胎盤性性腺刺激ホルモンに対する dd マウスの 卵巣黄体血点形成反応について

窪 道 護 夫・*猪 貴 義・鈴 木 勝 夫

(農林省動物医薬品検査所・*農林省家畜衛生試験場)

人胎盤絨毛組織の性腺刺激作用は村田ら¹⁾により証明され、ASCHHEIN ら¹⁾は妊婦の血液、尿中に多量の性腺刺激作用物質が存在することを明らかにした。のちに、これらの性腺刺激物質は胎盤性性腺刺激ホルモン(HCG と略)と称され、人のみならず広く家畜の卵巣疾患による繁殖障害に活用され、すぐれた治療効果をあげている。この HCG の国際標準品は第 3 回ホルモン物質標準設定国際会議において設定された。しかし、効力検定法に関しては定めていない²⁾。このホルモンの生物学的効力検定法は DICZFALUSY³⁾, ZONDEK⁴⁾, SMITH⁵⁾, HAMBURGER⁶⁾, FRIEDMAN⁷⁾, GALLI-MAININI⁸⁾, SEALEY⁹⁾, LORAIN¹⁰⁾, APOSTOLOKS¹¹⁾, DEFS¹²⁾, HEARD¹³⁾, CLARINGBOLD¹⁴⁾ らにより種々の方法が発表されているが、動物種、特異性、感受性、反応精度、再現性などの要因を考慮するとき、遺伝的、生理的、環境的に明かされていない課題が存在しているとみられる。

現在、わが国においては動物用 HCG 効力検定法として佐藤ら¹⁵⁾のマウス単位法を用いているが、将来市販される製品はその力価が一定であること、および万国共通の力価表示であることが望ましいことから、国際単位による標準品と比較試験する検定法の検討が重要であるとみられる。

著者らは HCG に対し感受性が高く、また、経費が安く、入手が容易であり、統計量としても取扱い易い幼若雌マウスによる生物学的力価検定法を検討する目的で、約 21 日令の dd マウスの卵巣黄体血点形成反応について、マウスの体重と反応陽性率、国際単位による用量反応曲線との関係を調べたので、その結果を報告する。

Hemorrhagic follicles and corpora lutea forming reaction in the ovaries of dd mice by chorionic gonadotropin administration.

KUBOMICHI, Morio, *Takayoshi Ino & Katsuo Suzuki
(National Veterinary Assay Laboratory & *National Institute of Animal Health. Tokyo)

Jap. J. Animal Reprod. 13 (3), 1967.

実験材料と方法

材料: HCG は CGH 委員会のマウス単位標品 (MU と略) と国際単位表示の標準品 (IU と略) を用い、滅菌生理食塩液で溶解稀釈し調製した。この溶液は 0~5°C に保存した。

動物: dd 幼若雌マウスは約 21 日令の健康マウスで、実験開始時において体重の著しく大きいもの、また小さいものは除外して使用した。

方法: 各濃度のホルモン溶液を各試験群のマウス一匹につき 0.1 ml ずつ 1 日 2 回 2 日間計 4 回 0.4 ml を腹部皮下に注射した。第 1 回注射後 100 時間目に剖検を行ない、卵巣黄体血点形成反応の有無を検査した。判定は黄体血点の出現をもって陽性とした。なお、0.5~6.0 IU の用量範囲においては実験の繰り返しによる反応精度を確めるため反復実験を行なった。

実験成績

1) マウスの体重と卵巣黄体血点形成反応の関係

Table 1 (1) は HCG 2.0 MU 皮下注射による dd 幼若雌マウスの注射時体重、供試頭数と卵巣黄体血点形成反応の関係を示した。体重を 7.0~7.4 g, 7.5~7.9 g, 8.0~8.5 g, 9.0 g の 4 群とし、卵巣における黄体血点出現数を 0~12 に分け、黄体数/全卵巣数を黄体血点出現率とした。8.0~8.5 g 群と 9.0 g 群では、それぞれ剖検時において卵巣が 1 箇破損し観察不可能のため資料から除いた。Table 1. (1) からわかるように 7.0~7.4 g 群の全体での反応陽性率は 42.2%, 7.5~7.9 g 群では 59.7%, 8.0~8.5 g 群では 79.4%, 9.0 g 群では 90.4 % であった。この体重別反応陽性率を Fig 1 に示した。これら、Table 1 (1), Fig. 1 から明らかなように、体重の大きいマウスが小さいマウスに比べて反応陽性率が高い傾向にあることがみられる。この体重と反応陽性率の関係について χ^2 -test で有意性検定を行なったところ、7.0~7.4 g: 7.5~7.9 g ($P=0.02\sim0.01$), 7.0~7.4 g:

Table 1. (1) The positive rate of hemorrhagic follicles and corpora lutea formation in each body weight of dd mice injected s.c. with 2.0 MU of HCG

Body weight g	No. of mice	No. of ovary	Number of hemorrhagic follicles and corpora lutea												Positive			
															rate			
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	%	%	
7.0 - 7.4	32	64	37	57.8	6	9.4	9	14.1	5	7.8	3	4.7	2	3.1			27	42.2
7.5 - 7.9	154	308	124	40.3	45	14.6	51	16.5	39	12.7	22	7.1	16	5.2	7	2.3	4	1.3
8.0 - 8.5	284	567	117	20.6	57	10.0	93	16.4	104	18.3	62	11.3	81	14.3	18	3.2	14	2.4
9.0	42	83	8	9.6	8	9.6	10	12.0	15	18.1	10	12.0	12	14.5	6	7.2	7	8.4
Total	512	1022	286	28.0	116	11.4	163	15.9	163	15.9	97	9.5	111	10.9	31	3.0	27	2.6
																	1	0.1
																	3	0.3
																	6	0.6
																	17	1.7
																	27	2.6
																	2	3.1
																	4	1.3
																	3	0.5
																	1	0.1
																	1	0.1
																	4	0.7
																	5	6.0
																	2	2.4
																	7	8.4
																	3	0.3
																	1	0.1
																	736	72.0

Fig. 1. The positive rate of hemorrhagic follicle and corpora lutea formation reaction in dd mice injected s.c. with 2.0 MU of HCG.

8.0~8.5 g ($P=0.001$), 7.0~7.4 g: 9.0 g ($P=0.001$), 7.5~7.9 g: 8.0~8.5 g ($P=0.001$), 7.5~7.9 g: 9.0 g ($P=0.001$) の関係において有意差が得られた。しかし, 8.0~8.5 g: 9.0 g ($P=1.64\sim2.71$) との関係では有意差は得られなかった。

2) 左右卵巣の黄体血点形成反応陽性率の比較

(1) の成績は左右卵巣を含めての黄体血点形成反応陽性率について調べたものであったが, さらに, 左右卵巣における黄体血点形成反応陽性率に差がみられるかどうかについて検討した。Table 1 (2) はその結果を示したものであるが, 4 群の体重区分における左右卵巣の反応陽性率は 7.0~7.4 g 群では 46.9: 37.5%, 7.5~7.9 g 群では 59.1: 60.4%, 8.0~8.5 g 群では 82.3: 76.4%, 9.0 g 群では 92.9: 87.8% であり, 左右卵巣間における黄体血点形成反応陽性率を χ^2 -test を用いて検討したところ, Table 1 (2) に示してあるように左右卵巣の反応性には差はないとみられる。

3) 国際単位による用量反応曲線

HCG の国際単位による用量反応曲線を求めるために, 前述の実験で卵巣黄体血点形成反応陽性率の高かった体重 8.0~9.0 g 前後の範囲にある dd マウスを用いて検討した。実験材料と方法は, すでに記載した通りである。Table 2 は測定に用いた各ホルモン用量に対するマウスの頭数と注射時体重, 解剖時体重の平均値と標準偏差, 黄体血点形成反応陽性率を示した。注射時と解剖時の体重は各ホルモン用量間でそれ程大きい差はみられない。0.5~6.0 IU の各用量で反復実験を行なったが, 各ホルモン用量での測定の繰り返しによるマウスの体重について検討したところ, 注射時, 解剖時体重ともに繰り返し

Table 1. (2) Comparison between the left and right ovary of hemorrhagic follicles and corpora lutea formation in dd mice injected s.c. with 2.0 MU HCG

Body weight g	Left ovary		% of Positive	Right ovary		% of Positive	X ² value	Probability
	Negative	Positive		Negative	Positive			
7.0-7.4	17	15	46.9	20	12	37.5	0.5765	0.5-0.3
7.5-7.9	63	91	59.1	61	93	60.4	0.0532	0.9-0.8
8.0-8.5	50	233	82.3	67	217	76.4	0.7220	0.5-0.3
9.0	3	39	92.9	5	36	87.8	0.6080	0.5-0.3

Table 2. Mean body weight and positive rate of hemorrhagic follicles and corpora lutea formation reaction in dd mice injected HCG

Hormone dose	No. of mice	Body Weight		Hemorrhagic follicles and corpora lutea formation reaction	
		at injection	at dissection		
0.1 IU	10	8.89 ± 0.67 ^g	12.31 ± 0.88 ^g	0/ 10	0.0 [%]
0.3 IU	10	8.95 ± 0.63	12.59 ± 0.63	0/ 10	0.0
0.5 IU	81	8.78 ± 0.53	12.04 ± 0.91	2/ 81	2.5
1.0 IU	122	8.74 ± 0.53	11.57 ± 1.41	9/122	7.4
1.5 IU	139	8.74 ± 0.51	11.78 ± 1.00	40/139	28.9
3.0 IU	131	8.69 ± 0.53	11.92 ± 0.88	81/131	61.8
4.5 IU	126	8.93 ± 0.70	11.88 ± 0.93	102/126	81.0
6.0 IU	81	8.70 ± 0.49	11.79 ± 0.95	72/ 81	88.9
8.0 IU	10	9.07 ± 0.56	12.10 ± 1.13	9/ 10	90.0
10.0 IU	10	9.11 ± 0.50	12.31 ± 0.90	10/ 10	100.0
0.85% NaCl	98	8.82 ± 0.57	11.87 ± 0.92	0/ 98	0.0

Mean ± SD

返し測定によるホルモン用量間で、P は 0.2~0.05 で有意差はみられなかった。これらのことは各ホルモン用量の測定に使用したマウスが、体重に関しては均一性であることを示しているとみられる。

次に、各ホルモン用量に対する反応陽性率について調べた。Table 2 における反応陽性率を Fig. 2 に示した。Table 2, Fig. 2 から明らかなように、反応陽性率は一般に、ホルモン量の増加にしたがい高まる傾向にあるが、4.5 IU ではほぼ反応の頂上に達し、6.0 IU, 8.0 IU はその反応曲線は横這いとなる。なお、1.0 IU 以下では反応陽性率は極めて低く、1.0 IU, 1.5 IU, 3.0 IU,

4.5 IU の範囲では用量に対し一定傾向をもつ用量反応曲線が得られた。各ホルモン用量と反応陽性率について χ^2 -test で有意性検定を行ない、その結果を Table 3 に示す。Table 3 から明らかなように 0.5:1.0 IU, 4.5:6.0 IU, 4.5:8.0 IU, 6.0:8.0 IU の用量間では有意差は得られなかったが、その他の用量間ではいずれも高い有意差が得られた。低用量における 0.5:1.0 IU, また高用量で反応曲線の横這いをした 4.5 IU, 6.0 IU, 8.0 IU 間の関係では有意差を示さなかった。

ホルモン用量に対して一定傾向の反応曲線を示した 1.5 IU, 3.0 IU, 4.5 IU, 6.0 IU について、測定の繰り

Fig. 2. The dose response curve of dd mice injected HCG.

Reproducibility of hemorrhagic follicles and corpora lutea formation reaction in dd mice

HCG dose	χ^2 value	Probability
1.5 IU	χ^2 (7) 7.6464	0.5-0.3
3.0 IU	χ^2 (7) 5.9870	0.8-0.7
4.5 IU	χ^2 (6) 11.4342	0.1-0.05
6.0 IU	χ^2 (5) 2.6312	0.8-0.7

Table 3. The χ^2 -test of hormone doses and positive rate in dd mice

Hormone dose	χ^2	P
0.5 : 1.0 IU	2.2879	0.2-0.1
0.5 : 1.5 IU	22.9310	0.001
0.5 : 3.0 IU	74.0380	0.001
0.5 : 4.5 IU	121.4812	0.001
0.5 : 6.0 IU	121.8980	0.001
0.5 : 8.0 IU	64.1750	0.001
1.0 : 1.5 IU	5.0927	0.05-0.02
1.0 : 3.0 IU	8.1732	0.01-0.001
1.0 : 4.5 IU	13.5707	0.001
1.0 : 6.0 IU	134.8768	0.001
1.0 : 8.0 IU	53.5744	0.001
1.5 : 3.0 IU	29.7957	0.001
1.5 : 4.5 IU	72.3384	0.001
1.5 : 6.0 IU	73.9948	0.001
1.5 : 8.0 IU	15.8428	0.001
3.0 : 4.5 IU	11.4520	0.001
3.0 : 6.0 IU	18.2432	0.001
3.0 : 8.0 IU	3.1929	0.05-0.02
4.5 : 6.0 IU	2.3175	0.2-0.1
4.5 : 8.0 IU	0.5054	0.5-0.3
6.0 : 8.0 IU	0.0112	0.9

返しによる反応陽性率の有意性検定を χ^2 -test で検討した結果を Fig. 2 の中に示した。この数値からも明らかに、各用量における測定の一連の繰り返しによる反応陽性率には有意差がなく、これらのホルモン用量における測定の一連の繰り返しによる反応陽性率の再現性はあるとみられる。

考 察

すでに実験結果で述べたように、卵巣黄体血点形成反応陽性率は実験に用いた dd マウスの体重の大小によって著しく異なり、体重の大きいマウスは小さいマウスに比べて、反応陽性率の高いことが明らかになった。

松本¹⁶⁾は HCG に対する CF1 マウスの感受性について、同日令のものでは体重の大きいものが、卵巣黄体血点形成反応陽性を示し易い傾向を認め、DONNELLY & STONE¹⁷⁾は Sw マウスで、日令 16~17 日、19~20 日、体重 7.5~9.5 g、9.5~11.5 g のそれぞれの群間の HCG に対する子宮重量増加を比較したところ、日令間での反応の有意差はなかったが、体重間では高い有意差のあることを報告している。BROWN¹⁸⁾は FSH assay で体重 8~10 g の albino マウスを実験に供し、WELLS¹⁹⁾らは GTH assay に 22±1 日、体重 6~10 g のマウスを実験に供した。また、HAMBURGER¹⁾は GTH assay に約 3 週令の 6~8 g の未成熟雌マウスが広く用いられると述べている。以上のように、GTH assay に用いるマウスの系統、体重はかなり巾がみられる。著者らは HCG に対する dd マウスの卵巣の反応性が、体重 8.0~9.0 g 前後において、最も高い反応陽性率を示したことから、HCG の bioassay に用いる dd マウスは 8.0~9.0 g 前後の体重が適切であると考えられる。

次いで dd マウスの左右卵巣の反応性を検討したところ、各体重間における左右卵巣の反応陽性率に明らかな差はみられず、統計的にも有意差は得られなかった。したがって、HCG に対する dd マウスの卵巣の反応性は左右間で差がないものとみられる。豊田²⁰⁾はラットにおける排卵数、黄体数、卵巣重量について検討し、左右間に有意差のないこと、左右間の分散は無作為的なものと見做し得ると報告している。FALCONER²¹⁾はマウスにおける過剰排卵の誘起実験においても、排卵数の左右における分布は無作為的であると報告している。今回の HCG に対する dd マウスの卵巣黄体血点形成反応においても、これらの報告と同様に左右卵巣の反応値に明らかな差がみられないことが明らかになったが、これらの結果は今後 HCG の検定を行なうには左右いずれかの片

側卵巢の示す反応の観察によって、その目的を達することができると考える。

次いで反応陽性率の高かった 8.0~9.0 g 前後の dd マウスを用いて、国際単位による用量反応曲線を求めたところ、4.5 IU ではほぼ反応の頂上に達し、6.0 IU, 8.0 IU でその反応曲線は横這いとなった。また 1.0 IU 以下では反応陽性率は極めて低く、1.0~4.5 IU の範囲では用量に対し一定傾向をもつ用量反応曲線が得られた。 χ^2 -test による有意性検定においても低い用量における 0.5 IU, 1.0 IU また高い用量における 4.5, 6.0, 8.0 IU 間の関係では有意差を示さないが、1.0, 1.5, 3.0, 4.5 IU の用量間においてはいずれも高い有意差を示すことが明らかとなった。HAMBURGER¹⁾ はマウスの卵巢黄体血点形成反応で 1.0 IU から 8.0 IU の用量範囲で用量反応曲線が得られると報告しているが、本実験では 1.0 IU から 4.5 IU の用量間で一定傾向を示す用量反応曲線が得られた。

佐藤ら¹⁵⁾は 0.1 mg が 1 MU と推定される標品による用量と卵巢反応陽性率との関係について検討し 0.0375 mg で 15.7%, 0.05 mg で 26.7%, 0.075 mg で 51.1%, 0.1 mg で 62.0%, 0.15 mg で 70.9%, 0.2 mg で 81.4% の成績を報告している。1 MU $\approx$ 3 IU として換算すると、著者らの卵巢黄体血点形成反応陽性率より全体的に反応は低く、0.2 mg MU 標品反応陽性率は 4.5 国際標準品の反応陽性率とほぼ等しい成績であるとみられる。

ホルモン用量に対して一定傾向の反応曲線を示した 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 IU について測定の一連の繰り返しによる反応陽性率の有意性を χ^2 -test で検討したところ、各用量における測定の一連の繰り返しによる反応陽性率には有意差がなく、各用量における再現性はあると認められる。

この実験時期は 11 月 ~ 1 月の 2 カ月間にわたって行なった成績であるが、他の時期においても、この実験と同様に反応陽性率の再現性が得られるかどうかさらに検討を加える予定である。

要 約

HCG の生物学的検定法を検討する目的で約 21 日令の dd マウスを用いて、マウス単位標品 (MU) と国際標準品 (IU) について実験した結果、次の成績が得られた。

1) HCG 2.0 MU 皮下注射による約 21 日令の幼若雌マウスの卵巢黄体血点形成反応について、注射時体重別と比較したところ、体重の大小によって反応陽性率に差

がみられ、8.0~8.5 g と 9.0 g で反応陽性率の高い結果を得た。

2) それぞれの注射時体重別における左右卵巢の黄体血点形成反応陽性率について調べたところ、その陽性率は左右卵巢間で有意差は得られなかった。したがって、HCG の検定を行なうには、左右卵巢いずれかの片側卵巢の示す反応の観察によって、その目的を達することは可能とみられる。

3) 反応陽性率の高かった 8.0~9.0 g 前後の dd マウスで 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 8.0 IU の用量に対する反応陽性率を求めたところ、反応陽性率は一般にホルモン用量の増加にしたがって高まる傾向が得られる。1.0 IU 以下では反応が低く、4.5 IU 以上では反応曲線は横這いを示し、0.5 : 1.0, 4.5 : 6.0, 4.5 : 8.0, 6.0 : 8.0 IU の関係を除く他の用量間でいずれも有意差が得られた。

本研究の機会を与えられた前動薬検所長川島秀雄現東京農業大学教授、農林省家畜衛生試験場 藤田淳吉 場長、動薬検信藤謙蔵所長に感謝いたします。また、種々有益なご助言とご批判を賜った農林省家畜衛生試験場須藤恒二博士に深謝いたします。

(1967.5.25 受付)

文 献

- 1) EMMENS, C.W.: Hormone Assay. Academic Press. N.Y. 173, 1950.
- 2) BANGHAM, D.R. & B. GRAB: *Bull. Wld. Hlth. Org.* **31**, 111, 1964.
- 3) DICZFALUSY, E & J.A. LORAIN: *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **15**, 424, 1956.
- 4) ZONDEK, B., F. SULMAN & R. BLACK: *J. Am. Med. Ass.* **128**, 939, 1945.
- 5) SMITH, G.V. & O.W. SMITH: *Am. J. physiol.* **107**, 128, 1934.
- 6) HAMBURGER, C. & K. PEDERSEH-BJERGAARD: *Quart. J. Pharmacol.* **10**, 662, 1937.
- 7) FRIEDMAN, M.H. & M.E. LAPHAM: *Am. J. Obst. & Gynec.* **21**, 405, 1931.
- 8) GALLI-MAININI, C.: *Endocrinol.* **43**, 349, 1948.
- 9) SEALEY, J.L. & C.W. SONDERN: *Endocrinol.* **26**, 813, 1940.
- 10) LORAIN, J.A.: *J. Endocrinol.* **6**, 319, 1950.
- 11) APOSTOLAKIS, M., K.D. VOIGT: *Acta Endocrinol.* **28**, 54, 1958.
- 12) DELFS, E.: *Endocrinol.* **28**, 196, 1941.
- 13) HEARD, R. D.H. & S.S. WINTON: *J. Physiol.* **96**, 248, 1939.
- 14) CLARINGBOLD, P.J. & LAMOND D.R.: *J. Endocrinol.* **16**, 86, 1957.
- 15) 佐藤(繁)・小野(元)・星(冬): 本誌, **2**, 115, 1957.
- 16) 松本(武)・江藤(禎)・

星(冬): 本誌, 5, 67, 1959. 17) DONNELLY, R.B. & M., T. KHOSLA & P.S. BROWN.: *J. Endocrinol.* 29, G.M. STONE.: *J. Endocrinol.* 21, 459, 1961. 18) 311, 1964. 20) 豊田(裕): 本誌, 8, 1, 1962. 21) BROWN, P.S.: *J. Endocrinol.* 13, 59, 1955. 19) WELLS, FALCONER. D.S.: *J. Reprod. Fertil.* 2, 418, 1961.

Summary

The method of assay for HCG using ca. 21 days old dd mice to the mouse unit and the international standard is investigated. The results may be summarized as follows:

1) The difference between body weight at the time of a subcutaneous injection with 2.0 MU HCG using the assay based on hemorrhagic follicles and corpora lutea formation in ovaries of 21-day-old immature female dd mice is significant, the positive response in the range of body weight 8.0-8.5 g and 9.0 g being greater.

2) The difference between right and left ovary in each body weight group is not significant. The result suggests that either ovary should give satisfactory assay results for HCG.

3) Using the weight range of around 8.0-9.0 g dd mice, the positive response to HCG being greater, the positive reaction rate shows a tendency to increase with increasing dosage of hormone at dose levels 0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 and 8.0 IU below 1.0 IU the reduced response is observed. A plateau slope covers the dose above 4.5 IU, though the significant difference is obtained except the dose range 0.5 : 1.0, 4.5 : 6.0, 4.5 : 8.0 IU groups.