

# 抽出回腸の収縮実験

D50 についての用量反応関係

第3回・高橋セミナー

2000年4月1日

総評会館

日本ロシュ

高橋 行雄

# 目次

---

<b>第 1 章</b>	<b>摘出回腸の収縮</b>	<b>1</b>
第 1 節	今回のテーマ .....	1
第 2 節	マグヌス装置による実験.....	2
第 3 節	実験データの解析モデル.....	3
第 4 節	統計ソフト .....	3
<b>第 2 章</b>	<b>データのグラフ化</b>	<b>5</b>
第 1 節	JMP へのデータの取り込み.....	5
第 2 節	データの転置 .....	6
第 3 節	データのグラフ化 .....	8
第 4 節	最大収縮量の検討 .....	9
第 5 節	反応量の基準化後の用量反応.....	10
<b>第 3 章</b>	<b>分散分析モデル</b>	<b>11</b>
第 1 節	分割型実験モデル .....	11
第 2 節	ヒスタミンの用量別ダネットの検定.....	12
<b>第 4 章</b>	<b>E<sub>max</sub>モデル</b>	<b>13</b>
第 1 節	非線形モデルの練習 1.....	13
第 2 節	非線形モデルの練習 2.....	16
第 3 節	最大収縮に対する比率 .....	21
第 4 節	E <sub>max</sub> モデル式の変形.....	22
第 5 節	実験結果の表示.....	23
第 6 節	EC <sub>50</sub> の一括計算 .....	27

# 図表目次

表 1	ヒスタミン収縮	2
表 2	EC50	23
表 3	シグモイドE <sub>max</sub> 法によるEC50	29
図 1	JMPへの取り込み	5
図 2	1行1データへ形式への変換	6
図 3	行方向に並べ替えたデータ	7
図 4	解析用JMPデータ	7
図 5	処置薬Gのヒスタミンに対する収縮反応	8
図 6	Y <sub>max</sub> の均一性の確認	9
図 7	Y <sub>max</sub> と累積投与最終時点のyとの相関	9
図 8	反応率pでの用量反応	10
図 9	分割実験モデルの解析	11
図 10	ダネットの多重比較	12
図 11	G薬 0.1μMの2番目のデータ	13
図 12	Nonlinearの起動	14
図 13	手動による最小2乗法	15
図 14	シグモイドE <sub>max</sub> モデル式	16
図 15	初期値	16
図 16	変数の指定	17
図 17	初期値によるシグモイド曲線	18
図 18	スクロールバーの移動による曲線の変化	19
図 19	逐次計算による逐次	20
図 20	EC50の推定値	22
図 21	デジタイザーによるEC50の読み取り	24
図 22	EC50についての用量反応	25
図 23	EC50についてLack of Fitを含む回帰直線の当てはめ	26
図 24	パラメータの重複を除いたE <sub>max</sub> モデル (式 2)	27
図 25	Byの機能	28
図 26	G薬 1.0μMの結果	29
図 27	スプライン曲線法とシグモイドE <sub>max</sub> 法のEC50の比較	30

# 第1章 摘出回腸の収縮

---

## 第1節 今回のテーマ

薬物 - 受容体を数量的に表現するために、累積投与による実験が広く行われている。累積投与による実験結果に基づき用量反応関係を論じようとする、統計的には常に疑問視される。これは、前の投与量の影響、いわゆる持越し効果を分離できないとの理由で、ランダム化を前提を好む統計家が納得できかねるのである。

累積投与による実験を行う場合には、ランダムな投与による結果と累積投与による結果が同じで、持ち越し効果がないことを事前に実験的に確認しておかなければならない。このような場合のみ、累積投与による用量反応関係が論じられるのである。

摘出した平滑筋を溶媒中の懸架して、溶媒中の薬物濃度を 3.3 倍上げ、平滑筋の収縮反応が最高となった時点で、さらに 3.3 倍の濃度にするといった手順により、反応に比較して、持ち越し効果を誤差程度に抑えるような工夫がされている場合にのみ、用量反応が論じられるのである。

平滑筋の薬物に対する収縮反応は、一般的にシグモイド曲線となる。要約統計量として、最大反応の 50%、いわゆる D50 となる薬物濃度が広く用いられている。この実験のデータを解析する場合に、実験データの構造が分割実験モデルであることに注意しなければならない。さらに、D50 の推定のために Emax モデル<sup>文献 1)</sup>といわれている非線形回帰モデルが必要となる、さらにいえば、非線形混合モデルの問題になり、一般的な統計解析のレベルを越えている。

今回は、これらの実験データの構造を認識しつつ、統計解析の実習をおこなう。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。

---

文献 1) Gabrielsson J, Weiner D. Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: Concepts and Applications, 2<sup>nd</sup> ed., Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm (1997).

## 第2節 マグナス装置による実験

高橋自身は、マグナ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°C 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示す。

表 1 ヒスタミン収縮

実験順	処置 G 薬	最大 収縮高	ヒスタミン添加量 (単位は $\mu\text{M}$ )、測定値: 収縮高(mm)							
			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 0.01 $\mu\text{M}$	186	27	23	29	41	68	116	149	191
	3 0.1 $\mu\text{M}$	123	1	1	7	4	16	34	80	122
	4 1.0 $\mu\text{M}$	167	-1	3	5	7	15	9	25	72
R2	5 0.01 $\mu\text{M}$	121	4	4	7	13	53	90	114	122
	6 0.1 $\mu\text{M}$	148	-21	4	0	-1	28	51	115	130
	7 1.0 $\mu\text{M}$	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

実験データのランダム化の手順によりデータの構造が異なり、その解析法も異なる。提供されたデータには、ランダム化の手順が示されていないので、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) マグナス装置に回腸を 1 検体ごとに懸垂し、ヒスタミン濃度が 30  $\mu\text{M}$  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。蒸留水をマグナス装置に注入し、手順 5 での実験を行い、G 薬の低濃度から手順 5 を繰り返す。

手順 5) マグナス装置にヒスタミン濃度が 0.01  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  となるように添加し、最後にヒスタミン濃度が 30  $\mu\text{M}$  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3節 実験データの解析モデル

8 匹のモルモットから摘出された回腸は、ヒスタミンの高濃度溶液にたいする収縮量を計測し、群分けのデータとした。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。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する。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 (agonist) 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、

- 1) 平行移動
- 2) 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 ( $pA_2$ ) を推定したいとしよう。

---

## 第4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、臨床データマネジメントセミナーでも使用されている。最近では、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ている。

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。

2000年1月の第2回目では、「複数の誤差を含んだ統計モデル、線形混合モデル」を行い、この中で今回のテーマを含めようとしたが、時間的に無理であった。第3回目は、JMP の非線形回帰モデルを用いて D50 の推定、および、その用量反応を求めてみる。

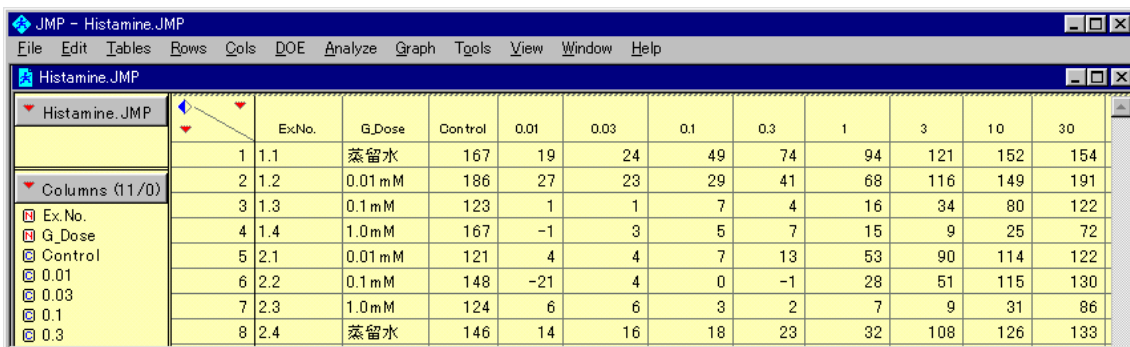
この実習の機材の提供は日本科学技術連盟、設置にはユックムス（株）、会場の提供は医薬安全研のご好意によっている。また、ここで使用する JMP バージョン 4 の  $\beta$  バージョンは、SAS ジャパン JMP 事業部から提供を受けた

# 第2章 データのグラフ化

## 第1節 JMPへのデータの取り込み

MS-Wordの表 1 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 1 に示す。

図 1 JMP への取り込み



	Ex.No.	G_Dose	Control	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	
	1	1.1	蒸留水	167	19	24	49	74	94	121	152	154
	2	1.2	0.01 mM	186	27	23	29	41	68	116	149	191
	3	1.3	0.1 mM	123	1	1	7	4	16	34	80	122
	4	1.4	1.0 mM	167	-1	3	5	7	15	9	25	72
	5	2.1	0.01 mM	121	4	4	7	13	53	90	114	122
	6	2.2	0.1 mM	148	-21	4	0	-1	28	51	115	130
	7	2.3	1.0 mM	124	6	6	3	2	7	9	31	86
	8	2.4	蒸留水	146	14	16	18	23	32	108	126	133

MS-Word から JMP に貼り付けた場合には、変数名が、「Column 1」,...となっているので上の字のように変更すること。

JMP ファイルからの入力、

- 1) JMP メニュー「File」を選択する。
- 2) プルダウンメニュー「Open」の選択する。
- 3) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開く。
- 4) ファイル「Hitamin.jmp」を開く。



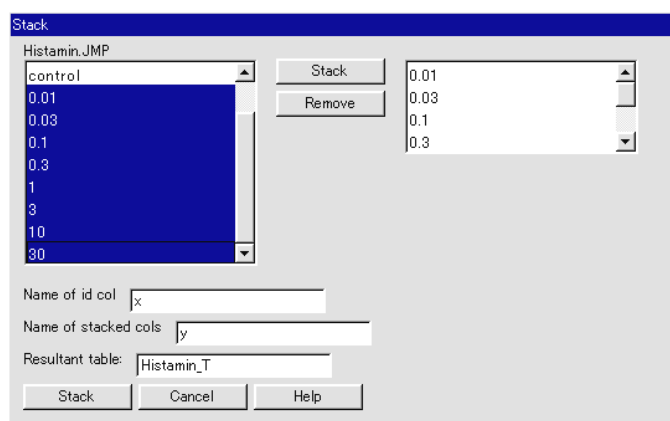
## 第2節 データの転置

JMPに限らず、統計ソフトが前提とする解析用のデータは、

投与量	ヒスタミン量 $x$	反応 $y$
0.01mM	0.01	27
0.01mM	0.03	23
⋮	⋮	⋮
0.01mM	30	191

のように行方向に展開したものが標準である。JMPには、データの行単位の転置機能があり、図 1 の列方向のデータを行方向 1 行ごとに展開すること、その逆も手軽にできる機能が備わっている。実際、この形式のデータを直接作成することは、かなり面倒であり、この機能を使うことを前提にしてデータを入力して解析用のデータを作成した方が能率的である。

図 2 1 行 1 データへ形式への変換



- 操作手順
- 1) JMP のメニュー「Table」の選択
  - 2) プルダウンメニュー「Stack」の選択
  - 3) Stack ウィンドウのヒスタミンの投与量、0.01 $\mu$ M から 30 $\mu$ M を選択する。
  - 4) 中央、上の Stack ボタンを押す。失敗したら Remove する。
  - 5) Name of col のボックスに x を入力する。
  - 6) Name of stackedcols のボックスに y を入力する。
  - 7) 左下の Stack ボタンを押して実行する。

図 3 行方向に並べ替えたデータ

Ex.No.	G_Dose	Control	x	y	
1	1.1	蒸留水	167	0.01	19
2	1.1	蒸留水	167	0.03	24
3	1.1	蒸留水	167	0.1	49
4	1.1	蒸留水	167	0.3	74
5	1.1	蒸留水	167	1	94
6	1.1	蒸留水	167	3	121
7	1.1	蒸留水	167	10	152
8	1.1	蒸留水	167	30	154
9	1.2	0.01 mM	186	0.01	27
10	1.2	0.01 mM	186	0.03	23
11	1.2	0.01 mM	186	0.1	29
12	1.2	0.01 mM	186	0.3	41

データの変容：これらの操作は、時間の都合で省略する。

- 1) 変数 x の型が、文字データ、名義尺度、となっているので、数値データ、連続量に変更する。
- 2) 変数 x の常用対数  $\log(x)$  の計算式を定義する。
- 3) Control を 100%としたときの y のパーセントを計算し変数 p とする。
- 4) 処置薬 G に対して色別マークを付ける。

図 4 解析用 JMP データ

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

Rows: All Rows 64, Selected 0, Excluded 0, Hidden 0

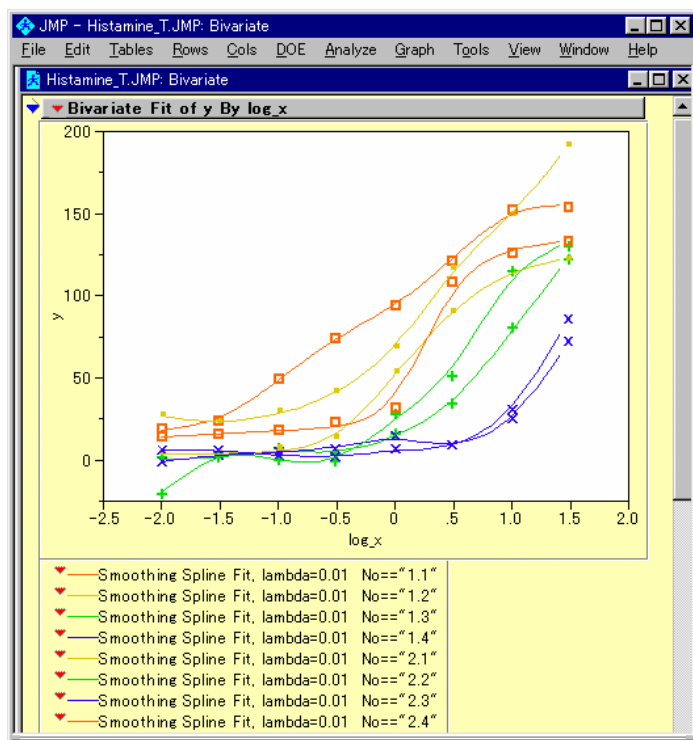
JMP ファイルからの入力、

- 1) JMP メニュー「File」を選択、プルダウンメニュー「Open」の選択。
- 2) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開き、ファイル「Hitamin\_T.jmp」を開く。

## 第3節 データのグラフ化

処置薬Gの検体ごとに、横軸にヒスタミンの対数用量 $\log(x)$ を、縦軸に収縮量 $y$ とし、スプライン曲線を引いたのが図5である。大部分の検体でシグモイド曲線らしき用量反応が得られている。同じ処置薬でも収縮量に差があることが観察される。これは、処置薬Gが添加されていない蒸留水にヒスタミン濃度を急速に高めたときに、検体ごとの収縮量にばらつきがあり、そのために累積投与下での反応に差が生ずるのである。

図5 処置薬Gのヒスタミンに対する収縮反応



- 操作手順
- 1) JMPのメニュー「Analyze」の選択
  - 2) プルダウン・メニュー「Fit Y by X」の選択
  - 3) 変数  $\log_x$  を **X, Factor** に、変数  $y$  を **Y, Response** に指定する。
  - 3) **▼ Bivariate Fit ...** をクリックし、プルダウン・メニューより「Group by ...」を選択する。
  - 4) Grouping 変数に変数  $Ex\_No$  を選択する。
  - 5) 再度プルダウン・メニューより「Fit Spline」を選択する。
  - 6) さらに、「.01, flexible」を選択する。

## 第4節 最大収縮量の検討

抽出した回腸の最大収縮量 $Y_{max}$ が、処置 $G$ の群に適切に群分けされているか、また検体間のSDがどの程度か調べてみる。図 1 のデータを用いて、1元配置分散分析を試みる。群分けは適切であったことが図 6 に示す結果から分かる。また図 7 より、処置薬 $G$ の最大用量  $1.0\mu\text{M}$ を除いて、ほぼ直線が当てはまることから、 $Y_{max}$ を考慮した解析が必要である。

図 6  $Y_{max}$  の均一性の確認

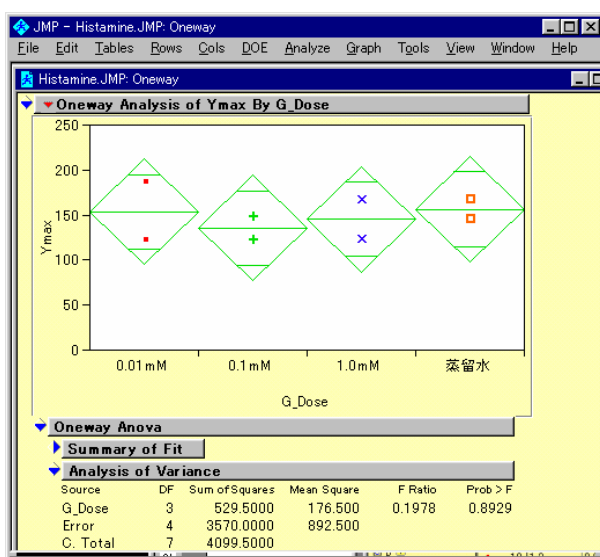
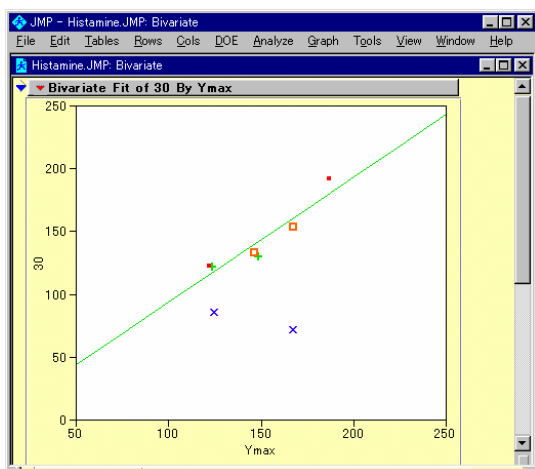


図 7  $Y_{max}$  と累積投与最終時点の  $y$  との相関

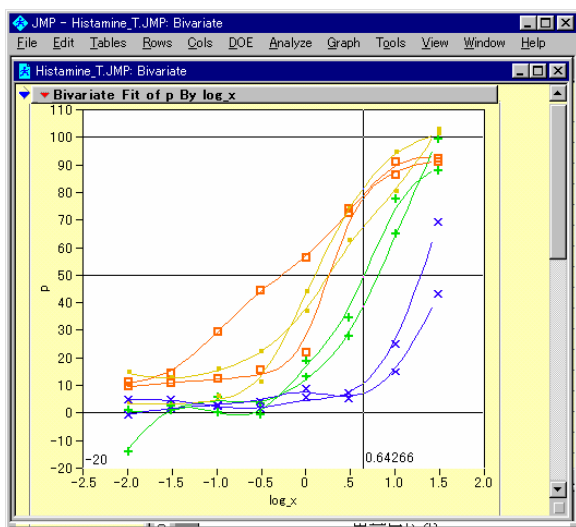


## 第5節 反応量の基準化後の用量反応

最大収縮高 $Y_{max}$ を100%とした時の反応を $p$ とした用量反応関係を図8に示す。シグモイド曲線となることが、より鮮明にうかがわれる。D50を図上で読みとれば、処置薬Gの $0.1\mu\text{M}$ の場合にヒスタミンの濃度が $\text{antilog}(0.6426)$ となる。

ヒスタミンの用量の幅が広いこともあり、摘出回腸の収縮が見られないデータもかなり含まれている。恣意性が入り込まないようにD50を機械的に求めようとした場合には、全データの利用が条件となる。シグモイド曲線を直線化する変換方法としてロジット変換があるが、反応が現れない投与量のデータに影響され、D50近辺の当てはめが悪くなる。そのために、連続量に対して直接シグモイド曲線を当てはめる非線形回帰モデルに魅力を感じるのである。

図8 反応率 $p$ での用量反応

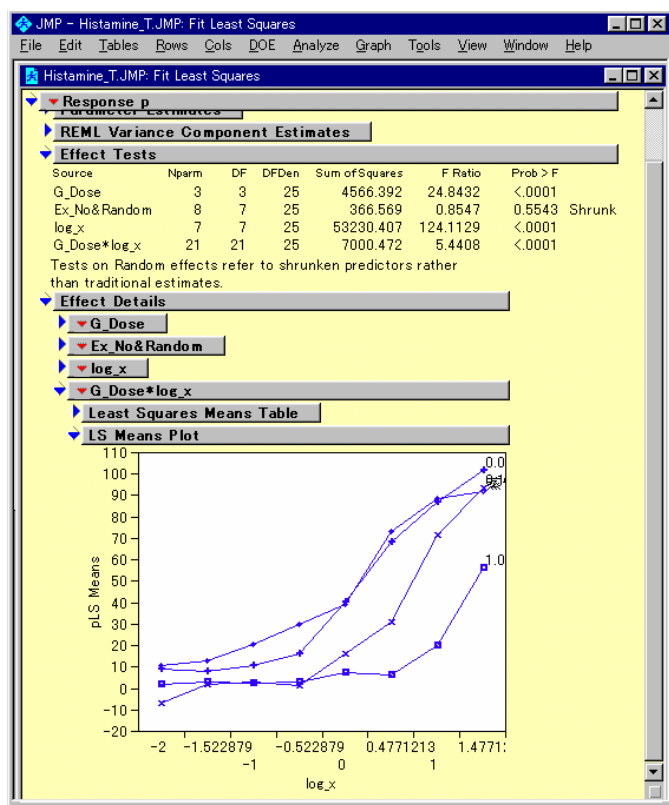


# 第3章 分散分析モデル

## 第1節 分割型実験モデル

表 1 のデータおよび実験手順より、処置薬Gを 1 次因子、ヒスタミン量を 2 次因子とした分散分析とみなすことができる。JMPのバージョン 4 より、線形混合モデルが使えるようになり、下に示すような結果が得られる。ただし、この解析法からいえるのは、G薬とヒスタミンの用量間の交互作用が有意であることから、何らかの用量反応に違いが統計的にある、という程度である。

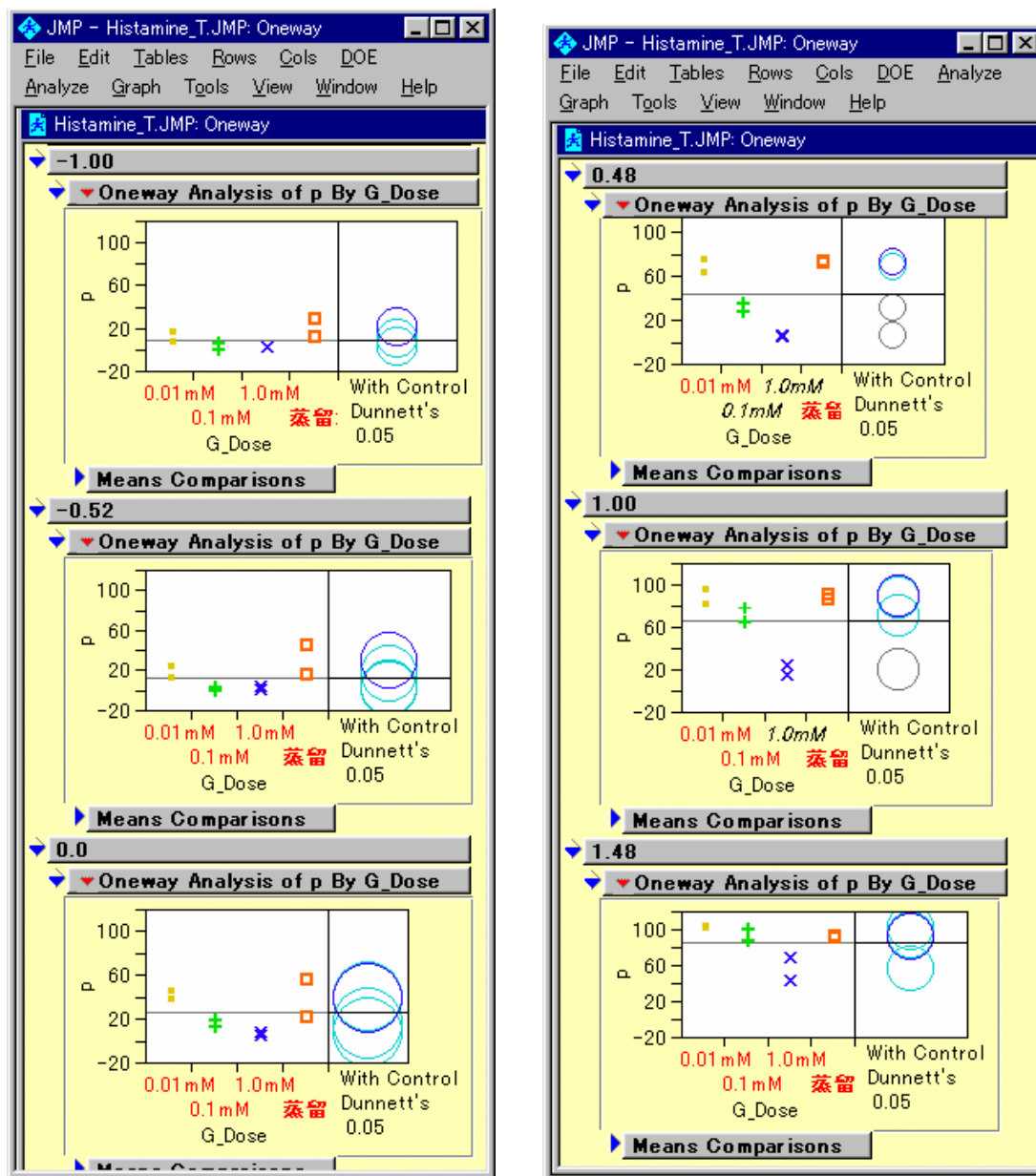
図 9 分割実験モデルの解析



## 第2節 ヒスタミンの用量別ダネットの検定

JMP では、ヒスタミンの用量ごとに G 薬の各群と対象の蒸留水群との間でダネットの多重比較を行うこともできる。しかし、薬物 - 受容体を数量的に評価する方法としては、不適切である。

図 10 ダネットの多重比較

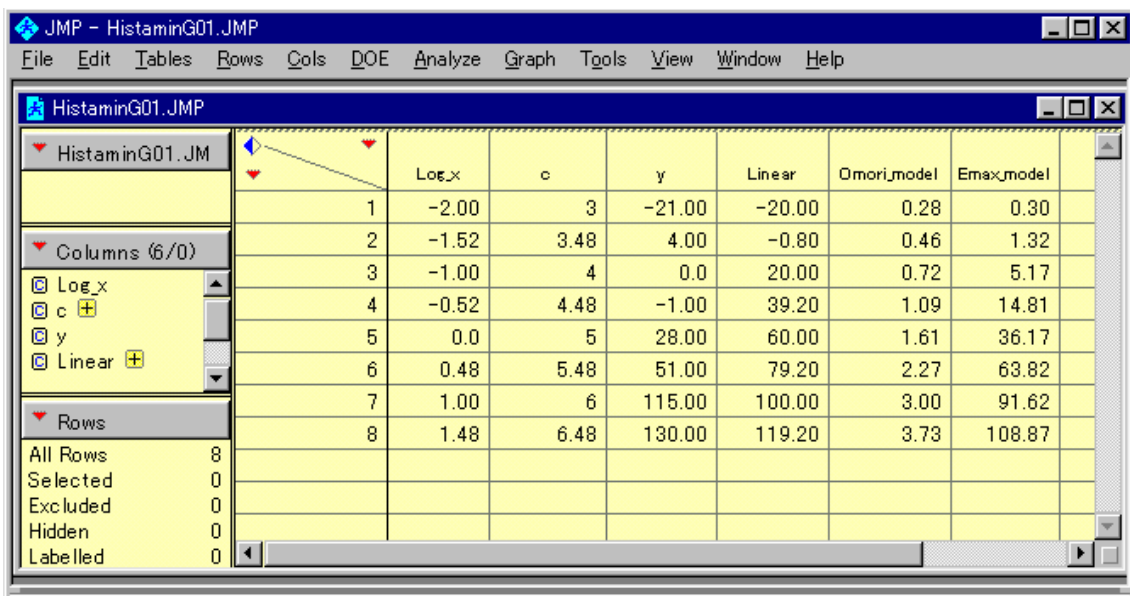


# 第4章 Emax モデル

## 第1節 非線形モデルの練習 1

非線形回帰モデルは、逐次計算前提にするために、モデル式のパラメータに初期値を与える必要がある。適切な初期値を与えないと、逐次計算が適切に行われなことがしばしば起きる。そのために、簡単な回帰分析で練習するとよい。ヒスタミンの対数濃度に5を加えた変数  $c$  を以後の計算で用いる。これは、シグモイド Emax モデルでは、濃度が正の場合に定義されているからである。

図 11 G 薬 0.1 $\mu$ M の 2 番目のデータ



	Log_x	c	y	Linear	Omori_model	Emax_model
1	-2.00	3	-21.00	-20.00	0.28	0.30
2	-1.52	3.48	4.00	-0.80	0.46	1.32
3	-1.00	4	0.0	20.00	0.72	5.17
4	-0.52	4.48	-1.00	39.20	1.09	14.81
5	0.0	5	28.00	60.00	1.61	36.17
6	0.48	5.48	51.00	79.20	2.27	63.82
7	1.00	6	115.00	100.00	3.00	91.62
8	1.48	6.48	130.00	119.20	3.73	108.87

変数 Linear に、 $y=b_0 + b_1 \cdot x$ ,  $b_0=-140$ ,  $b_1=40$  が定義してあり、その計算結果が示されている。変数  $c$  は、 $c=\text{Log}_x + 5$  で定義している。これは、Emax モデル式では、 $x \geq 0$  のためである。

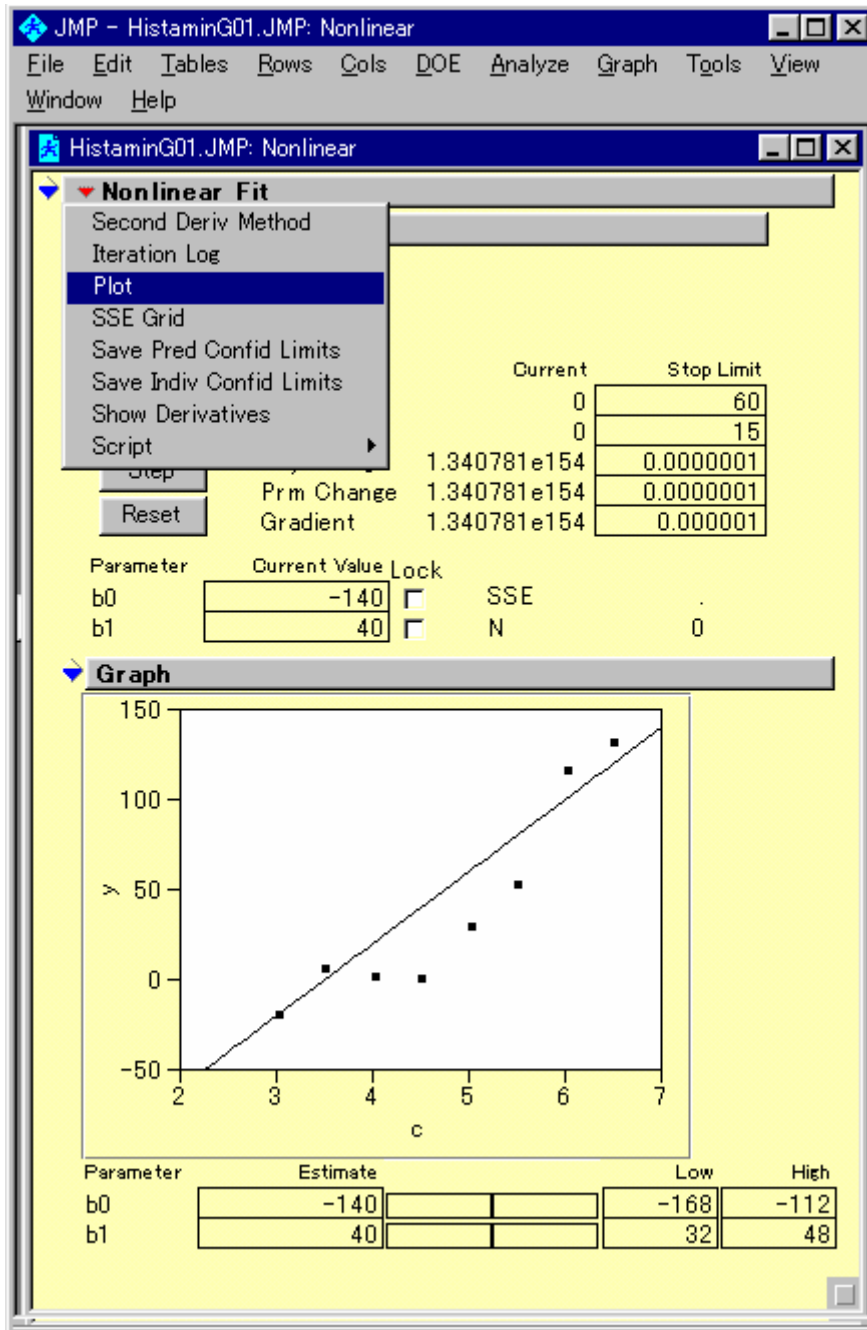
JMP ファイルからの入力、

- 1) JMP メニュー「File」を選択し、プルダウンメニュー「Open」の選択する。
- 2) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開き、ファイル「HitaminG01.jmp」を開く。



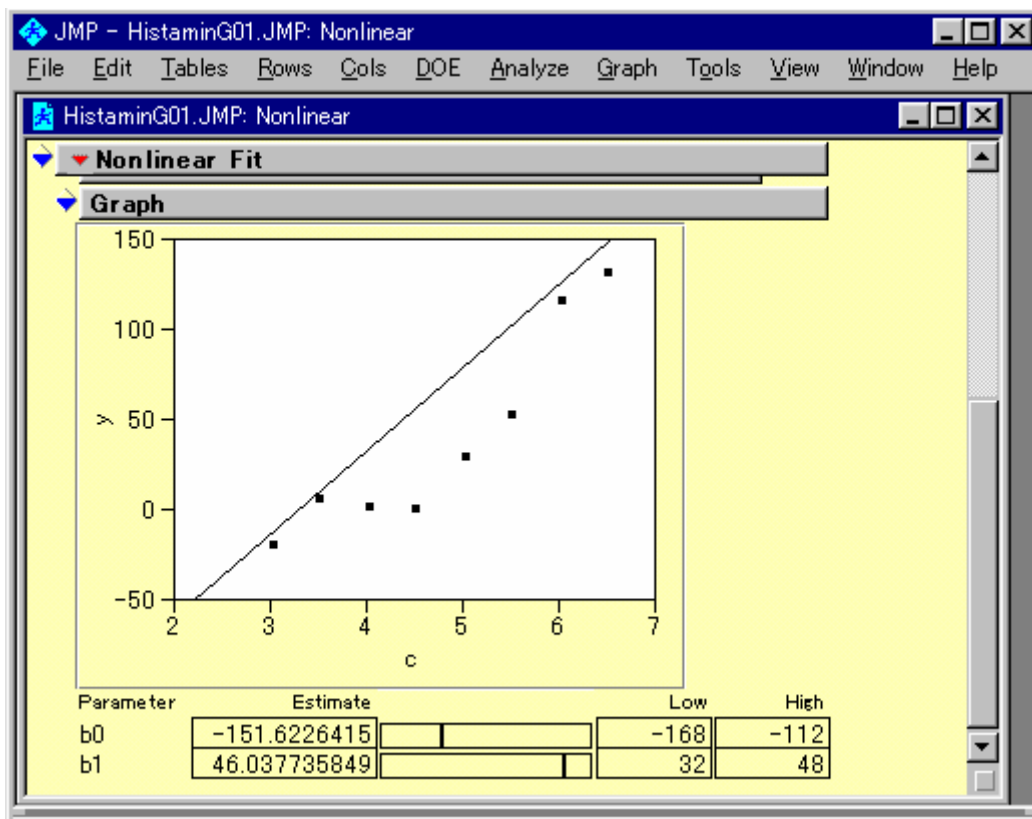
線形回帰モデルの最小 2 乗解は、逐次計算によらず簡単な行列計算で求めることができるが、非線形の統計ソフトの使い方に慣れるための入門として行ってみる。

図 12 Nonlinear の起動



- 操作手順
- 1) JMP のメニュー「Analyze」の選択
  - 2) プルダウン・メニュー「Nonlinear Fit」の選択
  - 3) 変数 y を  に、変数 Linear を  に指定し、 を押す。
  - 4)  をクリックし、プルダウン・メニューより「Plot」を選択する。

図 13 手動による最小 2 乗法

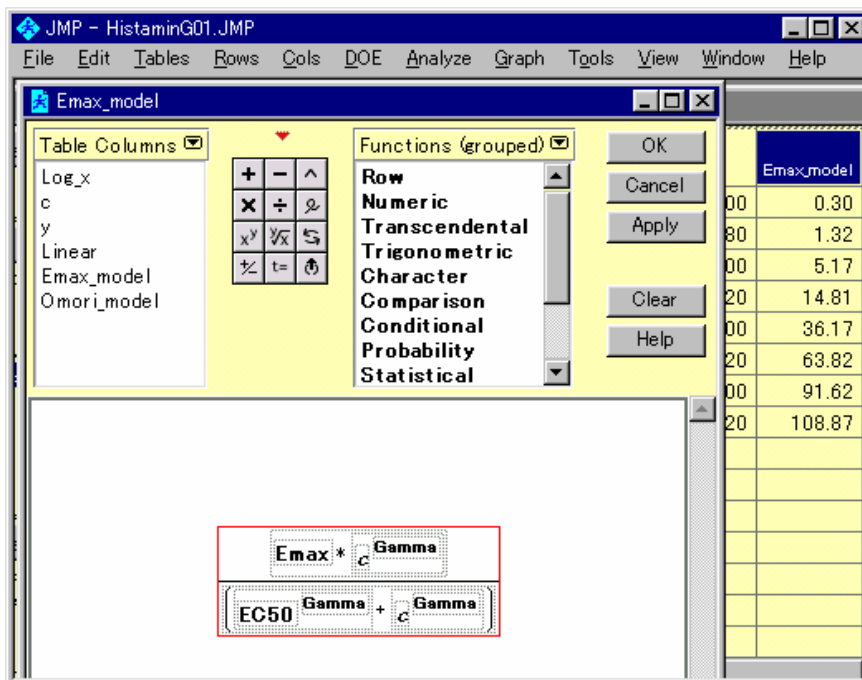


- 操作手順 1) Parameter b0 と b1 の横のスクロールバーを左右に動かして、直線から各点のまでの距離の 2 乗和が最小になるように設定してみよう。
- 2) 2 乗和は、**Reset** ボタンを押すことによる得られる。メモをとりながら残差平方和が最小になるまで続けてみよう。
- 3) くたびれたら、Go を押して御覧なさい。

## 第2節 非線形モデルの練習 2

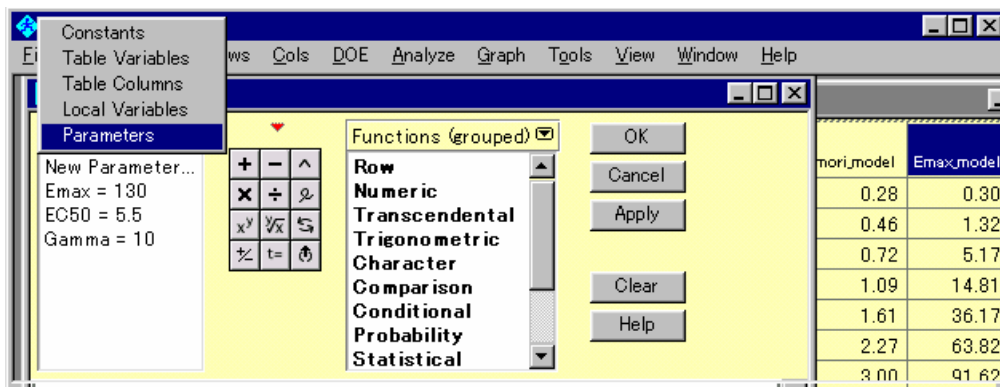
シグモイドEamxモデルは、図 14 に示すモデルで定義されている。練習用のJMPファイルには、予め定義式が与えられている。推定したいパラメータとして、50%反応量：EC50、最大反応量：Emax、曲線の傾斜：Gamma の初期値は、図 15 に示すように予め与えられている。

図 14 シグモイド Eamx モデル式



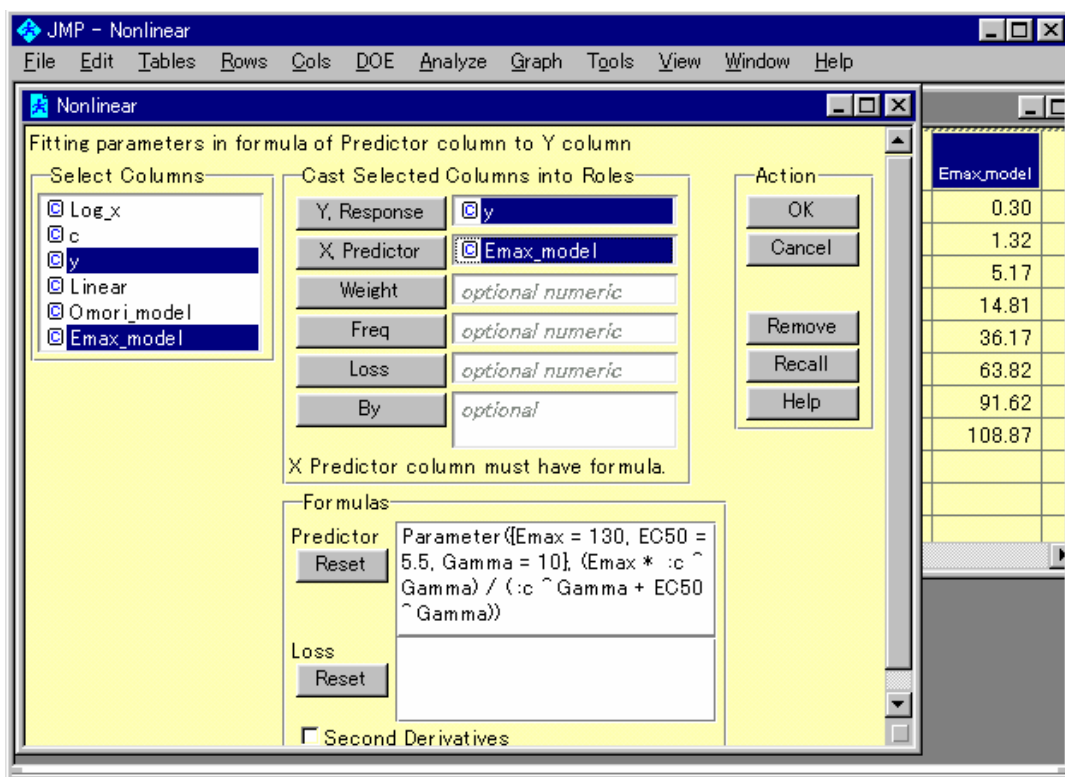
操作手順：変数を選択して、右クリックし、「Formula」を選択する。

図 15 初期値



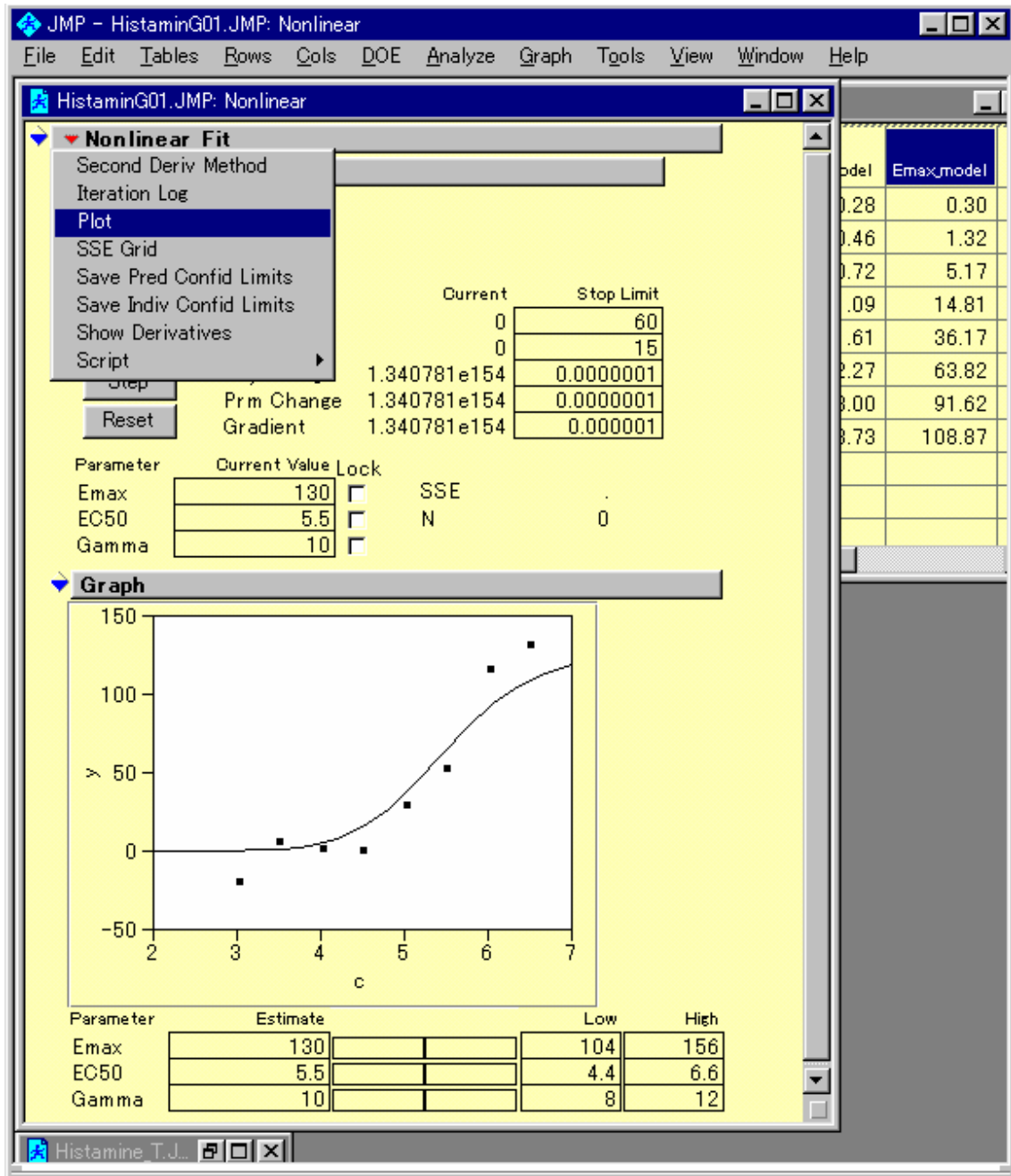
操作手順：「TableColumns」をクリックして Parameter を選択する。

図 16 変数の指定



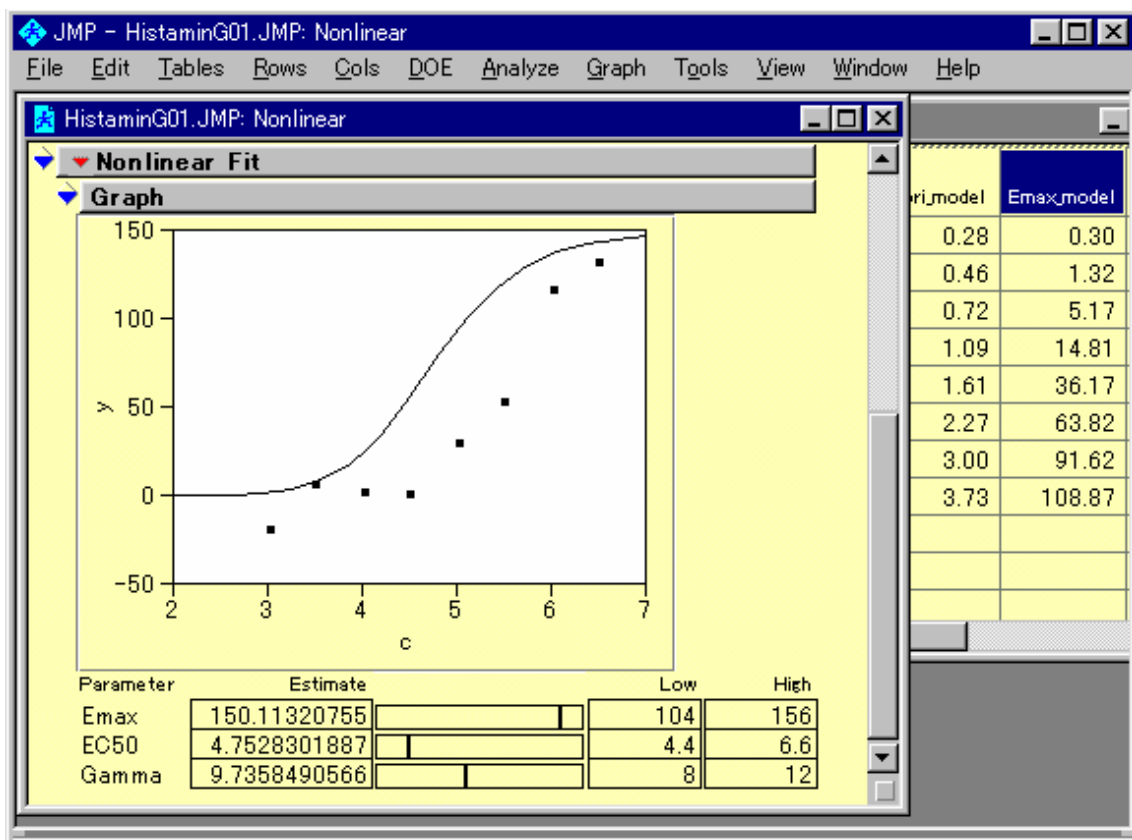
- 操作手順
- 1) JMP のメニュー「Analyze」の選択
  - 2) プルダウン・メニュー「Nonlinear Fit」の選択
  - 3) 変数 y を **Y, Response** に、変数 Emax\_model を **Y, Predictor** に指定し、**OK** を押す。

図 17 初期値によるシグモイド曲線



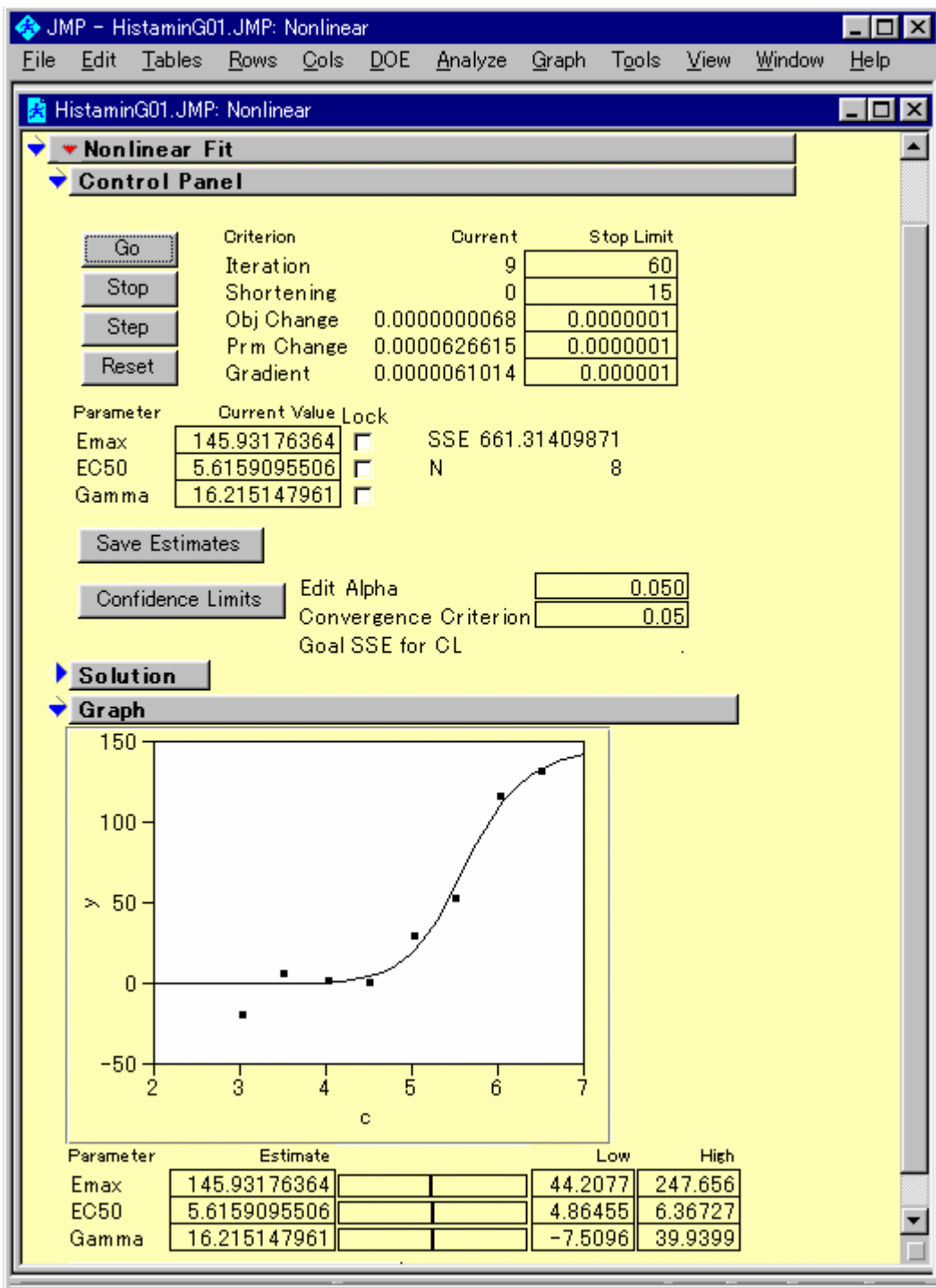
- 4) ▼ Nonlinear Fit... をクリックし、プルダウン・メニューより「Plot」を選択する。

図 18 スクロールバーの移動による曲線の変化



- 操作手順
- 1) 変数 Emax を変化させると、曲線高が上下する。
  - 2) 変数 EC50 を変化させると、曲線が左右に動く。
  - 3) 変数 Gamma を変化させると、曲線の立ち上がりが変化する。

図 19 逐次計算による逐次



- 操作手順 1) **Step** を何回も押しながら、SSE が減少する過程と図の当てはまり状況を確認してみよう。
- 2) くたびれたら、**Go** を押して御覧なさい。

### 第3節 最大収縮に対する比率

G薬の最大用量  $1.0\mu\text{M}$  の場合に、ヒスタミンの濃度が  $30\mu\text{M}$  となっても最大収縮が得られていない。さらに最大収縮高までヒスタミンの濃度を上げるべきであると思われるが、このように、途中までの収縮しか得られていない場合には、パラメータ  $E_{\text{max}}$  の推定が過小評価される。そこで、パラメータ  $E_{\text{max}}$  を最大収縮高に代入して、他の2つのパラメータを推定することにする。

最大収縮高をモデルに含める場合には、収縮量を最大収縮高の比で表せば、 $E_{\text{max}}$  は定数とすることができる。最大収縮高にも、誤差が含まれるので、累積投与終了時の収縮量が100%を越えることもあるが、データに含めて差し支えない。

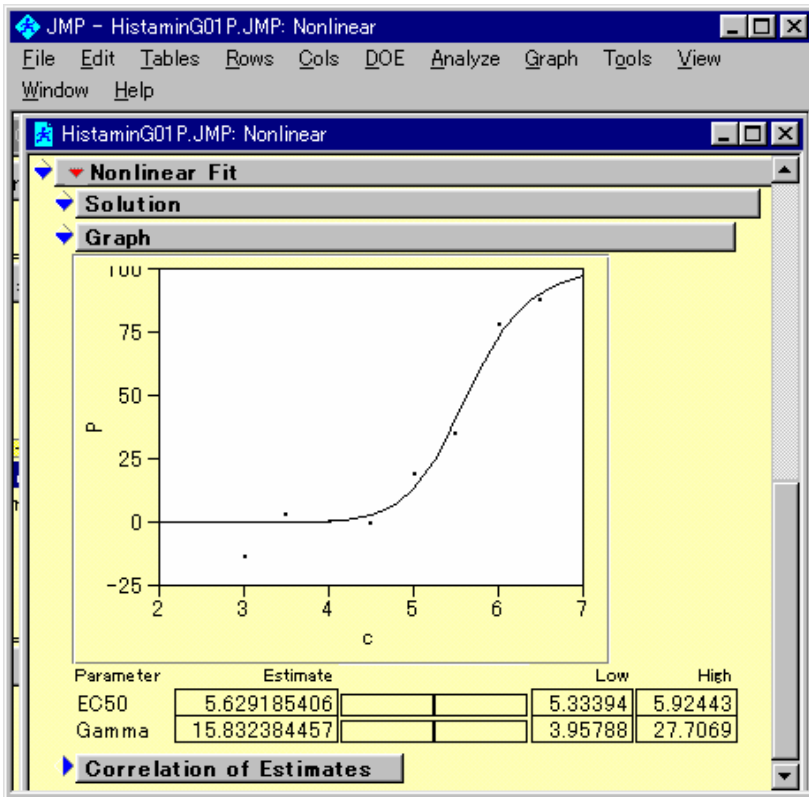
Linear	Emax_model
-5.00	0.23
7.00	1.02
20.00	3.98
32.00	11.39
45.00	27.83
57.00	49.09
70.00	70.48
82.00	83.75

操作手順：

- 1) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開き、ファイル「HitaminG01P.jmp」を開く。
- 2) 変数を選択して、右クリックし、「Formula」を選択する。



図 20 EC50 の推定値



- 操作手順
- 1) JMP のメニュー「Analyze」の選択
  - 2) プルダウン・メニュー「Nonlinear Fit」の選択
  - 3) 変数 y を  に、変数 Emax\_model を  に指定し、 を押す。
  - 4)  を何回も押しながら、SSE が減少する過程と図の当てはまり状況を確認してみよう。
  - 2) くたびれたら、 を押して御覧なさい。

## 第4節 Emax モデル式の変形

図 14 に示したシグモイドEmaxのモデル式は、

$$y_i = \frac{E_{\max} x_i^\gamma}{x_i^\gamma + EC50^\gamma} \quad (\text{式 1})$$

のように推定したいパラメータ  $\gamma$  が重複して現れ統計的には美しくない。回帰分析では、一般的に推定したいパラメータは、 $\beta_1, \beta_2, \dots$  を用いているので、

$$EC50 : \beta_1$$

$\gamma$  :  $\beta_2$

E<sub>max</sub> :  $\beta_3$

としたときに、式 1 は簡単な変形により次のように表せる。

$$y_i = \frac{\beta_3}{1 + \exp(\beta_2(\ln \beta_1 - \ln x_i))} \quad (\text{式 2})$$

この式は、JMP の STAT\_medel に登録したあるので、実行してみると良い。

---

## 第5節 実験結果の表示

薬物-受容体の理論に基づく実験データの統計的な表現方法は、競合的拮抗か、非競合的拮抗かによって異なる。競合的拮抗といわれるのは、拮抗薬 (Antagonist) 存在下で、作用薬 (Aginist) を加えた場合のシグモイド用量反応曲線が、作用薬単独の場合に対して平行移動した場合である。この場合には、最大反応の 2 分の 1 の反応を得るための作用薬の濃度が、要約統計量として薬理学的な意味をもつ。

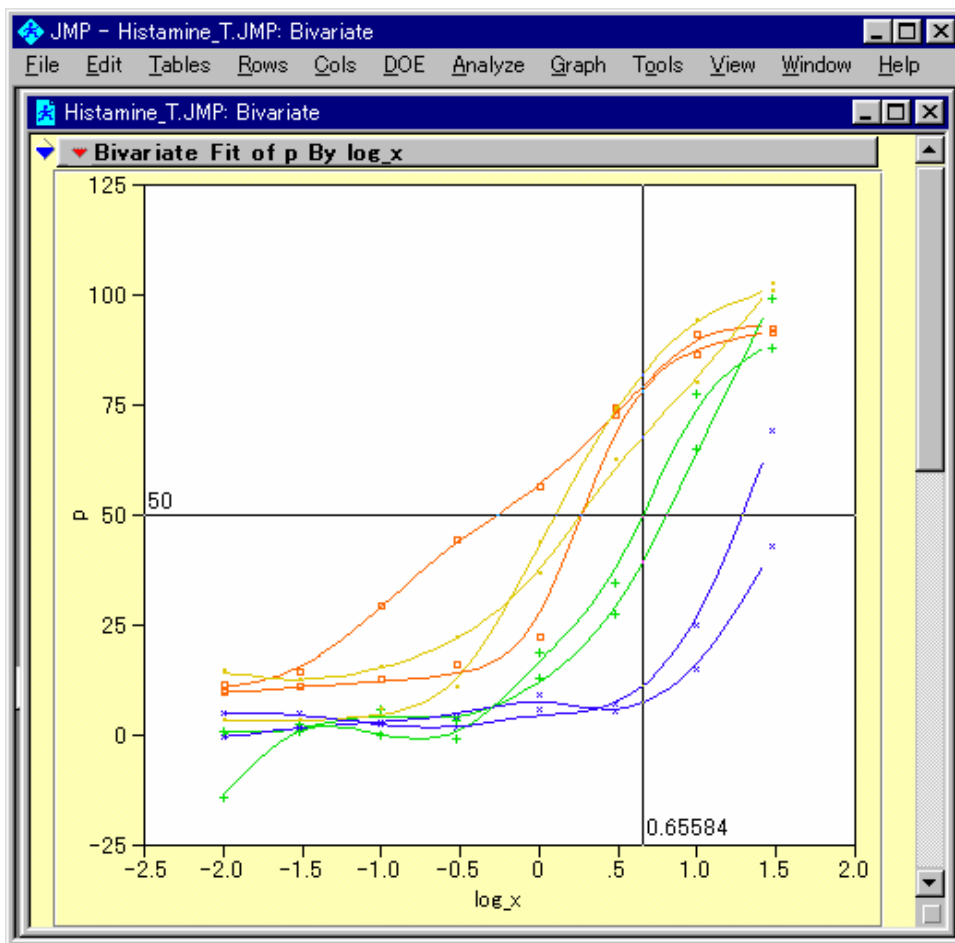
表 1 での処置薬 G が拮抗薬であり、ヒスタミンが作動薬であり、処置薬 G の用量ごとに、ヒスタミンの 50% 反応量、EC50 をデジタイザーで計測している様子を図 21 に示す。同様な手順で他の EC50 を読み取った結果を表 2 に示す。

表 2 EC50

処置 G 薬	EC50	
	R1	R2
蒸留水	-0.256	0.270
0.01 $\mu$ M	0.270	0.083
0.1 $\mu$ M	0.656	0.808
1.0 $\mu$ M	1.602	1.287

図 22 に EC50 についての用量反応曲線を示す。有意差検定を行うまでもなく、明らかな用量反応関係が得られている。

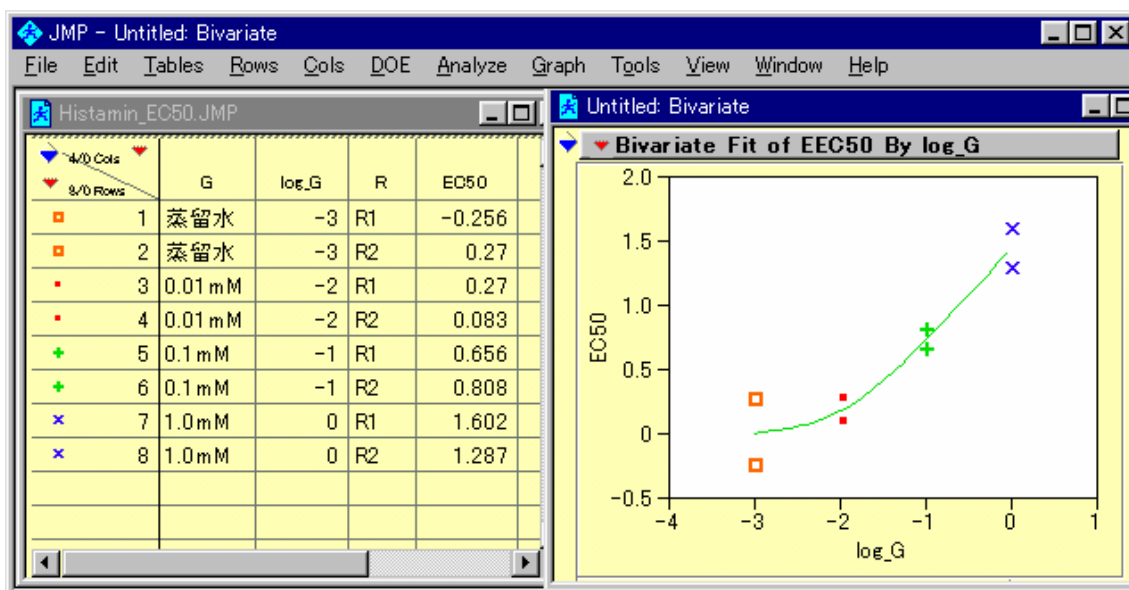
図 21 デジタイザーによる EC50 の読み取り



操作手順：

- 1) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開き、ファイル「Hitamin\_T.jmp」を開く。
- 2) JMP のメニュー「Analyze」の選択。
- 3) プルダウン・メニュー から「Fit Y by X」の選択。
- 4) 変数 Log\_x を  に、変数 y を  に指定する。
- 5)  をクリックし、プルダウン・メニューより「Group by ...」を選択する。
- 6) Grouping 変数に Ex\_No 変数を選択する。
- 7) 再度プルダウン・メニューより「Fit Spline」を選択する。
- 8) さらに、「.01, flexible」を選択する。
- 9) JMP のメニュー「Tool」の選択。
- 10) プルダウン・メニューより Crosshair (照準用十字線) を選択する。
- 11) Y 軸が 50% となるように、用量反応曲線上の点に照準をあてる。
- 12) X 軸の目盛りを読む。

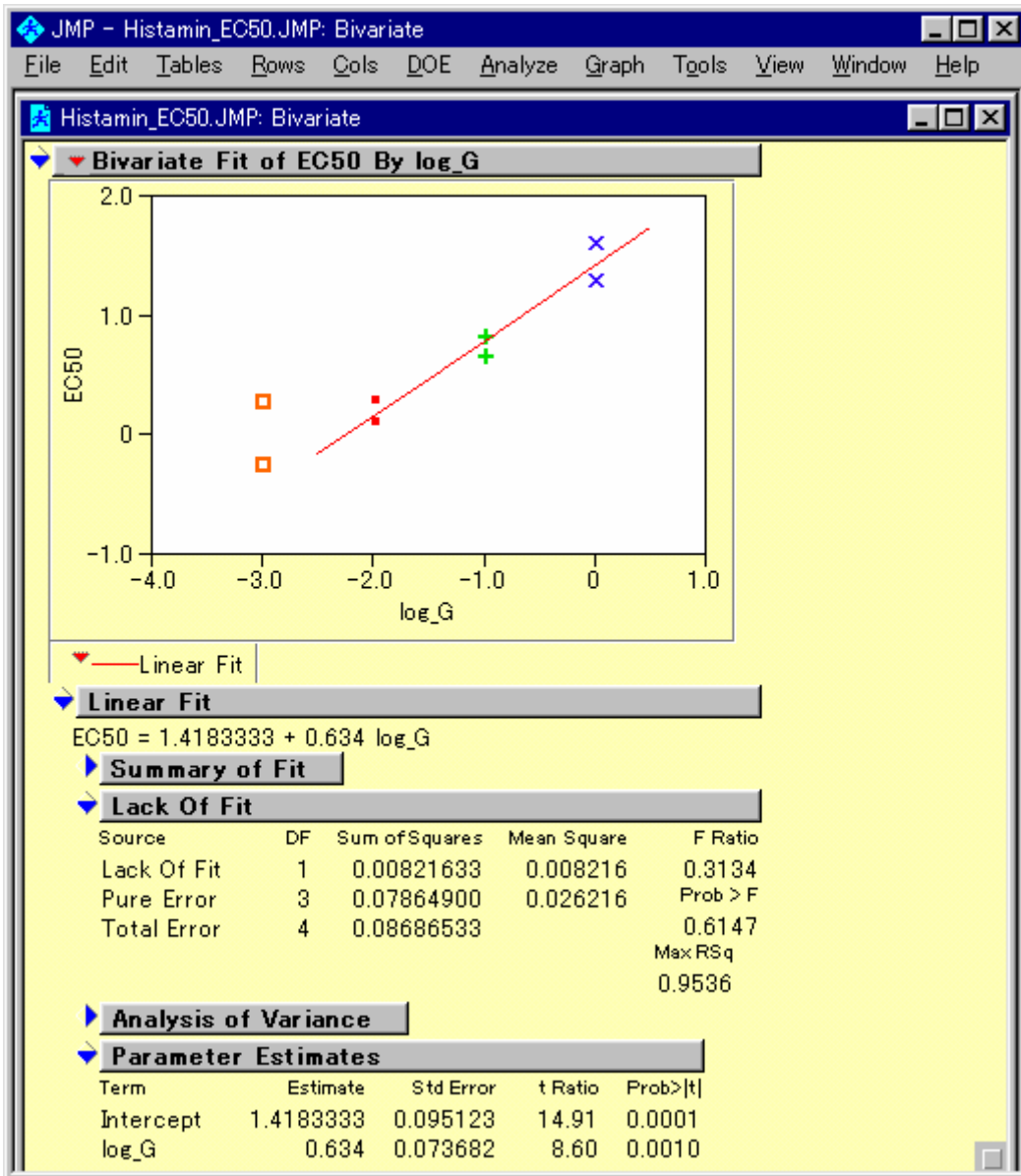
図 22 EC50 についての用量反応



操作手順：

- 1) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開き、ファイル「Hitamin\_EC50.jmp」を開く。
- 2) JMP のメニュー「Analyze」の選択。
- 3) プルダウン・メニュー から「Fit Y by X」の選択。
- 4) 変数 Log\_G を **X, Factor** に、変数 EC50 を **Y, Response** に指定する。
- 5) 再度プルダウン・メニューより「Fit Spline」を選択する。
- 6) さらに、「.01, flexible」を選択する。

図 23 EC50 について Lack of Fit を含む回帰直線の当てはめ



操作手順：

- 1) 蒸留水の行を選択して、「Row」 JMP メニューの「Exclude/Unexclude」を選択する。
- 2) JMP のメニュー「Analyze」の選択。
- 3) プルダウン・メニュー から「Fit Y by X」の選択。
- 4) 変数 Log\_G を **X, Factor** に、変数 EC50 を **Y, Response** に指定する。
- 5) 再度プルダウン・メニューより「Fit Line」を選択する。
- 6) 軸の側でダブルクリックして、Y 軸と X 軸の目盛りを変更する。

。

## 第6節 EC50 の一括計算

これまで、シグモイド Emax モデル当てはめ EC50 の推定の練習を行ってきたのであるが、JMP のバージョン 4 から、実験データすべてを一括して計算する機能が追加された。これを用いて ED50 を半自動的に求めてみよう。

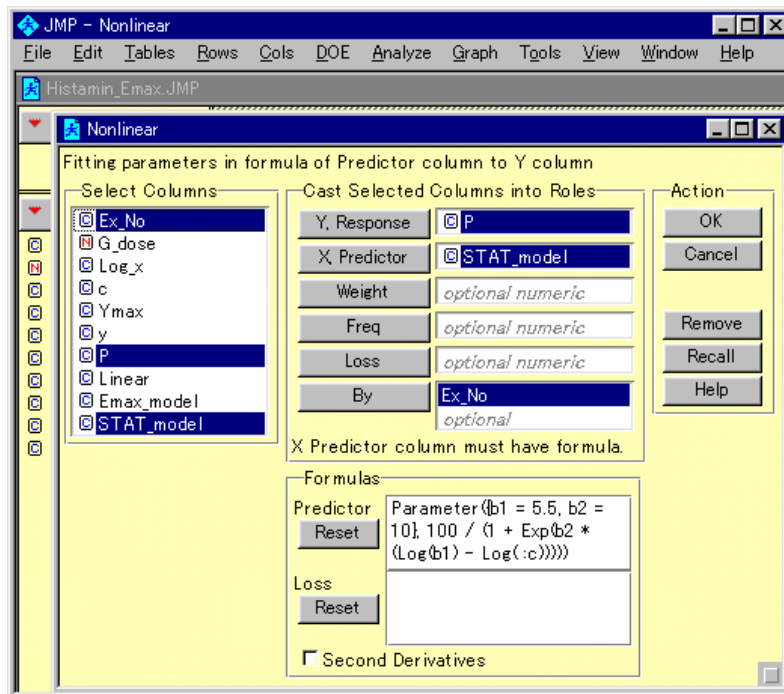
図 24 パラメータの重複を除いた Emax モデル (式 2)

ExNo	G_dose	Log_x	c	Ymax	y	P	Linear	Emax_model	STAT_model
1	1.1 蒸留水	-2.00	3	167	19.00	11.4	-5.00	0.23	0.23
2	1.1 蒸留水	-1.52	3.48	167	24.00	14.4	7.00	1.02	1.02
3	1.1 蒸留水	-1.00	4	167	49.00	29.3	20.00	3.98	3.98
4	1.1 蒸留水	-0.52	4.48	167	74.00	44.3	32.00	11.39	11.39
5	1.1 蒸留水	0.0	5	167	94.00	56.3	45.00	27.83	27.83
6	1.1 蒸留水	0.48	5.48	167	121.00	72.5	57.00	49.09	49.09
7	1.1 蒸留水	1.00	6	167	152.00	91.0	70.00	70.48	70.48
8	1.1 蒸留水	1.48	6.48	167	154.00	92.2	82.00	83.75	83.75
9	1.2 0.01 mM	-2.00	3	186	27.00	14.5	-5.00	0.23	0.23
10	1.2 0.01 mM	-1.52	3.48	186	23.00	12.4	7.00	1.02	1.02
11	1.2 0.01 mM	-1.00	4	186	29.00	15.6	20.00	3.98	3.98
12	1.2 0.01 mM	-0.52	4.48	186	41.00	22.0	32.00	11.39	11.39
13	1.2 0.01 mM	0.0	5	186	68.00	36.6	45.00	27.83	27.83
14	1.2 0.01 mM	0.48	5.48	186	116.00	62.4	57.00	49.09	49.09
15	1.2 0.01 mM	1.00	6	186	149.00	80.1	70.00	70.48	70.48
16	1.2 0.01 mM	1.48	6.48	186	191.00	102.7	82.00	83.75	83.75
17	1.3 0.1 mM	-2.00	3	123	1.00	0.8	-5.00	0.23	0.23
18	1.3 0.1 mM	-1.52	3.48	123	1.00	0.8	7.00	1.02	1.02
19	1.3 0.1 mM	-1.00	4	123	7.00	5.7	20.00	3.98	3.98
20	1.3 0.1 mM	-0.52	4.48	123	4.00	3.3	32.00	11.39	11.39
21	1.3 0.1 mM	0.0	5	123	16.00	13.0	45.00	27.83	27.83
22	1.3 0.1 mM	0.48	5.48	123	34.00	27.6	57.00	49.09	49.09
23	1.3 0.1 mM	1.00	6	123	80.00	65.0	70.00	70.48	70.48
24	1.3 0.1 mM	1.48	6.48	123	122.00	99.2	82.00	83.75	83.75
25	1.4 1.0 mM	-2.00	3	167	-1.00	-0.6	-5.00	0.23	0.23

Histamin\_Emax.JMP ファイルを開く。STAT\_Emax の計算式を確認して見なさい。

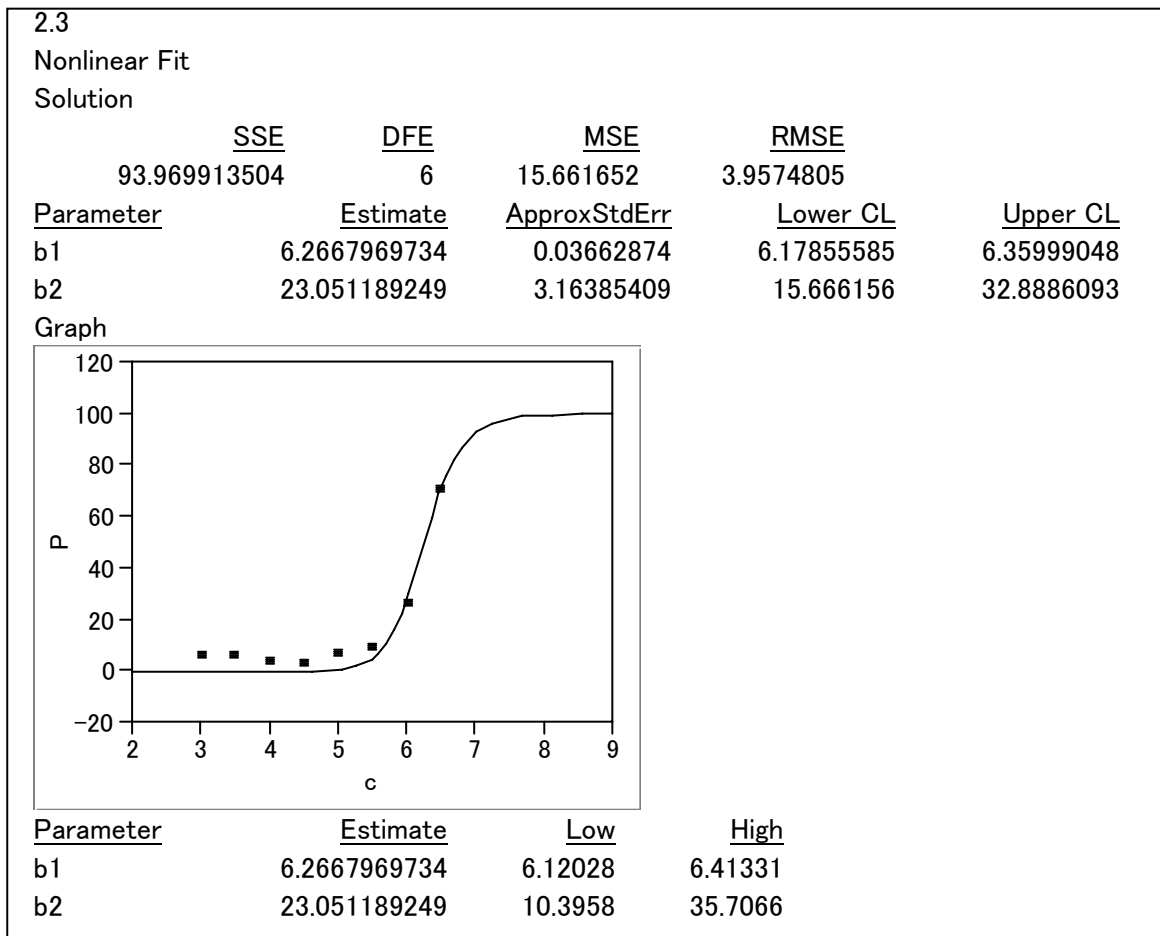
図 25 に By 機能を用いた一括処理の指定方法を示す。図 26 に、ファイルに出力した結果を、再度、読み込んだ一部の結果を示す。

図 25 By の機能



- 1) JMP のメニュー「Analyze」の選択
- 2) プルダウン・メニュー「Nonlinear Fit」の選択
- 3) 変数 p を **Y, Response** に、変数 STAT\_model を **Y, Predictor** に、変数 Ex\_No を **By** に指定し **OK** を押す。
- 4) Nonlinear ウィンドウが現れたら、それぞれの変数 Ex\_No に対して **Go** を押す。

図 26 G 薬 1.0 $\mu$ M の結果



EC50はb1、Gammaはb2に置き換えている。 $\log_x = 6.266 - 5 = 1.266$ 。

表 3 に結果に、シグモイドE<sub>max</sub>法にり推定されたEC50 を示す。スプライン曲線の当てはめにより求めた近似EC50 とほとんど同じ結果となっている。

表 3 シグモイド E<sub>max</sub> 法による EC50

処置 G 薬	EC50 (+5)	
	R1	R2
蒸留水	-0.37 (4.63)	0.25 (5.25)
0.01 $\mu$ M	0.15 (5.15)	0.09 (5.09)
0.1 $\mu$ M	0.75 (5.75)	0.63 (5.63)
1.0 $\mu$ M	1.16 (6.62)	1.27 (6.27)



図 27 スプライン曲線法とシグモイド Emax 法の EC50 の比較

