レーザー ATR 法を用いた非観血・連続的血糖測定装置の基礎的研究

Laser Absorption Spectroscopy for Blood Glucose Measurement

○菊地 真* 中須英輔** 佐野 昭** 桜井靖久***

○Makoto Kikuchi* Eisuke Nakasu** Akira Sano**
Yasuhisa Sakurai***

*防衛医大・医用電子 **慶応大・工

***東女医大・医工研

* Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

** Faculty of Engineering, Keio University

*** Institute of Medical Engineering, Tokyo Women's Medical College

We have developed a laser absorption spectroscopy for blood glucose measurement based on the use of carbonic gas laser which permits the glucose density of human tissues to be measured continuously without taking blood samples.

As compared with conventional types of infrared spectrometers, the newly developed laser absorption spectrometer features a higher light source brightness and combined use of laser beam displaying excellent wavelength resolution and attenuated total reflection(ATR) plate. The ATR plate is an attenuated total reflection prism with high refraction index containing arsenium selenide.

Regarding its principle of measurement, the ATR plate is pressed against the patients lips or other viscous membrane tissue and the carbonic gas laser beam made to penetrate to a depth of about 30 microns in the tissue for multiplexed reflection. The absorbed spectrum is measured and fed into a minicomputer for direct readout of glucose density.

Conventional methods for measuring the kinds or densities of molecules in human tissues optically require the use of visible light rays. However, the newly developed laser absorption spectrometer employs the ATR prism, by which it is possible to use a carbonic gas laser lying in the range of infrared rays for measuring the absorbed spectrum.

Since this new spectrometer permits the glucose density in the blood to be measured in real time and very accurately without extraction of blood serum from the body as with conventional great value in this field.

1 はじめに

今日の医療における臨床検査の果たす役割は大きく、とりわけ血液生化学検査データが診断・治療の決定に不可欠である。現在では、自動生化学分析装置の出現により検体の前処理や試薬の注入、さらに反応過程の自動化が行われたことにより血液生化学検査は大幅に簡略化されつつあるが、一方では、採血の必要性や測定結果が得られるまでに時間がかかることなど改善すべき点が多い。本来理想とされる非観血、連続的血液生化学検査を実現させるためには、単に用手法を自動化したこれまでの自動分析装置では原理的限界があり、従つて、異なつた原理に基づく新しい血液生化学分析法の研究が望まれるところである。

近年のレーザー技術の進歩に伴い、レーザーの医学的応用もレーザーメスに代表されるような主として熱作用を利用する治療レーザーの他に、レーザーの検査・診断への応用も急速に広がつつある。

そこで本研究では、レーザー光を光源に用いた血液生化学分析用のレーザー分光光度計を開発し、さらにこれらと内部多重全反射法(ATR法)を結びつけることによつて、血液あるいは組織液中のグルコースなど生体に重要な各種生化学物質を採血することなく、体表面から瞬時的にかつ連続的に定量測定できる新しい測定手法を開発することを目的として、その基礎的研究を行つた。

されている赤外吸収スペクトル²⁾と比較・検討した。

測定には日本分光製分光器SS-25(測定波長範囲は400 μ m~12 μ m、光源は特殊ニクロム発熱体、検知器は高感度熱電対)を使用し、血液、水(脱イオン水)、50%W/Vブドウ糖水溶液の吸収スペクトルを記録した。実験では、厚さ4mmのセレン化硅素板2枚の間に厚さ0.1mmの鉛スペーサをはさみ、この間に各サンプルを注入して測定した。なお、波長2 μ m以上の赤外領域では、水による吸収が強く透過光が極めて少ないので減光器を使用して透過度を拡大し測定を行つた。

血液の吸収スペクトルは、ほぼ水と同様のパターンを示し、3ないし6、1 μ m付近に吸収のピークがみられる。さらに10 μ mよりも長波長帯で再び吸収が増加する。これは赤外領域では血球による光の散乱作用が少ないことを示しており、血漿中の物質による吸収スペクトルが現われている。血漿の約92%は水分であり、従つてほぼ水の吸収スペクトルと似てくるわけである。しかしながら、6~12 μ mの範囲では血液と水の吸収スペクトルがわずかながら異つており、この差が血漿中に比較的高濃度で存在するグルコース、尿素、ポリペプチド、コレステリン等による吸収と思われる。

図1は、グルコース水溶液(50%W/V)の吸収スペクトルを示し、グルコースの吸収が7 μ m及び9~10 μ m付近で強まることが確認された。

2 吸収スペクトルの測定

2・1 透過法によるグルコースの赤外分光測定
研究に先立ち、まず従来からの分光器を用いて透過法によりグルコースの吸収特性の測定を行い、その特徴を既に報告

Fig.1 Transmission spectrum of glucose

2・2 ATR法による赤外分光測定

2・1の結果から明らかなように、血液、組織液等の水溶液の赤外分光では、水による吸収が極めて強く、透過法による測定は通常困難である。そこで、内部多重全反射吸収スペクトル法(ATR法:Attenuated Total Reflection)を用いて同様の測定を試みた。

2・2・1 ATR法の原理

図2にATR法の原理を示す。光は一般に臨界角以上の入射角で光学的に密な媒質(屈折率の大きい物質)から粗な媒質(屈折率の小さい物質)に移るときに、その境界面で屈折しないで全反射する。この反射では、普通の金属表面での反射と異なり、その境界面で光は波長に比例した深さ(波長の約2~3倍)だけ粗な媒質に浸み込み、そこから反射方向へ進んでゆく。このとき粗な媒質に吸収があれば浸み込んだ光の一部が吸収される。

2・2・2 ATR法による吸収スペクトルの測定

測定には日本分光製分光器A-302と赤外全反射吸収スペクトル装置ATR-6を用いた。

図3は、本装置によつて測定された水及びイヌ生体組織の吸収スペクトルの一例を示したもので、前述の如く6~12 μ mの範囲で両者に差が見られる。

次いで、グルコースの吸収スペクトルを検討するため、さらに日本分光製赤外データプロセッサDP-A300を連結してデータ処理を行つた。

図4は、イヌ血清(血糖値332mg/dl)及び脱イオン水の8.33 μ m(1200 cm^{-1})~11.1 μ m(930 cm^{-1})におけるATR法により得た吸収スペクトルを示す。これから明かなように両者の差はごくわずかであり、肉眼的には判断できない。そこで、前述のデータプロセッサにより吸光度を20倍に拡大して両スペクトルの差をとり、さらにこれを16回加算平均することにより、図5の結果を得た。同図下はグルコース水溶液(500mg/dl)から水の吸収パター

Fig.2 Principle of the ATR method

Fig.3 Spectral patterns of the various tissues obtained by the ATR method

Fig.4 The ATR absorption spectrum of blood serum and water

Fig.5 The ATR absorption spectrum of standard sample and serum

ンを差し引いた同様の吸収スペクトルを示すが、両者とも $9.17\mu\text{m}$ (1090cm^{-1}) $\sim$ $9.36\mu\text{m}$ (1070cm^{-1})、 $9.43\mu\text{m}$ (1060cm^{-1}) $\sim$ $9.81\mu\text{m}$ (1020cm^{-1}) に吸収のピークが現われており、これらの波長範囲における吸光度の変化が糖濃度の変化を反映していることがわかる。

なお、図から明らかなように水溶液中ではグルコースの吸収スペクトルのピークがなだらかな山状を呈しており、ピーク値の読み取りが困難である。そこでマイクロコンピュータによるデータ処理装置（後述）を試作してデータ処理を行つた。

図6は、データ処理により得られた結果の一例を示す。 $9.17\mu\text{m}$ と $9.36\mu\text{m}$ の二点の吸

Fig.6 Relation between absorbance and glucose concentration (simple revolution)

光度を結んでベースラインとし、その線を基準にして算出した同波長帯中の最大吸光度の値を読み取つて、予じめ酵素比色法で求めた血糖値との相関を調べた結果である。この際、吸光度の絶対値を用いなかつたのは、試料の注入状態などによつて吸光度の絶対値がわずかながら変化する可能性があるからであり、むしろ相対的变化量としてとらえた。図6は最小二乗法によつて求めた単回帰線を示し、サンプル数40で相関係数0.956である。同様に二次回帰線も求めたが(図7)、ほぼ直線に近く回帰偏差も同様の値を示したので、単回帰により処理することとした。なお、9.43~9.81 μm 帯では相関係数が0.911であつた。いづれにしてもグルコースの特異的な吸収波長帯に着目した高感度の吸光度測定が行えれば、吸光度の変化から

Fig.7 Relation between absorbance and glucose concentration (secondary revolution)

糖濃度が測定できることになる。

3 レーザ ATR 血糖測定装置

血清中の微量糖濃度を、グルコースと分子構造が似かよつた他の物質の吸収スペクトルから分離して選択的に測定するには、分光器の光源輝度を高めてS/N比を増加させるとともに、波長分解能を向上させる必要がある。従来の赤外分光光度計では光源にニクロム発熱体を用いたものが多く光源輝度が低い。さらに、回折格子による分光器の分解能では高々0.4 cm^{-1} 程度にとどまるものが多い。

一方、レーザーを光源に用いれば高輝度を得ることが容易であり、さらにレーザー光の発振スペクトルは 10^{-3}cm^{-1} 程度と極めて細いので高分解能が得られることが期待できる。従つて本研究ではレーザーを光源としたATR法による血糖測定装置を開発した。

3.1 装置の試作

図8は今回試作したレーザーATR装置のシステムブロック図を示す。

使用したレーザーは、図5に示したグルコースの吸収ピーク帯に発振波長をもつ炭酸ガス(CO_2)レーザー(米国MPB Technologies INC社製Model-ML3852、最大出力6W)であり、レーザー発振モードコントロールにより9.174~10.817 μm の範囲で特定の発振波長が選択できるようになつてい

Fig.8 Schematic illustration of the ATR laser spectrometer

なお、レーザー光源を用いることにより2・1で述べた透過法による分光測定も考えられるが、生体試料に高い光エネルギーを注入することにより、試料の熱的変性や、あるいはこれにより生ずる吸収スペクトルの変化も充分考慮しなければならない。そのため、2・2と同様にATR法を導入して、図8のようにレーザー光源と組み合わせた。さらにATR法を採用したことにより、ATR板を生体組織の表面に押し当てただけで、光が組織中に浸み込み全反射するので組織液の吸収スペクトルを非観血的に測定

Fig.10 Front-view of the measuring set-up

することが可能になる。一方、血液などの液体試料でもATR板の側面に試料を注入すれば、同様の測定が行えることになる。

光学系はダブルビーム法とし、回転円板による200Hzのチョツパーを介した後に、ELETEC社製Model 406赤外線検出器で検出してデータ処理部へ入力させた。なお、リファレンス側には脱イオン水を置いて、水の吸収スペクトルをデータ処理部で差し引いたが、個人の血糖の経時変化を監視するような場合には、個人の血液をリファレンスにしてその後の経時的変化の値を追うことも考えられる。

図9は検出器の出力信号を示し、図10は試作した装置の概観を示す。

3・2 データ処理部

検知信号(図9)は、A/D変換器によりA/D変換されてマイクロコンピュータ(Cannon社製BX-1)に転送されデータ処理を行う。なお、BX-1のデータ取り込み速度は9600ボ-、7ms/12bitである

ので、転送速度を調節するためにインターフェイス部を挿入してサンプル、リファレンス両信号とも各々4つのデータの和を処理するようにした。

レーザーATR法により得られたグルコース吸収帯のスペクトルのベースラインは2・2・2と同様にして決定し、最大吸光度並びに積分吸光度(指定された波長範囲における吸スペクトルの面積)を演算させた。なお、データ処理部では、図6、図7と同様に検量線や相関係数も算出した。

3・3 実験結果

図11及び図12は各々、P(28)枝(9.62μm)及びP(36)枝(9.69μm)における血清の吸光度とグルコース濃度の相関を示したもので、相関係数も、0.997、0.991と図6にくらべて高まっている。なお、実験に使用したレーザー入力は約200mWである。

Fig.11 Relation between absorbance and glucose concentration
(at p(28) branch)

Fig.12 (at p(36) branch)

4 結論及び検討

以上、本研究においてはレーザATR法の導入により新しい血液生化学検査法を開発する目的で、特に血糖測定を対象にした基礎的研究を行つた。

血糖の維持・調節は、生体機能を営む上で極めて重要であり、血糖値の把握は糖尿病患者、術中患者さらには新生児の血糖管理など臨床面でもその価値が大きい。特に最近では、血糖値を連続的に測定して必要なインスリンあるいはグルコースを適正に注入する自動治療制御システムの開発⁵⁾も盛んであり、これらのシステムにおいては血糖値の検出法の開発が残された最も大きな問題となつている。

本研究で試みたレーザATR法では、ATR板を口唇などの粘膜組織に押し当てて、これに炭酸ガスレーザ光を導光して約30 μm程度の深さの組織内にレーザ光を多重的に浸透させ、その吸収スペクトルを測定して組織糖濃度を非観血的に、しかも連続して測定しようとするもので、本法の開発は内科・外科を問わず広く臨床医学の有力なモニターとして役立つのみならず、基礎医学研究の有用な武器となる。

本法の原理となる赤外吸収分光分析は、光のエネルギーが溶液中に存在する溶質分子の振動あるいは回転エネルギーとして取り込まれて分

子の双極子モーメントの変化を生じさせることにより起こる赤外吸収に基づくものである。入射光のうち、吸収される光の割合は、光路内に存在する分子の数に比例し(Beer-Lambert則)、溶液の吸収は溶媒自身の吸収を差し引けば溶質分子の濃度に比例することになる。すなわち、吸光指数(absorbance)Aは、

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon C \ell$$

ただし、 I_0 は入射光強度、 I は出射光強度、 ϵ はモル吸光係数(molar absorption coefficient)、 C は濃度、 ℓ は光路長で示される。ただし、モル吸光係数は溶質の濃度によつてかなり変化することも見られるので、分光法により溶質の定量を行う場合には、測定対象とする濃度範囲においてBeer-Lambert則が成り立っているかを充分検定する必要がある。図6、図7は示された如く、グルコースに関してはかなりの高濃度(1000 mg/dl)まではほぼ直線性が得られているが、今後はたとえ吸光係数 ϵ が変化しても、積分吸光係数 $\int_V \epsilon dV$ (V は波長)がほぼ不変であることに注目して、グルコース吸収ピーク帯の面積変化量と糖濃度の相関も検討してみる必要がある。

2・2で述べたように従来の赤外分光器とATR法を連結した装置によつても、図6に示された如くかなりの相関が得られるが、図11、図12に示したレーザATR法の結果と比較し

てみると、臨床上重要である比較的低い範囲の血糖値における測定値のバラツキが大きく、この点がレーザATR法では大幅に改善されている。従来の分光器で測定精度を高めるために検出器の増幅度を上げなければならなかつたがS/N比の問題から限度があり、一方S/N比を改善するために加算平均の積算回数を増せば、測定時間が延長して連続的測定が困難になるなどの欠点を有していた。従つて、輝度の高いレーザを光源に用いることは、この点からも利点があるといえる。

一方、単色性にすぐれたレーザは種々の物質が混在する血液や組織液での特定物質の定量には適するが、この点についての定量的検討は現段階ではなされておらず、今後早急に詳細な検討を行う予定である。その結果によつては、2・2・2で述べたようなベースラインを設定して最大吸光度を読み取るよりも、むしろ、予じめ知られているグルコースの最大吸収ピーク波長だけに着目して、常にその吸光度だけを測定する方がよいことになることも考えられるが、いずれにせよ定量的検討を行つた上で結論すべきであろう。

本装置の実用化を考える場合には、生体組織と直接接するATR板の材質も充分考慮すべきであり、この点からは現在使用中のセレン化砒素は問題が残る。この他にもATR板の材質としては、KRS-5 (TlBrとTlIの混晶)、KRS-6 (TlClとTlBrの混晶)、ゲルマニウム、サファイアなどが考えられ、これらの検討も行う必要がある。

一方、光学系に関しても微量測定であるためATR板を含めた光路のわずかなずれも、測定結果に重大な影響を及ぼす。従つて、現在開発されつつある炭酸ガスレーザ用ファイバーなどを導入して、検査装置として充分柔軟性を持たせるなどの配慮も必要であろう。

謝辞

本装置の試作は、アロカ(株)の御協力により行われた。

ここに深く感謝の意を表する。

参考文献

- 1) 西坂 剛：レーザの生体計測への応用、医用電子と生体工学、17、7、523/529、1979
- 2) 堀口 博：赤外吸光図説総覧、三共出版1973
- 3) 菊地 真、南島健治、桜井靖久：各種生体組織のスペクトル特性について、第2回医用レーザ研究会にて発表、大阪、1978
- 4) 菊地 真、中須英輔、佐野 昭、桜井靖久：レーザの検査・診断への応用 - 体表面からの生体物質同定法について、医用電子と生体工学、18、特別号、148/149 (1980)
- 5) Makoto Kikuchi, Etuko Machiyama, Nobuyuki Kabei, Akio Yamada, Yasuhisa Sakurai: Adaptive Control System of Blood Glucose Regulation, Proceedings of MEDINFO 80, TOKYO, 1980
- 6) N. Kaiser: Laser Absorption Spectroscopy with an ATR Prism, IEEE, BME-26, 10, 597/600, 1979