破傷風毒素および抗毒素の測定方法について

村田 良介 和田 英太郎 久保田 憲太郎

国立予防衛生研究所血清部 (部長 中村敬三博士)

〔受付: 4月23日1956年〕

最近破傷風毒素の抗原的均一性が疑われているが¹⁻³⁾このような問題を取りあげるには厳密な動物試験が必要である。

毒素の定量方法については, Ipsen⁴⁾および Christensen 等⁵⁾の研究がある。彼等は, 毒素の注射量と動物の死亡時間との関係を利用すれば容易に推計学的な取扱いができることをのべた。この両者の関係は一般に曲線であらわされるが⁶⁾, Ipsen⁴⁾は死亡時間を $f(T)$ という函数に変換し, 注射量の対数と $f(T)$ をプロットすれば直線関係が成立することを認めた。彼は, $f(T)$ を次のように定義した。

$$f(T) = \log \left[\left(\frac{kt}{T-t} \right)^{\frac{1}{\alpha}} + 1 \right] \cdots \cdots (1)$$

ここで, T は死亡時間を示し, t, K, α の三つは常数で毒素の種類, 注射方法, 動物の種類, 動物のおかれる環境の温度などで決定される⁷⁾。したがって, 一度 $f(T)$ を計算しておけば, 同一条件で行われるすべての実験に利用することができる。すなわち, 動物の死亡時間を $f(T)$ に変換し, これを注射量の対数とプロットして得られる直線を用いて, 毒素の致死量を計算し, または抗毒素価を定めることができる⁸⁾。

しかし, $f(T)$ を計算するために必要な三つの常数はいろいろな条件によつて異なるために実用的には利用しにくいので, われわれはもつと簡単な方法を検討してみた。

実験方法

破傷風毒素をマウスに注射して, 動物の反応を記録した。

1. 稀釈液: 毒素および抗毒素をすすめるためにはつぎの組成の稀釈液を用いた。

a $N/5Na_2HPO_4$, 4容 + $N/5KH_2PO_4$, 1容

b 生理食塩液

a 液と b 液を 1:3 の割合に混合し, 0.02% にゲラチンを加える。この液の pH は 7.4 となる。

2. 致死量の測定法: 破傷風乾燥毒素を稀釈液にと

かし, いろいろにうすめたものを 0.4 ml ずつマウスの左下腹部皮下に注射した。注射量 (D) をあらわすには γ を用いた。動物の反応としては, 死亡時間を記録した。第1表のデータは $f(T)$ に含まれる常数を計算するために用いたので, できるだけ正確な時間を記録したがこれ以外の実験では3時間ごとに記録した。

実験に用いたマウスは, ddN, SmN および市販雑種の三種で順調に発育しているものを選んだ。マウスの種類による差は殆んど認められなかった⁹⁾。なお頻繁な観察による刺激をなるべく減らすように飼育箱の配置, 採光などに注意した。

3. 抗毒素価の測定法: 抗毒素は L_{+10} レベルで測定した。予備試験できめた試験毒素量に対し, 抗毒素血清を, 10% 間隔で増量して加え, 稀釈液で全量を 4 ml として, 室温に1時間おいてから, マウスの皮下に 0.4 ml ずつ注射し, 前項と同じように観察し3時間ごとに死亡時間を記録した。標準血清と被検血清につき全く同じ実験を行った。

計 算

死亡時間 (T) の代りにその逆数, 対数, $f(T)$ などの response metameter を用いて, これと注射量の対数との関係—とくに直線が得られるかどうかを検討した。推計学的取扱いはすべて Bliss¹⁰⁾ の文献を参照にした。

1. $f(T)$ の計算: Ipsen の $f(T)$ は, いろいろの点で参考になるので, 第1表のデータについて $f(T)$ 中に含まれる常数を計算した。計算法は Ipsen の原著⁴⁾にゆづるが, 体重12~16 g のマウスの皮下に破傷風毒素を注射したときには, $\alpha = 0.4$, $t = 6.31$, $K = 13.6$ が得られた。これらの数値を用いて式 (1) から計算した $f(T)$ の値を第2表に示した。

MURATA, Ryosuke, WADA, Eitaro & KUBOTA, Kentaro: On the standardisation of tetanus toxin and antitoxin. The National Institute of Health. —Jap. J. of Bact., 11 (9), 797-802, 1956.

Table. 1 A. Death time in hours of mice which received tetanus toxin No.10

	Experiment I					Experiment II				
	Dose in r					Dose in r				
	.14	.20	.28	.40	.57	.14	.20	.28	.40	.57
Death time *	95	76	71	49	49	143	90	71	46	46
	144	76	71	71	49	S	113	71	71	46
	144	76	89	71	49	S	113	71	89	46
	144	94	89	71	49	S	113	90	89	46
	144	94	89	71	49	S	113	93	89	46
	144	115	89	71	49	S	113	93	89	71
	144	115	94	71	49	S	136	113	89	71
	167	118	94	71	49	S	136	113	93	83
	167	118	114	89	74					
	S	118	114	89	74					
	S	118	114	89	74					
	S	118	114	114	74					
Median	144	115	91.5	71	49		113	91.5	89	46

Weight of mice: 13~16g in Exp. I and 12~16g in Exp. II.

* S: Survived at the last reading, after 10 days.

Table. 1 B. Death time in hours of mice which received tetanus toxin No.10 (continued)

Exp. VI	Doses in r																	
	.2	.28	.4	.57	.8	1.14	2.0	2.8	4.0	5.7	8.0	20.0	40.0	80.0	400	800	4000	8000
Death time	113	65	49	44.9	39.1	31.5	30.6	26.5	24.8	25.1	20.8	17.7	14.0	11.1	8.3	7.6	6.6	5.9
	137	75	60	47.8	39.1	43.6	33.3	31.7	26.0	25.6	22.1	18.5	17.8	12.8	11.7	7.7	6.7	6.5
	160	75	64	49	39.5	48	35.9	32.4	26.0	29.7	22.1	20.6	17.8	14.5	12.3	8.4	6.8	8.5
	161	78	69	50	44.8	49	37.5	33.5	26.4		22.1	21.2	18.4	14.5	14.1	8.6	6.9	10.9
	165	84	69.5	50	44.8	49.5	37.6	37.3	26.9		22.2		19.2	15.3		9.0	7.4	
	165	90	70	51	45.4	50	44.3		28.3		23.4		20.6	15.4		10.8	9.4	
	185	92	70	51	48.6	51	48.1		29.1		23.6			16.1				
	185	95	72	55	48.7	55	48.6		30.1		24.5			17.8				
	192	99	72	56	49.5	81	52		34.6		24.5			18.6				
	209	101	77	56	50				35.0		24.6			20.5				
	213	102	80	56	50													
	S	113	80	57	51													
	S	113	82	58.5	51.5													
	S	117	83	59	54.5													
	S	117	86	59.5	56													
	S	118	89	60	56													
	S	123	96	66.5	75													
	S	135	97	69	76													
	S	137	99	74	77													
	S	137		78	83													
Median	211	101.5	77	56	50	49.5	37.6	32.4	27.6	25.6	22.8	19.55	18.1	15.35	12.0	8.5	6.85	7.5

Weight of mice: 12~14g

Table 2. Transformation of time,
in hours, into $f(T)$

Time	$f(T)$	Time	$f(T)$	Time	$f(T)$
42	1.00	72	.47	108	.22
45	.93	75	.44	114	.20
48	.85	78	.41	120	.18
51	.80	81	.39	126	.16
54	.74	84	.36	132	.14
57	.69	87	.34	138	.13
60	.63	90	.32	144	.12
63	.59	93	.30	150	.11
66	.55	96	.28	156	.10
69	.50	102	.25	162	.09

2. 用量反応曲線: 第1表のデータにつき, $\log D+1$ を横軸 (X) にとり, 縦軸 (Y) にはいろいろの response metameter すなわち, $\frac{1000}{T}$, $\log T$, $f(T)$ などととりプロットすれば第1図のようになる。 $\log T$ を用いた場合には, 毒素量の少いところで曲っているが, 逆数および $f(T)$ を用いると, 最少致死量附近からかなり長いあいだに亘って直線が得られる。Christensen⁵⁾ によると, 蛇毒に関するデータでは, 逆数を用いると X が増量するにつれて急速に分散が大きくなるといわれているが, 第1表VIのデータでは20γまでの区間は, Xの値の如何にかかわらず分散は均一と見なされる (Bartlettの検定法¹¹⁾ による)。 $f(T)$ を用いたときにはこの範囲は40γまでとなる。

つきに分散の一樣な区間につき分散分析を行ってみると, 逆数でも, $f(T)$ でも用量反応曲線はほぼ直線と見な

Fig. 1. Dosis-response Curves

- △.....Points from Exp. I
-Points from Exp. II
-Coincident points from Exp. I and VI
-Points from Exp. VI in logarithm scale
- ×.....Points from Exp. VI in $f(T)$ scale
-Points from Exp. VI in reciprocal scale

すことができる。第3表には逆数を用いた例を示した。同じ条件で行った実験 I, II, VIの回帰係数, および回帰に関して補正したのちの反応の平均値の間に有意の差が認められない。すなわち三つの独立した実験は一つの直線で表わされる。これらの事実, は直線区間に相当する量の毒素を用いた場合には, 動物の死亡時間を逆数または $f(T)$ に変換して得られた直線によって, 毒素を定量し得ることを示している。

Table 3. Analysis of variance of y after adjustment for regression on x

Nature of variation	D. F.	Sum of squares	Mean square
Between experiments	2	52.4276	26.2138
Regression of y on x	1	9592.1411	9592.1411
Differences of regression coefficients	2	11.7739	5.8870
Within experiments: between doses	11	217.5740	19.7795
Between doses	16	9873.9166	
Within doses	178	1853.7552	10.4144
Total	194	11727.6718	

Calculation was carried out with the reciprocal ($1000 / T$).

Range of doses used in the calculation: 0.2–0.57 γ in Exp. I and II;

0.28–5.7 γ in Exp. VI

Number of mice: 195

3. 致死量の計算： 用量反応曲線が直線になる区間については、

$$Y = \bar{y} + b(X - \bar{x}) \cdots \cdots (2)$$

が成立する。Xは注射量をあらわし、Yは直線上の点、すなわち、各注射量における動物の反応の平均値を示すことになる。したがって、Yをきめれば(2)の直線から注射量(致死量LD50)を算出することができる。また致死量の標準誤差(S E_{LD50})は $\frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{N}}$ で与えられ、信頼限界は $\pm t \times SE$ となる。ここでSは分散分析で求められる誤差項で、Nは動物の総数、tは“student of the t”でSと同じ自由度をもつ。

4. 抗毒素価の計算： このときには試験毒素量が一定で、血清量が変化するので、横軸(X)には血清量の対数をとるほか、計算の方法は毒素の場合と同じである。被検血清の力価Mはつぎの一般式で与えられる。

$$M = \bar{x}_s - \bar{x}_n + \frac{\bar{y}_n - \bar{y}_s}{b} \cdots \cdots (3)$$

ここでXは血清量、yは response metameter $\left(\frac{1000}{T}\right)$ または $f(T)$ を示し、S, u はそれぞれ標準血清、被検血清の価を意味す。血清量をあらわすのに、標準血清については実際に動物に注射された単位、被検血清については ml を用いれば、Mは被検血清 1 ml 中の単位を示す(いずれも対数)。またMの誤差は

$$SE_M = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{N_n} + \frac{1}{N_s} + \frac{(\bar{y}_n - \bar{y}_s)^2}{B_c^2 - s^2 t^2}} \cdots \cdots (4)$$

で与えられる。Nは動物の数、 B_c^2 は共通の傾斜による分散を意味する。 $\frac{(\bar{y}_n - \bar{y}_s)^2}{B_c^2 - s^2 t^2}$ がマイナスになるような場合には、その検定が不正確であることを示す。通常この項は非常に小さいので省略しても大きい影響がない。

実験成績

1. 致死量LD50： 実験I, II, VIについては次の式が得られた。

$$Y = 21.8896 + 20.3434 \times (\text{逆数})$$

$$\text{または、 } Y = 0.8650 + 0.9870 \times (f(T))$$

最少致死量として 120時間以内に半数の動物を殺す量をとると、Yは8.33(逆数)および0.18($f(T)$)となる。これらの値を用いて、上の式および分散分析の結果(第3表)から、最少致死量およびその誤差を計算すると、逆数の場合には $T: 3336 \pm 0.0303$, $f(T)$ のときは $T: 30605 \pm 0.0299$ となり両方法による計算値がよく一致する。この毒素(No. 10)の致死量を約 $T: 30$ 即ち 0.2γ とすると、第1図より直線公式を使用できる範囲は 100(逆数)および 200($f(T)$)致死量までとなる。この

様にして数種の毒素を測った値を第4表に示してあるが、逆数を用いても、 $f(T)$ を用いても量少致死量には殆んど差が認められない。

Table 4. Results of the titration of tetanus toxin

Toxin	Number of mice	LD ₅₀ calculated by	
		Reciprocal	f (T)
17	40	.196 r ± 11.5%	.187 r ± 11.1%
19	40	.072 ± 12.9	.072 ± 12.8
20	70	1.290 ± 13.9	1.330 ± 13.8
21	40	.032 ± 9.5	.033 ± 9.4
22	60	.108 ± 10.0	.108 ± 10.2
Mean of the error when N=40		13.7 %	13.7 %

Weight of mice: 15—17 g

最少致死量の誤差も両方法による計算値がよく一致する。体重15—17 gのマウスを用いたときの誤差の平均をとると、N=40のときに致死量の信頼限界(P=0.99)は ± 0.05887 となる。すなわち、40匹のマウスを用いて最少致死量を測定したときの誤差は、100回の実験中99回は $\pm 13.7\%$ のうちに入ることができる。

2. 抗毒素価： 計算の実例は第5表に示した。また数種の血清を予研の標準血清に対して測定した成績を第6表に示した。これらのデータでは標準血清と被検血清の傾斜は常に並行で、特別の障害を認めなかった。ここでも前項と同様に、逆数でも $f(T)$ でも同じような成績が得られた。

現在破傷風抗毒素の検定に用いている試験毒素(陸三株)を用いて、体重15—17 gのマウスを用い、 $N_s = N_n = 30$ とすれば、力価の信頼限界(P=0.99)は ± 0.02613 となる。すなわち、標準血清および被検血清につき各30匹づつの動物を用いて、上述の方法で抗毒素価を測定したときの誤差は、100回の実験中99回は $\pm 6.2\%$ の範囲に入るといえる。

考 察

以上のべたように、注射量と動物の死亡時間との関係を利用すれば、簡単な推計学的手続きで最少致死量または抗毒素の単位を正確に計算することができる。推計学的手続きを簡単にするために、死亡時間をその対数、逆数、および Ipsen の $f(T)$ などに変換して注射量の対数に対しプロットする。死亡時間の対数を用いると、用量反応曲線が直線になる範囲が狭いが、逆数、 $f(T)$

Table 5. Example of antitoxin titration

	Dose of standard antitoxin in unit				Dose of unknown antitoxin in ml			
	.083	.091	.100	.110	1.503×10^{-4}	1.653×10^{-4}	1.819×10^{-4}	2.00×10^{-4}
Death time in hours & 1000 / T *	29 (34)	27 (37)	45 (22)	72 (14)	38 (26)	51 (20)	66 (15)	98 (10)
	34 (29)	45 (22)	45 (22)	87 (11)	44 (23)	66 (15)	72 (14)	138 (7)
	39 (26)	47 (21)	47 (21)	87 (11)	44 (23)	72 (14)	72 (14)	140 (7)
	45 (22)	51 (20)	51 (20)	94 (11)	44 (23)	76 (13)	78 (13)	146 (7)
	45 (22)	56 (18)	72 (14)	96 (10)	44 (23)	77 (13)	94 (11)	154 (6)
	44 (22)	66 (15)	82 (12)	111 (9)	72 (14)	89 (11)	96 (10)	162 (6)

Analysis of variance

Origin of variance	D. F.	Sum of squares	Mean square
Between preparations	1	336.0208	336.0208
Common slope (B^2_c)	1	1330.1042	1330.1042
Difference of the two slopes	1	.6958	.6958
Deviation from straight lines	4	64.4800	16.1200
Between doses	7	1731.3008	
Within doses	40	686.1700	17.1542 (= s^2)
Total	47	2417.4708	

Relative potency (M) = 2.78681, $s_M = .01035$ (45 D.F.), $b = -113.95$ Potency of the unknown antitoxin: 612 u $\pm$ 6.6 %

* Figures in bracket indicate the reciprocals (1000 / T).

Toxin: N-Z 4-6; Unknown antitoxin: Horse serum II-32.

Weight of mice: 15-17 g.

Table 6. Results of antitoxin titration

Anti-toxin	Number of mice	Antitoxin titer calculated by	
		Reciprocal (P = .99)	f(T) (P = .99)
I	30	236 ± 7.9	236 ± 6.8
II	30	496 ± 7.9	509 ± 6.8
II	40	511 ± 7.0	509 ± 7.9
U	30	4.34 ± 7.9	4.37 ± 6.8
TP52	48	89.6 ± 8.9	89.6 ± 7.9
TP52	40	90.8 ± 10.0	86.9 ± 11.2
VII-4	24	279 ± 8.5	277 ± 8.8

Weight of mice: 15-17g

などを用いた場合には直線部分が長く、それぞれ 100 および 200 致死量の範囲に及ぶ。日常の研究に用いる毒素量は、マウスが 24~144 時間以内に死亡するような量でこれは 50 致死量以下の毒素に相当するので直線を利用することができる範囲である。f(T)の方が直線区間が稍

長い、いろいろな条件の異なる研究を行うのに、その都度大がかりな予備試験と煩雑な手続きで常数を定めなければならないという不利な点がある。これらの点からわれわれは死亡時間の逆数を用いることにしている。

つぎに毒力または抗毒素価の誤差についてみると、毒素の測定には 40 匹、抗毒素の測定には 60 匹のマウス (15~17 g) を用いた場合に、それぞれ 13.7% および 6.2% の誤差で力価を測定することができる。この誤差は従来報告されている業績中最も綿密に行われたと思われる実験成績に近い⁽¹⁾⁽¹²⁾。この研究では 3 時間ごとに観察したが、6 時間隔でも差支えない。またマウスの種類による差は僅少で、市販雑種では体重 15~17 g のものが最も変動が少い⁽⁹⁾。

結 論

破傷風毒素、抗毒素を定量するときには、動物の死亡時間を観察し、その逆数と注射量の対数との関係を利用すれば、簡単な推計学的手続きで正確に検定することができる。

終りに臨み御指導ならびに御校閲を戴いた中村血清部長、および推計学的取扱いに關し御助言を戴いた伝研松本助教授に深謝致します。

文 献

- 1) Smith, M.L. : Bull. Hlth. Org. L. N., 10, 104~112, 1942~44.
- 2) Petrie, G. F. : Bull. Hlth. Org. L. N., 10, 113~143, 1942~44.
- 3) National Inst. Med. Res. London : Bull. W. H. O. : 2, 59~63, 1949.
- 4) Ipsen, Johs. : Contribution to the theory of biological standardisation. p. 73, Copenhagen, 1941, Nyt Nordisk Forlag.
- 5) Christensen, P. A. & Finney, D. J. : J. Im-

munol., 70, 7~20, 1953.

- 6) Glenny, A. T. : J. Hyg., 14, 371~392, 1914
- 7) Ipsen, Johs. : J. Immunol., 66, 687~694, 1951.
- 8) Ipsen, Johs. : Bull. Hlth. Org. L. N., 9, 452~475, 1940~41.
- 9) 村田良介, 和田英太郎, 久保田憲太郎, 山本昭夫 : 動物彙報, 4, 29~32, 1955.
- 10) Bliss, C. I. : The statistics of bioassay. New York, 1952, Academic Press.
- 11) Bartlett, M. S. : "Statistical Methods," by G. W. Snedecor, 4th Ed." p. 249 より引用.
- 12) Permanent Commission on Biological Standardisation : Bull. Hlth. Org. L. N., 7, 713~732, 1938.