

遺伝子治療薬のタンパク質発現と効力試験の新しいゴールドスタンダード

Simple Western™: マルチ特性分析プラットフォームによる、QC標準グレードのタンパク質発現の定量

遺伝子治療薬の効力測定に優れた分析法が必要

革新的な遺伝子治療が患者に届かないという大きな課題の一つとして、目的に即した効力測定法が存在しないことが挙げられます。効力測定は、医薬品の分析プロセスの中で最も重要な測定法の一つですが、最も複雑でリスクの高い測定法であるとも言われています^{1,5}。効力試験は、「適切な臨床試験において意図された方法で製剤を投与して得られ、適切に管理された臨床データによって示される、特定の結果をもたらす製剤の効力」と定義され、プロセス開発試験、特性評価分析、QCリリース試験、安定性試験、比較試験などに用いられます²。効力測定は、定量的で、なおかつ用量反応性があり、十分に管理されたものでなければなりません。作用機序が複雑であるため、遺伝子治療薬の効力測定には、感染性、導入遺伝子のmRNAおよびタンパク質の発現量、生物学的活性といった複数の相補的なアッセイを組み合わせたマトリックスアプローチが必要です。

ELISA法はタンパク質の発現量解析における実績のあるアッセイ法ですが⁶、マトリックス効果による干渉やアッセイ開発が困難なこと、交差反応による分析対象物の過大評価などの技術的な限界があります。ウェスタンブロットは、再現性が低いこと、定量が難しいこと、大量のサンプルを必要とすること、スルーputが低いことといった問題があるにもかかわらず、依然として臨床試験で使用されています⁷。フローサイトメトリーはバックグラウンド干渉⁸といった技術的制限があり、さらに検証済抗体が不足しているため、GMP要件を満たすことが複雑になる可能性があります。そして、PCR法ではタンパク質の発現を完全には予測できません⁹。

結果として、タンパク質発現を定量するための新しい効力測定法が求められています。製造プロセス開発の上流および下流に導入可能な、効率的で簡便かつ低コストなアッセイプラットフォームによる方法が理想的です⁹。

ELISAのQC標準グレードの定量性とウェスタンブロットの柔軟性の統合

Simple Western™は、分子量(MW) または 等電点分離と、定量的なイムノアッセイを組み合わせたキャピラリー電気泳動 (CE) プラットフォームです。高い再現性と特異性でタンパク質発現を定量でき、QC標準グレードの効力測定の次世代ゴールドスタンダードとして位置づけられます。ウェスタンブロットの柔軟性と特異性をELISAのQC標準グレードの定量性と組み合わせたSimple Westernでは、複雑なサンプル（例えば組織ホモジネート）内の特異的な測定に理想的です。また、ELISAでしばしば問題となるマトリックス効果の影響を受けずに、細胞内タンパク質発現を分析できます。

Simple Westernは、検証済みの抗体1種類だけを必要とし、トータル3時間という迅速な分析時間のアッセイプラットフォームのため、ELISAのような複雑なアッセイ開発を行うことなく、前臨床からGMPへのスケールアップまで、医薬品開発を迅速化します。さらに、遺伝子治療薬開発において、Simple Westernはマルチ特性解析法として、タンパク質発現量の定量による効力アッセイにとどまらず、純度、力価、中空(Empty)/完全粒子(Full)、カプシドタンパク質比などの定量的な重要品質特性(CQA)モニタリングにも使用できます¹⁰⁻¹⁵。

このアプリケーションノートでは、ヒトの培養細胞へのAAVを用いた遺伝子を導入する際の、Simple Westernによる平行線検定(PLA)を用いた相対効力測定法について述べます。実施した内容は以下の通りです:

- 高い特異性と5%未満のCVを実現したAAVセロタイプ間のタンパク質発現量分析による相対効力測定
- 組み換え体を用いた標準検量線による、AAV導入細胞での絶対的タンパク質発現定量
- 感染性の代用指標として、AAV導入細胞内の残存カプシドタンパク質の検出

GFP導入細胞で直接GFPを測定し、総タンパク質ノーマライゼーションを行うことで、AAV2がAAV9よりも有意に高い効力を持つことを示しました、またフローサイトメトリよりも10倍高感度で再現性が向上し、ELISAよりも特異性が高くまたマトリックス効果も少ない¹⁶、高い定量のある測定が可能なことも示しました。

材料と方法

タンパク質発現相対効力アッセイ

アッセイに使用した材料を表1に示します。血清型AAV2とAAV9を、AAV 遺伝子治療の in vivo 効力アッセイに使われているヒト肝癌細胞（HepG2肝細胞株）¹⁷への遺伝子導入に使用しました。これらのベクターは、HepG2細胞にレポーターであるGFPを導入し、CMVプロモーターによってGFP発現するように設計されたものです。レポーターはCMV-GFP導入遺伝子を挟む相同性配列のないランダムゲノムインテグレーションによって、HepG2細胞へのAAVによる遺伝子導入が確立されたものです。

ヒト肝細胞へのAAVによる遺伝子導入

HepG2細胞は、CMV-GFP遺伝子を持つAAV2またはAAV9ベクターにより、細胞あたり 1×10^6 、 2×10^5 、 4×10^4 、 8×10^3 、 1.6×10^3 、 3.2×10^2 、および 6.4×10^1 ベクターゲノム/細胞 (vg/cell) の7段階濃度（それぞれデュプリケート）で遺伝子導入しました。ネガティブコントロールにトランスジーンを持たないAAV2とAAV9を使用しました。遺伝子導入後48時間で、各バイアルから 6×10^6 細胞を回収し、3本のエッペンドルフチューブに分けました(1本あたり 2×10^6 細胞)。細胞を1000 x gで2分間遠心し、上清を除去した後、1 mLのPBSで洗浄しました。再度1000 x gで2分間遠心し、上清を除去した後、チューブをドライアイス上に10分間置き、細胞を瞬間凍結し、-80℃で保存しました。

Simple Westernでの分析

全てのサンプルの調製は、12-230 kDa Separation Moduleの製品添付文書に記載されている方法に従って行い、抗GFP抗体は、Milk-Free Antibody Diluentで20 µg/mLに希

釈しました。Simple WesternのJess™のデフォルト設定で、個別に0.1 mg/mLに調製したサンプルを用いてアッセイを3回実施し、相対効力を評価しました。ここでは、AAV9をレファレンス材料、AAV2を試験材料として選びました。GFPおよび総タンパク質は、それぞれRePlex™アッセイのプロープ1およびプロープ2で検出しました。

平行線検定 (PLA)

平行線検定法による相対効力の評価には、総タンパク質によるノーマライゼーション前後のデータを使用しました。GraphPad Prismによる平行線検定法の詳細については付録を参照ください。

タンパク質発現の絶対定量

GFPタンパク質を絶対定量するために、組み換えGFP (rGFP)を連続3倍で5 ng/mLから0.06 ng/mLまで希釈し、AAV2またはAAV9を導入した細胞と同じく、Simple Westernで分析しました。分析結果として得られた各rGFPのピーク面積と濃度を対数変換後にプロットし、 $1/y^2$ 重み付けを用いた回帰分析することで標準検量線を作成し、遺伝子導入細胞におけるGFPの発現量を絶対定量しました。全てのサンプルで2重分析を行いました。

細胞内のAAV VP1/VP2/VP3の検出

細胞内のAAV検出に使用した材料を表2に示します。全てのサンプルは、70 °Cで10分間熱変性した以外は、66-440 kDa Separation Moduleの製品添付文書に記載された方法に従って調製しました。抗VP1/VP2/VP3抗体はAntibody Diluent 2で20 µg/mLに希釈し、抗マウスHRP二次抗体はAntibody Diluent 2で1Xにしました。サンプルロード時間を6秒に調整した以外は、Simple WesternのJessでデフォルト設定のまま、全てのサンプルを2重分析しました。

表1. 相対効力試験に使用した材料

製品名	メーカー	製品番号
12-230 kDa Separation Module		SM-W004
EZ Standard Pack 2		PS-ST02EZ-8
Anti-Goat Detection Module		DM-006
Total Protein Detection Module	Bio-Techne	DM-TP01
RePlex™ Module		RP-001
Recombinant Jellyfish GFP Protein		NBC1-22949
Anti-GFP Antibody		AF4240
AAV2/9 with CMV-GFP and empty	Virovek	N/A

表2. VP1/2/3検出に使用した材料

製品名	メーカー	製品番号
66-440 kDa Separation Module		SM-W008
Goat-Anti-Mouse-HRP Antibody		040-655
Streptavidin-HRP	Bio-Techne	042-414
Luminol-S		043-311
Peroxide		043-379
Antibody Diluent 2		042-203
Anti-AAV VP1/VP2/VP3 Antibody	PROGEN	690058S
AAV2 vector stock	Virovek	N/A

Simple Westernを用いたタンパク質発現量の相対効力測定の結果

アッセイの対数線形範囲の決定

最初に、シグナル面積と濃度を対数変換後、それらの間に直線的な関係が得られるレファレンスサンプルと評価用サンプルの適切な濃度を決定しました。この時、AAV2を試験試料、AAV9をレファレンス試料としました。

AAV2またはAAV9を 1×10^6 から 6.4×10^1 まで、5倍連続希釈の濃度で遺伝子導入したHepG2細胞ライセートを、1、0.1、および0.01 mg/mLの濃度で分析しました。抗GFP抗体を用いてこれらのサンプルをJessで分析した結果、AAV2導入細胞のGFP発現量は1 mg/mLで飽和に達した（図1、上段）一方で、AAV9導入細胞では低濃度では非常に低いGFP発現シグナルでした（図1、中段）。細胞ライセート濃度が0.1 mg/mLの時、GFP発現量はAAV2では 6.4×10^1 から 8×10^3 vg/cell、AAV9では 1.6×10^3 から 1×10^6 vg/cellまで直線的に変化しました（図1、下段）。

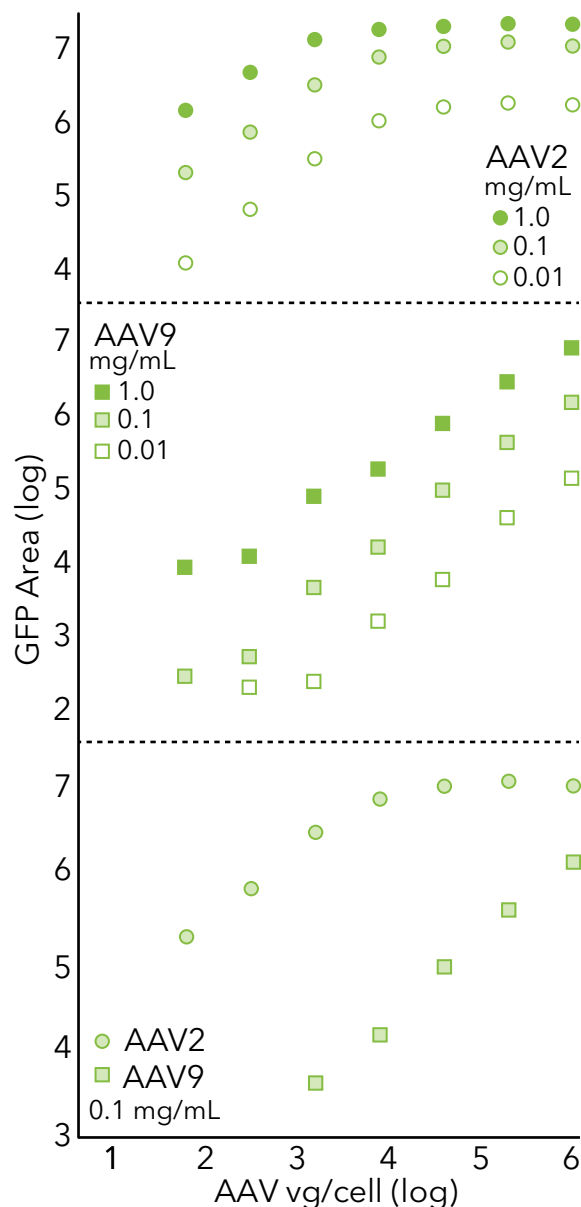
これらの結果に基づいて、AAV2およびAAV9によって遺伝子導入された細胞の、細胞ライセート濃度0.1 mg/mLでの相対効力を評価しました。AAV2では $6.4 \times 10^1 \sim 4 \times 10^4$ 、AAV9では $1.6 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ のウイルス力価を使用し、5段階の濃度で評価しました。

AAV2およびAAV9の相対効力の測定

前述で決定した0.1mg/mLの細胞ライセート濃度で、遺伝子導入した肝細胞のGFP発現量をSimple Westernで分析したところ、AAV2では力価 4×10^4 vg/cell以上で最大のGFP発現量が、AAV9では力価 1×10^6 vg/cell以上で最大のGFP発現量が得られました（図2A）。これらの結果は、同時間にサンプリングした細胞のフローサイトメトリー分析と一致しており、AAV2による遺伝子導入はAAV9よりも有意に高いGFPの発現をもたらしました（図2B）。フローサイトメトリーでは、AAV9で少なくとも 4.0×10^4 vg/cellの力価が必要であるのに対して、Simple Westernはより高感度で、わずか 1.6×10^3 vg/cellのAAV9導入細胞でもGFPを検出できました。本条件下では、Simple Westernによる検出は、フローサイトメトリーよりも10倍高感度でした。

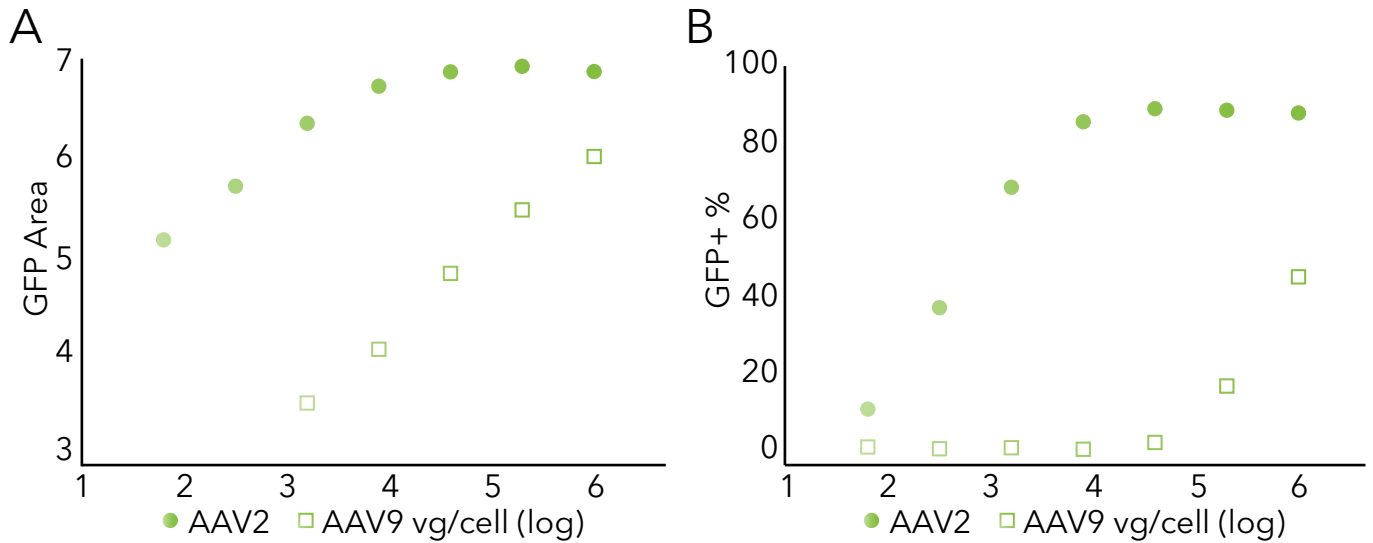
JessのRePlex機能を使い、プローブ1では抗GFP抗体による免疫検出を行い（図3、緑）、RePlexのプローブ2では総タンパク質を検出し、ノーマライゼーションを行いました（図3、青）。これを個別に調製したサンプルで3回繰り返し、後述の平行線検定法を用いて相対効力を算出しました。

図 1. アッセイの対数線形範囲の決定



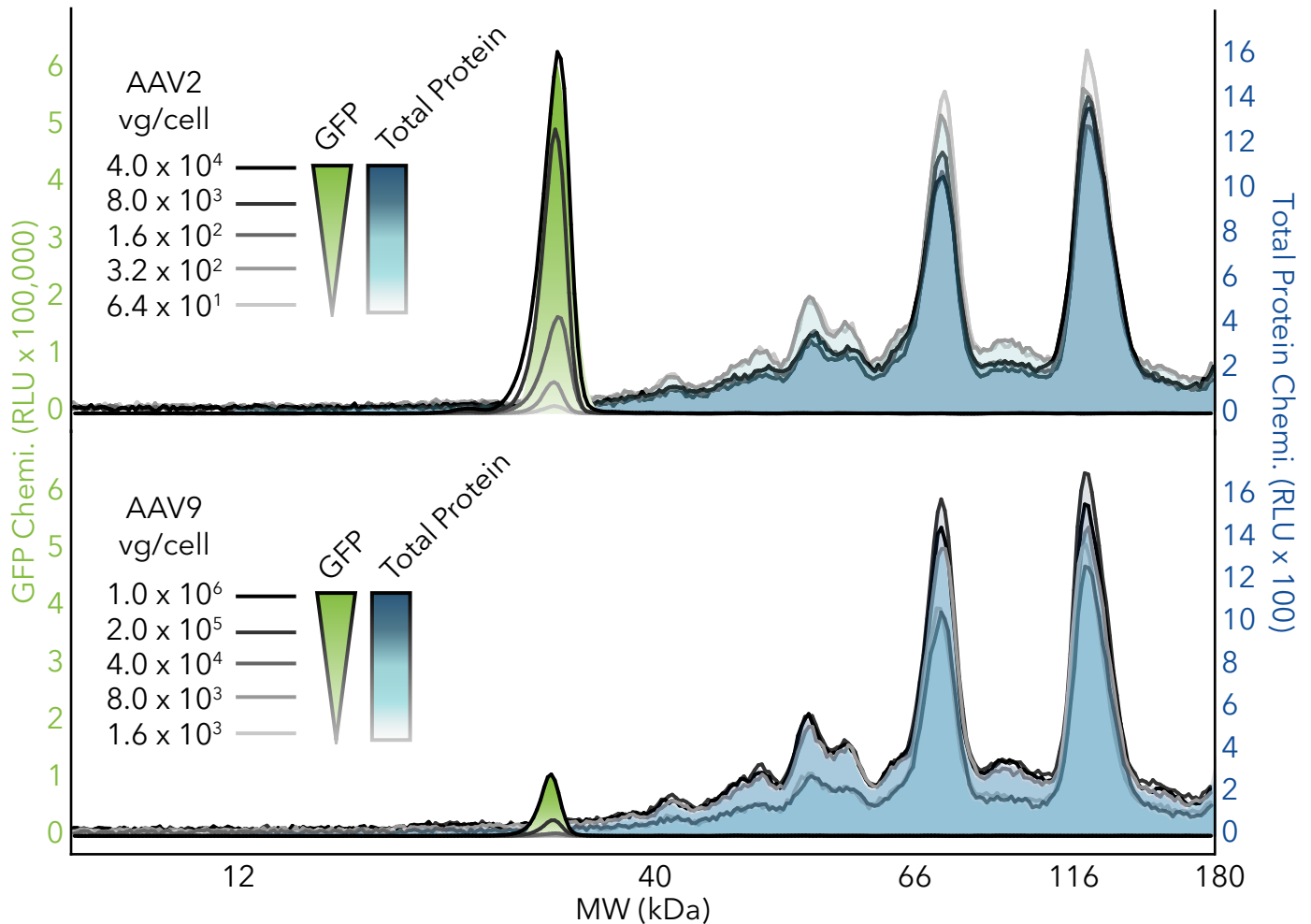
AAV2（丸）およびAAV9（四角）で遺伝子導入したHepG2細胞の細胞ライセートを、最終濃度1 mg/mL（塗りつぶし）、0.1 mg/mL（斜線）、および0.01 mg/mL（空）で分析した。導入遺伝子GFPの発現のピーク面積は抗GFP抗体で測定した。

図 2. AAVを介して導入した、GFP遺伝子の発現量のSimple Western(A)およびフローサイトメトリー(B)での解析



(A) AAV2 (緑丸) または AAV9 (白四角) による遺伝子導入後48時間で瞬間凍結した細胞ライセート (0.1 mg/mL) のGFP発現量をSimple Westernで測定した。
 (B) 同じ48時間後のサンプリングで、GFP陽性細胞の割合 (GFP+ %) をフローサイトメトリーで測定した。

図 3. AAVを介して導入した、GFP遺伝子の発現量の総タンパク質検出によるSimple Western解析



AAV2 (上図) と AAV9 (下図) を連続希釈してGFP遺伝子を導入した、肝細胞の細胞ライセートのSimple Western分析から得られたエレクトログラムを重ねたもの。RePlex機能のProbe 1 (緑) では抗GFP抗体で免疫検出を行い、Probe 2 (青) で総タンパク質を検出した。

平行線検定 (PLA)

相対効力は、平行線検定法（図4）を使用して、前述のSimple Western測定結果（図3）をもとに算出しました。平行性を評価するには、サンプルごとに最低3点のデータポイントが必要です。最も高濃度のAAV2は、アッセイ開発の初期段階に、アッセイ範囲の上限を超えていたため解析から除外しました。得られた直線を比較すると、2つの線形回帰の傾きに有意差は認められず、相対効力の平行線検定が可能でした（図4）。GraphPad Prismを用いた平行線検定の方法については付録を参照。

AAV9に対するAAV2の相対効力を各アッセイで算出し、3回のアッセイの平均値とアッセイ間変動係数（CV）を計算しました（表3）。Simple Westernでは、過去の報告例と同様¹⁷、HepG2細胞の遺伝子導入においてAAV2がAAV9よりも有意に強力なセロタイプであることが確認され、総タンパク質ノーマライゼーション前後の平均相対効

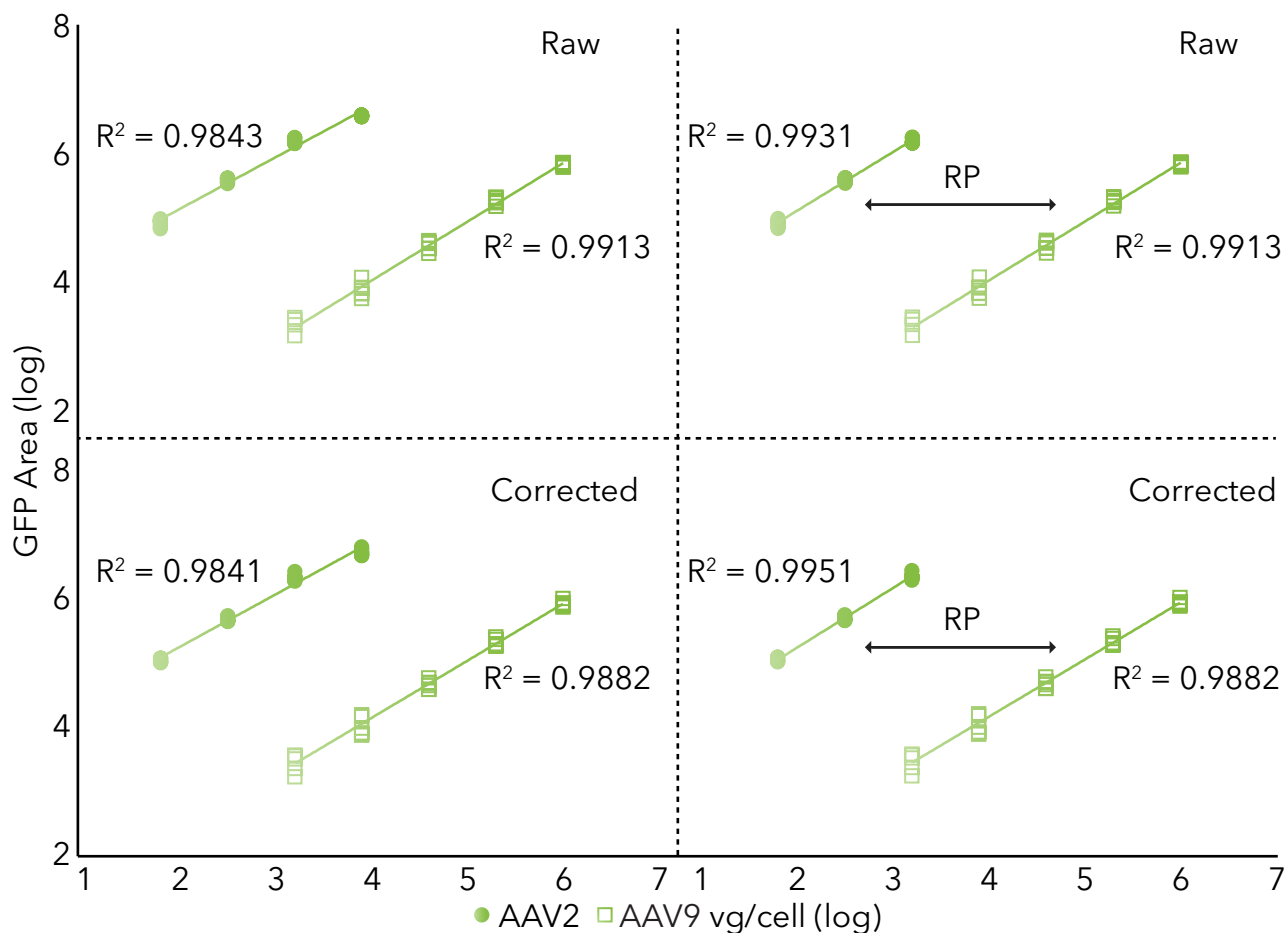
力はそれぞれ1452および1651でした（表3）。タンパク質発現データのノーマライゼーションは、分母にハウスキーピングタンパク質を使用するよりも、総タンパク質の方が信頼性が高いことが報告されています¹⁸。Simple Westernによる相対効力の定量は再現性が高く、アッセイ間のCVは総タンパク質ノーマライゼーション前後でそれぞれ2.0%、および4.8%でした（表3）。

表3. AAV9に対するAAV2の相対効力

	Rawデータ	総タンパク質ノーマライゼーション後
Run 1	1423	1597
Run 2	1451	1614
Run 3	1481	1743
Mean	1452	1651
%CV	2.0%	4.8%

相対効力は、個別に調製したサンプルを用いて行った3回のSimple Westernアッセイから評価した。総タンパク質ノーマライゼーション前後の値は、GraphPad Prism（付録参照）を使用した平行線検定法により算出した。

図4. タンパク質発現相対効力を計算するための、Simple Western平行線検定



GFPピークのRaw面積（上）および総タンパク質でノーマライズしたピーク面積（下）をAAVの力価の対数でプロットした。AAV2濃度の最も高い2点を削除し、GraphPadで解析（付録参照）すると、線形回帰の傾きに有意差はなかった。

AAV導入細胞における発現タンパク質の絶対定量

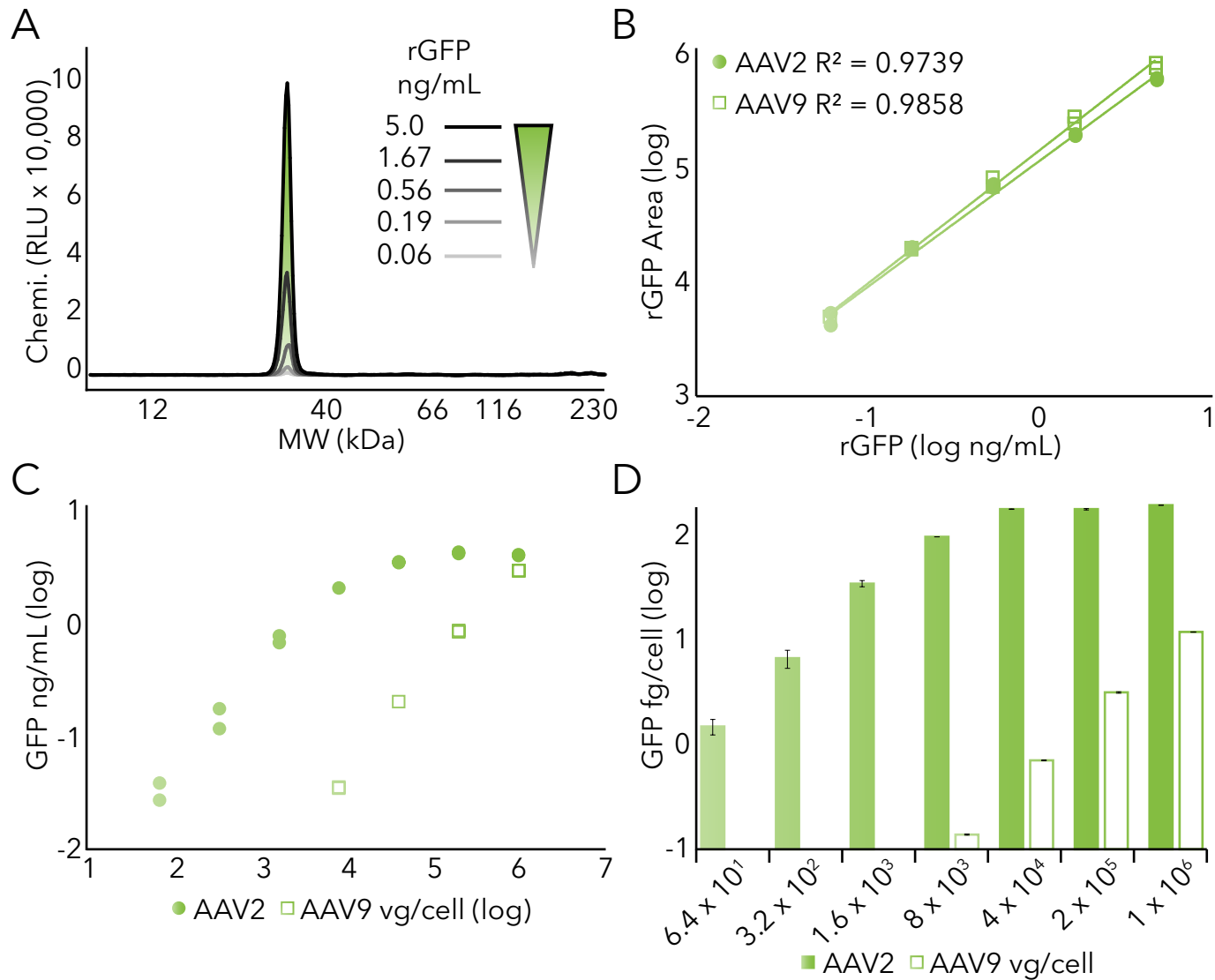
AAV導入細胞における導入されたGFP発現タンパク質濃度を絶対定量するために、AAV導入細胞サンプルと同じアッセイで分析した精製組み換えGFP（rGFP）の連続希釈系列を調製しました。各rGFP濃度とピーク面積を対数変換し、それらを1/y²重み付けを用いた回帰分析することで標準検量線を作成し、その検量線を用いてAAV導入サンプル中のGFP濃度を定量しました（図5B）。予想通り、AAV2で得られたGFP絶対濃度は3913 ng/mLと、有意に高い値を示しました(表4および図5C-D)。また、1細胞あたりのGFP絶対発現量を計算すると、AAV2ウイルス導入後の濃度は、1~196 fg/cellでした（表4および図5D）。

表 4. GFP発現量の絶対的な定量

AAV力価	AAV2-遺伝子導入細胞		AAV9遺伝子導入細胞	
	GFP ng/mL	GFP fg/cell	GFP ng/mL	GFP fg/cell
1.0 x 10 ⁶	3913	196	239	12
2.0 x 10 ⁵	3579	179	63	3
4.0 x 10 ⁴	3593	180	14	1
8.0 x 10 ³	1950	97	3	0
1.6 x 10 ³	697	35	ND	
3.2 x 10 ²	134	7	ND	
6.4 x 10 ¹	30	1	ND	

AAV9力価が1.6 x 10³ vg/cell以下の遺伝子導入細胞では、GFPの発現は検出できなかった(ND)。

図 5. AAV導入肝細胞におけるGFP発現量の絶対定量



AAV9力価が1.6 x 10³ vg/cell以下の遺伝子導入細胞では、GFPの発現は検出できなかった。エラーバーは、平均値の標準誤差を示す。

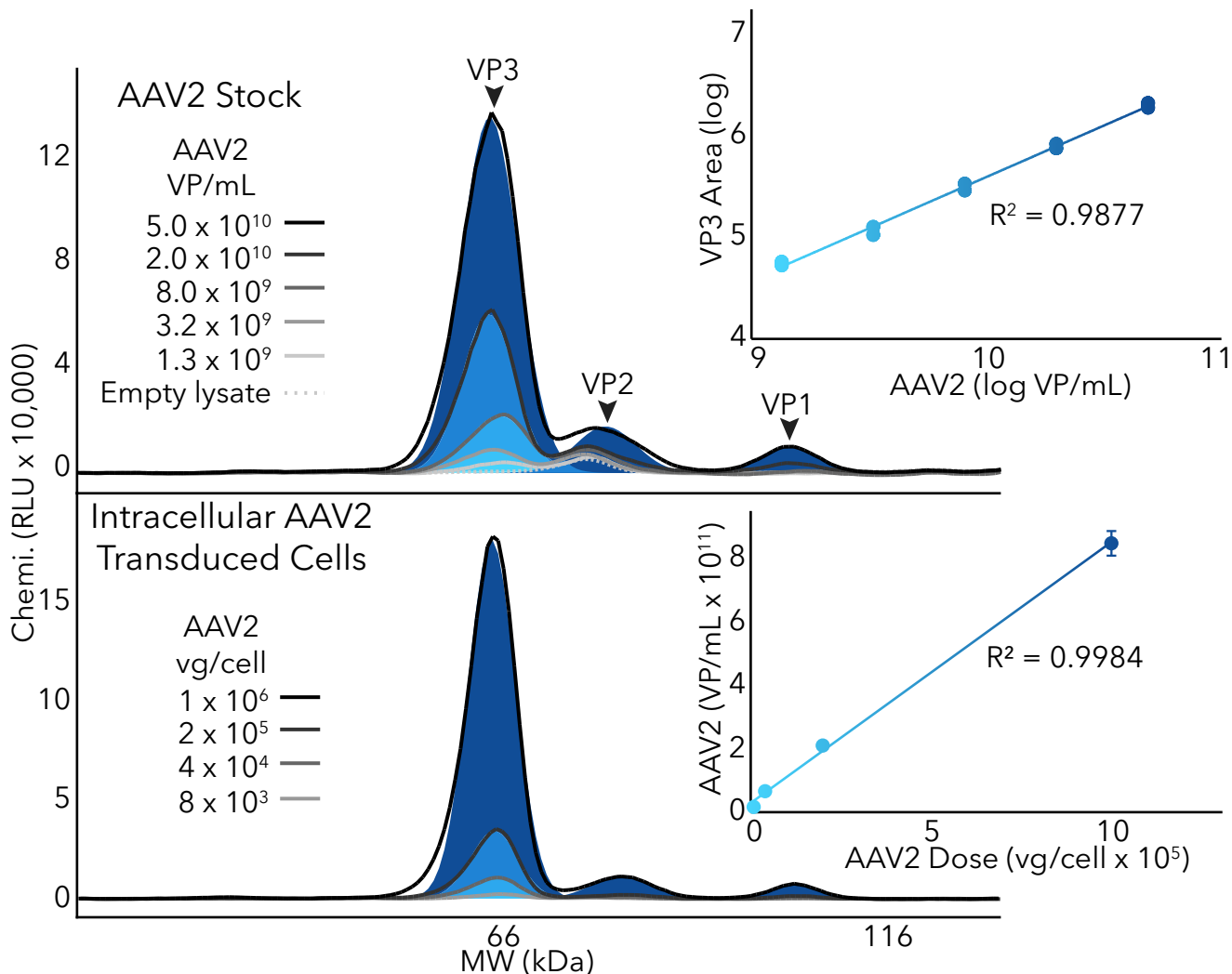
感染性代替指標としての遺伝子導入細胞における細胞内AAVカプシドタンパク質のスクリーニング

ここでは、Simple Westernを用いて遺伝子導入細胞におけるAAVカプシドタンパク質の残存性を検出できるかどうかをテストしました。精製AAV2をHepG2ライセートで連続希釈し、調製したものをポジティブコントロールとして使用し、抗VP1/2/3抗体で分析しました。VP1/2/3に対応する明確なシグナルが検出され、ベクター濃度の低下に伴いシグナルが減少しました(図6、上)。AAV2の濃度とVP3のピーク面積を対数変換し、 $1/y^2$ 重み付けを用いた回帰分析することで標準検量線を作成しました(図6、上挿入図)。次に、高いAAV2力価4濃度で遺伝子導入した細胞(図1、 $8 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ vg/cell)を抗VP1/2/3抗体で分析したところ、AAV2 stockコントロールと同様のVP1/2/3の分離プロファイルを得ました(図6、下)。最後に、検量線とVP3ピーク面積を用いて、導入細胞中のAAV2濃度を

絶対定量した結果、AAV2濃度は $1.67 \times 10^{10} \sim 8.41 \times 10^{11}$ VP/mL(希釈率で補正)となり、遺伝子導入に使用したウイルス量と直接相関していました(図6、下挿入図)。

TCID₅₀アッセイは感染価の測定に使用されますが、信頼性に欠け、スケールアップも容易ではありません。少なくとも、本試験はAAV感染価の代替法として、またTCID₅₀アッセイに代わる迅速なマルチ特性分析法として、Simple WesternがAAVベクター導入細胞内のAAVベクター発現タンパク質を絶対定量するために使用された最初の例です。残存するAAVカプシドタンパク質は免疫原性を持ち、AAV遺伝子治療薬投与後の患者の安全性に影響を及ぼす可能性があるため、AAVのin vivo残存性は臨床的に重要です。

図 6. AAV感染価の代替法としての遺伝子導入肝細胞における細胞内VP1/2/3の検出



抗VP1/2/3抗体を用いて、未処理HepG2細胞細胞ライセート(図上)で5倍希釈して調製したAAVベクター、および20倍希釈したAAV2遺伝子導入HepG2細胞細胞ライセート(図下)のSimple Western分析。AAV2 stockのVP3ピーク面積をAAV2 stockの濃度別にプロットして検量線を作製し(上部挿入図)、この検量線を用いて遺伝子導入した細胞中のAAV2を定量し、希釈率で補正して用量別にプロットした(下部挿入図)。AAV9で遺伝子導入した細胞で、抗VP1/2/3抗体によるシグナルは検出されなかった(データは示さず)。

目的に沿った効力測定法

本稿では、[Simple Western](#)がAAVの相対効力を評価するための、特異的で再現性の高い定量ツールとなることを示しました。AAV2とAAV9のセロタイプ間の相対効力は、Simple WesternのRePlex機能を用い、同一キャピラリー内で自動検出された総タンパク質量でノーマライズしたGFPトランスジーンが発現を測定することで評価しました。これまでの報告と同様、AAV2がAAV9よりも有意に強力なセロタイプであることをSimple Westernでも証明できました。Simple Westernのアッセイは定量的で再現性が高く、個別に調製した3つのサンプルで実施した3回のアッセイ間でCV<5%でした。

Simple Westernで得られた結果では、AAV2がAAV9よりも強力な遺伝子導入とGFP発現を示し、フローサイトメトリー分析とも一致していました。一方、今回試験した条件下では、Simple Westernはフローサイトメトリーよりも10倍以上高感度でした。Simple Westernには、フローサイトメトリーでは困難な細胞内タンパク質を検出できるという特長もあります。さらに、Simple Westernでは検量線を作製して、細胞内タンパク質の絶対発現量を直接測定することもできました。

Simple Westernは、種々の複雑なサンプルマトリックスに対応し、マトリックスの影響を最小限に抑えることができるため¹⁶、ベクターを介したタンパク質発現を定量する遺伝子治療薬の効力アッセイに適したツールです。従来のELISAやウェスタンブロット法と比較して、Simple Westernはタンパク質の必要量が大幅に少なく、貴重な組織サンプルを節約することができます。また、Simple Westernは自動化されているため、複数施設間での標準化が容易で、スループットも向上します。従って、実験サンプル数を増やし（反復）たり、実験を繰り返す（複数回）ことで、精度をさらに高めることもできます。

ウイルスベクター特性解析と製造のための多目的プラットフォームの導入

Simple Westernは、どのような抗体でも検出に使用できるオープンなイムノアッセイプラットフォームで、カスタムアッセイの開発に必要な検証済み抗体は1つだけでよいという利点があります。これによりSimple Western装置1台で、さらには同じSimple Westernラン内で複数の特性分析が可能になります。Simple Westernは、単一のプラットフォームで、ベクター特性解析のための複数のCQA項目を測定できます。それは、効力に加え、以下が含まれます:

- [純度と同一性](#)
- [中空/完全粒子](#)
- [AAVカプシドタンパク質比 \(VP1:VP2:VP3\)](#)

参考文献

1. [The Role of Analytics in Reproducibility and Regulatory Approval of Cell and Gene Therapies](#) (2020) Bio-Techne Phacilitate Report.
2. [Guidance for Industry, Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products](#) (2020) US FDA.
3. [FDA Calls for More Data on Sarepta Gene Therapy for DMD](#) (2020) BioPharma-Reporter.
4. [Sarepta Therapeutics Provides Program Update for SRP-9001, its Investigational Gene Therapy for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy](#) (2020) Sarepta Therapeutics Press Release.
5. [FDA Wants More Details on Sarepta Gene Therapy, Potentially Delaying Final Test](#) (2020) BioPharma Dive Brief.
6. De *et al* (2016) *Molecular Therapy* **24** S186.
7. Schnell *et al* (2019) **15** 40–6.
8. Aronson *et al* (2020) **18** 250-258.
9. [Accelerating The Time To Market Of Gene Therapies Through Use Of A Platform Approach To Characterization And Safety Testing](#) (2019) MilliporeSigma White Paper
10. Tabebordbar *et al* (2016) *Science* **351** 407-411.
11. Bäck *et al* (2019) *Neuron* **102** 05-119.e8.
12. Shyam *et al* (2022) *Ophthalmol Sci* **2** 100084.
13. Costa-Verdera *et al* (2021) *Nat Commun* **12** 6393.
14. Bezzerides *et al* (2019) *Circulation* **140** 405-419.
15. [Vector Characterization](#) (2022) ProteinSimple Bio-Techne.
16. [Stuck in the Matrix? Escape Matrix Effects in Complex Samples With Simple Western](#) (2023) ProteinSimple Bio-Techne App Note.
17. Ellis *et al* (2013) *Viro J* **10** 74.
18. Eaton *et al* (2013) *PLoS One* **8** e72457.

付録

GraphPad Prismによる平行線検定と相対効力

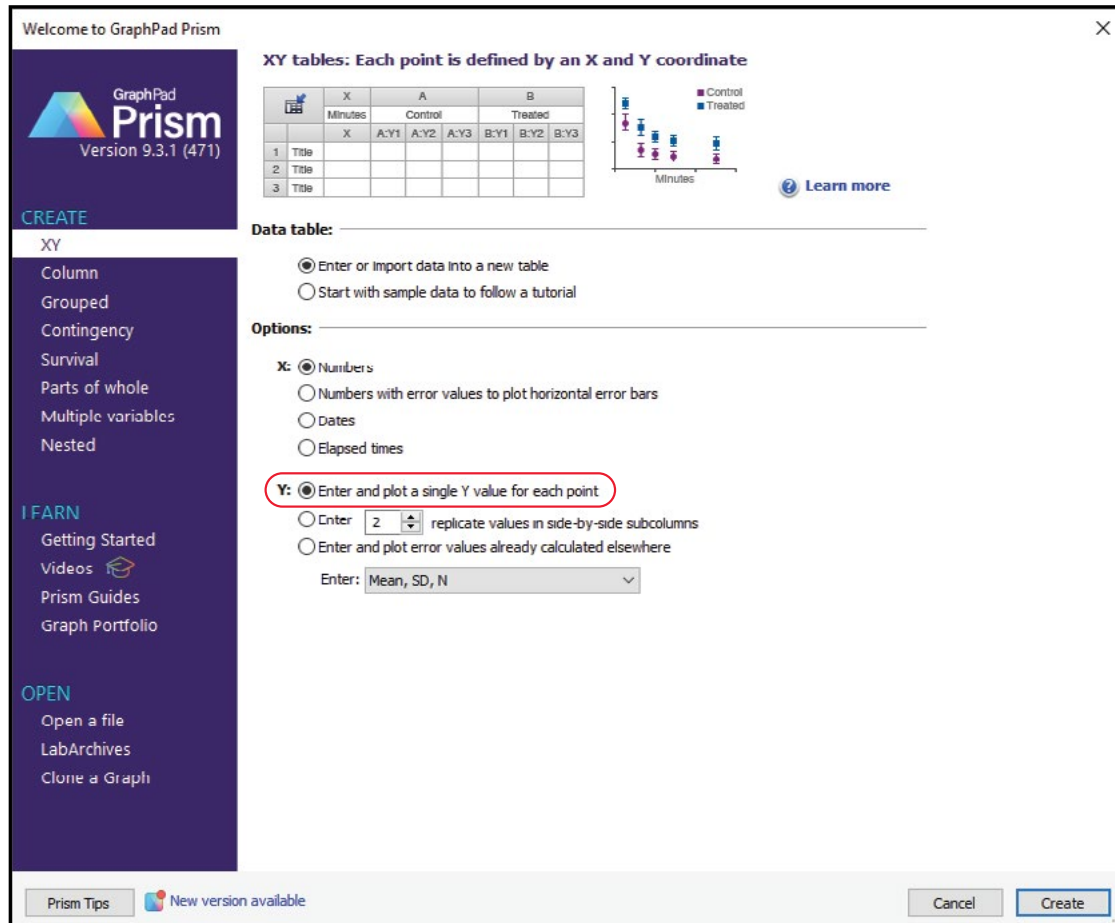
ここでは、GraphPad Prism解析ソフトを使用した平行線検定法による相対効力の求め方を、段階的に説明します。この平行線検定法は、ワクチン開発のような、遺伝子治療以外の応用でも、相対効力を計算するために使用されます。

一目でわかる相対効力の決定法

- すべてのデータを対数に変換します。
- 線形回帰フィットを適用します。
- AAV9（リファレンス）とAAV2（テスト）の線形回帰式を決定します。
- ソフトウェアが、傾きが等しいかどうか、平行かを判断します。
- Y値に対応するX値を求めます。
- 以下の手順でX 値から相対効力を決定します：
 - a. $\log(X)$ 値を10のX乗のべき数として計算します。
 - b. $\text{リファレンス} = \text{リファレンスX値} / \text{リファレンスX値}$
 - c. $\text{テスト} = \text{リファレンスX値} / \text{テストX値}$

その他の詳細とスクリーンショットを以下に示します。

1. XYファイルを作成し、適切なYオプションを選択し、Createをクリックします。



2. 「Data Tables」の「Data 1」にリファレンスデータとテストデータをペーストします。

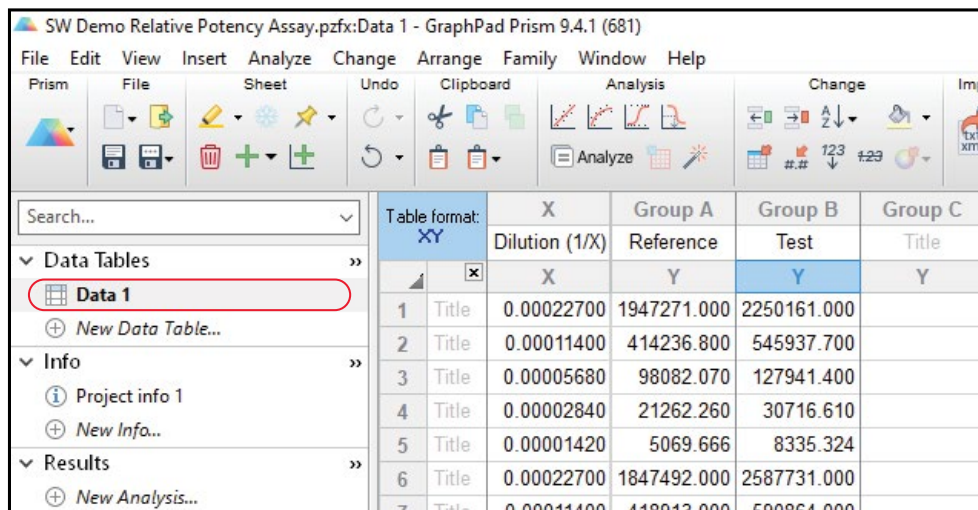


Table format: XY		X	Group A	Group B	Group C
		Dilution (1/X)	Reference	Test	Title
		X	Y	Y	Y
1	Title	0.00022700	1947271.000	2250161.000	
2	Title	0.00011400	414236.800	545937.700	
3	Title	0.00005680	98082.070	127941.400	
4	Title	0.00002840	21262.260	30716.610	
5	Title	0.00001420	5069.666	8335.324	
6	Title	0.00022700	1847492.000	2587731.000	
7	Title	0.00011400	418913.000	590864.000	

*レプリケートが同じ列に並んでいることを確認します。

3. データを入力後、「Analyze」ボタンをクリックします。

「Analyze Data」ウィンドウで「Transform」を選択します。「OK」をクリックします。

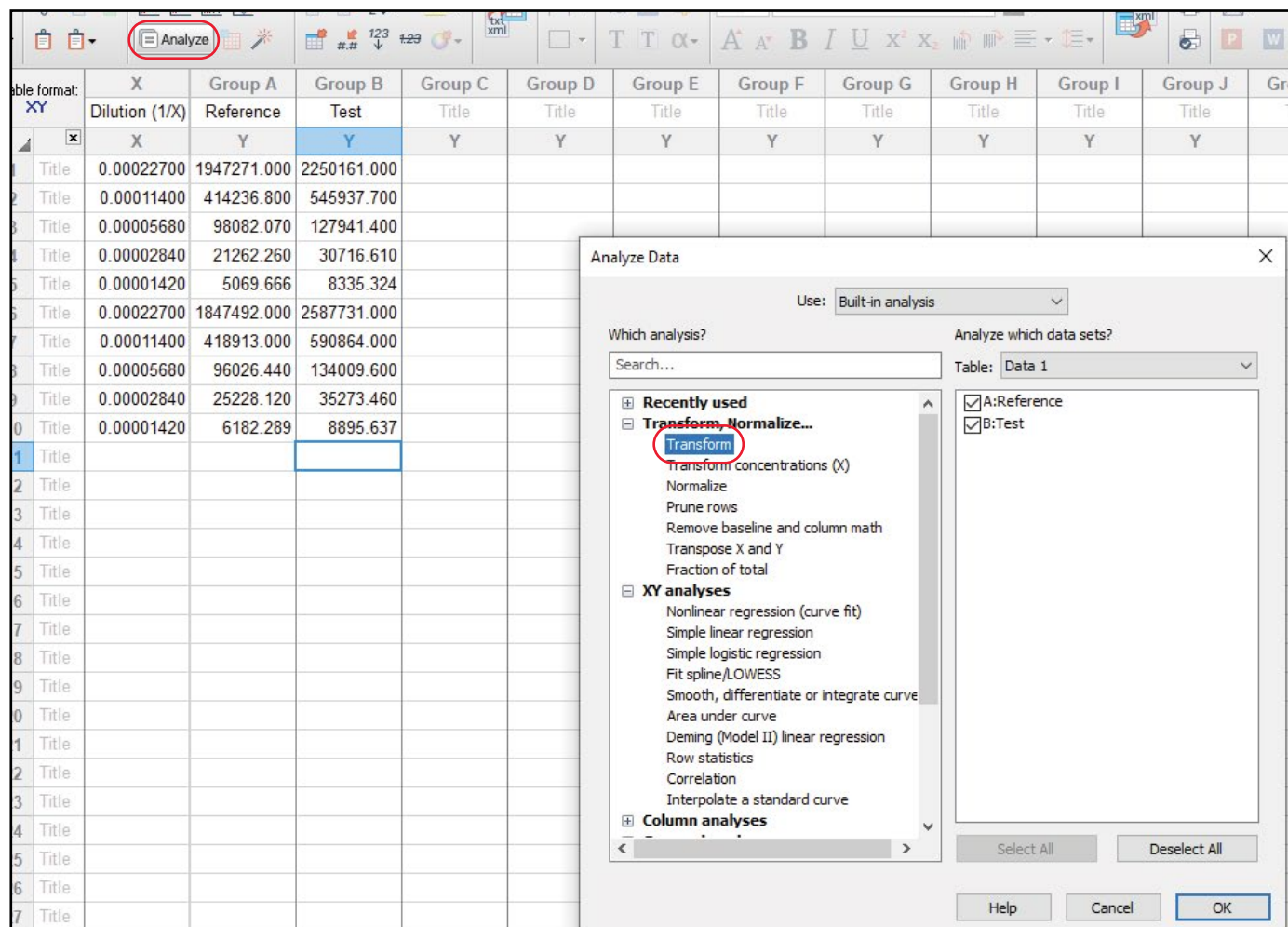


Table format: XY	X	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F	Group G	Group H	Group I	Group J	Group K
	Dilution (1/X)	Reference	Test	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
	X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Title	0.00022700	1947271.000	2250161.000								
2	Title	0.00011400	414236.800	545937.700								
3	Title	0.00005680	98082.070	127941.400								
4	Title	0.00002840	21262.260	30716.610								
5	Title	0.00001420	5069.666	8335.324								
6	Title	0.00022700	1847492.000	2587731.000								
7	Title	0.00011400	418913.000	590864.000								
8	Title	0.00005680	96026.440	134009.600								
9	Title	0.00002840	25228.120	35273.460								
10	Title	0.00001420	6182.289	8895.637								
11	Title											
12	Title											
13	Title											
14	Title											
15	Title											
16	Title											
17	Title											
18	Title											
19	Title											
20	Title											
21	Title											
22	Title											
23	Title											
24	Title											
25	Title											
26	Title											
27	Title											

Analyze Data

Use: Built-in analysis

Which analysis? Search...

Analyze which data sets? Table: Data 1

- Recently used
 - Transform, Normalize...**
 - Transform
 - Normalize
 - Prune rows
 - Remove baseline and column math
 - Transpose X and Y
 - Fraction of total
- XY analyses
 - Nonlinear regression (curve fit)
 - Simple linear regression
 - Simple logistic regression
 - Fit spline/LOWESS
 - Smooth, differentiate or integrate curve
 - Area under curve
 - Deming (Model II) linear regression
 - Row statistics
 - Correlation
 - Interpolate a standard curve
- Column analyses

☒ A:Reference
☒ B:Test

Select All Deselect All

Help Cancel OK

4. 「Parameters: Transform」ウィンドウ内で、「Transforms X and Y values using X and Y=Log(X or Y)」

にチェックを入れます。

「New Graph」の「Create a new graph of the results」ボックスも選択します。

「OK」をクリックします。

Table format: XY

		X	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E	Group F	Group G	Group H	Group I	Group J	Group K
		Dilution (1/X)	Reference	Test	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title	Title
		X	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Title	0.00022700	1947271.000	2250161.000									
2	Title	0.00011400	414236.800	545937.700									
3	Title	0.00005680	98082.070	127941.400									
4	Title	0.00002840	21262.260	30716.610									
5	Title	0.00001420	5069.666	8335.324									
6	Title	0.00022700	1847492.000	2587731.000									
7	Title	0.00011400	418913.000	590864.000									
8	Title	0.00005680	96026.440	134009.600									
9	Title	0.00002840	25228.120	35273.460									
10	Title	0.00001420	6182.289	8895.637									
11	Title												
12	Title												
13	Title												
14	Title												
15	Title												
16	Title												
17	Title												
18	Title												
19	Title												
20	Title												
21	Title												
22	Title												
23	Title												
24	Title												
25	Title												
26	Title												
27	Title												
28	Title												
29	Title												

Parameters: Transform

Function List

- ☒ Standard functions
- ☐ Pharmacology and biochemistry transforms
- ☐ User-defined X functions
- ☐ User-defined Y functions

☐ Interchange X and Y (then transform as specified below).

☒ Transform X values using X=Log(X)

☒ Transform Y values using Y=Log(Y)

☒ Same K for all data sets. K =

☐ Different K for each data set

Data set: Reference K =

When it is impossible to transform a SD or SEM

- ☒ Erase SD or SEM.
- ☐ Convert to an asymmetric 95% confidence interval.

Replicates

- ☒ Transform individual Y values
- ☐ Transform the average of replicates

New graph

☒ Create a new graph of the results

Learn Cancel OK

5. ナビゲーションツリーの「Results」内の「Transform of Data 1」に、変換されたデータテーブルが表示されます。

「Analyze」ボタンをクリックし、「Simple Linear Regression」を選択します。

「OK」をクリックします。

The screenshot shows the GraphPad Prism 9.4.1 interface. The main window displays a data table titled 'Transform of Data 1' with columns X, A, B, C, D, E, F, and G. The data is as follows:

	X	A	B	C	D	E	F	G
1	-3.644	6.289	6.352					
2	-3.943	5.617	5.737					
3	-4.246	4.992	5.107					
4	-4.547	4.328	4.487					
5	-4.848	3.705	3.921					
6	-3.644	6.267	6.413					
7	-3.943	5.622	5.771					
8	-4.246	4.982	5.127					
9	-4.547	4.402	4.547					
10	-4.848	3.791	3.949					

The 'Analyze Data' dialog box is open, showing the 'Which analysis?' section. The 'Simple linear regression' option is selected under the 'XY analyses' category. The 'Recently used' section also lists 'Simple linear regression' as a recent choice.

6. 「Parameters: Simple Linear Regression」ウィンドウ内で、「Compare」オプションにチェックを入れます。

「Also Calculate」ボックスにチェックが入っていることを確認します。

「OK」をクリックします。

Figure 1: GraphPad Prism 9.4.1 (681) interface showing the 'Parameters: Simple Linear Regression' dialog box. The dialog box is open over a data table. The 'Compare' checkbox is checked, indicating the test for whether slopes and intercepts are significantly different. The 'Also calculate' section is also checked.

Data Table:

	X	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Dilution (1/X)	Reference	Test								
1	-3.644	6.289	6.352								
2	-3.943	5.617	5.737								
3	-4.246	4.992	5.107								
4	-4.547	4.328	4.487								
5	-4.848	3.705	3.921								
6	-3.644	6.267	6.413								
7	-3.943	5.622	5.771								
8	-4.246	4.982	5.127								
9	-4.547	4.402	4.547								
10	-4.848	3.791	3.949								
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											

Parameters: Simple Linear Regression

Interpolate

☐ Interpolate unknowns from standard curve

Compare

☒ Test whether slopes and intercepts are significantly different

Graphing options

☐ Show the 95% confidence bands of the best-fit line

☐ Residual plot

Constrain

☐ Force the line to go through X = 0, Y = 0

Replicates

☐ Consider each replicate Y value as an individual point

☒ Only consider the mean Y value of each point

Also calculate

☐ Test departure from linearity with runs test

☒ 95% confidence interval of Y when X = 0

☒ 95% confidence interval of X when Y = 0

Range

Start regression line at: ☒ Auto

End regression line at: ☒ Auto

☐ X = -4.8477116

☐ X = -3.6439741

Output

Show this many significant digits (for everything except P values): 4

P value style: GP: 0.1234 (ns), 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0001 (***) N = 6

☐ Make these choices as default for future regressions

More choices... Learn Cancel OK

7. ナビゲーションツリー内の「Results」の「Simple linear regression」に線形回帰の結果が表示されます。

「Tabular results」タブ内の「Equations」項目に、テストサンプルの相対効力を評価するための線形回帰式が表示されています。

SW Demo Relative Potency Assay.pzfx: Simple linear regression of Transform of Data 1 - GraphPad Prism 9.4.1 (681)

File Edit View Insert Analyze Change Arrange Family Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Interpret Change Draw Write

Search...

▼ Data Tables

 Data 1

 + New Data Table...

▼ Info

 Project info 1

 New Info...

▼ Results

 Transform of Data 1

 Simple linear regression of Trans...

 + New Analysis...

▼ Graphs

 Data 1

 Transform of Data 1

 + New Graph...

▼ Layouts

 + New Layout...

Family

 Data 1

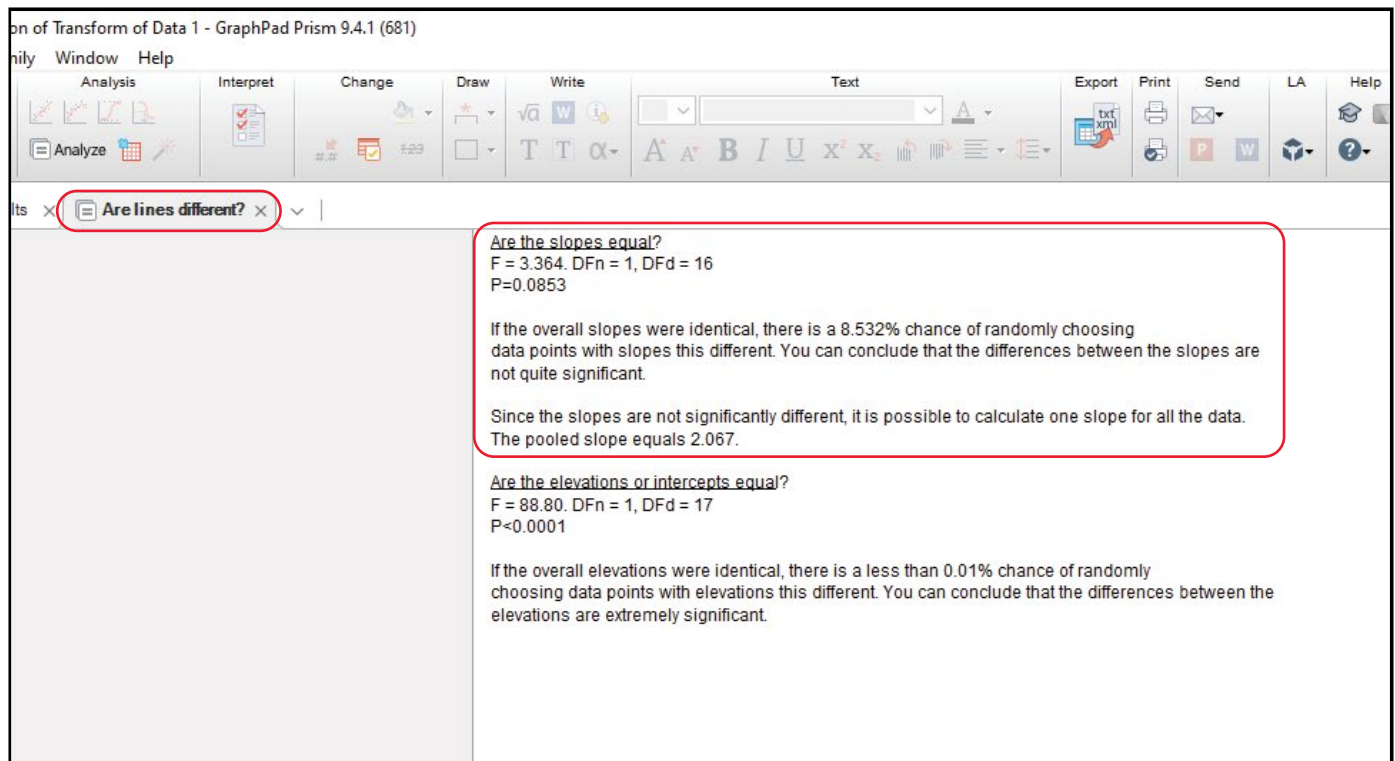
 Transform

 Simple linear regression

 Transform of Data 1

Simple linear regression		A	B
Tabular results		Reference	Test
1	Best fit values		
2	Slope	2.097	2.036
3	Y intercept	13.90	13.79
4	X intercept	-6.629	-6.770
5	1/slope	0.4768	0.4910
6			
7	Std. Error		
8	Slope	0.02397	0.02283
9	Y intercept	0.1023	0.09741
10			
11	95% Confidence Intervals		
12	Slope	2.042 to 2.152	1.984 to 2.089
13	Y intercept	13.67 to 14.14	13.56 to 14.01
14	X intercept	-6.695 to -6.567	-6.838 to -6.705
15			
16	Goodness of Fit		
17	R squared	0.9990	0.9990
18	Sy.x	0.03228	0.03074
19			
20	Is slope significantly non-zero?		
21	F	7652	7956
22	DFn, DFd	1, 8	1, 8
23	P value	<0.0001	<0.0001
24	Deviation from zero?	Significant	Significant
25			
26	Equation	$Y = 2.097 \cdot X + 13.90$	$Y = 2.036 \cdot X + 13.79$
27			
28	Data		
29	Number of X values	10	10
30	Maximum number of Y replicates	1	1
31	Total number of values	10	10
32	Number of missing values	0	0

8. 同じ「Results」フォルダ内の「Are lines different?」タブで、リファレンスの傾きとテストの傾きが等しいか確認できます。



9. ステップ6の「Test whether the slopes and intercepts are significantly different」オプションをチェックしていると、Prismソフトウェアは2つ以上の回帰直線の傾きを比較し、「Are lines different?」タブでこの解析の要約が表示されます。

傾きの比較

Prismソフトウェアでは、まず傾きを比較し、傾きが完全に同一である（線が平行である）という帰無仮説を検定するP値（両側）を計算します。P値は次の問いに答えています：

もし傾きが本当に同一であった場合、ランダムに選ばれたデータポイントが、得られたものと同程度に（またはそれ以上に）異なる傾きを持つ確率はどれくらいか。

P値が0.05未満の場合

P値が低い場合、Prismソフトウェアは2つの直線が有意に異なると結論づけます。この場合、切片を比較する意味はなく、2つの直線の交点は次の通りです：

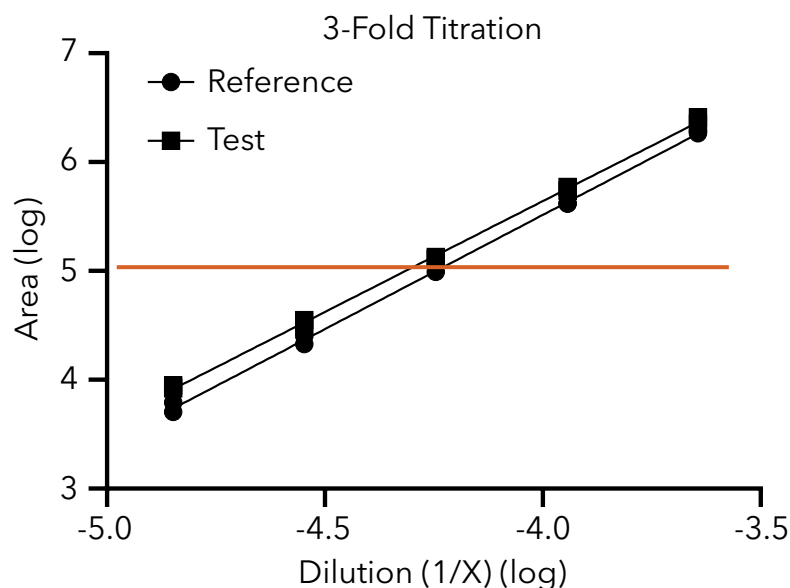
$$X = \frac{\text{Intercept}_1 - \text{Intercept}_2}{\text{Slope}_2 - \text{Slope}_1}$$

$$Y = \text{Intercept}_1 + \text{Slope}_1 = \text{Intercept}_2 + \text{Slope}_2 \cdot X$$

傾き比較のP値が0.05以上の場合

P値が高い場合、Prismソフトウェアは傾きに有意な差がないと結論し、すべての直線に共通の傾きを計算します。つまり、2つのデータセット間で傾きパラメータを共有することになります。

10. 単純線形回帰式を使用して、リファレンスとテスト線形回帰曲線の間で共通のY値を用いて、各回帰式からXを解くことで相対効力を計算します。



11. 以下の手順でX値から相対効力を決定します:

- $\log(X)$ 値を10のX乗のべき数として計算します
- リファレンス=リファレンスX値/リファレンスX値
- テスト=リファレンスX値/テストX値

	reference	test
Slope	2.097	2.036
Y-intercept	13.9	13.79
Rel Pot at log	5	
log (X)	-4.24416	-4.31729
power10 (X)	5.7E-05	4.82E-05
	reference	test
Rel Potency	1.00	1.18

プロテインシンプル ジャパン株式会社
 東京都日本橋室町3丁目4-7 日本橋室町プラザビル 9F
 TEL: 03-5542-1436 FAX: 03-5542-1437
 Email: info.japan@proteinsimple.com
 www.proteinsimple.jp