

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15271

研究課題名(和文) 血清と尿のNMRデータを用いた発熱原因の予測

研究課題名(英文) Inferring the cause of fever using NMR data obtained from serum and urine

研究代表者

森 智治 (Mori, Tomoharu)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：10725922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、発熱を主訴に救急外来を受診する患者から血清を採取してNMR計測し、我々独自の手法を用いて信号処理とデータ解析を行うと、得られたデータと原因疾患との間に関連を見出すことができるかどうかを検討することであった。ラット血漿を用いて検証した結果、本法は発熱等に伴う血清の変化を鋭敏にとらえ得ることが判明した。課題期間中に患者血清を解析するには至らなかったが、今後は臨床研究を本格的に始動する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study serum and urine samples were collected in the emergency room from the patients whose chief complaint was fever. Firstly NMR data obtained from rat plasma samples were analyzed by our original signal processing method. The purpose of this study was to ascertain if any relation was detected between the results we acquired and the cause of fever. This pilot study revealed that our method was useful to sensitively find out the change in the property of serum. The NMR measurement and subsequent analysis of human serum samples are ready to start in the near future.

研究分野：救急医学

キーワード：核磁気共鳴 発熱 敗血症 パターン認識

## 1. 研究開始当初の背景

外来受診患者の発熱原因を特定することは、初期診療にあたる医師にとって困難な場合がある。とりわけ発熱を主訴として救急外来を受診する患者においては、夜間・休日に利用できる緊急検査だけでは発熱原因を特定できないことが多い。疾患の病初期で特異的な症状に乏しい段階では、診断の難度は高くなり、経時的に患者の容態を観察して、やっと確定診断にいたる場合もある。もし、より早期に発熱原因が特定できれば、発熱原因に的を絞った適切な治療が早期から始められる。

我々は最近、生体試料の計測値を「ひとつのデータとして一括処理する」解析技術を開発した(特願 2012 - 157593 号、特願 2013 - 255181 号)。本技術では、従来のように検体中の個々の物質を同定・定量するのではなく、計測値全体を単一データとして診断指標とするため、検体から得られるすべての情報を活用できる。我々はこの手法を用いて、小児臨床では早期の鑑別がむずかしい急性脳症と熱性けいれん(複雑型)において、発症直後に採取した患児の髄液を本手法により解析し、両者を識別することに成功した(Pediatr Res. 2015 Jan;77(1-1):70-4)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、発熱を主訴に救急外来を受診する患者から血清や尿を採取し、我々が独自に開発した「NMR (nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴)計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」と、救急外来受診時の患者の血清データや尿データと発熱原因疾患名との間に関連を見出すことが可能かどうかを検討し、将来的には「原因の特定が難しい発熱疾患に対する早期診断、治療方針の決定」に役立つ新しい臨床検査法の開発を目指すことであった。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象

京都大学医学部附属病院救急外来、および神戸市立医療センター中央市民病院救急外来を受診した 20 歳以上の患者で、救急受診時に体温 38 度以上の発熱を認め、発熱原因が決定可能である症例を対象とした。本人もしくは代諾者より同意が得られない場合は研究より除外した。

### (2) 検体

救急受診時に対象者から採取した血液および尿検体の残余を使用した。

### (3) 検体の前処理・保存など

被験者より採取した血清・尿は、遠心分離により細胞成分等の不溶成分を除去し、-80 に保存した。

本研究を開始するにあたり、まず最初に、従来我々が髄液や細胞抽出液を対象に行ってきた手法が、血清・血漿に適用可能かどう

かを検証した。臨床検体は貴重であるため、予備的検討の目的で、動物から得られた血漿を用いて以下の実験研究を行った。

### (4) 敗血症モデルの作成/検体収集

SD ラットを用いた。LPS (E. coli 0111:B4, SIGMA) を 2 mg/kg または 10 mg/kg 腹腔内投与し、敗血症病態を作成した。対照群には等量の生理食塩水を投与した。投与 6 時間後にイソフルレン麻酔下に血漿を採取し、液体窒素で直ちに凍結後、-80 で保存した。

### (5) NMR 測定試料の調整

#### 血漿について

解凍した血漿に、内部ロック用重水およびケミカルシフト確認用内部標準物質を加え、ガラス性 NMR 試験管に入れた。

### (6) NMR 計測

NMR 装置は 7 テスラ (300MHz) FT-NMR 装置 (JEOL) にて行った。

測定は、核種はプロトン ( $^1\text{H}$ ) 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を用いて、CPMG 法による測定を行った。それぞれの積算回数は 400 回を標準とした。

### (7) NMR 計測値の数値化処理

#### 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。

#### NMR データの数値化処理

Alice2 ver5.5 (JEOL) を使って、フーリエ変換、位相補正、ベースライン補正等の通常の NMR スペクトルデータ処理を行った。観測周波数範囲の信号強度分布としてデータを数値化し、前処理を行った上で CSV 形式にて保存した。

### (8) パターン認識による NMR データ解析

Unscrambler<sup>®</sup> ver10.4.1 (CAMO) を使用して、主成分分析 (PCA) によるデータの可視化を行った後、PLS-DA 法による解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 生理食塩水を投与したラット血漿から得られた NMR スペクトルの観察

生理食塩水を投与したラット 1、2、3、4 から得られた血漿の NMR スペクトルを表示した (図 1)。

(2) LPS2 mg/kg を投与したラット血漿から得られた NMR スペクトルの観察

LPS2 mg/kg を腹腔内投与したラット 5、6、7、8、9 から得られた血漿の NMR スペクトルを表示した (図 2)。

(3) LPS10 mg/kg を投与したラット血漿から得られた NMR スペクトルの観察

LPS10 mg/kg を腹腔内投与したラット 10、11、12 から得られた血漿の NMR スペクトルを表示した (図 3)。

図 1 生理食塩水

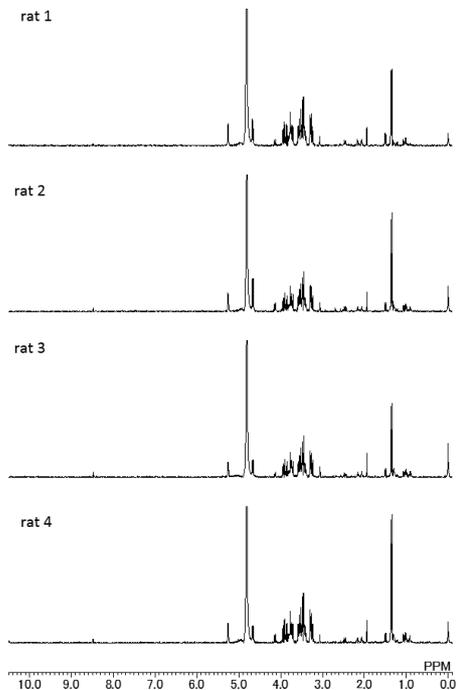


図 2 LPS 2mg/kg

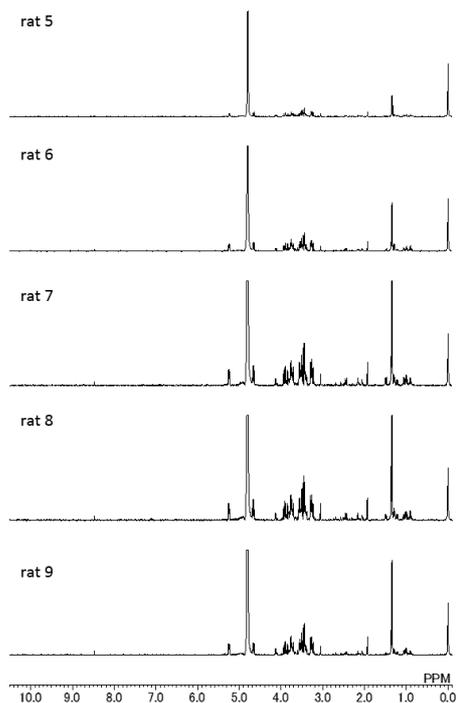
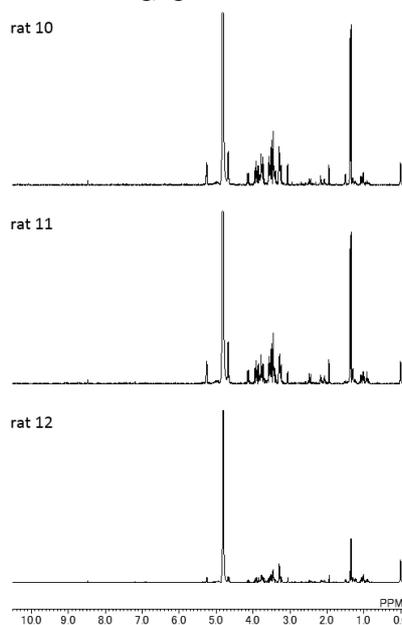


図 3 LPS 10mg/kg



スペクトルを目視にて概観したが、生理食塩水、LPS2 mg/kg、LPS10 mg/kg による効果の違いを識別するのに役立つスペクトルの特徴は見出せなかった。

#### (4) PCA 法によるデータの可視化

生理食塩水、LPS2 mg/kg、LPS10 mg/kg を投与したラット血漿から得られた NMR スペクトルに対して、我々独自の信号処理を行った後に、PCA 法を用いて解析した結果を示す。主成分 1、主成分 3 についてのスコアプロット(図 4)ならびにローディングプロット(図 5, 6)を表示した。

図 4 PCA スコアプロット

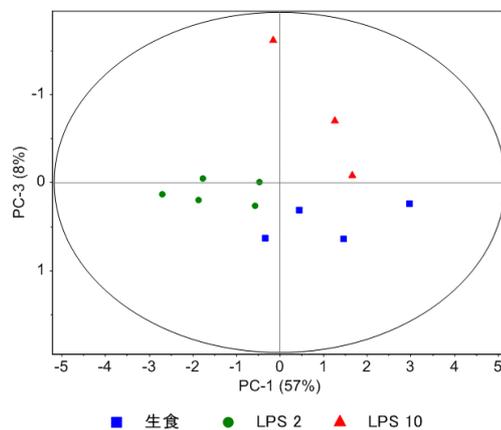


図 5 PCA ローディングプロット (主成分1)

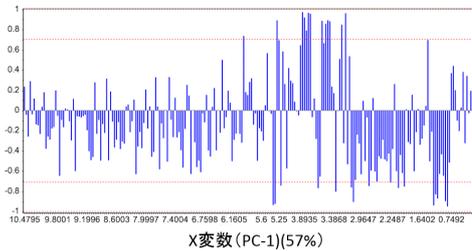


図 6 PCA ローディングプロット (主成分3)

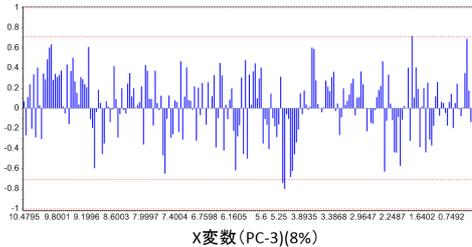


図 8 PLS-DAローディングプロット (因子1)

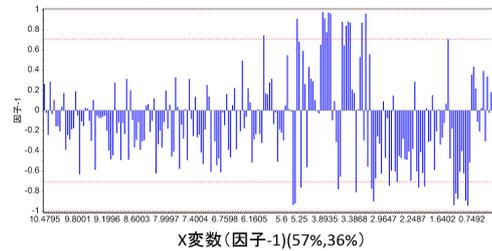
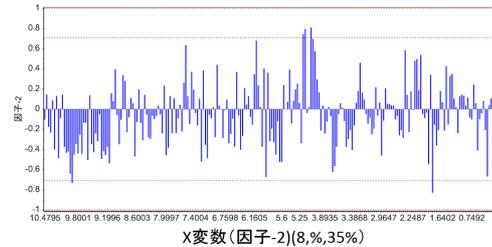


図 9 PLS-DAローディングプロット (因子2)

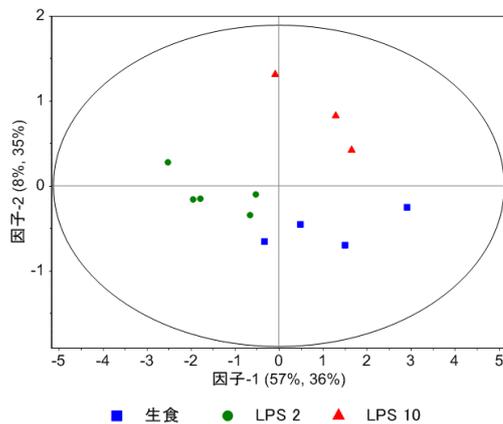


各プロットは実験グループ毎にスコアプロット上で集簇した。また、主成分 1、3 で各群を識別することが可能であった。

( 5 ) PLS-DA 法による解析

生理食塩水、LPS2 mg/kg、LPS10 mg/kg を投与したラット血漿から得られた NMR スペクトルに対して、我々独自の信号処理を行った後に、PLS-DA 法を用いて解析した結果を示す。因子 1、因子 2 についてのスコアプロット( 図 7 ) ならびにローディングプロット( 図 8,9 ) を表示した。

図 7 PLS-DA スコアプロット



各プロットは実験グループ毎にスコアプロット上で集簇した。また、因子 1、2 で各群を識別することが可能であった。

( 6 ) まとめ

本研究の目的は、発熱を主訴に救急外来を受診する患者から血清や尿を採取し、我々が独自に開発した「NMR ( nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴 ) 計測し、パターン認識によるデータ解析を行う」と、血清や尿データと発熱原因疾患名との間に関連を見出すことが可能かどうかを検討することであった。

本研究を開始するにあたり、我々が従来、髄液や細胞抽出液を対象に行ってきた手法が、血清・血漿に適用可能かどうかを調べるために、まずラット血漿を用いて検証した。ラット血漿から得られた NMR スペクトルに我々独自の信号処理を行い、PCA 法ならびに PLS-DA 法を用いて解析を行ったところ、本法は、LPS 投与量の違いから生じる血漿の変化を鋭敏にとらえ得ることが判明した。

一方、臨床研究に関しては、倫理委員会の承認を得、血清検体ならびに臨床データの収集体制を構築し、実施の準備は整えたものの、本法を患者血清に適用するまでには至らなかった。今後は、臨床研究を本格的に始動する予定である。

また、本課題研究では CPMG 法を用いたデータ計測を行ったが、本法はメタボロミクス等で多用される、血清・血漿中の低分子代謝物を対象とした測定法である。我々は現在、シングルパルス法を導入し、検体中に存在するすべての物質を対象とするデータ解析法を開発中である。

5. 主な発表論文等  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 智治 (MORI Tomoharu)  
京都大学・医学研究科・医員  
研究者番号：10725922

(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) 研究分担者

小池 薫 (KOIKE Kaoru)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：10267164

(4) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO Norio)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：30409205

(5) 研究分担者

鈴木 崇生 (SUZUKI Takao)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：40328810

(6) 研究分担者

金涌 佳雅 (KANAWAKU Yoshimasa)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80465343