日本腦炎ビールス定量におけるLD₅₀の誤差について*

新井 浩, 松本 稔

(傳染病研究所第四研究部: 部長, 長野教授)

[受付: 3月12日, 1949年]

ビールスの定量はふつう動物實驗によつて行われる。すなわちビールスを含んだ材料を階段的に稀釋し, その一定量を動物に接種して, 致死せしめるに必要な最小量をきめるのである。しかし動物の感受性には個體差があるため, 個體の最小致死量は一定ではない。いま個體の最小致死量の對數をとつてみると, それは正規分布をすることが一般に認められている⁽¹⁾。ある量のビールスを動物に接種した場合に, 個體の最小致死量が接種量よりも小さい動物は死に, 大きい動物は生き残るはずである。そこでいま一定材料の一定量についてこのような母集團を考えれば, その死亡率 p はある一定の値をとる。従つてある一定の母集團死亡率を與える接種量をもつてその材料にふくまれているビールスの濃度を現わすことができる。しかしわれわれは母集團死亡率を實際には知ることが出来ないから, 限られた數の動物をもちいての標本死亡率をこれに代用しなければならない。そのために生ずる誤差を最小ならしめるためには $p=50\%$ を標準にするのがよい⁽²⁾。これに對應する接種量が50%致死量(LD₅₀)といわれて通常もちいられているものである。

LD₅₀を求めるには Behrens-Kärber⁽³⁾の方法が簡單であり, 一般にもちいるによい方法と考えられる⁽⁴⁾ van der Waerden⁽⁵⁾はこの方法によつて得られた値の標準誤差を計算し, また標本死亡率から個體の最小致死量の對數の標準偏差を求める式を與えている。

われわれはこれに従つて日本腦炎ビールスについての實驗結果を統計的に分析し, 2, 3の考察を與えてみた。

理 論

接種量の對數を x_i , それに對應する母集團死亡率を p_i (但し $p_0=0$, $p_{s+1}=1$ とす) とすれば50%致死量 M は次式で與えられる。

$$M = \frac{x_s + x_{s+1}}{2} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^s p_i (x_{i+1} - x_{i-1}) \cdots (1)$$

母集團死亡率 p の代りに標本死亡率 h をもちいれれば,

$$L = \frac{x_s + x_{s+1}}{2} - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^s h_i (x_{i+1} - x_{i-1}) \cdots (2)$$

これが Behrens-Kärber の方法によつて LD₅₀を計算する式である。

次に L の標準誤差 μ は次のようにしてもとめられる。動物數を n とすれば

$$\sigma_p^2 = \frac{p(1-p)}{n} \quad \text{であるから}$$

$$\mu^2 = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^s \frac{p_i(1-p_i)}{n_i} (x_{i+1} - x_{i-1})^2 \cdots (3)$$

こゝでまた p を h にかえるために近似計算をすれば,

$$\frac{p(1-p)}{n} \div \frac{h(1-h)}{n-1}$$

従つて μ^2 の代りに次式によつて m^2 を計算すればその期望値が μ^2 となる。

$$m^2 = \frac{1}{4} \sum_{i=1}^s \frac{h_i(1-h_i)}{n_i-1} (x_{i+1} - x_{i-1})^2 \cdots (4)$$

いま x の間隔及び各接種量に對する動物の數が一定のときには, $x_{i+1} - x_i = \delta$, $n_i = n$ とすれば

* Hiroshi Arai & Minoru Matumoto: On the error of LD₅₀ in the titration of Japanese encephalitis virus. Jap. Jour. Bact., 4 (2): 85-88, 1949.

(3) は次のように變形できる。

$$\mu^2 = \sum_{i=1}^S \frac{p_i(1-p_i)}{n} \delta^2 = \left(\sum_{i=1}^S p_i(1-p_i) \frac{\delta}{\sigma} \right) \frac{\delta \sigma}{n}$$

但し σ は個體の最小致死量の對數の標準偏差をあらわす。

然るに

$$\int_{-\infty}^{+\infty} p(1-p) \frac{dx}{\sigma} = \frac{1}{\sqrt{\pi}} = 0.564 \dots$$

従つて

$$\mu^2 \div 0.564 \times \frac{\delta \sigma}{n} \dots \dots \dots (5)$$

また σ は次のようにしても計算できる。

$$\sigma^2 = \int_0^1 (x-M)^2 dp$$

故に

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^S \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} - M \right)^2 p_{i+1} - p_i - \frac{\delta^2}{12}$$

但し $\delta^2/12$ は Sheppard の補正である。

こゝで p, M のかわりにそれぞれ h, L をもちいれば、

$$S^2 = \sum \left(\frac{x_i + x_{i+1}}{2} - L \right)^2 (h_{i+1} - h_i) + \mu^2 - \frac{\delta^2}{12} \quad (6)$$

この S^2 の期望値が σ^2 となる。

實驗結果の分析

われわれの實驗結果を上式のてはめて m^2 及び S^2 を計算してみた。實驗はすべて日本腦炎(中山株)の中和試驗における對照例である。實驗方法としては、感染發症したマウスの腦をすりつぶし、50% 正常家兔血清食鹽水で20% 乳劑とし、毎分3,000回廻轉で15分間遠心沈澱した上清を10% 正常家兔血清食鹽水で10倍に階段稀釋する。各稀釋液0.2ccを等量の正常家兔血清に加えて37°Cに2時間おいた後、マウス(10g前後)の腦内に0.03ccづゝ注射する。その後2週間觀察して各接種量に對する標本死亡率を求める。

マウスは各接種量について4匹づゝもちいた。注射後3日以内に死亡したものもあるが、それは完全に潜伏期にあるので、そのような例の生じた實驗はすべて統計的處理からのぞいた。また死亡率の全領域をおういゑなかつた例ものぞいた。

まず(4)から m^2 を計算すれば第1表のようになる。その平均値を μ^2 とすれば、

第1表 LD₅₀ の標準誤差 (m) の計算

m^2	實驗數
0.	4
0.0625	20
0.0833	12
0.1250	14
0.1458	6
0.1666	3
0.1875	2
0.2083	3
0.2291	1

計 65

$$\mu^2 = 0.10159, \sigma_{\mu^2} = 0.00563$$

故に

$$\mu = 0.3189, \sigma_{\mu} = 0.0883$$

この値をもちいて(5)から σ をもとめると、

$$\sigma = 0.720, \sigma_{\sigma} = 0.0399$$

また(6)から S^2 を計算すれば第2表のようになる。その平均値を σ^2 とすれば

第2表 個體の最小致死量の標準偏差 (S) の計算

S^2	實驗數
0.01826	4
0.20826	18
0.26826	12
0.51826	10
0.68576	1
0.70826	4
0.76826	5
1.01826	3
1.16826	1
1.20576	1
1.20826	1
1.26826	1
1.40826	1
1.70826	2
2.20826	1

計 65

$$\sigma^2 = 0.53116, \sigma_{\sigma^2} = 0.0557$$

故に

$$\sigma = 0.729, \sigma_{\sigma} = 0.0382$$

考 察

上の方法によつて得られた μ, σ が實際上にはどんな意義をもっているであろうか。

まず(5)から明らかなように μ は $\sqrt{n}$ に反比例する。すなわち L の誤差は動物数を増すに従つて小さくなる。われわれの實驗からえられた μ をもとにして、種々の動物数の場合の μ を計算して第3表にしめた。なお μ の標準誤差もしめておいた。

第3表 各接種量あたりの色々の動物数にたいする LD_{50} の標準誤差(μ)中和對數の標準誤差($\sqrt{2}\mu$), 二つの中和對數の差の標準誤差(2μ)

n	μ	$\sqrt{2}\mu$	2μ
1	0.638±0.177	0.902±0.250	1.276±0.354
2	0.451±0.125	0.638±0.177	0.902±0.250
3	0.368±0.102	0.520±0.144	0.736±0.204
4	0.319±0.089	0.451±0.126	0.638±0.168
5	0.286±0.079	0.404±0.112	0.592±0.158
6	0.261±0.072	0.369±0.102	0.522±0.144
7	0.242±0.067	0.342±0.095	0.484±0.134
8	0.226±0.063	0.320±0.089	0.452±0.126
9	0.212±0.059	0.300±0.083	0.424±0.118
10	0.202±0.056	0.286±0.079	0.404±0.112
15	0.165±0.046	0.233±0.065	0.330±0.092
20	0.143±0.040	0.202±0.057	0.286±0.080
25	0.138±0.036	0.195±0.051	0.276±0.072
30	0.117±0.032	0.165±0.045	0.234±0.064
40	0.101±0.028	0.143±0.040	0.202±0.056
50	0.090±0.025	0.128±0.035	0.181±0.050
60	0.083±0.023	0.116±0.033	0.165±0.046
70	0.077±0.021	0.108±0.030	0.153±0.042
80	0.072±0.020	0.102±0.028	0.143±0.040
90	0.067±0.019	0.095±0.027	0.135±0.038
100	0.064±0.018	0.091±0.025	0.127±0.036
150	0.052±0.014	0.074±0.020	0.104±0.028
200	0.045±0.013	0.061±0.018	0.090±0.026

次に2つの50%致死量を比較する場合を考えてみよう。すなわちある實驗からえられた L_1 と他の實驗からえられた L_2 との間に差があるかどうかという問題である。同じビールスを含む2つの材料においてその濃度を比較する場合がこれにあたる。また中和試驗において、對照實驗の σ と中和實驗の σ とが一致するとみてよいので(6), 中和試驗の結果の判定にもこの方法がもちいられる。いま L_1, L_2 の標準誤差をそれぞれ μ_1, μ_2 とすれば, L_1-L_2 の標準誤差は $\sqrt{\mu_1^2+\mu_2^2}$ で與

えられる。もし2つの實驗にもちいた動物の数が同じであれば, $\mu_1=\mu_2=\mu$ であるから L_1-L_2 の標準誤差は $\sqrt{2}\mu$ となる。

次に2つの中和指數を比較する場合には, 中和對數の N_1, N_2 はそれぞれ2つの LD_{50} の差であるから, $N_1=L_1-L_2, N_2=L_1'-L_3'$ とおける。いま L_1, L_2, L_1', L_2' の標準誤差をそれぞれ $\mu_1, \mu_2, \mu_1', \mu_2'$ とすれば, N_1, N_2 の標準誤差はそれぞれ $\sqrt{\mu_1^2+\mu_2^2}, \sqrt{\mu_1'^2+\mu_2'^2}$ となる。従つて N_1-N_2 の標準誤差は $\sqrt{\mu_1^2+\mu_2^2+\mu_1'^2+\mu_2'^2}$ で與えられる。もし4つの實驗で動物数がすべて同一であるとすれば $\mu_1=\mu_2=\mu_1'=\mu_2'=\mu$ であるから N_1-N_2 の標準誤差は 2μ となる。

われわれの實驗からえられた μ を基準としていろいろな動物数の場合の $\sqrt{2}\mu, 2\mu$ を計算して第3表にしめた。なおそれぞれの標準誤差も同時にしめておいた。

從來一般にもちいられている中和試驗の判定の標準は, $n=5$ として中和指數10以下を陰性, 50及びそれ以上を陽性, その間を(±)としている。これを中和對數になおすと, 1.00以下を陰性, 1.70及びそれ以上を陽性, その間を(±)とすることになる。第3表で $n=5$ のときの中和對數の標準誤差は 0.404 ± 0.112 であるから, 標準誤差の2.5倍, 4.2倍をそれぞれ限界にとつてことになる。もちろん限界をどこにとるかは實驗者の任意にまかされるわけであるが, さらにここにあたえられた標準誤差の値にもかなりの誤差のあることを考えあわせると, この標準が不適當であるとは思われない。

次に接種量の間隔すなわち材料の稀釋の間隔はどのくらいにしたら適當であろうか。Behrens-Kärberの方法をもちいるときには, 接種量が個體の最小致死量の分布の全領域にまたがつていなければならない。しかもこの範圍外の接種量は LD_{50} の計算には無効であるから, 接種量の範圍は個體の最小致死量の範圍にひとしくするのが最もよい。個體の最小致死量の對數は M を中心とし標準偏差を σ とする正規分布をしているから, その99.7%は $M\pm3\sigma$ の範圍内にある。従つて接種量もこの範圍にまたがる様に分布させ

ばよいことになる。いま接種量の對數が公差 δ なる等差級數をなす様な稀釋 N 個を用いるときには、

$$\delta = \frac{6\sigma}{N-1}$$

ならしめればよい。つまり M を中心として、 $6\sigma/N-1$ の間隔で N 個の接種量をきめればよい。いま $\sigma=0.72$, $N=5$ とすれば、

$$\frac{6\sigma}{N-1} = 1.08$$

従つて日本腦炎の場合には 10 倍の階段稀釋を 5 本もちいるのは、稀釋法が簡單でありしかも間隔も適當であるので良い方法であると思われる。

總 括

van der Waerden の式に従つて日本腦炎ウイルスについてのわれわれの實驗結果を統計的に處理して、 LD_{50} の標準偏差及び個體の最小致死量の對數の標準偏差を計算した。また中和對數及び 2 つの中和對數の差の標準誤差をもとめ、日本腦炎の中和試驗にもちいられている判定標準を批判した。

さらに Behrens-Kärber の方法を用いて、 LD_{50} をもとめる場合の稀釋の適當な間隔について考察した。

文 献

- 1) 松本稔：ウィールスの定量に關する基礎的研究、日本腦炎ウィールスについての實驗，實驗醫學雜誌，27(11)：1025~1040, 1943(昭和18).
Matumoto, M. : Studies on titration of virus suspension. Analysis of dosage-mortality curve of Japanese encephalitis virus., Jap. J. Med., 20 : 153~160, 1949.
- 2) Fisher, R. A. : The design of experiments. pp. 227~230, 1935.
- 3) Kärber, G. : Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. Exp. Path. Pharm., 162 : 480~483, 1931.
- 5) van der Waerden, B.L. : Wirksamkeits- und Konzentrationsbestimmung durch Tierversuche. Arch. Exp. Path. Pharm., 195 : 389~412, 1940.
- 6) 松本稔：ウィールス中和反應の定量的研究，日本腦炎ウィールスについての實驗，實驗醫學雜誌，28(1)：10~20, 1944(昭和19).
Matumoto, M. : Quantitative studies on virus neutralization reaction. Experiments of Japanese B encephalitis virus, Jap. J. Exp. Med., 20 : 160~173, 1949.
- 7) 松本稔：日本腦炎 Japanese B encephalitis の血清學的診斷法，基礎と臨牀，2(3)：63~68, 1949 (昭和24).
- 4) 松本稔：Reed & Muench の LD_{50} の計算に關する二三の問題について
A note on some points of calculation method of LD_{50} by Reed and Muench., Jap. J. Exp. Med., 20 : 175~179, 1949.