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 (II) —PMS 前処置から HCG 追注までの時間に関する検討 (標準方式について)

笹本 修司・村上 一雄

(友田製薬株式会社品川工場, 試験課)

PMS 前処置により幼若雌マウスの卵巣を或る程度にまで発育させ、この中の卵胞に対する排卵刺激となる HCG に対する感受性を比較的均一ならしめて、HCG の assay を実施しようとする試みはほぼ成功して来た。又この為の priming としての PMS の適当な量は 3 乃至 5 IU であることが従来の実験から判明し、これらについては既に報告した通りである^{1,2)}。

そこで今回は、この幼若雌マウスの誘起排卵反応を実際の assay に応用する為、PMS 前処置から HCG 追注までの時間を更に検討し、routine work 化を計ろうとした。

又最初の報告¹⁾で PMS 10 IU 前処置の際の HCG 追注最適時間は PMS 前処置後 72 時間前後であることを明らかにしたが、前処置量を減少せしめているので更に検討すべき必要性が生じたこともこの実験を行う要因となった。

実験材料

使用動物；市販雑系幼若雌マウスで実験開始時の体重が 7.0 乃至 10.0 g のもの。

使用ホルモン；PMS はビーメックス (友田)

Lot 番号 WJ-1 を使用し、HCG は Substandard を用いた。

実験方法

PMS 前処置量を 10, 5, 2.5, 1.25 IU とする 4 つの実験区を設け、その各々に於て PMS 前処置後 48, 54, 72, 96 時間目に HCG を追注した。各区とも 1 群の動物

数は 10 匹宛とし、同じ実験を数回に亘つて繰り返し実施した。

HCG 追注量は PMS 前処置後 72 時間目に投与した場合に 60% 程度の排卵陽性率を示す量で而も PMS 前処置量に関係なく一定とすることが望ましいが、既に報告した通り PMS 10 IU 前処置の場合と 5 IU 以下の前処置の場合とでは HCG 追注による排卵反応に可成りの差があること²⁾から、PMS 10 IU 前処置区に於ては HCG 追注量を 2 IU、それ以外の PMS 前処置量が 5, 2.5, 1.25 IU の実験区では一律に 0.6 IU と定めた。

なおホルモンは各回毎に 0.1 cc の生理食塩液に所要の単位が含まれるように調整し、何れも調整後直ちに 1 匹当り 0.1 cc 1 回皮下注射とした。又排卵の判定方法に関する詳細は既報^{1,2)}の通りである。

実験成績及び考察

各実験区に於ける PMS 前処置からの時間による排卵反応の成績は第 1 表の通りでこれを第 1 図に図示したが何れも各区の平均値による総括である。

これによれば PMS 前処置量が 10 IU の場合には、PMS 前処置後 72 時間で HCG を追注するのが排卵陽性率を高めるのに最も効果的で (95%)、54 時間でも 96 時間でもこれに劣る (75% 及び 64%)。しかし PMS 5 及び 2.5 IU 前処置区では 54 時間目に HCG を追注する方が 72 時間目に追注するより効果的で (5 IU 前処置区では 54 時間目は 42%, 72 時間目は 25%; 2.5 IU 前処置区では 54 時間目は 60%, 72 時間目は 41%)、又 PMS 1.25 IU 前処置区では 48 時間目から 72 時間目にかけての HCG 追注による排卵反応は殆ど変化を示さなかつた (48, 54, 72 時間目でそれぞれ 70, 70, 71%)。なお 2.5 IU 前処置区では反応を平均した場合、48 時間目で 80%, 54 時間目で 60% という排卵陽性率で 48 時間目に於ける HCG 追注反応の方が良いようであるが、

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

On the optimum interval between PMS-priming and HCG administration. SASAMOTO, S. & K. MURAKAMI (Lab. Tomoda Pharm. Mfg., Co.) *Jap. J. Animal Reprod.* 7 (1).

第1表 PMS 前処置量と HCG 追注までの時間による排卵陽性率の変化

PMS (IU)	実験 前処置量 番号	PMS 前処置から HCG 追注までの時間			
		48時間	54時間	72時間	96時間
1.25	I	$7/10$ (3.2) 70.0	$6/9$ (2.9) 66.7	$7/10$ (2.8) 70.0	$1/5$ (0.4) 20.0
	II	—	$6/9$ (5.7) 66.7	$9/9$ (4.7) 100.0	$2/9$ (0.3) 22.2
	III	—	$8/9$ (2.3) 88.9	$8/10$ (2.6) 80.0	$0/10$ 0 (—)
	IV	—	$6/10$ (1.0) 60.0	$4/10$ (1.1) 40.0	—
	平均	$7/10$ (3.2) 70.0	$86/97$ (2.9) 70.3	$28/39$ (2.7) 71.8	$3/24$ (0.2) 12.5
2.50	I	$8/10$ (6.3) 80.0	$8/10$ (3.9) 80.0	$3/10$ (0.6) 30.0	$0/5$ 0 (—)
	II	—	$6/9$ (5.7) 66.7	$3/9$ (1.7) 33.3	$3/10$ (0.7) 30.0
	III	—	$8/9$ (2.3) 88.9	$7/10$ (2.3) 70.0	$2/10$ (0.3) 20.0
	IV	—	$1/10$ (0.3) 10.0	$3/10$ (0.3) 30.0	—
	平均	$8/10$ (6.3) 80.0	$23/38$ (3.5) 60.5	$16/39$ (1.2) 41.0	$5/25$ (0.4) 20.0
5.00	II	—	$5/9$ (9.1) 55.6	$4/10$ (0.6) 40.0	$2/9$ (0.2) 22.2
	III	—	$3/10$ (2.7) 30.0	$1/10$ (1.3) 10.0	$1/9$ (0.1) 11.1
	平均	—	$8/19$ (5.7) 42.1	$5/20$ (1.0) 25.0	$3/18$ (0.1) 16.7
10.00	I	$1/10$ (1.8) 10.0	$7/10$ (15.0) 70.0	$10/10$ (44.5) 100.0	$2/15$ (0.1) 40.0
	III	—	$8/10$ (18.9) 80.0	$9/10$ (30.5) 90.0	$7/9$ (7.1) 77.8
	平均	$1/10$ (1.8) 10.0	$15/20$ (16.9) 75.0	$19/20$ (37.5) 95.0	$9/14$ (3.9) 64.3

PMS: ビーメックス (友田) Lot. No. WJ-1

HCG: Substandard

排卵陽性率: $\frac{\text{排卵動物数}}{\text{使用動物数}} \times 100$

括弧内はその群の平均卵子数を示す。

これは48時間目の成績は僅かに1実験に過ぎず、又これと同時に実験の成績では54時間目でも80%の陽性率を示していたのでこの点に関しては更に実験を追加して比較することとした。

そこで priming としての PMS の適当な前処置量 3 乃至 5 IU²⁾ に近い 2.5 IU が前処置量として妥当か否かをも併せて検討することとし、PMS 2.5 IU 前処置後 48時間目及び54時間目に HCG の graded dose, 0.4, 0.6, 0.9 IU をそれぞれに追注し, graded response が

得られるか否か、及びこれらの反応が48時間目の HCG 追注と54時間目の HCG 追注とでどのような変化があるかを調べた。この成績は第2表及び第2図に示した。これによれば PMS 2.5 IU 前処置でも HCG 0.4 から 0.9 IU にかけて排卵反応が急激に上昇し assay に応用するのに不都合でないこと、及び第2図に明示される通り PMS 追注は48時間目より 54時間目の方が全体として排卵陽性率が向上し、PMS 前処置後48時間から 54時間に

第2表 PMS 2.5 IU 前処置後 48 及び 54 時間に於ける HCG 追注排卵反応の比較

HCG 追注量 IU	0.4	0.6	0.9
HCG 追注までの時間			
48	$1/9$ 11.1% ($1/9$ 0.1)	$8/15$ 53.2% ($78/65$ 5.0)	$9/10$ 90.0% ($201/10$ 20.1)
54	$3/8$ 33.3% ($4/8$ 0.5)	$7/10$ 70.0% ($117/10$ 11.7)	$8/8$ 100.0% ($194/8$ 24.3)

(注) 排卵陽性率 (%) = $\frac{\text{排卵動物数}}{\text{使用動物数}} \times 100$

括弧内は卵子数

かけてなお卵胞は発育し排卵刺激に対してより反応しやすい状態になるものと解せられた。これらの事実から PMS 前処置から HCG 追注までは 54 時間とすることに定めた。

事実上, assay を実施するに当つて PMS 前処置を 9 a.m. に行うと翌々日の 3 p.m. が 54時間目となりここで HCG を追注することとなる。又解剖判定は HCG 投与後 20 時間としてその次の日の 11 a.m. となつて routine work として好都合である。又このようにしてホルモンの注射時刻を一定にすることは LAMOND ら³⁾ の報告している幼若マウスの下垂体前葉機能の diurnal な変動をも併せ考慮すると必要な条件となるものであろう。

ROWLANDS⁴⁾ は幼若ラットに PMS 10 IU 投与後種々の時間間隔で HCG 20 IU を追注し更にこの18時間後に解剖し排卵の有無を調べ、HCG 追注は PMS 前処置後 48 乃至 72 時間が適当であるが 56 時間目が最も良いと報告している⁴⁾。

しかし PMS 前処置量を種々に変化させてこの関係を追究しているものではなく、前処置量と HCG 追注時間の関係についてはふれていない。

勿論著者もこの点について詳細な研究を実施している訳ではなく assay へ応用する為の至適条件を求めることを実験の第一義としているが、PMS 前処置量を変化

第1図 PMS 前処置量と HCG 追注までの時間による排卵反応の変化

させると HCG 追注による排卵反応が若干変化して来る事実は今後検討すべき問題を秘めているように思われる。

又 HCG 追注から解剖排卵判定までの時間を 20 時間と定めたのは、HCG 追注による排卵は追注後 12 時間頃から起り 16 時間では殆ど終了している事実 (未発表) に基くものであり、ZARROW ら⁵⁾ とほぼ同様の成績を得ているが HCG 投与から排卵に到るまでの変化とも併せ別の機会に報告したい。

結 論

幼若雌マウスを PMS で priming し HCG を追注し

て排卵を誘起せしめる反応を HCG assay に応用する為の条件を検討した結果

- (1) PMS 前処置量は 2.5 IU とする。
- (2) Assay すべき HCG を追注するのは PMS 投与後 54 時間目とする。
- (3) Assay の標準方法としては、PMS 前処置は 9 a.m. に、HCG 追注は翌々日の 3 p.m. と定め、解剖判定はその次の日の 11 a.m. からとするのが適当である。

との結論を得た。

(1961. 1. 25 受付)

参 考 文 献

- 1) 笹本 (修) ・村上 (一) ; 本誌, 5, 63, 1959.
- 2) 笹本 (修) ・村上 (一) ; 本誌, 5, 163, 1961. 3) LAMOND, D.R. & A.W.H. BRADEN; *Endocrinol.* 64, 921, 1959. 4) ROWLANDS, I.W.; *J. Endocrinol.* 3, 384, 1944. 5) ZARROW, M.X. *et al*; *Endocrinol.* 63, 748, 1958.

第2図 PMS 2.5 IU 前処置後48及び54時間に於ける HCG 追注排卵反応の比較