

腎移植患者尿の高速液体クロマトグラフィーによる 腎機能の自動診断システムの開発

田 口 幹

Development of Computer Aided Renal Diagnosis System by
Using of High Performance Liquid Chromatography

Kan TAGUCHI

Abstract

The author has been developing a computer aided renal diagnosis system for the renal transplanted patient by analyzing the patient's urine using high performance liquid chromatography (HPLC).

In this paper, the author pointed out that the acute rejection after renal transplantation could be predicted about one day before the clinical diagnosis. And to extract the state of fundamental renal function, he used the factor analysis for the peaks in chromatogram, and also pointed out that the two dimensional plane of scores is suitable to display the history of the state of the patient's renal function.

A model of chromatogram of urine for healthy man is also prepared. Using this model, the "renal state profile" and the renal function (RF) value are proposed. The pattern of "renal state profile" describes the present state of patient's renal function closely. The RF value enumerates the renal function in one value, roughly. However, the RF value shows a very good correlation to the clinical diagnosis by medical doctors.

An algorithm to diagnose renal function is also described.

1. はじめに

腎臓は体内に生じた老廃物や有毒物質をすみやかに体外に排泄する機能を持つ重要な臓器の1つである。腎臓に障害を来すと、この機能が低下し、体内に有毒物質が蓄積され、生命に危険を及ぼす。腎臓病のうち特に慢性腎不全は、急性腎不全とは異なり腎機能の低下が著しく長期にわたり定期的に人工透析を行わなければ生命を維持することができない。

慢性腎不全の根本的な治療法として腎臓移植法があり、近年になって腎臓移植手術の手法も確立され、わが国でもその症例数も多くなってきている。しかし、移植後も腎臓が患者に完全に生着するまで長期間にわたって十分な監視をする必要があり、このことは症例数の増加に伴って臨床医の大きな負担になっている。

一方、化学分析技術の進歩により非常に多種類の高分子化合物の含まれる生体液を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置によってかなり短時間で分析できるようになった。そこで、筆者は、東京大学医科学研究所臓器移植教室と協力して、腎移植患者の移植後の腎機能の監視と、とくに移植後の最大の危険である急性拒絶反応の早期発見を目的として腎臓の直接の代謝物である尿をHPLC装置によって分析し、得られたクロマトグラムを解析して腎機能を自動的に監視診断するシステムの開発を進めてきた。尿の液体クロマトグラムはこれまで臨床医学では使用された実績はない。しかし、尿は腎臓の直接代謝物であり、尿中の成分の変動は直接腎機能の変動を反映していると考えられる。そこで、本論文ではまず、尿のクロマトグラムと医師の診断による腎機能との相関関係を明らかにし、診断に役立つ知見を発見することを目的として、これまでに得られた結果と簡単な診断アルゴリズムを報告

する。

2. 方 法

本研究で使用した HPLC 装置は東京大学生産技術研究所で開発された陰イオン交換型充填剤と勾配溶出法を用いる HPLC 装置で、尿を約 70 分で分析する。表 1 にこの HPLC 装置の仕様を示す。

クロマトグラムは図 1 に示すようにペンレコーダーで記録すると同時にデジタルデータレコーダに記録し、オフラインによりコンピュータで解析した。

表 1. HPLC 装置の仕様

機械部：日立製 634 型
充填剤：ポーラス型陰イオン交換樹脂
溶離液：0.006 M から 6 M の酢酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.4)
検出器：紫外吸収計 (254 nm)
カラム：内径 5 mm, 長さ 250 mm, ステンレス鋼製クロマト管
溶離法：直線勾配溶出法 (60 分)
流 速：0.71 ml/分

これまでに東大医科学研究所病院において行われた腎移植 28 例, 比較用として慈恵会医科大学病院において行われた腎移植 3 例について, 移植直後から退院まで継続的に, 患者の新鮮尿を採取し, 新鮮尿または冷凍保存尿について, まず遠心によって沈渣を取り除き, 50 μ l を本 HPLC 装置で分析を行い, その得られたクロマトグラムと患者の病勢とを追跡した。またドナー(腎臓提供者)についても移植の前後に尿を採取し同様に分析を行った。さらに, 比較のために健常人の尿 76 例についても分析を行った。

クロマトグラムは原理的には各ピークの保持時間がその成分に, ピークの面積がその量に対応している。しかし, 本研究では, 各化学成分の量の変動に着目するのではなく, 生体では各成分のバランスが重要であるとの考えから, クロマトグラムのパターンに着目し, その変動を追跡することとした。

実際, 本研究で対象としたクロマトグラムでは

- (1) 生体液である尿が非常に多くの成分を含んでおり, かつそれぞれの濃度が低いので多くの小さなピークが出現すること,
- (2) 勾配溶出法によってピークの位置が変動すること,
- (3) 薬剤の代謝物の非常に大きなピークが存在する

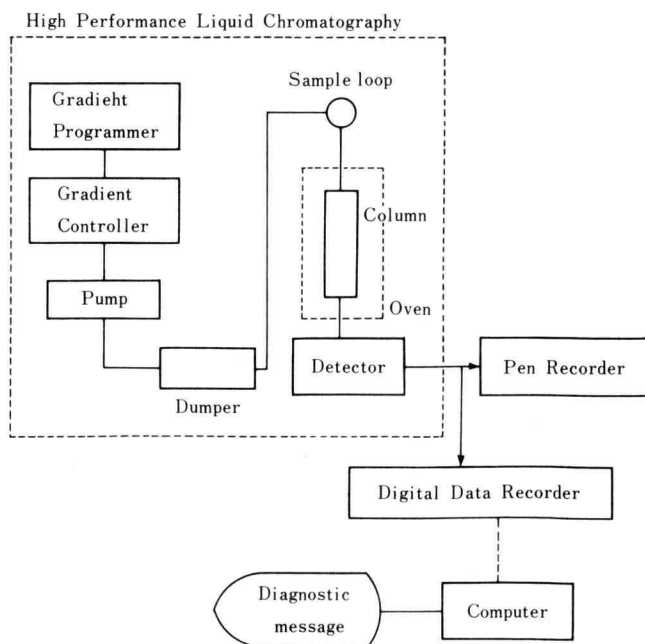


図 1. Total System

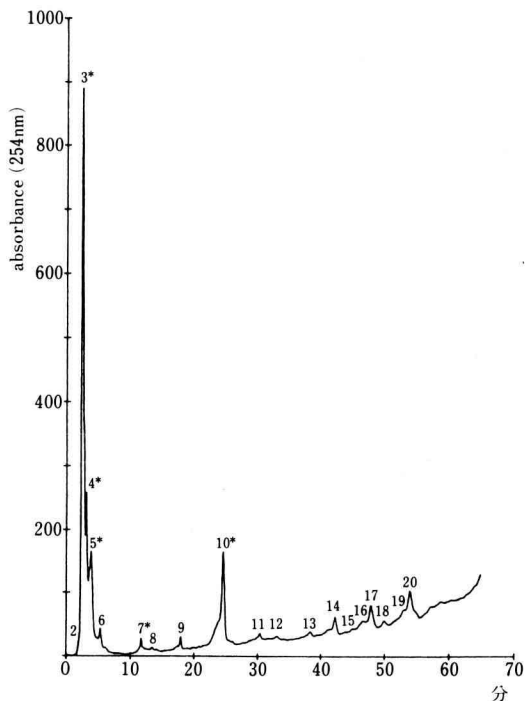


図2. 健康人の尿クロマトグラムの一例

ことがあること,

(4) 装置の完成度が低く、クロマトグラムの保持時間の再現性が悪いこと,

などの理由により、特定のピークを機械的に同定することはできなかった。^(#1)

そこで、得られたデータを次のような処理を行い以後の解析に用いた。

- (1) HPLC 装置に起因するノイズを除去する。
- (2) 勾配溶出法によるベースラインの補正を行う。
- (3) 各ピークを検出し、その面積を計算する。
- (4) これまでの予備実験の結果決定したクロマトグラム上の特徴的なピーク 20 個 (図 2 参照) についてそれぞれに同定する。^(#2)

(5) 各ピークを分離し、クロマトグラムをピークの間積を要素とする 20 次元のベクトルで表現する。

以上の処理を行ったデータを基に、次の 3 つの方法でクロマトグラムと腎機能との相関関係を分析した。

I クロマトグラム以外の臨床データと担当医師の診断結果を比較し、急性拒絶反応に特有のクロマトグラムのパターンを探索する。

II 医師の診断結果と相関の高いピークを抽出し、

多変量解析により腎機能の状態の分類を試みる。

III 健康人の尿のクロマトグラムを基にして腎機能低下者の腎機能の定量化を試みる。

3. 結 果

3.1 急性拒絶反応に特有なクロマトグラムのパターン

クロマトグラムに出現する個々のピークについて、その消長や面積の変化と医師による病勢診断との相関を調べた結果、図 3 中のピーク 1 が拒絶反応に特有のピークであることがわかった。このピークには^(#3)次のような特徴がある。

- (1) 健康人やドナーの尿では出現しない。
- (2) 急性拒絶反応を起こさない患者では、出現しないか、出現しても移植手術後 2~3 日に限られる。
- (3) 医師が臨床データから急性拒絶反応の診断を下す約 1 日以前から顕著に増大する。
- (4) 免疫抑制剤を投与すると直ちに縮小消滅する。

図 4 は移植後急性拒絶反応を起こした患者のピーク 1 の面積の推移を示したもので、その増大時と医師が

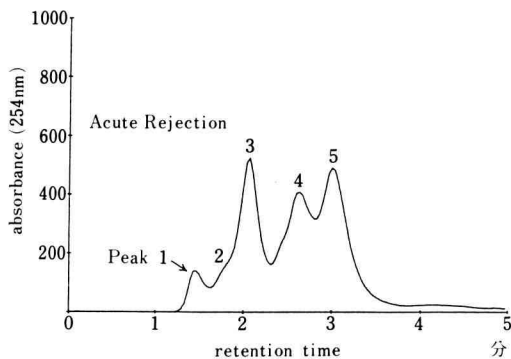


図3. 急性拒絶反応時に表われるピーク 1

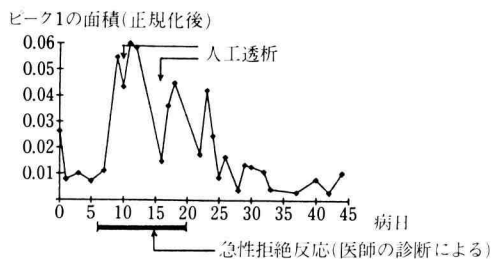


図4. ピーク 1 の面積の推移 (患者 S, 18 歳, 女性)

クロマトグラム以外の臨床データから急性拒絶反応と診断した時期とよく一致している。

3.2 多変量解析による腎機能の状態の分類

前もって健常人の尿 76 例のクロマトグラムのピークの面積を原変数として主成分分析を行った。その結果, 原変数とした 20 個のピークの中から腎機能を代表するピークとして 5 個のピークを抽出した (図 2 中で * を付けたピーク)。これに先のピーク 1 を加えた 6 個のピークについて, 尿の濃度の影響を除くためにこの 6 つのピーク的面積の和を 1 に正規化し, さらにこれを原変数として因子分析を行った。なお, 因子分析法は主成分分析法, 因子抽出行列は相関行列, 回転法はバリマックス法である。使用したデータは 505 例, プログラムは BMDP を用いた。

表 2 に因子分析の結果と因子負荷行列を示す。

さて, あるデータの因子得点を第 1・第 2 因子の平面にプロットしたものを仮に病態図と名づける。この病態図上で各患者は, 図 5 に示すように, 手術直後や病態の悪化したときには第 2 象限に (領域 A), やや回復したときには原点付近に (領域 B), 回復時には第 4 象限に (領域 C) プロットされる。また, 健常人は第 3 象限にプロットされる。

この病態図を用いれば腎機能の回復過程の推移を病態図上の位置の推移として表すことができる。^(注5)

3.3 健常人モデルによる腎機能の定量化

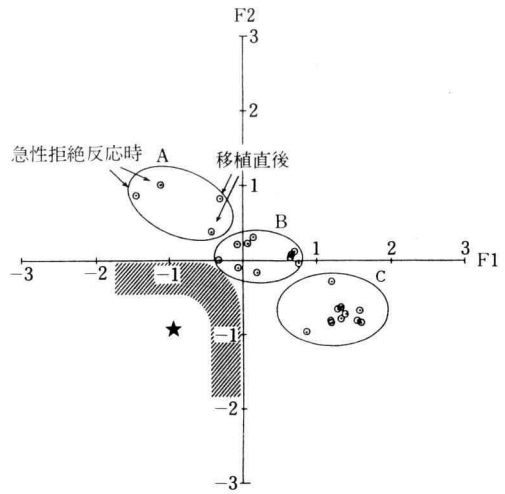
病態図は回復過程の把握には適しているが, 具体的

表 2. 因子分析の結果

Factor	Eigenvalue	Cumulative Proportion
F 1	2.255	56.4 (%)
F 2	1.150	85.1
F 3	0.571	99.4
F 4	0.024	100

Factor Score Coefficients

Peak	F 1	F 2
3	-0.39281	-0.13673
4	-0.15626	0.76192
5	0.54701	-0.31319
7	-0.22455	-0.29572



領域A:腎機能低下時, 領域B:やや回復, 領域C:回復期
斜線部より左下は健常域。(★:移植後14ヶ月目のデータ)

図 5. 病態図の一例 (図 4 と同じ患者)

に尿中の成分のバランスがどのようにくずれているかは表現できない。そこで腎機能の診断を行う際に基本とすべき健常人の尿のクロマトグラムのモデル (健常人モデル) を作成し, このモデルと患者の尿のクロマトグラムとの差異を用いて腎機能の定量化を試みた。

まず, クロマトグラム中の各ピーク i について健常人モデルからのへだたりを表す量として D_i 値を次式で定義する。

$$D_i = \frac{A_i - A_{mi}}{\sigma_{mi}} \dots\dots\dots(3-1)$$

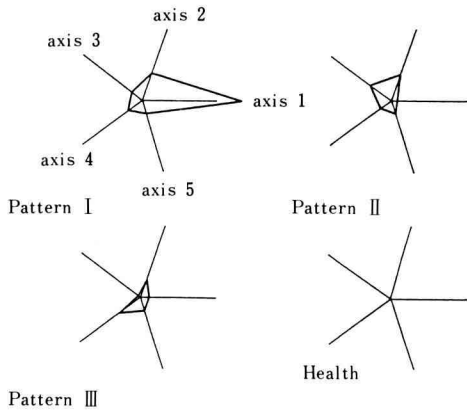
ただし,

- A_i : ピーク i の面積
- A_{mi} : 健常人モデルのピーク i の面積
- σ_{mi} : 健常人のピーク i の面積の標準偏差

である。

この D_i 値のうち前節で抽出した 6 つのピークのうち尿の濃度を代表すると考えられる尿酸のピーク (ピーク 10) を除いた 5 つのピークについて各 D_i 値の絶対値をプロフィール図に表し, これを腎機能状態プロフィールと名づけた。腎機能状態プロフィールによって腎機能の状態の変動の様子が一目で分かる。

腎機能状態プロフィールは図 6 に示すように腎機能の低下時の状態によって大きく 3 つのパターンに分類で



パターンⅠ：D₁が大きい、RF値は10より大、急性拒絶反応の疑い、RF値が100を越える時はATNの疑い。
 パターンⅡ：腎機能低下時、RF値は5から10の間、D₁は正常域、D₄が大きい。
 パターンⅢ：回復期、RF値は5から10の間、D₁は小さく、D₅が大きい。

図6. 腎機能状態プロフィールによる腎機能低下時のパターン

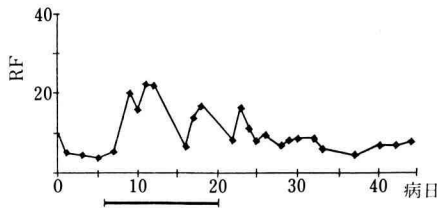


図7. RF 値の推移 (図4と同じ患者)

きる。

次に、D_i 値を用いて腎機能を一次的に定量化する RF 値を次式で定義する。

$$RF = \sqrt{\sum (D_i)^2} \dots\dots\dots(3-2)$$

ただし、 \sum は腎機能状態プロフィールで用いたものと同じピークについて和をとる。

図7に移植患者の RF 値の推移を示す。腎機能の低下にもなって RF 値の値が大きくなっていることがわかる。

4. 結 論

4.1 急性拒絶反応とピーク 1

本研究で得られた移植患者の尿のクロマトグラムピーク 1 の面積の増加と急性拒絶反応とは非常によく

対応しているが、さらに他の腎疾患患者についても検証を行い、その対応関係を明らかにしなければならない。さらにピーク 1 に対応する物質の化学的同定を行い生化学的な裏付けができれば急性拒絶反応の新たな知見が得られるかもしれない。

なお、すでに東大医科学研究所病院では、移植患者の尿のクロマトグラムにピーク 1 が出現すると直ちに免疫抑制剤を投与し、急性拒絶反応を未然に抑えるために利用している。⁴⁾

4.2 多変量解析による腎機能の評価

クロマトグラムは腎機能のみでなく、個体差、投与された薬剤、腎以外の病勢などによっても変化し、また同一試料に対するクロマトグラムの保持時間さえも 10% 以上も変動するほどデータの再現性が悪いので、多変量解析は有用な手法であると考えられる。なお、病態図に関しては、本研究で調べた患者については医師の診断による患者の腎機能と病態図上の位置とは定性的にはよく一致している。今後さらに各因子の意味づけについて検討すれば腎機能を表すなんらかの知見が得られるものと期待している。

医科学研究所においてはすでに急性腎不全の患者についてもその尿のクロマトグラムを病態図にプロットすることを試み、腎機能の低下時には第 2、第 4 象限にプロットされることは確認している。

4.3 健常人モデルによる腎機能の定量化

本研究では、腎移植患者についてその尿のクロマトグラムから移植された腎の機能の自動診断化を行うという限定された問題に取り組んでいるが、前述のように尿のクロマトグラムを腎機能の診断に利用することはやとその緒についたにすぎない。

腎疾患のコンピュータによる医療コンサルテーションシステムとしては、MIT および Tuft Medical Center によって開発された The Present Illness Program (PIP) がある。PIP の診断方法は、有名な緑内障の診断プログラム CASNET や感染症の診断プログラムの MYCIN のように症例と診断方法との膨大なデータベースを持ち、症状のデータ群から仮説をたて、他のデータを用いてその仮説の検証を行い、推論を深めて行くものである。PIP は医師の診断をモデル化するという立場に立った診断プログラムであるが、筆者の知る限りでは尿のクロマトグラムはデータとして使用していない。筆者はすでに健常人の尿のクロマ

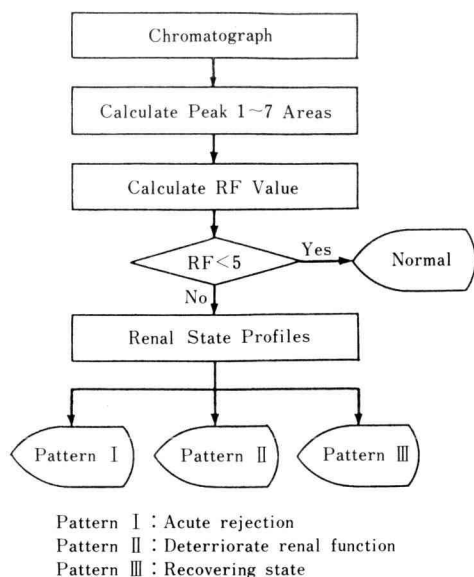


図8. 診断アルゴリズム

トグラムのモデルを構成し、 D_i 値、および RF 値によって腎機能の定量化を試み、腎機能状態プロフィール図によって腎機能低下時を3つのパターンに分類した。そこでこの D_i 値、および RF 値を用いて図8に示すような診断アルゴリズムを構成した。この診断アルゴリズムの妥当性は、今後医師による診断結果との突合せによりなされねばならないが、少なくとも本研究で対象とした患者については本アルゴリズムによる診断結果は医師により支持されている。

今後さらに症例数を増やし、診断基準値を確定するとともに、移植患者以外の腎疾患の場合にも本方式を適用してゆきたいと考えている。

参 考 文 献

- (1) 田口 幹・他：腎移植患者尿の高速液体クロマト

グラフィーによる腎機能の自動診断装置の開発、移植, 16-2, 97/100, 1981

- (2) 同：腎移植患者尿の高速液体クロマトグラフィーによる腎機能の自動診断装置の開発(II), 移植, 17-1, 61/65, 1982
 (3) 同：腎移植患者尿の高速液体クロマトグラフィーによる腎機能の自動診断装置の開発(III), 移植, 19-3, 145/149, 1984
 (4) 同：尿のクロマトグラムによる腎機能の診断, 第2回診断クロマトグラフィシンポジウム論文集, 86/91, 1984
 (5) 古川俊之：コンピュータ診断, 共立出版, 1982
 (6) 同：医師の診断のアルゴリズム, 数理科学, 241-5, 1981

- 注1) クロマトグラムでは各ピークに対応する物質の化学成分が同定できるはずである(例えばピーク10は尿酸のピークである)が、本研究ではあくまでもクロマトグラムのパターンのみを用いて診断を行うこととし、あえて各ピークはその出現順に番号で区別することとしている。
 注2) ここで「同定する」とは各ピークの化学成分を同定するのではなく、どのピークが追跡しているピーク何番であるかを同定すること。
 注3) ピーク1はクレアチンの代謝物らしい。
 注4) そのため急性拒絶反応患者の例がとれずピーク1の化学成分の同定ができないというジレンマになっている。
 注5) 他の臨床データから推測すると、第1因子は腎臓のろ過機能、第2因子は腎臓の核酸代謝機能に意味付けられそうである。いずれも大きくなるほど各機能が悪化している。