

# 内臓の疼痛行動に対する薬効評価

高橋 行雄

2006 年 12 月 11 日

## 概要

× × × × × × ×

## 1 はじめに

何らかの薬効を示したいと様々な実験が行われたときに，そのデータの解析に有意差検定がしばしば使われている．有意差検定は，様々な学問領域で広く用いられているのであるが，データがあれば，とりあえず有意差検定というぐらいに気楽に使われ，その結果として，実験目的にあった統計解析が行なわれなくなってしまう．実験研究者が紐解くほとんどの統計の教科書は有意差検定が主要なテーマとなっていると思われる．

薬効の現れ方は，低い用量では対照群と同じような反応であるが，用量を増加すると徐々に反応があらわれ，さらに用量を増やしても反応の伸びが小さくなるのが通例である．このような用量反応関係がある場合の薬効の表し方は，最大反応に対して 50% の反応  $y$  が得られる用量  $x$  がどのくらいなのか，その 95% 信頼区間を示して，実験に用いた薬剤の薬効を示すことが実験研究者の本質的な願望であろう．薬物の急性毒性を示す用量として，50% の動物が死亡する用量  $x$  が，薬物の危険度を示す要約統計量として広く用いられてるのであるが，薬効の分野では，とりあえず有意差検定に圧倒され，見る影もない．

これは，50% の反応  $y$  が得られる用量  $x$  を推定する統計的方法は，計算方法が煩雑であり実験研究者が手軽に使える統計ソフトに組み込まれていないことも原因のひとつである．とりあえず有意差検定をしておけばいいのではないかと統計アドバイザーの態度も，ますます有意差検定の誤用・乱用を増長している．

統計ソフトは，多くの統計学の成果を取り入れ 10 年前に比べ質的な変化を遂げている．10 年前には，とりあえず有意差検定，ノンパラメトリックかパラメトリックどちらを適用したらよいのか，多どのような重比較が適切なのか，などの議論が盛んに行われがちであった．その結果として，本質的に有意差検定を適用すべき実験データではないのに数多くの有意差検定の見本市のような統計解析が蔓延してしまい，実験の本質的な解析が忘れ去られてしまっている．

最近，前臨床実験の分野でも統計アドバイザーが育ってきつつある．しかしながら，彼ら・彼女らは，とりあえず有意差検定の世界で統計を学習してきた経緯もあり，実験の本質に切り込む統計

モデルについての研鑽に欠けがちである．そのために、彼ら・彼女らの現実の実験データを俎上に上げて、どのような統計解析が適切なのかについて議論をしたうえで、その結果を公表するような活動を継続的に行っている．ここに示す事例もその一貫である．

## 2 内臓痛試験，碓山さんの事例

- ・動物: Male SD rats (術時:240-270g)5 群 (Sham,TNBS,3dose), 各群 n=8 で計 n=40
- ・モデルの作成: ケタミン / キシラジン (ketamine/xylazine) 麻酔下でラット結腸起始部内にトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS,50mg/kg,with 30% EtOH) を投与し作成した．
- ・薬剤: Alosetron (5-HT<sub>3</sub> アンタゴニスト) 0.003, 0.03, 0.3 mg/kg を経口投与
- ・内臓痛閾値の測定: 閾値の測定には CRD(colorectal balloon-distension) 法を用い、結直腸内に挿入したバルーン内に 5mmHg の間隔で段階的に圧を負荷し、ラットが疼痛行動 (abdominal cramp: -position) を示した時点での圧力 (mmHg) を内臓痛閾値とする．測定は薬剤投与の直前、30 分後および 2 時間後に実施した．

### 2.1 実験結果のあらまし

表 1?? に実験結果を示す．データは、5mmHg 単位で測定されている．アンタゴニストとしての Alosetron 投与後には、バルーンの圧を高めることにより、0.5 時間後に疼痛行動が観察され、2 時間後には疼痛が弱まるが、高用量群では疼痛が残っている．Sham 群は、投与前値からバルーンの圧を高めないと疼痛が発生せず、0.5 時間後、および 2 時間後でも投与前と同様の経過を示している．図 1 に群ごと時間経過ごとの疼痛の分布と平均値の推移を示す．どの群のどの時点でも、疼痛の分布に大きな歪みはない．30 $\mu$ g/kg 群と 2 時間目 300 $\mu$ g/kg 群の 2 時間目は、疼痛が残っている症例と、軽減している症例が混在しており、投与前に比べて 2 倍程度の広がりをもっている．

S-Plus で経時変化を出す．V4.5 ではだめであった．

### 2.2 経時データとしての特質

この実験の経時データとしての性質は、単回投与後の短時間の作用で、反応は可逆的である．表 ?? に示すように、投与前の SD は、5mmHg 前後であり、0.5 時間目、2 時間目は、最大で 7.76 の SD があり、およそその変動係数 CV は、高々 20% と安定している．

経時データのままで解析をおこなうときには、時点間の誤差の相関構造の性質を特定する必要がある．群により、時間に関する反応が明らかに異なるので、投与群と時間、および交互作用を考慮した 2 元配置分散分析を行い、その推定値からの残差を求め、時点間の相関関係を検討し

表 1 内臓痛データリスト

Dose	time	1	2	3	4	5	6	7	8
Sham	0	50	45	40	55	55	45	45	40
	0.5	55	40	45	50	60	45	45	50
	3	50	45	45	60	50	50	45	45
TNBS	0	30	25	25	20	20	30	30	25
	0.5	30	20	25	20	25	30	25	20
	3	30	25	20	25	20	30	30	25
3 $\mu$ g/kg	0	25	25	25	30	30	25	30	25
	0.5	30	20	20	35	30	25	30	25
	2	25	25	20	30	25	30	25	20
30 $\mu$ g/kg	0	30	25	25	20	30	20	20	30
	0.5	40	45	30	40	35	25	40	45
	2	35	35	30	35	30	20	30	45
300 $\mu$ g/kg	0	30	30	20	30	30	25	30	20
	0.5	35	45	35	40	50	45	50	40
	2	30	30	20	35	40	35	45	40

表 2 時間ごとの各群の平均と SD

Group	time=0		time=0.5h		time=2j	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
1:TNBS	25.63	4.17	24.38	4.17	25.63	4.17
2: 3 $\mu$ g/kg	26.88	2.59	26.88	5.30	25.00	3.78
3: 30 $\mu$ g/kg	25.00	4.63	37.50	7.07	32.50	7.07
4: 300 $\mu$ g/kg	26.88	4.58	42.50	5.98	34.38	7.76
5:Sham	46.88	5.94	48.75	6.41	48.75	5.18

てみよう．その結果，40 症例について投与前と 0.5 時間目は  $r_{11} = 0.519$ ，投与前と 2 時間目は  $r_{12} = 0.545$ ，0.5 時間目と 2 時間目は  $r_{23} = 0.6309$  となり，時点間の相関構造は均一とみなしてよさそうである．

そこで，分割実験型の分散分析，1 次単位 [ 投与群，1 次誤差：症例 ( 投与群 ) ]，2 次単位に { 時点，時点  $\times$  投与群，2 次誤差：残り } を行くと，時点  $\times$  投与群の検定等計量は， $F_{70}^8(, 8, 70) = 9.5589$  となり， $p < 0.0001$  と明らかな経時変化のパターンの違いがあることがわかる．経時データのままでの解析で，実験研究者の要求を満たすことは困難あろう．

## 2.3 主要な評価変数と副次的な変数

この実験は，単回投与後のアンタゴニストである Alosetron が引き起こす内臓に対する刺激に対する疼痛の経時変化データである．2 時間目には疼痛が軽減されるであろう時間に設定されている

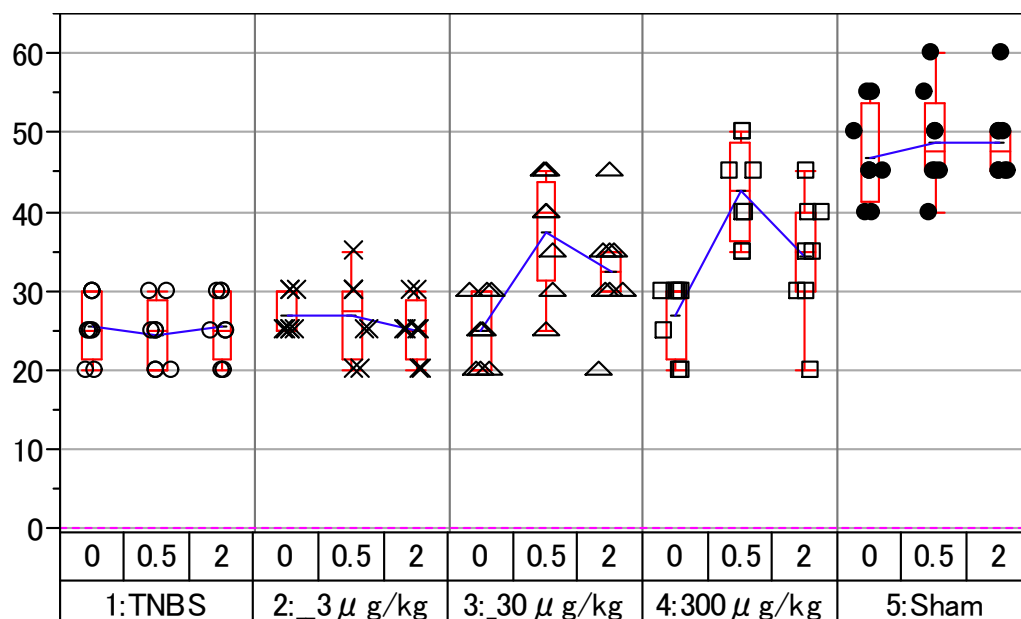
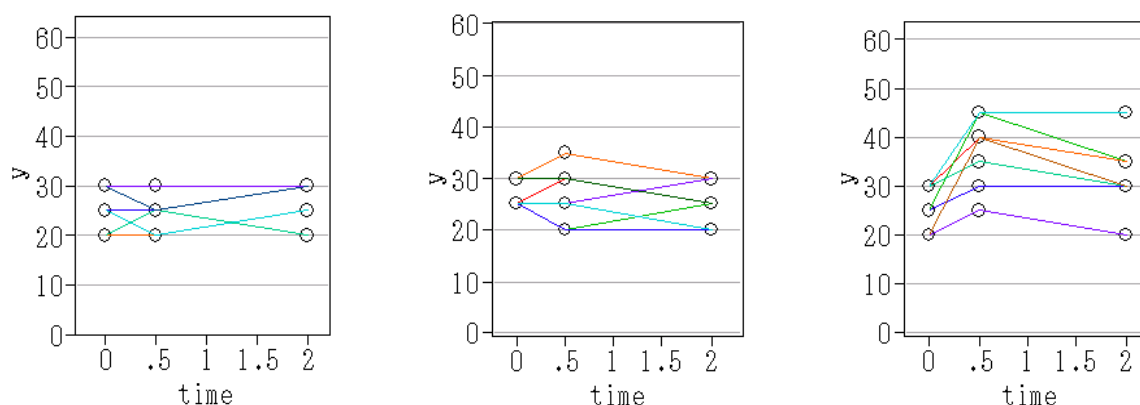


図 1 群ごとと時間経過ごとの疼痛の分布と平均値の推移



ようであり、0.5 時間目に疼痛が最大になることを期待されているような可逆的な反応である。このような場合に主要な評価変数は、最大反応が主要な評価変数となる。

投与前値の取り扱いは、その理由をきちっと示した上で決めなければならない。投与前値からの各時点の変化量とするのか、あるいは変化率とするのか、共変量みなすのか、生データのままで行うのかの判断である。このデータで、変化量・率は、陽性対照群の投与前値が明らかに高く、時間経過に対して変化していないことから適用は不可能である。また、投与前値を共変量としたくなるような時点間の相関構造であるが、投与前値の陽性対照が明らかに高いことは、共分散分析の前提条件を満たしていない。したがって、生データのままで解析を行うことになる。

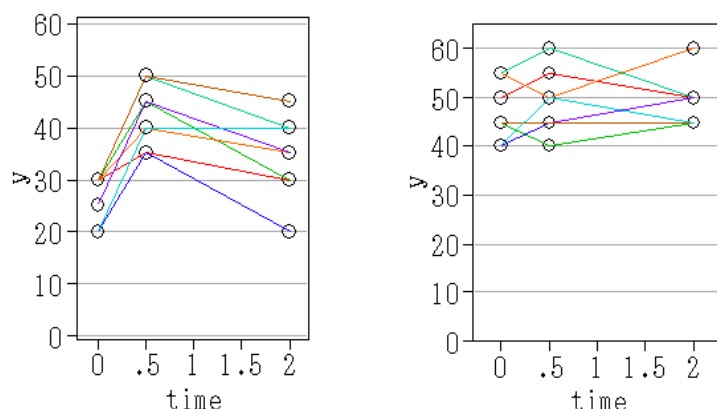


図2 対照群，Alosetron 投与群，Sham 群の痛みの経時変化

## 2.4 群間の有意差検定

0.5 時間目での群間の有意差検定を行うことは否定はしないが，対照群と中用量，あるいは，高用量群で統計的な有意差が出たからといって，これは，アンタゴニストの用量設置が適切であったことを確認しているに過ぎない．低用量で疼痛が出すぎた場合には，アンタゴニストの用量をもっと下げるべきと反省すべきである．症例数が少なかったために，高用量と中用量 2 群と合わせて対照群との間で有意差が出なかったとしても，薬効評価を行いうる実験ではある．

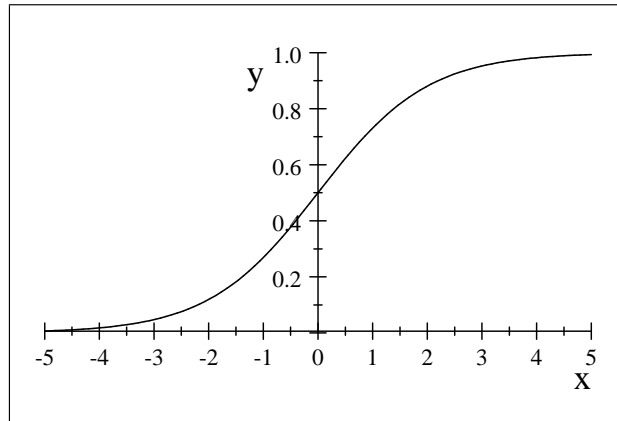
したがって，群間の有意差検定で，何らかの有意差が出ることは，何らかの薬効があることの証明とはなるが，用量反応関係を直接的に論ずることにはならない．

## 2.5 用量反応関係

多くの用量反応関係は，シグモイド曲線状になることが経験的に知られている．シグモイド曲線として，数学的・統計的な取り扱いが簡単なロジスティック曲線が幅広く使われている．

ロジスティック曲線は，式(1)で示したような，簡単な指数関数で，下限が 0，上限が 1 となり，Y 軸上の 0.5 で点対称となっている．実際の実験データにあてはめるために，X 軸に対して左右に位置を変化させたり，用量反応関係が現れる範囲に関連して形状を変えるために  $e^x$  の  $x$  代わりに，1 次式  $\eta = \beta_0 + \beta_1 x$  が使われる．

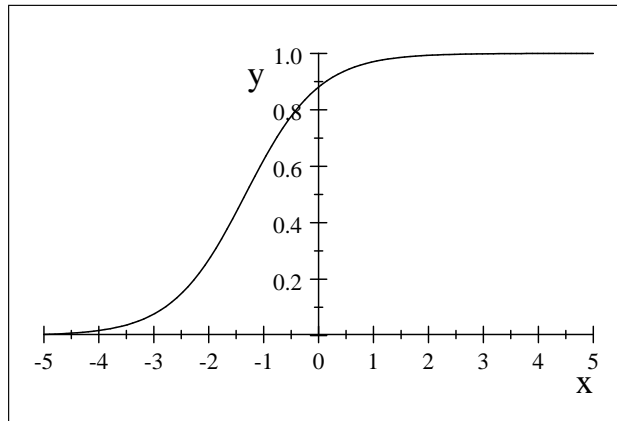
$$y = \frac{e^x}{1 + e^x} \quad (1)$$



ロジスティック曲線

1 次式  $\eta = 2 + 1.5x$  のロジスティック曲線を描いてみよう．曲線は負の方向にシフトし，曲線の立ち上がりが早くなっている．ここで，X 軸に負の目盛りがあるのは用量反応関係を論ずる場合には対数用量を前提にしているからである．

$$y = \frac{e^{2+1.5x}}{1 + e^{2+1.5x}}$$



位置と形状が異なるロジスティック曲線

ロジスティック曲線は，0 と 1 の範囲だけでなく，自由に下限と上限を設定して，その間で，シグモイド曲線を描く様に拡張できる．下限を  $\beta_3$ ，上限を  $\beta_4$  としたときに，式 (2) と

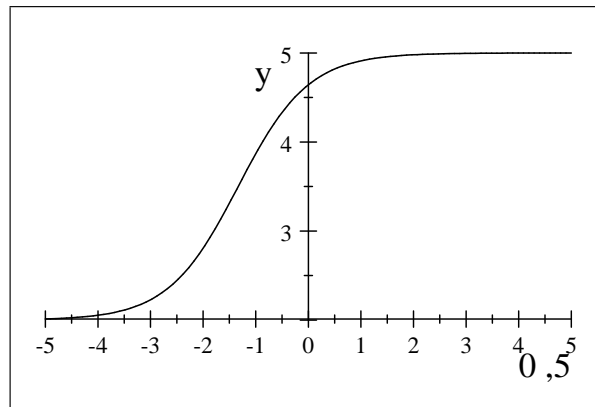
$$y = \frac{e^\eta}{1 + e^\eta} = \frac{1}{1 + e^{-\eta}} \quad (2)$$

と指数項少なくできるので，この式を一般化して，式 (3) が定義できる．

$$y = \beta_3 + \frac{\beta_4 - \beta_3}{1 + e^{-\eta}} \quad (3)$$

下限を  $\beta_3 = 2$ ，上限を  $\beta_4 = 5$  となる， $\eta = 2 + 1.5x$  のロジスティックは，

$$2 + \frac{5-2}{1+e^{-(2+1.5x)}}$$



下限が 2，上限が 5 のロジスティック曲線

となるのが確かめられるであろう．実際にデータに対して，ロジスティック曲線のあてはめは非線形最小 2 乗法の統計ソフトを用いて行うことができる．

と指数項少なくできるので，この式を一般化して，  
ではない．3 用量を用いて薬理作用を優位な差アンタゴニストの用量設定は，

いことから，  
この実験データは，対照群と  
経時データの解析を考える上で，投与前値の扱いは明確にする必要がある．

この実験で，対照群と 3 用量群間で平均値はほぼ同じであるが，陽性対照 Sham 群は明らかに高値である．投与前値を実験の  
主要な有意差検定を

### 3 シグモイド曲線のあてはめ

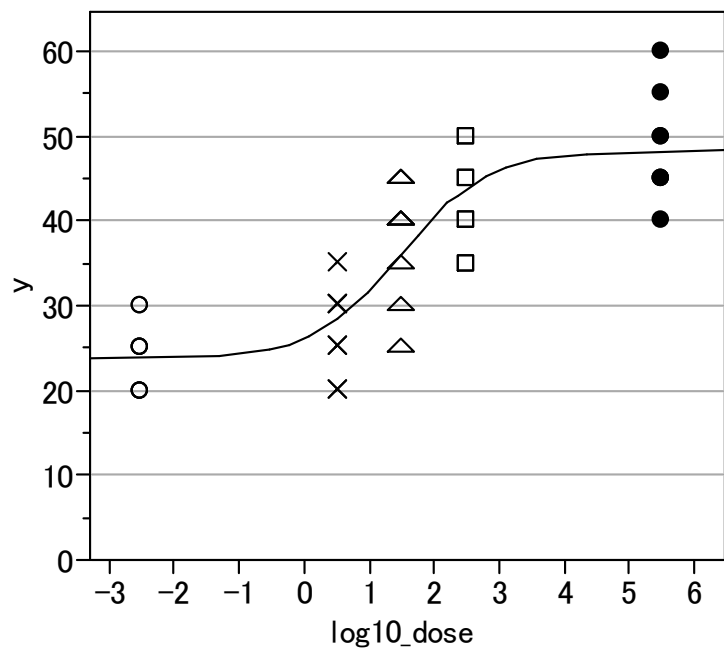
用量を何段階かに固定し生体の反応を観察し，最大反応に対してその半分の反応を起こすような用量がどのくらいかを推定したい．どのくらいの反応が起きるか，実験者，実験場所，実験条件によって異なるような場合に，シグモイド曲線状の用量反応関係が得られたならば，その実験での最大反応の半分反応が起きるような用量， $D_{50}$  がどのくらいかを推定することにより，実験に用いた薬物の薬効を計量できる．その化合物が，既存の薬物に対して，少ない用量で同等の薬効を示すのか，逆に多く必要とするのかなどの検討が容易にできる．疼痛を軽減する薬理作用がどのくらいの用量から起きるのかを推定するために， $D_{10}$  も合わせて推定したいとしよう．

実験は 5 水準の 1 元配置型実験である．群構成は，溶媒のみの対照群，アンタゴニストである Alosetron の 3 用量，陽性対照としての Sham 群であり，それぞれの群は 8 症例である．

その用量反応関係は，を

を計量効力を

が起こる用量を推定が計量値の場合のシグモイド曲線をあてはめて， $D_{50}$  などの，には，非線形回帰のソフトを用いる



解

	SSE	DFE	MSE	RMSE	
	1256.8501954	36	34.912505	5.9086805	
パラメータ	推定値	近似標準誤差	下側信頼限界	上側信頼限界	
y_min	23.777250616	2.27336568	19.4311897	.	
y_max	48.282339592	2.00982895	43.8655916	53.255683	
D50	1.4844349437	0.27457493	0.95545748	2.10417839	
gamma	1.5058431094	0.52313052	0.68504178	.	
次の値で解く: 解析 NR					