

報 文

赤外分光法を用いた生化学分析におけるグルコース
の干渉の低減藤井 稔子^{®*}, 宮原 裕二^{*}, 渡辺 吉雄^{*}

(1995 年 1 月 25 日受付)

(1995 年 3 月 14 日審査終了)

減衰全反射プリズムを用いた赤外分光法による生化学分析において、試料中グルコースが他の生化学成分の測定に与える干渉の低減について検討した。まず人工的に合成したグルコースと尿素の混合水溶液のスペクトルを用い、尿素濃度測定へのグルコースの干渉をシミュレーションにより検討し、校正条件の最適化により干渉が低減することを明らかにした。基礎検討に基づいて最適化した校正条件の下でヒト血清中生化学成分の定量分析を行った結果、トリグリセリド、尿素、コレステロール、尿酸、クレアチニンの測定に対するグルコースの干渉を低減することができた。又、総タンパク質、グルコース、トリグリセリド、コレステロール、尿素の測定では、自動分析装置との良好な相関が得られた。

1 緒 言

近年、分光計やデータ処理用ソフトウェアの発達に伴い、赤外分光法を生化学分析に適用する試みが行われている^{1)~7)}。赤外分光法による生化学分析は、無試薬で短時間に複数成分の同時分析ができるという従来にない特長がある。血液に適した分析手法として、減衰全反射 (attenuated total reflection, ATR) プリズムとフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) を組み合わせた ATR/FT-IR による生化学分析の研究が、1980 年代から行われている¹⁾。又、ATR/FT-IR によって測定した複雑な血液のスペクトルから目的成分を定量分析するために、多変量解析^{2)~4)}やニューラルネットワーク⁷⁾が検量法として適用されている。1989 年に Heise ら²⁾は、多変量解析による検量法のなかでは最も高精度である partial least squares (PLS) を用いて、全血中のグルコースの定量分析を行った。又、Janatsch ら³⁾は、同様の手法を用いて血しょう中のグルコースなど 6 成分の定量を行った。これらの報告では検出器の感度や血中タンパク質の ATR プリズム表面への吸着等の問題があり、測定精度が不十分であった。しかし 1994 年には Heise ら⁴⁾が、検出器の高感度化やプリズムの洗浄法の改善を行い、血しょう中 5 成分の定量分析において従来法との相関係数が 0.9 以上という良好な結果を得た。これらの報告の

分析対象である血液は、疾病などで様々な成分が正常な濃度範囲から外れた異常値をとることがあり、臨床検査ではこの異常値の検出が目的の一つとなっている。しかし上記の PLS による生化学分析^{2)~4)}では、ある成分が異常値を示す試料を測定した際の、異常値成分が他の成分の分析精度に及ぼす影響に関して検討されていなかった。又、PLS の校正条件が分析精度に及ぼす影響についても明らかではなかった。

本研究では、PLS を検量法とした ATR/FT-IR による生化学分析での、試料中に含まれる成分間の干渉について、糖尿病患者の血液などで高い異常値をとることがあるグルコースを一例として検討した。グルコース濃度が異常値である試料を測定した際の、グルコースが他の生化学成分の測定精度に及ぼす影響を明らかにし、PLS の校正条件を最適化することにより測定精度の向上を図ることを目的とした。

2 実 験

2・1 実験装置

FT-IR は、水銀-カドミウム-テルル検出器を搭載した日立 I-5040 を用いた。スペクトルは、蒸留水をバックグラウンドとして、分解能 16 cm^{-1} 、積算回数 100 回で測定した。試料セルは、スペクトラテック製の Horizontal cell を用いた。ATR プリズムの材質はセレン化亜鉛、試料面への入射角は 45° である。血清中のコレステロール濃度は日立 7150 形自動分析装置、その他の成

* (株)日立製作所中央研究所: 185 東京都国分寺市東恋ヶ窪 1-280

分の濃度は日立 736 形自動分析装置により測定し、PLS の校正及び ATR/FT-IR と自動分析装置との相関の評価に使用した。

2・2 血清及び試薬

校正に用いた標準液及び評価に用いた試料は、日立総合病院検査技術科に保管されていた 300 検体のヒト血清を用いた。ヒト血清は、テルモ製の分離剤入り採血管に採血し、凝固後に遠心分離したものである。すべての標準液及び試料は、ATR/FT-IR 法と自動分析装置の双方で測定を行った。1 回の測定に必要な血清量は、自動分析装置では 3 ml、ATR/FT-IR 法では 1 ml であり、合計 4 ml の血清量を得るために幾つかの検体を混合し、1 標準液もしくは 1 試料とした。又、再現性を評価するためのプール血清は、検体を必要量混合したものをを用いた。ヒト血清に添加したグルコースは、関東化学一級を用いた。

2・3 PLS による校正

PLS のアルゴリズムは、Martens ら⁸⁾によって報告されているものを使用した。実際の校正では、目的成分濃度が既知の血清を標準液とする。まず複数個の標準液の濃度を、自動分析装置によってあらかじめ測定しておく。次に標準液の赤外吸収スペクトルを測定し、目的成分ピークの吸光度を説明変数、目的成分濃度を目的変数として PLS によって検量式を算出する。一つの検量式を算出するのに使用する標準液のセットは、キャリブレーションセットと呼ばれている⁹⁾。なお本研究で PLS の校正に使用した生化学成分の波数範囲は、Janatsch らの報告値³⁾を用いた。

3 結果と考察

3・1 赤外吸収スペクトル

ATR/FT-IR によって測定したグルコース、尿素水溶液及び標準液として使用したヒト血清のスペクトルを Fig. 1 に示した。水溶液中のグルコース及び尿素の濃度は、それぞれ 1 g/dl 及び 500 mg/dl である。グルコース水溶液のスペクトルでは 1035 cm^{-1} 付近に大きな吸収があり、 1500 cm^{-1} 付近まで幅広く弱い吸収がある。尿素水溶液のスペクトルでは、1620、1470 及び 1160 cm^{-1} にピークがあるが、1470 及び 1160 cm^{-1} のピークはグルコースと重なりが生じている。血清のスペクトルでは、1630 及び 1550 cm^{-1} 付近のタンパク質のアミドの吸収が顕著であるが、 900 cm^{-1} 付近まで幅広い吸収があり、この吸収に埋もれているタンパク質以外の生

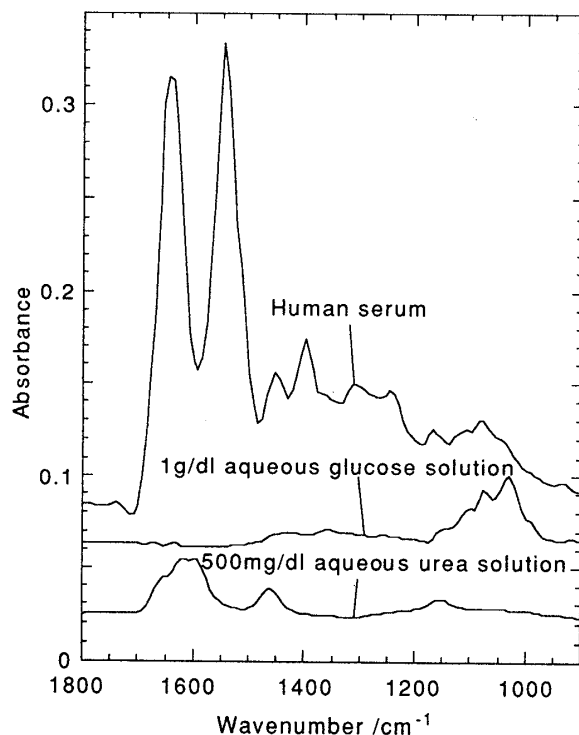


Fig. 1 Infrared spectra of aqueous urea solution, aqueous glucose solution and human serum

化学成分のピークを見分けることは難しい。しかし、前述した検量法の開発により、定量化が可能になってきている。

3・2 シミュレーションによる成分間干渉の検討

グルコース及び尿素混合水溶液において、試料中のグルコース濃度が、キャリブレーションセットの濃度範囲から外れた場合に、尿素濃度測定に及ぼす影響をシミュレーションにより検討した。Fig. 1 に示したグルコース及び尿素水溶液のスペクトルをもとに、各種濃度のグルコース及び尿素を含む混合水溶液のスペクトルを算出し、この疑似スペクトル及びスペクトル算出に用いた濃度によって PLS の校正及び評価を行った。疑似スペクトルは、 $1750\sim 950\text{ cm}^{-1}$ の波数範囲で 16 cm^{-1} ごとに吸光度を計算した。キャリブレーションセットには、グルコースが $0\sim 100\text{ mg/dl}$ 、尿素が $0\sim 100\text{ mg/dl}$ の濃度範囲からなる 59 個の疑似スペクトルを用いた。更にグルコース濃度がキャリブレーションセットの濃度分布内にある試料（正常値試料、グルコース、尿素とも濃度範囲は $0\sim 100\text{ mg/dl}$ ）とグルコース濃度がキャリブレーションセットの濃度分布外にある試料（異常値試料、グルコース濃度範囲は $0\sim 1000\text{ mg/dl}$ 、尿素濃度範囲は

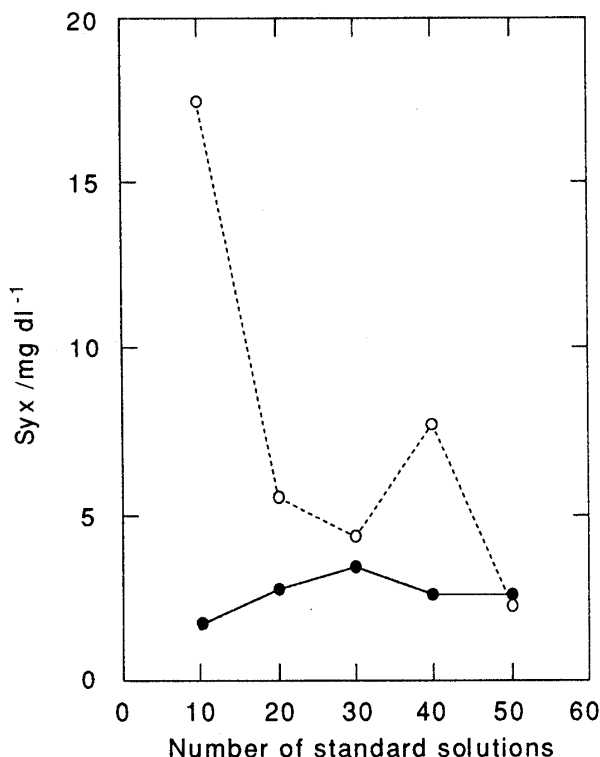


Fig. 2 Simulation results for urea measurement

Syx was calculated from correlation between urea concentrations used for spectra calculation and predicted urea concentrations using PLS. —●— sample set containing 0~100 mg/dl glucose; ---○--- sample set containing 0~1000 mg/dl glucose

0~100 mg/dl) の疑似スペクトルをそれぞれ 20 個作成した。正常値試料と異常値試料の尿素濃度測定精度、及びそれらのキャリブレーションセットを構成する標準液数への依存性を Fig. 2 に示した。縦軸は、疑似スペクトルの算出に用いた尿素濃度とその疑似スペクトルをもとに PLS により予測した尿素濃度の相関直線から算出した $Syx^{10)}$ である。異常値試料 (○) の Syx は標準液数の増加とともに小さくなり、標準液数 50 個で正常値試料 (●) の Syx と同等になる。この結果から、キャリブレーションセットの濃度範囲から外れた濃度のグルコースを含む試料では、標準液数を増加することにより測定精度が向上することが分かった。又、標準液数が限られる場合には、あらかじめ異常値のグルコース濃度を含む濃度範囲を持つキャリブレーションセットを構成することによっても、尿素濃度の測定を高精度に行うことができると考えられる。

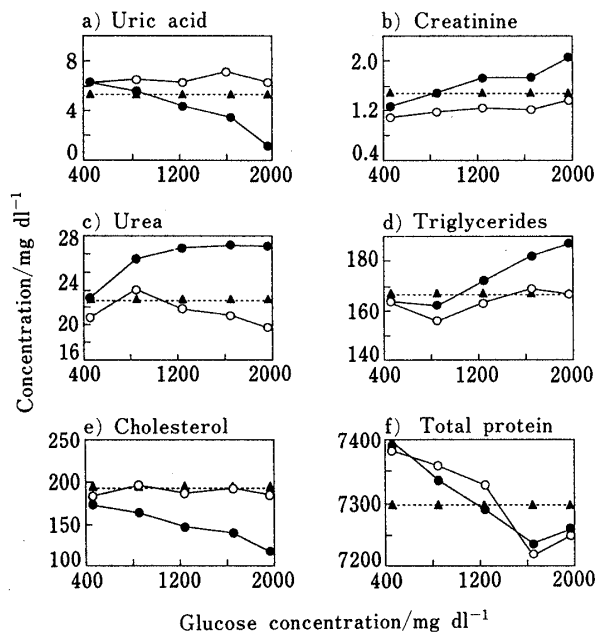


Fig. 3 Effect of glucose concentrations on biochemical analyses

Glucose concentration (x-axis) was measured by automatic clinical analyzer. Concentrations of uric acid, creatinine, urea, triglycerides, cholesterol and total protein (y-axis) were measured by ATR/FT-IR using a calibration set containing 70~1800 mg/dl glucose (○) or a calibration set containing 70~330 mg/dl glucose (●). ▲ indicates concentration of uric acid, creatinine, urea, triglycerides, cholesterol, total protein measured by automatic clinical analyzer.

3.3 血清中 7 成分の測定

上記の結果をもとに構成した 2 群のキャリブレーションセットにより、ヒト血清中の総タンパク質、尿素、コレステロール、トリグリセリド、尿酸、クレアチニン 6 成分を ATR/FT-IR によって測定し、血清中のグルコース濃度と各成分の測定濃度との関係を調べた。キャリブレーションセットは、無添加の 70 mg/dl から 330 mg/dl の濃度分布を有するヒト血清 100 検体を標準液とした無添加キャリブレーションセットと、グルコース添加により 70 mg/dl から 1800 mg/dl の広範囲のグルコース濃度分布を有するヒト血清 100 検体を標準液とした添加キャリブレーションセットを用いた。試料は、5 個に分けたプール血清で、グルコース以外の成分濃度が 5 個の試料間で一定となり、グルコース濃度のみがそれぞれ異なる異常値となるようグルコースを血清に添加したものをを用いた。2 群のキャリブレーションセットの測定結果の比較を Fig. 3 の a から f に示す。尿酸、クレ

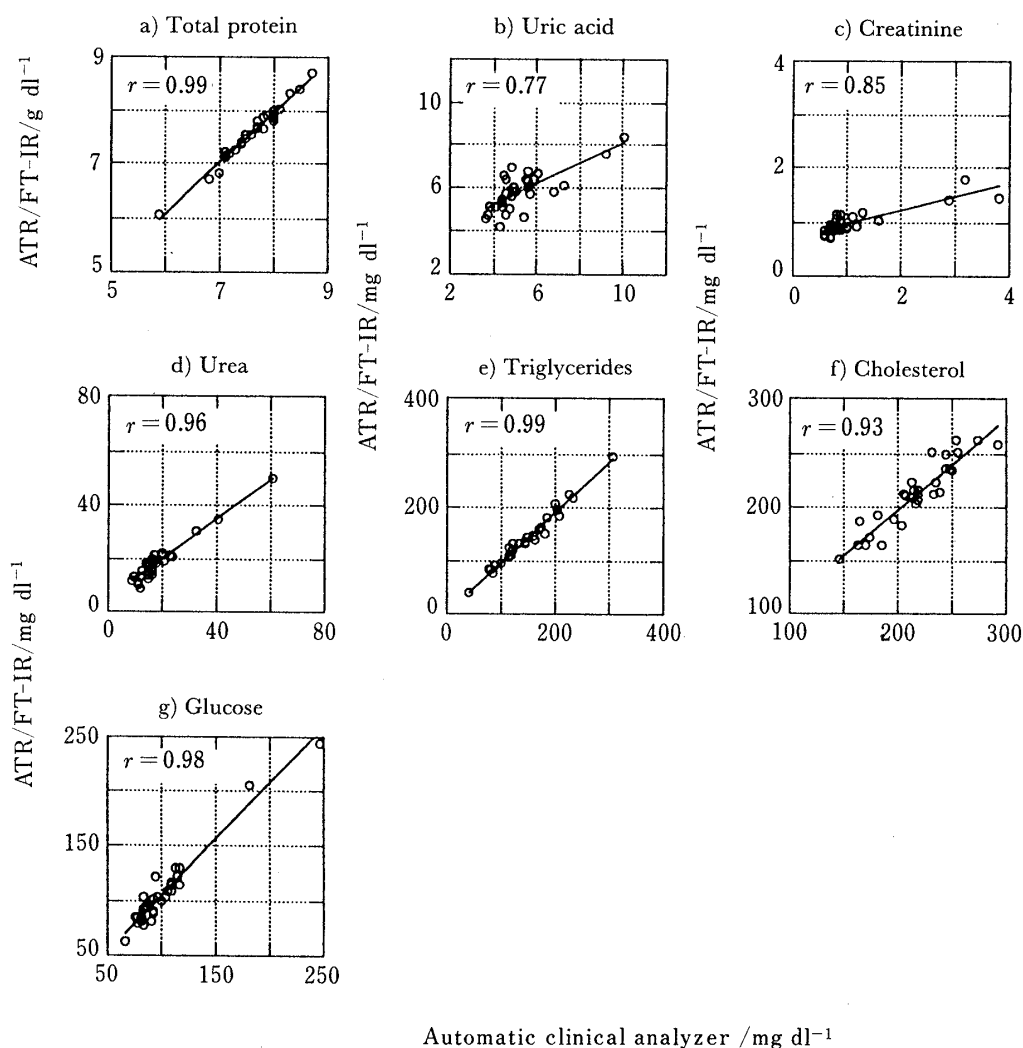


Fig. 4 Correlation between ATR/FT-IR and automatic clinical analyzer

アチニン、尿素、トリグリセリド、コレステロール (a~e) では、無添加セットの測定値 (●) は試料中のグルコース濃度によって変化し、グルコース濃度が変化することによって自動分析装置による測定値 (▲) との差が増大した。一方添加セットの測定値 (○) は試料中のグルコース濃度による影響をほとんど受けなかった。従ってグルコース濃度が異常値である試料の測定では、グルコースを添加してキャリブレーションセットの濃度範囲を広げることにより、上記 5 成分の測定精度が向上することが分かった。又、総タンパク質 (f) では、添加セットと無添加セットの測定結果に大きな違いはないが、両者とも測定誤差は臨床検査の許容範囲内であった¹¹⁾。

上記のグルコースを添加したキャリブレーションセットを用いて、ヒト血清 30 検体中の総タンパク質、尿

酸、クレアチニン、尿素、トリグリセリド、コレステロール、グルコース濃度を ATR/FT-IR 法と自動分析装置によって測定し、その相関を調べた。その結果を Fig. 4 の a から g に示す。総タンパク質 (a)、尿素、トリグリセリド、コレステロール、グルコース (d~g) は相関係数 (r) が 0.93 以上と良好な結果を得た。一方尿酸 (b)、クレアチニン (c) は、 r が 0.8 前後と低く、回帰直線の傾きも低かった。これは、2 成分の血清中の濃度が低く、分光計の感度が不十分なためと思われる。

以上のようにグルコースを添加した血清をキャリブレーションセットに用いることにより、尿酸、クレアチニン、尿素、トリグリセリド、コレステロールの測定に及ぼすグルコースの影響を低減できた。グルコース以外の成分濃度が異常値である場合、その成分が他の成分の測定に影響を及ぼすことが予測されるが、その際も本研

究での干渉低減の方法が有効であると思われる。

本研究にご協力いただいた日立製作所計測器事業部の保田和雄, 野村 靖, 宮城宏行, 菅原研之, 浅井英規各氏, 及び同社日立総合病院の津久井豊彦氏に感謝いたします。

(1994 年 10 月, 日本分析化学会)
(第 43 年会で一部発表)

文 献

- 1) B. Bauer, T. A. Floyd: *Anal. Chim. Acta*, **197**, 295 (1987).
- 2) H. M. Heise, R. Marbach, G. Janatsch, J. D. Kruse-Jarres: *Anal. Chem.*, **61**, 2009 (1989).
- 3) G. Janatsch, J. D. Kruse-Jarres, R. Marbach, H. M. Heise: *Anal. Chem.*, **61**, 2016 (1989).
- 4) H. M. Heise, R. Marbach, T. H. Koschinsky, F. A. Gries: *Appl. Spectrosc.*, **48**, 85 (1994).
- 5) H. Zeller, P. Novak, R. Landgraf: *Int. J. Artif. Organs*, **12**, 129 (1989).
- 6) K. J. Ward, D. M. Haaland, M. R. Robinson, R. P. Eaton: *Appl. Spectrosc.*, **46**, 959 (1992).
- 7) P. Bhandare, Y. Mendelson, E. Stohr, R. A. Peura: *Vib. Spectrosc.*, **6**, 363 (1994).
- 8) H. Martens, T. Karstang, T. Naes: *J. Chemom.*, **1**, 201 (1987).
- 9) P. Geladi, B. R. Kowalski: *Anal. Chim. Acta*, **185**, 1 (1986).
- 10) 小沢恭一: “臨床用自動分析”, p. 180 (1985), (講談社).
- 11) 野上清信, 中 甫: 臨床検査機器・試薬, **8**, 1313 (1985).



Reduction of glucose interference in biochemical analyses based on infrared spectroscopy. Toshiko FUJII, Yuji MIYAHARA and Yoshio WATANABE (Central Research Laboratory, Hitachi Ltd., 1-280, Higashi-koigakubo, Kokubunji-shi, Tokyo 185)

Simultaneous analyses of biochemical components in human serum were investigated using attenuated total reflection (ATR) and FT-IR in combination with the partial least squares (PLS) calibration method. When the glucose concentration in a sample was out of range of that in the standard solutions for calibration, measurements of biochemical components were found to be affected by the glucose concentration. Glucose interference could be reduced by optimizing the number of standard solutions and the range of glucose concentrations in the standard solutions. When the optimized standard solutions were used for calibration, good correlations between the ATR/FT-IR method and the automatic clinical analyzer could be obtained for measurements of triglycerides, urea, cholesterol, total protein and glucose, while correlation coefficients for uric acid and creatinine were 0.77 and 0.85 respectively because of insufficient sensitivity of the detector.

(Received January 25, 1995)

(Accepted March 14, 1995)

Keyword phrases

infrared spectroscopy; attenuated total reflection; blood serum; multivariate calibration; partial least squares.