

# TEKST NR 20

# 1979

**Michael Olsen**  
**Jørn Jensen**

STATISTISKE MODELLER  
TIL BESTEMMELSE AF  
SIKRE DOSER  
FOR  
CARCINOGENE STOFFER

VEJLEDER: JØRGEN LARSEN

## TEKSTER fra

### IMFUFA

**ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER**  
INSTITUT FOR STUDIET AF MATEMATIK OG FYSIK SAMT DERES  
FUNKTIONER I UNDERVISNING, FORSKNING OG ANVENDELSER

- 
- 1/78 "TANKER OM EN PRAKSIS" - et matematikprojekt  
Anne Jensen, Marianne Kesselhahn, Lena Lindenskov og Nicolai Lomholt.  
Vejleder: Anders Madsen.
- 2/78 "OPTIMERING" - Menneskets forøgede beherskelsesmuligheder af natur og samfund.  
Projektrapport af Tom J. Andersen, Tommy R. Andersen, Gert Kreinø og  
Peter H. Lassen. Vejleder: Bernhelm Booss
- 3/78 "Opgavesamling", breddekursus i fysik.  
Lasse Rasmussen, Aage Bonde Kræmmer, Jens Højgaard Jensen.
- 4/78 "Tre essays" - om matematikundervisning, matematiklæreruddannelsen og  
videnskabsrindalismen.  
Mogens Niss.
- 5/78 "BIBLIOGRAFISK VEJLEDNING til studiet af DEN MODERNE FYSIKS HISTORIE"  
Helge Kragh.
- 6/78 "Nogle artikler og debatindlæg om - læreruddannelse og undervisning i fysik,  
og - de naturvidenskabelige fags situation efter studenteroprøret"  
Karin Beyer, Jens Højgaard Jensen, Bent C. Jørgensen.
- 7/78 "Matematikkens forhold til samfundsøkonomien"  
B.V. Gnedenko.
- 8/78 "DYNAMIK OG DIAGRAMMER". Introduktion til energy-bond-graph formalismen.  
Peder Voetmann Christiansen.
- 9/78 "OM PRAKSIS' INDFLYDELSE PÅ MATEMATIKKENS UDVIKLING"  
Motiver til Kepler's: "Nova Stereometria Doliorum Vinariorum"  
Projektrapport af Lasse Rasmussen.  
Vejleder: Anders Madsen.
- 
- 10/79 "TERMODYNAMIK I GYMNASIET"  
Projektrapport af Jan Christensen og Jeanne Mortensen  
Vejledere: Karin Beyer og Peder Voetmann Christiansen.
- 11/79 "STATISTISKE MATERIALER"  
red. Jørgen Larsen.
- 12/79 "Lineære differentiaalligninger og differentiaalligningssystemer"  
Mogens Brun Heefelt.
- 13/79 "CAVENDISH'S FORSØG I GYMNASIET". Projektrapport af Gert Kreinø.  
Vejleder: Albert Chr. Paulsen.
- 14/79 "Books about Mathematics: History, Philosophy, Education, Models, System  
Theory, and Works of Reference etc. A Bibliography".  
Else Høyrup.
- 15/79 "STRUKTUREL STABILITET OG KATASTROFER i systemer i og udenfor  
termodynamisk ligevægt" Specialeopgave af Leif S. Striegler.  
Vejleder: Peder Voetmann Christiansen.

# TEKST NR 20

# 1979

**Michael Olsen**  
**Jørn Jensen**

STATISTISKE MODELLER  
TIL BESTEMMELSE AF  
SIKRE DOSER  
FOR  
CARCINOGENE STOFFER

VEJLEDER: JØRGEN LARSEN

## TEKSTER fra

**IMFUFA**

**ROSKILDE UNIVERSITETSCENTER**  
INSTITUT FOR STUDIET AF MATEMATIK OG FYSIK SAMT DERES  
FUNKTIONER I UNDERVISNING, FORSKNING OG ANVENDELSER

- 
- 1/78 "TANKER OM EN PRAKSIS" - et matematikprojekt  
Anne Jensen, Marianne Kesselhahn, Lena Lindenskov og Nicolai Lomholt.  
Vejleder: Anders Madsen.
- 2/78 "OPTIMERING" - Menneskets forøgede beherskelsesmuligheder af natur og samfund.  
Projektrapport af Tom J. Andersen, Tommy R. Andersen, Gert Kreinøe og  
Peter H. Lassen. Vejleder: Bernhelm Booss
- 3/78 "Opgavesamling", breddekursus i fysik.  
Lasse Rasmussen, Aage Bonde Kræmmer, Jens Højgaard Jensen.
- 4/78 "Tre essays" - om matematikundervisning, matematiklæreruddannelsen og  
videnskabsrindalismen.  
Mogens Niss.
- 5/78 "BIBLIOGRAFISK VEJLEDNING til studiet af DEN MODERNE FYSIKS HISTORIE"  
Helge Kragh.
- 6/78 "Nogle artikler og debatindlæg om - læreruddannelse og undervisning i fysik,  
og - de naturvidenskabelige fags situation efter studenteroprøret"  
Karin Beyer, Jens Højgaard Jensen, Bent C. Jørgensen.
- 7/78 "Matematikens forhold til samfundsøkonomien"  
B.V. Gnedenko.
- 8/78 "DYNAMIK OG DIAGRAMMER". Introduktion til energy-bond-graph formalismen.  
Peder Voetmann Christiansen.
- 9/78 "OM PRAKSIS' INDFLYDELSE PÅ MATEMATIKKENS UDVIKLING"  
Motiver til Kepler's: "Nova Stereometria Doliorum Vinarioum"  
Projektrapport af Lasse Rasmussen.  
Vejleder: Anders Madsen.
- 
- 10/79 "TERMODYNAMIK I GYMNASIET"  
Projektrapport af Jan Christensen og Jeanne Mortensen  
Vejledere: Karin Beyer og Peder Voetmann Christiansen.
- 11/79 "STATISTISKE MATERIALER"  
red. Jørgen Larsen.
- 12/79 "Lineære differentiaalligninger og differentiaalligningssystemer"  
Mogens Brun Heefelt.
- 13/79 "CAVENDISH'S FORSØG I GYMNASIET". Projektrapport af Gert Kreinøe.  
Vejleder: Albert Chr. Paulsen.
- 14/79 "Books about Mathematics: History, Philosophy, Education, Models, System  
Theory, and Works of Reference etc. A Bibliography".  
Else Høyrup.
- 15/79 "STRUKTUREL STABILITET OG KATASTROFER i systemer i og udenfor  
termodynamisk ligevægt". Specialopgave af Leif S. Striegler.  
Vejleder: Peder Voetmann Christiansen.

O. FORORD.

Rapporten er udarbejdet med henblik på opfyldelse af modul II i matematiklæreruddannelsen på RUC.

Modul II (modelmodulet) skal ifølge studieordningen inddrage : "matematisk modelbygning, herunder såvel stokastiske som deterministiske, og såvel selvstændig konstruktion som kritik af eksisterende modeller".

Da vi begge studerer biologi som andet fag, og her kun mangler specialemodulet, valgte vi at lade valget af modeller styres af en biologisk relevant problemstilling, og derved skabe mulighed for et tværfagligt dobbeltprojekt.

Vi valgte lavdosis ekstrapolationsmodeller i kræftforskningen, idet dette er et interessant eksempel på hvordan matematik anvendes i et biologisk problem af betydelig relevans; en medvirkende årsag til valget er, at vi igennem studiet har arbejdet en hel del med problemstillinger fra kræftforskningen, både i biologisk og matematisk sammenhæng.

Det var egentligt fra starten meningen at lave et fuldstændigt integreret projekt som kunne evalueres samlet, men forskellige problemer (bla. eksamensmæssige) er kommet på tværs, og dobbeltprojektet udkommer derfor i to dele.

Den foreliggende rapport, som vi har kaldt del I, indeholder således først og fremmest matematiske overvejelser over problemstillingen, mens del II som udkommer til januar 80, overvejende vil indeholde biologiske overvejelser.

Mens vi i del I undersøger modellernes antagelser og deres opbygning, vil vi i del II udføre nogle biologiske eksperimenter, som dels skal give mulighed for at vurdere nogle af modellernes antagelser, dels sigter mod at klarlægge forhold vedrørende carcinogene stoffers vekselvirkning (synergisme, antagonisme).

Den skitserede opdeling er af flere grunde uheldig; mate-

matisk modelbygning forudsætter næsten altid et indgående kendskab til objektet for modelbygningen, og sely om vi selv mener os i besiddelse af dette, kan det forekomme en læser vanskeligt at tage stilling til mange af de biologiske argumenter og antagelser der gøres undervejs.

For at råde lidt bod på dette har vi i afsnit II forsøgt at give en oversigtsmæssig fremstilling af kræftforskningens nuværende status, med særlig henblik på nogle for projektet relevante problemstillinger; dette er dog gjort meget overfladisk, ligesom væsentlige sider helt har måttet udelades (f.eks. ekstrapolation mellem arter, immunologi m.m.).

I forbindelse med projektet var vi så heldige at få mulighed for at deltage i et 3-dages symposium om kræftforskning, afholdt i Århus 3-5 maj 79, og det har givet os et bedre overblik over såvel kræftforskningens mange angrebsvinkler, som over problemer i forbindelse med fastsættelse af grænseværdier for carcinogene stoffer. I starten af projektet læste vi nogle oversigtsartikler over problemområdet, og udvalgte herfra for projektet relevante baggrundsartikler; på denne måde mener vi at være kommet i besiddelse af den relevante litteratur af lidt ældre dato; for at få litteratursøgningen up to date, har vi gennemgået "Current mathematical publications" for 78 og 79, samt "Current contents" 78 og 79.

Udover de tidligere nævnte krav til modul II, indeholder modulbeskrivelsen nogle pædagogiske krav; disse har vi her valgt at se bort fra af flere grunde.

I vort modul I projekt lagde vi hovedvægten netop på de krav til gymnasielæreruddannelsen, dels fordi vi ville skaffe os et overblik over vor kommende erhvervsfunktion i starten af studiet, dels fordi vi regnede med muligheden for i senere projekter at foretage emnevalg, som kunne vanskeliggøre en naturlig sammenhæng mellem projektets faglige indhold og formidlingen til gymnasieskolen.

Det er vor opfattelse, at størstedelen af de matematiske modeller som bruges i forskningen for det meste ligger langt ud over, hvad der rent fagligt kan formidles til gymnasieelever, måske med undtagelse af specialer. Dette er ihvertfald tilfældet for de modeller vi her arbejder med, og vi mener derfor kun det faglige indhold kan formidles til gymnasiet i meget begrænset omfang; dog vil vi ikke udelukke, at en del af problemstillingerne vil kunne indgå i et "kræft-tema", eller i et nærmere specificeret samarbejde matematik/biologi, (f.eks. probitmetoden).

I forbindelse med de pædagogiske krav til modul II har vi bestået 2. pædagogiske prøve indeholdende: "Udviklings-, indlærings- og socialiseringsmæssige forhold; forskellige sociale miljøer; faglige forudsætninger; det pædagogiske miljø; faget i skolen; den faglige formidling; evaluering".

I vor synopsis tog vi udgangspunkt i muligheden for inddragelse af matematik i tværfagligt arbejde i gymnasiet.

INDHOLDSFORTEGNELSE.

|       |  |       |
|-------|--|-------|
| O.    | FORORD   | s. 1  |
| I.    | INDLEDNING                                       | s. 5  |
| II.   | OVERSIGT OVER KRÆFTFORSKNINGENS NUVERENDE STATUS | s. 7  |
| III.  | OVERSIGT OVER EKSISTERENDE LAVDOSIS MODELLER     | s. 14 |
| IV.   | TRE UDVALGTE MODELLER                            | s. 32 |
| V.    | DISKUSSION OG KONKLUSION                         | s. 45 |
| VI.   | DESIGN AF EKSPERIMENT                            | s. 50 |
| VII.  | NOTER  | s. 56 |
| VIII. | LITTERATURLISTE                                  | s. 63 |



## I. INDLEDNING.

Vi kender idag ca. 20 stoffer, som vi med sikkerhed ved har carcinogen virkning på mennesker, og alene udfra antallet af forekommende kemiske stoffer må det antages, at dette antal må mangedobles.

Udfra den eksperimentelle viden vi har om carcinogene stoffer, er der temmeligt godt grundlag for at slutte, at effekten afhænger af den dosis vi udsættes for.

Eftersom mange af de stoffer vi optager metaboliseres, hvorved nogle carcinogener detoxificeres, (f.eks. 9-amino-fluoren), er det blevet foreslået, at der skulle eksistere en biologisk grænseværdi, hvorunder ingen carcinogen effekt opstår.

Der findes imidlertid også eksempler på at ikke-carcinogene stoffer metaboliseres til carcinogene stoffer, (f.eks. PAH), ligesom visse stoffer (f.eks. Mn) er nødvendige for organismen i meget små mængder, mens de i højere doser udviser carcinogen effekt.

Argumentet med en biologisk grænseværdi er altså temmeligt tyndt, og det vil næppe for de fleste stoffers vedkommende være muligt at fastsætte en grænseværdi på dette grundlag. I stedet kan man gå en anden vej og definere en "safe dose", dvs. en dosis som kun vil forårsage et minimalt antal cancere, og som sammenlignet med andre ricisi er negligerbar; (14) foreslår en safe dose som medfører 1 cancer pr. 100 mill. individer, hvilket vel må synes acceptabelt.

Så bliver problemet imidlertid, hvordan en sådan dosis kan fastlægges; i eksperimenter vil det altså kræve adskilligt flere end 100 mill. forsøgsdyr, hvis safe dose skulle fastlægges direkte; et sådant antal forsøgsdyr vil det under ingen omstændigheder være muligt at nærme sig, (bortset fra bakterologiske eksperimenter), og vi vil derfor være henvist til at udføre forsøg med langt færre forsøgsdyr, og væsentligt højere doser.

Resultater fra sådanne forsøg (i højdosis området) skal så ekstrapoleres til lavdosis området, hvilket indebærer, at

vi skal udsige noget om dosis-respons kurvens udseende i et dosisområde, hvor vi ingen mulighed har for at fremskaffe data.

Den mest simple og umiddelbare antagelse man kunne gøre, ville være blot at forlænge kurven ned i lavdosis området, men en sådan fremgangsmåde vil være stærkt diskutabel, både fordi eksperimentelle data ikke synes at pege i den retning, (bla. 7), og på grund af teoretiske argumenter; når det drejer sig om carcinogene stoffer, er det ikke den egentlige giftvirkning af stoffet, men dets evne til at få celler (een er i princippet nok) til at mutere til cancer-celler.

En anden vej er at forsøge at konstruere en matematisk model over dosis-respons sammenhængen for carcinogenese, således at modellens parametre kan bestemmes i det eksperimentelle område, hvorefter dosis-respons forholdet i lavdosis området kan beregnes.

Enhver matematisk model må nødvendigvis bygges op om visse antagelser om det fænomen som skal beskrives, og jo bedre disse antagelser passer med den fysiske (biologiske) virkelighed, jo bedre er modellens forudsigelser.

Vi har i de senere år været vidne til, hvordan matematiske modeller til brug indenfor forskellige fagområder er blevet konstrueret i meget stort omfang, og selv om vi ikke vil afvise at selv meget ufuldstændige modeller, som konstrueres til teoretiske formål, kan have deres berettigelse, må der efter vor mening lægges afgørende vægt på deres anvendelighed i praksis.

Vi har derfor i arbejdet med disse modeller lagt vægt på at vurdere, hvorvidt de vil kunne anvendes til det, der efter vor mening må være det væsentligste formål med dem: At åbne mulighed for en rimelig sikker beregningsmetode til bestemmelse af kræftrisikoen som følge af de eksponeringer af carcinogene stoffer, vi i varierende grad udsættes for.

## II. OVERSIGT OVER KRÆFTFORSKNINGENS NUVÆRENDE STATUS.

Vi skal i dette afsnit give en meget kort sammenfatning af kræftforskningens nuværende status.

De sidste 10-20 års forskning har indbragt os viden på en mængde områder, hvoraf nogle er direkte relevante i en profylaktisk bekæmpelse af kræften, mens andre er af betydning for vor forståelse af den carcinogene proces.

Til den førstnævnte gruppe hører først og fremmest epidemiologiske undersøgelser. I disse undersøgelser sammenligner man forskellige befolkningsgrupper med hensyn til cancerincidens, og har efterhånden udskilt en del forhold, der helt givet har betydning for cancerincidensen.

Den første cancerrisiko-faktor man opdagede (allerede i 30'erne), var radioaktiv stråling. Man opdagede, at der opstod skader (uregelmæssigheder) i kromosomerne, og sluttede heraf, at cancer var forårsaget af skader i vore arveanlæg. Senere er det vist, at en lang række kemiske stoffer er i stand til at inducere skader i vore arveanlæg, samt at disse stoffer indgivet i mus (rotter m.fl.) medfører en stærkt forøget cancerincidens.

Eftersom vi i hele efterkrigstiden har været vidne til en kraftig stigning i dødsfald som følge af de fleste former for cancer, er spørgsmålet helt naturligt, hvorvidt den øgede cancerincidens skyldes de kemiske stoffer, vi alle til daglig udsættes for i de industrialiserede lande. Da det drejer sig om tusindvis af stoffer, de fleste helt nye og fremmede for vores organisme, må spørgsmålet synes meget relevant, men har i praksis vist sig vanskeligt at besvare. Den væsentligste grund til dette dilemma, er de meget store vanskeligheder, der er ved at lave sikre epidemiologiske undersøgelser (18). Da der er stor forskel på vort miljø, er det vidt forskellige stoffer, vi hver især udsættes for (samt mængderne), og det har stort set kun vist sig muligt at få sikre resultater enten fra specielle eksponeringsgrupper med mulighed for veldefinerede kontrolgrupper, eller for meget udbredte eksponeringer med forholdsvis kraftig virkning (f.eks. cigaretrøg, aflatoxin B1 og vinylklorid).

For få år siden blev der dog fra forskellig side gjort forsøg på at give et skøn over hvor stor en del af cancerincidensen, der måtte antages at stamme fra carcinogener i vor hverdag, og flere vurderinger ligger på omkring 80% (2 m.fl.). Mens det som nævnt har været meget svært at påhæfte mange af de mistænkte stoffer en given risikorate, har det af forskellige grunde været muligt at få bedre viden om visse andre stoffer.

I den første gruppe finder vi især meget udbredte stoffer, som forekommer i meget små mængder, og som vi alle eksponeres for i varierende grad (tilsætningsstoffer i fødevarer, pvc m.fl.). I den anden gruppe finder vi de stoffer, vi mere eller mindre frivilligt indtager (tobak, alkohol, speciel fødesammensætning o.lign.), og dette har ledt en del forskere ind på "life style" begrebet, som efter vor mening er et meget tvivlsomt begreb, (note a), (12).

Selv om det er svært at afvise, at tobak og lignende spiller en væsentlig rolle i cancerincidensen, er det yderst betænkeligt at bruge dette til at bagatelisere virkningen af de andre (ufrivillige) stoffer i vor hverdag, dels fordi nogle af disse "life style" undersøgelser har haft specielt gode statistiske forudsætninger, dels fordi det efter vor mening kan diskuteres, hvorvidt vi alle sådan uden videre kan undgå dem.

Udover epidemiologiske undersøgelser findes der en del andre metoder til at få viden om stoffers carcinogene effekt, men fælles for dem alle er, at resultaterne må fortolkes, det vil sige oversættes til risikorater for mennesker, og dette indebærer en række videnskabelige og kommercielle problemer. De videnskabelige problemer er mange og forskelligartede, mens de kommercielle består i det grundlæggende spørgsmål, hvorvidt vi bør sikre os, at et stof er "clean", inden der gives tilladelse til at sende stoffet i produktion, eller hvorvidt vi udfra en teori om, at langt de fleste stoffer, vi bruger i industrien, ikke (eller kun i ringe grad) er carcinogene uden videre kan sætte dem i produktion.

For os at se er den første mulighed den eneste etisk forsvarelige, idet den anden i en vis udstrækning indebærer, at vi bogstavelig talt eksperimenterer med mennesker, og så udfra cost/benefit analyser afgør, hvilke stoffer der

kan tillades, og hvilke ikke.

Vi er af nødvendige grunde nødt til at lægge cost/benefit betragtninger til grund for en udvælgelse af tilladelige og forbudte stoffer, bl.a. fordi totalt forbud mod visse stoffer, som vi ved har ringe carcinogen effekt, vil kunne føre til en uacceptabel stigning i andre helbredsmæssige risici.

Endvidere vil det i mange tilfælde være umuligt at eliminere et stof absolut, og man er derfor henvist til at skulle fastsætte en tilladelig grænseværdi.

Men forsøgsmaterialet skal ikke være mennesker, og vi har endvidere en række andre muligheder for at teste og vurdere carcinogenesitet, hvilket vi i det følgende kort vil beskrive.

Når man taler om grænseværdifastsættelse for carcinogene stoffer, er der to problemer, der springer i øjnene: 1) hvordan bedømmes et stofs carcinogenesitet og 2) hvordan fastsættes grænseværdien.

#### Hvordan bedømmes stoffers carcinogenesitet.

Der opereres i øjeblikket med fem måder at bedømme et stofs carcinogene effekt på. Opstilles disse hierakisk med stigende bevisbyrde nedad, fås:

1. kemisk strukturanalyse
2. interaktion med cellulære makromolekyler
3. korttids tests
4. dyreforsøg
5. epidemiologiske undersøgelser.

ad. 1. Den kemiske strukturanalyse har til formål at undersøge kemiske stoffers struktur for at påvise ligheder med eller forskelligheder fra kendte carcinogenernes opbygning. En sådan analyse vejer selv sagt ikke meget som argument for enten stoffers forbud eller legalisering, idet der kun kan tilvejebringes en meget overfladisk viden om hvilke strukturer, der specielt skulle være carcinogene, og mange af de resultater, der findes, er da også undtagelser, der bekræfter regelen. Før der opnås betydelig større viden på de fire andre områder, vil det være en tvivl-

som affære at bedømme et stofs carcinogenesitet alene på grundlag af dets struktur.

ad. 2. Ved interaktion med cellulære makromolekyler forstås undersøgelser af kemiske stoffers påvirkning af for det meste isolerede celleproteiner (ribosomer). Heller ikke denne metode vejer tungt i bevis-sammenhænge. Dette skyldes hovedsageligt, at man på nuværende tidspunkt knap nok er i stand til at definere cancer. Man ved, at visse former for cancer skyldes ændringer i cellens DNA, men hvilke ændringer, der skal finde sted, og om cancer kan opstå udenfor DNA-et er uvist.

ad. 3. Korttids tests er forsøg udført på procaryoter, i visse tests dog på eucaryoter.

Korttids tests er for tiden inde i en rivende udvikling på grund af deres mange fordele. De giver mulighed for at teste stoffers carcinogene effekt på populationsstørrelser, der nærmer sig det menneskelige ( $10^8$ - $10^9$  individer), de er billige at udføre, og ikke mindst er de hurtige. Disse tests gør det altså muligt at undersøge nye kemiske stoffer, allerede inden de er på markedet.

Testene bygger kort fortalt på, at carcinogene stoffer for en stor dels vedkommende også er mutagene. Kan man derfor påvise, at det undersøgte kemiske stof ændrer arveanlægene i forsøgspopulationen, antager man, at det i den menneskelige organisme med rimelig stor sandsynlighed også vil virke carcinogent.

Ulemperne ved korttids tests er, at de indtil videre kun er kvalitative, og at man kan betvivle evnen til at afsløre alle carcinogene stoffer.

For at tage det sidste først vil kemiske stoffer i den menneskelige organisme udsættes for såvel vores immunsvøm som for den naturlige metabolisme og eventuelle detoxificering.

Et stof, der påføres en forsøgspopulation af f.eks. bakterier, vil derfor ikke være udsat for de samme påvirkninger, som hvis det opholdt sig i et menneske.

og det selv om man, som i visse tests, tilføjer levermikrosom for at efterligne en metabolisesituation. Der kendes da også flere eksempler på stoffer, som virker mutagene på bakterier, men ikke carcinogene på mennesker og omvendt.

At testene på nuværende tidspunkt ikke kan anses som kvantitative hænger præcis sammen med ovennævnte argumentation (note b)).

Flere forhold kan anføres, men burde dog ikke være nødvendige for en overordnet forståelse.

- ad. 4. Dyreforsøgsresultater anses derimod som tungtvejende argumenter, og de har oftest gennemslagskraft nok til at afgøre et kemisk stofs skæbne. Forsøgsdyrene er som regel mus eller rotter, idet man har fundet en god korrelation mellem carcinogen effekt hos gnavere og mennesker (16).

I dyreforsøgene optræder sjældent mere end 200 forsøgsdyr (det største omfatter 24.192 mus (16)), og disse dyr deles i en forsøgsgruppe og i en kontrolgruppe. Derefter eksponeres forsøgsgruppen for det kemiske stof, der ønskes testet. Efter et vist tidsrum undersøges hvor mange dyr i testgruppen, der har udviklet tumorer i forhold til kontrolgruppen, og hvis eksponeringen doseres, fås sammenhængen mellem dosis og respons.

Imidlertid er antallet af involverede forsøgsdyr ikke tilstrækkeligt stort til, at man kan teste stoffet i de for mennesket relevante doser (små doser lang tid). Derfor ekstrapoleres fra højdosis området til lavdosis området, og ekstrapolationen munder ud i en grænseværdi for forsøgsdyrene, der så endelig skal ekstrapoleres herfra og til mennesket, men herom senere.

- ad. 5. Ved epidemiologiske undersøgelser testes et stofs carcinogenesitet direkte på mennesket. Gennem en lang årrække sammenholdes en udsat gruppe menneskers kræfthyppighed med en kontrolgruppes ditto, og kendes doserne af det kemiske stof hos den eksponerede gruppe, fås et tydeligt billede af såvel stoffets som dosens effekt. Ved epidemiologiske undersøgelser

undgås altså problemet med ekstrapolation.

#### Hvordan fastsættes grænseværdier.

Problemerne med fastsættelse af grænseværdier er af både teknisk og teoretisk art. De teoretiske overvejelser kommer til udtryk i kraftige meningsudvekslinger om der biologisk set eksisterer grænseværdier, og (16) giver eksempler herpå.

Striden går bl.a. mellem forskere, der mener, at et molekyle af et carcinogen (evt. en carcinogen metabolit) er i stand til at forårsage en cancer og forskere, der mener det modsatte. De sidste argumenterer bl.a. med, at accepteres en 5-6 hit model, vil et molekyle højst kunne afstedkomme én ændring i DNA-et, og herved opstår en naturlig grænseværdi.

I stedet for at lede efter absolutte grænseværdier, hvis eksistens kan synes tvivlsom, går man ofte den anden vej ved at acceptere en "safe dose", og så ud fra eksperimenter forsøge at bestemme denne, (jvfr. indledningen).

Som nævnt tidligere er der to carcinogenesitetsundersøgelser, der er bredt accepterede, disse er epidemiologiske undersøgelser, og forsøg med gnavere.

De epidemiologiske undersøgelser har vi været inde på, og den væsentligste ulempe ved disse er, at et stof ikke kan testes for carcinogenesitet, før det sættes i produktion. Det kan derimod testes i dyreforsøg. Selvom disse også kræver forholdsvis lang tid, er en foreslået procedure, at et nyt stof først testes i en korttids test. Findes stoffet herved carcinogent, etableres et dyreforsøg for at efterprøve carcinogenesiteten på pattedyr og for at fastsætte en grænseværdi.

Som omtalt i forgående afsnit kan dyreforsøg ikke etableres med en sådan populationsstørrelse, at dosis-respons kurven direkte kan aflæses for de lave doser. Man er altså nødt til ud fra forløbet af kurven i højdosis området at ekstrapolere til lavdosis området. Til denne ekstrapolation findes matematiske modeller og procedurer, der enten er teo-



retisk eller empirisk funderet. Når ekstrapolationen er foretaget, findes en grænseværdi for forsøgsdyrene. Denne værdi skal så ekstrapoleres til mennesket, og problemer hermed omtales som nævnt i forordet i rapportens del II.

Der findes et uoverskueligt antal modeller til brug for ekstrapolationen, og grænseværdien er i høj grad afhængig af modelvalg.

På området hersker der stor usikkerhed, og dette illustreres ved, at tre nationale amerikanske institutioner benytter hver deres lavdosis procedure (model) til fastsættelse af grænseværdier (16), og der er set eksempler på, at et stofs (vinyklorids) grænseværdi varierer i størrelsesordenen  $10^6$  alt efter hvilken model, der vælges (29).

### III. OVERSIGT OVER EKSISTERENDE LAVDOSIS MODELLER.

Dette kapitel skal give en oversigt over de typer af modeller, vi er stødt på, som benyttes i ekstrapolation fra det typisk eksperimentelle område på en dosis-respons kurve til lavdosis området.

Kapitlet kan til tider virke uoverskueligt og læserfjendsk, og dette skyldes, at vi har været nødt til at gøre nogle matematisk/biologiske og nogle statistiske overvejelser imellem de egentlige hovedafsnit. For at råde lidt bod på uoverskueligheden vil vi indledningsvis give en oversigt over kapitlet.

De modeller, vi omtaler, er inddelt i to kategorier, nemlig "dichotomous" modeller og "time-to-occurrence" modeller. Indenfor hver kategori findes forskellige typer af modeller. Vi omtaler

1. one-hit modellen
2. a) probit modellen  
b) logistiske model  
c) ekstrem-værdi modellen
3. multicell modellen
4. multistage/multihit modellen
5. multievent modellen

hvoraf de to første punkter henføres til første kategori og de tre sidste til anden kategori.

Det er vigtigt at holde sig for øje, at de enkelte punkter er en generel beskrivelse af typer af modeller. Indenfor hver typer findes der flere modeller, der beskriver data forskelligt, men modellerne har det til fælles, at de bygger på samme grundidé.

Før vi beskriver de to kategorier, har vi gjort nogle linearitetsbetragtninger over dosis-respons kurven i lavdosis området. Disse betragtninger har betydning for den enkelte modeltypes udseende.

Dernæst beskriver vi de to modeltyper indenfor kategorien "dichotomous" modeller.

Før vi går igang med den egentlige omtale af "time-to-occurrence" modellerne, har vi fundet det rigtigst at gøre nogle statistiske forberedelser. Disse gøres på dette tidspunkt, fordi meget af det efterfølgende har som grundlag dette afsnit. Herefter beskrives de tre model-

typer indenfor kategorien og dette udgør kapitlets afslutning. Først vil vi indlede med nogle generelle betragtninger over modellerne.

#### Generelt om modellerne.

For at kunne forudsige en respons udenfor det eksperimentelle område er en funktionel sammenhæng mellem dosis og respons nødvendig.

Sammenhængen udtrykkes oftest ved en parametrisk model, som beskriver responsfordelingen for et givent sæt af eksperimentelle data (her doser).

Sådanne modeller er fuldt specificerede bortset fra nogle enkelte ukendte parametre, som enten estimeres fra de givne eksperimentelle data, modellen formodes at beskrive, eller som findes empirisk ud fra resultaterne af en stor klasse af lignende eksperimenter. Der findes nemlig matematiske modeller, som gennem tiden har vist sig at fitte forskellige typer af eksperimentelle data med tilpas nøjagtighed, men som kun meget svagt er biologisk funderede.

Ekstrapolationsproblemet omfatter en bestemmelse af den dosis, der vil forårsage en respons, som for det meste er af en given forudbestemt størrelse (i forhold til den spontane respons). Den fundne dosis vil imidlertid afhænge af den valgte model, men (10) mener, at man ved at beskæftige sig med klasser af modeller, som forekommer biologisk rimelige, vil modelafhængigheden kunne indarbejdes i de estimerede sikkerhedsgrænser for risikoestimererne.

Problemet kan også omfatte, hvordan man vælger en øvre grænse for den sande, men ukendte respons kurve.

Det må bemærkes, at den estimerede dosis ikke i dette tilfælde vil være et bedste estimat af den ukendte dosis, der forårsager den valgte respons. Den er i stedet en dosis, som for det meste vil ligge under den dosis, der kræves for den besluttede respons.

Begrundelsen for at gå denne vej ligger i, at kun meget lidt vides om den lavere ende af dosis-respons kurven, og at modelvalget derfor bliver kritisk i dette område af kurven. Problemet er altså, at i den eksperimentelle

del af kurven vil adskillige konkurrerende modeller fitte data godt, mens halerne på disse kurver vil afvige med flere størrelsesordener.

Fælles for modellerne er, at de bortset fra multicell modellen alle bygger på, at cancer opstår fra en enkelt celle. Det vil sige, at kun de stoffer, der påvirker cancerincidensen gennem en ændring af enkeltceller på en irreversibel og arvelig måde, beskrives af modellerne.

De stoffer, som øger cancerhyppigheden ved anatomiske og/eller fysiologiske ændringer af hele væv og organer, enten vil eller ikke vil kunne beskrives af modellerne. De matematiske modeller, som benyttes til at relatere en toksisk respons og en dosisstørrelse, falder hovedsageligt i to kategorier. Den ene kategori består af modeller, der bygger på en "dichotomous" respons. Det vil sige, at responsen er enten, at en given tilstand er til stede, eller at den ikke er.

Den anden kategori består af modeller, som bygger på fordelingen af "time-to-occurrence" og dennes sammenhæng med dosens størrelse. "Occurrence" kan i nogle tilfælde være opdagelsen af en tumor og i andre være død.

Før vi beskriver disse to kategorier, har vi fundet det rimeligt først at gøre nogle linearitetsbetragtninger i lavdosis området.

#### Linearitet.

Der er mange ting, der taler for en lineær dosis-respons sammenhæng i lavdosis området. (3) argumenterer for, at stort set alle modeller for carcinogenese, der skildrer eksponeringen som en påvirkning af en allerede igangværende proces, vil lede til linearitet ved lave doser. Postulatet bygger på det syn, at carcinogenese fundamentalt er et mutationsfænomen, og at derfor inducerede og spontane trin i carcinogenese er mekanistisk ens. Eksperimentel inducering af cancer kan så betragtes som en forøgelse af sandsynligheden for de forskellige trin. Således vil altså små ekstra doser af et carcinogen frembringe en lineær forøgelse i risikoen i stort set enhver dosis-respons model.

Postulatet implicerer, at ligegyldigt hvilken biologisk

vil carcinogenet forøge en eller anden igangvarende proces, og derfor må vi forvente, at responsen vil være lineær ved lav dosis.

Hvis vi betragter den proces, der ændrer cellerne, som en serie af enkelt-cellulære hændelser, der kan optræde i sekvenser eller tilfældigt i enhver given celle, og at en dosisuafhængig induktionstid følger (hvilket er en rimelig antagelse ved lave doser), så må man forvente, at dosis-respons sammenhængen udover baggrundsresponsen vil være lineær. Der kræves hverken, at alle trinnene skal påvirkes af carcinogenet (blot nogle), eller at trinnene skal være mekanistisk ens i kvalitet eller kvantitet.

Nøgleordene er enkelt-celle af oprindelse og dosisuafhængighed i induktionstiden, og størstedelen af de modeller, vi vil omtale i de følgende afsnit, opfylder betingelserne.

For at resumere forudsætningerne for linearitet ved lav dosis kræves altså at eksterne carcinogener virker additivt med enhver allerede igangvarende proces eller sagt på en anden måde, at tilførslen af carcinogenet blot øger raten af processer, der ville være tilstede alligevel.

#### "Dichotomous" modeller.

Disse modeller relaterer dosis til sandsynligheden for, at en given tilstand er tilstede (eller observeres). Tilstanden defineres generelt som tilstedeværelsen af en irreversibel toxisk effekt som f.eks. en bestemt form for cancer. Eksperimentelle data benyttes til at estimere parametrene i dosis-respons modellen for at kunne forudsige den dosis, der vil give en bestemt respons. Vi har opdelt denne kategori i to grupper:

1. one-hit modeller
2. a) probit modeller  
b) logistiske modeller  
c) ekstrem-værdi modeller.

#### One-hit modeller.

Disse modeller har sandsynligvis været udsat for mest opmærksomhed ved analyser af "dichotomous" data.

Grundlaget for modellen er antagelsen, at responsen kan induceres efter, at et enkelt følsomt target er blevet ramt af en enkelt biologisk effektiv dosisenhed. Sandsynligheden for respons  $p_d$  ved dosis  $d$  er da givet ved

$$p_d = 1 - \exp(-\gamma d)$$

hvor  $\gamma$  er en ukendt parameter.

Hvis de biologisk effektive doser er tilfældigt fordelt i det materiale, der indpodes, sådan at der er et gennemsnit på  $\gamma d$  effektive doser pr. indpodning, vil sandsynligheden for, at den givne indpodning vil indeholde nul effektive doser og dermed være sikker, være  $\exp(-\gamma d)$ .

Sandsynligheden for, at indpodningen ikke vil være sikker, er dermed  $1 - \exp(-\gamma d)$ . Deraf udtrykket for  $p_d$ .

For små værdier af  $\gamma d$  (lav dosis) følger det, at

$$p_d \sim \gamma d.$$

For lave doser er one-hit modellen altså numerisk lig med en lineær model,  $\gamma$  repræsenterer hældningskoefficienten.

(10) nævner, at det antages, at størstedelen af dosis-respons kurverne er opad konkave i lavdosis området, når dosis plottes mod respons. Intuitivt vil den lineære model da repræsentere en øvre grænse for sådanne dosis-respons kurver og må derfor være et konservativt (forsigtigt) estimat på den dosis, som giver en sandsynlighed for respons under en given grad.

#### Probit-, logistisk- og ekstrem-værdi model.

For enhver kumulativ fordelingsfunktion  $F$  er en hel klasse af modeller givet ved

$$p_d = F(\alpha + \beta \log d)$$

hvor  $\alpha$  og  $\beta$  er parametrene, hvis værdi skal bestemmes.

Hvis  $F$  er den kumulative normale fordelingsfunktion, udsiger modellen, at probit af sandsynligheden for respons er lineær i log dosis (note c)). Den logistiske og den normale fordeling har en lang tradition i studiet af kvantitative responsdata. Dette retfærdiggør dog i sig selv ikke deres brug i ekstrapolation.

Probit modellen kan relateres til brugen af lognormal fordelingen (logaritmen til observationerne følger en

re). Erstattes lognormal fordelingen med Weibull fordelingen, fremkommer ekstrem-værdi fordelingen for kvantitativ respons.

De tre modeller kan skrives som

$$\text{Probit: } p_d = \Phi(\alpha_1 + \beta_1 \log d)$$

$$\text{Logistisk: } p_d = (\exp(\alpha_2 + \beta_2 \log d) + 1)^{-1}$$

$$\text{Ekstrem-værdi: } p_d = 1 - (\exp(-\exp(\alpha_3 + \beta_3 \log d)))$$

hvor  $\Phi$  betegner den kumulative normale fordelingsfunktion.

For hver af modellerne benyttes incidensdata til direkte at estimere de ukendte parametre  $\alpha$  og  $\beta$ . Endvidere kan man konstruere et dosis estimat, som inden for et givent sikkerhedsinterval vil være mindre end eller lig med den ukendte dosisværdi, der forårsagede den besluttede responsgrad.

Vanskelighederne heri består i, at denne fremgangsmåde antager, at den ukendte dosis-respons kurve kan realiseres indenfor den funktionelle form, der benyttedes i estimationsproceduren. Selvom dette ikke er kritisk for interpolationsproblemer, er det en uhyre kritisk antagelse ved ekstrapolation blot et stykke fra det eksperimentelle område.

Et andet problem omhandler brugen af kontroldata, hvor baggrundsresponsen ikke er nul.

(10) har i litteraturen fundet tre justeringer af den oprindelige model:  $F(\alpha + \beta \log d)$ , nemlig

$$1) p_d - p_0 = F(\alpha + \beta \log d)$$

$$2) (p_d - p_0) / (1 - p_0) = F(\alpha + \beta \log d)$$

$$3) p_d = F(\alpha + \beta \log(d - d_0))$$

hvor  $d_0$  er den konstant, der giver  $p_0$ , når  $d$  er lig med nul.

Den første justering er blevet brugt i forbindelse med one-hit modellen. Ved lave doser udsiger modellen, at dosiseffekten er en effekt, der adderes til baggrundsresponsen. Men for større doser vil  $p_d$  blive større end 1 hvis  $p_0 \neq 0$ .

Alle tre justeringer var dog i 1975 endnu ikke udforsket teoretisk, og den statistiske effekt af at indarbejde baggrundsværdier i ekstrapolationsprocedurer behøver stadig udforskning.

### "Time-to-occurrence" modeller.

Den anden kategori af modeller relaterer "time-to-occurrence" af responsen til dosis i stedet for blot incidensen til dosis. "Time-to-occurrence" defineres sædvanligvis som død forårsaget af en bestemt sygdom eller som tid til sygdommen først optræder. Disse informationer er oftest tilgængelige i dyreforsøg og har vist sig særdeles brugbare i tolkninger af visse eksperimentelle resultater.

På baggrund af eksperimentelle og teoretiske overvejelser er to fordelinger af "time-to-occurrence" af cancer udsat for særlig opmærksomhed (10).

Den ene er en lognormal fordeling med gennemsnitstiden til cancers opståen som afhængig af dosis, men med standardafvigelse uafhængig af dosis.

Den anden fordeling er Weibull fordelingen, som er blevet foreslået ved humane cancerincidensmønstre, og som er blevet forudsagt af visse teoretiske modeller for carcinogenese (10).

Lognormal modellen bygger på den antagelse, at hvis cancer er den eneste grund til død, vil dødsfaldene have en lognormal fordeling. Relateres en dosisværdi  $d$  til fordelingen, antages det, at  $t^n d = C$ , hvor  $t$  er gennemsnitstiden for opståen af cancer,  $n$  er en parameter, der antages større end 1, og  $C$  er en konstant.

Da  $n$  antages større end 1, vil gennemsnitstiden til cancer aftage ved øgning af dosis. Standardafvigelsen for lognormal fordelingen antages at være konstant for varierende dosisværdier.

Weibull modellen definerer incidensraten for primære tumorer et givet sted ved alder  $t$  som  $b(t-w)^k$ .

Proportionalitetskonstanten  $b$  afhænger af dosis, mens parametrene  $k$  og  $w$  ikke gør. Parameteren  $k$  tolkes ofte som antallet af forskellige stages eller hit, og  $w$  re-



præsenterer minimum latenstiden.

For at udtrykke dosisafhængigheden i modellen erstattes parameteren  $b$ , som er dosisafhængig, ofte med  $cd^m$ , hvor  $c$  og  $m$  ikke er dosisafhængige.

### Statistiske forberedelser.

Før vi går over til en beskrivelse af "time-to-occurrence" modellerne, vil vi gøre nogle statistiske forberedelser.

Tiden fra den påbegyndte eksponering af en celle for et carcinogen til fremkomsten af en bestemt tumor benævnes tumortiden  $t$ . En tumors opståen kræver en transformation og en vækst. Tumortiden  $t$  er altså summen af af transformationstiden  $t_1$  og væksttiden  $t_2$ :  $t=t_1+t_2$ . Det antages, at  $t_1$  og  $t_2$  er uafhængige stokastiske variable med sandsynlighedstæthederne  $g(t_1)$  og  $\gamma(t_2)$ . Da  $t=t_1+t_2$ , følger heraf, at  $t$  også er en stokastisk variabel med sandsynlighedstætheden  $r(t)$ , som præcis er

$$r(t) = \int_0^t g(\tau) \gamma(t-\tau) d\tau.$$

Den tilsvarende kumulative fordelingsfunktion er da

$$R(t) = \int_0^t r(s) ds.$$

Størrelsen  $r(t)dt$  er sandsynligheden for, at en given normal celle vil blive en bestemt tumor i intervallet  $dt$ , og  $R(t)$  er sandsynligheden for, at cellen vil blive en bestemt tumor i intervallet  $[0, t]$ .

Betragter vi nu en samling af  $N$  identiske uafhængige normale celler hver med sandsynligheden  $R(t)$  for at udvikle en tumor i  $[0, t]$ , vil sandsynligheden  $P_j(t, N)$ , at de  $N$  celler vil udvikle sig til  $j$  tumorer i  $[0, t]$ , være binomialsandsynligheden

$$P_j(t, N) = (R(t))^j (1-R(t))^{N-j} N! / j!(N-j)! \quad j=0, \dots, N.$$

For  $N \gg 1$  og  $R(t) \ll 1$  kan binomialfordelingen tilnærmes med en Poissonfordeling

$$P_j(t, N) \sim (NR(t))^j \exp(-NR(t)) / j!$$

Er cellerne ikke identiske, sættes  $R(t)$  blot til gennemsnittet af værdierne  $R(t)$  for de individuelle celler.

Vi kan nu beregne sandsynligheden  $F(t)$ , at  $N$  celler ud-

vikles til mindst en tumor i  $[0, t]$ .

$$F(t) = 1 - P_0(t, N) = 1 - \exp(-NR(t)).$$

Sandsynligheden  $\tilde{P}_j(t, N)$ , at et væv bestående af  $N$  celler vil indeholde  $j$  transformerede celler i  $[0, t]$ , kan også beregnes. Erstattes  $R(t)$  med

$$G(t) = \int_0^t g(s) ds$$

fås for  $N \gg 1$  og  $G(t) \ll 1$

$$\tilde{P}_j(t, N) \sim (NG(t))^j \exp(-NG(t)) / j!$$

Endelig kan en sidste størrelse findes ud fra  $F(t)$ , nemlig incidens eller risikorate  $h(t)$ . Dette er raten med hvilken den første tumor optræder i et forudgående tumorfrit væv, og den er

$$h(t) = \frac{dF(t)/dt}{1-F(t)}$$

Af udtrykkene for  $r(t)$ ,  $F(t)$  og  $h(t)$  fås

$$h(t) = Nr(t) = N \int_0^t g(\tau) \gamma(t-\tau) d\tau.$$

Hvis væksttiden har en konstant værdi  $w$ , vil  $\gamma(t) = \delta(t-w)$  og ovenstående udtryk giver da

$$h(t) = Ng(t-w).$$

Ønsker vi at generalisere betragtningerne, således at dosisafhængigheden også fremgår, og lader vi  $\alpha$  og  $\beta$  være parametrene, vi ønsker at estimere, fås fordelingsfunktionen

$$R(t, x; \alpha, \beta)$$

hvor  $t$  er tiden til tumor, og  $x$  er dosen,

Frekvensfunktionen er da

$$r(t, x; \alpha, \beta) = \frac{d}{dt} R(t, x; \alpha, \beta)$$

og overlevelsesfunktionen

$$Q(t, x; \alpha, \beta) = 1 - R(t, x; \alpha, \beta).$$

Den aldersspecifikke tumorforøgelsesrate eller risikorate (i forsikringsstatistik DØDELIGHEDSSTYRKEN) fås da til

$$h(t, x; \alpha, \beta) = r(t, x; \alpha, \beta) / Q(t, x; \alpha, \beta) = -\frac{d}{dt} \ln Q(t, x; \alpha, \beta).$$

Begge anskuelser vil blive benyttet i det følgende.

Vi vil nu gå over til at beskrive modellerne indenfor kategorien "time-to-occurrence" modeller. De forskellige typer, der findes, er grupperet på følgende måde:

3. multicell model

4. multistage/multihit model

5. multievent model

(nummereringen fortsættes frs "dichotomous" modellerne).

#### Multicell modellen.

Omkring 1950 bemærkede et antal forskere, at dødsraten for mange former for human cancer øgedes proportionalt med den 5. eller 6. potens af alder. For at tolke disse observationer antog adskillige forskere, at tiden fra bestemmelsen af tumorens tilstedeværelse til dødens indtræffen er negligérbar sammenlignet med den tid, der behøves til transformation og vækst. Endvidere antoges det, at dødsraten for cancer er den samme som incidensraten. Derved bliver alderen den samme som eksponeringstiden.

Data viste altså, at incidensraten er proportional med den 5. eller 6. potens af længden af eksponering for et carcinogen ved konstant dosis.

Der kan gives to forklaringer på dette fænomen. Den ene er, at seks eller syv forskellige celler skal transformeres i et enkelt væv for at kunne forme en tumor. Den anden forklaring er, at en enkelt celle skal underkastes seks eller syv forandringer, før den kan udvikle sig til en tumor.

Den første forklaring danner grundlag for multicell teorien og den anden for multistage/multihit teorien, som vil blive omtalt senere.

Antager vi, at et væv bestående af  $N$  celler skal indeholde mindst  $k$  transformerede celler for, at en tumor kan opstå i vævet, vil sandsynligheden  $F(t)$ , at der er mindst en tumor i vævet til tid  $t$ , være sandsynligheden for, at der er mindst  $k$  transformerede celler. Dette er præcis 1-(sandsynligheden for, at der er mindre end  $k$  transformerede celler):

$$F(t) = 1 - \sum_{j=0}^{k-1} P_j(t, N).$$

Risikorate

$$h(t) = -\frac{d}{dt} \frac{\sum_{j=0}^{k-1} P_j(t, N)}{\sum_{j=0}^{k-1} P_j(t, N)}$$

$$= \left( \sum_{j=0}^{k-1} (NG(t))^j / j! \right)^{-1} NG'(t) (NG(t))^{k-1} / (k-1)!$$

Før vi kan komme videre med dette udtryk, er det nødvendigt at foretage et par mellemregninger. Lader vi  $p_0(t)$  betegne sandsynligheden for, at en celle er normal til tiden  $t$  og lader  $p_1(t)$  betegne sandsynligheden for, at cellen er transformeret til tiden  $t$ , og  $\lambda(t)$  betegner overgangens sandsynlighedsrate fås

$$\frac{d}{dt} p_0 = -\lambda(t) p_0(t), \quad p_0(0) = 1$$

$$\frac{d}{dt} p_1 = \lambda(t) p_1(t), \quad p_1(0) = 0$$

Disse ligninger har løsningerne

$$p_0(t) = \exp\left(-\int_0^t \lambda(s) ds\right) \text{ og}$$

$$p_1(t) = 1 - \exp\left(-\int_0^t \lambda(s) ds\right).$$

Heraf kan vi beregne transformationssandsynlighedsraten

$$g(t) = \frac{d}{dt} p_1(t) = \lambda(t) \exp\left(-\int_0^t \lambda(s) ds\right).$$

Benyttes dette resultat i udtrykket for  $r(t)$ , det vil sige raten pr. celle hvormed tumorer opstår, fås

$$r(t) = \int_0^t \lambda(\tau) \exp\left(\int_0^\tau \lambda(s) ds\right) \gamma(t-\tau) d\tau.$$

For at kunne benytte dette udtryk må bl.a.  $\lambda(t)$  specificeres. Da  $\lambda(t)$  afhænger af koncentrationen  $c(t)$  af carcinogenet foreslås, at  $\lambda$  er en lineær funktion af  $c$ :

$$\lambda(t) = \nu + \rho c(t),$$

hvor  $\nu$  er baggrundsomdannelsen eller sagt på en anden måde den spontane overgangssandsynlighed, som foregår i fraværelse af carcinogenet, og  $\rho$  er proportionalitetskonstanten mellem  $\lambda - \nu$  og  $c$ .

Hvis  $\lambda$  er konstant, og  $\lambda t \ll 1$  følger, at  $g(t) \sim \lambda$ . Derfor fås  $G(t) \sim \lambda t$  og

$$h(t) \sim (N\lambda)^k t^{k-1} / (k-1)!$$

Med  $k=6$  eller  $k=7$  fås  $h(t)$  proportional med  $t^5$  eller  $t^6$  i overensstemmelse med data.

Ovenstående udtryk for  $h(t)$  er baseret på antagelsen, at sandsynligheden for, at en celle er transformeret til

lille.

Sandsynligheden for, at  $k-1$  celler er transformerede til tiden  $t$ , er  $N(N-1)\dots(N-k+2)(\lambda t)^{k-1}/(k-1)! \sim (N\lambda t)^{k-1}/(k-1)!$  under forudsætning af, at  $N \gg k$ .

Raten, med hvilken  $k$  transformerede celler fremkommer, er  $N\lambda$  gange ovenstående udtryk, hvilket nøjagtigt giver udtrykket for  $h(t)$ .

Hvis vi i udtrykket

$$\lambda(t) = v + \rho c(t)$$

antager  $v=0$  og  $c$ =konstant, vil

$$\lambda(t) = \rho c.$$

At  $v=0$  betyder, at sandsynligheden for baggrundsomdannelsen er negligérbar i forhold til omdannelsessandsynligheden, der skyldes koncentrationen  $c$  af carcinonet.

Heraf følger så, at

$$h(t) \sim (N\rho c)^k t^{k-1}/(k-1)!$$

$k=6$  eller  $k=7$  giver da  $h(t)$  proportional med  $c^6$  eller  $c^7$ , hvilket er i modstrid med alle tilgængelige resultater, der giver  $h(t)$  proportional med  $c$  eller  $c^2$ .

Whittemore og Keller (22) beretter, hvordan Armitage og Doll ved et kunstgreb redder situationen.

Antager man nemlig, at der er et antal forskellige slags transformationer, f.eks.  $k$ , med forskellige transformationsrater  $\lambda_i(t)$ ,  $i=0, \dots, k-1$ , vil hvert  $\lambda_i$  kunne gives ved

$$\lambda_i(t) = v_i + \rho_i c(t), \quad i=0, \dots, k-1.$$

For  $n$  af transformationerne antages det, at  $v_i \ll \rho_i c$ , mens det for de resterende  $k-n$  antages, at  $v_i \gg \rho_i c$ . De  $n$  transformationer med  $v_i \ll \rho_i c$  vil give  $\lambda_i$  tilnærmelsesvist proportionalt med  $c$ , mens de  $k-n$  transformationer med  $v_i \gg \rho_i c$  vil give  $\lambda_i$  tilnærmelsesvist lig  $v_i$ . Produktet  $\lambda_0 \dots \lambda_{k-1}$  er altså proportionalt med  $c^n$ .

For at overføre denne idé til multicell teorien antager vi, at et væv skal indeholde mindst en transformeret celle af hver af de  $k$  typer for at kunne udvikle en tumor.

Modificeres

$$h(t) \sim (N\lambda)^k t^{k-1} / (k-1)!$$

fås

$$h(t) \sim \lambda_0 \dots \lambda_{k-1} N^k t^{k-1}.$$

$h(t)$  er herved proportional med  $c^n t^{k-1}$ , hvis  $\rho_i c \ll \nu_i$  når  $\nu_i \neq 0$ . Ved at vælge  $n=1$  eller  $n=2$  findes  $c$  proportionalt med  $c$  eller  $c^2$  for små  $\rho_i c$ , hvilket er i overensstemmelse med fundne sammenhænge.

Modellen blev oprindeligt forkastet, da den ikke stemte overens med fundne resultater. Efter at Armitage og Doll havde løst problemet, fortsatte modellen med at leve en skyggetilværelse, idet man i mellemtiden bredt accepterede, at cancer opstår fra en enkelt celle.

#### Multistage/multihit modeller.

Den anden forklaring på, at cancerincidensraten er proportional med den 5. eller 6. potens af længden af eksponering for et carcinogen ved konstant dosis, gives ved multistage teorien. Denne siger, at en celle kun kan udvikle sig til en cancer efter, at den har undergået et bestemt antal,  $k$ , ændringer eller mutationer. Antages det, at en celle har sandsynligheden  $q$  for at undergå en mutation pr. år, og at den ikke kan undergå mere end den ene årligt, vil sandsynligheden for, at cellen har  $k-1$  mutationer efter  $a-1$  år, være givet ved binomialfordelingen som

$$q^{k-1} (1-q)^{a-k} (a-1) \dots (a-k+1) / (k-1)!$$

Sandsynligheden for, at cellen undergår den  $k$ -te mutation i det  $a$ -te år, er da  $q$  gange ovenstående udtryk, og dette produkt er lig med  $g(t)$ , som er sandsynlighedsraten for transformation pr. celle i det  $a$ -te år. Denne beregning lider af den svaghed, at tiden er inddelt i intervaller af længden  $T$  ( $=1$  år), inden for hvilke kun en mutation tillades.

Restriktionen kan undgås ved at lade intervallængden  $T$  gå mod nul.

Sættes  $a=t/T$  og  $q=\lambda T$ , hvor  $t$  betegner tiden, og  $\lambda$  betegner sandsynligheden for mutation pr. tidsenhed, og multipliceres ovenstående binomialfordeling med  $q$ , fås

$$g(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T^k} (\lambda T)^k (1 - \lambda T)^{t/T - k} (t/T - 1) \dots (t/T - k + 1) / (k-1)!$$

$$= \lambda^k t^{k-1} e^{-\lambda t} / (k-1)!$$

$$\sim \lambda^k t^{k-1} / (k-1)! \quad \text{for lille } \lambda t.$$

Når man kan se bort fra væksttiden, vil  $r(t) = g(t)$ .

Hvis tillige  $\lambda t$  er lille, er altså

$$r(t) \sim \lambda^k t^{k-1} / (k-1)!$$

Benyttes dette i udtrykket for risikorate,  $h(t)$ , og udtrykkes  $\lambda$  ved

$$\lambda = v + \rho c(t)$$

med  $v \ll \rho c$ , fås

$$h(t) \sim N(\rho c)^k t^{k-1} / (k-1)!$$

I overensstemmelse med fundne resultater bliver  $h(t)$  for  $k=6$  eller  $k=7$  proportional med  $t^5$  eller  $t^6$ , men  $h(t)$  bliver også proportional med  $c^k$  i uoverensstemmelse med data.

Igen har Armitage og Doll (22) modificeret teorien.

De antager, at de  $k$  forandringer har forskellige overgangsrater  $\lambda_i(t)$ ,  $i=0, \dots, k-1$ , og at de må optræde i ordenen  $0, \dots, k-1$ . Modellen kan nu analyseres ved at lade  $p_i(t)$ ,  $i=0, \dots, k$ , være sandsynligheden for, at en celle er i "stage"  $i$  til tiden  $t$ , hvilket vil sige, at den har undergået de første  $i$  forandringer.

Endvidere skal sandsynligheden for celledød inkluderes, hvor celledød defineres som tab af evnen til at dele sig. Betegner  $\mu_i(t)$  dødsraten for celler i stage  $i$ ,  $i=0, \dots, k-1$ , tilfredsstiller  $p_i(t)$  følgende differentialligninger:

$$\frac{d}{dt} p_0(t) = -(\lambda_0(t) + \mu_0(t)) p_0(t), \quad p_0(0) = 1$$

$$\frac{d}{dt} p_i(t) = -(\lambda_i(t) + \mu_i(t)) p_i(t) + \lambda_{i-1}(t) p_{i-1}(t), \quad p_i(0) = 0$$

$$i = 1, \dots, k-1$$

$$\frac{d}{dt} p_k(t) = \lambda_{k-1}(t) p_{k-1}(t), \quad p_k(0) = 0$$

For at løse ligningerne defineres

$$L_i(t) = \int_0^t (\lambda_i(\tau) + \mu_i(\tau)) d\tau \quad i = 0, \dots, k-1$$

$$L_k(t) = 0$$

Vi finder da, at

$$p_0(t) = e^{-L_0(t)}$$

$$p_i(t) = e^{-L_i(t)} \int_0^t \lambda_{i-1}(\tau) p_{i-1}(\tau) e^{L_i(\tau)} d\tau \quad i=1, \dots, k.$$

For  $L_i(t) \ll 1$  for alle  $i$ , fås

$$p_0(t) \sim 1, \text{ og}$$

$$p_i(t) \sim \int_0^t \lambda_{i-1}(t_{i-1}) \dots \int_0^{t_1} \lambda_0 dt_0 dt_1 \dots dt_{i-1}.$$

Med  $c(t)$  konstant, således at alle  $\lambda_i$  er konstante, fås

$$p_i(t) \sim \lambda_0 \lambda_1 \dots \lambda_{i-1} t^i / i!$$

Da  $g(t) = p_2(0, t)$ , fås

$$\begin{aligned} g(t) &= p_2(0, t) \sim \int_0^t \lambda_1 e^{\beta x} \lambda_0 e^{(\lambda_1/\beta)(1-e^{\beta x})} dx \\ &= \lambda_0 (1 - e^{-(\lambda_1/\beta)(1-e^{\beta x})}) \end{aligned}$$

Antages væksttiden  $w$  konstant, fås

$$h(t) \sim 0 \quad t < w$$

$$h(t) \sim N \lambda_0 \dots \lambda_{k-1} (t-w)^{k-1} / (k-1)! \quad t \geq w$$

Når  $\lambda_i$  gives ved

$$\lambda_i = v_i + \rho_i c(t),$$

vil produktet  $\lambda_0 \dots \lambda_{k-1}$  i udtrykket for  $h(t)$  være et polynomium i  $c$  af grad  $m \leq k$ , hvor  $m$  er antallet af proportionalitetskonstanter  $\rho_i$ , som er forskellige fra nul.

Hvis  $n$  af baggrundsrateerne  $v_i \ll \rho_i c$ , og de resterende  $k-n$  rater tilfredsstillers  $v_i \gg \rho_i c$ , vil  $\lambda_0 \dots \lambda_{k-1}$  være proportional med  $c^n$ , og derved vil modellen være i overensstemmelse med fundne data.

Celledødsraten inkluderes i teorien for også at analysere strålingsinduceret cancer. Da vi udelukkende beskæftiger os med kemisk induceret cancer, tillader vi os at negligere  $\mu_i(t)$ .

Modellen har imidlertid visse biologiske defekter, hvoraf den vigtigste er manglende direkte eksperimentelt bevis for, at cancer udvikles efter mere end to-trins ændringer. Dette har fået Armitage og Doll samt Fisher (22) til at modificere multistage teorien således, at en to- eller tretrins teori kan forklare de observerede data.



Vi antager, at en celle på trin  $i$  forårsager en klon af lignende celler, og benævner denne en  $i$ -klon, og lader  $x$  betegne  $i$ -klonens alder, forstået som tiden der er forløbet siden den  $i$ -te ændring.

$p_i(x, t)$  betegner da aldersfordelingen af  $i$ -klonen til tiden  $t$ ,  $i=0, \dots, k$ , og den antages at opfylde ligningen

$$\partial_t p_i(x, t) + \partial_x p_i(x, t) = -(\lambda_i(x, t) + \mu_i(x, t)) p_i(x, t),$$

$i=0, \dots, k-1.$

$\mu_i(x, t)$  er raten, hvormed  $i$ -klonen går tabt på grund af celledød, og  $\lambda_i(x, t)$  er raten, hvormed der sker transformation til  $(i+1)$ kloner.

Raten af opståen af  $i$ -kloner fås ved at integrere raten  $\lambda_{i-1}(x, t) p_{i-1}(x, t)$  over alle aldre af  $(i-1)$ -kloner:

$$p_i(0, t) = \int_0^\infty \lambda_{i-1}(x, t) p_{i-1}(x, t) dx \quad i=1, \dots, k.$$

De normale celler er ikke karakteriseret ved alderen  $x$ , så  $\lambda_0(t)$  og  $\mu_0(t)$  er uafhængige af  $x$ .

Vi antager, at alle cellerne oprindeligt er normale, så

$$p_0(0) = 1 \text{ og } p_i(x, 0) = 0 \quad i=1, \dots, k.$$

Er  $\lambda_i$  og  $\mu_i$  givne, fås følgende løsninger

$$p_0(t) = e^{-L_0(t)}$$

$$p_i(x, t) = \begin{cases} p_i(0, t-x) \exp(-\int_0^x (\lambda_i(x', t-x') + \mu_i(x', t-x')) dx') & x < t, \quad i=1, \dots, k \\ 0 & x > t \end{cases}$$

$p_i$  kan nu bestemmes successivt, startende med  $p_0$ , og

$g(t) = p_k(0, t)$  er givet ved  $p_i(0, t)$  med  $i=k$ .

For  $\int_0^t \lambda_i dt \ll 1$  og  $\mu_i = 0$  for alle  $i$ , fås ligningen

$$p_1(x, t) \sim \lambda_0(t-x)$$

$$p_i(x, t) \sim \int_0^{t-x} \lambda_{i-1}(x_{i-1}, t-x) \int_0^{t-x-x_{i-1}} \lambda_{i-2}(x_{i-2}, t-x-x_{i-1}) \dots \\ \cdot \int_0^{t-x-x_{i-1}-\dots-x_2} \lambda_1(x_1, t-x-x_{i-1}-\dots-x_2) \lambda_0(t-x-x_{i-1}-\dots-x_1) \\ \cdot dx_1 dx_2 \dots dx_{i-1}, \quad x < t, \quad i=2, \dots, k-1$$

$$p_i(x, t) = 0 \quad x > t, \quad i=1, \dots, k-1.$$

Når  $\lambda_i(x, t)$  og  $\mu_i(x, t)$  er uafhængige af klonens alder  $x$  for  $i=1, \dots, k-1$ , fås

$$p_i(x, t) = \begin{cases} \lambda_{i-1}(t-x) \left( \int_0^t p_{i-1}(y, t-x) dy \right) \exp(L_i(t-x) - L_i(t)) & x < t, \quad i=1, \dots, k-1 \\ 0 & x > t \end{cases}$$

$L_i(t)$  defineres som på side 26

Integreres det sidste udtryk for  $p_i(x,t)$  med hensyn til  $x$ , fås  $p_i(t)$ , som er sandsynligheden for, at en celle vil være årsag til en  $i$ -klon til tiden  $t$ .

Der er forskellige måder at udtrykke  $\lambda_i(x,t)$  på. (22) nævner tre, hvoraf to er nært beslægtede.

Armitage og Doll antager, at  $\lambda_i(x,t)$  er proportional med størrelsen af  $i$ -klonen til alderen  $x$ , og at  $\mu_i=0$ . Endvidere antages eksponentiel vækst:

$$\lambda_i(x,t) = \lambda_i(t) e^{\beta_i x} \quad i=1, \dots, k-1.$$

$\beta_i$  er vækstraten for en klon af type  $i$ , og  $\lambda_i(t)$  er en proportionalitetsfaktor.

Fisher antager ligeledes, at  $\mu_i=0$ , men at kloner vokser som en cirkulær skive med radius proportional med alderen  $x$ , hvilket i hvert fald er tilfældet i pattedyrs epitelvæv, og får således:

$$\lambda_i(x,t) = \lambda_i(t) x^2 \quad i=1, \dots, k-1.$$

Whittemøre og Keller følger Fishers argumentation, men udvider den til at omfatte indre væv:

$$\lambda_i(x,t) = \lambda_i(t) x^3.$$

Som eksempel vil vi undersøge konsekvenserne af Armitage og Dolls antagelser.

Sættes  $k=2$ ,  $\beta_1=\beta$ ,  $\mu_i=0$ , og antages det, at  $\lambda_0$  og  $\lambda_1$  er konstante med  $\lambda_0 t \ll 1$  og  $\lambda_1 t \ll 1$ , fås med  $i=1$

$$p_1(0,t) = \lambda_0 e^{-\lambda_0 t} \lambda_0$$

Dernæst findes

$$p_1(x,t) \begin{cases} \lambda_0 \exp(-\int_0^x \lambda_1 e^{\beta x'} dx') = \lambda_0 e^{(\lambda_1/\beta)(1-e^{\beta x})}, & x < t \\ = 0 & x > t \end{cases}$$

Da  $g(t) = p_2(0,t)$ , fås

$$g(t) = p_2(0,t) \int_0^t \lambda_1 e^{\beta x} \lambda_0 e^{(\lambda_1/\beta)(1-e^{\beta x})} dx \\ = \lambda_0 (1 - e^{-(\lambda_1/\beta)(1-e^{\beta t})}).$$

Er væksttiden konstanten  $w$ , findes risikorate

$$h(t) \sim N \lambda_0 (1 - e^{-(\lambda_1/\beta)(e^{\beta(t-w)} - 1)}).$$

For  $\beta(t-w) \ll 1$  fås

$$h(t) \sim N \lambda_1 \lambda_0 (t-w).$$

Er omvendt  $\beta(t-w) \gg 1$  findes

$$h(t) \sim N \lambda_0.$$

Disse risikorater er fundet i overensstemmelse med udvalgte data.

Multihit modeller adskiller sig ikke meget fra multistage modeller. Den eneste forskel er, at de  $k$  ændringer i en multistage model opstår i en bestemt tidssekvens, hvad de ikke gør i en multihit model.

Antager vi, at  $k \geq 1$  forskellige hits skal forekomme i en celle før den er ændret, og at det  $i$ -te hit forekommer med en konstant rate  $\lambda_i$ ,  $i=1, \dots, k$ , og antager vi endvidere, at celler, som indeholder nogle, men ikke alle, af de relevante hits, ikke har nogen selektive fordele eller ulemper i forhold til en normal celle, kan en multihit model være følgende, som foreslås af (3).

$$l(t, d) = kt^{k-1} \left( \prod_{i=1}^k (\alpha_i + \beta_i d) \right)$$

hvor  $l(t, d)$  er incidensraten for ændringer af en enkelt celle,  $t$ =tiden,  $d$ =dosis,  $\lambda_i = \alpha_i + \beta_i d$  samt  $\alpha_i \geq 0$  og  $\beta_i \geq 0$ . Vi vil ikke her komme nærmere ind på multihit modeller, idet et af de følgende afsnit beskæftiger sig med netop ovennævnte model. I stedet vil vi give en kort beskrivelse af den sidste modeltype i "time-to-occurrence" kategorien.

#### Multievent modellen.

Multievent modellen bygger på, at et stort antal begivenheder relateret til cancers opståen skal forekomme i en celle.

Snarere end at alle begivenhederne er nødvendige for at kunne starte en cancer, forestiller man sig et antal samlinger  $A_1, \dots, A_n$  af begivenheder, som forårsager en cancer, så snart alle begivenhederne i et  $A_i$  er indtruffet. I denne model er der altså mange ruter, gennem hvilke en cancer kan opstå. En rute, der indeholder  $k$  begivenheder, kan benævnes en  $k$ -hit rute. Selve samlingerne  $A_1, \dots, A_n$  behøver ikke være disjunkte, så en bestemt begivenhed kan inkluderes i et antal forskellige ruter. Konsekvenserne af modellerne kan godt forstås uden at gå i detaljer. Det gør ingen forskel, hvorvidt nogle

af begivenhederne skal indtræffe i en specifik orden, da de justeringer, der er nødvendige for at gå fra det ene tilfælde til det andet, er meget lig de, der er nødvendige for at gå fra en multihit til en multistage model.

Antages det, at den  $i$ -te begivenhed indtræffer med en konstant rate  $\alpha_i + \beta_i d$ , hvor  $\alpha_i$ -erne er funktioner af dosisraterne for andre carcinogener, men ikke funktion af  $d$ , findes, at alle ruterne, i hvilke raterne ikke er funktioner af  $d$  ( $\beta_i = 0$  for alle  $i$ ), repræsenterer mekanismer, som er uafhængige af de mekanismer under hvilke primære carcinogener forårsager cancer (se senere om gruppe 1 og gruppe 2 mekanismer).

Det kan vises, at responsen vil være lineær i  $d$  for små dosisrater  $d$ , selvom alle ruter, der er afhængige af  $d$ , indeholder mindst to begivenheder, der kun indtræffer ved tilstedeværelsen af et specifikt carcinogen.

Vi har nu gennemgået typerne af modeller inden for kategorierne "dichotomous" og "time-to-occurrence".

Før vi går over til en sammenligning og diskussion af modellerne, vil vi gå i dybden med tre modeller for at se, på hvilke præmisser de fungerer, på principperne for deres opbygning og på estimation af parametre i modellen.

#### IV. TRE UDVALGTE MODELLER.

I dette afsnit vil vi undersøge tre modeller nøjere. Vi har ikke lagt nogen "objektive" kriterier til grund for udvælgelsen, men forskellige argumenter kan dog anføres.

Eftersom ingen af modellerne endnu har fundet nogen videre anvendelse, og eftersom de antagelser der gøres i de enkelte modeller endnu er yderst usikre, kan sådanne argumenter ikke bruges til en udvælgelse.

Vi har i stedet brugt vor intuition, og bla. skævet til hvilke modeller der i litteraturen synes mest omtalt, og endvidere har vi valgt tre forskellige typer.

Den første model vi ser på, Mantel-Bryan (14), er egentlig ikke en model, men en metode til at foretage et konservativt skøn på en grænseværdi udfra eksperimentelle data fra et højere dosis-område.

I de fleste artikler vi har læst er denne model nævnt, og det er vort indtryk at det er en af de mest kendte. De to næste er såkaldte "time to occurrence" modeller, hvilket vil sige, at de tager hensyn til at en observeret cancer (f.eks. i en mus) er resultatet af en transformation af en celle til cancercelle, efterfulgt af en vækstperiode, hvor tumoren bliver så stor, at den kan observeres.

Som beskrevet i afsnit III kan der gøres forskellige antagelser om disse to tidsforløb; endvidere gøres der antagelser om responsens dosisafhængighed, således at den observerbare cancer-rate bliver en funktion af tiden og dosis.

I den første artikel (3), undersøges forløbet af en "familie" af time to occurrence modeller (multihit, multistage, multievent) for små doser, og det konkluderes at disse modeller er tilnærmelsesvis lineære i lavdosis-området.

Den sidste model, produktmodellen, antager at cancer-raten

kan beskrives som produktet af en funktion af tiden, og en funktion af dosis, hvorefter det vises, hvordan parametrene i funktionerne kan estimeres.

Mantel-Bryan metoden.

Forfatterne starter med det kendte argument, at ingen absolut grænseværdi kan fastsættes udfra et eksperiment med endeligt mange forsøgsdyr.

De mener istedet man bør fastsætte en acceptabel risikorate (f.eks. en cancer pr. 100 mill.) og kalde den tilhørende dosis "safe dose"; kan vi så finde en metode til at beregne denne safe dose udfra eksperimentelle data, vil det være et godt udgangspunkt for fastsættelse af grænseværdier.

For at kunne dette, må der fastsættes tre ting :

- 1) et safe dose niveau - her foreslås 1/100 mill.
- 2) et statistisk sikkerhedsniveau - her foreslås 99%.
- 3) en konservativ måde at ekstrapolere på.

Punkt 1) og 2) gennemgås i forbindelse med eksemplet senere; punkt 3) kræver lidt omtale.

Den ekstrapoleringsmetode der foreslås er hovedsagelig baseret på erfaringer fra den medicinske dosis-respons sammenhæng "i al almindelighed".

Det er meget brugt i medicin (og andre biologiske områder) at afbilde dosis-respons kurven i et koordinatsystem, hvor x-aksen er skaleret logaritmisk, og hvor y-aksen er inddelt i probits, (se note C); i et sådant koordinatsystem vil dosis-respons kurver ofte være lineære, og ifølge forfatterne have hældningskoefficienter på :

|                        |   |          |         |                |
|------------------------|---|----------|---------|----------------|
| systemiske giftstoffer | : | hældning | 10 - 50 | probits/log d. |
| forsøg med antibiotika | : | -        | ca. 3   | -              |
| virus assays           | : | -        | ca. 2   | -              |

Forfatterne forslår på denne baggrund en hældning på 1 probit/log dosis i lavdosis området, og hævder, at uanset hvordan kurvens forløb ser ud i lavdosis området, vil den ligge under denne linie; metoden skulle altså give et kon-

servativt skøn på en grænseværdi.

Herefter gennemgås hvordan en safe dose kan beregnes :

- 1) i eksperimenter, hvor der i et givet antal mus ingen effekt konstateres (se skema nedenfor, og regneeksem-  
i. note d).
- 2) i eksperimenter, hvor der i et givet antal mus konsta-  
teres et antal tumorer, (se note d).

TABLE 1.—Illustration of "safe" doses determined when no risk was observed in single groups

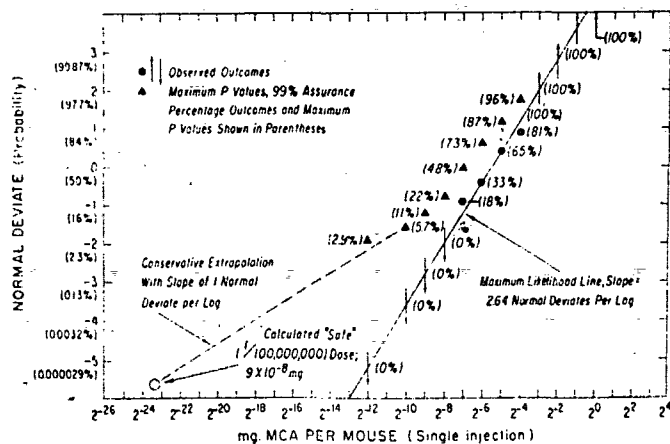
| Number of mice with tumors/<br>No. tested   | 0/10      | 0/50     | 0/100   | 0/500   | 0/1,000 |
|---|-----------|----------|---------|---------|---------|
| Upper limit on tumor risk at<br>level employed, 99 percent<br>assurance (percent) | 37        | 8.8      | 4.5     | 0.92    | 0.45    |
| Estimated "safe" dose (1/100<br>million) dose employed = 1                        | 1/190,000 | 1/18,000 | 1/8,300 | 1/1,800 | 1/1,000 |

Endvidere angives en metode til at modificere beregningerne, hvis der er kontrolgruppe - dette vil vi ikke komme nærmere ind på her, dog må vi som biologer kraftigt understrege nødvendigheden af kontrolgrupper.

I nedenstående eksempel er den foreslåede metode taget i anvendelse på nogle data fra et eksperiment, hvor der er resultater fra flere dosis niveauer.

TABLE 2.—Illustration of methodology for determining the "safe" dose from results at several dose levels; data from Bryan and Shimkin (11)

| Dose mg/<br>mouse | Log dose  | Result                       |  | Maxi-<br>mum<br>P<br>value<br>99%<br>assur-<br>ance | Corre-<br>sponding<br>normal<br>deviate | Calcu-<br>lated<br>"safe"<br>(1/100<br>million)<br>log dose<br>(2)-(6)<br>-5.612 |
|-------------------|-----------|------------------------------|--|---|---|--|
|                   |           | No. of tumors<br>No. of mice | Combined<br>result<br>No. of tumors<br>No. of mice |   |   |  |
| (1)               | (2)       | (3)                          | (4)  | (5)   | (6)                                     | (7)  |
| 0.000244          | 6.388-10  | 0/79                         | 0/158  | 0.0288  | -1.899                                  | 2.675-10   |
| 0.000975          | 6.990-10  | 0/41                         | 0/79   | 0.0566  | -1.584                                  | 2.962-10   |
| 0.00195           | 7.291-10  | 0/19                         | 0/38   | 0.1141  | -1.205                                  | 2.884-10   |
| 0.0039            | 7.592-10  | 0/19                         | 0/19   | 0.2152  | -0.789                                  | 2.769-10   |
| 0.0078            | 7.893-10  | 3/17                         | 3/17   | 0.480   | -0.050                                  | 2.331-10   |
| 0.0156            | 8.194-10  | 6/18                         | 6/18   | 0.729   | +0.610                                  | 1.972-10   |
| 0.0312            | 8.495-10  | 13/20                        | 13/20  | 0.871   | +1.131                                  | 1.752-10   |
| 0.0625            | 8.796-10  | 17/21                        | 17/21  | 0.958   | +1.728                                  | 1.456-10   |
| 0.125             | 9.097-10  | 21/21                        | —  | —   | —                                       | —  |
| 0.25              | 9.398-10  | 21/21                        | —  | —   | —                                       | —  |
| 0.50              | 9.699-10  | 21/21                        | —  | —   | —                                       | —  |
| 1.0               | 10.000-10 | 20/20                        | —  | —   | —                                       | —  |



TEXT-FIGURE 1.—Estimation of the "safe" dose from test results with a carcinogen methyleholanthrene, at several dose levels. At each test level both the observed percentage response and an upper limit, 99 percent assurance, based on combined data are shown. Solid line is the maximum likelihood probit line fitted to the data. The "safe" level of  $9 \times 10^{-8}$  mg per mouse is in this instance estimated by extrapolation with the conservative slope of 1 normal deviate per log from the upper limit on P at the second dose level.

Punkterne er sandsynligheds parametrene i binomialfordelingen - i stedet for denne bruges den øvre grænse af et 99% sikkerhedsniveau, som er angivet ved trekantene lodret over hver værdi, og som derved bliver et konservativt skøn over parameteren.

Forfatterne forskyder en linie med hældningen 1 fra højre mod venstre og lægger linien gennem den trekant, der først rammes. Derefter kan vi afgøre for hvilken dosis denne linie når vor fastsatte risikorate (1/100 mill. = -5.7 probits), dvs. hvor linien skærer en linie parallel med x-aksen gennem -5.7.



Time to occurrence modeller (multihit, multistage, multievent); deres udseende i lavdosis området, (3).

Til grund for modellerne ligger en række antagelser, som dels bygger på den viden vi har om den cancerogene proces, og dels er mere eller mindre arbitrære antagelser nødvendige for modelbygningen.

Det antages, at cancer opstår i een celle, som følge af nogle mutationer i DNA'et; En celletransformation kan tænkes at være resultatet af en del mutationer, som kan ske uafhængigt af hinanden, og uafhængigt i rækkefølge, eller den kan tænkes at være resultatet af mere komplekse mutationshændelser, (se afsnit III) - de følgende modelbetragtninger gælder derfor for en familie af modeller. Der foreligger en biologiske resultater, som tyder på, at disse antagelser er rimeligt gode.

Forfatterne antager endvidere, at vi påvirkes af en hel række forskellige carcinogene stoffer, foruden en vis spontan mutations rate (baggrundsstråling, fejl-repair), således at tilførslen af et nyt stof, her kaldet det primære carcinogen, påvirker en allerede igangværende proces.

Det antages, at nogle af disse stoffer virker uafhængigt af hinanden, og der opereres her med to grupper :

Grp. 1 : Alle carcinogener, hvis virkning er uafhængig af virkningen af det primære carcinogen - tumorraten som følge af disse kalder vi  $I_1$ .

Grp. 2 : Alle carcinogener som på en eller anden måde vekselvirker med det primære carcinogen, herunder også spontane mutationer - tumorraten som følge af disse kalder vi  $I_2$ .

Modellerne beskriver den alders-dosis afhængige cancer-rate,  $I(t,d)$ , antal tumorer som funktion af tid og dosis. Sætter vi i første omgang tiden konstant (vi vælger et bestemt tidspunkt at tælle tumorer på), får vi eftersom  $I_1$  og  $I_2$  er antaget uafhængige :

$$I(d) = I_1 + I_2$$

Antager vi nu, at gruppe 2 består af  $m$  stoffer med dosis  $d_1 \dots d_m$ , foruden det primære carcinogen med dosis  $d$ , og antager vi endvidere at virkningen af det primære carcinogen er additiv i forhold til virkningen af resten af stofferne i gruppe 2, får vi :

$$D = D_0 + bd \quad , \quad \text{hvor } D \text{ betegner virkningen af hele grp. 2, } D_0 \text{ virkningen af stofferne } d_1 \dots d_m.$$

Forfatterne bemærker her, at  $D_0$  ikke nødvendigvis er en sum af enkeltvirkningerne, men blot en funktion af dem; ser man imidlertid dette i en større sammenhæng, er det af hensyn til udforskningen af denne funktion nødvendigt at lade forskellige stoffer i grp. 2 indtage pladsen som det primære carcinogen, dvs. additiv i forhold til resten, men forfatterne går ikke nærmere ind på dette. Vi udtrykker nu tumorraten som en funktion af virkningen af stofferne i grp. 2 :

$$I_2 = H(D)$$

og vi får :

$$I(d) = I_1 + H(D_0 + bd)$$

Antager vi nu at  $H$  er en ikke aftagende differentiabel funktion, kan vi omskrive efter Taylor

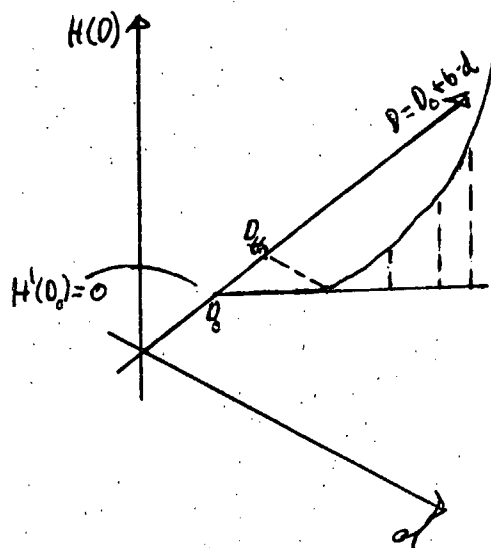
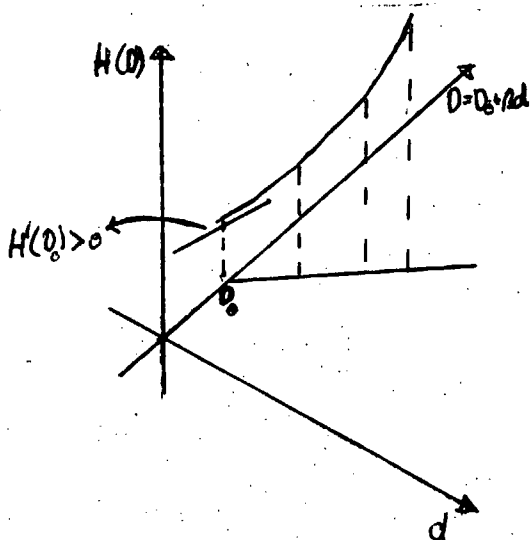
$$I(d) = I_1 + H(D_0) + bH'(D_0)d + o(d)$$

hvor restleddet  $o(d)$  går mod 0.

Vi ser nu, at tumorraten som følge af begge grupper  $I(d)$  er en lineær funktion af  $d$ .

Forfatterne bruger herefter nogen tid på at undersøge om  $H'(D_0) \geq 0$ , idet de hævder, at dette er en forudsætning for lineariteten - vi kan ikke helt følge denne argumentation, idet  $H'(D_0) = 0$  blot vil medføre, at  $I(d)$  vil være konstant, hvilket vel også må kaldes lineært.

Vi har forsøgt at skitsere forfatterens argumentation i de to omstående figurer.



Til venstre ses  $H'(D_0) > 0$ , funktionen  $H$  kan her approximeres med en lineær funktion i nærheden af  $D_0$ .

Til højre ses  $H'(D_0) = 0$  - hvilket f.eks. er tilfældet hvis der eksisterer en grænseværdi  $D_{th}$ , under hvilken der ingen virkning er.

Senere kommer forfatterne ind på en vurdering af graden af linearitet, og får her brug for at dividere med det approximerede 1. grads polynomium (som jo er nul i figuren til højre for små  $d$ ), så det er muligt, det er dette de sigter til.

Forfatterne rejser herefter en række spørgsmål vedrørende antagelsernes validitet :

1) virker alle carcinogener uafhængigt af hinanden, eller er det rimeligt at inddele dem i grupper, som foreslået. Dette skulle kunne undersøges eksperimentelt ved hensigtsmæssigt valt af nogle stoffer.

2) Hvis svaret i 1) er at nogle carcinogener vekselvirker, er det da rimeligt at antage at virkningen af en sådan gruppe og et nyt stof (primære carcinogen) er additiv, som antaget :  $D = D_0 + bd$  .

Denne antagelse vil det efter forfatternes mening blive sværere at undersøge, men de mener ikke at den er essentiel for modellernes holdbarhed.

3) er det sandt at  $H'(D_0)$  er positiv ?

Påstanden vil ikke holde stik, såfremt der eksisterer en nedre grænse for dosis, hvorunder der ikke opstår cancer; en sådan nedre grænse mener forfatterne dog ikke kan eksistere, såfremt man accepterer, at cancer kan opstå fra en celle.

Sådanne tolerancer vil ikke være ens i alle vore celler, men tilfældigt fordelt omkring en middelværdi, og antallet af celler i kroppen taget i betragtning, vil der være rigeligt med følsomme celler, til at respondere på selv en meget lille dosis.

4) Selvom vi accepterer argumentet om linearitet ved små doser, må vi vide noget om "hvor lineær" (dvs. hvor god approximationen er) - sådanne kvantitative spørgsmål vil kræve mere specifikke antagelser, og i det følgende undersøger forfatterne approximationen for den tidligere nævnte familie af lavdosis modeller.

$$I_v(t,d) = \int_0^t I_a(t-u) f(u) du$$

$I_v(t,d)$  = sandsynligheden for at en celle udvikler sig til en tumor

$I_a(t-u,d)$  = sandsynligheden for at en celle omdannes til en cancercelle

$f(u)$  = sandsynligheden for at en omdannet celle vokser til en tumor (bliver opdagelig); denne antages uafhængig af dosis.

For nærmere forklaring, se side

Antager vi, at der skal ske en række mutationer (hits)  $z_i$ ,  $i=1\dots k$  før en celle er omdannet til cancercelle, og at sandsynligheden for disse er lineært afhængig af dosis .

$$z_i = a_i + b_i d$$

Den følgende antagelse er der ikke argumenteret nærmere for, men blot henvist til en artikel (Armitage-Doll, "stochastic models for carcinogenesis, Pro-

ceedings of the fourth Berkeley symposium on mathematical statistics and probability, vol. 4, University of California press, 1961).

Denne artikel bestilte vi allerede i begyndelsen af marts måned, men har desværre ikke fået endnu, så vi kan ikke så godt gå nærmere ind i de gjorte antagelser. Raten  $I_a(t,d)$  opsplittes i en tidsafhængig funktion, kaldet Weibull distribution, og en dosisafhængig :

$$I_a(t,d) = kt^{k-1} \left( \prod_{i=1}^k (a_i + b_i d) \right)$$

Det dosisafhængige led er et polynomium i  $d$  af  $k$ -dte grad, og hvis vi antager  $d$  lille, ser vi at det kan tilnærmes et 1. gradspolynomium :

$$A + Bd + o(d) \text{ , hvor } o(d) \rightarrow 0 \text{ , for små } d.$$

Vi indsætter nu  $I_a(t,d)$  i integral ligningen :

$$I(t,d) = Q_k(d) n k \int_0^t u^{k-1} f(t-u) du = Q_k(d) S_k(t)$$

Hvor  $I(t,d) = nI_v(t,d)$ , (der er  $n$  celler).

$Q_k(d)$  er polynomiet i  $d$ , dvs. kun afhængigt af  $d$ , og aproximativt lineært for små  $d$ .

$S_k(t)$  er resten af udtrykket, kun afhængigt af  $t$ .

Ovenstående argumenter holder også, selvom vi i stedet for multihit modeller, anvender multistage og multievent modeller - disse er altså aproximativt lineære i dosis for små doser.

For at få et mål for, hvor god aproximationen er, ser forfatterne på forholdet :

$$R = \frac{I(d) - I(o)}{dI'(o)} \quad k$$

hvor  $I(o)$  og  $I(d)$  er to punkter på kurven  $I(d) = \prod_{i=1}^k (a_i + b_i d)$  og  $dI'(d)$  er den lineære aproximation til  $I(d)$ .

Vi definerer den relative tilvækst :

$$1 + p = \frac{I(d)}{I(o)} \text{ og beregner } R_{\max} \text{ (se skema) for}$$

forskellige givne k (hits), og forskellige p (forøgelse i raten over baggrundsrate).

Values of the upper bound of the ratio R from Equation Q

| k \ p    | 0.1  | 0.5  | 1    | 4    | 10   | 100   |
|----------|------|------|------|------|------|-------|
| 1        | 1    | 1    | 1    | 1    | 1    | 1     |
| 2        | 1.02 | 1.11 | 1.21 | 1.62 | 2.16 | 5.52  |
| 5        | 1.04 | 1.18 | 1.35 | 2.11 | 3.25 | 13.18 |
| $\infty$ | 1.05 | 1.23 | 1.44 | 2.49 | 4.17 | 21.67 |

### Produktmodellen.

Som nævnt andetsteds indeholder de fleste stokastiske modeller for carcinogenese tiden til tumor, t, som et observeret karakteristika ved forsøgdyrspopulationen. Produktmodellen, som skal omtales her, dækker imidlertid også situationer, hvor det for nogle (eller alle) forsøgsdyr(ene) gælder, at tiden til tumor ikke er tilgængelig, og det kun er kendt, om dyrene udviklede cancer inden forsøgets afslutning eller inden dødens indtræffen.

Den anvendte notation er præciseret i forgående kapitel under afsnittet "Statistiske forberedelser", og her skal kun tilføjes en enkelt ting.

I de tilfælde, hvor det ikke har været muligt at tilvejebringe tiden til tumor, og der kun kendes et tal for tumorforøgelsen ved forsøgets afslutning, T, benyttes symbolet  $R(x) = R(T, x; \alpha, \beta)$  for at understrege tumorforøgelsesratens afhængighed af dosis i disse eksperimenter.

Produktmodellen opfatter risikorate som et produkt af en funktion af x og en funktion af t. Det vil sige, at  $h(t, x; \alpha, \beta) = g(x; \alpha) f(t; \beta)$ .

Accepteres denne form, opstår to parallelle spørgsmål, nemlig formen af  $g(x; \alpha)$  og af  $f(t; \beta)$ .

Konstruktørene af produktmodellen (8) har valgt Weibull formen

$$f(t; \beta) = k(t-w)^{k-1}$$

som et udtryk for  $f(t; \beta)$ . Begrundelsen fremgår ikke tydeligt, men skal sandsynligvis søges i Weibull formens

empiriske og teoretiske kvaliteter, som er omtalt andetsteds.

I udtrykket  $k(t-w)^{k-1}$  antages  $w$  sædvanligvis kendt og sættes derfor til 0, idet nulpunktet for tidsskalaen blot sættes til  $w$ .

At Hartley og Sielken har valgt Weibull formen betyder ikke, at det er denne de benytter i deres model. De sætter nemlig

$$F(t;\beta) = \int_0^t f(t';\beta) dt' = \sum_{r=1}^b \beta_r t^r, \quad \text{hvor } \beta_r \geq 0 \text{ og } \beta_0 = 0.$$

De siger altså, at  $F(t;\beta)$  skal have ovennævnte form, og polynomiet kan betragtes som et vægtet gennemsnit af Weibull risikorater med positive vægtkoefficienter  $\beta_r$ .

Den dosisafhængige funktion  $g(x;\alpha)$  sættes til

$$g(x;\alpha) = \sum_{s=0}^a \alpha_s x^s, \quad \text{hvor } \alpha_s \geq 0.$$

Funktionen kan altså betragtes som et vægtet gennemsnit af doser.

Det gælder, at  $g(x;\alpha) \geq 0$  og  $\frac{d^2}{dx^2}g(x;\alpha) \geq 0$ , hvilket betyder, at  $g(x;\alpha)$  er en konveks funktion.

$g(x;\alpha)$  repræsenterer begyndelsen af en cancerinduktionsproces, som opstår pludseligt med en vis omdannelsessandsynlighed. Omdannelsen er fra normalt væv til cancer væv, er forårsaget af en given dosis-stimulus og er ikke afhængig af vævets alder.

#### Maximum-likelihood estimation af parametre.

Til bestemmelse af parametrene  $\alpha$  og  $\beta$  benyttes maximum-likelihood estimation.

I et karakteristisk dyreforsøg afprøves det mistænkte carcinogen i  $D$  doser, med  $n_d$  dyr udsat for  $d$ -te dosis. Det antages, at hvert forsøgsdyr er associeret med 1) dosen  $x_d$ , 2) den forudbestemte tid  $T$ , ved hvilken dyret aflives, 3) tiden til cancer,  $t$ , hvis den kan observeres og 4) tiden til død indtræffer,  $\tau$ , betinget af, at  $\tau \leq T$ .

Disse data vil for hvert dyr bidrage med faktorer til "the overall likelihood" som vist i tabellen på den følgende side.

BASIS FOR LIKELIHOOD IN RELATION TO EXPERIMENTAL PROTOCOL

| Experimental Protocol of Animal  | Assumptions about Data  | Factor of Likelihood which involves $\alpha, \beta$     |
|--|---|---|
| 1 Direct observation of time to cancer $t$ without necropsy (e.g. palpability)   | $t$ is random variable from uncensored range $t \leq T$   | $r(t, x; \alpha, \beta)$                                |
| 2 Negative necropsy at termination $T$   | Time to cancer $t$ occurs sometime after $T$  | $Q(T, x; \alpha, \beta)$                                |
| 3 Negative necropsy at death $\tau$  | Death is from causes independent of cancer; $t$ is censored at random value $\tau$ from life distribution                   | $Q(\tau, x; \alpha, \beta)$                             |
| 4 Positive necropsy at termination $T$ or at death $\tau$ ; $t$ can be estimated from necropsy information             | Estimated value of $t$ , denoted by $t'$ , is equivalent to random observation from time to cancer distribution             | $r(t', x; \alpha, \beta)$                               |
| 4' Positive necropsy at termination $T$ or death $\tau$ but $t \leq T$ or $t \leq \tau$ is all that is known about $t$ | The fact that $t$ cannot be estimated at necropsy means that its value on $t \leq T$ or $t \leq \tau$ is essentially random | $R(T, x; \alpha, \beta)$<br>$R(\tau, x; \alpha, \beta)$ |

I eksperimenter, hvor tiden til cancer,  $t$ , ikke kendes og kun antal dyr med -eller uden- cancer findes, benyttes punkterne 2, 3, og 4'.

De  $n_d$  forsøgsdyr opdeles i tre kategorier:

$n_{d1}$  = antallet af dyr, hvor tid til tumor er enten kendt eller estimeret på basis af positiv nekrose (punkt 1 og 4)

$n_{d2}$  = antallet af dyr med positiv nekrose men ingen kendt eller estimeret tid til tumor (punkt 4') og

$n_{d3}$  = antallet af dyr med negativ nekrose (punkt 2 og 3).

Fra hvert forsøgsdyr fås et bidrag til likelihood-funktionen, og disse multipliceres.

Likelihood-funktionen bliver da

$$L = \prod_{i=1}^p \left( \prod_{i=1}^{n_{d1}} r(t_i) \prod_{j=1}^{n_{d2}} R(\tau_j) \prod_{k=1}^{n_{d3}} Q(\tau_k) \right).$$

Accepteres risokoraten

$$h(t, x; \alpha, \beta) = g(x; \alpha) f(t; \beta) = \left( \sum_{s=0}^a \alpha_s x^s \right) \left( \sum_{r=1}^b \beta_r t^{r-1} \right)$$

fås

$$r(t, x; \alpha, \beta) = g(x; \alpha) f(t; \beta) \exp(-g(x; \alpha) F(t; \beta))$$

$$R(t, x; \alpha, \beta) = 1 - \exp(-g(x; \alpha) F(t; \beta))$$

$$Q(t, x; \alpha, \beta) = \exp(-g(x; \alpha) F(t; \beta))$$

og log likelihood bliver



$$\begin{aligned} \log L = & \sum_{d=1}^D \left( n_{d1} \log \left( \sum_{s=0}^a \alpha_s x_d^s \right) \right. \\ & + \sum_{i=1}^{n_{di}} \log \left( \sum_{v=1}^b r^v \beta_v t_{di}^{r-1} \right) - \sum_{i=1}^{n_{di}} \left( \sum_{s=0}^a \alpha_s x_d^s \sum_{v=1}^b r^v t_{di}^r \right) \\ & + \left( \sum_{j=1}^{n_{dj}} \log \left( 1 - \exp \left( - \sum_{s=0}^a \alpha_s x_d^s \sum_{v=1}^b r^v \tau_{dj}^r \right) \right) \right) \\ & + \left( - \left( \sum_{s=0}^a \alpha_s x_d^s \right) \sum_{k=1}^{n_{dk}} \left( \sum_{v=1}^b r^v \tau_{dk}^r \right) \right) \end{aligned}$$

Maximum-likelihood estimatorerne  $\hat{\alpha}$  og  $\hat{\beta}$  kan nu beregnes ved hjælp af en speciel procedure Hartley og Sielken selv har udviklet.

Punkt estimation.

Den sædvanlige definition af en sikker dosis,  $\xi$ , er en specifik tilladelig forøgelse i cancerraten i forhold til den spontane rate, og  $\xi$  defineres ved ligningen

$$\pi = R(T^*, \xi; \alpha, \beta) - R(T^*, 0; \alpha, \beta)$$

hvor  $T^*$  er en passende valgt eksponeringstid, almindeligvis længden af eksperimentet, og  $\pi$  er forøgelsen i forhold til den spontane rate.

Ækvivalent med ovenstående udtryk er

$$\text{Tol}(T^*) = Q(T^*, \xi; \alpha, \beta) / Q(T^*, 0; \alpha, \beta) = 1 - \pi / Q(T^*, 0; \alpha, \beta)$$

således at tolerancen  $\text{Tol}(T^*)$  defineres som en tilladelig procentvis reduktion i den spontane tumorfrie del.  $\xi$  gives således også ud fra formlen

$$(-\log \text{Tol}(T^*)) \left( \sum_{r=1}^b \beta_r T^{*r} \right)^{-1} = \sum_{s=0}^a \alpha_s \xi^s.$$

Indsættes heri parametrene  $\hat{\alpha}_s$  og  $\hat{\beta}_r$  og  $\xi$  beregnes, repræsenterer  $\hat{\xi}$  maximum-likelihood estimatet af den sikre dosis .

## V. DISKUSSION OG KONKLUSION.

Probit metoden har vist sin egnethed i en lang række biologiske forhold, bl.a. farmakologiske, men vi mener, som argumenteret andersteds, ikke det virker realistisk at overføre den til problemer vedrørende cancer, idet de biologiske mekanismer adskiller sig temmelig meget fra problemer ved almindelige toksikologiske forsøg.

Selvom probit metoden (ihvert fald for de i (14) præsenterede data) ser ud til at passe på data for det eksperimentelle område (den udviser linearitet), er der ingen garanti for, at dette også er tilfældet i lavdosisområdet, idet det som nævnt i note<sup>b</sup>) netop er her, den har visse svagheder.

Det fastlagte 99% niveau, samt safe dosen på 1/100 mill. synes i overensstemmelse med forfatterens intentioner at være fastlagt tilstrækkeligt konservativt. Derimod er det meget svært at tage stilling til den fastlagte hældningskoefficient på 1 probit pr. log dosis, eftersom den er baseret på meget generelle argumenter, hvor ligheden med den biologiske effekt af carcinogene stoffer er tvivlsom.

Med hensyn til anvendelse af metoden, må det bemærkes, at det er en forholdsvis simpel metode, hvilket vel ikke ligefrem er en ulempe (15), men selvfølgelig kommer nøjagtigheden i første række.

Nogle (bl.a. (8)) kritiserer modellen for at være inkonsistent for dosis = 0. Dette er vi ikke enige i, idet det er rigtigt at den ikke er defineret i 0, men grænseværdien for dosis gående mod 0 er 0, hvilket kan fortolkes som en uendelig lille effekt ved dosis = 0.

Den tager endvidere ikke hensyn til at den inducerede cancervirkning skal forholde sig til en allerede (for dosis=0) eksisterende cancerincidens, men forfatterne foreslår en metode (Abbots formel) til at indkalkulere spontanresponstraten fra kontrolforsøg.

Grundlaget for integralmodellen, at cancer er en funktion af tiden og dosis, synes at være en rimelig antagelse, som er i overensstemmelse med de fleste data.

Derimod synes påstanden om linearitet i lavdosis områ-

så henlede opmærksomheden på, at den forudsagte lineari-  
tet afhænger af modellens mere eller mindre teoretiske  
antagelser, herunder antagelsen om additivitet.

Konstruktørerne af produktmodellen nævner selv, at in-  
gen har anfægtet selve produktformen, og at ingen har  
kritiseret kurvens konveksitet. Derimod er der en del  
diskussion om, hvorvidt hældningskoefficienten er lig  
nul eller er strengt større end nul for  $x=0$ . Denne dis-  
kussion agter vi ikke at fordybe os i, idet konsekvenser-  
ne af begge synspunkter ikke nævneværdigt berører kur-  
vens udseende i de for os aktuelle doser, men nærmere  
har betydning for modellens matematiske holdbarhed for  
dosis lig nul.

Selvom ingen har anfægtet kurvens konveksitet eller pro-  
duktformen, bør argumenterne dog ikke uden videre accep-  
teres. Modellen fitter ganske vist data i det eksperimen-  
telle område, men så længe der ikke argumenteres bio-  
logisk for f.eks. produktformen, er der ingen grund til  
at tro, at specielt denne form beskriver de faktiske  
forhold i lavdosis området.

Vi har her kun berørt nogle få punkter i forbindelse  
med de forskellige modellers pålidelighed. Baggrunden for  
at vi ikke har påtaget os en mere detaljeret kritik af  
modellerne, er først og fremmest at vi ikke konkret ved,  
hvordan dosis-respons kurven opfører sig i lavdosis om-  
rådet, da de biologiske overvejelser, der er nødvendige,  
hindres af manglende viden om carcinogenese, og denne  
viden er desværre en betingelse for, at en entydig model  
kan konstrueres.

Vi kan i stedet gå ind i en generel diskussion af lav-  
dosis modellerne.

Modellerne har som tidligere nævnt til formål at skabe  
grundlag for en ekstrapolation af nogle resultater ob-  
serveret i højdosis området til lavdosis området.

De iagttagne resultater afhænger af det biologiske eks-  
periments tekniske kvalitet, og hermed forstås bl.a.

hvorvidt tumorer i visse organer vil blive opdaget (dvs.  
hvilke specielle teknikker, der tages i brug for at søge  
efter dem) hvor mange væv, der undersøges histologisk  
og graden af indsamlinger fra hvert organ.

Disse ting berører dog ikke selve modellen, der benyttes,

men snarere nøjagtigheden af dens ekstrapolation.

I en mere konkret diskussion af lavdosis modeller kunne man komme ind på brugen af f.eks lognormal og Weibull fordelingen i "time-to-occurrence" modeller.

I sammenligninger er brugen af disse testet på et stort antal data. Herved her man fundet, at Weibull formen fittede data bedre end lognormal formen. Weibull fordelingen er også at foretrække på grund af det teoretiske grundlag, og fordi lognormal fordelingen ikke har en monoton risikofunktion. På den anden side er lognormal fordelingen fundet velegnet til at beskrive andre data, og dette kunne lede til antagelsen, at modellens egnethed afhænger af typen af cancer, der beskrives.

(10) mener, at ingen matematisk model korrekt beskriver tidsfordelingen for en given cancer og heller ikke hvorledes en sådan fordeling afhænger af dosis. De finder det derfor af praktisk værdi at have flere forskellige tilgængelige modeller, som kollektivt kan bruges i løsningen af et specifikt problem.

I sammenligninger mellem "time-to-occurrence" modeller findes ofte resultatet: øget forskel ved aftagende dosisværdi. Dette er kvalitativt men ikke kvantitativt det samme, som gør sig gældende for "dichotomous" modeller. Det er ikke klart, hvorvidt disse forskelle primært skyldes måden, hvorpå dosisafhængigheden er indbygget i modellen, den fordeling der er valgt eller måske begge dele.

Problemet med modelafhængighed i lavdosis området er altså til stede i både "dichotomous" og "time-to-occurrence" situationer.

Ovenstående viser nogle problemer, der er forbundet med lavdosis modeller, og at hovedproblemet er deres betydelige forskelle i måden at beskrive responsen på, når dosisværdierne bliver små. Mange mener, at problemerne løses i det øjeblik, det bliver muligt at måle responsen direkte i lavdosis området gennem eksperimenter med bakterier.

Valget af en bestemt model med henblik på ekstrapolation fra højdosis området til lavdosis området er altså meget vanskeligt, idet modellerne i et typisk eksperimen-

forskkel i lavdosis området. Selvom det lykkes at vælge en troværdig model ud fra incidensdata, er der mulighed for, at en eller flere ukendte parametre kan være funktioner af f.eks. dosis.

Andre ting kan nævnes. Den rolle som kombinationen af flere faktorer spiller i induktionen af cancer, er blevet studeret i et begrænset antal tilfælde. Synergisme er blevet fundet i flere tilfælde mellem forskellige carcinogener, og adskillige faktorer, som ikke er carcinogene per se, kan skabe tilstande, der fremmer carcinogenesiteten af testkemikaliet. De testsystemer, vi råder over idag, benyttes da også hovedsageligt til at bestemme effekten af individuelle kemikalier snarere end af multipel eksponeringer.

Eksponeringer af mennesket er imidlertid i høj grad multifaktoriel.

Vi mener ikke, det vil lykkes at pege på en specifik model, der beskriver cancerincidensen over hele dosisskalaen. Begrundelsen er bl.a. at ingen eksisterende modeller skelner mellem maligne og benigne cancerceller, at ingen modeller tager højde for cellernes evne til reparere fejl i DNA-strengen, og at ingen af modellerne tager højde for tilstedeværelsen af immunsystem. Vanskeligheden ved at indarbejde f.eks. immunsystemets effekt i en respons model illustreres ved, at cancerincidensen tilsyneladende stiger med øget kompleksitet af immunsystemet (21).

Ovennævnte grunde kan meget vel tænkes at være årsagen til, at modellerne i forskellige situationer giver forskellige resultater, og at resultaterne i nogle tilfælde vil være i overensstemmelse med virkeligheden og i andre ikke.

Vi tror ikke på, at det kan lade sig gøre at finde frem til én model, der lige godt beskriver alle typer cancers incidens eller for den sags skyld samme cancers incidens under forskellige omstændigheder.

Skulle det mod forventning lykkes, melder næste problem sig. Med mindre kemiske stoffer virker additivt, vil værdien af modellerne nemlig være begrænset til grundforskning. Ingen mennesker påvirkes af kun et carcinogen af gangen. Derfor vil en nok så korrekt fastsat grænsevær-

di være ganske værdiløs i vores multifaktorielle miljø. Kan der påvises synergistisk effekt mellem to carcinogener eller måske ligefrem mellem to ikke-carcinogener, vil det være til stor belastning for enhver lavdosis model og for enhver grænseværdifastsættelse. Det er vores opfattelse, at grænseværdibegrebet, der er defineret for toksiske virkninger, ikke kan overføres til også at gælde carcinogene effekter, og hermed elimineres betydningen af lavdosis modellerne.

Der må radikale forskningspolitiske ændringer til for at styre den miljøbestemte cancer. Ændringer kan vi ikke nå at præstere, men vi forestiller os, at en kvantificering af korttids tests og at epidemiologiske undersøgelser af sammenhængen mellem naturligt forekommende grupper af kemiske stoffer og cancerincidensen kan komme til at spille en væsentlig rolle. Korttids testene vil med rimelig sikkerhed kunne bestemme nye stoffers carcinogene effekt, mens de epidemiologiske undersøgelser vil kunne bestemme risikoen ved hele miljøer.

Skal der nemlig fastsættes grænseværdier, må det være for den samlede gruppe af stoffer, vi til stadighed udsættes for, og grænseværdierne skal først og fremmest beskytte de mennesker, der ikke "frivilligt" udsættes for en signifikant cancerrisiko.

#### Konklusion.

Værdien af eksisterende statistiske modeller til bestemmelse af grænseværdier for carcinogene stoffer er begrænset.

Dels tager de ikke højde for en del vigtige biologiske faktorer som repair-mekanismer, immunsystem o.l., og dels kombinerer de kemiske stoffers carcinogene effekt additivt.

Dette fører til enten falske grænseværdier eller til underestimering af risikoen ved eksponering i multifaktorielle miljøer.

## VI. DESIGN AF EKSPERIMENT.

Vi har i det forgående beskæftiget os med forskellige modeller til ekstrapolation fra højdosis området til lavdosis området.

Eftersom en models værdi afhænger af, hvor godt den beskriver virkeligheden den er konstrueret over, er det af største betydning at afprøve, om de forudsigelser input i modellen fører til, er i overensstemmelse med data, man rent faktisk kan måle i virkeligheden.

Stemmer de empiriske resultater ikke overens med de af modellen forudsagte (og kan man iøvrigt eliminere fejlkilder o.lign.), er det som bekendt modellen som må forkastes eller modificeres.

Det er imidlertid forkert at anlægge et for statisk syn på modellers anvendelse, idet næsten al forskning er en dialektisk proces mellem teori og praksis; modelbygning medvirker til at få præciseret hvor mere viden er påkrævet og hvilke parametre eksperimentet skal medtage.

Meget ofte er det sådan, at jo flere data man råder over jo bedre er man i stand til at opbygge en konsistent model; er der ikke tilstrækkeligt med data, må modellen i første omgang formuleres generelt og hovedsageligt på basis af teoretisk viden og a priori antagelser, men vil så kunne forbedres, efterhånden som relevante data kan fremskaffes.

På det nuværende stade er lavdosis modeller netop for en meget stor del konstrueret på et teoretisk grundlag, men flere af de antagelser modellørerne har måttet gøre, er det muligt gennem eksperimenter at få empiriske data om, og således efterprøve nogle af modellens antagelser.

Vi har under arbejdet med modellerne hele tiden forsøgt at vurdere de biologiske antagelser der er gjort, og i særlig grad lagt vægt på at vurdere, hvilke af antagelserne det vil være muligt at efterprøve eksperimentelt.

I sidstnævnte vurdering har vi selvfølgelig endvidere måttet tage hensyn til de tids- og resourcemæssige rammer vi som studerende er underlagt, og vi har fra starten kunnet udelukke forsøg med mus.

Resultatet af denne vurdering er blevet følgende :

Undersøge nogle forskellige carcinogeneres vekselvirkning (synergisme, antagonisme) ved dosis-respons forsøg med Ames' test.

Som argumenteret i rapporten er det af afgørende betydning at vide noget om stoffernes vekselvirkning.

Hvorledes stofferne vekselvirker er endvidere af betydning for gyldigheden af en antagelse i en af modellerne (se side 37), idet denne model forudsætter at tilførsel af et nyt stof giver en additiv effekt.

Endvidere vil vi forsøge at undersøge dosis-respons forholdet (for bakterier) ved så lave doser som muligt (se note b); hertil hører en nøjagtig bestemmelse af spontanmutationsraten, hvilket yderligere kan bruges til at undersøge ovennævnte additivitets-antagelse.

Som fremhævet i (1) er det vigtigt at anvende og teste modeller i den virkelighed de beskriver, og da vore modeller beskriver den carcinogene proces i vertebrater, (mus, mennesker), kan der være betænkeligheder ved at teste dem i et bakterologisk eksperiment.

I denne forbindelse må vi erkende, at Ames' test indtil nu stort set kun er blevet brugt til kvalitative fortolkninger; det er dog langt fra udelukket at mere standardiserede udgaver af bakterietests vil kunne tillægges kvantitative fortolkninger (note b).

#### Beskrivelse af eksperimentet.

Eksperimentet skal fremskaffe data om, hvordan responsen af flere (3-5) forskellige carcinogener forholder sig til enkeltvirkningerne af stofferne.

Vi vil derfor først udføre forsøg med hvert stof for sig, for at fastlægge dosis-respons kurver; herefter vil vi tilsætte flere stoffer samtidigt i varierende doser, hvor-



ved vi får mulighed for at teste forskellige hypoteser om graden af den observerede vekselvirkning.

Vi har ikke på indeværende tidspunkt fastlagt hvilke stoffer vi vil bruge, men vi vil vælge stoffer med formodet synergistisk, formodet antagonistisk og formodet additiv virkning, idet det først og fremmest er størrelsesordenen af vekselvirkning vi er interesseret i.

Ligeledes er en række videre detaljer ikke fastlagt, men vi vil alligevel forsøge at skitsere, hvilke slags data vil kan forvente at få, samt hvordan vi har tænkt os at behandle dem.

Fra rapporten (4) har vi hentet omstående eksperimentelle data; som det fremgår er bakterierne eksponeret med asfalt i stigende doser, og det tilhørende antal revertanter (se note 6) er talt op.

De tynde linier angiver 95% sikkerhedsniveau, og de lodrette linier angiver spredningen på middelværdierne; for hver dosis er udført tre plader, også for 0-dosis, (her udført som blindprøve, uafhængigt af forsøgsrækken, og derfor ikke taget med i regressionslinien, men angivet som  $Y_0 = 300$ ).

Skæringspunktet mellem regressionslinien og 2.aksen angiver altså det formodede antal spontan revertanter, her ca. 380.

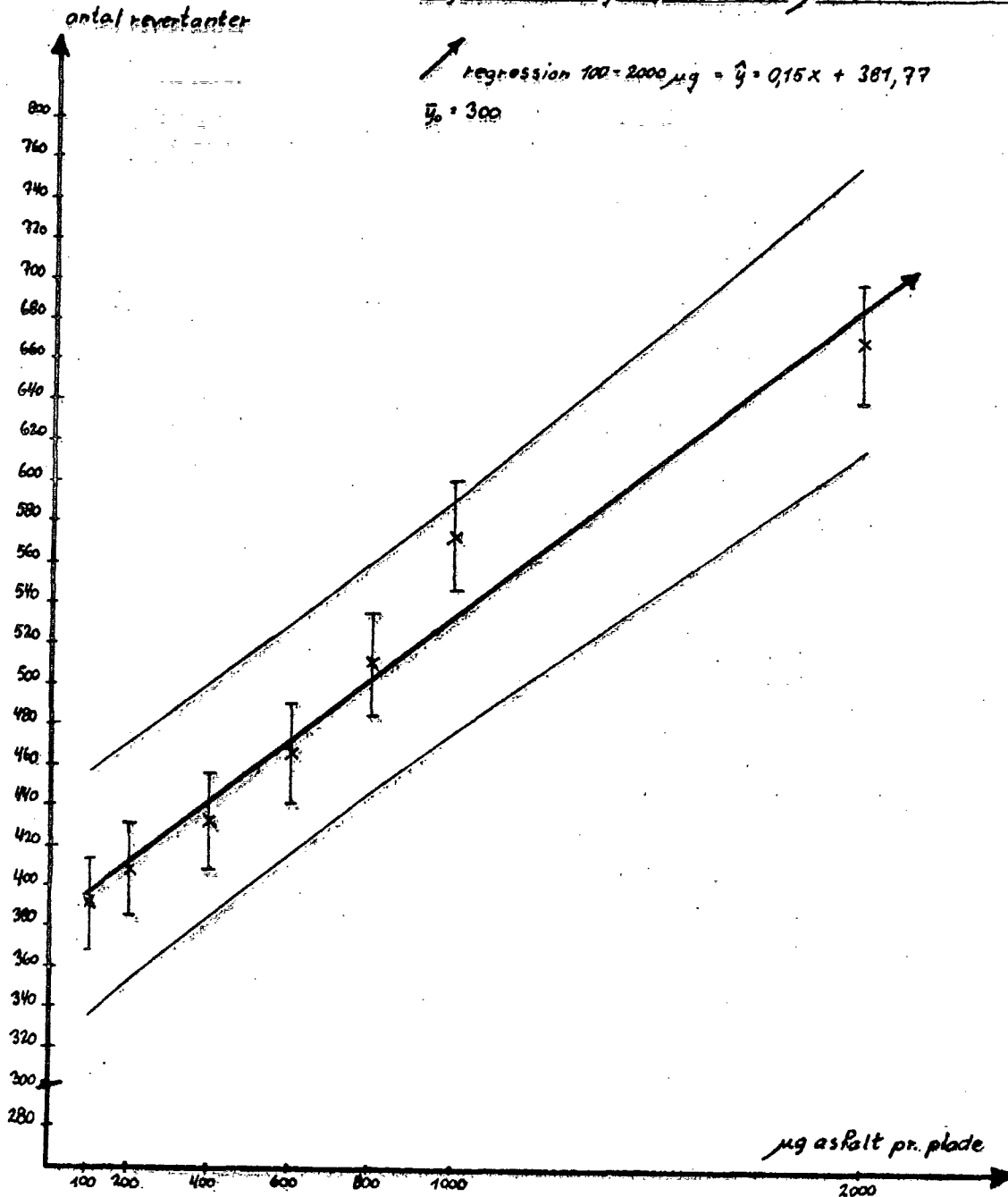
Som det fremgår har forfatterne testet en hypotese om linearitet, og fået denne accepteret på 95% niveau.

De følgende kurver i rapporten udviser dog ikke alle nogen udpræget linearitet, især hvis hele dosis intervallet tages i betragtning.

I den første fase af vort eksperiment, hvor dosis-respons kurver for enkeltstofferne skal fastlægges, er det vor hensigt at underkaste hypotesen om linearitet en kritisk vurdering, især hvis det viser sig muligt at inddrage de lavere doser i større omfang end på den viste kurve.

Som tidligere nævnt vil vi endvidere forsøge at få en meget nøjagtig bestemmelse af spontan reversions niveauet.

Figur til bilag 20, TA 100 + 150  $\mu$ l S-9 Anoclor 1254



Når man arbejder i lavdosis området, må man regne med relativt få inducerede revertanter, og for at få et skøn over det nødvendige <sup>antal</sup> plader til bestemmelse af en god middelværdi, således at en hypotese om signifikant forskel mellem to dosisværdier bliver mulig at teste, har vi lavet et par (grove) regneeksempler :

Ser vi på omstående kurve, er hver af de to mindste middelværdier,  $\bar{y}_1$  og  $\bar{y}_2$ , beregnet udfra tre værdier, og er ca. :  $\bar{y}_1 = 390$  og  $\bar{y}_2 = 410$ .

Vi vil teste en hypotese om hvorvidt  $\bar{y}_2$  er signifikant større end  $\bar{y}_1$  - til dette kan bruges et t-test (vi antager altså at de stokastiske variable er nf, og endvidere tillader vi os til dette brug at skønne variansen = middelværdien).

Teststørrelsen er da : 
$$\frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{\sqrt{s^2 (\frac{1}{n} + \frac{1}{m})}} \leq t_{95, (m+m-2)}$$

Indsættes  $\bar{y}_1 = 390$ ,  $\bar{y}_2 = 410$ ,  $s^2 = 400$ , og  $n = m$ , fås :

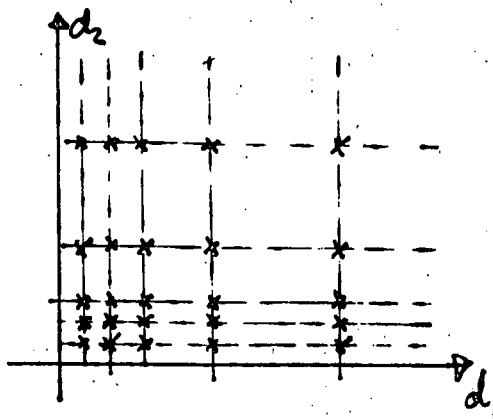
$m \leq 6$ , dvs. der skal bruges ca. 6 plader til hver dosis.

Vi har regnet det samme igennem for :

$y_1 = 395$ ,  $y_2 = 405$ , og får da  $m \leq 23$ .

Nu er det svært at sige noget præcist om hvilke tal vi får at arbejde med før der foreligger nogle indledende tal, men ovenstående skulle gerne vise, at det er muligt at arbejde i lavdosis området, hvis man tager hensyn til det i planlægningen.

I anden fase skal vi teste stofferne samtidigt i varierende doser, og kan f.eks. fremstille vore data for to stoffer som vist i nedenstående figur.



Antager vi at observationerne er normalfordelte, samt at de har samme varians, kan vi udføre en to-sidet variansanalyse og teste for additivitet :

$$f(d_1, d_2) = f(d_1) + f(d_2)$$

Denne test indeholder ikke noget krav om at de to dosis-respons kurver skal være lineære, og vi kan udvide testen til tresidet, osv., og teste en mængde hypoteser, bla.

kan vi bruge log d - værdier og teste hypoteser om produktvirkning.

Note a)

*Juf.* 09 11 78

*Juf.*  
14 11 78

DEBAT

Kræft og kemi

AT 85 PCT. AF al cancer skyldes kemisk påvirkning i miljøet er en ofte citeret og fejlagtig påstand. Tallet 85 pct. stammer bl. a. fra J. L. Higginson (1974), og blev citeret af E. Bier i Information den 3. november 1978.

Dette tal omfatter imidlertid det, der nu klades *lifestyle*, der omfatter spisevaner (mave-tarmkræft), drikkevaner (spiserørskræft og leverkræft), seksualvaner (brystkræft og livmoderhalskræft), opbevaring af føde (leverkræft og evt. mavekræft), industriel forurening (vinyl chlorid, radioaktivt støv i miner, sod, asbest (+ tobak)).

J. L. Higginson sagde på XII internationale cancerkongres (1978), at betydningen af alle disse faktorer nu skønnes til 30-50 pct. tilsammen. Heraf skønnes industriel carcinogenese i øjeblikket at udgøre 1/10, dvs. 3-5 pct.

Dette svarer til betragtninger jeg har fremsat i Ugeskrift for Læger 140, 1239 (1978).

Desuden har dr. Eyvind Thorling udgivet 2 omhygge-

ligt gennemarbejdede bøger hos Gyldendal i 1977 og 1978 om kræft og dens biologi. 1. bind hedder: *Kræft, Biologi og Forskning*. 2. bind som udkommer i disse dage, hedder: *Kræft, Patient og Samfund*.

Det er således ikke Landsforeningen til Kræftens Bekæmpelse eller dens videnskabelige personale, der er uvidende om kendsgerningerne, som de tegner sig i dag. Det er derimod journalisterne, der har tillagt sig den uvane at fortælle læserne om deres personlige meninger i stedet for at oplyse om facts plus forbehold, der vejer i den ene retning eller i den anden retning.

Jeg håber, at Information vil bringe læserne nogle af disse facts, der diskuteres intenst i fagpressen for øjeblikket. Ugeskrift for Læger har således bragt mindst 6 indlæg om sagen i år (bind 140, sider 705-708, 1178-1179, 1239, 1562-1563, 1713-1715, 2512-2516). På internationalt plan har *Nature* bragt både review-artikler og diskussionsindlæg om samme emne. Se f. eks. *Nature* 274, side 19-22 (1978), og der er et udmærket journalistisk stof i at belyse de forskellige synspunkter, der fremføres.

Kræft er for alvorlig en sag til blot at føre polemik om, som E. Bier gør det i Information den 3. november. Vi har alle haft pårørende der er døde af kræft, der som bekendt tegner sig for ca. 1/4 af alle dødsfald. Med den moderne biologi er vi begyndt at forstå kræftens mulige årsager og mekanismer, men vi er langt fra en præcis vi-

den. Man kunne ønske sig, at journalister, der skriver om kræft, forsøgte at bringe denne viden ud til bredere kredse og forstod at bruge disse facts ved diskussionen af den ene eller den anden påstand.

JES FORCHHAMMER  
Fibigerlaboratoriet  
Nordre Frihavnsgade 70  
2100 København Ø

Kræft og kemi

JEG FORSTAR godt Jes Forchhammers irritation 9. november over at journalister ikke er bedre orienterede omkring de sidste nye skøn over sammenhænge mellem kræft og kemi.

Men der var vel ikke mange journalister blandt deltagerne ved XII internationale cancerkongres, end ikke fra Information, vel? Jeg er glad for, at du reagerer og at du fortæller os det sidste nye, med referencer, så vi selv kan læse med.

Dit forsøg på afklapsning af E. Bier og hans kolleger i bred almindelighed er unødvendigt.

Det centrale problem for os alle er dog ikke, om skønnet over såkaldt »industriel forurening« og kræftfremkaldelse er igår, i dag, i morgen, 85 pct., 30-50 pct. eller 3 pct.

Det centrale udtrykkes ved spørgsmål som: Skal vi forsøge at forebygge kræfttilfælde eller vente til de er der og så forsøge at behandle? Skal vi medvirke til at tvinge samfundet over i forebyggende lovgivning og ageren? Skal tvivlen komme os eller kemikalierne til gode?

I den sammenhæng er det umådeligt vigtigt, at der findes journalister, som forsøger at formidle den indviklede natur- og lægevidenskab og eksperters skøn over sammenhænge. Osse selv om de er lidt umoderne. Du er her jo til at vejlede os om de nyeste skøn og overvejelser.

Bliv ved med det, eller skal du først provokeres, for at skrive til os, der ikke følger med i Ugeskrift for Læger?

KIRSTEN SØGAARD  
ANDERSEN  
Institut for biologi og Kemi  
Roskilde Universitetscenter  
Postbox 260  
4000 Roskilde

Note b)

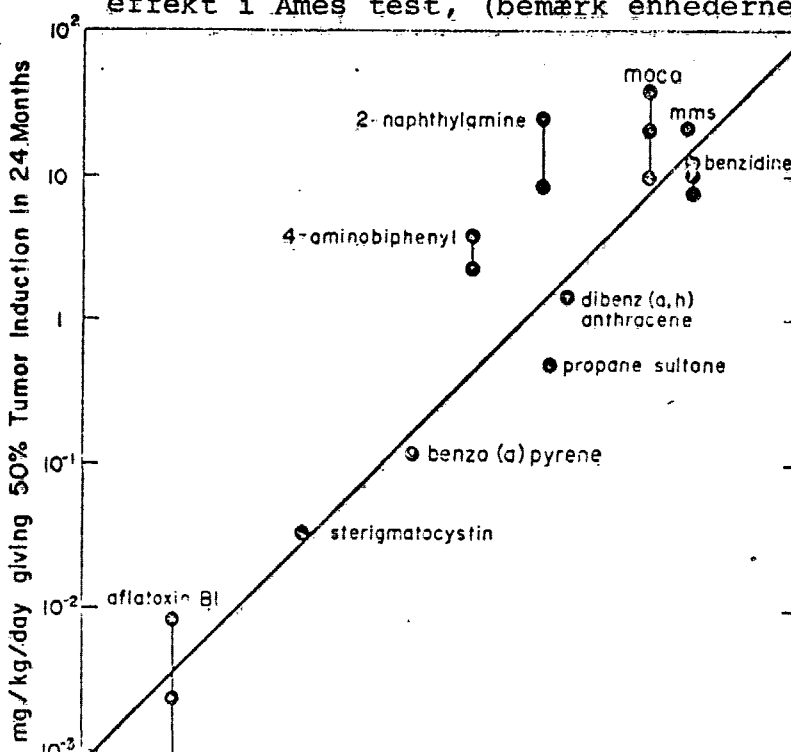
Som nævnt er Ames test indtil videre hovedsageligt blevet brugt til kvalitative test; dette skyldes at der er meget stor forskel hvad angår metabolisering af stoffer, mellem bakterier og mennesker.

Imidlertid er selve DNA'et, som anses for at være årsag til såvel mutagenese og carcinogenese, ens i alle organismer; selvom der i eucaryoter findes proteiner omkring DNA'et, cellekerne, og sandsynligvis også forskelle i repair mekanismerne udelukker det ikke at der kan etableres forsøgsbetingelser, hvorunder en kvantitativ sammenhæng kan findes.

De nævnte forskelle i metabolisme er det også til en vis grad lykkedes at kompensere for ved anvendelse af lever-enzymmer, som tilsættes under eksponeringen.

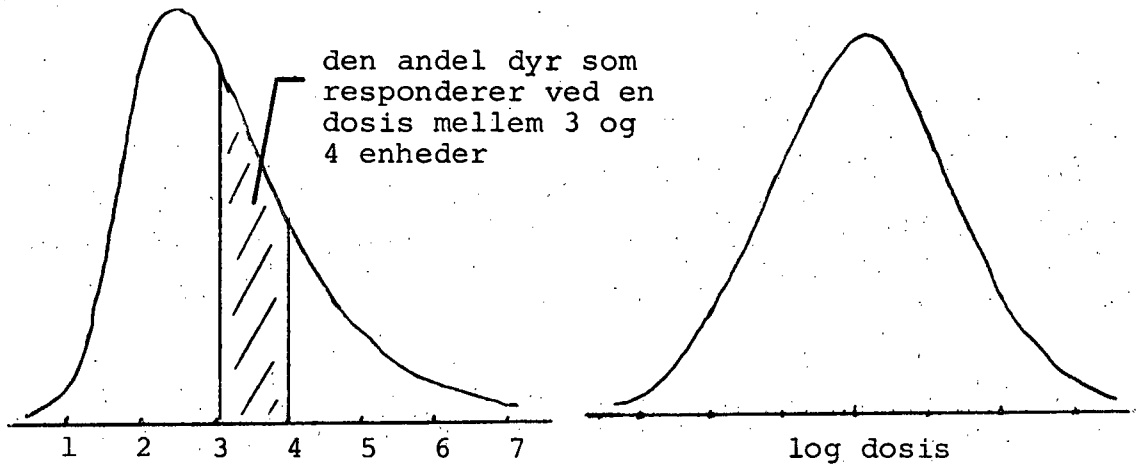
Et problem er her, at det er svært at standardisere mængden og kvaliteten af levermikrosomet, men dette skulle kunne lykkes ved indførelse af standardprocedurer; en af grundene til at dette endnu ikke er gjort er, at man indtil nu stort set kun har været interesseret i at finde kvalitative sammenhænge.

Nedenstående kurve er hentet fra (43), og den viser en nogenlunde rimelig sammenhæng mellem effekt på mus, og effekt i Ames test, (bemærk enhederne).

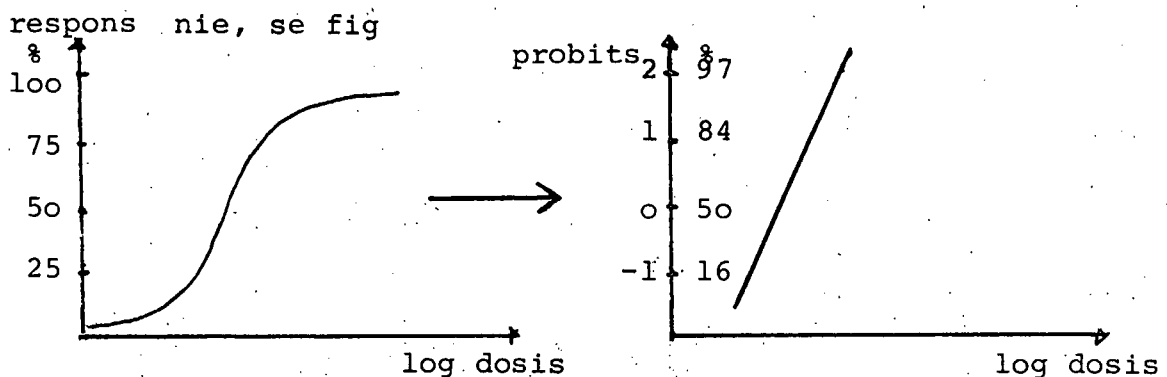


Note c)

Probit-metoden er en (udaf flere) metode til behandling af resultater fra dosis-respons forsøg. Metoden er groft set baseret på at der fremkommer en karakteristisk "klokkeformet" kurve når vi i et dosis-responsforsøg plotter koncentrationen af dosis på x-aksen og lader arealet mellem to x-værdier svare til det antal dyr, som responderer ved den tilsvarende dosisforøgelse; (i praksis afbildes dette ved søjlediagrammer, som så approximeres til en kurve), se fig.



Tager vi istedet logaritmen til dosis, bliver kurven "rettet ud" til en symetrisk form, som temmeligt godt ligner normalfordelingens frekvensfunktion, fig. Som vi ser er kurven i fig. skæv, hvilket som regel fortolkes som et resultat af visse individers særligt stærke modstandskraft som følge af biologiske særpræg. Indretter vi nu vort koordinatsystem sådan, at x-aksen skaleres i log dosis, og lader vi y-aksen skalere efter den inverse til normalfordelingens fordelingsfunktion, får vi rettet vor dosis-respons kurve ud til en ret linie, se fig



Eftersom en ret linie er nem at have med at gøre, og eftersom en række forskellige eksperimenter (inseks-forsøg, farmakologiske forsøg m.fl.) har vist sig at udvist stor lighed med den s-formede kurve for  $nf$  (eller den klokkeformede), har metoden vundet betydelig udbredelse i biologiske forsøg - man plotter da sine resultater ind på probitpapir, og får derved pæne rette linier at arbejde med.

Udover at den praktiske erfaring har vist metodens brugbarhed, begrundet i at en række biologiske størrelser er normalfordelt, kan der gives en vis teoretisk begrundelse, ( 5 ) :

Kalder vi dosis  $x$ , kan vi tænke os en tolerance i forhold til det givne stof, og vi kan udtrykke fordelingen af disse tolerancer  $dp = f(x)dx$  ; denne ligning udtrykker, at en vis (lille) del af populationen,  $dp$ , er individer med en tolerance mellem  $x$  og  $x + dx$ .

Antallet af individer som udviser respons til en given dosis  $x_0$ , er altså alle dem, hvis tolerance er mindre end  $x_0$  :

Er fordelingen af disse tolerancer en normalfordeling, hvilket som før nævnt er tilfældet ved en hel del biologiske forhold, stemmer den observerede kurve overens med normalfordelingen, og en transformation til probits vil gøre kurven lineær.

I artiklen "Why I prefer logits to probits" af J. Berkson ( 9 ) tages denne teoretiske begrundelse op til kritik :

I am interested in the slope of the dosage mortality line as a "rate," of the objectively observed increase of mortality with increase of dosage, not as a standard deviation of hypothetical tolerances of the animals. I should of course be very much interested in the last, if tolerance of the animals is what I was observing and studying. But we are not dealing with measured tolerances, we are dealing with a dosage mortality curve, and when my probitistic friends present a standard deviation of tolerances, they may be asserting a substantial quantity for the variability of something that in fact does not exist at all.

Berkson taler til fordel for anvendelse af logits, som



stammer fra den logistiske funktion :  $y = 1/1+e^{-x}$ ;  
denne ligner imidlertid nf så meget, at han da også må  
konkludere, at det i de fleste tilfælde ikke gør nogen  
praktisk forskel, men vi skal alligevel summarisk rede-  
gøre for hans synspunkter.

$y = 1/1+e^{-x}$  bliver ved transformationen  $u = \ln(y/1-y)$   
til en lineær funktion.

Et af hans argumenter er, at funktionen fremkommer af  
differentialligningen :  $y' = -by(1-y)$

Denne differentiaalligning kan indenfor kemien gives en  
generel fortolkning vedrørende omdannelsesrater i kemi-  
ske reaktioner, hvor et kemisk stof omdannes til et andet.  
Om man mener der er mest teoretisk begrundelse i probit-  
modellen eller logitmodellen, må afhænge af eksperimentet,  
men sikkert er det, at hvis kurven rent faktisk ikke er  
særlig lig den s-formede form duer metoden ikke, og en  
eventuel estimation af parametre for linien vil i så fald  
være fejlagtig.

(5) nævner, at overensstemmelsen bliver tvivlsom i ender-  
ne af kurven, selvom den ved et "overall"-skøn ser rime-  
lig ud, idet specielle forhold ved forsøgets udførelse  
og forsøgsmaterialet ofte vil spille ind her.

Note d)

Vi tænker os at vi i et forsøg med 100 mus ikke har konstateret nogen tumorer.

I stedet for den observerede rate, vil vi bruge den "sande" rate, dvs. den øvre grænse i et 99% sikkerhedsinterval.

Idet antal tumorer vil være binomialfordelt, med  $x = 0$ , og  $n = 100$ , får vi :

$$\begin{aligned}(1-p)^{100} &= 0,01 \\ 100 \log (1-p) &= -2 \\ \log (1-p) &= -0,02 = 9,98 - 10 \\ 1-p &= 0,955 \\ p &= 0,045\end{aligned}$$

Vi går nu (baglæns) ind i normalfordelingen, og finder  $P(X \leq x) = 0,045$  giver  $x = 1,695$

Eftersom probitværdi = 0 svarer til middelværdien i normalfordelingen (se note c), får vi altså en probitværdi på - 1,695.

Nogle bruger her at lægge 5 til alle beregnede probitværdier (for at arbejde med positive tal), se her eksemplet fra gennemgangen af Mantel-Bryan modellen.

I forsøg med flere end 0 observerede tumorer, benyttes samme metode, blot bliver beregningerne i binomialfordelingen mere indviklede, men så kan man jo bruge tabel.

Note e)

Vi har ikke noget sted i denne rapport direkte beskrevet Ames test, og vi vil derfor af hensyn til læsere uden det fornødne kendskab ganske kort resumere metoden.

De bakterier som anvendes er en særlig type Salmonella (fremelsket i laboratorier), hvor der er mutationer, der gør cellemembranen (og kappen) ret gennemtrængelig for de fleste stoffer; endvidere er der en mutation i det gen, som koder for dannelsen af histidin (en livsnødvendig aminosyre), og bakterierne kan derfor kun leve i substrat, hvor der i forvejen er histidin.

Udplader man nu bakterier på en plade med vækstmedium uden histidin (ca.  $10^8$  bakterier), vil en del af bakterierne (50 til 500) muttere netop i histidin-genet, og revertere til at kunne overleve uden histidin.

Efter et par dages forløb vil de have dannet kolonier, som kan tælles, og som hver er udtryk for een overlevende revertant.

Tilsætter man nu et stof, som øger mutationsfrekvensen, vil man kunne registrere flere mutanter, og på denne måde kan antal inducerede revertanter bestemmes som antal observerede minus antal spontane (uden tilsat mutagen).

Der findes en anden metode, hvor bakterierne holdes i flydende medium; metoden bygger på fluktuation-test-princippet, og vi vil ikke her komme nærmere ind på den, blot nævne at den er betydeligt mere følsom end den ovenfor beskrevne.

(9) har fundet, at mens stoffet MMC ikke har vist nogen mutagen effekt i almindelige pladetest, har den vist mutagen effekt i fluktuationstesten, i doser 100 gange lavere, og det skulle således ved at anvende denne være muligt at komme længere ned i dosis.

resultaterne (9) viser endvidere, at det vil føre til en kraftig underestimering, såfremt kurverne blot forlænges ned i lavdosis området.

LITTERATURLISTE.

- 1) Bender E.A.  
An introduction to mathematical modelling  
New York, 1978  
Berkson J. (se 23))
- 2) Cairns J.  
The cancer problem  
Scientific american, vol. 233, 64-78, 1975
- 3) Crump K.S. et al.  
"Safety" testing of carcinogenic processes and their  
implications for low dose risk assessment  
Cancer research, vol. 36, 2973-2979, 1976
- 4) Elkjær A. et al.  
Undersøgelse af asfaltrøgs mutagenicitet i Salmonella  
levermikrosom testen  
Projektrapport, RUC, 1978
- 5) Finney D.J.  
Probit analysis  
Cambridge, 1971
- 6) Green M.H.L.  
Mechanisms og bacterial mutagenesis and properties  
of mutagenesis tester strains  
Archives og toxicology, vol. 39, 241-248, 1978
- 7) Green M.H.L. et al.  
Use of a simplified fluctuation test to detect low  
levels of mutagens  
Mutation research, vol. 38, 33-42, 1976
- 8) Hartley H.O. & Sielken R.L.  
Estimation of "safe doses" in carcinogenic  
experiments  
Biometrics, vol. 33, 1-30, 1977
- 9) Hiatt H. et al.  
Origins of human cancer  
New York, 1977

- 10) Hoel D.G. et al.  
Estimation of risks of irreversible, delayed toxicity  
Journal of toxicology and environmental health,  
vol. 1, 133-151, 1975
- 11) Jenssen D. & Ramel C.  
Factors affecting the induction of micronuclei at  
low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine  
in mouse erythroblasts  
Mutation research, vol. 58, 51-65, 1978
- 12) Jensen O.M.  
International variation in cancer incidence  
providing pointers to aetiology  
Scanticon-symposiet, Århus
- 13) Kilbey et al.  
Handbook of mutagenicity test procedures  
Elsevier, 1977
- 14) Mantel N. & Bryan W.R.  
"Safety" testing of carcinogenic agents  
Journal of the national cancer institute, vol. 27,  
455-470, 1961
- 15) Mantel N. & Schneiderman M.A.  
Estimating "safe" levels, a hazardous undertaking  
Cancer research, vol. 35, 1379-1386, 1975
- 16) Maugh T.H.  
Chemical carcinogens: how dangerous are low doses?  
Science, vol. 202, 37-41, 1978
- 17) Old L.J.  
Cancer immunology  
Scientific american, ?
- 18) Olsen M. & Jensen J.  
Statistik i kræftforskningen  
Tekster fra IMFUFA, 16, RUC, 1979
- 19) Peto R. & Lee P.  
Weibull distributions for continuous-carcinogenesis  
experiments  
Biometrics, vol. 29, 457-470, 1973

- 20) Poulsen E.  
Vurdering af potentiel cancerogen effekt af til-  
sætningsstoffer og forurening i levnedsmidler  
Scanticon-symposiet, Århus
- 21) Spärck J.V.  
Cancer hos laverestående dyr, effekten af carcino-  
gener hos disse. Hvad kan vi lære heraf.  
Scanticon-symposiet, Århus
- 22) Whittemore A. & Keller J.B.  
Quantitative theories of carcinogenesis  
SIAM review, vol. 20, 1-30, 1978
- 23) Berkson J.  
Why I prefer logits to probits  
Biometrics, vol. 7, 327-339, 1951

- 16/79 "STATISTIK I KRÆFTFORSKNINGEN". Projektrapport af Michael Olsen og Jørn Jensen.  
Vejleder: Jørgen Larsen.
- 17/79 "AT SPØRGE OG AT SVARE i fysikundervisningen"  
Albert Christian Paulsen.
- 18/79 "MATHEMATICS AND THE REAL WORLD", Proceedings of an International Workshop, Roskilde  
university centre (Denmark), 1978. Preprint.  
Bernhelm Booss & Mogens Niss (eds.).
- 19/79 "GEOMETRI, SKOLE OG VIRKELIGHED".  
Projektrapport af Tom J. Andersen, Tommy R. Andersen og Per H.H. Larsen.  
Vejleder: Mogens Niss.