

神経線維の平均個数を推定するための標本抽出法

川崎医科大学 数学教室

有 田 清 三 郎

広島大学医学部 整形外科

宮 本 義 洋

川崎学園 コンピュータ センター

堀 義 巳

広島市民病院 形成外科

宮 本 博 子

(昭和56年8月13日受付)

Sampling Method for the Estimation of the Average Number of Nerve Fibers

Seizaburo Arita

Department of Mathematics, Kawasaki Medical School

Yoshihiro Miyamoto

Department of Orthopedic Surgery, Hiroshima University

Yoshimi Hori

Computer Center, Kawasaki School

Hiroko Miyamoto

Department of Plastic & Reconstructive Surgery, Hiroshima City Hospital

(Accepted on August 13, 1981)

組織標本写真の細胞や神経線維などを計数するとき、我々は次の問題に直面する。——信頼のおける個数の値を得るためにには、どの位の倍率で何枚の写真を使用すればよいか？

この問題を解決するためのひとつの試みとして、ラットの腓骨神経線維を具体的な対象としてとりあげ、神経線維数のデータを統計学的な見地から解析し、個数推定のための標本抽出法を提案した。

データ解析の結果、標本写真の許容しうる最大の大きさはおよそ ($30 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$) で、写真是 10 枚必要であることが示唆された。この調査領域は全体のおよそ 10 % であった。この標本抽出法は神経線維の数量的な研究の基礎として有用であろう。

When counting individuals such as cells or nerve fibers in the photomicrographs of a tissue section, we face the following problems. To obtain the good estimation of the number, in what magnifications and how many photos should be used?

As one solution of this problem, we proposed the sampling method for the estimation of the number of rat fibular nerves.

The results of statistical analysis suggested that the acceptable maximum size of a sample unit was approximately ($30 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$) and about 10 units should

be used. The sampling area was roughly 10 percent of the total area.

This sampling method seems to be useful in the quantitative study of nerve fibers.

1. はじめに

近年臨床面で、病状の進行や手術後の経過を表わすひとつの指標として、組織学的な計量評価が注目されるようになってきた。このような計量評価法は主として組織切片の光顕像や電顕像から、対象とする細胞の個数や面積を計測し、それらのデータから何らかの数量的指標を求め、その指標によって評価しようとするものである^{1)~4)}。しかしながら、実際に使用される組織の倍率や撮影枚数はまちまちで、その多くは妥当なものではなく、撮影個所も主観的な判断による有効抽出が行なわれていることが多く、算出された個体数などの平均値には必ずしも信頼のおけるものにはなっていない。したがって電顕写真などの組織写真にデータの源泉がある場合には、良いデータを得るためにまず解決しなければならないことは、写真の撮影個所、倍率、及び撮影枚数などを決める標本抽出法の確立である。

組織標本の横切写真から細胞や神経軸索などの個体の平均個数を求めるため、通常組織写真上を多くの正方形の区画で被い、その区画内の個体を計数する方法（区画法）が用いられる。ここでは、この区画法に基づき組織写真から信頼のおける平均個数を推定するためには“どのくらいの大きさの区画を使って、何カ所計ればよいか”という問題に対して、実際の神経線維数のデータを対象としてとりあげ、これを統計学的な見地から考察し、区画法による平均個数推定のためのひとつの標本抽出法を提案する。

解析方法としては、区画の大きさが異なる種々の区画を作り、それぞれの区画による平均個数の信頼区間を求め、それらを比較検討した。またある信頼幅を与えたときの各区画での必要最小限の区画数を求めた。具体的な対象としては、正常なラット腓骨神経の有髓

及び無髓の神経線維数をとりあげ、個数のデータはこの横切電顕写真（倍率6,300倍）約200枚で合成された1神経束の全体像から得た。

2. 区画の大きさによる平均個数の変動

区画の一辺の大きさがあらかじめ定められた正方形の区画を単位区画と称し、[1,1]で表示する。次に、この単位区画で、隣接する区画を合併して、区画の大きさが拡大された新しい区画を構成する。単位区画を縦軸方向にaコ、横軸方向にbコ合併して構成された新しい区画を[a, b]で表示する。区画[a, b]の面積は単位面積のa×b倍になっている（Fig. 1参照）。

ここでは区画[1, 1]における個体数の標本平均と区画[a, b]のそれを比較する。細胞な

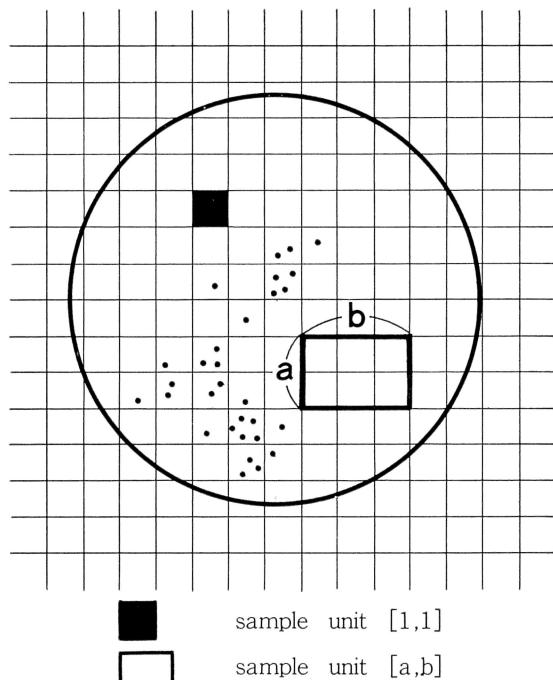


Fig. 1. The sample units [1, 1] and [a, b].

The dot shows the position of an axon.

どの個体が配置されている組織写真上を N 個の単位区画で被ったとする。また各区画内の個体数を X_1, X_2, \dots, X_N とする。個体数 $X_j (j=1, 2, \dots, N)$ の母平均 μ , 母分散 S^2 をそれぞれ次のように定義する。

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N X_j \quad (1)$$

$$S^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (X_j - \mu)^2 \quad (2)$$

また新しく構成された区画 [a, b] での区画数を M とする。 $a \times b = k$ とおけば、

$$N = k M \quad (3)$$

区画 [a, b] での各区画内の個体数を $X_{k1}, X_{k2}, \dots, X_{kM}$ とし, X_{ki} の母平均 μ_k , 母分散 S_k^2 を次のように定義する。

$$\mu_k = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M X_{ki} \quad (4)$$

$$S_k^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{i=1}^M (X_{ki} - \mu_k)^2 \quad (5)$$

X_{ki} は $X_j (j=1, 2, \dots, N)$ から隣接した k 個をとりだしたもので、たとえば $X_{k1} = X_1 + X_2 + \dots + X_k$ と表現できる。個体数 X は有限母集団からの非復元抽出による確率変数と考えられる。

このとき X_j と X_{ki} , μ と μ_k , S^2 と S_k^2 の間には次の関係が成立する。

$$\sum_{i=1}^M X_{ki} = \sum_{j=1}^N X_j \quad (6)$$

$$\mu_k = k \mu \quad (7)$$

$$S_k^2 = \frac{N-1}{M-1} S^2 + \frac{2}{M-1} \sum_{i=1}^M \Delta_i \quad (8)$$

Δ_i は N 個の X_j を k 個ずつ M 組にわけた 1 組の X_j についての, kC_2 個の $(X_j - \mu)(X_{j'} - \mu) (j \neq j')$ の和である。

次に各区画での標本平均の分布を求める。単位区画 [1, 1] での母集団から n 個の区画をランダム抽出して得た個体数の標本平均を \bar{X} , 区画 [a, b] での m 個の区画のランダム抽出による標本平均を \bar{X}_k とする。すなわち、

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n X_j \quad (9)$$

$$\bar{X}_k = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m X_{ki} \quad (10)$$

また区画 [a, b] で得た標本平均 \bar{X}_k を単位区画に換算した標本平均を \bar{Y} とする。すなわち、

$$\bar{Y} = \frac{1}{k} \bar{X}_k = \frac{1}{mk} \sum_{i=1}^m X_{ki} \quad (11)$$

このとき、標本平均 \bar{X}, \bar{Y} はともに母平均 μ の推定値である。 \bar{X} は単位区画に基づく標本平均, \bar{Y} は区画 [a, b] から単位区画へ換算した標本平均である。母平均 μ が未知のとき、区画の大きさを単位区画より拡大したもので推定しても、その推定の精度が単位区画のそれとあまり変わらなければ、区画の大きさを拡大した方が経済的にも有用である。そこで、ここでは、平均値の信頼区間と信頼幅を求め、これに基づく推定の精度を定義し、区画の大きさを単位区画よりどこまで拡大できるかを検討する。

細胞などの個数を区画法で考える場合、母集団として取り扱う総区画数は有限であるから、ここでは有限母集団での推定問題を考える。このような有限母集団では、通常使われている無限母集団の推定理論に多少の修正を加えなければならない。重複を許さない非復元抽出では標本平均 \bar{X} の平均と分散は次のようになる⁵⁾。

$$E(\bar{X}) = \mu \quad (12)$$

$$V(\bar{X}) = \frac{N-n}{N-1} \cdot \frac{S^2}{n} \quad (13)$$

(12)式から標本平均 \bar{X} は母平均 μ に対する偏りのない推定値であることがわかる。 N が十分大きいとき、

$$\frac{N-n}{N-1} = 1 - \frac{n}{N} \quad (14)$$

で近似でき、これは 1 より小さい。 n/N は総区画数に対する抽出区画数の割合（標本抽出率）を表すが、抽出率が十分小さければ、この修正項 $N-n/N-1$ は 1 で近似され、 \bar{X} の分散は無限母集団での S^2/n となる。ここでは

N が十分大きいとして修正項 $1-n/N$ を使用する。

\bar{Y} についても同様に、

$$E(\bar{Y}) = \mu \quad (15)$$

$$V(\bar{Y}) = \frac{M-m}{M-1} \cdot \frac{\hat{S}_Y^2}{m} = (1 - \frac{m}{M}) \frac{\hat{S}_Y^2}{m} \quad (16)$$

ここに $S_Y = S_k/k$ である。

次に「単位区画方式」と「区画 [a, b] からの換算方式」による母平均 μ に対する95%信頼区間を求める。この信頼区間は、区画数、標本平均、標本標準偏差及び信頼度 $1-\alpha$ によって次の不等式で与えられる。

「単位区画方式」

$$\bar{X} - L_{\bar{X}} \leq \mu \leq \bar{X} + L_{\bar{X}} \quad (17)$$

$$L_{\bar{X}} = t\alpha \sqrt{1 - \frac{n}{N}} \cdot \frac{\hat{S}_X}{\sqrt{n}} \quad (18)$$

「区画 [a, b] からの換算方式」

$$\bar{Y} - L_{\bar{Y}} \leq \mu \leq \bar{Y} + L_{\bar{Y}} \quad (19)$$

$$L_{\bar{Y}} = t\alpha \sqrt{1 - \frac{m}{M}} \cdot \frac{\hat{S}'_Y}{\sqrt{n}} \quad (20)$$

ここに $t\alpha$ は有意水準 α によって定まる定数で $\alpha=0.05$ つまり 95% の信頼度ではおよそ 1.96 である。 \bar{X}, \bar{Y} はそれぞれ X, Y の標本平均、 \hat{S}_X, \hat{S}'_Y は標本標準偏差で、 \hat{S}_X は(2)式の推定値、 \hat{S}'_Y は $\hat{S}'_Y = \hat{S}_k/\sqrt{k}$ で、 \hat{S}_k は(5)式の推定値である。

$L_{\bar{X}}, L_{\bar{Y}}$ は信頼区間の幅を示している。これを信頼幅と名づける。 $(L_{\bar{X}}, L_{\bar{Y}})$ の 2 倍を信頼幅と呼ぶ場合もある。 $L_{\bar{X}}/\mu, L_{\bar{Y}}/\mu$ は母平均 μ に対して上の方程式がどのくらいの信頼幅を持っているかを表わしており、この量は推定の精度をあらわすひとつの指標と考えることができる。

区画の大きさの拡大許容範囲として次の判定条件を採用する。 $L_{\bar{Y}}/\mu$ の値そのものに注目して、ある定数 c を与えて $L_{\bar{Y}}/\mu \leq c$ ならば区画 [a, b] の範囲まで拡大して良い。他の判定方法としては $L_{\bar{Y}}$ と $L_{\bar{X}}$ の比なども考えられる

であろう。

3. 信頼幅を与えたときの必要最小限の区画数

ある精度以上の信頼しうる平均値を得るためにには組織写真を何枚以上撮影せねばならないかという問題も切実な問題である。前述では標本平均、標本標準偏差、信頼度及び調査区画数を与えて信頼幅 L を求めたが、今度は逆に信頼度と信頼幅を与えることにより必要最小限の区画数を求める問題となる。

信頼幅 L は母平均 μ が 1000 か、2000 か、3000 かによってその度ごとに設定しなおさなければならないから、 μ が未知のときに信頼幅を設定するのは不便である。そこで母平均 μ に対する信頼幅 L の比 L/μ を推定の精度としてあらかじめ与えておくことにする。

$\alpha=0.05$ のとき区画数 n と標準偏差 S 及び信頼幅 L との関係は、

$$1.96 \sqrt{1 - \frac{n}{N}} \frac{S}{\sqrt{n}} \leq L \quad (21)$$

だから、この不等式を n について解くと、

$$n \geq \frac{1}{\frac{1}{N} + \left(\frac{L}{1.96 S} \right)^2} \quad (22)$$

ここで、

$$\frac{L}{S} = \frac{L}{\mu} \cdot \frac{\mu}{S} \quad (23)$$

μ, S が与えられるならば、 L/μ を定めると、(22)式、(23)式よって必要最小限の区画数を求めることができる。

4. 実験とその結果

(1) 神経線維数

ラットの腓骨神経は、3つの神経束から構成され、その1神経束には正常な場合、およそ数千個の有髓神経線維と1万個程度の無髓線維が存在するといわれている。したがって1神経束のすべての線維を計数することは多くの労力と時間を要する。光顕レベル（倍率 $10^2 \sim 10^3$ ）の像では無髓線維は識別されず、有髓線維は点として検出されるが、有髓線維は写真上の汚点と

混同され、正確な計数は困難である。また電顎レベル（倍率 $10^3\sim 10^4$ ）では有髓、無髓とも明瞭に識別されるが、1神経束のすべての神経線維を計数するには200枚以上の写真を合成せねばならず、その作業はきわめてやっかいである。したがって、平均神経線維数を得るために1神経束の横切断面から、何カ所かの領域をランダムに抽出し、それらの領域で計数された個数のデータから平均値を推定する方法が採用される。

（2）材料及び方法

体重250gの雄のラットの右腓骨神経の全横断電顎用薄切片を作製し、この切片を単孔グリッド上に置き、透過型電子顕微鏡を使用して、2100の倍率で全断面の連続写真を約200枚撮影した。このネガフィルムを3倍に拡大して6300倍の印画写真を作製し、それらの写真で1神経束の全体像を再構成した。

この1神経束の全体像に1辺が63mm（原寸では $10\mu\text{m}$ ）の正方形で被い、この区画を単位区画[1, 1]と定め、この単位区画の隣接区画を合併し拡大された区画を順次[1, 2], [1, 3], [1, 4], [2, 1], [2, 2], [2, 3], [2, 4], [3, 1], [3, 2], [3, 3], [3, 4]の12個類の区画を作った。これら12種類の区画について、各区画内の神経線維を計数した。また血管部分や欠損部

分は計測の対象から除外した。

5. 実験結果

Table 1は正常なラット腓骨神経の有髓線維数について、各区画での線維数の平均値(MEAN)、標本標準偏差(SD)、調査区画数(n)、標準誤差(SE)及び標本分散の標本平均に対する比(V/m)を示している。各区画での標本平均及び標本標準偏差を単位区画に換算したものがTableの右側に示されている。無髓線維については**Table 2**に示されている。

（1）平均値の信頼区間

データより得られた標本平均、SD、区画数nに信頼度を与えると、各区画での平均個数の信頼区間が得られる。単位区画での総区画数Nは1200であった。いま単位区画の平均個数(μ)を1000個に基準化する。このとき各区画での標本平均は $1000/(\mu \times a \times b)$ 倍される。このようにして求めた平均個数の95%信頼区間は**Table 3**で示される。**Table 3**での区画抽出率 n/N はおよそ0.35である。

①有髓線維についての平均個数の推定

Table 3の有髓線維では、単位区画での平均個数の95%信頼区間は970-1030で、1000を中心に ± 30 の幅で変動している。推定の精度は $L/\mu = 0.03$ である。また各区画での平均値は

Table 1. The number of nerve fibers for the various sample units. (Myelinated nerve)

UNIT	AREA	MEAN	SD	n	SE	v/m	Conversion into [1, 1]	
							MEAN	SD
[1, 1]	1	2.070	0.775	419	0.075	0.290	2.070	0.775
[1, 2]	2	4.161	1.194	200	0.168	0.343	2.081	0.844
[2, 1]	2	4.136	1.138	201	0.160	0.313	2.068	0.805
[1, 3]	3	6.217	1.441	122	0.261	0.334	2.072	0.832
[3, 1]	3	6.248	1.441	130	0.252	0.332	2.083	0.832
[1, 4]	4	8.306	1.621	89	0.343	0.316	2.077	0.811
[2, 2]	4	8.320	1.771	96	0.361	0.377	2.080	0.886
[2, 3]	6	12.496	2.112	57	0.559	0.357	2.083	0.862
[3, 2]	6	12.546	2.411	60	0.622	0.463	2.091	0.984
[2, 4]	8	16.610	2.495	41	0.779	0.375	2.076	0.882
[3, 3]	9	18.682	2.873	37	0.944	0.442	2.076	0.958
[3, 4]	12	24.840	3.264	25	1.305	0.429	2.070	0.942

Table 2. The number of nerve fibers for the various sample units. (Unmyelinated nerve)

UNIT	AREA	MEAN	SD	n	SE	v/m	Conversion into [1, 1]	
							MEAN	SD
[1, 1]	1	3.988	6.719	419	0.328	11.321	3.988	6.719
[1, 2]	2	7.988	10.258	200	0.725	13.174	3.994	7.254
[2, 1]	2	7.903	9.880	201	0.697	12.350	3.952	6.986
[1, 3]	3	10.889	12.372	122	1.120	14.056	3.630	7.143
[3, 1]	3	11.742	13.257	130	1.163	14.968	3.914	7.654
[1, 4]	4	15.590	15.427	89	1.635	15.265	3.898	7.714
[2, 2]	4	15.812	15.269	96	1.558	14.744	3.951	7.635
[2, 3]	6	21.772	18.761	57	2.485	16.167	3.629	7.659
[3, 2]	6	23.433	21.441	60	2.768	19.618	3.906	8.753
[2, 4]	8	30.293	20.637	41	3.223	14.058	3.787	7.296
[3, 3]	9	32.284	27.299	37	4.488	23.083	3.587	9.100
[3, 4]	12	44.320	28.136	25	5.627	17.861	3.693	8.122

Table 3. The confidence interval of the average number changed the total number into 1000. ($\alpha=0.05$)

UNIT	Myelinated Fiber			Unmyelinated Fiber		
	Mean	Confidence Interval	Confidence Belt	Mean	Confidence Interval	Confidence Belt
[1, 1]	1000	970-1030	30	1000	862-1138	138
[1, 2]	1005	971-1039	34	1002	851-1153	151
[2, 1]	999	966-1032	33	991	845-1137	146
[1, 3]	1001	966-1036	35	910	754-1066	156
[3, 1]	1006	972-1040	34	981	818-1144	163
[1, 4]	1003	968-1038	35	977	806-1148	171
[2, 2]	1005	968-1042	37	991	827-1155	164
[2, 3]	1006	968-1044	38	910	736-1084	174
[3, 2]	1010	968-1052	42	979	785-1173	194
[2, 4]	1003	964-1042	39	950	782-1118	168
[3, 3]	1003	961-1045	42	899	690-1108	209
[3, 4]	1000	956-1044	44	926	730-1122	196

ほぼ等しく、また信頼幅も各区画ともいすれ 50 以内でその変動はきわめて小さいことがわかる。推定の精度 L/μ を 0.05 以内と定めると、区画の大きさを [3, 4] の大きさまで拡大することができる。

②無髓線維についての平均個数の推定

Table 3において、無髓線維は有髓線維とは若干異なる様相を呈している。平均値では区画 [1, 3], [2, 3], [3, 3], [3, 4] でかなりのズレがうかがえる。また信頼幅は各区画とも大きくこのことから、無髓線維については平均値が

大きな変動をすることがわかる。実際単位区画においてすら 862-1138 と変動し信頼幅も 138 ときわめて大きい。このことから無髓線維の推定はきわめて精度の悪いものになっていることがわかる。

(2) 必要最小限の区画数

有髓線維について、 $\alpha=0.05$, $L/\mu=0.08$ として最小限の区画数を求めた。このときの標本抽出率は約 10 % となった。またこの区画数とほぼ同じ区画数を無髓線維について得るために $\alpha=0.05$ のとき、 L/μ を 0.35 程度のもの

Table 4. The maximum number of units. ($\alpha=0.05$)

UNIT	Myelinated Fiber	Unmyelinated Fiber
	$L/\mu=0.08$	$L/\mu=0.35$
	The Number of Units	The Number of Units
[1, 1]	84	89
[1, 2]	49	52
[2, 1]	45	49
[1, 3]	32	40
[3, 1]	32	40
[1, 4]	23	31
[2, 2]	27	29
[2, 3]	17	23
[3, 2]	22	26
[2, 4]	14	15
[3, 3]	14	22
[3, 4]	10	12

にしなければならなくなり、このことからも無髓線維については与えられた区画の大きさではきわめて精度の悪い推定値しか得られないことがわかる。(Table 4. 参照)

6. 考 察

(1) **Table 1, 2** より無髓線維数の SD は有髓線維数のそれに比べてきわめて大きい。また **Table 3** から無髓の信頼区間は有髓のそれに比べて大きく変動し、無髓線維数の平均値の推定値は精度の悪いものになっている。これは有髓が神経束内の空間にほぼ均質に分布しているのに対して、無髓のそれは、集塊を呈していることに起因しているように思われる。有髓がほぼ均質に、無髓が集塊の分布を呈していることは次のことからも推測される。

分散の平均値に対する比 V/m は 1 に等しけ

ればランダムな分布、1より小さければ均質、1より大きければ集塊の分布をあらわすが、

Table 1 の有髓線維では V/m は 1 よりきわめて小さく、**Table 2** の無髓のそれは 1 よりきわめて大きい。このことから有髓線維の分布は均質に近く、無髓のそれは集塊であることが示唆される。この V/m の値によって個体の空間配置の大まかな分布は推測できるが、この V/m は区画の大きさに多少影響されるため、さらに詳細な分布を検討するためには、種々の具体的な分布のあてはめ(適合度検定)や距離法にもとづく空間パターンの解析などが必要であろう。

したがって、有髓線維はその空間分布が均質に近いため、平均個数の推定値がきわめて精度の高いものになっているのに対し、無髓ではその分布が均質でないため、無髓の個数推定については別の角度からの検討が必要であろう。

(2) 一般に神経線維の計測では有髓、無髓の個数だけではなく、有髓の長径、短径、面積、中心の位置、形状、無髓の集塊の度合いなどを同時に行なうため、多变量の標本抽出法を考えなければならない。実際の標本抽出では、信頼性や精度のほかに、電顕写真の倍率などの制約条件や、労力、費用などの経済的な側面も加味されるであろう。

謝 辞

本研究は多大の労力を要し、多くの方々から献身的なご協力をいただきました。多量の組織切片、電顕写真の作製に川崎医科大学形成外科の山本和子氏、データ整理に川崎学園コンピュータセンターの平松朋子氏、ここに感謝の意を表します。

文 献

- Holmes, A. and Young, J. Z.: Nerve regeneration after immediate and delayed suture. *J. Anat.* 77: 63—96, 1942
- Gutmann, E. and Sanders, F. K.: Recovery of fiber numbers and diameters in the regeneration of peripheral nerves. *J. Physiol.* 101: 489—518, 1943
- Orgel, M. G. and Terzis, J. K.: Epineural vs. perineural repair, an ultrastructural and electrophysiological study of nerve regeneration. *Plast. & Rec. Surg.* 60: 80—91, 1977
- 野村 進: 末梢神経の再生. *日整会誌* 53: 105—114, 1979

- 5) Cochran, W. G.: Sampling techniques. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, Inc. 1963, pp. 18—47
- 6) Miyamoto, Y., Miyamoto, H. and Arita, S.: Nerve grafting time series and length series analysis of regenerated myelinated fibers. Proceedings of international symposium of post-traumatic peripheral neuropathies sponsored by WHO. New York, Raven Press. (in print)
- 7) 有田清三郎, 宮本義洋, 仮谷太一: 神経軸索の分布について. 京都大学数理解析研究所講究録 384: 143—160, 1980