〔原 著〕

コンピュータによる血清蛋白分画の 自動病態解析プログラムの開発

櫻林郁之介*・大門正博*・橋本好一*・太田拔徳*
河合 忠**・和田守弘***・妹尾英樹***

SUMMARY

Serum protein fractionation by cellulose acetate electrophoresis is routinely used in clinical laboratories. Recently, various types of automated electrophoresis equipment are commercially available. Although we can easily take the percentage or absolute value of each serum protein fraction, there is no information for the presence of abnormal proteins (especially M-protein) or pathologic condition.

We attempted to develop the automated detecting programs for presence of M-protein and pathologic condition by the combination of computer and automated electrophoresis equipment. Five computer programs for the detection of M-protein and one program for the detection of pathologic condition were developed. According to these programs, more than 90% of M-proteins including small amount of various types of M-protein could be detected and 79% of the pathologic conditions were detected automatically.

Key words: computer program, protein fractionation, pathologic condition, M-protein.

はじめに

電気泳動法を用いた血清蛋白分画は現在自動電気泳動装置の開発により、スピーディにまたより正確なデータを臨床に提供できるようになったが、反面M-蛋白、とくに微量M-蛋白の検出は自動化が進むにつれて見落としやすくなっているのが現状である。

一方、臨床検査室ではデータをただ臨床側に返すだけでなく、臨床家にとって意味のあるものにする必要があるのではないかと考えから、松田¹⁾や他の研究者²⁾

が行っているように、臨床化学データからの病態解析の開発が行われ、実用化の段階に入っているものもある。また、われわれも血清中のおもな蛋白をネフェロメトリーにより測定し、その測定結果をもとに自動的に各種病態を検出するコンピュータプログラムを開発した^{3,4)}。

そこで今回われわれは、セルロースアセテート膜を用いた自動電気泳動装置により得られた血清蛋白分画のデータをもとに、M-蛋白の検出をはじめ⁵⁾、各種病態解析を自動的に行えるように、デンストグラムの波形解析を主体にしたコンピュータを用いた自動病態解析装置の

Automated computer program for the detection of pathologic condition by the protein fractionation using automated electrophoresis equipment.

* Ikunosuke Sakurabayashi, Masahiro Daimon, Yoshikazu Hashimoto, Hatsunori Ohta; 自治医科大学大宮医療センター検査部

** Tadashi Kawai; 自治医科大学臨床病理学

*** Morihiro Wada, Hideki Senoh; 株式会社常光東京技術研究所

Correspondence address: Ikunosuke Sakurabayashi, Department of Clinical Laboratories, Omiya Medical Center, Jichi Medical School, 1-847 Amanuma-machi, Omiya, 330, Japan.

(受付 1991年6月6日, 受理 1991年6月13日)

本稿は故 児玉桂三先生生誕百年記念号に向けて執筆したものである。

開発を目的として研究を行った。

材料および方法

1. 材 料

基準とした対照血清にはプール血清を用い、異常検体には免疫電気泳動法によって、種々のM-蛋白が検出された血清、ならびに病態の確定した患者血清を用いた。

2. 実験方法

1) 自動病態解析システムの概要

システムの構成としては、泳動装置として全自動電気泳動装置 CTE-150 (常光)、データ解析用に PC-9801 (NEC) を使用し、その両者を RS-232C のオンラインで結んだ。なお、全自動電気泳動装置から出力されるデータをオンラインで結ぶ場合、RS-232C のオートサンプリングスやオートスパンを行わないものを用いた。

2) 電気泳動条件

セルロースアセテート膜電気泳動法は電気泳動学会標準操作法に準じて行った。支持体は富士セパラックス SP フィルム、緩衝液はペロナール緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.06)、染色液は 0.8% ボンソー 3R (溶媒は

6% トリクロロ酢酸)、脱色液は 1% 酢酸であり、泳動電流は膜 1cm あたり 0.6mA、泳動時間は 45 分、塗布チップ幅は 7mm で行った。なお、デンストグラム操作を行う際には、デカリンによる透明化は行っていない。

3) M-蛋白検出のプログラムの概要

M-蛋白検出のためのプログラムの概要を Fig. 1 に示す。プログラムは次の五つを組んだ。

① 差分による検出法

差分による検出は、まず患者血清の検体のデンストグラムの展開長を基準となる対照血清に対して正規化を行う。次に、患者検体から対照血清のデンストグラムを差し引いて、差分波形を求める。その求められた差分波形のピークが一定の値よりも大きくなった点をM-蛋白として検出する。Fig.1(a) では、 γ -グロブリン分画にM-蛋白が検出されている。

② ピーク比による検出

ピーク比による検出は、患者血清自身のアルブミン分画と、その他のグロブリン分画のピーク値の比較により、判定する方法である。Fig.1(b) では、 β -グロブ

a) Finite difference detection

b) Peak ratio detection

c) Inclination detection

d) Sixth fraction detection

e) Inflection point detection

Fig. 1. Computer program for the detection of M-protein by electrophoretic analysis.

Each figure shows densitogram of serum protein fractions after cellulose acetate electrophoresis.

Table 1. Change of protein fractions in pathologic conditions.

Pathologic condition	Total protein	Albumin	Globulins			
			α_1	α_2	β	γ
Acute inflammation		↓	↑	↑	N	N
Chronic inflammation		↓	↑	↑	N	↑
Chronic hepatic hypofunction		↓	N-↓	↓	N-↓	↑
Pregnancy, Iron deficiency, Anemia	↓	↓	↑	N	↑	N
Nephrotic syndrome	↓	↓	↓	↑	↓	↓
Protein loss	↓	↓	N-↓	N-↓	↓	↓
Increase of polyclonal γ F.	↑	↓				↑

N: within normal range

Increase (↑) or decrease is judged by concentration (g/dl).

リンのピーク値 P が高くなっており、その P をアルブミン分画のピーク値 PA で割った値が一定の値を超えているのでM-蛋白として検出する。

③ 傾斜による検出

傾斜による検出はデンストグラムの上昇度あるいは、下降度を用いて検出する。Fig. 1(c) で原理を説明すると、 $\Delta x = dx$ の間の上昇 $\Delta y = dy$ により傾きを求め、この値が一定値よりも大きい場合にM-蛋白を検出する。

この場合、上昇度だけでなく、下降度のチェックによっても検出できるようプログラムを作成した。

④ 6分画異常による検出

患者検体が6分画の場合は、次の方法で検出する。まず患者血清の検体のデンストグラムの展開長を、基準となる対照血清に対して正規化を行う。

次に、二つのデンストグラム図を重ね合わせる。Fig. 1(d) では、対照血清の γ -グロブリン分画中に患者検体の分画は二つ存在している。この場合、5分画目の分画幅 ($\Delta x_1 = dx_1$) と6分画目の分画幅 ($\Delta x_2 = dx_2$) を比較し、狭い方を異常と判定する。図では Δx_1 が狭いと判定されている。

⑤ 変曲点による検出

変曲点による検出は、各分画のピークおよび始点以外の変曲点を検出する方法である。デンストグラムにわずかなM-蛋白がみられるとき、Fig. 1(e) のように6分画が検出されるほどの落込みがない場合でも、変曲点として検出できることに注目した。デンストグラムの2次微分波形を算出すると微係数が0の軸を下から上へ横切る点は1分画に対して通常一つしかない。しかし、変曲点をもつ分画では、二つ現れる。この原理を利用して、微量のM-蛋白を検出する。

4) 病態解析のプログラムの概要

病態解析のプログラムに関しては、電気泳動法による

Table 2. Decision standard for the pathologic condition.

Pathologic condition	Decision standard
Acute inflammation	$K_4 < \alpha_2\text{-globulin} < K_5$ $K_6 < \gamma\text{-globulin} < K_7$
Chronic inflammation	$K_1 < \alpha_2\text{-globulin} < K_2$ $\gamma\text{-globulin} > K_3$
Acute hepatic hypofunction	albumin $< K_{11}$ $\alpha_2\text{-globulin} < K_{12}$ $\gamma\text{-globulin} < K_{13}$
Chronic hepatic hypofunction	albumin $< K_8$ $\alpha_2\text{-globulin} > K_9$ $\gamma\text{-globulin} < K_{10}$
Nephrotic syndrome	albumin $< K_{14}$ $\alpha_2\text{-globulin} > K_{15}$ $\gamma\text{-globulin} < K_{16}$
Pregnancy, Iron deficiency, Anemia	$\beta\text{-globulin} > K_{17}$
Protein loss	albumin $< K_{18}$ $\beta\text{-globulin} < K_{19}$

* K_1 - K_{19} are detecting constants for respective protein fractions.

血清蛋白分画の変化から病態を知るための各蛋白分画の変化を、河合の分類⁵⁾に従い作成した。Table 1 に示すごとく、M-蛋白を除く、主たる7種の病態での各分画の変化を示した。この変化をもとに Table 2 に示すように、各分画の各種病態での変化を捉えることのできるプログラムを作成した。このプログラムでは、おもな分画を選択し、ある一定の範囲を超えて増加しないしは減少する変化をとらえ、その条件を満たす変化を示したものをその病態として判定する。

結 果

1) M-蛋白の検出

まず、M-蛋白の検出に関しては、いろいろな検出方

Table 3. Results of M-protein detection by the computer program for serum protein analysis.

	Sample number	Detection number & rate (%)	Effective program number for M-protein detection*				
			①	②	③	④	⑤
Small amount of M-protein	14	13 (93)	1	2	2	2	9
Moderate amount of M-protein	11	11(100)	6	4	3	5	3
Large amount of M-protein	16	16(100)	15	15	2	15	0

* ①: finite difference detection, ②: peak ratio detection, ③: inclination detection, ④: six fraction detection, ⑤: inflexion point detection, cf Fig. 1.

Table 4. Result of pathologic condition detection by the computer program for serum protein analysis.

Case number	Number of cases detected	Detection ratio (%)
24	19	79

Cases contain various types of pathologic condition.

法を組み合わせることにより、Table 3 のような良好な結果が得られた。この表では上から IgM, IgA, IgG の、それぞれの微量から多量の M-蛋白が認められた検体を表した。横には検体数、およびそのうちの検体数と検出率を表している。中等量と多量の M-蛋白を含む検体に関してはそのすべてを検出することができた。微量の M-蛋白を含む検体に関しても 14 検体中 93% の検出率となった。これからわかるように、いずれのプログラムも有効に働いていることがわかるが、たとえば微量の M-蛋白の検出には、変曲点を用いたプログラムが有効であることがわかる。

2) 各種病態の把握

未だ病態のはっきりした症例が多数集められず合計で 24 例であったが、そのうち 80% 弱のものがその病態を判定することができた (Table 4)。

考 察

血清蛋白をセルロースアセテート膜電気泳動法により五つの分画に分け、各分画の絶対量を血清総蛋白から算出することにより、種々の病態を知ることができる。河合⁵⁾はこの蛋白分画を用いて、各種の病態を示す患者血清のデータを多数集積し、その詳細かつ注意深い観察結果から、独自の分類法を発表した。われわれは、このデータに基づき、自動電気泳動装置から出力されるデンストグラムの情報をコンピュータに入力し、そのデータを解析することにより、河合の分類に準じた自動病態解

析装置の開発を試みた。

まず、河合の分類のなかでの M-蛋白の検出法であるが、典型的なものに関しては比較的容易に検出することが可能であるが、ベテランの臨床検査技師でないと見逃がすような微量な M-蛋白に関しては、一つのコンピュータプログラムだけでは到底検出することができなかった。そこで、方法に示したような五つのプログラムを作成し、そのどれかが M-蛋白を検出するようにすべてのデンストグラムのデータを入力し、解析することとした。

その結果、解析に要する時間は数秒であり、日常の業務の中で使用しても十分に機能することがわかった。また、M-蛋白の見られた症例をこの解析装置で分析した結果も十分に満足するものであった。しかし、Bence Jones 蛋白が血清中に見られる症例のうち、まれに α_1 領域に泳動されるものがあるが、このような症例では検出不可能なこともわかった。今後これらの例でも検出できるようなプログラム (アルゴリズム) の開発をしていかなばならない。

各種病態解析用のプログラムについてであるが、未だ例数が少ないため断定的なことはいえないが、少なくとも組み込んだプログラムによって検出された病態と患者の病態との一致率は約 80% であり、まずまずの結果といえよう。現在、多くの病態のはっきりした各ステージでの症例からの血清蛋白分画のデータを集積し、より精度のよいプログラムを作成していく予定である。

ま と め

今回われわれが開発した方法によって、微量な M-蛋白でも、その有無や、位置を精度よく検出できるようになった。今後も、もっと高精度な M-蛋白の検出法を検討するとともに、病態解析に向けて、新しいアルゴリズムの開発を行う予定である。

文 献

- 1) 松田信義：臨床病理，特集，84：112，1990.
- 2) 丹羽正治，清水裕史：臨床病理，特集，83：92，1990.
- 3) Sakurabayashi, I. et al. : 12th WASP Abstracts, 1983, p. 242.
- 4) 櫻林郁之介，他：日本臨床検査自動化学会誌，9：419，1984.
- 5) 河合 忠，他：セルロースアセテート膜電気泳動法による血清蛋白分画，宇宙堂八木書店，東京，1972.
- 6) 和田守弘，他：生物物理化学，33：80，1989.

要 旨

全自動血清蛋白分画測定装置が多く用いられるようになってから，電気泳動図の観察によるM-蛋白の検出，ことに微量M-蛋白の検出が行われにくくなっている。また，検査結果の数値のみの報告では，検査結果が臨床家によって十分に活用されるとは限らない。このような

状況に鑑みて，セルロースアセテート膜電気泳動法を用いる全自動血清蛋白分画測定装置とコンピュータをオンラインで結んで，自動分析の結果を用いて，M-蛋白の検出と病態の判定を行うプログラムを開発した。

M-蛋白の検出のための5種類のプログラムを併用した場合の検出率は通常または多量のM-蛋白を含む血清では27例について100%，微量のM-蛋白を含む血清でも90%（14例中13例）であった。病態判定については24例中19例（79%）について正しい判定結果がえられた。

付 記

Fig. 1 中の a)～c) の3個の“definite value”と Table 2 の $K_1 \sim K_{19}$ の数値は特許出願の関係から示されていないが，判定の論理が本論文を原著として発表するに値すると考えられるので数値のないままでこの論文を受理した。

（編集責任者 島尾和男）