

第 12 回 続高橋セミナー  
層別因子を含む探索的な回帰分析入門  
2024 年 3 月 21 日

第 12 章 ミカエリス・メンテン式をめぐる新たな統計解析

ミカエリス・メンテン (*Michaelis-Menten*) 式は、酵素反応速度論における代表的な式であり、統計的にも非線形モデルの典型的な例としても広く知られている。また、ミカエリス・メンテン式の基質濃度  $[S]$  に対し対数を取ると 2 パラメータ・ロジスティック曲線になることも良く知られている。ミカエリス・メンテン式については、知名・岡田 (2014)、「原典からの酵素反応速度論」に歴史的背景も含め、線形化による各種のパラメータの推定法のみならず、非線形回帰によるパラメータの推定のための Excel も含む各種のソフトウェアも紹介されている。ミカエリス・メンテン式に対する数多くの線形化によるパラメータの推定方法は、実験結果を方眼紙にプロットし、回帰直線を目の子であてはめ Y 軸の切片、あるいは、X 軸の切片を方眼紙から読み取り、逆数などの変換で手軽に得られることの特徴が強調されている。したがって、得られたパラメータの標準誤差を求めることは無視されるのが通例である。そこで、Excel を用いて、各種の線形化によるパラメータの推定値に対し、標準誤差を求める方法を示し、非線形モデルにより推定されたパラメータの標準誤差と比較検討を行なう。さらに、酵素阻害実験データに対する線形化によるパラメータ推定の脆弱性を例示しつつ、非線形モデルによるパラメータ推定の頑健性について例示する。

第 12 章 目 次

12. ミカエリス・メンテン式をめぐる新たな統計解析-----	405
12.1. ミカエリス・メンテン式によるパラメータ推定 -----	405
線形化によるパラメータの推定精度, a) 非線形回帰によるミカエリス・メンテン式 のあてはめ, b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換, c) Hanes-Woolf 変換, d) Scatchard・Eadie-Hofstee 変換, 非線形回帰に対する線形化のパラメータの 推定精度の比較, 文献の推定値との差異	
次ページに続く	

12.2. 統計ソフト SAS によるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定-----	421
非線形回帰のパラメータ推定値の SAS による検証, パラメータの相関行列と 共分散行列の相互関係, ミカエリス・メンテン曲線の 95%信頼区間, 非線形 回帰による <i>Hanes-Woolf</i> 変換によるパラメータの直接, 誤差の伝播の公式を 用いた傾き $\beta_1^{\wedge}$ の逆数の標準誤差	
12.3. ミカエリス・メンテン式に基づく阻害定数 $K_i$ の推定-----	428
阻害定数 $K_i$ の推定方法による不一致, 酵素阻害実験データ, 阻害定数 $K_i$ の推定方法, 両逆数・ <i>Lineweaver-Burk</i> 変換によるミカエリス定数 $(K_m)_i$ の推定, 阻害定数 $K_i$ の揺らぎの実際, 傾き $(K_m)_i / (V_{max})_i$ を用いた 阻害定数 $K_i$ の推定	
12.4. 最大反応 $V_{max}$ を共通とした場合の阻害定数 $K_i$ の推定-----	439
(1, 1) 標示型ダミー変数の設定, Excel のソルバーを用いた非線形回帰, 阻害定数 $K_i$ の推定方法による揺らぎ	
12.5. 非線形回帰による阻害定数 $K_i$ の直接推定-----	443
阻害定数 $K_i$ を直接推定するための式の導出, NLIN プロシジャによる 阻害定数 $K_i$ の直接推定, 両逆数・ <i>Lineweaver-Burk</i> 変換による阻害定数 $K_i$ の 推定結果との比較, Excel の行列関数を用いた阻害定数 $K_i$ の直接推定, Excel のソルバーを用いた阻害定数 $K_i$ の直接推定	
12.6. 阻害様式の確認のための手順-----	443
Excel ソルバーを用いた個別パラメータの一括推定, NLIN プロシジャによるパラ メータの一括推定, 阻害様式の判別, 線形変換で悩むのは終わりにしませんか	
文献索引, 索引, 解析ファイル一覧-----	(455)

## 第 12 回 続・高橋セミナー 層別因子を含む探索的な回帰分析入門 目次 (全章)

はじめに-----	1
1. 層別因子を含む各種の回帰分析の実際-----	7
2. デザイン行列を活用した 1 因子実験データの解析-----	55
3. 繰り返しが不揃いの 2 因子実験データの解析-----	89
4. 欠測値がある直交表の線形モデルによる解析-----	121
5. デザイン行列を用いた回帰分析の基礎-----	155
6. 伝統的な共分散分析からの脱却-----	195
7. 共変量を含む 3 因子実験データの探索的解析-----	219
8. 交絡変数と共変量を含む 2 群比較-----	243
9. 前後差の前値は常に共変量-----	281
10. 層別因子を含むロジスティック曲線のあてはめ-----	327
11. 各種のシグモイド曲線を用いた逆推定-----	367
12. ミカエリス・メンテン式をめぐる新たな統計解析-----	405
13. ロジスティック曲線のさらなる活用-----	455
参考文献, 文献索引, 索引, 解析用ファイル一覧-----	489

## 12. ミカエリス・メンテン式をめぐる新たな統計解析

ミカエリス・メンテン (*Michaelis-Menten*) 式は、酵素反応速度論における代表的な式であり、統計的にも非線形モデルの典型的な例としても広く知られている。また、ミカエリス・メンテン式の基質濃度  $[S]$  に対し対数を取ると 2 パラメータ・ロジスティック曲線になることも良く知られている。ミカエリス・メンテン式については、知名・岡田 (2014)、「原典からの酵素反応速度論」に歴史的背景も含め、線形化による各種のパラメータの推定法のみならず、非線形回帰によるパラメータの推定のための Excel も含む各種のソフトウェアも紹介されている。ミカエリス・メンテン式に対する数多くの線形化によるパラメータの推定方法は、実験結果を方眼紙にプロットし、回帰直線を目の子であてはめ Y 軸の切片、あるいは、X 軸の切片を方眼紙から読み取り、逆数などの変換で手軽に得られることの特徴が強調されている。したがって、得られたパラメータの標準誤差を求めることは無視されるのが通例である。そこで、Excel を用いて、各種の線形化によるパラメータの推定値に対し、標準誤差を求める方法を示し、非線形モデルにより推定されたパラメータの標準誤差と比較検討を行なう。さらに、酵素阻害実験データに対する線形化によるパラメータ推定の脆弱性を例示しつつ、非線形モデルによるパラメータ推定の頑健性について例示する。

### 12.1. ミカエリス・メンテン式によるパラメータ推定

#### 線形化によるパラメータの推定精度

医学研究に関する統計の名著, Armitage ら (2002) , 「Statistical Methods in Medical Research, 4<sup>th</sup> edition.」 20.5 節の「*Michaelis-Menten assay*」に各種の線形化によるパラメータ推定値の比較検討に加えて、非線形回帰による推定結果も示されている。また、12.4 節の「Non-linear regression」にもミカエリス・メンテン式の線形化による推定法と非線形回帰によるパラメータの推定値について比較検討が詳細に示されている。

原著には、ミカエリス・メンテン式に対し、非線形回帰によって得られたミカエリス定数  $K_m$  と最大反応  $V_{max}$  の推定結果が示されている。さらに、ミカエリス・メンテン式に対する各種の線形化によって推定されたパラメータ  $K_m$  と  $V_{max}$  を比較し、線形化によるパラメータの推定精度が良くないことが示されている。ミカエリス・メンテン式は、式 (12.1) に示すよ

うに分子に基質濃度  $[S]$  と最大反応  $V_{max}$  との積，分母に基質濃度  $[S]$  に最大反応  $V_{max}$  の 2 分の 1 となる基質濃度であるミカエリス定数  $K_m$  との和で構成されている．基質濃度  $[S]$  に対する反応速度  $V$  データが得られたときに，最大反応  $V_{max}$  とミカエリス定数  $K_m$  を推定したい

a) 非線形・ミカエリス・メンテン式

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}, \quad y = \frac{\theta_{max} x}{x + \mu} \quad (12.1)$$

b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}, \quad \frac{1}{y} = \frac{1}{\theta_{max}} + \frac{\mu}{\theta_{max}} \frac{1}{x} \quad (12.2)$$

c) Hanes-Woolf 変換

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} [S], \quad \frac{x}{y} = \frac{\mu}{\theta_{max}} + \frac{1}{\theta_{max}} x \quad (12.3)$$

d) Scatchard・Eadie-Hofstee 変換

$$V = V_{max} - K_m \frac{V}{[S]}, \quad y = \theta_{max} - \mu \frac{y}{x} \quad (12.4)$$

b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換は，式 (12.1) の両辺に逆数を取り，式を整理して反応速度の逆数 ( $1/V$ ) に対する基質濃度の逆数 ( $1/[S]$ ) に関する線形式となっている．切片  $\beta_0$  が推定したい最大反応の逆数 ( $1/V_{max}$ )，傾き  $\beta_1$  がミカエリス定数  $K_m$  と  $V_{max}$  の比 ( $K_m/V_{max}$ ) となり，ミカエリス定数  $K_m$  は， $K_m = \beta_1 / \beta_0$  で推定することができる．

c) Hanes-Woolf 変換は，式 (12.2) の両逆数・Lineweaver-Burk 変換の両辺に基質濃度  $[S]$  を掛けて整理したものである．基質濃度  $[S]$  を反応速度  $V$  で除した ( $[S]/V$ ) に対し，基質濃度  $[S]$  による回帰式であり，切片が ( $K_m/V_{max}$ )，傾きが ( $1/V_{max}$ ) となっている．

d) Scatchard・Eadie-Hofstee 変換は，さらに技巧的な線形化であり，式 (12.2) の両逆数変換の両辺に  $V \cdot V_{max}$  を掛け

$$\left. \begin{aligned} \frac{\cancel{K} \cdot V_{max}}{\cancel{K}} &= \frac{V \cdot \cancel{V_{max}}}{\cancel{V_{max}}} + \frac{K_m}{\cancel{V_{max}}} \frac{V \cdot \cancel{V_{max}}}{[S]} & \frac{\cancel{x} \cdot \theta_{max}}{\cancel{x}} &= \frac{y \cdot \cancel{\theta_{max}}}{\cancel{\theta_{max}}} + \frac{\mu}{\cancel{\theta_{max}}} \frac{y \cdot \cancel{\theta_{max}}}{x} \\ V_{max} &= V + K_m \frac{V}{[S]} & \theta_{max} &= y + \mu \frac{y}{x} \\ V &= V_{max} - K_m \frac{V}{[S]} & y &= \theta_{max} - \mu \frac{y}{x} \end{aligned} \right\} \quad (12.5)$$

反応速度  $V$  について整理した式となっていて，切片の推定値が  $V_{max}$ ，傾きの推定値が  $-K_m$  となり，回帰のパラメータとして直接得られることに特徴がある．

これらの線形化によって、非線形回帰ではなく身近な回帰分析を用いて最大反応  $V_{max}$  とミカエリス定数  $K_m$  が推定できることは、画期的なことである。数学的には、どのように変換してもパラメータの推定に関して全く問題はないのであるが、実験データには、何らかの誤差がつきまとう。そのために、非線形のみカエリス・メンテン式の反応（反応速度  $V$ ）に対し、誤差が正規分布に従うと仮定した場合に、逆数変換 ( $1/V$ )、または、 $([S]/V)$  を反応とする回帰分析においては誤差が不均一となり、結果として  $V_{max}$  と  $K_m$  の推定値が不安定となる。*Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換は、通常回帰分析が前提としている「変数  $x$  には、誤差が含まれない」を無視し、誤差が含まれる  $y$  を変数  $x$  を含め  $x' = (y/x)$  による回帰分析をするため、推定精度の著しい劣化が懸念される。

Armitage ら(2002) には、a) から d) に基づく解析結果のサマリーに加えて散布図に回帰直線を重ね書きした結果が示されている。ただし、元のデータが示されていない。そのために、拡大コピーした複数枚の散布図の点の位置を計測し、元々の変数である  $V$  と  $[S]$  に換算し、幾つかのデータの平均を用いることにした。表 12.1 に復元したデータ、図 12.1 に散布図を示す。

表 12.1 Armitage ら(2002) の散布図から復元したデータ

	基質濃度	反応速度
	$[S]$	$V$
	$x$	$y$
1	2	65
2	5	362
3	10	581
4	20	686
5	80	985

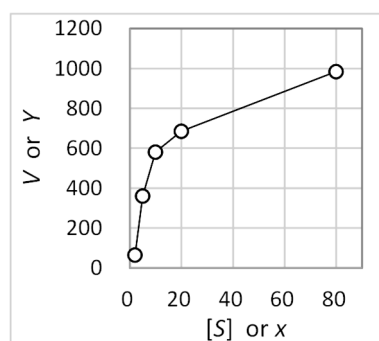


図 12.1 基質濃度  $[S]$  に対する反応速度  $V$  との関係

#### a) 非線形回帰によるミカエリス・メンテン式のあてはめ

式 (12.1) に示したミカエリス・メンテン式で、反応の  $V$  は、*Velocity* 反応速度であり、 $[S]$  は、*Substrate concentration* 基質濃度である。パラメータとしての  $V_{max}$  は、反応速度  $V$  の最大値、 $K_m$  は  $V_{max}$  の2分の1となる基質濃度  $[S]$  であり、ミカエリス定数として知られている。統計的には、 $V = y$ ,  $[S] = x$ ,  $V_{max} = \theta_{max}$ ,  $K_m = \mu$  すると理解しやすい。

非線形モデルであるミカエリス・メンテン式を表 12.1 に示したデータにあてはめ、 $V_{max}$  および  $K_m$  を推定し、それらの標準誤差の導出するためには、ミカエリス・メンテン式のパラメータに関する偏微分式が必要となる。式 (12.1) に示したミカエリス・メンテン式をパラメータ  $V_{max}$  および  $K_m$  で偏微分した式は、

$$z_1 = \frac{\partial V}{\partial V_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m}, \quad z_1 = \frac{\partial y}{\partial \theta_{\max}} = \frac{x}{x + \mu} \quad (12.6)$$

$$z_2 = \frac{\partial V}{\partial K_m} = \frac{-V_{\max}[S]}{([S] + K_m)^2}, \quad z_2 = \frac{\partial y}{\partial \mu} = \frac{-\theta_{\max}x}{(x + \theta_{\max})^2} \quad (12.7)$$

として得られる.

表 12.2 に示すように, Excel のソルバーにより推定された  $\hat{V}_{\max}$  および  $\hat{K}_m$  を使い,  $\hat{V}$  ( $V$  ハット) の推定値が示されている. さらに, 残差を  $\varepsilon = V - \hat{V}$  とし, 残差  $\varepsilon$  に対する残差平方和  $S_e = 14904.51$ , 残差平方和  $S_e$  を自由度  $df = [(データ数 n) - (推定に用いたパラメータ数 m)]$  で除した誤差分散の推定値が,  $\hat{\sigma}^2 = 14904.51 / (5 - 2) = 4968.2$  として計算されている. これらは, パラメータの初期値を ( $\hat{V}_{\max} = 1000$ ,  $\hat{K}_m = 10$ ) とし, 残差平方和  $S_e$  が最小になるように, Excel のソルバーで, 2つのパラメータ ( $\hat{V}_{\max}$ ,  $\hat{K}_m$ ) を変化させて得られた結果である. 推定されたパラメータ ( $\hat{V}_{\max} = 1130.00$ ,  $\hat{K}_m = 11.64$ ) の標準誤差  $SE$  を計算するためには, ミカエリス・メンテン式をパラメータで偏微分した式 (12.6), および, 式 (12.7) による微係数 ( $z_1$ ,  $z_2$ ) についての (5 行×2 列) の微係数行列  $\mathbf{Z}$  が必要となる.

表 12.2 ミカエリス・メンテン式を非線形モデルとした解析結果

	初期値		$\theta^{\wedge}$	パラメータの共分散行列	分散
	1000	$\theta^{\wedge}_{\max} = V^{\wedge}_{\max} =$	1130.00	10885.37	262.53
	10	$\mu = K^{\wedge}_m =$	11.64	$\sigma^{\wedge 2} = S_e / 3$	9.1359
		$S_e =$	14904.51	4968.2	$\Sigma(\theta^{\wedge}) = (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \sigma^{\wedge 2}$
	[S]	V	$V^{\wedge}$	$\varepsilon^{\wedge} = V - V^{\wedge}$	$\partial V^{\wedge}_{\max}$
No	x	y	$y^{\wedge}$	$\varepsilon^{\wedge} = y - y^{\wedge}$	$\partial K^{\wedge}_m$
1	2	65	165.69	-100.69	0.1466
2	5	362	339.54	22.46	0.3005
3	10	581	522.18	58.82	0.4621
4	20	686	714.29	-28.29	0.6321
5	80	985	986.47	-1.47	0.8730
	$V^{\wedge} = V^{\wedge}_{\max} [S] / ([S] + K^{\wedge}_m)$		$z_1 = [S] / ([S] + K^{\wedge}_m)$	$z_2 = -V^{\wedge}_{\max} [S] / ([S] + K^{\wedge}_m)^2$	

得られた (5 行×2 列) の微係数行列  $\mathbf{Z}$  に対し Excel の行列関数, Mmult (), Transpose (), Minverse () 関数を用いて (2×2) のパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  が

$$\left. \begin{aligned} \Sigma(\hat{\theta}) &= (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \hat{\sigma}^2 \\ &= \text{Minverse}(\text{Mmult}(\text{Transpose}(\mathbf{Zの範囲}), \mathbf{Zの範囲})) * 4968.2 \\ &= \begin{bmatrix} 10885.37 & 262.53 \\ 262.53 & 9.1359 \end{bmatrix} \end{aligned} \right\} \quad (12.8)$$

として求められている. このパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  の対角要素が, ( $\hat{V}_{\max}$ ,  $\hat{K}_m$ ) の分散であり,  $Var(\hat{V}_{\max}) = 10885.37$ ,  $Var(\hat{K}_m) = 9.1359$  が得られている.

表 12.2 で得られた推定値と分散を用いて、パラメータの 95%信頼区間を求めた結果を表 12.3 示す。最大反応  $\hat{V}_{max}=1130.00$  の分散は、パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  の対角要素から  $Var(\hat{V}_{max})=10885.37$ ，標準誤差は、分散の平方根で  $SE(\hat{V}_{max})=104.33$ ，95%信頼区間が (797.97, 1462.04) と推定されている。同様に、ミカエリス定数は、 $\hat{K}_m=11.64$  で、95%信頼区間は、自由度 (5-2) の  $t$  分布の両側 5 パーセント点  $T.inv.2T(0.05, 5-2)=3.1824$  を用いて (2.02, 21.26) と推定されている。

表 12.3 非線形回帰によるパラメータの 95%信頼区間

	推定値	分散	SE	L95%	U95%
$\theta_{max}^{\wedge}=V_{max}^{\wedge}=$	1130.00	10885.37	104.33	797.97	1462.04
$\mu^{\wedge}=K_m^{\wedge}=$	11.64	9.1359	3.02	2.02	21.26
		$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824		

推定されたパラメータを用いて、ミカエリス・メンテン曲線の推定値および 95%信頼区間を計算する。表 12.4 に示すように滑らかな曲線が描けるように基質濃度  $[S]$  を設定し、反応速度の推定値を  $\hat{V}$  を推定し、パラメータに関する微係数ベクトル  $\mathbf{z}=[z_1 \ z_2]$  を求める。推定値  $\hat{V}$  の分散  $Var(\hat{V})$  は、パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  に関する微係数ベクトル  $\mathbf{z}$  の 2 次形式  $Var(\hat{V})=\mathbf{z}\Sigma(\hat{\theta})\mathbf{z}^T$  によって求められている。さらに分散  $Var(\hat{V})$  の平方根を取った標準誤差  $SE(\hat{V})$  から 95%信頼区間が推定されている。最後の行に  $[S]=100000$  を設定し、表 12.3 に示した  $\hat{V}_{max}$  の推定値と 95%信頼区間 (797.97, 1462.04) に漸近することを確かめている。

表 12.4 ミカエリス・メンテン曲線の 95%信頼区間

	$\theta^{\wedge}$	$\Sigma(\theta^{\wedge})=(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \sigma^{\wedge 2}$					
$V_{max}^{\wedge}=$	1130.00	10885.37	262.53				
$K_m^{\wedge}=$	11.64	262.53	9.14				
$x$	$y^{\wedge}$	$\partial_{V_{max}}^{\wedge}$	$\partial_{K_m}^{\wedge}$	分散	標準誤差	95%信頼区間	
$[S]$	$V^{\wedge}$	$z_1$	$z_2$	$Var(V^{\wedge})$	$SE(V^{\wedge})$	L95%	U95%
0.1	9.6	0.0085	-0.820	3.3	1.8	3.9	15.4
1.0	89.4	0.0791	-7.073	231.3	15.2	41.0	137.8
5.0	339.5	0.3005	-20.405	1567.4	39.6	213.5	465.5
10.0	522.2	0.4621	-24.130	1789.2	42.3	387.6	656.8
20.0	714.3	0.6321	-22.575	1512.7	38.9	590.5	838.1
50.0	916.6	0.8112	-14.870	2849.1	53.4	746.7	1086.5
100.0	1012.2	0.8957	-9.066	5220.6	72.3	782.2	1242.1
300.0	1087.8	0.9626	-3.491	8434.4	91.8	795.5	1380.1
100000	1129.9	0.9999	-0.011	10876.9	104.3	798.0	1461.8
		$Var(V^{\wedge})=\mathbf{z}\Sigma(\theta^{\wedge})\mathbf{z}^T$		$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824		

ミカエリス・メンテン式で推定された反応速度  $\hat{V}$  を計算し、散布図に重ね書きすること自体は容易なのであるが、推定値  $\hat{V}$  の 95%信頼区間も含めて図示するためには、表 12.4 に示したように推定値  $\hat{V}$  の分散  $Var(\hat{V})=\mathbf{z}\Sigma(\hat{\theta})\mathbf{z}^T$  を計算する必要がある。表 12.2 上段にさげなく (2×2) のパラメータの共変量  $\Sigma(\hat{\theta})$  の計算結果を示したのであるが、これを求めるた

めに (5行×2列) の微係数行列  $\mathbf{Z}$  を用いた行列計算  $\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) = (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \hat{\sigma}^2$  を必要としている。行列計算の式に対し自ら計算するすべがない時代では、拒絶反応が起きることは当然であり、一般的な統計関連の成書では徹底的に避けられてきた。その結果として、回帰直線の場合を除いて、各種の推定曲線に対する 95%信頼区間の計算方法が示されることが皆無となっているのが現状である。

現代の算盤である Excel の計算シート上では、統計解析で必要となる  $t$  分布などの各種の分布関数の計算も手軽にでき、さらに、行列計算のための関数も用意されているので、Excel の計算シートを用いた統計解析を前提にすることにより、伝統的な統計解析の軛（くびき）を乗り越えることが可能となった。さて、推定値  $\hat{V}$  の分散  $\text{Var}(\hat{V}) = \mathbf{z} \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) \mathbf{z}^T$  の計算手順について段階を追って示す。

表 12.4 に示した  $[S]=10.0$  の場合の反応速度の推定値  $\hat{V}$  は、

$$\hat{V}_{[S]=10} = \frac{\hat{V}_{\max} [S]}{[S] + \hat{K}_m} = \frac{1130.00 \times 10.0}{10.0 + 11.64} = 522.2 \quad (12.9)$$

として計算されている。 $\hat{V}$  を  $\hat{V}_{\max}$  および  $\hat{K}_m$  で偏微分した式は、

$$z_1 = \frac{\partial \hat{V}}{\partial \hat{V}_{\max}} = \frac{[S]}{[S] + \hat{K}_m} = \frac{10.0}{10.0 + 11.64} = 0.4621 \quad (12.10)$$

$$z_2 = \frac{\partial \hat{V}}{\partial \hat{K}_m} = \frac{-\hat{V}_{\max} [S]}{([S] + \hat{K}_m)^2} = \frac{-1130.00 \times 10.0}{(10.0 + 11.64)^2} = -24.130 \quad (12.11)$$

であり、 $z_1$  と  $z_2$  をベクトル  $\mathbf{z} = [z_1 \ z_2]$  とする。推定値  $\hat{V}$  の分散  $\text{Var}(\hat{V}) = \mathbf{z} \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) \mathbf{z}^T$  は、以下に示すように、Excel の行列関数 Mmult () 関数、および、Transpose () 関数を使用し、

[S]=10.0 の場合		パラメータの共分散		転置
$z_1$	$z_2$	$\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) = (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \hat{\sigma}^2$		$[z_1 \ z_2]^T$
0.4621	-24.130	10885.37	262.53	0.4621
		262.53	9.14	-24.1305
		$\mathbf{z} \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}})$		
		= -1304.84	-99.135	0.4621
		-1304.84	-99.135	-24.1305
		$\text{Var}(\hat{V}) = \mathbf{z} \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}}) \mathbf{z}^T$		
				1789.188

=Mmult ( Mmult (  $\mathbf{z}$  の範囲,  $\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}})$  の範囲), Transpose ( $\mathbf{z}$  の範囲) )

(12.12)

として計算されている。

図 12.2 左は、表 12.4 で求められた 95%信頼区間をミカエリス・メンテン曲線に重ね書きした結果である。図 12.2 右は、Excel の X 軸の書式設定で「対数目盛」を選択した結果で、2 パラメータ・ロジスティック曲線となっている。



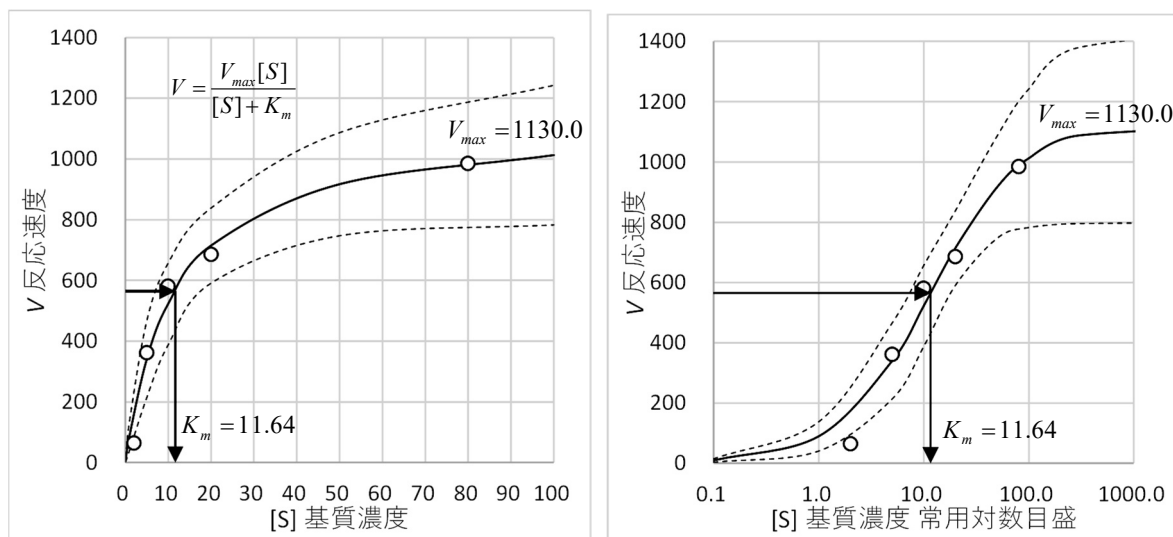


図 12.2 推定されたミカエリス・メンテン曲線に対する 95%信頼区間

式 (12.1) のミカエリス・メンテン式に対し、分子と分母を  $[S]$  で除し、分母の  $(K_m/[S])$  に対し指数と対数を  $\exp[\ln(\cdot)]$  のようにセットで適用し、整理すると対数濃度  $\ln([S])$  に関して 2 パラメータ・ロジスティック曲線式が得られる。

$$\begin{aligned}
 V &= \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \\
 &= \frac{V_{\max}}{1 + \exp\left[\ln\left(\frac{K_m}{[S]}\right)\right]} \\
 &= \frac{V_{\max}}{1 + \exp\{-[\ln([S]) - \ln(K_m)]\}}
 \end{aligned}
 \quad , \quad
 \begin{aligned}
 y &= \frac{\theta_{\max} x}{x + \mu} \\
 &= \frac{\theta_{\max}}{1 + \exp\left[\ln\left(\frac{\mu}{x}\right)\right]} \\
 &= \frac{\theta_{\max}}{1 + \exp\{-[\ln(x) - \ln(\mu)]\}}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} V &= \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \right.} \right\} \quad (12.13)$$

### b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換

ミカエリス・メンテン式を線形化するために、測定誤差が含まれる反応速度  $V$  について逆数とするので、基質濃度  $[S]$  が低い場合に反応速度  $V$  は大きくなり、 $(1/V)$  の誤差も相対的に大きくなる。その結果、切片として推定される  $(1/V_{\max})$  は、必然的に回帰直線の外挿となり、95%信頼区間も広がり、推定結果も不安定になる。

$$\text{式 (12.2): } \quad \frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]}, \quad \frac{1}{y} = \frac{1}{\theta_{\max}} + \frac{\mu}{\theta_{\max}} \frac{1}{x}$$

表 12.5 に示すのは、両逆数・Lineweaver-Burk 変換によるパラメータ推定のための Excel シートで、基質濃度  $[S]$  の逆数、反応速度  $V$  の逆数に対する回帰分析の結果である。回帰分析は、Excel の分析ツールの「回帰分析」、または、行列計算で行ってきたのであるが、ここでは、必要とするパラメータをコンパクトに推定できる Excel の「ソルバー」を用いて残差平方  $S_e$  を最小になるように  $(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)$  を変化させた結果である。なお、線形モデルなので、

初期値にどんな数値を設定しても解が求まる．パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  は， $[x_0, 1/x]$  の (5行×2列) のデザイン行列  $X$  を用いて， $\Sigma(\hat{\beta}) = (X^T X)^{-1} \hat{\sigma}^2$  によって求められている． $\Sigma(\hat{\beta})$  の対角要素が，パラメータの分散となり．その平方根の標準誤差  $SE$  を用いてパラメータの 95%信頼区間を求めている．

表 12.5 両逆数・Lineweaver-Burk 変換によるパラメータ推定

ソルバーで			$\beta_0 \hat{=}$	-0.00074	$\sigma^2 \hat{=}$	3.39E-06	$\Sigma(\beta^\wedge) = (X^T X)^{-1} \sigma^2 \hat{=}$	分散	SE	
$S_e$ を最小化			$\beta_1 \hat{=}$	0.03021	$S_e \hat{=}$	1.02E-05	1.33E-06	-3.80E-06	1.33E-06	0.0012
[S]	V		1/[S]	1/V	(1/V)^\wedge	残差	-3.80E-06	2.20E-05	2.20E-05	0.0047
x	y	x_0	1/x	1/y	(1/y)^\wedge	\varepsilon^\wedge		推定値	SE	L 95% U 95%
2	65	1	0.5000	0.0154	0.0144	0.0010	$\beta^\wedge_0 = 1/V_{max} =$	-0.0007	1.15E-03	-0.0044 0.0029
5	362	1	0.2000	0.0028	0.0053	-0.0025	$\beta^\wedge_1 = K_m/V_{max} =$	0.0302	4.69E-03	0.0153 0.0451
10	581	1	0.1000	0.0017	0.0023	-0.0006	$V_{max} = 1/\beta^\wedge_0 =$	-1345.7	2091.6	-8002.0 5310.5
20	686	1	0.0500	0.0015	0.0008	0.0007	$K_m = \beta^\wedge_1/\beta^\wedge_0 =$	-40.7	58.9	-228.2 146.9
80	985	1	0.0125	0.0010	-0.0004	0.0014		$t_{0.05}(5-2) =$	3.1824	

回帰分析で推定されたパラメータ ( $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1$ ) を用いて，最大反応  $\hat{V}_{max}$  とミカエリス定数  $\hat{K}_m$  が，表 12.5 右下段に

$$\hat{V}_{max} = 1 / \hat{\beta}_0 = 1 / -0.00074 = -1345.7 \quad (12.14)$$

$$\hat{K}_m = \frac{\hat{K}_m / \hat{V}_{max}}{1 / \hat{V}_{max}} = \frac{\hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_0} = \frac{0.03021}{-0.00074} = -40.7 \quad (12.15)$$

として推定されている．最大反応  $\hat{V}_{max}$  の分散  $Var(\hat{V}_{max})$  は，切片  $\hat{\beta}_0$  の逆数 ( $1/\hat{\beta}_0$ ) を  $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  で偏微分し，

$$d_1 = \frac{\partial(1/\hat{\beta}_0)}{\partial \hat{\beta}_0} = -\frac{1}{\hat{\beta}_0^2} = -\frac{1}{(-0.00074)^2} = -1810969, \quad d_2 = \frac{\partial(1/\hat{\beta}_0)}{\partial \hat{\beta}_1} = 0 \quad (12.16)$$

パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する  $[d_1 \ d_1]$  の 2 次形式により

$$\begin{aligned} Var(V_{max}) &= [d_1 \ d_1] \Sigma(\hat{\beta}) [d_1 \ d_2]^T \\ &= [-1810969 \ 0] \begin{bmatrix} 1.33E-06 & -3.80E-06 \\ -3.80E-06 & 2.20E-05 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -1810969 \\ 0 \end{bmatrix} \\ &= (2091.6)^2 \end{aligned} \quad (12.17)$$

として求められている．推定値は， $\hat{V}_{max} = -1345.7$  であり，奇異な結果となっている．また 95%信頼区間は，(-8002.4, 5311.0) と凄まじい範囲となっており，非線形回帰で求めた  $\hat{V}_{max}^{(非線形)} = 1130.0$  の推定値を含んでいるので，統計的には許容範囲であるが，まったく使い物にならない．

ミカエリス定数  $K_m$  の推定値は， $(\hat{\beta}_1 / \hat{\beta}_0)$  なので， $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  で偏微分し

$$d_1 = \frac{\partial(\hat{\beta}_1 / \hat{\beta}_0)}{\partial \hat{\beta}_0} = -\frac{\hat{\beta}_1}{\hat{\beta}_0^2} = -54713.7, \quad d_2 = \frac{\partial(\hat{\beta}_1 / \hat{\beta}_0)}{\partial \hat{\beta}_1} = \frac{1}{\hat{\beta}_0} = -1345.766 \quad (12.18)$$

$\hat{V}_{max}$  と同様にパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する  $[d_1 \ d_1]$  の2次形式により

$$\begin{aligned} \text{Var}(\hat{K}_m) &= [d_1 \ d_2] \Sigma(\hat{\beta}) [d_1 \ d_2]^T \\ &= [-54710 \quad -1345.72] \begin{bmatrix} 1.33E-06 & -3.80E-06 \\ -3.80E-06 & 2.20E-05 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} -54710 \\ -1345.72 \end{bmatrix} \\ &= (58.9)^2 \end{aligned} \quad (12.19)$$

によって求められている。ミカエリス定数の推定値は  $\hat{K}_m = -40.7$  と基質濃度が負となる不可思議な結果であるが、95%信頼区間  $(-228.2, 146.9)$  の中に非線形モデルで求めた  $\hat{K}_m^{(\text{非線形})} = 11.64$  が含まれているので、 $\hat{V}_{max}$  と同様に統計的には許容範囲であるが、実験結果として提示することは不可能である。

表 12.6 に示すのは、推定された  $(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)$  を用いて、回帰の推定値  $(1/y) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1(1/x)$  を求め、推定値の分散を  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する  $[1 \ (1/x)_i]$  の2次形式により

$$\text{Var}(\widehat{1/y}) = [1 \ (1/x)_i] \Sigma(\hat{\beta}) [1 \ (1/x)_i]^T \quad (12.20)$$

によって計算し、95%信頼区間を求めている。図 12.3 に示すのは、与えられたデータに対し回帰直線および 95%信頼区間を重ね書きした結果であり、妥当な結果と思われるが、切片  $\hat{\beta}_0$  が、きわどいところでマイナスとなっているために、式 (12.14) に示したように最大反応  $\hat{V}_{max} = -1345.7$  が、不可解な推定値となってしまう。

表 12.6 両逆数・Lineweaver-Burk 変換による回帰直線の 95%信頼区間

	1/[S]	1/Y	分散	SE	95%信頼区間	
$x_0$	1/x	(1/y)^	[(1/y)^]	[(1/y)^]	L 95%	U 95%
1	0.000	-0.0007	1.33E-06	0.0012	-0.0044	0.0029
1	0.050	0.0008	1.01E-06	0.0010	-0.0024	0.0040
1	0.100	0.0023	7.94E-07	0.0009	-0.0006	0.0051
1	0.200	0.0053	6.95E-07	0.0008	0.0026	0.0080
1	0.300	0.0083	1.04E-06	0.0010	0.0051	0.0116
1	0.400	0.0113	1.82E-06	0.0013	0.0070	0.0156
1	0.500	0.0144	3.04E-06	0.0017	0.0088	0.0199
1	0.600	0.0174	4.71E-06	0.0022	0.0105	0.0243
			$t_{0.05}(5-2) =$	3.1824		

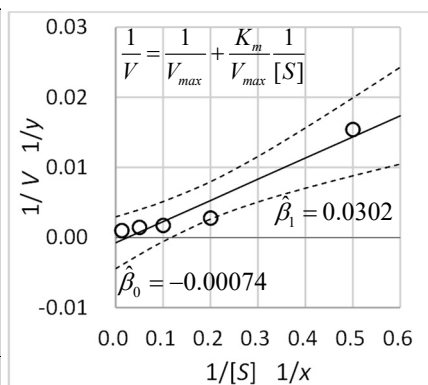


図 12.3 両逆数・Lineweaver-Burk 変換による回帰直線

両逆数・Lineweaver-Burk 変換による線形化によるパラメータの推定値が不安定であることは、実際に使用した化学者・技術者たちも実感したに違いない。そのために新たな線形変換式が、次から次へと考案されたと理解される。ただし、両逆数・Lineweaver-Burk 変換は、ミカエリス・メンテン式のパラメータ推定のための代表的な線形変換式として、消えることなく使い続けられている。

## c) Hanes-Woolf 変換

Hanes-Woolf 変換は、両逆数・Lineweaver-Burk 変換の両辺に基質濃度  $[S]$  を掛けて整理した線形変換式である。反応速度  $V$  の逆数に基質濃度  $[S]$  を掛けた  $([S]/V)$  を新たな反応とし、基質濃度  $[S]$  に対する回帰式となっていて、切片が  $\beta_0 = K_m / V_{max}$ 、傾きが  $\beta_1 = 1/V_{max}$  となっている。これにより、両逆数・Lineweaver-Burk 変換で、切片の推定値が、 $(1/V_{max})$  であることの不安定さの解消を狙ったものと思われる。

$$\text{式 (12.3): } \frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}}[S], \quad \frac{x}{y} = \frac{\mu}{\theta_{max}} + \frac{1}{\theta_{max}}x$$

表 12.7 に示すのは、Hanes-Woolf 変換によるパラメータ推定のための Excel シートで、基質濃度  $[S]$  に対し、 $[S]$  を反応速度  $V$  で除した反応  $([S]/V)$  に対する回帰分析の結果である。回帰パラメータの推定は、「ソルバー」を用いて残差平方  $S_e$  を最小にするように  $(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)$  を変化させた手順を用いている。パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  は、変数  $(x_0, x)$  に対する (5 行×2 列) のデザイン行列  $X$  とし、 $\Sigma(\hat{\beta}) = (X^T X)^{-1} \hat{\sigma}^2$  によって求め、 $\Sigma(\hat{\beta})$  の対角要素の平方根をパラメータの標準誤差  $SE$  と 95%信頼区間を求めている。

表 12.7 Hanes-Woolf 変換によるパラメータ推定

ソルバーで		$\beta^{\wedge}_0=$		1.57E-02	$\sigma^2\hat{=}$		8.90E-05	$\Sigma(\beta^{\wedge})=(X^T X)^{-1}\sigma^2\hat{=}$		分散		SE	
$S_e$ を最小化		$\beta^{\wedge}_1=$		8.00E-04	$S_e=$		2.67E-04	2.94E-05		-4.97E-07	2.94E-05	5.42E-03	
[S]	V	行列 X		[S]/V	推定値	残差		-4.97E-07		2.12E-08	2.12E-08	1.46E-04	
x	y	$x_0$	x	(x/y)	(x/y)^^	$\varepsilon^{\wedge}$				推定値	SE	L95%	U95%
2	65	1	2	0.0308	0.0173	0.0135		$\beta^{\wedge}_0=K^{\wedge}_m/V^{\wedge}_{max}=$		0.0157	5.42E-03	-0.0016	0.0330
5	362	1	5	0.0138	0.0197	-0.0059		$\beta^{\wedge}_1=1/V^{\wedge}_{max}=$		0.0008	1.46E-04	0.0003	0.0013
10	581	1	10	0.0172	0.0237	-0.0065		$V^{\wedge}_{max}=1/\beta^{\wedge}_1=$		1249.38	227.45	525.53	1973.24
20	686	1	20	0.0292	0.0317	-0.0026		$K^{\wedge}_m=\beta^{\wedge}_0/\beta^{\wedge}_1=$		19.62	9.44	-10.42	49.66
80	985	1	80	0.0812	0.0797	0.0015				$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824		

最大反応の推定値  $\hat{V}_{max}$  およびミカエリス定数の推定値  $\hat{K}_m$  は、回帰分析で求められたパラメータ  $(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)$  を用いて、

$$\hat{V}_{max} = \frac{1}{\hat{\beta}_1} = \frac{1}{0.0008004} = 1249.4 \quad (12.21)$$

$$\hat{K}_m = \frac{\hat{K}_m / \hat{V}_{max}}{1 / \hat{V}_{max}} = \frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} = \frac{0.0157}{0.0008004} = 19.62 \quad (12.22)$$

として推定されている。最大反応  $\hat{V}_{max}$  の分散  $Var(\hat{V}_{max}) = Var(1/\hat{\beta}_1)$  は、 $(1/\hat{\beta}_1)$  を  $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  で偏微分し、

$$d_1 = \frac{\partial(1/\hat{\beta}_1)}{\partial \hat{\beta}_0} = 0, \quad d_2 = \frac{\partial(1/\hat{\beta}_1)}{\partial \hat{\beta}_1} = -\frac{1}{\hat{\beta}_1^2} = -\frac{1}{0.0008004^2} = -1560960 \quad (12.23)$$

$\Sigma(\hat{\beta})$  に関する  $[d_1 \ d_1]$  の 2 次形式によって

$$\begin{aligned}
 \text{Var}(\hat{V}_{\max}) &= [d_1 \ d_2] \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\beta}}) [d_1 \ d_2]^T \\
 &= [0 \ -1560960] \begin{bmatrix} 2.94E-05 & -4.97E-07 \\ -4.97E-07 & 2.12E-08 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ -1560960 \end{bmatrix} \\
 &= (227.45)^2
 \end{aligned} \quad (12.24)$$

として求められている．最大反応  $\hat{V}_{\max}$  の 95%信頼区間は，(525.5, 1973.3) となっているので，非線形モデルで求めた  $\hat{V}_{\max}^{(\text{非線形})} = 1130.00$  の推定値を含んでいる

ミカエリス定数  $K_m$  の推定値は， $\hat{K}_m = \hat{\beta}_0 / \hat{\beta}_1$  なので， $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  で偏微分し

$$d_1 = \frac{\partial(\hat{\beta}_0 / \hat{\beta}_1)}{\partial \hat{\beta}_0} = \frac{1}{\hat{\beta}_1} = 1249.38, \quad d_2 = \frac{\partial(\hat{\beta}_0 / \hat{\beta}_1)}{\partial \hat{\beta}_1} = -\frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1^2} = -24513.36 \quad (12.25)$$

最大反応  $\hat{V}_{\max}$  と同様にパラメータの共分散行列  $\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\beta}})$  に関する  $[d_1 \ d_2]$  の 2 次形式によって

$$\begin{aligned}
 \text{Var}(\hat{K}_m) &= [d_1 \ d_2] \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\beta}}) [d_1 \ d_2]^T \\
 &= [1249.38 \ -24513.36] \begin{bmatrix} 2.94E-05 & -4.97E-07 \\ -4.97E-07 & 2.12E-08 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1249.38 \\ -24513.36 \end{bmatrix} \\
 &= (9.44)^2
 \end{aligned} \quad (12.26)$$

によって求められている．ミカエリス定数の推定値は  $\hat{K}_m = 19.6$  であり，95%信頼区間 (-10.42, 49.66) の中に非線形回帰で求めた  $\hat{K}_m^{(\text{非線形})} = 11.64$  が含まれている．

表 12.8 に示すのは，*Hanes-Woolf* 変換によって求められた回帰直線および 95%信頼区間を示したものである．分散の計算は， $[1 \ x_i]$  のパラメータの共分散行列  $\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\beta}})$  に関する 2 次形式によって計算している．

表 12.8 *Hanes-Woolf* 変換による回帰直線の 95%信頼区間

	[S]	[S]/Y	分散	SE	95%信頼区間	
$x_0$	$x$	$(x/y)^\wedge$	$(x/y)^\wedge$	$(x/y)^\wedge$	L 95%	U 95%
1	0	0.0157	2.94E-05	0.0054	-0.0016	0.0330
1	10	0.0237	2.16E-05	0.0046	0.0089	0.0385
1	20	0.0317	1.80E-05	0.0042	0.0182	0.0452
1	30	0.0397	1.87E-05	0.0043	0.0259	0.0535
1	50	0.0557	3.28E-05	0.0057	0.0375	0.0740
1	60	0.0637	4.62E-05	0.0068	0.0421	0.0854
1	70	0.0717	6.39E-05	0.0080	0.0463	0.0972
1	80	0.0797	8.58E-05	0.0093	0.0503	0.1092
1	90	0.0877	1.12E-04	0.0106	0.0541	0.1214
1	100	0.0957	1.42E-04	0.0119	0.0578	0.1337
$t_{0.05}(5-2)=$				3.1824		

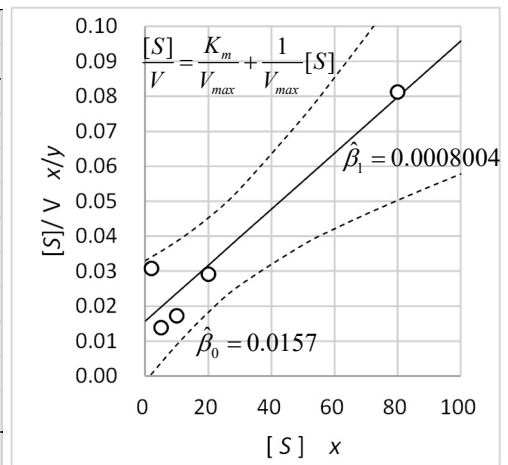


図 12.4 *Hanes-Woolf* 変換による回帰直線

d) *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換

*Hanes-Woolf* 変換により，両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換で反応速度の最大反応  $V_{max}$  の逆数 ( $1/V_{max}$ ) が，切片の推定値  $\hat{\beta}_0$  から傾きの推定値  $\hat{\beta}_1$  に変更され， $V_{max}$  の推定が安定したのであるが，ミカエリス定数  $K_m$  の推定に  $\hat{K}_m = \hat{\beta}_0 / \hat{\beta}_1$  のようにパラメータの比で求める必要があり，扱いにくかったのであろう．さらなる改良が *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換であり，

$$\text{式 (12.4) : } V = V_{max} - K_m \frac{V}{[S]}, \quad y = \theta_{max} - \mu \frac{y}{x}$$

切片の推定値が  $V_{max}$ ，傾きの推定値が  $-K_m$  となり，回帰分析のパラメータとして得られることに特徴がある．

ただし，測定誤差が含まれる反応速度  $V$ （反応  $y$ ）を変数に含んだ回帰式となっているので，一般的な回帰分析の前提「説明変数  $x$  に測定誤差を含まない」を満たしていないことに注意が必要である．測定誤差が小さく精度の高い実験データであれば，*Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換は，魅力的な方法であるが，測定誤差が大きい場合には，パラメータの推定値が不安定になり，使用に耐えないのではないかと推測される．

表 12.9 に示したのは，これまでと同様の計算シートであり，*Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換に合わせたデータがセットされている．切片の推定値が最大反応  $\hat{V}_{max} = 811.76$ ，95%信頼区間が  $(-320.74, 1944.25)$  と *Hanes-Woolf* 変換に比べてかなり拡大している．傾きの推定値が負のミカエリス定数  $-K_m$  となるので  $\hat{K}_m = 6.58$ ，95%信頼区間が  $(-17.56, 30.73)$  と推定されている．

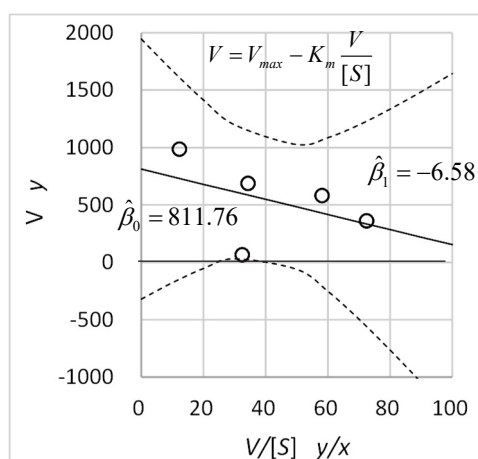
表 12.9 *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換によるパラメータ推定

ソルバーで		$\beta^{\wedge}_0=$		811.76	$\sigma^{\wedge 2}=$		1.27E+05	$\Sigma(\beta^{\wedge})=(X^T X)^{-1} \sigma^2 \wedge$		分散	SE	
$S_e$ を最小化		$\beta^{\wedge}_1=$		-6.5826	$S_e=$		3.82E+05	126634		-2412.7	126634	355.86
[S]	V	行列 X		V	推定値	残差		-2412.7		57.6	57.55	7.59
x	y	$x_0$	y/x	y	$y^{\wedge}$	$\varepsilon^{\wedge}$		推定値		SE	L 95%	U 95%
2	65	1	32.50	65	597.82	-532.82	$\beta^{\wedge}_0=V_{max}=$		811.76	355.86	-320.74	1944.25
5	362	1	72.40	362	335.18	26.82	$\beta^{\wedge}_1=-K_m=$		-6.58	7.59	-30.73	17.56
10	581	1	58.10	581	429.31	151.69	$V_{max}=\beta^{\wedge}_0=$		811.76	355.86	-320.74	1944.25
20	686	1	34.30	686	585.98	100.02	$K_m=-\beta^{\wedge}_1=$		6.58	7.59	-17.56	30.73
80	985	1	12.31	985	730.71	254.29			$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824		

表 12.10 に示すのは，推定されたパラメータを用い，散布図に *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換データを用いた回帰直線と 95%信頼区間を重ね書きした結果である．X 軸の変数は， $x$  ではなく  $(y/x)$  であり，そのために反応  $y$  に対する測定誤差の影響を受け 95%信頼区間が大きく広がっている．なお，反応の推定値  $\hat{V}$  に対する分散  $\text{Var}(\hat{V})$  は，これまでと同様に  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する  $[x_0 \ y/x]$  の 2 次形式によって求めている．

表 12.10 *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換による回帰直線の 95%信頼区間

	$V/[S]$	$V$	分散	標準誤差	95%信頼区間	
$x_0$	$y/x$	$y^{\wedge}$	$Var(y^{\wedge})$	$SE(y^{\wedge})$	$L95\%$	$U95\%$
1	0	811.8	1.27E+05	355.9	-320.7	1944.3
1	10	745.9	8.41E+04	290.1	-177.2	1669.0
1	20	680.1	5.31E+04	230.5	-53.6	1413.8
1	30	614.3	3.37E+04	183.5	30.3	1198.2
1	50	482.6	2.92E+04	171.0	-61.6	1026.8
1	60	416.8	4.43E+04	210.5	-253.0	1086.6
1	70	351.0	7.09E+04	266.2	-496.2	1198.1
1	80	285.2	1.09E+05	330.0	-765.2	1335.5
1	90	219.3	1.59E+05	398.1	-1047.7	1486.4
1	100	153.5	2.20E+05	468.6	-1337.9	1644.9
			$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824		

図 12.5 線形化 *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換

### 非線形回帰に対する線形化のパラメータの推定精度の比較

代表的な非線形モデルであるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定のために各種の線形変換が考案され実用化されてきた。コンピュータがない時代には、手計算に代えて方眼紙上で散布図を作成し、目の子で回帰直線を引き、切片および傾きを読み取ることによりパラメータの推定値が得る方法は、広く活用されていたと推測する。PC が普及している現代では、方眼紙に代え、コンピュータを用いた回帰分析が手軽に行えるようになった。他方、非線形回帰によるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定は、何らかの統計ソフトの使用が推奨されている。その結果として計算方法がブラック・ボックスのままとなっているために、いくつかの線形化の方法が、現在でも消えることなく綿々と使い続けられている。

非線形回帰によるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定は、表 12.2 に示したように Excel シート上で計算式を設定し、おおよその初期パラメータに対する推定値  $\hat{V}_i$  を設定し、ソルバーで残差平方和  $S_e = \sum_i (V_i - \hat{V}_i)^2$  を最小にするように、初期パラメータを変化させることにより手軽に推定できることを示した。また、推定されたパラメータの 95%信頼区間を求めるためには、式 (12.6) および 式 (12.7) に示した偏微分式を用い、Excel シート上で手軽に計算できることも示した。

線形化によるパラメータの推定にも Excel の「ソルバー」を用いて、非線形回帰の場合と同様に、おおよその初期値を与え、残差平方和  $S_e$  を最小にする方法を示し、パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  から  $V_{max}$  および  $K_m$  の推定値に対する 95%信頼区間を求める方法を示した。線形化した場合の  $V_{max}$  および  $K_m$  の推定は、推定されたパラメータの逆数あるいは比により求められるが、逆数あるいは比に対する 95%信頼区間の算出のために必要な分散は、式

(12.16) および 式 (12.18) に示したように推定したパラメータに関して偏微分した式に対し、パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する 2 次形式による計算が必要であることも示した。

表 12.11 に示すのは、これまで別々に推定結果を示してきた反応速度  $V$  に対する最大反応  $V_{max}$  およびミカエリス定数  $K_m$  についてまとめたものである。線形化した場合の切片の推定値、傾きの推定値を示し、 $V_{max}$  および  $K_m$  に戻した推定値を示す。両逆数・Lineweaver-Burk 変換を除いて、そこそこの推定値が得られているが、非線形回帰の場合の推定値に比べ乖離が大きい。ただし、いずれにしても“推定値”であり、どれが真の値に近いかは、なんとも言い難いのであるが、推定値の 95%信頼区間の大きさを比較することにより、推定法の良し悪しを評価することが可能となる。

表 12.11 非線形回帰および線形化により推定された  $V_{max}$  および  $K_m$  の比較

	推定方法	切片 $\beta_0$ の推定		傾き $\beta_1$ の推定		推定値	
		意味	値	意味	値	$V_{max}$	$K_m$
(a)	非線形回帰	—	—			1130.0	11.64
(b)	両逆数・Lineweaver-Burk	$1/V_{max}$	-0.00074	$K_m/V_{max}$	0.0302	-1345.7	-40.65
(c)	Hanes-Woolf	$K_m/V_{max}$	0.0157	$1/V_{max}$	0.0008	1249.4	19.62
(d)	Scatchard・Eadie-Hofstee	$V_{max}$	811.8	$-K_m$	-6.58	811.8	6.58

非線形回帰による最大反応  $V_{max}$  およびミカエリス定数  $K_m$  の推定が優れていることを示すためには、線形化による  $V_{max}$  および  $K_m$  の標準誤差  $SE$  を算出し、95%信頼区間を比較することが必須である。表 12.12 に最大反応  $V_{max}$  について、すでに計算されている標準誤差  $SE$  と 95%信頼区間をまとめて示す。

表 12.12 非線形回帰および線形化により推定された最大反応  $V_{max}$  の 95%信頼区間

	推定方法	推定値	標準誤差	95%信頼区間		幅
		$V_{max}$	$SE$	$L_{95\%}$	$U_{95\%}$	$t_{0.05} \times SE$
(a)	非線形回帰	1130.0	104.3	798.0	1462.0	332.0
(b)	両逆数・Lineweaver-Burk	-1345.7	2091.7	-8002.4	5311.0	6656.7
(c)	Hanes-Woolf	1249.4	227.5	525.5	1973.3	723.9
(d)	Scatchard・Eadie-Hofstee	811.8	355.9	-320.7	1944.3	1132.5
		$t_{0.05}(5-2)=$	3.1824			

両逆数・Lineweaver-Burk 変換では、非線形の  $SE^{(a)} = 104.3$  に比べ、 $SE^{(b)} = 2091.7$  と桁違いに大きい。Hanes-Woolf 変換では、 $SE^{(c)} = 227.5$  と 2 倍強、Scatchard・Eadie-Hofstee 変換では、 $SE^{(d)} = 355.9$  と 3.5 倍弱となっている。線形変換それぞれの 95%信頼区間は、非線形モデルの推定値  $V_{max}^{(a)} = 1130.0$  を含んでいることから、統計的には、おかしい推定値ではないとも言える。ただし、精度の極めて悪い標準誤差  $SE$  に基づく  $V_{max}$  を実験データの要約として用いることは、まったく薦められない。



表 12.13 に示すのは、ミカエリス定数  $K_m$  について最大反応  $V_{max}$  と同様にまとめた結果である。それぞれの標準誤差  $SE$  を非線形回帰の  $SE^{(a)} = 3.02$  と比較すると、*Hanes-Woolf* 変換では、 $SE^{(c)} = 9.44$  と 3 倍強の違い、*Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換では、 $SE^{(d)} = 7.59$  と 2.5 倍強の違いとなっている。この程度の違いならば、良しとするのであろうか。ただし、ここに示したのは、1 つの事例に過ぎないので、他の事例についても検討する必要があるとも言えるが、非線形回帰による推定が Excel により手軽にできるようになった時代に、常にセットで扱われる 3 種の線形変換式にこだわるのは、悪あがきとしか言いようがない。

表 12.13 非線形および線形化により推定されたミカエリス定数  $K_m$  の 95%信頼区間

	推定方法	推定値	標準誤差	95%信頼区間		幅
		$K_m$	$SE$	$L\ 95\%$	$U\ 95\%$	$t_{0.05} \times SE$
(a)	非線形回帰	11.64	3.02	2.02	21.26	9.62
(b)	両逆数・ <i>Lineweaver-Burk</i>	-40.65	58.93	-228.21	146.90	187.55
(c)	<i>Hanes-Woolf</i>	19.62	9.44	-10.42	49.66	30.04
(d)	<i>Scatchard・Eadie-Hofstee</i>	6.58	7.59	-17.56	30.73	24.14
		$t_{0.05}(5-2) =$	3.1824			

図 12.6 に 4 種の方法で推定された最大反応  $V_{max}$  およびミカエリス定数  $K_m$  の 95%信頼区間を示す。表に示した結果からでは、はっきりしなかったが、(a) 非線形回帰の推定値が、(c) *Hanes-Woolf* 変換、および、(d) *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換の中間となっていること、95%信頼区間が、他に比べて極めて小さいことが浮き彫りにされている。

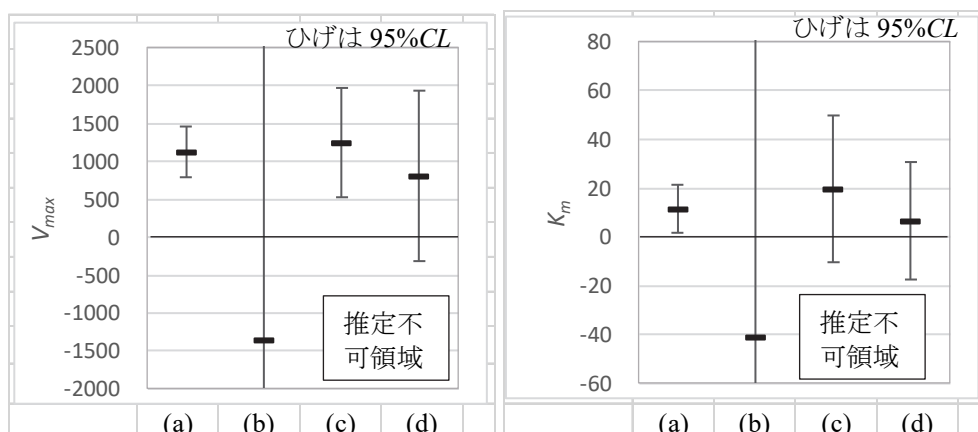


図 12.6 非線形回帰に対する線形化の  $V_{max}$  および  $K_m$  の 95%信頼区間の比較

(a) 非線形回帰, (b) 両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換, (c) *Hanes-Woolf* 変換, (d) *Scatchard・E-H* 変換

データ数が 5 点と少ないために 95%信頼区間の計算に自由度  $df = 5 - 2 = 3$  の  $t_{0.05}(5-2) = 3.1824$  を使っているとはいえ、(c) *Hanes-Woolf* 変換によるミカエリス定数  $K_m$  が“推定不可領域”まで伸びていること、(d) *Scatchard・Eadie-Hofstee* 変換では、 $V_{max}$  および  $K_m$  が共に“推定不可領域”まで伸びていることから、推定値そのものが不安定であることの証である。

各種の線形化による  $V_{max}$  の推定値,  $K_m$  の推定値に対する 95%信頼区間を付けて比較することにより, 線形化の方法で推定された  $V_{max}$  と  $K_m$  の 95%信頼区間が, 非線形回帰の適用に比べ, あまりにも大きいことである. 表 12.2 に示したように非線形回帰が, Excel の 1 枚のシート上で簡単に行えるようになった時代に, 推定誤差の大きい各種の線形化によるパラメータの推定に固執する理由は何であろうか.

### 文献の推定値との差異

Armitage ら (2002) に示されている  $V_{max}$  および  $K_m$  の推定値と, これまでに示した推定値に若干の差異が生じている. 表 12.14 に示すように, 差異が大きいのは (b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換の場合に非現実的な推定値ではあるが, 最大反応  $V_{max}$  で -11.2% と小さくなっているものの, 他は 5%前後の差異におさまっている. 文献には, 標準誤差が示されていないので, Excel シート上で計算した結果を示し, 非線形モデルの線形化に対する優位性を定量化して明らかにした.

表 12.14 文献値との差異

	推定方法	Armitage 文献値		推定値		差異	
		$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$
(a)	非線形回帰	1114	11.3	1130.0	11.64	1.4%	3.0%
(b)	両逆数・Lineweaver-Burk	-1515	-43.9	-1345.7	-40.65	-11.2%	-7.4%
(c)	Hanes-Woolf	1225	18.6	1249.4	19.62	2.0%	5.5%
(d)	Scatchard・Eadie-Hofstee	802	6.2	811.8	6.58	1.2%	6.2%
(e)	Direct linear plot	979	7.7				
(f)	両逆数GLM/gamma errors	1395	20.2				

なお, Armitage ら (2002) には, (e) Direct linear plot, (f) 両逆数 GLM/gamma errors, による  $V_{max}$  および  $K_m$  の推定値が示されている. (e) Direct linear plot は, 知名ら (2014) では, Cressie-Keightley プロットとして示されているが, 段階的に複数の直線をあてはめるような手順であり, 標準誤差の算出が困難なので割愛した. (f) 両逆数 GLM/gamma errors は, 一般化線形モデル (GLM) で gamma errors を用いた方法であるが, 線形化の範囲を超えるので割愛した. どちらの方法も非線形回帰での推定値との乖離が大きいので, 魅力的ではないことも割愛の理由である. 知名ら (2014) には, さらに Cleland-Wilkinson 法, Tseng-Hsu 法なども紹介されているが, 手順が煩雑なので割愛した.

第 10.6 節 の末尾で Wikipedia での日本語版の「ガウス・ニュートン法」に非線形モデルによるミカエリス・メンテン式の計算事例を紹介したが, 事例の出典は示されていない. 念のために英語版の「Gauss-Newton algorithm」を確認すると日本語版と同じ事例が示され, External links として「Probability, Statistics and Estimation. The algorithm is detailed and applied to the biology experiment discussed as an example in this article (page 84 with the uncertainties on the estimated values).」, Rouaud (2017), <https://www.incertitudes.fr/book.pdf> に, Wikipedia に引用されていないミカエリス・メンテン式の信頼区間の図が示されている.

## 12.2. 統計ソフト SAS によるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定

現代の算盤である Excel を用い、ミカエリス・メンテン式に派生する各種のあてはめ結果を示してきたのであるが、様々な操作ミス、計算式の設定ミスをしても見えてくれない本質的な脆弱性を内在している。そのために、結果の再現性に強い統計ソフトによる検証が欠かせない。そこで、無償で継続的に使える OnDemand SAS の NLIN プロシジャを用い、これまでの Excel の結果の検証を行うと共に、非線形回帰の統計ソフトの使い方を例示する。

### 非線形回帰のパラメータ推定値の SAS による検証

SAS は、データを入力し、SAS データセットを作成する DATA ステップ、PROC ステップ、から構成され交互に実行することができる。表 12.1 に示したデータを読み込む DATA ステップを次に示す。

#### SAS プログラム 12.1 データの入力

```
TITLE1 'ミカエリス.SAS 2023/02/26 << アーミテイジ >>' ;
DATA d01 ;
    input No S V ;
datalines ;
1 2 65
2 5 362
3 10 581
4 20 686
5 80 985
;
proc print data=d01 ; run;
```

PRINT プロシジャにより、DATA ステップで作成された「d01」SAS データセットを出力する。OnDemand SAS の標準出力は HTML 形式なので出力結果をコピーし Excel シートに貼り付け書式を整えた結果をワードに「図（拡張メタファイル）」形式でペーストした結果を表 12.15 に示す。

表 12.15 SAS の PRINT プロシジャの出力

OBS	No	S	V
1	1	2	65
2	2	5	362
3	3	10	581
4	4	20	686
5	5	80	985

非線形回帰のための NLIN プロシジャでは、用いるデータ「d01」を指定し、parms ステートメントで初期値  $\hat{V}_{max}=1000$  および  $\hat{K}_m=10$  を設定し、model ステートメントでミカエリス・メンテン式を設定する。

### SAS プログラム 12.2 ミカエリス・メンテン式

```
proc nlin data=d01 ;
  parms      Vmax = 1000   Km = 10   ;
  model  V = Vmax * S / (S + Km)  ;
run;
```

表 12.16 に NLIN プロシジャの出力結果を示す。最初の分散分析表で「Error」行の「平方和」列の 14904.5 が、表 12.2 に示した Excel の「ソルバー」で最小化した残差平方和  $S_e$  に一致する。パラメータの推定値  $\hat{V}_{max}=1130$ 、 $\hat{K}_m=11.64$  は、「ソルバー」で残差平方和  $S_e$  を最小化するために変化させたセル ( $\hat{V}_{max}$ 、 $\hat{K}_m$ ) に一致する。Excel による計算結果で統計ソフトによる検証が欠かせないのが、( $\hat{V}_{max}$ 、 $\hat{K}_m$ ) の標準誤差である。NLIN プロシジャの出力では、「近似標準誤差」が該当し (104.3, 3.0226) が得られる。表 12.3 に示した  $SE$  に一致し、もちろん 95%信頼区間も一致している。

表 12.16 SAS のミカエリス・メンテン式による NLIN プロシジャの出力

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値	近似Pr > F
Model	2	1898746	949373	191.09	0.0007
Error	3	14904.5	4968.2		
Uncorrected Total	5	1913651			
パラメータ	推定値	近似標準誤差	近似 95% 信頼限界		
Vmax	1130	104.3	798	1462	
Km	11.64	3.0226	2.0208	21.2591	
近似相関行列					
	Vmax	Km			
Vmax	1	0.8325			
Km	0.8325	1			

### パラメータの相関行列とパラメータの共分散行列の相互関係

NLIN プロシジャの標準出力に「パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$ 」がなく、「パラメータの相関行列  $R(\hat{\theta})$ 」が出力されている。これらは、推定されたパラメータの標準誤差の  $SE$  ベクトルを用いることにより、

$$\begin{aligned} R(\hat{\theta}) &= \Sigma(\hat{\theta}) / SE / SE^T \\ \Sigma(\hat{\theta}) &= R(\hat{\theta}) \times SE \times SE^T \end{aligned} \quad (12.27)$$

のように相互に互換性がある．表 12.2 のパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  と推定されたパラメータのベクトル  $SE = [104.33 \ 3.02]^T$  を用いて，Excel で

$$R(\hat{\theta}) = [\Sigma(\hat{\theta}) \text{の範囲}] / [SE \text{の範囲}] / [SE^T \text{の範囲}]$$

	$\Sigma(\hat{\theta})$			$SE$		$R(\hat{\theta})$	
	10885.37	262.53	÷	104.33	=	1	0.8325
	262.53	9.1359		3.02		0.8325	1
	÷						
$SE^T$	104.33	3.02					

$$\Sigma(\hat{\theta}) = [R(\hat{\theta}) \text{の範囲}] \times [SE \text{の範囲}] \times [SE^T \text{の範囲}]$$

	$R(\hat{\theta})$			$SE$		$\Sigma(\hat{\theta})$	
	1	0.8325	×	104.33	=	10885.37	262.53
	0.8325	1		3.02		262.53	9.1359
	×						
$SE^T$	104.33	3.02					

のように対応するセル同士の四則演算により計算できる．表 12.16 に示した「近似相関係数」から計算したパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  は，Excel で計算した表 12.2 の結果に一致する．

### ミカエリス・メンテン曲線の 95%信頼区間

図 12.2 に示したミカエリス・メンテン曲線を SAS で再現する．そのため表 12.4 に示した推定値とその 95%信頼区間の計算を必要とする．このような推定値を統計ソフトで計算するための基本は，元のデータファイルに，推定したい基質濃度  $[S]$  のみを追加し，元のデータも込みにして反応速度  $V$  の推定値  $\hat{V}$ ， $SE$ ， $L95\%$ ，および， $U95\%$  を計算させる．

基質濃度  $[S]$  の横並びのリストを読み込むために，input ステートメントで，変数  $S$  の後に「@@」により，1 つずつデータが尽きるまで繰り返せと指示している．その後の output ステートメントで，読み込んだ変数  $S$  を SAS データファイル「d02」に出力させている．データが尽きると，次の DATA ステップで，すでにある「d01」に「d02」を行方向に併合し，「d03」データファイルが作成され，print プロシジャで「d03」を出力する．

### SAS プログラム 12.3 追加データファイルの作成

```
data d02 ;
  input S @@ ; output ;
datalines;
  0.1 1 5 10 20 40 60 100 300 ;
  ;
data d03 ;
  set d01 d02 ;

proc print data=d03 ; run;
```

表 12.17 併合した「d03」データファイル

OBS	No	S	V
1	1	2	65
2	2	5	362
3	3	10	581
4	4	20	686
5	5	80	985
6	.	0.1	.
7	.	1	.

8	.	5	.
9	.	10	.
10	.	20	.
11	.	40	.
12	.	60	.
13	.	100	.
14	.	300	.

NLIN プロシジャで、推定された内部計算で使われているパラメータの共分散行列を出力するために `outest=cov1` オプションを設定し、`list` オプションでミカエリス・メンテン式をパラメータで偏微分した式を出力するように設定している。Output ステートメントで、`y_hat`, `SE`, `L95`, `U95` 変数に推定結果を保存するように設定している。

#### SAS プログラム 12.4 予測値および 95%信頼区間の計算

```
proc nlin data=d03 outest=cov1 list ;
  parms      Vmax=1000 Km=10 ;
  model  V = Vmax * S / (S + Km) ;
  output  out=out1 predicted=y_hat stdp=SE L95M=L95 U95M=U95 ;
run ;
proc print data=cov1 ; run ;
proc print data=out1 ; run ;
```

表 12.18 に示すのは、`list` オプションでミカエリス・メンテン式を `MODEL.V` としたときに、最大反応 `Vmax` での偏微分式が  $@MODEL.V/@Vmax = S / (S + Km)$ 、ミカエリス定数 `Km` での偏微分式が  $@MODEL.V/@Km = - MODEL.V / (S + Km)$  として内部で使用されているとの表示である。これは、パラメータに関して偏微分した式 (12.6) および式 (12.7) に対応している。

表 12.18 偏微分式の出力

Listing of Compiled Program Code		
Stmt	Line:Col	Statement as Parsed
1	71:05:00	MODEL.V = (Vmax * S) / (S + Km);
1	71:05:00	@MODEL.V/@Vmax = S / (S + Km);
1	71:05:00	@MODEL.V/@Km = - MODEL.V / (S + Km);

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}, \quad z_1 = \frac{\partial V}{\partial V_{max}} = \frac{[S]}{[S] + K_m}, \quad z_2 = \frac{\partial V}{\partial K_m} = -\frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m} \cdot \frac{1}{[S] + K_m} = \frac{-V_{max}[S]}{([S] + K_m)^2}$$

表 12.19 に示すのは、 $(V_{max}, K_m)$  を変化させて残差平方和  $S_e$  を最小化させる反復計算の過程である。FINAL 行が推定値で、その下にパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  が出力されている。

表 12.19 反復の過程とパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  の出力

OBS	_TYPE_	_STATUS	_NAME_	_ITER_	_SSE_	Vmax	Km
1	ITER	2 Iteration		0	27330.01	1000	10
2	ITER	2 Iteration		1	14925.99	1130.93	11.771
3	ITER	2 Iteration		2	14904.55	1129.76	11.631
4	ITER	2 Iteration		3	14904.51	1130.02	11.641
5	ITER	2 Iteration		4	14904.51	1130	11.64
6	FINAL	0		.	14904.51	1130	11.64
7	COVB	0	Vmax	.	14904.51	10885.37	262.534
8	COVB	0	Km	.	14904.51	262.53	9.136

表 12.20 左に示すのは、PRINT プロシジャで出力された予測値と 95%信頼区間を Excel に張り付けた結果である。図 12.7 Excel によるミカエリス・メンテン曲線と 95%信頼区間を散布図に重ね書きした結果である。このような統計ソフトの出力と Excel の作図機能のコラボレーションが、スムーズにできるようになったことは、画期的である。

表 12.20 予測値と 95%信頼区間の推定結果

OBS	No	S	V	y_hat	SE	L95	U95
1	1	2	65	165.7	25.4	84.7	246.6
2	2	5	362	339.5	39.6	213.6	465.5
3	3	10	581	522.2	42.3	387.6	656.8
4	4	20	686	714.3	38.9	590.5	838.1
5	5	80	985	986.5	66.5	774.9	1198.1
6	.	0.1	.	9.6	1.8	3.9	15.4
7	.	1	.	89.4	15.2	41.0	137.8
8	.	5	.	339.5	39.6	213.6	465.5
9	.	10	.	522.2	42.3	387.6	656.8
10	.	20	.	714.3	38.9	590.5	838.1
11	.	40	.	875.3	47.6	723.9	1026.7
12	.	60	.	946.4	58.5	760.3	1132.5
13	.	100	.	1012.2	72.3	782.2	1242.1
14	.	300	.	1087.8	91.8	795.5	1380.1

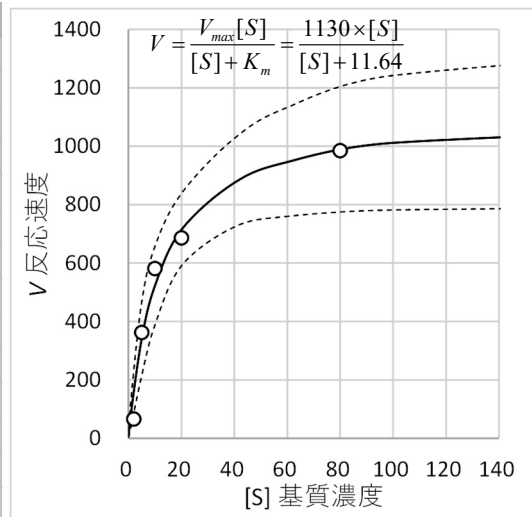


図 12.7 Excel によるミカエリス・メンテン曲線の作図例

### 非線形回帰による Hanes-Woolf 変換によるパラメータの直接推定

非線形モデルであるミカエリス・メンテン式を Hanes-Woolf 変換により線形化し、

$$\text{式 (12.2)} : \frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}[S], \quad \frac{x}{y} = \frac{\mu}{\theta_{\max}} + \frac{1}{\theta_{\max}}x$$

回帰パラメータ ( $\hat{\beta}_1$ ,  $\hat{\beta}_0$ ) の推定を行い、最大反応  $\hat{V}_{\max}$  およびミカエリス定数  $\hat{K}_m$  を Excel により

$$\text{式 (12.21)} : \hat{V}_{\max} = \frac{1}{\hat{\beta}_1} = 1249.4, \quad \text{式 (12.22)} : \hat{K}_m = \frac{K_m / V_{\max}}{1 / V_{\max}} = \frac{\hat{\beta}_0}{\hat{\beta}_1} = 19.62$$

を推定した。最大反応  $\hat{V}_{\max}$  のミカエリス定数  $\hat{K}_m$  の標準誤差を求めるために、それぞれの推定式を回帰パラメータで偏微分し、パラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\beta})$  に関する 2 次形式で分散

を推定し、表 12.8 に標準誤差の推定結果を示した。推定に際し、Excel の行列関数を用いたのであるが、結果が正しいと言えるのだろうか。そのためのバリデーション（検証）をどのように行ったらよいのであろうか。計算事例が公表されている場合には、用いられているデータに対する計算結果を参照すればよいのだが、見いだすことができない。

そこで、*Hanes-Woolf* 変換式を回帰モデルとして扱うのではなく、最大反応  $V_{max}$  とミカエリス定数  $K_m$  をそのままパラメータとして用い、非線形回帰を適用することにより、推定値と標準誤差を直接推定することができる。SAS の DATA ステップで表 12.1 のデータを読み込みつつ、変換式  $([S]/V)$  を計算し、変数名として  $S\_V$  とする。表 12.21 に示すのは、PRINT プロシジャによって、読みこんだデータが出力された結果である。

### SAS プログラム 12.5 線形変換

```
TITLE1 'ミカエリス Woolf. SAS 2023/02/27';
DATA d01;
    input No S V;
    S_V = S / V;
datalines;
1 2 65
2 5 362
3 10 581
4 20 686
5 80 985
;
proc print data=d01; run;
```

表 12.21 *Hanes-Woolf* 変換による解析用データファイルの出力

OBS	No	S	V	S_V
1	1	2	65	0.0308
2	2	5	362	0.0138
3	3	10	581	0.0172
4	4	20	686	0.0292
5	5	80	985	0.0812

非線形回帰による解析では、*Hanes-Woolf* 変換で用いられている回帰パラメータ  $\beta_0 = K_m / V_{max}$ 、 $\beta_1 = 1 / V_{max}$  ではなく、式 (12.2) に示されている  $V_{max}$  および  $K_m$  を model ステートメントでパラメータとして直接用いる。

### SAS プログラム 12.6 *Hanes-Woolf* 変換を非線形回帰で解く

```
proc nlin data=d01;
    parms Vmax = 1000 Km = 10;
    model S_V = Km / Vmax + (1 / Vmax) * S;
run;
```

表 12.22 に示す NLIN プロシジャの結果は、表 12.7 に示した *Hanes-Woolf* 変換式によるパラメータ推定の結果と完全に一致することが確かめられる。分散分析表の「Error」の平方和と



表 12.22 SAS の NLIN プロシジャによるの *Hanes-Woolf* 変換式によるパラメータ推定

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値	近似Pr > F
Model	1	0.00268	0.00268	30.17	0.0119
Error	3	0.000267	0.000089		
Correcte	4	0.00295			
パラメー	推定値	近似標準	近似 95% 信頼限界		
Vmax	1249.4	227.5	525.5	1973.3	
Km	19.6205	9.4405	-10.4233	49.6643	
近似相関行列					
	Vmax	Km			
Vmax	1	0.829621			
Km	0.829621	1			

平均平方は、残差平方和  $S_e = 2.67E-04$ 、誤差分散の推定値  $\sigma^2 = 8.90E-05$  のように一致する。  $\hat{V}_{max}$  および  $\hat{K}_m$  も

表 12.7 右下段の再掲

	推定値	SE	L 95%	U 95%
$V_{max} = 1/\beta^{\wedge}_1 =$	1249.38	227.45	525.53	1973.24
$K_m = \beta^{\wedge}_0/\beta^{\wedge}_1 =$	19.62	9.44	-10.42	49.66

のように完全に一致する。

線形化のための *Hanes-Woolf* 変換式に対して非線形回帰を適用すること自体はナンセンスなのであるが、線形回帰で推定されたパラメータの逆数 ( $1/\hat{\beta}_1$ ) あるいは比 ( $\hat{\beta}_0/\hat{\beta}_1$ ) の標準誤差を求める方法は、「知る人ぞ知る、合成分散の一般式 (デルタ法)」方法なので、Excel による計算結果が正しいのか検証するために例示した。

### 誤差の伝播の公式を用いた傾き $\hat{\beta}_1$ の逆数の標準誤差

表 12.7 で *Hanes-Woolf* 変換式で求めた回帰係数の傾き  $\hat{\beta}_1$  の逆数が、 $\hat{V}_{max}$  となることを示した。さて、表 12.22 では、 $\hat{V}_{max}$  の推定値は 1249.4、標準誤差は 227.5 となっている。表 12.7 および式 (12.21) から、傾き  $\hat{\beta}_1$  の推定値は 0.0008004、標準誤差は 0.000146 が読み取れる。推定値の逆数は、 $\hat{V}_{max} = 1/0.0008004 = 1249.4$  と SAS の結果に一致する。さて、 $\hat{V}_{max}$  の標準誤差と  $\hat{\beta}_1$  の関係はどのように説明したらよいのであろうか。式 (12.24) を整理すると誤差伝播の公式を適用することにより、 $\hat{V}_{max} = 1/\hat{\beta}_1$  の標準誤差が

$$\begin{aligned}
 SE(1/\hat{\beta}_1) &= \sqrt{\left(\frac{\partial(1/\hat{\beta}_1)}{\partial\hat{\beta}_1}\right)^2 \cdot SE(\hat{\beta}_1)^2} = \sqrt{\left(\frac{-1}{\hat{\beta}_1^2}\right)^2 \cdot SE(\hat{\beta}_1)^2} \\
 &= \sqrt{\left(\frac{-1}{0.0008004^2}\right)^2 \times 0.0001457^2} = 227.45
 \end{aligned} \tag{12.28}$$

のように求めることができる。

12.3. ミカエリス・メンテン式に基づく阻害定数  $K_i$  の推定

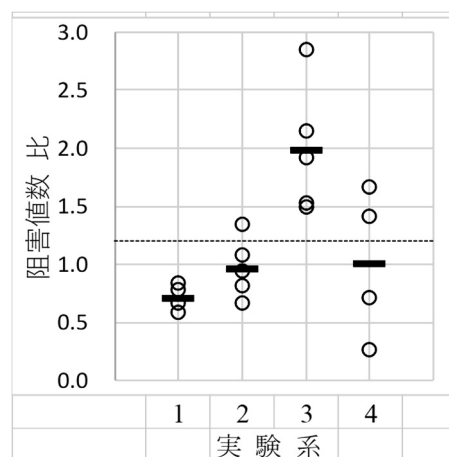
ミカエリス・メンテン式で示される酵素反応曲線は、基質濃度  $[S]$  の増加に伴い単調増加し、反応速度  $V$  の最大値  $V_{max}$ ，および、 $V_{max}$  の2分の1となる基質濃度  $[S]$  としての  $K_m$ （ミカエリス定数）によって定義されている．酵素阻害薬  $[I]$  を加えた場合に、基質  $[S]$  に対する酵素反応曲線にどのような変化が現れるか見極め定量化したい．

阻害定数  $K_i$  の推定方法による不一致

山崎ら（2008）は、「非線形回帰法によって薬理研究の精度は向上する — 酵素阻害薬の阻害定数の推定の事例 —」で、ミカエリス・メンテン式の最大値  $V_{max}$  に影響しないが、ミカエリス定数  $K_m$  にのみ影響を与える拮抗阻害薬について、a) SAS の NLIN プロシジャを用いた非線形回帰による阻害定数の推定値、b) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換を用いた 2 段階による推定値、の比較を行っている．表 12.23 は、4 種の実験系で 4～5 回の実験について a) および b) で推定された阻害定数  $K_i$  の比（b / a）を示している．同じ実験データを用いた統計量としての阻害定数  $K_i$  が、1/4 から 3 倍弱と大きく異なり、どちらの阻害定数  $K_i$  が正しいのか困惑している．方法 b) は、各種の阻害薬の濃度  $[I]$  ごとに異なる  $V_{max}$  を推定しているのに対し、方法 a) は、阻害薬の各濃度で共通の  $V_{max}$  を使っていることから、方法 a) が良い推定値が得られると確信している．しかし、どちらがより良い推定値なのかを判定する決め手がないので、モンテカルロ法による定量的な性能比較を行っている．その結果、方法 b) には、*Michaelis-Menten* モデルに整合しない推定値が得られることがあり、推定精度が一般に方法 a) に劣り、さらに b) は、極端に偏って推定された値が得られることがあることを結論付けている．

表 12.23 2 種類の推定方法で得られた阻害定数  $K_i$  の比

実験番号	実験系 1	実験系 2	実験系 3	実験系 4
1	0.666	0.663	1.49	0.264
2	0.776	0.946	2.15	1.41
3	0.589	0.816	1.92	0.712
4	0.835	1.08	1.53	1.67
5		1.34	2.85	
平均	0.7165	0.969	1.988	1.014
総平均	1.2059			
	山崎ら(2008)の表2の「推定値の比」を引用			
	比 = b)両逆数 / a)非線形			

図 12.8 2 種類の推定方法で得られた阻害定数  $K_i$  の比

ミカエリス・メンテン式によるパラメータの推定には、各種の線形化による方法よりも非線形回帰による推定が望ましいと言われているが、現実には各種の線形化によるミカエリス定数  $K_m$  の推定が使われ続けている。非線形回帰を適用したいと思っても、何らかの統計ソフトの使用が前提とされていることが、敬遠される原因であるに違いない。第 12.1 節では、統計ソフトに頼らずとも身近な Excel で、非線形回帰によるミカエリス定数  $K_m$  の推定および酵素反応曲線の 95%信頼区間の推定が簡単にできることを示した。

### 酵素阻害実験データ

表 12.24 に示すのは、阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  を設定し、基質濃度  $[S]_j$  を変化させた場合の反応速度  $V_{ijk}$  のデータである。実験計画法的には、繰り返しが 3 の量×量の 2 因子実験データとなっているが、一般的な分散分析の適用ではなく、ミカエリス・メンテン式の適用が求められている。伝統的には、解析の第 1 段階とし、阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス・メンテン式の各種の線形化式により、最大値  $(V_{max})_i$ 、および、最大値の 2 分の 1 となる基質の濃度であるミカエリス定数  $(K_m)_i$  を推定する。第 2 段階として、阻害薬 A がいない場合  $[I]_0$  のミカエリス定数  $(K_m)_0$  の 2 倍となる阻害薬 A の濃度  $[I]$  を阻害定数  $(K_i)$  として推定したい。

表 12.24 阻害薬 A の濃度別の反応速度  $V$  の変化

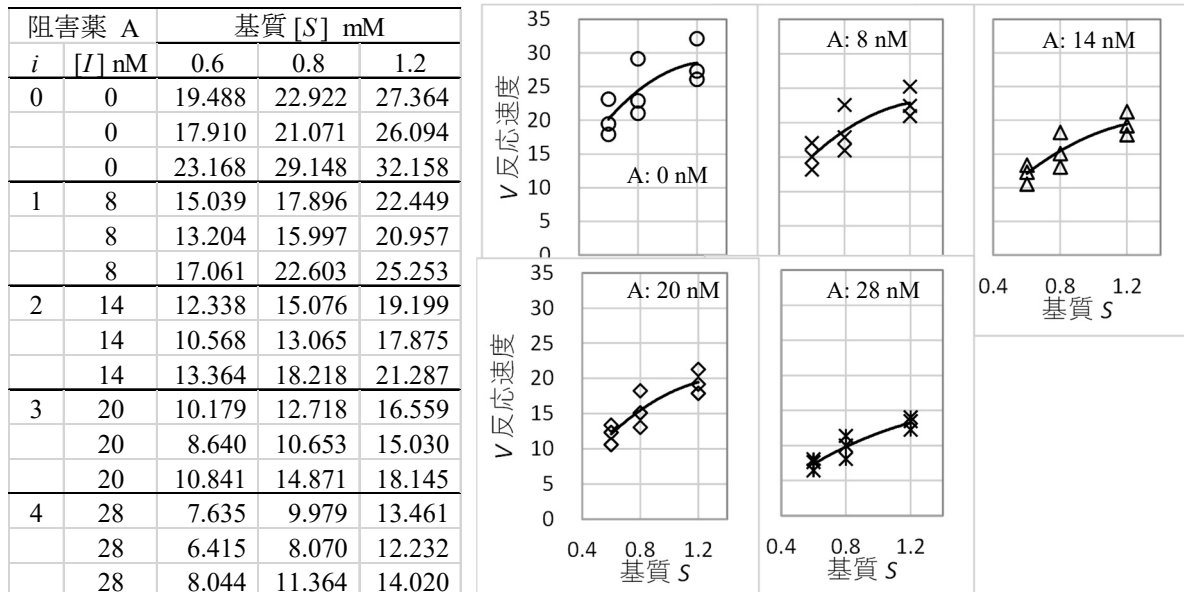


図 12.9 阻害薬 A の濃度別の反応速度  $V$  の変化

阻害薬の酵素反応に対する作用は、(1)  $V_{max}$  は変化しないが  $K_m$  を増加させる、(2)  $K_m$  は変化しないが  $V_{max}$  を減少させる、(3)  $V_{max}$  と  $K_m$  を同じ割合で減少させる、(4)  $K_m$  の増加と共に  $V_{max}$  が減少する、の 4 種類の阻害様式に分類できることが知られている。図 12.9 の阻害薬 A の濃度  $[I]$  を増加させた場合のデータのプロットからは、 $V_{max}$  と  $K_m$  がどのよ

うに変化するか、はっきりしないので、それぞれの濃度別に、 $(Vmax)_i$  と  $(Km)_i$  を推定することにより、(1) から (4) で示した阻害様式となるかの見当が付けられる。

阻害様式が、(1) の拮抗阻害であると確認されれば、表 12.25 に示すように、阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  別の  $(Vmax)_i$  ではなく、共通の  $(Vmax)^{共通}$  とした場合の  $(Km)'_i$  の推定を行なうことにより推定精度の向上が期待できる。また、阻害薬 A の濃度に比例して  $(Km)'_i$  の増加が確認できれば、阻害薬 A がいない場合  $[I]_0$  の  $(Km)'_0$  を基準とし、阻害定数  $(Ki)^{共通}$  を用いて阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  に比例する式に置き換えることができる。

表 12.25 拮抗阻害薬 A の添加によるミカエリス・メンテン式によるパラメータ推定

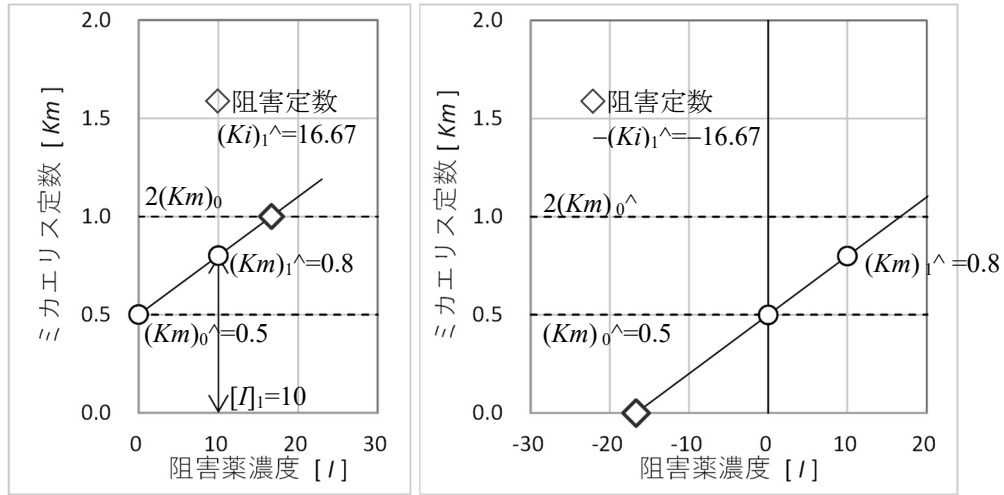
No	阻害薬 A (nM)	基質 [S] mM		基質 [S] mM		基質 [S] mM	
		個別に推定		共通 $Vmax$		共通 $Vmax$ , $(Km)$ が濃度 $[I]$ に比例	
$i$	濃度 $[I]$	$(Vmax)$	$(Km)$	$(Vmax)$	$(Km)$	$(Vmax)$	$(Km)$
0	0	$(Vmax)_0$	$(Km)_0$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0$
1	8	$(Vmax)_1$	$(Km)_1$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_1$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0 + (Km)'_0 \frac{[I]_1}{[I]_0 (Ki)^{共通}}$
2	14	$(Vmax)_2$	$(Km)_2$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_2$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0 + (Km)'_0 \frac{[I]_2}{[I]_0 (Ki)^{共通}}$
3	20	$(Vmax)_3$	$(Km)_3$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_3$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0 + (Km)'_0 \frac{[I]_3}{[I]_0 (Ki)^{共通}}$
4	28	$(Vmax)_4$	$(Km)_4$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_4$	$(Vmax)^{共通}$	$(Km)'_0 + (Km)'_0 \frac{[I]_4}{[I]_0 (Ki)^{共通}}$

### 阻害定数 $Ki$ の推定方法

一般的な実験データの解析においては、制御変数  $X$  に対する反応  $Y$  の変化の推定が主体となるが、酵素阻害の実験では、ある一定の反応  $Y_0$  となる濃度  $X_0$  を逆推定することが目的となる。ミカエリス定数  $(Km)_i$  の推定も制御変数である基質濃度  $[S]$  に対する逆推定値であり、まず、阻害薬 A がいない  $[I]_0=0$  場合のミカエリス定数  $(Km)_0$  を推定する。次に、ある阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  に対するミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定する。これらの関係から、 $(Km)_0$  の 2 倍となる阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  における阻害定数  $(Ki)_i$  を逆推定したい。

阻害定数  $(Ki)_i$  の推定方法を手順化するために、簡単な数値を与えて例示する。阻害薬 A の濃度が  $[I]_0=0$  nM の場合にミカエリス定数として  $(\widehat{Km})_0=0.50$  mM, 阻害薬 A の濃度が  $[I]_1=10$  nM の場合にミカエリス定数として  $(\widehat{Km})_1=0.80$  mM が得られたとする。ミカエリス定数  $(\widehat{Km})_0$  を 2 倍にする阻害薬 A の濃度  $[I]_1$  に対応する阻害定数  $(Ki)_1$  を推定したい。これらの数値を図 12.10 左に示す散布図にプロットする。2 点を結ぶ回帰直線の式は、切片を  $(Km)_0$ 、傾きを  $\{(Km)_1 - (Km)_0\} / [I]_1$  とする回帰式

$$(Km) = (Km)_0 + \frac{(Km)_1 - (Km)_0}{[I]_1} \cdot [I] \quad (12.29)$$

図 12.10 逆推定による阻害定数  $K_i$  の推定および X 切片による負の阻害定数  $K_i$  の推定

となる．この式で，ミカエリス定数  $(Km)_1$  が  $2 \times (Km)_0$  となる酵素阻害薬の濃度  $[I]$  を逆推定したい．そこで， $(Km)_1$  に  $2 \times (Km)_0$  を代入して  $[I]$  について解き， $[I]$  を  $(Ki)_1$  とおくと

$$\left. \begin{aligned} 2 \times (Km)_0 &= (Km)_0 + \frac{(Km)_1 - (Km)_0}{[I]_1} \cdot [I] \\ (\widehat{Ki})_1 &= \frac{(\widehat{Km})_0 \cdot [I]_1}{(\widehat{Km})_1 - (\widehat{Km})_0} \\ &= \frac{0.5 \times 10.0}{0.8 - 0.5} = 16.67 \text{ nM} \end{aligned} \right\} \quad (12.30)$$

阻害定数  $(\widehat{Ki})_1 = 16.67 \text{ nM}$  が得られる．阻害定数  $(Ki)_1$  をグラフ上の目盛りを読んで推定したい場合には，図 12.10 右に示すように X 軸の切片が  $-(Ki)_1$  となる．式 (12.29) で  $(Km) = 0$  を代入し，式 (12.30) を適用すれば，

$$[I] = -\frac{(Km)_0 \cdot [I]_1}{(Km)_1 - (Km)_0} = -(Ki)_1 \quad (12.31)$$

負の  $(\widehat{Ki})$  が推定される．この方法は，厄介な計算をせずとも方眼紙の目盛りから読み取ることができる利便性がある．

式 (12.29) でミカエリス定数  $(Km)_i$  が  $2 \times (Km)_0$  となる阻害薬の濃度を  $[I] = (Ki)_i$  と定義し，阻害薬の濃度を  $[I]_i$  におけるミカエリス定数を  $(Km)_i$  とする．この式を  $(Km)_i$  で解くと

$$\left. \begin{aligned} 2 \times (Km)_0 &= (Km)_0 + \frac{(Km)_i - (Km)_0}{[I]_i} \cdot (Ki)_i \\ (Km)_i &= (Km)_0 + \frac{(Km)_0 \cdot [I]_i}{(Ki)_i} \\ (Km)_i &= (Km)_0 \left( 1 + \frac{[I]_i}{(Ki)_i} \right) \end{aligned} \right\} \quad (12.32)$$

が得られる．この式は，ミカエリス定数  $(Km)_i$  を阻害薬の濃度  $[I]_i$  および阻害定数  $(Ki)_i$  を用いた式として定義できる．

阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス・メンテン式をあてはめた場合には、推定されるパラメータ数は  $(2 \times 5 = 10)$  であり、 $V_{max}$  を共通にした場合には  $(1 + 5 = 6)$  となる。阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  に対し共通の阻害定数  $(K_i)^{\text{共通}}$  をパラメータとして用いた場合には、3 パラメータ  $\{(V_{max})^{\text{共通}}, (K_m)_0^{\text{共通}}, (K_i)^{\text{共通}}\}$  で、表 12.24 に示した阻害薬 A に関する実験データを要約することができる。

### 両逆数・Lineweaver-Burk 変換によるミカエリス定数 $(K_m)_i$ の推定

表 12.24 に示したデータについて、第 1 ステップとして阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとに両逆数変換による  $(V_{max})_i$  および  $(K_m)_i$  の推定を行い、第 2 ステップとして阻害定数  $(K_i)^{\text{回帰}}$  の推定を行なう。両逆数変換による推定は、表 12.5 に示したように、基質濃度の逆数  $1/[S]$ 、反応速度の逆数  $1/V$  を Excel の計算シート上で計算し、推定された回帰パラメータ  $\hat{\beta}_0$  と  $\hat{\beta}_1$  から、 $(\widehat{V_{max}})_i = 1/\hat{\beta}_0$ 、 $(\widehat{K_m})_i = \hat{\beta}_1/\hat{\beta}_0$  を推定する。

表 12.26 に阻害薬の添加がない  $[I]_0 = 0$  場合についての両逆数変換による回帰パラメータ推定のための計算シートを示す。基質濃度  $[S]$  の逆数、反応速度  $V$  の逆数を計算し、回帰パラメータの初期値  $\hat{\beta}_0 = 0.01$  および  $\hat{\beta}_1 = 0.01$  を用いて推定値  $(1/y) = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1(1/x_i)$  を計算する。さらに、残差  $\hat{\varepsilon}_i = (1/y_i) - (1/y_i)$  から、残差平方和  $S_e$  を計算する。Excel のソルバーを用いて、 $S_e$  が最小になるように  $(\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1)$  を変化させた結果が示されている。

$$\begin{aligned} (1/y) &= \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1(1/x_i) \\ &= 0.0202 + 0.0177 \cdot (1/x_i) \end{aligned} \quad (12.33)$$

推定されたパラメータから、

$$\left. \begin{aligned} (\widehat{V_{max}})_0 &= 1/\hat{\beta}_0 \\ &= 1/0.0202 = 49.4209 \\ SE[(\widehat{V_{max}})_0] &= \sqrt{d_{V_{max}} \Sigma(\hat{\beta}) d_{V_{max}}^T} = 16.7360 \end{aligned} \right\} \quad (12.34)$$

表 12.26 阻害薬 A なし  $[I]_0 = 0$  の場合のミカエリス定数の推定

初期値 $\beta^{\wedge}_0=$		0.01		$\beta^{\wedge}_0=$	<b>0.0202</b>	$\sigma^{\wedge 2}=$	2.91E-05		$\Sigma(\beta^{\wedge})=(X^T X)^{-1} \sigma^2^{\wedge}$	分散		
	$\beta^{\wedge}_1=$	0.01		$\beta^{\wedge}_1=$	<b>0.0177</b>	$S_e=$	<b>0.0002</b>		$\beta^{\wedge}_0=$	<b>4.70E-05</b>	-3.50E-05	4.70E-05
A薬	基質	反応		1/[S]	1/V	推定値	残差		$\beta^{\wedge}_1=$	<b>-3.50E-05</b>	<b>2.80E-05</b>	2.80E-05
[I]	[S]	V	$x_0$	1/x	1/y	(1/y)^^	$\varepsilon^{\wedge}$					
0	0.6	19.488	1	1.6667	0.0513	0.0498	0.0015				推定値	SE
0	0.6	17.910	1	1.6667	0.0558	0.0498	0.0060		$\beta^{\wedge}_0=1/Vmax=$	0.0202	0.0069	
0	0.6	23.168	1	1.6667	0.0432	0.0498	-0.0066		$\beta^{\wedge}_1=Km/Vmax=$	0.0177	0.0053	
0	0.8	22.922	1	1.2500	0.0436	0.0424	0.0012			$d_1: \partial \beta^{\wedge}_0$	$d_2: \partial \beta^{\wedge}_1$	
0	0.8	21.071	1	1.2500	0.0475	0.0424	0.0051		$Vmax=1/\beta^{\wedge}_0=$	-2442.51	0	
0	0.8	29.148	1	1.2500	0.0343	0.0424	-0.0081		$Km=\beta^{\wedge}_1/\beta^{\wedge}_0=$	-43.3273	49.4218	
0	1.2	27.364	1	0.8333	0.0365	0.0350	0.0015			推定値	SE	
0	1.2	26.094	1	0.8333	0.0383	0.0350	0.0033		$Vmax=1/\beta^{\wedge}_0=$	49.4218	16.7366	
0	1.2	32.158	1	0.8333	0.0311	0.0350	-0.0039		$Km=\beta^{\wedge}_1/\beta^{\wedge}_0=$	0.8767	0.5534	
										$SE=\sqrt{(d\Sigma(\beta^{\wedge})d^T)}$		

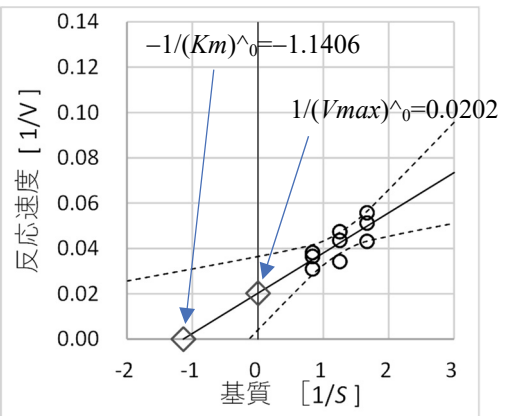
$$\left. \begin{aligned} (\widehat{Km})_0 &= \hat{\beta}_1 / \hat{\beta}_0 \\ &= 0.0177 / 0.0202 = 0.8767 \\ SE [(\widehat{Km})_0] &= \sqrt{\mathbf{d}_{Km} \boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\beta}}) \mathbf{d}_{Km}^T} = 0.5534 \end{aligned} \right\} \quad (12.35)$$

が計算されている．標準誤差  $SE$  の計算方法については，ここでは割愛するので表 12.5 に対する解説を参照のこと．

表 12.27 に示すのは，表 12.26 で計算された回帰係数  $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  による回帰直線の 95%信頼区間を計算した結果である．図 12.11 に示すのは，両逆数・Lineweaver-Burk 変換での回帰直線と 95%信頼区間を重ね書きし，Y 切片が  $1/(\widehat{Vmax})_0 = 0.0202$ ，X 切片が  $-1/(\widehat{Km})_0 = 1.1406$  となることを示している．

表 12.27 阻害薬 A なし  $[I]_0 = 0$  の 95%信頼区間

	X	Y				
$x_0$	$[1/S]$	$[1/V]^{\wedge}$	分散	$t_{0.05}SE$	L 95%	U 95%
1	-2.0	-0.0152	2.99E-04	0.0409	-0.0561	0.0256
1	-1.0	0.0025	1.45E-04	0.0285	-0.0260	0.0310
1	0.0	0.0202	4.70E-05	0.0162	0.0040	0.0364
1	0.5	0.0291	1.90E-05	0.0103	0.0188	0.0394
1	1.0	0.0380	4.99E-06	0.0053	0.0327	0.0433
1	1.5	0.0468	4.99E-06	0.0053	0.0416	0.0521
1	2.0	0.0557	1.90E-05	0.0103	0.0454	0.0660
1	2.5	0.0646	4.70E-05	0.0162	0.0484	0.0808
1	3.0	0.0735	8.89E-05	0.0223	0.0512	0.0957
			$t_{0.05}(9-2)=$	2.3646		

図 12.11 両逆数変換による  $[I]_0 = 0$  の場合の 95%信頼区間

両逆数・Lineweaver-Burk 変換によるミカエリス定数  $(Km)_0$  の推定を方眼紙上で推定するような場合に，Y 軸の 0 となる点（X 切片）を読んで，その点が  $-1/(Km)_0$  となることは，式 (12.2) で  $(1/V)=0$  と置いて， $(1/S)$  について解くと

$$\left. \begin{aligned} \frac{1}{V} &= \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} \\ \frac{1}{[S]} &= -\frac{1}{V_{max}} \cdot \frac{V_{max}}{K_m} = -\frac{1}{K_m} \end{aligned} \right\} \quad (12.36)$$

となることから簡単に確認できる．

表 12.26 は，Excel で作成してあるので，阻害薬 A の他の濃度の基質  $[S]$  および反応速度  $V$  に入れ替え，ソルバーで残差平方和を  $S_e$  を最小化させると，全ての計算が自動的に行なわれる．表 12.28 には，阻害薬 A の濃度  $[I]_2 = 14$  の場合についての計算結果が示されている．

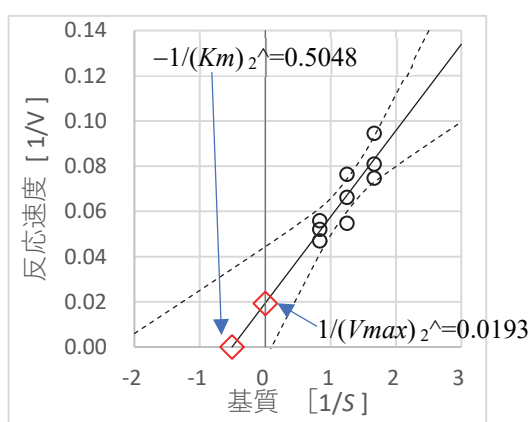
表 12.28 阻害薬 A の  $[I]_2=14$  の場合のミカエリス定数の推定

初期値 $\beta^{\wedge}_0=$		0.01		$\beta^{\wedge}_0=$	<b>0.0193</b>	$\sigma^{\wedge^2}=$	6.94E-05		$\Sigma(\beta^{\wedge})=(X^T X)^{-1} \sigma^{\wedge^2}$	分散	
	$\beta^{\wedge}_1=$	0.01		$\beta^{\wedge}_1=$	<b>0.0382</b>	$S_e=$	<b>0.0005</b>	$\beta^{\wedge}_0=$	<b>1.12E-04</b>	-8.32E-05	1.12E-04
A薬	基質	反応		1/[S]	1/V	推定値	残差	$\beta^{\wedge}_1=$	-8.32E-05	<b>6.66E-05</b>	6.66E-05
[I]	[S]	V	$x_0$	1/x	1/y	(1/y)^^	$\varepsilon^{\wedge}$				
14	0.6	12.338	1	1.6667	0.0811	0.0829	-0.0019			推定値	SE
14	0.6	10.568	1	1.6667	0.0946	0.0829	0.0117	$\beta^{\wedge}_0=1/Vmax=$		0.0193	0.0106
14	0.6	13.364	1	1.6667	0.0748	0.0829	-0.0081	$\beta^{\wedge}_1=Km/Vmax=$		0.0382	0.0082
14	0.8	15.076	1	1.2500	0.0663	0.0670	-0.0007			$d_1: \partial \beta^{\wedge}_0$	$d_2: \partial \beta^{\wedge}_1$
14	0.8	13.065	1	1.2500	0.0765	0.0670	0.0095	$Vmax=1/\beta^{\wedge}_0=$		-2689.57	0
14	0.8	18.218	1	1.2500	0.0549	0.0670	-0.0121	$Km=\beta^{\wedge}_1/\beta^{\wedge}_0=$		-102.737	51.86108
14	1.2	19.199	1	0.8333	0.0521	0.0511	0.0010			推定値	SE
14	1.2	17.875	1	0.8333	0.0559	0.0511	0.0048	$Vmax=1/\beta^{\wedge}_0=$		51.8611	28.4336
14	1.2	21.287	1	0.8333	0.0470	0.0511	-0.0041	$Km=\beta^{\wedge}_1/\beta^{\wedge}_0=$		1.9810	1.4986

推定結果は、 $(\widehat{Vmax})_2 = 1/0.0193 = 51.8611$ 、 $(\widehat{Km})_2 = 0.0382/0.0193 = 1.9810$  であり、さらに、標準誤差  $SE[(\widehat{Vmax})_2] = 28.4336$ 、 $SE[(\widehat{Km})_2] = 1.4986$  も計算されている。表 12.29 に示すのは、表 12.28 で計算された回帰係数  $\hat{\beta}_0$  および  $\hat{\beta}_1$  による回帰直線の 95%信頼区間を計算した結果である。図 12.12 に示すのは、両逆数・Lineweaver-Burk 変換での回帰直線と 95%信頼区間を重ね書きし、Y 切片が  $1/(Vmax)_2$ 、X 切片が  $-1/(Km)_2$  となることを示している。

表 12.29 阻害薬 A  $[I]_2=14$  nM の 95%信頼区間

	X	Y				
$x_0$	$[1/S]$	$[1/V]^{\wedge}$	分散	$t_{0.05}SE$	L 95%	U 95%
1	-2.0	-0.0571	7.11E-04	0.0631	-0.1202	0.0059
1	-1.0	-0.0189	3.45E-04	0.0439	-0.0628	0.0250
1	0.0	0.0193	1.12E-04	0.0250	-0.0057	0.0443
1	0.5	0.0384	4.52E-05	0.0159	0.0225	0.0543
1	1.0	0.0575	1.19E-05	0.0081	0.0493	0.0656
1	1.5	0.0766	1.19E-05	0.0081	0.0684	0.0847
1	2.0	0.0957	4.52E-05	0.0159	0.0798	0.1116
1	2.5	0.1148	1.12E-04	0.0250	0.0898	0.1398
1	3.0	0.1339	2.12E-04	0.0344	0.0995	0.1683
			$t_{0.05}(9-2)=$	2.3646		

図 12.12 両逆数変換による  $[I]_2=14$  の場合の 95%信頼区間

同様に、他の阻害薬の濃度に対しても計算を繰り返し、 $(Vmax)_i$  と  $(Km)_i$  を Excel シート上の別の表にコピー&ペーストし、その結果を表 12.30 に示す。推定された  $(Km)_i$  それぞれに対し  $(Km)_0$  の 2 倍となる阻害定数  $(Ki)_i$  を式 (12.30) を用いて推定することができる。

表 12.30 に示すように反応速度  $V$  の最大値  $Vmax$  は、阻害薬 A の濃度が 20 nM までは、およそ 50 で安定した推定値になっているが、28 nM の場合は、50 を大幅に超える 72.8 となっている。ただし、その  $SE$  は 91.4 であり、推定精度は極めて悪いが、全体的には、最大値



表 12.30 阻害薬 A の濃度別の反応速度  $(V_{max})_i$  およびミカエリス定数  $(K_m)_i$  の推定結果

$i$	A薬 [I]	最大反応速度		ミカエリス定数		阻害定数 ( $K_i$ )
		( $V_{max}$ )	SE	( $K_m$ )	SE	
0	0	49.4209	16.7360	0.8767	0.5534	—
1	8	48.6683	21.3948	1.3429	0.9221	15.04
2	14	51.8610	28.4334	1.9810	1.4986	11.11
3	20	53.2052	36.5593	2.6430	2.3321	9.93
4	28	72.8533	91.4534	5.3564	7.6631	5.48
	平均	55.2017				10.39
	SD	10.0353				3.94
$(K_i)_i = \{(K_m^*)_0 / [(K_m^*)_i - (K_m^*)_0]\} * [I]_i$						

$V_{max}$  は一定と仮定できそうである。ミカエリス定数  $(K_m)_i$  は、阻害薬の濃度におおよそ比例しているとみなせるので、拮抗阻害と判断することができる。ただし阻害薬の濃度ごとの推定された阻害定数  $(K_i)_i$  は、一定せず“定数”として受け入れ難い結果である。

### 阻害定数 $K_i$ の揺らぎの実際

図 12.13 に示すのは、阻害薬の3段階の濃度  $\{[I]_0=0, [I]_2=14, [I]_4=28\}$  を選択し、推定された  $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  を用い、基質  $[S]$  の濃度を与えて反応速度  $V$  を推定した結果を対数目盛によるミカエリス・メンテン曲線（2パラメータ・ロジスティック曲線）である。

表 12.31 阻害薬 A の濃度  $[I]$  別の反応速度  $V$  の推定値

基質	反応 $V$		
[S]	[I] <sub>0</sub> =0	[I] <sub>2</sub> =14	[I] <sub>4</sub> =28
0.01	0.56	0.26	0.14
0.03	1.64	0.77	0.41
0.1	5.06	2.49	1.34
0.3	12.60	6.82	3.86
1	26.33	17.40	11.46
3	38.25	31.24	26.15
10	45.44	43.29	47.44
30	48.02	48.65	61.82
100	48.99	50.85	69.15
1000	49.38	51.76	72.47
10000	49.42	51.85	72.81

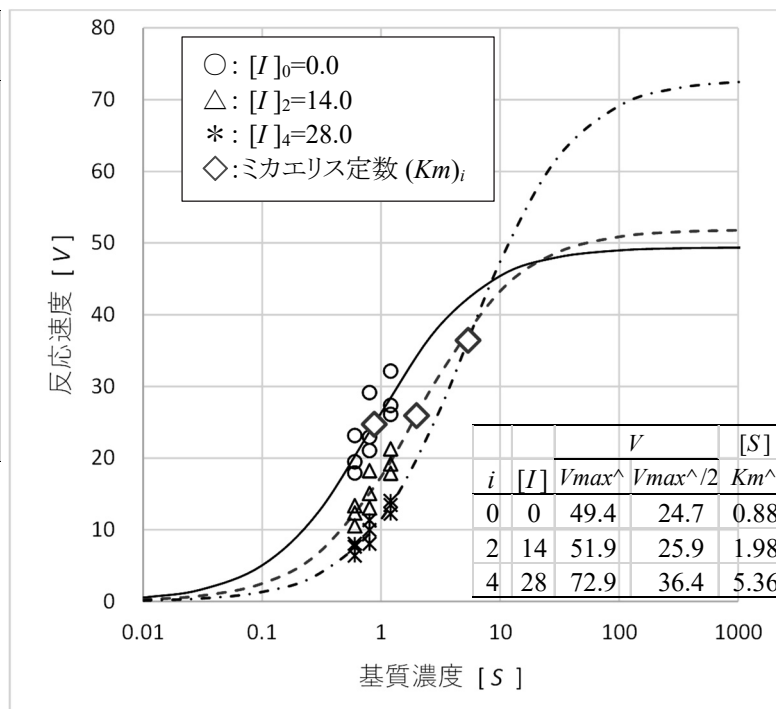
図 12.13 阻害薬 A の濃度  $[I]$  別の対数目盛によるミカエリス・メンテン曲線

表 12.30 で計算された阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  ごとの阻害定数  $(\widehat{K_i})_i$  は、図 12.14 左に示すように、推定された  $(\widehat{K_m})_0 = 0.8767$  とそれぞれの  $(\widehat{K_m})_i$  を結ぶ直線を引き、 $(\widehat{K_m})_0$  の 2 倍となる参照線を横切る点が阻害定数  $(\widehat{K_i})_i$  として推定される。図 12.14 右には、Excel の近似直線で推定された回帰直線  $(\widehat{K_m}) = 0.3123 + 0.1520 \cdot [I]$  が示されており、切片の 2 倍となる参照線を回帰直線が横切る点を阻害定数  $(\widehat{K_i})^{\text{回帰}}$  とすると、

$$\left. \begin{aligned} 2 \times 0.3123 &= 0.3123 + 0.1520 \cdot (\widehat{K_i})^{\text{回帰}} \\ (\widehat{K_i})^{\text{回帰}} &= \frac{0.3123}{0.1520} = 2.0546 \end{aligned} \right\} \quad (12.37)$$

それぞれの阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとの阻害定数  $(\widehat{K_i})_i$  の最小値を下回ってしまう。図 12.14 左から、 $(\widehat{K_m})_0 = 0.8767$  を通る阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとの直線をあてはめ、X 切片と交差する点を推定し、表 12.30 に示したように、それらの平均の阻害定数を  $(\widehat{K_i})^{\text{平均}} = 10.39$  と推定値する方が、妥当と思われる。

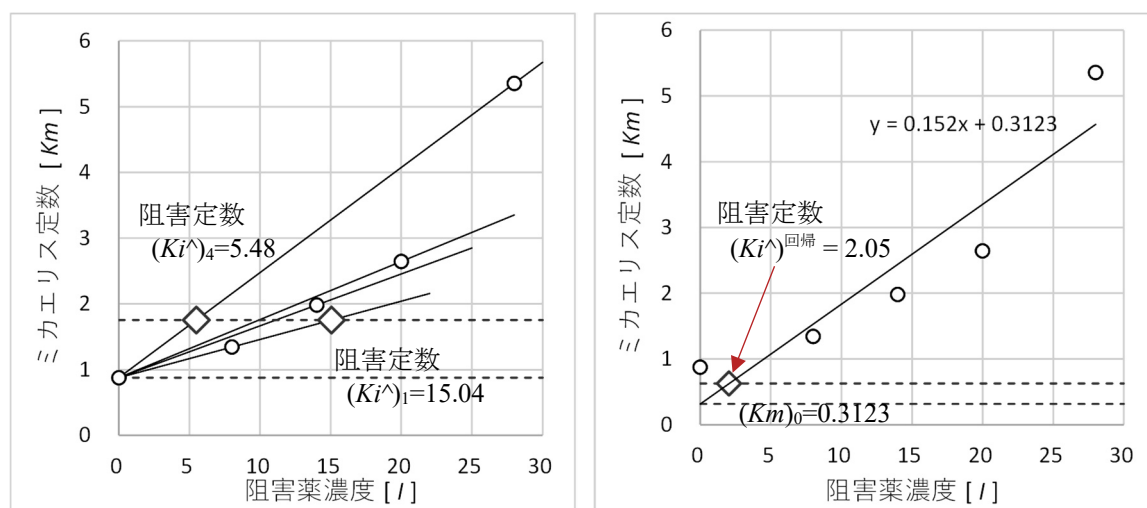


図 12.14 推定されたミカエリス定数  $(\widehat{K_m})_i$  を用いた阻害定数  $(\widehat{K_i})$  の推定

### 傾き $(K_m)_i / (V_{max})_i$ を用いた阻害定数 $K_i$ の推定

両逆数・Lineweaver-Burk 変換による  $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  の推定に引き続き、阻害定数  $(K_i)$  を推定する場合に、図 12.14 右に示した Y 軸にミカエリス定数  $(K_m)_i$  を用いるのではなく、推定された回帰直線の傾き  $(\beta_1)_i = (K_m)_i / (V_{max})_i$  に対して回帰直線をあてはめて阻害定数  $(K_i)$  を推定する方法が定式化されている。

図 12.13 に示すように、阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとの  $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  を推定した場合に、 $(V_{max})_i$  が大きめに推定されると  $(V_{max})_i / 2$  となる基質濃度である  $(K_m)_i$  も大きめに推定され、逆に  $(V_{max})_i$  が小さめに推定されると  $(K_m)_i$  も小さめに推定される。そのために  $(K_m)_i$  の推定値が不安定になる。 $(K_m)_i$  を  $(V_{max})_i$  で割ることにより  $(V_{max})_i$  の影響を補正するこ

となる。幸い、式 (12.2) に示したように両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換の回帰式の傾きが  $(\beta_1)_i = (Km)_i / (Vmax)_i$  であり、 $(\beta_1)_i$  を反応とみなすことにより、阻害薬の濃度  $[I]_i$  に関する回帰直線から、図 12.14 右に示したと同様の方法で、阻害定数  $(Ki)^{\text{回帰}}$  の推定が可能となる。

表 12.32 に示すのは、表 12.26 および表 12.28 に示した阻害薬濃度  $[I]_0 = 0$  および  $[I]_2 = 14$  に示した反応速度  $V$  に対する基質濃度  $[S]$  による回帰直線の切片  $(\hat{\beta}_0)_i = 1/(\widehat{Vmax})_i$  と傾き  $(\hat{\beta}_1)_i = (\widehat{Km})_i / (\widehat{Vmax})_i$  に加え、他の阻害薬濃度についての計算結果をまとめ直した結果である。さらに、表 12.30 に示した、阻害薬濃度ごとの阻害定数  $(\widehat{Ki})_i$  も求めている。

表 12.32 両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換による阻害薬濃度別の阻害定数  $(Ki)_i$  の推定

No. $i$	A薬 $[I]$	切片 $(1/Vmax)_i$		傾き $(Km)_i / (Vmax)_i$				阻害定数 $(Ki)_i$
		$\hat{\beta}_0$	$SE(\hat{\beta}_0)$	$\hat{\beta}_1$	$SE(\hat{\beta}_1)$	$L95\%$	$U95\%$	
0	0	0.0202	0.0069	<b>0.0177</b>	0.0053	0.0052	0.0302	—
1	8	0.0205	0.0090	<b>0.0276</b>	0.0070	0.0111	0.0441	14.40
2	14	0.0193	0.0106	<b>0.0382</b>	0.0082	0.0189	0.0575	12.14
3	20	0.0188	0.0129	<b>0.0497</b>	0.0100	0.0261	0.0732	11.11
4	28	0.0137	0.0172	<b>0.0735</b>	0.0133	0.0421	0.1050	8.90
	平均	0.0185		$t_{0.05}(9-2)=$	2.3646			11.64
	SD	0.0028						2.28
$(\widehat{Ki})_i = \{(\hat{\beta}_1)_0 / [(\hat{\beta}_1)_i - (\hat{\beta}_1)_0]\} * [I]_i$								

図 12.15 に示すのは、表 12.32 の傾き  $(\hat{\beta}_1)_i = (\widehat{Km})_i / (\widehat{Vmax})_i$  についての阻害薬濃度  $[I]$  に関する回帰直線である。散布図上のそれぞれの点  $(\hat{\beta}_1)_i$  には、標準誤差が付随しているので、計算された 95%信頼区間を重ね書きしている。推定された回帰直線は、

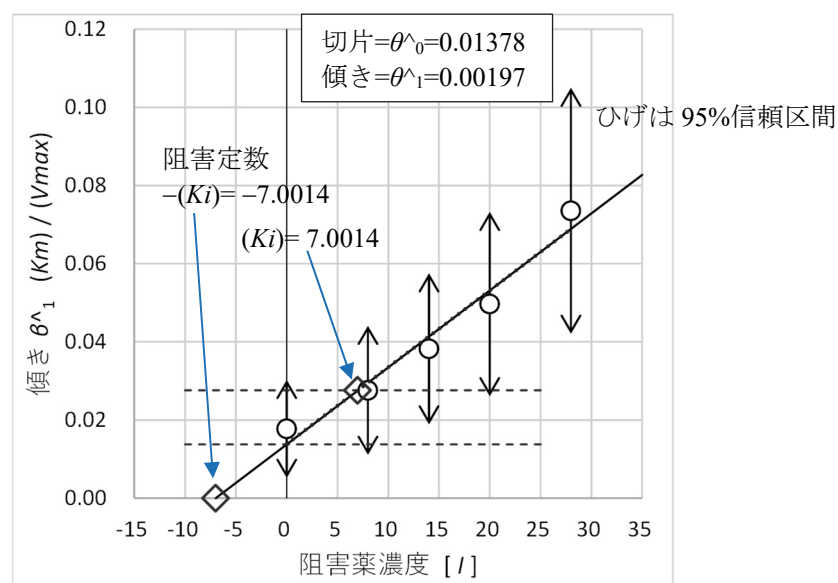


図 12.15 両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換の回帰式の傾きに対する阻害定数  $(Ki)$  の推定

$$\left[ \frac{(\widehat{Km})_i}{(\widehat{Vmax})_i} \right] = 0.01378 + 0.00197 \cdot [I] \quad (12.38)$$

であり、X 切片は、

$$\left. \begin{aligned} 0 &= 0.01378 + 0.00197 \cdot [I] \\ [I] &= \frac{-0.01378}{0.00197} = -7.0014 \end{aligned} \right\} \quad (12.39)$$

となるので、負の阻害定数  $-(\widehat{Ki})^{\text{回帰}} = -7.0014$  が得られる。推定された阻害定数は、 $(\widehat{Ki})^{\text{回帰}} = 7.0014$  であるが、阻害薬の濃度ごとに求めた最小の  $(\widehat{Ki})_4 = 8.90$  よりも小さく、どのように解釈したら良いのであろうか。

推定された阻害定数  $(\widehat{Ki})^{\text{回帰}} = 7.0014$  の 95%信頼区間を求めたいが、どうしたら求められるのであろうか。図 12.15 に示した回帰直線で推定されたパラメータの比から  $(\widehat{Ki})^{\text{回帰}}$  が推定されているので、式 (12.18) および式 (12.19) に示したようにパラメータの共分散行列  $\Sigma(\hat{\theta})$  に対する 2 次形式による  $\text{Var}(\widehat{Ki})$  を適用すれば良いと思われる。しかしながら、元のデータは、推定された傾き  $(\hat{\beta}_1)_i$  には、図 12.15 に示したような“揺らぎ”があり、これを考慮した重み付き回帰を適用することも考えられるが、95%信頼区間が広がり推定値精度が悪いことを示すことにしかならない。

このように、両逆数・Lineweaver-Burk 変換のみならず線形変換に基づく阻害定数  $(Ki)$  の推定は、いずれにしても「推定に推定を重ねる」ことになり、推定精度の劣化が免れない。実験で得られたデータの平均値に対し、その 95%信頼区間を示すことは当然のことと思うのであが、線形変換で求められたミカエリス定数の推定値  $(\widehat{Km})$  に対し、95%信頼区間を示すことすら一般化していない。

阻害定数の推定値  $(\widehat{Ki})$  についても 95%信頼区間の計算方法を例示したいと思うのであるが、「推定に推定を重ねる」ことになり、推定誤差を考慮した重み付き回帰を適用する必要があり、複雑な式となり実用性に欠けるために、深入りしないことにする。ただし、阻害定数  $(Ki)$  を直接推定するための計算式は知られており、非線形回帰を適用することにより、95%信頼区間を得ることができるので、Excel を用いた計算方法を第 12.5 節で詳しく示す。

12.4. 最大反応  $V_{max}$  を共通とした場合の阻害定数  $K_i$  の推定

## (1, 1) 標示型ダミー変数の設定

表 12.30 に示したように、それぞれの阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとの推定された  $(\widehat{Km})_i$  の標準誤差  $SE$  が極めて大きくなっているのは、基質濃度  $[S]$  の設定が、わずか 3 点しかないにもかかわらず、 $(V_{max})_i$  と  $(Km)_i$  の 2 つのパラメータの推定を試みているためである。もちろん、 $(V_{max})_i$  が共通と仮定できるか否かの検討のためには必要ではある。 $(V_{max})_i$  が阻害薬の濃度  $[I]_i$  に関わらず一定であると仮定できる場合に、阻害薬の濃度  $[I]_i$  に共通の最大反応  $(V_{max})^{\text{共通}}$  とした場合の  $(Km)'_i$  を推定したい。阻害薬の濃度ごとの  $(Km)'_i$  を推定するために、表 12.33 に示すように (1, 1) 標示型ダミー変数を設定する。

表 12.33 阻害薬 A の濃度別 (1, 1) 標示型ダミー変数

$i$	阻害薬 A 濃度 $[I]$	$(V_{max})$	$(Km)'$	(1, 1) 標示型ダミー変数 $a_i$				
				$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$
0	0	$(V_{max})^{\text{共通}}$	$(Km)'_0$	1	0	0	0	0
1	8	$(V_{max})^{\text{共通}}$	$(Km)'_1$	0	1	0	0	0
2	14	$(V_{max})^{\text{共通}}$	$(Km)'_2$	0	0	1	0	0
3	20	$(V_{max})^{\text{共通}}$	$(Km)'_3$	0	0	0	1	0
4	28	$(V_{max})^{\text{共通}}$	$(Km)'_4$	0	0	0	0	1

共通の最大反応  $(V_{max})^{\text{共通}}$  に対し、5 つのミカエリス定数  $(Km)'_i$  をもつミカエリス・メンテン式は、5 つのダミー変数  $a_i$  を用いて、

$$\left. \begin{aligned} (Km)' &= (Km)'_0 a_0 + (Km)'_1 a_1 + (Km)'_2 a_2 + (Km)'_3 a_3 + (Km)'_4 a_4 \\ V &= \frac{(V_{max})^{\text{共通}} \cdot [S]}{[S] + (Km)'_i} \end{aligned} \right\} \quad (12.40)$$

として設定する。阻害薬濃度が  $[I]_0$  の場合にダミー変数  $a_0=1$  で、他の濃度に対しては、すべて 0、阻害薬濃度が  $[I]_1$  の場合にダミー変数  $a_1=1$  で、他の濃度に対しては、すべて 0 となり、結果として最大反応  $(V_{max})^{\text{共通}}$  に対するミカエリス・メンテン式となる。

## Excel のソルバーを用いた非線形回帰

表 12.34 に示すのは、表 12.24 に示した阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  別に酵素の濃度  $[S]_j$  の反応速度  $V$  のデータを行方向に展開した全 45 件の Excel のデータで、濃度  $[I]_i$  に対応する (1, 1) 標示型ダミー変数  $a_i$  が設定されている。さらに、式 (12.40) の  $(\widehat{Km})'_i$  を行列の積の関数  $\text{Mmult}(\mathbf{a}$  の範囲,  $(\widehat{Km})'$  の範囲) で求め、最大反応を  $(V_{max})^{\text{共通}}$  とする反応速度の推定値  $\hat{V}$  を計算している。

表 12.34 最大反応  $V_{max}$  を共通とする阻害薬 A の濃度別のミカリス定数  $(K_m)'_i$  の推定

			初期値					ソルバー解				
			$(V_{max}') =$	50.0						$(V_{max}') =$	47.3925	
			$(K_m')_0 =$	1.0						$(K_m')_0 =$	0.7846	
			$(K_m')_1 =$	2.0						$(K_m')_1 =$	1.2596	
			$(K_m')_2 =$	3.0						$(K_m')_2 =$	1.7071	
			$(K_m')_3 =$	4.0						$(K_m')_3 =$	2.2228	
			$(K_m')_4 =$	5.0						$(K_m')_4 =$	3.1212	
								残差平方和 $S_e =$			162.1089	
No	$i$	阻害薬 [I]	酵素 [S]	(1, 1)型ダミー変数					反応 $V$	予測値 $(K_m')_i$	予測値 $V^{\wedge}$	残差 $\varepsilon^{\wedge} = V - V^{\wedge}$
1	0	0	0.6	1	0	0	0	0	19.488	0.7846	20.537	-1.049
2			0.6	1	0	0	0	0	17.910	0.7846	20.537	-2.627
:												
9			1.2	1	0	0	0	0	32.158	0.7846	28.656	3.502
10	1	8	0.6	0	1	0	0	0	15.039	1.2596	15.292	-0.253
:												
18			1.2	0	1	0	0	0	25.253	1.2596	23.122	2.131
19	2	14	0.6	0	0	1	0	0	12.338	1.7071	12.325	0.013
:												
27			1.2	0	0	1	0	0	21.287	1.7071	19.563	1.724
28	3	20	0.6	0	0	0	1	0	10.179	2.2228	10.074	0.105
:												
36			1.2	0	0	0	1	0	18.145	2.2228	16.615	1.530
37	4	28	0.6	0	0	0	0	1	7.635	3.1212	7.641	-0.006
:												
44			1.2	0	0	0	0	1	12.232	3.1212	13.161	-0.929
45			1.2	0	0	0	0	1	14.020	3.1212	13.161	0.859
$(K_m')_i = \text{Mmult} (a \text{ の範囲}, (K_m') \text{ の範囲})$												

元の反応速度  $V$  と推定値  $\hat{V}$  の残差を  $\varepsilon_{ij} = V_{ij} - \hat{V}_{ij}$  とし、残差に関する平方和  $S_e$  を SumSq ( $\varepsilon$  の範囲) によって求めている。ここに示した結果は、表 12.34 左上段の「初期値」を「ソルバー解」に数値のみをペーストし、Excel のソルバーで残差平方和  $S_e$  を最小にするように  $(V_{max})^{\text{共通}}$ ,  $(K_m')_0$ ,  $(K_m')_1, \dots, (K_m')_4$  を変更させて求めた結果である。このように、Excel のソルバーを使うことにより、阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとの最大反応を  $(V_{max})^{\text{共通}}$  とする非線形回帰の推定値が一気に得られるようになったことは、画期的なことである。両逆数・Lineweaver-Burk 変換式に対し、ダミー変数を用い、共通の切片  $[1/(V_{max})^{\text{共通}}]$  を持つ線形変換式によるパラメータ推定を行なこともできなくはないが、非線形回帰で直接パラメータ推定を簡単にできるのに、わざわざ面倒なことをする必然性がない。

表 12.35 に示すのは、表 12.34 で推定された  $(\widehat{V_{max}})^{\text{共通}} = 47.3925$ ,  $(\widehat{K_m})'_0 = 0.7846$ ,  $(\widehat{K_m})'_2 = 1.7071$ ,  $(\widehat{K_m})'_4 = 3.1212$  を用い、基質濃度  $[S]$  を変化させて反応速度  $V$  をミカエリス・メンテン式で計算した結果である。図 12.16 には、阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとの散布図にミカエリス・メンテン曲線の推定値を重ね書きし、さらに、推定された  $(\widehat{K_m})'_i$  を  $(\widehat{V_{max}})^{\text{共通}} = 47.3965$  の 2 分の 1 の直線上に  $\diamond$  を重ね書きしたものである。

表 12.35  $V_{max}$  を共通とする阻害薬 A の濃度別のミカエリス・メンテン曲線の推定

基質 [S]	反応V [I] <sub>0</sub> =0	[I] <sub>2</sub> =14	[I] <sub>4</sub> =28
0.01	0.60	0.28	0.15
0.03	1.75	0.82	0.45
0.1	5.36	2.62	1.47
0.3	13.11	7.08	4.16
0.6	20.54	12.33	7.64
1	26.56	17.51	11.50
2	34.04	25.57	18.51
3	37.57	30.21	23.23
10	43.94	40.48	36.12
30	46.18	44.84	42.93
100	47.02	46.60	45.96
1000	47.36	47.31	47.25
10000	47.39	47.38	47.38

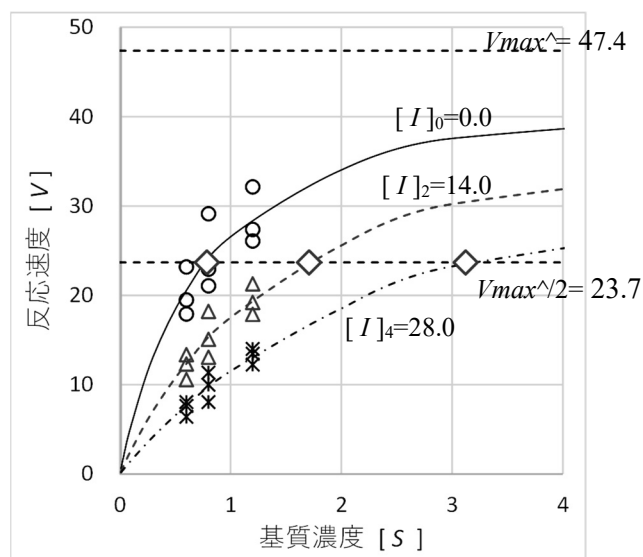
図 12.16 阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとのミカエリス・メンテン曲線

表 12.36 に示すのは、表 12.34 で推定された  $V_{max}$  を共通としたミカエリス定数  $(K_m)'_i$  を用い、阻害薬の濃度  $[I]_0$  に対するミカエリス定数  $(K_m)'_0$  を基準とした場合の阻害定数  $(K_i)'_i$  の推定結果である。格段に改善しているのが、阻害薬 A の濃度別の阻害定数  $(K_i)'_i$  の推定であり、表 12.32 に示した標準偏差 2.28 から 1.61 と小さくなっている。

表 12.36 非線形回帰による最大反応  $V_{max}$  を共通とした場合の阻害定数  $(K_i)'_i$ 

No.	A薬 [I]	$(V_{max})_{共通}$	$(K_m)'_i$	阻害定数 $(K_i)'_i$
0	0	47.3925	0.7846	—
1	8	47.3925	1.2596	13.22
2	14	47.3925	1.7071	11.91
3	20	47.3925	2.2228	10.91
4	28	47.3925	3.1212	9.40
	平均	47.3925		11.36
	SD	0.0000		1.61

$$(K_i)'_i = \{(K_m)'_0 / [(K_m)'_i - (K_m)'_0]\} * [I]_i$$

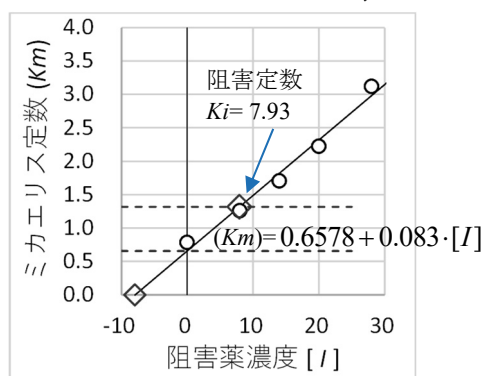


図 12.17 阻害薬 A の濃度と推定されたミカエリス定数との関連

図 12.17 に示すように、阻害薬濃度  $[I]_i$  と推定されたミカエリス定数  $(K_m)'_i$  との関連は、ほぼ直線上と見なせるので、阻害薬濃度  $[I]_i$  比例して  $(K_m)'_i$  が増加していることが確認される。推定される回帰直線は、 $(\widehat{K_m})'_i = 0.6578 + 0.083 \cdot [I]_i$  なので、阻害薬濃度  $[I]$  が 0 のミカエリス定数の推定値は、 $(\widehat{K_m})'_0 = 0.6578$  であり、 $(\widehat{K_m})'_0$  の 2 倍となる阻害定数  $(K_i)^{回帰}$  は、

$$\left. \begin{aligned} 2 \times 0.6578 &= 0.6578 + 0.083 \times (Ki)^{\text{回帰}} \\ (Ki)^{\text{回帰}} &= \frac{0.6578}{0.083} = 7.93 \end{aligned} \right\} \quad (12.41)$$

と推定される．表 12.36 で推定された阻害薬濃度ごとに推定した阻害定数  $(\widehat{Ki})'_i$  よりも小さくなっている．この原因は， $(\widehat{Km})'_0$  および  $(\widehat{Km})'_4$  が若干つではあるが大きめに推定された結果を反映している．

このように， $V_{max}$  を共通として推定された  $(Km)'_i$  を反応とし，阻害薬濃度  $[I]_i$  に対する回帰分析により阻害定数  $(Ki)^{\text{回帰}}$  を推定する方法でも， $(Km)'_i$  の推定誤差の影響を受けるために阻害定数  $(Ki)^{\text{回帰}}$  の推定が不安定になることが避けられない．

### 阻害定数 $Ki$ の推定方法による揺らぎ

同一の酵素反応データを用いてもミカエリス・メンテン式による推定方法による最大反応 ( $V_{max}$ ) およびミカエリス定数 ( $Km$ ) の推定値が大きく揺らぎ，またそれらの 95%信頼区間も大きく揺らぐことを示したきた．酵素阻害に対する阻害定数 ( $Ki$ ) の揺らぎについて，これまでの結果を比較する．表 12.30 に示したのは，(1) 阻害薬濃度ごとに両逆数・Lineweaver-Burk 変換により推定したミカエリス定数  $(\widehat{Km})_i$  を用いた方法である．表 12.32 に示したのは，(2) 両逆数・Lineweaver-Burk 変換により推定した傾き  $(\hat{\beta}_1)_i$  を用いた方法である．表 12.35 に示したのは，(3)  $V_{max}$  を共通とする非線形回帰によるミカエリス定数  $(Km)'_i$  を用いた方法であった．これらの推定値を用いた回帰分析から推定される阻害定数 ( $Ki$ ) は，表 12.37 に示すように，2.05，7.00，7.93 と一定しない．また，阻害薬の濃度  $[I]$  ごとに濃度が 0 の基準となる  $(\widehat{Km})_0$  との比較で算出した阻害定数  $(Ki)_i$  の平均は，10.39，11.64，11.36 と比較的安定しているが，それらの標準偏差  $SD$  は，3.94，2.28，1.64 であり，推定に推定を重ねることによる誤差の伝播による推定値の揺らぎが大きくなることの反映である．

表 12.37 各種の推定方法により求められた阻害定数  $(\widehat{Ki})$  の比較

$i$	阻害薬A	(1)両逆数 $Km$		(2)両逆数 傾き		(3)非線形 $V_{max}$ 共通	
	濃度 $[I]$	$(Km^{\wedge})$	$(Ki^{\wedge})$	$\beta^{\wedge}_1$	$(Ki^{\wedge})$	$(Km^{\wedge})'$	$(Ki^{\wedge})'$
0	0	0.8767	—	0.0177	—	0.7846	—
1	8	1.3429	15.04	0.0276	14.40	1.2596	13.22
2	14	1.9810	11.11	0.0382	12.14	1.7071	11.91
3	20	2.6430	9.93	0.0497	11.11	2.2228	10.91
4	28	5.3564	5.48	0.0735	8.90	3.1212	9.40
	平均		10.39		11.64		11.36
	SD		3.94		2.28		1.61
	回帰分析 $(Ki)$ 推定値		2.05		7.00		7.93



12.5. 非線形回帰による阻害定数  $K_i$  の直接推定

表 12.24 に示したように基質濃度  $[S]$  を (0.6, 0.8, 1.2) と 3 水準に設定し, 阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  を (0, 8, 14, 20, 28) と 5 水準とした繰り返し 3 の 2 因子型の実験データについて, ミカエリス・メンテン式を用い, 最大反応  $(Vmax)_i$  と最大反応の 1/2 となる基質の濃度・ミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定し, ミカエリス定数  $(Km)_0$  を 2 倍にする阻害薬 A の濃度としての阻害定数  $(Ki)_i$  を推定してきた. また, 阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとのミカエリス定数  $(Km)_i$  に対する回帰分析により阻害定数  $(Ki)^{共通}$  も推定したのであるが, 安定した阻害定数  $(Ki)$  を得ることができないだけでなく, 95%信頼区間の推定も行えなかった.

阻害定数  $K_i$  の直接推定するための式の導出

式 (12.32) に示したように, 阻害薬が含まれない  $[I]_0 = 0$  の場合のミカエリス定数の推定値を  $(Km)_0$ , 阻害薬の濃度  $[I]_i$  に対するミカエリス定数の推定値を  $(Km)_i$  とした場合に,  $(Km)_0$  を 2 倍とする阻害薬の濃度の推定値を  $(Ki)_i$  とした.

$$\left. \begin{aligned} (Km)_i &= (Km)_0 + (Km)_0 \frac{[I]_i}{(Ki)_i} \\ &= (Km)_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(Ki)_i} \right\} \end{aligned} \right\} \quad \text{式 (12.32) 再掲}$$

この  $(Km)_i$  に対する個別の  $(Ki)_i$  ではなく, 共通の  $(Ki)^{共通}$  と置きなおし, ミカエリス・メンテン式の  $(Km)$  に代入すると,

$$V = \frac{(Vmax) \cdot [S]}{[S] + (Km)_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(Ki)^{共通}} \right\}} \quad (12.42)$$

が得られる. 阻害薬の濃度が,  $[I]_0 = 0$  ならば, 通常のみカエリス・メンテン式となる. この式は, それぞれの阻害薬の濃度  $[I]_i$  ごとのミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定するのではなく, 阻害定数  $(Ki)^{共通}$  を用いて, 推定値としての  $(\widehat{Km})_i$  も含めて同時推定を行なうことにより, 安定した阻害定数  $(Ki)^{共通}$  を推定することが期待できる.

式 (12.42) を用いたミカエリス・メンテン式のあてはめは,

$$\begin{aligned} [I]_0 = 0 \text{ に対しては, } & (\widehat{Km})_0 \text{ を推定し,} \\ [I]_1 = 8 \text{ nM に対しては, } & [(\widehat{Km})_0 + (\widehat{Km})_0 \times 8 / (\widehat{Ki})^{共通}] \text{ を推定し, 順次} \\ & : \\ [I]_4 = 28 \text{ nM について } & [(\widehat{Km})_0 + (\widehat{Km})_0 \times 28 / (\widehat{Ki})^{共通}] \end{aligned}$$

を推定する. このように, 阻害定数  $(Ki)$  の推定の元になる  $(\widehat{Km})_0$  の推定に, 阻害薬の濃度  $[I]_i$  の全てのデータが総動員されることに特徴がある.

NLIN プロシジャによる阻害定数  $K_i$  の直接推定

直接推定のため表 12.24 に示したデータを元に SAS データファイルを作成する．基質濃度  $[S]$  は，DATA ステップの do ステートメントで (0.6, 0.8, 1.2) として与え，反応速度  $V$  を 1 つ読み込んだ後は，SAS データファイルに書き込む．1 行分の 3 つのデータの読み込みと書き込みが終わると，次の行のデータの読み込みと書き込みに移り，最後の行まで継続する．作成された 45 行の「d01」 SAS データセットを，PRINT プロシジャで書き出している．

## SAS プログラム 12.7 SAS データファイルの作成

```
TITLE1 ' 阻害薬 A. SAS Y. Takahashi 2023/07/28 ' ;
DATA d01 ;
    input A I @ ;
    do S = 0.6, 0.8, 1.2 ;
        input V @ ; ; output ;
    end ;
/* No I S:0.6 S:0.8 S:1.2 */
datalines ;
0 0 19.488 22.922 27.364
0 0 17.910 21.071 26.094
0 0 23.168 29.148 32.158
1 8 15.039 17.896 22.449
1 8 13.204 15.997 20.957
1 8 17.061 22.603 25.253
2 14 12.338 15.076 19.199
2 14 10.568 13.065 17.875
2 14 13.364 18.218 21.287
3 20 10.179 12.718 16.559
3 20 8.640 10.653 15.030
3 20 10.841 14.871 18.145
4 28 7.635 9.979 13.461
4 28 6.415 8.070 12.232
4 28 8.044 11.364 14.020
;
proc print data=d01 ; run;
```

NLIN プロシジャによる阻害定数 ( $K_i$ ) の直接推定プログラムを次に示す．

SAS プログラム 12.8 /\* ミカエリス・メンテン式 阻害定数  $K_i$  の直接推定 \*/

```
proc nlin data=d01 list ;
    parms Vmax = 50 Km0 = 1 Ki = 10 ;
        Km = Km0 * (1 + I / Ki) ;
    model V = Vmax * S / (S + Km) ;
run ;
```

表 12.38 に NLIN プロシジャによる阻害定数 ( $K_i$ ) の直接推定の結果を示す．推定された阻害定数は  $(\hat{K}_i)^{\text{共通}} = 10.5569$  で，これまで阻害薬の濃度ごとのミカエリス定数から推定した阻害定数の平均的な推定値となっている．NLIN プロシジャによる直接推定では，阻害定数

$(\widehat{K_i})^{\text{共通}}$  の標準誤差が  $SE((\widehat{K_i})^{\text{共通}})=2.0210$  として推定され、95%信頼区間も (6.4783, 14.6354) として推定することができている。

表 12.38 NLIN プロシジャによる阻害定数  $K_i$  の直接推定

要因	自由度	平方和	平均平方	F 値	近似Pr > F
Model	3	13623.5	4541.2	1079.44	<.0001
Error	42	176.7	4.207		
Uncorrected	45	13800.2			
パラメータ	推定値	近似標準誤差	近似 95% 信頼限界		
Vmax	47.6932	6.9798	33.6074	61.7790	
Km0	0.7717	0.2428	0.2818	1.2616	
Ki	10.5569	2.0210	6.4783	14.6354	

推定結果のまとめとしては、表 12.39 に示すように、阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス定数  $(K_m)_i$  の推定を式 (12.32) 再掲 を用いて次に示すように

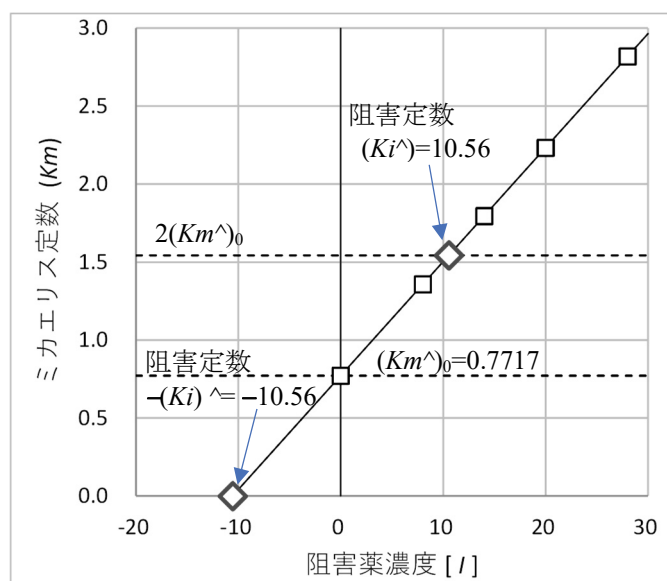
$$\left. \begin{aligned} (\widehat{K_m})_1 &= (\widehat{K_m})_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_1}{(\widehat{K_i})^{\text{共通}}} \right\} = 0.7717 \times \left\{ 1 + \frac{8}{10.5569} \right\} = 1.3565 \\ &\vdots \\ (\widehat{K_m})_4 &= (\widehat{K_m})_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_4}{(\widehat{K_i})^{\text{共通}}} \right\} = 0.7717 \times \left\{ 1 + \frac{28}{10.5569} \right\} = 2.8185 \end{aligned} \right\} \quad (12.43)$$

求めることができ、阻害定数  $(\widehat{K_i})_i$  の推定が適切に行なわれているか検証することができる。推定された  $(\widehat{K_m})_0 = 0.7717$  についての標準誤差  $SE[(\widehat{K_m})_0] = 0.2428$  の表示も推定精度を明示するために役に立つ。

表 12.39 NLIN プロシジャにより推定されたパラメータの一覧

$i$	A薬 $[I]$	最大値		ミカエリス定数		阻害定数	
		$V_{\max}^{\wedge}$	$SE[(V_{\max}^{\wedge})]$	$(K_m^{\wedge})$	$SE[(K_m^{\wedge})]$	$(K_i^{\wedge})^{\text{共通}}$	$SE[(K_i^{\wedge})]$
0	0	47.6932	6.9798	0.7717	0.2428	—	
1	8	47.6932	6.9798	1.3565	—	10.5569	2.02
2	14	47.6932	6.9798	1.7951	—	10.5569	2.02
3	20	47.6932	6.9798	2.2337	—	10.5569	2.02
4	28	47.6932	6.9798	2.8185	—	10.5569	2.02
$(K_m^{\wedge})_i = (K_m^{\wedge})_0 [1 + [I]_i / (K_i^{\wedge})^{\text{共通}}]$							

さらに、図 12.18 に示すように、阻害定数  $(K_i)$  を用いたミカエリス定数の推定値を散布図上にプロットし、 $(\widehat{K_m})_0 = 0.7717$  の水平線などを重ね書きすることにより、実験結果の理解と解釈に役に立つ。

図 12.18 阻害定数  $(\hat{K}i)$  を用いたミカエリス定数  $(\hat{K}m)_i$  の推定値

### 両逆数・Lineweaver-Burk 変換による阻害定数 $Ki$ の推定結果との比較

両逆数・Lineweaver-Burk 変換により，阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定し，表 12.30 に示すように阻害定数  $(Ki)_i$  を推定した．さらに，図 12.14 右に示したように阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  に対する回帰直線から，阻害定数  $(Ki)_i$  を推定したが，ミカエリス定数  $(Km)_i$  の推定値の変動により，安定した阻害定数  $(Ki)^{\text{回帰}}$  の推定ができなかった．回帰係数の傾き  $(\beta_1)_i = (Km)_i / (Vmax)_i$  を用いることにより，表 12.32 に示すように阻害定数  $(Ki)_i$  の推定は，ミカエリス定数  $(Km)_i$  を用いた場合に比べ安定したとは言え，図 12.15 に示した回帰直線をあてはめて推定した  $(Ki)^{\text{回帰}}$  も，回帰係数の傾き  $(\beta_1)_i = (Km)_i / (Vmax)_i$  の変動に影響を受け，安定した推定値が得られているとは言えない．

阻害薬濃度  $[I]_i$  に共通の  $(Vmax)$  を設定した非線形回帰により，阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定し，表 12.36 および図 12.17 に示すように阻害定数  $(Ki)$  の推定を行ってみても，安定した阻害定数  $(Ki)$  の推定ができているとはいえない．不安定な阻害定数  $(Ki)$  の推定となる原因は，推定に推定を重ねることによる誤差の伝播による影響であり，さらに，阻害定数  $(Ki)$  の標準誤差の推定，95%信頼区間の推定も思うようにできないと欠点を内在している．

式 (12.42) を用い，阻害薬濃度  $[I]_i$  ごとにミカエリス定数  $(Km)_i$  を推定することなく阻害定数  $(Ki)$  を非線形回帰により直接推定できることは，山崎ら (2008) にも明示されているが，実データを用いた推定結果が示されていない．

ミカエリス定数  $(Km)_i$  が阻害薬の濃度  $[I]_i$  に比例するとした場合の阻害定数  $(K_i)$  の直接推定に際し、NLINプロシジャを用いた。これにより、阻害定数  $(K_i)$  パラメータの標準誤差  $SE$  を推定することが可能となった。

### Excel の行列関数を用いた阻害定数 $K_i$ の直接推定

阻害定数  $(K_i)^{\text{共通}}$  の推定を含むミカエリス・メンテン式のあてはめを Excel によって行い、NLIN プロシジャの解析方法について理解を深めたい。表 12.2 に示した、ミカエリス・メンテン式を非線形回帰で解いた手順により、阻害薬の濃度  $[I]_i$  を含み、阻害定数  $(K_i)^{\text{共通}}$  の推定を加える。Excel での解析には、式 (12.42) をパラメータに関して偏微分することから始める。

式 (12.42) を偏微分しやすいように

$$\left. \begin{aligned} V &= \frac{(Vmax) \cdot [S]}{[S] + (Km)_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(K_i)^{\text{共通}}} \right\}} = \frac{(Vmax) \cdot [S]}{[S] + (Km)} \\ \text{ただし, } (Km) &= (Km)_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(K_i)^{\text{共通}}} \right\} \end{aligned} \right\} \quad (12.44)$$

とする。パラメータ  $(Vmax)$ ,  $(Km)_0$ ,  $(K_i)^{\text{共通}}$  について偏微分すると

$$\left. \begin{aligned} z_1 &= \frac{\partial V}{\partial (Vmax)} = \frac{[S]}{[S] + (Km)} \\ z_2 &= \frac{\partial V}{\partial (Km)_0} = - \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(K_i)^{\text{共通}}} \right\} \frac{(Vmax) \cdot [S]}{\{[S] + (Km)\}^2} \\ z_3 &= \frac{\partial V}{\partial (K_i)^{\text{共通}}} = \left\{ (Km)_0 \frac{[I]_i}{\{(K_i)^{\text{共通}}\}^2} \right\} \frac{(Vmax) \cdot [S]}{\{[S] + (Km)\}^2} \end{aligned} \right\} \quad (12.45)$$

が得られる。

表 12.24 に示した阻害薬 A のデータを、行方向に展開した結果を表 12.40 に示す。阻害薬の 5 段階の濃度  $[I]_i$  ごとに基質の 3 段階の濃度  $[S]_j$  に対し、繰り返しが 3 のデータなので、全体で  $5 \times 3 \times 3 = 45$  行のデータに対し、反応速度  $V$  が示されている。反応速度の推定値  $\hat{V}$  は、式 (12.44) によって計算され、第 1 行目は、

$$\hat{V}_1 = \frac{(\widehat{Vmax}) \cdot [S]}{[S] + (\widehat{Km})_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_0}{(\widehat{K_i})^{\text{共通}}} \right\}} = \frac{50 \times [0.6]}{[0.6] + 1 \times \left\{ 1 + \frac{[0]}{10} \right\}} = 18.750$$

$$\text{残差: } \varepsilon_1 = V_1 - \hat{V}_1 = 19.488 - 18.750 = 0.738$$

表 12.40 非線形回帰による阻害定数  $K_i$  の推定のための Excel の計算シート

初期値					$\theta^{(m-1)}$	$\delta^{\wedge}$	$\theta^{(m)}$	$(Z^T Z)^{-1}$		
	$(Vmax^{\wedge})=$	50.00		$(Vmax^{\wedge})=$	50.0000	-3.7672	46.2328	21.0589	0.7911	3.5483
	$(Km^{\wedge})_0=$	1.00		$(Km^{\wedge})_0=$	1.0000	-0.2991	0.7009	0.7911	0.0304	0.1449
	$(Ki^{\wedge})^{\text{共通}}=$	10.00		$(Ki^{\wedge})^{\text{共通}}=$	10.0000	0.6634	10.6634	3.5483	0.1449	0.8856
				$S_e=$	374.69					
No	阻害薬 A	酵素	反応	推定値	残差			$\partial\_Vmax$	$\partial\_Km_0$	$\partial\_Ki$
$i$	$I$	$S$	$V$	$V^{\wedge}$	$\varepsilon=V-V^{\wedge}$		$Km$	$z_1$	$z_2$	$z_3$
1	0	0	0.6	19.488	18.7500	0.7380	1.0000	0.3750	-11.7188	0.0000
2		0	0.6	17.910	18.7500	-0.8400	1.0000	0.3750	-11.7188	0.0000
9		0	1.2	32.158	27.2727	4.8853	1.0000	0.5455	-12.3967	0.0000
10	1	8	0.6	15.039	12.5000	2.5390	1.8000	0.2500	-9.3750	0.4167
18		8	1.2	25.253	20.0000	5.2530	1.8000	0.4000	-12.0000	0.5333
19	2	14	0.6	12.338	10.0000	2.3380	2.4000	0.2000	-8.0000	0.4667
27		14	1.2	21.287	16.6667	4.6203	2.4000	0.3333	-11.1111	0.6481
28	3	20	0.6	10.179	8.3333	1.8457	3.0000	0.1667	-6.9444	0.4630
36		20	1.2	18.145	14.2857	3.8593	3.0000	0.2857	-10.2041	0.6803
37	4	28	0.6	7.635	6.8182	0.8168	3.8000	0.1364	-5.8884	0.4339
44		28	1.2	12.232	12.0000	0.2320	3.8000	0.2400	-9.1200	0.6720
45		28	1.2	14.020	12.0000	2.0200	3.8000	0.2400	-9.1200	0.6720

$$(\widehat{Km}) = (\widehat{Km})_0 \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(\widehat{Ki})^{\text{共通}}} \right\} = 1 \times \left\{ 1 + \frac{[0]}{10} \right\} = 1.0000$$

$$z_{1,1} = \frac{[S]}{[S] + (\widehat{Km})} = \frac{[0.6]}{[0.6] + 1.0} = 0.3750$$

$$z_{2,1} = - \left\{ 1 + \frac{[I]_i}{(\widehat{Ki})^{\text{共通}}} \right\} \frac{(\widehat{Vmax}) \cdot [S]}{\{[S] + (\widehat{Km})\}^2} = - \left\{ 1 + \frac{[0]}{10} \right\} \frac{50 \times [0.6]}{\{[0.6] + 1\}^2} = -11.7188$$

$$z_{3,1} = \left\{ (\widehat{Km})_0 \frac{[I]_i}{\{(\widehat{Ki})^{\text{共通}}\}^2} \right\} \frac{(\widehat{Vmax}) \cdot [S]}{\{[S] + (\widehat{Km})\}^2} = - \left\{ 1 \times \frac{[0]}{10^2} \right\} \frac{50 \times [0.6]}{\{[0.6] + 1\}^2} = 0.0000$$

として計算されており，計算式を設定した 1 行目をフィルハンドルで，45 行目までコピーして計算させている．

表 12.40 上段に示しているのが，Excel での非線形モデルを解くための設定である．推定したいパラメータは， $(\widehat{Vmax})$ ， $(\widehat{Km})_0$ ， $(\widehat{Ki})^{\text{共通}}$  であり，これらを総称して  $\hat{\theta}$  とする．偏微分した  $z_1$ ， $z_2$ ， $z_3$  について（45 行×3 列）の微係数行列を  $Z$  とし，積和行列  $(Z^T Z)$  の逆行

$$(Z^T Z)^{-1} = \begin{array}{|c|c|c|} \hline \mathbf{21.0589} & 0.7911 & 3.5483 \\ \hline 0.7911 & \mathbf{0.0304} & 0.1449 \\ \hline 3.5483 & 0.1449 & \mathbf{0.8856} \\ \hline \end{array}$$

列が、として計算されている。残差のベクトル  $\hat{\mathbf{e}} = (\mathbf{V} - \hat{\mathbf{V}})$  を反応とし、微係数行列  $\mathbf{Z}$  をデザイン行列と見なした線形回帰（残差線形化法）により、 $\hat{\boldsymbol{\delta}}$  が

$$\hat{\boldsymbol{\delta}} = (\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1} \mathbf{Z}^T \hat{\mathbf{e}} = \begin{bmatrix} -3.7672 \\ -0.2991 \\ 0.6634 \end{bmatrix}$$

推定されている。

初期値を設定した  $\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m-1)}$  に  $\hat{\boldsymbol{\delta}}$  を加え、 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m)}$  を推定する。

$$\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m)} = \hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m-1)} + \hat{\boldsymbol{\delta}} = \begin{bmatrix} 50.0000 \\ 1.0000 \\ 10.0000 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} -3.7672 \\ -0.2991 \\ 0.6634 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 46.2328 \\ 0.7009 \\ 10.6634 \end{bmatrix}$$

推定された  $\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m)}$  をコピーし、 $\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m-1)}$  に値のみをペーストすると、

第 1 回目の反復：

	$\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m-1)}$	$\hat{\boldsymbol{\delta}}$	$\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m)}$	$(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1}$		
$(Vmax^\wedge) =$	<b>46.2328</b>	1.3779	47.6107	<b>9.4470</b>	0.3178	2.5372
$(Km^\wedge)_0 =$	<b>0.7009</b>	0.0662	0.7671	0.3178	<b>0.0111</b>	0.0953
$(Ki^\wedge)_{共通} =$	<b>10.6634</b>	-0.1278	10.5356	2.5372	0.0953	<b>1.0290</b>
$S_e =$	<b>188.50</b>					

同様に第 2 回目の反復、第 3 回目の反復、第 4 回目の反復で、

第 4 回目の反復：

	$\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m-1)}$	$\hat{\boldsymbol{\delta}}$	$\hat{\boldsymbol{\theta}}^{(m)}$	$(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1}$		
$(Vmax^\wedge) =$	<b>47.6932</b>	0.0000	47.6932	<b>11.5802</b>	0.3964	2.7332
$(Km^\wedge)_0 =$	<b>0.7717</b>	0.0000	0.7717	0.3964	<b>0.0140</b>	0.1037
$(Ki^\wedge)_{共通} =$	<b>10.5569</b>	0.0000	10.5569	2.7332	0.1037	<b>0.9709</b>
$S_e =$	<b>176.69</b>					

$\hat{\boldsymbol{\delta}}$  が全て 0.0000 となり、残差線形化法によるパラメータの推定値が得られたことになる。この推定結果は、表 12.38 下段に示した SAS の NLIN プロシジャの推定結果に一致する。

表 12.38 下段（再掲）SAS の NLIN プロシジャの推定結果

パラメータ	推定値	近似標準誤差	近似 95% 信頼限界	
<b>Vmax</b>	47.6932	6.9798	33.6074	61.7790
<b>Km0</b>	0.7717	0.2428	0.2818	1.2616
<b>Ki</b>	10.5569	2.0210	6.4783	14.6354

さて、推定されたパラメータの標準誤差は、残差線形化法で使った積和行列  $(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})$  の逆行列  $(\mathbf{Z}^T \mathbf{Z})^{-1}$  に誤差分散の推定値

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{S_e}{n - \text{パラメータ数}} = \frac{176.69}{45 - 3} = 4.2070$$

を掛けることにより、パラメータ共分散行列  $\boldsymbol{\Sigma}(\hat{\boldsymbol{\theta}})$  を求めることができる。

$$\Sigma(\hat{\theta}) = (Z^T Z)^{-1} \hat{\sigma}^2 = \begin{bmatrix} 11.5802 & 0.3964 & 2.7332 \\ 0.3964 & 0.0140 & 0.1037 \\ 2.7332 & 0.1037 & 0.9709 \end{bmatrix} \times 4.2070 = \begin{bmatrix} 48.7174 & 1.6676 & 11.4985 \\ 1.6676 & 0.0589 & 0.4362 \\ 11.4985 & 0.4362 & 4.0844 \end{bmatrix} \quad (12.46)$$

その対角要素がパラメータの分散なので、その平方根がパラメータの標準誤差となるので、  
 $SE(\widehat{Vmax}) = \sqrt{48.718} = 6.9798$ ,  $SE(\widehat{Km_0}) = \sqrt{0.0589} = 0.2428$ ,  $SE(\widehat{Ki}^{\text{共通}}) = \sqrt{4.0844} = 2.0210$  と  
 なり、この結果は、表 12.38 下段の結果に一致する。

### Excel のソルバーを用いた簡便な阻害定数 $Ki$ の直接推定

非線形回帰による阻害定数  $(Ki)^{\text{共通}}$  の推定の第 1 歩は、Excel のソルバーによる推定から始めることを勧める。表 12.41 に示すように、推定値  $\hat{V}$  を式 (12.44) により設定し、残差から残差平方和  $S_e$  を設定するだけで、阻害定数  $(Ki)^{\text{共通}}$  を推定することができる。パラメータの初期値を設定し、Excel のソルバーで、残差平方和  $S_e$  を最小にするように、 $(\widehat{Vmax})$ ,  $(\widehat{Km_0})$ ,  $(\widehat{Ki})^{\text{共通}}$  を変更すると瞬時に「ソルバー解」とし、阻害定数  $(\widehat{Ki})^{\text{共通}} = 10.5563$  が即座に得られる。

表 12.41 Excel ソルバーを用いた阻害定数  $Ki$  の推定

			初期値		初期値		ソルバー 解	
			$(Vmax)^{\wedge} =$	50.00	$(Vmax)^{\wedge} =$	50.00	$(Vmax)^{\wedge} =$	47.6901
			$(Km_0)^{\wedge} =$	1.00	$(Km_0)^{\wedge} =$	1.00	$(Km_0)^{\wedge} =$	0.7716
			$(Ki)^{\wedge} \text{共通} =$	10.00	$(Ki)^{\wedge} \text{共通} =$	10.00	$(Ki)^{\wedge} =$	10.5563
			残差平方和 $S_e =$		374.69	$S_e =$		176.69
No	阻害薬 A	酵素	反応	推定値	残差	推定値	残差	
	$i$	$I$	$S$	$V$	$V^{\wedge}$	$\varepsilon = V - V^{\wedge}$	$V^{\wedge}$	$\varepsilon = V - V^{\wedge}$
1	0	0	0.6	19.4880	18.7500	0.7380	20.8614	-1.3734
2		0	0.6	17.9100	18.7500	-0.8400	20.8614	-2.9514
9		0	1.2	32.1580	27.2727	4.8853	29.0258	3.1322
10	1	8	0.6	15.0390	12.5000	2.5390	14.6259	0.4131
18		8	1.2	25.2530	20.0000	5.2530	22.3862	2.8668
19	2	14	0.6	12.3380	10.0000	2.3380	11.9475	0.3905
27		14	1.2	21.2870	16.6667	4.6203	19.1080	2.1790
28	3	20	0.6	10.1790	8.3333	1.8457	10.0983	0.0807
36		20	1.2	18.1450	14.2857	3.8593	16.6673	1.4777
37	4	28	0.6	7.6350	6.8182	0.8168	8.3708	-0.7358
44		28	1.2	12.2320	12.0000	0.2320	14.2417	-2.0097
45		28	1.2	14.0200	12.0000	2.0200	14.2417	-0.2217

この結果は、NLIN プロシジャで計算した表 12.38 下段の結果とは、少数点以下 3 桁目、4 桁目で、収束の判定精度の差異のために一致しない。



## 12. 6. 阻害様式の確認のための手順

阻害薬を加えた場合の阻害定数 ( $K_i$ ) の推定法について、阻害薬濃度  $[I]$  ごとに両逆数・*Lineweaver-Burk* 変換を適用した場合の問題点を指摘し、それに代わる非線形回帰を用いることにより、安定した阻害定数 ( $K_i$ ) の推定法について示してきた。一般的に阻害薬の酵素反応に対する作用は、(1)  $V_{max}$  は変化しないが  $K_m$  を増加させる、(2)  $K_m$  は変化しないが  $V_{max}$  を減少させる、(3)  $V_{max}$  と  $K_m$  を同じ割合で減少させる、(4)  $K_m$  の増加と共に  $V_{max}$  が減少する、に分類できることが知られている。どのような阻害様式なのかを判定するためには、それぞれの阻害薬の濃度  $[I]$  ごとに、 $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  を別々に推定し、(1) から (4) で示したどの阻害様式となるかの見当が付ける必要がある。

## Excel ソルバーを用いた個別パラメータの一括推定

表 12.33 に示した阻害薬 A の濃度別 (1, 1) 標示型ダミー変数を使い、 $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  を一括して推定する方法を示す。表 12.42 に示すように、

表 12.42 Excel ソルバーを用いた個別パラメータの一括推定

		$(Vmax)'_i$	$(Km)'_i$									ソルバー解	
初期値		50.0	1.0							$(Vmax)'_0$	$(Km)'_0$	47.8120	0.7992
		50.0	2.0							$(Vmax)'_1$	$(Km)'_1$	45.6536	1.1807
		50.0	3.0							$(Vmax)'_2$	$(Km)'_2$	47.1047	1.6912
		50.0	4.0							$(Vmax)'_3$	$(Km)'_3$	48.2438	2.2794
		50.0	5.0							$(Vmax)'_4$	$(Km)'_4$	56.8061	3.9298
												残差平方和 $S_e$	161.9270
	群	阻害薬	酵素	(1, 1)型ダミー変数					反応			予測値	残差
No	$i$	$[I]$	$[S]$	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$	$V$	$(Vmax)'_i$	$(Km)'_i$	$V^\wedge$	$\varepsilon^\wedge = V - V^\wedge$
1	0	0	0.6	1	0	0	0	0	19.488	47.8120	0.7992	20.503	-1.015
2			0.6	1	0	0	0	0	17.910	47.8120	0.7992	20.503	-2.593
:													
9			1.2	1	0	0	0	0	32.158	47.8120	0.7992	28.699	3.459
10	1	8	0.6	0	1	0	0	0	15.039	45.6536	1.1807	15.383	-0.344
:													
18			1.2	0	1	0	0	0	25.253	45.6536	1.1807	23.012	2.241
19	2	14	0.6	0	0	1	0	0	12.338	47.1047	1.6912	12.336	0.002
:													
27			1.2	0	0	1	0	0	21.287	47.1047	1.6912	19.551	1.736
28	3	20	0.6	0	0	0	1	0	10.179	48.2438	2.2794	10.053	0.126
:													
36			1.2	0	0	0	1	0	18.145	48.2438	2.2794	16.639	1.506
37	4	28	0.6	0	0	0	0	1	7.635	56.8061	3.9298	7.524	0.111
:													
44			1.2	0	0	0	0	1	12.232	56.8061	3.9298	13.289	-1.057
45			1.2	0	0	0	0	1	14.020	56.8061	3.9298	13.289	0.731

$$(Vmax)'_i = \text{Mmult}(a \text{ の範囲}, Vmax' \text{ の範囲}) \quad (12.47)$$

$$(Km)'_i = \text{Mmult}(a \text{ の範囲}, Km' \text{ の範囲}) \quad (12.48)$$

と設定し,

$$\hat{V} = \frac{(Vmax)'_i [S]}{[S] + (Km)'_i} \quad (12.49)$$

により, 阻害薬の濃度  $[I]$  ごとの推定値を初期値に対し一括して計算する. 残差  $\hat{\varepsilon} = V - \hat{V}$  についての平方和  $S_e$  を最小にするように,  $(Vmax)'_i$  と  $(Km)'_i$  を一括して変更することにより, 表 12.30 に示した両逆数・Lineweaver-Burk 変換による場合よりも簡便にかつ安定した推定値が得られている.

### NLIN プロシジャによるパラメータの一括推定

NLIN プロシジャで  $(Vmax)_i$  を共通とし, 個別の  $(Km)_i$  を推定する際に, ダミー変数 ( $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ) を用いて推定した. このダミー変数を個別の  $(Vmax)_i$  の推定に拡張することにより, 一括して結果を得ることができる.

#### SAS プログラム 12.9 /\* ミカエリス・メンテン式 ダミー変数 \*/

```
TITLE1 ' 阻害薬 A2. SAS Y. Takahashi 2023/03/04 ' ;
DATA d01 ;
  input A a0 a1 a2 a3 a4 I @ ;
  do S = 0.6, 0.8, 1.2 ;
    input V @ ; output ;
  end ;
/* No a0 a1 a2 a3 a4 I S:0.6 S:0.8 S:1.2 */
datalines ;
0 1 0 0 0 0 0 19.488 22.922 27.364
0 1 0 0 0 0 0 17.910 21.071 26.094
0 1 0 0 0 0 0 23.168 29.148 32.158
1 0 1 0 0 0 8 15.039 17.896 22.449
1 0 1 0 0 0 8 13.204 15.997 20.957
1 0 1 0 0 0 8 17.061 22.603 25.253
2 0 0 1 0 0 14 12.338 15.076 19.199
2 0 0 1 0 0 14 10.568 13.065 17.875
2 0 0 1 0 0 14 13.364 18.218 21.287
3 0 0 0 1 0 20 10.179 12.718 16.559
3 0 0 0 1 0 20 8.640 10.653 15.030
3 0 0 0 1 0 20 10.841 14.871 18.145
4 0 0 0 0 1 28 7.635 9.979 13.461
4 0 0 0 0 1 28 6.415 8.070 12.232
4 0 0 0 0 1 28 8.044 11.364 14.020
;
proc print data=d01 ; run;
```

NLIN プロシジャでは,  $Vmax$  を  $(Vmax0*a0 + Vmax1*a1 + \dots + Vmax4*a4)$  に置き換え, parm ステートメントで初期値を全て 50 に設定する.

SAS プログラム 12.10 /\* ミカエリス・メンテン式 個別 Km Vmax \*/

```

proc nlin data=d01 list ;
  parms Vmax0=50 Vmax1=50 Vmax2=50 Vmax3=50 Vmax4=50 ;
  parms Km0=1 Km1=2 Km2=3 Km3=4 Km4=4 ;
  Vmax_i = (Vmax0*a0+Vmax1*a1+Vmax2*a2+Vmax3*a3+Vmax4*a4) ;
  Km_i = (Km0*a0 +Km1*a1 +Km2*a2 +Km3*a3+ Km4*a4) ;
  model V = Vmax_i * S / (S + Km_i) ;
run ;

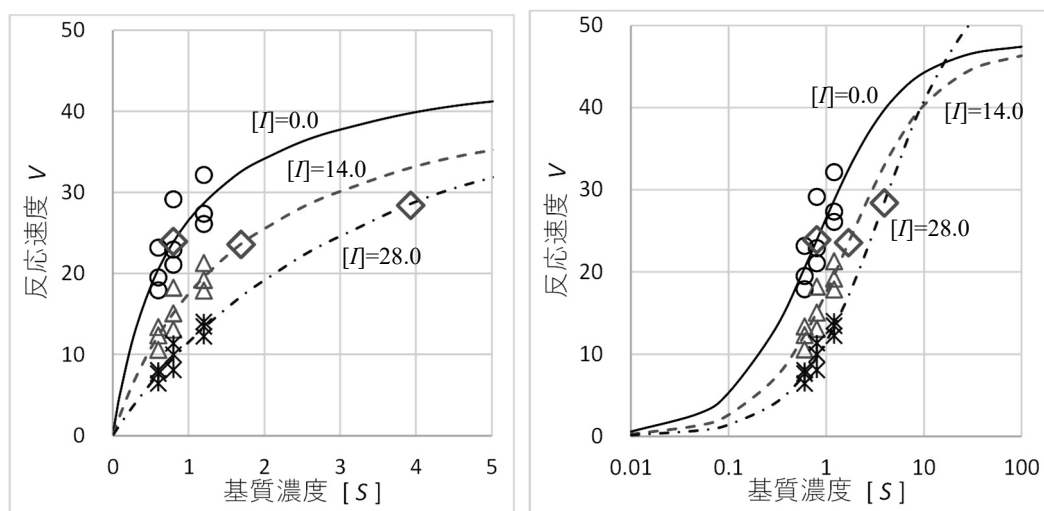
```

表 12.43 に示すように、非線形モデルの適用により  $(Vmax)_i$ ,  $(Km)_i$  が一括して出力される。表 12.30 に示した両逆数・Lineweaver-Burk 変換による推定値に比べ、 $(Vmax)_4$  の推定値が、72.8533 から 56.815 へと共通の推定値に近づき、 $(Km)_4$  も 7.6631 から 3.930 へと阻害薬濃度を反映した推定値が得られている。また、それらの標準誤差も全平均で 25%程度減少している。非線形モデルでの標準誤差を基準とした場合には、両逆数・Lineweaver-Burk 変換の標準誤差  $SE$  は、34%増しとなる。

表 12.43 非線形モデルにより推定された個別のパラメーター一覧

阻害薬 $[I]$	パラメータ	推定値	近似標準誤差	パラメータ	推定値	近似標準誤差
$[I] = 0$ nM	Vmax0	47.812	9.490	Km0	0.799	0.333
$[I] = 8$ nM	Vmax1	45.654	14.193	Km1	1.181	0.648
$[I] = 14$ nM	Vmax2	47.111	21.994	Km2	1.692	1.221
$[I] = 20$ nM	Vmax3	48.243	33.107	Km3	2.279	2.209
$[I] = 28$ nM	Vmax4	56.815	76.552	Km4	3.930	6.594

図 12.19 に示すのは、表 12.42 および表 12.43 に示した阻害薬 A の濃度  $[I]_i$  別に推定された最大反応  $(Vmax)_i$  およびミカエリス定数  $(Km)_i$  を用いて推定したミカエリス・メンテン曲線のプロット図であり、最大反応  $(Vmax)_i$  の 2 分の 1 となる位置にミカエリス定数  $(Km)_i$  を重ね書きした結果である。

図 12.19 阻害薬濃度  $[I]_i$  の増加に伴うミカエリス定数  $(Km)_i$  の変化

## 阻害様式の判別

図 12.20 に示すのは、阻害薬の濃度ごとの  $(V_{max})_i$  と  $(K_m)_i$  を算出し、 $K_m$  を X 軸とし、 $V_{max}$  を Y 軸とした散布図である。この図は、阻害様式の定義に従った判別をするために、両逆数・Lineweaver-Burk プロット図を用いる方法よりも簡潔で優れている。

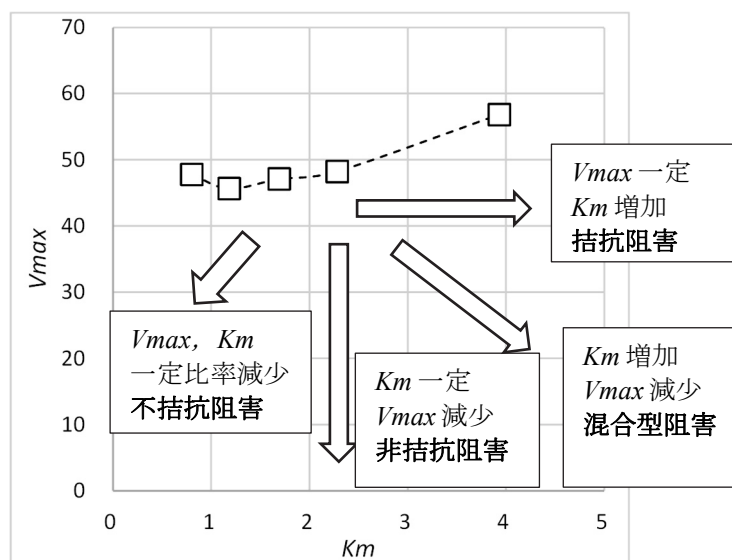


図 12.20 阻害様式の判別のためのミカエリス定数と最大反応の散布図

## 線形変換で悩むのは終わりにしませんか

酵素反応データの解析の基礎であるミカエリス・メンテン式によるパラメータの推定に、各種の線形変換による解析方法が綿々と受け継がれている。本質的に非線形であるミカエリス・メンテン式のパラメータ推定に多大な貢献を果たしてきたことは間違いない。ただし、線形化の方法により、推定値が不安定となる問題が内在している。もちろん、非線形回帰を使うことの必要性は説かれているものの、しかるべき統計ソフトを使えと言うだけで、その適用事例も計算原理の説明もないがしろにされて続けている。

救いの神が、Excel のソルバーを活用した非線形回帰を用いたカエリス・メンテン式によるパラメータの推定であり、計算の手間は、線形変換による方法よりはるかに簡単であり、安定した推定値も得られることを示した。また、阻害定数の推定にも、従来の線形化の方法に比べ、楽々とできることを例示した。各種の線形変換にこだわり続けるのは、そろそろ終わりにしませんか。

## 第 12 章 文 献 索 引

Armitageら(2002) - Statistical Methods in Medical Research, 4th edition. Sec. 20.5 <i>Michaelis-Menten assay</i>	405
知名・岡田(2014) - 原典からの酵素反応速度論	405
山崎ら(2008) - 非線形回帰法によって薬理研究の精度は向上する - 酵素阻害薬の阻害定数の推定の事例 -	428
Rouaud (2017) - Probability, Statistics and Estimation. <a href="https://www.incertitudes.fr/book.pdf">https://www.incertitudes.fr/book.pdf</a>	420

## 第 12 章 索 引

あ Armitageら(2002) - 散布図から復元	407	か Gauss-Newton algorithm - Wikipedia	420
- 推定値に若干の差異	420	ガウス・ニュートン法 - Wikipedia	420
- Direct linear plot	420	- Rouaud (2017)	420
- Non-linear regression	405	各種の推定方法 - 阻害定数 $K_i$ の比較	442
- 標準誤差が示されていない	420	各種の線形変換 - ミカエリス・メンテン式	417
- <i>Michaelis-Menten assay</i>	405	確認のための手順 - 阻害様式	451
- 両逆数 GLM/ gamma errors	420	傾き $\beta_1$ と切片 $\beta_0$ の比 - 偏微分	412
outest=cov1 オプション - NLINプロシジャ	424	- ミカエリス定数 $K_m$	412
output ステートメント - NLINプロシジャ	424	傾き $(K_m)_i / (V_{max})_i$ - 阻害定数 $K_i$ の推定	436
新たな統計解析 - ミカエリス・メンテン式	405	- 阻害薬濃度 $[I]$ に関する回帰	437
<i>Eadie-Hofstee</i> 変換 - <i>Scatchard</i> 変換	406	傾き $\beta_1$ の逆数 - <i>Hanes-Woolf</i> 変換式	427
(1, 1) 標示型 - 阻害薬 A の濃度別	439	簡単な数値を与えて例示 - 阻害定数 $K_i$	430
- ダミー変数	439	基質濃度 $[S]$ - <i>Substrate concentration</i>	407
一括推定 - 個別パラメータ	451	拮抗阻害 - 共通の $(V_{max})$ 共通	430
Wikipedia - Gauss-Newton algorithm	420	- 山崎ら(2008)	428
- ガウス・ニュートン法	420	逆数あるいは比 - 95%信頼区間	417
HTML形式 - SASの標準出力	421	逆数の標準誤差 - 誤差の伝播の公式	427
Excel - 本質的な脆弱性	421	逆数変換 $(1/V)$ - 誤差が不均一	407
Excel により手軽に - 非線形回帰	419	95%信頼区間 - 逆数あるいは比	417
Excel の計算シート - 現代の算盤	410	- 最大反応 $V_{max}$	418
- 阻害定数 $K_i$ の推定	448	- 阻害定数 $K_i$	438
Excel の行列の積 - Mmult () 関数	410	- 阻害薬 A 14 nM	434
Excel による非線形回帰 - SASによる検証	421	- 阻害薬 A なし	433
- 阻害定数 $K_i$ の直接推定	447	- ミカエリス・メンテン曲線	409, 411, 423, 425
Excel の 1 枚のシート上で - 非線形回帰	420	- ミカエリス定数 $K_m$	419
Excel の X 軸の書式設定 - 対数目盛	410	共通の $(V_{max})$ 共通 - 拮抗阻害	430
Excel のソルバー - 残差平方和 $Se$ を最小に	408	共分散行列/ パラメータ - 相関行列/ パラメータ	422
- 阻害定数 $K_i$ の直接推定	450	行列計算 - 拒絶反応	410
- 非線形回帰	439	拒絶反応 - 行列計算	410
Excel のソルバー/非線形回帰 - 線形変換で悩む	454	<i>Cleland-Wilkinson</i> 法 - 知名ら(2014)	420
Excel の作図機能 - 統計ソフトの出力	425	<i>Cressie-Keightley</i> プロット - Direct linear plot	420
行列の転置/ Excel - Transpose() 関数	410	$(K_m)_0$ の 2 倍となる阻害薬 A の濃度 - 阻害定数 $K_i$	429
X 切片 - 負の阻害定数 $K_i$ の推定	431	計算方法がブラック・ボックス - 非線形回帰	417
- $-(K_m)_0$	433	$K_m$ - $V_{max}$ の 2 分の 1 となる基質濃度	407
NLINプロシジャ - outest=cov1 オプション	424	- ミカエリス定数	407
- output ステートメント	424	$K_m$ で偏微分 - ミカエリス・メンテン式	407
- 阻害定数 $K_i$ の直接推定	444	検証/ NLINプロシジャ - 標準誤差	422
- パラメータの一括推定	452	現代の算盤 - Excel の計算シート	410
- 非線形回帰	421, 444	原典からの酵素反応速度論 - 知名・岡田(2014)	405
- <i>Hanes-Woolf</i> 変換	426	合成分散の一般式(デルタ法) - 知る人ぞ知る	427
- 理解を深めたい	447	酵素阻害実験データ - 量×量の 2 因子実験	429
Mmult () 関数 - Excel の行列の積	410	誤差が不均一 - 逆数変換 $(1/V)$	407
終わりにしませんか - 線形変換で悩む	454	- 推定値が不安定	407
OnDemand SAS - 無償で継続的	421	誤差の伝播の公式 - 逆数の標準誤差	427
か 回帰直線の 95% 信頼区間 - <i>Scatchard</i> ・ <i>Eadie-Hofstee</i> 変換	417	誤差の伝播 - 不安定な阻害定数 $K_i$ の推定	446
- <i>Hanes-Woolf</i> 変換	415	個別 $K_m$ $V_{max}$ - SAS プログラム	453
- <i>Lineweaver-Burk</i> 変換	413	個別パラメータ - 一括推定	451












さ 最大反応 $V_{max}$ - 95%信頼区間	418	さ 阻害定数 $K_i$ - 簡単な数値を与えて例示	430
- 標準誤差 $SE$	418	- $(K_m)_0$ の2倍となる阻害薬Aの濃度	429
- ミカエリス定数 $K_m$	405	- 95%信頼区間	438
最大反応 $V_{max}$ を共通 - ミカエリス定数	439	- 推定結果との比較	446
- ミカエリス定数の推定	440	- 推定方法	430
SAS - DATAステップ	421	- 推定方法による揺らぎ	442
- PROCステップ	421	- 濃度 $[I]$ を逆推定	430
SASによる検証 - Excel による非線形回帰	421	- 両逆数・Lineweaver-Burk 変換	446
SASの標準出力 - HTML形式	421	- 揺らぎの実際	435
SASプログラム - 個別 $K_m$ $V_{max}$	453	- 揺らぎ	442
- 阻害定数 $K_i$ 直接推定	444	阻害定数 $K_i$ が不安定 - $V_{max}$ を共通	442
- 追加データファイル	423	阻害定数 $K_i$ の推定 - Excel の計算シート	448
- ミカエリス・メンテン式	422	- 傾き $(K_m)_i / (V_{max})_i$	436
Substrate concentration - 基質濃度 $[S]$	407	- 2段階の線形化	444
さらなる改良 - Scatchard・Eadie-Hofstee 変換	416	- 2段階目	432
残差のベクトル $\varepsilon^\wedge$ - 残差線形化法 $\delta^\wedge$	449	- ミカエリス・メンテン式	428
残差線形化法 $\delta^\wedge$ - 残差のベクトル $\varepsilon^\wedge$	449	阻害定数 $K_i$ の直接推定 - Excel による非線形回帰	447
残差平方和 $Se$ を最小に - Excel のソルバー	408	- Excel のソルバー	450
3倍強の違い - ミカエリス定数の $SE$	419	- NLINプロシジャ	444
散布図から復元 - Armitageら(2002)	407	- SASプログラム	444
$\Sigma(\theta^\wedge)$ の対角要素 - パラメータの分散	408	- 非線形回帰	443
知る人ぞ知る - 合成分散の一般式(デルタ法)	427	阻害定数 $K_i$ の比 - 2種類の推定方法	428
推定に推定を重ねる線形変換 - 推定精度の劣化	438	阻害定数 $K_i$ の比較 - 各種の推定方法	442
推定結果との比較 - 阻害定数 $K_i$	446	阻害定数の推定 - 非線形回帰	428
推定精度の劣化 - 推定に推定を重ねる線形変換	438	- 山崎ら(2008)	428
推定値 $V^\wedge$ - 反応速度	410	阻害薬 A 14 nM - 95%信頼区間	434
推定値 $V^\wedge$ の分散 - 反応速度	410	- ミカエリス定数の推定	434
推定値が一定しない - 線形変換	454	阻害薬 A なし - 95%信頼区間	433
推定値が不安定 - 誤差が不均一	407	- ミカエリス定数の推定	432
- Lineweaver-Burk 変換	413	阻害薬Aの濃度 $[I]_i$ ごと - ミカエリス定数 $(K_m)_i$	445
推定値に若干の差異 - Armitageら(2002)	420	阻害薬Aの濃度別 - (1, 1) 標示型	439
推定方法 - 阻害定数 $K_i$	430	阻害薬の酵素反応 - 4種類の阻害様式	429
推定方法による揺らぎ - 阻害定数 $K_i^\wedge$	442	阻害薬の濃度別 - $(V_{max})_i$ と $(K_m)_i$ を推定	451
Scatchard・Eadie-Hofstee 変換 - さらなる改良	416	阻害薬濃度 $[I]$ に関する回帰 - 傾き $(K_m)_i / (V_{max})_i$	437
- パラメータ推定	416	阻害薬濃度 $[I]_i$ ごと - ミカエリス・メンテン曲線	441
- 回帰直線の95%信頼区間	417	阻害様式 - 確認のための手順	451
Scatchard 変換 - Eadie-Hofstee 変換	406	た 対数目盛 - Excel のX軸の書式設定	410
- 線形化	406	Direct linear plot - Armitageら(2002)	420
積和行列 $(Z^T Z)$ - 微係数行列 $Z$	448	- Cressie-Keightley プロット	420
切片 $\beta_0^\wedge$ の逆数 - $\beta_0^\wedge$ で偏微分	412	ダミー変数 - (1, 1) 標示型	439
線形化 - Scatchard 変換	406	知名ら(2014) - Cleland-Wilkinson 法	420
- パラメータの推定精度	405, 417	- 原典からの酵素反応速度論	405
- パラメータ推定の脆弱性	405	- Tseng-Hsu 法	420
- Hanes-Woolf 変換	406	- 非線形回帰	405
- ミカエリス・メンテン式	405	- 歴史的背景	405
線形化にこだわる - 悪あがき	419	追加データファイル - SASプログラム	423
線形変換 - 推定値が一定しない	454	2パラメータ - ロジスティック曲線	410
線形変換で悩む - Excel のソルバー/非線形回帰	454	DATAステップ - SAS	421
- 終わりにしませんか	454	- doステートメント	444
非線形回帰 - 阻害定数 $K_i$ の直接推定	443	データファイル - 併合	424
相関行列/パラメータ - 共分散行列/パラメータ	422	Tseng-Hsu 法 - 知名ら(2014)	420
阻害定数 $K_i$ を用いた式 - ミカエリス定数 $(K_m)_i$	431	doステートメント - DATAステップ	444
阻害定数 $(K_i)'_i$ - $V_{max}$ を共通	441	統計ソフトSAS - ミカエリス・メンテン式	421
		統計ソフトの使用 - 非線形回帰	417

た 統計ソフトの出力 - Excelの作図機能	425	は $V^{\wedge}max$ の分散 - 2 次形式	412
Transpose() 関数 - 行列の転置/ Excel	410	$Vmax$ - 反応速度 $V$ の最大値	407
量×量の2因子実験 - 酵素阻害実験データ	429	$Vmax$ および $Km$ - パラメータとして直接	426
な 2 次形式 - パラメータの共分散行列 $\Sigma(\theta^{\wedge})$	412	$Vmax$ で偏微分 - ミカエリス・メンテン式	407
- $V^{\wedge}max$ の分散	412	$Vmax$ の2分の1となる基質濃度 - $Km$	407
2 種類の推定方法 - 阻害定数 $Ki$ の比	428	$Vmax$ を共通 - 阻害定数 $(Ki)_i$	441
2 段階による推定値 - 両逆数・Lineweaver-Burk 変換	428	- 阻害定数 $Ki$ が不安定	442
2 段階の線形化 - 阻害定数 $Ki$ の推定	444	- ミカエリス・メンテン曲線	441
2 段階目 - 阻害定数 $Ki$ の推定	432	負の阻害定数 $Ki$ の推定 - X切片	431
濃度 $[I]$ を逆推定 - 阻害定数 $Ki$	430	PROCステップ - SAS	421
Non-linear regression - Armitageら (2002)	405	併合 - データファイル	424
は Hanes-Woolf 変換式 - 傾き $\beta_1^{\wedge}$ の逆数	426	Hanes-Woolf 変換 - NLINプロシジャ	427
パラメータとして直接 - $Vmax$ および $Km$	426	- 回帰直線の95%信頼区間	415
パラメータに関し - 偏微分	447	- パラメータ推定	414
パラメータの95%信頼区間 - 非線形回帰	409	- 非線形回帰	425, 426
パラメータの一括推定 - NLINプロシジャ	452	$\beta^{\wedge}_0$ で偏微分 - 切片 $\beta^{\wedge}_0$ の逆数	412
パラメータの共分散行列 $\Sigma(\theta^{\wedge})$ - 2 次形式	412	Velocity - 反応速度 $V$	407
- 反復の過程	425	変換式 $([S]/V)$ - 変数名として $S\_V$	426
- 微係数行列 $Z$	408	変数名として $S\_V$ - 変換式 $([S]/V)$	426
パラメータの推定精度 - 線形化	405, 417	偏微分 - 傾き $\beta^{\wedge}_1$ と切片 $\beta^{\wedge}_0$ の比	412
パラメータの分散 - $\Sigma(\theta^{\wedge})$ の対角要素	408	- パラメータに関し	447
パラメータ推定 - Scatchard・Eadie-Hofstee 変換	416	偏微分式の出力 - listオプション	424
- Hanes-Woolf 変換	414	本質的な脆弱性 - Excel	421
- ミカエリス・メンテン式	405	ま $-(Km)_0$ - X切片	433
- Lineweaver-Burk 変換	412	Michaelis-Menten - ミカエリス・メンテン	405
パラメータ推定の頑健性 - 非線形モデル	405	Michaelis-Menten assay - Armitageら (2002)	405
パラメータ推定の脆弱性 - 線形化	405	ミカエリス・メンテン - Michaelis-Menten	405
Hanes-Woolf 変換 - 線形化	406	ミカエリス・メンテン曲線 - 95%信頼区間	409
反応速度 - 推定値 $V^{\wedge}$	410	- 95%信頼区間	411, 423, 425
- 推定値 $V^{\wedge}$ の分散	410	- 阻害薬濃度 $[I]_i$ ごと	441
反応速度 $V$ - Velocity	407	- $Vmax$ を共通	441
反応速度 $V$ の最大値 - $Vmax$	407	ミカエリス・メンテン式 - 新たな統計解析	405
反復の過程 - パラメータの共分散行列 $\Sigma(\theta^{\wedge})$	425	- 各種の線形変換	417
微係数行列 $Z$ - 積和行列 $(Z^T Z)$	448	- $Km$ で偏微分	407
- パラメータの共分散行列 $\Sigma(\theta^{\wedge})$	408	- 線形化	405
非線形 - ミカエリス・メンテン式	406	- SAS プログラム	422
非線形モデル - パラメータ推定の頑健性	405	- 阻害定数 $Ki$ の推定	428
- ミカエリス・メンテン式	405, 408	- 統計ソフト SAS	421
非線形回帰 - Excel により手軽に	419	- パラメータ推定	405
- Excel の1枚のシート上で	420	- 非線形	406
- Excel のソルバー	439	- 非線形モデル	405, 408
- NLINプロシジャ	421, 444	- $Vmax$ で偏微分	407
- 計算方法がブラック・ボックス	417	- ロジスティック曲線式	411
- 阻害定数の推定	428	ミカエリス定数 - $Km$	407
- 知名ら (2014)	405	- 最大反応 $Vmax$ を共通	439
- 統計ソフトの使用	417	ミカエリス定数 $(Km)_i$ - 阻害定数 $Ki$ を用いた式	431
- パラメータの95%信頼区間	409	- 阻害薬Aの濃度 $[I]_i$ ごと	445
- Hanes-Woolf 変換	425, 426	- 両逆数・Lineweaver-Burk 変換	432
標準誤差 - 検証/ NLINプロシジャ	422	ミカエリス定数 $Km$ - 95%信頼区間	419
標準誤差 $SE$ - 最大反応 $Vmax$	418	- 最大反応 $Vmax$	405
- ミカエリス定数 $Km$	419	- 標準誤差 $SE$	419
標準誤差が示されていない - Armitageら (2002)	420	ミカエリス定数 $Km$ の推定 - 阻害薬 A なし	432
不安定な阻害定数 $Ki$ の推定 - 誤差の伝播	446	ミカエリス定数 $Km^{\wedge}$ - 傾き $\beta^{\wedge}_1$ と切片 $\beta^{\wedge}_0$ の比	412
$(Vmax)_i$ と $(Km)_i$ を推定 - 阻害薬の濃度別	451	ミカエリス定数の $SE$ - 3 倍強の違い	419
$1/(Vmax)_0$ - Y切片	433		

ま ミカエリス定数の推定 - 阻害薬 A 14 nM	434	ら listオプション - 偏微分式の出力	424
- 最大反応 $V_{max}$ を共通	440	両逆数 - <i>Lineweaver-Burk</i> 変換	406, 411
無償で継続的 - OnDemand SAS	421	両逆数 GLM/gamma errors - Armitageら (2002)	420
や 山崎ら (2008) - 拮抗阻害	428	両逆数・ <i>Lineweaver-Burk</i> 変換 - 阻害定数 $(K_i)_i$	446
- 阻害定数の推定	428	- 2 段階による推定値	428
揺らぎ - 阻害定数 $K_i$	442	- ミカエリス定数 $(K_m)_i$ の推定	432
揺らぎの実際 - 阻害定数 $K_i$	435	歴史的背景 - 知名ら (2014)	405
4 種類の阻害様式 - 阻害薬の酵素反応	429	Rouaud (2017) - ガウス・ニュートン法	420
ら <i>Lineweaver-Burk</i> 変換 - 回帰直線の95%信頼区間	413	ロジスティック曲線 - 2 パラメータ	410
- 推定値が不安定	413	ロジスティック曲線式 - ミカエリス・メンテン式	411
- パラメータ推定	412	Y切片 - $1 / (V_{max})_0$	433
- 両逆数	406, 411	悪あがき - 線形化にこだわる	419
理解を深めたい - NLINプロシジャ	447		



## 第 12 章 解析用ファイル一覧

サイズ	名前	種類
 160 KB	第12章_01_ミカエリス_メンテン_非線形_線形化	Microsoft Excel ワークシート
 1 KB	第12章_02_1_ミカエリス_SAS	テキストドキュメント
 1 KB	第12章_02_2_ミカエリスWoolf_SAS	テキストドキュメント
 54 KB	第12章_02_3_ミカエリス_SAS検証	Microsoft Excel ワークシート
 161 KB	第12章_03_1_酵素阻害	Microsoft Excel ワークシート
 168 KB	第12章_03_2_酵素阻害	Microsoft Excel ワークシート
 60 KB	第12章_04_Vmax共通	Microsoft Excel ワークシート
 2 KB	第12章_05_1_阻害定数 Ki 直接推定_SAS	テキストドキュメント
 101 KB	第12章_05_2_Ki直接	Microsoft Excel ワークシート
 52 KB	第12章_06_1_Vmax_Km 個別	Microsoft Excel ワークシート
 2 KB	第12章_06_2_Vmax_Km個別推定_SAS	テキストドキュメント

非売品，無断複製を禁ずる

第 12 回 続高橋セミナー  
層別因子を含む探索的な回帰分析入門

## 第 12 章 ミカエリス・メンテン式をめぐる新たな統計解析

BioStat 研究所(株)  
〒105-0014 東京都 港区 芝 1-12-3 の1005  
2024 年 3 月 21 日 高橋 行雄  
[takahashi.stat@nifty.com](mailto:takahashi.stat@nifty.com) , FAX : 03-342-8035