

근적외분광분석법을 이용한 생쥐꼬리에서의 비침습 혈당 정량 시 장기간 측정에 따른 변이 요인의 보정

백주현 · 강나루 · 우영아 · 김효진[#]

동덕여자대학교 약학대학

(Received March 25, 2004; Revised April 19, 2004)

Compensation of Variation from Long-Term Spectral Measurement for Non-invasive Blood Glucose in Mouse by Near-Infrared Spectroscopy

Ju-Hyun Baek, Naroo Kang, Young-Ah Woo and Hyo-Jin Kim[#]

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

Abstract — Non-invasive blood glucose measurement from mouse tail was performed by near-infrared (NIR) spectroscopy. Three groups; normal, type I diabetes (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), type II diabetes (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) group, were studied over a 10 weeks period with the collection of near-infrared (NIR) spectra. Spectral variations from long-term measurement (10 weeks) from dramatic and nonlinear changes in the optical properties of the live tissue sample were compensated by chemometrics techniques such as principle component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) regression. The effect from mouse body temperature changes on NIR spectral data was also considered. This study showed that the compensation of variations from long-term measurement and temperature changes improved calibration accuracy of non-invasive blood glucose measurement.

Keywords □ PLSR, PCA, blood glucose, near-infrared spectroscopy

근적외분광분석법은 신속성, 단순성, 비파괴적 측정, 전처리 과정 없이 직접 많은 시료의 측정이 가능하다는 장점으로 제약, 화학, 식품, 석유 산업분야에서 폭넓게 활용되고 있고,¹⁾ 이러한 장점은 근적외분광분석법을 이용한 비침투적 방식의 혈당측정이 통증의 경감과 합병증 발병률 감소에 대한 기대로 활발한 연구가 진행되고 있다. 전처리 과정의 생략은 중적외, 원적외의 배음이 나타나는 근적외부의 특성으로 그것의 신호는 분석 가능할 정도의 흡광도로 측정되므로, 무엇보다도 큰 장점인 반면, 신호가 약하고 중첩되어 나타나기 때문에 계량분석화학의 발전으로 다변량분석이 도입되기 이전에는 특징적인 흡수 밴드를 나타내는 몇 가지 물질의 정성분석만이 가능하였다.²⁾

근적외분광분석법을 이용한 비침투적 혈당측정을 위해 적용된 다변량분석법을 살펴보면, 측정 프루브의 수광부와 발광부 사이의 거리를 0.65 mm로 하여 1600 nm에서 양의 회귀 계수 벡터

를 확인한 Maruo³⁾ 등의 연구, 장기간의 당부하 실험을 통하여 근적외분광분석법에 의한 비침투적 혈당측정법의 장기간 자가 측정의 가능성을 확인한 Malin⁴⁾ 등의 연구, 인슐린 내성 검사를 행하여 저혈당 상태에서의 비침투적인 혈당측정에 관한 연구를 행한 Gabriely⁵⁾ 등의 연구에서는 부분 최소 제곱 회귀분석법 (partial least squares regression, PLSR)^{2,7)}을 검량모델의 작성 및 혈당의 추정에 사용하였다. Muller⁶⁾ 등은 이 부분 최소 제곱 회귀분석법에 전방향신경망 패턴 인식법인 방사형 기저 함수 (Radial basis functions, RBF)를 결부시켜 데이터의 패턴을 학습하여 더욱더 정확한 검량모델을 작성 할 수 있도록 하였다.

부분 최소 제곱 회귀분석법은 농도 데이터를 포함하므로, 구성성분과 직접적인 관련성을 지니는 주성분분석 (principle component analysis, PCA)^{2,7)} 모델의 사용, 대체적으로 잡음에 덜 민감한 검량모델, 원래의 표준품에는 없는 불순물을 함유하는 시료에 대해서도 적용이 가능하다는 장점으로 위의 연구들에서 많이 채택하고 있는 다변량분석법이다.⁷⁾ 이러한 장점을 지닌 부분 최소 제곱 회귀분석법의 적용에도 불구하고, 비침투적 혈당측정에서는 시료의 특이성, 즉, 환자의 피부 및 살아 있는 조

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4305 (팩스) 02-943-9578
(E-mail) hyojkim@dongduk.ac.kr

직인 시료가 갖는 동력학적 특성으로 인하여 실용화되기 위해 극복해야 할 여러 가지 문제를 지니고 있다.⁴⁾ 이에 Jagemann⁸⁾ 등, Fischbacher⁹⁾ 등, Danzer¹⁰⁾ 등, Muller¹¹⁾ 등, 그리고, Maruo³⁾ 등은 1일 동안 1인의 당뇨 환자에 대한 data를 수집 분석하여 이러한 문제점을 해결하고자 하였으나, 장기간 혈당 조절을 해야 하는 당뇨의 치료방법에 반하고, 검량모델의 작성을 위한 데이터의 수집에서 소요되는 노력과 시간의 비현실성이 문제가 되었다. Monfre¹²⁾ 등은 다변량분석 이전에 환자의 연령, 성별, 각질층의 수분상태, 체온, 피부 두께 등의 측정 시 변이가 될 수 있는 대상 환자들의 특성에 의해 몇 가지 집단으로 나누어 그 집단별로 다변량분석을 실시하고, 적용에 있어서도 측정 스펙트럼이 해당되는 그 집단의 검량모델이 적용될 수 있도록 하는 다층적 다변량분석법을 제시하여 부분 최소 제곱 회귀분석법으로 해결되지 않는 변이들을 줄이고자 하였다.

본 연구에서는 장기간 스펙트럼 측정 시, 나타나는 스펙트럼 변이를 극복하기 위하여 통계적, 가시적 변이 보정을 시도하였다. 다양한 범위의 혈당치와 당뇨 형태를 얻기 위해 정상군 및 제 1형 당뇨(Insulin dependent diabetes mellitus, IDDM), 제 2형 당뇨(Non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)를 유발시킨 생쥐를 이용하여 장기간의 실험을 행하였다. 마우스의 꼬리부분에서 얻어진 스펙트럼을 주성분분석 및 검증(Validation)의 과정을 통해 장기간의 스펙트럼 수집 동안에 야기된 변이로 발생한 이상치(outlier)를 제거하여, 부분 최소 제곱 회귀분석법의 적용 시 개선된 재현성 및 정확성을 지닌 검량 모델을 얻고자 하였다.

실험방법

검체

무균 상태에서 자란 7주령 된 KP600 BALB/C 암컷 생쥐를 6마리씩 정상군, 제 1형 당뇨군(IDDM), 제 2형 당뇨군(NIDDM)으로 나누어 20°C, 상대 습도 40%의 환경에서 1주일 정도 적응 기간을 주었다.¹³⁾ 그때의 평균 체중은 25 g ± 1.33(mean ± sd)이었다. 적응 기간 후 검체의 혈당, 체중, 체온 등의 기본적인 정보를 얻기 위해 어떠한 전처리를 하지 않은 상태에서 1차 실험을 행하였다. 1형 당뇨군은 24시간의 공복 기간을 가진 후, 췌장의 베타 세포를 선택적으로 파괴시키도록 185 mg/kg 이상의 알록산(C₄H₂N₂O₄ · 4H₂O, 5,6-dioxyuracil)을 투여하였고, 2차 실험을 통해 당뇨가 유발되지 않은 검체들은 재차 투여하여 당뇨가 유발 되도록 하였다.^{14,15)} 제 2형 당뇨군은 당부하 실험용 50.7 g/150 ml의 글루코오스 용액(글루오렌지 100액, 롯데제약(주), Korea)에 5.25 mg의 텍사메타손^{15,16)}을 혼합하여, 매일 0.3 ml씩 경구 투여 하였다. 제 2형 당뇨군의 경우, 물 대신 경구 투여에 사용한 글루코오스 용액을 자율적으로 투여되도록 하여 다양한

고혈당 범위를 유도하도록 하였다. 당뇨가 유발되고, 혈당 측정기의 측정범위 이상의 혈당이 되면 휴먼 인슐린(Humulin® N inj 100 IU/ml, Lilly Korea Ltd.)을 매일 3 × 10⁻³ units/g 씩 복강 투여하여 측정 가능 혈당 범위 내에 들어오도록 하였다.¹⁵⁾

기기 및 측정

측정은 체중 측정, 체온 측정, 근적외분광분석기로 측정, 체혈 및 간지 혈당기 측정의 순으로 이루어 졌다. 체중은 1g 단위의 0~100 g까지 측정이 가능한 생쥐 측정용 체중계로 측정하였고, 검체의 움직임에 의해 진동하는 바늘의 윗부분 수치를 읽어 기록하였다. 체온은 digital 체온계(Digital Clinical Thermometer, Model ACT2010, Actherm Medical Corp., China, range : 32.0~43.9°C, accuracy : ±0.1°C)를 검체의 입 안에 삽입하여 측정하였다. 근적외분광분석기로는 HN1100(SpectronTech Co., Ltd., Korea)을 사용하였고, 수광부와 발광부가 0.1 mm의 거리를 갖는 프루브를 스탠드에 고정하여 사용하였으며, 세라믹과 알루미늄이 동비로 함유된 물질을 측정하여, 확산 반사의 기준값으로 하고, log(1/R)로 나타내었다. 검체를 채혈대에 넣고, 꼬리 부분은 고정시켜 동맥혈이 보이는 정중앙을 측정하였다. 검체를 1000 ml 비이커에 담아 체혈용 스탠드 하에서 10분 정도 방치하여 혈관이 확장되면, 검체를 채혈대에 넣고, 해부용 메스를 이용하여 동맥에서 채혈하였다. 혈당측정은 글루코오스 산화효소(glucose oxidase, GOD)를 이용한 광학적 측정 방법인 SureStep plus(Lifescan, a Johnson & Johnson company, U.S.A.)로 이루어 졌다. 이 기기의 측정 가능한 혈당 농도 범위는 0~500 mg/dl이다. 실험은 일주일에 한 번씩 같은 요일에 측정하였고, 실험은 25°C ± 1.3(mean ± sd), 상대습도 49% ± 7.8(mean ± sd) 하에서 행해 졌다.

스펙트럼은 ChemoHN1100 소프트웨어(SpectronTech Co., Ltd., Korea)로 기록하였으며, Unscrambler v7.5(CAMO ASA, Norway)의 PLS법 및 PCA법을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

한 검체 당 2회의 스펙트럼을 측정하여 10주간 328개의 스펙트럼을 얻었다. 실험군 별로 평균한 스펙트럼은 Fig. 1에 나타내었고, 이는 인체의 손가락을 측정된 스펙트럼과 같이 수분 피크로 인한 1450 nm의 피크만 크게 나오는 형태를 띠었다.¹⁷⁾ 인체의 손가락보다 마우스의 꼬리가 작은 직경과 얇은 두께로 인해 인체 손가락 스펙트럼의 1/2 흡광도 값을 가졌다. 절대적으로 큰 수분 피크로 인해 스펙트럼만으로는 혈당 범위가 다른 실험군에 따른 차이는 확인 되지 않았다. 각 실험군 별 혈당은 정상군, 제 1형 당뇨군, 제 2형 당뇨군에서 각각 63~172 mg/dl, 57-H mg/dl, 59-H mg/dl의 혈당 범위를 얻었다. 정상군의 마우스 중 한 마

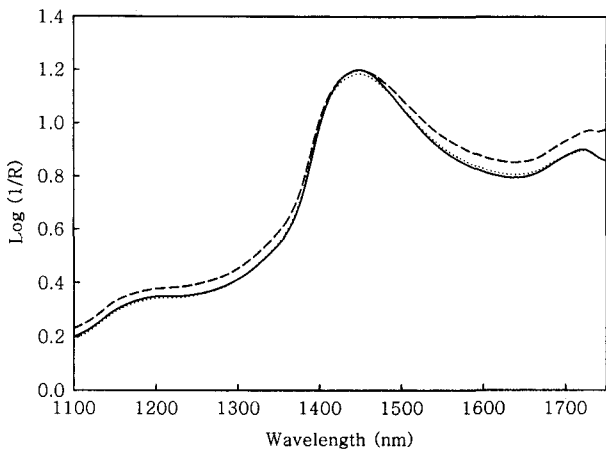


Fig. 1 - NIR diffuse reflectance spectra from mouse tail skin by experimental group; Normal group (solid line), IDDM (dotted line), NIDDM (dash line).

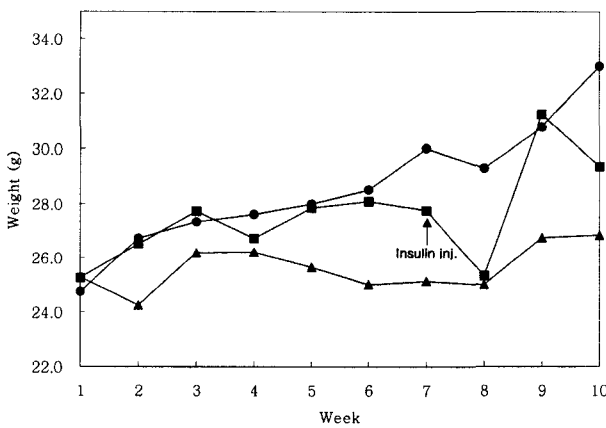


Fig. 2 - Change of weight by experimental group; Normal group (●), IDDM group (■), NIDDM group (▲), for 10 weeks.

리가 지속적으로 180 mg/dl 이상의 높은 혈당 값을 갖는 것으로 나타나 실험목적에 반하여 제외시켰다. 당뇨병군의 혈당 측정에서 혈당 측정기의 검출 범위 이상의 고혈당으로 측정되어진 결과를 H로 표시 하였고, 이는 데이터 처리 시 제외하고 분석하였다. 검체의 상태를 확인하기 위해 매회 측정된 체중은 측정 주별 집단의 평균 체중으로 나타내었고, Fig. 2와 같다. 어떠한 처리를 행하지 않은 정상군에서는 꾸준히 증가하는 반면, 당뇨유발 군에서는 증가와 감소를 반복하였다. 정상군, 제 1형 당뇨병, 제 2형 당뇨병이 각각 24.7 g, 25.2 g, 25.3 g에서 시작하였으나, 10회째 측정에서는 33.0 g, 29.0 g, 26.8 g로 증가했다.

통계적 변이 요인을 보정한 분석

전처리를 하지 않거나, 다분산 보정법¹⁸⁾(multiplicative scatter correction, MSC)의 전처리를 행하였다. 이것을 주별로, 또는 10주를 모두 합하여 부분 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 분석

Table I - PLSR modeling results from long-term study

Period (week)	Pretreatment	Factor	Calibration		Validation	
			SEC	R	SEP	R
1	Raw	9	20	0.862	28	0.697
2	Raw	7	29	0.795	28	0.574
3	Raw	9	17	0.903	40	0.670
4	Raw	3	99	0.504	129	0.445
5	Raw	6	36	0.810	47	0.757
7	Raw	7	11	0.964	31	0.625
8	Raw	9	0.3	1.000	23	0.893
10	Raw	7	25	0.745	37	0.597
all	MSC	2	50	0.108	43	0.167
All-outliers	MSC	4	32	0.546	35	0.480

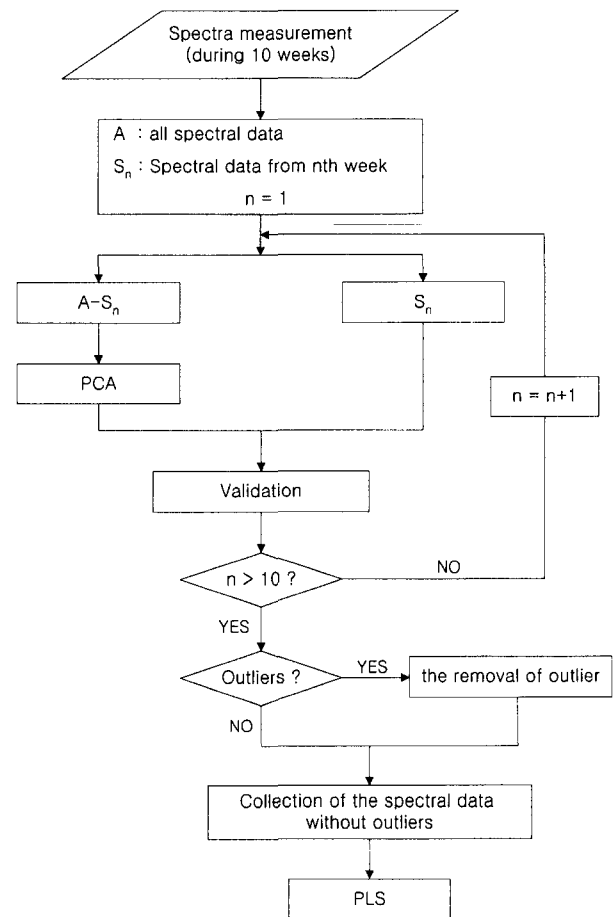


Fig. 3 - PCA for the removal of outliers.

하였고, 그 결과는 Table I에 나타내었다. 주별로 분석한 결과 표준 추정 오차(standard errors of prediction, SEP)^{2,7)}의 R값이 0.4 이상의 유의성 있는 상관관계를 확인할 수 있었으나, 전체 스펙트럼의 모델링 결과는 0.167의 저조한 상관관계를 나타냄을 알 수 있었다. 이상치(outlier)의 제거는 Fig. 3에 나타낸 것처럼 한 주의 스펙트럼을 남기고, 나머지 총 9주의 스펙트럼으로 주성분 분석을 행하였다. 여기서 얻은 9주의 주성분분석 모델을 남은 한

주의 스펙트럼과 검증의 과정을 거쳐 각 주별로 통계적인 차이가 있는지를 확인하였다. 이것은 총 10회에 걸쳐 10개의 주성분분석 모델을 얻었고, 그것에 대해 검증을 거친 10개의 결과를 얻었다. 검증 결과 각 주별로 적용한 주성분분석 모델에서 벗어나는 49개의 이상치의 스펙트럼이 있었고, 이것은 36.5°C 이하의 체온으로 측정되어진 검체에서만 나타나는 것을 확인하였다. 전체 스펙트럼에서 이상치의 스펙트럼을 제거한 279개의 스펙트럼에 대해 다시 부분 최소 제곱 회귀분석법으로 모델링 하여 Table I에 나타내었다. 이상치 (outlier)를 제거하기 이전의 모델보다 제거한 모델의 표준 추정 오차가 43에서 35로 향상되었고, R값 또한 0.4802로 유의성 있는 상관관계를 나타냄을 알 수 있었다.

가시적 변이 요인을 보정한 분석

근적외분광분석법을 이용한 수분을 함유하는 시료의 측정 온도의 변화에 민감하여 스펙트럼의 기준선에 변동을 주고, 결과에 영향을 미치므로 이는 중요한 변동요인이 된다. 특히 생체 시료는 70% 이상이 수분으로 구성되어 있어 온도의 영향을 배제해 줄 수 있는 다변량분석법을 적용 함에도 불구하고, 정밀한 측정을 위해서는 측정 검체의 온도를 통제하는 것이 필요하다.¹⁹⁾ 따라서 본 실험에서는 가시적인 이상치인 검체의 체온을 Fig. 4의 정규분포 곡선을 통해 측정 체온의 범위인 33.6~38.2°C에서 체온이 낮은 집단, 중간 집단, 높은 집단의 세 집단으로 나누어 부분 최소 제곱 회귀분석법을 이용하여 모델링 하였다. Table II에 검량 모델 결과 및 추정 결과를 나타내었다. 이 세집단의 결과는 앞의 전체 스펙트럼 데이터의 검량모델보다 더 좋은 상관성을 갖는 것으로 확인되었다. 이는 하나의 변이일 수 있는 검체의 체온을 배제하여 더 좋은 결과를 얻을 수 있다.

근적외분광분석법을 비롯한 혈당측정에 대한 *in vivo* 실험은 정상인의 당부하 실험, 당뇨병 환자의 측정을 통해 데이터를 수집한다. 이러한 검체들은 미확립된 근적외분광분석법을 이용한 혈당 측정 시기와 당대사 및 당뇨의 병리 기전과의 관계 등으로 하나의 변이 요인으로 작용되고, 선행 된 임상 실험에서도 정상인과 당뇨 환자라는 혈당의 상태 및 그에 수반하는 신체적 조건이 다른 집단을 대상으로 행한 실험에서 상이한 결과를 얻었다.²⁰⁾

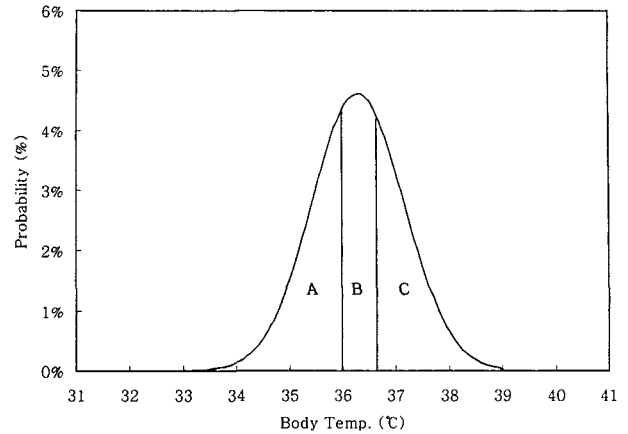


Fig. 4 - Normal probability curve of mouse body temperature for grouping such as low (A), medium (B), high temperature (C).

이 세 집단은 가시적으로도 구별되는 집단이기에 각 집단별로 다변량분석하여 변이 요인 하나를 배제하는 효과를 확인하고자 하였다. 그것의 다변량분석 결과는 Table II에 나타내었고, 전체 스펙트럼의 분석결과보다 더 좋은 상관성을 나타냄을 확인하였다.

결론

당뇨는 질병의 특성상 장기간, 여러 번 혈당의 측정이 이루어져야 하므로, 환자의 적절한 혈당의 관리를 위한 목적으로의 혈당측정기는 장기간의 측정에서 정확성 및 재현성의 확보는 필수적이다. 얻어진 스펙트럼을 부분 최소 제곱 회귀분석법의 적용 이전에 주성분분석 및 검증의 방법으로 각 주별의 이상치로 여겨지는 데이터를 제거하여 분석하였고, 유의성 있는 검량모델을 얻을 수 있었다. 이에 장기간 스펙트럼 측정으로 얻어진 이상치의 제거뿐만 아니라, 가시적으로 보여지는 분류를 통해 그것을 배제하여 개선된 검량모델을 얻을 수 있었다. 이것은 스펙트럼 데이터의 이상치의 배제가 다변량분석 이전에 선행되어 이루어져야 하는 단계임을 다시금 확인시켜준다. 본 실험에서는 부분 최소 제곱 회귀분석법을 이용한 다변량분석시 효과적인 이상치 배제 방법을 제시하였고, 그것의 배제를 통해 유의성 있는 혈당

Table II - PLSR modeling results of experimental group; Normal group, IDDM group, NIDDM group

Group	Range (mg/dl)	Pretreatment	Factor	Calibration		Validation	
				SEC	R	SEP	R
Normal	63~172	Raw	11	17	0.684	16	0.710
IDDM	57~495	Raw	9	74	0.669	69	0.629
NIDDM	59~241	Raw	11	27	0.821	28	0.775
Low Temp. (33.6~35.9°C)	57~437	Raw	11	59	0.724	55	0.561
Medium Temp. (36.0~36.7°C)	63~495	Raw	8	54	0.607	58	0.604
High Temp. (36.8~38.2°C)	59~314	Raw	5	8	0.975	37	0.420
All spectra	57~495	MSC	2	50	0.106	43	0.167

검량모델의 확보의 가능성을 보여주었다.

문 헌

- 1) Zhang, L., Small, G. W. and Arnold, M. A. : Calibration standardization algorithm for partial least-squares regression : Application to the determination of physiological levels of glucose by near-infrared spectroscopy. *Anal. Chem.* **74** (2002).
- 2) Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S. and Heise, H. M. : Near-infrared spectroscopy : Principles, Instruments, Applications, WILEY-VCH (2002).
- 3) Maruo, K., Tsurugi, M., Tamura, M. and Ozaki, Y. : *In vivo* noninvasive measurement of blood glucose by near-infrared diffuse-reflectance spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **57** (2003).
- 4) Malin, S. F., Ruchti, T. L., Blank, T. B., Thennadil, S. N. and Monfre, S. L. : Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Clinical Chemistry* **45** (1999).
- 5) Gabriely, I., Wozniak, R., Aharon, Y., Melvorach, M. and Shamoon, H. : Transcutaneous glucose measurement using near-infrared spectroscopy during hypoglycemia. *Diabetes Care* **22** (1999).
- 6) Muller, U. A., Mertes, B., Fischbacher, C., Jagemann, K. U. and Danzer, K. : Non-invasive blood glucose monitoring by means of near infrared spectroscopy : methods for improving the reliability of the calibration models, *Artificial Pancreas and Related Technology in Diabetes and Endocrinology* **20** (1997).
- 7) Edmund R. Malinowski, Factor Analysis in Chemistry, A Wiley-Interscience Publication, 2nd Edition (1991).
- 8) Jagemann, K. U., Fischbacher, C., Danzer, K., Muller, U. A. and Mertes, B. : Application of near-infrared spectroscopy for non-invasive determination of blood/tissue glucose using neural network. *Z. Phys. Chem.* **191S** (1995).
- 9) Fischbacher, C., Jagemann, K. U., Danzer, K., Muller, U. A., Papenkrodt, L. and Schuler, J. : Enhancing calibration models for non-invasive near-infrared spectroscopic blood glucose determinations. *Fresenius J. Anal. Chem.* **359** (1997).
- 10) Danzer, K., Fischbacher, C. H., Jagemann, K. U. and Reichelt, K. J. : Near-infrared diffuse reflection spectroscopy for non-invasive blood-glucose monitoring. *LEOS Newslett* **12** (1998).
- 11) Muller, U. A., Mertes, B., Fischbacher, C. F., Jagemann, K. U. and Danzer, K. : Non-invasive blood glucose monitoring by means of new infrared spectroscopic methods for improving the reliability of the calibration models. *Int. J. Artif. Organs* **20** (1997).
- 12) Monfre, S. L., Blank, T. B., Ruchti, T. L. and Thennadil, S. : Multi-tier method of classifying sample spectra for non-invasive blood analyte prediction. US 6512936 B1 (2003).
- 13) Ha, B. J. : The study on the biological activity in alloxan-induced diabetes mice. *J. of Nat. Sci. of Women's Univ.*, **3** (1997).
- 14) Szkudelski, T. : The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* **50**, 536 (2001).
- 15) Makimura, H., Mizuno, T. M., Isoda, E., Beasley, J., Silverstein, J. H. and Mobbs, C. V. : Role of glucocorticoids in mediating effects of fasting and diabetes on hypothalamic gene expression. *BMC Physiol.* **3** (2003).
- 16) Hoening, M. and Ferguson, D. C. : Diagnostic utility of glycosylated hemoglobin concentrations in the cat. *Domestic Animal Endocrinology* **16** (1999).
- 17) Kang, N., Woo, Y.-A., Cha, B.-S., Lee, H.-C. and Kim, H.-J. : Non-invasive blood glucose measurement by a portable near infrared (NIR) system. *Yakhak Hoeji* **46** (2002).
- 18) Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S. and Pezuela, C. de la : Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst* **123** (1998).
- 19) Hazen, K. H., Arnold, M. A. and Small, G. W. : Measurement of glucose and other analytes in undiluted human serum with near-infrared transmission spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **48** (1994).
- 20) Kang, N. : Development of noninvasive blood glucose measurement by portable near infrared spectrometer. master's thesis (2002).