



田辺製薬株式会社

# 酵素阻害薬の阻害定数の 非線形最小二乗法による 推定法の性能評価

2007年7月26日 SASユーザー会学術総会2007

田辺製薬株式会社  
東京理科大学

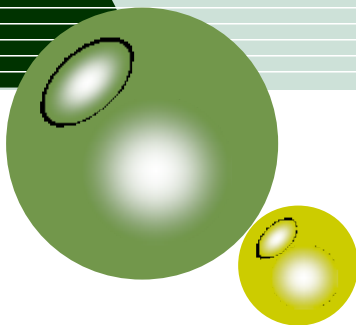
山崎亜紀子

久米英介

田中澄子

浜田知久馬

吉村功





# 発表構成

- 研究背景
- アンケート調査による現状把握
- 研究目的と方法
- SAS NLINプログラム解説
- シミュレーション方法
- シミュレーション結果
- 考察
- まとめ,今後の課題





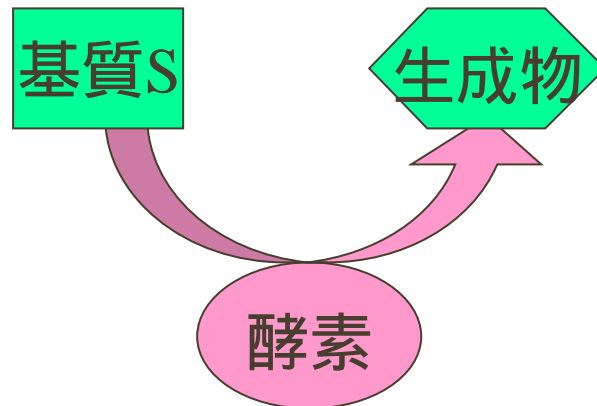
# 背景と動機

- 創薬研究の効率化に向け  
「薬理試験のデータ解析法の標準化」が必要とされる
- 社内における薬理試験データの統計解析手法について  
調査, 整理した
- 実験家が慣用的・伝統的に行ってきたデータ解析法で  
統計学的に適切とはいえないものがあった
- 「酵素阻害定数の推定法」の精度比較を行った



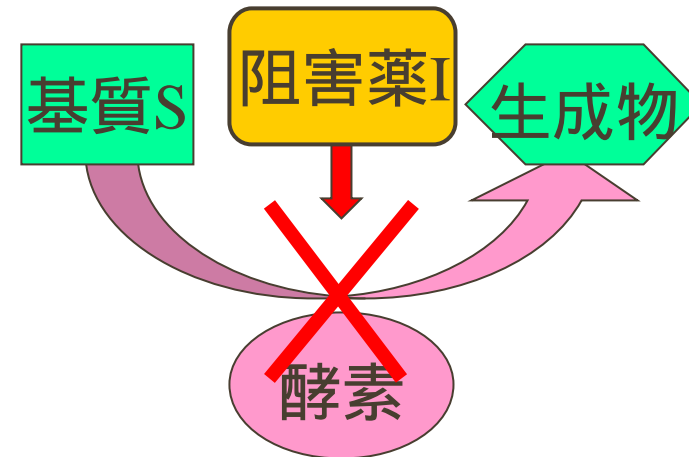
# 酵素阻害薬の重要性

## 酵素反応



酵素: 生体内反応を触媒

## 阻害薬の作用



生成物が病態に関係  
阻害薬が治療薬となる

## 酵素阻害薬の例

ACE阻害薬 (高血圧症治療薬タナトリル)

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) を特異的阻害  
基質 (アンジオテンシンI)      生成物 (アンジオテンシンII,  
昇圧作用) を抑制      降圧作用



# Michaelis-Menten 式

- 酵素反応の評価 反応速度の測定
- 反応速度は基質濃度に依存して増加  
関係式= Michaelis-Menten 式

- 反応速度パラメータ

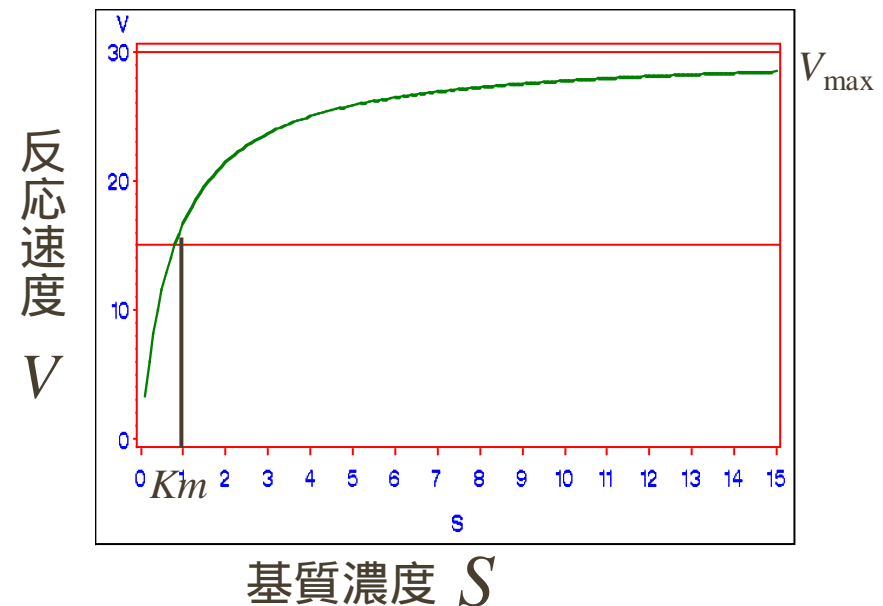
$V_{max}$  : 最高反応速度

$Km$  : Michaelis 定数

Michaelis-Menten 式

$$V = \frac{V_{max} \times S}{Km + S}$$

$V$  = 反応速度,  $S$  = 基質濃度



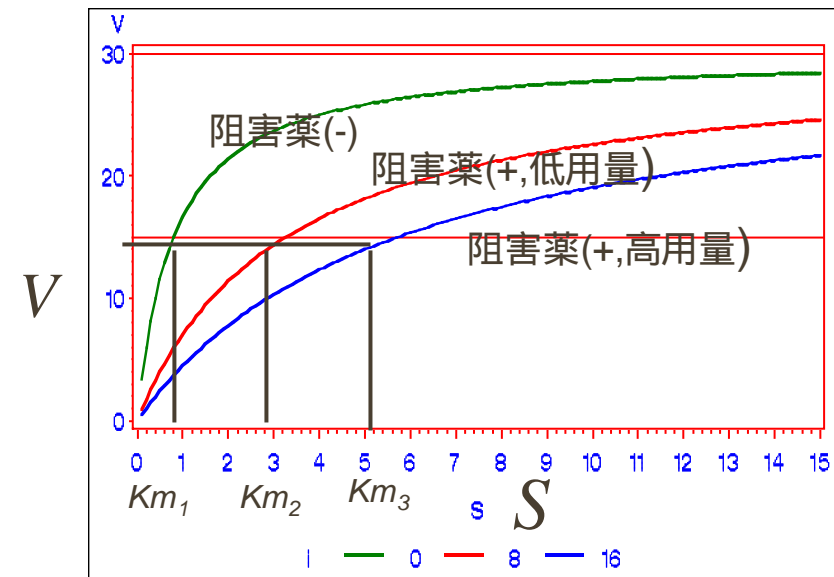
# 阻害定数とは

- 阻害薬 反応速度が減少
- 競合阻害: 基質を加えても反応速度が上昇しにくい

$I_i$  = 阻害薬濃度

$Km_i$  = 阻害薬存在下の  $Km$

$$Km_i = Km \left( 1 + \frac{I_i}{Ki} \right) \quad V_i = \frac{V_{max} \times S}{S + Km \left( 1 + \frac{I_i}{Ki} \right)}$$



- **阻害定数( $Ki$ )** 阻害薬の作用強度  
 $Km$  を2倍にするのに必要な阻害薬濃度
- $Ki$  小さい 阻害作用強 薬効評価指標として使用



# 非線形最小二乗法による推定法

推定すべきパラメータ:  $Ki, Km, V_{\max}$

Michaelis-Menten式を用いて  
残差二乗和 SSE を最小にするパラメータ推定

$$SSE = \sum_i \sum_j e_{ij}^2 = \sum_i \sum_j \left( V_{ij} - \frac{V_{\max} \times S_j}{S_j + Km \left( 1 + \frac{I_i}{Ki} \right)} \right)^2$$

二元配置型で、数段階に $I_i$ と $S_j$ を変えて $V_{ij}$ を測定

標準は最尤法・誤差が独立に正規分布に従えば、  
最尤法は非線形最小二乗法と等価

# 従来法(二段階推定法)における $K_i$ 推定



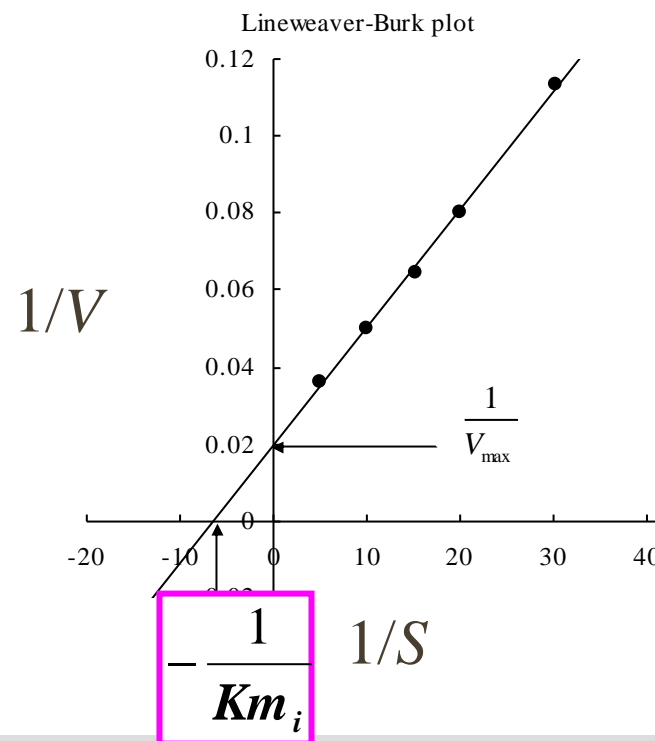
田辺製薬株式会社

## Lineweaver-Burk (両逆数) プロット

- 20世紀前半に考案 直線回帰法で各反応速度パラメータ算出
- 阻害薬濃度  $I_i$  を固定して  $Km_i$  算出
- 反応速度, 基質双方を逆数変換  
一次式となり, 直線回帰が可能

$$\boxed{\frac{1}{V}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{Km_i}{V_{\max}} \times \boxed{\frac{1}{S}}$$

y切片:  $1/V_{\max}$   
x切片:  $-1/Km_i$



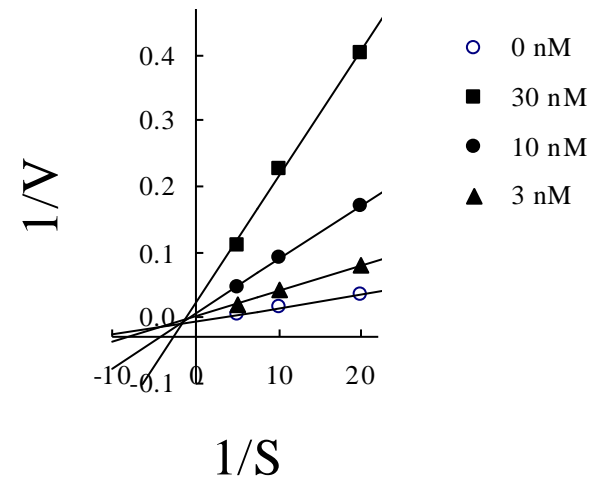




# 従来法(二段階推定法)における $K_i$ 推定

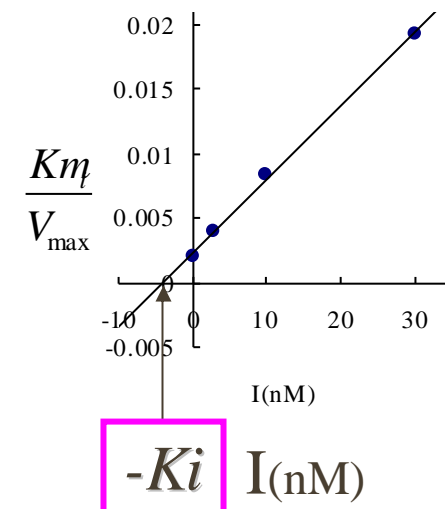
- 第一段階: 阻害薬濃度ごとに  
両逆数プロットを作成  
傾き (*slope*) 算出:

$$\text{slope} = \frac{Km_i}{V_{\max}}$$



- 第二段階:  
(阻害薬濃度  $I$  を  $x$  軸,  $\text{slope}$  を  $y$  軸)  
直線回帰の  $x$  切片 =  $-K_i$

$$\frac{Km_i}{V_{\max}} = \frac{Km}{V_{\max}} + \frac{Km}{V_{\max} \times K_i} \times I_i$$





# 従来法の統計学的な問題点

- 反応速度の誤差に等分散性が認められたとしても  
逆数変換によって等分散でなくなる
- 適切な信頼区間の構成が困難
- 基質濃度を3-5点しか取らず直線の推定が不安定
- 阻害薬の濃度ごとに $V_{\max}$ が異なる



# 国内企業アンケート調査 (2006年度)

- 対象：製薬企業の非臨床部門における標準的統計ソフト EXSAS (株式会社アームシステックス) ユーザー
- 質問：阻害定数 ( $K_i$ ) の推定方法

解析方法	回答数
従来法	7
非線形最小二乗法	0
両法とも行う	4
実験をしていない	2
計	13

- ほぼ全ての企業で未だに従来法を利用



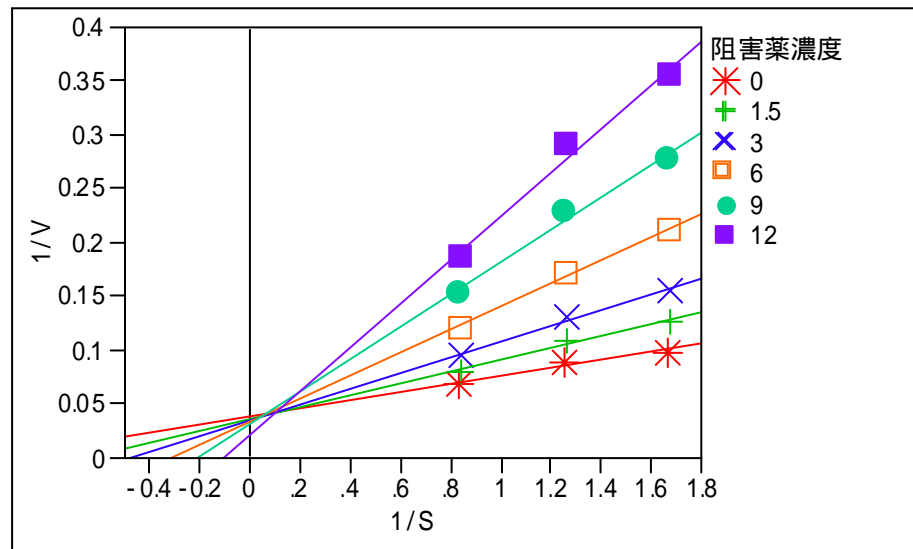
# 研究目的および方法

- 実際の実験に即して従来法と非線形最小二乗法とを  
シミュレーション実験で性能比較  
非線形最小二乗法の必要性を定量的に評価
- 非線形最小二乗法で $K_i$ を推定するプログラムの提供  
実験家にとって有用  
非線形最小二乗法による推定はSAS NLINプロシジャ  
を用いて実行可



# 対象となるデータ

## ■ 酵素阻害実験データの例



## データの両逆数プロット

基質濃度[S] 0.6 mM	
阻害薬濃度	反応速度
0	10.12
1.5	7.96
3	6.49
6	4.76
9	3.60
12	2.83
基質濃度[S] 0.8 mM	
阻害薬濃度	反応速度
0	11.22
1.5	9.27
3	7.71
6	5.81
9	4.36
12	3.46
基質濃度[S] 1.2 mM	
阻害薬濃度	反応速度
0	14.74
1.5	12.48
3	10.71
6	8.27
9	6.57
12	5.41

# 非線形最小二乗法プログラム



田辺製薬株式会社

## (SAS NLIN)

```
data data;  
do i=0,2,3.5,5,7;  
do s=0.6,0.8,1.2;  
input y @@; output; end;end;  
cards;  
8.958 10.525 13.056  
6.607 8.003 10.468  
5.276 6.539 8.955  
4.302 5.339 7.488  
3.208 4.044 6.114 ;  
  
proc nlin;  
parms vmax=30 ki=1.8 km=0.8;  
model y=vmax*s/(km*(1+i/ki)+s);  
output out=out p=p r=res; run;
```

反復計算法:  
Gauss-Newton

変数*i,s* :  
阻害薬, 基質の濃度

PARAM文:  
3パラメータ ( $K_i$ ,  $K_m$ ,  $V_{max}$ )  
初期値設定



# SAS NLIN 出力例

パラメータ	推定値	近似 標準誤差	95% 近似信頼限界	
km	1.1346	0.2081	0.6812	1.5880
ki	3.0972	0.2978	2.4484	3.7460
vmax	25.8910	2.6370	20.1455	31.6365

$K_m$  ,  $K_i$  ,  $V_{max}$  3パラメータの推定値が各々出力

阻害定数 ( $K_i$ ) の推定値は 3.0972

その95%信頼区間 は 2.4484 ~ 3.7460



# シミュレーション条件

- 真の基質-反応速度曲線 Michaelis-Menten 式

$$V_{ij} = \frac{V_{\max} \times S_j}{S_j + K_m \left( 1 + \frac{I_i}{K_i} \right)} + \varepsilon_{ij} \quad \varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$$

- 誤差を正規分布と仮定
- 実際の実験系に沿う．基質濃度 3-4水準，  
阻害薬濃度 4-6水準，繰り返し実験回数 3回  
シミュレーション回数 1000回

## シミュレーション条件(一部データ)

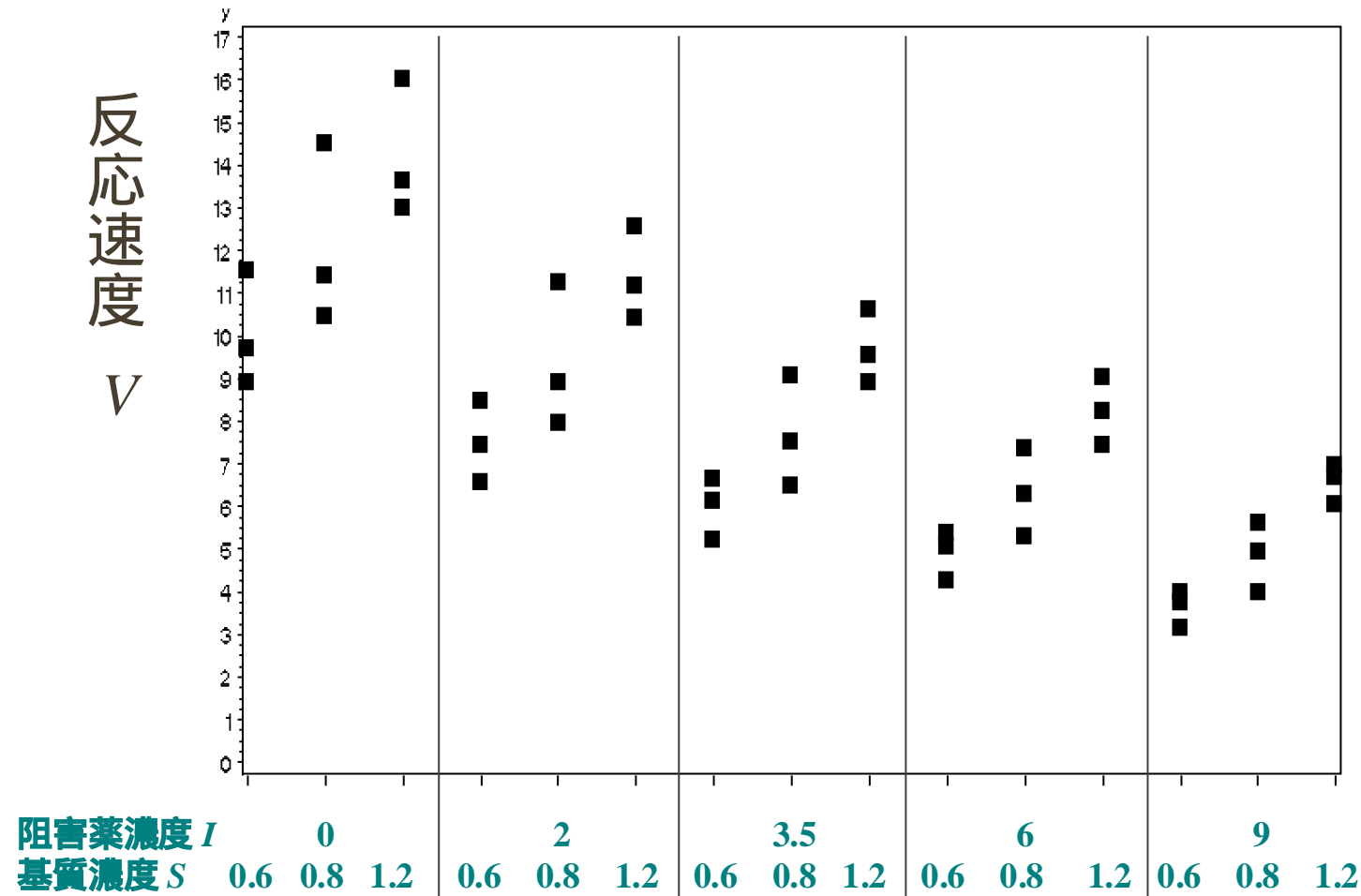
実験	A	C	D
$K_i$	3.3	4.6	2.5
$V_{\max}$	27.6	3.8	38.1
$K_m$	1	13.8	0.07
<sup>2</sup>	0.2	0.03	1.2





# 対数正規分布を仮定した検討

等分散性の視覚評価(実データ): V小 ばらつき小





# 対数正規分布を仮定した検討

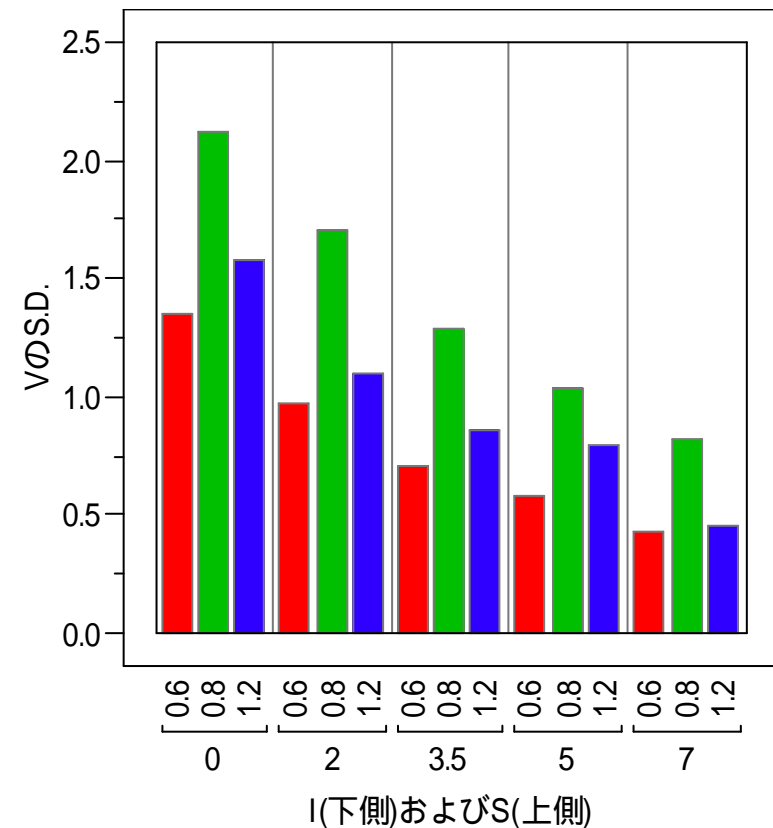
- 誤差は等分散と言えない？
- 対数正規分布：S.D.が平均値に比例して増加

シミュレーション追加

$$V_{ij} = \frac{V_{\max} \times S_j}{S_j + Km \left( 1 + \frac{I_i}{Ki} \right)} \times (1 + \varepsilon_{ij})$$

$$\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$$

実データのS.D.例



S 0.6 0.8 1.2



# シミュレーション結果(正規分布)

実験名	A	C	D
$K_i$ 真値	3.3	4.6	2.5
非線形最小二乗法による $K_i$ 推定値			
中央値	3.28	4.6	2.51
標準偏差	0.24	0.79	0.24
偏り	-0.024	-0.0038	0.0061
平均二乗誤差	0.057	0.62	0.058
従来法による $K_i$ 推定値			
中央値	3.61	5.01	3.92
標準偏差	18.7	6.06	81.2
偏り	0.31	0.41	1.42
平均二乗誤差	351	37.6	6590
比 (従来法 / 非線形最小二乗法)			
平均二乗誤差	<b>6158</b>	<b>60.6</b>	<b>113621</b>

$$\text{偏り}(\hat{K}_i) = \text{Median}\left(\hat{K}_{i_k} - K_i\right)$$

$$\text{平均二乗誤差}(\hat{K}_i) = \frac{\sum \left(\hat{K}_{i_k} - K_i\right)^2}{1000}$$



# シミュレーション結果 (対数正規分布)

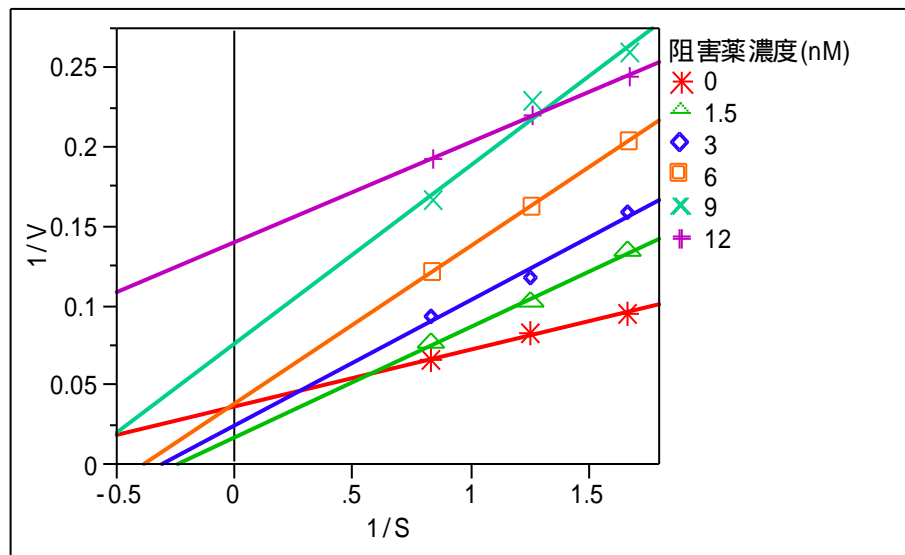
$K_i$ (真値)	3.3	4.6	2.5
非線形最小二乗法による $K_i$ 推定値			
中央値	3.29	4.55	2.51
標準偏差	0.15	0.84	0.18
偏り	-0.0073	-0.048	0.0061
平均二乗誤差	0.023	0.71	0.034
従来法による $K_i$ 推定値			
中央値	3.33	4.75	2.52
標準偏差	0.33	1.57	0.38
偏り	0.029	0.146	0.021
平均二乗誤差	0.112	2.55	0.149
比 (従来法 / 非線形最小二乗法)			
平均二乗誤差	4.87	3.59	4.38

変動係数CV:  
 実際の実験データの  
 平均値とばらつき  
 (S.D.) を参考

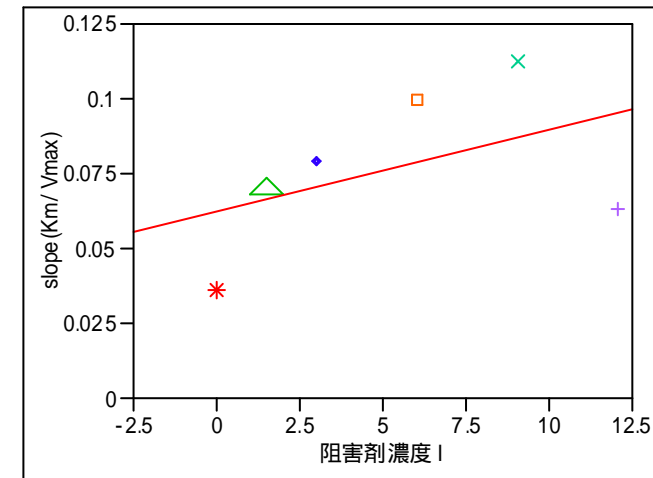


# 外れ値データの影響

## シミュレーション(正規分布)データ例 従来法での解析図



両逆数プロット



第二段階プロット

### 推定結果

	$K_i$
真値	3.30
従来法	22.6
非線形最小二乗法	3.53



# 対数正規分布 結果の考察

- 正規分布 (等分散性) より,  $V$  に比例的に誤差分散が増大する対数正規分布の方が現実の実験データを反映
- 従来法の平均二乗誤差は明らかに小さくなったが, 現場の実験結果に近づいた?
- 従来法の精度改善: S.D. が平均に比例する場合にも逆数変換することで等分散に近づく場合があるため
- 対数正規分布でも非線形最小二乗法の推定精度が優れる      本研究の重要な成果



# 従来法の性能が良くない理由

- 全データ情報を一括してパラメータを推定していない
- 阻害薬の濃度ごとに $V_{max}$ を算出するので、 $V_{max}$ が一定とならない
- 基質が3用量ほどしかないにもかかわらず、実験ごとに直線をあてはめるので推定が不安定
- 外挿によって切片からパラメータを推定



## まとめ

- 正規分布での検討:

従来法 / 非線形最小二乗法 (平均二乗誤差) = 数十倍以上

- 対数正規分布での検討:

従来法 / 非線形最小二乗法 (平均二乗誤差) = 約数倍

非線形最小二乗法は推定精度が優れて有用性が高い  
薬理試験の現場においても標準法とするのが望ましい

- SAS NLINプロシジャのプログラムを統計ソフトEXSASへ追加することを検討・協議中

簡便に現場で非線形最小二乗法を使用可能





# 今後の課題

- 本研究では競合阻害のみを前提  
非競合阻害,あるいは不競合阻害の場合には  
モデルを変更する必要あり  
その評価と対処法の検討
- 同様の,実験現場で悩んでいる,あるいは  
現在の科学水準では適切とは言えない問題の解決





# 参考文献

- 1) Michaelis L, Menten H. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochemische Zeitschrift 1913; 49: 333-69.
- 2) Motulsky H, Christopoulos A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. New York: Oxford University Press, Inc; 2004.
- 3) Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, et.al. *In vitro* and *in vivo* studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939-an oral, direct Factor Xa inhibitor. J Thromb Haemost 2005; 3: 514-21.
- 4) Hirai H, Shibata H, Kawai S, Nishida T. Role of 1-hydroxybenzotriazole in oxidation by laccase from *Trametes versicolor*. Kinetic analysis of the laccase-1-hydroxybenzotriazole couple. FEMS Microbiol Lett. 2006 Dec; 265(1): 56-9.
- 5) Dogan S, Turan P, Dogan M. Some kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymbra spicata* L. var.*spicata* . (in press) Biochemistry 2006; 41(12): 2379-85.
- 6) 浜田知久馬監修, 臨床評価研究会基礎解析分科会著. 実用SAS生物統計ハンドブック. サイエンティスト社; 2005.
- 7) Lineweaver H, Burk D. The Determination of enzyme dissociation constants. J Am Chem Soc 1934; 56: 658-66.
- 8) 大野素徳. 酵素実験法1. 廣川書店; 1993.