

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成 24 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：24659795

研究課題名（和文）

核磁気共鳴法を用いた小児熱性疾患の早期鑑別診断法の開発

研究課題名（英文）

Development of a novel diagnostic tool for pediatric febrile illness using nuclear magnetic resonance spectroscopy

研究代表者

小池 薫 (KOIKE KAORU) 京都大学 医学研究科 教授

研究者番号：10267164

研究成果の概要（和文）：

我々は、「複雑な混合物」全体の物性を識別できる、独自の電磁波信号処理方式を開発した。一例をあげると、小児の「急性脳症」と「複雑型熱性痙攣」は、最新の検査を駆使しても早期鑑別がむずかしいが、我々は、発症直後に患児から採取した脳脊髄液について NMR(核磁気共鳴)データ解析を行い、両者の識別に成功した。また、本技術を用いて、細菌性髄膜炎とウイルス性髄膜炎の鑑別にも成功した。本技術は、血液・尿・細胞・臓器に適用可能で、今後、がんやその他の疾患の早期診断や予後予測に役立てたい。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a new signal processing technique that comprehensively handles the signal of electromagnetic waves, such as that of nuclear magnetic resonance obtained from complex mixture. In children, it is difficult to distinguish "febrile seizure" from "acute encephalopathy" in the early phase. Our technique demonstrated the capability of identifying one from the other in such cases. We could also separate bacterial and viral meningitis using the same method. The proposed technology is suitable for applications such as blood, urine, cell and internal organ analysis, and we plan to develop it as a novel diagnostic tool for various medical conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：核磁気共鳴法、診断、パターン認識、急性脳症、髄液

1. 研究開始当初の背景

小児救急の日常臨床においては、「急性脳

症」と「熱性けいれん（特に複雑型）」を受診直後に鑑別診断することは困難なことが

多く、入院後の臨床経過やさまざまな検査結果（画像検査・生理学的検査・生化学的検査など）を総合して、後日確定診断することが多い。我々は、来院後2～3時間以内に患児から採取した髄液を用いて、「血清・髄液などの体液を核磁気共鳴（Nuclear Magnetic Resonance; NMR）計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」検査を試行したところ、「急性脳症」「熱性けいれん（複雑型）」「熱性けいれん（単純型）」を科学的に早期鑑別することに成功した。この結果を第114回日本小児学会学術集会（浅野健、平川慶子、小池薫、大野曜吉、他。「核磁気共鳴法を用いた小児の脳症・熱性けいれん児の髄液の代謝解析」2011年8月）で報告したところ、小児科専門医から「臨床現場での有用性が高く今後の実用化が待たれる」との評価を得た。これらの疾患の早期鑑別が可能になると、入院時からの治療方針決定や入院後の臨床経過の予測に役立つとともに、無駄な医療費を削減するという医療経済面での効果も期待できる。

本研究では上記研究を発展させ、対象を「発熱を伴って救急外来を受診し、①入院の適応があり、かつ②髄膜炎の鑑別診断が必要と判断された小児」に広げ、来院後早期に採取した髄液を「血清・髄液などの体液をNMR計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」ことにより、1)「急性脳症」「熱性けいれん（複雑型）」の鑑別精度を向上させる、2)「細菌性髄膜炎」と「ウイルス性髄膜炎」の鑑別を試みた。

2. 研究の目的

「発熱を伴って救急外来を受診し、①入院の適応があり、かつ②髄膜炎の鑑別診断が必要と判断された小児」の髄液を来院直後に採

取し、我々が開発した「血清・髄液などの体液をNMR計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」方法で検査すると、日常臨床においては来院直後の診断がしばしばむずかしい、脳症・髄膜炎・熱性けいれん・その他の熱性疾患の早期鑑別が可能かどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 検体および臨床情報

(1) 検体

発熱を伴って日本医科大学付属千葉北総病院救急外来を受診し、入院加療ならびに髄膜炎の鑑別診断が必要と判断された小児から、入院直後（来院後2～3時間以内）に髄液を採取した。

(2) 臨床情報の整理

患者毎に髄液データ（細胞数、糖、蛋白等）、血液生化学検査データ、画像所見、けいれんの有無（時間、回数）、予後などの臨床情報を整理した。

2. NMR計測および数値化処理

(1) NMR計測

◇ 検体の前処理・保存など

患者より採取した髄液は遠心分離（1,500ppm、5分）により細胞成分を除去し、 -80°C に保存した。NMR計測時に解凍して使用した。

◇ NMR測定試料の調整

解凍した髄液 $50\mu\text{L}$ に内部ロック用重水 (D_2O ISOTECH) $490\mu\text{L}$ およびケミカルシフト確認用内部標準物質 3-(トリメチルシリル)-2,2',3,3'-テトラジュウテロプロピオン酸 (TMSP-d4, 1.0mM/ D_2O 溶液) $60\mu\text{L}$ を加え、5mm径ガラス性NMR試料管 (Wilmad-LabGlass) に入れた。

◇ NMR測定およびデータ解析

NMR装置は7テスラ(300MHz) FT-NMR装置(日本電子製、autotunable type、Delta™システム(ver.4.3.2)、16本オートサンプルチェンジャー搭載)にて行った。測定は、核種はプロトン(1H)について行った。多検体の連続自動測定が可能なケモメトリクス用自動測定プログラム(Delta™システムに搭載)を用いて、CPMG スピンエコー測定、400回の積算にてデータ収集した。

(2) NMR計測値の数値化処理とパターン認識の前処理

- データの転送

NMR装置本体のPCよりrawデータ(FIDデータ)を数値化処理専用のPCに転送した。

- Alice2 ver5.5 (JEOL) および Alice2 for Metabolome™ ver1.0 (JEOL) によるパターン認識の前処理、バケット積分処理を行なってスペクトルデータを数値化した。

3. NMR計測値のパターン解析

(1) パターン認識によるデータ解析

Unscrambler X (Camo Japan) 等を用いて主成分分析(PCA)をベースに、PLS-DA、SIMCA法による解析を行なった。

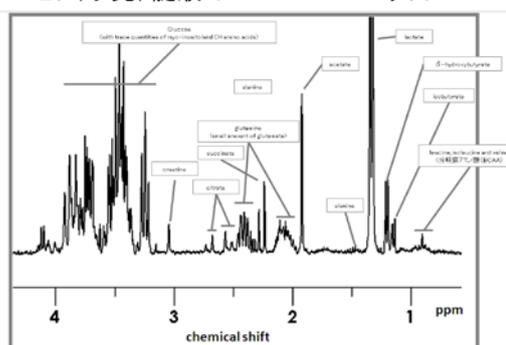
4. 研究成果

本研究に使用する髄液サンプルの内訳

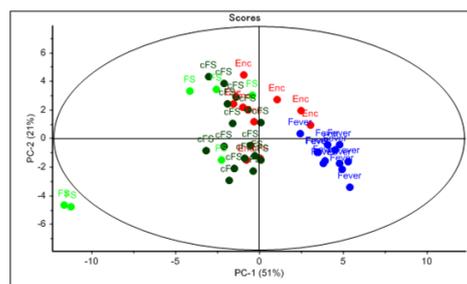
分類	サンプル数
脳症	4
熱性けいれん(複雑型)	9
熱性けいれん(単純型)	9
骨髄炎(細菌性)	10
骨髄炎(ウイルス性)	28
その他の熱性疾患	75
計	135

発熱を伴って日本医科大学付属千葉北総病院救急外来を受診し、入院加療ならびに髄膜炎の鑑別診断が必要と判断された小児から、入院直後(来院後2~3時間以内)に髄液を採取した。期間は2003-2008年、髄液の検体数は計135検体で、サンプルの内訳は表の通りである。

ヒト(小児)髄液の1H NMRスペクトル



ヒト(小児)髄液の1H NMRスペクトルの典型例を示す。



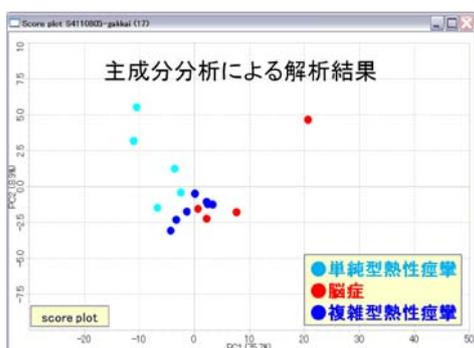
脳症、熱性けいれん(複雑型)、熱性けいれん(単純型)、その他の熱性疾患の1H NMRスペクトルデータの主成分分析による解析結果を示す。図は、主成分1(PC1)と主成分2(PC2)の各データのスコアプロットである。PC1では、「その他の熱性疾患」と「熱性けいれん(単純型および複雑型)」のスコアの相違が、PC2

では「脳症」と「その他の熱性けいれん」のスコアにより、各データがクラスター化されたが、「脳症」と「熱性けいれん」については、オーバーラップするデータがあり、本解析結果のみでは、十分な説明ができなかった。

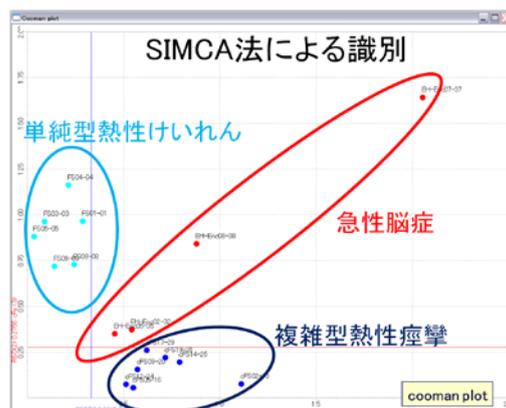
年齢・髄液検査結果

臨床診断	年齢 (y)	髄液細胞数 (/ml)	髄液蛋白量 (mg/dl)	髄液糖量 (mg/dl)
単純熱性けいれん	3.0±2.7	3.6±3.2	21.1±11.3	80.2±15.9
複雑熱性けいれん	2.5±1.7	8.6±10.2	19.0±5.1	76.4±8.2
急性脳症	5.1±3.3	3.2±8.6	17.0±8.8	101.1±29.6

「脳症」、「熱性けいれん（複雑型）」、「熱性けいれん（単純型）」、「その他の熱性疾患」の¹H NMR スペクトルデータの主成分分析による解析では、「脳症」と「熱性けいれん」のデータの特徴抽出が不十分であると考え、「脳症」と「熱性けいれん（単純型および複雑型）」のデータに絞った解析を行うこととした。解析に使用した各疾患データの年齢および一般的髄液検査の結果を表に示す。この表をみてわかるように、一般的髄液検査のみでは、「脳症」、「熱性けいれん（複雑型）」、「熱性けいれん（単純型）」の鑑別は困難である。



「脳症」、「熱性けいれん（複雑型）」、「熱性けいれん（単純型）」の¹H NMR スペクトルデータについて主成分分析を行ったところ、主成分1 (PC1) と主成分2 (PC2) の各データのスコアプロットにおいて、PC1 では、「脳症」と「熱性けいれん（単純型および複雑型）」のスコアの相違が、PC2 では「熱性けいれん（単純型）」と「熱性けいれん（複雑型）」のスコアの相違が観察されたが、「熱性けいれん（複雑型）」と「脳症」は類似したスコアを示すデータが複数あり、両者のデータの相違点をこの解析結果で説明することはできなかった。



次に、各グループの主成分スコアを用いたクラス分類分析 (SIMCA 法) を試みたところ、図の cooman's plot に示すように、¹H NMR スペクトルデータにより、三者の識別が可能となった。

複雑型熱性痙攣と診断された症例の髄液データと臨床所見

case No	年齢	発熱数	蛋白	糖	
12	0.11	3	11	105	痙攣重複1時間続く。ジアゼパム、アレピアチンでとまる。MRI異常なし。
13	4.06	34	15	94	痙攣複数回起こる。痙攣自体は2-3分で、ドルミカムで止まる。
14	1.02	1	14	88	痙攣1時間続く。ジアゼパムにてとまる。
15	1.04	2	21	126	痙攣40分続く。セルシンで止まる。
16	5.03	3	18	72	熱性けいれん5回目、10分続く。
17	4.1	1	17	71	痙攣が1日に4回あり入院。それぞれ30秒くらいの持続。
18	0.05	4			1日2回の熱性けいれん+無熱性けいれん2回、計4回。痙攣は1分と2分。
19	2.03	91	35	122	痙攣40分続く。セルシン、イソゾール、アレピアチンで止まる。RSウイルス感染あり。
20	1.08	4	14	78	痙攣30分続く。セルシンで止まる。
21	0.1	2	13	94	痙攣1時間続く。ジアゼパムにてとまる。
22	2	1	18	99	痙攣30分続く。セルシン、アレピアチンで止まる。
24	1.1	5	27	82	痙攣同日に3回、最後はセルシン使用後に7分の痙攣。
25	4.05	10	27	76	痙攣50分続く。セルシンで止まる。
26	1.07	13	22	66	痙攣同日に3回。
27	1.1	9	20	78	痙攣3回。セルシン使用にもかかわらず起こす。セルシンの静注にて止まる。
28	2.06	6	15	82	痙攣30分、セルシンで止まる。セルシンで止まる。
29	1.08	4	15	79	熱性けいれん30分。
30	2.05	21	114	122	熱性けいれん10分、セルシンで止まる。その後また痙攣。無熱性けいれんもあり10分。
31	1.11	3	16	70	痙攣3分。これは熱性けいれんの方へ。

脳症と診断された症例の臨床所見

case no.	意識障害	脳浮腫 (頭蓋内圧の上昇) CT/MRI所見	全身けいれん (convulsion seizures)	脳波 (slow activity)
23	+	-	+	nd
32	+	+	+	+
33	+	+	-	+
34	+	+	+	nd
35	+	+	+	+
36	+	-	+	nd
37	+	+	+	+
38	+	+	+	nd
50	+	-	+	nd
51	+	-	-	nd
52	±	-	+	+
53	+	-	+	-
54	±	-	-	-

「SIMCA 法」による「脳症」と「熱性けいれん（複雑型）」の識別精度をあげるために、各サンプルの臨床データを詳細に見直すことにした。

急性脳症（重症型）を1）下肢の麻痺の後遺症がある、2）意識障害の後遺症がある、3）難治性のおてんかんの後遺症がある、4）死亡した、のいずれかと定義した。

熱性けいれん（複雑型）は、1）持続時間が15分以上、2）焦点性発作、3）24時間で2回以上繰り返す、のいずれかを満たすものと定義した。

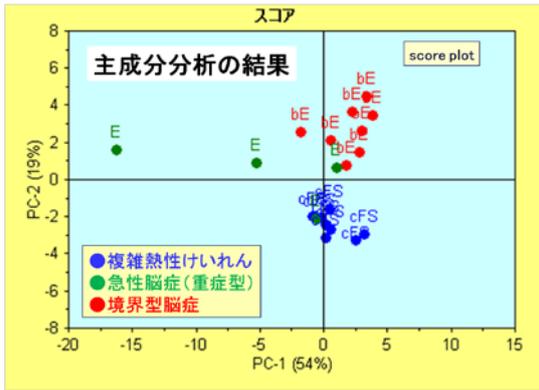
すると、「境界型脳症」とでも呼べる、「急性脳症」と同じ所見を呈するが予後が良好で、「熱性けいれん（複雑型）」とは脳浮腫があ

る、遷延するけいれんを止めるのに多剤による治療を要したなどの相違点を持つ、あらたな病型の存在が示唆された。

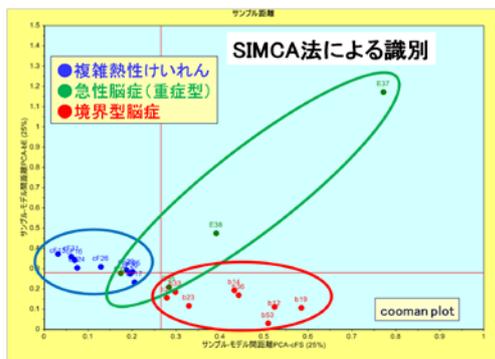
年齢・髄液検査の結果

あらたな分類	年齢 (y)	髄液細胞数 (/ml)	髄液蛋白量 (mg/dl)	髄液糖量 (mg/dl)
複雑型熱性痙攣 (n=9)	2.5+/-1.7	8.6+/-10.2	19.0+/-5.1	76.4+/-8.2
急性脳症 (重症型) (n=4)	5.1+/-3.3	3.2+/-8.6	17.0+/-8.8	101.1+/-29.6
境界型脳症 (仮称) (n=8)	1.8+/-1.8	5.5+/-3.7	21.0+/-8.8	97.0.0+/-23.3

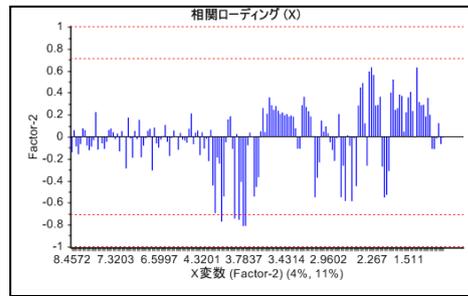
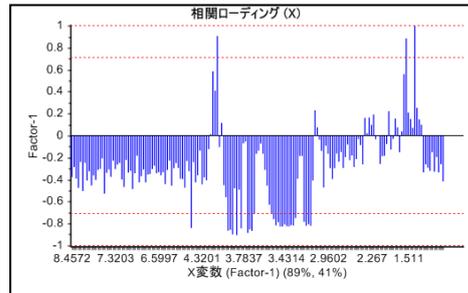
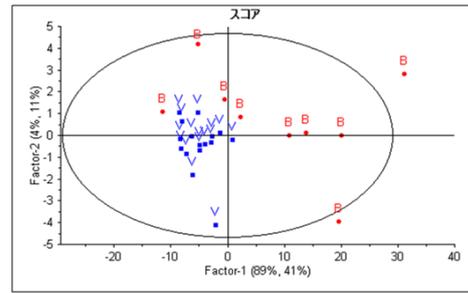
そこで、「急性脳症（重症型）」「熱性けいれん（複雑型）」「境界型脳症（仮称）」の三群にグループ分けし、あらためて解析を行うこととした。解析に使用した各群の年齢および一般的髄液検査の結果を表に示す。この表をみてわかるように、一般的髄液検査のみでは、「急性脳症（重症型）」「熱性けいれん（複雑型）」「境界型脳症（仮称）」の鑑別は困難である。



「急性脳症（重症型）」「熱性けいれん（複雑型）」「境界型脳症」の¹H NMR スペクトルデータについて主成分分析を行ったところ、主成分1（PC1）と主成分2（PC2）の各データのスコアプロットにおいて、「境界型脳症」の¹H NMR スペクトルデータは、「脳症」「熱性けいれん（複雑型）」とは異なる特徴を持つことが示唆された。



そこで、「急性脳症（重症型）」「熱性けいれん（複雑型）」「境界型脳症」各グループの主成分スコアを用いたクラス分類分析（SIMCA法）を試みたところ、図の cooman's plot に示すように、¹H NMR スペクトルデータによって、「境界型脳症」をひとつの病型として分類できる可能性が示された。



次に「細菌性髄膜炎」と「ウイルス性髄膜炎」を本技術で識別可能かどうかを検討した。

各群の¹H NMR スペクトルデータを主成分分析した結果、主成分1（PC1）と主成分2（PC2）のスコアプロットでは、「ウイルス性髄膜炎」のサンプルはプロット上で明らかなクラスター化が認められ、「細菌性髄膜炎」についても、PC2では類似のスコアを持つことが観察された。今後、「細菌性髄膜炎」サンプルについて、PC1への寄与度の高い¹H NMR スペクトルデータ成分と臨床データとの関連等を詳細に検討することにより、¹H NMR スペクトルデータの主成分スコアを用いた両者の識別は十分可能と思われた。

本課題は「核磁気共鳴法を用いた小児熱性疾患の早期鑑別診断法の開発」という極めて

特化した内容になっているが、本研究で得られた結果は、今後さまざまな医学領域で多種多様な疾患の鑑別診断や予後予測に応用できる基盤技術となるであろう。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (発表確定) (計 1 件)

発表者名：小池 薫

発表標題：複雑な混合物における変化や異常の検出を可能とする新規診断技術

学会等名：BIOtech 2013 第 12 回 国際バイオテクノロジー展/技術会議 アカデミックフォーラム

発表年月日：2013 年 05 月 08 日～2013 年 05 月 10 日

発表場所：東京ビッグサイト (東京)

[産業財産権] (計 1 件)

名称：混合物試料の属性を識別する方法及び装置

発明者：小池薫・平川慶子・大野曜吉・浅野健・森山剛・森川秀行・村木秀樹

権利者：京都大学・日本医科大学・東京工芸大学・株式会社ユニフローズ

種類：特許

番号：特願 2012-157593

出願年月日：2012 年 07 月 13 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 薫 (KOIKE KAORU)

京都大学 医学 (系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号：10267164

(2) 研究分担者

平川 慶子 (HIRAKAWA KEIKO)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号：30165162

(3) 連携研究者

西山 慶 (NISHIYAMA KEI)

京都大学 医学 (系) 研究科(研究院)

講師

研究者番号：90447970

浅野 健 (ASANO TAKESHI)

日本医科大学 医学部 准教授

研究者番号：30165162

大野 曜吉 (OHNO YOUKICHI)

日本医科大学 医学 (系) 研究科(研究院)

教授

研究者番号：70152220

藤野 修 (FUJINO OSAMU)

日本医科大学 医学部 教授

研究者番号：50173448