i

目 次

報	文				
パラアミ	ノサリチ	レ酸カルシウム顆粒中のカルシウムの定量	板井孝信,	菅沼義夫	1
60Co照射i	こよるホス	vモン剤の殺菌に関する研究·······	シ沢佳熊,中山豪 -	一,芹沢淳,	
		佐	佐藤浩,白井浄二 …	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	5
⁶⁵ Znの組約	微への沈清	青に関する研究長沢	?佳熊,中山豪一,	城戸靖雅,	
		鱼 名	>勝昭⋯⋯⋯		7
微量砒素	分析におり	ける反射光電比色法の利用(第1報)JI	城巖,岡田太郎,	加藤三郎	15
モノフル:	オール酢	彼(殺鼠剤) 及びモノフルオール酢酸アミド			
(農	薬)の定性	ŧ, 定量について	川城巖,川田公平,	竹内末久	19
農薬モノ	フルオー	♪酢酸アミドの残留試験(▮)茶及び柿について	川城巖,	竹内末久	23
農薬0-エ	チルー0-	-パラニトロフェニルベンゼンチオホスヘイト			
(E	PN)の数	【留試験······	·川城巖,竹内末久	、 江島昭	25
モノアゾ{	色素還元[戈績体の沪紙クロマトグラフィーについて 藤井清	与次,神蔵美枝子,紹	国具祐太郎	29
食品中の約	繊維素グ	リコール酸ナトリウムの定量法に関する研究(第1報)			
ケチ	ャップ,ジ	ャム及びマーマレード中の定性, 定量について	藤井清次,	原田基夫	33
バニリン:	およびイ	ノバニリンのポーラログラフ的還元について	藤井正道	道,佐藤寿	43
有機化合物	物のポー	ラログラフによる研究(第7報)クリソイジンの			
ポー	ラログラ	フィー, (第8報) 0-クロルマーキュリフェノールのポ	ーラログラフィー	,	
(第9	報)置接	ニトロベンゾール類のポーラログラフィー,			
(第10)報)辛味	性ケトン類のポーラログラフィー		·佐藤 寿	47
油性メチ	ルパラフ	ィノール・カプセルの定量法について	板井孝信,	神谷庄造	71
赤外線吸	収スペク	トル分析の医薬品試験における応用(第4報)			
消毒	用アルコ	- ル中のアルコール類の定量		…大場琢磨	73
医薬品の	螢光分析	に関する研究(第3報)医薬品の螢光強度及び			
螢光1	色		市村陽二,	太幡利一	79
医薬品の	螢光分析	こ関する研究(第4報)色素類の螢光強度及び			
螢光	色		太幡利一,	市村陽二	85
インシュ	リンの薬	L学的研究(第 19 報)純系マウスを用いる			
イン	シュリン	の検定長沙	尺佳熊,中山豪一,	西崎笹夫,	
		芹沙	尺淳		87
インシュ	リンの薬	L学的研究(第 20 報)粗マグロインシュリンから			
単離	した結晶	生蛋白質について長》	尺佳能,西崎笹夫,	平岡 孝,	
		深沙	尺真司		95
		上学的研究(第21報)アイソフェンインシュリン			
の電	気泳動に	ついて	長沢佳熊,	西崎笹夫	99
		ンムによる有機化合物の呈色反応(第4報)			
		ジン,プリン塩基の検出法·····			103
		、て(ルチンについて第4報)長沢			107
		ェクゴニンアルカロイド類の定量			113
		liva L. の抽出エキスの紫外線吸収について			117
		D沪紙クロマトグラフィー	朝比奈晴世,	志内賢彥	123
		フィーによるあへん中のモルヒネ定量について			
(そ)	の2) …		朝比奈晴世,	大野昌子	127

あへん産地鑑別法について(第8報)Porphyroxine-Meconidine		
比色定量(その3)		
沪紙クロマトグラフィーによるあへん中の主要アルカロイドの定	量郭比奈晴世,大野昌子	133
けし個体選抜に於ける個体間の生育並にあへん収量の		
差異について		
	伊坂 博,今井雅子,東谷芳江	
粉末生薬の純度測定法:分光反射率測定法の応用について		
ケシの栽培品種一貫種の特性について		
外国産ケシの外部形態的並にモルヒネ生産上の特性について		
タマサキツヅラフジの試植栽培(第2報) 実生栽培について(その) 2)石原活磨	165
レモングラスの生育並に含油量の時期的変化(第2報)植付2年		
度の成績	宮崎幸男	169
土壌水分がゼラニウム (Pelargonium denticulatum JACQ.) の		
生育並に含油量に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	宫崎幸男	181
ケシ (Papaver somniferum L.) の生育並びに収量に及ぼす		
肥料成分の影響について	木下孝三	189
クラムヨモギ (Artemisia kurramensis QAZILBASH) の水田裏作		
たついて		199
ヘパリン日局標準品力価の検定について	長沢佳熊,中山豪一,芹沢 淳	207
エピレナミンの検定(第3報)脳髄破壊白鼠による		
エピレナミンの2-2用量検定	長沢佳熊,中山豪一,芹沢 淳	211
性腺刺戟ホルモンの研究(第3報)胎盤性性腺刺戟ホルモン		
日局標準品の製造及びその検定	長沢佳熊,越村栄之助,岡崎精一	221
性腺刺戟ホルモンの研究(第4報)血清性性刺戟ホルモン		
日局標準品の製造及びその検定	長沢佳熊,越村栄之助,岡崎精一	231
食品着色料の食品衛生学的研究(第1報)特にローダミン,		
オーラミン、マラカイト緑の食品着色実態と消化酵素に		
及ぼす影響	… 青山好作, 宫沢文雄, 八田貞義,	
	大竹佐左衛門,浦部幹雄,酒井雄学,	
	藤田昭丸	
食品着色料の食品衛生学的研究(第2報)特に急性及び慢性	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
中毒量と生体臓器親和性について・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	青山好作,宮沢女雄,八田貞義、	
	小田幸子,浦部幹雄,酒井雄学,	
	藤田昭丸	245
食品着色料の食品衛生学的研究(第3報)特にローラミン,	NAC PRIVILLY II	
マラカイト緑の血液及び肝臓機能に及ぼす影響	壽山好作,宮沢文雄,覃枥以光。	
11 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	八田貞義,川浪 昇,浦部幹雄,	
	酒井雄学,藤田昭丸	251
食品着色料の食品衛生学的研究(第4報)特にローラミン,		201
スルフォローダミンの吸収並びに排泄について	李山好佐,它况才摊。10日春	
A CONTRACT TO THE CONTRACT OF	小田幸子,浦部幹雄,酒井雄学,	
	藤田和丸	250
Candida症の化学療法に関する実験的研究(第3報)特に発	8条四个4个6	200
育形態に関連して・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	冷心口→+++	265
『日本語に民産して 「Candida」 定面の化学療法に関する実験的研究(第4報)特に各	出版。	200
種薬剤の in vitro及びin vivoに於ける効果	1470日かか	971
		7.11

学童大便その他よりの病原性大腸菌検出について	山地幸雄,田中弘子,志波 剛,
	石関忠一,小嶋秩夫,金本珠子 279
ブドウ球菌性食中毒由来株に関する研究 特に供試株の	
Phage typing について	·······鈴木 昭,林 富子,河西 勉 289
90% 石炭酸による細菌内毒素の抽出	岩原繁雄,大渕令子
Zone ElectrophoresisによるShigella flexneri 2b	
の内毒素の精製(予報)	西村千昭,中村正夫,野崎泰彦 303
ゲル内抗原抗体反応(Ouchterlony法)による赤痢菌 (Shigella	
flexneri 2b)のO抗原の分析について	
食品の異物検査法(第3報)	宮島弘衛,小川秀子,野崎泰彦 315
合成樹脂製容器の研究(第1報)赤外線吸収スペクトルを	
応用せる定性及び溶出物の検討	
合成樹脂製容器の研究(第2報)尿素樹脂の溶出量について	川城巖,岡田太郎,細貝祐太郎 323
銀錫アマルガム合金の硬化膨縮について(第3報)	
銀錫アマルガムの異常膨脹について	
腸線の改良に関する研究	藤井正道,辻楠雄,薩摩義一郎 341
衛生材料の研究(第5報)人造繊維類の	
確認並びに定量試験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	
	遠藤 勝
衛生材料の研究(第6報)吸水力試験法の検討	
	遠藤 勝 351
衛生材料の研究(第7報)木綿と人造繊維類の比較	
	遠藤 勝,五十川泰郎 355
衛生材料の研究(第8報)印棉を原料とする	THE COLUMN TWO IS NOT THE TAIL THE TAIL THE
国産脱脂綿の性状について	
SELA ET SA JOS MENTE INT VA SIE A. V. TYP MA	遠藤 勝
重金属の経皮吸収に関する研究	•
	大森義仁,磯野千冬,林 悦子,
and the control of th	吉本浜子,狩野静雄 373
アニリン系色素の経皮吸収に関する研究	
	南城 実,大森義仁,神蔵美枝子, 磯野千冬,加藤三郎,林 悦子,
	吉本浜子,狩野静雄 381
	百个 队 士,对野时唯一————————————————————————————————————
資 料	
2	
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報)	
The second secon	長沢佳熊,中山豪一,榎本正義,
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析	··········長沢佳熊,中山豪一,榎本正義, 亀谷勝昭,城戸靖雅·········· 393
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報)	··········長沢佳熊,中山豪一,榎本正義, 亀谷勝昭,城戸靖雅·········· 393
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析	
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析 水の放射能測定試料の作成法(附・水道水及び雨水の放射能)…	長沢佳熊,中山豪一,榎本正義, 亀谷勝昭,城戸靖雅393河村正一,野崎泰彦 403朝比奈正人,山羽 力 407
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析 水の放射能測定試料の作成法(附・水道水及び雨水の放射能)… 糖燐酸エステル中の不純物について 日局 VI 法と米局 XV 法によるインシュリン注射液定量法の比較検討 インシュリンに関する資料(その1)インシュリン亜鉛懸濁注象	 長沢佳熊,中山豪一,榎本正義, 亀谷勝昭,城戸靖雅 393 河村正一,野崎泰彦 403 朝比奈正人,山羽 力 407 長沢佳能,佐藤 浩,白井浄二 411 甘液,
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析 水の放射能測定試料の作成法(附・水道水及び雨水の放射能)… 糖燐酸エステル中の不純物について 日局 VI 法と米局 XV 法によるインシュリン注射液定量法の比較検討 インシュリンに関する資料(その1)インシュリン亜鉛懸濁注象 結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液および無晶性インシュリ	
原水爆実験による放射能汚染の研究(第7報) 魚類の放射能汚染とその放射化学分析 水の放射能測定試料の作成法(附・水道水及び雨水の放射能)… 糖燐酸エステル中の不純物について 日局 VI 法と米局 XV 法によるインシュリン注射液定量法の比較検討 インシュリンに関する資料(その1)インシュリン亜鉛懸濁注象	

インシュリンに関する資料(その2)日局インシュリン標準品

(1955) の力価検定	…長沢佳熊,	佐藤	浩,自	井浄二	419
インシュリンに関する資料(その3)国家検定に合格した					
インシュリン製剤の年間量の統計					
輸入あへんについて	…朝比奈晴	世,志内]賢彦…	••••••	425
昭和31年度日本産あへんのモルヒネ含量について	…中川雄三,	伊坂	博,今	井雅子.	
	東谷芳子,	藤原英	子,薛	博允	e.
	中村好孝·				429
ビタミン標準品に関する資料 \mathbb{L} . ビタミン B_1 , B_2 , B_6 , C , パラア					
ミノベンゾイルグルタミン酸及び B_1 液の製造とその品質につ					
いて		• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	·····/ <u>J</u>	瀬朝次	433
米粒寄生糸状菌の分離培養方法に関する研究	…田中 穰,	平山重	勝,倉	計 出	,
	坂部フミ,				
	宇田川俊-				
熱帯産有用植物目録・昭和32年					
輸入食品の人工着色料について					467
繊維素グリコール酸ナトリウムの置換度の測定法について					471
遮光容器に関する研究(第2報)					481
		71	1000	5 5 - 5 - 6 - 6	
速 報					
	.中の				
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム		南城	実, お	木 悦子	491
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量		南城	実,标	木 悦子	491
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量インシュリン溶液に対するフタール酸水素カリウムの	…市川重春,				
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	…市川重春,			互崎笹夫	493
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ·····川谷豊彦;	,宮崎幸	·······西 幸男,ブ	写崎笹夫 大野忠郎	493 495
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ·····川谷豊彦; ····-岩原繁雄,	宮崎幸 栗栖弘	▽ 幸男,ブ 光 , 越 深	写崎笹夫 大野忠郎 ヨきみえ	493 495
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ····川谷豊彦, ····岩原繁雄, 中村正夫	, 宫崎 ^雲 栗栖弘 , 山地 ^雲	····································	^{国崎笹夫} 大野忠郎 Gきみえ 皮志 剛	493 495 ,
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ·····川谷豊彦; ····-岩原繁雄,	, 宮崎幸 栗栖弘 , 山地雪	····································	^{国崎笹夫} 大野忠郎 Gきみえ 皮志 剛	493 495 ,
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ····川谷豊彥, ····岩原繁雄, 中村正夫 石関忠一	,宫崎孝 栗栖弘 ,山地雪 ,小島和	 幸男,ブ 光 , 越 深 幸雄, 派 失夫	哲崎笹夫 大野忠郎 ヨきみえ 皮志 剛	493 495 , ,
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	一市川重春,一川谷豊彦,一岩原繁雄,中村正夫,石関忠一一中村正夫,		·····································	国崎笹夫 大野忠郎 ヨきみえ 支志 剛	493 495 , , 497
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	一市川重春,一川谷豊彦,一岩原繁雄,中村正夫,一中村正夫,八田貞義	。宫崎岩 栗栖弘 ,山地岩 ,小島和 宫沢又	····································	国崎笹夫 大野忠郎 男きみえ 関 きみえ 剛 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	493 495 , , 497
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	一市川重春,一川谷豊彦,一岩原繁雄,中村正夫,一中村正夫,八田貞義	。宫崎岩 栗栖弘 ,山地岩 ,小島和 宫沢又	····································	国崎笹夫 大野忠郎 男きみえ 関 きみえ 剛 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	493 495 , , 497
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	…市川重春, …川谷豊彦, 一川谷豊彦, 中村正夫, 石関忠一, 一中村正夫, 八田貞義	宮崎考 栗栖弘 東山地 東山 東 東 京 一 、 一 宮 沢 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	·····································	互崎催夫 郎 学	493 495 , , 497
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	…市川重春, …川谷豊彦, 一川谷豊彦, 中村正夫, 石関忠一, 一中村正夫, 八田貞義	宮崎考 栗栖弘 東山地 東山 東 東 京 一 、 一 宮 沢 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、 、	·····································	互崎催夫 郎 学	493 495 , , 497 , 499 501
化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム 無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	····市川重春, ····川谷豊彦, ····岩原繁雄, 中村関忠一, ····中村正夫, 八田貞義	、宮崎号 栗栖弘 ・ 東西 ・ 小島 ・ 宮沢 ・ 岩原 等	·····································	5 時後 で	493 495 , , 497 , 499 501 503
 化粧品の規格検査法について(第7報)ファウンデーションクリーム無機性常成分の定量について(その1)チタンの定量・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	一市川重春,一川谷豊彦,中村原繁雄,中村正夫,八田貞養	、宮崎号 栗栖弘 ・ 山小島和 ・ 宮沢 ・ 宮沢 ・ 岩原第	三年男, 为 产性, 数 产性 , 上 产性 , 一 、	写 (493 495 , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,

インシュリンの薬化学的研究 (第19報)* 純系マウスを用いるインシュリンの検定

長 沢 佳 熊, 中 山 豪 一 西 崎 笹 夫, 芹 沢 淳

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XIX. On the Assay of Insulin by the Uniform Strain Mice.

Kakuma Nagasawa, Goichi Nakayama, Sasao Nishizaki and Jun Serizawa

まえがき 著者等は第13報^りにおいてインシュリンのマウス・ケイレン法について報告した。ただしそのときは雑系のマウスを用いたが、今回は特に純系マウスを用い 雑系と比較しその利点を調べようと試みた。ここに用いたマウスは実験動物中央研究所から配布された純系マウス(ddN 系および Sm 系)であつた。雑系マウスについては第13報の成績を引用し(実験 1参照)、今回の純系マウスによる実験結果(実験 $2 \sim 8$ 参照)と比較した。ただしこの際、純系マウスは固型飼料 Clea を与えたものであり、雑系マウスは小麦、煮干、野菜を与え試験 2 日前からミルクを与えた。

以上雑系、純系の実験を比較した結果、実験温度 35° と 37° 、および雑系、純系では明らかにケイレンを起す最少量が異る。また ddN 系、Sm 系のケイレン状態にも若干の差を認めた。

実験の部

1) 注射液の調製 日局インシュリン標準品の適当量を精秤し、日局記載のインシュリン溶剤を用いて 20 u/cc の濃度に溶かしインシュリン注射原液とした.

2) 試験動物

雑系(市販マウス): 8 生年月日不明, 体重 15~20 g.

ddN 系: 5 200 匹 昭和 31.6.5~9 に出生したもの.

Sm 系: 8 200 匹 昭和 31.9.25~29 に出生したもの.

これらのマウス 30~50 匹ずつを飼育箱に入れ飼育した.

3) 実験方法 第13報に準じ試験前日午後4時から飼育室の温度を35°に調節し、飼育箱から水以外の食餌をとり去る.

翌朝温度 (35°) を確かめた. 37°の実験では午前9時 37°に調節した.

マウスの体重を秤量し、各群のマウスの体重の平均値およびバラツキが均等となるように各群にふり分ける・

午前 11 時から各群別にインシュリン原液を溶剤適当量で稀釈した注射液 $0.25\,\mathrm{cc}$ ずつをマウスの頸背部に皮下注射し、 $5\sim10\,\mathrm{m}$ でかる全 $18\,\mathrm{cm}$ 、高さ $23\,\mathrm{cm}$ のガラス円筒に入れ竹製スノコをかるせて反応症状を観察した。症状として定型的なケイレンを起すか、または低血糖性昏睡症状をあらわし、脊位にさせたとき自力で腹位にもどらないものを反応陽性とした。

反応陽性マウスはただちに15%ブドゥ糖注射液 0.5 ∞ ずつを腹腔内に注射し、実験終了後反応陰性マウスにもブドウ糖を注射して飼育を続けた。これらのマウスは実験終了後少くとも1週間を経過して次回の実験に供した。注射直後から30 分,60 分,90 分(1 部は120 分)の間隔内に起つた反応陽性マウスの匹数から統計的方法により直線性を検討し 2^{38} ED50値およびその信頼限界(%)を算出した。

また実験3において恒温箱を用いたが、これは注射直後マウスを各個室の金網カゴに入れ、二重ガラス蓋で外気と遮断し換気装置により一定温度の空気を還流させて内部の温度を一定に保ち反応症状を観察した。

^{*} 第18報は本誌 74, 179~183 (昭和31年)

実 験 結 果

実 験 1

使用したマウス:雑系(市販マウス) 実験場所:恒温室 実験温度:35°±0.5°

前報に1部誤りがあつたので訂正し、90分観察の結果から用量-反応間の直線性の検討およびED50値とその信頼限界を算出しTable 1に示す。

Table 1. Calculation of regression equation, ED50 and its fiducial limits of error.

These data are quoted from table 13 in Bull. Hyg. Lab. 72, 17 (1954) and partly corrected.

Dose	log(Dose			. (^()	Empirical	Exppeted				
(u/cc)×cc	×100) (x)	Mouse (n)	r	p(%)	Probit	$\frac{ ext{Probit}}{(ext{Y})}$	nw	У	nwx	nwy
0.0574×0.35	0.30	25	5	20	4.16	4.4	13.950	4.18	4.1850	58.3110
0.0630× //	0.34	11	11	44	4.85	4.6	15.025	4.86	5.1085	73.0215
0.0861× //	0.48	11	13	52	5.05	5.2	15.675	5.05	7.5240	79.1588
0.0945× /	0.52	11	17	68	5.47	5.3	15.400	5.46	8.0080	84.0840
0.1292× */	0.66	11	19	76	5.71	5.9	11.775	5.69	7.7715	66.9998
0.1418× *	0.70	11	22	88	6.18	6.0	10.957	6.16	7.6825	67.6060
Total							82.800		40.2795	429.1811

b = Sxy/Sxx = 4.0481; V(b) = 1/Sxx = 0.5951

The Regression equation is

$$Y = \overline{y} + b (x - \overline{x}) = 4.05x + 3.21$$

$$\log ED50 = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b} = 0.4412$$

∴ED50=0.0276 unit/mouse

$$g = t^2V(b)/b^2 = \frac{1.96^2 \times 0.5951}{4.0418^2} = 0.140$$

log fiducial limit (g>0.1) =

$$x \ + \frac{g}{1-g} \ (x-\overline{x}) \ \pm \ \frac{t}{b(1-g)} \sqrt{\frac{1-g}{Snw} + \frac{(x-\overline{x})^2}{Sxx}} \ = 0.4339 \pm 0.0606 = 0.3733 \sim 0.4945$$

:. Fiducial limits of $error(\%) = 86 \sim 113\%$ (P=0.95)

実 験 2

使用したマウス:ddN 系 実験月日:昭和 31.7.6. 実験場所:恒温室 実験温度:35°±0.5° 湿度:64% 生後日数:約 30日 体重:13~15g 実験経過を Table 2 に示す。

Dose	_	20 min	60 min.	90 min.	120 min.	
$(u/cc) \times cc$	n 30 min.		oo min.	90 mm.	120 mm.	
0.0574×0.25	30	0	0	0	0	
0.0630× //	11	0	. 0	0	0	
0.0800× /	"	0	2 (7)*	2 (7)	2 (7)	
0.0945× *	11	0	2 (7)	2 (7)	2 (7)	
0.1292× "	11	0	0	0	0	
0.1418× /	"	0	1 (3)	2 (7)	2 (7)	
0.1418×0.50**	3	0	1 (33)	2 (67)	3 (100)	

Table 2. Result of response observed in experiment 2,

実 験 3

使用したマウス:ddN 系 実験月日:昭和 31.7.20. 実験場所:恒温箱 実験温度:35°±2° 生後日数:約 44日 体重:12~21 g 実験経過を Table 3 に示す.

Table 3. Result of response observed in experiment 3. (Dose ratio: 1.25)

Dose	-	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
(u/cc)×cc	n	50 mm.	oo mm.	50 mm.	120 11111.
0.512×0.25	10	0 .	2 (20)	6 (60)	8 (80)
0.640× "	10	0	3 (30)	9 (90)	9 (90)
0.800× •	9	1 (11)	4 (44)	8 (89)	9 (100)
1.000× "	10	0	5 (50)	7 (70)	8 (80)
1.250× //	9	0	8 (89)	9 (100)	9 (100)

実 験 4

使用したマウス: ddN 系 実験月日: 昭和 31.7.24. 実験場所: 恒温室 実験温度: 35°±0.5° 湿度: 54% 生後日数: 約 48日 体重: 14~24g 実験経過を Table 4 に示す。

Table 4. Result of response observed in experiment 4. (Dose ratio: 1.5)

Dose	n	30 min.	60 m	nin	90	min.	120	min.
(u/cc)×cc	50	00 111111			24			
0.1500×0.25	25	0	0		1	(4)	1	(4)
0.2250× //	11	0	5	(20)	8	(32)	. 8	(32)
0.3375× //	11	0	4	(16)	12	(48)	17	(68)
0.5063× //	11	0	6	(24)	18	(72)	21	(84)

以上のうち 90 分観祭の反応から用量反応間の直線性の検討および ED50 値とその信頼限界を求めた。その結果をTable 5 に示す。

^{* ():} means % value.

^{**} Another three mice were applied, as the response was very weak.

Table 5. Calculation of regression equation, ED50 and its fiducial limits of error.

Dose	log(Dose	No. of Mouse	_	-(0/)	Empirical	Expected Probit				
(u/cc)×cc	×100) (x)	(n)	r	p(%)	Probit	(Y)	nw	У	nwx	nwy
0.1500×0.25	0.57	25	1	4	3.25	3.4	5.950	3.27	3.3915	19.4565
0.2250× "	0.75	11	8	32	4.53	4.2	12.575	4.57	9.4313	57.4678
0.3375× "	0.93	11	12	48	4.95	4.9	15.850	4.95	14.7405	78.4575
0.5063× /	1.10	"	18	72	5,58	5.7	13.300	5.58	14.6300	74.2140
Total							47.675		42.1933	229.5958

b = Sxy/Sxx = 3.8156; V(b) = 1/Sxx = 0.6819

The Regression equation is

$$Y = \overline{y} + b (x - \overline{x}) = 3.82x + 1.44$$

$$\log ED50 = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b} = 0.9332$$

$$g = t^2V(b)/b^2 = \frac{1.96^2 \times 0.6819}{3.8156^2} = 0.180$$

 $\log \text{ fiducial limit } (g>0.1) =$

$$x + \frac{g}{1-g} (x-\overline{x}) \pm \frac{t}{b(1-g)} \sqrt{\frac{1-g}{Snw} + \frac{(x-\overline{x})^2}{Sxx}} = 0.9438 \pm 0.0858 = 0.8580 \sim 1.0296$$

 \therefore Fiducial limits of error(%)=84~ 125 % (P=0.95)

また同様操作により 120 分観察の反応から回帰直線方程式, ED50 値およびその信頼限界を求め、結果のみを示す。

回帰方程式 : Y=5.03 x+0.65 ED50値 : 0.0730 u/mouse その信頼限界(%): 87~116%

実 験 5

使用したマウス:ddN系 実験月日:昭和 31.11.7. 実験場所:恒温室 実験温度:37°±0.5° 湿度:32% 生後日数:約 153日 体重:21~32 g 実験経過を Table 6 に示す.

Table 6. Result of response observed in experiment 5. (Dose ratio: 1.5)

$\begin{array}{c} \text{Dose} \\ (\text{u/cc}) \times \text{cc} \end{array}$	n	30	min.	60 n	nin.	90 r	nin.
0.067 × 0.25	22	1	(5)	7	(32)	7	(32)
0.100 × *	"	4	(18)	10	(45)	11	(50)
0.150 × ø	"	6	(27)	16	(73)	17	(77)
0.225 × /	"	9	(41)	21	(95)	21	(95)

実験5ではすべてのマウスは90分後には回復したので以後の観察を中止した.

90 分観察の反応から実験 4 と同様の操作により直線性の検討および ED 50値とその信頼限界を求めた。次にその結果のみを記す。

回帰直線方程式 : Y=3.75x+3.61

ED50値 : 0.0233 u/mouse

その信頼限界(%) : 77~120%

実験2~5の90分および120分観察の結果をFig.1に示す.

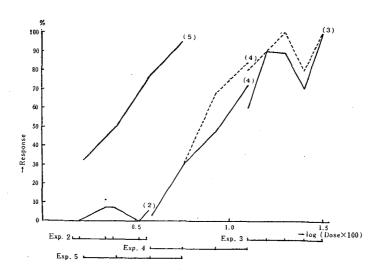


Fig. 1. Dose-response relationship of ddN strain, from table 2, 3, 4 and 6.

Exp. 2, 3 and 4. : at 35°.

Exp. 5. : at 37° .

_____ : Observed for 90 min.

: Observed for 120 min.

実 験 6

使用したマウス: Sm 系 実験月日: 昭和 31.10.25. 実験場所: 恒温室 実験温度: 35°±0.5° 湿度: 35% 生後日数: 約 28日 体重: 11~16 g 実験経過を Table 7 に示す。

Table 7. Result of response observed in experiment 6. (Dose ratio: 1.5)

$\begin{array}{c} \text{Dose} \\ (\text{u/cc}) \times \text{cc} \end{array}$	n	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
0.133× 0.25	10	0	0	0	0
0.200× •	11	0	0	0	0
0.300× /	11	0	3 (30)	4 (40)	5 (50)
0.450× *	11	0	2 (20)	5 (50)	6 (60)
0.675× •	11	0	0	7 (70)	10 (100)

実 験 7

使用したマウス: Sm 系 実験月日: 昭和 31.11.6. 実験場所: 恒温室 実験温度: 35°±0.5° 湿度: 38% 生後日数: 約 40日 体重: 12~20 g 実験経過を Table 8 に示す。

Table 8. Result of response observed in experiment 7. (Dose ratio: 1.5)

$\begin{array}{c} \text{Dose} \\ (\text{u/cc}) \times \text{cc} \end{array}$	n	30 min.	60 min	•	90 min.
0.0600×0.25	22	0	0		0
0.0900× ∥	"	0	0		0
0.1350× //	"	0	2	(9)	2 (9
0.2025× "	"	0	6	(27)	7 (32
0.3038× //	"	1 (5)	9 ((41)	12 (55
0.4556× "	"	2 (9)	12	(55)	18 (82

実験 7ではすべてのマウスは 90 分後には回復したので以後の観察を中止した。90 分観察の反応から 0.1350 \sim 0.4556u/cc 0.4 用量につき実験 3 と同様の操作により直線性の検討および ED 50 値とその信頼限界を求めた。次にその結果のみを記す。

回帰直線方程式 : Y=4.13x+1.54

ED50 值: 0.0689 u/mouse

その信頼限界 (%) : 84~121%

実 験 8

使用したマウス: Sm 系 実験月日: 昭和31.11.14. 実験場所: 恒温室 実験温度: 37°±0.5° 湿度: 30% 生後日数: 約 48日 体重: 13~23 g 実験経過を Table 9 に示す.

Table 9. Result of response observed in experiment 8. (Dose ratio: 1.5)

$\begin{array}{c} \textbf{Dose} \\ (\textbf{u/cc}) \times \textbf{cc} \end{array}$	n	30min.	60mi	in.	90mi	in.
0.050×0.25	25	0	2	(8)	2	(8)
0.075× /	"	0	3	(12)	3	(12)
0.113× //	11	2 (8)	10	(40)	11	(44)
0.169× *	"	2 (8)	14	(56)	15	(60)
0.253× •	"	5 (20)	18	(72)	21	(84)

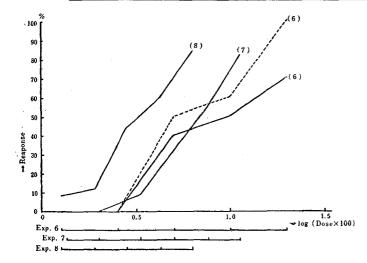


Fig. 2. Dose-response relationship of Sm strain, from table 7~9. Exp. 6 and 7.: at 35°.

Exp. 8. : at 37°.

: Observed for 90 min.

実験8ではすべてのマウスは90分後には回復したので以後の観察を中止した.

90分観察の反応から 0.075 \sim 0.253 u/ ∞ 0.4 用量につき実験 4 と同様の操作により直線性の検討および ED 50値とその信頼限界を求めた。次にその結果のみを示す。

回帰直線方程式 : Y = 3.83x + 2.94 ED50値 : 0.0345u/mouse その信頼限界 (%) : $83\sim119\%$ 実験 $6\sim8$ の 90 分, 120 分観察の結果を Fig. 2 に示す.

雑系および純系マウスの回帰直線および ED50 値を比較し、実験 1, 4, 5, 7, 8 の結果を Table 10 に示す。 またプロビット坐標により Fig. 3 に図示する.

Table 10. Comparison of regression equations, ED50 and their fiducial limits of error.

Strain	Temp.	ъ	Regression equation	ED50 (u)	Fiducial limits of error (P=0.95)(%)	Relative value of ED50
Ordinary	35 °	4.05	Y = 4.05x + 3.21	0.0276	86~113	1
	35°	3.82	Y=3.82x+1.44	0.0857	84~125	3.10
ddN	37°	3.75	Y = 3.75x + 3.61	0.0233	77~120	0.84
	35°	4.13	Y = 4.13x + 1.54	0.0689	84~121	2.50
Sm	37 °	3.83	Y = 3.83x + 2.94	0.0345	83~119	1.25

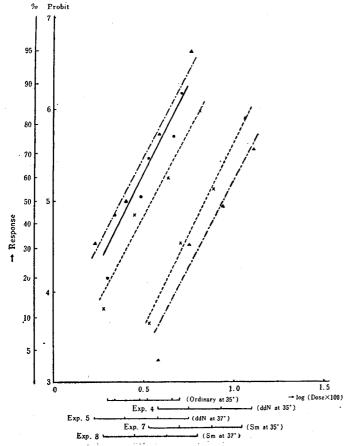


Fig. 3. Comparison of regression lines, from table 10.

(Observed for 90 min.)

------: Ordinary mice

---- × ---- : Sm Strain.

考察とむすび

- (1) 症状:雑系マウスでは注射後 30分~60 分でケイレンを起す数が最も多く,そのケイレン症状は大部分定型的なものである。しかるに ddN 系では生後 30~40日のものは注射後 60分~90分に反応陽性のものが多くしかも定型的なケイレン症状はきわめて少く大部分昏睡に陥るものであつた。しかし 老齢期になるにしたがい 定型的ケイレン症状を示すものが多く,反応の出方も雑系のものに近くなる傾向を認めた。Sm 系の場合,反応を示すまでの時間および症状は雑系の場合に近い。
- (2) 健康状態:純系の場合各回の実験終了後死亡するマウスは 雑系に比しきわめて少い. これは栄養状態がよいためかも知れない.
- (3) ED50: 純系マウスは雑系に比し鋭敏度(b)は大きな差異が認められない (Table 10). しかし同じ 35° の実験では感度は $2.5\sim3$ 倍鈍いが 37° の実験は雑系の 35° の実験に近い、また ddN系とSm 系では実験回数が少いため差があるとは結論できない。
 - (4) ED50の信頼限界: ED50値の信頼限界は雑系,純系ともにほとんど差異は認められない。

したがつて(1)~(4)からマウスケイレン法によりインシュリンを検定する場合必ずしも純系マウスを用いる必要はない。

終りに本研究費の1部を各種系統マウスの生理的特徴に関する文部省科学 研究費に依つた。その研究班長安東 洪次博士に謝意を表する。

文 献

- 1) 長沢他, 本誌 72 11-19 (昭29).
- 2) Burn, J. H. et al: Biological Standardization, Oxford Univ. Press. (1950).
- 3) Finney D. J.: Statistical Method in Biological Assay, C. Griffin &. Co. Ltd. (1952).

Summary

The assay of insulin by mouse convulsion method was done using ddN and Sm strain mice. The following results were found:

- 1) Young ddN strain showed seldom typical convulsion.
- In the uniform strain, number of dead mice after injection were less than that of ordinary mice from the market.
- 3) The co-efficients of the dose-response regression were almost similar in both strains.
- 4) In the experiments at 35°, ED 50 of ddN strain was 3.1 times larger, and Sm strain was 2.5 times larger than that of the ordinary one, while in the experiments at 37°, both ED 50 and the fiducial limits of errors are almost equal in the experiment.
- 5) From our experiments, it is not necessary to use uniform strain in this method.

Received June 18, 1957.

インシュリンの薬化学的研究 (第20報)*

粗マグロインシュリンから単離した結晶性蛋白質について

長 沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫, 平 岡 孝,** 深 沢 真 司**

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XX.

On the Crystalline Proteins Isolated from the Crude Tunna Insulin.

Kakuma Nagasawa, Sasao Nishizaki, Takashi Hiraoka and Shinji Fukasawa

まえがきと総括 著者等はまぐる Stannius 小体から得た粗インシュリン (16 u/mg) につき Scott¹⁾ の方法で結晶化を試みたところ,1部分が六面体結晶となることを認めた(Fig. 1参照)。この結晶(以下 Cryst. TA と称す)は分解点228°(褐変)~250°(黒変)(日局法)(実験2a参照),窒素(N)17.43%(実験2b参照),亜鉛(Zn)1.21%(実験2c 参照),ベーパクロマトグラフの Rf 値もインシュリンとほとんど変らず(実験2d 参照),等電点は6~7である(実験2e参照)。結晶形はStaub²)等の得たグルカゴン結晶によく似ているがグルカゴンの生物的作用をほとんど示さず,むしろきわめて弱いインシュリン作用を認めた(実験3参照)。

また同じ試料について実験をくり返したが、結晶化の pH がわずかに異なる pH 6.5 のとき 球状 結晶 を 得、 (Fig. 2 参照) これを Cryst. TB と称することにした。 Cryst. TB もまたグルカゴン作用はほとんど認められないが、若干のインシュリン作用を示した(実験 3 参照)、分解点は 240°(顕微鏡法)、 窒素(N) 17.35 %(実験 2 参照)であつた。 Cryst. TA と Cryst. TB との関係については現在詳細に研究中である。

実験の部

実験 1 結晶の単離方法: マグロ Stannius 小体から抽出した粗インシュリン (16 u/mg) 600 mg を N/100-塩酸 15ccに溶かす。 桝酸緩衝液 200 cc, 水 200 cc および N-塩酸 16 cc 試料溶液を内容 500 cc のフラスコに入れゆるやかにかきまぜる (pH=2.03)。 東洋戸紙 No. 5 で戸過後, 0.5 %塩化亜鉛液 4 cc およびアセトン 40 cc を加える。つぎに N-水酸化アンモニウム溶液を注意深く少量ずつ加えて pH を 6.2 に調節する。この蛋白石濁溶液をガラス棒で器壁をしばらくこすり,4°の冷暗室に放置し,ときどき沈澱の 1 部をとり顕微鏡で観察した・放置後 40 時間を経過して顕微鏡視野に数個の結晶の存在を確認し(最大径約 $15~\mu$),結晶は $4\sim5$ 日後さらに若干成長した(最大径約 $20~\mu$)。

この溶液をかきまぜてしばらく放置するとき、速く沈澱する部分には結晶量が多く、上部の乳濁液中には結晶量がきわめて少いことを知り、顕微鏡で注意深く観察しながら結晶量の多い沈澱部分を集め、さらに蒸留水を加えて数回この操作をくり返し、ついにほとんど完全に結晶部分のみを単離し減 圧乾燥した (Fig. 1 参照).

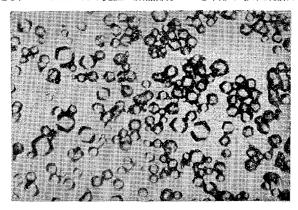


Fig. 1. Crystals isolated from the crude tunna insulin. (Cryst.TA) (×400).

^{*} 第19報は本誌75号 9 頁 ** 所員外 清水製薬株式会社 *** かつをのインシュリン からも結晶 TAにほとんど類似した結晶を得ているが、未だ詳細に検討できなかつた。

また同一試料 250 mg をとり同様に操作して pH 6.5 で冷暗室に放置した結果,球状結晶の存在を認め前と同様に蒸留水を加えて沈隆速度の差によりほとんど完全に結晶のみを巣離した(Fig. 2 参照).

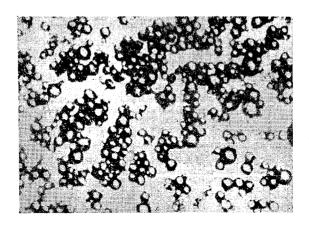


Fig. 2. Crystals isolated from the crude tunna insulin. (Cryst.TB) (×400).

実験2 物理化学的恒数の測定

- (a) 分解点: Cryst. TA を日局 VI 記載の融点測定装置で測定した結果, 228°で褐変, 250°で全く黒変した. これを白金板上で加熱するとき気泡を生じ後に白色の残留物を得た. また Cryst. TB は顕微鏡融点測定装置で測定した結果 240°で着色した.
- (b) 窒素の含量: アゾトメトリ法³⁾ で窒素を測定した結果, Cryst. TA は 17.43%, Cryst. TB は 17.35% であつた.
- (c) 亜鉛の含量:国際薬局方記載の亜鉛定量法がに準拠し Cryst. TA の亜鉛を定量した結果 12.17/mg であつた.
- (d) ペーパクロマトグラフの Rf 値:第 15 報の方法⁵) により牛のインシュリン結晶,マグロの無晶インシュリンと Cryst. TA を同時に展開した結果,0.28,0.24,0.23であつた。また Cryst. TB は Cryst. TA とほとんど等しいか,やや低い Rf 値を示した。これらはいずれも1つのスポットのみを検出し,しかも=ンヒドリン呈色は陽性であつた。
- (e) 等電点:Cryst. TA を日局記載のインシュリン溶剤に溶かし、塩酸および水酸化ナトリウム液を少量ずつ加えて沈澱の状態を注意深く観察した。沈澱の最もおこる点のpH をガラス電極で測定した結果、等電点はほぼ $6\sim7$ であつた。

実験3 生物学的検定

- (a) 単位の検定: Cryst. TA を米局 XV のインシュリン単位検定法のを適用し、20 u/mg と想定して検定した結果約4 u/mg であつた。(その信頼限界はこの場合の想定単位と実験値とがあまりにもかけ離れていたため非常に大きく、算出できない)。
- (b) グルカゴンの検定: Cryst. TA をインシュリン溶剤に溶かし、絶食した家鬼 2 匹にそれぞれ 400γ , 800γ を耳静脈内に注射し、血糖量の変化を検べた。その結果を Fig. 3 に示す。

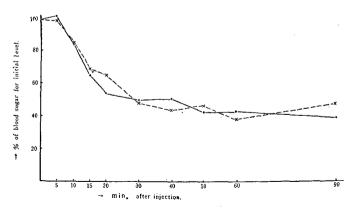


Fig. 3. Assay of blood sugar.

- $\cdot :$ injected 800 $\gamma/1.9$ kg (Body weight).
- $\cdots \times \cdots$: injected 400 $\gamma/1.8$ kg (Body weight).

These rabbits were fasted for 20 hr. before injection and injected Cryst. TA intraveniously.

この結果からグルカゴン作用はほとんど示さずむしろきわめて弱いインシュリン作用を認めた。もしこの 結晶 がインシュリン結晶 (23 u/mg) だと仮定すると 400γ 注射の場合では約9.2 単位, 800γ の場合はで約18.4 単位 の効力をあらわすはずなのである。

また Cryst. TB を前と同様に絶食家東2四に200 γ ずつ注射した結果を Fig. 4 に示す.

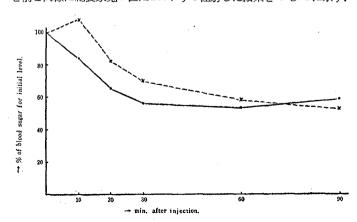


Fig. 4. Assay of blood sugar.

- $\cdot :$ injected 200 $\gamma/2.3$ kg (Body weight).
- $\cdots \times \cdots$: injected 200 $\gamma/1.6$ kg (Body weight).

These rabbits were fasted for 20 hr. before injection, and injected Cryst. TB intraveniously.

この結果からグルカゴン作用はほとんど認められないが、若干のインシュリン作用を示した。もしこの結晶 がインシュリン結晶(23 u/mg) だと仮定すると 200 γ 注射の場合約 4.6 単位に相当する。

実験 4 得量およびインシュリンの回収: Cryst. TA は試料 600 mg (16 u/mg) からほとんど完全な結晶 15 mg, やや無晶形を含むもの 3 mg, 無晶形 490 mg, 上澄液を塩析により回収したもの 35 mg を得た. (重量回収率: 90.5%). また Cryst. TB は試料 250 mg (16 u/mg) からほとんど完全な結晶 7 mg, 無晶形 180 mg, 上澄液を塩析により回収したもの 55 mgを得た (重量回収率: 97%). いずれも結晶の収率約 3 % である.

文 献

- 1) Scott, D. A.: Biochem. J. 28 1592 (1934)
- 2) Staub, A. et al.: I. Biol. Chem. 214 619 (1955)
- 3) 岩崎 憲:生化学, 23 4 (昭26)
- 4) International Pharmacopoeia: Vol. [, 274 (1955)
- 5) 長沢佳能, 西崎笹夫:本誌 74 171 (昭31)
- 6) 米局 XV p 339-342

Summary

The authors isolated two inactive proteins (Cryst. TA and Cryst.TB), which are different in their crystalline form, from the crude tunna insulin (see Fig. 1 and Fig. 2).

Crystals TA decomposed at 228° (turned into brown) by the melting point testing method of the Japanese Pharmacopoeia, and contained 1.21 % zinc (Zn), and 17.43 % nitrogen (N), and Rf value was close to that of tunna insulin.

Crystals TB decomposed at 240° (partly turned into brown) by microscope method, and contained 17.35 % nitrogen (N).

Received June 18, 1957.

インシュリンの薬化学的研究 (第21報)*
アイソフェンインシュリンの電気泳動について
長沢 佳 熊, 西 崎 笹 夫

Pharmaceutical and Chemical Studies of Insulin. XXI.

On the Electrophoreisis of Isophane Insulin.

Kakuma Nagasawa and Sasao Nishizaki

総括 アイソフェインシュリンの結晶を pH 3.5 および pH 2.2 の酸性緩衝液に溶かし、また同時に対照として 牛インシュリン結晶、プロタミン、インシュリンとプロタミンの混合試料についても電気泳動を行い比較した、 pH 3.5 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液中ではその上昇側ではインシュリンとプロタミンは分離して移動しない。下 降側では若干の分離が見られるが、これはアイソフェンインシュリンの泳動速度とインシュリンとプロタミンの 混合試料のそれとは明らかに異なるから(Fig. 1 および Fig. 2 参照) 、pH 3.5 の緩衝液中でアイソフェンインシュリン中のインシュリンとプロタミンが泳動前にそれぞれ独立して存在しているとは考えられない。しかし pH 2.2 の塩酸・塩化カリウム緩衝液中では上昇、下降側ともにインシュリンとプロタミンは分離して泳動することを確かめたから(Fig. 3 およびFig. 4 参照)、pH 2.2 の緩衝液中では 2 成分はそれぞれ独立して存在しているのであろう。

実験の部

1) 緩衝液の調製

(a) 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液

5 M-塩化ナトリウム 32 cc, 2 M-酢酸ナトリウム10 cc および 3.5 M-酢酸 200 cc を混和し、蒸留水を加えて 21 とする. (pH:3.5, イオン強度:0.44).

(b) 塩酸-塩化カリウム緩衝液

5 M-塩化ナトリウム 16 cc, 1 M-塩酸 7.52 cc および 1 M-塩化カリウム 92.5 cc を混合し蒸留水を加えて 1 とする. (pH: 2.2, イオン強度: 0.18).

2) 試料の調製

- (a) アイソフェンインシュリン注射液を遠心分離した後蒸留水を加えて洗い,ふたたび遠心分離し洗澱を pH 3.5 の緩衝液 [1), a] に溶かして試料とした.別に結晶インシュリンおよびプロタミンをそれぞれ緩衝液 [1), a] 適当量に溶かした.これら 3 検体をセロファン紙で 2 昼夜 4 の冷暗室で pH 3.5 の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 [1)a] に対して透析した.
- (b) またアイソフェンインシュリン注射液 30 cc を前記に従い遠心分離した後蒸留水を加えて洗いふたたび遠心分離し沈澱を pH2.2 の緩衝液 [1),b] に溶かして試料とした。別に結晶インシュリンプロタミン 50 mg ずつをとり緩衝液 [1),b] 9 cc ずつに溶かし、これら 3 検体を前記同様 pH2.2 の緩衝液 [1),b] に対して透析した。
- (c) プロタミンとインシュリンの混合試料は(a),(b)におけるインシュリン,プロタミンの試料を等量 混合して試料とした.

3) 電気泳動試験

常法により前記試料を日立製作所製 HT-B 型により 12.5 mA で泳動し,それらの泳動図を撮つた.

アイソフェンインシュリンは pH 3.5 の緩衝液 [1),a] では 1成分として存在する $(Fig.\ 1, Fig.\ 2$ 参照). しかしpH 2.2 の緩衝液 [1),b] では 2 成分として存在し,その 2 成分の泳動はインシュリンとプロタミンの混合液と同様に動作し,しかも $Fig.\ 4$ の泳動速度の点からもこのことが祭知される.

(a) pH 3.5 の緩衝液 [1),a] 中での泳動についてその泳動図を Fig. 1に示し、上昇法における泳動速度を Fig. 2に示す。

^{*} 第20報は本誌75号17頁

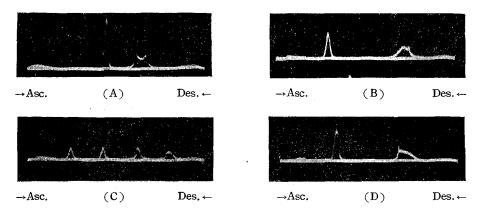


Fig.1. Descending and ascending electrophoreisis patterns of Protamine, Isophane insulin, the mixture of Protamine and Insulin, and Insulin, in 0.44 ionic strength acetic acid-sodium acetate buffer of pH 3.5.

- (A) : Protamine, 30 min.
- (B) : Isophane insulin, 40 min.
- (C) : Mixture of protamine and insulin, 30 min.
- (D): Insulin, 60 min.

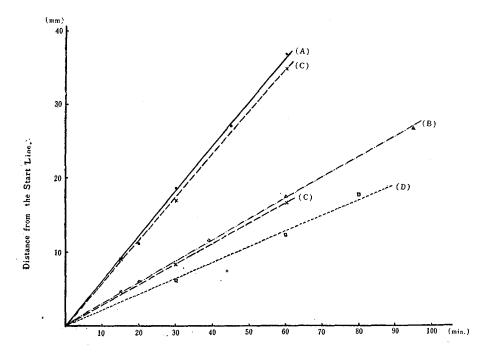


Fig. 2. Comparison of mobility in ascending. (pH: 3.5)

- (A) : Protamine.
- (B) : Isophane insulin.
- (C) : Mixture of protamine and insulin.
- (D): Insulin.

(b) pH 2.2 の緩衝液 [1),b] 中での泳動についてその泳動図を Fig. 3 に示し、上昇法における泳動速度を Fig. 4 に示す。

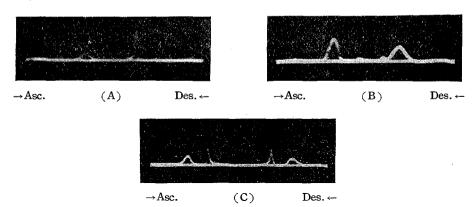


Fig. 3. Descending and ascending electrophoreisis patterns of Protamin, Isophane insulin, the mixture of Protamine and Insulin, in 0.18 ionic strength hydrochloride-potassium chloride buffer of pH 2.2.

- (A) : Protamine, 60 min.
- (B) : Isophane insulin, 90 min.
- (C) : Mixture of protamine and insulin, 60 min.

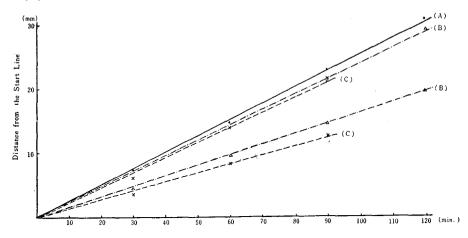


Fig. 4. Comparison of mobility in ascending. (pH: 2.2)

- (A) : Protamine.
- (B): Isophane insulin.
- (C) : Mixture of protamine and insulin.

終りに電気泳動操作につきお世話頂いた当所食品部竹内末久技官に謝意を表する.

Summary

By the experiment of the electrophoreisis with isophane insulin, insulin, protamine and their mixture in the acetic acid- sodium acetate buffer (pH 3.5) and hydrochloride-potassium chloride buffer (pH 2.2) solution, the authors found that, in the pH 3.5 buffer, isophane insulin moved as one component, while in the pH 2.2 buffer, it moved as two.

インシュリンに関する資料(その1)

インシュリン亜鉛懸濁注射液,結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射 液および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液の検定基準について

長沢佳熊,竹中祐典,西崎笹夫佐藤浩,白井浄二,岡崎精一

On the Insulin, No. I.

Test Requirements of Insulin Zinc Suspension, Crystalline Insulin Zinc Suspension and Amorphous Insulin Zinc Suspension.

Kakuma Nagasawa, Yusuke Takenaka, Sasao Nishizaki, Hiroshi Satō, Joji Shirai and Seiichi Okazaki

1952年 Hallas-Møller, Petersen, Schlichtkrulli)はインシュリン結晶に亜鉛を多く含む製品を製し、これがすぐれた持続作用を呈することを発見し、Ultralente Insulin と呼び、無晶形のものを Semilente Insulin, 前者を70%、後者を30%含むものを Lente Insulin と呼んだ。いずれもインシュリンの水性懸濁注射液で、1954年 N NR®)に、1955 年英国薬局方追補®)(以下英局と略す)に収載された。これらはつぎのような名称で呼ばれるようになり、また作用の持続もつぎのようにいわれている。

	英国薬局方の名称	国家検定におけ	注身	射後の作用時間			
	天国条向 万の石 州	る名称	開 始	最高	持続		
Ultralente	Insulin Zinc Suspension (Crystalline)	結晶性インシュリン 亜鉛懸濁注射液	4 ~ 6	24~25	24~30		
Lente	Insulin Zinc Suspension	インシュリン亜鉛 懸濁注射液	1~2	10~20	約 24		
Semilente	Insulin Zinc Suspension (Amorphous)	無晶性インシュリン 亜鉛懸濁注射液	1~2	10~12	12~22		

これらの内, Ultralente はプロタミン亜鉛インシュリン注射液に、Lente はアイソフェンインシュ リン注射液に相当する持続作用を有する。また米国では Lente 製品のみが許可され市販されている。

これらの製品の特長は 1) プロタミンのような異種の蛋白質を含まない持続化インシュリンであること、2) 注射後の作用について、3 製品を用時適当に混合して、目的とする発頭時間を求めることができること、である、 (ただし混合し放置後使つてはならない)・

本品の規格および試験法は、英局追補(1955)、FDA規則(以下FDAと略す)に記されている。 筆者等はこれらを参考としてインシュリン亜鉛懸濁注射液(以下[L]と略す)、結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液(以下[C]と略す)、および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液(以下[A]と略す)の検定基準を作成したのでここに報告する。なおこれらの基準による国家検定は、昭和32年6月1日から実施されるようになつた。

まず製品のおのおのについての製法の概略を記し、つぎに [L] の基準を示し ([C] および [A] と異なる箇所に下線を付け、それに相当する [C] および [A] の条文を挙げる)、以下 [L] 基準中の (注) に従つて実験例を挙げながら参考事項を述べる。

(以下 u とは単位の略号である).

製法

- [C] 単位既知のインシュリンを,塩化亜鉛を含む N/50 塩酸(塩化亜鉛濃度は 40 u/ccの 製品を作る場合は Z n として 0.0133~W/V%, 80~u/cc の場合は Znとして 0.0266~W/V%である)適量に溶かした液 1容に,酢酸ナトリウム5.44 W/V% がおよび塩化ナトリウム28 W/V% を含む液 1/3容を加え,水酸化ナトリウムで pHを5.4~5.5とする.約20時間ふりまぜ結晶を析出させ,この懸濁液に水酸化ナトリウム,塩化亜鉛および適当な防腐剤を含む液を加えて 9 倍量にする.この液中の水酸化ナトリウムおよび塩化亜鉛の濃度はそれぞれ 40~u/cc の場合は 0.014~W/V% および 0.0077~W/V% (Znとして),80~u/ccの場合は 0.017~W/V% および 0.0011~W/V% (Znとして) である.最終製品の Znとする.
- [A] 単位既知のインシュリンを,塩化亜鉛を Zn として 0.01W/V% 含む N/50 塩酸適当量に溶かした液 1 容に,適当な防腐剤を含む塩化亜鉛溶液(塩化亜鉛濃度は 40 u/cc の製品を作る場合は Zn として 0.00875 W/V%, 80 u/cc の場合は Zn として 0.01375 W/V% である) 8 容を加え,更に最終製品が酢酸ナトリウム 0.136 W/V% , 塩化ナトリウム 0.7W/V %および pH 約 7.3 となるような量の酢酸ナトリウム,塩化ナトリウムおよび水酸化ナトリウムを含む液 1 容を加える.
 - [L] 上記 [A] 3容と [C] 7容を混合する.
 - 注 以上製法は英局に従った.このほかに Novo 社の特許法》(結晶インシュリンを pH7 の塩化配鉛水溶液中 に懸独し、Zn 含量 2.3%のインシュリン結晶を製する方法)および Organon 社の特許法》(同社の製品 Insulin-Tardum の製法で、この製品は厳密には結晶性インシュリン亜鉛懸独注射液とは異なるも、筆者等の試験では著明な特続作用を家兎の血糖降下力について認めた)もある。

基 準

インシュリン亜鉛懸濁注射液検定基準

本品はインシュリン^{注1)}および亜鉛を緩衝液^{注2}) 中に懸濁した無菌の液で、表示単位の90~110%^{注3})に対応するインシュリンを含む.本品の懸濁インシュリン<u>のうち約70%は結晶でその他は無晶形である。注4</u>) ([C] … はほとんどすべて結晶形である。[A] …はほとんどすべて無晶形である。) また表示インシュリン100単位量につき Zn(=65.38) 0.15~0.30 mg^{注5)}を含む。

性 状 本品はほとんど白色の懸濁液である。本品中の懸濁物を鏡検するとき、その過半は単斜晶系の結晶で、その大きさは $10\sim40\mu$ である。その他の部分は無晶形でその大きさは 2μ 以下である。(〔 \mathbb{C} 〕 …ほとんどすべて結晶でその大きさは $10\sim40\mu$ である。〔 \mathbb{A} 〕 …ほとんどすべて無晶形で一定の形状を示さない。その大きさはほとんど 2μ 以下である。)

本品は安定剤として酢酸ナトリウム $0.15\sim0.17$ W/V%,塩化ナトリウム, $\pm0.0.65\sim0.75$ W/V% および防腐剤としてパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ 安息香酸エチル、パラオキシ 安息香酸プロピルまたはパラオキシ 安息香酸プチル $\pm0.09\sim0.11$ W/V%を含む。

本品のpH は 7.1~7.5注8)である.

確認試験 (1) 本品に塩酸少量を加え, pHを2.5~3.5とするとき沈澱は溶け, ほとんど無色澄明の液となる. ^{注の} (2) (1)の澄明な液につき, インシュリン注射液の確認試験(2)を準用する. ^{注の}

- (8) 本品に塩化第二鉄試液2~3滴を加えるとき赤褐色を呈しこれに塩酸を加えるとこの色は退色する。在10
- (4) 本品につきインシュリン注射液の定量法を準用して 試験を行うとき、注射後7時間の血糖量 は家兎の過半数において注射前血糖量の85%以下である。ただし注射は本品をそのまま1/100cc の目盛のある注射筒を用いて量り、家兎5匹を用い、その体重2kg につき表示の1.2単位量を注射し採血は注射前および注射後7時間に行い血糖を定量する. 注1)([C]…注射後9時間、[A]には(4)項を記載しない。)

純度試験 (1) 全窒素量 本品を一般試験法第11項のセミミクロケルダール法により窒素を定量するとき、その量は表示の100単位量につき0.7mg^{注12}) 以下でなければならない。

(2) 上澄液中のインシュリン 本品を遠心分離または河過して得た澄明な液につきインシュリン注射液の定量 法を準用するときその含量は表示インシュリン単位の4%以下でなければならない、注(3)

(2) 亜鉛 グロビン亜鉛インシュリン注射液の定量法(2)を準用する.

(3) 結晶性インシュリン^{注14}本品の表示 600単位量を正確に量り、([C]、[A] $\cdot\cdot\cdot$ 400単位量)遠心分離して上澄液を除き、残留物を水 5 cc に懸濁しアセトン緩衝液 10 cc を加え 3 分間ふりまぜた後遠心分離する。上澄液を除き再び同じ操作をくり返す、残留物を稀硫酸に溶かし全量を 15 cc とする。この液につき一般試験法第 11 項のセミミクロケルダール法により窒素を定量するとき、全窒素量の $55\sim70$ %でなければならない。([C] $\cdot\cdot\cdot$ 85%以上、[A] $\cdot\cdot\cdot$ 30%以下)

注 アセトン緩衝液: 酢酸ナトリウム 8.15g および塩化ナトリウム 42g を水に溶かし N/10塩酸 68cc、アセトン150cc および水を加えて 500cc とする.

貯法および有効期間 密封容器に入れ $1\sim15^\circ$ で貯える. 有効期間は検定合格の翌月から18ヵ月とする $^{\pm15}$. 製品 通例 1 cc 中40 または 80 単位を含む.

参考事項

- 注1) インシュリンの全窒素量限度を 0.7 mg/100 u 以下としたので少くともその純度は 21 u/mg 程度以上の結晶でなければならない。
- 注2) 酢酸ナトリウム緩衝液を用いる.この濃度はFDAに準じた.プロタミン亜鉛インシュリン注射液およびアイソフェンインシュリン注射液で用いられている燐酸ナトリウムは本品には使えない.
- 注3) 従来の持続性インシュリン製剤は $85\sim115$ %としたが本品には他 の蛋白質を加えていないので英局に準じて $90\sim110$ %とした. (第3表参照)
- 注4) 製法に述べたように、本品は [C] と [A] を 7:3 の割合で混合して調製される。この混合比を 適当に変えることにより持続時間を調節できるので臨床上他の製剤にない利点がある。これについて行なつた 動物実験例をつぎに示す。(第1表参照)

実験例 1. 混合比と持続時間との関係

体重 $1.95\sim2.65$ kg の家兎を 22 時間絶食させておき,その体重 2 kg に対して 1.2 単位を注射した.使用した [C], [A] は共に Novo (Denmark) 製品である. 注射前血糖量を 100 としたときの注射後血糖量を第1表に示す.なおこの値は 1 群 3 匹ずつで行なつた平均値である.

混 合 比	注射前血糖值		注 射 征	炎 血 糖	減 少 率	(%)	
(C):(A)	(mg%)	2	3	4.	6	9	12 (時間)
1:1	104	57	_ · ·	75	84	98	
3:2	107	49	_	66	70	82	. –
7:3=(L)	102	_	63	-	66	80	91
(C)	110	_	71	_	63	61	73

第1表 混合比と持続時間との関係

7:3の比に混合したものは他の類似製品グロビン亜鉛インシュリン注射液と比較して、はるかに持続時間が 長い・

注5) FDAは全亜鉛量を 100 単位につき 0.20~0.25mg,上澄液中にその 40~65 %を含むと規定している。英 局では上澄液中の亜鉛のみを定量し,40 u/cc 製品では 0.0055 W/V% 以下,80 u/cc 製品では 0.0070 W/V % 以下と規定しているが,これを換算すると FDA の上澄液中の範囲 (40~65%)にほぼ等しくなつている。この基準では窒素量が多くなつている点,試験法などを考慮していくらか範囲を拡げた。

実験例 2. 全亜鉛量と上澄液中の亜鉛量

Novoおよび Lilly 社製品についての実験結果を第2表に示す.

第2表

	全 亜 鉛 量	上澄液中の亜鉛量および%
Novo (L) 40 u/cc Novo (L) 40 u/cc	0. 208 mg/100 u 0. 235 mg/100 u	0.12 mg 58.7 0.11 mg 46.8
Lilly (L) 40 u/cc	0. 20 mg/100 u	0.13 mg 65

なお、この基準には規定していないが、上澄液中の亜鉛量も規定する必要があると考えられる.

注6) 塩化ナトリウムは他の製剤におけるグリセリンと同じく液を等張にする目的で加える.

注7) 英局には「適当な防腐剤」と記載し特にその品名を示していないが、FDA, NNRにはパラオキン安息香酸メチルと記載している。この基準はFDAに進じた。

注8) 英局は 7.2~7.5, FDA, NNR は 7.1~7.5 である.

注⁹) (1), (2)ともにプロタミン亜鉛インシュリン注射液(国薬),アイソフェンインシュリン注射液(国家検定基準)と同じである。

注10) 緩衝剤である酢酸ナトリウムの呈色反応である.

注11) 持続作用は家兎の個性によりかなり差を生ずることがあるが、通例の家兎についてはこの試験で充分と考えられる。(第3表参照)

注12) FDA は 0.65 mg/100 u 以下で実験結果(第4表参照)はこれでよいが、一応 0.7 mg 以下とした.

注13) 英局に準じたが、実験では規定より下廻つた結果を得ている。(第3表参照)

実験例 3. 注3),注11),注13) に関する実験例をまとめて第3表に示す。

第3表

製品	インシュリン定量値	上澄液中のインシュリン	持	続	作	用
Novo (L) 40 u/cc	98%	4%以下	5 匹申 3	匹 (81	, 77,	82%) 適
Lilly (L) 40 u/cc	103%	血糖量にほとんど変化が ない	5 匹中 4	匹 (79	, 83, 7	5,85%)適

注14) アセトン緩衝液によつて無晶性インシュリンは抽出され、残留した結晶性インシュリンの窒素量を定量することにより、混合比を知るのである。この基準では一般試験法第11項のセミミクロケルダール法を用いて窒素を定量するため、英局や FDA の方法をいくらか変えた。[A] については英局に 記載されていないが、これら3種を明確に区別するためこの基準には加えた。これについての実験例を第4表に示す。ただし遠心分離の操作中、回転数および回転時間を、それぞれ3000回転、5分間(半径13cm)で行った。この条件は一定にする必要があると考える。また [A] については更に検討中である。

第4表 全窒素量および結晶性インシュリンに関する実験例

製	旦	品 別 全窒素量 (mg/100 u)		結晶性インシュリン		
æ	HH	ניכל	主主系里(IIIS/100 u)	残留物の窒素(mg/100u)	%	
Novo	(L)	40 u/cc	0. 470	0. 319	68	
Novo	(L)	40 u/cc	0. 584	0. 379	64. 4	
Novo	(C)	40 u/cc	0. 466	0. 431	92.5	
Novo	(A)	40 u/cc	0. 411	0. 107	26	
Lilly	(L)	40 u/cc	0. 235	0.132	56	
Toronto	(L)	80 u/cc	0. 414	0. 232	56	

注15) 英局では凍結を避け、なるべく低温で貯える。その温度が 20° に近いと効力は減退する。有効期間は製

造年月日より2年間となつているが、プロタミン亜鉛インシュリン注射液(国薬)に準じた・

文 献

- 1) Hallas-Møller. K., Petersen. K., and Schlichtkrull. J.: Science, 116, 394 (1952).
- 2) NNR: 463 (1955), 395 (1956), 430 (1957).
- 3) British Pharmacopoeia1953: Addendum, (1955); 34~40.
- 4) Food and Drug Administration: 144.14~15, July, (1954).
- 5) Novo Terapeutisk Laboratorium: Brit. Patent. 711, 276 C. A. 49, 572 (1955)
- 6) J. D. H. Homan, J. Jens (to Organon, Inc.): U. S. Patent. 2,787,575, C. A. 51, 9099 (1957)

Summary

Tests and Standards for the national assay of Insulin Zinc Suspension, Crystalline Insulin Zinc Suspension and Amorphous Insulin Zinc Suspension were proposed by the authors in reference to the British Pharmacopoeia Addendum 1955 and the regulations of the Food and Drug Administration.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料 (その2) 日局インシュリン標準品 (1955) の力価検定

長沢佳熊,佐藤浩,白井浄二

On the Insulin No. | .

On the Assay of the Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1955).

Kakuma Nagasawa, Hiroshi Satō and Jōji Shirai

まえがき Connaught Laboratories, Toronto 製結晶インシュリンを, 日局インシュリン標準品 (1955) とするために, 国際標準品 (1952) および日局標準品 (1954) と比較してその 力価を検定したので, その成績について報告する.

実 験 方 法

- 1) 検定法 この報告では米局 (V^1) 記載の(2-2) 用量方式による交叉試験法を用いた。ただし血糖測定は日局 (V^2) 法に準拠した。
- 2) 標準液および検液の調製法 標準品,検体共に日局 \| 記載の溶剤を用いて溶かし,標準品は 1 cc 中 20単位を含むように調製して標準原液とし,検体は表記単位に従って 1 mg 中 23.6 単位を含むものとみなし,1 cc 中 20単位を含むように調製して検体原液とした。 この両原液を実験当日更に前記溶剤を用いて 適当な濃度に稀釈して注射した。 高用量と低用量との比は 2:1 とし,注射用量はすべて 0.5 cc とした。
 - 3) 実験動物 体重 1.8~2.6 kg の健康な家 24 匹を用い、実験当日は実験終了後まで飼料を与えない。
- 4) 採血時間その他 注射後1時間および2時間半の2回採血する,第2回の試験は第1回試験を行なつた日の翌日に実施した、採血量および血糖測定などはすべて日局 / L と同様に行なつた・

実 験 結 果

前記の実験条件に従って行なった実験の結果を Table 1, 2, 3 に示す。 なお Table 中 SH および SL はそれぞれ標準液の高用量および低用量を、TH および TL はそれぞれ検液の高用量および低用量を示す。

Carre	Rabbit		Resp	oonse		У	Ti
Group	No.	1 st	Day	2 no	l Day	(H-L)	11
1 2 3 4 5 6	3 4 5	SH	72 105 142 121 124 121	TL	119 121 170 174 155 151	-47 -16 -28 -53 -31 -30	$-205 = T_1$
2	7 8 9 10 11 12	SL	134 95 119 129 140 101	Тн	128 77 98 98 118 74	$egin{array}{ccc} -6 \ -18 \ -21 \ -31 \ -22 \ -27 \end{array}$	$-125 = T_2$

Table 1. 2 and 2 Dose Assay of Insulin. (Exp. 1)

C	Rabbit	Response				у	T):
Group	No.	1 9	st Day	2 n	d Day	(H-L)	Ti
3	13 14 15 16 17 18	Тн	117 135 145 110 134 120	SL	156 156 159 164 155	-39 -21 -14 -54 -21	$-170 = T_3$
4	19 20 21 22 23 24	TL	145 131 153 134 148 131	SH	128 115 130 126 128 123	-17 -16 -23 - 8 -20 - 8	$-92 = T_4$

 $SH\cdots 2\,u/cc$; $SL\cdots 1\,u/cc$; $TH\cdots 0.\,0847$ mg/cc ; $TL\cdots 0.\,0424$ mg/cc

M'=-0.0010; Potency=23.55 Units.

 $L = 2 \times 0.0602$

Fiducial limits of error=87.0~114.9%

Table 2. 2 and 2 Dose Assay of Insulin. (Exp. 2)

	Rabbit		Re	sponse		у	
Group	No.	1.5	st Day	2 r	nd Day	(H-L)	Ti
1	1 2 3 4 5 6	SH	86 111 134 124 143 105	TL	157 193 184 203 172 139	-71 -82 -50 -79 -29 -34	$-345 = T_1$
2	7 8 9 10 11 12	SL	127 116 120 141 143 90	Тн	117 84 85 116 127 58	-10 -32 -35 -25 -16 -32	$-150 = T_2$
3	13 14 15 16 17 18	Тн	107 136 148 125 102 128	SL	150 171 168 191 177 159	43 35 20 66 75 31	$-270 = T_8$
4	19 20 21 22 23 24	TL	138 127 163 101 142 131	SH	127 125 138 65 131 118	$\begin{array}{r} -11 \\ -2 \\ -25 \\ -36 \\ -11 \\ -13 \end{array}$	$-98 = T_4$

 $S_{H\cdots 1.~8~u/cc}$; $S_{L\cdots 0.~9~u/cc}$; $T_{H\cdots 0.~0763~mg/cc}$; $T_{L\cdots 0.~0382~mg/cc}$;

M' = -0.0080; Potency=23.17 Units

 $L = 2 \times 0.0639$

Fiducial limits of error=86.2~115.7%

Group	Rabbit		Resp	oonse		У	Ti
Group	No.	1 st	: Day	2 n	d Day	(H-L)	
1	26 25 27 28 29 30	SH	101 96 102 163 83 103	TL	143 121 122 219 186 155	42 25 20 56 103 52	-298=7
2	31 32 33 34 35 36	SL	174 169 143 163 135 128	Тн	145 115 117 145 101 101	29 54 26 18 34 27	-188=7
3	37 38 39 40 41 42	Тн	146 143 129 86 112 102	SL	207 190 185 133 174 162	61 47 56 47 62 60	-333=7
4	43 44 45 46 47 48	TL	157 171 163 133 160 159	SH	109 149 118 104 134 134	48 22 45 29 26 25	-195=7

Table 3. 2 and 2 Dose Assay of Insulin. (Exp. 3)

SH... 2 u/cc; SL... 1 u/cc; TH...0. 0847 mg/cc; TL...0. 0424 mg/cc;

M'=0.0083; Potency=24.05 Units;

 $L = 2 \times 0.0530$

Fiducial limits of error=88.6~113.1%

以上のごとくにして得た力価について 重みを加えた平均値を求めると $1 \, \mathrm{mg}$ 当り 23.64 単位となつた。 これを Table $4 \, \mathrm{kc}$ 示す。

Table 4. The Weighted Mean of the Potency of the Insulin Sample by the Three Assays.

Exp. No.	M	w	wM
1	-0.0010	1 200. 28	-1.20028
2	-0.0080	1 067.73	-8. 54184
3	0.0083	1 548. 81	12. 85512
To	tal	3 816.82	3. 11300

 \overline{M} =0.0008; \overline{R} =1.002; Potency=23.64 Units

むすび Toronto 製結晶インシュリンを検定した結果,これを日局標準品 (1955) と認めた、その力価は 1 mg 当り 23.6 日局単位 (=23.6 国際単位) である.

文 献

- 1) 米局XV; 339, 878, 879.
- 2) 日局 / 1; 59.
- 3) Drug Standards, 24, No. 2, 64 (1956).

Summary

The potency of crystalline insulin from the Connaught Medical Research Laboratories, Toronto was determined by the U. S. P. XV¹⁾ method, comparing its response with that of the International Standard (1952) and of the Japanese Pharmacopoeia Standard (1954).

From the result of the assays, we found that the sample preparation contains 23.6 international units per mg. This preparation was accepted by our Laboratories as a Japanese Pharmacopoeia Insulin Standard (1955), having a potency of the same number 23.6 of J.P. units.

Received June 18, 1957

インシュリンに関する資料(その3) 国家検定に合格したインシュリン製剤の年間量の統計

長 沢 佳 熊, 佐 藤 浩, 白 井 浄 二

On the Insulin, No. II.

The Total Amount of Annual Comsumption of Commercial Insulin Injections in Japan.

Kakuma Nagasawa, Hiroshi Satō and Jōji Shirai

昭和26年10月からインシュリン注射液 [Ins.と略す] およびプロタミン. 亜鉛. インシュリン注射液 [P.Z.I.と略す] の国家検定が実施されることになり、昭和30年8月にはアイソフェンインシュリン注射液 [N.P.H.と略す] およびグロビン亜鉛インシュリン注射液 [G.Z.I.と略す], 昭和32年6月にはイシュリン亜鉛懸濁注射液, 結晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液および無晶性インシュリン亜鉛懸濁注射液 も、これに加えられた. つぎに 昭和28年から31年までの国家検定合格数量を集計した. (ただし、年間集計は1月より12月末までに受付けた国産および輸入製品で、不合格品は含まない.) インシュリンの需要量については、従来しばしば問題となつたが、ここに得た数量が我が国の需要量または消費量を示すものと考えられよう. この資料から近年消費量は著しく増大していることがわかる (第1表、第1図および第2図参照).

第1表 国家検定に合格したインシュリン製品量(数字は1000単位量を示す)

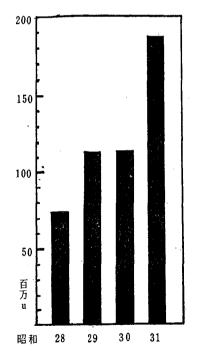
	28	29 .	30	31
Ins.	67 453.1 (1 230.4)	92 103.7	87 938.0 (117.2)	134 980.8
P. Z. I.	5 740.0 (840.0)	18 500.0	15 335.5 (157.2)	19 000.0
N.P.H.			8 175.2* (6 175.2)	28 055.2 (13 514.8)
G. Z. I.			0**	3 145.0
合 計	73 193.1 (1 070.4)	110 603.7	111 448.7 (6 449.6)	185 181.0 (13 514.8)

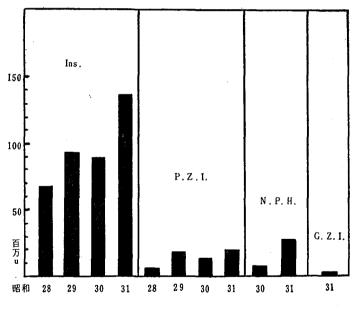
註:()内は、その内の輸入製品量である.

- * 8月より12月末までの集計である.
- ** 2検体あつたが不合格であつた。

第1図 製剤総合計の統計図

第2図 製剤別統計図





Summary

The histogram of the annua amount of commercial insulin injections passed by the National Assay carried out in our laboratory, from 1953 to 1956, is shown. This histogram could be suggested that the annual comsumption of insulin in Japan is remarkably increasing.

Received June 18, 1957

インシュリン溶液に対するフタール酸水素カリウムの影響について

西 崎 毎 夫

On the Influence of Acid Potassium Phthalate in the Insulin Solution.

Sasao Nishizaki

著者はインシュリンの澄明な酸性溶液に フタール酸水素 カリウム溶液(以下「フ・水・カ」と略す)を加えると白色沈澱を生ずることを認め(実験 1 参照),この沈澱物をアセトン,エーテルで乾燥したものは分解点,窒素含量はインシュリンとほとんど差はないがその力価は約半分であつた.

実験1 沈澱の生成条件の検討

牛インシュリン結晶($23.4\,\mathrm{u/mg}$)を日局記載のインシュリン 溶剤で $20\,\mathrm{u/cc}$ に溶かし ($\mathrm{pH}\,2.7$), その $5\,\mathrm{cc}$ を $\mathrm{b}\,\mathrm{M}/5$ 「フ. 水. カ」($\mathrm{pH}\,4.0$) $0.05\,\mathrm{cc}$ 加え $2\,\mathrm{分後}$ の濁度をコタキ光電比色計で $750\,\mathrm{m}\mu$ で測定後直ちに $\mathrm{pH}\,\mathrm{e}$ Beckman ガラス電極で測定した。 $5\,\mathrm{分後}$ 再び $\mathrm{M}/5$ 「フ. 水. カ」 $0.05\,\mathrm{cc}$ 加え前記同様の操作 をくり返した。 (Fig. $1\,\mathrm{参照}$).

次にpHを一定にするためインシュリン溶液と「フ・水・カ」にごく微量の水酸化ナトリウム液,塩酸を入れて共に pH 3.72 に調節し前と同様操作をし,グラフ上で比較した(Fig. 1参照)結果両者の差はわずかであるから実験誤差の範囲内にあると考えた。

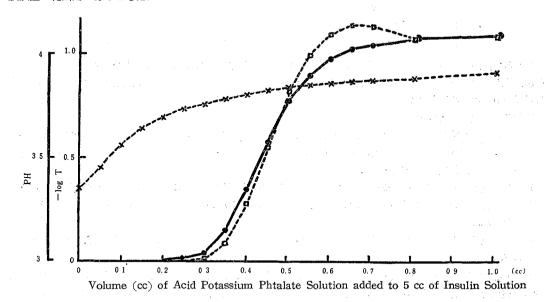


Fig. 1. Turbidity and pH curves : When Acid Potassium Phthalate was added to Insulin solution. (Turbidity measured at $750\,\mathrm{m}\mu$.)

: 20 u/cc× 5 cc of Insulin sol. +M/5-Acid Potassium Phthalate.

.....x shown pH in above Experiment.

--- • --- : 20 u/cc× 5 cc of Insulin sol. +M/5 -Acid Potassium Phthalate.

(at pH 3.72)

次にインシュリンと「フ・水・カ」の濃度の影響を検べるためインシュリン:20u/cc, 10u/cc, 「フ・水・カ」2/5M, 1/5M につき前と同様に操作した結果を Fig. 2に示す。

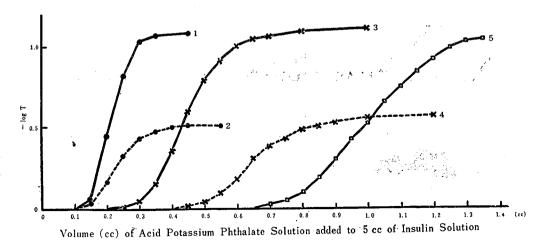


Fig. 2 Turbidity curves: When Potassium acid Phthalate was added to Insulin solution. (Turbidity measured at 750 mu.)

1:	$20\text{u/cc}{\times}5\text{cc}$ of	Insulin s	sol. $\pm 2M/5$ - Acid	Potassium Phthalate.
······2:	10 u/cc	"	+	"
×3:	20 u/cc	"	+M/5	"
×4:	10 u/cc	"	+	"
5:	20 u/cc	"	+M/10	"

これらの沈澱を遠心分離した残留物に蒸留水約5ccを加えると沈澱は澄明に溶けた。さらにM/5「7.水.カ」を加え沈澱を生成せしめこれに<math>N-塩酸,N-水酸化ナトリウムを少量ずつ注意しながら加え沈澱を溶かした。溶けた限界のpHはpH2.6およびpH5.9であつた。

実験2 沈澱乾燥物の検討

牛インシュリン結晶 $(23.4\,\mathrm{u/mg})$ を日局記載のインシュリン溶剤で $40\,\mathrm{u/cc}$ に溶かし、その $25\,\mathrm{cc}$ をとり $\mathrm{M/5}$ 「フ. 水. カ」 $10\,\mathrm{cc}$ を加え放置した。 5 時間後遠心分離しアセトン・エーテルで乾燥した $(41.5\,\mathrm{mg})$.

この乾燥上につき次の実験を行つた.

- 1) 分解点:228°で褐変し,237°で黒変収縮し,241°で膨潤発泡し完全に分解した(日局の方法による).
- 2) 窒素含量: 乾燥物 16.5 mg を日局記載のインシュリン溶剤 5 cc に溶かし、セミミクロケルダール法で測定し、(N) 14.12%を得た.
- 3) 動物実験による単位の検定: $Marks^2$)法により測定し、11.7~u/mg を得た. この値は原料の結晶インシュリンの1/2である。
- 4) 等電点:乾燥物は日局記載のインシュリン溶剤に全く溶ける。また前記同様 pH の移動による沈澱の生成を検べた結果その限界はpH 4.3, pH 7.7を得た。その過程で最も濁度の高いのは pH 6 附近であつた。(インシュリン結晶の等電点は 5.25である)。

文 献

- 1) 日局 [[;59.
- Marks, H. P.: The Health Organization of the Leaque of the Nations 1926, Biological Standardization of Insulin, 1957.