

## トリプトファン代謝産物の微量分析とマウス遅延性アレルギー抑制因子の研究

渡辺 光夫

**Microanalysis of Tryptophan Metabolites and Suppressor Factor of Delayed-type Hypersensitivity in Mice**

Mitsuo WATANABE

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, 1091 Suarashi, Sagamiko-machi, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195, Japan*

(Received March 18, 2002)

We developed methods for the fluorometric assay of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxy-anthranilic acid, which are suspected as carcinogens in bladder cancer. It was shown that the urinary excretion of 3-hydroxyanthranilic acid increased in patients with bladder cancer. We also developed methods for the fluorometric assay of glucuronide and sulfate of 3-hydroxyanthranilic acid and showed that the excretion of these conjugated forms was minor in humans. The distribution of 3-hydroxykynurenine was studied and data obtained suggested that it has an affinity for the pancreas. We then developed methods for determination of the related compounds of tryptophan. Fluorescence reaction with UV radiation was applied to the determinations of kynurenic acid, kynurenine, quinolinic acid, nicotinic acid, nicotinamide, N<sup>1</sup>-methyl-nicotinamide, isatin, xanthrenic acid, and melatonin in the serum or urine. Furthermore, the fluorescence reaction with UV radiation was applied to some drugs, *e.g.*, indomethacin, isoniazid, naldixic acid, nicorandil, and disodium cromoglycate. The relationship was investigated between the tumor promoter, 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), and delayed hypersensitivity in mice. The foot pad reaction (FPR) in mice was suppressed by the application of TPA following the application of 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]-anthracene (DMBA), a tumor initiator, in BALB/c mice, while the FPR was suppressed by the application of TPA alone in C3H/He mice. CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, which suppress the FPR, were induced in BALB/c and C3H/He mice, respectively. These T cells produced soluble factors that inhibited the FPR in mice.

**Key words**—tryptophan metabolites; fluorometry; suppression of hypersensitivity

**1. はじめに**

この度著者は定年を迎えるに当り、日本薬学会から研究業績について総説を執筆するよう勧誘を頂いた。しかし著者は、1997年に本誌に石館守三先生の追悼記念論文として「Tryptophan 代謝産物の微量分析の研究を中心として」と題する自分の仕事の総説<sup>1)</sup>を書いているので、今回は前回の論文に書いた部分は簡単に繰り返した上で、その後の進歩を加えて責を果たすこととする。なお1996年までの業績は前回の論文に記載したものを再掲することをお許しいただきたい。

前回の総説に記した通り、著者は1957年に石館

守三先生が主宰されていた東大薬学部の薬品分析化学教室に入り、その後東京生化学研究所、東大薬品分析化学教室の助手、国立衛生試験所医科学部を経て1977年に帝京大学薬学部の薬品分析学教室の教授となって現在に至った。石館先生の教室では、研究者がいくつかのグループに分れて多様なテーマの研究を行っていたが、著者は発癌研究のグループに属して最初はラットの発癌性アゾ色素(4-dimethylaminoazobenzene)の代謝を扱い、胆汁を採取する管にラットの忌避剤 cycloheximid を塗布してラットがかみ切るのを防ぐ工夫をして胆汁中の代謝産物の測定を行った。<sup>2)</sup>次に発癌実験の際に代謝酵素を誘導する作用のある phenobarbital を同時投与すると発癌が抑制されることを報告した。<sup>3)</sup>これでアゾ色素に関する仕事を終わり、当時膀胱癌との関係が注目されていた tryptophan 代謝産物の分

帝京大学薬学部 (〒199-0195 津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091)

\*本総説は、平成13年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

析の仕事に移った。

当時の化学発癌の研究は動物実験で発癌性を示す物質の関する研究が主で、実際にヒトに発生する癌の原因については特殊な職業癌等を除いてほとんど知られていなかったが、尿中の常成分である tryptophan 代謝産物の中に発癌性を示すものが報告され、内因性発癌物質と呼ばれてヒトの膀胱癌との関連が注目されていた。著者はこれらの物質について新しい発蛍光反応の発見を含む定量法の開発を行い、尿中排泄の状況を明らかにするとともに膀胱以外の臓器への影響を考えて臓器親和性の検討や発癌実験を行った。帝京大学に赴任後は教室で開発した分析法を用いてさらに広い範囲の tryptophan 代謝産物の微量分析を行い、この方法を一部の医薬品の分析にも応用した。

一方著者は最初の仕事が発癌であったことから発癌研究に対する興味を持ち続けていたが、その頃盛んに研究されていた発癌を助ける物質である発癌プロモーターについて、細胞に対する作用の面からのみ研究が行われ、癌に対する生体防御機構に対する影響という面からはほとんど研究が行われていないのを見て、この現象は免疫機構との関連の面からも研究されるべきではないかと考えた。そこで分析化学の研究とは別に、代表的な発癌プロモーター TPA (12-tetra-decanoylphorbol-13-acetate) をマウスに塗布して遅延性アレルギーに対する影響を観察したところ、系統によって条件が異なるが抑制が見られることが見出された。さらに、TPA を塗布されたマウスの T 細胞からは遅延性アレルギーを抑制する因子が分泌されるようになることが明らかになった。現在この因子の本態の追及を行っている。

## 2. 3-Hydroxykynurenine 及び 3-Hydroxyanthranilic Acid の尿中排泄、体内分布及び発癌実験

これについては前回の総説に詳述した。1957年英国の Boylnad らは tryptophan 代謝産物のうち 3-hydroxykynurenine 及び 3-hydroxyanthranilic acid を含んだ cholesteryl の粒をマウスの膀胱に挿入すると膀胱癌が発生することを発見し、さらにヒトの膀胱癌患者の尿にこれらの物質が多く含まれていることを報告して、これらの物質がヒトの膀胱癌の原因になっている可能性があると考えた。また膀胱癌患者の尿では glucuronide 抱合を切断する  $\beta$ -glucuronidase の活性が高いことからこれらの物質

は OH 基が glucuronide となった抱合体として排泄されていて、尿中の  $\beta$ -glucuronidase 活性が高いと遊離型を生じて発癌性を示すとの仮説を提唱した。<sup>4)</sup> これは当時ヒトの自然の癌と尿中の常成分との関係を示したのものとして注目され、膀胱癌の予防に  $\beta$ -glucuronidase の阻害剤を検討するところもあった。

しかしその頃行われた tryptophan 代謝産物の分析の方法を検討すると、感度、特異性等の点で極めて不完全で、それらの方法を用いた尿中含量のデータの信頼性は十分なものではないと考えざるを得なかった。また抱合体の存在は単なる推測で、なんら実証されたものではなかった。膀胱癌の原因を論ずるのに、初期とはいえすでに膀胱癌になった患者の尿を用いていることにも疑問があった。

そこで著者は、まずこれらの物質の信頼できる分析法の開発を計画し、微量分析法としてすぐれている蛍光分析法の適用を考えた。ところが蛍光に関する代表的な書物であった Udenfriend の著書<sup>5)</sup>には両物質とも強い蛍光があると記載されていたにもかかわらず、実際には 3-hydroxykynurenine の水溶液は蛍光を示さなかった(不純物の蛍光を誤認したのだという)。そこでこれについて発蛍光反応を検討したところ、弱アルカリ性の水溶液で *p*-toluenesulfonylchloride を作用させると青緑色の蛍光を生ずることを発見した。そこでこの反応と溶媒抽出、薄層クロマトグラフィーを組み合わせると 3-hydroxykynurenine の蛍光定量法を初めて確立した。<sup>6)</sup> この反応の生成物は **3** の位置の OH 基とアミノ酸の NH<sub>2</sub> 基がそれぞれスルホン酸エステルとスルホン酸アミドとなり、**2** に位置の NH<sub>2</sub> 基はそのまま残っている化合物であることが確認された。<sup>7)</sup> 3-hydroxyanthranilic acid についても蛍光定量法を確立し、<sup>8)</sup> 2つの物質について健常人と初期の膀胱癌患者の尿中排泄量を測定した結果、3-hydroxyanthranilic acid については膀胱癌患者尿で有意の増加が認められたが、3-hydroxykynurenine は膀胱癌患者でやや多かったが有意の差は認められなかった。<sup>6)</sup>

次に筑波大体育学部の高橋徹三教授の協力を得て、健常人について 2 g/d の tryptophan を 7 日間経口投与し、両物質の排泄量の変化を観察した。平均値で 2 倍程度の排泄増加が認められたが、個体差

が極めて大きく、排泄が多い個体は全期間継続して多い傾向があった。<sup>9)</sup>

次に抱合体については、glucuronide と共に sulfate についても検討を行った。3-hydroxyanthranilic acid の glucuronide はモルモット肝 microsome による酵素合成,<sup>10)</sup> 同じく sulfate は化学合成及びラット肝上清による酵素合成<sup>11)</sup> で標品が得られたが、3-hydroxykynurenine については酵素合成でもいずれの抱合体も得られなかった。3-hydroxyanthranilic acid の glucuronide 及び sulfate はいずれも蛍光性なので、イオン交換クロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーに蛍光分析を組み合わせた方法で定量法を確立し、ヒト、ラット及びモルモット尿中排泄量の測定を行った。その結果は著しい動物種差があり、ヒトでは遊離型の 3-hydroxyanthranilic acid, ラットでは sulfate, モルモットでは glucuronide が最も多く、さらに tryptophan を負荷(ヒトで 2 g, ラット及びモルモットで 60 mg)したとき、ヒトでは遊離型の 3-hydroxyanthranilic acid, ラットでは sulfate, モルモットでは glucuronide のみが増加することが認められた。<sup>12)</sup> したがってヒトでは遊離型の排泄が主で抱合体は少なく、尿中  $\beta$ -glucuronidase 活性は遊離型の濃度にはあまり関係しないと考えられるので、Boyland 仮説に対しては否定的な結果となった。

次に tryptophan 代謝産物については膀胱癌との関係だけが問題となっていたが、内因性の物質であるから他の臓器へ作用も検討すべきであるとの考えから、臓器親和性を検するために <sup>3</sup>H 標識化合物を用いてマウスの macroautoradiography を試みた。<sup>13,14)</sup> すると 3-hydroxykynurenine の場合には皮下注射 30 分後に膵臓に放射能が集積しており、さらに放射能を分析すると膵臓では 71.9% が 3-hydroxykynurenine の形で残っていたのでこの物質は膵臓に親和性があることが認められた。<sup>13)</sup> 次にマウス膵臓について microautoradiography を行ったところ、放射能は langerhans 島部分よりも acinar cells の部分に多かった。<sup>15)</sup>

次に国立衛生試験所薬品病理部の協力を得て、マウス新生児に対し皮下注射により 3-hydroxyanthranilic acid, 3-hydroxykynurenine の投与、及び代謝酵素阻害により 3-hydroxykynurenine を蓄積すると考えられる isoniazid と 3-hydroxykynurenine との

同時投与の実験を行った。結果は isoniazid と 3-hydroxykynurenine とを同時投与した群の雄のみに肝癌の増加が認められたが、他の部位の発癌はみられなかった。<sup>16)</sup>

Tryptophan 代謝産物と癌との関係については、その発癌性が弱く研究が困難だったこともあって 1980 年代以降はあまり報告されなくなった。しかし、1990 年代でも tryptophan 代謝産物による DNA 傷害に関する報告が出されており、<sup>17)</sup> 問題としては残っているものと思われる。

### 3. 光照射による発蛍光反応

1977 年帝京大に赴任後は、上記の物質に限らずさらに広い範囲の tryptophan 代謝産物の微量分析法の開発を行った。その過程で教室の馬渡によって tryptophan 代謝産物に紫外線を照射すると蛍光物質に変化する反応が発見された。

馬渡らは tryptophan 代謝産物の 1 つ kynurenic acid を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含むリン酸緩衝液 (pH 4.7) に溶かした状態で紫外線を照射すると、非常に強い蛍光を生ずることを発見した。多くの tryptophan 関連物質について類似した反応がみられ、さらに構造の類似した医薬品にも同様の反応が見られたので、これと HPLC とを組み合わせることで生体試料における微量定量法を開発した。現在までに報告したものは tryptophan 関連物質としては kynurenic acid,<sup>18,19)</sup> kynurenine,<sup>20)</sup> quinolinic acid,<sup>21)</sup> nicotinic acid,<sup>22)</sup> nicotinamide,<sup>22)</sup> N<sup>1</sup>-methylnicotinamide<sup>23)</sup> 及び isatin<sup>24)</sup> で、医薬品としては indomethacin,<sup>25)</sup> naldixic acid,<sup>26)</sup> disodium cromoglycate,<sup>27)</sup> isoniazid<sup>28)</sup> 及び nicorandil<sup>29)</sup> である。

この方法は、HPLC の移動相に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えておき、溶出液の tube を波長 300—400 nm の光を発する black light 又は 254 nm 殺菌灯に巻きつけて紫外線を照射し、蛍光検出器で測定するもので装置は極めて簡単である。Postcolumn 反応であるが溶出後に試薬を注入しないので (kynurenine は感度を向上させるため溶出後にエタノールを注入している) ポンプが 1 個ですむ。また同じ条件で光照射をしないことによって blank を容易にとることができる。尿中の kynurenic acid についてはカラムを廃し、光を照射しない bypass を用いて flow injection method で測定する簡便な方法を開発し得た。<sup>19)</sup> 以上のようにこの方法にはいくつかの利点があるので

応用性があるものと思われる。

反応生成物は、kynurenic acid については、希薄水溶液では比較的安定であるが濃縮するとはなはだ不安定な物質で、LC 分離と凍結乾燥で得られた試料の NMR から前回の総説に記したように酸素が結合した 3,4-epoxy-4-hydroxy-2(1H)-quinolinecarboxylic acid の可能性を考えている。Isatin については H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下の加熱反応で anthranilic acid が生じることが知られているが、<sup>30)</sup> 本反応でも同様の化合物が生じることが確認されている。Nicotinic acid 等 3-ピリジンカルボン酸については、紫外線照射で 2 量体が生じるとの報告があるが、<sup>31)</sup> 生成物の蛍光性は示されておらず、この反応との関係は明らかでない。

#### 4. 光照射以外の Tryptophan 代謝産物の定量法

Xanthurenic acid は kynurenic acid の 8 位に OH 基を持つ物質で、tryptophan 代謝産物中で排泄量が比較的多いものであるが、光照射による発蛍光は kynurenic acid より弱い。しかし OH 基がメチル化された 3-methoxyquinololine は強い蛍光を持っている。そこで飯沼らは dimethyl sulfate を作用させて発蛍光させ、生体試料に応用した。<sup>32,33)</sup>

飯沼らは meratonin を precolumn で Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との存在で加熱して発蛍光させ、HPLC で分離することにより生体試料における微量定量法を確立した。<sup>34)</sup>

#### 5. 発癌プロモーターによる免疫抑制

発癌プロモーターの生体防御機構への影響を検討するに当り、癌に対する免疫性は体液性免疫よりも細胞性免疫の方が主であると言われていたことから考えて、代表的な細胞性免疫である遅延性アレルギーに対する効果を観察することにした。測定法としてはマウスを羊赤血球で免疫し、7—12 日後に羊赤血球を足蹠の皮内に注射して 24 時間後のはれを測定する方法 (footpad reaction, FPR) を用いた。

田原らは生後 6 週の BALB/c マウスに TPA を塗布すると FPR は抑制されるがその効果は 24 時間以内に消失するのに対して、発癌イニシエーターである DMBA (7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene) 400 nmol を 1 回塗布した後に TPA 8 nmol/d を 4—7 日間塗布するというプロモーター発癌実験に近い操作をすると、FPR は持続的に抑制されることを見出した。<sup>35)</sup> そしてこの 2 段階の作用は脾細胞によって

同系の他の個体に別々に移入が可能であり、DMBA の作用は移入の際の操作と抗体処理に結果から Ia(-) macrophages, TPA の作用は抗体処理により Thy-1 及び Lyt-2 の存在が示されるところから CD8-T 細胞によるものと思われた。<sup>36)</sup> さらに同じく発癌プロモーターである anthralin にも同様の作用があることが示された。<sup>37)</sup> また prostaglandine 生成阻害作用がある indomethacin, 発癌プロモーションを阻害する 1-phenyl-2-pyrazolidine, sarco-phytol A, retinoic acid, quercetin 等を TPA と同時に塗布すると FPR 阻害の抑制がみられた。<sup>38)</sup>

次に根来らは未処理の 6—8 週 BALB/c マウスの脾細胞に培養条件下で DMBA 処理したマウスの macrophages と TPA を作用させ、その細胞又は培養上清を FPR 測定の際第 2 回の抗原注射と同時に局所に注射すると FPR が抑制されることを見出し、macrophages と TPA が *in vitro* でも作用すること、FPR を抑制する物質が分泌されていることを示した。<sup>39)</sup> さらに TPA 塗布の際まず CD4<sup>+</sup> の誘導細胞が生じ、これが CD8<sup>+</sup> の DTH 抑制細胞を誘導することを示すデータが得られた。<sup>40)</sup>

しかし、このように最初に行った 6—8 週 BALB/c マウスを用いた実験では、かなり複雑な条件で DTH 抑制細胞が誘導されたのであるが、その後 6—8 週 C3H/He マウスを用いて行った実験では、DMBA 処理を行わず TPA 8 nmol/d を 6 日間塗布したのみで DTH 抑制細胞が誘導され、その表面抗原は CD4<sup>+</sup> であった。したがってこの現象には大きな系統差があることが予想されたので、8 種の系統のマウスについて TPA のみの塗布実験 (*vivo*) 及び培養条件下で TPA を作用させた脾細胞を用いた実験 (*vitro*) を行った。その結果 FPR の抑制が起こったのはそのうち 4 系統 (C3H/He, C3H/HeN, AKR/N, DBA/2) で、他の 4 系統 (A/J, C57BL/6, C57BL/10, BALB/c) では抑制が起こらなかった。<sup>41)</sup> 一方ここで TPA のみの塗布では FPR の抑制が起こらなかった BALB/c 及び C57BL/6 でも、より成長した 10 週令のものを用いると TPA のみの塗布で FPR の抑制が起こったので、年齢による変化もあることが明らかになった。<sup>42)</sup>

年齢変化については、6—8 週と 10 週の BALB/c マウスの脾細胞を混合して培養すると FPR の抑制が抑えられるから、若い BALB/c の脾細胞には

DTH 抑制細胞の誘導を抑制する *contrasuppressor* というべき細胞が存在すると考えられる。これは CD8<sup>+</sup> で、*millipore membranes* を用いて接触を妨げると作用せず、ICAM-1 抗体によっても作用を妨げられるので、ICAM-1 を介して細胞が結合して作用すると推測される。<sup>42)</sup>

C3H/He マウスから得られた FPR 抑制物質は、IL-10 抗体のうち SXC-1 によって作用がなくなるが、IL-4, IL-6, TGF- $\beta$  の抗体及び IL-10 抗体のうち SXC-2 は影響がない。また IL-10 と異なり T 細胞クローンの増殖や IFN $\gamma$  の生産を抑制しない。FPR を局所で抑制する作用があるが、IL-10 にはない。作用は IL-10 に比べ *in vivo* に傾いている。したがって IL-10 と抗原性に一部共通点はあっても別の物質と考えられるので仮に DIF (DTH inhibitory factor) と呼んでいる。<sup>41)</sup>

発癌プロモーター TPA は、マウスへの塗布又は脾細胞への直接作用によって DTH 抑制物質を生産する CD4<sup>+</sup> T 細胞を誘導する。しかし BALB/c 等系統によっては比較的若い時期にはこの誘導を抑制する *contrasuppressor* が存在し、この誘導を妨げている。若い BALB/c では DMBA を塗布してから TPA を塗布すると DTH 抑制物質を生産する CD8<sup>+</sup> T 細胞が現れる。こうした事と発癌との関係、*contrasuppressor* の意義等は現在明らかでない。CD4<sup>+</sup> と CD8<sup>+</sup> の生産物が同一かどうか不明であるが、作用、IL-10 の SXC-1 抗体による作用の消失は共通である。

DIF については、新物質である可能性があるのでその本体の追究につとめており、TPA 処理した C3H/He マウスの脾細胞と Bw5147 細胞から *hybridoma* を作成した。著者の退職後も、根来が昭和大学薬学部において研究を継続する予定である。

## 6. おわりに

著者は tryptophan 代謝産物のうち膀胱癌との関連が疑われた 3-hydroxykynurenine と 3-hydroxyanthranilic acid について蛍光定量法を開発してヒト尿中排泄量の測定を行い、膀胱癌患者で 3-hydroxyanthranilic acid の排泄は増加するが、抱合体はヒトでは少なく、これが抱合体として排泄され、尿中で遊離型となって発癌性を示すとの当時の仮説は疑問であることを示した。次に体内分布を検討し、3-hydroxykynurenine が膵臓に親和性がある

ことを示した。

その後 tryptophan 関連物質について分析法の開発を行った。その過程で紫外線照射による発蛍光反応が発見され、tryptophan 関連物質のほか一部の医薬品の定量にも応用された。

これとは別に、発癌プロモーターの生体防御機構に対する影響の研究を行った。発癌プロモーター TPA のマウスの遅延性アレルギーに対する影響を観察したところ、系統により条件は異なるが遅延性アレルギーを抑制する T 細胞が誘導され、この細胞は遅延性アレルギーを抑制する物質を分泌することが明らかになった。現在この物質の本体を追究中である。

## REFERENCES

- 1) Watanabe M., *Yakugaku Zasshi*, **117**, 657-664 (1997).
- 2) Watanabe M., Ishidate M., *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1461-1469 (1967).
- 3) Ishidate M., Watanabe M., Odashima S., *Gann*, **58**, 267-281 (1967).
- 4) Allen M. J., Boyland R. R., Dukes C. E., Horning E. S., Watson J. J., *Brit. J. Cancer*, **11**, 212-228 (1957).
- 5) Udenfriend S., "Fluorescence Assay in Biology and Medicine," Academic Press, New York, 1962, Vol. I, pp. 174.
- 6) Watanabe M., Watanabe Y., Okada M., *Clin. Chim. Acta*, **27**, 461-466 (1970).
- 7) Watanabe M., Tamura Z., Okada M., *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 285-290 (1970).
- 8) Watanabe M., Hayashi K., *Clin. Chim. Acta*, **37**, 417-422 (1972).
- 9) Watanabe M., Takahashi T., Yoshida M., Suzuki M., Muramatsu S., *J. Nutr. Vitaminol.*, **25**, 115-122 (1979).
- 10) Watanabe M., Ohkubo K., Tamura Z., *Biochemical Pharmacol.*, **21**, 1337-1346 (1972).
- 11) Watanabe M., Minegishi K., *Biochemical Pharmacol.*, **21**, 1347-1356 (1972).
- 12) Watanabe M., Minegishi K., Tsutsui Y., *Cancer Res.*, **32**, 2049-2053 (1972).
- 13) Watanabe M., Sugimori S., *Cancer Res.*, **36**, 309-312 (1976).
- 14) Watanabe M., *Gann*, **69**, 585-587 (1978).

- 15) Watanabe M., Saito K., *Gann*, **72**, 166–169 (1981).
- 16) Fujii K., Watanabe M., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **96**, 163–168 (1980).
- 17) Haiku Y., Inoue S., Oikawa S., Yamamoto K., Tada S., Nishino K., Kawanishi S., *Carcinogenesis*, **16**, 349–356 (1995).
- 18) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Sci.*, **4**, 195–197 (1988).
- 19) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Biochem.*, **190**, 88–91 (1990).
- 20) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *J. Chromatogr.*, **488**, 349–355 (1989).
- 21) Mawatari K., Oshida K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Chim. Acta*, **302**, 179–183 (1995).
- 22) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Sci.*, **7**, 733–736 (1991).
- 23) Mawatari K., Andoh Y., Nakamura Y., Nishiyama K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Chim. Acta*, **363**, 133–139 (1998).
- 24) Mawatari K., Segawa M., Masatsuka R., Hanawa Y., Iinuma F., Watanabe M., *Analyst*, **126**, 33–36 (2001).
- 25) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *J. Chromatogr.*, **491**, 389–396 (1989).
- 26) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *Jpn. J. Clin. Chem.*, **21**, 13–17 (1992).
- 27) Mawatari K., Masiko S., Sate S., Usui Y., Iinuma F., Watanabe M., *Analyst*, **122**, 715–717 (1997).
- 28) Mawatari K., Iinuma F., Watanabe M., *Anal. Sci.*, **6**, 515–518 (1990).
- 29) Mawatari K., Nakamura Y., Shimizu R., Sate S., Iinuma F., Watanabe M., *J. Chromatogr. B*, **679**, 155–159 (1996).
- 30) Houlihan W. J., “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, Indoles,” ed. by Weissberger A., Taylor E. C., Wiley, New York, 1972, pt. 1, ch. 1, pp. 157.
- 31) Takeuchi F., Sugimori T., Fujimori T., Seki K., Harada Y., Sugimori A., *Bull. Chem. Soc. Jp.*, **37**, 1245–1250 (1974).
- 32) Iinuma F., Hara S., Watanabe M., *Anal. Sci.*, **7**, suppl. 783–787 (1991).
- 33) Iinuma F., Watanabe M., *Adv. in Tryptophan Research*, **1992**, 215–218 (1882).
- 34) Iinuma F., Hamase K., Matsubayashi S., Takahashi M., Watanabe M., Zaito K., *J. Chromatogr. A*, **835**, 67–72 (1999).
- 35) Tabara M., Watanabe M., *Jpn. J. Exp. Med.*, **58**, 67–72 (1988).
- 36) Tabara M., Watanabe M., *Jpn. J. Exp. Med.*, **60**, 5–11 (1990).
- 37) Tabara M., Watanabe M., *Jpn. J. Exp. Med.*, **60**, 317–320 (1990).
- 38) Tabara M., Watanabe M., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 449–451 (1992).
- 39) Negoro T., Iinuma F., Watanabe M., *Cell. Immunol.*, **138**, 437–444 (1991).
- 40) Negoro T., Iinuma F., Watanabe M., *Cell. Immunol.*, **167**, 216–223 (1996).
- 41) Negoro T., Iinuma F., Tobe T., Watanabe M., *Int. Immunopharm.*, **1**, 1153–1163 (2001).
- 42) Negoro T., Iinuma F., Satoh K., Tobe T., Watanabe M., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 172–178 (2002).