

近赤外分光法による実験動物の血糖値 および内臓脂肪の非侵襲測定

福本由希, 齊藤まゆ美, 渡佳代子, 内田菜穂子, 本三保子, 飯淵貞明

Non-Invasive Measurement of Blood Glucose and Visceral Fat of Experimental Animals by Near Infrared Spectroscopy.

Yuki Fukumoto, Mayumi Saito, Kayoko Watari, Naoko Uchida,
Mihoko Moto and Sadaaki Iibuchi

要 旨

近赤外領域の光は、測定対象物の中に深く入り込みやすい特徴があるため、測定対象物を加工することなく、そのままの形で測定することが可能である。そのため、近赤外分光法は、非破壊測定の一つとしてさまざまな分野で注目されている。近赤外分光法を用いることで、血糖値や内臓脂肪の非侵襲測定が可能になれば、それらの値をリアルタイムでモニタリングすることが可能になり、臨床検査分野の測定装置開発等に应用できるものと期待できる。特に、ヒトにおける血糖値測定については、これまでに多くの試みがなされているが、普及には至っていないのが現状である。そこで、本研究では近赤外分光法を用いて、まずヒトの血糖値を非侵襲測定することが可能かどうかを調べ、さらに実験動物の血糖値、内臓脂肪、血清中性脂肪の非侵襲測定が可能かどうかの検討を行った。その結果、ヒトの血糖値、マウスの内臓脂肪、ラットの血清中性脂肪と近赤外分光法による測定値の間に高い相関が認められた。また、マウスの血糖値についても近赤外分光法による測定値を用いて、ある程度の推定が可能であることが示唆された。

Key Word : 近赤外線 (Near Infrared)、血糖値 (Blood Glucose)、非侵襲測定 (Non-Invasive Measurement)

緒 言

近年、食品、農作物、薬品、医学分野等における成分の定量・定性分析法の一つとして近赤外分光法が注目されている。近赤外分光法は1960年代にアメリカの農務省(USDA)のNorrisらのグループが近赤外領域に水の吸収波長があるのを発見したことがきっかけで研究が

盛んになり¹⁾、主として穀類を対象として水分、タンパク質、脂質等の主要成分の迅速測定へと発展した。近赤外分光法は試料の形を保ったまま非破壊測定を行うことが可能で、複雑な操作技術を必要とせず、短時間で多くの成分情報が得られるため、ルーチン分析に適している方法である。これらの長所を活かし、臨床検査分野においても近赤外分光法により、血糖値等の非侵襲測定を行う目的でいくつか研究されてきている^{2~4)}。近赤外分光法を用いた総タンパク質、血糖値、中性脂肪等の生体成分分析の応用例の報告⁵⁾や近赤外分光法で血糖値測定を行う上での多変量解析の必要性⁶⁾、非侵襲測定装置開発の現状や今後の課題等の報告⁷⁾もなされている。しかしながら血糖値の非侵襲装置の普及には至っていない。ヒトの血糖値が血液採取を行うことなく非侵襲測定できれば、誰でもどのような場所でも短時間で測定可能となり、血糖値コントロールが容易になると考えられる。

本研究では近赤外分光法を用いて、これまでもさまざまな試みがなされているヒトの血糖値の非侵襲測定を実施し、本研究方法での測定の可能性を検討した。さらに実験動物の血糖値、内臓脂肪、血清中性脂肪の非侵襲測定に応用可能かどうかを検討した。

研究方法

1. 被験者、実験動物

健康女性(21~35歳) 8人を被験者とした。マウスは5~10週齢のkkAy雄性マウス30匹を、ラットは6週齢のwistar系の雄性ラット30匹を用いた(いずれも日本クレア製)。

本研究はヘルシンキ宣言に基づいて、和洋女子大学の倫理委員会の審議、承認を得て実施した。

2. 血糖値、血清中性脂肪、内臓脂肪量の測定方法

ヒトおよびマウスの血糖値は小型血糖測定器(グルテストセンサー、三和化学研究所製)を用いて侵襲測定を行った。マウスの内臓脂肪はエーテル麻酔下で解剖を行い、精巣周囲、腎周囲および腸管膜の脂肪量の合計とした。ラットの血清中性脂肪は市販のキット(トリグリセリドE-テスト、和光純薬製)により測定した。それぞれの測定項目は表1に示した通

表1 測定項目

測定項目	血糖値	中性脂肪	内臓脂肪
マウス	◎	-	◎
ラット	-	◎	-
ヒト	◎	-	-

りである。

3. 近赤外分光法の測定方法

分光器 (Carl Zeiss社製) が組み込まれた小型分光分析装置 (HandyLambda (300~1100 nm)、SolidLambda (950~1700nm) いずれもスペクトラ・コープ製) を用いて測定を行った。ヒトの場合には300~1100nmを、マウスおよびラットについては950~1700nmの装置を用いた。例として、実験動物の尻尾の近赤外分光法による測定の模式図を図1に示す。ハロゲンランプの光は同心円状の外周に配置されたガラスファイバーから測定対象部位に照射され、反射光は中心のファイバーを通過して分光器に導かれる。プローブ下端と測定対象部位表面の距離を一定に保つためおよび外光の影響をできるだけ少なくするために、ゴム栓の中心に穴を開けたものにプローブ先端を通して測定した。図1の右上のように、プローブ先端をゴム栓に差し込み、マウスおよびラットの尻尾およびマウス腹部に近赤外光を照射した。ヒトの場合は、プローブ先端にゴム栓をつけずに、一定距離から人さし指に直接近赤外光を照射した。反射光の基準として、白色セラミック板の各波長における反射強度のスペクトルを

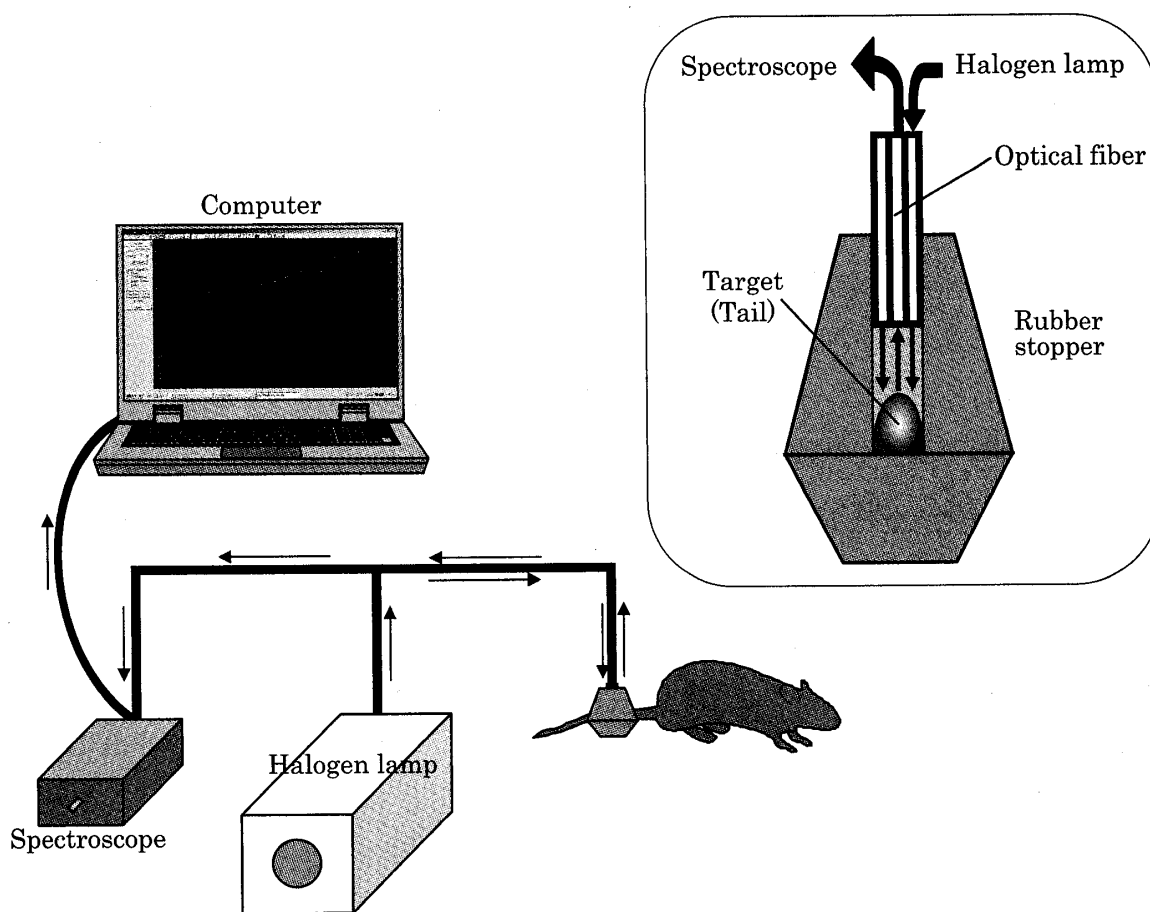


図1 近赤外分光法の測定の模式図 (実験動物の尻尾の測定の場合)

とった。測定対象部位の反射強度はそれぞれの波長における反射強度の基準値に対する割合で表した。10回スキャンし（1回の測定時間は0.1sec）、その平均値をスペクトルデータとした。

4. データの解析方法

測定対象物の反射強度をRとすると、 $\log(1/R)$ は近似的に測定対象物中の物質量に比例する¹⁾。波長(nm) vs. $\log(1/R)$ のスペクトルを、ピークを強調するために2次微分を行った。2次微分には解析用ソフトのPeakFit(seasolve社製)を用いた。このソフトは元スペクトル(本論文の場合は $\log(1/R)$ のスペクトル)でピークに肩がある場合、その肩は正規分布型ピークが重なってできたと仮定して、もっともデータ曲線に近くなるように正規分布型ピークを想定し、それらの2次微分をとる方法で $\log(1/R)$ の2次微分スペクトルを求めるものである。以後、 $\log(1/R)$ の2次微分スペクトルを2次微分スペクトルという。

得られた2次微分スペクトルと実際に測定された血糖値、血清中性脂肪、内臓脂肪の値との相関係数を波長1nmごとに求めた。相関係数が高い波長における反射強度の2次微分値を独立変数、実測によって得られた血糖値等の値を従属変数としてSPSS ver.15.0Jを用いて重回帰分析を行った。

結 果

ヒトの人さし指における2次微分スペクトルを図2に示す。ヒトの血糖値の実測値と近赤外分光法による推定値の関係を図3に示す。重回帰分析により選択された波長は549、712、923nmで、Rは0.892であった。マウスの尻尾における2次微分スペクトルを図4に示す。重回帰分析により選択された波長は1032、1208、1258、1341nmであった。血糖値の実測値と近赤外分光法による推定値の関係を図5に示す。Rは0.527であった。マウスの腹部における2次微分スペクトルを図6に示す。重回帰分析により選択された波長は1029nmであった。図7、図8にマウスの精巣周囲脂肪および内臓脂肪量と近赤外分光法による推定値の関係を示す。精巣周囲脂肪のRは0.752、内臓脂肪全体のRは0.660であった。ラットの尻尾における2次微分スペクトルを図9に示す。重回帰分析により選択された波長は1092、1181、1328nmであった。ラットの血清中性脂肪と近赤外分光法による推定値の関係は図10に示す。Rは0.758であった。

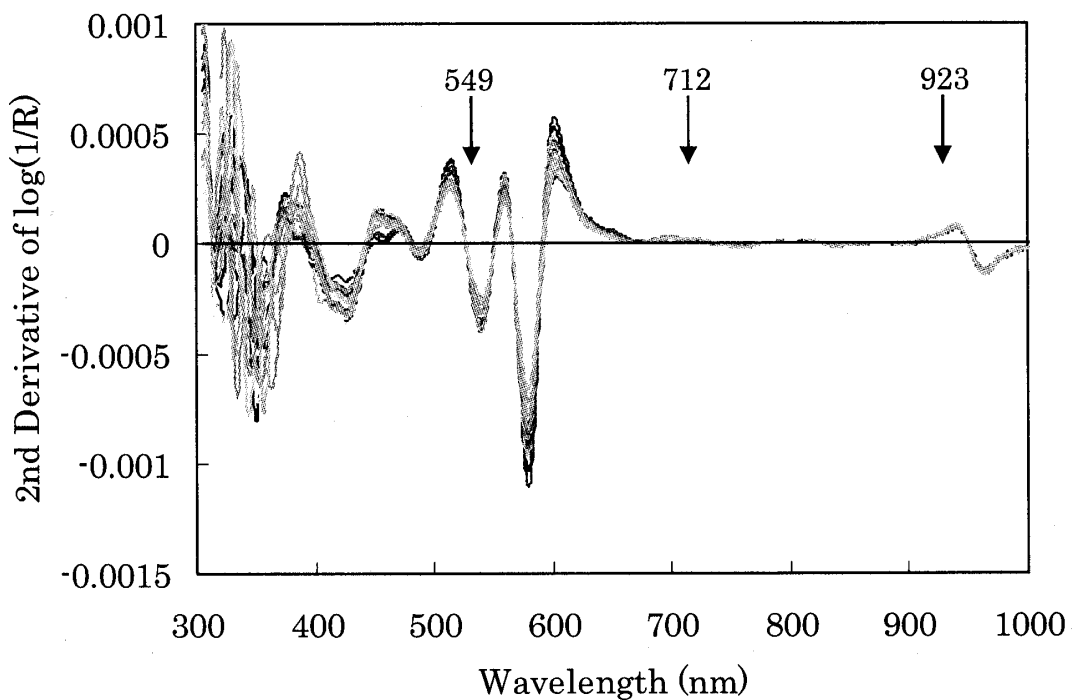


図2 ヒトの人さし指の2次微分スペクトル (矢印は選択波長)

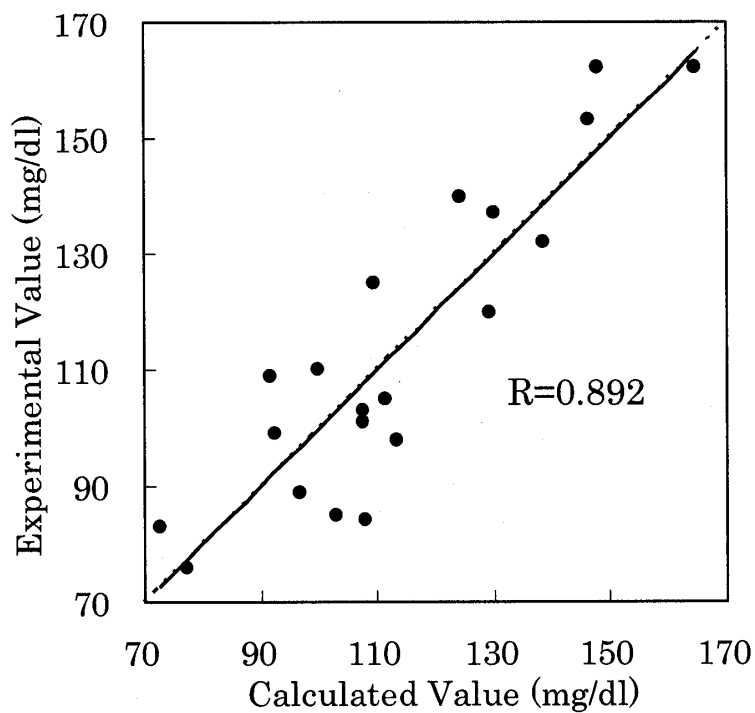


図3 ヒトにおける血糖値の実測値と近赤外分光法による推定値の関係

点線 $y = x$

実線 $y = x + 5.560 \times 10^{-13}$

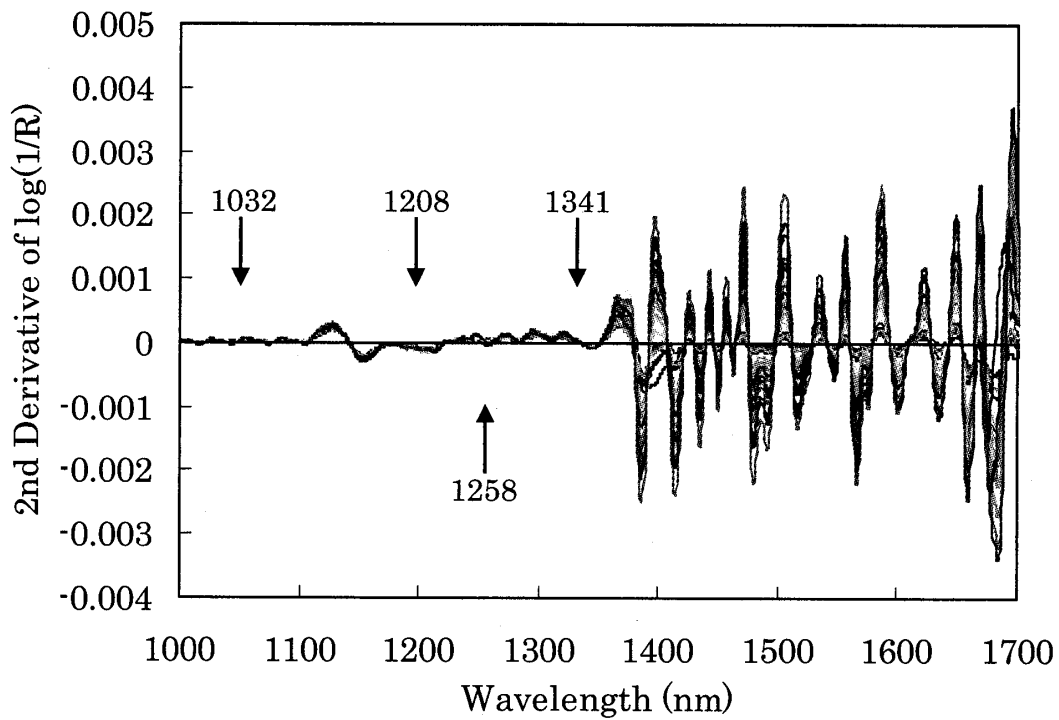


図4 マウス尻尾の2次微分スペクトル (矢印は選択波長)

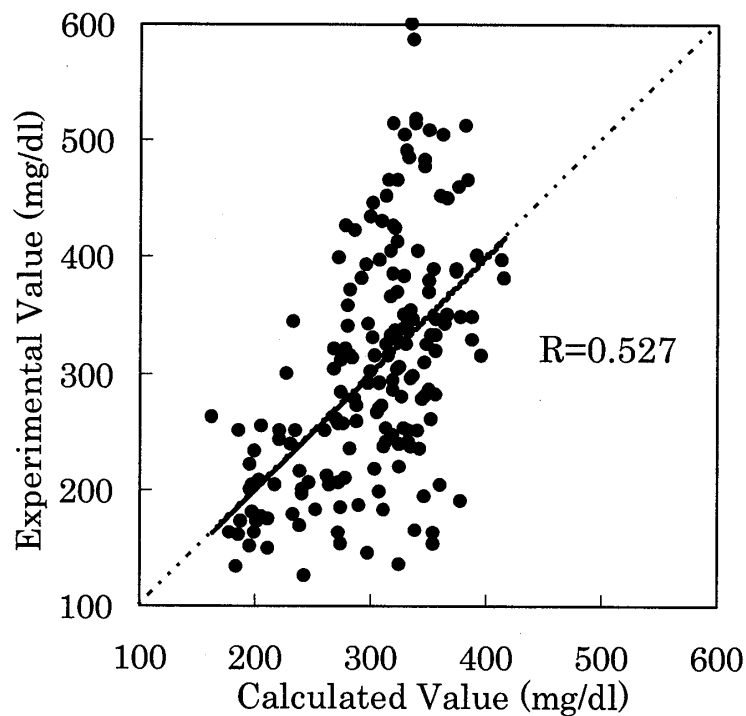


図5 マウスにおける血糖値の実測値と近赤外分光法による推定値の関係

点線 $y = x$

実線 $y = x + 7.592 \times 10^{-5}$

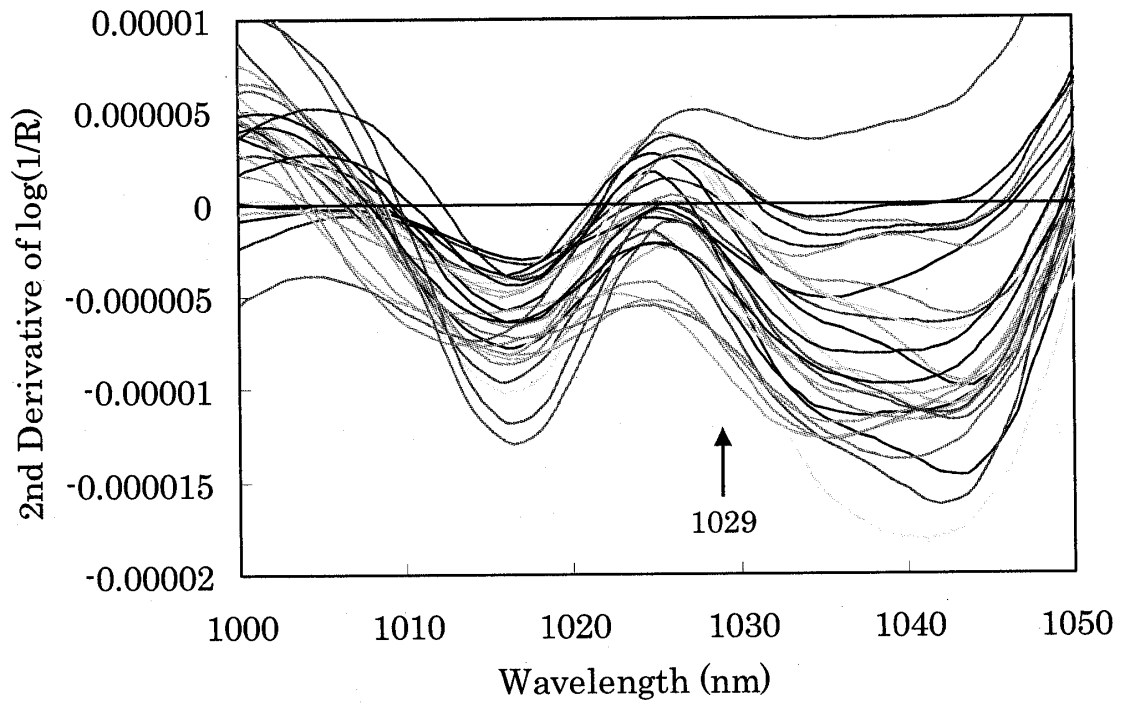


図6 マウス腹部の2次微分スペクトル (矢印は選択波長)

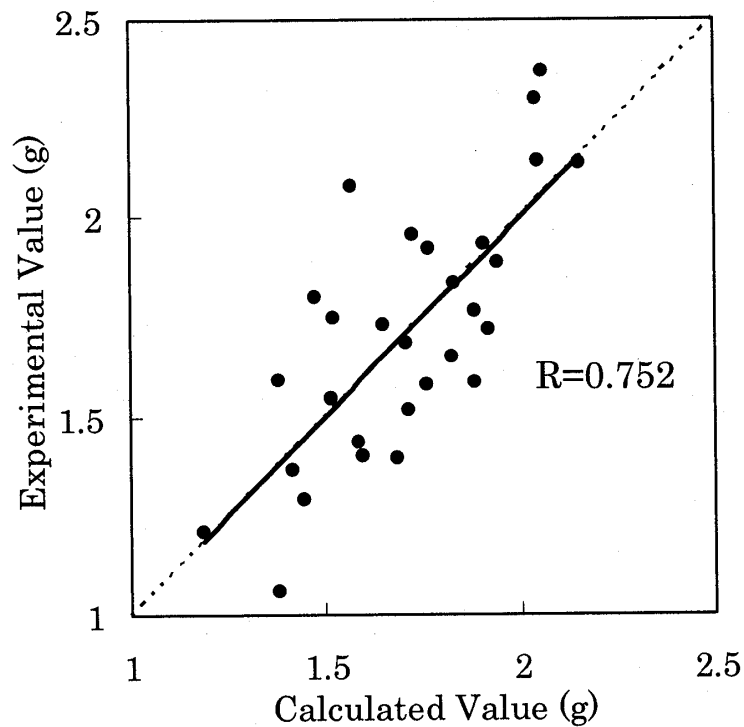


図7 マウス精巣周囲脂肪と近赤外分光法による推定値の関係

点線 $y = x$

実線 $y = x + 5.021 \times 10^{-8}$

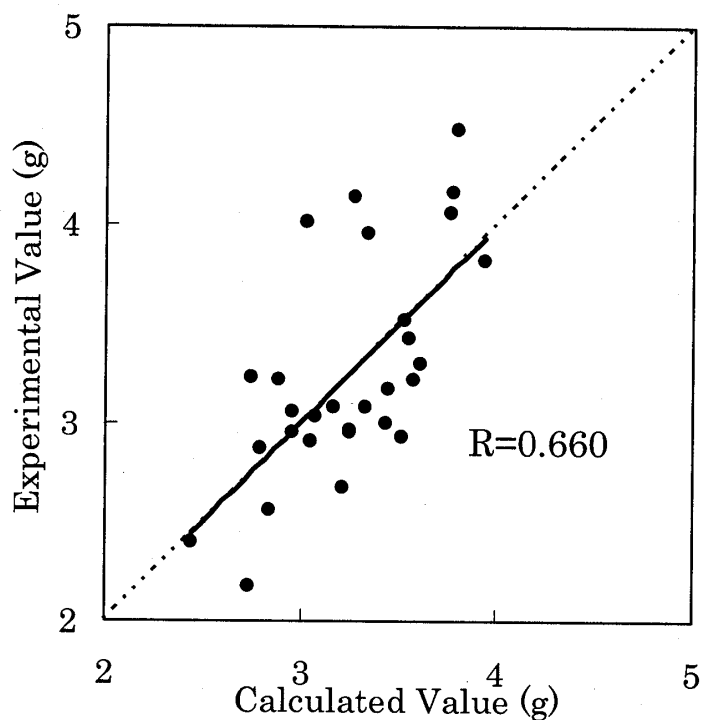


図8 マウス内臓脂肪*と近赤外分光法による推定値の関係
 点線— $y = x$
 実線— $y = x + 6.340 \times 10^{-8}$
 (*精巢周囲、腎周囲、腸管膜脂肪の合計量)

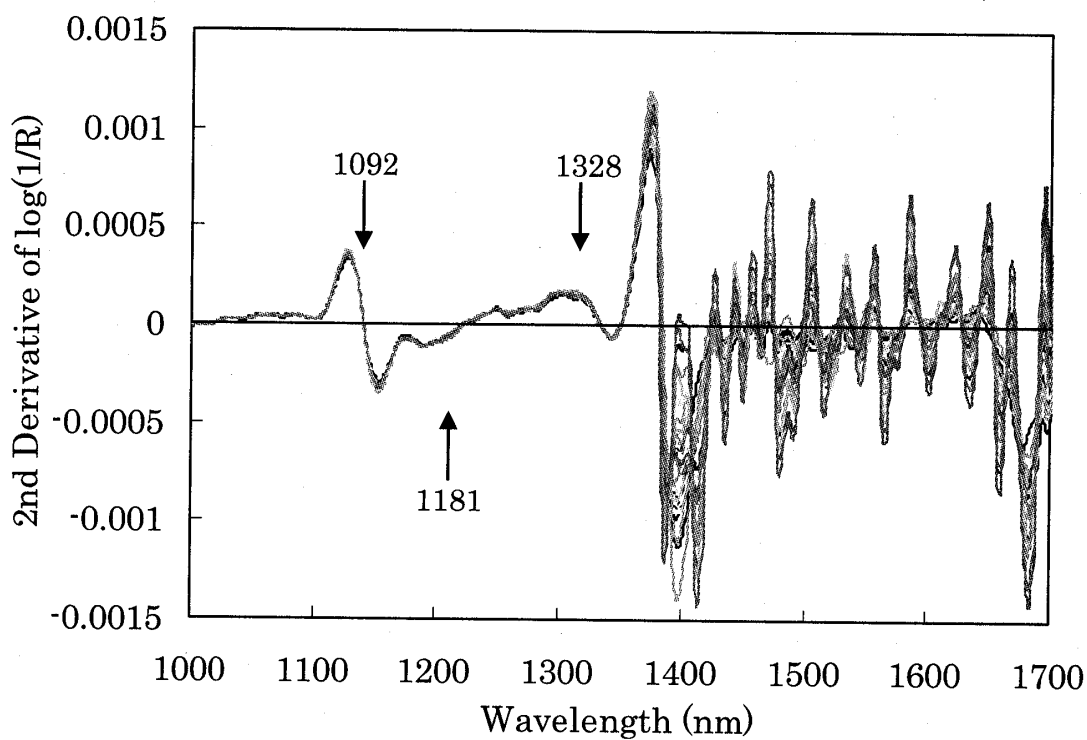


図9 ラット尻尾の2次微分スペクトル (矢印は選択波長)

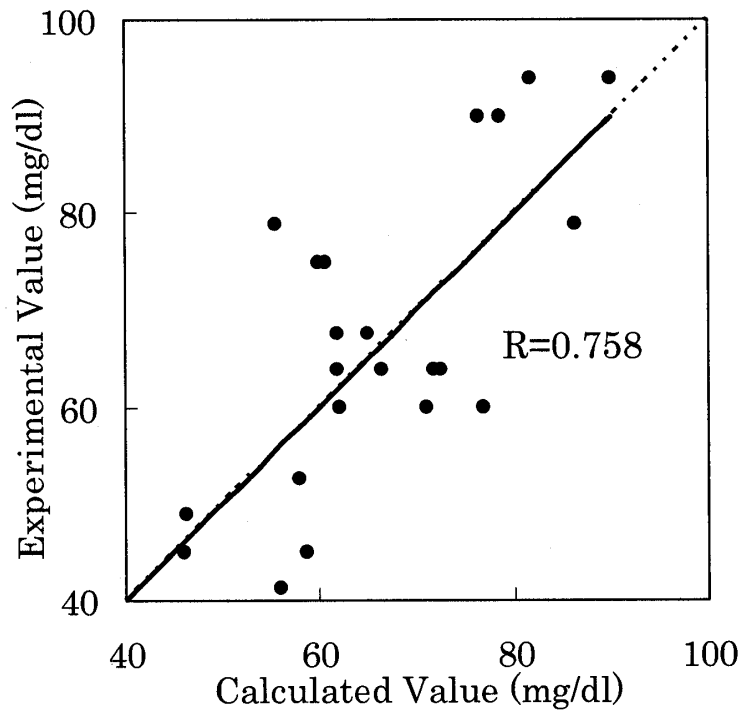


図10 ラットにおける中性脂肪と近赤外分光法による推定値の関係

点線--- $y = x$

実線— $y = x + 6.667 \times 10^{-6}$

考 察

ヒトの血糖値の非侵襲測定については従来からさまざまな検討がなされ、普及装置が待ち望まれている。本研究では、ヒトの人さし指を300~1100nmの波長領域の装置において測定を行い、血糖値の実測値との解析を行った。その結果、図3のようにRは0.892と高い値が認められた。高い値が得られた理由として、短波長領域の光は皮膚からある程度の深さまで光が侵入すること、近赤外分光法の測定部位として用いた指先は毛細血管が集中しており、血液内部の情報が多く得られたこと等が考えられる。本研究において、重回帰分析により選択された波長は549、712、923nmであった。549nmはヘモグロビン、712nmはC-H、923nmは油やCH₂の吸収波長付近と考えられる¹⁾。それらの吸収波長の帰属と目的物質であるグルコース(血糖値)は一致こそしていないが、それらの吸収波長強度の増減と何らかの関係があるということは確かである。そこで、短波長領域よりも物質の情報量の多い、長波長領域(950~1700nm)の装置を用いて、実験動物における非侵襲測定に応用できるかどうかを検討した。長波長領域は目的物質である血糖値の指標であるグルコースや血清中性脂肪の指標である脂質のCHに帰属する吸収波長が集中しており、精度よく安定した測定が可能で、

可視光の影響を受けないといった特長がある。

まず、マウスの尻尾を近赤外分光法により非侵襲測定し、実測した血糖値と検討した結果は図5のように高い相関は得られなかった。重回帰分析により選択された1032、1208、1258、1341nmはN-HやC-H等の吸収波長であった。マウスの血糖値は6週間に渡り、週1回の測定を行い、それらの値をすべて解析に用いたため、実験シリーズごとの測定条件に差があったと考えられる。すなわち、マウスを測定する部位の選定、近赤外光の通り方、マウスの体温や測定温度等のばらつきが影響しているものと考えられる。また、今回の血糖値測定にはヒト簡易血糖値測定用の小型装置を用いた。実験に使用したマウスは糖尿病誘発マウスだったため、血糖値が測定限界に近い値を示し、誤差が大きくなったと考えられる。図5を見ると2次曲線を当てはめると相関が高くなる可能性もある。しかし、それを当てはめる前に、測定値のチェックも必要であるため、今後詳細な検討が必要であろう。

マウスの内臓脂肪の近赤外分光法による測定は、マウス腹部に近赤外光を直接照射して、得られたスペクトルについて解析を行なった。本研究における内臓脂肪は、精巣周囲、腎周囲および腸管膜の脂肪を合計したものを示している。内臓脂肪と精巣周囲脂肪について、重回帰分析により選択された波長は1029nmであった。油の吸収波長は1037nm付近であるが¹⁾、近赤外分光法は吸収波長がシフトしやすい特徴があるため、重回帰分析により選ばれた1029nmは油の吸収バンドと考えられる。2次微分スペクトルと内臓脂肪、精巣周囲、腎周囲、腸管膜との対応を見た結果、図7のように精巣周囲脂肪との相関が0.752と最も高かった。マウス腹部に近赤外光を照射した部分が精巣周囲とほぼ一致するために相関が高かったと考えられる。内臓脂肪については1029nmが選択され、Rは0.660であった。内臓脂肪の中の約50%が精巣周囲脂肪であったため、このように精巣周囲脂肪量との相関が高くなったと考えられる。なお、腸管膜の脂肪量と近赤外分光法による推定値との関係については、1567nmの値を用い、Rは0.524、腎周囲の脂肪量との関係は1051nmの値を用いてRは0.437であった。腎臓は背中側に位置しており、腹部から照射された近赤外光からはもっとも距離が離れているので、腎周囲の脂肪量と近赤外分光法による測定値との相関は低かったものと考えられる。

実験動物であるマウスを用いて近赤外分光法による非侵襲測定を行なった結果、測定条件・測定部位等、今後検討を加える必要はあるものの、ある程度の相関が得られ、血糖値測定および内臓脂肪測定の非侵襲測定が可能であることが示唆された。そこで、マウス以外の他の実験動物にも応用可能かどうかラットを用いて検討を行った。

ラットにおいては血清中性脂肪との関係を調べた。マウスと同様に尻尾の近赤外光スペク

トルを得て、市販のキットにより測定した値と比べた。その結果、1092、1181、1328nmの値を用い、Rは0.758と高い値が認められた。これらの波長はC-HやCH₃に帰属する波長であり¹⁾、血清中性脂肪を推定しているものと考えられる。このことから、マウス以外の他の実験動物でも非侵襲測定の可能性がうかがえた。

以上のように、近赤外分光法を用いて実験動物の血糖値、内臓脂肪、血清中性脂肪の非侵襲測定が可能なが示唆された。しかしながら、近赤外領域は水の吸収の影響が大きいこと、多くの物質の吸収波長が重なりあっていること、実験条件によってピーク波長が数nmシフトしやすいこと等、さまざまな要因があるので、常に安定したスペクトルが得られるような工夫が必要である。ヒトにおいてもそのあたりが障害となり、非侵襲測定装置がなかなか実用化されないものと考えられる。今後は、安定したスペクトルを得る工夫をしながらサンプル数を増やし、非侵襲測定可能な波長を検索していく必要があるだろう。ヒトにも実験動物においても非侵襲測定できれば、1回のスキャンで多成分の同時測定が可能になるので、今後の検討が大いに期待される。

ま と め

近赤外分光法を用いて、ヒトの血糖値および実験動物の血糖値、内臓脂肪、血清中性脂肪の非侵襲測定を検討した結果、次のようなことがわかった。

ヒトの血糖値は300～1100nmの波長領域の装置で測定した結果、重回帰分析により選択された549、712、923nmの波長を用いて、Rが0.892と高い精度で非侵襲測定可能であることがわかった。実験動物においては、さらに糖や脂肪等の目的物質の情報量の多い波長領域950～1700nmの波長領域の装置で測定した。その結果、マウスの血糖値は1032、1208、1258、1341nmが選ばれ、Rは0.527であった。マウスの内臓脂肪は1029nmが選択され、精巣周囲脂肪のRは0.752、内臓脂肪全体のRは0.660であった。ラットの血清中性脂肪測定においては、1092、1181、1328nmが選択され、Rは0.758であった。それぞれの波長はCH等の吸収波長を示しているが、詳細な解明には至っていない。今後は、サンプル数を増やし、安定したスペクトルを得るための測定条件および選択された吸収波長の物質の帰属の説明等、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 岩元陸夫、河野澄夫、魚住純、近赤外分光法入門、(1994)、2-4、43-47、幸書房
- 2) 藤田圭一、田村一人、兼子亘、その他、赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定センサの

開発、電気論、124、1759-1765、(2004)

3) 鈴木健太郎、森川智隆、斎木富士男、その他、光学的非浸襲血液検査システムの開発、信学技報、41、9-12、(2006)

4) 田村一人、石澤広明、藤田圭一、その他、赤外分光法の非浸襲血液成分測定への適用、電気論、127、686-691、(2007)

5) 田村守、無浸襲血糖値測定法の現状と課題、光学、33、380-386、(2004)

6) 尾崎幸洋、松永貞一、近赤外分光と生体試料分析、臨床化学、24、123-131、(1995)

7) 尾崎幸洋、森田成昭、近赤外分光法による非浸襲血糖値測定と多変量解析法、光学、33、404-406、(2004)

福 本 由 希 (生活環境学科専任講師)

齊 藤 まゆ美 (生活環境学科助手)

渡 佳代子 (健康栄養学科助手)

内 田 菜穂子 (総合生活研究科2年)

本 三保子 (健康栄養学科専任講師)

飯 淵 貞 明 (生活環境学科教授)