

薬物効果試験のあり方について

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
巻/号	376
掲載ページ	p. 388-396
発行年月	1984年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ではなく腸管粘膜に付着する条虫を遊離させ、腸の運動を促進させて排虫する。排出された虫体は黄色を帯び活性をもっている。副作用としては嘔吐がある。

Uredofos : これは有機燐剤の1つで、イヌの数々の腸管内寄生虫に対して試験されている。瓜実条虫や *Taenia*

属のものに対して効力をもつほか、数種の線虫類に対しても効果をもつ。投薬量 25~100 mg/kg で、10 週齢以上のイヌでは安全であるが、10週齢以下のものについては不明である。犬糸状虫感染のイヌには用いてはけない。

資 料

薬物効果試験のあり方について

赤堀文昭*

(昭和 59 年 4 月 24 日受理)

これまで数多くの臨床試験あるいは薬物の効果に関する研究が行われてきている。しかし、これらの試験・研究のなかには所期の目的にかなった成績が得られなかったり、時には主観的に都合のよい結論のみを下そうとするものさえ見られる。そこで試験・研究のすすめ方を十分検討しておけば、少数例でも精度の高い、期待する結果の得られることを犬の Coumatetralyl (以下、Cou. と略す) 中毒に対する Vitamin K₁ (以下、V. K₁ と略す) の効果試験⁶⁾ や Tetrapotassium Pyrophosphate (以下、TKPP と略す) の催吐有効量を求める試験¹⁾ を例にとりて述べてみたいと思う。

1. はじめに

試験・研究をすすめるにあたり、とくに表1に示すようなことに注意をはらった。これらのことは一般的なことばかりであるが^{2,3,7,10,11)}、ややもするとおざりにされがちなる事柄でもある。そのため、これらのことを十分吟味することによって、少数例でも精度の高い実験結果が得られたという実例を述べることにする。

表1 試験研究のすすめ方

- | |
|---------------------------------|
| 1. 実験仮説をはっきりさせる |
| 2. 実験計画をたてる |
| ・測定項目 ・測定日 ・二元配置 or 三元配置など |
| ・繰り返しを行うか否か ・実験動物種および数 |
| 3. 実験精度の高くなるような実験を行う |
| ・予備実験を行う ・実験動物の選定 ・実験動物の飼育・環境条件 |
| ・実験動物の群分け ・対照群のとり方 ・測定の順序 |

* 麻布大学獣医学部 (神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71)

2. 実験仮説

臨床試験であれ、実験的研究であれ、薬物効果試験ではその試験の目的が対象とする動物あるいは疾病に対して、供試薬がプラシボ(脚注)に比べ期待する効果があるか否かの比較試験である。例えば「V. K₁ 効果試験」の目的は犬の Cou. 中毒に対し、V. K₁ の投与がプラシボに比べ効果があるか否かの比較試験となる。そこで、この比較試験における推論は「V. K₁ はプラシボより犬の Cou. 中毒に有効らしい」という実験仮説の形をとる。また、「TKPP 効果試験」では、その試験の目的は犬に対し、TKPP の投与がプラシボに比べ嘔吐効果をもつか否かの比較試験となり、その推論は「TKPP はプラシボに比べ、犬に嘔吐を誘発させるらしい」とする。また、豚細菌性肺炎に対する抗菌性物質の治療効果試験などでは「A薬は対照薬 (プラシボまたはすでに使われている

脚注) プラシボ (Placebo) とは偽薬といわれ、人の臨床試験では供試薬の対照として投与されるものであり、プラシボとしては活性をもたない乳糖などの賦形剤が用いられている。ヒトでは薬を飲んだとか、薬を投与されたとかいう暗示でもって、症状が改善されることがしばしばみられるが、これをプラシボ効果といっている。それゆえ、その薬物の真の効果とプラシボ効果とを分離するため対照群にはプラシボが投与される。動物においてはプラシボ効果はみられないが、経口投与あるいは注射による投与にしても、投与という刺激がプラシボ効果と同じように時にはプラス効果として、時にはマイナス効果として薬物の効果に加わって動物にはかかってくることもある。そこで、活性をもつ被験薬物の真の効果を求めるために、対照として、被験薬物以外の不活性なものが同じ方法で与えられる。これも広い意味でプラシボと呼んでいる。なお、臨床比較試験ではすでに効果の確かされている薬物や、あるいはすでに市販され使われている薬物がしばしば比較の対照に用いられる。

同様の効果をもつ薬物)より、豚の細菌性肺炎に有効らしい」といったような実験仮説をたてる。こうした統計的推論においては実験仮説を帰無仮説と対立仮説におき、定まった形式で実験仮説の正しさを評価する。

3. 効果判定基準

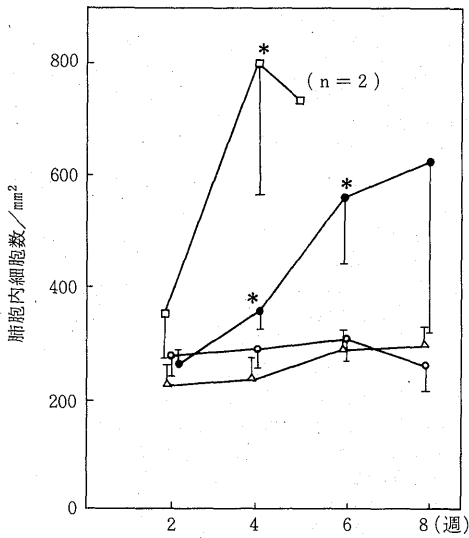
実験仮説の判定にあたって大切なことは、効果の判定基準を明らかにしておくことである。「V. K₁ 効果試験」では治療した犬が生存するか死亡するかを効果の判定基準とし、「TKPP 効果試験」では TKPP の投与により嘔吐が誘発されるか否かを効果の判定基準とした。いずれも「生」と「死」あるいは「嘔吐有」と「嘔吐無」の割合が一定の下で成立する統計量であることから、 χ^2 検定による統計処理が適している。このように効果の判定基準を単純化することによって統計的解析は容易になるが、いっぽう、臨床試験ではしばしば有意性を検出できなくなる場合が多い。それゆえ、臨床試験における治療効果の評価基準はむずかしいといえる。例えば人の細菌性肺炎症における化学療法薬の治療効果判定基準^{8,9,12)}としては、① 胸部レ線所見、② 臨床徴候(呼吸困難、胸痛、ラ音、心不全、チアノーゼ、白血球増多、赤沈亢進、体温など)、③ その他があげられており、これらの項目をそれぞれ点数化し(レ線は0~10点、徴候は一、十、廿、卅で記載し、評価基準のあてはめに際してはそれぞれ0、

1, 2, 3 と点数化している)、全項目の合計点の試験薬投与前後比(後/前)から0.10を著効、0.11~0.30を有効、0.31~0.70をやや有効、0.71以上を無効と判定している¹²⁾。このように、効果の判定を単純化できない場合にはいくつかの項目をとりあげ、それを点数化し、さらに点数比による治療効果評価基準をもうけることで判定を客観化し、統計的に解析することができる。この場合も統計処理の方法は有効以上を「効果有」、やや有効以下を「効果無」とし、2つの薬物投与群間で χ^2 検定が行われる。なお、効果判定のための観察項目は対象とする疾病により異なるが、治療効果の評価基準となり得る項目、しかも客観的データとなり得る項目を選ばなければならない。例えば、SIRIC¹³⁾(1978)らはプレオマイシン投与後の肺毒性の評価において、組織病理学的所見をこれまでの定性的、主観的判断から、1mm²当たりの肺胞内細胞数、肺実質細胞数および肺胞壁の厚さを測定することにより、計量値としての客観的データを得ることで、肺の形態学的変化の程度が薬物の用量依存性に評価できることを報告している(図1)。

いっぽう、細菌感染症においては細菌学的検査なども実施され、起炎菌の検出率が評価のための項目にとりあげられる。起炎菌の検出率は大切な項目の一つではあるが、肺炎などでは、もともと起炎菌の検出率が低いなどの理由により、有効な評価基準の項目にならないこともある。

4. 試験の計画

薬物効果試験に限らず、すべての実験的研究においては、初めにその実験的研究の目的を明らかにしておくことが最も重要なことである。これがなされない場合、主観や恣意により、意識的あるいは無意識的に都合のよい結論を導きだす危険性がある。いっぽう、臨床報告のなかには、例えば「下痢をしているブタに投薬したところ、20例治癒した、30例治癒した。それゆえ、この薬物は有効である」というような結論を下す例が多い。このような曖昧な報告をいくらかたくさん集めても、販売の承認を与えられるための判断資料にはなり得ないということである。したがって、実験的研究や臨床試験においても、それらの試験における計画書を作成しておくことが肝要である。表2と表3に「V. K₁ 効果比較試験」および「TKPP 効果比較試験」の実験計画書を例にあげる。とくに試験の計画をたてる段階において、以下にあげる事柄を吟味しておくことが大切となる。すなわち、統計処理のできるデータを得るために試験開始前に当然吟味しなければならない事柄であり、このことによって初めて効能または効果を裏付ける試験資料を得ることができるからである。このような考えに基づき実験的研究を進めることを実験計画法と呼んでいる。



△: Control ○: 1 mg/kg
●: 20mg/kg □: 40mg/kg *: 対照群との有意性 (P ≤ 0.05)
平均 ± SE (n = 3 ~ 6)
SIRIC et al. (1978) より引用
左肺後葉の上部、中部、下部の3か所を鏡見
測定部位は0.033mm²の視野に肺胞および肺胞管のみらる
肺実質とし、3か所の合計(0.1mm²)の細胞数を示している
プレパラートは全てコード化。

図1 プレオマイシン投与期間のマウス肺胞内細胞数の変化

表2 V. K₁ 効果比較試験計画書

〔目的〕 V. K₁ 3 mg/kg 1回投与後1 mg/kg 5日間連続投与, V. K₁ 3 mg/kg 1回投与, 1 mg/kg 6日間連続投与, 生理食塩液 0.3 ml/kg 6日間連続投与について, 抗クマテトラリール中毒効果を比較する

- 1) 方法: 群間比較
- 2) 対象: 次の2項目のいずれにも該当するものクマテトラリール1回経口投与後,
 - i) 出血など一般症状が悪化し, 放置すれば死の転帰をとると判断される状態
 - ii) プロトロンビン時間が5分以上に延長された時期
- 3) 対象犬の選択条件
 - i) 年齢 成熟したもの
 - ii) 体重 10 kg 前後のもの
 - iii) 性別 不問
 - iv) 確認 抗ジステンパー血清を投与し, 一般症状ならびに各種血液検査により, つとめて健康とおもわれるもの
- 4) 使用薬剤
 - i) V. K₁
 - ii) プランボ (生理食塩液)
- 5) 用法および用量

用法: 対象の条件をみたした時に, 筋肉内に投与する

用量: i. 初日 V. K₁ 3 mg/kg 1回投与し, その後 V. K₁ 1 mg/kg を連続5日間投与
 ii. V. K₁ 3 mg/kg を初日1回だけ投与
 iii. V. K₁ 1 mg/kg 連続6日間投与
 iv. 生理食塩液 0.3 ml/kg 連続6日間投与
- 6) 割付け カードによる無作為割付け
- 7) 観測
 - i) プロトロンビン時間, 血清 GOT および GPT 活性値, 赤血球数, 白血球数, ヘマトクリット値, ヘモグロビン量をクマテトラリール投与前, および投与後3日毎に測定
 - ii) 一般症状は試験期間中毎日
- 8) 評価 薬効の評価は治療犬が生存するか否かに行う
- 9) 解析方法 χ^2 検定による統計処理を行う
- 10) 例数 各群8頭の同数とする
- 11) 実験期間 昭和51年4月より1.5ヵ月
- 12) 注意事項 実験精度の高くなるような実験を行うため次の事項についてとくに配慮する
 - i) 実験動物の選定
 - ii) 対照群のとり方
 - iii) 測定 of 順序
 - iv) 予備実験を行う

1) 被験動物の選定

「V. K₁ 効果試験」では動物を分類や層別しないで網羅するようなデータがよいという判断と経済面からの制約も考えて, 雌雄を問わない体重 10 kg 前後の雑種成犬を選ぶことにした。動物は神奈川県動物保護センターより約1年間かかって導入した193頭で, 導入後抗ジス

表3 TKPP 効果比較実験計画書

〔目的〕 ① 600 mg/animal; 5% 濃度, ② 600 mg/animal; 10% 濃度, ③ 600 mg/animal; 20% 濃度, ④ 1,200 mg/animal; 5% 濃度, ⑤ 1,200 mg/animal; 10% 濃度, ⑥ 1,200 mg/animal; 20% 濃度, ⑦ 2,400 mg/animal; 5% 濃度, ⑧ 2,400 mg/animal; 10% 濃度, ⑨ 2,400 mg/animal; 20% 濃度, ⑩ 4,800 mg/animal; 5% 濃度, ⑪ 4,800 mg/animal; 10% 濃度, ⑫ 4,800 mg/animal; 20% 濃度, ⑬ 水道水 96 ml/animal の1回投与において嘔吐誘発効果を比較する

- 1) 方法: 群間比較
- 2) 対象: 次の条件に該当する犬
 - i) 年齢 成熟したもの
 - ii) 体重 10 kg 前後のもの
 - iii) 性別 不問
 - iv) 確認 抗ジステンパー血清を投与し, 一般症状ならびに各種血液検査により, 健康であると診断された犬
- 3) 使用薬物
 - i) TKPP
 - ii) プランボ (水道水)
- 4) 用法および用量

用法: 1週間に1回計13回, 胃カテーテルによる強制経口投与

試験開始前20時間絶食させ, TKPP 投与30分前に肉汗をかけたドッグフード100gを給与

用量: 目的の項に挙げた各濃度と用量の組み合わせ, 合計13群を設ける
- 5) 割付け: 乱数サイによる無作為割付け
- 6) 観察: TKPP 投与後1時間以内に嘔吐のみられたものにつき, 潜伏期および吐物量を測定。投与後1時間以降に嘔吐した犬は TKPP により嘔吐効果のみられなかったものとして処理
- 7) 評価: 薬物の評価は対象動物が嘔吐するか否かに行う
- 8) 解析方法: 嘔吐に対する TKPP の濃度および (または) 用量の効果については分散分析を行う
嘔吐効果の評価においては χ^2 検定による統計処理を行う。また, 潜伏期ならびに吐物量に関してはステューデントの t 検定を実施する
- 9) 例数: 各群12例の同数とする
- 10) 実験期間: 昭和55年6月より3ヵ月
- 11) 注意事項: 実験精度の高くなるような実験を行うため, 次の事項についてとくに配慮する
 - i) 被験動物の選定
 - ii) 対照群のとり方
 - iii) 予備実験を行う

テンパー血清を投与し, 1~2週間隔で2回の検疫を行い, 測定値にバラツキが少なく健康と思われるもの約50頭を選択し, 別棟の実験用犬舎に移して3~6ヵ月間飼育・馴化したのち, 実験に供した。環境条件はとくにコントロールされた実験犬舎でないため, 実験は4月から5月にかけての気候のよい時期に実施した。山内

(1971)¹⁶⁾によればアメリカでは、実験用の犬は3グループに分けられているという。「V. K₁ 効果試験」におけるこのような選択を行って実験に供した犬は、少なくともアメリカでの Conditioned random source dogs のカテゴリーに該当するものといえる。「TKPP 効果試験」では、Conditioned random source dogs のカテゴリーに該当する犬 20 頭を、同センターより3カ月間にわたって導入した 72 頭のなかから選択した。この試験では温度 22±3℃、湿度 60±12% の制御環境下で、1頭ずつ個体ケージに入れて実験を遂行した。

2) 被験動物の層別

「TKPP 効果試験」では動物を層別して実験を進めることにした。その理由は、筆者らのこれまでの研究(城之内ら; 1980)⁵⁾ から、雑種成犬における硫酸銅誘発嘔吐には著しい個体差のあることが知られており、実験精度を高めるためには、実験計画法の層別の原則をあてはめることがよいと考えたからである。したがって、表4に示すように Conditioned random source dogs のカテゴリーに該当する犬 20 頭のなかから、硫酸銅 50 mg/animal または 100 mg/animal で嘔吐する犬 12 頭を選んだ。

いっぽう、臨床試験においてもこの層別の原則をあてはめなければならないことが多い。なぜなら、臨床試験においては対象となる動物の重症度がすべて同程度ではなく、「軽症」のものから「きわめて重症」のものまで幅広く含まれている。このような場合、比較する群間への動物の割付けを無作為に行くと、偶然に群間に重症度あるいは軽症度の偏りを生ずるおそれがあり、その結果、評価を誤らせる危険性があるからである。そこで、このような場合は対象動物を軽症、中等症、重症、きわめて重症といった層に分けることが行われている(概括重症度評価基準をもうけその点数により分類¹²⁾)。また、臨床試験の実施場所の差違、動物舎および房の差違、母親の差違、年齢別あるいは性別などによっても試験の目的により層別されることがある。いずれにしても層別後は実験

表4 硫酸銅誘発嘔吐の選択予備実験 (I)

個体番号	体重 (kg)	性	硫酸銅閾値量 (mg/animal)
8	13.0	F	100
17	9.8	M	50
20	9.0	M	100
22	10.0	F	50
24	14.0	F	100
28	9.5	M	100
44	9.5	M	50
48	8.0	F	50
51	9.0	F	50
52	8.0	M	100
54	8.5	M	50
55	7.5	F	100

計画法にいう無作為割付けの原則にしたがって実験は進められなければならない。

3) 対象群のとり方

「V. K₁ 効果試験」および「TKPP 効果試験」とも対照群の処理の仕方は、投与というストレス刺激と V. K₁ あるいは TKPP そのものの生体に対する作用とを分離して解析を容易にするため、プラシボとして生理食塩液あるいは水道水を実験群と同様に処理した。また、「V. K₁ 効果試験」では別に Cou. 中毒に対する対照として、ラクトースを同様に処理した群をもうけた。なお、1群の実験動物数と対照動物数を同数としたとき、実験精度を上げることが多いので同じ数とした。

いっぽう、臨床試験においては、しばしば農家の疾病家畜を対象にして進められることがあり、この場合、陰性対照群を設定するのは困難である。しかし、実験の精度からいえば陰性対照群を設けることがよい結果をうむるので、本来ならば試験依頼者により対照群に用いる動物を買い上げてもらうか、あるいは実験者が経費の一部として、動物を買い上げて実施することが望ましい。もし、経済的理由あるいはその他の理由から動物の買い上げが困難な場合、陽性対照群(すでにその疾病に対し治療薬として使用されている薬物を投与する群)を設けるようにする。

4) 投与の順序および測定

「V. K₁ 効果試験」では薬物投与や血液検査などにおいて、いつも動物の番号順に投与や測定を行うことは、時間の影響がバイアスとしてかかってくるので、そのつど無作為化して実施するようにした。ただし、血液測定項目の順序は、例えば赤血球数を測定し、ついで白血球数、Ht 値などと血液の使用順位は決めて行った。

5) 予備実験

実験における対照群の反応率が 100% あるいは 0% を示す場合での比較はきわめて精度が高くなることから、「V. K₁ 効果試験」では対照群の生存率が 0% になるような用量を求めため表5に示す予備実験を実施した。この予備実験の結果から、野外での中毒発生形態も考え合わせ、本実験では Cou. を 100 mg/kg 1 回経口投与することにした。また、測定項目は赤血球数、白血球数、Ht 値、Hb 値、プロトロンビン時間(以下、PT 時間と略す)、血清 GOT および GPT とし、測定日は Cou. 投与前ならびに投与後 3 日目ごとに行うこととし、V. K₁ またはプラシボ投与は Cou. の投与により、一般症状の悪化、すなわち出血などの症状が発現し、放置すれば死の転帰をとると判断される状態ならびに PT 時間が 5 分以上に延長されたときに行うこととした。

「TKPP 効果試験」では前述のように実験精度をあげるために硫酸銅誘発嘔吐犬選択の予備実験(表4)を実施した。

表5 V. K₁ 効果試験における予備試験 (I)

投与法	投与量 mg/kg	例数	PT時間>5分 日 目	出血等 日 目	斃日	死目	生存率 %
6日間連続	0.25	3	7~10		11~15(2/3)		33.3
	1.00	3	6~9	5~7(2/3)*	7~13(3/3)		0
1回	50	3	7~11	10(1/3)	8~12(2/3)		33.3
	100	3	6~8	5~7(2/3)	5~9(3/3)		0

注) *: () 内の数字は使用動物数に対する反応動物数

表6 V. K₁ 効果試験における予備実験(II)

- * 成犬 3頭
- * Coumatetralyl 100 mg/kg P. O
- * 5日目 V. K₁ 1 mg/kg i. m
(4~5日間連続投与)
- * 8日目 1頭斃死(2頭回復)
- * 生存率 66.7%

なお、臨床試験においても測定項目および測定日の決定、ならびに重症度層別のための予備検査や予備試験を行うことにより、合理的な試験の計画を立てることができよう。

表6はV. K₁ 投与量および必要最小限の標本数を求めるために行った予備実験である。すなわち、全例ともCou. 投与後5日目にV. K₁ 投与の基準に合致したので、V. K₁ 1 mg/kgを筋肉内に4~5日間連続投与した。その結果、1例死亡、2例は回復して生存率66.7%であった。この予備実験から、本実験における必要最小限の標本数を求めることにした。標本数は、① データが正規分布するとき、② 二項データから求めた比率が近似的に正規分布するとき、③ データが対数正規分布するとき、④ 標本百分率の分布をF分布に近似させたとき、などによってそれぞれ求め方が異なる。

二項データから求めた標本百分率において、
 $np \geq 500\%$ (ただし、 $p \leq 50\%$)

n: 標本数(データ数), p: 標本百分率

上記の式が成立するとき、

pの分布を正規分布に近似できる。

成立しないとき、

pの分布をF分布に近似しなければならない。

ことから、この予備実験では例数が3例と少ないため上記の式は成立せず、したがって、pの分布をF分布に近似させて標本数を求めることにした。滝沢¹⁴⁻¹⁷⁾(1976)は必要最小限の標本数を簡単に求めるためにノモグラムを作成しており、今回の標本数は図2に示すような滝沢¹⁷⁾(1976)のノモグラムを使用して求めた。すなわち、予備実験から対照群の生存率は0%、V. K₁ 投与群は66.7%であったので、本実験におけるV. K₁ 投与群の生存率の近似値を70%と予想し、得られる生存率の信頼下限の許容誤差を40%程度とすれば、比較する両群の許容誤差は重ならないだろうと判断して、これを満足

表7 TKPPの投与量および必要最小限の標本数を求める予備実験

TKPP 用量 (mg/animal)	TKPP 濃度	使用例数	嘔吐例数
1,200	10	3	0
1,500	5	3	0
1,500	15	3	2
2,400	10	3	2
3,000	7.5	3	2
Water (40 ml)	0	3	0

させるための標本数を求めた。この場合の許容誤差cはp-PLであり、Pu-pよりも大きい(Pu:母百分率の信頼上限, PL:母百分率の信頼下限, p:標本百分率)とみなして、ノモグラムのp目盛上(下段)に70%、c目盛上に40%を取り、両者の交点を求めると、交点をささむ2本の折れ線のnの目盛は7と8であり、小数点以下を切り上げれば求めるnは8である。したがって、本実験での1群の標本数を8例として実験を進めることにした。

表7はTKPPの投与量および必要最小限の標本数を求めるために実施した予備実験である。すなわち、TKPP 1,200 mg/animal(10%濃度)、TKPP 1,500 mg/animal(5%濃度)および水道水40 ml/animalを投与した群では嘔吐発現率はいずれも0%であった。いっぽう、TKPPの1,500 mg/animal(15%濃度)、2,400 mg/animal(10%濃度)および3,000 mg/animal(7.5%濃度)群においてはいずれも3例中2例に嘔吐がみられ、嘔吐率66.7%であった。この予備実験の結果から滝沢のノモグラム(図2)を用いて前述のように必要最小限の標本数を求めた。すなわち、この「TKPP 効果試験」では、対照群(水道水投与群)の嘔吐率0%、TKPP投与群(1,500 mg/animal; 15%、2,400 mg/animal; 10%、3,000 mg/animal; 7.5%)の嘔吐率の近似値を70%と予想し、得られる嘔吐率の信頼下限の許容誤差を35%程度とすれば、有意性を検出できるだろうと判断して、これを満足させるための標本数を求めた。その結果、1群11例以上の標本数を必要とした。また、この予備実験からTKPPの用量と濃度の両者が嘔吐の誘発に影響を与えていることが推察されたので、2要因(用量および濃度)のそれぞれ4水準、3水準の二元配置実験とすることにした。その結果、対照群を含む各投与群の合計は13群となり、先

標本百分率の分布を F 分布に近似する場合
 標本数決定用 (信頼度95%)
 許容誤差: $P_U - p$ または $p - P_L$
 95%信頼限界計算用

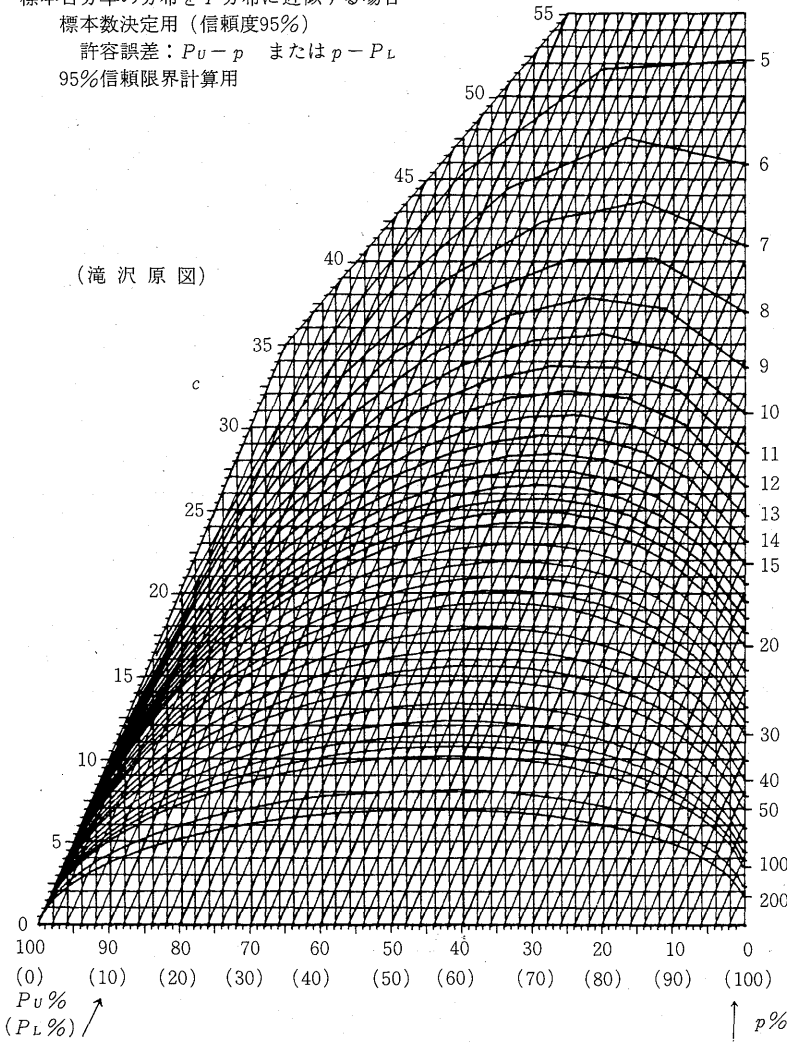


図2 ノモグラム

表8 犬にけおる TKPP の嘔吐誘発

TKPP 用量 (mg/animal)	濃 度 (%)		
	5	10	20
600	{ 0/6 0/6	0/6	1/6 0/6
1,200	{ 0/6 0/6	1/6 2/6	2/6 3/6
2,400	{ 1/6 0/6	3/6 4/6	3/6 2/6
4,800	{ 6/6 3/6	5/6 3/6	6/6 6/6
Placebo*	0/12		

注) *: 全 12 頭にプラシボとして 96 ml の水道水を強制経口投与. 数値は 1 群の動物数に対する嘔吐動物数を示してある

に求めた 1 群 11 例の標本数が必要となると, 使用する動物数は合計 143 頭になる. そこで, 12 頭の動物を 1 週間に 1 回, 13 週にわたって使用しても, この実験では獣医学的立場から実験成績に影響を与えないだろうと判断し, また, 経済的, 労力の背景をも考慮して同一動物を各群に 1 回必ず割付けられるように繰り返して用いることにした. したがって, 1 群の例数は 12 例となり, 先にノモグラムより求めた 1 群の必要最小限の標本数 11 例を十分満足していることになる. なお, 予備実験の結果, 用量と濃度が TKPP の嘔吐に影響を及ぼしていることが考えられたので, 本試験では二元配置実験としたが, 因子の主効果のほかに, 因子の組合せの効果 (用量と濃度の組合せの効果), いわゆる交互作用のあることも考えられたので, 繰り返しのある実験系とした (表 8). すなわち, 各群 6 例のデータが得られたとき, その成績を実験 1 とし, 続いて 6 例のデータが得られたとき, その成績を実験 2 とした. このように繰り返しのある二元配置法の実験としてデータを得ることにより, 分散分析による要因効果ならびに交互作用の効果を検定することができる⁴⁾.

以上のことから, 臨床試験においても実験の仮説をあらかじめ明確にしておき, 得られるデータの性格に基づいて検定方法を定め, 統計処理していくとよい. この場合, 重要なことは検定の帰無仮説がなんであるかを十分理解しておくことが必要であろう.

6) 実験の方法

「V. K₁ 効果試験」の実験方法を表 9 に示してある. すなわち, V. K₁ 投与量は予備実験での例数が 3 頭と少ないことから, 許容誤差のかかなり大きいことを考慮して, 3 mg/kg 1 回投与群, ならびに 3 mg/kg 1 回投与後 1 mg/kg を連続投与する群をさらにもうけることにした.

いっぽう, 「TKPP 効果試験」では, 表 8 に示すようにプラシボ群, TKPP の 600, 1,200, 2,400 および 4,800 mg/animal の各用量につき, それぞれ 5, 10 およ

表9 V. K₁ 効果試験における実験方法

グループ	例数	クマテト ラリール	指 標	ビタミン K ₁ 治 療
I	8	100 mg/kg } (ラクトース)	PT 時間 出血等	3 mg 1回
II	8			1 mg 連続
III	8			3 mg 1回
IV	8			1 mg 連続
V	8			生理食塩液

び 20% 濃度の各組合せ、計 13 群とした。実験は犬を試験開始前 20 時間にわたり絶食させ、被験薬投与 30 分前に 50 ml の肉汁をかけたドッグフード 100 g を与え全量摂食したことを確認した。この試験では Conditioned random source dogs のカテゴリーに入る犬 20 頭を選択したが、そのうち硫酸銅で嘔吐を発現した犬は 12 頭のみであった。したがって、13 ブロックに 13 回無作為に割付ける、いわゆる乱塊法を採用することができなかった。そこで、少なくとも TKPP 投与群、すなわち 12 ブロックへの動物の割付けを毎回無作為に行いたいという考えから、第 1 回目の投与として全 12 頭に水道水 96 ml を強制経口投与し、対照群とした。なお、12 頭の犬は各々必ず 1 回だけ、各ブロックに割付けられるように配慮したがその割付ける順序は無作為に行った。TKPP およびプランボ投与後は嘔吐発現の観察時間を 1 時間とした。その理由は、TKPP 投与後 1 時間以降に嘔吐がみられたとしても実用的かつ効果的な催吐薬とはいえないからである。

5. 実験の成績

表 10 は「V. K₁ 効果試験」の結果を示したものであ

る。

V. K₁ を投与しても死の転帰をとるものは 5 日目から 13 日目までにいずれも死亡し、各群における生存率はそれぞれ 87.5% (I 群), 75% (II 群), 37.5% (III 群), 0% (IV 群) であった。なお、死の転帰をとらなかった個体は 14 日間の観察後、さらに引き続いて約 1 カ月間観察を継続したが、その間死亡するもの、あるいは一般症状の悪化するものは認められなかった。これらの結果から、V. K₁ 投与による治療効果があったか否かを、生理食塩液投与による方法との間で比較検定することにした。このような 2 つの比率の差、すなわち 2 × 2 分割表といわれている検定には χ^2 検定が用いられているが、表 10 に示すように 2 × 2 分割表の枠内度数において、いずれの場合も 4 以下が 2 つ以上存在しているので、Fisher の直接確率計算法で検定した。その結果、V. K₁ 3 mg/kg 1 回投与後 1 mg/kg を 5 日間連続投与する方法ならびに V. K₁ 3 mg/kg を 1 回投与する方法は、V. K₁ を投与しない方法に比べ、1% の危険率で有効であるといえる。しかし、V. K₁ 1 mg/kg を 6 日間連続投与する方法では、V. K₁ を投与しない方法との間に有意の差がないものとみなされる。このことから、犬の Cou. 中毒に対し、V. K₁ の投与は早い時期に比較的少量投与し、その後経過に応じた用量を投与すれば、きわめて有効であることが示唆されたといえよう。

いっぽう、「TKPP 効果試験」における実験成績を表 8 および表 11 に示してある。この試験では、まず TKPP の用量と濃度がそれぞれ嘔吐誘発に影響を与えているか、また、それらの因子の交互作用が存在するか否かを検定することにした。このように、その実験にとり上げた因子の効果を検定する方法として分散分析法が用いら

表10 V. K₁ 効果試験の結果

グループ	指 標		ビタミン K ₁ 治療	斃 死 例	生存率 (%)
	出血等	PT 時間 5分以上			
I	4~5日目	5日	{ K ₁ 3 mg/kg 1回 (5日目), K ₁ 1 mg/kg 連続 (6~10日目) }	5日 (1/8)	87.5
II	4~7日目	5日	K ₁ 3 mg/kg 1回 (5日目)	8~12日 (2/8)	75.0
III	2~5日目	5日	K ₁ 1 mg/kg 連続 (5~10日目)	6~13日 (5/8)	37.5
IV	2~6日目	5日	生理食塩液連続 (5~10日目)	5~9日 (8/8)	0
V	—	—	—	(0/8)	100

生死			生死			生死					
I	7	1	8	II	6	2	8	III	3	5	8
IV	0	8	8	IV	0	8	8	IV	0	8	8
	7	9	16		6	10	16		3	13	16

I : V. K₁ 3 mg/kg 1日, 1 mg/kg 5日間 P=0.0007<0.01
 II : V. K₁ 3 mg/kg 1日 P=0.0034<0.01
 III : V. K₁ 1 mg/kg 6日間 P=0.1 >0.05
 IV : 生理食塩液 6日間

表11 TKPP 効果試験の結果

TKPP 用量 (mg/animal)	濃 度 (%)		
	5	10	20
600	0/12	0/12	1/12
1,200	0/12	3/12	5/12*
2,400	1/12	7/12**	5/12*
4,800	9/12**	8/12**	12/12**

注) * P<0.05 ** P<0.01

れているが、交互作用の効果を求めるためには、繰り返しのある二元配置法の実験を実施しておく必要がある。

表 8 の成績を分散分析した結果、

用 量 : $F_0=28.29 > F(3, 12; 0.01) = 5.95$

濃 度 : $F_0=7.84 > F(2, 12; 0.01) = 6.93$

交互作用 : $F_0=2.04 < F(6, 12; 0.05) = 3.00$

であった。したがって、用量および濃度はそれぞれ TKPP の嘔吐発現にきわめて大きな影響を与えているといえる。しかし、用量と濃度の 2 因子の交互作用の効果は TKPP 嘔吐発現に影響を及ぼしていない。このように、分散分析の結果、交互作用が有意でなかったことから、この交互作用 (用量×濃度) を誤差項にプールして再度検定を行ったところ

用 量 : $F_0=21.02 > F(3, 18; 0.01) = 5.09$

濃 度 : $F(2, 18; 0.01) = 6.01 > F_0$

$= 5.84 > F(2, 18; 0.05) = 3.56$

であった。それゆえ、TKPP の用量は 1% の有意水準で、また TKPP の濃度は 5% の有意水準で、それぞれ嘔吐効果発現に影響を与えているといえる。そこで、TKPP の用量と濃度が嘔吐を誘発させる効果因子としてとりあげられるならば、次に、TKPP の各用量・濃度の組合せを投与したとき、どの組合せに嘔吐効果があったか否かを、水道水投与による方法との間で、Fisher の

直接確率計算法を用いて検定した。その結果、TKPP の 1,200 mg (20%) および 2,400 mg (20%) の投与は 5% 有意水準で、また、2,400 mg (10%) および 4,800 mg (5%, 10% および 20%) の投与は 1% の有意水準で、効果的に嘔吐を誘発させるといえる。

表 12 には TKPP 投与後、嘔吐のみられるまでの潜伏期についてその成績を示した。

TKPP 投与により 3 頭以上嘔吐のみられた群で、平均潜伏期を求め、ステューデントの t 検定を用い各群間での潜伏期の有意性を解析した。その結果、いずれの群間にも有意差はみとめられなかったため、TKPP 投与により嘔吐のみられたすべてのデータから、TKPP 誘発嘔吐時の平均潜伏期を計算した。その結果、潜伏期は 7 分 33 秒であり、その 95% 信頼区間は 5 分 58 秒から 9 分 7 秒であった。

このように、十分な予備実験に立脚した実験計画をたてることにより、「V. K₁ 効果試験」ではわずか 1 群 8 頭、また、「TKPP 効果試験」では全頭わずか 12 頭という少数例の実験でも、かなり精度の高い実験が実施できることが確認された。

6. ま と め

統計的検定においては実験的研究であれ、調査であれ、その測定値であるデータはそのまま使用され解析されていく。それゆえ、そのデータは客観的な情報でなければならないと同時に、バイアスの含まれない、しかもバラツキの小さいデータであることが望ましい。そうすることにより、より精度の高い統計的推測が行えるからである。そのためにはデータを得る前の問題を十分吟味しておく必要がある。著者はとくに、① 条件設定の問題、② 実験計画、③ 標本数の決め方などを吟味することによって、雑種の犬を少数例使った実験でも、かな

表12 TKPP 誘発嘔吐の潜伏期 (分)

TKPP 用量 (mg/animal)	濃度 (%)	個 体 番 号												$\bar{X} \pm SE$
		8	17	20	22	24	28	44	48	51	52	54	55	
600	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	20	n	n	9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	9
1,200	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	10	n	7	n	n	n	5	6	n	n	n	n	n	6:00±:34
	20	7	n	n	n	4	n	5	7	n	6	n	n	5:48±:34
2,400	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	7	7
	10	n	n	n	8	n	8	6	21	22	5	3	n	10:25±2:56
	20	6	n	n	5	8	3	n	n	n	n	6	n	5:36±:48
4,800	5	n	5	6	5	7	10	n	8	8	4	26	n	8:48±2:14
	10	n	5	n	7	5	5	4	n	5	4	n	11	5:45±:49
	20	18	4	3	8	6	8	3	5	28	2	6	5	8:00±2:11
Placebo	0	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n

注) n : 嘔吐なし $\bar{X} \pm SE$: 平均値±標準誤差 (分:秒)

り精度の高い実験結果を得ることができた。

しかし、この研究のすすめ方においても予備実験で期待したのもってきただけという点では成功しているものの、完全なものであるとは考えていない。なぜなら、層別の原則、繰り返しの原則および乱塊法を適用することなど、また、解析方法を検討することなどで、さらに精度の高い実験へと進めることができるからである。

以上のことは臨床試験においてもいえることであり、実験計画法に基づく治療効果試験が実施されれば、これまで以上に説得力のある成績を得ることができるものと思われる。このことが将来、動物薬においても、臨床評価の公平性を保証していくことになることと信じている。

最後に、統計的に有意の差があったとしても、データに現われた差が獣医学的あるいは医学的に有意義であるかどうかの評価は、実験者が客観的に行わなければならないことを付記しておきたい。

参考文献

- 1) AKAHORI, F., MASAOKA, T. and AKIYAMA, E.: *J. Toxicol. Sci.*, 7, 151~158 (1982).
- 2) 朝尾 正, 安藤貞一, 楠 正, ほか: 最新実験計画法, 3~40, 405~419, 日科技連出版, 東京 (1973).
- 3) FLEISS, J. L.: 計数データの統計学, 佐久間 昭訳, 25~42, 117~137, 東大出版, 東京 (1975).

- 4) 石川 馨, 米山高範: 分散分析入門, 78~109, 日科技連出版, 東京 (1967).
- 5) 城之内信一, 政岡俊夫, 赤堀文昭: 麻大獣研報, 1(2) 289~296 (1980).
- 6) 政岡俊夫, 赤堀文昭, 鈴木貴開, ほか: 麻大獣研報, 3(2) 109~117 (1981).
- 7) 増山元三郎, 奥野忠一, 田口玄一, ほか: 実験計画法, 109~156, 東大出版, 東京 (1974).
- 8) 松本慶蔵, 斉藤 玲, 横山紘一, ほか: 臨床薬理, 8, 155~168 (1977).
- 9) 松本慶蔵, 斉藤 玲, 志摩 清, ほか: 臨床薬理, 11, 37~47 (1980).
- 10) 野見山一生, 前田 博: 産業医学, 5, 30~34 (1963).
- 11) 佐久間 昭: 生物検定法, 1~73 東大出版, 東京 (1964).
- 12) 佐久間 昭, 松本慶蔵, 斉藤 玲, ほか: 臨床薬理, 13, 547~558 (1982).
- 13) SIKIC, B. I., YOUNG, D. M., MIMNAUGH, E. G., et al.: *Cancer Res.*, 38, 787~792 (1978).
- 14) TAKIZAWA, T.: *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 16, 25~30 (1976).
- 15) TAKIZAWA, T.: *ibid.*, 16, 25~30 (1976).
- 16) 滝沢隆安: 家畜衛試研究報告, 73, 37~42 (1976).
- 17) 滝沢隆安: 同上, 73, 43~49 (1976).
- 18) 山内忠平: 実験動物, 20, 173~177 (1971).

地方会だより

岩手県獣だより

第13回 通常総会

岩手県獣医師会(三浦定夫会長)では去る5月24日、岩手県農業保険会館において第13回通常総会を開催した。当日は、来賓からご祝辞をいただいたのち議案審議に入り、提出された議案のすべてを原案どおり可決・承認した。

なお、役員任期満了に伴う改選が行われ、以下のとおり選任された。

<新役員>

会長: 三浦定夫(再)

副会長: 川口善弥(再) 米沢重右=門(再)

理事: 岩野忠吉(新) 川向幸雄(再) 熊谷彦十郎(再)
佐々木多助(再) 古水寛一(再) 大森良平(新)
小岩円治(再) 北田俊男(新) 大島寛一(再)
横沢孝市(新) 大石 尚(再) 石川欣司(新)
本田慶三(再) 多田 晃(新) 金子和弘(新)
千葉洋一(新)

監事: 千田 稔(再) 鶴浦有一(新) 及川岑夫(新)
(藤 原)

栃木県獣だより

第37回 通常総会

栃木県獣医師会(塚田賢一郎会長)では第37回通常総会を去る5月26日、宇都宮市・栃木県獣医師会館に会員多数出席のもと盛大に開催した。

当日は、県出納長の推津弘之先生(県獣顧問)はじめ、県畜産課の荒川課長、県環境衛生課の萱島課長のご臨席をいただいた。

総会は吉成副会長の開会宣言に始まり、物故者に対する黙禱、塚田会長の挨拶に続いて、会員歴50年の奈良部峯吉、30年の館野平蔵・中村房登・田村 保・多部田兼弘・渡辺豊通・水沼正雄・小林文夫・七原孝夫の各氏、および狂犬病予防注射優秀支部として安佐・栃中・上都賀の各支部を表彰した。また、昭和58年度の各種受賞者に対する副賞贈呈を行ったのち、ご出席の来賓からご祝辞を頂戴した。

つづいて、斉藤信吉氏(佐野市)を議長に昭和58年度事業報告・決算承認のあと、昭和59年度事業計画および予算案件等について慎重審議の結果、全議案を原案(p.405につづく)