

目 次

報 文	
エビレナミンの検定 (第2報) 国立衛生試験所エビレナミン標準品の力価検定について	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳
インシュリンの薬化学的研究 (第12報) インシュリンの新資源としてのアブラカレイの Stannius 小体の価値について	長沢佳熊, 中山豪一, 池田伝市, 佐藤 浩, 芹沢 淳
インシュリンの薬化学的研究 (第13報) インシュリンのマウスのケイレン法による検定	長沢佳熊, 中山豪一, 芹沢 淳
ジギタリスの検定 (第1報) 標準粉末 (日局標準品) の力価検定について	長沢佳熊, 中山豪一, 越村栄之助, 芹沢 淳, 佐藤 浩, 伊藤 顕, 岡崎正彦
卵胞ホルモンの研究 (第5報) 妊馬尿からのエストロンの簡易製造法	長沢佳熊, 越村栄之助
ペーパクロマトグラフィによるエストロンの定量法 (その1)	越村栄之助, 岡崎精一
卵胞ホルモンの研究 (第7報) 幼若白ネズミの子宮重量増加法による卵胞ホルモン及び糞情物質の検定 (その1)	長沢佳熊, 越村栄之助, 岡崎精一, 黒馬敏子
アヘン産地鑑別法について (第2報) モルヒネ定量値の比較	朝比奈晴世
アヘン産地鑑別法について (第3報) アヘン中のモルヒネ及びコデインの定量	朝比奈晴世, 志内賢彦
アヘン産地鑑別法について (第4報) 主要アルカロイドの定量 (その1)	朝比奈晴世
アヘン産地鑑別法について (第5報) 朝鮮産アヘン (その1) 乾燥原料とモルヒネ含量	朝比奈晴世, 大野昌子, 水町彰吾
アヘン産地鑑別法について (第6報) "Porphyrroxine-Meconidine" の比色定量 (その1)	朝比奈晴世, 水町彰吾
邦産麦角よりの麦角アルカロイド標準物質の製造試験	福島清吾, 伊藤みよ子
バラニトロアニリンに依る PAS 中の MAP の比色定量及び一斉検査成績について	板井孝信, 井下田浩
ビリジンカルボン酸ヒドラジド類のペーパクロマトグラフィについて	板井孝信, 大場琢磨, 神谷庄造
パラ・アミノサリチル酸ナトリウムの比色定量法	喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑
イソニコチン酸ヒドラジドの比色定量法	喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 笠原 閑
塩酸プロカイソ-N-グルコシッドについて (第1報) Frostbite Solution の経時変化	海東常敏, 小林茂子
塩酸プロカイソ-N-グルコシッドについて (第2報) 二つの異性体及びその相互転移について	海東常敏
エフェドリンとクロロホルムの反応に関する研究	伊藤西一, 北川純男
比濁法によるペプシンの定量	山羽 力
血清中の蛋白分解酵素の研究(1) 人プラスミノゲン及びストレプトキナーゼの定量法	朝比奈正人, 岡万千子
血清中の蛋白分解酵素の研究(2) 人血清グロブリン及びストレプトキナーゼによる牛プラスミノゲンの活性化	朝比奈正人, 岡万千子
化粧品規格検査法について (第1報) 化粧品中の鉛並びに砒素の試験法	市川重春, 小幡利勝, 汐見 信
化粧品規格検査法について (第2報) 口紅中の色素の一検査例	市川重春, 南城 実
化粧品規格検査法について (第3報) 化粧品中のクロロフィリンの検査法(試案1)	市川重春, 南城 実
衛生上から見た化粧品の容器について (第1報) 鉛製チューブ中の化粧品の汚染防止	市川重春, 汐見 信

(2)

医薬品中の無機イオンの分離定量法に関する研究(第1報) リンゲル液中のNa⁺, K⁺及びCa⁺⁺の分離定量
 量.....市川重春, 山手 昇, 白井浄二... 139

非水溶液滴定による医薬品の定量(第3報) 氷酢酸を溶媒とするカルボン酸ナトリウム塩類の滴定.....
鹿島 哲, 加納宏一郎... 145

非水溶液滴定による医薬品の定量(第4報) 氷酢酸を溶媒とするピリジンカルボン酸とそのアミド及び
 イソニコチン酸ヒドラジドの滴定.....鹿島 哲... 151

0.5%γ-B.H.C. 油剤のポーラログラフ定量法(エタノール法).....
藤井正道, 佐藤 寿, 辻 楠雄, 菅原 実... 155

医薬品中の水分定量法の研究.....喜谷市郎右衛門, 中島辰巳, 河内敬朝, 伊藤西一, 吉村 淳... 159

食品中デハイドロ酢酸及びその塩類の試験法(第2報) 固体食品中の検出法.....川城 巖, 福沢富美... 161

食品中デハイドロ酢酸及びその塩類の試験法(第3報) 定量法.....川城 巖, 福沢富美... 163

製品検査から見たズルチン夾雑物について.....川城 巖, 福沢富美... 167

食品中のモノフルオール酢酸(殺鼠剤)の検出法.....川城 巖, 大久保敬四郎... 171

(附) 液体食品中のモノクロール酢酸検出法.....川城 巖, 大久保敬四郎... 174

水, 野菜, 果実等のパラチオン試験法.....川城 巖, 江島 昭... 177

肉及び肉製品中亜硝酸の定量について.....野崎泰彦, 川田公平, 久保 章... 181

パンの簡易異物検査法.....野崎泰彦, 宮島弘衛, 清水央子... 191

食品及び薬品の異物検査(I) 新考案の異物抽出装置.....豊田勤治, 持田研秀, 永田 正... 193

食品及び薬品の異物検査(II) 生薬製剤の異物検査.....豊田勤治, 持田研秀, 永田 正... 196

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第3報) 牛乳飲用によるブドウ球菌性食中毒事例.....鈴木 昭... 199

牛乳由来ブドウ球菌に関する研究(第4報) エンテロトキシン(培養濾液)による基礎実験成績.....
八田貞義, 鈴木 昭, 林 富子... 205

ハトムギ黒穂病の防除試験.....平山重勝, 山本昌木, 坂部フミ, 古藤カヨ... 219

野草食糧化の一例——ハマニソクの場合に就いて.....川谷豊彦, 田村良修... 225

ゼラニウム (*Pelargonium denticulatum jacq.*)の生育に及ぼす肥料成分の影響.....宮崎幸男... 231

土壌成分がムラサキオモト (*Rhoeo discolor Hance*)の初期生育に及ぼす影響について(第1報).....
宮崎幸男... 241

土壌水分がムラサキオモト (*Rhoeo discolor Hance*)の初期生育に及ぼす影響について(第2報).....
宮崎幸男... 248

寄生虫殺卵剤の研究(I) 文献の追試及び市販殺虫, 殺菌剤の殺卵力について.....佐渡正四郎... 257

資 料

○ 学校給食用小麦粉強化剤に関する調査.....小川俊太郎, 平岡栄一, 中路幸男... 269

○ 還元性安定剤を含有する市販ビタミンC注射液に関する調査.....小川俊太郎, 平岡栄一, 中路幸男... 273

○ 人造米の化学試験及び異物検査について.....
川城 巖, 藤井清次, 林 敏夫, 宮島弘衛, 渡辺秀子, 原田基夫, 河村正一, 西村千昭... 277

○ 食品の新鮮度保持に関する研究(其の11) 人造米・干麺類などの細菌試験成績.....
 八田貞義, 青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 赤坂京子, 中本ムツ江, 新井秀男, 川浪 昇, 藤波龍恵... 281

○ 地下鉄駅構内空気中塵埃測定結果について.....川城 巖, 浦久保五郎, 佐々木睦江... 285

○ 腸腺についての実験(III) Chromic 腸線の消化性について.....八田貞義, 功刀 博, 石関忠一... 289

○ 公定書収載砒素試験法に関する研究.....喜谷市郎右衛門, 吉村 淳, 守田 実, 奥村恭子... 293

○ 銀錫アマルガム合金の硬化膨脹の測定装置について.....藤井正道, 堀部 隆, 亀田 務... 295

○ 有用植物目録.....川谷豊彦, 石原活磨, 逸見誠三郎... 301

速 報 小麦粉中の2,4-Dの検出.....川城 巖, 大久保敬四郎... 319

抄 録 321

業務報告(昭和28年1月~12月).....総合調整部... 327

インシュリンの薬化学的研究 (第12報)

インシュリンの新資源としてのアブラカレイの Stannius

小体の価値について*

長沢 佳熊, 中山 豪一, 池田 伝市, 佐藤 浩, 芹沢 淳

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 12)

On the Insulin Content of the Stannius' Bodies of "Reinhardtius Maturae Jordan & Snyder"^{*} as a New Source for Insulin Preparations.By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA, Denichi IKEDA,
Hiroshi SATO and Jun SERIZAWA

まえがき 現在我国のインシュリン注射液は著者等の研究¹⁾によるカツオ, マグロなど回遊魚の Stannius 小体を原料として生産されている。魚類のインシュリンを実用化しているのは我国のみであり, これはカツオなどのような漁獲量が多く, カツオブシ, 鱈などの製造時にまとまった臓器の集荷ができるからである。我国のインシュリン需要量は毎年増加し, 現在1年間6000~8000万単位と推定され, その需要を満たすには不足を来し, 新資源を他に求める必要が起つた。

クジラ臓器を原料とする方法も現在企てられているが²⁾, 新鮮な原料の大量の集荷と, 採算上の点で企業化には困難が多い。

著者等は終戦直後当時の Stannius 小体の価格暴騰に対処するために昭和21年3月アブラカレイに着目し, 解剖学的の検索, 漁獲量の調査を行つたが, インシュリン注射液の規格制定と, 国家検査及び検定の実施によつて技術の不完全な多数の製造会社はその生産を中止し, 僅かに3社のみが製造を続けるのみとなり, 一時は原料過剰となつたので著者等は一時この研究を中止したが, 今回前述の必要に迫られて詳細な検討を行うことにしたのである。

原料 昭和27年12月八戸市において採取したアブラカレイの Stannius 小体を原料とした。その鮮度は外観上中程度であり, 魚体の大きさはかなり差があるが, 秤量できなかつた。原料の鮮度や大きさは生産工業上採取できると思ふ程度のものである。

定量的抽出法 著者の方法による (第1表参照)

第1表 Stannius 小体からインシュリンの抽出 (長沢法)¹⁾

Stannius 小体

↓ 飽和ピクリン酸水溶液に浸し実験室に持帰り, 濾過

残 留 物

↓ アセトン抽出

アセトン液

↓ アセトン3~5容量を加え, 濃塩酸数滴を加える。濾過

析 出 物

↓ アセトン, エーテルで洗い乾かす

粗インシュリン (ほとんど白色の粉末)

本法は加熱と濃縮とを避けることが特徴で、従来の Dudley法³⁾, Jensen, Wintersteiner, Geiling法⁴⁾, Best, Jephcott, Scott 法⁵⁾とは趣旨が異なる。なお定量的に抽出するためには、アセトン多量を用いて数回抽出した。かくして得た粗インシュリン粉末はほとんど白色であるが、純度は低い。生産的に抽出製造を行う場合には第2表に示すように収量は低くとも、純度即ち 1mg のインシュリン量の多い方法もある。この粉末が着色するのは原料の鮮度が悪いか又は操作上の不完全によるもので、Dudley 法のように実験室で簡単に減圧濃縮する場合などにも見られる。原料 1mg 中インシュリン 4.5 単位、重量による取得量 70 mg (3.2%), 1尾当り 9 単位, 1g 当り 143 単位、これをきわめて新鮮な原料を用いたトラフグ、ホンマグロの例 (第2表参照) に比して劣るのは、生産上の条件に適するように特にその鮮度を選ばなかつたためである (実験 1 参照)。

第2表 Stannius 小体中のインシュリン含量

魚種 (産地)	全量(g)	数	1個平均 (g)	粗インシュリンの収量 (g)	同収率 (%)	•同単位/mg	1尾当り単位	1g当り単位	研究者
マカツオ (静岡) ※ Katsunus vagans	8.9	120	0.07	0.128	1.4	9.5	10	137	長沢等 ¹⁾ (昭17)
トラフグ (戸畑) Spheroides rubripes	1.09	48	0.023	0.031	2.8	7.7	5	218	長沢等 ⁶⁾ (昭17)
ホンマグロ (森) Thynnus thynnus	0.3	1	0.3	0.013	4.5	5.0	67.5	225	長沢等 ⁷⁾ (昭18)
アブラカレイ (八戸) Reinhardtius matsurae, Jordan & Snyder	2.20	35	0.062	0.07	3.2	4.5	9	143	長沢等 (昭28) (本報告)

単位検定法 標準品は日局インシュリン標準品 (1mg中 21 単位含有) を用いた。予試験として英局 VIII のマウスのケイレン法を採用し、その結果、1mg=5.3 単位であつた (実験 2 参照)。この値は標準品の純度 (1mg=21 単位) と検体の純度 (1mg=約 5.3 単位) との差が大きいこと、マウスのケイレン率 (%) が 8%, 13% という低い値を以て計算していることの 2 点から、検定法としては成立しない (純度にこのような差があるとき、マウス法では一般に 10~30% も差のある値を示すことが知られ、又ケイレン率 15~85% で log 用量とケイレン率が直線関係を示すからである)。然しこの値をとつても大体の目標となり得るから、1mg=5 単位と仮定して日局 VI のインシュリン注射液の定量法⁹⁾に従つて検定した結果は 1mg 中 4.5 単位を含むことを知つた (実験 3 参照)。

生産に関する考察 第3表により、アブラカレイの全国水揚量から計算するとインシュリン 0.6 億単位、実際に原料に供し得るもの 50%、精製インシュリンにしたときの収量 70% と仮定しても、1年間のインシュリン収量 0.21 億単位が得られ、これを我国のインシュリンの現在の生産量 0.6 億単位、需要量 0.8 億単位に対照すると、それぞれの約 1/3 及び 1/4 に相当する。なおアブラカレイは現在肝油源として臓器の採取が行われ、原料の集荷には便宜が多い。

第3表 カレイの漁獲量とインシュリンの生産量 アブラカレイの全国水揚総量

(農林省水産統計課調査, 昭和27年1月~12月)

総量 (kg)	尾数 (1尾600匁 = 2.25kgと仮定した)	インシュリン生産量 (単位)
14 903 515	6 623 784	0.6 億単位

八戸市場統計 (昭和26年1月~12月) 八戸市水揚量

魚種	量 (貫)	魚種	量 (貫)
アブラカレイ	796 050	浅羽 カレイ	29 292
サメ カレイ	243 325	母 カレイ	91 240
宗八 カレイ	54 424	松川 カレイ	6 308
赤 カレイ	18 886	マ カレイ	3 827
沖母 カレイ	53 255	水 カレイ	19 793

なお八戸市だけについて考察すると (第3表参照), アブラカレイ 1尾600匁と仮定し, 1 350 000尾, インシュリン量 1 215 万単位, 精製インシュリン量 850 万単位, その他のカレイを総計し, 1尾200匁平均と仮定し, 1尾から3単位を得るものと仮定して, カレイの総量 520 358貫, 2 600 000尾, 粗製インシュリン780万単位, 精製インシュリン量 550万単位, 総計1 400万単位のインシュリンが八戸市1年間に生産されることとなる。

実験結果 実験 1. 昭和27年12月初旬八戸市においてアブラカレイの Stannius 小体35個を採取し直ちにピクリン酸飽和水溶液に浸す。この原料は肝油製造用として八戸市大木工場が採取したものである。

当所に持参し, 約40日後に (実際の生産に際し, 原料採取から処理までに要する日数と考えた), 取出し, 水をぬぐい去り秤量した。

Stannius 小体を大体, 大型, 中型, 中小型, 小型に分け秤量した成績を次表に示す。

	大 型	中 型	中 小 型	小 型	合 計	平 均 (g)
数 (個)	5	5	15	10	35	
総 量 (g)	0.51	0.36	0.80	0.43	2.1	0.06
平 均 (g)	0.102	0.072	0.06	0.043		

これをすりつぶし, 80%アセトン 35 cc, 35 cc, 15 cc, 15 cc, 95%アセトン 30 cc で合計5回抽出し, 抽出液 125 ccを得, これに95%アセトン 400 ccを加え, 濃塩酸数滴を加え, 析出物を遠心分離し, アセトン及びエーテルで洗い減圧下に乾燥した。かくて得た粗インシュリンの収量: ほとんど白色の粉末 70 mg, 原料からの収率 3.2%。

実験 2. 予試験: マウスケイレン法。

英局⁸⁾による。但し, 1群23匹, マウスの体重: 14~20 g, 試験温度: 33°±0.5°, 注射量: 0.35cc, 試験前2日から食餌にミルクを添加, 試験前日正午から恒温室 (33°±0.5°) に入れ, 午後4時30分から絶食, 試験日は午前11時注射開始, 実験日: 昭和28年1月27日, 少雨。

		1 cc中のインシュリン量	注射後90分のケイレン	
			数	(ケイレン率 %)
標 準 品	高 用 量	0.14単位	11	48
	低 用 量	0.07単位	3	13
検 体	高 用 量	0.02338mg	10	42
	低 用 量	0.01169mg	2	8

この結果はケイレン%が15~85%に包含されないから, その範囲内でのみ用量の log とケイレン%が直線比例するという次式を使うことには疑問があるが, 一応単位の計算を行つた。

以上の成績を次式によつて計算する。

$$M = \frac{d}{c} \times \log \frac{S_1}{S_2} \quad \left[\text{インシュリンの注射量の log と効価 (ケイレン\%)} \right. \\ \left. \text{は正規分布... (直線比例) をするとの理にもとづく} \right]$$

Mは検体及び標準品の力価比の対数

S₁: 標準品の高用量, その平均力価: f₁

S₂: " 低用量, その平均力価: f₂

T₁: 検体の高用量, その平均力価: f₃

T₂: " 低用量, その平均力価: f₄

$$c = \frac{f_1 + f_3}{2} - \frac{f_2 + f_4}{2} \quad d = \frac{f_1 - f_3}{2} + \frac{f_2 - f_4}{2}$$

S₁: 0.14単位, S₂: 0.07単位, T₁: 0.02338mg

T₂: 0.01169mg, f₁: 48, f₂: 13, f₃: 42

f₄: 8.

$M=0.048$, $\text{Antilog}M=1.117$

検液の単位=0.125単位/cc

検体の単位=5.35単位/mg

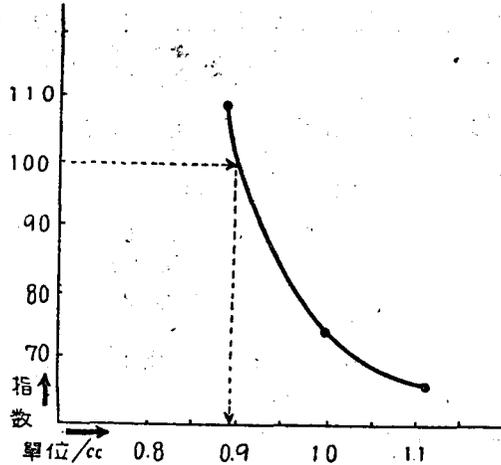
信頼限度を英局VII⁸⁾記述の計算法によつて一応算出したところ、68.4~145% ($P=0.95$)であつた。

実験 3. 検体1mg 中に5単位を含むと仮定し、

日局VI⁹⁾のインシュリン注射液の定量法によつて単位を測定した結果、次図(第1図)に示す成績(本粉末1mg 中 $5 \times 0.9 = 4.5$ 単位含有)を得た。

この研究費の1部は昭和28年度厚生科学研究補助金を使用したことを附記して感謝する。

第 1 図



文 献

- 1) 長沢佳熊: 昭和15年日本薬学会総会講演, 長沢佳熊, 近藤政次郎: 薬学雑誌, 62, 288~291 (昭和17). 長沢佳熊: 日本衛生化学会誌, 15, 73~92 (昭和18).
- 2) 柴田 哲: 九州医学会雑誌, (昭和28).
- 3) I. H. W. Dudley: Bioch. J. 18, 665 (1924).
- 4) H. Jensen, O. Wintersteiner, E. M. K. Geiling: J. pharm. Ex. Therap. 36, 116 (1929).
- 5) C. H. Best, C. M. Jephcott, D. A. Scott: Am. J. physiol. 100, 285.
- 6) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学, 1, 378~379 (昭和17).
- 7) 長沢佳熊, 近藤政次郎: 医学と生物学, 1, 137~140 (昭和18).
- 8) 第八英国薬局方, 816~819 (1953).
- 9) 第六改正日本薬局方(厚生省版), 60 (1951).

Summary

In Japan, the demand for insulin had become so much, increasing year after year that it is necessary to search new source.

The authors prepared insulin powder from the Stannius' bodies of "Reinhardtius matsuurae" in accordance with Nagasawa's method, and assayed the preparation preliminarily by a mouse method and determined its potency by a rabbit method: the former gave 5.35 u./mg, fiducial limits of error 68.4~145% ($P=0.95$), the latter gave 4.5 u./mg. Insulin was prepared at the rate, 9 u./fish or 143 u./g. of the Stannius' body.

From this result, we can use the Stannius' bodies of the fish as a good source for insulin.

Received April 20, 1954

インシュリンの薬化学的研究 (第13報)

インシュリンのマウスのケイレン法による検定

長沢 佳熊, 中山 豪一, 芹沢 淳

On the Pharmaco-chemical Studies of Insulin (No. 13)

Assay of Insulin by a Mouse Convulsion Method

By Kakuma NAGASAWA, Goichi NAKAYAMA and Jun SERIZAWA

インシュリンの力価検定法として家兔の血糖量測定法とマウスのケイレン率測定法は、すでに公式の試験法として日局¹⁾, 米局²⁾では前者を, 国局³⁾, 英局⁴⁾では両者を採用している。これに関する従来の研究は多数あるが、後者に関しては Hemmingsen⁵⁾⁶⁾⁷⁾, Gaddum⁸⁾, Marks⁹⁾等によりlog用量と効力とが平行することが認められて以来、統計学的方法の皆無型の検定法の研究の中心となり、現在では反応率を Probit に変換する方法が一般に行われている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。我国では著者等は昭和27年秋頃より輸入 NPH インシュリン注射液の単位検定に使っている。又昭和28年伊藤, 玉置¹⁸⁾のマウス法による2-2用量検定法, ED50, 3-3用量検定法についての報告があるが、後二者の信頼限界は75.5~132.9%及び62.0~150.0%であり、2-2用量検定法ではg-criterionが大き過ぎるため信頼限界は非常に広くなり、英局の規定を越え、検定成績としては不適当である。この原因は、用量比が大きくその割合に効力差が小さいために用量効力線の傾斜が小さい条件で実験が行われていることと、使用マウス数が少な過ぎるためと思う。

家兔法では動物数が少くてよいこと(12~18匹)、方法が医療目的と同じ血糖降下を目標とすること、交叉試験ができ、検定の精度が高いこと、標準品と検体との純度が著しく異るときでもかなり正確な値が得られること及び変量型検定法を用いることができるという長所がある。その欠点は通例1回の検定に1週間を要すること及び血糖微量測定操作のような特殊技術を必要とすることである。

マウス法の長所は試験を1日で終了でき、同一標準品を用いて、同時に数検体を検定できることであるが、皆無型の反応によるので多数の動物を必要とし、精度もやや劣るという短所がある。経済的には試験を行う土地柄、回数、検体数などによつて、両方法の優劣は連断できない。

著者等はインシュリンの単位検定の予試験及びNPHインシュリン注射液、グロビン・亜鉛・インシュリン注射液の単位検定についてマウスのケイレン法を試み、検定成績の平行性、直線性の検討及びED50の測定も行ったので、その結果を報告する。

実験方法 1. 標準液及び検液の調製: 日局インシュリン標準品(21u/mg)の適当量を精密に秤り、日局規定のインシュリン稀釈液を用いて1cc中20単位を含む溶液を調製し、標準原液とし、検定当日更に上記稀釈液を用いて稀釈し、稀標準液とした。検液はインシュリン粉末のときは、標準液と同様にして調製し、NPHインシュリン、グロビン・亜鉛・インシュリンのときは予め濃塩酸少量を加えて澄明な溶液とし、次いで上記稀釈液で稀釈して調製した。

2. 試験動物: 体重12~25gの雄マウスを用い、各検定では体重差10g以内のマウスを用いた。英局では体重差5g以内としているが、我国の現状では、96匹以上のそのようなマウスを入手することは困難である。食餌は小麦、煮干、野菜を主とし、試験の2日前からミルクを与えた場合もある。

3. 試験条件: 試験前日午後4時に水以外の食餌を去り、換気装置を備えた室温30~35°、湿度30~40%の恒温室(約2坪)に入れ、翌朝体重をgまで秤り、各マウスは、各群の平均体重がほぼ等しくなり、各群中の体重の重いもの、軽いものがほぼ同数となるように群分けした。午前11時~12時から注射を開始する。注射はマウスの背部皮下に0.25cc又は0.35ccずつ行う。1群24匹(合計96匹)の場合の所要注射時間は約5~6分である。注射したマウスは径19cmのガラス円筒内に5~10匹ずつ入れ、竹製スの子で蓋をし、注射終了時から30, 60, 90,

120分間にケイレンを起したマウス数を記録した。ただし計算に採用した観察時間は90分とした。

4. 反応：特有のケイレンを起したマウス及びコンスイ状態となり、背位にしたとき、マウス自身で腹位にもどることのできないものを陽性として数えた。陽性のマウスには直ちに15%ブドウ糖液0.5ccを腹腔内に注射して助け、次の予試験用に供した。

実験結果 1. 一般検定：インシュリン粉末20種、同注射液4種について行つた検定成績をTable 1に示す。インシュリン粉末についてはその純度が低いため、純度の高いインシュリン標準品と比較することは適当でないが、一応実施した。

Table 1. Results of Assay of the Powders and Injections of Insulin (2 and 2 Dose Assay)

No.	Sample	According to B. P. VIII		Unit/mg	Mouse number in group (n)	Remark
		Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)			
1	A	0.89	70~130	6.8	24	△
2	A	0.90	37~1128	7.6	24	
3	B	1.75	55~4438	14.5	20	
4	B	1.00	93~136	10.7	24	
5	B	0.24	56~2288	8.2	24	△
6	C*	1.48	74~165	4.9	24	△
7	D**	0.97	65~145	5.8	23	△
8	D	0.88	63~146	5.3	23	△
9	E	1.01	49~206	5.1	20	
10	F soln.	1.57	69~224	31.4/cc	20	△
11	F soln.	1.66	73~152	31.2/cc	20	△
12	G soln.	1.12	67~180	22.4/cc	20	△
13	H	0.78	71~125	3.9	24	
14	I	0.82	67~130	24.6/cc	24	
15	J	0.73	64~128	1.5/ cc	24	
16	K	0.91	77~130	2.7/ cc	24	
17	L	0.97	76~129	4.9/ cc	24	
18	M	1.11	72~140	1.1/ cc	24	
19	N	1.47	72~235	4.4/ cc	24	
20	O	1.06	80.6~126.7	15.2	20	
21	P	1.27	68~254	5.7/cc	24	
22	Q	0.75	46~132	0.8/cc	24	
23	R	1.15	69~239	1.2/cc	24	
24	S	0.96	80~123	1.0/cc	24	

Note: The temperature of Experiments No. 1~12 is $33^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses 2:1 is adopted.

The temperature of Experiments No. 13~24 is $35^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2:1.2 adopted.

△: The experiment was unsuitable, for the percentage of convulsed mice was either less 15% or over 85%.

*: 4.2 units/mg by the rabbit method.

** : 4.5 units/mg by the rabbit method.

2. NPHインシュリンの単位検定：NPHインシュリン14種について行つた検定成績をTable 2に示す。

注射液は鹽酸でpH約3とし、澄明な液としたものを使った。

Table 2. Results of Assay for NPH Insulin Injection (2 and 2 Dose Assay)

No.	Sample	According to B. P. VIII		Unit/cc	Mouse Number in group	Remark
		Potency ratio (R)	Fiducial limits of error (%)			
1	1605-585703:L40u	1.15	71~153	46	24	
2	2M-11896A*:S40u	0.62	62~144	25	24	
3	3626-585703:L40u	1.18	77~141	47	25	△
4	8153-585913:L40u	0.91	59~113	32	20	△
5	8153-585913:L40u	1.13	77~134	45	20	△
6	6041-585713:L40u	1.12	73~145	45	20	△
7	2077-585316:L80u	0.95	52~180	76	20	
8	7038-585503:L40u	0.86	54~159	34	20	
9	2547-587113:L40u	0.85	64~142	34	23	
10	502039 :T40u	1.20	73~150	48	24	△
11	4332-591103:L40u	1.25	71~197	50	24	
12	2068-597706:L80u	1.11	71~159	89	24	
13	3011-600513:L40u	1.12	76~151	44.8	24	
14	3008-600506:L80u	0.97	66~146	77.6	24	

Note: The temperature of Experiment No. 1-10 is $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2:1 adopted.

The temperature of Experiment No. 11-14 is $35^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses is 2 : 1.2 adopted.

△ The experiment was unsuitable, for the percentage of convulsed mice was either less 15% or over 85%.

* 44 units/cc by the rabbit method.

3. グロビン・亜鉛・インシュリン注射液の単位検定: 本品の単位検定には英局VIII¹⁹⁾では, その英局標準品との比較法を採用し, Stewart, Smart²⁰⁾はモルモットによる持続試験法を報告しているが, 通常のインシュリン標準品を用いてどの程度まで単位の比較検定ができるかを試験した1例を Table 3 に示した.

Table 3. Result of Assay for Globin Zinc Insulin Injection (2 and 2 Dose Assay)

Sample	According to B. P. VIII		Unit/cc	Number of mouse in Group
	Potency ratio (R)	Fiducial limits of error %		
G-283A 40u	0.96	71~138	38	24

Note: The temperature of Experiment is $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, the ratio of doses : 2:1.

4. 実験温度, 用量比及び1群中のマウス数が2-2用量検定の "誤差の信頼限界" に与える影響: 実験温度 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$, 用量比2:1, 1群中のマウス数20~24匹で行った20回以上の実験で得た誤差の信頼限界は, よい例で71.1~134%, 悪い例で55.0~44.38%であった. Table 4 にそのよい例を, 第5表に悪い例を示す.

Table 4. Experiment at 33°C (Dose Ratio is 2:1) (According to B. P. VIII)

Sample	Dose		Number of animals (n)	Number of convulsed animals (r)	Percentage of convulsion P (%)	Probit (Y)	Weight factor (w)
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.047	24	6	25	4.33	0.540
	0.35	0.095	24	16	67	5.44	0.593
Insulin powder from whale	0.35	0.0055mg	24	3	13	3.87	0.395
	0.35	0.0110mg	24	16	67	5.44	0.593

I (log Dose ratio) = $\log 2/1 = 0.3010$, $V = 0.8878$, $b = 4.45$, M (log potency ratio) = $\bar{1}.9483$,
 R (Potency ratio) = $\text{Anti log } M = 0.8878$, $g = 0.169$
 \log (fiducial limits %) = $1.8517 \sim 2.1273$, Fiducial limits of error = $71.1 \sim 134.1\%$ ($P = 0.95$)

Table 5. Experiment at 33° (Dose Ratio is 2 : 1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	u					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.047	20	6	30	4.48	0.576
	0.35	0.095	20	10	50	5.00	0.637
Insulin powder from whale	0.35	0.0057mg	20	9	45	4.87	0.632
	0.35	0.0114mg	20	15	75	5.67	0.540

$I = 0.3010$, $V = 0.0839$, $b = 2.19$, $M = 0.242$, $R = 1.746$, $g = 0.741$

\log (fiducial limits %) = $1.7402 \sim 3.6472$, Fiducial limits of error = $55.0 \sim 4438\%$ ($P = 0.95$)

実験温度 $35^\circ \pm 0.5^\circ$, 用量比 2 : 1, 1 群中のマウス数 20~24 匹で行った実験ではその誤差の信頼限界は、よい例で 73.1~150%, 悪い例で 4.6~127% であった。Table 6 により例を, Table 7 に悪い例を示す。なお後述の Table 9 も参照されたい。

Table 6. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.026	24	13	54	5.10	0.634
	0.35	0.052	24	20	83	5.95	0.455
NPH-Insulin Injection	0.35	0.026	24	12	50	5.00	0.637
	0.35	0.052	24	23	96	6.75	0.194

$I = 0.3010$, $V = 0.0868$, $b = 4.32$, $M = 0.081$, $R = 1.205$, $g = 0.198$

\log (fiducial limits %) = $1.8641 \sim 2.1757$, Fiducial limits of error = $73.1 \sim 149.8\%$ ($P = 0.95$)

Table 7. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J. P. Insulin Standard	0.35	0.026	20	8	40	4.75	0.618
	0.35	0.052	20	13	65	5.39	0.603
NPH-Insulin Injection	0.35	0.026	20	12	60	5.25	0.623
	0.35	0.052	20	14	70	5.52	0.578

$I = 0.3010$, $V = 0.0826$, $b = 1.53$, $M = 0.2091$, $R = 1.618$, $g = 1.509$

\log (fiducial limits %) = $0.6584 \sim 2.102$; Fiducial limits of error = $4.6 \sim 127\%$ ($P = 0.95$)

即ち温度を高くすれば誤差の信頼限界の上・下限の巾が小さくなることを知った。

実験温度 $35^\circ \pm 0.5^\circ$, 用量比 2:1.2, 1 群中のマウス数 24 匹で行った実験では、英局 VII 規定の誤差の信頼限界 80~125% ($P = 0.95$) 内に入る結果が得られた。Table 8 にその結果を示す。

Table 8. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2 : 1.2) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.35	0.42	24	15	63	5.33	0.611
Standard	0.35	0.72	24	21	88	6.18	0.377
J.P. Insulin	0.35	0.35	24	8	29	4.45	0.570
Standard	0.35	0.59	24	23	96	6.75	0.194

$I=0.2219$, $V=0.095$, $b=7.12$, $M=\bar{1}.9775$, $R=0.950$, $g=0.146$

\log (fiducial limit %) = 1.9038~2.0884, Fiducial limits of error = 80.1~122.6% (P=0.95)

1群中のマウス数を52匹として行つた実験結果を Table 9 に示す。

Table 9. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2 : 1.2) (According to B.P. VIII)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.060	52	11	21	4.79	0.500
Standard	0.25	0.100	52	31	60	5.25	0.621
J.P. Insulin	0.25	0.066	52	14	27	4.39	0.581
Standard	0.25	0.110	52	34	65	5.39	0.602

$I=0.2219$, $V=0.0334$, $b=4.64$, $M=0.0366$, $R=1.087$

$g=0.121$, \log (fiducial limits %) = 1.9214~2.0886

Fiducial limits of error = 83.4~122.7%

5. 3-3用量検定 次に同一用量を用い、用量比2 : 1.2, 1群中のマウス数30匹で、実験温度を30°及び35°で行つた3-3用量検定結果をそれぞれ Table 10 及び Table 11 に示す。両表から明かなように30°ではケイレンを起す率が小さく、更に用量の増加をしなければ検定できないが、35°ではよい結果を与えることが分る、Fig. 1 参照)。3-3用量検定の計算法については Gaddum²¹⁾が報告している簡便法によつた。

Table 10. Experiment at 30° (Dose Ratio is 2:1.2)

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.025	30	6	20		
Standard	0.25	0.015	30	0	0		
(I)	0.25	0.009	30	0	0		
J.P. Insulin	0.25	0.0275	30	7	23		
Standard	0.25	0.0165	30	2	7		
(II)	0.25	0.0099	30	0	0		

Table 11. Experiment at 35° (Dose Ratio is 2:1.2) (According to Gaddum)²¹⁾

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J.P. Insulin	0.25	0.025	30	21	70	5.52	0.576
Standard	0.25	0.015	30	12	40	4.75	0.622
I	0.25	0.009	30	6	20	4.16	0.473

Sample	Dose		n	r	%	Y	w
	cc	unit					
J. P. Insulin	0.25	0.0275	31	23	74	5.64	0.548
Standard	0.25	0.0165	30	9	30	4.48	0.576
II	0.25	0.0099	30	7	23	4.26	0.508

$I = \log 2/1.2 = 0.2219$, $V = 0.0594$, $b = 3.11$, $M = 0.006$,

R (potency ratio) = Antilog $M = 1.014$.

Validity test

	Index	Variance	S. D.	t	P
Parallelism	$G = 0.01$	$V = 0.0594$	0.244	0.04	$0.9 <$
Curvature	$H_1 = 0.72$	$6V = 0.3564$	0.597	1.21	0.2~0.3
	$H_2 = 0.18$				0.7~0.8

Errors

$\lambda = 0.322$, $P = 0.95$, $t = 1.96$, $g = 0.12$

Fiducial limits of $M = \bar{1}.9544 \sim 0.0578$

Potency of J. P. Insulin Standard (II) is 101.4 (74.7~138.2) % of expected potency ($P = 0.95$).

Fiducial limits of error = 73.6~136.3%

Table 12も3-3用量検定例である。(Fig. 2参照)

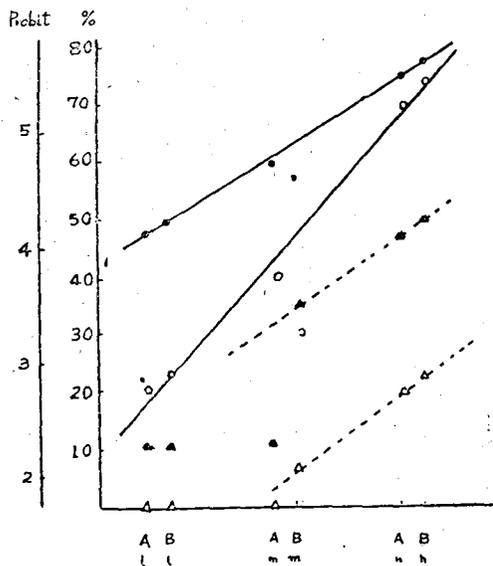


Fig 1. From data of Table 10 and 11

- : Result at 35°
- - - : Result at 30°
- ▲ : Probit ratio
- △ : % ratio

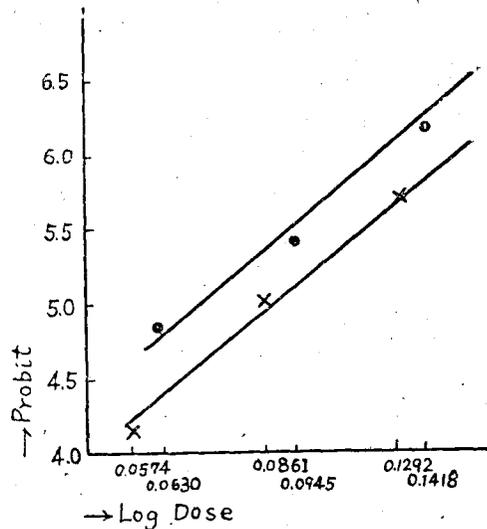


Fig 2. From data of Table 12

- : J. P. Insulin Standard prep. I
- × : " " " " II

Table 12. 3 and 3 Dose Assay

Sample	Dose (r)	r	n	P(%)	Y	Sum	w	n × w	
J. P. Insulin Standard I	0.1418 0.0945 0.0630	22 17 11	25 25 25	88 68 44	6.18 5.47 4.85	16.50	0.377 0.587 0.631	9.425 14.675 15.775	
J. P. Insulin Standard II	0.1292 0.0861 0.0574	19 13 5	25 25 25	76 52 20	5.71 5.05 4.16		14.92	0.529 0.635 0.490	13.225 15.875 12.250

I=0.1761, V=0.076, b=4.09, M=0.1296

R=Antilog M=1.348

Validity test

	Index	Variance	S. D.	t	P
Parallelism	G = -0.11	V = 0.076	0.27	0.41	0.6~0.7
Curvature	H ₁ = 0.09 H ₂ = -0.23	6V = 0.432	0.66	{ 0.14 0.35	0.8~0.9 0.7~0.8

Errors

λ=0.2445, P=0.95, t=1.96, g=0.133

Fiducial limits of M=0.0282~0.2786

Potency of J. P. Insulin Standard (II) is 134.8 (106.7~190.0) % of expected potency ((P=0.95).

Fiducial limits of error = 79.2~140.9%

6. 対数用量と效力線の直線性の検討及び ED50 値とその信頼限界: 日局標準品 6 用量を用い, 実験温度 35° ± 0.5°, 用量比 2 : 1.8, 1 群中のマウス数 25 匹で行った実験資料の分析結果を Table 13 に示す (Fig. 3 参照).

Table 13

Dose (unit)	log Dose × 100 (x)	Number of Mouse (n)	r	P (%)	Empirical Probit	Expected Probit (Y)	nw	y	nwx	nwy
0.0574	0.76	25	5	20	4.16	4.4	13.950	4.18	10.6020	58.3110
0.0630	0.80	25	11	44	4.85	4.6	15.025	4.86	12.0200	73.0215
0.0861	0.94	25	13	52	5.05	5.2	15.675	5.05	14.7345	79.1588
0.0945	0.98	25	17	68	5.47	5.3	15.400	5.46	15.0920	84.0840
0.1292	1.11	25	19	76	5.71	5.9	11.775	5.69	13.0703	66.9998
0.1418	1.15	25	22	88	6.18	6.0	10.975	6.16	12.6213	67.6060
Total							82.800		78.1401	429.1811

1/Snw = 1/82.8 = 0.0120773; \bar{x} = 78.1401/82.8 = 0.9437

\bar{y} = 429.1811/82.8 = 5.1833.

S_{nx^2}
75.3366
73.7425
S_{xx} = 1.5941

S_{nwy}
411.6623
405.0274
S_{xy} = 6.6349

S_{nwy^2}
2255.1569
2224.5954
S_{yy} = 30.5615
27.6155

*
2.9460 ← X²(4).

b = S_{xy}/S_{xx} = 4.1612; V(b) = 1/S_{xx} = 0.6273

The Regression equation is

Y = \bar{y} + b(x - \bar{x}) = 4.162x + 1.356

$$\log ED50 = \bar{x} + \frac{5 - \bar{y}}{b} = 0.8997$$

$$\therefore ED50 = 0.0794 \text{ unit } (=3.78\gamma)$$

$$g = t^2(Vb)/b^2 = \frac{(1.96)^2 \times 0.6273}{(4.1621)^2} = 0.139$$

$$\log \text{ fiducial limits } (g > 0.1) =$$

$$x + \frac{g}{1-g} (x - \bar{x}) \pm \frac{t}{b(1-g)} \sqrt{\frac{1-g}{Snw} + \frac{(x - \bar{x})^2}{Sxx}}$$

$$= 0.8926 \pm 0.059 = 0.8336 \sim 0.9516$$

$$\text{Fiducial limits} = 0.0682 \sim 0.0895u (=3.25 \sim 4.26\gamma)$$

$$\therefore \text{Fiducial limits of error} = 85.9 \sim 119.8\%$$

Note : * As the value of $\chi^2_{(4)}$ ($P=0.95$) does not exceed 9.5, there is no suspicion of non-linearity.

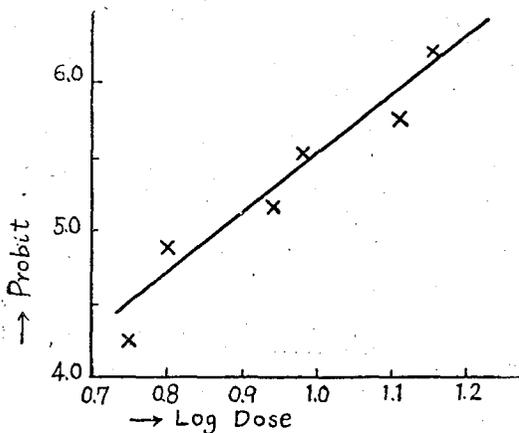


Fig 3. From Data of Table 13

を示す範囲外にあるので、Probit 変換、重み補正をしないで、log 法によつて計算すれば却つて真の値0.83に近い0.89という値が得られる。規定の信頼限界内に入れるためには1群中のマウス数を52匹(合計208匹)に増加すれば、一層容易となる (Table 9参照)。

2. 3-3用量検定を行えば、一層正確な検定ができる。

3. 日局標準品6用量を用いてED50値及びその信頼限界を求めると、ED50=0.0794単位 (=3.78 γ)、信頼限界=85.9~119.8% ($P=0.95$)であつた。

4. 以上の結果からインシュリンの検定、特に予試験として、マウスのケイレン法を採用できることを知った。ただし純度の低い検体では家兎法に比して大きな値を与えるような結果を示すことを注意しなければならない。

文 献

- 1) 日局 (厚生省版), 59. 2) 米局 XIV. 29. 3) 国局. 4) 英局 VIII. 278, 817. 5) A. M. Hemmingsen, A. Krogh : Pubs. League of Nations III, Health, III, C. H. 398 (1926). 6) A. M. Hemmingsen : Quart. J. Pharm. Pharmacol. 6, 39, 187 (1933). 7) A. M. Hemmingsen : Quart. Bull. Health Organisation 5, League of Nations, Geneva, 589 (1936). 8) J.H. Gaddum : Med. Research Council (British) Special Repts. Ser. No. 183 (1933). 9) H.P. Marks, C.k: Quart. Bull. Health Organisation, 5, League of Nations, Geneva, 631 (1936). 10) C.I. Bliss: Ann. Appl. Biol. 22, 134, 307 (1935). 11) H.P. Marks: : Quart. J. Pharm. Pharmacol., 13, 344 (1940). 12) 英局 VIII. 788. 13) J.H. Burn, D.J. Finney,

考察とむすび

1 誤差限界 生物学的検定法では標準品を用いて、それと検体とを比較検定し、標準品の量又は標準品の一定重量で規定された単位によつて検体量又はその効価をあらわす。この際の誤差は従来大体 $\pm 20\%$ 以内のものを検定法として採用するのが通例であつた。近代統計学の適用によつて、現在の目標は、例えば英局VIIIでは一般に誤差の信頼限界=80~125% ($P=0.95$)を要求している。著者等の実験によると、高用量と低用量の比が英局のように2:1では信頼限界内に入ることは困難であるので、その比を2:1.2として、しかも実験温度35°として始めて至適に近い信頼限界が得られる (Table 8)。しかしこの実験ではケイレン率が85%以上である、88%又は96%というような正規分布

L. G. Goodwin: Biol. Standardization, Oxford Univ. Press (1950). 15) D. J. Finney: Statistical Method in Biological Assay, C. Griffin (1952). 15) C. W. Emmens: Principles of Bioassay, Chapman Hall (1948); Hormone assay, Academic Press (1950). 16) C. I. Bliss: Statistics of Bioassay, Academic Press (1952). 17) P. Gyoergy: Vitamin Method II., Academic Press (1951). 18) Y. Ito, B. Tamaoki and H. Sakamoto: Pharm. Bull 1, 236 (1953) 19) 英局 VIII., 819 (1953). 20) G. A. Stewart, J. V. Smart: J. Pharm. Pharmacol., 5, 939 (1953). 21) J. H. Gaddum: J. Pharm. Pharmacol., 5, 345 (1953).

Summary

1. The assays can be carried out within the limits of error 80~125% ($P=0.95$) in a (2 and 2) dose assay when the temperature of the experiments is 35°C, using 24 mice per group (96 mice in all), adopting 2:1.2 of the ratio of doses. If 52 mice per group (208 mice in all) are used, the assay may with ease be carried out within the above-mentioned limits of error. 2. A 3 and 3 dose assay is carried out with more accuracy than a 2 and 2 dose assay. 3. $ED_{50}=0.0794$ units ($=3.78\gamma$) was calculated, from 6 dose levels for J. P. Insulin Standard Preparation (the limits of error is 85.9~119.8%, $P=0.95$). 4. These data showed that the mouse method may be adopted in the assay of insulin, especially as its preliminary test. But it should be remembered that this mouse method gives a higher value than the rabbit method when the samples are in low purity.

In Japan, authors have been assaying imported NPH Insulin Injection by mouse method since 1952. Ito, Tamaoki and Sakamoto¹⁸⁾ reported in 1953 on the mouse method of assaying insulin, but their result is unsatisfactory, for the fiducial limits of error is larger than that of B.P. regulation.

Received April 20, 1954