

令和元年6月11日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26282119

研究課題名(和文) 近赤外領域の陰性吸光度を利用した試薬レス在宅尿成分分析システムの開発

研究課題名(英文) Development of a reagent-less urine components monitor based on near-infrared spectroscopy.

研究代表者

田中 志信 (Tanaka, Shinou)

金沢大学・フロンティア工学系・教授

研究者番号：40242218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病関連の医療費削減に貢献すべく、糖尿病と高血圧症の一次予防及び慢性腎臓病の進行抑制に有用となる光学式の在宅尿成分分析システム開発を最終目標とし、尿中の有機成分(尿糖、尿素、クレアチニン)に加えて無機成分(塩化ナトリウム)をも試薬を一切用いずに単一の方法(近赤外吸光度計測法)で濃度推定可能とする方法を考案した。具体的には、高価な分光器を必要とせず10波長程度の近赤外LEDアレイと光検出器という簡易・低廉なシステム構成とするために、近赤外領域における水溶液の陰性吸光度を積極的に利用し、各成分を10以下の波長数で濃度推定可能な至適波長組合せを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、6～7種類の波長の近赤外光を用いて、尿中のグルコース、尿素、NaClおよびクレアチニンの濃度を推定可能な最適な波長組合せを決めることが出来た。これにより近赤外LEDを光源とした簡易な光学式尿成分計測システム具現化の端緒が開かれ、生活習慣病予防のためのホームヘルスケアシステムとしての応用が期待される。さらに、得られたデータから一日のタンパク摂取量の指標となる尿素/クレアチニン比や、一日の塩分摂取量の指標となるNaCl/クレアチニン比が算出可能で、近年普及の著しい臨床現場即時検査(POCT)用の装置としての適用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this project is to realize a low-price optical and reagent-less system for monitoring multiple components of urine. For this purpose, we examined the absorption spectrum of urine in the near-infrared region and selected 10 wavelength based on the concentration dependence of the spectra including "negative absorption" region. These wavelength were also selected by availability in the market as near-infrared LED (1400-2300nm, 100nm step). Using 51 urine samples obtained from diabetics, multiple regression analysis using all combinations of 10 wavelengths was performed. The optimum number of wavelength and their combination for estimating concentration of glucose, urea, NaCl and creatinine were determined by the value of standard error of prediction. The number of wavelengths required for estimating concentration of urine glucose, urea, NaCl and creatinine were 6, 6, 7 and 6, respectively, suggesting possibility of realizing a low-cost optical urine monitoring system.

研究分野：生体医工学

キーワード：尿成分計測 近赤外分光法 在宅ヘルスケア 糖尿病 近赤外LED 試薬レス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

少子・高齢化が急速に進むわが国において「高騰する医療・介護費用の削減」が急務となっており、「治療型から予防型医療への転換」を目指して2008年4月より「特定健診・特定保健指導制度」がスタートした。この健診では身体測定、血圧測定、血液検査、検尿などが必須検査項目となっており、これら項目の長期計測の重要性は自ずと了解できる。

これらの項目のうち、非侵襲的に繰り返し採取可能な『尿』は尿糖、尿タンパク、潜血が定期健康診断で測定され糖尿病や腎疾患、尿路感染症等の診断だけでなく、食塩の1日の尿中排泄量は血圧管理の指標としても用いられている。

在宅下で尿成分を測る方法としては「試験紙法」が最も一般的で、尿糖だけでなく尿タンパク、潜血、pH など多項目の試験紙も市販されている。この方法は家庭で手軽に実施できる反面、尿を試験紙にかけ、余分な尿をふき取り規定時間(通常10秒~20秒)呈色反応を待つなど操作が面倒で衛生面での抵抗感があるなど難点も多い。また測定結果は数値(濃度)ではなく「-、±、+、++」などの記号を用いた「半定量」的なもので、あくまでも「スクリーニング的」な用途に限られるうえに、計測データが電子化されていないため長期・継続的モニタには適していない。

一方、試薬不要(試薬レス)でかつ定量的な方法としては「酵素電極」による尿糖測定法が開発され、携帯型尿糖計やトイレ組込型システムとして実用化されている。特に後者は「在宅長期計測システム」の理想形と言えるが、4カ月毎に酵素電極の交換が必要なうえに価格的問題(本体:23万円、取付料:10万円、年間メンテナンス料:2万円)もあって普及せず、現在は販売中止となっている。また当然ながら「多項目同時計測」の適用は不可である。

2. 研究の目的

本研究ではこのような現状の問題点を解決し、年間8兆円を超える生活習慣病関連の医療費削減に貢献すべく、糖尿病と高血圧症の一次予防及び慢性腎臓病の進行抑制に有用となる光学式の在宅尿成分分析システムの開発を最終目標とした。具体的には尿中の有機成分(尿糖、タンパク、尿素、クレアチニン)に加えて無機成分(塩化ナトリウム)をも試薬を一切用いずに単一の方法(近赤外吸光度計測法)で濃度推定可能なシステムを構築すべく、FT-IR分光計を用いて各成分の濃度推定精度を検証する。次いで、高価な分光器を必要とせず10波長程度の多波長近赤外LEDとフォトダイオードなどの光検出器という簡易・低廉なシステム構成を実現するため使用波長数を10波長程度までに削減する。その際、近赤外領域における水溶液特有の現象である「陰性吸光度(後述)」を示す波長帯も積極的に利用し、各成分に適した波長組合せを決定する。

3. 研究の方法

尿中の多成分の濃度が光学的に試薬レスで同時推定可能かどうか検証するため、FT-IR型分光光度計(計測波長750-2500nm、分解能1.667、計測波長数:1050波長)を用いて濃度予測実験を行なった。計測対象尿成分はグルコース(Glu)、尿素(Ure)、塩化ナトリウム(NaCl)、クレアチニン(Crea)の4成分(表1)である。計測サンプルとしては、()健常成人男性の尿にグルコースを添加した「グルコース添加尿」、()糖尿病が疑われる55歳男性の随時尿(高尿糖随時尿)、()糖尿病患者尿(51名分)の3種類とした。測定手順は次のとおりである。

表1 各成分の計測意義

Glu	糖尿病早期発見の指標。腎疾患や肝硬変などで高値を示す。
Ure	慢性腎臓病の進行予防のための蛋白摂取量把握に用いる。重症肝障害で低値を示す。
NaCl	塩分摂取量の指標。主に高血圧症などの栄養管理に用いる。
Crea	24h蓄尿に代わって尿量の総排出量推定に用いる。脱水や重症腎機能不全で低下。

- 1) 光路長0.5mmのフローセルに水と尿サンプルを交互に注入。
- 2) 入射光 I_0 を照射し、透過光 I_w と I_s を得る。
- 3) 各透過光強度を用いて差分吸光度 $Abs = \log_{10}(I_w/I_s)$ を求める。
- 4) 外部臨床検査機関にて事前に測定した尿成分濃度(実測濃度)と各波長に対する Abs を用いてPLS回帰または重回帰分析により予測濃度を求める。
- 5) 実測濃度と予測濃度の相関分析により相関係数()および標準予測誤差(SEP)を求め濃度予測精度を評価する。

次に光学的方法における実用化の最重要課題である「使用波長数の削減」について、以下に示す方法で各成分10波長以下での濃度予測実現を目指した。

- 1) FT-IR装置の計測波長域(750-2500nm)における全波長データ(1,050個)を用いてPLS回帰によりモデル構築し、およびSEPを評価指標として各成分の濃度推定精度を検証。
- 2) 次に各成分の感度波長帯のみを使用したときの濃度推定精度を求め、全波長使用時の精度と比較。なお波長帯選定に際しては、溶質の濃度増加に対して吸光度が減少する(透過光強度が増加する)いわゆる「陰性吸光度」を示す波長帯も積極的に利用する。
- 3) 市販の近赤外LEDで入手可能な波長10種類を光源として使用した場合を想定し、FT-IRにおける該当波長の吸光度データを用いて「総当り方式(後述)」により至適波長数とその組合せを決定する。

4. 研究成果

(1) FT-IR 装置の計測範囲全波長 (1,050 個) を用いた濃度予測実験結果

以下、標記検討事項について述べるが、紙面が限られているので上述した3種類のサンプルのうちの結果は省略し、の「グルコース添加尿」との「糖尿病患者尿」についてのみ記述する。

グルコース添加尿の濃度予測結果

21-23 歳の健常成人男性 11 名から随時尿を採取し、それぞれの尿にグルコースを 0-500 [mg/dl] (市販尿試験紙の測定範囲) の 11 段階に添加し、計 121 サンプルを計測サンプルとした。なお原尿中の尿素、塩化ナトリウム、グルコース、クレアチニンについては臨床検査センターに委託し濃度を決定した。

得られたサンプルに対して 750-2500[nm] の波長範囲で各波長での差分吸光度 Abs を測定し、グルコース、尿素、塩化ナトリウム、及びクレアチニンの各濃度を従属変数とし、全 121 サンプルのデータを用いて PLS 法により回帰分析を行った。解析ソフトには「総計ソフト R」を使用し、予測濃度と実測濃度の相関係数()及び平均予測誤差(SEP)により予測精度を評価した。

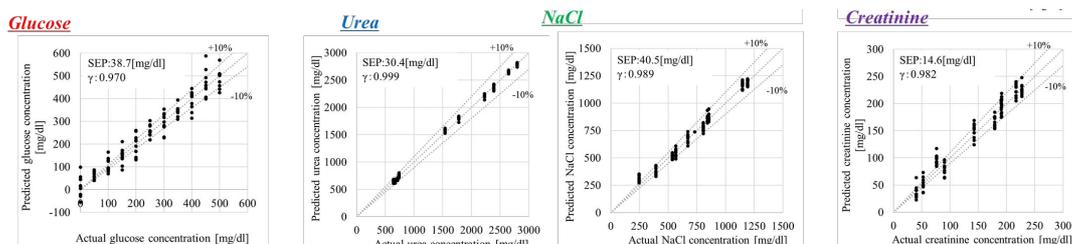


図1 グルコース添加尿における濃度予測結果 (使用波長数: 1,050)

図1にグルコース、尿素、塩化ナトリウム、及びクレアチニン各成分の濃度予測結果を示した。濃度予測精度は、グルコースについては $r=0.970$ 、 $SEP=38.7$ [mg/dl]、尿素は $r=0.999$ 、 $SEP=30.4$ [mg/dl]、塩化ナトリウムは $r=0.989$ 、 $SEP=40.5$ [mg/dl]、クレアチニンは $r=0.982$ 、 $SEP=14.6$ [mg/dl] となり、光学的な方法でグルコース添加尿の各成分濃度を高精度で濃度予測可能であることが確認された。

糖尿病患者尿の濃度予測結果

上記で使用したサンプルは健常成人から採取した尿にグルコースを添加することで「高血糖状態」を模擬したものであった。そこで実際の「高グルコース尿」においても上記と同様な精度で尿成分の濃度を推定可能か検討するため、糖尿病患者の尿を対象に濃度予測実験を行った。

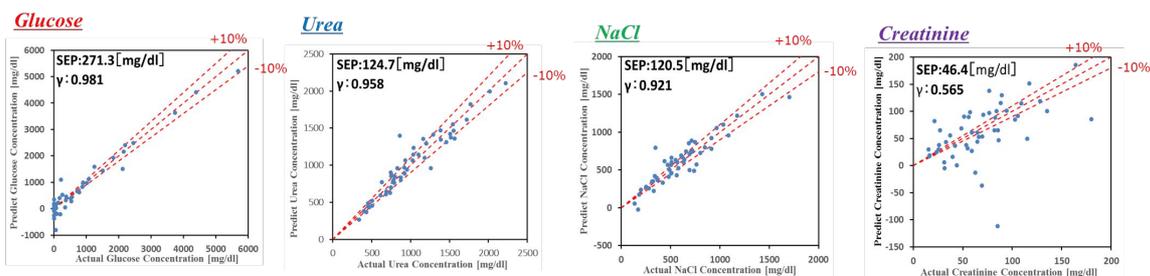


図2 糖尿病患者尿における濃度予測結果 (使用波長数: 1,050)

図2はその結果で、左端のグルコースの結果を見ると実測のグルコース濃度が数千 mg/dl という極めて高い値を示していることがわかる。このように糖尿病患者尿ではグルコース濃度が広範囲に渡るため、グルコース濃度予測における r の値は 0.981 と極めて高い値を示している。しかし本来「ホームヘルスケア」で対象とすべき濃度範囲は 50~500mg/dl 程度であり、この領域ではばらつきが多いことが判る。

一方、このようにグルコース濃度が大きく変動しているにも拘らず、尿素及び NaCl の濃度予測精度は $r > 0.9$ と良好であった。しかしクレアチニンについては (もともと尿中の生理的濃度が低いこともあってか) $r=0.565$ と予測精度の向上が必要と考えられた。

(2) 濃度予測精度の向上と使用波長数の削減

前項では FT-IR の測定範囲における全ての波長 (1,050 波長) を用いて PLS 解析を行った。しかし図3に示すように、単一成分水溶液における感度波長(濃度変化に対して Abs が変化する波長)は、1,050 個の波長のうち極めて限られた帯域で

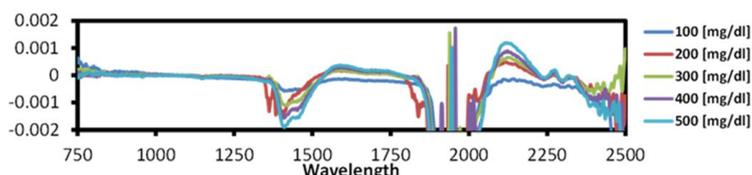


図3 グルコース単一成分水溶液における Abs スペクトルの濃度依存性

あることが判る。逆に言えば、感度波長以外の波長を用いることが濃度推定精度の低下を招いている可能性も否定できない。

そこで単一成分水溶液における成分濃度と Abs との相関係数を 1,050 個の波長毎に求め、波長と相関係数との関係を示したのが図 4 である。これと同様の解析を他の 3 成分についても行い、4 成分に共通して高い相関係数を示す波長域（計 236 波長）を選び出した（具体的な波長域は非開示）。なおその際、相関係数が「+1」だけでなく「-1」の波長域、すなわち「陰性吸光度」を示す領域も積極的に利用することとした。

この様にして得た 3 波長域のデータを用いて、糖尿病患者尿の濃度推定を PLS 回帰により行った結果が図 5 である。この結果より、解析に使用する波長を（陰性吸光度を示す波長を含め）「感度波長」に絞ることで濃度予測精度が格段に向上することが明らかとなった。

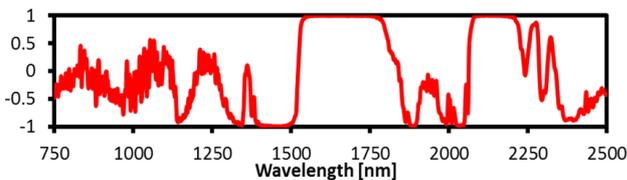


図 4 グルコース単一成分水溶液における溶質濃度と Abs の相関係数スペクトル

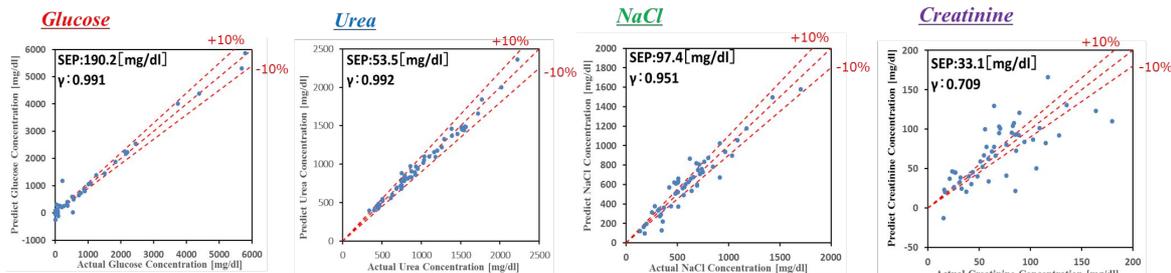


図 5 糖尿病患者尿の濃度予測結果（3 波長域：236 波長使用）

(3) 「総当り解析」による使用波長数の更なる低減

前項では使用波長数を「1,050」から「236」まで削減できたが、依然として「近赤外 LED を光源とした簡易光学システム」の実現にはほど遠い数字（波長数）である。そこで次のような方法により「10 波長以下」で各成分の濃度予測可能な最適波長数とその組合せを決定した。

まず最初に現状で入手可能な近赤外 LED の波長を調べたところ、1400～2300nm の範囲の 10 波長であることが判った。そこでこれらの波長における Abs のデータを用いて、表 2 に示す 1,023 通りの全ての波長組合せについて重回帰分析を行った。そして波長数と標準予測誤差（SEP）を評価指標として、使用する波長数が可能な限り少なく、かつ SEP が小さい波長の組合せを決定した。

表 2 波長組合せ数

波長数	組合せ数
10	1
9	10
8	45
7	120
6	210
5	252
4	210
3	120
2	45
1	10
計	1,023

図 6 は糖尿病患者尿の尿素濃度予測における使用波長数と各波長における最小 SEP 値との関係を示したもので、この結果より波長数を 1 から増やしていくことで各波長数における最小 SEP 値が減少し、測定精度が向上していくことが判る。しかし波長数 4 を超えたあたりで SEP の減少傾向は緩徐になり、6 以上ではほぼ一定となっている。このことから尿素計測に当たっては「波長数 6」が最も好ましい（使用する波長数が可能な限り少なく、SEP が少ない）値であることが判る（SEP 最小となる 6 波長の組合せについては非開示）。これと同様にしてグルコース：6 波長、NaCl：7 波長、クレアチニン：6 波長の最適組合せを決定した。

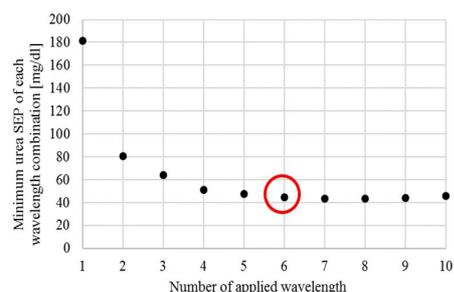


図 6 尿素濃度予測における使用波長数と SEP 最小値との関係

図 7 はこれらの波長を用いて 4 成分の濃度推定を行った結果で、NaCl では 7 波長、それ以外の 3 成分では 6 波長という桁台の少ない波長数で $\gamma = 0.810 \sim 0.995$ と極めて良好な精度で各成分の濃度予測が可能であることが明らかとなり、LED を光源とした簡易尿成分計測システム具現化の見通しが得られた。

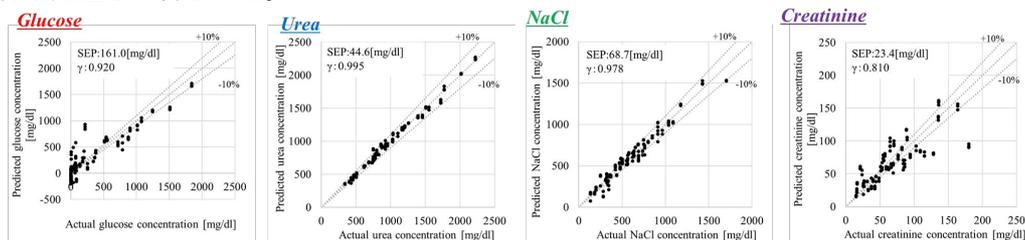


図 7 総当り法で得た 6～7 波長による解析結果（糖尿病患者尿の濃度予測結果）

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) I. Suzuki, M. Ogawa, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, K. Yamakoshi, S. Tanaka, Reagentless estimation of urea and creatinine concentrations using near-infrared spectroscopy for spot urine test of urea-to-creatinine ratio, *Advanced Biomedical Engineering*, Vol.7, pp. 72-81 (2018 年)
- (2) 野川雅道、田中志信：コロイド粒子系における古典的密度関数法を用いた血液の光散乱特性の導出、計測自動制御学会論文集、52 巻、pp. 458-466 (2018 年)

〔学会発表〕(計14件)

- (1) 田中志信、鈴木郁斗、清野公宏、野川雅道、内藤 尚、五十嵐朗、小川充洋、高田重男、山越憲一：近赤外分光法による尿成分濃度推定と使用波長数削減の試み、日本分光学会近赤外分光部会 第 14 回シンポジウム ~ 近赤外分光法の生命科学への応用と装置開発 ~ (2019 年)【招待講演】
- (2) I. Suzuki, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka, NIR spectroscopic prediction of urinary components for management of protein and salt intake, 41th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Berlin, Germany, July 2019. (accepted)
- (3) I. Suzuki, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka, A reagent-less system for monitoring Urinary multi-components using near infrared spectroscopy, 40th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Honolulu, US, August 2018.
- (4) I. Suzuki, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka, An optical system for monitoring urine components for home healthcare- Accuracy assessment using urine from multiple diabetic subjects-, 39th Annual International Conference of The IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Jeju island, Korea, July 2017.

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学理工研究域 人間適応制御研究室 研究紹介

<http://www.me.se.kanazawa-u.ac.jp/biomed/research/urinaryglucose.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小川 充洋

ローマ字氏名：Mitsuhiro OGAWA

所属研究機関名：帝京大学

部局名：理工学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30322085

研究分担者氏名：野川 雅道

ローマ字氏名：Masamichi NOGAWA

所属研究機関名：公立小松大学

部局名：保健医療学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 40292445

(2)研究協力者

該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。