

目 次

報 文

Echinopsine 類似体の合成

板井孝信・末吉祥子・大草源三1

オートアナライザーによる医薬品の分析

(第5報) 塩酸ピロカルピンの定量

柴崎利雄・山本美代子5

混合製剤の分析に関する研究(第10報) 比

色法による混合製剤中のニコチノイル

-4-アミノアンチピリンの定量

立沢政義・橋場茂子・村田昌保8

混合製剤の分析に関する研究(第12報) 電

位差滴定による安息香酸ナトリウムカ

フェインの同時定量

立沢政義・石橋無味雄・中山修三12

キノホルムの電位差滴定について

伊阪博・野口衛・柴田正・吉村淳15

リン酸ジヒドロコデインの確認試験について

朝比奈晴世・大野昌子・島峯望彦・

高橋一徳18

大麻の研究(第1報) 薄層クロマトグラフ

ィーおよびガスクロマトグラフィーに

よる成分の分離

朝比奈晴世・島峯望彦・高橋一徳21

大麻の研究(第2報) テトラヒドロカンナ

ビノールの単離

朝比奈晴世・島峯望彦・高橋一徳25

メタノール中毒の実験的研究(第5報) ^{14}C

メタノールを投与したウサギの肝アセ

トン乾燥粉末の分画の放射能(2), ^{14}C

結合物質の単離

竹中祐典28

熱帯魚グッピーによるパラチオンおよびシ

アン化カリウムの定量とパラチオンの

 LD_{50} およびシアン化カリウムの ED_{50}

長沢佳熊・越村榮之助・福田秀男32

細菌ヘパリナーゼによるヘパリンの分解

山羽力・高橋昭江・木村俊夫36

医療用縫合糸の放射線滅菌について(第1

報) 機械的性質におよぼす影響

堀部隆・菊池寛・藤井正道41

サリドマイドおよび関連化合物の交直ポー

ラログラフィー

水町彰吾45

パラオキシ安息香酸エステル類のガスクロ

マトグラフィー(第2報)

加藤三郎・下田通敏48

ガスクロマトグラフィーによるバター中の

有機塩素剤の定量分析

二郷俊郎・細貝祐太郎・田辺弘也・

川城巖52

かき毒に関する研究 毒素の分離, 精製お

よび毒性について

二郷俊郎・田辺弘也・川城巖・篠田

光雄・大森義仁・池田良雄54

大気中ホルムアルデヒドの比色法による連

続測定について

山手昇・松村年郎・外村正治58

内毒素投与によるウサギ血清中のLysozyme

活性の変化について

石関忠一・岩原繁雄64

蒸気加熱法と γ 線照射によるケンおよび大

麻の発芽におよぼす阻止の効果(第2

報)

藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾68

蒸気加熱法と γ 線照射によるケンおよび大

麻の発芽におよぼす影響

藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾74

実験ノート

3-Methyl-4-methoxy-6-hydroxymethyl-
pyridazine のクロルメチル化反応

鈴木郁生・中館正弘・吉田紀代78

ナトリウム塩中のカリウムイオンの試験

柴崎利雄・高重美恵79

ホウ酸の定量法の検討

斎藤恵美子・西村祝子82

混合製剤の分析に関する研究(第11報) 比

色法による混合製剤中のフェナセチン

の定量

立沢政義・橋場茂子84

ステロイドの試験法(第1報) ジヒドロキ

シメチルアンドロスタジエノンの比色

定量法

越村榮之助86

水溶性ビタミンのガスクロマトグラフィー

河原邦子・谷村顕雄88

システイン塩酸塩のニンヒドリン呈色につ

いて

加藤三郎	91
食品中の有害金属の定量(第7報) 缶入グ リンピース中の銅および鉛含量について	
山縣翠・辰濃隆・川城巖	94
飲用牛乳中の異種脂肪の検出について	
井上哲男・慶田雅洋	96
納豆菌錠剤の腸内細菌叢に及ぼす影響	
栗栖弘光・岩佐曜・飯沢一美	99
ヒゴタイ属植物の試作と染色体数およびエ ヒノプシンの存在	
川谷豊彦・大野忠郎・兼松明子	103
光線の強さがセネガの生育および収根量に およぼす影響	
川谷豊彦・大野忠郎	105
<i>Withania somnifera</i> DUNAL の試作栽培につい て(続報)	
川谷豊彦・大野忠郎	107
若干の除草剤処理がミシマサイコの発芽お よび初期生育におよぼす影響について	
藤田早苗之助・川谷豊彦・栗原孝吾	109
サジオモダカの試作栽培について(第5報)	
外国種の根茎の形状と重量について (その1)	
藤田早苗之助・栗原孝吾・川谷豊彦	114
資 料	
放射性医薬品として用いられる核種の γ 線 スペクトルについて	
長谷川明・城戸靖雅	119
医療用プラスチックに関する研究(第9 報) 塩化ビニル樹脂製血液セット中の 可塑剤および重金属について	
堀部隆・水町彰吾・菊池寛	122
プラスチックに関する衛生化学的研究(第 1報) プラスチック包装材料および容 器の溶出試験について	
辰濃隆・慶田雅洋・川城巖	124
食品中の有害金属の定量(第6報) ヤクル ト製造原料としてのクロレラ抽出液中 のマンガン量について	
辰濃隆・慶田雅洋・川城巖	127
昭和42年度食品残留農薬調査について	
鈴木隆・辰濃隆・磯部公明・叶多謙蔵 ・武田明治・二郷俊郎・近藤竜雄 ・細貝祐太郎・田辺弘也・川城巖	129
輸入食品の人工着色料について(第6報)	

山縣翠・内山貞夫・天野立爾・近藤 竜雄・川城巖	132
国立衛生試験所標準品(色素標準品) アシ ッドレッド標準品およびブリリアント ブルー F C F 標準品について	
井上哲男・神蔵美枝子・村上信江	135
国立衛生試験所標準品(色素標準品) リソ ールルビン BCA 標準品, レーキレッ ドC標準品およびレーキレッド CBA 標準品について	
井上哲男・神蔵美枝子・村上信江	136
化粧品用色素の品質について 化粧品用黄 色 203 号 (Quinoline Yellow WS)	
五十畑悦子・南城実	139
シャンプー剤の毛髪の傷害試験法について	
南城実・狩野静雄・小林紀子	142
皇居外苑内濠水の水質改善について	
小幡利勝・松井啓子・田中守	144
工事中トンネル内の空気汚染について	
山手昇・松村年郎	148
防腐剤の併用効果(第1報) パラオキシ安 息香酸ブチルとデヒドロ酢酸ナトリウ ムの併用効果	
栗栖弘光・小林常男	151
防腐剤の併用効果(第2報) 安息香酸ナト リウム, パラオキシ安息香酸ブチルお よびデヒドロ酢酸ナトリウムの併用効 果	
栗栖弘光・川原隆一	154
癌および細菌に対する化学療法剤のスクリ ーニング試験成績(第5報) 主として 含窒素異項環化合物について(5)	
越沼きみえ・石関忠一・岩原繁雄・ 板井孝信・中島利章・末吉祥子・ 名当国臣・神谷庄造・鈴木郁生	157
癌および細菌に対する化学療法剤のスクリ ーニング試験成績(第6報) 主として 含窒素異項環化合物について(6)	
越沼きみえ・岩原繁雄・鈴木郁生・ 神谷庄造・大草原三	159
昭和41年度の一斉取締検査における解熱鎮 痛剤の試験方法および試験結果	
柴崎利雄・鯉淵昌信・山本美代子・ 石橋無味雄	161
昭和42年度における特別審査について	
立沢政義・橋場茂子・柴崎利雄	164

国家検定からみた最近10年間の下垂体後葉

製剤の動向

長沢佳熊・福田秀男167

ビタミンに関する最近の特行試験ならびに

一斉取締試験成績

谷村顕雄・河原邦子・足立透170

昭和42年度における市販粉末生菓の検査に

ついて

西本和光・佐竹元吉・坂東きみ子172

昭和38年～42年度における腸線縫合糸の輸

出検査（物理試験）成績について

藤井正道・堀部隆・菊池寛172

市販プリント包装パターの検査成績について

慶田雅洋・辰濃隆・海老根涼子・

川城巖173

最近5年間ににおける輸入粉乳の異物試験成

績について

光楽昭雄・宮島弘衛・川城巖177

昭和42年度の輸入食品の化学検査概況

天野立爾・内山貞夫・山縣翠・近藤

竜雄179

昭和38～42年度における人工甘味料および

小麦粉改良剤の製品検査について

井上哲男・寺島敏雄・林敏夫・志村

博・外海泰透・西野順子・中村昌子・

斉藤良枝181

昭和29～42年における貯蔵米菌学検査成績

倉田浩・坂部フミ・宇田川俊一・

一戸正勝・鈴木明子・高橋紀子183

わが国11都市の街路大気の鉛汚染について

山手昇・松村年郎189

植物目録 春日部薬用植物栽培試験場

川谷豊彦・堀越司・金子政次191

抄録223

学会講演245

衛試例会250

国家検定, 国家検査などの試験状況報告255

国立衛生試験所標準品265

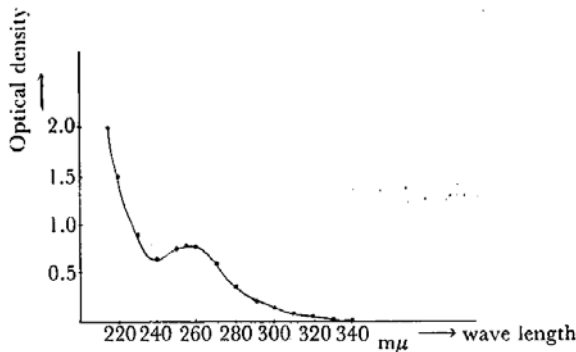


Fig. 6. Ultraviolet spectrum of fr 2 in Fig. 5.

ら¹³⁾の報告があり、前者は葉酸および N⁵-ホルミルテトラヒドロ葉酸の pH 7 での励起およびけい光波長の極大をそれぞれ 365 mμ と 450 mμ および 370 mμ と 460 mμ としており、後者は葉酸 (pH 9), N⁵-ホルミルおよび N¹⁰-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (いずれも pH 7) の励起およびけい光波長の極大をそれぞれ 363 mμ と 450~460 mμ, 314 mμ と 365 mμ および 313 mμ と 360 mμ としている。最近, Anthony ら¹⁴⁾は、プテリジンを補欠分子族とする新しいアルコールデヒドロゲナーゼについて報告しているが、彼らによると、ほとんどの葉酸誘導体は、355~375 mμ に励起波長の極大、450~470 mμ にけい光波長の極大をもつ。

これらのデータから、Fr II の Dowex 1-X 4 によるイオン交換クロマトグラフィーで単離した白色固体は、¹⁴C メタノールの体内変化物質と葉酸関連物質と

の結合体、たとえば N¹⁰-ホルミルテトラヒドロ葉酸のようなものと考えられる。

おわりに、本実験をご指導下さった生物化学部長長沢佳熊先生に深く感謝するとともに、実験の一部に協力された同部西崎笹夫技官ならびに放射線化学部亀谷勝昭技官に謝意を表わす。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 竹中祐典: 衛生試験報, **85**, 8 (1967).
- 2) 生化学研究法 II, p. 476 [朝倉書店] (1967).
- 3) R. Tye, J. D. Engel: *Anal. Chem.*, **37**, 1255 (1965).
- 4) 亀谷勝昭, 井上陽一, 丸山孝一: *Radioisotopes*, **16**, 41 (1967).
- 5) 佐竹一夫: クロマトグラフ, p. 87 [共立出版] (1952).
- 6) C. W. Waller: *J. A. C. S.*, **70**, 19 (1948).
- 7) M. Silverman, F. G. Ebaugh and R. C. Gardiner: *J. B. C.*, **223**, 263 (1956).
- 8) M. Silverman, L. W. Law and B. Kaufman: *J. B. C.*, **236**, 2530 (1961).
- 9) H. Sotobayashi, F. Rosen and C. A. Nichol: *Biochemistry*, **5**, No. 12, 3878 (1966).
- 10) F. M. Huennekens and M. J. Osborn: *Advance in Enzymol.*, **21**, 369 (1959).
- 11) L. Jaenicke und C. Kutzbach: *Fortschritte der Chem. org. Naturstoffe*, **XXI**, 183 (1963).
- 12) D. E. Duggan: *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 1 (1957).
- 13) K. Ueda and J. Rabinowitz: *Anal. Biochem.*, **6**, 100 (1963).
- 14) C. Anthony and L. J. Zatman: *Biochem. J.*, **104**, 960 (1967).

熱帯魚グッピーによるパラチオンおよびシアン化カリウムの定量とパラチオンの LD₅₀ およびシアン化カリウムの ED₅₀*

長沢佳熊・越村栄之助・福田秀男

LD₅₀ and ED₅₀ of Parathion and Potassium Cyanide and their Bioassay using Guppies (Lebistes reticulatus)

Kakuma NAGASAWA, Einosuke KOSHIMURA and Hideo FUKUDA

Two and two dose assay (dose ratio = 1.5) for parathion using tropical fish, guppies, gave the found values 92~108% [fiducial limits of error (FLE): 54~156% (P=0.95)] against the actual one 100%. The values of LD₅₀ at 24, 48 and 72 hours after treatment with parathion were 0.0476 ppm [FLE: 88~112% (P=0.95)], 0.034 ppm [FLE: 80~124% (P = 0.95)], and 0.029 ppm [FLE: 75~126% (P = 0.95)] respectively.

* 本報告の一部は、昭和39年6月22日 国立衛生試験所特別研究報告会および昭和41年7月21日、日本実験動物研究会において発表した(実験動物, **15**, 122 (1966) 参照)。

本研究の一部は、昭和38, 39年度工場排水に関する特別研究費によって行なわれた。

Two and two dose assay (dose ratio = 1.1) for potassium cyanide on stopping swimming of guppies gave the found values 98~102% [FLE: 91~108% (P=0.95)] against the actual one 100%. The values of LD₅₀ during from 90 to 165 minutes after treatment with potassium cyanide were 0.767 ppm [FLE: 94~109% (P=0.95)] ~ 0.709 ppm [FLE: 90~110% (P = 0.95)].

The sensitivities of these assays were higher than Averell-Norris' chemical method (0.2~5 ppm) for parathion, and for potassium cyanide, a little lower than the pyridine pyrazolone method (0.02~0.22 ppm), and higher than the mercuric thiocyanate method (0.83~8.3 ppm).

(Received May 31, 1968)

工場排水の生物学的試験法として、JIS²⁾ に定められた めだか などを用いる急性毒性試験は、その結果 (TLm 値) がかなり変動する。また、諸種の農薬の魚に対する LD 値については、板沢、田村の報告²⁾ がある。著者は、熱帯魚グッピー (*Lebistes reticulatus*) を用い、これにパラチオンまたはシアン化カリウムを投与し、その死亡または運動不能となる時点を目標とし、それぞれ LD₅₀ または ED₅₀ を求め、さらに、それぞれの標準物質と比較するパラチオンおよびシアン化カリウムの 2-2 用量定量法を行なった。

実験の部

1. 実験材料

1.1 試験動物: 成熟雄グッピー

1.2 試料: 1) 精製パラチオン (98.8%)

2) シアン化カリウム (特級試薬)

1.3 魚の容器: 飼育用 ほうろう引水槽 (円筒) 43×40 cm

試験用 ガラス製水槽 (円筒) 30×30 cm

1.4 水: 飼育用 アクリフラビン 1 ppm (シアン化カリウムの場合は除く)、チオ硫酸ナトリウム 28 ppm (シアン化カリウムの場合は除く)、塩化ナトリウム 300 ppm (シアン化カリウムの場合は 500 ppm) を含む水道水 (シアン化カリウムの場合は蒸留水) に酸素を通じたもの。

試験用 チオ硫酸ナトリウム 28 ppm を含む水道水 (シアン化カリウムの場合は塩化ナトリウム 500 ppm を含む蒸留水に酸素を通じ、1 夜放置後使用する) を魚 1 匹につき 250~1000 ml の割合で使用する。

1.5 水槽の温度: 飼育時 25°~28°

実験時 23° (23° の恒温室におく)

1.6 飼料: 乾燥みじんこ (市販品) 1 日 1 回 1 匹当り約 1 mg を与える。

2. 実験方法および結果

2.1 実験方法: 購入したグッピーを数日間飼育用水槽で飼いならす。実験前日に 23° の恒温室へ移し、

飼料は与えない。用量反応線を求める場合は、1 群を 10~15 匹とし、その数群を準備し、種々の濃度の精製パラチオンのエタノール溶液、またはシアン化カリウムの水溶液の一定容量を試験水槽に加えてよくかき混ぜ、魚を入れる。パラチオンの場合は魚の死亡数と投与後の経過時間とを記録する。シアン化カリウムの場合は、魚が運動不能となり、水底へ沈み、静止した数と投与後の経過時間とを記録する。2-2 用量定量法の場合には、魚約 20 匹を 1 群とし、4 群を準備し、それぞれ標準品の高用量群と低用量群、および、試料の高用量群と低用量群とにあてる。同一試験では、投与する標準品および試料の各容量は等しくする。魚の死亡数、または、運動不能になって水底に沈んだ数をパーセントで表わし、これをプロビットに変換する。

2.2 パラチオンについての実験結果

2.2.1 パラチオンの用量反応線と LD₅₀

精製パラチオン 0.0166~0.1265 ppm の濃度における魚の死亡数とそのプロビット、および、経過時間を Table 1 に示す。

Table 1 について、用量反応線の直線性が成立すると予想されるものについて、その直線性の検定、回帰方程式、LD₅₀ およびその信頼限界などを Table 2 に示す。

2.2.2 パラチオンの 2-2 用量方式による定量

1 群 19~21 匹のグッピーに、精製パラチオン 0.0562 ppm および 0.0375 ppm をそれぞれ高用量および低用量として与えた時の 48 時間後の魚の死亡数とそのプロビットを Table 3 に示す。

Table 3 から計算すると、効価比 0.92 (実際値 1.00)、信頼限界 (P = 0.95) 54.4~156% となる。

2.3 シアン化カリウムについての実験結果

2.3.1 シアン化カリウムの用量反応線と ED₅₀

シアン化カリウム 0.6010~0.8800 ppm の濃度における魚の反応数とそのプロビット、および、経過時間を Table 4 に示す。

Table 4 について、用量反応線の直線性が成立すると予想されるものについて、その直線性の検定、回帰

Table 1. Numbers of guppies killed by different doses of parathione and their probits

time (hr.)	dose (parathione ppm)*											
	0.0166		0.0250		0.0375		0.0562		0.0843		0.1265	
	K/F**	probit	K/F	probit	K/F	probit	K/F	probit	K/F	probit	K/F	probit
6	0/15	—	0/15	—	0/15	—	2/15	3.889	2/15	3.889	5/15	4.569
12	0/15	—	0/15	—	2/15	3.889	6/15	4.747	5/15	4.569	11/15	5.623
24	2/15	3.889	2/15	3.889	5/15	4.569	12/15	5.854	13/15	6.388	14/15	6.501
48	3/15	4.158	4/15	4.377	7/15	4.917	13/15	6.388	15/15	—	14/15	6.501
72	4/15	4.377	5/15	4.569	8/15	5.083	14/15	6.501	15/15	—	14/15	6.501

* dose ratio: 1.5 ** K: numbers of guppies killed, F: total numbers of guppies used

Table 2. Linearity, regression equation, LD₅₀ and its fiducial limits of error from the data in Table 1

time (hr.)	linearity (χ^2 , $P=0.95$)	regression equation (Y)	LD ₅₀ (ppm)	fiducial limits of error ($P=0.95$), %
24	3.30 < 7.81	5.319 + 0.7764X	0.0476	87.9 ~ 112
48	1.90 < 5.99	4.856 + 0.3149X	0.0336	80.3 ~ 124
72	2.86 < 5.99	5.065 + 0.3140X	0.0293	74.5 ~ 126

Table 3. Numbers of guppies killed by parathione and their probits for 2 and 2 dose assay

Standard				Sample			
high dose (0.0562 ppm)		low dose (0.0375 ppm)		high dose (0.0562 ppm)		low dose (0.0375 ppm)	
K/F*	probit	K/F	probit	K/F	probit	K/F	probit
17/19	6.255	13/21	5.302	17/21	5.878	12/20	5.253

dose ratio: 1.5 potency ratio: 0.92 [ELE: 54.4 ~ 156% ($P=0.95$)]

* K: numbers of guppies killed, F: total numbers of guppies used

Table 4. Numbers of guppies effected by different doses of potassium cyanide and their probits

time (min.)	dose (potassium cyanide ppm)*									
	0.6010		0.6611		0.7272		0.8000		0.8800	
	E/F**	probit	E/F	probit	E/F	probit	E/F	probit	E/F	probit
15	0/10	—	0/10	—	0/10	—	0/10	—	0/10	—
30	0/10	—	0/10	—	0/10	—	0/10	—	1/10	3.718
45	0/10	—	0/10	—	1/10	3.718	2/10	4.158	3/10	4.476
60	0/10	—	0/10	—	2/10	4.158	3/10	4.476	4/10	4.747
75	0/10	—	1/10	3.718	3/10	4.476	3/10	4.476	5/10	5.000
90	1/10	3.718	2/10	4.158	3/10	4.476	5/10	5.000	9/10	6.282
105	1/10	3.718	2/10	4.158	4/10	4.747	6/10	5.253	9/10	6.282
120	1/10	3.718	2/10	4.158	4/10	4.747	7/10	5.524	8/10	5.842
135	2/10	4.158	4/10	4.747	5/10	5.000	7/10	5.524	9/10	6.286
150	1/10	3.718	4/10	4.747	5/10	5.000	7/10	5.524	9/10	6.282
165	1/10	3.718	4/10	4.747	6/10	5.253	7/10	5.524	9/10	6.282

* dose ratio: 1.1

** E: numbers of guppies which stopped swimming at the bottom, F: total numbers of guppies used

Table 5. Linearity, regression equation, ED₅₀ and its fiducial limits of error from the data in Table 4

time (min.)	linearity (χ^2 , P=0.95)	regression equation (Y)	ED ₅₀ (ppm)	fiducial limits of error (P=0.95), %
90	1.37<7.81	4.668+0.5853X	0.7674	93.6~109
105	0.46<7.81	4.798+0.6154X	0.7501	93.7~108
120	0.24<7.81	4.798+0.5678X	0.7520	93.2~109
135	0.43<7.81	5.128+0.4887X	0.7091	90.3~110
150	0.67<7.81	5.062+0.5681X	0.7193	88.8~111
165	0.73<7.81	5.126+0.5695X	0.7117	92.1~107

Table 6. Numbers of guppies effected by potassium cyanide and their probits for 2 and 2 dose assay

time (min.)	Standard				Sample			
	high dose (0.800 ppm)		low dose (0.727 ppm)		high dose (0.800 ppm)		low dose (0.727 ppm)	
	E/F	probit	E/F	probit	E/F	probit	E/F	probit
270	11/20	5.126	7/20	4.615	11/20	5.126	5/20	4.326
285	13/20	5.385	7/20	4.615	12/20	5.253	5/20	4.326
300	13/20	5.385	7/20	4.615	13/20	5.385	6/20	4.476
315	14/20	5.524	7/20	4.615	12/20	5.253	6/20	4.476
330	15/20	5.674	7/20	4.615	13/20	5.385	6/20	4.476
345	15/20	5.674	8/20	4.747	14/20	5.524	8/20	4.747
360	14/20	5.524	6/20	4.476	14/20	5.524	6/20	4.476
375	16/20	5.842	8/20	4.747	14/20	5.524	8/20	4.747
390	15/20	5.674	8/20	4.747	14/20	5.524	7/20	4.615
405	15/20	5.674	7/20	4.615	14/20	5.524	7/20	4.615
420	15/20	5.674	7/20	4.615	15/20	5.674	6/20	4.476
435	15/20	5.674	9/20	4.874	16/20	5.842	7/20	4.615
450	16/20	5.842	9/20	4.874	15/20	5.674	6/20	4.476

potency ratios and their fiducial limits of error: see Table 7

方程式, ED₅₀ およびその信頼限界などを Table 5 に示す.

2・3・2 シアン化カリウムの2-2用量方式による定量

1群20匹のグッピーに, シアン化カリウム 0.8000 ppm および 0.7272 ppm をそれぞれ高用量および低用量として与えたときの, 270分後から 450分までの間の15分ごとの魚の反応数を Table 6 に示す.

Table 6 より計算した効価比 (実際比 1.00) および信頼限界を Table 7 に示す.

む す び

熱帯魚グッピーの, パラチオンの急性中毒による死亡を利用して行なった2-2用量方式による定量法 (用量比 1.5) によって, 実際値 100% に対して 92~108% の測定値 [信頼限界 54~156% (P=0.95)] を得た. LD₅₀ は24時間, 48時間および72時間ではそれぞれ 0.048 ppm [信頼限界 87.9~112% (P=0.95)], 0.034 ppm [信頼限界 80~124% (P=0.95)], 0.029 ppm [信頼限界 75~126% (P=0.95)] であった.

Table 7. Potency ratios from the data in Table 6.

time (min.)	potency ratio*	fiducial limits of error (P=0.95), %
270	0.98	—
285	0.98	—
300	0.99	—
315	0.98	90.8~108
330	0.98	—
345	0.99	—
360	1.00	—
375	0.98	—
390	0.99	—
405	0.99	—
420	0.99	—
435	1.00	—
450	0.98	—

*actual value: 1.00

また, シアン化カリウムにより運動不能となることを利用して行なった2-2用量方式による定量法 (用量比 1.1) によって, 実際値 100% に対して 98~102% の測定値 [信頼限界 91~108% (P=0.95)] を得た. ED₅₀ は90分~165分の間では 0.77 ppm [信頼限界 94~109% (P=0.95)] ~ 0.71 ppm [信頼限界 90~110% (P=0.95)] であった.

この定量法を化学的定量法の感度と比較すると、パラチオンでは Table 3 によると Averell-Norris 法⁸⁾ の 0.2~5 ppm より感度がよく、シアン化カリウムでは Table 6 および Table 7 によるとピリジン・ピラゾロン法⁴⁾ の 0.02~0.22 ppm よりもやや感度が低い、チオシアン酸第二水銀法⁵⁾ の 0.83~8.3 ppm より感度がよい。

文 献

- 1) JIS K 0102 (1964), 55 (p. 99)
- 2) 板沢靖男, 田村保: 水産増殖, 11, 113 (1963)
- 3) JIS K 0102 (1964), 23.2 (p. 40)
- 4) JIS K 0102 (1964), 29.2 (p. 61)
- 5) JIS K 0102 (1964), 29.3 (p. 63)

細菌ヘパリナーゼによるヘパリンの分解

山羽 力・高橋昭江・木村俊夫

Degradation of heparin by bacterial heparinase

Tsutomu YAMAHA, Terue TAKAHASHI and Toshio KIMURA

- 1) Heparinase was partially purified from *Flavobacteria* adapted to chondroitin sulfate.
- 2) The purified enzyme also degraded hyaluronic acid, chondroitin sulfate and pectic acid as well as heparin.
- 3) Glucosamine moiety, one of the main enzymatic digests of heparin was identified by paper chromatography and paper electrophoresis. The main product of whale heparin was glucosamine-N-sulfate, while that of bovine heparin was suggested as glucosamine-N, O-disulfate.
- 4) N-acetylglucosamine was detected only from the digesting products of whale heparin.

(Received May 30, 1968)

起源(種族, 臓器)を異にするヘパリンの生理活性と化学構造の関係を明らかにするため, われわれは, クジラヘパリンがイオウ含量が高いにもかかわらず, その抗凝血活性が著しく高いことを報告した^{1,2)}. そしてその化学構造についてもウシヘパリンとの差異が指摘されている^{3,4,5)}.

一方, 細菌ヘパリナーゼによるヘパリンの分解生成物の同定から, ヘパリンの化学構造を推定する試みもなされている^{6,7)}. われわれは, *Flavobacteria* からのヘパリナーゼを部分的に精製し, クジラおよびウシヘパリンの分解物, 特にグルコサミン残基を比較検討した.

実験材料および方法

酵素材料: *Flavobacterium heparinum* ATCC 13125 を本文で述べる条件で培養した.

ヘパリンナトリウム: クジラヘパリン(腸粘膜)およびウシヘパリン(肺)は大洋漁業株式会社から提供されたもので, 前報の方法¹⁾によって精製した.

グリコスルファターゼ: サザエの肝から高橋の方法⁸⁾で精製した. ただし GM セルローズカラムクロマトグラフィーは省略した.

グルコサミン-N-硫酸 (2-デオキシ-2-スルホアミド-D-グルコース): Wolfson らの方法⁹⁾で合成した.

グルコース-6-硫酸カリウム: 生化学工業から購入した.

グルコサミン塩酸塩: 大洋漁業株式会社から提供されたものを再結晶した.

N-アセチルグルコサミン: グルコサミン塩酸塩から Roseman らの方法¹⁰⁾で調製した.

酵素活性の測定: 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 0.1 ml, 1% ヘパリンナトリウム (pH 7.0) 0.1 ml および酵素液 0.1 ml を含む反応液を 24°, 3 時間放置後, Somogyi 銅試液 1 ml を加えて反応を停止させ, 水 0.7 ml を加えた後, 沸騰水浴中で 10 分間加熱し, 冷後, Nelson 試液 1 ml および水 2 ml を加え, よく振り混ぜ, その遠沈上清について層長 10 mm, 波長 660 mμ における吸光度を測定した.

本実験条件下で, 3 時間で 1 μ mole のグルコースに相当する還元物質を生成する酵素量を 1 ヘパリナーゼ単位とする. また, 酵素たん白質 1 mg 当たりのヘパリナーゼの単位数を比活性とする.

たん白量: Lowry 法により, ヒト結晶アルブミン

を標準にした。

ペーパークロマトグラフィー: ろ紙は Whatman No. 1 を使用し, 展開溶媒はブタノール-酢酸-水 (50:12:25) を用いて下降法で行なった。発色はアルカリ性硝酸銀を用いた。

ろ紙電気泳動: ろ紙は Whatman No. 1 を使用し, 0.05 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.2) を用い, 16 v/cm, 90 分間泳動を行なった。

実験結果

I. 適応菌の調製

Fig. 1 に示すように Payza らの方法¹²⁾に準じて培養した。

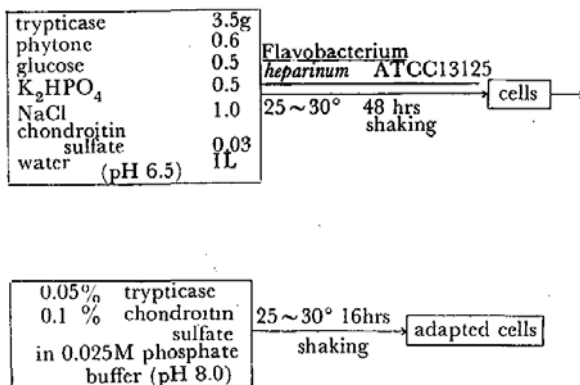


Fig. 1. Preparation of adapted cells.

ヘパリンが高価なため, ヘパリンの代わりにコンドロイチン硫酸で適応させたため, ヘパリナーゼ活性は約1/2に低下したが, 非適応菌に比べるとかなりの活性の増加がみられる (Fig. 2)。

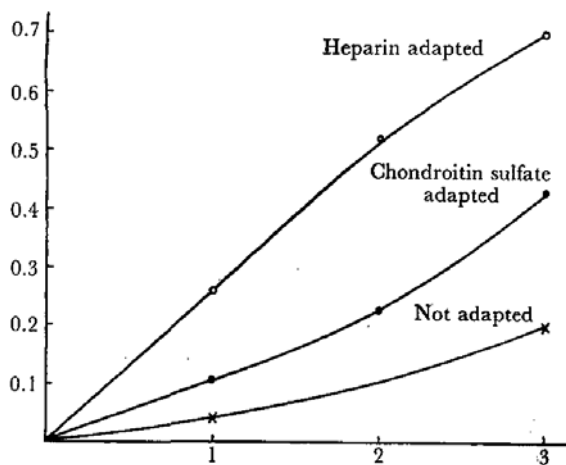


Fig. 2. Comparison of the activities of heparinase prepared from adapted and non-adapted cells. Purified enzymes (2.5 mg/ml) prepared by the procedure described in Fig. 3 were used respectively.

II. 酵素の精製

Fig. 3 に示すような操作でヘパリナーゼを精製した。

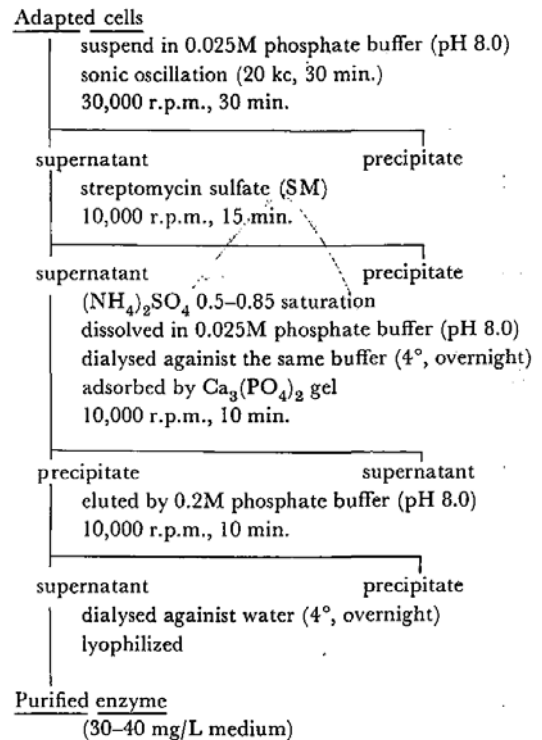


Fig. 3. Procedure for purification of heparinase.

このようにして得られた精製酵素の比活性は粗抽出液の約7倍であった (Table 1)。

Table 1 Purification of heparinase.

Procedure	vol (ml)	total protein (mg)	specific activity (units/mg)	total activity (units)	yield (%)
crude extract (treated with SM)	184	2315	0.20	468	100.0
Ammonium sulfate (0.5-0.85 sat.)	50	400	0.87	346	74.0
Calcium phosphate-gel adsorption	37	127	1.43	182	38.8

1 unit: amount of enzyme which will produce 1 μ mole of reducing group (as glucose) in three hours.

本精製酵素をさらに Amberlite XE-64 カラムクロマトグラフィー, でん粉電気泳動で精製すると, かなり単一なピークに溶出されるが, 凍結乾燥すると幾分不溶性となり, 比活性の増加は認められなかった。また, Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーによ

る Δ^4 不飽和二糖をつくるエリミナーゼと、これをさらに単糖と α -ケト酸に分解する α -グルクロニダーゼの分離^{6,7)}は成功しなかった。

III. 酵素の性状

本酵素の至適 pH は 7.0 付近にあり (Fig. 4), その活性は塩類により著しく阻害され、リン酸塩緩衝液も 0.03 M 付近に至適濃度がある (Fig. 5)。

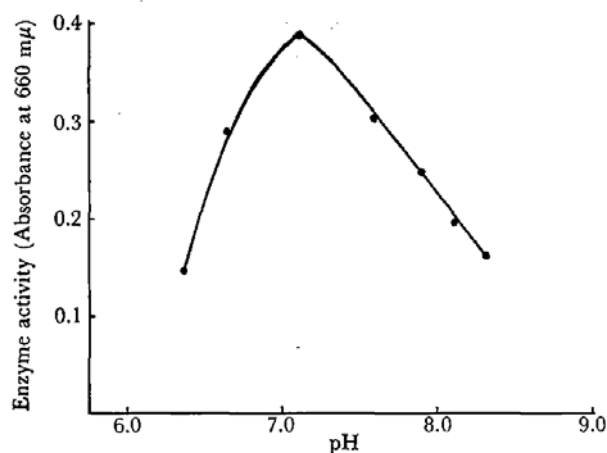


Fig. 4. Effect of pH

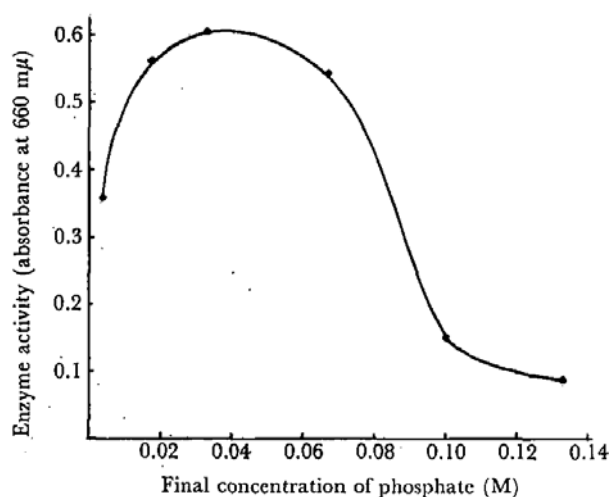


Fig. 5. Effect of phosphate concentration.

反応は基質濃度に比例して進行する (Fig. 6)。また、Fig. 7 で示すように酵素濃度が低いときには活性が余り現われなないのは、分解がある程度進行していても還元糖の増加が測定にかかってこないためなのか、分解機構自体にその原因があるのか明らかでない。クジラヘパリンの方がウシヘパリンよりも分解されやすい。

以上のことを考慮して反応を行なわせると、Fig. 8 に示すように反応時間にしたがって分解が進行する。

本酵素はヘパリン以外にヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ペクチン酸もよく分解する (Fig. 9)。

この酵素はヘパリンのアミノ基に結合した硫酸をあらかじめ酸処理ではずすと分解しなくなる。すなわち、ヘパリンを 0.04 N 塩酸中に溶かして封管し、沸

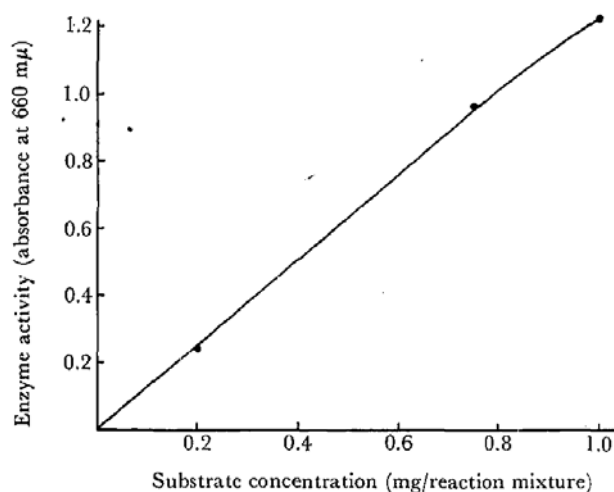


Fig. 6. Effect of substrate concentration.

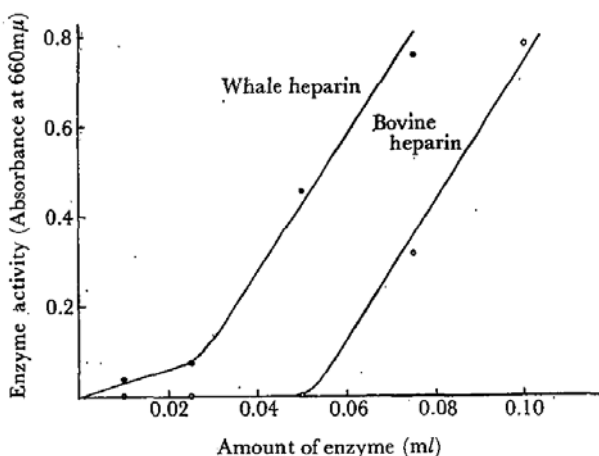


Fig. 7. Effect of enzyme concentration.

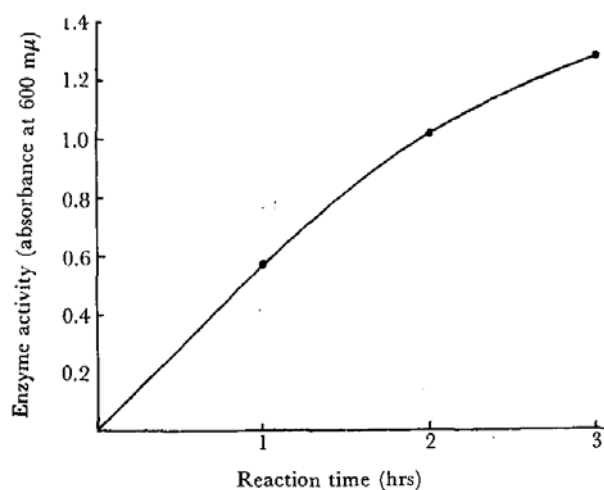


Fig. 8. Time curve of the reaction.

騰水浴中で一定時間加熱したのち、水酸化ナトリウムで中和後、ヘパリナーゼを働かせると、1 時間加熱したものは完全に分解を受けなくなる (Fig. 10)。普通、この条件で、ヘパリンのアミノ基に結合している硫酸は完全に離れることが知られているので、アミノ基の硫酸が本酵素の分解に必要であることがわかる。

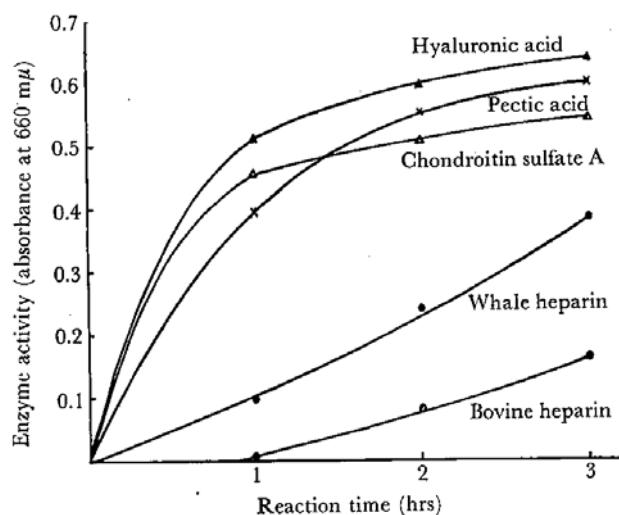


Fig. 9. Comparison of different kind of substrates.

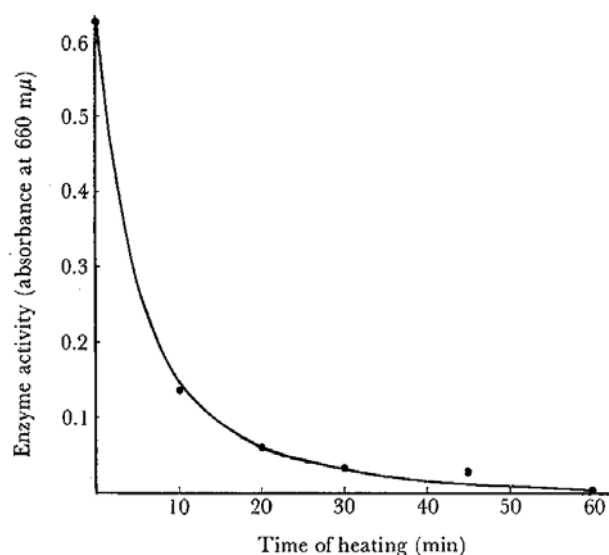


Fig. 10. Effect of N-desulfation of heparin.

IV. 分解生成物の確認

ウシおよびクジラヘパリン各 50 mg と精製酵素 50 mg を 1/30Mリン酸塩緩衝液 (pH 7.0) 15 ml に溶かし, 24°, 4日間放置後, ペーパークロマトグラフィーで調べると Fig. 11 で示すようなスポットが得られる。

クジラヘパリンの場合 N-アセチルグルコサミン (compound-III) とグルコサミン-N-硫酸 (compound-II) が顕著に認められるのに対して, ウシヘパリンでは compound-I が多い。このものはつぎのろ紙電気泳動の実験および文献の *Rf*^{6,7)} から考えて, グルコサミンN, Oジ硫酸と推定される。つぎに, 前述の反応液をカーボン・セライトカラム (1.5×5 cm) につけ, 水で溶出してくる分画を濃縮し, ろ紙電気泳動にかけると, Fig. 12 に示すように, クジラヘパリンからはグルコサミン-N-硫酸と少量の N-アセチルグルコサミンが, ウシヘパリンからは, グルコサミン-N-硫酸

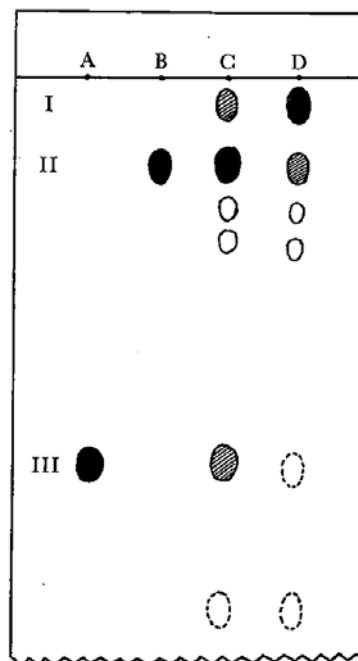


Fig. 11. Paperchromatogram of products
A. N-acetylglucosamine, B. glucosamine-N-sulfate, C. digesting product of whale heparin, D. digesting product of bovine heparin

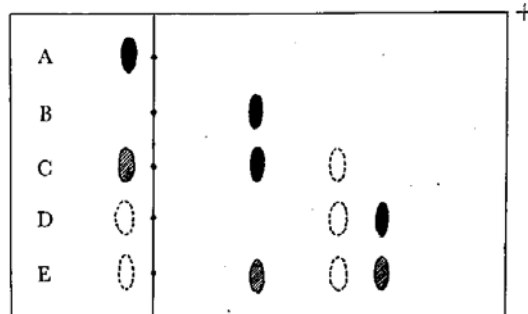


Fig. 12. Paperelectrophoresis of products.
A. N-acetylglucosamine, B. glucosamine-N-sulfate, C. digesting product (compound-II) of whale heparin, D. digesting product (compound-I) of bovine heparin, E. D after incubation with glycosulfatase.

より陽極側に速く移動するスポット (compound-I) がみられる。これがグルコサミンN, Oジ硫酸であることは, サザエの肝から得た glycosulfatase を働かせると, グルコサミン-N-硫酸を与えることから推定できる。この glycosulfatase はグルコース-6-硫酸を加水分解してグルコースを与えるが, グルコサミン-N-硫酸には作用しないので, O-硫酸は分解するが, N-硫酸は分解しないことがわかる。

考 察

ある多糖にその分解酵素を作用させ、分解生成物を同定することは、多糖の化学構造の解明の一つの有力な手段である。たとえば、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸の場合、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼがその化学構造の推定に役立った。

ヘパリンについては、Jaques¹³⁾により組織ヘパリナーゼがウサギ肝に存在することが早くから指摘されたが、現在ではその存在は否定的である。最近、ラット肝のリゾゾーム中にヘパリチン硫酸を分解する酵素の存在が報告されているが¹⁴⁾、それがヘパリナーゼといわれるものかどうか明らかでない。

一方、細菌ヘパリナーゼの存在がKornら¹²⁾により指摘されて以来、この酵素をヘパリンの構造の解明に利用する試みもなされているが^{6,7)}、いまだ十分でない。

本報において、われわれはクジラヘパリンの化学構造の研究に本酵素を利用することを試み、その最終分解物の1つであるアミノ糖残基の性状について検討した。

クジラヘパリンの場合、主としてグルコサミン-N-硫酸と少量のNアセチルグルコサミン、ウシヘパリンの場合は、主としてグルコサミンN、Oジ硫酸の存在が推定できた。このことは化学分析、NMR⁴⁾からの実験結果を支持するものであるが、クジラヘパリンにも少量のグルコサミンN、Oジ硫酸が、また、ウシヘパリンにも少量のグルコサミン-N-硫酸の存在が認められることは、ヘパリンのグルコサミン残基中の硫酸基の結合部位も、あまり画一的でないことを示している。この点、さらに酵素の精製、特にエリミナーゼと α -グルクロニダーゼの分離、および分解生成物のより詳細な検討を必要とする。

要 約

- 1) Flavobacteria からヘパリナーゼの精製を試みた。
- 2) 本酵素はヘパリンの他、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ペクチン酸もよく分解する。
- 3) 本酵素をクジラおよびウシヘパリンに作用させ、その最終分解物の1つであるアミノ糖成分について検

討した結果、前者の場合はグルコサミン-N-硫酸が、後者の場合はグルコサミンN、Oジ硫酸が主成分であることがわかった。

- 4) N-アセチルグルコサミンはクジラヘパリンの場合にのみ認められた。

文 献

- 1) 長沢佳熊, 山羽力, 木村俊夫, 高橋昭江: 生化学, **36**, 29 (1964).
- 2) 山羽力, 高橋昭江: 生化学, **38**, 414 (1966).
- 3) Z. Yoshizawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 336 (1964).
- 4) S. Inoue, Y. Inoue: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 513 (1966).
- 5) T. Kotoku, Z. Yoshizawa, F. Yamauchi: *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 553 (1967).
- 6) A. Linker, P. Hovingh: *J. Biol. Chem.*, **240**, 3724 (1965).
- 7) Z. Yoshizawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 600 (1967).
- 8) N. Takahashi: *J. Biochem.*, **48**, 508 (1960).
- 9) M. L. Wolfrom, R. A. Gibbons, A. J. Huggard: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5043 (1957).
- 10) S. Roseman, J. Ludowieg: *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 301 (1954).
- 11) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Forr, R. T. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 12) A. N. Payza, E. D. Korn: *J. Biol. Chem.*, **223**, 853 (1956).
- 13) L. B. Jaques: *J. Biol. Chem.*, **133**, 445 (1940).
- 14) F. Hutterer: *Biochim. Biophys. Acta*, **115**, 312 (1966).

終わりに本研究の終始御指導いただいた生物化学部長 長沢佳熊博士、ヘパリン製品などを提供いただいた大洋漁業株式会社 柴田哲夫博士 および菌株の入手に御骨折りいただいた東京大学理学部 寺山宏博士に感謝の意を表する。

いない規格も見られる。またこの逆で、スルピリンの配合されていない場合でもこの操作を行なっている規格もあるが、不必要な試験はつける必要がなく、試験法を作成にあたっては試験法の意味を十分理解した上で十分な実験を行なうこと、局方に準じた試験法を行なうこと、但し最新の方法で信頼性のある方法であれば局方にとらわれず記載するように指導してきた。特に混合製剤の場合従来の滴定法、重量法などでは定量が不可能と言って過言ではなく、定量には大いに機器分析を利用すべきである。

以上特審の審査状況、注意事項その他感じた点につ

き報告する。

文 献

- 1) 解熱鎮痛剤試験法1965年度版 (厚生省)
- 2) " 1966 " (大阪医薬品協会年報)
- 3) " 1967 " (日本公定書協会)
- 4) 立沢政義: 公定書会報 **22**, 46 (1968)
- 5) " : *ibid.*, **23**, 23 (1968).

国家検定からみた最近10年間の下垂体後葉製剤の動向

長 沢 佳 熊・福 田 秀 男

Results of the National Assay of Posterior Pituitary Preparations During Recent Ten Years

Kakuma NAGASAWA and Hideo FUKUDA

Results of the national assay of posterior pituitary preparations in 1958~1967 were described.

1. Numbers of injections examined and rejected in the assay are shown in Table 1.
2. The annual total oxytocin and vasopressin units passed in the assay are shown in Fig. 1 and Fig. 2 respectively.
3. The percentages of annual total units of posterior pituitary or oxytocin injection with different concentration are shown in Fig. 4.
4. The percentages of annual total units of natural and synthetic oxytocin injection passed are shown in Fig. 5, [A].
5. The percentages of annual total units of synthetic oxytocin injection imported and prepared domestically passed are shown in Fig. 5, [B].

(Received May 31, 1968)

下垂体後葉ホルモン剤として、脳下垂体後葉注射液は1951年、オキシトシン注射液およびバソプレシン注射液は1957年から、またオキシトシン・マレイン酸エルゴメトリン注射液は1963年からそれぞれ国家検定品目に指定されてきたが、さらに1967年以降にはオキシトシン点鼻剤、オキシトシンパッカル錠が加えられて現在に至っている。それらの過去10年間(1958~1967)における年間総単位数およびそれら製剤の試験内容などについて述べる。

1. 検定に合格した年間総単位数

a. オキシトシン製剤

Fig. 1 に示したように、1960年までは減少の傾向を示し、その後2年間に急激な増加を示し、1962年以降は700万単位をやや上廻り大きな変動を認めない。それらのうち、脳下垂体後葉注射液は1960年まで急減

し、その後も徐々に減少した。オキシトシン注射液では逆に1960年まで一定の生産であったが、その後1965年に至る5年間に急増し、脳下垂体後葉注射液と置き換えられた。これは前者が不純物としてのバソプレシンを含まないために、分べん時の使用に適することと、合成オキシトシンが各所で生産されるようになったことが主原因と考えられる。オキシトシン・マレイン酸エルゴメトリン注射液は1963年以降平均して年間約50万単位に一定している。

b. バソプレシン製剤

この製剤には国産品は全くなく、すべて輸入品である。Fig. 2 に示したように、1959年までは輸入量も少なかったが1960年頃から次第に増加し、現在では初期(1958~9年)の10倍以上の量が輸入されている。

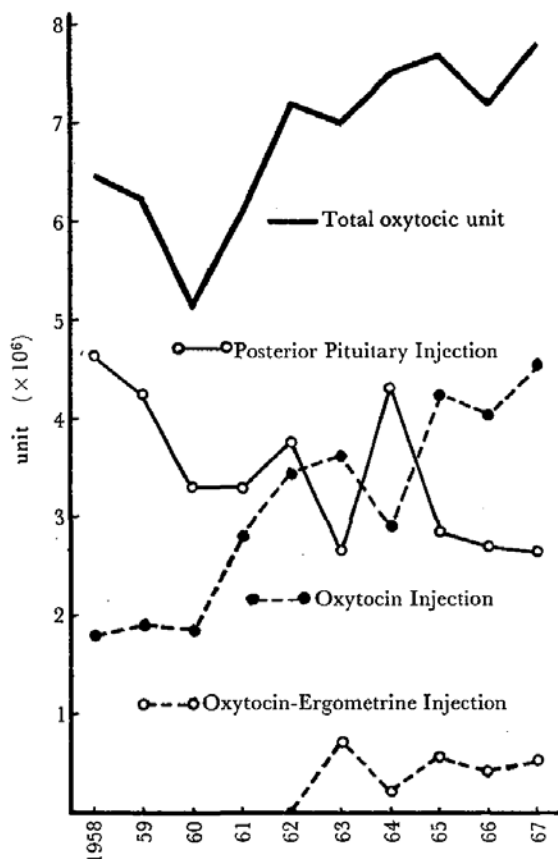


Fig. 1. The annual total oxytocic units of each injection passed in the national assay

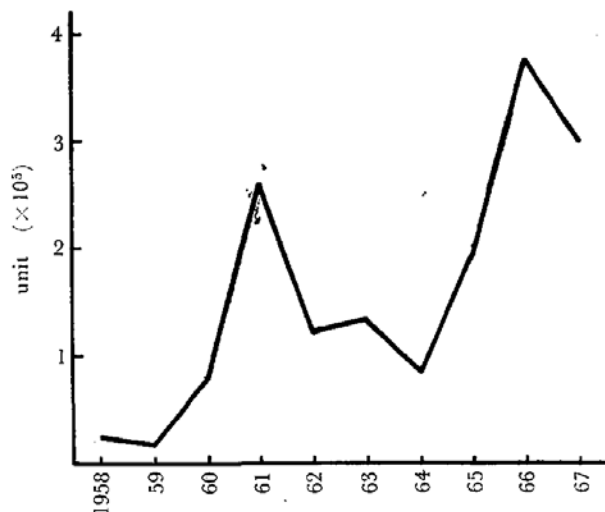


Fig. 2. The annual total units of vasopressin injection passed in the national assay

c. 獣医用脳下垂体後葉注射液

1961年以来、獣医用として 5~10 ml の比較的大型のアンプルまたはバイアル瓶入りの製剤が現われてきた。この生産量の変移を Fig. 3 に示した。

2. 各製剤の濃度 (単位/ml) の変移

バソプレシン注射液には 5 単位と 10 単位の 2 種類があるが、ここ 10 年来変っていない。

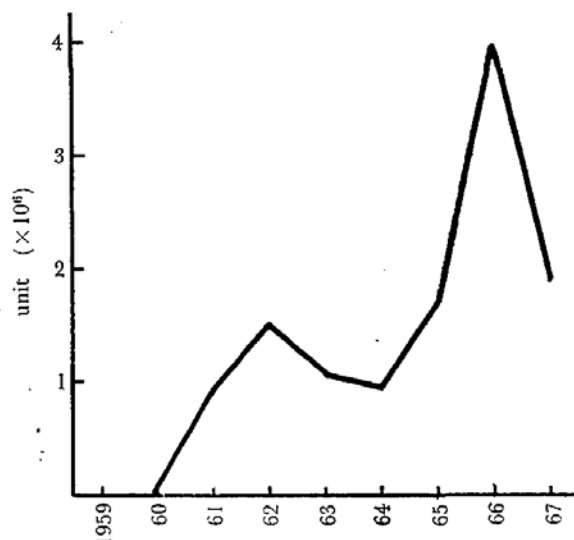


Fig. 3. The annual total oxytocic units of veterinary posterior pituitary injection passed in the national assay

特に特異な変移を示したのは脳下垂体後葉注射液とオキシトシン注射液で、その各年間総単位数に対する各種濃度の製剤の総単位数の割合を調べると Fig. 4 のようになる。

脳下垂体後葉注射液の濃度は、前半は 10 単位の 1 種類しか存在しなかったが、後半から 5 単位の製剤が現

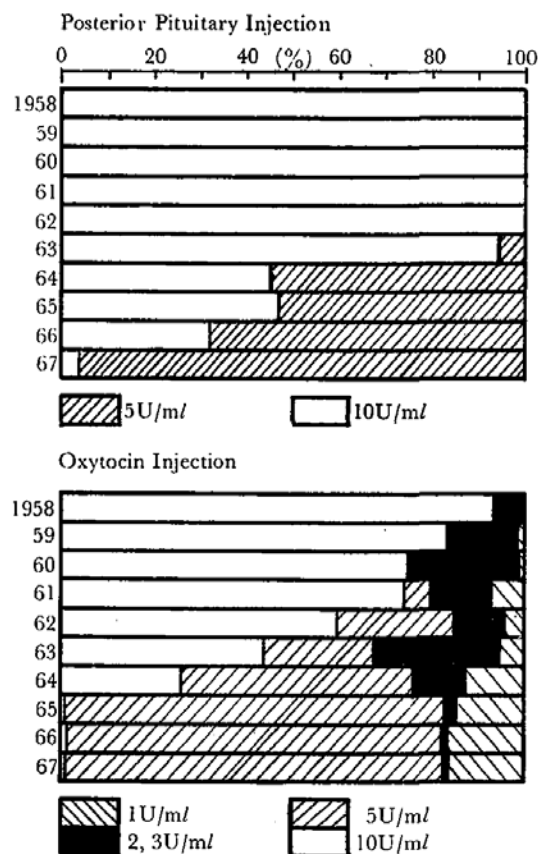


Fig. 4. The percentage of annual total units of posterior pituitary or oxytocin injection with different concentration

われ, 次第に10単位のもの置き換わってきている。これは臨床的に5単位の製剤の方が使用し易いためと考えられる。オキシトシン注射液については, 10年前(1958年)には10単位と2単位および3単位の製剤しか存在しなかったが, 次第に5単位と1単位のものが現われて, この2種類に置き換わっていく傾向が見られた。

3. 合成オキシトシン注射液について

1956年にオキシトシンの合成が成功し, それがオキシトシン製剤に使用されるようになった。1958年にはオキシトシン注射液の総単位量の約3%のみが合成品であったが, 翌1959年には64%にも増加した。しかし次第に減少し, 1961年以降は30~35%の間に落ち着いてきた (Fig. 5, [A])。

合成のオキシトシン注射液には原料を輸入し, 国内でそれを注射液化したもの (国産品) と, 製剤化されたものを輸入したもの (輸入品) とがある。その割合を調べると Fig. 5, [B] のようである。1959年までは全部が輸入品であったが, 1960年になって国産品が急激に現われ, 以後その量は1年毎に激しく増減したが, 1965年以降になってそれらの比率は落ち着いてきた。

4. 検体数および不合格件数とその内容

Table 1 に示したように, 過去10年間における不合格品は, 脳下垂体後葉注射液では7件で, そのうち6件が単位の不足, 他の1件は異物の混入によるもの, オキシトシン注射液では3件でそのうち1件が単位不足, 2件が無菌試験で不合格となっている。オキシトシン注射液で純度試験としてのバソプレシンの含量過

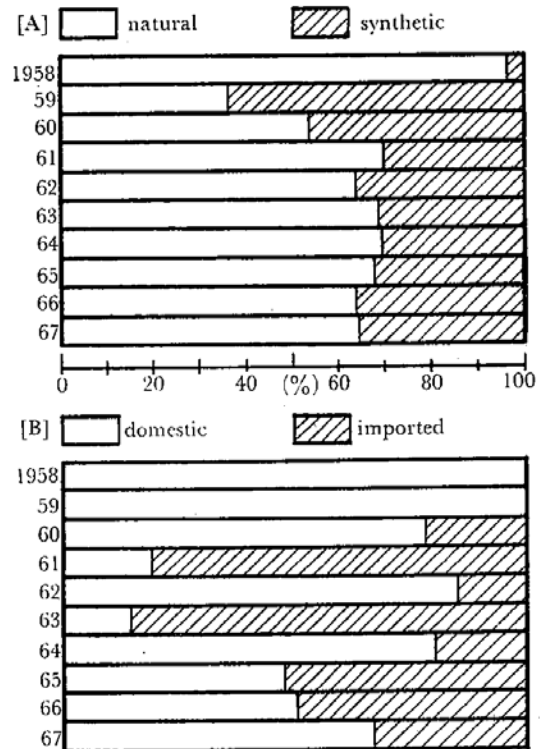


Fig. 5 [A] The percentages of annual total units of natural and synthetic oxytocin injection [B] The percentages of annual total units of synthetic oxytocin injection imported and prepared domestically.

多のために不合格となった例は今までにない。オキシトシン・マレイン酸エルゴメトリン注射液はまだ歴史が浅いが, マレイン酸エルゴメトリンの含量不足による不合格が1件あった。なお, バソプレシン注射液では不合格品はなかった。

Table 1. Numbers of posterior pituitary preparations examined and rejected in the national assay during recent ten years

year	posterior pituitary inj.		oxytocin inj.		oxytocin-ergometrine inj.		veterinary posterior pituitary inj.		vasopressin inj.	
	examined	rejected	examined	rejected	examined	rejected	examined	rejected	examined	rejected
1958	22	1	10	0	—	—	—	—	1	0
59	16	0	14	0	—	—	—	—	1	0
60	21	1	19	0	—	—	—	—	5	0
61	18	0	28	0	—	—	1	0	10	0
62	17	1	25	0	—	—	8	1	3	0
63	18	2	31	0	4	0	4	0	4	0
64	21	0	29	1	3	0	4	0	1	0
65	13	2	36	1	5	1	7	0	5	0
66	7	0	35	1	3	0	10	0	3	0
67	9	0	34	0	4	0	5	0	2	0
total	162	7	261	3	19	1	39	1	35	0