

# アクアフォトミクスを用いた 新鮮尿分析による食事摂取量評価

(研究助成金 90万円)

代表研究者 東京医科大学腎臓内科学分野

菅野義彦

## 1. 目的

生活習慣病において食事療法は治療の基盤であるが、メタボリックシンドロームのような前疾患状態であっても適切な食事摂取が求められている。その実践にあたり指示量は疾患や検査値、体格、生活強度などによりかなりテーラーメイド化されたものが提供可能であるが、そのコンプライアンスを評価する方法は確立されていない。特に実際に摂取した量の定量法としては従来からの食事記録法、頻度調査法など主として患者の記憶をもとに算出していく方法のみで、客観的と言いつても難しい状態が続いている<sup>1</sup>。生活習慣病に関する知見が次々と報告されているが、最も大切な実践レベルでのコンプライアンスの評価が客観的でなければ、これらの知見も真に活かされているとはいえない。

本研究の最終目的は尿検体を用いた食事摂取量の客観的評価法の確立にある。特に三大栄養素であるエネルギー、たんぱく、脂質および食塩の摂取量を簡便かつ客観的な方法で確立することで、食事指導の有効性を向上させ、生活習慣病の発症、進展予防に寄与したいと考えている。現在、三大栄養素のうちたんぱく摂取量だけは24時間蓄尿検体中で蛋白質の代謝産物である尿素窒素濃度を測定することで概算することができるが、これは患者負担が大きく一般的には行われていない。申請者は24時間蓄尿ではなく随時尿の尿素窒素濃度を用いて窒素の24時間排泄量さらにたんぱく摂取量を概算する式を作成し米国、日本腎臓学会で発表した<sup>2</sup>、本研究ではまったく異なる新しいアプローチでたんぱく質だけでなくエネルギー、脂質の摂取量を把握する方法を健常者で検討し、臨床応用の基盤とすることを目的とする。

## 2. 方法

- 尿検体の採取は女子栄養大学栄養生理学研究室で募集したボランティア健康人100名より行う。原則的に2回の検体採取日を設定し、それぞれの採取日前日における栄養素摂取量を極端に変更する。条件を変更する栄養素としては、エネルギー、たんぱく、脂質、食塩の4項目とする。
- 提出する尿検体、食事記録などに付ける番号は、すべて本研究内で使われる通し番号だけを用いるため、どの検体、どの食事内容が誰のものかは、検体を受け付けた時点でだれにも分からなくなる。そのため検体、食事記録とボランティア個人は関係づけが出来なくなる。
- 尿検体は原液を、近赤外分光器 (Bruker) の内部温度である32℃に30分かけて加温した後に測定した。冷蔵保存の過程で沈殿物を形成していたサンプルに関しては、その有無を記録し、震盪・混和にて強制溶解させてから測定に供した。測定条件は、一つの尿サンプルにつき、記録範囲4000-12000 $\text{cm}^{-1}$ 、分解能8 $\text{cm}^{-1}$ 、16回走査×3コピースペクトル×3回同一尿サンプルの入れ替え、により計9本のスペクトルを得た。
- 統計解析ソフトウェアRを用いて1サンプルあたり9本のスペクトルを平均し、1サンプルにつき1本のスペクトルを得た。その後、Infometrix社Pirouette ver.4.5を用いて、多変量解析 (PCA, SIMCA, PLS-DA) を行った (註1)。
- 以上につき女子栄養大学倫理委員会で審査を受け承認され (承認番号269号平成25年7月17日付けで申請承認を取得した)、研究協力の同意書を取得して行った。

## 3. 結果・考察

助成決定以降、研究開始に向け準備を進めたが、その準備段階でいくつかの問題が生じたために研究計画を変更することとなった。また研究代表者の菅野義彦が25年4月に慶應義塾大学医学部血液浄化・透析センター准教授から東京医科大学腎臓内科主任教授職に異動した (報告済)。両大学の研究環境、職務内容には予想よりも大きな隔たりがあり、本研究に対するエフォートが大きく減少したことから本年度は計画の再検討および倫理委員会の申請承認取得のみに終わり、経費を伴う研究活動はできなかった。このため研究活動と結果は26年度に再報告を行う。

### • 尿検体の採取

本件では、女子栄養大学で健常ボランティアから検体採取を行うよう申請に変更された。そのため検体採取担当の女子栄養大学の共同研究者を上西一弘から臨床栄養療法学研究室助教の坂本香織に変更した。また、採取検体の解析を共同研究者である、慶應義塾大学の安井正人らとアクアフォトミクスによる解析を行うこととした<sup>3</sup>。これについては、健常成人女性10人に対して、蛋白摂取量を60g/日×3日 (Run-in期間)、60g/日×3日 (正常蛋白期間N1-N3; Class1)、40g×4日 (低蛋白期間L1-L4; Class2)、60g/日×3日 (Washout期間W1-W3)、90g/日×4日 (高蛋白期間H1-H4; Class3) にコントロールし、総カロリー1800kcal、塩分6g/日の試験食を負荷した。N1-H4の各日程にスポット尿、N3、L4、W3、H4の各日程には蓄尿を採取し、これを冷蔵保存にて可及的速

やかに近赤外分光器で測定，記録した。

• 近赤外分光スペクトルと多変量解析

原スペクトルの全記録範囲から1100-1300nmおよび1300-1600nmの範囲を抽出し解析を行った（1300-1600nm領域は，Aquaphotomics領域，O-Hの第1倍領域とされる。）。これら2領域についての結果を①，②に示す。

① 1300-1600nm を用いた場合

スポット尿Class1，Class2，Class3のうち，第1日目と第2日目のサンプルを除いたものを解析した。（代謝上の平衡に至るまでの期間2日を想定したため。実際に解析に含めた場合，分類はほぼ不能であった（データは省略）。）

SIMCA法やPLS-DA法では，全体の20～30%のサンプルを除外したTraining-setから多変量解析モデルを作成した後で，除外しておいた20～30%（Test-set）のサンプルを予測させて分類能を検討することが一般に行われる。Class1～Class3に関して，SIMCA法を被験者1～7の検体（Class1 7検体，Class2 14検体，Class3 14検体）に対して行った結果，Class1と予測されかつ実際にClass1であったサンプル数は4検体のみであった（図1）。Class1と予測されながら実際にはClass2，Class3であったサンプル数はそれぞれ2検体，4検体であった。（Class2，Class3についても同様に分類能は不十分であった。）そのため，Test-setの予測には使用できないと判断した。

図1 SIMCA法でModellingを行った結果

	予測Class 1	予測Class 2	予測Class 3	分類不能
検体Class 1	4	0	3	0
検体Class 2	2	11	1	0
検体Class 3	4	0	10	0

そこで，低蛋白摂取群（Class2）と高蛋白摂取群（Class3）の区別が出来るかどうかに着目し，Class2とClass3の分離を試みた。被験者連続3人を除いた7人（例：被験者2～8）のサンプルデータをTraining-set，残りの被験者3人（例：被験者10，1，2）のサンプルのデータをTest-setとしたところ，PLS-DA法でTest-setを予測させると良好な分離が得られた。Training-setとTest-setを10組作成し（Test-setが被験者10と1と2，被験者1～3，被験者2～4，……となるように設定した。），PLS-DA法でTest-setの群分けを行った（図2）。

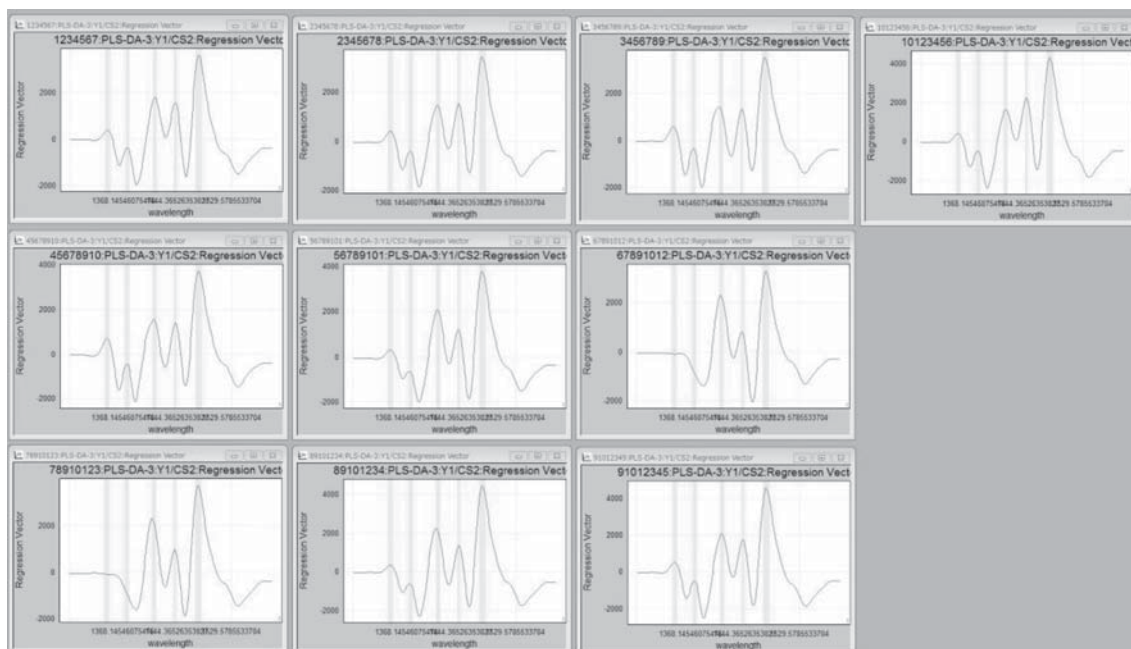
図2 PLS-DAモデルを用いて予測させた結果（10組すべてについて示した）。

Test-set1 (被験者1,2,3)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能	Test-set6 (被験者6,7,8)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能
検体Class2	5	0	1	検体Class2	5	0	1
検体Class3	1	4	1	検体Class3	2	4	0
Test-set2 (被験者2,3,4)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能	Test-set7 (被験者7,8,9)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能
検体Class2	3	0	3	検体Class2	4	1	1
検体Class3	0	4	2	検体Class3	2	4	0
Test-set3 (被験者3,4,5)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能	Test-set8 (被験者8,9,10)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能
検体Class2	5	1	0	検体Class2	5	1	0
検体Class3	0	6	0	検体Class3	2	4	0
Test-set4 (被験者4,5,6)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能	Test-set9 (被験者9,10,1)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能
検体Class2	2	4	0	検体Class2	5	1	0
検体Class3	0	6	0	検体Class3	0	6	0
Test-set5 (被験者5,6,7)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能	Test-set10(被験者10,1,2)	予測 Class2	予測 Class3	予測 不能
検体Class2	4	2	0	検体Class2	4	1	1
検体Class3	0	6	0	検体Class3	0	6	0

PLS-DA法（スペクトルの平滑化（ノイズ除去）、2階微分した後主成分数3で行った）で、10組のTest-setの70.0%のサンプルが正しくClass2に予測され、83.3%のサンプルが正しくClass3に予測された。

PLS-DA法のRegression vector（註2）は、10組すべてにおいてほぼ共通の位置にピーク10個を有した（図3）。

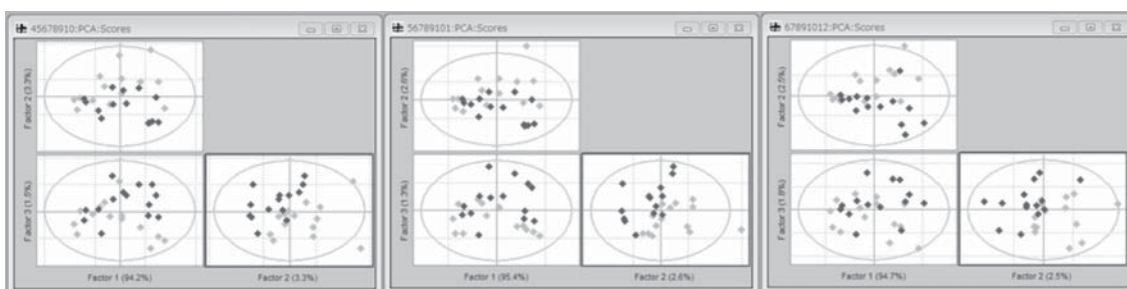
図3 Regression vectorをプロットした結果



低蛋白群（Class 2）か高蛋白群（Class 3）か分類するのに重要な波長が、被験者を変えても安定していることを示す。例えば、左上の図と左下の図は、それぞれ被験者1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 被験者1, 2, 3, 7, 8, 9, 10の異なる7人の組み合わせでPLS-DA法を行い、各波長の重要性（Regression vector）をプロットしたものであるが、短波長領域の一部（図の左寄りの部分）を除いて、黄色でハイライトしたバンドに共通のピークがあり、これら異なる2群でClassを区別する際の波長の重要性が類似していることを示している。

次に、PCA法を用いたアルゴリズムとして、3つの主成分（PC 1 vsPC 2, PC 2 vsPC 3, PC 1 vsPC 3）のスコア（註4）をプロットしてみたところ、図4のようにPC 2 vsPC 3のプロットで直線  $2y=x$  より下方にある点が低蛋白群（Class2）として判定するアルゴリズムが考えられた。PLS-DA法と同じTraining-set, Test-setを作成し、このアルゴリズムで10組のTest-setの解析を行ったところ、71.6%のサンプルが正しくClass2に予測され、90%のサンプルが正しくClass3に予測された。であった。予測した際のプロットの一例を図5に示した。

図4 PCA法を用いた簡易アルゴリズムの探索



3組のTraining-setそれぞれについて、PC 1 vsPC 2, PC 2 vsPC 3, PC 1 vsPC 3のプロットを示した。各ウィンドウの右下に示されているのがPC 2 vsPC 3のプロットで、緑色の点が低蛋白食、青色の点が高蛋白食のサンプルであるが、 $2y=x$ の直線の上下に分かれていることがわかる。

図5 PCA法を用いて作成した主成分空間への未知サンプルの投影

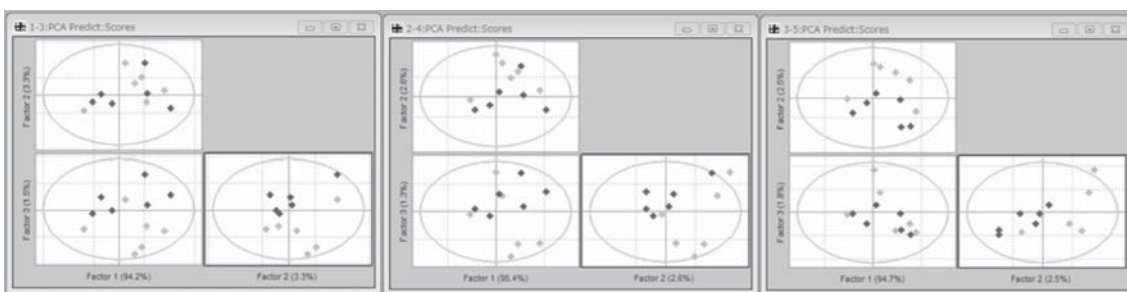


図4で作成された主成分空間に、それぞれ対応する3組のTest-setのサンプルデータを投影した。やはり、緑と青で示した蛋白摂取量の差が、 $2y=x$ の上下に分かれる傾向がみえる。

## ② 1100-1300nm（C-H結合第2倍音領域）を用いた場合

アクアフォトミクスでは、O-H分子内振動の変化を分析しているが、1100-1300nm領域にはC-H結合の第2倍音が分布し、振幅は弱いものの複雑な吸収スペクトルを示す。この領域を用いて①とまったく同様のアプローチをとったところ、63.3%のサンプルが正しくClass2に割り当てられ、75.5%のサンプルが正しくClass3に割り当てられたが、1300-1600nmを用いた場合には及ばなかった。

近赤外分光法は、一般に吸収ピークの重なりが大きく、単純な物質であっても、個々の吸収ピー

クの分子振動への帰属を明らかにすることは容易でないといわれている。今回の分析でも、原スペクトルのみでは特定のピークを指摘することは出来なかった。そこで、多変量解析（ケモメトリックス）に依存して図3の10個のピークを得た。これらのピークの意義については今後の課題である。

## 4. 注 釈

註1：PCAはPrincipal component analysis（主成分分析）の略で、n変数（nは数百以上が典型的である）に及ぶスペクトルデータを数個の合成変数（各変数につき係数をかけ足し合わせて得る変数で、主成分と呼ばれる。）に要約する手法である。SIMCAではあらかじめコンピュータに低蛋白群か高蛋白群かの情報を与え、それぞれの群内でPCAを行い、一定のアルゴリズムに基づいて群間の距離やサンプルとそのサンプルの属さない群との間の距離などを計算し、あるサンプルがどちらかまたは両方の群に当てはまるか、またはいずれの群にも当てはまらないかの情報を得ることが出来る。PLS-DA法はPLS法の応用で、SIMCAと同じく、多変量解析による未知サンプルの既知サンプル群への分類法であるが、基礎となるPLS法は数学的に近縁のPCR（Principal component regression）法の応用であり、数百のサンプル変数から一つの目的変数を回帰する方法である。目的変数の値に0と1を割り当てることで、任意の二群間の分類が可能で、多群に拡張したものが、今回用いたPLS-DA法である。

註2：PLS-DA法では回帰変数が0～1周辺の値をとる（註1参照）が、一本のスペクトルデータから回帰変数を計算する際に使用される係数の組み合わせがRegression vectorで、スペクトルと同じ要素数を持つ1行n列の行列であり、しばしばグラフ表示される。

註3：S0分子種とは水素結合を形成していない水分子種を指し、S1はHまたはO原子に一つ水素結合を形成した水分子種を指す。

註4：註1で説明したPCAで得られた主成分の値をスコアと呼ぶ。

## 5. 文 献

- 1) Kanno Y, Sasaki S, Suzuki H. Nutritional assessment by a new method for patients with renal disease. Contributions to nephrology 155:29-39.2007
- 2) 坂本香織, 神田英一郎, 平山智也, et al. 健常若年女性におけるたんぱく質摂取量を推定する根拠としての蓄尿と随時尿の比較. 日本臨床栄養学会雑誌 36 : 34-39. 2014
- 3) Tsenkova T. Aquaphotomics: dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water. J Near Infrared Spec 17: 303-314. 2009