

近赤外分光法による血液生化学検査の検討

東部家畜保健衛生所

○北本英司、野崎 宏

はじめに

近赤外分光法 (NIRS) は、物質に 800~2,500nm の近赤外光を照射したときの吸収スペクトルを測定し、解析を行うことで、物質の同定や濃度測定を行う技術¹⁾ であり、飼料分析²⁾、堆肥分析³⁾、果物の糖度測定⁴⁾、酸素飽和度測定⁵⁾ 等において実用化されている。多項目を短時間で測定でき、試薬が不要でランニングコストが安価であるメリットがある一方で、初期導入費用が高く、測定前に検量線を作成する必要があるデメリットがある¹⁾。香川県では、畜産試験場に飼料の分析用として平成 23 年度、近赤外分光光度計が導入され、自給飼料の迅速な成分分析のニーズに応えることが期待されている。

一方、血液生化学検査は病性鑑定や代謝プロファイルテスト (MPT) で実施されているが、試薬のランニングコストが高いことから、多検体の検査依頼に応えることが難しいのが現状である。

今回、NIRS を用いて、血液生化学検査を低コストで実施できないか検討したので報告する。

材料と方法

材料は、平成 23 年 12 月から平成 24 年 11 月にかけて病性鑑定や MPT の目的で化学分析を実施した牛の余剰血清合計 89 検体を用いた。内訳は、検量線用の血清が病性鑑定 29 検体 (病鑑血清) と MPT48 検体 (MPT 血清) の計 77 検体、未知試料の実測用の血清が 12 検体 (実測用血清) であった。

測定項目は総蛋白 (TP)・アルブミン (Alb)・血中尿素窒素 (BUN)・グルコース (Glu)・総コレステロール (TC)・遊離脂肪酸 (NEFA)・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST/GOT)・ γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT/ γ -GTP)・カルシウム (Ca)・無機リン (IP)・マグネシウム (Mg) の合計 11 項目とした。

NIRS の分析には近赤外分光光度計 NIR Flex N-500、トランスフレクションカバー (反射板) 0.5ml 用・5ml 用、分析ソフトウェア (NIR Cal、NIR Ware Operator、Management Console) (いずれも日本ビュッヒ) を用い、反射透過測定法により 1,000~2,500nm (4,000~10,000 cm^{-1}) の範囲を 1nm 間隔で連続測定した。

化学分析には TP・Alb・BUN・Glu・TC・AST・GGT・Ca・IP・Mg の各項目については富士ドライケム 5500V 及び専用スライド（富士フィルム）、NEFA については NEFA C-テストワコー（和光純薬）を用いた。

測定の概要

透明なガラス製シャーレの上に血清 0.5ml（0.5ml 用反射板使用、メーカーより借用）又は蒸留水 10 倍希釈血清（5ml 用反射板使用、購入済）を載せ、図 1 のように血清を測定した。なお、蒸留水で 10 倍希釈を行ったのは、一般的な採血管（7ml 容量）では血清を 5ml 回収することが困難であるため、実用性を考慮したためである。

このようにして得られた血清の連続吸収スペクトルのうち、5,000~5,300 cm^{-1} にかけて大きく吸収が認められた箇所は水の吸収領域であるため除外した（図 2）。

得られたスペクトルと化学分析値を分析ソフトウェアに入力し、検量線を作成した。検量線を作成するために必要な波長や統計処理法は同ソフトによる自動処理にて実施した（図 3）。

この検量線を使用した、実際の測定では、測定時間約 30 秒で全 11 項目の推定値が得られた（図 4）。



図 1 測定機器（NIR Flex N-500）

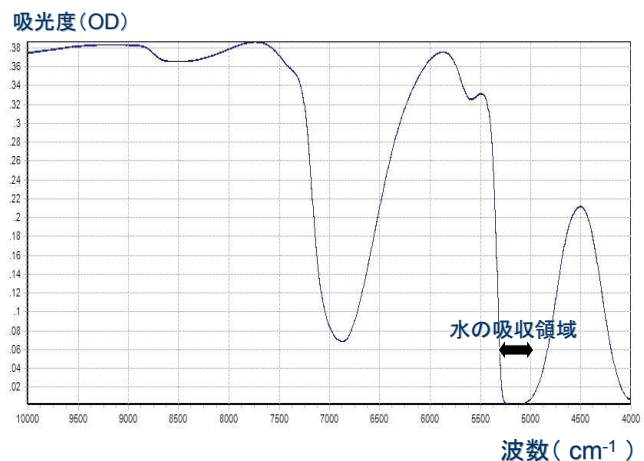


図 2 血清の連続吸収スペクトルの一例

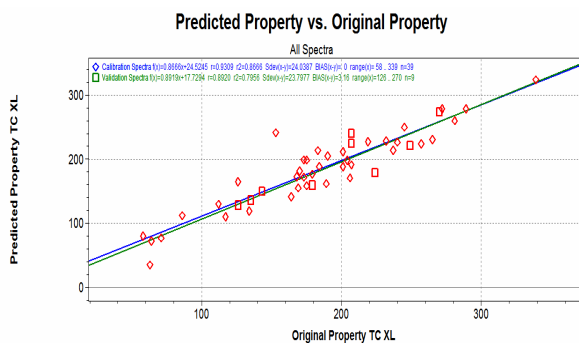


図 3 検量線の一例（TC）



図 4 未知検体の測定結果の一例

結果

1 検量線の相関

(1) 検量線用血清（病鑑血清+MPT血清）を用いて作成した検量線（検量線①）

TP、Alb、TCの3項目のみが相関係数 $r \geq 0.8$ であった。なお、NEFAは化学分析値がない検体があったため除外した（表1）。

(2) 病鑑血清を用いて作成した検量線（検量線②）

多くの項目で極端な化学分析値の検体が含まれており、 $r \geq 0.8$ はTCとMgの2項目であった。NEFAは化学分析値を測定していないため除外した（表2）。

(3) MPT血清を用いて作成した検量線（検量線③）

病鑑血清に比べ、化学分析値の分布範囲が狭く、 $r \geq 0.8$ は、TP、Alb、BUN、TC、NEFA、IPの6項目が $r \geq 0.8$ であった（表3）。

(4) 10倍希釈したMPT血清を用いて作成した検量線（検量線④）

$r \geq 0.8$ は、TP、BUN、Glu、TC、NEFA、IP、Mgの7項目であり、手持ちの5ml用反射板を用いて測定することが可能であった（表4）。

項目	使用波数 (1/cm)	回帰 分析法	キャリブレーション		化学分析値		
			相関係数	標準誤差	最小値	最大値	単位
			(r)	(Sdev)			
AST	4,400-4,800 5,400-6,600 7,800-10,000	PCR ^{※1}	0.55	27	41	474	IU/L
GGT		PLS ^{※2}	0.45	40	13	516	IU/L
TC		PLS	0.96	21	26	339	mg/dl
TP		PLS	0.97	0.2	4.7	9.7	g/dl
Alb		PLS	0.84	0.2	2.3	4.3	g/dl
Glu		PLS	0.58	10.8	34	136	mg/dl
Ca	5,300-10,000	PCR	0.69	0.5	6.8	10.8	mg/dl
IP		PLS	0.48	1.3	2.6	11.1	mg/dl
BUN	4,000-5,000	PLS	0.77	2.6	2.9	23.3	mg/dl
Mg	5,300-10,000	PLS	0.74	0.2	1.4	2.9	mg/dl

表1 検量線①の解析結果 (n=77)

※1 主成分回帰分析 ※2 部分最小二乗回帰分析

項目	使用波数 (1/cm)	回帰 分析法	キャリブレーション		化学分析値		
			相関係数	標準誤差	最小値	最大値	単位
			(r)	(Sdev)			
AST	4,400-4,800 5,400-6,600 7,800-10,000	PLS	0.65	84	41	474	IU/L
GGT	5,300-7,144 7,404-10,000	PLS	0.79	76	21	516	IU/L
TC	4,000-5,000 5,300-10,000	PLS	0.98	15	26	333	mg/dl
TP	4,400-4,800	PCR	0.88	0.5	4.7	9.1	g/dl
Alb	5,400-6,600 7,800-10,000	PLS	0.74	0.2	2.3	3.7	g/dl
Glu	5,300-7,144 7,404-10,000	PCR	0.27	23	34	136	mg/dl
Ca	4,400-4,800	PLS	0.55	0.7	6.8	10.8	mg/dl
IP	5,400-6,600 7,800-10,000	PCR	0.61	1.5	3.2	11.1	mg/dl
BUN	4,000-5,000	PCR	0.14	4.6	2.9	23.3	mg/dl
Mg	5,300-10,000	PLS	0.96	0.1	1.4	2.7	mg/dl

表2 検量線②の解析結果 (n=29)

項目	使用波数 (1/cm)	回帰 分析法	キャリブレーション		化学分析値		
			相関係 数	標準誤差	最小値	最大値	単位
			(r)	(Sdev)			
AST	4,400-4,800 5,400-6,600 7,800-10,000	PLS	0.30	25	52	195	IU/L
GGT		PCR	0.60	7	13	79	IU/L
TC		PLS	0.93	24	58	339	mg/dl
TP		PLS	0.99	0.1	6.2	9.7	g/dl
Alb		PLS	0.85	0.2	2.4	4.3	g/dl
Glu		PCR	0.21	6.8	45	91	mg/dl
NEFA	5,300-10,000	PLS	0.86	25	42	270	μ Eq/L
Ca		PLS	0.63	0.4	7.2	9.4	mg/dl
IP		PLS	0.90	0.6	2.6	9.4	mg/dl
BUN	4,000-5,000	PLS	0.88	1.8	4.4	17.9	mg/dl
Mg	5,300-10,000	PCR	0.48	0.2	1.7	2.9	mg/dl

表3 検量線③の解析結果 (n=48)

項目	使用波数 (1/cm)	回帰 分析法	キャリブレーション		化学分析値 (原液換算)		
			相関係数	標準誤差	最小値	最大値	単位
			(r)	(Sdev)			
AST	4,400-4,800 5,400-6,600 7,800-10,000	PCR	0.55	27	52	195	IU/L
GGT		PLS	0.41	8.1	13	79	IU/L
TC		PLS	0.85	34	58	339	mg/dl
TP		PLS	0.88	0.3	6.2	9.7	g/dl
Alb		PLS	0.60	0.2	2.4	4.3	g/dl
Glu		PLS	0.90	6.4	45	91	mg/dl
NEFA	5,300-10,000	PLS	0.92	29	42	270	μ Eq/L
Ca		PLS	0.43	0.5	7.2	9.4	mg/dl
IP		PLS	0.88	0.6	2.6	9.4	mg/dl
BUN	4,000-5,000	PLS	0.81	0.2	4.4	17.9	mg/dl
Mg	5,300-10,000	PLS	0.80	0.2	1.7	2.9	mg/dl

表4 検量線④の解析結果 (n=48)

2 反復測定

本測定法の精度を確認するため、MPT 血清 3 検体について 5 回の反復測定を実施した結果、大きな差異は認められなかった（表 5）。

項目 \ 回	1	2	3	4	5	平均	化学分析値
TP (g/dL) 原液	6.00	6.06	6.08	6.05	6.00	6.04	6.1
TP (g/dL) 原液	8.30	8.30	8.30	8.28	8.34	8.30	8.2
TC(mg/dL) 10 倍希釈	158.90	162.60	145.40	184.90	164.90	163.34	158

表 5 反復測定結果

3 未知検体の測定

検量線③④を用いて、実測用血清の測定を行い、NIRS の推定値と化学分析値の差について検討した。帯広畜産大学の木田らにより実施された代謝プロファイルテストにおける、各測定項目の標準偏差⁶⁾を 1σ とし、推定値と化学分析値の差について、 $\pm 1 \cdot 2 \cdot 3\sigma$ とし推定値をプロットした。また、今回は、代謝プロファイルテストで基準範囲とされる平均値 $\pm 1\sigma$ 以内であれば判断上大きな支障がないとされることから許容範囲と設定した。

その結果、10 倍希釈血清の方が、多くの検体・項目で許容範囲内に収束した。（図 5）

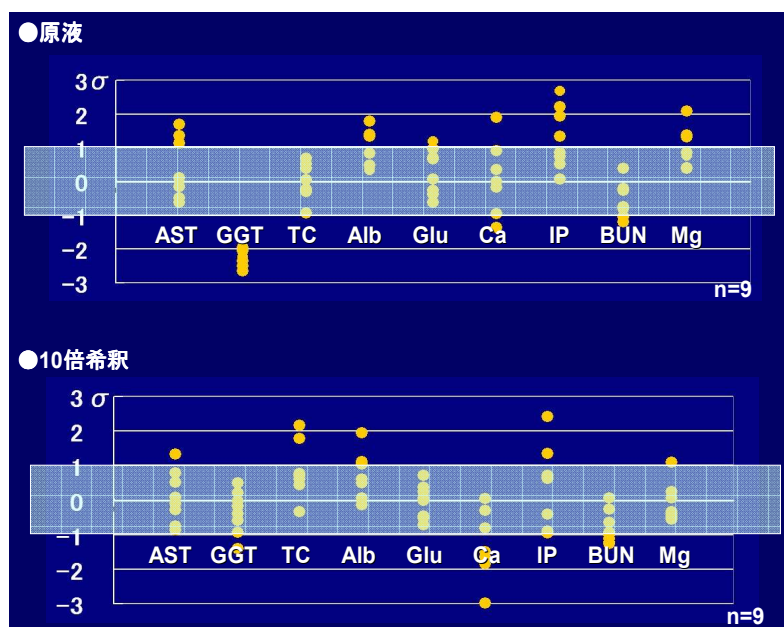


図 5 推定値と化学分析値の差

4 MPTでの検討

化学分析値との乖離率が小さかった検量線④について、MPT で実用性を検討するため、MPT 血清を用いて、化学分析値と推定値を比較した。

その結果、化学分析値、推定値ともに同じ形状が維持されていたが、推定値の方が、中央値に収束する傾向であった（図6）。

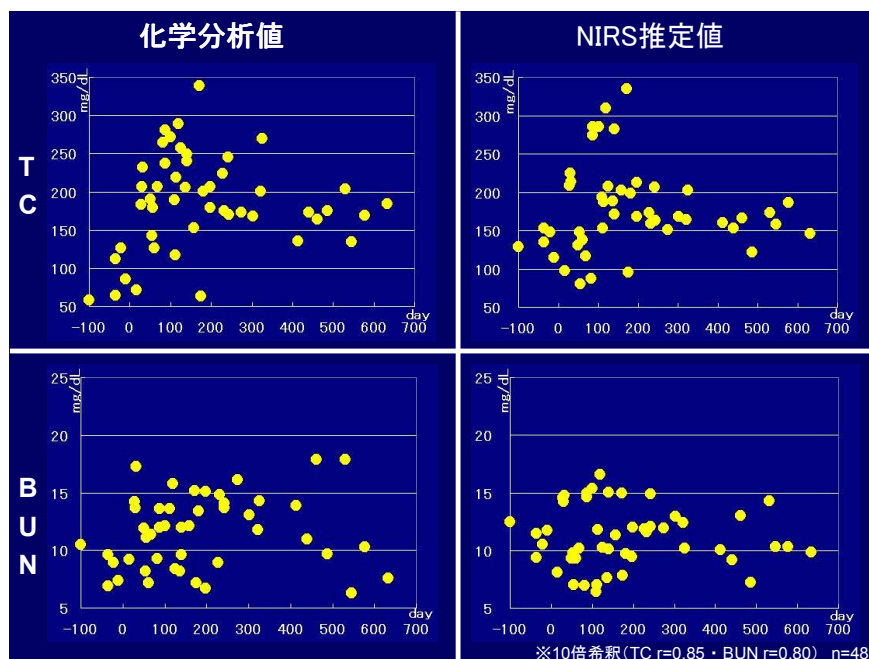


図6 化学分析値と NIRS 推定値の散布図による比較

考察

今回、代謝プロファイルテストの血清で有用な検量線が作成できたことから、近赤外分光法（反射測定法）による血液生化学検査は有用であると示唆された。また、相関係数が 0.8 以上の項目は、透過測定法を用いた林らの報告^{7) 8)} や Jeffrey らの報告^{9) 10)} と同様の傾向であった。

一方で、病畜等、正常範囲から大きく乖離した数値を含んでいる病性鑑定の血清では、適切な検量線が作成できなかった。これは、上下に極端な値を含む検体数が少なく、検量線を作成する時の回帰分析において、充分反映できなかった可能性が考えられ、さらなる検討が必要であると思われた。

以上のことから、本手法は群管理を目的とし、定型かつ多項目を測定する代謝プロファイルテストでは実用性にほぼ問題がないと考えられた。

現在実施している代謝プロファイルテストの一部項目を近赤外分光法に置き換えた場合のコスト削減と時間短縮の効果を試算した。化学分析のみの場合は、1頭あたり 1,546 円・10 分間であるが、10 倍希釈で相関係数が 0.8 以上であった TP・BUN・Glu・TC・NEFA・IP・Mg の 7 項目を置き換えた場合、近赤外分光光度計のランニングコストはほぼ 0 円・30 秒測定となり、471 円・3 分で 1 頭の測定が可能で、現在の約 1/3 のコストと時間で測定が可能である。

一般的に、MPT では各乳期 5 頭・6 乳期の合計 30 頭を標準とすることから、MPT 1 回あたりのコスト削減効果は 32,250 円・210 分間と推定された。

今回使用した機器は、正確な検量線を作成するために、70 検体以上が必要とされていることから、今後とも検査を継続し、検量線の精度を高めることにより、MPT での実用化に取り組むとともに、病性鑑定等の異常値を含む幅広い測定値に対応できるよう、特定成分の添加試験等を実施し、調査・検討を行いたい。

参考文献

- 1 松本清、食品分析学 機器分析から応用まで、培風館（2006）
- 2 自給飼料品質評価研究会編、改訂粗飼料の品質評価ガイドブック、
社団法人日本草地畜産種子協会（2001）
- 3 林薫月ら、近赤外分析法による堆肥の成分分析、福井県畜産試験場研究報告第 18 号、
22-30（2004）
- 4 蔦瑞樹ら、近赤外分光イメージング法による食品品質計測法の開発、
日本食品科学工学会誌 73-80（2011）
- 5 Kirkopatrik PJ et al., Near-infrared spectroscopy use in patients with head injury,
J. Neurosurg.,963-970（1995）
- 6 木田克弥、代謝プロファイルテストの実際（生産獣医療における牛の生産病の実際）、
文永堂出版、13-33（2000）
- 7 Hayashi T et al., The prediction of bovine blood plasma cholesterol by near infrared
spectra Anim. Sci. Technol., 674-682（1998）
- 8 林ら、近赤外情報による牛血漿成分の予測、生研機構畜産試験場研究成果情報（2000）
- 9 Jeffrey W Hall et al., Near- Infrared Spectrophotometry: A New Dimension in
Clinical Chemistry, Clin. Chem., 1623-1631（1992）
- 10 Jeffrey W Hall et al., Near-infrared spectroscopic determination of serum total
proteins, albumin, globulins, and urea, Clin. Biochem, 483-490（1993）