

光学式試薬レス尿成分分析システムの開発研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 郁斗, SUZUKI, Ikuto メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059751

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文

光学式試薬レス尿成分分析システムの 開発研究

Development of a reagent-less optical system for
analyzing urinary components

金沢大学大学院自然科学研究科
機械科学専攻

学 籍 番 号 1724032003

氏 名 鈴木 郁斗

主任指導教員名 田中 志信

提 出 年 月 令和2年1月

目次

第1章 序論	1
1-1 本研究の目的.....	1
1-2 生活習慣病.....	2
1-2-1 糖尿病.....	2
1-2-2 慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease, CKD).....	3
1-2-3 高血圧.....	3
1-3 尿成分計測の意義.....	3
1-3-1 尿糖 (グルコース).....	4
1-3-2 尿素.....	4
1-3-3 ナトリウム (Na).....	4
1-3-4 クレアチニン.....	5
1-4 家庭での尿成分計測の現状とその問題点.....	5
1-4-1 試験紙.....	5
1-4-2 デジタル尿糖計.....	6
1-4-3 インテリジェンストイレ 2.....	7
1-4-4 従来法の問題点.....	7
1-5 本研究の目的と範囲.....	8
1-6 1章の参考文献.....	10
第2章 近赤外分光法による定量分析	13
2-1 近赤外分光法の特徴.....	13
2-2 分子の振動.....	13
2-3 調和振動.....	15
2-4 非調和振動.....	16
2-5 Lambert-beer 則.....	18
2-6 スペクトル計測におけるノイズ.....	19
2-7 差スペクトル法による定量分析.....	19
2-8 本研究に用いる統計解析手法.....	20
2-9 近赤外分光法を用いた成分分析に関する既往研究とその課題.....	21
2-10 2章の参考文献.....	23
第3章 単一水溶液のスペクトル計測	25
3-1 はじめに.....	25
3-2 単一水溶液の濃度設定.....	25
3-3 単一水溶液の作製.....	25

3-4	実験装置と計測方法	26
3-5	単一水溶液のスペクトル波形	27
3-5-1	各成分のスペクトル波形	27
3-5-2	結果と考察	29
3-5-2-1	グルコース	30
3-5-2-2	尿素	30
3-5-2-3	ナトリウム	30
3-5-2-4	クレアチニン	31
3-6	3章の参考文献	34
第4章	グルコース添加尿を用いた定量分析における使用波長数削減の試み	35
4-1	はじめに	35
4-2	予備実験-グルコース添加による他成分への影響-	35
4-3	実験サンプル	37
4-4	実験装置	38
4-5	全波長使用解析の濃度予測	38
4-5-1	濃度予測結果	38
4-5-2	考察	42
4-6	総当たり解析による濃度予測	43
4-6-1	最適な波長組み合わせの選定	44
4-6-2	濃度予測結果	47
4-6-3	考察	50
4-6-3-1	グルコース	50
4-6-3-2	尿素	50
4-6-3-3	ナトリウム	51
4-6-3-4	クレアチニン	52
4-6-4	各 UCR および NCR の算出とその考察	54
4-7	4章の参考文献	57
第5章	糖尿病患者尿を用いた定量分析における使用波長数削減の試み	58
5-1	はじめに	58

5-2	実験サンプル	58
5-3	実験装置	59
5-4	全波長使用解析の濃度予測	59
5-4-1	濃度予測結果	59
5-4-2	考察	63
5-5	総当たり解析における濃度予測	64
5-5-1	最適波長組み合わせの選定	64
5-5-2	濃度予測結果	66
5-5-3	考察	70
5-5-3-1	グルコース	70
5-5-3-2	尿素	70
5-5-3-3	ナトリウム	70
5-5-3-4	クレアチニン	71
5-6	総当たり解析による濃度予測	71
第6章	糖尿病患者尿を用いたLED光源模擬解析	73
6-1	はじめに	73
6-2	LED光源の模擬方法	73
6-3	実験サンプル	75
6-4	LED模擬解析における使用波長	75
6-5	LED模擬解析による濃度予測	75
6-5-1	濃度予測結果	75
6-5-2	考察	78
第7章	近赤外マルチチップLEDの試作	79
7-1	はじめに	79
7-2	近赤外マルチチップLED・受光器・駆動用ドライバー	79
7-3	7章の参考文献	85
第8章	結論	86
	謝辞	89
	本論文に関係した研究発表文献	90

本文論文で使用する主要な略語・記号の一覧

CKD	: Chronic Kidney disease, 慢性腎臓病.
UCR	: Urea-to-creatinine ratio, 尿素クレアチニン比.
NCR	: Na-to-creatinine ratio, ナトリウムクレアチニン比.
Δ Abs	: 差分吸光度. サンプルの吸光度から純水の吸光度を引いたもの.
PLS回帰分析	: Partial Least Squares Regression, 部分的最小二乗回帰.
LOOCV	: Leave-one-out Cross Validation, 1つ抜き交差検証.
GAU	: Glucose added Urine, グルコース添加尿.
SEP	: Standard error of Prediction, 予測標準誤差.
γ	: Correlation coefficient, 相関係数.

第1章 序論

1-1 本研究の背景

我が国の総人口は長期の減少過程にあるだけでなく、総人口に対する 65 歳以上の高齢者の割合（高齢化率）が世界最高水準になっている。2065 年には高齢化率が 38.4% に達し、約 2.6 人に 1 人が 65 歳以上の高齢者になる社会が到来すると推計されている¹⁾。それに伴い社会保障給付費が増加しており、その費用は主に現役世代の負担することになるため、少子高齢化は社会保障財政に深刻な影響を与える²⁾。また我が国は 65 歳以上の人口が全人口の 21% を超える超高齢化社会に突入しており、糖尿病、高血圧、がんなどのライフスタイルを基盤として発症する生活習慣病は年々増加し³⁾、国民医療費（一般診療医療費）の約 3 割、死亡者数の約 6 割を占めている⁴⁾。このような背景から厚生労働省は 2000 年から健康増進の推進に関する基本的な方向や目標を定めた「21 世紀における国民健康づくり運動（健康日本 21）」を推進しており、2013 年には「健康日本 21（第 2 次）」が施行された。その中では生活習慣の改善による健康増進、生活習慣病等の発症予防など「一次予防」が重視され、この観点から生体情報を日常的かつ長期に渡り計測をすることが望ましい。しかし今日一般に普及しているデジタル尿糖計や家庭用血圧計は、生体情報を得るために使用者が「計測する」という操作を日常生活に加える必要があるため、使用者は少なからず煩わしさを伴う。また、上記 2 つの計測機器のように在宅使用を踏まえると、生体計測に精通していなくとも容易に計測およびその情報を管理可能で、身体への拘束や煩雑な操作が不要なシステムを構築することが望ましい。

在宅環境下で日常的に生体情報を得るためには、一般家庭に広く普及している物を利用することが望ましく、家具や調度品がそれに相当する。特にトイレは、人間の生理的機能の一つである排泄を行なう場所として日常的に使用されるため、計測の場として適

していると考えられる。随時尿、つまり任意の時間に採取された尿を使用した簡便な尿検査法として、試験紙法（例えば、新ウリエース Ga, テルモ株式会社）や酵素電極法（タニタ電子尿糖計ユーチェック, 株式会社タニタ, 2017 年 9 月末生産終了）などがあり、薬局や大手 WEB ショッピングサイトなどで手軽に購入可能である。一方で、随時尿中のほとんどの成分濃度は、食事や運動により影響を受けるため、随時尿中の排泄基準値が明確でない、もしくは存在しない場合もある。そこで病院などの臨床機関では外来患者を除いて、24 時間畜尿を用いることで患者の 1 日の摂取量（蛋白質や塩分など）を定量的に検査することが一般的である。しかし 24 時間畜尿は文字通り、計測までに 24 時間を要し、外来患者や家庭での使用は現実的ではない。そこで近年では尿中の尿素やナトリウムなど一日の排出量を、随時尿中のクレアチニンとの比から推定する試み⁵⁻⁹⁾も多く報告されており、これら比を用いて簡便かつ正確に尿成分濃度や特定成分の 1 日摂取量を推定する方法の確立が望まれる。

1-2 生活習慣病

ここでは尿成分計測で発症予防もしくは進行予防し得る 3 つの生活習慣病を例に挙げて簡単に説明する。予防し得る根拠については次項を参照されたい。

1-2-1 糖尿病¹⁰⁾

健常人では、血糖値を低下させる作用があるインスリンが膵臓から分泌され、細胞が血中のブドウ糖を取り込むことで血糖値は正常を保っている。しかしインスリン分泌障害や細胞のインスリン抵抗性亢進によって、細胞が血中のブドウ糖を取り込むことが出来ず、慢性的な高血糖状態を示す糖尿病となる。慢性的な高血糖状態は種々の合併症をきたしやすく、例として三大合併症と呼ばれる糖尿病網膜症（失明の原因となる）、糖尿病性腎症（透析導入の原疾患 1 位）、糖尿病神経障害（主に足部の感覚や運動神経や自律神経障害の可能性）、脳疾患や心疾患の原因となる動脈硬化などがある。

1-2-2 慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease, CKD) ¹¹⁾

慢性腎臓病は、何らかの腎臓病が慢性的に経過する病態を意味する。CKD 発症や進行の危険因子としては糖尿病や高血圧、メタボリックシンドロームなどが挙げられ、国内での罹患率は成人の 8 人に 1 人 (1330 万人) と非常に高く、国民病と呼ばれている。CKD は初期での自覚症状が無いため、進行により現れた夜間尿や貧血、浮腫などの種々の症状の自覚により発見されるため、早期発見が難しい。

1-2-3 高血圧 ¹²⁾

高血圧は収縮期血圧が 140 mmHg, 拡張期血圧が 90 mmHg 以上の状態を指し、動脈硬化を促進させることにより、脳卒中や心血管病、腎臓病などの危険因子となる。高血圧の人口は非常に多く、国内の約 4300 万人が高血圧と推定されているが、治療人口は 900 万人にすぎないと言われている。生活習慣の改善が重要で、減塩、減量、運動、アルコール制限、禁煙などが基本となっている。

1-3 尿成分の計測意義

尿計測の重要性は古くから知られており、紀元前 4 世紀、ヒポクラテスの時代には、病気の診断における尿の所見が示されている ¹³⁾。現代においても尿検査は、腎・尿路系疾患や種々の疾患のスクリーニングに重要な役割を担っており、栄養状態や病状、ストレスなどを反映する。尿は容易かつ無侵襲的に採取でき、その成分のほとんどは水分である。全体のおよそ 5% が固形物 (蛋白、種々の有機および無機塩類、電解質など) であり、これらの成分は健常成人においては、量的・質的な変化はほとんど変化しないか、食事や運動などに伴う一時的な変化のみである。しかし反復的な尿検査によって腎や尿路系疾患のみならず種々の病態の情報や予後の推定、治療法の選択にとっての重要な指標になり得る ¹⁴⁾。本節では本研究における 4 つの対象成分 (以降、対象 4 成分とする) について述べる。

1-3-1 尿糖（グルコース）

尿糖は健常人の尿中にも微量に存在し、2-20 mg/dl 程度、一日の排泄量は 40-85 mg/dl 程度である¹⁴⁾。健康診断など一般的な尿検査の項目にも含まれ、糖尿病のスクリーニング検査や血糖管理を目的としている。また大学健康診断においては学校保険安全法によって尿糖検査が義務化されている¹⁵⁾。尿糖は食事の影響を受けやすく、検査結果が陽性であっても直ちに受診する必要はないが、継続的に陽性が確認される場合は、医療機関の受診が推奨される。尿糖が陽性を示す疾患・状態は、糖尿病や甲状腺疾患、腎性糖尿、妊婦などがあり、考え得る疾患に応じて必要な検査を行なう。このように尿糖は種々の疾患により高値を示し、継続的な尿糖モニタリングは一過性の高値と慢性的高値（＝糖尿病）の判断に有効である。

1-3-2 尿素

尿素は肝臓の尿素サイクルにおいてアンモニアから生成される。蛋白質の終末代謝物であるため、食事によるたんぱく摂取量に影響を受け、濃度が変動するが 14-28 g/day が排泄される¹⁴⁾。生成された尿素は全て腎から排出されるため、腎機能の指標となる。近年、従来 24 時間畜尿によって評価されていた 1 日のたんぱく摂取量を、随時尿中の尿素とクレアチニンの比（UCR, urea-to-creatinine ratio）によって評価可能であるという報告⁷⁾がある。慢性腎臓病患者においては、腎臓の負担となるたんぱく摂取量管理は進行予防に有用であるため、UCR はその評価指標となり得る。

1-3-3 ナトリウム（Na）

健常人ではホメオスタシス（生体の恒常性）により、経口摂取されたナトリウムと同量が尿中に排泄される。ナトリウムは主に食塩として摂取され、常食摂取時の尿中 Na 排泄基準量は 70-250 mEq/day である¹⁴⁾。塩分の多量摂取は高血圧のリスクファクターであるのは周知の事実であるが、塩分摂取量の全世界平均は WHO の推奨摂取制限値の 2 倍程度である¹⁶⁾。Pimenta らは、降圧剤を使用しても降圧目標に達しない治療抵抗性血圧の患者においても、食塩制限によって血圧が下がることを確認した¹⁷⁾。このように食塩摂取量は健常人および有病者の両者において重要であるが、食事に含まれる塩分を

完全に把握することは家庭では難しい。また1日の塩分摂取量においても24時間畜尿によって評価されていたが、随時尿中のNaとクレアチニンとの比（NCR, Na-to-creatinine ratio）がその評価に有効であるとの報告⁶⁾がある。したがって随時尿中のNCRの計測による継続的な塩分摂取量の管理が望まれる。

1-3-4 クレアチニン

クレアチニンは筋肉に含まれるクレアチンリン酸の最終代謝物である。同一固体であれば平常時の排泄量（約1.0-1.5 g/day）は一定であり、食事による変動が無く、筋量や運動、腎機能に依存する。臨床においてクレアチニン排泄量が単体で意味を持つことは無いが、クレアチニンクリアランスの算出や随時尿中の種々の成分の計測値補正に用いられる。

1-4 家庭での尿成分計測の現状とその問題点

本項では家庭でも実施可能な尿検査（主に尿糖計測）について、従来法として試験紙とデジタル尿糖計、インテリジェンストイレを例に挙げ、その原理について述べる。

1-4-1 試験紙

古く、臨床における尿検査では多数の患者から得られたサンプルをそれぞれ試験管に移し、化学反応により含有成分を測定するという煩雑な手法を用いていた。しかし1957年、Freeらによって発表された「dip and read方式」¹⁸⁾は、サンプルを試験紙につけ、色調を目視で判断することで測定できるため、臨床検査を飛躍的に進歩させた。今日、尿試験紙はその方式に基づき、成分濃度による色調変化により定性的もしくは半定量測定を行なう。現在国内では、尿成分検査用の単項目および多項目複合試験紙が、テルモ株式会社や栄研化学株式会社など10を超える企業から販売されており、簡便かつ安価な尿成分計測が実施可能である。ここでは尿糖試験紙を例に、その測定原理を述べる。

尿糖（尿中グルコース）はグルコースオキシターゼによる呈色反応によって測定される。グルコースオキシターゼは酵素の一種であり、FAD（活性型ビタミンB₂）を補酵

素として、 δ -D-グルコラクトンと過酸化水素を生成する。過酸化水素はペルオキシターゼの触媒作用で活性酸素を生成し、試験紙上の指示薬を酸化させ、グルコース濃度に応じた色調を呈する。これを試験紙に付属の標準色調表と比較することで、尿中のグルコースの量を判定する。使用上いくつかの注意点はあるものの、医学に関する専門的な知識が無くとも簡単に使用できることが試験紙における最大の利点である。

1-4-2 デジタル尿糖計¹⁹⁾

図 1.1 に示すデジタル尿糖計は酵素電極法に基づき、尿中のグルコースを 200-5000 mg/dl の範囲で測定可能である²⁰⁾。測定方法は、尿を本体先端のセンサ部にかけるだけであり、6 秒後に尿中のグルコース濃度が本体の液晶画面に表示される。センサ部は制限透過層、酵素層、選択透過層、接着層の 4 つの薄膜機能層から構成されており、尿中の干渉物質（アスコルビン酸や尿酸など）は、制限透過層や選択透過層により排除している。酵素層に固定化したグルコースオキシターゼより、グルコースを過酸化水素に変換し、過酸化水素電極で電流値に変換することで定量測定を実現している。またカバーや携帯用洗浄ボトルも付属されているため持ち運び可能で、外出先でも使用できる。



図 1.1 タニタ電子尿糖計 UG-130-H

(出典：タニタ株式会社ホームページ)

1-4-3 インテリジェンストイレ 2

インテリジェンストイレ 2 は大和ハウス工業株式会社と TOTO 株式会社共同で開発され、自宅で健康チェックが出来る在宅健康システムとして発売された²¹⁾。トイレ空間で尿糖値、血圧、体重、尿温度（深部体温）、BMI 値が測定可能であるため、理想的在宅用長期計測システムである。なお、尿糖値の計測原理はデジタル尿糖計と同様である。

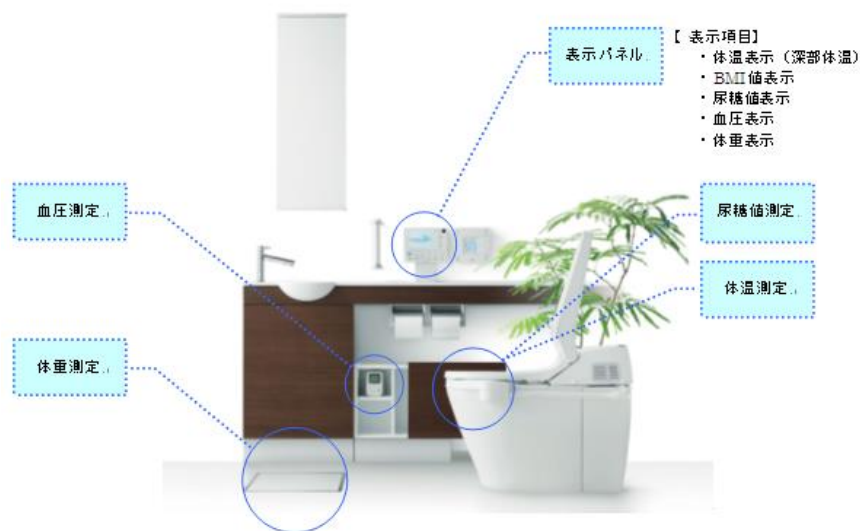


図 1.2 インテリジェンストイレ

(出典：大和ハウス工業株式会社ホームページ)

1-4-4 従来法の問題点

(1) 試験紙

酸化還元反応を利用しているため、アスコルビン酸などの還元性物質が多量に含まれる場合や薬物の代謝産物による偽陰性を示すことがある。その他にも内因性・外因性の還元性物質や酸化性物質による偽反応の可能性があるので、新鮮尿による迅速な測定が求められる。

臨床で使用されている試験紙を含めると、尿糖試験紙の他にも種々の試験紙が存在し、尿糖などの単一項目だけでなく、一枚で多項目測定可能な試験紙も販売されている。しかしそれらにおいても、①試験紙の色調から尿成分濃度を判定するため、定

性的計測手法であること、②試験紙の劣化や尿の成分変化、尿中に存在する化学物質による偽反応の可能性があること、③誤った使用法によるランオーバー現象（隣り合う試験部の干渉現象）、④成分毎に反応時間に差があること、⑤標準色調表の比較において個人差が生じ得るなどの問題点が存在する。

(2) デジタル尿糖計

デジタル尿糖計は尿中に含まれる干渉物質の影響を取り除くことで、定量測定を実現している。しかし①尿糖一項目のみの測定であること、②測定毎に洗浄の必要があること、③90日ごとに酵素電極を交換する必要があること、④そもそも試薬を使用した間接手法であるため潜在的な誤差が存在するなどの問題点が存在する。

(3) インテリジェンストイレ 2

尿糖値の計測原理はデジタル尿糖計と同様なため、尿糖のみの測定であることや試薬を使用するという問題は共通である。この装置の主な問題点は4カ月ごとに酵素電極を交換が必要なことや価格的な問題（本体：23万円、取り付け料：10万円、メンテナンス料：2万円/年）であり、このような理由から現在は販売中止となっている。

上記3つの手法は手軽かつ安価に尿成分計測可能であるという利点はあるが、先述の解決すべき問題点は数多くある。高齢化が進む現代では、尿中の多成分を対象とし、酵素などの試薬を必要とせず、トイレで排尿するだけで尿成分を計測可能なシステムが望ましい。

1-5 本研究の目的

種々の疾患の確定診断は、主に血液成分を基準としているが、尿成分もまた腎尿路系疾患や摂食状態に関する有用な情報を与え得る。現在の市販されている尿成分試験紙やデジタル尿糖計は、家庭でも導入可能な低価格・迅速性を実現しているが、試薬を必要

とし偽反応や定期交換などの使用者視点での問題点も多い。それらの解決方策として近赤外光を用いた尿成分分析に関して多数の報告²²⁻²⁶⁾があるが、分光器を用いた基礎的な検討に留まっており、使用波長数の削減などによる実用的なシステム構築を目指した例は見られない。そこで本研究では、それらの報告に比べて使用波長数を大幅に削減し、陰性吸光度と呼ばれる従来解析に用いられなかった波長を積極的に使用し、光源に近赤外 LED を用いた分析システムの実現を目指している。本研究では、トイレ空間に実装可能な光学尿成分分析システムの開発を目指し、試薬を一切必要としない近赤外分光法により、10 波長程度の波長を用いて尿中多成分を定量計測することを目的とする。

1-6 1章の参考文献

1. 厚生労働省：平成 29 年版高齢社会白書（全体版），2017.
2. 岩本康志：少子高齢化社会における社会保障の財源問題，学術の動向，公益財団法人日本学術協力財団，2013 年 1 月号，pp. 63-66，2013.
3. 日本学術会議臨床医学委員会 循環器・内分泌・代謝分科会：報告「超高齢社会における生活習慣病の研究と医療体制」，2017.
4. 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会：健康日本 21（第 2 次）の推進に関する参考資料，2012.
5. Ilich JZ, Blanusa M, Orlic ZC, Orct T, Kostial K: Comparison of calcium, magnesium, sodium, potassium, zinc, and creatinine concentration in 24-h and spot urine samples in women, *Clin Chem Lab Med* 47(2), pp. 216-221, 2009.
6. Mann SJ, Gerber LM: Estimation of 24-Hour Sodium Excretion from Spot Urine Samples, *J. Clin Hypertens* 12(3), pp. 174-180, 2010.
7. Ndzengue A, Ramaiah M, Wallick A, Bal-asubramony S, Kovesdy CP: Use of spot urine urea/creatinine ratio to examine the association of dietary protein intake with kidney function in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 67(5), A78, 2016.
8. Uechi K, Asakura K, Ri Y, Masayasu S, Sasaki S: Advantage of multiple spot urine collections for estimating daily sodium excretion: comparison with two 24-h urine collections as reference. *J Hypertens* 34(2), pp. 204-214, 2016.
9. Kanno H, Kanda E, Sato A, Sakamoto K, Kanno Y: Estimation of daily protein intake based on spot urine urea nitrogen concentration in chronic kidney disease patients. *Clin Exp Nephrol* 20(2), pp. 258-264, 2016.
10. 医療情報科学研究所：病気が見える vol.8:腎・泌尿器 第 3 版，メディックメディア，pp. 189-190，2019.
11. 一般社団法人全国腎臓病協議会ホームページ，腎臓病について，<https://www.zjk.or.jp/kidney-disease/about/>，2019 年 9 月 18 日.
12. 順天堂大学医学部附属順天堂医院 腎・高血圧内科ホームページ，

https://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/zinzo/about/disease/kanja02_08.html ,
2019年12月4日.

13. 今裕 訳編：ヒポクラテス全集，名著刊行会，1978.
14. 金井正光，奥村伸生，“臨床検査法提要”，第32版，金原出版，p.161，2005.
15. 澁谷麻由美，広瀬寛，當仲香，高山昌子，松本可愛，佐藤幸美子，戸田寛子，堂坂愛，田立暁子，高橋綾，小坂桃子，太田麻紀子，神田武志，横山裕一，森正明，河邊博史：大学生健康診断における尿糖陽性者への対応の検討，慶應保健研究，32(1)，pp. 71-74，2004.
16. Powles J, Fahimi S, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Ezzati M, Engell RE, Lim SS, Danaei G, Mozaffarian D: Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide, *BMJ Open* 3:e003733, 2013.
17. Pimenta E, Gaddam KK, Oparil S, Aban I, Husain S, Dell'Italia LJ, Calhoun DA: Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant hypertension: results from a randomized trial, *Hypertension*, 54(3), pp. 475-481, 2009.
18. Free AH, Rupe CO, Mefzler I: Studies with a New Colorimetric Test for Proteinuria, *Clin Chem* 3(6), pp. 716-727, 1957.
19. 伊藤成史：デジタル尿糖計の開発と糖尿病予防への応用，化学工学会研究発表講演要旨集，AB115，pp. 166-167，2009.
20. タニタ株式会社ホームページ，https://www.tanita.co.jp/product/g/_UG130H/，2019年10月16日.
21. 大和ハウス工業株式会社ホームページ，<https://www.daiwhouse.co.jp/release/20081224111714.html>，2019年10月21日.
22. Shaw RA, Kotowich S, Mantsch HH, Leroux M: Quantitation of protein, creatinine, and urea in urine by near-infrared spectroscopy. *Clin Biochem.* 29(1), pp. 11–19, 1996.
23. Pezzaniti JL, Jeng TW, McDowell L, Oosta GM: Preliminary investigation of near-infrared spectroscopic measurements of urea, creatinine, glucose, protein, and ketone in urine. *Clin Biochem*, 34, pp. 239–246, 2001.

24. Susmel PA, Piani B, Toso B, Stefanon B: Prediction of purine derivatives, creatinine and total nitrogen concentrations in urine by FT-near infrared reflectance spectroscopy (FT-NIR). *Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives*. pp. 160–166, 2004.
25. Liu W, Xu K, Yu Q, Zhang S, Ran D: Determination of multiple components in urine using FT-MIR, NIR and FT-Raman spectroscopic technique, *Proc SPIE*. 5640, pp. 610–615, 2005.
26. Liu W, Yang W, Liu L, Yu Q: Use of artificial neural networks in near-infrared spectroscopy calibrations for predicting glucose concentration in urine. 4th International Conference on Intelligent Computing, ICIC 2008, Shanghai, China, LNCS. 5226, pp. 1040–1046, 2008.

第2章 近赤外分光法による定量分析

本章は近赤外分光法入門¹⁾ および近赤外スペクトル法²⁾ に基づくものである。

2-1 近赤外分光法の特徴

本章では近赤外分光法の原理と定量分析への応用について述べるが、まず近赤外分光法の特徴を下記に示す。

- 1) 低エネルギーの光を用いるため、ほとんどの場合、試料に損傷なく分析が可能である。
- 2) 試薬を必要としない分析手法である。
- 3) 使用する波長域によっては検出器や光源の選択が容易である。
- 4) 固体、液体など種々の状態の試料に適用可能である。
- 5) 赤外領域に比べて、水の吸収が弱く、水溶液の分析が比較的容易である。
- 6) 複数の分子の光の吸収現象により、スペクトルが複雑になる。
- 7) 多くの場合、統計学的（ケモメトリクス）手法が必要となる。

などの特徴を持っており、本研究目的である尿成分分析に有用である。近赤外分光法の詳細については次項から述べる。

2-2 分子の振動

可視光と赤外光の間にある近赤外光は、下限が明瞭でないが一般に波長 750-2500 nm 程度の電磁波を指し、物質による光の吸収は分子の振動に基づいて生じる。物質を構成する原子は、エネルギーの最も低い位置（平衡位置）付近で振動しており、この分子振動と振動数が同じ光が分子に照射されると、分子が光の一部を吸収し、分子の振動エネ

ルギーは増加する¹⁾。分子の運動は厳密には量子力学に基づいて記述されるが、ここでは二原子分子の伸縮振動を古典力学により取り扱い、図 2.1 のような系を考える。

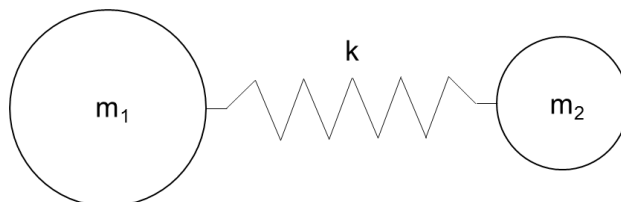


図 2.1 二原子分子のモデル

質量 m_1 と m_2 が原子核、バネ定数 k のバネが化学結合を示しており、この系の固有振動数 f は、換算質量 M を用いて次の式で示すことが出来る。

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{M}} \quad (2.1)$$

$$M = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (2.2)$$

式(2.1)は、原子の質量が小さくなればなるほど、共有結合が強くなればなるほど、この分子モデルの固有振動数は高くなることを意味している。この系と同じ振動数を持つ外力が作用すると、共振が起こり、原子核は固有振動数で激しく振動する。また、式(2.1)から分かるように二原子分子の場合は、分子の固有振動数は1つしか存在しないが、三原子以上の多原子分子の場合は複雑な振動が生じる。三原子以上における現象は次項で述べる。

2-3 調和振動

調和振動における分子のポテンシャルエネルギーは二次関数で表すことができ、分子の振動は厳密には、近似的に調和振動で表現される分子振動が非調和性を持つことで起こる²⁾。そしてこの分子の振動は、並進振動や回転運動を含まない分子内での原子核の振動（基準振動）のみで表される。基準振動の数は分子の自由度の数に等しく、ここで n 個の原子を持つ分子の自由度を考える。それぞれの原子が自由に独立して移動可能な三次元空間を仮定すると、各原子は 3 自由度を持つので、分子全体としては $3n$ の自由度となる。二酸化炭素のような直線的な分子の場合、その自由度は $3n-5=4$ （並進自由度：3 と回転自由度：2 を差し引く）と表すことができる。図 2.2 に示す水のような非直線的な分子であれば、回転の自由度が 3 となるので、 $3n-6=3$ と表すことができる。この複数の基準振動の重ね合わせによって全ての分子振動は表される。基準振動のエネルギーは量子力学により式 (2.3) で表される。

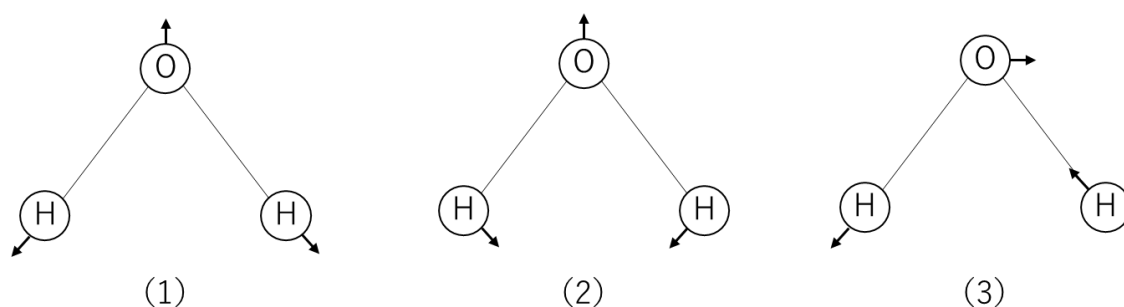


図 2.2 水の基準振動

(1)対称伸縮振動, (2)変角振動, (3)逆対称伸縮振動

$$E_k = h\nu_k \left(k + 0.5 \right) \quad (2.3)$$

ここで、 h はプランク定数、 ν は0, 1, 2, ...の値をとる系の振動数（波数 [cm^{-1}]), k は振動の量子数である。 $\nu=0$ の時、つまり最も低い分子の振動エネルギーは $0.5h\nu_i \neq 0$ となり、量子力学においては原子が静止しないことを意味する。この点は、先述の古典力学的考え方と異なる。 $k=1, 2, 3, \dots, n$ に対し、振動エネルギーは不

連続な値をとり、量子力学における調和振動では $\Delta v = \pm 1$ の遷移（隣接したエネルギー間）のみ許される。

2-4 非調和振動

調和振動では複数の基準振動が同時に励起することや、 $\Delta v = \pm 1$ 以外の遷移は許していない。したがって、調和振動では原理的に近赤外光領域の吸光は起こりえない。そこで、現実に観測される近赤外吸光を説明するには二次曲線だけでなく、モース関数によって三次以上の成分を含む振動ポテンシャルエネルギーを考える必要がある（図 2.3²⁾）。

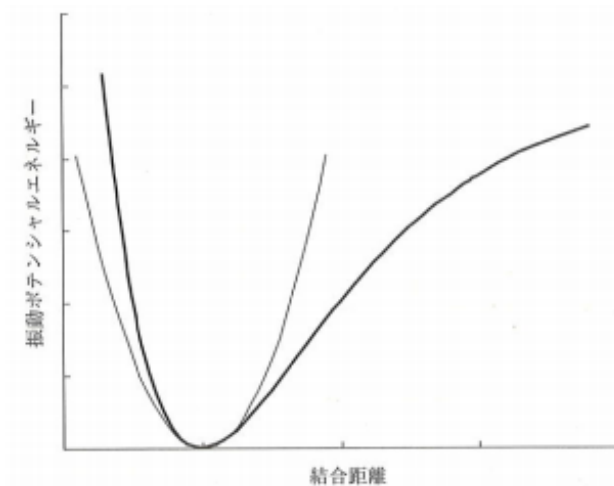


図 2.3 振動ポテンシャルエネルギー：モース関数および二次関数（図中、極小位置平衡位置，太線：モース関数，細線：二次関数）

図 2.3 において、平衡位置近傍では二つの曲線はほぼ一致しているが、結合距離が平衡位置から離れるほど、モース関数は二次曲線から離れ、ズレが大きくなる。これは分子が高い励起状態に遷移すると非調和性が大きくなることを示している。図 2.3 のモース関数をシュレディンガーの波動方程式で解くと、非調和振動における分子の振動エネルギーを次式から求めることが出来る。

$$E_k = hv\{1 - \chi(k + 0.5)\}(k + 0.5) \quad (2.4)$$

ここでは χ は非調和定数 ($0 < \chi \ll 1$) である. $k=0, 1, 2, 3$ に対する分子の振動エネルギーは

$$\left. \begin{aligned} E_0 &= 0.5hv(1 - 0.5\chi) \\ E_1 &= 1.5hv(1 - 1.5\chi) \\ E_2 &= 2.5hv(1 - 2.5\chi) \\ E_3 &= 3.5hv(1 - 3.5\chi) \end{aligned} \right\} \quad (2.5)$$

となる. 一般に室温下における分子は, 平衡位置にあるため振動エネルギーが低い状態 ($=E_0$) を保っている. 高いエネルギーへの遷移の確率は時数が上がるほど急激に減少する. χ が 1 より非常に小さい正の数であることを考慮した遷移エネルギーは次式で表される.

$$\left. \begin{aligned} \Delta E_1 &= E_1 - E_0 = hv \\ \Delta E_2 &= E_2 - E_1 = 2hv \\ \Delta E_3 &= E_3 - E_2 = 3hv \\ \Delta E_4 &= E_4 - E_3 = 4hv \end{aligned} \right\} \quad (2.6)$$

これらのエネルギー遷移による吸光は, 式 (2.6) における $ν, 2hν, 3hν, 4hν$ に相当する波数に現れ, $2hν, 3hν, 4hν$ をそれぞれ第 1 倍音, 第 2 倍音, 第 3 倍音と呼ばれる. 近赤外領域においてはこれらの倍音による吸光が観察される. また複数の基準振動が生じた際, それらが組み合わせに由来する結合音が観察される. これら倍音や結合音で吸光 (振動) を示す主な化学結合は O-H, C-H, N-H の 3 つである. したがって, 近赤外分光法による計測対象のほとんどは, これらの化学結合を含む物質となる.

2-5 Lambert-beer 則

前項までは物質の近赤外吸光の原理について述べた。ここでは溶液など透明な物質による吸光の強さと吸光する物質との関係を示す Lambert-beer 則について述べる。

図 2.4 のようなセルと呼ばれる容器に入った散乱の生じない溶液（図中灰色で示す）に入射光 I_0 を照射し、溶液中を通過した光 I_t （透過光）が発生する場合、下式より透過率 T を求められる。なお、セルの材質は近赤外領域での特異的な吸光を示さないものとする。

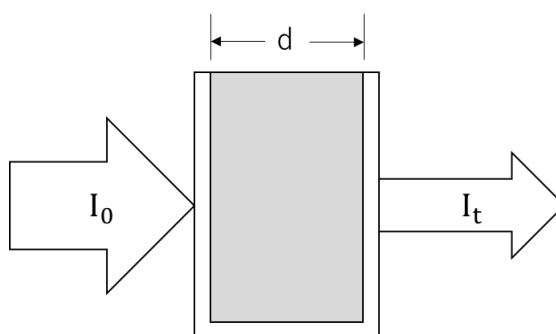


図 2.4 溶液中の溶質による吸光

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (2.7)$$

しかし溶液中の溶質による吸光を考える場合、「光がどの程度透過したか」ではなく「どの程度吸収されたか」を表す必要があるため、一般に以下のような吸光度 A が用いられる。

$$A = -\log_{10} \frac{I_t}{I_0} = \log_{10} \frac{I_0}{I_t} \quad (2.8)$$

この吸光度は溶液の濃度 c と光路長 d 、モル吸光係数 ε を用いて、Lambert-beer 則によって以下のようにも表すことができる。

$$A = \varepsilon cd \quad (2.9)$$

計測対象が溶液である場合、 ϵ は溶質により決まる定数である。つまり光路長が一定である時、吸光度は濃度に比例することを示している。

2-6 スペクトル計測におけるノイズ

具体的な定量分析について述べる前に、スペクトル計測において問題となる、スペクトル計測時のノイズについて述べる。上記の分光法の原理に基づけば、吸光の発生しない波長域においてベースラインは「吸光度=0」に完全に一致するはずである。しかし実際には光学的な要因による加算誤差としてベースラインの上下シフト、乗算誤差であるベースラインの傾きがたびたび発生し、このようなノイズを取り除くことは通常不可能である。また、スペクトルの温度依存性を考慮した室温などの温度管理や、測定器である分光器自体の光安定性も非常に重要であり、一般的には分光器の起動から数十分～1時間後に使用する。

これらのノイズを低減するために、スペクトルに前処理を施すことが一般的である。例として差スペクトル法やスムージングなどがある。差スペクトル法は次項で詳細について述べるが、スペクトルの変化を算出するだけでなく、除算によってベースラインシフトを吸光度ゼロラインに合わせる目的でも使用される。スムージングは文字通り、スペクトルに乗ったノイズを滑らかにする処理である。周囲の点から一点一点の平均位置を予測していくというアルゴリズムであり、ノイズを効果的に取り除くことが出来る。しかしその反面、ピークの分解能低下や高さの変動など問題となることもある。これらの問題を抑える目的で Savitzkey-Golay 法によるスムージングがよく行われ、この手法は多項式を用いた最小二乗法によるものである。

2-7 差スペクトル法による定量分析

差スペクトル法は吸収スペクトルの極めて小さな差や変化を検出可能で、溶液分析には必要不可欠²⁾であるため、その有効性について述べる。

先述の通り Lambert-beer 則に基づけば、光路長が一定の場合、吸光度は溶液の濃度に比例する。しかし本研究の計測対象である尿など多成分が混合された溶液においては、各成分の吸光波長が複雑に重なり合うことで、特定の成分（溶質）のスペクトルを得ることは難しい。そこで溶液分析においては、溶質の吸光スペクトルを得るために、溶液の吸光スペクトルから溶媒の吸光スペクトルを差し引いた差スペクトル ΔAbs （以降、差分吸光度とする）を求める。差分吸光度は、入射光量 I_0 と計測試料（例えば尿）の透過光量 I_s 、参照試料（例えば純水）の透過光量 I_r を用いて式 2.10 で表される。なお、 $\log_{10}(I_0/I_s)$ は計測試料の吸光度を、 $\log_{10}(I_0/I_r)$ は参照試料の吸光度を示している。

$$\Delta Abs = \log_{10} \frac{I_0}{I_s} - \log_{10} \frac{I_0}{I_r} = \log_{10} \frac{I_r}{I_s} \quad (2.10)$$

式 2.10 に示す通り、差スペクトル法は I_0 の計測が不要で、 I_s と I_r のみを計測するだけで差分吸光度を求めることが出来る。したがって、受光部の計測最大値が入射光量に等しい場合も、計測可能な範囲で透過光量を増幅することで差分吸光度の計測精度を高められることを示している³⁾。また差分吸光度の正負は、溶質の吸光を示しており、正の値の場合は $I_s > I_r$ 、負の符号では $I_s < I_r$ であることを示している。

定量分析において Lambert-beer 則の適用が出来るか否かは成分数に依存しており、成分数の増加により適用が難しくなる。また、溶媒による光の吸収が溶質による吸光を上回ることによって発生する負の吸光度「陰性吸光度」が生じるため、溶質分子による溶媒分子の排除効果と両分子の分子吸光係数の差を考慮する必要がある⁴⁾。そこで上記で算出した差分吸光度を用いて重回帰分析などの統計解析手法を用いることにより溶質の濃度を予測する。

2-8 本研究で用いる統計解析手法

各成分の予測濃度を得るためには、差分吸光度を用いて統計学的手法を用いる必要がある。ここでは本研究で用いる統計手法について概要を述べる。

本研究で実施された全ての統計解析においては、R プログラミング言語（以降、R とする）が使用された。R はインターネット上で無料配布されており、ダウンロードすれ

ばオフラインでも使用可能である。また、多くの統計手法が種々のパッケージに実装されているため、パッケージさえインストールすれば、数行で統計解析が行なえるという利点がある。

解析には、多変量解析手法である重回帰分析と PLS 回帰分析を使用した。多変量解析においては予測結果のことを目的変数と原因のことを説明変数と呼び、本研究においては予測濃度を目的変数、種々の波長における差分吸光度を説明変数とする。重回帰分析は2つ以上の説明変数を用いて回帰式を算出する手法であり、非線形回帰と線形回帰に分類されるが、通常は線形回帰分析を意味する。これに対して PLS 回帰分析 (Partial Least Squares Regression, 部分的最小二乗回帰) は、重回帰分析に主成分分析を掛け合わせた手法である⁵⁾。無相関に線形変換した潜在変数を用いるため、使用波長数がサンプル数に比べて圧倒的に多い場合や多重共線性 (説明変数の共線性が高い) がある場合に有用とされている。更に全ての回帰分析は、1つ抜き交差検証 (Leave-one-out Cross Validation, LOOCV) により実行された。LOOCV は全データを n とした時、それらを2分割し、被予測データとして1サンプル、 $n-1$ のデータを検量線作成サンプルとして使用する。過学習を防ぎつつ、未知のデータに対する予測性能が高いモデル作成することに適している。これらの R および統計学手法の定義式を含む詳細については参考文献⁶⁻¹⁰⁾を参照されたい。

2-9 近赤外光を用いた成分分析に関する既往研究とその課題

近赤外分光法の種々の特徴から、食品分野¹¹⁻¹³⁾や宇宙分野^{14, 15)}、医学分野¹⁶⁻¹⁸⁾などに幅広い分野で注目され、研究・応用されている。また前章で述べたように近赤外光を用いた尿成分分析に関する研究もまた多数報告されている。Shaw らは尿中のタンパク質、クレアチニン、尿素を近赤外分光法により予測し、尿素予測において従来の酵素を用いた手法と同程度の精度であることを報告している^[1章-19]。しかし解析には数百の波長を用いる必要がある。また、Pezzaniti らは尿中の尿素、クレアチニン、グルコース、ケトン体、タンパク質の近赤外分光法による定量分析を試みているが、その使用波長数の多さ (最低でも 2050-2275 nm) から実用的な使用は難しいと考えられる^[1章-20]。これ

らの報告は「尿成分を近赤外分光法により定量可能か」という高価かつ大型の分光器を用いた原理確認実験は行なっているが、使用波長数の削減など実用化に向けた試みを行なったという報告はない。上記のように近赤外分光法による尿成分の定量はある程度可能であることが示されているが、この技術の実用化には「使用波長数の削減」や「システムの小型化」などの課題が残されている。

2-10 2章の参考文献

1. 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住純: 近赤外分光法入門, 幸書房, 1994.
2. 岩本令吉: 近赤外スペクトル法, 講談社サイエンティフィク, 2008.
3. 小川充洋, 山越健弘, 田中志信, 山越憲一: ヒト血清アルブミンリン酸緩衝溶液の近赤外領域における分光学的特性およびその定量化の試み, 生体医工学, 48 (3), pp. 259-268, 2010.
4. Amerov AK, Chen J, Arnold MA: Molar absorptivities of glucose and other biological molecules in aqueous solutions over the first overtone and combination regions of the near-infrared spectrum, *Appl Spectrosc* 58(10), pp. 1195–1204, 2004.
5. 株式会社 YDC ホームページ, 便利な線形回帰手法 PLS の使い方【前編】, <https://www.ydc.co.jp/column/0003/20171215-1.html>, 2019年8月3日.
6. 舟尾暢男, 高波洋平: データ解析環境「R」, 工学社, 2005.
7. 石田基広 訳: Rの基礎とプログラミング技法, シュプリンガー・ジャパン, 2006.
8. 岡田昌史 監訳: Rによる医療統計学, 丸善株式会社, 2007.
9. 金明哲: Rによるデータサイエンス, 森北出版, 2017.
10. 落海浩, 首藤信通 訳: Rによる統計的学習入門, 朝倉書店, 2018.
11. 岩本睦夫: 近赤外分光法による食品成分の非破壊測定, 日本食品工業学会誌, 27(9), pp. 464-472, 1980.
12. 藤原孝之: 近赤外分光法による果実類の糖および酸の測定のその問題点, 日本食品光学会誌, 5 (2), pp. 51-62, 2004.
13. Huang H, Yu H, Xu H, Ying Y: Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review, *J Food Eng* 87, pp303-313, 2008.
14. 平尾直久: 惑星探査における鉱物光学の重要性, 岩石鉱物科学, 31, pp. 111-122, 2002.
15. 廣井孝弘, 杉田精司: C型小惑星の探査における可視・近赤外分光法の役割, 19(1), pp. 36-47, 2010.

16. 松永貞一, 長谷川美奈子, 龍野国弘, 川満幸子, 大崎一男, 三浦剛, 尾崎幸洋, 黒板公生: 近赤外分光法による細菌同定法の可能性と問題点ーブドウ球菌 (MRSA, MSSA) と大腸菌の同定を例にしてー, 感染症学雑誌, 69 (6), pp. 729-737, 1995.
17. 池田東香, 池田英二, 塩崎一昌, 平安良雄: 2 チャンネル近赤外分光法を用いて測定した前頭葉課題実行中の前頭前野の活性と 5 因子性格モデルの関連性, 精神神経学雑誌, 118 (2), pp. 65-69, 2016.
18. Miura K, Matsubara H, Tanaka SM: Development of optical bone densitometry using near-infrared light, J Mech Eng 5(Specialissue4), pp. 60-67, 2018.

第3章 単一水溶液のスペクトル計測

3-1 はじめに

尿サンプルを用いた濃度予測実験に先立ち、対象 4 成分それぞれの感度波長やピーク波長を確認した。グルコース、尿素、塩化ナトリウム (NaCl)、水酸化ナトリウム (NaOH)、クレアチニン、それぞれの粉末・顆粒を純水に溶かした単一水溶液を作成し、スペクトル計測を行なった。なお、ナトリウム単体のスペクトル波形の取得に関しては、NaCl と NaOH のスペクトル波形を比較することで、共通した感度・ピーク波長を確認することとした。

3-2 単一水溶液の濃度設定

随時尿中の各成分の基準値についてはいくつかの報告があるが、グルコース：2-20 mg/dl^{1 章-11)}、尿素：1200-2400 mg/dl¹⁾、ナトリウム：50-130 mEq/L¹⁾、クレアチニン 68-226mg/dl¹⁾ 程度である。これを基に水溶液の濃度を下記のように設定した。

まずグルコースに関しては、糖尿病の早期発見に重きを置くと、検知すべき濃度範囲は上記の基準値よりも高値を含むことになる。そこで尿試験紙ウリエース（テルモ株式会社）において「2+」を示す尿糖値 500 mg/dl を最大値として設定し、0-500 mg/dl（100 mg/dl 刻み）に設定した。尿素、NaCl と NaOH、クレアチニンに関しては、上記の基準範囲の最大値を各単一水溶液のおおよその中央値と設定し、尿素：1000-5000 mg/dl (1000 mg/dl 刻み), NaCl と NaOH: 50-260 mEq/L, クレアチニン: 100-500 (100 mg/dl 刻み) に設定した。

3-3 単一水溶液の作製

溶媒となる純水の作製は、残留塩素除去用活性炭フィルター (FAC-2, オルガノ株式会社, 日本) とイオン交換によるカートリッジ純水器 (G-5, オルガノ株式会社) を組み合わせて行なった。この純水を約 25°Cの室内にて 1 時間以上放置し、水温を室温に

調整した。この純水にグルコース（JIS 試薬特級，和光純薬工業株式会社），尿素（JIS 試薬特級，和光純薬工業株式会社，日本），NaCl（和光一級，富士フイルム和光純薬株式会社），NaOH（JIS 試薬特級，ナカライテスク株式会社），クレアチニン（和光特級，和光純薬株式会社）をそれぞれ添加した。グルコース，尿素，クレアチニンは各水溶液の最大濃度を作製の後，純水で希釈し，約 20 分攪拌することで各濃度に調整した。NaOH および NaCl 水溶液においては，各水溶液中の Na イオンの濃度が可能な限り上記の設定濃度に一致するように調整した。しかし NaOH は他の成分に比べて粒径が非常に大きく，正確な濃度に調整することが難しい。また，空気中の水分を吸収して溶ける潮解性があるため，迅速な溶液調整が求められる。NaOH との比較のための NaCl は，最終的な NaOH 水溶液の各濃度に合わせて作製した。

3-4 実験装置と計測方法

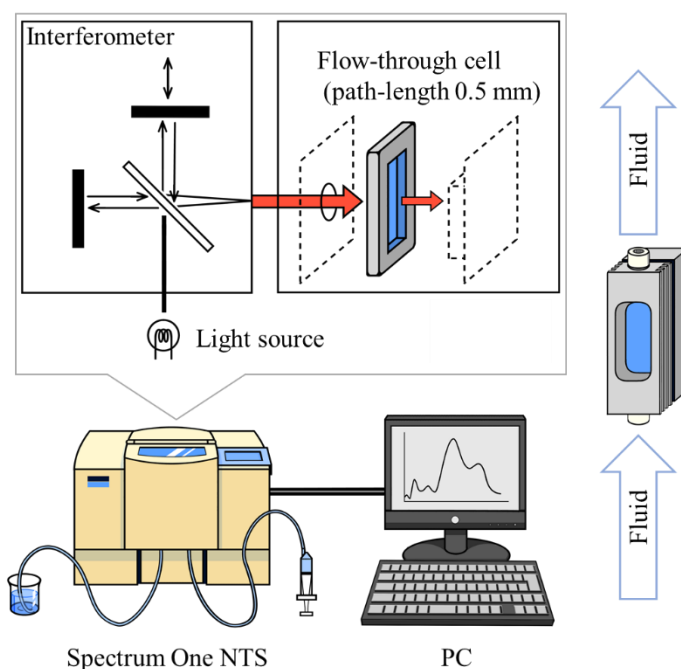


図 3.1 FT-IR 型分光を用いた測定装置

本章およびこれ以降のスペクトル測定では，約 25°C に設定された室内において，図 3.1 に示す FT-IR 型分光器（Spectrum One，パーキンエルマー株式会社，アメリカ）を用

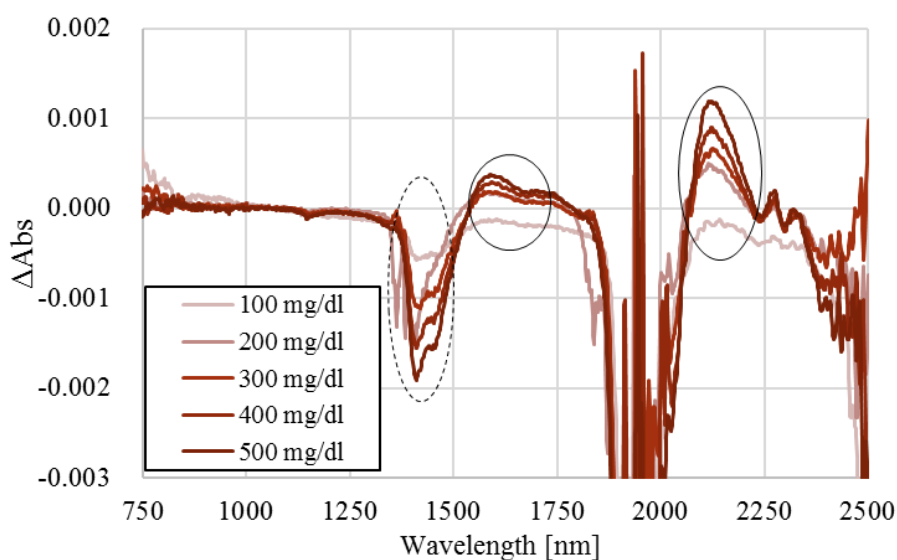
いており、計測波長範囲は 750-2500 nm、波長分解能は 1.667 nm、計 1051 波長である。SN 比向上のため 1 サンプルあたり 10 回の透過光計測（1 回あたり約 3 秒、計 30 秒）を行ない、その平均値を計測値として用いた。計測セルには光路長 0.5 mm のフローセルを用いた。なお、計測回数のこれ以上増加により、SN 比が大きく向上することはないことを事前に確認しており、計測時間短縮のために 10 回に設定した。

スペクトルの計測方法は以下の通りである。1) 純水もしくはサンプルを交互に充填し約 1 分待機の後、2) フローセルに入射光 I_0 を照射し、3) セルを通過した透過光 I_t と I_s を計測する。4) 前章の式 2.10 より差分吸光度 ΔAbs を算出する。算出された ΔAbs に基づいて各成分の感度波長およびピーク波長を確認するものとする。なお、全てのスペクトルは、全成分で濃度依存性のない 1060 nm のデータを用いてベースライン補正され、Savitzkey-Golay 法により平滑化された。

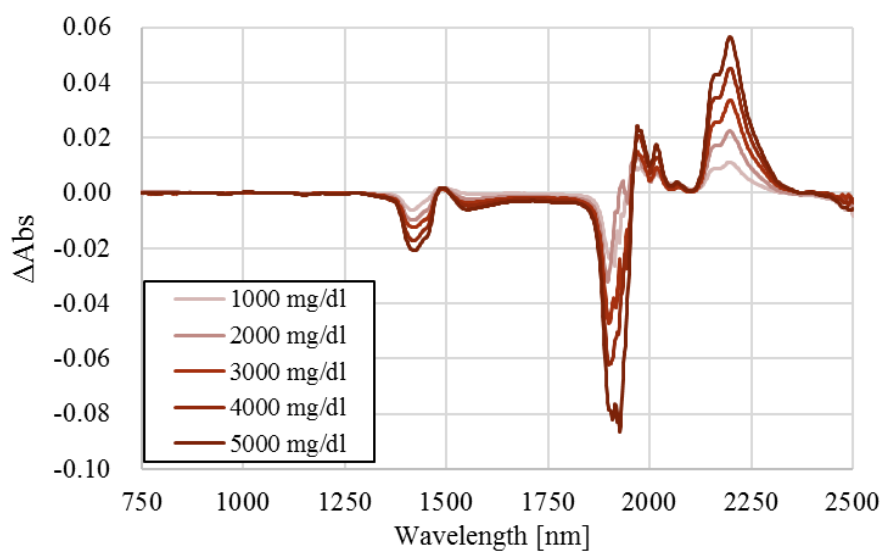
3-5 単一水溶液のスペクトル波形

3-5-1 各成分のスペクトル波形

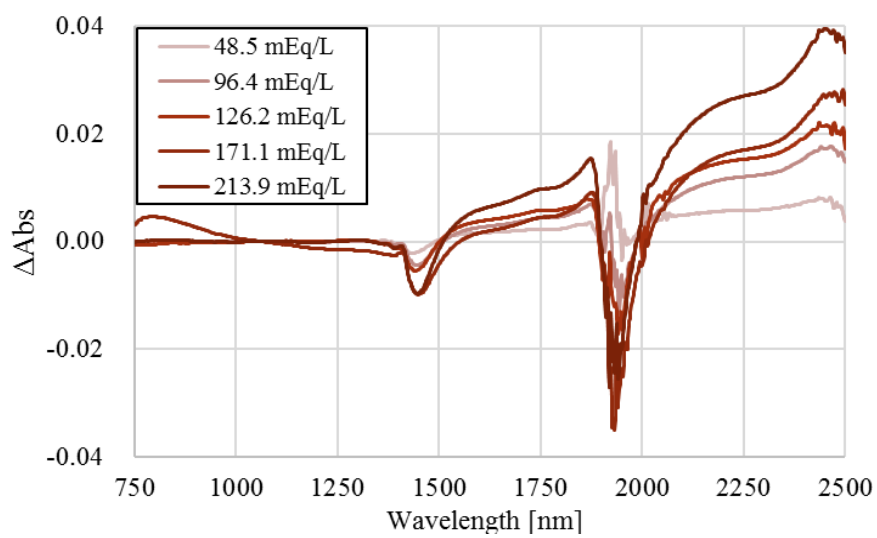
各成分の単一水溶液のスペクトル測定を行なった。図 3.2 に(a)グルコース、(b)尿素、(c)NaOH、(d)NaCl、(e)クレアチニンのスペクトル波形を示す。なお、図中の実線の濃淡は水溶液の濃度に対応している。



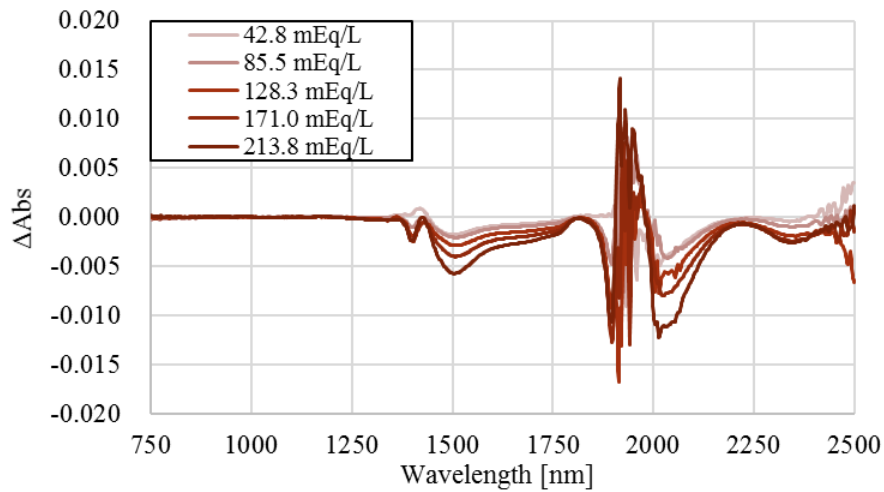
(a) グルコース



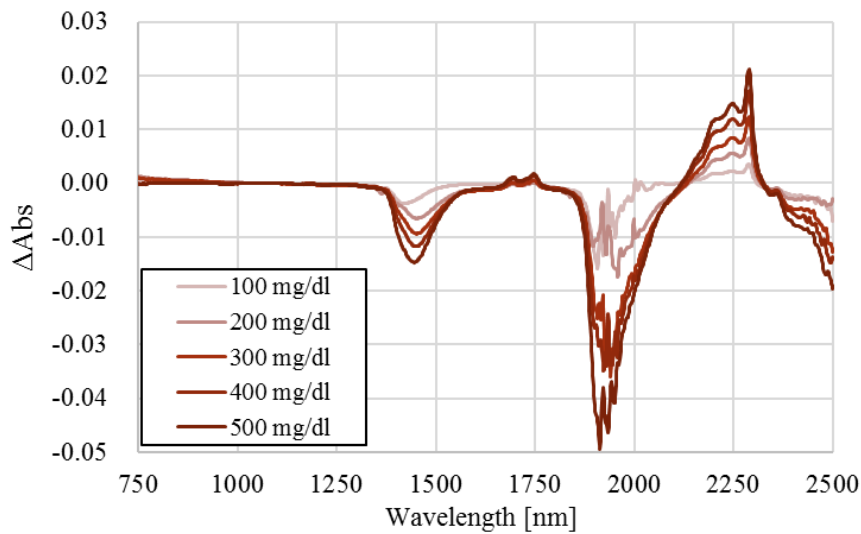
(b) 尿素



(c) NaOH



(d) NaCl



(e) クレアチニン

図 3.2 各成分の単一水溶液のスペクトル波形

3-5-2 結果と考察

表 3.1 に各成分の構造式を示す。グルコースは水溶液中で 3 つの構造異性体を持ち、その割合は α -D-グルコースが約 4 割、 β -D-グルコースが 6 割、D-グルコースが微量となっている。表 3.2 に各成分が持つ官能基と吸収波長の関係²⁾を示す。なお、表 3.2 に示す吸収波長は、図 3.2 において明確な吸光が確認された 1300 nm 以降の波長のみを記載している。

3-5-2-1 グルコース

図 3.2(a)はグルコースのスペクトル波形を示している。図中の黒実線で囲まれている 1570-1640 nm 付近と 2100 nm を中心とする波長域は溶質濃度の増加に伴い Δ Abs が増加しており、これらは溶質のグルコースによる吸光を示していると考えられる。一方で、黒点線で囲まれた波長域 (1380-1500 nm 付近) は溶質濃度の増加に伴い Δ Abs が減少しており、見かけ上、溶質が発光していることになる。しかしこの現象は、純水の吸光度が溶質の吸光度を上回ることによって、つまりは可視光域では生じ得ない「水が光を吸収する現象」に起因する。近赤外領域では水が強い吸光物質であることが知られており、波長 1100 nm 以上の領域では多くが水によって吸収され³⁾、Yamatera らは 847 nm, 979 nm, 1203 nm, 1454 nm, 1779 nm, 1938 nm 付近に水による近赤外光の吸収を確認している⁴⁾。この水の吸光現象により負の値を示す「陰性吸光度」もまた溶質特有の吸光現象に基づいて発生すると考えれば、1380-1500 nm 付近もグルコースの感度波長と考えられる。図 3.2(a)で観測された感度波長は、OH の対称伸縮振動の第一倍音や分子内の水素結合、OH の対称伸縮振動+OH の偏角振動などを反映していると考えられる。

3-5-2-2 尿素

図 3.2(b)は尿素のスペクトル波形を示しており、1390-1460 nm および 1890-1900 nm 付近に負の感度波長が、1960-2010 nm や 2140-2230 nm 付近に正の感度波長およびピーク波長が確認された。近赤外領域における尿素の基準振動や倍音、結合音、つまり感度波長は 1470, 1500, 1530, 1990, 2040, 2080 nm^{2章-1)} と示されており、観測された感度波長範囲と概ね一致している。観測された波長は NH の非対称伸縮振動の第一倍音や NH 非対称伸縮振動+第 2 アミドなど反映していると考えられる。

3-5-2-3 ナトリウム

Na の感度波長の確認のため、図 3.2 の(c)NaOH と(d)NaCl を比較した。両図において負の感度波長域として 1450-1500 nm, 1800-1900 nm が確認された。これら 2 つの

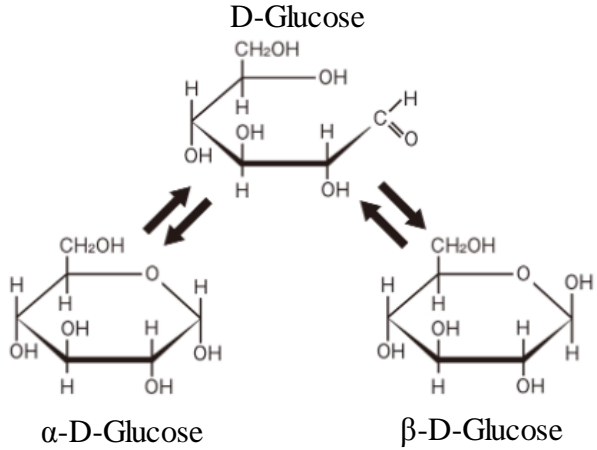
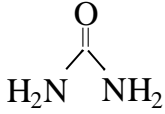
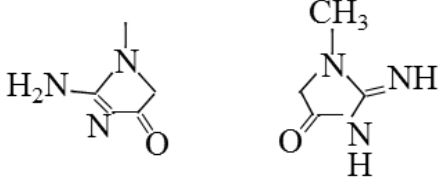
水溶液に共通したイオンが Na であるため、これら 2つの波長域は Na の濃度変化による吸光度変化を直接的に反映していると考えられる。

ナトリウムは水溶液中ではイオン化しており、近赤外分光法の原理に基づけば、分子を持たないイオンによる光の吸収は起こりえない。しかし近赤外分光法によるイオン濃度計測に関して複数の報告⁵⁻⁹⁾があり、水溶液中の Na イオンが吸光量や吸光波長に変化を与えている可能性がある。Sauvage らは、複数の地域で作られた白ワイン中の微量金属イオンの測定を行い、溶液中の金属カチオンの周囲で水素結合が変化することにより近赤外光の吸収が生じている可能性があるとして報告している。また、陳らは濃縮した海水中の複数の無機イオン成分の測定に近赤外分光法が適用可能であるとし、イオンと水分子の相互作用が OH 基を強弱させ、水の吸光に変化を与えたと述べている。したがって、水溶液中の Na イオンと水分子の相互作用による OH 基の変化により、上記のような Na イオン固有のスペクトルパターンが得られると考えられる。

3-5-2-4 クレアチニン

図 3.2(e) に示すクレアチニンのスペクトル波形より、負の感度波長域として 1400-1480 nm と 1890-1960 nm 付近、正の感度波長として 2185-2307 nm 付近、非常に鋭い正のピーク波長としては 2290 nm が確認された。前章で述べたように分子振動は複数の基準振動の重ね合わせであるため、厳密に言えば、表 3.3 に従わない。しかし観測された波長と表が示す吸収波長はある程度一致しており、クレアチニンの持つ官能基が反映されたものと考えられる。また、これらの波長は、NH の対称伸縮振動の第一倍音や、CH の対称伸縮振動の結合音などに対応していると考えられる。

表 3.1 グルコース, 尿素, クレアチニンの構造式

Component	Structural formula
Glucose*	<p style="text-align: center;">D-Glucose</p>  <p style="text-align: center;">α-D-Glucose β-D-Glucose</p>
Urea	
Creatinine	

*出典（一部改変）：Try it ホームページ, 5分でわかる！グルコースの水溶液中での平衡, <https://www.try-it.jp/chapters-10095/sections-10116/lessons-10125/point-2/>

表 3.2 官能基と吸収波長との関係

Functional group	Components			Absorption wavelength [nm]
	Glucose	Urea	Creatinine	
$\begin{array}{c} \diagup \\ -\text{CH} \\ \diagdown \end{array}$	○		○	1340-1470, 1680-1830, 2250-2500
$\begin{array}{c} \diagdown \\ -\text{CH}_2 \\ \diagup \end{array}$	○		○	1360-1470, 1680-1830, 2250-2500
$-\text{CH}_3$			○	1340-1480, 1660-1830, 2200-2500
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \end{array}$	○			1330-1440, 1900-1960, 2150-2220
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$		○		1420-1540, 1900-2020
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}-\text{R} \end{array}$		○		1340-1500, 1980-2090, 2110-2220
$\begin{array}{c} \text{R}-\text{NH} \\ \diagdown \\ \text{R} \end{array}$		○	○	1470-1660, 2020-2220
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\ \diagdown \end{array}$	○			1390-1640, 1990-2160
$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \diagup \end{array}$	○			1390-1630, 1980-2160
$\begin{array}{c} \diagdown \\ -\text{C}-\text{OH} \\ \diagup \end{array}$	○			1400-1600, 1950-2150
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \end{array}$			○	1870-1970, 2090-2180
$\begin{array}{c} \diagdown \quad \diagup \\ -\text{C}-\text{C}- \\ \diagup \quad \diagdown \end{array}$	○			1800-1890, 1960-2180

3-6 3章の参考文献

1. Berne RM, Levy MN: Principles of physiology. 3rd ed. Mosby, Missouri, part 7, ch. 36, p. 424, 2000.
2. Williams P, Norris K: Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, Minnesota, pp. 33–35, 2001.
3. 田村守：光による医学診断，共立出版， p.38， 2001.
4. Yamatera H, Fitzpatrick B, Gordon G: Near infrared spectra of water and aqueous solutions, J Mol Spectrosc 14(1-4), pp. 268-278, 1964.
5. Ciavarella S, Batten GD, Blakeney AB: Measuring potassium in plant tissue s using near infrared spectroscopy, J Near Infrared Spectrosc 6(A), A63–A66, 1998.
6. Sauvage L, Frank D, Stearne J, Millikana MB: Trace metal studies of selected white wines: an alternative approach, Anal Chim Acta 458, pp. 223–230, 2002.
7. Chung H, Ku MS: Feasibility of monitoring acetic acid process using near-infrared spectroscopy, Vib Spectrosc 31, pp. 125–131, 2003.
8. Nah S, Ryu K, Cho S, Chung H, Namkung H: Simple and robust near-infrared spectroscopic monitoring of indium-tin-oxide (ITO) etching solution using Teflon tubing, Anal Chim Acta 59, pp. 208–215, 2006.
9. 陳 介余，張 菌，松永 隆司：近赤外分光法による濃縮海水の主要無機イオン成分の測定，日本海水学会誌 60 (2)， pp.125-131， 2006.

第4章 グルコース添加尿を用いた定量分析における

使用波長数削減の試み

4-1 はじめに

随時尿中の成分計測の重要性および近赤外光による尿成分計測の現状に関しては第1章で述べた。本章では健常成人男性から採取された尿を用いた基礎的なスペクトル計測から、実用的な尿成分計測システムの実現のための使用波長数削減の試みについて述べる。

生活習慣病は、文字通り生活習慣に起因しており、その習慣によって複数の疾患を併発する場合もある。例として、運動習慣に起因する肥満と糖尿病、食習慣や飲酒習慣に起因する肝疾患と大腸がんなどである。そこで数ある生活習慣病の中から、尿成分への影響が顕著と考えられる糖尿病を罹患していることを想定し、模擬的な糖尿病患者尿を作成した。具体的には、健常成人から採取された尿にグルコースを添加したものを計測サンプルとし、分光器を用いてスペクトル計測および統計解析による尿中成分定量分析を行なった。

なお、実験に際しては、金沢大学医学倫理審査委員会の承認および被験者に対して実験の趣旨及び内容の説明を行い、十分なインフォームド・コンセントを得た上で実施した。

4-2 予備実験-グルコース添加による他成分への影響-

本実験では、健常成人の尿にグルコース粉末を添加したグルコース添加尿（Glucose added urine, GAU）をサンプルとするが、厳密にはグルコースの添加により溶液充填用セル内の他の成分分子が追い出されること、また体積変化による濃度の変動も考え得る。そこで、実験の被験者とは別の3名（21-55歳、男性）から尿サンプルを提供していただき、グルコース添加による他成分濃度への影響を検討した。なお、グルコースの添加量は、定性評価手法である尿試験紙ウリエース（テルモ社）において「2+」を示す尿糖値 500 mg/dl を添加の最大量として設定し、0-500 mg/dl（100 mg/dl 刻み）のグル

コースを添加した後、20 分間攪拌した。尿サンプルの実測濃度は外部臨床検査機関（株式会社 SRL，日本）によって計測された。表 4.1 に臨床検査機関での各成分の計測方法を示す。臨床検査機関ではそれぞれの成分に、異なる手法と試薬を用いて計測している。表 4.2 に各被験者の成分濃度を示す。表 4.2 では、原尿の濃度を 1 とした時の最大誤差を Maximum error としている。Subject 1 の尿素窒素を除いて、最大誤差が 3.24% と臨床検査機関の計測誤差である ±10% の範囲である。したがって、グルコースの添加は他の成分濃度に影響を与えることはないと考えられる。

表 4.1 臨床検査機関における各成分の計測方法

項目名称	検査方法	検査試薬_主要試薬名称
グルコース（糖定量）	ヘキソキナーゼUV法	シカリット [®] GLU J
尿素窒素	ウレアーゼ・LED・UV法（回避）	シカリット [®] -N UN
Na(ナトリウム)	電極法	Na, K, Cl 測定用試薬
クレアチニン	酵素法	デタミナーL CRE

表 4.2 グルコース添加による各成分への影響

Subject	components	Amount of added glucose powder [mg/dl]						Maximum error [%]
		0	100	200	300	400	500	
1	Na [mEq/L]	104	105	105	105	104	104	0.96
	尿素窒素 [mg/dl]	995.8	1114.1	1000	1118.2	990.9	999.4	12.29
	creatinine [mg/dl]	185.5	188.5	187.9	184.0	182.2	187.7	1.58
2	Na [mEq/L]	106	107	107	107	106	107	0.94
	尿素窒素 [mg/dl]	1253.8	1240.8	1241.4	1255.6	1231.8	1230.4	0.14
	creatinine [mg/dl]	286.71	290.97	288.30	287.60	289.88	288.32	1.49
3	Na [mEq/L]	145	146	146	145	145	145	0.69
	尿素窒素 [mg/dl]	1420.8	1424.7	1441.8	1413.4	1449.7	1466.8	3.24
	creatinine [mg/dl]	182.7	184.8	184.2	185.4	185.6	184.8	1.60

4-3 実験サンプル

表 4.3 原尿およびグルコース添加尿の各成分濃度

Subject	Unmodified urine						GAU
	Glucose [mg/dl]	Urea [mg/dl]	Na		Creatinine [mg/dl]	K [mEq/L]	Glucose [mg/dl]
			[mEq/L]	[mg/dl]			
a	2	669.6	97	223.1	40.1	16	*
b	8	2646.4	204	469.2	227.2	24	
c	3	737.1	92	211.6	52.6	12	
d	3	714.2	42	96.6	76.4	10	
e	3	639.9	67	154.1	89.9	8	
f	5	1780.7	146	335.8	142.7	33	
g	7	1540.7	138	317.4	178.9	13	
h	10	2796.4	144	331.2	190.9	62	
i	18	2389.3	196	450.8	191.4	38	
j	8	2228.6	115	264.5	216.8	29	

*Glucose concentrations of GAU samples are prepared by adding glucose powder (for 0-500 mg/dl, 50 mg/dl increments) to unmodified urine samples.

21-23 歳の健常成人男性 10 名 (61.67 ± 5.63 kg) から尿を採取し、0-500 mg/dl (50 mg/dl 刻み) のグルコースを添加することで、11 濃度を作成し、計 110 個の GAU サンプルを作製した。サンプルの調製においては、最大濃度 500 mg/dl の添加サンプルを作製し、それを原尿で希釈することで各濃度サンプルを作製した。サンプルの温度は、25°C の室内放置により調製した。計測に際しては、1 被験者サンプルを 3 つに分けて、10 回の透過光計測の平均値をそれぞれの計測値とした。なお、グルコース以外の成分は一切添加しておらず、尿採取にあたっては被験者の食事や運動などの制限は一切行っていない。表 4.3 に被験者の各尿中成分濃度を示す。図中のカリウム (K) は計測対象成分ではないが、これについては 4-6-3-3 で述べる。

厚生労働省は尿検査を採尿後 4 時間以内実施すること、困難な場合は冷蔵保存 (4-10°C 以下) することを推奨している¹⁾。また、尿検査に影響するような生理的・病的成分 (細菌) を含有した尿である場合は経時変化が明白であるが、蓋付容器での冷蔵保存では血液由来の一部成分を除いて 24 時間での変化が見られない²⁾。そこで、全て

の尿スペクトル計測は可能な限り尿の採取日に迅速に行うとともに、計測が翌日に持ち越される場合は冷蔵庫にて保存した。

4-4 実験装置

実験装置は前章の 3-4 と同様である。計測に際しては、透過光強度を著しく低下させる尿沈渣や濁りが無いことを目視にて確認した。なお、本実験は尿と純水を交互に注入しており、純水の透過光計測におけるノイズを防ぐため、尿サンプルの透過光計測後は、多量の純水を流すことによりセル内を洗浄した。

4-5 全波長使用解析の濃度予測

4-5-1 濃度予測結果

基礎的な計測として、分光器の計測波長範囲（750-2500 nm, 1051 波長）を全て用いた全波長使用解析を実施した。LOOCV を用いて PLS 回帰分析を実行し、予測濃度を求めた。検量線作成時の潜在変数（説明変数と同等）の使用数は任意に決定可能であり、上限はプログラムがデータ数に応じて自動決定する。潜在変数の使用数決定のため、使用可能な潜在変数の数を全てコンピュータ上で実行し、検量線の予測精度を示す平方平均二乗誤差（Root Mean Squared Error of Prediction, RMSEP）が最小の場合の潜在変数の使用数を採用した。図 4.1 に濃度予測結果を示す。横軸が臨床検査機関にて計測された実測濃度、縦軸が近赤外分光法による予測濃度を示しており、図中の γ は相関係数、 $\pm 10\%$ 点線は臨床検査機関での計測誤差範囲を示している。図中の SEP は予測標準誤差（Standard error of Prediction）と呼ばれ、その定義は論文や成書によって統一されていないが、本論文では文献 3 による下式を用いた。なお、グルコース添加量 50-500 mg/dl の尿サンプルの実測濃度は、添加量に原尿のグルコース濃度を足し合わせることで設定した。

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n}} \quad (2.1)$$

ここで n は検量線作成に用いたサンプル数、 C_i は予測濃度、 \hat{C}_i は実測濃度を示す。

① グルコース

グルコースの濃度予測においては 47 個の潜在変数が選定された。図 4.1 (a) に示すようにグルコースの濃度範囲に対して良好な SEP 値と非常に強い相関 ($\gamma = 0.987$) が確認された。しかし、横軸 0 および 50 mg/dl において予測濃度が負の値を示すなど、低濃度領域での精度は十分でないことが確認された。なお、濃度が離散的になっているが、これはグルコース添加によるもので、例えば図中右の濃度 500 mg/dl 付近の縦の集団に 10 名分のプロットが含まれている。

② 尿素

尿素の濃度予測においては 32 個の潜在変数が選定された。図 4.1 (b) に示すように尿素の濃度予測において非常に良好な SEP 値および非常に強い相関 ($\gamma = 0.9995$) が確認された。また、濃度によらず全てのプロットが $\pm 10\%$ 線内に入るなど、臨床検査と比較しても遜色ない予測精度が確認された。

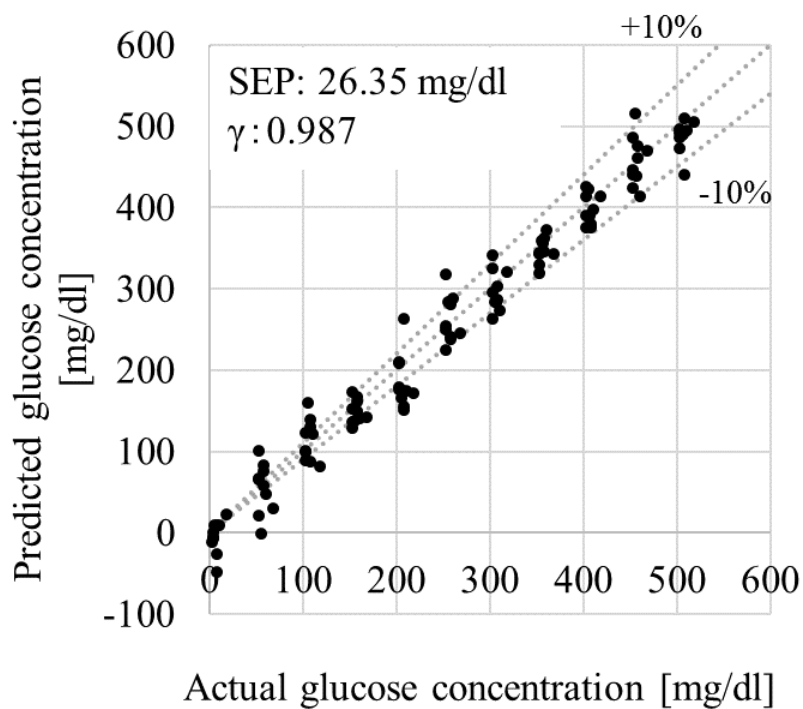
③ Na

Na の濃度予測においては 40 個の潜在変数が選定された。図 4.1 (c) に示すように Na の濃度予測においても、尿素と同様に非常に高い精度で予測可能であることを確認した。110 プロット中 108 プロットが $\pm 10\%$ 線内に入っており、臨床検査と同程度の予測精度が確認された。

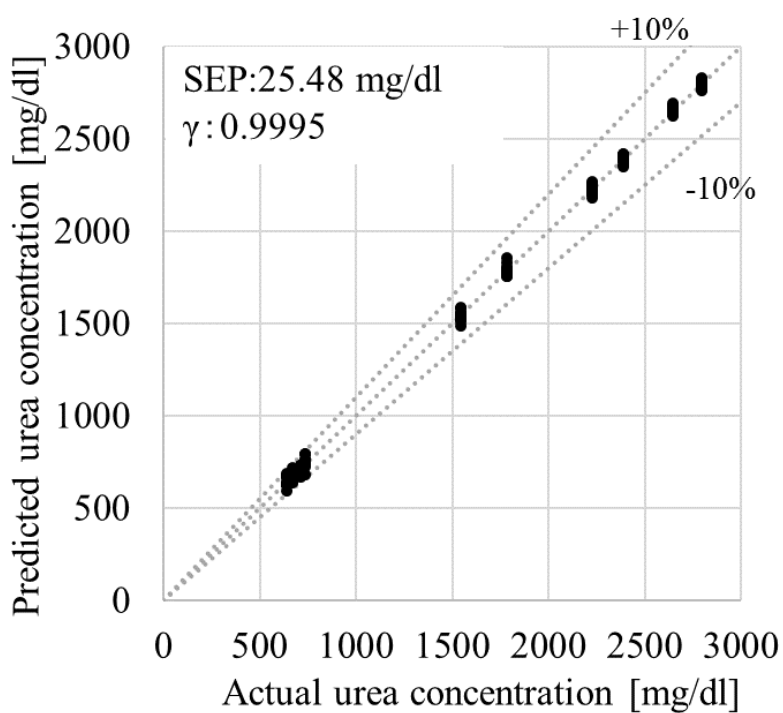
④ クレアチニン

クレアチニンの濃度予測においては 46 個の潜在変数が選定された。図 4.1 (d) に示すように良好な SEP 値および非常に高い相関が確認され、110 プロット中

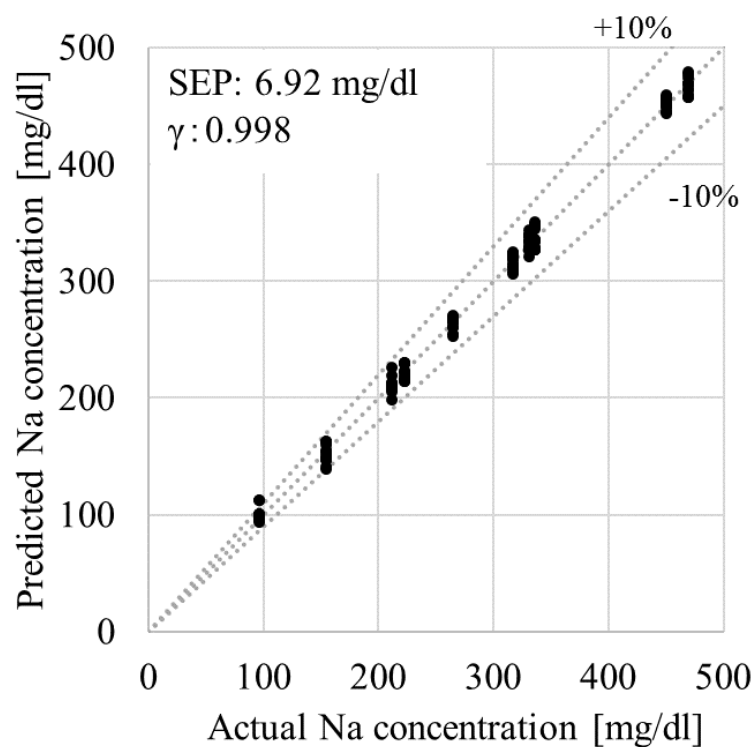
101 プロットが±10%線内に入っているため、臨床検査と遜色ない予測精度が確認された。



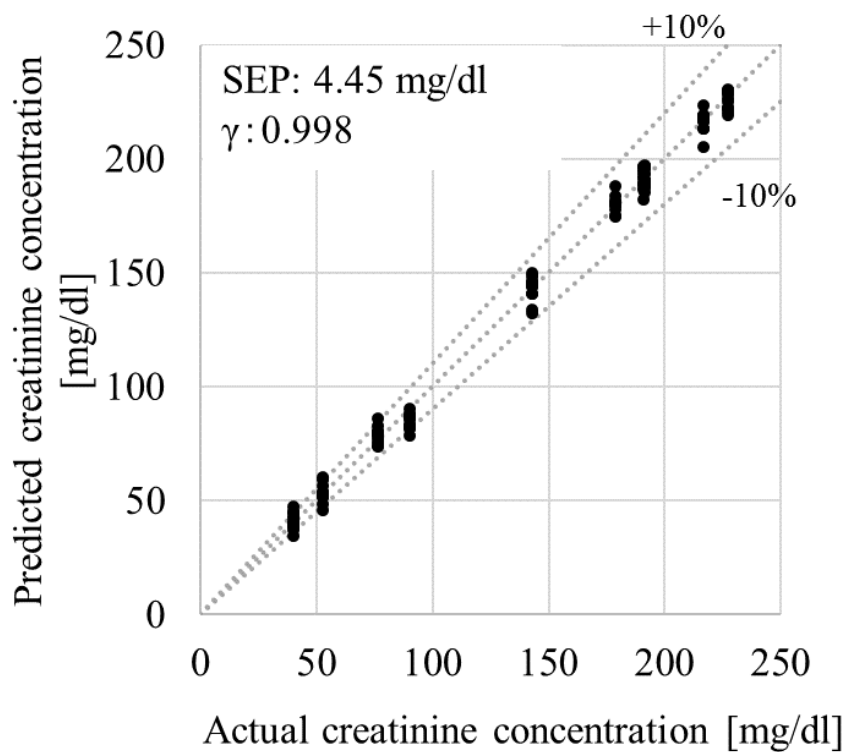
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na

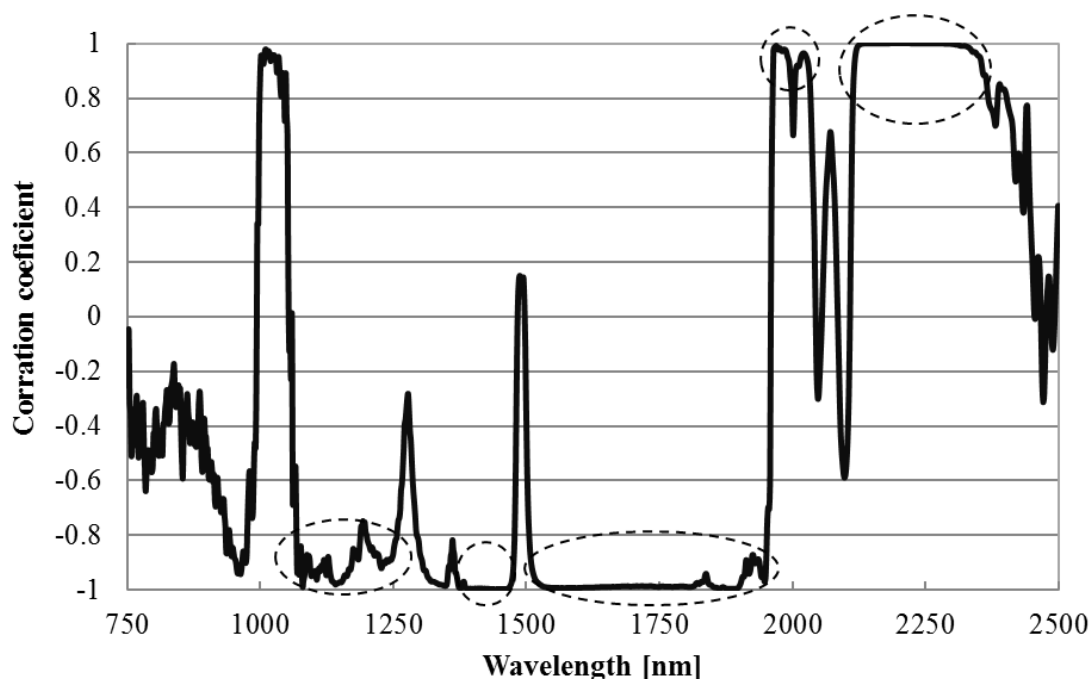


(d) Creatinine

図 4.1 全波長解析による各成分の濃度予測結果

4-5-2 考察

グルコース添加尿中の4つの成分に対して、全1051波長を用いて予測した場合、尿素、Na、クレアチニンにおいて非常に高精度な予測精度が可能で、臨床検査と遜色ない精度であることを確認した。グルコースにおいては負の予測濃度が確認されたが、SEP値と相関係数は他の成分同様に良好であることを確認した。しかしながら、実用的なシステム構築するためには現状の1051波長は非常に多く、波長数の削減は必須である。また、図3.2に示した各単一水溶液のスペクトルを見ると、1051波長の中には各成分に感度が低いもしくは感度がない波長が確認できる。グルコースと尿素を例に、濃度変化と差分吸光度の相関を図4.2に示す。1もしくは-1に近づくほど相関が強いことを示しており、図中の点線で囲まれた強い相関を示す領域はグルコースおよび尿素の感度波長領域であると考えられる。こうした感度波長データのみを解析に用いることで、予測精度向上に繋がる可能性がある。尿素に比べて、グルコースは1や-1など明確な感度波長域が狭いことから、この点がグルコースの予測精度に影響したと推察する。他の成分も同様に、全波長解析では、感度の低いもしくは感度がない波長が含まれているため、実用的なシステム構築および精度向上のため波長を選定する必要がある。



(a) Glucose

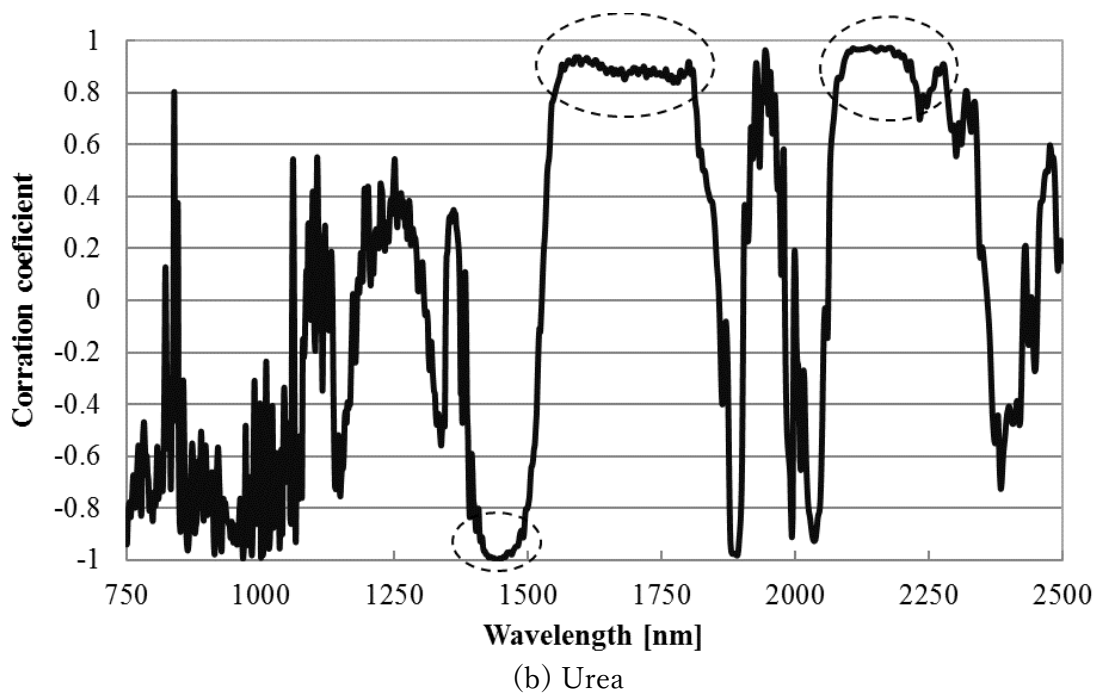


図 4.2 成分の濃度変化と差分吸光度との相関

4-6 総当たり解析による濃度予測

本研究の最終目標として近赤外 LED 光源を用いた実用的な光学式尿成分分析システムを挙げた。実用的な LED システムを想定した場合、4 成分共通の光源使用することになり、現在使用を検討している近赤外マルチチップ LED (LED Microsensor NT 社, ロシア) は、1 つの筐体に複数の波長のチップを搭載することが可能である。光強度はチップ数により調整可能であり、最大 24 チップまで搭載可能である。そこで、分光器で得られた波長のデータの中から、上記の近赤外マルチチップ LED の 10 波長 (1400-2300 nm, 100nm 刻み) のみを抽出し、総当たり解析 (重回帰分析, LOOCV) を行なった。具体的には、計 1023 通りの波長組み合わせを用いて、重回帰分析を行なうことで、各組み合わせにおける予測濃度を算出した。なお、総当たり解析では、各成分の濃度予測結果に加え、たんぱく摂取量の把握によって慢性腎臓病の進行予防に有効な Urea-to-creatinine ratio (UCR) および一日の塩分摂取量推定に有用な Na-to-creatinine ratio (NCR) も算出した。

4-6-1 最適な波長組み合わせの選定

表 4.4 に使用波長数と波長の組み合わせ数との対応を示す。表 4.4 の通り、1 波長を使用した場合の波長組み合わせは、抽出した波長数に等しい ${}_{10}C_1$ 、2 波長を使用した場合は ${}_{10}C_2$ となっている。これら計 1023 通りから最適な組み合わせを選定するため、各波長組み合わせにおける最小の SEP 値を図 4.2 に示す。例えば、図 4.2 において横軸=1 である時の SEP 値は、10 個中から最小の SEP 値が示されている。

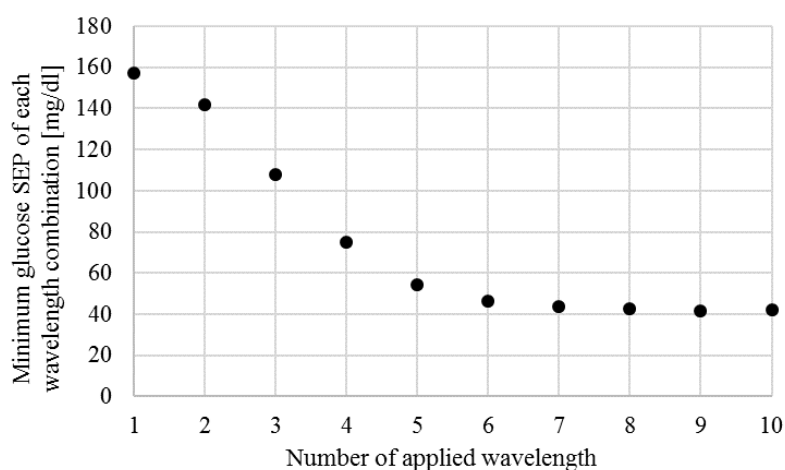
表 4.4 使用波長数と波長の組み合わせ数との対応

使用波長数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合計
波長組み合わせ	10	45	120	210	252	210	120	45	10	1	1023

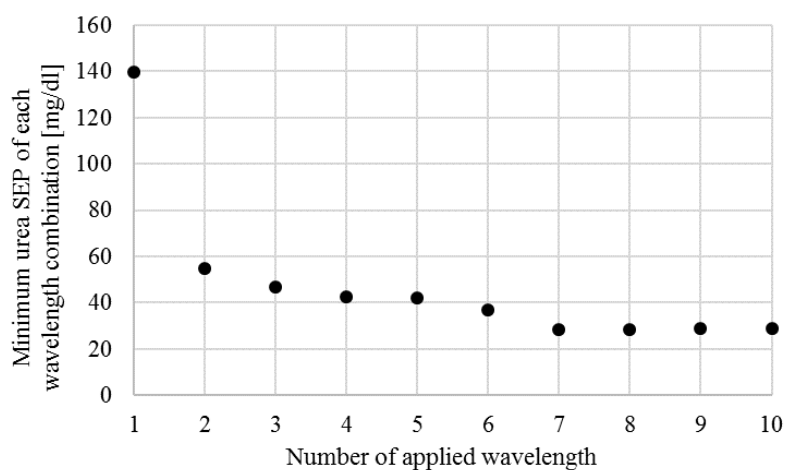
まずグルコースを例にとって、最適波長組み合わせの選定方法の概要を述べる。図 4.2 (a) において、7-10 波長は SEP 値に大きな変動はないが、6 波長以降は増加しており、1 波長使用時の SEP 値は 7-10 波長使用時に比べて 4 倍程度の値を示している。このことから最適波長組み合わせを 7 波長と仮定し、実測濃度と予測濃度の相関図を作成した。比較のため 6 波長使用時の相関図を作成したところ、7 波長使用時の結果は SEP が 4%減少、相関係数が 0.4%向上、更に 100 mg/dl 以下の低濃度領域で負の予測濃度を示すプロット数が 4 個から 2 個に低減した。以上により、グルコースに対する最適波長組み合わせは 7 波長を選定した。クレアチニンも同様の手順で決定した。

次に尿素と Na における最適波長組み合わせの選定に関して、尿素を例に述べる。図 4.2(b)において 1 および 2 波長使用時に SEP 値が 3 波長使用時の SEP 値の 2 倍以上の値を示していることから、この 2 つの組み合わせを除外した。また 4 波長使用時の SEP は 10 波長使用時のそれに比べ、45.5%増加しているが、尿素の実測濃度範囲から考えると 4 波長使用時の SEP 値でも十分に小さい。更に使用波長数を半分以下に削減できている点においても、良好な結果と考えられる。加えて、4 波長の前後、つまり 3 波長および 5 波長を使用した場合の実測濃度と予測濃度の相関図を作成し、相関係数 γ を評価指標として比較した場合も同等の強い正の相関を確認した (3 波長: $\gamma = 0.999$, 4 波長: $\gamma = 0.999$, 5 波長: $\gamma = 0.998$)。また UCR を計算することを前提にクレアチニン

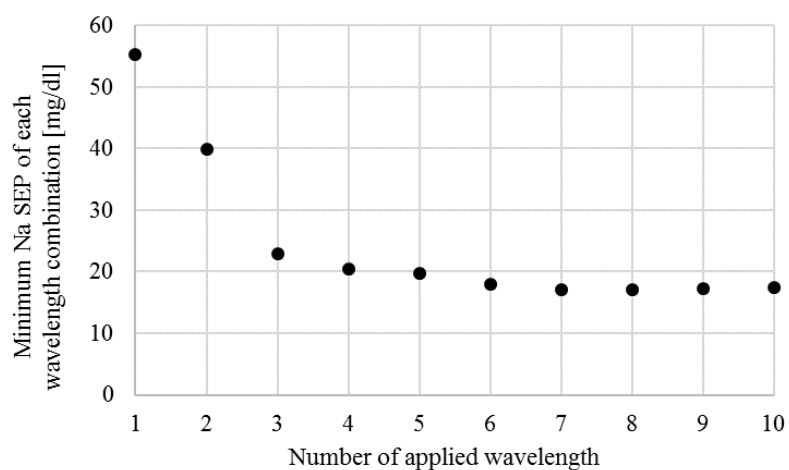
用に選ばれた波長との共通波長を考慮すると、尿素に対して3波長を選定した場合でも UCR 算出時の総波長数が等しいこと（7波長）を確認した。したがって、尿素には4波長が選定され、NaもまたNCRの算出を考慮し、尿素と同様のプロセスにて最適波長組み合わせを選定した。選定された波長組み合わせを表4.5に示す。なお、グルコース用の選定波長に関しては論文執筆中につき非公開とさせていただきます。



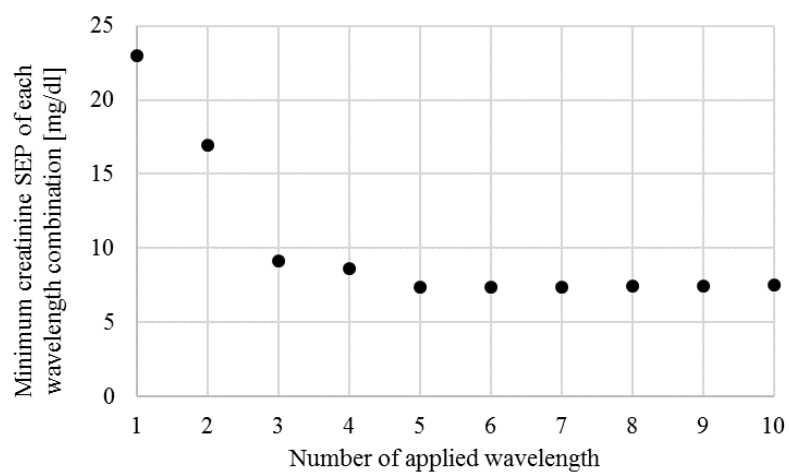
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 4.2 各波長組み合わせにおける最小 SEP の比較

表 4.5 各成分の選定波長組み合わせ

	Number of wavelengths	selected wavelengths						
		1400	1600	1700	1800	2000	2100	2200
Glucose	7	Non-disclosure						
Urea	4	○	/	/	○	○	/	○
Na	4	○	○	/	○	/	/	○
Creatinine	5	/	○	○	○	/	○	○

4-6-2 濃度予測結果

図 4.3 に最適波長組み合わせによる各成分の濃度予測結果の相関図を示す。横軸が臨床検査機関にて計測された実測濃度、縦軸が近赤外分光法による予測濃度を示しており、図中の±10%点線は臨床検査機関での計測誤差範囲を示している。

① グルコース

図 4.4(a)に示すように強い相関が得られたが、全波長使用解析に比べて SEP 値の低下 (26.35→44.99 mg/dl) が確認された。また、全濃度範囲で±10%線外のプロット数が非常に多く、実用化に供し得る濃度予測結果は得ることが出来なかった。

② 尿素

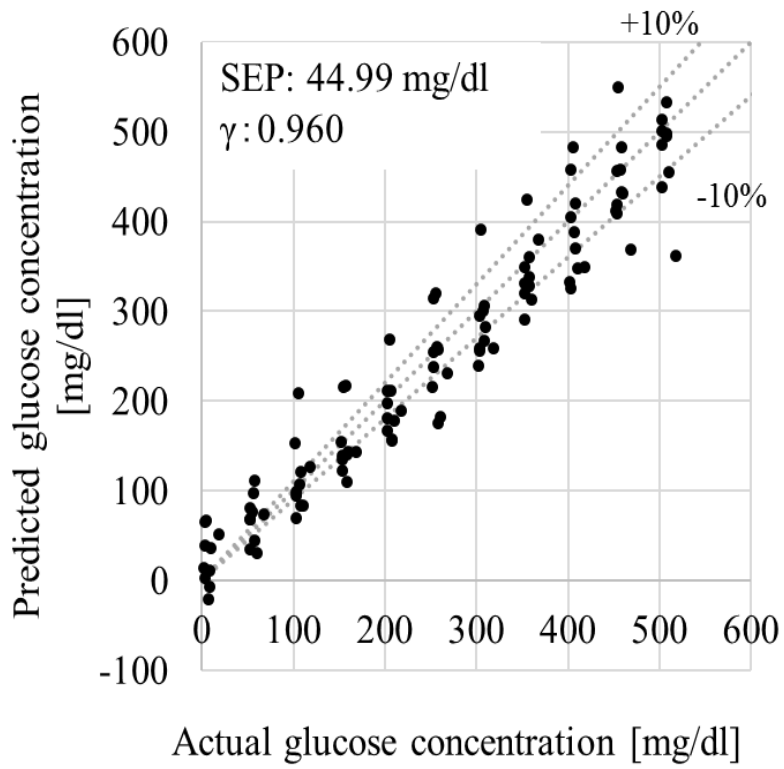
1400, 1800, 2000, 2200 nm の全 4 波長を用いた濃度予測において、非常に強い相関と良好な SEP 値 ($\gamma = 0.999$, SEP: 42.37 mg/dl) を確認した。また、全てのプロットが±10%線内に収まっており、臨床検査と遜色のない高い予測精度を確認した。

③ Na

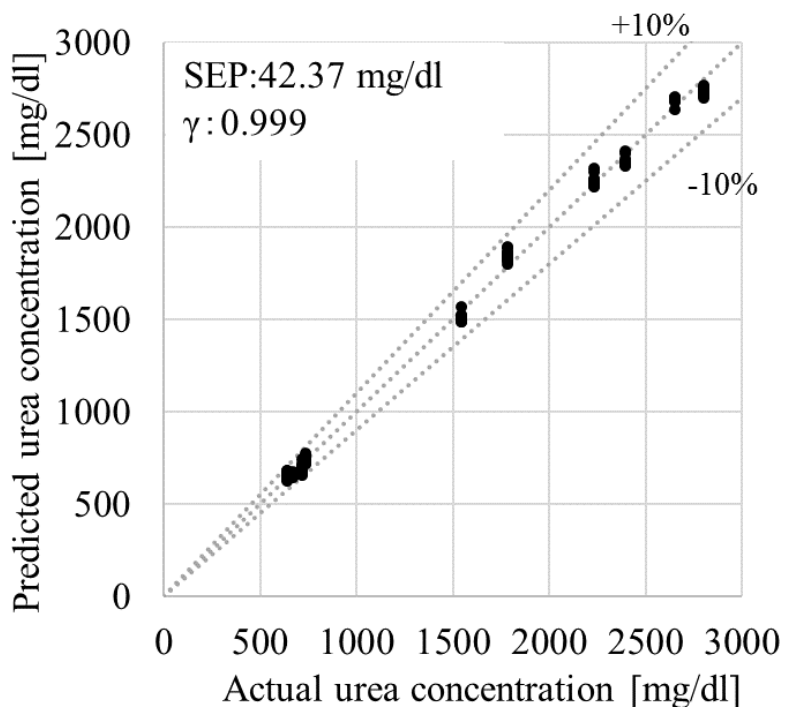
近赤外光の吸収のないと考えられている Na イオンの濃度予測において、1400, 1600, 1800, 2200 nm の 4 波長を解析に使用することで強い正の相関と良好な SEP 値を確認した。更に 110 プロット中 86 プロットが±10%線内に収まっていることから、臨床検査と同程度の予測精度が確認された。

④ クレアチニン

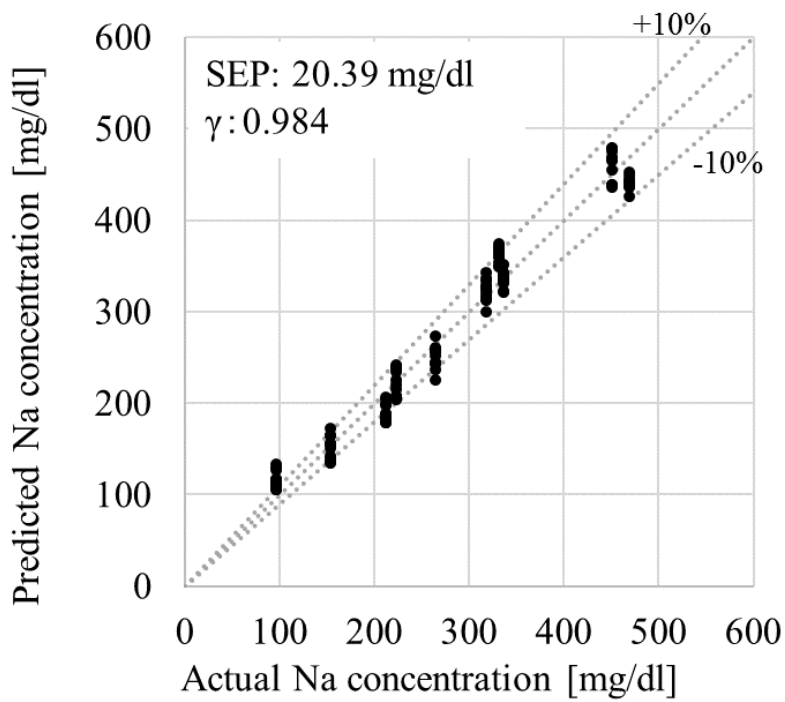
1600, 1700, 1800, 2100, 2200 nm の 5 波長のみを使用した濃度予測において、全波長使用解析と比較すると、SEP 値が低下 (4.45→7.34 mg/dl) しているものの強い正の相関を確認した。また、全体の 88 プロットが±10%線内に収まっており、光学的手法を用いてクレアチニンを高い精度で予測可能であることを確認した。



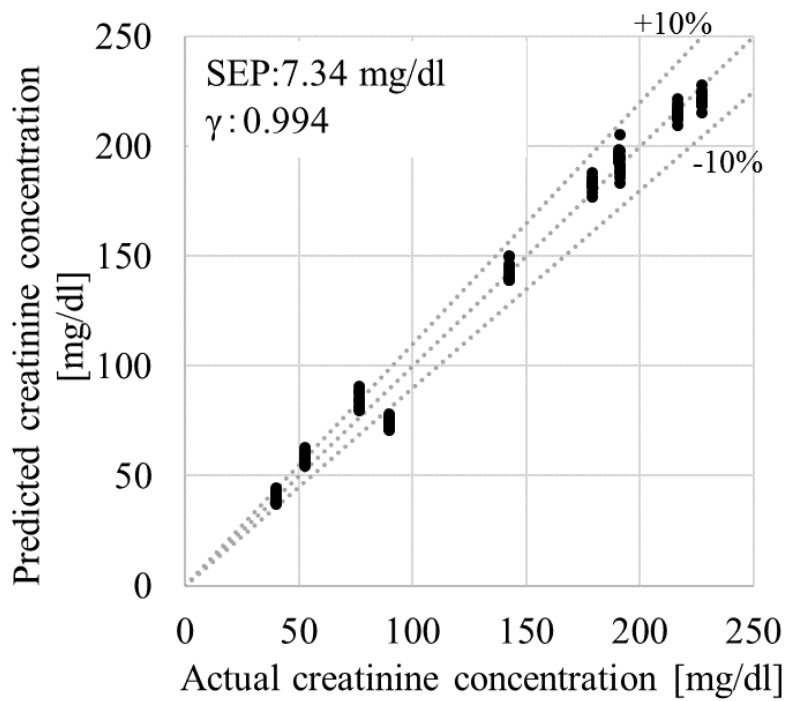
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 4.3 総当たり解析による各成分の予測濃度結果

4-6-3 考察

4-6-3-1 グルコース

4-5-2 で述べたように、全波長使用解析ではグルコース予測において感度を示さない波長を含むため、図 4.2 の点線囲まれた感度波長帯を含む 10 波長の総当たり解析により精度向上することが見込まれた。しかしながら、その 2 種類の解析結果の比較において、7 波長を用いた濃度予測結果は実用に供し得る精度を得ることは出来なかった。その原因として、近赤外領域でのグルコースの吸光量が、他の成分より小さいことが考えられる。図 3.2 に示した単一水溶液のスペクトルを比較すると、尿素やクレアチニンに比べて差分吸光度が 10 分の 1 程度の低値を示している。またグルコースは尿素とクレアチニンに比べ、分子量が多いため、尿中の種々の成分と類似した基準振動を多く持つ可能性もある。これらにより、尿素やクレアチニンなどがグルコース予測における妨害物質となっている可能性がある。また、式 2.9 の Lambert-beer 則に従えば、成分が同一かつ濃度が一定であれば吸光度は光路長に比例する。したがって、成分毎に最適な光路長を検討することにより、精度の向上に繋がる可能性がある。加えて、中赤外光領域を使用したグルコースの定量について報告^{4,5)}があり、亀岡らは 3175, 3419 nm 付近など 5 つの波長帯で吸光を確認している。一方で、尿素の吸光波長は 2941, 6093 nm との報告⁶⁾がある。グルコースの吸光波長は尿素の吸光波長の最も近い波長と比較しても、234 nm 離れているため、予測精度が向上する可能性がある。したがって本研究で使用した近赤外領域に加えて中赤外領域を導入することで予測精度が向上する可能性がある。

4-6-3-2 尿素

1400, 1800, 2000, 2200 nm の 4 波長で得られた SEP 値は、これ以外の組み合わせの 4 波長で得られた SEP 値に比べて低く (43.2-384.8 mg/dl)、最適な波長組み合わせが選定されたことを確認した。選定された波長は概ね、図 3.2 のスペクトル波形が示す感度波長や尿素が持つ官能基の吸収とよく一致しており、尿素の吸光波長を示していると考えられる。

1400 nm と 1800 nm は陰性吸光度を示しており、これらの波長は既往研究^{1章-22-26)}では用いられていなかった。そこで陰性吸光度を示す波長の有無による予測精度への影響を検討した。まず 1400 nm の有用性を検討するため、当該波長を除いた 9 波長を使用した総当たり解析を実施した。1400 nm を含まない 4 波長を使用した場合の最低 SEP 値はおよそ 4.5% 低下した。次に 1800 nm においても同様の解析を実施したところ、当該波長を含まない 4 波長を使用した場合の最低 SEP 値は、15.3% 低下した。これらの結果は、陰性吸光度を示す 1400 nm および 1800 nm などの陰性吸光度が濃度予測において有用であることを強く示している。

またグルコースの添加による他 3 成分の影響を検討するため、横軸にグルコースの実測濃度、縦軸に各成分の予測濃度を示す相関図を作成した (図 4.4)。図 4.4(a) より、尿素の予測濃度とグルコースの実測濃度との相関係数は非常に低く、無相関であることを確認した。これにより健常成人尿へのグルコースの添加は、一桁程度の波長のみを用いた場合でも尿素の予測精度に影響を与えないことを確認した。

4-6-3-3 ナトリウム

図 4.5 に Na 濃度が最大と最小を示す GAU サンプルの差分吸光度を示す。図中点線で示される選定された 1400, 1600, 1800, 2200 nm の 4 波長を用いて、SEP 値の最低値を得た。3-10 波長使用した場合の SEP 値と明確な差は確認されなかったが、全体の 78.2% のプロットが $\pm 10\%$ 線内に収まっており、この結果は 3 波長や 5 波長を使用した場合に比べて 4-5% 良好な予測精度であることを確認した。

カリウムは尿中における含有量が Na に次ぐカチオンである。表 4.3 に示すように通常の濃度範囲内 (20-70 mEq/L)^{1章-22)} で濃度変動があることが確認できる。しかし Na の濃度予測においてカリウムの濃度変動による影響は確認されなかった。

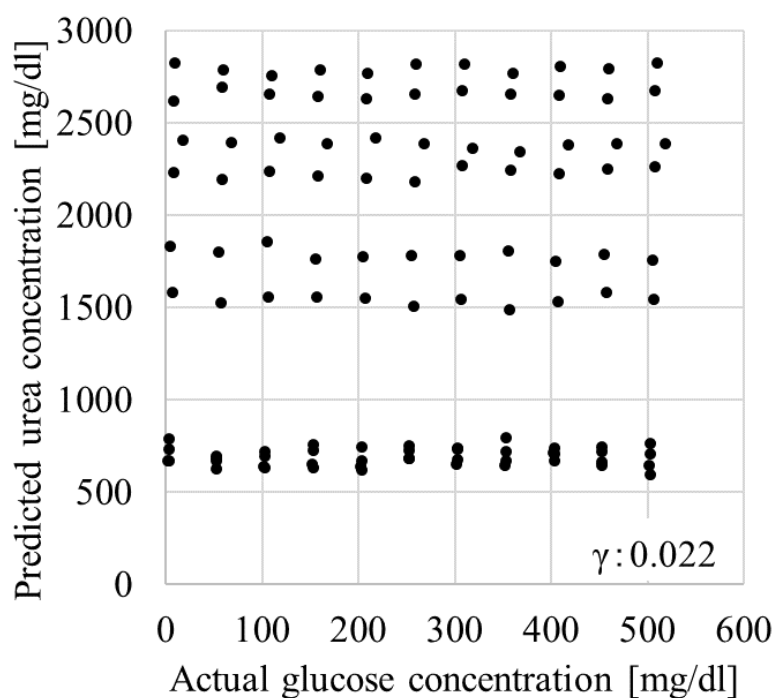
また、図 4.4(b) が示すようにグルコースの添加量と Na の予測濃度は無相関であることが確認され、尿素と同様にグルコースの添加は、一桁程度の波長のみを用いた場合でも Na の予測精度に影響を与えないことを確認した。

更に、この結果は Na が無機イオンであるにも関わらず濃度予測が可能であるため、他のイオンも濃度予測の可能性を示唆している。

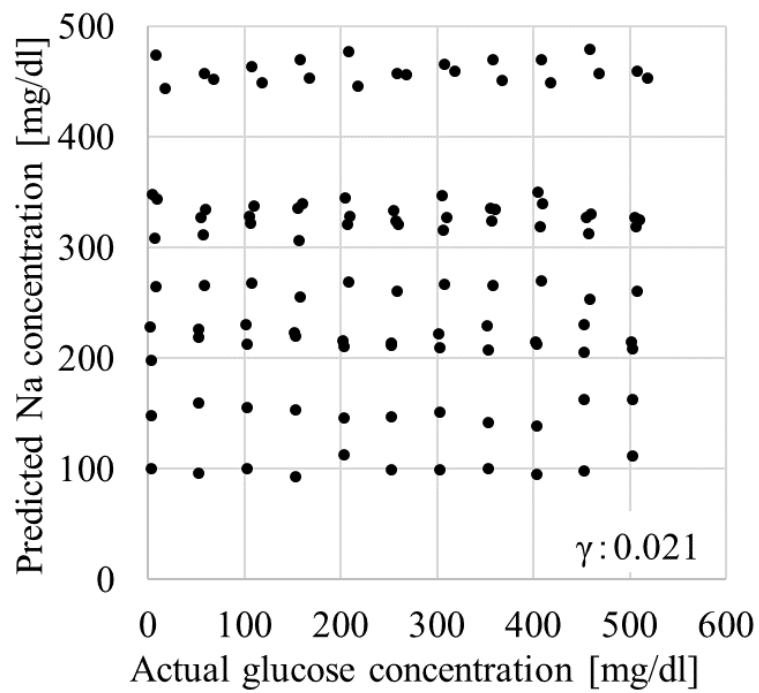
4-6-3-4 クレアチニン

1600, 1700, 1800, 2100, 2200 nm の 5 波長を使用したクレアチニン濃度の予測において、臨床検査と遜色のない予測精度を得た。図 3.2 の単一水溶液のスペクトル波形において、1600 nm および 2100 nm は弱い負の感度波長、1700 nm は弱い正の感度波長、2200 nm は強い正の感度波長を示していると考えられる。1800 nm はスペクトル波形上では感度波長と確認することは出来なかった。表 3.2 に示すようにクレアチニンの持つ CH および CH₂, CH₃ の振動を表している可能性があるが、断定は出来なかった。

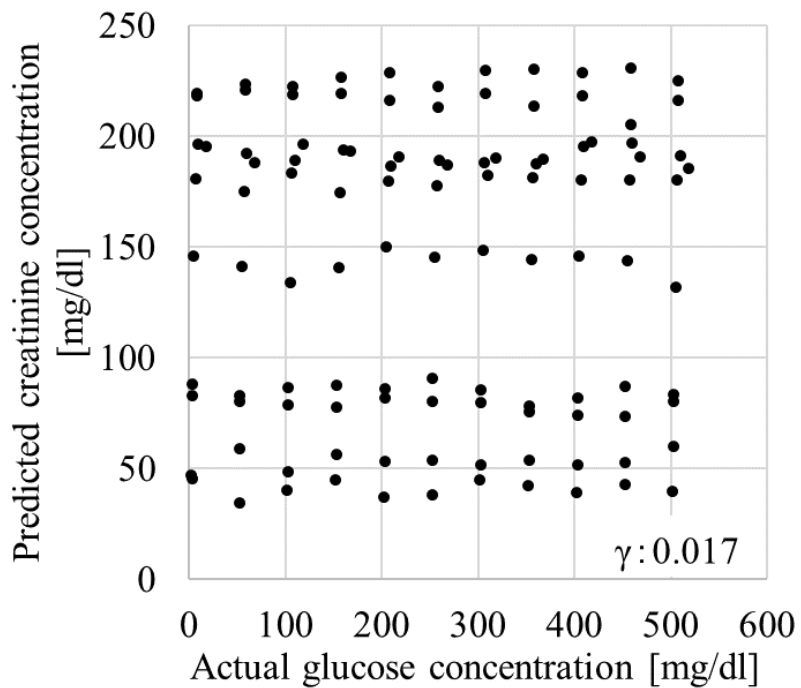
また、図 4.4(c) が示すようにグルコースの添加量とクレアチニンの予測濃度は相関係数が非常に低く ($\gamma = 0.017$)、無相関であることが確認された。一桁程度の波長のみを用いたクレアチニンの予測においても、グルコースの添加はクレアチニンの予測精度に影響を与えないことを確認した。



(a) Urea-Glucose



(b) Na-Glucose



(c) Creatinine-Glucose

図 4.4 グルコースの添加が他成分に与える影響

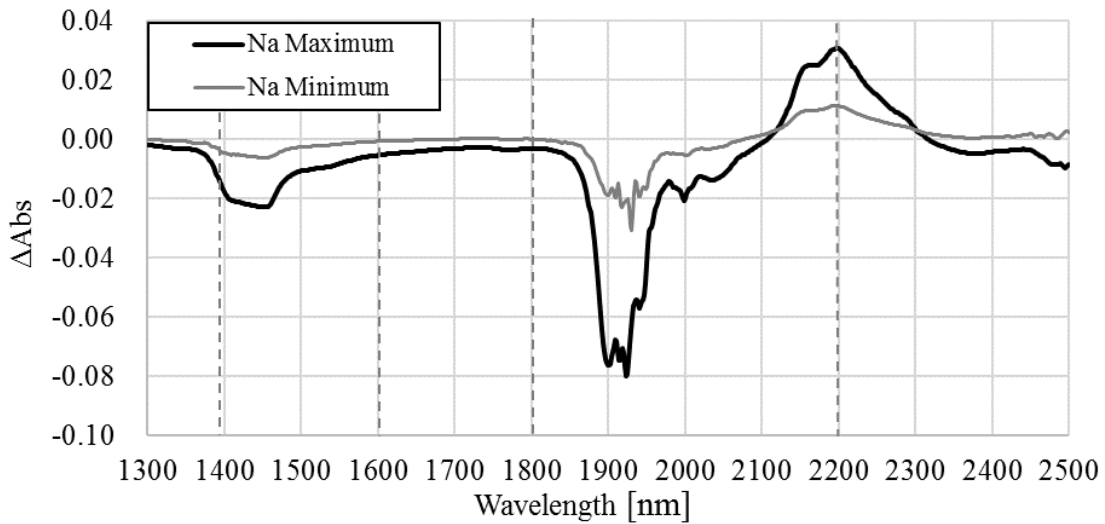


図 4.5 グルコース添加尿の差分吸光度

4-6-4 UCR および NCR の算出とその考察

4-6-2 の結果を用いて、UCR および NCR を算出した (図 4.6)。なお図中の点線は推定誤差範囲を示しており、臨床検査で発生し得る誤差を次式により計算した。

$$\begin{aligned}
 \text{Maximum error} &= \frac{\text{Urea or Na}}{\text{Creatinine}} = \frac{1.1}{0.9} * 100 - 100 = 22.2 \% \\
 \text{Minimum error} &= \frac{\text{Urea or Na}}{\text{Creatinine}} = \frac{0.9}{1.1} * 100 - 100 = -18.2 \%
 \end{aligned}
 \tag{4.1}$$

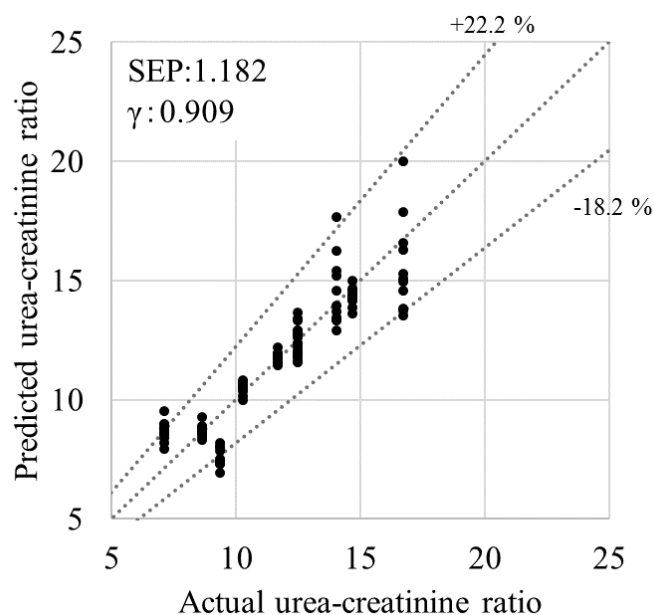
図 4.6 に示すように計 7 波長を使用した UCR の算出において強い相関 ($\gamma = 0.909$) と良好な SEP 値 (1.182) を得た。110 プロット中 98 プロット (89%) が推定誤差範囲内に収まっており、非常に高い精度で UCR が予測可能であることを確認した。

また、計 6 波長を使用した NCR の算出において非常に強い相関 ($\gamma = 0.979$) と良好な SEP 値 (0.282) を得た。全体の 97.3% のプロットが推定誤差範囲内に収まっているため、臨床検査と同等程度の濃度予測精度が確認された。

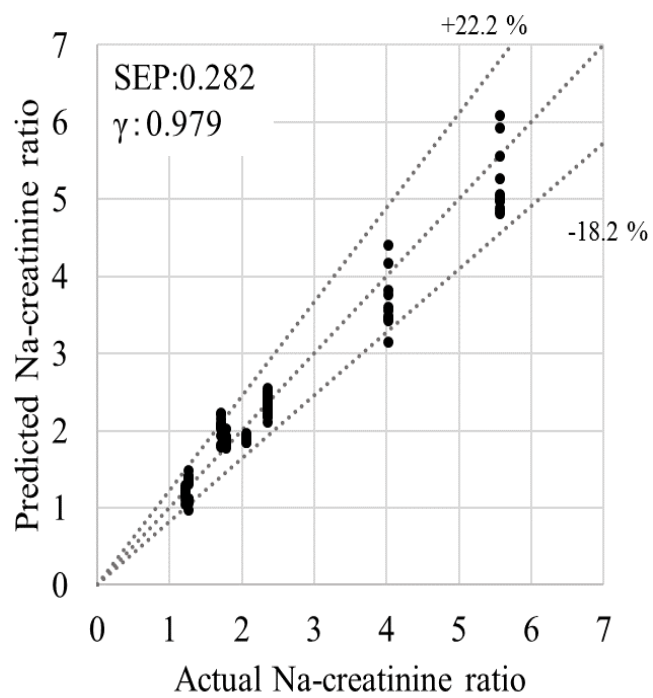
上記の結果は、試薬レスの光学的手法で尿中の成分を高精度予測可能であることを示しており、随時尿だけでなく 24 時間蓄尿を対象とした計測への使用も可能であると考

えられる。試薬レスという点において、試薬自体が計測精度に誤差を生じさせるという問題が起こりえないため、医療や化学の専門知識を持たない患者の自宅でも簡単に使用できるという利点を有する。また、一桁台の波長を使用した予測結果であることを踏まえ、将来的に LED を用いた簡単かつ安価な尿成分計測システムの構築が実現可能であることを示唆している。更に、今後そのようなシステムの小型化を行えば、近年公衆衛生における幅広い応用が注目を集めている Point-of-care testing (POCT)⁷⁻⁸⁾への適用可能性もある。

UCR, NCR のそれぞれに注目すると、UCR においては、随時尿中の UCR 計測により 1 日のたんぱく摂取量を推定可能であるとの報告がある。したがって、本研究では 24 時間畜尿との比較は行なっていないが、随時尿を使用した本手法が、従来まで実施された 24 時間畜尿による計測に代わる手法となり得る。NCR においては、24 時間畜尿を用いずに食塩摂取量を推定できる可能性を示しており、本手法を POCT 手法としての使用することで高血圧患者のみならず健常人においても個人の健康管理に貢献し得る。



(a) Urea-to-creatinine ratio



(b) Na-to-creatinine ratio

図 4.6 尿素-クレアチニン比および Na-クレアチニン比

4-7 4章の参考文献

1. 厚生労働省健康局：標準的な健診・保健指導プログラム 健康検査における精度管理の在り方，2007.
2. 仲谷和彦，柏倉紀子，黒木悟，遠藤正志，杉田暁大：採尿後の経過時間と温度が尿検査に及ぼす影響，日本農村医学会雑誌 64 (5)，2016.
3. 山口茂六，熊谷哲，西岡洋：多変量回帰分析法による数種多環芳香族炭化水素の同時蛍光定量，J Chem Software 3(2)，pp. 65-72，1996.
4. 亀岡孝治，橋本篤：農産物・食品の赤外分光分析とその応用，農業情報研究 12 (3)，pp. 167-188，2003.
5. 藤田圭一，田村一人，兼子亘，石澤広明，鳥羽栄治：赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定センサの開発，電気学会論文誌 C 124 (9)，pp. 1759-1765，2004.
6. Ahmadl SI, Syed IA, Prasad PR, Ahmad A: Quantitation of urea in urine by Fourier transforms infrared spectroscopy, Der Pharma Chemica 6(1), pp. 90-96, 2014.
7. McTaggart MP, Price CP, Pinnock RG, Stevens PE, Newall RG, Lamb EJ: The diagnostic accuracy of a urine albumin:creatinine ratio point-of-care test for detection of albuminuria in primary care. Am J Kidney Dis 60, pp. 787-794, 2012.
8. Hamilton FW, Penfold CM, Ness AR, Stevenson KP, Atkinson C, Day AM, Sebeos-Rogers GM, Tyrrell-Price J: Can Quantab titrator sticks reliably predict urinary sodium? Clin Nutr ESPEN 23, pp. 217-221, 2018.

第5章 糖尿病患者尿を用いた定量分析における 使用波長数削減の試み

5-1 はじめに

前章では健常成人男性の尿にグルコース粉末を添加することで、模擬的な糖尿病患者尿を作成した。GAU サンプルを用いた実験において、全波長使用解析および総当たり解析の両方で良好な予測精度を確認した。

そこで、本章では生活習慣病の中でも尿成分に顕著な影響があると考えられる糖尿病を患う複数の被験者から尿を採取し、GAU サンプルと同様の尿中4成分の濃度予測を行なった。

5-2 実験サンプル

糖尿病は慢性的に血糖値が高い状態を指し、細胞に吸収されない糖分（グルコース）は血中に留まるだけでなく尿中にも排泄される。そこで、複数の糖尿病患者から採取された尿サンプルを金沢市立病院より提供していただき、本実験の実験サンプルとした。なお、性別や年齢などの個人情報の開示されておらず、被験者には男女両方のサンプルが含まれている可能性がある。尿サンプルの採取時間は指定されておらず、随時尿が提供され、採取後速やかに回収した。計62名分のサンプルを提供していただき、そのうち、尿沈渣と思われる有形物質や濁りの影響で十分な透過光を得られなかったサンプルを計測対象から除いた。また尿試験紙ウリエース（テルモ株式会社）において「3+」を示す尿糖値2000 mg/dlを計測対象の最大値として、尿糖値がそれを超えるサンプルを除いた43名分の尿を解析の対象とした。計測に際しては、1被験者サンプルを3つに分けて（例：サンプル1a、サンプル1b、サンプル1c）、3つそれぞれに対して透過光計測を行なった。

なお、実験に際しては、金沢大学医学倫理審査委員会の承認および被験者に対して実験の趣旨及び内容の説明を行い、十分なインフォームド・コンセントを得た上で実施した。

5-3 実験装置

実験装置は3章の3-4と同様である。計測に際しては、透過光強度を著しく低下させる尿沈渣や濁りが無いことを目視にて確認し、先述の通り、計測に適さないサンプルを取り除いた。なお、本実験においても尿と純水を交互に注入しており、純水の透過光計測におけるノイズを防ぐため、尿サンプルの透過光計測後は、多量の純水を流すことによりセル内を洗浄した。

5-4 全波長使用解析の濃度予測

5-4-1 濃度予測結果

前章と同様に全 1051 波長を用いて、PLS 回帰分析による濃度予測に行なった。図 5.1 に全波長使用解析による濃度予測結果を示す。また、GAU サンプルと糖尿病患者尿における相関係数と SEP の比較を表 5.1 に示す。横軸が臨床検査機関にて計測された実測濃度、縦軸が近赤外分光法による予測濃度を示しており、図中の±10%点線は臨床検査機関での計測誤差範囲を示している。

⑤ グルコース

グルコースの濃度予測において、RMSEP に基づき 32 個の潜在変数が選定された。相関係数 $\gamma = 0.987$ と強い相関が得られ、1000 mg/dl 以上の高濃度領域では、1 プロットを除き全てのプロットが臨床検査の誤差範囲に収まっている。一方で 100 mg/dl 以下の低濃度領域において、非常に多くの負の予測濃度(全体の約 24%、120 プロット中 29 プロット)が確認された。また、表 5.1 より GAU サンプルでの SEP 値に比べ、2.8 倍程度の SEP 値が確認された。

⑥ 尿素

尿素の濃度予測において、18 個の潜在変数が選定された。SEP 値も低く (41.20 mg/dl)、非常に強い相関 ($\gamma = 0.996$) が確認された。臨床検査の誤差範囲に収まっていないプロットは 120 プロット中わずか 5 プロットであり、臨床検査と遜

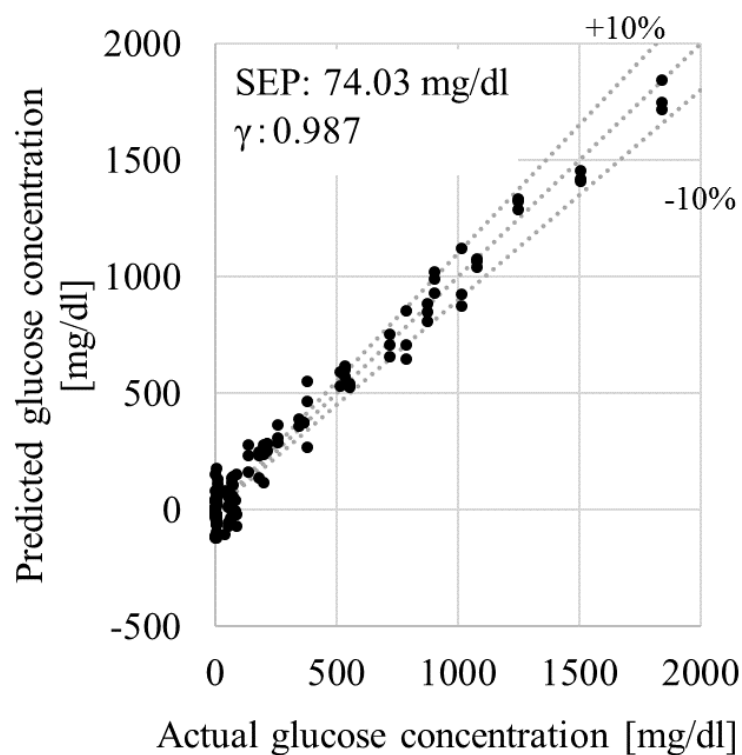
色のない予測精度が得られた。表 5.1 より GAU サンプルの結果に比べ、相関係数の低下は微小であるが、SEP 値が 1.6 倍程度を示した。

⑦ Na

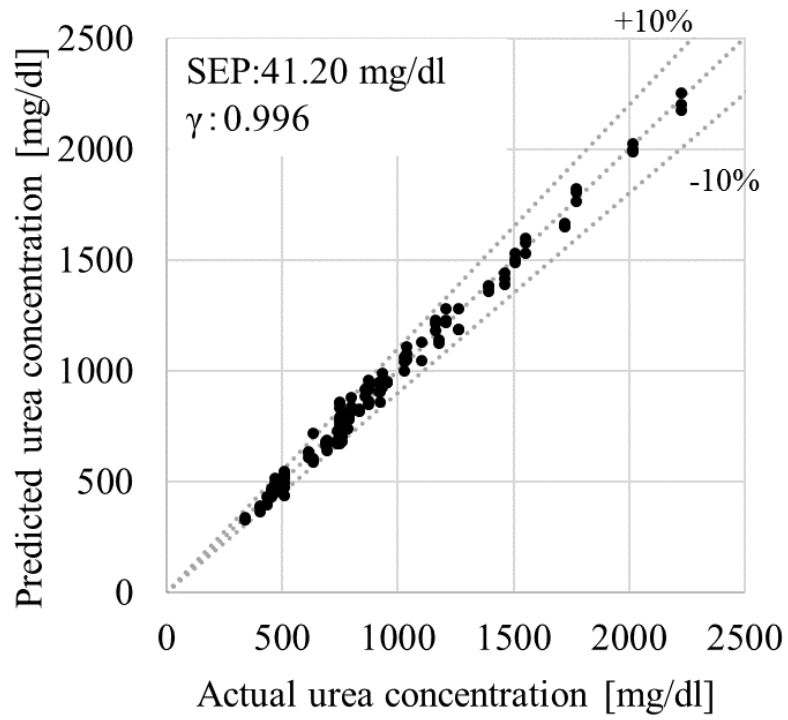
Na の濃度予測においては 44 個の潜在変数が選定された。図 5.1 (c) に示す通り、非常に強い相関と良好な SEP を得た。表 5.1 より GAU サンプルの結果と比較すると、SEP 値が 3 倍程度の値を示すなど予測精度の低下が確認された。

⑧ クレアチニン

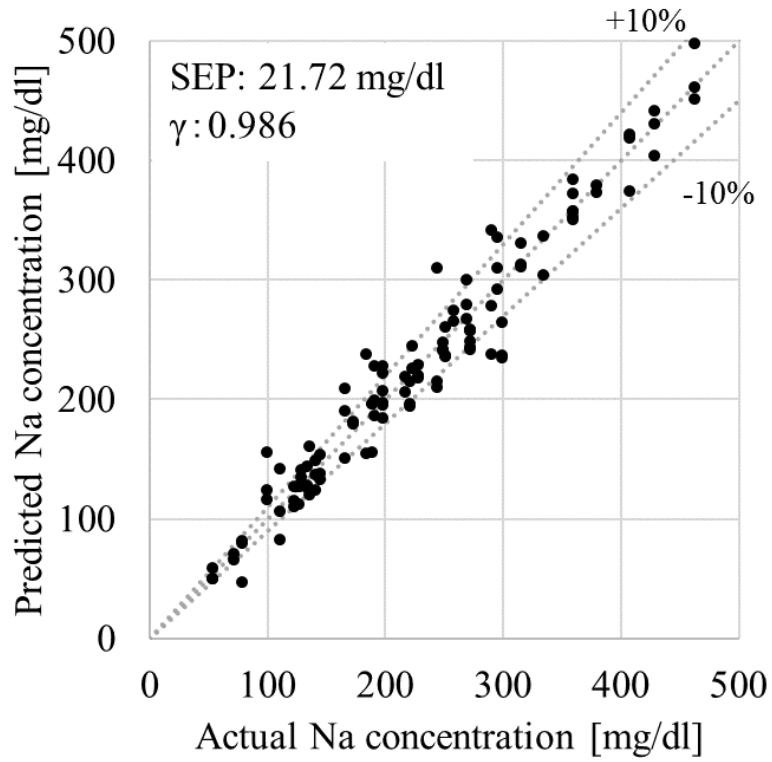
クレアチニンの濃度予測において、21 個の潜在変数が選定された。強い相関($\gamma = 0.843$)が確認されたが、SEP 値が大きく、非常に多くのプロットが臨床検査の誤差範囲外にあり、良好な予測精度は得られなかった。表 5.1 より GAU サンプルの結果に比べて、SEP は約 5 倍、相関係数は 15%程度低下した。



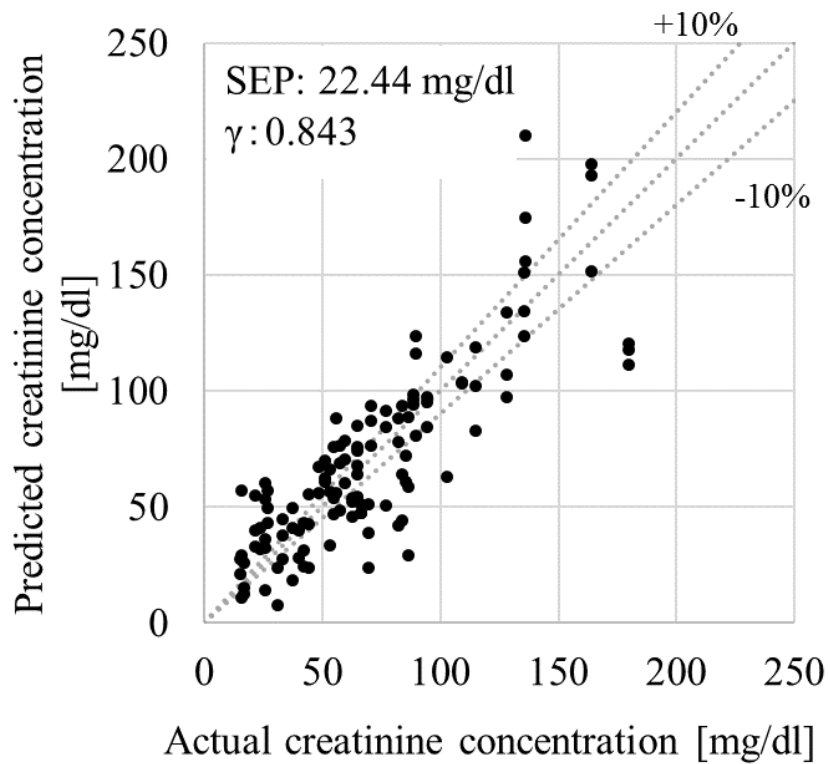
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 5.1 全波長解析による各成分の濃度予測結果

表 5.1 SEP と相関係数との比較

	GAU sample		diabetic sample	
	SEP	γ	SEP	γ
Glucose	26.35	0.987	74.12	0.987
Urea	25.48	0.9995	41.08	0.996
Na	6.92	0.998	21.72	0.986
Creatinine	4.45	0.998	22.51	0.843

5-4-2 考察

4 成分全ての予測結果において、GAU サンプルを用いた予測結果に比べ、予測精度の低下が確認された。精度に影響し得る原因を4つ示す。

(1) 有病者に由来する排泄成分の種類や量

有病者は治療のための投薬により、薬に含まれる何らかの成分が尿中に排泄され、その成分が妨害物質となっている可能性がある。また、今回の臨床検査機関の測定項目外で、健常者より有病者の排泄量が多い成分の存在を否定できない。上記のような成分が妨害物質やノイズとなりスペクトル波形に影響を与えることにより、GAU サンプルで比較的良好であった測定精度に影響している可能性がある。

(2) 計測タイミングに由来する計測誤差

病院での採取後に冷蔵された尿は速やかに回収されたが、サンプル数が非常に多いため、実験が当日に処理しきれず翌日に持ち越されることがあった。そのため時間経過による成分の微小変化や臨床検査機関での計測時刻と本法による透過光計測の時刻に開きが生まれ、影響を与えた可能性がある。

(3) 濃度レンジや濃度のバラツキに由来する計測誤差

グルコースにおいては、糖尿病患者尿の濃度レンジが GAU サンプルでのレンジの4倍程度と広く、検量線が高濃度サンプル(1000 mg/dl 以上)に影響され、低濃度領域の予測精度の低下が発生したと考えられる。また、クレアチニンにおいては、GAU サンプルに比べて、やや低濃度領域に偏っていることも検量線に影響を与え、予測精度低下を招く可能性がある。

(4) 女性被験者尿の影響

GAU サンプルは健常成人男性の尿のみを用いて作成したが、糖尿病患者尿では女性被験者が含まれている可能性を否定できない。女性の尿には膣や外陰部の分泌物中に含まれる成分が尿に混入しやすく、白血球や上皮細胞、細菌等がある^{1章-14)}。また女性特有の成分である黄体形成ホルモンなども含まれている可能性があり、これらの尿中混入物が予測精度に何らかの影響を与えている可能性がある。

しかしながら、尿中成分予測における上記4項目は現時点では解明されておらず、今後有病者の尿に含まれる特有の代謝物や高含有量の成分の調査、また、新たに女性被験者の尿を採取するなどして、男性被験者の結果との比較を行なう必要がある。

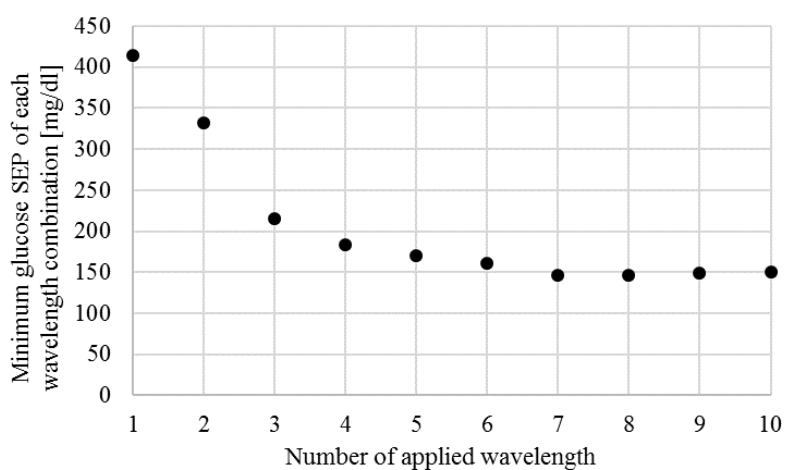
5-5 総当たり解析における濃度予測

前章と同様に近赤外 LED 光源を用いた実用的な光学式尿成分分析システムの構築のため波長削減を試みた。分光器の波長範囲のうち、10 波長 (1400-2300 nm, 100nm 刻み) のみを用いて総当たり解析 (重回帰分析, LOOCV) を行なった。また、尿素, Na, クレアチニンの予測結果を用いて UCR および NCR を算出した。

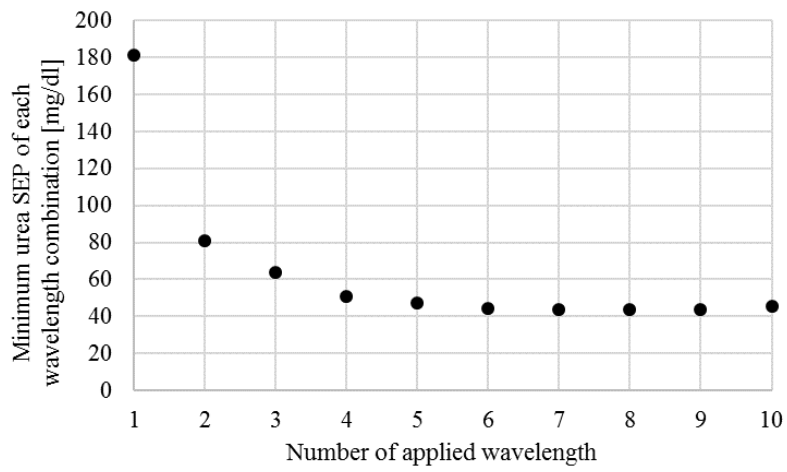
解析に用いた各対象成分の具体的な使用波長およびその組み合わせに関しては、論文執筆中につき非公開とする。なお、GAU サンプルで用いた波長組み合わせと共通の波長に関しては、5-4-2 および 5-4-3 にて言及する。

5-5-1 最適波長組み合わせの選定

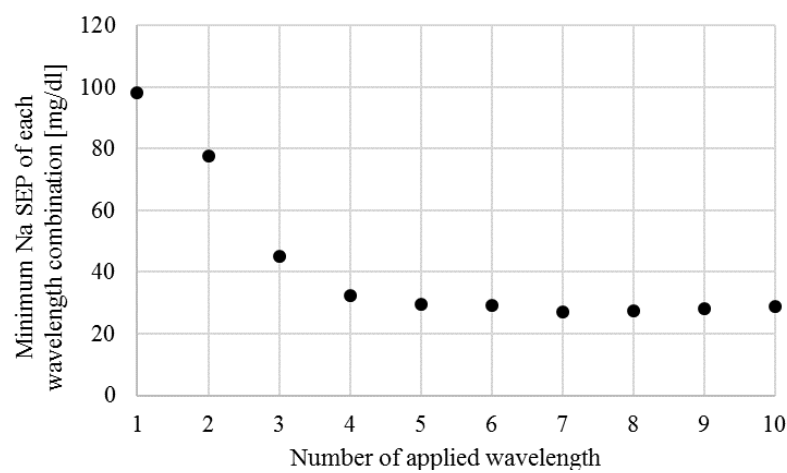
各波長組み合わせにおける最小の予測標準誤差 (Standard error of Prediction, SEP) を図 5.2 に示す。横軸に示す波長数を用いた組み合わせの中から、最も低値を示した SEP がプロットされている。



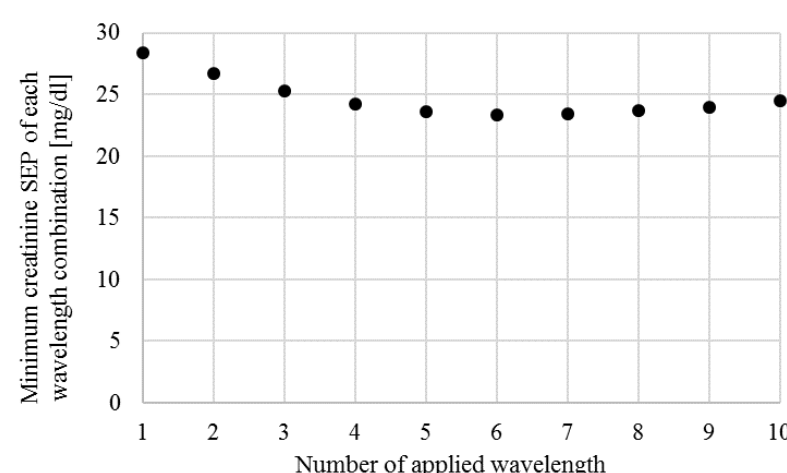
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 5.2 各波長組み合わせにおける最小 SEP の比較

まずグルコースでは、7波長使用時に最小のSEP値(145.76 mg/dl)を示した。波長数を6波長よりも減らしていくとSEP値が増加し、4波長では7波長の1.26倍の値を示した。グルコースの濃度範囲を考慮すると、7波長未満の波長数を使用することはSEP値の観点から難しいため、7波長に決定した。

尿素では、10-5波長の間ではSEP値の差が最大で8%と、大きな差は確認されず、4波長以下で緩やかにSEP値が上昇する。最小値を示す7波長から5波長までの相関図を作成し比較した。その結果、7波長に比べて相関係数の差が1%未満、SEP値の低下がわずか2%、臨床検査の誤差範囲内に95.8%のプロットが収まり、1波長を削減可能な6波長に決定した。

Naにおいては、7波長が最小SEP値(27.03 mg/dl)を示しており、10-5波長の間ではSEP値の差が最大で9%と、大きな差は確認されなかった。そこで7-5波長の相関図を作成し比較検討した。相関係数の差は最大で0.5%程度、更に臨床検査の誤算範囲内のプロット数は同数であるため、波長削減のため5波長が選定された。

クレアチニンでは10-3波長においてSEP値の差が最大で8%程度であったため、上記と同様に最小SEP値を示す6波長から3波長までの相関図を作成した。結果として臨床検査の誤差範囲内のプロット数に大きな変化は見られなかったため、相関係数が最も高くSEP値が最小の6波長を選定した。

5-5-2 濃度予測結果

図5.3に最適波長組み合わせによる各成分の濃度予測結果の相関図を示す。横軸が臨床検査機関にて計測された実測濃度、縦軸が近赤外分光法による予測濃度を示しており、図中の±10%点線は臨床検査機関での計測誤差範囲を示している。また、GAUサンプルと糖尿病患者尿における相関係数とSEPの比較を表5.2に示す。

① グルコース

図5.3(a)に示すように7波長を用いて強い相関が得られたが、全波長使用解析に比べてSEP値の低下(74.03→145.8 mg/dl)が確認された。特に低濃度領域には±10%線外のプロットが顕著であり、全体の75%のプロットが臨床検査機関

の誤差範囲外で確認された。表 5.2 より GAU サンプルでの結果と比較すると、SEP 値が 3.2 倍程度を示しており、精度低下が確認された。

② 尿素

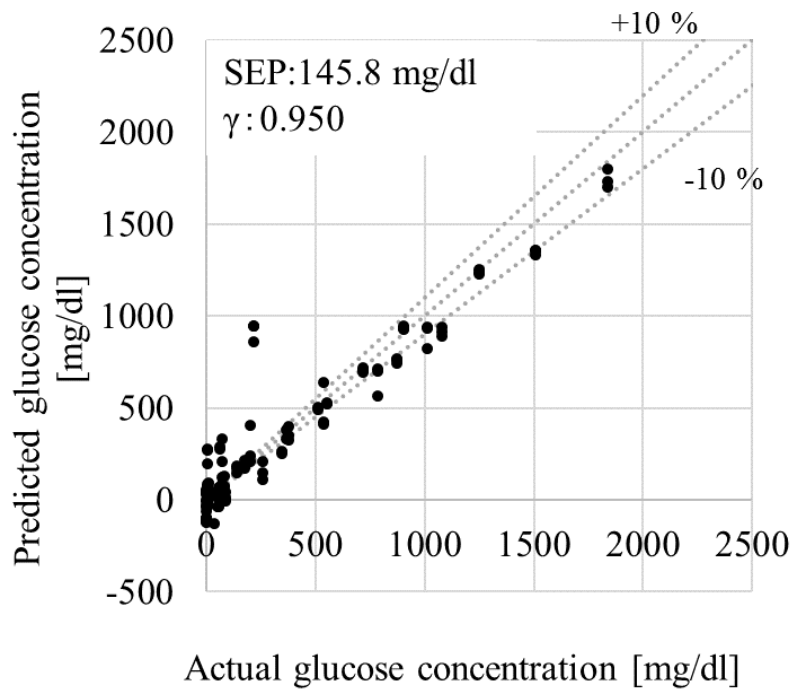
尿素では 6 波長が選定され、GAU サンプルの結果で選定された 4 波長、1400、1800、2000、2200 nm に対して、共通して選定された波長は 1800 nm（陰性吸光度を示す）および 2200 nm であった。表 5.2 の GAU サンプルの結果と比較すると、1.6 倍程度の SEP 値を示しているが、非常に強い相関（ $\gamma = 0.995$ ）と臨床検査の誤算範囲内に 95.8% のプロットが収まっていることから、非常に高い予測精度を確認した。

③ Na

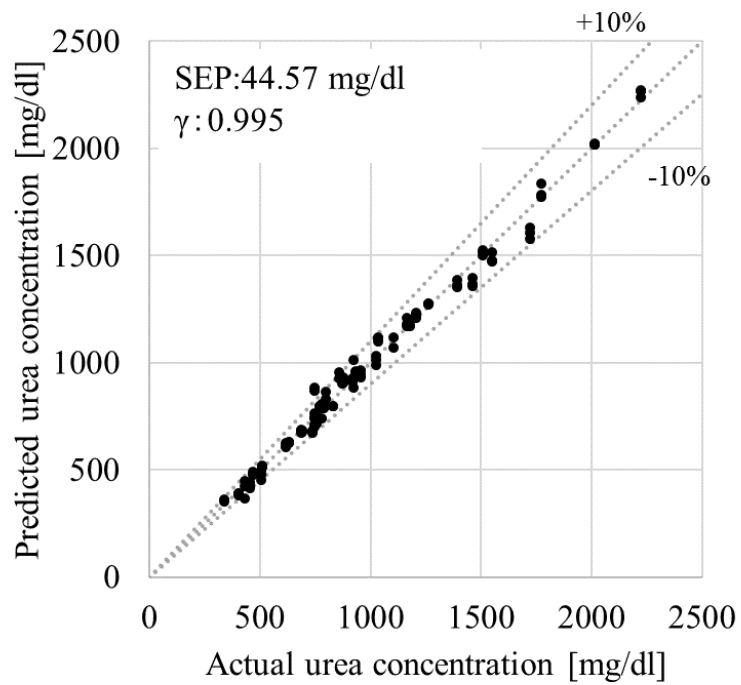
Na では 5 波長が選定され、GAU サンプルの結果で選定された 4 波長、1400、1600、1800、2200 nm が全て含まれていた。 $\gamma = 0.974$ という強い相関が確認されたが、臨床検査の誤算範囲との一致は 6 割程度であった。表 5.2 の GAU サンプルの結果と比較すると、相関係数は 1% 程度の低下だが、SEP 値は 1.5 倍程度を示した。

④ クレアチニン

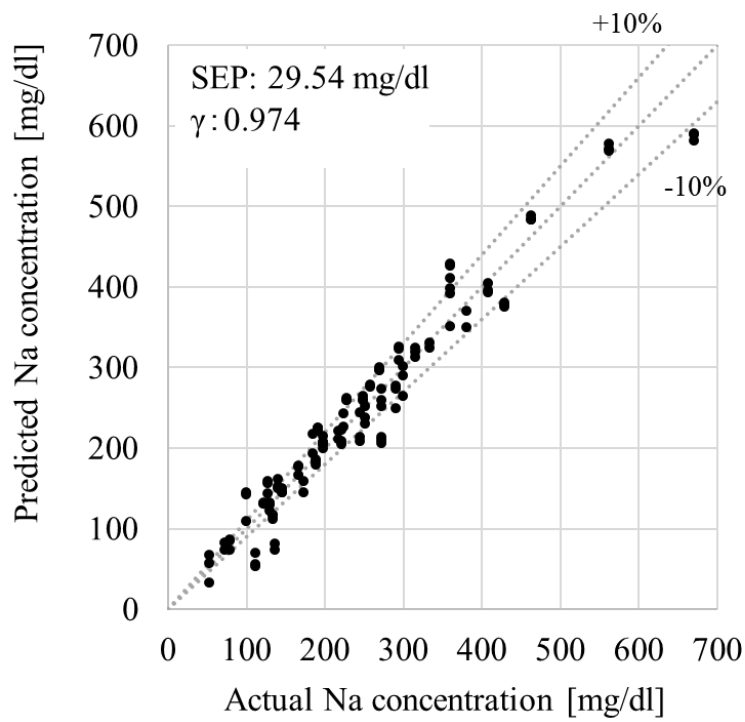
クレアチニンでは 6 波長が選定され、GAU サンプルの結果で選定された 5 波長、1600、1700、1800、2100、2200 nm のうち、1600、1800、2200 nm の 3 波長が含まれていた。相関係数に着目すると、強い相関を示しているが、4 成分の中で最も低下の割合が大きい（約 19%）。また、SEP 値は 3.2 倍程度を示し、臨床検査の誤差範囲との一致は 23% と低値を示した。



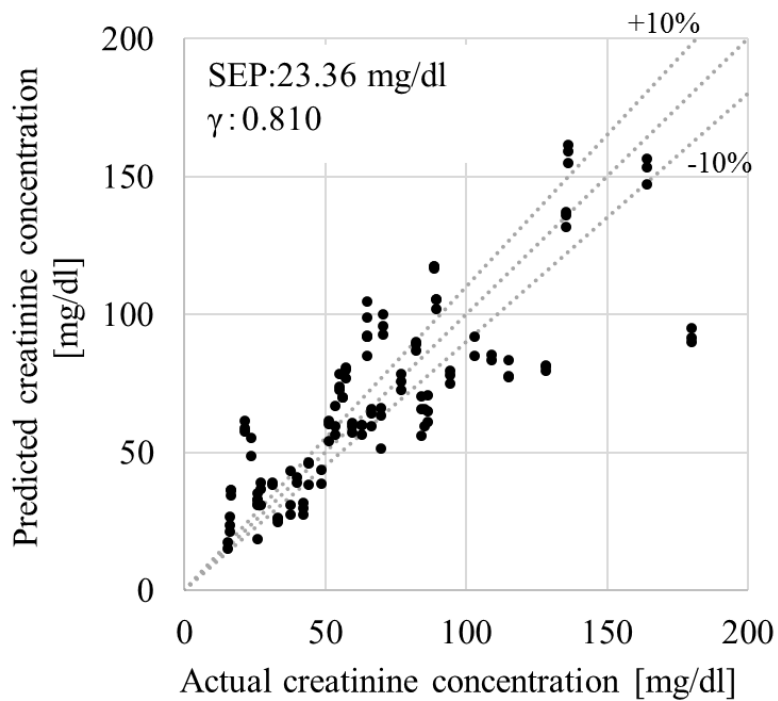
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 5.3 総当たり解析による各成分の予測濃度結果

表 5.2 SEP と相関係数との比較

	GAU sample		diabetic sample	
	SEP	γ	SEP	γ
Glucose	44.99	0.960	145.80	0.950
Urea	42.37	0.999	44.57	0.995
Na	20.39	0.984	29.54	0.974
Creatinine	7.34	0.994	23.36	0.810

5-5-3 考察

5-5-3-1 グルコース

前章の GAU サンプルを用いた予測結果と同様に、波長削減による精度の向上は確認できなかった。先述の通り、グルコースの濃度予測において尿素やクレアチニンなどの成分が妨害物質となっている可能性があり、5-5-2 での尿素の結果が良好であることから尿素が妨害物質であると推察する。前章同様に、中赤外領域の波長を導入による精度向上を検討する必要がある。また、光路長を検討することにより精度向上の可能性がある。

5-5-3-2 尿素

先述の通り 1800 nm および 2200 nm は GAU サンプルと共通の波長であった。使用サンプルに依らず選定されたこれらの波長は、尿素の濃度予測において有用な波長であると考えられる。また、1800 nm が含まれることから、濃度予測における陰性吸光度の有用性を示していると考えられる。また、グルコースの最大濃度は GAU サンプルの 4 倍程度だが、尿素の濃度予測においてはグルコースの含有量による影響はないことが示唆された。

5-5-3-3 ナトリウム

Na の 5 つの選定波長には、GAU サンプルの結果で選定された 4 波長全て含まれていた。このことから 1400, 1600, 1800, 2200 nm は Na の濃度予測において有用な波

長であることが示唆された。上記のように 4 つの有用な波長を含むが、SEP 値が 1.5 倍程度であるなど予測精度の低下を確認した。前章で述べたカリウムに関しては、濃度変動が健常人と同程度であるため、影響はないことが示唆されており、精度低下の原因は 5-4-2 に示した (1) から (4) のいずれかによると推察する。

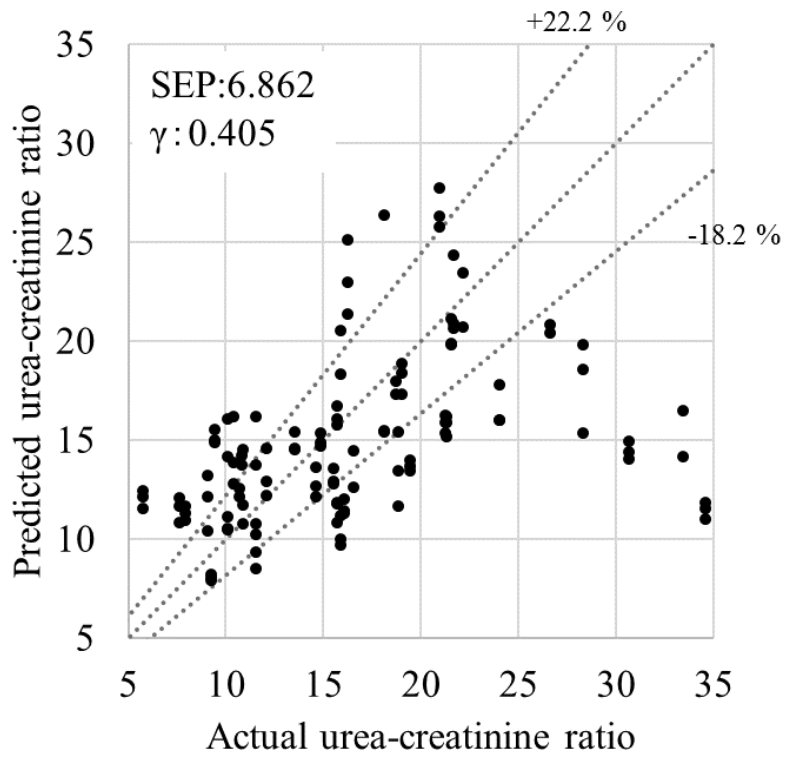
5-5-3-4 クレアチニン

クレアチニンで選定された 6 波長は、GAU サンプルの結果で選定された 3 波長が含まれていた。1600, 1800, 2200 nm の 3 波長はクレアチニンの濃度予測において有用な波長でことが示唆されたことにより、スペクトル波形上では感度と判断することが出来なかった 1800 nm もクレアチニンの濃度予測における重要な波長である可能性が示された。

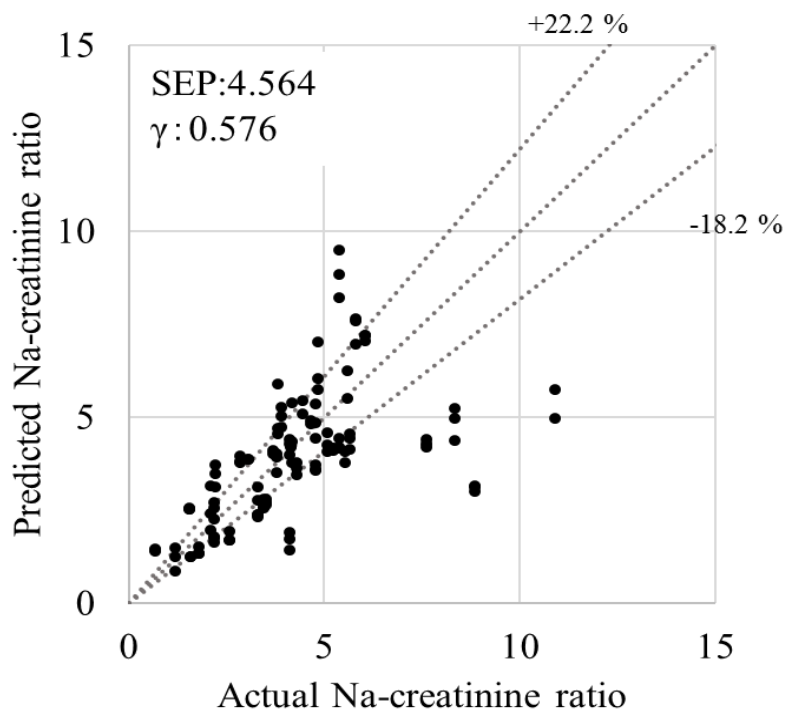
5-6 UCR および NCR の算出とその考察

5-5-2 の結果を用いて、UCR および NCR を算出した (図 5.4)。なお図中の +22.2 および -18.2% の点線は臨床検査で発生し得る推定誤差範囲を示している。

計 6 波長使用された UCR において SEP 値 : 6.862, 相関係数 $\gamma = 0.405$ が得られ、弱い相関はあるものの、GAU サンプルの UCR (SEP : 1.182, $\gamma = 0.909$) に比べて精度が低下した。UCR の実測値が高い領域 ($25 < \text{UCR}$, 以降では高実測値領域とする) では、誤差が大きくなる傾向が確認された。NCR に対しては計 6 波長使用され、SEP 値 : 4.564, 相関係数 $\gamma = 0.576$ が得られた。UCR と同様に相関はあるが、GAU サンプルの NCR (SEP : 0.282, $\gamma = 0.979$) に比べて精度が低下した。また、NCR においても高実測値領域 ($6 < \text{NCR}$) で誤差が大きくなることを確認した。UCR と NCR の高実測値領域にプロットがある被験者は UCR : 5 人, NCR : 4 人であり、共通の 4 名の被験者が確認された。これらの被験者におけるクレアチニンの予測濃度は全て実測値に対して 1.3-2.9 倍程度高い値を示している。したがって、UCR と NCR の分母に相当するクレアチニンの精度低下により、誤差の増大が生じたと考えられる。本研究ではこのクレアチニンの誤差増大の原因は断定できなかった。



(a) Urea-to-creatinine ratio



(b) Na-to-creatinine ratio

図 5.4 尿素-クレアチニン比および Na-クレアチニン比の相関図

第6章 糖尿病患者尿を用いた LED 光源模擬解析

6-1 はじめに

前章までは、分光器の計測波長範囲から一桁程度の波長の組み合わせを使用して、尿中の複数の成分の濃度予測を試みた。本章では、従来法に比べてメンテナンスフリーかつ試薬が不要なシステムを目指した近赤外 LED アレイを用いた実用化プロトシステムを試作するため、LED 光源の特徴である「ある波長を中心にブロード状に広がった光強度」を、分光器で得られた光強度データを用いて模擬することで、LED システムで想定される尿中各成分の予測精度を求めた。

6-2 LED 光源の模擬方法

これまで用いていた分光器の透過光強度スペクトルデータ (750-2500 nm, 1.667 nm) は、図 6.1 のように 1400 nm などの波長に対して、赤丸に示す非常にピンポイントな光強度データを得ていた。

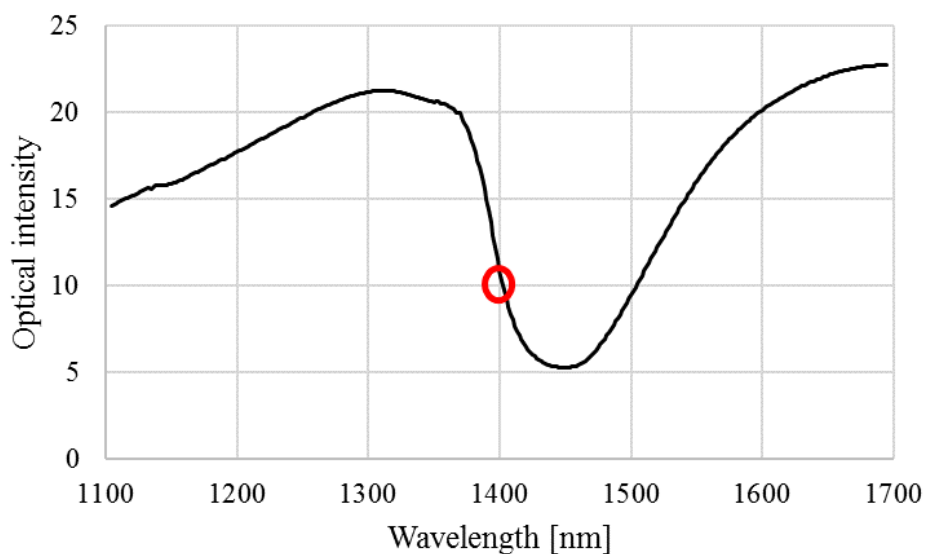


図 6.1 分光器で得られた水の透過光強度スペクトルの例

一方、LED 光源は一般に図 6.2 のような発光特性を持っているため、前章までのようなピンポイントのデータを用いることは出来ない。そこで LED 光源を用いた場合の透過光強度を次のような手順で模擬した。近赤外 LED における中心波長を λ_i 、半値幅を 200 nm として、想定される発光強度の波長性を図 6.3 のような最大値 1 のガウス関数で近似した。図 6.4 中、点線で示される分光器で得られた透過光強度スペクトルにガウス関数を乗じ、赤線で示される模擬的な LED 模擬透過光強度スペクトルを得る。最後に斜線部を積分することで特定の波長（図中では 1400 nm）での透過光強度データとした。

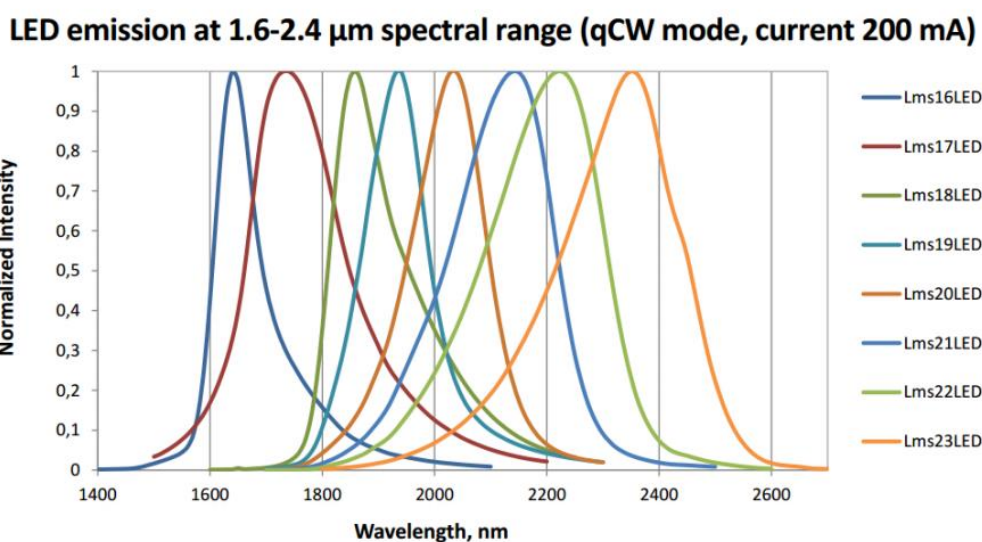


図 6.2 LED 光源の透過光強度スペクトルの例

(出典： http://www.prolinx.co.jp/catalogs/pdf/led/LMS_JP.pdf)

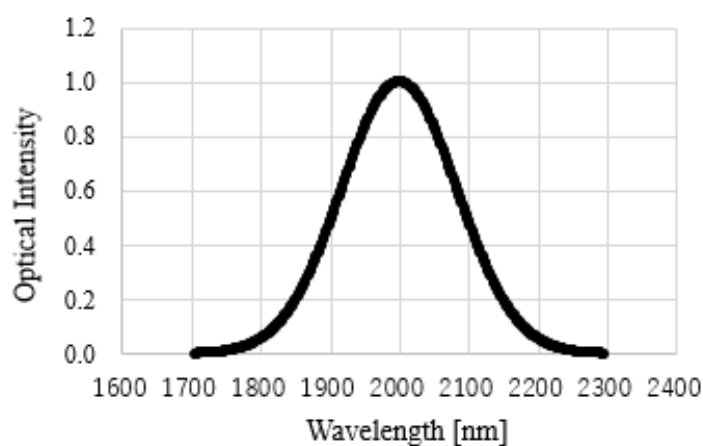


図 6.3 LED 光源模擬のためのガウス関数

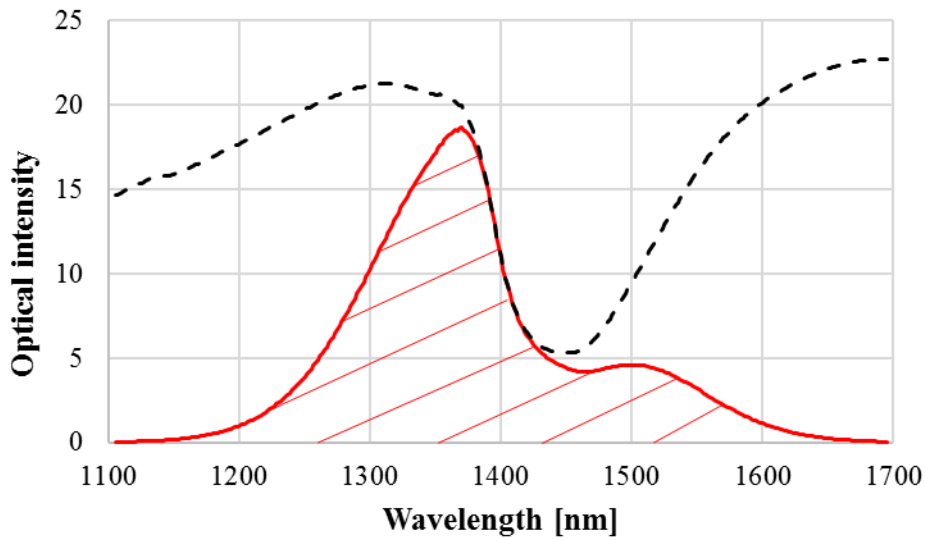


図 6.4 中心波長 1400 nm における LED 模擬透過強度スペクトル

6-3 実験サンプル

前章と同様に 51 名の糖尿病患者尿から 43 名分のサンプルを抽出，それらを解析の対象とし，1 被験者サンプルを 3 つに分けて（例：サンプル 1a，サンプル 1b，サンプル 1c），3 つそれぞれの透過光データを用いた。

6-4 LED 模擬解析における使用波長

前章で各成分に対して選定された波長を用いて濃度予測を行ない，前章の結果との比較を行い，LED 模擬解析の評価を行なった。なお，ガウス関数全体の幅が中心波長±295 nm で作成されているため，2300 nm の模擬透過光強度スペクトルは 2005-2595 nm の合算値である。分光器の最大波長 2500 nm を考慮すると，2300 nm における完全な模擬透過光強度スペクトルの作成が出来ない。しかし中心波長 2300 nm の模擬透過光強度スペクトル全体に占める 2500-2595 nm の割合はわずか 0.78% であるため，2300 nm のデータを用いる場合もその影響は無視できるものとした。

6-5 LED 模擬解析による濃度予測

6-5-1 濃度予測結果

図 6.4 に LED 模擬透過光強度スペクトルを用いた濃度予測結果を示す。横軸が臨床検査機関にて計測された実測濃度、縦軸が近赤外分光法による予測濃度を示しており、図中の±10%点線は臨床検査機関での計測誤差範囲を示している。

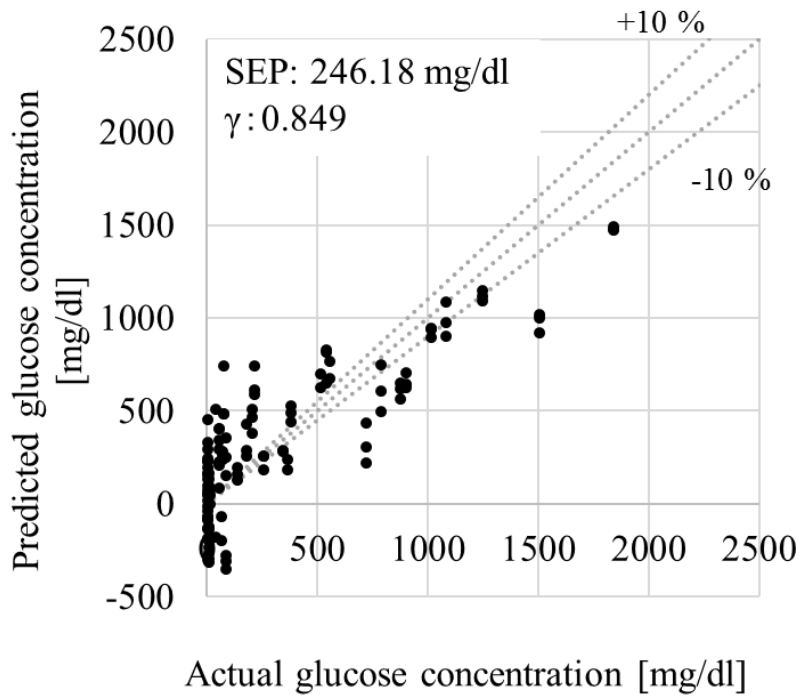
前章で選定した最適波長組み合わせを用いた結果、図 5.3 よりグルコース、Na、クレアチニンに関しては SEP 値および臨床検査の誤差範囲内のプロット数から、実用化に供し得る高い予測精度は得ることが出来なかった。しかし 3 成分ともに強い正の相関 ($0.8 < \gamma$) を得ることが出来た。一方、尿素においては 6 波長を用いた濃度予測において、相関係数 $\gamma = 0.970$ の非常に強い相関を得た。また、SEP 値は 107.32 mg/dl を示し、臨床検査の誤差範囲内に 120 プロット中 91 プロットを確認した。

6-5-2 考察

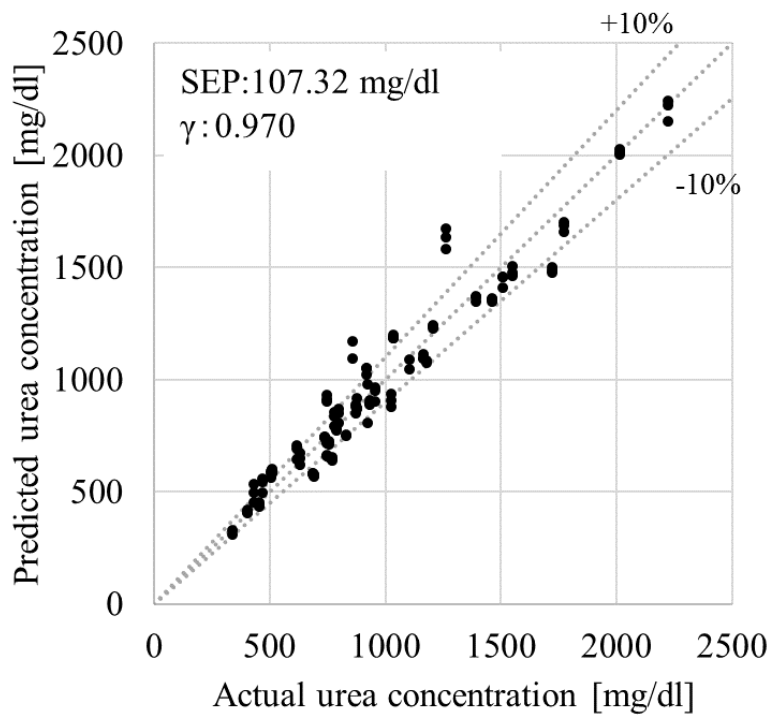
特定の波長での透過光強度をピンポイントに使用可能な分光器に比べ、LED はブロード状の発光特性のため、周辺波長の影響を受ける。その結果、先述の通り、グルコース、Na、クレアチニンでは、実用化に供し得る精度を得ることは出来なかった。しかし、強い正の相関が得られたため、先述の成分毎に光路長を検討することで精度が向上する可能性がある。また、分光器は入射光の光強度を調整することが不可能だが、マルチチップ LED の導入により波長毎の光強度の調整が可能になるため、分光器に比べて良好な透過光が得られ、予測精度向上に繋がる可能性がある。

上記の 3 成分で精度低下が確認された一方で、尿素の濃度予測においては非常に強い相関 ($\gamma = 0.970$) が確認され、臨床検査の誤差範囲内に約 75% のプロットが収まり、高い予測精度を得た。

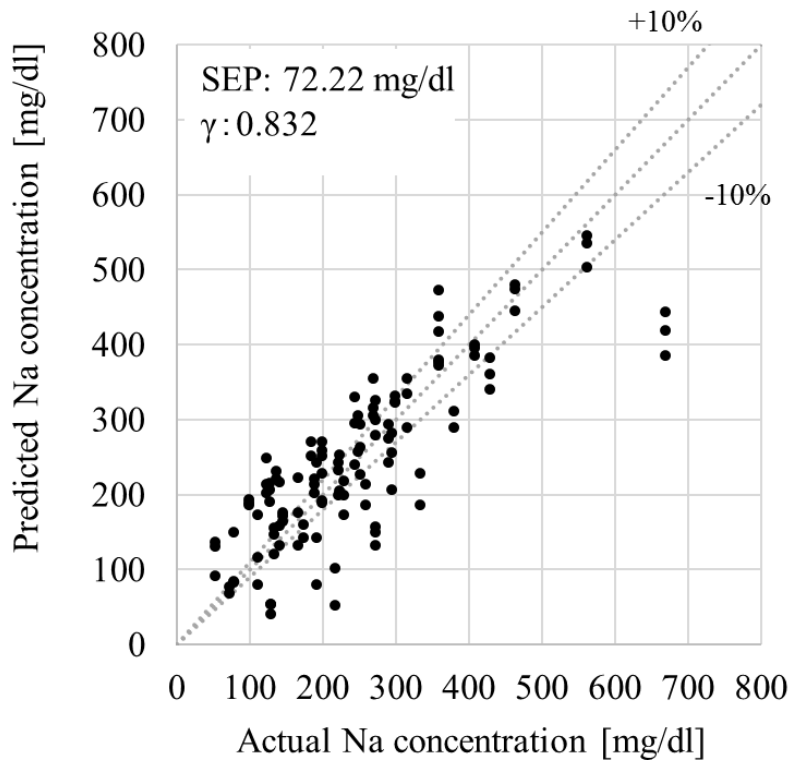
成分毎の予測精度に開きが存在するが、今後、光路長や光強度を検討することで精度が向上する可能性があり、本実験は LED システム構築の足掛かりとなった。



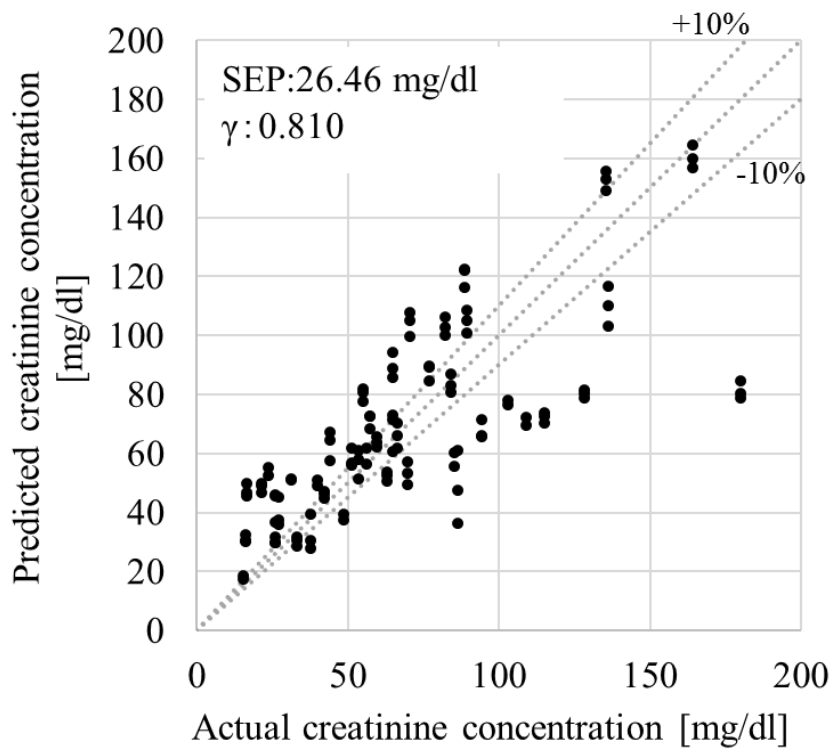
(a) Glucose



(b) Urea



(c) Na



(d) Creatinine

図 6.4 総当たり解析による各成分の予測濃度結果

第7章 近赤外マルチチップ LED の試作

7-1 はじめに

前章では、FT-IR 型分光器で得られた透過光強度スペクトルに対して、ガウス関数を乗じることにより、LED の持つブロード状の発光特性を模擬し、LED 光源使用時の各成分濃度を模擬的に予測した。結果として、LED 光源への移行により精度の低下は生じ得るが、各成分の予測可能性が示された。そこで本章では、図 7.1 に示すような近赤外 LED 光源を使用した実用的なシステム構築を目指し、近赤外マルチチップ LED の試作を行なうと共に、その駆動用回路やフォトダイオードなどについて述べる。

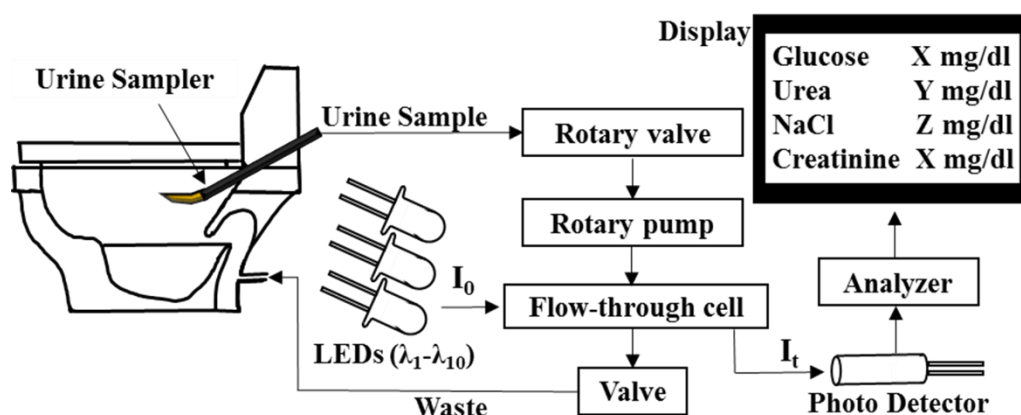


図 7.1 LED 光源を使用した尿成分計測システム

7-2 近赤外マルチチップ LED・受光器・駆動用ドライバー

実用的なシステム構築のため、図 7.2 に示す近赤外マルチチップ LED (LED Microsensor NT, Russia) を試作した。

この LED は中心波長 1400-2300 nm (100 nm 刻み) を持つ LED チップを最大で 4 チップ×6 列、計 24 チップを搭載可能であり、チップ数によって発光強度を調整可能である。また、8 万時間の継続使用が可能であり、1 列ごとにパルス駆動により発光させることが出来る。

3 章で述べたように、近赤外領域では溶媒である水による吸光現象を無視することができない。したがって水の吸光を考慮し、透過光強度を得るために十分な発光強度を持

つ LED が求められる。Devaux ら¹⁾ や Jacquemoud ら²⁾ の報告によると、2000 nm 付近に水による大きな吸光が確認できる。一方で、図 3.2 に示す単一水溶液の吸光スペクトルが示すように 2200 nm 付近は尿素の吸光ピークを示しており、他の成分に比べても大きな ΔAbs を示している。そこでまず、表 7.1 のような特性を持つ 2200 nm の LED チップを 24 個搭載した近赤外マルチチップ LED を試作し、尿素の吸光ピーク波長における水の吸光による透過光強度への影響を検討することとした。

試作した LED に対応する受光器として図 7.3 に示す中赤外フォトダイオード (LED Microsensor NT, Russia) を使用する。パラボラ型反射鏡で受けた光は図中の photodiode chip に集光され、電流を発生させる。内部のプリアンプにより増幅された電圧信号に変換される。この電圧信号は電流と直線的に対応しており、同じ周波数およびパルス幅を持つ。なお、フォトダイオードおよび後述の駆動用ドライバーには波長の識別機能は無く、フォトダイオードが受け取った「ある波長の光を電圧に変換する」機能のみを持つため、特定の波長の電圧値を得る場合は当該波長の LED のみを発光させる必要がある。表 7.2 にフォトダイオードの特性を示す。

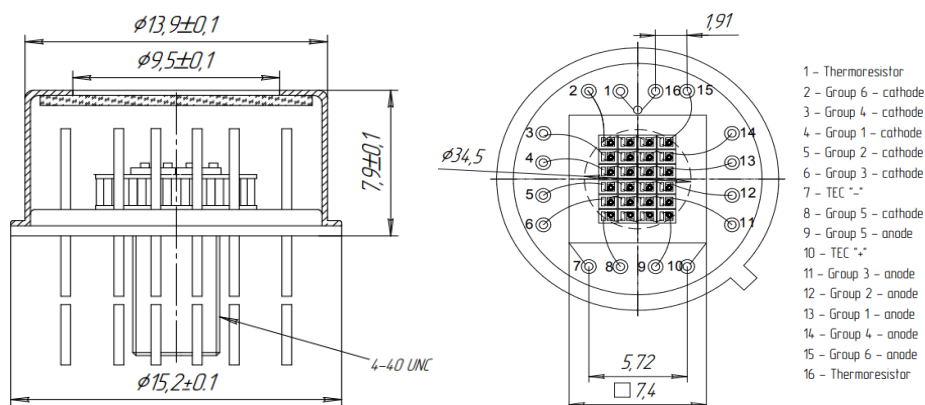


図 7.2 試作した近赤外マルチチップ LED

表 7.1 試作した LED の特性

Parameters	Units	Conditions	Group number of LED-4M					
			# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6
Peak emission wavelength	nm	26 °C	2200	2200	2200	2200	2190	2200
FWHM of the emission band	nm		215	215	220	215	210	215
Optical power @200 mA/per LED-4M array qCW (duty cycle 50 %)	mW		3.04	3.60	3.77	3.06	3.52	3.23

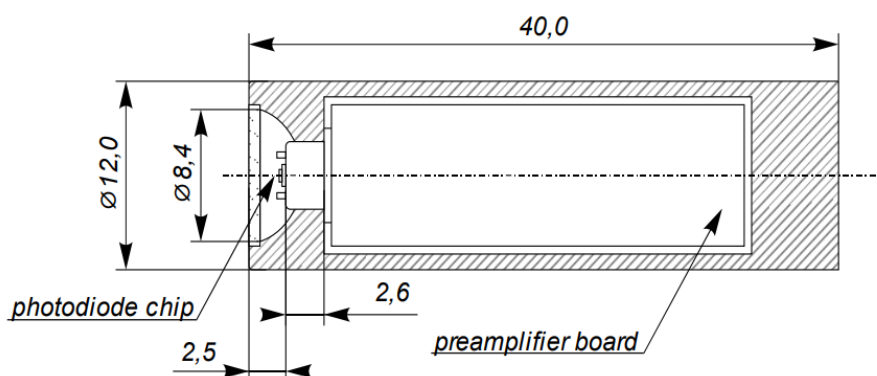


図 7.3 フォトダイオード

表 7.2 フォトダイオードの特性

Parameters	Units	Conditions	Values
Cut-off wavelength	nm	25 °C	2400 - 2460
Max. sensitivity range (> 80 %)	nm	25 °C	1400 - 2200
Dark current	μ A	25 °C, 1 V	100 - 300
Shunt resistance	k Ω	25 °C, 10 mV	1 - 3
Capacitance	pF	25 °C	1000 - 5000
Sensitivity	A/W	25 °C	0.8 - 0.9
Noise equivalent power	W/Hz ^{1/2}	25 °C	(2.5 - 5.0)*10 ⁻¹²
Detectivity	cm \cdot Hz ^{1/2} \cdot W ⁻¹	25 °C	(2.5 - 3.5)*10 ¹⁰

次に LED の電源供給用に設計された D-51i Universal LED Driver(LED Microsensor NT, Russia) およフォトダイオードの電圧信号を測定する SDM synchronous detector について述べる。以降では、前者を D-51i, 後者を SDM とする。

図 7.4 に示す D-51i は、LED をパルスモードで駆動させ、ジャンパーにより LED 電流の振幅、周波数、パルス幅が調整可能である。また後述の SDM により同期可能であり、サーキットブレイク時の LED の損傷を防ぐためのセーフティシステム用ジャンパーも搭載している。なお各ドライバーの番号と各機能との対応は表 7.3 に、D-51i の特性については表 7.4 に示す。

図 7.5 に示す SDM は、フォトダイオードプリアンプの出力電圧信号を測定し、入力からの電圧の振幅に比例した直流電圧信号に変換する。また、パルスモードにおける最

大の信号振幅と SN 比を達成でき、パルスモードのために最適化されている。3つの独立したチャンネルが搭載されており、D-51i との同期駆動、マルチメーターなどへの出力が可能である。SDM の特性については表 7.5 に示す。

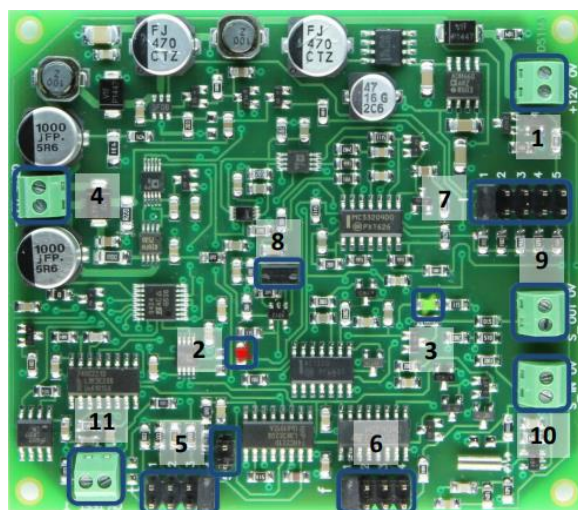


図 7.4 LED 駆動用ドライバーD-51i

表 7.3 各ドライバーの番号と機能との対応

Numbers	D-51i	SDM (Channel 1)	TCM
1	Power input terminal block	Averaging time adjustment jumper	Power input terminal block
2	Circuit break indicator	Input polarity inversion jumper	Temperature voltage adjustment input terminal block
3	LED current indicator	Signal input (from output of preamplifier supply) terminal block	D51 temperature observation input terminal block
4	frequency adjustment jumper	Power output terminal block (preamplifier supply)(DC, unipolar, bipolar)	Thermocoller power output terminal block
5	Pulse duration adjustment jumper	Output signal gain adjustment jumper	Thermistor input terminal block
6	Frequency adjustment jumper	signal output terminal block	Thermistor temperature signal output terminal block
7	LED current adjustment jumper	Synchronization input terminal block (from LED driver synchronization)	Thermistor temperature adjustment potentiometer
8	Circuit break safety system disabling jumper		.D51 temperature adjustment potentiometer
9	synchronization output terminal block		Mode switching jumper
10	synchronization input terminal block		LED indicator of selected mode
11	Temperature observation voltage output terminal		Thermocontroller start/stop button
12			Green/red thermocontroller LED indicator

表 7.4 D-51i の特性

Parameters	Units	Values
Input voltage	V	+ 12, stabilized
Voltage tolerance	%	-5 … +5
Input current	A	max. 0.3
Board dimensions	mm	80 × 70 × 15
Synchronization output voltage	V	5
Adjustable parameters	Units	Values
Pulse duration	μ s	5/10/20/50/150
Frequency	kHz	0.5/1/2/4
Output current amplitude	A	0.2/0.6/1.0/1.5/1.9

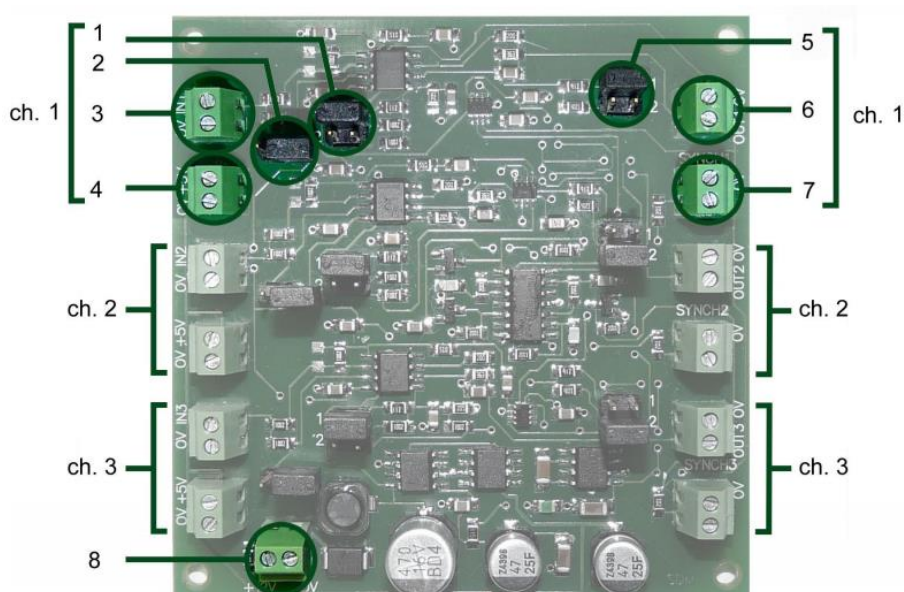


図 7.5 フォトダイオード駆動用ドライバーSDM

表 7.5 SDM の特性

Parameters	Units	Values
Input voltage	V	+ 12, stabilized
Voltage tolerance	%	-5 … +5
Input current	A	max. 0.1
Board dimensions	mm	70 × 70 × 19
Preamplifier supply output voltage	V	5
Output constant voltage signal	V	max. 10
Adjustable parameters	Units	Values
Averaging time	ms	100/200/300
Signal gain	kHz	1x/5x/10x

最後に LED の温度制御用モジュールについて述べる。図 7.5 に示す TCM Thermocontroller (以降, TCM とする) は, 熱電モジュールを搭載しており, LED/フォトダイオードチップの温度制御および調整のために設計されている。本研究では, LED の連続点灯によって生じる発熱を制御するために使用する。

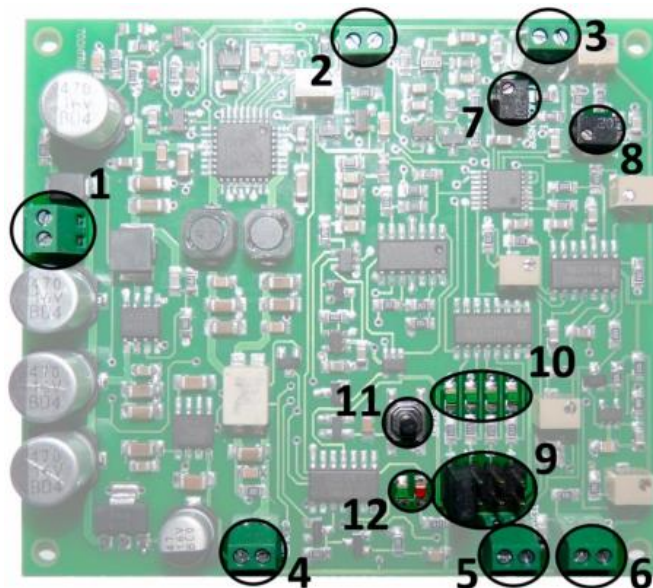


図 7.6 温度制御用ドライバーTCM

7-3 7章の参考文献

1. Devaux BC, Roux FX : Experimental and Clinical Standards, and Evolution of Lasers in Neurosurgery, Acta Neurochir (Wien) 138, pp 1135-1147, 1996.
2. Jacquemoud S, Bacour C, Poilvé H, Frangi J-P: Comparison of Four Radiative Transfer Models to Simulate Plant Canopies Reflectance: Direct and Inverse Mode, Remote Sens Environ 74(3), pp 471-481, 2000.

第8章 結論

はじめに

糖尿病や高血圧，がんなどの生活習慣病の罹患者数は増加傾向にあり，国民医療費に占める割合も3割と無視できない．そのような背景から厚生労働省は疾患の一次予防を重視しており，生体情報の日常的な計測が望まれる．

計測器の在宅利用を考えた場合，容易に計測でき，非侵襲かつ非拘束なシステム構築が望ましい．そのような条件を満たして在宅下で生体情報を得るため，24時間の畜尿ではなく随時尿を対象として，トイレにおける尿成分計測に着目した．試験紙やデジタル尿糖計は在宅でも簡単に使用可能だが，定性的であること，単項目計測であること，電極の交換が必要であることなどの問題点がある．

それに対して近赤外光を用いた尿成分計測に関する多数の報告があるが，分光器を用いた基礎的な検討に留まり，実用化には至っていない．そこで本研究では，種々の生活習慣病の予防に有用とされるグルコース，尿素，ナトリウム，クレアチニンの4成分を計測対象とし，最終目標としてLED光源を用いた光学式尿成分分析システムの開発を設定した．目標の達成のため，従来使用されていなかった負の値を示す吸光度「陰性吸光度」の積極利用や波長数の削減を含む実用化への検討を行なった．

- (1) 4成分の感度波長やピーク波長の確認のため，各成分の単一水溶液を5濃度ずつ作成し，FT-IR型分光器によるスペクトル計測を行なった．取得したスペクトル波形は，各成分の濃度増加に伴う吸光度の増減を表しており，官能基などに応じた感度波長・ピーク波長，陰性吸光度が確認された．また，本来は光を吸収しないイオンであるNaにおいても吸光が確認された．
- (2) 数ある生活習慣病の中でも，尿成分に顕著な影響を与えられられる糖尿病患者の尿を想定し，10名の健常成人男性の尿にグルコースを添加した，GAUサンプルを用いて各成分の濃度予測を試みた．濃度予測はシステムの全波長を用いた全波長使用解析と，購入可能な10個のLED波長を用いた総当たり解析によって求められた．総当たり解析の結果として，グルコースの低濃度領域で負の予測濃度が確認さ

れたが、一桁程度の波長を用いることで各成分解析において高い精度で尿中成分を予測可能であることを確認した。また、それらの結果を用いて、1日たんぱく摂取量の推定に有用な尿素-クレアチニン比と1日の食塩摂取量推定に有用なNa-クレアチニン比を算出した。これらの比は従来24時間畜尿を用いて計測されていたが、本研究により随時尿中の各比を臨床検査と同程度の高い精度で予測可能であることが示された。

- (3) 計測サンプルとして43名の糖尿病患者尿を用いて、総当たり解析を実施した結果、GAUサンプルに比べ、4成分ともに精度低下が確認された。尿素は尿中の高濃度グルコースの影響もなく、非常に良好な予測精度を得た。しかし他の成分は精度低下の原因が明らかでなく、有病者特有の排泄成分や女性サンプルの混入などによる影響であると推察した。グルコースの精度向上方法としては、中赤外領域の波長を導入することが考えられる。
- (4) LED光源を用いたシステム構築のため、分光器を用いてブロード状の発光特性を持つLEDで得られる透過光強度を模擬し、糖尿病患者尿中の各成分の模擬的な濃度予測を行なった。分光器のデータを使用して選定された波長組み合わせを、模擬解析に適用した結果、グルコース、Na、クレアチニンにおいては実用化に供し得る精度を得ることは出来なかった。その一方で、尿素の濃度予測においては $\gamma = 0.970$ という非常に強い相関が確認され、全体の75%のプロットが臨床検査の誤差範囲内に収まるという高い予測精度を得た。対象4成分の中で、予測精度に開きが出るという結果になったが、光路長や光強度の検討により予測精度は向上する可能性があり、LEDシステムの構築のための足掛かりとなった。
- (5) しかし本研究にはいくつかの限界が存在する。まず、水溶液中におけるグルコースの3種の構造のうち、どの構造が計測されているかに関して、従来法および本手法のどちらにおいても明らかではない。次に、本研究では尿中Naがスペクトルに与える影響については検討したが、尿に限らず水溶液中に存在するカチオンとアニオンがスペクトルにどのような影響与えているのかは、完全には明らかになっていな

い。今後、溶液中のイオンの存在がどのような機序でスペクトルに与えているのかについて明確化する必要がある。また、有病者や女性尿の特有物質の有無やその量、それらの影響に関しては検討できていない。更に、本研究結果は全て大型かつ高額な FT-IR 型分光器を用いた尿成分濃度の予測に留まっており、今後の実用的なシステム構築のためには LED 光源と受光器を用いた計測実験が必須となる。

以上、本手法により一桁台の波長を解析に使用することによって、サンプルに依存的ではあるが、尿中の複数の成分を高精度に予測できることが示された。また、LED を光源として用いた場合でも、予測できる可能性が示され、LED を用いたシステム構築の足掛かりとなった。今後実用化を進めるためには、カチオンやアニオンのスペクトルへの影響、有病者や性別による尿成分の際やその予測精度、光路長や光強度などについて検討し、更なる予測精度の向上が必要となる。また、試作した近赤外マルチチップ LED を使用した透過光強度計測実験も行っていく。

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始暖かく丁寧なご指導とご鞭撻、激励を頂いた金沢大学理工研究域フロンティア工学系 田中志信教授に深甚なる謝意を表します。本研究に対し、種々の有益なるご教示、ご助言を賜りました金沢大学設計製造技術研究所 坂本二郎教授、金沢大学理工研究域フロンティア工学系 田中茂雄教授、内藤尚准教授、村越道生准教授に心より感謝致します。また、本研究を通して、終始ご支援とご指導を賜りました小松大学保健医療学部臨床工学科 野川雅道准教授、藍野大学医療保健学部臨床工学科 五十嵐朗教授、帝京大学理工学部情報電子工学科 小川充洋准教授に深謝致します。更に、論文執筆に対して多大なるご支援とご助言を賜りました金沢大学理工研究域 山越憲一名誉教授に深く感謝致します。

最後に本研究を共に遂行してきた金沢大学理工学域人間適応制御研究室、丹羽佑介氏（現 株式会社 IPA）、清野公宏氏（現 三菱ケミカルエンジニアリング株式会社）、鶴田貴弘氏、実験に協力していただいた同人間適応制御研究室の諸氏に深く感謝致します。

本論文に関連した研究発表文献

<論文>

- 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* 7, pp. 72-81, 2018.
- 2) I. Suzuki, M. Ogawa, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, K. Yamakoshi, S. Tanaka: NIR spectroscopic determination of urine components in spot urine: Preliminary investigation towards optical point-of-care test, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 58(1), pp. 67-74, 2020.

<国際会議/査読付き>

- 1) S. Tanaka, I. Suzuki, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi: Development of an Optical Monitoring System of Urine Substances for Home Healthcare, EMBC2015, Abstract URL: <https://events.infovaya.com/presentation?id=22272>, Miran, Italy, 2015.
- 2) I. Suzuki, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka: Development of an optical system for multi-component analysis of urine for Home Healthcare, 12th International Conference on Ubiquitous Healthcare, Proceedings of the 12th International Conference on Ubiquitous Healthcare (u-Healthcare2015), p. 28. Osaka, Japan, 2015.
- 3) I. Suzuki, M. Nogawa, H. Naito, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka: Development of an optical system for multi-component analysis of urine for Home Healthcare - Reduction of the number of wavelength for concentration estimation -, EMBC2016, Abstract URL: <https://events.infovaya.com/presentation?id=27049>, Florida, US, 2016.
- 4) I. Suzuki, K. Seino, M. Nogawa, H. Naito, A. Ikarashi, M. Ogawa, K. Yamakoshi, S. Tanaka: Development of an optical system for multi-component analysis of urine for Home Healthcare - Concentration estimation using urine from multiple diabetic subjects -, EMBC2017, Abstract URL: <https://events.infovaya.com/presentation?id=30283>, Jeju, Korea, 2017.
- 5) 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, EMBC2018, Abstract (Not available), Honolulu, US, 2018.

- 6) 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, EMBC2019, Abstract URL: <https://events.infovaya.com/presentation?id=44897>, Berlin, Germany, 2019.

<受賞>

公益社団法人計測自動制御学会北陸支部優秀学生賞 受賞, 2016年3月.