

# 病理組織学所見の統計処理について

— 特に Peto の検定法 —

小林克己\* 井上博之\*  
榎本 真\* 北川裕行\*\*

## 序

毒性試験における病理組織学所見データ、いわゆるノンパラメトリック値の検定は、従来、 $\chi^2$ -検定<sup>1)</sup>や順位和検定( U-検定<sup>2)</sup>等によって実施されている場合が散見されるが、多くの場合、これらの値の取り扱いは生物統計法がなされず背景データと比較し考察がなされている。これら統計処理の応用が少ない理由は、病理所見の変量は非連続型で、変量の幅も限られ、定性的である。これらの要因に薬量の要素が加わると統計処理が一層困難となる。

最近これら病理所見の持つ問題解決の一例としてWHOからLONG-TERM AND SHORT-TERM SCREENING ASSAY FOR CARCINOGENS: A critical appraisal, 1980. が示唆されているので、その概要を述べる。

## 1. 特徴

本検定は腫瘍発生率の取り扱いを中心に述べられており、標本の抽出は試験経過に従い、三つの群に分けられる。一群は切迫屠殺および死亡動物で、その原因が腫瘍である場合。二群は切迫屠殺および死亡動物で腫瘍があるが死因が腫瘍でない場合。三群は計画屠殺動物で腫瘍の発生を認めた場合。

これら一～三群を取り入れる事によって、試験期間を通して均一に腫瘍発生を把握でき、併せて薬量の要因も加わることから、このPetoの検定法は他の検定法に比べて説得力が高いと考えられる。本検定法はすでにOECD圏で使用されている。

発生率の有意差判定法はZ値が正の場合(対照群に対して投薬群の発生が大きい場合、逆の場合はZが負となり検定から除外される)のみに実施される期待

\* (財) 食品農薬薬品安全性評価センター

〒437-12 静岡県磐田郡福田町塩新田字荒浜582-2

\*\* カリ・デュジャー株式会社

〒103 東京都中央区日本橋1-1-7 OP日本橋ビル6階

値 (Expected value) に対して大きい群のみ有意と判定されるのも本検定法の特徴である。

## 2. データの整理

表-1 に示すごとく、臓器および腫瘍別に分類コードを作成。次いで腫瘍ごとに表-2 に示すごとく、切迫屠殺および死亡動物用コード分類表に従い、腫瘍とその因果関係を分類する。この分類で重要なことは Context Code 1 および 2 (腫瘍が原因でない) と 3 および 4 (腫瘍が原因) の分類に注意を払うこと。

## 3. 例題および計算手順

### 1) 試験概要

試験期間：110週

試験群：対照群、50ppm、400ppm および 3,200ppm の4群 (60頭/群)

計画屠殺：試験開始後52週および78週で各群約10頭、110週で残りの40頭

### 2) 調査項目

雌の肝の adenoma と hepatocellular adenoma

(Tumour code 4+5, 表-1 参照)

### 3) 計算手順

表-3 に従って記入する。すなわち、Tumour Code 4+5 は52週の計画屠殺を含め77週までその発生が全く認められず、78週の計画屠殺で始めて、3,200ppm 群で発生を認めた。その後110週の計画屠殺時までの間100週で1例、103週で2例、いずれも3,200ppm 群に認められた。しかし、100週の Context code は(4)、すなわち腫瘍が原因である。一方、103週の Context code は(1)、すなわち本例の死因または切迫屠殺の理由は腫瘍ではないと認められた。110週の計画屠殺時は400ppm 群で2例、3,200ppm 群で4例腫瘍が発生した。このように Context code の分類に留意する。

次に表-3 中の N (標本数) 値について説明する。計画屠殺時は群中の解剖動物数を記入する。100週で発生した腫瘍 (Context code 3 と 4) はその週の生存動物数を記入する。次いで103週で発生した腫瘍 (Context code 1 と 2) は各群とも100週から109週の間は全 Tumour (Tumour code 1~5) の発生を認めた動物数を個体表から抽出する。このように100週と103週における N 数の違いは表-2 の Context code による。

これら切迫屠殺および死亡動物の原因が腫瘍によって誘因されたか否によって大きく結果に変化を与える。

次いで表-3を表-4に集計する。この表に記載のZ値は後で述べる最終の判定基準を示す。次いで表-4から表-5(100週)、表-6(103~110週)、表-7(78週)および表-8(110週)へ各々移し記入された計算式によって、各々のO、VおよびT値を算出する。全て算出したら表-9へ集計する。この場合の計算は上記(表-5~8)の単純総和で示される。Expected(E)値およびV値は4つ(100、103~110、78および110週)の単純総和で示す。

次いで最終Z値を算出する。本例の場合は4.17である。この値を表-10の確率表からZ値4.17に対応する1P(有意水準)を求める。この場合4.17に対応する1P値は $< 0.00005$ となり、一般的には $P < 0.001$ と現し、有意差ありと判定する。

#### 4. 考察

表-9に示すごとく、この場合 Observed(O)と Expected(E)を比べて Observed(O)値が大きい群が0.1%水準で対照群との間に有意差を示すことが判断できる。

従って本例の場合、肝の adenoma + hepatocellular carcinoma の発生は対照群と3.200ppm群との間のみ0.1%水準で有意差を示したことになる。

Table- 1. Tumour classification code number

Organ	Tumour	Code
Thymus Spleen Marrow Lymph node Small intestine	lymphoma	1
Kidney	adenocarcinoma	2
Adrenal gland	pheochromocytoma	3
Liver	adenoma	4
Liver	hepatocellular carcinoma	5
Thyroid	c-cell adenoma	6
Thyroid	adenoma	7
Skin	malignant fibrous histiocytoma	8
Skin	sarcomas	9
Mammary Uterus Spleen Vagina Small intestine		
Code not used		10
Code not used		11
Uterus	fibromixoma	12
Mammary	fibroadenoma	13
Pituitary	adenoma	14
Pituitary	adenocarcinoma	15
Blood	leukemia	16
Stomach	papilloma	17
Testis	interstitial cell tumour	18
Epididymis	mesothelioma	19
Skin	fibroma	20
Skin	keratocanthoma	21
Various	leiomyoma	22
Skin	basal cell carcinoma	23
Mammary	adenocarcinoma	24
Pancreas	islet cell carcinoma	25

Table- 2. Definition of Peto context codes used

Context code	Definition used
0	- scheduled kill : tumour <u>absent or present</u>
1	- unscheduled death or kill : tumour <u>not</u> causative factor
2	- unscheduled death or kill : tumour <u>probably not</u> causative factor
3	- unscheduled death or kill : tumour <u>probably</u> causative factor
4	- unscheduled death or kill : tumour <u>causative</u> factor
5	- <u>clinically observed</u> superficial tumour (animal alive)
6	- unscheduled death or kill : tumor <u>absent</u>
7	- not used
8	- not used
9	- animal <u>not examined</u> in histopathology

Table- 3. Raw data to Peto analysis

Sex:Female

Tumour code:4+5(adenoma + hepatocellular carcinoma/liver)

Item	Period ppm: (week)	0		50		400		3,200	
		N	O	N	O	N	O	N	O
50									
51									
52									
53									
54									
55									
56									
57									
58									
59									
60									
61									
62									
63									
64									
65									
66									
67									
68									
69									
70									
71									
72									
73									
74									
75									
76									
77									
78		10	0	9	0	10	0	10	1(0)
79									
80									
81									
82									
83									
84									
85									
86									
87									
88									
89									
90									
91									
92									
93									
94									
95									
96									
97									
98									
99									
100		38	0	45	0	40	0	42	1(4)
101									
102									
103		4	0	7	0	4	0	9	2(1)
104									
105									
106									
107									
108									
109									
110		33	0	37	0	34	2(0)	28	4(0)

( ):Peto contex code N=標本数, O=発生数

Table-4. Final gathering data from raw data

Tumor code: 4 + 5

Item	Period (week)	0		50		400		3,200	
		N	O	N	O	N	O	N	O
	100	38	0	45	0	40	0	42	1(4)
	103-109	4	0	7	0	4	0	9	2(1)
	78	10	0	9	0	10	0	10	1(0)
	110	33	0	37	0	34	2(0)	28	4(0)
	T.period		0		0		2		8

Calculation/final

Z=4.178  
P< 0.001

N=標本数, O=発生数

Table- 5. Peto analysis/week

The following tumours were examined using Peto analysis:

Sex:Female Week: 100 Tumour code:4+5

Concentration of test drug in diet,ppm(D)	0	50	400	3,200	
No. of finding	0	0	0	1	
Observed (O)	38	45	40	42	
Expected (E)	0.230	0.272	0.242	0.254	
(O) - (E)	-0.230	-0.272	-0.242	0.745	
A	0	-13.636	-96.969	2385.454	$\Sigma A = 2274.848$
B	0	13.636	96.969	814.545	$\Sigma B = 925.151$
C	0	681.818	38787.878	2606545.5	$\Sigma C = 2646015.151$

$$A = D_x(O - E) \quad B = D_x E \quad C = D_x D_x E$$

$$Q = C_{sum} - (B_{sum} \times B_{sum} + E_{sum})$$

$$= 1790009.825$$

=

$$V = Q \times (N - E_{sum}) / (N - 1)$$

$$= 1790109.825$$

=

$$T = 0(O^* - E) + 50(O^* - E) + 400(O^* - E) + 3,200(O^* - E)$$

$$= 2274.848$$

=

$$Z = T + \sqrt{V}$$

$$= 1.700$$

=

Remake:  $\Sigma$ =sum

\*Observed



Table-6 . Peto analysis/week

The following tumours were examined using Peto analysis:

103-  
Sex:Female Week: 110 Tumour code:4+5

Concentration of test drug in diet,ppm(D)	0	50	400	3,200	
No. of finding	0	0	0	2	
Observed (O)	4	7	4	9	
Expected (E)	0.333	0.583	0.333	0.750	
(O) - (E)	-0.333	-0.583	-0.333	1.250	
A	0	-29.166	-133.333	4000.000	$\Sigma A = 3837.500$
B	0	29.166	133.333	2400.000	$\Sigma B = 2562.499$
C	0	1458.333	53333.333	7680000.0	$\Sigma C = 734791.666$

$$A = D \times (O - E) \quad B = D \times E \quad C = D \times D \times E$$

$$Q = C_{sum} - (B_{sum} \times B_{sum} \div E_{sum})$$

$$= 451588.541$$

=

$$V = Q \times (N - E_{sum}) / (N - 1)$$

$$= 4258041.213$$

=

$$T = 0(O^* - E) + 50(O^* - E) + 400(O^* - E) + 3,200(O^* - E)$$

$$= 3837.5$$

=

$$Z = T \div \sqrt{V}$$

$$= 1.859$$

=

Remake:  $\Sigma$ =sum

\*Observed

Table- 7. Peto analysis/week

The following tumours were examined using Peto analysis:

Sex:Female Week: 78 Tumour code:4+5

Concentration of test drug in diet,ppm(D)	0	50	400	3,200	
No. of finding	0	0	0	1	
Observed (O)	10	9	10	10	
Expected (E)	0.256	0.230	0.256	0.256	
(O) - (E)	-0.256	-0.230	-0.256	0.743	
A	0	-11.53846	-102.564	2379.487	$\Sigma A = 2265.384$
B	0	11.53846	102.564	820.512	$\Sigma B = 934.615$
C	0	576.923	41025.641	2625641.0	$\Sigma C = 2667243.539$

$$A = D \times (O - E) \quad B = D \times E \quad C = D \times D \times E$$

$$Q = C_{sum} - (B_{sum} \times B_{sum} + E_{sum})$$

$$= 1793737.672$$

=

$$V = Q \times (N - E_{sum}) / (N - 1)$$

$$= 1793737.672$$

=

$$T = 0(O^* - E) + 50(O^* - E) + 400(O^* - E) + 3,200(O^* - E)$$

$$= 2265.384$$

=

$$Z = T + \sqrt{V}$$

$$= 1.691$$

=

Remake:  $\Sigma$ =sum

\*Observed

Table-8. Peto analysis/week

The following tumours were examined using Peto analysis:

Sex:Female Week: 110 Tumour code:4+5

Concentration of test drug in diet,ppm(D)	0	50	400	3,200	
No. of finding	0	0	2	4	
Observed (O)	33	37	34	28	
Expected (E)	1.500	1.681	1.545	1.272	
(O) - (E)	-1.500	-1.681	0.454	2.727	
A	0	-84.090	118.818	8727.272	$\Sigma A = 8825.000$
B	0	84.090	618.181	4072.727	$\Sigma B = 4774.999$
C	0	4204.545	247272.727	13032727	$\Sigma C = 13284204.55$

$A = D \times (O - E)$      $B = D \times E$      $C = D \times D \times E$

$Q = C_{sum} - (B_{sum} \times B_{sum} \div E_{sum})$

= 9484100.378

=

$V = Q \times (N - E_{sum}) / (N - 1)$

= 9122111.814

=

$T = 0(O^* - E) + 50(O^* - E) + 400(O^* - E) + 3,200(O^* - E)$

= 8825.00

=

$Z = T \div \sqrt{V}$

= 2.921

=

Remake:  $\Sigma =$ sum

\*Observed

Table-9. Peto analysis/final

Sex:Female    Week:Total period    Tumor code:4+5

Concentration of test drug in diet,ppm(D)	0	50	400	3,200	
No. of finding					
Observed (O)	0	0	2	8	
Expected (E)	2.319	2.766	2.376	2.532	
(O) - (E)					
A					ΣA=
B					ΣB=
C					ΣC=

A= Dx(O-E)    B= Dx E    C= Dx Dx E

Q= Csum-(Bsum x Bsum ÷ Esum)

=

=

V = Q x (N - Esum)/(N-1)

= 1790109+4258041+1793737+9122111

= 16963998

T = 0(O\* - E) + 50(O\* - E) + 400(O\* - E) + 3,200(O\* - E)

= 0(0-2.319)+50(0-2.766)+400(2-2.376)+3,200(8-2.532)

= 0+50(-2.766)+400(-0.376)+3,200(5.468)=17208.9

Z = T ÷ √V

= 17208.9 ÷ √16963998 = 4.178

=

P value is determined by One-tailed P-value from table-10.

Result: P < 0.00005

P < 0.001 in report

Remake: Σ=sum

\*Observed

Table-10. The one-tailed probability, 1P, that a normally distributed random variable will by chance alone fall more than a certain number, Z, of standard deviations above its expectation

Z	1P	Z	1P	Z	1P
0.00	0.50	1.55	0.06	2.46	0.007
0.25	0.40	1.64	0.05	2.52	0.006
0.52	0.30	1.75	0.04	2.58	0.005
0.67	0.25	1.88	0.03	2.65	0.004
0.84	0.20	1.96	0.025	2.75	0.003
1.04	0.15	2.05	0.020	2.88	0.002
1.28	0.10	2.17	0.015	3.09	0.001
1.34	0.09	2.33	0.010	3.29	0.0005
1.41	0.08	2.37	0.009	3.66	0.0001
1.48	0.07	2.41	0.008	3.89	0.00005

- Notes: (i) When citing P-values from tests for positive trend, always make it very clear that they are one-tailed P-values for positive trend, as unless otherwise stated 'P-value' usually means the two-tailed P-value (which is double the one-tailed P-value).
- (ii) A negative value of Z that is not an arithmetical error indicates that the higher-dosed groups contained fewer tumour-bearing animals than expected: there is an approximately even chance of this happening in tests with noncarcinogens.

文献

- 1) 竹内雅也ら Cholestyramive のラットにおける発癌性試験  
The Journal of Toxicological Sciences vol 8, 71-86, 1983.
- 2) Wilcoxon F. et al. Some Rapid Approximate Statistical Procedures  
1965. Translation distributed by LEDERLE (Japan), LTD. Tokyo, Japan

# 飛び離れた変量の取扱法

小林克己  
(財)食品農薬品質安全性研究所

一般毒性試験において、特に2年間に渡る慢性毒性試験を実施した場合、いわゆる異常値〔飛び離れた変量 (Outlier) と呼んだ方が正確と思う〕と呼ばれる値が散見される。この値の取り扱いについては、いくつかの方法があるがその応用になると迷う点が多々ある。

そこで今回、この飛び離れた変量を分類し、特に問題があると思われる老齢期 (78週以降) の臓器重量について若干の知見を加えてみた。

## 1. 飛び離れた変量の分類

一般的には第1表に示すような変量の幅が示される。対照群 (試験中の無処理解無投薬群または背景データを示す) の値に対して差の大きい値の項目順は臓器重量 (腫瘍等の発生しやすい臓器)、血液検査値そして一般臨床値である。

第1表 一般毒性試験における飛び離れた変量の分類

		対照群に対する増減	棄却検定の使用	
調 査 項 目	一般臨床	体 重	-40 ~ +10 %	
		飼料摂取量	-90 ~ +30 %	
	血液検査	血球恒数	-50 ~ +300 %	×
		血清生化学*	-90 ~ +500 %	
	臓器重量	肝・心・脾・他	-50 ~ +200 %	○
		卵巣・脾	+10 ~ + > 1,000倍	

\*ヒルビリンおよび酵素類は 100 倍以上を示す場合がある。

一般臨床値の内、体重は増加してもせいぜい10%以内、約40%減少すればもはや切迫屠殺または死亡動物となる。一方、飼料摂取量は増加30%以内、減少90%以内を示し、これらの棄却は血液検査値を含め不用と考へる。まして、78週齢以降臓器重量を含めこれらの値は若齢時に比べて変動が大きく、統計処理を必要とすることが無意味と考へる。だが、登録データとしては何らかの方

去で処理を行う必要がある。

特に今回提起したいのは98週以降の臓器中、特に腫瘍発生が起こりやすく、またその重量が正常に対して極めて大きい卵巣および脾臓等である。従って登録データにおいてこれら腫瘍を持った臓器の取り扱いほ明らかに棄却検定の対象になろう。だがどの方法で、またどの程度の目安（危険率および棄却しようとする個体値）によって実施するか否かの判断は好みの問題となろう。

## 2. 棄却検定の応用 (例題)

第2表はマウス投薬群・104週時の卵巣重量である。

第2表 マウス(B6C3F1)投薬群の104週時の卵巣(左右)重量

Ovaries weight (mg)								
60	7	8	6	10	11	10	78	4
8	4	7	5	6	6	5	3	20
11	10	6	9	343*	5	5	6	8
6	5	7	6	6	4866*	8	6	7

\* 印は棄却し平均±標準偏差は  $11 \pm 15$  となる。

動物試験のための棄却検定法は一般的に下記の三法<sup>1)</sup>が常用されている。

1) 増山の棄却限界法

$$\bar{x} \pm \left( S_x \sqrt{\frac{N+1}{N}} \cdot t(N-1)0.05 \right)$$

2) Thompsonの棄却検定法

$$t = \frac{\tau \sqrt{N-2}}{\sqrt{N-1-\tau^2}}$$

3) Smirnovの棄却検定法

Thompsonの棄却検定法の $t$ -検定を行う前の段階で、式  $\delta/S_n = \tau$  より得られたこの $\tau$ の値と $N$ 、Smirnovの表の数値とを比較して、棄却してよいか否かを判定する方法である。

さて、ここでどの棄却検定を用いるかである。



増山の棄却限界法を用いて検定した結果を第3表に示した。

第3表 増山の棄却限界による検定結果

棄却回数	5%危険率		20%危険率		50%危険率		90%危険率		
	棄却限界	棄却値	棄却限界	棄却値	棄却限界	棄却値	棄却限界	棄却値	
1	N=36 M=154.9 SD=809.6	-1519.5 ~1829.4	4866	-928.5 ~1238.4	4866	-403.2 ~713.1	4866	48.2 ~261.6	4866 343
2	N=35 M=20.3 SD=58.1	-99.9 ~140.6	343	-56.9 ~97.5	343	-19.7 ~60.4	343 78	12.7 ~28.0	全データ
3	N=34 M=10.9 SD=15.1	-20.5 ~42.4	78 60	-9.4 ~31.1	78 60	2.1 ~15.5	60 20		
4	N=32 M=7.2 SD=3.1	0.8 ~13.6	20	3.1 ~11.3	20	5.4 ~8.2	11.10 10.11 10		
5	N=31 M=6.8 SD=2.1	2.5 ~11.1	ナシ	4.0 ~9.6	11.10 10.10				

N : 標本数  
M : 平均値  
SD : 標準偏差

一般的に危険率の5%水準で1回検定した結果は棄却限界>1829.4mgで4866mgが除外される。次いで残った標本数35で2回目の検定結果は棄却限界>140.6mgで343mgが除外される。残った標本数34で3回目の検定結果は棄却限界>42.4mgで78と60mgが除外される。標本数32で4回目の検定結果は棄却限界0.8~13.6mgで20mgが除外される。このように何回棄却検定を実施して良いか根拠が不明となる。一方、5%危険率以外の20%、50%および90%水準で実施し棄却幅を大きくし1回で検定終了も考えられるが、一般的には5%水準で1回または1~3回、その外に20%水準で1回それぞれ棄却検定を行なうようである。

いずれにしても登録に必要な標本数(最低8/群)を満足しなくてはならない大前提がある以上、棄却検定を繰り返して標本数が著しく少数にならないように留意しなくてはならない。

Thompsonの棄却検定法は一つの値を棄却した場合仮説に合致する場合や、一つの値がどうも背景データと比較して著しい差があるように思われる場合等に使用する。

従って、第2表の例題のように明らかに飛び離れた変量を棄却する場合以外に標本数が少ない場合、群内分散が著しく他群と異り有意差検定に移れない場合等に有用な検定と思われる。

### 3.まとめ

原因を把握できない個体は原則として棄却しない。つまり病理組織検査成績の知見から明らかでない理由を認めない個体の変量は除外し、残った個体で有意差検定を実施する。

しかし、この除外された数値は報告書に残し、注釈を付ける。

- 1) 体重、飼料摂取量、飼料要求率および飲水量等は変動が少ないことから、一切棄却検定をしない。
- 2) 血液、血清パラメータは原因が明確かまたは極めて飛び離れた変量について任意に選んで Thompson の棄却検定法を使用する。
- 3) 年齢時(78週以降)の卵巣および脾臓等の臓器重量は通常の10~50倍以上のものについてのみ Thompson の棄却検定法を使用する。

従って、第2表に示した例題は Thompson の棄却検定法を2回以上実施し、4866 および 243mg を除外し、標本数34、平均値11、標準偏差15となる。報告書中ではこの除外された動物の値の肩口に\*印を付し、除外されたことを記述している。

#### 参考文献

- 1) 柴田寛三. 新・生物統計学序説、創文、1983、東京。