

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670760

研究課題名(和文) 質量分析を用いた小児急性脳症の早期鑑別診断法の開発

研究課題名(英文) Development of early diagnostic method that differentiates pediatric acute encephalopathy using mass spectrometry

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

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。小児の「急性脳症」と「熱性痙攣(複雑型)」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、これまでに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。本研究では、発症直後に患児から採取した脳脊髄液について得られたプロテオミクス用MS(質量分析)データについて、本技術を用いて解析を行ったところ、「急性脳症」「熱性痙攣(単純型)」「熱性痙攣(複雑型)」の三者を識別しうる結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In children, it is difficult to distinguish "febrile seizure" from "acute encephalopathy" in the early phase. Our technique using proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectra could differentiate cerebrospinal fluid (CSF) obtained from patients with acute encephalopathy, complex febrile seizures and simple febrile seizures. In the present study, we used our technique, analyzed CSF mass spectrometric (MS) data in the similar way and acquired a reasonable result. This technique proved to be a novel signal processing method that comprehensively handles the signal of electromagnetic waves obtained from complex mixture.

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：集中治療医学

1. 研究開始当初の背景

小児救急の日常臨床において、「急性脳症（インフルエンザ脳症を含む）」と「重症熱性痙攣（複雑型）」を受診直後に鑑別することはむずかしく、入院後の臨床経過に加えて、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、後日確定診断に至ることが多い。我々は、患児から来院後2～3時間以内に採取した髄液を用いてNMR計測し、パターン認識によるデータ解析を行ったところ、「急性脳症」「熱性痙攣（複雑型）」を世界で初めて早期鑑別することに成功した。

一方、我々は、当該技術がNMR以外のデータ解析にも適用できるのではと考え、予備的検討として、髄液を質量分析（MS）し、パターン認識によるデータ解析を行ってみたところ、本技術は「MS計測値」にも応用可能であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、患児から来院直後に採取した髄液をMS（質量分析）計測し、パターン認識によるデータ解析を行うと、両疾患を鑑別することが可能か、を検討した。

3. 研究の方法

① 患者の選択と髄液検体について

2003-2008年に発熱を伴う痙攣症状で日本医科大学附属千葉北総病院救急外来を受診し、入院加療が必要と判断された患児から、入院直後（来院後2～3時間以内）に髄液検体を採取した。

その後、患者毎に髄液の細胞数、糖、蛋白等を調べ、血液生化学検査データ、画像所見、痙攣の有無（時間、回数）、予後などの臨床情報を精査し、最終的に急性脳症と熱性痙攣と診断された髄液サンプルを本研究に使用した。

② MSデータセットについて

本研究では、以下の手順に従って、プロテオミクス用に加工した髄液MSデータセット（CSV形式）を使用した。

使用した質量分析装置は、ProteinChip SELDI System（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）である。チップはQチップ（strong anion exchange surface）を用いた。各髄液を50 mM Tris-HCl, pH 8.0で10:1に希釈し、60分間、チップ上で固着後、pH8の洗浄バッファー（50 mM Tris-HCl, pH 8.0）で洗浄後、乾燥、energy absorbing molecule (EAM)として飽和シナピン酸、50%アセトニトリル、5%トリフルオロ酢酸を用いた。測定には外部標準として human angiotensin I (1296.5 Da), Fibrinopeptide B (1570.6 Da), porcine Dynorphin A [209-225] (2147.5 Da), human ACTH[1-24] 2933.5 Da, human β -endorphin [61-91] 3465.0 Da, bovine insulin (5733.6 Da), bovine Ubiquitin (8564.8 Da), bovine cytochrome-C (12230.9 Da), bovine superoxide dismutase (15591.4 Da), equine myoglobin (16951.5 Da), bovine β -lactoglobulin A (18363.3 Da), horseradish peroxidase (43240.0 Da), bovine albumin (66410 Da), chicken conalbumin (77490.0 Da) bovine IgG (147300.0 Da)を用いた。得られたデータを ProteinChip Data Manager software version 3.0 (Bio-Rad). の Export Raw Spectra のプログラムにより CSV ファイルにて抽出した。

③ パターン認識によるデータ解析

◇ ソフトウェア：本研究では、我々のNMRデータ解析で、ケモメトリクス解析で実績のある Unscrambler[®] ver10.2 (CAMO) を使用した。

◇ データの前処理：計測データの正

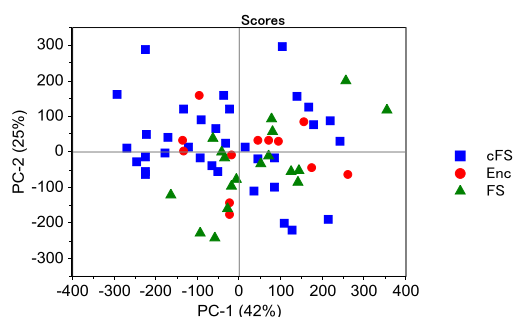
規化・中心化などの解析前処理を行った。

◇ 多変量解析と検証：本研究では、主成分分析（PCA）によるデータの可視化を行った後、PLS-DA 法による解析を行い、クロスバリデーションによって結果を検証した。

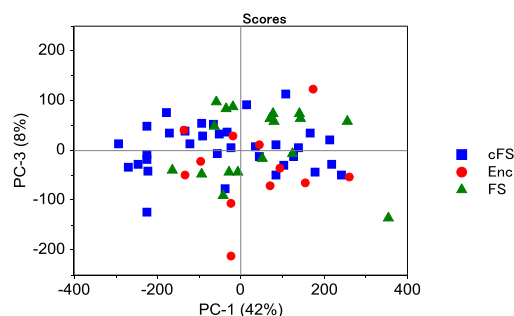
4. 研究成果

脳症（Enc）、熱性痙攣（複雑型）（cFS）、熱性痙攣（単純型）（FS）のMSデータの解析結果を示す。

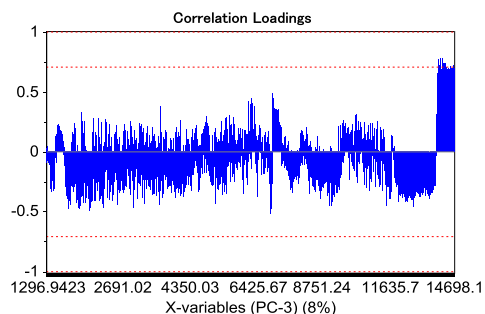
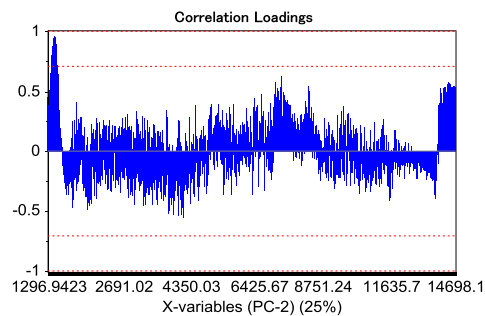
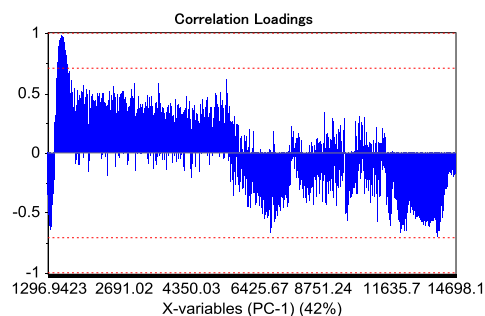
① 主成分分析の結果（データの可視化）



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。



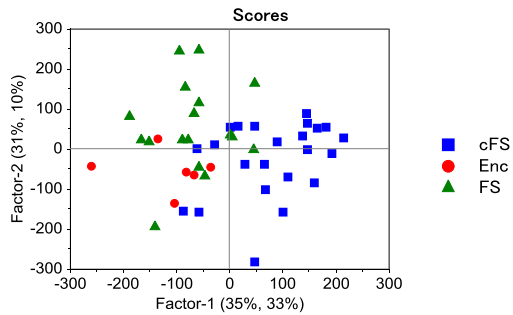
主成分 1（PC1）と主成分 3（PC3）の各データのスコアプロットである。



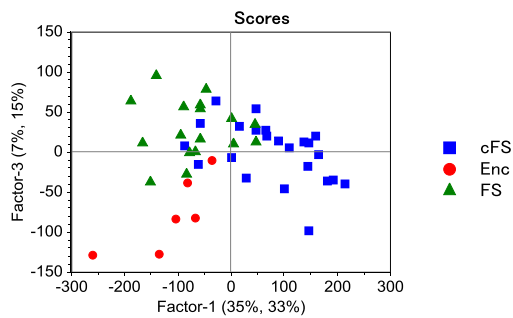
主成分 1（PC1）、主成分 2（PC2）および主成分 3（PC3）のローディングプロットである。

「脳症」、「熱性けいれん（複雑型）」、「熱性けいれん（単純型）」のMSデータについて主成分分析を行ったところ、主成分 1（PC1）、主成分 2（PC2）、主成分 3（PC3）のいずれを用いても、「脳症」と「熱性けいれん（単純型）」、「熱性けいれん（複雑型）」の差異を説明しうる結果が得られず、それぞれの疾患を特徴づける因子となりうるローディング値の特定も困難であった。

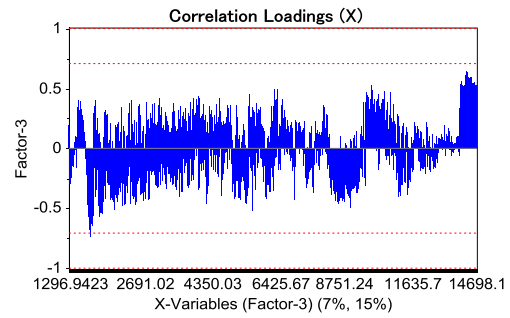
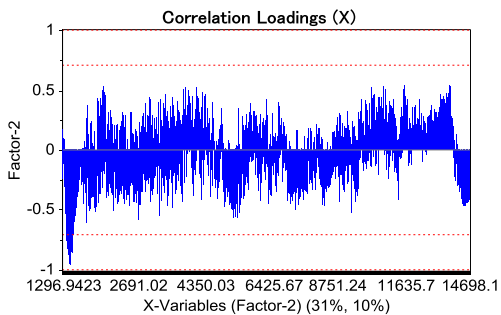
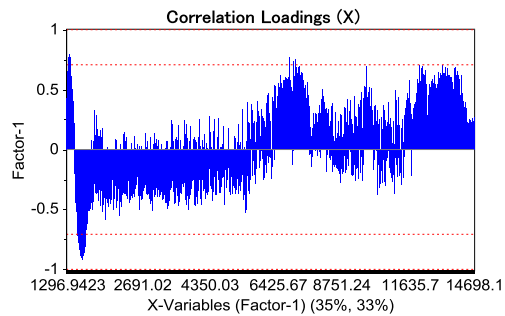
② PLS-DA の結果 (クラス分類)



ファクター1とファクター2によるスコアプロットである



ファクター1とファクター3によるスコアプロットである



ファクター1、ファクター2およびファクター3のローディングプロットである。

「急性脳症」「熱性けいれん (単純型)」「熱性けいれん (複雑型)」のMSデータについて三者の識別を目的として、PLS-DA法による解析を行ったところ、ファクター1では、「熱性けいれん (複雑型)」と他の二群が、ファクター3では、「急性脳症」と「熱性けいれん (単純型)」が正負の異なるスコアを持つことから、ファクター1とファクター3をつかかって、三者を識別できる可能性が示唆された。

今後、PLS-DAのローディングデータと、プロテオミクスの解析結果の関連を調べるとともに、髄液の他のデータおよび患者の臨床所見等を考慮した解析を進めることにより、「急性脳症」患者の髄液に特異的に含まれる物質群の同定につながる成果が挙げられるものと期待される結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

[その他]

(発表 1 件、発表確定 1 件、計 2 件)

発表者名：小池 薫

発表標題：「複雑な混合物」の属性を識別する技術

学会等名：イノベーションジャパン 2013 大学見本市&ビジネスマッチング

発表年月日：2013 年 08 月 29 日～2013 年 08 月 30 日

発表場所：東京ビッグサイト（東京）

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 2014 第 13 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：2014 年 05 月 14 日～2014 年 05 月 16 日

発表場所：東京ビッグサイト（東京）

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

森山 剛 (MORIYAMA TSUYOSHI)

東京工芸大学 工学部 准教授

研究者番号：80449032

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