

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12615

研究課題名(和文) 体表部の中赤外減衰全反射測定による無侵襲血中脂質濃度予測

研究課題名(英文) Non-invasive prediction of blood lipid concentrations by mid-infrared attenuated total reflection measurement on the body surface

研究代表者

木野 彩子 (Kino, Saiko)

東北大学・医工学研究科・学術研究員

研究者番号：30536082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：無侵襲での血中脂質濃度計測を目的とし、中赤外減衰全反射(attenuated total reflection：ATR)法をベースとする光学的手法を用いて、ヒト皮膚表面の赤外吸収スペクトルを取得し、スペクトルからの多変量解析による血中脂質濃度予測を試みた。血中TG濃度の一個外し交差検証によるPLS予測では実測値との相関係数は0.6程度、血中LDL/HDLコレステロール濃度においては実測値との相関0.8以上と比較的良好な結果を得た。異なる被験者間での回帰直線や各吸収波数の寄与度の一致も確認された。さらに各コレステロールに関しては、精度は不足するものの単一の吸収強度からの予測可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

無侵襲での血中脂質濃度計測を目的とし、中赤外減衰全反射(attenuated total reflection：ATR)法をベースとする光学的手法を用いて、ヒト皮膚表面の赤外吸収スペクトルを取得し、スペクトルからの多変量解析による血中脂質濃度の予測を試みた。皮膚表面のスペクトルにおいて摂食前後で変化の大きい吸収波数、また血中濃度PLS予測において寄与度の高い吸収波数に着目することにより、各脂質成分の代謝の過程を考察することができた。交差検証の結果、脂質成分によっては高い精度で堅牢な予測可能性を示し、「未病」の観点からも社会的要望の高い血中成分の無侵襲測定の実現に向け前進したといえる。

研究成果の概要(英文)：To measure blood lipid concentrations noninvasively, we attempted to predict blood lipid concentrations by multivariate analysis of infrared absorption spectra of human skin surface using an optical technique based on attenuated total reflection (ATR) in the mid-infrared region. The PLS prediction of blood TG concentration by one-off cross-validation showed a correlation coefficient of about 0.6 with the measured value, and that of blood LDL/HDL cholesterol concentration with the measured value was 0.8 or higher, which is relatively good. The regression line and the contribution of each absorptive wave number among different subjects were also consistent. Furthermore, for each cholesterol, predictability from a single absorption intensity was demonstrated, although the accuracy was lacking.

研究分野：赤外分光

キーワード：血中脂質 無侵襲 中赤外分光 PLS回帰

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症は血中に存在するコレステロールや中性脂肪の値が基準範囲を逸脱した状態を指し、動脈硬化など様々な疾患につながる原因として知られている。脂質の代謝には数時間を要するため、診断に際しては長時間にわたり医療機関に拘束され採血検査を受けなければならないのが現状であり、無侵襲測定法の開発への要望は高い。

脂質成分を光学的に測定するための手法として、中赤外減衰全反射 (ATR) 分光を用いたものが挙げられる。分子の基準振動に基づく中赤外光の吸収は、高感度かつ如実にその構造と周辺環境を描出することが可能であるため、高精度かつ高感度な分析が期待できる。しかし ATR 法における生体組織への光のしみ込み深さは原理的に体表面下の数 μm に限定されるため、実際に検出されるのは体細胞間質液中の成分のみであり、血中の脂質とは完全には一致しない。

末梢細胞における脂質代謝に関しては、例えばコレステロール分子の低密度リポタンパク質 (LDL) による輸送と細胞膜上 LDL 受容体による細胞内への取込 (エンドサイトーシス)、細胞外への放出 (エキソサイトーシス) と高密度リポタンパク質 (HDL) による逆輸送等、血中濃度を基準範囲内に保つための機序の詳細が生理学的な研究によって解明しつつある。しかし、インビトロの実験では生体内における実際の膜輸送速度や、代謝過程で起こる体細胞間質液中の各脂質成分の濃度変化を知ることが難しい。

そこで本研究における学術的な問いは、体表から得られる間質液と、採血により得られる血液の両方において、複数の脂質代謝成分に関するリアルタイムかつ高精度な赤外分光分析を行うことにより、末梢血管から体細胞間質液への輸送速度や代謝機序をインビボで明らかにすることができるか、というところであった。

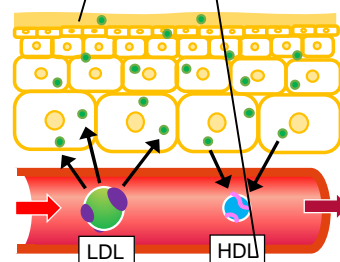
申請者はこれまでに、非侵襲な血中グルコース濃度測定を目的とし、フーリエ変換赤外分光器 (FTIR)、赤外光伝送が可能な中空光ファイバ、そして減衰全反射 (ATR) プリズムを組み合わせたリモート分光システムを開発してきた。このシステムは多重反射 ATR プリズムの導入により感度向上を達成し、測定の再現性と精度は大きく向上した。口唇粘膜を対象とした測定では吸収スペクトルからの予測血糖値と実測値の誤差が 20% 以内となり、血糖測定器として「臨床的測定精度を有する」評価を達成している。非侵襲血糖測定においては寄与率の高い吸収波数域が複数選定され、これらを組み合わせた回帰モデルが構築されており、すでに実用化に向け単波長量子カスケードレーザ (QCL) 等の小型光源を導入済の段階にある。

この血糖測定の精度改善の過程において、糖と脂質の代謝には互いに密接な関わりがあり、特に日内変動など長時間にわたる連続測定においては他方を無視できないことがわかってきた。右図は指先の吸収スペクトルの測定例であるが、摂食後 3 時間まで中性脂肪 TG の基幹構造グリセロール由来の吸収 (着色部分) が顕著に増大している。測定系の最適化が達成されたことを差し引いても、予備実験の段階での脂質濃度予測は血糖よりもかなり良い結果を示しており、これまでのノウハウを活かした脂質濃度予測モデルの構築は十分可能と考え、本研究の着想に至った。

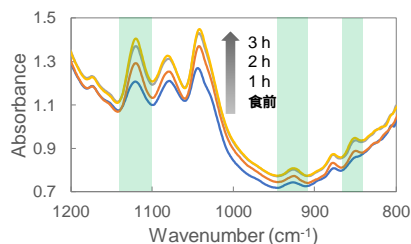
2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、右図に示すように指先などをセンサ部に触れるだけで、血中の脂質成分を高精度かつリアルタイムに測定することが可能なシステムを構築することである。本システムはフーリエ赤外分光器 (FT-IR)、中赤外光伝送用中空光ファイバ、多重反射型 ATR プリズム、および半導体 (HgCdTe) 検出器からなる。プリズムの表面にサンプルを配置すると、光がプリズムとサンプル表面の境界で全反射する際に、プリズム外表面に染み出るエバネセント場のパワーの一部がサンプルに吸収される。これによりサンプルの吸収スペクトルを得ることができる。赤外分光法を用いて、各種脂質成分の濃度変化測定を全血と体表部の双方で行うことにより、当該物質の末梢血管から体細胞への輸送 / 取込時間に関する情報をインビボで得る。この情報を用いて、体表細胞へのアクセスから血管内脂質濃度を予測し、採血不要の無侵襲測定法を構築する。

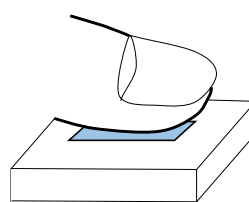
* 体表部と全血の赤外スペクトルを同時に取得 / 比較し脂質濃度変化の時間遅延情報を得る



末梢血管 細胞間におけるコレステロール分子の輸送イメージ



体表面 (指先) スペクトルの摂食後時間変化



測定装置の概念図

3. 研究の方法

非侵襲血中脂質濃度測定方法を確立するため、主要な3つの成分

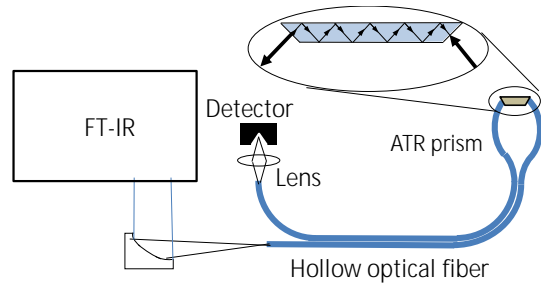
中性脂肪トリグリセリド(TG)

低密度リポタンパクコレステロール(LDL)

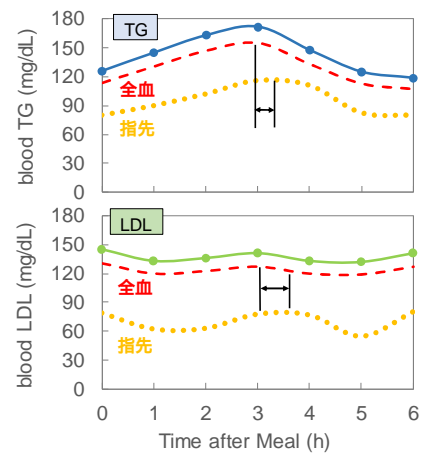
高密度リポタンパクコレステロール(HDL)

に着目する。体表部(指先)および近傍の毛細血管より採取した全血について、それぞれATR分光測定を行う。血液の測定においても遠心分離等の前処理は不要であり、採取後直ちに全血のまま乾燥を防ぎながら20秒程度の測定を行うことで、凝固の影響を排除しつつ十分なS/Nが得られる。同時に、全血試料については酵素比色法に基づく血中脂質計測器(Abbott, Alere Afinion Analyzer)を用いて、指標となる脂質成分濃度を測定する。

右図に全血中の各脂質成分濃度の実測値の摂食後時間変化例、および予想される間質液中の脂質成分濃度推移を示す。まず全血の赤外スペクトルにおいて、目的とする脂質成分由来の吸収のうち、強度推移が実測値に追従しており、他成分由来の吸収の重畳などの影響が少ない波数域を選定する。タンパク質や糖類など他成分の影響を除去する必要が生じる場合には、群別の追跡を行い既知の代謝機構に照らし合わせることにより、吸収ピークの分離を試みる。次に体表部(指先)の赤外スペクトルにおいて、同じ波数域の吸収強度推移より、間質液中の各脂質成分の濃度変化を推測する。TG, LDL, HDLそれぞれについて、全血および間質液中の濃度変化の時間差から、代謝および体表細胞への輸送/取込に要する時間のデータを集積する。この結果より、時間遅れを仮定したPLS回帰分析によって、各成分の濃度予測を行い、最も高い相関係数が得られる時間遅れを探索する。注目すべき波数域、および全血-間質液間の輸送速度に関するこれらの結果を総合的に考慮することにより、体表から得られる間質液中の脂質成分情報から、血中脂質を正確に予測するためのモデルを構築する。



FT-IRによる吸収スペクトル測定装置



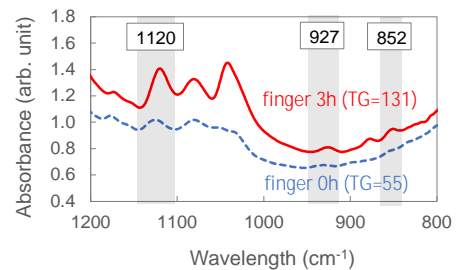
摂食後の血中脂質濃度(実測値)と予想される間質液中の濃度推移

4. 研究成果

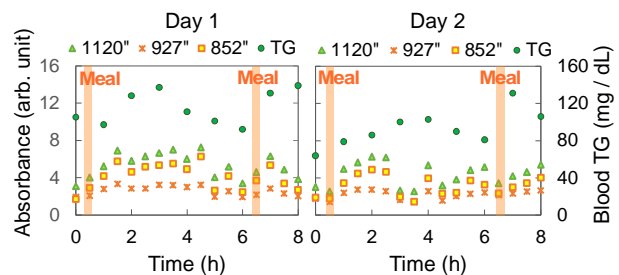
(1) 体表部スペクトルからの血中TG濃度予測

図に測定開始時(摂食前)および3時間経過時の指先のATRスペクトルの例を、その時点の血中TG濃度(単位はmg/dL)とともに示す。同日の血中TG濃度は1回目の摂食後に上昇し、3時間時点で最大値となり以降は2回目の摂食開始まで減少に転じている。指先には角質層が存在し、皮膚組織を構成するタンパク質や脂質の吸収が常に高いレベルで観測されるが、スペクトルには摂食の前後で随所に明瞭な変化が現れている。これらの変化の大きい波数域を、まずTGの一種であるラウリン酸の標準スペクトルと照合したが、期待された合致は見られなかった。TGが組織細胞内に取り込まれる際には、その大部分が酵素反応によって遊離脂肪酸(free fatty acid; FFA)およびTGの基幹構造グリセロールへと加水分解されており、脂質由来の吸収としてはこれらが支配的であると考えられる。そこで摂食前後の変化が大きく表れた波数域のうち、FFAおよびグリセロール由来の吸収と考えられる3つの波数域1120 cm⁻¹(FFA)、927 cm⁻¹および852 cm⁻¹(グリセロール)に着目した(図の着色部分)。

これらの波数域における吸収強度の2日分の測定結果を、直接測定された同日の血中TG濃度とともに示す。3つの波数域の吸収強度はいずれの測定回においても同様の時間推移を示したが、短時間のうちに上



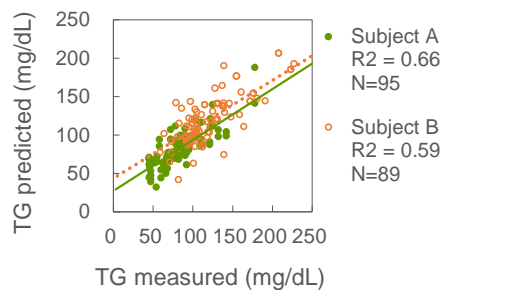
摂食前後の指先のATRスペクトル変化



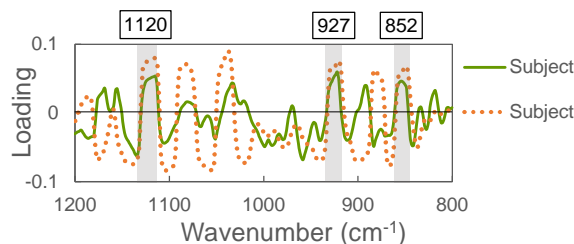
血中TG濃度および3波数(1120, 927, and 852 cm⁻¹)における指先の吸収強度推移。

下動を繰り返す傾向にあり血中 TG 濃度推移とは一致しない。摂食後の脂質代謝の過程において供給と消費が繰り返され、細胞内の濃度を一定の範囲内に保つ機構が働いていると考えられる。

代謝の過程には非常に多くの物質が関与しており、スペクトル情報からそれらの寄与度を分離抽出するためには多変量解析の導入が必須となりつつある。スペクトルと同時に取得された血中 TG 濃度の測定値を目的変数、波数域 3000 – 500 cm^{-1} における指先の吸収強度を説明変数とし、成分数 3 の leave-one-out 交差検証により PLS 回帰を行った。図に異なる被験者 2 名における、指先の ATR スペクトル吸収強度からの血中 TG 濃度への回帰直線を示す。2 名の測定データによる回帰直線は、切片の値はやや異なるものの傾きはほぼ一致していた。濃度予測値の実測値との相関係数 R^2 は両者とも 0.6 程度であり、互いの回帰直線を用いた場合の相関の低下は 0.04 程度であった。この結果より、未知の取得スペクトルからの血中 TG 濃度予測もある程度の精度で可能であることがうかがえる。TG 濃度予測における各説明変数の寄与度を示す因子負荷量プロットにおいては、両者とも先述の 3 波数域 1120 cm^{-1} 、927 cm^{-1} 、および 852 cm^{-1} の寄与度が高く、着目すべき波数域としては裏付けがなされたといえる。



(a)



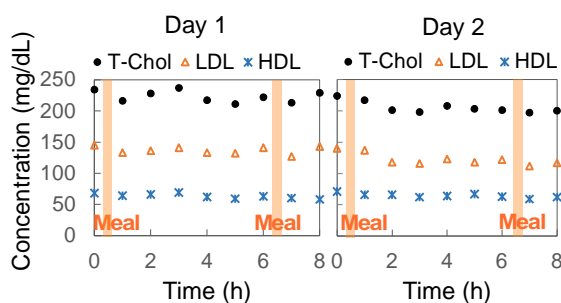
(b)

(a) 指先の吸収スペクトルからの血中 TG 濃度予測値
(b) 血中 TG 濃度予測における吸収強度の因子負荷量

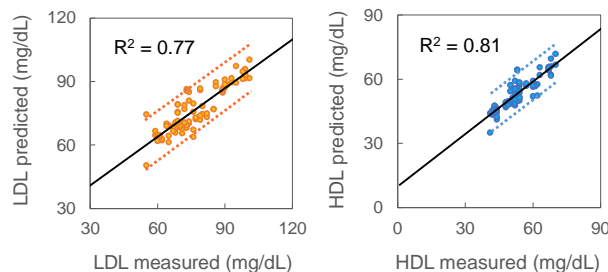
以上のように、血中 TG 濃度に関しては体表部のスペクトル情報を用いて、ある程度の精度で予測が可能であることを示した。しかし予測値の実測値との残差は区間内での偏りはないものの全体的に高く、95% 予測区間は実測値中央で $\pm 30\%$ 以上となり、現状では精度不足といえる。今後もデータ数の拡大とともに、堅牢かつ予測精度の高い血中 TG 濃度への回帰モデルを模索してゆく予定である。

(2) 体表部スペクトルからの血中コレステロール濃度予測

図に直接計測された血中 T-Chol, HDL, LDL 濃度の摂食前後の推移について、2 日分のデータを示す。いずれの数値も TG ほどの大きな変動は見られず、特に相対的に低濃度となる HDL では変動の範囲もかなり小さいことが分かる。血中コレステロール濃度を反映する体表部スペクトル吸収の時間推移追跡による探索は難しいため、当初より多変量解析を試みた。波数域 3000 – 500 cm^{-1} の吸収強度を説明変数とした場合の、指先の ATR スペクトルからの血中 LDL および HDL 濃度の PLS 回帰の結果を示す。いずれも TG の場合と同様、成分数 3 で leave-one-out 交差検証を行っている。それぞれ実測値に対する相関は 0.77 および 0.81 となり、95% 予測区間 (図中点線内) も基準濃度範囲の $\pm 10\%$ 以内に収まるなど比較的良好な結果が得られた。血中濃度の予測精度が中性脂肪よりも高かったことから、コレステロールでは間質液中の濃度変化が、血中のそれをリアルタイムでよりよく反映していると考えられる。また LDL および HDL 濃度予測における因子負荷量プロットの形状はよく類似しており、いずれも寄与度の高い吸収波数としてはリン脂質由来の 1240 cm^{-1} および 1080 cm^{-1} 、カルボキシレートアニオン由来の 1400 cm^{-1} 等が挙げられる。これらは両者に共通するリポタンパク粒子自体の構成を示すものである。



血中 T-Chol, LDL, HDL 濃度の摂食前後の推移



(a)

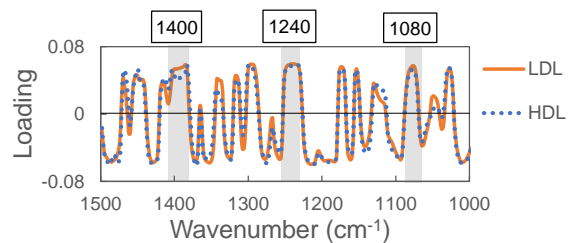
(b)

指先の吸収スペクトルからの血中(a)LDL および(b)HDL 濃度予測

(3)まとめ

摂食前後の体表部（指先）の赤外吸収スペクトルを測定し、その推移を同時刻に直接測定により得た血中の脂質成分濃度と比較しながら追うことにより、スペクトル情報からの無侵襲血中脂質濃度予測を試みた。中性脂肪 TG に関しては、全スペクトル情報からの血中濃度への PLS 回帰直線が異なる被験者間でよく近似し、無侵襲での予測可能性を示したが、95%予測区間が実測値の $\pm 30\%$ 以上とその精度は不足していた。一方 LDL, HDL コレステロール濃度に関しては、体表部の全スペクトル情報からの血中濃度への PLS 回帰結果は実測値との相関も比較的高く、95%予測区間も実測値の $\pm 10\%$ 程度と良好な結果であった。

以上のように、体表部への光学的なアクセスにより、無侵襲で脂質成分の血中濃度に関する情報が得られることを示した。指先のような比較的厚い角質層に覆われた部位においても、代謝の状態をリアルタイムで反映した間質液中の成分変化の観測が可能であることを示した画期的な成果といえる。ただし今回の被検者は健常者のみであり、基準範囲外の血中濃度予測については評価に至っていない。今後も試行数および条件の拡張を図ると共に、体表部スペクトル情報からのより良い血中脂質濃度予測モデルの構築を目指していく予定である。



指先の吸収スペクトルからの血中 LDL および HDL 濃度予測における吸収強度の因子負荷量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 木野彩子, 小西格司, 松浦祐司	4. 巻 49
2. 論文標題 中赤外分光法を用いた無侵襲血中脂質分析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 レーザー研究	6. 最初と最後の頁 516-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 木野彩子, 松浦祐司	4. 巻 48
2. 論文標題 赤外分光法による無侵襲血中脂質分析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 52-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三上のどか, 木野彩子, 松浦祐司
2. 発表標題 中赤外光を用いた光熱偏向分光測定による生体分析
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木亮太, 木野彩子, 松浦祐司
2. 発表標題 中赤外パルス光誘起超音波を用いた光音響分光法による生体測定の試み
3. 学会等名 日本光学会年次学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木野彩子, 小田直樹, 金森政之, 新妻邦泰, 富永悌二, 松浦祐司
2. 発表標題 血漿の赤外吸収スペクトルからの脳腫瘍スクリーニングの試み
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木亮太, 木野彩子, 松浦祐司
2. 発表標題 圧電トランスデューサを用いた中赤外光音響分光法による生体分析
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木野彩子, 伊達政滋, Ine Larsen Jernelv, 松浦祐司
2. 発表標題 中赤外分光用ヒト口唇粘膜ファントムの調製と評価
3. 学会等名 第68回応用物理学会春期学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木野彩子, 小西格司, 松浦祐司
2. 発表標題 体表部の赤外ATR測定による血中脂質濃度へのアプローチ
3. 学会等名 電気学会 光・量子デバイス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T. Koyama, S. Kino, T. Sasaki, Y. Wada, R. Kasahara, Y. Oba, Y. Matsuura
2. 発表標題 Measurement and uniformization of power distribution on the prism for biomedical applications of mid-infrared, attenuated-total-reflection spectroscopy
3. 学会等名 SPIE. Photonics West 2021 Digital Forum (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松浦 祐司 (Matsuura Yuji) (10241530)	東北大学・医工学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------