

— 昭和 41 年度島村賞受賞講演 —

幼若雌マウスの誘起排卵反応による性腺刺激

ホルモンの生物学的検定法に関する研究

笹 本 修 司

(東京農工大学農学部 家畜生理学教室)

性腺刺激ホルモン (GTH) は家畜繁殖領域で広範に利用され、優れた効果を挙げていることは周知の事実である。GTH はその分泌源から、下垂体性と非下垂体性に 2 大別されるが、化学的にはいずれも糖蛋白質に属し、その存在および量を示すには生物学的試験にたよらざるを得ない。

非下垂体性の、絨毛性性腺刺激ホルモン (HCG) および妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMS) は、GTH のうちで最も利用度が高く、1938 年に各々の国際標準品が設定され、それぞれの標準品の一定量の示す生物学的効果と等しい効果を示す量を以て 1 国際単位 (IU) とすることに定めて世界的に単位の統一がはかられた。

その他の GTH については未だ国際標準品を設けての単位統一は行なわれていないが、国によっては局方に記載し独自に単位を定めているところもある。

GTH の作用を調べるには、はじめ幼若マウスないしラットの早期性現象の発現 (腔開口、腔垢発情像の出現、卵巣黄体血点の出現) や家兎での排卵誘起現象が用いられたが、下垂体 GTH や性現象全般についての研究が進展するにつれて、HCG や PMS も単に早期性現象発現効果を調べるのみならず、形態的な面でそれぞれの示す卵胞発育効果、黄体形成効果、黄体維持効果、造精効果を調べると共にこれと併せて性腺での steroid hormone 分泌作用をも調べながら、その生物学的特性を解明しようとする方向に研究が進められ、一方化学的には純度の高いもの、均質なものを得ようとする試みが盛んに行なわれるようになってきた。

このような研究の根拠になることは、用いた GTH の量、単位を正確に定めておくことである。国際標準品が

設定され単位が統一されているはずの HCG は、検定に使用する動物について我が国では必ずしも充分な検討が実施されておらず、便宜的に種々の生理単位が用いられややもすれば広く一般に使用されている HCG の単位に統一性が欠けるおそれが生じた。これを防止するため家畜繁殖領域では『マウス単位検定法』を実施しマウス単位 (MU) で統一する暫定措置を講じて今日に到っているが、将来は IU に統一することを目指している。

マウス単位検定法自体は優れた生物検定法の 1 つであるが、検定使用動物に市販の幼若雌マウスを用いているため動物の反応が均一性を欠くことがあり、且つ標準品との比較を行なわない生理単位法であるので、表示単位には可成りの市が見込まれ使用動物の HCG に対する感受性試験が必要となり、検定使用動物に強い制限が加えられるに到った。

そこで市販幼若雌マウスを用いて、動物に対する制限が比較的ゆるく、手技が簡単で更に IU 表示が可能となるような HCG の生物学的検定法の研究を開始することにした。

本研究の第 1 の目標は、一定量の HCG に対し反応性が不均一である市販幼若雌マウスの卵巣を何らかの処置によって均一化させることであった。そこで卵胞発育作用の強い PMS の過大量を用いて幼若雌マウスを前処置し、強制的に卵胞を発育させて比較的一様な状態をつくりあげ、この条件下で検定すべき HCG に反応させれば比較的均一な成績が得られるのではないかと予想し、その線にそって HCG の排卵誘起能を指標として下記順序に従って実験を行なった。(1) 幼若マウスでの排卵誘起の可能性 (2) 幼若マウスでの排卵誘起のための最適条件 (3) HCG 検定のための標準方法 (4) 検定使用動物 (5) 検定成績の処理方法と測定誤差

本論に入るに先立ち、終始ご指導ご鞭撻を賜った東京大学教授星冬四郎博士、東京農工大学教授高嶺浩博士、愛知学院大学教授今井倭武博士に対し深く感謝する。

Bioassay of gonadotrophins by induced ovulatory response in immature female mice.

SASAMOTO, Shuji (Veterinary Physiology, Faculty of Agric. Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo)

Jap. J. Animal Reprod. 12 (2), 1966.

1. 幼若マウスでの排卵誘起の可能性

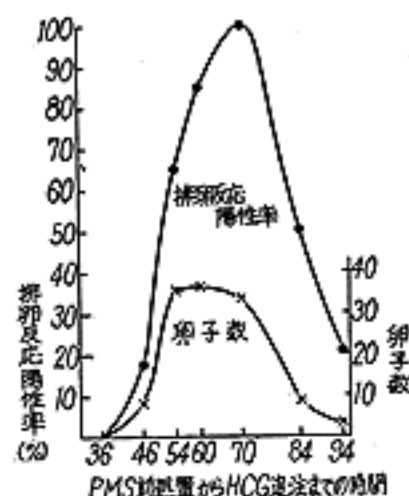
本実験は PMS 単独 1 回投与ないしは HCG と各々 1 回宛の併用投与により、幼若マウスで排卵誘起が可能であるか否かを調べることを目的としたものである。

(1) PMS 単独 1 回投与の場合: PMS が幼若マウスの卵巣に黄体、血点を発現させるためには 6IU 前後を要することが知られていたため、幼若マウスの卵巣を発育させるための過大量としては 10IU を用いることとした。

体重 7.0~10.0g の幼若雑マウスに PMS 10IU を皮下注射してから経時的に剖検し、卵巣重量、子宮重量を測定し、卵管内卵子の有無を検査することによって排卵を判定し排卵している場合には卵子数を記録した(本研究では排卵の有無を反応の指標の中心とした)。

その結果 PMS 投与後 116 時間まで排卵が起らないことが確認され、PMS 投与量を 20IU に増加しても排卵は誘起されず、PMS 1 回のみの投与では排卵は起らないものと推察された。

(2) PMS, HCG の併用の場合 (第 1 図): HCG が発育しているマウスの卵巣に作用して排卵を誘起するための量は、成熟マウスを用いて検討した結果、3IU で充分であった。一方幼若マウスでは HCG 3IU だけを皮下



第 1 図 PMS 前処置後各時期における HCG 追注による排卵反応及び卵子数の変化

注射しても排卵は認められなかった。

そこで PMS 10IU を皮下注射し時間を追って HCG 2IU を追加皮下注射して HCG 投与後 20 時間後に幼若マウスを殺して排卵の有無を調べたところ、PMS 投与後 48~96 時間の範囲で HCG を追注すれば排卵が誘起されることが判明した。そして最も排卵しやすい状態は PMS 投与後 72 時間前後であることが知られた。

第 1 表 PMS 前処置量を変化させた場合の HCG 投与量と排卵反応との関係

(括弧内は卵子数)

HCG 追注量 (IU)	0.25	0.40	0.50	0.60	0.75	0.90	1.00	1.20	1.25	1.50	2.00
PMS 前処置量											
10IU	—	—	0/10 0 (—)	—	0/10 0 (—)	—	1/10 10.0 (8/10 0.8)	—	—	1/10 10.0 (22/10 2.2)	—
10	—	—	15/51 29.4 (324/51 6.4)	—	11/38 28.9 (131/38 3.4)	—	47/72 65.3 (780/72 10.9)	—	8/10 80.0 (110/10 11.0)	46/48 95.8 (780/48 16)	10/10 100.0 (230/10 23.0)
5	0/14 0 (—)	3/28 10.6 (54/28 1.9)	12/54 22.2 (160/54 3.0)	32/58 55.2 (361/58 6.2)	41/63 65.1 (469/63 7.4)	40/46 87.0 (1163/4 6 25.3)	59/64 92.2 (1231/ 64 19.2)	14/15 93.3 (371/15 24.7)	21/23 91.3 (553/23 24.1)	32/34 94.1 (669/34 19.7)	—
3	—	11/53 20.8 (64/53 1.2)	6/9 66.7 (40/9 4.4)	59/94 62.8 (452/94 4.8)	5/6 83.3 (178/6 29.7)	46/57 80.7 (544/57 9.5)	8/8 100.0 (229/8 28.6)	—	—	—	—

排卵陽性率 (%) = (排卵動物数/使用動物数) × 100, 平均卵子数 (個) = 排卵卵子数/使用動物数,

▲印は概算卵子数, PMS Lot. VH-1, HCG Sub-standard

以上の成績から、体重 7.0~10.0 g の幼若雑マウスは PMS を前処置してから HCG を投与すればそれによって排卵することが確認された。

2. 幼若マウスでの排卵誘起のための最適条件

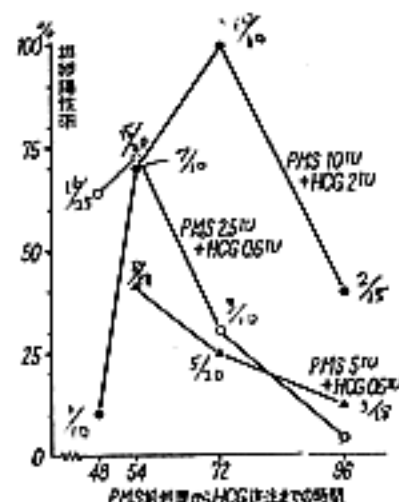
前実験の成績から PMS 前処置後 72 時間前後に HCG を追注すると最も排卵しやすいことが伺われたので、この時点において HCG 追注量を変化させて排卵率（排卵動物数 / 使用動物数）が HCG 量に応じて変化するか、また前処置 PMS 量を変化させ、HCG 追注によって誘起される排卵反応が最も鋭敏となる（HCG 追注量が少なくて排卵を起こすこと）条件を求めた（第 1 表）。猶 PMS 前処置量を 1.5 IU 以下にすると PMS に対する反応が不充分的ものが出現したのでこれ以下での反応は今回はそれ以上検討しなかった。この成績から PMS 前処置量は 3 IU 前後が適当であり、その量を増加するとかえって排卵が起こりにくくなることが知られた。この原因を究明するため、本実験に用いた卵巣を組織学的に検討し、第 2 表に一括する成績を得た。これにより PMS 前処置量を増加した場合に排卵が起こりにくくなっていくのは、卵巣の premature luteinization によるものと解せられた。

適切な PMS 前処置量は 3 IU 前後であることが判明

したので、実験に便利な 2.5 IU を検討した結果反応には殆んど差がみられず良好な成績を示したので、PMS 前処置量としては以後 2.5 IU を用いることとした。

ここで PMS 前処置量が 10 IU から 2.5 IU に低下したので、排卵誘起の最適条件——PMS 前処置から HCG 追注までの時間——について再度検討を加え第 2 図に示す結果を得た。

以上の成績から、幼若マウスの排卵誘起のための最適



第 2 図 PMS 前処置量と HCG 追注までの時期による排卵率の変化

第 2 表 PMS 投与後の幼若マウス卵巣の変化

時間 PMS量 (IU)		54	72				96			
		2.5	2.5	5.0	10.0	20.0	2.5	5.0	10.0	20.0
卵	卵巣	+	顆粒膜細胞の変性	++ (黄体化あり)	++ (黄体化多し)	++ (黄体化多し)	顆粒膜細胞の変性が著しい	++ (黄体化)	++ (黄体化)	++ (黄体化)
	大	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	中	+	+	+	+	+	+	+	+	+
卵	二次卵胞	+	顆粒膜細胞の変性	+	+	+	顆粒膜細胞の変性が著しい	+	変性死滅	変性死滅
	大	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	小	+	+	+	+	+	+	+	+	+
卵	一次卵胞	+	顆粒膜細胞の変性	+	+	+	顆粒膜細胞の変性が著しい	+	変性死滅	変性死滅
	大	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	小	+	+	+	+	+	+	+	+	+
卵	排 卵	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	大 閉 鎖	-	-	+	++	++	-	+	++	++
	夾 膜	-	-	-	+	++	-	-	++	++
卵	小 卵 胞	-	-	-	+	++	-	-	++	++
	大 卵 胞	-	-	-	+	++	-	-	++	++
	顆 粒 膜	-	-	-	+	++	-	-	++	++
備 考		PMS を投与しない対照幼若マウスの卵巣； 一次卵胞，大小二次卵胞，中小卵状卵胞が主体。卵胞退化像認めず，黄体存在せず。								

条件は、PMS 前処置量 2.5 IU, PMS 前処置から HCG 追注までの時間 54~56 時間と決定した。

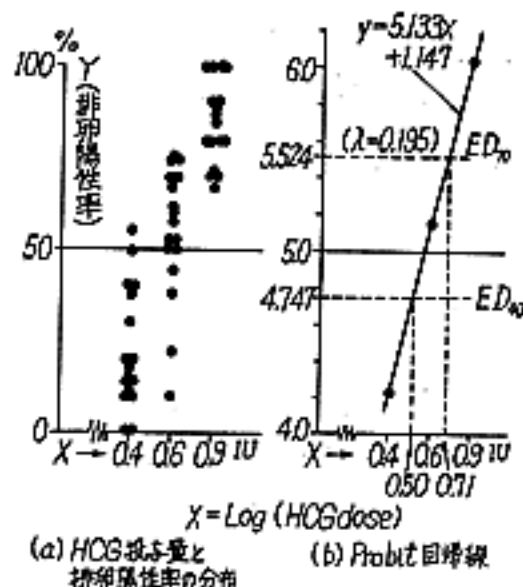
3. HCG 検定のための標準方法

前実験により決定された最適条件の下で、HCG 投与による排卵率が HCG 量の変化に応じて鋭敏に変動する

か否か、またその反応には再現性があるか否かを検討した(第 3 表及び 第 3 図)。その成績から HCG 投与量が 1.5 倍変動するとその変化が反応に鋭敏に現われること、検定の精度指数(λ)は 0.2 以下で満足すべきものであること、反応の再現性も乏しくないことが判明した。

第 3 表 HCG 投与量と排卵陽性率との関係

実験番号	対 照 区		HCG 追 注 区					
			0.4 IU 群		0.6 IU 群		0.9 IU 群	
	排卵陽性率 %	卵子数平均	排卵陽性率 %	卵子数平均	排卵陽性率 %	卵子数平均	排卵陽性率 %	卵子数平均
46	0/6 0	0	5/8 37.5	4/8 0.5	7/10 70.0	117/10 11.7	8/8 100.0	124/6 20.7
47	0/6 0	0	1/7 14.3	12/7 1.7	5/10 50.0	42/10 4.2	9/9 90.6	163/10 16.3
48	—	—	0/10 0	0/10 0	1/10 10.0	2/10 0.3	8/10 80.0	64/10 6.4
56	1/9 11.1	2/9 0.2	5/9 55.6	17/9 2.0	11/15 73.3	38/15 2.5	7/10 70.0	39/10 3.8
57	0/9 0	0	1/10 10.0	1/10 0.1	9/15 60.0	55/15 3.6	10/10 100.0	144/10 14.4
58	1/10 10.0	3/10 0.3	4/10 40.0	20/10 2.0	8/15 53.3	39/15 2.6	10/10 100.0	57/10 5.7
59	0/10 0	0	2/10 20.0	3/10 0.3	11/15 73.3	76/15 5.1	9/9 100.0	99/9 11.0
60	0/8 0	0	4/10 40.0	20/10 2.0	10/15 66.7	64/15 4.3	8/10 80.0	75/10 7.6
61	0/10 0	0	5/10 50.0	15/10 1.5	4/9 44.4	27/9 3.0	7/10 70.0	43/10 4.3
62	0/10 0	0	3/10 30.0	6/10 0.6	11/15 73.3	52/15 3.2	8/10 80.0	113/10 11.3
63	1/10 10.0	1/10 0.1	1/10 10.0	6/10 0.6	3/15 53.3	31/15 2.1	8/9 88.9	74/9 8.2
64	0/15 0	0	2/14 14.3	3/14 0.2	14/20 70.0	73/20 3.7	13/15 86.7	179/15 11.9
65	0/9 0	0	2/10 20.0	4/10 0.4	7/12 58.3	17/12 1.4	8/10 80.0	65/10 6.5
66	0/8 0	0	1/9 11.1	2/9 0.2	3/12 23.1	13/12 1.0	6/9 66.7	67/9 7.4
67	0/7 0	0	2/11 18.2	2/11 0.2	8/12 61.5	62/12 4.0	5/7 71.4	73/7 10.1
68	0/8 0	0	2/12 15.4	12/12 1.0	5/12 38.5	42/12 3.3	9/10 90.0	109/10 10.9
69	1/9 11.1	26/9 2.9	0/12 0	0/12 0	7/14 50.0	65/14 3.9	12/14 85.7	307/14 21.9
単純平均	2.7	0.2	22.7	0.7	54.6	3.5	84.7	10.5
同上標準偏差	—	—	16.6	0.75	18.0	2.46	11.3	5.29
誤差の95%信頼限界	—	—	±8.6	±0.34	±9.2	±1.30	±5.8	±2.80
総加重平均	4/143 2.8	33/143 0.2	28/173 22.0	127/173 0.7	120/229 56.3	697/229 3.5	148/169 84.6	1793/169 10.6



第 3 図

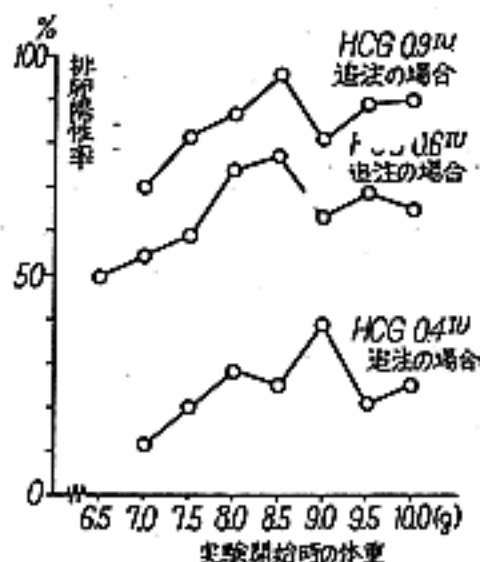
本実験条件下で、HCG の代りに PMS を用いても 1.0 ~ 2.25 IU の間で PMS 追注量の変化に応じて排卵率は鋭敏に変化することが認められ、PMS の生物検定法としても利用し得る可能性を認めた。(さらに少数例からではあるが、LH、FSH についても同様の傾向を認めた。)

しかしながら動物を多数用いた本実験の成績から、PMS 2.5 IU 1 回だけの注射で HCG を追注しないでも排卵するものが僅かながら出現することが注目された。このことは、標準品との比較を伴わない検定方式をとる

ことは一層危険であることを窺わしめた。

4. 検定使用動物

(1) 体重と反応の関係: 前項までの実験に使用した動物は「幼若」という点を、体重 7.0~10.0 g と規制しただけの市販雑マウスであった。果してこのような規制で適当であるか否か、体重や日令が反応にどう影響するのか、については全く不明のままである。本実験では検定開始時 (PMS 前処置時) の体重が反応に与える影響を体重 6.5~10.0 g の間のものについて、0.5 g 間隔



第 4 図 HCG 追注量に対する体重による反応の変化

第 4 表 幼若雌マウスの体重別による排卵反応

HCG 量 開始時 (g) 体重	対 照 群			0.4 IU 追注群			0.6 IU 追注群			0.9 IU 追注群		
区分 割検時 体重	割検時 体重	排卵陽性率 %	卵子数	割検時 体重	排卵陽性率 %	卵子数	割検時 体重	排卵陽性率 %	卵子数	割検時 体重	排卵陽性率 %	卵子数
6.5	7.6	0/7 0	—				7.5	7/14 50.0	29/14 2.1			
7.0	8.6	0/10 0	—	8.5	2/17 11.8	14/17 0.8	8.1	19/25 54.2	121/25 3.5	7.9	7/10 70.0	73/10 7.3
7.5	8.5	0/16 0	—	8.2	3/15 20.0	15/15 1.0	8.6	24/41 58.5	155/41 3.8	8.3	13/16 81.3	183/16 11.3
8.0	9.3	3/30 10.0	5/30 0.2	9.1	6/21 28.6	21/21 1.0	9.2	36/49 73.5	232/49 4.7	8.9	19/22 86.4	294/22 13.4
8.5	9.6	3/29 10.3	3/29 0.1	9.8	5/20 25.0	8/20 0.4	9.8	37/48 77.1	246/48 5.1	9.4	24/25 96.0	293/25 11.7
9.0	10.5	1/23 4.3	3/23 0.1	10.3	11/28 39.3	37/28 1.3	10.6	31/49 63.3	247/49 5.0	10.5	21/26 80.8	169/26 6.5
9.5	10.6	3/25 12.0	35/25 1.4	10.9	3/14 21.4	4/14 0.3	10.9	24/35 68.6	171/35 4.9	10.5	16/18 88.9	180/18 10.0
10.0	11.7	4/33 12.1	9.33 0.3	11.3	3/12 25.0	16/12 1.3	11.5	26/40 65.0	159/40 4.0	11.6	9/10 90.0	74/10 7.4
総 括	14/173	8.1	55/173 0.3	33/127	26.0	115/127 0.9	204/301	67.8	1360/301 4.5	109/127	85.8	1266/127 10.0

(備考) 体重総平均: 開始時 8.6 g 割検時 9.8 g

で検討した(第4表, 第4図)。なお体重 6.5g とは 6.5~7.0g, 7.0g は 7.0~7.25g, 7.5g から 9.5g の各区分はそれぞれ ± 0.25 g の範囲のもので, 10.0g 区分は 9.75~10.0g の間のものである。

第4表の成績から, どの体重区分においても, HCG 投与量の増加に従って反応は急激に上昇することが確認され, また体重の大きい区分の方が小さい区分よりも全体として反応は上昇しているように見えるが体重の増加と反応の上昇との間には相関は認められず一定の傾向を示さなかった。

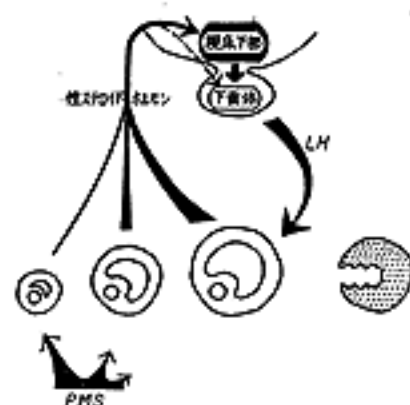
それ故各試験区に動物の体重をかたよらないように平均して配置するならば, 体重 7.0~10.0g の市販幼若雑マウスは本検定法に使用するのに支障ないものと判断された。

(2) PMS 2.5IU 1 回投与だけでの排卵: 第4表で注目すべきことは, PMS 2.5IU を投与しただけの実験区(第4表対照群の欄)で 8% (14/173) の排卵がみられたことである。このような動物はあらかじめ検定から除去出来ることが最も望ましい。そこで PMS 1 回だけの投与で排卵の多発するマウスの条件を調べ, そのことから逆に検定使用適格マウスの条件をより一層明瞭にしたいと考えた。

そのために体重 10.5g 以上の雌未開口のマウスを用いて検討を行なった(第5表)。その成績から約 50% の動物に PMS 投与後 72 時間で排卵がみられることが判明した(この体重区分も ± 0.25 g の範囲を許容しているが, 10.5g 区分だけは 10.0~10.75g のものを含めている)。

PMS 投与後 24 時間で排卵した 1 例は, 成熟マウスでの PMS による排卵試験から考えて 2.5IU 投与で幼

若マウスが排卵する可能性は殆んど考えられず, 偶発的なものと見做される。PMS 投与後 72 時間目に認められた排卵には動物自体の下重体の GTH が関与しているものと考えられ, 動物が春機発動期により近づくことによってこのような排卵が多発するのではないかと想像された(第5図)。



第5図 PMS 1 回投与だけでの排卵誘起現象

(3) マウスの系統と日令による反応の差異: マウスは同日令, 同体重であっても性成熟度には差異があると考えられる。マウスの系統および日令が反応にどのように関係しているかを知る 1 指標として, 本実験は PMS 2.5IU 1 回投与だけで排卵する動物の最低日令および体重を, 各系統別に調べることを目的とした。目下継続中であり現在までの成績は第6図に示した。PMS 投与量は 2.5IU, 解剖は PMS 投与後 72 時間目で実施し, 排卵の判定を行なった。

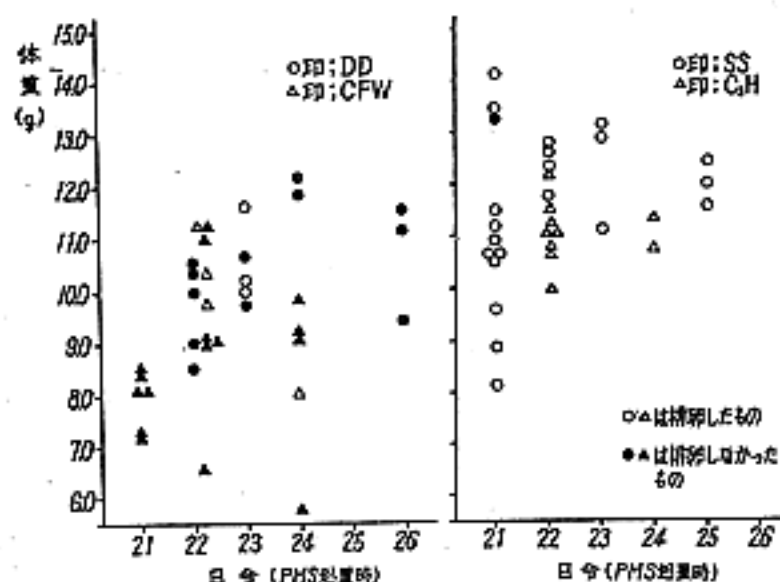
この成績からも明らかなように, PMS に対する反応は同日令, 同体重であっても使用するマウスの系統によ

第5表 体重 10g 以上の雌マウスに PMS 1 回投与した際の排卵反応

PMS 注射後の時間	体 重 区 分							合 計
	10.5g	11.0g	11.5g	12.0g	12.5g	13.0g	13.5g	
剖検体重				12.0	13.0	13.5	14.3	
24				0/1	0/3	1/4(2)	0/2	1/10 (2) 10%
剖検体重	12.0	12.5	12.5	13.1	13.5			
48	0/3	0/2	0/4	0/6	0/1	—	—	0/16 0%
剖検体重	12.3	12.0	13.5	13.6	13.4			
72	3/3(6)	1/6(3)	4/5(4)	2/5(3)	1/4(20)	—	—	11/23 47.8%
剖検体重								
96	—	—	2/5*	—	—	2/3*	—	—

括弧内は排卵動物 1 匹当たりの平均卵子数

* この場合の卵子は cumulus を失って個々ばらばらとなっていた



第 6 図 PMS 1 回投与だけでの排卵(日令体重との関係)

って異なっていることが知られる。

以上 (1), (2), (3) の成績から, 市販幼若雑マウスは著者の検定法を実施するのに使用し得ること, その際体重 7.0~9.5 g の範囲のものをを用いるのが妥当であることが知られた。なお一般に, 体重 8.0 g と指定して動物商から幼若雑マウスを購入する場合, 体重が 7.5~8.5 g の範囲にあるものは数にして約 45% を占めるに過ぎないが, 7.0~9.5 g の範囲には約 85% のものが含まれ, 大多数の動物が検定に使用できることとなり経済的である。

体重 7.0~9.5 g の範囲の市販雑マウスでも PMS 1 回のみの注射で排卵するもの (8%) を除去出来ないが, 各群間に体重が均等になるように動物を配分すると共に, 標準品を用いて比較検定を実施することにより誤差を少なくするように配慮すべきことが知られた。

5. 検定成績の処理方法と測定誤差

前述のようにして決定した実験方法と実験動物を用いて HCG 検定を実施することとした (第 7 図)。HCG 力

前処置—54~56時間—HCG 投与(標準品群) —20時間—解剖・判定
↓
↓
↓

PMS 2.5 IU

低用量: 0.4 IU

中間用量: 0.6 IU

高用量: 0.9 IU

(使用動物数は 各群 10~20 匹)

実験使用動物: 市販雑幼若雌マウス
体重 7.0~9.5 g

排卵
(卵管内
卵の検査)

第 7 図 幼若雌マウスの誘起排卵反応による HCG の生物学的検定法

価およびその 95% 信頼限界は標準品と比較検定を行ない, 排卵率をもとにして probit 処理法を応用して算出した。

(1) 日本薬局方規定の方法と誘起排卵法との比較: 同一検体を日本薬局方の幼若マウスの卵巣重量増加反応と本誘起排卵反応とで検定した場合, それぞれの力価に差異がどの程度生ずるかを検討した (第 6 表)。

この成績から両者間に大きな差異があるとは認められなかった。

(2) 理論力価 1.11 のものの検定成績: 誘起排卵法で検定を実施した際, どの程度の力価の差まで判別できるかを知る目的で, 0.9 と 1.0 の差を有するものについてくり返し検定を行ないその成績の変動を調べた (第 7 表)。

第 6 表 局方と排卵誘起法とで検定した HCG 力価の比較

検体番号	(J) 局方 (卵巣重量増加法)	幼若マウス誘 起排卵法(A)	A/J
P-P-1	2500 IU/mg	2000 IU/mg	0.80
P-P-2	3900 IU/mg	3660 IU/mg	0.94
P-P-3	4400 IU/mg	4740 IU/mg	1.08
P-P-7	2000 IU/mg	2200 IU/mg	1.10
P-P-11	2500 IU/mg	2400 IU/mg	0.96

0.9—1.0 の差について実施したのは, 日本薬局方が力価 1 に対して 0.9~1.1 の範囲を許容しているからである (英局は 0.80~1.25)。前後 5 回の検定で, 第 5 回目は検定が成立し得なかったが, 他の 4 回の成績から 0.9—1.0 の力価差があるものが同一力価と判定されることはなかった。算定力価と理論力価を比較すると No. 4 では若干高過ぎるが力価の低いものが高く判定されるようなことはなかった。力価が理論値とほぼ一致したのは No. 1 および No. 3 の 2 回だけでその限りでは充分満足すべきものとはいえないが, 国連が第 2 代目の HCG 国際標準品を作成するに際して 9 カ国に同一検体を配布して実施した検定成績の変動と較べるならば, 本法の力価の変動域はせまく, 応用し得る方法と判断される。

一般に生物学的検定を実施するに当っては検体の推定力価が 1 となるような投与量を選ぶことが望ましい。ことに本法の如く勾配の高い反応では標準品検体間の検定

第 7 表 力価 (理論値) 1.11 のものの検定成績

6 点検定法 (標準品群 (S.P.) 0.4 0.6 0.9IU.
検体群 (T.P.) 1.0/1.5² 1.0/1.5 1.0IU.)

Assay No.	反 応	直線性	平行性	力価	95%信頼限界(%)	力価/1.11
1.	S.P. 0/20, 7/20, 14/20 T.S. 2/20, 6/20, 18/20	○	○	1.08	82.9~122.8	0.97
2.	S.P. 3/20, 7/20, 18/20 T.P. 3/20, 15/20, 19/20	○	○	1.19	84.5~121.9	1.07
3.	S.P. 0/20, 10/20, 15/20 T.P. 2/20, 9/20, 17/20	○	○	1.08	82.4~121.3	0.97
4.	S.P. 2/20, 7/20, 13/20 T.P. 4/20, 11/20, 18/20	○	○	1.30	80.4~130.9	1.17
5.	S.P. 3/20, 4/20, 10/19 T.P. 0/20, 2/20, 14/20	×		—	—	—
平 均				1.16		1.05

第 8 表 力価の 95% 信頼限界に及ぼす動物数の影響

	反 応 (%)	力価比	信頼限界 (95%)	
			n=10×6	n=20×6
1	S.P.* 20 30 100 T.P.** 20 20 70	0.74	53~144	70~129
2	S.P. 20 50 100 T.P. 20 60 70	0.90	69~143	78~127
3	S.P. 40 70 80 T.P. 20 50 78 ¹	0.78	47~154	66~134
4	S.P. 20 30 90 T.P. 10 40 70	0.90	69~139	79~125
5	S.P. 10 30 70 T.P. 10 40 80	1.10	73~143	87~126
6	S.P. 15 35 90 T.P. 15 75 95	1.19	78~134	85~122

* S.P. 標準品群の 0.4, 0.6, 0.9IU に対する排卵陽性率

** T.P. 検体群の 0.4, 0.6, 0.9IU (推定値) に対する排卵陽性率 $\frac{1}{2}$

に際しての投与力価の差によって、どちらかの反応値が極限に達してしまうことがあり、その結果測定値には計算以前の誤差が入ることとなるから特に注意を要する。

(3) 力価の 95% 信頼限界と検定使用動物数: 生物学的検定を実施して力価を算定する場合にその 95% 信頼限界は、検定成績を採用するか棄却するかを決定するものとなっている。現在日本薬局方はこの値を 70~143%,

英国薬局方は 64~156% と規定している。この 95% 信頼限界の範囲を 70~143% とする場合に、誘起排卵法では動物数をどの位にすればよいかを検討した (第 8 表)。検体はそれぞれロットの異なる HCG 原末で、No. 1~5 は 1 群の動物数 10 匹、即ち 1 回の検定に 60 匹のマウスを用いたもので、1 群の動物数を 20 即ち 1 検定に 120 匹を充たした場合の力価の 95% 信頼限界は、動物数のみを 2 倍にして計算した理論上の推定値であり、No. 6 は逆に 1 群 20 匹で実施した成績で、1 群の数を 10 匹にした場合の数値は、動物数を半減して計算した理論上の推定値である。この成績から、No. 1 および 3 のように力価比が 1.0 から著るしく外れるものを除けば、動物数を 1 群 20 匹とすることによって力価の 95% 信頼限界は 70~143% の範囲に入ることが判った。この条件を満足させるための動物数は必ずしも 1 群 20 匹を必要とせず、15 匹でも可能であることが試算されている。

これらの成績から誘起排卵法は、1 群の動物数を 10 匹以上 20 匹以内とし、標準品-検体の 3-3 用量検定を実施することによって日本薬局方が規定する条件を満足することが知られた。

参考までに、日本薬局方、幼若マウスの誘起排卵法およびマウス単位検定法の概要を一括し、その特徴を表示すれば第 9 表の如くである。

以上本研究の結果、市販の幼若雑マウスを用いて下記条件に従って HCG の検定を実施すれば比較的容易に日本薬局方の力価およびその 95% 信頼限界の条件を満た

	日本薬局方 (JP)	幼若雌マウス誘起 排卵法 (IMO)	マウス単位検定法 (MU)	備 考
使 用 動 物	幼若雌ラット (30~40 g) 40匹以上	幼若雌マウス (7.0~9.5 g) 90~120 匹	幼若雌マウス (7.5~8.5 g) 30匹以上	IMO: 適格マウスが多い MU: 適格マウスが少ない
所 要 日 数	7 日 間	4 日 間	5 日 間	HCG 投与後判定まで JP 2 日間 IMO 1 日間 MU 3 日間
注 射 回 数	5 回 (1日1回×5)	2 回 (PMS 1 回, HCG 1 回)	4 回 (1日2回×2)	
生 物 反 応	卵 巢 重 量 (計量反応)	排 卵 (卵管内卵子) (計数反応)	卵巣の黄体・血点 (計数反応)	
検 定 様 式	比 較 検 定 (国際単位表示) 4 点 測定	比 較 検 定 (国際単位表示) 6 点 測定	絶 対 検 定 (生理単位表示)	MU: マウスの感受性の 変動を規制する手 段が必要
感 度	8~32 IU	0.4~1.0 IU	(1.5~6.0 IU)	

す方法となることが判明した。

即ち

1. 使用動物として 7.5~9.5 g のものを選ぶ。
2. 1 群の動物数を 10~20 匹とし 6 群を設け、各群間の体重差をできるだけ少なくする。
3. 上記マウスに一律に PMS 2.5 IU を皮下注射し、54~56 時間を経ってから HCG を皮下に追注する。
4. 追注 HCG は、標準品、検体ともに 3 用量区宛を設け、投与量はほぼ、低用量区 0.4 IU、中間用量区 0.6 IU、高用量区 0.9 IU 程度の 1.5 倍量の 3 区宛(検体区は推定用量)として、3-3 用量検定を行なう。
5. HCG 反応の判定基準は排卵(卵管内卵子)の有無とし、成績は排卵率(排卵動物数/1 用量当り使用動物数)を以て示し、プロビット処理法により力価及び 95% 信頼限界を算出する。

終りに、本研究の大部分は友田製薬株式会社が職中に

実施したものであることを付記し、研究の推進に温かい御配慮を賜った山浦工場長、村上研究部長、および研究に協力された試験課員各位に謝意を表する。

本研究に関する本誌掲載の報告

- 1) 妊馬血清性腺刺激ホルモンの生物学的性状に関する二、三の考察 5, 63~66, 1959.
- 2) 幼若雌マウスの誘起排卵反応による性腺刺激ホルモンの生物学的検定法について I. 排卵誘起の為の PMS 前処置量に関する検討 6, 163~166, 1961.
- 3) 同上 II. PMS 前処置から HCG 追注までの時間に関する検討 7, 17~20, 1961.
- 4) 同上 III 実験使用動物に関する検討 7, 151~156, 1962.
- 5) 同上 IV 検定誤差に関する二、三の考察 8, 81~84, 1962.
- 6) 同上 V -PMS, FSH, および LH の生物学的検定への応用 8, 93~97, 1962.
- 7) 性腺刺激ホルモン投与幼若マウス卵巣の組織学的研究(第 2 報) 10, 114~119, 1965.

お こ と わ り

昭和 41 年度佐藤賞受賞論文

杉 江 估: 牛の受精卵移植に関する研究 は、頁数の都合によって次号に掲載することとなりました。
著者ならびに会員各位には悪しからずご諒承くださるようお願いいたします。(係)