

# 平滑筋を用いた実験データの解析

第4回・高橋セミナー

2000年7月1日  
総評会館

日本ロシュ  
高橋 行雄

<b>第1章</b>	<b><u>これまでのセミナーの内容</u></b> .....	<b>1</b>
第1節	このセミナーを始めた経緯.....	1
第2節	生物検定法入門.....	2
第3節	JMPによる生物検定法.....	3
第4節	複数の誤差を持つ実験データ.....	4
第5節	摘出回腸の収縮実験.....	5
<b>第2章</b>	<b><u>平滑筋を用いた薬理実験</u></b> .....	<b>7</b>
第1節	50%反応濃度.....	7
第2節	抗ヒスタミン剤Aの作用.....	9
第3節	統計ソフトJMPについて.....	12
<b>第3章</b>	<b><u>データの吟味</u></b> .....	<b>13</b>
第1節	JMPへのデータの取り込み.....	13
第2節	最大収縮高の検討.....	14
第3節	処置後の反応.....	15
第4節	データの転置.....	16
第5節	シグモイド曲線の形状.....	18
<b>第4章</b>	<b><u>EMAXモデル</u></b> .....	<b>19</b>
第1節	非線形モデルの練習1.....	19
第2節	非線形モデルの練習2.....	21
第3節	最大収縮に対する比率.....	24
第4節	EMAXモデル式の変形.....	25
<b>第5章</b>	<b><u>EC50の一括計算</u></b> .....	<b>26</b>
第1節	実験結EC50の一括計算.....	26
第2節	EC50についての用量反応.....	31
第3節	モルモットを变量効果とした解析.....	32
第4節	G薬の用量反応.....	35
<b>第6章</b>	<b><u>ラテン方格</u></b> .....	<b>37</b>
第1節	4×4のラテン方格の種類.....	37
第2節	良い実験計画とは.....	38
第3節	JMPで任意のラテン方格を作る.....	40

図表目次

表 1	実験デザイン（ラテン方格）	10
表 2	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G薬の作用	11
表 3	実験結果（ラテン方格）	32
表 4	実験に用いた 4×4 のラテン方格	37
表 5	改良した 4×4 のラテン方格	37
表 6	改良した 4×4 のグレコ・ラテン方格	38
表 7	超グレコ・ラテン 4×4 のラテン方格	38
表 8	ラテン方格の試験デザイン行列	39
表 9	相関行列	39

図 1	EC <sub>50</sub> の推定	8
図 2	非線型・用量反応に関する学習Webセンター	9
図 3	JMPファイルの取り込み	13
図 4	最大収縮高Y <sub>0</sub> の変動	14
図 5	分散成分の推定	15
図 6	最大収縮高Xと累積投与最終時の収縮高の関係	16
図 7	1行1データへ形式への変換	17
図 8	解析用のJMPデータ	17
図 9	処置薬Gのヒスタミンに対する収縮反応	18
図 10	G薬 0.1μMの2番目のデータ	19
図 11	Nonlinearの起動	20
図 12	手動による最小2乗法	20
図 13	シグモイドE <sub>max</sub> モデル式	21
図 14	初期値	21
図 15	変数の指定	22
図 16	初期値によるシグモイド曲線	22
図 17	スクロールバーの移動による曲線の変化	23
図 18	逐次計算による逐次	23
図 19	収縮率に対するE <sub>max</sub> モデル	24
図 20	EC <sub>50</sub> の推定値	24
図 21	パラメータの重複を除いたE <sub>max</sub> モデル式（式2）	26

図 22	By の機能.....	27
図 23	解が求まらない例.....	27
図 24	サブセット化.....	28
図 25	収縮率に対するシグモイド曲線.....	28
図 26	推定されたパラメータのファイルへの出力.....	31
図 27	EC50 の推定値、および部位別および処置別への並べ替え.....	32
図 28	線形混合モデルによるラテン方格の解析.....	33
図 29	EC50 についての分散分析.....	34
図 30	用量反応直線.....	35
図 31	生データから求めたEC50 とパーセント変換後のEC50 の比較.....	36
図 32	割付のバランスの良さ.....	39
図 33	JMP / DOE による 3 因子 4 水準の実験計画.....	40
図 34	作成された試験デザイン.....	40
図 35	ラテン方格状に並べ換えた実験計画.....	41

# 第1章 これまでのセミナーの内容

---

## 第1節 このセミナーを始めた経緯

このセミナーを始めるに至った経緯は、医薬安全研で行なわれている「質疑応答」の内容に疑問を持ったのが切っ掛けであった。私には、質問者と回答者の議論が噛み合っていないような「質疑応答」は聞くに堪えないのである。この問題点は、質問者と回答者の両者にある。質問者側の問題点としては、生物学的な実験仮説の不鮮明さ、形式的な有意差検定の多用、共分散分析などの統計モデルを活用する知識・技術力の不足、回答者側の問題として、生物学的な有意差に対する認識の不足、問題に対する切り込み不足など、の原因が考えられた。

多くの聴衆の前で行われる医薬安全研の定例会であるので、少しでも質の高い「質疑応答」が成立するために、私なりに何らかの努力をしようと思い立ったのである。このような事態のときは、古典に戻ってみるのが常套手段である。古典としては、統計モデルを前提にしたFinney<sup>1, 2)</sup>の「Statistical Method in Biologica Assay」、および「Probit Analysis」が望ましいと考えた。

私自身も生物検定法の古典を現代的に見直し、「質疑応答」の関係者が、集まりやすい医薬安全研の午前中に、塾のようなスタイルでセミナーを行うことにした。生物検定法は、統計の応用分野として二昔前までは最先端であった。現代的に言えばロジスティック回帰の交互作用を予備検定とし、2水準間の差について逆推定し、その信頼区間を求めるといった内容であった。その後、コンピュータの普及に伴い、多くの実験研究者たちは、簡単にプログラミングできる統計的有意差検定に流れ込んだように思われた。

このセミナーを始めるに際して、統計ソフトJMPが、ロジスティック回帰において、生物検定法のテーマである逆推定とその信頼区間の計算を標準的な機能として持っていることに注目した。JMPは、グラフィカルユーザインターフェイスにすぐれ統計教

育の道具としても優れていることが、慶応大の片岡<sup>3)</sup>により示されていたのたことも影響を受けた。

医薬安全研の午前中も会場が予約されて使用可能であったこと、JMP が搭載されたノート PC も日本科学技術連盟より借用できること、PC の設置にユックムス (株) の皆様の協力が得られること、などの条件がそろい、第 1 回目の高橋セミナーを 1999 年 7 月 3 日に開始した。テーマは、「薬理学的活性の評価、生物検定法の古典を思い出そう」であった。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、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」であった。

なお、これまでに作成した生物検定関連の資料は、希望者には電子メールなどにより、無料で配布しますので、連絡してください。

1) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay* (3<sup>rd</sup> edn). London: Charles Griffin.

2) Finney, D.J. (1971). *Proit Analysis* (3<sup>rd</sup> edn). Cambridge: The University Press.

3) 片岡正明 (1998). 慶応湘南藤沢キャンパスのデータサイエンス教育. 日本統計学会、**95**、(6-10).

---

## 第2節 生物検定法入門

第 1 回目のセミナーは、1999 年 7 月 3 日に行ったのであるが、まとまった資料を作成してなかった。1999 年 8 月の SAS / JMP ユーザ会のハンズオンセミナーで「生物検定法入門」を行った。このときに使用したテキストの目次を示す。

### 目 次

0.	生物検定法とは	3
1.	50%有効量の推定	8
1.1	モルヒネの 50%鎮痛効果	8
1.2	有効率を用いた単回帰	8

1.3	ロジットとは何か	9
1.4	シグモイド曲線の直線化	10
1.5	Fit Y by Xによるロジスティック回帰分析での逆推定	11
1.5.1	反応あり・なしの表	11
1.5.2	ロジスティック回帰分析	11
1.5.3	50%有効量と、その95%信頼区間の計算	13
2.	効力比の推定	15
2.1	4種の鎮痛薬の効果	15
2.2	ロジットを用いた回帰直線	15
2.3	反応あり・なしの表	16
2.4	平行性の検討	17
2.4.1	Fit modelの使用	17
2.4.2	当てはまりの欠如、平行性の欠如	18
2.4.3	分散分析的なまとめ	19
2.5	平行線の当てはめ	20
2.5.1	Fit model	20
2.5.2	4本の回帰直線	21
2.5.3	回帰係数	23
2.5.4	50%有効量の推定	24
2.5.5	効力比の計算	25
2.6	効力比の95%信頼区間	26
2.6.1	ダミー変数の生成	26
2.6.2	切片なしのモデル	27
2.6.3	第2の切片なしモデル	28

---

## 第3節 JMPによる生物検定法

更に、この内容に加筆した、1日の生物検定法入門セミナーを12月1日に行った。  
そのときの資料の目次を示す。

0.	JMP で生物検定法	1
1.	DIRECT ASSAY, 直接法で JMP に慣れよう	6
1.1.	DIRECT ASSAY、FINNEY の文献例	6
1.2.	文献データの入力、直接、MS-EXCEL、MS-WORD、SAS から	7
1.3.	データのグラフ化	8
1.4.	結果を MS-WORD へ掃出し	11
1.5.	データの転置、JMP の標準データ形式へ	12
1.6.	薬剤間の比較、多重比較、分散の比較	16
1.7.	対数変換	19
1.8.	効力比	21
1.9.	FIT MODEL による、効力比の 95%信頼区間	22
1.10.	解析用変数、ダミー変数	27
1.11.	JOIN を用いたダミー変数の作成	29
2.	50%有効量の推定	31
	生物検定法入門と同じ	
3.	計量値に対する逆推定	38
	生物検定法入門と同じ	
5.	複数の誤差を伴う生物検定法	58
6.	JMP による混合モデルの解析	65

---

## 第4節 複数の誤差を持つ実験データ

2000年1月29日のテーマは、「複数の誤差を持つ実験データ」であり、その内容は次のようであった。

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5節 摘出回腸の収縮実験

第3回目は、受容体モデルの実験データの解析であり、新・生物検定法の分野であり、非線形モデルによる D50 の逆推定を含むものであった。

第1章	摘出回腸の収縮	1
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
第2章	データのグラフ化	5
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
第3章	分散分析モデル	11
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
第4章	Emax モデル	13

第 1 節	非線形モデルの練習	113	
第 2 節	非線形モデルの練習	216	
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	

# 第2章 平滑筋を用いた薬理実験

---

## 第1節 50%反応濃度

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、ランダム化の前提を好む統計家が納得しないのである。

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、図 1 に示すよう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 あるいはEC50 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>4)</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。また、これらの問題について、日本語での適切な教科書が見当たらないので、詳しく学習したい方は、図 2 に示したホームページにアクセスしてもらいたい。このWebサイトには、さらに、薬理関連の統計およびPK/PDに関する問題についても充実しているので活用の価値が高い。

今回は、第 3 回目に引き続き、平滑筋（摘出した回腸）を用いた実験データの統計解析を行う。今回は、ラテン方格で割り付けられた実験データに対して、D50 を Emax モデルで計算した上で、個体間誤差と個体内（標本内）誤差を考慮した統計解析の実習をおこなう。

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

図 1 EC<sub>50</sub> の推定

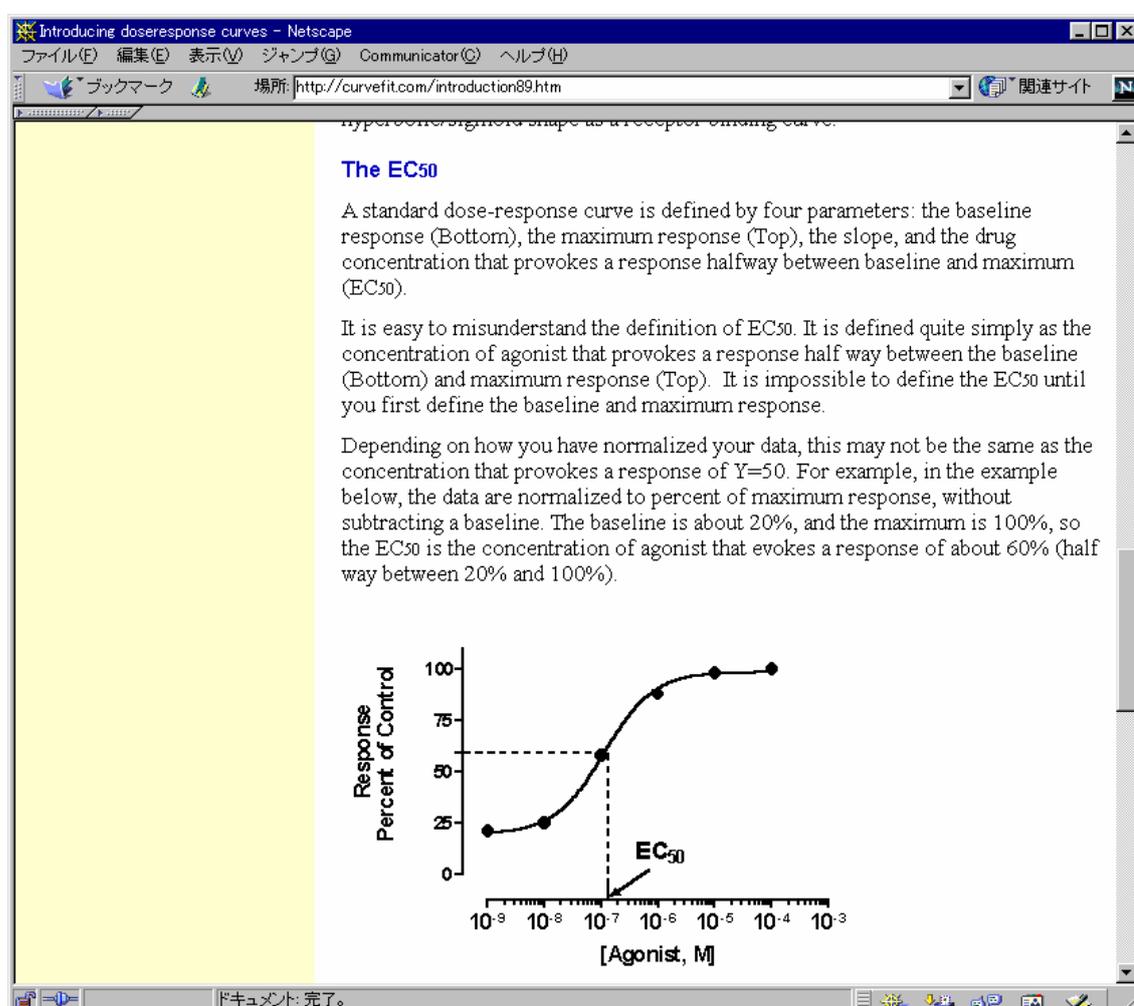


図 2 非線型・用量反応に関する学習 Web センター



## 第2節 抗ヒスタミン剤 A の作用

A 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 G 薬の実験について取り上げる。

実験は、表 1 に示すように 4×4 のラテン方格で行われた。実験データの解析は、ランダム化の手順を正確に把握することから始まる。これは、実験データの誤差構造がランダム化の手順により明らかに異なり、それを正確に反映しないと誤った統計的な結論を導いてしまうからである。

表 1 実験デザイン（ラテン方格）

実験日	モルモット 番号	標本			
		胃側	<----->		肛門側
		部位 1	部位 2	部位 3	部位 4
1	1	A: 水	B: 0.01 $\mu$ M	C: 0.1 $\mu$ M	D: 1 $\mu$ M
1	2	B: 0.01 $\mu$ M	C: 0.1 $\mu$ M	D: 1 $\mu$ M	A: 水
2	3	C: 0.1 $\mu$ M	D: 1 $\mu$ M	A: 水	B: 0.01 $\mu$ M
2	4	D: 1 $\mu$ M	A: 水	B: 0.01 $\mu$ M	C: 0.1 $\mu$ M

## 実験手順

手順 1) 1 匹目のモルモットから回腸を摘出し、一本の長さが約 20mm となるように 4 本の標本を作製する。標本は、胃側から肛門側へ 1~4 の番号を付与する。

手順 2) 4 連のマグヌス装置に標本を 1 ずつ懸垂し、それぞれヒスタミン濃度が 300  $\mu$  M となるまで累積的に添加し、懸垂した回腸の最大収縮高を添加前値とする。

手順 3) 回腸中のヒスタミンを洗浄する。

手順 4) 4 連のマグヌス装置に、それぞれ蒸留水、D 薬の 0.01、0.1、1.0  $\mu$  M の順にする。

手順 5) マグヌス装置にヒスタミン濃度が 0.01  $\mu$  M となるように添加し、回腸の収縮が止まったら、次にヒスタミン濃度が 0.03  $\mu$  M となるように添加する。この累積的添加をヒスタミン濃度が 300  $\mu$  M となるまで繰り返す。この間の回腸の収縮高をキモグラフ (kymograph、筋肉の運動や心臓の拍動などを記録する装置) に連続的に記録する。

手順 6) 2 匹目のモルモットについて手順 1 からの操作を繰り返す。ただし、注入順は表 1 に示した手順 4 で、G 薬の 3 用量を先に行い、蒸留水は最後とする。

## 統計解析の考え方

実験に用いた 4 匹のモルモットから摘出された回腸には、それぞれのモルモット固有の性質を持っていて、薬物に対する反応に違いがあると考えられる。摘出した回腸の 4 つの標本間にも反応の違いがあるかも知れない。この違いの一部は、摘出部位による差で説明できるかもしれない。実験は 2 日間に渡って実施されていて、実施日間

に何らかの違いがあるかもしれない。しかし、異なるモルモットの標本が使用されているので、実施日の違いは、モルモットに交絡して分離できない。

ヒスタミンは  $0.01 \mu\text{M}$  から逐次的に 3.3 倍の濃度となるように、 $300 \mu\text{M}$  まで 10 段階の回腸の収縮高が得られる。ただし、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。

表 2 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 G 薬の作用

モルモット 番号	回腸 部位	処置	最大 収縮高	ヒスタミンによる収縮(収縮高(mm))									
				処置後									
				$300 \mu\text{M}$	$0.01 \mu\text{M}$	$0.03 \mu\text{M}$	$0.1 \mu\text{M}$	$0.3 \mu\text{M}$	$1 \mu\text{M}$	$3 \mu\text{M}$	$10 \mu\text{M}$	$30 \mu\text{M}$	$100 \mu\text{M}$
1	1	蒸留水	84	0	7	8	16	40	54	65	79	84	83
	2	D- $0.01 \mu\text{M}$	148	10	12	7	20	76	97	129	138	141	141
	3	D- $0.1 \mu\text{M}$	133	5	-3	1	8	16	41	98	139	154	160
	4	D- $1 \mu\text{M}$	162	-3	1	-5	4	4	15	10	62	101	143
2	1	D- $0.01 \mu\text{M}$	158	1	1	3	9	50	98	141	165	170	169
	2	D- $0.1 \mu\text{M}$	118	0	1	1	2	25	10	46	96	122	127
	3	D- $1 \mu\text{M}$	163	0	0	1	0	1	2	6	54	120	136
	4	蒸留水	165	1	3	5	23	66	113	158	171	171	165
3	1	D- $0.1 \mu\text{M}$	141	0	0	0	1	3	3	32	99	127	141
	2	D- $1 \mu\text{M}$	107	0	0	3	3	4	33	13	87	74	89
	3	蒸留水	119	2	11	53	20	60	98	115	121	121	121
	4	D- $0.01 \mu\text{M}$	113	1	4	13	27	53	84	105	117	115	115
4	1	D- $1 \mu\text{M}$	85	0	0	0	0	0	1	3	9	43	61
	2	蒸留水	69	3	1	3	9	40	55	61	72	71	69
	3	D- $0.01 \mu\text{M}$	114	1	3	21	21	52	65	80	104	113	114
	4	D- $0.1 \mu\text{M}$	111	0	0	0	1	1	1	31	59	119	122

この実験データは、実験計画的に言えば 1 次単位がラテン法格である分割実験といえる。

1 次単位：ラテン法格で割り付け

モルモット：変量効果

回腸部位：固定効果

D 薬の濃度：固定効果

2 次単位：回腸片ごとにランダムに実験されたと見なす

ヒスタミンの濃度：固定効果

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、D 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

のどちらであるかを知りたいのである。そして、平行移動ならば、D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D薬のモル濃度 ( $pA_2$ ) を推定したいとののである。

データを見たときに、ヒスタミンの濃度ごとに、回腸の収縮高を蒸留水と D 薬の濃度間で統計的に比較したくなるが、実験の目的には合致しない見方である。

---

## 第3節 統計ソフト JMP について

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は、StatView あるいは国産の Fisher が好み、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。

2000年6月より、JMPのバージョン4が出荷され、これまでのバージョン3に比べ大幅な機能アップが図られている。細かなことは省くが、これまでのバージョン3は、全体的には統計の入門者レベル、特殊用途では統計のプロフェッショナル向け仕様であると私は評価していた。

バージョン4は、日本語を変数名とすることもできるようになり、マトリクス言語も含むスクリプト言語の正式サポート、by ステートメント (機能)、MIXED モデル、非線形モデルのビジュアル化、田口メソッドも含む実験計画機能の充実も図られ、統計の入門者のみならず、SAS を自在に使う統計のプロフェッショナル、幅広いビジネス向けのデータ解析ツールとして活用できるようになったと評価している。

# 第3章 データの吟味

## 第1節 JMPへのデータの取り込み

MS-Word の表 2 のデータを JMP に取り込むためには幾つかの方法がある。1) MS-Word から直接コピー&ペースト JMP に張り込む方法、2) MS-Word から Excel に貼り付て Excel のリスト形式にしてから JMP で Excel ファイルをオープンする方法がある。前者は、JMP の変数名を付け替える必要があるが、後者の場合は Excel の 1 行目が JMP の変数名となる。ここでは、すでに JMP ファイル化した結果を使う。

図 3 JMP ファイルの取り込み

ID	部位	処置	X	0.01	0.03	0.1	0.3	1	3	10	30	100	300
1	1	1 蒸留水	84	0	7	8	16	40	54	65	79	84	83
2	1	2 D-0.01 μM	148	10	12	7	20	76	97	129	138	141	141
3	1	3 D-0.1 μM	133	5	-3	1	8	16	41	98	139	154	160
4	1	4 D-1 μM	162	-3	1	-5	4	4	15	10	62	101	143
5	2	1 D-0.01 μM	158	1	1	3	9	50	98	141	165	170	169
6	2	2 D-0.1 μM	118	0	1	1	2	25	10	46	96	122	127
7	2	3 D-1 μM	163	0	0	1	0	1	2	6	54	120	136
8	2	4 蒸留水	165	1	3	5	23	66	113	158	171	171	165
9	3	1 D-0.1 μM	141	0	0	0	1	3	3	32	99	127	141
10	3	2 D-1 μM	107	0	0	3	3	4	33	13	87	74	89
11	3	3 蒸留水	119	2	11	53	20	60	98	115	121	121	121
12	3	4 D-0.01 μM	113	1	4	13	27	53	84	105	117	115	115
13	4	1 D-1 μM	85	0	0	0	0	0	1	3	9	43	61
14	4	2 蒸留水	69	3	1	3	9	40	55	61	72	71	69
15	4	3 D-0.01 μM	114	1	3	21	21	52	65	80	104	113	114
16	4	4 D-0.1 μM	111	0	0	0	1	1	1	31	59	119	122

JMP ファイルからの入力、

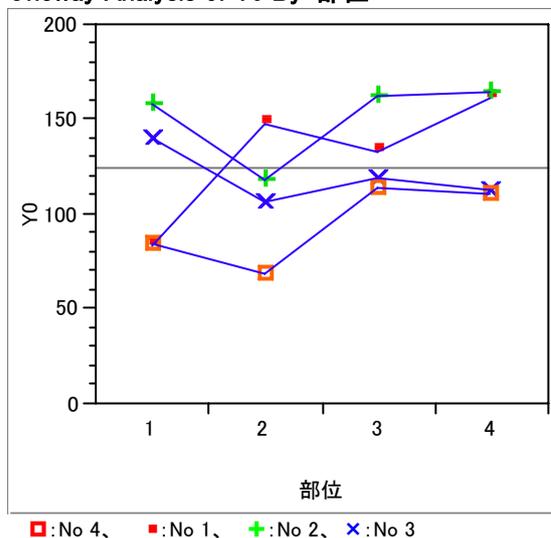
- 1) JMP メニュー「File」を選択する。
- 2) プルダウン・メニュー「Open」の選択する。
- 3) フォルダ「ANZ\_TKH\_Seminar」を開く。
- 4) ファイル「Drug\_Gjmp」を開く。

## 第2節 最大収縮高の検討

最大収縮高  $X$  は、D 薬の処置前の結果であり、これによりモルモット間、および部位間の違いを検討してみよう。このために、図 4 に示すように  $X$  軸に部位を、 $Y$  軸に  $Y_0$  をプロットして、同じモルモット ID を線で結んでみる。部位間に差はないようであるが、モルモット間には、個体間に差があるようだ。モルモットを固定効果と見なした分散分析の結果も示すが、グラフからの推測に一致することがわかる。

図 4 最大収縮高  $Y_0$  の変動

Oneway Analysis of  $Y_0$  By 部位



### Matching Fit

Source	SS	DF	MS	F Ratio	Prob>F
Whole Model	8591.500	6	1431.917	2.557	0.0995
部位	1951.250	3	650.417	1.161	0.3769
ID	6640.250	3	2213.417	3.952	0.0473
Error1	5040.250	9	560.028	.	.
Interaction	5040.250	9	560.028	.	.
Error2	0.000	0	.	.	.

- 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「部位」を **X, Factor** に、変数「 $Y_0$ 」を **Y, Response** に指定する。
- 3) **▼ Oneway Analysis ...** をクリックし、プルダウン・メニューより「Matching Column ...」を選択する。
- 4) Matching 変数に変数「ID」を選択する。
- 5)  $Y$  軸をダブルクリックして、軸の体裁を整える。
- 6) **▼ Matching Fit** をクリックすると分散分析表が表示される。

次に、モルモットを変量効果と見なした場合の解析結果を示す。その誤差を推定してみる。図 5 に「Fit Model」により計算した結果を示す。REML Variance Component Estimates よりモルモットの分散成分は、413.34 であり、その平方根から SD は 20.3 と推定される。標本間の誤差は Residual より、 $\sqrt{560.03} = 23.7$  であるから、同程度の誤差を持っていることがわかる。

図 5 分散成分の推定

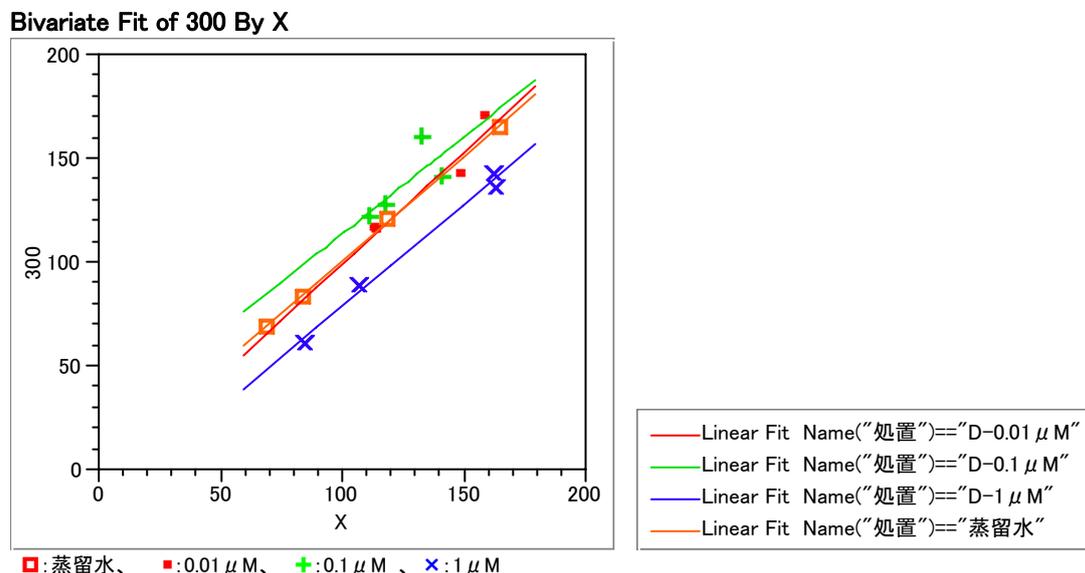
Analysis of Variance							
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio			
Model	6	6911.417	1151.90	2.0569			
Error	9	5040.250	560.03	Prob > F			
C. Total	15	13631.750		0.1590			
REML Variance Component Estimates							
Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper	Pct of Total	
ID&Random	0.7380834	413.34722	521.70731	91.222963	109860.24	42.465	
Residual		560.02778				57.535	
Total		973.375				100.000	
-2 LogLikelihood = 122.43105							
Effect Tests							
Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F	
ID&Random	4	3	9	4960.1667	2.9523	0.0907	Shrunk
部位	3	3	9	1951.2500	1.1614	0.3769	
Tests on Random effects refer to shrunken predictors rather than traditional estimates.							

### 第3節 処置後の反応

D 薬の存在下で、ヒスタミンを累積投与した場合に、最大収縮高が得られない場合が考えられる。そこで、最大収縮高 X を共変量と見なし、ヒスタミンの累積投与の最終用量  $300 \mu\text{M}$  での収縮高を Y として、処置の水準ごとにこの相関を調べてみよう。これは、拮抗薬 D の存在下では、最大収縮高 X に達しない場合もあるためである。このような場合には、Emax モデルでパラメータしている反応の飽和量が実験結果から得られないことになり、何らかの形で、飽和量をモデルに与えなければならなくなる。

図 6 に示すように、D 薬  $1.0 \mu\text{M}$  存在下では、反応が最大収縮高に達していないことがわかる。

図 6 最大収縮高 X と累積投与最終時の収縮高の関係



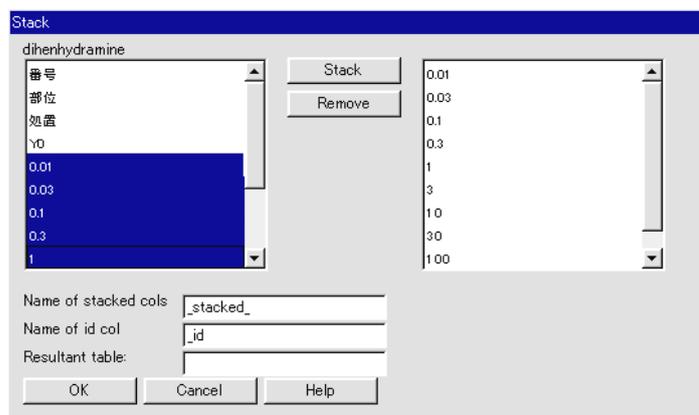
## 第4節 データの転置

JMP に限らず、統計ソフトが前提とする解析用のデータは、

モルモット 番号	回腸 番号	投与量	ヒスタミン量 $x$	反応 $y$
1	1	蒸留水	0.01	0
1	1	蒸留水	0.03	7
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
1	1	蒸留水	300	83
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
4	4	D-0.1 $\mu\text{M}$	300	122

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「Stack」があり、図 3 の列方向の列ごとのデータを行方向に逐次的に展開することができる。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「Stack」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 7 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 8 解析用の JMP データ

番号	部位	標本	処置	Y0	x	log_x	c	y	p
1	1	1	1.1 蒸留水	84	0.01	-2.000	3.000	0	0.0
2	1	1	1.1 蒸留水	84	0.03	-1.523	3.477	7	8.3
3	1	1	1.1 蒸留水	84	0.1	-0.523	4.000	8	9.5
4	1	1	1.1 蒸留水	84	0.3	-0.523	4.477	16	19.0
5	1	1	1.1 蒸留水	84	1	0.000	5.000	40	47.6
6	1	1	1.1 蒸留水	84	3	0.477	5.477	54	64.3
7	1	1	1.1 蒸留水	84	10	1.000	6.000	65	77.4
8	1	1	1.1 蒸留水	84	30	1.477	6.477	79	94.0
9	1	1	1.1 蒸留水	84	100	2.000	7.000	84	100.0
10	1	1	1.1 蒸留水	84	300	2.477	7.477	83	98.8
11	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	0.01	-2.000	3.000	10	6.8
12	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	0.03	-1.523	3.477	12	8.1
13	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	0.1	-1.000	4.000	7	4.7
14	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	0.3	-0.523	4.477	20	13.5
15	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	1	0.000	5.000	76	51.4
16	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	3	0.477	5.477	97	65.5
17	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	10	1.000	6.000	129	87.2
18	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	30	1.477	6.477	138	93.2
19	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	100	2.000	7.000	141	95.3
20	1	2	1.2 D-0.01 $\mu$ M	148	300	2.477	7.477	141	95.3
21	1	3	1.3 D-0.1 $\mu$ M	133	0.01	-2.000	3.000	5	3.8
22	1	3	1.3 D-0.1 $\mu$ M	133	0.03	-1.523	3.477	-3	-2.3

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)  $c = \log(x) + 2$

- 3) Y0 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。

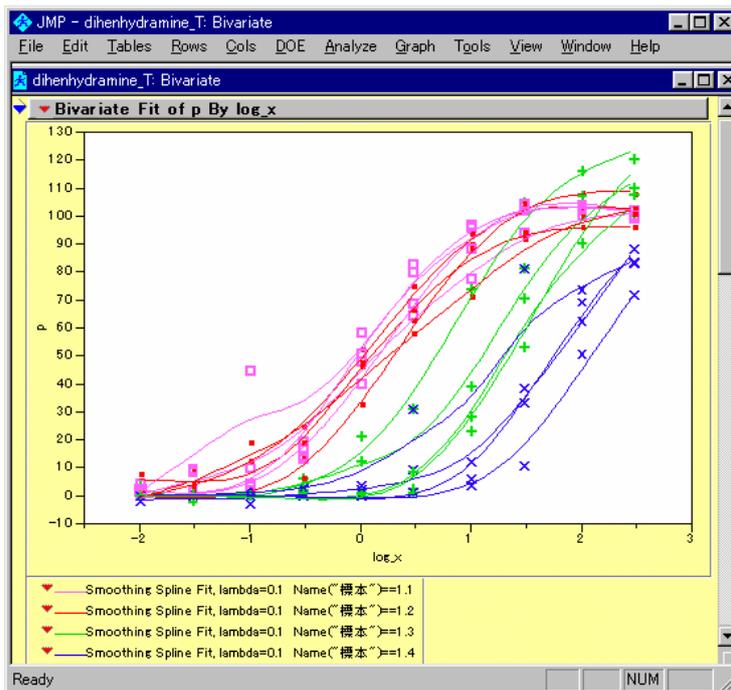
JMP ファイルからの入力、

- 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「Drug\_G\_T.jmp」を開く。

## 第5節 シグモイド曲線の形状

処置薬 D の検体ごとに、横軸にヒスタミンの対数用量  $\log(x)$  を、縦軸に収縮率 p とし、スプライン曲線を引いたのが 図 9 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。全体的には、それらのシグモイド曲線は D 薬存在下で右に平行移動していると判断される。D 薬  $1.0 \mu\text{M}$  存在下でも、ヒスタミンの濃度を更に増やせば最大収縮高に飽和すると見なせるであろう。

図 9 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「標本」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、λとして「.1」を選択する。

# 第4章 Emax モデル

## 第1節 非線形モデルの練習 1

第 3 回目のセミナーで使った非線形回帰の問題によって復習をしてみよう。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かったりする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 10 G 薬 0.1 $\mu$ M の 2 番目のデータ



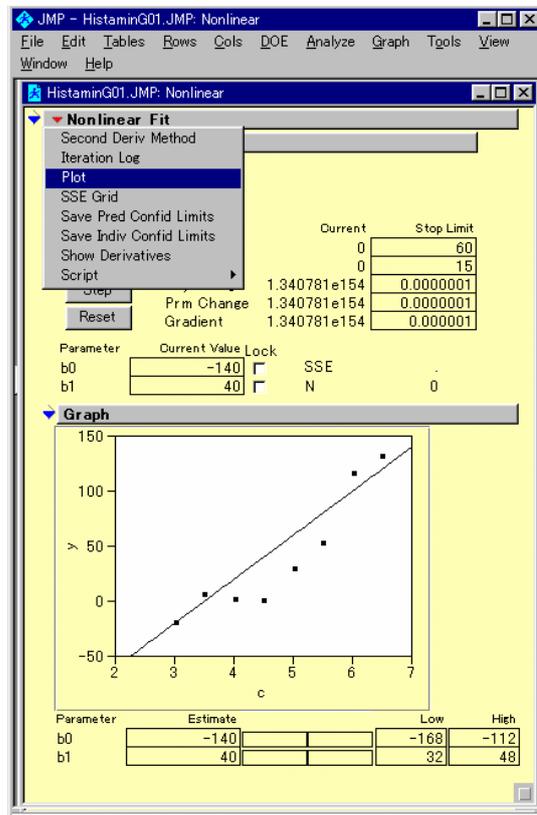
	Log_x	c	y	Linear	Omori_model	Emax_model
1	-2.00	3	-21.00	-20.00	0.28	0.30
2	-1.52	3.48	4.00	-0.80	0.46	1.32
3	-1.00	4	0.0	20.00	0.72	5.17
4	-0.52	4.48	-1.00	39.20	1.09	14.81
5	0.0	5	28.00	60.00	1.61	36.17
6	0.48	5.48	51.00	79.20	2.27	63.82
7	1.00	6	115.00	100.00	3.00	91.62
8	1.48	6.48	130.00	119.20	3.73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

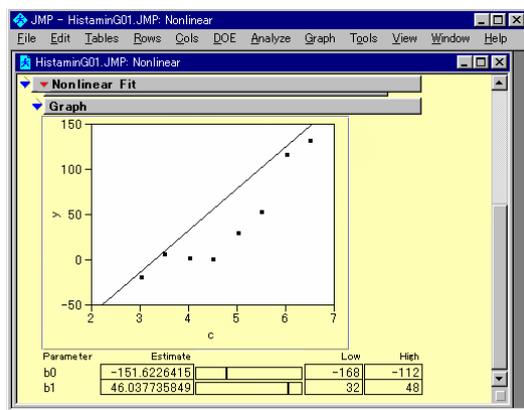
図 11 Nonlinear の起動



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 **Y, Response** に、変数 Linear を **Y, Predictor** に指定し、**OK** を押す。
- 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 12 手動による最小 2 乗法



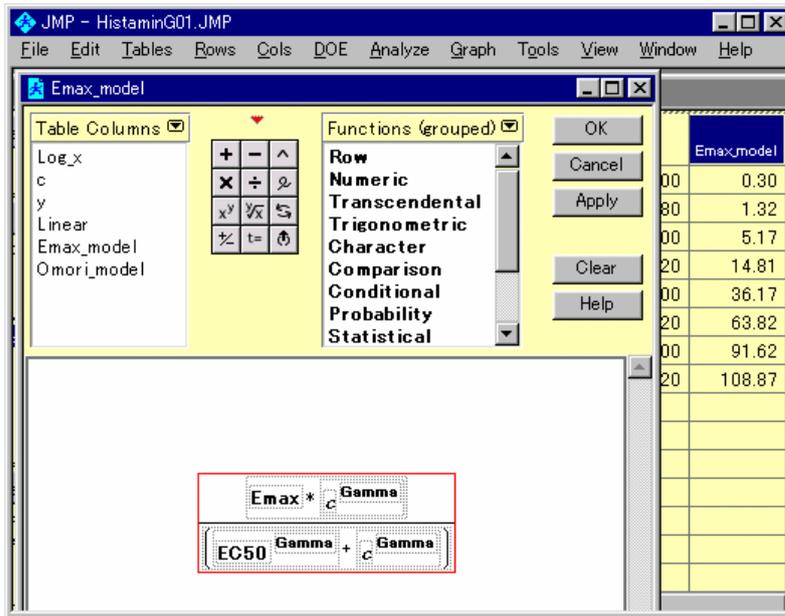
操作手順

- 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

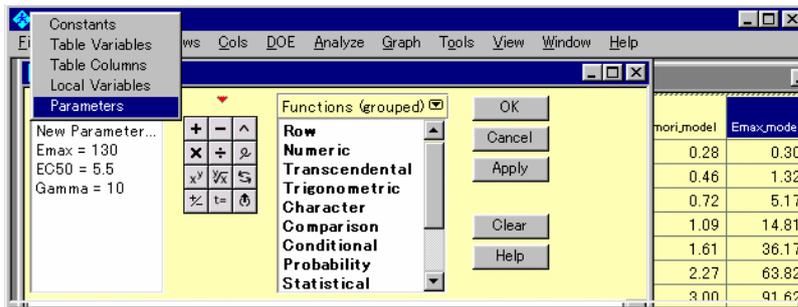
シグモイド Emax モデルは、図 13 に示すモデルで定義されている。練習用の JMP ファイルには、予め定義式が与えられている。推定したいパラメータとして、50%反応量：EC50、最大反応量：Emax、曲線の傾斜：Gamma の初期値は、図 14 に示すように予め与えられている。

図 13 シグモイド Eamx モデル式



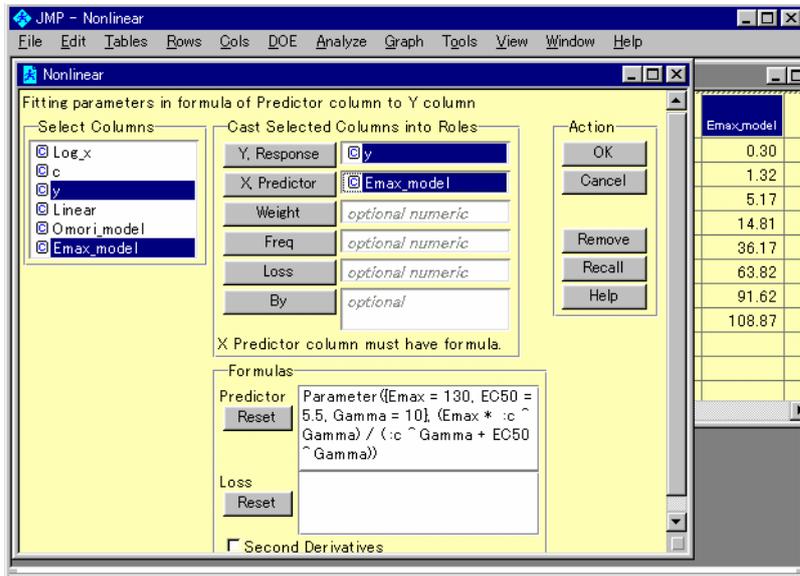
操作手順：変数を選択して、右クリックし、「Formula」を選択する。

図 14 初期値



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

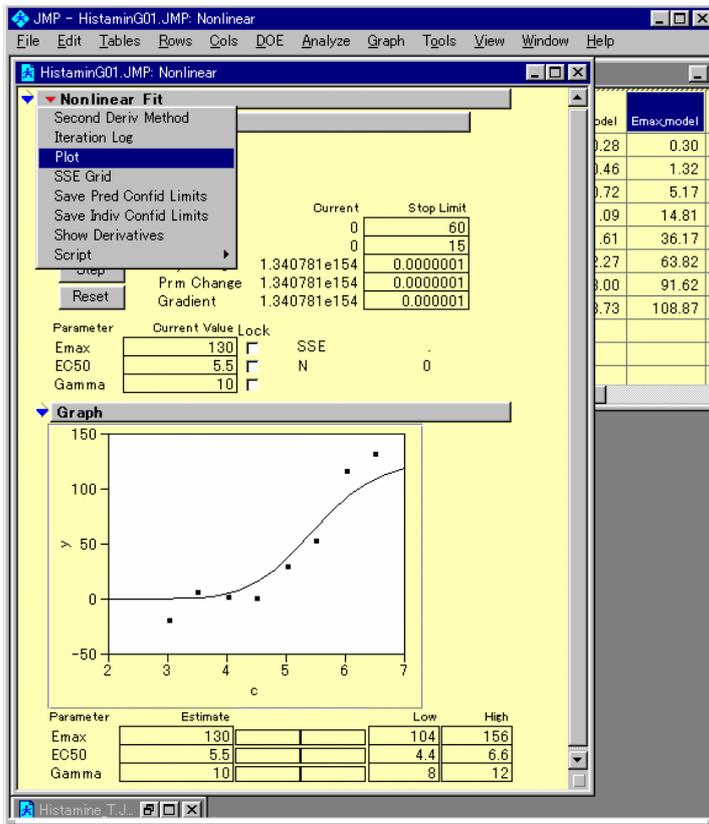
図 15 変数の指定



操作手順

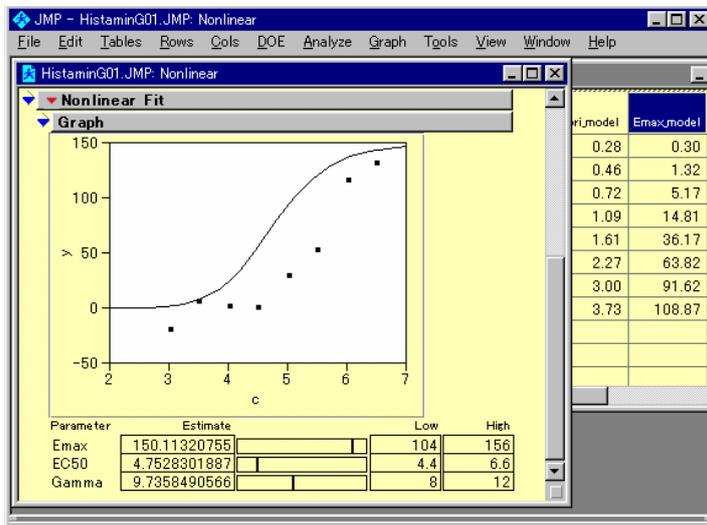
- 1) JMP のメニュー  
「Analyze」の選択
- 2) プルダウン・メニュー  
「Nonlinear Fit」の選択
- 3) 変数 y を **Y**,  
**Response** に、  
変数 Emax\_model を  
**Y, Predictor** に指定  
し、**OK** を押す。

図 16 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。

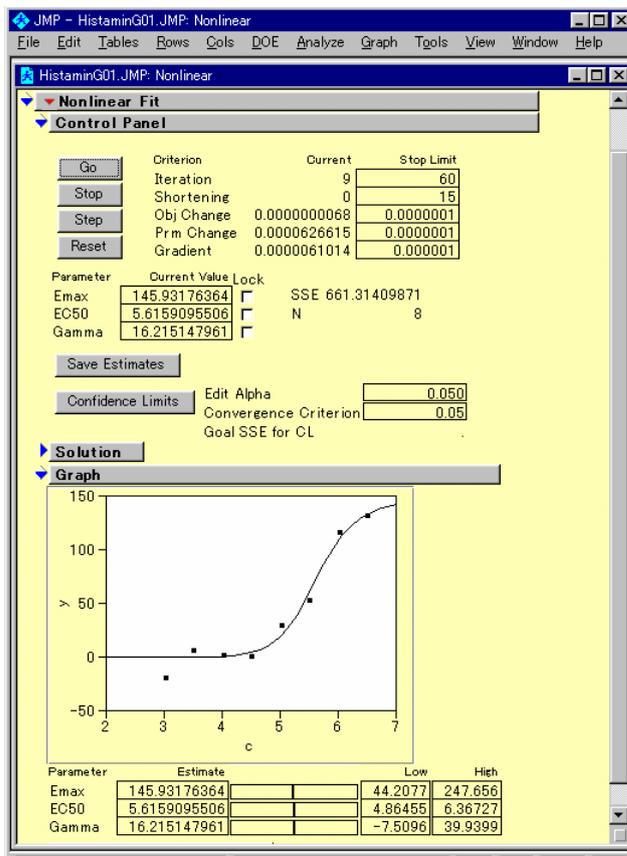
図 17 スクロールバーの移動による曲線の変化



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 18 逐次計算による逐次



操作手順

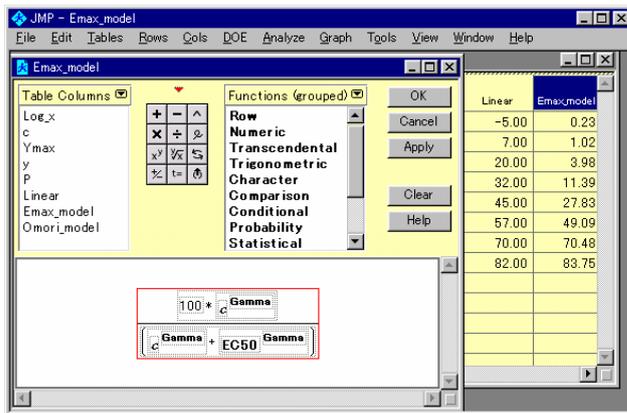
- 1) **Step** を何回も押しながら、  
SSE が減少する過程と  
図の当てはまり状況を  
確認してみよう。
- 2) くだびれたら、  
**Go** を押して御覧なさい。

## 第3節 最大収縮に対する比率

G 薬の最大用量 1.0 $\mu$ M の場合に、ヒスタミンの濃度が 30 $\mu$ 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 Emax の推定が過小評価される。そこで、パラメータ Emax 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、Emax 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。

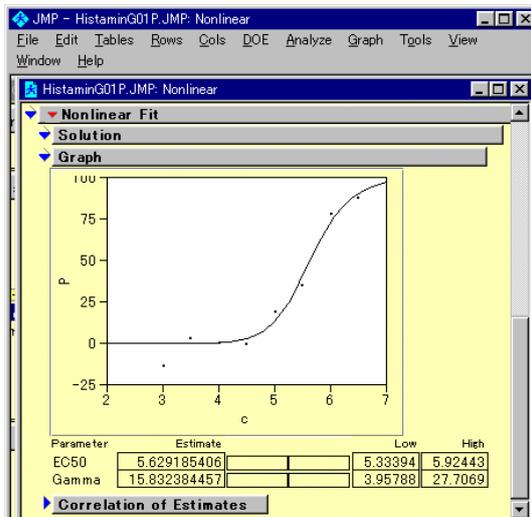
図 19 収縮率に対する Emax モデル



操作手順：

- 1) フォルダー  
「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 **Y, Response** に、  
変数 Emax\_model を **Y, Predictor** に  
指定し、**OK** を押す。
- 4) **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4節 Emax モデル式の変形

図 19 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 :  $\beta_1$

$\gamma$  :  $\beta_2$

Emax :  $\beta_3$

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章 EC50 の一括計算

## 第1節 実験結 EC50 の一括計算

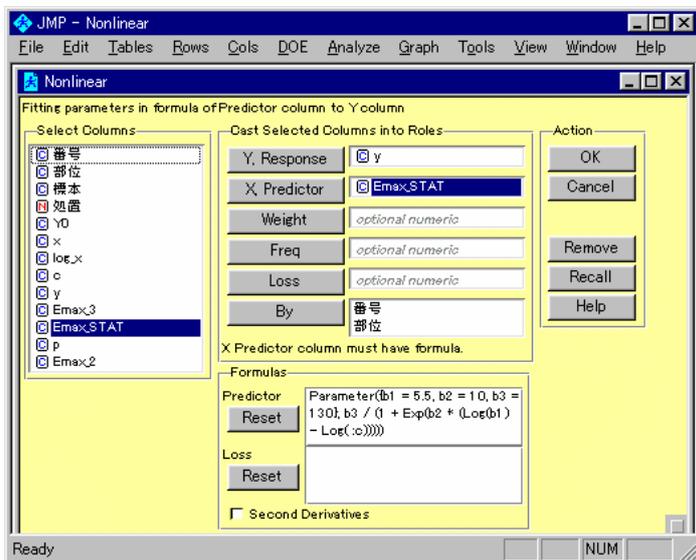
これまで、シグモイド Emax モデル当てはめ EC50 の推定の練習を行ってきたのであるが、JMP のバージョン 4 から、実験データすべてを一括して計算する機能が追加された。これを用いて ED50 を半自動的に求めてみよう。図 22 に By 機能を用いた一括処理の指定方法を示す。

図 21 パラメータの重複を除いた Emax モデル式 (式 2)

番号	部位	標本	処置	Y0	x	log_x	c	y	Emax3	Emax_STAT	p	Emax2
1	1	1	1.1 蒸留水	84	0.01	-2.000	3.000	0	0.3	0.3	0.0	5.9
2	1	1	1.1 蒸留水	84	0.03	-1.523	3.477	7	1.3	1.3	8.3	13.9
3	1	1	1.1 蒸留水	84	0.1	-1.000	4.000	8	5.2	5.2	9.5	28.2
4	1	1	1.1 蒸留水	84	0.3	-0.523	4.477	16	14.7	14.7	19.0	44.6
5	1	1	1.1 蒸留水	84	1	0.000	5.000	40	36.2	36.2	47.6	61.9
6	1	1	1.1 蒸留水	84	3	0.477	5.477	54	63.6	63.6	64.3	74.4
7	1	1	1.1 蒸留水	84	10	1.000	6.000	65	91.6	91.6	77.4	83.8
8	1	1	1.1 蒸留水	84	30	1.477	6.477	79	108.8	108.8	94.0	89.4
9	1	1	1.1 蒸留水	84	100	2.000	7.000	84	119.3	119.3	100.0	93.3
10	1	1	1.1 蒸留水	84	300	2.477	7.477	83	124.2	124.2	98.8	95.5
11	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	0.01	-2.000	3.000	10	0.3	0.3	6.8	5.9
12	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	0.03	-1.523	3.477	12	1.3	1.3	8.1	13.9
13	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	0.1	-1.000	4.000	7	5.2	5.2	4.7	28.2
14	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	0.3	-0.523	4.477	20	14.7	14.7	13.5	44.6
15	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	1	0.000	5.000	76	36.2	36.2	51.4	61.9
16	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	3	0.477	5.477	97	63.6	63.6	65.5	74.4
17	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	10	1.000	6.000	129	91.6	91.6	87.2	83.8
18	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	30	1.477	6.477	138	108.8	108.8	93.2	89.4
19	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	100	2.000	7.000	141	119.3	119.3	95.3	93.3
20	1	2	1.2 D-0.01 μM	148	300	2.477	7.477	141	124.2	124.2	95.3	95.5
21	1	3	1.3 D-0.1 μM	133	0.01	-2.000	3.000	5	0.3	0.3	3.8	5.9
22	1	3	1.3 D-0.1 μM	133	0.03	-1.523	3.477	-3	1.3	1.3	-2.3	13.9
23	1	3	1.3 D-0.1 μM	133	0.1	-1.000	4.000	1	5.2	5.2	0.8	28.2
24	1	3	1.3 D-0.1 μM	133	0.3	-0.523	4.477	8	14.7	14.7	6.0	44.6

Drug\_G\_Emax.JMP ファイルを開く。Emax\_STAT の計算式を確認して見なさい。

図 22 By の機能

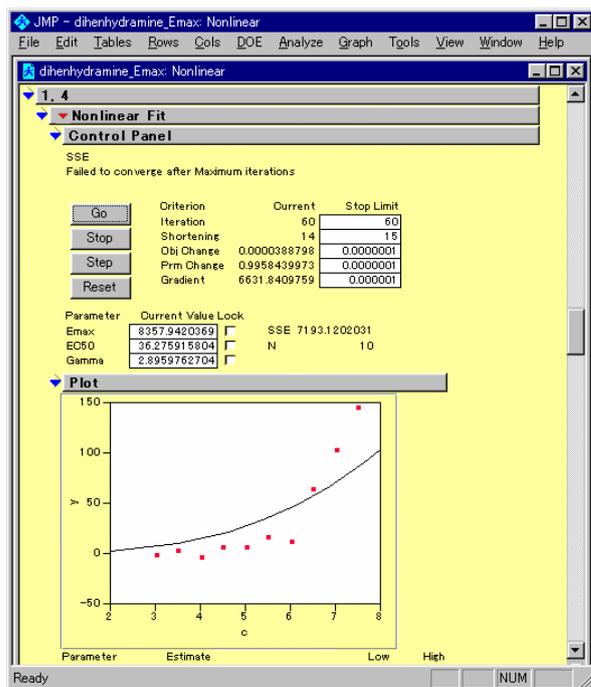


操作手順

- 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 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。

最大収縮高パラメータとするモデルは、D薬 1.0 μ Mのように累積投与により飽和しない場合があり、非線型問題では解が求まらないことが発生する。

図 23 解が求まらない例



Iteration が 60 回と事前に定められた打ち切り回数に達している。

グラフからも当てはめが失敗していることが明らかである。

これを避けるために、最大収縮高  $Y_0$  を 100% と基準化し、パラメータを 1 つ減らしたモデルを使えば安定して解が求めることができる。図 23 の例は、モルモットの No.1、回腸 No.4 の例である。この例だけ抜き出したのが図 24 である。

図 24 サブセット化

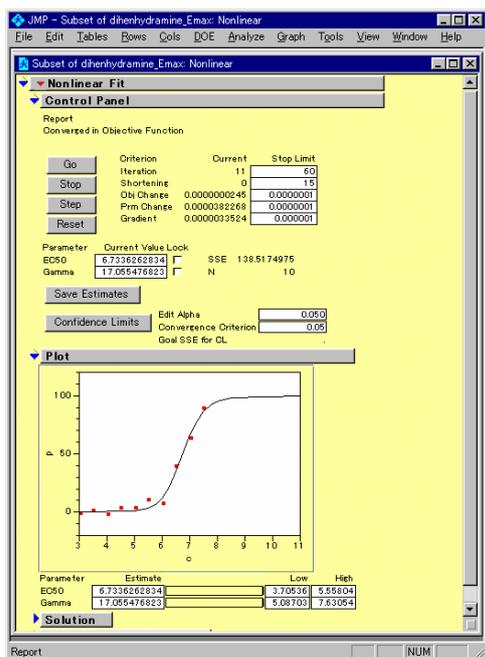
Subset of dihe	番号	部位	処置	log_x	c	y	Emax_3	p	Emax_2	
Source	1	1	4	D-1 μM	-2.000	3.000	-3	0.3	-1.9	5.9
	2	1	4	D-1 μM	-1.823	3.477	1	1.3	0.6	13.9
Columns (0/0)	3	1	4	D-1 μM	-1.000	4.000	-5	5.2	-3.1	28.2
	4	1	4	D-1 μM	-0.523	4.477	4	14.7	2.5	44.6
Rows	5	1	4	D-1 μM	0.000	5.000	4	36.2	2.5	61.9
All Rows	6	1	4	D-1 μM	0.477	5.477	15	63.6	9.3	74.4
Selected	7	1	4	D-1 μM	1.000	6.000	10	91.6	6.2	83.8
Excluded	8	1	4	D-1 μM	1.477	6.477	62	108.8	38.3	89.4
Hidden	9	1	4	D-1 μM	2.000	7.000	101	119.3	62.3	93.3
Labelled										

操作手順

- 1) Drug\_G\_Emax.JMP  
モルモット番号 1、  
部位番号 4 を選択する。
- 2) JMP のメニュー「Table」の  
選択プルダウン・メニューから  
「Subset」を選択する。
- 3) うまく出来ない場合は、  
「Subset...」ファイルを開く

次に、図 25 に示すようにヒスタミンの累積投与による回腸の収縮高  $y$  を最大収縮高  $Y_0$  の比率  $p$  にし、シグモイド曲線を当てはめてみよう。この場合のパラメータは、50 パーセント反応量と曲線の立ち上がり角度の 2 つとなる。最大反応は、100 パーセントに固定され、シグモイド曲線は、0 パーセントから立ち上がり 100 パーセントで飽和することになる。

図 25 収縮率に対するシグモイド曲線



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。
- 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。
- 5) **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ぐわいを  
楽しんで見なさい。
- 6) くたびれたら、**Go** を押して御覧なさい。

全部で 16 標本について逐次的に EC50 を求め、推定されたパラメータを

## 第2節 モルモットを変量効果とした解析

表 3 は 4×4 のラテン方格のデザインであるが、モルモットは、任意に選ばれ、たまたま番号が付けられているだけであり、モルモット間の差は誤差と考えるべき因子、変量因子、あるいは変量 (random) 効果、である。JMP のバージョン 4 より、これらの変量効果と固定効果を複合した線形混合モデルの機能が拡充された。すでに、図 5 で、この機能を使っているのが、逐次、解説する。

図 28 線形混合モデルによるラテン方格の解析

操作手順

- 1) 「Drug\_GEC50.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  
「Fit Y by X」の選択
- 4) 変数「Emx2\_EC50」を **Y** に。
- 5) 変数「ID」を **Add** し、  
「ID」を選択しておく  
**Attributes** をクリックし、  
「Random Effect」を選択。
- 6) 変数「部位」および「処置」を  
**Add** する。
- 7) **Run Model** をクリック。

結果を図 29 に示す。b) REML Variance Component Estimates から、全体の分散が 0.0381553、個体間分散が 0.0127447、誤差分散 0.0254106 となり、個体間分散が誤差分散よりも小さく、モルモットに起因する EC50 の差は見出せない。最大収縮高  $Y_0$  には、よるでモルモット間の違いが認められていたが、ヒスタミンの累積投与時の反応は、モルモットによらず、均一と考えられた。

c) Effect Tests から、回腸の部位の p 値が 0.0639 であるので、Lsmean のプロットをみると、真中の 2 と 3 が低めになっているが、ラテン方格で割り付けているので、処置の差に対し影響は及ぼしていない。処置、G 薬の低用量は蒸留水と同様の EC50 となり、中用量、高用量とほぼ直線的な明らかな増加とみなせる。

図 29 EC50 についての分散分析

a) Response Emax2\_EC50

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	8.3623494	0.929150	36.5654
Error	6	0.1524638	0.025411	Prob > F
C. Total	15	8.5910452		0.0001

b) REML Variance Component Estimates

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper	Pct of Total
ID&Random	0.5015491	0.0127447	0.0190973	0.0024064	29.480978	33.402
Residual		0.0254106				66.598
Total		0.0381553				100.000

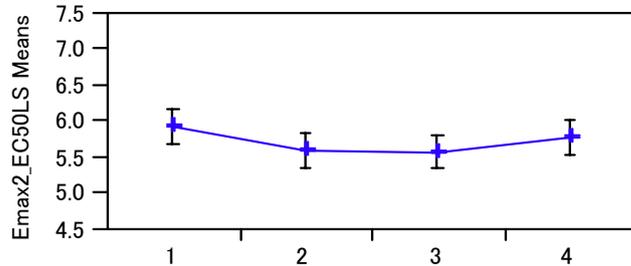
-2 LogLikelihood = 9.6525781

c) Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
ID&Random	4	3	6	0.1529362	2.0062	0.2147 Shrunken
部位	3	3	6	0.3202063	4.2004	0.0639
処置	3	3	6	7.8892069	103.4896	<.0001

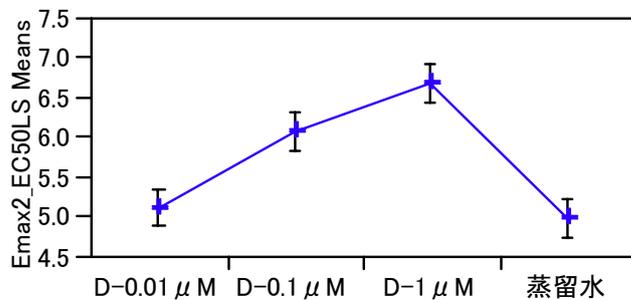
d) LS Means Plot

部位



部位

処置

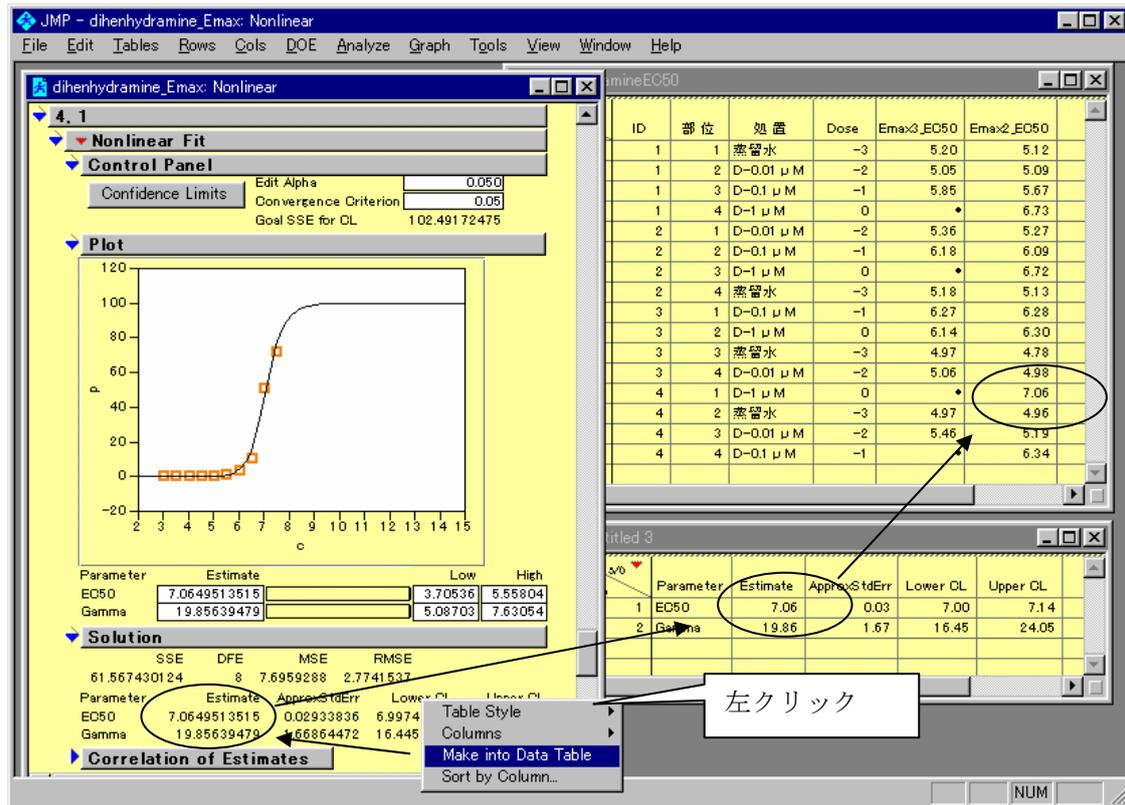


処置

## 第3節 G 薬の用量反応

に示すように逐次 JMP ファイルに書き出す。

図 26 推定されたパラメータのファイルへの出力



## 第4節 EC50 についての用量反応

推定された EC50 を実験計画の表 1 の形式にまとめてみよう。データ量が少ないので再入力しても大したことは無いのであるが、できるだけカット&ペーストで表 1 を表 3 の MS ワードに張り込みたい。

「Table」メニューにある「Split」は、縦に並んでいるデータをグループごとに分割して横方向並べなおしてくれる。この方法で、モルモットごと、部位ごとの 4×4 の表を

作成し、これをコピーし、MS ワードに貼り付け、さらに表 1 をコピーした表 3 に貼り付ける、といった方法が生産的でミスも少ない。

図 27 EC50 の推定値、および部位別および処置別への並べ替え

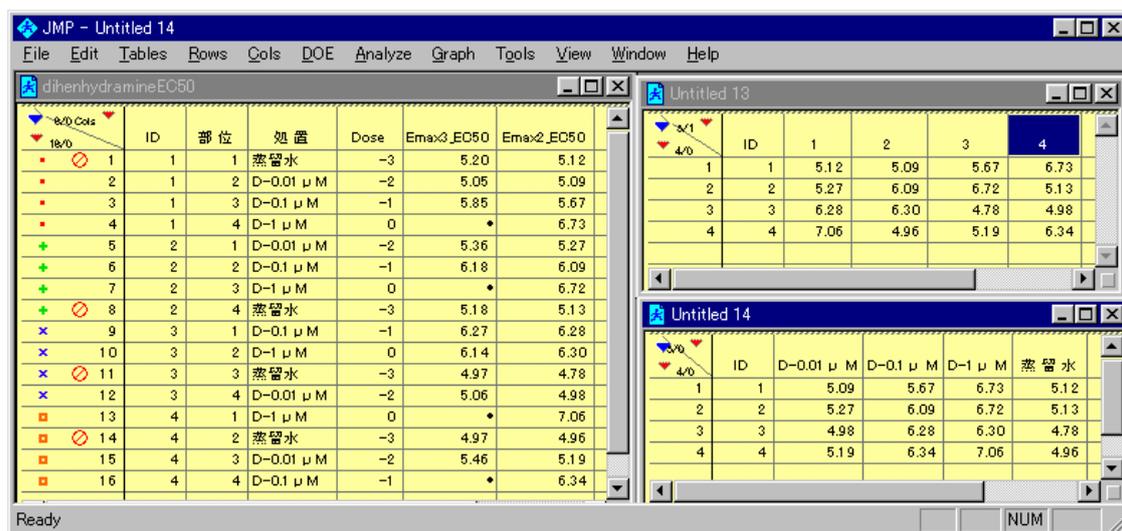


表 3 実験結果（ラテン方格）

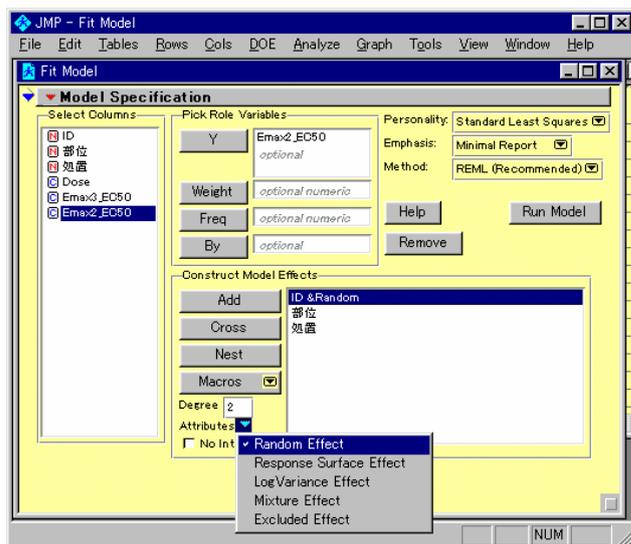
実験日	モルモット 番号	標本			
		胃側 部位 1	<----->		肛門側 部位 4
1	1	A: 水 5.12	B: 0.01 μM 5.09	C: 0.1 μM 5.67	D: 1 μM 6.73
1	2	B: 0.01 μM 5.27	C: 0.1 μM 6.09	D: 1 μM 6.72	A: 水 5.13
2	3	C: 0.1 μM 6.28	D: 1 μM 6.30	A: 水 4.78	B: 0.01 μM 4.98
2	4	D: 1 μM 7.06	A: 水 4.96	B: 0.01 μM 5.19	C: 0.1 μM 6.34

## 第5節 モルモットを変量効果とした解析

表 3 は 4×4 のラテン方格のデザインであるが、モルモットは、任意に選ばれ、たまたま番号が付けられているだけであり、モルモット間の差は誤差と考えるべき因子、変量因子、あるいは変量 (random) 効果、である。JMP のバージョン 4 より、これら

の変量効果と固定効果を複合した線形混合モデルの機能が拡充された。すでに、図 5 で、この機能を使っているのであるが、逐次、解説する。

図 28 線形混合モデルによるラテン方格の解析



操作手順

- 1) 「Drug\_GEC50.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  
「Fit Y by X」の選択
- 4) 変数「Emx2\_EC50」を **Y** に。
- 5) 変数「ID」を **Add** し、  
「ID」を選択しておき  
**Attributes** をクリックし、  
「Random Effect」を選択。
- 6) 変数「部位」および「処置」を  
**Add** する。
- 7) **Run Model** をクリック。

結果を図 29 に示す。 b) REML Variance Component Estimates から、全体の分散が 0.0381553、個体間分散が 0.0127447、誤差分散 0.0254106 となり、個体間分散が誤差分散よりも小さく、モルモットに起因する EC50 の差は見出せない。最大収縮高  $Y_0$  には、よるでモルモット間の違いが認められていたが、ヒスタミンの累積投与時の反応は、モルモットによらず、均一と考えられた。

c) Effect Tests から、回腸の部位の p 値が 0.0639 であるので、Lsmean のプロットをみると、真中の 2 と 3 が低めになっているが、ラテン方格で割り付けているので、処置の差に対し影響は及ぼしていない。処置、G 薬の低用量は蒸留水と同様の EC50 となり、中用量、高用量とほぼ直線的な明らかな増加とみなせる。

図 29 EC50 についての分散分析

a) Response Emax2\_EC50

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	8.3623494	0.929150	36.5654
Error	6	0.1524638	0.025411	Prob > F
C. Total	15	8.5910452		0.0001

b) REML Variance Component Estimates

Random Effect	Var Ratio	Var Component	Std Error	95% Lower	95% Upper	Pct of Total
ID&Random	0.5015491	0.0127447	0.0190973	0.0024064	29.480978	33.402
Residual		0.0254106				66.598
Total		0.0381553				100.000

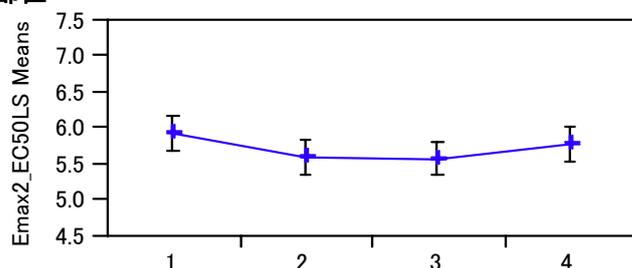
-2 LogLikelihood = 9.6525781

c) Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	Sum of Squares	F Ratio	Prob > F
ID&Random	4	3	6	0.1529362	2.0062	0.2147 Shrunken
部位	3	3	6	0.3202063	4.2004	0.0639
処置	3	3	6	7.8892069	103.4896	<.0001

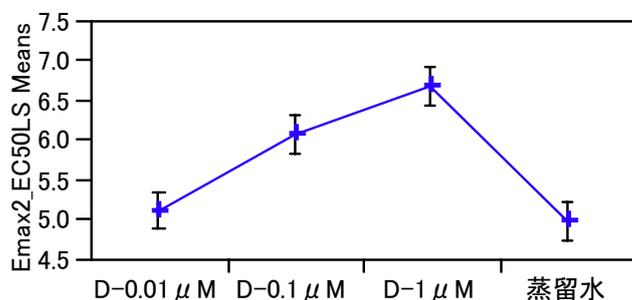
d) LS Means Plot

部位



部位

処置

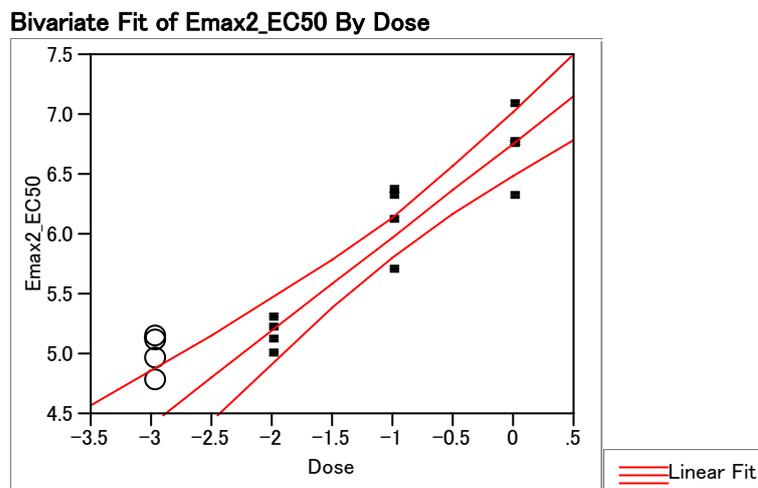


処置

## 第6節 G 薬の用量反応

分散分析の結果から、16 標本の EC50 は、完全ランダム実験の結果として取り扱ってよいと結論される。そこで、蒸留水を除く 3 用量の EC50 について回帰直線を引くことにする。

図 30 用量反応直線



### b) Linear Fit

$$\text{Emax2\_EC50} = 6.7623448 + 0.7839957 \text{ Dose}$$

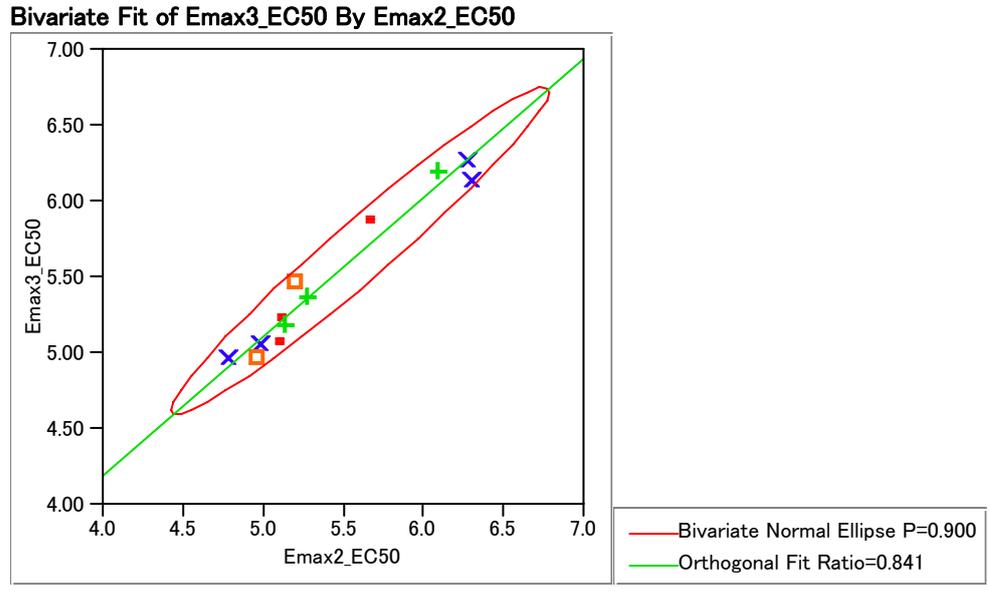
### Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	0.08242394	0.082424	1.1957
Pure Error	9	0.62042736	0.068936	Prob > F
Total Error	10	0.70285130		0.3026
				Max RSq
				0.8896

### Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	6.7623448	0.121007	55.88	<.0001
Dose	0.7839957	0.093732	8.36	<.0001

図 31 生データから求めた EC50 とパーセント変換後の EC50 の比較



**Orthogonal Regression**

Variable	Mean	Std Dev	Variance Ratio	Correlation
Emax2_EC50	5.610558	0.548945	0.841011	0.9722
Emax3_EC50	5.673037	0.503419		
Intercept	Slope	LowerCL	UpperCL	Alpha
0.527783	0.917066	0.717568	1.172029	0.05000

# 第6章 ラテン方格

---

## 第1節 4×4 のラテン方格の種類

表 1 で示されたラテン方格は、整理すると次のようである。

表 4 実験に用いた 4×4 のラテン方格

	1	2	3	4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C

このラテン方格は、A、B、C、D の順番を規則的にずらして作られている。行方向、および列方向でバランスが取れているが、A の右隣がかならず B となり、その反対の並びがないという欠点を持っている。表 5 のように一部を入れ替えてみよう。行方向、および列方向でバランスもとれ、隣り合う A、B の順番もバランスが取れるようになった。

表 5 改良した 4×4 のラテン方格

	1	2	3	4
1	A	B	C	D
2	B	<del>EA</del>	D	<del>AC</del>
3	C	D	A	B
4	D	<del>AC</del>	B	<del>EA</del>

更に因子を割り振ってみよう。

表 6 改良した 4×4 のグレコ・ラテン方格

	1	2	3	4
1	A $\alpha$	B $\beta$	C $\gamma$	D $\delta$
2	B $\delta$	A $\gamma$	D $\beta$	C $\alpha$
3	C $\beta$	D $\alpha$	A $\delta$	B $\gamma$
4	D $\gamma$	C $\delta$	B $\alpha$	A $\beta$

表 7 超グレコ・ラテン 4×4 のラテン方格

	1	2	3	4
1	A $\alpha$ い	B $\beta$ ろ	C $\gamma$ は	D $\delta$ に
2	B $\delta$ は	A $\gamma$ に	D $\beta$ い	C $\alpha$ ろ
3	C $\beta$ に	D $\alpha$ は	A $\delta$ ろ	B $\gamma$ い
4	D $\gamma$ ろ	C $\delta$ い	B $\alpha$ に	A $\beta$ は

## 第2節 良い実験計画とは

良い実験計画の条件は、因子間のバランスが取れていることである。別の言い方をすれば、「互いに直交している」ことである。4×4 のラテン方格のように各因子が 4 水準である場合には、簡便的に「相関がゼロである」を条件にすることができる。

表 7 の超グレコ・ラテン方格と実験に用いた計画を含めて表 8 にデザイン行列として整理した。それらの変数間の相関行列を表 9 示す。これによると、超グレコ・ラテン方格の変数 (A, B, C, D, E) 間の相関係数は、すべてゼロであるが、実際の実験につかた変数 Z と C の間の相関は 0.6、Z と E では 0.4 となり、互いに直交している。

さらに詳細に見ると、Z と D の間は相関係数がゼロであるが、バランスが崩れている。図 32 に示すように (A, B, C, D, E) 間では、2 つの因子の組み合わせにより 16 個のデータが均一に配置されているが、Z と D の間では、不均衡となっている。

表 8 ラテン方格の試験デザイン行列

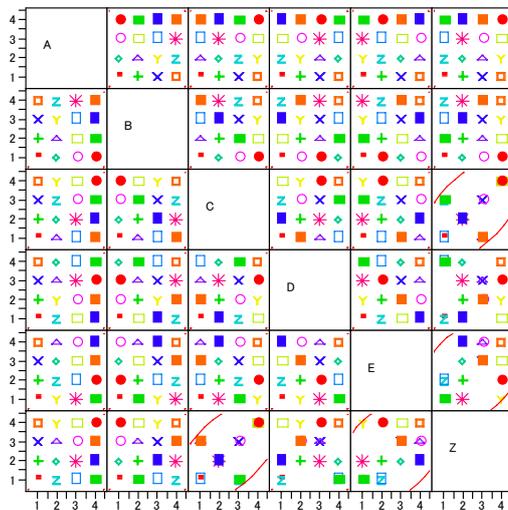
No.	A : 行	B : 列	C : ABC	D : $\alpha\beta\gamma$	E : いろは	Z : 123
1	1	1	1	1	1	1
2	1	2	2	2	2	2
3	1	3	3	3	3	3
4	1	4	4	4	4	4
5	2	1	2	4	3	2
6	2	2	1	3	4	3
7	2	3	4	2	1	4
8	2	4	3	1	2	1
9	3	1	3	2	4	3
10	3	2	4	1	3	4
11	3	3	1	4	2	1
12	3	4	2	3	1	2
13	4	1	4	3	2	4
14	4	2	3	4	1	1
15	4	3	2	1	4	2
16	4	4	1	2	3	3

(A, B, C, D, E) が超グレコ/ラテン方格、(A, B, Z) が実際の割り付け。

表 9 相関行列

	A	B	C	D	E	F
A	1	0	0	0	0	0
B	0	1	0	0	0	0
C	0	0	1	0	0	0.6
D	0	0	0	1	0	0
E	0	0	0	0	1	0.4
Z	0	0	0.6	0	0.4	1

図 32 割付のバランスの良さ



## 第3節 JMP で任意のラテン方格を作る

JMP には、実験デザインを作成する機能を持っている。その機能を使うと、超グレコ・ラテン方格を容易に作成することができる。実際にはラテン方格であっても、この機能を使うことにより、性質の良いラテン方格を作ることができる。

図 33 JMP / DOE による 3 因子 4 水準の実験計画

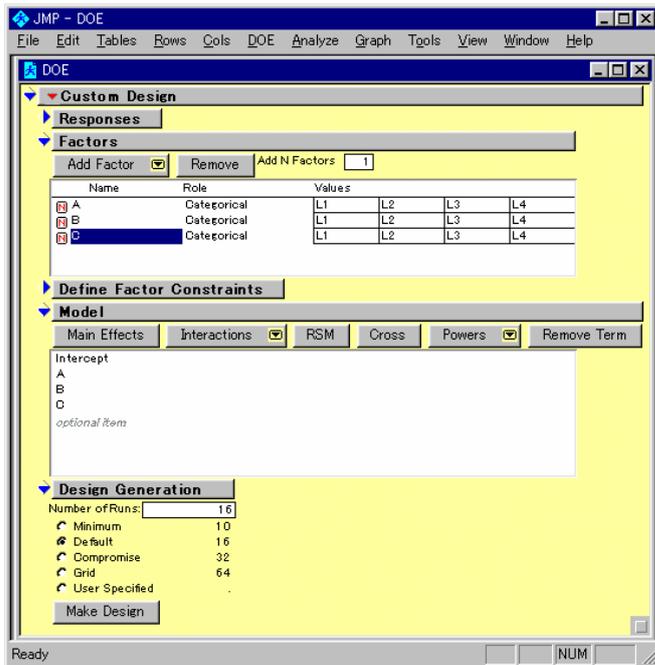


図 34 作成された試験デザイン

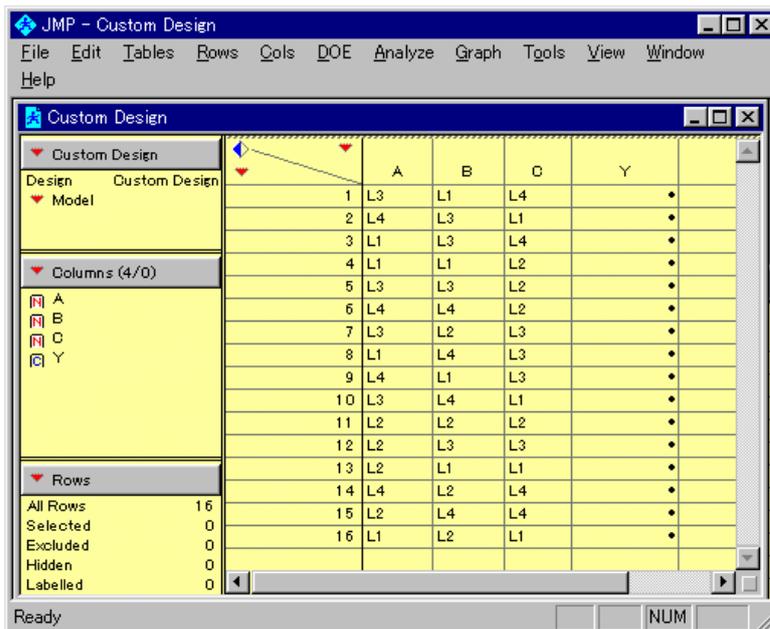


図 35 ラテン方格状に並べ換えた実験計画

The screenshot shows the JMP software interface with a table of experimental design data. The table has 4 rows and 5 columns. The columns are labeled 'A', 'L1', 'L2', 'L3', and 'L4'. The rows are numbered 1 to 4. The data is as follows:

	A	L1	L2	L3	L4
1	L1	L2	L1	L4	L3
2	L2	L1	L2	L3	L4
3	L3	L4	L3	L2	L1
4	L4	L3	L4	L1	L2

The interface also shows a sidebar with 'Source', 'Columns (5/0)', and 'Rows' sections. The 'Rows' section indicates 'All Rows' as 4 and 'Selected' as 0. The status bar at the bottom shows 'Ready' and 'NUM'.