

皮膚中の自家蛍光測定技術の開発

食品・環境科 主任研究員 三木伸一

生体測定では、採血や皮下埋め込みを要することなく、非破壊、非侵襲で測定できることが望ましい。また、近年、ウェアラブル（身に付ける）端末がトレンドとなっており、小型化、低コスト化も求められている。こうしたなか、LED等の安価な光源の進展もあり、光を使った計測が健康管理の有力な手段の一つとなっている。

光を用いた計測手法は多数あるが、本研究では、生体の内在物質から発光する蛍光（自家蛍光）に着目する。蛍光は、特定の波長の光（励起光）により励起された物質が、別の波長（励起光より長波長）の光を放出する現象で、励起光と蛍光の波長が一致する物質は限られるので、高い選択性を有する。

一方、生体組織に含まれる物質は多種多様で、また、その構造は複雑である。そのため、発光した光を単に検出するだけでは、目的成分以外の情報が含まれ、正確に測定できない。本研究では、分光分析等による光学特性（蛍光、散乱、吸光）の測定データを基に光伝播シミュレーションを実施し、皮膚等の散乱体の蛍光測定技術の確立を目指す。具体的には、蛍光性タンパク（糖化生成物）、脂質など、夾雑成分、散乱成分を含んだサンプルを調整し、これらの吸光及び蛍光に関する光学特性を調べるとともに、拡散近似やモンテシミュレーションなどの解析法による理論検証を実施し、誤差要因の洗い出しとその補正方法を検討した。

1. 緒言

ヘルスケアに関する測定機器は、体を傷つけないこと、簡便であること、などが機器の仕様として要求される。そのため、人体への影響が少なく、化学的な前処理が不要な光技術の利用が効果的であり、脂肪、タンパク、血糖などの測定や、癌診断や組織活性の評価、老化の評価などに光計測が用いられている^[1]。

一方、生体の強い多重散乱性により生体を伝播する光は散乱し、分光情報はゆがめられる。そのため、生体内の物質量を正確に測定することは容易ではない。生体計測においては、多重散乱の影響を如何に補正するかが肝要である。

筆者らは、これまでに散乱補正技術を用いた近赤外光の吸光分析に取り組んできた^[2]。散乱補正技術は、分析値の確からしさの向上に加え、適用する光情報の最適化、最小化につながり、分析装置の小型化、簡便化の実現に資する。また、近赤外域の光は「生体の窓」と呼ばれる透過性の高い光であり、体を傷つけることなく、生体内部の情報を取得できる。しかしながら、近赤外光は非破壊計測の有用なツールであるが、C-HやO-Hなどの分子振動の倍音、結合音からなるブロードな吸収特性に基づくことから、測定できる対象には限りがある。

本研究では、これまでの生体計測、散乱補正技術等のノウハウ、知見を、蛍光測定へと応用する。蛍光性を有する生体物質の中には、生体にとって重要な役割

を持ち、健康状態の指標となるものが数多く存在する。蛍光は、特定の波長の光（励起光）により励起された物質が、別の波長（励起光より長波長）の光を放出する現象である。励起光及び蛍光の波長が一致する物質は稀であることから、蛍光測定は高い選択性を有し、また、微弱な光を検出できる特徴も併せ持つ。一方、生体組織に含まれる物質は多種多様で、励起光や蛍光波長域における夾雑物質の吸光や発光の重なりや、前述の多重散乱による分光情報の歪みなどに起因して、目的成分の量を正確に測定することは難しい。

本研究では、近年注目されている蛍光性を有する糖化タンパク質をターゲットとし、より正確な皮膚の蛍光測定技術の確立を目指す。まずは、吸光、蛍光、散乱の観点から分光データの取得及び疑似モデル等による解析等を行い、支配的な誤差要因となる物質を洗い出した。次に、得られた分光データを基に拡散近似やモンテカルロシミュレーション等を実施し、誤差要因の補正法について検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬

分光特性の検証用として、市販のタンパク質、アミノ酸、グルコース等の試薬を用いた。また、生体の散乱性を疑似するため、イントラリピッド（脂質）を用いた。

2.2 蛍光性物質の調整

蛍光性を示す糖化タンパク質を調整するために、ヒト血清アルブミンにグルコースを添加し、緩衝溶液を用いて中性及びアルカリ条件とした後、60℃で数日インキュベーションし、糖化タンパク質を生成した。また、比較に用いるため、蛍光性を示すアミノ酸であるトリプトファン溶液を調整した。

2.3 分光測定

分光スペクトルは紫外可視分光光度計、蛍光光度計を用いて測定した。紫外可視分光光度計の測定波長の範囲は200～1000nmとした。蛍光分光光度計においては、220～750nmの波長範囲の三次元蛍光スペクトルを取得した。

3 結果と考察

3.1 吸光

吸光に関する光学特性を評価するため、紫外～可視域にかけて生体の構成成分の吸光係数を調べた。測定結果の中から生体計測の妨げになることが予想されるメラニン及びヘモグロビン、コラーゲン、また、主要成分の水の吸光スペクトルを示す(図1)。ヘモグロビンについては酸化型及び還元型があり、酸化型の比率を60%として換算している。メラニンの吸光係数については、不溶性で分光光度計による正確な測定ができないため、外部データベースの近似式^[3]を用いた。生体には多くの水が存在するが、可視、紫外域の吸光係数は相対的に小さく、水の影響はほぼ無視できる。また、コラーゲンの吸収の影響も小さい。一方、ヘモグロビン、メラニンは蛍光の発光領域に吸収があるため、蛍光測定に影響を与えらる。

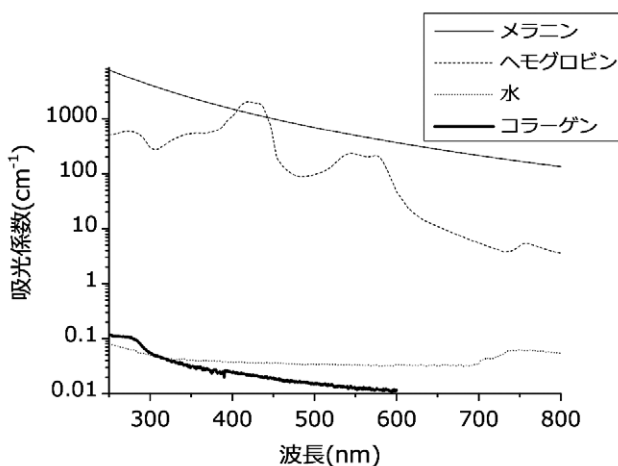


図1 生体成分の吸光係数

3.2 散乱

次に散乱について考察する。濁りのない溶液は、入射光の強度と透過光の強度との間に一般にランベルト・ベールの法則が成り立ち、所定のセルに入れた溶液の透過率を分光光度計などで調べることにより含有成分量を推定できる。一方、人体などの不透明体(散乱体)に光が入射されると四方八方に光を放出する現象(散乱)が生じる。このとき、入射された光は、散乱を繰り返しながら伝播し(多重散乱)、この伝播した光の一部が吸収や発光に使われる。したがって、光の強度測定だけでは、得られる情報が何に起因しているかわからない。図2に同一濃度のトリプトファン溶液(蛍光溶液)に散乱性を有する種々の濃度のイントラリピッド(脂質)を添加し、蛍光光度計で測定した蛍光スペクトルの結果を示す。同一濃度の蛍光溶液においても、散乱性が大きくなると明らかに蛍光強度が小さくなるのがわかる。このことは、測定部位が異なる(散乱性が異なる)と、含まれる目的成分の量が同じでも、得られる測定結果が異なることを意味する。また、測定部位が同じでも、個人差が大きい場合、同様に測定値に影響する。言い換えれば、散乱の影響を受けない測定方法の確立は、測定値の確からしさにつながる。

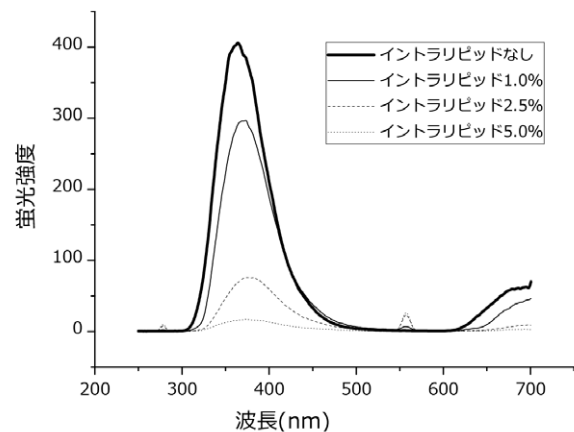


図2 散乱性の異なる蛍光スペクトル

散乱の補正方法を検討するため、まず、生体の散乱係数を求める。散乱係数は、単位長さあたりに散乱によって消失する光の割合を示す。補正には複数の波長による情報が必要なので、表皮付近の散乱係数を求めた文献^[4]を参考に、拡散近似、ミー理論を用いて波長ごとの散乱係数を推量した(図3)。

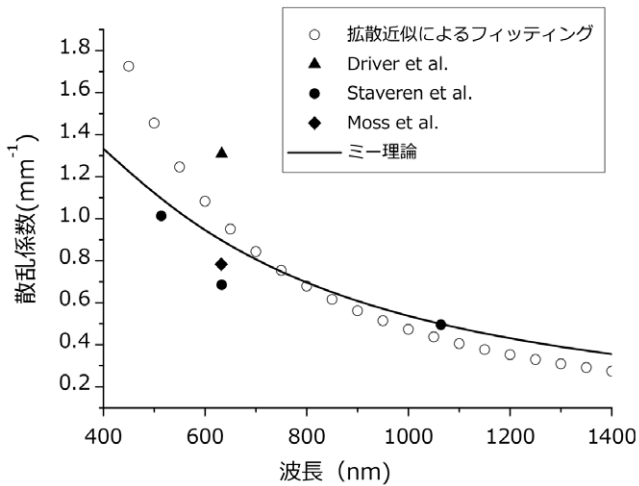


図3 散乱係数の算出

この得られた散乱係数から皮膚のスペクトルモデルを作成し、ヘモグロビン／メラニン比及び散乱係数が定量できるか検討した。筆者らは、特定の波長における吸光度を組み合わせ、散乱に依存しない定量アルゴリズムを開発した実績がある。ヘモグロビン／メラニン比においても、400～800 nmの波長のうち、550 nm、660 nmの二つの波長を軸に、複数の波長の吸光度を用いて、散乱に影響なく高い相関を示す関数($F(\lambda)$)を導出できた(図4)。また、散乱係数と高い相関を示す関数($F'(\lambda)$)の導出も併せて行った(図5)。これらの結果から、複数の波長を用いて、散乱体の蛍光測定において誤差要因になる散乱及び吸光成分の量を推定できることを明らかにした。

3.3 蛍光

最後に蛍光に関する誤差要因について考える。初めに、励起、蛍光の波長範囲や強度を明らかにするため、糖化タンパク質とアミノ酸溶液の3次元蛍光分析を実施した。図6 Aにトリプトファン、図6 Bに糖化タンパク質(ヒト血清アルブミン)の蛍光スペクトルを示す。これらは同一濃度であるが、トリプトワンの蛍光は強く、糖化タンパク質の蛍光は弱いことがわかる。なお、アルカリ性と中性条件で糖化タンパク質を生成させたが、生成速度は違いがあるものの、検討した条件化において蛍光スペクトルに大きな差異はなかった。

例示したトリプトファンと糖化タンパク質については、励起や蛍光の波長が異なるので、バンドパスフィルターなどを用いて光学的に容易に分離できる。一方、測定対象において目的物質と類似の励起、蛍光波長をもつ物質が含まれている場合、散乱や吸収の影響を最

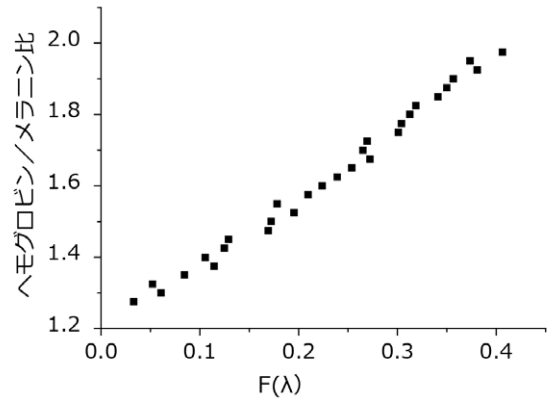


図4 ヘモグロビン／メラニン比の推定

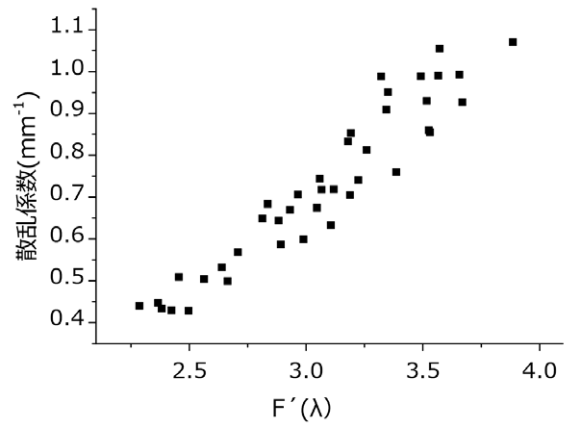
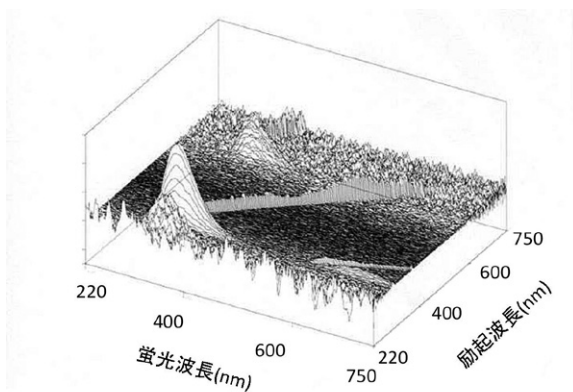


図5 散乱係数の推定

小化できても、その蛍光が測定の誤差となる。当然のことながら、生体には、糖化タンパク質と類似の蛍光特性を示すものも存在している。これらのスペクトルは完全には一致しないので、分解能が高い分光器を用いれば、目的成分を分離することは可能と考えられるが、一般的に高性能な分光器は高額である。そこで、解決の一助となるべく、生体中で蛍光がどのような伝播挙動を示すか、モンテカルロシミュレーションを実施した。モンテカルロシミュレーションは乱数と確立分布を利用して問題を解く方法で、散乱体における光子の空間的なふるまいを明らかにできる。生体に含まれる物質は一樣ではなく、局所的に存在していることが多いため、モンテカルロシミュレーションによる空間情報は有益であると考えた。得られた結果を図7に示す。図7 Aは光を散乱体に入射したときの蛍光の伝播の様子で、図7 Bは特定の位置における蛍光の伝播の様子である。詳細は省くが、これらの結果に基づき

A トリプトファン



B 糖化タンパク質

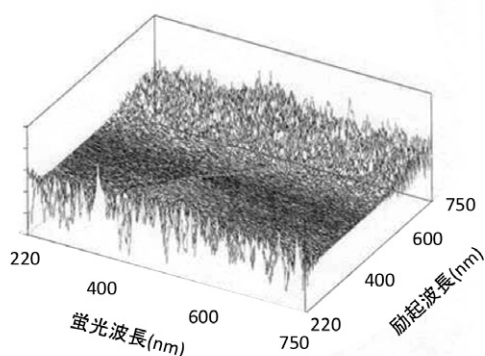


図6 三次元蛍光スペクトル

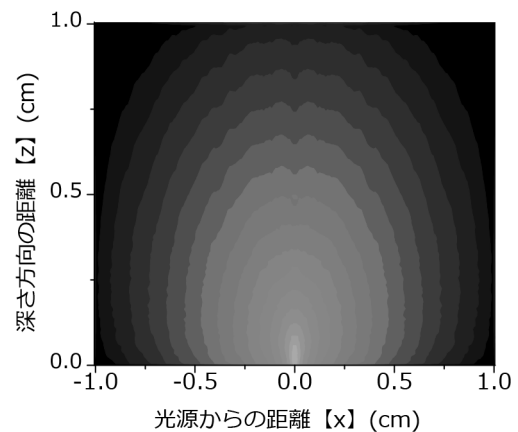
表皮に含まれる目的成分以外の蛍光の影響をより小さくする受光方法について検討を行い、一定の成果を得た。

4. 結 言

本研究では、吸光、蛍光、散乱の観点から疑似生体モデル等を用いて分光データの取得、解析等を行い、支配的な誤差要因となる物質を洗い出した。吸光については、ヘモグロビン、メラニンが影響すると考えられ、その存在比及び散乱係数を推定できることを示した。また、蛍光においては、スペクトルに影響を与える他の物質の蛍光挙動をシミュレーションし、その影響を最小化する手法を創案するに至った。

本研究で得られた結果は、生体の蛍光測定装置開発に資するものであるが、例えば、LEDを用いる場合は、その中心波長の尤度などが問題になる。このため、実用的には、より詳細なデータ取得が不可欠である。現在、光学特性値を評価する装置開発を進めており、具体的な装置構成等について検討していく。

A 蛍光の伝播(全体)



B 特定の位置における蛍光の伝播

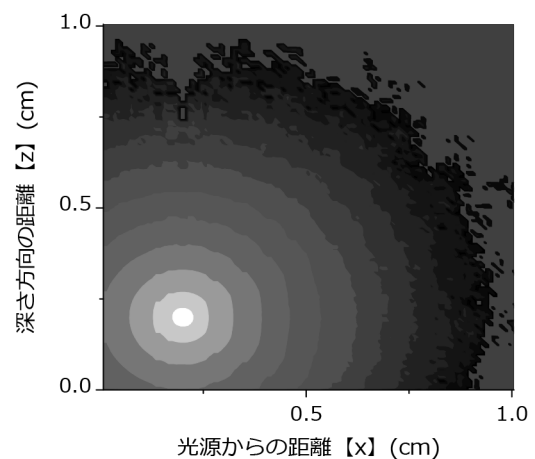


図7 モンテカルロシミュレーションによる光の伝播

参考文献

- [1] 小川誠二, 上野照剛, 非侵襲・可視化技術ハンドブック, (株)エヌ・ティー・エス (2003)
- [2] S. Miki, Y. Shimomura, Pittcon 2009 Conference Proceedings, 920-5 (2009)
- [3] Oregon Medical Laser Center, Optical
- [4] Absorption of Melanin, <http://omlc.org/spectra/melanin/> (アクセス日:2015.05.07)
- [5] H.J.Staveren, C.J.M.Moes, J.van Marle, S.A.Prahl and M.J.C.van Gemert, Appl.Opt. 30, 4507-4514 (1991)