175. 伊藤四十二, 青沼 繁, 長崎義一: 臓器製剤の生物学的検定法に
関する研究 (第1報) 脳下垂体後葉製剤の検定法 (その1)

Yosoji Ito, Shigeru Aonuma and Giichi Nagasaki: Bioassay of Hormone
Preparations. I. Assay Method of Posterior Pituitary Lobe Extracts. (1).

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Tokyo*)

脳下垂体後葉子宮緊縮成分の効力検定は現在専ら Dale, Laidlaw¹⁾ 或は Burn-Dale²⁾ の摘出モルモット子宮緊縮反應によつてゐるが、この反應はモルモット子宮の状態により変動が著しく、従つて1回の検定に数匹のモルモットを屠殺しないと正確な結果が得られない場合が多く、そのために多大の労力、時間及び費用を費す欠点がある。また仮りに1回で条件の丁度良い子宮が得られた場合でも誤差が相当大きく、Gaddum³⁾ は標準誤差7.7%と計算し、米英局方でも $\pm 20\%$ の誤差を許容している程である。これは一つには本試験法の依存している生物反應が所謂 graded response に属する反應で、この種類の反應によつて得た測定値の統計的取扱法が現在では未だ完全に進んでいない上に、この反應自体統計的処理が困難であるために動物反應の変動に基く誤差を可及的小くする手段がないことに原因している。これに対して中毒死の場合のような所謂 all-or-none response に基く反應の場合には観測結果の統計的処理が比較的容易であり、またその方法の研究も前者に比して相当進んでいる。そこで本検定法も本来の graded response から all-or-none response に変換することが出来れば、反應の変動に基く誤差を小にすることができるであろうと考えられ且毎回の検定に際して唯1匹のモルモット子宮で済めばなお結構である。カナダの Morrel,⁴⁾ 等は上記の考えから1匹のモルモット子宮から摘出して8小片に分けたものを同時に使つて all-or-none response に変換する方法を考案した。著者等はこの方法を追試しその装置を考案し、結果の取扱い法に若干改良を加えた結果実用され得ることを認めたので茲に報告する。

装置 同時に8子宮片を残生させその収縮を描画するために特殊の tissue chamber と書槓を考案した (第1図参照) tissue chamber は排出口、流入口および酸素導入口をそなえた内容11の薄壁のガラス容器で700 cc

Fig. 1

の劃線を刻しておき、底に金網を敷きこの網の目に、一端にセルフインを結びつけた8本の糸を等間隔に通しこの糸に一定の張を與えておく。tissue chamber 内には van Dyke and Hasting 液 (pH 7.4)⁵⁾ 或は oxygenated Locke-Ringer 液を700 ccの劃線まで充てておき chamber を 37~38° の一定温度に調節した恒温槽中に沈め、chamber 内の栄養液の温度をこの温度に一定に保つ。書槓は8個の滑車を適當の間隔で一直線に並列させて一纏めとした特殊の装置を考案した。先の tissue chamber の底の網を通した糸に結びつけたセルフインとこの書槓から垂らした糸の一端につけたセルフインとで夫々8個の子宮小片をはさみ、書槓の先端をキモグラフィオンの煤紙上に触れさせておく。

子宮片 雌モルモットを撲殺し腹壁を切

* Motofuji-cho, Bunkyo-ku, Tokyo.

1) J. Pharmacol. Exptl. Therap. 4, 75 (1912).

2) Med. Research Council Brit. Special Rep. Ser. No. 69 (1922).

3) Quart. J. Pharm. Pharmacol. 11, 697 (1938).

4) J. Pharmacol. Exptl. Therap. 70, 440 (1940). 5) Am. J. Physiol. 83, 563 (1928).

開して両側の子宮角を切りとる. 各々の子宮角は夫々長経に沿つて縦断し更に中央の部分で横断して1子宮角から4小片, 1匹のモルモットから計8片を得る.

検定操作 子宮片を tissue chamber 中に懸垂し, 子宮片に触れぬように徐々に栄養液中に酸素を通ずる. 標準液或いは検液の注入による子宮片の収縮はキモグラフを回轉させずに3分間続けて煤紙上に描画し, 0.5 cm 以上の収縮直線を描いた場合を陽性 (+) とし, 0.5 cm に達しない場合に陰性 (-) とする. 1 回收縮を起させた後は栄養液を流出し, 同じ温度に加温した新しい栄養液 700 cc で洗い, 更に新しい栄養液 700 cc を充し, 15 分後に次の収縮を起させる.

実験結果から ED_{50} の算出 標準粉末から米局方 13 版の方法に従つて標準溶液を製し, その 50 倍稀釈液 (1 cc 中 0.02 mg 標準粉末対應量を含む) について実験を行つた.

実験例1 モルモット体重 270 g.

50 倍稀釋標準液 cc 数	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.3	1.5
陽性反應 (0.5 cm 以上の収縮) を示した子宮片の数	0	3	3	4	3	5	6	7	8
子宮片總数	8	8	8	8	8	8	8	8	8

この結果から Bliss 法⁶⁾ によつて回帰線方程式を計算すると第2回補正直線の式として $Y=0.58776+5.0417 X$ を得. Chi-squar test により適合試験に合格する. 故にこれより $Y=5.0$ として $X=0.8749$, $\mu=\pm 0.0341$, $\therefore \log ED_{50}=0.8749\pm 0.0341$ 故に Anti-log をとり log dose を 10 倍量として計算したので 1/10 にすると $ED_{50}=0.7497 \text{ cc}\pm 0.0591$ となる. 尙上のデータより算出した provisional-, 1st corrected- 及び 2nd corrected regression line を図示すると第2図の如くなる.

Fig. 2

次に上と同じデータを使つて Behrens-Kärber-Gaddum 法⁷⁾ によつて ED_{50} を計算すると $\log ED_{50}=0.86541$ 従つて $ED_{50}=0.7335 \text{ cc}$ (但し log bose を 10 倍量として計算したため.) また Behrens-Kärber 法⁸⁾ によつて計算すれば $ED_{50}=0.80 \text{ cc}$ を得, Van der Waerden 法⁹⁾ で計算すると $ED_{50}=0.7294 \text{ cc} \pm 0.0544$ を得る.

6) Quart. J. Pharm. Pharmacol. **11**, 192 (1938).

7) Med. Research. Council Brit. Special Rep. Ser. No. **183** (1933).

J. H. Burn: "The biological standardization" (1936).

8) Behrens, Kärber: Arch. exptl. Path. Pharmacol. **162**, 480 (1931), **177** 383 (1935).

Behrens, Hildebrandt: Ibid. **167**, 365 (1932).

9) Van der Waerden: Arch. exptl. Path. Pharmacol. **195** 389 (1940).

実験例2 モルモット体重 305 g

50 倍稀釋標準液 cc 数	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5
陽性反應 (0.5 cm 以上の収縮) を示した子宮片の数	0	2	2	5	6	7	8
子宮片総数	8	8	8	8	8	8	8

Bliss 法により計算すれば第2回補正直線の式として

$$Y = -0.16239 + 5.72934 X$$

を得。この直線は Chi-squar test に合格する。故に $Y=5.0$ として $X=0.90104$, $\mu = \pm 0.0385$

故に $\log ED_{50} = 0.90104 \pm 0.0385$, $ED_{50} = 0.7962$ cc, ± 0.0707 (但し $\log$ dose を 10 倍量として計算したため)

なお Behrens-Kärber-Gaddum 法では 0.7206 cc, Behrens-Kärber 法では 0.85 cc, Van der Waerden 法では 0.7708 cc ± 0.0775 となる。

上例の如くして標準粉末から製した標準溶液及び検体について実験して得た結果から夫々 Bliss 法, Behrens-Kärber-Gaddum 法 (以下 Gaddum 法と略す) 及び Behrens-Kärber 法によつて ED_{50} を計算した結果をまとめると第1表の如くなる。

第 1 表

	モルモット 体 重 (g)	性 週 期 の 状 態	ED_{50} の 値		
			Bliss 法	Gaddum 法	Behrens- Kärber 法
標準粉末より製したる標準溶液	240	diestrus	0.7712 ± 0.0537	0.7599	0.78
	270	〃	0.7197 ± 0.0591	0.7335	0.80
	305	〃	0.7962 ± 0.0707	0.7706	0.85
	平 均		0.7724	0.7580	0.81
	300	estrus	—	0.5018	0.56
	190	〃	—	0.5003	0.51
	300	〃	0.5420 ± 0.0544	0.5013	0.56
	平 均		0.5420	0.5013	0.54
検 体 1	175	陰開口せず	—	1.077	1.10
検 体 2	180	〃	0.8853 ± 0.0623	0.7439	0.90
検 体 3	180	〃	0.5935 ± 0.0516	0.5024	0.65

第1表から3種類の計算法によつて求めた ED_{50} の値を比較すると、Gaddum 法と Bliss 法による計算値は殆んど一致し、Behrens-Kärber 法による結果これらの値と極めて近いが少々大きい値に出ている。なお Van der Waerden による計算値も上述の実験例の如くよく一致する。これらの計算法の内 Bliss 法が最も理論的に正しく、また最も正確な ED_{50} を與えるがその計算法は極めて煩雑である。Gaddum 法は Behrens-Kärber 法を理論的に修正した点で後者に優れてはいるがその根拠とする数理統計学的理論に誤りがあり正確度に於ても Bliss 法の比でなく、また用量のとり方によつて標準誤差の算出ができない大きな欠陥がある。Behrens-Kärber 法は Bliss 法の如き嚴密さは無いにしてもその計算法が至つて簡便な点が長所である。それ故統計学上の本質的意義をわきまえておれば実用的にはわざわざ Bliss 法, Van der Waerden 法によらなくとも Behrens-Kärber 法で計算しても差支えないものと考ええる。

次に従來の Burn 法ではモルモットが diestrus の状態の場合のみ試験が可能で proestrus 或は estrus の状態にあるときは余りに鋭敏で試験を行うことが出来ないという欠点があるが本法では如何なる性週期の状態にあ

つても試験を行うことが出来る長所がある。estrus と diestrus の場合の ED_{50} の差は第1表で見ても分る如く estrus の場合は diestrus に比し ED_{50} の値は常に小さく出る。即ち estrus の場合には子宮筋が鋭敏になつてゐるので、たとえ本法でも diestrus とは異つた値即ちより強力に出ることは致し方がないが、常に標準液と検液とについて同時に試験しさえすれば Burn 法の如く全然試験不能というようなことは無い。現在までに得た経験からすると膈が開口していない未成熟期の子宮の ED_{50} の値は夫々の子宮によりその値の変動が見られる。之を要するに一定の性週期の状態殊に diestrus の場合には常にほぼ一定した ED_{50} の値が得られる。

標準液と検液とについて測定して得た ED_{50} から検体の効力算出法 標準粉末から製した標準原液 (1 cc 中 2 I.U. 含有) は 50 倍に稀釈し (稀釈原液 1 cc 中 0.04 I.U. 含有), 検体が粉末の場合は 1 cc 中 1 mg の検体を含むように溶した液を原液とし之を同じく 50 倍に稀釈する (1 cc 中 0.02 mg 検体粉末含有)。なお標準原液は Burn の如く 10 倍稀釈にしても構わない。次に標準稀釈液と被検稀釈液とについて上記の方法で ED_{50} の値を算出し標準液 1 cc に対応する被検液の cc 数を求め、夫から單位を算出する。

同一検体による本法と Burn 法との比較 同一検体について本法と同時に Burn 法で試験し、両法によつて求めた効力單位の値にどのような開きがあるかを調べたが、一般に本法の方がやや値が小さく出るが殆んど一致した結果を得た (第2表)。なお Burn 法では体重 230~270 g のモルモットを使用した。本法ではモルモットの体重、性週期等には関係なく任意のものを使つた。また検体は牛後葉乾燥粉末から Kamm, Aldrich 法¹⁰⁾ により抽出した粉末を用いた。

第 2 表

試験法 検体の種類	検体 1 mg 当りの單位数 (I.U.)	
	Burn 法	本法 (Behrens-Kärber 法により計算)
A	3.5	3.4
B	4.0	3.9
C	5.0	4.8
D	8.0	7.0
E	10.0	9.0
F	16.5	16.3

本実験は子宮片の總数を 8 本で行つたが更に正確を期す場合には各用量毎に 2 回或は 3 回を行い、子宮總数を 16 本、24 本として実験する。

上述の実験結果から Burn 法に比し本法の方が遙かに優れていることを知つたが、近時外国で盛んに行われている鶏の血圧低下法¹¹⁾ の方が更に優れているように考えられるので、現在鶏の血圧法と本法及び Burn 法との関係につき尙研究続行中である。

東京大学医学部薬学科

Summary

Burn's method used for the estimation of oxytocic activity in posterior pituitary extracts, as modified by Morrell, et al., was examined and found to be very convenient. An apparatus suitable for its carrying out was devised by the authors and it was confirmed that the ED_{50} value of the standard and unknown solutions can be satisfactorily calculated by Behrens-Kärber's method instead of by the complicated Bliss' or Van der Waerden's methods for the routine assay of posterior pituitary preparations.

(Received October 2, 1950)

10) J. Am. Chem. Soc. 50, 573 (1928).

11) Coon, J. M.: Arch. intern. Pharmacodynamie, 62, 79 (1939).