



質問・コメントとそれに対する回答

## 客観的な判断のむずかしい事例をどう扱うか？ (2009年4月号掲載)

齋藤成昭 (久留米大学分子生命科学研究所)

**Q** ある発現量が低く非常に検出のむずかしい遺伝子に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行なうと、2~3割の確率でしかシグナルを検出することができません。ただ、検出できた場合はいつも同じパターンであり、機能欠損変異体の表現型と一致する部位で検出されます。この、2~3割で検出されるパターンを典型例とみなしてよいのでしょうか。それとも、やはりこれは、“低頻度でしか検出できない”ときちんと記述するべきなのでしょう。

**A** 成功率の低い実験結果を評価する際には、さまざまな要因を考慮して慎重に結論をくだすべきでしょう。質問の例ですと、2~3割の成功率とはいえ、成功したときには再現性よく同じパターンが得られており、しかも、その結果と符合する表現型のデータが得られているのですから、典型的なパターンとみなしてよいのではないかと思います。ただし、本当はその遺伝子を発現しているのに、感度の限界ゆえに検出できなかった部位の存在する可能性は十分にあります。その可能性に言及するうえでも、ターゲットが検出のむずかしい遺伝子であることを述べておくのは意味があると思います。

**Q** 客観性を保とうとすること、あるいは、倫理観には個人差が大きく、データに主観性が入りうるものについて卒業研究生の結果を追試すると、異なる結果の得られることもめずらしくありません。とくに、“異常”は記述しやすいのですが“正常”を定義することは非常にむずかしく、研究チーム内でのコンセンサスをとってみても、同じサンプルに対して異なる者が計数すると異なる結果になることもしばしばあります。何かよい方法はありますか。

**A** 筆者らも、質問と同じ問題にはよくぶつかります。卒業研究生のような初学者の場合、指導教官やまわりの意見に惑わされることが多いようです。“できるかぎり客観的かつ正直にデータを解析すること”が科学の基本であることを十分に教えるとともに、実験指導にあたる者は予断をあたえるような言動を慎むべきでしょう。卒業研究であると時間も限られているのでなかなかむずかしいかもしれませんが、同じ実験を何度も追試させて、自身で再現性を確認させることも重要なトレーニングだと思います。4月号の記事でも述べましたが、筆者も、自分の実験を追試する過程で自分の思い込みによるミスに気づきました。そして、いまになってみれば、それは非常に貴重な体験であったと感じています。また、重要な実験や観察の場合には指導者も付き添い、結果に“主観性による歪み”がふくまれていないことを確認すべきでしょう。また、“正常”の定義が非常にむずかしいという意見には完全に同意します。これに関しては慣れるよりほかはないと思います。回り道のようなかもしれませんが、“サンプル”を観察するまえに、まず、“正常型”“野生型”といった細胞や標本を十分な時間をかけてじっくりと観察し、それらの形態に習熟する必要があります。実際の“正常型”が、教科書に記載されているイラストとは異なることを体感することが重要です。研究チーム内でコンセンサスをとる際には、実際に細胞や写真を見ながら“その細胞をどう分類するか”を議論するようにすれば、ある程度まで基準がまとまるように思います。



Q およそ何パーセント以上の細胞に異常があれば、“代表例”“典型例”として例示してもよいものなのでしょうか？たとえば、統計では5%有意などといいますように、5%以上の細胞がある表現型を示せば“代表”とみなせるのでしょうか？あるいは、1%であっても複数の細胞が観察されれば“代表”とみなしてよいのでしょうか？おおよその基準をお教えください。



A 研究分野や対象によって基準は大きく異なるでしょうから、一概に何パーセント以上あれば表現型として有意であると断定することはできません。おおよその基準を知るためには、類似の研究分野の論文を参考にするのが近道のように思います。複数の論文を比較すれば、いわば“業界標準”のようなものがみつかるでしょうから、その値を基準にすればよいでしょう。より正確には、やはり統計的な解析を行なうべきです。その表現型の出現頻度に関して対照実験と比較して検定を行ない、たとえば、95%の確度で有意性が支持できるのであれば（すなわち、“対照との差がない”という帰無仮説が95%の確度で棄却できるのであれば）、有意な表現型であるとみなしてもよいでしょう。いずれの場合にせよ、例示した細胞像とともに、そのような細胞がどれくらいの頻度で出現するのかを記述しておくのがよいと思います。



Q 百間は一見に如かずといいますが、それでも、“代表例”の一見だけでの判断はむずかしいとわかりました。代表例だけでなく、ひとつの視野に複数の細胞の写っている写真を掲載すれば多くの問題は解決すると思うのですが、それは技術的にむずかしいのでしょうか？あるいは、学会のレベルではそのような試みはなされているのでしょうか？最新のトレンドなどがあたらご紹介ください。



A 指摘のとおり、複数の細胞の写った視野の写真を示すのはよいアイデアだと思いますし、実際に、筆者らも可能な限りそのようにしています。ただし、論文にする場合、誌面の都合から掲載できる写真の大きさには限界があります。したがって、ひとつの視野にあまりにも多くの細胞を詰め込むとそれぞれが小さくなってしまい、ディテールを表現することがむずかしくなります。技術的にはこの点が問題になるかもしれません。最近では、supplemental materialsとしてWeb上にデータを提示することも可能ですから、これをうまく利用すれば技術的な問題は回避できるでしょう。学会での口頭発表の場合には、時間が限られていますからさらに状況はむずかしいと思います。プレゼンテーションの技量によっても左右されますが、複数の細胞が提示されると、どこに注目してよいかわからなくなって聴衆がかえって混乱するということもありえます。筆者の場合には、自分の技量と相談したうえで、少数の代表例のみを示すようにしています。それにくわえて、示したような細胞がどのくらいの頻度で現われるかといった統計的なデータも提示するようにしています。



Q 例としてあげられた分裂酵母変異体の分類は、非専門家にとっては正確に行なえる自信がありません。また、手で数えるのにも数えられる数に限度があります。この例にかぎらず、何か客観的に計測・判断できるアルゴリズムやプログラムができれば便利だと思うのですが、市販あるいはフリーのソフトウェアで可能でしょうか？



A 筆者は、米国NIHよりフリーで提供されているImage Jという画像解析ソフトウェアを利用しています。Image Jでは、マクロとよばれる小さなプログラムを作成することで機能を追加することができます。筆者は、このマクロ機能を利用してM期紡錘体の長さや位置の計測を自動化しています。筆者には把握しきれませんが、

そのほかにも多くのすぐれたソフトウェアが開発されているようです。ただし、4月号の記事で示したような、観察者の“感性”に大きく依存するような分類や解析をアルゴリズム化するのは容易ではないと思います。



おそらく手間がかかるせいで、あまり基礎生命科学の研究で行なわれているという話は聞きませんが、客観性が非常に重要な場面においては、臨床薬学研究で行なわれるようなブラインド実験が有効な場合もあるのではないかと思いました。



指摘のとおりだと思います。かつていちど、筆者も試みたことがあるのですが、面倒ではあるものの、データの客観性は増すように思えました。サンプルによってはラベルがなくても一目瞭然にどのサンプルかわかってしまうこともあり、この場合には、ブラインド性が保てなくなってしまいます。しかしながら、対照との違いがあったとしてもわずかであるようなサンプルの場合（すなわち、もっとも客観性を要求される場合なのですが）には、たいへん有効な手段だと思います。