

青酸化合物検知法の法医毒物学的研究

昭和34年9月12日 受付

信州大学医学部法医学教室 (主任: 野田金次郎教授)

大 野 喜 佐 雄

Studies of the Medico-Legal and Toxicological Observations
of the Detection of Cyanides

Kisao Ohno

The Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. Dr. K. Noda)

まえがき

青酸化合物は法医学的にも古来より重要な毒物の一つである事は多言を要しない。やや古くでは、東京浅草の校長殺し(コーヒーに混じて飲ませて殺害したもの: 昭和10年11月)、戦後に於ては帝銀事件、等何れも未だ一般の記憶を去らない事件であろう。

青酸化合物は、之等法医学的使用の外、化学工業関係、鉄工関係、倉庫内の殺鼠用等々かなり身近かに使用せられているが、その管理等もあり良好でなく、事故死、災害死、等の原因にもなり、全く等閑に附しえない薬品の一つである。未だに青酸による自殺者が総自殺者の上位を占めているのであるが、その検出法に至つては、法医学的には一般に、Schönbein 法、Berliner Blau 反応等、古来よりの法を用いているに過ぎない。

分析化学的に種々新しい方法が報告されているが、それをそのまま法医学的に臓器よりの証明に用いるか何うかは問題であるので著者は、この点を検討して、多少の知見を得たので、茲に報告するものである。

この際、法医学的検査としては、死後経過日時との関係は常に念頭におかなければならない問題であるので、この点の考慮をはらいつつ実験を行つた。

第I編 新定量法の検討: 附 青酸中毒屍臓器よりの青酸の検出と死後経過との関係

I. ビリヂン・ピラツオロン法について

緒言

青酸化合物による中毒例は、法医裁判化学的にも問題となる場合が少なくない。しかしながら、青酸化合物は、酸性に於ては揮発性に富んだ毒物であるために死後比較的速やかに失はれ、長時間経過後では検出不可能であると考えられている。著者は死体各種臓器のうちでも、歯髄は、歯牙ホラー質で取こまれている

ために揮散青酸が存在するとすれば、揮散することもなく、長時間の後でも検出が可能ではなからうかと考え、歯髄をはじめとする各種臓器の青酸定量を行うことを考えてみた。そこで青酸化合物の定量法について、各種検討を加えたが、従来方法では感度が不良であり、絶対量が限られている歯髄組織には適用不可能であることが判つた。即ち、その感度の面からみただけでも、ピクリン酸法^⑤では20r、ヨード滴定法^⑥では20~2,000r、最も感度が良いと言われているAldridge のロダゲ法^⑦でも3rが必要である。しかしながら1947年、Epstein 等^⑧は塩化シアンがピラツオロン系化合物のビリヂン溶液と特異的な結合をすることを利用して、この反応を青酸化合物の定量に用いることを考案した。この反応の呈色機構を図示すれば下の如くである。即ち青酸化合物をクロロミンTで酸化して塩化シアンに変化させる前処置後、反応を進めるものである。

我々はこの定量法を青酸中毒屍の臓器中の青酸の定量に用いることを検討しあわせて検出量が死後経過と共にどのように変化するかを考察した。

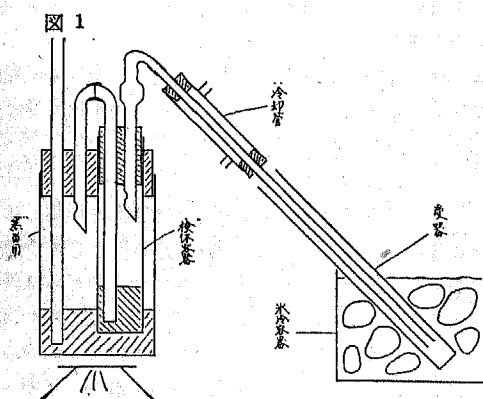
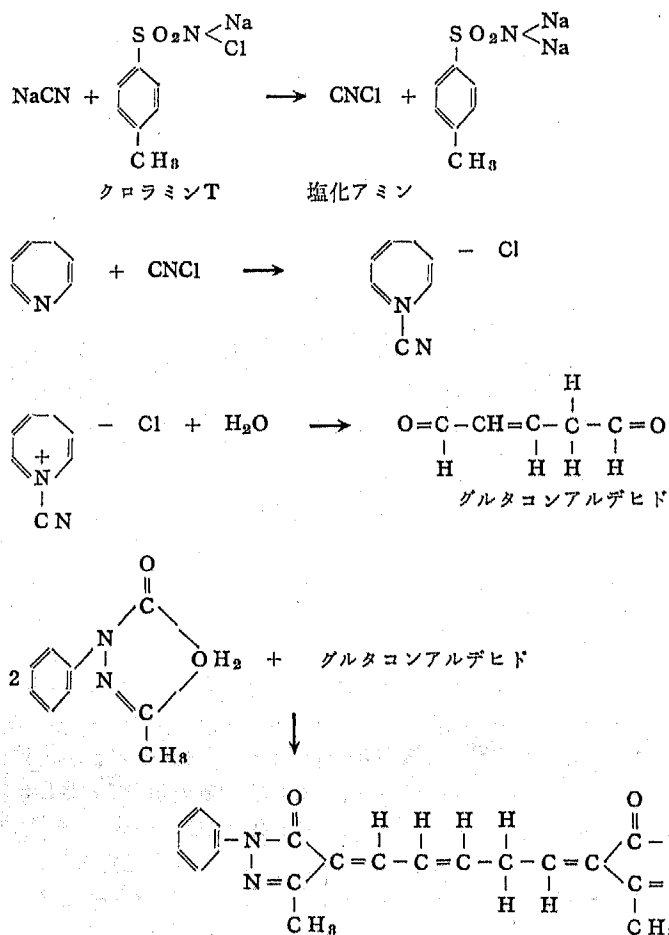
実験の部

1. 実験材料及方法: 実験動物は健康犬を使用、体重kg当り、青酸カリウム10mgを皮下投与して中毒死せしめた。通常10~30分間で死に至る。死体は直ちに土製のカメに投じて放置し、所定の日時を経たのち、検出すべき臓器を取出す。被検臓器は肝、肺、脳、脾、腎、筋、骨髓、歯髄の實質性臓器であり、原則として各々1.0gを切りとつて以下の分析を行つた。

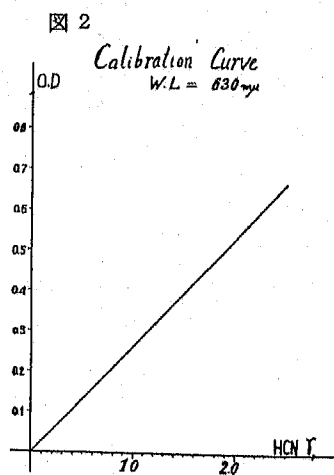
尚同時に対照として、各種死因によつて死亡した犬を使用し、同様の日数を経過せしめた後、各臓器を摘出し、比較分析した。

2. 分析方法

(イ) 青酸化合物の分離: 検体臓器の一定量(0.2~1.0g)を5%炭酸ソーダ含有の金剛砂0.5gと混和し

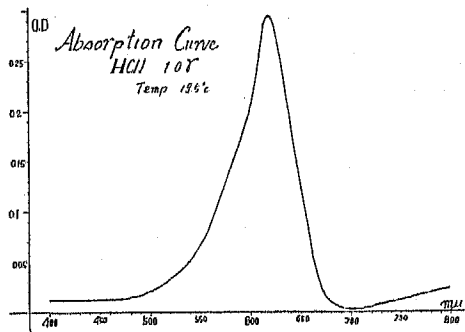


てよく摺合せ、下記のセミマイクロ水蒸気蒸溜装置⑤の蒸溜コルベン部に入れる。消泡剤としてセチルアルコールの少片を加えた後酒石酸結晶を加えて酸性とし、以下の法に従つて水蒸気蒸溜を行なつた。(図1) 受器にはあらかじめ N/20 KOH 2ml を入れておき、蒸溜器の先はこの中に浸し、周囲は氷で冷却しておく。約



15分間水蒸気蒸溜を行ない溜液 5 ml を得たならば蒸溜をやめ、蒸溜器の先を水で洗滌して溜液と合し、これを一旦濾過して揮発固型分を除き、濾液を 10cc 目盛附試験管に入れて検液とする。

図 3



(ロ) 比色定量法

発色は pH=7~9 でないと好適でないで (イ) で得た検液はフェノールフタレインを指示薬として N/20 H_2SO_4 で中和後⑥, 10cc になるように水で稀釈する。直ちに 1% クロラミン T 液 0.2cc を加え, 1 分間放置後ビリヂンピラツオロン試液 (3=メチル, 1=フェニル, 5=ピラツオロン飽和水溶液 5 部にビス (3-メチル, 1-フェニール, 5-ピラツオロン) の 0.1% ビリヂン溶液 1 部を加えたもの。) 5ml を加え 25°C, 30 分間放置する。発色液は Beckmann D-U, Spectrophotometer, で波長 630mμ で吸光度を測定した。

一方 HCN 含量を Liebig-Denigé 法で定量したものより HCN として 0.1~2.0 μg 迄含むように調製した標準液を上と同様に発色せしめて検量線を作成する。その測定結果は (図 2) の如くであつた。

これより, 青酸含量 0.1~2.0 μg の範囲に於ては, Lambert-Beer の法測が適用されることが判り, 定量が可能である。

尚この呈色の特徴を調べるために HCN 含量 1.0r の場合の吸収曲線を作成してみた。(図 3), この結果, 本呈色が 620 mμ に単一の頂点を持った曲線であることがわかる。

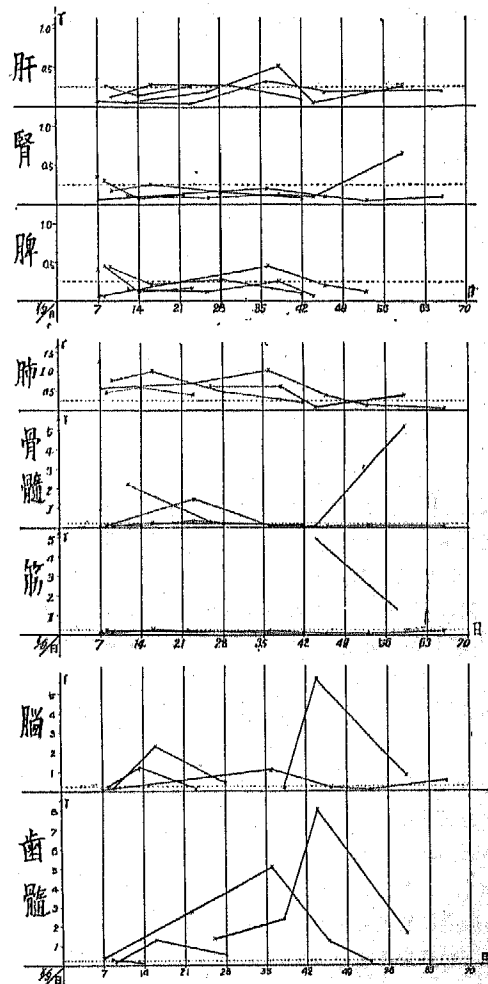
実験成績

各臓器 1g 中の青酸化合物の量を HCN に換算してこれを縦軸にとり, 死後経過日数を横軸にとつた結果を示すと (図 4) の如くである。即ち第 4 図に於ては, 肺臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 筋肉, 骨髓, 脳髓, 及歯髄中の青酸含量と死後経過日数との関係を示してある。尚同じ臓器を用い, 同様に分析した対照動物はすべて毒物含量零の結果を得た。

説明並に小括

青酸化合物の定量法に Epstein のビリヂンピラツオロン法を用いたが, 本方法は極めて反応が鋭敏で,

図 4



絶対量 0.1r 程度存在すれば波長 620mμ に吸収の極大値を有する特異的な色調を呈することがわかる。又, この反応を利用して, 各種臓器中の青酸中毒死時に於ける青酸含量を測定したが, 本実験の条件, (冬期 10 月~4 月) では, 予想に反して, 比較的長期に至つても青酸が検知出来ることがわかると同時に, 青酸含量の時間的变化を調べると, 臓器の種類によつて青酸の残留態度に可成りの差を見出し得ることが判つた。その結果によると, 長期に亘り大量に証明されるのは肺臓であり, 肝臓, 脾臓, 腎臓がこれに次いでいる。筋肉ではずっと低値を示したが, かなりの長期間を経たのちでもその微量を証明することが出来る。しかるに, 特に注目すべき事実は, 脳髓, 歯髄などの所謂神経組織であり, これらに於ては, 中毒死後の一定時間後に青酸検出量が増大することである。この原因としては種々

のものが考えられるが、我々はこれを組織に対する毒物の親和性の差と、死後の腐敗現象によるものと考えている。

Ⅱ・微量拡散法について

緒言

第Ⅰ項に於て、我々は青酸化合物の定量法としてビリヂンピラツオロン法を用い、本方法が優れた感度と特異性を持つていることを確かめ得た。しかしながら、発色をほぼ中性で行うために酸を以て中和する操作を行うので、その際に青酸が気体として失われる恐れもあり、実際にも困難な操作上の欠陥となつてゐる。こうした際、1950年 Boxer^⑦～^⑨等は、Vitamin B₁₂の化学構造からこのビタミン中にはシアノ基が存在することに注目しその定量にビリヂン・ピラツオロン法を用いることを報告した。彼等はそこで呈色液のpHを調節するために磷酸緩衝液を用い、その感度をも0.005～0.10 μ という驚異的な微量に迄高めることに成功した。

又、同時に生体中のVitamin B₁₂を定量する際、^⑨若し水蒸気蒸溜法を用いて青酸を分離しようとする、種々の点で不都合が生ずることを観察している。即ち、極微量の青酸が正常の体液中に不明な結合物質として存在しており、硫酸酸性で100°Cに加熱した場合には分解されると述べている。又、生体に存在する還元性物質が、本呈色を阻害し、充分なる除去純化装置が必要である事をも示している。第Ⅰ項で述べた如く、前報の発色操作に於ては、対照よりは、いかなる段階に於ても青酸を検知した事はないが、100°C加熱という条件をとつてゐるために、又、発色阻害物質の除去が行はれてゐないためにないものがあるとすることはなく、あるものを少なく定量する場合があつたかも知れない。

さて純青酸の定量はビリヂン・ピラツオロン法によつて感度が高められることは判つたが、青酸の分離の方法としてBoxerの方法は非常に手数がかかり、時間を追つて青酸を分離してゆくには不適當である。幸いにも、近時Conway^⑩を中心とする一派が、各種の揮散性物質の定量に微量拡散分析法を用いることを提唱している。この方法によると、試料が数種類同時に出来ること、又実験誤差がかなり少ないことで注目するに足るものである。更に本実験の如き加熱が問題となる場合に於ては、利用価値が特に高いと考えられる。

最近に至つてFeldstein^⑪～^⑬等は臨床的な立場から、Conwayの微量拡散分析法とビリヂン・ピラツオロン法とを組合せ、体液中の青酸の分析を行つてい

る。報告者によると、正常人血液中でも微量の青酸が存在し、特殊な病変に際してのその消長が検討されている。

我々は、実験動物に於て、第Ⅰ項と全く同様にして中毒死せしめた動物の諸臓器中の青酸をFeldsteinの方法に準じて定量し、その結果を考察することとした。本法によれば、測定された青酸量は遊離青酸値とも言えるものであり、裁判化学的に問題とする場合には、この値の存否であらうと考えられるものである。

尚併せて、本定量法に於いて注意されるべきいろいろの問題を基礎的な眼で検討した。

又、動物の腐敗状態は季節に依つて著しく変動することは法医学的にも明らかにされており、本実験の結果にも重大な影響を及ぼしていることが明らかであるので、この様子を何等かの形で記載するため、実験時の平均気温を測定してみた。現在の段階では腐敗度を数量化することが不可能であるので、比較が難かしいが、肉眼的な考察から参考となるべきものは述べることにした。

実験の部

1. 実験材料及方法：実験動物、中毒死に至らしめる方法、臓器の摘出などはすべて第Ⅰ項と同様にこれを行つた。

2. 分析方法

(イ) 青酸化合物の分離：検体臓器の一定量を(0.2～1.0g) Potter-elvehjem のホモゲナイザーに入れ、N/20 NaOH 4cc、分散媒として5% Tween 80水溶液1ccを加え均一に磨碎する。組織ホモゲネートは遠沈管に移して遠心分離し、その上澄3mlを使用する。本抽出液は用意してあつたConwayの微量拡散ユニットの外室に注入し、内室には吸収剤として、N/10 NaOH 2mlを入れる。拡散装置の上蓋すり合せには白色ワセリンを塗布して気密が保たれるようにし、蓋の一部をずらせて外室中に10%硫酸1mlを加えて酸性とする。全ユニットを静かに回転して外室を均一にせしめ、一夜放置する。この間に外室中に含まれていた青酸はすべて内室に吸収される。次いで上蓋をはづし、内室から1mlをとつて以下の発色操作を行う。

(ロ) 比色定量法

(イ) で分離した吸収液1mlを共栓試験管に入れ、これにクロラミンT-磷酸緩衝液試液0.2ccを加え、氷冷しつつ、2～3分間放置する。次いでビリヂン・ピラツオロン試液3mlを加え、試験管をよく混和して室温に1時間放置する。対照としては、N/10 NaOH 1mlを用い、同様に操作したものを用いる。

呈色液は Beckmann-DU Spectrophotometer により波長 $630m\mu$ で吸光度を測定する。

別に第 I 項で行ったと同様にして検量線, 吸収曲線を作成すると, それぞれ図 5, 図 6 が得られる。(図 5), (図 6)

図 5

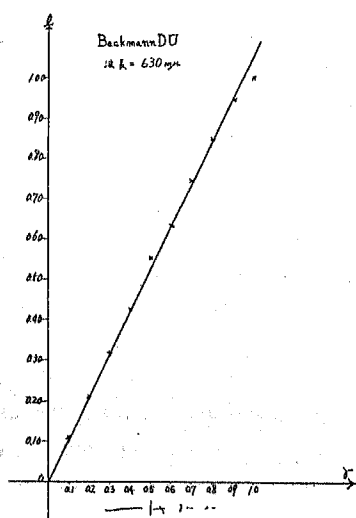


図 6

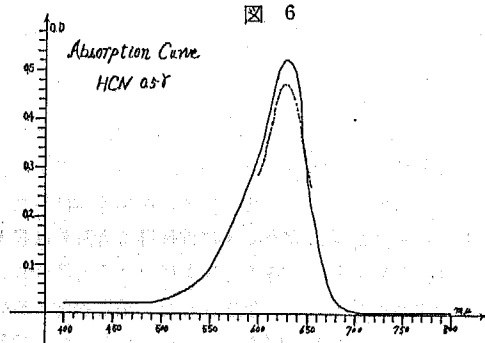


図 5 より青酸含量 $0.1 \sim 2.0 \mu g$ の間では Lambert-Beer の法則に従っていることが判り, この範囲では定量が可能である。又, 第 I 項に示した場合に等しい形の吸収曲線が得られる。

実験成績

各臓器 1gr 中の青酸化合物の量を HCN に換算してこれを縦軸にとり, 死後経過日数を横軸にとつた結果を示すと下の図の如くなる。(図 7) 又, 検査時の平均気温の概要を各動物について調べ, 青酸含量の変化の指標とした。我々の実験によると, 冬期に観察さ

れる死後変化は, 夏期のそれよりはるかにゆつくりとしており, 大略次のような肉眼的現象と比較された。

図 7

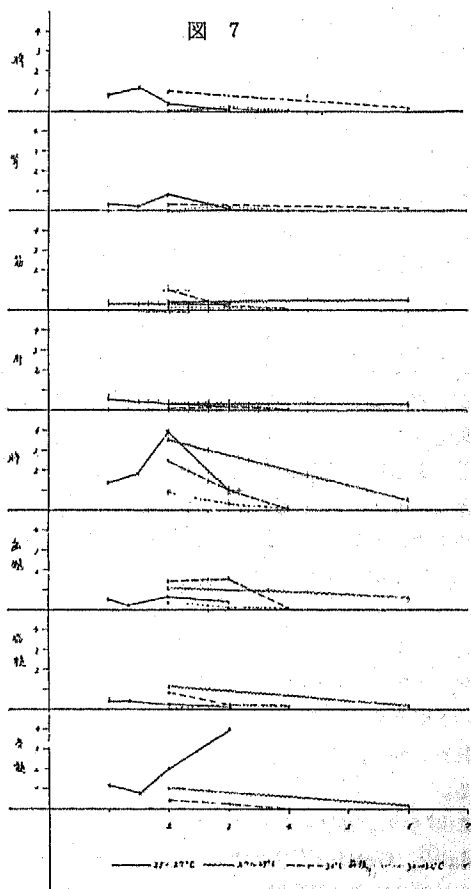


表 1

死後変化	冬期 (1.2月)	夏期 (7.8月)
腹部膨隆	3日	1日
眼球突出	ナシ	1~2日
脳軟化	1週間	1日
脱毛	15日	1~2日
筋肉膨化	30日	1~2日
歯骨(髄)質溶解	>2ヶ月	1週間
骨膜ハクリ容易	>2ヶ月	3~5日

説明並に小括

先ず青酸化合物の定量法として, 第 I 項が述べた Epstein の方法を改良した Boxer のビリヂン-ピラッオロン法を用いた。本方法に依ると, 前法に比べて操作も簡単になり, 同時に感度も増加していることが判る。定量は $0.1 \sim 2.0r$ の間に於て可能であること, 又

その特異的な吸収も第Ⅰ項で検したものと変りのないことから、原著者の報告を裏付けるべき結果を得た。

次に、臓器中の青酸の全量に Conway の微量拡散分析法を取入れた。この方法によれば、臓器加熱による種々の弊害が除けるし、数種の検体が同時に定量出来る利点があつた。

以上の方法によつて青酸中毒屍臓器中の青酸含量(遊離)を定量した結果を考察すると、第一に、第Ⅰ項で得たものとは可成り異なつた結果が得られた。即ち、各臓器いづれも、時間の経過と共に単に単調な減少傾向を示しているのみであり、第Ⅱ項のように神経組織系に異常な極大値を持つている例はない。

又、季節的な差に依り腐敗現象の進行が異なるのとはほぼ平行して、青酸含量も変化してゆくように思われた。従つて或る種の臓器特に肺臓では、時間的な面だけが伸縮するだけで、検出状態には第Ⅰ項、第Ⅱ項の結果も殆んど変つていないと考えられる。各臓器で特に差のある場合の原因は、臓器に依る青酸結合力による差と、死後経過中の腐敗分解による再揮散との差によるものと考えられる。

第Ⅱ編 微量拡散法の法医毒物学的検討

緒 言

青酸化合物を法医、毒物学的に検討するに当つて、青酸の分析法について従來の報告を概観すると、それらは青酸を純粋に分離する方法に関する研究と、分離された青酸の分析化学的な研究とに大別することが出来る。

このうち、後者の分析化学的分野の研究の一部は Feigl^①、Gettler^②等によつて總説が述べられており、一般的な成書^{③④⑤}にも記載されている。しかしながら、これらの分析法は少量の試料の分析、特に特殊な臓器の一定量から分離定量を行う場合には感度が低すぎる欠点を持つている。青酸の致死量が成人でも高々 $5 \times 10^{-2} \text{g}$ 程度とすれば $1 \times 10^{-8} \text{g/kg}$ 以下の青酸が体内に摂取される訳であり、臓器 1g を用いても定量が出来るためには $1 \times 10^{-9} \text{g}$ ($1 \mu\text{g}$) 以下の青酸が分析出来なければならない。最近に至つて、Epstein^⑥は高い感度と優れた特異性を持った反応を報告し、我々もこれを追試して、第Ⅰ編に記載した如く、満足すべき結果が得られた。尚、本法は Boxer^⑦等によつて改良が加えられ、操作が簡略化されると共に比色反応が安定化されている。又、原著者によつて述べられている如く、チオシアン基の如き、クロラミンTと反応して塩化シアンを発生する物質を除いては陽性反応を呈することはない。

しかしながら、還元性物質の存在は反応に障害を与

えるので、本法を毒物生化学的な系に応用するためには、先ず青酸を純粋に分離することを試みなければならない。即ち、1) チオシアン基からの分離、2) 濃縮、3) 妨害物質の除去の3点を考慮しなければならない。一般に生体成分などから青酸を分離するには、蒸溜法、水蒸気蒸溜法、空気導入法が用いられている。このうちで、蒸溜法を直接用いる場合には、前述の2)の条件を満足させることは出来るが、3)の条件は不満足であり、酸性での加熱は1)をも危険にしている。次の水蒸気蒸溜法については、第Ⅰ編で検討し、興味ある結果を得たが、3)の条件を満たしていない。更に空気導入法は、近時 Boxer^{⑧⑨}が生体成分中のビタミンB₁₂分子中の青酸の定量に用い、以上の点を考慮して一応の成果をみているが、その記載する処は操作が複雑であり、青酸の定量を多種類の臓器などについて同時に行うことは不可能であり、常に有利であると考えすることは出来ない。最近では、この空気導入法とガス-フレンヂを組合せる所謂 Test-Flecken 法が発達しているが^{⑩⑪}、現存の処、感度、回収性共に Epstein-Boxer 法に劣るようである^⑫。一方1950年頃よりガス体の分離に、拡散作用を利用する Conway の微量拡散分析法が発達して来ている^⑬、本法により青酸を分離すれば、1)、2)の条件は完全に満足され、3)に於てもその大部分が除去されるものと考えられる。青酸を Conway 法によつて分離定量する試みは、我国では竹村^⑭が滴定法と組合せてこれを行つており、又最近には、Feldstein がビリヂンピラツオロン比色法^⑮バルビツールビリヂン比色法^{⑯⑰}を応用して拡散による分離定量を為している。我々は、本法を用いて、実験的に青酸で中毒死せしめた動物の各種臓器から、どの程度に回収定量されるかを第Ⅱ項に於て考察した。その結果、実際に回収され得る青酸量は投与量をはるかに下廻り、特に日時を経過すると予想外に定量が困難になることが観察された。第Ⅰ項での実験と併せて考えて、この原因は、体内に入つた青酸が何等の形で補捉せられて、青酸以外の化合物に解毒的变化を遂げたか、あるいは、青酸基が強固な力で分子内に取込まれているかが考えられる。これらの点を更に深く検討するために、先ず生体成分から、Feldstein 法で青酸を分離する場合に、拡散時間と拡散量が純青酸の分離の条件と全く同じで良いか否かが問題とされなければならない。

本編に於ては先ず微量拡散分析の基礎的な面について検討した。即ち拡散温度と拡散時間、拡散量の関係、又、拡散分析法でのチオシアン基の分離の問題について実験を行つた。次いで動物臓器と青酸とを試験

管内で反応せしめた場合、回収され得ない青酸量が臓器別でどのような相異を示すかを観察した。この実験により、臓器に対する青酸の親和性の差が推測出来、逆に考えると、検索定量出来た青酸値から初めの摂取青酸量が概算出来れば、法医学的な応用面に大きな役割を果たすこともあり得ると考えた。更に裁判化学的な毒物分析の方法を確立し、青酸中毒時の検体の取捨選択にも利用されるようにすることを目的としている。

実験の部

§1. 微量拡散法による青酸分離能の検討

装置、試薬類：第Ⅱ項に同じ。

実験方法：青酸の分離量は拡散温度拡散時間に依つて定まると考えられるので、次の如き条件を定めて検討した。即ち、前編第Ⅱ項と同様の定量操作を行なうに際して、種々の規定の温度に調節した恒温器中で拡散が実施されるようにした。又、硫酸を加えて酸性とし、拡散が開始される時刻を記載しておき、以後一定時間後に内室に分離された青酸を定量する。尚拡散に使用する青酸は、前編第Ⅰ項での青酸カリウム標準液を用い、青酸としてに $1\mu\text{g}$ に相当する量が 4ml の $\text{N}/20$ NaOH 中に含有されるように希釈して外室に入れた。従つて青酸が完全に回収された場合には、 $0.5\mu\text{g}$ の青酸値として定量される。

実験結果：拡散温度、拡散時間、それに対する回収率の関係を図で示した。(図8, 図9, 図10) 本図により明らかなる如く、5乃至 27°C の温度範囲に於ては、回収率は拡散時間により大きな差を示さず、いずれの場合に於ても約2時間後には回収率は95%を越え、3時間後に至れば殆んど完全に吸収分離されることが判

図8 拡散時間と回収率-(1)
拡散温度; 20°C

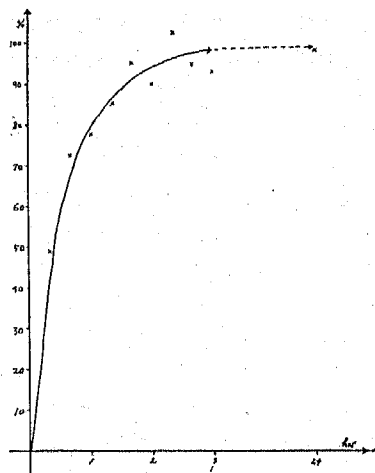


図9 拡散時間と回収率-(2)
拡散温度: 室温 ($5\sim 15^\circ\text{C}$)

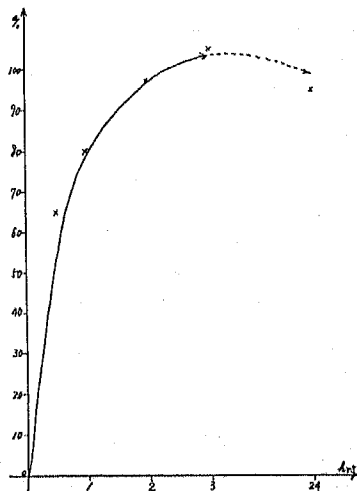
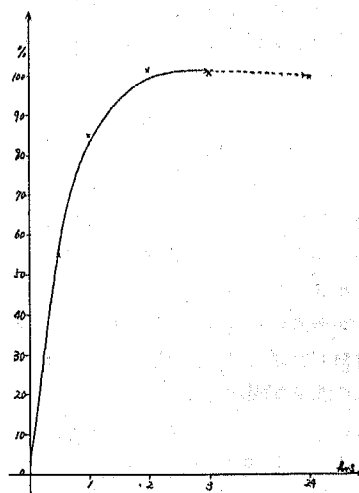


図10 拡散時間と回収率-(3)
拡散温度; 27°C



る。尚24時間の放置は寧ろ回収率を減少せしめる。従つて生体成分が特別の抑制効果を持たなければ、いずれの温度でも3時間後には、青酸は完全に回収されると考えられる。

§2. 微量拡散法に於けるチオシアン基の影響

拡散法によつて青酸の分離を行う場合、チオシアン化合物は不揮発性である為に内室に吸収される事はない。しかしながら、チオシアン化合物を酸性で加熱することによつて青酸が発生する可能性のある事が知られており、本実験の温度、酸性度でも化学的な分解が起り得るか否かを調べた。

実験方法：装置，試薬共に既述の通りに使用し，§1の青酸の代りに，チオシアンカリウムをそれぞれ100 mg, 100 μ g, 1 μ g 含有せしめて拡散操作を行つた。拡散温度は20°Cである

実験結果：表 2

表 2

チオシアン カリウム量	青 酸 定 量 値 μ g			
	1時間 拡 散	2時間 拡 散	4時間 拡 散	24時間 拡 散
100 mg	0.038	0.066	0.093	0.118
100 μ g	0.000	0.020	0.043	0.045
1 μ g	0	0	0	0

上表の如く，チオシアンカリの含量が100 μ g 以下であれば，青酸として定量される値は僅少であり，以下の実験には影響を及ぼさぬと考えられる。尚使用したチオシアンカリウム中に不純物として含まれる青酸は除去出来ないでそのまま定量されている。従つて分解値は更に低い事も予想される。

§2. 生体諸成分の青酸化合物に対する親和性の検討

微量拡散法を法医学的に利用するためには，摂取された青酸化合物が生体成分からどの程度回収されるかを検討しなければならない。そこで本実験では，青酸の一定量を生体諸成分の一定量と試験管で反応せしめ，次いで規定の如く拡散分離した場合，どの程度の回収性を示すかを検策した。

実験 I：血液からの青酸の回収性

実験材料：健康犬の後肢静脈より採血した血液を用いる。この際抗凝固剤としては，ヘパリンナトリウムを用いた。

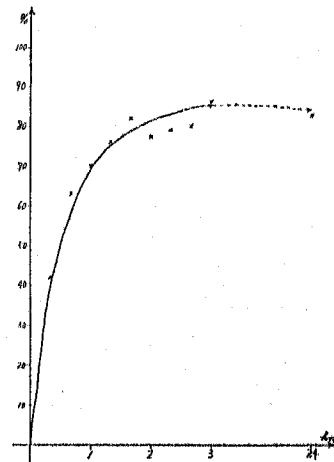
実験方法：血液 1ml を生理食塩液で2倍に稀釈し，これに青酸標準液 1ml (=1 μ g) を加えて 37°C の恒温器に30分間放置する。次いで，反応液を酸性とし，20°C の恒温器中で拡散を行つた。§1と同様に，拡散時間と回収率の曲線を抽けば図11で表はす様な関係が得られる。(図11)

実験 II：実質性臓器に於ける青酸の回収性-(A)

実験動物及材料：実験動物には，体重 50~20kg の健康な犬を使用した。実質性臓器を取出すには，これから血液を除くため，麻酔下に頸部静脈を摘出し，ヘパリンを加えた生理食塩水をこの静脈から送り込み，同時に他の静脈端より瀉血して出入量を調節しつつ還流せしめる。一般に 2000ml を送入すれば死亡するが，更に，この操作を続け，腹圧を加えて，総量3000

図11 回収率曲線；A-(1)

血液 1cc+HCN 1 μ g (in N/10 NaOH)
拡散温度；20°C



~4000ml を灌流せしめる。次いで直ちに開腹し，実験に使用する臓器，即ち，肺，肝，腎，脾，脳，筋肉などを取出して以下の検査に供する。

実験方法：臓器 1g を採取して，Potterelvejem の Homogenizer に投じ，これに生理食塩水 4ml, 5% Tween 1ml を加えて均一にホモゲナイズする。次いでこの懸濁液を生理食塩水抽出部分と非抽出部分とに分離するため，3000 r. p. m. で10分間遠心分離する。通常上清として 1~5ml が得られる。次に沈渣は更に生理食塩水 5ml を加えて洗滌し，同様の操作を3回繰返した後，全量が 6cc になる様に生理食塩水に懸濁せしめておく。一方微量拡散装置には，常法に従つてその内室に 2ml の 0.1 N-NaOH を入れた後，外室には上述の臓器生理食塩水抽出液か或いは，臓器生理食塩水非抽出物懸濁液の 3ml を入れる。次いで実験 I と同様に青酸標準液 1ml (=1 μ g) を外室に加えて30分間，37°C に放置する。以後，既述の方法に従つて酸性となし，20°C で拡散を行ない。拡散時間と回収率との関係をグラフで表わした。

実験結果 (図12~17)：本実験の結果を考察すると，或種の臓器では，正常時に於ても，青酸の含量が可成りの値に達しているのではないかと考えられる。即ち，肺臓では加えた青酸含量を上廻る量が回収されており，他にも特に生理食塩水抽出部分の回収率が高い例では，更に深い考慮が必要であることがわかる。又，拡散に於ける回収率曲線は，臓器に依つてかなり特異的な差を現わしている。拡散時間は4時間を経過すればほぼ一定の分析値を与えるようである。

図12 回収率曲線; A-(2)

I; 肺臓 食塩水抽出部
II; 肺臓 食塩水非抽出部

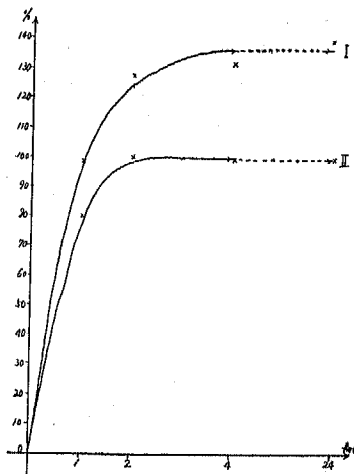


図14 回収率曲線; A-(4)

I; 腎臓 生理食塩水抽出部
II; " 生理食塩水非抽出部
拡散温度; 20°C

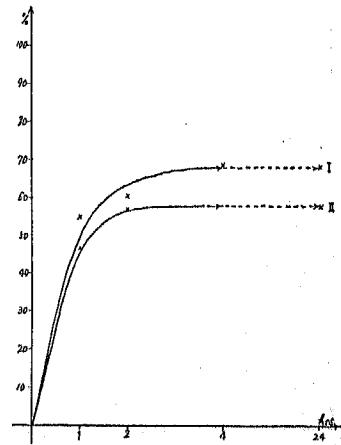


図13 回収率曲線; A-(3)

I; 肝臓 食塩水抽出部
II; " 食塩水非抽出部
拡散温度; 20°C

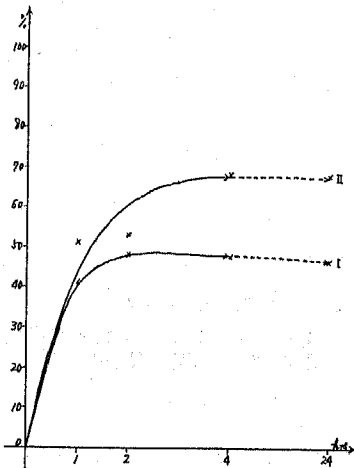
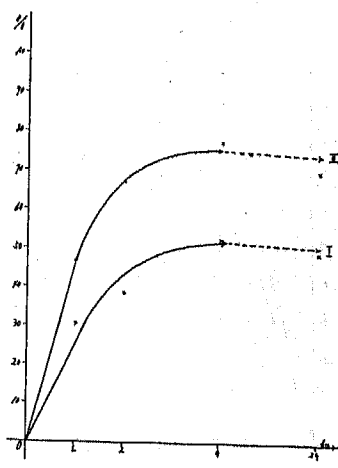


図15 回収率曲線; A-(5)

I; 脾臓 生理食塩水抽出部
II; " 生理食塩水非抽出部
拡散温度; 20°C



実験Ⅲ: 実質性臓器に於ける青酸含有量の定量

実験動物及材料: 実験Ⅱに同じ。

実験方法: 実験Ⅱの青酸標準液に代える。に生理食塩水を使用する以外は、全く同様の操作で行った。

実験結果: 表 3

実験Ⅳ: 実質性臓器に於ける青酸の回収率-(B)

実験Ⅱの結果から、実質性臓器によつて青酸が何らかの形で捕捉され、回収率が臓器の種類により差を示している事が判る。実験Ⅱに用いた青酸化合物は、標準液とする場合、空気中への揮散によつてその Factor

表 3 正常犬臓器中の青酸含量

臓 器 名	含 量 $\mu\text{g/g}$	
	生理食塩水抽出部	生理食塩水非抽出部
肺	0.482	0.000
肝	0.000	0.000
脾	0.208	0.000
腎	0.124	0.000
筋	0.370	0.000
脳	0.000	0.000

図16 回収率曲線; A-(6)

I; 筋肉 生理食塩水抽出部
II; " 生理食塩水非抽出部
拡散温度: 20°C

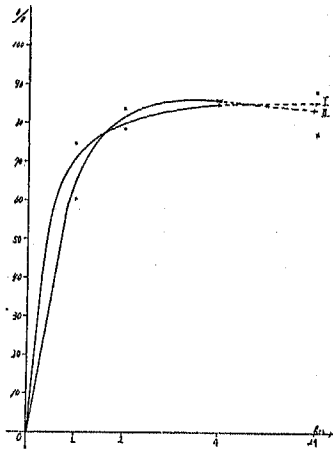
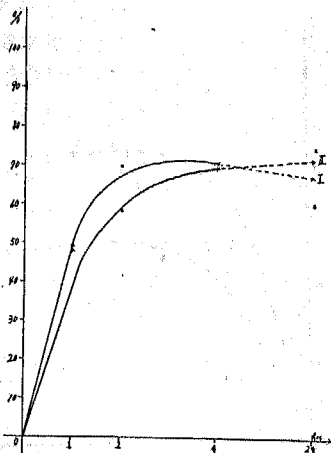


図17 回収率曲線; A-(7)

I; 脳髓 生理食塩水抽出部
II; " 生理食塩水非抽出部
拡散温度: 20°C



を変えぬように 0.1N の NaOH 溶液として用いたため、可成りの高い pH で臓器と反応している。本実験では、標準液の溶媒として生理食塩液を用い、青酸カリウムの示す pH で反応を行つてみた。青酸の捕促が酵素反応に依るものであれば、一般に pH の変化によつて異なる結果の得られる場合がある。又、この際には、対照として同量の青酸標準液を 4 時間拡散させたものを 100% 値とし、他をその比率で計算するようにした。

実験動物及材料: 実験 II に同じ。

試薬: 青酸標準液は第 I 編の方法で検定した青酸原液を、生理食塩水で稀釈して、使用直前に 1.0/μg/cc になるようにしたものを用いる。

実験方法: 実験 II に全く同じ。

実験結果: 実験 II と同様に、拡散時間回収率曲線を作成した。又、実験 III から、対照臓器中にも青酸が定量されるので、この定量値が §1 の回収率曲線と同一の曲線をたどつて拡散するものと考え、本実験の回収値から、各拡散時間に対応する対照の回収値を減じて換算回収率を求めた。この換算回収率はグラフの中で破線で表わして、他と比較した。(図18~図23)

図18 回収率曲線; B-(1)

I; 肺臓 生理食塩水抽出部
I'; " " (換算図)
II; " 生理食塩水非抽出部

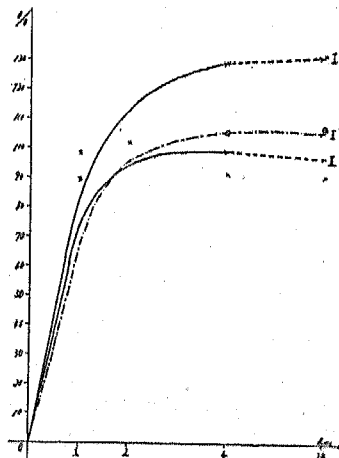


図19 回収率曲線; B-(2)

I; 肝臓 生理食塩水抽出部
II; " 生理食塩水非抽出部

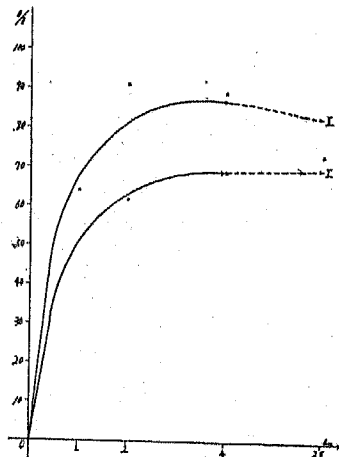


図20 回収率曲線; B-(3)

I; 腎臓 生理食塩水抽出部
 I'; " " (換算値)
 II; " 生理食塩水非抽出部

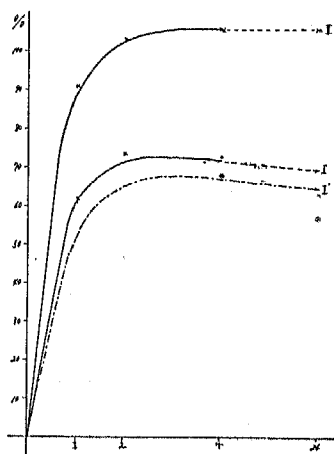


図22 回収率曲線; B-(5)

I; 筋肉 生理食塩水抽出部
 I'; " " (換算値)
 II; " 生理食塩水非抽出部

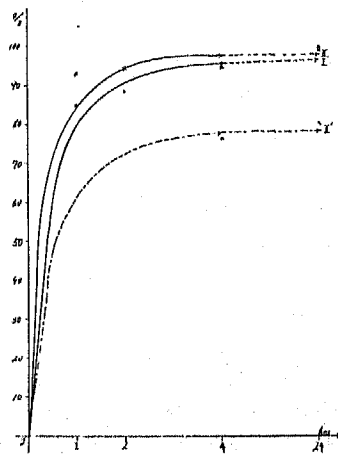


図22 回収率曲線; B-(4)

I; 脾臓 生理食塩水抽出部
 I'; " " (換算値)
 II; " 生理食塩水非抽出部

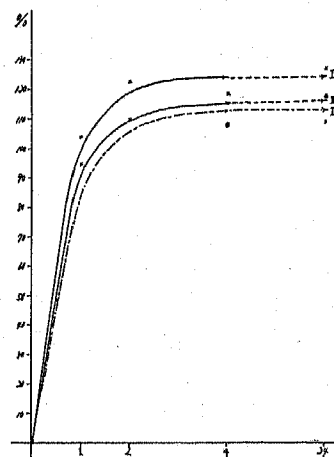
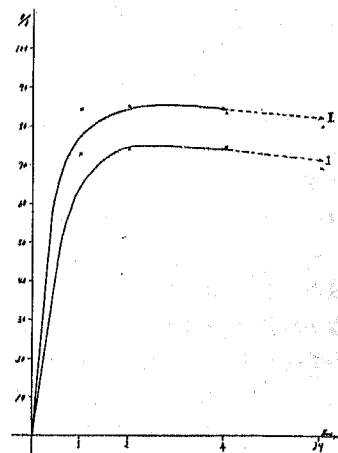


図23 回収率曲線; B-(6)

I; 脳髓 生理食塩水抽出部
 II; " 生理食塩水非抽出部



説明並に小括

1. Conway の微量拡散装置を用いる青酸の分離定量法についての検討を行つた。本法に於て、拡散温度、拡散時間、回収率の関係を調べたが、その結果、拡散温度は 5~27°C の間を変動せしめても、拡散された青酸量に影響がなく、いづれに於ても 3 時間の拡散により定量的に分離回収された。

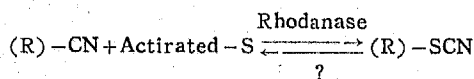
2. 拡散分離の際の、チオシアン酸塩の共存時の影響を調べたが、チオシアンカリウム 100μg 以下の共存は分析値に殆んど影響を与えなかつた。

3. 各種の実質性臓器を生理食塩水抽出部分、非抽出性部分に分け、各々に青酸の一定量を加えて中毒を起さしめた場合、微量拡散法による回収能がどの程度であるかを観察した。又、青酸との反応時の pH を強アルカリ性、中性の 2 種の場合について実験を行つた。その結果、臓器別、分割別及び pH 別に特異的な回収率曲線が得られた。又、一般に食塩水抽出部分は、非抽出部分よりも、低い回収率を示した。

4. 或種の臓器特に肺腎などでは正常時に於ても、青酸が分離定量される事を確認した。

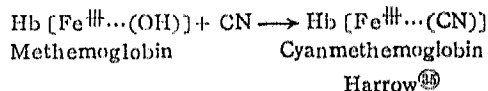
第Ⅲ編 全編の考察並に結論

第Ⅰ, 第Ⅱ編の実験を通じて, 青酸の定量に Epstein-Boxer の Pyridine-Pyrazolone 法を用い, その利用価値を検討したが, 其後同法に属する分析法も種々の改変法として報告され初めている。(K. Jørgensen¹⁸, R. B. Bruce et al¹⁹) 又, 本定量法の応用面では, 我国では以前より空気中の有毒ガスの分析に用いているが, (福山²⁰), E. J. Serfass²¹, F. L. Ludzick²²) は工業用排水等の青酸の定量に, Feldstein¹⁷ は青酸中毒者の血液分析に利用して成果を挙げている。然し, 感度が高まった反面, 従来には問題にならなかった微量の青酸が定量される為, 分析値には慎重な考察を行なはねばならない。第Ⅱ編の実験で, 正常犬臓器中にも青酸が定量される事実を確かめたのもこの一例であり, Feldstein は正常人血中の青酸値に 0~15 μ g/100ml を与えている。此等の血液や臓器中の青酸の成因として, Feldstein は動物が摂取した食物中の青酸を考慮しているが, これを以て総てを説明することは出来ないであろう。寧ろ, 種々の有機アミン類の代謝過程に, 必然的に青酸が生じることが有り得るので, 正常代謝産物と考えてもよいと思われる。この事実は, 現在体内に普ねく分布していると報告されている Rhodanose の存在意義と関連して考えることも出来る。即ち, 下式の反応が, その一部でも可逆的に進行する事が考えられ, R-CN の一例として Cyananide 代謝などが注目される。



さて, 以上の正常生体成分としての青酸とは別に, 多量の青酸が摂取されて中毒を起す場合には, 体内が種々の解毒的作用でこれに対応するが, 先ず第一に上述の反応式によつて青酸がロダン化される場合もあり得よう。本反応については, C. J. Clemensen²³, B. Sörbo^{24,25}, 小宮山・谷村・榎原²⁶, 小林²⁷, 宮崎他²⁸, 佐藤他^{30,31}, 板岡³²等内外共に数多くの報告が為されている。或いは Cyotone の如く, 青酸と結合して 2-imino-4-thiazolidine-carboxylic acid を形成することにより解毒的分解を逃げる例 (J. L. Wood³³), 又は白³⁴の報告の如く青酸から Urea を形成する場合もあり得るであろう。これらの上記の反応様式は, いずれも青酸を他の別の化合物に変化せしめてしまう点で次の解毒反応と明らかに異なっている。この第2の解毒法は青酸と生体色素との結合によつて行はれる。この反応の最も著明な場合としては, Methemoglobin と青酸の結合が挙げられる。この結合の反応は, 一

般に Methemoglobin 分子中の鉄イオンとシアニオンが一種の錯塩を形成し, 青酸としての活性を完全に mask するものと考えられている。即ち下式による反応である。



これに類似する反応例として, Hematin, Hem との反応 (内村^{36,37}) や Myoglobin との結合反応 (菊地³⁸) の報告もある。有効な解毒剤として用いられる NaNO₂, Amylnitrit はいずれも Methemoglobin を形成せしめるためとされている。

さて, 第3の結合様式は, その方法は第2に類似している部分もあるが, 生理的な面で区別すれば, このように分けて考えてみたい一連の反応である。青酸中毒の本体としては諸説あつて一定でないが, 実験的には, 青酸が多種類の酵素系を阻害することが判っている。この阻害反応がどのようにして成されるかはやはり不明な点も多いが, 青酸と酵素が化学的, 又は物理的に結合することが判っている。Dixon³⁹ は, 酵素を青酸と強固に結びついて不可逆的な反応を示す群と, その結合が比較的ゆるやかで, 他の, 青酸を奪う物質によつて容易に可逆的な態度をとる群とに分類したが, これは青酸化合物の酵素系に対する作用をよく表わしているものと云える。

此等の酵素群の中でも, 青酸中毒の本体としては, 以前からチトクローム系の酸化酵素が注目されて来ている。この場合の青酸と酵素系の結合様式は, 一部ではメトヘモグロビンに対して為されるのと同様の反応であると考えられており, 酵素中に含まれる金属とキレート結合を行うものである。(Keilim⁴⁰) このチトクローム系酵素の如く, 酵素中に金属を含有したり, 金属を含む化合物を基質とする酵素群は数多く知られており, 青酸による阻害作用は同様の機序でなされると思われる。(S. J. Leach⁴¹) 然し, 金属を含まぬ酵素に対しても青酸は阻害作用を持ち, 実際には可成り複雑な方法で作用を示すのである。次の表は (第4表), 各種の酵素に対する青酸の阻害作用を濃度で示したものである。これらはその活性中心が金属即ち鉄, 亜鉛, マンガンを持っているもの, 又は非金属 Phospho-Pyridoxal を含有しており, 青酸の阻害作用は其等金属や, 他の Prosthetic group との結合によるものである。各酵素との結合様式はしかしながら一定の型をとらず, 一次的な阻害反応に依らずに, 一つの酵素系の各所に亘つてその活性を冒すのが青酸中毒

表 4 M. Dixon (39) に よる

Enzyme	cyanide concentration	Inhibition %
cytochrome oxidase	10 ⁻⁸	50
cytochromec peroxidase	10 ⁻⁴	50
catalase	5×10 ⁻⁶	50
carbonic Dehydrogenase (blood)	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁵	50
isocitrate dehydrogenase	10 ⁻²	50
Arginine decarboxylase	10 ⁻³	98
Glutamate decarboxylase	10 ⁻⁴	93
Histidin decarboxylase	10 ⁻²	97
Lysine decarbxyase	10 ⁻⁴	81
Ornithine decarboxylase	10 ⁻⁴	40
Tyrosine decarboxylase	10 ⁻⁴	64
Alkali phosphatase	3×10 ⁻³	50
Acetoacetate decarboxylase	10 ⁻⁴	82
Alcohol dehydrogenase (Liver)	10 ⁻⁴	67

の特徴となつている。

以上の報告を基にして、第Ⅰ編で行つた実験を考察すると、死後経過と共に青酸が異状に高まる臓器群は脳髓を初めとして、チトクローム系の酸化酵素を多量に含有する臓器であることが知られ、青酸の酵素阻害様式の差が興味ある結果を与えたものと考えられる。チトクローム-Oxidase と青酸との結合が比較的 reversible であり (Cohen-Bazire⁴²)、一方他の酸化酵素、例えば Xanthine-oxidase と青酸との結合が irreversible である (B. Chance⁴³) ことを考えると、先の実験の一部を理解することが出来る。即ち、青酸中毒死の動物に於ては、青酸が各種の酵素系と結合し、脳髓で Cytochrome oxidase の如き物質と結合していた青酸が、時間の経過や加熱などの条件で再び遊離されて、可成りの量に定量されるのが推察される。尚、河田等⁴⁴は、組織の酸素消費が青酸に依つて阻害される度合を各種臓器別に比較検討し、これを Cytochrome-oxidase の函数としている。それによると臓器は三つの群に分けられ、(1) 青酸による阻害度が大きく、これが酸化還元色素によつても回復されない臓器 (網膜、脳髓)、(2) 青酸の阻害度が少なく、色素によつて完全に回復するもの (副腎皮質、筋、肝)、(3) 中間に属するもの (腎皮質) としている。第Ⅰ編の実験で、死後に青酸が定量される群、されない群・不明の群と大別すると、この二つの実験で大別される臓器群の種類はいづれも非常によく類似していて、偶然とは考えられない。従つて、臓器差、死

後経過時間、青酸分離条件、青酸定量値が相関々係にあることが推察される。

次に第Ⅰ編の実験に於ては、実験的に中毒死せしめた動物の諸臓器からの青酸の検出を、死後の日時を追つて行つてみたが、死後経過と共に、青酸の検出量は減じて行つた。この際には、死後直後の検出量も投与量をはるかに下廻り、先に述べた解毒分解反応や、色素との結合反応を裏書きする。正常臓器中に存在する青酸の意義についても、死後の臓器対照ではこれが証明されないことから、正常青酸は単に遊離して存在するものでなく、代謝過程に現われると考え、死後は寧ろ解毒的な分解面への速度が勝るためにこの実験の如き現象が観察されるのであろう。更に第Ⅱ編の実験によつて、正常臓器中の青酸含量を定量し得たが、これらの青酸の証明される臓器群は、特に高値を示す肺臓、筋肉などの例から明らかな如く、特異的な酵素分布と関係があるように思われる。

第Ⅱ編に於ては、第Ⅰ編で観察された。青酸の回収性の低下の原因を調べるために、試験管内で各種臓器と青酸を反応せしめてみた。この際、青酸と酵素との結合性が pH によつて変化することが Catalase の例などで知られており、pH が 8 より大では阻害能が減じる。(B. Chance⁴⁵)。本実験でも液性を 2 種類変えたが、青酸の定量的回収を行なうためにはアルカリ性でなければならないので、実験条件には限界があつた。次に、この pH 以外の要因として、細胞内成分がある。一般に毒物を生物体から分離する場合や、細胞内成分を分離する場合には適当な Homogenizer によつて均一な懸濁液を作成して、抽出を行なうが本実験の分離定量的ための限界のため、単に生理食塩水を加えて Homogenizer し、遠心分離して、生理食塩水抽出部分と非抽出部分とに分離するに止めた。細胞内成分を核、ミトコンドリア、ミクロゾーム、遠心上清と分離してその各々に含まれる酵素成分を定量する実験は、De Duve^{46,47}、F. Appelmans⁴⁸などに依つて実施されており、肝では Cytochrome-oxidase は主にミトコンドリアに、Catalase はミトコンドリアと上清の両者に、Isocitrate dehydrogenase は上清に検出されている。しかしながら、現在細胞分劃に最も適当と考えられている抽出溶媒は、Sucrose を含有しているので、我々の実験では、青酸との結合が考えられるので、用いることは出来ない。この抽出溶媒による酵素の不活性化は避けられぬとしても、Potter-elvejem の Homogenizer⁴⁹ではミトコンドリアは破壊されずに残り沈降するものと考えられる。この実験の結果から、各臓器の最大平均回収率を表示すると次の第 5 表

となり、大体の回収率の順序をつけてみると肺>筋>脳>腎>脾>肝の如くなる。

表 5

臓器名	回 収 率 (%)			
	苛性アルカリ 溶 媒		生理食塩水 溶 媒	
	上 清	沈 渣	上 清	沈 渣
肺	137	100	(105) 130	98
肝	47	68	69	85
腎	68	57	(65) 71	106
脾	51	75	123	115
筋	85	85	(78) 96	97
脳	68	71	74	84

() 内は換算値

本表から、青酸との反応時の pH の影響は腎、肝、脾に於ては認める事が出来る差異を他臓器では認め得ない。又、生理食塩水による抽出の難易による差は特異的に現れず、一般に生理食塩水抽出部分は、非抽出部分より低い回収性を示していることが判る。以上の実験を基にしても、これらの回収率を減少せしめている要因は、先に考察せる如くに、一部は肝臓に於て特に顕著であると考ええる化学的な解毒分解であり、他は脳に於けるが如き生体触媒との結合であると推察される。そうして各種の臓器に含有される酵素系、酵素量、又は不明な物理化学的な因子が相互に作用して、臓器毎に特異的な回収率曲線や回収率を与えているものであろう。

最後に、本法を適用して法医学的に中毒屍体より青酸を分離定量するに当つては、各臓器中の青酸正常値を常に考慮し、死後経過時間や、臓器による回収性の差を考えて分析を行う必要のあることが感じられる。又、法医学的な応用面での優れた効果をもたらす事が期待されるばかりでなく、Feldstein¹⁶⁾が Multiple Sclerosis 患者の血漿中のシアンを定量した如くに、臨牀的な方面にも利用され得る興味ある問題を含んでいる。

結 論

以上を要約結論すれば次の如くである。

1) Epstein の Pyridin pyrazolone 法はその感度、特異性、共に従来常用の法に比し、数等優れた法医学的青酸検知法であり、絶対量 0.1r 程度でも検出可能である。因に Beckmann DU型 Spectrophotometer

を用いて波長 630m μ で、青酸含量 0.1~2.0 μ g の範囲で定量が可能である事を知った。

2) Conway の微量拡散法と Epstein-Boxer の法とを組合せる事によつて、更に実用性を増す事が確認された。即ち本法では加熱処理を行はず、且同時に数多の検体より青酸の抽出が可能であり、簡便である上に正確な値を得る事が出来る。因に Beckmann DU 型 Spectrophotometer を用いて波長 630m μ で青酸含量 0.1~2.0 μ g の範囲で定量可能である事を確認した。

3) 青酸死犬臓器について青酸含量を測定した結果は、1) の方法では、死後比較的長期にわたつて検出可能であつた。(10月~4月の間に測定、最長、肺では50日内外)

又本法によると肺は上記の如く長期にわたり、大量の検知が可能であり、肝、脾、腎、筋がこれに続いている。筋肉では、ずつと低値を示したが、かなり長期にわたつて証明可能であつた。脳髄、齒髄では死後一定時間後に検出量の増大を認め、以後低値に傾いて降下して行く事をみ、臓器により残留態度差がある事を知った。(之等は組織のチトクローム系の量に関するものとみられる。)

然るに 2) の方法で全く同様の実験を行つた所、各臓器について、死後時間の経過と共に下降してゆく単調下降型を示す結果を得た。又両者の場合、腐敗現象と略々並行して青酸含量の変化がみられるように思われる。

4) 3) に於ける両法による測定結果の差は、臓器による青酸結合性の差と死後変化による再拡散の差とに基因すると考えられる。

又、両方法に於ける季節による逐時的検出状態の差は、検出可能な期間の時間的短縮があるが、検出様相はあまり変わらないとみられる。

5) 未処置犬臓器中特に肺、腎では、常時微量の青酸が検知しえられた。

6) Conway 微量拡散法を用いる場合、拡散温度は 5~27°C の間ではあまり差はなく、又 2 時間の拡散で 95 を越える回収率を示し、3 時間後で殆んど完全に吸収分離される事を知った。24 時間というような長時間の拡散は、かえつて回収率を減少せしめる結果を得た。本実験では 3~4 時間拡散法を用いた。

7) 臓器乳材に青酸を加えて 2) の方法による回収率を測定すると、肺>筋>脳>腎>脾>肝、の順序であり、例えば肝に於いての生体解毒作用の影響、脳に於いての生体触媒との結合の影響等が回収率に差を生ぜしめていると考慮される。

之等を考え合せると、本法即ち Conway 微量拡散

法を用いた Pyridin-Pyrazolon 法 (Epstein-Boxer) は、法医毒物学的な応用面での優れた効果が充分期待されると同時に、臓器より青酸を分離定量する際には、各臓器中の青酸正常値と、死後の経過時間、各臓器よりの回収率等を常に考慮に入れて判断を下す必要性を痛感する。又 Feldstein の Multiple Sclerosis の血漿中のシアン量の検討結果の如きは、臨牀的にも充分活用しうる簡便正確な方法であり、且この問題は実に興味深いものがあり、今後の臨牀面での検討がまたれる。

(終りに、主任野田教授に深謝の至情を捧げると共に、教室諸兄姉、特に鈴木助手(現東北大学医学部薬学科)の御協力を謝す。)

文 献

- ①F. Feigl; Qualitative Analys's by Spot-Test (1946) ②A. O. Gettler; Am. Med. Sei 195, 182—98 (1938) ③J. A. Gonzales; Legal Medicine Pathology & Toxycology (1954) ④F. Bamfora; Poisons: theri isolation & identification (1951) ⑤塚元・奥井; 裁判化学 (昭.33) ⑥J. Epstein; Anal. Chem. 19, 272 (1947) ⑦G. E. Boxer, J. C. Richard; Arch. Biochem. 30, 327 (1951) ⑧G. E. Boxer, J. C. Richard; ibia 30, 382 (1951) ⑨G. E. Boxer, J. C. Richard; ibid 30, 392 (1951) ⑩A. O. Gettler, L. Goldbaum; Anal. Chem. 19, 270 (1947) ⑪小幡武郎・加賀谷洋蔵; 衛生化学 Vol. 5. 28 (昭30) ⑫未発表実験 ⑬E. J. Conway; Microdiffusion Analys's and Volumetric error (1950) ⑭竹村豊造; 科学と捜査 Vol. 8. (1955) ⑮M. Feldstein, N. C. Klendshoj; J. Lab. Clin. Med. 44 166 (1954) ⑯M. Feldstein, N. C. Klendshoj; Can. J. Med. Technol. 17, 28 (1955) ⑰M. Feldstein, N. C. Klendshoj; J. For. Med. 2, 39 (1957) ⑱K. Jørgensen; Acta. Chim. Scand. 9, 548 (1955) ⑲R. B. Bruce, J. W. Haward, R. F. Hanzal; Anal. Chem. 27 1346 (1955) ⑳E. J. Serfass, R. F. Muraca; Planting 43 1027 (1956) ㉑F. L. Ludzuck et al; Anal. Chem 26 1784 (1954) ㉒福山富太郎・佐藤徳郎・他; 国立公衆衛生院研究報告 Vol. 3. 10 (昭.28). 労働科学 Vol. 29. 231 (昭.28) ㉓C. J. Clemensen et al; Acta. Physiol. Scand. 32, 245 (1954) ㉔B. Sörbo; Acta. Chem. Scand. 7, 1129 (1953) ㉕B. Sörbo; ibid 7, 1137 (1953) ㉖小宮山泰・谷村久康・柳原栄一・富士貞吉; 日本衛生学雑誌 11, 67 (昭.31) ㉗小林 昇; 日大医学雑誌 Vol. 13, 547 (昭.29) ㉘宮崎三郎・小田切美文・他; 日大医学雑誌 Vol. 11. 827 (昭.27) ㉙宮崎三郎・小田切美文・他; 日大医学雑誌 Vol. 11. 830 (昭.27) ㉚佐藤徳郎・福山富太郎・他; 公衆衛生 Vol. 12. 39 (昭27) ㉛佐藤徳郎・福山富太郎・山田美恵子; 公衆衛生 Vol. 15. 100 (昭.29) ㉜板岡立郎; 日大医学雑誌 Vol. 13. 1974 (昭.29) ㉝J. L. Wood; J. Biol. Chem. 218 449 (1956) ㉞白 性基; 生化学 Vol. 25. 62 (昭.28) ㉟Harrow; Textbook of Biochemistry (1954) ㊱内村富士子; 日本医科大学雑誌 Vol. 21. 249 (昭.29) ㊲内村富士子; 生化学 Vol. 26. 49 (昭.29) ㊳菊地吾郎; J. Biochemistry Vol. 42. 461 (昭.30) ㊴M. Dixon, E. C. Wett; Enzymes p. 171. (1958) ㊵D. Keilim, E. F. Hartec; Biochem. J. 61, 153 (1955) ㊶S. J. Leach; Advance. Enzymol. 15, 1 (1954) ㊷G. Choen-Bazire, M. Jolit; Ann. Inst. Pasteur 84 937 (1953) ㊸B. Chance; J. Biol. Chem. 202, 383 (1953) ㊹M. Kawada; Kumamoto Med. J. 8, 42 (1955) ㊺B. Chance; J. Biol. Chem. 194, 483 (1952) ㊻C. De Duve, J. Int. Rev. Cytol. 3, 225 (1954) ㊼C. De Duve, B. C. Pressman et al; Biochem. J. 60, 604 (1955) ㊽F. Appelmans, R. Wattiaux, C. De Duve; Biochem. J. 59, 438 (1955) ㊾V. R. Potter, C. A. Elvejem; J. Biol. Chem. 144, 495 (1936)