

第三章 基本理論及數據處理方法

3.1 毒性物質劑量-反應模式

生物受到毒性物質作用時，其所受的影響或者是死亡情況，會隨著毒性物質的濃度成 S 型的關係曲線如圖 3.1.1，此曲線我們稱之劑量反應關係，當在此曲線中，受測生物體受毒性物質影響，而造成百分之十的抑制情形，所對應的濃度，則稱之為 EC10

為了方便求得 EC10 值，便藉由數學關係式將 S 型轉為直線型，圖 3.1.1 所示，而此種數學轉換模式便稱為劑量反應關係模式，而不同的數學轉換的模式，所根據的基礎理論是有所不同，因此同一組數據經由不同的模式轉換過後，獲得的結果可能會有所差異；以生物試驗來說，不同的生物種類甚至不同的觀測參數(Endpoint)對毒性物質的容忍度不盡相同，若以不適當的反應模式來計算，會造成實驗點與理論之間的變異過大，特別是在結果須經外插法而求得的情況下，例如：低影響濃度的求得(EC₁₀ 或 NOEC)，其波動就更加明顯了。不同的測試物種對於不同的毒性物質有不同的斜率大小的劑量反應關係如圖 3.1.2 所示。因此，在數據的處理程序時往往需做適當的分析，判斷最適合的使用模式，以減少實驗值與理論值之見的差異。

常見的毒性劑量反應模式有三種，分別為 Logit、Weibull 及 Probit 三種。表 3.1.1 針對 Weibull、Probit 與 Logit 三種模式的容忍度分布公式。下列為常用模式之解釋：

I. Probit：為最常用的劑量-反應(dose-response)模式，其假設生物對毒性

物質的容忍度分布為常態分布(Log-normal distribution)，因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率 P 對毒物濃度 (劑量) Z 的濃度 (劑量) 反應曲線。在 Probit 轉換式中，毒性物質之 S 型濃度反應曲線先轉換成 NED (Normal Equivalent Deviation) scale 之直線，其中 50 % 抑制率 (P) 對應至 NED scale 上時為 0，而 84.1% 則對應為 1，而 NED scale 的座標值加上 5 即為 Probit 座標之概率單位 Y 值 ($Y = NED + 5$)，當 $Y = 5$ 時表示一半的測試生物受到毒性物質抑制，此時對應的毒物濃度就是 EC_{50} 。

- II. Logit：由人口成長研究所發展而出的另一種模式，描述毒性反應中的某種酵素反應(Enzyme Reaction)，適用於自催化(autocatalysis)之化學反應。
- III. Weibull：為機率-反應機制基礎 (Mechanistic-Probability basis) 模式，發展根據毒性物質分子與受測試生物之受體分子間化學鍵關係所推演而來。與 logit 模式相同，毒性物質在生物體內產生某種化學鍵結，其對參與生化反應之反應性有機物質及重金屬具有一重要之特殊涵義。

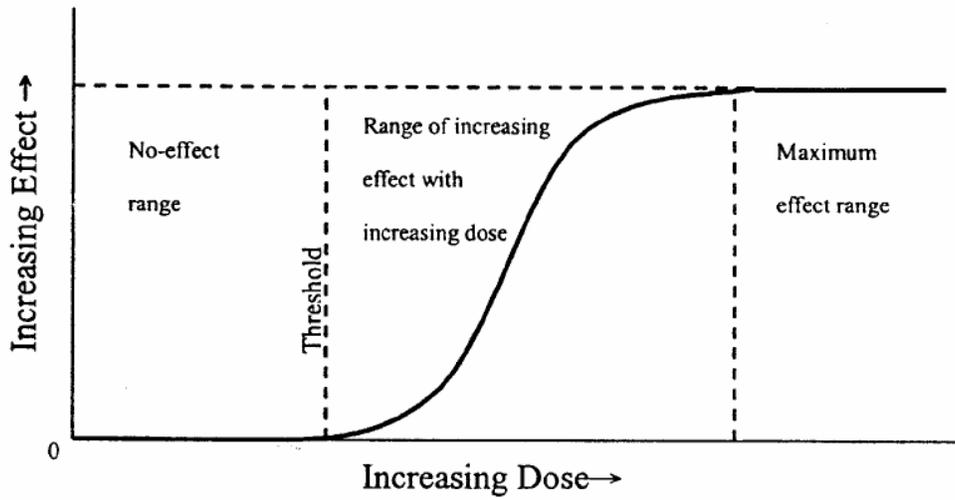


Fig 3.1.1 劑量-反應曲線 (dose-response curve) 示意圖

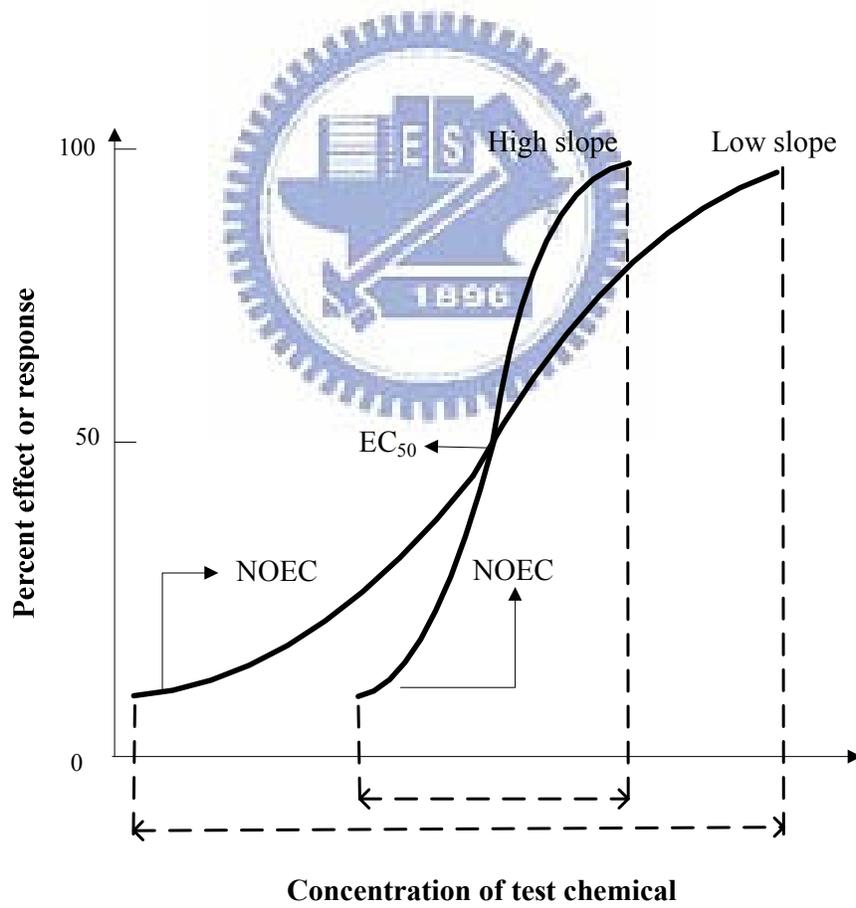


Fig 3.1.2 不同斜率的劑量反應關係

Table 3.1.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probility of response P
Weibull	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
Probit	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 + \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$
Logit	$1 = \theta + \phi \ln(z)$	$\frac{1}{4 \cosh^2(\frac{t}{2})}$	$\frac{1}{1 + e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$
Type	Probility of no-response Q	Transform vs P	Transform vs Q
Weibull	$\exp(-kz^\eta) = \exp(-e^u)$	$u = \ln(-\ln(1 - P))$	$u = \ln(-\ln Q)$
Probit	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 - \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
Logit	$\frac{1}{1 + e^{\theta} z^{\phi}} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln(\frac{P}{1 - P})$	$1 = \ln(\frac{1 - Q}{Q})$

3.2 最佳化模式(G-test)

一般毒性試驗為了具體表示實驗系統的敏感度，一般選擇以其 EC_x 值來表示，然而在數據的處理上，不同的分析模式用來分析毒性試驗的 EC_x 值會造成不同程度的誤差，而一般常用的劑量反應關係模式如 Probit、Weibull 與 Logit 所計算出的 EC_x 值又以 EC_{50} 較為接近，故實驗系統的敏感度又多以 EC_{50} 表示之。然而超過或低於 EC_{50} 的 EC_x 值，例如 EC_{90} 或 EC_{10} 會因為信賴區間的變大而誤差變會被放大，為了降低往後分析的不確定性，因此為了改善這種情況，毒性數據處理程序中往往需要對模式本身作適合度分析，以找出最適合之分析模式。本研究主要觀察引起百分之十的藻類致死性效應的化學濃度即求得 EC_{10} (mg/L)，並進行最佳模式的選擇。

在模式最佳化方面，參考 Caux 及 Moore^[59] 所提出的方法，利用 G test 來作最佳化選擇 (goodness of fit)，經由對重複試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，所得絕對值最小之 G 值可為適合的最佳模式 (best fit)。G 值之計算公式如下：

$$G = 2 \sum_{i=1}^a f_i \ln \left(\frac{f_i}{\hat{f}_i} \right)$$

其中 a 是重複組次數， f_i 是處理組觀察到的實際抑制率，而 \hat{f}_i 是對應模式所求得的理論抑制率。

其計算過程可分為四個步驟

步驟一：將溶氧、細胞數或生長率三個不同參數所觀察到的處理組和控制組比較，處理組和控制組相比轉換成抑制百分比，若最低濃度產生刺激作

用，則依使用者決定將此組數據刪除；

$$\text{即 } f_{ij} = \frac{x_{ij} - x_{i_0}}{x_{i_0}} \times 100$$

其中 x_{ij} = 第 i 組重複組，第 j 處理組對應的反應終點。

x_{i_0} = 第 i 重複組的控制組對應的反應終點。

步驟二：將已知實驗濃度根據不同的劑量反應關係模式(Weibull、Probit 與 Logit)，分別轉換成其相對應的理論抑制百分比(\hat{f}_{ij})

步驟三：將以上兩步驟所求的結果帶入 G 值之計算公式，所得的數值大小取絕對值後，選擇最小者，即為最佳值。

而在建立處理組觀察到的實際抑制率 f_i 時，在最低濃度會出現刺激作用，使得所求得的结果為負值，此時須對此值做轉換或者直接刪除此點，將其從處理組中去除。



3.3 無明顯影響濃度及中斷值

3.3.1 無明顯影響濃度(No Observed Effect Concentrations, NOEC)

另一個判斷毒性反應的指標為 NOEC (no observed effect concentration) 或 LOEC (lowest observed effect concentration)，其代表毒性物質對受測物的無影響濃度或最小影響濃度。其利用統計方法如 t-test 及 Dunnett's test^[9-10] 等，藉以分別出各濃度區間下的毒性反應與控制組的比較，在機率上是否達到顯著水準。未造成明顯反應之最高濃度為 NOEC，而達到顯著反應之最低濃度則稱為 LOEC。雖然 NOEC 值及 LOEC 值常受到實驗濃度的設定區間及實驗變異的影響，有時並未能明確表示出毒性的實際效應，在敏感度的比較上較不常使用，不過在風險評估上仍有相當的重要性。

一般而言，在所有試驗中 NOEC 濃度一定比 EC50 值小，但 LOEC 值則可能較 EC50 值小或大，皆依實驗濃度值的區間設計及實驗中各組的變異情形而定。在實驗設計上毒物濃度間相距愈小和增加各組試驗中的重複次數，都有利於實驗的準確性。

➤ ANOVA 基本原理

即是利用分析變異的方法來判定，變異為基於各類觀察體常因受某些因素之影響，以致其特性常發生不同之差異。通常總變異可分為兩方面來說明變異產生的原因：

- ✓ 已知原因之變異(由自變數引起)。
- ✓ 未知原因之變異(實驗誤差 Experimental Error，包含抽樣誤差)

Sampling Error)

亦即以下列關係式表示之：

$$\text{總變異} = \text{組間變異} + \text{組內變異(誤差變異)}$$

$$SST = SSB + SSW$$

ANOVA TABLE

變異數之來源 (SOURCE)	自由度 (DF)	平方和 (SUM OF SQUARE)	平均方 (MEAN SQUARE)
組間(BETWEEN)	P-1	SSB	$S_B^2 = SSB/(P-1)$
組內(WITHIN)	N-P	SSW	$S_w^2 = SSW/(N-P)$
總和(TOTAL)	N-1	SST	

P：組數個數

N：總樣本數

所以

$$SST = \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}^2 - G^2 / N$$

$$SSB = \sum_{i=1}^P T_i^2 / n_i - G^2 / N$$

$$SSW = SST - SSB$$

G：所有試驗數據之和

T_i：組數為第 i 組時，所有 replicates 數據之和

X_{ij}：組數為第 i 組時的第 j 個 replicate 之數據

n_i：處理組 replicates 之數目。

➤ 以下為統計方法中之 Dunnett's Test 的操作程序:

步驟一：建立毒性試驗原始資料表

Replicate	Treatment				
	Control	1	2	3	---- j
1	y_{11}	y_{21}	y_{31}	y_{41}	y_{j1}
2	y_{12}	y_{22}	y_{32}	y_{42}	y_{j2}
3	y_{13}	y_{23}	y_{33}	y_{43}	y_{j3}
---- i	y_{1i}	y_{2i}	y_{3i}	y_{4i}	y_{ji}

步驟二：建立變異數分析表

變異數之來源 (SOURCE)	自由度 (DF)	平方和 (SUM OF SQUARE)	平均方 (MEAN SQUARE)
Blocks(rows)	$n-1$	SSQ_R	$\frac{SSQ_R}{n-1}$
處理組(columns)	$c-1$	SSQ_K	$\frac{SSQ_K}{c-1}$
誤差(ERROR)	$(n-1) \times (c-1)$	SSQ_E	$S^2 = \frac{SSQ_E}{(n-1) \times (c-1)}$

c：包含控制組的毒物濃度個數。

n：所有試驗重複組的組數。

S^2 ：Estimated error variance。

其中

$$SSQ_R = \frac{1}{c} \sum_{i=1}^c Y_i^2 - \frac{G^2}{c \times n}$$

$$SSQ_k = \frac{1}{n} \sum_{j=0}^c Y_j^2 - \frac{G^2}{c \times n}$$

$$SSQ_E = \sum_{j=0}^c \sum_{i=1}^n y_{ji}^2 - \frac{1}{c} \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \frac{1}{n} \sum_{j=0}^c Y_j^2 + \frac{G^2}{c \times n}$$

G：所有試驗數據之和

Y_i ：重複組為第 i 組時，所有對應濃度數據之和

Y_j ：濃度為第 j 組時，所有重複組數據之和

y_{ji} ：濃度為第 j 組時的第 i 個 replicate 之數據

步驟三：計算出每種毒物濃度與控制組間的 S 值。

$$S_i = \frac{(\bar{y}_j - \bar{y}_0)}{S_d}$$

而 S_d 為 The standard error of difference： $S_d = \sqrt{\frac{2 \times S^2}{n}}$

其中 \bar{y}_0 ：控制組數據之平均值。

\bar{y}_j ：處理組第 j 數據之平均值。

S^2 ：分析變數表中 Estimated error variance。

步驟四：可表示為下表並查表得出結論

Treatment	S_i	r	查表 $T_{\alpha, (N-1) \times (C-1)}$ (Tabulated value)
1	S_1	2	
2	S_2	3	$S_i < T$ 不顯著
3	S_3	4	$S_i > T$ 顯著
4	S_4	5	
...j	S_j	j+1	

其中

- I. 以上各處理組 S_i 值以步驟 3 方法算出。
- II. r 為依 S_i 值大小而排序 (S_i 值最小時, r 定為 2, 依此類推)。
- III. $T_{\alpha, (n-1) \times (c-1)}$ 查表求 T 值時, α 顯著水準 (一般為 one-side test)、 $(n-1) \times (c-1)$ 為組內自由度、 r 為排序。
- IV. 當 S_i 值大於其所相對的 T 值時則為達顯著 (Significant), 當 S_i 值小於其所相對的 T 值時則未達顯著 (Not Significant), 此值即為 NOEC。

3.3.2 中斷值(cut-off value)

求出 NOEC 後，可經由 Chao *et al.* [60] 所提出的平均中斷值(cut-off value)來判斷 NOEC 所能對應到之保護程度的極限，藉此作為判斷 NOEC 是否較 EC₁₀ 能提供為較敏感及客觀的環境保護參數(Endpoint)。應用 One-tail Dunnett's 建立具有 5% 顯著值的 NOEC 及 LOEC，即可建立標準化全距，如下所表示

$$\text{標準化全距 (SI)} = \frac{X_c - X_i}{S_w \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{1}{n_i}}}$$

其中，

X_c：控制組之平均值

X_i：處理組之平均值

S_w：組內變異之平方根。

n_c 與 n_i：控制組與處理組重複試驗次數。



假設平均中斷值與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此若組內變異較小的精確試驗則有較小的平均中斷值，其計算公式如下：

$$\text{平均中斷值 (\%reduction)} = \frac{X_c - X_i}{X_c} \times 100 = \frac{T}{X_c} \times S_w \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{1}{n_i}} \times 100$$

其中，

T：查表所得（以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表）。

X_c：控制組之平均值。

X_i：處理組之平均值。

S_w：ANOVA TABLE 表內的組內變異之平方根。

n_c 與 n_i：控制組與處理組重複試驗次數。

3.4 無影響濃度(No Effect Concentrations, NEC)

毒性反應的判斷指標，除了前面提到的 NOEC 及 EC₁₀ 外，還有無影響濃度(No Effect Concentrations, NEC)。NEC 主要和 NOEC 不同的地方是在於計算的方法不同，之前已提到 NOEC 是利用變數分析(ANOVA)的方法求得的，而 NEC 則是利用回歸分析(Regression analysis)的方法所求得的。

計算 NEC 主要惟一非線性模式的假設，其主要是假設所觀測到的反應終點參數和濃度呈現一個簡單的線性遞減關係或者是惟一指數遞減的關係，但在接近濃度為零(及控制組)時，會呈現一定值接著即開始遞減，如圖 3.4.1, 3.4.2 所示，c 即表示為 NEC。而這些模式在統計學上的文獻中已存在很久並且有相當多的命名，例如：segmented regression, multiphase regression, regression with changepoint 以及 regression with breakpoint 等等^[61]。而使用這樣的方式求的 NEC，計算方法複雜且須有良好的統計背景基礎才會運用。因此，本研究求得方法是參考 Liber *et al.*^[62] 所提出的方法，利用將濃度及反應終點的參數取對數轉換後，相互做圖比較取其線性關係式後，將反應終點參數控制組的值代入，推出 NEC 的值。而此線性關係的判斷則是參考 Paulsson *et al.*^[63] 其根據兩項參考值

- (1) 回歸斜率的顯著值($P < 0.05$)。
- (2) 最大的 r^2 。

即可判定此迴歸為一線性關係。在本研究中，超過百分之九十五的數據其 P 值皆小於 0.05，而平均 P 值約為 0.016。

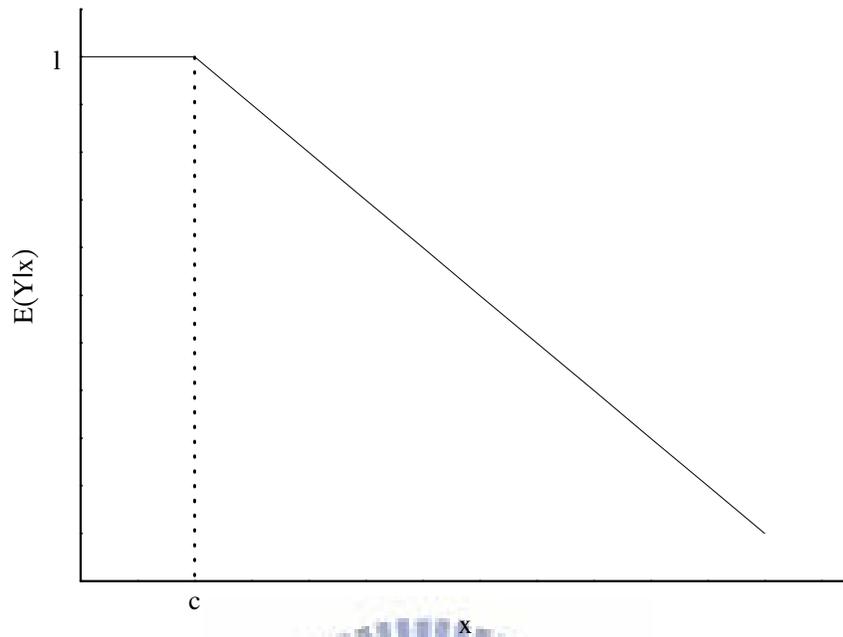


Fig 3.4.1 Mean response function with a linear decay

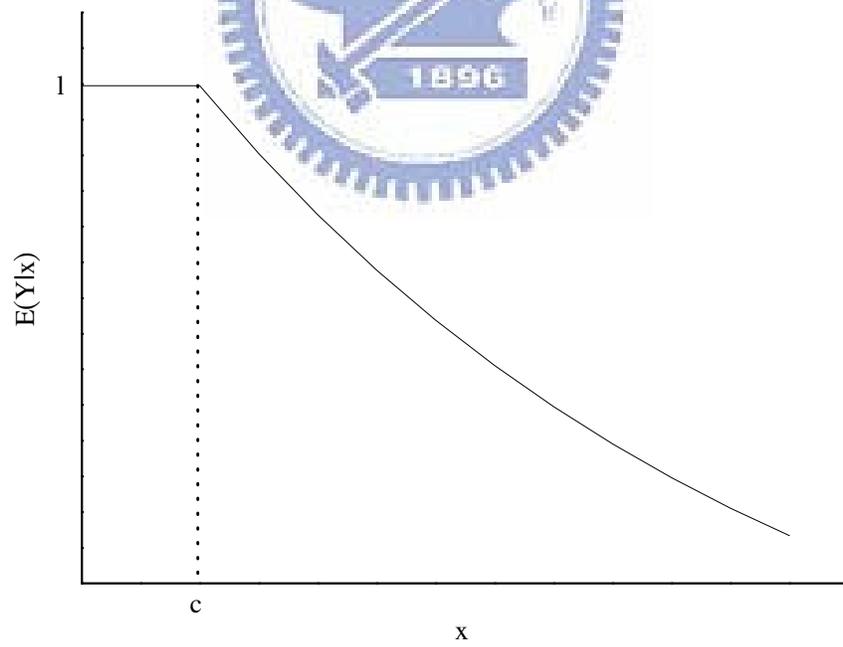


Fig 3.4.2 Mean response function with an exponential decay

亦可參考 Draper 及 Smith^[64]所提出的方法，求出 NEC 之 95%信賴區間的上下極限值(公式如下)，如圖 3.4.3 所示。

$$\left. \begin{array}{l} \text{NEC}_{\text{upper}} \\ \text{NEC}_{\text{lower}} \end{array} \right\} = \bar{X} + \frac{b_1(Y_0 - \bar{Y}) \pm ts \left\{ \left[(Y_0 - \bar{Y})^2 / S_{xx} \right] + (b_1^2/n) - (t^2 s^2 / n S_{xx}) \right\}^{1/2}}{b_1^2 - (t^2 s^2 / S_{xx})}$$

其中，

b_1 = 迴歸方程式的斜率。

\bar{X} = 平均濃度。

\bar{Y} = \bar{X} 所對應的 Y 值。

t = 自由度為(n-1)的 T-value

$$S_{xx} = \sum (X_i - \bar{X})^2$$

t = t(v, 1 - α /2), v 是 s^2 的自由度而

s = 標準偏差，

n = 迴歸方程式點的個數。



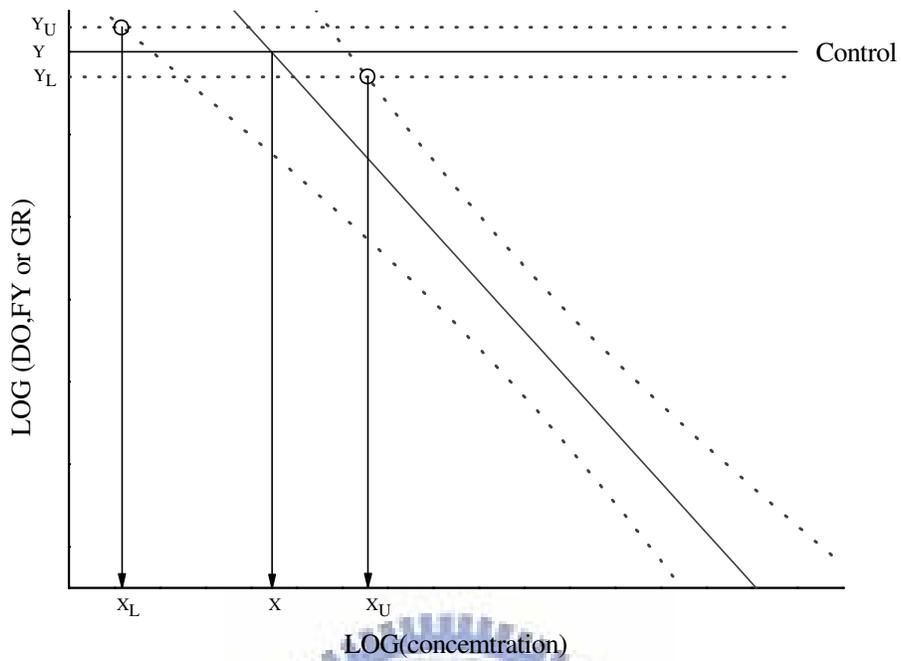


Fig 3.4.3 Diagrammatic representation of inverse regression analysis procedure for estimating the no-effect concentration (NEC).

