

第99回 北海道医学大会 プログラム・抄録

Program of the 99th Hokkaido Medical Congress

臨床検査医学分科会

(第53回日本臨床検査医学会北海道支部総会)
(第29回日本臨床化学会北海道支部例会)

日時：令和元年10月19日(土) 12:30~17:30

会場：北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス

札幌市中央区北4条西5丁目 ASTY45 12階

TEL (011) 223-0205

日本臨床検査医学会北海道支部総会総会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 学部長／教授 幸村 近

日本臨床化学会北海道支部例会会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 教授 吉田 繁

特別講演

「ピロリ菌の除菌で胃がんはどこまで予防できるのか？」

北海道医療大学 学長 浅香 正博

開催期間

総会 令和元年10月5日(土)

分科会 自 令和元年8月31日(土)

至 令和元年11月23日(土)

総会会場 札幌グランドホテル

会 頭 塚 本 泰 司

主 催 札 幌 医 科 大 学

北海道大学医学研究院

旭 川 医 科 大 学

北 海 道 医 師 会

臨床検査医学分科会

(第53回日本臨床検査医学会北海道支部総会)
(第29回日本臨床化学会北海道支部例会)

日 時：令和元年10月19日(土) 12：30～17：30

会 場：北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス

札幌市中央区北 4 条西 5 丁目 ASTY45 12階

TEL (011) 223-0205

日本臨床検査医学会北海道支部総会総会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 学部長／教授 幸村 近

日本臨床化学会北海道支部例会会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 教授 吉田 繁

特別講演

「ピロリ菌の除菌で胃がんはどこまで予防できるのか？」

北海道医療大学 学長 浅香 正博

-
1. 講演時間 一般演題 (01～28)：1 題 6 分、討論 2 分
特別講演：質疑応答含め60分
 2. 発表方法 液晶プロジェクターを用いた発表とします。
(OSはWindows 10/Power Point 2016です。Macは使用できません)
 3. データ受付 USBフラッシュメモリのみとします。
 4. 幹事会 11：00～11：45 (日本臨床検査医学会北海道支部)
北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス 講義室B
 5. 総会 11：50～12：00 (日本臨床化学会北海道支部総会)
12：00～12：20 (日本臨床検査医学会北海道支部総会)
北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス 講義室A
 6. 事務局 北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科内
TEL：011-778-8931
FAX：011-778-8941
E-mail：ysk-tkhs@hoku-iryo-u.ac.jp
-

臨床検査医学分科会
(第53回日本臨床検査医学会北海道支部総会)
(第29回日本臨床化学会北海道支部例会)

日 時：令和元年10月19日(土) 12:30～17:30

会 場：北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス

札幌市中央区北4条西5丁目 ASTY45 12階

TEL (011) 223-0205

日本臨床検査医学会北海道支部総会総会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 学部長／教授 幸村 近

日本臨床化学会北海道支部例会会長

北海道医療大学 医療技術学部 臨床検査学科 教授 吉田 繁

特別講演

「ピロリ菌の除菌で胃がんはどこまで予防できるのか？」

北海道医療大学 学長 浅香 正博

一般演題1 (12:30～13:02)

座長 遠藤 輝夫 (北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科)

1. 胎児・新生児溶血性疾患におけるIgGサブクラス解析の有用性

○村井 良精¹, 遠藤 輝夫², 盛合美加子¹, 浅沼 康一¹, 柳原 希美^{1,3}, 田中 信悟^{1,3}, 永原 大五^{1,3}, 高橋 聡^{1,3} (札幌医科大学附属病院検査部¹, 北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科², 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座³)

2. NASH鑑別のための血中LDL-TG値の有用性

○櫻井 俊宏¹, 高橋 祐司², 藤井 佑樹³, 能祖 一裕³, 太田 素子⁴, 伊藤 康樹⁴, 千葉 仁志⁵, 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究所¹, 北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科², 岡山大学消化器肝臓内科³, デンカ生研株式会社⁴, 札幌保健医療大学⁵)

3. 尿沈渣円柱, 尿生化学マーカー, およびeGFRの関連性

○伊藤 敦巳, 野澤 佳祐, 及川 貴允, 高橋 裕之, 渡辺 愉美, 高橋 順也, 佐渡 正敏, 藤井 聡 (旭川医科大学病院)

4. 腎移植術後極早期における尿中肝臓型遊離脂肪酸結合蛋白の動態

○中村真由美¹, 高橋 祐司², 矢野 智哉¹, 福澤 信之³, 見附 明彦⁴, 平野 哲夫⁴, 原田 浩⁴ (市立札幌病院検査部¹, 北海道医療大学医療技術学部², 五稜郭ネフロクリニック泌尿器科³, 市立札幌病院腎臓移植外科⁴)

一般演題2 (13:02～13:34)

座長 小栗 聡 (北海道大学病院検査・輸血部)

5. E型肝炎ウイルスの遺伝子型3型および4型鑑別に向けたマルチプレックスreal-time RT-PCR法の開発

○飯田 樹里¹, 小林 悠¹, 坂田 秀勝¹, 佐藤進一郎¹, 生田 克哉², 山本 哲², 池田 久實², 紀野 修一¹ (日本赤十字社北海道ブロック血液センター¹, 北海道赤十字血液センター²)

6. HIV薬剤耐性検査の外部精度評価における次世代シーケンサーの活用

○吉田 繁¹, 蜂谷 敦子², 松田 昌和², 齊藤 浩一³, 岡田 清美⁴, 椎野慎一郎⁵, 佐藤かおり⁶, 藤澤 真一⁶, 遠藤 知之⁷, 豊嶋 崇徳⁷, 杉浦 亘², 吉村 和久^{5,8}, 菊地 正⁵ (北海道医療大学医療技術学部¹, 国立病院機構名古屋医療センター², LSIメディエンス³, 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所⁴, 国立感染症研究所⁵, 北海道大学病院検査・輸血部⁶, 北海道大学病院血液内科⁷, 東京都健康安全研究センター⁸)

7. 献血者の梅毒血清学的検査RPRカード法におけるプロゾーン現象の検討

○後藤 智哉¹, 尾山 秀明¹, 岸本 信一¹, 佐藤進一郎¹, 生田 克哉², 山本 哲², 池田 久實², 紀野 修一¹ (日本赤十字社北海道ブロック血液センター¹, 北海道赤十字血液センター²)

8. (1→3) β-Dグルカン測定試薬「ファンギテック Gテスト ES「ニッスイ」」の有用性評価

○小林 亮¹, 品川 雅明¹, 佐藤 勇樹¹, 荏澤 慎也¹, 柳原 希美^{1,2}, 浅沼 康一¹, 高橋 聡^{1,2}
(札幌医科大学附属病院検査部¹, 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

一般演題3 (13:34~14:06)

座長 安田 慶子 (北海道大学病院検査・輸血部)

9. ASTおよびALT活性測定におけるIFCC対応試薬の基本性能

○高橋 祐輔¹, 梅森 祥央², 浅沼 康一², 高橋 聡^{2,3} (北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科¹, 札幌医科大学附属病院検査部², 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座³)

10. 自動分析装置 コバスpro<503>によるLDおよびALP項目の基礎的検討

○梅森 祥央¹, 田中真輝人¹, 早坂 享子¹, 前田 瑛真¹, 浅沼 康一¹, 柳原 希美², 田中 信悟², 永原 大五², 高橋 聡² (札幌医科大学附属病院検査部¹, 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

11. 血中IgG 4 測定試薬「N-アッセイ LA IgG4 ニットーポー」の基礎的検討

○田中真輝人¹, 梅森 祥央¹, 早坂 享子¹, 浅沼 康一¹, 柳原 希美^{1,2}, 田中 信悟^{1,2}, 永原 大五^{1,2}, 高橋 聡^{1,2} (札幌医科大学附属病院検査部¹, 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

12. 『デタミナーCL IL-2R NX』の非特異反応抑制効果と基本性能の評価

○近藤 崇¹, 盛合 亮介¹, 山田 浩司¹, 遠藤 明美¹, 浅沼 康一¹, 柳原 希美², 高橋 聡^{1,2}
(札幌医科大学附属病院検査部¹, 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

一般演題4 (14:06~14:38)

座長 高橋 祐司 (北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科)

13. 肝細胞の脂質代謝とミトコンドリア代謝への酸化HDLの影響

○山端ありさ¹, 櫻井 俊宏², 関島 将人², 上野 朱音¹, 布田 博敏², 千葉 仁志³, 恵 淑萍²
(北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究所², 札幌保健医療大学³)

14. ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 cell) におけるDDTのレドックス制御への関与

○武石 にれ¹, Darwish Wageh², 千葉 仁志³, 恵 淑萍² (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究所², 札幌保健医療大学³)

15. ムール貝抽出物のNrf2を介した抗酸化能の評価と抗酸化物質の探索

○鈴木 拓貴¹, 譚 慧¹, 高 明晨¹, 布田 博敏¹, 千葉 仁志², 恵 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究所¹, 札幌保健医療大学²)

16. リゾホスファチジルエタノールアミンのLC/MS定量法の検討

○山本 祐輔¹, 櫻井 俊宏², 陳 震², 三浦 佑介³, 千葉 仁志⁴, 恵 淑萍² (北海道大学大学院保健科学研究所¹, 北海道大学大学院保健科学研究所², 群馬パース大学保健科学部検査技術科³, 札幌保健医療大学⁴)

一般演題5 (14:48~15:20)

座長 Rojeet Shrestha (北海道大学大学院保健科学研究所)

17. Plasmalogen species protect HepG2 cells from lead-induced cytotoxicity and lipid oxidation

○WU YUE¹, Chen Zhen¹, Wageh Darwish¹, 千葉 仁志², 恵 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究所¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

18. Compositional analysis of lipid droplets in HepG2 cells after treatment with oxidized lipoproteins

○Rojeet Shrestha¹, Chen Zhen¹, 櫻井 俊宏¹, 千葉 仁志², 恵 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究所¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

19. Study of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mutagenic activation in HepG2 cells

○朱 子健¹, Wageh Sobhy DARWISH¹, 千葉 仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学²)

20. Cadmium-induced oxidative damage in human breast cancer cells (MCF7) and protection with fat-soluble vitamins

○Wageh Sobhy DARWISH¹, 千葉 仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学²)

一般演題 6 (15:20~15:52)

座長 櫻井 俊宏 (北海道大学大学院保健科学研究院)

21. Fried oil-induced changes in xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cells

○Jin-Kui Ma^{1,2}, Wageh Sobhy Darwish¹, Min-Cheng Gao¹, Hui Tan¹, 千葉 仁志³, 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究院¹, 肇慶学院², 札幌保健医療大学³)

22. 環境濃度オゾンによるPOPG脂質膜の酸化に関する研究

○大場 早紀¹, 喬 琳¹, 千葉 仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学医学部保健学科¹, 札幌保健医療大学²)

23. オゾンによる肺サーファクタントリン脂質膜の構造と安定性への影響

○喬 琳¹, 陳 震¹, 高田 俊智², 千葉 仁志³, 叶 深², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究院¹, 東北大学大学院理学研究科², 札幌保健医療大学³)

24. Quantitative profiling of fatty acids in human plasma by derivatization and LC-MS/MS

○陳 震¹, 高 紫君¹, Wu Yue¹, ロジート シュレスト¹, 千葉 仁志^{1,2}, 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

一般演題 7 (15:52~16:16)

座長 阿部記代士 (札幌医科大学附属病院検査部)

25. 乳腺Matrix-producing carcinomaの1例

○沖野久美子¹, 幸村 近¹, 小野 誠司¹, 川江 孝子², 坂井 香里², 富樫 由衣², 達髭 麻衣², 酢谷 充寿², 池田 亮輔², 照井 雅弥², 長嶋 和郎³, 南 誠一⁴ (北海道医療大学医療技術学部¹, 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院検査センター², 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院病理診断科³, 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院乳腺外科⁴)

26. 超音波法による上大静脈血流速度波形記録における心窩部アプローチと鎖骨上窩アプローチの比較

○前泊 佐南¹, 村山 迪史², 加賀 早苗³, 岡田 一範³, 柳 裕介⁴, 三神 大世³, 政氏 伸夫³, 中鉢 雅大², 西野 久雄², 横山しのぶ², 岩野 弘幸⁵ (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学病院超音波センター², 北海道大学大学院保健科学研究院³, 北海道大学大学院保健科学院⁴, 北海道大学大学循環病態内科学⁵)

27. 心不全患者の左房リザーバ機能低下を規定する因子の検討

○後藤 真奈¹, 加賀 早苗², 岡田 一範², 三神 大世², 村山 迪史³, 中鉢 雅大³, 西野 久雄³, 横山しのぶ³, 岩野 弘幸⁴, 安斉 俊久⁴ (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究院², 北海道大学病院超音波センター³, 北海道大学大学院循環病態内科学⁴)

特別講演 (16:30~17:30)

座長 幸村 近 (北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科)

ピロリ菌の除菌で胃がんはどこまで予防できるのか?

○浅香 正博 (北海道医療大学学長)

1. 胎児・新生児溶血性疾患におけるIgGサブクラス解析の有用性

○村井良精¹、遠藤輝夫²、盛合美加子¹、浅沼康一¹、柳原希美^{1,3}、田中信悟^{1,3}、永原大五^{1,3}、高橋 聡^{1,3}（札幌医科大学附属病院検査部¹、北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科²、札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座³）

【目的】血液型不適合妊娠では、母体が保有する同種抗体によって胎児の血球成分を減少・破壊する胎児・新生児溶血性疾患（Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn, HDFN）を発症することがあり、その発症を予測することは非常に重要である。今回、血液型不適合妊娠の新生児とその母親を対象とし、それぞれの保有抗体、IgGサブクラスおよび抗体価と出生後の溶血所見の有無を解析し、サブクラス解析が血液型不適合妊娠によるHDFN発症予測の指標となり得るか検証したので報告する。

【対象および方法】当院で出産した妊婦10例と出生した児10例を対象に、母体あるいは新生児中の抗体、IgGサブクラス、抗体価および新生児の赤血球抗原発現の有無を調べた。抗体同定および抗体価は、既報に従い試験管法で確認した。抗体同定は、反応増強剤にポリエチレングリコールを用い、抗体価の測定には反応増強剤無添加での間接抗グロブリン試験を行った。HDFN発症は臨床診断、溶血所見を示唆する検査データの集積を行い評価した。IgGサブクラス解析は、フローサイトメーターを用い、各IgGサブクラス特異的な標識抗体を用い解析した。

【結果】妊婦10例より検出された抗体の内訳は、抗Eが4例、抗eで1例、抗Di^aが2例、抗Jra が2例そして抗EとcとDi^aの3種保有例が1例であり、HDFNと診断された症例は抗E保有（抗体価1,024倍）の1例であった。HDFNと診断された新生児の血中および赤血球より得られたDT分離液中の抗体はE抗原に対する特異性を認め、フローサイトメーターによるサブクラス解析では血中でIgG1、分離液中にはIgG1およびIgG3に特異性を認めた。

【結語】高力価の抗Eが検出された母体から出生した児でHDFNの発症が確認された。本検討においても、抗体の種類と抗体価に加え、IgGサブクラス解析もHDFN発症を予測できる因子である可能性が示唆された。

2. NASH鑑別のための血中LDL-TG値の有用性

○櫻井俊宏¹、高橋祐司²、藤井佑樹³、能祖一裕³、太田素子⁴、伊藤康樹⁴、千葉仁志⁵、恵 淑洋¹（北海道大学大学院保健科学研究院¹、北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科²、岡山大学消化器肝臓内科³、デンカ生研株式会社⁴、札幌保健医療大学⁵）

【背景】血中LDLはコレステロール、リン脂質、中性脂肪（TG）、タンパク質（主にapo B-100）から構成される。当研究室では、肝不全末期患者において（1）LDLが強い酸化を受けていること、

（2）LDLの粒子サイズが正常LDLと同程度であること、（3）TG含量が多いこと（TG-rich LDL）を報告した。また我々は、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）のLDL中のTG含量がコレステロールに比べて多いことをゲル濾過HPLC法により観察した。NASHと単純性脂肪肝との鑑別には肝生検による組織診断が必要で、血中バイオマーカーが無いことが問題である。近年、Itoらによって自動分析装置対応LDL-TG試薬が開発され、簡便かつ高速に多検体処理が可能となった。本研究ではLDL-TGが単純性脂肪肝とNASHを鑑別し得るかどうかを検証した。

【方法】岡山大学病院消化器肝臓内科より提供された健常者（n = 154）、単純性脂肪肝患者（n = 9）、及びNASH患者（n = 35）の血清を用いた（倫理承認番号：18-69-2）。健常者群にはデンカ生研株式会社健診データを含めた。主要な評価項目として、LDL-TG、T-CHO、LDL-C、TG、HDL-C、HDL3-C、small dense LDL、RLP、apoA-I、apoB、AST、ALTなどを測定した。Tukey's multiple comparisons testを用いて3群間比較を行った。また、単純性脂肪肝群とNASH群の鑑別能を調査するために、各項目でのROC曲線から曲線下面積（AUC）を求めた。

【結果】LDL-TG値はNASH群で有意に高値を示し、健常者、単純性脂肪肝、NASHで各々の平均値は14.7、14.9、19.2 mg/dLであった。また、LDL-TG/LDL-C比もまたNASH群で有意に高値を示し、各々の平均値は0.119、0.122、0.194であった。LDL-TG値単独でのROC-AUCは0.778と良好であったが、LDL-TG/LDL-C比のROC-AUCは0.857と更に増加した。

【結論】NASHと単純性脂肪肝の鑑別にLDL-TGが有用であることが示された。

3. 尿沈渣円柱、尿生化学マーカー、およびeGFRの関連性

○伊藤敦巳、野澤佳祐、及川貴允、高橋裕之、渡辺倫美、高橋順也、佐渡正敏、藤井 聡（旭川医科大学病院）

【目的】尿沈渣に認められる硝子円柱は健常人でも出現することがあるが、1個/LPF以上の出現で尿管虚血状態や循環血流量減少を反映するマーカーとなりうる。慢性腎臓病（CKD）患者において、円柱や各尿生化学マーカーは推定糸球体濾過率（eGFR）との関連性が示唆されているが、現在までにこれらの相互関連性について検討した十分な報告はない。今回我々は、円柱、尿生化学マーカー、eGFRとの関連性について解析した。【対象と方法】対象には尿検体127例を使用した。円柱の出現程度に応じて患者を3群（レベル0：円柱を認めない、レベル1：硝子円柱を認めるが1個/LPF未満、レベル2：硝子円柱が1個/LPF以上、または硝子円柱以外の円柱を認める）に区分した。尿生化学マーカーには、L-FABP、尿β2 mG、NAG、μALBを使用した。統計解析として円柱レベル0-2と各マーカー間で一元配置分散分析・多重比較（Bonferroni法）を、L-FABPとその他のマーカーとの間で相関分析を、観察開始時のeGFRおよびeGFR変化率（観察期間：1年間）と観察開始時の各マーカー間で単回帰分析を実施した。【結果】円柱レベル間で平均値に有意差を認めたのはL-FABP、尿β2mG（いずれもレベル0-2間）であった。L-FABPは、他の尿生化学マーカーと有意な相関性を示した。観察開始時のeGFRは円柱レベル、L-FABP、尿β2mG、μALBと有意な関連性を示した。1年間でのeGFR変化率はL-FABP、尿β2mG、NAGおよびμALBと有意な関連性を示した。【まとめ】円柱は尿管障害マーカーと有意に関連し、1年間のeGFR低下率は各尿生化学マーカーと有意に関連していた。CKD患者では観察期間2～3年間のeGFRの低下率は末期腎不全への移行を予測しうる指標であることが報告されており、上記マーカーは腎予後の指標となりうることが示唆された。

4. 腎移植術後極早期における尿中肝臓型遊離脂肪酸結合蛋白の動態

○中村真由美¹、高橋祐司²、矢野智哉¹、福澤信之³、見附明彦⁴、平野哲夫⁴、原田 浩⁴（市立札幌病院検査部¹、北海道医療大学医療技術学部²、五稜郭ネフロクリニック泌尿器科³、市立札幌病院腎臓移植外科⁴）

【背景】腎移植術後早期において、移植腎の急性拒絶反応や急性尿管壊死などの急性腎障害（acute kidney injury: AKI）をいかに早期に見つけ対処するかが重要である。そのため、AKIバイオマーカーを早期診断マーカーとして利用することが試みられているが、腎移植領域においては確信的な診断・運用は検討中である。我々は特に、尿中肝臓型遊離脂肪酸結合蛋白（尿中L-FABP）を用いた移植腎のイベント発生について検討を行ってきた。今回、腎移植術後極早期において尿中L-FABPがどのような挙動を示しているかを確認したので報告する。

【方法】

（対象）生体腎移植レシピエント39例および献腎移植レシピエント1例（採尿）生体腎移植術直後（術野にて回収）、再灌流後3時間、6時間、術後1日目から6日目の早朝尿を採取した。

（測定方法）ラテックス凝集法を原理とするホルディアL-FABP（積水メディカル）を用いて、生化学自動分析装置LABOSPECT 008αにて測定を行った。得られた尿中L-FABP値は尿中Cr値で除算し、補正を行った。

（検討内容）

Study1：生体腎移植術および献腎移植術後の初尿中L-FABP

Study2：生体腎移植術後の初尿中L-FABPと虚血時間（WIT・TIT）との相関

Study3：生体腎移植術直後の初尿中L-FABPの上昇と、虚血時間以外の要因との関連

【結果】生体腎移植術の初尿中L-FABPの平均は23039 ± 3794.4 μg/gCr（平均 ± SE）であった。最大値は75921.6 μg/gCr、最小値は387.3 μg/gCrであった。また、献腎移植術の初尿中L-FABPは2515.5 μg/gCrであった。生体腎移植術後の39例の初尿中L-FABPと温阻血時間（Warm Ischemic Time: WIT）、総阻血時間（Total Ischemic Time: TIT）、初尿発現時間との相関は認められなかった。

【結論】一般的な腎移植術において、初尿中L-FABPの上昇は虚血時間の影響を受けておらず、再灌流障害または手術侵襲やその他要因によることが示唆された。

5. E型肝炎ウイルスの遺伝子型3型および4型鑑別に向けたマルチプレックスreal-time RT-PCR法の開発

○飯田樹里¹, 小林 悠¹, 坂田秀勝¹, 佐藤進一郎¹, 生田克哉², 山本 哲², 池田久實², 紀野修一¹ (日本赤十字社北海道ブロック血液センター¹, 北海道赤十字血液センター²)

【背景】E型肝炎ウイルス(HEV)はE型肝炎の原因ウイルスであり、日本では主に遺伝子型3型と4型が検出される。4型は3型よりも高病原性で、北海道は4型の検出頻度が高いことが知られている。北海道では輸血後E型肝炎の発生を機に、献血者においてHEV 核酸増幅検査(NAT)を試行的に実施しており、HEV陽性検体についてはRNA定量に加えて系統樹解析による遺伝子型決定を行っているが、これには数日を要する。そこで3型と4型の迅速鑑別法としてマルチプレックスreal-time RT-PCR法(鑑別PCR)の開発を行ったので報告する。

【方法】3型、4型検出用ターゲット領域は、それぞれHEV ORF2/3、ORF1領域から選択した。各遺伝子型の特異的プローブに異なる蛍光色素を使用することで、鑑別法を開発した。献血者から分離された3型4本および4型3本について2倍段階希釈パネルを作製し、各血漿0.2 mlから核酸を抽出した後、鑑別PCRによる測定(N=24)を実施し、プロビット分析により検出感度を算出した。また、2016年1月から2019年5月までに検出された遺伝子型既知のHEV陽性検体381本について鑑別PCRを実施した。50 IU/ml未満の低濃度検体157本と、血漿0.2 ml使用時の鑑別PCRで検出できなかった検体については、核酸抽出時に血漿1 mlを使用した。

【結果】鑑別PCRによる遺伝子型決定までの所要時間は約4.5時間であった。鑑別PCRの検出感度は、血漿1 ml使用時において、3型で32 IU/ml、4型で65 IU/mlと推定された。また、HEV陽性検体381本中342本について鑑別PCRで決定された遺伝子型は、系統樹解析の結果と全て一致した。鑑別ができなかった41本は低濃度(平均11 IU/ml)であった。

【結論】鑑別PCRの開発により、遺伝子型決定までの所要時間が大幅に短縮された。したがって、献血者本人への受診勧奨や医療機関に対するE型肝炎の治療方針に係る有効な情報提供が早期に可能となる。

6. HIV薬剤耐性検査の外部精度評価における次世代シーケンサーの活用

○吉田 繁¹, 蜂谷敦子², 松田昌和², 齊藤浩一³, 岡田清美⁴, 椎野 慎一郎⁵, 佐藤 孝⁶, 藤澤 真一⁶, 遠藤 知之⁷, 豊嶋崇徳⁷, 杉浦 互², 吉村和久^{5,8}, 菊地 正⁵ (北海道医療大学医療技術学部¹, 国立病院機構名古屋医療センター², LSIメディエンス³, 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所⁴, 国立感染症研究所⁵, 北海道大学病院検査・輸血部⁶, 北海道大学病院血液内科⁷, 東京都健康安全研究センター⁸)

【はじめに】HIV薬剤耐性検査は適切な抗HIV薬剤を選択するための検査であるが、各施設で方法が異なるため外部精度評価(EQA)を実施してきた。評価サンプルに患者血漿を用いた場合は、血漿中のminority variant (MV) の割合が不明なため正しさの評価が困難であった。今回、次世代シーケンサー(NGS)によりMVの割合を算出した血漿を評価サンプルとしたEQAの構築を検討した。【方法】国内10施設に評価サンプル4検体を配布した。各施設の方法で検査を実施してもらい、プロテアーゼから逆転写酵素(PR/RT)とインテグラーゼ(IN)の塩基配列を収集した。その後、各施設から精製済みPCR産物を回収し、うち1検体のみ3施設のPCR産物をMiSeq(イルミナ)により解析をおこなった。loci毎にA、T、G、Cの平均割合を算出し、カットオフ値(CO)5%以上の塩基から共通配列を作成した。【結果】サンガー法による共通配列(S共通配列:2施設以上で一致した塩基)とNGSによる共通配列(N共通配列)との一致率はPR/RTではCO 5%で99.6%と最も高く、INではCO 10%で99.1%と最も高かった。また、CO 20%で作成したN共通配列と各施設の塩基配列との平均一致率はPR/RTで99.4%、INで99.2%であった。【考察】S共通配列はMV 5-10%での評価であることが示唆された。N共通配列(CO 20%)による一致率はS共通配列による率と比べ高い値となった。NGSは高感度かつ定量的な塩基配列の解析ができることから、より正確なEQAの評価に有用であると考えられる。今後、評価サンプル数を増やし検討が必要である。本研究はAMED「国内流行HIV及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」によって実施された。

7. 献血者の梅毒血清学的検査RPRカード法におけるプロゾーン現象の検討

○後藤智哉¹, 尾山秀明¹, 岸本信一¹, 佐藤進一郎¹, 生田克哉², 山本 哲², 池田久實², 紀野修一¹ (日本赤十字社北海道ブロック血液センター¹, 北海道赤十字血液センター²)

【はじめに】血液センターでは、安全な血液製剤を供給するため、各種感染症検査を実施している。梅毒血清学的検査については、梅毒TP抗体検査を行った後、陽性の場合には更にRPRカード法(以下RPR法)を実施している。梅毒罹患患者の中には抗体過剰のためRPR法が偽陰性となるプロゾーン現象を呈するケースが報告されている。今回我々は、献血者におけるRPR法のプロゾーン現象の有無について調査したので報告する。【対象および方法】2018年度に北海道内で献血された248,504名について、梅毒TP抗体検査(ルミバルスプレストTP:富士レビオ)を行い、陽性検体にはRPR法(RPRテスト"三光":積水メディカル)を実施した。なお、梅毒TP抗体検査結果が ≥ 100.0 C.O.I.かつRPR法陰性の場合、原血清を連続希釈後にRPR法を実施し、プロゾーン現象の有無を確認した。

【結果】梅毒TP抗体陽性となったのは124名(0.05%)で、 ≥ 100.0 C.O.I.の高値を示した献血者は6名存在した。この6名中4名はRPR法陽性であったが、残る2名はRPR法陰性となった。この2名の原血清を連続希釈後にRPR法を実施したところ、1名は陰性だったが、残る1名はプロゾーン現象を呈し、原血清:(-)、2倍:(±)、4倍:(1+)、8倍:(2+)、16倍:(2+)、32倍:(2+)、64倍:(1+)、128倍:(-)となり、4倍希釈でRPR法の結果が陽転化した。また、当該献血者の血清を異なるロットのRPR試薬を用いて検査したところ、原血清:(3+)を示し、プロゾーン現象は認められなかった。このことより、プロゾーン現象出現に関してはRPR試薬にロット間差があることも明らかになった。【まとめ】健康な人が大多数を占める献血者においても、プロゾーン現象によりRPR法が偽陰性となるケースを認めた。梅毒TP抗体検査結果が高値でRPR法陰性となった際は、原血清を連続希釈し、プロゾーン現象の有無を確認することが極めて重要と考えられた。

8. (1→3)β-Dグルカン測定試薬「ファンギテック Gテスト ES「ニッスイ」」の有用性評価

○小林 亮¹, 品川雅明¹, 佐藤勇樹¹, 荻澤慎也¹, 柳原希美^{1,2}, 浅沼康一¹, 高橋 聡^{1,2} (札幌医科大学附属病院検査部¹, 札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

【はじめに】(1→3)β-Dグルカン(以下BG)は真菌細胞壁の構成成分であり、深在性真菌症の診断補助に用いられ、主に比濁時間分析法(比濁法)、または発色合成基質法(比色法)で測定されている。これまでの比色法の測定は、マイクロプレートを用いたパッチ処理であり、運用面において測定回数に制限があった。今回、比色法を原理としたモノテスト試薬である「ファンギテック Gテスト ES「ニッスイ」」および「ESアナライザー」が開発された。そこで、その基本性能および比濁法との比較検討を行った。【対象および方法】当院にて、深在性真菌症疑い患者の血漿を対象とした。「ファンギテック GテストES「ニッスイ」」(以下ニッスイBG)を用い「ESアナライザー」(日水製薬)で測定し、対照試薬には「βグルカンテストワコー」(以下ワコーBG)を使用し、「Toxinometer MT5500」(富士フィルム和光純薬)を用いて測定した。【結果】基本性能の検討では、1)2濃度のプール血漿を20回連続測定した変動係数は、低濃度5.56%、高濃度5.87%であった。2)高BG試料を10倍段階希釈し、直線性を調べた結果、理論値666 pg/mLまで直線性が得られた。続いて、ワコーBGとの相関性を、患者血漿116例を対象に検討した結果、相関係数は0.97、回帰式は $y = 3.34x - 10.306$ とニッスイBGの高値傾向がみられた。また、両試薬のカットオフ値による判定結果では、8例の不一致が認められ、すべてニッスイBG陽性、ワコーBG陰性であった。そこで、不一致の要因について培養結果と比較したところ、5例で真菌検出を認めた。また、経時的にBGを測定し得た症例により検証したところ、ニッスイBGの検出感度が高い可能性が考えられた。【結論】ニッスイBGはワコーBGより高感度であり、深在性真菌症の早期検出に有用である可能性が示唆された。ただし、偽陽性を呈する可能性もあり、臨床症状、培養結果等と併せた判断が必要である。

9. ASTおよびALT活性測定におけるIFCC対応試薬の基本性能
○高橋祐輔¹、梅森祥央²、浅沼康一²、高橋 聡^{2,3} (北海道医療大学医療技術学部臨床検査学科¹、札幌医科大学附属病院検査部²、札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座³)

【目的】本邦では、ASTおよびALTの測定に日本臨床化学会(JSCC)標準化対応法が広く用いられている。JSCC法は酵素活性を有するホロ酵素のみを測定対象とするのに対し、国際臨床化学連合(IFCC)の勧告法は、アポ酵素を活性化するポリドキサルリン酸(PALP)を添加し、アポ酵素とホロ酵素を測定している。近年、国際標準化の観点から、JSCC法からIFCC法への移行が議論されている。そこで、ASTとALT測定用のIFCC対応法試薬の基本性能を検討した。

【対象および方法】1)対象には、札幌医科大学附属病院の外来および入院患者の、残存血清およびヘパリンLi加血漿を用いた。2)検討試薬には、LタイプワコーAST IFCCとLタイプワコーALT IFCC(富士フイルム和光純薬(株))を使用した。また、比較対照には、JSCC標準化対応法のクイックオートネオ AST JS-HLSまたはクイックオートネオ ALT JS-HLS(シノテスト(株))を使用した。3)いずれも、自動分析装置LaboSPECT008(日立ハイテクノロジーズ(株))にて測定を行った。

【結果】1)3濃度のブール血を20回連続測定し、併行精度を調べたところ、変動係数(CV)はASTで0.24~3.00%、ALTで0.24~2.68%であった。2) -80℃で凍結保存した同様の試料を、それぞれ1日2回、15日間連続で測定を行い、室内再現精度を検討した。その結果、CVは、ASTで0.39~2.36%、ALTで0.90~1.89%と、良好であった。3)直線性は、ASTで2,342、ALTで2,430 U/Lまで得られた。4)共存物質の影響では、溶血ヘモグロビンの添加で、両測定値は上昇した。5)患者血192例を用い、本法とJSCC法との相関性を検討した。ASTでは、相関係数(r)が0.993、回帰式 $y=1.198x-0.207$ 、ALTでは、 $r=0.998$ 、 $y=1.148x+6.756$ と、いずれも相関性は良好であるが、IFCC法で高値となる傾向が得られた。また、両者で、乖離例がみられた。

【結語】ASTおよびALT測定用のIFCC対応法試薬の基本性能は良好で、日常検査に有用と考えられた。

10. 自動分析装置 コバスpro<503>によるLDおよびALP項目の基礎的検討

○梅森祥央¹、田中真輝人¹、早坂享子¹、前田瑛真¹、浅沼康一¹、柳原希美²、田中信悟²、永原大五²、高橋 聡² (札幌医科大学附属病院検査部¹、札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

【目的】臨床化学検査の大部分は自動分析装置を用いて実施されており、正確性・精密性・迅速性・互換性・簡便性は特に重要である。また、近年グローバルハーモナイゼーションの必要性からJSCC法からIFCC法への移行が推進されている。このような背景から、ロシュ・タイアグノスティックス(株)(以下ロシュ)は自動分析装置コバス pro<503>(以下c503)を開発した。本研究ではc503を用いて酵素2項目の測定性能を評価し、加えてIFCC法とJSCC法との比較も行った。

【対象および方法】1)当院における患者の血清および血漿を用いた。2)検討機器はc503、検討試薬はコバス試薬LDおよびALP(いずれもIFCC法、ロシュ)を使用した。対照機器はLABOSPECT008((株)日立ハイテクノロジーズ)、対照試薬はJSCC標準化対応試薬(いずれも(株)シノテスト)を使用した。測定初日にキャリブレーションを実施し、2日目以降はノンキャリブレーションで測定した。

【結果】1)2濃度のブール試料を20回連続測定し併行精度を調べたところ、2項目の変動係数(CV)は0.31~0.50%の範囲内であった。2)同様の試料をそれぞれ1日2回、15日間測定を行い試薬安定性と室内精度を検討した。その結果、15日目までいずれの試薬も安定しており、その間の総合CVは、0.46~1.79%の範囲内と良好であった。3)希釈直線性は、LDで1,913 U/L、ALPで1,624 U/Lまで得られた。4)患者検体119例を用いて、本法とJSCC法との相関性を検討した。2項目とも乖離例が散見されたものの、全体的には、LDで相関係数(r)=0.975、Passing-Bablok回帰式 $y=0.929x+11.143$ 、ALPで $r=0.998$ 、 $y=0.304x-1.256$ と、いずれも良好な相関を示した。

【結語】c503を用いたLDおよびALP項目の基本性能は概ね良好で、特にキャップピアッシング方式により試薬安定性に優れ、日常検査に有用と考えられる。

11. 血中IgG4測定試薬「N-アッセイ LA IgG4 ニットーボー」の基礎的検討

○田中真輝人¹、梅森祥央¹、早坂享子¹、浅沼康一¹、柳原希美^{1,2}、田中信悟^{1,2}、永原大五^{1,2}、高橋 聡^{1,2} (札幌医科大学附属病院検査部¹、札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

【背景および目的】血中IgG4値は、IgG4関連疾患の診断に用いられている。これまで、血中IgG4の測定には専用機器・試薬が必要であったが、最近、汎用自動分析装置に搭載可能な「N-アッセイ LA IgG4 ニットーボー」が開発されたので、その基本性能を評価した。

【対象および方法】1)当院の入院および外来患者の血清、ヘパリンLi加血漿を用いた。2)N-アッセイ LA IgG4 ニットーボーを用い、LABOSPECT 008で測定した。比較対照は、BS-TIA3 IgG4を用い、BioMajesty JCA-BM9130で測定した。

【結果】1)3濃度のブール血清をそれぞれ20回連続、また、同一試料を15日間連続1日2回(午前、午後)測定することで併行精度および室内精度を調べた。その結果、変動係数はそれぞれ最大2.63、3.01%と良好であった。2)1)と同一試料を用いて試薬安定性を検討したところ、オンボードでは2週目、非測定時間閉栓保存下では7週目まで良好であった。3)2SD法で求めた検出限界は6.1 mg/dLであった。4)希釈直線性は557 mg/dLまで得られた。5)患者100例の血清およびヘパリンLi加血漿間の相関性を解析したところ、相関係数(r)0.999、標準主軸回帰式は $y=0.99x-0.08$ であった。6)抱合および遊離型ビリルビン、ヘモグロビン、乳び、アスコルビン酸の添加で測定値に影響はみられなかった。一方、RFでは添加濃度依存性に負の影響を認めた。7)患者血清90例を用いて本試薬と対照試薬間の相関性を解析したところ、 $r=0.992$ 、標準主軸回帰式は $y=1.05x-8.3$ であった。また、RF高値血清1例が本試薬で大幅に低値となった。8)RF高値血清10例を追加し対照試薬と比較したところ、10例中5例が本試薬で大幅に低値となった。

【結語】「N-アッセイ LA IgG4 ニットーボー」の基本性能は概ね良好で、ヘパリンLi加血漿を用いた測定も可能であった。ただし、RF高値で偽低値となる可能性があることに留意する必要がある。

12. 『デタミナー-CL IL-2R NX』の非特異反応抑制効果と基本性能の評価

○近藤 崇¹、盛合亮介¹、山田浩司¹、遠藤明美¹、浅沼康一¹、柳原希美²、高橋 聡^{1,2} (札幌医科大学附属病院検査部¹、札幌医科大学医学部感染制御・臨床検査医学講座²)

【目的】血中可溶性インターロイキン2受容体(sIL-2R)は、悪性リンパ腫や成人T細胞性白血病/リンパ腫等で高値となるため、診断や経過観察に用いられている。現在、化学発光酵素免疫法を用いた測定法が普及しつつあるが、以前我々がデタミナー-CL IL-2R NX(協和メデックス株式会社)の基本性能を評価した際に、異常IgMが原因と推察される非特異反応を認めた。この問題を克服するため、試薬に阻害物質の吸収剤を添加し、非特異反応の軽減を図った改良試薬が開発された。そこで、改良試薬の基本性能と非特異反応の抑制効果を検討した。【対象および方法】1)当院において、sIL-2Rと免疫グロブリンを測定した患者の残存血清を用いた。2)改良前後のデタミナー-CL IL-2R NXを用い、全自動化学発光免疫測定装置CL-JACK NXで測定した。【結果】1)同時再現性の変動係数は1.1~2.6%と良好であった。2)sIL-2R 値が既知の管理試料を用いて算出した正確性は、100.1%~108.8%で現行試薬と同等であった。3)66,744 U/mLまで良好な直線性を認めた。4)非特異検体を希釈液で連続希釈し、現行試薬と改良試薬で測定後、それぞれ希釈倍率を掛けてsIL-2R値を算出した。その結果、現行試薬では希釈前に42,946 U/mLであったが、希釈により低下し8倍希釈で1,904 U/mLになった。一方、改良試薬では原液を含むいずれの希釈倍率でもほぼ同じ値で非特異反応を認めなかった。5)添加する阻害物質の吸収剤濃度を、種々の割合で変えた試薬を用いて非特異検体を測定し、非特異反応の抑制効果を検討した。現行試薬の10倍の吸収剤濃度からsIL-2R値はほぼ同程度となり、非特異反応が抑制された。【結語】改良試薬は、現行試薬と同等の基本性能を有しており、非特異反応が抑制されていることから、日常検査に有用と考えられた。

13. 肝細胞の脂質代謝とミトコンドリア代謝への酸化HDLの影響

○山端ありさ¹, 櫻井俊宏², 関島将人², 上野朱音¹, 布田博敏², 千葉仁志³, 恵 淑萍² (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究院², 札幌保健医療大学³)

【背景】非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓に脂質が蓄積し、酸化ストレスなどが加わって発症し、線維化を生じて進行する。当研究室の先行研究において、肝細胞への酸化HDL刺激により、脂肪滴と酸化脂肪滴が形成され、炎症関連遺伝子の発現が亢進し、線維化が誘導されることが観察されている。酸化HDLとNASHとの関連性が示唆されるが詳細は不明である。本研究では、酸化HDL刺激の脂肪滴関連タンパク質及びミトコンドリア代謝への影響を遺伝子発現量解析により検討した。

【方法】健常者の空腹時血清からHDLを超遠心法及びゲル濾過HPLC法により単離した。HDLを硫酸銅により24時間酸化し、EDTAを加えて酸化を停止した。 2.0×10^5 cells/wellとなるようにヒト肝培養細胞C3Aを24穴プレートに播種し、24時間培養後、無血清培地に交換し、PBS、未酸化HDLあるいは酸化HDL溶液を添加した (タンパク質終濃度: $20 \mu\text{g/mL}$)。24時間後、リアルタイムPCR法により、脂肪滴合成を促進する*DGAT1*、*ACAT*、脂肪滴分解を促進する*ATGL*、さらにミトコンドリアのエネルギー産生を促進する*NRF1*とその発現を促進する*PGC1 α* の遺伝子発現量を測定し、*GAPDH*発現量で補正した。

【結果】PBS群と比較して、酸化HDL群では、*DGAT1*及び*ACAT*の発現が有意に減少し (脂肪滴合成の低下)、*ATGL*は減少傾向 (脂肪滴分解の低下傾向) を示した。また、*NRF1*は有意に減少し (エネルギー産生低下)、*PGC1 α* は減少傾向 (エネルギー産生低下) を示した。未酸化HDL群では、他の群と有意差を持つ遺伝子種は認められなかった。

【結論】酸化HDL刺激は、肝細胞において脂肪滴分解の低下とミトコンドリアにおけるエネルギー産生の低下を介して、脂肪滴を形成した可能性がある。

14. ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 cell) におけるDDTのレドックス制御への関与

○武石にれ¹, Darwish Wageh², 千葉仁志³, 恵 淑萍² (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究院², 札幌保健医療大学³)

【背景】DDTとは、Dichlorodiphenyltrichloroethaneの略であり、マラリア対策のためにかつて多くの国で使用された農薬である。DDTの特徴としては、非常に安定な物質であり環境中で分解されにくいこと、また、DDTに汚染された食物や水の摂取によって人間の体内に侵入することがあげられる。DDTは環境ホルモンとしても知られており、肝臓や乳房、脂肪組織に対して毒性を持つ。本研究では、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 cell) における、DDTの細胞毒性や酸化ストレスといった悪影響を検討した。【方法】具体的な手法としては、体内のレドックス制御への関与を解明するため、qRT-PCRを用いた抗酸化酵素をはじめとしたmRNA発現量の観察をした。さらに、抗酸化作用を持つ生姜とハーブ (タイム) を用いた保護実験を行った。また、DDTによる脂肪酸産生への関与を究明するため、LC/MSによるDDT暴露細胞の質量分析を行った。【結果】これまでの結果から、DDTは細胞毒性をもたらす活性酸素種 (ROS) の著しい産生を引き起こし、また抗酸化酵素や、一部の薬物代謝酵素を下方制御することがわかった。また、保護実験では、生姜とハーブ (タイム) に、DDTの引き起こす活性酸素種を減少させる作用や、DDTによってmRNA発現量を下方制御された酵素を上方制御する働きがあることが示された。【考察】以上の結果より、DDTは、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2 cell) において、抗酸化酵素や薬物代謝の調節に関与することで細胞に酸化ストレスを引き起こしていることがわかった。今後は、質量分析によるDDTの脂肪酸産生関与について検討していく予定である。

15. ムール貝抽出物のNrf2を介した抗酸化能の評価と抗酸化物質の探索

○鈴木拓貴¹, 譚 慧¹, 高明晨¹, 布田博敏¹, 千葉仁志², 恵 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学院¹, 札幌保健医療大学²)

【背景・目的】

酸化ストレスは癌や老化など様々な疾患の発症・増悪の原因となるため、食事中からの抗酸化物質の摂取が重要視されている。これまでは活性酸素と直接反応して不活性化する直接的な抗酸化能の評価が一般的であったが、近年では生体内の抗酸化酵素や毒物代謝酵素を制御するKeap1-Nrf2経路に作用することで抗酸化能を示す間接的な抗酸化能が注目を集めている。北海道ではカラスガイの名で知られるムール貝は $\omega 3$ 多価不飽和脂肪酸に富み、高い抗炎症作用を持つことが報告されているが、間接的な抗酸化作用に関する報告はない。本研究ではムール貝抽出物の抗酸化能について培養細胞を用いて多面的に評価を行い、その活性に寄与する単一成分の同定を目的とした。

【方法】

ムール貝の可食部分からそれぞれ水、熱水、エタノールを用いて抽出し、水抽出物、熱水抽出物、エタノール抽出物を得た。これらについてin vitroでの抗酸化能の評価としてORAC法、Keap1-Nrf2経路の活性化能の評価には、ヒト肝腫瘍由来細胞株HepG2細胞を用いたレポーターアッセイ、酸化剤AAPHに対する細胞保護能試験を行った。さらに同経路活性化により誘導される抗酸化遺伝子群の発現はリアルタイムPCR法、タンパク質の発現はウェスタンブロット法を用いて測定した。続いて、レポーターアッセイの活性を指標として各種カラムクロマトグラフィーによる分離・精製を繰り返すことで目的の活性物質の探索を行った。

【結果・考察】

それぞれの抽出物の中でも、特にエタノール抽出物は高いORAC値とKeap1-Nrf2経路の活性化能を示した。加えてエタノール抽出物は酸化剤AAPHの毒性に対して強い細胞保護効果を示し、NQO1等の抗酸化遺伝子群の発現を誘導した。さらにエタノール抽出物中よりNrf2活性化物質を単離するために、カラムクロマトグラフィーとレポーターアッセイによる活性評価を繰り返したところ物質Xが得られた。今後はNMR等を用いて構造解析を行う予定である。

16. リゾホスファチジルエタノールアミンのLC/MS定量法の検討

○山本祐輔¹, 櫻井俊宏², 陳 震², 三浦佑介³, 千葉仁志⁴, 恵 淑萍² (北海道大学大学院保健科学院¹, 北海道大学大学院保健科学研究院², 群馬大学保健科学部検査技術科³, 札幌保健医療大学⁴)

【背景・目的】

リゾリン脂質は脂肪鎖を一本のみ有するリン脂質であり、様々な生理活性物質が報告されている。リゾリン脂質の中でも、リゾホスファチジルコリンは、がんや動脈硬化との関連性も指摘されており、その背景や機序に多くの興味が集まっている。我々の研究室では、リゾリン脂質の中でもリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) に着目し研究を進めてきた。その研究成果のひとつとして、これまでに非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic Steatohepatitis: NASH) モデルマウスの肝臓中LPEがコントロールマウスの肝臓中LPEより有意に減少あるいは上昇することを見いだした。この知見より、NASHとLPEに何らかの関係があると考えた。そこで本研究では、LC/MSによるLPEの絶対定量系を開発し、それを用いてNASH患者と健常者における血清中LPE濃度を比較することを最終目的としている。現在は定量系の確立に取り組んでおり、その進捗を報告する。

【方法】

LPEの定量系開発にあたり、先行研究よりスタンダードとして7種類の脂肪酸型LPE (パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)) と内部標準物質としてLPE-Pentadecanoylを用いた。なお、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸型には、市販品を用いた。

【結果・今後の展望】

現在、合成品及び市販品のLPEを用いたLPE定量系を開発中であり、今後は、健常者検体やNASH患者検体、単純性脂肪肝患者検体などの臨床検体に応用する予定である。

17. Plasmalogen species protect HepG2 cells from lead-induced cytotoxicity and lipid oxidation

○WU YUE¹, Chen Zhen¹, Wageh Darwish¹, 千葉仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学院¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

Plasmalogens come from dietary phospholipids and are considered as potential protectors against oxidation-related disorders. However, the protective effect of plasmalogens against Pb-induced cytotoxicity has received little attention. In this study, ameliorative effect of six synthesized plasmalogen species (namely choline plasmalogen 16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:5, and ethanolamine plasmalogen 16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:5) in Pb-treated human hepatoma cells (HepG2) was investigated by a combination of bioassays and lipidomic analysis. The results showed that Pb caused a significant reduction in cell viability accompanied by an increase of reactive oxygen species. These adverse effects of Pb were almost entirely prevented by plasmalogens. The cellular uptake of plasmalogens was confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry, and the cellular plasmalogen content was observed elevating when co-treated with exogenous plasmalogen species and Pb. Moreover, phospholipid hydroperoxides (PCOOH, PEOOH) and lysophospholipids (LPC, LPE) resulted from Pb-induced lipid oxidation and subsequent degradation were largely eliminated by plasmalogens. Furthermore, the cell protective ability of tested plasmalogen species were mainly due to their vinyl-ether linkage on sn-1 position. In conclusion, exogenous plasmalogens protect the HepG2 cells from Pb-induced cytotoxicity and lipid oxidation. These results indicated a potential utility of plasmalogens for treatment or prevention of oxidative stress-related diseases, such as Alzheimer's diseases and metabolic syndrome.

18. Compositional analysis of lipid droplets in HepG2 cells after treatment with oxidized lipoproteins

○Rojeet Shrestha¹, Chen Zhen¹, 櫻井俊宏¹, 千葉仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

【目的】 Oxidative modification of lipid droplets (LD) can induce inflammatory events that can potentially progress to severe liver disease. Since the oxidatively modified lipoproteins carry considerable amount of oxidized lipid that can be taken up by the liver. Therefore, the present study is designed to investigate the role of oxidized lipoproteins in the formation of LD rich in oxidized lipids in liver cells. 【方法】 A fasting EDTA blood sample was collected from a healthy human volunteer to isolate VLDL, IDL, LDL and. Oxidized lipoproteins were prepared by incubating the lipoprotein fraction with Cu²⁺ for 2, 4 and 8 h. LD in the HepG2 cells were induced by incubating cells in medium supplemented with 0.2 mM of each oleic and linolenic acid followed by treatment with the oxidized lipoproteins and incubated for 24 h. Single LD sample was isolated from the cells and were analyzed with Orbitrap mass spectrometry equipped with nano-electrospray ionization. 【成績】 The amount of triglyceride hydroperoxides (TGOOH) in LD treated with native VLDL and IDL less than 0.5%. The relative amount of TGOOH in LD depends on the degree of oxidation of VLDL and IDL. As high as 5% of TG were oxidized in the cells treated with oxVLDL oxidized for 8 hr. Treatment of cells with oxLDL and oxHDL is associated with a significant increase in the concentration of cholesteryl ester hydroperoxides (CEOOH) in LD. 【結論】 TGOOH and CEOOH in oxidized lipoproteins can be incorporated in LD in liver cells. The incorporation depends on the degree of oxidation.

19. Study of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mutagenic activation in HepG2 cells

○朱 子健¹, Wageh Sobhy DARWISH¹, 千葉仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学²)

[Background] Chrysene (CHR) is one of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that is commonly produced in the environment. Chrysene is classified among the priority 2-PAHs. The cytotoxic effects of CHR on human liver cells had received little attention. Therefore, this study aimed at investigating the cytotoxic effects of CHR on HepG2 cells. Furthermore, CHR-induced oxidative damage on HepG2 cells was examined. The effects of CHR on the antioxidant enzymes were further examined using real-time PCR and their-dependent enzyme activities. Finally, the effects of CHR on the Nrf2-Keap1 metabolic pathway were examined. [Methods] HepG2 cells were exposed to food relevant concentrations of CHR for 24 h. Cell viability was tested using CCK8 assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as a substrate. CHR-induced alterations in the mRNA expression levels of the antioxidant enzymes were determined using qPCR. GST and CAT-dependent enzyme activities were examined using CDNB and H₂O₂ as substrates. CHR-induced activation of Nrf2-Keap1 pathway was examined using the reporter gene assay. [Results] The achieved results indicated that CHR had clear cytotoxic effects on HepG2 cells. These effects were positively associated with CHR-produced reactive oxygen species. CHR downregulated the antioxidant enzymes including GSTO1, SOD1, SOD2, CAT at both the pretranscriptional and the functional levels confirming the oxidative damage of CHR.

20. Cadmium-induced oxidative damage in human breast cancer cells (MCF7) and protection with fat-soluble vitamins

○Wageh Sobhy DARWISH¹, 千葉仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究院¹, 札幌保健医療大学²)

[Introduction] Cadmium (Cd) is a toxic metal that is regarded as a metalloestrogen with estrogen-like properties. The cytotoxic effects of Cd on human breast cancer (MCF7) were proposed to be associated with Cd-induced oxidative stress and to involve lipid peroxidation. Therefore, the present study aimed at identification of lipid hydroperoxides produced in MCF7 exposed to Cd at environmentally-relevant levels. [Methods] MCF7 cells were exposed to environmentally-relevant levels of Cd for 24 h. Cell viability was tested using CCK8 assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as a substrate. Cd-produced lipid hydroperoxides were quantitatively estimated using LC/MS. Furthermore, Cd-induced alterations in the mRNA expression levels of the antioxidant enzymes including glutathione-S-transferases (GST) O1, NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1 (NQO1), heme oxygenase (HO)1, superoxide dismutase (SOD) 1, 2 and catalase (CAT) were determined using qPCR. Protection trials using fat-soluble vitamins were additionally tested. [Results] Cd induced cytotoxicity and oxidative stress and produced a series of 26 lipid hydroperoxide species including 14 phosphatidylcholine hydroperoxides (PC-OOH), 9 triacylglycerol hydroperoxides (TG-OOH) and 3 cholesteryl ester hydroperoxides (CE-OOH). Among these hydroperoxides, PC34:2-OOH, PC34:3-OOH, TG60:14-OOH, TG48:5-OOH, TG60:15-OOH and CE20:4-OOH were produced in a dose-dependent manner, suggesting these as possible biomarkers for Cd exposure in MCF7 cells.

21. Fried oil-induced changes in xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cells

○Jin-Kui Ma^{1,2}, Wageh Sobhy Darwish¹, Min-Cheng Gao¹, Hui Tan¹, 千葉仁志³, 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究所¹, 肇慶学院², 札幌保健医療大学³)

[Background]

Heat treatment of the oil release abundant of chemical substances including polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines and others which might have adverse health effects on the human health. Therefore, this study was undertaken to examine the cytotoxic effects of the fried oil extract. In addition, the fried oil-induced oxidative damage was further examined. Furthermore, the effects of the fried oil extract on xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs) including phase I, II and III enzymes were examined using real-time PCR.

[Methods]

Oil used for potato fry was collected and n-hexane extraction was conducted. Human HepG2 cells were exposed to the methanolic extract of the fried oil at different concentrations ranging from 1 µg-1mg/ml for 24 h. Cell viability was tested using CCK8 assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as a substrate. Transcriptomic changes of XMEs including phase I, II and III enzymes were examined using qPCR.

[Results]

Fried oil extract had significant cytotoxic effects on HepG2 cells at 1 mg/mL. In addition, this extract induced oxidative damage in a concentration dependent manner. Interestingly, fried oil extracts upregulated phase I enzymes while down regulated phase II and III xenobiotic metabolizing enzymes.

22. 環境濃度オゾンによるPOPG脂質膜の酸化に関する研究

○大場早紀¹, 喬 琳¹, 千葉仁志², 惠 淑萍¹ (北海道大学医学部保健学科¹, 札幌保健医療大学²)

【目的】肺サーファクタントは肺胞表面で単分子膜を形成しており、肺の表面張力を低下させ、肺胞が潰れるのを防いでいる。肺サーファクタントは90%がリン脂質で構成されており、その中でもPC、PGが最も多くを占めている。一方、大気中のオゾンは呼吸の際に体内に侵入するため、肺が障害される。肺の脂質酸化で肺に炎症が起こる、肺機能が低下するなどの報告もある。【方法】実験で使 用 し た 脂 質 は POPG (1 - palmitoyl-2-oleoyl-sn-3-phosphatidylglycerol)である。これらの脂質を用いて水表面に脂質の単分子膜を作製し、オゾンに暴露した。この際、オゾン暴露時間、オゾン濃度を变化させた。暴露終了後の脂質は回収し、高分解能質量分析法 (Orbitrap LC/MS) により酸化脂質の分子種や量を解析した。【結果】酸化脂質としてPONPG、PAzPG、Second ozonide (SOZ) が検出された。10分間暴露した際でも、約80%のPOPGが酸化され、暴露時間が増加するほど酸化される量が増加しました。また、アスコルビン酸、 α -トコフェロール、DHMBなど抗酸化物を添加した場合、POPGが有意に増加しました。【考察】POPGは低濃度のオゾン下でも、短時間で酸化されることを発見した。抗酸化物質を添加した膜では安定性が増加した。アスコルビン酸、 α -トコフェロール、DHMBなどは、オゾンによるPOPGの酸化を防止することが明らかとなった。アスコルビン酸の方がより強力な抗酸化作用を持つ。アスコルビン酸と α -トコフェロールを同時添加した場合、相乗効果がある。各々のみを添加した際より、抗酸化作用が強力になることが明らかとなった。

23. オゾンによる肺サーファクタントリン脂質膜の構造と安定性への影響

○喬 琳¹, 陳 震¹, 高田俊智², 千葉仁志³, 叶 深², 惠 淑萍¹ (北海道大学大学院保健科学研究所¹, 東北大学大学院理学研究科², 札幌保健医療大学³)

【目的】As one of the major components of the lung surfactant, the unsaturated lipids play essential biofunctions. But the C=C bond in the alkyl chain is a weak spot that can be easily attacked by ozone, which is a universal air pollutant. In the present study, the degradation of the unsaturated phospholipid in ambient ozone (20 ~40 ppb) is studied at a molecular level. 【方法】The single or binary mixed monolayers of a saturated lipid and two unsaturated lipids were made by LB method on the water surface (22 °C) in an atmosphere-controlled chamber. The phase states, molecular structure and surface morphology of these monolayers were characterized by a combination of various methods. 【結果・考察】All the lipid monolayers are stable in the nitrogen environment. However, ozone (20~40 ppb) is introduced into the chamber, only the saturated lipid, keep stable, while all the monolayers which contains unsaturated lipids become quite instable. The C=C bond in unsaturated lipid is attacked by ozone, and the terminal nine-carbon portion is get away from the monolayer. And several kinds of oxidized lipids are generated after ozone exposure.

24. Quantitative profiling of fatty acids in human plasma by derivatization and LC-MS/MS

○陳 震¹, 高 紫君¹, Wu Yue¹, ロジートシュレスト¹, 千葉仁志^{1,2}, 惠 淑萍¹ (北海道大学保健科学研究所¹, 札幌保健医療大学栄養学科²)

【目的】Fatty acids (FA) have been important in clinical diagnosis for long, which makes the increasing need for a fast, reliable, and economic approach to determine FA from short to very long chain by widely available equipment and with high-throughput capacity. Herein, we describe the development of a practical LC-MS/MS method for the simultaneous determination of SCFA, MCFA, LCFA, and VLCFA in human blood. 【方法】The 2-nitrophenylhydrazine derivatization coupling with LC-MS/MS detection was utilized to simultaneously quantitate 18 FAs ranging from C4 to C26 in human plasma. For methodology validation, selectivity, specificity, matrix effects were evaluated, as well as linearity, sensitivity, reproducibility, and recovery. 【成績】The sample preparation protocol was optimized and extracting with diethyl ether-potassium phosphate buffer twice was found as the highest efficiency along with economic feasibility. Under the optimized conditions, all the FA showed excellent linearity ($R^2 > 0.999$ for each), sufficient sensitivity (LOD 0.2–330 fmol and LOQ 2.3–660 fmol for all), favorable accuracy (recovery ranged from $98.1 \pm 3.6\%$ to $104.9 \pm 5.5\%$ with coefficient of variation no more than 8.6% for all), and negligible matrix effect. In the clinical application on 30 healthy subjects, compared with the previous HPLC-UV method, the developed method showed high reliability, as well as reduced time and reagent costs. 【結論】The established method showed the potential to apply to not only diagnostic practice, but also nutritional and epidemiological studies.

25. 乳腺Matrix-producing carcinomaの1例

○沖野久美子¹, 幸村 近¹, 小野誠司¹, 川江孝子², 坂井香里², 富樫由衣², 達髭麻衣², 酢谷充寿², 池田亮輔², 照井雅弥², 長嶋和郎³, 南 誠一⁴ (北海道医療大学医療技術学部¹, 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院検査センター², 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院病理診断科³, 医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院乳腺外科⁴)

【はじめに】乳腺のmatrix-producing carcinoma (MPC) は、WargotzとNorrisにより提唱されたmetaplastic carcinomaの一亜型である。MPCの全乳癌症例数に占める割合は0.1%と稀な組織型である。今回我々はMPCの1例を経験した報告する。【症例】40代女性【現病歴】7ヶ月前に右乳房腫瘍に気づき、徐々に増大し痛みも伴ったため受診。【家族歴】乳癌の家族歴なし【超音波検査】右C区域に143×88 mmの巨大な腫瘍性病変を認めた。境界明瞭不整形で、内部エコーは不均一な低エコーを示した。腫瘍内部の一部で不均一な高エコー領域も描出された。後方エコーは増強し、内部に音響陰影を伴う石灰化を認めた。【CT/PET検査】右乳房C領域の腫瘍は大胸筋と不分離であり、表層皮膚にも肥厚を認めT4c相当。PETにて右乳房腫瘍にSUVmax = 16.2のFDG高集積を伴っていたほか、Level I リンパ節にも淡い集積を認め転移が疑われた。【針生検所見】針生検にて軟骨様の基質中に異型上皮細胞が索状増殖を示す像を認めた。免疫組織化学にて腫瘍細胞に対しCAM5.2 (+), AE1/AE3 (+), 背景の軟骨様基質に対してS-100 (+)。MPCと診断された。【経過】9ヶ月間の化学療法後の超音波検査では、腫瘍径は28×24 mmに縮小しており、境界がやや不明瞭化していた。その後、右乳房部分切除術+腋窩リンパ節郭清術を施行。乳房の切除検体内に針生検同様の組織型を残す癌腫の残存を認めた。組織学的化学療法効果判定ではGrade 1a相当であった。【考察】超音波検査では、比較的境界明瞭な腫瘍として描出されればしばしば良性腫瘍として混同されやすいが、化学療法後は境界不明瞭な結節として観察された。【結語】術前化学療法を施行したMPCを超音波検査で観察し、治療により境界性状の変化を捉えることができた。

26. 超音波法による上大静脈血流速度波形記録における心窩部アプローチと鎖骨上窩アプローチの比較

○前泊佐南¹, 村山迪史², 加賀早苗³, 岡田一範³, 柳 裕介⁴, 三神大世³, 政氏伸夫³, 中鉢雅大², 西野久雄², 横山しのぶ², 岩野弘幸⁵ (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学病院超音波センター², 北海道大学大学院保健科学研究所³, 北海道大学大学院保健科学院⁴, 北海道大学大学循環病態内科学⁵)

【背景】超音波パルスドプラ法による上大静脈 (SVC) の血流速度波形は、右房圧の推定に有用であると報告されている。その記録には、通常、鎖骨上窩アプローチが用いられる。心窩部からは右房入口部付近での血流記録が可能と考えられるが、具体的な成績は示されていない。そこで、本研究では、心窩部アプローチによるSVC血流記録の可否とその流速波形の鎖骨上窩アプローチとの差異を検討した。

【方法】対象は健康ボランティア20例 (男性12例、年齢33±13歳) である。超音波パルスドプラ法により仰臥位と座位で鎖骨上窩と心窩部からSVC流速波形を記録し、収縮期順行波 (S)、拡張期順行波 (D) および両者の比 (S/D) を安静呼吸下の呼吸時と吸気時で計測した。

【結果】20例中、鎖骨上窩アプローチでは20例 (100%) で、心窩部アプローチでは18例 (90%) でSVC流速波形の記録が可能であった。仰臥位で呼吸時に計測したSとDは、鎖骨上窩より心窩部で有意に大であったが (S: 45±11 vs 59±14 cm/s, p<0.001; D: 23±6 vs 31±9 cm/s, p<0.05), S/Dには差を認めなかった (2.1±1.0 vs 2.1±0.9 cm/s, N.S.)。両アプローチとも呼吸時と吸気時でS、D、S/Dに差がなかった。体位による変化を検討すると、心窩部のS、S/Dは仰臥位と座位で差を認めなかったが、Dは座位で有意に増大した (31±9 vs 36±12 cm/s, p<0.05)。鎖骨上窩では、SとDは座位で有意に増大し (S: 45±11 vs 70±19 cm/s, p<0.05; D: 23±6 vs 55±27 cm/s, p<0.05), S/Dは有意に低下した (2.1±1.0 vs 1.5±0.5 cm/s, p<0.05)。

【結論】心窩部アプローチによるSVC流速波形記録は十分に可能であり、鎖骨上窩アプローチに比し、体位による変化が少なかった。

27. 心不全患者の左房リザーバ機能低下を規定する因子の検討

○後藤真奈¹, 加賀早苗², 岡田一範², 三神大世², 村山迪史³, 中鉢雅大³, 西野久雄³, 横山しのぶ³, 岩野弘幸⁴, 安斉俊久⁴ (北海道大学医学部保健学科¹, 北海道大学大学院保健科学研究所², 北海道大学病院超音波センター³, 北海道大学大学院循環病態内科学⁴)

【背景】左心不全に伴う肺高血圧症 (PH) に肺血管抵抗の上昇を合併した混合性PHは予後不良な病態として知られている。我々は、混合性PHでは後毛細管性PHより左房リザーバ機能が低下していることを発表した。それには長期の左房圧上昇による左房筋障害が関与していると考え、本研究では、心不全の病歴の長さや左房リザーバ機能との関連を検討した。

【方法】平均肺動脈圧≥25mmHgかつ肺動脈楔入圧>15mmHgであった左心不全患者57例を対象に、心不全発症後の経過日数と心不全入院回数を調査した。心エコー法で左室駆出率 (EF)、拡張早期の左室流入血流速度と僧帽弁輪運動速度との比 (E/e') を計測し、僧帽弁逆流 (MR) の重症度を評価した。心尖部四腔像で左室の長軸方向ストレイン (LV-LS) と心室収縮期の左房の長軸方向ストレイン (LA-LS) を求めた。EFが50%以上の症例をHFrEF、50%未満をHFpEFとした。

【結果】心不全発症からの経過日数は0~4332日 (中央値339日)、入院回数は0~27回 (中央値2回) であった。LA-LSは、経過日数 (1か月未満: 24±8%, 1か月~1年: 17±7%, 1年以上: 13±5%, p<0.05) と入院回数 (1回以下: 20±8%, 2~3回: 15±5%, 4回以上: 11±3%, p<0.05) の増加に従って低下した。また、LA-LSはE/e'とMR重症度とは相関しなかったが、LV-LSと有意に相関した (r=0.69, p<0.05)。HFrEFとHFpEFのそれぞれで、経過日数あるいは入院回数とLV-LSを説明変数としてLA-LSの規定因子を検討すると、HFpEFではLV-LSが独立規定因子であったのに対し、HFrEFでは経過日数ないし入院回数が独立規定因子であった。

【結論】心不全患者の左房リザーバ機能は病歴が長いほど低下しており、とくにHFrEFでは、長軸方向の左室心筋短縮ではなく、心不全の病歴の長さや急性増悪の回数に規定されていた。

特別講演. ピロリ菌の除菌で胃がんはどこまで予防できるのか?

○浅香正博 (北海道医療大学学長)

ピロリ菌感染によって発生する慢性活動性胃炎 (ピロリ菌感染胃炎) を抑制すれば、萎縮性胃炎はもとより、胃・十二指腸潰瘍、胃MALTリンパ腫、胃ポリープなどのピロリ菌関連胃疾患すべてが抑制される可能性が高い。もちろん胃がんもその中に含まれる。日本消化器病学会、日本消化器内視鏡学会および日本ヘリコバクター学会の理事長名で慢性胃炎への保険適用拡大を告知申請に行ってほしい旨の要請書を厚労大臣宛に提出した結果、2013年2月21日に慢性胃炎の除菌療法への保険適用がなされた。保険適用以後は除菌療法の頻度は急速に増加すると推測されていたが、予想通り全国で除菌の件数が急激に増加し、毎年約150万件を越えるピロリ菌除菌が行われており、2019年度までには1000万件を超えるのはほぼ確実になっている。実際、内視鏡検査の頻度は年間約200万件も増加しており、今回の慢性胃炎への除菌の保険適用によって保険を使用した内視鏡検診ともいえる状況が作り出されてきた。ピロリ菌の除菌の普及により、胃がんの発生が減少し、発生したとしても早期のうちに発見可能となるので、胃がん関連死は劇的に減少していくと考えられる。実際、2015年の胃がん死亡者数は保険適用前から7%の減少を示し、2018年の胃がん死亡者数は44189名と12%の減少を示した。40年にわたって年間約5万人が死亡していた胃がん死亡者数の減少は、ピロリ菌除菌の慢性胃炎への保険適用の効果以外には考えられない。

このような胃がん撲滅計画を推進できるのは、早期胃がんの診断、内視鏡治療が世界で最も進んでいるわが国だけである。WHOの胃がん研究機関 (IARC) は2014年ピロリ菌除菌の胃がん抑制効果を正式に認め、世界各国にピロリ菌除菌による胃がん予防を各国ごとに行うよう勧告するとともにわが国が胃がん撲滅政策において最も進んだ国であることも認めてくれた。わが国が2020年の東京オリンピック開幕までに胃がん関連死を20%減少させることはこの会議での国際公約であり、どうしても実現させなければならない重要事項である。