赤痢ワクチンの力価測定法の研究

中 谷 林 太 郎

国立予防衛生研究所細菌部 (部長 福見秀雄)

〔受付: 7 月 16 日 1956 年〕

ワクチンの有効性を検討するには実験動物により力価および毒性¹⁾を定量的に測定できることが第一に必要である。Batson 等²⁾³⁾は腸チフスワクチンの力価測定法について検討し、免疫ワクチン量の変化の方が攻撃菌量の変化よりもマウスの生残率に与える影響が敏感であるとしている。Bliss⁴⁾, Finney⁵⁾によつて薬剤量-反応の関係を推計学的に処理する方法が確立され、これによつてワクチンの力価測定の場合の解析も従来の方法に比してより定量的に行うことが可能になった。赤痢ワクチンの力価測定法に関してはまだかかる面からは十分に検討されていない。こゝにはマウス感染防禦試験による力価測定法を実験的ならびに推計学的に検討した結果を報告する。

材料および方法

ワクチン: *Shigella sonnei* (Ch) および *Sh. flexneri* 2b (P. R. 10307 B) を用いてそれぞれ単価のワクチンを造つた。製法は M. L. Cooper 等⁶⁾の方法と同一で、60°C30分加熱殺菌法を行つた。免疫注射には 1 ml 中に原液ワクチンの所定量が含まれるように緩衝食塩液で希釈したものを 1 ml ずつ腹腔中に注射した。

マウス: 15 g 前後のマウスを用いた。

攻撃菌液: 攻撃菌株はワクチン製造株と同種の株を用いた。Brain heart infusion (Difco) に 37°C20 時間培養した菌を 10 倍希釈し必要な生菌数を含む菌液を調製した。希釈は 0.3% ムチン (granular Type 1701-W. The Wilson Laboratories, Chicago, Ill., U. S. A.) で行い、*Sh. sonnei* では 0.5 ml 中に、*Sh. flexneri* では 1.0 ml 中に所要菌数が含まれるようにした。菌液中の生菌数はその都度混濁培養法で測定した。攻撃注射は調製後 2 時間以内に完了した。

免疫法および攻撃法: ワクチン希釈液および攻撃菌液はともに腹腔内注射によつた。免疫から攻撃までの期間は 6 日ないし 10 日で、攻撃後 72 時間生死を観察した。

推計学的分析法: 致命率をプロビット変換し、分散分析法⁷⁾によつて実験成績の変動要因の有意性を検討

し、Bliss⁴⁾ および Finney⁵⁾の方法により量-致命率 (または生残率) の回帰式および相対力価とその 95% 信頼限界を算出し実験成績の解析を行つた。分散分析の場合 0 または 100 % の致命率のプロビット値は Bartlett⁸⁾ に従い 1/4 匹が死亡または生残したものとして計算した。

成 績

1 免疫ワクチン量変量法と攻撃菌数変量法の優劣の比較

a. *Sh. sonnei* ワクチンによる検討

Sh. sonnei ワクチン (濃度: 窒素量 9.6 mg/dl) の 8 段階の希釈液で免疫したマウス群を 7 日後 3 段階に希釈した攻撃菌液で攻撃した成績は表 1 a の如くである。こ

表 1 a *Shigella sonnei* ワクチンの成績
(死亡数/総数)

ワクチン量 (ml)	攻撃菌数 ($\times 1.61 \times 10^9$)			合 計
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
1: 10	2/10	0/10	1/11	3/31
1: 40	1/10	3/10	2/12	6/32
1: 160	3/10	3/10	1/10	7/30
1: 640	4/10	3/10	4/12	11/32
1: 2,560	4/10	3/10	1/11	8/31
1: 10,240	7/11	7/10	6/12	20/33
1: 40,960	8/10	8/10	8/12	24/32
1: 163,840	8/10	10/10	10/10	28/30
合 計	37/81	37/80	33/90	107/251

毒 力 対 照

攻撃菌数 ($\times 1.61 \times 10^9$)							
10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	
10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	8/10	

NAKAYA Rintaro: Mouse-Protective Potency Assay of *Shigella* Vaccines. Department of Bacteriology, National Institute of Health. — Jap. J. of Bact., 11 (11), 965-972, 1956.

表 1 b 表 1 a の致命率に対するプロビット値

ワクチン量 (ml)	攻撃菌数 ($\times 1.61 \times 10^3$)			合 計
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
1: 10	4.16	3.04*	3.67	10.87
1: 40	3.72	4.48	4.03	12.23
1: 160	4.48	4.48	3.72	12.68
1: 640	4.75	4.48	4.57	13.80
1: 2,560	4.75	4.48	3.67	12.90
1: 10,240	5.35	5.52	5.00	15.87
1: 40,960	5.84	5.84	5.43	17.11
1: 163,840	5.84	6.96*	6.96*	19.76
合 計	38.89	39.28	37.05	115.22

* 指定値, Bartlett (8) 参照。

表 2 *Shigella sonnei* ワクチンの成績の
分散分析表

要 因	平方和	自由度	不偏分散	F ₀
ワクチン量間	20.291	7	2.899	15.93**
攻撃菌数間	0.355	2	0.178	
残 差	2.746	14	0.182	
合 計	23.392	23		

* 1% の水準で有意。

れをプロビット値に変換したものが表 1 b である。

異った攻撃菌数に対する反応の差および異ったワクチン量に対する反応の差の有意性を分散分析によつて検定した。分散分析表は表 2 の如くである。ワクチン量間には 1% 以下の危険率で有意差が認められるが、攻撃菌数間には有意差がない。

ワクチン量間に何倍の差があれば平均致命率に有意差がみられるかを調べるために次式により平均致命率間の最小有意差を計算した。

$$LS\bar{a} = t_{0.05} \sqrt{\sigma^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)} \quad (1)$$

ここで、 $LS\bar{a}$ は平均致命率間の最小有意差； $t_{0.05}$ 0.05 は残差の不偏分散の自由度をもつ t の 5% 有意水準値； n_1 および n_2 は平均致命率を比較する 2 群におけるマウス群数である。

$$LS\bar{a} = 2.145 \sqrt{0.1213} = 0.75 \text{ プロビット} \quad (2)$$

これだけの致命率の差を生ずるためにはワクチン量間に何倍の差が必要であるかを算定するために表 1 a から Finney の方法により、3 段階の攻撃菌数に対応するワクチン量-致命率に関する回帰式を求めた。共通の回帰

表 3 *Shigella sonnei* ワクチンの成績から
ワクチン量-致命率回帰式を算定した
ときの χ^2 分析

	自由度	平方和	不偏分散
回帰の平行性	2	0.798	0.399
残 差	18	16.120	0.896
合 計	20	16.918	

表 4 有意差のある致命率に対する
ワクチン量の計算値

致 命 率	ワクチン量の計算値	
プロビット	%	ml
3.50	6.7	1: 8.4
4.25	22.7	1: 162.0
5.00	50.0	1: 3,141.7
5.75	77.3	1: 60,901.3
6.50	93.3	1: 1,181,056.1

係数 b は、 $b = -0.5825$ となり、表 3 に示す χ^2 分析から残差項および回帰の平行性がともに有意な χ^2 値を示さないから（いずれも $P > 0.50$ ）、3 本の回帰線は平行しているとみなしうる。

3 段階の攻撃菌数に対する成績をまとめたものから回帰式を求めると

$$Y_T = 2.9629 - 0.5825 X \quad (3)$$

となる。ここで Y_T は致命率の計算値でプロビットで表わされ、 X はワクチン量の対数である。式 2 および 3 から表 4 の如くなる。これから有意差のある致命率を与えるワクチン量間の比率は 19.4 倍すなわち約 20 倍と推定できる。

各攻撃菌数におけるワクチン量-致命率に関する回帰式を求め、さらに相対力価、するわけ ED_{50} 量間の比率とその 95% 信頼限界値から、攻撃菌数が異なる場合に ED_{50} の値にどれだけの差がみられるか、また最小どれだけの差があれば ED_{50} に差があるといえるかを推定してみた。回帰式はそれぞれ

$$Y_3 = 3.0714 - 0.5825 X$$

$$Y_4 = 3.0762 - 0.5825 X$$

$$Y_5 = 2.7643 - 0.5825 X$$

となる。ここで Y_3 、 Y_4 、 Y_5 はそれぞれ攻撃菌数が $(1.61 \times 10^3) \times 10^{-3}$ (1.61×10^3) $\times 10^{-4}$ (1.61×10^3) $\times 10^{-5}$ に対する致命率の計算値（プロビット）で X はワクチン量の対数である。仮に $(1.61 \times 10^3) \times 10^{-3}$ の菌数で

攻撃したときの力価に対する残りの2段階の攻撃菌量の場合の力価の相対力価を求め、それぞれ $M_{3,-4}$, $M_{3,-5}$ で表わし、値を対数で求めると

$$M_{3,-4} = 0.0082 \pm 0.7316$$

$$M_{3,-5} = -0.5272 \pm 0.7178$$

となる。明らかに3段階の攻撃菌数に対して ED_{50} には有意差がなく、いいかえればこの場合攻撃菌数が100倍変化しても ED_{50} には変化がみとめられないといえる。これに反し、ワクチン量間には誤差項から計算した値、すなわち5.89倍、約5.4倍以上の差があれば ED_{50} の値の間に有意差があることが推定できる。

この実験では1群のマウス数は10匹であつたが、理論的に匹数を増せば力価比較がより精密にできることがわかつていたので、他の条件を仮に一定とみなしてマウス数を増加した場合どの程度の力価の差を検出できるかを

計算してみると

1群10匹……5.4 倍の差

1群20匹……3.3 倍の差

1群30匹……2.7 倍の差

1群40匹……2.3 倍の差

を検出できることになる。

b. *Sh. flexneri* 2b ワクチンによる検討

Sh. flexneri 2b ワクチン(濃度: 窒素量 9.0mg/dl) の8段階の希釈液で免疫したマウス群を7日後9段階希釈攻撃菌液で攻撃した成績は表5aの如くである。この一部をプロビット値に変換したものが表5bである。

各攻撃菌数または各ワクチン量に対する反応の差の有意性を分散分析によつて検定した結果は表6に示してある。ワクチン量間および攻撃菌数間にも1%以下の危険率で有意差が認められる。

表 5 a *Shigella flexneri* 2b ワクチンの成績 (死亡数/総数)

ワクチン量 (ml)	攻 撃 菌 数 ($\times 1.70 \times 10^9$)									
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
1: 10	9/10	3/10	3/10	0/10	0/10	0/10				
1: 40	10/10	8/10	2/10	4/10	2/10	1/10				
1: 160	8/10	9/10	7/10	3/10	3/10	1/10	0/10			
1: 640	10/10	9/10	6/10	7/10	3/10	0/10	2/10			
1: 2,560	10/10	10/10	10/10	9/10	8/10	6/10	2/10	0/10		
1: 10,240	10/10	10/10	9/10	10/10	7/10	6/10	4/10	1/10	0/10	
1: 40,960	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	7/10	3/10	4/10	0/3	
1: 163,840	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	4/10	3/10	0/10	
毒 力 対 照	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	2/10	2/10	1/10

表 5 b 表 5 a の致命率に対するプロビット値

ワクチン量 (ml)	攻 撃 菌 数 ($\times 1.70 \times 10^9$)						合 計
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
1: 10	6.28	4.48	4.48	3.03*	3.03*	3.03*	24.33
1: 40	6.96*	5.84	4.16	4.75	4.16	3.72	25.59
1: 160	5.84	6.28	5.52	4.48	4.48	3.72	30.32
1: 640	6.96*	6.28	5.25	5.52	4.48	3.03*	31.52
1: 2,560	6.96*	6.96*	6.96*	6.28	5.84	5.25	38.25
1: 10,240	6.96*	6.96*	6.28	6.96*	5.52	5.25	37.93
1: 40,960	6.96*	6.96*	6.96*	6.28	6.96*	5.52	39.64
1: 163,840	6.96*	5.96*	6.96*	6.96	6.96	6.28	41.08
合 計	53.88	50.72	46.57	44.26	41.43	35.80	272.66

* 指定値, Bartlett (8) 参照。

表 6 *Shigella flexneri* 2b ワクチンの
成績の分散分析表

要 因	平方和	自由度	不偏分散	F。
ワクチン量間	41.340	7	5.906	17.42*
攻撃菌数間	26.349	5	5.270	15.55*
残 差	11.881	35	0.339	
合 計	79.570	47		

* 1%の水準で有意。

ワクチン量または攻撃菌数の有意差をみいだすために、それぞれの場合の平均致命率の最小有意差を式1によつて計算した。

$$mLS\bar{a} = 2.029 \sqrt{0.1130} = 0.68 \text{ プロビット (4)}$$

$$cdLS\bar{a} = 2.029 \sqrt{0.0848} = 0.59 \text{ プロビット (5)}$$

これらの致命率の差を生ずるに必要なワクチン量間の差または攻撃菌数間の差を求めるためにそれぞれに対応する回帰式を求めた。

まず、 $(1.70 \times 10^9) \times 10^{-1} \sim (1.70 \times 10^9) \times 10^{-6}$ の攻撃菌数に対するワクチン量-致命率の回帰式を求めた。

6個の回帰の平行性は表7の χ^2 分析から明らかであるので、これらをまとめた成績から回帰式を算出すると

$$mY_T = 2.9766 - 0.8755 X \quad (6)$$

表 7 *Shigella flexneri* 2b ワクチンの成績から
ワクチン量-致命率回帰式を
算定したときの χ^2 分析

	自由度	平方和	不偏分散
回帰の平行性	5	2.546	0.509
残 差	30	31.621	1.054
合 計	35	34.167	

表 8 有意差のある致命率に対する
ワクチン量の計算値

致 命 率	ワクチン量の計算値
プロビット %	ml
2.95 2.0	1: 0.94
3.64 8.6	1: 5.7
4.32 24.8	1: 34.1
5.00 50.0	1: 204.7
5.68 75.2	1: 1,230.5
6.36 91.4	1: 7,396.5
7.05 98.0	1: 44,464.2

となる。 X はこの場合ワクチン量の対数である。式4および6から表8の値がえられる。したがって有意差のみとめられる致命率がえられるワクチン量間の比率は6.0倍と推定できる。

1: 10~1: 163,840 ml の8段階のワクチン量および毒力対照に対応する攻撃菌数-致命率の回帰式を求めた。9個の回帰は表9の如くて平行性がみとめられるので、まとめた成績から回帰を求めると

$$cdY_T = 8.3174 + 0.6368 X \quad (7)$$

となり、この場合 X は攻撃菌液の希釈倍数の対数を表わす。式5および7から表10の値がえられる。したがって有意差のみとめられる致命率がえられる攻撃菌量間の比率は8.4倍となる。

表 9 *Shigella flexneri* 2b ワクチンの成績から
攻撃菌数-致命率回帰式を算定した
ときの χ^2 分析

	自由度	平方和	不偏分散
回帰の平行性	8	14.207	1.776
残 差	44	42.929	0.976
合 計	52	57.136	

表 10 有意差のある致命率に対する
攻撃菌数の計算値

致 命 率	攻撃菌数の計算値
プロビット %	($\times 1.70 \times 10^9$)
2.64 0.9	0.1214×10^{-8}
3.23 3.8	0.1026×10^{-7}
3.82 11.9	0.8660×10^{-7}
4.41 27.8	0.7311×10^{-6}
5.00 50.0	0.6173×10^{-5}
5.59 72.2	0.5212×10^{-4}
6.18 88.1	0.4400×10^{-3}
6.77 96.2	0.3715×10^{-2}
7.36 99.1	0.3188×10^{-1}

6段階の攻撃菌数のそれぞれに対するワクチン量-致命率の回帰式から、 ED_{50} 量間の比率および95%信頼限界値を求め、攻撃菌量が10倍だけ異なる場合に ED_{50} の間に差がみられるかどうか、また ED_{50} に有意差があるというためには最小有意差はどれだけ必要かを検討した。各回帰式はつぎの通りである。

$$\left. \begin{aligned} IDY_{-1} &= 4.8805 - 0.8755 X \\ IDY_{-2} &= 4.0642 - 0.8755 X \\ IDY_{-3} &= 3.2353 - 0.8755 X \\ IDY_{-4} &= 2.9366 - 0.8755 X \\ IDY_{-5} &= 2.4669 - 0.8755 X \\ IDY_{-6} &= 1.7360 - 0.8755 X \end{aligned} \right\} \quad (8)$$

攻撃菌量が10倍異なる間の相対力価とその95%信頼限界を求めて対数で表わすと,

$$\left. \begin{aligned} IDM_{-1,-2} &= -0.9324 \pm 0.7743 \\ IDM_{-2,-3} &= -0.9467 \pm 0.6524 \\ IDM_{-3,-4} &= -0.3412 \pm 0.5765 \\ IDM_{-4,-5} &= -0.5365 \pm 0.5595 \\ IDM_{-5,-6} &= -0.8349 \pm 0.5592 \end{aligned} \right\}$$

となる。攻撃菌量が10倍変化することにより ED_{50} 量間に有意差がみられる場合とそうでない場合がある。一方、ワクチン量間には、誤差項から計算して 3.6~5.9 倍程度の差があれば ED_{50} の値の差が有意になるものと推定できる。

上と同様に、攻撃菌数-致命率の回帰式から LD_{50} 量間の比率およびその95%信頼限界値を求めて検討した。回帰式は、

$$\left. \begin{aligned} CDY_1 &= 6.1683 + 0.6368 X \\ CDY_2 &= 7.0806 + 0.6368 X \\ CDY_3 &= 7.2740 + 0.6368 X \\ CDY_4 &= 7.6964 + 0.6368 X \\ CDY_5 &= 8.8059 + 0.6368 X \\ CDY_6 &= 8.9182 + 0.6368 X \\ CDY_7 &= 9.3871 + 0.6368 X \\ CDY_8 &= 9.5423 + 0.6368 X \\ CDY_9 &= 10.0925 + 0.6368 X \end{aligned} \right\} \quad (9)$$

となり、 $CDY_1, CDY_2, \dots, CDY_8, CDY_9$ はそれぞれ免疫ワクチン量が 1:10, 1:40, ..., 1:163,840 ml および毒力対照群における致命率の計算値で、 X は攻撃菌液の希釈倍数の対数である。

ワクチン量が4倍異なる間の相対菌数および毒力対照群と1:10 ml のワクチン免疫群間の相対菌数とその95%信頼限界を求めてみるとつぎの通りである。

$$\left. \begin{aligned} CDM_{1,2} &= -1.4327 \pm 0.8808 \\ CDM_{2,3} &= -0.3037 \pm 0.8384 \\ CDM_{3,4} &= -0.6633 \pm 0.8190 \\ CDM_{4,5} &= -1.7423 \pm 0.8272 \\ CDM_{5,6} &= -0.1764 \pm 0.8263 \\ CDM_{6,7} &= -0.7363 \pm 0.8659 \\ CDM_{7,8} &= -0.2437 \pm 0.9117 \\ CDM_{8,9} &= 6.0624 \pm 0.8776 \end{aligned} \right\}$$

これによれば免疫ワクチン量が4倍異なることによって LD_{50} 値間には有意差がある場合とそうでない場合とがあるのがわかる。一方攻撃菌数間には誤差項から計算して、6.6~8.2 倍の差があれば LD_{50} の値の差が有意になると推定される。

式8および9から ED_{50} および LD_{50} を求め、それぞれ各攻撃菌数または免疫ワクチン量に対する関係を図示してみると図1の如くなる。これから攻撃菌数の対数と ED_{50} の対数との間には直線的比例関係が成立し、一方免疫ワクチン量の対数と LD_{50} の対数との間にも比例関係が成立することがわかる。

図1 *Shigella flexneri* 2b ワクチンにおける攻撃菌数と ED_{50} の関係 (●—●), および免疫ワクチン量と LD_{50} の関係 (○—○)
免疫ワクチン量 (ml)

この実験のように致命率が、ワクチン量および攻撃菌数の両方の変動によって変るときには重回帰式によって両方の変動の有効度を表わすことができる⁵⁾。表5aの一部、すなわちワクチン量に関しては1:40~1:10, 240 ml の5段階、攻撃菌液の希釈倍数では 10^{-2} ~ 10^{-6} の5段階をとって重回帰式を求めた。

$$Y = 5.2016 - 0.8248 X_1 + 0.5337 X_2 \quad (10)$$

Y はプロビット致命率の計算値、 X_1 はワクチン量の対数、 X_2 は攻撃菌液の希釈倍数の対数である。この式は図2の如くプロビット平面として示される。

ワクチン量の対数の回帰係数と攻撃菌液希釈倍数の対数の回帰係数の間には有意差がみとめられないが、両方の係数の絶対値の比は1.55となり、たとえばワクチン量が2倍になったときの致命率の変化は等しい効果を与え

図 2 プロビット致命率の計算値, Log ワクチン量, および Log 攻撃菌液希釈倍数の間の関係を表すプロビット平面。●は実験値, 実線は各攻撃菌数におけるワクチン量の変化の効果, 破線は各ワクチン量における攻撃菌数の変化を表す。

表 11 *Shigella flexneri* 2b ワクチンによる免疫期間の比較成績 (生残数/総数)

ワクチン量 (ml)	免 疫 期 間	
	6 日	10 日
1: 640	11/19	19/20
1: 2,560	9/20	16/20
1: 10,240	6/19	12/20
1: 40,960	5/19	6/20
1: 163,840		1/20

るに必要な攻撃菌数は 2.9 倍の変化に相当することが計算され, 傾向としてはワクチン量変量が敏感であることを示している。

2 免疫期間の検討

Sh. flexneri 2b ワクチン (濃度: 窒素量 6.0mg/dl) で免疫したマウス群の中一方は 6 日後に, 他方は 10 日後に 1,000 LD₅₀ の攻撃菌液で攻撃した成績が表 11 および図 3 に示してある。各々の回帰式は

$$Y_6 = 6.520 + 0.480 X \quad (11)$$

$$Y_{10} = 10.331 + 1.291 X \quad (12)$$

となる。

両方の成績から相対力価を求めるときの計算を行って回帰の平行性を調べてみると, χ^2 分析表は表 12 の如くなり, 残差項の χ^2 値は有意でないが, これに対して回帰の平行性の χ^2 値は 1% 以下の危険率で有意となり, したがって両直線は平行でない結論される。このこと

図 3 *Shigella flexneri* 2b ワクチンによる免疫期間の比較実験における免疫ワクチン量—生残率の回帰線。●: 10 日群, ○: 6 日群, 各直線は計算値から画いた。

表 12 *Shigella flexneri* 2b ワクチンによる免疫期間の比較実験からワクチン量—生残率回帰式を求めたときの χ^2 分析

	自由度	平方和	不偏分散
回 帰 の 平 行 性	1	6.706	6.706 *
残 差	5	0.724	0.145
合 計	6	7.430	

* 1% の水準で有意。

は式 13 から t 分布により回帰係数の差の検定を行つても

$$t = \frac{b_{10} - b_6}{\sqrt{V(b_{10}) + V(b_6)}} \quad (13)$$

$$\therefore t = 2.59, \quad n = 7$$

となりやはり有意差がみとめられる。ここで b_{10} , b_6 は式 12, 11 の X の係数で, $V(b_{10})$, $V(b_6)$ はその分散である。

10 日後攻撃群の方が 6 日後攻撃群に比して回帰係数が大となることから, ED₅₀ の誤差範囲は前者の方が遙かに狭くなり, したがって 2 種以上のワクチン間の相対力価を求めるときには 10 日後攻撃法の方が差の検出が鋭敏になると考えられる。

論 議

ワクチンの予防効果をきめるには最終的には人体接種によらねばならないことはもちろんであるが、その前段階としては実験的に力価や毒性を変動の少い値を与える定量的方法によって測定する必要がある。かゝる方法が確定されて、常に一定基準の性状をもつワクチンにより人体接種が施行でき、また製造法の異なるワクチン間の比較検討も可能となる。一方、菌体より抽出した抗原の免疫原性の研究にも役立つと考えられる。

実験動物によるワクチンの力価の測定にあたってまず考慮されねばならないことは動物の種であるが、ウサギを用いてワクチン注射後の血清の凝集素価、マウス感染防禦能などを測定した成績では余り定量的な成績はえられず、もし十分定量化するとすれば数をかなり増加することが不可欠となるから実用的でない。しかるにマウスを用いて感染防禦試験を行うことによって動物数の面の問題がなくなり、また凝集素価測定よりは敏感に定量できる⁹⁾。したがってこゝではマウスの活動性感染防禦試験について検討を試みた。

Sh. sonnei ワクチン、*Sh. flexneri* 2b ワクチンのいずれの成績からも、攻撃菌数の変化が致命率におよぼす効果より免疫ワクチン量の変化の効果が敏感であることが明らかである。したがって力価測定にはワクチン量を変化させ一定菌数で攻撃することが感度を増すわけであり、またこの方法によれば、實際上攻撃菌数をいつも一定にすること、ことに恒常的に LD_{50} を正確に予知することは困難であるという理由からも、攻撃菌数に幾分の変動があつても ED_{50} にはそれ程敏感に影響してこないということがあつて好都合である。

上の2種のワクチンの成績はいずれもそれぞれ単一のワクチンを用い免疫ワクチン量および攻撃菌数を変化して行つた実験からのものであつて、攻撃菌数が異つた場合における同一のワクチンの ED_{50} 量の相対値の95%信頼限界値から、ワクチンの ED_{50} 量の最小有意差を推定したが、これは一般には異つた2種以上のワクチンの力価を比較する場合にそれぞれ数段階に希釈したワクチンで免疫したマウス群を同一攻撃菌数にて攻撃した場合の成績にもあてはめることができると考えられる。このワクチン量変量—一定菌数攻撃法で異種のワクチン間の相対力価を求める解析方法は分散分析による解析方法より感度が高く、またワクチン間の ED_{50} の相対値を直接に計算できることも上の解析結果から明らかであるから、実験成績の解析には相対力価による解析法を用いる方がす

ぐれていると考えられる。なお *Sh. flexneri* 2b ワクチンの成績の一部に関するプロビット平面による解析で、ワクチン量の変化と攻撃菌数の変化の有効度を直接比較した結果からは、両者に有意差をみとめるに至らなかつたのであるが、これから先の各単独の解析からえられた結論が妥当でないと考えよりは、むしろ使用した実験成績が動物数の少いことあるいは繰返し実験を行つていないことなどの点においてかゝる解析法を適用するには不十分であると解釈した方がよいと思われる。

実験に使用する一群のマウス数について *Sh. sonnei* ワクチンの場合に検討した結果から導かれるマウス数を増加すれば精度を増すという結論は当然であろうが、実地上は一群20~30匹を用いれば適當であることを示している。

図1に示した成績から、同一ワクチンでは攻撃菌数を減少するときはえられるワクチン ED_{50} 量も減少し、およびワクチン量を減量するときはえられる LD_{50} 値も小さくなるのがわかるが、これらの関係はそれぞれ対数的比例関係にあつてその変化は図1の各直線にしたがつて実験的に出現する可能性のある十分に広い範囲にわたつて変化することがわかる。これはたとえば免疫ワクチン量変量—一定菌数攻撃法で、同一ワクチンについて別個の実験を行つたとき、仮に攻撃菌数（または毒力）に予知できない変動が起つて他の条件は全く同一に保たれたというような場合が起つたとすれば（このことは実際上しばしば起る）、図1の上方の直線によつて ED_{50} 値の修正をすることが可能であることを示している。また図1の2つの直線の傾斜は上方の実線が緩やかであることから、先にえられた攻撃菌数の変化が ED_{50} 値におよぼす効果が小さいという傾向にあることを表わしている。

免疫後攻撃までの期間が6日間より10日間の方がワクチン量-生残率の回帰式の回帰係数が大きいという結果は、免疫ワクチン量の比較的多いマウス群には6日後ではまだ十分な抗体産生がなされていないことによるのではないかと推論される。またこの結果は実際に測定を行うときには10日後に攻撃するのが ED_{50} 値の精度を高める意味で好都合であることを示している。

結 論

赤痢ワクチンの力価測定法をマウスの活動性感染防禦試験によつて実験し成績の解析を推計学的に検討した。

1 力価測定にはマウスの活動性感染防禦試験が最もすぐれていると考えられる。

2 測定値の精度からみてワクチン量を段階的に変量して免疫し、一定数の攻撃菌で攻撃する方法が、その逆の方法よりすぐれている。

3 成績の解析にはプロビット分析による相対力価を求める方法がすぐれている。

4 免疫期間は6～7日間より10日間の方が精度が高くなる。

本研究にあたり指導を頂いた福見部長に感謝するとともに、種々の指導ならびに協力を頂いた Merlin L. Cooper 博士に感謝の意を表する。また本研究の一部は厚生科学研究費の補助を受けた。

文 献

1) 中谷林太郎： 第3回日本細菌学会関東支部例会

講演，1953年6月27日。

- 2) Batson, H. C. : J. Exper. Med. 90, 233, 1949.
- 3) Batson, H. C., Brown, M. & Oberstein, M. : Pub. Health Rep., 66, 789, 1951.
- 4) Bliss, C. I. : Quart. J. Pharm & Pharmacol., 11, 192, 1938.
- 5) Finney, D. J. : Probit Analysis, Cambridge University Press, 2nd ed., 1952.
- 6) Cooper, M. L. & Keller, H. M. : J. Immunol., 58, 361, 1948.
- 7) Fisher, R. A. : Statistical Methods for Research Workers, Edinburgh, Oliver & Boyd, 10th ed., 1946.
- 8) Bartlett, M. S. : Supp. J. Roy. Statist. Soc., 4, 137, 1937.
- 9) 中谷林太郎：予研伝研学術集談会講演，1953年10月29日。