



偽反復

松田 史生¹*・川瀬 雅也²

C君：Aさん，B先輩，「偽反復」って知ってます？
Aさん：知らない。
B君：僕も。
C君：この間読んでいた本¹⁾に出ていたんですよ。

偽反復とは

Aさん：それで，偽反復ってどんなこと？
C君：その本には，次のような例がありました。
まず，何を調べようとしているのかですが，「巣箱で育てられたアオガラのヒナは，自然の巣穴で育てられたヒナに比べて，外部寄生虫が多い」という仮説が正しいかどうかです。
B君：外部寄生虫って何？
C君：調べたら，寄生虫の中で，宿主の体表あるいは皮膚内に，一時的あるいは長期に寄生するものだそうです。
Aさん：それで，どうやって調べたの？
C君：10個の巣箱から42羽のヒナをとってきて，外部寄生虫の数を調べて，自然の巣穴のヒナの外部寄生虫の数と比較しようとしているようでした。巣箱の方の話に重点が置かれていて，巣穴の話は出てこなかったんですが，多分，間違いだと思います。
ここで，問題になっていたのが，1個の巣箱から4羽のヒナをとってきて調べた場合，4つのデータになるかどうかということです。
B君：個体が違うんだから，当然，4つのデータだよ。
Aさん：私も，そう思うけど，ただ，話の流れから，4つのデータにならないんだよね，きっと。
C君：さすが，Aさん，鋭い。
Aさん：どうして，4つのデータにならないかの説明はあったの。
C君：ありました。ある巣箱で一緒に育てられたヒナの寄生虫の数の間には，強い相関関係がみられる可能性が高いとのことでした。このように，本当に調べたい因子（ここでは巣箱か巣穴か）以外の因子の影響が出てくるためとのことでした。一見，4回実験を繰り返した（反復した）ように見えて，そうではないことを「偽反復」というとのことでした。

B君：納得できないな。
Aさん：でも，この例って，私たちのような実験室で実験をする人間には関係ないし，偽反復は起こらないんじゃないかな。
C君：それが，僕たちの分野でも，十分起こるようなんです。

生命科学での偽反復

Aさん，B君，C君の3人は，詳しいことが知りたくて，X教授の部屋を訪れた。
X教授：今日は，どんな話かな。
B君：偽反復です。どうも納得がいかなくて。
C君：この本¹⁾に出ていたんです。
X教授：なるほど。まず，偽反復を説明する前に，独立ということを説明しよう。この本にも，独立の説明があるだろう。
C君：ありました。
X教授：まず，何故，独立していることが重要かということだが，その理由の1つは，ほとんどの統計処理法が，「互いに独立していることを前提としている」ためだ。では，2つの事象が「統計的に独立である」とはどういうことかと言うと，一方の結果が，もう一方の結果に影響を与えないということなんだ。つまり，2つの結果の起こり方に関連性がないということだ。
C君が紹介した寄生虫の例でみると，同じ巣箱にいた場合，あるヒナの寄生虫は，そのヒナにとどまらず，他のヒナに移っていく可能性があるわけだ。そうすると，その巣箱のヒナの寄生虫数は，個体ごとに「独立」とは，言えなくなってくる。これと同じような例はたくさんある。この本にもあったが，同じケージで飼ったマウスは，独立しているとは言えない。たとえば，マウスに与える水に，薬剤を加えて自由に摂取させて，その影響を見る場合，一見，個体間に関係性はないように思えるだろう。
B君：そう思いますし，こういった方法はよく使います。
X教授：ところが，よく考えてみると，薬剤を与えたケージと，与えていないケージで，薬剤以外の条件がまった

著者紹介 ¹大阪大学大学院情報科学研究科（教授） E-mail: fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp

²長浜バイオ大学（教授）



く同じにできるかどうかという点が問題になるんだ。

Aさん：薬剤以外の条件は、管理された飼育室に置かれているので同じじゃないんですか。

X教授：本当に同じかというと、実は、同じではないんだ。照明、温度、湿度などの物理条件も異なるし、マウスの体調などは、同じケージの他のマウスに影響されることもあるだろう。照明、温度、湿度などの物理条件はケージが置かれた場所に依存する。こういった効果を「空間効果」と言うんだが、案外、認識されていない。

B君：何か、納得できるような、できないような。難しいですね。

C君：言われてみれば、そうかもしれないという気がします。

X教授：同じく空間効果に注意しないといけないのが、君たちがよく使うプレートを使った分析などの例じゃないかな。この本¹⁾では、マイクロプレートの例は、あまり詳しく触れられていないので、こちらの本²⁾を見るといい。まず、ある薬剤の効果を知るために、培養細胞を使ったとしよう。細胞は24穴のプレートで培養されたとする。よく行う実験法は、どんなものかな。

Aさん：薬剤を添加して細胞を培養するプレートと、添加しないプレートに分けて実験します(図1)。

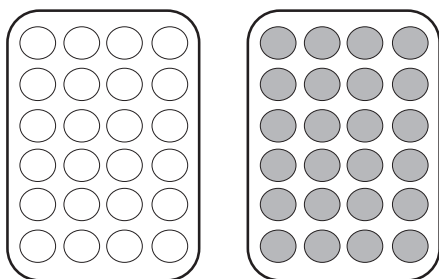


図1. 薬剤の添加効果1. 左：対象実験，右：薬剤添加。

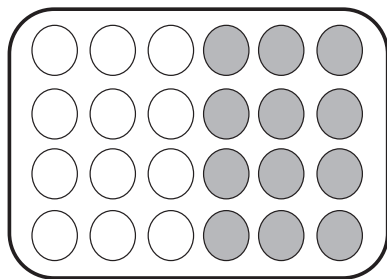


図2. 薬剤の添加効果2. 色のついた穴には薬剤が添加され、白い穴には、薬剤は添加されていない。

B君：プレートの半分に添加して、残り半分に転嫁しない場合もある(図2)。

X教授：まず、Aさんの実験系だが、プレートが異なることや、インキュベーターの位置に依存する条件の違いが発生する。インキュベーターの中では、温度分布やCO₂の濃度分布が存在するので、2つのプレートがまったく同じ条件ということは実現できない。また、B君の言う実験系では、プレート内の位置の効果が生じる可能性がある。さっき言ったインキュベーター内のさまざまな要因の分布が、プレートの中央を境に、左右対称である保証はないし、また、プレートの端と中央部でも条件が異なってくるので、厳密にはプレート内の位置効果を排除できないんだ。

このような空間効果を打ち消す方法としては、図3のように、薬剤が添加された穴の列と添加されていない穴の列が、交互に並ぶようにする。あるいは、ある程度、薬剤添加の穴の位置がランダムになるようにするなどの工夫が必要になる。

C君：こうなると、どの位置に添加したかの記録が大事になって、ウツカリすると、どの位置に添加したのかが分からなくなったりしませんか。

B君：そんなことがないように、記録をとるんだよ。

Aさん：B先輩、以前、記録をとっていたのに、分からなくなって、失敗しましたよね。

B君：言わなくていいよ。

X教授：失敗の経験は、あればあるほどいいので、大事にしよう。Aさんが言ったようなプレートに分ける系を使うなら、何枚もプレートを用意して、置く位置をランダムにして、薬剤添加という因子以外は、平均すれば、ほぼ同じになるようにする方法もある。この場合は、1枚のプレートから1つを選び、測定して、そのプレートの値とするか、プレートの平均値を採用するかになる。つまり、1枚のプレートから得られるデータは1つになるということだ。

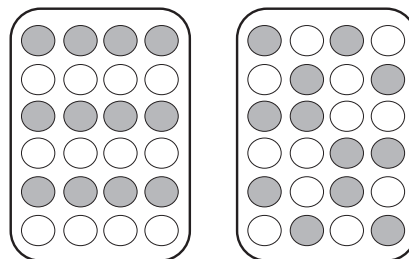


図3. 薬剤の添加効果3. 色のついた穴には薬剤が添加され、白い穴には、薬剤は添加されていない。

B君：そんな～。

X教授：でも、偽反復のデータという指摘は受けなくなるぞ。生命科学で、再現性が低いという話を聞いたことがあるが、ここまで説明してきたような、偽反復も関係しているように思うが、どうかな。

C君：はい、僕もそう思います。結局、偽反復が起これば、4個のデータと思っていたものが、実は1つのデータしか取れていないことになり、1個同士で比較して、違っていたと言っていることになってしまいますから。

X教授：まさに、その通りだね。実験デザインの不備があれば、偏ったデータしか取れておらず、さらに実験が必要な場合でも、それに気がつかないということになってしまうからね。

統計処理をしたといっても、十分なデータ数がなければ、結果は信用できない。何度も言うが、統計処理は、単なる計算法で、処理の結果は、単なる計算結果だからね。根本の、実験デザインに不備があれば、最新の統計処理法を使っても、得られる結果は「ゴミ箱行き」になってしまう。つまり、“Garbage in, garbage out”だし、もっと言えば、有名な統計学者であるR. A. Fisherが言うように、“To call in the statistician after the experiment is done may be no more than asking him to perform a post-mortem examination, he may be able to say what the experiment died of.” だな。

統計学を学ぶ意味は、もちろん、統計処理法を正しく理解するという目的がある。それ以上に、今回問題にしたような「独立」の理解や、「偽反復」になっていないかどうかの判断を、正しく行う力を身につけるといふ面もあるんだ。言い換えれば、データを、正しく見る力を養うということだ。

Aさん：統計学が大事だということは分かっていたが、今のお話で、一気にハードルも上がりましたね。

B君：データが集まって、統計処理すればいいということ自体が間違いで、そもそもデータの集め方に問題がなかったかを、きちんと吟味することが大事だということですね。やっと、納得できました。

C君：このような話は、今まで聞いたことがなかったので、大変、勉強になりました。

X教授：実験デザインの基本的な教育をしている研究室が、どのくらいあるのかは分からないが、少しでいいから、増えていってくれるといいと思うんだが。

実験の検証方法

Aさん：ねえねえ、昨日X教授が言っていた偽反復だけど、自分の実験に問題があるのかないかどうすれば確認できるのかな？

C君：培養の時のフラスコの並べ方、とか、酵素アッセイで反応開始の試料を添加する順番とか、植物を生育するときのポットの並べ方とか、HPLCやGCのオートサンプラーにサンプルを並べる順番とか、偽反復が起きそうな要因っていっぱいありますよね。

B君：そうなんだよ、フラスコの並べ方を複雑にすると、サンプリングの時に間違えちゃうかも。

Aさん：でも、偽反復が「起きてない」ってことを確かめさえすればそれでいいですよ。うーん。たとえばこうするのはどうでしょう？昨日の「細胞を培養するプレート2枚」の例でも、2枚とも薬剤を添加しない予行演習の実験を行って、プレート2枚の間で結果に差が出ないことを確かめておけば、「問題ない」って言えませんか。

C君：本番の実験と同じ条件でそれをやっておけば安心ですよ。あと、同じ実験を $n = 20$ とかで行って、得られた数値データが正規分布になるか確かめる、というのでもいいかもしれませんね。

B君：めんどくさいよ。なんでそんなことするの？

Aさん：そか、ランダムなばらつきは正規分布になるんだから、正規分布にならない場合は、なにかしら変な影響が起きているってことになるわけね。

C君：なので、可能な限りランダム化しつつ、予行演習の実験を行って、偽反復などが起きていないこと確かめておけば、安心、ですかね。

Aさん：実験は、いくらでも予行演習できるのがいいところですね。

参考書

- 1) G. D. ラクストン, N. コルグレイヴ：生命科学の実験デザイン (第5章), 名古屋大学出版会 (2019).
- 2) Lazic, S. E.: *Experimental Design for Laboratory Biologists*, pp. 84–91, Cambridge University Press (2016).
- 3) Iqbal, S. A. *et al.*: *PLoS Biol.*, **14**, e1002333 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002333> (2016).



まとめ

本文の通り、最初の実験デザインに不備があれば、統計処理は、まったく意味のない、単なる計算結果になってしまうことを、ご理解いただけたと思う。

では、どうすれば、うまく実験のデザインができるのかという疑問が出てくる。参考書1には、仮説の重要性が述べられている。

つまり、仮説を持たず、ただ、実験を行い、得られた結果を解釈しようとしても、多くの可能性があり、結局は、解釈ができなくなる。逆に、仮説(自分のストーリー)を持っていると、そのストーリーに合わせた形で解釈をしてしまい、他のストーリーを無視してしまうことも起こりうる。実験デザインでは、後者に陥らないように、考えられる限りのパターンを用意し、客観的に、自分の仮説の正しさを立証するようにしなければならない。

参考書1には「仮説と整合するデータをとっても、それが他の妥当な仮説とも整合するならば、仮説を裏付ける証拠としてはあまり役に立たない」とある。後者の戒めである。

さらに、「効果的な実験のデザインに必要なのは、数学の計算ではなく、生物学的な考察である。最初に注意深く実験をデザインしておけば、データを解析するときになって大量の汗をかいたり涙を流したりしなくてすむ」「批判的に読んだり聞いたりしよう。アイデアは自分の胸にしまっておくのではなく、尊敬する人たちにぶつけてみよう」とある。つまり、仮説を立てる際に、あらゆる可能性を考えて、批判的に仮説を検証することの重要性が述べられているわけである。そして、一人で考えていても、そこには限界があり、他人と議論することで、より強固な仮説となることが、教えられている。

参考書1では、本文の最後に、実験デザインを行うときに参考となるフローシートが示されている。ただし、

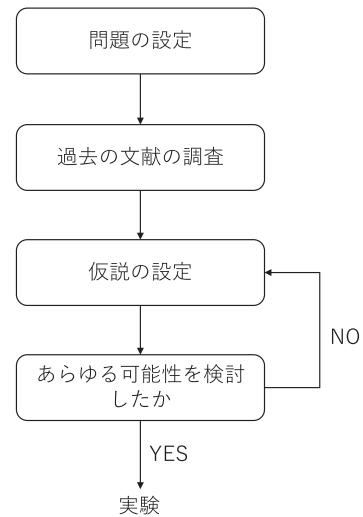


図4. 仮説設定のためのフローシート

この本は、主に、生態学分野のことを例としているため、このフローシートも生態学研究を前提としたものである。このフローシートの中で、仮説の設定に関する部分を、生物工学分野に当てはまるように直したものを次に示す。

図4はもっともシンプルな形になっており、各分野で加えることも多いと思う。過去の研究を批判的に見て、何がまだ分かっているのかを把握し、時には、その論文の欠点を見つけることになる場合もあると思うが、自分の研究のその分野での位置と意義を明確にすることが、仮説の設定の第一歩である。そして、仮説を検証する際に、さまざまな方向から見て、反論がなく成り立つには、どのような検証が必要かを考える。このプロセスが、実験デザインに重要である。

実験デザインは「自然科学の仕事」であり、決して、「統計学の仕事」ではないということを、十分理解していたいただければと願っている。