

Title	長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる予測とメタボローム解析による実証
Sub Title	Simulation and metabolome analysis of human red blood cells during long-term storage
Author	西野, 泰子(Nishino, Taiko) 富田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2009-04
Jtitle	優秀修士論文
JaLC DOI	
Abstract	本論文は、輸血用保存赤血球の代謝動態を予測するシミュレーションモデルを作成し、メタボローム解析技術を駆使した生化学実験を行い、作成したモデルが保存された赤血球に含まれる複数の代謝物質濃度を長期に渡って予測できるモデルである事を実証した。このモデルを用いた数理解析によって保存赤血球の代謝不全を招くと予想される原因を突き止め、今まで不明だった代謝メカニズムの解明へ向けて大きく前進した。
Notes	先端生命科学プロジェクト2008年
Genre	Thesis or Dissertation
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0620

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

優秀修士論文

長

長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる
予測とメタボローム解析による実証

2008年

優秀修士論文推薦のことば

本論文では、輸血用保存血液の赤血球代謝動態を再現するシミュレーションモデルを作成し、予測の確からしさをメタボローム解析実験によって実証した。さらに、作成したモデルを用いたシミュレーション解析実験により、血液を長期保存した際に問題となる赤血球機能不全のメカニズムを分子レベルから解明できる可能性を強く示した。

今後新たな長期血液保存法の開発に大きく貢献することが期待できると共に、これからのシステム生物学における科学的意義は極めて大きく、優秀修士論文として推薦する。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
富田 勝

修士論文 2008 年度（平成 20 年度）

長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる予測と
メタボローム解析による実証

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

西野泰子

修士論文 2008 年度（平成 20 年度）

[題目]

長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる予測と メタボローム解析による実証

[論文要旨]

輸血用赤血球製剤として一般に用いられる MAP 濃厚赤血球液 (RC-MAP) では、保存中に赤血球内のアデノシン 3 リン酸 (ATP)、2,3-ビスホスホグリセリン酸 (2,3-BPG) が失われて赤血球の生理機能が低下するため、保存期限を短く設定せざるを得ない。しかし、ATP、2,3-BPG が保存期間中に減少する本質的なメカニズムは解明されておらず、現在でも経験に則った方法によって血液保存手法の開発が行われている。本研究では、シミュレーションによる代謝予測とキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) による代謝物質一斉測定 (メタボローム解析) を駆使して、低温保存赤血球の代謝不全メカニズムの解明と保存条件の最適化を目指した。

保存赤血球を模した RC-MAP モデルでは、(1)低温条件による代謝酵素と Na^+/K^+ ポンプ活性の低下、(2)ヘモグロビンの R 型遷移、(3)赤血球内 pH 低下、(4)pH に依存したプリン代謝酵素活性変化、を代謝変動のパラメータとして表現した。この RC-MAP モデルが予測した低温保存下での代謝変動は、同様の条件で実際に長期保存した赤血球メタボロームの解析結果とよく一致しており、構築したモデルの妥当性と新規保存法開発におけるシミュレーションモデルの有用性が示すことができた。また、シミュレーションモデルに実装したパラメータの感受性解析結果から、代謝酵素活性の分布、液性 (pH) の変動、ヘモグロビン型の遷移が ATP、2,3-BPG の濃度変化に影響を及ぼす因子として重要であることが示唆された。さらに、赤血球の保存中に不活性化するホスホフルクトキナーゼ (PFK) をはじめとした数種類の酵素の働きによって ATP や 2,3-BPG の減少が引き起こされていることをシミュレーション解析の結果から突き止めた。本研究の成果により、細胞シミュレーションとメタボローム解析を連携させて血液保存法をデザインする戦略が有用であることを提示した。

[キーワード]

血液保存, 赤血球, シミュレーション, 代謝, メタボローム解析

慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科

西野泰子

Abstract of Master's Thesis Academic Year 2008

[Title]

Simulation and metabolome analysis of human red blood cells during long-term storage

[Summary]

Improving red blood cell (RBC or RC) storage system using Mannitol-adenine-phosphate (MAP) solution, which is widely used, has been an important issue especially in emergency medicine. During storage, RBCs progressively lose their viabilities and functions by reducing intracellular ATP and 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG). These two metabolites are used as indicators for assessment of the expiration date of RC-MAP. However, the detailed mechanism of this metabolic failure in stored RBC remains unclear. In this study, to propose possible candidates of the target for novel storage method which can retain the amount of ATP and 2,3-BPG, we reconstruct the MAP-stored condition at low temperature and predict the metabolic behavior of RC-MAP using mathematical model of human erythrocyte covering wide range of metabolic pathways, connection between hemoglobin and metabolism.

To characterize the MAP-stored conditions, we set five external parameters including pH variation during storage, inhibition of enzyme activities and Na^+/K^+ pump activities by low temperature, activation of enzymes in purine metabolism by lowered pH, and stabilization of hemoglobin state to R-state by low temperature. As a result, the time-courses of ATP and 2,3-BPG in MAP-stored RBC predicted by the above model showed good agreement with those of previously reported experimental data. Moreover, we validated the RC-MAP model by comparing with metabolome data collected using capillary electrophoresis / time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS). Further simulation analysis of the model suggested that the five external parameters should be strongly considered to preserve the quality of stored blood.

This work indicates the possibility of the mathematical model of large-scale metabolism in human RBCs to represent the metabolic status in cold-MAP-stored RBCs and to predict the way to maintain its quality efficiently.

[Keywords]

Blood storage, Erythrocyte, Simulation, Metabolism, Metabolome analysis

Keio University Graduate School of Media and Governance
Taiko Nishino

目次

第1章 序論	6
1-1 研究背景	6
1.1.1 保存血液について	6
1.1.2 赤血球代謝シミュレーション	8
1.1.3 メタボローム解析	8
1-2 本研究のねらい	10
第2章 保存赤血球シミュレーションモデルの作成	11
2-1 文献調査とモデル化	11
2.1.1 MAP 組成の実装	12
2.1.2 pH 変化の実装	12
2.1.3 低温刺激による酵素活性低下の実装	13
2.1.6 低温刺激によるヘモグロビンの状態遷移	14
2-2 RC-MAP モデルのシミュレーション結果	14
2-3 GA による未知パラメータ推定	16
2-4 パラメータ範囲の全域探索	18
第3章 CE-TOFMS による保存赤血球代謝物質の測定	21
3-1 RC-MAP の作成と長期保存実験	21
3-2 赤血球メタボローム抽出処理	22
3-3 CE-TOFMS による代謝物質一斉測定	23
3-4 実測結果とシミュレーション結果の比較	24
第4章 シミュレーション解析	27
4-1 パラメータの感受性解析	27
4-2 酵素活性の感受性解析	32
4-3 新しい保存液組成の提案へ向けたシミュレーション解析	38
4.3.1 MAP 組成の感受性解析	38
4.3.2 保存赤血球細胞外物質の感受性解析	41
4.3.3 再活性化のシミュレーション解析	43
第5章 結論	47
謝辞	48
成果発表一覧	49
参考文献	51

目次

図 1: ヒト赤血球モデルの代謝経路図.....	9
図 2: RC-MAP おける代謝影響因子.....	11
図 3: RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデルにおける ATP, 2,3-BPG 濃度の時系列 変動.....	15
図 4: RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデル (プロトタイプモデル・GA によるパ ラメータ推定モデル) の比較.....	17
図 5: 酵素活性に関するパラメータ範囲の傾向と GA によるパラメータ推定結果.....	19
図 6: RC-MAP モデルと酵素活性の条件を満たさないモデルの比較.....	20
図 7: 赤血球メタボローム抽出の行程.....	22
図 8: 保存赤血球メタボローム測定と RC-MAP モデルにおける解糖系中間代謝物濃度 の時系列変動.....	25
図 9: RC-MAP モデルに実装したパラメータの感受性解析.....	29
図 10: 酵素活性の感受性解析.....	35
図 11: MAP 組成の感受性解析.....	40
図 12: イノシン、アデノシン、ピルビン酸の感受性解析.....	42
図 13: イノシン、ピルビン酸とリン酸の添加による再活性化 (Osaki et al. の再実験).....	44
図 14: イノシン、ピルビン酸とリン酸の添加による再活性化 (Osaki et al. の再実験) に おける中間代謝物質濃度の変化.....	46
図 15: 赤血球におけるイノシン代謝経路.....	46

表目次

表 1 : 血液保存液の組成と有効性	7
表 2 : E-Cell 赤血球代謝モデルに含まれる反応・代謝物質・略語一覧.....	9
表 3 : RC-MAP の赤血球外物質濃度	12
表 4 : RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデルの細胞外物質濃度	15
表 5 : GA によって得られたパラメータ値	17
表 6 : RC-MAP 長期保存試験と GA で予測したモデルの細胞外物質濃度	17
表 7 : MAP 液の組成 (100 mL 中).....	21
表 8 : 各酵素反応の高活性化(+10%)と低活性化(-10%)がもたらす ATP, 2,3-BPG への 影響度	33

第 1 章 序論

1-1 研究背景

1.1.1 保存血液について

輸血用赤血球をはじめとした血液製剤は臨床医療に不可欠であるが、現在においても血液の代替物（人工血液）は実用化されておらず、献血による供給に頼らざるを得ない状況である。少子高齢化が進む中で献血者数は減少傾向にあり、限られた血液資源を有効に活用するためにも、血液の長期保存を実現することは重要な研究課題である。

赤血球保存法の開発は、(1)輸血された赤血球が十分な生存期間を維持出来ること、(2)赤血球の変形能が保たれていること、(3)赤血球の酸素運搬能が十分に保持されていること、の 3 つの指標を評価の対象として行われてきた[1]。第一の指標である輸血後の赤血球生存率は細胞内アデノシン 3 リン酸（以下、ATP）量に強く相関することが知られており[20]、体内に戻された赤血球が 120 日間の寿命をまっとうするには一定量以上の ATP が必須であるとされる[2]。第二の指標である赤血球変形能については直接的な評価はほとんどされないが、ATP が細胞の可塑性に重要な役割を持つと考えられている[1]。そして第三の指標である酸素運搬に関しては、ヘモグロビンの酸素結合能を調節する 2,3-ビスホスホグリセリン酸（以下、2,3-BPG）が重要な機能を果たしていることが知られる[3]。これらの理由から、赤血球保存法の有効性を向上するには ATP と 2,3-BPG を維持することが望ましく、保存血液研究の創成期から現在に至るまで、ATP と 2,3-BPG を指標として添加物質を検討し有効期限を設定する方法が繰り返されてきた [4]。

現在までに開発されてきた代表的な血液保存液の組成と保存日数、輸血 24 時間後の赤血球回収率を表 1 に示した[5-18]。1940-50 年代に全血の保存液として開発された ACD(Acid Citrate Dextrose)[5]や CPD(Citrate Phosphate Dextrose)[7]は 3 週間の血液保存を可能にした。しかし、これらの保存液中では赤血球の ATP や 2,3-BPG が急速に減少し、赤血球膜の硬化や酸素運搬能が低下するという問題があった[19]。1960 年代に入ると、中尾らによって ATP 濃度が赤血球生存率に直接関わることと、アデニンが ATP の減少を抑制する効果を持つことが発見された[20]。それ以降、CPD にアデニンを添加した処方種々検討され、CPDA-1(Citrate Phosphate Dextrose Adenine 1), CPDA-2 といった全血用保存液が開発されてきた[8, 9]。1980 年代からは赤血球保存用添加液が普及しはじめ、より長期的な血液の保存が可能になった。欧米では SAGM(Saline Adenine Glucose Mannitol)[11]や AS-1(Additive

Solution-1)、AS-3[13]が開発されて主要な血液保存液として利用されており、現在はエネルギー代謝をさらに改善する目的でグアノシンを添加した PAGGS-M(Phosphate Adenine Guanosine Glucose Saline Mannitol)[17]についても研究が進められている。

表 1：血液保存液の組成と有効性¹

solution	components	days storage	recovery	references
ACD	citrate, sodium citrate, glucose	21days	75%	[5, 6]
CPD	citrate, sodium citrate, glucose, sodium phosphate	21days	79%	[6, 7]
CPDA-1	citrate, sodium citrate, glucose, sodium phosphate, adenine	35 days	72%	[8, 9]
CPDA-2	citrate, sodium citrate, glucose, sodium phosphate, adenine	42 days	83.6%	[9, 10]
SAGM	glucose, adenine, mannitol, NaCl	42 days	78-84%	[11, 12]
AS-1(Adsol)	glucose, adenine, mannitol, NaCl	42 days	72%	[13-15]
AS-3(Nutricel)	glucose, adenine, mannitol, NaCl	42 days	78-84%	[12, 13]
MAP	citrate, sodium citrate, glucose, sodium phosphate, adenine, mannitol, NaCl	42 days	82%	[16, 18]
PAGGS-M	glucose, sodium phosphate, adenine, mannitol, NaCl, guanosine,	49 days	74%	[17]

日本においては、血液から赤血球画分のみを分離して MAP (Mannitol Adenine Phosphate) を混和した MAP 加濃厚赤血球液 (RC-MAP) が輸血用の血液製剤として主に利用されている。RC-MAP は保存 6 週目でも保存初期の 50%もの ATP が維持できており 42 日間の長期保存が可能になった²[16]。その一方で、RC-MAP の欠点としては 2,3-BPG の極めて速い枯渇による酸素運搬能の低下があげられる[21-23]。輸血本来の意義から考えても、2,3-BPG の減少は克服すべき重要な課題であるが、この濃度減少を招く代謝メカニズムは明らかになっていない。保存中に起こる ATP, 2,3-BPG の減少を食い止める方法は現時点では凍結保存以外に無いが、凍結法は 4℃保存が基本である他の赤血球保存法と比較して溶血が多くなることは避けられず、稀な血液型の輸血のみに利用は限られている[1]。一般に広く利用されている 4℃での赤血球製剤保存法の更なる改善を目指すには、保存期間中の代謝動態を詳細に把握することが有効なアプローチであると考えられる。

1 表中の recovery は輸血 24 時間後の赤血球回収率を指す。

2 但し微生物増殖による感染症を防ぐために使用期限は採血後 21 日間となっている。

1.1.2 赤血球代謝シミュレーション

赤血球の代謝ネットワークを対象としたコンピュータシミュレーション研究は 1980 年代頃から盛んに行われており、数々の数理モデルが発表されてきた[24-32]。その理由として、赤血球は無核の単純な袋状細胞であるためシステムの抽象化が容易であることや、様々な分野で研究材料とされてきたためモデルの構築に必要な生化学的な情報がすでに揃っていることが挙げられる。

1997 年に慶應義塾大学環境情報学部で発足した E-Cell プロジェクトでは、全細胞シミュレーションの実現に向けたシミュレーションプラットフォーム (E-Cell System / E-Cell Simulation Environment) の技術開発とそれを用いた細胞モデル構築に取り組んでいる[33]。このプロジェクトの一環として、ヒト赤血球の主要な代謝制御機構とそれに関連した物質の輸送機構を再現するシミュレーションモデルを E-Cell System 上に構築してきた[34-36]。E-Cell ヒト赤血球代謝モデルでは、これまでは部分的に表現されていた数種類の代謝系、膜輸送系、イオンポンプ機構を統合し、すべての酵素反応をその特性にあわせた反応速度式で表現することに成功している。E-Cell ヒト赤血球代謝モデルで再現されている代謝経路を図 1 と表 2 に示す。図 1 に描かれている赤血球の代謝に関する大規模かつ包括的な反応機構の全体像に加えて、E-Cell ヒト赤血球モデルでは酸素分圧変化によるヘモグロビンの状態遷移が代謝に影響を及ぼす仕組みについても詳細に再現されており、赤血球の生理的意義を考察する上で非常に有用なモデルであるといえる。

1.1.3 メタボローム解析

近年、生物の細胞内に存在する遺伝子やタンパク質をはじめとした分子情報に関して網羅的な調査や計測を行い生命科学の発展に役立てようという、いわゆるオミックス解析が盛んに行われている。代謝物質の網羅的解析であるメタボローム解析も、ゲノム解析やプロテオーム解析に続く新たな研究分野として注目を集めている。

慶應義塾大学環境情報学部 曾我朋義教授らによって開発されたキャピラリー電気泳動-飛行型質量分析計 (CE-TOFMS) はメタボローム解析ツールのひとつであり、各代謝物質をキャピラリー電気泳動で分離後、キャピラリーの陰極あるいは陽極部に設置された質量分析計で検出する[37]。CE-MS 法では細胞内の代謝物質のほとんどが陽イオン性あるいは陰イオン性の低分子であることに着目しており、多くの代謝物質を同一条件下で一斉に測定できる利点をもつ。

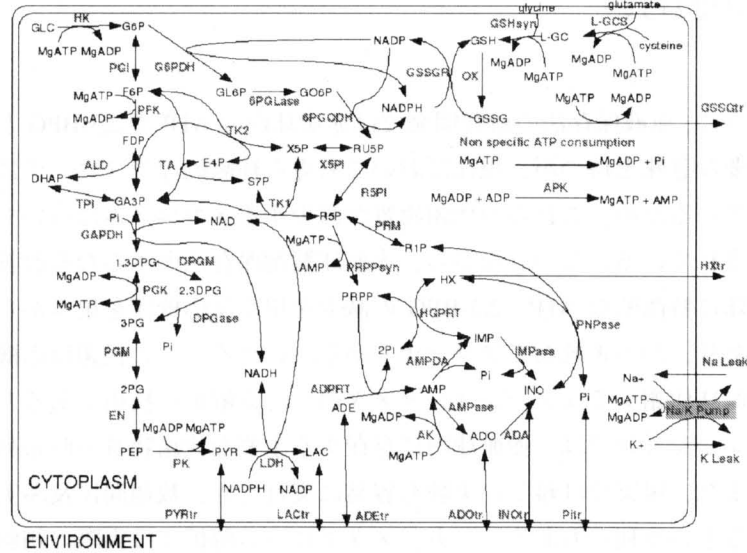


図 1: ヒト赤血球モデルの代謝経路図

(Kinoshita et al. JBC 2007 より転載)

表 2: E-Cell 赤血球代謝モデルに含まれる反応・代謝物質・略語一覧

代謝系	代謝物質	略記	代謝系	酵素反応プロセス	略記
解糖系	Glucose	GLC	解糖系	Hexokinase	HK
	Glucose 6-phosphate	G6P		Phosphoglucisomerase	PGI
	Fructose 6-phosphate	F6P		Phosphofruktokinase	PFK
	Fructose 1,6-bisphosphate	F-1,6BP		Aldolase	ALD
	Dihydroxyacetone phosphate	DHAP		Triose Phosphate isomerase	TPI
	Glyceraldehyde 3-phosphate	GA3P		Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	GAPDH
	1,3-Bisphosphoglycerate	1,3-BPG		Diphosphoglycerate mutase	DPGM
	3-Phosphoglycerate	3PG		Diphosphoglycerate phosphatase	DPGase
	2-Phosphoglycerate	2PG		Phosphoglycerate kinase	PGK
	Phosphoenolpyruvate	PEP		Phosphoglyceromutase	PGM
	Pyruvate	PYR		Enolase	ENO
	Lactate	LAC		Pyruvate kinase	PYR
				Lactate dehydrogenase	LDH
				Glucose 6-phosphate dehydrogenase	G6PDH
				6-Phosphogluconolactonase	6PGase
ペントースリン酸回路	Gluconolactone 6-phosphate	GL6P	ペントースリン酸回路	6-Phosphogluconolactonase	6PGase
	Gluconate 6-phosphate	GO6P		6-Phosphogluconate dehydrogenase	6PGODH
	Ribulose 5-phosphate	RUSP		Transketolase	TK
	Sedoheptulose 7-phosphate	S7P		Transketolase I	TK1
	Xylulose 5-phosphate	X5P		Transketolase II	TK2
	Erythrose 4-phosphate	E4P		Ribose-5-phosphate isomerase	R5PI
	Glutathione (reduced)	GSH		Xylulose-5-phosphate isomerase	X5PI
	Glutathione (oxidized)	GSSG		Glutathione turnover	OX
	Ribose 5-phosphate	R5P		Glutathione reductase	GSSGR
				Adenosine deaminase	ADA
プリン代謝	Ribose 1-phosphate	R1P	プリン代謝	Adenine phosphoribosyl transferase	ADPRT
	5-Phosphoribosyl 1-phosphate	PRPP		Adenosine kinase	AK
	Inosine monophosphate	IMP		Adenosine monophosphate deaminase	AMPDA
	Adenine	ADO		AMP phosphohydrolase	AMPase
	Adenosine	ADO		Adenylyl kinase	APK
	Hypoxanthin	HX		Hypoxanthine-guanine phosphoryl transferase	HGPRT
				Inosine monophosphatase	IMPase
				Purine nucleotide phosphorylase	PNPase
				Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	PRPPsyn
				Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	PRPPsyn
補酵素	Nicotinamide adenine dinucleotide	NAD	膜輸送系	Adenine transport process	ADEtr
	Nicotinamide adenine dinucleotide	NADH		Adenosine transport process	ADOtr
	Nicotinamide adenine phosphate	NADP		Hypoxanthine transport process	HXtr
	Nicotinamide adenine phosphate	NADPH		Inosine transport process	INOtr
	Potassium ion	Ki		Lactate transport process	LACtr
	Sodium ion	Nai		Pyruvate transport process	PYRtr
	Inorganic phosphate	Pi		Inorganic phosphate transport process	PItr
	Total adenosine diphosphate	tADP		GSSG transport process	GSSGtr
	Total adenosine monophosphate	tAMP		Leak of potassium	K_Leak
	Total adenosine triphosphate	tATP		Leak of sodium	Na_Leak
	Total 2,3-bisphosphoglycerate	t2,3-BPG		Sodium/potassium pump	NaK Pump
				Non specific ATP consumption	MgATP -> MgADP + Pi
				APK	MgADP + ADP -> MgATP + AMP

1-2 本研究のねらい

先に述べたように、血液保存法の研究開発では赤血球内の ATP や 2,3-BPG といった代謝物質の挙動が重要な意味を持つが、現在においても専ら経験的なアプローチによって研究開発が進められているため、これらの代謝物質が減少するメカニズムについては明らかでない点が多く残されている。しかしながら、赤血球製剤保存法のさらなる改善を目指す上では、保存赤血球に特徴的な ATP、2,3-BPG の減少を招く反応機序を根本から理解することは大変重要であり、かつ正統なアプローチであるといえる。この代謝反応機序の解明に役立つのが、赤血球代謝シミュレーションとメタボローム解析の技術であると考えた。

赤血球シミュレーションでは、赤血球内に存在する主要な代謝物質の時系列変化の予測が可能である。また、現実では難しい実験も容易に実行でき、数週間に及ぶ実験も数秒から数分で終了するという利点もある。一方、メタボローム解析では実際の細胞内に含まれる数十の代謝物質を同一条件下で測定可能であり、包括的な赤血球の代謝動態を実験的に把握できる唯一の方法でもある。これらの技術を駆使して ATP や 2,3-BPG 以外の代謝物質の挙動をとらえることは、保存赤血球の代謝メカニズムを解明する上で非常に有効な手段であるといえる。

以上の前提をふまえ、本研究では、コンピューター上に構築された精緻な代謝シミュレーションモデルを応用して 4°C で保存された赤血球の代謝を再現し、ATP と 2,3-BPG の減少を引き起こすメカニズムを予測し、その予測に基づいた新たな血液保存法の提唱を目指した。予測結果の実験的な検証は CE-TOFMS を用いた保存赤血球のメタボローム解析によって行うことにした。この目的を達成するため、以下の計画で研究を進めた。

1. 低温保存赤血球代謝シミュレーションモデルの構築
2. 代謝物質一斉解析（メタボローム解析）によるモデルの妥当性確認
3. 保存赤血球代謝メカニズムの理解へ向けたシミュレーション解析
4. 保存手法の改良へ向けたシミュレーション解析

次章より各段階における詳細な目的と結果について記述する。

第2章 保存赤血球シミュレーションモデルの作成

2-1 文献調査とモデル化

序論で述べたように、体内環境を想定したヒト赤血球モデルとして、ヘモグロビンの酵素運搬機能を考慮した常微分方程式モデルが E-Cell System Version 3 上に既に構築されている[36] (図1, 表2)。しかしながら、保存血液中における赤血球代謝の動態を解析するためには、MAP などの保存液の組成や保存温度条件を考慮したモデルを新たに作成する必要がある。そこでまず、MAP 液を添加して低温保存された赤血球を想定した RC-MAP モデルの作成に着手した。

体内環境とは異なる保存血液に特有の条件の中から、保存溶液の組成による細胞外物質濃度や温度条件など、ヒト赤血球の代謝に影響があると推測される要素をまず抽出した。これらの要素をパラメータ化して既存のモデルに設定することで、RC-MAP モデルを得た (図2)。これにより、保存溶液中のヒト赤血球代謝の動態予測を行なうことが可能となった。

以下で、要素の詳細と各パラメータの初期値の試算に関する意味づけとその値に関して記述する。

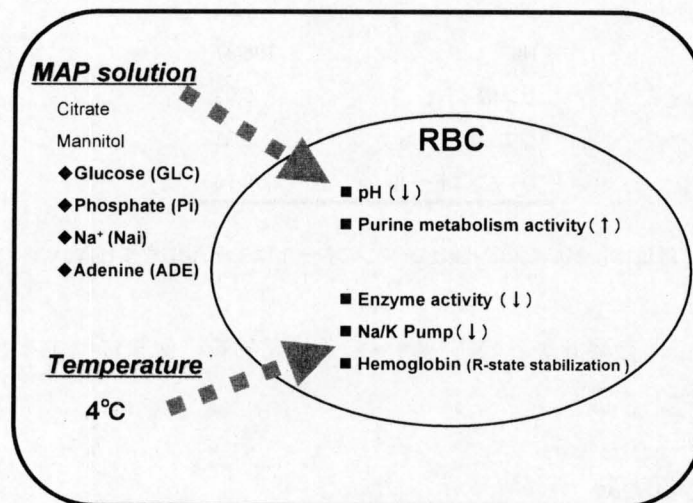


図 2 : RC-MAP おける代謝影響因子

2.1.1 MAP 組成の実装

血液バッグに保存された赤血球と体内を循環する赤血球で大きく異なる点として、細胞外環境の組成が上げられる。MAP の組成は正確に定義されているが、組成自体が赤血球内の代謝に及ぼす影響は明らかでない。RC-MAP は調整方法やヘマトクリット値(約 60%) の条件から赤血球外部はほぼ MAP と見なすことができるため、保存中の外部環境の変化は赤血球への入出力のみで決まると考えられる。そこで、MAP 組成が細胞内の代謝に与える影響として、MAP とヒト赤血球モデルの両者に含まれる代謝物質の入出力だけに注目し、その他の影響は無いものと仮定した。したがって、赤血球内の代謝には直接影響を与えないと考えられるマンニトールなどはパラメータとして考慮しなかった。

具体的な MAP の組成[16] [クエン酸ナトリウム, 0.15 g/dl ; クエン酸, 0.02 g/dl ; グルコース, 0.721 g/dl ; リン酸二水素ナトリウム, 0.094 g/dl ; アデニン, 0.014 g/dl ; 塩化ナトリウム, 0.497 g/dl ; D-マンニトール, 1.453 g/dl] から 細胞外物質濃度を表 3 のように算出し、RC-MAP モデルの初期値とした。

表 3 : RC-MAP の赤血球外物質濃度

グルコース	40.02
アデニン	1.04
Na ⁺	106.37
リン酸	6.03
クエン酸*	6.05
D-マンニトール*	79.76

単位は[mM]. *クエン酸と D-マンニトールはモデルに含まれない。

このようにして、保存溶液からの細胞内への各代謝物質の流量に関するパラメータはすべて決定することができた。

2.1.2 pH 変化の実装

保存赤血球内の pH は保存液に含まれるクエン酸の影響のため生体内よりも低い。また、保存期間が経過するにつれて赤血球内で産生される乳酸やピルビン酸の蓄積によっても細

胞内 pH は徐々に酸性に傾く [38]。Shiba らの RC-MAP 保存試験の結果[16]から pH の時系列変化は傾き $k = -8.66 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ とした 1 次式に近似できるため、RC-MAP モデルにおいてもそのように実装した。本モデルの pH は 7 週間で 6.95 から 6.59 に低下する。pH の変化による代謝への影響は、木下氏らによるヒト赤血球モデルにおいて、既に pH 依存的な速度式として 2,3-BPG 産生系 (BPGSP) と 5 種類の解糖系酵素 (ヘキソキナーゼ(HK)、ホスホフルクトキナーゼ(PFK)、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、ピルビン酸キナーゼ(PK)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)) に実装されている。そのため RC-MAP モデルにおいても pH 変化の影響はこれらの反応活性の変化として反映されることになっている。

2.1.3 低温刺激による酵素活性低下の実装

血液の保存条件である 4°C では、PFK、アルドラーゼ(ALD)の酵素活性が通常の 1%程度にまで減少する [39, 40]。今回の調査ではその他の酵素活性については情報を得られなかったが、一般に低温条件下においてはアレニウスの式にしたがって細胞内のあらゆる生化学反応の活性が低下すると考えられる。ただし、プリン代謝系酵素と Na^+ と K^+ の ATP を利用した能動輸送機構 (Na^+/K^+ ポンプ) の反応活性は、血液保存の条件下において特別な挙動を示すことが今回の文献調査でわかった。その詳細について以下で説明する。

赤血球中に存在するプリン代謝系の酵素は低 pH の条件下で活性化することが調査でわかった [41-45]。先に述べたとおり保存条件下では赤血球内の pH が著しく低下するため、プリン代謝酵素は活性化するであろうと仮定し、他の代謝酵素活性とは別枠としてプリン代謝系に属する 8 種類の酵素 (ADA, ADPRT, AMPDA, AMPase, IMPase, PNPase, PRM, PRPPsyn ; 略語の正式名称は表 2 を参照のこと) の活性を一斉に操作するパラメータ (Purine metabolism activity) を設定した。なお、プリン代謝系の酵素でも adenosine kinase (AK) と hypoxanthine-guanine phosphoryl transferase (HGPRT) は高い pH で活性が最適化されているとの報告があったため、Purine metabolism activity の範疇からは除外してある[46, 47]。

細胞内の ATP 消費の大部分を占めている Na^+/K^+ ポンプは、37°C から 5°C に温度が低下すると代謝回転数が 0.4% にまで落ち込むという報告例がある [48]。低温刺激による活性低下率が 1% 前後である PFK、ALD などの他の代謝酵素と比べて低温に対する感受性が高いことを受けて、 Na^+/K^+ ポンプ活性も “ Na^+/K^+ pump activity” という個別のパラメータとして操作することとした。

これらプリン代謝系と Na^+/K^+ ポンプを除く酵素反応および分子結合反応の反応速度活性に対しては、低温刺激の与える影響として Enzyme activity というパラメータを設定し、この値にしたがって一律に 1% 前後を基準に活性を低下させることにした。

2.1.6 低温刺激によるヘモグロビンの状態遷移

ヘモグロビンには2つの構造、oxyHb (R型) と deoxyHb (T型) が存在し、その状態遷移による代謝変動を巧みに利用して酸素運搬を効率的に行っている [36]。実際に血中赤血球モデルにおいて、T型・R型ヘモグロビンの存在比は、酸素分圧によっておよそ1対20から3対4程度まで変化する。一方、低温条件下におかれた場合には、ヘモグロビンの状態はR型にかたよって安定化されることが知られている[49]⁺。そこで、ヘモグロビンのT-R状態遷移による低温代謝動態の違いを考慮するため、RC-MAPモデルではT型・R型ヘモグロビンの存在比を0対1、すなわちすべてR型ヘモグロビンとして存在する設定にした。

2-2 RC-MAPモデルのシミュレーション結果

赤血球の保存に関する種々の条件を考慮して新たに作成したRC-MAPモデルの妥当性を検証するために、実際にシミュレーションを行った。細胞内の初期pH値、Na⁺/K⁺ポンプ活性(Na⁺/K⁺ pump activity)、ヘモグロビンのT型・R型の存在比はすべて文献から得られた測定の結果を基に固定値を利用した。ただし、血液の保存温度である低温(4℃)条件下における酵素活性(Enzyme activity)とプリン代謝系酵素活性(Purine metabolism activity)の値に関しては正確な値を文献から得ることができなかった。そこでまず酵素活性に関しては一部の酵素活性変化の報告結果を拡張し、体内環境における通常活性の2.5%とした。一方で、pH低下による活性化が見込まれるプリン代謝系はその10倍として、25%の活性低下に留めることとした。

上述のパラメータセットを用いたRC-MAPモデルで7週間のシミュレーションを行いATP, 2,3-BPGの時系列を予測した。その結果、酵素活性変化の値は試算であったにもかかわらず、ShibaらによるRC-MAP長期保存試験の測定結果と非常に似た時系列を得ることができた(図3)。さらに、ATP, 2,3-BPG以外の細胞外物質濃度の変動についても、実験値とほぼ一致していた(表4)。

細胞外アデニンについては、RC-MAP長期保存試験では細胞外アデニンは3週間で消費され枯渇したと報告されているが[16]、RC-MAPモデルにおいても細胞外アデニンは4週間でほぼ枯渇しており、先行研究の結果を再現していたといえる。

以上のように、調査に基づいたパラメータ設定によって赤血球保存時の代謝変動を再現するプロトタイプモデルの作成に成功した。しかしながら、酵素活性に関する3種類のパ

ラメータ (Enzyme activity, Purine activity, Na^+/K^+ pump activity) の値は過去の知見を元に見積もった値であり、唯一の解であるとは言えない。そこで、これらのパラメータ値を遺伝的アルゴリズム法 (GA) によって改めて推定することにした。

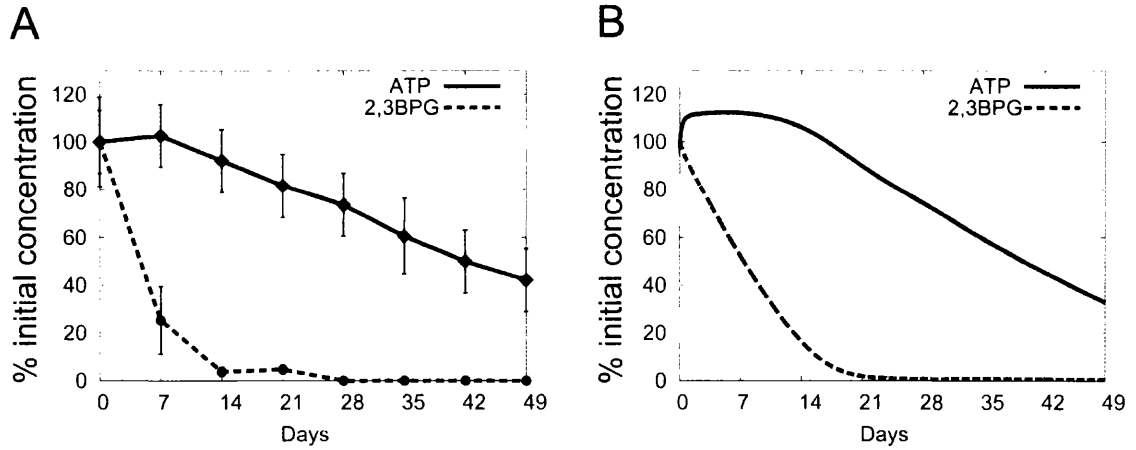


図 3: RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデルにおける ATP, 2,3-BPG 濃度の時系列変動

MAP 液に保存した赤血球の 7 週間にわたる ATP(実線), 2,3-BPG(破線)の時系列測定結果を示している。y 軸は初期濃度に対する%で表してある。A: MAP-CRC 長期保存試験の結果 (Shiba *et al.* のデータを元に値を算出した); B: 本報告で構築した MAP-RBC モデルの結果。MAP-RBC モデルの初期値は以下のとおりである: 外部グルコース濃度, 40.02[mM]; 外部アデニン濃度, 1.04[mM]; 外部 Na^+ 濃度, 106.37[mM]; 外部リン酸濃度, 6.03[mM]; pH, 6.95; アデニン代謝系活性, 25%; 酵素活性, 2.5%; Na^+/K^+ ポンプ, 0.4%; ヘモグロビン, R 型。

表 4: RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデルの細胞外物質濃度

[days]	細胞外 Na^+		細胞外 K^+		細胞外グルコース		細胞外アデニン	
	実測	モデル	実測	モデル	実測	モデル	実測	モデル
0	100±2	106.0	2±1	0.0	29.6±1.9	40.0	1.04	1.0
7	97±6	100.6	22±3	33.1	26.7±2.1	36.9	-	0.4
14	90±3	96.0	34±3	42.7	24.0±2.2	33.9	-	0.3
21	86±3	91.9	41±2	46.8	21.7±2.4	31.1	3週間で枯渇	0.1
28	84±3	88.3	47±3	48.5	20.5±2.6	28.7	-	0.0
35	84±3	85.0	56±4	49.3	19.1±2.4	26.6	-	0.0
42	81±3	82.0	58±3	49.8	17.9±2.7	24.8	-	0.0
49	78±3	79.2	60±3	50.0	16.7±2.7	23.3	-	0.0

単位は[mM].

2-3 GA による未知パラメータ推定

実験条件

RC-MAPモデルに含まれる Enzyme activity, Purine metabolism activity, Na^+/K^+ pump activity という3つのパラメータ値を、E-Cell System に実装されている実数 GA を利用して推定した。GA の実験条件は以下のとおりである。

(時系列データ)

ATP, 2,3-BPG の時系列実測データ (0-7 週間までの合計 8 ポイント) [16]

(パラメータ探索範囲)

Enzyme activity : 0.1-100.0 (%)
Purine activity : 0.1-100.0 (%)
 Na^+/K^+ pump activity : 0.1-100.0 (%)

(GA のパラメータ)

個体数 : 300
世代数 : 4000
最大変異率 : 0.75

(評価関数)

評価値 EV は以下の式で算出した。ここで、 $[\text{X}]_i$ は物質 X の i 週間後の実測値、 $[\text{X}_{\text{sim}}]_i$ は物質 X の i 週間後のシミュレーション予測値を表す。 $[\text{X}]_i$, $[\text{X}_{\text{sim}}]_i$ はそれぞれの初期濃度で正規化してある。

$$\text{EV} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{[\text{ATP}]_i - [\text{ATP}_{\text{sim}}]_i}{[\text{ATP}_{\text{sim}}]_i} \right)^2 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{[2,3\text{BPG}]_i - [2,3\text{BPG}_{\text{sim}}]_i}{[2,3\text{BPG}_{\text{sim}}]_i} \right)^2$$

結果

得られた評価値とパラメータ値を表 5 に示した。GA は 4000 世代にわたって実行したが、今回の探索で得られたパラメータセットは 28 世代目に得られたものだった。このパラメータ値を RC-MAP モデルに代入して ATP, 2,3-BPG の時系列を予測した結果が図 4 である。

表 5 : GA によって得られたパラメータ値

	Value
EV	0.08152
Enzyme activity (%)	3.5
Purine metabolism activity (%)	24.1
NaK pump activity (%)	0.6

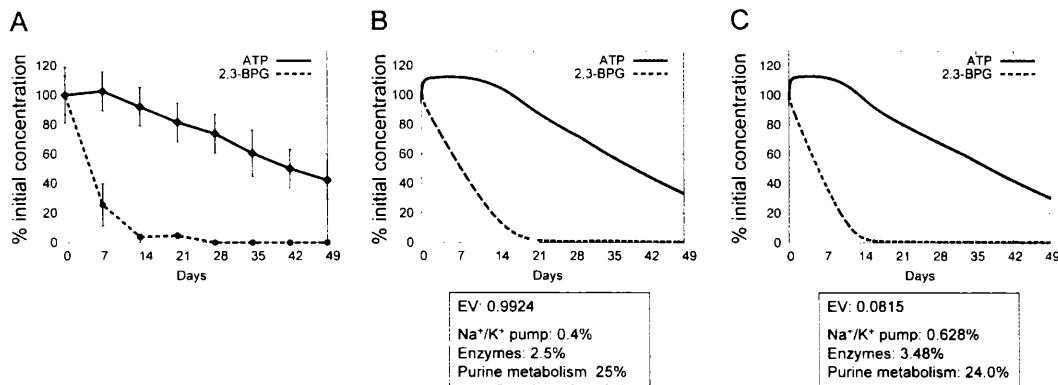


図 4 : RC-MAP 長期保存試験と RC-MAP モデル (プロトタイプモデル・GA によるパラメータ推定モデル) の比較

MAP に保存した赤血球の 7 週間にわたる ATP (実線), 2,3-BPG (破線) の時系列測定結果を示している。y 軸は初期濃度に対する%で表してある。A: RC-MAP 長期保存試験の結果 (Shiba *et al.* のデータを元に値を算出した); B: RC-MAP モデル (プロトタイプ) の結果。C: GA で最適化したパラメータを持つ RC-MAP モデルの結果。

表 6 : RC-MAP 長期保存試験と GA で予測したモデルの細胞外物質濃度

[days]	細胞外Na ⁺		細胞外K ⁺		細胞外グルコース		細胞外アデニン	
	実測	モデル	実測	モデル	実測	モデル	実測	モデル
0	100±2	106.0	2±1	0.0	29.6±1.9	40.0	1.04	1.0
7	97±6	98.9	22±3	32.2	26.7±2.1	35.6	-	0.4
14	90±3	93.1	34±3	41.8	24.0±2.2	31.6	-	0.3
21	86±3	88.2	41±2	46.0	21.7±2.4	28.0	3週間で枯渇	0.1
28	84±3	84.0	47±3	47.9	20.5±2.6	24.9	-	0.0
35	84±3	80.4	56±4	48.8	19.1±2.4	22.0	-	0.0
42	81±3	77.2	58±3	49.3	17.9±2.7	19.6	-	0.0
49	78±3	74.3	60±3	49.6	16.7±2.7	17.7	-	0.0

単位は[mM].

GA で予測したパラメータ値を代入したモデルによっても、Shiba らによる RC-MAP 長期保存試験の測定結果を再現できていた。GA による探索で予測されたパラメータ値は、Purine metabolism activity が最も大きく 24%、次いで Enzyme activity が 3.5%、そして Na^+/K^+ pump activity が最も小さく 0.6%となっていた。この結果は、保存状態を仮定したときの酵素活性低下の条件をすべて満たしており、生化学的な根拠と矛盾していない。また、GA で推定したパラメータ値を用いた場合には、2,3-BPG が 14 日目付近で枯渇しており、プロトタイプモデルよりも実測に近い予測ができていた。同時に、今回の学習データとして用いた ATP と 2,3-BPG 以外の細胞外代謝物質の時系列変化についても、Shiba らの実測値とほぼ変わらないことが確認できた (表 6)。

2-4 パラメータ範囲の全域探索

GA では広域にわたって効率よく最適解が探索できる一方で、局所解に陥ることにより最適な値を見逃している可能性がある。そこで、GA で探索した範囲の一部に関して精密にすべての組合せを網羅した全域探索を行うことで、GA で得られたパラメータセットの妥当性を検証した。

パラメータ探索範囲

まず、代謝反応に関する 3 種類のパラメータ (Enzyme activity, Purine metabolism activity, Na^+/K^+ pump activity) について、GA では通常赤血球モデルが持つ活性の 0.1%-100%の範囲で探索したのに対し、全域探索では 0.0-50%の範囲で 24 ポイント [0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 (%)] のパラメータ値の網羅的な組合せパターン ($24^3 = 13824$) を用いた。さらに、ヘモグロビンの状態が R 型・T 型のいずれかであると条件設定した。以上、合計で $24^3 \times 2 = 27648$ パターンをシミュレーション実験の対象とした。

評価値

前述の GA で用いた評価関数を適用した。

結果

ATP、2,3-BPG の実測時系列データを再現可能であるパラメータセットが示す特徴を明らかにするために、全探索を行った 27826 パラメータセットのシミュレーション結果から

導出した EV 値が小さい上位 0.1% (27 セット) を抽出・比較した。

その結果、GA で推定されたモデルは、全探索によって得られた条件をすべて満たしていることが確認できた (図 5)。また、探索を行った 3 つのパラメータの値は、Enzyme activity で 3-6%、Purine metabolism activity で 20-30%、 Na^+/K^+ pump activity で 0-1% の範囲内での組合せに限られていた。なお、抽出されたモデルのヘモグロビンはすべて R 型となっていた。

今回得られた条件 (ヘモグロビン型と、各酵素群の活性の比) は、前述の通り、文献などから推察される条件とも一致が見られることから、条件を満たさない他のパラメータセットを許す可能性は低い。以上のことから、これらのパラメータ範囲に関する条件は RC-MAP の代謝動態を再現するために必要十分な条件であると予測される。

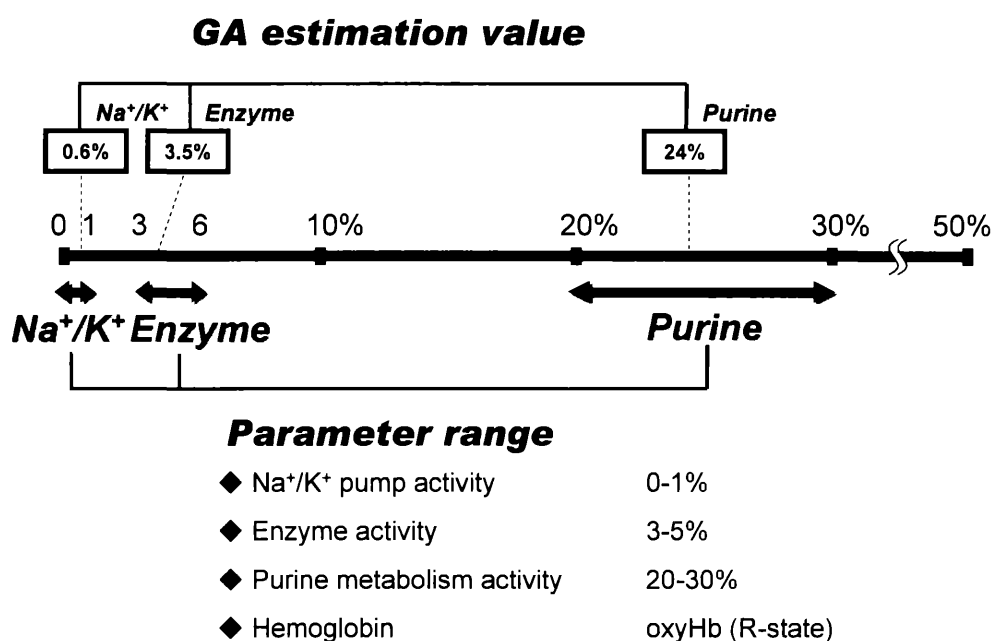


図 5 : 酵素活性に関するパラメータ範囲の傾向と GA によるパラメータ推定結果

さらに、パラメータの種類によって値の範囲が限定されていることを検証するために、今回得られた 3 つの酵素活性の各条件を満たさない 3 つのモデルを作成したシミュレーションを行い、それらが実測データと異なる結果を示すことを確認した (図 6)。

まず、Enzyme activity と Na^+/K^+ pump activity を各々、条件よりも高く (24%) 設定した 2 つのモデルでは、Shiba らの実測データよりも物質の減少速度がはやく、ATP は 14 日後、2,3-BPG は 7 日後までに枯渇してしまった。逆に Purine metabolism activity を低く (0.6%) 設定した場合、ATP が保存 49 日後でも初期値のまま保たれていた。以上のシミュレーション結果からも、保存赤血球の ATP、2,3-BPG の代謝動態を再現するためには、代謝酵素

活性を全般的に低下（3.5%）させた上で Na^+/K^+ ポンプの活性はより低く（0.6%）、プリン代謝系の酵素活性をより高く（24%）設定する必要があることが示唆された。このことから、複数の生化学的な知見から推察した、保存条件下での反応活性に関する仮定は妥当である可能性が高いと考えられる。

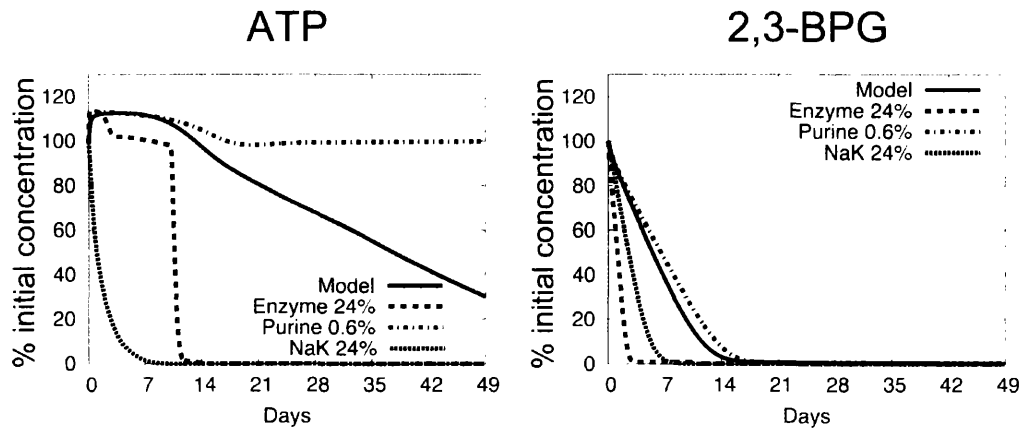


図 6：RC-MAP モデルと酵素活性の条件を満たさないモデルの比較

左図は ATP、右図は 2,3-BPG の時系列シミュレーション結果。y 軸は初期濃度に対する%で表してある。“Model” は GA で最適化したパラメータを持つ RC-MAP モデルの結果である。このモデルを基準にして、Enzyme activity のみを 24%にしたモデルの結果を“Enzyme 24%”で、Purine metabolism activity のみを 0.6%にしたモデルの結果を“Purine 0.6%”で、 Na^+/K^+ pump activity のみを 24%にしたモデルの結果を“NaK 24%”で表した。

生化学の知見を元に保存赤血球の代謝動態に関与する条件を統合し、不確定要素を機械学習の手法を用いて推定することによって、赤血球の保存状態を再現する確からしいモデルを得ることができた。次章では、このシミュレーションモデルの予測結果を検証するために実施した、MAP 保存赤血球液の代謝物質測定実験の結果について述べる。

第3章 CE-TOFMS による保存赤血球代謝物質の測定

第2章において、生体内環境下でのヒト赤血球モデルを拡張することで RC-MAP モデルを作成し、このモデルが保存赤血球内の ATP および 2,3-BPG の動態を正確に再現することを示した。しかしながら、ヒト赤血球内では数百、赤血球モデル上でも 50 程度の代謝物質が相互に影響を及ぼしあって赤血球の生理機能を維持している。そのため、赤血球をよい状態で保存する新たな手法を見出すためには、とりわけ重要だと考えられる ATP および 2,3-BPG 以外にも、数多くの代謝物質の動態を把握することが必要不可欠である。

そこで、CE-TOFMS 用いて実際の RC-MAP にふくまれる多数の代謝物質の量を一齐に測定し、その時系列データとシミュレーション予測結果と比較することで、複数の代謝物質に対しての RC-MAP モデルの予測精度と妥当性を実験的に検証した。

3-1 RC-MAP の作成と長期保存実験

RC-MAP の作成

クエン酸ナトリウム入り真空採血管³にて 10~40 代の健常成人から静脈血を採取して遠心分離 (4670 g, 6 min, 4°C) し、血漿および Buffy coat を除去した赤血球層に MAP 液 (表 7) を添加して密封し、4°C で静置保存した。

表 7: MAP 液の組成 (100mL 中)

塩化ナトリウム	0.497g
アデニン	0.014g
ブドウ糖	0.721g
マンニトール	1.457g
クエン酸	0.020g
クエン酸ナトリウム	0.150g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.094g

³本来ならば血液保存液の一種である CPD 液 (Citrate-Phosphate-Dextrose) 入りのバッグに採血を行うが、CPD の主成分であるクエン酸ナトリウムを用いて採血をおこなうことで代用した。

RC-MAP の時系列サンプリング

調整直後より 1 mL ずつサンプリングして、遠心分離 (800-700 g, 10 min, 4°C) して赤血球層に等張緩衝液であるトリス緩衝液 + グルコース溶液 (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM glucose, pH 7.4) を加えてから転倒混和して遠心分離する操作を 3 回繰り返す (洗浄操作) 赤血球サンプルを得た。RC-MAP の採取は保存後 0, 1, 3, 5, 7, 14, 28, 49 日後の合計 8 点、各タイムポイントで 5 サンプル (n=5) ずつ行った。

3-2 赤血球メタボローム抽出処理

20 μ M 内部標準 IS1⁴を含むメタノール 1.8 mL とサンプル赤血球 200 μ L を攪拌しタンパク質を変性させ、クロロホルム 2 mL と精製水 800 μ L を加えてさらに攪拌してから有機化合物層と水層に分離し (4°C, 3,500 rpm, 5 min 遠心分離処理)、水層部分を取り出して限外濾過処理をしてメタボローム抽出液を得た。真空乾燥機で溶媒を完全に除去した乾燥したペレットを、200 μ L 内部標準 IS2⁵を含む精製水 50 μ L で溶解して、CE-TOFMS を用いたメタボローム測定用のサンプルとした (図 7)。

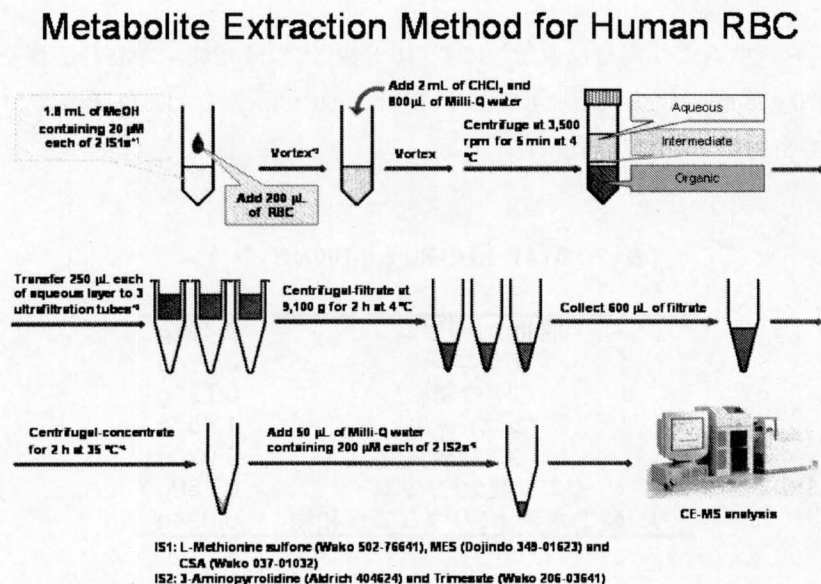


図 7 : 赤血球メタボローム抽出の行程

4 IS1 (Methionine Sulfone, MES, CSA)

5 IS2 (3-Aminopyrrolidine, Trimesate)

3-3 CE-TOFMS による代謝物質一斉測定

CE-TOFMS での測定は cation mode (陽イオン性物質) / anion mode (陰イオン性物質) / nucleotide mode (中性物質) で行った。それぞれの分析条件は以下のとおりである。

陽イオン性物質

物質の分離には 1 M の蟻酸を電解液として満たしたフューズドシリカキャピラリー (50 μm i.d. \times 全長 100 cm) を使用した。試料は 50 mbar の空気圧で 3 秒間、3 nL を注入した。電圧は +30 kV に設定した。キャピラリーは 20 $^{\circ}\text{C}$ 、サンプルトレイは 5 $^{\circ}\text{C}$ に保った。シース液には 50% MeOH / Milli-Q 水 (5 mM 酢酸アンモニウム, 0.1 μM Hexakis (2,2-difluoroethoxy) phosphazene 入り) を用い、1 mL/min で送液した。ESI-MS (Electro Spray Ionization-Mass Spectrometry) はポジティブイオンモード、キャピラリーの電圧は 30 kV に設定した。窒素ガスは 300 $^{\circ}\text{C}$ のヒーターで加熱し、10 L/min で供給した。

陰イオン性物質

物質の分離には 50 mM の酢酸アンモニウム (pH 8.5) を電解液として満たし、内表面が陰イオンポリマーでコーティングされている Nacalai Tesque 社製 SMILE(+)キャピラリー (50 μm i.d. \times 全長 100cm) を使用した。試料は 50 mbar の空気圧で 30 秒、30 nL を注入した。ESI-MS はネガティブモード、電圧は -30 kV に設定した。その他の条件は陽イオン測定と同じにした。

中性物質

物質の分離には 50 mM の酢酸アンモニウム (pH 7.5) を電解液として満たしフューズドシリカキャピラリー (50 μm i.d. \times 全長 100cm) を使用した。キャピラリーを使用する前にプレコンディショニングバッファ (25 mM 酢酸アンモニウム / 75 mM リン酸ナトリウム液 (pH 7.5)) で 20 分間前処理を行った。シース液には 50% MeOH / Milli-Q 水 (0.1 μM Hexakis (2,2-difluoroethoxy) phosphazene 入り) を用い、1 mL/min で送液した。それぞれのサンプルを注入する前には、キャピラリーをプレコンディショニングバッファで 10 分間平衡化し、引き続きランニングバッファを 6 分間送液する操作をリプレニッシュシステムにて行った。サンプルは 50 mbar の空気圧で 30 秒、30 nL を注入した。ESI-MS はネガティブモード、キャピラリーの電圧は 30 kV に設定した。その他の条件は陽イオン測定と同じにした。

3-4 実測結果とシミュレーション結果の比較

今回の測定実験では、RC-MAP モデルに含まれている約 50 個の代謝産物のうち、27 物質の時系列データの取得に成功した。中でも特に重要な解糖系中間代謝物質の実測結果を図 8 の左列に、RC-MAP モデルの予測結果を図 8 中央列に示した。結果からわかるように、RC-MAP のメタボローム測定結果の時系列が示す定性的な特徴はシミュレーション予測においても非常によく再現されていた。しかしながら、時系列を細かく検討すると定量的には複数の点に渡って差異が見られた。

解糖系上流の代謝物質のグルコース 6 リン酸 (G6P) とフルクトース 6 リン酸 (F6P) は、保存初期に増加した後、保存 49 日後までゆるやかに減少していた。濃度上昇のピークは、実測結果では 14 日後であったがモデルではシミュレーション開始直後に位置していた。

解糖系中流に位置するフルクトース 1,6-ビスリン酸 (F1,6BP) とジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) は、保存直後に F1,6BP は初期値の 8 倍、DHAP は 20 倍にまで急激に上昇し、その後激減して 14 日後にはほぼ枯渇していた。シミュレーション結果でも急激な濃度上昇の後、減少するという変動パターンが予測されたが、濃度上昇は 1.4 倍程度に留まっていた。3-ホスホグリセリン酸 (3PG) とホスホエノールピルビン酸 (PEP) も保存後に一旦増加してから減少するパターンを見せていた。

ピルビン酸 (PYR) と乳酸 (LAC) は時系列にしたがって徐々に増加し続け、49 日後には約 30 倍の濃度に達する。RC-MAP モデルでも LAC は単調に増加し続け 30 倍程度にまで達していたが、PYR は 14 日目付近から横這いに減少していた。

以上、保存初期に見られる物質の蓄積率や濃度上昇のピークを迎える時期にはズレがあるものの、実測データと似た挙動を示すことが確かめられた。当初 RC-MAP モデルは ATP と 2,3-BPG の時系列変動を予測するために最適化したモデルとして構築されたが、その他の代謝物質の挙動を予測するモデルとしても有用であることが実証されたといえる。なお、網羅的な解糖系中間代謝物質の時系列データを一斉に取得した保存血液関連の研究はこれまで行われておらず、この実験結果は保存赤血球の中間代謝物質を包括的に測定することに成功した初めての例である。

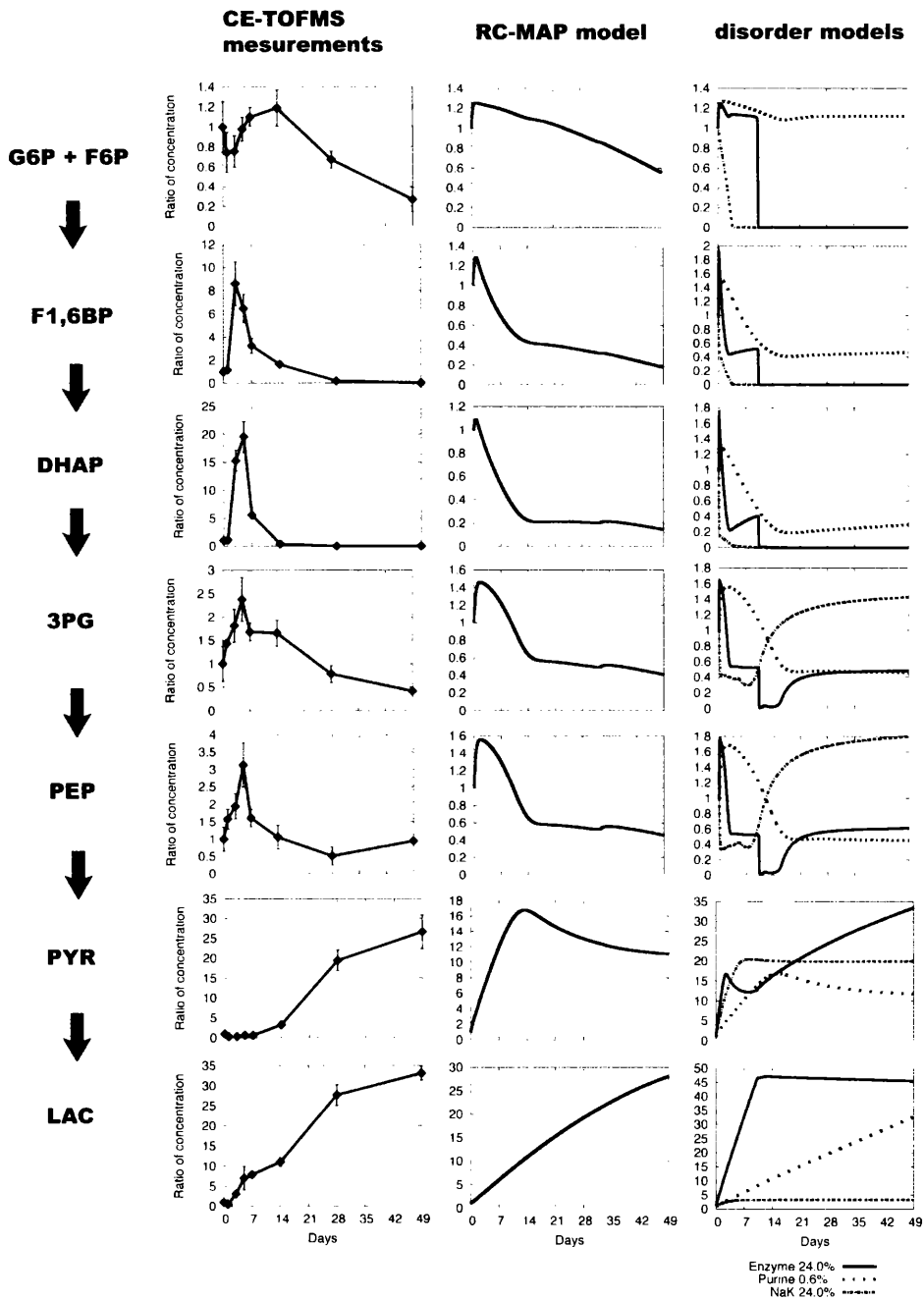


図 8 : 保存赤血球メタボローム測定と RC-MAP モデルにおける解糖系中間代謝物濃度の時系列変動

保存赤血球メタボローム測定 (n=5) の結果 (左列)。RC-MAP モデル結果が中央列である。最上段から順に、G6P と F6P の合計、F16BP、DHAP、3PG、PEP、PYR、LAC。酵素活性の条件を満たさないモデルの結果が右列である。RC-MAP モデルを基準にして、Enzyme activity のみを 24% にしたモデルの結果を“Enzyme 24%”で、Purine metabolism activity のみを 0.6% にしたモデルの結果を“Purine 0.6%”で、Na⁺/K⁺ pump activity のみを 24% にしたモデルの結果を“Na⁺/K⁺ 24%”で表した。

さらに、前章で得られたパラメータ条件から逸脱した3つのモデル（図6のモデル）によって解糖系の物質変動の予測した結果が図8の右列である。前述のとおり、この3つのモデルはATPおよび2,3-BPGについて実測結果と大幅に異なる挙動を示していたが、今回新たに測定された解糖系の7つの代謝物質についてもまったく異なる時系列の結果を示していることが確認できた。特に Enzyme activity、ないし Na^+/K^+ activity を24%に設定したモデルでは実測データの挙動を全く予測できないことがわかる。このシミュレーション結果からも、ATPと2,3-BPGの代謝動態に最適化されたパラメータ値を使用したモデルは、それら2物質のみならず、その他の解糖系中間代謝物質の時系列変化も予測可能なモデルであることが示唆された。

第4章 シミュレーション解析

CE-TOFMS を用いた代謝物質測定実験によって、RC-MAP モデルは保存赤血球の代謝動態を正確に再現するモデルであることが実証された。このモデルを利用したシミュレーション解析により、保存赤血球において ATP および 2,3-BPG が激減する代謝メカニズムを説明することが本研究の目的である。さらに RC-MAP モデルを利用したシミュレーション実験を重ねることにより、赤血球の保存状態を改善する手法の検討が期待される。

本章では構築した RC-MAP モデルを利用して行った複数のシミュレーション実験の結果について述べていきたい。

4-1 パラメータの感受性解析

先に示した通り、RC-MAP モデルには低温保存下の赤血球代謝を説明する変数として 5 種類のパラメータ (pH, Purine metabolism activity, Enzyme activity, Na^+/K^+ pump activity, ヘモグロビン) を実装されている。そこで、赤血球の重要な物質である ATP および 2,3-BPG と、ATP を維持する効果を持つアデニンに対して、各パラメータが及ぼす影響を感受性解析によって確認した。この解析により、各パラメータが保存赤血球内の ATP、2,3-BPG およびアデニンの挙動に対してどのような役割を果たしているかを知ることができる。

解析条件

RC-MAP モデルで設定した保存状態を説明する 5 要素 (パラメータ: pH, Purine metabolism activity, Enzyme activity, Na^+/K^+ pump activity, ヘモグロビン) に対し、GA で得られた基準となる値から各パラメータ毎に値を変化させて 49 日間のシミュレーションを行い、ATP、2,3-BPG、アデニン量の時系列変化を比較した (図 9)。ただし、pH はモデルの初期設定のみを 5 段階 (pH = 6.5, 6.75, 6.9*, 7.0, 7.25) に設定し、Purine metabolism activity は 2.5%, 12.5%, 24%*, 50% の 4 段階に、Enzyme activity は 4 段階 (0.5%, 1%, 2.5%, 3.4%*, 5%) に、 Na^+/K^+ pump activity は 5 段階 (0.25%, 0.5%, 0.6%*, 1%, 2.5%) にそれぞれ設定した。右肩に*がついた値が RC-MAP モデルがもつパラメータ値である。ヘモグロビンについては、赤血球中に存在する R 型 / T 型の割合を、全て R 型 (T:R=1:0)、全て T 型 (T:R=0:1)、同量の存在比 (T:R=1:1) の 3 段階に設定した。

結果

各パラメータの値を変化させたときに ATP, 2,3-BPG およびアデニンの時系列変動に表れた影響について、5 種類のパラメータ (pH, Purine metabolism activity, Enzyme activity, Na^+/K^+ pump activity, Hemoglobin) をひとつずつ取り上げて詳しく述べていく。

pH

pH の影響は 2,3-BPG に最も顕著に表れており、pH7.25 と pH7.0 以下の場合とでは 2,3-BPG の変動パターン自体に大きな違いが見られた(図 9-B)。また pH が高いほど、その濃度がよく維持されていた。すでに実験的に確認されている事実として、生体内での範囲においては pH が高いほど 2,3-BPG の定常濃度が高いことが報告されている [50]。また、2,3-BPG に関する反応プロセスとして本モデルに実装されている反応速度式には pH が変数として組み込まれており、pH と 2,3-BPG の関係は実験的な知見と一致することが先行研究において確認されている[29]。よって、高い pH によって 2,3-BPG 濃度を維持した本モデルの結果は妥当であることと、保存中の pH 変化が 2,3-BPG 濃度に多大な影響を及ぼすことが示唆された。

Purine metabolism activity

プリン代謝系には、赤血球内の ATP 量を維持する効果を持つアデニン[20]が存在している。Purine metabolism activity を GA で予測された値から 2.5%まで減少させた場合では、アデニンと ATP の濃度は7週間を過ぎても維持されると予測された(図 9-D,F)。一方、RC-MAP モデルで採用した 24%に設定した場合では、実際の保存血液中において示されるアデニンの枯渇と ATP の減少カーブの特徴を再現できている。また、図 9- C, F, I, L, O を比較するとモデルに実装したその他のパラメータはアデニン量の変化に影響していないことがわかる。つまり、感受性を見た 5 種類のパラメータの中では Purine metabolism activity のみがアデニン量を直接制御する要素であるといえる。さらに、アデニンの初期濃度を大きくしても ATP の減少率はほとんど変化しないというシミュレーション結果が得られており、アデニン量の減少が直接的に ATP の減少を招いているわけではないと考えられる。

以上の結果から、アデニンの枯渇現象は赤血球の保存中に起こるプリン代謝系の活性化を暗示しており、このプリン代謝系の高活性化が保存赤血球の ATP 減少を引き起こしていると予想できる。したがって、ATP を維持しつつ赤血球を保存するためには、プリン代謝系活性を適切に制御することが重要であるといえる。実際に、ATP とプリン代謝周辺経路に注目した研究は多数報告されている [51-55]。

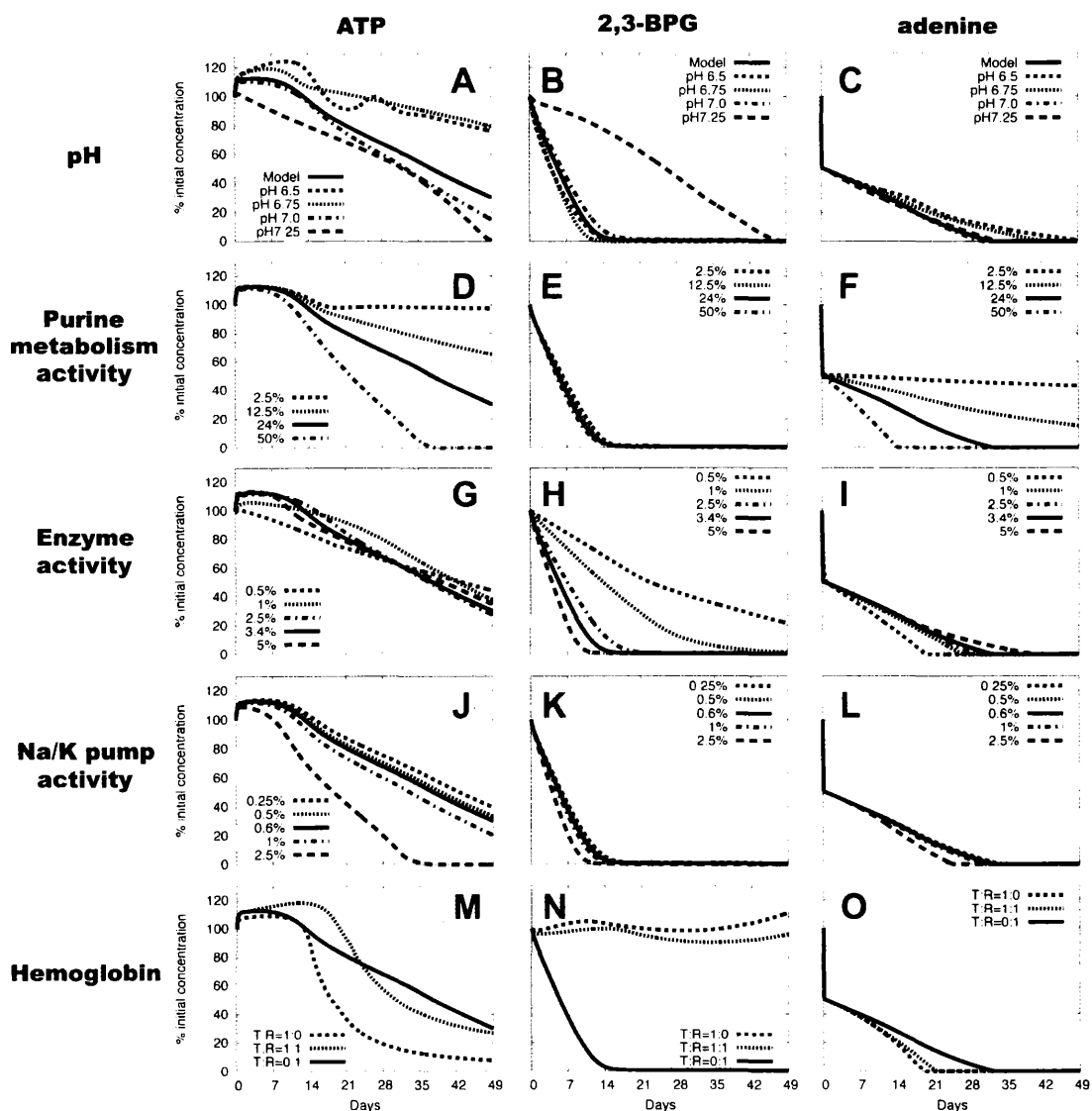


図 9 : RC-MAP モデルに実装したパラメータの感受性解析

RC-MAP モデルに実装した要素 (pH, プリン代謝系活性, 酵素活性, Na⁺/K⁺ポンプ活性, ヘモグロビン) に対し、1 要素ずつパラメータ値を変えた 7 週間のシミュレーションを行い、ATP, 2,3-BPG, アデニン量の各時系列濃度をグラフ化した。y 軸は初期濃度に対する % で表してある。このとき他の 4 要素には RC-MAP モデルの初期値が設定されている。各パラメータ値は以下のとおり: pH = 6.95 (Model), 6.5, 6.75, 7.0, 7.25 ; Purine metabolism activity (プリン代謝系活性) = 2.5%, 12.5%, 24% (Model), 50% ; Enzyme activity (酵素活性) = 0.5%, 1%, 2.5%, 3.4% (Model), 5%; Na/K Pump activity (Na⁺/K⁺ポンプ活性) = 0.25%, 0.5%, 0.6% (Model), 1%, 2.5%; Hemoglobin (ヘモグロビン) = 全て T 型 (T : R = 1 : 0), T 型と R 型を半量ずつ (T : R = 1 : 1), 全て R 型 (T : R = 0 : 1) (Model)。黒の実線 (Model) は GA で推測した RC-MAP モデルの結果である。

Enzyme activity

Enzyme activity は 2,3-BPG の減少速度に影響を与えるパラメータであることが図 9-H からわかる。5% の場合は約 10 日前後で 2,3-BPG は枯渇するが、活性が低くなればなるほど 2,3-BPG が枯渇するまでに要する時間は長くなる傾向がみられた。2,3-BPG は代謝物質の中でも特に保存処理後の温度条件による影響を受けやすい物質であると報告されている [38]。Enzyme activity は保存期間中の低温刺激を表現したパラメータであることを踏まえると、Enzyme activity に対しての 2,3-BPG の感度の高さは、温度に対する 2,3-BPG の感度の高さであると読み替えることができ、実際の保存赤血球の代謝変動と相違ない結果だといえる。

アデニンは Enzyme activity が小さいほど枯渇までの時間が短い(図 9-I)。これは、Enzyme activity が小さいほどプリン代謝系の活性速度は相対的に速くなるため、アデニンの枯渇が早まっていることで説明できる。この結果からも、アデニンは Purine metabolism activity の影響を直接受けている物質であることが示されたといえる。

Na⁺/K⁺ pump activity

Na⁺/K⁺ pump activity は 2,3-BPG やアデニン濃度にはほとんど影響しないが、ATP の減少速度をコントロールする要因となっていることが図 9-J からわかった。先述したとおり、Na⁺/K⁺ポンプは大量の ATP を使って能動的な膜輸送を行っている機構である。Na⁺/K⁺ pump activity が大きいほど ATP の減少速度が大きくなることが予測されており、妥当な結果であるといえる。

Hemoglobin

ヘモグロビンの T-R 型の違いは 2,3-BPG の濃度遷移に大きく影響していた(図 9-N)。2,3-BPG はヘモグロビンが全て R 型の場合は約 14 日間で枯渇してしまったが、T 型、もしくは T:R の比が 1:1 の条件では、初期濃度を 49 日間に渡って維持し続けていた。ヘモグロビンが T 型に安定化しているときは、大部分の 2,3-BPG はヘモグロビンに結合して代謝に利用されないため 2,3-BPG 濃度は維持される。また、T 型ヘモグロビンは R 型と比較して 2,3-BPG に約 100 倍、ATP に約 30 倍結合しやすいため [56]、T 型と R 型が半数ずつの条件では T 型のみ挙動に近づくと解釈できる。また、R 型のみの場合と T 型が過剰に含まれる場合とでは ATP 濃度の時系列変化の挙動も異なっていた。低温条件下における 2,3-BPG 濃度とヘモグロビンの状態遷移の関係性についてはこれまでも議論がされてきた [57]。現在のところ、ヘモグロビンの状態を人工的にどちらかに安定化させるためには、

一酸化窒素 NO などのガスを用いるしか方法がないが、その方法では期待される効果よりも副次的な影響が大きいと見られるため、実用化までを視野に入れた研究は行われていない。本研究での取り組みは、それらの問題を解決してヘモグロビンと代謝の連関を考慮した低温血液保存法の開発を提唱する初めての試みになり得るといえる。

モデルに実装されたパラメータの感受性解析の結果から、各パラメータ値のわずかな違いが代謝物質濃度の時系列に大きな影響を与えることがわかり、モデルに実装したパラメータは、保存時の代謝状態を再現する上で重要な項目であることが確かめられた。さらに、それぞれのパラメータは独立して感受性が高いため、低温保存赤血球にみられる ATP、2,3-BPG の特徴的な濃度変化は、各パラメータの非常に限定された条件（緩やかに低下する細胞内 pH、低温によって 3.5% に低下する酵素活性、pH の低下に伴って高活性化するプリン代謝経路の酵素活性、低温刺激に感受性の高い Na^+/K^+ pump-ATPase 活性、低温によるヘモグロビンの R 型安定化）を満たす場合においてのみ再現されることが示された。

また、Purine metabolism activity の解析結果から、プリン代謝系の活性制御が保存赤血球の ATP 濃度を維持する上で重要であることが示唆されており、保存状態の改善に関して有益な情報を得ることができた。このプリン代謝系に関わる個々の反応を子細に解析して律速酵素を特定できれば、ATP が減少するメカニズムの理解につながると考えられる。そこで、代謝モデルに含まれる各酵素反応が保存時の ATP や 2,3-BPG の挙動に与える影響を見積もる解析を行うことにした。

4-2 酵素活性の感受性解析

保存赤血球で起こる ATP や 2,3-BPG の著しい減少を引き起こすメカニズムを明らかにして保存中の物質減少を食い止めるためには、代謝酵素や代謝物質のふるまいを詳細に把握する必要がある。そこで、低温保存の条件下で ATP や 2,3-BPG の濃度変化に強い影響を及ぼす酵素反応段階を特定するために、各酵素活性の感受性解析を行った。

解析条件

解糖系・ペントースリン酸回路・プリン代謝系に含まれる計 35 反応について、RC-MAP モデルを基準として各酵素反応の活性に±10%の摂動を加えて、保存後 21 日目と 49 日目における ATP、2,3-BPG 濃度変化の影響度 (Sensitivity) として以下の式で算出した。 $[X]_{RC-MAP}$ は RC-MAP モデルでの物質 X の濃度、 $[X]_e$ は酵素 e の活性を変えて得られた物質 X の濃度を表す。この Sensivity の値が高いほど、通常の RC-MAP モデルよりも ATP、2,3-BPG を維持する効果が高いといえる。

$$\text{Sensitivity (\%)} = \frac{[X]_e}{[X]_{RC-MAP}} \times 100$$

結果

HK、PFK、PK を高活性化した場合と、BPG 産生系 (BPGSP)、PRPP 合成酵素 (PRPPsyn)、AMP アーゼ (AMPase) を低活性化した場合に ATP、2,3-BPG の濃度に顕著な改善効果が見られた (表 8)。そこで、これら 6 酵素については RC-MAP モデルにおける反応活性を 0.1、0.5、1.5、5 倍して 49 日間のシミュレーションを走らせ、ATP、2,3-BPG、アデニン、グルコースの時系列データを取得して RC-MAP の結果と比較した (図 10)。6 種類の酵素活性をそれぞれ変化させたときの結果について、酵素 1 種類ずつ取り上げながら詳細に述べていく。

表 8 : 各酵素反応の高活性化(+10%)と低活性化(-10%)がもたらす ATP、2,3-BPG への影響度

Enzyme	Enzymatic activities increased by 10%				Enzymatic activities decreased by 10%			
	28days		49days		28days		49days	
	ATP(%)	2,3-BPG(%)	ATP(%)	2,3-BPG(%)	ATP(%)	2,3-BPG(%)	ATP(%)	2,3-BPG(%)
HK	112 (↑)	157 (**)	130 (**)	188 (**)	87 (↓)	60 (**)	65 (**)	34 (**)
PGI	100	100	100	100	100	100	100	100
PFK	105	121 (**)	114 (↑)	130 (**)	94	81 (↓)	84 (↓)	71 (**)
ALD	100	100	100	100	100	100	100	100
TPI	100	100	100	100	100	100	100	100
GAPDH	100	99	98	97	100	101	102	103
BPGSP	89 (↓)	75 (**)	69 (**)	48 (**)	112	135 (**)	134 (**)	173 (**)
PGK	100	100	100	100	100	100	100	100
PGM	100	100	100	100	100	100	100	100
EN	101	99	102	102	99	101	98	98
PK	104	94	112 (↑)	106	96	106	86 (↓)	91
LDH	100	100	100	100	100	100	100	100
LDH2	101	99	102	102	99	101	97	98
G6PDH	100	100	100	100	100	100	100	100
6PGODH	100	100	100	100	100	100	100	100
6PGLase	100	100	100	100	100	100	100	100
GSSGR	100	100	100	99	100	100	100	101
L_GCS	100	98	98	96	100	102	102	104
OX	99	96	94	88 (↓)	101	104	105	111 (↑)
GSH_S	100	100	100	100	100	100	100	100
R5PI	100	100	100	100	100	100	100	100
X5PI	100	100	100	100	100	100	100	100
TK1	100	102	102	104	100	98	98	96
TK2	100	100	100	101	100	100	100	99
TA	101	103	104	108	99	96	95	89 (↓)
PRPPsyn	99	95	93	87 (↓)	101	106	108	114 (↑)
PRM	100	100	100	100	100	100	100	100
PNPase	100	100	100	100	100	100	100	100
AK	101	98	102	101	99	102	97	99
ADA	100	102	98	99	101	98	103	101
AMPDA	100	100	100	100	100	100	100	100
ADPRT	100	99	100	100	100	101	100	101
AMPase	96	102	86 (↓)	86 (↓)	104	98	114 (↑)	113 (↑)
HGPRT	100	101	100	100	100	99	100	100
IMPase	100	100	100	100	100	100	100	100
APK	100	100	100	100	100	100	100	100

値の横についている上下の矢印は RC-MAP モデルに比べて ATP、2,3-BPG が 10%以上増加(↑)、20%以上増加(**)、あるいは 10%より減少(↓)、20%より減少(**)していることを示している。

HK

HK を活性化すると ATP, 2,3-BPG の両者を維持する効果が非常に高いが、活性を上げすぎると ATP は急激に減少してしまった (図 10-A)。このとき、ATP が激減する時期とアデニンの枯渇時期は重なっている。このことから ATP の維持にアデニンが直接関与していると考えられたが、PRPPsyn と AMPase の解析結果 (図 10-Q, S, U V) からはアデニンの枯渇が ATP 量の減少の直因となっていないことがわかった。一方、2,3-BPG は HK 活性が高いほど維持され(図 10-B)、ATP のような減少は見られない。

PFK

HK とは異なり、PFK では活性を大幅に上げても ATP の急激な低下は起きなかった。一方で PFK 活性が高いほど、アデニンの消費はゆるやかに起こる (図 10-G)。49 日目の直前に ATP が減少し始めるが、これはグルコースの枯渇による間接的な影響だと考えられる。中尾らは、保存赤血球での解糖系活性低下とそれに伴う ATP 減少の原因は、PFK の顕著な不活性化に依るところが大きいと指摘した [58]。彼らはアデニンとイノシンの添加によって PFK 活性の改善と ATP の維持に効果があることを確認しているが、その詳細なメカニズムの解明には至っていない。

PK

PK を活性化させると ATP が長期にわたり維持される一方で 2,3-BPG が早期に減少し、逆に不活性化すると 2,3-BPG が維持され ATP が激減するという両物質間のトレードオフが観察された(図 10-I,J)。解糖系の下流に位置する PK が活性化されると、ATP を生成すると同時に解糖系中流に蓄積している 2,3-BPG が消費される。逆に不活性化すれば、ATP 生成は抑制されるが 2,3-BPG 量は減らない。そのため、このシミュレーション結果は妥当であると考えられる。PK の阻害剤であるアラニンを加えて赤血球を保存した場合には 2,3-BPG は増加するが、ATP は増加しないという実験結果も報告されている [59]。

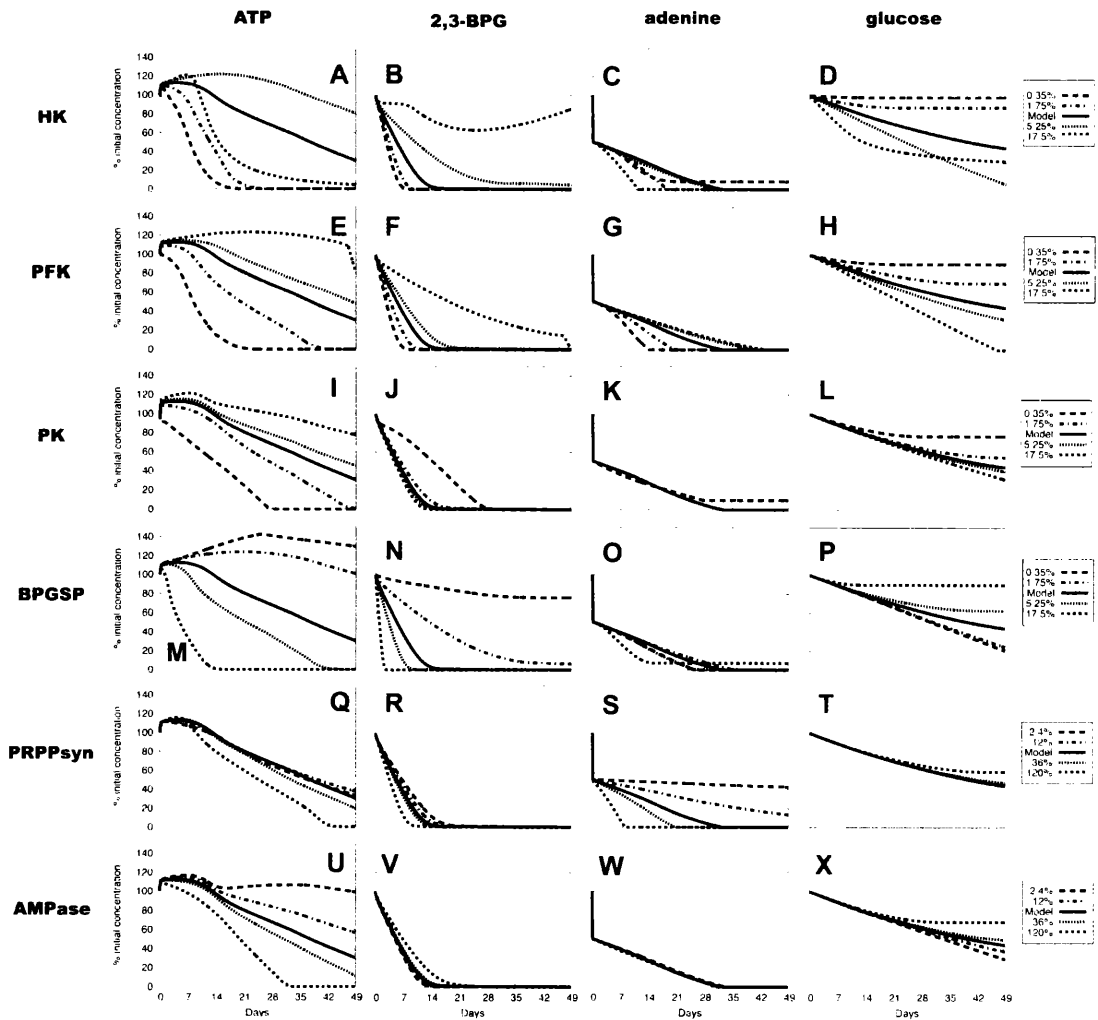


図 10：酵素活性の感受性解析

表 8 において ATP、2,3-BPG を増加させる効果のあった PFK, PK, AMPase, BPGSP, PRPPsyn, AMPase の反応活性を変動させた時の ATP, 2,3-BPG 濃度を時系列グラフにした。RC-MAP モデルでの結果も共に載せた。

BPGSP

BPGSP は赤血球特異的に存在する解糖系中流の迂回経路 (2,3-BPG shunt) の反応系である。1,3-BPG がリン酸基転移して 2,3-BPG となりさらに脱リン酸化が起こって 3PG となるまでの一連の反応によって 2,3-BPG 濃度を直接的に調節している系である。BPGSP を不活性化すると ATP, 2,3-BPG ともに保存後 49 日後に至るまで濃度を保つことができた (図 10-M, N)。

PRPPsyn

PRPPsyn は ATP や 2,3-BPG の維持に対する直接的な効果は見られないが、アデニンの消費速度を決定していることが図 10-S からわかる。アデニンは PRPPsyn の反応生成物である PRPP と結びついて AMP を産生するため、PRPP が不足するとアデニンが代謝されないまま残ってしまう。モデルが持つパラメータの感受性解析結果においては、プリン代謝系の活性化がアデニンの枯渇を招いていたが、PRPPsyn の感受性解析結果もあわせて考えると、プリン代謝系の中でも PRPPsyn がその中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

AMPase

AMPase の不活性化によっても ATP が維持できていた (図 10-U)。AMPase が不活性化すると反応生成物であるアデノシンが不足し、アデノシンと ATP を基質とするアデノシンキナーゼ (AK) の反応が抑制され、ATP の消費量が減少すると考えられる。一方で、AMPase の活性を変えてもアデニン量の変動パターンには影響がなかった。PRPPsyn の結果をふまえると、少なくともプリン代謝系の反応段階ではアデニン量が直接的に ATP 量の調節しているわけではないことが予想できる。

以上の感受性解析の結果から、低温保存時の ATP の減少を招いている主な原因として HK, PFK の不活性化と AMPase の活性化が挙げられる。保存溶液には血液抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが含まれるが、クエン酸は PFK の阻害作用をもつことが一般的に知られている[60]。クエン酸を他の物質に置き換えることが可能であれば、PFK の活性化にともない ATP 量が増大し、保存赤血球の品質向上につながると予測される。

また、プリン代謝系に属する反応段階のみでアデニンと ATP の関係性を考えると、アデニンの消費と ATP の産生 (蓄積) は必ずしも同時には起こらないことがわかる。一方で、

解糖系酵素の活性化にともなって ATP が産生される場面では、アデニン量に依存して ATP が生成されている。これらのシミュレーション予測結果から、プリン代謝系におけるアデニンの消費が、解糖系での ATP 産生効率を高める効果をもつのではないかと考えられる。

2,3-BPG 量の変化には pH とヘモグロビン型が多大な影響を及ぼすことがモデルのパラメータ解析でわかっている。加えて、BPG 合成系が 2,3-BPG の減少を食い止める作用をもつことが示された。Mulquiney らによる 2,3-BPG 代謝モデル解析では、pH と酸素によるヘモグロビンの変化が 2,3-BPG の最も効果的な調節因子であり、HK や PFK の反応を通してこれら 2 つの調節因子の影響が 2,3-BPG 量に反映していると結論していた [29]。このように、2,3-BPG の制御には代謝反応以外の様々な要因が重なっているため、保存中に濃度変化がおこる作用機序を特定することは大変難しい。ただし、赤血球モデルの 2,3-BPG 産生系には pH に依存した反応速度式が使われているため、RC-MAP モデルを利用すれば pH 変化と代謝の関連を考慮した上で保存条件の最適化が実現できると考えている。

4-3 新しい保存液組成の提案へ向けたシミュレーション解析

日本における最も一般的な赤血球の保存法としては MAP を用いた手法が挙げられる。しかし、序論でもふれたように、MAP による保存法には 2,3-BPG が比較的早く枯渇してしまうことなどの問題があるため、より有効な保存手法の開発が期待されているといえる。今回得られた RC-MAP モデルを用いて新たな保存液の組成を提案するため、はじめに既存の MAP 組成の有効性について検証し、さらにそれを拡張することでより有効な保存用液の組成を予測することが可能であるかどうかについて確かめた。

4.3.1 MAP 組成の感受性解析

赤血球を長期保存する上で、その有効期限を延長するための最も直截かつ現実的な手法として、保存液組成を最適化が考えられる。そこで、現在一般に用いられる MAP 組成に含まれる細胞外物質の初期濃度が ATP、2,3-BPG に与える影響を確認するとともに、より有効な組成比について検討した。

解析条件

MAP 液に含まれる各成分の初期値を変えた RC-MAP モデルで 7 週間のシミュレーション実験を行い、MAP の組成が保存赤血球の ATP、2,3-BPG の変動に及ぼす影響を観察した。アデニンは 1.5 μ M-30 mM、グルコースは 1 mM-150 mM、リン酸は 0.5 mM-30 mM、ナトリウムイオンは 1 mM-300 mM の範囲で変えて感受性解析を試みた (図 11)。これ以降に記載する保存液組成に関する解析についても、GA によって最適化した RC-MAP モデルを用いてシミュレーション実験を行った。

結果

アデニンが高濃度だと保存 49 日後でも ATP の残存量は約 50% であり ATP の維持に効果が高いが、2,3-BPG の枯渇は避けられなかった。グルコース濃度が低いと ATP と 2,3-BPG は保存後 4 週間で完全に枯渇してしまった。ただし、MAP で採用されている 40 mM より多くのグルコースを添加しても、ATP と 2,3-BPG を維持する効果は向上しなかった。リン酸は濃度が低いほど ATP や 2,3-BPG を維持する効果が高いが、アデニンやグルコースほど大きな影響はみられなかった。ナトリウムイオン濃度は ATP、2,3-BPG 量の変動に全く影響していなかった。

以上から、保存赤血球の ATP, 2,3-BPG を維持する上では、MAP に含まれるアデニンとグルコースが特に重要であることが示された。グルコースは低濃度だと ATP と 2,3-BPG が早期に枯渇してしまうが、今まで以上に大量に添加してもその効果は変わらない。アデニンは ATP の維持に貢献しているが、同時に 2,3-BPG の枯渇を早めることがこの結果からわかった。つまり、MAP の作成に使用される物質のうち赤血球代謝モデルに影響がある 4 物質の濃度比は、現在採用されている比率がほぼ最適である可能性が高いと考えられる。

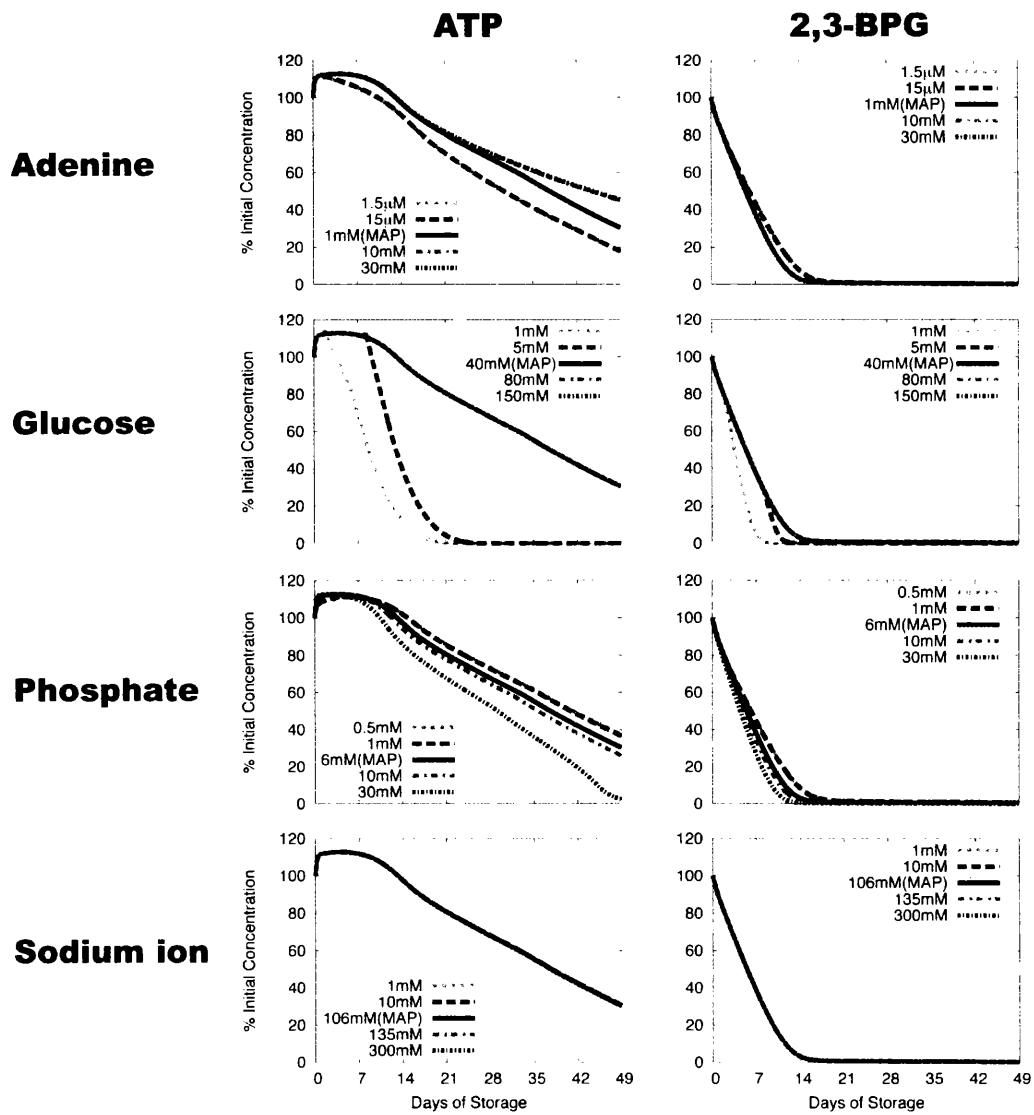


図 11 : MAP 組成の感受性解析

MAP 液の組成に含まれる 4 種の物質が ATP, 2,3-BPG に与える影響を解析した。アデニンは 1.5 μ M-30mM (1 段目), グルコースは 1mM-150mM (2 段目), リン酸は 0.5mM-30mM (3 段目), ナトリウムイオンは 1mM-300mM (4 段目) の範囲で変えて 7 週間の保存を模したシミュレーションを行った。パネルの左列は ATP、右列は 2,3-BPG のグラフである。MAP 液に採用されている濃度は黒い実線で示した値 (アデニン: 1mM, グルコース: 40mM, リン酸: 6mM, ナトリウムイオン: 106mM) である。

4.3.2 保存赤血球細胞外物質の感受性解析

MAP における物質の組成比を変化させた先のシミュレーション予測により、現在の MAP 組成の成分比を変えるだけでは今まで以上に ATP と 2,3-BPG を劇的に維持することは難しいと判断できた。そこで、2,3-BPG の回復に効果があるとされるイノシンとピルビン酸 [13, 61]、そして、ATP や AMP の原料となるアデノシン[62]が保存添加剤としての効果を持つかを、シミュレーションによる感受性解析で確かめた。

解析条件

MAP には含まれていないアデノシン(ADO)、イノシン(INO)、PYR を保存液の組成として RC-MAP モデルに新たに添加し、7 週間のシミュレーションによる感受性解析を行った。MAP に何も添加しない場合、MAP に上記の 3 物質をそれぞれ 1 mM ずつ加えた場合、2 種類を組み合わせで添加した場合 (INO と PYR、ADO と PYR) の計 6 パターンにおける ATP、2,3-BPG の時系列変化を比較した(図 12)。

結果

前述の MAP における結果と同様に、今回選出した 3 つの物質を MAP に添加した場合においても ATP、2,3-BPG の濃度変化の動向に変化はみられず、ATP、2,3-BPG の維持効果は小さかった (図 12)。代謝物質の添加によって多少の効果はみられたものの、今回設定した範囲内では ATP と 2,3-BPG の維持に劇的な効果をもたらしたとは言い難い。

今回は MAP に含まれない物質の添加が代謝動態に及ぼす影響を大まかに検討することを目的としていたため、3 つの代謝物質に関して、添加する濃度条件も一律な値を用いて 6 通りの条件しか検討しなかった。そのため、実際により有効な保存液組成を得るためには、添加する物質の種類や濃度に関して、さらに広範な検討が必要であると考えられる。

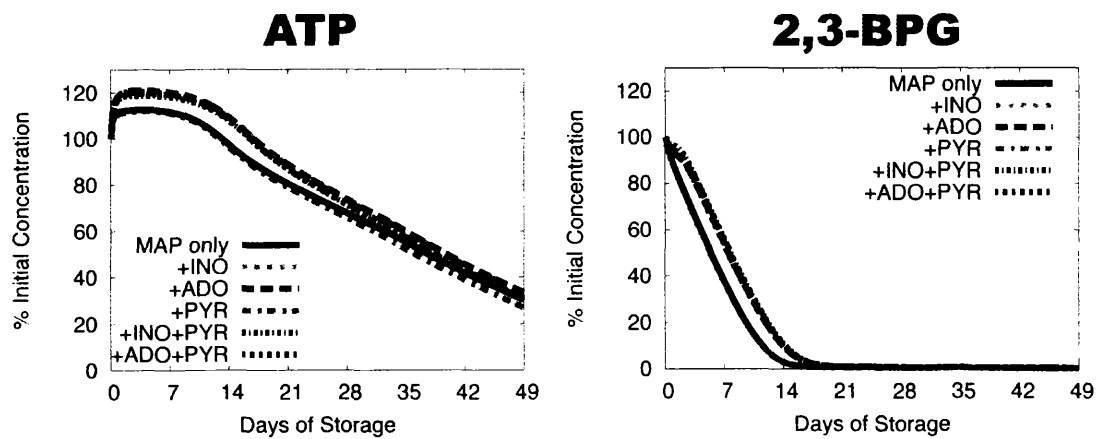


図 12 : イノシン, アデノシン, ピルビン酸の感受性解析

MAPには含まれていないアデノシン, イノシン, ピルビン酸をRC-MAPモデルに適宜追加し, 7週間のシミュレーションを行ったときの ATP(左パネル)と 2,3-BPG(右パネル)の経時変化を表した。何も添加しない(MAP only), MAP+イノシン1mM (+INO), MAP+アデノシン 1mM(+ADO), MAP+ピルビン酸 1mM(+PYR), MAP+イノシン 1mM+ピルビン酸 1mM (+INO+PYR), MAP+アデノシン 1mM+ピルビン酸 1mM (+ADO+PYR) の計 6 パターンを比較した。

4.3.3 再活性化のシミュレーション解析

再活性化（若返り処置）とは、保存状態から温度のみを体温まで戻してそのまま使用する一般的な輸血の前処理に対して、利用前の保存赤血球に賦活液（若返り液：rejuvenation）を添加して 37°C で加温し ATP や 2,3-BPG 値を高める処置のことで、酸素運搬能を新鮮血と同じ程度まで回復させることが可能である[19]。賦活液には PYR、リン酸、イノシン、アデニンなどが見出されている。日本ではまだ実用化されていないが、アメリカでは 42 日間の有効期限を過ぎた赤血球製剤に対して既に利用されている[63]。

これまでの RC-MAP を用いたシミュレーション解析により、保存溶液の組成を変化させることには限界があると考えられたため、それ以外に適用可能な手段のひとつとして、再活性化の有効性をシミュレーション実験によって検証することにした。

解析条件

再活性化の効果を RC-MAP モデルでも確認するために、過去の先行研究と同様の条件下でのシミュレーションを実行することにした。

Oski らによって 4°C で 21-28 日間保存された赤血球を各 10 mM のイノシン、無機リン酸 (Pi)、PYR を含む培地中 37°C 条件下で 4 時間加温したときの 2,3-BPG 濃度が測定されており、保存赤血球の再活性化の効果が議論されている[64]。これと同様の条件を用いてシミュレーションを行った。

結果

Oski らの実験では、2,3-BPG の初期値 (176 μM) に対して、イノシンのみの添加で 1395 μM に回復するが、イノシンと Pi の添加ではイノシンだけの場合と大差ない結果であった。イノシンと PYR の添加で 3365 μM まで上昇し、イノシンと Pi と PYR を全て入れたときは更に高濃度の 6637 μM まで回復していた[64] (図 13-A)。一方シミュレーションでは、2,3-BPG の初期値 (697 μM) に対して、イノシンだけの添加で 6210 μM に回復した。イノシンと Pi の添加ではイノシンだけの場合と大差なく、Oski らの実験と同じ結果であった。イノシンと PYR の添加で 7490 μM 、イノシンと Pi と PYR の添加で 8950 μM まで回復していた (図 13-B)。

以上の結果から、保存期間終了後にイノシンを添加することによって、枯渇した 2,3-BPG の回復を促進する効果がみられることが、シミュレーション実験においても確認できた。さらに PYR と Pi を加えることによって、その効果がいっそう高まることもわかった。この現象のメカニズムを追求するために、シミュレーションでは、2,3-BPG 以外の代謝物質 [リボース 5 リン酸 (R5P)、グリセルアルデヒド 3 リン酸 (GA3P)、3PG、PYR、NAD、

NADH]の時系列変化も観察した (図 14)。

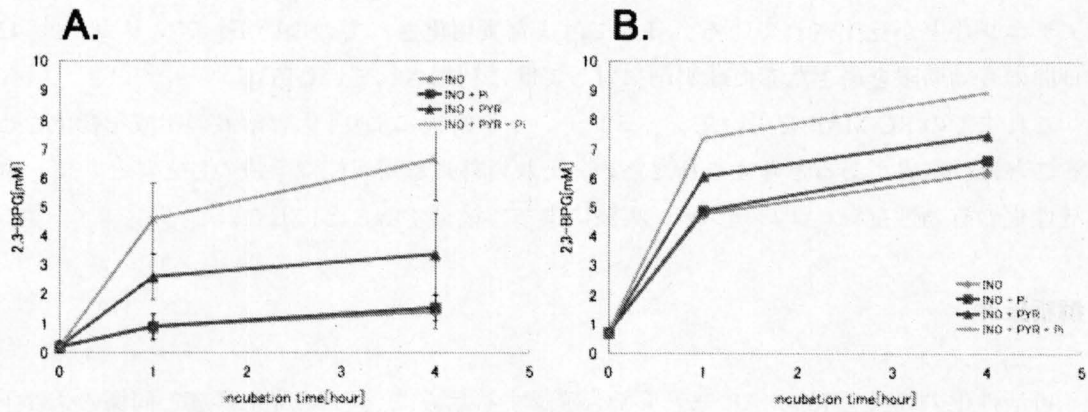


図 13 : イノシン, ピルビン酸とリン酸の添加による 2,3-BPG の再活性化 (Oski et al. の再実験)

保存約 20 日後の赤血球にイノシン, ピルビン酸, リン酸を適宜加えて、37°C に 4 時間インキュベートしたときの 2,3-BPG 量の増減をグラフ化した。イノシン 10mM (INO), イノシン 10mM+リン酸 10mM (INO+Pi), イノシン 10mM+ピルビン酸 10mM (INO+PYR), イノシン 10mM+ピルビン酸 10mM+リン酸 10mM (INO+PYR+Pi) の 4 パターンを比較した。パネル A : Oski らの実験結果[64]。パネル B : RC-MAP モデルによるシミュレーションの結果。

イノシンのみの場合とイノシン・Pi・PYRを同時に入れた場合には、インキュベーション直後にR5Pが上昇し、次いで3PG, GA3Pの蓄積がみられた。イノシンだけの場合には、NADの減少とNADHの上昇が特に顕著だった。イノシンの添加とヌクレオシドホスホリラーゼ働きによってリボース1リン酸(R1P)とヒポキサンチン(HX)が生成されて2,3-BPGの蓄積につながるということが知られている [65]。シミュレーションにおいても、イノシンを入れた場合にはインキュベート開始直後にR1Pの代謝産物であるR5Pが急激に上昇している (図 14-a)。Osakiらは、イノシンによってNADの利用が制限されるというBorgeseらの仮説 [66]をもとに、『R1PからR5Pが生成され、解糖系のF6PやGA3Pへと反応が進み、GA3PとNADによって1,3-BPGが生成され、最終的に2,3-BPGが蓄積する。』(図 15)という、一連の代謝反応に関する仮説を立てている [64]。今回のシミュレーションでは、R5Pの急激な上昇後にGA3Pと1,3-BPGが蓄積しており (図 14-b,c)、Osakiらの仮説を裏付ける結果が得られたといえる。

また、イノシンだけを添加した場合にはNADが減少しNADHが上昇するが、PYRも同時に加えるとNAD/NADH比は変化しない (図 14-e,f)。これは、1,3-BPGと一緒に生成されたNADHがPYRの還元反応で積極的に利用されてNADへと戻るためだと考えられる (図 15)。イノシンのみが過剰に存在すると、NADが不足してGA3Pから1,3-BPGが生成される反応が進まなくなり、GA3PとNADHが大量に蓄積する (図 14-b,f)。逆に、イノシンとPYRが両方とも多量に存在していると、大量のGA3PからNADHが順次生成されるが、NADHはPYRの反応によって逐次NADへと酸化されるためNAD/NADH比は正常に保たれる。同時に、1,3-BPGへ進む反応も円滑に起こるようになり、2,3-BPGが活発に生成されるようになる。このときPYRも一緒に消費される様子が図 14-d からわかる。Osakiらは2,3-BPGにおけるPYRの効能について論文中では触れていないが、PYRによるNADHの酸化が2,3-BPGの回復を促す可能性についての議論はこれまでも多くなされており [61, 67-69]、シミュレーション結果から導かれた仮説は支持されるといえるだろう。

以上のシミュレーション実験によって、再活性化法の有効性を根本的な代謝のメカニズムから解明することが可能になった。ここで得られた理解を活かしつつ、構築したRC-MAPモデルを応用してあらゆる組成パターンを網羅したシミュレーション実験を繰り返すことで、よりよい賦活液の提案につながることを期待される。

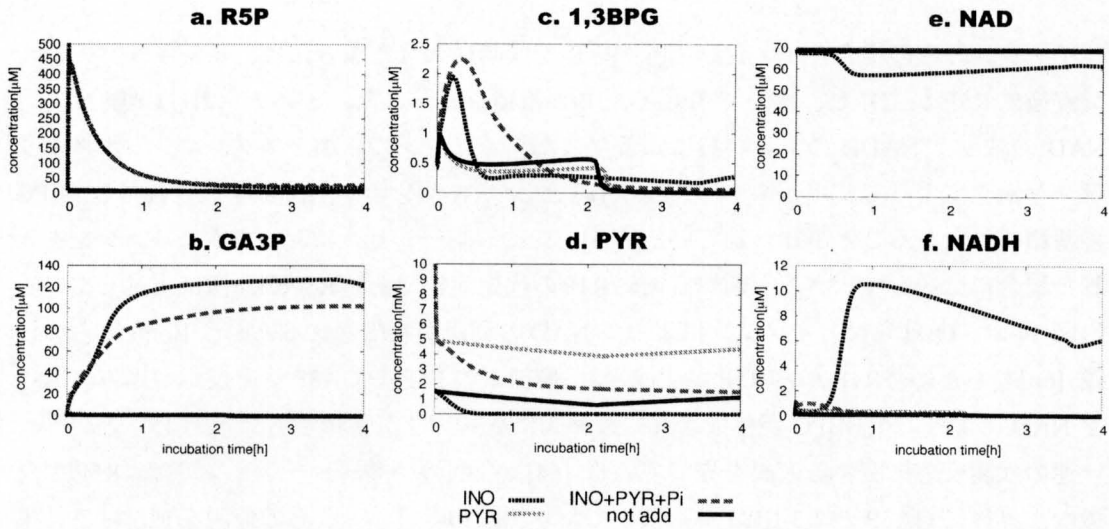


図 14：イノシン、ピルビン酸とリン酸の添加による再活性化 (Osaki et al. の再実験) における中間代謝物質濃度の変化

保存約 20 日後の赤血球にイノシン、ピルビン酸、リン酸を適宜加えて、37°C に 4 時間インキュベートしたときの中間代謝物質の増減をグラフ化した。イノシン 10mM (INO)、ピルビン酸 10mM (PYR)、イノシン 10mM+ピルビン酸 10mM+リン酸 10mM (INO+PYR+Pi)、何も添加しない(not add) の 4 パターンを比較した。a: R5P, b: GA3P, c: 1,3-BPG, d: PYR, e: NAD, f: NADH. 全て RC-MAP モデルによるシミュレーションの結果である。

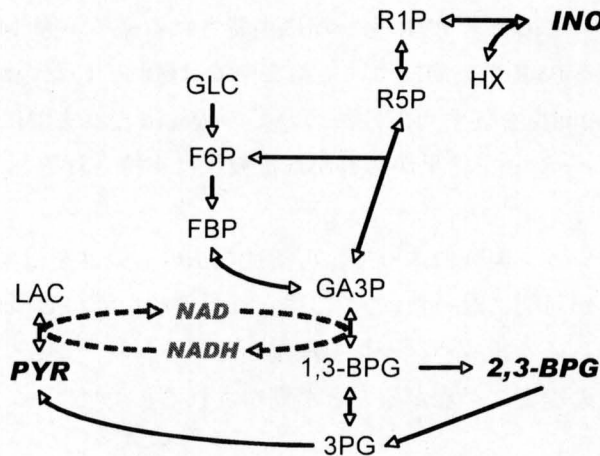


図 15：赤血球におけるイノシン代謝経路

INO : イノシン; F6P : フルクトース 6 リン酸; DHAP : ジヒドロキシアセトンリン酸; GA3P : グリセルアルデヒド 3 リン酸; 3PG : 3-ホスホグリセリン酸; PYR : ピルビン酸; LAC : 乳酸; R5P : リボース5リン酸; R1P : リボース 1 リン酸; HX : ヒポキサンチン

第5章 結論

本研究では、従来は経験的な手順で行われていた血液保存の研究開発に、コンピュータシミュレーションやメタボローム解析といった新しい技術を取り入れ、新たな血液保存手法の提案を目指した。

文献から得られた知見をベースに作成したモデルを GA によって精緻化し、保存赤血球の代謝動態を精密に予測できるモデル (RC-MAP モデル) を得ることに成功した。さらに、CE-TOFMS を用いて保存赤血球の代謝物質を網羅的に測定する実験系を立ち上げ、RC-MAP モデルの予測結果が妥当であることを実証した。

この RC-MAP モデルによるシミュレーション実験によって、pH やヘモグロビンといった外的要因が保存時の代謝動態に強く影響していること示唆した。また、赤血球の保存中に不活性化する PFK や活性化する AMPase などが、ATP や 2,3-BPG の減少を引き起こす酵素反応段階であることを突き止めた。これらの成果を得たことによって、保存赤血球に特異的な ATP や 2,3-BPG の減少を招く代謝メカニズムの解明へ大きく前進したといえる。

保存液の最適化を念頭に置いたシミュレーション実験により、MAP 組成および、イノシン、アデノシン等の代謝物質が保存中の代謝変動に与える影響を調べたが、現在の保存液組成の最適化によって保存状態を改善することは難しいという結論を得た。今後はこれまで注目されてこなかった代謝物質も保存液組成の候補物質として組成最適化の対象とし、あらゆる状況下でのシミュレーション実験を繰り返し行うことで、より適切な保存条件の探索を目指す必要があるだろう。また、保存赤血球の再活性化（若返り処置）に用いられる賦活液の開発においても、RC-MAP モデルを利用したシミュレーション実験の手法が有効であることが示唆された。

本研究の戦略である、ヘモグロビンや pH と代謝の関係を記述したシミュレーションモデルと CE-TOFMS でのメタボローム測定で取得した代謝物質濃度のデータを連携させて血液保存法をデザインする手法は非常に新しく、かつ有用であることが示された。また、細胞シミュレーションとメタボローム解析の両方の応用例として大きなインパクトを持つ研究成果であるといえよう。

謝辞

慶應義塾大学医学部医化学教室 谷内江綾子助教には、アドバイザーとして本研究の全域にわたって指導とアドバイスをいただいた。研究室に所属してから数年来、研究に対する姿勢から技術的な事項に至るまで本当に多くのことを学ばせていただいた。この場を借りて心よりお礼申し上げたい。

赤血球の生化学実験と CE-TOFMS を使ったメタボローム測定では、同大先端生命科学研究所の平山明由研究員、阿部忍技術員の両氏に指導を仰いだ。両氏の指導と助けをなくしては本論文の実測データを得ることができなかった。また、一連の実験は同大環境情報学部2年の中島乃雅氏と藤本誠也氏と共同で行った。大変な実験スケジュールと解析量だったにもかかわらずついてきてくれた中島氏と藤本氏の協力は大変ありがたかった。

同大環境情報学部 内藤泰宏准教授には本研究に対して非常に多くの有益なコメントを与えていただいた。また、赤血球のメタボローム実験に関するディスカッションでは、同大環境情報学部 曾我朋義教授から示唆に富んだ助言をいただいた。

研究計画の段階において、同大医学部医化学教室 末松誠教授には実験系との関連の上でシミュレーションがとるべきアプローチについての議論を通して、本研究を始めるきっかけを与えていただいた。

コテージプログレスミーティングなどの機会を通じて、同大環境情報学部 荒川和晴助教と同大政策・メディア研究科博士課程 谷内江望氏には研究の方向性についての数多くのアドバイスと励ましをいただいた。

同 修士課程2年の村田真也氏とは SFC 側唯一の同期として修士課程の2年間、苦楽をともにした。村田氏のおかげで有意義な修士課程を過ごすことができたことに、感謝の意を表したい。

同大 理工学研究科 博士課程の海津一成氏には公私にわたって大変お世話になった。研究に関しても数多くの相談に応じていただき、その都度、建設的かつ非常に的確な助言を与えていただいた。いつでも支えとなってくれた海津氏には心から感謝している。

最後に、同大環境情報学部 富田勝教授には研究の機会と素晴らしい環境と勇気を与えていただいた。シミュレーションと組み合わせで赤血球メタボローム実験を実現できたことも富田教授の尽力によるところが大変大きい。深く感謝の意を表すとともに厚くお礼申し上げたい。

成果発表一覧

印刷、刊行物

1. 西野泰子

「ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルを用いた低温保存血液における代謝動態の予測と解析」 慶応義塾大学湘南藤沢学会 優秀論文 (2007/9)

2. 西野泰子 谷内江綾子 富田勝

「E-Cell system によるヒト赤血球代謝シミュレーションの展開」人工血液 17(1) 掲載予定

国際学会ポスター発表

1. Nishino, T., Yachie-Kinoshita, A., Suematsu, M. and Tomita, M

“Simulation and metabolome analysis of human red blood cells during storage in MAP medium at 4°C” The 9th International Conference on Systems Biology (Gothenburg, Sweden 2008/8)

国内学会口頭発表

1. 西野泰子 谷内江綾子 末松誠 富田勝

「E-Cell ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルの構築と応用 ～低温保存赤血球の品質向上を目指して～」 第18回システムバイオロジー研究会 (三田 2008/3)

国内学会ポスター発表

1. 西野泰子 谷内江綾子 末松誠 富田勝

「E-CELL ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルの構築と応用」CREST シミュレーション技術の革新と実用化基盤の構築 第3回シンポジウム (三田 2007/11)

2. 西野泰子 谷内江綾子 末松誠 富田勝

「ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルを用いた低温保存血液における代謝動態の予測

と解析」 BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会) (横浜 2007/12)

3. 西野泰子 谷内江綾子 平山明由 曾我朋義 末松誠 富田勝
「ヒト赤血球低温保存モデルのシミュレーション解析とメタボローム測定による検証」
第 3 回メタボロームシンポジウム (鶴岡 2008/10)

4. 西野泰子 谷内江綾子 平山明由 曾我朋義 末松誠 富田勝
「E-Cell シミュレーションとメタボローム技術による低温保存赤血球の代謝動態解析」
CREST シミュレーション技術の革新と実用化基盤の構築 第 4 回シンポジウム (三田 2008/11)

5. 西野泰子 谷内江綾子 末松誠 富田勝
「ヒト赤血球代謝シミュレーションとメタボローム技術による MAP 保存赤血球代謝の予測と解析」 BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会) (神戸 2008/12)

参考文献

1. 遠山, 博., *輸血学 改訂第3版*. 改訂第3版 ed. 2004: 中外医学社.
2. Dern, R.J., Brewer, G.J., and Wiorkowski, J.J., *Studies on the preservation of human blood. II. The relationship of erythrocyte adenosine triphosphate levels and other in vitro measures to red cell storageability*. J Lab Clin Med, 1967. **69**(6): p. 968-78.
3. Hamasaki, N. and Yamamoto, M., *Red blood cell function and blood storage*. Vox Sang, 2000. **79**(4): p. 191-7.
4. Hess, J.R., *An update on solutions for red cell storage*. Vox Sang, 2006. **91**(1): p. 13-9.
5. Loutit, J.F. and Mollison, P.L., *Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative*. Br Med J, 1943. **2**: p. 744-45.
6. Orlina, A.R. and Josephson, A.M., *Comparative viability of blood stored in ACD and CPD*. Transfusion, 1969. **9**(2): p. 62-9.
7. Gibson, J.G., 2nd, et al., *A citrate-phosphatedextrose solution for the preservation of human blood*. Am J Clin Pathol, 1957. **28**(6): p. 569-78.
8. Zuck, T.F., et al., *The in vivo survival of red blood cells stored in modified CPD with adenine: report of a multi-institutional cooperative effort*. Transfusion, 1977. **17**(4): p. 374-82.
9. Valeri, C.R., et al., *Viability and function of red blood cell concentrates stored at 4 degrees C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2, or CPDA-3*. Transfusion, 1982. **22**(3): p. 210-6.
10. Beutler, E. and West, C., *Storage of red cell concentrates in CPD-A2 for 42 and 49 days*. J Lab Clin Med, 1983. **102**(1): p. 53-62.
11. Hogman, C.F., et al., *Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience of in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects*. Vox Sang, 1983. **45**(3): p. 217-23.
12. Moore, G.L., *Additive solutions for better blood preservation*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1987. **25**(3): p. 211-29.
13. Brecher, M.E., Zylstra-Halling, V.W., and Pineda, A.A., *Rejuvenation of erythrocytes preserved with AS-1 and AS-3*. Am J Clin Pathol, 1991. **96**(6): p. 767-9.
14. Jeter, E.K., Gadsden, R.H., and Cate, J.t., *Effects of irradiation on red cells stored in CPDA-1 and CPD-ADSOL (AS-1)*. Ann Clin Lab Sci, 1991. **21**(3): p. 177-86.
15. Valeri, C.R., Pivacek, L.E., and Ragno, G., *The quality of RBCs stored in CPD/ADSOL*. Transfusion, 2001. **41**(8): p. 1072-3.
16. Shiba, M., et al., *Preparation and preservation of red blood cell concentrates in MAP solution by quadruple bag system*. Japanese Journal of Transfusion Medicine, 1991. **37**: p. 404-410.

17. Walker, W.H., Netz, M., and Ganshirt, K.H., *49 day storage of erythrocyte concentrates in blood bags with the PAGGS-mannitol*. Beitr Infusionsther, 1990. **26**: p. 55-59.
18. 清水, 勝., et al., *新しい赤血球保存液 (MAP) 添加による長期保存濃厚赤血球の安全性ならびに有効性についての他施設共同臨床評価*. 臨床血液, 1992. **33**(2): p. 148-56.
19. Yasutake, M. and Takahashi, T.A., [*Current advance of blood preservation--development and clinical application of additive solutions for preservation of red blood cells and platelets*]. Nippon Rinsho, 1997. **55**(9): p. 2429-33.
20. Nakao, K., et al., *A direct relationship between adenosine triphosphate-level and in vivo viability of erythrocytes*. Nature, 1962. **194**: p. 877-8.
21. Hess, J.R. and Greenwalt, T.G., *Storage of red blood cells: new approaches*. Transfus Med Rev, 2002. **16**(4): p. 283-95.
22. Hogman, C.F., Lof, H., and Meryman, H.T., *Storage of red blood cells with improved maintenance of 2,3-bisphosphoglycerate*. Transfusion, 2006. **46**(9): p. 1543-52.
23. Hogman, C.F., *Preparation and preservation of red cells*. Vox Sang, 1998. **74 Suppl 2**: p. 177-87.
24. Joshi, A. and Palsson, B.O., *Metabolic dynamics in the human red cell. Part I--A comprehensive kinetic model*. J Theor Biol, 1989. **141**(4): p. 515-28.
25. Joshi, A. and Palsson, B.O., *Metabolic dynamics in the human red cell. Part II--Interactions with the environment*. J Theor Biol, 1989. **141**(4): p. 529-45.
26. Joshi, A. and Palsson, B.O., *Metabolic dynamics in the human red cell. Part III--Metabolic reaction rates*. J Theor Biol, 1990. **142**(1): p. 41-68.
27. Joshi, A. and Palsson, B.O., *Metabolic dynamics in the human red cell. Part IV--Data prediction and some model computations*. J Theor Biol, 1990. **142**(1): p. 69-85.
28. Mulquiney, P.J., Bubb, W.A., and Kuchel, P.W., *Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: in vivo kinetic characterization of 2,3-bisphosphoglycerate synthase/phosphatase using ¹³C and ³¹P NMR*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 567-80.
29. Mulquiney, P.J. and Kuchel, P.W., *Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and metabolic control analysis*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 597-604.
30. Mulquiney, P.J. and Kuchel, P.W., *Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 581-96.
31. Rapoport, T.A., et al., *A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes*. Eur J Biochem, 1974. **42**(1): p. 107-20.
32. Rapoport, T.A., Heinrich, R., and Rapoport, S.M., *The regulatory principles of glycolysis in*

- erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes.* Biochem J, 1976. **154**(2): p. 449-69.
33. Tomita, M., et al., *E-CELL: software environment for whole-cell simulation.* Bioinformatics, 1999. **15**(1): p. 72-84.
 34. Nakayama, Y., Kinoshita, A., and Tomita, M., *Dynamic simulation of red blood cell metabolism and its application to the analysis of a pathological condition.* Theor Biol Med Model, 2005. **2**: p. 18.
 35. Kinoshita, A., et al., *Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress.* Febs J, 2007. **274**(6): p. 1449-58.
 36. Kinoshita, A., et al., *Roles of hemoglobin Allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis.* J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10731-41.
 37. Soga, T., et al., *Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry.* J Proteome Res, 2003. **2**(5): p. 488-94.
 38. Hogman, C.F., Knutson, F., and Loof, H., *Storage of whole blood before separation: the effect of temperature on red cell 2,3 DPG and the accumulation of lactate.* Transfusion, 1999. **39**(5): p. 492-7.
 39. MacDonald, J.A. and Storey, K.B., *Purification and characterization of fructose bisphosphate aldolase from the ground squirrel, Spermophilus lateralis: enzyme role in mammalian hibernation.* Arch Biochem Biophys, 2002. **408**(2): p. 279-85.
 40. Macdonald, J.A. and Storey, K.B., *Temperature and phosphate effects on allosteric phenomena of phosphofructokinase from a hibernating ground squirrel (Spermophilus lateralis).* Febs J, 2005. **272**(1): p. 120-8.
 41. Osborne, W.R. and Spencer, N., *Partial purification and properties of the common inherited forms of adenosine deaminase from human erythrocytes.* Biochem J, 1973. **133**(1): p. 117-23.
 42. Palella, T.D., Andres, C.M., and Fox, I.H., *Human placental adenosine kinase. Kinetic mechanism and inhibition.* J Biol Chem, 1980. **255**(11): p. 5264-9.
 43. Daddona, P.E., et al., *Human malaria parasite adenosine deaminase. Characterization in host enzyme-deficient erythrocyte culture.* J Biol Chem, 1984. **259**(3): p. 1472-5.
 44. Lee, R.S. and Ford, H.C., *5'-Nucleotidase of human placental trophoblastic microvilli possesses cobalt-stimulated FAD pyrophosphatase activity.* J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 14878-83.
 45. Stoychev, G., Kierdaszuk, B., and Shugar, D., *Xanthosine and xanthine. Substrate properties with purine nucleoside phosphorylases. and relevance to other enzyme systems.* Eur J Biochem, 2002. **269**(16): p. 4048-57.
 46. Olsen, A.S. and Milman, G., *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from Chinese hamster*

- brain and human erythrocytes. Methods Enzymol, 1978. 51: p. 543-9.*
47. Yamada, Y., Goto, H., and Ogasawara, N., *Adenosine kinase from human liver. Biochim Biophys Acta, 1981. 660(1): p. 36-43.*
 48. Ellory, J.C. and Willis, J.S., *Kinetics of the sodium pump in red cells of different temperature sensitivity. J Gen Physiol, 1982. 79(6): p. 1115-30.*
 49. Imai, K. and Yonetani, T., *Thermodynamical studies of oxygen equilibrium of hemoglobin. Nonuniform heats and entropy changes for the individual oxygenation steps and enthalpy-entropy compensation. J Biol Chem, 1975. 250(18): p. 7093-8.*
 50. Rapoport, I., et al., *PH-dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states in vitro. Eur J Biochem, 1977. 73(2): p. 421-7.*
 51. Strauss, D., et al., *Preservation of red blood cells with purines and nucleosides. I. Changes of ATP, 2,3-P2G and further parameters of metabolism in red cells stored as whole blood and as resuspension at 4 degrees C and 25 degrees C. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 1980. 107(3): p. 397-416.*
 52. Strauss, D. and de Verdier, C.D., *Preservation of red blood cells with purines and nucleosides. III. Synthesis of adenine, guanine, and hypoxanthine nucleotides. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 1980. 107(3): p. 434-53.*
 53. Dawson, R.B., Jr. and Ellis, T.J., *Hemoglobin function of blood stored at 4 C in ACD and CPD with adenine and inosine. Transfusion, 1970. 10(3): p. 113-20.*
 54. Zachara, B., *The effect of inosine, pyruvate, and inorganic phosphate on 2,3-diphosphoglycerate, adenine, and hypoxanthine nucleotide synthesis in outdated human erythrocytes. J Lab Clin Med, 1975. 85(3): p. 436-44.*
 55. Strauss, D. and de Verdier, C.H., *Preservation of red blood cells with purines and nucleosides. II. Uptake and utilization of purines and nucleosides by stored red blood cells. Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch, 1980. 107(3): p. 417-33.*
 56. Hamasaki, N. and Rose, Z.B., *The binding of phosphorylated red cell metabolites to human hemoglobin A. J Biol Chem, 1974. 249(24): p. 7896-901.*
 57. Yoshida, T., et al., *Extended storage of red blood cells under anaerobic conditions. Vox Sang, 2007. 92(1): p. 22-31.*
 58. Nakao, M. and Nakayama, T., *Decrease in phosphofructokinase activity during blood preservation and the effect of intracellular ATP. Biochem Biophys Res Commun, 1980. 95(3): p. 1294-8.*
 59. Matsuyama, H., et al., *Lack of success with a combination of alanine and phosphoenolpyruvate as an additive for liquid storage of red cells at 4 degrees C. Transfusion, 1990. 30(4): p. 339-43.*
 60. Bloxham, D.P. and Lardy, H.A., *Phosphofructokinase. In: Boyer, P.D. , editor. The Enzymes,*

3rd Ed., ed. Boyer, P.D., editor. Vol. 8. 1973, New York: Academic Press. 239-278.

61. Warrendorf, E.M. and Rubinstein, D., *The elevation of adenosine-triphosphate levels in human erythrocytes*. Blood, 1973. **42**(4): p. 637-48.
62. Kopff, M., et al., *Relationship between adenosine deaminase activity (ADA) and inosinemonophosphate (IMP) accumulation in fresh erythrocytes incubated with adenosine and dipyridamole*. Haematologia (Budap), 1989. **22**(3): p. 161-7.
63. Beutler, *Red cell metabolism and storage*. 1994.
64. Oski, F.A., et al., *The in vitro restoration of red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in banked blood*. Blood, 1971. **37**(1): p. 52-8.
65. Gabrio, B.W., Huenekens, F.M., and Nurk, E., *Erythrocyte metabolism. I. Purine nucleoside phosphorylase*. J Biol Chem, 1956. **221**(2): p. 971-81.
66. Borgese, T.A.a.M., T. J., *Effect of DPN on inosine metabolism by red cells and hemolysates*. Fed. Proc., 1962. **21**: p. 68.
67. Duhm, J., Deuticke, B., and Gerlach, E., *Complete restoration of oxygen transport function and 2,3-diphosphoglycerate concentration in stored blood*. Transfusion, 1971. **11**(3): p. 147-51.
68. Rubinstein, D. and Warrendorf, E., *An incubation medium for the elevation of adenosine triphosphate and 2,3-diphosphoglycerate in fresh and long-preserved human erythrocytes*. Can J Biochem, 1975. **53**(6): p. 671-8.
69. Rose, I.A. and Warms, J.V., *Control of red cell glycolysis. The cause of triose phosphate accumulation*. J Biol Chem, 1970. **245**(16): p. 4009-15.

長期保存赤血球代謝のシミュレーションによる
予測とメタボローム解析による実証

2009年4月20日 初版発行

著者 西野泰子

監修 富田勝

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会
〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322
TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

ISBN 978-4-87762-222-0
SFC-MT 2008-008

■ 本論文は修士論文において優秀と認められ、出版されたものです。