



LD₅₀ 산출방법에 있어서 수리·통계학적 특성

김세기¹ · 김근종² · 이병무³

¹성균관대학교 자연과학대학, ²홍익대학교 상경대학, ³성균관대학교 약학대학

Mathematical and Statistical Characterization of LD₅₀ Estimation

Se Ki Kim¹, Keun-Chong Kim² and Byung Mu Lee³

¹College of Natural Science, SungKyunKwan University, Suwon 440-746

²College of Business Management, Hong-Ik University, Chochiwon 339-701

³College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea

Received August 3, 2004; Accepted November 6, 2004

ABSTRACT. Lethal dose 50% (LD₅₀) has been commonly used as a parameter for the estimation of acute toxicity not only in animal experiment, but also in human study. Several methods to estimate LD₅₀ had been introduced, but Spearman-Karber and Berens-Karber method have been widely used due to their relative convenience and accuracy. However, LD₅₀ values estimated from the two methods showed inconsistency and variation depending on the characteristics of mortality data. In this study, the two methods were comparatively investigated in terms of accuracy and stability for the estimation of LD₅₀.

Keywords: Lethal dose 50% (LD₅₀), Spearman-Karber, Berens-Karber.

서 론

Lethal dose 50%(LD₅₀)는 실험동물의 50%를 치사케 하는 단일투여 용량을 의미하며 연구대상 물질의 1차적인 독성지표로서 널리 이용되고 있다(Zbinden and Flury-Roversi, 1981; Jung and Choi, 1994; Park *et al.*, 1996). 최근 LD₅₀의 독성학적 의미와 그 활용성에 대하여서는 독성학자에 따라 다른 주장이 제기 되고 있으나, 아직도 LD₅₀는 가장 단시간 내에 미지의 물질에 대한 상대적인 독성을 평가하는 parameter로서 흔히 활용되고 있으며, 아급성 실험을 계획할 때 용량을 설정하는 수단으로도 이용되고 있다. 따라서, 안전성이 전혀 보고된 바 없는 물질의 독성평가에 있어서 제일 먼저 수행하는 1차 스크리닝 방법이라고 할 수 있다.

LD₅₀는 1927년 Trevan(1927) 이 제안한 이래, 방법론적으

로 1934년 Bliss(1934), Litchfield and Wilcoxon(1949), 1971년 Finney에 의한 Probit Analysis(a parametric technique) 그리고 Rosiello *et al.*(1977)에 의해 간편하고 신뢰할 수 있는 개선된 산출방법이 연구되어 왔다. 그러나, 아직도 데이터의 성격에 따라 그 예상값이 많은 오차를 가져다 주고 있다. 이미, Bliss에 의해 제안된 방법은 Probit unit를 이용하여 용량반응곡선에서 각각의 용량을 Log값으로 선형화시켜 쉽게 산출하는 방법을 제시되어 이용되어 왔다. 상기의 산출방법 외에도 다양한 방법이 제기 되었으나(Brownlee *et al.*, 1953; Van der Heuvel *et al.*, 1990), 정확한 LD₅₀을 얻는데 문제가 있다고 제기되어 왔다(Hunter *et al.*, unpublished data).

따라서 최근에는 LD₅₀의 간편한 계산 방법으로 Spearman-Karber 방법(a nonparametric technique)이나 Berens-Karber 방법을 주로 사용하고 있다. Spearman-Karber 방법은 용량반응 곡선에서 최대 치사치를 확률값 1(100% 치사치)로 정하여 0.5인 LD₅₀ 값을 계산하는 방식으로 각각의 치사치를 log화 시켜 계산방식을 좀 더 간편하고 수치의 variation을 적게 한 후 log값을 다시 정산

Correspondence to: Byung Mu Lee, Division of Toxicology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea
E-mail: bmllee@skku.ac.kr

수치으로 변형시켜 얻는다(Miller and Ulrich, 2004). 반면, Berens-Karber 방법은 치사치에 log를 취하지 않고 관찰된 치사치에서 바로 LD₅₀를 구하는 방식이다(Wilbrandt, 1952). 그러나, 이 두 가지 방법에도 데이터의 성격에 따라 LD₅₀ 값이 불안정하게 계산될 수 있다는 문제점이 제기되고 있다. Spearman-Karber 방법은 Trimmed Spearman-Karber 방법으로 변형되어 이용되고 있기도 하다(Hamilton *et al.*, 1997). Spearman-Karber 및 Berens-Karber 방법은 독성학, 약물학, 미생물, 면역학 그리고 환경과학 분야에서 LD₅₀, LC₅₀(lethal concentration 50%)을 산출하는 데 활용되고 있으며, 특히, Spearman-Karber 방법은 IC₅₀(inhibitory concentration 50%) 또는 EC₅₀(median effective concentration)를 계산하는 데 활용되고 있다(Thakur *et al.*, 1981; Gumusderelioglu *et al.*, 2001; Lynn, 2001; Suarez *et al.*, 2003; An, 2004).

본 연구에서는 이 두 가지 방식에 의한 LD₅₀ 값을 비교하여 정확도를 측정하고 오차를 등 문제점을 파악하여 앞으로 새로운 LD₅₀ 산출방법의 개발을 하는 기초연구로 활용하고자 한다.

Spearman-Karber 방법을 이용한 LD50 산출

아래와 같이 Data 1의 특성을 갖고 있는 사망률의 자료를 가지고 LD₅₀를 Spearman-Karber 및 Behrens-Karber 방법을 통해 산출할 수 있으며, Spearman-Karber 방법을 이용하여 얻은 LD₅₀ 값과 이론적 예상치를 비교할 수 있다. Data 1은 항암제처럼 독성이 강한 물질인 경우 용량간격을 공차 0.1로 하여 사망률의 차이가 생길 수 있다. 이 경우 용량-반응 곡선의 특성은 각 군당 동물의 수를 5마리씩으로 하여 최저 용량 0.3에서 사망수가 없었으며 (0/5), 최고 용량 0.9에서 모두 사망하게 되었다(5/5). 그러나, 용량 0.7의 경우 사망률이 2/5로 용량 0.6에서 나타난 사망률 4/5 보다 2/5 적게 관찰 되었다(Fig. 1).

Data 1 = {{0.3, 0/5}, {0.4, 1/5}, {0.5, 3/5},
{0.6, 4/5}, {0.7, 2/5}, {0.8, 4/5}, {0.9, 5/5}}

LD₅₀를 산출하는 Spearman-Karber 식은 다음과 같다.

$$\text{Equation SK1} = \log\text{LD}_{50} = x[[n]] - \sum_{k=1}^{n-1} \frac{1}{2} (p[[k]] + p[[k+1]]) (x[[k+1]] - x[[k]])$$

여기에서 x는 log dose를 의미하고 (-0.522897, -0.39794, -0.30103, -0.221849, -0.154902, -0.09691, -0.045775), [n]은 dose의 전체 개수 7로 7 번째 dose를 의미한다. 따라서, x[[n]]값은 -0.045775이 된다. p는 각 사망률(0, 1/5, 3/5, 4/5, 2/5, 4/5, 5/5), k는 몇 번째를 의미한다. 따

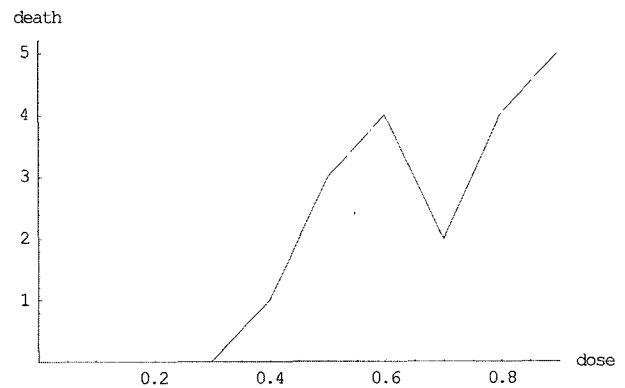


Fig. 1. Data 1의 용량-반응 사망률 곡선.

라서, p[k]는 k 번째 p값을 말한다.

Equation SK1은 LD₅₀ = 10^{logLD₅₀}로 쓸 수 있으며, 계산한 logLD₅₀ 값은 -0.273443이 되며, LD₅₀ 값은 0.532791이 된다. 즉, Spearman-Karber 방법에 의한 LD₅₀ 값은 0.532791으로 산출되었다.

Behrens-Karber 방법에 의한 LD50 산출

Behrens-Karber 방법은 Spearman-Karber 방법과 달리 log를 취하지 않고, 바로 관찰된 수치를 적용한다. 수식은 다음과 같이 표시된다.

$$\text{Equation BK1} = \text{LD}_{50} = x[[n]] - \frac{1}{m_k} \sum_{k=1}^{n-1} \left(\frac{1}{2} * (p[[k]] + p[[k+1]]) * (x[[k+1]] - x[[k]]) \right)$$

여기에서 x는 (0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9)를 의미하고, p는 (0, 1, 3, 4, 2, 4, 5)로 표시될 수 있다. m은 가장 높은 용량에서의 사망수, 즉 5를 의미한다.

Equation BK1을 통해 얻은 LD₅₀ 값은 0.57이 된다. 즉, Behrens-Karber 방법을 통해 얻은 LD₅₀ 값이 Spearman-Karber 방법을 통해 얻은 LD₅₀ 값 0.532791 보다 6.98% 높게 나타났다. 그러나, 서로 다른 두 가지 방법에서 얻은 LD₅₀ 값 중 어떤 값이 정확한지는 알 수가 없다. 따라서, Behrens-Karber 방법에 Monte-Carlo simulation을 적용하여 LD₅₀ 산출 값의 변화를 관측해 보았다.

Behrens-Karber에 Monte-Carlo simulation을 적용한 LD₅₀ 산출

주어진 Data 1 = {{0.3, 0/5}, {0.4, 1/5}, {0.5, 3/5}, {0.6, 4/5}, {0.7,2/5}, {0.8, 4/5}, {0.9, 5/5}}에서, 각 용량별 사망률 값이 -0.5에서 0.5 사이의 값을 random으로 10,000번 씩 주었을 때, 방정식은 Behrens-Karber 방법과 동일 식을 사용하게 된다.

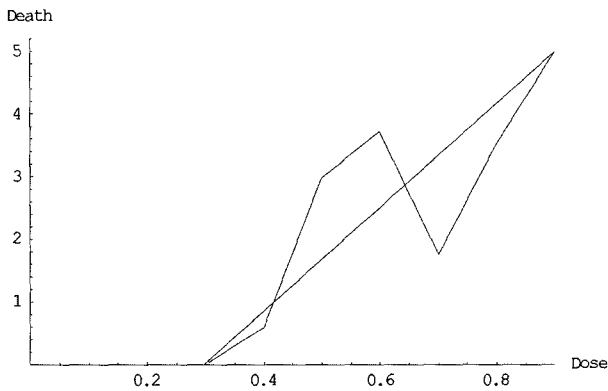


Fig. 2. Data 1에 Monte-Carlo simulation을 적용한 용량반응 곡선의 예 1.

$$\text{Equation BKMC1}[0.5] = LD_{50} = x[[n]]$$

$$-\frac{1}{m_k} \sum_{k=1}^{n-1} \left(\frac{1}{2} * (p[[k]] + p[[k+1]]) * (x[[k+1]] - x[[k]]) \right)$$

Behrens-Karber에 Monte-Carlo simulation을 적용하여 얻은 LD₅₀ 값은 0.598293을 얻게 되었으며, 용량반응 곡선에서 표현된 형태는 Fig. 2와 같다.

Behrens-Karber에 Monte-Carlo simulation을 적용할 때 이 번에는 주어진 Data 1에서, 각 용량별 사망률 값의 범위를 -0.05에서 0.05 사이의 값을 random으로 10,000 번 씩 주었을 때 하여 얻은 LD₅₀ 값은 0.56574을 얻게 되었으며, 용량반응 곡선에서 표현된 형태는 Fig. 3와 같다.

$$\text{Equation BKMC2}[0.05] = LD_{50} = x[[n]]$$

$$-\frac{1}{m_k} \sum_{k=1}^{n-1} \left(\frac{1}{2} * (p[[k]] + p[[k+1]]) * (x[[k+1]] - x[[k]]) \right)$$

이 경우는 동일한 방정식을 사용했지만, 실제 표현된 용량반응 곡선에서 100% 사망률에서 0% 사망률로 선형화

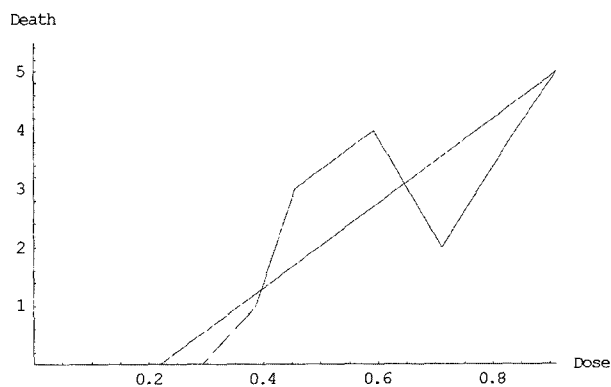


Fig. 3. Data 1에 Monte-Carlo simulation을 적용한 용량반응 곡선의 예 2.

시켰을 때 기울기가 random 값의 범위를 크게 주었을 때 보다 완만하여 실제 LD₅₀의 산출 값은 작게 나오게 된다.

결론 및 고찰

LD₅₀ 산출에 널리 이용되고 있는 (1) Spearman-Karber 방법, (2) Behrens-Karber 방법, 그리고, (3) Behrens-Karber 방법에 Monte-Carlo simulation 1(random number 범위: ±0.5) 및 (4) Monte-Carlo simulation 2(random number 범위: ±0.05) 을 적용하여 얻은 LD₅₀ 산출값의 변화를 관측해 보았다. 상기 네 가지 방법을 통해 얻은 LD₅₀ 값은 각각 0.532791, 0.57, 0.598293, 0.56574 이었다. Spearman-Karber 방법과 Behrens-Karber 방법의 결과에서 얻은 LD₅₀ 값을 비교해본 결과 Spearman-Karber 방법을 통해 얻은 값(0.532791)은 낮은 값이고, Behrens-Karber 방법을 통해 얻은 값은 상대적으로 높은 값(0.57)이다. 즉, Spearman-Karber 방법은 낮은 값에서 50% 치사치가 발생할 수 있다고 예측한 보수적인 방법이라고 볼 수 있다. Behrens-Karber 방법은 그러나, Behrens-Karber에 Monte-Carlo simulation 1(random number 범위: ±0.5) 을 적용했을 때 Behrens-Karber에서 보다 더 높은 값(0.598293)을 얻을 수 있었다. 높은 값을 준 Monte-Carlo simulation 1 방법은 보수적인 것 (인체를 보호하기위해 아주 낮은 값에서 독성이 일어날 것으로 예측하는 것) 과는 제일 거리가 멀다고 볼 수 있다. 그 변화율의 범위는 이 경우 최대 11.2%에 불과하나, 경우에 따라서는 LD₅₀% 산출값이 방법에 따라, 50% 이상의 차이를 가져다 줄 수 있다. 만일, 용량 반응 곡선의 형태가 규칙적이라면, 각 방법에서 얻은 LD₅₀ 값의 변화폭은 매우 적을 수도 있다.

그러나, 실제 원래 주어진 Data 1의 성격이 용량 반응에 따른 규칙적인 상관관계를 나타내지 않았으므로, Data 1을 best-fitting하여 LD₅₀ 값을 계산하면, 0.5~0.6을 얻을 수 있다. 따라서, 0.6을 정확한 값이라 가정한다면, 0.6에 가장 근접한 LD₅₀ 값을 얻을 수 있는 산출방법은 Behrens-Karber 방법에 Monte-Carlo simulation 1 (random number 범위: ±0.5)이 신뢰할 수 있는 방법이라고 평가할 수 있다. Behrens-Karber 방법을 단독으로 사용했을 경우 얻을 수 있는 값 0.57에 비해 약 5%의 오차를 줄일 수 있다. Simulation 1은 오차 값 0.28%으로 1% 미만의 매우 정확한 값을 제공할 수 있었다. 그러나, best-fitting의 다양한 경우의 수 때문에 예측이 어렵다.

Best fitting의 경우 기존의 모형(예, linear, logistic, weibull 등)을 이용할 경우에는 데이터 성격에 따라 적용이 안 되는 경우가 많이 발생하므로, 실제 데이터에 가장

근접한 simulation 모델식을 Mathematica program (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL) 등을 이용해 만들어 사용하는 것이 가장 이상적인 산출법이 될 수도 있을 것이다(Lee et al., 2002).

본 연구 결과는 만일 LD₅₀ 산출 뿐만 아니라, 생체 내에서 일어나는 결과를 용량 반응 곡선으로 적용하여 50%의 median 값을 구할 때, 곡선의 형태가 불규칙할 경우, Spearman-Karber 방법보다는 Behrens-Karber 방법이 오차가 적은 값을 제공할 수 있음을 의미하며, 가장 바람직한 경우는 가능하면 Spearman-Karber 방법에 Monte-Carlo simulation을 적용하는 것이다. 그러나, Monte-Carlo simulation을 적용할 경우 random number의 선택범위를 좀 크게 잡는 것이 좋을 것으로 예측 할 수 있다. 범위의 선택은 본 연구에서는 실제 얻은 LD₅₀ 값(0.57)의 약 10%의 값(0.5)을 적용했다. 따라서, 산출 값의 약 10%를 시도하는 것이 적절한 범위라고 판단된다.

그러나, 앞으로 다른 분석방법과 좀 더 포괄적으로 비교 검토하여 지금까지 제안되었던 방법의 장단점을 면밀히 평가하여 간편하고, 오차가 적은 LD₅₀ 산출법을 개발해야 될 필요가 있다고 사료된다(Benjumovich, 2001).

참고문헌

- An, Y.J. (2004): Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.*, **127**, 21-26.
- Behrens, B. and Schlosser, L. (1957): [Determination of LD₅₀ and calculation of the error range], Naunyn. Schmiedeberg's. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **230**, 59-72.
- Benjumovich, M.S. (2001): The application of Poisson units to the determination of median lethal cell culture dose, *Toxicol. In Vitro*, **15**, 671-675.
- Bliss, C.I. (1934): The method of method of probits-A. *Correction Science*, **79**, 409-410.
- Brownlee, K.A., Hodges, J.L. and Rosenbaltt, M. (1953): The up-and-down method with small samples. *J. Am. Statist. Assoc.*, **48**, 262-277.
- Finney, D.J. (1971): Chapter 3 and 4 in probits Analysis (Cambridge University Press, Cambridge UK).
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. and Thurston, R.C. (1997): Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Evn. Sci. Technol.*, **7**, 714-719.
- Hunter, W.J., Lingk, W. and Recht, P. (unpublished document, not dated): An intercomparison study conducted by the Commission of the European Communities of the determination of the single the Health and Safety Directorate (Commission of the European Communities).
- Jung, H. and Choi, S.C. (1994): Sequential method of estimating the LD₅₀ using a modified up-and-down rule. *J. Biopharm. Stat.*, **4**, 19-30.
- Lee, B.M., Yoo, S.D. and Kim, S. (2002): A proposed methodology of cancer risk assessment modeling using biomarkers. *J. Toxicol. Environ. Health*, **65**, 341-354.
- Litchfield, J.T. (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-115.
- Lynn, D.E. (2001): Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses. *Methods Cell Sci.*, **23**, 221-225.
- Miller, J. and Ulrich, R. (2004): A computer program for Spearman-Karber and probit analysis of psychometric function data. *Behav. Res. Methods Instrum. Comput.*, **36**, 11-16.
- Park, H.S., Hong, C.Y., Oh, J.A., Yun, S.C. and Lee, B.M. (1996): Toxicological evaluation of median lethal dose (LD₅₀). *Kor. J. Toxicol.*, **12**, 143-154.
- Rosiello, A.P., Essignmann, J.M. and Wogan, G.N. (1977): Rapid and accurate determination of the median lethal dose (LD₅₀) and its error with a small computer. *J. Toxicol. Environ. Health*, **3**, 797-809.
- Suarez, A., Echandi, M.M., Ulate, G. and Ciccio, J.F. (2003): Pharmacological activity of the essential oil of *Satureja viminea* (Lamiaceae). *Rev. Biol. Trop.*, **51**, 247-252.
- Thakur, A.K. and Fezio, W.L. (1981): A computer program for estimating LD₅₀ and its confidence limits using modified Behrens-Reed-Muench cumulant method. *Drug Chem. Toxicol.*, **4**, 297-305.
- Trevar, J.W. (1927): The error of determination of toxicity. *Pro. Royal Soc. Lond.*, **101B**, 483-514.
- Van der Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Thomlison, N.J. and Walker, A.P. (1990): The international validation of a fixed dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 469-482.
- Wilbrandt, W. (1952): [Behrens methods for calculation of LD₅₀]. *Arzneimittelforschung.*, **2**, 501-503.
- Zbinden, G. and Flury-Roversi, M. (1981): Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch Toxicol.*, **47**, 77-99.