

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

小川 充洋*・山越 健弘*・田中 志信*・山越 憲一*

Near-infrared Spectroscopy of Human Serum Albumin and Determination of its Concentrations in Phosphate Buffer Solutions

Mitsuhiro OGAWA,* Takehiro YAMAKOSHI,* Shinobu TANAKA,* Ken-Ichi YAMAKOSHI*

Abstract Near-infrared differential absorbance spectra from pure water have been measured for phosphate buffer solutions (pH = 7.4) of human serum albumin (HSA) in the wavelength range of 750–2500 nm. The peaks that follow HSA concentration can be observed in near-infrared differential absorbance spectra; in the 1650–1750 nm and 2150–2350 nm region. The near-infrared spectra in the 750–1350 nm, 1550–1850 nm and 2052–2500 nm regions of the solutions have been subjected to partial least squares (PLS) regression analysis to make calibration models predicting the concentrations of the HSA. The calibration in the concentration range of 0–5 g/dl has yielded a correlation coefficient of 0.999 and a standard error of prediction of 0.0283 g/dl with latent variable of seven. This result suggests that the near-infrared differential spectra of HSA from pure water reference and its calibration model constructed by using PLS regression can pick up effectively the information about albumin contained in phosphate buffer solutions. This result can be a base of reagentless measurement of HSA in human serum and *in vivo* HSA measurement.

Keywords : near infrared, spectroscopy, PLS regression, human serum albumin, differential absorbance.

1. 緒 言

生体情報には様々なものがあるが、その中でも各種の血中成分は重要な情報を与えるもののひとつであると考えられている。血中成分の分析は、一般に採血された血液サンプルを化学的に分析することによって行われる。このための様々な化学分析法がこれまでに提案、実用化されてきた。多くの化学分析法は各種試薬と血中成分との化学反応を用いるものであるが、そうした試薬を用いない分析法 (reagentless assay) が提案されている[1]。試薬を用いない手法においては、高価な試薬や有害な試薬を用いなくてよいことや試薬の変性や失活を考えなくともよくなること、有害な試薬を含む廃液の処理の問題を考えなくともよ

くなることなどが利点と考えられている[2, 3]。試薬を用いない血中成分情報の分析としては、血中ヘモグロビンの酸素化状態を光を用いて計測する方法が古くから研究され、いわゆるコオキシメータ (CO-oximeter) として実用に供されているが[4, 5]、それ以外の計測に関しては、いまだ発展途上である。

試薬を用いない分析法のひとつとして考えられるのが、分光学的手法を用いた分析である。分光学的手法によれば、多成分計測を高速に行える可能性があり、期待が持たれている[6]。また、近年の半導体プロセスの発展により可視～近赤外領域の受光素子の高性能化や小型化、低廉化が進んでおり、ポータブル型の分光光度計や近赤外領域に感度を持つ高感度のアバランシェフォトダイオードなども数多く市販されるようになってきている。こうした受光素子の急速な発展もまた、光を用いた血液分析法の実用化を後押しするものと考えられる。これまで、近赤外領域の分光法を基礎として、ケモメトリクス (計量科学) 分野の多変量解析法を用いることによって、血漿中の尿素、蛋白質、コレステロールおよびグルコースなどの計測が試みられてきた[7-11]。なかでも、血漿中のアルブミンや総蛋白の計測

2010年1月27日受付, 2010年4月23日改訂, 2010年4月30日再改訂

Received January 27, 2010; revised April 23, 2010, April 30, 2010.

*金沢大学大学院自然科学研究科
Graduate School of Natural Science and Technology,
Kanazawa University

の試みは多いが、これらの多くはケモメトリクス的な解析手法について議論、考察を行っており、実際のアルブミンなどの蛋白質の吸光度そのものについては論じられていない。一方、Ozaki らは、波長領域 1300~1850 nm において粉末ヒト血清アルブミンと粉末 γ -グロブリンの吸光度スペクトラムの反射測定を試み、この領域で反射吸光度の正のピークを観察したことを傍証として、近赤外領域での蛋白質計測は物理的な吸光現象に基づくものであると結論づけている [6]。しかし、Ozaki らの論文でも、アルブミンや γ -グロブリンのリン酸緩衝溶液の吸光度スペクトラム計測においては、吸光度ピークを観察することはできていない。

本研究では試薬を用いない分光学的手法による血中成分分析の試みとして、血漿成分のひとつであるアルブミンに注目した。本報告では、血中・血漿中のアルブミン濃度測定のための第一段階として、アルブミン緩衝溶液の近赤外領域における吸光度スペクトラム計測を再検討した。また、アルブミン緩衝溶液の濃度の定量分析について、近赤外領域の分光法によって検討したので報告する。

2. 方 法

2.1 ヒト血清アルブミンについて

人血は血球成分と血漿成分から構成され、血漿は血液の容積のうち 60~50% 程度を占める。血漿成分の組成は、90% 程度が水、7% が蛋白質であり、残りは脂質、糖類、無機塩類などとなる。血漿中の蛋白質のうち、主たる成分はヒト血清アルブミン（以下、文脈的に明らかな場合はアルブミンと略す）であり、2 番目に多い血漿蛋白質であるグロブリンの 1.2~2.0 倍程度存在する。アルブミンは 585 個のアミノ酸からなり、分子量は約 66500 である。アルブミンの側鎖・ペプチド結合には、水素結合可能な部位（-OH, C=O, N-H など）が多く存在し、親水性を高めている [12]。一方、ヒト血清アルブミンの分子表面には疎水性領域が存在することが知られており、アルブミン全体では疎水性と親水性の双方の性質を持つ。生体物質のうちの非水溶性のものは、そのまま血漿には溶けないが、アルブミンの疎水性領域と結合することによって血漿に溶解し、生体内を輸送される。このようにアルブミンは生体中の化学物質輸送を担う物質のひとつであり、このことから、その濃度は生体の栄養状態を表す指標のひとつであると考えられているほか、血中の膠質浸透圧の維持・調整についても重要な役割を担っている。今回、近赤外領域の赤外線を用いた血中成分分析法の開発を最終目的とし、主たる血漿成分であるアルブミンにまず着目して、アルブミン緩衝溶液の分光学的手法による測定を試みた。

2.2 計測法

物質濃度の定量化のための分光学的計測法としては試料の透過光計測による吸光度計測による方法のほかに、

ATR 法（全反射測定法）を用いた吸光度計測 [13] やラマン分光法によるもの [14] などが考えられるが、将来的な実用化のために最も単純な試料の透過光計測による吸光度計測について検討することとした。

試料の調整のため、ヒト血清アルブミン（Albumin from Human Serum, 019-10503, 和光純薬工業(株)）を用いた。ヒト血清アルブミンを、pH 7.4 のリン酸緩衝液（生化学用リン酸緩衝剤粉末 167-14491, 和光純薬工業(株)により調整）に溶解させ、試料とした。リン酸緩衝液の調整には、超純水器（AUTOPURE WD500, ヤマト科学）で生成した純水を用いた。今回、健常なヒト血漿中のアルブミン濃度が 3000~5000 mg/dl 程度であることから、濃度 0~5000 mg/dl のヒト血清アルブミンを緩衝溶液に溶解させた試料を用いた。試料の濃度は 0 mg/dl（純水）から 250 mg/dl 間隔で 5000 mg/dl まで、合計 21 種類とした。

吸光度の計測には、FT-IR 型分光光度計（Spectrum One NTS, (株)パーキンエルマージャパン）を用い、計測波長範囲 750~2500 nm、波長分解能 1.67 nm で計測を行った。光計測セルには、組立フローセル（FLAB50-UV-02, ジーエルサイエンス(株)）を用い、光路長は 0.5 mm とした。吸光度の計測では、1) フローセル中に標準ガスを充填した状態をバックグラウンドとした絶対吸光度の計測と、2) フローセル中に純水を充填した状態をバックグラウンドとした純水との差分吸光度計測のふたつの計測を行った。各濃度の試料をそれぞれ 3 個用意し、試料の温度を $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保ち、各試料の計測をそれぞれ 1 回行った。また、各試料の計測はランダムな順序で行った。さらに、計測された吸光度スペクトラムを用いたアルブミン濃度の定量分析を行った。

また、アルブミン以外の血漿成分のアルブミン定量分析への影響について検討するために、血漿成分のひとつであるグルコース水溶液の吸光度計測も併せて行った。グルコース水溶液の調整のためには、グルコース（D-Glucose, 049-00591, 和光純薬工業(株)）を pH 7.4 のリン酸緩衝液に溶解させて試料とした。また、グルコース試料の水溶液濃度は、ヒトの血糖値の範囲内の濃度として、100, 150, 200 mg/dl とした。またさらに、ヒト血清アルブミンとグルコースの混合溶液の吸光度計測も行った。混合溶液はヒトの血清中のアルブミンとグルコース濃度範囲で調整するものとした。混合溶液のアルブミン濃度を 3000 mg/dl から 250 mg/dl 間隔で 5000 mg/dl までの 9 通り、グルコース濃度 100, 150, 200 mg/dl の 3 通りとして、合計 $9 \times 3 = 27$ 種の試料を用いた。

なお、本論文では純水との差分吸光度との差異を明らかにするため、一般的な吸光度のことを絶対吸光度と表現することがあるので注意されたい。

3. 結 果

3・1 絶対吸光度の計測

絶対吸光度の計測結果の一例を図1に示す。図1で示した吸光度スペクトラムに明らかなように、近赤外領域では水の吸光が支配的であり、アルブミン濃度の影響を吸光度スペクトラム上に明確に観察することはできなかった。

3・2 差分吸光度の計測

アルブミン緩衝溶液の純水との差分吸光度の計測結果の一例を図2に示す。図2において、差分吸光度が正であることは、その波長において純水と比較して吸光度が大きいこと、すなわち試料を透過した光量が純水より小さいことを示す。逆に、差分吸光度が負であることは、純水と比較して吸光度が小さいことを示す。図2において、波長1450 nm 付近の吸光度の減少は、主として水の影響によるものであると考えられる[6, 15]。また、波長1850~2050 nm 付近においては大きなノイズ状の吸光度パターンを得たが、この領域では水の吸光度が大きく、計測のために必要な光量を確保できないために正しい計測が行えないものと考えられる。図2で示した差分吸光度スペクトラムから明

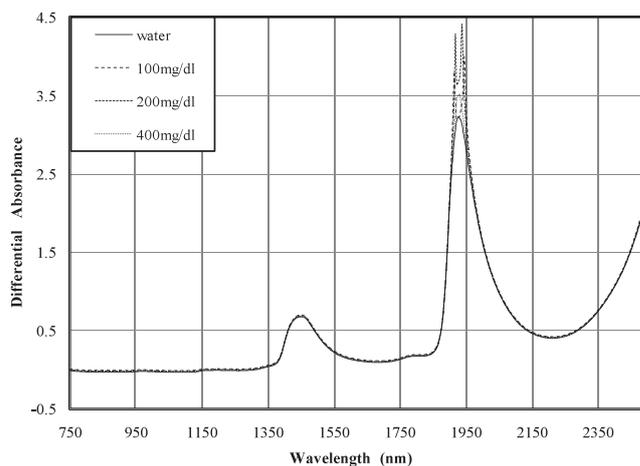


図1 ヒト血清アルブミンリン酸緩衝溶液と純水の近赤外領域での吸光度スペクトラムの例

Fig. 1 Examples of near-infrared absorbance spectra of phosphate buffer solutions of human serum albumin and pure water; the region of wavelength is 750-2500 nm.

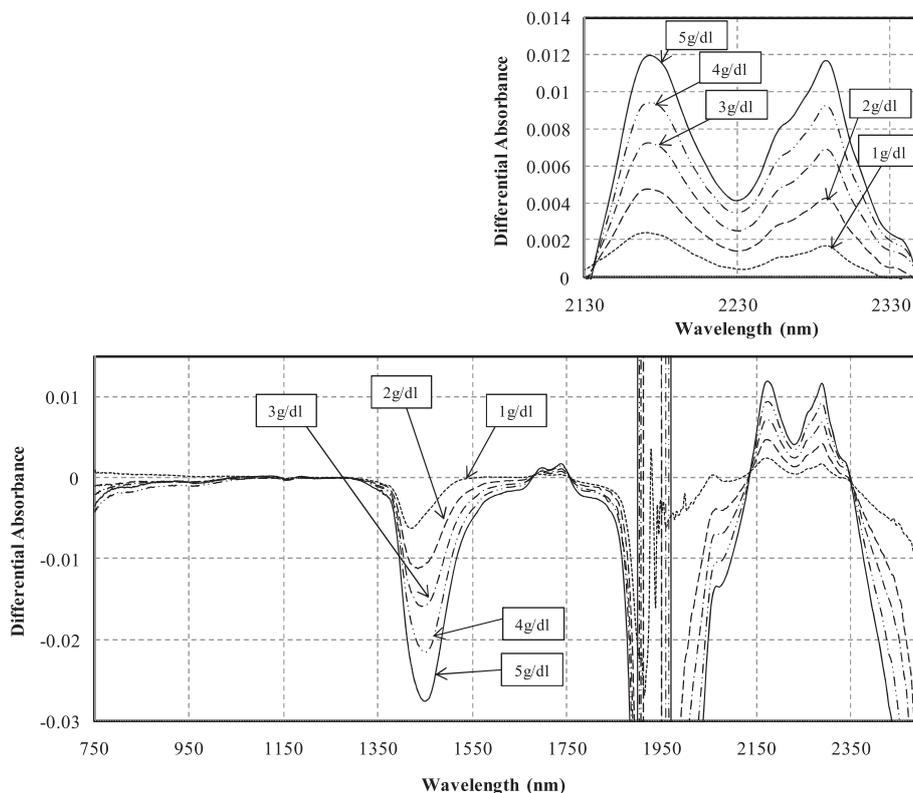


図2 ヒト血清アルブミンリン酸緩衝溶液の近赤外領域での差分吸光度スペクトラムの例；下図は波長750~2050 nm までのスペクトラム，上図は波長2130~2350 nm 付近の拡大図

Fig. 2 Examples of near-infrared differential absorbance spectra from pure water of phosphate buffer solutions of human serum albumin: Lower panel provides an overall view of spectra and upper panel shows a closeup views in the region of wavelength 2130-2350 nm.

らかなように、純水との差分吸光度を計測することによって、アルブミン固有のものと思われる吸光ピークを波長 1650~1750 nm 付近, 2150~2350 nm 付近で明確に観察することができた。

次に、これらの吸光度ピークの大きさが濃度順であったことから、このピークはアルブミン濃度に関する情報を持つものと考えて、差分吸光度スペクトラムを用いたアルブミン濃度の定量化を試みた。定量化のためには、PLS 回帰を用いて回帰検量モデルを作成することとした[16]。回帰検量モデルの作成のためには、ソフトウェア“R”(version 2.9.2)と“R”用モジュール“pls”(version 1.2-1)を用いた[17]。まず、波長 1200 nm の差分吸光度を 0 とするように差分吸光度スペクトラムのオフセット除去を行った。図 2 より、差分吸光度スペクトラムのうち、水の影響が大きい領域 1351~1549 nm と正しく計測が行われていない領域 1851~2051 nm を除いた領域の差分吸光度を独立変数とし(すなわち、独立変数に含まれる差分吸光度スペクトラムの波長範囲は、750~1350 nm, 1550~1850 nm および 2052~2500 nm である)、アルブミン濃度を従属変数として、回帰を行った。

まず、差分吸光度スペクトラムにアルブミン濃度に関する情報が含まれるかどうかを確認するために、Leave One Out Cross Validation 法を用いて交差検定を行った。Leave One Out Cross Validation 法を用いた交差検定の結果を図 3 に示す。図 3 の交差検定において、PLS 回帰の潜在変数(Latency Variable)は 8 であり、予測標準誤差 SEP (Standard Error of Prediction) は 37.7[mg/dl]、予測値と計測値の相関係数 $\gamma = 0.999$ であった。図 3 は良好な回帰を示しており、差分吸光度スペクトラムにアルブミン濃度に関する情報が含まれることを強く示唆する。そこで次に、データセットをモデル構築群と検証群の二つに分割して、検討を行った。

Leave One Out Cross Validation の結果を受け、データセットをモデル構築群と検証群の二つに分割して、検討を行った。

1) はじめに、データセットをランダムに 2 群に分割した。データセット中の各濃度にはそれぞれ 3 個の光学データが含まれるが(2・2において、各濃度の試料を 3 つ用意して計測を行ったため)、モデル構築群、検証群ともに全ての濃度が含まれるように分割を行った。このとき、PLS の潜在変数 7 で SEP は 56.6[mg/dl]、予測値と計測値の相関係数 $\gamma = 0.998$ という結果を得た。このときの検証群に対するアルブミン濃度予測結果を図 4 に示す。

2) 次に、モデル構築群に含まれるサンプルのアルブミン濃度を検証群には含まれないように設定した。このときのモデル構築群と検証群それぞれに含まれるサンプルのアルブミン濃度を表 1 に示す。このときの結果は、PLS の潜在変数 7 で SEP は 28.3[mg/dl]、予測値と計測値の相

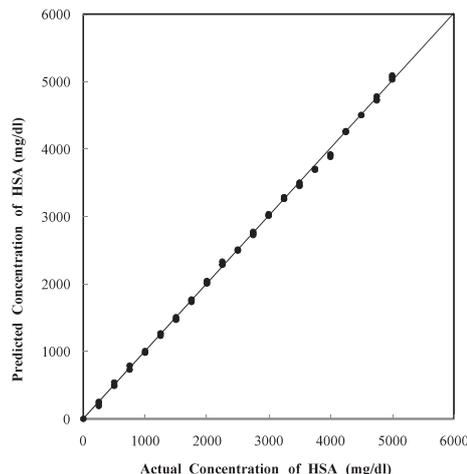


図 3 ヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果 (Leave one out cross validation)

Fig. 3 Calibration plot of estimated concentration of human serum albumin (HSA) solutions against measured concentration by leave one out cross validation. Solid line is the line of equal values.

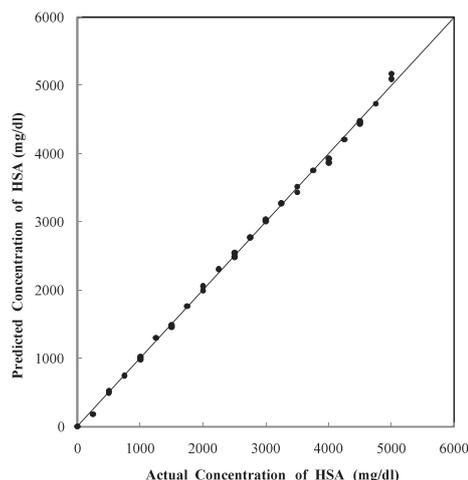


図 4 ヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果 (検量回帰モデル構築群と検証群に同一濃度のアルブミン溶液サンプルの光学データを含む)

Fig. 4 Calibration plot of estimated concentration of human serum albumin (HSA) solutions against measured concentration; training data set and validation data set also contain samples of all prepared albumin concentration. Solid line is the line of equal values.

関係数 $\gamma = 0.999$ であった。このときの検証群に対するアルブミン濃度予測結果を図 5 に示す。

続いて、アルブミン固有と考えられる吸光ピークが観察された波長 2150~2350 nm 付近におけるグルコース緩衝溶液の純水との差分吸光スペクトラムを、図 2 に示したアルブミンの差分吸光スペクトラムと併せて図 6 に示す。図 6 に示すように、この範囲ではグルコース水溶液の差分吸光度の濃度依存性は、アルブミンのそれと比較して明らかに小さかった。また、この波長 2150~2350 nm の差分

表1 モデル構築群と検証群に含まれるサンプルのヒト血清アルブミン濃度

Table 1 Concentrations of human serum albumin concentration in training data and validation data.

	Concentration of human serum albumin solutions [mg/dl]
Training data	0 (pure water), 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000
Validation data	250, 750, 1250, 1750, 2250, 2750, 3250, 3750, 4250, 4750

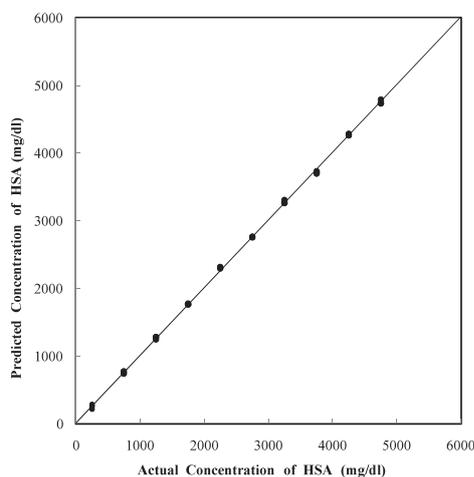


図5 ヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果 (検量回帰モデル構築群と検証群は、それぞれ異なる濃度のアルブミン溶液サンプルの光学データから構成される)

Fig. 5 Calibration plot of estimated concentration of human serum albumin (HSA) solutions against measured concentration; training data set and validation data set are with different albumin concentrations for each data set. Solid line is the line of equal values.

吸光スペクトラムを用いた PLS 回帰によるアルブミン濃度の推定を行った。結果、上記1)の方法で行った交差検定では、PLSの潜在変数7でSEPは58.3[mg/dl]、予測値と計測値の相関係数 $\gamma = 0.998$ という結果を得た。このときの検証群に対するアルブミン濃度予測結果を図7に示す。また、上記2)の方法で行った交差検定では、PLSの潜在変数7でSEPは42.9[mg/dl]、予測値と計測値の相関係数 $\gamma = 0.999$ であった。このときの検証群に対するアルブミン濃度予測結果を図8に示す。

次に、ヒト血清アルブミンとグルコースの混合溶液の波長2150~2350 nm付近における差分吸光度スペクトラムを図9に示す。図9に明らかのように、波長2150~2350 nm付近においては、アルブミン-グルコース混合溶液の差分吸光度スペクトラムはアルブミン濃度に大きく依存し、グルコース濃度による影響は小さかった。次に、アルブミン-グルコース混合溶液における差分吸光度スペクトラムを用いたアルブミン濃度推定を試みた。混合溶液での濃度推定では、グルコース濃度100 mg/dlの試料群 (アルブミン濃度:3000~5000 mg/dl)を用いてPLSによって回帰モ

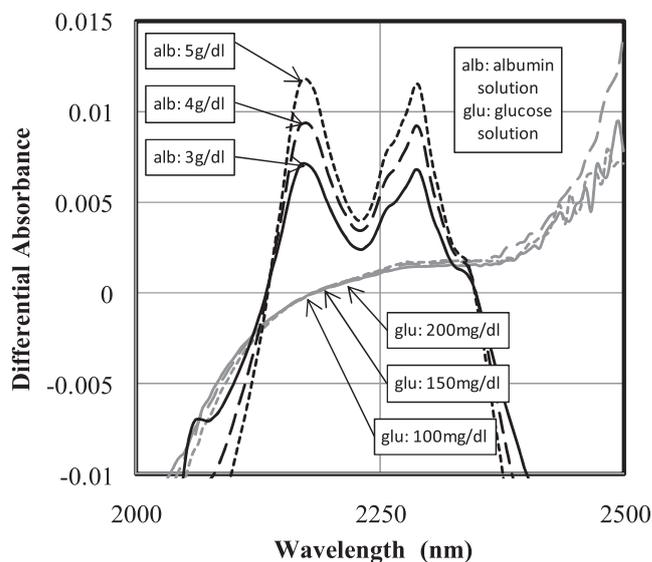


図6 ヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液のグルコースリン酸緩衝溶液の波長範囲2000-2500 nmにおける差分吸光度スペクトラムの例; 黒色がHSA溶液の、灰色がグルコース溶液のスペクトラム

Fig. 6 Examples of near-infrared differential absorbance spectra from pure water of phosphate buffer solutions of human serum albumin and glucose in the wavelength of 2000-2500 nm. Black lines show solutions of human serum albumin, gray lines show solutions of glucose.

デルを作成し、作成された回帰モデルをグルコース濃度150および200 mg/dlの試料群 (アルブミン濃度:3000~5000 mg/dl)を検証データとして、交差検定を行った。結果、PLSの潜在変数4でSEPは61.3[mg/dl]、予測値と計測値の相関係数 $\gamma = 0.994$ という結果を得た。このときの検証群に対するアルブミン濃度予測結果を図10に示す。

以上のいずれの場合においても、良好なアルブミン濃度予測を行うことが可能であった。

なおSEP (Standard Error of Prediction)の定義については、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[18]の定義によった。

4. 考 察

4.1 先行研究との比較

血中成分・血漿成分の分光学的手法による定量化の試み

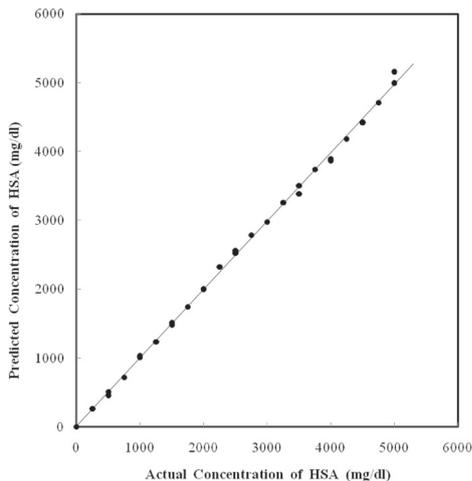


図 7 波長範囲 2150-2350 nm の差分吸光スペクトラムによるヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果 (検量回帰モデル構築群と検証群は、それぞれ異なる濃度のアルブミン溶液サンプルの光学データから構成される)

Fig. 7 Calibration plot of estimated concentration of human serum albumin (HSA) solutions against measured concentration; training data set and validation data set also contain samples of all prepared albumin concentration; calibration model is obtained by differential absorbance in the wavelength of 2150-2350 nm. Solid line is the line of equal values.

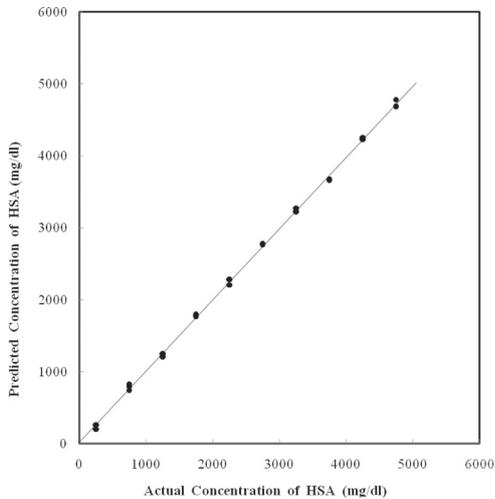


図 8 波長範囲 2150-2350 nm の差分吸光スペクトラムによるヒト血清アルブミン (HSA) リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果 (検量回帰モデル構築群と検証群は、それぞれ異なる濃度のアルブミン溶液サンプルの光学データから構成される)

Fig. 8 Calibration plot of estimated concentration of human serum albumin (HSA) solutions against measured concentration; training data set and validation data set are with different albumin concentrations for each data set calibration model is obtained by differential absorbance in the wavelength of 2150-2350 nm. Solid line is the line of equal values.

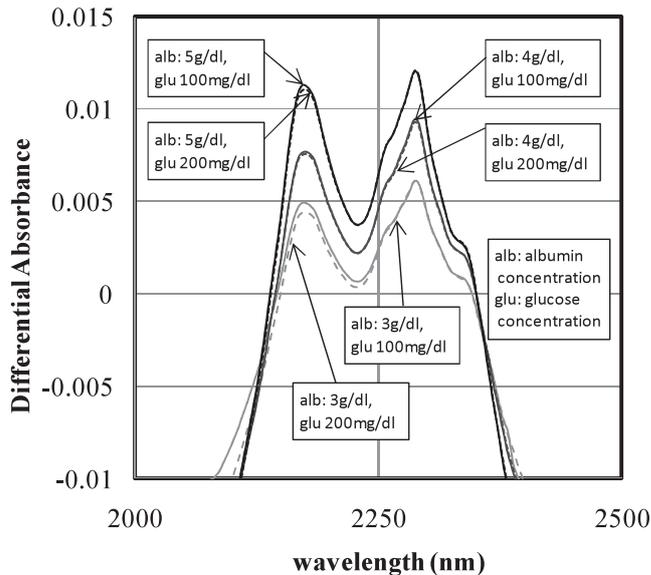


図 9 ヒト血清アルブミン (HSA) とグルコースの混合リン酸緩衝溶液の波長範囲 2000-2500 nm における差分吸光度スペクトラムの例

Fig. 9 Examples of near-infrared differential absorbance spectra from pure water of mixed phosphate buffer solutions of human serum albumin and glucose in the wavelength of 2000-2500 nm.

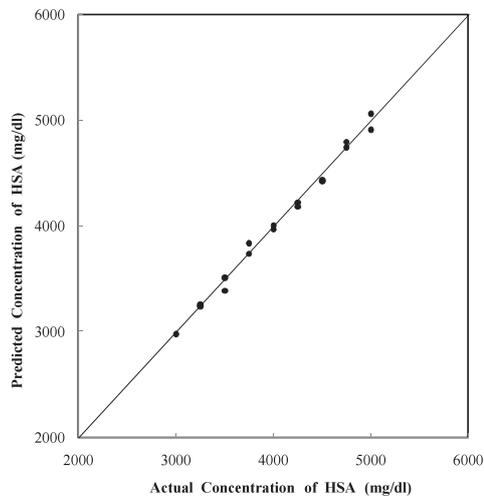


図 10 波長範囲 2150-2350 nm の差分吸光スペクトラムによるヒト血清アルブミン (HSA) とグルコースの混合リン酸緩衝溶液の濃度予測の結果

Fig. 10 Calibration plot of estimated human serum albumin (HSA) concentration of mixed phosphate buffer solutions of HSA and glucose against measured concentration; calibration model is obtained by differential absorbance in the wavelength of 2150-2350 nm. Solid line is the line of equal values.

はこれまでも数多く行われている。しかし、それらの試みの多くはケモメトリクス分野で用いられる各種の多変量解析と計測情報の前処理法を組み合わせることによって、定量化のための回帰モデルを得るものであって、実際に測定対象とする物質の分光学的特性がどのようなものであるかが論じられることはほとんどなく、得られた回帰モデルと測定対象物質の分光学的特性の関係は曖昧なままであることが多い。そのため、「良好な回帰結果を得たこと」を「正しい分光計測が実施できたこと」の証明とするような論理が多いが、理想的には「正しい分光計測が実施できたこと」は「良好な回帰結果を得ること」の前提であるべきである。ケモメトリクスは複雑な現象（例えば吸光現象）の統計的な解析によって、観察された現象の背景にある原因（例えば測定対象物質の濃度）を明らかにするものであるが、統計的データ解析に偏っている例も多い。こうした問題を解決するために、Ozakiらはアルブミン緩衝溶液濃度の定量化を波長1300~1850 nmの範囲における吸光度計測を用いて行った[6]。Ozakiらはアルブミン緩衝溶液の絶対吸光度を用いており、彼らが示した絶対吸光度スペクトラムからは、本研究の図2のように、アルブミンに特有と考えられるピークを観察できない。そのためOzakiらは、粉末アルブミンの反射光計測による吸光度計測を行い、この吸光度スペクトラムパターンにおいて1700 nm付近にピークを認めた。また同時に、アルブミン緩衝溶液の絶対吸光度スペクトラムにケモメトリクス分野で広く用いられる移動平均平滑化処理やSavitzky-Golayフィルタによる波形整形などの前処理操作[19, 20]を行った後に波長方向2階差分スペクトラムを得て、この2階差分スペクトラムを用いて定量化のための回帰モデルを作成した。この定量化に用いた回帰係数ベクトル上において1700 nm付近に正のピークを認めたことから、この回帰ベクトルがアルブミンに由来する濃度変化を回帰していることを間接的に示している。本研究では、吸光度スペクトラムの計測領域を750~2500 nmとし、Ozakiらよりも広範囲において計測を行った。また、純水との差分吸光度計測によって、計測データ上に明らかなピークを1650~1750 nm付近と2150~2350 nm付近に得た。1650~1750 nm付近の差分吸光度ピークは、Ozakiらの示した粉末アルブミンの吸光度ピークの位置および形状と一致した。また、差分吸光度スペクトラムにケモメトリクス分野で用いられている波形の前処理操作を行うことなく、また、スペクトラムの波長方向の差分操作を行うこともなしに、純水との差分吸光度スペクトラムを用いた定量化のための検量回帰モデルを得た。本研究は、Ozakiらが間接的に示すに留まったアルブミン緩衝溶液の吸光度スペクトラム上のアルブミン濃度依存のピークは、差分吸光度計測を用いることで直接観察可能であり、これを用いて回帰モデルの作成が可能であることを示し、血漿成分の分光学的手法による計測の光学

的な機序を明らかとしたものである。また、Ozakiらよりも広範囲の計測を行ったことにより、1650~1750 nm付近に加えて、2150~2350 nm付近により大きな濃度依存のピークがあることも明らかにすることができた。

本研究においては、アルブミン以外の血漿成分がアルブミン計測に与える影響を考察するために、グルコース緩衝溶液水溶液の吸光度計測を行った。図6に示されたように、波長2150~2350 nm付近においてはヒト血中濃度付近におけるグルコース溶液の濃度依存性はヒト血中濃度付近におけるアルブミン溶液の示す濃度依存性よりも明らかに小さく、この領域におけるアルブミン濃度の計測にグルコースの与える影響は小さいものと考えられた。また、この領域の差分吸光スペクトラムによるアルブミン濃度の推定は図7、図8に示したように良好であった。さらに、アルブミンとグルコースの混合溶液の差分吸光度スペクトラムを用いたアルブミン濃度の推測も行い、図10に示すように良好な結果を得た。ヒトの血漿中および全血中には、グルコース以外にもアルブミン計測の妨害物質となる可能性がある成分が存在するが、今回行ったような手法によって、妨害成分の影響について考察することができるものと考えられる。これは、従来の統計的手法に大きく依存した方法と異なり、吸光ピークを差分吸光スペクトラム上で直接観察する本手法の持つ利点である。また、今後はケモメトリクス分野で提案されているセルフモデリングカーブレゾリューション (Self-Modeling Curve Resolution ; SMCR) 法の適応も検討したい。このSMCR法は、複数成分の混合物の実測スペクトルを混合物構成成分それぞれの純スペクトルとその濃度情報に分解し、複数成分の検量を行う手法である[21]。血液ないしは血漿のような複数成分の混合物の計測において、SMCR法は有望と考えられ、差分吸光スペクトラムの分析にSMCR法を用いることができるかどうか、今後実験的に検討・検証を行う予定である。

4.2 差分吸光度計測

一般に、ケモメトリクスなどの分野では絶対吸光度計測が多く用いられる。絶対吸光度計測の重要性は、物性について考察する場合には明らかであるが、実際の応用においては差分吸光度の計測だけで十分である場合も多いと考えられる。また、血中アルブミン濃度のような絶対吸光度計測においては微小な変動しか現れない変化を検出するためには、差分吸光度情報こそが重要と考えられる。たとえば、血漿あるいは血清の吸光度を考えた場合、水ないしは生理食塩水との差分情報を計測することによって、より精密な計測が可能となる場面が考えられる。単純のために、とある波長における差分吸光度の計測について、以下に考察する。

とある測定物質と参照物質の吸光度の差分を計測する場合を考える。参照物質に光量 I_0 を入射した場合の透過光量を I_r 、測定物質に同一の光量 I_0 を入射した場合の透過

光量を I_m とすれば, $\log_{10}(I_m/I_r)$ で表わされる量は式 (1) のように変形できる.

$$\log_{10}(I_m/I_r) = \log_{10}(I_m/I_o) - \log_{10}(I_r/I_o) \quad (1)$$

ここで式 (1) 右辺の $\log_{10}(I_m/I_o)$ は測定物質の吸光度, $\log_{10}(I_r/I_o)$ は参照物質の吸光度にほかならないから, ここで式 (1) 左辺の $\log_{10}(I_m/I_r)$ は測定物質と参照物質の吸光度の差分である. ここで, $\log_{10}(I_m/I_r)$ で示される測定物質と参照物質の吸光度の差分を計測するためには, 入射光 I_o の計測が不要であることに注意されたい.

通常の絶対吸光度の計測においては, 入射光と透過光の双方を計測しなければならないため, とくに吸光度の大きい領域においては透過光の光量が小さくなるために吸光度の測定分解能を密にすることはできない. 一方, 差分吸光度の計測においては, 式 (1) 左辺に現れる I_m と I_r の双方を計測すればよい. 今回計測したアルブミンの場合などにおいては測定物質と参照物質の吸光度の差は小さいため, I_m と I_r の双方が計測可能な範囲で入射光量を増加させて計測することが可能となり, 入射光量が大きいほど I_m と I_r も大きくなるので差分吸光度の計測精度が高まるという実用上の利点がある. このように, 微小な吸光度の差に意味がある場合には, 一般的な絶対吸光度ではなく差分吸光度の計測も検討する価値があると言える.

4.3 無試薬計測の意義

生体物質の化学分析において用いられる試薬の多くは高価であり, 毒性のあるものも少なくない. 例えば Park らによれば, 韓国では医療用分析装置の運用コストのうち試薬の占める割合は試薬以外のコストの 50 倍以上であるという [2]. 国民医療費における試薬に関わる費用の割合やその適正さについてはほとんど論じられないことがないが, 試薬が不要な計測法が実用化されれば, 臨床検査のコストの大幅な低減が期待でき, 医療費の低減にも資することができる. また, 一般に血漿中のアルブミンの定量は, 色素 Bromocresol Green (BCG, 和名: プロモクレゾールグリーン, 分子式: $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) を用いるが [22], この色素は毒性は低いものの皮膚への刺激を起こす物質とされ, 臭素化合物であることから取り扱いや廃棄には注意が必要である. 無試薬での生体物質の定量・計測が可能となれば, 臨床検査の過程で不可避な廃棄物による環境負荷を減ずることが可能となり, その意義は大きい.

4.4 アルブミン計測の意義と *in vivo* 計測への発展

現在, 血中成分の計測には侵襲的な採血が必須である. 血液分析法の発達によって, 必要とされる採血量は減少しているが, 最も理想的には, 血中成分計測は非侵襲的手法により行われることが望ましい. これまでにわれわれは, 多波長で計測した光電脈波の多変量解析によって血糖値を非侵襲で計測する方法を開発し, Pulse glucometry と名付けて研究を進めている [23-26]. Pulse glucometry は, グルコースの吸光度ピークが近赤外領域に存在することを

その機序としており, アルブミンも近赤外領域に吸光度ピークを持つなら, Pulse glucometry 同様の方法によって血中アルブミン濃度を計測することが期待できる. 本研究は, Pulse glucometry を血中アルブミン計測に発展させるための基礎としても考えることができ, 本研究によれば, アルブミンの主たる吸光度ピークは 1700 nm ないしは 2200~2400 nm 付近であることから, 今後, この領域の光電脈波を精度よく計測可能な装置を開発し, 血中アルブミンの非侵襲計測を試みる予定である.

血中でのアルブミンの半減期は約 14 日であり, このことからアルブミンは比較的長期の, 蛋白栄養状態を示す指標として知られ [22, 27], 低血中アルブミン状態は肺炎, 褥瘡 [28], 口腔健康状態 [29] などの様々なリスクであるほか, 要介護保険認定や死亡そのもののリスクであるともされている [30]. 血中アルブミンの非侵襲計測が可能となれば, 栄養状態の計測が簡便に可能となる可能性があり, 有用であるものと考えられる. また, 尿中のアルブミンは糖尿病性腎症の指標となるパラメータであり, 本研究の手法の尿中アルブミン計測への発展についても今後検討したい. 尿中アルブミンは, 放射性免疫測定法 (Radioimmunoassay, RIA) で計測されることがあり [22], 分光学的手法による計測が可能となれば, 放射性物質の使用を低減できるという意味からも望ましい. 尿中アルブミンの計測には, RIA に代わって放射性物質を用いない免疫比濁法 (Turbidimetric immunoassay, TIA) も実用化されたが [31], TIA においても抗原抗体反応を利用するために試薬は高価なものとならざるを得ず, より安価に計測が可能となる分光学的手法の開発の意義は大きい. ただし, 尿中アルブミンは血漿中アルブミンと比較して低濃度であり, 本研究よりも低濃度での検討が必要となる.

本研究では, 主たる血漿成分であるアルブミンの計測に関するものであるが, 今後はグロブリンや血中の脂質などの計測を行い, 試薬なしの血中成分計測や非侵襲血中成分計測へ展開したい.

5. 結 論

試薬を用いない分光学的手法による血中成分分析法の開発のために, 血漿の主たる成分であるアルブミン緩衝溶液の濃度の定量分析について, 波長 750~2500 nm の近赤外領域の吸光度分析を用いて検討を行った. 結果, アルブミン緩衝溶液の純水との差分吸光度を計測することによって, 1650~1750 nm 付近と 2150~2350 nm 付近に正の吸光度ピークを観察することができ, 差分吸光度スペクトラムの多変量回帰分析によって, アルブミン緩衝溶液濃度を推定可能な定量回帰モデルを得ることができた. また, アルブミンとグルコースの混合リン酸緩衝溶液においても, 差分吸光度スペクトラムからアルブミン緩衝溶液濃度を推定可能な回帰モデルを得た. この結果は, 試薬を用いない

血中成分分析法や非侵襲血中成分分析法のための基礎を与えるものと考えられた。

謝辞 本研究の実施にあたってご協力を頂いた金沢大学自然科学研究科大学院生・野本大貴氏，岡田拓也氏，金沢大学工学部・斎藤淳夫氏に深謝したい。また，本研究の一部は，科学研究費補助金・基盤研究（A）(21240047) および基盤研究（B）(20300195) の助成を受けたものである。

文 献

- Bittner A, Marbach R, Heise HM: Multivariate calibration for protein, cholesterol and triglycerides in human plasma using short-wave near infrared spectrometry. *J Mol Struct.* **349**(1): 341-344, 1994.
- Hahn S, Yoon G, Kim G, Park SH: Reagentless determination of human serum components using infrared absorption spectroscopy. *J Opt Soc Korea.* **7**(4): 240-244, 2003.
- 林孝: 特開 2002-168775, 2002.
- Severinghaus JW, Astrup PB: History of blood gas analysis. VI. Oximetry. *J Clin Monit Comput.* **2** (4): 1387-1307, 1986.
- Drabkin DL, Austin JH: Spectrophotometric studies. V. Technique for analysis of undiluted blood and concentrated hemoglobin solutions. *J Biol Chem.* **112**: 105-115, 1935.
- Murayama K, Yamada K, Tsenkova R, Wang Y, Ozaki Y: Near-infrared spectra of serum albumin and g-globulin and determination of their concentrations in phosphate buffer solutions by partial least squares regression. *Vib Spectrosc.* **18**: 33-40, 1998.
- Hall JW, Pollard A: Near-infrared spectroscopic determination of serum total proteins, albumin, globulins, and urea. *Clin Biochem.* **26**(6): 483-490, 1993.
- Haaland DM, Robinson MR, Koepp GW, Thomas EV, Eaton, RP: Reagentless near-infrared determination of glucose in whole blood using multivariate calibration. *Appl Spectrosc.* **46**(10): 1447-1592, 1992.
- Hall JW, Pollard A: Near-infrared spectrophotometry: a new dimension in clinical chemistry. *Clin Chem.* **38**: 1623-1631, 1992.
- van Toorenbergen AW, Blijenberg BG, Leijnse B: Measurement of total serum protein by near-infrared reflectance spectroscopy. *Clin Chem Lab Med.* **26** (4): 209-212, 1988.
- Peuchant E, Salles C, Jensen R: Determination of serum cholesterol by near-infrared reflectance spectrometry. *Anal Chem.* **59**(14): 1816-1819, 1987
- 山田尚之, 窪田和幸, 河上麻美, 鈴木榮一郎: アルブミンの化学構造と機能および翻訳後修飾による変化. 栄養 評価と治療. **24**(2): 110-115, 2007.
- Heise MH, Küpper L, Butvina LN: Attenuated total reflection mid-infrared spectroscopy for clinical chemistry applications using silver halide fibers. *Sensors and Actuators B: Chemical.* **51** (1): 84-91, 1998.
- Rein AJ, Saperstein DD, Pines SH, Radlick PC: Blood plasma investigations by resonance raman spectroscopy: Detection of carotenoid pigments. *Cell Mol Life Sci.* **32** (10): 1352-1354, 1976.
- Maeda H, Ozaki Y, Tanaka M, Hayashi N, Kojima T: Near infrared spectroscopy and chemometrics studies of temperature-dependent spectral variations of water: relationship between spectral changes and hydrogen bonds. *Near Infrared Spectrosc.* **3**(1): 191-201, 1995.
- Wold S, Sjostrom M, Eriksson L: PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics Intell Lab Syst.* **58** (2): 109-130, 2001.
- Ihaka R, Gentleman R: R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graphical Stat.* **5** (3): 299-314, 1996.
- 岩元陸夫, 河野澄夫, 魚住純: 近赤外分光法入門. 幸書房, 東京, 1995.
- 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄: 化学者のための多変量解析. 講談社, 東京, 2002.
- Beebe K, Pell R, Seasholts M: Preprocessing. *In*: Beebe K, Pell R, Seasholts M, Eds. *Chemometrics: a practical guide.* Wiley, New York, 1998. pp. 26-55.
- Jiang JH, Ozaki Y: Self-modeling curve resolution (SMCR): principles, techniques and applications. *Appl Spectrosc Rev.* **37**(3): 321-345, 2002.
- 金井正光(編): 臨床検査法提要 改訂第 32 版. 金原出版, 東京, 2005.
- Yamakoshi K: International Patent No. PCT/JP03/03587, 2003.
- Yamakoshi K and Yamakoshi Y: Pulse glucometry: a new approach for noninvasive blood glucose measurement using instantaneous differential near-infrared spectrophotometry. *J Biomed Optics.* **11** (5): 054028, 2006.
- 山越康弘, 小川充洋, 山越健弘, 田村俊世, 山越憲一: 近赤外瞬時差分分光法による非観血的血統計測のための多変量校正モデルの検討. 生体医工学. **46**(1): 49-57, 2008.
- Yamakoshi Y, Ogawa M, Tamura T: Multivariate regression and classification models for estimation of blood glucose levels using a new non-invasive optical measurement technique named "Pulse-Glucometry". *The Open Optics Journal.* **3**: 63-69, 2009.
- Corti MC, Guralnik JM, Salive ME, Sorkin JD: Serum albumin level and physical disability as predictors of mortality in older persons. *JAMA.* **272** (13): 1036-1042, 1994.
- 美濃良夫: 褥瘡の栄養管理. 医学のあゆみ. **198** (13): 1108-1112, 2001.
- 葭原明弘, 岩崎正則, 宮崎秀夫: 口腔健康状態と血清アルブミンの関連. 新潟歯学会誌. **37**(2): 209-210, 2007.
- 東口みづか, 中谷直樹, 大森芳, 島津太一, 曾根稔雅, 寶澤篤, 栗山進一, 辻一郎: 低栄養と介護保険認定・死亡リスクに関するコホート研究 鶴ヶ谷プロジェクト. 日本公衆衛生雑誌. **55**(7): 433-439, 2008.
- Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, Hillege HL, Kema IP, Gans RO, de Jong PE, de Zeeuw D: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int Suppl.* (92): **S69-75**, 2004.

小川 充洋 (オガワ ミツヒロ)

1994 年早稲田大学大学院修士課程修了, 1998 年東京医科歯科大学大学院医学系研究科博士課程修了. 博士 (医学). 1998 年(財)長寿科学振興財団リサーチ・レジデント, 1999 年国立療養所中部病院長寿医療研究センター流動研究員, 同年, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所助手, 2005 年 Microvitae Technologies 社 (仏) 主席技師, 2006 年 TYT (株) 研究員, 2007 年(株)ユーシス取締役, 2010 年金沢大学博士研究員, 現在に至る. 無侵襲生体計測, バイオセンサなどの研究開発に従事.

日本生体医工学会, IEEE などに所属.



山越 憲一 (ヤマコシ ケンイチ)

1970 年早稲田大学理工学部機械工学科卒, 1972 年同大学院修士課程修了. 工学博士, 医学博士. 1972 年東京女子医科大学助手, 1974 年東京医科歯科大学助手, 1980 年同大講師, 同年北海道大学助教授, 1987 年オックスフォード大学客員教授, 1994 年金沢大学教授, 2002 年中国大連大学客員教授, 2003 年早稲田大学客員教授, 2008 年中国黒竜江大学客員教授, 現在に至る. 生体計測と制御, バイオメカニクス, 健康・福祉工学などの研究開発に従事.

日本生体医工学会, 計測自動制御学会, 日本機械学会, 日本臨床モニター学会, 国際医用生体工学会議, IEEE などに所属.



山越 健弘 (ヤマコシ タケヒロ)

2006 年福井大学大学院工学研究科博士後期課程修了. 博士 (工学). 2006 年金沢大学大学院自然科学研究科特任准教授に就任, 現在に至る. 生体計測と解析, 生体情報の無侵襲・無拘束計測法, 健康・福祉工学, スポーツ工学に関する研究に従事.

日本生体医工学会, 計測自動制御学会, 日本自動車技術会, IEEE Engineering in Medicine & Biology Society などに所属.



田中 志信 (タナカ シノブ)

1980 年早稲田大学理工学部応用化学科卒, 1987 年北海道大学大学院工学研究科博士課程修了. 工学博士. 1991 年英国キール大学客員研究員, 1992 年東京医科歯科大助手, 1995 年山形大学助教授, 1998 年金沢大学助教授, 2007 年金沢大学教授, 現在に至る. 生体情報の無侵襲・無拘束計測法, 福祉工学, バイオセンサなどの研究に従事.

日本生体医工学会, 日本機械学会, 計測自動制御学会, 日本バイオマテリアル学会, IEEE, 日本生理人類学会, 化学センサ研究会などに所属.

