



第 31 回日本臨床化学会近畿支部総会
(第 73 回日本臨床化学会近畿支部例会合同開催)
プログラム・抄録集



日時:2022年3月6日(日)9:30~15:50

会場:京都橘大学 啓成館1階

総会長 米田 孝司

例会長 南部 昭

京都橘大学健康科学部臨床検査学科

〒607-8175 京都市山科区大宅山田町 34

第 31 回日本臨床化学会近畿支部総会 (第 73 回日本臨床化学会近畿支部例会合同開催)

日時: 令和 4 年(2022 年)3 月 6 日(日) 9:30~16:00

会場: 京都橘大学・啓成館 1 階 (京都市山科区大宅山田町 34)

(山科駅バス停 2 番から大宅バス停 20 分→徒歩 5 分、柳辻駅より徒歩 15 分、山科駅からタクシー 1500 円)

総会長: 米田孝司(京都橘大学健康科学部臨床検査学科)

例会長: 南部 昭(同上)

事務局: 岡田光貴(同上)

(演題募集および問い合わせ等:okada-ko@tachibana-u.ac.jp)

テーマ: 新時代に適応した臨床化学

会費: 無料 (会員・非会員関係なく無料で参加できます。)

ランチョンは先着 80 名(当日チケット制)に弁当無料でお配りします)

～コンセプト～

本大会では、「新時代に適応した臨床化学」というテーマを取り上げました。次なるパンデミックに備えて我々臨床検査技師は何を準備すれば良いのか。一つはコロナ禍に適応するための臨床検査(抗原および抗体測定)の新情報を知る必要があります。SARS-CoV2 は膜状のスパイク蛋白 S1 部に ACE2 と結合し、粒子内に RNA とヌクレオカプシドがあり、それらの抗原をどう測定(イムノクロマト法～化学発光 ELISA 法)するかです。これらを国民へ情報発信する役目も臨床検査技師には必要です。今回はテレビ等で有名な忽那賢志先生に新型コロナウイルス感染症の教育講演をお願いしました。また、検査体制の新情報として企業の取り組みも知って頂きたいと思います。

一方、腰痛等で痛みに関心ある国民が多く、病院へ行くのは痛みを感じてからです。疼痛に関する臨床化学研究は遅れており、現場で検査されることはありません。このような時代背景や問題を鑑みて、将来の臨床化学の発展に対する取り組みとあるべき姿について考えたいと思います。

～プログラム～

●YIA 演題(9:30~10:20)

司会 竹橋 正則(神戸学院大学)

1) 「唾液試料を用いたストレスおよびレジリエンス研究」

奥村 瞭(京都橘大学)

2) 「自然毒成分 α -アマニチンの高速液体クロマトグラフィー測定系の構築」

松尾 佳乃(京都橘大学)

3) 「京都府下の河川における四季に応じた水質変動の解析」

和久 一哉(京都橘大学)

4) 「hMIKO-1 によるラット大腸炎抑制効果及びその薬理効果」

堀内 彩香(長浜バイオ大学大学院)

5) 「自己免疫性甲状腺疾患の病因病態に影響する *IL17A* 遺伝子のエピゲノム変化」

竹野 友梨(大阪大学大学院)

- 教育講演(10:30～11:30) 司会 前田 育宏(大阪大学医学部附属病院)
「新型コロナウイルス感染症について」
忽那 賢志(大阪大学医学部附属病院感染制御部)

- 役員会および京都橋大学臨床検査学科内の見学(11:45～12:15)

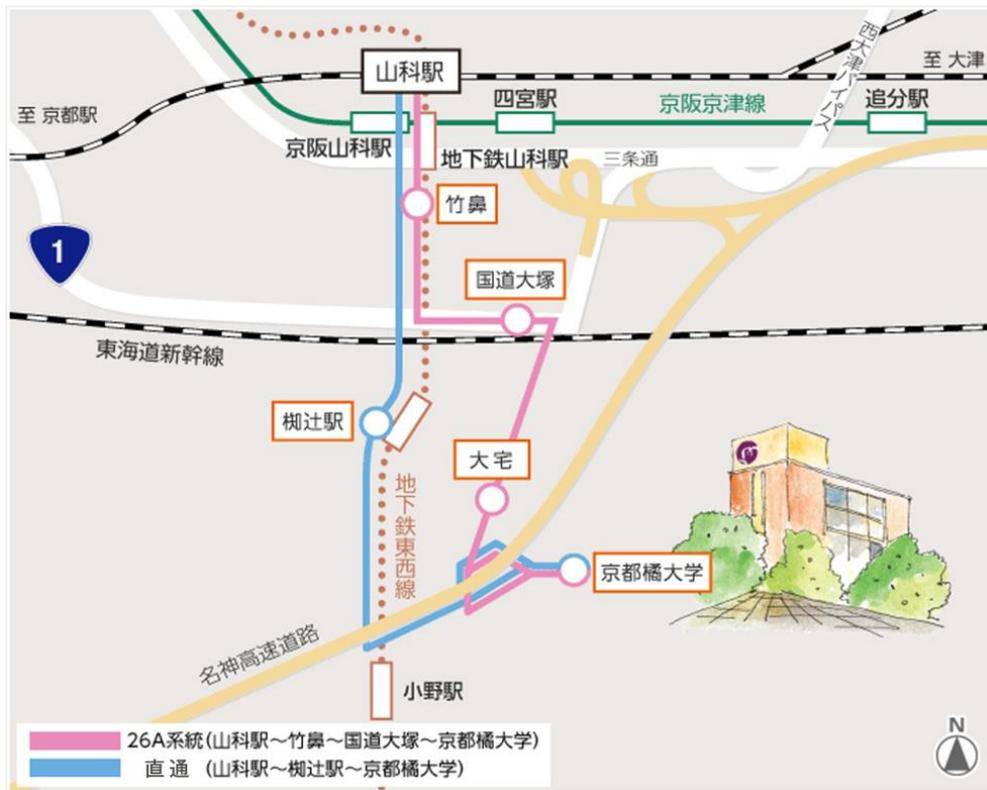
- 総会および YIA 受賞報告(12:20～12:35) 米田 孝司 (支部長)

- ランチョンセミナー(シスメックス株式会社 共催) (12:45～14:15) 司会 南部 昭(例会長)
「疼痛における臨床化学」
池田 哲也(京都橋大学健康科学部臨床検査学科)

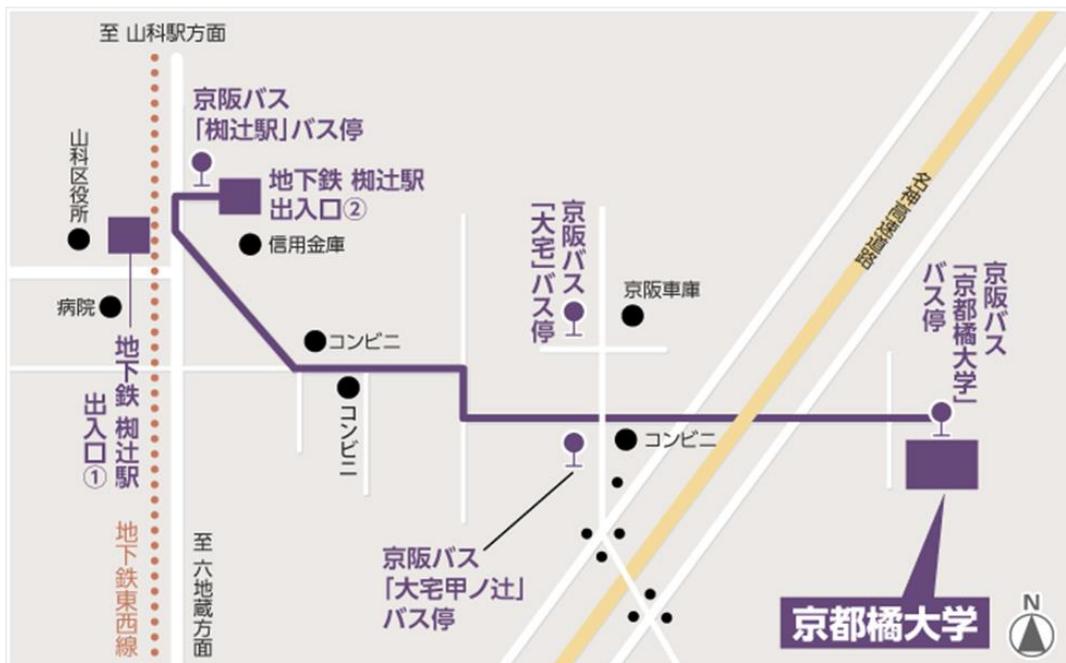
- 企業シンポジウム(コロナ禍に適応するための臨床化学) (14:30～15:50)
司会 伊藤 洋志(長浜バイオ大学)
藤原 麻有(京都橋大学)
 - 1) 新型コロナウイルス感染症検査に対する栄研化学の取り組み
石塚 昌弘(栄研化学株式会社)
 - 2) COVID-19 迅速検査への取組み
小形 聡(富士フイルム和光純薬株式会社)
 - 3) SARS-CoV2 抗体定量検査の意義と最新情報
村上 総 (アボットジャパン株式会社)
 - 4) SARS-CoV2 抗原定性検査について
波多 宏幸(極東製薬株式会社)

※問い合わせ等は、当日の事務局(岡田光貴)の E-mail へお願い致します。なお、駐車場はございませんので公共機関でお越し下さい。よろしく申し上げます。

アクセス(京都橋大学)



- JR・京阪京津線・京都市営地下鉄東西線「山科駅」バス停 2 番乗り場から、26A 系統で約 20 分「大宅(おおやけ)バス停」まで。大宅バス停から徒歩約 5 分 (※日曜日は京都橋大学までの直通バスはありません)
- タクシー山科駅から 15 分(1,500 円程度)



- 京都市営地下鉄東西線「柳辻(なぎつじ)駅」から徒歩約 15 分
- 車でのご来場はお控えいただきますようお願いいたします。

会場 (京都橋大学 啓成館)のご案内



京都橋大学キャンパスマップ

参加者・演者の方へのご案内

1. 受付は9時00分より会場前で行います。
2. 受付で参加証・ランチョンチケットをお渡ししますので会場にお入り下さい。
3. 口演発表は、PowerPointによる発表とします。フォントは標準のものでお願いします。Windows10 PC PowerPoint 2016 を用意します。PC 受付にて、USB メモリーで受付を行います。データのファイル名には発表者名を明記してください。PC 持参の場合は、外部出力コネクタ(HDMI を推奨)をご持参ください。
4. プレゼンテーションは、会場前にセットされているノート PC を利用し、発表者ご自身で操作願います。
5. 一般演題(YIA)の発表時間は質疑応答も含めて10分(発表8分+質疑応答2分)、企業シンポジウムは20分(発表15分+質疑応答5分)となっています。

教育講演 新型コロナウイルス感染症について

忽那 賢志

大阪大学大学院 医学系研究科 感染制御学

新型コロナウイルスはヒト-ヒト感染を起こす7つ目のコロナウイルスであり、2022年2月現在は感染性増加や免疫逃避に関連する変異を獲得したオミクロン株が世界的に問題となっている。感染者の約3~4割は無症候性感染者とされるが、発症者の潜伏期は約5日（オミクロン株では3日）でありインフルエンザ様症状を呈する。嗅覚障害・味覚障害は新型コロナウイルス感染症に特異度の高い症状であるがオミクロン株では頻度が低くなっており、ますます臨床症状だけの診断が困難となっている。発症者の約2割が発症から7~10日目に重症化するのが典型的な経過である。高齢者や基礎疾患を持つ患者、肥満などがリスクファクターである。

急性期を脱して回復した後も症状が遷延する **LONG COVID** と呼ばれる、いわゆる後遺症の病態が注目されている。確定診断には **PCR** 検査または抗原検査を用いる。**PCR** 検査は感度・特異度が高いという利点がある一方で結果までに時間を要すること、感染性が無くなった後も陽性が続くことがあることが欠点と言える。抗原検査は短時間で検査可能であり安価である一方、感度・特異度は **PCR** 検査に劣る。新型コロナウイルス感染症は、発症後しばらくの間はウイルスが増殖しており抗ウイルス薬が有効と考えられ、また重症化してくる頃には過剰な炎症反応が主病態となる。したがって、病期を適切に捉えた上で、抗ウイルス薬と抗炎症薬とを組み合わせることが重要である。2022年2月時点で国内承認されている抗ウイルス活性を持つ薬剤にはレムデシビル、カシリビマブ/イムデビマブ、ソトロビマブ、モルヌピラビルが、抗炎症薬にはデキサメタゾン、バリシチニブ、トシリズマブがある。また凝固異常も病態に関わっていることから、ヘパリンなどの抗凝固薬を併用することも一般的となっている。新型コロナウイルス感染症は、飛沫感染および接触感染によって広がるが、いわゆる3密と呼ばれる空間で伝播しやすいことが分かっており、1つでも密が生じると感染リスクがあるため、できる限り密を避けることが重要である。国内で承認となっている新型コロナワクチンは3種類あり、2022年2月現在は主に2つの **mRNA** ワクチンの接種が行われている。いずれも極めて高い感染予防効果が示されており、また第5波における致死率の低下に寄与したと考えられる。一方で、オミクロン株に対する感染予防効果は大幅に低下しており、また高齢者においては重症化予防効果も時間経過によって低下することから、ブースター接種によって再び感染予防効果・重症化予防効果を高める必要がある。

ランチョンセミナー(シスメックス株式会社 共催)
疼痛における臨床化学

池田哲也

京都橘大学健康科学部臨床検査学科

疼痛、痛み、痛覚、いずれも身体に害を及ぼしうる侵害刺激に応じて、反応する神経活動を指す言葉です。誰でも持っている身近にある感覚ですが、定義は意外と新しく、国際疼痛学会 (IASP) ではじめて定義されたのは、1979 年でした。それから 41 年、2020 年に改訂され、現在は「実際の組織損傷もしくは組織損傷が起こりうる状態に付随する、あるいはそれに似た、感覚かつ情動の不快感な体験」と定義されています。つまり、侵害刺激があろうがなかろうが、本人が痛みを感じれば、それは「痛み」ということになります。痛みは「感覚」と同時に「情動」を伴うために、定量化を困難にし、研究を難しい物にしています。また、痛みには急性の疼痛と慢性の疼痛があります。急性疼痛は、警告系であり、痛みによってそれ以上損傷が広がらないように動物の行動を止める働きがあります。しかしながら神経痛や糖尿病性疼痛、がん性疼痛に代表される長期間持続する慢性疼痛は、警告としての働きは既に失っており、痛み自体が障害となって苦痛を大きくしています。

私は、「疼痛」、中でも「慢性疼痛」を研究のテーマにしています。特に齧歯類を使った動物実験をメインの手段として研究に取り組んできました。ヒトでは定量化が難しい、「痛み」を動物の行動を指標にして定量化し、慢性疼痛の仕組みや、鎮痛薬の作用機序、効果的な鎮痛薬の探索を行ってきました。

今回の講演では、感覚としての「痛覚」の経路と仕組み、その結果「痛み」をどのように認識しているのか、また、「慢性疼痛」は、その痛覚の仕組みのどこがおかしくなっているのかをお話した後、今どのような研究をしているのかを御紹介していく予定です。今はまだ痛みそのものを検査で定量化することはできませんが、例えば血液検査等の侵襲性の小さい方法で痛みの定量化ができれば、疼痛治療は大きく前進していくと考えられます。その意味では「疼痛における臨床化学」は今後大事なテーマになっていくかもしれません。

企業シンポジウム-1 (コロナ禍に適応するための臨床化学) 新型コロナウイルス感染症検査に対する栄研化学の取り組み

石塚 昌弘¹、副島 隆浩²

栄研化学株式会社 マーケティング推進室

1. マーケティング二部 2. マーケティング三部

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による感染症 (COVID-19) は 2019 年 12 月に中華人民共和国 湖北省武漢市で報告されて以降、現在も世界的な流行を見せている。日本においては、2020 年 1 月 15 日に国内初の感染者が確認され、2 年を経た 2022 年 1 月 14 日時点では累計陽性患者数 181 万人、死亡者数 18,412 人、変異株の拡大による第 6 波の中にあり、今後の更なる感染拡大が懸念されている状況である。

弊社では国内の感染者が徐々に報告されつつあった 2020 年 1 月中旬に LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による新型コロナウイルス検出試薬の開発に着手し、研究用試薬としての販売を経て、2020 年 4 月 10 日「Loopamp® 新型コロナウイルス 2019(SARS-CoV-2)検出試薬キット」を体外診断用医薬品として販売を開始した。本製品は、感染状況の迅速把握と拡大防止が急務であったことから、反応時間の短縮、試薬調製不要、核酸の簡易抽出を可能とするなど、LAMP 法の特長存分に活かした迅速報告が可能な製品として設計され、また、開発開始から極めて短期間で薬事承認の取得と上市によって、新型コロナウイルス検査の普及に貢献してきた。

現在、感染力の強い Omicron 株が蔓延しつつある状況下においても、感染拡大の抑制と経済活動の活性化という、二つの命題のバランスを取った展開が求められており、そのキーアイテムとしてワクチン接種率の拡大推進と治療薬の開発が期待されている。

今後、弊社としても、ワクチンと治療薬が普及した With コロナの時代を鑑み、核酸増幅法による高精度な検査に加え、インフルエンザウイルス検査同様な運用にするために、さらに感度をアップした抗原定性検査についても、視野に入れていきたい。

企業シンポジウム-2 (コロナ禍に適応するための臨床化学) COVID-19 迅速検査への取組み

小形 聡

富士フイルム和光純薬株式会社 臨床検査薬事業部
臨床検査薬学術研究本部 西日本学術部

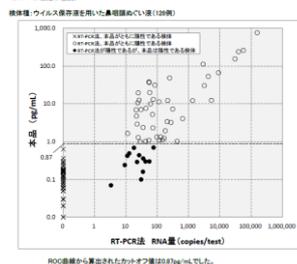
2019 年よりはじまった新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は、変異を繰り返し、度重なる猛威をふるっております。弊社も全自動遺伝子解析装置 ミュータスワコー g 1 の研究用試薬として ミュータス COVID-19 を上市しておりました。ワクチン接種が進み、一時収束に向かったものの、2022 年に出現したオミクロン変異株の感染力は凄まじく、医療現場をひっ迫させております。より迅速な検査結果を求められる状況下で、反応時間 10 分で測定可能な自動分析化学発光酵素免疫分析装置 Accuraseed にラインナップされた体外診断用医薬品「アキュラシード SARS-CoV-2 抗原」を上市致しましたのでご紹介致します。

特徴

- 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) による SARS-CoV-2 抗原測定試薬です。
- わずか 10 分の迅速測定により、報告時間の短縮に貢献します。
- 反応に関わる全ての試薬がカートリッジに封入されているため、有効期限まで試薬のロスなく使用できます。
- SARS-CoV-2 感染の診断補助に有用です。
- 公立大学法人横浜市立大学 (神奈川県横浜市) が開発したモノクローナル抗体を使用しています。
- 測定範囲 0.6~5000 pg/mL
- 測定試料 鼻咽頭ぬぐい液または鼻腔ぬぐい液
- 必要検体量 25 μ L

臨床試験

<RT-PCR法との相関>



一致率

・鼻咽頭ぬぐい液 (0.87pg/mL をカットオフ値とした場合)

本品	RT-PCR法		合計
	陽性	陰性	
陽性	46	0	46
陰性	13	69	82
合計	59	69	128

陽性一致率 78% (46例/59例)
陰性一致率 100% (69例/69例)
一致率 90% (115例/128例)

・鼻腔ぬぐい液 (0.87pg/mL をカットオフ値とした場合)

本品	RT-PCR法		合計
	陽性	陰性	
陽性	49	0	49
陰性	9	60	69
合計	58	60	118

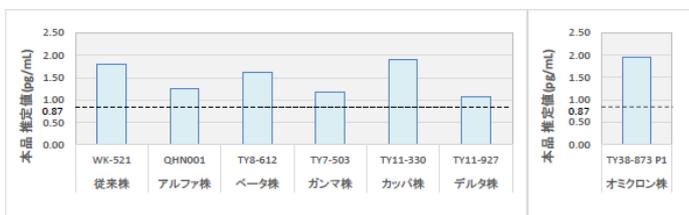
陽性一致率 84% (49例/58例)
陰性一致率 100% (60例/60例)
一致率 92% (109例/118例)

※鼻腔ぬぐい液については追加検体を用いています。

変異株との反応性

段階希釈した培養ウイルスを本品で測定し、求められた近似値から、RNA量 100copies/test の時の推定値を算出した。

由来	従来株	アルファ株	ベータ株	ガンマ株	カッパ株	デルタ株	オミクロン株
株名	WK-521	QHN001	TY8-612	TY7-503	TY11-330	TY11-927	TY38-873 P1
本品 (pg/mL)	1.79	1.25	1.63	1.17	1.90	1.07	1.94



いずれの変異株についても反応することが確認できました。

企業シンポジウム-3 (コロナ禍に適応するための臨床化学)

SARS-CoV2 IgG 抗体定量検査の意義と最新情報

村上 聡

アボットジャパン合同会社診断薬機器事業部学術情報室

COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 は、スパイク (S) タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) を用いて宿主細胞上の受容体である ACE2 と結合する。Jingyun らは、S タンパク質の RBD の 319~545 番目の残基からなる組換えワクチンが、マウス、ウサギ、アカゲザルにおいて、注射による単回投与の早くて 7 日または 14 日後に強力な機能性抗体応答を誘導することを報告した。ワクチン接種個体の血清は、細胞表面に発現している ACE2 への RBD の結合を阻害し、*in vitro* で SARS-CoV-2 のシールドウイルスおよび生ウイルスによる感染を中和し、特に、ワクチン接種はアカゲザルにおいて、*in vivo* での SARS-CoV-2 のチャンレジ感染に対しても予防効果を示した。COVID-19 患者の血清では、S1 サブユニット RBD 特異的抗体価が上昇していたことから、RBD ドメインに対する抗体の誘導を介した SARS-CoV-2 ワクチンの効果に対する期待が持てる結果であることを示唆している (Nature, 586, 572-577, 2020)。実際、新型コロナウイルスの中和活性と S1 サブユニット RBD 抗体とが相関するとの報告や、ワクチンの接種により、RBD 特異的抗体の誘導が確認された文献が多数出版されている。弊社は 2020 年の 12 月にスパイクタンパク質 S1 サブユニット RBD に対する IgG 抗体を定量捕捉可能な研究用試薬 (CLIA 法) を上市した。測定結果の判定法として、対象抗体の測定時点での抗体の有無の目安となるカットオフ値 (AU/ml) を 50.0(AU/ml)以上を陽性、未満を陰性としている。中和活性との関連性について、米国 Broad 研究所にてプラーク減少中和試験 (PRNT) を実施し、PRNT(1:20)で陽性となった 86 名の COVID-19 自然感染回復者の抗体価が全例 (100%) カットオフ以上となることを確認している。また、PRNT ID50 の代表的な高力価として 1 : 250 希釈試料を使用した確率プロファイルの試算も行い、2000(AU/ml)の抗体価が 80% (95%CI ; 0.65,0.90) 、3950(AU/ml)の抗体価が 95%の確率 (95%CI ; 0.78,0.99) で高力価に相当していることを確認した。

本会においては、自然感染およびワクチン接種における抗体発現の実際を概説する。また、今後、抗体検査を用いて COVID19 の感染状態把握およびワクチン誘導抗体の測定を行う意義について議論する場としたい。

企業シンポジウム-4 (コロナ禍に適応するための臨床化学) SARS-CoV-2 抗原定性検査について

波多 宏幸

極東製薬工業株式会社

2019 年末から流行が始まった新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、瞬く間に世界中に流行し、1 年以上経った現在でもその流行は治まっていない状況である。

COVID-19 を惹き起こす病原体である SARS-CoV-2 の検出は、ゲノム解析技術の進歩により流行早期に全塩基配列が解明されたことから、ウイルスの遺伝子をターゲットとした核酸増幅法が流行初期に開発され、検査に用いられてきた。当初は煩雑な核酸抽出・精製によるリアルタイム PCR 法が主であったが、各社から簡便な前処理法や全自動に対応した試薬が発売され、多くの病院や検査センター、そして一部の診療所で実施されている。しかしながら、核酸増幅検査は時間がかかることから、インフルエンザ等の迅速診断で用いられているラテラルフロー技術を応用した抗原定性検査が製品化され、多くの診療所で迅速に COVID-19 の診断が行えるようになった。

本講演では、SARS-CoV-2 の診断に用いられる各種検査法と合わせ抗原定性検査の特徴について述べると共に、弊社が取り扱っている迅速抗原定性検査キットの紹介を行う。

(YIA-1) 唾液試料を用いたストレスおよびレジリエンス研究

奥村瞭、塩尻菜月、佐野由奈、國増知可子、阪口愛美、星野紗菜、後藤紗綾、米田孝司
京都橘大学健康科学部臨床検査学科

【背景】現在、ストレスのない社会とストレスに耐える個人のレジリエンスが重要である。特に、学生生活をする上では試験や対人関係などのストレスが多いのでレジリエンス対応は急務となる。我々は唾液 α アミラーゼ(s-AMY)活性がストレスおよびレジリエンスに反映することをすでに確認 1) できたが問題点も生じた。その問題点を回避するために、1) ストレス負荷の種類を変更した唾液 s-AMY 活性測定、2) 唾液中における他の消化酵素の存在、3) 日常ストレスチェックシートの考案、4) 特異性のある唾液 s-AMY 蛋白測定の試薬開発 2) の改良を行った。

【材料と方法】対象は共同研究者(男 1 名・女 6 名, 年齢 21・22 歳)7 名である。実験方法は、1) 20m シャトルラン負荷試験、ドミノ負荷試験、国家試験問題実施における負荷前後の s-AMY 活性(Salivary α -Amylase Assay Kit; Salimetrics 社)の比較、2) 唾液中 α グルコシダーゼ活性(QuantiChrom α -Glucosidase Assay Kit; BioAssay Systems 社)の有無、3) 対象者のストレスチェックシートによるレベル評価、4) ヒト s-AMY ポリクローナル抗体(ウサギ由来)をプレート固相し、ヒト s-AMY モノクローナル抗体(マウス由来)を POD 標識してサンドイッチ ELISA 法の s-AMY 蛋白測定試薬を作製した。

【結果および考察】1) シャトルラン負荷実験の s-AMY 活性は直前より直後が高値($p < 0.05$)を示し、直後と 1 時間後は初期値に戻った($p < 0.05$)。また、試験問題負荷とドミノ負荷試験の s-AMY 活性変化はシャトルラン負荷試験より緩やかな変化を示した。2) α グルコシダーゼ活性は唾液中に 1.6 ± 1.8 U/L 存在した。3) ストレスチェックシートからストレス・レーダーチャートを作成し比較した結果、ストレスチェックシートによるレベル評価が 0.3 と低値であった対象者は s-AMY 活性 371 U/L と高値を示したのに対して、他の対象者(ストレス・レベルが平均 1.1)においては s-AMY 活性 140 U/L と低かった。この結果は s-AMY が高い人が日常ストレスを感じないかストレス耐性がある可能性が考えられた。このことは先行研究 1) においても初期値が高い人に日常ストレスを感じない人が多かったことに一致した。4) s-AMY 抗体のプレート固相、異なる s-AMY 抗体への POD 標識などサンドイッチ ELISA 法(自家製試薬)による s-AMY 蛋白測定の試薬条件を確立した。今後の実験として免疫クロマト法の試薬作製、シャトルラン負荷試験前後の s-AMY 活性が顕著な試料を用いてマイクロアレイ法による唾液中バイオマーカー 62 項目を測定し解析する予定である。

【参考文献】

- 1) 米田孝司, 他. 臨床病理, 68:162, 2020.
- 2) 米田孝司, 他. 生物試料分析科学会, 45:51, 2022.

(YIA-2) 自然毒成分 α -アマニチンの高速液体クロマトグラフィー測定系の構築

松尾佳乃¹、岡田光貴¹、南部昭¹、竹下仁¹、福田篤久²、米田孝司¹

1. 京都橋大学健康科学部臨床検査学科

2. 大阪医科薬科大学三島南病院臨床検査科

【背景】

ドクツルタケなどの毒キノコが含有する成分 α -アマニチン(AMA)は致死性の自然毒として危険視されている。一方で、生体試料中における AMA の検出と定量を目的とした臨床検査法は無いため、医療現場では患者や家族の聴取、および症状などを基に病期や重症度の判定が行われる。この様に診断基準が曖昧な状況は誤診や対応の遅れに繋がるため、対策が必要と思われる。本研究では、ゲル濾過クロマトグラフィー(GFC)を原理とするカラムを用いた HPLC 分析により、キノコの成分抽出液や生体試料からの AMA の検出と定量を試みる。

【材料と方法】

ドクツルタケ(n=5)および、それ以外の毒キノコ(n=5)は日本きのこセンター・菌茸研究所(鳥取)より供した。それらキノコをすり潰し、凍結融解を繰り返して得た抽出液を検体とした。健常人の血清と尿試料を、コスモ・バイオ株式会社より供した。AMA の製剤、および一般試薬は富士フィルム和光純薬株式会社より供した。HPLC 分析には、株式会社島津製作所の Prominence HPLC 装置を利用した。GFC 用カラム PROTEIN KW-803 とガードカラム PROTEIN KW-G 6B は、株式会社昭和電工より購入した。本研究の HPLC 分析は室温で実施し、流速は 1.0 mL/min に固定、移動相として超純水(35%)とアセトニトリル(65%)の混合液(以降 solution A と記載)を展開した。分析に用いる検体の液量は全て 100 μ L とした。検体の注入後は、30 min の測定時間(以降, Time と記載)における波長 280 nm で検出した波形を記録した。中毒患者の生体試料の入手は困難であるため、市販の AMA を solution A, 尿試料, あるいは血清試料に溶解したものを検体とした。

【結果】

- ① Solution A で調製した AMA 溶液 14 段階希釈系列(200 - 0.1 μ g/mL)の HPLC 分析を実施した。この時, Time が 14 min 付近の箇所で AMA の波形が検出された。この波形を基に、濃度 200-0.5 μ g/mL の AMA が検出可能であり、検量線を作成することができた。
- ② ドクツルタケ抽出液全てから AMA の波形を検出することができた。それ以外の毒キノコからは検出不可であった。
- ③ 尿試料で調製した AMA 溶液(200 - 100 μ g/mL)の HPLC 分析を実施したが, AMA の波形を検出することはできなかった。
- ④ 除タンパク処理を実施した AMA 含有血清試料(200 - 10 μ g/mL)の HPLC 分析を実施したところ, 200 - 20 μ g/mL の濃度範囲で AMA の検出を認めた。一方, 算出された AMA 濃度は, 実際の濃度の 1/2~1/3 程度の値となった。

【考察と結論】

本研究を通じて構築した HPLC 測定系は、毒キノコ抽出液および除タンパク血清中の AMA の検出と定量に有用と思われた。本測定法は、臨床検査や食品安全検査への応用が期待できる。

(YIA-3) 京都府下の河川における四季に応じた水質変動の解析

和久一哉、吉田純、岡田光貴、竹下仁、米田孝司
京都橘大学健康科学部臨床検査学科

【背景】

我々が日常的に使用する水は河川に由来するため、近隣地域の河川の水質が保たれることは重要である。河川の水質調査は行政機関により実施されるが、この調査では把握しきれない水質検査項目も存在する。また、河川の水質は季節性に変動する可能性があることから、定期的な調査が不可欠である。本研究では、京都府下の河川を対象とし、行政機関で測定される一般的な水質検査項目と我々が独自に選定した特殊検査項目を、化学実験により測定する。得られた成果から水質変動の原因物質や汚染物質を推定する。

【方法】

- ① 以下の 7 河川, 10 ヶ所において採水し, 水質調査を実施した。
鴨川, 桂川, 高野川, 高瀬川, 琵琶湖疏水, 山科川(2 ヶ所), 宇治川(2 ヶ所), 山科音羽川
- ② 水質検査項目は以下である。
水温, pH, 色度, 導電率, 総溶解固形物(TDS), 溶存酸素(DO), 生物化学的酸素要求量(BOD), 溶存硫化物, Fe, Cu, 6 価クロム, 硝酸イオン, シアンイオン, 硝酸イオン, 一般細菌数, 大腸菌数
- ③ 採水と水質調査は以下の時期に, 2 年間に渡り実施した。
春季(5 月), 夏季(8 月), 秋季(11 月), 冬季(2 月)

【結果】

- ① いずれの河川でも夏場は水温が上昇した。pH はどの河川でも塩基性に傾いた。
- ② 色度, 導電率, TDS は山科川や宇治川で高値を示したが, 季節性に乏しいことが分かった。
- ③ DO は多くの河川で春季に大きく, BOD は夏季に大きい傾向があった。BOD は高野川, 桂川, 高瀬川, 山科音羽川で基準値を超えた。
- ④ Fe は春季に多少検出される河川があったが, Cu や溶存硫化物, 6 価クロムはいずれの河川でもほとんど検出されなかった。硝酸イオンは多少検出されたが, いずれの河川でも基準範囲内であった。
- ⑤ 一般細菌や大腸菌は, 夏季に比較的多く検出されることが分かった。

【考察と結論】

採水を行なった河川では DO が高く, BOD がやや基準を超えた河川があったものの水中の酸素濃度は比較的良好であり, 水生生物の生息には殆ど問題が無いレベルであった。金属イオン並びに硝酸イオンはほぼ基準範囲内であり, 工場排水や生活排水の影響が小さく, 良好な水質であることが示唆された。一方, 細菌類, 特に大腸菌はいずれの河川でも一定数が検出されるので, 入水や飲水は控えるべきと考えられた。

(YIA-4) hMIKO-1 によるラット大腸炎抑制効果及びその薬理効果

堀内 彩香¹, 岡田 光貴², 池本 正生³, 伊藤 洋志¹

1. 長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻 統合バイオ科学技術領域
2. 京都橘大学 健康科学部 臨床検査学科

3. 長浜バイオ大学 バイオサイエンス学部 臨床検査学コース

【はじめに】 潰瘍性大腸炎 (UC) は大腸, とくに直腸で発症し, 重症化する原因不明の難病である. 池本らは新しいリコンビナントヒト MIKO-1 (hM1) 及びその誘導体 (hM1a, hM1b, hM1c) を作製した. 本研究では, これらの hMIKO タンパク質を硫酸化デキストラン (DSS) 誘導 UC ラットの腹腔内に毎日連続投与し, 大腸炎に対する hM1 の薬理効果とそのメカニズムについて考察する.

【方法】 ① 正常ラット (N 群: Wistar rat, 220~250 g/rat, male, n=5), ② N 群ラットに 5%DSS のみを 10 日間連続投与した群 (UC 群, n=10), ③ UC 群ラットに hM1 (0.6 mg/日/ラット) を毎日腹腔内投与した群 (hM1 群, n=10) を用いた. なお, 各ラットの体重変化と糞便の性状を毎日観察した. ④ 実験最終日に N 群, UC 群, hM1 群ラットから心臓採血し, 血清を分離した. その後大腸を摘出し, 長さを計測した. ⑤ 摘出した大腸組織は病理組織標本の作製, タンパク質及び mRNA の抽出に用いた. ⑥ 大腸組織の切片を HE 染色し, 腸炎の重症度を評価した. ⑦ hM1 及びその誘導体のヒトマクロファージ様細胞 (hMΦ) への免疫作用を蛍光免疫染色法により観察し, hM1 の機能ドメインをアミノ酸レベルで推測した.

【結果】 ① UC 群ラットの体重は明らかに減少したが, hM1 群ラットの体重は増加傾向を示した. ② HE 染色の結果, UC 群の大腸 (とくに直腸) 組織は癒痕化し, 大腸の長さは約 30% 短縮したが, hM1 群ラット大腸には有意な短縮は観察されなかった. ③ hM1 及びその誘導体は hMΦ に取り込まれ, 細胞質内で少なくとも β -アクチンと複合体を形成することによって核内に輸送される可能性が示唆された (免疫沈降法). ④ hM1 群ラットにおいて, hM1 は炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1 β , IL-6) mRNA の発現を有意に抑制した. ⑤ hM1 の N 末端及び C 末端側のアミノ酸配列が機能発現に深く関わっている可能性が示唆された.

【考察】 hM1 は炎症性サイトカイン mRNA の発現を強く抑制し, UC の発症を制御する可能性が示唆された. しかし, その機序は不明であり, 今後 *in vitro* の実験系による詳細な検証が必要と思われた.

(YIA-5) 自己免疫性甲状腺疾患の病因病態に影響する *IL17A* 遺伝子のエピゲノム変化

竹野友梨¹、井上直哉^{1,2}、上田宏達¹、高山直美¹、日高洋³、岩谷良則¹、渡邊幹夫¹

1. 大阪大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 生体病態情報科学講座
2. 大阪大学医学部附属病院 医療技術部検査部門
3. 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

【背景】

自己免疫性甲状腺疾患(AITD)であるバセドウ病(GD)と橋本病(HD)の病態は、患者によって様々であり、発症時に予後を予測診断することは困難である。

我々は、以前、Th17 細胞の増加が AITD の発症および GD の難治化に関連することを報告した。IL-17A は Th17 細胞が産生するサイトカインであることから、IL-17A 産生に関与する遺伝子として *IL17A* 遺伝子-197 G/A 多型を解析したが、AITD の病因病態と関連はなかった。本研究では、遺伝因子以外の要因として *IL17A* 遺伝子のメチル化率に注目し、他の遺伝子多型と合わせて調べることで、AITD の病因病態予後に影響を及ぼす環境因子(エピゲノム因子)の影響を調べた。

【対象・方法】

GD 患者(422 名)のうち、5 年以上抗甲状腺剤で治療しても TRAb が陰性化しない患者を難治群(129 名)、投薬治療により TRAb 陰性化後、2 年以上再発しなかった患者を寛解群(55 名)とした。HD 患者(227 名)のうち、50 歳未満で甲状腺機能低下症を発症した患者を重症群(110 名)、50 歳以上でも甲状腺機能正常で治療不要な患者を軽症群(85 名)とした。甲状腺自己抗体陰性かつ甲状腺機能正常な人を健常群(224 名)とした。

メチル化率、-121 G/A および+45 G/A 多型は、末梢血全血細胞由来の DNA をバイサルファイト変換し、Pyrosequence 法を用い、定量測定した。また、-197 G/A 多型は TaqMan-PCR 法を用いてタイピングを行った。

【結果】

1. -168CpG, -117CpG, +48CpG のメチル化率が 100%未満を示した個体の割合は、AITD 患者、特に GD 難治群および HD 重症群で高かった(AITD: P=0.004, 0.006, 0.021 GD 難治群: P=0.044 HD 重症群: P=0.046)。
2. +45 A carrier, A allele の頻度は、HD 重症群で軽症群に比べ増加していた(P=0.019, 0.030)。
3. +45 A allele 数が多い個体ほど、+48CpG のメチル化率が低かった(P<0.001)。
4. 性別や年齢を考慮した多変量解析の結果、-168CpG, +48CpG の脱メチル化は、AITD 発症、GD 難治化、HD 重症化のリスク増加に関連していた。また、+45 A allele 数の増加は、GD 難治化のリスク減少および HD 重症化のリスク増加に関連していた。

【結語】

IL17A 遺伝子-168CpG, +48CpG のメチル化率の低下および+45 G/A 多型は、AITD の病因病態予後に関与している。