

日生研おより

第66巻 第4号(通巻617号) 2020年(令和2年)10月

挨拶・巻頭言

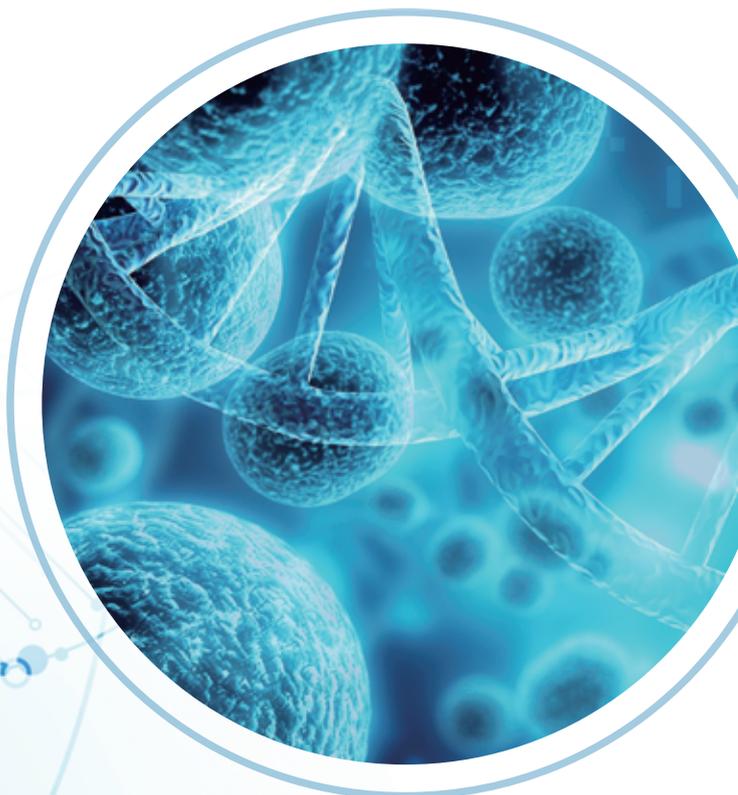
健康長寿……………朱通市次郎(2)

レビュー

野兎病菌の自然宿主内における増殖と
共生機構……………度会雅久(3)

解説

微生物の動物接種・動物継代の際に必要な
動物数の統計学的推定について
-二項分布の応用-
……………玄間 剛(7)



健康長寿

朱通市次郎

2020年も残り二か月余となりました。「新しい生活様式」、「with コロナの時代」となった本年を振り返ってみますと私自身、健康長寿への意識が非常に強くなったと感じております。

さて、7月30日に厚生労働省から2019年の日本人の「平均寿命」が発表されました。その資料によりますと、女性87.45歳、男性84.41歳でいずれも過去最高とのこと。また、10年ほど前からは「健康寿命」も発表されるようになりました。こちらは厚生労働省国民生活基礎調査（自己申告）をもとにしたものであり、「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」と定義されております。最新データ（2016年発表）による健康寿命は女性74.79歳、男性72.14歳となっております。人生100年時代を見据えて、健康寿命を伸ばすことが日本社会の大きな課題の一つとされております。実際、誰もが望んでいる「ピンピンコロリ」はまれであり、「ピンピン」の後の「ヨロヨロ・ヨタヨタ」期間、さらには「寝たきり」の時期もあります。10年超となる「ピンピン」後の人生、どうよく過ごすか考えざるを得ません。

厚生労働省は、2011年から健康寿命を延ばすための生活習慣病予防の啓発活動「スマート・ライフ・プロジェクト」を立ち上げ、以下の取り組みを推進しています。

- ①毎日プラス10分の身体活動（毎日なら、10分のはや歩き。3曲分歩きましょう等）
- ②1日あと70グラムの野菜をプラス（野菜不足は、あとトマト半分等）
- ③禁煙でタバコの煙をマイナス
- ④健診・検診で定期的な健康チェック

先の見えない自粛期間中、私はあまりの閉塞感に押し潰されてしまう恐怖に喘ぎました。偶然、書棚にあった「人は感情から老化する」（和田秀樹著 祥伝社新書）が目にとまり、「感情が老化（意欲や自発性や好奇心が低下）すると体を動かさなくなったり、頭を働かせなくなる」、そして「他の機能の老化が進む」とありました。さらに「感情の老化は40代から始まる」との言葉に、もう手遅れかと感じつつ、とにかく何か新しいこと、面白そうなことを始めることにしました。

手始めに前から興味があったクリーピングタイム、アロマティカスとバジルを植えました。しかし、その後のバジルとタイムの成長・広がりやの速さに手を焼き、その利活用もよく分からず悩んでおります。次に一度も読んだことのない作家の小説等7冊を購入、読みづらさを感じながら現在も挑戦しております。そして八月からは週1回の食事作り（キーマカレー専門ですが）を開始し、九月には数年ぶりにウォーキングを再開しました。また、この間にスマホのみならずズームデビューも果たしました。いろいろ試していますが、家人から好評なのはキーマカレーと風呂掃除ぐらいです。

「Go To トラベル」に東京が追加され、少し気分的に楽になりました。久しぶりに親戚、友人を訪ねてみようかと思っております。

（常務理事）

野兎病菌の自然宿主内における増殖と共生機構

度会 雅久 (山口大学共同獣医学部)

1. はじめに

病原体は人や動物に感染後、標的臓器・細胞内で増殖し、破壊することによって最終的には体外へ脱出し、新たな宿主に感染する。この過程で宿主が死に至る場合もある。一方で、病原体が環境中で自らの居場所としている自然宿主に侵入した場合、宿主内での爆発的な増殖は認められず、体内で維持され共生関係が成立すると考えられる。この自然宿主は病原巣となり感受性宿主にとって排除しなければならない脅威となっている。感染症を予防するためには病原巣からの感染ルートを断つことが重要である。しかしながら、病原体の環境中での動態、特に自然宿主との共生メカニズムは不明な点が多い。そこで我々は病原体の感染環を断ち切るために、環境中の自然宿主内における病原体の共生機構を解明し、新たな感染制御法の構築を目指している。本稿では、細胞内寄生菌の一つである野兎病菌 *Francisella tularensis* と自然宿主との関係について最近の知見を紹介する。

2. 野兎病

野兎病菌は人獣共通感染症の一つである野兎病の原因菌であり、主にマダニや蚊などによって媒介されると考えられている。感染動物から人へ感染することも知られており、公衆衛生上重要な感染症である。北米大陸で確認されている強毒型の菌では健全な皮膚から数個の菌で感染が成立するといわれており、感染力が非常に強いことから生物兵器としての使用が懸念されている。日本には弱毒型の菌が分布しており、東北地方を中心に散発的に症例が報告され、現在は四類感染症に指定されている。症状としては、皮膚潰瘍やリンパ節の腫脹、感冒様の全身症

状などが認められる。

3. マダニにおける野兎病の動態

野兎病の制御には、環境中の病原体の実態を把握することが必須である。しかしながら、日本では媒介するマダニの種類も不明確な状況であった。そこで、我々は国内において採取されたマダニ由来 DNA を用いた疫学調査を行い、野兎病菌を保有しているマダニ種の特異性を試みた。その結果、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) とシュルツェマダニ (*I. persulcatus*) に維持されていることが示された。この調査により、症例未報告地域や西日本にも野兎病菌を保有したマダニが分布し、野兎病菌は全国的に存在していることが認められた [6]。

マダニ体内における野兎病菌の動態を解析するために、研究室内で繁殖させたシュルツェマダニを用いた感染モデルの構築を行った。若ダニに野兎病菌 LVS 株を肛門より注入後、一定期間、25°C で飼育し、体内の野兎病菌 DNA 量をリアルタイム PCR により定量した。加熱処理した死菌を対照として用い、DNA 量の推移を比較検討した。当初はマダニ体内の菌数をコロニー計測により定量することを試みた。しかし、雑菌が多く困難であったため、DNA 量の変化を解析することにした。その結果、加熱処理した死菌は注入 1 週間後から減少し、2 から 3 週間後では生菌と比べ有意に減少することが認められた。一方、生菌を注入した群では、一定量維持されていることが明らかとなった (図 1)。注入された野兎病菌はシュルツェマダニの体内で生存し、その菌数が長期間維持されることが示唆された [6]。

野兎病菌のマダニ体内における共生に関与する菌側因子を検索するために、37°C と比較して 26°C で発現が上昇する因子に着目して解析を行った。複数

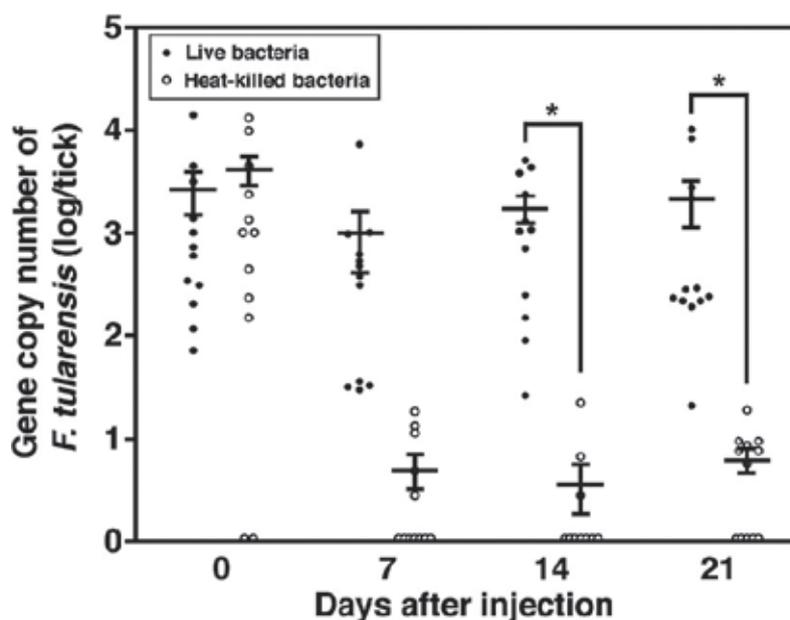


図1 シュルツェマダニ体内における野兎病菌 DNA 量の推移
生菌（黒丸）および熱処理死菌（白丸）注入後、定期的に体内の菌 DNA 量を定量した。点は個々のマダニ、バーは各群の平均、* : $P < 0.05$ を示している。

の因子を検討したところ、I型分泌装置を構成する HlyD が関与することが認められた。LVS 株の生菌あるいは *hlyD* 遺伝子を欠損させた変異株の生菌をマダニに注入した場合、*hlyD* 変異株は親株に比べ注入2週間後に、DNA量が有意に減少することが認められた [6]。HlyDは大腸菌などの病原細菌においてI型分泌機構を構成する因子の一つであり、病原因子を菌体外へ分泌する機能を有している [5]。HlyDが野兎病菌のマダニ共生因子として機能している可能性も考えられる。

4. カイコにおける野兎病の動態

カイコは飼育や取り扱いが容易であり、逃亡のリスクもなく管理しやすい点において、モデル動物としてはマダニより優れていると言える。マウスなどの実験動物で課題となっている倫理的問題がないことから、大量のサンプルを用いた解析に応用できるため、今後のその有用性が増加するものと考えられる。マダニにおける実験時間の短縮を図るために、カイコを用いた解析を試みた。カイコの5齢幼虫に、野兎病菌 LVS 株、大腸菌および黄色ブドウ球菌を接種し、カイコの生存率とカイコ体内の菌数測定を

行った。黄色ブドウ球菌を感染させたカイコは感染24時間後から、身体が黒色化して死亡し始め、1週間以内に全て死亡した。一方、野兎病菌および大腸菌を感染させたカイコは死亡しなかった (図2A)。同時にカイコ体内の菌数を測定したところ、黄色ブドウ球菌は感染1日後に急激な増殖を示した。大腸菌は感染後、時間の経過とともに体内菌数が減少し、排除されていくことが認められた。一方、野兎病菌は感染後ほぼ一定の菌数が維持され、マダニ感染モデルと同様の結果が示された (図2B)。野兎病菌の感染の有無により、カイコの外見上の変化は認められない。これらのことから、野兎病菌はカイコと共生関係にあると考えられ、自然宿主モデルとして有用であることが示された [7]。

5. カイコにおける免疫応答

節足動物の免疫応答は血球細胞による細胞性免疫と血漿成分による液性免疫に分けられる [2]。野兎病菌は細胞内寄生菌であるため、最初にカイコの血リンパ球内における増殖の解析を行った。GFPを発現した野兎病菌および大腸菌をカイコに感染させ、体内から血リンパ球を分離して細胞内の菌を共焦点

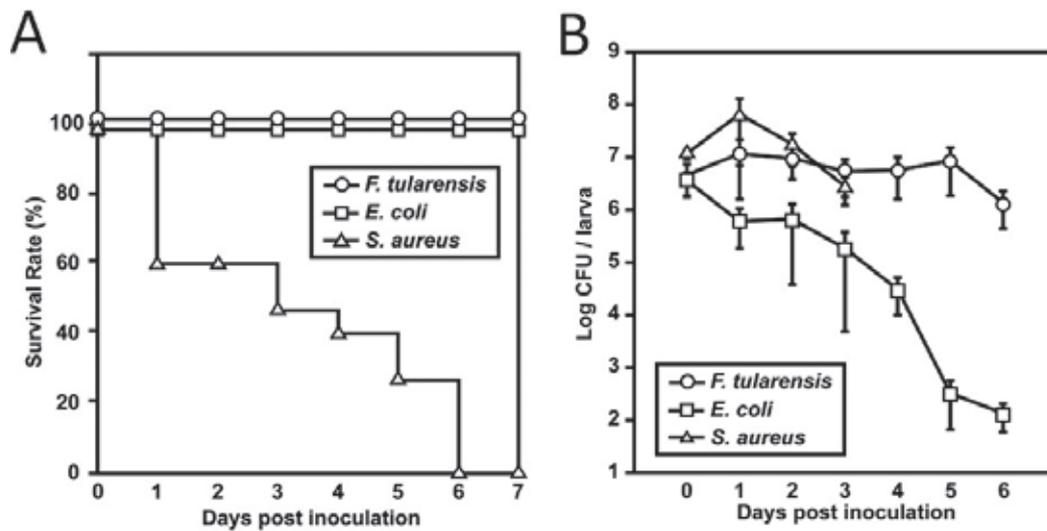


図2 野兎病菌感染後のカイコ生存率 (A) と体内菌数 (B)
野兎病菌 (丸)、大腸菌 (四角) および黄色ブドウ球菌 (三角) をカイコに感染させた (5×10^5 CFU/カイコ)。

レーザー顕微鏡で観察した。感染直後は細胞内にはほとんど菌は認められないが、野兎病菌を感染させた場合、感染5日後には細胞内で増殖する菌が認められた。一方、大腸菌は細胞内における菌の増殖は認められなかった。カイコ由来の細胞株であるBmN4細胞を用いた実験でも、野兎病菌は細胞内で消化されず一定の菌数が維持されることが確認された。これらのことから、野兎病菌はカイコ細胞内で共生していることが考えられた。

液性免疫として、フェノール酸化酵素前駆体カスケードの活性化によるメラニン形成と抗菌ペプチドの産生が代表的なものとして知られている [2]。メラニン化は活性型フェノール酸化酵素がドーパ等のフェノール性物質を酸化して、異物周囲にメラニンが形成されるものである。これにより異物を物理的に包囲するとともに、活性酸素等の殺菌物質の作用により異物を排除する。この反応が体液において過度に引き起こされると、自身の組織にも障害を与え有害となる。黄色ブドウ球菌をカイコに感染させた場合、全身がメラニン化し死亡することが知られている [3]。野兎病菌の感染でメラニン化が引き起こされるかどうか検討を行なった。菌接種後1時間後と18時間後に確認したところ、野兎病菌の熱処理した死菌ではメラニン化が引き起こされるが、生菌の感染ではメラニン化は認められず、野兎病菌の生

菌はメラニン化を抑制する機能があることが示された。野兎病菌が黄色ブドウ球菌感染によって引き起こされるメラニン化に影響を与えるかどうか検討を行なった。野兎病菌の生菌を感染させ、72時間後に黄色ブドウ球菌を接種し、メラニン化の有無を解析した。その結果、野兎病菌は黄色ブドウ球菌によるメラニン化も抑制することが認められた。さらに、野兎病菌共生後の黄色ブドウ球菌感染カイコにおける生存率の推移と黄色ブドウ球菌の体内菌数を解析した。野兎病菌が共生したカイコでは黄色ブドウ球菌感染によるカイコの死亡率と体内菌数の低下が認められた (図3)。

野兎病菌の共生による黄色ブドウ球菌感染に対する防御機構を解析するために、抗菌ペプチドの産生量について検討を行った。節足動物は抗体を持たず、脂肪体と呼ばれる組織から抗菌ペプチドを血リンパ液中に放出する。この抗菌ペプチドは静菌的または殺菌的な作用を示す。カイコにおいてこれまでに報告されている抗菌ペプチドのうち、**cecropin B** について、野兎病菌を感染させたカイコの血リンパ液中への分泌量をウエスタンブロッティング法により継続的に測定した。その結果、**cecropin B** は感染24時間後から血リンパ液中に検出されることが認められた。生菌処置群においては感染48時間および72時間後においても分泌が確認された。一方、熱処理

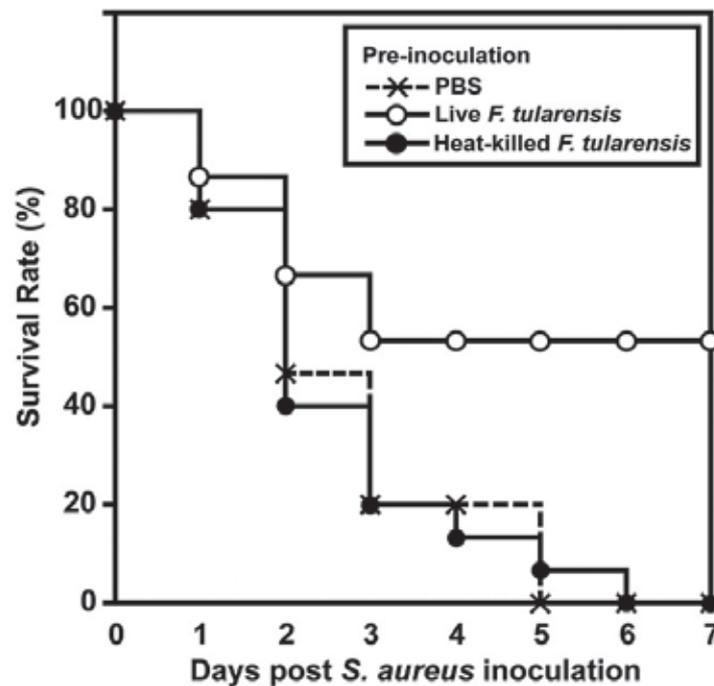


図3 野兎病菌共生後の黄色ブドウ球菌感染カイコの生存率
PBS (×)、野兎病菌の生菌 (白丸) および熱処理死菌 (黒丸)
接種 72 時間後に黄色ブドウ球菌の感染を行った。

死菌投与群では分泌量が徐々に低下し、72 時間後では検出されなかった。さらに、cecropin B 以外の抗菌ペプチドである、lebocin、attacin、moricin の発現量の検討を行った。脂肪体から mRNA を採取し、各々の遺伝子発現量を RT-PCR で定量した。その結果、測定した全ての抗菌ペプチドにおいて、cecropin B と同様に生菌処置群に特異的な発現上昇が認められた。これらの抗菌ペプチドはいずれも広い抗菌スペクトルを持つことから、野兎病菌感染によって分泌された抗菌ペプチドが黄色ブドウ球菌の増殖を阻害したと考えられる。抗菌ペプチドは細胞外に存在するため細胞内寄生菌である野兎病菌は影響を受けにくく、細胞外に存在する細菌にのみ作用したと推察される [7]。

6. ノビシダ菌

野兎病菌の類縁菌に *Francisella novicida* (ノビシダ菌) がある。現在では遺伝子配列の相同性から野兎病菌の亜種 *Francisella tularensis* subsp. *novicida* とされている。人への感染は非常に稀であるが、野兎病菌と同様に細胞内増殖能を有している。ノビシ

ダ菌では野兎病菌で認められるようなカイコへの共生は認められない。ノビシダ菌が感染したカイコは感染後 3~7 日で死亡し、菌はカイコ細胞内で著しく増殖する [4]。この差異は何に起因するのか詳細は不明であるが、野兎病菌との自然宿主の違いによるものかもしれない。ノビシダ菌は野兎病菌と違い、海水、汽水、土壌といった環境中から分離されることが多い [1]。節足動物が自然宿主とは考えられないため、共生しないと推測される。

7. おわりに

野兎病菌はカイコ感染初期において、メラニン化やノジュール形成を阻害することによって、体内からの排除機構を回避していると考えられる。その後、血リンパ球などの細胞内に侵入し、カイコ体内に適応することによって共生が可能になると推察される。その後、感染後期では抗菌ペプチドが産生・分泌され、新たに感染してきた外来の細菌に対する抵抗性の向上につながっている。野兎病菌は細胞内に存在するため抗菌ペプチドの影響は少なく、これにより共生関係が維持されているとも考えられる。また、

過剰なメラニン化は正常な組織にも傷害を与えることから、その抑制により宿主の保護に寄与している可能性もある。病原細菌は人や動物にとっては有害なものであるが、自然界の中では何らかの役割を持って存在しているのではないだろうか。野兎病菌と自然宿主との共生関係の解析が、病原細菌の自然界における役割を理解するヒントを与えてくれると考えている。さらに研究を進めることによって、新たな感染制御法の開発につながることを期待される。

8. 引用文献

1. Brett, M.E., Respicio-Kingry, L.B., Yendell, S., Ratard, R., Hand, J., Balsamo, G., Scott-Waldron, C., O'Neal, C., Kidwell, D., Yockey, B., Singh, P., Carpenter, J., Hill, V., Petersen, J.M. and Mead, P. 2014. Outbreak of *Francisella novicida* bacteremia among inmates at a louisiana correctional facility. *Clin. Infect. Dis.* **59** : 826-33.
2. Chen, K. and Lu, Z. 2017. Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **83** : 3-11.
3. Kaito, C. 2016. Understanding of bacterial virulence using the silkworm infection model. *Drug Discov. Ther.* **10** : 30-33.
4. Saha, S.S., Suzuki, J., Uda, A., Watanabe, K., Shimizu, T. and Watarai, M. 2017. Silkworm model for *Francisella novicida* infection. *Microb. Pathog.* **113** : 94-101.
5. Spitz, O., Erenburg, I.N., Beer, T., Kanonenberg, K., Holland, I.B. and Schmitt, L. 2019. Type I secretion systems—one mechanism for all? *Microbiol. Spectr.* **7** (2) : doi : 10.1128/microbiolspec. PSIB-0003-2018.
6. Suzuki, J., Hashino, M., Matsumoto, S., Takano, A., Kawabata, H., Takada, N., Andoh, M., Oikawa, Y., Kajita, H., Uda, A., Watanabe, K., Shimizu, T. and Watarai, M. 2016. Detection of *Francisella tularensis* and analysis of bacterial growth in ticks in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* **63** : 240-246.
7. Suzuki, J., Uda, A., Watanabe, K., Shimizu, T. and Watarai, M. 2016. Symbiosis with *Francisella tularensis* provides resistance to pathogens in the silkworm. *Sci. Rep.* **6** : 31476.

解説

微生物の動物接種・動物継代の際に必要な動物数の統計学的推定について - 二項分布の応用 -

玄間 剛

筆者は日生研株式会社の商品開発部で動物用医薬品の製造販売承認申請のための資料整備や、当局からの指摘対応を行っているが、近年、製造販売承認申請に係る添付資料において、試験結果の統計処理や統計学的な根拠に基づく考察や、規格値、判定基準の設定根拠の明示が求められることが多くなってきているのを実感する。これは製造・測定技術の進

歩や獣医学領域における微生物学、伝染病学の進展に伴い、動物用医薬品の承認基準が人体薬や VICH (動物用医薬品の承認審査資料の調和に関する国際協力) ガイドラインとの整合性が求められてきていることによるものと思われる。この流れは客観的な指標に基づく審査がなされるという点では妥当であると思いつつも、最近の「供試動物数・有意差検定

原理主義」とでも呼びたいほどの統計処理偏重の雰囲気疑問を感じないわけではない。しかし、この流れは今後進みこそすれ、元に戻ることはないであろう。従って、動物用医薬品の開発に携わる者は、統計処理についての知識を増していく必要がある。

さて、冒頭で試験結果の統計処理、と書いたが、統計処理は結果の解釈だけに適用されるものではない。試験設計にも適用でき、例えば動物試験であれば、事前に必要最低限の動物数を推定することができる。これにより、必要以上の動物を供試することなく、あるいは本来必要な数の動物を供試しなかったがために、意味の乏しい試験を繰り返すような事態を避けることができる。統計処理という専用ソフトウェアや高等数学を駆使するような印象があつて身構えてしまうが、そのようなものばかりではない。統計学の教科書のかなり最初の方に出てくるような内容であっても普段の実験に応用が利くものがある。今回はそうした初歩的ではあるが知っている役立つ一例を紹介したい。

前置きが長くなったので本論に入ろう。最近では動物試験の結果や考察だけでなく、試験において適切な動物数が用いられているかについても審査される。実際に試験設計をしたことがある方は痛感するところだと思うが、必要な動物数を決定するのは一苦勞である。具体例として、ここでは「目的とする微生物の検出に必要な動物数を推定する」ことを考えよう。これは、例えば「菌やウイルスの排泄の予防」を指標とした感染防御試験や、生ワクチンに用いる菌株やウイルス株の病原性復帰否定試験（動物継代しても病原性が復帰、もしくは増強しないことを確認する試験で、その方法として何代で継代できなくなるかを調べることが多い）といったものに利用できる。ここで登場するのが、「二項分布」である。

「二項分布」について、統計学の教科書やインターネットの検索エンジンで検索すると、大抵はコインを投げた時に表が出るか裏が出るか、あるいはサイコロを振ったときに特定の目が出るか出ないか、といった「出た」か「出ない」のような、結果が2種類しかないことを n 回行って、「出た」回数と、そ

の場合の確率—すなわち確率分布—のことを二項分布という、といった説明がされている。コインやサイコロの比喩は正しくはあるが、いかにも説明のための説明のような感じでピンとこないという人も多い（多かった）と思う（筆者もそうだった）。だが、ここを「微生物の分離を n 回試みて、分離に『成功した』回数の確率分布」と読みかえたらどうだろう。俄然、現実味を帯び、普段の研究との接点が見えてこないだろうか。微生物の分離も結果は「成功」と「失敗」の2種類しかないので、何もおかしいことはない。

二項分布では、結果が2種類しかないことを n 回行って、「出た（成功した）」回数が k 回となる確率は、次の式で与えられるとされている。

$${}_n C_k p^k (1-p)^{n-k} \dots \text{式①}$$

ここで、 p は「成功する」確率とする。 ${}_n C_k$ は「組み合わせ」（コンビネーション）で、総数 n 個の異なるものから k 個を選ぶ組み合わせの数を表すもので、この種の計算では汎用されるものである。計算自体は階乗の計算が要るので手計算や通常の電卓だと面倒だが、Excelなら組み込み関数の CONBIN 関数を使って簡単に計算できる。多機能の関数電卓によっては、 ${}_n C_k$ が求められるものもある。今回の例でいえば、 p は微生物を分離できる確率、言い換えれば検出率ということになる。言うまでもなく、 n は微生物の分離を試みた（サンプルの）数であり、つまりはそのサンプルが由来する動物の数ということになる。そして、 k は分離に成功した（サンプルの）数となる。

具体例を挙げてみる。方法は何でも（直接分離でも、PCR法による特異的遺伝子検出でも）よいが、その検出率が例えば70%だとしよう。ここで動物2頭からのサンプルを用いて（すなわち2回分離を行って）1回分離に成功する確率は、式①に $n=2$, $k=1$, $p=0.7$ を代入して

$${}_2 C_1 0.7^1 (1-0.7)^{2-1} = 0.420$$

となる。微生物分離の可否ということであれば、2

回分離を試みて2回とも分離されるということもありえる。この場合の確率は、同様に式①に $n=2, k=2, p=0.7$ を代入して

$${}^2C_2 0.7^2 (1-0.7)^{2-2} = 0.490$$

を得る。つまり、分離を2回試みて最低1回（つまり1回以上）分離できる確率は、この2値の和、 $0.420+0.490=0.910$ となる。90%以上の確率で目的とする微生物が分離できるのであれば、これは十分高い確率といってよいし、このような実験系で仮に1回も分離されなければ、その結果は信頼できると見なしてよいだろう（つまり、供試動物数が少なかつたから、たまたま分離できなかったということは考えなくてもいいということ）。ちなみに、同様にして検出率70%の方法を用いて3回分離を試みて最低1回以上分離できる確率を計算すると、これは1回分離できる確率、2回分離できる確率、そして3回分離できる確率の総和である $0.189+0.441+0.343=0.973$ となる。これを一般化して、 n 回分離を試みて最低1回以上分離できる確率は、

$$\sum_{i=1}^n {}^n C_i p^i (1-p)^{n-i} \quad \dots \quad \text{式②}$$

(ただし n は1以上の整数)

となる。

話を戻す。ここで分かることは、検出率70%の微生物の分離方法があるならば、ある試験、例えば試作ワクチン投与後にその微生物の攻撃株で攻撃し、排泄の有無を調べるであるとか、ワクチン候補株を動物継代して、継代ごとに当該株の排泄の有無を調べるといったような場合、供試動物は2頭、できれば3頭用いればよいということである。ところが、例えば検出率が40% ($p=0.4$) とすると、2, 3, 5, 7回分離を試みて ($n=2, 3, 5, 7$) 最低1回以上分離できる確率を式②で計算すると、それぞれ0.640, 0.784, 0.922そして0.972となる。先ほどと同じく90%の確率で分離できることを目標にすると、供試動物は最低でも5頭は必要になる計算になる。検出率が低ければ、それだけ余計に動物が必要なことは定性的には容易に想像できるが、こうした方法で、

何頭必要かを試験計画立案の時点で見積もることができる。

ここで紹介した方法は、筆者が勝手に思いついた方法ではなく、現実の試験ガイドラインにも用いられている。VICHの動物用生ワクチンにおける対象動物の病原性復帰否定試験ガイドライン (VICH GL41) では、被験微生物の動物継代中に動物から被験微生物が回収されなくなった場合、その確認方法として、最後に分離できた微生物を用い、改めて10頭の動物に接種して微生物の分離（回収）を試みることを定めている。この10頭というのは、微生物の検出率が20%である検出方法が用いられたと仮定し、最低1頭から微生物が回収される確率が約90%となるような動物数であって、その根拠として、被験微生物を動物に接種し、被験微生物の検出率（上述の数式でいう p ）と接種した動物（上述の数式でいう n ）の数ごとに、最低1頭から微生物が分離（回収）できる確率を求める数表とグラフが EMEA (European Medicines Evaluation Agency、欧州医薬品審査庁) のウェブサイトに掲載している VICH GL41には付属書 (Appendix) として添付されている (<https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl41-target-animal-safety-examination-live-veterinary-vaccines-target-animals-absence-reversion-en.pdf>) (この数表とグラフは、VICHのウェブサイトに掲載されている VICH GL41には含まれていない)。この数表を読むと、検出率20%で供試動物数が10頭の場合、最低1頭から微生物が分離（回収）できる確率が約90% (0.893) となっている。先に例で挙げた検出率40%の場合について表をみると、供試動物数が5頭の場合は分離（回収）できる確率は92.2% (0.922) となっており、先の計算結果と符合している。供試動物数を10頭に増やせば分離（回収）できる確率は99.4% (0.994) まで上げることができる（言い換えれば、誤って検出不能と判定する「偽陰性」の確率は0.6%にまで下げられる）。逆に、検出率が10%だと、10頭の動物を供試しても分離（回収）できる確率は65.1% (0.651) に過ぎない。

付属書には数表の数値の算出方法については一切説明がないが、数表の数値は上述の計算式で求めた値と一致するので、上述の計算式と考え方で求めたものと考えて差し支えないであろう。

実際に上述の数式あるいは(VICH GL41)の数表を用いて、今回の目的である、ある動物試験における、微生物の検出に必要な動物数を推定する手順は次のようになる。まず、試験で採用する微生物検出法の検出率 p を調べる。これは文献や、自分の過去の実験で明らかにされていればそれを用いるのが一番であるが、そうでなければ類縁の微生物なり研究、あるいは教科書、総論などで一般的とされている値を用いる。ついで、大雑把に供試動物数 n を決めて、その前後数頭分について、式②あるいはVICH GL41の数表を用いて、推定される微生物の分離(回収)確率を求める。その確率がおおよそ9割(0.9)を超えていれば、そのときの n を供試動物数とする。そうでなければ n を増やして再計算する。 n がどこまで許容できるかは供試動物種にもよるが、あまり多くなるときは検出法を再検討するか、微生物の分離の可否を指標とすることの是非を再検討しなくてはならないかもしれない。

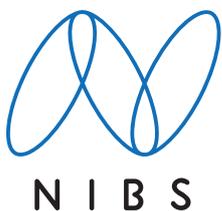
以上、統計的手法で、事前に微生物の検出に必要な

動物数を推定する例を紹介した。これにより、必要な動物数を事前に予測して試験計画を立案できるだけでなく、結果的に試験費用、結果を出すまでの期間の短縮、供試動物数の削減も可能になる。統計学の初歩的な部分であっても、思った以上に活用できそうなことが感じられたのではないだろうか。Excelや多機能な関数電卓を用いれば気軽に計算できるので、自分のPCなど使って、実際に試してみたい。本稿が、日常の研究活動の一助となれば幸いである。

参考文献

1. 統計WEB 13-1. 二項分布 (<https://bellcurve.jp/statistics/course/6979.html>)
2. VICH GL 41 (TARGET ANIMAL SAFETY)-REVERSION TO VIRULENCE
TARGET ANIMAL SAFETY: EXAMINATION OF LIVE VETERINARY VACCINES IN TARGET ANIMALS FOR ABSENCE OF REVERSION TO VIRULENCE

(日生研株式会社)



—— テーマは「生命の連鎖」——
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)
(通巻617号) 令和2年9月25日印刷 令和2年10月1日発行(第66巻第4号)
発行所 一般財団法人日本生物科学研究所
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166
URL: <http://nibs.lin.gr.jp/>
発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/古澤貴章(委員長)、篠原みなみ、古賀早織
事務/経営企画部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)