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 (IV)

——検定誤差に関する二、三の考察

笹 本 修 司

(友田製薬・試験課)

著者は既に報告して来た如く、幼若雌マウスの誘起排卵反応を HCG の生物学的検定法に応用するに際しては、体重 7.0~9.5 g の幼若雌マウスを用いて¹⁾、あらかじめ PMS 2.5 IU の皮下注射による前処置を行つてから 54 時間後に検定すべき HCG を皮下注射し更に 20 時間を経て動物を解剖し卵管をとり出して排卵の有無を調べる手技を HCG の効果判定の方法とすればよいこと²⁾を明らかにして来た。又この場合の HCG 効果は同一量の HCG を投与した動物中、排卵を認めた動物数を百分率で示してこれを排卵陽性率とすれば、これは HCG 投与量に応じて (0.4~0.9 IU) 急激に上昇することが判明した。

そこで今回はこの HCG 検定法にともなう誤差についてその範囲を推察しようとして試みた。前報¹⁾に於て体重 7.0~10.0 g の幼若雌マウスでも PMS 25 IU 1 回だけの投与で HCG を追注しなくても排卵のみられるものが 8% 程度出現することを認め、HCG を追注した場合の排卵陽性率は低用量群 0.4 IU 投与で平均 25%、高用量群 0.9 IU 投与で平均 85% となることを知つた。勿論この排卵陽性率には HCG を追注しなくとも排卵する可能性のある 8% 程度のものが含まれているから、これを念頭にして何等かの単位表示基準を考える必要があろう。

そこで現行のマウス単位検定法³⁾のような力価表示法を考えることとし、HCG 投与量と排卵陽性率の関係を調べて一応の力価表示法を仮定しこれに基いて検定誤差を推定しようとして試みた。

実 験 材 料

実験動物；市販雑系幼若雌マウスで実験開始時の体重が 7.0~9.5 g のものとしたが一部に 10.0 g のものも含めた¹⁾。

使用ホルモン；PMS はピーメックス (友田) Lot. No.

Bioassay of gonadotrophins by induced ovulatory response in immature female mice (IV) —On the precision of our assay method. SASAMOTO, S. (Lab. of Tomoda Phar. Mfg. Co.), *Jap. J. Animal Reprod.* 8 (3).

WJ-1 を、HCG は Substandard を用いた。

実 験 方 法

実験手技は既報の通りで、幼若雌マウスに午前 9~10 時に PMS 2.5 IU を皮下注射し 54 時間後 (翌々日の午後 3~4 時) に HCG を皮下注射する、更に 20 時間を経て動物を解剖し卵管をとり出しその中の卵子の有無を調べて排卵を判定するものである^{2,4,5)}。

1 回の実験で HCG の注射量を低用量 0.4 IU、中間用量 0.6 IU、高用量 0.9 IU の 3 用量とし、動物数はそれぞれ 10 匹、15 匹、10 匹を原則とし各群の動物の体重の平均がほぼ等しくなるように配分し、群によつて動物の体重が偏らないようにした。

HCG の効果は同一単位を注射した動物のうちで排卵した動物の数を百分率で示しこれを排卵陽性率とした。即ち、

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

である。但し実験中体重の減少を示したものは実験成績から除外した。

実験成績及び考察

実験成績は第 1 表に綜括し第 1 図に示した通りである。この前後 17 回の実験での各回、各用量群に於ける排卵陽性率の単純平均を算出すると、HCG 0.4 IU 群では $22.7 \pm 8.6\%$ 、0.6 IU 群では 54.6 ± 9.2 、0.9 IU 群では $84.7 \pm 5.8\%$ となつた (±以下は 95% 信頼限界を示す)。

さきにも述べた如くこれらの値は何れも HCG を追注しなくても排卵の誘起される可能性のある 8% 程度のものを含んでいると解される訳であるが¹⁾、これらの点も併せてマウス単位検定法³⁾と同様な考え方で処理を進めてみることにする。

先ず低用量群である HCG 0.4 IU 投与群の排卵陽性率をどの程度に見做すべきかについて考えてみる。この群の排卵陽性率の平均は 22.7%、誤差の 95% 信頼限界は 8.6 と算出されるから統計的には各回の排卵陽性率は

第 1 表 HCG 投与量と排卵陽性率との関係

実験番号	対 照 区		H C G 追 注 区					
			0.4 IU 群		0.5 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	$\frac{0}{5}$ 0	0	$\frac{3}{8}$ 37.5	$\frac{4}{8}$ 0.5	$\frac{7}{10}$ 70.0	$\frac{117}{10}$ 11.7	$\frac{6}{6}$ 100.0	$\frac{124}{6}$ 20.7
47	$\frac{0}{5}$ 0	0	$\frac{1}{7}$ 14.3	$\frac{12}{7}$ 1.7	$\frac{5}{10}$ 50.0	$\frac{42}{10}$ 4.2	$\frac{9}{10}$ 90.6	$\frac{163}{10}$ 16.3
48	—	—	$\frac{0}{10}$ 0	$\frac{0}{12}$ 0	$\frac{1}{10}$ 10.0	$\frac{3}{10}$ 0.3	$\frac{8}{10}$ 80.0	$\frac{64}{10}$ 6.4
56	$\frac{1}{9}$ 11.1	$\frac{2}{9}$ 0.2	$\frac{5}{9}$ 55.6	$\frac{17}{9}$ 2.0	$\frac{11}{15}$ 73.3	$\frac{38}{15}$ 2.5	$\frac{7}{10}$ 70.0	$\frac{38}{10}$ 3.8
57	$\frac{0}{9}$ 0	0	$\frac{1}{10}$ 10.0	$\frac{1}{10}$ 0.1	$\frac{9}{15}$ 60.0	$\frac{55}{15}$ 3.6	$\frac{10}{10}$ 100.0	$\frac{144}{10}$ 14.4
58	$\frac{1}{10}$ 10.0	$\frac{3}{10}$ 0.3	$\frac{4}{10}$ 40.0	$\frac{10}{10}$ 2.0	$\frac{8}{15}$ 53.3	$\frac{39}{15}$ 2.6	$\frac{10}{10}$ 100.0	$\frac{57}{10}$ 5.7
59	$\frac{0}{10}$ 0	0	$\frac{2}{10}$ 20.0	$\frac{3}{10}$ 0.3	$\frac{11}{15}$ 73.3	$\frac{76}{15}$ 5.1	$\frac{9}{9}$ 100.0	$\frac{99}{9}$ 11.0
60	$\frac{0}{8}$ 0	0	$\frac{4}{10}$ 40.0	$\frac{20}{10}$ 2.0	$\frac{10}{15}$ 66.7	$\frac{64}{15}$ 4.3	$\frac{8}{10}$ 80.0	$\frac{76}{10}$ 7.6
61	$\frac{0}{10}$ 0	0	$\frac{5}{10}$ 50.0	$\frac{15}{10}$ 1.5	$\frac{4}{9}$ 44.4	$\frac{27}{9}$ 3.0	$\frac{7}{10}$ 70.0	$\frac{43}{10}$ 4.3
62	$\frac{0}{10}$ 0	0	$\frac{3}{10}$ 30.0	$\frac{6}{10}$ 0.6	$\frac{11}{15}$ 73.3	$\frac{52}{15}$ 3.2	$\frac{8}{10}$ 80.0	$\frac{113}{10}$ 11.3
63	$\frac{1}{10}$ 10.0	$\frac{1}{10}$ 0.1	$\frac{1}{10}$ 10.0	$\frac{6}{10}$ 0.6	$\frac{8}{15}$ 53.3	$\frac{31}{15}$ 2.1	$\frac{8}{9}$ 88.9	$\frac{74}{9}$ 8.2
64	$\frac{0}{15}$ 0	0	$\frac{2}{14}$ 14.3	$\frac{3}{14}$ 0.2	$\frac{14}{20}$ 70.0	$\frac{73}{20}$ 3.7	$\frac{13}{15}$ 86.7	$\frac{179}{15}$ 11.9
65	$\frac{0}{9}$ 0	0	$\frac{2}{10}$ 20.0	$\frac{4}{10}$ 0.4	$\frac{7}{12}$ 58.3	$\frac{17}{12}$ 1.4	$\frac{8}{10}$ 80.0	$\frac{65}{10}$ 6.5
66	$\frac{0}{8}$ 0	0	$\frac{1}{9}$ 11.1	$\frac{2}{9}$ 0.2	$\frac{3}{13}$ 23.1	$\frac{13}{13}$ 1.0	$\frac{6}{9}$ 66.7	$\frac{67}{9}$ 7.4
67	$\frac{0}{7}$ 0	0	$\frac{2}{11}$ 18.2	$\frac{2}{11}$ 0.2	$\frac{8}{13}$ 61.5	$\frac{52}{13}$ 4.0	$\frac{5}{7}$ 71.4	$\frac{81}{7}$ 10.1
68	$\frac{0}{8}$ 0	0	$\frac{2}{13}$ 15.4	$\frac{12}{13}$ 1.0	$\frac{5}{13}$ 38.5	$\frac{43}{13}$ 3.3	$\frac{9}{10}$ 90.0	$\frac{109}{10}$ 10.9
69	$\frac{1}{9}$ 11.1	$\frac{26}{9}$ 2.0	$\frac{0}{12}$ 0	$\frac{0}{12}$ 0	$\frac{7}{14}$ 50.0	$\frac{55}{14}$ 3.9	$\frac{12}{14}$ 85.7	$\frac{307}{14}$ 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	$\frac{4}{142}$ 2.8	$\frac{32}{142}$ 0.2	$\frac{38}{173}$ 22.0	$\frac{127}{173}$ 0.7	$\frac{120}{229}$ 56.3	$\frac{697}{229}$ 3.5	$\frac{143}{169}$ 84.6	$\frac{1793}{169}$ 10.6

部分が 22.7+8.6=31.3% 以下であるといえる。しかしこの平均 22.7% には 1 実験での使用匹数が大部分 10 匹以下であるため、HCG を追注しないでも排卵し得る可能性のある 8% 程度のものが偶然全く入らなかったと仮定すると（何故なら当実験での対照は 1 群 10 匹以下で、排卵陽性率は平均 3% 弱であるから）、更にこの 8

% 程度の可能性を含めて HCG 0.4 IU 追注による排卵陽性率は 40% を超えないと見做して差し支えないと考えられる。

一方高用量群である HCG 0.9 IU 投与の場合はどうであろうか。この群の排卵陽性率の平均値は 84.7%、誤差の 95% 信頼限界は 5.8 となるから、反応が悪い場合で

註 印は95%信頼限界を示す

第1図 HCG 投与量と排卵陽性率の関係

も統計的には $84.7 - 5.8 = 78.9\%$ を殆ど下ることにはないと考えられる。又この群に於ても1実験での動物の使用匹数が大部分 10 匹であるが、この中に HCG 追注によらずして排卵を示す可能性のある 8% 程度のものが偶然全部含まれていたものとしても、HCG 0.9IU 追注群での反応は更にこの 8% を差引いた約 70% 以上を示すものと見做してよいと考えられる。

つまり HCG 0.4IU 追注での排卵陽性率が 40% を超えず、又 HCG 0.9IU 追注での排卵陽性率は 70% 以上を示すものと見做される。

第1表に示した 17 回の実験中、この条件に外れるものは No. 56, No. 61, No. 66 の 3 回であり 56 と 61 は低用量群の反応が、66 は全体として反応が悪くその為高用量群の反応が条件を満たさなかつたものである。何れにせよこれら不適格な実験は何れも低用量群か或は高用量群のどちらか一方のみが条件から外れるもので両者が条件を満たさないということではない。これらは更に再び実験を繰返すことによつて適否を決めることとすれば、このような実験例は 2 回連続して発生しないことから適正な判断が可能となるものと解せられる。

それ故幼若雌マウスの誘起排卵反応による HCG 検定に於て「HCG 特定量の 1.5 倍量での排卵陽性率が 70% 以上で、同時にこの HCG 特定量の $1/1.5$ ($2/3$) 倍量での排卵陽性率が 40% を超えないような HCG 量を 0.6 IU とする」ように見做せばよいということになる。これを力価の一応の表示方法として、次にこのような測定方法に伴う誤差について試算してみよう。

この場合、前後 17 回の実験を 1 つの実験と見做した加重平均値について HCG 投与量の対数 (X) と排卵陽性率 (Y) との間の相関、回帰等の計数を算出すれば第 2 表の如くで何れも 5% で有意となつた⁶⁾。

第2表 HCG 投与量と加重平均に基づく排卵陽性率との相関、回帰及び ED_{40} , ED_{50} , ED_{70}

相 関 係 数	0.998*
回 帰 係 数	177.8*
回帰係数の 95% 信頼限界	± 137.5
回 帰 直 線	$Y = 177.8X - 83.9$ $\begin{cases} Y_l = 54.1X + 12.3 \\ Y_h = 301.5X - 179.9 \end{cases}$
ED_{40} (Y=40) ならしめる HCG の最高限界量	0.54 IU
ED_{50} (Y=50) ならしめる HCG の最高限界量	0.58 IU
ED_{70} (Y=70) ならしめる HCG の最低限界量	0.67 IU

* 5% で有意

Y ; 排卵陽性率

X ; ($10 \times$ HCG 投与量) の対数

又この回帰係数の 95% 信頼限界をもとにして排卵陽性率 40% を呈すべき HCG の最高限界値を求めると 0.54IU となり、これを低用量とすれば高用量は $0.54 \times 1.5^2 = 1.22$ IU であるからこれに対する排卵陽性率は明らかに 70% 以上となり条件を満たす、一方排卵陽性率

第2図 HCG 投与量と加重平均に基づく排卵陽性率との関係

(a) プロビット回帰線 (b) ED_{40} , ED_{70} の限界値

70% を示す HCG の最低限界量を求めると 0.67 IU となり、これを高用量とすれば低用量は $0.67 \text{ IU} \times 1/1.5^2 \rightleftharpoons 0.31 \text{ IU}$ となり、これに対する排卵陽性率は明らかに 40% 以下となりさきの条件を満足する (第 2 図参照)。

それ故 0.6 IU と誤定される可き範囲を算出すれば、 $0.67 \times 1/1.5 = 0.45 \text{ IU}$ から $0.54 \times 1.5 = 0.81 \text{ IU}$ となる。即ち 0.6 IU と認められる可能性のある範囲は 0.45 ~ 0.81 IU であるから誤差の幅としては、74.5 ~ 135.0% ($P=0.95$) と推算される。

一般に反応値がこのような陽性率といつた計数で表現される生物反応 (所謂 quantal response) に於ては Probit を用いることによって数値の処理を計量反応と同様ならしめる統計的処理方法が応用され、所謂 ED_{50} 等の算出には probit 法が用いられている⁷⁾。そこで前述の反応値を一応 probit 法によつて統計処理を行い、排卵陽性率を 40% ならしめる HCG 量、70% ならしめる HCG 量及びそれぞれの誤差の 95% 信頼限界を計算すると第 3 表に示す通りとなり probit 回帰線は第 2 図の如くである。これらの数値から前述の条件を満足せしめ、0.6 IU と認められる HCG 量の範囲は、 ED_{70} 値の最低限界 0.67 IU の 1/1.5 倍即ち 0.45 IU から、 ED_{40} 値の最高限界 0.5324 IU の 1.5 倍即ち 0.80 IU と推算され、これは 74.5 ~ 133.1% となる。この値はさきの HCG 投与量の対数と排卵陽性率との間の回帰直線の勾配を検討して得た値とほぼ一致し、これらの統計的処理から誤差範囲は $P=0.95$ で 74 ~ 135% と推察される。

しかしながら、このようにして標準品と比較しないで力価を表示する場合には、動物の使用ホルモンに対する感受性に変化がないことが前提となる。幼若雌マウスの PMS に対する感受性は季節的な原因で変化する⁸⁾ ともいわれ、このような感受性の変動は同一の排卵陽性率を

第 3 表 HCG 投与量と加重平均に基く排卵陽性率の Probit による回帰直線及びこれによる ED_{40} , ED_{50} , ED_{70}

Probit 回帰線	$y = 5.133x + 1.147$
ED_{40} ならしめる HCG 量	0.5028 IU
同上 95% 信頼限界	0.4747 ~ 0.5324 IU
ED_{50} ならしめる HCG 量	0.5632 IU
同上 95% 信頼限界	0.5351 ~ 0.5928 IU
ED_{70} ならしめる HCG 量	0.7125 IU
同上 95% 信頼限界	0.6700 ~ 0.7575 IU

y ; 排卵陽性率の Probit
 x ; $(10 \times \text{HCG 投与量})$ の対数

得るのに必要な HCG 量にも変化を与えるおそれがある。何故なら PMS 前処置量を変化させると排卵陽性率 50% を示すに必要な HCG 量にも変化がみられた⁹⁾ からであり、PMS に対する感受性の差は前処置 PMS 量の変化にも相当し得るからである。

更に CARTER ら¹⁰⁾ は pituitary gonadotrophins を用いての下垂体摘出ラットに於ける排卵誘起実験で、FSH をあらかじめ投与し更に FSH を追注して排卵を誘起させているが、この場合あらかじめ投与する FSH の purity の変化により追注する FSH が同質、同量であつても排卵率及び卵子数に差が生じ、前処置に用いる FSH に ICSH が生物学的単位で 10% の割合に混在すると排卵率及び卵子数は最も高い値を示すことを報告している。この事実は幼若雌マウスの誘起排卵反応に於て前処置に用いる PMS の生物学的性状が Lot によつて異つているかも知れないという可能性及び差があるとすればその幼若雌マウスの卵胞発育に及ぼす微妙な効果の差が追注 HCG の反応にも若干の差異を起さしめる危険性を否定し得ないことを示すものである。

これらの事項を併せ考えると、やはり HCG 検定に際しては何等かの意味で標準品と比較する方法を講ずべきであろう。猶このような計数反応の比較方法としては一般に probit を用いる方法があるが、之等の処理方法に關しては更に将来の検討が必要である。

結 び

現段階に於ては、幼若雌マウスの誘起排卵反応は適当な範囲での HCG 投与量を選べばその 1.5 倍量の差を見分け得る方法であり、HCG 0.4 IU で排卵陽性率が 40% を超えず HCG 0.9 IU で排卵陽性率が 70% 以上を示すような条件を満足する HCG 量を 0.6 IU とすれば、その誤差は $P=0.95$ で 74 ~ 135% となるものと推察される。

而して HCG 検定は最終的には標準品との比較検定が望ましく、この点については更に将来の検討を必要とする。(1962. 6. 5 受付)

文 献

- 1) 笹本 (修); 本誌 7, 151, 1962.
- 2) 笹本 (修)・村上 (一); 本誌 7, 17, 1961.
- 3) 佐藤 (繁)・小野 (元)・星 (冬); 本誌 2, 115, 1957.
- 4) BURDICK, H. O. & R. WHITNEY; *Amer. J. Physiol.* 132, 405, 1941.
- 5) 笹本 (修)・村上 (一); 本誌 5, 63, 1959.
- 6) スネデカー; 統計的方法 (上), 118, 岩波書店.
- 7) 玉置 (文); 推計学の化学及び生物学への応用 (2) p. 30, 南江堂, 1955.
- 8) SANTAMARINA, E. & L. L. JOVEN; *Amer. J. Vet. Res.* 21, 585, 1960.
- 9) 笹本 (修)・村上 (一); 本誌 6, 163, 1961.
- 10) CARTER, F., M. C. WOODS, & M. E. SIMPSON; *Control of Ovulation*, 1, Pergman Press, 1961.