

平成30年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15663

研究課題名(和文)核磁気共鳴データのパターン認識解析による敗血症関連脳症の予後予測法の開発

研究課題名(英文)Development of method of predicting prognosis for sepsis-associated encephalopathy using pattern recognition analysis of nuclear magnetic resonance data

研究代表者

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

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)：LPS(リポポリサッカリド)を腹腔内投与して作製した敗血症モデルラットから採取した脳脊髄液を、7テスラ(300MHz)FT-NMR装置(JEOL)を用いて、プロトン(1H)NMR計測し、そのNMRスペクトルをパターン認識した。Single pulseのスペクトルデータを部分二乗最小回帰により解析したが、対照群(生理食塩水の投与)、LPS2群(LPS2mg/kg投与)そしてLPS10群(LPS10mg/kg投与)を識別することはできなかった。一方、T2スペクトルデータを解析した結果、LPS2群とLPS10群が識別できる可能性が示唆された他、上3群も一定程度クラスター化されたことが観察された。

研究成果の概要(英文)：We collected cerebrospinal fluid from rat septic models, following sepsis induction by intraperitoneal administration of LPS (lipopolysaccharide). Then, the cerebrospinal fluid sample was subjected to proton (1 H) NMR measurement using a 7 tesla (300 MHz) FT-NMR apparatus (JEOL). We pattern-recognized this NMR spectrum and spectral data of a single pulse was analyzed by partial least squares regression (PLS-DA). The NS group (control group; administered physiological saline), LPS 2 group (administered 2 mg/kg LPS), and LPS 10 group (administered 10 mg/kg LPS) could not be clustered on the score plot. However, results from the analysis of the T2 spectrum data by PLS-DA suggested that there was a possibility of distinguishing between the LPS 2 and 10 groups. We confirmed that these three groups were clustered on the score plot to a certain extent.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 敗血症関連脳症 脳脊髄液 NMR

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症関連脳症の課題

敗血症では、しばしば意識障害などのびまん性脳機能障害を発症することがある。これは、細菌等の微生物の中枢神経系への侵入により発症する脳炎での意識障害とは異なり、敗血症の本態たる感染による全身性炎症反応の結果としての臓器障害の1つと考えられ、敗血症関連脳症 (sepsis-associated encephalopathy) あるいは敗血症性脳症 (septic encephalopathy)、敗血症関連譫妄 (sepsis-associated delirium) などとも呼称されている。

敗血症関連脳症の特徴としては、敗血症による脳以外の臓器不全が先行することも多く、その神経症状として、易刺激性による譫妄、見当識障害、興奮あるいは昏睡といった多種多様な症状がみられる。一方、痙攣や巣症状の発症頻度は少ないとされる。

また、本脳症は多くの場合、敗血症の改善と共に軽快するが、近年、敗血症治癒後も長期にわたって認知機能等の障害が遷延する例が指摘され、敗血症診療の課題のひとつとして注目されている。

しかし、現状ではどのような症例で認知機能障害が遷延するかを予測することは困難である。このような現状において、どの敗血症症例で脳症が遷延化するか、敗血症急性期の段階で予測可能とする臨床検査法の開発が望まれている。

(2) 敗血症ラットから発症早期に採取した髄液で、敗血症関連脳症の発症予測、早期診断が可能となれば、敗血症関連脳症に対する早期治療が可能となり、治療効果への改善のほか、長期認知機能障害の予防が可能となるかもしれない。とくに意識障害を呈する患者に対しては、敗血症の他髄膜炎等の疾患を確実に除外するため、当該患者の髄液を採取することが多く、検体試料の活用応用性という点も含めて、十分に臨床応用可能な技術となり得ると予想される。

そして、臨床の現場で、長期認知機能障害発生予測が可能となれば、敗血症の神経予後改善に有効な新規薬剤の開発につながる可能性がある。また、敗血症に由来する認知機能障害の病態生理、発生機序の解明への第一歩になる可能性もある。

(3) ところで、我々はこれまでに、生体試料の分析値を「ひとつのデータとして一括処理する」解析技術を開発している。この技術は、従来のように試料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、サンプルから得られるすべての情報を活用できるという利点がある。

本研究では、NMR 分析データの従来のなスペクトル解析の手法に加えて、この我々独

自の手法についても、検証を行い、髄液からの敗血症早期診断の可能性について検討することが期待された。

2. 研究の目的

本研究で我々は、LPS 投与による敗血症病態ラットモデル動物における髄液等の試料を、NMR 分析し、そのデータを多変量解析の手法で分析することで、敗血症による変化ならびに敗血症の重症度の違いを、同サンプルにおいて検出できるかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルの作成/検体収集

本研究の実験動物としては、S-D ラット (週齢 7-8 週) を用いた。飼育室で馴化後、敗血症モデルとして LPS (E. coli 0111:B4, SIGMA) を 2 mg/kg または 10 mg/kg 腹腔内投与した 2 群 (LPS2、LPS10) に割り当てた。また対照群 (NS) として、等量の生理食塩水を腹腔内投与した群もそれぞれ割り当てた。

LPS もしくは生理食塩水の腹腔内投与から 6 時間後にイソフルレン麻酔下に髄液・脳組織を採取し、それぞれの検体を液体窒素で直ちに凍結後、-80 で保存した。

(2) NMR 測定試料の調整

髄液 (抽出分離しない) 解凍した髄液に、内部ロック用重水を加え、ガラス性 NMR 試料管に入れた。

脳組織 (抽出分離する) クロロフォルム・メタノール・水等の混合溶媒による遠心抽出 (Centractor™、ユニフローズ製使用) で二層に分離後、上層 (水・メタノール層) と下層 (クロロフォルム・メタノール層) をそれぞれ分取、溶媒を除去後の残渣について抽出分離しない場合と同様の処理を行った。

(3) NMR 計測

NMR 装置:

7 tesla (300MHz) FT-NMR 装置 (JEOL)

測定核種:

プロトン (^1H)

多検体の連続自動測定が可能なケモトリクス用自動測定プログラムを用いて、次の 2 種の異なる測定を行った。それぞれの積算回数は 400 回を標準とした。

水信号消去 1 次元測定

低分子量の成分や高分子の両成分が重なって検出できる。

CPMG スピンエコー測定

主として低分子量の成分が検出できる。

(4) 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)を用いて、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、CSV形式にて保存した。

(5) 多変量解析

パターン認識によるNMRデータ解析ソフトウェアを用いたソフトウェアおよび解析手法と結果の検証についてのソフトウェアとして、Unscrambler[®] ver10.3 (CAMO)を使用した。

主成分分析(PCA)によるデータの可視化を行った後、PLS-DA法にて、解析した。

各解析で得られた結果については、クロスバリデーションによる検証・評価を行った。

4. 研究の成果

(1) 敗血症モデルの作成/検体収集

動物実験はいずれも成功裡に完了した。本解析に用いた各群の匹数は、LPS2群4匹、LPS10群5匹、NS群4匹であり、それぞれ髄液や脳組織を採取した。

(2) NMRスペクトル

Fig.1は、それぞれSingle pulseとT2の代表的なNMRスペクトルを示す。

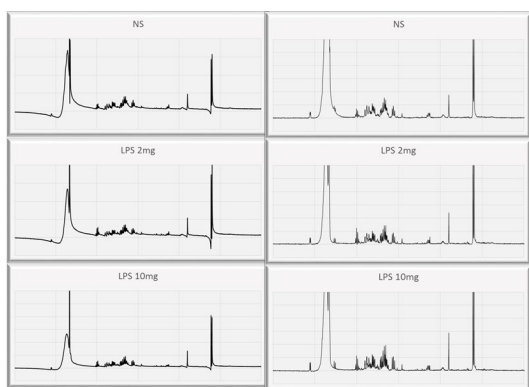


Fig.1 NMRスペクトル

左はSingle pulseスペクトル、右はT2スペクトル、上段は上図はNS群、中段はLPS2群、下段はLPS10群の代表的なラット髄液のデータを示す。横軸は0~6Hzの範囲を示す。

各群のラットから採取された髄液は、極少量であるため、計測が難渋したが、ラット髄液に最適な計測パラメータを探索した結果、いずれのサンプルも無事計測を完了することができた。

Single pulseとT2のスペクトルのいずれ

も、各群に特徴的なピークを肉眼的に指摘することは困難であり、多変量解析による分析が必須であると認められた。

(3) 多変量解析

上記NMRスペクトル(Single pulseとT2)について、数値データとして取り込み、UnscramblerにてPCA、PLS-DA、PCRの多変量解析を実施した。以下に、PLS-DAによる代表的な解析結果を提示する。

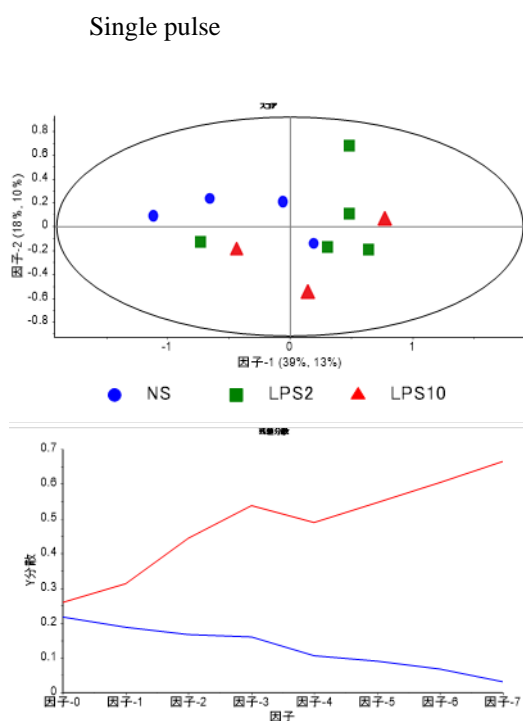


Fig.2 NMRスペクトル(Single pulse)の解析結果

この図は、部分二乗最小回帰(PLS-DA)の結果を示す。

上図はスコアプロットであり、青丸はNS群、緑四角はLPS2群、赤三角はLPS10群のラット個体を示す。

下図は因子毎のY分散であり、青線はcalibrationデータ、赤線はvalidationデータを示す。

Single pulseのスペクトルデータで、PLS-DAを実施したが、スコアプロット上でNS群、LPS2群そしてLPS10群ごとの明確なクラスター化は観察されなかった。決定係数は0.023(calibrationデータ)であり、validationデータについては決定係数が算出されなかった。

このことから、本動物モデルの髄液に関するSingle pulseスペクトルデータから敗血症モデルの識別は困難であることが示唆された。

T2

次に、T2 スペクトルの解析結果を Fig.3 に示す。

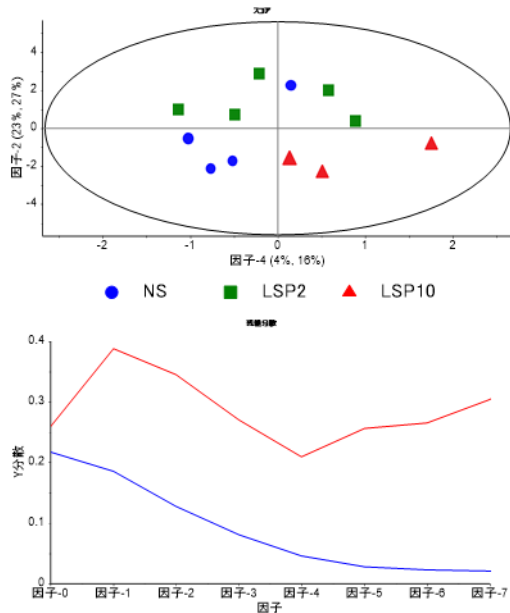


Fig.3 NMR スペクトル(T2)の解析結果
 この図は、部分二乗最小回帰 (PLS-DA) の結果を示す。
 上図はスコアプロットであり、青丸は NS 群、緑四角は LPS2 群、赤三角は LPS10 群のラット個体を示す。
 下図は因子毎の Y 分散であり、青線は calibration データ、赤線は validation データを示す。

T2 のスペクトルデータで PLS-DA による解析を実施したところ、スコアプロット上、因子 2 と因子 4 で、群ごとの一定程度のクラスター化が観察された。すなわち、因子 2 が負で因子 4 が正の領域で LPS10 のラットが、因子 2 が正の領域で LPS2 のラットが、因子 2 と因子 4 が負の領域で NS のラットがクラスター化していた。ただし、NS ラット 1 匹が LPS2 の領域にプロットされており、群ごとの完全なクラスター化には至っていない。

Y 分散の値は、calibration データ上、因子 4 で最小の値であり、決定係数についても 0.894 (calibration データ) 0.559 (validation データ) であり、多変量解析モデルとしては、Single pulse データよりは改善されていると考えられる。

T2 スペクトルのデータだけでは、現状、髄液からの敗血症発症の有無を識別することはまだまだ困難ではある。しかし、LPS の投与量に応じた敗血症モデルの重症度を識別できる可能性は指摘できるかもしれない。このことから、敗血症の重症度の診断可能性については、今後、十分検討するに値すると思われる。

また T2 スペクトルの解析結果で一定程度の成果が得られたが、このことは、髄液中の低分子成分が、NS 群、LPS2 群、LPS10 群の識別に関与している可能性が示唆される。

- (4) 今後の課題
- 本研究では髄液試料を計測・解析した。今後は血漿試料や脳組織も解析対象に加えることで、実臨床への応用・発展可能性を広げると共に、敗血症脳症の病態解析や長期認知機能障害の発生予測に関する研究の一助になると期待された。
 - 本研究では NMR スペクトルを解析の対象としたが、我々が独自に開発した NMR データの分析方法を、今後本格的に適用することが可能となろう。特に、T2 スペクトルデータでは、一定程度のクラスター化に成功していることから、敗血症モデルラットの識別に十分な成果が得られることが期待できる。

5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
 (雑誌論文)(計 0 件)
 (学会発表)(計 0 件)

- (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：
 出願年月日：
 国内外の別：

- 取得状況 (計 0 件)
 名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

(その他) なし

6. 研究組織
- (1)研究代表者
 鈴木 崇生(SUZUKI, Takao)
 京都大学・医学研究科・研究員
 研究者番号：4 0 3 2 8 8 1 0
- (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：3 0 1 6 5 1 6 2

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

佐藤 格夫(SATO, Norio)
愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：30409205

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

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし