STUDY ON THE MALE HORMONE (VII)
TEST METHOD OF THE MALE HORMONE BY
THE MEASUREMENT OF THE INCREASE
IN WEIGHT OF SEMINAL VESICLES
OF CASTRATED RATS
A NEW RAT UNIT*

A. Ogata and S. Hirano

*From the Department of Pharmaceutical Chemistry, Medical Faculty,
Imperial University of Tokyo.*

(Received October 20, 1934)

There are various test methods of the male hormone, but as a quantitative test the capon comb-growth method is not only the best, but comparatively easy to test, so it is used by many workers. We (1), too, have tested this method to the minutest detail and proposed a new cock unit, which we believe to be most rational, but in this method we use, contrary to the seminal vesicle test, the capon's comb which is the external secondary sexual character so we cannot say this is always a complete method when compared with the test method in which accessory reproductive organs such as seminal vesicles or prostate glands that have close connection with clinical application of the male hormone are used as test object. We have, therefore, carefully examined the conditions of a test method by measurement of increase in weight of seminal vesicles of castrated rats and we propose a dependable new rat unit.

Test method in which seminal vesicles or prostates of castrated rats are employed as quantitative indicators of testicular hormone may be divided into two kinds—cytological test and gravimetric test. Hansen (2) has tested the former fully. But this test gives one not only the trouble in fixation of tissues, staining, etc., but it takes eleven days to test, and moreover, does not produce dependable quantitative results, whilst the gravimetric test is

* We wish to express our sincere gratitude to the Imperial Academy for the support it has given to our study.

much simpler in test technique, so we believe it is the proper test method of the male hormone, if it is accurate.

Korenchevsky (3) tested this method by using many rats, but it took him seven days in his test, and moreover, he proposed a rat unit according to the rate of increase in weight of prostate with seminal vesicles without taking into consideration the relations of the reaction with the dose and the period of injection. We think, therefore, it is not as yet safe to test the hormone by his method. From the reason noted above, we have studied this method by using our highly purified male hormone from testes. (For the preparations refer to our preceding paper).

TABLE 1.

Preparation	Dose of injection mg.	Number of days of injection	Percentage increase in weight of seminal vesicles	Dose of injection which will exhibit the rate of increase of 50%. mg.	Average percentage difference of the dose of injection which will exhibit the rate of increase of 50%
T11	1.483 0.7415	3	271 143	0.274 0.251 } 0.263	± 4.4
S10	3.315 1.6575	3	248 136	0.668 0.609 } 0.639	± 4.6
	3.315 1.6575	2	91 65	1.821 1.275 } 1.548	± 17.6
			(104) (67)	(1.659) (1.237) } 1.448	(± 14.6)
	3.707 1.8535 0.9268	7	846 554 482	0.219 0.167 0.096 } 0.161	+ 36~40

Table 1 shows the summary of experiment which lead us to propose a new rat unit. Now, by way of example, take our preparation S10 and inject it to each of the three groups of castrated rats in different doses of 3.707 mg., 1.8535 mg and 0.9268 mg. respectively, once daily for seven consecutive days and in checking up the average rate of increase in weight of seminal vesicles of each group on the eighth day, we get 846%, 554%, and 482% respectively. In figuring out the doses of injections which will increase the weight by 50%, from these rates of increases and doses of in-

jections given to each group of rats, we get 0.219 mg., 0.167 mg. and 0.096 mg. respectively, and these average 0.161 mg. To express the differences between this average and each figure representing the dose of injection noted above, by per centum against this average (For example, $\frac{0.219-0.161}{0.161} \times 100 = +36.$), it is $+36\% \sim -40\%$. We will call this *the average percentage difference*. The fact that such a large disparity produced in the average percentage difference indicates the percentage increases in weight of seminal vesicles are not in proportionate to the doses of injection. There is a certain limit in the growth of seminal vesicles, so when the injections are continued for a long period such as seven days, the reactions will not be in proportion to the doses of injections, except when the doses are small.

Next, assuming that 3.315 mg. and 1.6575 mg. of S10 are injected to two groups of castrated rats respectively once a day for three days, and in checking up the results on the fourth day, the average percentage difference shows ± 4.6 and the doses are in proportion to the reactions to a degree. As regards other preparation, the T11, in three days' injections the average percentage difference is ± 4.4 , and shows a figure very similar to three days' injections of S10, namely it shows that the reactions are well in proportion to the doses. Again, shortening the period of injection to two days, the average percentage difference is $\pm 17.6\%$ and the result is more worse than that of three days' injections. The reason of this fact is that the susceptibility of each castrated rat to the male hormone varies with the individual, so if the rat which is quick of responding is injected consecutively for two days, will show an ample reaction already in the third day, whilst the rat which is of dull susceptibility, will not exhibit a sufficient reaction in two days' injections. Now, by way of experiment, suppose the injection period is two days and allow a day in order to enable the rat to show an ample reaction, and we examine the weight of seminal vesicles two days after the completion of injections (figures within the parentheses in Table 1.), the average percentage difference is $\pm 14.6\%$, and a slightly better result is obtained

than when measured on the day after injections. In comparing this with the result of injections of three days which is examined on the fourth day, it is more worse. But in this experiment, even if the same amount of identical preparation is injected, the rate of increase in weight of seminal vesicles would be different due to the difference in the lapse of time from the completion of injections and to the time the rat is dissected. In glancing through Table 1, it will be clearly seen that the longer the period of injection is, the lesser the dose of injection is enough to produce the larger rate of increase than in the shorter period of injection.

Table 2 shows more fully the experiment indicated in table 1.

TABLE 2.

Preparation	Dose of injection		Number of days of injection (Once daily)	Number of days elapsed from the time of castration to the time of testing	Weight of seminal vesicles (mg.)		Rate of increase in weight of seminal vesicles %	
	Weight of substance mg.	Volume of injection cc.			Uninjected castrated rats	Injected castrated rats		
S 10	3.707	0.1	7	21	5.0 4.5 5.0 5.5	45.0 58.0 45.5 45.0 43.0	47.3	846
	1.8535	0.1	7	27	5.2 5.2 5.0	30.8 25.3 46.5 31.5	33.53	554
	0.9268	0.05				25.7 35.2 26.0 32.5	29.85	482
	3.315	0.1			3	34	4.7 4.0	17.5 15.5 13.0
	1.6575	0.05	9.8 9.0 12.5	10.4				136
	3.315	0.1	2	37	3.8 4.9 5.1	9.7 8.4 8.2	8.8	91
	1.6575	0.05				7.6 7.8 7.5	7.6	65
	3.315	0.1				(9.4 9.3)	9.4	(104)
	1.6575	0.05				(8.0 7.3)	7.7	(67)
	T 11	1.483	0.1	3	34	4.7 4.0	15.0 16.5 17.5	16.5
0.7415		0.05	9.3 12.5				10.9	148

Based upon the experiments given above, we propose a rat unit as follows :

Take two groups of castrated rats, each group consisting of more than four rats, and different doses of an unknown sample are injected to each group once a day for three consecutive days. On the fourth day, the average weight of seminal vesicles of injected rats is compared with that of uninjected rats to get the rate of increase in weight, and work out the dose of injection which will increase the weight by 50% from the rate of increase in weight of each group and the dose injected to each group, and make the average of two groups *1 rat unit*. For example, 1 rat unit of T11 in Table 1 is 0.263 mg. and 1 rat unit of S10 is 0.639 mg. If the average percentage difference shown at this stage is more than 8, regard it as the reaction is not in proportionate to the dose of injection on account of too large or too small a dose has been injected. Then test it again by changing the dose of injection.

The rats used in this test have been castrated at the same time when they were thirty days old and more than twenty days lapsed after castration.

Seminal vesicles are separated carefully from other tissues and those of each rat are put into a small weighing bottle, stoppered tight and then weighed.

Discussion

The seminal vesicle tests which have been reported heretofore, give no dependable quantitative results, and besides it take long time to test, while it can be tested within 100 hours by our method and at the same time, quantitative results are obtained.

The minute the seminal vesicles are taken out, those of each rat are placed in the weighing bottle and weighed after it is stoppered tight; there is no fear of committing any error caused by the evaporation of water or leaking of any secretion. Therefore, the weight obtained is absolutely accurate.

Korenchevsky (4) says that in testing the activity of unknown sample, if it does not show the rate of increase of 40% should be taken as inactive,

as the maximum percentage difference in weight of prostate with seminal vesicles in each pair of uninjected castrated rats was 34.3%.

In order to avoid any mistake of taking inactive substance for an active substance due to an experimental error, we made the rate of increase of 50 % in weight of seminal vesicles as the criteria for judging the reaction.

The average percentage difference of our seminal vesicle test is only $\pm 4.6\%$, but seeing that it is not necessary to limit strictly the average percentage difference in biological assay, so in working out the rat unit in our tests we decided to limit it to $\pm 8\%$.

The solvent of injection used in our present test is dilute alcohol. Therefore, in the case of oil solution, a special care must be taken in the volume of injection.

Summary

1. We have dealt with the conditions which enable one to test easily the male hormone by the measurement of increase in weight of seminal vesicles of castrated rats.
2. We proposed a new rat unit, which is most rational and dependable.

References

- (1) Ogata, A. and Hirano, S.: J. Pharmaceut. Soc. (Japan) **54**.49 (1934)
- (2) Hansen, J. B.: Endocri. **17**,163 (1933)
- (3) Korenchevsky, V.: Bioch. J. **26**. 2097 (1932)
- (4) Korenchevsky, V.: Bioch. J. **26**, 413 (1932).

R = 結晶の列.

Rp = 針晶.

S = 砂晶細胞.

St = 氣孔.

T = 正方晶系柱狀結晶.

Z = 双晶.

文 獻

- 1) 藥學雜誌 573, 1036.(1929). 藥學雜誌 595, 738.(1931). Arch. d. Pharm. Jahrg, 1931, S. 292. 藥學雜誌 597, 913.(1931). 2) 藥學雜誌 615, 505.(1933). 3) 日本學術協會報告 第8卷, 第3號, 385.(1933). 4) 藥學雜誌 595, 740.(1931). Arch. d. Pharm. Jahrg. 1931 S. 295. 5) 藥學雜誌 573, 1045.(1929). Arch. d. Pharm. Jahrg. 1931, S. 301.

男性ホルモンの研究 (第七報)

去勢ラツテ精囊重量増加による男性ホルモンの検定法

一新ラツテ單位

緒 方 章

平 野 四 郎

(東京帝國大學醫學部藥學科)

(昭和9年10月20日受理)

男性ホルモンの検定法には色々あるが定量的試験法としては去勢雞雞冠試験法が最も優れているのみならず比較的簡単に試験を行ひ得るので最も多くの研究者が此試験法を採用している。故に余等(本誌 54, 351, 1934)も此試験法に就ては既に詳細なる實驗を行ひ最も合理的であると信する一新雞單位を規定した。然し此試験法は試験の對照として第二次性徴である雞冠を用ひるのであるから此ホルモンの臨床的應用に密接な關係と重要な意義を有する生殖器附屬器官である精囊或は攝護腺等を用ふる試験法に比して必ずしも完全なものと云ひ得ない。故に此度余等は去勢ラツテの精囊重量を増加させる方法につき其條件を精査して茲に信賴し得る一新ラツテ單位を規定し得たので之を報告する。

去勢ラツテの精囊或は攝護腺を男性ホルモンの定量試験に用ひる方法を大別すると細胞學的試験及重量試験の二つである。前者に就ては I. B. Hansen (Endo-cri 17, 163, 1933) が詳細なる實驗を行つてゐる。然し組織の固定染色等に手数を要するのみならず試験に 11 日も要し而も結果が定量的でない。然るに後者は前者よりも操作が遙かに簡單であるから其正確率が大きくさへあれば男性ホルモ

ン試験法としては適當なものであると信ずる。

V. Korenchevsky (Bioch J. 26. 2097, 1932) は多數のラツテを使用して重量試験法を實驗したが彼の試験には日數が7日間もかかる上に效力と注射量及注射期間との關係を考慮せず單に攝護腺及精囊の重量増加率によつてラツテ單位を規定してゐる。故に此規定によつて效力を檢定することは未だ安全でないと思ふ。斯る理由により余等はよく精製した余等の辜丸ホルモンを使つて此方法に就て研究して見た。

第 1 表

製品	1回注射量 mg	注射日數 (1日1回注射)	精囊重量増加率 %	増加率50%を與へる 管の1回注射量 mg	増加率50%を與へる管 の注射量の平均差異 %
T.1	1.483 0.742	3	271 148	0.274 0.251 } 0.263	± 4.4
S. 10	3.315 1.658	3	248 136	0.663 0.609 } 0.639	± 4.6
	3.315 1.658	2	91 65 (104) (67)	1.821 1.275 } 1.548 (1.659) (1.237) } (1.448)	± 17.6 (± 14.6)
	3.707 1.854 0.927	7	846 554 482	0.219 0.167 0.096 } 0.161	+ 36~40

第1表は余等が今回一新ラツテ單位を規定するに至つた實驗を總括的に表示したものである。即ち今余等の男性ホルモン製品 S10 を試みに 3 群の去勢ラツテに各群毎に夫々異つた量即ち 1 日 1 回 3.707mg, 1.854mg 及 0.927mg 宛 7 日間繼續して皮下注射し第 8 日目に各群につき平均精囊重量増加率を求めると夫々 846%, 554% 及 482% となり此等の増加率と 1 回注射量とから増加率 50% を與へるべき管の 1 回注射量を算出すると夫々 0.219mg, 0.167mg 及 0.096mg 平均 0.161mg となる。此平均數と各數値との差を此平均數に對する % で顯すと(例へば $\frac{0.219-0.161}{0.161} \times 100 = +36$) +36% ~ -40% となる。平均差異が斯の如く大きい開きを生ずることは精囊重量増加率と注射量とが比例しないことを示している。精囊の大きくなるのには一定の限度があるから、7 日間の如き長期間注射する場合には、1 回注射量が少いときのほかは效力と注射量とは比例しなくなる。

次に S10 の 3.315mg 及 1.658mg を 1 回注射量として夫々 2 群の去勢ラツ

テに3日間注射し第4日目に結果を検すると平均差異が ± 4.6 を示し注射量と効力が非常によく比例する。別の製品 T.11 についても3日間の注射では平均差異が ± 4.4 となり S10 の3日間注射の場合と略々近似の数値を示す。即ち効力が注射量によく比例して顯はれることがわかる。更に注射日数を短縮して2日にすると平均差異は $\pm 17.6\%$ となり3日間の注射の時よりも結果が不良である。其理由は各去勢ラツテのホルモンに対する反應能力は個性によつて相異している

第 2 表

製 品	1 回 注 射 量		注 射 日 数	注 射 全 量 mg	去勢後試 驗迄の經 過日数	精 囊 重 量 mg		精囊重量 増加率%
	物質量mg	注射液cc				對照動物	注射動物	
S 10	3.707	0.1	7	25.949	21	5.0 4.5 5.0 5.5	5.0 45.0 48.0 45.5 45.0 43.0	47.3 846
	1.854	0.1	7	12.978	27	5.2 5.2 5.0	5.13 30.8 25.3 46.5 31.5	33.53 554
	0.927	0.05		6.489			25.7 35.2 26.0 32.5	29.85 482
	3.315	0.1	3	9.945	34	4.7 4.0	4.4 17.5 15.5 13.0	15.3 248
	1.658	0.05		4.974			9.8 9.0 12.5	10.4 136
	3.315	0.1	2	6.630	37	3.8 4.9 5.1	4.6 9.7 8.4 8.2	8.8 91
	1.658	0.05		3.316			7.6 7.8 7.5	7.6 65
	3.315	0.1		6.130			(9.4) (9.3)	9.4 (104)
	1.658	0.05		3.316			(8.0) (7.3)	7.7 (67)
	1.483	0.1		4.449		4.7 4.0	4.4 15.0 16.5 17.5	16.5 271
	0.742	0.05		2.226			9.3 12.5	10.9 148

から反應の鋭敏なものは2日間の注射でも第3日目には既に充分効力が顯はれるに拘らず反應能力の鈍いものに於ては2日間では未だ効力が充分顯はれない爲である。今試みに注射期間を2日とし効力が充分顯はれ得る爲に1日餘裕をおき、注射終了翌々日に精囊の重量を検して見ると(表中括弧内の數字)平均差異は $\pm 14.6\%$ となり注射終了翌日に測定したときよりも幾分良好な結果を得る。然し3日間注射して第4日目に檢した結果と比べると遙に悪い。然し此實驗で同一製品の同量を注射しても注射終了後ラツテを剖見するまでの経過時間の相異によつて精囊重量増加率が違つて來ることがわかる。

第2表は第1表に示した實驗を更に詳細に示したものである。

第1表及第2表を通覽すると注射期間が長い程注射全量は尠くても増加率は却つて大きく顯はれることがわかる。

以上の實驗を基として余等は一新ラツテ單位を次の如く定めることを提議する。4匹以上の去勢ラツテを1群となしその2群に各群毎に檢體量を違へて1日1回づつ3日間繼續して注射し第4日目に注射ラツテの精囊重量を對照ラツテの精囊重量と比較して重量増加率を求め重量増加率と注射量とから重量増加率50%を示すべき筈の1回注射量を各群毎に算出し其平均數を**1ラツテ單位**とする。例へば第1表の T. 11 は1ラツテ單位 = 0.263mg. であり S10 は1ラツテ單位 = 0.639mg である。而して其際平均差異が8以上を示した時は注射量が多過ぎたか或は少なすぎたために注射量と効力が比例しなかつたものと見做し今1回注射量を變更して試験を仕直す。

此試験には生後30日に同時に去勢したラツテを去勢後20日以上経過してから使ふ。

精囊は他の組織から注意して分離し直ちに小さな秤量壺中に1匹分づつ別々に入れ密栓して秤量する。故に秤量の際に水分の蒸發による誤差を生ぜず又分泌物を漏すこともないから秤量は正確である。

從來發表せられている精囊試験は定量的には完全なものがないのみならず試験に長時間を要したのに反し余等の試験法に従ふと100時間以内に檢定することが出來ると共に結果が定量的である。

V. Korenchevsky (Bioch. J. 26. 413. 1932) は去勢ラツテの攝護腺及精囊の重量和の最大差異が34.3%であつたことからホルモンの効力を判定する時に40%

以上の増加率を示さないものは無効とすべきであると云つている。余等は實驗誤差等の爲に無効物を有効物と誤認する惧れのない様に精囊重量増加率 50%を示すものを以て效力判定の標準とした。

余等の精囊試験の平均差異は僅に $\pm 4.6\%$ であるが動物を用ひる検定法としてはそれ程嚴格に限定する必要もないからラツテ單位を求める際平均差異を $\pm 8\%$ まで許容することとした。

余等の今回用ひた注射液は稀アルコール溶液である。故に油溶液の場合には特に注射容量について注意する必要がある。

總 括

1. 男性ホルモンの試験法として用ひられている去勢ラツテ精囊重量増加による試験法を簡單に行ひ得る條件について述べた。
2. 上記の實驗に基き最も合理的で且つ信頼し得る一新ラツテ單位を規定した。本研究には帝國學士院より賜りたる學術研究補助費の一部を充當した。記して厚く謝意を表す。

會 務 報 告

○衛生調査會

昭和9年10月30日午後5時より本會事務所に於て開會左記諸氏出席左記事項に就て協議せられたり

一、牛乳検査法改正に關する件

出席者 委員長 衣 笠 豊

委 員 松 南 千 壽 服 部 健 三 中 西 莊 吉

佐々木 元 加 藤 恭 石 尾 正 文

○衛生調査會

昭和9年11月13日午後5時より本會事務所に於て開會左記諸氏出席左記事項に就て協議せられたり

一、牛乳検査法中改正の件

出席者 委員長 衣 笠 豊

委 員 服 部 健 三 高 木 誠 司 佐々木 元

加 藤 恭 石 尾 正 文 畑 忠 三

松 南 千 壽