

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 3 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670785

研究課題名(和文)敗血症ラット検体を用いた近赤外とラマン分光法の新規解析技術の開発

研究課題名(英文) Newly development of analytical techniques for near infrared and raman spectroscopies using septic rat samples

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) 2,800,000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。近赤外(NIR)スペクトル法は、非破壊、非接触で、瞬時に測定できる電磁波計測法で、救急集中治療領域では、リアルタイム計測ツールとして大きな魅力を有する。本研究では、リポポリサッカライド(LPS) 2 mg/kgあるいは10mg/kgを腹腔内投与した敗血症ラットから血漿を採取し、これらを被検試料として得られたNIRスペクトルデータについて、本技術を用いてケモメトリクスによる解析を行ったところ、LPS 2 mg/kg群とLPS 10mg/kg群両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)：Near infrared (NIR) spectroscopy is a noninvasive, contactless and real-time analytical technology that may yield a variety of promising bedside monitoring systems in the field of emergency and critical care medicine. Rats were injected 2 mg/kg or 10mg/kg of lipopolysaccharide (LPS) intraperitoneally and the plasma was collected. The present study revealed that our technique using NIR spectra could differentiate septic plasmas obtained from LPS 2 mg/kg group and 10mg/kg group. This technique proved to be a novel signal processing method that comprehensively handles the signal of electromagnetic waves derived from complex mixture.

研究分野：救急医学

キーワード：近赤外分光法 敗血症 ケモメトリクス 複雑な混合物

## 1. 研究開始当初の背景

近赤外分光法は、物質に近赤外線 (750nm ~2,500nm) を照射し、分子振動により吸収された振動数の電磁波を調べることで、物質の定性・定量的評価を行う方法で、現在、経皮的動脈血酸素飽和度測定 (SpO<sub>2</sub>) や脳局所酸素飽和度 (rSO<sub>2</sub>) 測定に利用されている。ラマン分光法は、ラマン散乱光\*の振動数が物質内分子の固有振動数と関連することを利用して、分子情報を得る方法で、がんや動脈硬化の研究に加え、無染色組織イメージング法に応用されている。(\*: 光が物質に入射して分子と衝突すると、入射光の一部は散乱する。この散乱光の大部分は入射光と同じ波長を示すが、ごくわずかな成分は入射光と異なる波長の光となる。これをラマン散乱光という。)

血液・臓器等の生体サンプルから得られる近赤外・ラマン信号には、疾患や病態に関する膨大な情報が含まれると考えられる。従来の近赤外・ラマンのデータ解析法は、「単純な化合物」の構造解析を目的に開発されたため、血液・臓器等の「複雑な混合物」を測定対象として解析する場合にはおのずと限界があり、近赤外・ラマンスペクトルに含まれる生体情報の一部しか活用できないことが課題であった。近年、近赤外データ解析にケモメトリクス (計量化学) の手法が取り入れられ、解析能は向上した。しかし、血液・臓器等を被検試料とする場合、その解析能は未だ十分とはいえない状況である。

我々は長年、臨床に役立つ新規病態解析法を開発することを目的に、生体サンプル由来の電磁波信号の解析手法に関する研究を続けてきた。そして、近年、血液・臓器等由来の電磁波信号に適した信号処理方式を新たに考案し、電磁波信号の特性を評価、活用して、各生体サンプル固有の物

理情報を、精度よく迅速に検出するデータ解析手法を開発した。本手法は、近赤外・ラマン分光法における新しいデータ解析法として応用可能である。

## 2. 研究の目的

近赤外 (線) 分光法やラマン分光法は、非破壊、非接触で、瞬時に測定できる電磁波計測法で、時々刻々と病態が変化する救急・集中治療領域では、リアルタイム計測ツールとして大きな魅力を有する。しかし、医学の領域において、近赤外分光法は限られた範囲での臨床応用にとどまり、ラマン分光法はいまだ基礎研究の域を出ていない。本研究では、敗血症動物モデルの血漿・臓器を被検試料として、1) 近赤外・ラマン分光法による計測を行い、2) 生物サンプルに最適化した電磁波信号処理法を開発し、3) 新しいデータ解析アルゴリズムを考案し、両電磁波信号の特性から敗血症病態を精度よく迅速に検出する、新たな分析技術を編み出すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

Lipopolysaccharide (LPS) を投与し作製した敗血症ラットとコントロールラットから血漿と臓器 (肝臓) を採取し、これらを被検試料として、近赤外分光法による計測を行った。得られた近赤外スペクトルデータについて、我々独自の手法で信号処理を行い、ケモメトリクスによる解析を行った。ラマンスペクトル法についても、同様の計測および解析を試みた。

### 敗血症ラットからサンプルを採取する

体重 280~330 g の雄性 Sprague-Dawley ラットに、LPS (Escherichia coli 0111:B4) 2 mg/kg (n=3) あるいは 10mg/kg (n=3) を腹腔内投与し、敗血症を惹起させた。投与6時間後に3~5%イソフルラン麻酔下に

静脈血と肝臓を採取し、血液は遠心分離（4℃、10,000 g、10分）後に、血漿を-80℃で保存し、肝臓は直ちに-80℃で保存した。LPSの代わりに生理食塩水を投与したラット（n=3）から得られた検体を、コントロール血漿・肝とした。

#### ① 近赤外計測

近赤外線センサー（ビートセンサーGP2<sup>®</sup>、（株）ビートセンシング）を用い、測定条件を以下に設定した。波長：900-1,700nm、蓄積時間モード：自動、蓄積時間上限：1024ms、ゲイン：GAIN\_LOW、スキャン回数：10回、計測モード：回数指定計測モード、保存データ：カウント値、吸光度、スペクトル（規格化吸光度）。測定に際しては、血漿・肝試料をガラス製試料管に入れ、各個体のサンプルについて3回の計測を行った。データセットは血漿・肝試料の近赤外スペクトル計測データから作成し、CSV形式で保存した。

#### ② ラマン計測

ラマン分析装置（Enspectr<sup>®</sup>、ケーエルブイ（株））を用い、パラメータを以下に設定した。波長：120cm<sup>-1</sup>-4,000cm<sup>-1</sup>、露光時間：1,000msec、レーザー強度：55%。測定に際しては、血漿・肝試料をガラス製試料管に入れ、ラマン分析装置に設置し、100回の積算を行った。データセットは血漿・肝ラマンスペクトル計測データから作成し、CSV形式で保存した。

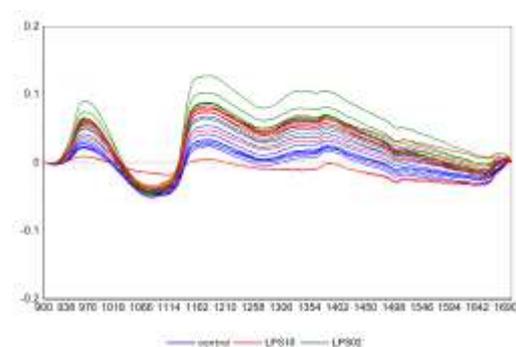
#### 我々独自の技術による信号処理

得られた個々の血漿近赤外スペクトルデータについて、Unscrambler-X<sup>®</sup> ver10.3（CAMO）を用いてベースライン補正、平滑化処理等を行った。次に、我々独自の技術（特願2012-157593号）に

より処理した後、正規化し、ケモメトリクスによる解析を行った。本研究では、主成分分析（PCA）およびPLS-DA法による解析を行い、クロスバリデーションによる解析結果の検証と評価を行った。

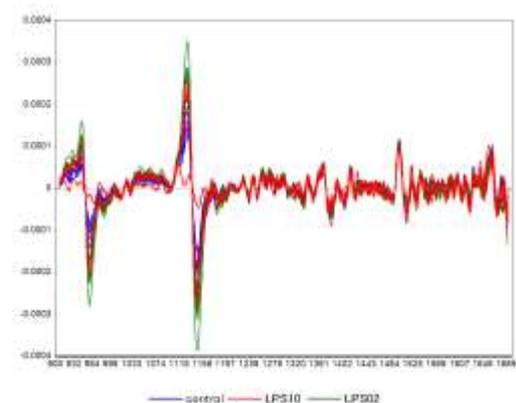
肝の近赤外スペクトルデータおよびラマンスペクトルデータについても同様の研究を行った。

#### 4. 研究成果



##### ① 近赤外線スペクトル

赤：LPS10mg/kg、緑：LPS2mg/kg、青：コントロール

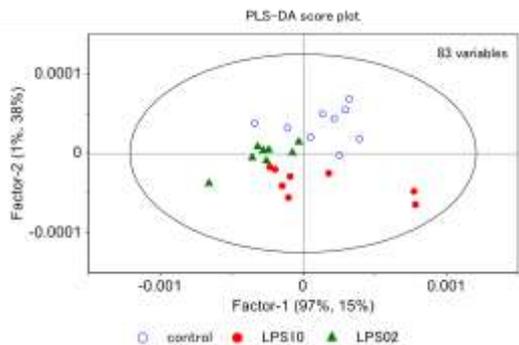


##### ② Savitzky-Golay 微分後のスペクトル

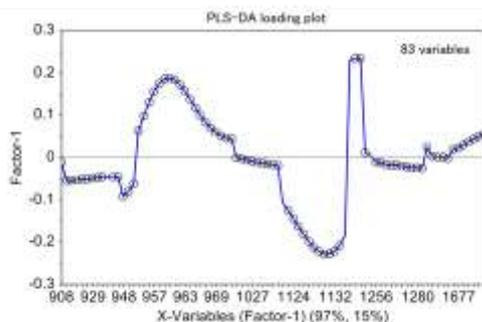
赤：LPS10mg/kg、緑：LPS2mg/kg、青：コントロール

「LPS 2 mg/kg 血漿群」と「LPS 10mg/kg 血漿群」および「コントロール血漿群」の解析結果を示す。

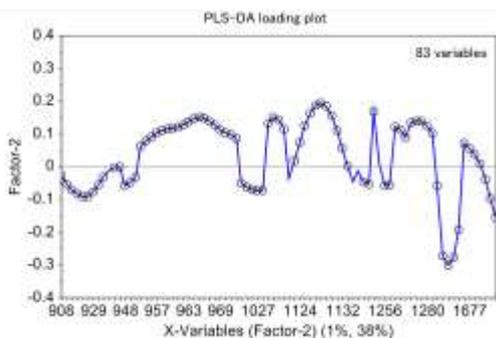
③ PLS-DA の結果（3グループのデータ）



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

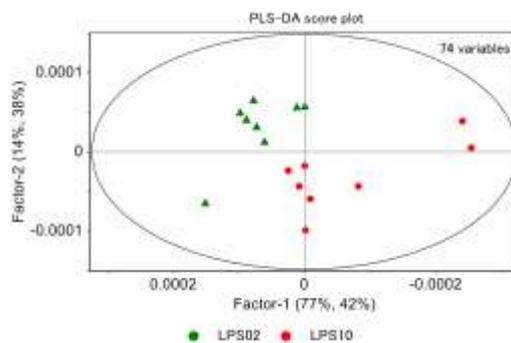


ファクター1のローディングプロットである。

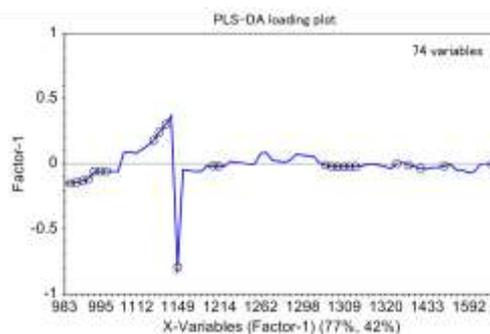


ファクター2のローディングプロットである。

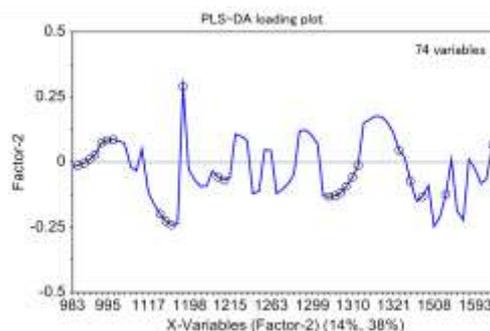
① PLS-DA の結果（2グループのデータ）



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

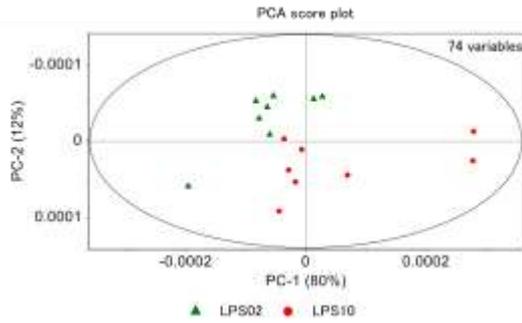


ファクター1のローディングプロットである。

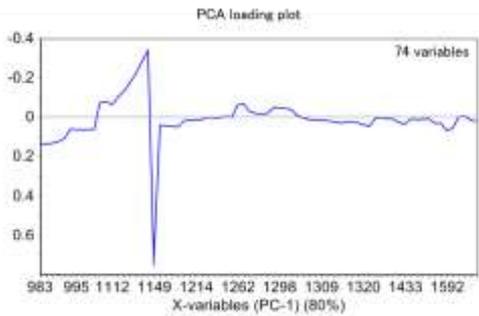


ファクター2のローディングプロットである。

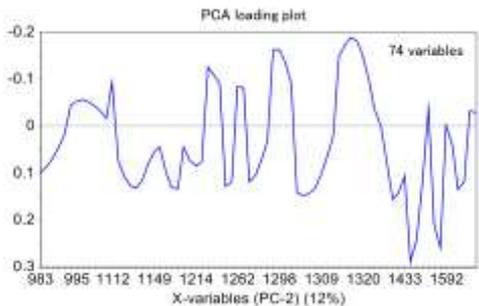
② PCA の結果（2 グループのデータ）



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）のローディングプロットである。



主成分2（PC2）のローディングプロットである。

「LPS 2 mg/kg 血漿群」「LPS 10mg/kg 血漿群」「コントロール血漿群」の近赤外スペクトルデータについて3群の識別を目的として、PLS-DA法による解析を行った。すべてのスペクトルデータ（785変数）を用いて行った結果では、ファクター1とファクター2で、3群を明瞭に分離することは困難であった。そこで、各変数のローディング値から、3グループの識別に重要と考えられる83変数を選択し、再度PLS-DA法による解析を行ったところ、ファクター1およびファクター2によって、3群を識別しうる結果を得ることができた。

そこで、同74変数を用いて主成分分析（PCA）を行ったところ、両グループは、主成分1と主成分2のスコアプロット上で、それぞれ異なるエリアに分離してマッピングされた。今回の結果から、2グループの近赤外線スペクトルの特徴抽出には、PLS-DA法が有効であることがわかった。

肝についても同様の検討を行ったが、試料の不均一性に起因すると思われる計測値のバラつきが大きく、解析を行うに十分な精度をもつスペクトルデータを得られることができなかった。今後は、臓器試料については、反射スペクトルを用いたスキャナによる計測を行うことが望ましいと考えている。

ラマンスペクトルについては、標準試料のデータに基づいて、血漿・肝の計測を試みたが、本研究期間中では、基礎的な検討にとどまっており、今後更なる検討を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

④産業財産権

(1) 産業財産権の名称

混合物試料に由来する電磁波信号を処理する方法及び混合物試料の属性を識別する方法

(2) 発明者

小池薫、平川慶子、大野曜吉、森山剛、森川秀行、村木秀樹

(3) 権利者

国立大学法人京都大学、学校法人日本医科大学、学校法人東京工芸大学、株式会社ニユフローズ

(4) 産業財産権の種類

特許権

(5) 番号

PCT/JP2014/082616

(6) 出願（取得）年月日

2014年12月10日

(7) 国内・国外

国外（PCT出願）

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) 研究分担者

鈴木 崇生 (SUZUKI TAKAO)  
京都大学 医学（系）研究科(研究院)  
講師  
研究者番号：40328810

(4) 研究分担者

佐藤 格夫 (SATO NORIO)  
京都大学 医学（系）研究科(研究院)  
講師  
研究者番号：30409205

(5) 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