

(内田和彦)

- 1) 内田和彦, 目野浩二, 鈴木秀昭, 赤津博康, 水上勝義, 朝田隆. 認知機能障害とアルツハイマー病の血液バイオマーカー. *Dementia Japan* 27: 277-288, 2013
- 2) Sugimoto K, Shiraki K, Takei Y, Ito M, Nobori T, Suzuki H, Dissanayaka SK, Meno K, Asashima M, Uchida K. Serum protein isoform profiles indicate the progression of hepatitis C virus-induced liver diseases. *Int. J. Mol Med.*, 31: 943-950, 2013
- 3) Shimazui T, Yoshikawa K, Miyazaki J, Kojima T, Inai H, Ando S, Uemura H, Uchida K, Nishiyama H. Systemic transduction of p16INK4A antitumor peptide inhibits the growth of MBT-2 mouse bladder tumor cell line grafts. *Int. J. Oncol.*, 42: 543-548, 2013

(朝田 隆)

- 4) Endo G, Tachikawa H, Fukuoka Y, Aiba M, Nemoto K, Shiratori Y, Matsui Y, Doi M, Asada T. How perceived social support relates to suicidal ideation: A Japanese social resident survey. *Int. J. Soc. Psychiatry*, 2013 [Epub ahead of print].
- 5) Yasuno F and Asada T. Effect of plasma lipids and APOE genotype on cognitive decline. *Dialogues Clin Neurosci.* 15: 120-6, 2013.
- 6) Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T,

Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, 12: 487-496, 2013

- 7) Nose M, Kodama C, Ikejima C, Mizukami K, Matsuzaki A, Tanaka S, Yoshimura A, Yasuno F, Asada T. ApoE4 is not associated with depression when mild cognitive impairment is considered. *Int. J Geriatr. Psychiatry*, 28: 155-163, 2013.

(水上勝義)

- 8) Mizukami K, Abrahamson EE, Mi Z, Ishikawa M, Watanabe K, Kinoshita S, Asada T, Ikonovic MD. Immunohistochemical analysis of ubiquitin-1 in the human hippocampus: association with neurofibrillary tangle pathology. *Neuropathology*.34: 503, 11-8 (Epub 2013 Jul 21.)

2. 学会発表

- 1) 佐藤晋爾, 村木悦子, 石田一希, 太田深秀, 服部功太郎, 内田和彦, 功刀浩, 朝田隆 東日本大震災後の北茨城市におけるうつ状態に関連する因子の検討。
第109回日本精神神経学会学術総会 (福岡) 2013.5.23.
- 2) Uchida K, Suzuki H, Meno K, Korenaga T, Sugimoto K, Shiraki K.
Identification of circulating cell-derived peptides as novel biomarkers for chronic liver disease and hepatocellular carcinoma by non-labeling LC-MS APASL 2013 HCC conference, Cebu, Philippines, 2013.11.22.
- 3) 内田和彦, 劉珊, 鈴木秀昭, 西村吉典, 目野浩二,. 軽度認知障害とアルツハイマー

病の血液バイオマーカーについて、第9回認知症サプリメント研究会（品川） 2013.9.7.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許出願

PCT/JP/2013/67785

認知機能障害疾患のバイオマーカー及び当該バイオマーカーを用いる認知機能障害疾患の検出方法、 内田和彦、目野浩二、鈴木秀昭、西村吉典

2013.6.29.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 総括研究報告書 各論

II. 総括研究報告 各論

1. MCIならびにアルツハイマー病のバイオマーカー（遺伝子・タンパク質）候補の多施設解析（朝田・水上・内田）

A. 研究目的

利根プロジェクトと称した2001年から今日まで継続する「認知症予防の地域介入縦断研究」（利根コホート）を実施しており、そこで蓄積してきた時系列の臨床データと血清を活用し、認知症を発症した者としなかった者の分子基盤の解析を行うものである。MCIの診断には、5-Cogファイブ・コグ（記憶、言語、注意、視空間、推論の5つの認知機能検査）を用いている。表2, 3に利根縦断研究に参加人数、採取血清数を示す。本研究項目では、筑波大学などで供与をうけたサンプルと、利根コホートのサンプルを横断面での解析に用いた。これらを低分子量タンパク質（ペプチド）を2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MS (Ultraflex, Bruker Daltonics) による非標識比較定量解析ならびに2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS (Q-STAR, ABSciex) を用いたiTRAQラベル法による比較定量解析に供した。

今年度は、A β オリゴマーの脳からの排出機構やその神経毒 (synaptotoxin) を防御する仕組みに関係するタンパク質を対象に解析を進めた。

表2 利根町縦断研究の参加者数

	2001年	2005年	2008年	2009年
Normal	1270	813	542	98
MCI	382	211	92	70
合計	1652	1024	634	237

表3 利根町縦断研究の血清サンプル数

	2001年	2005年	2008年	2009年
Normal	705	645	500	—*
MCI	194	153	90	—*
合計	899	798	590	

*2009年の血清は東日本大震災による停電のため溶解し使用対象としていない。

B. 研究方法

1) 対象

参加者は採血と5-Cogファイブ・コグの検査を同時に受けており、NDC、MCI、アルツハイマー病などの認知症やそのほかの精神神経疾患かについての診断を受けている。2次検査では、MMSEを実施している。表3では、各年で新規の参加者からの採血者数を含んでいるため、サンプル数が蓄積しているが、縦断研究として、2001年から継続して参加し、血清サンプルが得られている参加者のうち時間軸にそって解析ができるものを選択した。またフォローアップが継続するにつれて年齢も高齢化しており、解析においては年齢による除外を行った。

2) タンパク質の調査

AD の発症機序には A β が深く関与している (アミロイドカスケード仮説)。AD の発症する 20 年近く前から原因物質である A β が凝集体を形成し、脳の中に少しずつ蓄積する。可溶性の A β オリゴマーはシナプス毒性があり、神経細胞にダメージを与え、記憶や認知機能を担うシナプスを障害する。A β によって障害を受けたシナプスの状態が病態の進行に関係すると考えられる。最近では、認知機能健常から AD に至るまで、プレクリニカル AD、MCI due to AD、AD という臨床病理上のプロセスを経ると考えられている (図 2)。プレクリニカル期や MCI 期に介入することの重要性が示唆されている。

MCI や AD に至る認知機能の低下は、A β の産生と排出 (クリアランス) のバランスの異常が一つの要因にあると考えてもよい。アミロイドプレカーサープロテイン (APP) から産生された A β は、脳内から脊髄液 (CSF) に排出される。私たちの体には A β が脳内に蓄積しないよう排除する仕組みやその毒性を弱める仕組みが備わっている。脂質代謝に関連するアポリポタンパク質や免疫機能としての補体タンパク質や A β と結合してその作用を抑制するトランスサイレチンなどが関係している (図 4)。

アポリポタンパク質の apoE、apoA1 および apoJ は、アミロドベータペプチドと結合してその凝集や毒性を防ぐといわれている。apoE タンパク質は 299 アミノ酸残基の糖タンパク質で、その遺伝子型がアルツハイマー病の発症と関係している。 $\epsilon 2$ 、 $\epsilon 3$ 、 $\epsilon 4$ の 3 つのアイソフォームがあり (*APOE2*, *APOE3*, *APOE4*)、 $\epsilon 4$ アレルを持たないものと比較して $\epsilon 4$ アレルを 1 つもつものは、AD の発症のリスクが 2~3 倍、 $\epsilon 4$ アレルを 2 つもつものは発症のリスクが 12 倍といわれている。AD のリスクに対する apoE アイソフォームの主な効果は、

A β 凝集および排除における違いと考えられている。ApoE は肝臓と脳で高い発現が高く、脳ではアストロサイトとミクログリアに認められる。ApoE はリポタンパク質のエンドサイトーシスのリガンドとして機能している。脳においては高密度リポタンパク質 (HDL) の構成成分は主に apoE である。アストロサイトとミクログリアで産生された apoE は、アイソフォームに依存してすなわち E2>E3>E4 のように A β と結合し、受容体を介してエンドサイトーシスされる。さらに脳血流関門 (BBB) を介した血流への移行に関与する。われわれも検討でも血液中の apoE は ϵ 4 アレルに依存して低下することがわかっている。CSF におけるアイソフォームに依存した量の違いは認められない。CSF や血液における apoE のレベルは、AD と健常人の間で有意な違いはない。

ApoA1 は、血液中では HDL の構成成分として細胞から肝臓へのコレステロールの輸送に働いている。apoA1 は HDL とは独立して心血管疾患のリスクを下げるといわれている。また抗炎症作用と抗酸化作用によって血管障害を防ぐといわれている (Barter, *et al.*, 2004)。AD では apoA1 は脳組織と CSF で A β ならびに APP と結合しており、A β の凝集と A β による毒性を抑制することが示されている。ラットの海馬の培養系を用いて apoA1 が A β の凝集を抑制し、A β による酸化ストレスと神経変性を防ぐことが示されている。さらに APP/presenilin 1 (PS1) トランスジェニックマウス (Tg) と *APP PS1/APOA1* Tg マウスの比較によって、apoA1 が A β によって誘導される炎症を抑制し、*APP PS1* マウスにおける学習記憶機能レベルの低下を防ぐことが報告されている (Lewis, *et al.*, 2010)。臨床サンプルを用いた研究で AD では apoA1 の血漿レベルが低下していること、疫学研究により apoA1 は AD 発症のリスクを下げる事が明らかになっている。APOA1 のポリモルフィズムと AD の発症リスクの関連についての報告

もある。

ApoJ タンパク質は clusterin とよばれ、最近 genome-wide association study (GWAS) によってその遺伝子 *CLU* は *APOE* について AD の発症リスクと関連していることが明らかになった。ApoJ は 75-80 Kda の糖タンパク質で α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとして存在する。427 アミノ酸残基の前駆体タンパク質がプロテアーゼで切断され、それぞれ 40 kDa の α 鎖と β 鎖が 5つのジスルフィド結合でヘテロダイマーを形成する (Yu and Tan, 2012)。ApoJ は脳組織で産生され、AD をはじめとする脳神経疾患で発現が上昇する。ApoJ は、 $A\beta$ の凝集を阻害し、BBB を介した $A\beta$ の脳からの排出に働いている。APP tg の AD マウスモデルで *APOE* と *APOJ* をダブルノックアウトすると、 $A\beta$ とアミロイドプラークが増加し AD の発症が早まった。ApoJ は ApoE と強調して $A\beta$ の脳からの排出や毒性の軽減にはたらいっている可能性がある。

AD など神経変性疾患は脳における炎症がその発症に関与しているといわれている。補体は 20 以上のタンパク質からなり、主に肝臓で産生され、自然免疫においてマクロファージによる異物の排除に必要なタンパク質である。補体タンパク質は通常は非活性化された血漿タンパク質である。補体の活性化に 3つの経路があるが、いずれの経路でも最も量の多い補体タンパク質である C3 の分解が起こり、C3a と C3b に分解される。C3b は貪食細胞のレセプター CR1 と結合することによりオプソニンとして作用する。CR1 は AD の発症に関わる遺伝子ポリモルフィズムとして GWAS で同定されている。血漿 C3 については AD でのあまりはっきりした量の変化は認められないが、CSF 中の C3 と補体因子 H が AD で上昇するという報告がある。しかしアッセイに使用している ELISA などで、全長の C3 を特異的に検出しているものは少なく、多くは C3b など活性化断片もあわ

せて全体を検出していることが多い。

中枢神経系でも補体が産生され、補体系の活性化に必要なコンポーネントも備わっている。補体は脳組織においもマイクログリアやアストロサイトによるエンドサイトーシスに重要であり、 $A\beta$ オリゴマーは補体の働きによって貪食作用によって排除される。この過程には補体 C3、C4 の活性化が必要といわれている。AD マウスモデルである APP トランスジェニックマウスにおいて C3 をさらにノックアウトすると、 $A\beta$ やアミロイドプラークが増強するという報告がある (Wyss-Coray, *et al.*, 2002)。最近、シナプスの再構築におけるマイクログリアを介した synaptic pruning (シナプスの枝打ち) に C3 と補体レセプターCR3 が関与しており、正常の中枢神経系において不必要なシナプスを選択的にプルニングし、シナプスの可塑性に寄与していることが報告された。認知機能の低下との関連が興味深い。

トランスサイレチン (transthyretin; TTR) はプレアルブミンとも呼ばれ、ホモ 4 量体の 64 kDa のタンパク質で主に肝臓と脈絡叢で産生されている。血液中の TTR は低栄養や肝硬変など低下することから、臨床検査では栄養状態の評価に使われている。TTR は以前から AD のバイオマーカーとしても注目されてきた。1994 年に TTR は $A\beta$ オリゴマーと結合してその凝集を阻害することが報告され、さらに AD のマウスモデルで TTR が $A\beta$ のシナプス毒性を抑制することが示されている。免疫組織染色で TTR は海馬のアミロイドプラークと共存していること、AD の脳組織に多いことが報告されている。TTR は AD 患者の CSF で低下することが報告されている。また AD では血清 TTR レベルが低下するといわれている。

このように、アポリポタンパク質や TTR は $A\beta$ と結合してその毒性を抑制す

る、ないしは脳内から排出する働きをもついわゆる「sequester (シークエスタ) タンパク質」であり、その量や機能が低下することが AD の発症の背景にあると考えられる (図 4)。

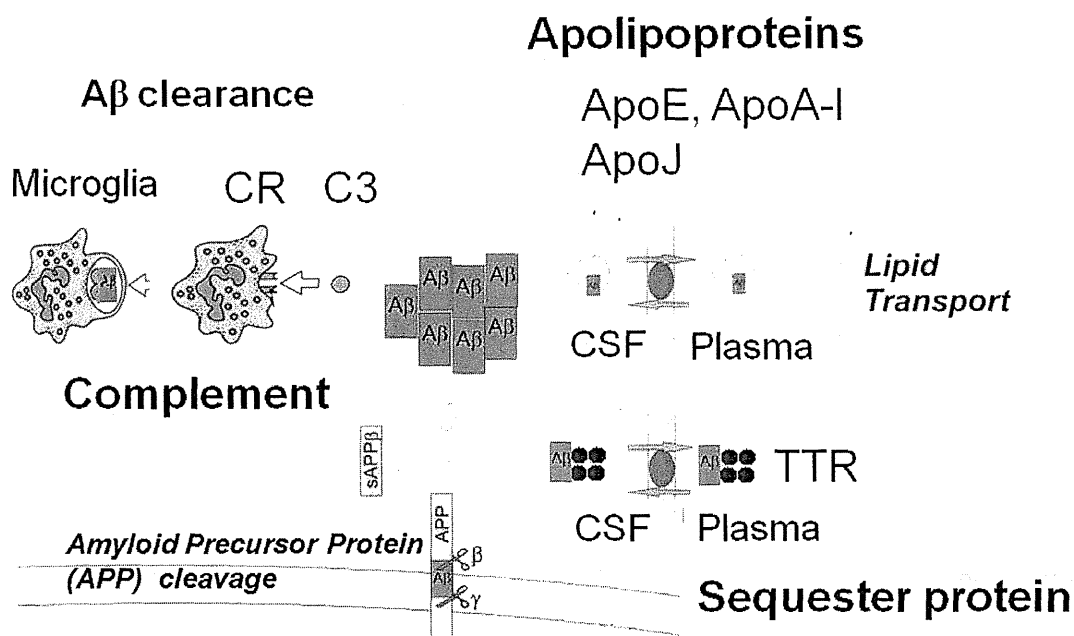


図 4 「sequester (シークエスタ) タンパク質」の働き

3) バイオマーカーペプチドについて

昨年度の結果の再現性を慎重に確認するため、同一のサンプルで実験を行った。ペプチドマーカー候補については、利根コホートのサンプルを横断研究解析と縦断研究解析として分析した。

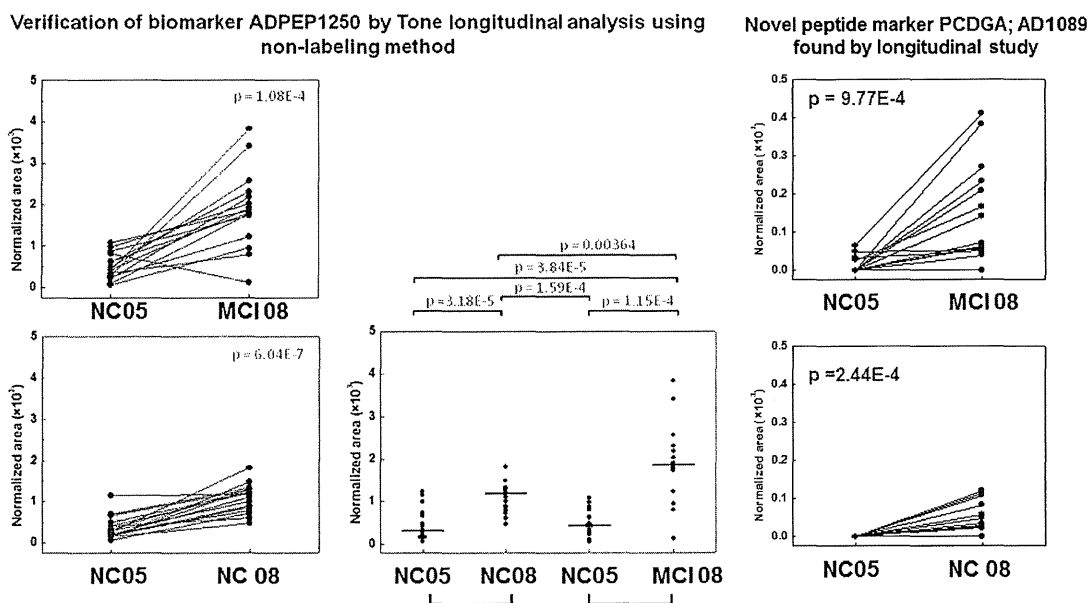
C. 研究結果

本研究において解析に供する血清サンプル数とこれらの参加者の臨床情報を表 4 に示す。

表 4 本研究に使用した利根町縦断研究血清サンプルの数とその臨床情報

	NDC → NDC (n = 46)	NDC → MCI (n = 15)	MCI → MCI (n = 9)
Age (2005)	75.2 ± 0.7	75.5 ± 2.0	74.0 ± 2.7
Age (2008)	79.1 ± 0.7	79.3 ± 1.9	77.5 ± 1.3
Gender (Male/Female)	25/21	2/13	3/6
Years of education	10.5 ± 2.6	9.9 ± 0.5	11.6 ± 0.4
BMI	22.6 ± 2.6	24.2 ± 4.5	22.4 ± 4.4
GDS	2.0 ± 1.7	3.1 ± 0.8	2.7 ± 0.9
Cigarette smoking (%)	16 (34.8%)	1 (7%)	3 (33%)
Alcohol (%)	21 (45.7%)	2 (13%)	3 (33%)
History of disease (%)			
Cardiovascular disease	3 (6.5%)	0 (0%)	0 (0%)
Diabetes mellitus	4 (8.7%)	0 (0%)	1 (5%)
Hyperlipidemia	1 (2.2%)	0 (0%)	0 (0%)
Hypertension	8 (17.4%)	4 (27%)	3 (33%)

LC-MS/MS アッセイによる横断解析の結果の一部を図5に示す。



1

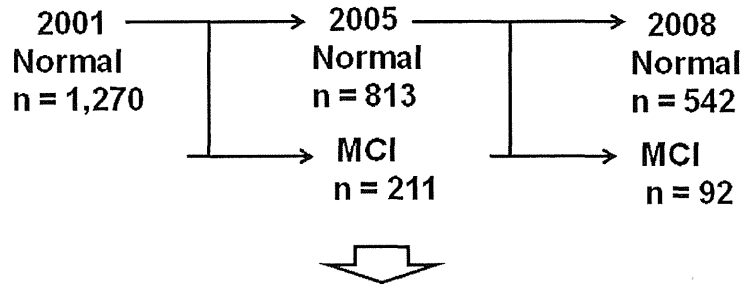
図5

本研究では、認知症のない健常高齢者（非認知症老人；NDC, Non-demented control）ならびにMCIとアルツハイマー病について、2001年、2005年、2008年、2009年と臨床評価を行ったもので、2005年と2008年の血清を本研究の解析に供した。NDCについては、3年ごとの検査において継続してNDCと診断されたものを用いた。表4に NDC→NDC、NDC → MCI、MCI → MCIと示してあるのは、2005年NDC→2008年NDC、2005年NDC → 2008年MCI、2005年MCI →2008年MCIである。

血清・血漿を用いたタンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）は、多量の含

まれるアルブミンなど血漿タンパク質が網羅的解析を妨げるため、SDS-PAGE や LC-MS を用いたプロテオミクス解析によって ng/ml 以下で存在するバイオマーカーの探索はきわめて難しい。われわれは、タンパク質バイオマーカーは'Focused proteomics'によって、低分子量タンパク質を'Peptidomics'によって探索してきた。'Focused proteomics'では、横断研究と縦断研究の血清サンプルを用いて前述の"sequester タンパク質"に注目してその量の変化について調べた。正常の中樞神経系においては、"sequester タンパク質"による神経保護 (neuroprotective) 作用がもともと備わっており、A β の神経 (シナプス) 毒性による AD の発症を抑制していること、加齢によるこれらの神経保護タンパク質の量や機能の低下が、AD の発症のリスクを高めると考えた。縦断研究の血清サンプルは貴重なため、これらのタンパク質の解析には、少量のサンプルで多くのアナライトが解析できる同時多項目免疫アッセイ Luminex 法を用いた。縦断研究に用いた症例を図4に示す。2001年からの調査のうち、2005年と2008年の血清サンプルを用いた。2001年のNDCを追跡調査し、2005年と2008年の診断をもとに症例を選択した。Stable MCI とは、2005年にMCIと診断され、2008年もMCIであった症例を指している。下図に本解析に用いたサンプルについて示す。

Numbers of participants in Tone cohort



Paired serum samples from Tone cohort

Group	2005	2008	Sample sets
NDC during follow up	NDC	⇒ NDC	20
NDC to MCI	NDC	⇒ MCI	15
MCI to stable MCI	MCI	⇒ MCI	9

図6

その結果、アポリポタンパク質をはじめとして、これらの”sequester タンパク質”は MCI の進行とともに減少することがわかった (表1)。横断研究においても MCI で有意に減少するもの、MCI から AD で有意に減少するものが認められた。TTR、apoA1、C3 の臨床有効性については、NDC vs. AD において receiver operating characteristic (ROC) 曲線における area under curve (AUC) 値がそれぞれ 0.73、0.67、0.83、NDC vs. MCI において、0.68、0.65、0.66 であった。そのほかのタンパク質についても有意差は認められなかったが減少ないしは増加の傾向が認められた。さらにこれら TTR、apoA1、C3 を用いて多重ロジスティック回帰を用いたマルチマーカーによる判別解析を行ったところ、NDC vs.

ADにおいて感度92%、特異度68%、NDC vs. MCIにおいて感度90%、特異度50%の結果が得られた。さらにこれらのマーカーにMMSEの結果を加えると、NDC vs. ADにおいて感度100%、特異度96%、NDC vs. MCIにおいて感度87%、特異度82%となった。以上の結果から、MCIおよびADのスクリーニング検査として、A β と結合してその毒性の抑制や排出にかかわる”sequester タンパク質”を測定することは有用と思われる。これらのタンパク質の減少が結果的に認知機能の低下につながったと考えられるが、血液における変化が、CSFや中枢神経系にどのように影響しているのかは今後明らかにしていく必要がある。

表5 縦断研究と横断研究においてADおよびMCIで変動する血液中のタンパク質

Protein	Changes in MCI and/or AD
ApoE	decrease in MCI and AD
ApoA1	decrease in MCI and AD
ApoJ	increase in MCI and AD
C3	decrease in MCI and AD
C4	no change
Complement factor H	no change
A2-macroglobulin	no change
TTR	decrease in stable MCI and AD

D. 考察

本研究の最終年度には、アポリポ蛋白E 遺伝子4 というリスクファクターを有しながらもアルツハイマー病を発症しない例に注目した解析を実施したい。これまでに蓄積した臨床情報ならびに血清サンプルの解析によって、これまで明らかにされていないリスク抵抗要因についての情報が得られる可能性がある。また介入による効果があるもの、なかったものの比較について詳細のためには、収集した情報の評価(Validation)と、データベースへの登録を行う。

2. 脳組織、脳脊髄液と血清における新規バイオマーカー（タンパク質・ペプチド）

の動態ならびに前処理条件、LC-MS条件の検討（内田）

①脳組織、脳脊髄液と血清における新規バイオマーカー（タンパク質・ペプチド）

の動態

A. 研究目的

NDCならびにアルツハイマー病の脳組織・髄液・血清におけるバイオマーカーペプチドおよび親タンパク質の存在を明らかにする。親タンパク質とは、それぞれのペプチドの由来するタンパク質をさす。脳組織・髄液・血清におけるそれぞれのバイオマーカー候補の動態は、それらの親タンパク質の生理的役割やバイオマーカーペプチドの意義を知る上で重要な情報をなりうると考えられるため、これらのサンプルの収集を行ってきたが、脳組織、髄液、血液のセットでの症例は得られなかった。髄液、血液のペアについての解析も実施した。脳組織と髄液・血清については、別の患者由来のものである。

B. 研究方法

NDCならびにアルツハイマー病患者由来組織・髄液・血清の前処理を行った後、2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MS (Ultraflex, Bruker Daltonics)ならびに2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS (Q-STAR, ABSciex)で各バイオマーカーペプチドの分析を行った。2D-LCにおいては、1次元目をSCXで6 fractionに分画し、2次元目をC18逆相カラムで分画した。

脳組織

2D- μ HPLC MALDI TOF MS/MSによる分析には、組織5 mgならびに10 mgを用い、2D-nanoLC-ESI TOF MS/MS・組織 2 mgを用いた。

髄液

アルツハイマー病：AD 10人分のプールサンプル

NDC： 健常高齢者 9人分のプールサンプル

分析に用いた量：髄液 500 μ l相当

血漿・血清

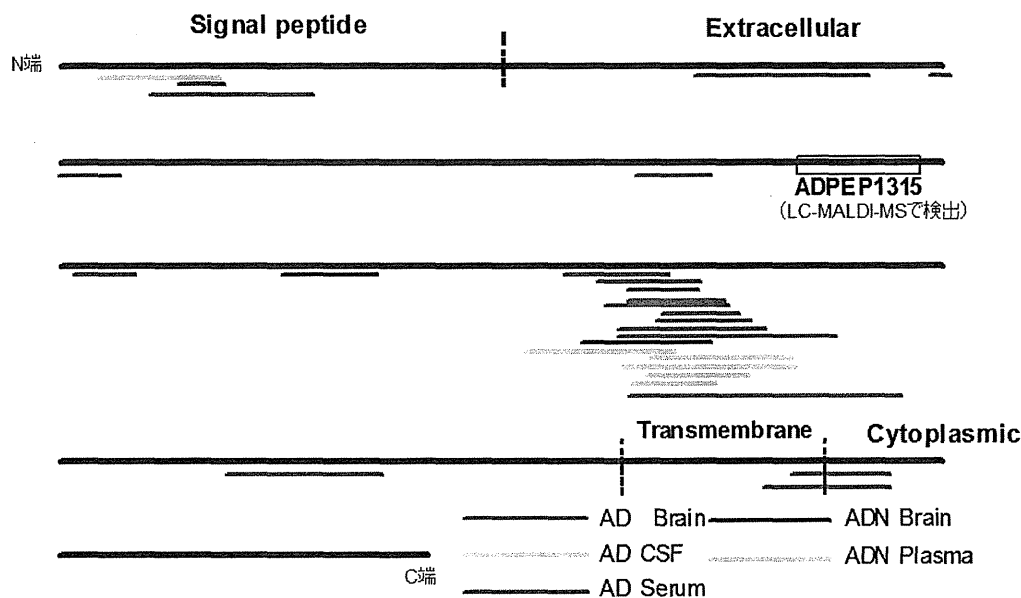
25 μ l

C. 研究結果

昨年度から引き続き行った詳細なマッピングによってタンパク質の特定の部位由来のペプチドが血液中にでてくることが明らかになった。図5に脳組織由来ペプチドの親タンパク質のアミノ酸配列上のマップを示す。

脳組織におけるこれらバイオマーカー由来ペプチドについては、アルツハイマー病脳組織において特定の領域において複数の症例でペプチド断片が検出されたが、NDC脳では検出されなかった。髄液でも同様の結果であった。

LC-MS/MS (ESI)によるAD脳組織、CSFならびに血液におけるADPEP1315関連タンパク質由来ペプチドの検索



12

図 7

D. 考察

これまでの研究として、同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清5例セットを用いて、両者におけるバイオマーカーの定量を行い、さらに親タンパク質へのそれぞれのペプチドのマッピングを行った。ADPEP1315ペプチドならびにADPEP1250ペプチドマーカーについて、同一患者の脳組織、脳脊髄液ならびに血清についての解析をLC-ESI TOF MS/MSを用いて解析した。シナプスの傷害の結果、タンパク質の分解が促進されたものと考えられる。

それぞれのペプチドが由来するタンパク質（以後、親タンパク質とよぶ）の全アミノ酸配列上の位置を確認することができた。同一患者の脳組織、脳脊髄液ならび

に血清では共通して検出される（おそらくプロテアーゼによって切断される）ペプチド領域については、これらのタンパク質・代謝物ペプチドの動態とくに脳内、脳血管関門と末梢血管における移動状況について分析を行う必要があると考える。

3. 知的健常からMCI、アルツハイマー病へと至った者における疾患関連タンパク質・ペプチドの推移と介入効果との関連（朝田・内田）

A. 研究目的

今年度は、知的健常からMCI、アルツハイマー病へと至った者における疾患関連タンパク質をイムノアッセイで解析した。イムノアッセイは、2つ抗体を用いたサンドイッチ法であるが、サンプル量が限られているため同時多項目免疫アッセイができるビーズを用いたLuminex法による解析を行った。またペプチドについては、本解析におけるバイオマーカーペプチドとはこれまで本研究に用いてきたADPEP1315、ADPEP1250、ADPEP1039、さらに新たにAD1089を加えて解析を行った。

Luminex法では、3種の蛍光色素を個別の濃度で配合したビーズを用い、赤色レーザー照射により最大で500種類のビーズを判別することができる同時多項目免疫アッセイで、アナライトの定量にはラベル化2次抗体に緑色レーザーを当て蛍光強度を測定することで検量線から定量を行う。本解析システムの特徴は、サンプル量が限られている場合でも多くのアナライトを定量することができるため本研究に適している。ただし、計測対象アナライトの濃度が異なる場合は、計測前の希釈倍率がことなるので同時に計測はできないため、今回も2回にわけて分析を行った。