

修士学位論文要約（令和4年3月）

中赤外減衰全反射分光法による血清分析に関する研究

小田 直樹

指導教員：松浦 祐司

Study on serum analysis by mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy

Naoki ODA

Supervisor: Yuji MATSUURA

Human plasma obtained by blood sampling contains biomarkers that can be indicators for diagnostics and screening for various diseases. Spectroscopy using mid-infrared light, in which the proteins and lipids to be mainly inspected show a clear absorption spectrum, does not require pretreatment and possibly enables highly sensitive measurement in a short time. In this paper, to establish a plasma analysis method using mid-infrared attenuated total reflection (ATR) spectroscopy, a protocol for performing spectroscopic measurements with high reproducibility is developed. Firstly, we developed a plasma phantom having an absorption spectrum that is almost equivalent to that of human plasma. Then we found that the increase in absorption intensity was saturated by drying in air at about 20 °C for about 30 minutes. Then human plasma was analyzed according to this protocol and as a result, stable spectra were successfully obtained. Furthermore, from experiment using plasma samples with constant glucose concentrations, it was found that the glucose concentrations were quantitatively evaluated by using the protocol.

1. はじめに

血液採取によって得られる血漿中には、各種疾病の診断指針やスクリーニングの指標となるバイオマーカーが含まれる。通常はクロマトグラフィーなどによって分析を行うが、サンプルの前処理や検査プローブ試薬の添加の必要性があり、一般的にはある程度の測定時間を要する。一方、主な検査対象となるタンパク質や脂質が明確な吸収スペクトルを示す、中赤外光を用いた分光法は、前処理の必要がなく、短時間、高感度の測定が行える可能性がある。本研究では、中赤外減衰全反射分光法(ATR法)を用いた血漿分析法の確立を目指し、再現性の高い分光測定を行うためのプロトコルを確立することを目的とし、さまざまな実験検証を行った。

2. 測定系および測定方法

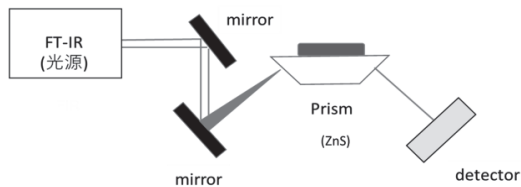


図1 ATR測定系の概要。

図1に測定に使用したATR測定系の概要を示す。フーリエ赤外分光光度計(FT-IR)から取り出した赤

外光を凹面鏡によってプリズム入射面に集光し、プリズムからの出射光をHgCdTe検出器で受光している。なお、プリズム材質としては屈折率2.2のZnSを選択した。測定分解能は 4 cm^{-1} 、スペクトル取得時の積算回数を32回、測定波数範囲を $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ とし、この条件下での測定時間を約30秒であった。測定においては、プリズム上にサンプル0.02 mlを塗布し、サンプルを自然乾燥させながら測定を行った。

3. 疑似血漿についての検討

測定プロトコル確立には数多くの試行実験を要するが、その際に貴重な血漿を用いることを避けるために、血漿に類似した組成を有する疑似血漿を調製し、血漿の代わりに用いることが可能か検討した。血漿の構成物の割合¹⁾は、水が90%、タンパク質が8%、残り2%は糖などの物質で構成される。そこで疑似血漿成分90%、ウシ血清アルブミンを8%、グルコースを2%として、疑似血漿を調製した。図2に、バックグラウンドを純水とした時の疑似血漿とヒト血漿の測定結果を示した。双方の結果で、タンパク質のピークである 1635 cm^{-1} 付近のAmide Iと 1537 cm^{-1} 付近のAmide IIの2つのピークが確認できた。また、 1000 cm^{-1} から 1200 cm^{-1} の範囲ではグルコースに関するピークが確認できたが、疑似血漿では血漿の20倍の濃度のグルコースが含まれているため、ピークが大きく現れていることに留意されたい。この結果から、疑似血漿を測定プロトコル決定のための試行実験に用いても問題ないと判断した。

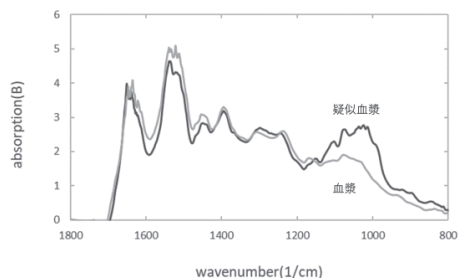


図2 疑似血漿とヒト血漿の吸収スペクトル。

3. 測定条件についての検討

血漿サンプルの測定時に、スペクトル形状が時間とともに変化してしまう問題が生じた。これはサンプルの乾燥が原因と考えられた。そこでサンプルを自然乾燥させることにより、スペクトルを安定化させることについて検討した。

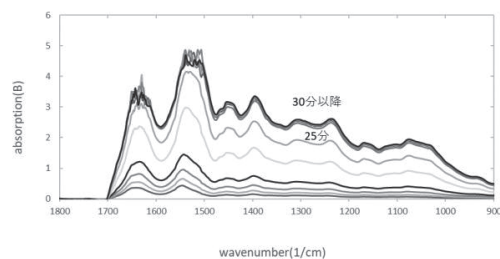


図3 血漿の吸収スペクトルの時間変化。

図3は、純水をリファレンスとして、室温約20℃の環境で自然乾燥させながら5分間隔で血漿を測定した結果である。乾燥による濃度上昇に伴い吸収が増大するが、30分以降はスペクトルの増大が飽和した。この結果から、30分間程度乾燥させ増大が飽和した時点でのスペクトルを取得することとした。

また、ここまで純水をリファレンスとして用いてきたが、純水を用いた測定では、水滴の形成により、測定が失敗する可能性があった。そこで新たに、空気をリファレンスとして用いることを検討した。

図4は純水および空気をリファレンスとした時の疑似血漿の吸収スペクトルである。この結果、純水の吸収ピークと重畳する1600 cm⁻¹付近のAmide Iのピーク以外は純水と空気で同様の波形が得られ、Amide Iのみ注意すれば、空気をリファレンスとしても問題なく、それにより測定の安定性が向上した。

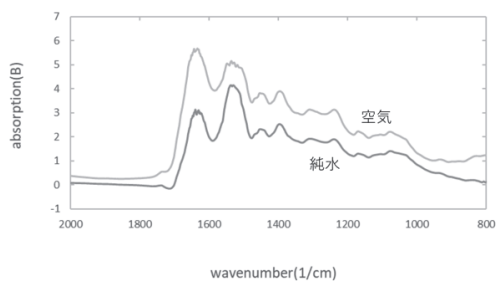


図4 空気および純水をバックグラウンドとして測定した血漿の吸収スペクトル。

4. 測定プロトコルの決定および実践

最終的な測定プロトコルとして、リファレンスを空気とし、20℃の室温で、スペクトルの増大が飽和するまで自然乾燥させた後に測定を行うこととし、この測定プロトコルの実践として、血漿に糖を添加した試料の定量測定を試みた。

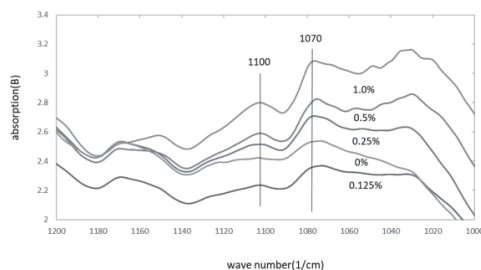


図5 糖を添加した血漿試料の吸収スペクトル。

図5に糖を添加した血漿試料の吸収スペクトルを示す。図中に示すグルコースの吸収ピーク1070 cm⁻¹および1100 cm⁻¹を基準に、濃度に対する校正直線を作成したところ、濃度1.0%までは高い線形性のある結果が得られた。

5. まとめ

疑似血漿やヒト血漿サンプルを対象としたATR法によるスペクトル評価について検討を行った結果、リファレンスを空気とし、20℃の室温で、スペクトルの増大が飽和するまで自然乾燥させた後に測定を行うという、再現性の高い測定結果を得るための測定プロトコルを確立できた。

文献

- 1) 川上浩ら, ヒトの基礎生化学, アイ・ケイ・コーポレーション(2016), p204