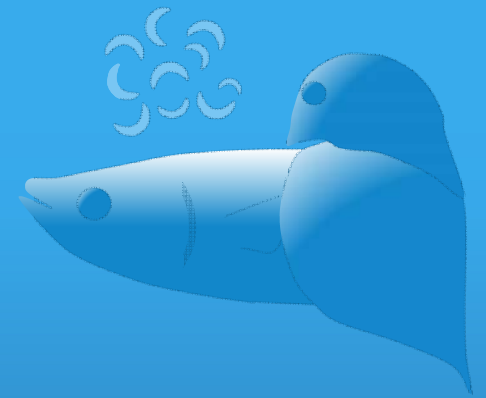


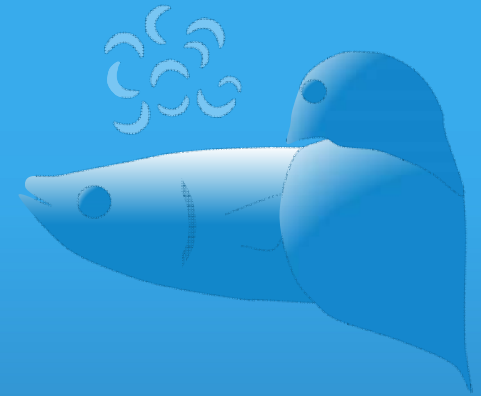


生態毒性試験毒性値算出に当たっての 統計的な留意点について

(独) 国立環境研究所
小田重人

平成26年2月10日 津田ホール
平成26年2月14日 新梅田研修センター

はじめに



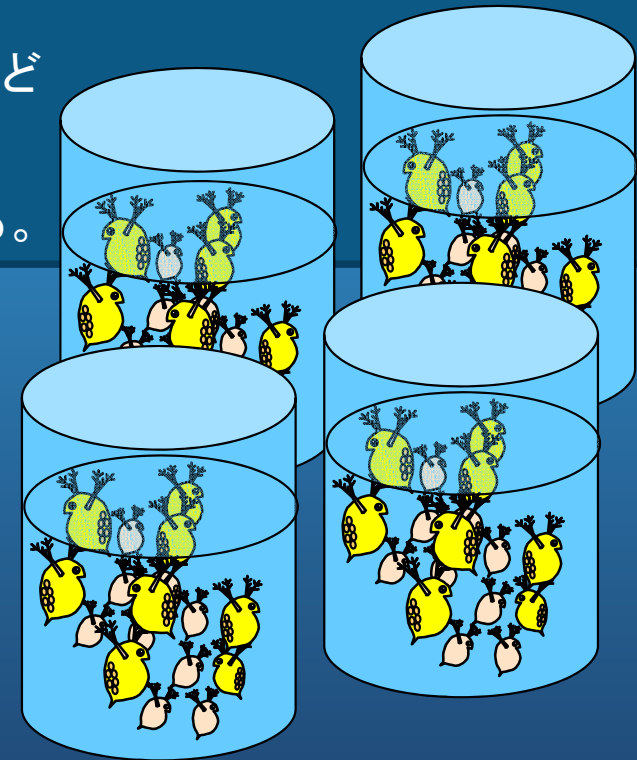
- OECD TGの改訂
 - TG 211
 - 試験個体の死亡を伴う産仔データの新たな扱い方
 - TG 210
 - Annex 5, “Statistical guidance for NOEC determination”
 - Annex 6, “Statistical guidance for regression estimates”
- 生態毒性試験法
 - 試験生物の配置とデータ構造の特徴
 - 処理-容器-個体
 - 解析の単位とプーリング
 - 容器ごとの平均値の使用
 - 容器を無視したデータのプーリング

試験生物の配置とデータ構造

- 多くの生態毒性試験では、処理-容器-複数個体といったように試験生物を入れ子状に配置している。
- 得られるデータは、入れ子状になることもあれば、容器ごとの値や平均となってしまうものもある。
 - 試験終了時の体長、体重、ふ化、死亡、羽化など
 - 産卵数、産仔数など
- 容器あたり1個体で完全に個体識別できる配置もある。



処理（容器＝個体）



処理（容器（複数個体））

入れ子構造を持つデータの解析

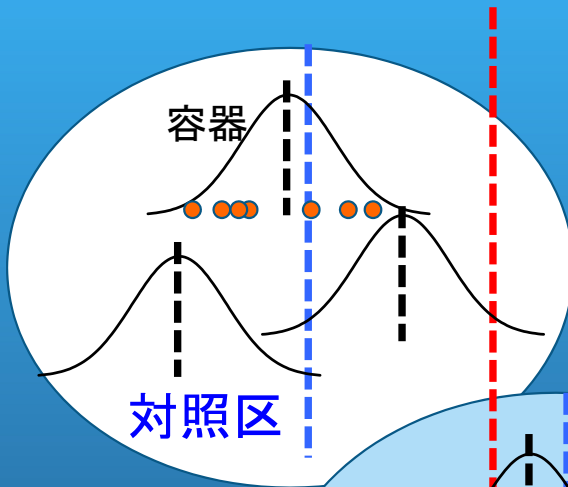


- 生態毒性試験法により得られるデータの多くは、処理-容器-個体といった入れ子構造を持っている
 - 解析方法としてはNested ANOVAと呼ばれる入れ子構造を考慮した分散分析を用いることが多い
- OECD TGでは、「解析の単位を容器とする」との記述がある（TG 210など）
 - 個体データが得られていても、容器ごとの平均を用いる
 - 複数個体の容器ごとのデータ（個体識別できない）
 - TG 211半止水式曝露では容器と個体の区別なし

- 容器ごとの平均を扱うこと
- 容器を無視してプールすること

分散分析による解析

入れ子構造を持つ分散分析 (Nested ANOVA)



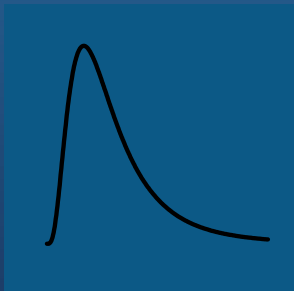
変動要因	df	SS	用いる平均	MS	F	Expected MS
処理間 A	$a-1$	SS_A		$\frac{SS_A}{(a-1)}$	$\frac{MS_A}{MS_{B(A)}}$	$\sigma_e^2 + n\sigma_{B(A)}^2 + \frac{bn \sum (A_i - \bar{A})^2}{a-1}$
容器間 B(A)	$a(b-1)$	$SS_{B(A)}$		$\frac{SS_{B(A)}}{a(b-1)}$	$\frac{MS_{B(A)}}{MS_W}$	$\sigma_e^2 + n\sigma_{B(A)}^2$
容器内 W	$ab(n-1)$	SS_W		$\frac{SS_W}{ab(n-1)}$		σ_e^2
総和	$abn-1$	SS_{Total}				

$$SS_A = nb \sum_{i=1}^a (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

a: 処理区数
b: 処理区あたりの容器数
n: 容器あたりの個体数

分散の比をF分布と比較することにより、処理、容器の違いによって平均値の違いがもたらされているかを検定する。

F分布



濃度 1

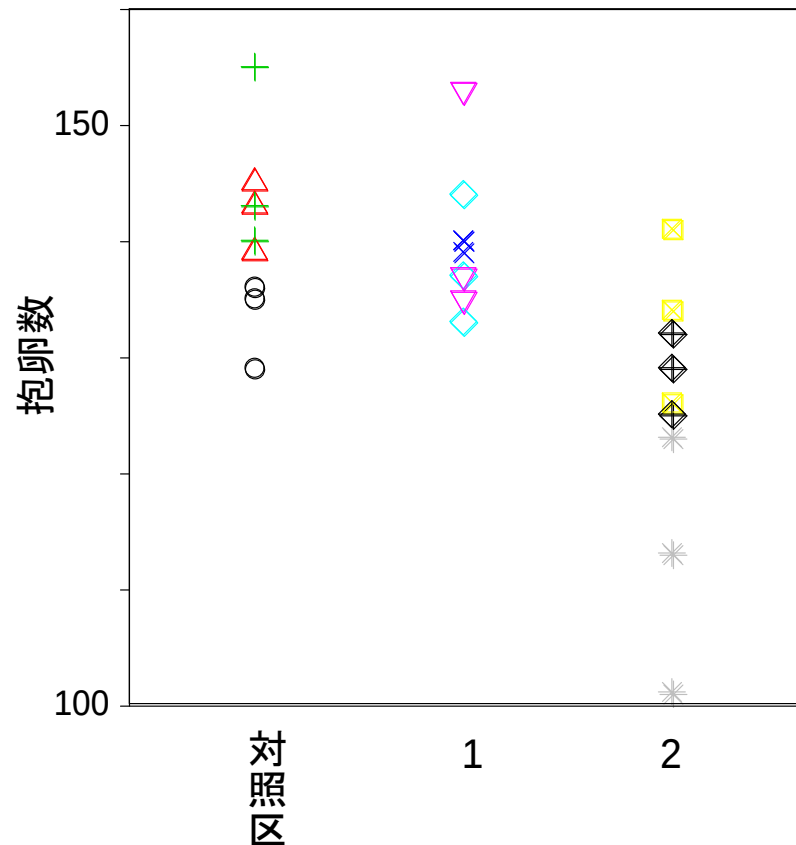
濃度 2

- 処理効果の検定には容器ごとの平均が用いられている。
- 容器の効果が見られるときに容器を無視したプーリングを行わない。

容器ごとの平均の使用



実験処理による抱卵数の変化



Nested Anovaによる解析結果

変動要因	df	SS	MS	F	P
処理間 A	2	1403	701.6	4.120	0.0748
容器間 B(A)	6	1022	170.3	3.781	0.0130
容器内 W	18	810.7	45.04		

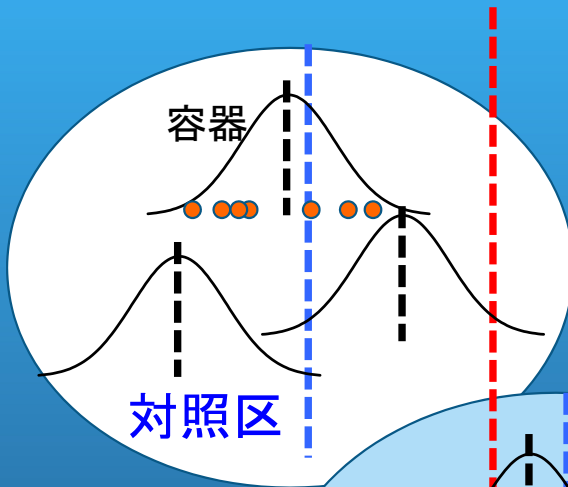
容器ごとの平均を用いた解析結果

変動要因	df	SS	MS	F	P
処理間 A	2	467.7	233.86	4.119	0.0748
容器間 B(A)	6	340.7	56.78		

- 容器あたりの試験個体数が同じであれば、容器ごとの平均を用いて解析しても処理効果の検定は同じとなる。

分散分析による解析

入れ子構造を持つ分散分析 (Nested ANOVA)



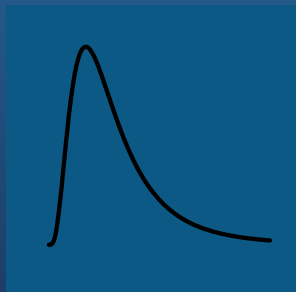
変動要因	df	SS	用いる平均	MS	F	Expected MS
処理間 A	$a-1$	SS_A		$\frac{SS_A}{(a-1)}$	$\frac{MS_A}{MS_{B(A)}}$	$\sigma_e^2 + n\sigma_{B(A)}^2 + \frac{bn \sum (A_i - \bar{A})^2}{a-1}$
容器間 B(A)	$a(b-1)$	$SS_{B(A)}$		$\frac{SS_{B(A)}}{a(b-1)}$	$\frac{MS_{B(A)}}{MS_W}$	$\sigma_e^2 + n\sigma_{B(A)}^2$
容器内 W	$ab(n-1)$	SS_W		$\frac{SS_W}{ab(n-1)}$		σ_e^2
総和	$abn-1$	SS_{Total}				

$$SS_A = nb \sum_{i=1}^a (\bar{X}_i - \bar{X})^2$$

a: 処理区数
b: 処理区あたりの容器数
n: 容器あたりの個体数

分散の比をF分布と比較することにより、処理、容器の違いによって平均値の違いがもたらされているかを検定する。

F分布



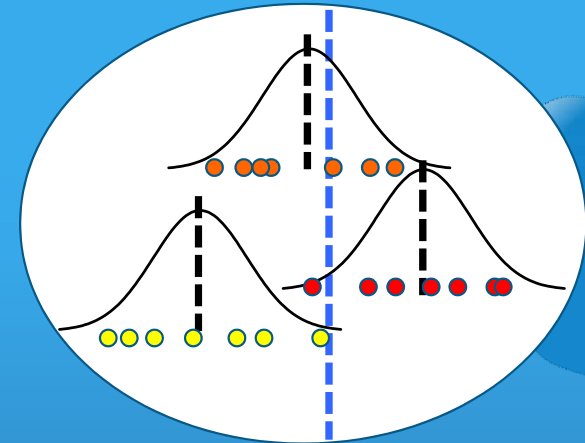
濃度 1

濃度 2

- 処理効果の検定には容器ごとの平均が用いられている。
- 容器の効果が見られるときに容器を無視したプーリングを行わない。

プーリング

- 効果の見られない要因を除いて解析しなおすことにより検出力を上げる



Nested Anovaによる解析結果

変動要因	df	SS	MS	F	P
処理間 A	2	1403	701.6	4.120	0.0748
容器間 B(A)	6	1022	170.3	3.781	0.0130
容器内 W	18	810.7	45.04		

容器間の効果が有意だがプールしてみると

変動要因	df	SS	MS	F	P
処理間 A	2	1403	701.6	9.188	0.00109
容器内 W	24	1833	76.4		

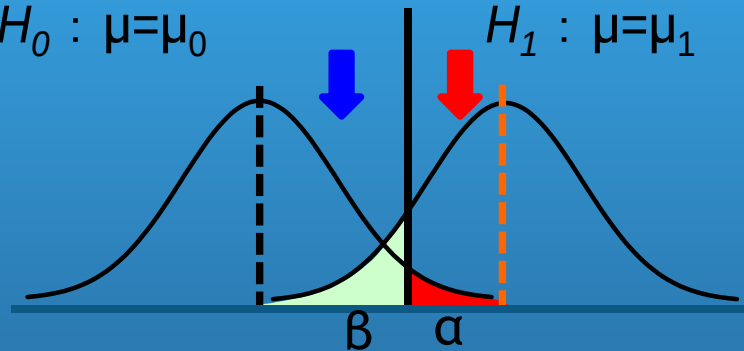
正しい「繰り返し」でない
F分布からのずれ
自由度の水増し

- 容器間の違いを無視してプールすれば誤った結論を導くことも
- 効果の検出には棄却率を $\alpha=0.05$ に設定しているが、 $p > \alpha$ であればプーリングを行ってよいのか？
 - たとえば p が0.25以上であれば良いとする

プーリングの条件

帰無仮説
 $H_0: \mu = \mu_0$

対立仮説
 $H_1: \mu = \mu_1$



- 第一種の過誤 : α
帰無仮説が正しいにもかかわらず棄却してしまう確率
- 第二種の過誤 : β
対立仮説が正しいにもかかわらず帰無仮説を誤って受け入れてしまう確率
- 検出力 : $1 - \beta$



- 対立仮説の母平均が帰無仮説の母平均に近づくと第二種の過誤が増大する（検出力が低下する）
- 棄却率を操作することによって第二種の過誤を減らすことが可能

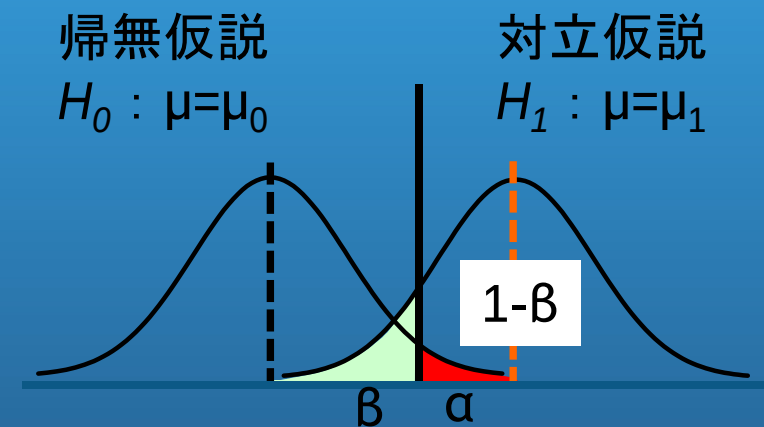
助剤対照区の扱い
についても同様の
ことが言える

検出力

- TG 210 Annex 5
 - 75-80%の検出力となる差を示すこと
- TG 211
 - 段落35：試験を行う前に、解析に用いる統計手法と試験系が持つ検出力について検討しておくこと
 - 段落38：対照区における生存仔虫数の変動係数（CV）が25%以下であること

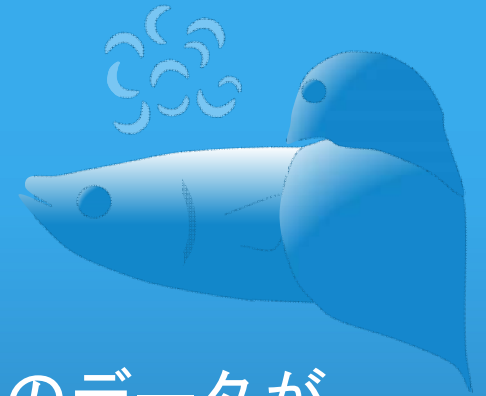
- どの程度の母平均の差が、どの程度の確率で検出できるのかを知っておきたい
- LOEC, NOECを求める試験系では検出力を把握しておくことが大事

- 第二種の過誤： β
対立仮説が正しいにもかかわらず帰無仮説を誤って受け入れてしまう確率
- 検出力： $1-\beta$



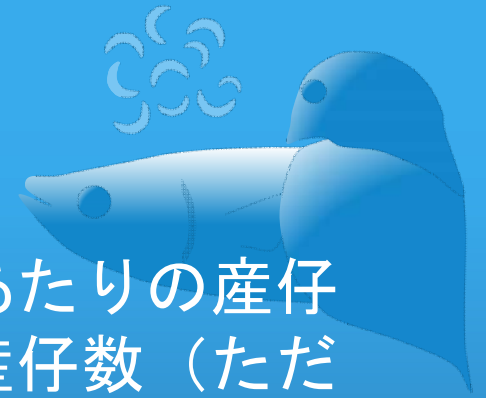
- サンプルサイズ
- 棄却率： α
- 平均の差： $|\mu_0-\mu_1|$
- 母分散

入れ子構造からの変形

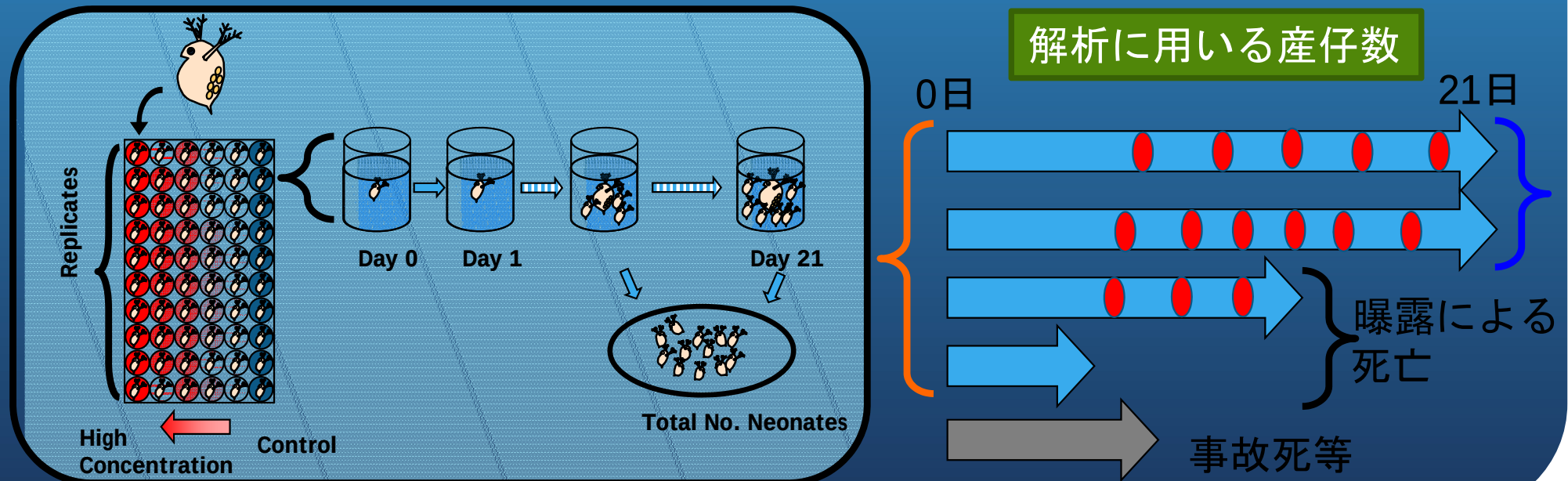


- 容器ごとの平均で代用してしまう（個体ごとのデータがそもそも得られない場合を含む）
 - 観察個体数が（ほぼ）同じであること
 - 個体データが正規分布から多少はずれていても平均は正規性の前提を満たすことが多い（中心極限定理）
- 容器間の効果がもしもないのであればプーリングを行うことができる。
 - 自由度が増え、検出力があがる
 - 容器効果があるにもかかわらずプールすると誤った結論を導くことも

OECD TG 211改訂 (2012)



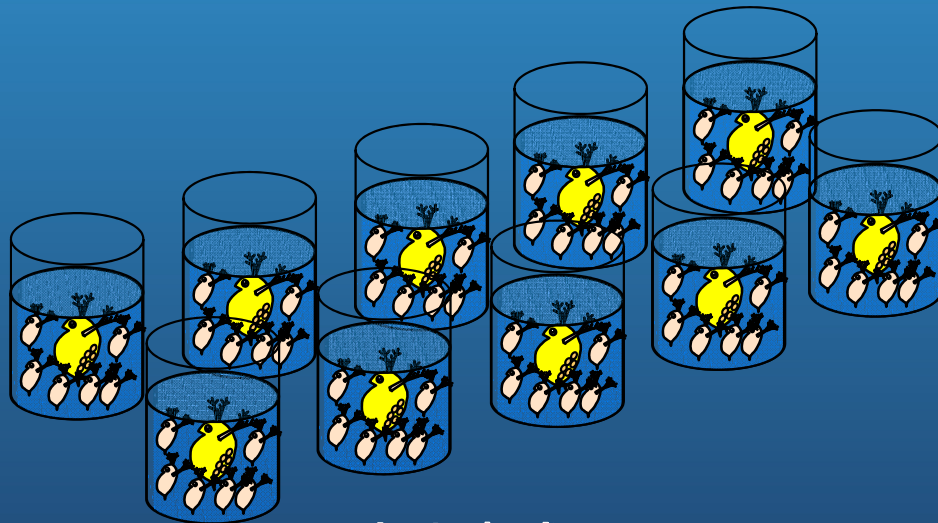
- 従来の「試験終了時まで生存した試験個体あたりの産仔数」に、「試験開始時の試験個体あたりの産仔数（ただし事故や予期しない死亡を除く）」が追加された。
- 生態学的影響、個体群レベルの影響
- 他の無脊椎動物を用いたTGでは繁殖への影響は試験個体の曝露による死亡の影響を含めて解析を行っている。



試験デザインについて

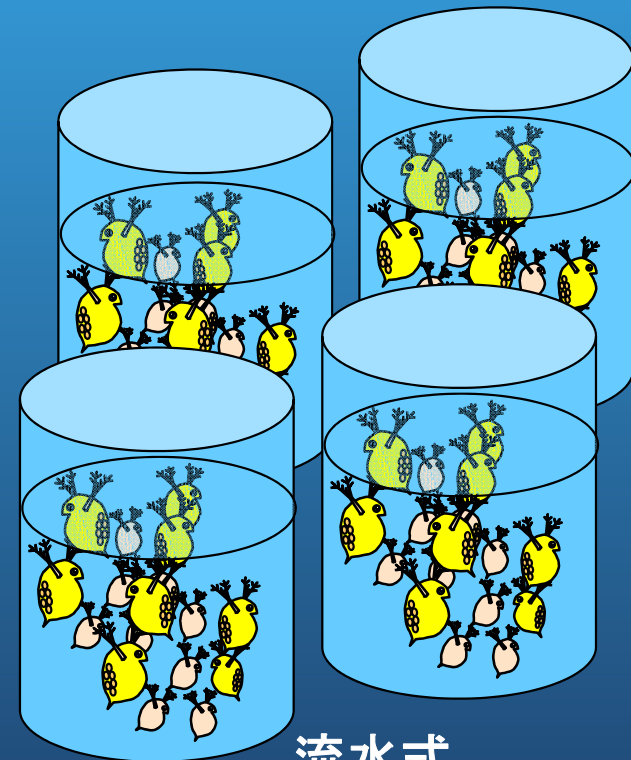
- TG 211の産仔数データ
 - 半止水式曝露
1個体 / 容器
 - 流水式曝露
10個体 / 容器

他の無脊椎動物を用いた生態毒性試験（繁殖）の多くも個体識別せず、複数個体を容器ごとの平均として扱っている。



半止水式

処理（容器＝個体）

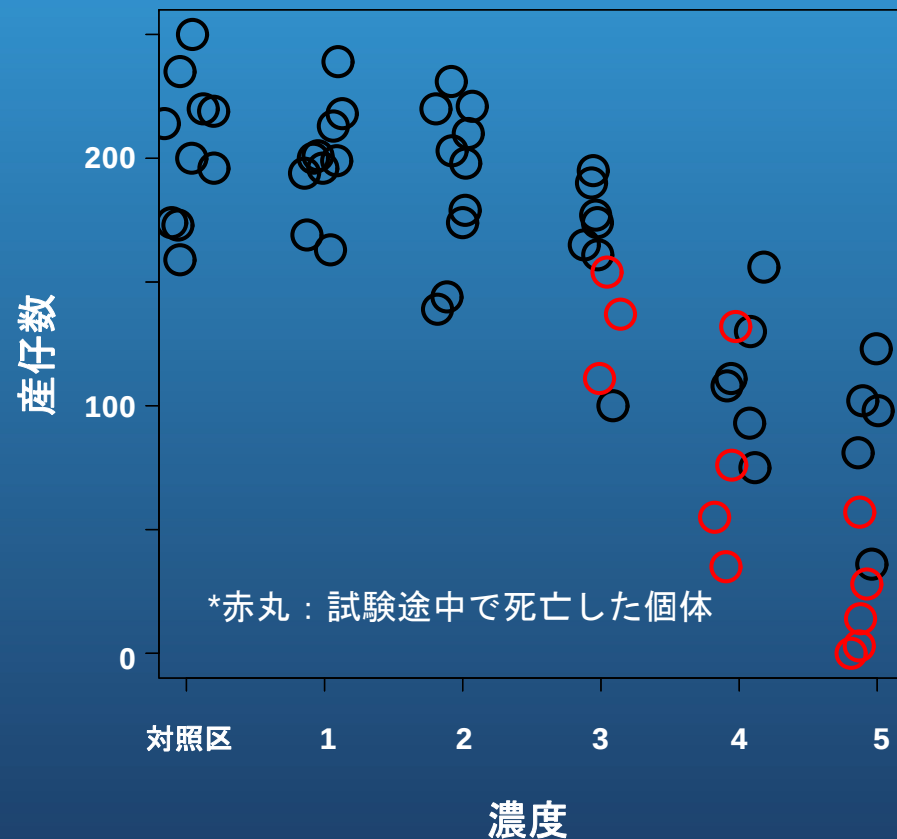


流水式

処理（容器（複数個体））

試験個体の死亡と平均産仔数

オオミジンコ繁殖試験 (架空のデータ)



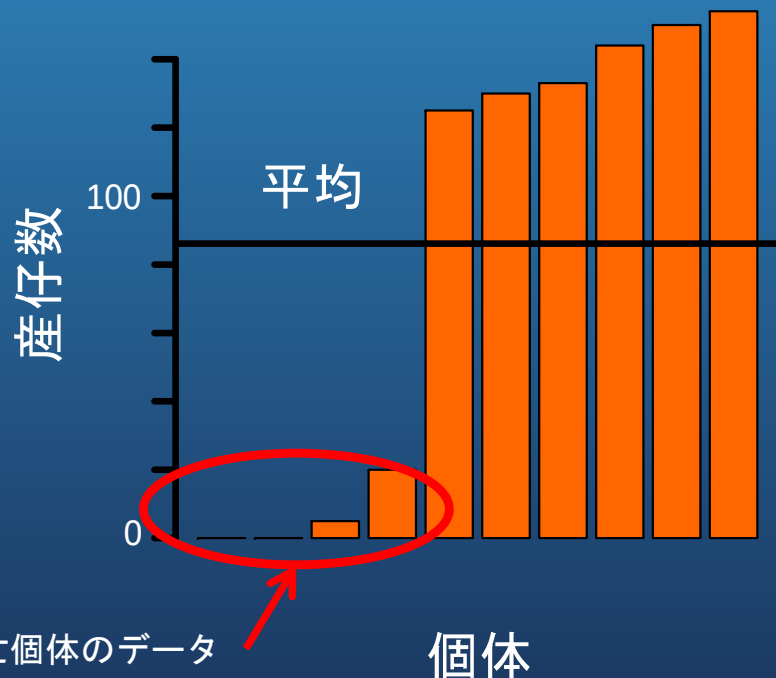
- 新たな応答変数の使用条件
 - 濃度依存的な死亡の確認
 - Cochran-Armitage testなど
(Exact CAが良いかも)
- 使用した場合には従来の方法による結果と比較して毒性値を選択

- 試験途中に曝露により死亡した試験個体を解析に含めることにより、
 - 死亡が産仔数低下に反映される
 - サンプルサイズが保たれる
 - 残差の増加による検出力低下
 - 正規性、等分散性からの逸脱によりパラメトリック検定からノンパラメトリック検定へ
- 個体ごとのデータであることの影響
 - 分布の仮定が崩れる

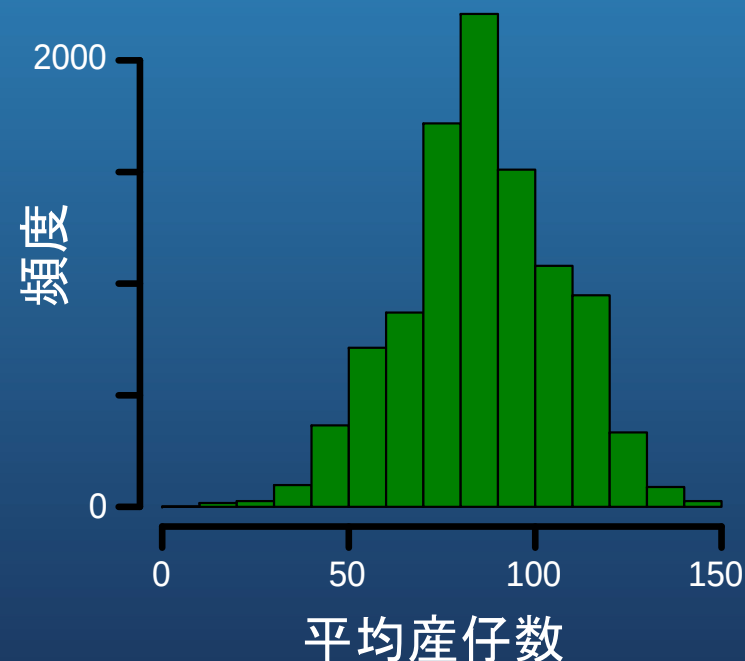
平均産仔数の振る舞い

- 試験終了までに死亡した個体のデータを解析に含める
 - 産仔数の分布は正規分布とは見なせない
 - 平均の振る舞いはある程度正規分布に近づく
 - 「容器=個体」と「容器=複数個体」の違い

個体ごとの産仔数

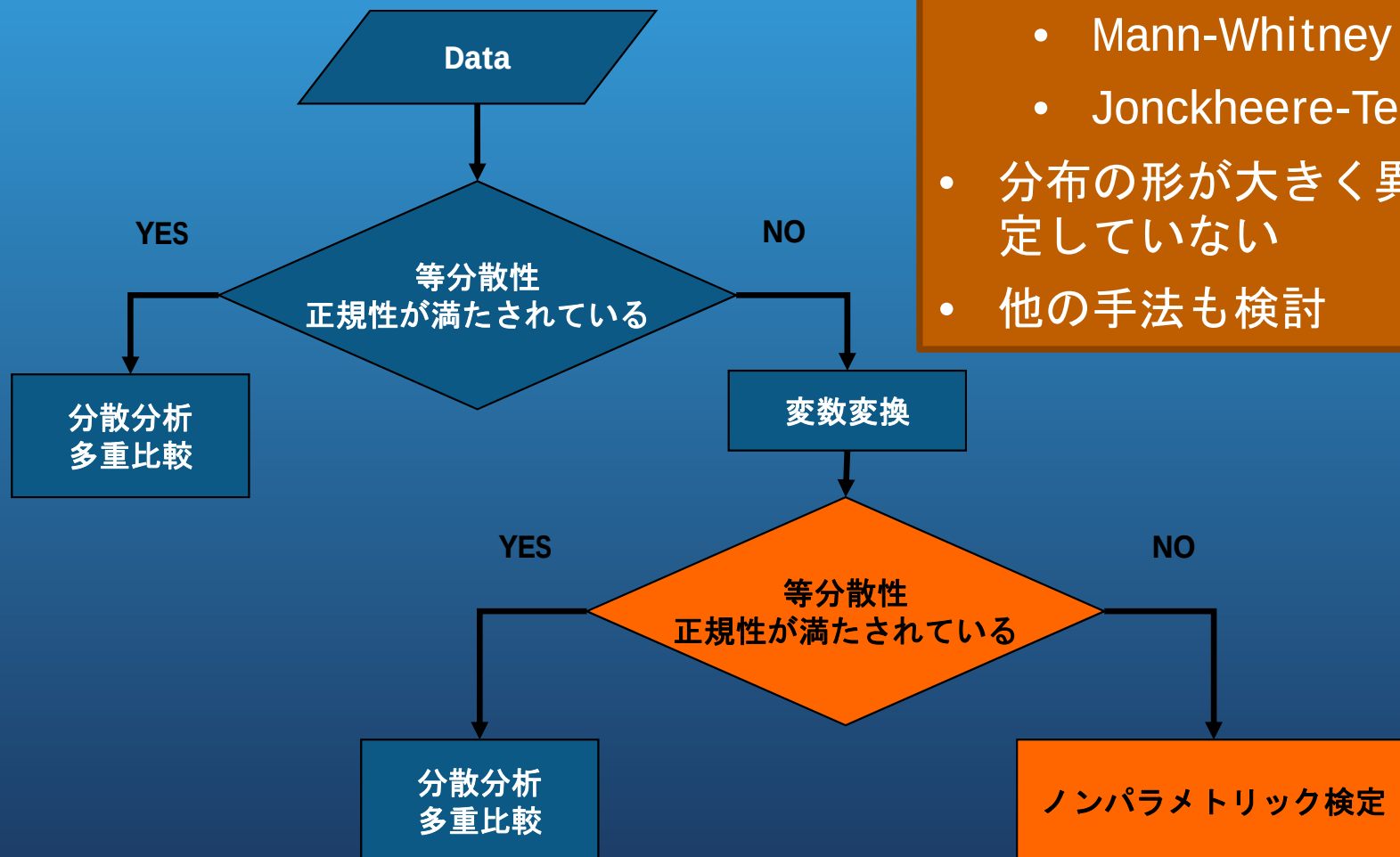


ブートストラップ法により得られた10個体の平均産仔数の分布

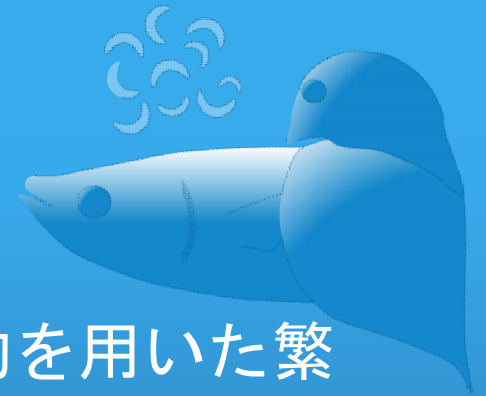


死亡個体の産仔数を含めたデータの扱い

- ノンパラメトリック検定
 - Kruskal-Wallis test
 - Mann-Whitney test
 - Jonckheere-Terpstra testなど
- 分布の形が大きく異なることを想定していない
- 他の手法も検討

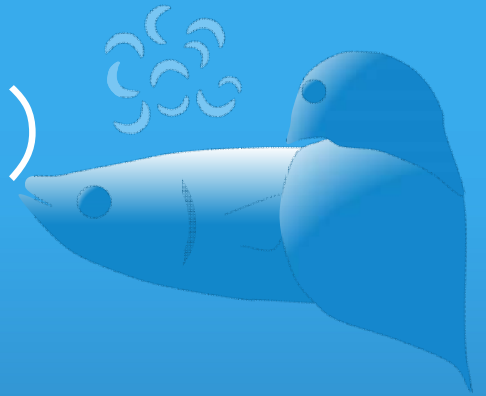


新たな応答変数（TG 211）



- TG 211（流水式曝露）やその他の無脊椎動物を用いた繁殖試験では容器には複数個体が配置される。
- TG 211（半止水式曝露）では容器と個体の効果は区別されない。
- TG 211に追加された新たな応答変数では半止水式曝露データの分布に正規性、等分散性を仮定することが難しい。
- 通常用いられるノンパラメトリック検定の手法は、分布の形、広がりグループ間で大きく異なることを想定していないものが多い。

ふ化、死亡データ (TG 210)



- 二値データ
- 処理-容器-個体の入れ子構造
- 観察数が大きく異ならないのであれば、容器を解析の単位として扱い、パラメトリック、ノンパラメトリックの手法により解析
 - パラメトリックな手法では、容器ごとに平均をとり変数変換（アークサイン変換）
- 個体の反応データをそのまま扱う場合には、Cochran-Armitage test
 - 容器の効果がある場合には、Extra binomial variance（過分散）に注意

二項分布と過分散

二項分布

- ふ化や死亡（する, しない）
- 性別（オス, メス）

生起確率 q である事象が k 回の試行により Y 回起きる確率

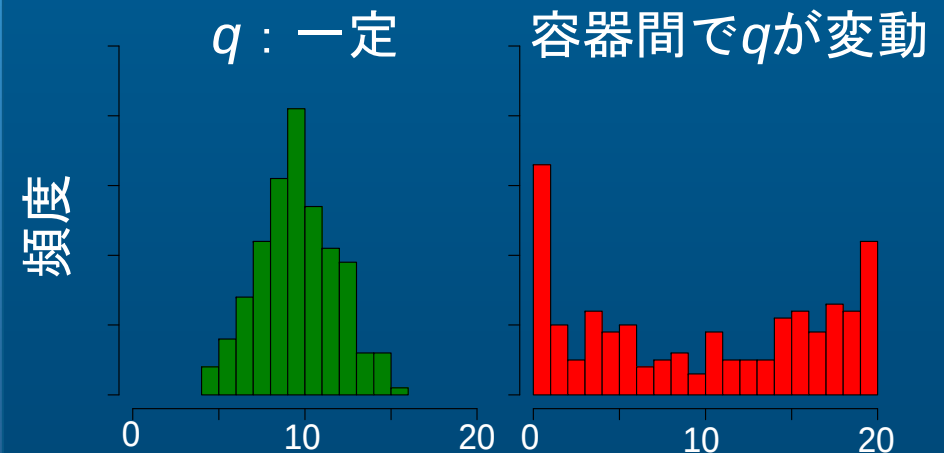
$$p(Y | k, q) = \binom{k}{Y} q^Y (1-q)^{k-Y}$$

平均 $\mu = kq$

分散 $\sigma^2 = kq(1-q)$

過分散

(extra-binomial variance, overdispersion)



- 1容器に入れた20個体の生死
- 曝露により $q=0.5$ の死亡率
- 平均死亡個体は10個体

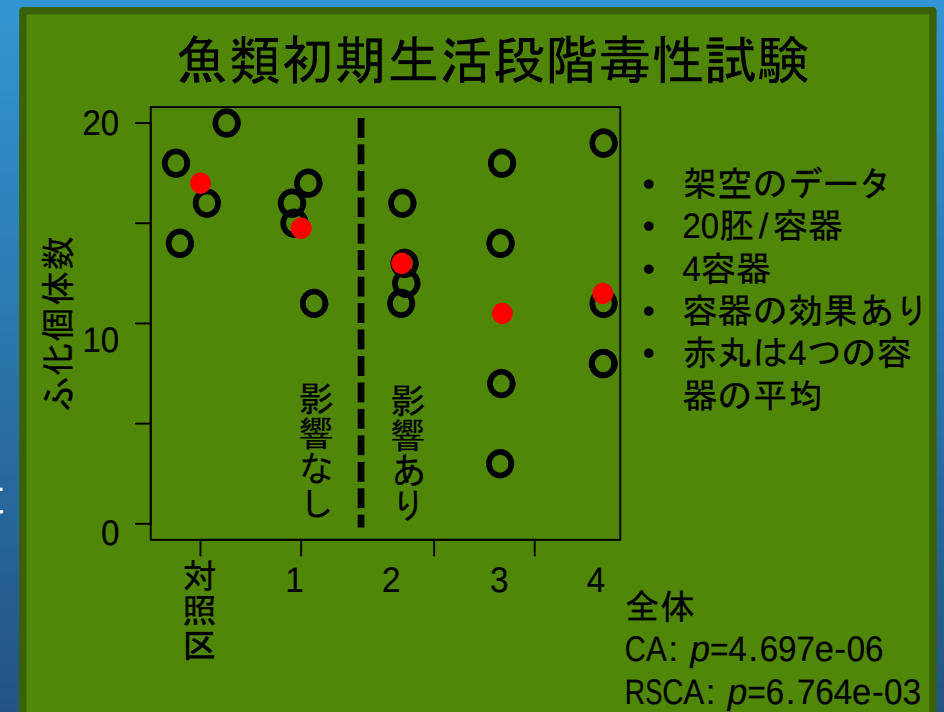
個体差、容器差により生じる過分散を考慮しないと

- モデルの当てはまりが悪い
- 曝露の効果に関して誤った結論を導く

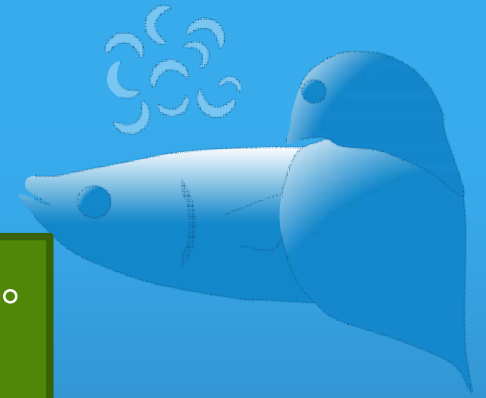
Cochran-Armitage test

- 変量（濃度）つき分割表
- Chi-square testを、濃度に依存した線形な傾向成分とそこからのズレの成分とに分割
- 容器の効果が見られるか
 - Tarone's C(α) test, Chi-square testを濃度ごとに行う
- 容器効果が見られれば
 - 過分散、容器間の個体数の違いへの対応
 - Rao-Scottの補正付きCochran-Armitage test
- ステップダウン方式
 - すべてのデータを用いて検定を行う
 - $\alpha=0.05$ の危険率で減少、増加の傾向が見られれば、最高濃度を除いて検定を行う
 - 有意な傾向が見られなくなるまでステップ2を繰り返す
 - 危険率はすべて $\alpha=0.05$ でよい

	対照区 : 0	1	2	3	4
ふ化	68	59	52	42	46
未ふ化・死亡	12	21	28	38	34

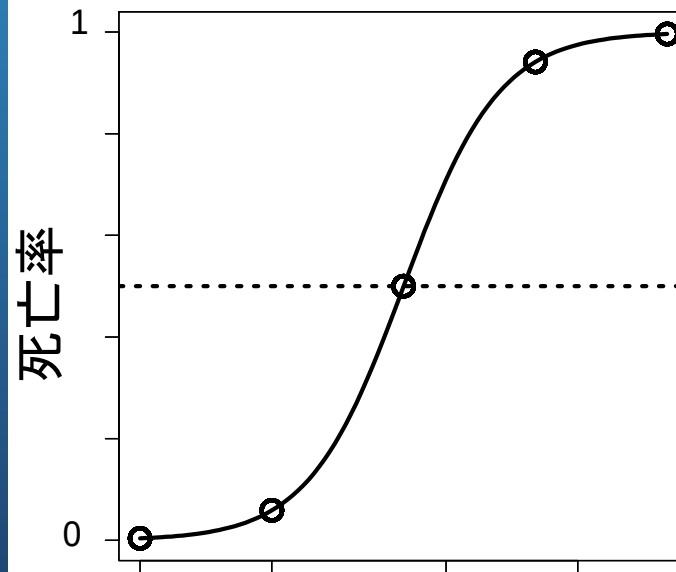


ミジンコ急性遊泳阻害試験

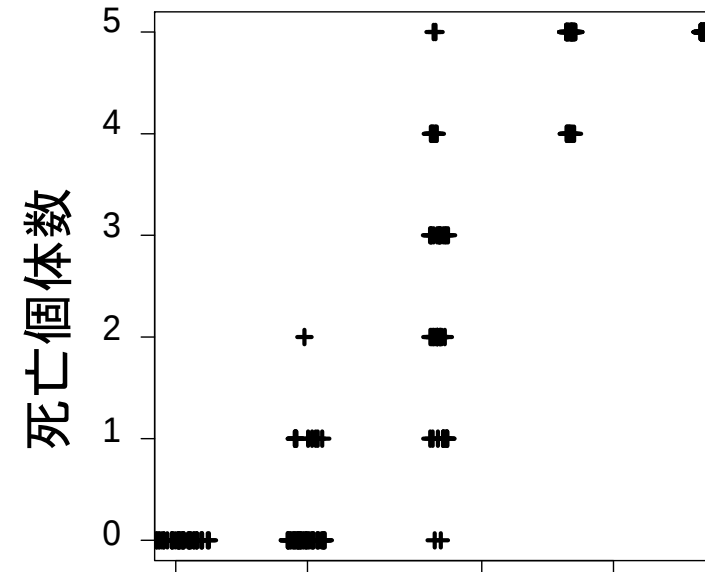


- 各濃度20個体を4つの容器に分けて行う。
- 容器あたり5個体
- 短期の試験
- 過分散は生じにくいのでは

濃度依存的死亡率

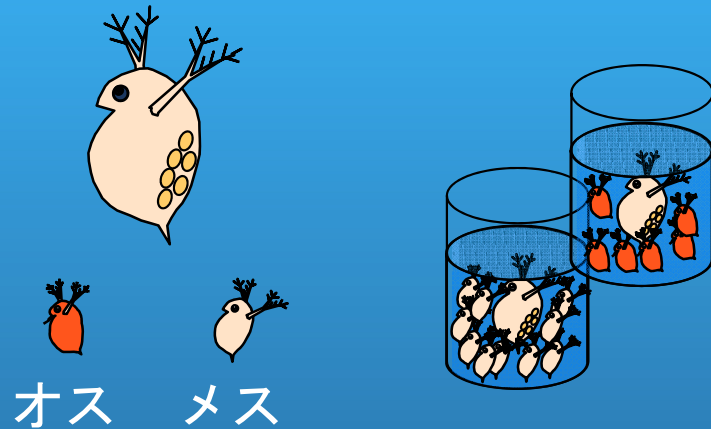


架空のデータ



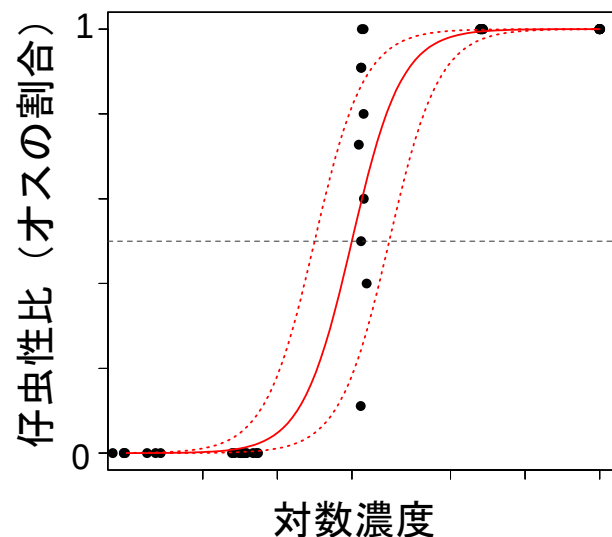
対数濃度

仔虫性比 (TG 211 Annex 7)



- オス仔虫生産
- 幼若ホルモン様作用
- 一腹仔の性はオス、メスのどちらかに偏ることが多いように思われる
- 過分散の例

濃度依存的なオス仔虫生産



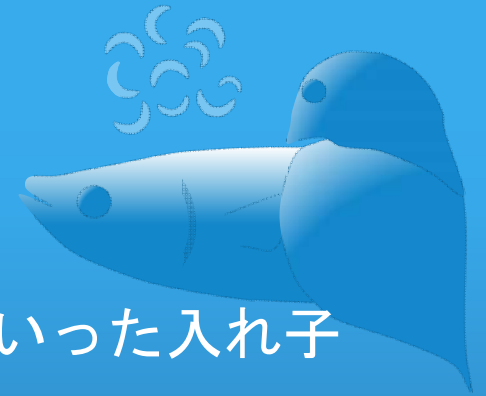
- 一腹仔データ
- 実線：個体の反応曲線の平均
- 点線：95%の個体を取り得る範囲

一腹仔の性別

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
オス	10	10	8	11	8	4	5	1	6	10
メス	1	0	3	0	2	6	5	8	4	1

- 過分散が見られる
 - 1濃度区だけの分割表
 - ロジスティック曲線のあてはめ
- 同一個体の腹仔間にも過分散が見られる
- 性比データのプーリングには注意

まとめ



- 多くの生態毒性試験データは、処理-容器-個体といった入れ子構造を持っている。
 - 容器の効果を無視してデータをプールしない
 - 解析の単位を容器として、容器ごとの平均値を用いることは、入れ子構造を扱うタイプの分散分析の部分と見なせる場合もある
 - 個体のデータが正規性、等分散性を満たさない場合にも、容器ごとの平均値を用いることによって分散分析が可能となることもある
- 容器-個体の区別がないミジンコ繁殖試験（半止水式）では、死亡した試験個体の産仔数を解析に含めると、正規性、等分散性を仮定できない。
- 二値データ（ふ化、死亡、性別など）
 - サンプルサイズが容器により大きく異なるときには平均（割合）は用いない
 - Cochran-Armitageの傾向検定
 - 容器間にばらつきがみられる場合（過分散）にはRao-Scottの手法による補正を行う必要がある