

# マルチコンパートメント解析による代謝回転率の測定

——トレーサー法の定量的取扱いのために——

竹 葉 剛

## Multicompartment Analysis of Metabolic Flows

GO TAKEBA

A new computation method was introduced into multicompartment analysis, which saved CPU time and gave good fitting parameters even in complicated systems. This technique may be applied to systematic estimation of metabolic flows in tissues under various physiological conditions.

### 1. は じ め に

マルチコンパートメント解析（Multicompartment Analysis）とは、各種の同位元素で標識した化合物を生体に投与した後、代謝物間の同位元素の分布を経時的に追跡し、得られたデータから、投与した化合物の代謝経路とその移行速度、更には分布等についての情報を得ようとする手法である。従来のトレーサー動力学（tracer kinetics）を一般化した手法であると思えばよい。

生物学の分野でのトレーサー実験には、2つの目的がある。1つは、特定の元素の代謝経路を知ることであり、もう1つの目的は、その代謝速度を知ることである。

生体内の基本的な代謝経路についてはほぼ解明されつくされた現状であり、多くの生化学者の関心は、代謝経路そのものから代謝調節の機構解明へと移っているが、未知の代謝調節の存在を明らかにする上でも、また1つの代謝系と他の代謝系との関わり方を検討していく上でも、生体内での代謝速度を測定することは大きな意義がある。

生体は動的な平衡状態にあり、それぞれの成分は合成される一方で分解されたり、他の成分に変化している。したがって、各成分の量的な変動を調べても、それは一般的には代謝速度を反映していない。特別な場合、合成か分解かの一方が無視しうるほどに小さい場

合にのみ、成分の量的変化量から代謝速度を推定する。たとえば、ガス交換のある場合や、植物細胞壁成分のように分解を受けない場合などである。また、生体から酵素を抽出しその活性を測定することによっても、生体内での代謝速度を知ることが、一般的にはできない。それは、その酵素の存在する部位での種々の活性化因子、阻害因子などの量を正確に知ることが困難なためである。

ところで、トレーサー法によって生体内の代謝速度が測定できるといっても、従来の方法は、次項でも述べるとおり、ごく単純な系でしかも限定された場合にしか利用できなかった。マルチコンパートメント解析は、従来のトレーサー法を飛躍的に発展させたもので、生体内の代謝速度を系統的に測定するための大きな武器となるものであるが、わが国ではまだその解説書もなく、この手法を用いる研究者もほとんどいない現状なので、その特徴と計算方法を、筆者の開発した方法を中心に紹介することにする。

### 2. トレーサー法の用語と記号

トレーサー法で用いられる用語とその表現方法は、研究者によりまちまちである。ここでは、Atkins<sup>3)</sup>の表記法を使用することにする。

コンパートメント（Compartment）：

物質の移動や他の成分への転換に際して、速度論的

に区別されかつ均一にかくはんされている物質の集合（又は、そのような物質の存在する一區画）。混同しやすい用語である「プール(pool)」は生体構成分の前駆物質のたまり、ぐらゐな意味で、定量的トレーサー速度論上の用語ではない。コンパートメントを記述するのに次の記号が使用される。

$Q_j$ ……コンパートメント  $j$  中の物質質量。単位は通常 moles, m-moles などの [mass] で与えられる。コンパートメントの大きさ (Compartment size) とよぶ。

$q_j$ ……コンパートメント  $j$  中のトレーサー量。トレーサーとして放射性同位元素を用いる場合の単位は [dpm]。

$a_j$ ……コンパートメント  $j$  中の比放射能。  $a_j = q_j / Q_j$  で与えられる。

$n$ ……系の中のコンパートメント数。

$t$ ……時間。

ターンオーバー (turnover) :

定性的には、コンパートメント中の物質が、合成、交換・移動によって更新（交替）すること。代謝回転ともいう。ターンオーバーは、以下の4つの用語で定量的に表現される。

代謝回転速度 (turnover rate) :  $R_{ij}$  [mass · time<sup>-1</sup>]

単位時間内に代謝回転する物質質量。記号  $R_{ij}$  はコンパートメント  $j$  から  $i$  へ速度を意味する ( $i$  から  $j$  へ、ではない)。研究者により, flux (Solomon, 1953), flux rate (Mawson, 1955) ともいわれる。

代謝回転率 (turnover rate constant) :  $K_{ij}$  [time<sup>-1</sup>]

代謝回転速度とコンパートメントの大きさとの比 ( $K_{ij} = R_{ij} / Q_j$ )。同義語として, transfer coefficient (Solomon, 1953), relative turnover rate (Zilversmit, 1955), flow constant (Bergner, 1959) などがある。ここでは  $K_{ij}$  を使用したが、平衡定数と区別するため、 $K_{ij}$  を使用する方がよい。

半減期 (half time) :  $t_{1/2}$  [time]

あるコンパートメントにおける比放射能が半分になるのに要する時間。  $da/dt = -K \cdot a$  であるから、  $a = a_0/2$  ( $a_0$  は  $t=0$  のときの  $a$  値) を  $\ln(a/a_0) = -K \cdot t_{1/2}$  に代入すれば、  $t_{1/2} = \ln 2 / K = 0.693 / K$  が得られる。

代謝回転時間 (turnover time) :  $T$  [time]

定常状態にあるコンパートメント中の物質質量が、入ってくる（または、出てゆく）物質質量と数値的に等しくなるのに要する時間。そのコンパートメント中の物質の平均寿命。  $T = 1/K$ 。

### 3. 古典的トレーサー法による代謝回転率の測定法とその限界

放射性同位元素を生体に投与し、その吸収・移行を調べた初期の研究成果をまとめて、Schoenheimer (1940) は生体の「動的平衡の原理」をうちたてたが、少しおくれで、Zilversmit ら (1943)<sup>27)</sup> はトレーサー法の基本概念を整理し、同時に turnover rate の測定法を示した。その後1950年代に n-compartments 系についての理論的取扱いは進んだが、その実用化は、1960年代の大型電子計算機の普及によるマルチコンパートメント解析の確立まで待たねばならなかった。そこで、マルチコンパートメント解析の確立以前の、主要には Zilversmit の水準のトレーサー法を、ここでは古典的トレーサー法と呼ぶことにする。古典的トレーサー法の解説は、Reiner (1953)<sup>17)</sup>、Aronoff (1956)<sup>2)</sup>、Robertson (1957)<sup>18)</sup> に詳しく展開されているので参照されたい。ここでは、マルチコンパートメント解析と対比させる意味で、古典的トレーサー法の原理と適用上の問題点、限界等を列挙しておく。

#### (1) 1コンパートメントの場合

いま、1つのコンパートメントのみから成る系を考える。コンパートメントの大きさは  $Q_1$  で、時間  $t$  における放射エネルギーを  $q_1$  とすれば、比放射能は、  $a_1 = q_1 / Q_1$  である (図1)。コンパートメント中の放射能の時間的変化量  $dq_1/dt$  は、その時間内に系から出ていった物質質量  $R_1$  に比放射能  $a_1$  をかけたものに等しいから、

$$\frac{dq_1}{dt} = -a_1 \cdot R_1 \quad (1)$$

ここで、負記号は放射能の減少を示す。系は定常状態にあり、  $Q_1$  は時間に対して変化しない、と仮定すれば、  $q_1 = a_1 Q_1$  で、かつ  $R_1 / Q_1 = K_1$  であるので、(1)式は

$$\frac{da_1}{dt} = -K_1 \cdot a_1 \quad (2)$$

(2)式を積分すれば次式が得られる。

$$a_1 = a_1(0) \cdot e^{-K_1 t} \quad (3)$$

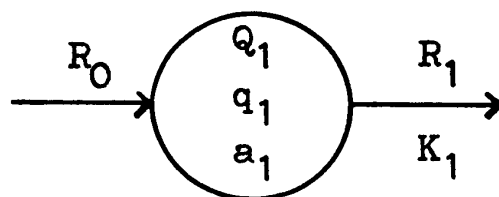


図1 1-コンパートメント系

ここで、 $a_1(0)$  は  $t=0$  での  $a_1$  の値である。(3)式をグラフで示せば、時間軸に対して指数関数となり、また、(3)式の両辺の対数をとれば、傾き  $K_1$  の直線が得られる。

この取扱いは、現在でも、代謝回転率を測定しようとするほとんど大部分の研究者の用いる方法である。実際には、測定したい成分の標識した代謝前駆体を一定期間生体に与える。標識した前駆体を取除いた時点をも  $t=0$  とし、経時的に目的とする成分中の比放射能を測定し、それを片対数グラフにプロットし、得られた直線の傾きから代謝回転率  $K_1$  を求めるのである。

この方法の特徴は、考え方およびデータ処理が非常に簡単なことである。とくに、データを直線にプロットできるから、定常状態が成立しないなどの理由による、データの直線からのずれが検出しやすいことは、この方法の長所である。一方、この方法の短所の1つは、前駆体の放射能を完全に取除くことが困難なこと、および、分解物が再利用される可能性を評価しがたい点である。たとえば、あるタンパク質の turnover rate を測定しようとして、アミノ酸- $^{14}\text{C}$  を与えた場合、いったんタンパク質へとりこまれた放射性アミノ酸がその分解により放出され、それが再利用される割合を算出することは、この方法のみでは困難である。この方法のもう一つの短所は、1度に1つの成分についてしか測定できない点である。異なった成分が100あれば、原則として異なった標識化合物を用いて100回の実験を行わなければならない。したがって、この方法で特定の条件下の生体の代謝速度を系統的に測定することは、事実上不可能である。

なお、Arias<sup>11)</sup>, Glass<sup>12)</sup> らは、 $^{14}\text{C}$ -アミノ酸を投与して一定時間経過後、 $^3\text{H}$ -アミノ酸を与え、その直後に反応を止めて、特定のタンパク質中の  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  比を算出することにより、タンパク質の代謝回転率を求めている。このような「2重標識法」は、経時的な比放射能の測定を省略した簡便法である。

## (2) 2～3コンパートメントの場合

いま、図2に示すような3つのコンパートメントから成る系について考えてみる。各コンパートメント毎の放射能量の収支関係から次式が成立する。

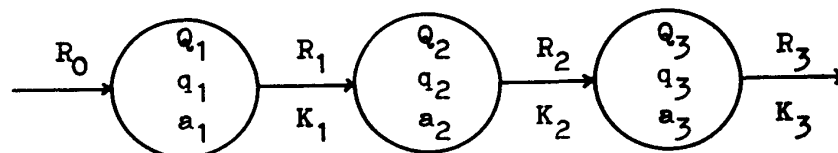


図2 3-コンパートメント系

$$\left. \begin{aligned} dq_1/dt &= -K_1 q_1 \\ dq_2/dt &= K_1 q_1 - K_2 q_2 \\ dq_3/dt &= K_2 q_2 - K_3 q_3 \end{aligned} \right\} \quad (4)$$

$q=aQ$  であるから、(4)式を書きかえると、

$$\left. \begin{aligned} da_1/dt &= -K_1 a_1 \\ da_2/dt &= K_1 \cdot \frac{Q_1}{Q_2} \cdot a_1 - K_2 a_2 \\ da_3/dt &= K_2 \cdot \frac{Q_2}{Q_3} \cdot a_2 - K_3 a_3 \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

(5)式で与えられる連立微分方程式を解くと、(6)式が得られる。

$$\left. \begin{aligned} a_1 &= X_1 e^{-K_1 t} \\ a_2 &= X_2 e^{-K_1 t} + X_3 e^{-K_2 t} \\ a_3 &= X_4 e^{-K_1 t} + X_5 e^{-K_2 t} + X_6 e^{-K_3 t} \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

ここで、 $X_1 \sim X_6$  は  $K, Q$ , および  $a$  の初期条件により定まる定数である。一般に(5)式のような一階連立微分方程式の解は、(6)のように指数関数の和の形となる。コンパートメントが  $n$  個あれば、

$$a_j = \sum_{i=1}^n X_i e^{-\lambda_i t} \quad (j=1, 2, \dots, n) \quad (7)$$

ところで、(7)式において、 $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_n$  とすると、 $t$  が十分大きければ、 $\sum_{i=1}^{n-1} X_i e^{-\lambda_i t}$  は最終項  $X_n e^{-\lambda_n t}$  に対して無視できる。したがって、

$$\begin{aligned} a_j &\doteq X_n e^{-\lambda_n t} \\ \ln a_j &= \ln X_n - \lambda_n t \end{aligned} \quad (8)$$

すなわち、(7)式で実測値  $a_j$  の対数を時間に対してプロットすれば、 $t$  の十分大きな領域で直線となる部分が表われ、その直線の傾きから最も小さい  $\lambda_n$  値が、また、 $a_j$  軸の切片から  $X_n$  値が求められる。次に、(7)式から  $X_n e^{-\lambda_n t}$  値を引き、残りの  $(n-1)$  個の指数関数についても同様の操作をくり返せば、原理的にはすべての  $\lambda$  値が求められる。この手法を適用した研究例としては、Krane<sup>14)</sup>, Worsley<sup>25)</sup>, Baker<sup>4)20)</sup> などがあるが、(7)式の  $\lambda$  値が互いに2倍以上異なる場合でなければよく分離できないこと、相当長期間生体の定常状態が続く必要のあること、したがってせいぜい3コンパートメントの解析にしか適用できないことがこの手法の特徴である。なお、与えられた連立微分方程式の解析解を求めて、それをデータに適合させることによって、係数すなわち代謝回転率を求

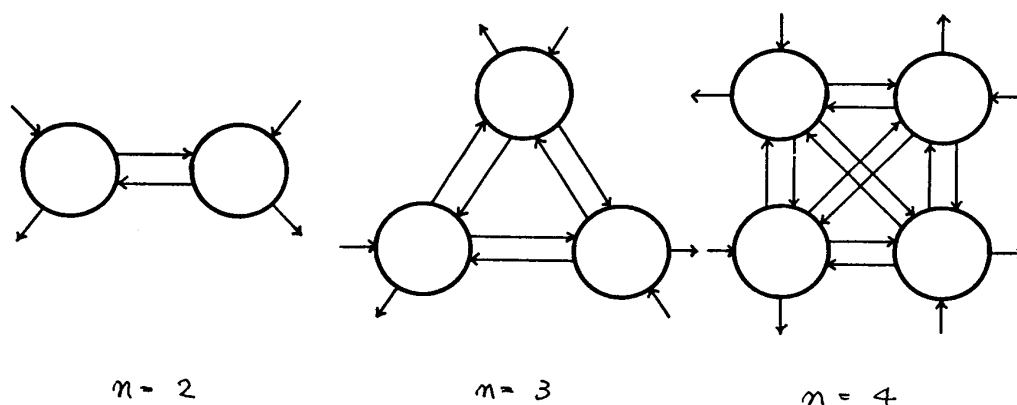


図3 コンパートメントの数と速度パラメータの数との関係

める一般的な方法についての解説は、文献<sup>6)7)10)16)24)26)</sup>を参照されたい。

#### 4. マルチコンパートメント解析の理論

マルチコンパートメント解析は、古典的トレーサー法を発展させた手法であるが、次の2点において性格を異にしている。

- (i) 対照とするコンパートメントの数は、理論的には制限がなく、可能なすべての場合について解法をもつ（現実には、データの精度からくる制限が生ずる）。
- (ii) 理論的コンパートメントモデルをつくり、その理論モデルで、トレーサーおよび物質の流れ方についてのシミュレーションを行う。そのシミュレーション結果と生体系との比較により、生体系についての情報を得ようとする。

##### (1) マルチコンパートメント解析の数学モデル

図3に示すように、コンパートメント数が  $n = 2$  の場合、可能なすべての速度パラメータ ( $K$  または  $R$ ) の数は6である。 $n = 3$  の場合は12,  $n = 4$  の場合は20となり、一般に  $n$  個のコンパートメントでは  $n(n-1)$  個となる。このような  $n$  個のコンパートメントから成る系について成立する速度式を導いておこう。

図4に示すように、 $j$  番目のコンパートメントでは、

$$\frac{d q_j}{dt} = R_{j1}a_1 + R_{j2}a_2 + \cdots + R_{jn}a_n - (R_{0j} + R_{1j} + \cdots + R_{nj})a_j \quad (9)$$

( $j = 1, 2, \dots, n$ )

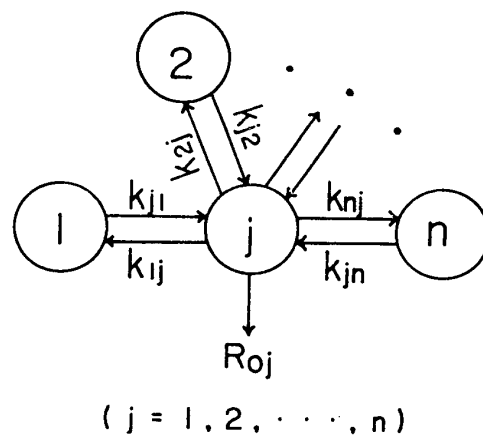
ここで、添字 0 は系外を意味する。

$a_i = q_i/Q_i$ , かつ  $K_{ji} = R_{ji}/Q_i$  であるから、

$$\frac{d q_j}{dt} = K_{j1}q_1 + K_{j2}q_2 + \cdots + K_{jn}q_n - (K_{0j} + K_{1j} + \cdots + K_{nj})q_j \quad (10)$$

( $j = 1, 2, \dots, n$ )

したがって、次の一般式を得る。

図4  $n$ -コンパートメント系

$$\frac{d q_j}{dt} = \sum_i^n K_{ji}q_i, \quad K_{jj} = -\sum_{\substack{p=0 \\ p \neq j}}^n K_{pj} \quad (11)$$

( $j = 1, 2, \dots, n$ )

(11)式において、 $q_j$  の代りに  $a_j$  をおきかえた関係式は、一般的には成立しないので注意を要する。

##### (2) マルチコンパートメントモデルの Berman らによる解法

Berman ら<sup>8)9)</sup>は、先に述べたマルチコンパートメント解析の2つの特徴をそなえた手法を最初に確立し、いくつかの系への適用例<sup>(11)19)</sup>を報告しているが、その解法について若干言及しておく。

- (i) 実測データ：いくつかの  $t$  に対し  $q_j(t)$  ( $j = 1, 2, \dots, n$ ) をプロットする。
- (ii) これらのグラフから  $K_{ji}$  の initial estimate  $\bar{K}_{ji}$  を得る ( $dq_j/dt$  値をグラフ上で求めると(11)式は  $\bar{K}_{ji}$  についての連立一次方程式となるので、その最小2乗解を求めると  $\bar{K}_{ji}$  が得られる)。
- (iii)  $\bar{K}_{ji}$  を用いて(11)式により  $dq_j/dt$  の計算値  $F_j(t)$  を求める。
- (iv)  $F_j(t)$  と最小2乗解  $F_j^*(t)$  とは、テーラー展開

により以下のごとく関係づけられる。

$$F_j^\circ(t) = F_j(t) + \sum_i \frac{\partial F_j(t)}{\partial x_i} (\delta x_i) + \frac{1}{2} \sum_{i,k} \frac{\partial^2 F_j(t)}{\partial x_i \partial x_k} (\delta x_i) (\delta x_k) + \dots \quad (12)$$

ここで、 $\delta x_i$  は  $\bar{K}_{ji}$  とその最小 2 乗解との差である。上式で右辺の第 3 項以下を省略すると、

$$F_j^\circ(t) - F_j(t) = \sum_i \frac{\partial F_j(t)}{\partial x_i} \cdot \delta x_i \quad (13)$$

ここで、 $\partial F_j(t)/\partial x_i \equiv \Delta F_j / \Delta x_i$  とし、 $\Delta$  の大きさは適当に選ぶ。また、 $F_j^\circ(t)$  は (ii) でグラフ上より求めた  $dq_j(t)/dt$  値を用いる。次に

$$d^2 = [F_j^\circ(t) - F_j(t) - \sum_i \frac{\Delta F_j}{\Delta x_i} \cdot \delta x_i]^2 \quad (14)$$

この  $d^2$  を最小にすべく、 $\delta x_i$  で偏微分し  $\partial d^2 / \partial (\delta x_i) = 0$  とおくことにより、最小 2 乗の正規方程式を得る。これを解いて  $\delta x_i$  を求める。

- (V)  $\bar{K}_{ji} + \delta x_i$  を新たに  $K_{ji}$  の initial estimate  $\bar{K}_{ji}$  とし、一定の限界内に収れんするまで、この操作 (iii)→(V) をくり返す。

Berman らの解法は、 $dq_j/dt$  値をあらかじめグラフ上で求める必要があり、この段階が、得られる結果に大きな誤差を生む原因となる。したがって、とくにパラメータ ( $K_{ji}$ ) の数が多くなった場合に誤差が大きくなり、また計算時間が多くかかるので、実用上難点があるといえよう。

### (3) マルチコンパートメントモデルの新しい解法

Himmelblau ら<sup>13)</sup>は、複雑な化学反応の速度定数の決定法として、次のような種類があると報告している。

- (i) 一連の微分方程式を解析的に積分し、くり返し非線型最小 2 乗回帰法を適用する。（：3-(2)で述べた古典的トレーサー法）
- (ii) 実験データを直接微分し、線型最小 2 乗法を適用する。（：Berman らによる解法）
- (iii) 実験データを用いて、一連の微分方程式を数値積分し、くり返し非線型最小 2 乗法を適用する。または、実験データにあう線型回帰を行い、その微分方程式を数値積分する。
- (iv) アナログ計算機を用い、実験データに合うように試行錯誤で速度定数を決める。
- (v) その他

このうち、(i)の方法は簡単な場合で、微分方程式の数が少ない場合に適用できるが、実際にあてはめうる場合が少ない。(ii)の方法は線型回帰解析ができる点で便利だが、実験データを微分する点で誤差が生じやすい。(iv)の方法は時間がかかり、“best-fit”の値がなか

なか出しにくい。という欠点をもつ、として、主に (iii)の方法を重点的に検討しているが、この方法は、マルチコンパートメントモデル解析にも、直接適用できるものである。以下にHimmelblau らの方法（上記(iii)）を適用した、マルチコンパートメントモデルの新しい解法の要点を述べる。

後の式の展開に便利のように、(11)式を次のように書きかえる。

$$\frac{d q_j}{dt} = \sum_{k=1}^N B_k R_{j,k} \quad (j=1, 2, \dots, M) \quad (15)$$

ここで  $B_k$  は、式(11)の  $K_{ji}$  に相当する速度パラメーターである。 $N$ は  $B_k$  の数。 $R_{j,k}$  は  $q_j$  の一次関数であるが、 $B_k$  との対応をつけるために添字をつけてある。 $M$ はコンパートメントの数である。(15)式を時間  $t_0$  から  $t_i$  まで積分すると、

$$q_j(t_i) - q_j(t_0) = \sum_{k=1}^N B_k \int_{t_0}^{t_i} R_{j,k} dt \quad (16)$$

( $i=1, 2, \dots, p$ )

ここで、 $p$  は各々コンパートメントごとの測定点の数である。(16)式を線型化するために、以下の変数を定義する。

$$\left. \begin{aligned} Y_{i,j} &= q_j(t_i) - q_j(t_0) \\ X_{i,j,k} &= \int_{t_0}^{t_i} R_{j,k} dt \end{aligned} \right\} \quad (17)$$

$Y_{i,j}$  はデータから直接計算でき、 $X_{i,j,k}$  はデータを数値積分して計算する。また、 $\bar{Y}_{i,j}$ 、 $D_{i,j}$  を次のように定義すると、

$$\left. \begin{aligned} \bar{Y}_{i,j} &= \sum_{k=1}^N B_k X_{i,j,k} \\ D_{i,j} &= (Y_{i,j} - \bar{Y}_{i,j}) \end{aligned} \right\} \quad (18)$$

$D_{i,j}$  の 2 乗を最小にする  $B_k$  値を求めればよいことになる。データの精度をそろえて計算するために、重み  $W_{i,j}$  をかけておく。

$$DN_{i,j} = (Y_{i,j} - \bar{Y}_{i,j}) W_{i,j} \quad (19)$$

すなわち、次式で定義される  $F$  を最小にする  $B_k$  値を求めることになる。

$$F = \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M [(Y_{i,j} - \bar{Y}_{i,j}) W_{i,j}]^2 \quad (20)$$

(20)式は、 $B_k$  について 2 次関数となるから、 $F$  の最小値を求めるために、(20)式の 1 次導関数 = 0 とおく。

$$\begin{aligned} \frac{\partial F}{\partial B_k} &= 0 \\ &= \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M \left\{ 2W_{i,j}^2 (Y_{i,j} - \sum_{L=1}^N B_L X_{i,j,L}) \right. \\ &\quad \left. (-X_{i,j,k}) \right\} \quad (k=1, 2, \dots, N) \quad (21) \end{aligned}$$

したがって,

$$\sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 Y_{i,j} X_{i,j,k} - W_{i,j}^2 X_{i,j,k} \sum_{L=1}^N B_L X_{i,j,L}) = 0$$

または,

$$\begin{aligned} & \sum_{L=1}^N \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (B_L W_{i,j}^2 X_{i,j,k} X_{i,j,L}) \\ &= \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 Y_{i,j} X_{i,j,k}) \\ &= \sum_{L=1}^N B_L \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 X_{i,j,k} X_{i,j,L}) \\ &= \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 Y_{i,j} X_{i,j,k}) \end{aligned} \quad (22)$$

②2式を行列式記号で表わせば,

$$\underline{A} \underline{B} = \underline{G} \quad (23)$$

ここで,

$$a_{k,l} = \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 X_{i,j,k} X_{i,j,L}) \quad (L=1, 2, \dots, N)$$

$$g_k = \sum_{i=1}^P \sum_{j=1}^M (W_{i,j}^2 Y_{i,j} X_{i,j,k}) \quad (k=1, 2, \dots, N)$$

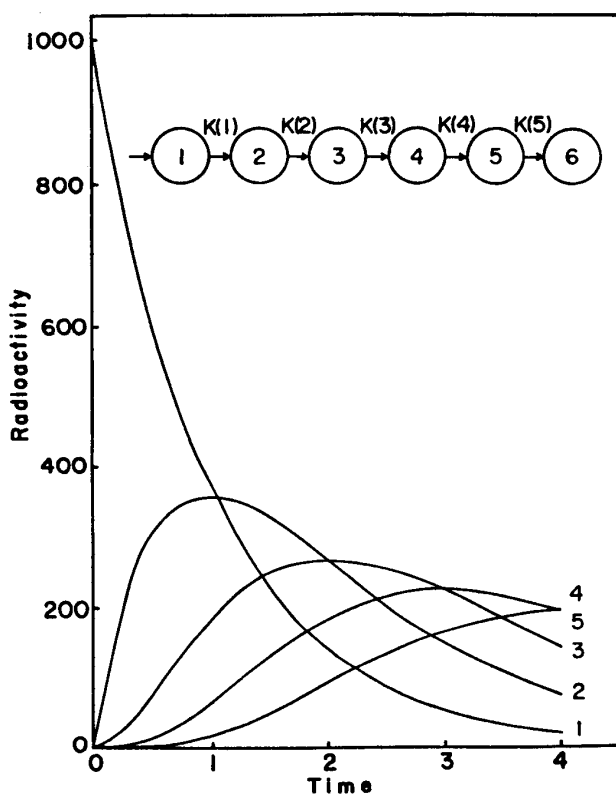


図5 モデル系-1

$$\underline{B} = \begin{bmatrix} B_1 \\ B_2 \\ \vdots \\ B_N \end{bmatrix}$$

#### (4) 新しい解法によるモデル系での検討

マルチコンパートメントモデルの新しい解法の有効性を, いくつかのモデル系で調べてみた<sup>21)22)</sup>. その方法は, それぞれのコンパートメントモデルにおいて, あらかじめ定めた代謝回転率K値を用いて理論曲線を求め, その曲線上の何点かでデータをばらつかせる. それら一定のばらつきをもったデータを入力データとし, K値を出力させるのである. 次に示したモデル1から4までは, コンパートメント数を6とし, K値はいずれも1.0とした. モデル5は, より複雑な系のモデルとして, バクテリアのリン酸代謝系をコンパートメントモデル化したもので, コンパートメント数14, K値数23とし, 各K値は実際の存在量と流量とを反映して0.05~10.0の範囲にある. 各モデルは図5~9, 結果の一部は表1~5に示してある. その要点を列挙すれば次のようになる. なお, 検討の詳細は文献<sup>21)</sup>を参照されたい.

- 古典的トレーサー法と比較して, 解析力は飛躍的に増大している.
- モデルの複雑さが増しても, 計算に要する時間はほとんど変わらない.

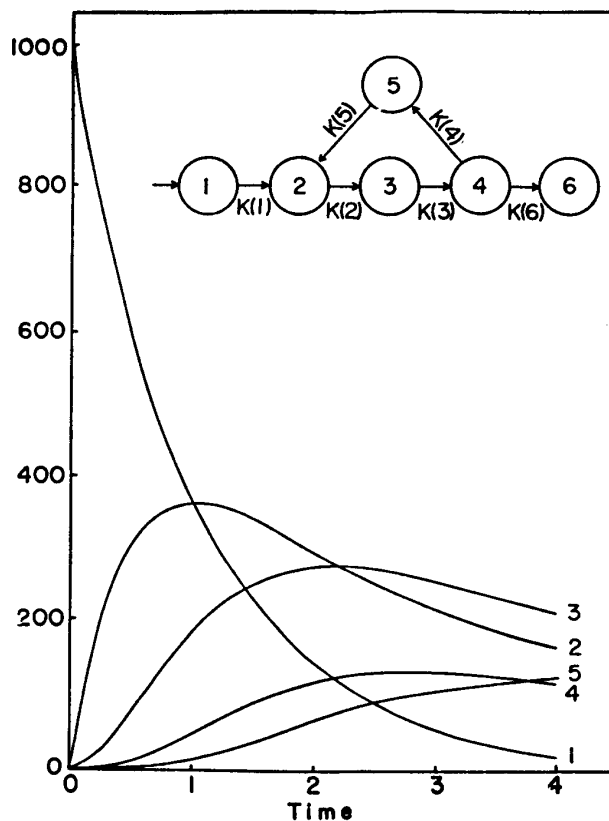


図6 モデル系-2

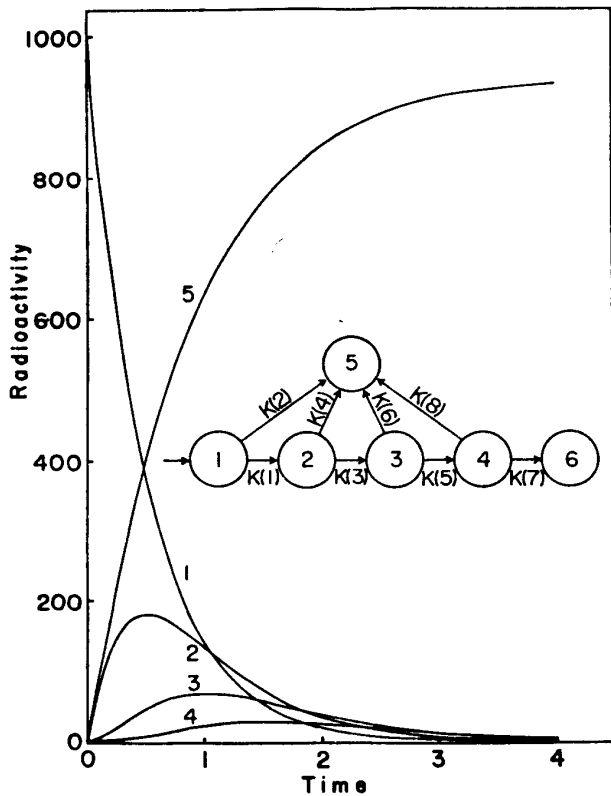


図7 モデル系-3

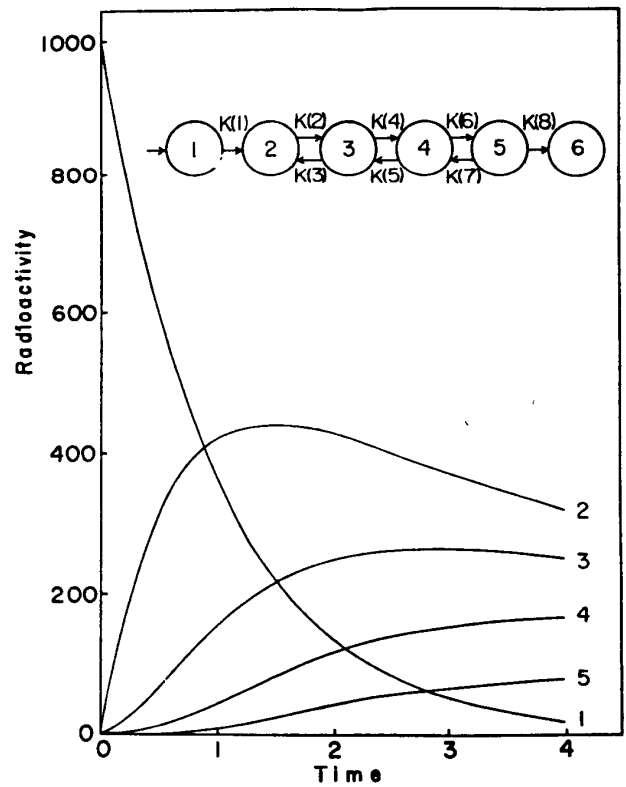


図8 モデル系-4

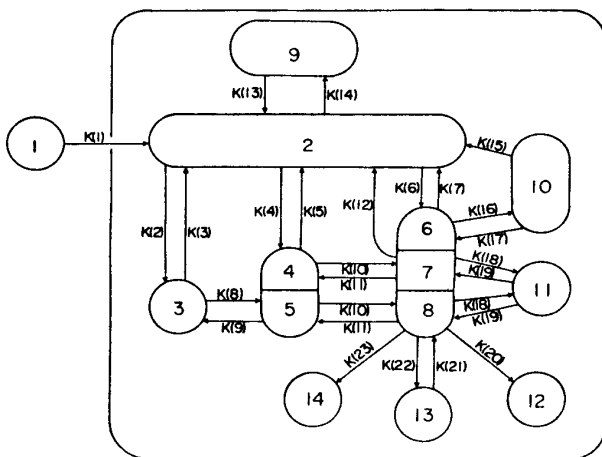


図9 モデル系-5

(iii) 解析に必要なデータ測定点の数は、モデルの複雑さにもよるが、一応のめやすはKの数をとってよい。

(iv) 得られる結果にもっとも大きな影響をもつのは、データの精度である。可逆経路の部分で結果のずれが大きいのは、そのためである(表2, 表4)。データの精度をよくするための特別の配慮をしなければ、トレーサー実験の通常のデータ精度5~10%では、モデル5のような可逆過程を多く含むモデルは一度には解析できない。

(v) 計算の過程で用いる重み  $W_{i,j}$  は、各  $q_j$  値の逆数の相加平均値が一般性が高い。

$$W_{i,j} = \frac{1/q_{i,j}}{1/q_{i,1} + 1/q_{i,2} + \dots + 1/q_{i,M}} \quad (24)$$

表1 モデル系-1のK値 (P=5)

Parameters	Original value	Standard deviation (%)			
		0.0	1.0	5.0	10.0
K (1)	1.0	0.999	0.999	0.957	0.950
K (2)	1.0	1.01	1.02	0.963	0.960
K (3)	1.0	0.993	0.997	0.994	0.979
K (4)	1.0	0.996	1.01	1.01	1.07
K (5)	1.0	1.01	1.00	0.929	0.871

表 2 モデル系-2のK値 (P=4)

Parameters	Original value	Standard deviation (%)			
		0.0	1.0	5.0	10.0
K (1)	1.0	0.999	1.00	1.02	1.05
K (2)	1.0	1.01	1.02	1.05	1.09
K (3)	1.0	1.01	0.986	0.882	0.692
K (4)	1.0	1.04	1.02	0.931	0.715
K (5)	1.0	1.13	1.10	0.928	0.408
K (6)	1.0	0.993	0.990	0.975	0.939

表 3 モデル系-3のK値 (P=8)

Parameters	Original value	Standard deviation (%)			
		0.0	1.0	5.0	10.0
K (1)	1.0	1.04	1.04	1.05	1.02
K (2)	1.0	0.961	0.957	0.910	0.715
K (3)	1.0	0.988	0.973	0.898	0.757
K (4)	1.0	1.10	1.12	1.19	1.22
K (5)	1.0	0.984	0.985	0.988	0.974
K (6)	1.0	0.984	0.960	0.815	0.549
K (7)	1.0	1.00	1.00	0.998	0.970
K (8)	1.0	0.943	0.935	0.891	0.772

素 4 モデル系-4のK値 (P=8)

Parameters	Original value	Standard deviation (%)			
		0.0	1.0	5.0	10.0
K (1)	1.0	1.00	1.00	1.00	0.989
K (2)	1.0	0.989	0.978	0.904	0.672
K (3)	1.0	0.984	0.967	0.844	0.438
K (4)	1.0	1.00	1.01	1.03	0.824
K (5)	1.0	1.01	1.02	1.03	0.607
K (6)	1.0	1.01	1.05	1.17	0.678
K (7)	1.0	1.02	1.14	1.61	0.524
K (8)	1.0	1.00	1.01	1.05	1.07

## (5) 直接探索法による補正

以上述べた解法により求めたK値を用いて理論曲線を計算してみると、データとの適合が必ずしもよくない場合のあることが判明した。その原因は、主に計算の過程で導入する重み  $W_{i,j}$  の性質によるようであるが、実験のたびに最適の重み  $W_{i,j}$  を検討し直すことは煩雑でもあるので、先に述べた解法により求めたK値をもとにして、その最小2乗解を、さらに、直接探索法 (direct search method) によって1%の精度ま

で求めることを、マルチコンパートメント解析のプログラムの中に組みこんである。直接探索法というのは、たとえば、関数  $f(x)$  が区間  $(a, b)$  において唯一の最小点をもつ場合、区間  $(a, b)$  内の2点で関数値がわかれば、最小点の存在範囲を知ることができるので、この原理を使って、関数  $f(x)$  の最小点を含む区間  $(a, b)$  を一定の割合で縮めてゆき、最小点を与える最小  $x$  の値を求める方法である (詳しくは文献<sup>15)</sup>を参照のこと)。



素5 モデル系-5のK値 (P=40)

Parameters	Original value	Standard deviation (%)		
		0.0	1.0	5.0
K (1)	10.0	9.90	10.1	12.3
K (2)	0.20	0.213	0.217	0.0973
K (3)	2.0	2.69	2.52	-1.02
K (4)	0.20	0.198	0.200	0.105
K (5)	0.833	0.806	0.921	-1.27
K (6)	0.55	0.547	0.549	0.672
K (7)	1.50	1.49	1.44	3.18
K (8)	4.0	3.85	4.04	2.84
K (9)	0.833	1.00	0.934	-0.363
K (10)	5.0	4.97	5.03	3.54
K (11)	2.50	2.47	2.60	1.04
K (12)	0.50	0.503	0.432	0.622
K (13)	0.40	0.392	0.398	-0.505
K (14)	0.20	0.199	0.200	0.119
K (15)	0.50	0.492	0.550	-1.15
K (16)	1.50	1.49	1.51	0.904
K (17)	0.10	0.098	0.0637	0.592
K (18)	0.15	0.149	0.147	0.146
K (19)	1.50	1.49	1.46	1.44
K (20)	0.45	0.451	0.448	0.475
K (21)	0.05	0.045	0.0322	-0.307
K (22)	0.50	0.499	0.497	0.436
K (23)	0.05	0.0501	0.0530	0.00701

実際には、先に求めたK値を一定の巾で変動させ、(18)式に従って  $Y_{i,j}$  および  $D_{i,j}^2$  を計算する。この  $D_{i,j}^2$  値の最小点が 0.99K と 1.01K との範囲に入るようなK値を求めるのである。このとき、最小とすべき関数は各コンパートメントと各データ点の総和  $\sum_{j=1}^M \sum_{i=1}^P D_{i,j}^2$  としている。

#### (6) 最小2乗解の信頼限界の求め方

一般に、線型方程式の未知数を最小2乗法によって求めた場合の信頼限界は、次のようにして求める（詳しくは文献<sup>5)</sup>を参照のこと）。

いま、次のような測定方程式を考える。

$$a_i x_1 + b_i x_2 + \cdots + l_i x_n = f_i \quad (25)$$

$$(i=1, 2, \dots, m) \quad (m > n)$$

$x$  の最小2乗解  $\bar{x}$  を(25)式に代入すると、左辺の値は右辺の  $f_i$  といくらかの差を生ずるから、これを  $\xi_i$  で表わせば、

$$a_i \bar{x}_1 + b_i \bar{x}_2 + \cdots + l_i \bar{x}_n - f_i = \xi_i \quad (26)$$

このとき、 $x_j$  の平均2乗誤差は次の公式で表わされる。

$$\mu_k = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \xi_i^2}{G_k(m-n)}} \quad (k=x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (27)$$

ここで、 $G_k$  は、最小2乗解を求めるための正規方程式の係数からつくられる行列式

$$\begin{bmatrix} [aa] & [ab] & \cdots & [al] \\ [ba] & [bb] & \cdots & [bl] \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ [la] & [lb] & \cdots & [ll] \end{bmatrix}$$

と、この行列式の番号  $k$  の行と列とを消去して得た小行列式との比に等しい。ここで、

$$[aa] = \sum a_i^2, [ab] = \sum a_i b_i, \dots, [ll] = \sum l_i^2$$

求める値の信頼限界とその特徴は、次のようにして得られる。すなわち、信頼確率  $\alpha$  と値  $k=m-n$  に対する  $t_\alpha$  の値は学生分布表から求められ、未知量の真の値  $x_i$  と、最小2乗法によって求めた値  $\bar{x}_i$  との差は、量  $t_\alpha \mu_k$  より大きくはない、ということを確認確率  $\alpha$  で断言できる。

マルチコンパートメントモデルの数学的表現(11), (15)式は非線型であるが、これらは、(16)~(18)式によって線型化されているので、上記の方法が適用できる。

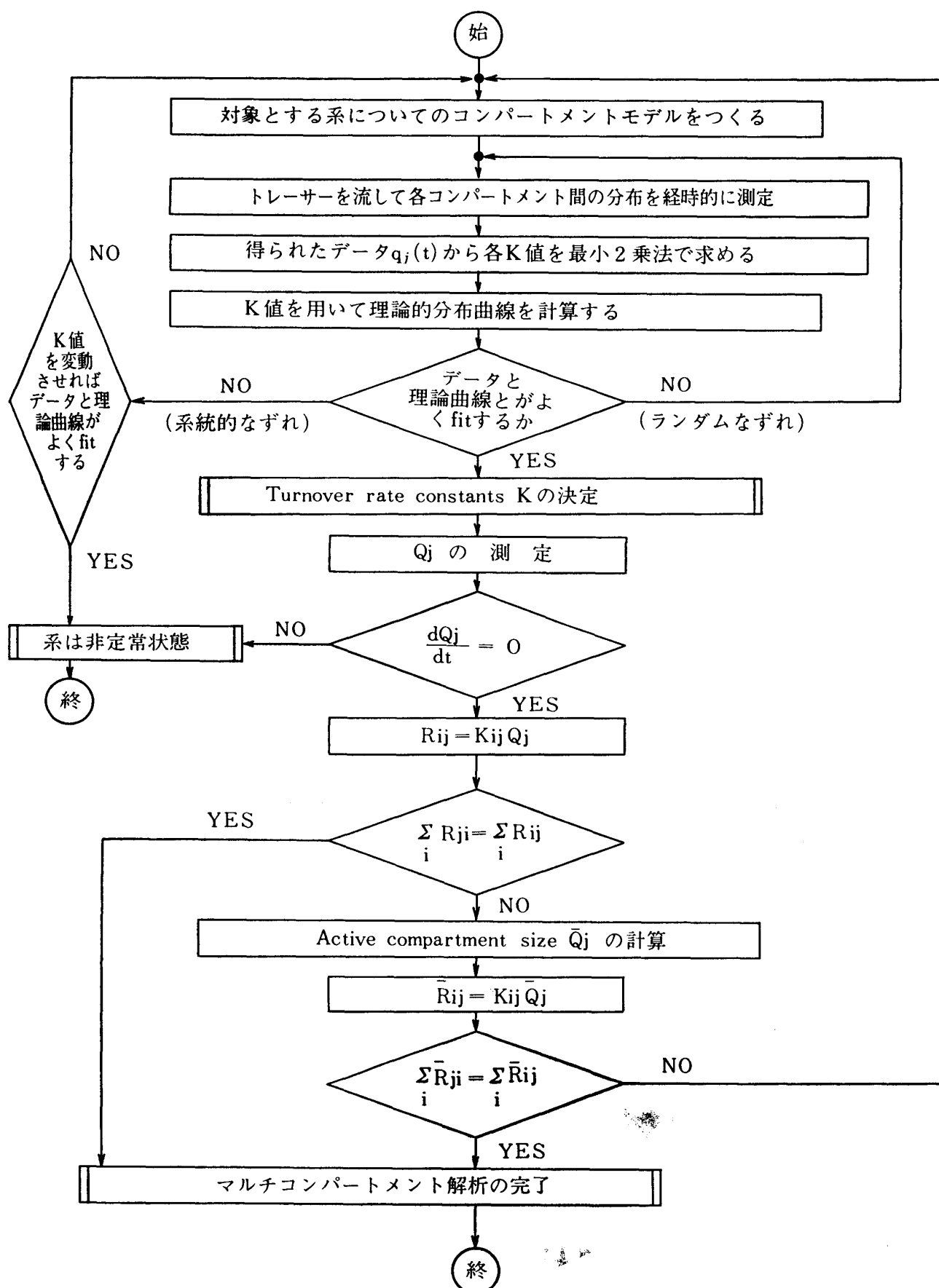


図10 マルチコンパートメント解析の作業流れ図

## 5. マルチコンパートメント解析の方法

図10に、マルチコンパートメント解析の手順の概略が流れ図の形で示してある。ここでは、この手法を生体系に適用する上で問題となるいくつかの点について説明しておく。

### (1) 系の定常性について

生体は無数に近い化学反応が複雑に関連し合って進行しているが、それぞれ反応にあずかる成分は、新しくつくられる一方で絶えず別の成分へと変化しているので、見かけ上量的な変化を示さないことが多い。また、系全体としてみても、系内の物質代謝は盛んに行われていても、系の状態が一定時間内には変化しないことが多い。このような状態を定常状態とよぶ。定常状態下では、系が単純化できるので、古くからトレーサー法は定常状態を仮定した生体系に適用されてきた。マルチコンパートメント解析でも、定常状態を想定してその数学モデルがつくられ、また解かれている。たとえば、コンパートメントの大きさ  $Q$ 、代謝回転速度  $R$ 、代謝回転率  $K$  については、時間の変数としてではなく、定数として扱っている。

ところで、このことは、系が何らかの方法で定常状態にあることが証明された後でなければ、この手法が適用できないことは意味しない。その数学モデルである(1)式において  $K_{ji}$  値は定数として扱われているけれども、それが時間に関して変数であっても(1)式は成立するのである。マルチコンパートメント解析では、系が定常か非定常かの問題は、むしろ、この手法を適用した結果判定すべき問題としている。すなわち、 $K$  値を定数とみなして計算した理論曲線と、実測した  $q_i$  値とがよく適合しておれば、その実験の精度内では、 $K$  値は一定とみなせるわけである。系の定常性とは、このような性質の問題である。すなわち、非常に厳密でない方をすれば決して定常ではない生体系の定常性とは、一定の時間内において一定の実験精度のもとではじめて言う性質の問題である。

ところで、実験の目的が、代謝回転率  $K$  を求めるだけでなく、図10に示すような完全なコンパートメント解析を行うことにある場合は、実験時間中  $Q_j$  値を測定し、それがその時間内では変化しないことを確認しておく必要がある。 $K$ 、 $Q$  値がともに実験時間内に变化する場合には、実験時間を短縮して、定常状態とみなせる時間範囲を見出すべきである。なお、 $K$ 、 $Q$  値のいずれかが变化する場合の解析は不可能ではないが、ごく簡単な場合を除き一般的には困難であるので、その場合も、実験時間を短縮すべきであろう。

### (2) Non-active compartment size の求め方

コンパートメントは、速度論的に均一にかくはんされた一区画、として定義されているが、実際の生体系をモデル化する場合、この仮定をどのように扱えばよいかという問題が生じる。この問題も基本的には系の定常性の問題と同様に扱えばよい。すなわち、空間的あるいは物質的に明確に区別しうれば、どのような単位でも1つのコンパートメントとして、とりあえずは扱ってよい。コンパートメントが均一にかくはんされているとみなせるかどうかの1つの基準は、 $K$  値が一定とみなせるかどうかである。もし  $K$  値が一定とみなされれば、そのコンパートメントは速度論的には1つのコンパートメントとしてふるまった、といえる。

もう1つの基準は、系が定常状態にあるとき、計算により求めた  $K$  値と実測した  $Q$  とを掛け合わせて  $R = KQ$  を計算し、そのコンパートメントに入る量と出る量とが等しくなれば、そのコンパートメント内は速度論的に均一であるとみなせる。等しくなれば、均一ではなく、non-active な部分、つまり放射能の混ざらない部分が含まれると結論される。この non-active compartment size を求める方法を、簡単な場合について次に説明しよう。

図11で、 $Q_1$  は  $q_1$  とよくかくはんされている部分、 $Q_2$  は隔てられ  $q_1$  の混入しない部分とする。定常

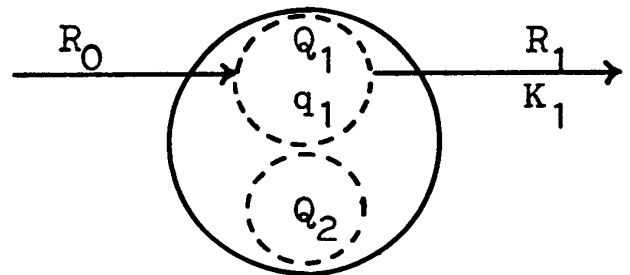


図11 Non-active compartment の存在する場合

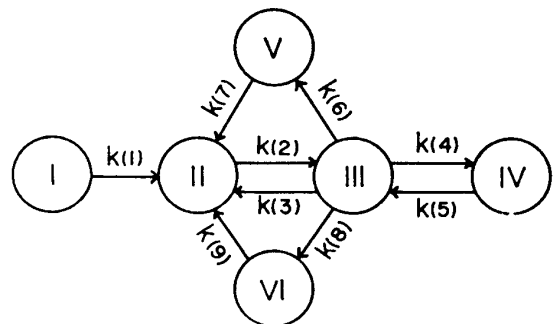


図12 アサガオ子葉のリン酸代謝系のコンパートメントモデル<sup>22)</sup>。  $K(1) \sim K(9)$ : 代謝回転率。 I:  $^{32}\text{P}$  II: 細胞内無機リン酸, III: 糖リン酸+ヌクレオチド, IV: RNA, V: リン脂質, VI: タンパク態リン酸。

状態にあるから  $R_0=R_1$ , したがって

active compartment size  $Q_1=R_0/K_1$

non-active compartment size  $Q_2=Q-R_0/K_1$

なお, 実際には, このように  $Q_1$  と  $Q_2$  とが明確に区別されない場合が多いと思われるが, その場合も  $R_0/K_1$  に相当する  $Q_1$  を, 見かけ上の active compartment size とみなしうる。

実験の目的が代謝回転率を求めることのみの場合,  $K$  値が一定であることが示されれば, 2 番目の判定基準を用いる必要はない。

### (3) マルチコンパートメント解析は, シミュレーション技法である

古典的トレーサー法がいわば単なるデータ処理の手法であったのに対し, マルチコンパートメント解析の基本的性格は, それがシミュレーション技法である点にある。シミュレーションというのは, 系 (システム) を数学的表現を用いて, あるいは物理的モデルを用いて調べることである。複雑な系は, そのままではなかなか解析し難い。そこで, 性質のよくわかった要素から成るモデルをつくり, そのモデルについての性

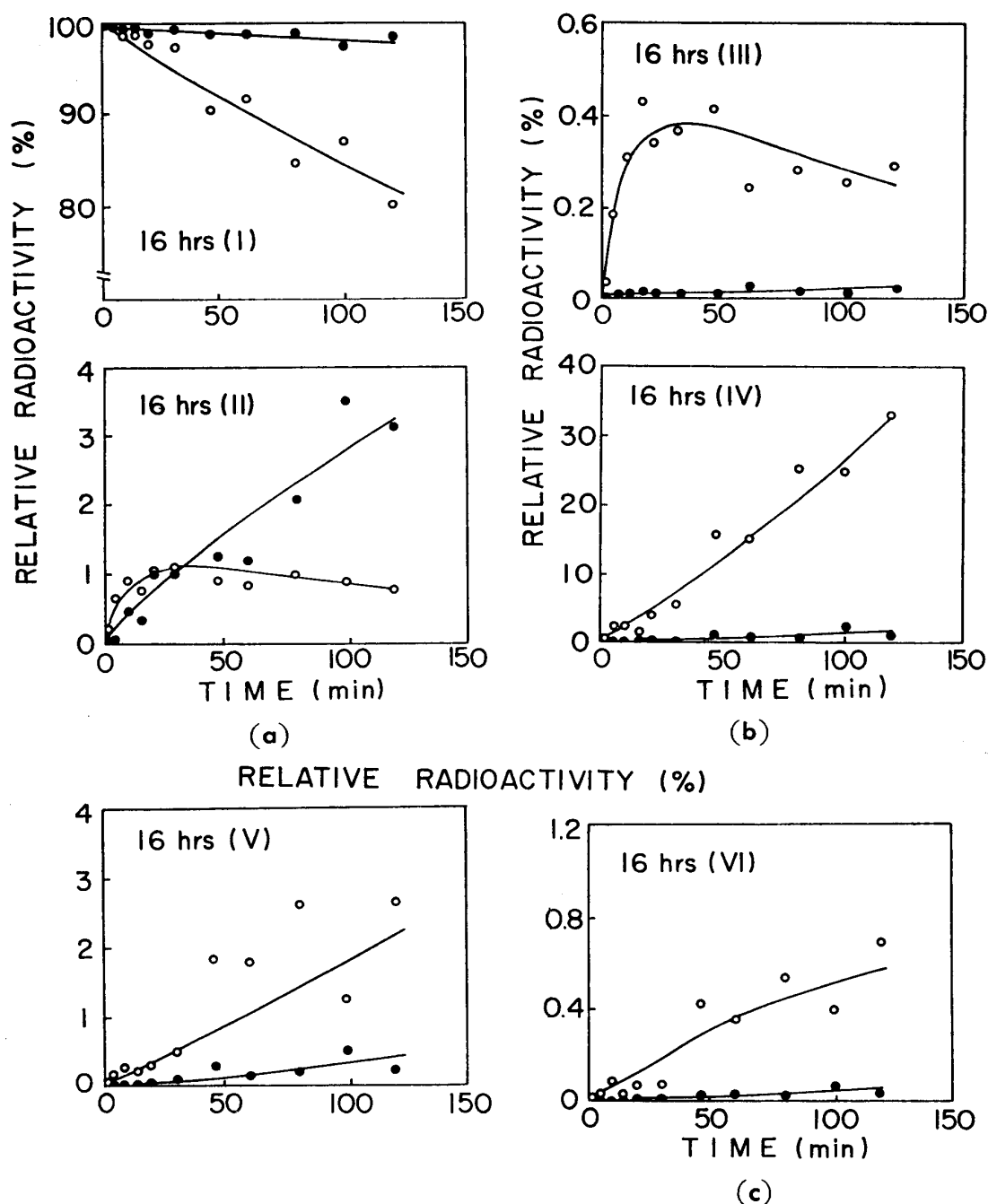


図13 リン酸代謝系の各コンパートメント中の放射能分布<sup>22)</sup>. I~VIは図12に示したコンパートメント. <sup>32</sup>Pは, 吸水開始後16時間めに与えられた. ●: Cycloheximide 処理区, ○: Cycloheximide 無処理区.

質を、実際の系と対比させながら調べるのである。重要なことは、シミュレーションの結果は、あくまでもそのモデルについての性質であって、実際の系そのものではないことである。

## 6. マルチコンパートメント解析による代謝回転率の測定例

ここで紹介する2つの適用例は、いずれも代謝回転率を求めることを目的としており、図10に示した「完全な」マルチコンパートメント解析の適用例ではないことをあらかじめ断っておく。

### (1) 種子発芽期のリン酸代謝系の活性化<sup>21)22)</sup>

種子発芽期の子葉は、比較的均一な細胞集団から成っているため、トレーサー実験の材料として適している。またその代謝系が休止状態から貯蔵養分の分解系へと活性化され、やがて光合成機能をもつに至るといふ、たいへん変動のはげしい器官でもある。代謝等の活性化には当然一定の法則性があるはずであるので、その法則性を調べる予備段階として、もっとも基本的な代謝系の1つであるリン酸代謝系について、<sup>32</sup>Pを用い、その流れ方の発芽期における変化を調べてみた。リン酸代謝系はたいへん複雑であるので、成分の分画の都合から、便宜上図12に示すような分け方をした。Cycloheximideを用いたのは、核の情報に依存した酵素系の活性化を区別するためである。図13は、アサガオ種子の吸水開始後16時間めの子葉に<sup>32</sup>Pを投与し、2時間その代謝を追跡した結果が示してある。このようなデータを用いて図12に示す各K値を計算した結果が表6に示してある。

また、図13中の実線は、表6のK値を用いて計算した理論(シミュレーション)曲線である。実験の具

体的方法と得られた結果の詳しい考察は原報にゆずるが、表6から結論できる主な点を次にかかげておく。

- (i) アサガオ種子の子葉中では、吸水開始とともに、リン酸代謝系がごくゆるやかに回転しはじめる。
- (ii) 吸水が進むにつれ、リン酸化、RNA合成、リン脂質合成系等は、Cycloheximide存在下でも、ある程度は活性化される。
- (iii) タンパク合成が開始すると、RNA、リン脂質、タンパク態リン酸の各分解系以外は、K値が数10倍から数100倍増大する。

一般に、1つの代謝経路には多数の酵素が関与し、それぞれの酵素の活性にも多数の因子が影響するので、1つの代謝系の生体での活性を知ろうとして、それぞれの酵素活性をin vitro(試験管内)で測定していくのは、多大の労力を費す仕事になる。しかも厳密に言えば、in vitroのデータをいくら集めてみても、それらからはin vivo(生体内)での情報は得られないので、ここに示した取扱いが目的によっては大きな意義がある。

### (2) トマトすじぐされ病果のグルコース代謝<sup>23)</sup>

トマトすじぐされ病は、一種の栄養障害であり、低日照下で、低カリウム施用、アンモニア態窒素過剰施用、感受性品種を組み合わせた条件下で生じ、とくに近年冬のハウス栽培において多発するという。そこで、とくに低カリウム施用、アンモニア態窒素過剰の2つの要因の作用機構を知るために、発育段階の約3分の2を経過しているトマト果実(この段階では、病徴は認められない)の組織片を材料として用い、グルコース-<sup>14</sup>C(U)の流れ方を調べてみた。コンパートメントの分け方は、図14に示す通りである。データと理論曲線が図15に、また、K値が表7に示してある。

表6 アサガオ子葉リン酸代謝系の代謝回転率<sup>22)</sup>。K(1)~K(9)は図12に示した経路の代謝回転率を示す。30min, 16hr, 48hrは吸水後の時間。+: Cycloheximide 処理区。-: 無処理区

Parameters	30min	16hr		48hr	
	-	-	+	-	+
K (1)	0.00189 min <sup>-1</sup>	0.00350	0.000430	0.00221	0.00121
K (2)	0.000859	0.395	0.0103	0.136	0.00238
K (3)	0.00754	0.641	0.171	0.128	0.00813
K (4)	0.0118	4.16	1.55	0.461	0.0400
K (5)	0.0207	0.000235	0.000383	0.221	0.00992
K (6)	0.00913	0.372	0.240	0.413	0.0460
K (7)	0.0266	0.00851	0.00399	0.254	0.0360
K (8)	0.00218	0.119	0.0612	0.136	0.00962
K (9)	0.0473	0.0225	0.0167	0.577	0.0234

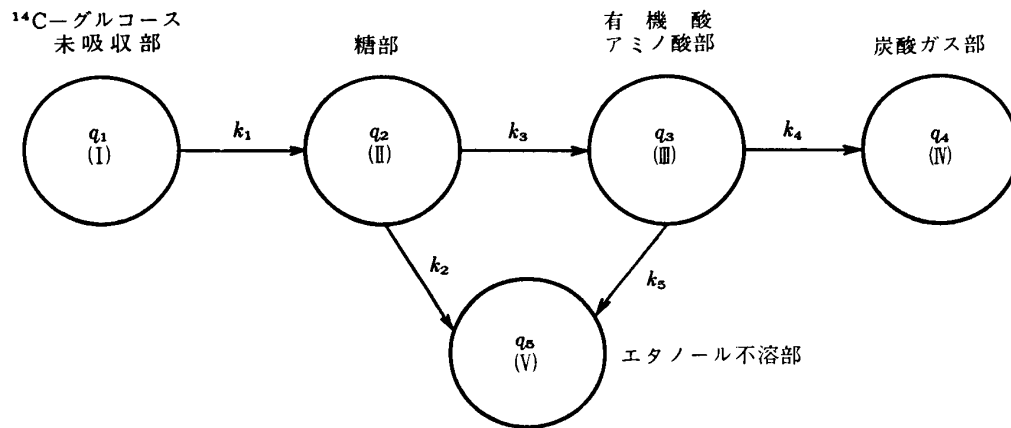


図14 トマトすじぐされ病果のグルコース代謝を調べるためのコンパートメントモデル<sup>23)</sup>。

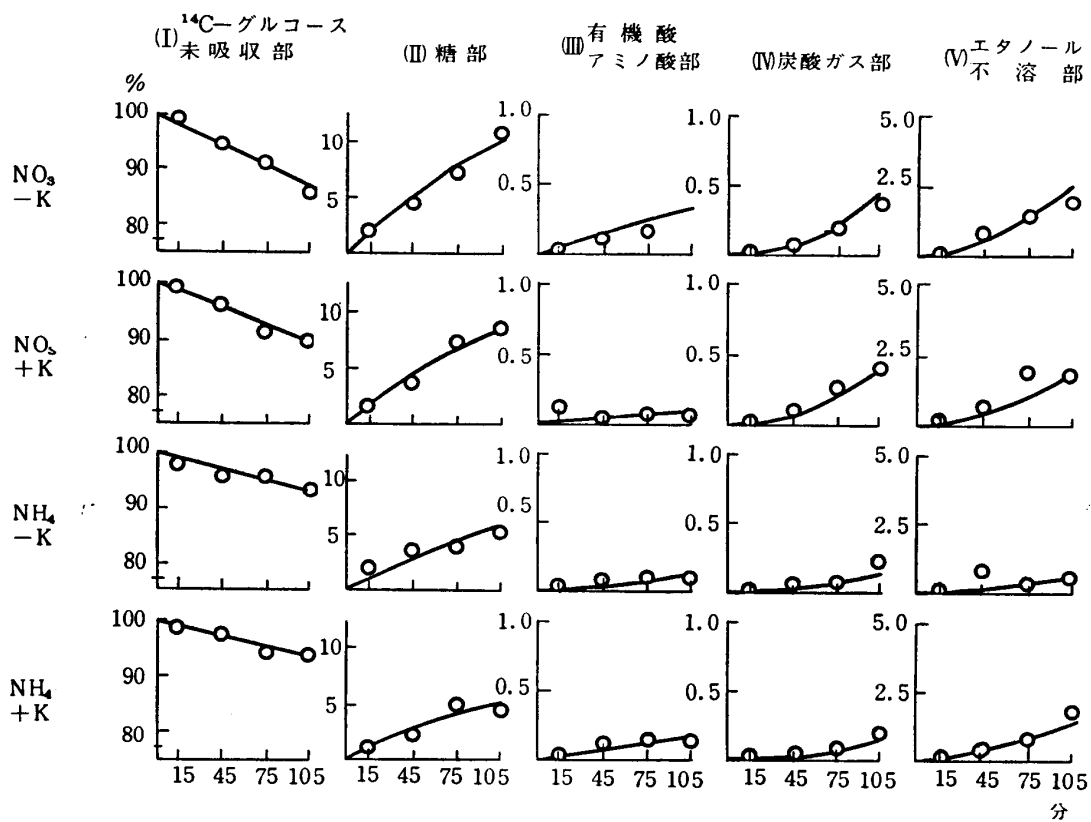


図15 各栄養処理区でのグルコース-<sup>14</sup>Cの代謝。白丸は実測値を、実線は表7に示したk値を用いて計算したシミュレーション曲線を示す<sup>23)</sup>。

表7 各栄養処理によるすじぐされ病果発生率とコンパートメント間の代謝回転率 (K) とターンオーバータイム (T)<sup>23)</sup>

栄養処理	すじぐされ 病果発生率 %	$k_1$ ( $T_1$ )	$k_2$ ( $T_2$ )	$k_3$ ( $T_3$ )	$k_4$ ( $T_4$ )	$k_5 \text{ min}^{-1}$ ( $T_5$ ) (min)
NO <sub>3</sub> -K	15	0.00136 (735)	0.00437 (229)	0.00162 (617)	0.0318 (31)	0.00951 (105)
NO <sub>3</sub> +K	0	0.00111 (901)	0.00348 (287)	0.00391 (256)	0.0694 (14)	0.256 (4)
NH <sub>4</sub> -K	75	0.000666 (1500)	0.00161 (621)	0.000828 (1210)	0.0247 (40)	0.000621 (1610)
NH <sub>4</sub> +K	0	0.000679 (1470)	0.00122 (620)	0.00179 (559)	0.0183 (55)	0.0256 (39)

注) 代謝回転率 k (1~5) は第14図参照, ターンオーバータイムは k 値の逆数

計算により求められたK値とすじぐされ病発生率とを対応させてみると(表7),まず目につくのは,  $\text{NH}_4$  処理により  $K_1$  すなわち, グルコースの組織細胞中への吸収過程の回転率が, 半減していることである. また, カリウム欠乏の影響が最も強くでているのは,  $K_5$  すなわち, アミノ酸・有機酸区画からエタノール不溶部への移行段階であることがわかる.

これだけの結果から直ちに, 低カリウム施用, アンモニア態窒素過剰施用の作用部位についての結論を出すことはできないが, 更に研究を進めるための重要な手がかりが得られた, といってよい.

## 7. 今 後 の 課 題

マルチコンパートメント解析の解析力は, 以上概説してきたように, 古典的トレーサー法に比べて飛躍的に進歩しているといえる. ところで, この手法のこれまでの適用例は, いずれも代謝回転率を求めることにとどまり, 図10に示した最終段階, すなわち, 生体内の物質の流量までをモデル化した適用例はまだ報告されていない. この手法を代謝回転率を求めることにとどめて利用するのであれば, 前項でも述べたように, 系の定常性にこだわる必要はなく, またコンパートメントの分け方も, いわば大きな単位でまとめてしまって, さしつかえない. しかしながら, この手法による解析能力を更に高めるためには, いいかえれば, 生体反応系を更に詳しく解析するためには, できるだけ生体中の各物質のコンパートメントに対応し, しかも流量をも含めたモデルをつくって検討する必要があることは, いうまでもない. そのために確立しなければならないことは, 精度の高いデータを得るための, 生体成分の系統的な分析法である. 従来, 生化学の発達させてきた物質の分画法は, 特定の物質(群)の回収率に注目した分画法であったから, あらゆる生体成分を同時に扱うことは, 必ずしも得意ではなかった. また, 再現性を確保し, 分画操作をルーチン化するためには, 機械化しておくことが望ましい.

生体成分の系統的な分画法が確立し, 精度の高いデータが得られるようになれば, この手法の生理学上の利用価値は大いに高まるであろう. とくに, いくつかの代謝系にまたがった現象の解析には役立つと思われる. たとえば, 作用部位を複数もつ薬物の作用点の検索, あるいは, 細胞の老化や死の過程の解析, などである. また, *in vivo* での酵素(代謝)活性を測定することがとくに必要な現象, たとえば, 植物の光や温度による形態形成作用の第一次作用点を検索する場合にも威力を発揮しよう.

ここに紹介したマルチコンパートメント解析の手法は, 筆者が京都大学食糧科学研究所放射生化学部門で研究に従事した際に開発したものである. 葛西善三郎教授はじめ研究室のスタッフの方々の御指導に感謝の意を表する.

(1977年7月29日受理)

## 文 献

- (1) Arias, I. M., D. Doyle, and R. T. Schimke: Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Biol. Chem.* **244** : 3303-3315 (1969).
- (2) Aronoff, S: Pools, cycling, and turnover time. (Chap. 5. in "Techniques in Radiobiochemistry", The Iowa State College Press 1956).
- (3) Atkins, G. L.: "Multicompartment Models for Biological Systems" (Methuen & Co., LTD. 1969).
- (4) Baker, N., R. A. Shipley, R. E. Clark, and G. E. Incefy:  $\text{C}^{14}$  studies in carbohydrate metabolism: glucose pool size and rate of turnover in the normal rat. *Am. J. Physiol.* **196** : 245-252 (1959).
- (5) バッネル=ボジン:「化学工学の数学的方法」(山崎, 須斎, 北原訳, 東京図書).
- (6) Beccari, E.: "Drug and Tracer Kinetics" (Blaisdel Pub. Company 1966).
- (7) Berman, M. and R. Schoenfeld: Invariants in experimental data on linear kinetics and the formulation of models. *J. Appl. Physics* **27**: 1361-1370 (1956).
- (8) Berman, M., E. Shahn, and M. F. Weiss: The routine fitting of kinetic data to models. A mathematical formalism for digital computers. *Biophys. J.* **2**: 275-287 (1962).
- (9) Berman, M., M. F. Weiss, and E. Shahn: Some formal approaches to the analysis of kinetic data in terms of linear compartmental systems. *ibid.* **2** : 289-316 (1962).
- (10) Box, G. E. P.: Fitting empirical data. *Ann. New York Acad. Sc.*, **86** : 792-816 (1960).
- (11) Cohn, S. H., S. R. Bozzo, J. E. Jesseph, C. Constantinides, D. R. Huene, and E. A. Gusmano: Formulation and testing of a compartmental model for calcium metabolism in man. *Rad. Res.* **26** : 319-333 (1965).
- (12) Glass, R. D. and D. Doyle: On the measurement of protein turnover in animal cells. *J. Biol. Chem.* **247** : 5234-5242 (1972).

- (13) Himmelblau, D. M., C. R. Jones, and K. B. Bischoff : Determination of rate constants for complex kinetics models. I & EC, Fundamentals, **6** : 539-543 (1967).
- (14) Krane, S. M., G. L. Brownell, J. B. Stanbury, and H. Corrigan : The effect of thyroid disease on calcium metabolism in man. *J. Clin. Invest.* **35**: 874-887 (1956).
- (15) Kowalik, J. and M. R. Osborne: "Methods for Unconstrained Optimization Problems" (Amer. Els. Pub. Co., New York. 1968).
- (16) Perl, W.: A method for curve-fitting by exponential functions. *Internat. J. Appl. Rad. Isot.* **8** : 211-222 (1960).
- (17) Reiner, J. M.: The study of metabolic turnover rates by means of isotopic tracers. : *Arch. Biochem.* **46** : 53-99 (1953).
- (18) Robertson, J. S.: Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems. *Physiol. Rev.* **37** : 133-154 (1957).
- (19) Rosenberg, L. E., M. Berman, and S. Segal : Studies on the kinetics of amino acid transport, incorporation into protein and oxidation in kidney-cortex slices. *Biochim. Biophys. Acta* **71** : 644-675 (1963).
- (20) Skinner, S. M., R. E. Clark, N. Baker, and R. A. Shipley ; Complete solution of the three-compartment model in steady state after single injection of radioactive tracer. *Am. J. Physiol.* **196** : 238-244 (1959).
- (21) Takeba, G : Activation of phosphate metabolism in cotyledon of *Pharbitis nil* (Doctorial thesis, 1972),
- (22) Takeba, G : Activation of phosphate metabolism in cotyledon of *Pharbitis nil* in the early stage of germination as studied by multicompartment analysis. *Plant & Cell Physiol.* **15**: 83-93 (1974).
- (23) 渡辺和彦：作物の生理障害に関する土壌肥料学的研究。(学位論文, 1976).
- (24) Whipple, H. E. (ed.) : Multicompartment analysis of tracer experiments. *Ann. New York Acad. Sc.* **108** 1-338 (1963).
- (25) Worsley, B. H. and L. C. Lax: Selection of a numerical technique for analyzing experimental data of decay type with special reference to the use of tracers in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* **59** : 1-24 (1962).
- (26) Worsley, B. H. : Analysis of decay-type data *Comm. ACM* **7** : 39-44 (1964).
- (27) Zilversmit, D. B., C. Entenman, and M. C. Fishler : On the calculation of turnover time and turnover rate from experiments involving the use of labeling agents. *J. Gen. Physiol.* **26** : 325 (1943).