マイマイガの幼虫に対する DDVP の毒性
とくに size factor の算定

長澤純夫・神崎 務・永津明敏*

Sumio NAGASAWA, Tsutomu KANZAKI, Akitoshi NAGATSU

The Size Factor in the Toxic Action of DDVP upon Gypsy Moth Larvae

大幅に大きさの異なる生物を材料に薬物の生理作用を *in vivo* で見る実験においては，普通その体重に正比例した薬量が慣例的に投与され，反応が測定されている．しかし，これは後に述べる size factor $h^* = -1$ のごく限られた場合だけに成り立つ事であって，厳密には薬量の補正がこの size factor の値からなされなければならない．また体重の 2/3 乗が体表面積に相当するものとして，この後者に比例した薬量が見積られ投与される場合もあるが，多くの薬理学また毒理学実験の結果を，こうした簡単な型に限定して考えることの困難な例が少なくない．そのために個々の体重の相違を平均化するための size factor を，薬物の種類あるいは試験法ごとに実験値からきめることが，カイコガの幼虫に対する砒酸塩の毒性を実験した結果を解析する中で Bliss[1] によってこころみられている．本文においては，マイマイガの4令期前後の幼虫に対する DDVP の毒性を評価した実験結果を用いて，この問題を考える．

本文に入るに先立ち，供試材料の御提供を戴いた，農林省林業試験場浅川実験林岩田善三技官に謝意を表する．なお，この研究の一部は「農薬の生物に対する正と負の衝撃評価方法，および理論確立」を目的に，昭和52年度全国農業協同組合連合会委託研究費によって行われた．

実験材料および方法

供試昆虫：この実験に用いたマイマイガ *Lymantria disper* L. の幼虫は，1977年2月東京都青梅市富岡のクリの樹幹から採集した1卵塊に出発するもので，4月初旬ふ化した幼虫を普通の実験室の条件下で第2令までノイバラの幼芽で飼育し，その後は約10匹を一群として直径 10cm，高さ 4.5cmのポリエチレン製カップでポプラの葉を与えて飼育した．試験には概ね第4令期のものを用いた．

供試薬剤：DDVP は純度98.2%の工業製品で，この 50mg をアセトンで10ccとし，これから順次対数値にして $i = 0.1$ の間隔で7段階に稀釈した．

試験方法：供試昆虫は薬剤投与直前，化学天秤でその体重を mg の単位まで測定した．Arnold hand micro-applicator を用いて，薬液 5 μl を幼虫胸部背面に滴下処理した．処理後は1個体づつ直径 9cm のペトリ皿に入れ，この薬液処理の時から，苦悶，仰転するまでの時間を分単位で観察記録した．幼虫は全部で68個体を用いた．

実 験 結 果

処理薬量 $d_*(\mu g)$ の対数 x_1，体重 $w\,(g\times10)$ の対数 x_2，および仰転までの時間（分の逆数×1,000），すなわち反応速度の対数 y の関係を各個体毎に示したのが，第1表の 2, 3, 4 欄の数値である．ここで反応 y は，ふたつの独立変数 x_1, x_2 の次の様な関数として表わしうると考える．

$$Y = a + b_1(x_1 - \bar{x}_1) + b_2(x_2 - \bar{x}_2)$$

Y は x_1, x_2 を与えられた時の反応 y の期待値で，反応の平均である係数，$a = \bar{y}$ および偏回帰係数 b_1, b_2 はいづれもデーターから計算される．

上に述べた様に，体重の変異の幅の広い生物を試験に用いる場合は，従来行われている様な体重に正比例した

* 生物汚染化学研究室

Table 1. Rate of toxic action of DDVP in larvae of the gypsy moth

Larva No.	Dose x_1	Weight x_2	Rate y	z^*	Larva No.	Dose x_1	Weight x_2	Rate y	z^*
1	1.4	0.775	2.398	0.2163	35	1.1	0.896	1.959	-0.2686
2	1.4	0.634	2.301	0.4316	36	1.1	0.769	1.553	-0.0746
3	1.4	0.671	2.046	0.3751	37	1.1	0.710	1.824	0.0155
4	1.4	0.430	3.000	0.7432	38	1.1	0.705	1.959	0.0232
5	1.4	0.757	2.155	0.2438	39	1.1	0.529	2.301	0.2920
6	1.4	0.655	2.523	0.3996	40	1.1	0.366	2.699	0.5410
7	1.4	0.757	2.301	0.2438	41	1.0	0.837	1.638	-0.2784
8	1.4	0.786	2.155	0.1995	42	1.0	0.705	1.721	-0.0768
9	1.4	0.752	2.000	0.2514	43	1.0	0.531	2.155	0.1890
10	1.4	0.553	2.155	0.5553	44	1.0	0.736	1.721	-0.1242
11	1.3	0.616	2.699	0.3591	45	1.0	0.705	1.678	-0.0768
12	1.3	0.375	2.699	0.7272	46	1.0	0.710	1.569	-0.0845
13	1.3	0.547	2.398	0.4645	47	1.0	0.795	1.569	-0.2143
14	1.3	0.734	2.046	0.1789	48	1.0	0.173	2.523	0.7358
15	1.3	0.463	2.398	0.5928	49	1.0	0.921	1.538	-0.4067
16	1.3	0.714	2.222	0.2094	50	1.0	0.902	1.222	-0.3777
17	1.3	0.601	2.097	0.3820	51	0.9	0.630	2.222	-0.0623
18†	1.3	0.943	2.699		52	0.9	0.774	1.409	-0.2822
19	1.3	0.543	2.097	0.4706	53	0.9	0.896	1.268	-0.4686
20	1.3	0.696	2.000	0.2369	54	0.9	0.541	2.398	0.0737
21	1.2	0.767	1.678	0.0285	55	0.9	0.839	1.187	-0.3815
22	1.2	0.442	2.398	0.5249	56	0.9	0.470	2.523	0.1821
23	1.2	0.875	1.921	-0.1365	57	0.9	0.954	0.886	-0.5571
24	1.2	0.620	1.796	0.2530	58	0.9	0.764	1.409	-0.2669
25	1.2	0.758	1.569	0.0422	59	0.9	0.747	1.036	-0.2410
26	1.2	0.534	2.398	0.3844	60	0.9	0.797	1.509	-0.3173
27	1.2	0.622	2.398	0.2500	61	0.8	0.704	1.495	-0.2753
28	1.2	0.765	1.921	0.0315	62	0.8	0.896	1.208	-0.5686
29	1.2	0.787	2.222	-0.0021	63	0.8	0.800	1.319	-0.4219
30	1.2	0.778	2.398	0.0117	64	0.8	0.798	1.027	-0.4189
31	1.1	0.667	2.000	0.0812	65	0.8	0.569	1.721	-0.0691
32	1.1	0.711	1.959	0.0140	66	0.8	0.791	1.032	-0.4082
33	1.1	0.588	2.523	0.2019	67	0.8	0.921	0.842	-0.6067
34	1.1	0.630	2.000	0.1377	68	0.8	0.844	1.886	-0.4891

薬量を与えるかわりに，個体毎の体重の違いを平均化するための大きさの因子 size factor を，上述の回帰式から推定し，これを用いて薬量を決めた方がより妥当であることは論をまたない．そして，体重に正比例した薬量を与えるのが適当な場合は，この方法でも同じ結論に達するはずである．

後で述べるが，棄却検定の結果から第1表の †印を附した No.18 は outlier として除外すべきことがわかったので，これを除いた残りの67個体について得られた x_1, x_2 と y の和と平均値，および生の平方和と積和を計算した．その結果は，

$$N = 67$$
$$\Sigma x_1 = 74.1$$
$$\Sigma x_2 = 46.328$$
$$\Sigma y = 128.877$$
$$\bar{x}_1 = 1.105970$$
$$\bar{x}_2 = 0.691463$$
$$\bar{y} = 1.923537$$
$$\Sigma(x_1^2) = 84.53$$
$$\Sigma(x_1 x_2) = 50.6636$$
$$\Sigma(x_2^2) = 33.551698$$
$$\Sigma(x_1 y) = 146.8142$$
$$\Sigma(x_2 y) = 85.530232$$
$$\Sigma(y^2) = 264.002319$$

のごとくである．

これから偏差平方和および偏差積和を計算すると，

$$[x_1^2] = 2.577612$$
$$[x_2^2] = 1.517615$$
$$[x_1 x_2] = -0.573785$$
$$[x_1 y] = 4.280085$$

Table 2. Analysis of variance of toxic action of DDVP in Table 1.

Row	Term	DF	SS	MS	F
1	Combined effect of b_i' s	2	12.086018	6.043009	96.29
2	Test of b_1	1	3.624867	3.624867	57.76
3	Test of b_2	1	4.979013	4.979013	79.34
4	Residual error	64	4.016583	0.062759	
5	Total	66	16.102601		

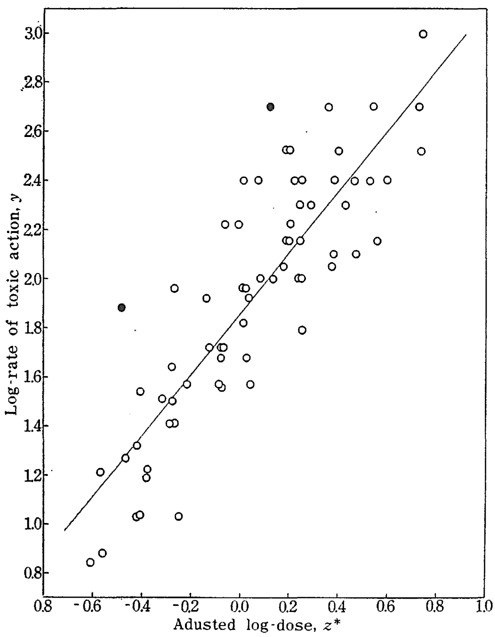

Fig. 1. Dosage-response curve for the toxic action of DDVP in gypsy moth larvae

$$[x_2y] = -3.583405$$

となる．これから逆行列

$$\begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} \\ c_{21} & c_{22} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0.4236073 & 0.1601589 \\ 0.1601589 & 0.7194811 \end{pmatrix}$$

を導き，偏回帰係数

$$b_1 = 1.239161$$
$$b_2 = -1.892698$$

を得る．

先の多重回帰式は$a' = \bar{y}-b_1\bar{x}_1-b_2\bar{x}_2$ とおくと，

$$Y = a'+b_1x_1+b_2x_2$$

と書き改めることができる．a' について計算を行うと 1.861793 を得る．

ここで $x_1 = \log d_*$, $x_2 = \log w$ であるから，上の式は

$$Y = a'+b_1(\log d_*+\frac{b_2}{b_1}\log w)$$

と変形できる．$b_2/b_1 = h^*$ とおき，体重換算の factor を w^{h^*} で定義すると，上の重回帰式は

$$Y = a'+b_1 \log (d_*w^{h^*})$$

という，y の $d_*w^{h^*}$ に対する単回帰式に帰着する．一般に体重が大きいほど，反応 y の値は小さくなるから，上の偏回帰係数 b_2 は，ほとんど常に負である．

いまここで h^* の特殊なふたつの場合を考えてみると，$h^* = -1$ の場合は，

$$d_*w^{h^*} = \frac{d_*}{w}$$

となり，同じ y をうるためには，体重に正比例した薬量を与えれば良いことを意味する．そして従来の人畜毒性の検定実験などは，全て慣例的にこの前提のもとに行われている．一方 $h^* = 0$ の場合は，$h^* = b_2/b_1$ から $b_2 = 0$ で体重には無関係になる．昆虫やダニを用いる殺虫剤，殺ダニ剤の効力検定は，この条件を満足するものとして，同じ薬量レベルに割り当てられた個体には，すべて同じ薬量が与えられているのに他ならない．

No.18 を除く67個体について得られた実験値から計算された，先の多重回帰式は，

$$Y = 1.86179+1.23916x_1-1.89270x_2$$

となる．よって求める size factor $w^{h^*} = -1.527403$をうる．そして体重換算薬量 $z^* = x_1-1.52740x_2$ を計算して表示したのが第１表第５欄の数値である．これに対する y の回帰を求めると，

$$Y = 1.923537+1.239174(z^*-0.049827)$$
$$= 1.8618+1.2392z^*$$

で，この回帰係数は，先に求めた b_1 とまるめの誤差しか違っていない．そしてこの y と z^* の関係を打点し，計算された回帰直線をひいたのが第１図である．

分散分析によって多重回帰式の，全体としての有意性と，各々の回帰係数 b_1, b_2 の重要性を検定した結果が第２表で，いづれも有意である．b_2 に有意性が認めら

れない場合は，体重換算を必要としない $h^*=0$ の場合と抽出誤差の範囲内で一致する．全体の平方和 $[y^2]$ のうち，薬量と体重で説明される部分，すなわち b_1 と b_2 の結合効果の割合は，

$$R^2=0.750563$$

となる．すなわち，薬液処理後，反応判定基準に至るまでの時間のばらつきの75%まで，薬量と体重によって説明しうることを示している．そして薬量と体重の反応時間に関与する重要度は後者が少しく大である．slope coefficient C は

$$C=b_1^2/(b_1^2-c_{11}s^2t^2)$$

の式から 1.074215 となる．ここで，t^2 は自由度 $n=64$ に対する t 表の 5%値 $t=1.9976$ から 3.9904 となり，s^2 は分散分析の誤差の平均平方である．この slope coefficient は回帰の部分と誤差の部分を対決させた数値で，$C\approx 1$, $b_1^2 \gg 2t^2s^2c_{11}$ の時は，その回帰の勾配が完全に信頼できることを意味し，$C>2$ または負になる様な場合は，b_1 はほとんど信頼できず生物試験結果として，それは全く使いものにならないことを示すものである．そして $1<C<2$, $b_2^2>2t^2s^2c_{11}$ の場合は，その実験結果は大体信用できることを意味し，本実験の場合，この条件を満たしているものと判断される．ふたつの独立変数 x_1 および x_2 の共分散の補正項は，

$$K=(C-1)c_{12}/c_{11}$$

の式から 0.028059 となる．この C および K を用いて，h^* の信頼限界を

$$X_{h^*}=Ch^*-K\pm\sqrt{(C-1)(Ch^*+c_{22}/c_{11})+K(K-2\ Ch^*)}$$

の式によって計算すると，

$$X_{h^*}=-1.668818\pm 0.636322$$

を得る．すなわち，95%の信頼限界において size factor は$-2.3051\sim-1.0325$の間にあり，最も適当な値として-1.5274があげられる．言い換えれば，体重が k 倍のマイマイガの幼虫を DDVP で同じ時間に苦悶，仰転させるためには $k^{1.5274}$ 倍の薬量を投与することが必要で，そうすることによって，体重に正比例した薬量を与えるより，大きさの相違による反応の変動を小さくすることができると結論される．

尚，先に生理的に感受性の異なる個体であると考えて，初めから No. 18 をを除外して計算を進めたが，この処置が妥当であったかどうかは，次の方法で検定した．すなわちこの除外した個体の示す $x_1'=1.3$, $x_2'=0.943$ を，先に示した多重回帰方程式に代入すると，$Y=1.6879$ が得られる．この Y と $y'=2.699$との差は，$(y'-Y)=1.0111$ となる．Y の分散を

$$V(Y)=s^2\{1/N+c_{11}(x_1-\bar{x}_1)^2+2c_{12}(x_1-\bar{x}_1)(x_2-\bar{x}_2)+c_{22}(x_2-\bar{x}_2)^2\}$$

の式によって求めると，0.009933を得る．実験値と多重回帰式からの期待値 Y との差の分散を，

$$V(y'-Y)=s^2+V(Y)$$

から求める．そしてこの標準誤差 $\sqrt{V(y'-Y)}=0.269615$ の $(y'-Y)$ に対する比，すなわち，

$$t=(y'-Y)/\sqrt{V(y'-Y)}=3.7502$$

を求め，$n=N-3$ において，この t に対応する確率 P_r を，Bliss[2] の A. 14 表からひくと 0.00041434720 となる．この確率 P_r を $N+1=68$ 倍した値は 0.0282 で，0.05よりも小である．故に，この1個体について得られた y' は，これを除いた67個体について計算された回帰直線から，有意に離れていると判定される．なお，第1図で黒丸で示した No. 18 の座標は，これをも含めた68個体について計算した，重回帰式から決められたものである．

なお，ここで No. 18 を除外した67個体について求めた，y と z^* との関係を示す単回帰式から決めた第1図の座標群をみると，斜線で塗りつぶした No. 68 に，更に outlier の疑いがもたれたので，これを除外した66個体から得られた実験値について，回帰直線の方程式

$$Y=1.80218+1.30942x_1-1.93328x_2$$

を計算した．これに No. 68 の示す $x_1'=0.8$, $x_2'=0.844$ を代入して得た期待値 $Y=1.2180$ と実験値 $y'=1.886$ との差0.688と，その分散 $V(y'-Y)=(0.245931)^2$ とから，検定を行った結果は $P_r=0.592>0.05$ となり，これは取り除く必要のないことがわかった．

ところでこうした size factor の算定は，x_1, x_2 の関係より，必ず y の得られる実験結果から可能で，yの得られない，すなわちある薬量，またはある大きさで反応を示さない個体が入ってくる様な場合は，そのまま上の方法に従うことはできない．

佐藤・諏訪内[3]は，ヨトウガ幼虫，ハスモンヨトウ，ハチミツガの幼虫[4]，カイコガおよびアメリカシロヒトリの幼虫[5]に対する種々の殺虫剤の毒性を，筆者らとほとんど全く同じ方法で実験し，施用薬量と致死時間の関係を定

量的に表現する方法を提示している．しかしこれらの報文では，ある薬量レベルで用いた個体群の体重は，あらかじめそろえられており，それらの反応時間は，実験結果のとりまとめに当って，平均化され，そうして求められた一連の薬量と時間の関係をグラフの上に打点し，それから限界致死時間と限界致死薬量とを推定した上で，実験式を導いている．しかし x_1 と x_2 の種々の組合せによって y がすべての個体に求められる実験の範囲内では，体重換算の size factor の概念をとりいれた，上述の様な単回帰式によって施用薬量と反応時間の関係を示す方がより簡単であり，理解も容易であろう．

摘　　要

1．体重 (g) の変異の幅のひろいマイマイガの幼虫68個体に，種々の濃度 (ppm) の DDVP 5μl を個体別に処理して，それらが苦悶仰転する時間(分)を測定した

2．1個体をのぞく，67個体についてえられた処理薬量 d_* (μg) の対数 x_1，体重 w (g×10) の対数 x_2，反応時間の逆数 ×1000 すなわち反応速度の対数 y との間には，

$$Y = 1.86179 + 1.23916x_1 - 1.89270x_2$$

の関係がえられた．

3．95%の信頼限界において size factor w^{h*} は $-2.3051 \sim -1.0325$ の間にあり，最も適当な値として-1.5274 がえられた．体重が k 倍の個体が同じ時間に反応するためには，$k^{1.5274}$ 倍の薬量を与える必要がある．

4．本実験の結果は，薬液処理後の反応判定基準に至るまでの時間のばらつきの75%までを，薬量と体重が説明し，slope coefficient C は，$1 < C < 2$ の条件をみたし，生物試験結果として充分使いものになることを示していた．

5．実験に用いた68個体のうち，1個体は生理学的にも outlier として除外すべきものであった．その棄却検定法を併せ示した．

引　用　文　献

1．BLISS, C. I.: J. Exptl. Biol. **13**; 95-110, 1936.
2．BLISS, C. I.: Statistics in Biology II. McGraw-Hill Book Co., New York. 1970, 639 pp.
3．佐藤仁彦・諏訪内正名：防虫科学**41**：112-134,1976.
4．佐藤仁彦・諏訪内正名：防虫科学**41**：152-176,1976.
5．佐藤仁彦・諏訪内正名：防虫科学**42**：3-31, 1977.

Summary

In many effectiveness evaluation tests of insecticides or acaricides for their target pests, the same dose is usually given to each pest individual, as if its action were independent of body size. Alternatively, in various pharmacometric experiments of drugs or poisons *in vivo*, doses proportioned directly to the body weight of animals are given to each individual. Instead of an arbitrary correction such as the latter, a size factor for equalizing individual differences in body weight can be determined experimentally for each drug or poison by multiple regression. This approach was taken by Bliss for analysing a controlled experimental data on the rate of toxic action of sodium arsenate in silkworm larvae.

When the response y is a measurement, an empirical size factor w^{h*} can be estimated from the multiple regression of y upon the dose per animal ($x_1 = \log d_*$) and its body weight ($x_2 = \log w$) by transforming the basic regression equation

$$Y = a' + b_1x_1 + b_2x_2$$

or

$$Y = a' + b_1 (\log d_* + \frac{b_2}{b_1} \log w)$$

to

$$Y = a' + b_1 \log (d_* w^{h*}),$$

where $h^* = b_2/b_1$, and b_2 is almost always negative.

In the present experiment, each 4 th instar gypsy moth larva was weighed in mg in advance of the application of chemical. Five μ1 of DDVP dissolved in acetone at a prescribed concentration was topically applied by Arnold hand microapplicator to the dorsal side of larva. The time of its surrender was measured in minutes, as judged by the turning over on its back from the intoxication of chemical. For the 68 larvae in Table 1, $x_1 = \log \mu g$ is the log dose of DDVP per larva, $x_2 = \log(\text{grams} \times 10)$ is the body weight, and $y = \log(1{,}000/\text{minutes survived})$ is the log rate of toxic action. A

larva with a prolonged non-reacted period No. 18 has been omitted as an outlier in the calculation.

The multiple regression equation

$$Y = 1.86179 + 1.23916x_1 - 1.89270x_2$$

was given for the remaining 67 larvae. From the ratio of the two partial regression coefficients, the size factor w^{h^*} for equalizing the effective dose of DDVP in the gypsy moth larvae differing in body weight has been estimated within 95% confidence limits of -2.3051 and -1.0325, with its most probable value at -1.5274. It could be concluded that k times larger larvae required relatively $k^{1.5274}$ times more DDVP than that indicated by the ratio of their body weight to kill them in the same time as the smaller larvae. Here, $h^* = -1$ means that the dose should be proportioned directly to the body weight and $h^* = 0$ means that doses are independent of body weight. For graphic test of linearity, the log doses adjusted for differences in body weight have been computed as $z^* = x_1 - 1.5274\,x_2$ for each larva and listed in Table 1, then log rate y for each larva has been so plotted against z^* in Fig. 1. It has been fitted with the line

$$Y = 1.8616 + 1.2392\,z^*,$$

the slope differing from the original b_1 by rounding error. As shown in Table 2, the scatter about the predicted line gave no indication of curvature. Since the coefficient of determination $R^2 = 0.756$, three-quarters of the total variation in y could be attributed to dose and weight. The latter variable related little more to the response than the former. The slope coefficient $C = 1.074215$, $(1 < C < 2)$, indicates that the result of the present experiment is sufficiently useable for bioassay purpose. The larva No. 18 which responsed very slowly to DDVP has been omitted in computing the multiple regression equation. The test for this suspected outlier showed that No. 18 does not belong in the equation.