



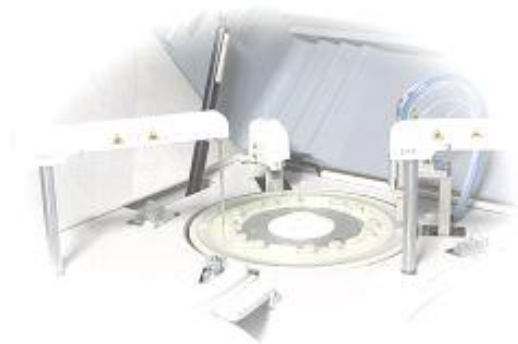
これからの自動分析装置は？

2006/12/03

海ほたるセミナー

日本電子株式会社

JEOL



BioMajesty® Series Line-up

JEOL



New

JCA-BM6010
800TPH/ELA600TPH



New

JCA-BM6050
1200TPH/ELA600TPH



JCA-BM2250
1800TPH/ELA600TPH



New

JCA-BM8040
4800TPH/ELA1800TPH



JCA-BM9030
1200TPH for HbA1c



New

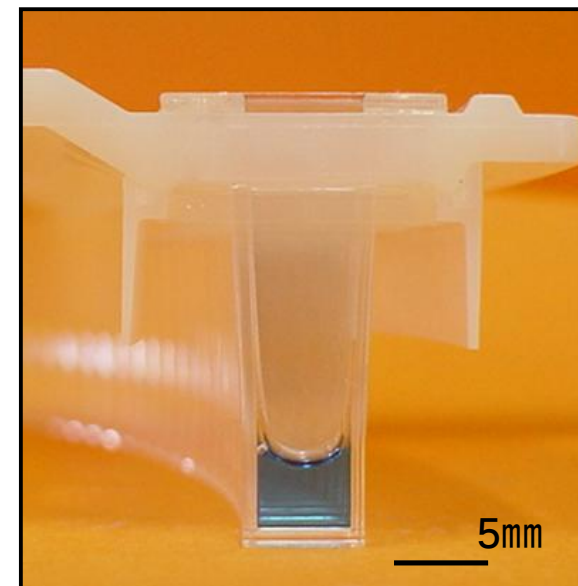
JCA-BM9020
1200TPH for HbA1c

BioMajesty®躍進の理由



微量

- | 試薬費用削減 同一試薬包装使用で 1/2~1/5
- | 採血量削減、採血管本数削減
- | コントロール費用削減 2/3~1/2
- | 水道使用量、純水装置カラム費用削減
- | 廃液量削減、環境汚染削減

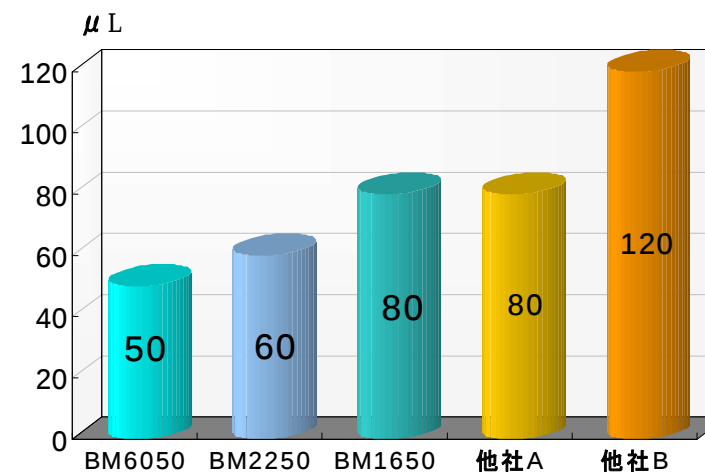


高速

- | 装置台数削減
- | 報告時間短縮
- | Latex試薬、薬物専用機削減、BMへ搭載変更

省スペース

- | 高処理能力、省スペース

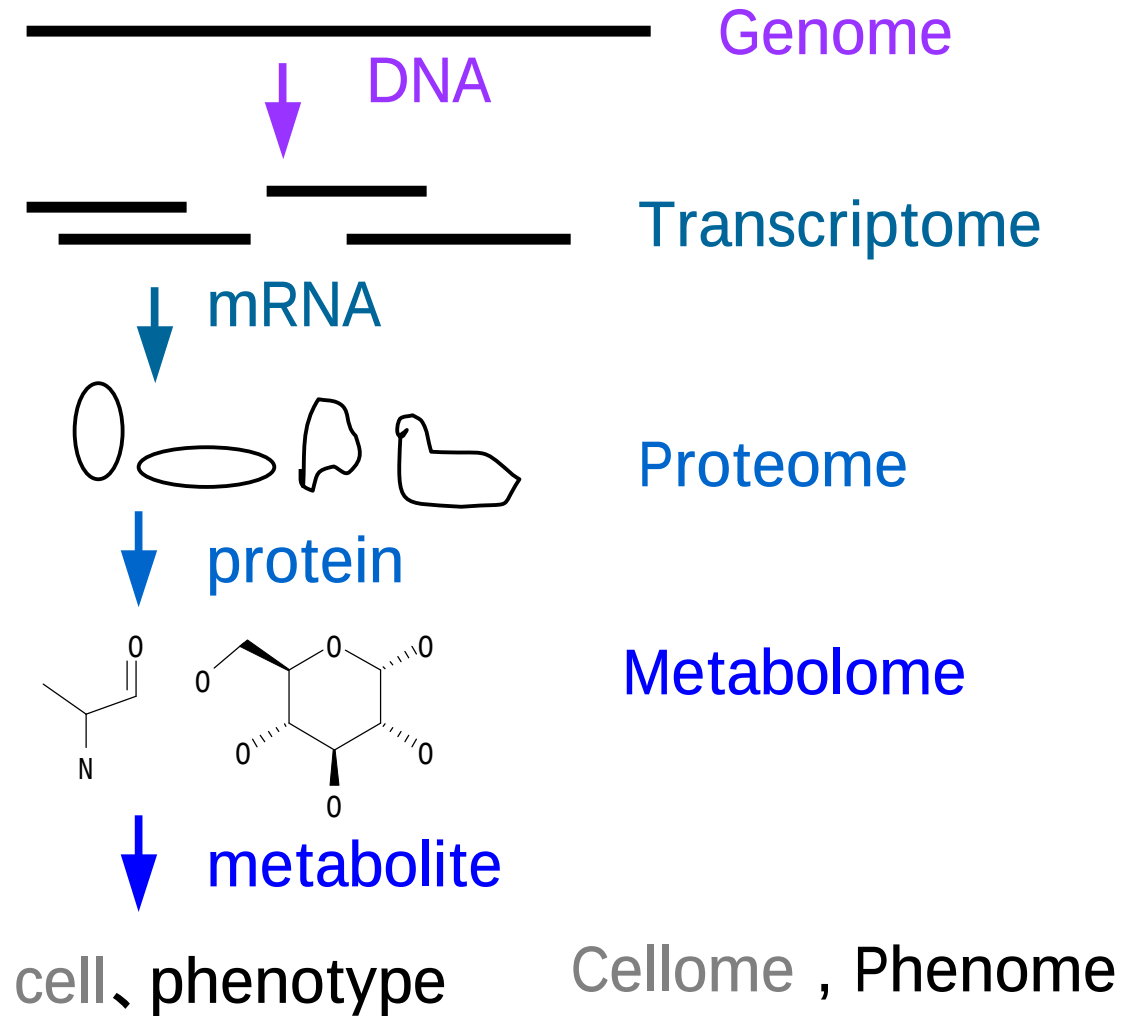


質量分析(MS)を用いた診断マーカー探索 (メタボロミクスを中心に)

内容

- 様々なOmics研究
- メタボロミクスとは
- メタボロミクスではどのように分析をする
- バイオマーカー探索例(花粉症アレルギー)
- まとめ

様々なOmics研究

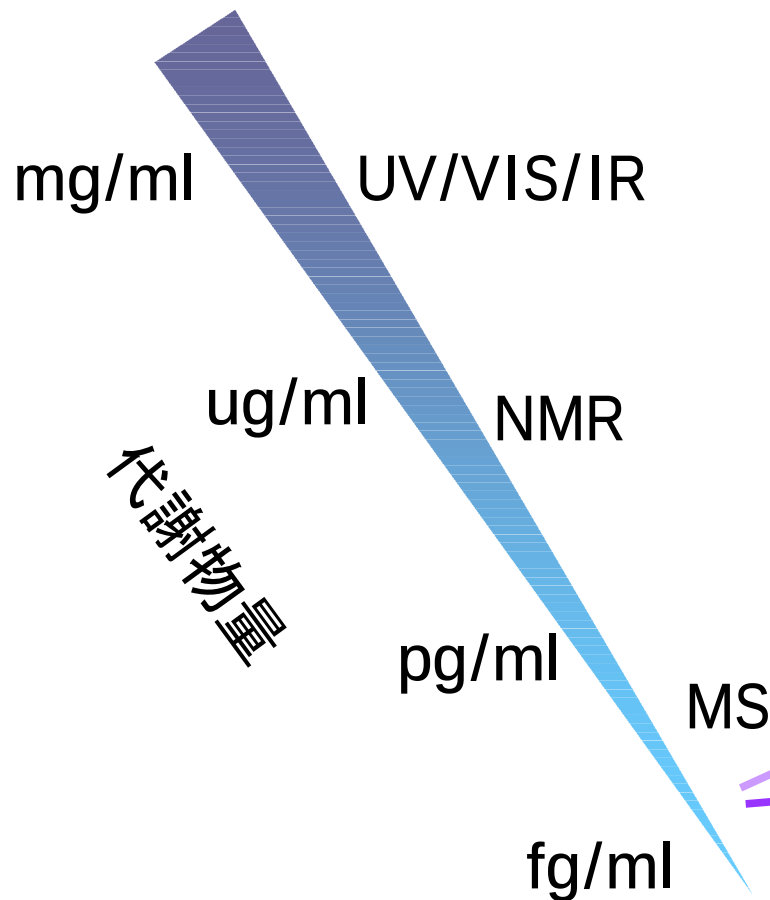


遺伝因子から環境、因子も加味した結果である表現型までを一貫して扱う必要がある

メタボロミクスとは



- 細胞や生体内の代謝物の網羅的解析
- 実用に向けた研究として臨床診断、病因解析、品種解析、など
- 非/低侵襲の分析が可能 (vs 生検)

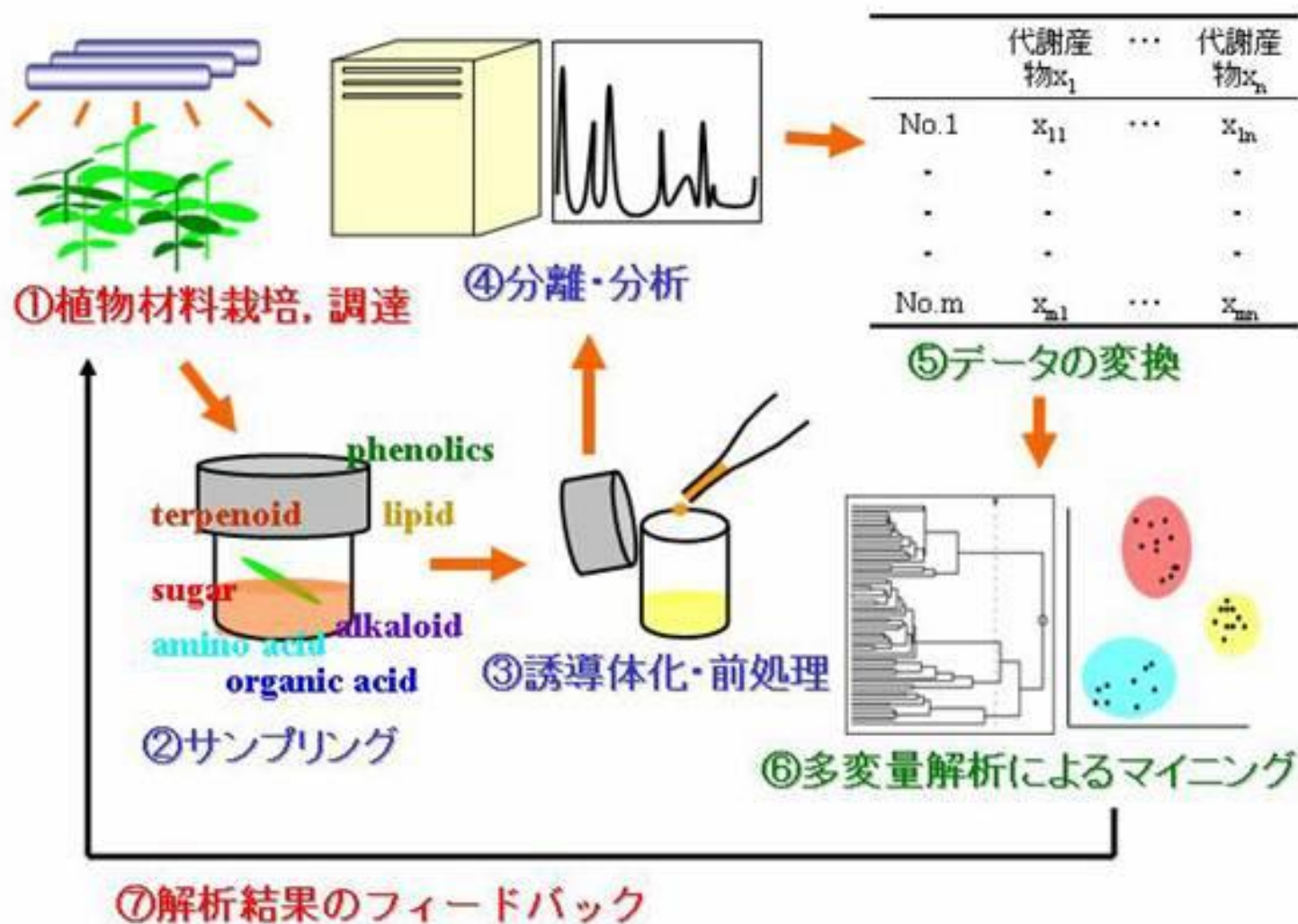


メタボロミクスの要求に応えるためには**高感度**で**定量的**な取り扱いの出来る分析機器が必要

個別診断/医療

疾患病因解析

メタボロミクスの技術要素



質量分析装置



- 網羅的探索には、**スペクトル感度**の高い装置が有利、
- 質量分解能(**精度**)が高いほうが高い定性能力
- 高速分析によりハイスループット化(多検体処理)



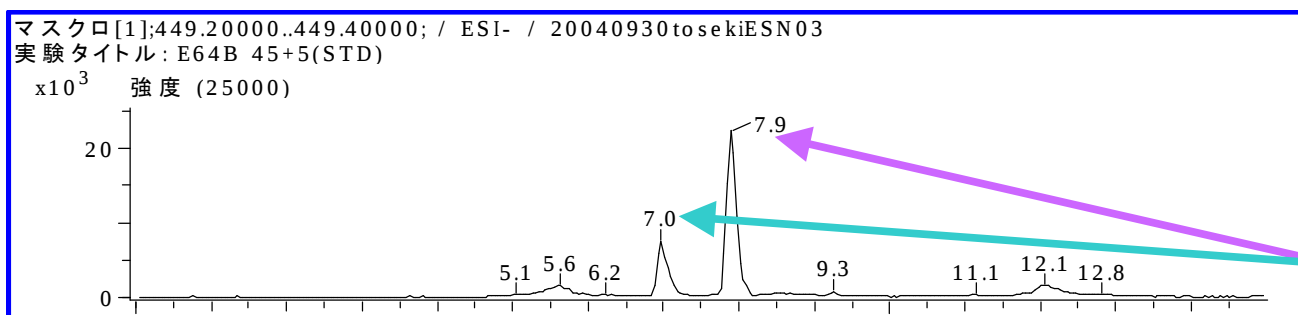
- 飛行時間型(TOF)が有利
 - 高分解能
 - 高質量精度
 - 高速データ取り込み



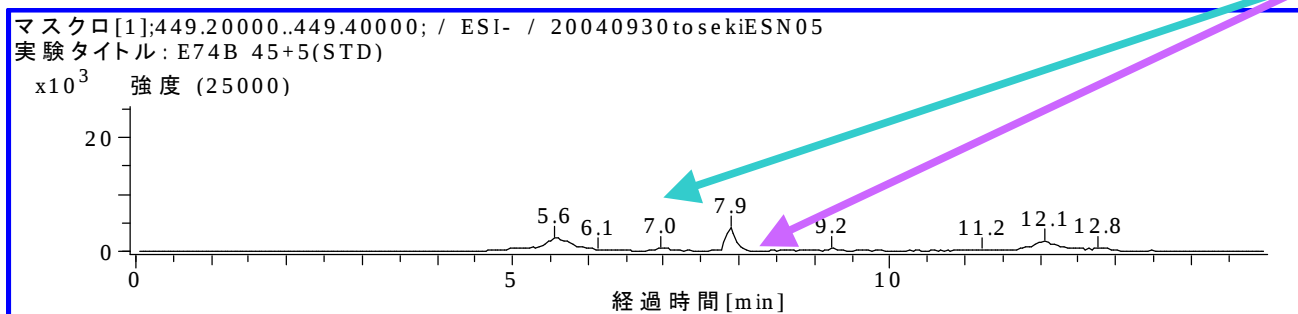
JMS-T100LP

Metabolite Profilingの考え方 JEOL

- 混合系にある代謝物を分離(HPLC、MS、NMRなど)
- 分離されたピークを定量的に扱えるようにする
- サンプル間の違いを比較



tR=7.0、7.9のピーク
面積の違いに注目



臨床応用を目指した Metabolomics

1. 健常人との比較による疾病マーカーの探索
2. 疾病マーカーによる(早期)診断
3. マーカーの同定、疾病の発症機構解明
4. 早期診断情報からの予防法の開発
5. 創薬、新規治療法の開発

花粉症患者の血漿を 用いた比較解析



- オフシーズン(10月)の血漿試料を用いて健常人と(スギ)花粉症患者の代謝物の比較を行った
- 花粉症患者8名、健常人8名
- アレルギー重症度を診断基準で選別
- 他の生化学的手法との相関も同時に調べた

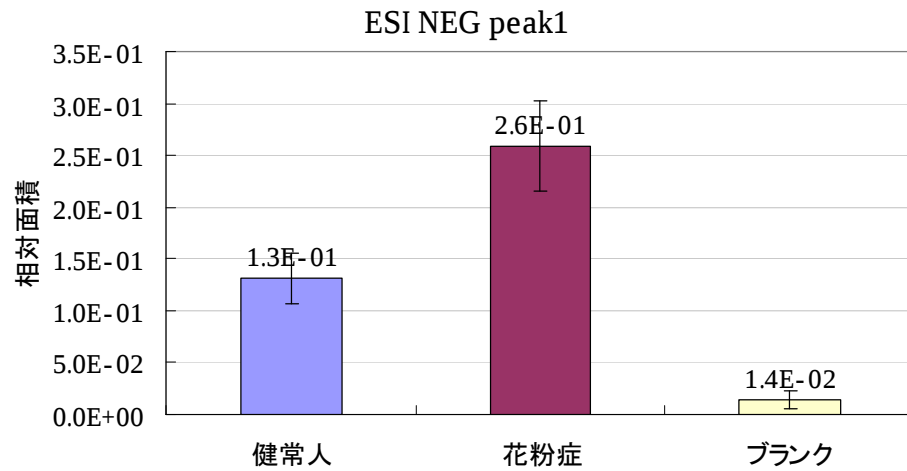
結果

健常人、花粉症患者の分析結果から、正イオン測定で2成分(112ピーク中)、負イオン測定で2成分(135ピーク中)が健常人と統計的に有意差ありと判定された

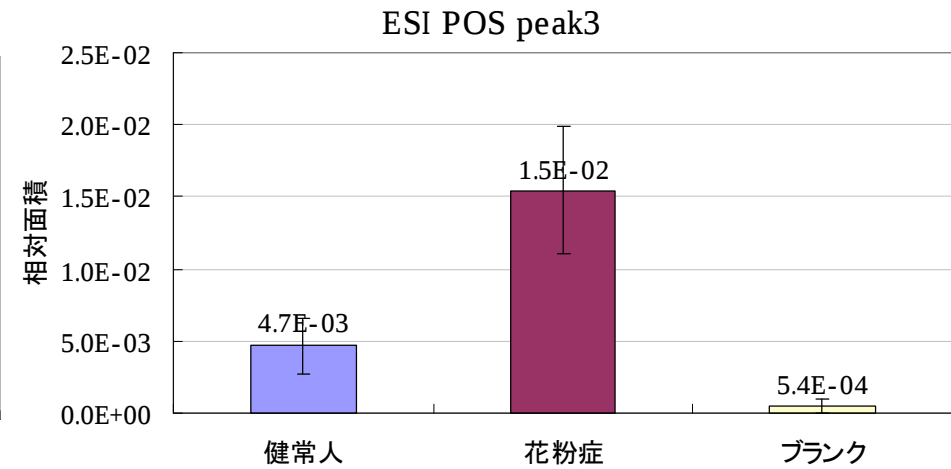
Table 2. Comparisons between pollinosis patients and healthy volunteers

ESI Pos	P<0.05	ESI Neg	P<0.05
High level for patients	2	High level for patients	1
High level for volunteers	0	High level for volunteers	1
n.s.	110	n.s.	133
Total	112	Total	135

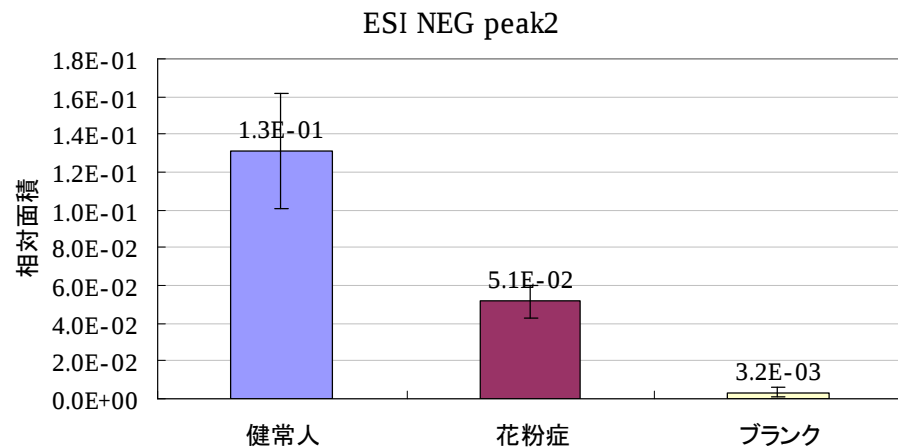
結果



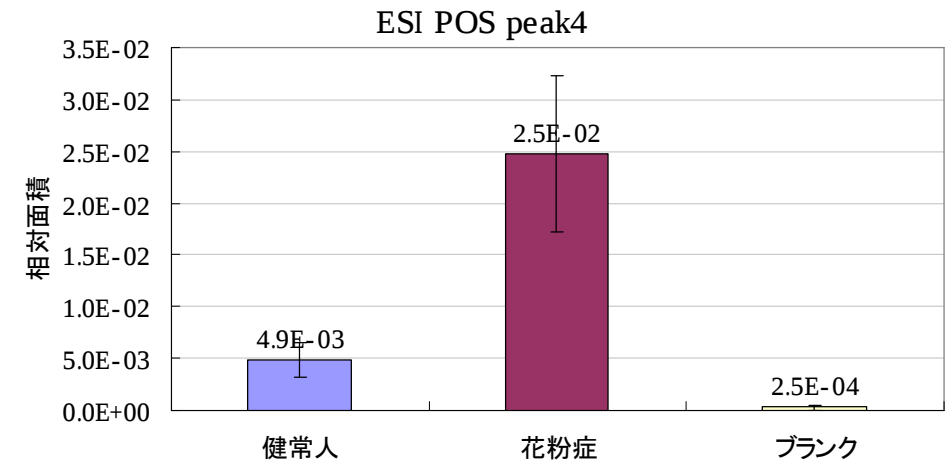
Peak9N



Peak4P



Peak14N



Peak5P

Figure 2. 4 compounds with significant differences ($P < 0.05$)

結果

得られたバイオマーカー候補と以下の指標との相関を調べた

- 有意差のあったピーク間
- 顆粒球の産生するラジカル量
- ヒスタミン遊離率
- IgE量
- アレルギー重症度診断(0, 1, 2, 3の4段階)

Table 4. Explanation of correlation coefficient

相関係数の解釈	
相関係数の絶対値	解釈
0.0～0.2	ほとんど相関関係がない
0.2～0.4	やや相関関係がある
0.4～0.7	かなり相関関係がある
0.7～1.0	強い相関関係がある

有意差のあった4ピーク間の相関

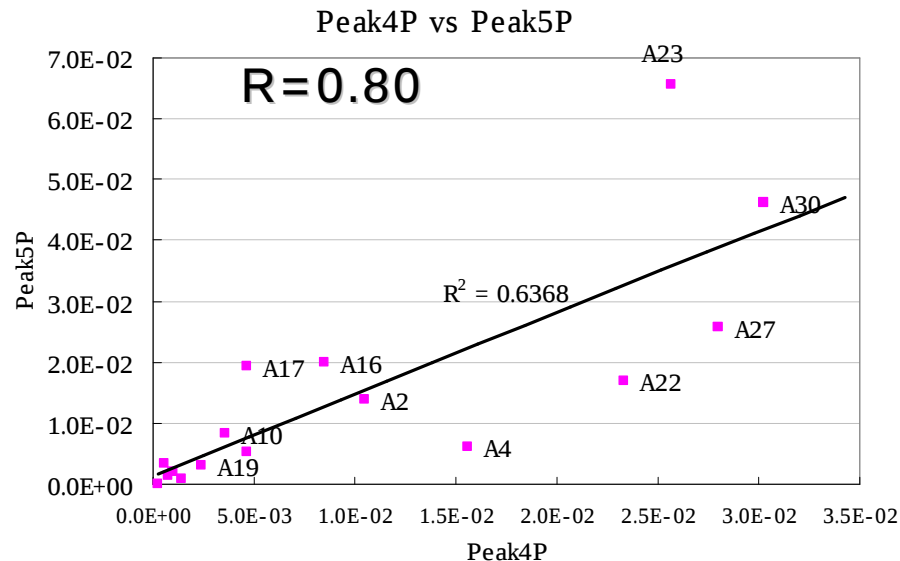


Figure 3. Peak4P VS Peak5P

Table 5. Coefficient of correlation in 4 peaks

	Peak4P	Peak5P	Peak9N	Peak14N
Peak4P				
Peak5P	0.80			
Peak9N	0.12	0.037		
Peak14N	-0.51	-0.37	-0.30	

- Peak4PとPeak5Pの間に強い相関関係がみられた
- Peak14Nは他の3成分と負の相関がみられた

ヒスタミン遊離率との相関関係

ヒスタミン遊離率は、抗原刺激後の白血球懸濁液
上清ヒスタミン濃度と総ヒスタミン濃度の比率

$$\text{遊離率} = (\text{上清濃度}) / (\text{上清濃度} + \text{細胞破碎液濃度})$$

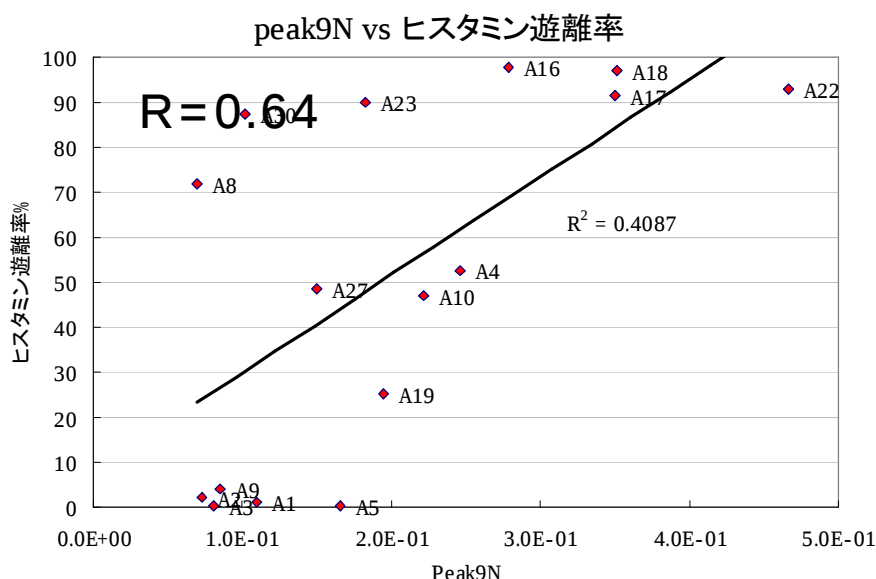


Table 7. Correlation coefficient for rate of free histamine in serum and *m/z* peaks

x	y	r^2	r
peak4P	ヒスタミン遊離率	0.18	0.43
peak5P	ヒスタミン遊離率	0.25	0.50
peak9N	ヒスタミン遊離率	0.41	0.64
peak14N	ヒスタミン遊離率	0.073	-0.27

Figure 7. Peak9N VS Rate of free histamine

全てのピークに何らかの相関があるように思われる

IgE量との相関関係

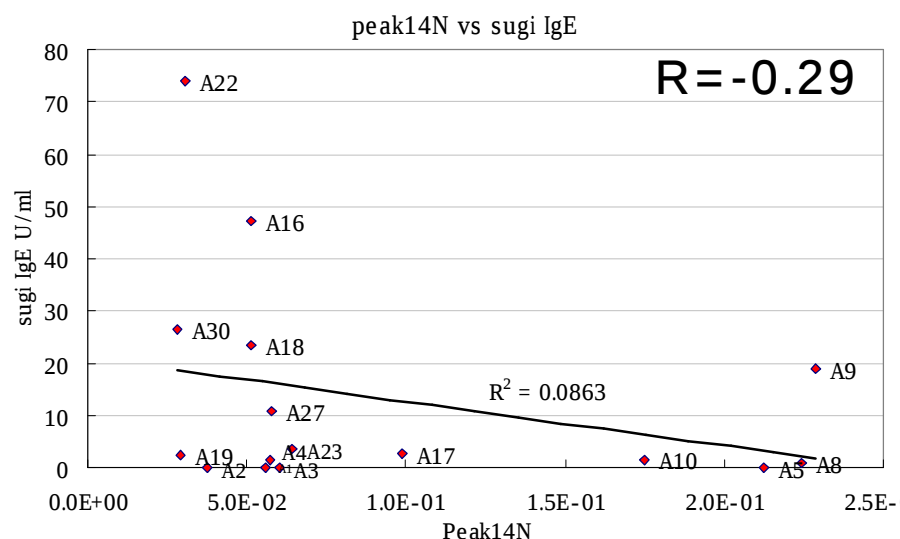


Figure 8. Peak14N VS IgE

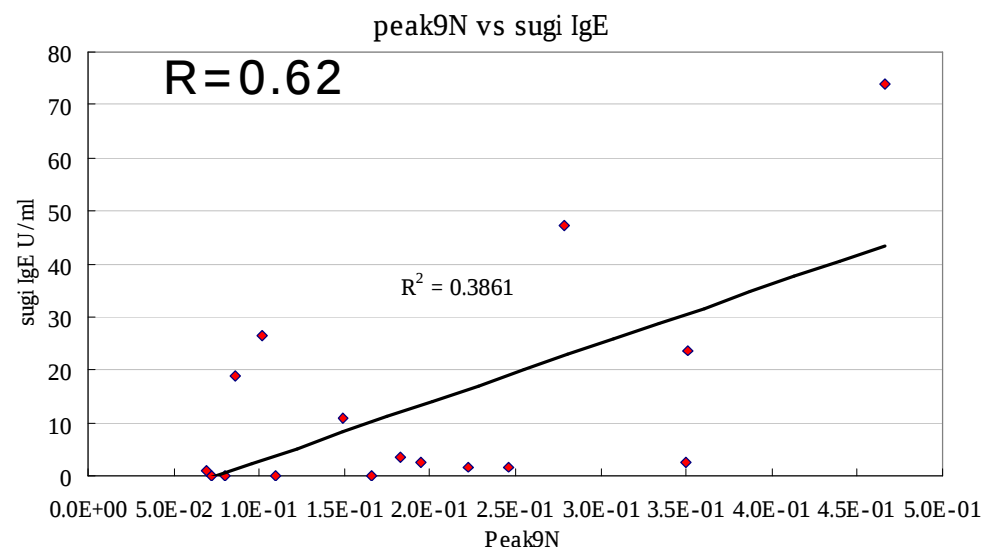


Figure 9. Peak9N VS IgE

- Peak9Nは比較的強い相関を示している
- Peak14Nは2段階で負の相関があるように思われる

Table 8. Correlation coefficient for IgE production and m/z peaks

x	y	r^2	r
peak4P	sugi IgE	0.14	0.37
peak5P	sugi IgE	0.024	0.15
peak9N	sugi IgE	0.39	0.62
peak14N	sugi IgE	0.086	-0.29

アレルギー重症度診断との 相関関係

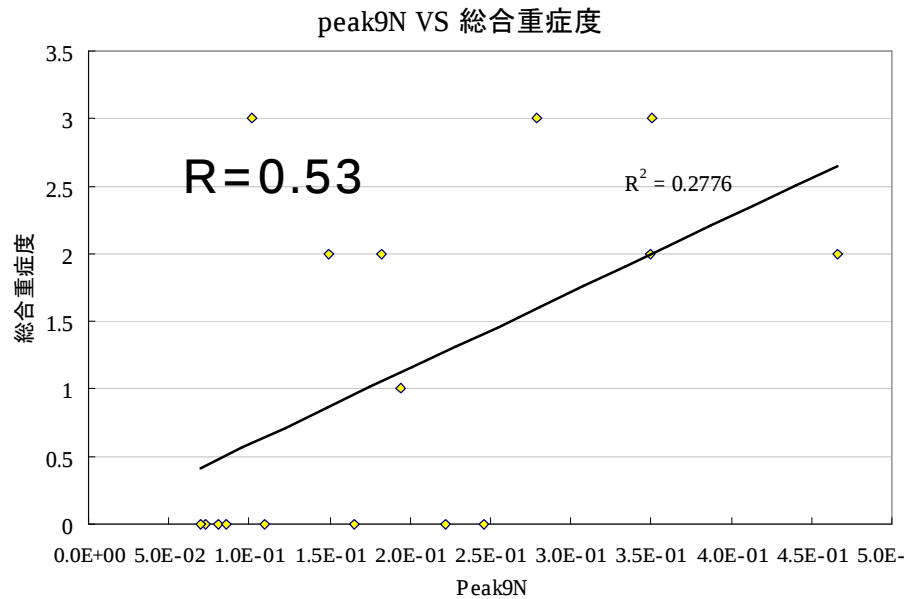


Figure 10. Peak9N VS Severity

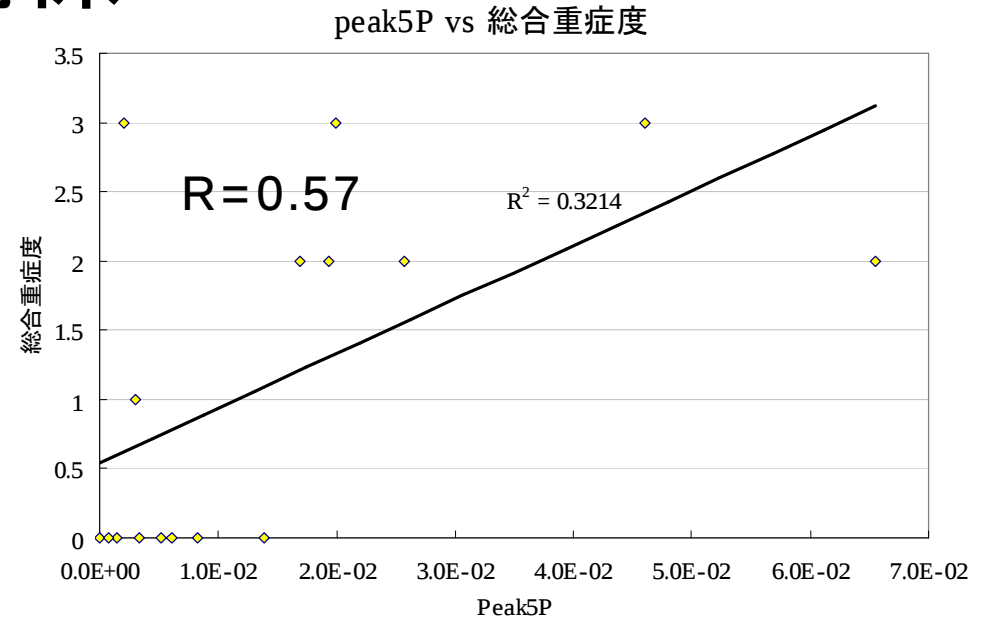


Figure 11. Peak5P VS Severity

Table 9. Correlation coefficient
for severity and m/z peaks

x	y	r^2	r
peak4P	severity	0.26	0.51
peak5P	severity	0.32	0.57
peak9N	severity	0.28	0.53
peak14N	severity	0.27	-0.52

- 全てのピークに相関があるように思われる
- 相関の程度に大きな違いはない

Correlation for cytokines

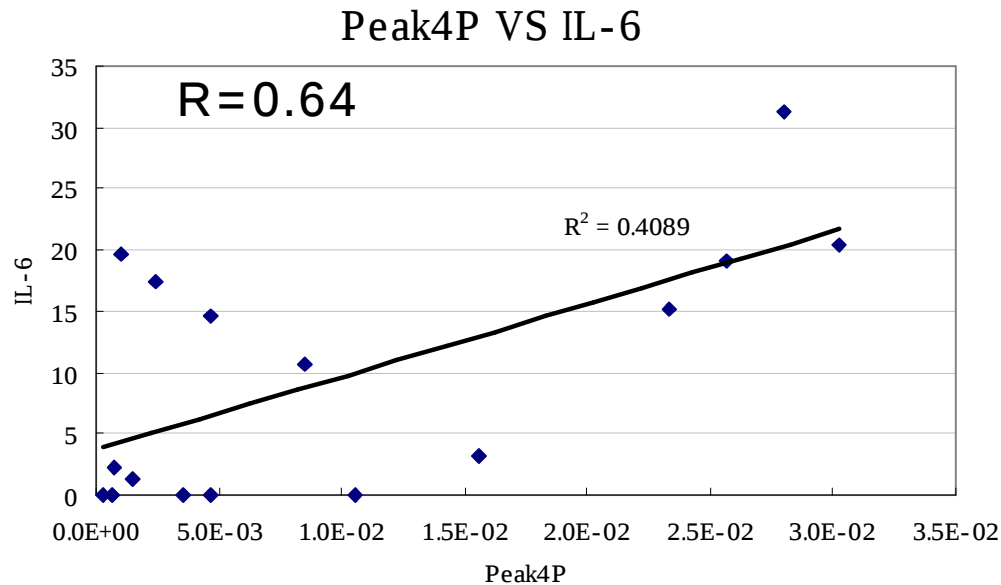


Table 8. Correlation coefficients for IL-6 in plasma and MS markers

MS marker	Cytokine	r
Peak4P	IL-6	0.64
Peak5P	IL-6	0.57
Peak9N	IL-6	0.37
Peak14N	IL-6	-0.54

Figure 6. Peak4P VS IL-6

1. Peak4P have relatively strong correlation for IL-6
2. MS markers seems no or less correlation for other cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-12, TNF- α)
3. Some person have high values because of individual's problem

PCA結果

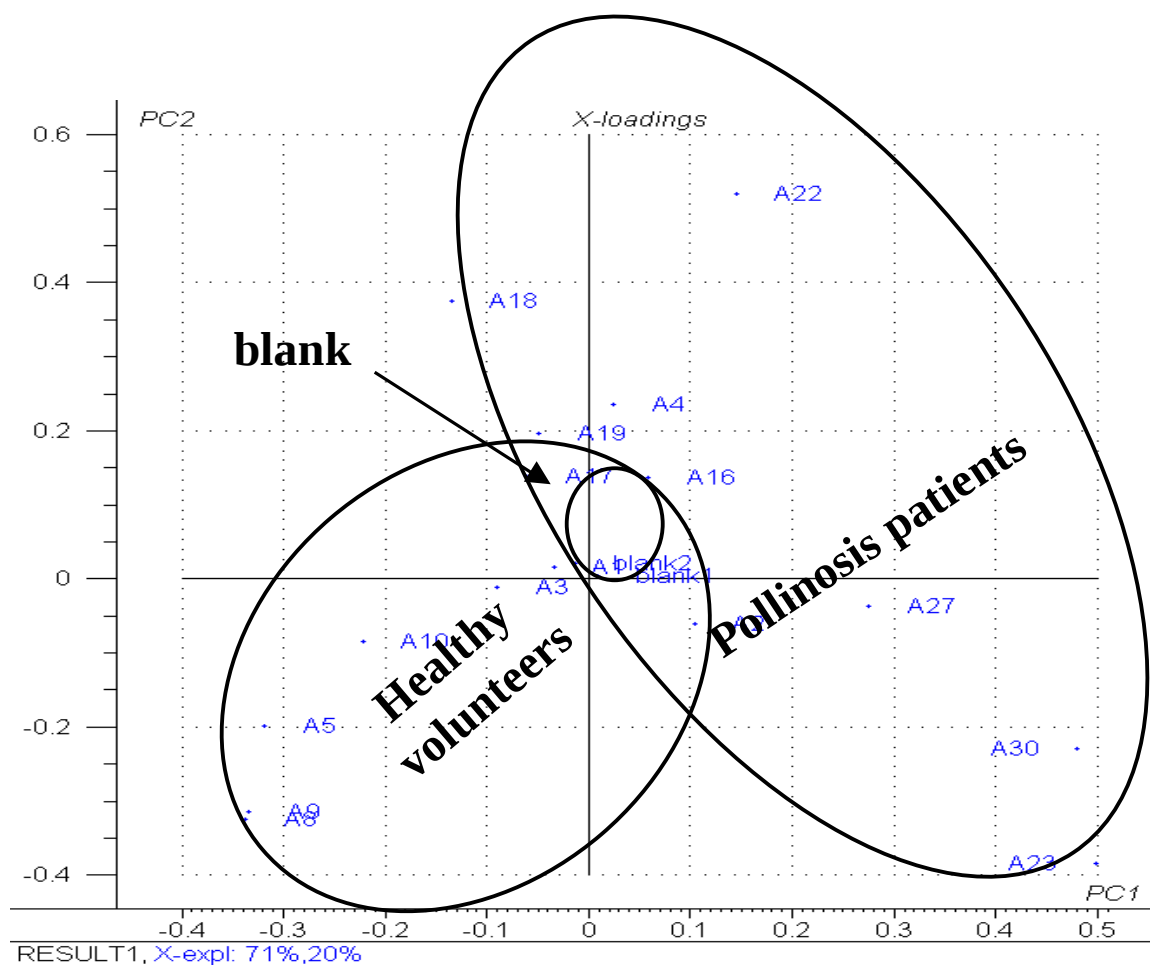


Figure 12. Principle Component Analysis by 4 compounds ($P < 0.05$)

まとめ

- 今回検討を行った花粉症アレルギーの場合において、健常人と統計上有意に異なるバイオマーカー候補が見つかった
- 見つかったバイオマーカー候補と他の指標との相関を調べることによってマーカー候補の生体内での機能を類推できる情報が得られる
- このようなバイオマーカー候補を用いることにより早期診断や治療効果の確認などの臨床目的に応用できる可能性がある
- また、バイオマーカーは疾患の原因、または結果として現われると考えられるので、疾患自体の研究に非常に役立つと考えられる