

令和 元年 6月 14日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08848

研究課題名(和文) 蛋白分画波形を用いた栄養モニタリングを支援する微量元素の推定

研究課題名(英文) Estimation of trace elements supporting nutrient monitoring using protein fraction waveform data

研究代表者

久原 太助 (HISAHARA, Taisuke)

高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師

研究者番号：80457407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：亜鉛は、生体において必須微量元素の一つで、細胞の分裂・代謝、免疫機能、生殖機能など幅広い役割を担い、特に高齢者の場合、亜鉛低下による味覚障害から食欲低下、そして栄養失調に至り褥瘡の発生リスクを増加させ、その治療においても、亜鉛が不足すると治癒が遅れるため亜鉛濃度の把握は非常に重要である。しかし血清亜鉛濃度測定は検査費用が高額であり頻繁な測定は困難である。本研究は、褥瘡で重要となってくる血清亜鉛濃度の状態を、比較的安価な費用で検査できる蛋白分画波形を用いて予測することを目的とした。このことより褥瘡で重要となる蛋白を網羅的に解析できると同時に血清亜鉛の欠乏状態が一つの検査で得ることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白電気泳動は、非常に安価な検査であり従来から臨床検査の一つとして実施されていたが、通常波形の5～6分画での評価に加え、今回我々が開発した波形易動度の正規化技術を適用することで、肉眼では検出できない波形ピーク前後の歪みでも精度の高い分離性能を有し有用性の高い検査であることが示唆された。このことより栄養モニタリングで重要な血清蛋白状態を網羅的に把握できることとともに、栄養状態に関連性が深い微量元素である亜鉛の欠乏状態が一つの検査で得ることができる。このことより患者の採血や身体的負担を軽減させ、さらには医療費の節減にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Zinc (Zn), one of the essential trace elements of human body, has a wide role including metabolism of the skin and hair, cell division, cell metabolism, taste and immunity. In a case of elderly, fall in serum Zn concentration has a risk for appetite loss and malnutrition, and generation of pressure ulcer. On the other hand increase of serum Zn concentration is observed in hyperthyroidism, polycythemia, essential hypertension and hemolytic anemia. Therefore, measurement of serum Zn concentration is important, but as the cost of measurement is expensive frequent measurement of Zn is unreasonable. The aim of this study was to examine serum Zn concentration using the protein fraction waveform with a relatively low cost, and to determine the clinical utility of this method for predicting serum Zn concentration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：蛋白電気泳動 波形正規化 血清亜鉛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Nutrition Support Team (NST) による栄養管理を積極的に行うことは、敗血症や褥瘡の発生率を抑制し、さらには外科手術後の治療成績を改善するなどの利点が報告されている。従来から栄養管理の客観的指標として、血清アルブミン (ALB) や末梢血リンパ球数などが利用されているが、近年になって Rapid turnover protein (RTP) や亜鉛などの微量元素が注目されている。

NST の対象患者は様々な疾患背景があるため、モニタリングすべき検査項目として多数の検査項目を測定すべきであり、それらの時系列変化を捉え介入することが重要である。しかし、これらの検査項目を頻繁に測定することは経費負担が大きく、実施が困難な場合があった。

### 2. 研究の目的

Nutrition Support Team (NST) の活動は、患者の生命予後を改善させることが知られている。客観的な指標により介入すべき課題であるが、多くの検査項目を定期的に測定しなければならず医療経済面の問題があった。これまで申請者らの研究で蛋白分画検査の波形データに着目し波形解析技術を駆使することにより、アルブミン (ALB)、プレアルブミン (トランスサイレチン : TTR) レチノール結合蛋白 (RBP)、トランスフェリン (Tf) などの推定が可能で、さらには微量元素の亜鉛 (Zn) 量を蛋白分画検査の波形から間接的に推定できる可能性を見出した。

そこで本研究では、前向き研究として亜鉛、銅及びその他の微量元素関連項目の推定精度を向上させ、蛋白分画検査を用いた総合的な NST 支援システムを構築するとともに、亜鉛欠乏による蛋白合成の低下や、免疫機能 (易感染性、自己免疫疾患、アレルギー疾患など) への影響、さらに糖尿病におけるインスリン活性への関与について明らかにする。

### 3. 研究の方法

日常臨床検査で検査が行われている蛋白電気泳動検査を用いた。その中でも比較的分析精度の高いキャピラリー電気泳動法を使用した。その電気泳動で得られた波形情報の収集は先行研究により開発した方法を用いた。キャピラリー蛋白電気泳動装置は、Sebia 社の CAPILLARYS2 PROTEIN(E)6 を用いた。

#### (1) データ収集と波形の正規化

日常臨床検査に提出された検査結果から、血清微量元素である亜鉛 (Zn) の検査結果と、蛋白分画検査の生波形データをオンラインで収集するプログラムを開発し、検体 300 件のデータ収集を行った。蛋白電気泳動検査は、蛋白分画波形の ALB 分画から 1 分画の間の情報を除去しないプレアルブミン分画側 (陽極側) から グロブリン分画側 (陰極側) まですべての領域の生波形データを収集し波形の正規化を行った。波形の正規化は、生波形データに対して易動度と強度を補正した (図 1.)。内部標準液として N,N-dimethylformamide (DMF) を添加して測定した波形の易動度を正規化した後、クラスタリングを行い波形パターンのテンプレートを作成した。次に、DMF を添加しない正規的分析法から得られた波形を Dynamic Time Warping (DTW) アルゴリズムでテンプレート波形とのマッチングによる補正法を用い、易動度の正規化は、アルブミンのピーク位置を易動度 75 とし、DMF のピーク位置を易動度 300 となるように標準化し、さらに、総蛋白値が 7.0 g/dL の時、曲線下面積が 100,000 となるように曲線下面積を補正した。

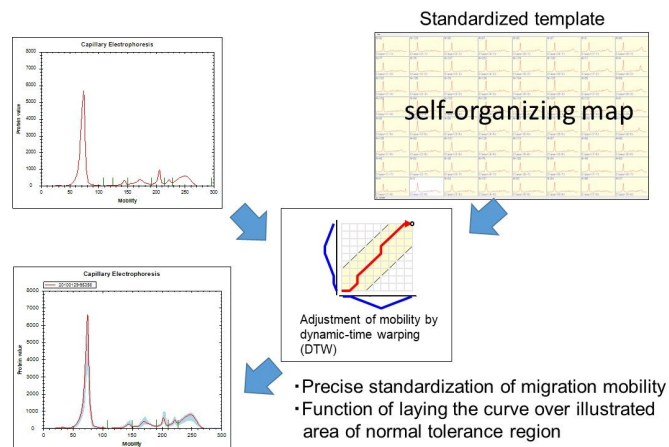


図1. 易動度と強度の正規化

#### (2) 血清亜鉛濃度を予測するための ROC 分析

蛋白分画波形の正規化を行い、得られた 300 の易動度各点に対して、蛋白電気泳動検査と同時に測定された血清亜鉛濃度のデータを用いて、血清亜鉛低下について血清亜鉛濃度が 66  $\mu$ g/dL 未満を陽性群とし、66  $\mu$ g/dL 以上を陰性群とした ROC 分析を行った。さらに血清亜鉛濃度の 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150  $\mu$ g/dL の各濃度でも 300 の各易動度それぞれについて ROC 分析を行い血清亜鉛濃度の推定について評価した。

#### (3) 血清亜鉛濃度を予測するロジスティック回帰分析

ROC 分析と同様に、血清亜鉛低下の陽性群を 66  $\mu$ g/dL 未満とし、陰性群を 66  $\mu$ g/dL 以上とし、血清亜鉛濃度を目的変数としてロジスティック回帰分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血清亜鉛濃度低下を予測するためのROC分析

まず血清亜鉛濃度の低下を予測するため、正規化された易動度の各300ポイントにおいて、ROC分析 (< 66  $\mu\text{g/dL}$  を陽性群 (1)、 $\geq 66 \mu\text{g/dL}$  を陰性群 (0)) を実施した。

血清亜鉛濃度の低下は、プレアルブミン分画の易動度が Mobility = 33 (M33) の低下 (AUC = 0.737)、アルブミン分画尾部の易動度が Mobility = 77 (M77) の低下 (AUC = 0.750)、1分画の易動度が Mobility = 203 (M203) の低下 (AUC = 0.705) を検出し3ポイントそれぞれAUCが0.7以上の良好な検査診断特性が得られた (図2.)。

これら良好な検査診断特性が得られた3ポイントのROC曲線を図3に示す。特にM33とM77では感度がそれぞれ0.818と0.740で良好な感度が得られ、M203では特異度が0.814の良好な結果が得られた。

血液中の亜鉛は、約80%が赤血球、約3%が白血球や血小板、そして約20%が血清中に分布している。そしてその血清中では、約60~80%がアルブミンと結合し、その他は2マクログロブリンやトランスフェリンと結合している。アルブミンはアルブミン分画、2マクログロブリンは2分画、トランスフェリンは1分画に泳動される蛋白であり、それらを考えると本研究で検出されたアルブミン分画のM77、1分画のM203は、それぞれ亜鉛と結合するアルブミンおよびトランスフェリンの分画位置と一致する結果である。しかしながら血清中亜鉛濃度の基準範囲は80~130  $\mu\text{g/dL}$  であり、2グロブリンやトランスフェリンと比較してもその濃度は非常に低くキャピラリ電気泳動でも検出が困難な濃度域であり血清中亜鉛そのものが検出されているのではないと考えられた。むしろ亜鉛欠乏による味覚障害や食欲不振によりプレアルブミンやレチノール結合蛋白およびトランスフェリンなどの栄養アセスメントの動的指標として用いられる蛋白が低下することにより蛋白電気泳動波形に変化を生じさせたものとする。

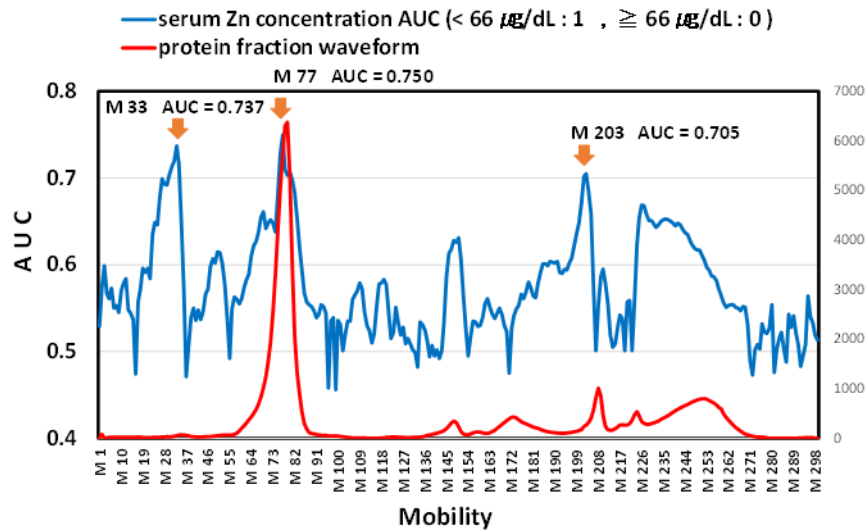


図2. 蛋白電気泳動波形と血清亜鉛低下の関係

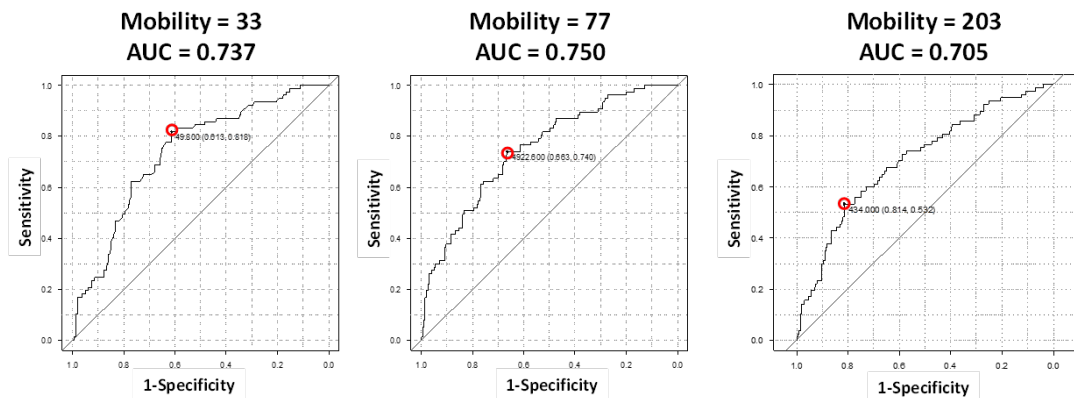


図3. 血清亜鉛濃度低下を予測する3ポイントのROC曲線



(2) 血清亜鉛濃度を予測するための ROC 分析

血清亜鉛濃度を予測するため、亜鉛濃度を 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150  $\mu\text{g/dL}$  とし、その各濃度をカットオフ値とする ROC 分析を各易動度 (M1 ~ M300) において実施した結果を AUC ヒートマップとして 図 4. に示した。

血清亜鉛濃度のカットオフ値を 100  $\mu\text{g/dL}$  以上とする高値側血清亜鉛濃度でもアルブミン分画と 1 分画の間の領域、 2 分画の領域、 1 分画から 2 分画の間の領域で高い AUC を認めた。

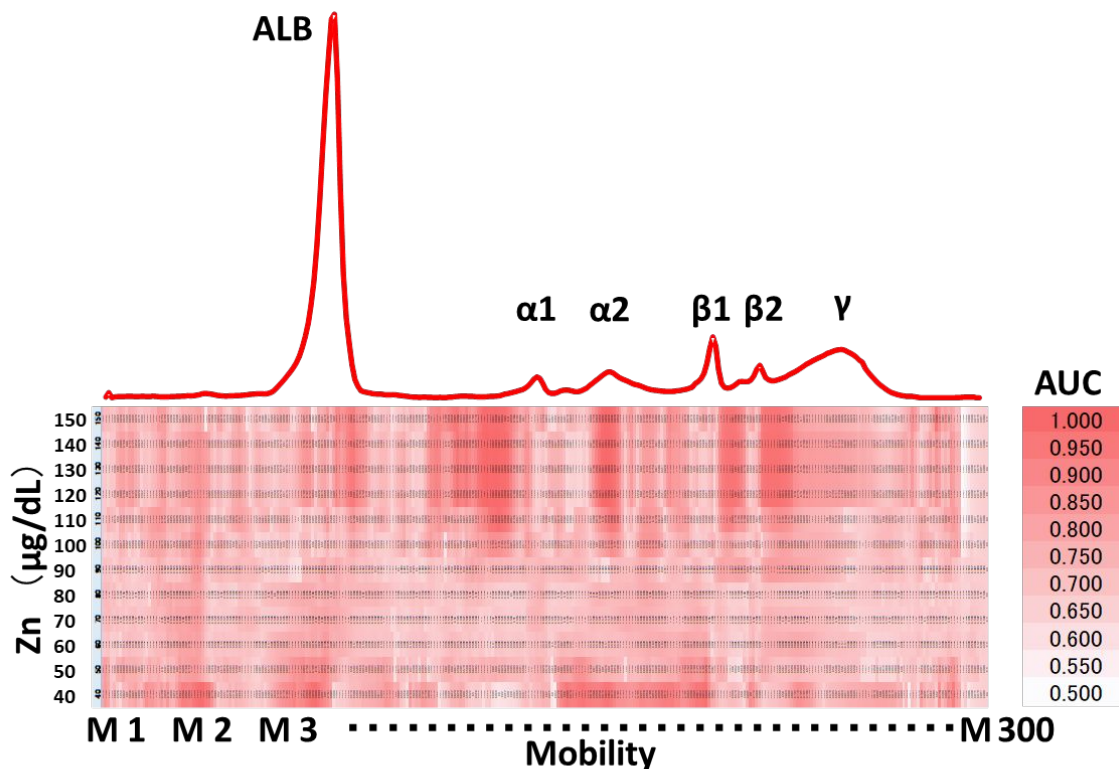


図4. 血清亜鉛濃度と蛋白分画波形に基づくROC分析を用いたAUCヒートマップ

(3) 血清亜鉛濃度を予測するロジスティック回帰分析

ROC 分析と同様に、血清亜鉛低下の陽性群を 66  $\mu\text{g/dL}$  未満とし、陰性群を 66  $\mu\text{g/dL}$  以上とし、血清亜鉛濃度を目的変数としてロジスティック回帰分析を行った (表 1.)

ロジスティック回帰分析でも、ROC 分析と同じく 3 ポイントの易動度を検出しその中の 1 つプレアルブミン分画の M33 は、ROC 分析と一致する異動度であった。その他は、M82、M83 でありほぼ同じ易動度で、アルブミン分画の領域であった。これら、3 ポイントから得られる血清亜鉛濃度低下の予測式の AUC は、0.791 と良好な結果が得られた。

表1. 血清Zn濃度低下を予測するロジスティック回帰分析

	Estimate	Std.Error	P-value
Intercept	3.6071	0.74140	<0.00001
M33	-0.0650	0.01262	<0.00001
M82	-0.0119	0.00321	0.00022
M83	0.01512	0.00467	0.00122

Logistic regression formula

$$3.607 + (-0.065) \times M33 + (-0.012) \times M82 + 0.015 \times M83$$

(AUC = 0.791)

(4) まとめと今後の展望

ROC 分析の結果、蛋白分画波形データの数多くの易動度の中で、亜鉛欠乏の検査診断特性が得られる特徴的な領域が、易動度 33、77、203 にあり、ロジスティック回帰分析結果は、AUC = 0.791 と良好な結果が得られ、これらを総合的に用いて予測した場合は、非常に高い亜鉛欠乏の分離性能を有する判定が可能である。

蛋白電気泳動検査は、現在の臨床検査において、ほぼ多発性骨髄腫でみられる M 蛋白の検出を目的とした検査依頼がほとんどである。非常に安価な検査であるが得られる情報量は多く、従来からの 5~6 分画での評価のみでなく、我々が開発した波形易動度の正規化技術を適用することで、波形ピーク前後の歪の形から血清亜鉛濃度の推定可能であることが示唆された。

今後、蛋白分画検査を用いた総合的な NST 支援システムを構築するとともに、亜鉛欠乏による蛋白合成の低下や、免疫機能 (易感染性、自己免疫疾患、アレルギー疾患など) への影響、さらに糖尿病におけるインスリン活性への関与について明らかにする計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

久原太助、片岡浩巳、亀山智代、徳弘慎治、矢野礼那、楠瀬慶二、小松あかり、星野将規、山中茂雄、上岡樹生、兵頭政光、蛋白質分画波形を用いた血清亜鉛濃度スクリーニング検査の開発 第 64 回 日本臨床検査医学会中国・四国支部総会 岡山 2019.2.16 ~ 2019.2.17

T.Hisahara, H.Kataoka, K.Ogura, S.Yamanaka, T.Sugiura, Y.Matsumura, Evaluation of serum zinc concentration using protein fraction waveform data Cherry Blossom Symposium 2018 Morioka Japan 2018.4.19 ~ 2018.4.21

久原太助、片岡浩巳、亀山智代、徳弘慎治、岡崎渚、楠瀬慶二、小松あかり、山本真美、片岡将規、山中茂雄、上岡樹生、杉浦哲朗、松村敬久、蛋白質分画波形を用いた血清亜鉛濃度スクリーニング検査の評価 日本臨床化学会 第 57 回年次学術集会 札幌 2017.10.6 ~ 2017.10.8

T.Hisahara, H.Kataoka, K.Ogura, S.Yamanaka, T.Sugiura, Y.Matsumura, Evaluation of serum zinc concentration using protein fraction waveform data 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo San Diego, CA USA 2017.7.30 ~ 2017.8.3

T.Hisahara, H.Kataoka, K.Ogura, Y.Matsumura, T.Sugiura, Prediction of pressure ulcer based on the protein fraction waveform data 68th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo Philadelphia, PA USA 2016.7.31 ~ 2016.8.4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：片岡 浩巳

ローマ字氏名：KATAOKA, Hiromi

所属研究機関名：川崎医療福祉大学

部局名：医療技術学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80398049

(2)研究分担者

研究分担者氏名：杉浦 哲朗

ローマ字氏名：SUGIURA, Tetsuro

所属研究機関名：高知大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任教授

研究者番号(8桁): 50171145

(3)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。