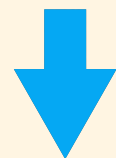


こんなときどうする？

マウスにHFDあるいはHFD+baccteriaを摂取させて、
4週間後の体重を測定した。

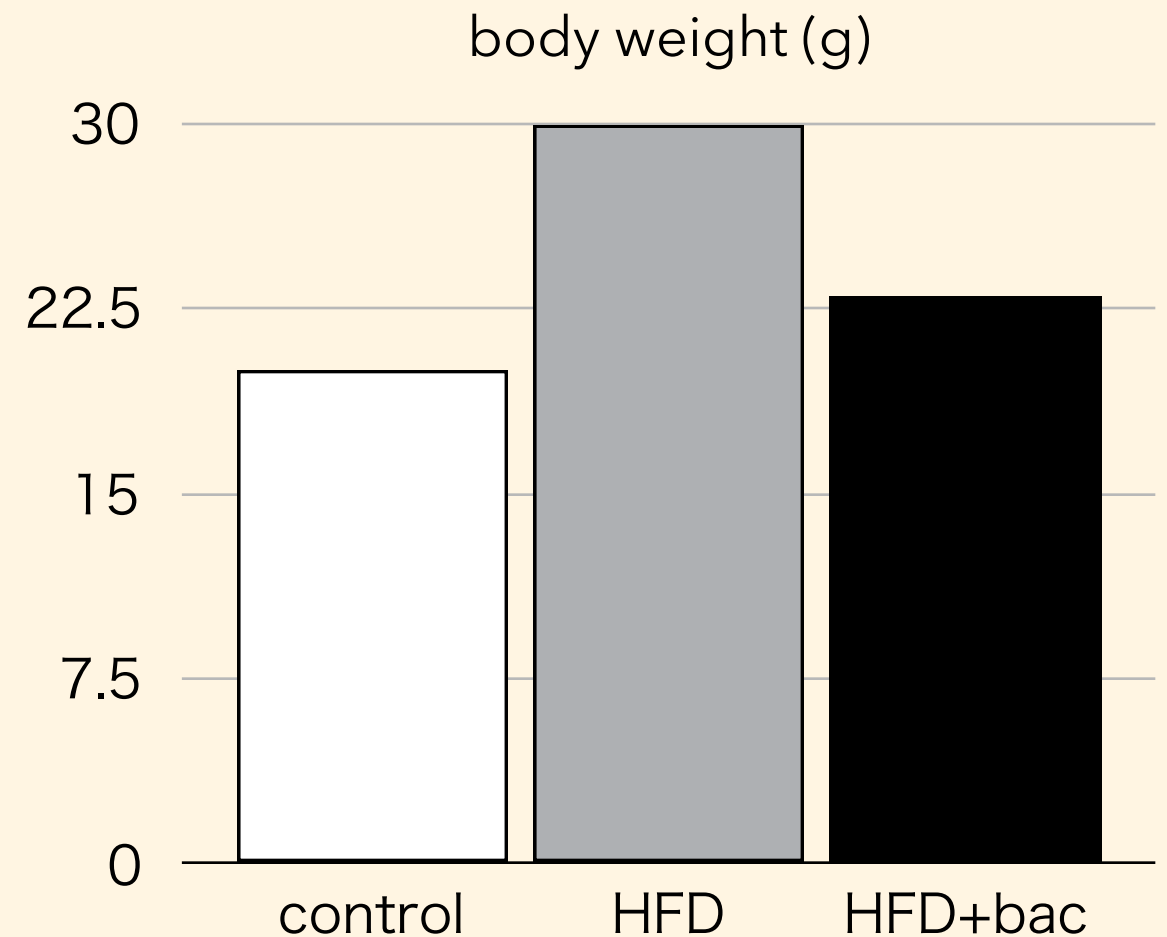
- control vs HFD
- control vs HFD+bac
- HFD vs HFD + bac

の3通りで体重に差があるか検定したい。



よくある間違い

t検定を3回繰り返す



Q.なぜ検定を繰り返してはいけないか？

A.有意水準が高くなるから

有意水準：あるP値を有意とするときの閾値（通常は0.05）

例：検定すると $P = 0.01$ だった→有意水準の0.05より小さいため有意である。

検定すると $P = 0.06$ だった→有意水準の0.05より大きいため有意でない。

さいころでイメージ

- ・さいころを1回振って1が出る確率
→ $1/6 = 0.167$
- ・さいころを2回振って少なくとも1回1が出る確率
→ $1 - (1 - 1/6)^2 = 0.306$
- ・さいころを20回振って少なくとも1回1が出る確率
→ $1 - (1 - 1/6)^{20} = 0.974$



検定を繰り返すとは5%の確率のさいころを振り続けるのと同じ

有意水準0.05の検定を繰り返す

- 1回の検定で有意となる確率
→0.05
- 2回の検定で少なくとも1回有意となる確率
→ $1 - (1 - 0.05)^2 = 0.098$
- 20回の検定で少なくとも1回有意となる確率
→ $1 - (1 - 0.05)^{20} = 0.642$
- 100回の検定で少なくとも1回有意となる確率
→ $1 - (1 - 0.05)^{100} = 0.994$

有意水準0.05の検定を繰り返す

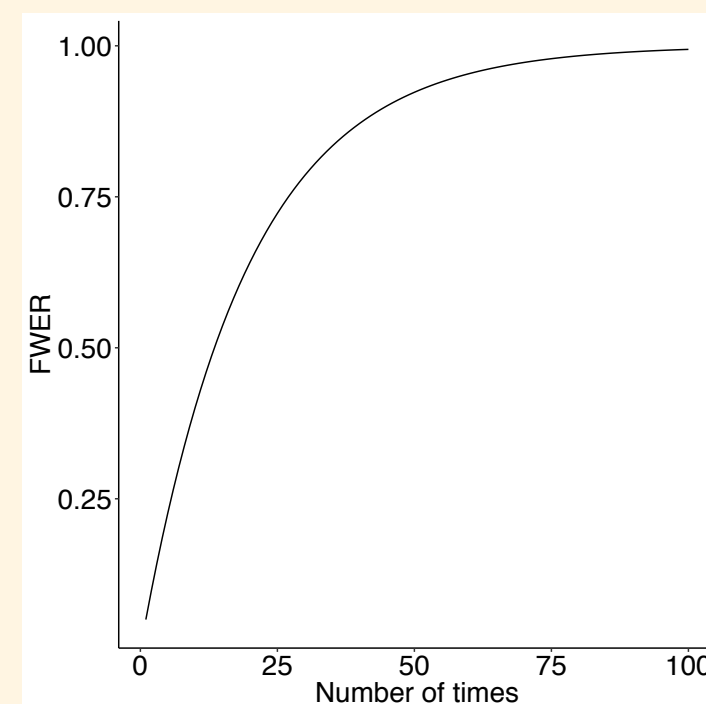
100回検定を繰り返すと、**例え有意差がなくても1回は有意差ありと判断されてしまう。**

検定を繰り返すときに1回でも有意差がありと判断される確率
FWER (Family-Wise Error Rate)

参考:RでFWERを求めてみる

```
alpha <- 0.05 #有意水準0.05の検定
FWER <- c()
for (i in 1:100) {
  FWER <- c(FWER, 1 - (1 - alpha) ^ i)
}
FWER_result <- data.frame(times = 1:100, FWER = FWER)

pdf("fwer.pdf")
ggplot(FWER_result, aes(x = times, y = FWER)) + geom_line() +
  theme_classic() +
  theme(axis.title = element_text(size = 20, colour = "black"),
        axis.text = element_text(size = 20, colour = "black"),
        axis.line = element_line(colour = "black")) +
  xlab("Number of times")
dev.off()
```



有意差のないデータを100回検定してみる

- ・イメージ

2群($n = 10$)のマウス実験で100種の細菌種が検出されたとき、t検定で全細菌の存在量を検定する。

- ・Rで存在量をランダムに生成 (=有意差なし) して検定してみる。

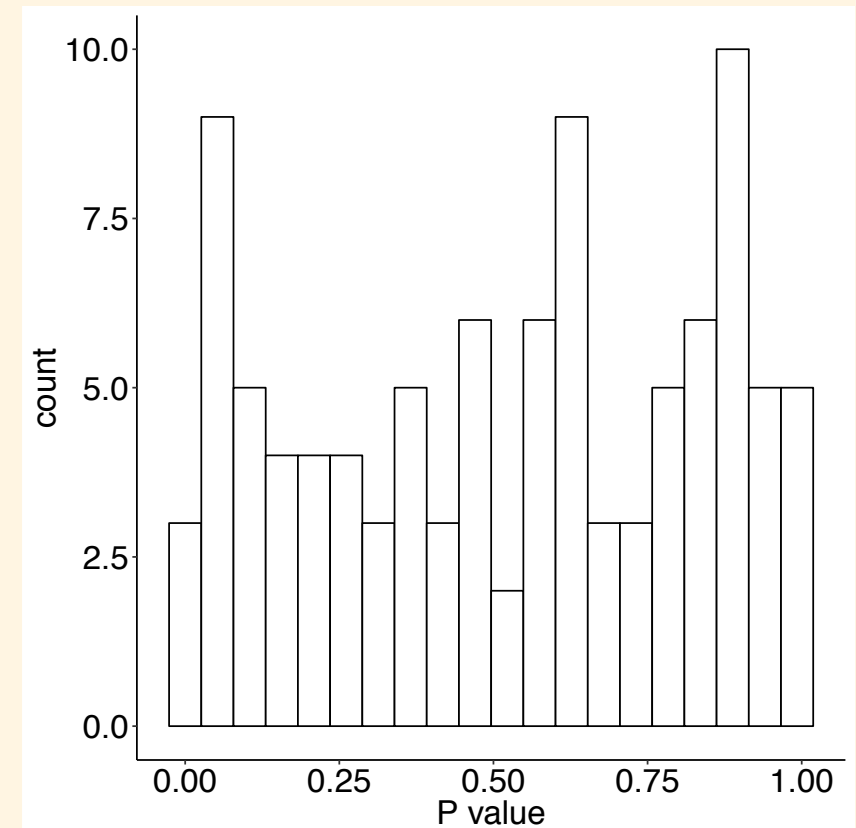
- ・P値の分布を見ると、0.05未満がいくつかある。



有意差がないデータでも有意差ありと判断されてしまう危険性がある。

```
pvec <- c()
for (i in 1:100) {
  result <- t.test(rnorm(10, mean = 1, sd = 1),
                  rnorm(10, mean = 1, sd = 1),
                  paired = F, var.equal = T)
  pvec <- c(pvec, result$p.value)
}

pdf("pvalue_hist.pdf")
ggplot(NULL, aes(x = pvec)) +
  geom_histogram(bins = 20, fill = "white", colour = "black") +
  theme_classic() +
  theme(axis.title = element_text(size = 20, colour = "black"),
        axis.text = element_text(size = 20, colour = "black"),
        axis.line = element_line(colour = "black")) +
  xlab("P value")
dev.off()
```



じゃあ、結局どうすればいい？

- ①検定方法自体を変更する(統計量を工夫)
- ②P値を補正する、あるいはP値以外の指標を使う

①検定方法自体を変更

パラメトリック：Tukey-Kramer検定（全群比較）、Dunnett検定（コントロール対比較）

ノンパラメトリック：Steel-Dwass検定（全群比較）、Dunn検定（コントロール対比較）

全群比較：control vs HFD, control vs HFD+bac, HFD vs HFD + bacの3通り（nC2通り）

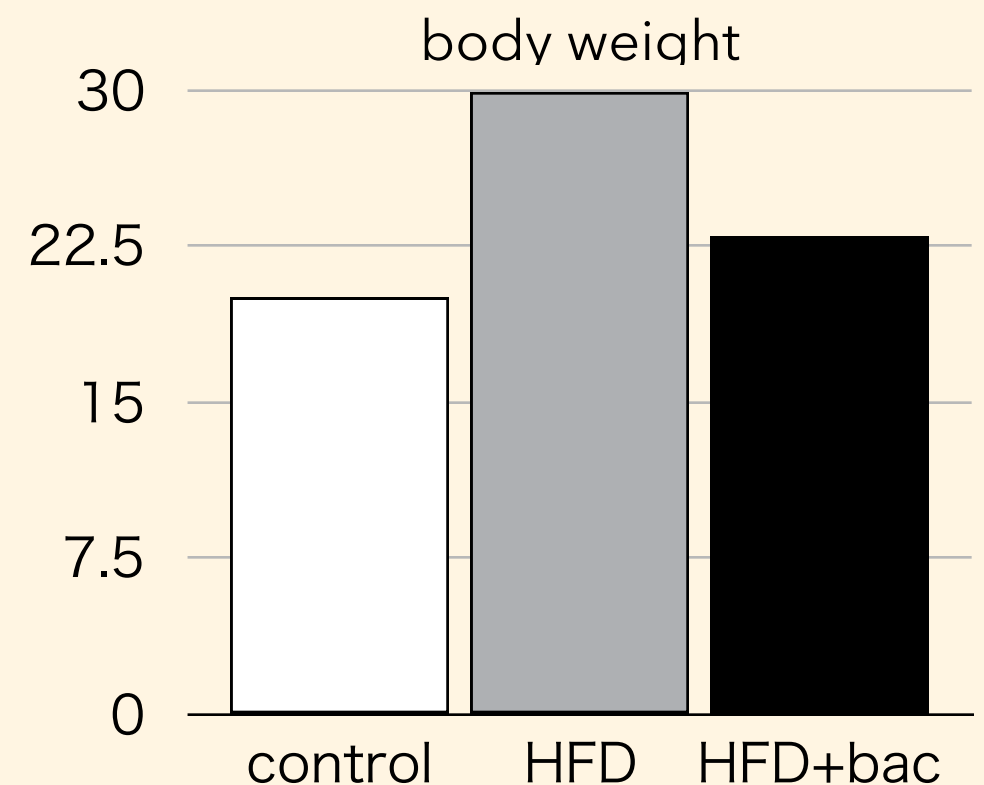
コントロール対比較：control vs HFD, control vs HFD+bacの2通り（n-1通り）

検定回数が多いほどP値は高くなる

= 全群比較の方がコントロール対比較よりもP値は高くなる



検定方法はよく考えて選択しましょう



Bonferroni補正

- FWER(family-wise error rate)が5%（以下）になるようにP値を補正する方法
- 有意水準を検定回数で割る＝P値に検定回数をかける

- メリット：簡便
- デメリット：回数が多くなると有意が出にくい

100回検定したら0.0005以下じゃないと有意にならない

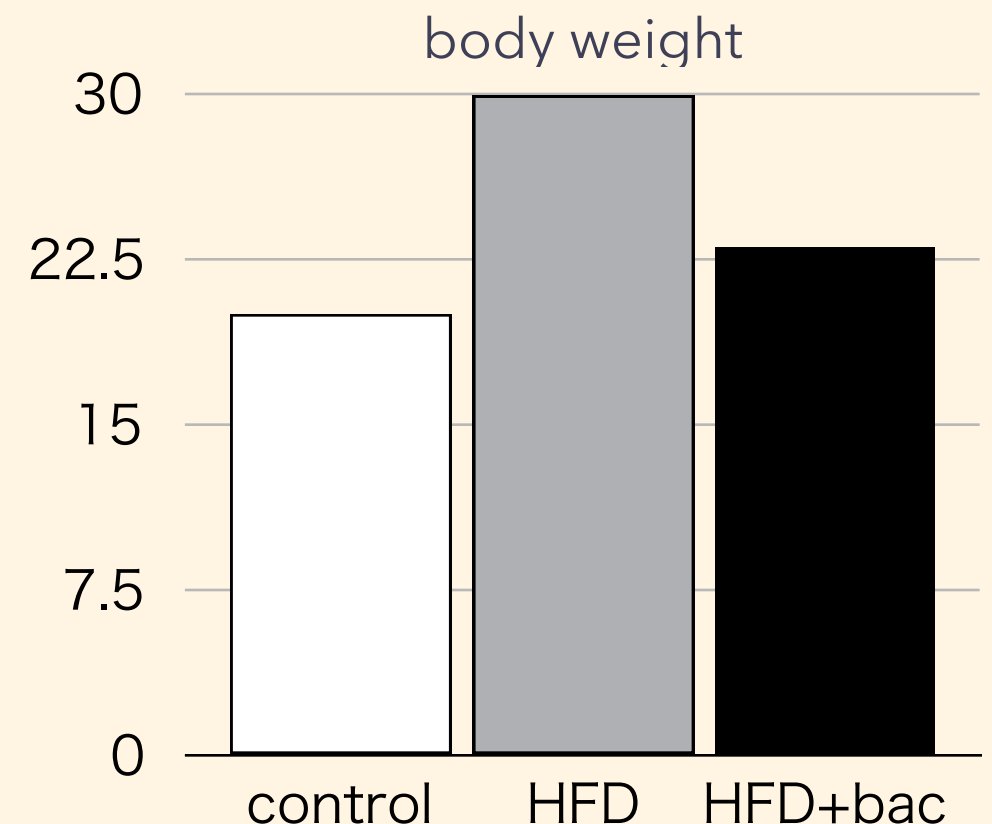
- 具体例

control vs HFD: $P = 0.012$
control vs HFD+bac: $P = 0.022$
HFD vs HFD + bac: $P = 0.034$



Bonferroni補正

control vs HFD: $P = 0.012 \times 3 = 0.036$
control vs HFD+bac: $P = 0.022 \times 3 = 0.066$
HFD vs HFD + bac: $P = 0.034 \times 3 = 0.102$



FDR(false discovery rate)

- 棄却された全ての帰無仮説のうち、 α エラー（＝偽陽性）が含まれる期待値
→有意となったP値のうち、本当は有意でないものの割合
- $FP/(TP+FP)$ の割合
- 検定回数が多いときに有用
→遺伝子発現、細菌存在量、代謝物濃度など
- P値と比較してQ値とも呼ばれる
- 具体例
100の細菌種を検定してFDR < 0.05となったのは20種だった。
→1種は偽陽性が含まれる可能性があることを示す。

分かる人用の説明

	検定の結果		計
	帰無仮説を採択 (有意差あり)	帰無仮説を棄却 (有意差なし)	
真の帰無仮説 (実際は有意差なし)	u	$v(\alpha \text{ エラー})$	n
偽の帰無仮説 (実際は有意差あり)	$t(\beta \text{ エラー})$	s	$N - n$
計	$N - R$	R	N

大阪大学大学院医学系研究科 老齢・腎臓内科学 腎臓内科(<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/clinicaljournalclub1.html>)より一部改変

- N 回検定して R 個帰無仮説を棄却（＝有意と判断）した場合
- u, v, t, s, n は未知の値であり（分かってたら研究する必要ないので）、観測できるのは N と R のみ
- FWERは $v \geq 1$ となる確率: $P(V \geq 1)$
- FDRは v / R

参考資料

- 池田郁男.実験で使うところだけ生物統計1 改訂版, 羊土社, 2017.
- 池田郁男.実験で使うところだけ生物統計2 改訂版, 羊土社, 2017.
- 結城浩. 数学ガールの秘密ノート やさしい統計, SBクリエイティブ, 2016.
- 弘前大学医学部 統計的検定資料①<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~pteiki/research/stat/multi.pdf>
- 大阪大学大学院医学系研究科 老齢・腎臓内科学 腎臓内科 <http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/kid/clinicaljournalclub1.html>
- 大人になってからの再学習<http://zellij.hatenablog.com/entry/20120525/p1>
- いらすとや<https://www.irasutoya.com/>
- P値とQ値<https://products.sint.co.jp/aisia/blog/vol1-11>