

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-HT₃ 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 μ g/kg 群と 2 時間目 300 μ 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．

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，おおよその変動係数 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

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 μ 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 μ 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 μ 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

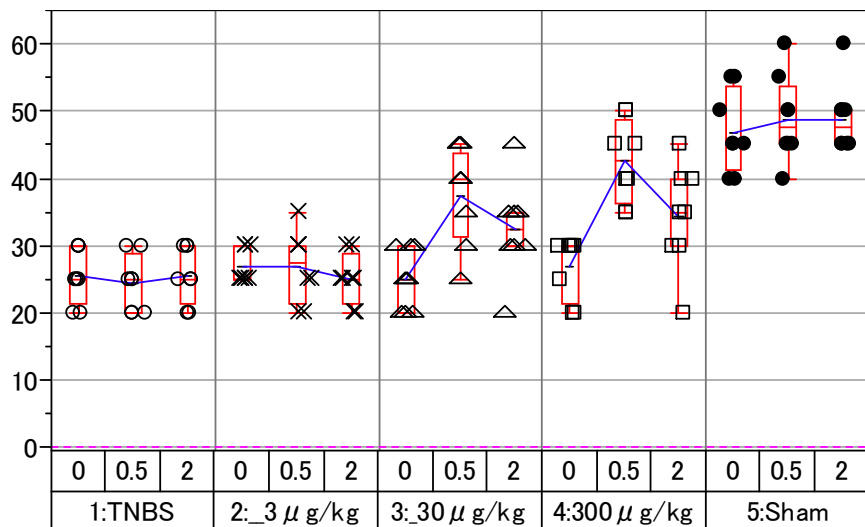


図 1 群ごと時間経過ごとの疼痛の分布と平均値の推移

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。

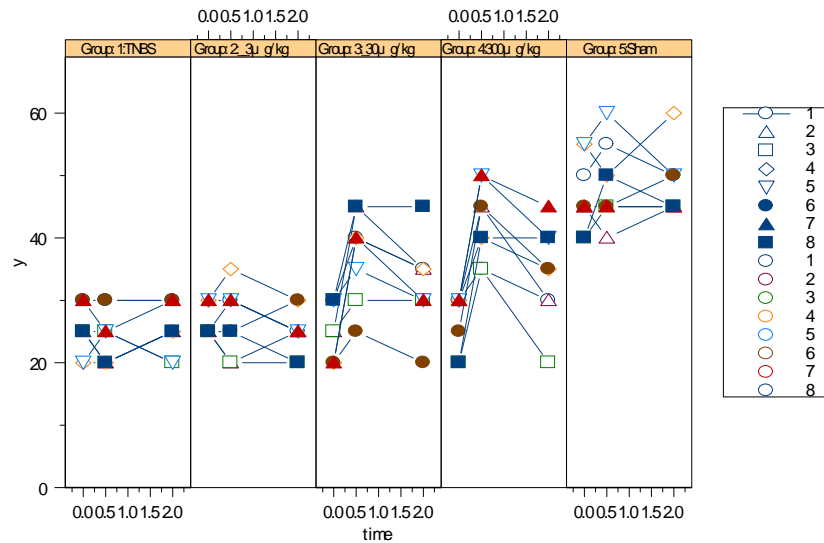


図 2 群ごとの経時変化

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
2:3μg/kg	26.88	2.59	26.88	5.30	25.00	3.78
3:30μg/kg	25.00	4.63	37.50	7.07	32.50	7.07
4:300μg/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

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、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。

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。

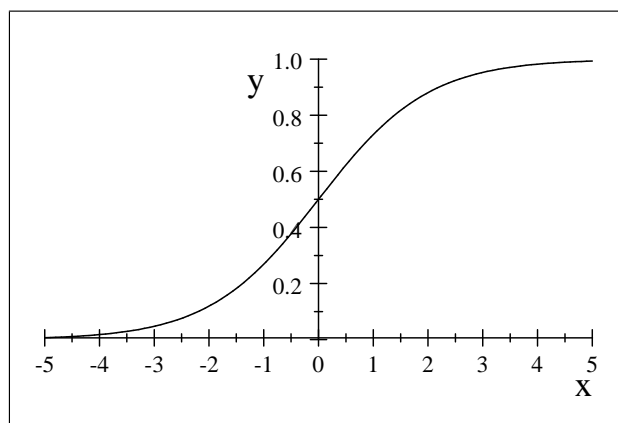
したがって、群間の有意差検定で、何らかの有意差が出ることは、何らかの薬効があることの証明とはなるが、用量反応関係を直接的に論ずることにはならない。

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。

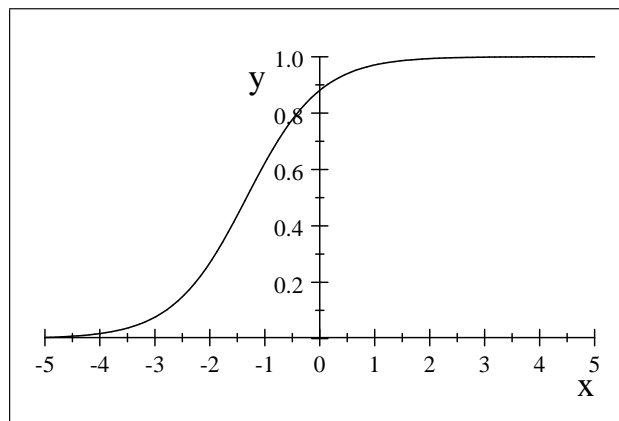
$$y = \frac{e^x}{1 + e^x} \quad (1)$$



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

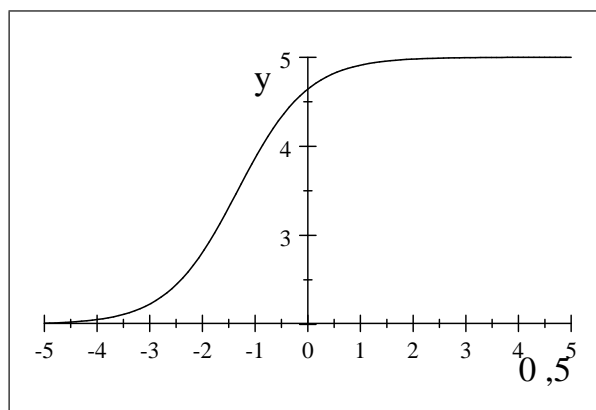
ロジスティック曲線は、0 と 1 の範囲だけでなく、自由に下限と上限を設定して、その間で、シグモイド曲線を描く様に拡張できる。下限を β_3 、上限を β_4 としたときに、式 (2) と

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

と分母の指数項を消去できるので、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、図 2.5 のようになるのと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。



下限が 2、上限が 5 のロジスティック曲線

2.6 最大反応の 1/2 となる用量 D_{50} の推定

式 (2) で反応が定義されているロジスティック曲線の式のままでは、反応が y_0 となるような用量 x_0 を推定することができない。そのためには、式 (2) の $\eta = \beta_0 + \beta_1 x$ で定義されている回帰

式を次のように変形する．反応が y_0 となるような η_0 ，そのときの用量を x_0 としたときに，回帰直線が，座標 (η_0, x_0) を通る傾きが β_1 であるような直線を考えよう．

$$\eta - \eta_0 = \beta_1(x - x_0) \quad (4)$$

式 (2) の最大反応は 1 であり，最大反応の $1/2$ となる η_0 は 0 である．これを式 (4) に代入すれば，

$$\eta = \beta_1(x - x_0) \quad (5)$$

が得られる．式 (5) の x_0 は，反応 $y_0 = 0.5$ と定められたときに推定したい回帰係であるので， $x_0 = \beta_2$ と置きなおして，式 (6) が得られる．

$$y = \frac{1}{1 + e^{-\beta_1(x - \beta_2)}} \quad (6)$$

この関係は，式 (2) だけでなく，証明は@@@に別途示すが，式 (3) の場合でも成り立つ．

$$y = \beta_3 + \frac{\beta_4 - \beta_3}{1 + e^{-\beta_1(x - \beta_2)}} \quad (7)$$

式 (6) は，様々な分野での形を変えて使われている．シグモイド曲線の最大反応の $1/2$ の位置を示す β_2 は， $D50$ と置き換えられ，シグモイド曲線の形状を示す β_1 は， γ と置き換えられ，

$$y = \frac{1}{1 + e^{\gamma(D50 - x)}} \quad (8)$$

がしばしば使われる．統計の線形モデルの記述では，推定したい回帰係数に伝統的に β_i を使うために，ここでは， β_i を用いて式の記述を行った．統計でも非線形モデルの記述では， β_i ではなく伝統的に θ_i を用いている．何をを使うかは，本質的なことではないので理解しやすい式を使うことを薦める．

3 統計ソフトを用いた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， $D50$ 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， $D10$ 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．式 (7) で，反応の下限 β_3 ，反応の上限 β_4 は，実際に投与された用量から推定する回帰係数であれ，陰性対照と陽性対照として実験された群ではない．用量 x は対数変換されていることが前提であるので，陰性対照の用量は 0mg とすると $\log(0) = \infty$ であり，陽性対照の用量は設定できない．

そこで、推定したい回帰式を別々に設定し、統計ソフトで、最小 2 乗法による回帰係数の同時推定を用いることにする。陰性対照群軍を $i = 1$, Alosetron 投与 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ 群, $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 群, $300\mu\text{g}/\text{kg}$ 群をそれぞれ $i = 2, 3, 4$ とし、陽性対象群を $i = 5$ としたときに、

$$\begin{aligned} y_{ij} &= \beta_3 + e_{ij}, & i = 1, & j = 1, 2, \dots, 8, \\ y_{ij} &= \beta_3 + \frac{\beta_4 - \beta_3}{1 + e^{-\beta_1(x - \beta_2)}} + e_{ij}, & i = 2, 3, 4, & j = 1, 2, \dots, 8, \\ y_{ij} &= \beta_4 + e_{ij}, & i = 5, & j = 1, 2, \dots, 8, \end{aligned} \quad (@9)$$

ただし、 $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$,

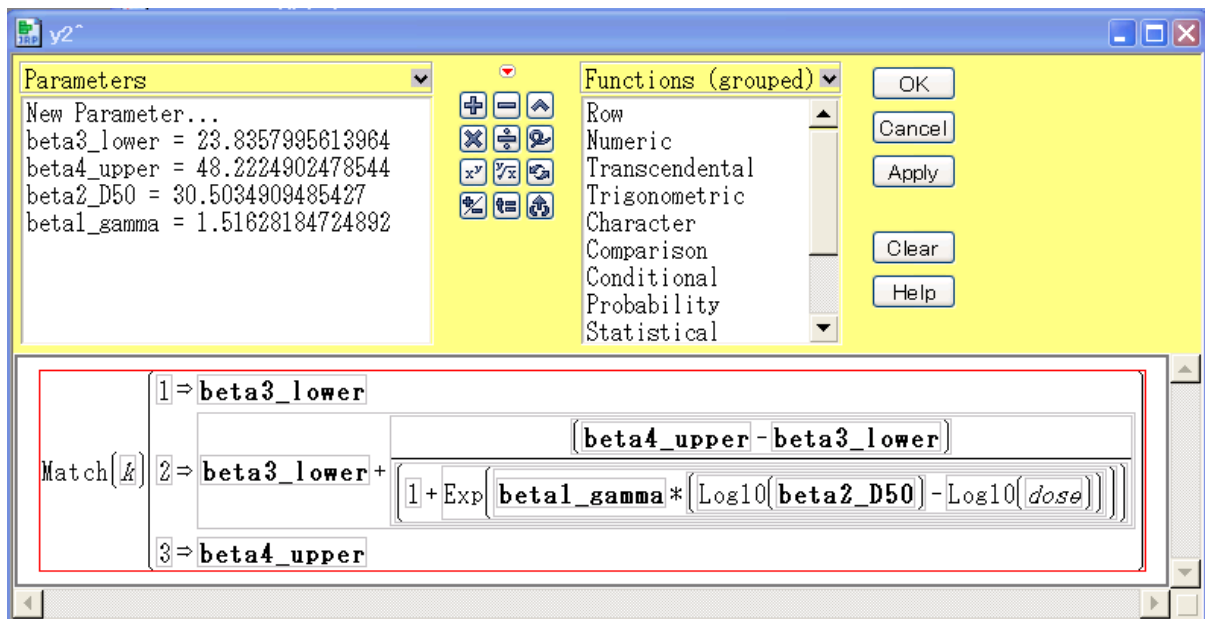
の 3 式の同時に成り立つように、 $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ を推定すればよい。

3.1 JMP を用いた推定

次のような JMP データセット organ_pain_05h.JMP を用意する。反応 y の予測値 $y1^\wedge$ が、陰性対象を $3\mu\text{g}/\text{kg}$ より常用対数で -3 小さくし、陽性対照を $300\mu\text{g}/\text{kg}$ より常用対数で $+3$ 大きくした場合の推定結果である。予測値 $y2^\wedge$ は、式 (@9) で推定した結果である。

organ_pain_05h_T									
40/0	Group	k	dose	log10_dose	No	time	y	y1 [^]	y2 [^]
○	1:TNBS	1	0.003	-2.52	1	0.5	30	20.70	23.84
○	2:TNBS	1	0.003	-2.52	2	0.5	20	20.70	23.84
○	3:TNBS	1	0.003	-2.52	3	0.5	25	20.70	23.84
○	4:TNBS	1	0.003	-2.52	4	0.5	20	20.70	23.84
○	5:TNBS	1	0.003	-2.52	5	0.5	25	20.70	23.84
○	6:TNBS	1	0.003	-2.52	6	0.5	30	20.70	23.84
○	7:TNBS	1	0.003	-2.52	7	0.5	25	20.70	23.84
○	8:TNBS	1	0.003	-2.52	8	0.5	20	20.70	23.84
×	2: 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	3	0.48	1	0.5	30	30.58	28.19
×	10: 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	3	0.48	2	0.5	20	30.58	28.19
■	4: 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2	300	2.48	8	0.5	40	49.06	43.79
●	5:Sham	3	30000	5.48	1	0.5	55	59.26	48.22
●	34:Sham	3	30000	5.48	2	0.5	40	59.26	48.22
●	35:Sham	3	30000	5.48	3	0.5	45	59.26	48.22
●	36:Sham	3	30000	5.48	4	0.5	50	59.26	48.22
●	37:Sham	3	30000	5.48	5	0.5	60	59.26	48.22
●	38:Sham	3	30000	5.48	6	0.5	45	59.26	48.22
●	39:Sham	3	30000	5.48	7	0.5	45	59.26	48.22
●	40:Sham	3	30000	5.48	8	0.5	50	59.26	48.22

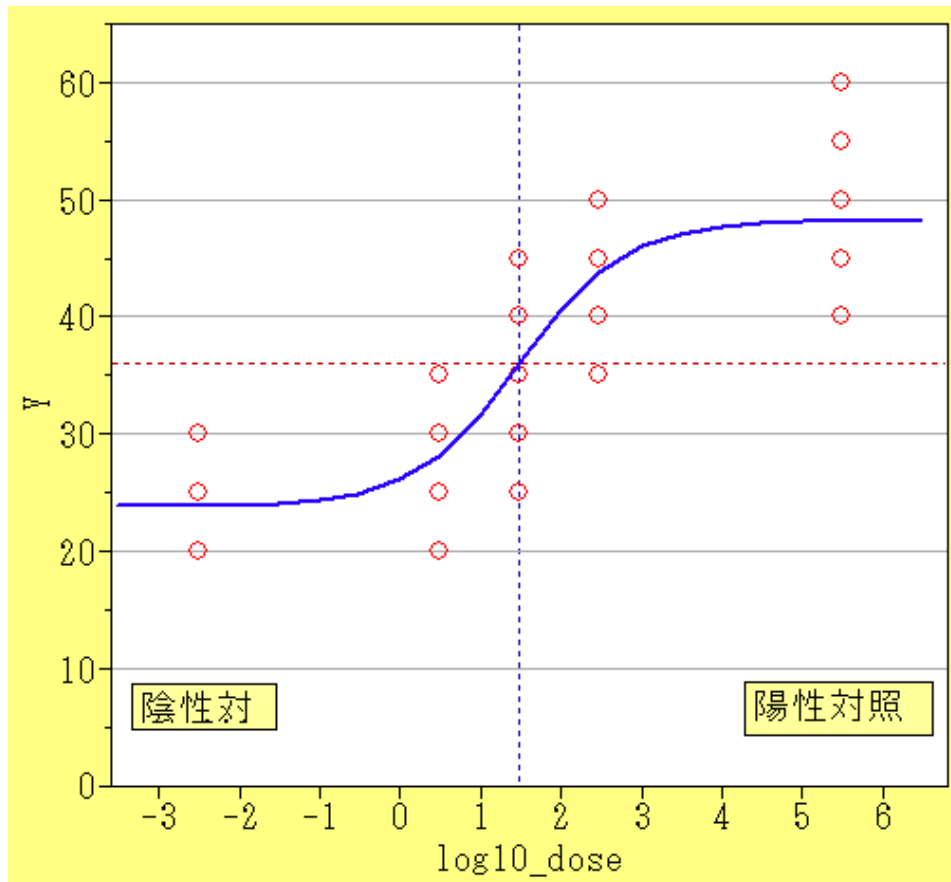
予測値 $y2^\wedge$ は、計算式で次のように定義され、推定されたパラメータ（回帰係数）は、適当な初期値をあたえ、JMP の非線形回帰モデルのニュートン・ラフソン法によって推定された最小 2 乗解である。



D50 の信頼区間は ,

Solution					
	SSE	DFE	MSE	RMSE	
	1256.8501954	36	34.912505	5.9086805	
Parameter	Estimate	ApproxStdErr	Lower CL	Upper CL	
beta3_lower	23.8358	2.1877	19.7945	.	
beta4_upper	48.2225	1.9563	43.8652	52.6070	
beta2_D50	30.5035	19.0631	9.1333	118.1815	
beta1_gamma	1.5163	0.5072	0.7890	.	
Solved By: Analytic NR					

これらの結果から , $\widehat{D50} = 30.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 95% 信頼区間は (19.1, 118.2) となる . これは , 反応の下限と上限の平均値 , $(23.8358 + 48.2225)/2 = 36.03$ となるような用量の推定値となっている . 常用対数では , $\log_{10}(36.0292) = 1.48$ となる .



3.2 2 値反応での用量反応曲線

反応が 2 値の場合のシグモイド曲線のあてはめを考えよう．ある用量で n_i 症例に対して r_i 症例に反応が出るような場合を考えよう．反応を $p_i = r_i/n_i$ としたときに p_i は 0 から 1 の間でシグモイド曲線となる．計量値の場合にあてはめの誤差に正規分布を仮定したのであるが，2 値反応の場合は， p_i に正規分布を仮定することは非現実的であるので， n_i 個中 r_i 個が出現率の推定値 \hat{p}_i にかんして，2 項分布 $r_i \sim B(\hat{p}_i, n_i)$ に従うことを仮定して，最尤法によって推定する．

統計ソフトによっては非線形モデルで最小 2 乗法だけでなく最尤法をサポートするものもある．JMP の場合についての事例を示す．吉村本の事例を用いる．

JMP データセット D10 の推定，logit_yoshimira_LDp
 \hat{p}_i についてのロジスティック回帰式の設定

