

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870130

研究課題名(和文) 中赤外光を用いた非侵襲的血糖値測定のためのスペクトル解析法の開発

研究課題名(英文) Development of the spectral analytical algorithm for determination of noninvasive blood glucose using mid-infrared spectroscopy

研究代表者

佐藤 謙一 (SATO, Kenichi)

国際医療福祉大学・保健医療学部・講師

研究者番号：90505687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検査において血中成分測定(血液検査)は、病態把握、治療経過観察、診断の根拠のために重要である。現在の標準的な検査法では、高価な試薬と装置が必要であり、測定時間は10分程度から数時間程度かかる場合もある。本研究課題では、中赤外スペクトル解析法を血中成分測定に適用することにより、無試薬で簡便な操作かつ短時間測定(1分程度)可能な検査法の開発を試み、さらに採血を要しない非侵襲検査への応用を検討した。

研究成果の概要(英文)：Determination of blood component (blood test) in clinical laboratory is important for clinical condition grasp, treatment follow-up and evidence of diagnosis. The current standard methods need expensive reagents and devices and take measurement time for around several hours from around ten minutes. Mid-infrared spectroscopy is a simple and reagent-free physicochemical analysis method, and is a potential alternative to more time-consuming and labor-intensive procedures. In this project, we have developed of mid-infrared spectroscopy for blood component determination and examined application to noninvasive testing without drawing blood.

研究分野：病態解析、核酸解析

キーワード：中赤外スペクトル解析 血中成分測定 血中グルコース測定 全血試料無試薬測定

1. 研究開始当初の背景

臨床検査における血中成分測定（血液検査）は、病態把握、治療経過観察、診断の根拠のために重要である。現在の標準的な検査法では、高価な試薬と装置が必要であり、測定時間は10分程度から数時間程度かかる場合もある。また、糖尿病患者には血糖値管理が必須であり、非侵襲的（無採血無痛）連続血糖測定が望まれ、これまでは、特に近赤外スペクトル測定技術に基づく研究が多くなされてきたが1)~3)、実用化に至る測定精度は得られていない。これは血中の多種多様な分子の中からグルコース分子由来の弱いシグナルを検出すること、患者個々で測定部と接する体表部の状態が様々であることに起因する。中赤外スペクトル解析では指紋領域なるものが存在し、近赤外スペクトルにはない詳細なスペクトル情報を取り扱うことができる。血液より血球成分を除いた血清試料の中赤外スペクトル解析によって、血中グルコース（血糖）、蛋白質、コレステロール、トリグリセリド、尿酸など種々の血中成分定量測定が可能である4)~7)（図1）。メタボリックシンドロームに關係する高脂血症患者では、治療方針決定のための病型分類のために、その主たる成分が何かを判断する必要があるが、その測定には、煩雑で長時間を要する手技が必要である。我々は、血清試料の中赤外スペクトル解析により、高TG血症に必要な血清カイロミクロン-TG及びVLDL-TG濃度測定を無試薬で簡便に数分で行えることを報告した8)（図2）。

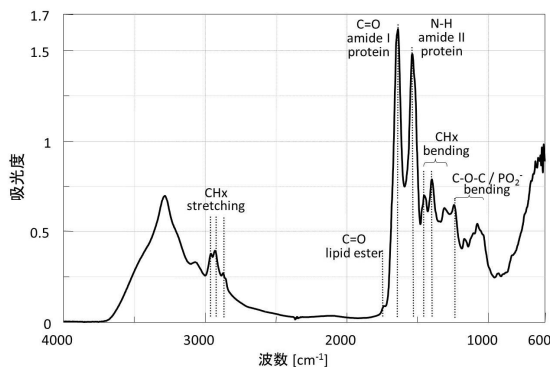


図1. 乾燥血清の赤外スペクトル

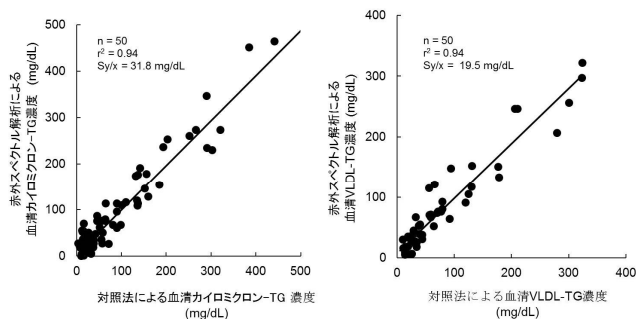


図2. 赤外スペクトル解析による血清カイロミクロン-TGとVLDL-TG

全血を試料とした中赤外スペクトル解析では、血清を試料とするより遠心操作などの前処理が不要になるため取扱いが非常に簡単になり、無試薬測定が可能であるという大きなアドバンテージがあるが、中赤外光は水分子による非常に強い吸収を受けること、血球成分による干渉を受けることにより、測定精度が劣ってしまう9)。現在、自施設で血液検査が実施できず、検査センターなどに依頼している診療所などは多くあり、検査結果を得るまでに数日を要することもある。遠心操作や試薬を必要としないため、簡便で迅速に測定結果を得ることができる血中成分測定機が実現できれば、上述の診療所などでは有用な測定機となるものと考えられる。

2. 研究の目的

第一の目標として全血試料を対象とした、血糖値、ヘモグロビンA1C、グリコヘモグロビンなど糖尿病マーカーを含めた中赤外光スペクトル分析による無試薬迅速多項目測定器の実現のためのスペクトル解析手法を開発することとした。近年レーザー光源開発が進み、中赤外領域レーザー光源の使用が可能となった10),11)。中赤外スペクトル解析には分光器が用いられてきたが、レーザー光源は分光器光源に比べ数100倍の分解能をもち、高精度なスペクトル解析が可能と考えられる（図3）。また、レーザー光源を用いることにより手のひらサイズのコンパクトデバイスに組み上げることも可能である。第二の目標として、中赤外レーザー光源を適用するための前段として、汎用の赤外分光計を用いて、上述全血試料スペクトル解析法を経皮的非侵襲的血糖値測定に応用・開発することを目的とした。

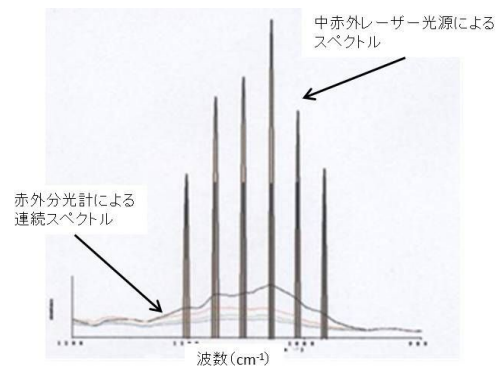


図3. 中赤外レーザー光源によるスペクトル

文献

- 1) MR Robinson, et al. CLIN.CHEM.38 (9):1618-1622 (1992).
- 2) JJ Burmeister, et al. CLIN.CHEM 45(9):1621-1627 (1999).
- 3) K Maruo, et al. Appl Spectrosc. 60

- (12):1423-31(2006).
 4) Shaw RA, et al. Ann Clin Biochem 1998; 35 (Pt 5): 624-32.
 5) Petibois C, et al. Clin Chem 1999; 45 (9): 1530-5.
 6) Petibois C, et al. Clin Chem 2001; 47 (4): 730-8.
 7) Liu K, et al. Clin Chem 2002; 48(3): 499-506.
 8) Sato K, et al. Clin Chim Acta 2010; 411: 285-290.
 9) Vonach R, et al. Appl spectrosc 1998; 52(6): 820-822.
 10) Jerome F, et al. Science 1994; 264 (22): 553-556.
 11) Wagner J, et al. Appl. Phys A 2004; 78: 505-512.

3. 研究の方法

(1) 全血試料の中赤外光スペクトル解析

千葉大学医学部附属病院検査部に検査目的で提出された検査終了後の残余 EDTA 加全血検体 150 例を同意を得たうえで試料とした。

中赤外分光計 (FT/IR-4100、日本分光社) を用い波数領域 $800 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ で全血試料の中赤外スペクトル測定を行い、併せて臨床検査室で実施されている対照法によって測定された同試料のグルコース、ヘモグロビン A1C、グリコヘモグロビン、蛋白質、コレステロール、中性脂肪、などの血中成分濃度を測定した。100 例の試料の中赤外スペクトルと対照法による各成分濃度値を用いて検量線を作成した (トレーニングセット)。検量線作成には Partial Least Squares (PLS) 解析および Support Vector Machine (SVM) 解析を用いた。

作成された検量線を用いて残り 50 例の試料の中赤外スペクトルから各成分の濃度値を予測し (テストセット) 対照法にて得られた濃度値と相関分析を行った。

(2) 経皮的非侵襲的測定法の検討

被験者の非侵襲的経皮的中赤外スペクトル測定を行い、測定結果の再現性が高く安定測定に適する測定部位及び測定時間を検索した。

で決定した測定部位及び測定時間にて非侵襲的中赤外スペクトル測定を実施する (30 測定) した。同時に採血を行い対照法による血糖値測定を行った (30 測定)。30 測定のうちの任意の 20 測定に対して、得られたスペクトルと対照法での血糖値を用いて検量線を作成した (トレーニングセット)。検量線作成の為に解析法としては PLS 解析および

SVM 解析を用いた。経皮的スペクトルと並行して、全血を試料とした中赤外スペクトルも測定し、両スペクトルの差を詳細に解析し、疑似皮膚スペクトルなるものを想定し、経皮スペクトルからその差分をとることにより血糖スペクトルを算出する方法を検討した。

残りの 10 測定の中赤外スペクトルと検量線よりスペクトルより予想される血糖値を算出し、従来法で得られた血糖値との間の回帰分析を行った (テストセット)。

4. 研究成果

全血試料 150 検体を対象として、対照法による血糖値、ヘモグロビン A1C、蛋白質、中性脂肪、総コレステロール濃度を測定し、それらの値をもとに、同時に測定した全血試料の中赤外分光スペクトルデータから最適なスペクトル解析法を見出し、スペクトル解析による全血試料の濃度予測法の確立を検討した。スペクトル解析手法として PLS 解析法を用いたところ、グルコース $r=0.9$ 、ヘモグロビン A1C $r=0.4$ 、蛋白質 $r=0.9$ 、中性脂肪 $r=0.7$ 、総コレステロール $r=0.8$ であった。さらなる精度向上の為に SVM 解析を検討したが、PLS 解析法に対して明確な改善には至らなかった。全血試料の中赤外光スペクトル解析では、試料中の水分子の吸収スペクトルが極めて大きく、グルコースのように分子特異的スペクトルが明確なものの、あるいはアルブミンのように血中濃度が極めて高い分子を測定する場合には、良好な相関係数を得ることができるが、分子特異的スペクトルが弱い場合や血中濃度が低い場合には精度の高い定量測定は困難である。そこで、分子特異的スペクトルが明確なグルコースにターゲットを絞り、全血試料解析に用いたスペクトル解析法を、非侵襲的経皮的中赤外スペクトル解析に応用することを検討した。

まず、適した測定部位および測定時間の検討を行い、前腕部にてスペクトル取得時間を 60 秒間とする条件を見出した。この条件にて、非侵襲的経皮的中赤外スペクトル測定と同時に標準的検査法によるグルコース測定 (30 測定) を行い、全血試料での検討に用いたスペクトル解析手法により検量線を作成した。標準法に対して、誤差 10% 未満、相関係数 $r=0.9$ 以上を目標としたが、このスペクトル解析手法では設定値満たせなかった。そこで、このスペクトル解析法をもとに、経皮的スペクトルと全血試料スペクトルの差を詳細に解析することにより疑似皮膚スペクトルを想定し、経皮スペクトルからその差分をとることにより血糖スペクトルを算出するなど、演算方法の最適化を試みたが、目標値の実現には至らなかった (誤差 30%、相関係数 $r=0.7$)。

本研究課題において検討した中赤外スベ

クトル解析法により、全血試料におけるグルコース、アルブミンなどの測定は、臨床検査として現実的な精度を得る可能性を示すデータが得られた(グルコース $r=0.9$ 、アルブミン $r=0.9$)。この中赤外スペクトル解析法を適用することで、無試薬で短い測定時間(1分程度)、極めて操作が簡便な全血試料定量装置の実現の可能性が示唆される。血清分離のための遠心操作を要さず、無試薬で操作が簡便な測定装置は、発展途上国や災害時における検査、または外来診療室やベットサイドでの簡易測定に需要があるものと考えられる。中赤外スペクトル解析法による無試薬・簡便な測定装置を確立することに主眼を置き、引き続き、臨床適用可能な設定を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

- 1 Takatani R, Minagawa M, Molinaro A, Reyes M, Kinoshita K, Takatani T, Kazukawa I, Nagatsuma M, Kashimada K, Sato K, Matsushita K, Nomura F, Shimojo N, Jüppner H. Similar frequency of paternal uniparental disomy involving chromosome 20q (patUPD20q) in Japanese and Caucasian patients affected by sporadic pseudohypoparathyroidism type 1b (sporPHP1B). *Bone* 2015; 79: 15-20 (査読有)
- 2 Kamachi K, Fukushima N, Ando T, Sato K, Ohshima K, Yokoo M, Shindo T, Kubota Y, Kojima K, Kimura S. Coexistence of ALK-anaplastic large cell lymphoma and CD4+ T cell large granular lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2015; 94(3): 539-40. (査読有)
- 3 Ishige T, Itoga S, Sato K, Kitamura K, Nishimura M, Sawai S, Matsushita K, Suzuki K, Ota S, Miyauchi H, Matsubara H, Nakatani Y, Nomura F. High-throughput screening of extended RAS mutations based on high-resolution melting analysis for prediction of anti-EGFR treatment efficacy in colorectal carcinoma. *Clin Biochem.* 2014; 47(18): 340-3. (査読有)
- 4 Sawai S, Satoh M, Mori M, Misawa S, Sogawa K, Kazami T, Ishibashi M, Beppu M, Shibuya K, Ishige T, Sekiguchi Y, Noda K, Sato K, Matsushita K, Kodera Y, Nomura F, Kuwabara S. Moesin is a possible target molecule for cytomegalovirus-related

Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2014; 83(2): 113-7. (査読有)

- 5 Sakairi Y, Sato K, Itoga S, Saegusa F, Matsushita K, Nakajima T, Yoshida S, Takiguchi Y, Nomura F, Yoshino I. Transbronchial Biopsy Needle Rinse Solution Used for Comprehensive Biomarker Testing in Patients with Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2014; (1): 6-32. (査読有)
- 6 Nishimura M, Satoh M, Nishimura S, Kakinuma S, Sato K, Sawai S, Tsuchida S, Kazama T, Matsushita K, Kado S, Kodera Y, Nomura F. Human apolipoprotein E resequencing by proteomic analysis and its application to serotyping. *PLoS ONE.* 2014; 9(1): E85356. (査読有)
- 7 佐藤謙二, 北村彰英. 光で血糖値を測定する—中赤外光スペクトル解析による非侵襲的血糖測定—. *化学* 2013; 68: 68-69. (査読無)

[学会発表](計 6件)

- 1 佐藤謙二. 遺伝学的検査を実践する臨床検査技師の育成. 第55回日本臨床化学会年次集会(2015年11月、大阪)
- 2 Sato K, Itoga S, Ishige T, Kitamura K, Nomura F. Simple and easy hepatitis C virus (HCV) genotyping using high resolution melting analysis (HRMA) together with amplicon post HCV viral load determination. IFCC WorldLab Istanbul 2014 (June 2014, Istanbul)
- 3 佐藤謙二, 糸賀栄, 石毛崇, 松下一之, 澤部祐司, 野村文夫. High Resolution Melting 解析による簡便な HCV genotyping—HCV RNA 定量検査後 PCR 産物を試料として—. 日本臨床検査自動化学会第45回大会(2013年10月、横浜)
- 4 Sato K, Itoga S, Sakairi Y, Ishige T, Matsushita K, Yoshino I, Nomura F. Highly sensitive detection of EGFR mutations using Bronchoscopic Ultra-Micro Sampling in patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). 2013 AACC annual meeting (July 2013, Huston)
- 5 佐藤謙二, 清宮正徳, 澤部祐司, 野村文夫. 中赤外光吸収スペクトル解析による血中成分測定—無試薬で簡便な Chylomicron-Triglyceride(CM-TG)と Very low density lipoprotein-Triglyceride(VLDL-TG)測定—. 第62回日本医学検査学会(2013年5月、高松)
- 6 石毛崇之, 澤井撰, 糸賀栄, 佐藤謙二, 宇津野恵美, 野村文夫, 桑原聡. Multiplex PCR と Repeat primed PCR による遺伝

性脊髄小脳変性症 10 病型の包括的遺伝子
変異解析．第 62 回日本医学検査学会
(2013 年 5 月、高松)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

佐藤 謙一 (Sato Kenichi)
国際医療福祉大学福岡保健医療学部・講師
研究者番号：90505687

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

野村 文夫 (Nomura Fumio)
千葉大学医学部附属病院マススペクトロメ
トリー検査診断学寄付研究部門・教授
研究者番号：80164739

北村 彰英 (Kitamura Akihide)
公益財団法人千葉市産業振興財団理事長
研究者番号：00143248

曾我 公平 (Soga Kohei)
東京理科大学基礎工学部・教授
研究者番号：50272399

中口 俊哉 (Nakaguchi Toshiya)
千葉大学大学院工学研究科・教授
研究者番号：20361412