

[招待論文：総説・レビュー論文]

メタボローム解析を用いたデータ駆動型サイエンス

Data-Driven Science Using Metabolome Analysis

杉本 昌弘

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科特任教授

Masahiro Sugimoto

Project Professor, Graduate School of Media and Governance, Keio University

Correspondence to: msugi@sfc.keio.ac.jp

Abstract: 生体内では様々な分子が相互作用をして多様な機能を実現している。生体内の分子を測定するオミックス解析の発展により、分子の挙動を一斉に観測し包括的に把握することが可能となっている。本稿では、多数の代謝物を同時に測定するメタボローム解析の技術的な側面について解説する。また、代謝物のデータの解釈として、統計解析だけでなく、化学反応を定量的な数式で表現しシミュレーションすることによって代謝の複雑な仕組みを理解しようとする取り組みも紹介する。

Interactions of various cellular molecules result in a wide range of biological functions. Innovative development of omics technologies enables the comprehensive profiling of these molecules. In this review, the technical aspects of metabolomics that can simultaneously quantify hundreds of metabolites have been described. In addition to statistical analyses, mathematical modeling of the metabolic systems has been developed to understand the metabolomic data. Such modeling studies simulating the dynamic transition of metabolic pathways have also been reviewed.

Keywords: メタボローム、シミュレーション、数理モデル
metabolome, simulation, mathematical model

1 はじめに

シミュレーションが一般化されている例としては、自動車の設計が挙げられる。全体の構造を細かいメッシュ状に区切り、有限要素法で各メッシュの応力や変形を数理的に表現しシミュレーションすることで、例えば衝突時に大きな応力が加わる部材を想定し、全体の強度を上げるための設計変更の指針を出すことができる。勿論最終製品では実験による検証が必要ではあるが、

シミュレーションによって必要な実験の回数を減らし、設計プロセスを効率化することができる。いまやシミュレーションは、工学的な製品開発だけでなく、天気や地震など、幅広い分野で実用的に利用されている。

薬理学の分野においても、生体现象の数理モデル化やシミュレーションの歴史は古い。例えば経口投与された薬剤が、血中や作用すべき臓器でどのように濃度変化するかを定量的な数式で表現し、経時的な変化を再現するなどである。薬理的なシミュレーションは、対象とする現象を単純化し、比較的少ない変数の数式で実施されてきたものが多い。一方、生体内の様々な分子情報を一斉測定するオミックス解析技術が発展してきたために、観測できる様々な情報をできるだけ取り込み、より精緻に生体情報を数理モデル化するシステムズ・バイオロジーという学問が発展してきた。

オミックス解析技術としては、ゲノムをはじめ、トランスクリプトームやプロテオーム等が先に発展し、様々な生物の分子情報が取得できるようになった。代謝に関しては、メタボロームという解析技術が他のオミックスに遅れて開発され、一斉測定が可能になってきた。個々の代謝反応を定量的に数式化する知見が多く蓄積していたため数理モデル化によるシミュレーションと親和性が良く、細胞内の代謝パスウェイを対象とした数理モデルには数多くの取り組みがある。

本稿では、メタボローム解析を用いて生体試料を分析する技術的な課題や、代謝に関する現象を数理モデル化してシミュレーションする研究を紹介する。

2 メタボローム解析技術

2.1 測定技術

メタボロームとは、代謝物(メタボライト)を網羅的(オーム)に測定する技術である。網羅的とはいうものの現状では、一つの手法で全ての代謝物を測定できる技術はなく、個々の技術の高感度化などは行われているものの、現状では複数の手法を組み合わせることが現実的である。広く使われているのは、ガスクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動など、分子を化学的な特性で分離する機器と、質量分析装置などの検出器を組み合わせた装置である。これらは核磁気共鳴と比べて高感度の測定が可能

能ではあるが、測定検体に一定の化学処理が必要など、それぞれの手法に特徴がある。

質量分析装置を使った測定においては、観測できるシグナルを解釈して測定検体に含まれる代謝物を同定する技術の確立が望まれている。質量分析装置から得られるイオンのシグナルには、質量荷電比 (m/z) とシグナル強度がある。 m/z 値やシグナルから観測できる一定のパターン等を利用して、ある程度物質を推測することはできるが、不十分なことも多い。このため、質量分析装置を連結させた装置でイオンを破壊してより多くの情報を取得し、データベースに蓄積された同様の情報との相同性から、より高精度に分子の推測を行うこともある。また、分離装置での分離時間の情報を活用した推測も数多く取り組まれている。何れにしても測定できる情報を最大限利用するには、代謝物同定の技術を確立することが重要である。

2.2 生体試料を分析するときの課題

メタボローム解析によって生体試料から疾患マーカーを探索する研究や、生活習慣等と代謝の関係を調べるコホート研究等は数多くある。しかし、生体中の代謝物には様々な変動要因があるため、慎重に検体を扱わなければ本来期待していないノイズが含まれてしまう危険性がある。再現性の高いデータを取得するためには、検体の採取、保存、処理方法、測定など、全てに厳密な標準化(SOP)の確立と順守が必要である。以下に検体ごとの例を挙げる。

- 血液では、採取後に血清や血漿を分離して保存することが一般的であるが、採取から分離までの時間の違いが検体中の代謝物の値を変化させてしまう (Hirayama et al., 2015)。そもそも血清と血漿では代謝物の濃度が異なるので、測定する手法によってどちらの方が感度や再現性の観点から適切な検体なのか、統一された結論は得られていない。
- 唾液では、(1) 非刺激性・刺激性の採取方法の統一、(2) 採取前の絶食期間の統一、(3) 日内変動を排除するための採取時間の制限、などを規格化しなければならない (Ishikawa et al., 2017; Sugimoto et al., 2013)。採取後の温度や保存時間に関して、採取直後の短期的な期間と、測定までの長期的な期間の影響がそれぞれどの程度かを調べ、採取後の

SOPの規格化も試みられている (Tomita et al., 2018; Wang et al., 2014)。

- 尿では、24時間の畜尿と1度のみの採尿という採取方法があり、検査目的に応じて選択される。後者の場合、日内変動が尿中の代謝物に与える影響を考慮した上でのマーカー探索などが求められる (Nakajima et al., 2018)。
- 呼吸を用いる場合は、採取後の長期的な保存が難しく、短い期間での測定が求められる複数拠点での試験などは工夫が必要である (Hagens et al., 2021)。
- 細胞からの代謝物抽出も細胞を洗う処理時の温度によって、抽出されるアミノ酸の効率が異なるという結果もある (Koh et al., 2013)。多くの論文のマテメソにて記載されておらず、室温にて実施されている可能性が高いが、本来は目的に応じて厳密に管理すべき対象である。

何れにしても、研究段階では厳密なSOPによって余計なバイアスを排除すべきだが、実用化に向けては、普及のためにある程度の緩和が必要であり、簡便な測定アッセイの開発 (Zhang et al., 2020) とともに、現実的なSOPの選定が必要である。

2.3 再現性の高い定量値を観測するための品質制御

測定装置から得られるシグナル強度が常に一定であれば、後続するデータ解析は単純化することができる。しかし、実際には測定装置の感度が刻々と変化するため、これを補正する工夫が必要となる。臨床検査に用いられるような装置では、測定前に感度を一定の範囲内に収める規格等が確立しているが、オミックス解析の場合は非常に数多くの項目を同時に観測するため、品質評価や制御の規格化そのものが複雑になる。特に長期的な測定においては、測定単位 (バッチ) 間ごとの誤差が観測されることが多く、この影響を最小化する対策が必要である (図1)。

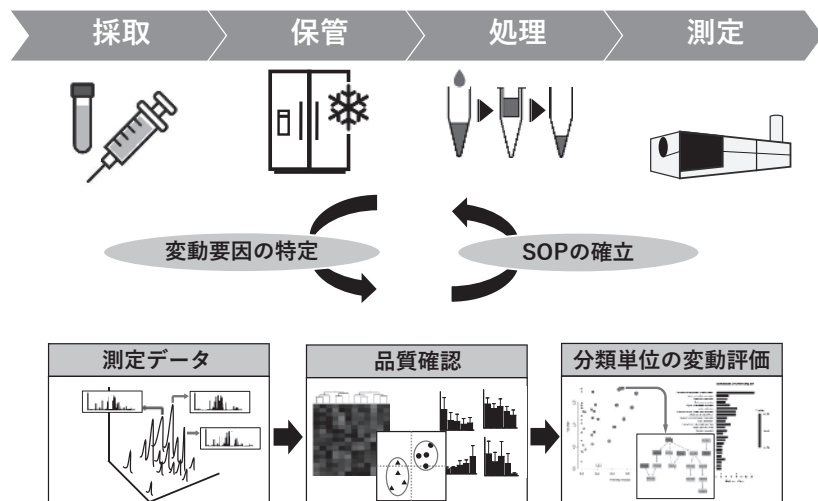


図1 メタボローム解析における検体採取、保存、前処理、測定、データ処理までの一連の流れ。データ全体を俯瞰する解析によって測定までの様々な品質を評価し、SOPを確立する。SOPが十分に確立され再現性の高いデータが得られた場合、統計解析に進む。

データにばらつきが生じる原因として、測定装置の感度のブレだけでなく、分離装置の消耗品による感度の劣化や、ピークの検出位置のズレとこれに伴う感度の変化などがある。更に、測定前の検体処理から測定にいたるまで、本来生体試料中にあるべき物質が100%存在した状態を維持できないという問題もある。例えば物質が酸化して変化する、あるいは処理中の消耗品に吸着するなどのロスが発生し回収率が低下するなどの可能性がある。これらの問題をカバーするために、検体処理前に、測定したい物質と化学的な特徴が同じで質量だけが異なる安定同位体を添加するなどの工夫を行い、データ解析時に回収率や感度の揺らぎを補正することなどが一般的に行われている (Saito et al., 2021)。

マイクロアレイでは、測定できるシグナルの総和は検体間で一定という考えのもとにデータをノーマライズする。核磁気共鳴のデータも同様に、検出できたシグナルの総和を一定にするノーマライズをすることが一般的である。先のような測定時の工夫とデータ処理上での工夫を組み合わせ、測定に伴う

余計なバイアスを排除することが必要である。これらには世界標準的な手法はなく、試行錯誤の段階であり、様々な手法が検討されている。

測定された生データの処理も、自動化することで客観性と再現性を担保する方法が望ましい。データ処理にはピークの抽出やサンプル間のアライメント等があり、機械学習を用いた自動化が進んできているが、いまだ不十分なところもあるため、現実的には段階的に品質を確認し、必要に応じて特定の処理を異なるパラメータで再実施するなどが行われている (Sugimoto et al., 2012) (図2)。これらメタボロームの解析後のデータは様々な情報を含んでいるため、長期的に蓄積してくると、先に述べてきた検体の保存状況の問題や測定装置の品質劣化などを推測することができる。ラボラトリー情報管理システム (LIMS) 等で一元管理をし、普段とは異なる異常値を検出しやすくするなど、検体採取から測定まで一貫通貫して品質の評価をすることが重要である (図2)。

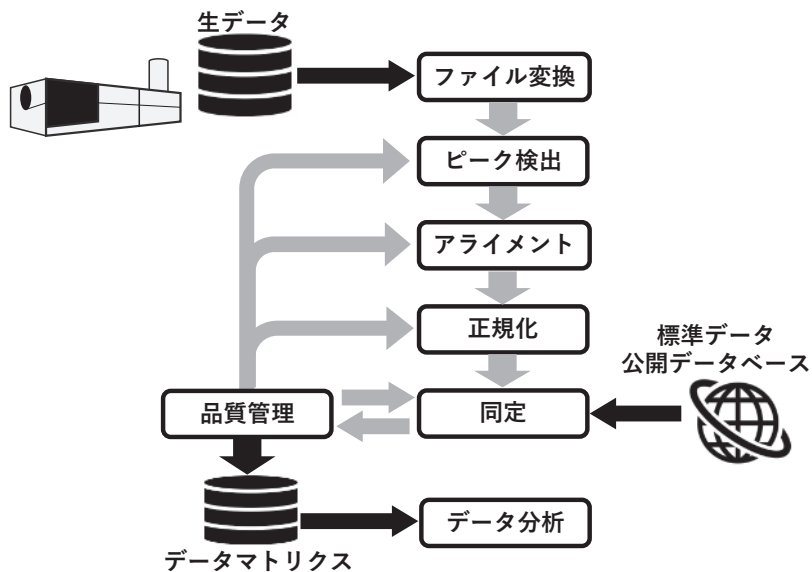


図2 メタボロームのデータ解析の流れ。機器メーカー独自のフォーマット変換、ピークの抽出、サンプル間でのアライメント、データのノーマライズ、物質の同定・定量。各工程の品質を評価し、必要な処理に戻って解析を行う。

2.4 測定情報の解釈

メタボロームで得られたデータの解釈として、個々の代謝物の変動を評価する方法と、代謝パスウェイなど従来から知られていた既知の分類の単位での変動を評価する方法がよく利用される。

前者では、(1) 複数分子が類似した挙動を示す変化を探すために主成分分析 (PCA) を行う、(2) 検体が所属する群間で共分散が最も大きくなるように主成分を決定する部分的最小二乗回帰 (PLS-DA)、などが頻繁に利用されている。その際、複数分子の組み合わせで群分けを行う多重ロジスティック回帰等の代わりに LASSO 回帰等が用いられる (Da Cunha et al., 2022)。メタボローム解析は多数の代謝物を同時に測定するため、サンプル数より観測情報が多くなり、かつ相関する代謝物も多くなるため、多重共線性の問題を回避する必要があるためである。

後者では、測定データを部分的な代謝パスウェイごと (例えば glycolysis, TCA 回路等) にマッピングし、パスウェイ単位で変動を評価する Metabolite set enrichment analysis (MSEA) や、マッピングされた代謝物がパスウェイ全体に及ぼし得る影響度も同時に評価する Pathway Analysis 等が利用される。これらは、ヒトの体液で検出された代謝物の過去の文献情報や質量分析装置のスペクトルを格納する Human metabolome database (HMDB) や、代謝パスウェイのデータベースである Small molecule pathway database (SMPDB) と連動した解析ツールとして、MetaboAnalyst にて実装されている (Pang et al., 2021)。

PLS-DA 等は教師あり学習であるために、過学習にならない汎化性の評価が重要であり、単純なクロスバリデーションでは不十分なため、より厳しい評価試験が必要という指摘もある (Szymańska et al., 2012)。また、どの解析方法もサンプル間のデータのノーマライズや、代謝物の規格化などで解析結果が変わるために注意が必要となる。

3 生体数理モデル化とシミュレーション

3.1 代謝ダイナミクスの数理モデル

メタボローム解析では代謝物の定量値、つまりある一時点での代謝のスナ

アップショットを観測することができる。(1) これらの代謝物が生体内でどのような相互作用をしているのか、(2) 時間的にどのように変化していくか、などの現象を数理モデルで表現してシミュレーションを行う取り組みが数多くある。つまり個々の代謝反応などの部分的な代謝の多数の知見が分散された状態で蓄積してきているが、これらを統合して一つの土俵に載せて、代謝の複雑な関係を包括的に理解しようとする試みである (Viceconti & Hunter, 2016)。

代謝反応のモデル化は大きく分けて、(1) 微分方程式を用いて、該当する代謝反応の酵素活性等から、基質と生成物の関係を動的ダイナミクスとして再現するアプローチ、(2) 時間的な変化は関係なく細胞内外との物質収支の流量だけを再現する静的なアプローチの2つがある (Musilova & Sedlar, 2021; Zhou et al., 2021)。ここでは前者を紹介する。

大腸菌などの単一細胞を対象とした場合、ゲノムワイドなレベルで大規模に代謝経路をモデル化し、更に他のオミックスデータを統合して精緻化する方向性の研究が多い (Skalnik et al., 2021; Sun et al., 2021)。ヒトの細胞でも、赤血球など単一細胞の代謝を対象とした場合も同様のアプローチで、細胞膜を境界条件として、内外の物質収支や内部での物質の化学反応をモデル化している (Nishino et al., 2009; 2013)。つまり細胞の外側を単一な空間とする境界条件の設定においてモデル化されている。

一方、ヒト生体内の臓器レベルで観測される代謝変動や、全身性の慢性代謝疾患などを理解するためには、単一細胞のモデル化と細胞外を単一空間の境界条件とする仕組みでは不十分となる。例えば、肝臓など臓器レベルのシミュレーションでは、細胞の局在ごとに酸素濃度勾配等の環境が異なるため、様々な遺伝子発現に勾配が発生し、結果として代謝も異なる動態を示す。複数の細胞を連結させて、個々の細胞が血液を通して様々な物質の取り込みや分泌を行っていることを考慮するなどのスケールアップが行われている (Berndt & Holzhütter, 2018; Berndt et al., 2018; Ohno et al., 2008; Schleicher et al., 2017)。また、複数の臓器間にまたがる疾患として、糖尿病に特異的な代謝を再現することを目的とし、各臓器が単一細胞で構成されている前提で臓器間を血管でつなぐ仕組みで全身の代謝をモデル化している

(Kurata, 2021)。いずれの方法も目的に応じた抽象度を設定して、妥当性の検証が行える範囲まで単純化することで、不要に問題を難しくすることを回避している。

3.2 物理的・空間的条件も考慮した数理モデル

先に紹介したモデルは、境界条件として細胞そのものは変化しないという前提のもと、代謝反応を微分方程式で表現し、微小時間ごとの変化を数値解法によって解くものである。しかし疾患によっては、細胞間の位置関係や、細胞そのものの状態変化を考慮する必要がある。例えば、肝臓の毒性物質に対する反応としては、代謝反応だけでなく臓器へのコラーゲンの蓄積や、細胞死や再生などの動的な変化を考慮しなければならない。これらを個々の要素が周辺の環境に合わせて変化するエージェント指向のモデルとしてシミュレーションする例がある (Dutta-Moscato et al., 2014)。

がん細胞では、特殊な代謝がされていることが古くから知られており (Warburg, 1956)、マルチオミックス解析によってこの原因となる要因の特定なども進められてきている (Satoh et al., 2017)。しかし、これはがん組織を均一な単一細胞と仮定した解析である。実際の腫瘍組織はヘテロな細胞の集合体となっており、細胞のタイプ自体も時間によって変化していく。Guptaらは、マルコフモデルを用いて細胞の経時的な状態変化をモデル化し、ヘテロな細胞分布との関係を加味して抗がん剤の効果予測のシミュレーションを実施している (Gupta et al., 2011)。また、がん細胞が入手する酸素やエネルギーを空間的にモデル化し、個々のがん細胞が得られる環境からがん細胞の増殖方向を決定し、がん周辺の間質細胞が腫瘍成長の形状にどのような影響をもたらすかをシミュレーションし、悪性度の高いがん細胞がスピキュラの形状となる原因を探索したものもある (Anderson et al., 2006)。

実際の腫瘍の成長過程では、がん細胞は周辺が低酸素になって代謝がシフトすると、周辺に新しい血管を伸ばし(血管新生)、酸素と栄養を安定的に得られるような環境を作る(図3) (Folkman & Klagsbrun, 1987)。腫瘍組織と既存の血管との位置関係によってがん細胞の環境が異なるため、個々の細胞ごとに代謝状態やこれに伴う血管新生因子の分泌なども異なる。血管から分泌

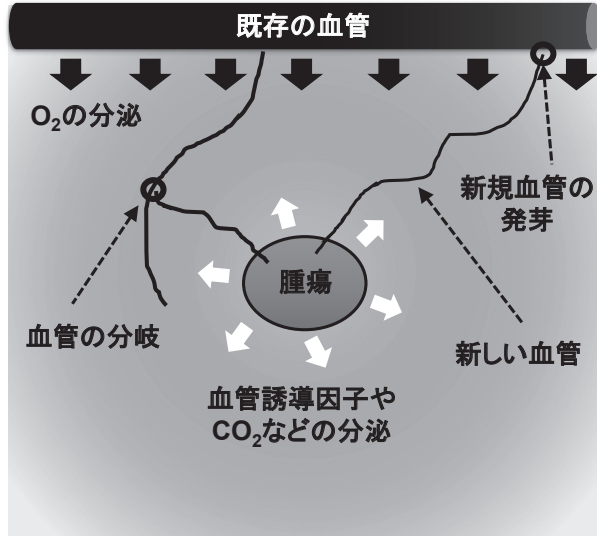


図3 がんの微小環境における血管新生

される酸素や、がん細胞から分泌される血管誘導因子の分布が重要な因子となるため、これらの因子を偏微分方程式で実装し、新しい血管の伸長方向を決める数理モデル等もある (図4、図5) (Tang et al., 2014; Yanagisawa et al., 2021)。

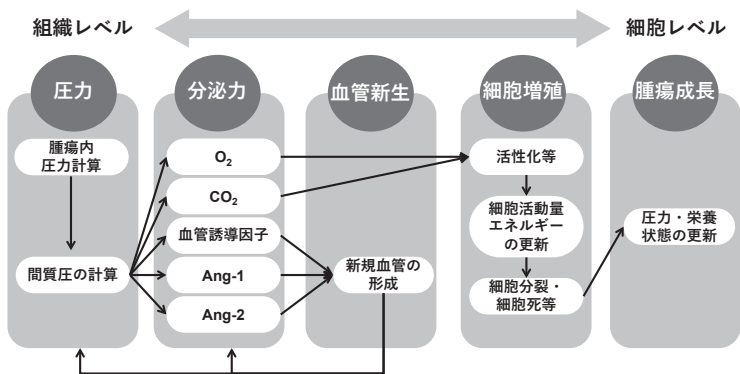


図4 がんの血管新生においてモデル化される要素

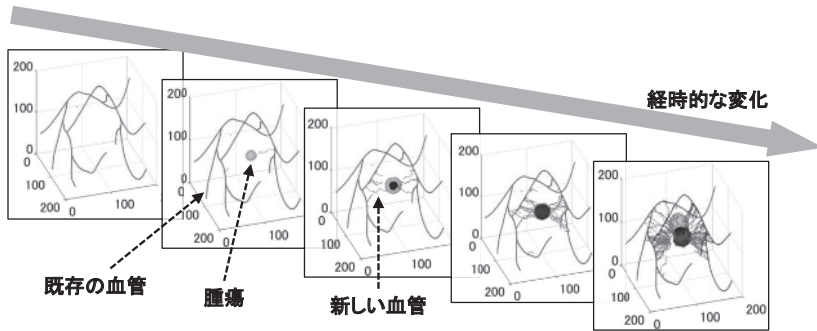


図5 がんの血管新生モデルの経時的な変化の様子

これらのモデルは、生体内において特定の細胞の代謝を理解するという同一目的ではあるものの、境界条件や細胞の状態に応じて抽象化のレベルやモデル化の手法そのものが異なる。

4 おわりに

メタボロームを中心とした、生体内の代謝に対する理解への取り組みについて、測定の技術的な側面とシミュレーションを含むデータ解析に関して紹介した。測定もモデル化も、生体内のヘテロな細胞の複雑な代謝を理解するためには有益なツールである。一方、再現しようとする現象次第では、細胞内の代謝だけでなくがん組織周辺の微小環境もモデル化の対象とし、かつ、化学的・物理的な特徴を同時に考慮するなど学際的な取り組みが必要な場合もある。取り組むべき課題も多いが、特に観測と介入に制限がある条件下においては、十分な妥当性を検証した数理モデルを用いて、得られたデータを十分に活用することは、さまざまな治療の予測や、新しい仕組みの発見の可能性を秘めている技術であると考えられる。

研究助成の有無及び利益相反

利益相反に該当する事項はない

引用文献

- Anderson, A. R., Weaver, A. M., Cummings, P. T., Quaranta, V. (2006) “Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment”, *Cell*. 127(5), pp. 905-15.
- Berndt, N., Holzhütter, H.-G. (2018) “Dynamic metabolic zonation of the hepatic glucose metabolism is accomplished by sinusoidal plasma gradients of nutrients and hormones”, *Frontiers in Physiology*. 9, 1786.
- Berndt, N., Horger, M. S., Bulik, S., Holzhütter, H. -G. (2018) “A multiscale modelling approach to assess the impact of metabolic zonation and microperfusion on the hepatic carbohydrate metabolism”, *PLOS Comput Biol*. 14(2), e1006005.
- Da Cunha, P. A., Nitusca, D., Canto, L. M. D., Varghese, R. S., Resson, H. W., et al. (2022) “Metabolomic analysis of plasma from breast cancer patients using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: An untargeted study”, *Metabolites*. 12(5), 447.
- Dutta-Moscato, J., Solovyev, A., Mi, Q., Nishikawa, T., Soto-Gutierrez, A., et al. (2014) “A multiscale agent-based in silico model of liver fibrosis progression”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2, 18.
- Folkman, J., Klagsbrun, M. (1987) “Angiogenic factors”, *Science*. 235(4787), pp. 442-7.
- Gupta, P. B., Fillmore, C. M., Jiang, G., Shapira, S. D., Tao, K., et al. (2011) “Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells”, *Cell*. 146(4), pp. 633-44.
- Hagens, L. A., Heijnen, N. F. L., Smit, M. R., Verschuere, A. R. M., Nijssen, T. M. E., et al. (2021) “Diagnosis of acute respiratory distress syndrome (ARDS) by bedside exhaled breath octane measurements in invasively ventilated patients: Protocol of a multicentre observational cohort study”, *Ann Transl Med*. 9(15), 1262.
- Hirayama, A., Sugimoto, M., Suzuki, A., Hatakeyama, Y., Enomoto, A., et al. (2015) “Effects of processing and storage conditions on charged metabolomic profiles in blood”, *Electrophoresis*. 36(18), pp. 2148-55.
- Ishikawa, S., Sugimoto, M., Kitabatake, K., Tu, M., Sugano, A., et al. (2017) “Effect of timing of collection of salivary metabolomic biomarkers on oral cancer detection”, *Amino Acids*. 49(4), pp. 761-70.
- Koh, T., Murakami, Y., Tanaka, S., Machino, M., Onuma, H., et al. (2013) “Changes of metabolic profiles in an oral squamous cell carcinoma cell line induced by eugenol”, *In Vivo*. 27(2), pp. 233-43.
- Kurata, H. (2021) “Virtual metabolic human dynamic model for pathological analysis and therapy design for diabetes”, *iScience*. 24(2), 102101.
- Musilova, J., Sedlar, K. (2021) “Tools for time-course simulation in systems biology: A brief overview”, *Briefings in Bioinformatics*. 22(5), bbaa392.
- Nakajima, T., Katsumata, K., Kuwabara, H., Soya, R., Enomoto, M., et al. (2018) “Urinary polyamine biomarker panels with machine-learning differentiated colorectal cancers, benign disease, and healthy controls”, *Int J Mol Sci*. 19(3), 756.
- Nishino, T., Yachie-Kinoshita, A., Hirayama, A., Soga, T., Suematsu, M., Tomita, M. (2009) “In silico modeling and metabolome analysis of long-stored erythrocytes to improve blood storage methods”, *J Biotechnol*. 144(3), pp. 212-23.
- Nishino, T., Yachie-Kinoshita, A., Hirayama, A., Soga, T., Suematsu, M., Tomita, M. (2013) “Dynamic simulation and metabolome analysis of long-term erythrocyte storage in

- adenine-guanosine solution”, *PLOS ONE*. 8(8), e71060.
- Ohno, H., Naito, Y., Nakajima, H., Tomita, M. (2008) “Construction of a biological tissue model based on a single-cell model: A computer simulation of metabolic heterogeneity in the liver lobule”, *Artif Life*. 14(1), pp. 3-28.
- Pang, Z., Chong, J., Zhou, G., de Lima Morais, D. A., Chang, L., et al. (2021) “Metaboanalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights”, *Nucleic Acids Res*. 49(W1), pp. W388-W396.
- Saito, R., Sugimoto, M., Hirayama, A., Soga, T., Tomita, M., Takebayashi, T. (2021) “Quality assessment of untargeted analytical data in a large-scale metabolomic study”, *J Clin Med*. 10(9), 1826.
- Satoh, K., Yachida, S., Sugimoto, M., Oshima, M., Nakagawa, T., et al. (2017) “Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by myc”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(37), pp. E7697-E7706.
- Schleicher, J., Dahmen, U., Guthke, R., Schuster, S. (2017) “Zonation of hepatic fat accumulation: Insights from mathematical modelling of nutrient gradients and fatty acid uptake”, *J R Soc Interface*. 14(133), 20170443.
- Skalnik, C. J., Agmon, E., Spangler, R. K., Talman, L., Morrison, J. H., et al. (2021) “Whole-colony modeling of escherichia coli. [Reviewed Item]”, *Journal*(Issue), doi:<https://doi.org/10.1101/2021.04.27.441666>
- Sugimoto, M., Kawakami, M., Robert, M., Soga, T., Tomita, M. (2012) “Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis”, *Curr Bioinform*. 7(1), pp. 96-108.
- Sugimoto, M., Saruta, J., Matsuki, C., To, M., Onuma, H., et al. (2013) “Physiological and environmental parameters associated with mass spectrometry-based salivary metabolomic profiles”, *Metabolomics*. 9(2), pp. 454-63.
- Sun, G., Ahn-Horst, T. A., Covert, M. W. (2021) “The e. Coli whole-cell modeling project”, *EcoSal Plus*. 9(2), eESP00012020.
- Szymańska, E., Saccenti, E., Smilde, A. K., Westerhuis, J. A. (2012) “Double-check: Validation of diagnostic statistics for pls-da models in metabolomics studies”, *Metabolomics*. 8(Suppl 1), pp. 3-16.
- Tang, L., van de Ven, A. L., Guo, D., Andasari, V., Cristini, V., et al. (2014) “Computational modeling of 3d tumor growth and angiogenesis for chemotherapy evaluation”, *PLOS ONE*. 9(1), e83962.
- Tomita, A., Mori, M., Hiwatari, K., Yamaguchi, E., Itoi, T., et al. (2018) “Effect of storage conditions on salivary polyamines quantified via liquid chromatography-mass spectrometry”, *Sci Rep*. 8(1), 12075.
- Viceconti, M., Hunter, P. (2016) “The virtual physiological human: Ten years after”, *Annu Rev Biomed Eng*. 18, pp. 103-23.
- Wang, Q., Gao, P., Wang, X., Duan, Y. (2014) “Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma”, *Clin Chim Acta*. 427, pp. 79-85.
- Warburg, O. (1956) “On the origin of cancer cells”, *Science*. 123(3191), pp. 309-14.
- Yanagisawa, H., Sugimoto, M., Miyashita, T. (2021) “Mathematical simulation of tumour angiogenesis: Angiopoietin balance is a key factor in vessel growth and regression”, *Sci Rep*. 11(1), 419.
- Zhang, Z., Niwa, O., Shiba, S., Tokito, S., Nagamine, K., et al. (2020) “Electrochemical enzyme biosensor for carnitine detection based on cathodic stripping voltammetry”, *Sensors and*

Actuators B: Chemical. 321, 128473.

Zhou, J., Fan, X., Cao, L., Sun, H., Xia, J., Yan, X. (2021) “Review of construction methods for whole-cell computational models”, *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. pp. 1-12.

[受付日 2022. 6. 8]