

[B26] 近赤外光を用いた生体中における水分量計測

知能機械工学専攻 山田研究室

0334038 中村 優一

1. 緒言

人体の約70%は水分である。人体における水の役割としては、消化管において食物を吸収し易い状態にすること、血液の溶媒として働くこと、生体中のあらゆる老廃物を受け入れて排泄すること等が挙げられる。この水分の量の調節は主に腎臓において行われており、尿として生成し、体内の水分を排泄している。このとき、体内の老廃物も同時に排泄されている。この腎臓の機能が低下し、十分に水分および老廃物が排泄できなくなった状態が腎不全である。腎不全は急性腎不全と慢性腎不全に区別されるが、慢性腎不全では、失われた腎臓の機能を取り戻すことができず、最終的には、定期的に透析治療を行うことによって、余分な水分や老廃物を取り除いている。透析治療には、腹膜透析と血液透析があり、腹膜透析は家庭で行うことが可能であるが、長期で行うことができず、数年で血液透析に移行する可能性が大きい。一方、血液透析は古くから行われてきた、安心感のある治療法であるが、週3回程度通院の必要があり、また治療に3-4時間必要のために、拘束時間が長く、社会復帰が困難となる場合が多い。

血液透析における事故の1つとして、血圧低下によるショック症状が挙げられるが、これを防止するためには、体内中の水分をモニタリングすることが有効である。

そこで本研究では、より安全な血液透析、さらには家庭で行える血液透析の実現を目指し、透析中の体内における水分量をリアルタイムにモニタリングする装置の開発を目的とした。さらに、透析時における除水量の定量的な指標を得ることができるという点においても、本研究は有意義であると考えている。

本研究では、リアルタイムかつ無侵襲測定が可能な光、特に生体に対して透過性の高い近赤外域の光を用いた生体中の水分量測定の可能性について報告する。

2. 水分量の予測法

水分量の予測は対象試料の波長範囲900-1600nmでの近赤外光スペクトルを測定し、それに多変量解析を適用することによって行う。多変量解析においては、まず水の体積分率が既知の複数のサンプルに対して吸光度スペクトルを実測し、水の体積分率(目的変数)と吸光度スペクトル(説明変数)を関連づける検量関数を求める。未知のサンプルの吸光度スペクトルを測定し、求められた検量関数に適用することにより未知のサンプルの水体積分率を予測することができる。本研究では水の体積分率が既知のサンプルを未知のサンプルと考えて予測を行い、予測値との比較を行って、予測精度の評価を行った。

3. 実験方法とデータ解析方法

吸光度スペクトルの測定はファイバマルチチャンネル分光計(S-2710, 相馬光学)を用いて行った。光源にはハロゲンランプを使用した。光ファイバプローブの構成は図1のようになっており、中心に直径800 μm の受光用ファイバ、その周囲に直径400 μm の照射用ファイバが9本配置されている。

3mm毎に900-1600nmの波長域で拡散反射光から吸光度の測定を行った。測定値は露光時間10msで10回行い、積算平均した値である。測定試料として用いられる溶液をビーカーに入れ、ファイバプローブを溶液の中に10mm浸

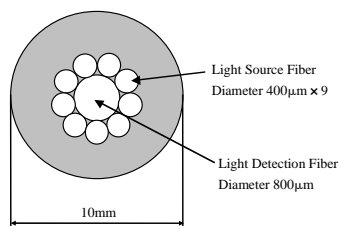


図1: 光ファイバプローブの構成

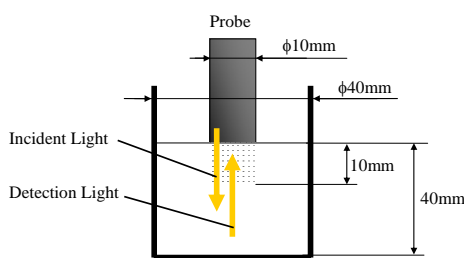


図2: 溶液の測定

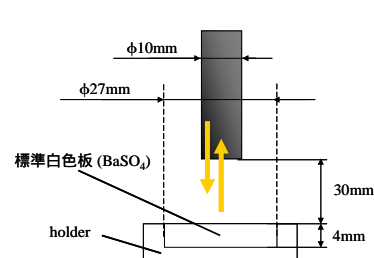


図3: リファレンス測定

漬させて測定を行った。測定の様子を図2に示す。

ここで、吸光度を求める際に必要となる入射光の強度は、高反射率をもつ硫酸バリウムの標準白色板を用いて測定し(図3)、これをリファレンス光強度 I_0 とした。吸光度 A をリファレンス光強度 I_0 と測定試料の拡散反射光強度 I の比の常用対数 $A = -\log_{10}(I/I_0)$ で求めた。

スペクトルの解析には Unscrambler(CAMO,Norway)を用いた。検量関数の作成には、説明変数と目的変数から情報を抽出し、新たな変数を作成して、検量関数を作る Partial Least Squares (PLS)法を使用した。予測値の評価には leave-one-out 法を用いた。この手法ではまず、全てのサンプルから1つのサンプルを予測用サンプルとして除き、残りのサンプルから検量関数を作成し、予測用サンプルに検量関数を適用して予測値を求める。全てのサンプルを予測用サンプルにしてこのプロセスを繰り返す。

4.光散乱媒体における水分量の予測

近赤外域の波長で生体組織と同様に光を強く散乱させるイントラリピッド溶液(Fresenius Kabi, Inc)を使用して、その水分量を測定した。イントラリピッドは水中の大豆油を乳化剤(レシチン)を用いて懸濁させたものであり、生体分光計測の分野において、生体模擬試料として広く用いられている。本研究ではイントラリピッド 20% 溶液を希釈し、水体積分率を 75.5-90.2 (vol%)まで変化させ、吸光度スペクトル測定のための試料として用意した。

測定した吸光度スペクトルを図4に示す。、水の体積分率が増加するほど、吸収が大きくなり、同時に散乱体の濃度の減少により、反射光強度が減少するため、吸光度は増加する。次に、水分量を予測する際に誤差要因となる散乱特性の影響を除去するために、測定で得た吸光度スペクトル

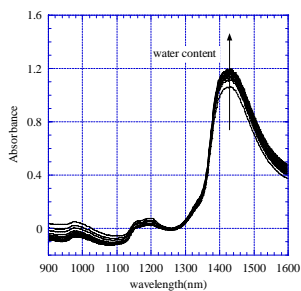


図4: 吸光度スペクトルの測定結果

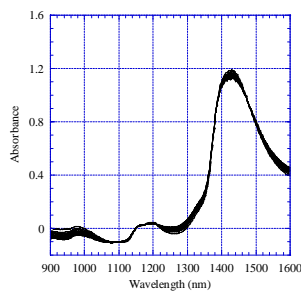


図5: MSC スペクトル

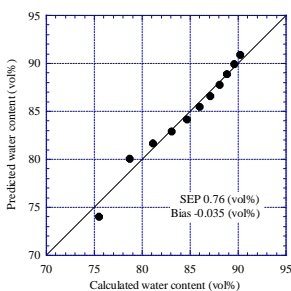


図6: 測定したスペクトルからの予測結果

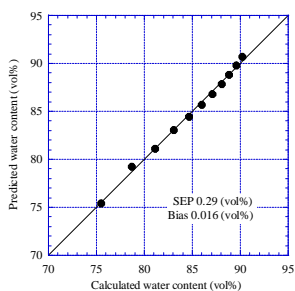


図7: MSC スペクトルからの予測結果

ルにベースラインを補正する Multiplicative Scatter Correction (MSC)処理を行った結果を図5に示す。これらの吸光度データを使用し、水体積分率に対して、PLS 回帰分析を行い、事前に求めておいた水体積分率の計算値を横軸、PLS による検量関数の予測値を縦軸にとった結果が図6、7である。図中に示す SEP および Bias はそれぞれ予測値の散らばりと偏りを表す。MSC スペクトルから予測した場合において、精度が向上するのは、ベースライン補正によって水体積分率の情報をもたないスペクトルの変動が除去できたためだと考えられる。今回の予測では、散乱体の水体積分率の測定が SEP=0.29 (vol%)程度の高精度で可能であることを示すことができた。

5.水分量予測における血液成分の影響

さらに生体組織と類似した吸光度スペクトルを得るために、イントラリピッド溶液に血液成分を添加した試料を測定対象とした。近赤外領域の波長においては、赤血球の中に含まれるヘモグロビンが特に大きな吸収帯を持っているので、これをイントラリピッドにさまざまな濃度で加え、測定試料とした。ここで、ヘモグロビンは酸素の運搬機能をもつ蛋白質であり、 O_2 が結合したオキシヘモグロビン (HbO_2)と O_2 が結合していないデオキシヘモグロビン (Hb) があり、それぞれ吸収スペクトルが異なることに注意しなければならない。測定に使用したヘモグロビン溶液の詳細と作成方法は以下のとおりである。

HbO_2 における O_2 の結合は緩く、離れやすい。Hb は NO や CO に強い親和性を有し、 O_2 を追い出して結合する。そこで、市販のヘモグロビン (freeze dried bovine blood hemoglobin, MP Biomedicals, USA) を水に溶解させた後、還元剤 (sodium hydrosulfite: $Na_2S_2O_4$) を使用し、デオキシヘモグロビン水溶液を作成する。ここで、還元剤の濃度は、1.2mg/ml で一定とした。これより大きな濃度で還元剤を加えると、還元剤による光散乱が検出されてしまうためである。オキシヘモグロビン水溶液はデオキシヘモグロビン水溶液に空気を注入することにより作成した。濃度を変化させたそれぞれの水溶液をイントラリピッド 20% 溶液に加え、測定試料とした。

さらに、血液中に老廃物として含まれる尿素(和光純薬製)をイントラリピッド 20% 溶液に濃度を変化させ加え、これも測定試料とした。

上記三種類の溶液の濃度、および水の体積分率を表1に示す。ここで、溶液の水の体積分率は、それぞれの溶液の濃度と水の体積分率が比例関係にあるとして計算した。つまり、事前にそれぞれの溶質を加えたときに増加する溶液の体積をメスピペットによって測定(増加した体積は溶

表1: 用意した試料の濃度

Material	HbO_2	Hb	Urea
Concentration (mg/ml)	4.7-42.0	2.1-38.4	0.3-64.0
Water content (vol%)	75.6-80.9	75.7-82.1	70.8-75.5

質の体積)し、溶液の濃度と水体積分率の間での比例定数を求めておく。そうすることで、溶液の濃度から水の体積分率が求まる。

これらの溶液について、吸光度スペクトルの測定を行った。それぞれの溶質による吸収を明確にするため、イントラリピッド 20%原液に対して、差スペクトルをとった。それぞれの吸光度差スペクトルを図 8-10 に示す。

900-1600nm の波長においては、ヘモグロビンは低波長側で吸収をもっており、尿素は水が大きな吸収ピークをもつ波長(およそ 1450nm)に吸収をもつ。1400nm 付近で吸光度が減少しているのは、尿素を加えることで、水の体積分率が減少するために、水による吸収が小さくなるためである。ただし、ヘモグロビン溶液で減少していないのはヘモグロビンを水に溶解させた後に加えており、ヘモグロビンの濃度と共に水の体積分率が増加しているためである。

そして、それぞれの溶液の吸光度スペクトルにベースラインを補正した後、各水体積分率に対して、PLS 回帰分析を行った。水体積分率の計算値を横軸、PLS 回帰分析による予測値を縦軸にとった結果が図 11、および表 2 である。この予測結果から、ヘモグロビン溶液の場合は、大きな吸収をもつ波長が、水とは異なるということと、その濃度変化に対する吸光度変化が大きいために、PLS 回帰分析がよく機能し、吸光度スペクトルから水体積分率の情報を精度良く抽出し、高精度で水の体積分率を予測できた。一方、尿素の場合において少し誤差が大きいのは、吸収を持つ波長が、水のそれに近いために、PLS 回帰分析によって、水によるスペクトル変化と尿素によるスペクトル変化をうまく分離できずに誤差が大きくなったと考えられる。

以上の結果をまとめると、生体組織において、ヘモグロビンの濃度変化によって、吸光度スペクトルが変化しても、水の体積分率は十分な精度で求まることが示された。また、尿素の濃度変化によるスペクトル変化の場合、水体積分率の予測における誤差は比較的大きくなったが、それでも SEP は 1.6 (vol%)程度である。よって、生体組織での水体積分率の測定において、血液の影響は本研究で用いた成分については、十分に取り除くことができると結論付けられる。ただ、血液中には上記の他にもいくつかの成分が含まれており、特に多く含まれるアルブミン、グロブリン等の蛋白質については、その影響を調査する必要があると考えられる。また、イントラピッド溶液中に含まれている脂質と生体中に含まれる脂質はその種類が異なるので、これらについても考慮していく必要がある。

6. Monte Carlo 法による吸光度スペクトルの計算

生体組織におけるさまざまな条件を簡便に模擬するために、統計的手法である Monte Carlo 法を用いて吸光度スペクトルを計算した。Monte Carlo 法では入射する光のビームを多くのエネルギー粒子と考え、その媒体における光学特性値に基づいて、一つ一つのエネルギー粒子を追跡する。媒体内での光伝播を規定する光学特性値として吸収係

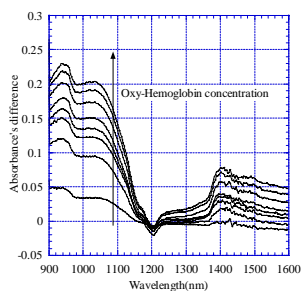


図 8: Oxy-Hemoglobin 溶液の吸光度差スペクトル

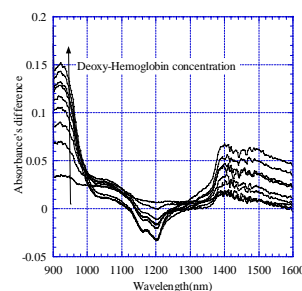


図 9: Deoxy-Hemoglobin 溶液の吸光度差スペクトル

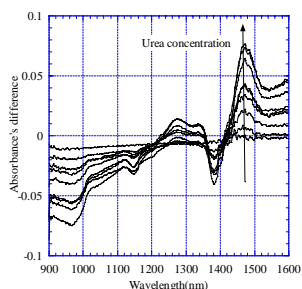


図 10: 尿素溶液の吸光度差スペクトル

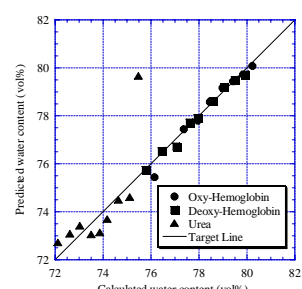


図 11: 予測結果

表 2: 図 11 より計算される SEP と Bias

Added material	Oxy-hemoglobin	Deoxy-hemoglobin	Urea
SEP (vol%)	0.29	0.15	1.6
Bias (vol%)	-0.083	-0.030	0.40

数 μ_a 、散乱係数 μ_s 、異方散乱パラメータ g 、屈折率 n を考慮する。また、本シミュレーションにおける入射光と検出器は図 1 に示した光ファイバの構成に基づいて設定した。

まず、4 節で行った実験を想定し、イントラリピッド溶液を希釈した場合において、モンテカルロシミュレーションを行い、吸光度スペクトルを計算した。光学特性値は、 μ_s および g については staveren ら¹⁾が求めた近似式を使用し、 μ_a については、イントラリピッド溶液では 900-1600nm の波長においては、水の吸収が支配的なので、水の吸収係数にその体積分率を乗じたものを使用した。 n は 1.32 で波長に依存せず一定とした。2nm 毎の波長で光学特性値を与え、計算した結果を図 12 に示す。この結果は 4 節での実験結果と少し異なる。この原因として、以下のことが挙げられる。

- (1) 吸光度を求める際の入射光強度が、実験においては標準白色板を用いて測定したりファレンス光強度であるために実際の入射光強度より小さく、計算結果において、実験結果よりも吸光度が大きくなる。
- (2) シミュレーションにおいて、検出ファイバの NA(Numerical Aperture)や検出感度を考慮していないために、実験では検出できないような光までも検出してしまい、吸光度が小さくなる。
- (3) 今回のシミュレーションには staveren らが求めた光学特性値を使用したが、彼らが求めた 400-1100nm の波長では、多くの研究者がイントラリピッドの光学特性値を測定しており、その値が 20%程度異なる報告もある。さらに今

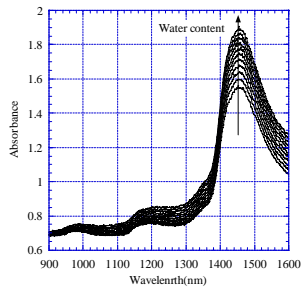


図 11: Monte Carlo 法による吸光度スペクトル

回使用した波長は 900-1600nm であるために、この波長における光学特性値を測定する必要がある。

また、図 11 を用いた PLS 回帰分析による水体積分率の予測結果が図 12、計算結果のベースラインを補正したスペクトルからの予測結果が図 13 であるが、この 2 つの予測結果の精度は実験の場合と異なり、ほとんど変わらない。これは、シミュレーションにおいて設定した g を水体積分率に対して一定としたため、水体積分率に対する溶液のベースライン変化(散乱特性の変化)が単調となったためだと考えられる。今後、散乱体の濃度を变化させたときの g の変化について調査する必要があると考えられる。

7. Monte Carlo 法による皮膚スペクトルの計算

皮膚は表皮と真皮の 2 層から構成され、皮膚の下には皮下組織がある。本研究は血液透析時の水分量のモニタリングを目指しており、血液透析においては、間質液として貯留した水分は毛細血管を介して、血液から取り除く。よって、シミュレーションモデルとして、血管が張り巡らされた真皮層の水分量を変化させ、表皮、真皮および皮下組織の 3 層構造のモデルを考えた。また、モデルを簡単化するため、各層は光学的に均一な媒体とし、各層の厚さは、表皮 0.2mm、真皮 1.5mm、皮下組織 3mm とした。それぞれ

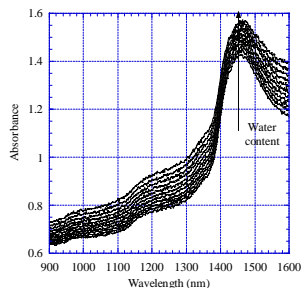


図 14: Monte Carlo 法による皮膚の吸光度スペクトル

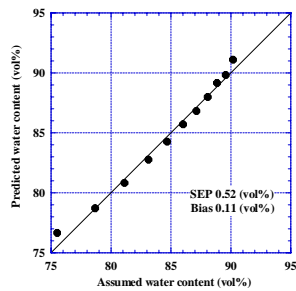


図 12: 計算で得たスペクトルからの予測結果

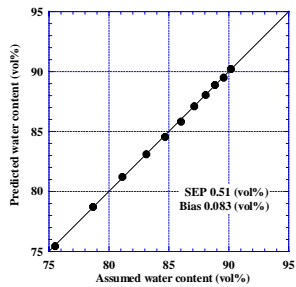


図 13: MSC スペクトルからの予測結果

の層の光学特性値は、表皮と真皮の散乱係数を Simpsonら²⁾が測定した皮膚の散乱係数を参考にし、イントラリピッド 15% 溶液の散乱係数を表皮の散乱係数として使用した。真皮においても、この値を水体積分率 60% における真皮の散乱係数とし、水の体積分率を 80% まで 2% 刻みで増加させ、それと共に、真皮の散乱係数を散乱体の濃度に比例させて、小さくした。皮下組織の散乱係数は Simpsonらの測定結果より、イントラリピッド 10% 溶液の値を用いた。本研究の対象としている 900nm-1600nm の近赤外光では、生体による光の吸収の大部分は水によるものであり、角質の水分量が 20% 程度であることから、表皮の吸収係数を水の吸収係数の 20% とした。真皮の吸収係数は、真皮の水体積分率に応じて、水の吸収係数とその体積分率を乗じた。皮下組織層の吸収係数は、脂肪組織が主であることから、大豆油の吸収係数を用いた。皮膚の屈折率は波長に依存せず全ての層で $n=1.37$ とした。異方散乱パラメータ g も本来であれば波長依存性があることが知られているが、本研究では波長に依存せず、全ての層で 0.7 とした。

そして、皮膚の吸光度スペクトル計算結果が図 14 であり、この吸光度スペクトルから水分量を予測した結果が図 15 である。この結果から、シミュレーションにおいて SEP が 1% 以内で皮膚の水分量が予測できることが分かった。しかし、本シミュレーションの正確さには課題が多い。前節でも述べたように検出ファイバについて課題が残っており、さらに大きな課題は皮膚における光学特性値である。表皮と真皮を分離することが難しいため、それらの光学特性値は確かな値が分かっていない。さらに、その水分量に対する変化は詳しく調査する必要がある。特に最も必要な値が散乱係数 μ_s と異方散乱パラメータ g であると考えられる。これらの値の波長に対する変化、水分量に対する変化を詳しく調査することが不可欠だと考えられる。

8. 結言

近赤外光を用いて水分量を変化させたイントラリピッド溶液、およびイントラリピッド溶液に血液成分を添加した試料に対し、吸光度スペクトルを測定し、多変量解析を用いて水の体積分率を求めた結果、高精度で予測できた。また、Monte Carlo 法を用いてイントラリピッド溶液、および皮膚の吸光度スペクトルを計算し、計算結果の精度向上のための課題を挙げた。

参考文献

- 1) Hubo J. van Staveren, Christian J. M. Moes, Jan van Marle, Scott A. Prahl, and Martin J. C. van Gemert "Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100nm" Appl. Opt., Vol 30 pp. 4507-4514 (1991)
- 2) C Rebecca Simpson, Matthias Kohl, Matthias Essenpreis and Mark Cope "Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique" Phys. Med. Biol., Vol. 43, 2465-2478(1998)

図 15: 皮膚水分量の予測結果