複数の誤差を持つ実験データ

第 2 回・高橋セミナー

2000 年 1 月 29 日
総評会館

日本ロシュ
高橋 行雄

目次

第１章　複数の誤差 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿ 1

第１節　はじめに 1
第２節　統計ソフト 1
第３節　今回のテーマ 2

第２章　逐次増量実験 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿ 3

第１節　逐次増量の例 3
第２節　誤差の構造 5
第３節　　MIXEDプロシジャによる解 5
第４節　　JMPによる実習 9

第３章　アトロピンの逐次増量 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿ 13

第１節　適切でない実験データの解析 13
第２節　ウサギの流延抑制 13
第３節　ＪＭＰによるデータのグラフ化 14

第４章　摘出回腸の収縮 ＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿ 23

第１節　マグヌス装置による実験 23
第２節　実験データの解析モデル 24
第３節　ＪＭＰによるデータのグラフ化 25

第1章 複数の誤差

第1節 はじめに

実験データには、複数の誤差が含まれる。血圧の場合を考えてみよう。測定を 2 回繰り返すと微妙に食い違いが生じる。いわゆる測定誤差である。毎日、同じ時刻に 3 回の測定して平均値を比較した場合にも、食い違いが生じる。いわゆる個体内誤差である。測定の対象が異なれば、血圧も異なる。さらに、実験のランダム化の手順によってもいくつかの実験誤差が生じる。

統計的検定手法は、一般的に考慮する誤差が一つであることを前提にしている。ところが、少し手の込んだ実験によって得られたデータには、これらの誤差が複合して入り込んでいいて、単純な統計手法の適用では、処理法間の統計的な差を検出できない場合がある。

幾つかの事例を通じて、複数の誤差を統計的に分離し、それを用いて処理法間の比較の方法を紹介する。

第2節 統計ソフト

統計解析を実際に行う手段の変遷は、目まぐるしい。統計解析を職業としている人たちは SAS を使い、統計学の研究者たちは S-Plus を好み、社会科学系の研究者は SPSS を愛好し、医学系の研究者たちの間では StatView あるいは国産の Fisher が好まれ、国内の生物実験系では Muscot が一時的に広まった。一般の統計ユーザたちは、Basic による統計手法シリーズから、Excel による統計手法シリーズに流れ込んでいる。

さて、このセミナーでは、日本ではマイナーな JMP を使用する。これは、統計解析を職業としている高橋が、実験研究を職業としている人たち、一般の統計ユーザたち、さらには、臨床試験に携わっているすべての関係者にとって、最も強力なデータ分析ツールと確信したからである。

JMP は、日本科学技術連盟の実験計画法セミナーの講義・実習でも採用され、また、臨床データマネージメントセミナーでも使用されている。最近は、日本ロシュ内部の統計実践セミナーにおいて、いわゆる臨床担当者、薬事担当者にも JMP を用いた教育を高橋が始めた。

1999 年 7 月、医薬安全研の定例会の前に、高橋の私的なセミナーとして「薬理学的活性の評価、生物検定法の古典を思い出そう」を開催した。そこで、生物検定法の代表的な方法である、質的反応に対する効力比とその信頼区間の計算実習に JMP を用いた。一般的な統計ソフトで、この問題に対応しているのは、たぶん JMP のみであろう。

第 2 回目でも JMP を計算実習に使用する。これは、複数の誤差を含んだ統計モデル、線形混合モデルが JMP で使えるからである。これまでは、SAS の MIXED プロシジャが、高橋は、さまざまな分割実験の解析、および経時データの解析に適用できることを紹介してきたのであるが、先にも述べたように SAS は、一般の統計ユーザに普及していないので、今回も SAS ではなく JMP を使用する。

なお、この実習の機材の提供は日本科学技術連盟、設置にはユックムス（株)、会場の提供は医薬安全研のご好意によっている。また、ここで使用する JMP バージョン 4 の β バージョンは、SAS ジャパン JMP 事業部から提供を受けた。

第3節 今回のテーマ

複数の実験誤差が存在するが、それらが埋没しており、一見しただけでは時計手法が誤用されていても分かりにくいような事例を取り上げた。それらの、誤差構造を明示し、JMP を用いて線形混合モデルによる誤差の計量を経験してもらう。それにより、多くの実験に含まれる誤差について見識を深める切っ掛けとなることを期待している。

1. 心不全ブタにたいする降圧剤の逐次増量による薬効評価
2. アトロピンによるウサギの流延抑制、乱塊法による用量反応
3. モルモット摘出回腸のヒスタミン誘発収縮反応
4. $E_{\max}$ 法による D_{50} の推定、D_{50} による用量反応関係の表示

新しい実習の試みを行う。実習データは、この文書ファイルの写しにある。このデータを、JMP に、コピー&ペーストし、JMP の結果を文書ファイルにペーストすることを主体にする。

第2章　逐次増量実験

第1節 逐次増量の例

心不全ブタにおけるA薬とB薬の降圧効果を持続点滴増量法により得られた経時データを表 1 に示す。さらに、投与終了後の回復過程を観察している。各薬剤の平均値の経時推移を図 1 に示す。A剤は、1 mg/kg/min、3 mg/kg/min まで用量の増加を反映して血圧の下降しているが、10 mg/kg/minでは、更なる下降には陰りが見えている。B剤は、10 mg/kg/minから下降が観察されている。

投与後 30 分間での血圧の戻りは、A 剤では戻りが遅いが、B 剤では、血圧が低下している時間が A 剤に比べ短いこと、血圧の絶対値が高いことを無視すれば、血圧の戻りが速やかである。

表 1 心不全ブタに対する血圧下降作用　　血圧(mmHg)

時間経過		0分	15分	30分	45分	60分	75分	90分	105分	120分
投与順		0	1	1	2	2	3	3	4	5
薬剤の種類	個体番号	投与前	投与量 1 mg/kg/min		投与量 3 mg/kg/min		投与量 10 mg/kg/min		投与なし	
1:溶媒	1	110	107	105	108	105	107	110	110	115
	2	100	100	100	100	102	100	102	104	103
	3	107	108	108	107	106	106	106	103	105
	4	97	97	100	97	98	100	97	100	100
	5	108	105	105	105	108	105	106	108	108
	6	87	87	90	86	88	85	86	86	87
2:A剤	7	108	105	105	100	100	103	100	99	106
	8	99	95	93	93	90	92	91	92	94
	9	117	116	116	113	111	105	104	105	100
	10	112	106	106	102	102	99	100	100	100
	11	112	112	110	100	100	100	96	99	99
	12	95	93	93	91	88	88	85	87	87
3:B剤	13	122	125	125	117	120	115	125	130	128
3	14	107	105	110	108	108	106	110	110	103
	15	97	98	100	98	99	90	88	95	102
	16	100	100	98	102	98	94	93	98	100
	17	112	109	100	100	109	103	110	115	112
	18	91	90	88	87	85	83	82	85	90

投与前の薬剤の種類は、「なし」である。

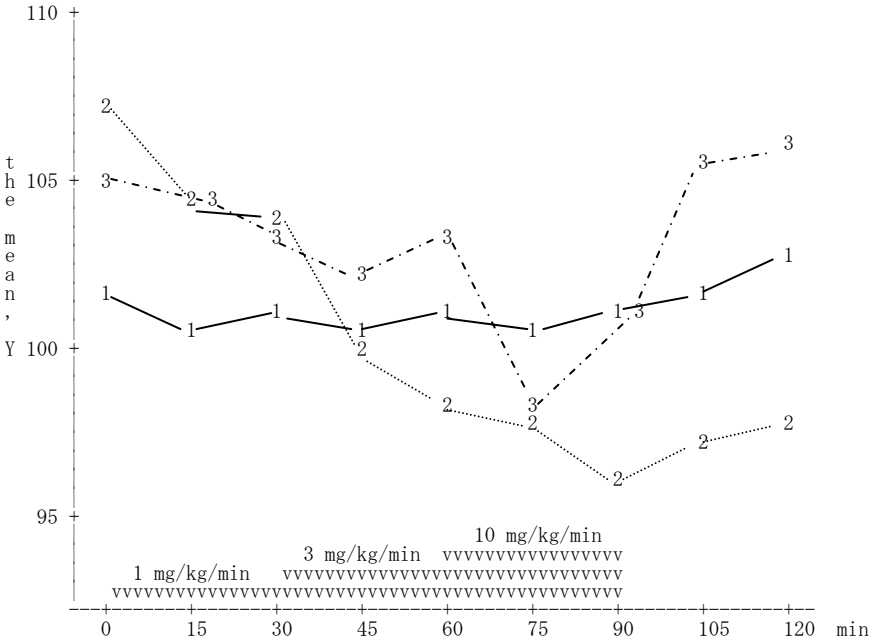


図 1 心不全ブタに対する血圧下降作用

1: 対照群、 2: A 薬、3: B 薬

この実験データの統計解析の計画を考える前に、この実験の主たる目的が何であるかが分からないと適切な解析計画は立てられない。事後的ではあるが、B 薬を標準薬として新規化合物 A 薬の効果が、B 薬の効果発現用量として知られている持続点滴 10 mg/kg/min の 1/3 で同等の効果が得られることを証明したいとしよう。また、効果の発現は、10 分までに現れる、それ以後は定常状態になることが一般的であるとしよう。

実際の実験では、証明したいこと以外に、実験が適切に行われていることを示すデータ、実験の仮説が証明できない場合に備えて、幾つかの付加的な条件でのデータが取れるように計画されている。

第2節 誤差の構造

溶媒群の No.1 の症例を取り上げてみよう。データの構造は、次のようである。

時間	投与量	薬剤	データ	データの構造 $\mu + s_i + \alpha_j + \beta_k + (\alpha\beta)_{jk} + e_{ijk} + e_{ijkl}$
投与前	0	―	110	$\mu + s_i + \alpha_0 + \beta_0 + (\alpha\beta)_{00} + e_{i00} + e_{i001}$
15 分	1	溶媒	107	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_1 + (\alpha\beta)_{11} + e_{i11} + e_{i111}$
30 分	1	溶媒	105	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_1 + (\alpha\beta)_{11} + e_{i11} + e_{i112}$
45 分	3	溶媒	108	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_2 + (\alpha\beta)_{12} + e_{i12} + e_{i121}$
60 分	3	溶媒	105	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_2 + (\alpha\beta)_{12} + e_{i12} + e_{i122}$
75 分	10	溶媒	107	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_3 + (\alpha\beta)_{13} + e_{i13} + e_{i131}$
90 分	10	溶媒	110	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_3 + (\alpha\beta)_{13} + e_{i13} + e_{i132}$
105 分	0	―	110	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_4 + (\alpha\beta)_{14} + e_{i14} + e_{i141}$
120 分	0	―	115	$\mu + s_i + \alpha_1 + \beta_5 + (\alpha\beta)_{15} + e_{i15} + e_{i141}$

ここで、

μ ：総平均

s_i ：個体の変量効果（個体間誤差）

i ：$i = 1, 2, \ldots, 18$ 個体番号

α_j ：薬剤の効果、α_0は投与前、α_1は溶媒、α_2はA薬、α_3はB薬

j ：$j = 0, 1, 2, 3$ 薬剤の種類

β_k ：増量効果

$(\alpha\beta)_{jk}$ ：交互作用

k ：$k = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ 投与順

w_{ijk} ：個体内誤差

e_{ijkl} ：測定誤差

このように、データの統計モデルができれば、線形混合モデルにより解くことができる。

第3節 MIXED プロシジャによる解

```
proc  mixed  data=D01 ;
    class   ID  G2  DOSE  ;
    model   Y = G2  DOSE  G2*DOSE  / ddfm=satterth solution  ;
    lsmeans     G2*DOSE            / diff=control('0' 'D0') cl ;
    random  ID  ID*G2*DOSE         / solution ;
run ;
```

用いたデータセット

OBS	ID	G	DOSE	TIME	T0	G2	Y
1	1	1	D0	0	110	0	110
2	1	1	D1	15	110	1	107
3	1	1	D1	30	110	1	105
4	1	1	D12	45	110	1	108
5	1	1	D12	60	110	1	105
6	1	1	D123	75	110	1	107
7	1	1	D123	90	110	1	110
8	1	1	D123a15	105	110	1	110
9	1	1	D123a30	120	110	1	115
:							
:							
154	18	3	D0	0	91	0	91
155	18	3	D1	15	91	3	90
156	18	3	D1	30	91	3	88
157	18	3	D12	45	91	3	87
158	18	3	D12	60	91	3	85
159	18	3	D123	75	91	3	83
160	18	3	D123	90	91	3	82
161	18	3	D123a15	105	91	3	85
162	18	3	D123a30	120	91	3	90

基本統計量

		DOSE								
		D0	D1		D12		D123		D123a-15	D123a-30
		0	15	30	45	60	75	90	105	120
G ALL										
1	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	MEAN	101.5	100.7	101.3	100.5	101.2	100.5	101.2	101.8	103.0
	STD	8.7	7.9	6.4	8.3	7.3	8.2	8.6	8.5	9.4
2	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	MEAN	107.2	104.5	103.8	99.8	98.5	97.8	96.0	97.0	97.7
	STD	8.5	9.1	9.2	7.8	8.4	6.6	7.0	6.4	6.5
3	N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	MEAN	104.8	104.5	103.5	102.0	103.2	98.5	101.3	105.5	105.8
	STD	11.2	11.9	12.6	10.1	12.0	11.7	16.3	16.1	12.9
ALL	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18
	MEAN	104.5	103.2	102.9	100.8	100.9	98.9	99.5	101.4	102.2

誤差分散の推定値

Covariance Parameter Estimates (REML)

Cov Parm	Estimate
ID	85.47581748
ID*G2*DOSE	3.28951873
Residual	5.04936620

個体間分散=9.245^2 =85.475、個体内分散=1.814^2 =3.2895、誤差分散=2.247^2 =5.049

固定効果の推定値

Solution for Fixed Effects

	Effect	G2	DOSE	Estimate	Std Error	DF	t	Pr > |t|
	INTERCEPT			105.52962892	2.64247158	33.4	39.94	0.0001
a0	G2	0		-1.02962892	1.64233703	110	-0.63	0.5320
a1	G2	1		0.20371080	2.30481766	112	0.09	0.9297
a2	G2	2		-10.29259756	2.30481766	112	-4.47	0.0001
a3	G2	3		0.00000000	.	.	.	.
b0	DOSE		D0	0.00000000	.	.	.	.
b1	DOSE		D1	-1.83333333	1.53585409	80	-1.19	0.2361
b2	DOSE		D12	-3.25000000	1.53585409	80	-2.12	0.0374
b3	DOSE		D123	-5.91666667	1.53585409	80	-3.85	0.0002
b4	DOSE		D123a15	-0.33333333	1.66722173	104	-0.20	0.8419
b5	DOSE		D123a30	0.00000000	.	.	.	.
(ab)00	G2*DOSE	0	D0	0.00000000	.	.	.	.
(ab)11	G2*DOSE	1	D1	-0.16666667	2.17202569	80	-0.08	0.9390
	:							
(ab)35	G2*DOSE	3	D123a30	0.00000000	.	.	.	.

変量効果の推定値

Solution for Random Effects

	Effect	ID	G2	DOSE	Estimate	SE Pred	DF	t	Pr > |t|
s1	ID	1			4.69355899	2.55575335	29.3	1.84	0.0765
s2	ID	2			-2.77245800	2.55575335	29.3	-1.08	0.2869
	:								
s18	ID	18			-15.97195681	2.55575335	29.3	-6.25	0.0001
w1,0,0	ID*G2*DOSE	1	0	D0	0.31812440	1.53018188	25.4	0.21	0.8370
w1,1,1	ID*G2*DOSE	1	1	D1	-1.37307390	1.42799449	28.9	-0.96	0.3443
	:								
w18,3,5	ID*G2*DOSE	18	3	D123a30	0.17448926	1.53436389	25	0.11	0.9104

固定効果の検定

Tests of Fixed Effects

	Source	NDF	DDF	Type III F	Pr > F
A	G2	2	112	11.71	0.0001
B	DOSE	4	67.5	6.29	0.0002
A*B	G2*DOSE	8	67.5	4.32	0.0003

最小２乗平均

Least Squares Means

	Effect	G2	DOSE	LSMEAN	Std Error	DF	t	Pr > |t|	Alpha	Lower	Upper
(ab)00	G2*DOSE	0	D0	104.50000000	2.28296472	19.7	45.77	0.0001	0.05	99.7337	109.2663
(ab)11	G2*DOSE	1	D1	103.73333972	2.56161581	29.5	40.50	0.0001	0.05	98.4981	108.9686
2	G2*DOSE	1	D12	103.56667305	2.56161581	29.5	40.43	0.0001	0.05	98.3315	108.8019
3	G2*DOSE	1	D123	103.56667305	2.56161581	29.5	40.43	0.0001	0.05	98.3315	108.8019
4	G2*DOSE	1	D123a15	104.56667305	2.64247158	33.4	39.57	0.0001	0.05	99.1927	109.9406
5	G2*DOSE	1	D123a30	105.73333972	2.64247158	33.4	40.01	0.0001	0.05	100.3594	111.1073
(ab)21	G2*DOSE	2	D1	101.73703136	2.56161581	29.5	39.72	0.0001	0.05	96.5018	106.9723
2	G2*DOSE	2	D12	96.73703136	2.56161581	29.5	37.76	0.0001	0.05	91.5018	101.9723
3	G2*DOSE	2	D123	94.48703136	2.56161581	29.5	36.89	0.0001	0.05	89.2518	99.7223
4	G2*DOSE	2	D123a15	94.57036469	2.64247158	33.4	35.79	0.0001	0.05	89.1964	99.9443
5	G2*DOSE	2	D123a30	95.23703136	2.64247158	33.4	36.04	0.0001	0.05	89.8631	100.6110
(ab)31	G2*DOSE	3	D1	103.69629559	2.56161581	29.5	40.48	0.0001	0.05	98.4611	108.9315
2	G2*DOSE	3	D12	102.27962892	2.56161581	29.5	39.93	0.0001	0.05	97.0444	107.5148
3	G2*DOSE	3	D123	99.61296225	2.56161581	29.5	38.89	0.0001	0.05	94.3777	104.8482
4	G2*DOSE	3	D123a15	105.19629559	2.64247158	33.4	39.81	0.0001	0.05	99.8223	110.5703
5	G2*DOSE	3	D123a30	105.52962892	2.64247158	33.4	39.94	0.0001	0.05	100.1557	110.9036

投与前値との差についての最小 2 乗平均

Differences of Least Squares Means

Effect	G2	DOSE	_G2	_DOSE	Difference	Std Error	DF	t	Pr > |t|	Alpha	Lower	Upper
G2*DOSE	1	D1	0	D0	-0.76666028	1.50880430	83.4	-0.51	0.6127	0.05	-3.7674	2.2341
G2*DOSE	1	D12	0	D0	-0.93332695	1.50880430	83.4	-0.62	0.5379	0.05	-3.9341	2.0674
G2*DOSE	1	D123	0	D0	-0.93332695	1.50880430	83.4	-0.62	0.5379	0.05	-3.9341	2.0674
G2*DOSE	1	D123a15	0	D0	0.06667305	1.64233703	110	0.04	0.9677	0.05	-3.1881	3.3215
G2*DOSE	1	D123a30	0	D0	1.23333972	1.64233703	110	0.75	0.4543	0.05	-2.0214	4.4881
G2*DOSE	2	D1	0	D0	-2.76296864	1.50880430	83.4	-1.83	0.0706	0.05	-5.7637	0.2378
G2*DOSE	2	D12	0	D0	-7.76296864	1.50880430	83.4	-5.15	0.0001	0.05	-10.7637	-4.7622
G2*DOSE	2	D123	0	D0	-10.01296864	1.50880430	83.4	-6.64	0.0001	0.05	-13.0137	-7.0122
G2*DOSE	2	D123a15	0	D0	-9.92963531	1.64233703	110	-6.05	0.0001	0.05	-13.1844	-6.6749
G2*DOSE	2	D123a30	0	D0	-9.26296864	1.64233703	110	-5.64	0.0001	0.05	-12.5178	-6.0082
G2*DOSE	3	D1	0	D0	-0.80370441	1.50880430	83.4	-0.53	0.5957	0.05	-3.8044	2.1970
G2*DOSE	3	D12	0	D0	-2.22037108	1.50880430	83.4	-1.47	0.1449	0.05	-5.2211	0.7804
G2*DOSE	3	D123	0	D0	-4.88703775	1.50880430	83.4	-3.24	0.0017	0.05	-7.8878	-1.8863
G2*DOSE	3	D123a15	0	D0	0.69629559	1.64233703	110	0.42	0.6724	0.05	-2.5585	3.9511
G2*DOSE	3	D123a30	0	D0	1.02962892	1.64233703	110	0.63	0.5320	0.05	-2.2252	4.2844

結果の要約

溶媒の投与による血圧の変化は、1mmHg の範囲であり、有意な変化ではない。B 薬は、10mg/kg/min で-4.887 mmHg と有意な変化があった。A 薬は、3mg/kg/min で-7.762 mmHg と有意な変化があた。用量反応的に表現すれば、B 薬 10mg/kg/min と同等の効果を得る A 薬の用量は、antilog10(0.22) = 1.6mg/kg/min であり、B 薬の 1/6 で同等の効果が得られる。ただし、用量反応の傾きが異なるので、その比は一定でない。

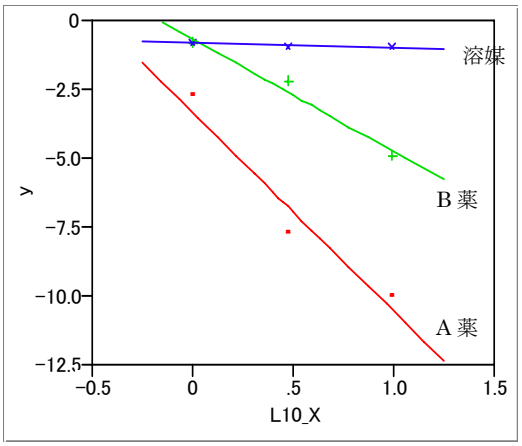
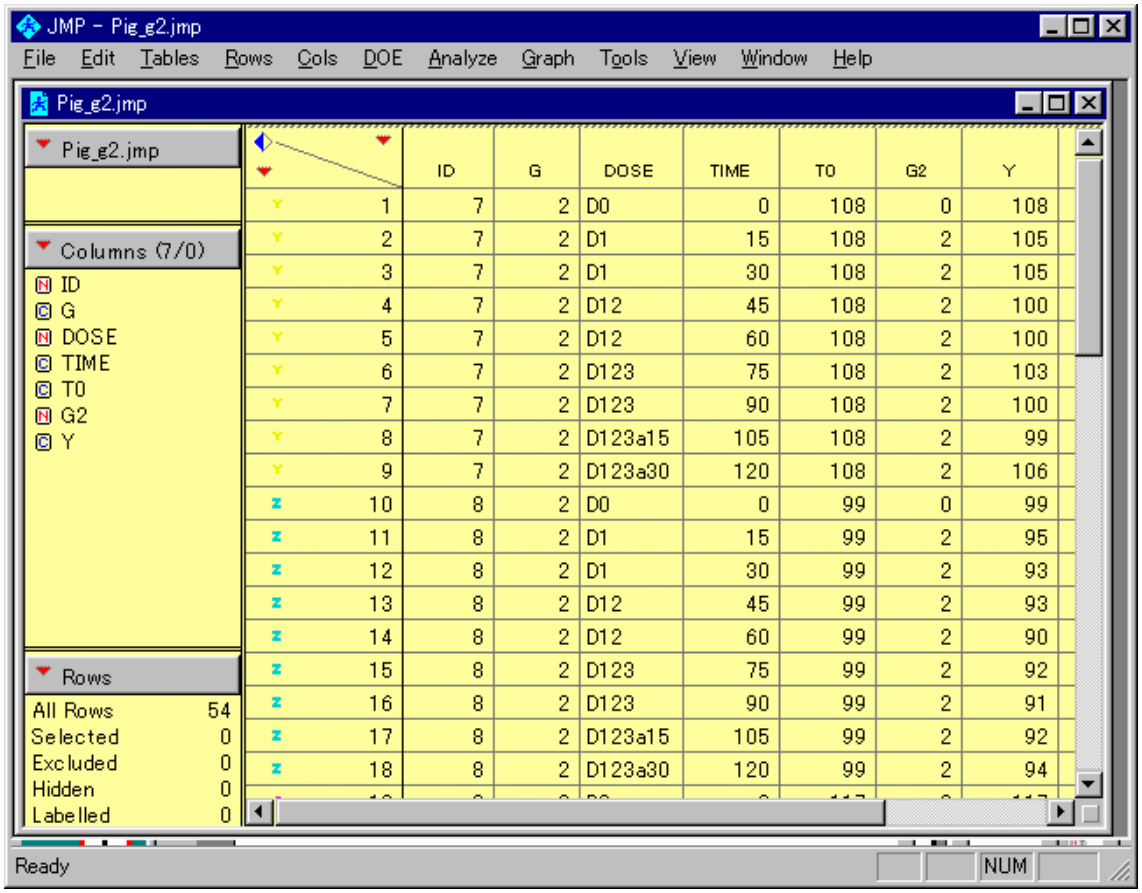


図 2　投与前値からの LSMEAN の差のよる用量反応

第4節 JMP による実習

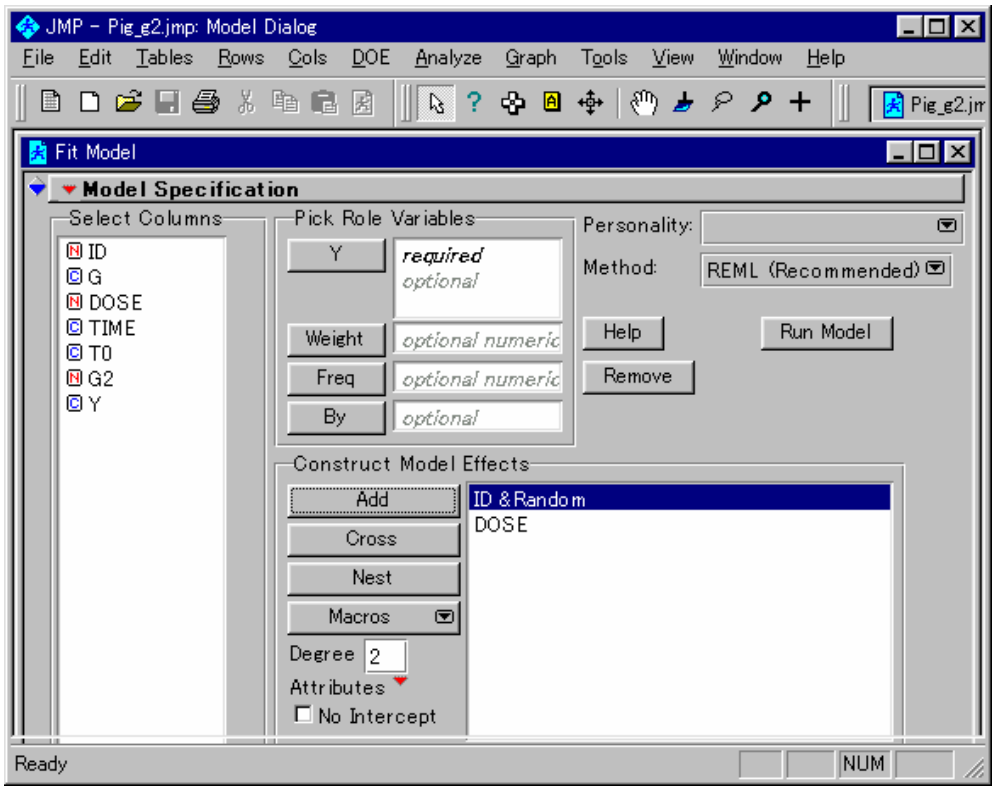
A 薬のデータに限定して、JMP の新しいバージョン 4 の β 6 版による線形混合モデルの実習を行う。これは、前節のモデルの解析が、JMP のエラーにより実現できないので、便宜的な対処法であることと、線形混合モデルの入門としては簡単な問題の方がよいとの判断にもよる。

図 3　SAS データセットから JMP への取り込み



	ID	G	DOSE	TIME	T0	G2	Y
1	7	2	D0	0	108	0	108
2	7	2	D1	15	108	2	105
3	7	2	D1	30	108	2	105
4	7	2	D12	45	108	2	100
5	7	2	D12	60	108	2	100
6	7	2	D123	75	108	2	103
7	7	2	D123	90	108	2	100
8	7	2	D123a15	105	108	2	99
9	7	2	D123a30	120	108	2	106
10	8	2	D0	0	99	0	99
11	8	2	D1	15	99	2	95
12	8	2	D1	30	99	2	93
13	8	2	D12	45	99	2	93
14	8	2	D12	60	99	2	90
15	8	2	D123	75	99	2	92
16	8	2	D123	90	99	2	91
17	8	2	D123a15	105	99	2	92
18	8	2	D123a30	120	99	2	94

図 4　線形混合モデル、Random の指定



Response Y

Summary of Fit

Rsquare	0.906221
RSquare Adj	0.896452
Root Mean Square Error	2.603127
Mean of Response	100.2593
Observations (or Sum Wgts)	54

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	10	3143.1094	314.311	46.3841
Error	43	291.3796	6.776	Prob > F
C. Total	53	3468.3704		<.0001

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob>|t|
Intercept	100.34722	3.018015	33.25	<.0001
ID[7]	2.5933388	3.096129	0.84	0.4069
ID[8]	-6.939921	3.096129	-2.24	0.0302
ID[9]	9.2775781	3.096129	3.00	0.0045
ID[10]	2.7029165	3.096129	0.87	0.3875
ID[11]	2.8124942	3.096129	0.91	0.3687
ID[12]	-10.44641	3.096129	-3.37	0.0016

DOSE[D0]	6.8194444	0.945564	7.21	<.0001
DOSE[D1]	3.8194444	0.719466	5.31	<.0001
DOSE[D12]	-1.180556	0.719466	-1.64	0.1081
DOSE[D123]	-3.430556	0.719466	-4.77	<.0001
DOSE[D123a15]	-3.347222	0.945564	-3.54	0.0010

REML Variance Component Estimates

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper	Pct of Total
ID&Random	7.9399811	53.80346	36.455404	19.939077	390.53534	88.814
Residual		6.7762705				11.186
Total		60.57973				100.000

-2 LogLikelihood =

265.89127

Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F	
ID&Random	6	5	43	2421.1557	71.4598	<.0001	Shrunk
DOSE	5	5	43	721.9537	21.3083	<.0001	

Tests on Random effects refer to shrunken predictors rather than traditional estimates.

Effect Details

ID&Random

Least Squares Means Table

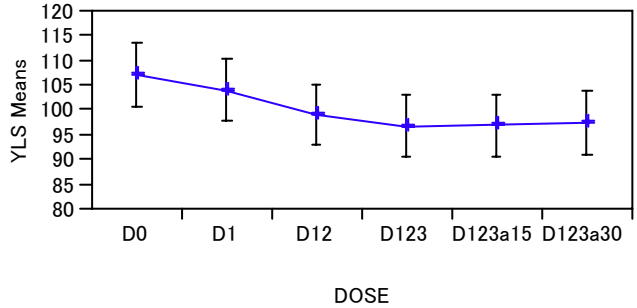
Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
7	102.94056	0.87174865	102.889
8	93.40730	0.87174865	93.222
9	109.62480	0.87174865	109.667
10	103.05014	0.87174865	103.000
11	103.15972	0.87174865	103.111
12	89.90082	0.87174865	89.667

DOSE

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
D0	107.16667	3.1775182	107.167
D1	104.16667	3.0873828	104.167
D12	99.16667	3.0873828	99.167
D123	96.91667	3.0873828	96.917
D123a15	97.00000	3.1775182	97.000
D123a30	97.66667	3.1775182	97.667

LS Means Plot



LSMeans Differences Student's t
Alpha=0.050
Q=2.01669

LSMean[i] By LSMean[j]

Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	D0	D1	D12	D123	D123a15	D123a30
D0	0	3	8	10.25	10.1667	9.5
	0	1.30156	1.30156	1.30156	1.50292	1.50292
	0	0.37515	5.37515	7.62515	7.13575	6.46908
	0	5.62485	10.6249	12.8749	13.1976	12.5309
D1	-3	0	5	7.25	7.16667	6.5
	1.30156	0	1.06272	1.06272	1.30156	1.30156
	-5.6249	0	2.85682	5.10682	4.54181	3.87515
	-0.3751	0	7.14318	9.39318	9.79152	9.12485
D12	-8	-5	0	2.25	2.16667	1.5
	1.30156	1.06272	0	1.06272	1.30156	1.30156
	-10.625	-7.1432	0	0.10682	-0.4582	-1.1249
	-5.3751	-2.8568	0	4.39318	4.79152	4.12485
D123	-10.25	-7.25	-2.25	0	-0.0833	-0.75
	1.30156	1.06272	1.06272	0	1.30156	1.30156
	-12.875	-9.3932	-4.3932	0	-2.7082	-3.3749
	-7.6251	-5.1068	-0.1068	0	2.54152	1.87485
D123a15	-10.167	-7.1667	-2.1667	0.08333	0	-0.6667
	1.50292	1.30156	1.30156	1.30156	0	1.50292
	-13.198	-9.7915	-4.7915	-2.5415	0	-3.6976
	-7.1357	-4.5418	0.45819	2.70819	0	2.36425
D123a30	-9.5	-6.5	-1.5	0.75	0.66667	0
	1.50292	1.30156	1.30156	1.30156	1.50292	0
	-12.531	-9.1249	-4.1249	-1.8749	-2.3643	0
	-6.4691	-3.8751	1.12485	3.37485	3.69759	0

第3章 アトロピンの逐次増量

第1節 適切でない実験データの解析

統計の応用分野で、適切でない統計解析の事例をよく目にする。多くは、適用している統計手法が前提にしている仮定とのミスマッチである。高橋も駆け出しのころ、臨床試験データの解析で、1 標本の問題を 2 標本の問題として解くプログラムを書き、結果を報告したこともある。気が付いたときは、すでに遅し、であった。

適切でない統計解析の事例は、各学問分野で、その分野の典型的な実験データの解析を解説している教科書にも散見する。これは、教科書が出版された当時の統計の教科書に、その分野で広く行われている実験データを適切に解析する方法が述べられていなかった場合、統計の理論はあったが、計算手段がない場合に実験にも起きる。

薬理試験の分野で、同一検体または同一個体内での逐次増量による試験が、*in vitro*に限らず*in vivo*の試験でも多用されている。この章では、医薬品研究法[文献1)]で述べられている古典的な解析事例の問題点を指摘し、近代的な統計解析法を示す。

第2節 ウサギの流延抑制

文献には、マグヌス装置を用いた摘出臓器に対する薬物の用量反応曲線の推定に、Lack of Fitの解析を含む回帰分析による計算手順が示されている。この計算例として、アトロピン投与によるウサギの流延抑制が示されている。表 2 にデータを示す。

このデータから用量反応関係を示そうとしたときに、回帰直線の当てはめについての統計的な知識があり、コンピュータによる計算プログラムが手元にあった場合に、それ以上の統計的素養がなければ、迷わずアトロピンの用量を横軸に、抑制率を縦軸にした散布図を作成し、回帰直線を当てはめ、実験結果を要約し解釈するに違いない。

この回帰分析の統計的問題点は、第 1 は、1 羽のウサギに 4 用量を投与しているにもかかわらず、それを無視して 4 羽に異なる用量を投与して得られたデータと見なす手法

を適用していることである。第 2 は、投与量を逐次的に増量しているにも係わらず、ランダムに投与したことを前提にした統計手法を適用していることである。表 2 を見ただけでは、第 2 の問題が、あるか否かは分からない。第 3 は、抑制率には、下限と上限があり、薬理反応は、その範囲内でシグモイド曲線になり、回帰直線を当てはめて良いか吟味が必要であるが、無視されている。

表 2　アトロピン投与によるウサギの流延抑制

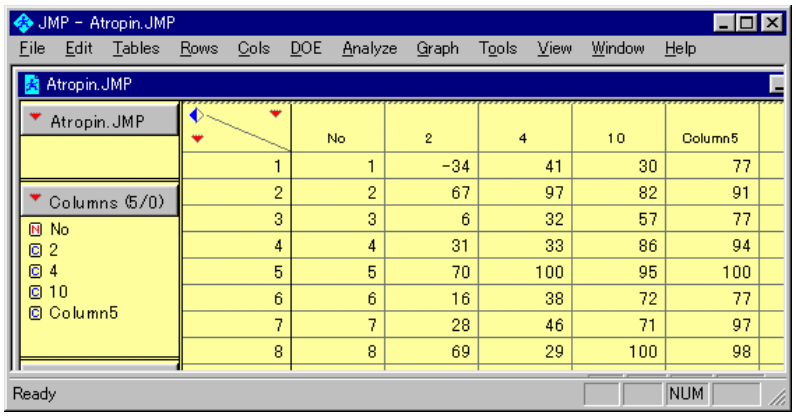
ウサギ	アトロピン（μg/kg）投与後の％抑制				
	2	4	10	15	計
1	-34	41	30	77	114
2	67	97	82	91	337
3	6	32	57	77	172
4	31	33	86	94	264
5	70	100	95	100	365
6	16	38	72	77	203
7	28	46	71	97	242
8	69	29	100	98	296
計	273	416	593	711	1993
平　均	34.1	52.0	74.1	88.9	

古典的な生物検定法により、このデータの解析法を考えると、1 羽ごとのウサギから 50％抑制用量を推定して、その平均値と 95％信頼区間を計算するならば、生物検定法的にいえば、直接法（Direct Assay）の問題である。このような方法ならば、統計的には、正しい方法である。

第3節　ＪＭＰによるデータのグラフ化

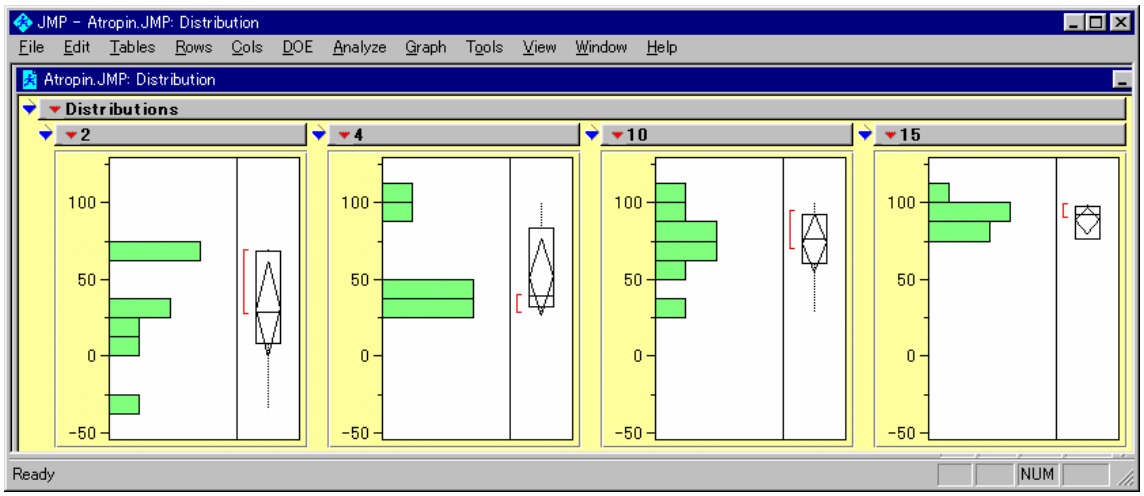
MS-Wordの表 2 のデータをコピー＆ペーストでJMPの表に貼り付けてみよう。結果を図 5 に示す。コピーするデータはウサギの番号と抑制データのみである。図 7 では、変数名を投与量に変更している途中である。

図 5　JMP にペーストし、変数名の変更



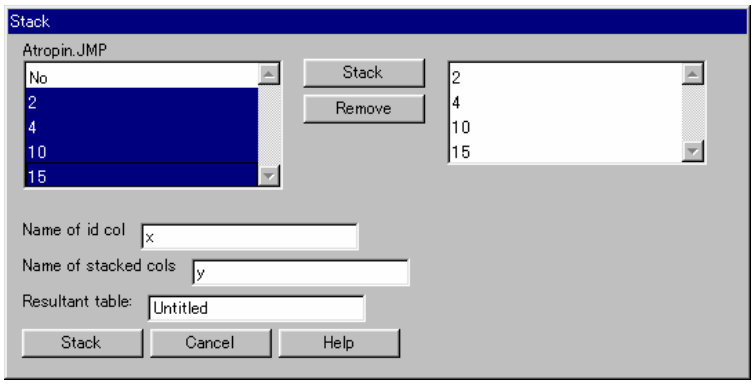
	No	2	4	10	Column5
1	1	-34	41	30	77
2	2	67	97	82	91
3	3	6	32	57	77
4	4	31	33	86	94
5	5	70	100	95	100
6	6	16	38	72	77
7	7	28	46	71	97
8	8	69	29	100	98

図 6　棒グラフとボックスプロット



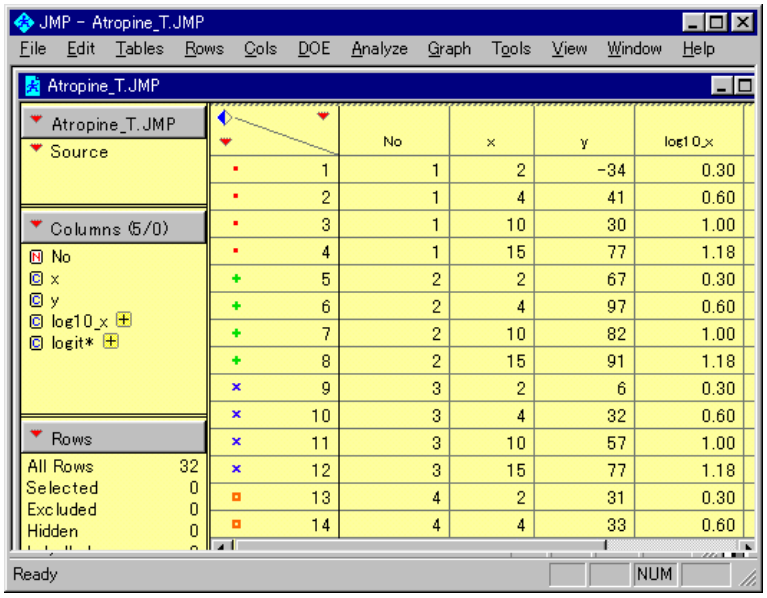
この図は、JPM でテーブルメニューの「Analyze、Distribution」の選択、投与量を「Y、Columns」に選択、「OK」の選択、手のツールを選択、「▼Distribution、Uniform Scaling」の選択、「✋手ツール」で棒の幅の調整、テーブルメニューの「Edit、Copy」の選択、MS-Word でのペーストをしたものである。

図 7　1 行 1 データの形式への変換



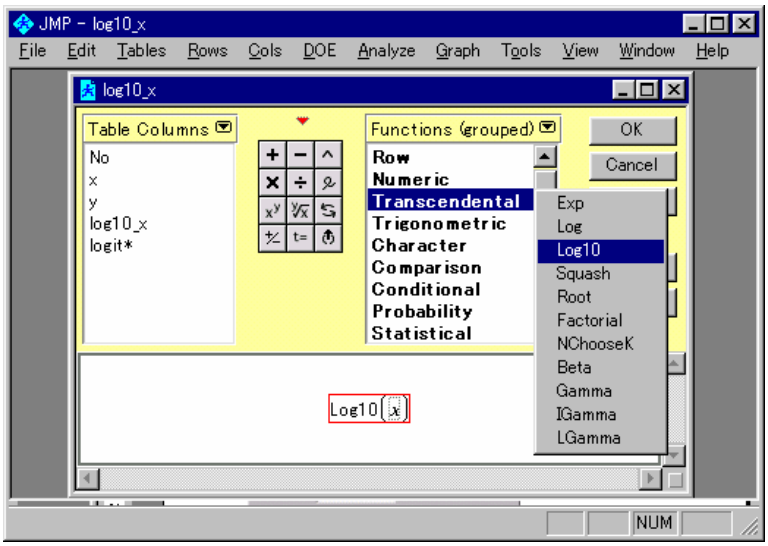
この図は、JPM のテーブルメニューの「Tables、Stack」の選択、投与量を「Named of id COL」に「x」の入力、「Name of stacked cols」に「y」の入力、変数「2、4、10、15」を選択して「Stack」をクリックして Stack 変数領域への移動をしている。

図 8　スタック機能によるデータの転置、変数 x の属性の変更、log の計算



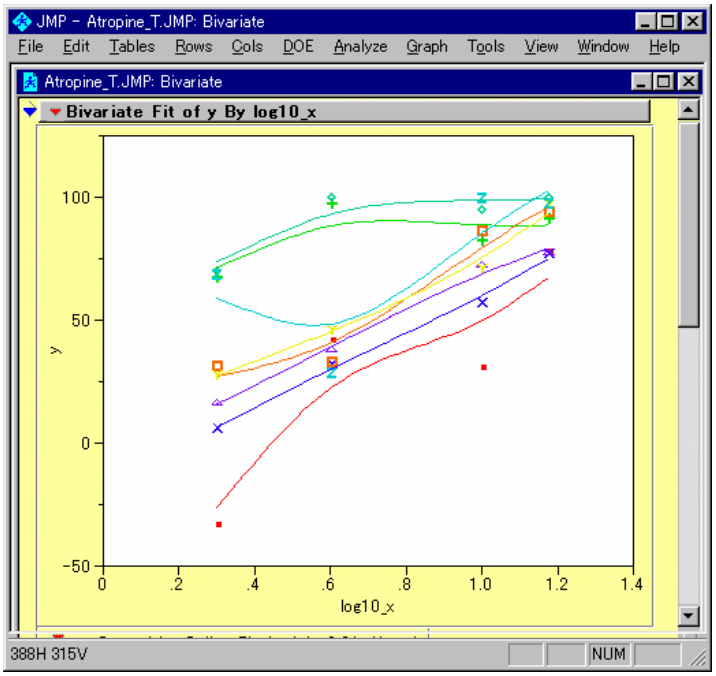
変数 x の属性を N から C への変更する。手順：「x」の選択、「右クリック、Column Info…」の選択、「Data Type を Character から Numeric」へ変更、「Modeling Type を Noninal から Continuous」への変更する。

図 9　変数の追加と変数変換



変数変換は、テーブルメニューの「Cols、Fomura」で実施する。Log10 は、Transcendental（〔数〕〈関数が〉超越の ～ number 〔数〕 超越数.[1]の中に入っている。）

図 10　スプライン関数によるウサギごとの用量反応

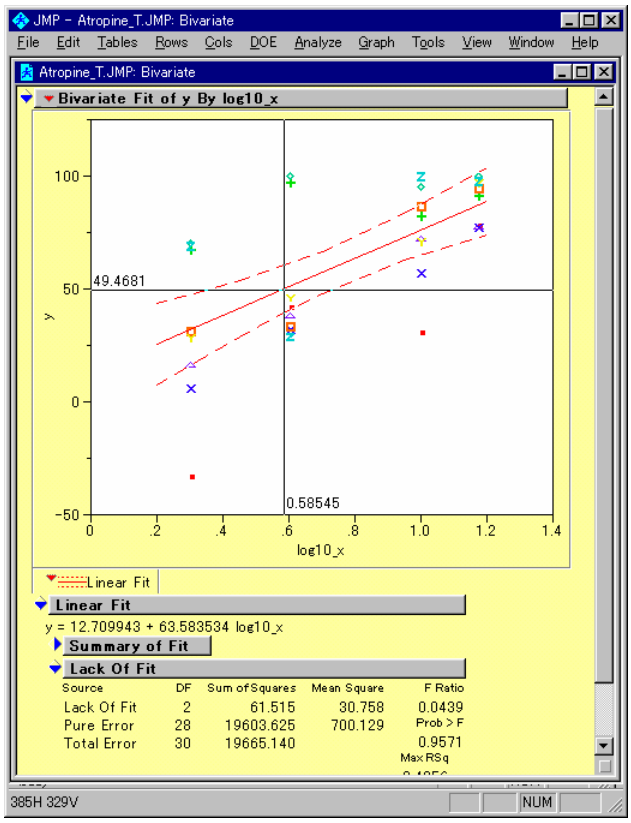


投与量が増加すると反応が、100%で頭打ちになっていることが、観察される。

---

[1]Progressive English-Japanese Dictionary, Third edition © Shogakukan 1980,1987,1998/プログレッシブ英和中辞典　第3版　©小学館 1980,1987,1998

図 11 回帰直線の当てはめと 95%信頼区間



＋字ツールで 95%信頼区間を読み取ると、（0.37、0.74）が得られる。Lack of Fit 1 の結果から、直線の当てはめは、支持される。

図 12　ウサギごとに回帰直線の当てはめ

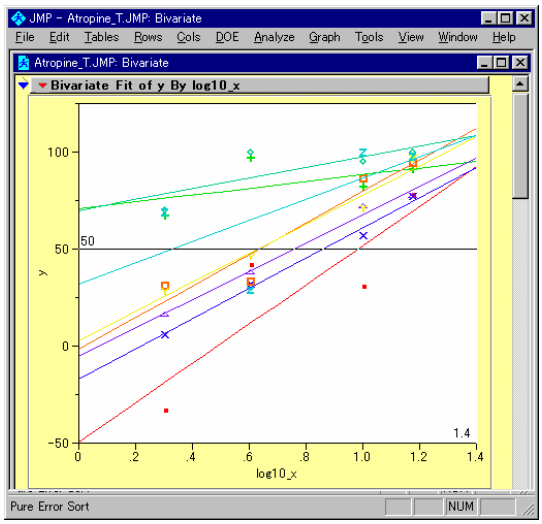
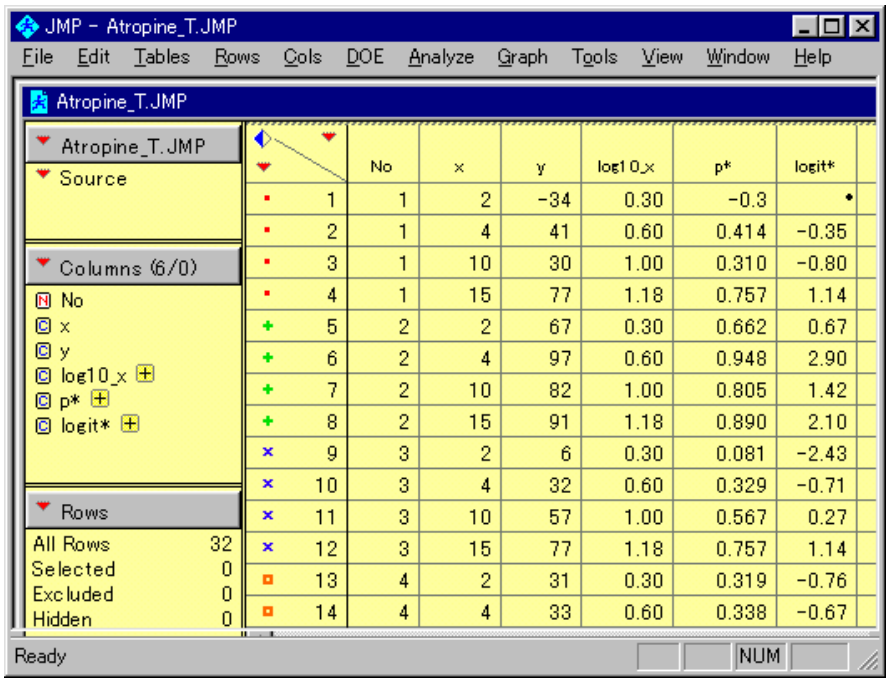


図 13　経験ロジットの生成



	No	x	y	log10_x	p*	logit*
1	1	2	-34	0.30	-0.3	•
2	1	4	41	0.60	0.414	-0.35
3	1	10	30	1.00	0.310	-0.80
4	1	15	77	1.18	0.757	1.14
5	2	2	67	0.30	0.662	0.67
6	2	4	97	0.60	0.948	2.90
7	2	10	82	1.00	0.805	1.42
8	2	15	91	1.18	0.890	2.10
9	3	2	6	0.30	0.081	-2.43
10	3	4	32	0.60	0.329	-0.71
11	3	10	57	1.00	0.567	0.27
12	3	15	77	1.18	0.757	1.14
13	4	2	31	0.30	0.319	-0.76
14	4	4	33	0.60	0.338	-0.67

$P^* = (y + 2.5) / (100+5)$、　$\text{logit}^* = \log10 (p^* / (1 - p^*))$

図 14　経験ロジット変換後の回帰の当てはめ

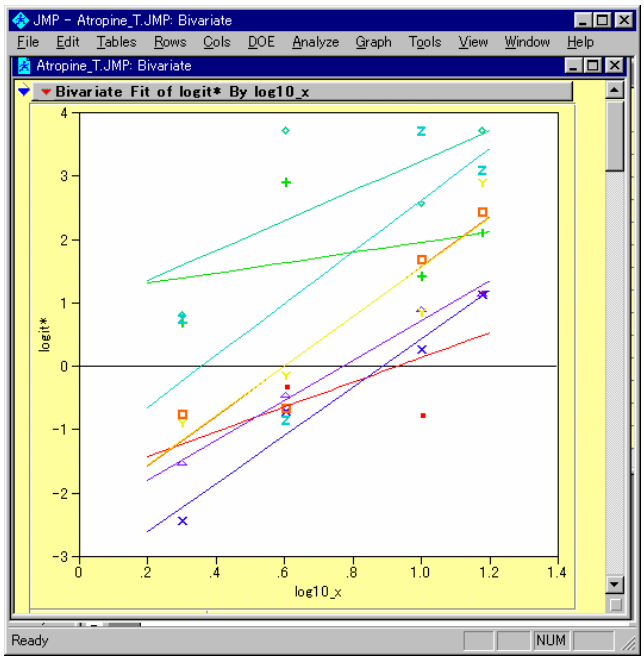
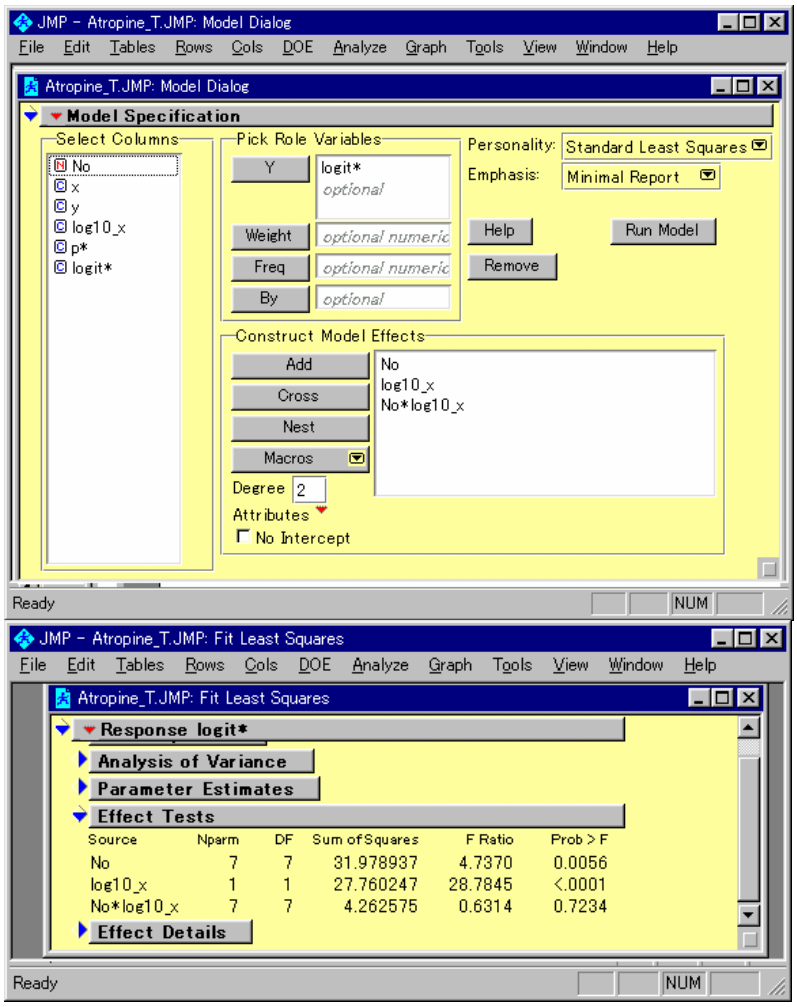
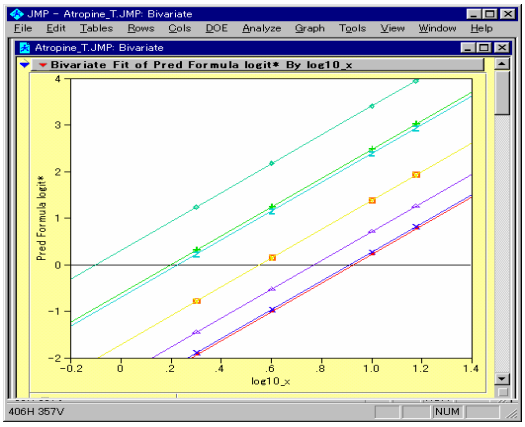


図 15　Fit Model による交互作用の検討



交互作用は、n.s.である。

図 16　平行な回帰直線の当てはめ



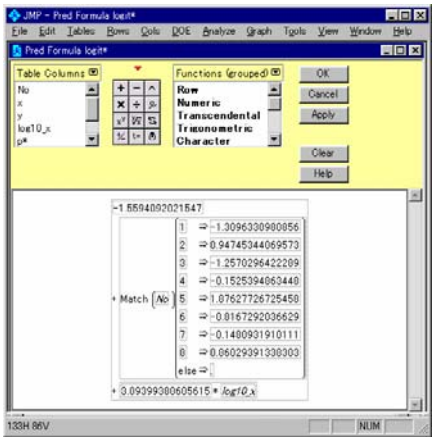


図 17　推定値のデータシートへの保存

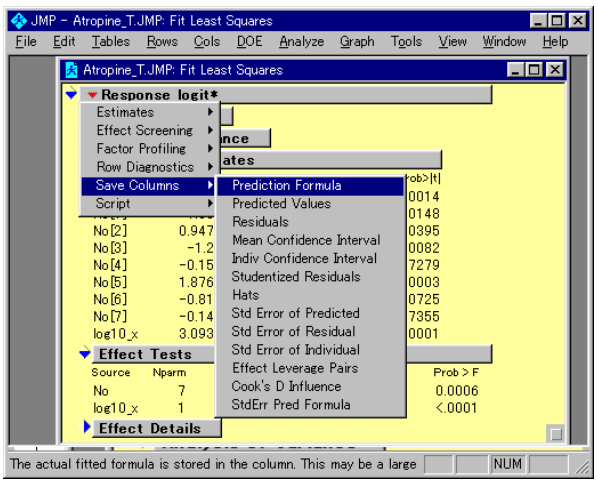
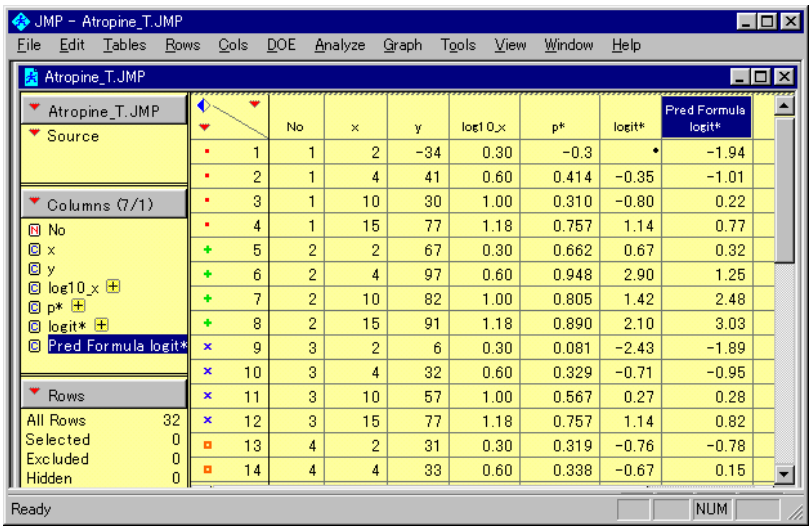


図 18　推定値の出力結果



	No	x	y	log10_x	p*	logit*	Pred Formula logit*
1	1	2	-34	0.30	-0.3	•	-1.94
2	1	4	41	0.60	0.414	-0.35	-1.01
3	1	10	30	1.00	0.310	-0.80	0.22
4	1	15	77	1.18	0.757	1.14	0.77
5	2	2	67	0.30	0.662	0.67	0.32
6	2	4	97	0.60	0.948	2.90	1.25
7	2	10	82	1.00	0.805	1.42	2.48
8	2	15	91	1.18	0.890	2.10	3.03
9	3	2	6	0.30	0.081	-2.43	-1.89
10	3	4	32	0.60	0.329	-0.71	-0.95
11	3	10	57	1.00	0.567	0.27	0.28
12	3	15	77	1.18	0.757	1.14	0.82
13	4	2	31	0.30	0.319	-0.76	-0.78
14	4	4	33	0.60	0.338	-0.67	0.15

表 3　ED50 の計算

No	m	a	b		−(m+a)/b
	1	−1.5594	−1.3096	3.09399	0.93
	2	−1.5594	0.9474	3.09399	0.20
	3	−1.5594	−1.257	3.09399	0.91
	4	−1.5594	−0.1525	3.09399	0.55
	5	−1.5594	1.8762	3.09399	−0.10
	6	−1.5594	−0.8167	3.09399	0.77
	7	−1.5594	−0.148	3.09399	0.55
	8	−1.5594	0.8602	3.09399	0.23
				平均	0.50
				VAR	0.14
				SD	0.37
				SE	0.13

文献

1) 伴義男、岡本敏彦、北川晴雄ほか編（1974）、医薬品研究法 91-97、朝倉書店.

第4章 摘出回腸の収縮

第1節 マグヌス装置による実験

高橋自身は、マグヌス装置を見たことがないのであるが、浦川紀元監修の「平滑筋の薬物反応、IV 章 平滑筋実験法、p250」の次の記載により、抽象的に理解をしている。「モルモット摘出回腸を 37℃で通気した 20mL の organ bath に懸垂し、ACh を収縮薬として用いることにする」。

エーザイの小野さんから提供された、モルモット摘出回腸のヒスタミン誘発収縮反応に及ぼす影響のデータをしめす。

表 4 ヒスタミン収縮

実験順		処置	最大	ヒスタミン添加量（単位はμM）、測定値：収縮高(mm)							
		G 薬	収縮高	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30
R1	1	蒸留水	167	19	24	49	74	94	121	152	154
	2	0.01μM	186	27	23	29	41	68	116	149	191
	3	0.1μM	123	1	1	7	4	16	34	80	122
	4	1.0μM	167	-1	3	5	7	15	9	25	72
R2	5	0.01μM	121	4	4	7	13	53	90	114	122
	6	0.1μM	148	-21	4	0	-1	28	51	115	130
	6	1.0μM	124	6	6	3	2	7	9	31	86
	8	蒸留水	146	14	16	18	23	32	108	126	133

実験手順

実験データの解析法は、実験手順によって異なる。提供されたデータには、手順が示されてたいなかったが、薬理実験の解説書などから類推して手順を示す。

手順 1）8 匹のモルモットから回腸を摘出する。

手順 2）マグヌス装置に回腸を 1 検体ごとに懸垂し、ヒスタミン濃度が 30 μM となるまでゆっくりと添加し、懸垂した回腸の収縮量を最大収縮高とする。これを 4 件体分行う。

手順 3）回腸中のヒスタミンを洗浄する。

手順 4）蒸留水、3 用量の濃度に調製された G 薬を準備する。蒸留水をマグヌス装置に注入し、手順 5 での実験を行い、G 薬の低濃度から手順 5 を繰返す。

手順 5）マグヌス装置にヒスタミン濃度が 0.01 μMとなるように添加し、回腸の収縮速度が止まったら、次にヒスタミン濃度が 0.03 μMとなるように添加し、最後にヒスタミン濃度が 30 μMとなるまで添加する。この間の回腸の収縮量を連続的に記録する。

手順 6）手順 2 に戻る。ただし、手順 4 で、G 薬の 3 用量を先に行い、蒸留水は最後とする。

第2節　実験データの解析モデル

ランダムに選ばれた 8 匹のモルモットから摘出された回腸は、ランダム効果と考えられる。その検体を 4 本ごとに分けて、それらを蒸留水と G 薬の 3 濃度溶液に割り付ける。その 1 回腸ごとに、ヒスタミンを 3.3 倍の濃度となるように逐次増量し、回腸の収縮量を計測している。これを残りの 4 本の回腸についても同様に実施した。実験に先立って、ヒスタミンの 3.3 倍の逐次増量は、ランダムな単回投与の結果が一致し、増量前の影響の持ち越し効果がないことが確かめられているとする。

この実験で知りたいことは、ヒスタミンを完全活性薬としたときに、G 薬の存在下での、ヒスタミンによる回腸の収縮の用量反応が、

平行移動

傾きが平坦化

のどちらかを知りたいのである。そして、平行移動ならば、G薬が存在しないときのヒスタミンの用量反応曲線を基準にして、常用対数目盛りで 0.3010 右にシフトさせるG薬のモル濃度（pA_2）を推定したいのである。

このような実験目的を勘案して、データの構造は、

$$y_{ijk} = \mu + r_i + s_{ij} + \alpha_k + x + (\alpha x)_k + e_{ijkl} + e_{ijkl}$$

ここで、

μ　：総平均

r_i　：反復

i : $j = 1, 2$　実験の反復

s_i　：個体の変量効果（個体間誤差）

j : $j = 1, 2, \ldots, 8$　個体番号

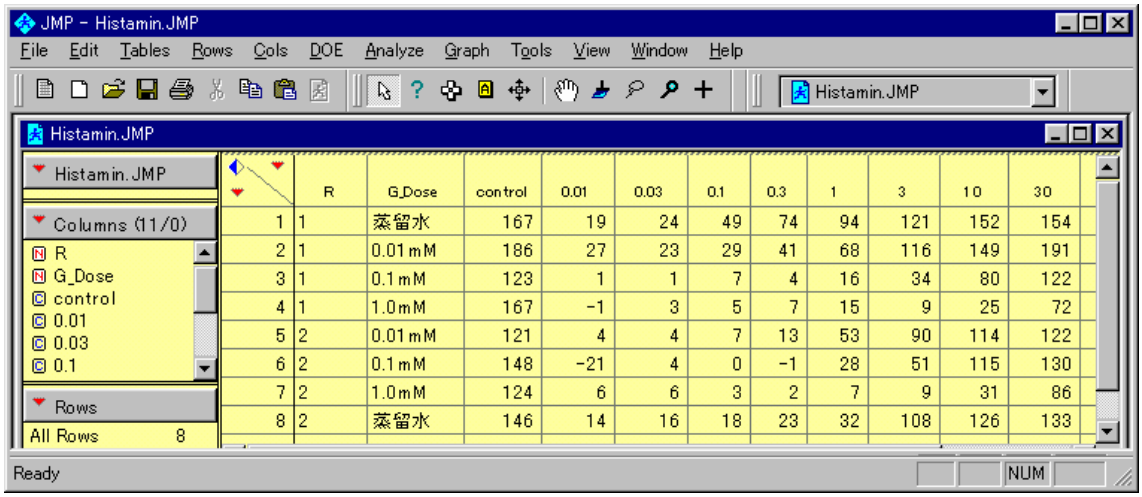
α_k ：G薬の効果
　k : $k = 0, 1, 2, 3$　G 薬の用量
x ：ヒスタミンの用量
　$(\alpha x)_k$ ：交互作用
l ：$i = 1, 2, . . . , 8$　ヒスタミンの用量変更数
　e_{ijkl} ：誤差

このように、データの統計モデルができれば、線形混合モデルにより解くことができる。

第3節　ＪＭＰによるデータのグラフ化

MS-Wordの表 4 のデータをコピー＆ペーストでJMPの表に貼り付けてみよう。結果を図 19 に示す。

図 19　JMP への取り込み



	R	G_Dose	control	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30
1	1	蒸留水	167	19	24	49	74	94	121	152	154
2	1	0.01mM	186	27	23	29	41	68	116	149	191
3	1	0.1mM	123	1	1	7	4	16	34	80	122
4	1	1.0mM	167	-1	3	5	7	15	9	25	72
5	2	0.01mM	121	4	4	7	13	53	90	114	122
6	2	0.1mM	148	-21	4	0	-1	28	51	115	130
7	2	1.0mM	124	6	6	3	2	7	9	31	86
8	2	蒸留水	146	14	16	18	23	32	108	126	133

変数名は、ヒスタミンの投与量に変更した。

図 20　1 行 1 データへ形式への変換

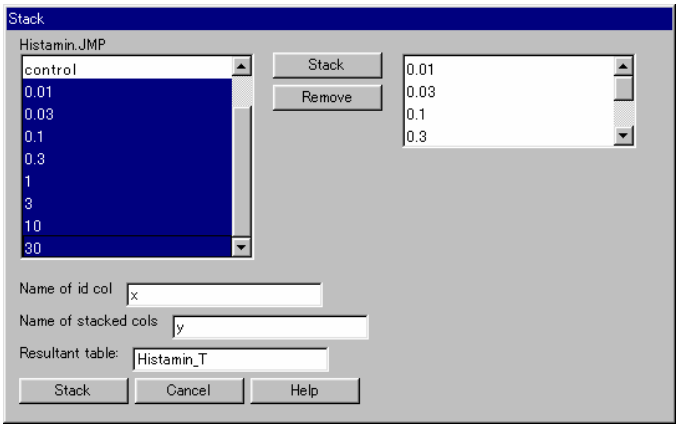
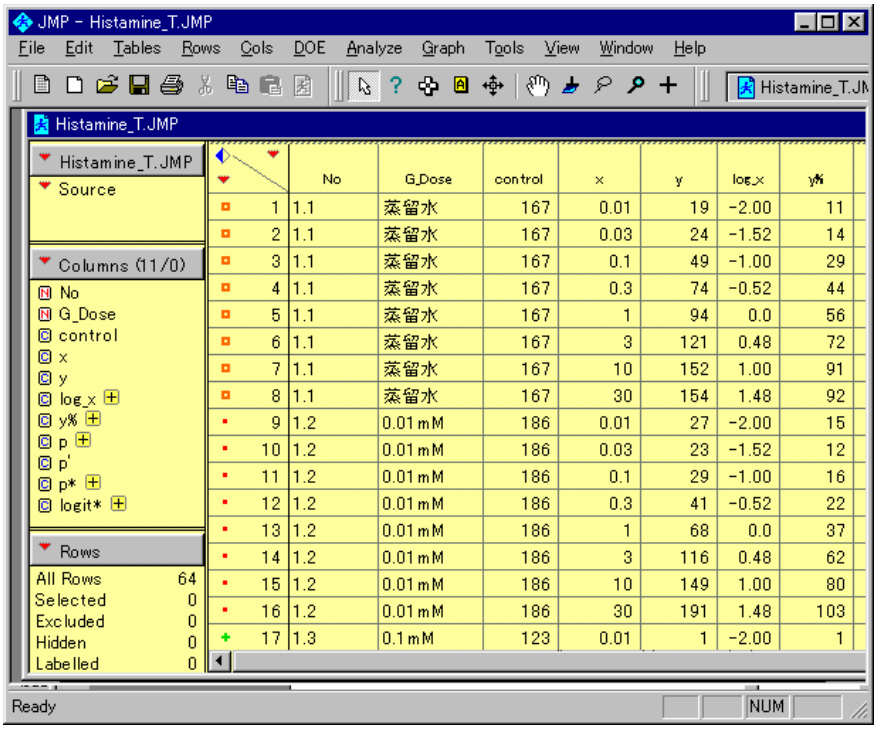


図 21



	No	G_Dose	control	x	y	log_x	y%
1	1.1	蒸留水	167	0.01	19	-2.00	11
2	1.1	蒸留水	167	0.03	24	-1.52	14
3	1.1	蒸留水	167	0.1	49	-1.00	29
4	1.1	蒸留水	167	0.3	74	-0.52	44
5	1.1	蒸留水	167	1	94	0.0	56
6	1.1	蒸留水	167	3	121	0.48	72
7	1.1	蒸留水	167	10	152	1.00	91
8	1.1	蒸留水	167	30	154	1.48	92
9	1.2	0.01 mM	186	0.01	27	-2.00	15
10	1.2	0.01 mM	186	0.03	23	-1.52	12
11	1.2	0.01 mM	186	0.1	29	-1.00	16
12	1.2	0.01 mM	186	0.3	41	-0.52	22
13	1.2	0.01 mM	186	1	68	0.0	37
14	1.2	0.01 mM	186	3	116	0.48	62
15	1.2	0.01 mM	186	10	149	1.00	80
16	1.2	0.01 mM	186	30	191	1.48	103
17	1.3	0.1 mM	123	0.01	1	-2.00	1

図 22

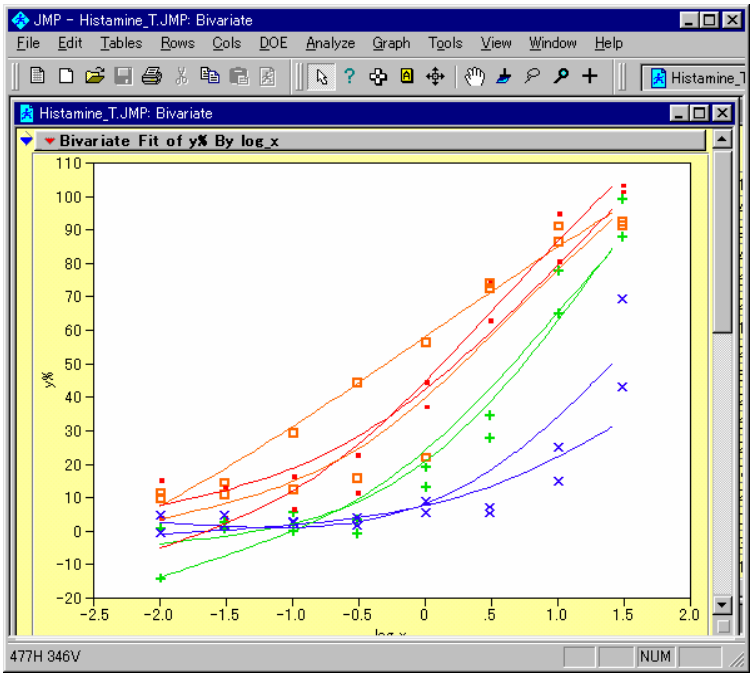
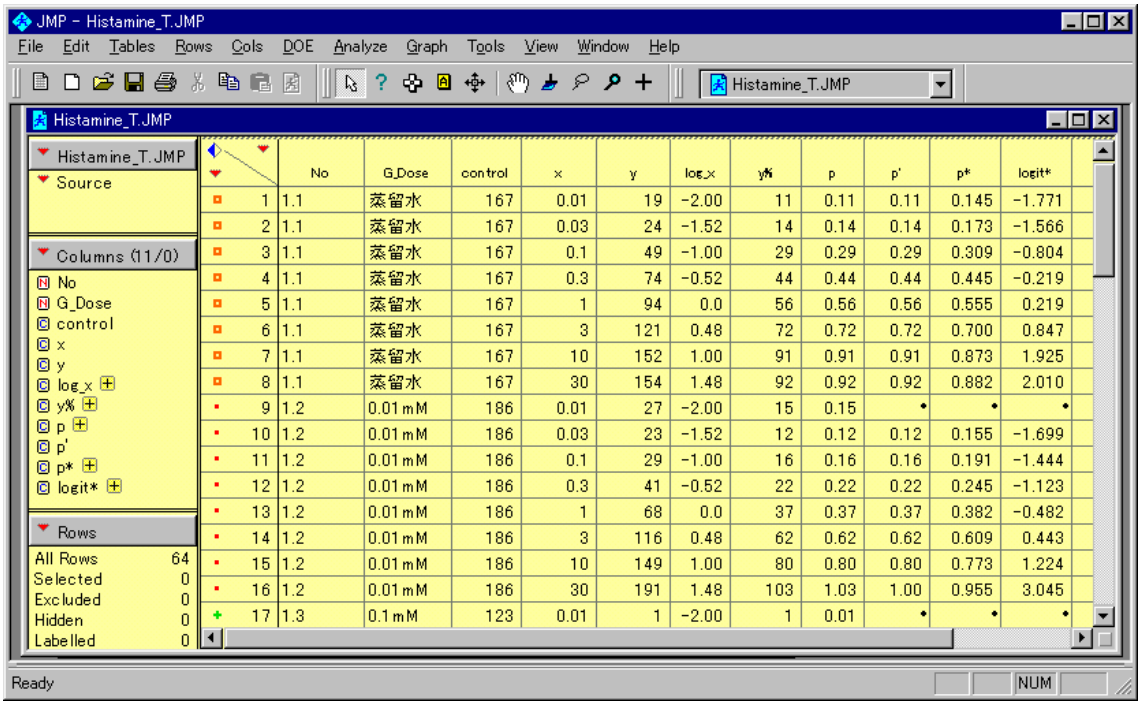


図 23



	No	G_Dose	control	x	y	log_x	y%	p	p'	p*	logit*
1	1.1	蒸留水	167	0.01	19	-2.00	11	0.11	0.11	0.145	-1.771
2	1.1	蒸留水	167	0.03	24	-1.52	14	0.14	0.14	0.173	-1.566
3	1.1	蒸留水	167	0.1	49	-1.00	29	0.29	0.29	0.309	-0.804
4	1.1	蒸留水	167	0.3	74	-0.52	44	0.44	0.44	0.445	-0.219
5	1.1	蒸留水	167	1	94	0.0	56	0.56	0.56	0.555	0.219
6	1.1	蒸留水	167	3	121	0.48	72	0.72	0.72	0.700	0.847
7	1.1	蒸留水	167	10	152	1.00	91	0.91	0.91	0.873	1.925
8	1.1	蒸留水	167	30	154	1.48	92	0.92	0.92	0.882	2.010
9	1.2	0.01 mM	186	0.01	27	-2.00	15	0.15	•	•	•
10	1.2	0.01 mM	186	0.03	23	-1.52	12	0.12	0.12	0.155	-1.699
11	1.2	0.01 mM	186	0.1	29	-1.00	16	0.16	0.16	0.191	-1.444
12	1.2	0.01 mM	186	0.3	41	-0.52	22	0.22	0.22	0.245	-1.123
13	1.2	0.01 mM	186	1	68	0.0	37	0.37	0.37	0.382	-0.482
14	1.2	0.01 mM	186	3	116	0.48	62	0.62	0.62	0.609	0.443
15	1.2	0.01 mM	186	10	149	1.00	80	0.80	0.80	0.773	1.224
16	1.2	0.01 mM	186	30	191	1.48	103	1.03	1.00	0.955	3.045
17	1.3	0.1 mM	123	0.01	1	-2.00	1	0.01	•	•	•

図 24

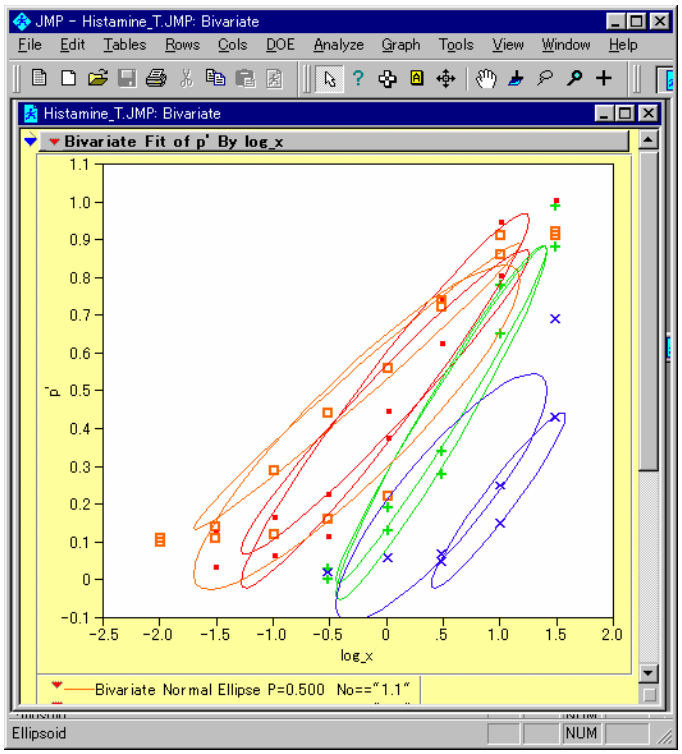

JMP - Histamine_T.JMP: Bivariate
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Histamine_T.JMP: Bivariate
Bivariate Fit of p' By log_x
p'
log_x
Bivariate Normal Ellipse P=0.500 No=="1.1"
Ellipsoid
NUM

図 25

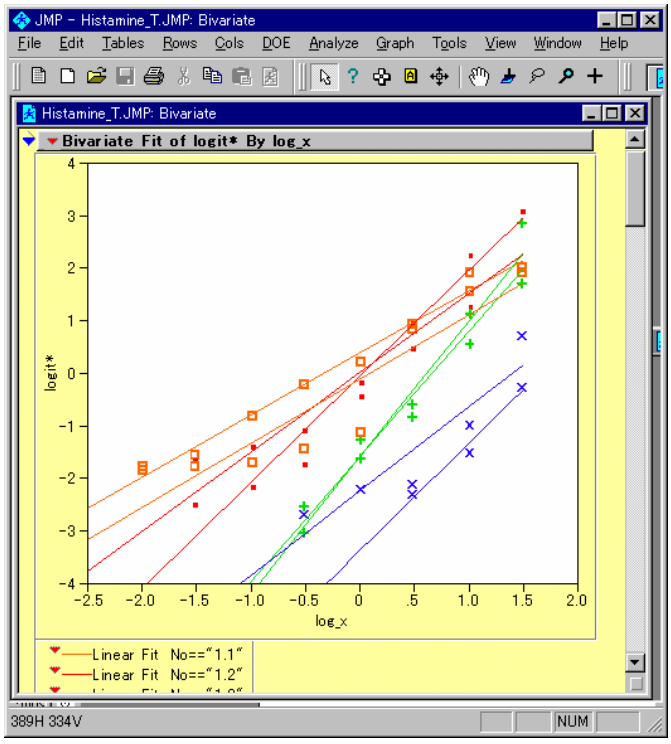

JMP - Histamine_T.JMP: Bivariate
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Histamine_T.JMP: Bivariate
Bivariate Fit of logit* By log_x
logit*
log_x
Linear Fit No=="1.1"
Linear Fit No=="1.2"
389H 334V
NUM

図 26

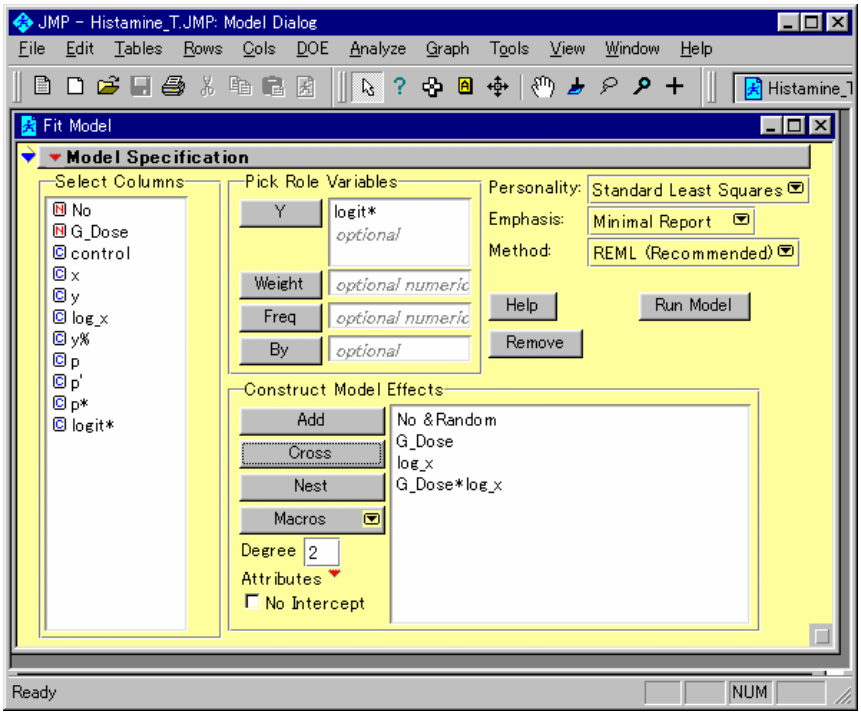

JMP - Histamine_T.JMP: Model Dialog
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Histamine_T
Fit Model
Model Specification
Select Columns
No
G_Dose
control
x
y
log_x
y%
p
p'
p*
logit*
Pick Role Variables
Y
logit*
optional
Weight
optional numeric
Freq
optional numeric
By
optional
Personality: Standard Least Squares
Emphasis: Minimal Report
Method: REML (Recommended)
Help
Run Model
Remove
Construct Model Effects
Add
Cross
Nest
Macros
Degree 2
Attributes
No Intercept
No &Random
G_Dose
log_x
G_Dose*log_x
Ready
NUM

図 27

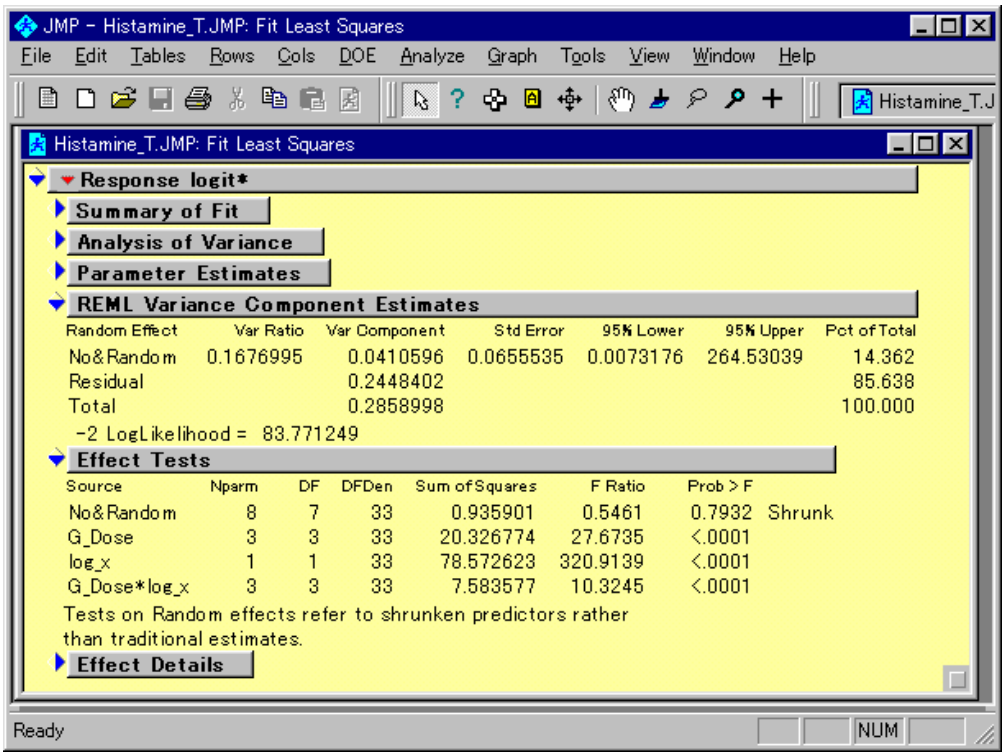
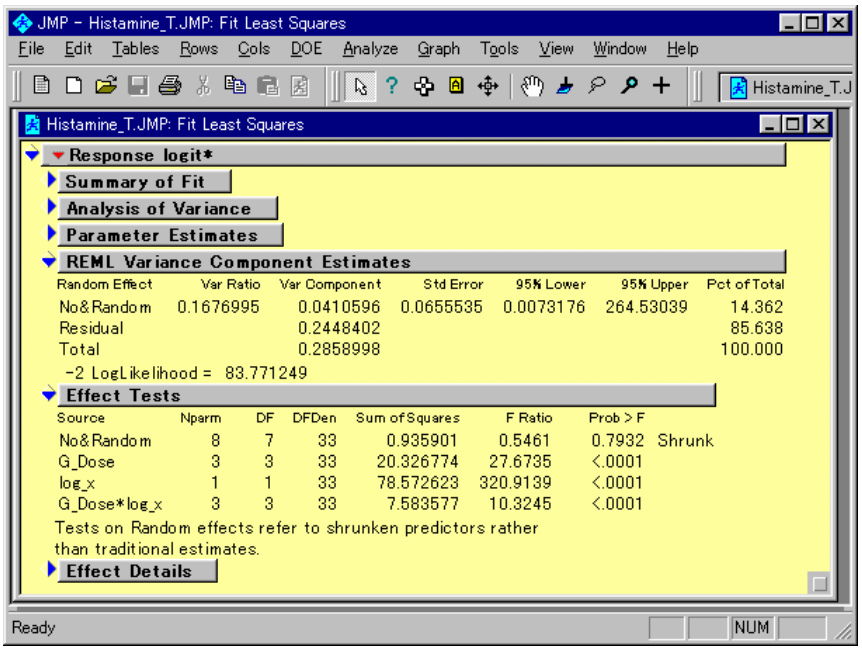

JMP - Histamine_T.JMP: Fit Least Squares
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Histamine_T.J
Histamine_T.JMP: Fit Least Squares
Response logit*
Summary of Fit
Analysis of Variance
Parameter Estimates
REML Variance Component Estimates
Random Effect Var Ratio Var Component Std Error 95% Lower 95% Upper Pct of Total
No&Random 0.1676995 0.0410596 0.0655535 0.0073176 264.53039 14.362
Residual 0.2448402 85.638
Total 0.2858998 100.000
-2 LogLikelihood = 83.771249
Effect Tests
Source Nparm DF DFDen Sum of Squares F Ratio Prob > F
No&Random 8 7 33 0.935901 0.5461 0.7932 Shrunk
G_Dose 3 3 33 20.326774 27.6735 <.0001
log_x 1 1 33 78.572623 320.9139 <.0001
G_Dose*log_x 3 3 33 7.583577 10.3245 <.0001
Tests on Random effects refer to shrunken predictors rather than traditional estimates.
Effect Details
Ready
NUM

図 28



JMP - Histamine_T.JMP: Fit Least Squares

File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help

Histamine_T.JMP: Fit Least Squares

Response logit*

Summary of Fit

Analysis of Variance

Parameter Estimates

REML Variance Component Estimates

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper	Pct of Total
No&Random	0.1676995	0.0410596	0.0655535	0.0073176	264.53039	14.362
Residual		0.2448402				85.638
Total		0.2858998				100.000

-2 LogLikelihood = 83.771249

Effect Tests

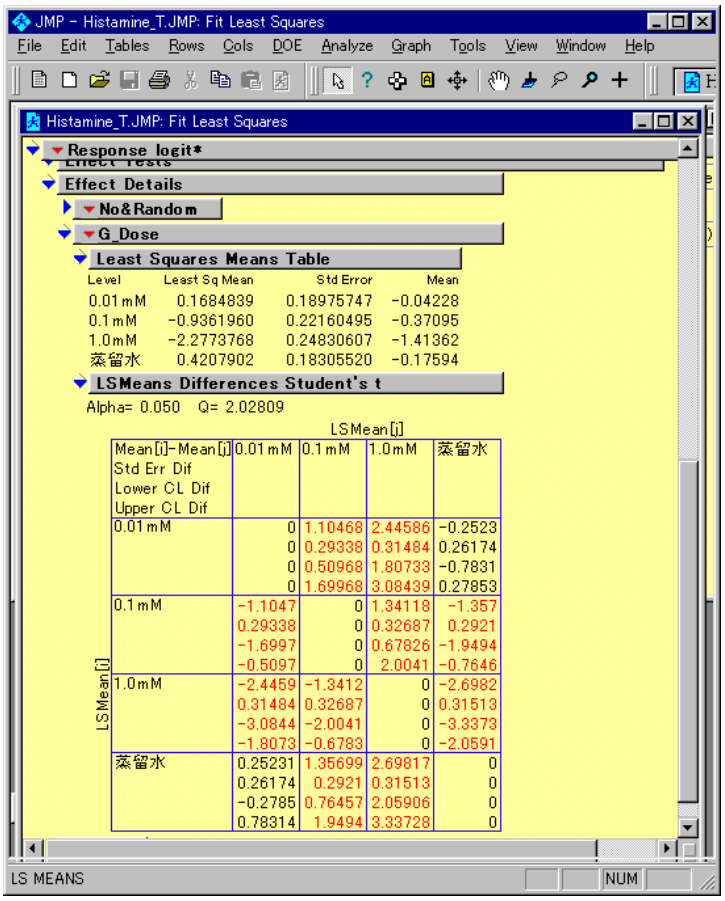
Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F	
No&Random	8	7	33	0.935901	0.5461	0.7932	Shrunk
G_Dose	3	3	33	20.326774	27.6735	<.0001	
log_x	1	1	33	78.572623	320.9139	<.0001	
G_Dose*log_x	3	3	33	7.583577	10.3245	<.0001	

Tests on Random effects refer to shrunken predictors rather than traditional estimates.

Effect Details

Ready NUM

図 29



JMP - Histamine_T.JMP: Fit Least Squares

File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help

Histamine_T.JMP: Fit Least Squares

Response logit*

Effect Details

No&Random

G_Dose

Least Squares Means Table

Level	Least Sq Mean	Std Error	Mean
0.01mM	0.1684839	0.18975747	-0.04228
0.1mM	-0.9361960	0.22160495	-0.37095
1.0mM	-2.2773768	0.24830607	-1.41362
蒸留水	0.4207902	0.18305520	-0.17594

LSMeans Differences Student's t

Alpha= 0.050 Q= 2.02809

LSMean[j]

LSMean[i]	Mean[i]-Mean[j] Std Err Dif Lower CL Dif Upper CL Dif	0.01mM	0.1mM	1.0mM	蒸留水
	0.01mM	0 0 0 0	1.10468 0.29338 0.50968 1.69968	2.44586 0.31484 1.80733 3.08439	-0.2523 0.26174 -0.7831 0.27853
	0.1mM	-1.1047 0.29338 -1.6997 -0.5097	0 0 0 0	1.34118 0.32687 0.67826 2.0041	-1.357 0.2921 -1.9494 -0.7646
	1.0mM	-2.4459 0.31484 -3.0844 -1.8073	-1.3412 0.32687 -2.0041 -0.6783	0 0 0 0	-2.6982 0.31513 -3.3373 -2.0591
	蒸留水	0.25231 0.26174 -0.2785 0.78314	1.35699 0.2921 0.76457 1.9494	2.69817 0.31513 2.05906 3.33728	0 0 0 0

LS MEANS NUM

図 30

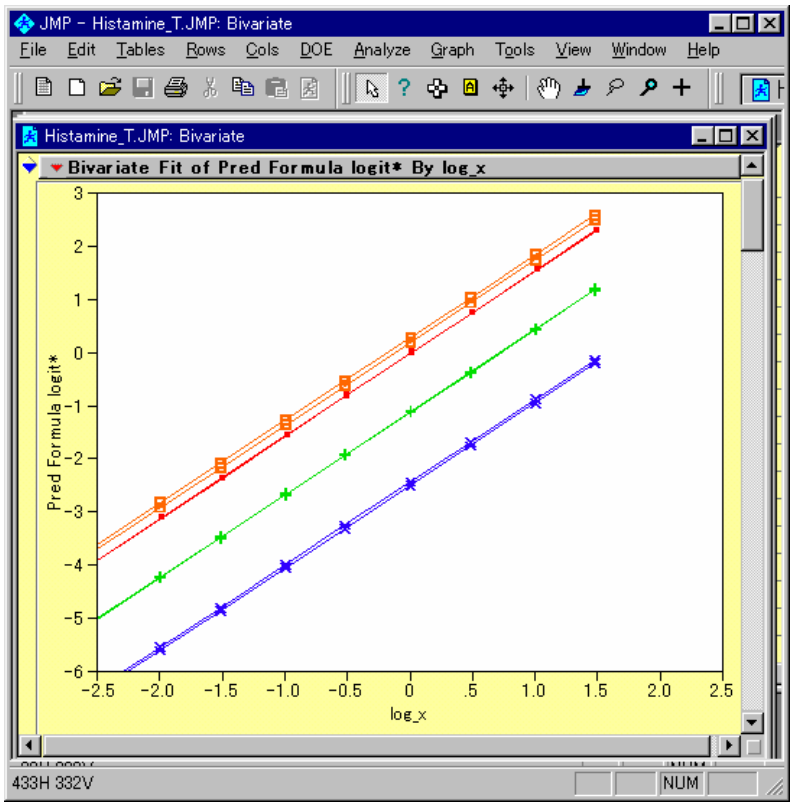
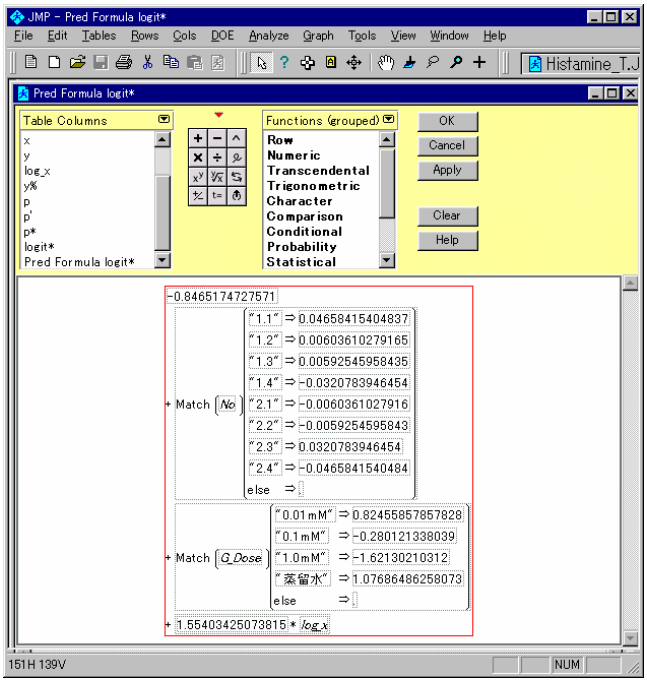

JMP - Histamine_T.JMP: Bivariate
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Histamine_T.JMP: Bivariate
Bivariate Fit of Pred Formula logit* By log_x
Pred Formula logit*
log_x
433H 332V
NUM

図 31


JMP - Pred Formula logit*
File Edit Tables Rows Cols DOE Analyze Graph Tools View Window Help
Pred Formula logit*
Table Columns
x
y
log_x
y%
p
p'
p*
logit*
Pred Formula logit*
Functions (grouped)
Row
Numeric
Transcendental
Trigonometric
Character
Comparison
Conditional
Probability
Statistical
OK
Cancel
Apply
Clear
Help
-0.8465174727571
Match (No)
"1.1" ⇒ 0.04658415404837
"1.2" ⇒ 0.00603610279165
"1.3" ⇒ 0.00592545958435
"1.4" ⇒ -0.0320783946454
"2.1" ⇒ -0.0060361027916
"2.2" ⇒ -0.0059254595843
"2.3" ⇒ 0.0320783946454
"2.4" ⇒ -0.0465841540484
else ⇒
Match (G_Dose)
"0.01mM" ⇒ 0.82455857857828
"0.1mM" ⇒ -0.280121338039
"1.0mM" ⇒ -1.62130210312
"蒸留水" ⇒ 1.07686486258073
else ⇒
+ 1.55403425073815 * log_x
151H 139V
NUM