体系における相互作用に関する研究

前年度までの成績に基づいて、塩化カドミウムを選んで、汚染物質と内毒素の妊娠ラットおよび胎仔に対する毒性の増強効果を検討し、さらに細菌外毒素と内毒素の併用効果についても妊娠ウサギを用いて検討した。すなわち、カドミウム投与妊娠ラットに対する内毒素投与は、流産、胎仔死亡、骨格の変異を増加させる傾向を示すこと、さらに外毒素と内毒素の併用により妊娠ウサギの流産と胎仔死亡が著明に増加することを明らかにした。以上3ヵ年の成績から、急性、慢性および次世代に対する試験において、内毒素を負荷することにより、通常あまり明確でない汚染物質による毒性を明確に示し得ることを示し、汚染物質の毒性を試験する系へ、内毒素汚染を挿入するこの試験法が、公害病を誘起するかも知れない汚染物質を予知するための試験法としての新しい手段になり得ることを示唆した（公害防止等試験研究費，環境庁企画調整局研究調整課）。そのうちの汚染物質のマウスおよびラットへの長期間の投与実験の成績について報告した。

以上の他に、本年度は家庭用品安全対策の一環として、メタクリル酸ラウリルのラットに対する催奇形試験を行いつつある。

## 北海道薬用植物栽培試験場

場長 畠山好雄

### 概要

施設に関しては宿舍の4～5号の用途廃止を行い、機器については麻薬課の予算により無機成分専用の分析機およびクリーンベンチを購入し、試験作物の栄養診断および組織培養が可能となった。

昭和60年は6月14日に降霜があり、6月いっぱい低温が続いたが、以降高温多照となり作物も特異な生育を示した。

研究業務は前年と同じく寒地産薬用植物の栽培と育種、野生薬用植物の栽培研究に当たった。また、道内のケン的一般耕作が一挙に14名に増え、その指導、講習に当たっている。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採種	192種	(筑波試験場へ送付)
受入	58件	639種
分譲	23件	70種

#### 2. 薬用植物の栽培・自生調査

栽培植物の調査・指導はダイオウ(池田・名寄)、カラスビジャク・ジャクヤク(岩手・訓子府・名寄)、ケン(名寄・下川)、エゾウコギ(丸瀬布)について実施した。

### 研究業績

#### 1. トウキ

特定総合研究は終了したが、選抜はまだ不十分なのでさらに続行した。

ヤマト・ホッカイ両系統について形態上の選抜を行い、低温伸長性については次年度春に行うこととした。

#### 2. ケン

寒冷地春播き栽培における花芽分化および生育過程を2年間に亘って検鏡し、その概略を解明した。また、春播き栽培では基肥ないし早期追肥が収量を確める傾向が見られた。

生育・収量の施肥反応を調べたところ、アヘン収量については明確な施肥の反応を示さなかった。なお、単位面積当りのアヘン収量は過去最高の1458g/10aを示した。

朔果収量は昨年と同様、施肥時期が遅れるに従い減少した(薬務局麻薬課)。

#### 3. ジャクヤク

3年生の個体収量を400gに設定し、それ以上の多収を示す11系統を得た。また、ペオニフロリン含量3.0%以上を示す系統は14系統あり、多収高含量系統は3系統見出されたが、中でも、特にNo.29は現在最も有望系統である。なお、1977～1981年に行った5年生と1981～1984年に行った3年生の収量および含量の間には正の相関(各 $r=0.346^*$ ,  $r=0.891^{**}$ )が見られた。

#### 4. 野生薬用植物

ハシドコロについて、種球の大小および栽培期間を組合せて過去3年試験を行い、種球は30g・栽培期間2年が適当であると結論した。また、1・2年生のアルカロイド含量(スコポラミン アトロピン)は0.15～0.20%の範囲にあり局方の規定値0.3%に達しなかった。

モッコウについては、畑地条件下での栽培が可能なることを確認し、晩霜に弱く、稔実歩合の低いのが栽培

上の難点になるという結果を得た。

#### 5. その他

ダイオウの耐暑系選抜技術開発のため高温下での断水処理による幼苗選抜に着手した。

ゲンチアナは早熟系統を4系統選抜し、取播きを行った。

### 筑波薬用植物栽培試験場

場 長 佐 竹 元 吉

#### 概要

昭和61年4月1日付けで庶務課長に森永修次郎事務官（前大阪支所庶務課長補佐）が昇任し、豊田芳男前課長は薬務局経済課流通調査官に、庶務課庶務係長に藤井厚美事務官（前業務課調査係）が昇任し、笠木直一郎前係長は業務課検定係長に転任した。育種生理研究室に池田嘉代技官が採用された。

本年度の主な業務は業務成績および研究業務の項で述べるが昭和60年度科学技術振興調整費による重点基礎研究に“薬用植物の成分多生産系統の開発等に関する研究”および長寿関連基礎科学研究の受託研究として「形質転換薬用植物細胞による有用物質の生産の研究」が開始された。

“遺伝子資源開発利用のための国際協力に関するASCAセミナー”が科学技術庁資源調査所の主催で昭和60年11月5～8日、筑波で開催され、9ヶ国、3国際機関が参加し、筑波場長が日本側委員として、薬用植物資源の面から発表した。

昭和61年1月7日薬用植物遺伝資源貯蔵室が完成し、発芽試験の終了したものについて、保存が開始された。

昭和61年2月14日、当场において、薬用植物栽培試験場業務打ち合せ会が開催され、所長、副所長、生薬部長および業務課長が列席し、意義ある論議が交された。

海外出張はインドネシア（1月18日～2月2日）に薬品品質管理プロジェクト専門家として、佐竹が派遣された。

#### 業務成績

##### 1. 種子交換

種子の保管数	1,815種	(’84年, ’85年分)
入手種子数	197件	1,270種
分譲種子数	194件	4,567種
種子目録配布数	76ヶ国	410機関

##### 2. 薬用植物の自生地及び栽培地調査

京都大学芦生演習林の薬用植物調査、長野県、埼玉県、茨城県下でミシマサイコ等の栽培指導、山梨県下でキバナオウギ、ウスバサイシン、チョウセンニンジン等の野生薬用植物の調査を行った。

#### 研究業績

##### 1. ミシマサイコ

###### i) 優良系統の選抜育成に関する研究

野生種、個体選抜系統および組織培養で誘導された55系統の2年生の生育特性を明らかにした。1年生のサイコサポニン a, d の含有量や生育の良い27系統について、隔離採種し、今年度、第3代目の選抜を行った。

1年生でサイコサポニン a と d が 1.174% と高い No. 74 は 2年生でも 1.386% と高い値を示したが、No. 57 は 1.7844% から 0.9533% と低い値を示し、サイコサポニンの含量が遺伝的に安定した形質か、更に検討が必要がある。

また耐病性に関しては収集した野生種の中に優良なものは見られない。

###### ii) 受精様式に関する研究

自殖劣勢の有無を検討するため自殖 F<sub>1</sub> に関して発芽率及び生育を調査したところ、自殖種子の発芽は他殖種子とはほぼ同程度で高い発芽率を示した。抽苔率、開花率は他殖が高い。草丈の均一性については自殖の方がやや高い。

自殖 F<sub>2</sub> の劣勢の有無を検討する必要がある。

###### iii) 摘芯試験

摘芯処理が生育、収量に及ぼす影響を2年生株で検討したところ、栽植密度の影響が摘芯効果より、有効であることが根の生育、収量の面で明らかになった。

##### 2. ケン

一貫種および外国導入種78系統について、第2代目の選抜試験を行った。春播きのためと気候不順のため相対的に含量が低かったが、モルヒネ含量17%以上、又はコデイン含量5%以上の22系統を選抜し、継続育種を行っている。

またケンがらの成分含量についても検討を行った。

##### 3. ハトムギ

タイ系統と筑波系統の交配雑種 F<sub>5</sub> 世代の選抜育種を行い、F<sub>4</sub> で58系統、144種を選抜採種したが、F<sub>5</sub> では21系統42種を播種し、18系統134種を採種した。雌ずいはいは緑白色で筑波種に近いタイプは安定して来たが、タイ系統のものではまだ不安定である。F<sub>4</sub> 同様に大粒種は草丈が高く、果実の硬度が硬く、晩生の傾向が見られる。

またハトムギの他殖性については筑波と中国種で雌

ずいの色の出現率で検討したところ、 $F_1$  では赤色雌ずいが優勢であることが判明し、筑波(♀)の赤色雌ずい株の種子でみると $F_2$  では白、赤の分離比は306:933(1:3.05)となった。

#### 4. ムラサキ

ムラサキは栽培困難な植物といわれているが、その原因の一つは生育初期におけるアブラムシによるキュウリモザイクウイルスの感染と考えられる。アブラムシを白色寒冷沙で防除したところ、シコニンの含量および収量性の高い紫根が得られた。

#### 5. 組織培養に関する研究

##### i) Ri プラスミドによる形質転換細胞の研究

##### a) 毛状根の誘導およびその培養

ベラドンナ、ダツラ、ニチニチソウの無菌植物に *Agrobacterium rhizogenes* 15834 (pRi 15834) を接種したところ、1~4週間て毛状根の形成が見られた。除菌した毛状根はホルモン無添加 MS 培地で伸長・増殖を行った。毛状根は高圧ろ紙電気泳動法でのオパイン検出で、形質転換を確認した。

##### b) 毛状根および形質転換細胞による物質生産の検討

a) で得られた毛状根を液体培養で増殖し、アトロピン、スコボラミンおよびピンクリステンを TLC および HPLC で確認した。

##### ii) 植物組織培養における培地固定化剤

クローン増殖に効率的な寒天に代る固定化剤として、ゲルライトを検討した。センキュウではゲルライトにより、一移植片あたりに得られる葉数や不定根は増大し、生長も著しく良い。ウスユキクチャナシグサでは、寒天では生育が遅いが、ゲルライトではセンキュウ同様著しく、良い傾向が見られた。またゲルライトが透明であるため、観察が容易である。

##### iii) 優良品種選抜法の開発

ハシリドコロの産地別系統のクローン増殖およびマオウのカルス増殖、分化培地の検討を行い、良好な培地条件が見つけ出されている。(原子力試験研究費)

#### 5. 薬用植物の品種保存および技術保存

保存しているボタン属、カノコソウ属、カンゾウ属、オケラ属の保存と成分含量の検討を行った。

ジオウの生薬調整法により成分が変化することが明らかになった。

#### 6. ニホンザルの薬用植物の摂食

野生ニホンザルの動態調査より薬用植物の摂食が観察された。それらはイヌガヤ、ハイヌガヤ、アケビ、ノイバラ等79種である。京都大学霊長類研究所で生態観察用ニホンザルに11種類の薬用植物を与えたところ、

摂食行動のみられたのはセンブリ、オウレン、キハダの3種類であった。

## 伊豆薬用植物栽培試験場

場長 西 孝三郎

### 概要

本年度の特記事項としては台風の襲来がある。昭和60年7月1日未明、大型台風6号(最大風速29.8m、連続雨量130mm)が伊豆半島中央部を横断した。その影響で屋外便所の一部破損のほか、門扉、温室、ビニールハウス等に若干の被害をこうむり、また、栽培中の植物も被害を受けた。

前年度倉庫の改修工事を行い培養室、標本室が完成したが、本年度は組織培養関係の充実を図るため、培養室に照明付回転組織培養恒温槽とプログラム式低温恒温器を設置し、さらに透過型ノマルスキー式微分干涉顕微鏡を購入した。

### 業務成績

#### 1. 種子交換

採種	82種	(筑波試験場へ送付)
内訳	野生植物	29種
	標本植物	31種
	温室植物	22種

受入れ 12件 172種

分譲 28件 65種

#### 2. 薬用植物の自生地調査

本年度は長者ヶ原、石廊崎、天子山および稲取の伊豆半島各地と箱根地区の野生薬用植物の植生調査を行い、96種の植物標本を採取した。また、ミシマサイコの自生地の土壌を採取し、簡易土壌検定器により、その特性について調査した。その結果、いずれの土壌も腐植含量は極めて高いが、有効リン酸、窒素分はほとんど含有せず、pHは4.5~5.0であった。

#### 3. 台風による植物の被害調査

前述の台風による植物への被害程度を知るため、通過直後、2週後、4週後の3回観察調査を行った。温室は数枚のガラスが破損したが、植物への影響はほとんど認められなかった。しかしながら、戸外の試験植物、標本植物では完全に枯死するもの、倒伏、折損、落葉または葉が黄変する等、植物によって程度は異なるが、大半の植物が何らかの被害をこうむった。

### 研究業績

#### 1. ミシマサイコ

##### i) 茎頂培養

前年度に引続き茎頂培養による増殖法の検討を行った。その結果、MS 培地 1/2 濃度、カイネチン 0.01~0.05 mg/l, IBA 0.5~1.0 mg/l, pH 5.5~6.0, 14時間照明、20°C で良好な生育を示し、茎頂置床後 4 週間で鉢上げする稚苗移植法を確立した。一方、前年度育苗し隔離栽培した 9 株より 20 g (約 10,000 粒) の種子を採取した。

#### ii) 染色体の観察

伊豆・箱根地区に自生するミンマサイコを中心に各地より導入したサイコの染色体数について観察を行った。結果は次に示すとおりである。

伊豆・箱根地区	2n=26
九州北部	2n=20, 21, 32
中国産(万里の長城)	2n=12
栽培種	2n=26, 28

#### 2. Cinnamomum 属植物

Cinnamomum 属植物のさし木による増殖法を確立するため、C. cassia をはじめとする 10 種について試験を行った。常法による戸外区ではジャバシナモン、シバニッケイおよびイヌニッケイで 20% の発根率を示したが、他種の発根は認められなかった。一方、ミストハウス区では戸外で発根の認められた 3 種は 50~70% の発根率を示し、セイロンニッケイ等 7 種でも 10~40% の発根率であった。したがって Cinnamomum 属植物のさし木増殖は温・湿度の条件を考慮することにより可能であることを明らかにした。さらに発根剤を併用することにより、C. cassia の発根率を 85% 以上にすることができた。

### 和歌山薬用植物栽培試験場

場 長 堀 越 司

#### 概要

ケシは 11 月 12 日に播種し、11 月~12 月は降水量少く、発芽はやや遅れ気味であったが良好であった。3 月~5 月の最高気温は平年に比し、やや高めで、最低気温は 11 月~5 月まで平年より低く、生育も遅れ気味であった。その上に 4 月の気温も低く、晩霜に見舞われ、生育停止の株も見られた。アヘン採取については、早生系は普通であったが、一貫種系は早生系に比しやや減少した。特に 5 月 23 日の降水量と気温低下が、アヘン収量に影響したと思われる。開花、特性調査、モルヒネ、コデイン含量についても実施した。

トウキ、ミンマサイコの個体選抜、採種、トウキの掘り上げ調査、アマチャヅルの収穫セネガの掘り上げ

調査を実施するとともに、実習生の受け入れも二件行った。(1985. 6. 24~7. 8 農改、普及員 29 才。1985. 8. 5~9. 5 県農大卒 20 才)

#### 業務成績

- 栽培文書応答 30 件
- 植物(種苗舎) 入手 36 件 120 種  
配布 33 件 130 種
- 植物調査 キイセンニンソウ、ヒキオコン、サカキ、ヒサカキ、フユノハナワラビ、アンタバ、センブリ、キハダ。
- 種子交換 120 種の種子を採取調製し筑波薬試に送付。

5. 白浜南方熊楠記念館見学(1985. 5. 24)、美山村林業振興会(1985. 6. 14)、竜神村薬草研究会(1985. 6. 28, 7. 18, 1986. 3. 30)、川辺町 4H クラブ(1985. 6. 21)、高野町富貴地区トウキの栽培見学(1985. 7. 19)、金屋町修理川地区キハダの自生地調査(1985. 7. 30)、吉備町老人大学講座(1985. 8. 29~30)、御坊南ロータリークラブ例会(1985. 11. 5)、中津村田尻婦人会薬草観察会(1985. 7. 7)、中津村下田原婦人会薬草観察会(1985. 11. 14)、中津村農林まつり展示協力(1986. 1. 15)、60 年度特殊農産物新規導入事業(印南町、中津村、新宮市)、印南町薬草栽培研究会、中津村、美山村、竜神村、金屋町修理川薬草研究会、田辺市などに対し指導協力した。来場者は前年より多く 1,788 名であった。

#### 研究業績

1. ケシ 品種および系統保存ならびに技術保存を目的に育成管理し、開花、特性調査、アヘン採取、モルヒネ、コデイン含量の測定(薬品部麻薬室)、種子の保存を行った。

i) 開花調査 開花始めの最も早いものはインド 61 赤紫の 4 月 8 日であった。69 系統の開花始めは 4 月 8 日~5 月 4 日であり、開花最盛は 4 月 11 日~5 月 10 日で、開花終りは 4 月 18 日~5 月 18 日であった。花色は前年同様であったが、當場外 317-1 赤八重、317-2 淡紫一重、317-3 濃赤紫となった。

ii) 特性調査 前年と同様で特異性は認められない。

iii) アヘン採取期とモルヒネ、コデイン含量 南広 3 号、湯浅 2 号を用いた。前年同様通説どおりであって、特異性は認められない。

iv) モルヒネ、コデイン高含量系統の選抜 一貫種、交配種、外国種 69 系統を用いた。

モルヒネ含量は II 31 の 27.7% が最も高く(ローマ 3-1) 平均 19.33% であった。コデイン含量は、II 51 の 6.11% が最も高く(トルコ 2-3) 平均 1.93% であった。

## v) 全草抽出法

一貫種系南広10号のさく果40ヶを用いた。アヘン採取期を対照区とし、さく果20ヶを慣行法で4回採取し、一方全草抽出区(さく果のみ)をアヘン採取期に採取し乾燥したものを抽出エキスとし、高速液体クロマトグラフ法で、モルヒネ、コデイン含量を測定した。対照区(慣行法)のアヘン収量は4.28gで、モルヒネ含量81.07%、コデイン含量26.78%であった。一方全草抽出区のモルヒネ含量は55.20%、コデイン含量0.88%であった。今後新しい採取法の検討材料にしたい。

iv) アヘン採取、早生系では5月14日より開始し、5月21日までに4回、中晩生系は5月23日より開始し5月30日までに4回実施した。

2. トウキ 畑試験、採種農家別、苗の大きさ別生育収量、鉢試験、発芽、採種農家別、種子の大きさ別などについて検討した。

i) 苗の生存率 採種農家別では矢辻>大谷>林阪の順であって経時変化の差異は認められた。即ち4月11日植付時より28日後の5月18日では、矢辻96.6%、大谷69.6%、林阪59.0%であって、掘り上げ時の1986年1月8日では、矢辻69.5%、大谷47.8%、林阪41.0%と低下した。苗の大きさ別では、5月18日で中78.3%、大73.0%、小67.2%であったが、掘り上げ時の1986年1月6日では大57.8%、中55.7%、小42.6%と低下した。

ii) 地上部の生育 採種農家別では生葉重で大谷>林阪>矢辻の順で差異が認められ、苗の大きさ別では大、中に比し小ははるかに劣っていた。

iii) 地下部の生育、収量 採種別農家別では大谷が安定し他に優り、林阪は第1次分岐根数は最少であった。根の乾燥歩留りは矢辻34.2%、大谷32.4%、林阪32.1%であった。苗の大きさ別では地上部の生育と同様の傾向を示した。

## 鉢試験

i) 発芽: 1984.6.29 開花時に葉柄色により純赤、赤混緑に分類し、部位別に採種した。種子は大きさ別に区分し、1985.5.14 直径18cm 鉢に1鉢30粒を播き1区5連とした。全般に発芽は不良で、生存株は5本であった。発芽数は純赤6本、赤混緑29本であった。即ち純赤では第1次分枝上部1.5mm、下部1.5mm、第2次分枝1.5mm、1.25mm、1.0mmの発芽を見たが、その中生存しているものは第2次分枝の1.5mm 2本であった。一方赤混緑では、主茎頂果2.0mm、第1次分枝上部1.25mm、第2次分枝2.0mm、1.5mm、1.25mmの発芽を見たが、生存中のものは、

第2次分枝2.0mm 1本、1.25mm 2本であった。

ii) 2年生株(前年発芽したもの)採種農家別、種子の大きさ別について生存状況をみると次のようである。採種農家別では林阪、矢辻は6本づつで、和薬試5本、大谷3本であった。種子の大きさ別では2.0mm以下が6本、1.5mmと1.5mm以下は5本づつで、2.0mm以上は4本であった。

## 3. ミシマサイコ 鉢試験(前年播種したもの)

開花結実したものについて順次部位別、熟期別に採種した。部位別では主茎頂果21株、第1次分枝頂果97株、その他混合176株より採種した。熟期別では、早生はその他混合43株、中生は主茎頂果2株、第1次分枝頂果34株、その他混合67株、晩生は主茎頂果19株、第1次分枝頂果63株、その他混合66株であった。種子の大きさ別では、1.0mm以上と1.25mm以上に区分した。全体に早生は少なく、その他の部位(混合)では、早生4,719粒(10月採種)、中生系7,876粒(11月採種)、晩生系16,554粒(10, 11, 12, 1月採種)であった。

4. オウレン、ジャクヤク、キハダ(タイワンキハダ)、セネガ、アマチャヅルについても続行中で、ハトムギ、ヒマワリ、トウスケボウフウ、ハブソウ、エビスグサ、トチュウなどの展示栽培も行った。

## 種子島薬用植物栽培試験場

場長 葵 一八

## 概要

前年度に継続して、本年度も場内の防風林造成、ならびに圃場の一部に、植質土を50cm高さに客土して、薬用植物種の植生維持に努めた。また、場内圃場が砂土を母体としているため、夏季の早ばつ防止用に、灌水用の水道配管を埋設した。なお、樹木園内および休閒圃場には、客土のほか、樹勢涵養ならびに、地力維持の立場から、マメ科緑肥作物をカバー作物として導入し、省力的肥培管理を実施してきた。

本年度は、クミスクチンの個体選抜、および栽培試験のほか、ウコン・ガジュツについての栽培法の圃場試験を実施し、生育中期までの生育は、極めて順調であったが、稀に見る台風12・13号(8月29~31日、最大風速44.5m/s)の被害により、圃場試験の殆んどは中止するに至ったが、被害が少なくなかった試験のみについて、その結果を検討した。

## 業務成績

## 1. 種子交換

採 種 (79種: 筑植へ送付)

内訳 自生植物 51種

栽培種 28

受入れ (27件, 65種)

分 譲 (11件, 30種)

## 2. 薬用植物の自生地調査

前年度に継続して、種子島におけるショウガ科の自生種調査のほか、とくに本年度は、屋久島における、オオゴカヨウオウレンの自生地を調査し、主としてヤクスギ・モミ・ツガ等、苔むした原生林床での植生が旺盛であることを認めた。

## 3. その他

年間の来訪者は、約1000名を超す程であった。とくに、鹿児島テレビで、当場の業務内容を紹介した年度末からは、九州本土からの訪問者も多く、種苗分譲ならびに栽培法等についての照会が多くなった。

## 研究業績

### 1. ガジュツの連作障害防止試験

1) 土壤線虫を防除することによって、線虫密度が低下し、ガジュツの草勢が極めて良好となった。

2) また、土壤線虫を防除しない場合は、有機物+標肥(化学肥料)の併用により、増収が期待できた。

### 2. ウコンの栽培に関する研究

1) 供試したウコン4品種(種子島産・台湾産・インドネシア・ジャワ No.2)では、高収量(種子島産・台湾産)と低収量(インドネシア・ジャワ No.2)とに明らかに群別できた。また、クルクミン類の含量は、低収量群が、高収量群よりも含量が高い。すなわち、収量と含量との間には、負の関係にあることを認めた。

### 3. ガジュツの栽培密度試験

ガジュツを密植区(80 cm×20 cm)、標準区(80 cm×30 cm)、疎植区(80 cm×40 cm)とについて、生育収量を検討した結果、1個の種イモ重が40~70 g 範囲のものであれば、80 cm×20 cm の栽培密度が、経済性の面からみて有利であることを認めた。

医薬品の名称・構造式とその改正点

神谷庄造：薬局，37，65（1986）

第11改正日本薬局方新収載医薬品の名称（日本名，日本別名，ラテン名，英名），継続収載医薬品の名称の改正点および構造式の記載法などについて要約した。

**Nitrosation of 1-Phenyl-3-(pyridylmethyl)ureas and the Reactivity of Two Nitrosated Isomers**

Makoto MIYAHARA and Michiko MIYAHARA:  
*Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 980 (1986)

1-Phenyl-3-(pyridylmethyl)ureas (I) を亜硝酸ナトリウムで酸性条件下ニトロ化するると二つの位置異性体，1-Nitroso-1-phenyl-3-(pyridylmethyl)urea (II) と 3-Nitroso-1-phenyl-3-(pyridylmethyl)urea (III) を与えた。種々のニトロ化試薬を様々な条件で用い，(I)のニトロ化を行い，それぞれの異性体の生成を HPLC で測定した。ニトロ化の位置選択性は溶媒，pH や用いる試薬に依存した。ガス状のニトロ化試薬 ( $N_2O_3$ ,  $N_2O_4$ ,  $NOCl$ ) を有機溶媒中用いると，(III) を主に与える。一方，亜硝酸ナトリウム酸 (1M  $HClO_4$ , 1M  $HCl$ , 99%  $HCOOH$ ) や，ガス状ニトロ化試薬-酸では (II) を主に与えた。しかし， $N_2O_3$  を用いた弱酸性水溶液の系では，主生成物は pH に依存した。さらに，化学反応性と抗腫瘍効果について，(II) と (III) を比較した。

**Reactions of 1-Nitroso-1-phenyl-3-(4-pyridylmethyl)ureas**

Shozo KAMIYA, Makoto MIYAHARA and Michiko MIYAHARA: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 385 (1986)

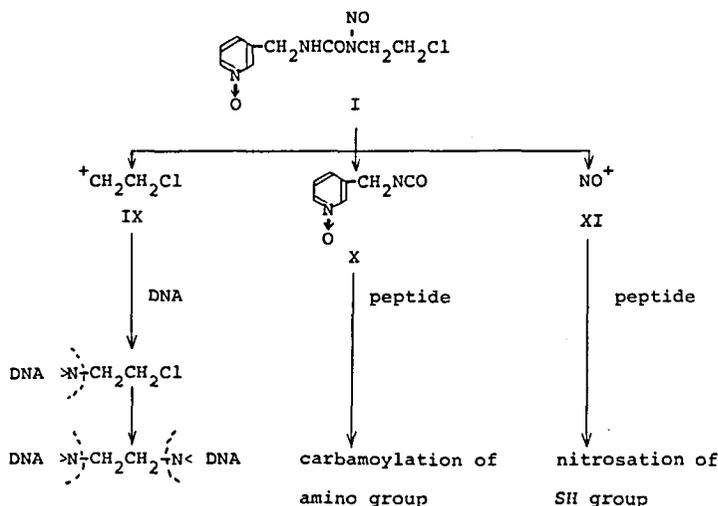
抗腫瘍性ニトロ尿素誘導体の合成研究の過程で得られた 1-nitroso-1-phenyl-3-(4-pyridylmethyl)urea は，rat ascites hepatoma AH-13 に有効であり，また，きわめて反応性に富んだ化合物である。本化合物の反応様式と腫瘍細胞レベルにおける作用機作について考察した。

**Reactions of 1-(2-Chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea  $N_{arom}$ -Oxide with Several Biological Model Compounds**

Michiko MIYAHARA, Shoko SUEYOSHI and Shozo KAMIYA: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5557 (1985)

1-(2-chloroethyl)-1-nitroso-3-(3-pyridylmethyl)urea  $N_{arom}$ -Oxide (I) の抗腫瘍作用機作検討を生物学的モデル化合物を使って行った。アルキル化の検討はピペリジンとの反応により行った。カルバモイル化は  $N_{\alpha}$ -アセチル-L-リジンとの反応により，ニトロ化は  $N$ -アセチル-DL-ペニシラミンとの反応より検討を行った。それらの反応により下図のような抗腫瘍作用機作の推定を行った。

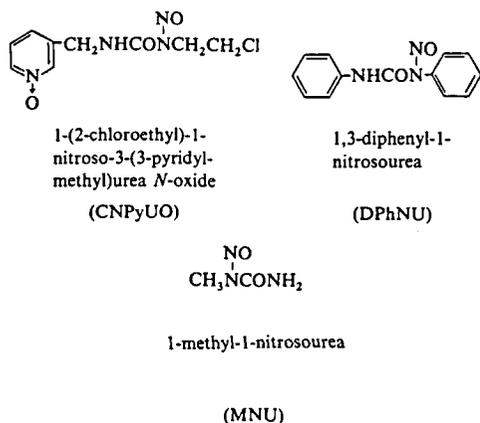
**Different Sensitivities of Rat Ascites Hepatoma AH13 and Mouse Lymphoid Leukemia**



**L1210 Cells to Typical N-Nitrosoureas**

Michiko MIYAHARA, Shoko SUEYOSHI and Shozo KAMIYA: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 188 (1986)

ラット腹水肝癌 AH13 とマウスリンパ様白血病 L1210 細胞担癌動物への延命効果に違いを及ぼす三種のニトロソ尿素誘導体がある。その三種の抗腫瘍作用機作を細胞や DNA のレベルで検討した。in vitro での三種化合物の殺細胞効果, in vivo (腹腔内移植-腹腔内投与での殺細胞の時間経過, および in vivo 処置後の細胞より DNA を集め, アルカリエリユーションを行って DNA の損傷を検討した。その結果, 三種化合物の抗腫瘍作用発現のための細胞内での時間経過を詳しく推定することができた。

**「日本薬局方外医薬品成分規格」について**

神谷 庄造: 医薬品研究, **16**, 1435 (1985)

「日本薬局方外医薬品成分規格」(局外規)の制定の目的は, 各種医薬品の製造に使用される成分(原末と医薬品添加物)について, 現在の技術水準に合った統一規格を設定し, わが国の医薬品の品質の向上と確保ならびに審査業務の簡素化をはかることにある。

局外規の現状について解説した。また, 局外規原案と添付資料の作成のための「日本薬局方外医薬品成分規格 原案作成要綱」を本文に続いて記載した。

**Extra-weak Chemiluminescence of Drugs. II. Relationship between the Structure and the Extra-weak Chemiluminescence of Organic Compounds**

Kiyoto EDO\*, Hideaki SATO\*, Mayuko KATO\*, Michinao MIZUGAKI\* and Mitsuru UCHIYAMA: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3042 (1985)

116種の化合物について超微弱発光を測定した結果,

アルキン, 脂肪族アミン, 脂肪族アルデヒド, エポキシド, ベルオキシドに発光現象を検出した。

\* 東北大学医学部

**Gastric Acidity Dependent Bioavailability of Cinnarizine from Two Commercial Capsules in Healthy Volunteers**

Hiroyasu OGATA, Nobuo AOYAGI, Nahoko KANIWA, Akira EJIMA, Nobuo SEKINE, Masataka KITAMURA\* and Yoshinori INOUE\*: *Int. J. Pharm.*, **29**, 113 (1986)

市販シンナリジン・カプセル2銘柄の溶出速度とヒトにおけるバイオアベイラビリティを検討した。両製剤ともに pH 1.2 においては溶出速度が速く, 一方 pH 6.0 においては遅かった。シンナリジン・カプセルのバイオアベイラビリティには大きなばらつきが認められたが, これは, 被験者の胃液酸度による影響と考えられた。低酸群の被験者では  $C_{max}$  および AUC は正常酸群の被験者におけるそれらの値の15~30程度であった。

\* 日本レダリー株式会社

**Evaluation of Beagle Dogs as an Animal Model for Bioavailability Testing of Cinnarizine Capsules**

Hiroyasu OGATA, Nobuo AOYAGI, Nahoko KANIWA, Akira EJIMA, Toshiyuki KITAURA\*, Toshimitsu OHKI and Koichi KITAMURA\*: *Int. J. Pharm.*, **29**, 121 (1986)

ヒト試験において用いられた, シンナリジン市販カプセル2銘柄のビーグル犬による生物学的同等性試験を行った。また同時に犬の胃液酸度を pH 試験紙を用いて測定した。ヒト試験の結果とは異なり, ビーグル犬試験においてはシンナリジンのバイオアベイラビリティは胃液酸度とは無関係であった。これは, ビーグル犬の胃液酸度の固体間および固体内ばらつきが大きいためと判断される。

\* 藤沢製薬株式会社

**Bioavailability of Indomethacin Capsules in Humans (I): Bioavailability and Effects of Gastric Acidity**

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA and Akira EJIMA: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **23**, 469 (1985)

2種の市販インドメタシンカプセルおよび3種の試作製剤を対象にヒトでバイオアベイラビリティ試験を

行った。溶出速度の遅い製剤ほどバイオアベイラビリティは低下する傾向がみられ、製剤間に有意な差が生じた。また、胃液酸度の低い被験者は正常酸度の被験者に比べ薬物の吸収が速く、インドメタシンの溶解、吸収は胃液酸度によって影響されることが明らかとなった。

#### Bioavailability of Indomethacin Capsules in Humans (II): Correlation with Dissolution Rate

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA and Akira EJIMA: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **23**, 529 (1985)

インドメタシン製剤のバイオアベイラビリティと *in vitro* 溶出速度との関連性について検討を行った。両者の間の相関性は、*in vitro* 溶出試験法によって異なり、溶媒の pH、粘度は相関性に影響しないが溶媒の攪拌速度は相関性に大きく影響し、攪拌速度の速い方法で求めた溶出速度より遅い方法で求めた溶出速度の方がバイオアベイラビリティと良く相関することが判明した。また、薬物の吸収量を示すパラメータである血中濃度-時間曲線下面積より最高血中濃度の方が溶出速度と高い相関性を示すことも明らかとなった。

#### Bioavailability of Indomethacin Capsules in Humans (III): Correlation with Bioavailability in Beagle Dogs

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA, Akira EJIMA, Hiroshi NAKATA\*, Jyunzo Tsutsumi\*, Takeshi FUJITA\* and Iwao AMADA\*: *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, **23**, 578 (1985)

ヒト試験で用いるインドメタシン製剤のバイオアベイラビリティをビーグル犬でも同様に評価し、ヒトとの関連性について検討を行った。最高血中濃度およびその到達時間はヒト、特に正常胃液酸度を有した被験者の結果と良く相関した。しかし、血中濃度-時間曲線下面積のヒト-動物間の相関性は低かった。また、ヒト、イヌにおける製剤間のバイオアベイラビリティの差の比較から、製剤に及ぼすイヌ消化管の強い崩壊力が示唆された。

\* 第一製薬株式会社

#### Bioavailability of Sugar-coated Tablets of Thiamine Disulfide in Humans I. Effect of Gastric Acidity and in vivo-in vitro Correla-

tion

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA, Masanobu KOIBUCHI, Toshio SHIBAZAKI, Akira EJIMA, Masakazu MIZOBE\*, Keiichi KOHNO\*, and Masayoshi SAMEJIMA\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 281 (1986)

市販チアミンジスルフィド糖衣錠6種のヒトにおけるバイオアベイラビリティと *in vitro* の溶出速度との関連性について検討した結果、薬物の溶出速度はコーティング膜の物性、特に pH-溶解性に大きく影響されること、それら製剤のバイオアベイラビリティは胃液酸度の影響を受け、胃液酸度が高い被験者、低い被験者の *in vivo* パラメータはそれぞれ pH 1.3~3, pH 5~7.2 で求めた溶出速度と良く相関することが明らかとなった。

\* 田辺製薬株式会社

#### Bioavailability of Sugar-coated Tablets of Thiamine Disulfide in Humans. II. Correlation with Bioavailability in Beagle Dogs

Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA, Nahoko KANIWA, Masanobu KOIBUCHI, Toshio SHIBAZAKI, Akira EJIMA, Masakazu MIZOBE\*, Keiichi KOHNO\* and Masayoshi SAMEJIMA\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 292 (1986)

ヒトで試験したチアミンジスルフィド糖衣錠6製剤のバイオアベイラビリティをビーグル犬でも同様に評価し、ヒトとの関連性について検討した。崩壊性に問題のある一製剤を除けば、胃液酸度が高いヒト被験者とイヌとの間に *in vivo* パラメータの高い相関性がみられた。一方、*in vitro* 崩壊がわかった製剤のバイオアベイラビリティはヒトに比しイヌでは相対的に高く、イヌ消化管の強い崩壊性が示唆された。

\* 田辺製薬株式会社

#### Bioavailability of Pyridoxal Phosphate from Enteric-Coated Tablets. II. Effects of Gastric Acidity of Humans

Nahoko, KANIWA, Hiroyasu OGATA, Nobuo AOYAGI, Masanobu KOIBUCHI, Toshio SHIBAZAKI, and Akira EJIMA: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3899 (1985)

リン酸ピリドキサル腸溶錠の溶出臨界 pH と被験者の胃液酸度との関係を検討した。溶出臨界 pH が 5.5 の製剤からの薬物の吸収は胃液酸度の影響を受けず、腸へ移行して後速やかに行われた。溶出臨界 pH

が6.6の製剤では、被験者の胃液酸度が高いほど、薬物の吸収が遅れる傾向にあった。溶出限界 pH が4.5の製剤では、胃液酸度の極めて低い被験者の胃内で、製剤が崩壊している可能性が示唆された。

**Bioavailability of Pyridoxal Phosphate from Enteric-Coated Tablets. III. Correlations between Bioavailability in Humans and Beagle Dogs and between Bioavailability in Humans and in vitro Dissolution Rates**

Nahoko KANIWA, Hiroyasu OGATA, Nobuo AOYAGI, Masanobu KOIBUCHI, Toshio SHIBAZAKI, Akira EJIMA, Shigeru TAKANASHI\*, Hiroshi KAMIYAMA\*, Hidetaka SUZUKI\*, Yoshikazu HINOHARA\*, Hideki NAKANO\*, Akira OKAZAKI\*, Tadao FUJIKURA\*, Kazuo IGUSA\* and Sadao BESSHO\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3906 (1985)

リン酸ピリドキサル腸溶錠のビーグル犬による生物学的同等性試験の結果はヒトによる試験の結果と有意に相関した。同製剤の溶出速度はヒトにおけるバイオアベイラビリティとあまり相関しなかった。

\* 中外製薬株式会社

**Bioavailability of Pyridoxal Phosphate from Enteric-Coated Tablets. I. Apparent Critical Dissolution pH and Bioavailability of Commercial Products in Humans**

Nahoko KANIWA, Hiroyasu OGATA, Nobuo AOYAGI, Masanobu KOIBUCHI, Toshio SHIBAZAKI, Akira EJIMA, Shigeru TAKANASHI\*, Hiroshi KAMIYAMA\*, Hidetaka SUZUKI\*, Yoshikazu HINOHARA\*, Kazuo IGUSA\* and Sadao BESSHO\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4045 (1985)

48銘柄の市販のりん酸ピリドキサル腸溶錠の見かけの臨界溶出 pH を測定した。溶出限界 pH によって市販製剤は三つのグループに分けられた。ヒトで生物学的同等性試験を行った結果、溶出限界 pH が高い製剤の中にバイオアベイラビリティの悪い物があつた。

\* 中外製薬株式会社

**高速液体クロマトグラフィーによる熱帯病治療薬の定量**

リン酸プリマキン錠、スルファドキシシ・ピリメタミン錠、プラジカンテル錠及び注射用スラミンの定量

香取典子, 柴崎利雄, 内山 充: 医薬品研究, **16**, 1407 (1985)

4種の熱帯病治療薬: リン酸プリマキン錠, スルファドキシシ・ピリメタミン錠, プラジカンテル錠および注射用スラミンにつき, 簡単かつ迅速な液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法を確立した。これらの医薬品の分析にはいずれも ODS 系カラム (TSKgel-410) を用い, 検出は UV 吸収により行った。いずれの試験法も従来の定量法と同等以上の結果がえられ, また分解物の同時定量も可能であり, 安定性試験にも適用可能であった。

ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィーによるエタノール含有製剤中のエタノールの純度試験—メタノール, アセトアルデヒド, アセトン, 2-プロパノール, 1-プロパノールおよび第三ブタノールの検出—

柴崎利雄, 田中篤子, 浅野忠之, 内山 充: 医薬品研究, **17**, 100 (1986)

エタノール含有薬局方製剤中の使用したエタノールに由来する揮発性不純物の微量検出及び半定量法を検討した。確立されたヘッドスペース-GC 法による不純物の検出限度はメタノール0.001-0.0005, アセトアルデヒド0.0005-0.0002, アセトン0.002, 2-プロパノール0.01-0.003, 1-プロパノール0.015-0.005, 第三ブタノール0.01-0.005 (v/v %) であった。本法は簡便で, カラム汚染がないので, 該製剤の品質試験に適したものと思う。

**Kinetics and Mechanism of the Solid-State Decomposition of Propantheline Bromide**

Sumie YOSHIOKA and Mitsuru UCHIYAMA: *J. Pharm. Sci.*, **75**, 92 (1986)

臭化プロバンテリンの固体状態における加水分解に及ぼす温度および湿度の影響に関して速度論的検討を行なった。臨界湿度 (CRH) 以上の高湿度領域における加水分解では, 分解率  $x$  は次式で表わされた。

$$x = kt^n$$

ここで  $n$  は温度および湿度に依存しない定数であり, また  $k$  は次式によって温度 ( $T$ ) および水蒸気圧 ( $P$ ) に関係づけられることが示された。

$$k = k' \exp(-Ea/RT) P^s$$

ここで  $k'$  および  $s$  は定数である。分解機構として, 加水分解生成物が反応核となって分解を促進する機構が示された。一方, CRH 以下の低湿度領域における加水分解はラグタイムを伴う0次反応モデルで表わす

ことができ、測定された0次反応速度定数とラグタイムの温度および水蒸気圧から、機構として吸着水層における分解が示唆された。

### Dependence of the Solid-State Hydrolysis and Oxidation Rate of Drugs on Temperature and Humidity

Sumie YOSHIOKA, Toshio SHIBAZAKI and Mitsuru UCHIYAMA: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, s-6 (1986)

固体状態における塩酸メクロフェノキサートおよび臭化プロバンテリンの加水分解およびフェニルブタゾンの酸化分解について、その速度の温湿度依存性を表わす式として、アウレニウスの式に水蒸気圧の項を加えた式を提示した。更にその速度論的パラメータの推定法を検討し、非線形回帰法が古典的線形回帰法に比較してはるかに有為なパラメータの推定値を与えることを示した。

### 光学活性移動相を用いた高速液体クロマトグラフィーによる製剤中の D-及び L-ドーパの定量

阿曾幸男, 吉岡澄江, 柴崎利雄, 内山 充: 分析化学, **35**, 314 (1986)

純度試験や安定性試験のために、光学活性な移動相添加物として L-フェニアラニン-銅(II)錯体を用いる方法を L-ドーパ製剤中の D-ドーパの定量に応用した。D-および L-ドーパの分離に及ぼす移動相中の錯体濃度の影響はほとんど見られなかったが、移動相中のメタノール濃度が小さくなると保持時間および分離度は大きくなった。UV 検出器と電気化学検出器の検出限界を比較し、電気化学検出器は L-ドーパ共存下において UV 検出器より少量の D-ドーパを検出しうることを見いだした。UV 検出器と電気化学検出器を直列に接続することにより、市販の錠剤中の D-および L-ドーパが同時に定量できた。

### Application of Synthetic Hydrated Aluminum Silicates as Orally Administered Absorbents of Ammonium ion

Mumio ISHIBASHI, Sumie YOSHIOKA, Toshio SHIBAZAKI, Mitsuru UCHIYAMA, Toshifumi WATANABE\*1, Yuzo KUROMATSU and Shinji TAKAI\*2: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 806 (1986)

ゼオライトを口経投与アンモニア吸着剤とし用い、高アンモニア血症および尿毒症の治療剤として用いる為の基礎的研究を *in vitro* および *in vivo* で行った。用いたゼオライトの内、ZPC-10A がイオン選択性、耐

酸性、吸着量等に良い値を示した。また、*in vivo* においても、有意に血中アンモニウム濃度を低下させた。

\*1 東大 医科研

\*2 東大 生研

### 注射用蒸留水の純度試験 (第2報)

石橋無味雄, 吉岡澄江, 阿曾幸男, 柴崎利雄, 内山 充: 医薬品研究, **16**, 1413 (1985)

蒸発残分試験は通常蒸発皿、ビーカーなどを用いて行われるが、重量が量る目的の重量の5000倍もあり、また、恒量にすることが困難である。そこでアルミニウム製の容器を用いて蒸発残分試験の検討を行いアルミニウム箔を用いて作られた容器で試験が行えることをみいだした。

### カルボキシル基を持つ医薬品のジシクロヘキシルカルボジイミドによる吸光光度定量

松田りえ子, 武田 寧, 石橋無味雄, 内山 充, 鈴木政雄, 滝谷昭司: 分析化学, **35**, 151 (1986)

ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)の存在化でカルボン酸が過塩素酸ヒドロキシルアミンと反応してヒドロキサム酸を生成する。これに過塩素酸鉄を加えると鉄-ヒドロキサム酸錯体を生成する。この反応を、医薬品の製剤分析に応用した。イブプロフェン、パルプロ酸ナトリウム、メフェナム酸に付いて最適な反応条件、安定性について検討した。

### 第11改正日本薬局方について

内山 充: ファルマシア, **22**, 271 (1986)

第11改正日本薬局方における改定方針およびその内容について概説した。

### 医薬品の分析と日本薬局方

内山 充: 分析化学, **35**, 145 (1986)

分析化学と日本薬局方とのかかわり合い、規格分析の特徴、および第11改正のねらいなどについて解説した。

### 日本薬局方を見直す—6—

#### 医薬品各条とその試験法について

内山 充: 月刊薬事, **27**, 2295 (1985)

局方100年の経過をふりかえって、各条化学薬品に関する種々の変遷を解説した。

#### —日本薬局方のめざすもの—

#### 各条化学薬品についての考え方

内山 充: 月刊薬事, **27**, 2501 (1985)

第11改正薬局方のうち各条化学薬品について改正方針などを述べた。

#### 新医薬品の規格試験法検討上の留意点

内山 充：医薬品研究，16，887（1985）

新医薬品の承認申請書に必要な規格試験法の考え方，水準，および記載法などを，原則論から具体例まで説明した。

#### わが国における「日常食からの化学物質摂取量調査」のための食品リスト

井崎やえ子\*，内山 充：日本栄養・食糧学会誌，33，241（1985）

日常食からの汚染物や添加物の取込み量を最も的確に求めるには total diet study が良いとされている。その場合の試料収集の根拠は，対象となる住民の食物消費量データであることは明らかである。しかしわが国にはこのような目的に使用しうる調査データがない。国民栄養調査の中の食品分類および消費量データが最もひろく使われてはいるが，これも毎年11月の連続した3日間の調査であるので季節の偏りが避けられない。そこで，これに季節補正係数（総理府統計局家計調査より算出）を入れ，さらに農林水産統計や食品産業総合統計による補正を行って，日本人の平均的食生活によく適合した食品リストを作成した。今後の各種摂取量調査に有用と考える。

\* 京都市衛生研究所

#### Syntheses of Carbon-14 and Sulfur-35 Labeled 2-(Morpholinio)-Benzothiazoles and Carbon-14 Labeled 2-(Cyclohexylaminio)-benzothiazoles

Akira TANAKA, Masamichi FUKUOKA, Tohru ADACHI and Tsutomu YAMAHA: *J. Label. Comp. Radiopharm.*, 23, 405 (1986)

$^{14}\text{C}$  または  $^{35}\text{S}$  で標識したメルカプトベンゾチアゾール系加硫促進剤数種を合成した。2-位の炭素または SH 基を  $^{35}\text{S}$  で標識した 2-(モルホリノチオ) ベンゾチアゾールはモルホリンと 2-メルカプトベンゾチアゾール- $2-^{14}\text{C}$  または 2-メルカプトベンゾチアゾール- $2-^{35}\text{S}$  の混合物を  $\text{NaClO}$  で酸化的に縮合することにより合成した。同様の方法は原料をモルホリン- $U-^{14}\text{C}$  を用いた 2-(モルホリノ- $U-^{14}\text{C}$ -チオ) ベンゾチアゾールの合成に応用された。

2-(シクロアミノチオ) ベンゾチアゾール- $2-^{14}\text{C}$  は，シクロヘキシルアミンと二硫化炭素- $^{14}\text{C}$  と 2-メルカ

プトアニンから合成した 2-メルカプトベンゾチアゾール- $2-^{14}\text{C}$  の混液を  $\text{KI} + \text{I}_2$  の混合物により酸化的に合成した。2-(シクロヘキシル- $U-^{14}\text{C}$ -アミノチオ) ベンゾチアゾールもシクロヘキシルアミン- $U-^{14}\text{C}$  と 2-メルカプトベンゾチアゾールから合成された。

#### Excretion, distribution and metabolism of 1,2,4-Trichlorobenzene in rats

Akira TANAKA, Michio SATO, Toshie TSUCHIYA, Tohru ADACHI, Toshio NIIMURA and Tsutomu YAMAHA: *Arch. Toxicology*, 59, 82 (1986)

1,2,4-トリクロロベンゼン (TCB) を  $^{14}\text{C}$  で標識し，50 mg/kg の割合でラットに投与し吸収，分布，排泄をしらべた。7日間で尿へ66%，糞へ17%の放射能が排泄され，呼気には2.1%の  $\text{CO}_2$  以外のガスが排出された。とくに親和性の高い臓器はなく，尿中代謝物として2,4,5-および2,3,5-トリクロロフェノールが遊離の型と抱合体の型で検出され，微量代謝物として5または6-位に SH,  $\text{SCH}_3$ ,  $\text{SOCH}_3$ ,  $\text{SO}_2\text{CH}_3$  が導入された含硫化合物が証明された。呼吸中には未変化の TCB とジクロロベンゼン類が確認された。

これら脱クロル体は腸内細菌が関与して生成されるものと思われる。

#### IPCS: 毒物動態学の原則 (Principles of Toxicokinetic Studies)

田中 彰：トキシコロジーフォーラム，9，308（1986）

国際化学物質安全性計画 (International Programme on Chemical Safety: IPCS) の環境保健基準 (Environmental Health Criteria: EHC) の作成作業の一環として，上記テーマのドキュメントの作成に参加した経緯とその内容について概要を説明した。

#### 遺伝子工学によって産生されるホルモン (臨床と安全性)

早川堯夫：ホルモンと臨床，34，1（1986）

遺伝子工学によって産生されるホルモンの医薬品としての有効性，安全性評価にさいしての一般的留意点について述べた。また，組換え DNA 技術により生産されたヒトインスリン，ヒト成長ホルモンが実用化されるに至るまでに，どのような基礎的検討，安定性に関する検討並びに臨床的評価がなされたかについて解説した。

## 一般試験法の改正点について

山羽 力: 薬局, 37, 549 (1986)

第十一改正日本薬局方一般試験法における改正点を要約して解説した。

## Kallidinogenase 製剤の品質試験へのブラジキニンエンザイムイムノアッセイの適用

谷本 剛, 福田秀男, 山羽 力: 医薬品研究, 16, 839 (1985)

カリジノゲナーゼの活性はキノノーゲンを基質にしたときに生じるキニン量を測定することによって求めるのが望ましい。従来、生じたキニン量はバイオアッセイで測定していたが、この方法は操作が繁雑であるとともに精度が悪い。そこで、操作の簡便さ、精度の向上を目的に、生じたキニン量、すなわちブラジキニン (BK) をエンザイムイムノアッセイ (EIA) で測定する方法を検討した。ここで確立した EIA は製剤の定量試験に適用可能であった。一方、この EIA は BK および N 末端に 1~2 個のアミノ酸残基を結合した BK 誘導体あるいは N 末端アミノ酸を欠いた BK 誘導体には同じ交差反応性を示したが、C 末端側アミノ酸残基を欠いた BK 誘導体とはまったく交差反応性を示さなかった。このことから、この EIA は、キナーゼが BK の C 末端側に作用するので、カリジノゲナーゼ製剤のキナーゼに関する純度試験にも適用できることが明らかになった。

Partial Purification and Biological Activity of the Product of Chemically Synthesized Human Growth Hormone Gene Expression in *Escherichia Coli*Tadashi OSHIZAWA, Tadao TERAU, Hiroshi SATO, Toshio KIMURA, Hideo FUKUDA, Tsuyoshi, TANIMOTO, Shingo NIMI, Jiro KAWAMURA, Takao HAYAKAWA, Eiko OTSUKA\*1 and Morio IKEHARA\*2: *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3561 (1985)

化学合成されたヒト成長ホルモン遺伝子 (584 塩基対) を、大腸菌に組み込んで発現させた菌体タンパク質の中から、硫酸分画、DE-52 カラムクロマトグラフィーによってヒト成長ホルモンを部分精製し、その生物活性を調べた。発現タンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、液体クロマトグラフィーにおいてヒト成長ホルモンと同一の挙動を示した。生物活性は、予め脳下垂体を摘出したラットを用いて、脛骨骨端軟骨幅の伸長 (tibia 法) によって調べたところ、軟骨幅の伸長を促進する成長ホルモンに特異的な特性を

有していた。

\*1 北海道大学薬学部

\*2 大阪大学薬学部

Enhancement of the Sensitivity of a Fluorometric Lysozyme Assay System by Adding  $\beta$ -N-AcetylhexosaminidaseHideo FUKUDA, Tsuyoshi TANIMOTO and Tsutomu YAMAHA: *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3375 (1985)

4-methylumbelliferyl tetra-N-acetyl- $\beta$ -chitotetraoside (4-MU-(GlcNAc)<sub>4</sub>) を基質としてリゾチームを作用させ、遊離する 4-methylumbelliferone (4-MU) の量からリゾチーム活性を測定する系で、4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -glucosaminide (4-MU-(GlcNAc)) も生成されると推測されたため、4-MU-(GlcNAc) の量も同時に測定すれば、リゾチーム測定法として感度を上昇させることができると考え、4-MU-(GlcNAc) から 4-MU を遊離させる酵素、 $\beta$ -N-acetylhexosaminidase (ナタ豆) (NAHase) をこの系に添加したところ、約 5 倍の感度上昇が得られた。さらに、NAHase の添加により、製剤中のリゾチームの測定値が従来法 (基質: *M. lysodeikticus*) による結果とよく一致するように改善されることがわかった。

## 液体クロマトグラフ法によるジギタリス配糖体の定量 (第1報) ジゴキシン含有錠剤、散剤及び注射液への応用

徳永裕司, 木村俊夫, 山羽 力: 医薬品研究, 17, 94 (1986)

リクロソルブ RP-18 カラムでの液体クロマトグラフ法によりジゴキシン (DX) を定量した。移動相へのメタノールあるいはアセトニトリルの添加は DX の保持時間 ( $t_R$ ) の短縮をもたらした。 $t_R$  の短縮という面では、メタノールはアセトニトリルよりその効果は小さかったが、DX のピークの型の改善には有用であった。DX の  $t_R$  はカラム温度の上昇とともに増加した。0.01-0.06 mg/ml の範囲での DX の検量線は直線で原点を通過した。ラナトシド C 以外のジギタリス配糖体はクロマトグラム中で DX のピークを妨害しなかった。粉末中の DX の定量のための操作は次の通りである。水 4 ml 及び内部標準として p-オキシ安息香酸エチル約 0.81 mg を含むメタノール 20 ml が DX 1.25 mg を含む DX 粉末に加え、5 分間超音波照射した。混液はメタノールで 25 ml とし、5 分間遠心分離した。上清 20  $\mu$ l を使い、ピーク面積比を測定した。この方法で得られた分析値は比色定量法で得

られた値と一致した。この方法を DX 錠の含量均一試験法に応用した結果、各錠剤の10錠の含量の平均値は比色定量法で得られた値と良く一致した。

#### 副腎皮質ステロイドの標準品について

木村俊夫, 綱川延孝\*<sup>1</sup>, 中守律夫\*<sup>2</sup>: 医薬品研究, 17, 143 (1986)

昭和58, 59年度に行った厚生科学研究「標準品の製法及びその品質規格の設定に関する研究」の成果をまとめたものである。液体クロマトグラフ法による副腎皮質ステロイド製剤の定量に必要な標準品9品目について、USPあるいはBPの標準品との比較、純度の決定法の検討を行い、これらのステロイドホルモンの標準品の品質規格を確立した。

\*<sup>1</sup> 東京医薬品工業協会技術委員会

\*<sup>2</sup> 大阪医薬品協会技術研究委員会

#### An Immunological Study of a Pb-Thionein-like Protein in Rat Liver

Hideharu IKEBUCHI, Reiko TESHIMA, Kazuhiro SUZUKI, Jun-ichi SAWADA, Tadao TERAO and Yasuhiro YAMANE\*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **136**, 535 (1986)

酢酸鉛 (24 $\mu$  mol/100 g 体重) を腹腔内一回投与したラットの肝臓に鉛-チオネイン様蛋白質 (Pb-BP) と亜鉛チオネインが同時に誘導合成された。このPb-BPがメタロチオネインか否かを明らかにするために、この蛋白質の免疫学的同定を試みた。その結果、Pb-BPがZn-チオネインIIに対する抗体と交叉反応性を示し、Pb-BPがチオネインであることを明らかにした。

\* 千葉大学薬学部

#### Simultaneous Induction of Pb-Metallothionein-like Protein and Zn-Thionein in the Liver of Rats Given Lead Acetate

Hideharu IKEBUCHI, Reiko TESHIMA, Kazuhiro SUZUKI, Tadao TERAO and Yasuhiro YAMANE\*: *Biochem. J.*, **233**, 541 (1986)

酢酸鉛 (24 $\mu$  mol/100 g 体重) を腹腔内一回投与したラットの肝で鉛-メタロチオネイン (Pb-MT)-様蛋白質 (Pb-BP) と亜鉛-チオネイン (Zn-BP) の同時誘導が示された。Pb-BPは分子量 6900 Da で、肝上清の鉛を優先的に結合した。Zn-BPは Sephadex G-75, DEAE Sephadex A-25 の溶離及び電気泳動の移動度がラット肝の Zn-MT-II と同じであった。Pb-BP の

産生は酢酸鉛投与後6時間で最高に達し、この時、肝上清鉛の約60%と結合していた。以後24時間まで次第に減少した。一方、Zn-MTの産生は漸次増加し、投与後12時間で最高となり、24時間でも一定量であった。Pb-BPのアミノ酸分析は約28%システイン含量を示した。これらの結果より、酢酸鉛投与ラットの肝では、Zn-MTと同様にPb-BPの合成も誘導されることを示唆した。

\* 千葉大学薬学部

#### Lignoceroyl-coenzyme A Synthetase from Developing Rat Brain: Partial Purification, Characterization and Comparison with Palmitoyl-coenzyme A Synthetase Activity and Liver Enzyme

Kunisuke NAGAMATSU, Shinji SOEDA\*<sup>1</sup>, Masa-aki MORI\*<sup>2</sup> and Yasuo KISHIMOTO\*<sup>3</sup>: *Biochem. Biophys. Acta*, **836**, 80 (1985)

発育途中のラット脳および肝臓のミクロソームから長鎖-アシル-CoA合成酵素の精製を検討した。Triton X-100で可溶化したのちBlue-SepharoseならびにDEAE-Sepharoseのカラムクロマトにより精製できた。

Lignoceroyl-CoA合成酵素の活性をpalmitoyl-CoA合成酵素の活性と比較すると脳では肝臓に比べてlignoceroyl-CoA合成酵素の活性が高いことが認められた。

\*<sup>1</sup> 福岡大学薬学部

\*<sup>2</sup> 富山医科薬科大学

\*<sup>3</sup> ジョンズ・ホプキンス大学

#### In Vitro Formation of Codeinone from Codeine by Rat or Guinea Pig Liver Homogenate and Its Acute Toxicity in Mice

Kunisuke NAGAMATSU, Tadao TERAO and Satoshi TOKI\*: *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3143 (1985)

ラットあるいはモルモット肝 9000 g 上清を用いてコデインの代謝について検討した。コデインの代謝物としてモルヒネ、ノルコデインならびにコデイノンを検出した。コデイノンはコデインに比べ約30倍程強い急性毒性を示すことが認められた。

\* 福岡大学薬学部

#### Effects of Glutathione and Phenobarbital on the Toxicity of Codeinone

Kunisuke NAGAMATSU, Kazuhide INOUE, Tadao

TERAO and Satoshi TOKI\*: *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 1675 (1986)

コデイン (コデインの毒性代謝物) の急性毒性に及ぼすグルタチオンならびにフェノバルビタールの影響について検討した。コデインをマウスに皮下投与すると、肝臓中のグルタチオン濃度がわずかに減少することが認められた。コデインの急性毒性はグルタチオンならびにシステインの前処置により抑制できた。グルタチオンの前処置により  $^3\text{H}$ -コデインの体内分布量が減少することが認められた。グルタチオンとコデインが生理的条件下で反応することが認められたことから、グルタチオンはコデインのスカベンジャーとして作用しているものと考えられた。フェノバルビタールはコデインの痙攣作用を抑制することにより急性毒性を減少させた。ナロキソンはコデインの急性毒性を減少させたが、コデインの急性毒性は抑制できなかった。

\* 福岡大学薬学部

#### Effects of Various Cytochalasins on the IgE-Mediated Serotonin Release from Rat Basophilic Leukemia Cells

Reiko TESHIMA, Hideharu IKEBUCHI, Setsuko SEKITA, Shinsaku NATORI and Tadao TERAO: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **78**, 237 (1985)

ラット好塩基球細胞からの抗原特異的脱顆粒におよぼす10種のサイトカラシン類の効果を調べたところ、その効果に基づいて4群に分類された。第1群は、脱顆粒を促進するもので、cytochalasin B, D がこれに属した。第2群は低濃度 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$  M) で脱顆粒を促進するが、高濃度 ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  M) では抑制するもので、Chaetoglobosin A, D, J が、これに属した。第3群は、脱顆粒に抑制的に働くもので、Aspochalasin B, D, Cytochalasin A がこれに属した。第4群は、脱顆粒にほとんど影響しないもので、Chaetoglobosin E, F がこれに属した。これらサイトカラシン類の構造活性相関についても考察した。

#### Possible Involvement of Phosphorylation of a 36,000-Dalton Protein of Rat Basophilic Leukemia (RBL-2H3) Cell Membranes in Serotonin Release

Reiko TESHIMA, Kazuhiro SUZUKI, Hideharu IKEBUCHI and Tadao TERAO: *Molecular Immunology*, **23**, 279 (1986)

ラット好塩基球 (RBL-2H3) 細胞膜画分を用いて、

36 kDa 蛋白質のリン酸化について検討した。protein kinase C を活性化すると知られているリン脂質 (phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, phosphatidyl ethanolamine) により、36 kDa 蛋白質のリン酸化が促進された。一方、protein kinase C の阻害剤として知られている 1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) は、この蛋白質のリン酸化を抑制した。この結果から、RBL-2H3 細胞膜の 36 kDa 蛋白質は、膜画分に存在する protein kinase C によりリン酸化をうけていることが示された。

また、RBL-2H3 細胞からの脱顆粒におよぼす protein kinase C の関与を調べるため、protein kinase C の活性化剤である phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) または、1-oleoyl-2-acetyl glycerol (OAG) の脱顆粒への影響を調べた。それら単独では、細胞からの脱顆粒をほとんど引き起こさなかったが、calcium ionophore である A 23187 と共存すると、相乗的に脱顆粒を促進させた。また、上記 H-7 は、細胞からの脱顆粒も抑制した。以上から、脱顆粒反応への protein kinase C の関与も示された。

#### Comparison of the Antigenicities of Native Human Growth Hormone (hGH) and Three Forms of Recombinant hGHs Using Monoclonal Antibodies

Jun-ichi SAWADA, Naruhito WADA\*<sup>1</sup>, Masachika IRIE\*<sup>1</sup>, Tomoko TOKUNAGA-DOI\*<sup>2</sup>, Eiko OHTSUKA\*<sup>2</sup>, Morio IKEHARA\*<sup>2</sup> and Tadao TERAO: *Mol. Immunol.*, **23**, 625 (1986)

ヒト成長ホルモン (hGH) に対する複数のモノクローナル抗体を、リコンビナント hGH (メチオニルソマトトロピン) を抗原として用いて、作製した。異なる反応性を示す13種のモノクローナル抗体を用いて、天然および3種のリコンビナント hGH の抗原性を解析した。

\*<sup>1</sup> 星薬科大学

\*<sup>2</sup> 大阪大学薬学部

#### Production and Specificity of a Monoclonal Anti-11-deoxycortisol Antibody

Hiroshi HOSODA\*, Norihiro KOBAYASHI\*, Sakiko TAMURA\*, Mizue MITSUMA\*, Jun-ichi SAWADA, Tadao TERAO and Toshio NAMBARA\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2914 (1986)

11-デオキシコルチゾールに対するモノクローナル抗体を調製し、結合定数および交差反応性の検討を加

えた。このモノクローナル抗体を用いてメチラボン検査における血中 11-デオキシコルチゾールのレベルを定量したところ、満足のゆく結果が得られた。

\* 東北大学薬学部

#### Antitumour Triterpenes of *Maytenus Diversifolia*

Hiroshi NOZAKI\*, Hideyo SUZUKI, Teruhisa HIRAYAMA\*, Ryoji KASAI\*, Rong-Yang Wu\* and Kuo-Hsiung LEE\*: *Phytochemistry*, **25**, 479 (1986)

*Maytenus diversifolia* からの抗腫瘍性成分として、maytansine,  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside の他、新しいトリテルペンの maytenfoliol と maytenfolic acid を単離した。また同時に二種の新しいトリテルペン maytensifolin-A, -B と構造既知の friedelin, canophyllal,  $\beta$ -amyrin, canophyllol, pachysonol, 29-hydroxyfriedelin-3-one, 30-hydroxyfriedelin-3-one を単離した。

\* School of Pharmacy, University of North Carolina, U. S. A.

#### 漢方エキス製剤の品質評価

原田正敏: 和漢医薬学会誌, **2**, 482 (1985)

漢方エキス製剤の品質規格が行政上の新基準によって発効されることになった。この動きに関連して、生薬の成分上のバラツキの問題、漢方製剤の現在までの実情、今後の品質評価の考え方と実施方法の概要などを総合的にまとめた。統一のとれた漢方エキス製剤を今後臨床的に注意深く使用し、その効果を観察することがエキス製剤の医薬品としての位置づけを明確にするための重要な作業であることに触れた。

#### Structure-activity Relationship of Thirtynine Cytochalasans Observed in the Effects on Cellular Structures and Cellular Events and on Actin Polymerization *in vitro*

Setsuko SEKITA, Kunitoshi YOSHIHARA, Shinsaku NATORI, Fumiko HARADA\*, Kazuko IIDA\* and Ichiro YAHARA: *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 906 (1985)

天然由来の23種の cytochalasans とその誘導体、合成中間体16種を用いて、細胞に対する作用 (C3H-2 k cell での actin cable の収縮, fibroblastic cell の円形化, リンパ球の capping の阻害, Con A によるリンパ球の興奮阻害) と *in vitro* での作用 (actin filament の延長阻害) の強度および活性相関を調べた。さらに、これらの結果から、化合物の構造活性相関を検討したと

ころ, perhydro isoindlone 骨格, macrocyclic ring および C<sub>13-16</sub> の hydrophobic 領域が作用発現に必須であり, aromatic ring の存在, macro cyclic ring 上の共役 enedione 系, 化合物全体の lipophilicity が効果に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

\* 都立臨床研

#### Studies on the Pharmaceutical Quality Evaluation of Crude Drug Preparations Used in Oriental Medicine "Kampo" VI <sup>13</sup>C NMR Studies on Diberberine-monomglycyrhizinate and related Compounds

Mamoru NOGUCHI, Youhei HASHIMOTO\* and Atsushi KATO\*: 生薬学雑誌, **39**, 101 (1985)

黄連, 甘草配合漢方煎剤調製時に生成する diberberine-monomglycyrhizinate (DBMG) の結合様式を解析するため、まず、<sup>13</sup>C NMR を用い、glycyrhizin (G) の3個のカルボン酸のイオン形を推定する方法を確立した。ついで、各種 pH 条件下に G と berberine (B) を反応させ、生成した沈殿の <sup>13</sup>C NMR スペクトルを測定したところ、pH 3 では G のグルクロン酸が1個、pH 5.5 では2個がイオン化し、沈殿反応に関与していると推定されたが、トリテルペン骨格のカルボン酸は、いずれの場合にも分子形に留まった。pH 3 および 5.5 沈殿物中の B の含量は、それぞれ 30.7, 46.1% となり、これは、それぞれ B と G との組成比 1:1 あるいは 2:1 の場合の計算値、29.0%, 45.0% とよく一致した。

以上の結果より、DBMG において、2個の B は、G の2個のグルクロン酸とイオン性の結合を形成していると推定した。

\* 神戸女子薬科大学

#### 漢方エキス製剤の品質評価について—1— 研究班、懇談会の基本的考え方

野上 寿\*<sup>1</sup>, 大塚恭男\*<sup>2</sup>, 原田正敏: 月刊薬事, **27**, 1591 (1985)

医療用漢方エキス製剤の品質を確保し、できるだけその力価を一定にすることを目標として、「漢方エキス製剤の規格基準作成に関する研究 (昭和57年~59年)」が行われた。

その成果を記載して行くにあたり、本号では基本的考え方を述べた。内容は複雑なエキス製剤といえども、現在の進歩した化学分析技術と薬理的試験技術を利用することにより、その品質規格の設定が可能であるこ

とを示している。

\*1 研究班・懇談会メンバー, 日本薬剤師会

\*2 研究班・懇談会メンバー, 北里研究所附属東洋医学総合研究所

#### 漢方エキス製剤の品質評価について—2—

##### 規格基準の具体的検討面について

野上 寿\*1, 大塚恭男\*2, 原田正敏, 丁 宗鉄\*2,  
野口 衛: 月刊薬事, 27, 1927 (1985)

まず, 漢方エキス製剤の化学的品質評価は, 原料生薬から製剤中へ安定した割合で移行する成分(指標成分)のエキスあるいは最終製品と標準湯剤との含量を比較することにより, 原理的に可能であることを明らかにした。

ついで, この場合の指標物質の備うべき条件, 標準湯剤の調製法と規格の設定法を明らかにし, 工場レベルでの抽出工程の問題点について, データをもとに考察した。

\*1 日本薬剤師会

\*2 北里研究所附属東洋医学総合研究所

#### 漢方エキス製剤の品質評価について—3—

##### 規格基準の具体的検討面について

野上 寿\*1, 大塚恭男\*2, 原田正敏, 丁 宗鉄\*2,  
野口 衛: 月刊薬事, 27, 2307 (1985)

前報に引き続き, 工場生産レベルでの濃縮, 乾燥, 製剤工程における問題点を検討し, 工場製剤と標準湯剤の指標成分含量の差異の原因を解明した。さらに, 化学分析の困難な処方については, パターン分析も適用可能であることを明らかにした。

\*1 日本薬剤師会

\*2 北里研究所附属東洋医学総合研究所

#### 漢方エキス製剤の品質評価について—4—

##### 規格基準の具体的検討面について

野上 寿\*1, 大塚恭男\*2, 原田正敏, 丁 宗鉄\*2,  
野口 衛: 月刊薬事, 27, 2603 (1985)

漢方エキス製剤の品質評価に対して, 生物学的方法も可能である。

そこで, 麻黄湯を代表例として取り上げ, 治療効果の検定モデルとしてマウス酢酸 writhing 法, 副作用検定モデルとして中枢興奮測定法, 生物活性検定モデルとして LD<sub>50</sub> 測定法を検討し, 各法の特性と問題点について考察した。

\*1 日本薬剤師会

\*2 北里研究所附属東洋医学総合研究所

#### 漢方エキス製剤の品質評価について—5—

##### 規格基準の具体的検討面について

野上 寿\*1, 大塚恭男\*2, 原田正敏, 丁 宗鉄\*2,  
野口 衛: 月刊薬事, 28, 95 (1986)

生物学的試験法を漢方エキス製剤の品質評価に用いる場合に, 漢方薬の適応(証)に対応したモデル動物の開発ならびに臨床的な有効性に結びついた検定法の作成がとくに重要となる。

このような観点から, 現在までに発表された漢方薬の生物検定に関する報告を整理し, 考察を加えた。

\*1 日本薬剤師会

\*2 北里研究所附属東洋医学総合研究所

#### Simultaneous Determination of Serum Cations, Anions and Uremic Toxins by Ion Chromatography Using an Immobilized Enzyme

Hidecharu SHINTANI and Shozo UBE\*: *J. Chromatogr.*, **344**, 145 (1985)

血清中の尿素をウレアーゼを固定化したカラムで前処理してアンモニアに変換した後, イオンクロマトグラフに注入し, バルブ・スイッチングによって尿毒症成分(アンモニア, クレアチニン, メチルグアニジン), カチオン(Na, K), アニオン(塩素イオン, 重炭酸イオン)を一度に分析する方法を開発した。固定化ウレアーゼカラムは2カ月使用しても劣化しなかった。

\* センジュウ科学(株)

#### 赤眼症候群の原因物質

大場琢磨\*, 中村晃忠: 臨床透析, **2**, 675 (1986)

NAC 透析器による眼障害事故(昭和56~57年に発生。術試報告102号参照のこと)の原因物質について, 最近の知見も含めて解説した。著者らが特定した原因物質であるアセチル化多糖類は白血球減少を引き起す作用をも有することが最近明らかにされている。本総説は「透析に関連する生体影響因子」の特集の一片である。

\* 日本医療用プラスチック協会

#### Naphthol AS as a Cause of Pigmented Contact Dermatitis

Ritsuko HAYAKAWA\*, Kayoko MATSUNAGA\*, Shigeo KOJIMA, Masa-aki KANIWA and Akitada NAKAMURA: *Contact Dermatitis*, **13**, 20 (1985)

首, 前腕, 下肢にかゆみを覚え, 次第にこれらの部位に色素沈着を来たすに至った接触皮膚炎の症例につ

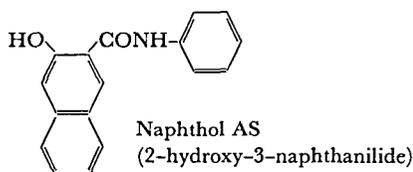
いて、その原因の追究を行った。患者は年配の女性二名で、冬期には綿ネルの寝間着を着ていた。患者は、いずれも着ていた綿ネルとそのメタノール抽出物のパッチテストに陽性の反応を示し、他方、メタノール抽出後のネルには陰性の反応であった。綿ネルの抽出物からアゾニック染料の一種であるナフトール AS が多量に検出された。患者がいずれもナフトール AS に陽性の反応を示したことから、このナフトール AS が今回の接触皮膚炎の原因物質であることが分かった。

\* 名古屋大学附属病院分院

#### ネル寝間着による色素沈着型接触皮膚炎

早川律子\*, 松永佳世子\*, 小嶋茂雄, 鹿庭正昭, 中村晃忠: 日皮会誌, 95, 1441 (1985)

衣料品による色素沈着型接触皮膚炎の報告は少ない。今回著者らは、ネル寝間着によって、頸部、前腕などに色素沈着を来たした接触皮膚炎患者を経験し、患者に対するパッチテストと事故品のネルの化学分析を結びつけて検討することによって、ネルの染色の際に用いられたナフトール AS (Azoic coupling component の一種) が原因化学物質であることを明らかにした。



\* 名古屋大学附属病院分院

#### 食品衛生—食品の安全とその将来—

齋藤衛生: 食料・栄養・健康 1986年版, 39(1986)

我々は一生の間に40~50トン程の食品を摂取するとされている。これから得られるエネルギーを自己の人生及び社会の為に有効に用いるために、食品を損う外的因子、並びに天然物としての食品に内在する毒性、さらに、従来、見落されがちな役割の不明な成分の意義等にも目を向けつつ食品衛生につき私見を述べた。

#### 農業

齋藤衛生: 食の科学, 100, 60 (1986)

農業開発の歴史を概観しつつ、農業使用の現状と問題点さらに農業の将来等につき概説した。

#### Cadmium Found in Non-soluble Fraction of Kidney Homogenates and Its Relation to Renal Dysfunction after Cadmium-cysteine Administration

Tamio MAITANI, Yukio SAITO and Kazuo T. SUZUKI\*: *Toxicology*, 37, 27 (1985)

Cd-チオネインの毒性モデルとして Cd-システイン (Cys) を用い、その腎毒性の原因を調べた。投与後4時間での腎中 Cd 濃度は Cd-Cys の投与量とともに増加したが、腎障害が認められた高用量では、超遠心上清中 Cd 濃度はほぼ一定の値を示した。この結果から、沈渣画分に Cd が存在することが腎毒性の原因ではないかと考えられた。その沈渣画分中の Cd は投与後24時間までに腎からなくなった。一方、上清中の Cd は、投与後4時間では多くが高分子タンパクと結合して存在していたが、24時間目ではほとんどがメタロチオネイン (MT) と結合していた。このことから、上清中で MT と結合していない Cd が腎障害をひきおこしたと解釈することも可能であった。

\* 国立公害研究所

#### 食品中の亜鉛及びカドミウムの化学形と消化管吸収

米谷民雄: 食衛誌, 27, 145 (1986)

金属の化学形の分析法として、高速液体クロマトグラフィー-原子分光直結システムと金属核種 NMR について述べた後、種々の食品中での亜鉛とカドミウムの化学形について、多くの論文を引用し解説した。特にカドミウムの場合には、メタロチオネイン (様タンパク) の存在に焦点をあてた。また、実際にそれらの化学形で亜鉛やカドミウムを食べた時の、消化管からの吸収率や臓器分布についてもあわせ記述した。

#### Comparative Induction of Hepatic Zinc-thionein and Increase in Tissue Calcium by Bacterial Endotoxin in Endotoxin-sensitive (C3H/HeN) and Endotoxin-resistant (C3H/HeJ) Mice

Tamio MAITANI, Yukio SAITO, Hidekazu FUZIMAKI\* and Kazuo T. SUZUKI\*: *Toxicol. Lett.*, 30, 181 (1985)

エンドトキシン (ET) 投与により、肝臓に亜鉛-チオネインが誘導されることが知られている。ET に対するマウスの感受性と ET による肝亜鉛-チオネイン誘導との間に相関があるかを調べるため、ET 高感受性の C3H/HeN マウスと低感受性の C3H/HeJ マウスにおいて、肝亜鉛-チオネイン誘導量を調べた。その結果、従来の報告とは違って、低感受性マウスでは肝亜鉛-チオネイン誘導量が少ないことが明らかとなった。また、肝亜鉛-チオネイン誘導量に相関して、肝中カルシウム濃度の上昇が認められた。

\* 国立公害研究所

### Induction of Metallothionein after Lead Administration by Three Injection Routes in Mice

Tamio MAITANI, Akemi WATAHIKI\* and Kazuo T. SUZUKI\*<sup>2</sup>: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **83**, 211 (1986)

三種の投与方法でマウスに酢酸鉛を投与し、肝臓に誘導されるメタロチオネイン(MT)量、血中および臓器中のCa、Pb濃度を比較した。投与後1日目の肝臓中Pb濃度はiv>ip>sc投与の順であったが、誘導MT量はip>iv>sc投与≈0の順であった。臓器中Pb濃度が高かったほとんどの場合において、Ca濃度の上昇が認められた。肝臓におけるPbとCaレベルの上昇は、おもに超遠心沈渣画分中での上昇として検出された。

\*1 北里大学衛生学部

\*2 国立公害研究所

### Acute Renal Dysfunction by Cadmium Injected with Cysteine in Relation to Renal Critical Concentration of Cadmium

Tamio MAITANI, Akemi WATAHIKI\* and Kazuo T. SUZUKI\*<sup>2</sup>: *Arch. Toxicol.*, **58**, 136 (1986)

Cdをシステインと混合してマウスに静脈内投与したところ、急性腎障害が認められた。その時の腎中Cd濃度の臨界濃度は、腎全体として10μg/g湿重量であった。この値はCdチオネイン(Th)投与時の値と同じであったことから、Cd-Thによる腎障害はCd-ThやThによるのではなく、Cd-Thから遊離したCdによることが示唆された。腎障害の指標として用いた*in vitro*での腎皮質スライスによるp-アミノ馬尿酸(PAH)の取り込みは、感度も良く、また尿中タンパクやグルコース濃度とは違った経時変化を示した。このことからPAHの取り込みが腎障害の指標として有用であると考えられた。腎障害に伴い、腎中Ca濃度の著しい上昇が認められた。

\*1 北里大学衛生学部

\*2 国立公害研究所

### フェオホルバイドと関連化合物

内山貞夫、武田由比子：製薬工場，5，821(1985)

フェオホルバイドaはクロロフィルの分解物であり、健康食品であるクロレラ加工品の摂取から生じた光過敏症皮膚炎中毒事件の原因物質である。クロロフィルを多量に含む緑色野菜の漬物やアワビの中腸腺にはさらに光過敏毒性の強い分解物ピロフェオホルバイドa

が検出されることから、フェオホルバイドaおよびピロフェオホルバイドaを分別して定量する必要性が生じている。それには従来の比色定量法にかわってHPTLC法とHPLC法が有効であり、これらを用いたクロレラ錠および野菜の漬物中のフェオホルバイドaおよびピロフェオホルバイドaの実態について述べた。

### Protein-binding of Ochratoxin A and Its Extractability from Proteinous Food

Sadao UCHIYAMA, Yukio SAITO and Mitsuru UCHIYAMA: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **26**, 651 (1985)

発ガン性マイコトキシンであるオクラトキシンAと牛血清アルブミンの結合性は蛍光スペクトルや薄層クロマトグラフィーで観察され、クロロホルムによる抽出率からpH4.0~6.0において強く、主たる結合様式はイオン結合によることが推定された。pH7.4における結合部位数 $n=2.38 \pm 0.7$ 、親和定数 $K=7.67 \pm 0.37 (\times 10^5 M)$ であった。この結合性は塩のイオン強度の増加やメタノールの添加によって弱められた。タンパク食品であるかつお節において、A.O.A.C.法の最初のクロロホルム抽出操作では29%の低抽出率を示したが、2M食塩の添加及びリン酸の増量添加で液性をより酸性(pH1.6)にしたところ85%の抽出率を得ることができた。

### Metabolic Fate of N-Nitrodibutylamine in the Rat

Emako SUZUKI\*<sup>1</sup>, Masataka MOCHIZUKI\*<sup>2</sup>, Takashi SUZUKI and Masashi OKADA\*<sup>1</sup>: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **77**, 39 (1986)

N-ニトロジブチルアミン(NO<sub>2</sub>DBA)およびN-ニトロブチルアミン(NO<sub>2</sub>BA)のラットにおける代謝について検討した。NO<sub>2</sub>DBAを投与したラット尿からグルクロナイドをも含めて8種のニトラミンが単離同定された。これらの代謝物はN-ニトラミンの $\omega$ 、 $\omega-1$ 、 $\omega-2$ および $\alpha$ 位の酸化により生成した。*in vivo*でのNO<sub>2</sub>DBAの代謝様式はN-ニトロジブチルアミンに類似し、N-ニトラミンの他にN-アセチルS-(ブチル、3-オキソブチルおよび3-ヒドロキシブチル)L-システインがNO<sub>2</sub>DBAおよびNO<sub>2</sub>BAから生成した。NO<sub>2</sub>BA投与から得られたこれら3種類のL-システイン誘導体の相対比はNO<sub>2</sub>BA投与により得られたL-システイン誘導体の相対比に極めて良く類似し、このことはNO<sub>2</sub>DBAはNO<sub>2</sub>BAを経てブチル化能力のあ

る化学種を生成することを意味する。

\*1 東京生化学研究所

\*2 共立女子薬科大学

### ワキン (*Carassius auratus*) によるリン酸トリエステルの代謝

佐々木久美子, 鈴木隆, 武田明治, 内山 充: 衛生化学, 31, 397 (1985)

トリブチルホスフェート (TBP), トリス (1,3-ジクロロ-2-プロピル) ホスフェート (TDCPP) とトリフェニルホスフェート (TPP) のワキンによる代謝について検討した。肝ミクロソームによって TBP は水酸化体とジ体で代謝されたが TDCPP と TPP は代謝されなかった。TDCPP はグルタチオントランスフェラーゼ (GSTase) によって速やかに代謝された。

ワキンの GSTase は反応速度定数の測定結果から, 特に TDCPP に高い親和性を示し, 45°C に至るまで温度に依存して活性は増加した。

ワキンをジエチルマレエートに暴露したとき, TBP および TPP の体内蓄積量は変化しないが TDCPP の蓄積は 6.6 倍に増加した。

### 食器塗装用ポリウレタン及びポリウレタン塗装食器からのトルエンジアミンの溶出及び測定法の検討

井上たき子, 石綿 肇, 谷村顕雄: 食衛誌, 26, 326 (1985)

ポリウレタンの原料であるトルエンジイソシアネート (TDI) は加水分解されて発がん性物質であるトルエンジアミン (TDA) となる事から, これらの物質の溶出について検討した。ジアゾ発色法による TDI の検出限界は 50 ppb であり, 他のイソシアネート類も一部感応した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) では検出限界は TDA として 0.2 ppb であり, 2,4-および 2,6-異性体の分離が可能であった。HPLC で塗装用ポリウレタンおよびポリウレタン塗装食器からの TDA の溶出を測定したところ, 溶出用液として 20% エタノールが優れている事, 原料から 1.1 ppb の 2,4-TDA が溶出する事, TDA 過剰配合塗装で, かつ硬化未完了の場合, 0.7 ppb の 2,4-体が, 0.3 ppb の 2,6-体が溶出する事が認められた。

### High-performance Liquid Chromatographic Determination of Melamine Extracted from Cups made of Melamine Resin

Takiko INOUE, Hajimu ISHIWATA, Kunitoshi YOSHIHARA and Akio TANIMURA: *J. Chromatogr.*,

346, 450 (1985)

高速液体クロマトグラフィーによるメラミンの定量法について検討した。装置は Yanaco L-2000 に ODS-A カラム (2.6×250 mm) を着装し, 検出器として M-215 を用い, 235 nm で測定した。メラミンは酸性領域で強い UV 吸収を持ち, pH 5 を越えると吸収は弱くなった。また, 保持時間は移動相の pH が低くなるほど短くなった。両者の関係から, 移動相として pH 3.0 の 0.1 M リン酸塩緩衝液を用いた。本法を, メラミン樹脂製コップからの水または 4% 酢酸による溶出液に応用したところ, 回収率は, 水で 99.2 ± 0.9%, 4% 酢酸で 98.8 ± 1.0% であった。溶出液中のメラミンの濃度は水で 19.0 ± 2.7 ppb, 4% 酢酸で 23.6 ± 5.2 ppb であり, 定量上妨害となるピーク等は認められなかった。

### Migration of Melamine and Formaldehyde from Tableware made of Melamine Resin

Hajimu ISHIWATA, Takiko INOUE and Akio TANIMURA: *Food Additives & Contaminants*, 3, 63 (1986)

メラミン・ホルムアルデヒド樹脂製食器からのメラミン (M) とホルムアルデヒド (F) の溶出について検討した。法定溶出試験条件では F は検出されず, M は 4% 酢酸を用いたとき 0.08 ± 0.03 ppm の溶出が認められた。同一被験食器を用い, 試験を 20 回繰り返したが, その後溶出は認められなかった。4% 酢酸を用い 95° で 30 分間加熱したところ, M は 2.1 ± 0.2 ppm, F は 7.6 ± 1.0 ppm 溶出した。溶出濃度は繰り返し試験 7 回目で最高値 (M: 42.9 ± 7.2 ppm, F: 14.2 ± 0.6 ppm) を示し, その後減少した。この時の M に対する F のモル濃度比は,  $y = 9.15x^{-0.813}$  (x: 繰り返し回数) の式にそって減少し, 約 1.6 で平衡状態に達した。この式は水による 95° での溶出試験にも該当した。

### 蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによる食品中のメチルグアニジン, アグマチンの分別定量法

川崎洋子, 山田 隆, 義平邦利, 谷村顕雄: 食衛誌, 26, 483 (1985)

蛍光検出高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い, 食品中のメチルグアニジン (MG), アグマチン (AGM) の高感度で簡便な分別定量法を検討した。試料を, トリクロロ酢酸で抽出及び除タンパク後, 強アルカリ性で, n-ブタノールによる抽出, ついで 1N 塩酸で抽出を行い, 妨害物の除去を試みた。アルカリ性下ベンゾインと反応後, 生成した MG および AGM

のベンゾイン縮合物を酢酸エチルで抽出した。メタノール-0.5M トリス緩衝液(8:2)を移動相とし、Nucleosil 5C<sub>18</sub>を用いてHPLCを行った。けずり節からの添加回収率はMG 85.0%, AGM 82.5%であり、検出限界はMG 0.1 ppm, AGM 0.5 ppmであった。MGはかつお節類に多く、AGMはチーズ、納豆にわずかに検出されたのみであった。

#### HPLC Determination of N-Nitrosomethyl-urea in Biological Fluids by Reaction with 4-Nitrothiophenol

Miyako YAMAMOTO, Hajimu ISHIWATA, Takashi YAMADA, Akio TANIMURA and Isao TOMITA\*: *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 247 (1986)

生体試料中からのN-ニトロソメチルウレア(NMU)の簡便かつ高感度な分析法について検討した。定量の原理は、NMUにアルカリを加えることによって生成するジアゾメタンと、4-ニトロチオフェノール(NTP)からの4-ニトロチオフェノールメチルチオエーテル(NTP-Me)の生成である。NMU水溶液とエチルエーテルの混液にアルカリを加えた後水層を除去し、ジアゾメタンが捕集されているエーテル層にNTP/エーテル溶液を加え、生成したNTP-MeをHPLCで定量した。胃および腸内容物、血液はキーゼルゲールカラムおよびヘプタン-水抽出によりクリーンアップした。回収率は胃および腸内容物から95%、血液から80%だった。検出限界は胃内容物中0.5 nmol/g、腸内容物および血液中1 nmol/gだった。

\* 静岡薬科大学

#### 高速逆相クロマトグラフィーによるアミノ酸の対掌体の分離

加藤三郎, 鎌倉浩之, 有泉純男\*: *食衛誌*, **27**, 272 (1986)

ODSカラムとキラルな移動相を用いたHPLCにより、食品添加物に指定されたDL-アミノ酸の対掌体の分離について検討した。移動相に1 mM アスパルテーム(AMP)-塩化第二銅(Cu(II))とメタノール混合液を用い、メタノール濃度30~40%においてトリプトファンが、10~20%においてメチオニンが、それぞれL体とD体に完全に分離して良好なピークを示した。アラニンは0.1 mM以下のAPM-Cu(II)でL体とD体に完全分離した。スレオニンは完全分離は困難であったが、0.025 mM APM-Cu(II)で最も分離してD体とL体の判別ができた。本法は系の安定化にやや長時間を要し、カラム洗浄に注意を要するが、

UV(254 nm)検出器で0.1 μg以下の分離確認が可能である。

\* 陸上自衛隊衛生補給処

#### Analysis of Residual Vulcanization accelerators in Baby Bottle Rubber Teats

Takeshi YAMAZAKI, Takiko INOUE, Takashi YAMADA and Akio TANIMURA: *Food Additives and Contaminants*, **3**, 145 (1986)

哺乳びん用イソブレンゴム製乳首中に残存している加硫促進剤ジアルキルジチオカルバミン酸塩(DTC)の分析法を開発した。DTCをゴムからクロロホルム-アセトン混液で抽出した後、エチルエステルに変え、窒素・リン検出器付ガスクロマトグラフで分析した。市販乳首のクロロホルム-アセトン混液抽出物からジメチルジチオカルバミン酸が最大3.2 μg/gゴム、ジエチルジチオカルバミン酸が最大6.4 μg/gゴム検出された。DTCが酸水解すると2級アミンを生じる。そこでゴム抽出物中の2級アミン前駆体(酸水解すると2級アミンを生じる物質)の総量を測定した。DTC量は2級アミン前駆体量の10~50%にすぎなかった。

#### 食用赤色3号中の中間体、反応副生成物の分離および定量ならびに反応副生成物の安定性\*

神蔵美枝子: *食衛誌*, **26**, 643 (1986)

食用赤色3号(R3)の中間体レゾルシン、反応副生成物2,4,6-tri-, 2,4-di-iodoresorcinol, 2-(2',4'-dihydroxybenzoyl) benzoic acid (2',4'-diOHBBBA)は薄層クロマトグラフィ/デンシトメトリーによって分離定量でき、検出感度も高く、定量法として有効である。R3中の上記物質は10%塩酸-エタノール-水(1:1:1)混液で抽出後、上記方法で分析できるが、2,4,6-triiodoresorcinolの回収が悪く、この原因はdi-およびmono-iodoresorcinolに分解するためと判明した。2',4'-diOHBBBAとヨウ素との反応では主に2種のiodo-2',4'-diOHBBBAを生成した。R3の主な市販製品5社、10試料について分析したところ、いずれの試料からも上記物質は検出されなかった。

\* 食用色素に含まれる有機性不純物に関する研究(第2報)

#### 食用青色1号の付随色素の構造並びに高速液体クロマトグラフィーによる分離定量\*

神蔵美枝子: *食衛誌*, **27**, 27 (1986)

食用青色1号(B1)の付随色素としてN-ethylaniline(EA), o-sulfobenzaldehyde(OSBA)およびN-ethyl-

*N*-benzylaniline sulfonic acid (EBASA) とから EA-付随色素を、*N*-ethyl-*N*-benzylaniline (EBA), OSBA および EBASA とから EBA-付随色素を調製し、構造を確かめた。B1 市販製品の付随色素は上記 2 種の付随色素と同定した。分離定量法は Zorbax ODS カラム、溶離液 (1) 0.5%炭酸アンモニウム溶液、(2) メタノール (40~100%, 5%/min)。測定波長 B1 628 nm, EA-付随色素 618 nm, EBA-付随色素 633 nm。最小検出量はそれぞれ 2.5 ng, 5 ng, 3 ng であった。B1 市販製品から EA-付随色素を 2.7~10.4%, EBA-付随色素をこん跡程度検出した。本法は B1 中の EA-, EBA-付随色素の定量法として適用できる。

\* 食用色素に含まれる付随色素に関する研究 (第 1 報)

#### 食用緑色 3 号から単離された付随色素の構造並びに高速液体クロマトグラフィーによる分離定量\*

神蔵美枝子: 食衛誌, 27, 398 (1986)

食用緑色 3 号 (G3) から単離された 2 種類の付随色素の 1 つは、G3 から *m*-sulfoethyl 基が 1 個脱離した 3-[*N*-ethyl-[(4-ethylaminophenyl) (4-hydroxy-2-sulfophenyl) methylene-2, 5-cyclohexadienylidene] ammoniomethyl] benzenesulfonate (EA-付随色素) であることを明らかにした。他の 1 つは G3 から -SO<sub>3</sub>H 基が 1 個脱離した *N*-ethyl-*N*-benzylaniline (EBA), *p*-hydroxy-*o*-sulfo benzaldehyde および EBA-sulfonic acid からつくられる色素 (EBA-付随色素) と考える。G3 および 2 種の付随色素は Zorbax ODS カラム、溶離液 (1) 0.5%炭酸アンモニウム溶液、(2) メタノール (40~100%, 5%/min) によって G3, EA-, EBA-付随色素の順に分離できた。G3 市販製品から EA-付随色素は 0.4~5.7%, EBA-付随色素は 0.2~3.5% 検出した。本法は G3 中の EA- および EBA-付随色素の定量法として適用できる。

\* 食用色素に含まれる付随色素に関する研究 (第 2 報)

#### 天然食品添加物

神蔵美枝子: 食品衛生研究, 36(2), 17 (1986)

近年、とくにその開発、利用が著しい天然食品添加物につき、種類、諸外国における規制、品質、安全性および食品中の分析法につき解説した。現在流通している主な製品については、その実測データを示し、また、天然着色料については世界 17 ヶ国で使用されている品目とその許可状況を一覧表にまとめた。

#### 炎光光度検出器付きガスクロマトグラフによる大気中の硫酸ミストの定量

松村年郎, 亀谷勝昭, 等々力 仁\*<sup>1</sup>, 竹村忠憲\*<sup>2</sup>, 留目真理子\*<sup>3</sup>, 武田明治: 日本化学会誌, 1986, 100 (1986)

大気中の硫酸ミストを浮遊粒子状物質とともにテフロンフィルターに捕集したのち、アセトンを用いて硫酸ミストを抽出後、抽出液にジアゾメタンを加えて硫酸ミストをメチル化後、GC-FPD で定量する方法を確立した。本法を東京都内の大気中の硫酸ミストの実測に適用した。その結果、大気中の硫酸ミスト濃度は 0.2~1.2 μg/m<sup>3</sup> の範囲を示し、硫酸塩に占める割合 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) は 2~12% であった。

\*<sup>1</sup> 日穀製粉株式会社

\*<sup>2</sup> 上智社会福祉専門学校

\*<sup>3</sup> 株式会社エレナ

#### HeLa 細胞による actin 作動マイコトキシンの検索

名取信策\*<sup>1</sup>, 小山清隆\*<sup>1</sup>, 富岡敬子\*<sup>1</sup>, 的場正行\*<sup>1</sup>, 西本春子\*<sup>1</sup>, 梅田 誠\*<sup>2</sup>, 倉田 浩, 宇田川俊一: マイコトキシン, 21, 30 (1985)

著者らは食品由来カビのマイコトキシン生産性検索に当たって HeLa 細胞に対する毒性と障害像を調べてきたが、とくに細胞分裂の障害像において M 型 (cytochalasins などによる) を示すものは actin 繊維に作用するものであるとされる。供試した 12 菌種のうちで 3 株が M 型の細胞毒性を示したが、その 1 種 *Phomopsis* sp. について代謝産物の分離を試み、既知の epoxy cytochalasin H, J, cytochalasin H, J を同定したほか、endo site に 2 重結合をもつ新化合物 cytochalasin N, O を単離、構造を明らかにした。

\*<sup>1</sup> 明治薬科大学

\*<sup>2</sup> 横浜市立大学木原生物学研究所

#### 輸入コーヒー豆におけるマイコトキシン生産菌の汚染実態

宇田川俊一, 成田紀子, 鈴木明子: マイコトキシン, 22, 17 (1985)

輸入生コーヒー豆 11 検体について菌学的調査を行った結果、生コーヒー豆のカビフローラは *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. tama rii*, *Eurotium herbariorum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum* が主体であることが明らかにされた。*A. flavus* の 9 分離株についてアフラトキシン生産性を検索したところ、1 株に生産性が認められ、米培地での生産量は 1.1595 mg/kg, コ

ーヒー豆培地での生産量は 58.69 $\mu$ g/kg であった。コーヒー豆から分離されたアフラトキシン生産菌はカフェイン抵抗性株であり、コーヒー豆を基質としてよく生育し、アフラトキシンを生産する。したがって生コーヒー豆のアフラトキシン汚染に関して十分な監視が必要である。

**Structure and Absolute Configuration of Emestrin, a New Macrocyclic Epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata***

Hideyuki SEYA\*, Shoichi NAKAJIMA\*, Ken-ichi KAWAI\*, and Shun-ichi UDAGAWA: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 657 (1985)

子の菌類 *Emericella striata* の二次代謝産物を検索し、培養菌体のアセトン抽出エキスから epidithiodioxopiperazine 系の新化合物である emestrin を分離した。<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C n.m.r. スペクトルおよび emestrin の methanol solvate の結晶を用いての直接法による X線結晶解析を行った結果、化学構造を決定した。さらに、その絶対配位についても明らかにした。

\* 星薬科大学

**Studies on Fungal Products. Part 8. Isolation and Structure of Emestrin, a Novel Antifungal Macrocyclic Epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*. X-ray Molecular Structure of Emestrin**

Hideyuki SEYA\*, Koohei NOZAWA\*, Shoichi NAKAJIMA\*, Ken-ichi KAWAI\*, and Shun-ichi UDAGAWA: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 109 (1986)

子の菌類マユハキタケ科の *Emericella striata* の二次代謝産物について研究を行った結果、菌体抽出物から ergosterol, sterigmatocystin, emericellin, emestrin を分離した。また培養ろ液からは violaceic acid が分離された。このうち、emestrin は新化合物で、2, 3 の誘導体についての機器分析ならびに emestrin の methanol solvate の X線結晶解析の結果から絶対配位を含む構造を決定した。本化合物は2分子のフェニールアラニンと1分子の安息香酸から誘導され、強い抗真菌活性を有する。

\* 星薬科大学

**A New Species of *Podospira* from Marine Sediment**

Shun-ichi UDAGAWA and Seiichi UEDA\*: *Mycotaxon*, **22**, 399 (1985)

1979年4月、長崎市内の長崎湾海泥から分離された子の菌類の新種をソルダリア科の *Podospira inquinata* と命名し記載報告した。本種は *P. macropodalis* に類似するが子の胞子の形態が相違する。これまで *Podospira* 属の真菌は動物の糞生菌として知られ、若干の種は土壌からの分離記録があるが、海水環境からの報告は見当たらない。そこで海水培地を使用、本種の生理的性質を調べたところ、子の胞子の発芽は海水によって抑制されたが、生育は海水によって阻害されず、100%海水培地上での生育が最もよいという結果を得た。

\* 長崎県衛生公害研究所

**A New Species of *Leptodiscella***

Shun-ichi UDAGAWA and Noritsuna TOYAZAKI\*: *Mycotaxon*, **22**, 407 (1985)

者著らは大阪府吹田市千里ヶ丘の集合住宅を対象とし、家屋塵埃中の真菌相を公衆衛生学的な面から調査してきたが、1984年2月に分離された不完全菌類の1株が分類学上新種であることを認め、*Leptodiscella chlamydospora* と命名し記載した。*Leptodiscella* 属には *L. africana* という種が南アフリカから、また *L. japonica* がわが国の森林土壌から報告されている。*L. chlamydospora* はこれらの2種とは、大型で褐色、しばしば連鎖状になる厚膜胞子を形成する点で容易に区別される。

\* 神戸市環境保健研究所

***Trichurus dendrocephalus* sp. nov. from Iraqi Soil**

Shun-ichi UDAGAWA, Yoshikazu HORIE\*<sup>1</sup> and Samir K. ABDULLAH\*<sup>2</sup>: *Mycotaxon*, **23**, 253 (1985)

1983年7月、イラク国 Basrah 市郊外のナツメヤシ林地土壌から分離された不完全菌類の1菌株について分類学的研究を行った結果、新種と認め、*Trichurus dendrocephalus* と命名し記載した。*Trichurus* 属には *T. spiralis* を含め3種がこれまで知られていたが、本種はふたまた状に2, 3回分岐する剛毛の特徴から容易に既知種と区別することができる。

\*<sup>1</sup> 千葉大学生物活性研究所

\*<sup>2</sup> Department of Biology, College of Science, University of Basrah, Iraq

**A New Species of *Phialophora* from Japan**

Tokio IWATSU\* and Shun-ichi UDAGAWA: *Mycotaxon*, **22**, 399 (1985)

taxon, 24, 387 (1985)

1978年12月、千葉県佐原市で腐朽木から分離された不完全菌類の1株について分類学的研究を行った結果、新種と認め、*Phialophora japonica* と命名し記載した。本菌は病原真菌でもある *P. verrucosa* および *P. cyclaminis* にやや類似する。しかし、*P. verrucosa* とはフィアライドの構造、分生子の形態が異なる上に、本菌が37°で生育しない点から区別される。*P. cyclaminis* とは生育速度、フィアライドの幅、分生子の形態などの諸性質が相違する。

\* 千葉県大学生物活性研究所

#### A New Species of Heterothallic *Neosartorya*

Masaki TAKADA\* and Shun-ichi UDAGAWA:  
*Mycotaxon*, 24, 395 (1985)

*Aspergillus fumigatus* 群種のテレオモルフは子のう菌類マユハキタケ科の *Neosartorya* である。この属ではこれまで USA において実験動物のウサギの眼球から分離された *N. fennelliae* が性的にヘテロタリックであると報告されていた。著者らが1982年10月に台湾の Tai-Ping 村で畑地土壌から分離した *Neosartorya* は性的にヘテロタリックであるにもかかわらず、上記の *N. fennelliae* とは明らかに相違し、淡黄色の子のう果、表面が滑らかなレンズ形の子のう胞子、大・小2形性の分生子柄を形成した。また、交配試験からも *N. fennelliae* ではないことが確認された。以上の結果から、本菌を新種と判断し、*N. spathulata* と命名し記載した。

\* 東洋醸造株式会社研究所

#### Four New Japanese Species of the Ceratostomataceae (Ascomycetes)

Yoshikazu HORIE\*<sup>1</sup>, Shun-ichi UDAGAWA and Paul F. CANNON\*<sup>2</sup>: *Mycotaxon*, 25, 229 (1986)

日本国内の畑地・森林土壌から分離された子のう菌類ケラトストマ科菌類について分類学的研究を行い、以下の4種を記載報告した。すなわち、*Arxiomyces campanulatus*, *Persiciospora japonica*, *Sphaerodes micropertusa*, *Syspastospora boninensis* を新種とし、各属における類似種との比較検討の結果を述べた。

\*<sup>1</sup> 千葉大学生物活性研究所

\*<sup>2</sup> Commonwealth Mycological Institute, Kew, U. K.

#### *Scytalidium japonicum*, a New Species, the Casual Agent of Cattle Bronchiolitis

Shun-ichi UDAGAWA, Kiyoshi TOMINAGA\*<sup>1</sup>, and Takafumi HAMAOKA\*<sup>2</sup>: *Mycotaxon*, 25, 279 (1986)

1984年に山口県下で発生した和牛の細気管支真菌症の原因菌として分離された不完全菌について分類学的研究を行った結果、*Scytalidium* の新種と認め、*S. japonicum* として記載報告した。本菌の特徴はにぶい緑色緑灰色のコロニー、大形で無色の分節分生子と暗色で連鎖となる厚膜胞子を形成する点である。本属の種として *Hendersonula toruloidea* の *Scytalidium* モルフ、*S. hyalinum*, *S. lignicola* などがヒトの皮膚真菌症を起こすことが報告されているが、家畜の疾病、しかも肺真菌症の原因となった事例は始めてである。

\*<sup>1</sup> 山口県中部家畜保健衛生所

\*<sup>2</sup> 農林水産省家畜衛生試験場

#### Taxonomy of Thermophilic and Thermotolerant Fungi—Recent Developments on Their Detrimental Activities

Shun-ichi UDAGAWA: *Filamentous Microorganisms, Biomedical Aspects* (T. Arat et al. eds.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p. 61 (1985)

高温菌、耐温菌として最近発見された *Achaetomium hamadae*, *Myceliophthora hinnulea*, *Sagenoma ryukyensis*, *Thermoascus aegyptiacus*, *Thielavia emodensis* について分類学的研究を述べた。また、病原真菌として高温菌や耐温菌がひよみ感染症の原因になること、とくに急性白血病患者に併発した皮膚潰瘍の原因菌として分離された不完全菌 *Ochroconis gallopava* の耐温性について詳述した。最後にマイコトキシン生産菌にも耐温菌があり、*Chaetomium* の数種が発癌性マイコトキシン sterigmatocystin を含む多数のマイコトキシンを生産することを指摘した。

#### Contribution to our Knowledge of *Aspergillus* Teleomorphs: Some Taxonomic Problems

Sun-ichi UDAGAWA and Masaki TAKADA\*: *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (R. A. Samson and J. I. Pitt, eds.), Plenum Publishing, New York, 429 (1985)

*Aspergillus* 属のテレオモルフについて、とくに *Eurotium*, *Neosartorya*, *Emericella* に関する最近の知見に基づき分類学的研究を述べた。さらに *Neosartorya* のヘテロタリックな種である *N. spathulata* および *N. fennelliae* に関しては交配試験の結果について言及した。すなわち、*N. spathulata* と *N. fischeri* との異種間交配による

*N. fischeri* var. *glabra* における子のう果形成促進効果、*N. fennelliae* と *Aspergillus fumigatus* 43株との異種間交配による *A. fumigatus* の潜在的な性的因子 (a-factor) の発現などを紹介した。

\* 東洋醸造株式会社研究所

### Screening of Antibacterial Constituents of Crude Drugs and Plants

Masanori KUROYANAGI, Tsuyoshi EBIHARA, Kuninobu TSUKAMOTO, Seigo FUKUSHIMA\*, Chuichi ISHIZEKI and Motoyoshi SATAKE\*\* : *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, s-62 (1985)

植物成分に関する一連の研究のうち、今回は抗菌活性物質についての知見を報告した。試験に供した植物分画成分は320種でこれについて寒天平板混釈法によるMIC測定による抗菌活性値を求めた。試験菌にはGram+2種、Gram-2種である。その結果試験に供した320画分のうち22試料にGram+2菌種、*St. aureus*, *Bac. subtilis*に稍々強い抗菌活性を認めた。活性を認めた植物は *Magnoliae obovatae cortex* 他5種であった。

そしてこれら活性画分の構造は acetyl 系, lignans 系 それに diterpenes 系化合物でそれらの活性値は 5~20 µg/ml であった。

\* 静岡薬科大学

### ID テスト・SP-18 による食肉および食肉製品由来黄色ブドウ球菌の生化学的性状の検討

三瓶憲一\*<sup>1</sup>, 今野純夫\*<sup>2</sup>, 品川邦汎\*<sup>3</sup>, 小沼博隆, 倉田 浩, 尾上洋一\*<sup>4</sup> : 食品と微生物, **2**, 88(1985)

ブドウ球菌簡易同定キットとして市販されているIDテスト・SP-18を用い、食肉および食肉製品由来 *Staphylococcus aureus* の生化学的性状を検討した結果、供試234株のうち、従来法で定型的性状を示した株は231株で、そのうち225株(97.4%)が *S. aureus* と同定された。また、非定型3株のうち2株が *S. aureus*, 1株は *S. aureus* または *S. intermedius* と同定された。IDテストにより *S. aureus* と同定された227株は19種類の性状パターンに類別された。従来法およびIDテストによる性状はリポース分解能において両者は異なり、一致率は42.0%であった。本テストでは特にVP反応、ノボピオン感受性試験において判定が困難であった。さらにIDテストを使用する場合、コアグラゼ試験を併用して行う必要のあることが認められた。

以上の成績から、本簡易同定キットは *S. aureus* の性状パターンを調べるのに有効であり、本菌の汚染源

追求等の疫学調査に活用できると思われる。

\*<sup>1</sup> 千葉県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 仙台市衛生試験所

\*<sup>3</sup> 岩手大学農学部

\*<sup>4</sup> 神奈川県衛生研究所

### シンポジウム：食品微生物検査における最近の進歩—スパイラル法

小沼博隆：食衛誌, **26**, 555 (1985)

食品の微生物検査領域においても検査の能率化、迅速化、省力化および検査器材の節約を目的とした新しい検査機器の開発がさかに行なわれるようになってきた。本稿ではスパイラル・プレーターを使用した細菌検査システムの原理、応用につき紹介すると共に、本システムを実際に食品中の細菌数測定に適用した時の問題点、正確性、簡易・迅速性ならびに経済性について、各種食品100検体を対象に、本システムと従来法の混釈法の両法について比較検討した。

### 食品ならびに微生物の生態要因をベースとした重ね合せ評価法 (ファックス・アセスメント) による微生物制御

尾上洋一\*<sup>1</sup>, 小沼博隆, 品川邦汎\*<sup>2</sup> : 食品と微生物, **2**, 24 (1985)

食品の微生物の規格基準を設定するにあたり、各種食品および微生物の各因子に関するデータを文献等から集め整理してデータベースとし、これをもとにして食品をaw, pHの2因子で構成するマトリックス上に配置し、食品の類別表を作成した。一方、微生物の発育可能領域を同様にマトリックス上に描き、微生物の類別表を作成した。これら、食品と微生物の両類別表を重ね合わせてみると、食品中で増殖可能な微生物の推定、および微生物の食品に対する活性(腐敗、変敗、食中毒原性)などの予測、評価が行いうる事が判明し、この評価の手法を「重ね合せ評価法, FA」法、と呼ぶこととした。

\*<sup>1</sup> 神奈川県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 岩手大学農学部

### 食肉、食肉製品および食肉製品副原料中の *Bacillus cereus* 汚染と分離菌株のエンテロトキシン産生性

品川邦汎\*, 小沼博隆, 倉田 浩, 棚林 清\*, 松坂尚典\* : 岩手大農学部報告, **17**, 175 (1985)

岩手、宮城、埼玉、大阪および兵庫の各府県において屠畜場、食品製造・加工所および小売店から採取した食肉(452検体)、食肉製品(686検体)および食肉製

品に使用される副原料(356検体)について *B. cereus* 汚染状況を調べ、さらに分離菌株(281株)のエンテロトキシン産産性を検討した。*B. cereus* 汚染は食肉5.8%, 食肉製品14.7%であり、これらの中でハンバーグ未加熱品, 同加熱品, ソーセージから *B. cereus* が高率に検出された。さらに副原料の着色料, 植物タンパク質, 結着・増量剤, デンプン, 香辛料などが高率に汚染されていることが判明し, 食肉製品中の汚染源は主として副原料による可能性が大きい。

各材料から分離した *B. cereus* 281株中121株(43.1%)にエンテロトキシン産産性が認められた。このうちデンプン分解陽性株が108株(89.3%), 陰性株13株(10.7%)で, エンテロトキシン産産性とデンプン分解性との間には高い相関が認められた。

\* 岩手大学農学部

### The Relation between the Diarrheal and Other Biological Activities of *Bacillus cereus* Involved Food Poisoning Outbreaks

Kunihiro SHINAGAWA\*, Naonori MATSUSAKA\*, Hirotaka KONUMA and Hiroshi KURATA: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47, 557 (1985)

下痢型食中毒4事例および嘔吐型食中毒21事例から分離したセレウス菌(59株)の培養遠心上清について, ウサギ皮内血管透過性亢進(VP), マウスおよびウサギ結腸腸管における液体貯留(MILおよびRIL)およびマウス致死(MLT)の各活性を調べた。下痢型由来菌株のほとんど(9株中7株)がデンプン分解陽性であるのに対し, 嘔吐型由来菌株はすべて陰性であった。下痢型株のVP活性は全て15mm以上のblueing zoneを形成し, 嘔吐型株より明らかに強かった。MPT活性は下痢型株のすべてがマウスを致死させ(0.1~0.2 ml i. v.), 嘔吐型株でも80%が致死を(0.2~0.4 ml i. v.)示した。MIL活性は下痢型株では50%が陽性を示したが, 嘔吐型株では100%陰性であった。また, 50倍濃縮した試料のRIL活性は, 下痢型株で62%が, 嘔吐型株では15%が陽性を示した。

\* 岩手大学農学部

### 原発性浅在型皮膚アスペルギルス症

猿田隆夫\*1, 河野昭彦\*1, 木田浩隆\*2, 一戸正勝: 皮膚臨床, 27, 1237 (1985)

原発性浅在型皮膚アスペルギルス症の2例を報告した。2例とも整形外科の術後, 同じ部屋ではほぼ同じ条件下で発症したが, その分離菌は, 1例は *A. flavus*, 他の1例は *A. fumigatus* と *A. terreus* の混合感染であ

った。走査電顕的観察により, *A. flavus* および *A. terreus* の分生子にそれぞれ特徴的な形態を認めた。本邦における皮膚アスペルギルス症(総計47例)は, 原発性で浅在型のものがもっとも多く, 臥床, ギプス, 点滴絆創膏固定が発症要因の半数以上を占めていた。浅在型は早期に治癒し, その分離菌は *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* の三者がほぼ同数で多く, 深在型は *A. fumigatus* が大部分を占めていた。

\*1 九州大学生体防御医学研究所

\*2 大分赤十字病院

### ムギ類赤かび病一病原菌・発生生態・防除

小泉信三\*, 吉野嶺\*1, 駒田且\*, 加藤 肇\*, 一戸正勝: 植物防疫, 40, 163 (1986)

ムギ類の重要病害の一つの赤かび病につき病原菌の分類学的位置付けを明確にしたのち, 自然界での赤かび病発症に近い条件として, ビニルハウス内での病原菌の接種法を開発した。噴霧接種法, 葉しよう内注射接種法により, 確実に発症させることが出来ることを明らかにし, 両接種法の相関性についても検討した。生態的に病原菌の土壌中での生存, 空気中の飛散についても確認した。菌種の面では *Fusarium graminearum* がもっとも病原性が強く, *F. avenaceum*, *F. culmorum* の他, *F. acuminatum* にも病原性を認めた。防除法としてはチオフェネートメチルが有効であり, 予防散布がのぞましく, 発症後の散布では効果が低かった。

\* 農林水産省・農業研究センター

### Trichothecene-producing *Fusarium* in Barley and Wheat in Japan

Masakatsu ICHINOE, Shigeru UCHIYAMA\*1, Ryuji AMANO\*2 and Hiroshi KURATA: *Trichothecenes and Other Mycotoxins*, Ed. J. Lacey, John Wiley & Sons Ltd., 1985, 21

中部日本, 東北および北海道で栽培されているムギ類につき, 赤かび病菌を含む *Fusarium* 属の菌種の分布状況を調査し, それぞれの菌種のトリコテセンマイコトキシン類の生産能および培養抽出物の鶏胚に対する毒性を検索した。赤かび病菌 *F. graminearum* はもっとも広く分布し, ニバレノール生産株, デオキシニバレノール生産株に分かれた。 *F. equiseti*, *F. semitectum* にはジアセトオキシシルベノール(DAS)生産株が見出され, *F. acuminatum*, *F. sporotrichioides* はT-2トキシン, HT-2トキシン, DASなどを生産し, いずれも鶏胚に対して強い毒性を示した。北海道産コムギに広く分布する *F. nivale* 既知のトリコテセンマイコ

トキシンを生産しないことを確認した。

\*1 (財)日本きのこ研究所

\*2 国民生活センター

**Purification of a New Restriction Endonuclease, StyI, from *Escherichia coli* carrying the Hsd<sup>+</sup> Miniplasmid**

Katsutoshi MISE and Katsuhisa NAKAJIMA\*: *Gene*, **33**, 357 (1985)

チフス菌由来の小型 Hsd プラスミドを持つ大腸菌から, Sty I と命名された制限酵素を精製した。Sty I 制限酵素は, 10 mM の Mg<sup>++</sup> 存在下で, 5'-CC(A)(A)GG という塩基配列を認識切断した。Sty I は安定で収量も良く, かつ CCAAGG や CCTTGG という特異的な塩基配列を認識する所から, 組み換え DNA 技術に有用な手段を提供する事になる。

\* 東京大学医科学研究所

**Restriction Endonuclease Eco O 109 from *Escherichia coli* H709c with Heptanucleotide Recognition Site 5'-PuG/GNCCPy**

Katsutoshi MISE and Katsuhisa NAKAJIMA\*: *Gene*, **36**, 363 (1985)

大腸菌 H709c 株から, ポリエチレンイミン沈殿, DEAE セルローズ及びヘパリンアガロースクロマトグラフィーにより, Eco O109 とよばれる新型制限酵素を精製した。この酵素の収量は高く, 1 グラムの細菌当たり3000ユニット以上のものが精製された。本酵素は, 10 mM Mg<sup>++</sup> 存在下で, 5'-PuGGNCCPy という特異的な塩基配列を認識切断した。酵素の安定性と高収量が故に, Eco O109 は DNA の構造解析やクローニングに, 有用であると考えられる。

\* 東京大学医科学研究所

**Occurrence of Small Hsd Plasmids in *Salmonella typhi*, *Shigella boydii* and *Escherichia coli***

Yoko YOSHIDA\* and Katsutoshi MISE: *J. Bacteriol.*, **165**, 357 (1986)

小型の Hsd (Host specificity for DNA) プラスミドが, チフス菌, 赤痢菌および大腸菌の制限酵素産生株から発見された。分離された5つの Hsd プラスミドの大きさは, 5.0から 12.2 kb の大きさであった。また, 小型 Hsd プラスミドのコピー数も多く, いずれも1個の細菌あたり10コピー以上であった。この高いコピー数がゆえに, これらのプラスミドを持つ菌から,

大量の制限酵素が簡単に精製された。自然界に存在する Hsd プラスミドを見出し, 利用する事によって, さらに多くの制限酵素の精製を容易にする事が期待される。

\* 国立公衆衛生院

**N-Methylnornicotinium Ion, A New *in vivo* Metabolite of R-(+)-Nicotine**

Michio SATO and Peter A. CROOKS\*: *Drug Metab. Dispos.*, **13**, 348 (1985)

R-(+)-nicotine を常習的に腹腔内に投与した雄モルモット (Hartley 種) の尿から, N-methylnornicotinium ion を代謝物として同定した。同様な条件下で, S(-)-nicotine は同様な代謝物へは変換されなかった。代謝物は分取用陽イオン交換高速液体クロマトグラフィーによって単離, 精製した。代謝物の構造は, UV スペクトルの分析, 水素化ホウ素ナトリウムによる還元体の GC-MS 分析, および <sup>1</sup>H-FT-NMR 分析によって決定した。nicotine から, この代謝物が形成されるという事実は, 同一の分子内で N-脱メチル化反応と N-メチル化反応の両方が起こるというユニークな反応例であることを示している。

\* ケンタッキー大学薬学部

**Reduction of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA Alkyltransferase Activity in HeLa Cells Treated with O<sup>6</sup>-alkylguanines**

M. Eileen DOLAN\*, Kazushige MORIMOTO and Anthony E. PEGG\*: *Cancer Res.*, **45**, 6413 (1985)

HeLa S3 細胞を O<sup>6</sup>-alkyl G 共存下で培養すると O<sup>6</sup>-alkyl G-DNA alkyltransferase (AGT) 活性が急激に低下する現象を見出した。本現象は細胞より抽出した AGT と O<sup>6</sup>-alkyl G を *in vitro* でインキュベートしても認められた。これらの効果は O<sup>6</sup>-alkyl G の中で methyl や n-butyl 基が強く, ethyl, n-propyl 基で中程度, iso-propyl や hydroxyethyl 基では弱かった。[<sup>3</sup>H] O<sup>6</sup>-methyl G と AGT をインキュベートすると [<sup>3</sup>H] G が生成した。HeLa の細胞 AGT は本来 DNA 中の O<sup>6</sup>-alkyl G を基質として nM のオーダーで作用後その活性を喪失するが, 比較的高濃度 (0.2 mM) では O<sup>6</sup>-alkyl G も基質として働き活性を喪失することが明らかとなった。

\* 米国ペンシルベニア州立大学ハーシーメディカルセンター癌研究所

### Studies of the Repair of O<sup>6</sup>-Alkylguanine and O<sup>6</sup>-Alkylthymine in DNA by Alkyltransferases from Mammalian Cells and Bacteria

Anthony E. PEGG\*, M. Eileen DOLAN\*, David SCICCHITANO\* and Kazushige MORIMOTO: *Environ. Health Perspect.*, **62**, 109 (1985)

大腸菌 O<sup>6</sup>-alkyl G-DNA alkyltransferase (AGT) は DNA 中の O<sup>6</sup>-alkyl G の修復速度としては methyl 基の除去がきわめて早く, ethyl 基よりも長い alkyl 基の除去はかなり遅かった. ラット肝臓 AGT も methyl 基が最も速やかに除去され alkyl 鎖長が長くなると修復速度は遅くなるが, 大腸菌の場合のような大きな差異は認められなかった.

また, 大腸菌 AGT は DNA 中の O<sup>4</sup>-methylthymine をも修復するが, ラット肝臓やヒト線維芽細胞 AGT は O<sup>4</sup>-methyl T を修復しなかった.

これらの結果より哺乳動物における発ガンや突然変異における AGT の役割について論じた.

\* 米国ペンシルベニア州立大学ハーシーメディカルセンター癌研究所

### Acetyl-CoA-Dependent Chain Elongation of Fatty Acids in *Escherichia coli* K-12

Tomoko NISHIMAKI, Hiroshi YAMANAKA\*<sup>1</sup>, and Michinao MIZUGAKI\*<sup>2</sup>: *J. Biochem.*, **99**, 365 (1986)

脂質を構成する脂肪酸の合成に I 型の脂肪酸合成酵素 (FAS) と脂肪酸修飾系とを必要とする哺乳動物と異なり, 大腸菌等では多種の脂肪酸を合成する II 型の FAS が唯一の合成系と考えられてきたが, 大腸菌にアセチル CoA を C<sub>2</sub> 供与体とするミトコンドリア型の脂肪酸炭素鎖伸長系の存在を明らかにした.

大腸菌の粗抽出液は, [1-<sup>14</sup>C] アセチル CoA の存在下中鎖アシル CoA の炭素鎖を伸長した. 本反応は, マロニル CoA, ACP を必要とせず, セルレニン非感受性であり, FAS の反応と区別される. 縮合, 3-ケト還元, 脱水, エノイル還元 の 4 段階で進行し, 中鎖のアシル CoA に最大活性を示した. NADH, NADPH いずれでも進行したが, NADPH の場合は 3-ケト還元段階の pH 依存性により, 低 pH 範囲に限定された. 中間体の蓄積がなく, 最初の縮合が律速段階となるが, 共存するアシル CoA ヒドロラーゼも速度に影響していた. SH 阻害剤は縮合あるいは 3-ケト還元酵素に作用し, 反応を阻害した.

\*<sup>1</sup> 東北大学薬学部

\*<sup>2</sup> 東北大学医学部

### 赤色 3 号添加飼料によるラット甲状腺機能に対する影響について

嶺岸謙一郎, 紅林秀雄, 佐藤道夫, 西巻知子, 福岡正道, 田中 彰: 食衛誌, **27**, 156 (1986)

二社の食用赤色 3 号 (エリスロシン, ER) を 0% (対照), 0.25%, 1%, 4% 含有する添加飼料を作製し, SD 雄性ラット (7 週齢) に 10~15 匹を一群とし二週間の摂餌試験を行い, その血清中の T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の変動, さらに甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 活性, 血清中 ER 濃度を調べた.

4% 飼料群で体重増加の抑制が認められ, TSH レベルの変化は認められなかったが, TPO 活性は低下し, 血清中の T<sub>4</sub> は増加し, T<sub>3</sub> は減少が認められた. 二社の色素の粒子形の異なることから物理化学的性状による影響もあることが知られた.

### 等張酢酸溶液のウサギ外側広筋 (*M. vastus lateralis*) に対する局所障害性ならびにその投与部位の確認

落合敏秋, 松本清司, 関田清司, 内田雄幸, 川崎靖, 降矢 強: 実験動物, **34**, 399 (1985)

生理食塩液と等張にした 0.106%, 0.425%, 1.7% 酢酸溶液をウサギ外側広筋に注射し, その後 2, 7, 14 日目に筋肉を摘出し, 肉眼的および組織学的に検査した. 2 日目にみられた肉眼的および組織学的変化は, 用量および投与後の日数に依存して縮小あるいは回復した. これらの変化は, 種々の薬剤を筋肉内注射した時にみられる変化と同様であった.

これらの結果をもとにして現在「注射剤の局所障害性に関する試験法」(案) の改正がすすめられている.

### Spontaneous Diabetes-like Symptoms Appeared in the WBN/Kob Rat

Kazuma NAKAMA\*, Kazuhiro SHICHINOHE\*, Katsushi NAITO, Osayuki UCHIDA, Kazuo YASUHARA, Kazuo KOBAYASHI and Masuo TOBE: *Acta Diabetologia Latina*, **22**(4), 335 (1985)

WBN/Kob ラットの自然発がんを調べる目的で長期飼育を行ったところ, 生後約 9 ヶ月頃より床敷の汚染, 体重の減少などがみられ, そのときの尿糖反応は異常に高かった. また, 12 ヶ月目にグルコース負荷試験を行った結果, 0, 30, 60, 90 および 120 分目の平均血糖値は, 146.2, 389.5, 419.4, 416.6 および 487.4 mg% であった. 組織学的には膵臓の障害がみられ, このラットは自然発生糖尿病様を示すものと結論し

た。

\* 日本医科大学

### 緑青 (塩基性炭酸銅) のラットによる急性および慢性経口毒性試験

落合敏秋, 白井章夫, 松本清司, 関田清司, 内藤克司, 川崎 靖, 降矢 強, 戸部満寿夫: 食衛誌, 26, 605 (1985)

緑青の主成分とされる塩基性炭酸銅の急性および慢性経口毒性試験を Slc: Wistar ラットを用いて行った。急性毒性試験で, LD<sub>50</sub> 値は雄: 1350 mg/kg, 雌: 1495 mg/kg であった。慢性試験では 0, 70, 220, 670 および 2000 ppm 塩基性炭酸銅添加固形飼料を12ヶ月間投与した。2000 ppm 群で体重増加抑制 (雄, 雌), 血清 GOT, GPT, LDH の上昇が実験期間を通して観察された。組織学的には, 雌雄 2000 ppm 群で肝臓の単細胞壊死の発現数が有意に増加した。以上, 塩基性炭酸銅の 2000 ppm はラットに肝臓障害を起こすものと結論された。

### Effects of Oral Contraceptive Steroids (Norethisterone/Mestranol) on the Activities of Hepatic Drug-metabolizing Enzymes in Iron-deficient Anemic Rats

K. MIZOKAMI, K. SUZUKI\*<sup>1</sup>, K. INOUE, M. SUNO-UCHI, S. HIRAKAWA, S. GOTO, A. TAKANAKA and Y. KANKE\*<sup>2</sup>: *Experientia*, 41, 734 (1985)

鉄欠乏性貧血雌ラットにおける薬物代謝酵素系に及ぼす経口避妊薬 (ノルエチステロン 3mg+メストラノール 0.15 mg/kg, N/M) 投与の影響について調べた。対照群 (C) には Fe50 ppm 食餌を, 鉄欠乏性貧血群 (Fe (-)) には Fe 6~10 ppm 食餌をそれぞれ8週間あたえた。また C 食餌を4週間与え, さらに N/M を含む C 食餌を後半の4週間与えた C+N/M 群と, Fe (-) 食餌を4週間与え, ついで N/M を含む Fe (-) 食餌を後半の4週間与えた (Fe (-)+N/M) 群について, 肝臓の薬物代謝酵素系に与える影響を調べた。

Fe (-), Fe (-)+N/M の両群では血中ヘモグロビン量は, 対照群に比べ有意に減少した。Fe (-) 及び C+N/M 群では, それぞれ NADPH-チトクローム C 還元酵素活性, ヘキソバルピタル, アミノピリン, ベンツピレンの代謝活性は, 対照群に比べ有意に増加した。また, Fe (-) 群ではチトクローム P-450 (P-450) 量が増加した。これに対して Fe (-)+N/M 群でも P-450 が誘導され, 薬物代謝酵素系の増加がみられたが, Fe (-) および C+N/M 群とほぼ同程度で, 相加

的な増加は認められなかった。

以上の結果から, 鉄欠乏性貧血状態において, 経口避妊薬を投与しても肝臓の薬物代謝酵素系に著明な影響は認められなかった。なお, 鉄欠乏性貧血と経口避妊薬投与では誘導される P-450 の分子種が異なることが推測された。

\*<sup>1</sup> 東邦大学医学部産婦人科

\*<sup>2</sup> 東京農業大学栄養学教室

### Mechanism of Allyl Alcohol Toxicity and Protective Effects of Low Molecular-Weight Thiols Studied with Isolated Rat Hepatocytes

Yasuo OHNO, Kari ORMSTAD, David ROSS and Sten ORRENIUS: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 78, 169 (1985)

遊離肝細胞を用いて allyl alcohol の肝毒性発現機序の検討を行った。

allyl alcohol は肝細胞の GSH 含量を枯渇させ, それに遅れて viability を低下させた。この毒性には明らかな GSH 閾値が存在し, GSH が 1 nmol/10<sup>6</sup> cells 以上存在する場合は全く viability の低下が起こらず, それ以下ではほぼ 100% に近い細胞が viability を失った。また, 細胞内の GSH を増やす条件下では毒性は抑制され, 減少させる条件下では毒性が増強された。また, allyl alcohol の毒性は pyrazole で抑制され, 懸濁液中から acrolein と GSH との抱合化合物が検出された。これらの結果から allyl alcohol は alcohol dehydrogenase により代謝を受け, 反応性の高い acrolein を生成し, これは細胞内の GSH と速やかに結合し解毒されるが, GSH が枯渇すると細胞内の重要な構成因子と結合し細胞を死に到らしめるものと考えられた。

### Substrate Concentration Dependency of N-Nitrosodimethylamine and N-Nitrosomethylbenzylamine Metabolism in Rat Liver

Toru KAWANISHI, Yasuo OHNO, Atsushi TAKAHASHI, Akira TAKANAKA, Yutaka KASUYA\* and Yoshihito OMORI: *Carcinogenesis*, 6, 823 (1985)

ラット肝臓による N-ニトロソジメチルアミン (NDMA) と N-ニトロソメチルベンジルアミン (NMBa) の代謝を比較検討した。これらニトロソアミン 25 μmole/kg をラットへ経口投与した場合, 血清および肝臓中からの消失速度は NDMA の方が速かった。単離肝細胞による代謝消失を比較すると, ニトロ

ソアミンの初期濃度が 0.5 mM の時は、NMBeA の消失が速かったが、初期濃度が 6.7  $\mu$ M の時は逆転して NDMA の方が速くなった。次に肝ミクロソーム分画による脱アルキル化反応の基質濃度 (1  $\mu$ M ~ 1 mM) 依存性を調べた所、低濃度の NDMA は効率よく脱メチル化をうけることがわかった。以上の結果から発癌用量のニトロソアミンが投与された場合、肝臓では NMBeA より NDMA が効率よくメチル化物質へ代謝されていることが示唆された。

\* 東京大学薬学部

#### Formation, Toxicity and Inactivation of Acrolein during Biotransformation of Cyclophosphamide as Studied in Freshly Isolated Cells from Rat Liver and Kidney

Yasuo OHNO and Kari ORMSTAD: *Arch. Toxicol.*, 57, 99 (1985)

抗癌剤として広く使われているシクロフォスファミドの膀胱毒性の発現機構を遊離肝および腎細胞を用い検討した。

シクロフォスファミドは腎細胞には影響せず、肝細胞に対しては GSH の低下や viability の低下などの毒性の影響を示した。この作用は phenobarbital 前処置で増強され、metryprone で抑制された。一方、肝細胞懸濁液から細胞を除いた液を腎細胞懸濁液に加えると腎細胞に毒性が現れ、この懸濁液中から acrolein を検出した。acrolein の腎細胞毒性は即時的に現れるが、この懸濁液の影響は比較的ゆっくりと現れた。これらの結果からシクロフォスファミドの毒性発現には P-450 系による代謝的活性化が必要であり、肝で生成した中間体は速やかに細胞外へ出、血液を介して尿中に入り、膀胱中で分解し、アクロレインを生成し毒性を現すことが示された。

#### Determination of Acetylcholine and Choline in Rat Brain Tissue by Liquid Chromatography/Electrochemistry Using an Immobilized Enzyme Column Reactor

Masao ASANO, Takako MIYAUCHI, Takashi KATO, Katsunobu YAMAMOTO and Kannosuke FUJIMORI: *J. Liq. Chromatogr.*, 9, 199 (1986)

アセチルコリンエステラーゼおよびコリンオキシダーゼをガラスビーズに活性の低下のない安定した状態で固定化することに成功した。この固定化酵素カラムを C-18 (Nucleosil) カラムおよび EC detector と組合せ脳内アセチルコリンおよびコリンを高感度 (10

pmole オーダー) かつ簡単に測定できるようになった。

#### 生活環境中における胃癌発生要因

高橋道人: 臨床科学, 21, 71 (1985)

現在までのところ胃癌の原因が何であるのか明らかでない。しかし疫学的研究によれば外来性因子が極めて重要な要因であることが示唆されている。動物の実験胃癌モデルによる各種の胃癌発生要因の検討から、胃癌発生の要因とその関与の機序について総説的に述べた。内容は次の通りである。

はじめに

- I. 胃の発癌因子
  - II. 二段階発癌修飾
  - III. イニシエーターを修飾する因子
  - IV. 宿主側の修飾要因—潰瘍、胃炎の役割
  - V. 胃の部分切除後の発癌—残胃癌
  - VI. 食塩の役割
  - VII. 胃癌のプロモーター検索
- おわりに

#### Marked Epithelial Hyperplasia of the Rat Glandular Stomach Induced by Long-term Administration of Iodoacetamide

T. SHIRAI\*, M. TAKAHASHI, S. FUKUSHIMA\* and N. ITO\*: *Acta Pathol. Jpn.*, 35, 35 (1985)

ヨードアセトアミド (IAA) は潰瘍形成剤であるが、低濃度 (0.02%) の IAA をウイスター系雄ラットに飲料水として 74 週間投与した。胃癌の発生はなかったが、腺胃の著しい増生が見られ、胃低腺部の潰瘍ないしはびらんと共に腺性過形成が認められた。一部では偽浸潤像が粘膜下、肉芽、筋層内にまで認められた。しかし細胞および核の異形性はなかった。IAA によって傷害を受ける部位は、前胃との境界縁に沿った胃底腺領域粘膜であり、その部での異型的再生粘膜すなわち幽門腺化生がみられ、パラドキシカルコンカナバリン A 染色や HID-AB 染色で幽門腺と同様の反応を示した。しかしこの実験では腸上皮化生の形成は見られなかった。

\* 名古屋市立大学医学部第 1 病理学教室

#### 制癌剤の毒性試験と副作用

林 裕造, 前川昭彦: トキシコロジーフォーラム, 8, 3 (1985)

制癌剤は化学構造及び作用機序の観点からさまざまに分類されるが、本章では広義の細胞分裂阻害剤、即

ち細胞分裂サイクルに影響を与える薬剤を中心に、(1) 毒性試験の方法と考え方、(2) 臓器別にみた制癌剤の毒性と副作用及び(3) 制癌剤による癌の発生の三項目について記述し、それら制癌剤の毒性評価の問題点を考察した。

#### N-ニトロソ化合物の化学構造と臓器特異的発癌性

前川昭彦, 萩生俊昭\*, 中館正弘: トキシコロジーフォーラム, 8, 221 (1985)

N-ニトロソ化合物はその構造上大きく 1) Aliphatic nitrosamine (symmetric および unsymmetric nitrosamine) 2) Cyclic nitrosamine および 3) Nitrosamide に分けられるが、本章ではこれら N-ニトロソ化合物の構造別に現在までの N-ニトロソ化合物の癌原性に関する多数の報告の中から代表的な N-ニトロソ化合物の化学構造と発癌標的臓器との関係をまとめ、著者等のこれまでの一連の実験も加え N-ニトロソ化合物の臓器特異的発癌性 (organotropic carcinogenicity) について考察した。

\* 愛知県がんセンター研究所超微形態部

#### 環境化学物質の発がん性評価に関する国際協力研究

林 裕造: 癌と化学療法, 12, 579 (1985)  
 大多数の人ががんが環境発癌物質への曝露によるとの疫学的調査結果を契機として、がんの一次予防を目的とする国際協力研究が開始され、多数の化学物質について動物発癌試験が行われるに至った。本論文では、人での発癌性危険度を評価するための問題点について述べると共に今後の発癌研究やその評価についての課題を呈示し、国際協力研究のあり方について言及した。

#### High Incidences of Pheochromocytomas after Long-term Administration of Retinol Acetate to F344/Du Crj Rats

Y. KUROKAWA, Y. HAYASHI, A. MAEKAWA, M. TAKAHASHI and T. KOKUBO: *JNCL*, 74, 715 (1985)  
 雌雄 F344 ラットを用い、酢酸レチノール (RAC) の発癌性試験を行った。RAC は飲料水中に濃度 0.25 および 0.125% で加えて、104 週間投与し、108 週目に動物を全解剖後、病理組織学的に検索した。

その結果、0.25% 投与群の雌雄及び 0.125% 投与群雌において有意の副腎褐色細胞腫の発生が見られた。一方、雄の乳腺腫瘍、雌の甲状腺腫瘍および陰核腺瘍では有意の発生率の低下を認めた。以上の結果から、RAC はラットにおいて副腎の褐色細胞腫瘍の発生を

有意に増加させる作用のあることが判明した。

#### 発癌性評価における諸問題

林 裕造: 衛生化学, 31, 15 (1985)

最近、化学物質の発癌性評価の考え方が混乱しているといわれている。本論文では、有機塩素系化合物を中心に混乱の背景と混乱への対応策について言及した。

#### Lack of Carcinogenicity of 8-Nitroquinoline on Long-term *in vivo* Test in Hamsters

F. FURUKAWA, Y. KISHIMOTO, K. TOYODA, H. SATOU, M. TAKAHASHI and Y. HAYASHI: *J. Toxicol. Sci.*, 10, 101 (1985)

8-ニトロキノリンの癌原性はラットで、食道、前胃および肺について腫瘍発生がみられたが、ハムスターでのデータはない。

8 週齢の雌雄ハムスター 100 匹に、0.05% の割合で 10% エタノール水溶液に溶解した 8-ニトロキノリンを飲料水として 104 週間にわたり自由に摂取させた。

その結果、対照群と処置群の間に諸臓器の腫瘍発生頻度に大きな差は見られず、このような条件下では、8-ニトロキノリンはハムスターに対し癌原性を示さないことが明らかとなった。

#### 薬物誘発性脂質症 (薬物の蓄積と毒性)

林 裕造, 森本和滋, 前川昭彦: トキシコロジーフォーラム, 8, 468 (1985)

薬物誘発性脂質症に関する基礎的及び臨床的報告を病理学および物理化学の立場から、(1) 薬物誘発性脂質症の実例、(2) 薬物誘発性脂質症の病理所見、および (3) 薬物による脂質症誘発の機序について記述すると共に、脂質症を誘発する薬物の安全性評価について考察した。

#### Organ-specific Carcinogenicity of N-Methyl-N-Nitrosourea in F-344 and ACI/N Rats

Akihiko MAEKAWA, Chiaki MATSUOKA, Hiroshi ONODERA, Hiroyuki TANIGAWA, Kyoko FURUTA, Toshiaki OGIU\*<sup>1</sup>, Kunitoshi MITSUMORI\*<sup>2</sup> and Yuzo HAYASHI: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 109, 178 (1985)

雌雄 F344 ラットに 200 または 100 ppm の N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU) を、雌雄 ACI/N ラットには 200 ppm をそれぞれ飲料水として投与し、42 週目に全生存動物を屠殺・剖検し実験を終了した。両系

統のいずれの群にも中枢および末梢神経系の腫瘍が最も多くみられたが、これらの腫瘍の発生頻度や組織型には、系統、性あるいは用量による差異は認められなかった。これらの腫瘍に加え、舌および食道の腫瘍がF344ラット高用量群に好発したが低用量群ではむしろ腺胃腫瘍がより多くみられた。一方ACI/Nラットではこれら消化管の腫瘍はより少なく、代りに心および腎盂の腫瘍発生がみられた。これら2系統のラットにおけるMNUの臓器特異性を先のドンリュウラットにおけるそれと併せ検討した結果、MNUの経口投与における臓器特異性は系統ばかりではなく用量によっても影響される事が示された。

\*1 愛知県がんセンター研究所超微形態部

\*2 残留農薬研究所毒性部

#### Mouse Skin Melanoma Induced in Two Stage Chemical Carcinogenesis with 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene and Croton Oil

Haruo TAKIZAWA\*, Sei-ichi SATO\*, Hirono KITAJIMA\*, Sumie KONISHI\*, Kunio IWATA\* and Yuzo HAYASHI: *Carcinogenesis*, 6, 921 (1985)

4週齢雌のC57BL, DBA, CDF<sub>1</sub>, BDF<sub>1</sub>マウスに低濃度のDMBA (100 $\mu$ g/マウス)を1回背部皮膚に塗布した後、プロモーターとしてクロトンオイル(15 $\mu$ g/マウス)を週2回1年間塗布した。DBAを除いて25週までに皮膚に黒色斑が出現し、徐々に増加、増大していった。組織学的にこれらの腫瘍は黒色腫であり、悪性のものも多数認められた。これら黒色腫/悪性黒色腫の発生率はDBF<sub>1</sub> 80%, CDF<sub>1</sub> 70%, C57BL 30%, DBA 0%で、CDF<sub>1</sub>では移植可能なものも認められた。

\* 日本たばこ産業中央研究所生物実験センター

#### Effect of Nocardia Rubra Cell Wall Skeleton and Cyclophosphamide on Leukomogenesis Induced by N-Ethyl-N-Nitrosourea in Donryu Rats

Toshiaki OGIU\*<sup>1</sup>, Kyoko FURUTA, Chiaki MATSUOKA, Akihiko MAEKAWA and Ichiro AZUMA\*<sup>2</sup>: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 109, 173 (1985)

雌雄Donryuラットに400ppmのN-エチル-N-ニトロソ尿素(ENU)を飲料水として6週間投与し、ENUによる腫瘍発生に及ぼすNocardia rubra cell wall skeleton (N-CWS) およびサイクロフォスファミド(CP)の影響を検討した。ENU投与に引続き5回のN-CWSの投与は平均生存日数を僅かに延長させ

たがENUによる白血病の発生を抑制しなかった。一方、ENU投与に引続き2回CPを投与された群では中程度の生存日数延長及び白血病発生の抑制が認められたが、ENUのみの群と比べ有意差はみられなかった。これに対し、ENU投与に引続きN-CWSとCPを併用投与した群では生存日数の延長とともに有意の白血病発生抑制がみられたが、白血病以外の腫瘍発生には何ら抑制傾向はみられなかった。

\*<sup>1</sup> 愛知県がんセンター研究所超微形態部

\*<sup>2</sup> 北海道大学免疫科学研究所

#### Dose-related Enhancing Effect of Potassium Bromate on Renal Tumorigenesis in Rats Initiated with N-Ethyl-N-Hydroxyethyl-Nitrosamine

Y. KUROKAWA, S. AOKI\*, T. IMAZAWA, Y. HAYASHI, Y. MATSUSHIMA and N. TAKAMURA: *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76, 583 (1985)

食品添加物の一つである臭素酸カリウムの腎に対するプロモーター作用を報告したが、引きつづいてその作用の用量作用関係を知る為の実験を行った。

雄F344ラットに先ず、N-エチル-N-ハイドロオキシニトロサミンを2週間投与しその後、臭素酸カリウムを飲料水として濃度500, 250, 125, 60, 30, 15, 0ppmで2週間与えて、腎を病理組織学的に検索した。その結果、異型細胞葉の出現が30ppm以上の投与群で用量作用関係を示してみられたが、腎細胞腫瘍は500ppm投与群のみで有意に増加した。同時に検討した臭化カリには腎へのプロモーター作用は認められなかった。

\* 群馬大学医学部公衆衛生学

#### 第一次予防の可能性

林 裕造, 高橋道人: 癌85 (代謝22, 中山書店), 3 (1985)

癌の第一次予防の可能性につき、肯定的立場に立ち、環境化学物質の発癌性研究の成果を踏まえ、論じた。内容は以下の通りである。

はじめに

I. 第一次予防の目標

II. 第一次予防の前提

- 1) 人癌の原因の多くが環境中に存在していることを示唆する疫学的調査結果
- 2) 環境条件の相違と人癌発生状況の関係についての疫学的調査結果
- 3) 特殊環境条件における人癌の発生と環境要因と

の関連性を示す疫学的調査結果

- 4) 環境化学物質の動物発癌性試験ならびに関連試験成績
- 5) 癌の多段階発生を示す実験的事実
- 6) 癌の発生に多数の要因が関与しているという設定
- 7) 癌の多様性

Ⅲ. 単一発癌要因の制御による第一次予防の実例

Ⅳ. 多要因による発癌と第一次予防

Ⅴ. 第一次予防のストラテジー

おわりに

#### Lack of Evidence of Carcinogenicity of Technical-grade Piperonyl Butoxide in F-344 Rats: Selective Induction of Ileocaecal Ulcers

A. MAEKAWA, H. ONODERA, K. FURUTA, H. TANIGAWA, T. OGIU\* and Y. HAYASHI: *Fd. Chem. Toxic.*, **23**, 675 (1985)

ピペロニルブトキシド(工業用原体)の癌原性をラットを用いて検討した。F344 ラットは各群雌雄50匹よりなる3群に分け、検体は0.5または1%の割合で飼料に混じり2年間自由に摂取させた。対照群には検体を含まない飼料を同様の方法で与えた。対照群を含む全群に種々の腫瘍が認められたが、すべてこの系統のラットにみられる自然発生腫瘍と同じものであり用量相関をもった有意の腫瘍発生はみられなかった。この事より、この条件下ではピペロニルブトキシドはF344 ラットに癌原性を示さないと判断された。しかしながら雌雄の投与群に回盲部に限局した潰瘍の発生が用量相関をもって認められた。

\* 愛知県がんセンター研究所超微形態部

#### Sequential Observation of Thymic Lymphoma Development Induced in 10-Week-Old F344 Rats by N-Propyl-N-Nitrosourea

Toshiaki OGIU\*<sup>1</sup>, Yasufumi SAKURA\*<sup>2</sup> and Akihiko MAEKAWA: *Acta Pathol. Jpn.*, **35**, 1191 (1985)

N-プロピル-N-ニトロソ尿素(PNU)はF344 ラットに高率に胸腺リンパ腫を発生させる。この実験では、PNU 胸腺リンパ腫の発生機序を検討する目的でPNU 投与ラットの胸腺、脾、骨髓等を経時的に観察した。PNU 投与開始後より造血臓器は速やかに低形成状態となった。胸腺は低形成状態の後10週を過ぎる頃より過形成の状態がみられた。最初の胸腺リンパ腫は片側胸腺を含有するのみであったが、次第に両側に広がり16週目には骨髓への転移がみられるようになって

た。一方、骨髓の低形成は実験終了まで続き、脾赤髄での低形成も12週まで続いた。これらの結果は、PNU の標的細胞を含む骨髓の役割を否定できないが、PNU 誘発胸腺リンパ腫は胸腺に由来することを示している。F344 ラットの PNU-胸腺リンパ腫は実験的胸腺リンパ腫の良きモデルであると考えられる。

\*<sup>1</sup> 愛知県がんセンター研究所超微形態部

\*<sup>2</sup> 武田薬品中央研究所

#### 新規化学物質の安全性評価について

前川昭彦, 大森義仁: 有機合成化学, **43**, 962(1985)

新規化学物質の安全性評価について、中央薬事審議会、化学物質調査会において最近まとめられた化学物質毒性試験法指針の概略を簡単に紹介すると共に、化学物質の安全性評価の現状と問題点について記述した。

#### Relation between Development of Leukemia and Duration of N-Nitroso-N-Ethylurea Treatment in DONRYU Rats

T. OGIU\*, C. MATSUOKA, K. FURUTA and A. MAEKAWA: *JNCI.*, **75**, 743 (1985)

N-エチル-N-ニトロソ尿素(ENU)はドンリュウラットに赤芽球性白血病を発生させる強力な白血病誘発物質である。この実験に於いては、白血病発生とENU 処置の期間及び造血臓器の経時変化との関係を検討した。400 ppm ENU を0, 2, 4, 6, 8又は10週間投与した実験におけるラットの白血病発生率はそれぞれ、0, 26, 40, 75, 95及び100%であった。そのうち赤芽球性白血病の占める割合は0, 0, 20, 40, 95及び90%であり、白血病発生迄の潜伏期間は投与期間の長さと同関していた。ENU を投与し、造血器の経時変化をみた実験では、投与間もなく骨髓は低形成となり、6週目には最も高度となったが、その後次第に回復し、10週目には5例中2例に白血病の発生が認められた。

\* 愛知県がんセンター研究所超微形態部

#### 臭素酸カリウムの毒性及び発癌性について

黒川雄二: 抗酸菌病研究所雑誌, **37**, 139 (1985)

臭素酸カリウム(臭カ)にその酸化剤としての性質を利用して食品添加物として広く用いられてきたものである。臭カの発癌性試験は、厚生省がん研究助成金による研究班「突然変異性物質の動物発癌テストに関する研究」(班長、故小田嶋成和病理部長)の一研究として当所で行われた。その結果、臭カは雌雄F344 ラットに於いて、50及び250 ppmの濃度で飲料水と

して2年内投与すると、高率に腎細胞性腫瘍及び腹膜中皮腫を発生し、発癌性を示すことが確かめられた。この総説に於いては、臭カの化学的性質、毒性、変異原性、発癌性、プロモーター作用、代謝等の生化学的知見について述べた。

### Experimental Pancreatic Carcinogenesis in Syrian Golden Hamsters

M. TAKAHASHI: *Exp. Path.*, **28**, 147 (1985)

ハムスターにN-ニトロソビス(2-オキソプロピル)アミン(BOP)を皮下注射して得られる膵臓癌は、膵管由来で人間の膵臓癌の組織像と極めてよく類似している。

膵の分泌液のうちアミラーゼは重要な酵素であるが、膵炎の診断の際の意義については肯定的な報告が多い。しかし膵臓癌を含め他の膵臓疾患での意義については明らかでない。

実験的膵臓癌発生過程におけるアミラーゼ値の変動を調べてみると、P型アミラーゼ値の上昇と膵臓癌発生との間に相関が見られた。特に、尿中のP型アミラーゼ出現が、膵臓癌発生と相関しており、初期病変における局所性膵炎の発生がその原因と考えられた。

このような初期病変の特異的な変化は、膵臓癌のスクリーニングなどに利用できる可能性がある。

### Adenoma, Stomach, Rat

Michihito TAKAHASHI: *In: Digestive system* (T. C. Jones, et al. eds.) p. 296, Springer-Verlag, Berlin (1985)

ラット腺胃における腺腫の肉眼的形態像、能織学的特徴、電顕的所見、鑑別診断、生物学的特性を写真を用いて解説しており、他の動物種との比較も実施した。

腺腫は自然発生腫瘍として、まれに見られることがあるが、ある系のマウスでは好発する。実験的にはMNNGを飲料水としてラットに投与すると発生する。

腺腫は呼ばれる病変には2種類あり、内腔に突出するポリープ形のものにはポリープ状腺腫と呼ばれ、嚢胞状で下方へ向かって増殖する型ものは、腺腫様嚢胞または腺腫性憩室と呼ばれる。

この病変は実験胃癌の研究によれば、胃癌の初期病変と考えられ、前癌病変として位置づけられている。

### Leiomyoma and Leiomyosarcoma, Stomach, Rat

Michihito TAKAHASHI: *In: Digestive system* (T. C. Jones, et al. eds.) p. 310, Springer-Verlag, Berlin (1985)

ラット胃における平滑筋腫および平滑筋肉腫の肉眼的形態像、組織学的特徴、電顕的所見、鑑別診断、生物学的特性、他の動物種との比較を、写真を用いて解説してある。

平滑筋由来の腫瘍は、MNNGなどを用いた実験的胃癌研究における副産物として見られることが多い。

形態学的には紡錘形細胞が束状に走り、胞体はやや好酸性で、核は楕円形をなす。時に巨細胞を混じることがあり、悪性のもものでは核分割像を認める。

### Promoting Effect of Metal Compounds on Rat Renal Tumorigenesis

Y. KUROKAWA, M. MATSUSHIMA, T. IMAZAWA, N. TAKAMURA, M. TAKAHASHI and Y. HAYASHI: *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **4**, 321 (1985)

ラット腎2段階発癌モデルを用いて、5種の重金属(塩化亜鉛、塩化第2クロム、塩化カドミウム、塩化ニッケル、塩化第2水銀)のプロモーター作用を検索した。

F344ラット、雄を用い、最初の2週間N-エチル-N-ヒドロキシニトロサミンを投与し、その後種々の濃度で5種の金属を飲料水として25週間投与し、腎を病理組織学的に検索した。その結果、塩化ニッケルを投与した群に腎細胞腫瘍の有意の増加が見られ、腎に対してプロモーター作用を有することが示された。

### Lack of Promoting Effect of Sodium Chlorate and Potassium Chlorate in Two-stage Rat Renal Carcinogenesis

Y. KUROKAWA, T. IMAZAWA, M. MATSUSHIMA, N. TAKAMURA and Y. HAYASHI: *J. Amer. Coll. Toxicol.*, **4**, 331 (1985)

二酸化塩素による水道殺菌の際に生ずる、塩素酸ソーダ及び塩素酸カリウムの腎に対するプロモーター作用を、ラット腎二段階発癌モデルを用いて検索した。

雄F344ラットに先ず、N-エチル-N-ヒドロキシニトロサミンを2週間投与し、その後1%の塩素酸ソーダまたは塩素酸カリウムを飲料水として25週間投与して、腎を病理組織学的に検索した。その結果、両物質共に腎に対してプロモーター作用を示さないことが判明した。

### Intestinal Tumors Induced in the Rat by

### Various N-Nitrosoureas

T. OGIU\*<sup>1</sup>, A. MAEKAWA and T. NARISAWA\*<sup>2</sup>:  
In: Carl J. Pfeiffer, ed., **Animal Models for Intestinal Diseases**, 79, CRC, Florida (1985)

ヒト腸癌研究の際の動物モデルとして、ニトロソ尿素によるラット腸癌について、(1)種々ニトロソ尿素による腸癌の誘発(経口投与、直腸内投与、その他の投与)、(2)ニトロソ尿素誘発腸癌の病理(腫瘍発生部位及び肉眼所見、組織学的分類)、(3)ニトロソ尿素前駆物質による腸癌の発生、(4)MNU直腸内投与による腸癌の発生、(5)腸癌発生に影響を及ぼす環境要因等の項目で記述した。

\*<sup>1</sup> 荻生俊昭:愛知県がんセンター研究所 超微形態部

\*<sup>2</sup> 成沢富雄:秋田大学医学部 外科学教室

### Bladder Freeze Ulceration and Sodium Saccharin Feeding in the Rat: Examination for Urinary Nitrosamines, Mutagens and Bacteria, and Effects on Hepatic Microsomal Enzymes

R. HASEGAWA, M. K. ST. JOHN\*<sup>1</sup>, M. Cano\*<sup>1</sup>, P. ISSENBERG\*<sup>2</sup>, D. A. KLEIN\*<sup>2</sup>, B. A. WALKER\*<sup>2</sup>, J. W. JONES\*<sup>1</sup>, R. C. SCHNELL\*<sup>3</sup>, B. A. MERRICK\*<sup>3</sup>, M. H. DAVIES\*<sup>3</sup>, D. T. McMILLAN\*<sup>3</sup> and S. M. COHEN\*<sup>1</sup>: *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**, 935 (1985)

ラット膀胱の凍結潰瘍形成後、膀胱癌プロモーターであるサッカリンナトリウムを長期間投与すると有意な膀胱腫瘍の発生増加がみられ、凍結潰瘍形成は膀胱に対してイニシエーション作用をもつことが明らかとなっている。本実験では、そのイニシエーション作用に対応するような尿の変化がみられるか否かを検索した。5週齢雄 F344 ラットに膀胱凍結潰瘍形成後14日まで経時的に尿を採取し、Ames 試験による変異原性、ニトロソ化合物の有無、細菌の混入等について検索したが、すべて陰性であった。この事は、膀胱凍結潰瘍のイニシエーション効果は多くの膀胱発癌物質が尿中の最終発癌物質により作用するのとは異なり、尿の性状変化によるものではないことを示しており、発癌のメカニズムを考える上で興味ある所見である。

\*<sup>1</sup> アメリカ・ネブラスカ大学医学部病理

\*<sup>2</sup> ネブラスカ大学医学部エプリー癌研究所

\*<sup>3</sup> ネブラスカ大学薬学部

### Initiation of Urinary Bladder Carcinogenesis

### in Rats by Freeze Ulceration with Sodium Saccharin Promotion

Ryohei HASEGAWA, Robert E. GREENFIELD\*, Gen'i MURASAKI\*, Toru SUZUKI\* and Samuel M. COHEN\*: *Cancer Res.*, **45**, 1469 (1985)

ラット膀胱の凍結潰瘍形成後、0, 2, 4, 6, 18週後より5%サッカリンナトリウムを飼料に混じて2年間投与した。凍結潰瘍形成のみで39匹中1匹に移行上皮癌、サッカリン投与のみで39匹中1匹に乳頭腫が発生した。これに対し、凍結潰瘍形成後サッカリンを投与した群ではいずれも有意な膀胱腫瘍の発生を認めた。サッカリンの投与開始時期による差異はみられず、膀胱凍結潰瘍には明らかにイニシエーション作用のあることが確認された。この実験モデルは従来の二段階発癌モデルとは異なり遺伝毒性を示す化学物質を全く含まず単純に物理学的処置だけでイニシエーション作用が得られたことから、発癌のメカニズムを解明する上で重要であると考えられる。

\* アメリカ・ネブラスカ大学医学部病理

### Immunohistochemical Study of Keratin in Proliferative Bladder Epithelium Induced by Freezing, Cyclophosphamide or N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide in the Rat

Ryohei HASEGAWA and Samuel M. COHEN\*: *Carcinogenesis*, **6**, 409 (1985)

ラット膀胱粘膜の増殖性病変におけるケラチンの分布を免疫組織学的に検索した。動物は雄 F344 ラットを用い、ヒトの総ケラチンに対する抗体を使用した。膀胱発癌物質による過形成病変部では全層にわたって強い陽性がみられたが、移行上皮癌では陽性細胞の分布は一様でなく陰性細胞が増加する傾向であった。膀胱凍結潰瘍による過形成巣では、ケラチンの増加が顕著ではなく、発癌物質による変化とは異なっていた。同程度の膀胱発癌のイニシエーション作用を示しながら、凍結潰瘍と発癌物質には今日のケラチン蛋白の分布のほか種々の差異のあることが知られている。

\* アメリカ・ネブラスカ大学医学部病理

### Long-term Oral Administration of Potassium Bromate in Male Syrian Golden Hamsters

Naoko TAKAMURA, Yuji KUROKAWA, Yuko MATSUSHIMA, Takayoshi IMAZAWA, Hiroshi ONODERA and Yuzo HAYASHI: *Sci. Rep. Res. Inst.*

*Tohoku Univ. Series C.*, **32**, 43 (1985)

臭素酸カリウムの発癌性の種差を知る目的でハムスターでの長期経口投与実験を行った。

雄シリアンゴールドンハムスターに臭素酸カリウムを飲料水として濃度 2000, 500, 250, 125 ppm で 89 週間投与し、全臓器を病理組織学的に検索した。その結果、臭素酸カリウム投与群における腎細胞腫瘍の発生率は 9.3% (7/75) であり、対照群は 0% (0/20) であった。ハムスターにおける腎細胞腫瘍の自然発生率は極めて低いことから臭素酸カリウムはラットと同様ハムスターでも弱い発癌性を有することが疑える。

#### **Histologic Typing of Liver Tumors in Rats, Mice and Hamsters—a Workshop Report**

Yuzo HAYASHI: *Exp. Pathol.*, **28**, 140 (1985)

実験小動物の肝病変の病理組織学的分類を呈示した。この作成には 33 名の病理学者が関与し今後の検討のための基本となるべきものであろう。

#### **Mechanism of Metabolic Activation of the Analgetic Bucetin to Bacterial Mutagens by Hamster Liver Microsomes**

Takehiko NOHMI, Motoi ISHIDATE Jr., Akira HIRATSUKA and Tadashi WATABE\*: *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2877 (1985)

ブセチンは PCB 処理ハムスター肝由来 S9 存在下では、サルモネラ菌 TA100 に変異原性を示したが、同様に調製したラット由来 S9 存在下では変異原性を示さなかった。また、ブセチンの突然変異誘発能は、構造的に類似している同じ鎮痛薬であるフェナセチンの約 1/4 であった。PCB 処理ハムスター肝 S9 は、ブセチンを代謝して 2 種の直接変異原、N-ヒドロキシフェネチジン、パラニトロソフェネトールを産生した。その結果、ブセチンの代謝における種差は、肝ミクロゾームの脱アシル化活性の差によるものであることが示唆された。

#### **Effect of DNA Conformation on the Binding of Antibodies to Benzo(a)pyrene Diol-Epoxy DNA Adducts**

Hanoch SLOR\*, Gaither D. BYNUM, Jr.\*, Che-Hung LEE\*, Hiroshi MIZUSAWA and Tsuyoshi KAKEFUDA\*: *Gann*, **76**, 488 (1985)

DNA と発癌剤の複合体に特異的に結合する抗体が、複合体に結合する際 DNA の構造が重要な役割を荷なっていることを明らかにした。プラスミド ColE1DNA

を (+)-trans-7 $\beta$ , 8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ , 10 $\alpha$ -epoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydrobenzo(a) pyrene (BPDE) と混合し BPDE-DNA 複合体を得た。この DNA を熱、有機溶媒あるいは陽イオンで処理し、らせん構造を変化させた後、抗体を作用させ、その結合能を調べた。その結果、DNA に結合した BPDE は、DNA の二重らせんがゆるくなった場合露出され、抗体が結合しやすくなると考えられる。

#### **厚生省・細胞バンク計画とその現状**

水沢 博, 石館 基: トキシコロジーフォーラム, **8**, 481 (1985)

「対がん 10 年総合戦略」に基づき細胞バンクは設立されたが、それまでの経緯ならびにバンクの機構、運営について紹介している。

#### **細胞バンクの設立と運営状況**

水沢 博, 川瀬雅子, 佐々木澄志, 石館 基: 実験医学, **3**, 32 (1985)

細胞バンクは、昭和 58 年に発足した「対がん 10 年総合戦略」の基本方針に基づき、厚生省がん研究リサーチリソースバンクの一つとして、昭和 59 年 10 月 1 日に設立された。がん研究の重点プロジェクト研究に必要な、細胞、遺伝子を収集、保存、管理、供給することを目的としている。本稿では、以下、細胞バンクの組織、運営等について紹介している。

#### **バクテリアを用いる誘発突然変異頻度の測定法**

能美健彦, 松井道子, 石館 基: トキシコロジーフォーラム, **9**, 91 (1985)

生物に突然変異作用をもつ化学物質の強さは、生存細胞数当たり誘発される変異体頻度すなわち誘発突然変異頻度 (Induced-Mutation の Frequency, IMF) であらわされ、化学物質の突然変異誘発作用を定量的に比較、討論する際の基本となるものであり、最近、労働省の「労働安全衛生法」や厚生省の「医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドライン」でも、殺菌作用の強い化学物質については、IMF 法による試験の実施が求められている。そこで、以下、IMF 法の概要と意義、及び筆者らの研究室におけるその実際を紹介している。

#### **食品添加物の変異原性試験成績 (その 6) —昭和 59 年度厚生省試験研究費による—**

石館 基, 祖父尼俊雄, 岸美智子: トキシコロジーフォーラム, **8**, 85 (1985)

厚生省食品化学課の依頼により、日本食品添加物協会を通じて配布された天然添加物19種類について染色体異常試験を行った。さらに、神奈川県衛生研究所の協力を得て、天然添加物3種類についてマウス小核試験を行った。その結果、検体19種類のうち、陽性と判定されたものは、カキ色素、クチナン赤色素および精製没食子酸の3種類であった。また、サンダルウッドオイルでは染色体の構造上の異常は誘発されなかったが、倍数体の出現が認められた。小核試験を行った3検体はいずれも陰性の結果に終わった。

#### 変異原性試験法の適用に関する国内外の動向

石館 基：環境変異原研究，7，47 (1985)

変異原性試験は、発癌性物質のスクリーニングに広く起用されているばかりではなく、薬品、食品添加物その他の生活関連物質の安全性を評価する上でも、重要な役割を果たしてきている。本邦をはじめ、諸外国で検討されている変異原性試験法ガイドラインを参考とし、そこに示されている基本的な考え方について解説をくわえている。

#### 発癌性物質短期スクリーニング法に関する国際協力事業 (CSSTT/IPCS) 活動の現状

石館 基：トキシコロジーフォーラム，8，358 (1985)

CSSTT (Collaborative Study on Short-Term Tests for Genotoxicity and Carcinogenicity) の活動について、前回報告後の経過ならびに成果について報告する。本計画の目的は、発癌性が認められているにも拘わらず、Ames テストではかかりにくい化合物8種類と発癌性の知られていない化合物2種類、合計10種類の化合物について、Ames テスト以外の短期試験法を適用し、その結果から Ames テストを補足しうるような試験法を見い出そうとすることにある。7種類の試験法を行い、そのうち2, 3種類の試験法がうきぼりにされた。既知発癌物質すべてを陽性とする試験法は見い出せず、指標の異なるいくつかの試験法を組み合わせるべきことが示唆された。

#### ATCC 培養細胞部門の現状

祖父尼俊雄：実験医学，3，48 (1985)

ATCC (American Type Culture Collection) は各種生物系の標準株を、収集、保存、供給する機関として国際的に知られている。著者は、60年1月10日より1ヵ月間、ATCC の細胞培養部門 (Cell Culture Department) を中心として、培養細胞株の保存、品質管理、

供給などの運営状況を視察してきた。その現状を紹介している。

#### The Role of Solvent in the Partition of Procaine and p-Aminobenzoic Acid between Organic Solvent and Water

Satoshi OKADA, Hiroshi NAKAHARA, Chikako YOMOTA and Kenshu MOCHIDA: *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 4916 (1985)

Procaine (PC) とその加水分解産物 p-aminobenzoic acid (PABA) の種々の溶媒中への分配における溶媒の役割について極性、プロトン供与性/受容性、溶媒和の観点より検討した。Pentanol (PeOH)/Cyclohexane (CyH) 混合溶媒系における PC, PABA の分配挙動から PeOH の混合比の増加に伴い両溶質とも分配係数は増大するが、極性の変化に対して linear な関係は得られない。一方、溶媒の親電子性/求核性は PC 分配に対しては大きな影響を与えないが PABA の分配は異なる溶媒系での次のような変化がみられた; 求核性溶媒 > 両性溶媒 > 親電子性溶媒 > 不活性溶媒。

また PC, PABA のような極性溶質の分配においては適当な溶媒和剤の存在が必要であるが、両溶質とも両親媒性の溶質のためその選択性は必ずしも高くない。さらに PeOH, Ethylacetate, Chloroform を溶媒和剤とした時の PC, PABA に対する溶媒和数および抽出定数を求め溶質-溶媒間相互作用について考察した。

\* フナイ薬品工業(株)

#### みかん缶詰中のメチルセルロースの定量

四方田千佳子, 豊田正武, 伊藤智志男, 原田基夫: *日食工誌*, 32, 56 (1985)

みかん缶詰中のメチルセルロースは、多くの妨害物のため定量が困難であるとされていた。そこで妨害物の除去法を検討したところ、従来の Zeisel 装置およびガスクロマトグラフィーによる定量が可能となった。みかん缶詰を均質化し、遠心分離後上澄を採る。上澄を水に対して2時間透析後、減圧濃縮し、Toyopearl HW-60F カラム (1.5×30 cm) による分子ふるいで低分子妨害物を除いてから再び濃縮し、Zeisel 装置にかけた。ヨウ化メチルを酢酸エチルで捕集し、ガスクロマトグラフィーにより定量した。みかんの缶詰にメチルセルロースを0.1%添加したところ回収率は86%と良好であった。市販みかん缶詰11検体中3検体より0.0008~0.0015%のメチルセルロースが検出された。

#### Establishment of Residue Analysis of Pro-

**panil (Dichloropropionanilide) Linuron and Diphenamide in Agricultural Commodities**

Yoshio ITO, Hideyo SUZUKI, Shunjiro OGAWA, and Masahiro IWAIDA: *J. Food Protection*, **48** 320 (1985)

プロパニル、リニユロンおよびジフェナミドの3種の含窒素除草剤の系統的分析法を作製した。試料をアセトン抽出し、食塩水で稀釈後、ジクロロメタンで再抽出し、減圧乾固後、*n*-ヘキサン・アセトニトリル分配し、フロリジルカラムを用いて、アセトン・*n*-ヘキサン(2:8)で溶出した。ジフェナミドは直接、前2者は強力メチル化剤(CH<sub>3</sub><sup>-</sup>+NaH)でメチル化後、FTD-GCにより定量した。米、小麦、トウモロコシ、ジャガイモ、ニンジンおよびネギにおける本法の回収率は1および0.1 ppm 添加で、いずれも80%および70%以上の良好な結果が得られた。

**ガスクロマトグラフィーによる食品中のクエン酸モノ、ジおよびトリイソプロピルの分別定量**

辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤蒼志男, 原田基男: 食衛誌, **26**, 357 (1985)

クエン酸モノイソプロピル(M), ジイソプロピル(D)およびトリイソプロピル(T)の合成精製法を考察し、ついでこれらを標準品として用い、ガスクロマトグラフィー(GC)による食品中のM, DおよびTの分別定量法を確立した。食用油は*n*-ヘキサンに溶かし、バター又は粉乳は硫酸酸性条件下で酢酸エチルでM, DおよびTを抽出した。抽出液を5%重炭酸ナトリウム液で振とうしてMおよびDを分離後、硫酸酸性下酢酸エチルでMおよびDを再抽出した。一方、Tを含む有機層を*n*-ヘキサンに換えて、Tをアセトニトリルに移行させた。溶媒を留去後、MおよびDはジアゾメタンでメチル化し、Tは直接GCにより定量した。回収率は91.4%以上、検出限界は試料に対して1μg/gであった。

**化粧品中の天然ワックスの分析法について**

辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤蒼志男, 原田基夫: 日本化粧品技術者会誌, **19**, 79 (1985)

天然ワックス(パラフィン、マイクロクリスタリンワックス、セレンシン、ミツロウ、キヤンデリラロウ、カルナウバロウ、ラノリン、ゲイロウ、モクロウ)の成分分析ならびに化粧品からの系統的分析法を開発した。化粧品をベンゼン還流抽出後、フロリジルカラムで5つの画分に分画した。各画分の成分を薄層クロマトグラフィーにより定性試験を行った後、ガスクロマトグラフィー(GC)測定を行い、各々天然ワックス標

品との比較により、GCパターンから含有する天然ワックスの同定をし、主分画の特徴的なピークを基に定量を行った。口紅、チック、クリームに含有する天然ワックスは処方量に対して75%以上であった。

**輸入食品の現状**

伊藤蒼志男: 生活衛生, **30**, 2 (1986)

我が国の食糧総消費の約40%、穀類のみに限定すると67%が輸入に依存している。したがって輸入食品の食品衛生上の安全性を確保することは極めて重要な問題である。しかしそれらの実態はあまり知られていない。そこで下記の種々の角度から輸入食品について紹介した。

I. 輸入食品の実態: 輸入食品数量の年次推移・食品別輸入数量・輸出国別輸入数量・輸出国と食品種との関係。

II. 輸入食品の監視体系: 機構・検疫所、民間指定検査機関および国衛試の役割。

III. 輸入食品の法規を基にした違反状況: 年次別検査率と不合格率・違反検体と違反理由・輸出国別および食品別違反状況。

IV. 輸入食品検査: 輸入食品検査の特殊性・良く検査される食品種と検査項目・最近および過去の主な違反事例・検査方法の作製。

**カラムクロマトグラフィーによる食品中の遊離EDTAおよび金属キレート型EDTAの分別定量**

浜野 孝\*, 三ツ橋幸正\*, 田中喜作\*, 松本幸夫\*, 外海泰秀, 中村恵三, 伊藤蒼志男: 食衛誌, **26**(6), 630 (1985)

食品をpH 8.5で透析して得た試験溶液を分離用イオン交換カラムに流し、遊離型EDTA(EDTA-2Na)と金属キレート型EDTA(EDTA-metals)を分離した。両EDTAをそれぞれEDTA-Cuに変換して高速液体クロマトグラフ(HPLC)法で定量し、後者はEDTA-Caとして算出した。ただし、EDTA-Feのみは遊離型EDTAと同一挙動を示したので、HPLC上で分別定量した。各種食品にEDTA-Ca 250 ppm 添加したときの回収率は92.4%以上であった。EDTA-2Naは大部分が金属キレート型EDTAとして回収率されたが、遊離型との合計は91.2%以上であった。

\* 神戸市環境保健研究所

**ガスクロマトグラフィーによる食品中の有機塩素系、有機リン系、カーバメート系等8種農薬の系統的分析法**

小林加代子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 衛生化学, 31, 414 (1985)

キントゼン, クロロタロニル, ジスルホトン, IBP, BPMC, プロボキスル, アラクロール, トリフルラリンの系統的分析法を設定した。

農薬はアセトンおよび30%含水アセトンで試料から同時に抽出し, 20%ジクロロメタン含有ヘキサン層へ再抽出した。この有機層は濃縮し, アセトニトリル・ヘキサン分配で精製後, シリカゲルおよび活性炭からカラムで分画し, 電子捕獲型または熱イオン化検出器付きガスクロマトグラフで定量した。

#### 食品中の各種乳化剤の分析法

四方田千佳子, 豊田正武, 伊藤誉志男: 食衛誌, 27, 37 (1986)

食品に使用される5種の乳化剤のうち, レンチンを除く, プロピレングリコール脂肪酸エステル (PE), グリセリン脂肪酸エステル (GE), ソルビタン脂肪酸エステル (SE) およびショ糖脂肪酸エステル (SuE) の4種についての系統的分析法を作成した。食品中より乳化剤をテトラヒドロフランで抽出し, シリカゲルカラムで精製した。エーテル-クロロホルム混液(1:99)で妨害物を除去後, メタノール-クロロホルム混液(5:95)で PE, GE および SE のイソソルバイド部分を, メタノールで SE のソルビタン部分および SuE を溶出させた。それぞれの画分は TMS 化後ガスクロマトグラフで分析した。各種食品に乳化剤を 0.1% 添加したときの回収率は PE, GE および SE では 90%, SuE では 38.6~98.0% であった。検出限界は PE, GE で 10 ppm, SE, SuE で 50 ppm であった。

#### 2,6-ジクロロキノロンクロイミドとの結合反応を利用した食品中 BHA の抽出・比色定量法

小林加代子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 日食工誌, 33, 134 (1986)

食品から n-ヘキサンに抽出した BHA は, 2,6-ジクロロキノロンクロイミドを含むエタノール・ホウ酸緩衝液 (1:1) 混液と振り混ぜることにより選択的に水層へ移行した。このとき, 試料中に BHA が存在すれば水層は明良な青色を呈する。ついで BHA 呈色物は酢酸 n-ブチル層へ再抽出し, 比色定量した。食品に 20 および 200 ppm 添加した BHA の本法による回収率はそれぞれ 78.1% および 86.0% 以上であり, 本法による食品中 BHA の検出限界は 1 ppm であった。

#### 各種環境汚染物のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に

#### 対する致死毒性におよぼす飼育水温の影響

辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 加納晴三郎: 衛生化学, 32, 46 (1986)

小止水系を用いて 89 種の環境汚染物の LC<sub>50</sub> 試験が低温 (10°), 中温 (20°), 高温 (30°) で行われた。水難溶性溶解剤について, 30° での安全量を測定し, 10% エーテル・ジメチルスルホキシド溶液が一番安全であった。種々の汚染物の温度の影響について観測し, 4 群に分類できた。

- 1 群: 温度が変化しても毒性に影響がない。
- 2 群: 中温 (20°) での毒性が最も強い。
- 3 群: 温度が上昇すると毒性が減少する。
- 4 群: 温度が上昇すると毒性が増強される。

#### 食用タール色素およびその不純物の分析法

外海泰秀: 科学と工業, 59, 481 (1985)

食用タール色素の純度試験法の改良と食品中の合成ならびに天然色素の系統的分析法の開発について検討した。

色素原未の純度試験においては, 塩化物および硫酸塩試験を電位差滴定法に, ヒ素試験および重金属試験を原子吸光法に改良した。また主色素および有機性不純物の定量に, 高速液体クロマトグラフィーを適用した。

食品中色素の分析法には液状陰イオン交換体であるアンバーライト LA-2 を用いる検液調製法を考案し, 定性法としてペーパークロマトグラフィーならびに薄層クロマトグラフィー条件の設定および定量法として高速液体クロマトグラフィー条件の設定を行なった。

#### Studies on the Specific Retention Ratio on Gas-Liquid Chromatography of Acyclic Saturated Hydrocarbons by Means of Lennard-Jones (12,6) Potential Force Constants

Yoshio SASAKI\*, Tetsuya TAKAGI\*, Su-lan HSIU\* and Keizo NAKAMURA: *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3385 (1985)

粘度と第 2 ビリアル係数から求められたレナードジョーンズの作用エネルギー  $\epsilon/k$  と第 3 法則エントロピー  $S_{298}^0$  との間に相関関係が存在することから, 未知の飽和炭化水素の作用エネルギー  $\epsilon/k$  を推算することができた。

また, ガスクロマトグラフにおける溶質と固定相および移動相の分散力がエネルギーの混合則を使って相互作用の差として求めることができるが, その平方根  $\epsilon^{1/2}$  がガスクロの保持比の対数値 ( $\log \tau$ ) と相関関係

が認められたことから、飽和脂肪族炭化水素の保持比が標準エントロピー  $S_{298}^0$  と相関関係が存在するという結果が理解される。

\* 大阪大学薬学部

### 化粧品中の乳化剤の分析法—非イオン界面活性剤のエステル類4種についての系統的分析法—

四方田千佳子, 中村恵三, 伊藤善志男: 日本化粧品技術者会誌, 20, 5 (1986)

化粧品中のプロピレングリコール脂肪酸エステル (PE), グリセリン脂肪酸エステル (GE), ソルビタン脂肪酸エステル (SE) およびシヨ糖脂肪酸エステル (SuE) のモノエステルの系統的分析法を開発した。化粧品を凍結乾燥後, 乳化剤をテトラヒドロフランで抽出し, シリカゲルカラムで精製後, 2つの画分に分けて TMS 化し, ガスクロマトグラフィーで定量した。クリーム, クレンジングクリーム, ローション, クレンジングローションに0.1%または0.5%添加したところ, いずれの乳化剤も82.5~100%と良好な回収率が得られた。検出限界は, PE, GE で10 ppm, SE, SuE で50 ppmであった。

### Ultrafiltration Removal of Native and Heat-decomposed Bacterial Pyrogen (LPS)

Yoshiyuki OGAWA, Hironoshin KAWASAKI and Seizaburo KANOH: *Japan. J. Pharmacol.*, 40, 135P (1986)

LPS の定量的分析法, すなわち, カルボシアニン色素を用いた比色法により LPS および加熱分解した LPS の限外ろ過による除去について検討した。LPS は *E. coli* UKT-B より温フェノール法で抽出し, エタノールで部分精製あるいは超遠心機により高度に精製した。LPS を各種濃度に蒸留水に溶解して, 種々の孔径の膜 (Amicon) によりろ過した。

部分精製した LPS を公称分画分子量限界  $3 \times 10^5$  の XM 300 膜でろ過したとき, LPS の除去効率は試料濃度に依存した。すなわち, LPS の総ろ過量は  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  のとき52%,  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  のとき20%,  $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$  では2%であった。LPS は公称分画分子量限界  $3 \times 10^4$  の PM 30 膜を通過しえなかった。大腸菌の自己融解により自然に遊離した LPS もまた PM 30 膜を通過できなかった。

これに反して, 純粋の LPS を  $100^\circ$  30分間あるいは  $121^\circ$  30分間加熱して調製した加熱分解 LPS は PM 30 膜や公称分画分子量限界  $10^4$  の PM 10 膜すらも通過することができた。熱分解 LPS の比色分析において

は, 元の LPS の吸収極大が  $470 \text{ nm}$  であったものが, より短波長の  $450 \text{ nm}$  付近にシフトしていた。さらに *Limulus amoebocyte lysate* の凝固活性では, 公称分画分子量限界  $10^4$  以下の加熱分解 LPS では元の LPS の活性に比べ  $1/100,000$  に活性が低下し, また公称分画分子量限界  $10^4 \sim 3 \times 10^4$  の加熱分解 LPS では  $1/100$  に活性が低下していることがわかった。

### 滅菌法によるバイロジェンの不活化

小川義之, 製薬工業, 6, 274 (1986)

一般に注射薬等に混在するバイロジェンは細菌汚染に起因するものであり, 主としてグラム陰性菌由来の内毒素である。内毒素は多くのグラム陰性菌の細胞壁の外膜に局在するが, 特に *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* 等の菌に多く認められる。一方, 注射薬はもちろんのこと注射蒸留水, 輸液, その他各種の医療用器具ではバイロジェンフリーであると同時に無菌であることが要求されている。滅菌対象物の種類により各種の滅菌法が日本薬局方に記載されている。その中でバイロジェン, すなわちリポ多糖の除去あるいは不活化に有効なものを紹介し, 除去, 不活化機構についても著者らの成績を含めて論述した。

### 発熱物質とリムラステスト

加納晴三郎: *J. Antibact. Antifung. Agents.* 13, 501 (1985)

発熱性物質試験としてのウサギを用いるバイロジェンテストにおける発熱物質とその発熱機構およびカプトガニの血球成分がバイロジェンと反応して形成されるゲル化反応を利用するバイロジェンの *in vitro* での試験法であるリムラステストのテスト法とその反応機構などについて解説し, さらに公定法としての発熱性物質試験法と, 近時急速に普及したりムラステストとの相関性について詳述した。

### A Possible Mechanism of the Potentiation of the Fetal Toxicities of Salicylates by Bacterial Pyrogen

Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOH: *Teratology*, 33, 54A (1986)

アスピリン (ASA) および代謝産物サリチル酸 (SA) はラット (妊娠15日) に投与すると, 胎仔の死亡・吸収, 発育不良や骨格の変異を誘導するが, 細菌性発熱物質 (LPS,  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  i. v.) の投与でこの作用は著しく増強された。この時の胎仔内 SA 濃度は対照群に比し

著明に増加していた。LPSを投与した時の母体血清の総蛋白及びアルブミン(Alb)濃度は低下しており、遊離脂肪酸(FFA)は増加していた。この時、血清蛋白当たりのSA結合能は著しく低下していたが、活性炭でFFAを除去すると回復した。LPS投与時の胎仔血でのFFA及びAlbの濃度の変化は少なく、また蛋白のSA結合能の低下も小さかった。以上から、ASA及びSAの胎仔毒性のLPSによる増強は、母体血中のFFAの増加およびAlbの減少により非結合性SAが増加し、胎仔への移行が促進されたことによるものと考えられた。

#### Effect of Sodium Erythorbate on Pregnant Rats and Their Offspring (Studies on the Fetal Toxicity of Food Additives. I)

Makoto EMA, Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOH: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 26, 448 (1985)

エリソルビン酸ナトリウムの胎仔毒性をウイスターラットを用いて検討した。妊娠7日から14日まで5, 0.5または0.05%のエリソルビン酸ナトリウムを含む飼料を与えた。いずれの投与群にも母体に対する影響はみられなかった。妊娠20日の胎仔を調べたところ、子宮内死亡率、胎仔数、胎仔の性比、胎仔体重及び胎盤重量には各投与群と対照群との差はみられなかった。胎仔の外表、骨格及び内臓検査の結果、いずれの投与群にも催奇形性は示されなかった。エリソルビン酸ナトリウムを与えた母体から得た仔の生後発育を調べたところ、いずれの投与群でも良好な仔の発育がみられた。以上の結果から、エリソルビン酸ナトリウムは本実験条件下ではラットに対する催奇形性を示さないものと考えられた。

#### Effect of Potassium Metabisulfite on Pregnant Rats and Their Offspring (Studies on the Fetal Toxicity of Food Additives. II)

Makoto EMA, Takafumi ITAMI and Seizaburo KANOH: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 26, 454 (1985)

メタ重亜硫酸カリウム(MBS)の胎仔毒性をウイスターラットを用いて検討した。妊娠7日から14日まで10, 1または0.1%のMBSを含む飼料を与え、妊娠20日に胎仔を検査し、また、自然分娩させて得た仔の生後観察を行った。10%投与群において、妊娠ラットの摂餌量の低下、母体重と胎仔体重増加の抑制がみられ、仔の生後の生存率がやや低下した。妊娠中の母体の栄養不良がこれらの原因の一つと考えられた。しかし、胎仔の外表、骨格及び内臓検査では催奇形性は示され

ず、1及び0.1%投与群では妊娠末期胎仔及び仔の生後発育に対する影響は認められなかった。以上の結果から、MBSは本実験条件下においてはラットに対して催奇形作用は示さないものと考えられた。

#### Effect of Disodium Glycyrrhizinate on Pregnant Rats and Their Offspring (Studies on the Fetal Toxicity of Food Additives. III)

Takafumi ITAMI, Makoto EMA and Seizaburo KANOH: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 26, 460 (1985)

甘味料、グリチルリチン酸二ナトリウム(NaG)のラット胎仔に及ぼす毒性を検討した。妊娠0日から20日の間にNaGを2, 0.4及び0.08%含む飼料で飼育し、妊娠20日に胎仔を観察した。別の1部は分娩させ新生仔の発育状態を観察した。妊娠期間中の飼料摂取量および体重の増加は、どのNaG投与群も対照群と有意な差は認められなかった。胎仔の骨格および内臓検査でも催奇形作用は認められなかった。黄体数、着床数、生存胎仔数、死亡胎仔数、胎盤重量、胸骨核および尾雄骨の化骨数、新生仔の性比、新生仔の生存率および体重の増加などにNaG投与群と対照群の間の有意の差は認められなかった。以上から、NaGはこの条件下では胎仔毒性は示さないものと考えられた。

#### 殺虫剤および食品添加物などのラットにおける胎仔毒性に関する研究(第7報) Hexabromocyclododecaneの胎仔毒性

村井敏美, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 応用薬理, 29, 981 (1985)

Hexabromocyclododecane (HBCD)を1, 0.1および0.01%濃度に添加混合した飼料を、妊娠ラットの妊娠0日から20日まで摂取させて母体ならびに胎仔に及ぼす影響について検討した。母体に及ぼす影響としては、1%投与群で肝臓重量が有意に増加したことを除いて特に異常は認められなかった。また胎仔についても胚致死作用あるいは胎仔致死作用は認められず、外表、骨格、内臓の諸検査においても異常例は見い出されなかった。さらに母体の分娩、哺育状況ならびに出生仔の生後発育においても、検体投与によると考えられる異常はいずれの投与群にも観察されなかった。以上の成績から、本実験の範囲内ではHBCDのラットに対する催奇形性は示さないものと考えられた。

坐剤漏出防止栓付ウサギ用直腸体温計感温部の試作  
江馬 真, 伊丹孝文, 加納晴三郎: *Exp. Anim.*, 35, 181 (1986)

解熱坐剤の効力をウサギを用いて検討するためにサーミスター式体温計の感温部を、坐剤の漏出が防止できるように改良した。今回試作した感温部のうち、3枚の円盤状ゴム栓を取付けた感温部では、首架式保定器に保定した通常姿勢のウサギの直腸内に坐剤を投与したときの直腸からの薬物の漏出を完全に防止できた。また改良した感温部あるいは漏出防止栓のない従来の感温部を使用して、細菌性発熱物質を投与したウサギ直腸温を測定したところ、両感温部の検温性能に差はみられなかった。

これらの結果から、今回改良した感温部は解熱坐剤の効果を検討するために有用であると考えられた。

#### Antipyretic Effect of Indomethacin Suppository in Rabbits

Takafumi ITAMI, Makoto EMA and Seizaburo KANOH: *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 265 (1986)

現在まで動物を用いて解熱薬坐剤の効果を検討した報告はみあたらない。そこで著者らの改良した坐剤漏出防止栓付ウサギ用直腸体温計感温部 (Exp. Anim., 35, 181, 1986) を用いてインドメタシン (IM) 坐剤の解熱効果を検討した。ウサギ直腸内に IM 坐剤 (IM 25 mg) を投与した時、正常体温への影響は認められなかった。細菌性発熱物質 (LPS, 0.2 µg/kg i. v.) を投与して発熱させたウサギに IM 坐剤を投与したところ、IM の投与量 (6.3~23.7 mg/body) に対応した解熱効果がみられた。IM 坐剤の解熱効果は、同じ用量の IM を溶液として静注または懸濁液を経口投与した時よりも強力であった。

以上のことから、IM 坐剤の直腸内投与では静注に劣らない強い解熱効果が得られることが明らかになった。

#### Antipyretic Mechanism of Indomethacin in Rabbits

Takafumi ITAMI, Makoto EMA and Seizaburo KANOH: *J. Pharmacobio-Dyn.*, 9, 271 (1986)

インドメタシン (IM) の解熱機構を細菌性発熱物質 (LPS, 0.2 µg/kg i. v.)、白血球性発熱物質 (LP, 2 ml/kg, i. v.) および 2,4-ジニトロフェノール (DNP, 20 mg/kg, i. m.) で発熱させた雄ウサギを用いて検討した。IM の半減期は血中では初期24分、1時間以後72分で

あったが、LPS で発熱させたウサギではそれぞれ 21分および51分であった。LPS 及び LP で発熱させたウサギでは IM (5 mg/kg i. v.) で解熱効果は著しかったが、DNP 発熱ウサギでは効果は認められなかった。LPS 発熱ウサギに IM を大槽内に 0.013 mg/kg 投与すると強い解熱効果がみられた。LPS 投与後の血中の LP 出現に対する IM (10 mg/kg, i. v.) の影響はなかった。また *in vitro* での白血球の LP 産生も IM (10 µg/ml) の阻害を受けなかった。IM は正常体温には影響しなかった。以上から、IM は中枢での発熱機構を抑制するものと考えられた。

#### 薬用植物栽培の動向

佐竹元吉：薬局，37(2)，(1986)

薬用植物栽培の動向について、国内栽培植物の現状を述べ、現在、品種改良保存の重要性をミシマサイコを例にとって述べている。更に新しい技術の導入として、組織培養の応用や植物工場の利用にふれ、筑波で新しく出来た薬用植物遺伝資源貯蔵室の役割を述べている。

#### 植物組織培養における培地固型化剤の役割

下村講一郎，鎌田 博：植物組織培養，3，38 (1986)

植物組織培養で種々の条件については検討されるが、あまり問題とされないのが培地固型化剤の選択である。固型化剤は、現在培養目的に合ったものが市販され、また、寒天の精製状態により好結果が得られている。最近入手したゲルライト (正式名 Gellan Gum) と寒天とを使用して、ウスユキクチナグサとセンキュウを用いて両者固型化剤を比較したところ、ウスユキクチナグサでは不定根形成がゲルライトでは寒天の約 2.5 倍、生育は非常に良好であった。センキュウもゲルライトの使用で不定芽形成が約 2 倍と良好であった。なお、同様の報告が種々の植物で研究され、全ての植物種においてゲルライトが寒天より良好な結果が得られるとは限らない。

次に問題点であるが、これはある植物種の酵素により分解されたり、凝結水が若干多いのが気になる。しかし、他の利用法も開発されている。培養の目的に合った他の固型化剤についての報告もかなりあり、各々の目的に合った固型化剤の選択が可能となるものと思われる。

- 宮原 誠, 神谷庄造: 尿素誘導体のニトロソ化における二, 三の閉環反応について  
第17回複素環化学討論会 (1985. 8. 29)
- 宮原 誠, 宮原美知子, 神谷庄造: 置換尿素類の N-ニトロソ化による閉環反応—3—  
日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)
- 宮原美知子, 宮原 誠, 神谷庄造: 各種ニトロソ尿素誘導体の抗腫瘍スペクトラムの比較検討  
日本癌学会第44回総会 (1985. 10. 31)
- 宮原美知子, 神谷庄造, 末吉祥子: 複素環置換  $\alpha$ -アミノ酸類および環状  $\gamma$ -アミノ酸類と Formaldehyde の反応  
日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)
- 丹野雅幸, 末吉祥子: 1-アリル-1-ニトロソ尿素化合物におけるニトロソ基の転位とニトロ体の生成  
日本化学会第51秋季年会 (1985. 10. 5)
- 末吉祥子, 丹野雅幸: 1-Aryl-1-nitrosourea 類の Conformation と分解反応  
第12回反応と合成の進歩シンポジウム (1985. 11. 9)
- 丹野雅幸, 末吉祥子: N-(p-置換フェニル)-N-ニトロソ化合物の分解反応—ニトロ化合物の生成について  
日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)
- 内山 充: 今後の大衆薬について  
第18回日本薬剤師会学術大会 (1985. 9. 28)
- 内山 充: 有害物質の定量的危険度評価—その方法と応用—  
第26回大気汚染学会 (1985. 11. 12)
- 内山 充: 実質安全濃度の毒性学的考察  
第26回大気汚染学会 (1985. 11. 12)
- 内山 充: 化学物質のリスクアセスメントに関する問題について  
昭和60年度環境科学セミナー (1986. 2. 28)
- 緒方宏泰\*, 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 内山 充: 内服固形剤のバイオアベイラビリティの変動要因の検討  
第1回クリニカルファーマシーシンポジウム (1985. 6. 6)
- \* 明治薬科大学
- Nobuo AOYAGI, Hiroyasu OGATA\*, Nahoko KANIWA and Mitsuru UCHIYAMA: Differences in Oral Drug Bioavailability between Humans and Beagle Dogs  
The 3rd Japanese-American Congress on Pharmacokinetics and Biopharmaceutics (1985. 7. 22)
- \* 明治薬科大学
- 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 内山 充, 緒方宏泰\*: 局方インドメタシンカプセルの溶出試験法について  
第22回全国衛生化学技術協議会 (1985. 10. 8)
- \* 明治薬科大学
- 青柳伸男, 鹿庭なほ子, 武田 寧, 内山 充, 緒方宏泰\*: ヒト, 動物におけるグリセオフルビン製剤のバイオアベイラビリティに及ぼす食餌の影響  
日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)
- \* 明治薬科大学
- 香取典子, 松田りえ子, 武田 寧, 内山 充: 市販製剤の重量偏差と含量均一性の関連, LA による, 試料の前処理からデータ処理までの流れ  
日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)
- 吉岡澄江, 柴崎利雄, 内山 充: 薬物の固体状態における加水分解および酸化分解の速度に及ぼす湿度の影響  
第6回製剤の開発と評価シンポジウム (1985. 10. 11)
- 阿曾幸男, 吉岡澄江, 柴崎利雄, 内山 充: 製剤の光学純度について (1)—レボドパ製剤—  
日本薬学会 106 年会 (1986. 4. 3)
- 吉岡澄江, 阿曾幸男, 柴崎利雄, 内山 充: 製剤の光学純度について (2)—ピロカルピン製剤—  
日本薬学会 106 年会 (1986. 4. 3)
- 石橋無味雄, 吉岡澄江, 阿曾幸男: 蒸発残分試験法について  
第22回全国衛生化学技術協議会年会 (1985. 10. 9)
- 石橋無味雄, 吉岡澄江, 内山 充, 渡辺俊文\*, 高井

信治\*2: 経口投与カリウムイオン吸着剤としてのゼオライトの基礎的検討

第1回エル・エス・ティ学会 (1985. 2. 1)

\*1 東京大学・医科研

\*2 東京大学・生研

松田りえ子, 武田 寧, 内山 充: カルボキシル基を持つ医薬品の比色分析法

第22回全国衛生化学技術協議会年会 (1985. 10. 9)

大野昌子, 島峯望彦, 高橋一徳, 寺本真人\*, 角田健司\*, 渡辺富雄\*: 向精神剤のマイクロクリスタルテスト IV

第70次日本法医学会総会 (1986. 5. 15)

\* 昭和大学医学部

徳永裕司, 木村俊夫, 山羽 力: 液体クロマトグラフ法によるジギタリス配糖体の定量 I. ジゴキシン含有錠剤, 散剤および注射液への応用

第22回全国衛生化学技術者協議会年会 (1985. 10. 9)

徳永裕司, 丹野雅幸, 木村俊夫, 山羽 力: ピロールによるコルチコイドの定量 V. 呈色物質の検索

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

新見伸吾, 押沢正, 早川堯夫, 山羽 力: 化学合成ヒト成長ホルモン遺伝子の発現蛋白質の精製と蛋白質化学的検討

第58回日本生化学会 (1985. 9. 27)

太田美矢子, 木村俊夫, 山羽 力: 高速液体クロマトグラフィーによる国際標準品原料のインシュリンの分析

第22回全国衛生化学技術協議会 (1985. 10. 9)

太田美矢子, 木村俊夫, 山羽 力: 高速液体クロマトグラフィーによるオキシトシンの分析—製剤への応用と生物活性との相関性について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

谷本 剛, 福田秀男, 山羽 力: Benzyl oxazolecarbamate 誘導体のアルドース還元酵素に対する阻害効果

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

内田恵理子, 渡辺恵史\*, 大沢利昭\*: ヒトメラノーマ細胞株に対するモノクローナル抗体の作製とその応用

性の検討

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 31)

\* 東京大学薬学部

藤本貞毅\*, 水谷淳\*, 石光 進\*, 小原 晃\*, 早川堯夫: 白血球による Phenylalanine の非酵素的水酸化反応—食作用時に生産する水酸ラジカル検出の試み—

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

\* 京都薬科大学

Yoshihiko OISHI\*1, Toyohi MACHIDA\*1, Akira TANAKA and Hideo YAMADA\*2: Estimation of <sup>99m</sup>Tc-DMSA Renal Uptake using Single Photon Emission Computerized Tomography

6th International Symposium on Radionuclides in Nephrology, Lausanne, Switzerland, May 5, 1986

\*1 東京慈恵会医科大学泌尿器科

\*2 東京都養育院

池淵秀治, 手島玲子, 寺尾允男, 山根靖弘\*: 鉛の胆汁排泄に及ぼす diethylmaleate 及び actinomycin D の影響について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

\* 千葉大学薬学部

鈴木和博, 手島玲子, 永松国助, 沢田純一, 池淵秀治, 寺尾允男: ヒト成長ホルモンレセプターの精製とその性質について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

手島玲子, 鈴木和博, 池淵秀治, 寺尾允男: ラット好塩基球細胞からのセロトニン遊離における膜蛋白質リン酸化反応の関与

第58回日本生化学会大会 (1985. 9. 27)

手島玲子, 鈴木和博, 池淵秀治, 寺尾允男: ラット好塩基球細胞の脱顆粒と膜蛋白質リン酸化反応について第 8 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (1985. 11. 12)

永松国助, 大野泰雄, 池淵秀治, 高橋 惇, 寺尾允男, 高仲 正: 単離肝細胞を用いたモルヒネの代謝と肝毒性の関連性について

第17回薬物代謝と薬効・毒性シンポジウム (1985. 10. 4)

和田成仁\*1, 入江昌親\*1, 土井知子\*2, 大塚栄子\*2, 池原森男\*2, 沢田純一, 寺尾允男: モノクローナル抗体を用いたリコンビナントヒト成長ホルモンの抗原性の解析

日本薬学会第106年会(1986.4.3)

\*1 星薬科大学

\*2 大阪大学薬学部

伊藤俊介\*1, 前田昌子\*1, 辻 章夫\*1, 沢田純一, 寺尾允男, 細田 宏\*2, 南原利夫\*2: 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンのモノクローナル抗体の調製

日本薬学会第106年会(1986.4.3)

\*1 昭和大学薬学部

\*2 東北大学薬学部

鈴木英世, 尾崎幸紘, 関田節子, 原田正敏: オゴノリの生物活性と加工処理による影響

第22回全国衛生化学技術協議会(1985.10.9)

鈴木英世, 野口 衛: ケイヒ配合漢方エキス剤の品質管理のための指標成分について

日本薬学会第106年会(1986.4.2)

Setsuko SEKITA, Shinsaku NATORI\* and Shun-ichi UDAGAWA: **Safety of Thermophilic and Thermotolerant Fungi for Industrial Applications: Chemistry Aspects—*Chaetomium* mycotoxins**  
International Symposium: Microbial Biomass Proteins, Waterloo, Ontario, Canada (1985.6.19)

\* 明治薬科大学

野口 衛, 尾崎幸紘: 漢方製剤の生物学的試験法 I 麻黄湯の急性毒性面からの検討

第14回生薬分析討論会(1985.7.23)

原田正敏: 漢方エキス剤の品質評価

第2回和漢医薬学会学術総会(1985.9.6)

原田正敏: 生薬の品質評価をめぐって

第18回日本薬剤師会学術大会(1985.9.29)

原田正敏: 生薬, 生薬製剤および衛生材料の試験法について

第18回日本薬剤師会学術大会(1985.9.29)

原田正敏: 生薬製剤の諸問題について

第22回全国衛生化学技術協議会年会(1985.10.9)

原田正敏: トウキ・センキュウの薬効解析と薬理作用  
第9回生薬の栽培と品質に関する研究会(1986.3.8)

辻 楠雄, 菊池 寛, 中村晃忠, 堀部 隆\*, 宮崎光治\*: 歯科用コンポジットレジンからのモノマーの溶出

第6回日本歯科理工学会(1985.10.14)

\* 福岡歯科大学

鹿庭正昭, 五十嵐良明, 小嶋茂雄, 中村晃忠, 石原勝\*: ゴム皮膚炎の原因化学物質の追一メルカプトベンゾチアゾール系加硫促進剤一

第22回全国衛生化学技術協議会年会(1985.10.9)

\* 東邦大学病院

小嶋茂雄: 皮膚科医と化学者の協力の必要性一綿ネルの寝間着による色素沈着性接触皮膚炎の原因追究を中心一

第10回パッチテスト研究班総会(1985.12.8)

有馬八重野\*, 松永佳世子\*, 早川律子\*, 小嶋茂雄, 鹿庭正昭, 中村晃忠: ネルの寝間着による **Pigmented contact dermatitis**

第10回パッチテスト研究班総会(1985.12.8)

\* 名古屋大学付属病院分院

叶多謙蔵, 片桐 禅\*: ダブレット・デジタイザーによるプロトン NMR スペクトル・データベースの作製

第8回情報化学討論会(1985.10.7)

\* 三菱レイヨン(株)

叶多謙蔵, 片桐 禅\*: マイクロコンピュータ向けプロトン NMR データ検索システムの作製

第24回 NMR 討論会(1985.11.6)

\* 三菱レイヨン(株)

叶多謙蔵, 長谷川光夫\*, 大原 誠\*: 高分解能 NMR スペクトル測定用キャピラリー・サンプル管の考案

日本化学会第50春季年会(1985.4.2)

\* 東京化成(株)

松村年郎, 村松 学\*: ホルムアルデヒドおよび二酸化窒素の個人曝露濃度の同時測定法について

第56回日本衛生学会 (1986. 3. 29)

\* 東京都衛生局

亀谷勝昭, 松村年郎: 大気中の  $^{210}\text{Pb}$  分析法とその測定結果

第27回環境放射能調査研究発表会 (1985. 12. 4)

木嶋敬二, 斎藤恵美子, 石野正蔵\*, 岩倉良平\*, 澤村邦夫\*, 永山富雄\*, 西島 靖\*, 原田裕文\*, 平松 功\*, 廣田 博\*, 藤山喜雄\*, 渡辺四男也\*: 化粧品試験法, ピリチオン亜鉛

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\* 日本薬学会衛生試験法部会化粧品試験法, ワーキンググループ

木嶋敬二, 斎藤恵美子, 武田明治, 矢田久美子\*: HPLC による化粧品用タール色素の分析 (VI) Azo 系色素中の Naphthylamine sulfonic acid などの定量法

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

\* 北里大学衛生学部

木嶋敬二, 斎藤恵美子, 武田明治: HPLC による化粧品用タール色素の分析 (IV) Azo 系色素中の Tobias acid などの定量法

第22回全国衛生化学技術協議会年会 (1985. 10. 9)

安藤正典, 関田 寛, 能勢憲英\*<sup>1</sup>, 木川 寛\*<sup>2</sup>, 土屋悦輝\*<sup>3</sup>, 宮崎奉之\*<sup>3</sup>, 渡辺重信\*<sup>4</sup>: 食品汚染物試験法, クロルデン類

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\*<sup>1</sup> 埼玉県衛生研究所

\*<sup>2</sup> 横浜市衛生研究所

\*<sup>3</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>4</sup> 神奈川県衛生研究所

高橋淳子\*, 岩原繁雄\*, 安藤正典, 武田明治: 水中芳香族アミン類の濃縮方法について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

\* 食品薬品安全センター

松田克子, 神野透人, 松井啓子, 安藤正典, 武田明治: 水中オゾン酸化生成物の濃縮方法に関する研究

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

神野透人, 松田克子, 松井啓子, 安藤正典, 武田明治: Microcystis 中の生物活性物質の分解・精製に

ついて

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

Yukio SAITO, Masatake TOYODA, Masakatsu ICHINOE and Hiroshi KURATA: A Survey of Trichothecene Contamination in Commercial Foods

Meeting of the Joint US-Japan Toxic Microorganisms, UJNR Scientific Session—Toxic Fungi and Mycotoxins (1986. 5. 22)

石坂 孝, 関田 寛, 鈴木 隆, 斎藤行生: 食品中のトリクロロホンの分析法

日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985. 10. 17)

武田由比子, 豊田正武, 斎藤行生: 脂質の光酸化に対するピロフェオホルバイドの影響

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

佐々木久美子, 鈴木 隆, 斎藤行生: 凝固法による残留有機リン農薬の分析

日本食品衛生学会第51回学術講演会 (1986. 5. 16)

関田 寛, 斎藤行生, 武田明治, 内山 充: 食品中のクロルデン類の残留実態

日本農薬学会第 9 回農薬残留分析研究会 (1985. 11. 6)

内山貞夫, 石坂孝, 斎藤行生: HPLC によるオゴノリ成分変動の検索

第22回全国衛生化学技術協議会年会 (1985. 10. 9)

内山貞夫, 田村行弘\*<sup>1</sup>, 星野庸二\*<sup>2</sup>, 土井佳代\*<sup>3</sup>, 斎藤行生: フェオホルバイド a およびピロフェオホルバイド a

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\*<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

米谷民雄, 内山貞夫, 斎藤行生: ヒ素の状態分析法としての HPLC—還元気化原子吸光直結法

日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985. 10. 17)

米谷民雄, 斎藤行生, 藤巻秀和\*, 鈴木和夫\*: エンドトキシンに感受性の低い C3H/HeJ マウスにおけるエンドトキシンによる肝亜鉛—チオネイン誘導

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

\* 国立公害研究所

河村葉子, 内山貞夫, 斎藤行生, 鎌田栄一, 小川幸男, 金子豊蔵, 戸部満寿夫: **Benzo (a) pyrene** の吸収に及ぼす食品成分の影響

日本食品衛生学会第51回学術講演会(1986. 5. 14)

五十畑悦子, 豊田正武, 斎藤行生: 高速液体クロマトグラフィーを利用する食品中の **Sterigmatocystin** 類の分析

エル・ネス・ティ学会(ライフサポートテクノロジー)(1985. 11. 30)

光栄昭雄, 豊田正武, 斎藤行生: 食品異物としての昆虫の混入時期の酵素化学的手段による推定

第22回全国衛生化学技術協議会年会(1985. 10. 9)

光栄昭雄, 豊田正武, 斎藤行生: バイオルミネッセンスによる生存コナダニ数の推定とその食品への応用

日本食品衛生学会第50回学術講演会(1985. 10. 17)

豊田正武, 石坂 孝, 斎藤行生: 食品中の微量クロロホルムの定量について

日本食品衛生学会第50回学術講演会(1985. 10. 18)

石綿 肇, 井上たき子, 義平邦利: メラミンの衛生化学的研究 II 飲料中のメラミンの分析法の検討

日本食品衛生学会第50回学術講演会(1985. 10. 18)

山本 都, 石綿 肇, 義平邦利, 谷村顕雄, 富田 勲\*: モルモットの胃内におけるメチルウレアと亜硫酸からのニトロソメチルウレアの生成および消失

日本薬学会第106年会(1986. 4. 3)

\* 静岡薬科大学

川崎洋子, 合田幸広, 山崎 壮, 義平邦利: 天然着色料の突然変異原試験及びプロスタグランディン合成系に対する影響について

日本食品衛生学会第51回学術講演会(1986. 5. 14)

Shun-ichi UDAGAWA and Masaki TAKADA\*: **Contribution to Our Knowledge of Aspergillus Teleomorphs: Some Taxonomic Problems**

The First International *Penicillium* and *Aspergillus* Workshop, CBS, Amsterdam, The Netherlands (1985. 5. 9)

\* 東洋醸造株式会社

堀江義一\*, 山崎幹夫\*, 宇田川俊一: 小笠原産土壌子

のう菌の研究

日本菌学会第29回大会(1985. 5. 19)

\* 千葉大学

Shun-ichi UDAGAWA, Setsuko SEKITA and Shinsaku NATORI\*: **Safety of Thermophilic and Thermotolerant Fungi for Industrial Applications: Mycology Aspects**

Microbial Biomass Proteins (MBP): Nutritional, Safety and Economic Aspects, Symposium at the University of Waterloo, NRC Biotechnology Program, UNESCO/UNEP MIRCENS (1985. 6. 19)

\* 明治薬科大学

篠山浩文\*, 吉川恵美子\*, 藤井貴明\*, 矢吹 稔\*, 宇田川俊一: 二種の *Penicillium* 属糸状菌によるリゲニンスルホン酸に対する対称的な作用

日本農芸化学会昭和60年度大会(1985. 7. 31)

\* 千葉大学

宇田川俊一: 微生物の分類と保存, ペニシリウム・アスペルギルス分類(第1回国際ワークショップ報告)

日本醸造工学会昭和60年度大会(1985. 10. 16)

宇田川俊一: 好温性真菌とその周辺

第29回日本医真菌学会総会(1985. 11. 7)

法月克弘\*1, 能崎章輔\*1, 浜岡隆文\*2, 宇田川俊一: 病原性黒色不完全菌 *Scytalidium* spp. に対する抗真菌剤の薬剤感受性について

第29回日本医真菌学会総会(1985. 11. 8)

\*1 東洋ビューティサプライ研究所

\*2 農林水産省家畜衛生試験場

宇田川俊一: 食品の真菌汚染とその防除(2) 輸入香辛料の真菌, とくに子のう菌類について

食品衛生微生物研究会第6回学術講演会(1985. 11. 15)

田中敏嗣\*1, 長谷川明彦\*1, 戸矢崎紀紘\*1, 松木幸夫\*1, 松田良夫\*1, 宇田川俊一, 上野芳夫\*2: 国内産落花生のアフラトキシン汚染事例について

第23回マイコトキシン研究会(1986. 1. 11)

\*1 神戸市環境保健研究所

\*2 東京理科大学

坪内春夫\*, 山本勝彦\*, 久田和夫\*, 坂部美雄\*, 宇田

川俊一：培養汚染コーヒー豆中のオクラトキシンAの熱安定性

第23回マイコトキシン研究会 (1986. 1. 11)

\* 名古屋市衛生研究所

篠山浩文\*, 安藤昭一\*, 藤井貴明\*, 矢吹 稔\*, 宇田川俊一：*Penicillium* sp. O-7W によるリゲニンシルホン酸の不溶化

日本農芸化学会昭和61年度大会 (1986. 4. 2)

\* 千葉大学

瀬谷秀之\*, 河合賢一\*, 野沢幸平\*, 仲嶋正一\*, 宇田川俊一：*Emericella striata* の成分研究 II *Dethiosecoemestrin* の構造

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

\* 星薬科大学

野沢幸平\*, 瀬谷秀之\*, 仲嶋正一\*, 河合賢一\*, 宇田川俊一：*Emericella desertorum* CBS 653. 73 の産生する新ビクマリン *Desertorin A, B, C* の構造

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

\* 星薬科大学

小林礼治\*, 鮫島勇次\*, 仲嶋正一\*, 河合賢一\*, 宇田川俊一：*Aspergillus* sp. NE-45 の産生する新化合物 *Cycloaspeptide A, B* および *C* の構造

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 4)

\* 星薬科大学

三瀬勝利, 松井道子, 石館 基：チフス菌, 赤痢菌および病原大腸菌由来の *Hsd miniplasmid* を利用した制限酵素の精製と遺伝子操作への応用

第14回薬剤耐性菌シンポジウム (1985. 8. 24)

下平富子, 荻原秀樹：テトラサイクリン抵抗性R因子によるストレプトマイシン依存性大腸菌の変異感度上昇について

日本環境変異学会第14回大会 (1985. 10. 1)

小島満子, 外海泰秀, 小林加代子, 伊藤善志男：酵母と細菌による魚介類の軟化・腐敗について

日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985. 10. 17)

一戸正勝：シンポジウム *Opportunistic fungous infection*—真菌学領域

日本医真菌学会第29回総会 (1985. 11. 8)

出口順子\*, 篠原信之\*, 一戸正勝：結核患者および健康者の喀痰等から検出した真菌について

日本医真菌学会第29回総会 (1985. 11. 8)

\* 愛媛県衛生研究所

猿田隆夫\*<sup>1</sup>, 矢野 寛\*<sup>1</sup>, 吉田正美\*<sup>1</sup>, 一戸正勝, 松崎 統\*<sup>2</sup>, 池田正身\*<sup>3</sup>：*Aspergillus terreus* の走査電顕像

日本医真菌学会第29回総会 (1985. 11. 8)

\*<sup>1</sup> 九州大学医学部生体防御医学研究所

\*<sup>2</sup> 国立別府病院

\*<sup>3</sup> 高知医科大学

一戸正勝, 陶山一雄\*, 浅田紀恵\*, 根岸寛光\*, 藤井 溥\*：*ジャガイモ乾腐病原因菌の菌名について*

日本植物病理学会61年度大会 (1985. 4. 3)

\* 東京農業大学

陶山一雄\*, 一戸正勝, 根岸寛光\*, 藤井 溥\*：*ジャガイモ乾腐病菌の病原性*

日本植物病理学会61年度大会 (1985. 4. 3)

\* 東京農業大学

Masakatsu ICHINOE, Hisashi KAMIMURA\*<sup>1</sup>, Shinzo KOIZUMI\*<sup>2</sup> and Hajime KATO\*<sup>2</sup>：*Formation of Trichothecenes by Fusarium graminearum and F. acuminatum in Wheat*

20th Meeting of the Joint US-Japan Toxic Microorganisms, UJNR, Scientific Session (1986. 5. 22)

\*<sup>1</sup> 東京都立衛生研究所

\*<sup>2</sup> 農林水産省農業研究センター

Hirota K. KONUMA, Kunihiro SHINAGAWA\* and Hiroshi KURATA：*Surveillance of Raw Meat and Meat Products Contamination with S. aureus and B. cereus*

World Assoc. Vet. Food Hyg. 19th Int. Symposium (1985. 8. 25)

\* 岩手大学農学部

Kunihiro SHINAGAWA\*, Hirota K. KONUMA and Hiroshi KURATA：*Purification and Characterization of Bacillus cereus Diarrheal Toxin*

World Assoc. Vet. Food Hyg. 19th Int. Symposium (1985. 8. 25)

\* 岩手大学農学部

武政二郎\*<sup>1</sup>, 品川邦汎\*<sup>2</sup>, 小沼博隆: 食肉製品及び副原料中における *Bacillus* 属と *B. cereus*  
食品衛生微生物研究会第6回学術講演会(1985. 11. 15)

\*<sup>1</sup> 日本油料検定協会

\*<sup>2</sup> 岩手大学農学部

河西 勉, 高山澄江: *E. coli* 迅速鑑別法としての蛍光光度法の食品検査への応用  
日本食品衛生学会第50回学術講演会(1985. 10. 17)

紅林秀雄, 田中 彰: 2-Nitro-*p*-cresol の代謝に関する研究(第3報) マウスにおける吸収, 分布, 代謝, 排泄  
日本薬学会第106年会(1986. 4. 4)

福岡正道, 大野泰雄, 神野透人, 佐藤道夫, 紅林秀雄, 田中 彰: ベンゾチアジルスルフェニアミド系加硫促進剤の代謝 IV. 2,2'-dibenzothiazyl disulfide の生成  
日本薬学会第106年会(1986. 4. 4)

森本和滋, 福岡正道, 田中 彰, 長谷川良平, 林 裕造: ラット膀胱上皮細胞における DNA 損傷とその修復(その1) 測定法の基礎的条件の検討  
日本薬学会第106年会(1986. 4. 4)

土屋利江, 田中 彰, 福岡正道, 久野拓造\*: Benimidazole 系化合物による proteoglycan 生成阻害作用について—mice limb bud cell culture system を用いて—

日本薬学会第106年会(1986. 4. 4)

\* 熊本大学薬学部

嶺岸謙一郎, 南原精一, 福岡正道, 佐藤道夫, 田中 彰: ムスクシレン(MX)の代謝(1) ラット糞および胆汁中の代謝物の検索  
日本薬学会第106年会(1986. 4. 3)

A. E. PEGG\*, M. E. DOLAN\*, D. SCICCHITANO\*, and K. MORIMOTO: Studies of the Repair of O<sup>6</sup>-alkyl G and O<sup>4</sup>-alkyl T in DNA by Alkyl-transferases from Mammalian Cells and Bacteria

DNA Adducts: Dosimeters to monitor human exposure to environmental mutagens and carcinogens, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A.

(1984. 9. 25)

\* Cancer Research Center, The Pennsylvania State University, U. S. A.

森本和滋, A. E. PEGG\*: ラット肝臓及び大腸菌 AGT による DNA 中の O<sup>6</sup>-プロピルグアニンと O<sup>6</sup>-ブチルグアニンの修復  
第44回日本癌学会総会(1985. 10. 29)

\* Cancer Research Center, The Pennsylvania State University, U. S. A.

最上(西巻)知子, 田中 彰: ソルビン酸投与によるマウス肝ペルオキシゾーム β-酸化及び不飽和脂肪酸代謝酵素の誘導  
第57回日本生化学会大会(1985. 9. 29)

紅林秀雄, 南原精一, 福岡正道, 田中 彰: ラットによる 2-Nitro-*p*-cresol の体内動態並びに肝 Ornithine Decarboxylase 活性への影響  
第12回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム(1985. 10. 24)

関沢 純: 農薬の発癌性および生殖毒性についての国際機関による評価情報のデータベース化  
第12回日本毒科学会学術年会(1985. 7. 1)

関沢 純, 橋場茂子: IRPTC (国際有害化学物質登録制度) のデータベースの作成と利用について  
日本薬学会第106年会(1986. 4. 4)

安原加寿雄, 内藤克司, 内田雄幸, 高田幸一, 大場 栄, 佐藤千百合, 小林和雄, 戸部満寿夫: Mitomycin C 投与による脾臓の病変について  
昭和60年度東京獣医畜産学会(1985. 6. 23)

鎌田栄一, 内田雄幸, 鈴木幸子, 池田康和, 小川幸男, 金子豊蔵, 戸部満寿夫: 化学物質の吸入による気道および肺の毒性学的研究(第2報)  
第12回日本毒科学会学術年会(1985. 7. 1)

川崎 靖: 投与困難な物性の薬物の剤形処理  
第12回日本毒科学会学術年会(1985. 7. 1)

松本清司, 白井章夫, 落合敏秋, 関田清司, 川崎 靖: ラット末梢血液および骨髓に及ぼす繰返し採血の影響  
第32回日本実験動物学会総会(1985. 9. 13)

山海 直\*, 内田雄幸, 金山喜一\*, 遠藤 克\*, 佐久間勇次\*: ウサギの大動脈弓における主要動脈の分岐について

第32回日本実験動物学会総会 (1985. 9. 13)

\* 日本大学農獣医学部

落合敏秋, 白井章夫, 松本清司, 関田清司, 菅野 純, 内藤克司, 川崎 靖, 小林和雄, 中路幸男, 降矢強, 林 裕三, 戸部満寿夫, 小久保 武\*: **Butylated hydroxyanisole (BHA)** のイヌによる6ヵ月間混餌投与試験について

日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985. 10. 17)

\* 亀田総合病院

児玉幸夫, 堀内茂友, 重盛正彦\*, 岡野 満\*: 実験動物の遺伝的統御の相異による毒性発現 (1) 急性毒性を指標としたマウスでの  $F_1$  同腹産仔交雑群と近交系, 多元交雑動物等との比較検討

第33回日本実験動物学会総会 (1986. 5. 27)

\* 三協ラボ・サービス(株)

杉浦彰彦\*, 八田 清\*, 中西政一\*, 松本清司, 降矢強, 児玉幸夫, 堀内茂友: **SD, Wistar および F344 雄ラットの週令および体重差の血液形態学的検討**

第33回日本実験動物学会総会 (1986. 5. 28)

\* 三協ラボ・サービス(株)

仲間一雅\*, 七戸和博\*, 戸部満寿夫, 小林和雄, 内藤克司, 内田雄幸, 安原加寿雄: **WBN/Kob ラットの血糖値推移と耐糖能の変化について**

第33回日本実験動物学会総会 (1986. 5. 28)

\* 日本医科大学

酒井和之\*, 岡野 満\*, 重盛正彦\*, 児玉幸夫, 堀内茂友: ナキウサギのバイオメディカル研究分野における有用性の探索—体温および発熱性反応に関する研究—

第32回日本実験動物学会総会 (1985. 9. 12)

\* 三協ラボ・サービス(株)

酒井健夫\*<sup>1</sup>, 山田俊治\*<sup>1</sup>, 谷口雄三\*<sup>2</sup>, 児玉幸夫, 堀内茂友: ナキウサギのバイオメディカル研究分野における有用性の探索—ナキウサギ皮膚の組織, 微細構造および組織化学—

第32回日本実験動物学会総会 (1985. 9. 12)

\*<sup>1</sup> 日本大学農獣医学部

\*<sup>2</sup> 奈良医科大学

児玉幸夫, 内藤克司, 堀内茂友, 重盛正彦\*: ナキウサギのバイオメディカル研究分野における有用性の探索—ナキウサギの胃潰瘍形成に関する研究—

第32回日本実験動物学会総会 (1985. 9. 14)

\* 三協ラボ・サービス(株)

中西政一\*, 杉浦彰彦\*, 八田 清\*, 重盛正彦\*, 堀内茂友, 児玉幸夫: 同出生時ラットの体型別による性成熟度のペニス型と精子生成期との関係

日本実験動物技術者協会関東支部

第11回懇話会と総会 (1985. 11. 30)

\* 三協ラボ・サービス(株)

八田 清\*, 杉浦彰彦\*, 中西政一\*, 重盛正彦\*, 児玉幸夫, 松本清司, 堀内茂友: 同出生時ラットの体型別による成長過程に伴うバックグラウンド データの検討 (第三報)

日本実験動物技術者協会第20回総会 (1986. 5. 17)

\* 三協ラボ・サービス(株)

大野泰雄, 川西 徹, 高橋 惇, 高仲 正, 大森義仁: 単離肝細胞を用いたジスルフィラムの細胞毒性の研究

日本薬学会第105年会 (1985. 4. 5)

中浦慎介, 川西 徹, 川島邦夫, 田中 悟, 高仲 正, 大森義仁: ジチオカルバミン酸亜鉛系加硫促進剤の胎仔致死作用と赤血球系に及ぼす影響について

日本薬学会第105年会 (1985. 4. 5)

Kannosuke FUJIMORI, Akira TAKAHASHI, Hiroaki NUMATA and Akira TAKANAKA: **Drug Metabolizing Enzyme System of Gottingen Miniature Pig**

Conference of Swine in Biomedical Research (Washington) (1985. 6. 17)

井上和秀, 藤森観之助, 溝上敬之助, 簾内桃子, 高仲正, 大森義仁: 神経機能障害性の *in vitro* 検索法に関する研究 (1): 神経系クローン NG108-15 の電気生理的特性に及ぼすクロルデンの影響

第12回日本毒科学会学術年会 (1985. 7. 1)

中浦慎介, 川西 徹, 大野泰雄, 川島邦夫, 田中 悟, 高橋 惇, 高仲 正, 大森義仁, 松本清司: エチルフェニルジチオカルバミン酸亜鉛 (ZEPIC) の胎仔毒性 (3) ZEPIC のメトヘモグロビン形成機序について

第12回毒科学会学術年会(1985.7.1)

高橋 惇, 大野泰雄: 腎毒性発現の生化学的特徴  
第12回毒科学会学術年会(1985.7.1)

溝上敬之助, 能美健彦, 篠内桃子, 藤森観之助, 高仲  
正, 大森義仁: スンクス肝のチトクロム P-450s  
第58回日本生化学会(1985.9.26)

長尾重之, 川島邦夫, 中浦慎介, 小野田欽一, 田中  
悟, 高仲 正, 大森義仁: エタノールあるいはクロル  
プロジンのラット出生仔 one-way avoidance に及  
ぼす影響

日本先天異常学会 Behavioral Teratology 懇話会第2  
回共同研究発表会(1985.10.4)

長尾重之: 片道式シャトルと往復式シャトルとの一般  
的な比較

日本先天異常学会 Behavioral Teratology 懇話会第2  
回共同研究発表会(1985.10.4)

大野泰雄, 川西 徹, 高橋 惇, 高仲 正, 大森義仁,  
遠藤 仁\*: コラーゲナーゼ選流法により得られた腎  
単離細胞の由来とその特徴  
第17回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム(1985.10.4)

\* 東京大学医学部

林 裕造: ラット, マウス, ハムスターの肝腫瘍の組  
織学的分類

実験動物の肝, 唾液腺, 脾に関する国際シンポジウム  
(1985.3.27)

高橋道人: ハムスター実験膀胱癌

実験動物の肝, 唾液腺, 脾に関する国際シンポジウム  
(1985.3.27)

前川昭彦, 小野寺博志, 古田京子, 林 裕造: トリエ  
タノールアミンの F344 ラットにおける癌原性につ  
いて

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

高橋道人, 古川文夫, 内藤修一, 岸本嘉夫, 林 裕造:  
実験膀胱癌発生におけるプロスタグランディン合成阻害  
剤およびメチオニンの抑制効果

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

長谷川良平, 鈴木 徹\*<sup>1</sup>, Samuel M. COHEN\*<sup>2</sup>: ラッ

ト膀胱2段階発癌における膀胱凍結潰瘍の initiation  
効果

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

\*<sup>1</sup> 獨協医科大学泌尿器科

\*<sup>2</sup> Dept. Pathol., Univ. Nebraska Med. Center.

小野寺博志, 前川昭彦, 古田京子, 谷川廣行, 菅野  
純, 望月正隆\*, 武田 啓\*, 岡田正志\*: N-アルキル  
N-( $\alpha$ -ヒドロペルオキシアルキル)ニトロサミンのラ  
ットにおける癌原性について

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

\* 東京生化学

佐藤秀隆, 高橋道人, 古川文夫, 宮川義史\*, 林 裕  
造: 皮膚2段階発癌における純粋なイニシエーターと  
しての Trp-P2 について

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

\* 日本たばこ生物センター

内藤修一, 高橋道人, 古川文夫, 佐藤秀隆, 林 裕造:  
重金属塩による胃発癌プロモーター作用の検討

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

古川文夫, 高橋道人, 佐藤秀隆, 長谷川良平, 林 裕  
造: 胃癌の2段階発癌モデルを用いた抗酸化剤のプロ  
モーター作用の検索

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

岸本嘉夫, 高橋道人, 古川文夫, 内藤修一, 林 裕造:  
重金属塩による膀胱発癌プロモーター作用の検討

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

小久保 武, 黒川雄二, 高橋道人, 前川昭彦, 林 裕  
造: 重金属塩のラット腎に対するプロモーター作用に  
ついて

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

黒川雄二, 前川昭彦, 小野寺博志, 林 裕造: 臭素酸  
カリウムのラット腎に対するプロモーター作用にお  
ける用量相関について

第44回日本癌学会総会(1985.10.29)

杉山賢司\*, 長瀬すみ\*, 前川昭彦, 小野寺博志, 林  
裕造: MNNG による無アルブミンラット実験胃癌の  
発生

第44回日本癌学会総会(1985.10.30)

\* 佐々木研究所化学部

江上 格\*<sup>1</sup>, 内藤修一\*<sup>1</sup>, 松田 健\*<sup>1</sup>, 渡辺 章\*<sup>1</sup>, 小島範子\*<sup>1</sup>, 松倉則夫\*<sup>1</sup>, 恩田昌彦\*<sup>1</sup>, 浅野伍朗\*<sup>2</sup>, 高橋道人: **BHP 誘発ハムスター膀胱癌の同種移植における生物学的特性について**

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

\*<sup>1</sup> 日本医科大学第1外科

\*<sup>2</sup> 日本医科大学第2病理

宮川義史\*, 高橋道人, 古川文夫, 林 裕造: **DEN によるハムスター気管腫瘍発生過程の走査電顕的観察**

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

\* 日本たばこ産業(株)生物実験センター

高橋正一\*, 小野寺博志, 前川昭彦, 林 裕造, 長瀬すみ\*: **メチルコランスレンの無アルブミンラット皮膚における発癌実験**

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

\* 佐々木研究所化学部

林 裕造, 黒川雄二, 小野寺博志, 前川昭彦: **臭素酸カリウムのハムスター腎に対する発癌性について**

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

長瀬すみ\*<sup>1</sup>, 高橋正一\*<sup>1</sup>, 朱宮正剛\*<sup>2</sup>, 前川昭彦, 林裕造: **BBN による無アルブミン congenic 系統ラット (ACI-alb) の膀胱腫瘍に関する研究**

第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

\*<sup>1</sup> 佐々木研究所化学部

\*<sup>2</sup> 東京都立老人研究所実験動物

小久保 武\*, 高橋道人, 林 裕造: **モノクロタリンによる肺高血圧症モデルにおける末梢肺動脈枝の修飾について**

第74回日本病理学会総会 (1985. 4. 17)

\* 亀田総合病院病理

内藤修一\*, 浅野伍朗\*, 高橋道人, 林 裕造: **実験膀胱癌の移植系の確立とその特性について**

第74回日本病理学会総会 (1985. 4. 17)

\* 日本医科大学第2病理

前川昭彦, 小野寺博志, 谷川廣行, 菅野 純: **ニトロソ尿素によるラット卵巣セルトリ細胞腫の発生**

毒性病理研究会第2回学術集会 (1986. 2. 7)

長谷川良平, 古川文夫, 豊田和弘, 佐藤秀隆, 高橋道人: **食塩長期投与によるラット胃粘膜の病理組織学的**

**変化**

毒性病理研究会第2回学術集会 (1986. 2. 7)

古川文夫, 豊田和弘, 高橋道人, 林 裕造: **放射性医薬品 (骨診断薬) の傷害骨に及ぼす影響について**

第12回日本毒科学会学術年会 (1985. 7. 1)

宮川義史, 古川文夫, 高橋道人, 林 裕造: **BHT 並びに BHA のマウス経皮毒性について**

第12回日本毒科学会学術年会 (1985. 7. 1)

林 裕造, 藤原公策\*: **毒性変化, 死後変化および人工産物の鑑別**

第12回日本毒科学会学術年会 (1985. 7. 1)

\* 東京大学農学部

前川昭彦, 小野寺博志, 林 裕造: **ラット神経系および関連臓器組織の自然発生腫瘍**

第12回日本毒科学会学術年会 (1985. 7. 1)

小野寺博志, 前川昭彦: **癌原性試験における F344 ラットの有用性とその評価**

第5回 Fischer ラット研究会 (1985. 5. 24)

高橋道人: **実験的胃発癌における食塩のプロモーター作用**

第16回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム「食物、栄養と癌」(1985. 11. 12)

林 裕造: **食物中の発がん物質のリスク評価**

第16回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム「食物、栄養と癌」(1985. 11. 12)

林 裕造: **危険性評価・安全性ファクター**

食品関連物質の安全性評価に関する ILSI 国際シンポジウム (1984. 11. 20)

石館 基: **変異原性試験と生活関連物質の安全性評価**

安全性評価に関する ILSI 国際シンポジウム (1984. 11. 20)

能美健彦, 溝上敬之助, 福原守雄\*, 石館 基: **Aflatoxin B<sub>1</sub> に対し高い活性化能を有するハムスター肝由来のチトクローム P-450**

第58回日本生化学会大会 (1985. 9. 29)

\* 国立公衆衛生院

林 真, 祖父尼俊雄, 沢田 稔, 石館 基: フローサイトメータを用いる小核試験 I 測定条件の検討  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 9. 30)

沢田 稔, 祖父尼俊雄, 畑中みどり, 石館 基: 活性酸素発生系における染色体異常誘発 III 過酸化水素抵抗性細胞による検討  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 9. 30)

能美健彦, 溝上敬之助, 渡辺雅彦, 石館 基: フェナセチンの代謝活性化および不活性化に関与するハムスター肝由来のチトクローム P-450 の分子種  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 10. 1)

渡辺雅彦, 能美健彦, 石館 基: ニトロフルオレン類の変異原性と代謝活性化  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 10. 1)

松岡厚子, 祖父尼俊雄, 石館 基: 染色体異常誘発性 (*in vitro*) に及ぼす界面活性剤の影響  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 10. 1)

祖父尼俊雄, 林 真, 島田弘康\*, 恵比根 豊\*, 松岡厚子, 沢田 稔, 石館 基: ベンゼンの小核誘発における性差の発現機構  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 10. 1)

\* 第一製薬・中央研

松井道子, 三瀬勝利, 石館 基: ブタ由来病原大腸菌と患者由来サルモネラの産生する制限酵素  
第59回日本細菌学総会 (1986. 3. 27)

林 真, 祖父尼俊雄, 石館 基 (小核試験共同研究グループ): 小核試験における性差について—その2—  
第14回日本環境変異原学会 (1985. 10. 1)

石館 基: 変異原性の強さとその評価—生活関連物質の面から—  
第14回日本環境変異原学会, シンポジウム (1985. 10. 1)

佐々木澄志, 水沢 博, 鈴木かおり, 石館 基: *H-ras* 遺伝子導入 BALB3T3 細胞による形質転換誘導  
第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

水沢 博, 佐々木澄志, 川瀬雅子, 石館 基: 厚生省細胞バンクシステムの現状と問題点  
第44回日本癌学会総会 (1985. 10. 30)

長谷川隆一, 櫛谷真美, 小室徹雄, 伊阪 博, 加納晴三郎: マウス肝リソソームに対する四塩化炭素と細菌内毒素の作用について  
日本薬学会第106年会 (1986. 4. 4)

柴田 正, 伊阪 博, 加納晴三郎: ブタ降性カリジノゲナーゼ製剤のエンザイムイムノッセイ  
第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

Tetsuo KOMURO and Chris GALANOS\*: Analysis of Salmonella Lipopolysaccharides by Sodium Deoxycholate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
International Symposium on Endotoxin (1986. 5. 30)

\* マックスプランク研究所

四方田千佳子, 中村恵三, 伊藤誉志男: 化粧品中の各種乳化剤の分析法  
第18回日本化粧品技術者会研究討論会 (1985. 6. 20)

外海泰秀, 小林加代子, 伊藤誉志男, 小島満子: 酵母と細菌により生成される魚介類中揮発性アミンおよびアンモニアの経日変化  
日本食品衛生学会第50回学術講演会 (1985. 10. 17)

辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 環境汚染物質と細菌内毒素との生態系における相互作用に関する研究—ヒメダカについて—  
第12回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1985. 10. 24)

小林加代子, 外海泰秀, 伊藤誉志男: 2,6-ジクロロキノクロロイミドを用いた食品中 BHA の迅速比色定量  
第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

辻 澄子, 外海泰秀, 伊藤誉志男, 福岡正道: クエン酸モノ, ジおよびトリイソプロピルの合成と  $C^{13}$ -NMR スペクトルによる構造解明  
第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

浜野 孝\*, 三ツ橋幸正\*, 田中喜作\*, 松本幸夫\*, 中村恵三, 外海泰秀, 伊藤誉志男: バソクプロイン—銅錯体生成による食品中の総 EDTA の比色定量法  
第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

\* 神戸市環境保健研究所

中村恵三, 高木達也\*, 佐々木喜男\*: よわい分子間相互作用の記述子  $\mu^2/\alpha$  について

第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

\* 大阪大学薬学部

四方田千佳子, 中村恵三, 伊藤誉志男: アラビアゴムと陽イオン界面活性剤との相互作用

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 3)

辻 澄子, 海外泰秀, 伊藤誉志男: 亜硫酸および過酸化水素の各種臓器での *in vitro* における分解

日本食品衛生学会第51回学術講演会 (1986. 5. 14)

海外泰秀, 小林加代子, 伊藤誉志男, 小島満子: 酵母及び細菌を接種したサバ試料のガスクロマトグラフィーによる脂肪分解試験

日本食品衛生学会第51回学術講演会 (1986. 5. 14)

松野まゆみ, 中村恵三, 伊藤誉志男: 高速液体クロマトグラフィーによる食用許可色素中の主色素の定量法の検討

日本食品衛生学会第51回学術講演会 (1986. 5. 16)

小川義之, 井上和美, 村井敏美, 川崎浩之進, 加納晴三郎: アフィニティークロマトグラフィーによる内毒素(LPS) 結合性大脳 Proteolipid Apoprotein の分離精製

第35回日本薬学会近畿支部大会 (1985. 11. 2)

小川義之, 川崎浩之進, 加納晴三郎: 細菌性発熱物質(LPS) およびその加熱分解産物の限外濾過による除去

第59回日本薬理学会総会 (1986. 4. 4)

Takafumi ITAMI and Seizaburo KANO: A Possible Mechanism for the Potentiation of the Fetal Toxicities of Salicylates by Bacterial Pyrogen

International Symposium/Workshop "Pharmacokinetics in Teratogenesis" (1985. 9. 14)

川崎浩之進, 村井敏美, 井上和美, 江馬 真, 伊丹孝文, 小川義之, 荒木宏昌, 加納晴三郎: 環境汚染物質と細菌内毒素との生体系における相互作用に関する研究—マウスおよびラットについて—

第12回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム (1985. 10. 25)

熊谷健夫, 畠山好雄: ホッカイトウキの生理・生態的形質について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

畠山好雄, 熊谷健夫: トウキの選抜について

第 9 回生薬の栽培と品質に関する研究会 (1986. 3. 8)

畠山好雄, 熊谷健夫, 米田該典\*: モッコウの導入種について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

\* 大阪大学

米田該典\*, 須磨一夫\*, 畠山好雄: 栽培木香の品質について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\* 大阪大学

下村講一郎, 佐竹元吉, 鎌田 博\*: Ri プラスミドによる形質転換細胞の研究 ナス科薬用植物について

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\* 筑波大学遺伝子実験センター

佐藤 誠\*, 黒柳正典\*, 福島清吾\*, 上野 明\*, 下村講一郎, 佐竹元吉: ショウガ科植物の組織培養とその成分—ショウガについて—

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\* 静岡薬科大学

金子 光\*<sup>1</sup>, 小林 優\*<sup>1</sup>, 吉田尚利\*<sup>1</sup>, 田中美香子\*<sup>2</sup>, 佐竹元吉: 中国産川芎 *Ligusticum wallichii* Franch の莖頂培養による育苗

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\*<sup>1</sup> 北海道大学

\*<sup>2</sup> ホシ伊藤

吉川雅之\*, 福田陽一\*, 谷山登志男\*, 車 培夫\*, 長浜佳子\*, 北川 勲\*, 佐竹元吉: 生薬修治の化学的研究: 地黄 (5) 日本産地黄修治における化学過程の解析

日本薬学会第 106 年会 (1986. 4. 2)

\* 大阪大学

下村講一郎, 佐竹元吉, 鎌田 博\*: ニチニチソウの Ri プラスミド感染細胞におけるアルカロイド

第 9 回植物組織培養シンポジウム大会 (1985. 7. 18)

\* 筑波大学遺伝子実験センター

飯田 修, 佐竹元吉, 浜野朋子\*, 安田一郎\*, 秋山和幸\*: ムラサキの栽培における寒冷紗の被覆効果とシコニン類含量

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

\* 東京都立衛生研究所

飯田 修, 佐竹元吉, 葵 一八, 西 孝三郎, 堀越司: ミシマサイコの育種に関する研究 I 受粉・繁殖様式について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

矢原正治\*<sup>1</sup>, 野原稔弘\*<sup>1</sup>, 下村講一郎, 佐竹元吉, 神田博史\*<sup>2</sup>: ウスユキクチナシグサの成分と組織培養

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

\*<sup>1</sup> 熊本大学

\*<sup>2</sup> 広島大学

磯田 進\*<sup>1</sup>, 泉 宏昌\*<sup>2</sup>, 香月茂樹\*<sup>3</sup>, 神田博史\*<sup>4</sup>, 後

藤勝美\*<sup>5</sup>, 布 万理子\*<sup>6</sup>, 佐竹元吉: オケラ属 (*Atractylodes*) の国内野生種および植栽種について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 12)

\*<sup>1</sup> 昭和大学

\*<sup>4</sup> 広島大学

\*<sup>2</sup> 東京薬科大学

\*<sup>5</sup> 京都薬科大学

\*<sup>3</sup> 北里大学

\*<sup>6</sup> 帝京大学

西 孝三郎, 井上 修, 山田和也: *Cinnamomum cassia Blume* の栽培に関する研究 (1) 栄養繁殖について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

江崎勝司, 西 孝三郎: *Bupleurum* 属植物の生態学的研究 (1) ミシマサイコ (*B. falcatum* L.) の染色体について

日本生薬学会第32回年会 (1985. 10. 11)

所属の研究、試験および検査に関する発表を主とする「衛試例会」は、昭和26年から原則として毎月第2火曜日、本所講堂および会議室において開催されているが、昭和60年度に実施された演題は、次のとおりである。

#### 第271回（昭和60年4月9日）

1. 好塩基球細胞の抗原特異的脱顆粒に及ぼす各種サイトカラシン類の効果  
放射線化学部 °手 島 玲 子  
生 薬 部 関 田 節 子
2. メラミン樹脂製コップからのメラミンとホルムアルデヒドの溶出について  
食品添加物部 井 上 たき子
3. 幼若期ラット脳および肝の長鎖アシル CoA 合成酵素の精製および米国ボルチモアの印象  
放射線化学部 永 松 国 助
4. デオキシコール酸に可溶化した脂肪酸ビニルエステルを基質とする腓リパーゼ活性に関する速度論的研究（統報）  
大阪支所薬品部 中 原 裕

#### 第272回（昭和60年5月14日）

1. ニトロソジエチルアミン生成に対する野菜、果実汁の促進および抑制作用について  
食品添加物部 尾 張 恭 子
2. 乳首ゴム中の残存加硫促進剤の分析  
食品添加物部 山 崎 壮
3. プラスミド感染により生ずる宿主菌の変異感受性の上昇について  
衛生微生物部 °下 平 富 子  
萩 原 秀 樹
4. 細胞バンクの発足にあたって  
変 異 原 性 部 水 沢 博

#### 第273回（昭和60年6月11日）

—特研テーマ報告会—

- I 「医薬品、食品添加物等安全性評価のための新技術利用と評価基準の確立に関する研究」  
座 長 内 山 充
1. 総括報告  
世 話 人 戸 部 満 寿 夫
2. 腎障害に関する基礎的研究  
毒 性 部 安 原 加 寿 雄
3. 医薬品、食品添加物等の安全性評価のためのラッ

ト経胎盤発癌試験法の検討

- 病 理 部 前 川 昭 彦
  4. 出生仔の学習能試験における One-Way shuttle box 法の応用に関する基礎的研究  
薬 理 部 小 野 田 欽 一
  5. マウス小核試験法の技術並びに結果の評価に関する基礎的研究  
変 異 原 性 部 石 館 基
  6. 機器を用いた生体成分の分析に関する研究  
医 化 学 部 福 岡 正 道
  - II 「遺伝子組換え等の新技術により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究」  
座 長 寺 尾 允 男
  1. 総括報告  
世 話 人 山 羽 力
  2. 組換えヒトインシュリン、成長ホルモンなどの品質確保に必要な理化学的試験法について  
生 物 化 学 部 早 川 堯 夫
  3. 遺伝子組換えを利用して生産される高分子医薬品の抗原性に関する研究  
—モノクローナル抗体を用いたリコンビナント、ヒト成長ホルモンの抗原性の解析—  
放射線化学部 沢 田 純 一
  4. 遺伝子組換えの新技術により生産される高分子医薬品中の発熱性物質の試験法の検討  
薬 理 部 藤 森 観 之 助
- #### 第274回（昭和60年7月9日）
1. 実験腫瘍の移植系の確立とその特性について  
病 理 部 古 川 文 夫
  2. 臭素酸カリウムの腎プロモーター作用における用量作用関係  
病 理 部 今 沢 孝 喜
  3. 実験用動物の市販固型飼料中のニトロソジメチルアミン  
毒 性 部 児 玉 幸 夫  
堀 内 茂 友  
衛生微生物部 林 長 男  
三協ラボサービス(株) 重 盛 正 彦
  4. Thiabendazole (TBZ) および 5hydroxy TBZ (5HYTBZ) による proteoglycan 生成阻害の種差について  
—in vivo ならびに in vitro (cell) での比較—  
医 化 学 部 土 屋 利 江

5. 培養神経クローンの電気生理的特性に及ぼす環境汚染物質クロルデンの影響

薬理部 井上和秀

第275回 (昭和60年9月10日)

ワークショップ「化学物質によるDNA修飾と生体の障害」

1. 発ガンに関連するDNAの修飾とその修復機構

医化学部 森本和滋

2. DNA修飾の細胞学—cell transformationを中心に

変異原性部 水沢博

3. DNA修飾の生物学—遺伝毒性研究の展望

変異原性部 石館基

4. DNA修飾の病理学—細胞のガン化と老化

病理部 林裕造

第276回 (昭和60年10月15日)

1. 赤色3号添加飼料によるラット甲状腺機能に対する影響について

医化学部 嶺岸謙一郎

紅林秀雄

佐藤道夫

最上知子

福岡正道

2. 芳香族アミンを有する薬物と糖類の相互作用

大阪支所・薬品部 岡田敏史

3. 制限食ラット末梢血および骨髄細胞数に及ぼす影響

毒性部 小川幸男

4. マーモセットによるジメチルアミノアゾベンゼン(DAB)の短期毒性試験

毒性部 松本清司

5. ラット膀胱2段階発癌における凍結潰瘍のイニシエーション効果

病理部 長谷川良平

豊田和弘

6. 皮膚2段階発癌における純粋なイニシエーターとしてのTrp-P2について

病理部 佐藤秀隆

古川文夫

豊田和弘

長谷川良平

高橋道人

林裕造

第277回 (昭和60年11月12日)

1. 置換尿素類のN-ニトロ化を利用した閉環反応  
合成化学研究部 宮原誠

2. アフィニティークロマトグラフィーによるLPS結合性大脳プロテオリビドアポプロテインの分離精製

大阪支所・薬理微生物部 小川義之

3. トリエタノールアミンのF344ラットにおける癌原性試験

病理部 小野寺博志

古田京子

前川昭彦

林裕造

4. 化学物質の吸入による気道及び肺の毒性学的研究  
(第二報)

毒性部 鎌田栄一

5. 2-Ethylhexyl diphenyl phosphateのラットによる吸収、分布、代謝、排泄

医化学部 最上知子

嶺岸謙一郎

6. 市販ゴム手袋中のゴム添加剤—老化防止剤、加硫促進剤など—の使用実態について

療品部 鹿庭正昭

第278回 (昭和60年12月10日)

1. ウサギによる脂環族ケトンオキシムの代謝

医化学部 紅林秀雄

2. クエン酸イソプロピルの標準品の合成と食品中からの分析法について

大阪支所・食品部 辻澄子

3. 1-アリル-1-ニトロソ尿素化合物におけるニトロソ基の転位とニトロ体の生成

合成化学研究部 丹野雅幸

4. 胃癌の2段階発癌モデルを用いた抗酸化剤のプロモーター作用の検索

病理部 豊田和弘

古川文夫

佐藤秀隆

長谷川良平

高橋道人

林裕造

5. Butylated hydroxyanisole (BHA)のイヌによる6カ月間混餌投与試験について

毒性部 落合敏秋

6. 漢方製剤の生物学的試験法I

一麻黄湯の急性毒性面からの検討—

生 薬 部 °野 口 衛  
尾 崎 幸 紘

第 279 回 (昭和61年 1 月 14 日)

1. オゴノリの生物活性と加工処理による影響  
生 薬 部 °鈴 木 英 世  
尾 崎 幸 紘  
関 田 節 子  
原 田 正 敏
2. ジチオカーバメート系加硫促進剤によるゴム皮膚炎—ゴム手袋など—  
療 品 部 鹿 庭 正 昭
3. O<sup>6</sup>-alkylguanine で処理した HeLa 細胞における O<sup>6</sup>-alkylguanine—DNA alkyltransferase 活性の減少  
医 化 学 部 森 本 和 滋
4. アフラトキシン B<sub>1</sub> に対し高い活性化能を有するハムスター肝由来のチトクロム P-450  
変 異 原 性 部 °能 美 健 彦  
薬 理 部 溝 上 敬 之 助
5. ベンゼンの小核誘発における性差について  
変 異 原 性 部 祖 父 尼 俊 雄

第 280 回 (昭和61年 2 月 18 日)

1. 化学合成ヒト成長ホルモン遺伝子の発現蛋白質の精製と蛋白質化学的検討  
生 物 化 学 部 °新 見 伸 吾  
早 川 堯 夫  
山 羽 力
2. 錠剤および顆粒のヒト、動物における胃内容物排出速度  
薬 品 部 青 柳 伸 男
3. 鉛の胆汁排泄に及ぼす鉛—チオネイン様蛋白質の

役割について

- 放射線化学部 池 淵 秀 治
4. 病原細菌からの遺伝子操作関連試薬の開発—サルモネラと大腸菌の産生する制限酵素—  
変 異 原 性 部 °松 井 道 子  
三 瀬 勝 利
  5. 活性酸素発生系における染色体異常誘発—過酸化水素抵抗性細胞を用いる検討—  
変 異 原 性 部 °沢 田 稔  
祖父尼 俊 雄  
石 館 基

第 281 回 (昭和61年 3 月 11 日)

1. ザイメイトシステムによる製剤分析の自動化  
薬 品 部 香 取 典 子
2. ベンゾチアジルスルフェンアミド系加硫促進剤の代謝 (その 3) 2-チオベンゾチアゾール誘導体の代謝経路と LD<sub>50</sub> との相関性について  
医 化 学 部 °福 岡 正 道  
佐 藤 道 夫  
紅 林 秀 雄  
薬 理 部 大 野 泰 雄  
環 境 衛 生 化 学 部 神 野 秀 人
3. 同出生時ラットの体型別による性成熟度のベニス型と精子生成期との関係  
毒 性 部 児 玉 幸 夫
4. Bis-BP の毒性に関する研究  
毒 性 部 高 田 幸 一
5. マウスにおけるナリジクス酸の癌原性について  
病 理 部 °松 島 裕 子  
黒 川 雄 二  
今 沢 孝 喜  
高 村 直 子

## 支 所 例 会

## 第 79 回 (昭和60年 5月31日)

1. ガスクロマトグラフィーによる食品中のクエン酸モノ、ジおよびトリイソプロピルの分別定量

食 品 部 辻 澄 子

2. 食用タール色素およびその不純物の分析法に関する研究

食 品 部 外 海 泰 秀

## 第 80 回 (昭和60年 7月 1日)

1. ブタ胼性カリジノゲナーゼ製剤のエンザイムイムノアッセイ

薬 品 部 柴 田 正

2. アフィニティークロマトグラフィーによる LPS 結合性大脳プロテオリピドアポプロテインの分離精製

薬 理 微 生 物 部 小 川 義 之

## 第 81 回 (昭和60年 10月 2日)

1. 食品中の総 EDTA の迅速比色定量法の検討

食 品 部 中 村 恵 三

2. 市販の各種デキストリン中に含まれる還元糖 (デキストロース・エキバレント) の試験法について

薬 品 部 伊 阪 博

## 第 82 回 (昭和60年 11月 25日)

1. International Symposium-Workshop, Pharmacokinetics in Teratogenesis (Berlin-West, Sep. 13~15, 1985) に参加して

薬 理 微 生 物 部 伊 丹 孝 文

2. LPS の構造と活性相関に関する研究

薬 品 部 小 室 徹 雄

## 第 83 回 (昭和60年 12月 18日)

1. クエン酸モノ、ジおよびトリイソプロピルの合成ならびに食品からの迅速定量法

食 品 部 辻 澄 子

2. インドメサチンの解熱機作

薬 理 微 生 物 部 伊 丹 孝 文

---

**特別講演会**

---

1. 昭和60年9月10日  
DNAの化学修飾と発癌  
—化学と生物学の接点—  
東京大学薬学部  
教授 首藤 紘一
2. 昭和60年11月13日  
安全性を主体とした構造 活性相関について  
北里大学薬学部  
教授 森口 郁生
3. 昭和61年1月31日  
人表皮細胞を用いた化学発癌の研究
4. 昭和61年2月26日  
医用材料の生体応答性  
国立循環器病センター  
人工臓器部  
研究室長 松田 武久
5. 昭和61年3月6日  
チトクローム P-450 の1次構造と分子進化  
財団法人癌研究会癌研究所  
生化学部長 藤井 義明

---

**支所所内講演会**

---

(昭和61年3月24日)

1. 存在と時間 その忘れられた世界から  
支所長 加納 晴三郎

## 特別研究 (厚生省)

1. 生活関連諸物質に含まれる微量有害成分の体内動態ならびに毒性発現機構に関する研究 (合成, 環境, 食品, 医化学, 支所薬品)
2. 遺伝子組換え等の新技术により生産される高分子医薬品の品質試験法の開発研究 (生物, 放射線, 薬理, 支所薬品)

## 国立機関原子力試験研究費 (科学技術庁)

1. 放射性医薬品の品質試験法に関する研究 (放射線)
2. 体内適用放射性医薬品の安全性に関する研究
  - (1) 放射性医薬品の標的臓器の生化学的機能に及ぼす影響 (放射線, 食品)
  - (2) 放射性医薬品の毒性試験 (毒性)
  - (3) 放射性医薬品の各種臓器に及ぼす組織学的変化に関する研究 (病理)
  - (4) 放射性医薬品の突然変異原性に関する研究 (変異原)
  - (5) 放射性医薬品の生体解毒機能に及ぼす影響に関する研究 (薬理)
3. 標識化合物の利用による医薬品等の生体免疫機能に及ぼす影響に関する研究 (生物, 放射線)
4. 標識化合物を用いた化粧品安全性試験法の開発研究 (環境, 薬理, 放射線)
5. 薬用植物の優良品種の選抜法の開発に関する研究 (筑波)
6. 標識化合物と細胞工学的手法の利用による医薬品, 生活関連物質のアレルギー感作およびその安全性評価法の確立に関する基礎的研究 (生物)
7. 医薬品の生体利用率等におよぼす製剤材料の影響判定に用いる標準標識化合物の作成とその評価 (薬品, 支所薬品)

## 放射能調査研究費 (科学技術庁)

環境試料中の天然放射性核種の調査に関する研究

## 科学技術振興調整費 (科学技術庁)

1. ネットワーク共用による化合物情報等の利用高度化に関する研究
 

化合物総合データベースシステムの形成に関する研究

バイオロジカルデータベース作成・検索システム (情報, 薬理, 病理, 変異原)
2. 実験動物の開発等に関する研究
 

実験生物の開発に関する研究

## 実験動物の開発と品質管理に関する研究

- 小型霊長類等の実験動物化と特性に関する研究
- マーモセットの特性に関する研究 (毒性)
3. トガリネズミ科動物の特性および有用性に関する研究
 

スunksの特性と有用性に関する研究 (センター長, 薬理)
  4. 証・経穴の科学的実証および生薬資源の確保に関する総合研究
    - (1) 漢方療法に関する研究
 

証に関する研究

駆瘀血剤の有用性に関する研究 (生薬, 毒性, 薬理)
    - (2) 生薬資源の確保に関する研究
 

薬用植物の品質評価に関する研究 (筑波)
  5. 生体膜機能の解析・利用技術の開発に関する研究
    - (1) 特異的機能を持つ生体膜の解析・構成技術の開発
 

生体膜の精製技術の開発

界面活性剤の開発と使用条件の確立 (放射線, 合成)
    - (2) 生体膜の利用技術の開発
      - ① 反応物質等の吸収・輸送・蓄積技術の開発
 

生体膜の機能を利用して薬物を選択的に投与する技術の開発 (薬品)
      - ② 反応物質等の効率的な分離・濃縮技術の開発
 

生体膜機能を利用した生理活性物質の分離・精製技術等の開発 (療品, 放射線)
  6. アセアン諸国との協力による新有用遺伝子資源の探索と活用に関する共同研究
 

新有用遺伝子資源としての熱帯性植物の探索と活用技術の開発

有用生理活性物質を生産する薬用植物の探索と活用

医薬活性植物の探索と活用 (生薬)

## 国立機関公害防止等試験研究費 (環境庁)

1. 水域環境変異原性物質の生物評価に関する研究 (環境)
2. 生物質を指示剤とする環境汚染物質の監視システムに関する研究 (食品)

3. 環境汚染物質の発癌促進作用の評価に関する研究 (病理)
  4. 大気汚染物質の哺乳動物細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響に関する研究 (変異)
  5. 環境汚染物質の生体機能障害に関する研究 (薬理)
  6. 環境汚染物質と細菌毒素との生体系における相互作用に関する研究 (支所薬品, 支所食品, 支所薬徴)
  7. 環境汚染物質の低濃度レベルにおける生体内変異原活性検出法の開発に関する研究 (変異原)
  8. 脂溶性環境汚染物質に関するヒーマンモニタリング手法の開発とその応用に関する研究 (薬品, 環境)
- 厚生科学研究費補助金 (厚生省)
1. その他厚生行政の企画および効率的な推進に関する研究
    - (1) 食品中の一般生菌数測定方法の簡易化に関する研究 (衛徴)
    - (2) 照射食品の判別および国際動向等に関する研究 (毒性)
    - (3) 表示すべき食品添加物の範囲等の見直しに関する研究 (食添)
    - (4) 大麻種子の発芽不能処理方法の検討 (薬品)
  2. 医薬品薬効分類体系の適正化に関する研究 (薬理)
  3. 輸入熱帯病の治療薬に関する研究 (薬品)
  4. フッ素化合物の変異原性について (変異原)
  5. 坐剤の安全性確保に関する研究 (薬品, 支所薬品, 支所薬徴)
  6. 注射剤の局所刺激性に関する研究 (センター長, 毒性, 薬理)
  7. 標準品の製法およびその品質規格の設定に関する研究 (生物)
  8. 溶出試験による内服固形剤の品質向上に関する研究 (薬品)
  9. 局方生薬の規格設定に関する研究 (生薬)
  10. かぜ薬および解熱鎮痛薬の試験法整備のための研究 (薬品)
  11. 化粧品の新規基準作成に関する研究 (環境)
  12. 医薬品原料および添加剤の規格整備のための研究 (合成, 薬品, 生物, 情報, センター長, 支所薬品, 毒性, 薬理, 変異原)
  13. 発がんリスクの評価に関する研究 (薬品, 病理)
  14. ヒトがん発生における重要な促進物質の研究 (病理)
  15. 生活環境における発癌関連物質等による人体暴露とその総合評価に関する研究 (食品)
  16. 器具の試験法に関する研究 (食添)
  17. 食品中の各種汚染物質の実態に関する研究 (食品)
  18. 新開発食品の安全性評価に関する研究 (薬品, 食品, 生薬)
  19. 動物性食品中の残留医薬品等の検査法に関する調査研究 (食添)
  20. 天然添加物の分析手法等に関する研究 (食添, 支所食品)
  21. 海藻 (オゴノリ類) による原因不明の食中毒の解明に関する研究 (生薬, 食品, 毒性, 薬理)
  22. 食品化学物質の食品衛生上の有用性等に関する調査研究 (センター長)
  23. 漢方エキス剤の規格標準の作成に関する研究 (生薬)
  24. 農薬中毒の解毒剤に関する研究 (毒性)
  25. 歯科材料の安全性評価法の確立に関する研究 (療品, 毒性)
  26. バイオテクノロジーにより生産される医薬品の品質確保に関する研究 (センター長, 生物, 放射線)
  27. 高分子膜分離の方法による注射用原料水の製造に関する研究 (所長, 支所長, 生物, 支所薬品, 支所薬徴)
  28. 国家検定対象医薬品および検定基準の改善に関する研究 (薬品, 生物)
  29. 建築物維持管理, 資材の衛生安全性確保手法の策定に関する研究 (環境)
  30. 昇華性化学物質の吸入毒性に関する研究 (毒性, 合成)
  31. フサリウム属が産生するトリコテセン系カビ毒についての毒性学的作用等に関する研究 (衛徴, 食品)
  32. 生活環境中における家庭用品から発生する化学物質の吸入暴露に関する研究 (環境)
  33. 有害物質の健康リスク評価システムに関する研究 (薬品, 情報)
  34. 細胞資源保存に関する基礎的研究 (変異原)
  35. 家庭用繊維製品に使用される抗菌・防臭加工剤の安全性試験に関する研究 (療品)
  36. 食品添加物の変異原性に関する研究 (変異原)
  37. 水道水中の微量有機化合物の変異原性に関する研究 (変異原)
  38. 現場における食品等の簡易試験法に関する研究

(支所長, 支所食品)

39. 食品添加物生産量, 流通量, 消費量の総合的把握に関する調査研究 (支所食品)
40. 食品由来成分 (バックグランド) の含有量調査—食品添加物規格基準設定—(支所食品)
41. 残留農薬多成分分析法の作製 (支所食品)
42. 食品添加物の遊離と塩類の毒性比較 (支所食品, 支所薬徴)

科学研究費補助金 (文部省)

1. 単離細胞を用いた薬物性腎障害モデル作成に関する研究 (薬理)
2. ラット胎子を用いた胎生期の薬物代謝系の特異性の解析 (センター長, 薬理)
3. 合成黄体ホルモンによる性分化異常の発現機構に関する研究 (薬理)
4. 化学物質の機能的発達過程に及ぼす影響に関する行動薬理学的研究 (薬理)
5. クローン神経細胞を用いたレセプターアッセイによる抗うつ剤作用機序の検討 (薬理)
6. フェナセチン・ブセチンの代謝活性化と変異原性 (変異原)
7. 単離肝細胞を用いたジスルフィラムの肝毒性発現機構の研究 (薬理)
8. 食品起原プロオキシダントの測定法の確立とその応用 (薬品)
9. 発癌プロモーターとその抑制要因に関する研究 (病理)
10. 複数癌原因子の相互作用 (病理)
11. N-ニトロ化合物の構造, 代謝と標的臓器相関 (病理)
12. 胃癌の発生に関する研究 (病理)
13. 毒性発現機構に関する基礎的研究 (病理)
14. 微量元素の生体内動態と交互作用 (薬品)
15. 実験動物施設における滅菌, 消毒作業マニュアルの作成消毒剤の毒性に関する検討 (毒性)

16. フェナセチンの代謝活性化および不活性化に關与するチトクローム P-450 の分子種 (変異原)
17. ラット肝臓におけるニトロソアミン類の代謝とチトクローム P-450 分子種との関係 (薬品部) がん研究助成金 (厚生省)

1. 国産穀類のマイコトキシン汚染実態と汚染原因菌の生化学的検討 (衛徴)
2. アルコールと食塩の発癌プロモーター作用の研究—膀胱発生に及ぼす影響—(病理)
3. ヒトの内因性ニトロソ発がん物質および食品中のニトロソ化される物質の研究 (センター長, 食添, 薬理)
4. 飲料水中および大気中の発癌物質汚染に関する研究 (薬品, 食品, 環境)
5. 食品中のニトロソ化合物生成阻止物質の研究 (食添)
6. 長期動物試験による環境化学物質の発がん評価に関する研究 (病理, 食添)

委託事業

1. 覚せい剤中毒者診断用簡易試験法開発研究 (薬品) 厚生省
2. 尿中の覚せい剤類似物質の鑑定法研究 (薬品) 厚生省
3. 生体膜の薬物に対する選択的吸収能の評価技術に関する研究 (薬品) 厚生省
4. ディーゼル排出ガス影響調査に関する研究 (変異原) 環境庁
5. がん細胞の開発等に関する研究 (変異原) がん研究振興財団

その他

1. 食肉製品におけるセレウス菌の制御について (衛徴) 伊藤記念財団
2. 医薬品の規格および試験法に関する研究 (薬品, 生物) 日本公定書協会

## 国家検定および検査等の処理状況

## Survey of The Results of National Tests

昭和60年度における検定および検査等の処理状況は次のとおりである。

国家検定については、総件数で前年度に比べて277件(17.8%)の減少となった。

検定品目別では、ブドウ糖注射液が195件(15.3%)、昭和59年12月13日削除された抗結核薬5品目が90件減少となり、昭和60年11月5日に追加されたヒトインシ

ュリン注射液4品目が15件あった。

次に、製品検査については前年度に比べて20件(2.4%)、特別審査試験11件(4.6%)、輸入食品検査76件(61.3%)、一斉取締試験168件(35.9%)、特別行政試験283件(40.1%)の減少であった。

検定検査の処理件数は3,352件で、前年度に比べて834件(21.3%)の減少であった。

区 分	昭和60年度の処理件数			
	東	京	大 阪	合 計
国 家 検 定		550件	729件	1,279件
製 品 検 査		325	483	808
特 別 審 査 試 験	( 321)	227	—	( 321) 227
一 般 依 頼 試 験		2	0	2
特 別 行 政 試 験		406	17	423
一 斉 取 締 試 験		282	18	300
輸 入 食 品 検 査	( 27)	27	( 22) 21	( 49) 48
計	(1,913)	1,819	(1,269) 1,268	(3,182) 3,087

( ) 内数字は試験件数

国家検定および検査等の処理実績(次頁以下に掲載)は次のとおりである。

- 昭和60年度国家検定品目別月別判定別件数実績表…………… 256頁
- 昭和60年度製品検査月別判定別件数実績表… 258頁
- 昭和60年度特別審査試験月別判定別件数実

- 績表…………… 258頁
- 昭和60年度輸入食品検査品目別月別判定別件数実績表…………… 260頁
- 昭和60年度特別行政試験実績表…………… 264頁
- 昭和60年度一斉取締試験判定別件数実績表… 264頁

## 昭和60年度国家検定品目別

区分		4月			5月			6月			7月			8月			9月			
		合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	合格	不合格	計	
避妊用ポリオキソエチレンノニルフェニルエーテルゼリー	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—		
避妊用ポリオキソエチレンノニルフェニルエーテルフィルム	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	2	—	2	—	—		
避妊用ポリオキソエチレンノニルフェニルエーテル錠	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
避妊用メンフェゴール錠	東京	3	—	3	—	—	—	1	—	1	3	—	3	—	—	—	—	—		
インシュリン注射液	東京	1	—	1	3	—	3	1	—	1	—	—	—	1	—	1	1	—	1	
プロタミンインシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
イソフェンインシュリン水性懸濁注射液	東京	3	—	3	1	—	1	1	—	1	1	—	1	3	—	3	2	—	2	
インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	4	—	4	2	—	2	3	—	3	4	—	4	5	—	5	2	—	2	
ブタ精製インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	
結晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	
無晶性インシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
中性インシュリン注射液	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—		
ブタ精製中性インシュリン注射液	東京	1	—	1	—	—	—	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	
二相性インシュリン水性懸濁注射液	東京	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	
オキシトシン注射液	東京	4	—	4	5	—	5	3	—	3	9	—	9	2	—	2	2	—	2	
バソプレシン注射液	東京	—	—	—	3	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
タンニン酸バソプレシン注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
フェリプレシン注射液	東京	2	—	2	—	—	—	—	—	—	2	—	2	—	—	—	2	—	2	
ブドウ糖注射液	東京 大阪	28 61	—	28 61	39 71	—	39 71	19 59	—	19 59	63 66	—	63 66	17 73	—	17 73	23 62	—	23 62	
内訳	容量100 ml 未満	東京 大阪	9 36	—	9 36	18 36	—	18 36	12 36	—	12 36	24 43	—	24 43	7 41	—	7 41	9 43	—	9 43

月別判定別件数実績表 (No.1)

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
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
1	-	1	1	-	1	1	-	1	2	-	2	-	-	-	1	-	1	10	-	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	10	-	10
1	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	10	-	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	-	2
-	-	-	2	-	2	3	-	3	-	-	-	1	-	1	1	-	1	18	-	18
4	-	4	4	-	4	2	-	2	-	-	-	6	-	6	1	-	1	37	-	37
1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	5	-	5
-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	5	-	5
-	-	-	1	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	3	-	3
-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
2	-	2	6	-	6	2	-	2	2	-	2	6	-	6	3	-	3	46	-	46
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
2	-	2	-	-	-	-	-	-	2	-	2	1	-	1	1	-	1	12	-	12
27 72	1 -	28 72	34 34	- -	34 34	19 79	- -	19 79	25 39	1 -	26 39	30 48	- -	30 48	30 59	- -	30 59	354 723	2 -	356 723
11 35	1 -	12 35	17 24	- -	17 24	5 41	- -	5 41	9 22	- -	9 22	9 31	- -	9 31	17 33	- -	17 33	147 421	1 -	148 421

昭和60年度国家検定品目別

区分			4月			5月			6月			7月			8月			9月		
			合格	不合格	計															
内訳	容量100 ml以上	東京 大阪	19 25	—	19 25	21 35	—	21 35	7 23	—	7 23	39 23	—	39 23	10 32	—	10 32	14 19	—	14 19
	リンゲル液	東京 大阪	1 1	—	1 1	—	—	—	—	—	—	2 1	—	2 1	—	—	—	—	—	—
内訳	容量100 ml未満	東京 大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	容量100 ml以上	東京 大阪	1 1	—	1 1	—	—	—	—	—	—	2 1	—	2 1	—	—	—	—	—	—
	ヒトインシュリン注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒトインシュリン水性懸濁注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	半合成ヒト中性インシュリン注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	半合成ヒトインシュリン亜鉛水性懸濁注射液	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	計	東京 大阪	50 62	—	50 62	57 71	—	57 71	30 59	—	30 59	88 67	—	88 67	31 73	—	31 73	36 63	—	36 63
合計			112	—	112	128	—	128	89	—	89	155	—	155	104	—	104	99	—	99

昭和60年度製品検査月別

区分		4月			5月			6月			7月			8月			9月		
		合格	不合格	計															
東	京	33	—	33	8	—	8	32	—	32	35	—	35	30	—	30	35	—	35
大	阪	61	—	61	24	—	24	34	—	34	37	—	37	52	—	52	32	—	32
計		94	—	94	32	—	32	66	—	66	72	—	72	82	—	82	67	—	67

昭和60年度特別審査試験月別

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												
東	京	22	—	22	16	—	16	42	—	42	52	—	52	22	—	22	4	—	4
試験件数		41			18			71			86			25			4		

月別判定別件数実績表 (No.2)

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
16	—	16	17	—	17	14	—	14	16	1	17	21	—	21	13	—	13	207	1	208
37	—	37	10	—	10	38	—	38	17	—	17	17	—	17	26	—	26	302	—	302
—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	5
1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	6	—	6
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	—	5
1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	1	—	1	—	—	—	6	—	6
—	—	—	—	—	—	3	—	3	—	—	—	1	—	1	1	—	1	5	—	5
—	—	—	—	—	—	1	—	1	2	—	2	1	—	1	1	—	1	5	—	5
—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	1	—	1	3	—	3
—	—	—	—	—	—	1	—	1	1	—	1	—	—	—	—	—	—	2	—	2
38	1	39	51	—	51	38	—	38	36	1	37	51	—	51	42	—	42	548	2	550
73	—	73	34	—	34	80	—	80	39	—	39	49	—	49	59	—	59	729	—	729
111	1	112	85	—	85	118	—	118	75	1	76	100	—	100	101	—	101	1,277	2	1,279

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
7	—	7	32	—	32	5	—	5	42	—	42	28	—	28	38	—	38	325	—	325
48	—	48	46	—	46	45	—	45	16	—	16	31	—	31	57	—	57	483	—	483
55	—	55	78	—	78	50	—	50	58	—	58	59	—	59	95	—	95	808	—	808

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	3	—	3	15	—	15	18	—	18	14	—	14	11	—	11	227	—	227
		8			6			15			20			16			11			321





## 昭和60年度輸入食品試

区 分	4 月				5 月				6 月				7 月				8 月				9 月			
	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計	合格	不合格	要注意	計
上記いずれにも属さないもの	東京	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	大阪	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
計	東京	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	大阪	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	計	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	(2) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

験月別判定一覧表(No.2)

10 月			11 月			12 月			1 月			2 月			3 月			合 計			試験 件数		
合 格	不 合 格	要 注 意 計																					
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
0	0	(3) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	22	22	0	(5) 22	27
0	0	(13) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2) 0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	(15) 6	22
0	0	(16) 0	0	0	0	0	0	0	0	0	(2) 0	0	0	0	0	22	0	0	22	27	1	(20) 28	49

( ) 内数字は無判定

## 昭和60年度特別行政試験実績表

局(部) 課(室)	品(項) 目	件数	担 当 部
薬 務 局	監視指導課	1. 医薬品の収去試験について	23 薬品部
		2. 医薬品の検定規準, 検定手数料及び試験品の数量の改正案の作成	8 {生物化学部(4) 衛生微生物部(4)}
麻 薬 課	1. 国内産収納あへんのモルヒネ含有率試験	37	{薬品部(25) 大阪支所薬品部(12)}
	2. 輸入あへん(インド産)のモルヒネ含有率試験	60	薬品部
	3. 栽培試験によるケシのアヘンアルカロイドの定量	235	薬品部
生活衛生局	食品保健課	1. 食品の衛生規範の設定等に係る試験検査	30 衛生微生物部
		2. ミネラルウォーターに係る試験	3 衛生微生物部
宮 内 庁	食品化学課	食用赤色105号の検査	5 大阪支所食品部
	管理部	ワインの検査	22 食品部
計		423	{東京 406件 大阪 17件}

## 昭和60年度一斉取締試験判定別件数実績表

区 分	合 格	不 合 格	計
東 京	282	0	282
大 阪	18	0	18
計	300	0	300

## 国立衛生試験所標準品

Reference Standards Prepared by National  
Institute of Hygienic Sciences

国立衛生試験所において製造し、交付している標準品は別表のとおりである。

## 別表

## 日本薬局方標準品

(昭和61年4月1日現在)

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	アスコルビン酸	1g入 1本	15,500	アスコルビン酸散、同注射液の定量法
2	安息香酸エストラジオール	50mg入 1本	12,000	安息香酸エストラジオールの純度試験、同注射液、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
3	インスリン	20mg入 1本	22,900	インスリン、インスリン注射液、インスリン亜鉛水性懸濁注射液、結晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、無晶性インスリン亜鉛水性懸濁注射液、プロタミンインスリン亜鉛水性懸濁注射液、イソフェンインスリン水性懸濁注射液および中性インスリン注射液の定量法、イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
4	エルゴカルシフェロール	100mg入 1本	14,100	エルゴカルシフェロールの確認試験および定量法
5	塩酸チアミン	1g入 1本	14,700	塩酸チアミン、同散、同注射液、硝酸チアミン、乾燥酵母の定量法
6	塩酸ピリドキシン	200mg入 1本	18,400	塩酸ピリドキシン注射液の定量法
7	含糖ペプシン	5g入 1本	14,900	含糖ペプシンのたん白消化力試験
8	吉草酸ベタメタゾン	100mg入 1本	14,400	吉草酸ベタメタゾンの確認試験および定量法
9	ジゴキシン	20mg入 1本	11,900	ジゴキシン、同錠、同注射液の純度試験
10	血清性性腺刺激ホルモン	1,000単位入	28,400	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
11	コハク酸トコフェロール	150mg入 1本	12,900	コハク酸トコフェロールカルシウムの定量法、同ナトリウムの定量法
12	コハク酸ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	14,400	コハク酸ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法
13	コレカルシフェロール	100mg入 1本	14,100	コレカルシフェロールの確認試験および定量法
14	酢酸コルチゾン	100mg入 1本	11,500	酢酸コルチゾンの確認試験および定量法 同水性懸濁注射液の確認試験
15	酢酸トコフェロール	150mg入 1本	12,900	酢酸トコフェロールの確認試験および定量法
16	酢酸ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	12,500	酢酸ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法、同水性懸濁注射液の確認試験および定量法
17	酢酸プレドニゾン	100mg入 1本	12,300	酢酸プレドニゾンの確認試験および定量法
18	シアノコバラミン	200mg入 1本	11,800	シアノコバラミン、同注射液の定量法、酢酸ヒドロキシコバラミンの純度試験および定量法
19	ジギタリス	1g入 3本	12,100	ジギタリス、同末の定量法
20	ジギトキシン	50mg入 1本	11,800	ジギトキシンの確認試験および定量法、同錠の溶出試験、含量均一性試験および定量法
21	ジゴキシン	50mg入 1本	11,600	ジゴキシンの確認試験および定量法、同錠の溶出試験、含量均一性試験および定量法、同注射液の定量法
22	酒石酸水素エピネフリン	50mg入 1本	10,200	エピネフリン、ノルエピネフリン、同注射液の純度試験
23	酒石酸水素ノルエピネフリン	50mg入 1本	11,400	エピネフリン、ノルエピネフリンの純度試験、同注射液の純度試験および定量法
24	G-ストロファンチン	100mg入 1本	12,500	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

## 日本薬局方標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
25	胎盤性性腺刺激ホルモン	1,000単位入 1本	26,800	胎盤性性腺刺激ホルモン、注射用胎盤性性腺刺激ホルモンの定量法
26	チロジン	500mg入 1本	10,100	バンクレアチンのたん白消化力試験
27	デキサメタゾン	100mg入 1本	12,300	デキサメタゾンの確認試験および定量法
28	デスラノシド	100mg入 1本	12,900	デスラノシドの純度試験および定量法、同注射液の確認試験および定量法
29	トコフェロール	150mg入 1本	12,900	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および酢酸トコフェロールの純度試験
30	トリアムシノロン	100mg入 1本	12,300	トリアムシノロンの確認試験および定量法
31	トリアムシノロンアセトニド	100mg入 1本	12,300	トリアムシノロンアセトニドの確認試験および定量法
32	トロンビン	500単位入 2本	29,500	トロンビンの定量法
33	ニコチン酸	500mg入 1本	12,200	ニコチン酸注射液の定量法
34	ニコチン酸アミド	500mg入 1本	13,000	ニコチン酸アミド注射液の定量法
35	脳下垂体後葉	20mg入 2本	11,300	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
36	薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	10,000単位入 10カプセル	3,400	酢酸レチノールおよびパルミチン酸レチノールの確認試験、ビタミンA油、同カプセルの定量法
37	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 10カプセル	3,300	酢酸レチノールおよび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
38	パラアミノベンゾイルグルタミン酸	500mg入 1本	20,400	葉酸の純度試験
39	ヒドロクロロチアジド	100mg入 1本	11,300	ヒドロクロロチアジドの定量法
40	ヒドロコルチゾン	100mg入 1本	12,300	ヒドロコルチゾンの確認試験および定量法、プレドニゾロンの純度試験
41	フルオシノロンアセトニド	50mg入 1本	11,900	フルオシノロンアセトニドの定量法
42	プレドニゾン	100mg入 1本	11,900	プレドニゾロンの確認試験、同錠の確認試験、溶出試験および含量均一性試験
43	プロゲステロン	50mg入 1本	11,700	プロゲステロンの確認試験
44	ベタメタゾン	100mg入 1本	12,300	ベタメタゾンの確認試験および定量法
45	ヘパリンナトリウム	1,200単位入 1本	20,300	ヘパリンナトリウム、同注射液の定量法、硫酸プロタミン、同注射液の抗ヘパリン試験
46	マレイン酸エルゴメトリン	50mg入 1本	13,000	マレイン酸エルゴメトリンの純度試験および定量法、同錠の含量均一性試験および定量法、同注射液の定量法、マレイン酸メチルエルゴメトリンの定量法、同錠の含量均一性試験および定量法
47	メトトレキサート	200mg入 1本	18,500	メトトレキサートの確認試験および定量法
48	葉酸	500mg入 1本	13,600	葉酸、同錠、同注射液の定量法
49	ラナトシドC	100mg入 1本	12,200	ラナトシドCの純度試験および定量法、同錠の確認試験、溶出試験、含量均一性試験および定量法
50	リボフラビン	200mg入 1本	15,400	リボフラビン、同散、リン酸リボフラビンナトリウム、同注射液の定量法
51	硫酸プロタミン	100mg入 1本	20,000	イソフェンインスリン水性懸濁注射液の純度試験
52	レセルピン	50mg入 1本	21,800	レセルピン、同散、同錠、同注射液の定量法、同錠の溶出試験および含量均一性試験

## 国立衛生試験所標準品

(昭和61年4月1日現在)

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
1	ウロキナーゼ	1,000単位入1本	15,400	ウロキナーゼ原液およびその製剤の定量法
2	エストラジオール	50mg入 1本	12,000	エストラジオール製品の純度試験
3	エストロン	50mg入 1本	12,000	エストロン製品の確認試験および定量法
4	塩酸チアミン液	1mg入 10本	8,500	チアミン製品の定量法
5	カリジノゲナーゼ	100単位入 1本	13,500	カリジノゲナーゼおよびその製剤の生物活性試験並びに定量法
6	ヒアルロニダーゼ	500mg入 1本	14,300	注射用ヒアルロニダーゼの定量法
7	フルオシノニド	100mg入 1本	14,400	フルオシノニドの確認試験および定量法
8	プロピオン酸テストステロン	50mg入 1本	11,500	プロピオン酸テストステロン製品の定量法
9	融点測定用 アセトアニリド, アセトフェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スルファピリジン, フニリン	各1g入 6本	35,700	融点測定用温度計, 同装置の補正
10	リゾチーム	500mg入 1本	19,500	リゾチーム製品の定量法
11	リン酸ヒスタミン	50mg入 1本	9,600	ヒスタミン試験
12	ルチン	500mg入 1本	11,100	ルチン製品の定量法
13	アシッドバイオレット6B	1g入 1本	2,900	食品, 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
14	アシッドレッド	1g入 1本	3,100	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のアシッドレッドの確認試験
15	アゾルビンエキストラ	1g入 1本	2,700	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
16	アマランス	1g入 1本	2,600	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
17	インジゴ	1g入 1本	2,800	外用医薬品, 化粧品および製剤中のインジゴの確認試験
18	インジゴカルミン	1g入 1本	2,600	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
19	エオシン	1g入 1本	2,700	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のエオシンの確認試験
20	エリスロシン	1g入 1本	2,800	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のエリスロシンの確認試験
21	オイルエロー AB	1g入 1本	2,500	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
22	オイルエロー OB	1g入 1本	2,500	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
23	オイルオレンジ SS	1g入 1本	2,500	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
24	オイルレッド XO	1g入 1本	2,400	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
25	オレンジ I	1g入 1本	2,600	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

## 国立衛生試験所標準品

	標準品名	包装単位	価格	使用目的
26	オレンジ II	1g入 1本	2,600	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
27	ギネアグリーン B	1g入 1本	2,900	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のギネアグリーンBの確認試験
28	サンセットエロー FCF	1g入 1本	2,600	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
29	タートラジン	1g入 1本	2,600	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
30	テトラクロルテトラブromフルオレセイン	1g入 1本	2,700	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romフルオレセインの確認試験
31	テトラブromフルオレセイン	1g入 1本	2,900	外用医薬品, 化粧品および製剤中のテトラブromフルオレセインの確認試験
32	トルイジンレッド	1g入 1本	2,400	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
33	ナフトールエロー S	1g入 1本	2,700	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のナフトールエローの確認試験
34	ニューコクシン	1g入 1本	2,600	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
35	パーマネントオレンジ	1g入 1本	2,400	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
36	ハンサエロー	1g入 1本	2,400	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
37	ファストグリーン FCF	1g入 1本	3,700	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のファストグリーン FCFの確認試験
38	ファストレッド S	1g入 1本	3,100	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のファストレッドSの確認試験
39	ブリリアントブルー FCF	1g入 1本	2,800	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
40	フルオレセイン	1g入 1本	2,700	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
45	フロキシシン	1g入 1本	2,700	食品, 医薬品, 化粧品および製剤中のフロキシシンの確認試験
46	ボンソー R	1g入 1本	2,700	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
47	ボンソー SX	1g入 1本	2,700	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
48	ボンソー 3R	1g入 1本	2,800	粘膜以外医薬品, 化粧品および製剤中のボンソー3Rの確認試験
49	リソールルピン BCA	1g入 1本	2,800	外用医薬品, 化粧品および製剤中のリソールルピンBCAの確認試験
50	レーキレッド C	1g入 1本	2,800	外用医薬品, 化粧品および製剤中のレーキレッドCの確認試験
51	レーキレッド CBA	1g入 1本	2,900	外用医薬品, 化粧品および製剤中のレーキレッドCBAの確認試験
52	レーキレッド DBA	1g入 1本	2,900	外用医薬品, 化粧品および製剤中のレーキレッドDBAの確認試験
53	ローズベンガル	1g入 1本	2,700	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

## 昭和60年度国立衛生試験所標準品出納状況

(医薬品等試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量 個	製造数量 個	売払数量 個	自家消費等 数量 個	年度末 在庫数量 個	備考
アスコルビン酸	101	160	180	0	81	
安息香酸エストラジオール	50	47	4	50	43	
インシュリン	4	91	77	11	7	
ウロキナーゼ	8	97	92	0	13	
エストラジオール	25	73	14	25	59	
エストロン	41	39	0	41	39	
塩酸チアミン	82	200	209	0	73	
塩酸チアミン液	53	0	23	0	30	
塩酸ピリドキシソ	149	100	220	0	29	
カリジノゲナーゼ	2	209	156	12	43	
含糖ペプシン	43	43	16	43	27	
吉草酸ベタメタゾン	0	50	3	2	45	
ギトキシソ	39	0	11	0	28	
血清性性腺刺激ホルモン	40	100	55	0	85	
コハク酸ヒドロコルチゾン	0	50	1	2	47	
酢酸コルチゾン	25	0	3	1	21	
酢酸ヒドロコルチゾン	33	50	26	2	55	
酢酸ブレドニゾロン	39	0	4	0	35	
シアノコバラミン	87	200	234	0	53	
ジギタリス	18	0	0	1	17	
ジギトキシソ	32	0	12	0	20	
ジゴキシソ	38	101	96	0	43	
酒石酸水素エピネフリン	32	30	1	32	29	
酒石酸水素ノルエピネフリン	29	27	1	29	26	
G-ストロファンテン	30	0	3	0	27	
胎盤性性腺刺激ホルモン	75	97	94	0	78	
チロジン	97	100	118	0	79	
デキサメタゾン	0	50	1	2	47	
デスラノシド	22	0	10	0	12	
トリアムシノロン	0	50	1	2	47	
トリアムシノロンアセトニド	0	50	1	2	47	
トロンピン	37	50	39	0	48	
ニコチン酸	59	0	27	0	32	
ニコチン酸アミド	102	100	118	0	84	
脳下垂体後葉	15	48	12	14	37	
薄層クロマトグラフ用酢酸レチノール	101	0	17	1	83	
薄層クロマトグラフ用パルミチン酸レチノール	122	0	38	0	84	
パラアミノベンゾイルグルタミン酸	20	0	7	0	13	
ヒアルロニダーゼ	31	0	1	0	30	
ヒドロコルチゾン	66	50	11	2	103	
フルオシノロンアセトニド	60	0	22	0	38	
ブレドニゾロン	33	0	27	2	4	

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
プロゲステロン	44	0	3	0	41	
プロピオン酸テストステロン	30	28	2	30	26	
ベタメタゾン	0	50	1	2	47	
ヘパリンナトリウム	36	61	51	0	46	
マレイン酸エルゴメトリン	48	95	49	48	46	
メトトレキサート	37	0	0	2	35	
融点測定用 (アセトアニリド, アセトフ ェネチジン, カフェイン, スルファニルアミド, スル ファピリジン, ワニリン)	21	21	26	0	26	
葉酸	51	70	57	0	64	
ラナトシドC	14	0	9	0	5	
リゾチーム	47	390	307	1	129	
リボフラビン	4	432	329	0	107	
硫酸プロタミン	12	0	0	0	12	
リン酸ヒスタミン	31	65	41	31	24	
ルチン	37	0	19	0	18	
レセルピン	70	0	13	0	57	
計	2,322	3,474	2,892	390	2,514	

## (色素試験用標準品)

標準品名	前年度末 在庫数量 個	製造数量 個	売払数量 個	自家消費等 数量 個	年度末 在庫数量 個	備考
アシッドバイオレット6B	79	0	1	0	78	
アシッドレッド	1	0	1	0	0	
アゾルビンエキストラ	89	0	1	0	88	
アマランス	492	0	7	0	485	
インジゴ	139	0	4	1	134	
インジゴカルミン	0	0	0	0	0	
エオシン	120	0	1	0	119	
エリスロシン	0	0	0	0	0	
オイルエローAB	223	0	3	0	220	
オイルエローOB	233	0	3	0	230	
オイルオレンジSS	230	0	3	0	227	
オイルレッドFXO	210	0	4	1	205	
オレンジI	279	0	3	0	276	
オレンジII	158	0	1	0	157	
ギネアグリーンB	73	0	3	0	70	
サンセットエローFCF	0	0	0	0	0	
タートラジン	0	0	0	0	0	
テトラクロルテトラブROMフル オレセイン	158	0	3	1	154	
テトラブROMフルオレセイン	119	0	4	1	114	
トルイジンレッド	82	0	2	0	80	
ナフトールエローS	152	0	2	0	150	
ニューコクシン	0	0	0	0	0	
パーマネントオレンジ	36	0	3	0	33	
ハンサエロー	81	0	3	0	78	
ファストグリーンFCF	38	0	6	0	32	
ファストレッドS	205	0	5	0	200	
ブリリアントブルーFCF	0	0	0	0	0	
フルオレセイン	196	0	5	1	190	
フロキシシン	365	0	6	1	358	
ボンソーR	250	0	2	0	248	
ボンソーSX	154	0	4	0	150	
ボンソー3R	162	0	4	0	158	
リソールルビンBCA	365	0	2	0	363	
レーキレッドC	392	0	3	2	387	
レーキレッドCBA	125	0	2	0	123	
レーキレッドDBA	166	0	3	0	163	
ローズベンガル	0	0	0	0	0	
計	5,372	0	94	8	5,270	

# 衛生試験所報告への投稿について

## 投稿規定

1. 投稿資格：国立衛生試験所所員とする（共著者はこの限りでない）。
2. 内容：原稿は報文、ノート、資料とする。そのほか誌上発表、学会発表、業務報告、総説などを収載する。
 

報文：独創性に富み、新知見を含むまとまった研究業績。  
 ノート：断片的な研究業績で、独創性や新知見が認められるもの。  
 資料：試験、製造または調査などで、記録しておく必要のあるもの。  
 誌上発表：衛生試験所報告以外の専門誌に発表したもの。  
 学会発表：学会で講演したもの。  
 業務報告：所長、各部長（支所も含む）および各薬用植物栽培試験場の長が過去1年間（前年度）の業務成績、研究業績をまとめた報告。  
 総説：所員の調査または研究を中心とした総説で、図書委員会が執筆を依頼したもの。
3. 用紙および枚数の制限：衛生試験所所定の原稿用紙あるいは、ワープロ用紙（B5、20×20）を用い、原則として下記の規定に従う。
 

報文：図表を含めて20枚以内。  
 ノートおよび資料：図表を含めて15枚以内。  
 誌上発表：1題目について1枚程度。  
 業務報告：各部および各薬用植物栽培試験場について8枚以内。  
 総説：原稿を依頼するとき別に定める。
4. 原稿の提出：原稿は表紙（第1ページとする）、英文要旨、本文、文献、英文要旨の和文（参考）、最後に図表を入れた封筒の順に左上をひもでとじ、表紙右上に報文、ノート、資料のうち希望する分類を朱書きし、所長宛の報告書を表紙の上に添えて、定められた原稿〆切期日までに図書館宛に提出する。
5. 原稿の審査：図書委員会は提出された原稿の採否および分類を決定する。また、必要ならば字句や表現の部分的な訂正、図表の書き直しなどを求める。

## 執筆規定

1. 文体：現代かなづかい、新送りがな、ひらがなまじり口語文とし、簡潔で理解しやすい表現にする。原稿の語句の統一を計るため、原則的に「日本薬局方記載の手引」に従う。ただし用語例に関しては「衛生試験所報告記載の手引」による。止むを得ぬ学術用語以外は当用漢字を用いる。必要ならば全文を外国語で書いてもよい。
 

なお、外国文はタイプライター（ダブルスペース）で打つこと。  
 また、原稿は楷書ペン書きおよびワードプロセッサ書きにする。
2. 学術用語：学会の慣例に従う。文中では物質はその名称を記し、化学式は用いない。例えば塩酸と書き、HCl としない。また、化学名を英語で書く場合、文中では原則として小文字で始める。
3. 略記、略語、記号：次の例示のほかは学会の慣例に従う。また、物質名あるいは分析法などを略記するとき、和文、英文とも最初は正式な名称とともに示す。例えば、イソニコチン酸(INA)、示差熱分析法—ガスクロマトグラフィー (DTA-GC) と書き、(以下 INA と略す) などとしない。

### 3・1 単位のべき指数表記には、次の記号を用いる。

テ	ラ (tera)	10 <sup>12</sup>	T	ミ	リ (milli)	10 <sup>-3</sup>	m
ギ	ガ (giga)	10 <sup>9</sup>	G	マイクロ	(micro)	10 <sup>-6</sup>	μ
メ	ガ (mega)	10 <sup>6</sup>	M	ナ	ノ (nano)	10 <sup>-9</sup>	n
キ	ロ (kilo)	10 <sup>3</sup>	k	ピ	コ (pico)	10 <sup>-12</sup>	p
デ	シ (deci)	10 <sup>-1</sup>	d	フェムト	(femto)	10 <sup>-15</sup>	f
セ	ンチ (centi)	10 <sup>-2</sup>	c	ア	ト (atto)	10 <sup>-18</sup>	a

## 3・2 物理量、化学量、物性などの単位および定数の記号または略号は、次に掲げるものを用いる。

メートル	m	度(セルシウス)	°C	parts per billion	ppb
マイクロメートル	$\mu\text{m}$	ケルビン度	K	モル濃度	M
ナノメートル	nm	キュリー	Ci	規定濃度	N
( $m\mu$ を用いない)		カウント毎分	cpm	旋光度	$\alpha$
オングストローム	Å	(cps は用いない)		吸光度	A
平方メートル	$\text{m}^2$	ラド	rad	水素イオン指数	pH
アール	a	レム	rem	pK 値	pK
リットル	l	レントゲン	R	ミハエリス定数	K <sub>m</sub>
(L を用いない)		サイクル	cycle	R <sub>f</sub> 値	R <sub>f</sub>
ミリリットル	ml	回毎分	rpm	保持時間	t <sub>R</sub>
(cc を用いない)		ヘルツ	Hz	50%致死量	LD <sub>50</sub>
マイクロリットル	$\mu\text{l}$	キャンデラ	cd	50%有効量	ED <sub>50</sub>
( $\lambda$ を用いない)		ルクス	lx	経口投与	p. o.
立方メートル	$\text{m}^3$	ダイン	dyn	静脈投与	i. v.
グラム	g	気圧	atm	腹腔投与	i. p.
マイクログラム	$\mu\text{g}$	トル	Torr	皮下投与	s. c.
( $\gamma$ を用いない)		水銀柱ミリメートル	mmHg	筋肉投与	i. m.
時	hr	毎センチメートル	$\text{cm}^{-1}$	標準偏差	S. D.
分	min	(カイザー)		標準誤差	S. E.
秒	sec	融点	mp		
(時間は複数でも s をつけない)		分解点	mp(dec.)		
アンペア	A	沸点	bp	紫外吸収	UV
ボルト	V	凝固点	fp	赤外吸収	IR
オーム	$\Omega$	比重	d	核磁気共鳴	NMR
ガウス	G	屈折率	n	電子スピン共鳴	ESR
エルステッド	Oe	重量パーセント	%	旋光分散	ORD
ジュール	J	容量/重量パーセント	v/w%	円偏光二色性	CD
カロリー	cal	parts per million	ppm	マスペクトル	MS

4. 句読点: , . を用い、. . . としない。

5. 数字: アラビア数字を用いる。千の単位にコンマをつけない。ただし、成語となっている数字は漢字とする。

6. 字体の指定: 黒鉛筆で次のように記す。

ゴシック体~~~~~	例: 見出しなど	<u>試薬</u>
イタリック体——	例: 学名など	<i>Papaver somniferum</i> L.
スモールキャピタル——	例: 著者名など	Masato <u>ASAHINA</u>

7. 報文、ノート、資料の記載要領:

7・1 記載順序: 7・2~7・5 の順に書く。

7・2 題名、著者名: 次の例に従い、表紙(用紙1枚全部)をこれに当てる。

例: 医薬品の確認試験法に関する研究(第2報)

鎮痛剤のクロマトグラフィー

用賀 衛・世田一郎・東京子

Studies on the Identification of Drugs II

Chromatographic Methods for the Analgesics

Mamoru YOGA, Ichirō SETA and Kyōko AZUMA

7・3 英文要旨: 論文の内容を簡潔にまとめ、タイプライターで打つ。参考のため別紙に書いた和文を文献の次に添える。

7・4 本文: 新しいページから書き始める。本文のスタイルは特に規定しないが、内容の重複を避ける。凸版にする図、または原稿用紙に書き切れない表がある場合、それらのそう入位置に若干の余白を設け、図表の番号を明記する。

7・5 文献: 本文の引用箇所の右肩に<sup>3)</sup>, <sup>2,5)</sup>, <sup>1-4)</sup> のように記し、終わりに文献として引用順に書く。

雑誌名は Chemical Abstracts 及び日本化学総覧の略記法による。外国雑誌名はイタリ

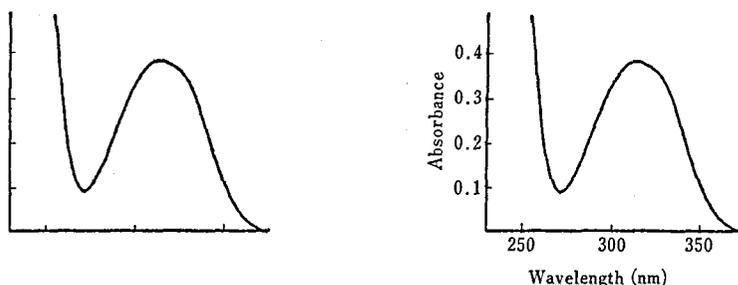
ック体で表し、単行本は書名を省略しない。

- 例：1) 神蔵美枝子, 谷村頭雄: 衛生試報, 88, 112 (1970)  
 2) 菅野三郎ら: 衛生化学, 17, 19 (1971)  
 3) M. D. Hollenberg, D. B. Hope: *Biochem. J.*, 106, 557 (1968)  
 4) A. White *et al.*: *Principles of Biochemistry*, 4th Ed., p. 937 (1968), McGraw-Hill Inc., New York  
 5) 佐々木慎一: マススペクトル解説, p. 61 (1967) 広川書店  
 6) USP XVIII, p. 321      7) JIS K 1234 (1970)

7・6 図 表: 図または複雑な構造式など、凸版にする必要のあるものは厚手白色紙か青色方眼紙(黒、茶色の方眼紙は使用しない)に黒インクまたはすみで書き、図中の数字、記号または説明などの文字は入れない(原図)。別に原図のコピーをとり、図中の数字、記号または説明などの文字はタイプで打ち、原図と共に提出する。ただし、説明が多い場合は別紙にタイプしても良い。

また、図の大きさは原則として原稿用紙1/2枚とする。表の画線はできるだけ少なくし、左右両端の縦線を省く。簡単な表はなるべく本文中に書き、図はすべて本文中に書かない。

(例)



(原図)

Fig. 2. Ultraviolet spectrum of material for "Ergometrine Maleate Reference Standard" (20 µg/ml) (コピーにタイプ)

図の番号は Fig. 1., Fig. 2., ……とし、表題、説明はともに図の下に、表の番号は Table 1., Table 2., ……とし、表題は表の上に、説明は表の下に記す。なお、表題、説明は原則として英語で書き(資料の場合はこの限りでない)、表題は大文字で始め、最後に . をつけない。

例: Fig. 1. Influence of enzyme concentration on reductive sugar production

Table 2. Reaction of ephedrine and pseudoephedrine with acetone as a function of time

図および別紙に書いた表は、その裏に題名、著者名、本文中のそう入ページを記す。提出するときは一括して封筒に入れ、そのおもてに論文題名、著者名、ならびに図、表のそれぞれの枚数を記し、原稿の最後にとじる。

8. 誌上発表の記載要領: 題名の次に改行して著者名、雑誌名、巻数、ページ数、年号の順に記す。さらに改行して論文の要旨のみに記す。外国語の論文の要旨は、日本語で原稿用紙1枚程度にまとめる。ただし、題名、著者名、雑誌名は外国語。
9. 学会発表の記載要領: 演者名に続いて演題名を記す。改行して学会名、日付け [例: (1972. 4. 5)] を記す。各演題ごとに余白2行を設ける。

## 校 正

初校は著者が行う。人名、化学名、数値、文献などは特に綿密に校正する。内容の追加、行数の増加は認めない。

国立衛生試験所図書委員会

昭和 61 年度 図書編集委員

谷村 顕雄	武田 明治	竹中 祐典
末吉 祥子	吉岡 澄江	押沢 正
永松 国助	鈴木 英世	鹿庭 正昭
豊田 正武	川崎 洋子	宇田川 俊一
高橋 照江	小林 和雄	川島 邦夫
長谷川 良平	松岡 厚子	長谷川 隆一
飯田 修	大野 清	笹子 久美子

衛生試験所報告 第104号

昭和 61 年 10 月 25 日 印刷  
昭和 61 年 10 月 31 日 発行

発行所 国立衛生試験所化学物質情報部  
東京都世田谷区上用賀1丁目18番1号

印刷所 サンヨー印刷株式会社  
東京都文京区小石川2-25-12-903