近赤外分光法による非侵襲血糖値測定法の開発と
その食品血糖応答性測定への応用

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
国際地縁技術開発科学専攻
博士（学術）学位論文

上　平　安　紘

目 次

第１章　緒言 1
1.1　研究の背景 2
1.2　近赤外分光法の概要 4
1.3　近赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定に関する従来の研究 6
1.4　研究の目的 9
第２章　近赤外分光法を用いた *in vitro* でのグルコース濃度の定量 13
要　約 14
2.1　緒言 15
2.2　実験方法 17
2.2.1　試料の調製 17
2.2.2　スペクトル測定とデータ解析 18
2.3　結果および考察 18
第３章　非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼす要因 23
要　約 24
3.1　緒言 25
3.2　実験方法 25
3.2.1　実験１：スペクトル測定部位 26
3.2.2　実験２：測定プローブのサイズ 26
3.2.3　実験３：測定プローブの保持方法 27
3.2.4　実験４：スペクトル測定と血糖値測定の時間差 27
3.3　結果および考察 28
第４章　非侵襲血糖値測定法の GI 測定への応用 39
要　約 40
4.1　緒言 41
4.2　非侵襲血糖値測定用近赤外分光装置の開発 41

4.3　実験方法 42
4.3.1　スペクトル測定条件の探索 42
4.3.2　被験者専用血糖値検量モデルの開発 43
4.3.3　検査食の GI 測定 44
4.4　結果および考察 44
4.4.1　スペクトル測定条件 44
4.4.2　被験者専用血糖値検量モデル 46
4.4.3　検査食の GI 46
第 5 章　複数被験者での非侵襲 GI 測定 59
要　約 60
5.1　緒言 61
5.2　実験方法 61
5.3　結果および考察 62
第 6 章　結言 72
参考文献 78
謝　辞 84
関連論文の印刷公表の方法及び時期 86
付録（検量モデルの精度の評価法について） 87

第１章

緒　言

1.1　研究の背景

糖尿病は今や国際的に最も深刻な健康問題の 1 つである。国際糖尿病連盟（International Diabetes Federation : IDF）は 2003 年の全世界の糖尿病患者数を 1 億 9,400 万人と推定しており、さらに、この患者数が 2025 年には 3 億 3,300 万人にまで増加すると予測している [1)]。我が国においても、厚生労働省が平成 19 年 11 月に行った調査で糖尿病患者及びその予備軍は 2,210 万人に上ると推計されており [2)]、平成 14 年の 1,620 万人からおよそ 36 %も増加している [3)]。糖尿病患者は少なくとも 1 日 4 回の血糖値測定を行い、合併症予防のために血糖値の変化を管理しなければならない。現在、その管理の主な手段は自己血糖測定(self-monitoring of blood glucose : SMBG)であり、指などを針で穿刺して採血しなければならず、患者は煩わしさとともに精神的ストレスと苦痛を余儀なくされる。そのため、患者の精神的・身体的苦痛の解消と感染症予防の観点から、採血の必要がない非侵襲的な血糖値測定法が強く求められている。

また、近年では生活習慣病予防の観点から食生活の改善に関心が寄せられ、食品の血糖応答性を示すグリセミック・インデックス(GI)が注目されている。GI は 1981 年に Jenkins ら [4)]によって提唱された指標で、空腹状態で糖質 50 g 相当量の検査食を摂取した際の 2 時間後までの血糖上昇曲線下面積(the incremental area under the blood glucose response curve : IAUC)を、基準食(主にグルコース)を摂取した際の血糖上昇曲線下面積に対する割合で表した値である(図 1.1)。低 GI 食品は血糖値の上昇が緩やかで、そのピーク値が低く、血糖上昇曲線下面積が小さいことを意味する。そのため、低 GI 食品はインスリン分泌とインスリン感受性の低下を起こしている糖尿病患者にとって膵臓の負担を軽減する意味から注目されている [5)]。しかし、GI 測定では被験者 1 名につき数 10 回もの採血が必要となることから、非侵襲的な血糖値測定法の確立が求められている。

非侵襲血糖値測定は様々な手法により研究されており [6~7]、中でも近赤外分光法は有望な技術であるが [7]、長年多くの研究機関や企業によって研究が為されてきたにも関わらず、未だ日本の薬事承認あるいは米国の FDA 承認を受けた非侵襲血糖計は存在しないのが現状である。

1.2　近赤外分光法の概要

近赤外光は、可視光と赤外光の間にあって、上限、下限ともに波長の限界は明瞭ではないが、一般に 800 nm から 2,500 nm の電磁波を指す[8]。この波長領域に現れる吸収は、水素原子が関与する OH、NH、CH の官能基によるものが主で、すべて赤外領域で観察される分子の基準振動の倍音または結合音による振動によって生じる。したがって、その吸収強度は基準振動に比べて小さく、吸収バンドはブロードである。また、様々な構成成分の吸収バンドが重なり合って現れるため、個々のバンドの帰属や解釈が困難な場合が多い。その一方で、近赤外光は物質透過性に優れており、測定試料の前処理を行わずに吸光度スペクトルの測定が行えるため、非破壊分析に応用することが可能である。近赤外領域では化学成分の吸収バンドが重なり合っていること、及び対象物が光散乱体であることが多いことから、一般の分光分析で使われる Lambert-Beer の法則による分光データの解析法は適用できない。このため、近赤外分光法の実用化に向けて特殊な分光データの解析法が必要とされ、これを支えたのが 1970 年代中頃に生まれたケモメトリックス(chemometrics)である。近赤外分光法におけるケモメトリックスとしては、線形重回帰(multiple linear regression : MLR)分析が基本的手法であり、これをさらに発展させた手法として、主成分回帰(principal component regression : PCR)、PLS 回帰(partial least square regression : PLSR)などが用いられる[9]。本論文で用いる PLS 回帰では、データに内在する仮想的な変量をファクターと呼び、スペクトルデータの中から目的特性の振る舞いをより良く説明する(目的変数との相関が高い)ファクターが順番に抽出される。したがって、回帰分析におけるファクターの取捨選択が不要であって、充分な性能を有する検量モデルが得られるまで、ファクターの抽出を繰り返せばよい。ただし、各種の要因によるデータ中の偶然的な相関がファクターの中に混入することは避けられず、それによるオーバーフィッティン

グが起きやすいため、検量モデルの精度の評価(バリデーション)を怠らないようにすることが特に重要である。近赤外領域の複雑なスペクトルにケモメトリックスを応用したことによって近赤外分光法は急速に広まり、今日では、農業、食品工業をはじめ、石油化学、製薬、医療など、様々な分野でその応用技術が普及している。

1.3　近赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定に関する従来の研究

近赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定に関する従来の研究は、光の透過性が高い短波長領域(700～1,300 nm)を用いる方法と、生体組織を数 mm 程度しか透過しない長波長領域(1,300～2,500 nm)を用いる方法との 2 つに大別される。短波長領域では、主に CH の第 3 倍音、第 4 倍音あるいは OH の第 2 倍音が観測され、真皮組織や皮下組織内の間質液(interstitial field : ISF)や動脈血、静脈血、毛細管血中のグルコースの情報が得られる。しかしながら、第 3 倍音、第 4 倍音の吸収は微弱でバンドがブロードであるため、帰属が困難であるという問題がある。一方、長波長領域では、主に CH あるいは OH の第 1 倍音および第 2 倍音が観測され、比較的シャープな吸収が得られるが、光透過性が低いため、主に真皮組織内の間質液や毛細管血中のグルコースの情報が得られる。以下に代表的な従来の研究の概要を示す。

Robinson らは、3 つの異なる構成の分光装置、すなわち、(a)フーリエ変換型装置、(b)回折格子型装置、(c)回折格子型で光ファイバープローブを備えた装置を用いて糖尿病患者 1 名の指の透過スペクトルを測定し、血糖値の非侵襲測定を行った。その結果、装置(a)で測定したスペクトル(600～1,300 nm)に PLS 回帰を適用した場合に最も良好な検量モデルが得られ、クロス・バリデーションによる予測平均絶対誤差(average absolute error of cross-validation : AAECV)は 19.8 mg/dL であった。ただし、血糖値定量において重要な波長は明らかにされていない[10]。

Fischbacher らは、糖尿病患者に対して、指の拡散反射スペクトル(850～1,350 nm)に、Radial basis function(RBF)ネットワークを適用して血糖値の非侵襲測定を行った。測定プローブの接触位置のずれなどにより生じるスペクトルの異常値を除いたことにより、クロス・バリデーションによる予測二乗平均平方根誤差(root mean square error of cross-validation : RMSECV)21.6

mg/dL という結果を得た[11]。また、彼らは同手法の長期的な精度の安定性について、10 名の糖尿病患者を対象に最長 169 日間にわたり収集したデータセットを用いて検証した結果、予測二乗平均平方根誤差(root mean square error of prediction : RMSEP)は 56～646 mg/dL であった。測定プローブの接触位置のずれや測定部位の状態変化(むれ、体温、血流など)が予測誤差悪化の原因と推察された[12]。

Heise らは、糖尿病患者 1 名に対して、下唇内側の拡散反射スペクトル(1,100～1,800 nm)に PLS 回帰を適用して血糖値の非侵襲測定を行った。彼らは回帰係数をもとに選択した 26～32 個の波長を用いて検量モデルを作成することで推定精度が向上すると報告した。この手法により得られた検量モデルの相関係数(R)は 0.95 で、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(standard error of cross-validation : SECV)は 36.4 mg/dL であった。彼らは、この実験で得られた回帰係数プロットが、*in vitro* でのヒト血漿中のグルコース濃度の定量で得られた回帰係数プロットに類似していたことを示した[13]。

Malin らは、前腕部の拡散反射スペクトル(1,050～2,450 nm)を用いて血糖値の非侵襲測定を行った。まず、7 名の糖尿病患者に対し 35 日間にわたって収集したデータセットに PLS 回帰を適用した結果、3 名の患者において良好な検量モデルが得られ、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 17～31 mg/dL であった。次に、3 名の健常人に経口グルコース負荷試験を行い、2 回分のデータで検量モデルを作成し、別の 1 回分のデータの推定を行った結果、バイアスを補正した予測標準誤差(standard error of prediction : SEP)は 17～20 mg/dL であった[14]。

Burmeister らは、糖尿病患者 5 名に対し、舌の透過スペクトル(1,430～2,000 nm) に PLS 回帰を適用して、被験者ごとの非侵襲血糖測定用検量モデルを作成した。被験者 1 名に対して相関係数(R)0.70、バイアスを補正した予測標準誤

差(SEP)61.2 mg/dL という結果が得られたが、他の被験者では検量モデルが作成できなかった[15]。

Maruo らは、モンテカルロ法による皮膚組織内光伝播シミュレーションをもとに設計した測定プローブ(測光用光ファイバーバンドルを中心に半径 0.65 mm の円周上に 12 点の照射用光ファイバーバンドルを配置)を用いて、前腕部真皮組織の拡散反射スペクトル(1,300～2,500 nm)を選択的に測定する手法により血糖値の非侵襲測定を行った。6 名の被験者を対象に経口グルコース負荷試験を 5 回から 6 回実施し、最後の 1 回分を推定用として、PLS 回帰により被験者ごとの検量モデルを作成した。被験者 6 名分のバイアスを補正した予測標準誤差(SEP)の平均値は 23.7 mg/dL であり、グルコースの特異吸収波長である 1,600 nm の吸光度が重要であることを指摘した[16]。また、彼らは数値シミュレーションで合成した吸光度スペクトルを用いることによって、被験者ごとの検量モデルを瞬時に作成する手法を提案し、被験者 1 名から 3 回に分けて収集したデータセットで検量モデルの評価を行った結果、相関係数(R)0.87、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)12.3 mg/dL という良好な結果を得た[17]。さらに、彼らはこの手法を用いて、健常人 5 名、ICU 患者 7 名の非侵襲血糖値モニタリングを行い、相関係数(R)の平均値 0.71 及び 0.97、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP) の平均値 28.7 mg/dL 及び 27.2 mg/dL という結果を得た[18]。

このように多くの研究が為されているにも関わらず、非侵襲血糖値測定は未だ実用化されていないのが現状である。

1.4　研究の目的

非侵襲血糖値測定の実用化において最大の障壁となるのは測定精度の問題である。従来の研究の多くは、1 名の被験者専用に作成した検量モデルの測定誤差が 20～30 mg/dL 程度であり、臨床的精度である 10 mg/dL には達していない。近年、Maruo ら [17]によって提案された“数値シミュレーションで合成した吸光度スペクトルを用いて被験者専用の検量モデルを瞬時に作成する手法”では、ある被験者について測定誤差 12 mg/dL 程度を実現しているが、被験者によって測定誤差にばらつきが生じる(健常人 5 名の平均誤差が 28.7 mg/dL)。また、測定精度には日間差も大きく影響し、長期的な安定性の確保も課題の一つである [12]。個人差や日間差による様々な要因の変動を補正することができ、測定誤差 10 mg/dL 程度の精度がいつでも誰に対しても保証できることが実用化への条件となる。

このようなサンプルの個体差や日間差による変動をクリアし、実用化されている近赤外分光法を用いた定量技術が存在する。それは、桃やみかんなどの果実糖度の非破壊測定法である [19~20]。この方法は、近赤外短波長領域(700～1,000 nm)のうちの 4 波長程度の吸光度を変数とした線形重回帰モデルにより実現されている。第 1 波長(最も寄与率の高い波長)に選ばれるのは必ず“糖の吸収に関連する波長”である。当該技術では、キャリブレーション用データセットにあらかじめサンプルの個体差や日間差による変動を含めることで汎用性の高い検量モデルの開発に成功している。

そこで、本研究では、次の 3 点を研究の目的とする。

1. 果実非破壊糖度選別機の開発で得られた技術を応用するという新しいアプローチにより、近赤外短波長領域を用いた非侵襲血糖値測定法を開発する。
2. 近赤外短波長領域の吸光度スペクトルを用いて、“糖(グルコース)の情報

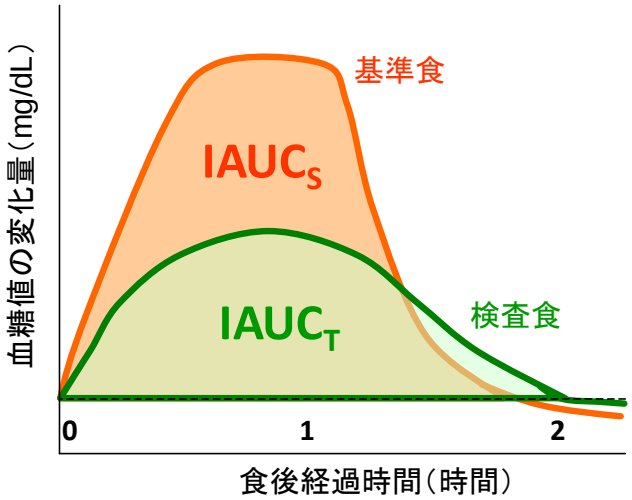
に基づく検量モデル”が作成できるかどうかという点について検証する。

3. 開発した非侵襲血糖値測定法を食品の GI 測定に応用し、実用化の可能性を探る。

従来の研究では近赤外長波長領域(1,300～2,500 nm)が多く用いられているが、光の浸透性が低いため、狭い測定領域を厳密なコントロールのもとで測定したスペクトルを解析しなければならない。そのため、測定時の様々な要因のわずかな変化がスペクトル変動を生じさせ、測定誤差を大きくしてしまう。一方、短波長領域では光の浸透性が高く測定領域を広く確保できるため、比較的ラフな条件での測定が可能となるが、前述したとおり、吸収バンドの帰属が困難であるという問題がある。そのため、短波長領域ではグルコースの濃度変化に伴う生体組織の散乱係数の変化から血糖値を定量する方法 [21]も研究されているが、*in vivo* 測定ではグルコースの濃度変化に由来する僅かな散乱変化を選択的に捉えることは難しく、現時点では十分な精度は得られていない。近赤外短波長領域を用いた非侵襲血糖値測定法の開発においては、得られた検量モデルが偶然の相関によるものではなく、“糖(グルコース)の情報に基づく”ものであることを検証することが重要である。また、過去に非侵襲血糖値測定法を食品の GI 測定に応用した例は見られず、医療現場での応用の前段階として、GI 測定での実用化の可能性を探る。

本論文は、第 1 章の緒言に続き、第 2 章では、基礎段階として実施した *in vitro* でのグルコース濃度の定量実験から得られた知見について解説する。この実験では、近赤外短波長領域の吸光度スペクトルを用いた *in vitro* のグルコース濃度検量モデルの精度及び重要波長を検証するとともに、*in vivo* における測定誤差 10 mg/dL 程度の実現の可能性について検討する。第 3 章では、近赤外分光法による非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼす要因について検討し、検量モデルを作成する上で重要となる条件に関して得られた知見を解説するとともに、

最良の条件下で作成した検量モデルの測定精度及び構造について解説する。第 4 章では、第 3 章で得られた知見をもとに開発した非侵襲血糖値測定用近赤外分光装置を用いて、1 名の被験者を対象に実施した非侵襲 GI 測定実験から得られた知見について解説する。第 5 章では、第 4 章の非侵襲 GI 測定実験を複数の被験者を対象に実施し、測定精度の個人差や日間差に関して得られた知見を解説する。第 6 章では、本研究を通じて得られた知見を総括し、結論を記述する。



$$GI = (IAUC_T / IAUC_S) \times 100$$

IAUC: the incremental area under the blood glucose response curve
(血糖上昇曲線下面積)

図 1.1　グリセミック・インデックスの測定方法

第 2 章

近赤外分光法を用いた *in vitro* での

グルコース濃度の定量

要　約

本章では、微量成分である血中グルコース濃度の定量の可能性を探るため、近赤外短波長領域(700～1,100 nm)を用いて *in vitro* でのグルコース濃度の定量を行った。試料には、グルコースと牛血清アルブミン(bovine serum albumin : BSA)に、光散乱を増幅させるために均質化された牛乳を加えた混合溶液を用いた。グルコースと BSA はヒト血液中の濃度に近い範囲でそれぞれ 10 段階と 4 段階で変化させた。牛乳の濃度は全ての試料において一定とした。試料セルには試験管を用い、透過法で測定したスペクトルに PLS 回帰を適用して、グルコース濃度の検量モデルを作成した結果、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)が 39.6 mg/dL という良好な検量モデルが得られた。検量モデルの回帰係数プロットにおける 922 nm と 990 nm のピークが水和グルコースの 2 つの吸収ピーク(920 nm と 988 nm)とほぼ一致していたことから、得られた検量モデルはグルコースの情報を含んでいるものと考えられた。

この実験により、近赤外短波長領域を用いてグルコース濃度を 0.01 %(10 mg/dL)オーダーで定量できる可能性が示唆されたとともに、グルコース濃度を定量するための主要吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)が明らかとなった。

2.1　緒言

本章における *in vitro* でのグルコース濃度の定量は、*in vivo* での非侵襲血糖値測定の前段階として、グルコース濃度の定量に用いる吸収バンドの帰属や血糖値定量の技術的な可能性の検証等を行うために重要な意味を持つ。

近赤外分光法によるグルコース濃度の定量を *in vitro* で行った従来の研究には以下のようなものがある。

Hazen らは、グルコース水溶液中のグルコース濃度の定量分析を、1,520～1,810 nm の波長領域において 3 つの異なる光路長(2 mm、5.2 mm、10 mm)を用いて測定した透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行い、それぞれのバイアスを補正した予測標準誤差(SEP)が 14.6 mg/dL、7.4 mg/dL、6.1 mg/dL という結果を得た。この結果は、光路長が長くなるほど測定精度が向上することを示唆している [22]。

Golic らは、グルコース水溶液中のグルコース濃度の定量分析を、700～1,050 nm の波長領域の透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行い、相関係数(R)0.997、クロス・バリデーションによる予測二乗平均平方根誤差(RMSECV)1.22 % (w/w)という結果を得た。回帰モデルに取り込まれた 910 nm と 760 nm の吸収はグルコースの CH の第 2 倍音と OH の第 3 倍音に帰属すると考察した [23]。

Shaffer らは、グルコース・中性脂肪・牛血清アルブミンの混合溶液中のグルコース濃度の定量分析を、2,000～2,500 nm の波長領域の透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行い、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)11.8 mg/dL という結果を得た [24]。

Kasemsumran らは、グルコース・ヒト血清アルブミン・γ - グロブリンの混合溶液における多成分同時定量分析を、834～2,500 nm の波長領域の透過スペクトルに Moving window partial least square(MWPLS)回帰を適用して行

い、インフォメイティブ・リージョンである 2,035～2,325 nm を用いた検量モデルにおいて予測二乗平均平方根誤差(RMSEP)15.6 mg/dL という結果を得た[25]。

Hazen らは、ヒト血清中のグルコース濃度の定量分析を、2,000～2,500 nm の波長領域の透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行い、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)23.3 mg/dL という結果を得た。さらに、19 ヶ月後に新たに採取したヒト血清を用いてモデルの精度を評価した結果、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)は 44.7 mg/dL であった[26]。

Heise らは、血漿中のグルコース濃度の定量分析を、1,400～2,400 nm の波長領域のシングルビームの対数データに PLS 回帰を適用して行い、相関係数(R)0.969、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)16.2 mg/dL という結果を得た[27]。

Turza らは、牛全血中のグルコース濃度の定量分析を、700～1,000 nm の波長領域の透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行い、相関係数(R)0.78、検量モデルの標準誤差(SEC) 7.3 mg/dL、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV) 8.3 mg/dL という結果を得た[28]。

Haaland らは、ヒト全血中のグルコース濃度の定量分析を、1,516～2,353 nm の波長領域の透過スペクトルに PLS 回帰を適用して行った。4 名の被験者ごとに作成した 4 つの検量モデルにおけるクロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)の平均値は 32.9 mg/dL であり、4 名を合わせて作成した 1 つの検量モデルでは 38.6 mg/dL であった。しかし、3 名の被験者で作成した検量モデルで残りの 1 名の推定を行った場合のバイアスを補正した予測標準誤差(SEP)は 177 mg/dL と大きく、被験者間の光学的及び血液化学的特性の違いによる測定誤差の発生が今後の課題であるとした[29]。

Amerov らは、全血中のグルコース濃度を結合音領域(2,062～2,381 nm)、第 1 倍音領域(1,551～1,755 nm)、短波長領域(1,177～1,370 nm)のそれぞれの波

長領域で測定したスペクトルで定量し、結合音領域と第 1 倍音領域においてはグルコースの情報を選択的に活用した検量モデルが得られ、短波長領域では赤血球がグルコースを取り込むことによって生じる光散乱の違いに基づく検量モデルが得られた[30]。

以上のような従来の研究の中で、近赤外短波長領域(700～1,100 nm)を用いて *in vitro* でのグルコース濃度の定量を行った研究は少ない。それは、短波長領域で観察される吸収は微弱でブロードな吸収バンドが重なり合って現れるため、微量のグルコースから発せられる吸収信号を有効に活用することが困難であると考えられているからである。また、短波長領域のスペクトルを用いた検量モデルはグルコースそのものの情報ではなく散乱情報に基づくものである[30]との指摘があるからであろう。しかしながら、果実の非破壊糖度測定[19~20]においては短波長領域の近赤外光が利用されており、この領域でもグルコースの情報に基づいた検量モデルが得られるはずである。そこで、本実験では、試料の光散乱を増幅させることによって光路長を伸ばした場合の検量モデルの構造及び測定精度のオーダーについて確認を行った。

2.2　実験方法

2.2.1　試料の調製

本実験に用いた試料は、グルコース、牛血清アルブミン(bovine serum albumin：BSA)、牛乳の混合試料であり、試料の調製には、グルコース(和光純薬工業社，日本)、BSA(シグマ アルドリッチ ジャパン社，日本)、均質化(ホモジナイズ)された市販の牛乳、リン酸緩衝溶液(pH 7.4、0.1 M)を用いた。リン酸緩衝溶液は Milli-Q システム(18.2 MΩ·cm)で精製した水を用いて調製した。牛乳は、光散乱を強めて光路長を伸ばす光散乱体として用いた。

グルコース濃度は 1～19 mM(18～342 mg/dL)まで 2 mM 間隔、10 段階で変

化させ、BSA 濃度は 2～5 g/dL まで 1 g/dL 間隔、4 段階で変化させた。したがって、全ての濃度の組み合わせは 40 通りである。1 組の濃度の組み合わせにつき 2 つの試料を作成し、合計 80 個の試料を準備した。グルコース及び BSA 濃度はヒト血液中の濃度に近い値である。試料調製では濃度を正確に調製するためグルコース濃度の単位に mM を用いたが、以降は mg/dL に変換して記述する。牛乳の濃度は全ての試料において一定とした。

2.2.2　スペクトル測定とデータ解析

試料の透過吸光度スペクトル(波長領域 700～1,100 nm)は、市販の近赤外分光装置 NIRSystems6500(Foss NIRSystems 社，米国)を用いて測定した(測定間隔：2 nm，積算回数：50 回，測定時間：25 秒)。試料セルには過去の牛乳実験 [31]と同様、市販のキャップ付パイレックスガラス試験管(旭硝子社，日本)を用いた。ガラス試験管の厚さは 1.2 mm、内径は 17.6 mm である。リファレンスには厚さ 3 mm のアルミナセラミック板を用い、5 つの試料測定につき 1 回のリファレンス測定を行った。試料の温度を安定させるため、スペクトル測定前に試料が入った試験管を 25.0 ± 0.1°C のウォーターバスに 20 分以上浸した。スペクトル測定はランダム順で行った。濃度の組み合わせが重ならないよう、80 個の試料を 40 個ずつに分割し、一方をキャリブレーション用、もう一方をバリデーション用とした。データ解析は多変量解析専用のソフトウェア The Unscrambler プログラム(CAMO 社，ノルウェー)を用いて行い、スペクトルの前処理として Savitzky-Golay 法による 2 次微分(窓サイズ：29 ポイント，多項式次数：2)を適用し、検量モデルの作成には PLS 回帰を用いた。

2.3　結果および考察

グルコース・BSA・牛乳の混合試料中のグルコース濃度測定用キャリブレーションおよびバリデーションの結果を表 2.3 に示す。バイアスを補正した予測

標準誤差(SEP)39.6 mg/dL の良好な検量モデルが得られた。この検量モデルがグルコースの情報に基づいているかどうかを確認するため、回帰係数プロット(図 2.3.1)を検証する。回帰係数は PLS 回帰により推定される値で、検量モデルに強く影響している波長あるいは吸収バンドを示したものである。今回のモデルは 2 次微分スペクトルを用いているため、回帰係数プロットにおいて、グルコースに関連する吸収バンドに負のピークが観察されなければならない。図 2.3.2 に粉末グルコースと水和グルコースの 2 次微分スペクトルを示す。水和グルコースのスペクトルはグルコース水溶液のスペクトルから水のスペクトルのみを差し引いたものである。920 nm にピークを持つ吸収バンドは粉末と水和両方のスペクトルで観察されるため、CH の第 3 倍音によるものと考えられる [32]。一方、988 nm にピークを持つ吸収バンドは水和グルコースのみで観察されるため、水素結合した OH の第 2 倍音によるものと考えられる [23]。改めて回帰係数プロットを見てみると、922 nm と 990 nm の負のピークが水和グルコースの 2 つの吸収バンドのピークとほぼ一致していることがわかる。したがって、得られた検量モデルはグルコースの情報を含んでいるものと考えられる。回帰係数プロットにおける 920 nm 付近のピークは牛血漿中のグルコース濃度測定用検量モデルの回帰係数プロットにおいても観察される [28]。また、桃 [19] やみかん [20]の糖分及び玉葱のドライマター[33]の非破壊測定においても 920 nm 付近の波長が主要波長として利用されている。

以上の実験により、近赤外短波長領域に存在する 920 nm と 988 nm にピークを持つグルコースに関連する 2 つの吸収バンドがグルコース濃度を定量するために重要であることが明らかとなった。また、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)39.6 mg/dL という結果は、*in vivo* でのグルコース濃度の定量において 10 mg/dL オーダーでの測定の可能性を示唆している。

表 2.3　グルコース・BSA・牛乳の混合試料中のグルコース濃度測定用キャリブレーションおよびバリデーション

波長領域	F	R^2	SEC (mg/dL)	SEP (mg/dL)	Bias (mg/dL)
700～1,100 nm	7	0.95	23.8	39.6	-0.30

F：ファクター数

R^2：決定係数

SEC：検量モデルの標準誤差

SEP：バイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

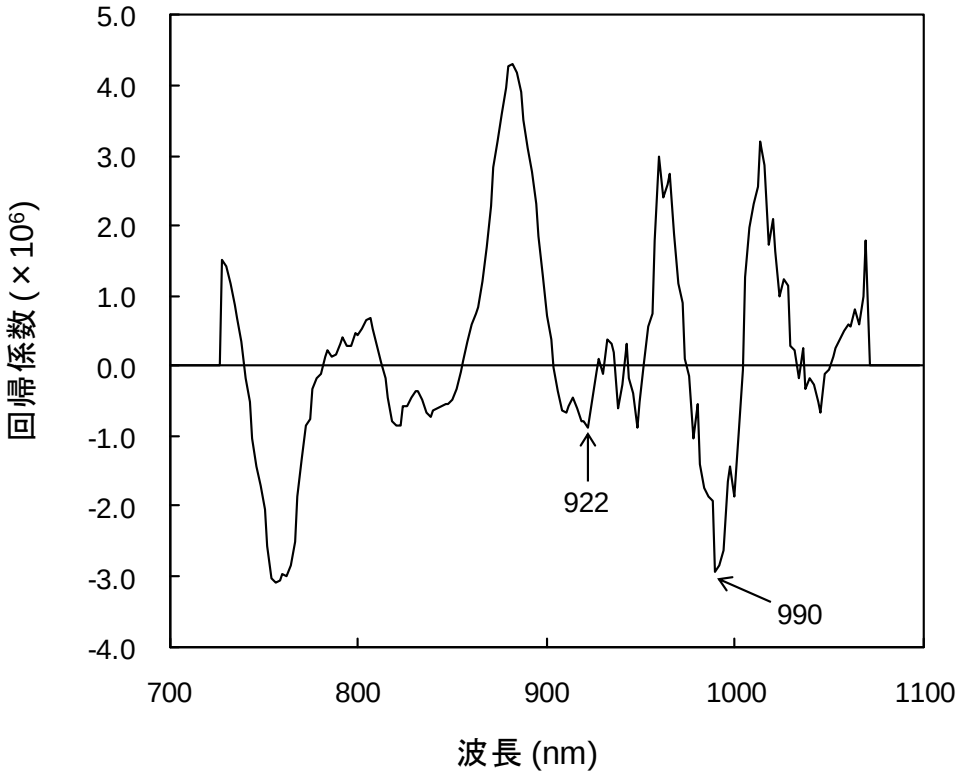


図 2.3.1　グルコース・BSA・牛乳の混合試料中のグルコース濃度測定用検量モデルの回帰係数プロット

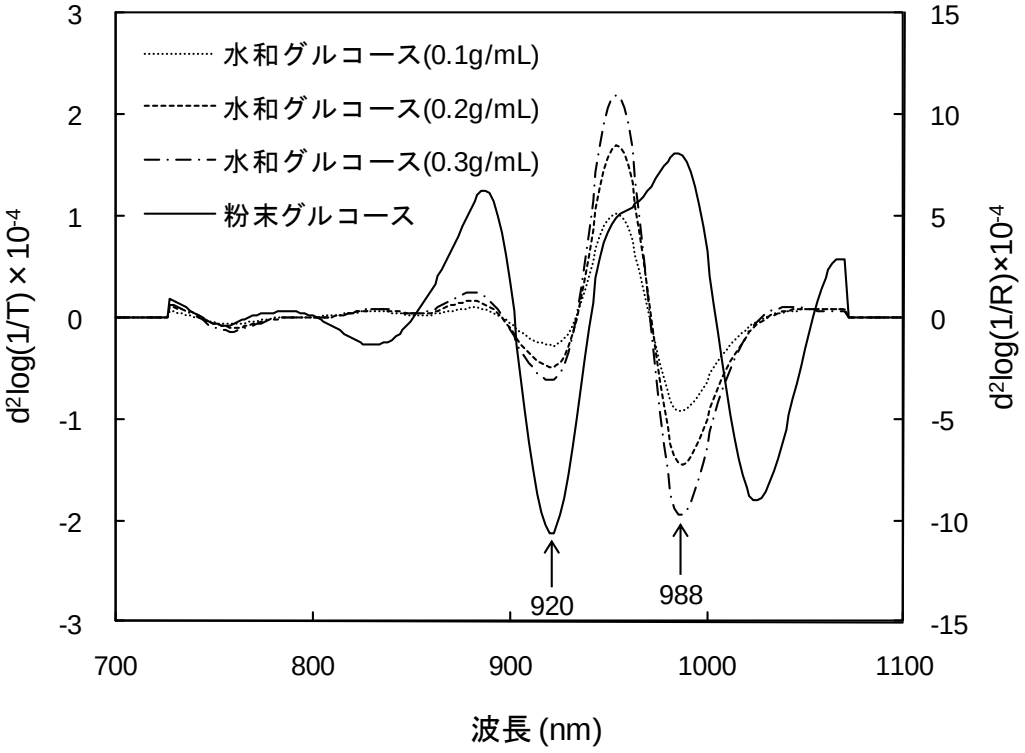


図 2.3.2　粉末グルコースおよび水和グルコース(濃度 3 段階)の
2 次微分スペクトル

(単位)　粉末グルコース：$d^2\log(1/R)\times10^{-4}$
水和グルコース：$d^2\log(1/T)\times10^{-4}$

第 3 章

非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼす要因

要　約

本章では、近赤外分光法による非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼすと考えられる 4 つの要因、すなわち、(1)スペクトル測定部位、(2)測定プローブのサイズ、(3)測定プローブの保持方法、(4)スペクトル測定と血糖値測定の時間差について、それぞれ 2 通りの方法を比較し、検量モデルを作成する上で適切な方法を探索した。その結果、手の平(小指球)の拡散反射スペクトル(700～1,100 nm)を台に固定したインタラクタンス型測定プローブ(大)を用いて測定し、同時に血糖値測定を行う方法により、最も良好な検量モデルが得られることが明らかとなった。得られた検量モデルの決定係数(R^2)は 0.85、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 9.7 mg/dL であり、臨床的測定精度を有していた。また、検量モデルの回帰係数プロットに見られる 918 nm と 984 nm の負のピークは、第 2 章で示したグルコースに関連する吸収バンドのピーク(920 nm と 988 nm)とほぼ一致しており、得られた検量モデルはグルコースの情報に基づくものであると考えられた。第 2 章の *in vitro* でのグルコース濃度の定量と同様、*in vivo* での非侵襲血糖値測定においても、近赤外短波長領域に存在するグルコースに関連する吸収バンドが有効に利用できることが示された。

今回得られた検量モデルは、クロス・バリデーションではバイアスが小さいが、プレディクション(別の日の測定)では推定値に大きなバイアスが生じる。しかし、GI 測定では空腹時からの相対値のみが得られれば良いためバイアス補正を行う必要がない。そのため、今回開発した非侵襲血糖値測定法は、臨床での血糖値測定よりも GI 測定へ応用する方が容易であるといえる。

3.1　緒言

近赤外分光法による定量において良好な結果を得るためには、目的の情報を含んだ安定したスペクトルを測定し、従来法による正確な実測値を得ることが重要である。本章では、非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼすと考えられる 4 つ要因、すなわち、(1)スペクトル測定部位、(2)測定プローブのサイズ、(3)測定プローブの保持方法、(4)スペクトル測定と血糖値測定の時間差に着目し、それぞれの要因について 2 通りの方法を比較することで適切な方法を探索した。そして、最適な条件で測定したスペクトルデータ及び血糖値データを用いて検量モデルを作成し、第 2 章の *in vitro* でのグルコース濃度の定量結果をもとに、得られた検量モデルの構造の解釈を行った。

3.2　実験方法

各要因における 2 通りの方法は、PLS 回帰により作成した検量モデルの結果で比較した。検量モデルのキャリブレーションデータセットは、健常人 1 名を対象に経口糖質負荷試験を実施して収集した。被験者には前日の夜から 8 時間以上絶食した朝に糖質 50 g 相当量の試験食を摂取させ、空腹時および摂取後 10 分あるいは 15 分、30 分間隔で食後 3 時間までの血糖値と近赤外スペクトルを測定した。血糖値測定は、実験 1 においてはグルコカードダイアメーター(アークレイ社，日本)を用いて行い、実験 2～4 はより精度の高いドライケム FDC300G(富士フィルムメディカル社，日本)を用いて行った。負荷試験は 1 日 1 回実施した。

生体組織のスペクトル測定には、果実の非破壊糖度測定[19]と同様のインタラクタンス型測定プローブ(3.2.2 項において詳細を記述する)を備えた市販の近赤外分光装置 NIRSystems6500(Foss NIRSystems 社，米国)を用いた。測定プローブを測定部位に対して垂直に接触させ、700～1,100 nm の波長領域の拡散

反射スペクトルを測定した(測定間隔：2 nm，積算回数：50 回，測定時間：25 秒)。標準物質にはテフロンを用いた。スペクトル測定の直前に測定部位と測定プローブを 31.0 ± 0.1 °C にコントロールしたドライバスに 30 秒間接触させ、温度を安定させた。

データ解析には The Unscrambler プログラム(CAMO 社，ノルウェー)を用いた。スペクトルデータには Savitzky-Golay 法による 2 次微分(窓サイズ：17 ポイント，多項式次数：2)を適用した。スペクトルと血糖値のデータセットに PLS 回帰を適用し、検量モデルを作成した。回帰分析において 1 つのサンプルの影響度を表す Cook's distance[34]が他に比べて有意に大きいサンプルを異常値として除外した。経口糖質負荷試験によって得られた経時的なデータセットを用いる場合、予期せぬ偶然の相関によって検量モデルが作成されてしまうことが懸念される[35]。そこで、本実験では、偶然の相関を回避するため、異なる日に実施した 2～4 回分の負荷試験から得られたデータセットを統合して検量モデルのキャリブレーションデータセットを作成した(表 3.2)。検量モデルの予測精度の評価はクロス・バリデーション(leave-one-out)[36]により行った。

3.2.1　実験 1：スペクトル測定部位

スペクトル測定部位として、手首と手の平(小指球部分)を比較した(図 3.2.1)。スペクトル測定中は測定プローブを右手で保持した。血糖値測定はスペクトル測定直後に行った。各測定部位において 4 回の負荷試験を行い、合計 40 個ずつのデータセットが得られた。

3.2.2　実験 2：測定プローブのサイズ

インタラクタンス方式の測定において、光の浸透する深さは照射部と測光部の距離によって調節することが可能である。照射部から照射され、測定対象物内部を拡散反射し、測光部まで達する光の伝播経路は“バナナ・シェイプ”と

呼ばれる特徴的な形状をとる。2 つの距離が長くなるほど光はより深くまで浸透し測定領域が広くなるが検出される光の強度は弱くなる。本実験では、照射用光ファイバーバンドルと測光用光ファイバーバンドルの距離が異なる 2 種類の測定プローブを比較した(図 3.2.2)。スペクトル測定部位は手の平(小指球部分)とし、各プローブにおいて 4 回の負荷試験を行い、合計 39 個ずつのデータセットが得られた。

3.2.3　実験 3：測定プローブの保持方法

測定プローブの保持方法は変動の少ない安定したスペクトルを測定するために重要である。特に、プローブの接触位置や圧力の変化は皮膚組織の光散乱に影響を与え、スペクトルのベースラインシフトや吸光強度の変化の原因となる。本実験では、測定プローブ(大)を“手で保持する方法”と“台に固定する方法”(図 3.2.3)を比較した。後者ではプローブ自体に自動温度調節器に接続されたラバーヒーターを巻き付けて温度を常に 31.0 ± 0.1 °C にコントロールした。スペクトル測定部位は手の平(小指球部分)とし、“手で保持する方法”において 2 回、“台に固定する方法”において 4 回の負荷試験を行い、合計 37 個ずつのデータセットが得られた。

3.2.4　実験 4：スペクトル測定と血糖値測定の時間差

糖質負荷試験中は血糖値が急速に変化する。我々の過去の実験では、2 分間に 15 mg/dL の変化が観測された。スペクトル測定と血糖値測定の間に時間差が生じると正確な実測値が得られず、検量モデルの測定精度が悪化する原因となる。本実験では、スペクトル測定の後に血糖値を測定する“順次測定(30 秒程度の時間差が生じる)”と 2 つの測定を同時に行う“同時測定(時間差は 1 秒以内)”を比較した。

スペクトル測定部位は手の平(小指球部分)とし、測定プローブ(大)を台に固定

する方法でスペクトルを測定した。順次測定においては 2 回の負荷試験を行い、合計 37 個のデータセットが得られた。同時測定においては 4 回の負荷試験を行い、合計 67 個のデータセットが得られた。

3.3　結果および考察

後述する最適な条件で測定した近赤外スペクトルを図 3.3.1(a)に示す。2 次微分スペクトル(図 3.3.1(b))において観察される 760 nm と 964 nm にピークを持つ顕著な吸収は、脱酸素化ヘモグロビン[37]と水[32]によるものである。この波長領域には 910 nm[23, 32]付近と 930 nm[32]付近に糖類の CH と CH_2 の第 3 倍音による吸収が存在するが、このスペクトルでは観察されなかった。各実験において PLS 回帰で得られた検量モデルの結果を表 3.3 に示す。

(1) スペクトル測定部位

手の平での測定の方が手首での測定よりも良好な結果が得られた。その理由としては、各部位の生体組織構造、特に血管の状態が影響していると考えられる。手の平の皮膚組織は動脈網から豊富な血液供給を受けており[38]、密集した毛細血管網は測定空間の情報を均一化するのに適している。一方、手首には皮膚の上からも確認できる静脈が通っており、微妙な測定部位のズレによって光が静脈を通過する経路に違いが生じ、スペクトル変動が生じると考えられる。

(2) 測定プローブのサイズ

非侵襲測定におけるグルコースの吸収信号は微弱であるため、光路長を十分長く確保する必要がある。したがって、測定領域が広く光路長が長い測定プローブ(大)の方が良好な結果が得られたと考えられる。

(3) 測定プローブの保持方法

測定プローブを“台に固定する方法”の方が良好な結果が得られた。その理

由としては、測定プローブを手で保持するよりもプローブの接触圧力が安定し、また、測定プローブ自体に自動温度調節器に接続されたラバーヒーターを巻き付けて温度を常に 31.0 ± 0.1 °C にコントロールしたことにより、変動の小さいスペクトルが測定できたためと考えられる。測定部位の温度変化によるスペクトル変動については、4.4.1 項でより詳しく記述する。

(4) スペクトル測定と血糖値測定の時間差

同時測定の方が良好な結果が得られたことから、正確な実測値を得るためにはスペクトルと血糖値を同時に測定することが重要であることが明らかとなった。

最適な条件で測定したデータセットを用いて作成した検量モデルの決定係数(R^2)は 0.85、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 9.7 mg/dL であり、全ての推定値はクラーク・エラー・グリッド分析 [39]の A 領域に入った(図 3.3.2)。情報の均一化に適した手の平のスペクトルを、測定プローブ(大)を用いて指先などの測定に比べ広範囲に測定したことが、従来の研究に比べて高い精度が得られた要因であると考えられる。この検量モデルが本当に血中濃度 0.1 %オーダーであるグルコースの情報に基づいているかどうかを検証するため、図 3.3.3 に示す回帰係数プロットをみると、918 nm と 984 nm に負のピークが確認できる。これらのピークは、第 2 章で示したグルコースに関連する吸収バンドのピーク(920 nm と 988 nm)とほぼ一致しており、得られた検量モデルがグルコースの情報を含んでいることを示している。また、回帰係数プロットで確認できる 746 nm の顕著なピークは、ヘモグロビンに関係するものと思われる。この付近の波長帯においては、酸素化、脱酸素化ヘモグロビンの吸光特性が異なることが知られており [37]、ヘモグロビンの吸光特性を利用してグルコースの濃度を定量した報告がある [40]。PLS 回帰を行う際に 700～800 nm の波長領域を除くと良好な検量モデルは得られないため、

746 nm 付近の情報も検量モデルの作成には重要であると考えられる。今回得られた検量モデルはバリデーションにおいて高い精度を示しているが、サンプル数が少なく汎用モデルとはいえないため、別の日に測定を行った場合(プレディクション)、大きなバイアスが生じる。バイアスの原因は、測定部位のずれ、プローブ接触圧力の変化、測定部位の状態(水分量、汗、血流、血中成分など)の変化、装置のドリフト、そして未知の要因の変動によるものと考えられる。これらをいつでもどこでも一定にコントロールすることは困難であるが、GI 測定のように、比較的室内の状態がコントロールしやすい実験室であれば未知の変動要因を極力排除でき、負荷試験中は測定部位を固定したまま動かさないことで変動の少ないスペクトルを測定することが可能である。また、GI 測定では空腹時からの相対値のみが得られれば良いため、負荷試験ごとにバイアス補正を必要としないことからも、今回開発した非侵襲血糖値測定法は、臨床での血糖値測定よりも GI 測定へ応用する方が容易であるといえる。

表 3.2　非侵襲血糖値検量モデルのキャリブレーションデータセット

要因	方法	サンプル数	血糖値 (mg/dL)			
			平均値	標準偏差	最小値	最大値
スペクトル測定部位	手首	40	114.7	22.3	79	152
	手の平	40	114.7	22.3	79	152
測定プローブのサイズ	小	39	135.7	20.4	97	171
	大	39	135.7	20.4	97	171
測定プローブの保持方法	手で保持	37	126.4	22.4	91	169
	台に固定	37	128.6	15.1	96	154
スペクトル測定と血糖値測定の時間差	約 30 秒	37	128.6	15.1	96	154
	1 秒以内	62	135.6	19.2	102	169

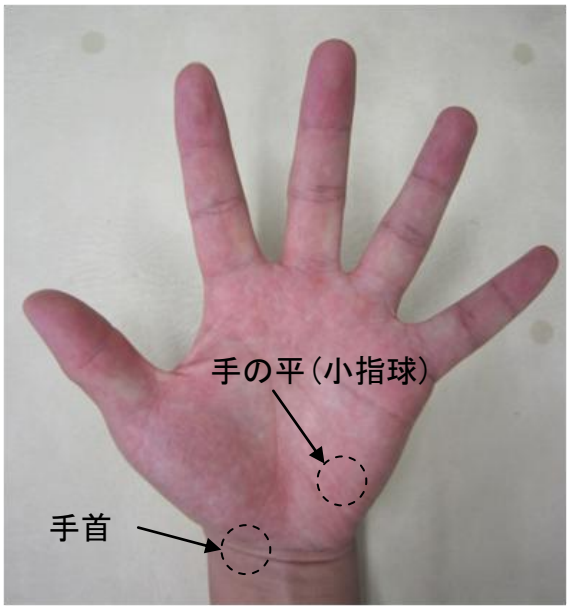
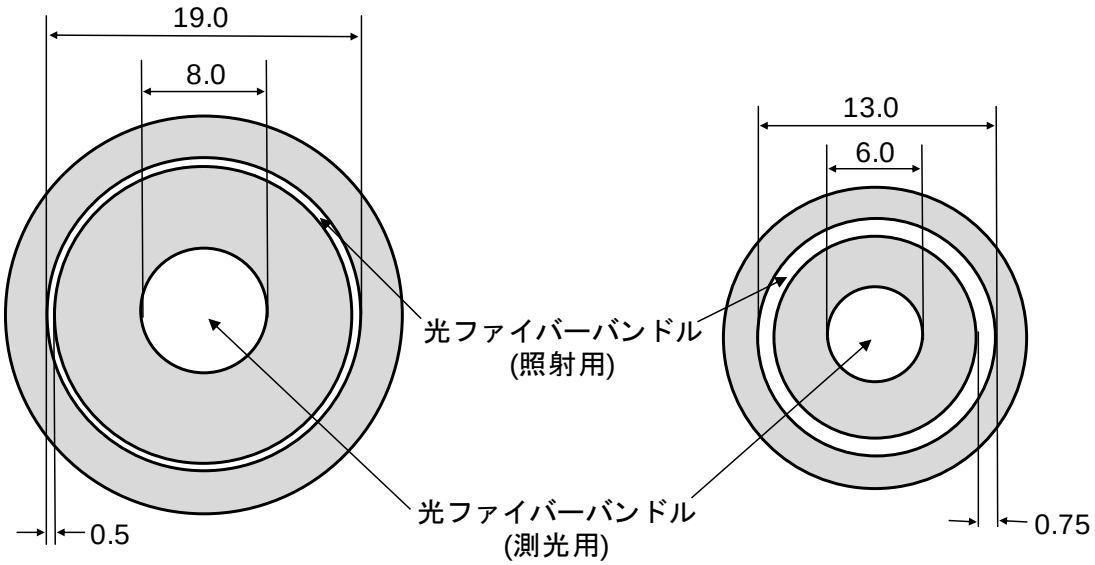


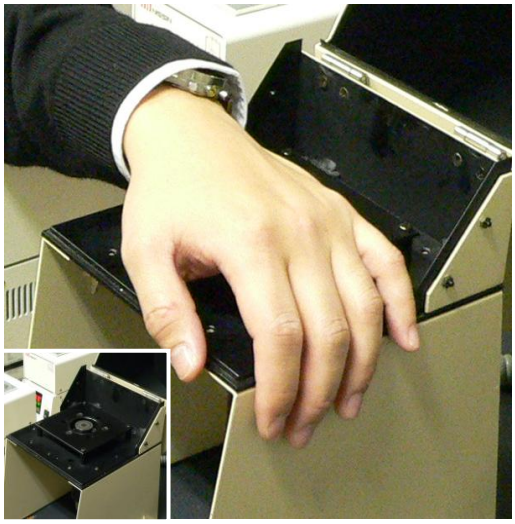
図 3.2.1　スペクトル測定部位



(a) 測定プローブ(大)　　(b) 測定プローブ(小)

図 3.2.2　インタラクタンス型測定プローブ (単位：mm)

(a) 手で保持する方法



(b) 台に固定する方法

図 3.2.3　測定プローブの保持方法

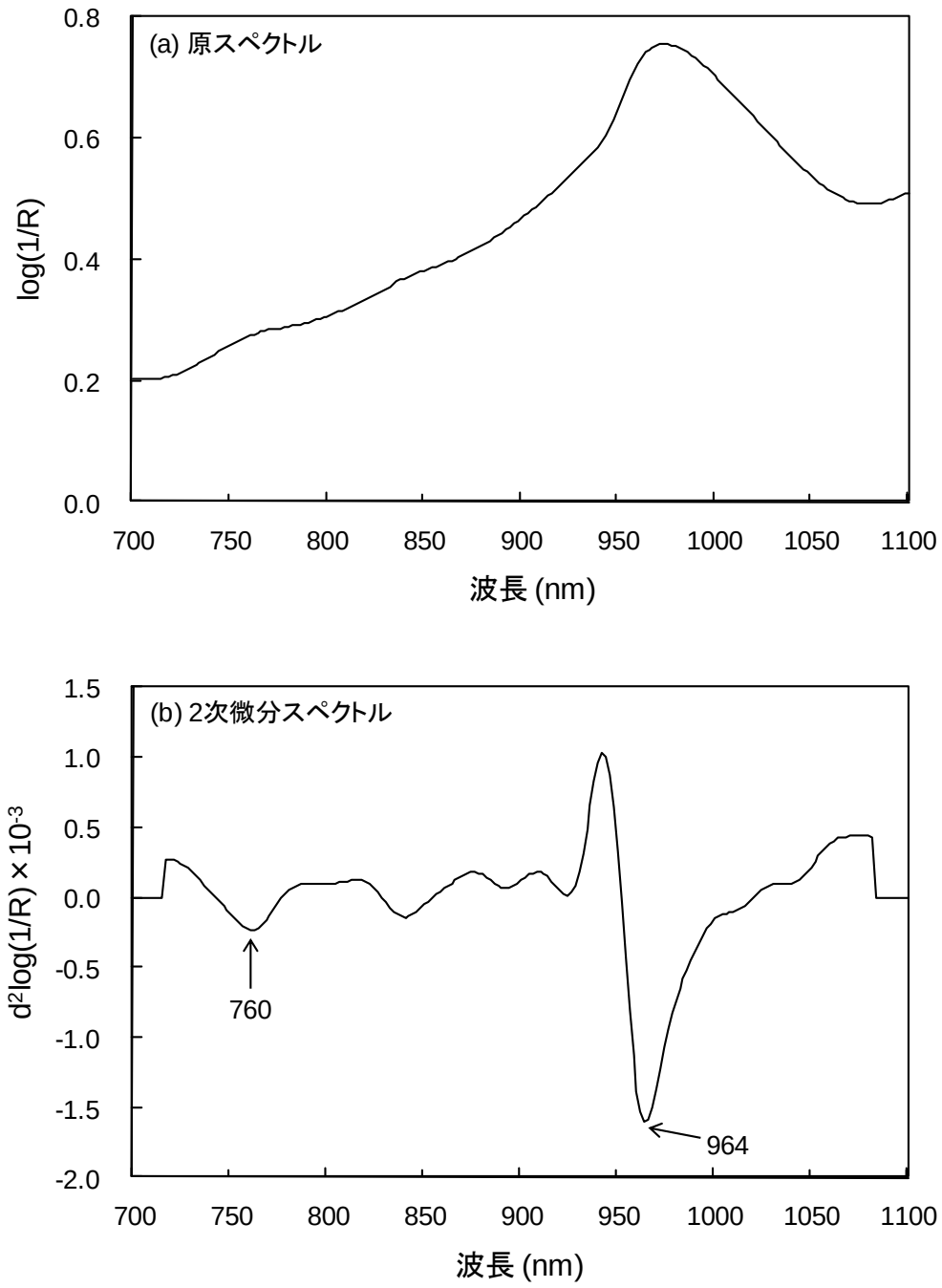


図 3.3.1　最適な条件で測定した手の平(小指球)の近赤外スペクトル

表 3.3　PLS 回帰で得られた検量モデルの結果

要因	方法	その他の要因	F	R^2	SECV (mg/dL)	Bias (mg/dL)
スペクトル測定部位	手首	測定プローブのサイズ：大 測定プローブの保持方法：手で保持 時間差：約 30 秒	3	0.26	22.0	0.2
	手の平		7	0.69	20.0	0.0
測定プローブのサイズ	小	スペクトル測定部位：手の平 測定プローブの保持方法：手で保持 時間差：約 30 秒	5	0.65	17.1	0.9
	大		7	0.78	15.3	0.2
測定プローブの保持方法	手で保持	スペクトル測定部位：手の平 測定プローブのサイズ：大 時間差：約 30 秒	13	0.91	15.8	1.1
	台に固定		13	0.87	12.5	-0.8
スペクトル測定と血糖値測定の時間差	約 30 秒	スペクトル測定部位：手の平 測定プローブのサイズ：大 測定プローブの保持方法：台に固定	13	0.87	12.5	-0.8
	1 秒以内		7	0.85	9.7	-0.1

F：ファクター数

R^2：決定係数

SECV：クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

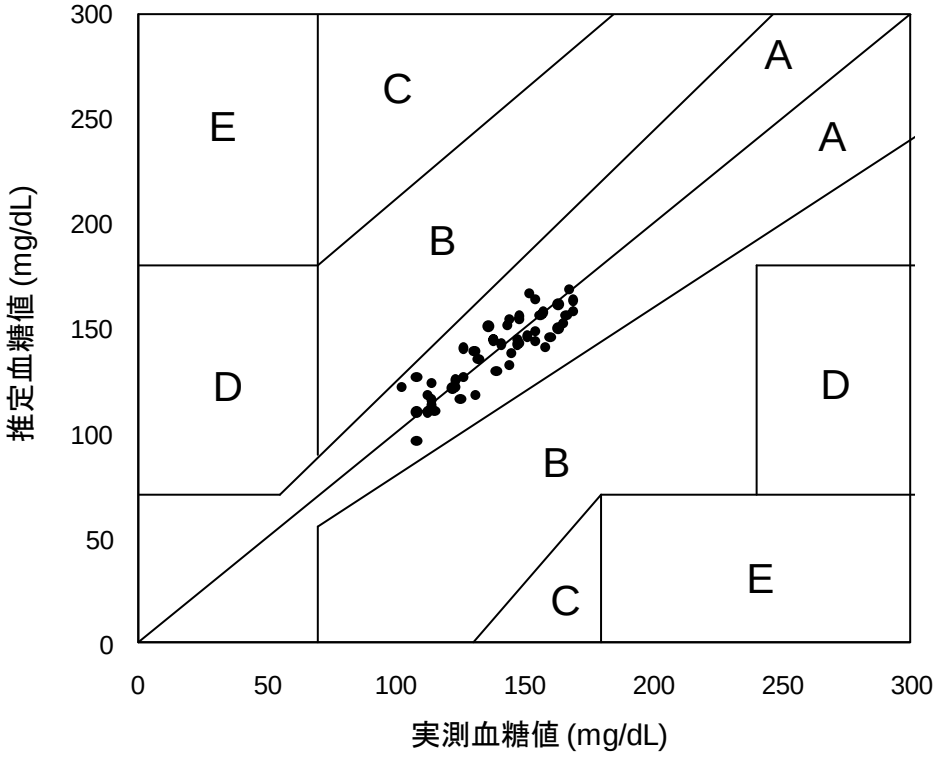


図 3.3.2　クラーク・エラー・グリッド上にプロットしたクロス・バリデーションによる推定値と実測値

A 領域：臨床的測定精度を有する
B 領域：測定誤差は臨床的には問題がないと考えられる
C 領域：不必要な処置を招くおそれがある
D 領域：低血糖および高血糖であることを見過ごすおそれがある
E 領域：低血糖でありながら高血糖(またはその逆)と診断するおそれがある

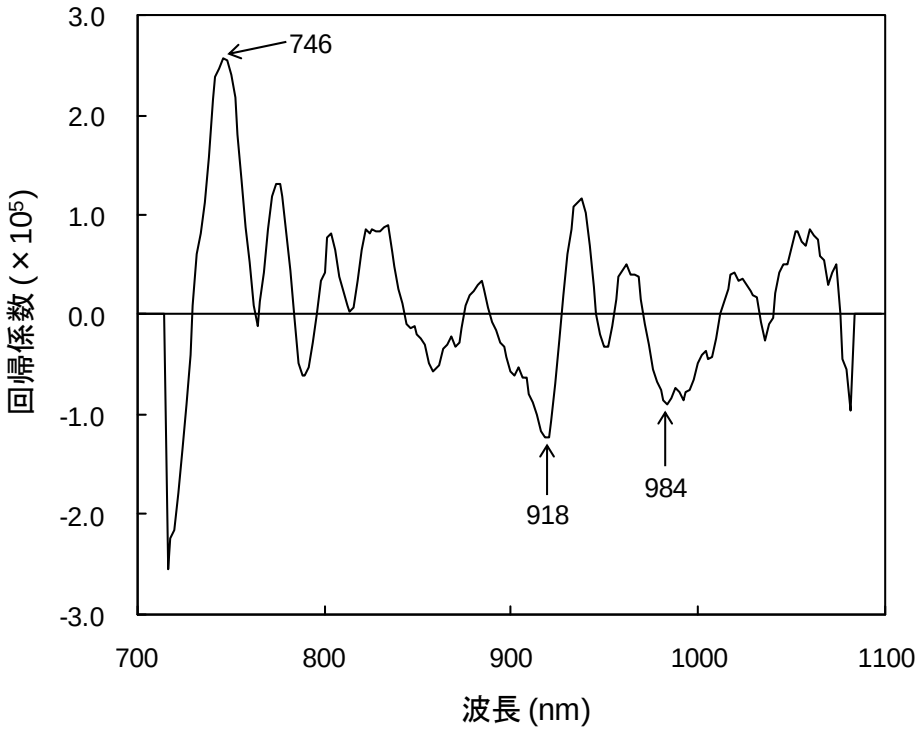


図 3.3.3　非侵襲血糖値検量モデルの回帰係数プロット

第 4 章

非侵襲血糖値測定法の GI 測定への応用

要　約

食品のグリセミック・インデックス(GI)測定は、被験者の指先から数 10 回もの採血を必要とするため、被験者に苦痛を与える。そのため、採血を伴わない非侵襲血糖値測定法が強く求められている。本章では、非侵襲血糖値測定用の近赤外分光装置を開発し、GI 測定への応用について検討した。

分光装置はインタラクタンス方式の既存装置を基に開発し、測定部位の温度をコントロールできるよう、スペクトル測定部の内側に温度調節装置に接続したラバーヒーターを取り付けた。測定部位のずれ、接触圧力の変化、測定温度の変化によるスペクトル変動を検証し、変動の小さい安定したスペクトルの測定方法を明らかにした。

GI 測定における基準食の負荷試験において、血糖値と同時に被験者の手の平の近赤外拡散反射スペクトル(700 nm～1,050 nm)を測定し、PLS 回帰を適用して被験者専用の血糖値検量モデルを作成した結果、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 9.1 mg/dL であった。

得られた検量モデルを用いて、3 品の検査食(米飯、かまぼこ、ヨーグルト)の負荷試験中の血糖値を推定した結果、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)は 8.5～14.5 mg/dL であり、算出された検査食の GI は、米飯 70(実測値 80)、かまぼこ 57(49)及びヨーグルト 45(38)であった。

以上の結果から、非侵襲血糖値測定用に開発した近赤外分光装置は GI 測定に応用可能であることが明らかとなった。

4.1　緒言

グリセミック・インデックス(GI)の概要については 1.1 節で述べたとおりであり、低 GI 食品は糖尿病患者の食後血糖管理に特に有用であり、糖尿病予防にも役立つと言われている[5)]。しかし、GI 測定では各被験者から合計数 10 回もの採血を行う必要があり、非侵襲血糖値測定法の開発が求められている。第 3 章では、手の平の近赤外スペクトルを用いた新しい非侵襲血糖値測定法の開発について一定の成果が得られたことを紹介した。当該技術を普及させるためには安価な専用機の開発が必要である。そこで、本章では、インタラクタンス方式の既存装置を基にした非侵襲血糖値測定用の近赤外分光装置の開発を行うとともに、GI 測定への応用について検討した。

4.2　非侵襲血糖値測定用近赤外分光装置の開発

市販のインタラクタンス方式の食肉用分光装置を改良することにより、手の平の近赤外スペクトルを非侵襲的に測定する血糖値測定用分光装置を開発した。その装置の構成及び測定部の構造を図 4.2 に示す。本装置は、光源、スペクトル測定部、分光器、センサー、コントロールユニット及び温度調節装置から構成される(図 4.2(a))。図 4.2(b)に示すように、スペクトル測定部には 1 ワット(W)の小型タングステンハロゲンランプ 5 個が測光部(光誘導パイプ)を中心にして半径 8.5 mm の円周上に配置されている。ランプから発した光は測定対象である手の平の内部で拡散反射され、その一部が光誘導パイプを介して分光器に導かれ、アレイ型センサーにより 700～1,050 nm の波長領域のスペクトルが 1 nm 間隔で測定される。測定中の手の平の温度を一定に保つため、手の平が接触するスペクトル測定部の内側にラバーヒーターが取り付けられている。ラバーヒーターの温度は熱電対(銅－コンスタンタン型)からの温度シグナルによりヒーターへの供給電圧をコントロールする温度調節装置により制御される。コ

ントロールユニットとして小型コンピュータ VAIO VGN-UX72(ソニー社, 日本)が設置されている。

4.3　実験方法

4.3.1　スペクトル測定条件の探索

スペクトルに影響を及ぼす要因として、測定部位のずれ、測定部への接触圧力の変化、測定温度の変化に着目し、これらの変動の影響を調べるとともに、その影響を小さくするための方法を探索した。

(1) 測定部位

スペクトル測定ごとに手の平を測定部に置き直す場合と測定部に置いたままにする場合とのスペクトル変動を比較した。前者の場合、10 mm 以内の範囲で被験者が意図的に測定部位をずらした。接触圧力及び温度は一定にコントロールした。

(2) 接触圧力

手の平の測定部への接触圧力の変化がスペクトルに及ぼす影響を調べるため、接触圧力をほぼ一定にする場合と変動させる場合とのスペクトル変動を比較した。前者の場合、接触圧力を安定させるために手の上に質量 1,326 g の重りを載せた。後者の場合、接触圧力を被験者が意図的に大、中、小と変動させた。測定部位及び測定温度は一定にコントロールした。

(3) 測定温度

測定部位の温度変化がスペクトルに及ぼす影響を調べるため、手の平の温度を 35.2 ± 0.1 °C にコントロールした場合と 34.0～37.0 °C の間で変化させた場合とのスペクトル変動を比較した。温度制御はスペクトル測定部の内側に設置されたラバーヒーターにより行った。測定部位及び接触圧力は一定にコントロ

ールした。

4.3.2　被験者専用血糖値検量モデルの開発

GI 測定における 3 回の基準食の負荷試験において、血糖値測定と同時にスペクトル測定を行い、得られたデータセットに PLS 回帰を適用して被験者専用の血糖値検量モデルを作成した。

(1) 基準食の負荷試験

基準食の負荷試験は FAO/WHO のプロトコル[41]に準拠して行った。ただし、応用事例であることから被験者は 1 名とした。

一晩絶食した健常人ボランティア 1 名(年齢：60 歳，性別：男性)を対象にグルコース 50 g の経口負荷試験を実施した。グルコースは 150 mL の水に溶かして摂取し、空腹時及び摂取後 15、30、45、60、75、90、105、120 分の時点において、右手の指先から採血し、医療用血糖値測定装置ドライケム FDC300G(富士フィルムメディカル社，日本)を用いて血糖値を測定した。採血と同時に手の平の近赤外拡散反射スペクトルを後述する方法により測定した。同様の負荷試験を異なる日に分けて 3 回実施した。

(2) データ解析

データ解析には The Unscrambler プログラム(CAMO 社，ノルウェー)を用いた。スペクトルデータには Savitzky-Golay 法による 2 次微分(窓サイズ：17 ポイント，多項式次数：2)を適用した。スペクトルと血糖値のデータセットに PLS 回帰を適用し、検量モデルを作成した。検量モデルの予測精度の検証はクロス・バリデーション(leave-one-out)[36]により行った。PLS 回帰において 1 つのサンプルの影響度を表す Cook's distance[34]が他に比べて有意に大きいサンプルを異常値として除外した。検量モデルのキャリブレーションデータセットの概要を表 4.3.2 に示す。

4.3.3 検査食の GI 測定

検査食の負荷試験も基準食と同様、FAO/WHO のプロトコル[41] に準拠して実施した。検査食には高 GI 食として包装米飯(サトウのごはん，サトウ食品工業社，日本)、中 GI 食としてかまぼこ(夕月さしみ蒲鉾，夕月社，日本)及び低 GI 食としてヨーグルト(明治ブルガリアのむヨーグルト LB81 プレーン，明治乳業社，日本)の 3 品を用い、糖質 50 g 相当量(米飯 147 g、かまぼこ 476 g、ヨーグルト 424 g)を水 150 mL とともに摂取した。被験者は基準食の負荷試験と同じ健常人ボランティア 1 名であり、検査前日の 22 時から翌朝の検査食摂取時まで 11 時間以上絶食した。検査食は 10 分以内に完食し、空腹時から摂取後 2 時間までの血糖値を基準食の負荷試験と同様の方法により測定した。採血と同時に手の平の近赤外拡散反射スペクトルを後述する方法により測定した。ただし、GI 測定に必要のない摂取後 75 分と 115 分の時点の血糖値測定は行わず、スペクトルは空腹時に 2 回、摂取後 2 時間までは 5 分間隔で測定した。

4.4 結果および考察

4.4.1 スペクトル測定条件

(1) 測定部位

手の平を測定部に置いたまま測定した場合、毎回置き直して測定するよりもスペクトル変動が小さかった(図 4.4.1.1(a))。生体組織は不均一であり、測定部位が数 mm でもずれると組織構成や散乱状態が変化し、スペクトルが変動すると考えられる。

(2) 接触圧力

スペクトル測定時に手の上に重りを載せて測定部への接触圧力を安定させた場合、重りを載せずに測定するよりもスペクトル変動が小さかった(図

4.4.1.1(b))。測定部への接触圧力が変化すると生体組織の散乱状態が変化し、スペクトルが変動すると考えられる。

(3) 測定温度

700～1,050 nm の波長領域の手の平の近赤外スペクトルにおいて顕著に見られる 970 nm 付近の水の OH の吸収は温度によって変化する[42]。測定部への接触圧力の変化に比べ、温度変化によるスペクトル変動は小さいが、測定温度を 35.2 ± 0.1 °C にコントロールした場合、温度を変化させた場合よりもスペクトル変動が小さかった(図 4.4.1.1(c))。

以上の結果から、手の平を測定部に置いたままの状態で、接触圧力を安定させ、測定温度を一定にコントロールする方法により、変動の小さい安定したスペクトルを測定できることが明らかとなった。そこで、検量モデルの作成及び GI 測定に用いる手の平のスペクトルは次の方法により測定した。

(ア) 装置を電気的に安定化させるため、前夜から電源を ON にする。

(イ) 36.0 ± 0.1°C に温度制御したアルミニウム製のドライバスに手の平を約 30 秒間接触させ、手の平の温度調整を行う。

(ウ) 手の平の型紙を用いて、スペクトル測定部に小指球部分が接触するよう手の平をセットする(図 4.4.1.2)。検量モデル作成用のスペクトル測定においては測定毎に手の平をスペクトル測定部にセットし直す。検査食の負荷試験では手の平は負荷試験終了時までセットしたままの状態で動かさない。

(エ) 外光の影響を除くために、手の上に遮光性布を被せる。

(オ) 接触圧力を一定にするため、質量 1326 g の重りを載せる。

(カ) スペクトル測定部の手の平接触面温度が 36.0 ± 0.1°C に安定した時、スペクトル測定を開始する。

(キ) 露光時間は 300 ms、積算回数は 50 回とする。

(ク) リファレンス(標準物質)にはテフロンを用い、リファレンス測定は負荷試験開始前に 1 回行う。

4.4.2 被験者専用血糖値検量モデル

検量モデル作成用のスペクトル測定において測定毎に手の平をセットし直したのは、検量モデルに測定部位の微妙なずれによる変動要因を含めることによって、予測時に補正できるようにするためである。これは温度補償型検量モデル[43~44]の考え方に基づいている。

手の平小指球部分の典型的な原スペクトル及び 2 次微分スペクトルを図 4.4.2.1 に示す。第 3 章と同様、760 nm と 964 nm にそれぞれ脱酸素化ヘモグロビン[37]と水[32]による吸収が観察される。2 次微分スペクトルを用いて PLS 回帰を行った結果、ファクター数 5、決定係数(R^2)0.95、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)9.1 mg/dL の良好な検量モデルが得られた(図 4.4.2.2)。負荷試験では経時的にデータを収集するため、未知の要因による偶然の相関によって検量モデルが作成されてしまうことが懸念される[35]ことは第 3 章でも述べたが、本実験でも、偶然の相関を回避するため 3 回の負荷試験を連続しない異なる日に実施した。得られた検量モデルの回帰係数プロット(図 4.4.2.3)に見られる 908 nm と 980 nm の負のピークは、第 2 章で示したグルコースに関連する 2 つの吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)に関係していると考えられ、第 3 章で得られた非侵襲血糖値用検量モデルと同様、今回得られた検量モデルも偶然の相関ではなく、グルコースの情報に基づくものであると考えられる。

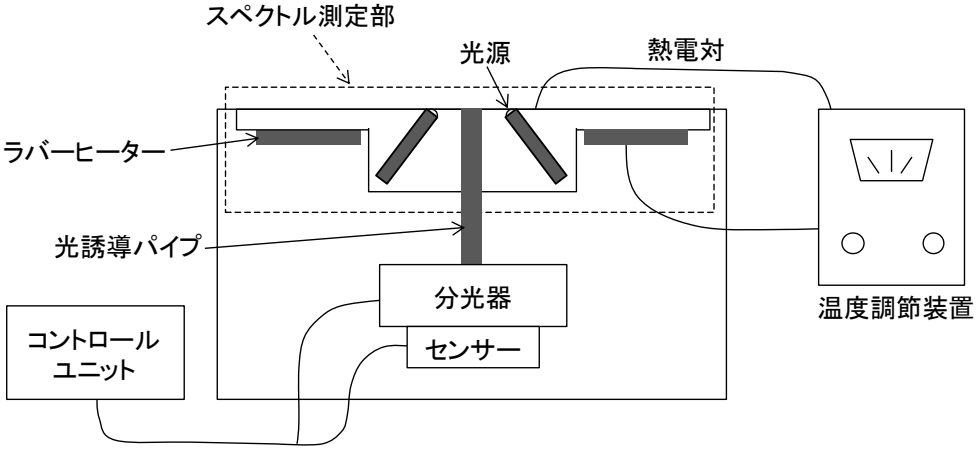
4.4.3 検査食の GI

検査食の負荷試験中に測定したスペクトルデータに被験者専用検量モデルを適用して血糖値を推定した結果を表 4.4.3.1 に示す。バイアスは−29.9〜−15.4

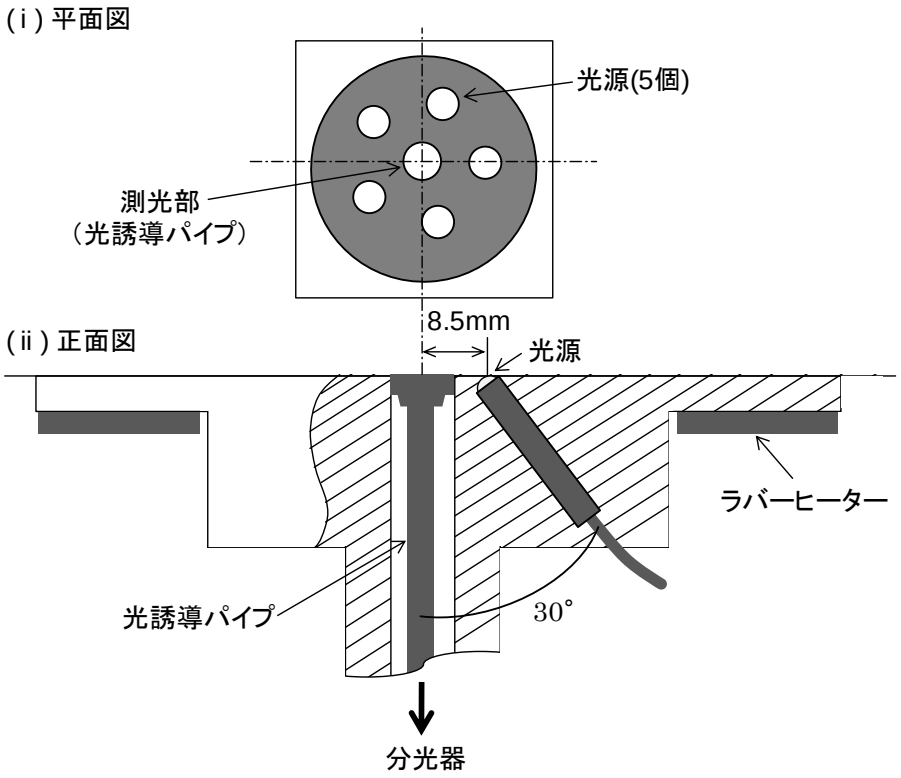
mg/dL、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)は 8.5～14.5 mg/dL であった。スペクトル測定部に手の平を置き直すことによる測定部位のずれ、接触圧力の変動、あるいは、日間差により生じる未知の外乱要因の変動などにより、推定値には大きなバイアスが生じてしまうが、GI 測定では空腹時からの変化量を測定できれば良いため、バイアスを補正する必要はない。現段階では検量モデルの精度が充分でなく、誤差の影響を小さくするため、血糖上昇曲線下面積(the incremental area under the blood glucose response curve：IAUC)の計算に用いる空腹時の血糖値には空腹時に測定した 2 つのスペクトルから求めた 2 つの推定値の平均値を、摂取後 15、30、45、60、90、120 分の時点の血糖値には測定時前後 5 分を含めたスペクトルから求めた 3 つの推定値の平均値を採用した。5 分間隔の連続した推定値において、直前の値からの変化量の標準偏差(σ)は 14.5 mg/dL であり、変化量が±2σ(信頼水準 95 %)を超える値は異常値と見なし除外した。検査食の負荷試験中における血糖上昇曲線を図 4.4.3 に示す。全ての検査食において、推定値と実測値の変動は類似していた。また、実測値の IAUC に対する推定値の IAUC の誤差は 400 未満であり、その値を GI に換算すると 10 以下であった(表 4.4.3.2)。なお、今回の GI 測定結果は、3 品とも他の文献[4, 45]における測定結果に近い値となっている。

以上の結果から、非侵襲血糖値測定用に開発した近赤外分光装置を用いて作成した被験者専用検量モデルが食品の GI 測定に適用可能であることが明らかとなった。GI 測定では一度手の平を測定部にセットすれば、負荷試験終了まで動かさずに維持することが可能であるため、1 回の負荷試験中においては、測定部位、測定部への接触圧力、測定温度を安定させることが比較的容易である。また、GI 測定に必要な血糖値は空腹時からの相対値であるため、負荷試験ごとのバイアス補正を必要としない点も非侵襲血糖値測定法の利用に適している。現段階での測定精度は充分ではないが、連続モニタリングが可能であるため、

短い間隔で測定した値を平滑化して用いることによって、誤差の影響を小さくし、実測値に近い GI を求めることが可能である。今回の手法では、基準食の負荷試験で被験者専用の検量モデルを開発する必要があるため、非侵襲測定が利用できるのは検査食の負荷試験のみであるという制約がある。また、被験者が 1 名であるため、他の被験者における再現性を検証する必要がある。次章では、GI 測定において最小限必要とされる 6 名の被験者を対象に、本章と同様の非侵襲血糖値測定法を用いた GI 測定を行った結果について解説する。



(a) 装置の構成図



(b) スペクトル測定部の詳細図

図 4.2　手の平の近赤外スペクトルを非侵襲的に測定する
血糖値用分光装置の概略図

表 4.3.2　非侵襲血糖値検量モデルのキャリブレーションデータセット

サンプル数	血糖値 (mg/dL)			
	平均値	標準偏差	最小値	最大値
22	147	16.0	117	179

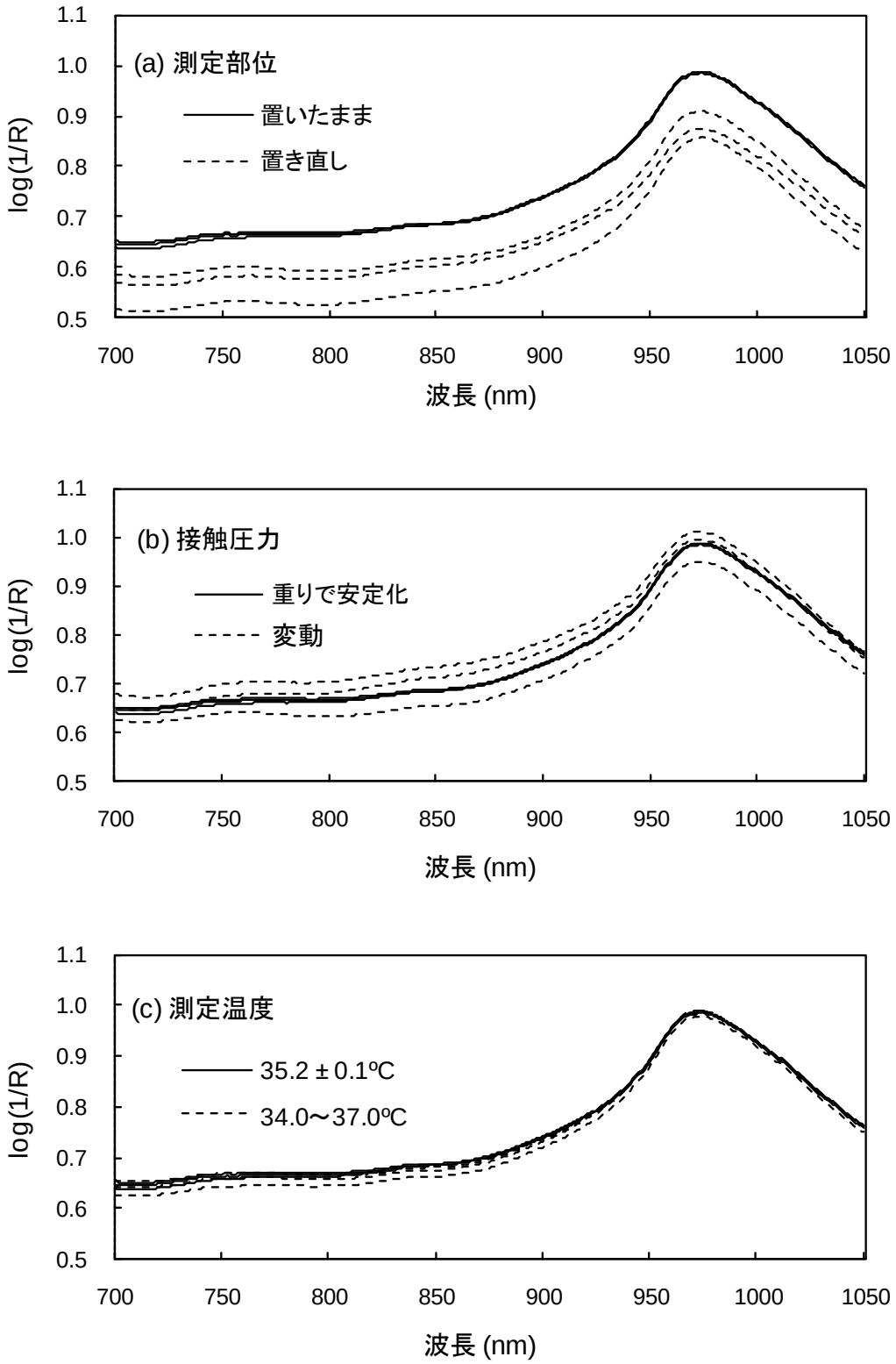


図 4.4.1.1　(a) 測定部位、(b) 接触圧力、(c) 測定温度の変化に起因するスペクトル変動（各 3 スペクトル）

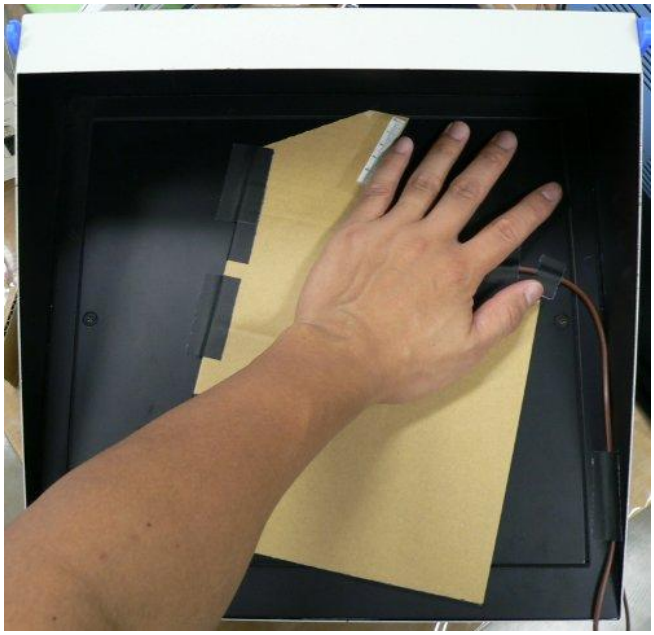


図 4.4.1.2　手の平(小指球)の近赤外スペクトル測定

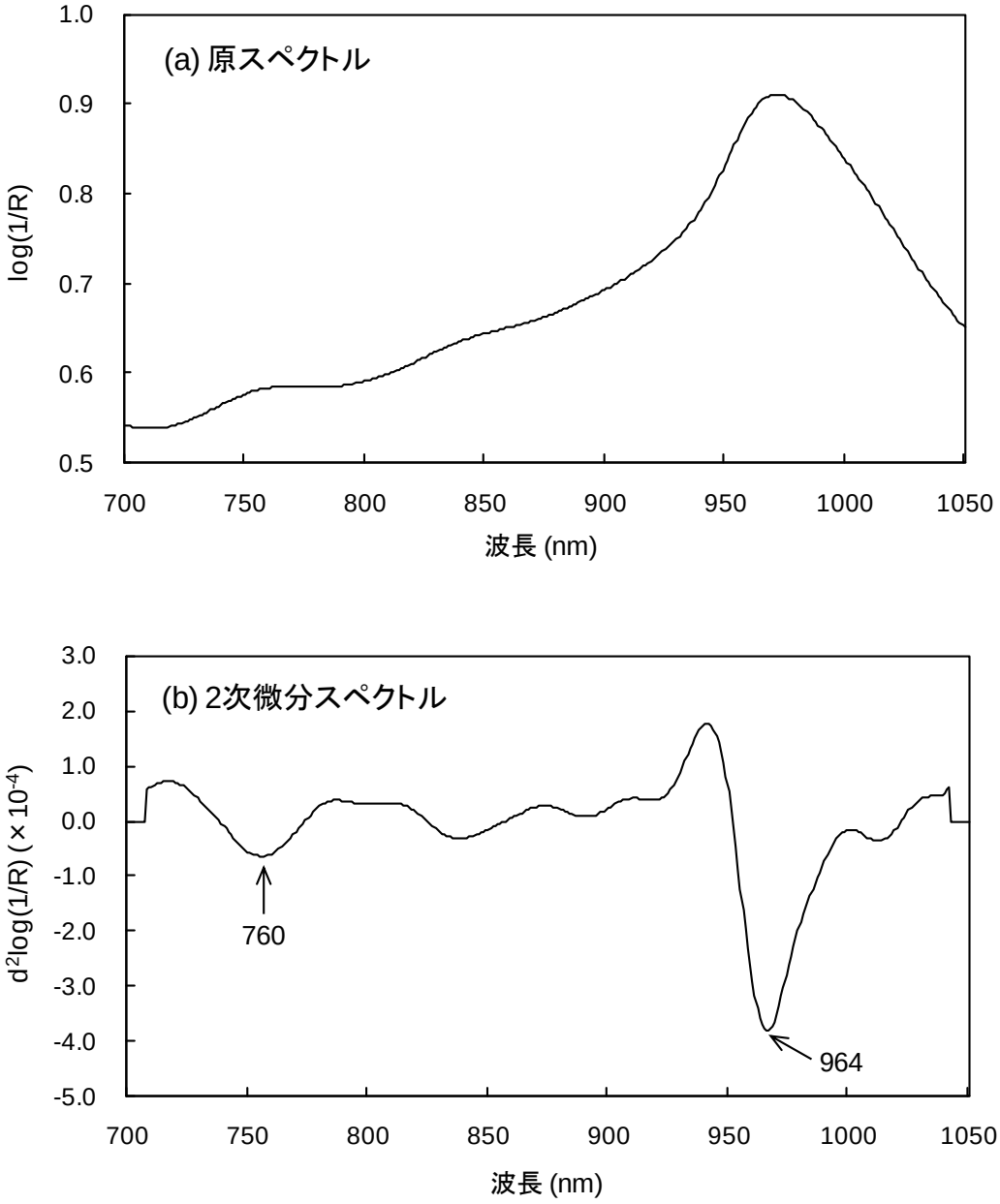


図 4.4.2.1　手の平(小指球)の近赤外スペクトル

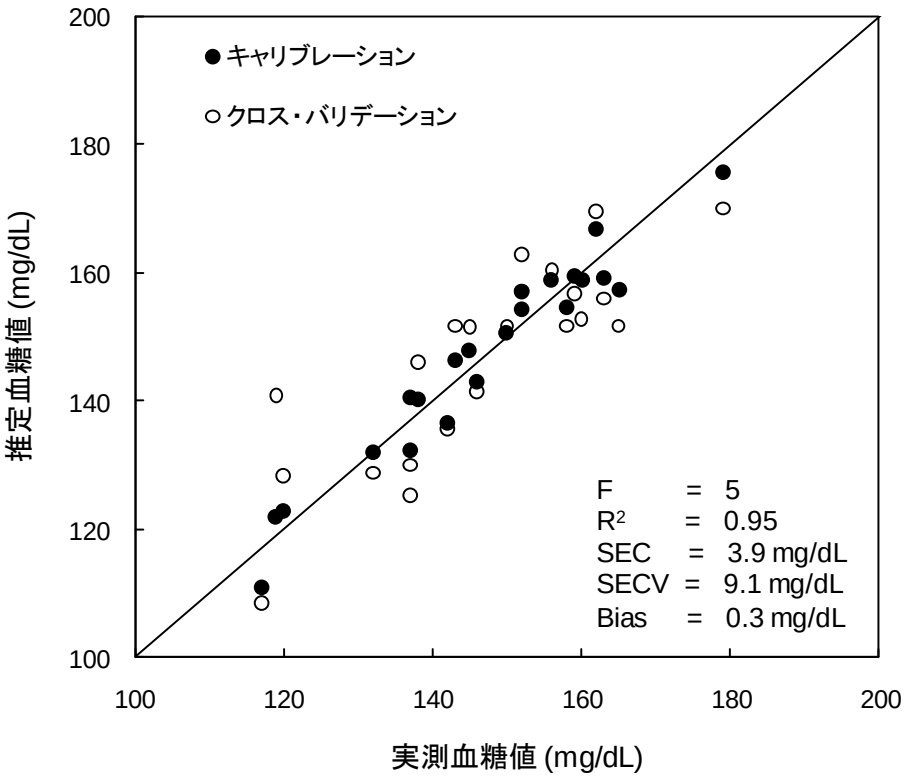


図 4.4.2.2　推定値と実測値の散布図

F：ファクター数

R^2：決定係数

SECV：クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

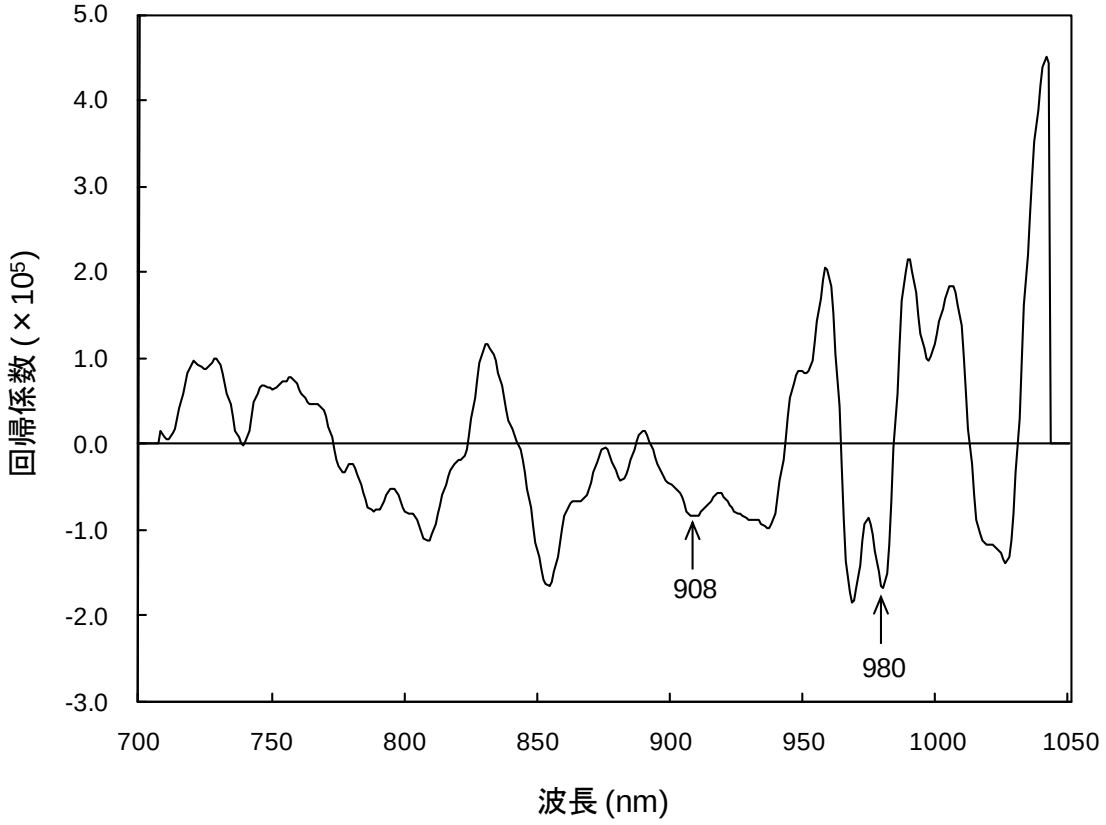


図 4.4.2.3　非侵襲血糖値検量モデルの回帰係数プロット

表 4.4.3.1　検査食の負荷試験における血糖値の推定結果

食品	SEP	Bias
米飯	14.5	-15.4
かまぼこ	13.8	-15.9
ヨーグルト	8.5	-29.9

SEP：バイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

単位：mg/dL

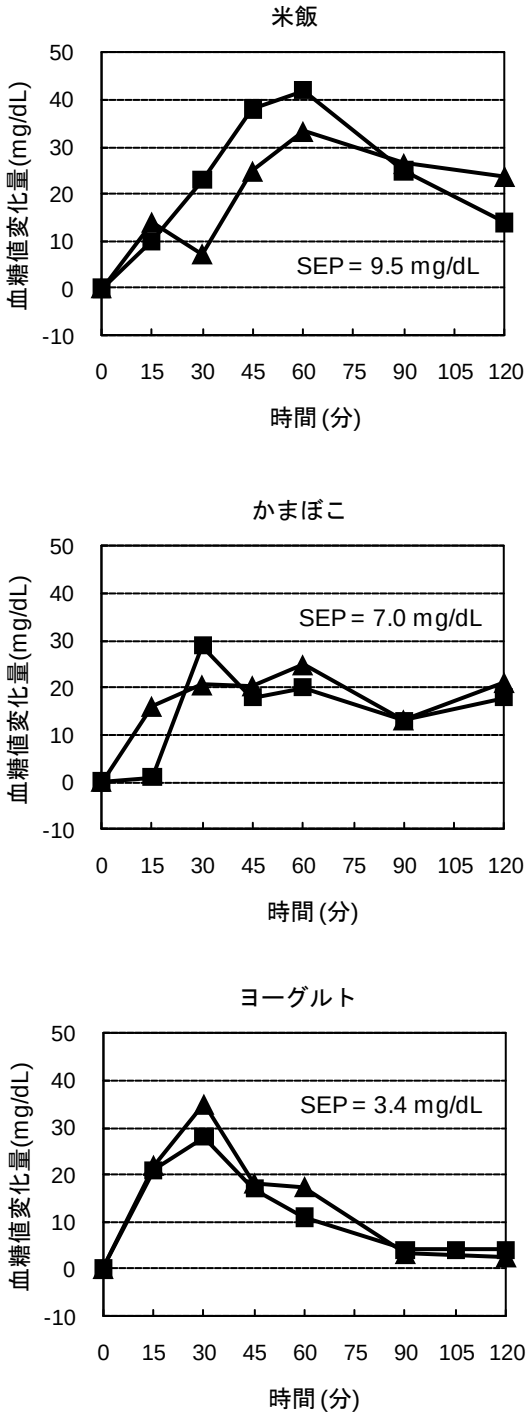


図 4.4.3　検査食における血糖上昇曲線

■：実測値

▲：推定値(前後 5 分を含めた 3 つの値の平均値)

表 4.4.3.2　基準食および検査食の IAUC 及び GI

食品	IAUC		GI	
	実測値	推定値	実測値	推定値
グルコース	3698	-	100	-
米飯	2970	2590	80	70
かまぼこ	1830	2122	49	57
ヨーグルト	1418	1652	38	45

IAUC : the incremental area under the blood glucose response curve (血糖上昇曲線下面積)

GI : グリセミック・インデックス

第 5 章

複数被験者での非侵襲 GI 測定

要　約

グリセミック・インデックス(GI)測定において最小限必要とされる 6 名の被験者を対象に、第 4 章と同様、基準食の負荷試験において血糖値と同時に被験者の手の平の近赤外拡散反射スペクトル(700～1,050 nm)を測定し、PLS 回帰を適用して各被験者専用の血糖値検量モデルを作成した結果、決定係数(R^2)は 0.83～0.90、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 7.5～17.2 mg/dL であった。

得られた検量モデルを用いて 3 品の検査食(米飯、スパゲティー、ヨーグルト)の負荷試験における血糖値を推定した結果、バイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 7.2～30.9 mg/dL であり、推定精度には個人差及び日間差が確認された。推定精度が良好であった被験者のみの結果を用いて GI を算出した結果、米飯 93(実測値 89)、スパゲティー45(45)及びヨーグルト 63(50)であった。

以上の結果から、第 4 章で得られた結果が他の被験者でも再現でき、近赤外短波長領域を用いた非侵襲血糖値測定法の精度が GI 測定に応用できるレベルに到達し得ることが示唆されたが、測定精度の個人差及び日間差を解消するためには、更なる研究が必要であることが明らかとなった。

5.1　緒言

前章では、1 名の被験者を対象とした GI 測定において、基準食の負荷試験 3 回分から得られたデータセットを用いて被験者専用検量モデルを作成し、得られた検量モデルを用いて検査食の負荷試験における血糖値変動を推定した。その結果、検査食全 3 品について、推定値から計算した GI は実測値から計算した GI に近い値となった。しかし、個人差が測定精度に大きく影響することを考慮すると、複数の被験者において同様の実験を行い、推定精度を検証する必要がある。

本章では、GI 測定において最小限必要とされる 6 名の被験者を対象に第 4 章と同様の実験を行い、開発した非侵襲血糖値測定法の再現性を検証した。

5.2　実験方法

実験プロトコルは原則的に第 4 章の実験と同様とした。第 4 章の実験と異なるのは、以下の点である。

(ア)　被験者を 1 名から 6 名(健常人ボランティア，年齢：27～60 歳，性別：男女 3 名ずつ)に増やした。

(イ)　検量モデル作成用データセットを収集する基準食の負荷試験において、

①　手の平はセットしたままの状態で動かさない。

②　空腹時のスペクトル測定回数を 1 回から 5 回に増やした。

(ウ)　検査食のかまぼこはスパゲティー(ディ・チェコ No.11 スパゲッティーニ 161 g，日清フーズ社，日本)に変更した。

(エ)　検査食の負荷試験において、空腹時の手の平のスペクトル測定回数を 2 回から 5 回に増やした。

基準食の負荷試験で得られた各被験者専用検量モデルのキャリブレーション

データセットの概要を表 5.2 に示す。

5.3　結果および考察

PLS 回帰を行った結果、決定係数(R^2)は 0.83～0.90、クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差(SECV)は 7.5～17.2 mg/dL であり、すべての被験者において良好な検量モデルが得られた(表 5.3.1)。検量モデルの回帰係数プロット(図 5.3.1)を見ると、全ての被験者において 900～930 nm 近辺あるいは 980～1,000 nm 近辺に負のピークが観測でき、それらは第 2 章で示したグルコースに関連する吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)に関係すると考えられる。したがって、得られた検量モデルは偶然の相関ではなく、グルコースの情報を含むものであると考えられる。

次に、検査食の負荷試験中に測定したスペクトルデータに被験者専用検量モデルを適用して血糖値を推定した結果を表 5.3.2 示す。バイアスは−68.3～3.7 mg/dL、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)は 7.2～30.9 mg/dL であった。バイアスについては、第 4 章と同様、かなり大きく、ばらつきのある値となったが、今回は誤差についても同様の傾向が見られた。同一被験者の検査食による推定誤差のばらつきは日間差の影響であり、異なる被験者間の推定誤差のばらつきは個人差の影響であると考えられる。誤差の影響を小さくするため、空腹時の値には測定した 5 つのスペクトルから求めた推定値の平均値を、摂取後 15、30、45、60、90、120 分の時点の値には測定時前後 5 分を含めた 3 つのスペクトルから求めた推定値の平均値を採用した。検査食における各被験者の典型的な推定結果を図 5.3.2 および図 5.3.3 に示す。ここで、図 5.3.2 は各被験者において実測値と推定値が最もよく一致した例で、図 5.3.3 は誤差が最も大きかった例である。最も良い例(図 5.3.2)でも、被験者 C と F の測定誤差は大きく、被験者専用検量モデルの精度に個人差が生じていることが確認できる。最も悪い例(図 5.3.3)では、すべての被験者において測定誤差が大きく、同じ被

験者でも日によって測定精度に大きなばらつきが生じていることがわかる。検査食の種類による測定精度の偏りは見られなかった。

被験者専用検量モデルの測定精度に個人差が生じる原因としては、3 つの要素が考えられる。1 つ目は、スペクトル測定部位の皮膚構造、血管構造、血液組成、血流、水分量などといった生体的特徴の違いである。2 つ目は、スペクトル測定部位の変動度合いである。負荷試験中は手の平をスペクトル測定部に置いたままの状態にしていても、無意識のうちに僅かな動きが生じることは避けられず、その変動度合いは被験者ごとに異なるだろう。3 つ目は、接触圧力の変動度合いである。今回は重りを載せることのみで接触圧力をコントロールしたため、測定ごとに微妙なばらつきが生じていると考えられる。手の平を押し当てる強さも被験者ごとに異なるだろう。生体的特徴は短い期間であれば大きな変動は生じないと予想できるが、スペクトル測定部位と接触圧力の変動は、日間差においても大きなウエイトを占めると考えられ、これらをより厳密にコントロールすることで被験者専用検量モデルの精度を向上させることができると考えられる。例えば、CCD カメラを用いて手相をもとにスペクトル測定部位を毎回全く同じ位置に制御し、圧力センサーを用いて接触圧力を一定にコントロールする手法は将来検討すべきである。生体的特徴の違いによる測定精度の個人差を解消するためには、より生体的特徴の違いが小さい測定部位を検証することも必要であろう。

検査食の GI は全被験者の GI を平均して求めることとなっているが [41]、推定誤差の大きかった被験者を含めると、推定値から計算した GI が実測値から計算した値と大きく乖離することは明白である。したがって、今回は参考までに、実測値と推定値がよく一致した結果(米飯は被験者 A 及び D、スパゲティーは被験者 E、ヨーグルトは被験者 B)から計算した血糖上昇曲線下面積(the incremental area under the blood glucose response curve：IAUC)及び GI を表 5.3.3 に示す。IAUC の誤差は 625 未満、GI に換算すると 13 以下であった。

このように、良好な結果を用いれば 3 品全ての検査食について推定値と実測値から計算した GI が近い値となることから、複数の被験者においても第 4 章の結果が再現でき、近赤外短波長領域を用いた非侵襲血糖値測定法の精度が GI 測定に応用できるレベルに到達し得ることが示唆された。しかしながら、被験者専用検量モデルの測定精度の個人差及び日間差を解消するためには、更なる研究が必要である。

最後に、基準食の負荷試験で得られた 6 名全ての被験者のデータセットを統合して一つの検量モデルを作成することを試みた。全 234 個のデータセットの中からランダムに 80 個を抽出してバリデーション用とし、残りの 154 個をキャリブレーション用として検量モデルを作成した。この際、被験者専用検量モデル作成の際に異常値となったサンプルデータは除外した。PLS 回帰を行った結果は、決定係数(R^2)が 0.40、バイアスを補正した予測標準誤差(SEP)が 21.6 mg/dL であり、被験者ごとでは良好な検量モデルが得られても、6 名全てに共通して用いることのできる 1 つの検量モデルは得られなかった。この結果に最も影響しているのは被験者の個人差であると考えられる。被験者専用検量モデルの場合には、生体的特徴の日間差はさほどではなく、スペクトル測定部位と接触圧力を厳密にコントロールできれば測定精度の向上が期待できる。しかし、複数の被験者に適用できる検量モデルを作成するためには、生体的特徴の違いを補正しなければならないため、様々な生体的特徴を網羅するだけの膨大な被験者数が必要となるだろう。

表 5.2　非侵襲血糖値検量モデルのキャリブレーションデータセット

被験者	サンプル数	血糖値 (mg/dL)			
		平均値	標準偏差	最小値	最大値
A	31	129.1	18.8	110	166
B	34	126.5	18.8	104	161
C	34	152.6	25.6	125	195
D	39	139.3	21.3	108	173
E	36	136.9	29.3	100	193
F	34	143.1	28.0	108	196

表 5.3.1　PLS 回帰で得られた非侵襲血糖値検量モデルの結果

被験者	F	R^2	SEC (mg/dL)	SECV (mg/dL)	Bias (mg/dL)
A	4	0.90	5.6	7.5	0.2
B	3	0.86	7.1	8.6	-0.0
C	4	0.89	8.5	12.1	-0.9
D	3	0.89	7.0	8.6	-0.2
E	5	0.85	11.4	17.2	-0.1
F	4	0.83	11.7	14.4	-1.8

F：ファクター数

R^2：決定係数

SEC：検量モデルの標準誤差

SECV：クロス・バリデーションによるバイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

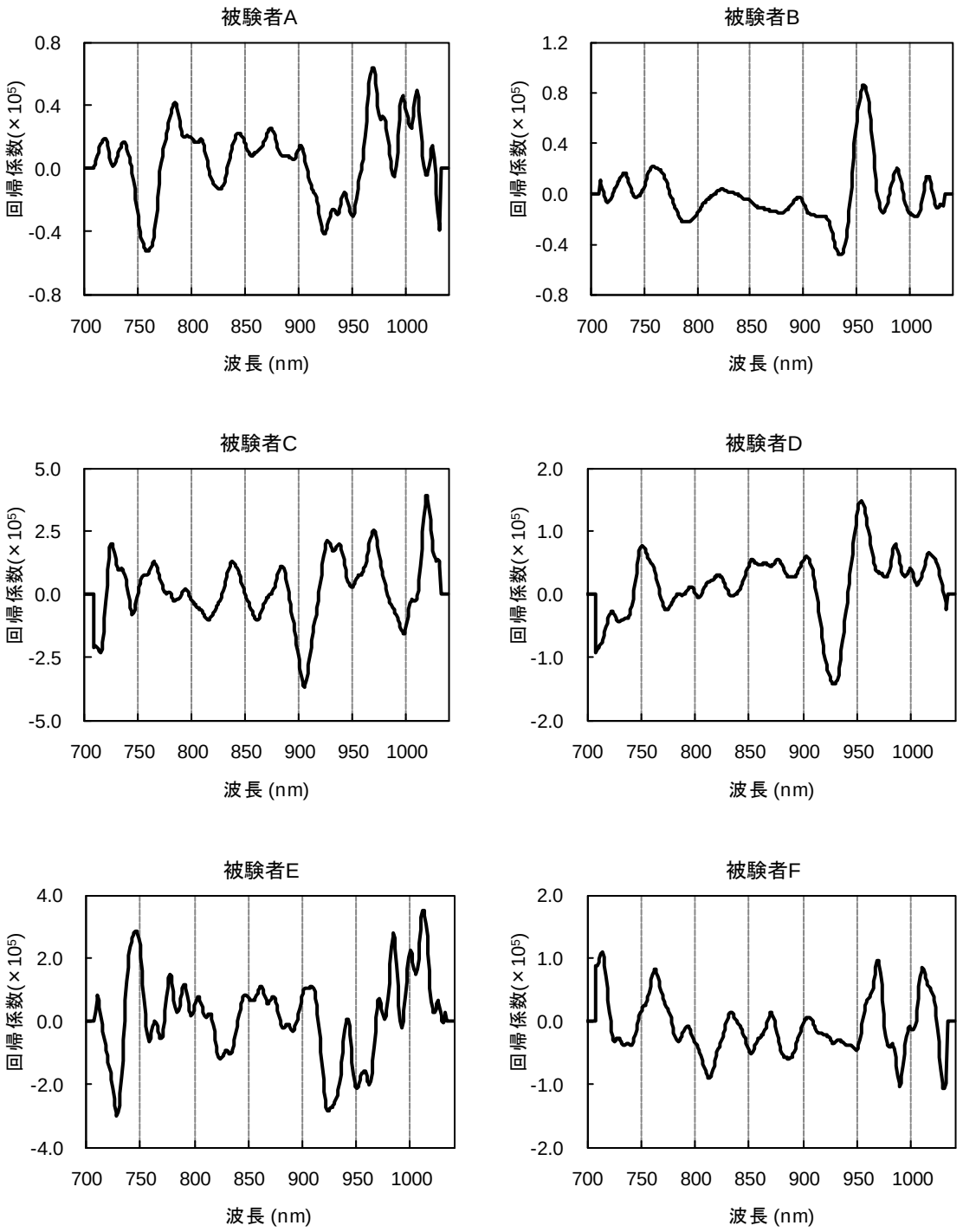


図 5.3.1　非侵襲血糖値検量モデルの回帰係数プロット

表 5.3.2　検査食の負荷試験における血糖値の推定結果

被験者	米飯		スパゲティー		ヨーグルト	
	SEP	Bias	SEP	Bias	SEP	Bias
A	13.3	-21.5	14.0	-23.7	24.6	-33.5
B	12.3	-11.1	12.7	-15.1	7.2	-18.1
C	23.4	8.3	30.9	-25.1	19.6	-20.6
D	7.7	15.3	19.5	3.7	19.8	-68.3
E	27.7	-30.0	8.6	-56.7	26.4	-63.6
F	20.1	-15.3	14.9	-7.7	17.6	-24.8

SEP：バイアスを補正した予測標準誤差

Bias：推定値と実測値の差の平均

単位：mg/dL

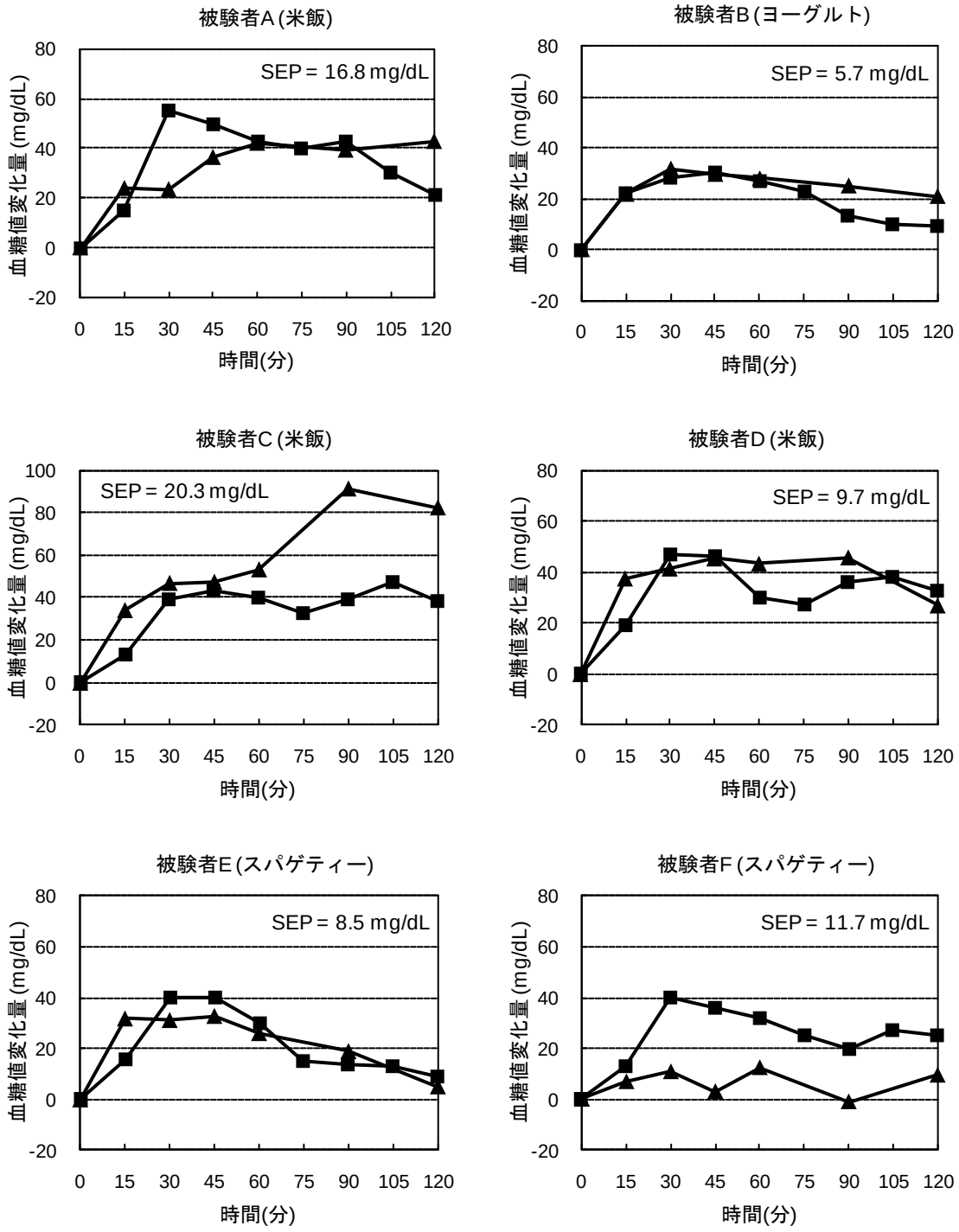


図 5.3.2　検査食における血糖値推定結果(最も良い例)

■：実測値

▲：推定値(前後 5 分を含めた 3 つの値の平均値)

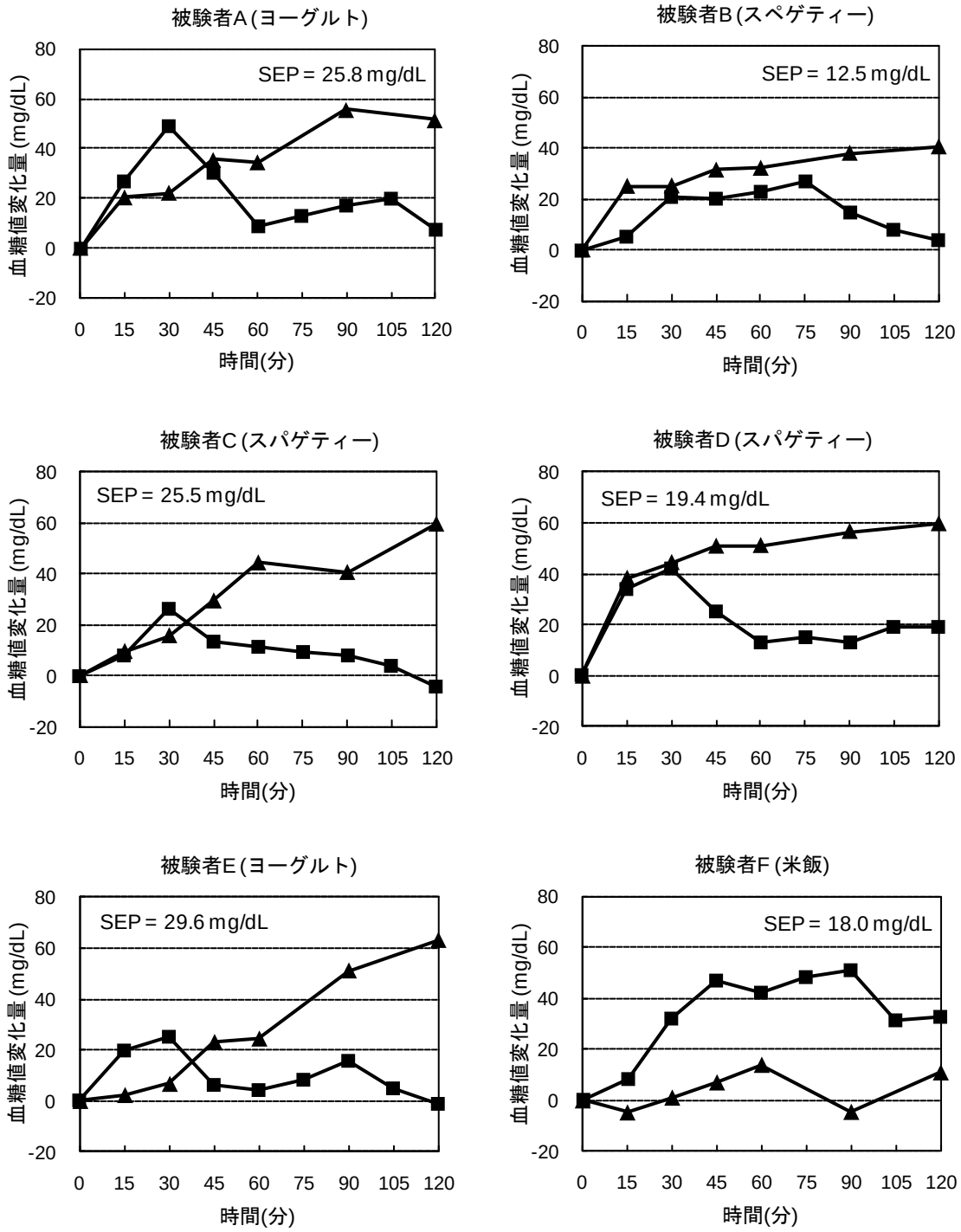


図 5.3.3　検査食における血糖値推定結果(最も悪い例)

■：実測値

▲：推定値(前後 5 分を含めた 3 つの値の平均値)

表 5.3.3　検査食の IAUC 及び GI

食品	被験者	IAUC		GI	
		実測値	推定値	実測値	推定値
米飯	A, D	3979.2	4325.5	89	93
スパゲティー	E	2670.0	2664.0	45	45
ヨーグルト	B	2332.5	2957.1	50	63

IAUC：the incremental area under the blood glucose response curve (血糖上昇曲線下面積)

GI：グリセミック・インデックス

第 6 章

結言

糖尿病は国際的に最も深刻な健康問題の 1 つであり、糖尿病患者は合併症予防のため、1 日 4 回以上の自己血糖測定(self-monitoring of blood glucose : SMBG)を行い、血糖値変動を管理しなければならない。自己血糖測定は採血を伴うため、患者は煩わしさとともに精神的ストレスと苦痛を余儀なくされる。そのため、非侵襲的な血糖値測定法が強く求められている。また、食品の血糖応答性を示すグリセミック・インデックス(GI)が低い食品は、食後の血糖値の上昇が緩やかで、そのピーク値が低いため、糖尿病患者の食後血糖管理に特に有用であり、糖尿病予防にも役立つと言われているが、GI 測定では被験者 1 名につき数 10 回もの血糖測定が必要となることから、非侵襲的な血糖値測定法の導入が期待されている。

非侵襲血糖値測定は様々な手法により研究されており、中でも近赤外分光法は非常に有望な技術であるが、未だ日本の薬事承認あるいは米国の FDA 承認を受けた非侵襲血糖計は存在しないのが現状である。実用化への大きな障壁となっているのは、測定精度の個人差と日間差の問題であり、測定誤差 10 mg/dL 程度の臨床的精度が、誰に対しても、いつでも実現できることが実用化への条件となる。本研究では、既に実用化されている桃やみかんなどの果実糖度の非破壊測定法を応用することにより、近赤外短波長領域(700～1,100 nm)を用いた非侵襲血糖値測定法の開発を試みた。そして、開発した手法を食品の GI 測定に応用し、実用化の可能性を検討した。

第 1 章においては、本研究の背景と目的、及び本研究の技術的なベースとなる近赤外分光法の概要と近赤外分光法を用いた非侵襲血糖値測定に関する従来の研究について述べた。

第 2 章においては、*in vivo* での非侵襲血糖値測定の前段階として実施した、*in vitro* でのグルコース濃度の定量で得られた知見について解説した。グルコースと牛血清アルブミン(BSA)に光散乱を増幅させるために均質化された牛乳

を加えた混合溶液中のグルコース濃度を定量した結果、測定誤差 39.6 mg/dL という良好な検量モデルが得られ、*in vivo* でのグルコース濃度の定量における 10 mg/dL オーダーでの測定の可能性が示唆されたとともに、近赤外短波長領域の吸光度スペクトルを用いてグルコースを定量する際に有用となるグルコースに関連する 2 つの吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)が明らかとなった。

第 3 章においては、近赤外分光法による非侵襲血糖値測定の精度に影響を及ぼすと考えられる要因を検証し、検量モデルを作成する上で適切な方法を探索した結果について解説した。4 つの要因に着目し、それぞれ 2 通りの方法を比較した結果、手の平(小指球)の拡散反射スペクトル(700～1,100 nm)を台に固定したインタラクタンス型測定プローブ(図 3.2.2(a))を用いて測定し、同時に血糖値測定を行う方法を用いることで、測定誤差 9.7 mg/dL という目標としていた臨床的精度を有する良好な検量モデルが得られた。検量モデルの回帰係数プロットは、*in vitro* 実験で明らかとなった“グルコースを定量する際に有用となるグルコースに関連する吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)”にピークを有しており、グルコースの情報に基づくものであると考えられた。

第 4 章においては、第 3 章で得られた知見をもとに非侵襲血糖値測定用の近赤外分光装置を開発し、食品の GI 測定に応用した結果について解説した。被験者 1 名を対象とし、GI 測定における基準食の負荷試験中に測定した血糖値とスペクトルデータから被験者専用の検量モデルを作成し、得られた検量モデルを用いて 3 品の検査食の負荷試験中の血糖値を推定した結果、推定誤差は 8.5～14.5 mg/dL であった。推定値から GI を算出した結果は、米飯 70(実測値 80)、かまぼこ 57(49)及びヨーグルト 45(38)と良好で、近赤外短波長領域を用いた非侵襲血糖値測定法が GI 測定に応用可能であることが示唆された。

第 5 章においては、第 4 章で得られた 1 名の被験者における良好な結果の再現性を検証することを目的として、GI 測定において最小限必要とされる 6 名の被験者を対象に、第 4 章と同様の方法を用いて GI 測定を行った結果について

解説した。検査食の負荷試験中の血糖値の推定誤差には大きなばらつき(7.2～30.9 mg/dL)が認められ、個人差及び日間差の問題が改めて浮き彫りとなった。推定精度が良好であった被験者のみの結果を用いて検査食の GI を算出した結果、米飯 93(実測値 89)、スパゲティー45(45)及びヨーグルト 63(50)となり、第 4 章で得られた結果が複数の被験者においても再現できる可能性が示唆されたものの、測定精度の個人差及び日間差を解消するためにさらなる研究が必要であることが明らかとなった。

本研究の根幹となるのは、近赤外短波長領域の吸光度スペクトルを用いた場合に、グルコースの情報に基づく非侵襲血糖値検量モデルが作成可能であるかどうかという点である。近赤外短波長領域で観測される第 3 倍音、第 4 倍音の吸収は微弱でバンドがブロードであるため、果物の皮の上から光を照射して果実の糖度が定量できても、血中グルコースのように濃度が 0.1 %程度しかない対象成分をヒトの皮膚の上から光を照射し *in vivo* で定量することは、分光学の理論から見て不可能であると指摘する専門家もいる。しかし、第 3 章から第 5 章において解説したように、本研究で得られた検量モデルの回帰係数プロットは“グルコースを定量する際に有用となるグルコースに関連する吸収バンド(ピークが 920 nm と 988 nm)”にピークを有しており、検量モデルはグルコースの情報を含んでいると考えられた。ただし、ケモメトリクスの代表的な手法である PLS 回帰を用いて検量モデルを作成した場合、検量モデルの構造全てを解釈することは不可能であり、対象成分の吸収バンドと回帰係数プロットを比較することは検量モデルの構造の一部分を解釈しているに過ぎない。しかし、この一部分は非常に重要な部分であることに違いはなく、第 5 章で解説したように、複数の被験者において、検量モデルの作成日とは異なる日における測定(プレディクション)において、測定誤差 10 mg/dl 未満という結果が得られた点は、本手法で得られた検量モデルが偶然の相関によるものではないことを裏付

けているといえるだろう。本研究において、近赤外短波長領域の吸光度スペクトルを用いて測定精度の高い検量モデルが作成できたのには、次の 3 つの要因が大きく影響していると考えられる。

1. 測定部位に手の平(小指球部分)を選択した点
2. 測定領域を広くすることで光路長を十分に確保した点
3. 血糖濃度以外の外乱要因(測定部位、測定プローブの接触圧力、測定温度など)によるスペクトル変動を極力排除するよう工夫した点

これら 3 点はまさに本研究の新規性に関わるものである。第 4 章、第 5 章で解説したように、GI 測定において、基準食の負荷試験で被験者専用検量モデルを作成し、検査食の負荷試験の血糖値を推定する方法であれば、個人差及び日間差による測定精度のばらつきが問題のない範囲内に収まれば、非侵襲血糖値測定法の実用化の第一歩が見えてくる。そのためには、外乱要因によるスペクトル変動を排除する点についてさらなる研究が必要であろう。

本研究によって、近赤外短波長領域における非侵襲血糖値測定の重要波長が明らかとなったこと、短波長領域でもグルコースの吸収情報を利用した検量モデルが作成でき、臨床的精度を達成し得る可能性を証明できたことは有意義であり、特定の個人専用の非侵襲血糖値測定法の実用化は決して夢物語ではないといえるだろう。個人専用測定法であっても、GI 測定だけでなく糖尿病患者の自己血糖測定に応用することは可能である。しかし、被験者ごとにその都度検量モデルを作成する方法を医療現場で応用することは難しく、将来的にはやはり不特定多数に適用できる汎用性の高い非侵襲血糖値測定法の開発が求められる。第 5 章では、被験者 6 名に共通して利用できる検量モデルの作成を試みたが、現段階では良好な検量モデルは得られなかった。様々な生体的特徴に対応する汎用性の高い検量モデルを作成するためには、多くの被験者から収集した

大規模データを用いて検量モデルの開発を検討する必要があるだろう。

参考文献

1) International Diabetes Federation, Diabetes Atlas Second Edition (2003).

2) 厚生労働省, 平成 19 年 国民健康・栄養調査報告 (2010).

3) 厚生労働省, 平成 14 年 糖尿病実態調査報告 (2004).

4) D.J.A. Jenkins, T.M.S. Wolever, R.H. Taylor, H. Barker, H. Fielden, J.M. Baldwin, A.C. Bowling, H.C. Newman, A.L. Jenkins, and D.V. Goff, Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 3, 362-366 (1981).

5) T.M.S. Wolever, Glycaemic index and disease. In "The Glycaemic index," 1st ed. (CAB International), pp. 147-154 (2006).

6) C.F. Amaral, and B. Wolf, Current development in non-invasive glucose monitoring. *Med. Eng. Phys.*, **30**, 5, 541-549 (2008).

7) N.S. Oliver, C. Toumazou, A.E.G. Cass, and D.G. Johnston, Glucose sensors: a review of current and emerging technology. *Diabet. Med.*, **26**, 3, 197-210 (2009).

8) 岩元睦夫, 河野澄夫, 魚住純, 近赤外分光法の理論, 近赤外分光法入門, 初版, (幸書房, 東京), pp. 40-61 (1994).

9) H. Martens, and T. Naes, Methods for calibration. In "Multivariate Calibration," 1st ed. (John Wiley & Sons), pp. 73-165 (1991).

10) M.R. Robinson, R.P. Eaton, D.M. Haaland, G.W. Koepp, E.V. Thomas, B.R. Stallard, and P.L. Robinson, Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation. *Clin. Chem.*, **38**, 9,

1618-1622 (1992).

11) Ch. Fischbacher, K.-U. Jagemann, K. Danzer, U.A. Müller, L. Papenkordt, and J. Schüler, Enhancing calibration models for non-invasive near-infrared spectroscopical blood glucose determination. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **359**, 1, 78-82 (1997).

12) A. Sämann, Ch. Fischbacher, K.-U. Jagemann, K. Danzer, J. Schüler, L. Papenkordt, and U.A. Müller, Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy: investigation of long-term accuracy and stability. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, **108**, 6, 406-413 (2000).

13) H.M. Heise, A. Bittner, and R. Marbach, Clinical chemistry and near infrared spectroscopy: technology for non-invasive glucose monitoring. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **6**, 1, 349-359 (1998).

14) S.F. Malin, T.L. Ruchti, T.B. Blank, S.N. Thennadil, and S.L. Monfre, Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Clin. Chem.*, **45**, 9, 1651-1658 (1999).

15) J.J. Burmeister, M.A. Arnold, and G.W. Small, Noninvasive blood glucose measurements by near-infrared transmission spectroscopy across human tongues. *Diabetes Technol. Ther.*, **2**, 1, 5-16 (2000).

16) K. Maruo, M. Tsurugi, M. Tamura, and Y. Ozaki, In vivo noninvasive measurement of blood glucose by near-infrared diffuse-reflectance spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **57**, 10, 1236-1244 (2003).

17) K. Maruo, T. Oota, M. Tsurugi, T. Nakagawa, H. Arimoto, M. Tamura, Y. Ozaki, and Y. Yamada, New methodology to obtain a calibration model for noninvasive near-infrared blood glucose monitoring. *Appl. Spectrosc.*, **60**, 4, 441-449 (2006).

18) K. Maruo, T. Oota, M. Tsurugi, T. Nakagawa, H. Arimoto, M. Hayakawa, .M. Tamura, Y. Ozaki, and Y. Yamada, Noninvasive near-infrared blood glucose monitoring using a calibration model built by a numerical simulation method: trial application to patients in an intensive care unit. *Appl. Spectrosc.*, **60**, 12, 1423-1431 (2006).

19) S. Kawano, H. Watanabe, and M. Iwamoto, Determination of sugar content in intact peaches by near infrared spectroscopy with fiber optics in interactance mode. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **61**, 2, 445-451 (1992).

20) S. Kawano, T. Fujiwara, and M. Iwamoto, Nondestructive determination of sugar content in satsuma mandarin using near infrared (NIR) transmittance. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **62**, 2, 465-470 (1993).

21) J.T. Bruulsema, J.E. Hayward, T.J. Farrell, M.S. Patterson, L. Heinemann, M. Berger, T. Koschinsky, J. Sandahl-Christiansen, H. Orskov, M. Essenpreis, G. Schmelzeisen-Redeker, and D. Böocker, Correlation between blood glucose concentration in diabetics and noninvasively measured tissue optical scattering coefficient. *Opt. Lett.*, **22**, 3, 190-192 (1997).

22) K.H. Hazen, M.A. Arnold, and G.W. Small, Measurement of glucose in water with first-overtone near-infrared spectra. *Appl. Spectrosc.*, **52**, 12, 1597-1605 (1998).

23) M. Golic, K. Walsh, and P. Lawson, Short-wavelength near-infrared spectra of sucrose, glucose, and fructose with respect to sugar concentration and temperature. *Appl. Spectrosc.*, **57**, 2, 139-145 (2003).

24) R.E. Shaffer, and G.W. Small, Genetic algorithm-based protocol for coupling digital filtering and partial least-squares regression:

application to the near-infrared analysis of glucose in biological matrices. *Anal. Chem.*, **68**, 15, 2663-2675 (1996).

25) S. Kasemsumran, Y.P. Du, K. Murayama, M. Huehne, and Y. Ozaki, Simultaneous determination of human serum albumin, gamma-globulin, and glucose in a phosphate buffer solution by near-infrared spectroscopy with moving window partial least-squares regression. *ANALYST*, **128**, 12, 1471-1477 (2003).

26) K.H. Hazen, M.A. Arnold, and G.W. Small, Measurement of glucose and other analytes in undiluted human serum with near-infrared transmission spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, **371**, 2-3, 255-267 (1998).

27) H.M. Heise, R. Marbach, and A. Bittner, Clinical chemistry and near infrared spectroscopy: multicomponent assay for human plasma and its evaluation for the determination of blood substrates. *J. Near Infared Spectrosc.*, **6**, 1, 361-374 (1998).

28) S. Turza, M. Kurihara, and S. Kawano, Near infrared analysis of whole blood and plasma in blood-collecting tubes. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **14**, 3, 147-153 (2006).

29) D.M. Haaland, M.R. Robinson, G.W. Koepp, E.V. Thomas, and R.P. Eaton, Reagentless near-infrared determination of glucose in whole blood using multivariate calibration. *Appl. Spectrosc.*, **46**, 10, 1575-1578 (1992).

30) A.K. Amerov, J. Chen, G.W. Small, and M.A. Arnold, Scattering and absorption effects in the determination of glucose in whole blood by near-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.*, **77**, 14, 4587-4594 (2005).

31) S. Saranwong, and S. Kawano, System design for non-destructive near

infrared analyses of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **16**, 4, 389-398 (2008).

32) B.G. Osborne, T. Fearn, and P.H. Hindle, Theory of near infrared spectrophotometry. In "Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis," 2nd ed. (Longman Scientific & Technical), pp. 24-35 (1993).

33) G.S. Birth, G.G. Dull, W.T. Renfroe, and S.J. Kays, Nondestructive spectrophotometric determination of dry matter in onions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 2, 297-303 (1985).

34) R.D. Cook, Influential observations in linear regression. *J. Am. Stat. Assoc.*, **74**, 365, 169-174 (1979).

35) M.A. Arnold, J.J. Burmeister, and G.W. Small, Phantom glucose calibration models from simulated noninvasive human near-infrared spectra. *Anal. Chem.*, **70**, 9, 1773-1781 (1998).

36) Wold, S, Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics*, **20**, 4, 397-405 (1978).

37) O. Hazeki, and M. Tamura, Quantitative analysis of hemoglobin oxygenation state of rat brain in situ by near-infrared spectrophotometry. *J. Appl. Physiol.*, **64**, 2, 796-802 (1988).

38) Y. Kinoshita, T. Kojima, Y. Hirase, H. Kim, and T. Endo, Subcutaneous pedicle hypothenar island flap. *Ann. Plast. Surg.*, **27**, 6, 519-526 (1991).

39) W.L. Clarke, D. Cox, L.A. Gonder-Frederick, W. Carter, and S.L. Pohl, Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood

glucose. *Diabetes Care*, **10**, 5, 622-628 (1987).

40) V. Sanz, S. Marcos, and J. Galbán, A blood-assisted optical biosensor for automatic glucose determination. *Talanta*, **78**, 3, 846-851 (2009).

41) Food and Agreculture Organization, "Carbohydrates in human nutrition: reports of a joint FAO/WHO expert consultation," (FAO), pp. 25-30 (1998).

42) 阿部英幸, 草間豊子, 河野澄夫, 岩元睦夫, 近赤外吸収スペクトルのバンド分解による水の水素結合状態の解析. *分光研究*, **44**, 5, 247-253 (1995).

43) S. Kawano, H. Abe, and M. Iwamoto, Development of a calibration equation with temperature compensation for determining the Brix value in intact peaches. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **3**, 4, 211-218 (1995).

44) H. Abe, C. Iyo, and S. Kawano, A study on the universality of a calibration with sample temperature compensation. *J. Near Infrared Spectrosc.*, **8**, 3, 209-213 (2000).

45) 低インシュリンダイエットー超実践版, 永田孝行監修（永岡書店, 東京), pp. 61 (2002).

謝　辞

本論文は筆者が筑波大学大学院 生命環境科学研究科 国際地縁技術開発科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。

同専攻教授（独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 非破壊評価ユニット ユニット長）河野澄夫 先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、暖かい激励とご指導、ご鞭撻を戴きました。ここに深謝の意を表します。

同専攻教授 中嶋光敏 先生、同専攻教授 宮崎均 先生、生命産業科学専攻教授 佐竹隆顕 先生には副査として貴重なご指導とご助言を戴きました。ここに深謝の意を表します。

本研究の第 4 章及び第 5 章の実験で近赤外装置の改良にご協力戴いた株式会社相馬光学 技術開発部 指田邦夫 氏に感謝の意を表します。

食品総合研究所 非破壊評価ユニット主任研究員 池羽田昌文 博士、同研究員 Sirinnapa Saranwong 博士、同研究員 後藤剛喜 博士には研究遂行にあたり日頃より有益なご助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。

株式会社 WACCORD において筆者と共に本研究を推進した研究開発部 足立憲彦 氏、並びに、日頃より惜しみないサポートを戴いた当社社員の皆様に感謝の意を表します。民間企業であるにも関わらず、未だ実用化に至っていない、夢を追いかけるような研究に取り組む機会を与えて戴き、学位取得を全面的にご支援戴いた当社代表取締役 善養寺英行 社長に心から感謝の意を表します。折々に相談に乗って戴き、いつも暖かい激励とご指導を戴きました株式会社レイコー 代表取締役 神崎良太郎 社長に心より感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、ご支援、ご協力を戴きながら、ここにお名前を記すことが出来なかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、いつも明るい笑顔で筆者に活力を与えてくれた 2 人の息子達 晃太郎と匠真、そして、幼い 2 人の子育てに奮闘しながらも常に筆者の良き理解者となり暖かく励まし続けてくれた妻 麻貴に感謝します。

本研究の一部は農林水産省委託プロジェクト「食品・農産物の表示の信頼性確保と機能性解析のための基盤技術の開発（略称 : 信頼機能プロ）」により行われたことを付記します。

関連論文の印刷公表の方法及び時期

1) 全著者名：Y. Uwadaira, N. Adachi, I. Ikehata and S. Kawano

論文題名：Factors affecting the accuracy of non-invasive blood glucose measurement by short-wavelength near infrared spectroscopy in the determination of the glycaemic index of foods

印刷公表の方法及び時期：Journal of Near Infrared Spectroscopy, 18(5), pp.291-300 (2010)

(第 2 章、第 3 章の内容)

2) 全著者名：上平安紘，足立憲彦，池羽田晶文，河野澄夫

論文題名：短波長域を用いた近赤外分光法による非侵襲血糖値測定装置の開発とその応用

印刷公表の方法及び時期：日本食品科学工学会誌, 58(3) (2010)

(第 4 章の内容)

付録（検量モデルの精度の評価法について）

近赤外分光法における代表的な精度の評価法は、予測検定法(prediction testing)である。これは、検量モデル作成用サンプルとは別の検量モデル評価用サンプルを用い、その予測値と実測値から予測誤差を求めて精度を判定する方法で、外的確認法(external validation)と呼ばれる。しかし、検量モデル評価用サンプルには検量モデル作成用サンプルとほぼ同数のサンプルが必要となるため、サンプル数が少ない場合は評価用サンプルを用いずに精度を評価する内的確認法(internal validation)を使うのが望ましい。

検量モデルの精度評価に適した内的確認法として、クロス・バリデーション(cross-validation)がある。この方法では、まず、N個の検量モデル作成用サンプルをM個のグループに等分割する(本研究で用いたleave-one-outは$M=N$)。このうち、1グループのみを除外して、残りの$M-1$グループ全体で検量モデルを作成した後、除外した1グループを評価用サンプルとして予測を行う。この操作を全てのグループについて繰り返すと、最終的に全てのサンプルが一度ずつ評価用として扱われるため、それらの予測値と実測値から予測誤差を算出する。

説明変数の数を決定するには、説明変数を変化させながら評価法を繰り返し、予測誤差が最小となる変数の数を最適数とする。本研究において血糖値を推定するための検量モデルの作成に用いたPLS回帰では、最適なファクター数をこの方法で決定することで、オーバーフィッティングを防止することができる。

検量モデルの精度評価に用いる予測誤差にはいくつかの種類があり、本研究及び紹介した従来の研究で用いられた誤差の計算方法は次のとおりである。

1） 平均絶対誤差(average absolute error：AAE)

$$AAE = \frac{\sum_{i=1}^{n} \left| y_i - \hat{y}_i \right|}{n}$$

2） 二乗平均平方根誤差(root mean square error：RMSE)

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2}{n}}$$

3） 標準誤差(standard error：SE)

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i - Bias \right)^2}{n-1}} \qquad Bias = \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i \right)}{n}$$

ここで、n はサンプル数、y_i は i 番目のサンプルの実測値、$\hat{y}_i$ は i 番目のサンプルの推定値である。

一般に、検量モデル作成用サンプルの誤差は～C(例：RMSEC)で表し、検量モデル評価用サンプルの予測誤差は、クロス・バリデーションで行った場合は～CV(例：RMSECV)、予測検定法で行った場合は～P(例：RMSEP)と表す。