

赤外分光法による生体成分測定

岐阜大学工学部生命工学科

吉田 敏

[はじめに]

21世紀に入って、ポストゲノム時代の新しい技術開発による医療医学への貢献が再度強く求められている。特に、ゲノム構造解析から個人個人に合った「オーダーメイド医療」等ということも期待され、遺伝子レベルだけではなく、より個人の状態に合わせた測定解析システムの発展が期待される。しかし、個人個人の状態を「測る」という技術は様々あるが、非侵襲的に個人の体の「化学的情報」を速やかに得るという意味ではまだ十分な段階にあるとはいえない。化学的情報とは、生体内にあるタンパク質、脂質、糖質など組織・細胞を構成する成分の量的質的な変化をさすが、それらが様々な細胞の状態の変化(癌化、炎症など病気に関連する変化を含む)に対応して、質的量的な変化をするので、その化学的情報をより精密にかつ非侵襲的に取得し管理することが、今後の医療診断において重要性を増すと考えられる。しかし、これまでの血液、尿などの一般的化学的検査だけでは、体内の状態の一面しか見ることはできず、より患部組織細胞に近い部位の化学的情報が必要になる場合がある。そのような時、光、特に赤外光を用いた技術は威力を発揮すると考えている。このセッションでは、赤外光のなかでも近赤外ではなく通常赤外(波長で2.5 μmから25 μm程度、波数では4000cm⁻¹から400cm⁻¹程度)を使った技術について紹介する。通常赤外領域の分光スペクトルでは、近赤外領域では得られない高度な解像度をもったスペクトル情報が得られる。さらに高度なスペクトル解析によってさらに高解像度な情報も得ることができ、その互いに連関した大きなスペクトルピーク情報を扱う必要が出てくる。その大きな情報量を有効に扱うため、ソフト的にもハード的にも今後一層の技術開発が望まれている。さらに、医療関係者とスペクトル解析の専門部署との緊密な情報交流を行うためにも、新たなネットワークを利用したシステムの構築が課題となる。この一文ではこれまでの研究の一部を紹介し今後の課題について触れたい。

[これまでの赤外分光法の臨床研究への応用の流れ]

非侵襲的な測定という点では、近赤外や通常赤外光を用いた振動分光法による生体の測定には多くのメリットがある。この赤外線を用いた分析は、様々な化学分析に古くから使われている技術であり、化学物質の同定において欠かせない分析手法の一つである。フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) の登場によって生体組織も水の影響を取り除いて測定することが可能になって4半世紀近く経つが、我々自身も10数年前から、血管や脳組織などの脂質・糖・タンパク質等生体組織の成分をFTIRによって非破壊的に測定してきた。

特に最近、人の口腔粘膜を in vivo で測定する技術¹も開発し臨床応用すべく現在もその改良に努めている。その他、癌の検出のために大腸癌、乳癌、皮膚癌、子宮頸癌、口腔癌などの組織の FTIR 測定により正常組織との違いが報告され臨床診断への応用の試みもなされている。Mantsch²が述べているように、多くの生体組織での、臨床診断への応用が可能なレベルの装置も基礎的なデータも、我々は現在手に入れることができるようになってきているが、まだ臨床診断へ十分な適用ができていない要因の一つは、大量のスペクトルデータから迅速に且つ有効に診断のポイントとなる情報の抽出・提示が不十分な点にある。この意味では、Chemometrics などの情報処理技術の更なる進展とその利用が重要である。

[組織中の中性脂肪と血糖測定に関する研究について]

我々は血中トリグリセリド量の動態を口腔粘膜の非侵襲的 in vivo FTIR 測定から判断できることを 1993 年に報告した¹。この方法では、口腔粘膜の赤外吸収スペクトルの中で、ある吸収ピーク同士の比率が、血中トリグリセリド量と比較的良く相関することを示した。さらに、何度でも簡単に測定できるメリットを生かし、口腔粘膜赤外スペクトルの日内変化、特に食事後の変化を検討した。これは、口腔粘膜赤外スペクトルに現れる種々のピークのうちのピークが体内の脂質や糖、タンパク質などの影響を受けるのかを明らかにして、非侵襲的検査の基礎研究とするためである。この場合、それらのピークの中でメジャーなところでも 20 程度のピークが関与しているので、多変量解析による評価が有効である。日内変動するピークに対してどのようなグループ分けが可能か、を検討するために、因子分析 (Factor Analysis) の手法を用いて、関与する因子の評価を試みた。紙幅の都合で詳細な記述は省略するが、日内変動する口腔粘膜の赤外吸収ピークでは 4 ~ 5 つの分類が可能であることがわかった。特に比較的強く変動する因子に対応する吸収ピークのグループの波数位置から、第 1 に脂質 (脂肪酸) が強く関与したグループ、第 2 に糖が強く関与したグループ、第 3 にタンパク質が強く関与したグループ、第 4 にそれらの混合したグループ、第 5 に再び糖が関与したグループ、と解釈できた。これは、ピークの波数位置からどのような化学物質が関与するか、推定できる通常赤外領域での測定を行っているメリットが生かされている。それらの因子得点 (Factor Score) の日内変動を表示することができる。(Fig.1) この図では、第 1 因子 (脂質が関与したピークグループ) の因子得点が、昼の食事後 3 時間ほどして最大になっていることが示されている。これは、通常、食事後 2 ~ 3 時間後に血中トリグリセリドが最大になる検査データと関係していると解釈できる。

このような赤外スペクトルデータをもっと素早く解析するために、上で述べた多変量解析の結果を利用して人工ニューラルネットワーク (ANN) の手法を適用することを試みた。Fig.2 に、その解析方法の概念図を示している。ここでは、口腔粘膜の赤外スペクトル変化の因子分析から得られた 5 つの分類に従って、あらかじめ対象となる規格化したスペクトルピークのグループを人工的にランダムに変化させて一群のデータファイルを多く生成させ、それを ANN で「学習」させる。その上で、未知の規格化したスペクトルデータを ANN で「判

断」させどの分類の寄与が大きいかを点数化(5段階)する。そして、例えば、相対的に脂質性のピークからの寄与がグレード4(やや強い;グレード1から5まで)、などと「診断」する。実際、この診断は瞬時に行われ、隠れ層(HiddenLayer)を作らない(0-Layer)ANNでも良く「診断」できることが判った(プログラムはSUNコンピュータ上でC言語で作成)⁽³⁾。さらに、微妙な変化をよく「判断」できるようにするためには、更なるANN解析技術のスキルアップが必要と考えられるが、今回は因子分析とANNの組み合わせで比較的簡単なプログラムでも体内脂質動態の「良い診断」に到達できることが示された。

次に、非侵襲的な血糖測定ということで需要の高い赤外線を使った体内糖量の変動の測定について検討した。上に述べた体内脂質動態の測定法の開発に前後して、血中グルコース量の動態を口腔(口唇)粘膜を用いて赤外・近赤外で捉えた(梶原ら⁴、;Heiseら⁵、)という報告がある。血糖に関しては、その後も指などを使って近赤外で測定する方法が試みられ、実際近赤外光を使った機器も開発されている。しかし、実際様々な被験者の組織・血清等を用いて血糖値との関係を見ると、多少の傾向は判るものの、検査値として明瞭に示すには相対的に糖の赤外吸収が小さく、スペクトルに対する他の様々な生体成分からの妨害的要因が多いので、臨床的な最終的応用にはまだ困難があると言わざるを得ない。

実際、最も信頼度が高いと思われる血清そのものの赤外分析による糖関係スペクトル強度と化学分析によるグルコース量との間の相関関係で見ても、相関係数 r^2 は7人の試料検体で見た場合せいぜい0.6程度で0.9以上は得られなかった。脂質関連スペクトルピークではほとんど相関が無いので、やはり糖関連スペクトルピークは血糖値と相対的に高い相関関係にあるとは言える。また、個人一人分のデータで見ると、その相関関係の直線性の「傾き」は様々で1人分のデータ数も少ないが比較的相関係数の大きな直線性が得られることがある(Fig.3)。これは、個人一人の測定データには、糖のスペクトルに対する妨害要因の個人差が無いぶん、高い相関性のあるデータが得られるものもあったのかもしれない。

血糖測定の場合、皮膚や粘膜を通して得られるスペクトル情報には組織の化学的成分からの妨害要因が血清の場合よりも大きくなるはずである。その意味で、個人差からの妨害要因を少なくできるような方法をとることが、体内の糖の変動を非侵襲的に計測し臨床応用するために必須の条件となるだろう。

[今後の実用的診断技術の開発へ向けて]

血糖や組織の中性脂肪の非侵襲的マスキング法として赤外分析を用いる場合は、生体成分の個人差(性・年齢差等)によるばらつきがかなり定量性に影響するが、個人レベルでのそれらの時間変化や糖負荷等の影響を見るときの変化量の定量性では信頼度は増すと考えられる。従って、新たに個人個人に対する生体組織毎の赤外スペクトルのデータベースを構築し、得られた詳細なスペクトル情報を基盤にすることが重要であろう。さらに小型化した測定装置とネットワーク化した高度なデータ解析システムを構築して、個人と医療機関とデータ解析部門が緊密に連携し、新しい診断システムの実用化を進める必要があると考

える。

(文献)

- 1 . 吉田ら、(1993) 医学のあゆみ、164、147-148.
- 2 . H. Mantsch、(1999) 12th ICOFTS Meeting、Tokyo.
- 3 . **Tanaka-Yamawaki,M. and Yoshida,S. (2000) Proc. 5th Joint Conference on Information Sciences, Vol.1, pp.830-831.**
- 4 . 梶原ら、(1992) Jpn.J.Artif.Organs,21,1099-1103.
- 5 . Heise ら、(1993) Appl.Spectrosc., 47,875-881.

Figures.

Fig.1. Diurnal Changes of Factor Scores in Factor Analysis and Effect by Meal-Intakes.

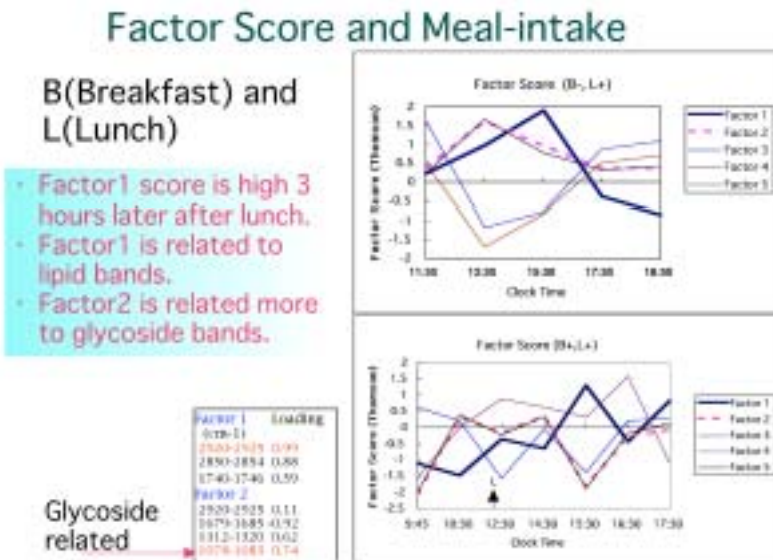


Fig.2. Analysis of Infrared Data of Oral Mucosa by Artificial Neural Networks.

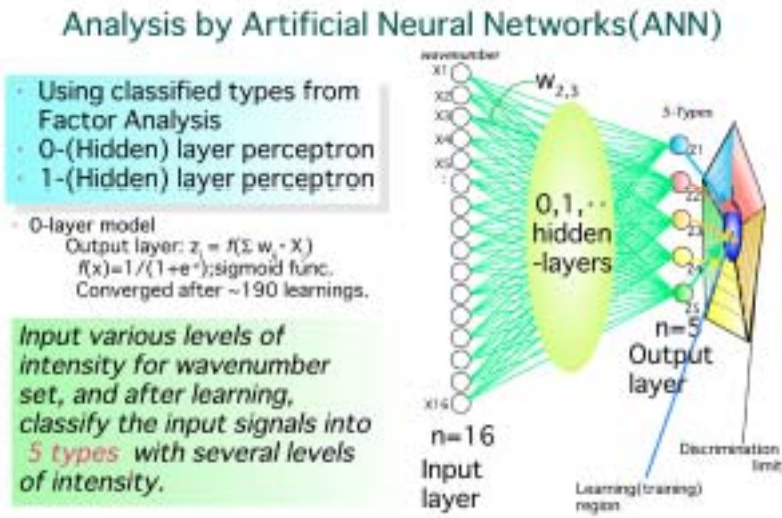


Fig.3. Individual Differences in Serum Glucose Analysis with Infrared Spectra and Comparison with Lipid-related Peaks.

7 Individual data and Comparison with a lipid band

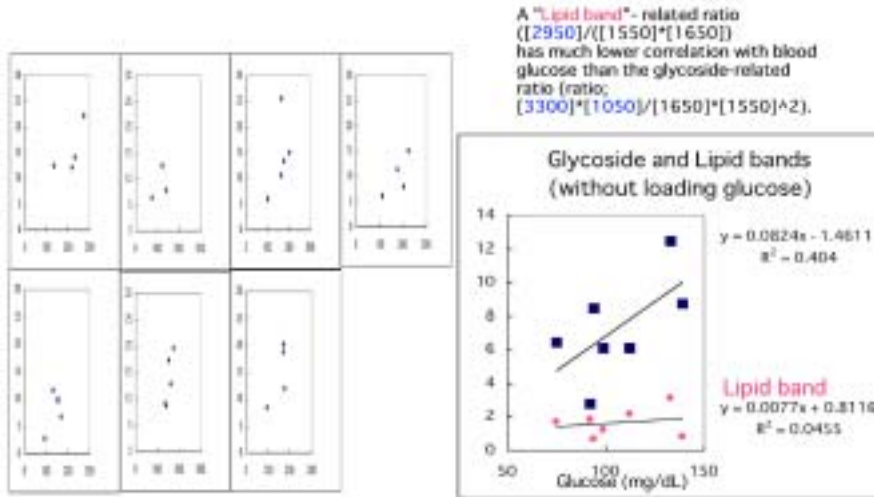


Figure Legends:

Fig.1. Diurnal Changes of Factor Scores in Factor Analysis and Effect by Meal-Intakes.

Without breakfast and with lunch (B-, L+), the factor score changes for factors 1 to 5 are shown on upper panel, and with both breakfast and lunch (B+, L+) on lower panel. Lunch was taken at around 12 o'clock.. Factor 1 was related to infrared bands concerning to fatty acids (around 2920 and 2850 cm^{-1}) and their esters. Factor 2 was related to bands concerning to glycosides at around 1080 cm^{-1} .

Fig.2. Analysis of Infrared Data of Oral Mucosa by Artificial Neural Networks.

For artificial neural networks (ANN) analysis, several hidden layers could be used for calculation, however, here we used no hidden layer actually, and got good results with a simple calculation program using sigmoidal function for output layer. In the input layer, 16 peak data were used with a set of wavenumber and intensity. For output layer, classification into 5 types was used according to the Factor Analysis data.

Fig.3. Individual Differences in Serum Glucose Analysis with Infrared Spectra and Comparison with Lipid-related Peaks.

7 individual serum data was presented after glucose loading. In the right panel, seven individual data for glycan-related infrared bands without glucose loading were plotted in comparison with those for lipid –related bands. A lipid band was determined by calculating the ratio ($[\text{2950}]/([\text{1550}]*[\text{1650}])$) , and a glycan-related band was determined by calculating the ration ($[\text{3300}]*[\text{1050}]/([\text{1650}]*[\text{1550}]^2)$).

Abstract:

We have developed the Fourier transform infrared spectral analysis system to measure constituents of human oral mucosa in vivo and clinically obtained serum for non-invasive diagnosis. The attenuated total reflectance (ATR) probe in rod shape was used for the measurements of both oral tissue and serum. The results indicate that the change of in vivo oral mucosal infrared spectra correlated with that of blood triglyceride level, and rapidly analyzed by artificial neural networks successfully. The serum glucose level was correlated with glycan-related infrared bands, although the correlation coefficient (r^2) was not high enough (0.58). When more sophisticated analytical methods are developed for multiple infrared data sets using a miniaturized instrument, the application of Fourier transform infrared analytical technique would be more advanced in the field of non-invasive clinical diagnosis for individuals.

Key words:

FTIR, non-invasive diagnosis, serum glucose, triglyceride, neural networks.