

北里大学保健衛生専門学院紀要

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

第 22 卷

ヒト用超音波診断装置を用いたラット腹部超音波検査

笹岡 悠一（北里大学保健衛生専門学院 臨床検査技師養成科）他

小胞体ストレス誘発性肝疾患における飼料組成の影響

高橋 知衣（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）他

凍結加温手術装置の基礎研究 二重管を用いた手術用プローブの作製と評価

高橋 大志（北里大学保健衛生専門学院 臨床工学専攻科）他

嚥下調整食学会分類 2013 を用いた学生の嚥下食評価における栄養補給法実習の有効性—主食・主菜間の評価格差から明らかになった教育課題—

柄澤 美佳（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）他

BCG 予防接種後の副作用と思われる左肩腫瘤の一症例

坂西 清（新潟大学地域医療教育センター・魚沼基幹病院 臨床検査科）他

2 型糖尿病モデル雄性マウスにおけるローゼル萼の血糖低下作用

岩本 直樹（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）

当院における遺伝子検査の取り組み

畔上 公子（新潟県立がんセンター新潟病院 病理部）

臨床検査技師に必要な統計学について（第 4 報）

小林 浩二（北里大学保健衛生専門学院 臨床検査技師養成科）

KITASATO JUNIOR COLLEGE
OF HEALTH AND HYGIENIC SCIENCES

Vol. 22

2017

北里大学保健衛生専門学院紀要
第22巻 平成29年(2017年)
目 次

〔原著論文〕

- ヒト用超音波診断装置を用いたラット腹部超音波検査 …………… 1
笹岡 悠一（北里大学保健衛生専門学院 臨床検査技師養成科）他
- 小胞体ストレス誘発性肝疾患における飼料組成の影響 …………… 7
高橋 知衣（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）他
- 凍結加温手術装置の基礎研究 二重管を用いた手術用プローブの作製と評価 ……………19
高橋 大志（北里大学保健衛生専門学院 臨床工学専攻科）他
- 嚥下調整食学会分類 2013 を用いた学生の嚥下食評価における栄養補給法実習の有効性……29
—主食・主菜間の評価格差から明らかになった教育課題—
柄澤 美佳（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）他

〔短報〕

- BCG 予防接種後の副作用と思われる左肩腫瘤の一症例……………39
坂西 清（新潟大学地域医療教育センター・魚沼基幹病院 臨床検査科）他
- 2型糖尿病モデル雄性マウスにおけるローゼル蓂の血糖低下作用……………45
岩本 直樹（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）
- 当院における遺伝子検査の取り組み ……………49
畔上 公子（新潟県立がんセンター新潟病院 病理部）

〔活動報告〕

- 臨床検査技師に必要な統計学について（第4報）……………55
小林 浩二（北里大学保健衛生専門学院 臨床検査技師養成科）

〔雑報〕

- 作成基準・執筆要領 ……………63

〔編集後記〕

- 小林 健司（学術委員会委員長）……………67

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

Vol.22

2017

Contents

[Original Article]

Rat abdominal study with an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans

Yuuichi SASAOKA et al. (Department of Medical Technology, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

The influence of diet composition on fatty liver disease induced by endoplasmic reticulum stress

Chie TAKAHASHI et al. (Department of Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

A Basic study of Double Pipe Surgical Probe attached to the Combination Treatment System Of cryosurgery and hyperthermia treatment

Daishi TAKAHASHI et al. (Course of Clinical Engineering, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

Effectiveness of the nutrition support practice to the nutrition course-students on the validity evaluation of various deglutitive foods according to “The classification of modified diet for dysphagic persons in 2013”—Educational tasks revealed from the evaluation gap between the staple food and main dish—

Mika KARASAWA et al. (Department of Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

[Short Communication]

A case of left shoulder mass considered to be a side effect after BCG vaccination

Kiyoshi SAKANISHI et al. (Clinical Laboratory Department, Uonuma Kikan Hospital)

The suppressive effect of Malvaceae Hibiscus roselle calyx on blood glucose in type 2 diabetic male mice

Naoki IWAMOTO (Department of Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

Genetic testing of efforts in our hospital

Kimiko AZEGAMI (Pathological Department, Niigata Cancer Center Hospital)

[Activity Report]

Statistics required for a medical laboratory technologist (Part 4)

Koji KOBAYASHI (Department of Medical Technology, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

[Information]

Instruction to Authors

Editor's postscript

Kenji KOBAYASHI (Editor-in-Chief, Chairperson of Scholarly Committee)

Rat abdominal study with an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans

Yuuichi SASAOKA¹, Yuuko KOSUGE¹, Koji KOBAYASHI¹
Noriko TAKEUCHI¹, Kiyoko YAMAGUCHI¹, Yasuyuki IGARASHI¹
Yosuke TAJIKA², Hideaki SUZUKI¹

¹Department of Medical Technology, Kitasato Junior College of Health and Hygienic
Sciences, Minamiuonuma, Niigata, Japan

² Department of Pathology, Saiseikai Toyama Hospital
500 Kurotsuchishinden, Minamiuonuma, Niigata 949-7241, Japan

Abstract

A real-time ultrasonographic diagnostic apparatus was used for investigating the abdomen in rats. The ultrasonographic diagnostic apparatus was used for the diagnosis of clinical pathology. It is very useful for continuous follow-up after experiments with test samples such as a drug or health food, to noninvasively investigate the inside of the body of an animal. We aimed to observe the abdominal cavity of rat, a small animal, by using an ultrasonographic diagnostic apparatus used in humans. The liver and kidney of rats that were immobilized with ether anesthesia were observed by using an ultrasonographic diagnostic apparatus. Ultrasonography was used to clearly observe the organization of the liver and kidney in rats. Our results showed that the ultrasonographic diagnostic apparatus used in humans is capable of noninvasive, easy, and accurate internal measurements in rat experiments.

Keywords: rat abdomen, ultrasonography, liver disease, kidney disease

(Received : April 28, 2017 / Accepted : June 23, 2017)

Introduction

In research, ultrasonography is important for depicting the real-time movements of internal organs and status of structures such as the thyroid gland, breast, liver, or kidney.⁽¹⁾ Ultrasonography can be used for bloodstream measurements, because examination of the ultrasound image taken with the animation display function can demonstrate the flow of material, unlike magnetic resonance imaging and computed tomography.⁽²⁾ In addition, ultrasonography is a noninvasive method and a suitable technique for the diagnosis of tumors, pregnancy, inflammation, and lithogenous substances.⁽³⁾

Animals are widely used as experimental models such as the effect of metabolism and the influence of the dosage of a health food or medicine.⁽⁴⁾ These animal experiments are important for the noninvasive study of organs in addition to real-time investigations of change over time. However, in most experiments, it is difficult to inspect the internal body parts of an animal noninvasively. Application of medical imaging systems is valuable in reducing the number of experimental animals. Accordingly, ultrasonography seems to be a very suitable technique for organ imaging in animals. However, an ultrasonographic diagnostic apparatus for animals is very expensive and difficult to purchase.

Thus, in this study, we aimed to assess whether an ultrasonographic diagnostic apparatus and probe used in humans is suitable for animal studies. We performed imaging of the rat abdomen with an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans.

Materials and Methods

Experimental animals and treatments

All animals were allowed free access to standard laboratory rodent chow CE-2 (Clea Japan, Tokyo, Japan) and tap water. The animals were housed in environmentally controlled animal chambers with a 12:12-h light: dark cycle. All procedures were conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments at Kitasato University and approved by the ethics committee of Kitasato University.

Ultrasound imaging in rats

Male Sprague-Dawley rats (659–738 g, n = 3) immobilized with ether anesthesia were tested daily for the investigation of the abdomen by using an ultrasonographic diagnostic apparatus (LOGIQ7; GE Healthcare, USA) with a 14-MHz linear array transducer. The color flow settings included a 6.5 repeat gain and 1.6-kHz frequency. The tip of the probe was covered with water-soluble gel before being applied to the abdomen.

Results

Ultrasound imaging of the rat liver

First, we investigated the rat liver. Fig. 1(a) shows the image of the liver from sagittal scan. The left side is the head side, and the right side is the foot side; the upper part is the ventral side, and the bottom part is the back side. The image was smooth; the liver parenchyma echo was uniform; the

vessels in the liver were clearly seen; and no ascites. There is no clear lesion. Fig. 1(b) shows the image of the liver from transverse scan. The vessels in the liver did not show a clear and distinct lesion.

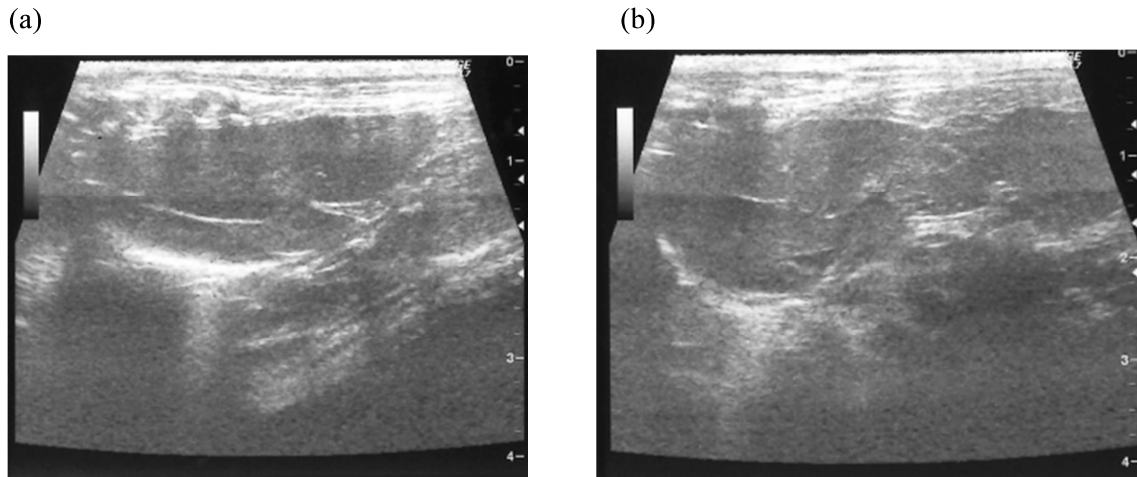


Fig. 1. Ultrasound image of the rat liver.

Male rats under ether anesthesia were tested daily for the investigation of the abdomen by using an ultrasonographic diagnostic apparatus with a 14-MHz linear array transducer. The tip of the probe was first covered with water-soluble gel before being applied to the abdomen. (a) Ultrasound image of the rat liver from sagittal scan. (b) Ultrasound image of the rat liver from transverse scan.

Ultrasound imaging of the rat kidney

To further investigate the kidney in rats, we applied a probe to the lower flank of the animals. Fig. 2(a) shows the major-axis image of the right kidney from right subcostal scan. The right side is the upper pole, and the left side is the lower pole. The echo brightness of the kidney was the same as that of the liver. The real echo was uniform. The center has a lumen structure with a low echo level. The bloodstream flow was not shown by the color flow. Fig. 2(b) shows the minor-axis image of the right kidney from right subcostal scan. There was no clear lesion. Fig. 2(c) shows the left kidney from left subcostal scan. The center shows a round mass without continuity. The image showed a smooth surface, a clear border, and no echo. A 3.4 mm cyst without bloodstream flow was found (Fig. 3).

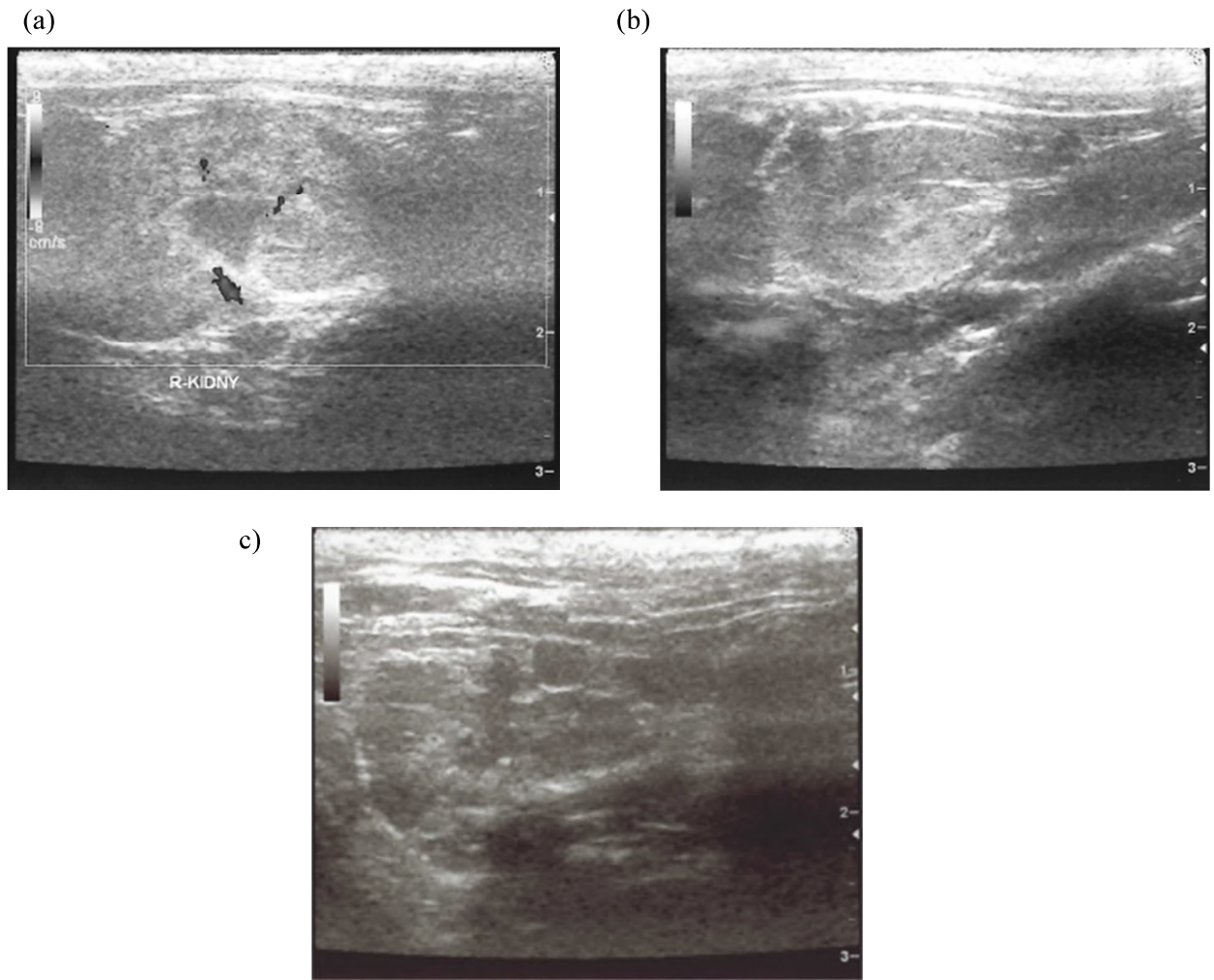


Fig. 2. Case 1: ultrasound abdominal scanning of the rat kidney.

Male rats under ether anesthesia were tested daily for the investigation of the abdomen by using an ultrasonographic diagnostic apparatus with a 14-MHz linear array transducer. The tip of the probe was first covered with water-soluble gel before being applied to the abdomen. The color flow settings included a 6.5 repeat gain and 1.6-kHz frequency. (a) Longitudinal image of the right kidney of rat from right subcostal scan. (b) Cross-sectional image of the short axis of the right kidney of rat from right subcostal scan. (c) Ultrasound image of the left kidney of rat from left subcostal scan.

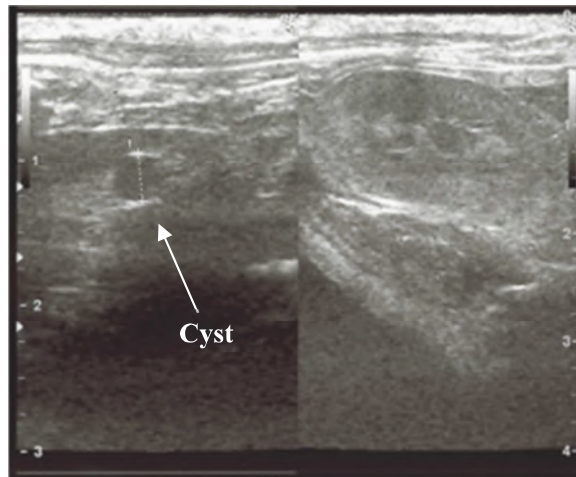


Fig. 3. Case 2: ultrasound abdominal scanning of the rat kidney.

The left screen shows a cross-sectional image; the right screen shows vertical-section images from subcostal scan. Male rats under ether anesthesia were tested daily for the investigation of the abdomen by using an ultrasonographic diagnostic apparatus with a 14-MHz linear array transducer. The tip of the probe was first covered water-soluble gel before being applied to the abdomen.

Discussion

Small animals are used as models of human diseases, and rat experiments are particularly important.^{(5),(6)} Imaging studies have been used as a diachronic observation method in past experiments. In this study, we investigated the use of an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans in the noninvasive examination of small animals. Our results showed that the ultrasonographic diagnostic apparatus for humans is useful for imaging the abdomen in rats.

We investigated whether an existing apparatus is available for small-animal imaging. In our study, we obtained liver images from longitudinal and cross-sectional scanning of the abdomen. The vessels in the liver were clearly and distinctly shown. We were able to detect abnormal findings, when present. Thus, it is necessary to examine the gallbladder by using an ultrasonographic diagnostic apparatus and probe used in humans. Observation of the liver is useful in the study of various diseases such as acute viral hepatitis and chronic hepatitis,⁽⁷⁾ liver fibrosis, and cirrhosis, which are leading causes of morbidity and mortality,⁽⁸⁾ and in liver cancer studies about the curative effect of drugs.⁽⁹⁾ Our findings suggested that an ultrasonographic diagnostic apparatus and probe used in humans is useful for the noninvasive observation of the rat liver and for continuous monitoring of chronic liver diseases.

Next, we investigated the cross-section and the longitudinal section of the right and left kidney by imaging. In addition, the renal pelvis was distinguished by using color flow imaging to observe the bloodstream. Moreover, we found a cyst without bloodstream flow. Observation of the kidney is useful in studies of various diseases such as chronic renal failure,⁽¹⁰⁾ liver and kidney damage

induced by hyperlipidemia,⁽¹¹⁾ and acute kidney injury.⁽¹²⁾

In summary, we were able to perform clear imaging of the liver and kidney of rats by using an ultrasound imaging system for humans. Therefore, further studies are needed to clarify whether the thickness of the heart and blood vessels, as well as the bloodstream flow in rats can be measured with an ultrasonographic diagnostic apparatus and probe for humans.

Conclusion

We investigated whether an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans could be used to analyze the abdomen of rats. As a result, scanning of the rat liver and kidney produced clear images that could distinguish blood vessels and cyst. Therefore, the noninvasive observation of abdominal organs of rats over time will be possible in the future by using an ultrasonographic diagnostic apparatus for humans.

References

- (1) Somer JC. [Echodiagnosis. Technical aspects]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 1971;115(32):1347-1350.
- (2) Bom N, Lancée CT, Honkoop J, Hugenholtz PG. Ultrasonic viewer for cross-sectional analyses of moving cardiac structures. *Biomed Eng (NY).* 1971;6(11):500-503, 5.
- (3) Olson ES, Ortac I, Malone C, Esener S, Mattrey R. Ultrasound Detection of Regional Oxidative Stress in Deep Tissues Using Novel Enzyme Loaded Nanoparticles. *Adv Healthc Mater.* January 2017:1601163.
- (4) Suzuki H, Kobayashi K, Kosuge Y. Probiotics *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus sakei* reduce IgE and increase Th1 cytokines in an ovalbumin-induced murine model of allergy. *Int J Anal Bio-Sci.* 2015;3(4):90-96.
- (5) Inaba Toshio IA. Use of Echography in Rats for Pregnancy Diagnosis. *Japansese J Vet Sci.* 1985;3:523-525.
- (6) Takeda Y, Asaoka H, Ueno M, Jimma F, Hidaka M, Shibusawa H, Kaneda K, Saniabadi AR, Hiraishi K, Kashiwagi N. Assessment of rabbit spleen size using ultrasonography. *Lab Anim Sci.* 2007;69(8):841-842.
- (7) Debing Y, Mishra N, Verbeke E, Ramaekers K, Dallmeier K, Neyts J. A rat model for hepatitis E virus. *Dis Model Mech.* 2016;1-25.
- (8) Ganai AA, Ganaie IA, Verma N, Farooqi H. Regression of fibrosis/cirrhosis by Glycine propionyl-L-carnitine treatment in D-Galactosamine induced chronic liver damage. *Chem Biol Interact.* 2016;260:117-128.
- (9) Maté ML, Geary T, Mackenzie C, Lanusse C, Virkel G. Species differences in hepatic biotransformation of the anthelmintic drug flubendazole. *J Vet Pharmacol Ther.* 2017:1-7.
- (10) Cai H-D, Su S-L, Li Y, Zhu Z, Guo J, Zhu Y, Guo S, Qian D, Duan J. Simultaneous Determination of Four Tanshinones by UPLC-TQ/MS and Their Simultaneous Determination of Four Tanshinones by UPLC-TQ/MS and Their Pharmacokinetic Application after Administration of Single Ethanol Extract of Danshen Combined with Water Extract. *Molecules.* 2016;21(12):1630.
- (11) Vinothiya K, Ashokkumar N. Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. *Biomed Pharmacother.* 2017;87:640-652.
- (12) Zhang J, Fallahzadeh MK, McCullough PA. Aging Male Spontaneously Hypertensive Rat as an Animal Model for the Aging Male Spontaneously Hypertensive Rat as an Animal Model for the Evaluation of the Interplay between Contrast-Induced Acute Kidney Injury and Cardiorenal Syndrome in Humans. *Cardiorenal Med.* 2016;7(1):1-10.

小胞体ストレス誘発性肝疾患における飼料組成の影響

高橋知衣*¹, 今井敦士*¹, 渡邊健太郎*¹, 渡辺卓也*¹, 清瀬千佳子*²

*¹ 北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科

〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

*² 神奈川工科大学 応用バイオ科学部 栄養生命科学科

〒243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

要旨

近年罹患者が増加している非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症及び進展に関与する因子として、食事因子、遺伝的素因、アディポカイン、酸化ストレス、腸内細菌に加えて小胞体ストレスの関わりが挙げられる。本研究では、NAFLD の予防または改善効果について研究を行うにあたり必要な動物モデルの構築を目的とし、通常食または高脂肪食で 8 週間飼育した C57BL/6J マウスに小胞体ストレス惹起剤であるツニカマイシン (TM) を投与した際の肝臓への影響について検討を行った。

その結果、通常食群並びに高脂肪食群において、TM 投与により肝臓中の中性脂肪 (TG) が増加し、血漿の TG は減少した。血漿 TG の減少は通常食+TM 投与群で特に顕著であった。また、肝臓 Oil Red O 染色の結果から、通常食+TM 投与群の方が高脂肪食+TM 投与群よりも多くの脂質が観察された。小胞体ストレスマーカーの CHOP タンパク質発現量、血漿の AST 及び ALT 活性は、TM 投与によって増加したが飼料組成の影響は見られなかった。また、脂肪酸合成に関わる SREBP-1c のタンパク質発現量は飼料による影響も TM 投与による影響も見られなかった。

以上の結果から、通常食すなわち高炭水化物食の方が高脂肪食よりも小胞体ストレス誘発性の脂肪肝が起りやすいことが示唆された。

キーワード

NAFLD、脂肪肝、ツニカマイシン、小胞体ストレス、高脂肪食

(投稿日：2017 年 4 月 28 日 / 受理日：2017 年 6 月 23 日)

1. 序文

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、飲酒歴のない人に発症するアルコール性肝障害に類似した一連の脂肪性肝疾患であり、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型と言われている。NAFLD の多くは非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver : NAFL) だが、10～20%が非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) であり肝硬変や肝がんへと進行する。日本においても罹患者が増加しており、健康診断受診者の NAFLD 有病率は約 30%であると報告されている⁽¹⁾。一般的に NAFL 自体は良性と言われているが NASH へ進行する可能性があるため、NAFLD の治療あるいは予防効果について検討を行うにあたり作用機序を明らかにして病態のステージに合ったアプローチをすることが必要と考えられる。

NAFLD の発症および進展機序として、近年提唱されているのが multiple parallel hits hypothesis すなわち、食事因子、遺伝的素因、アディポカイン、酸化ストレス、腸内細菌、運動不足などの種々の因子が並行して肝臓に作用し NAFLD や NASH の病態形成に関与しているという説である⁽²⁾。さらに、小胞体ストレスが NAFLD の進行に関わっていることが報告されている⁽³⁾。小胞体ストレスとは、ミスフォールドタンパク質が小胞体内に蓄積することによって生じるストレスである。これが小胞体ストレスセンサーによって感知され、小胞体ストレスを除去しようと小胞体ストレス応答が誘導されるが、この応答経路がインスリン抵抗性、肝脂質蓄積、炎症に関与することで NAFLD の病態形成に影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

NAFLD 改善効果については、種々の食品成分や薬剤について研究が行われているものの、適切な動物モデルが存在しないのが現状である。そこで本研究では、比較的短期間で NASH の病態を再現することを目指し、小胞体ストレスを惹起する因子であるツニカマイシン (Tunicamycin : TM) の影響について調べることにした。TM は、糖鎖修飾酵素を阻害することで異常タンパク質の蓄積を促し小胞体ストレスを招く物質である。TM による NAFLD 誘発の影響については複数の報告がある。C57BL/6J マウスを用いた実験では、TM により NASH に特徴的な所見が観察されたが⁽⁴⁾、その一方でメタボリックシンドロームモデルの *foz/foz* マウスに高脂肪食を与えた実験では、さらに TM を投与することによる NASH の病態への影響は見られなかったと報告されている⁽⁵⁾。このように、TM による小胞体ストレス誘導が NAFLD に及ぼす影響はマウスの系統、飼料組成、飼育期間等の種々の因子によって左右されると考えられる。そこで本研究では飼料中の脂質含量の違いに着目し、通常食と高脂肪食で飼育したマウスに対して TM を投与した際の影響について明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2-1. 動物

4 週齢の C57BL/6J 雄性マウス 25 匹は日本エスエルシー株式会社より購入し、通常食で 10 日間馴化飼育した後、各群の平均体重が均一になるように通常食群 (C 群)、通常食 + TM 投与群 (CT 群)、高脂肪食群 (H 群)、高脂肪食 + TM 投与群 (HT 群) の 4 群に分けた (n=6~7)。C 及び CT 群には AIN93G に準拠した脂質を 5% (w/w) 含む通常食を、H 及び HT 群には脂質を 20% (w/w) 含む高脂肪食をそれぞれ与え、8 週間飼育した。飼料組

成は表 1 に示した。マウスは室温 $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 7\%$ 、12 時間の明暗サイクル下で飼育し、飼料並びに水は自由摂食とした。

ツニカマイシン (TM) は和光純薬工業株式会社より購入し、 $150 \mu\text{mol/L}$ グルコース溶液 (ジメチルスルホキシドを 0.5% 含む) に溶解し、本飼育から 8 週間後に CT 及び HT 群のマウスに体重 1g あたり $2 \mu\text{g}$ を腹腔注射により単回投与した。C 及び H 群には、グルコース溶液のみを同様に投与した。投与から 24 時間後にイソフルラン麻酔下で採血及び解剖を行った。血液はペパリン処理をしたものを遠心分離 (4°C 、 $1000g$ 、15 分) し、血漿を -80°C で保存した。肝臓は、一部を組織観察用に 4%ホルムアルデヒドに浸漬し、その他は切り分けて -30°C または -80°C で保存した。また、腎周囲脂肪並びに副睾丸周囲脂肪は重量の測定のみを行った。

なお、本研究は北里大学動物実験委員会の承認を得た後に「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守して実施した。

表 1 飼料組成 (g / kg)

	通常食	高脂肪食
<i>t</i> -BHQ	0.014	0.014
L-シスチン	3	3
ビタミン混合	10	10
ミネラル混合	35	35
セルロース	50	50
スクロース	252	252
α -コーンスターチ	400	250
コーンオイル (VE free)	50	200
カゼイン	200	200

2-2. 肝臓総脂質の抽出

肝臓中の総脂質は、Folch 法⁽⁶⁾で抽出した。肝臓 0.45g に無水硫酸ナトリウムを加えて乳鉢ですり潰し、クロロホルム:メタノール=2:1 を加えてよく攪拌し、濾過をしながら 25mL にメスアップした。試験管に抽出液 250 μL と 1% TritonX-100/エタノールを 250 μL 入れて混合し、 50°C のヒートブロックで一晩濃縮した。試験管に蒸留水を加えて溶解したものを肝脂質抽出液とした。

2-3. 肝臓及び血漿中のトリアシルグリセロール (TG) 量の測定

血漿及び 2-2 で得られた肝脂質抽出液を試料とし、トリグリセライド E テストワコー (和光純薬工業株式会社) を使用して測定を行った。

2-4. 血漿中のアミノトランスフェラーゼ活性の測定

血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 並びにアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は、トランスアミラーゼ C II テストワコー (和光純薬工業株式会社) を使用して測定を行った。

2-5. 肝臓の小胞体ストレス関連タンパク質発現量の測定

小胞体ストレスシグナル伝達経路である C/EBP-homologous protein (CHOP)、eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) のリン酸化、sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) のタンパク質発現量は、ウエスタンブロット法で測定を行った。なお、ハウスキーピングタンパク質として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) も同様に測定した。

肝臓約 0.1g に対して Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を添加した RIPA buffer を 0.9mL 加えてホモジナイズした。ホモジネートを遠心分離 (4°C、15,000rpm、15 分) 後、上清を -80°C で保存した。Lowry 法⁽⁷⁾でタンパク質定量を行い、一定のタンパク質濃度に希釈したタンパク質溶液を SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレン (アトー株式会社) に転写した。メンブレンは 1% ウシ血清アルブミンでブロッキング後、一次抗体 (抗 CHOP、eIF2 α 及びリン酸化 eIF2 α 抗体は Cell Signaling 社、抗 SREBP-1 抗体は Abnova 社、抗 GAPDH 抗体は IMGENEX 社よりそれぞれ購入) と 4°C で一晩反応させ、さらに二次抗体と反応後、化学発光試薬 (Pierce Western Blotting Substrate) による発光強度を化学発光撮影システム (G:BOX Chemi XRQ) で測定した。

2-6. 肝臓の病理組織観察

4%ホルムアルデヒドで固定した肝臓は、札幌総合病理研究所にパラフィンブロック作製、凍結ブロック作製、凍結切片作製及び Oil Red O 染色を委託した。パラフィンブロックはミクロトームで薄切し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を行った。染色後のスライドは、光学顕微鏡 (アズワン株式会社 DA2-180M) で観察した。

2-7. 統計解析

測定結果は、平均±標準偏差で示した。2つの要因 (飼料組成並びに TM 投与の有無) による影響は二元配置の分散分析を行い、交互作用が有意だった場合には下位検定として Bonferroni の多重比較検定により群間の差を比較した。統計解析は SPSS (version11.0) を用いた。

3. 結果

3-1. 摂食量、体重及び臓器重量への影響

本飼育期間中の総摂食量、本飼育開始時及び解剖直前の体重、肝臓、腎周囲脂肪及び副睾丸周囲脂肪重量を表 2 に示した。摂食量は高脂肪食を摂取した H 及び HT 群で少ないが、これは同重量あたりのエネルギーが高脂肪食の方が高いためである。最終体重、肝臓、腎周囲脂肪及び副睾丸周囲脂肪重量は、高脂肪食を摂取した群で有意に高く、特に脂肪組織は 2 倍程度に増加した。一方、TM 投与による体重や臓器重量への影響は見られなかった。

3-2. 肝脂質蓄積への影響

解剖時の肝臓の写真を図 1 に示した。大きさは重量で示されたのと同様に高脂肪食を摂取した群 (H、HT 群) で大きかったが、白色化 (脂肪化) していたのは TM を投与した群

(CT、HT 群) だった。

肝臓中の TG 量 (図 2 左) は、CT 群と HT 群で高く、飼料の影響ではなく TM 投与によって増加した。これは肝臓の白色化の結果と一致している。血漿中の TG 量 (図 2 右) は、肝臓中の TG 量と逆の挙動を示し、TM 投与によって有意に減少した。また交互作用も見られ、多重比較検定の結果 CT 群の血漿中 TG 量は C 及び H 群よりも有意に低かった。

肝臓 Oil Red O 染色の顕微鏡画像を図 3 に示した。脂肪滴 (赤色) は、C 及び H 群ではほとんど観察されなかった。一方、CT 及び HT 群で脂肪滴が観察され、特に CT 群では顕著に赤かったことから、Oil Red O 染色の結果では CT 群が最も肝臓中の脂質が多いことが示された。

肝臓 HE 染色は全ての個体について観察を行ったが、特徴的だったものを図 4 に示した。CT 群では 6 匹のうち 1 匹に大滴性の脂肪が多数見られたが、残りの 5 匹では見られなかった。HT 群では 6 匹のうち 3 匹に幾つかの大滴性脂肪が見られた。HE 染色の結果を平均的に見ると、TM 投与によって肝脂肪変性が誘発される傾向が見られたものの、個体差があり CT 群と HT 群との明らかな差は見られなかった。

表 2 飼料摂取量、体重及び臓器重量 (g)

	総摂食量	開始時体重	最終体重	肝臓重量	腎周囲 脂肪重量	副睾丸周囲 脂肪重量
C 群	231.1±29.3	18.2±2.3	29.6±2.5	1.33±0.12	0.35±0.19	0.81±0.29
CT 群	249.1±21.4	18.9±1.1	27.8±3.2	1.28±0.19	0.31±0.17	0.75±0.36
H 群	186.5±21.7	18.8±0.9	33.4±3.8	1.46±0.25	0.62±0.18	1.38±0.46
HT 群	185.6±20.3	18.8±0.8	33.5±2.8	1.45±0.13	0.67±0.16	1.61±0.44
飼料	P<0.001	N.S.	P<0.01	P<0.05	P<0.001	P<0.001
TM	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
交互作用	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

N.S. : 有意差なし

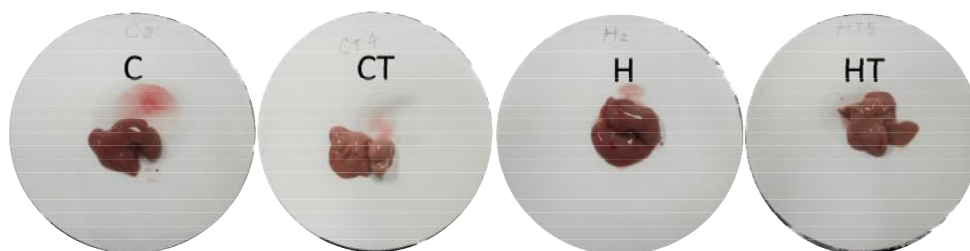


図 1 解剖時の肝臓の写真

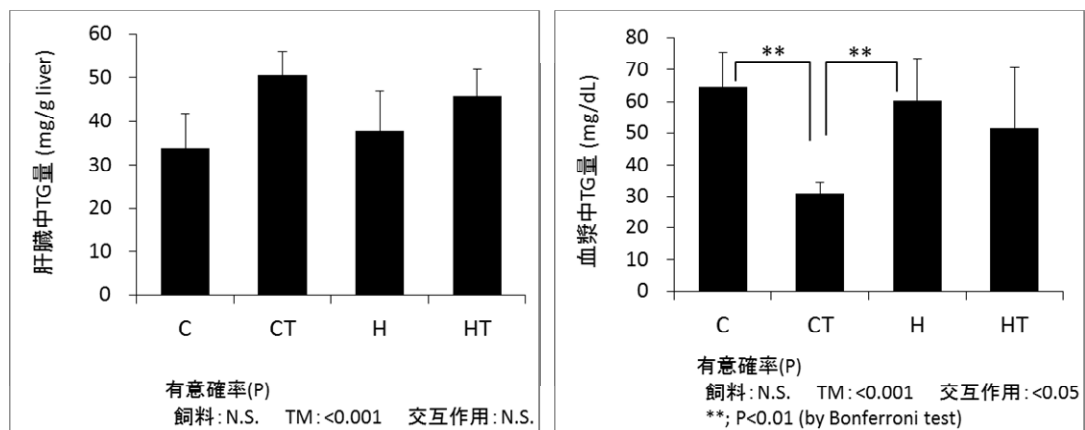


図2 肝臓及び血漿中のTG量 (左: 肝臓、右: 血漿)

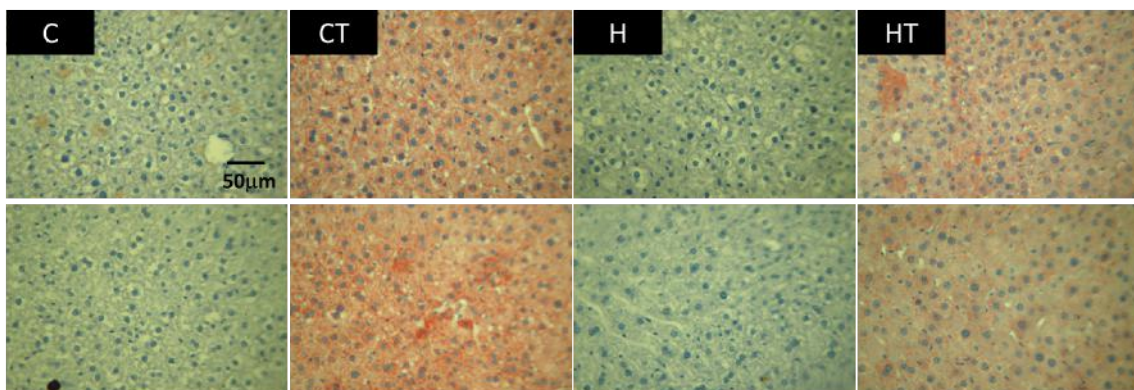


図3 肝臓 Oil Red O 染色後の顕微鏡画像 (×400、n=2)

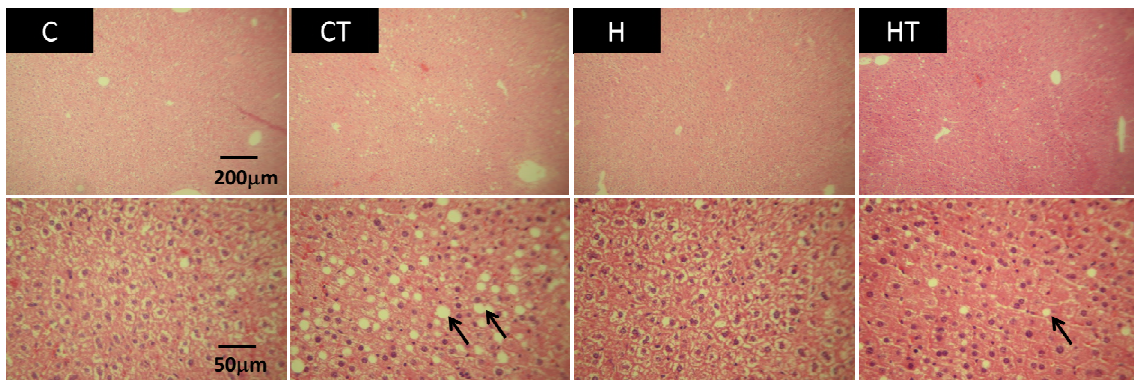


図4 肝臓 HE 染色後の顕微鏡画像 (上: ×100、下: ×400、矢印は脂肪化を示す。n=1)

3-3. 肝損傷マーカーへの影響

血漿のAST及びALT活性を図5に示した。TM投与によってAST並びにALTが上昇したが、飼料による影響は見られなかった。

一方、HE染色(図4)の結果からは、肝臓における炎症の所見はいずれの群でも観察されず、今回の条件では病理組織レベルでの炎症には至らなかったと考えられる。

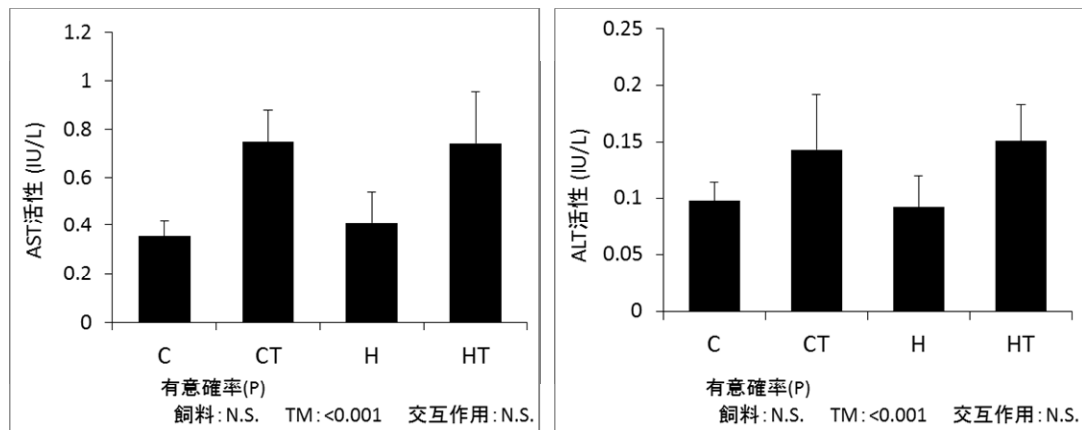


図5 血漿中のアミノトランスフェラーゼ活性 (左: AST、右: ALT)

3-4. 小胞体ストレスマーカーへの影響

小胞体ストレスシグナルと肝脂質蓄積との関連について図6に示した。本研究では図6左に記載したPERK系に着目し、eIF2 α のリン酸化とCHOP、SREBP-1cのタンパク質発現量を測定した。その結果(図7)、最も上流のeIF2 α のリン酸化については4群間の差は見られなかったものの、CHOPタンパク質発現量は、TM投与によって顕著に増加し、TMを投与した群には一過的な小胞体ストレスが誘発されたことを確認した。しかし、飼料によるCHOPへの影響は見られなかった。SREBP-1cタンパク質発現量については、CT群において高い個体が見られたが、全個体の発光強度(SREBP-1c/GAPDH)を数値化して比較をした結果4群間の有意差はなく(図示せず)、TM投与並びに飼料組成はSREBP-1cタンパク質発現量にほとんど影響しなかったと考えた。

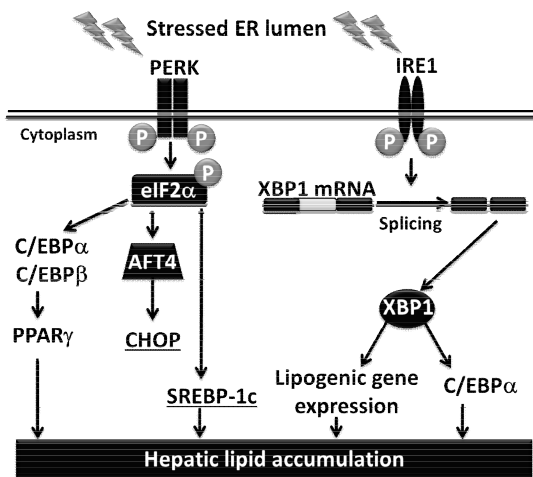


図6 小胞体ストレスシグナルと肝脂質蓄積との関係

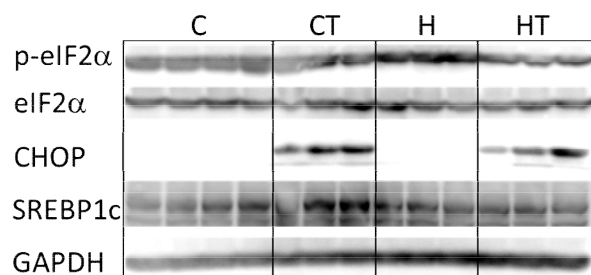


図7 小胞体ストレスマーカーのタンパク質発現量

4. 考察

本研究では TM 投与による NAFLD 発症に飼料組成がどのような影響を与えるのかについて評価を行い、特に肝臓への脂質蓄積に影響が見られた。肝脂質の起源として、食事由来の TG、脂肪組織から流入する脂肪酸、肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成の 3 つが挙げられる。実際に NAFLD 患者における肝脂質の起源については、遊離脂肪酸に由来する TG が約 59%、脂質 *de novo* 合成に由来する TG が約 26%、食事に由来する TG が約 15% であることが報告されているため⁽⁸⁾、脂肪組織からの遊離脂肪酸流入と肝臓における脂肪酸合成を制御することが NAFLD の発症及び増悪を抑制するために重要であると考えられる。

脂肪組織からの脂肪酸の流入に関しては、高脂肪食を摂取したことで脂肪組織量が増加したが、H 群と HT 群で脂肪組織重量に差が無かったことから小胞体ストレスの誘導により遊離脂肪酸が急性的に肝臓へ流入するという現象は見られなかった。肝細胞における脂質蓄積に関わる因子と小胞体ストレスによる影響について、図 8 に示した。小胞体ストレスによる肝脂質増加の要因として、脂肪酸 *de novo* 合成の促進、VLDL 分泌の抑制及び VLDL 受容体の増加が寄与している。脂肪酸 *de novo* 合成については、小胞体ストレスが肝脂質の増加並びに SREBP-1c の活性化を惹き起こすことが細胞及び動物レベルで報告されており^(4,9)、またアルコール誘発性の脂肪肝において小胞体ストレスと SREBP-1 を介する経路が重要であることが報告されている⁽¹⁰⁾。VLDL 分泌の抑制については、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸によって小胞体ストレスが誘導されるとともに VLDL の分泌阻害を起こすこと⁽¹¹⁾が示唆されている。さらに VLDL 受容体の増加については、TM による小胞体ストレスが肝臓の VLDL 受容体の発現増加を介して脂肪肝を発症することが報告されている。本実験では、TM 投与によって肝臓中 TG 量の増加及び血漿中 TG 量の減少が見られたため、先行研究から推察するに CT 群及び HT 群に見られた脂肪肝は VLDL の分泌あるいは受容体への影響といったリポタンパク質輸送が関与していると考えられる。本研究では CHOP タンパク質発現量の結果より TM 投与によって小胞体ストレスが誘導されたことが確認されたが、飼料の脂質含量の違いによる小胞体ストレスそのものへの影響は見られなかった。また、小胞体ストレスによって誘導されると予想していた SREBP-1c のタンパク質発現量に大きな影響は見られなかった。本実験は TM 投与 24 時間後のみで検討を行ったため CHOP タンパク質発現量のみの変動しか見られなかったが、単回ではなく複数回投与して小胞体ストレスを継続して惹起した場合には SREBP-1c の上昇や肝脂肪変性が見られる可能性も考えられる。

飼料の影響については、血漿中 TG 量は CT 群で特に抑制されたが、肝臓 TG 量は CT 群と HT 群で差が見られなかった。一方、Oil Red O 染色の結果ではあらかじめ高脂肪食を摂取していた HT 群よりも通常食を摂取していた CT 群の方が TM 投与によって顕著な肝脂質蓄積を惹き起こした。TG 定量と Oil Red O 染色の結果が一致しなかった理由として、肝臓中 TG 定量の方法が考えられる。この方法は肝臓中の脂質を抽出した後、脂肪酸とグリセロールに分解しグリセロール量を測定することで TG 濃度として換算するものである。肝臓中の遊離のグリセロールは水溶性のため抽出の際に混入することはないと考えられるが、グリセロールではなく脂質を直接的に測定する手法を取り入れることは今後の課題であると考えられる。もう一つ、Oil Red O 染色では TG 以外の脂質も染色されることも異なる結果となった理由と考えられる。

上記のように肝脂質について分析内容による多少の差異は見られたものの、Oil Red O 染色の結果から通常食に TM を投与した群で顕著に肝脂質の増加が確認されたことは本研究による新たな発見であった。高脂肪食のみでは肝臓ではなく脂肪組織に脂質が蓄積するだけで NAFLD の悪化は見られず、むしろ通常食すなわち“高炭水化物食”摂取により TM 刺激を加えることによる肝脂肪化が進んだと推察される。本研究で用いた飼料についてたんぱく質 (P)、脂質 (F)、炭水化物 (C) のエネルギー比率を飼料組成より算出すると、通常食は P : F : C = 21 : 12 : 67 (%エネルギー)、高脂肪食は P : F : C = 18 : 39 : 43 (%エネルギー) となる。日本人の食事摂取基準 2015 年版⁽¹²⁾に策定されている目標量(脂質 20~30%エネルギー、炭水化物 50~65%エネルギー)と比較すると、通常食として用いた飼料は炭水化物が若干多く、高脂肪食として用いた飼料は脂質がかなり多いものであることが分かる。しかし、脂質については二重結合の数に基づく分類によって生活習慣病との関わりが異なることがわかっており、飽和脂肪酸が小胞体ストレスを誘導するという報告もある⁽¹³⁾。本研究で用いたコーンオイルには飽和脂肪酸が少なく多価不飽和脂肪酸が多いことも、高脂肪食摂取群において小胞体ストレスを介した脂肪肝を誘発しにくかった要因の 1 つと推察される。高炭水化物食摂取による肝脂質増加のメカニズムについては本研究で明らかにすることはできなかったが、Oil Red O 染色の結果から CT 群における肝脂質蓄積は小胞体ストレスと高炭水化物食が相乗的に作用しており、高炭水化物によって小胞体ストレスが増強された可能性が考えられた。実際に、高炭水化物食の長期摂取により小胞体ストレス及び脂質合成の亢進が報告されている⁽¹⁴⁾。一方、Li ら⁽¹⁵⁾の報告によると動物実験において高炭水化物食群が高脂肪食群よりも顕著な脂肪肝を誘発し、silent information regulator T1 (SIRT1)及び AMP-activated protein kinase (AMPK)の抑制を介して脂肪酸合成の亢進並びに脂肪酸β酸化の抑制が関連することが示唆されている。したがって、今後の課題として CHOP 以外の小胞体ストレスマーカーについても検討を行うとともに多方面からメカニズムを探る必要があると考えられる。

脂肪肝以外の NAFLD の指標に関しては、本研究条件では NASH と言える病態を引き起こすに至らなかった。これは、AST 並びに ALT の上昇は見られたものの病理組織学的には NASH に特徴的な肝細胞の風船用肥大や炎症が見られなかったためである。Lee ら⁽⁴⁾は、3 ヶ月齢の C57BL/6J マウスに TM を 2µg/g B.W. で投与し 8 または 30 時間後に解剖を行った結果、特に 30 時間後の群において肝臓の脂肪化、好中球の浸潤(炎症)、線維化、SREBP-1c の活性化を認めたことを報告している。一方 Legry ら⁽⁵⁾は、高脂肪食によりメタボリック シンドロームを惹き起こすとされている *foz/foz* マウスに 5 週間高脂肪食を与え、さらに 1 週間後から TM 10ng/kg B.W./day を 4 週間投与した結果、TM 投与による NASH の指標への影響は無かったことを報告している。後者においては、TM 非投与群でも NASH が進行していたために 2 群間での差が見られなかったことも考えられる。このように、動物の種類、TM の投与量、飼料組成等によって肝臓への影響が大きく異なるため、種々の要因について条件を精査することはモデル動物の作成において重要である。

生活習慣病モデルマウスについては近年多くの研究者によって検討が行われており、その一つに高スクロースや高フルクトース食がある。高フルクトース食摂取により小胞体ストレスが誘導され、SREBP-1c の活性化および肝脂質蓄積が亢進したことが動物実験で報告されている⁽¹⁶⁾。本研究では炭水化物源としてα-コーンスターチとスクロースを用い、さ

らに油脂との置き換えは α -コーンスターチとした。しかし高脂肪食よりもむしろ高炭水化物による脂肪肝誘発の可能性が示唆されたため、今後は特定の種類の炭水化物の組成を調節することにより NAFLD が進行したモデルの構築を検討することが必要と思われる。

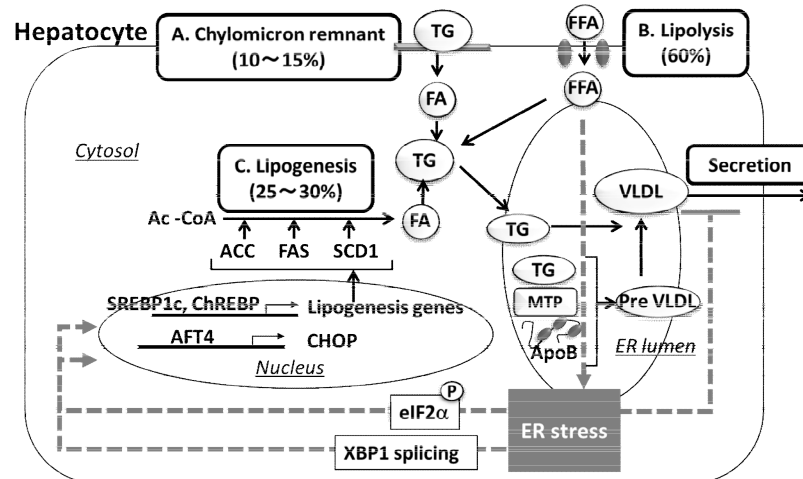


図8 肝細胞における脂質蓄積に関わる因子と小胞体ストレスによる影響

5. 結論

小胞体ストレス惹起剤としてTMをマウスの腹腔内に投与したところ、脂肪肝が誘発し、さらに肝損傷マーカーであるASLとALTが上昇した。また、高脂肪食との併用により病態が悪化することを予想していたが、高脂肪食よりもむしろ通常食（高炭水化物食）で飼育したマウスの方が小胞体ストレスによる肝脂質蓄積の影響を受けやすいことが示唆された。しかしながら、NASHに特徴的な病理的所見である風船様肥大や炎症性細胞浸潤などはどの群においても観察されなかったことから、NASHのモデル構築のためには、さらなる工夫が必要である。

6. 謝辞

本研究の実施にあたり、ご助言をいただきました北里大学保健衛生専門学院・臨床検査技師養成科の小丸圭一先生、小菅優子先生、管理栄養科の小林健司先生に、心より御礼申し上げます。

引用文献

- (1) Eguchi Y et al. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*, 2012; 47: 586-595.
- (2) Tilg H et al. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypotheses. *Hepatology*, 2010; 52: 1836-1846.
- (3) Dara L et al. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology*, 2011; 55: 1752-1763.
- (4) Lee JS et al. Pharmacologic ER stress induces non-alcoholic steatohepatitis in animal model. *Toxicol Lett*,

- 2012; 211: 29-38.
- (5) Legry V et al. Endoplasmic reticulum stress does not contribute to steatohepatitis in obese and insulin-resistant high-fat-diet-fed foz/foz mice. *Clin Sci*, 2014; 127: 507-518.
 - (6) Folch J et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem*, 1957; 226: 497-509.
 - (7) Lowry OH et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193: 264-275
 - (8) Donnelly KL et al. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 2005; 115: 1343-1351
 - (9) Fang DL et al. Endoplasmic reticulum stress leads to lipid accumulation through upregulation of SREBP-1c in normal hepatic and hepatoma cells. *Mol Cell Biochem*, 2013; 381: 127-137
 - (10) Ji C et al. Predominant role of sterol response element binding proteins (SREBP) lipogenic pathways in hepatic steatosis in the murine intragastric ethanol feeding model. *J Hepatol*, 2006; 45: 717-724
 - (11) Ota T et al. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest*, 2008; 118: 316-332
 - (12) 菱田明、佐々木敏ら・日本人の食事摂取基準 2015 年版, 東京 : 第一出版. 2014 ; 158
 - (13) Wei Y et al. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 291: E275-281
 - (14) Semiane N et al. High carbohydrate diet induces nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) in a desert gerbil. *C R Biol*. 2017; 340: 25-36.
 - (15) Li X et al. Isocaloric Pair-Fed High-Carbohydrate Diet Induced More Hepatic Steatosis and Inflammation than High-Fat Diet Mediated by miR-34a/SIRT1 Axis in Mice. *Sci Rep*. 2015; 26:16774
 - (16) Zhang C et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol Lett*, 2012; 212: 229-240

The influence of diet composition on fatty liver disease induced by endoplasmic reticulum stress

Chie Takahashi^{*1}, Atsushi Imai^{*1}, Kentaro Watanabe^{*1},
Takuya Watanabe^{*1}, and Chikako Kiyose^{*2}

^{*1}Department of Applied Clinical Dietetics,
Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences

500 Kurotsuchishinden, Minamiuonuma, Niigata 940-7241, Japan

^{*2}Department of Nutrition and Life science, Kanagawa Institute of Technology
1030 Shimoogino, Atsugi, Kanagawa 243-0292, Japan

Abstract

In recent years, the number of people suffering from non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has increased. In addition to dietary factors, genetic predisposition, adipokine, oxidative stress, and intestinal bacteria, endoplasmic reticulum (ER) stress can be mentioned one of the factors that are involved in the development of NAFLD. In this study, we investigated the influence of tunicamycin (TM) as an ER stress inducer on the liver of C57BL/6J mice fed normal diet or high fat diet for 8 weeks, for the purpose of constructing an animal model necessary for research on NAFLD prevention or amelioration effect.

As a result, triacylglycerol (TG) in the liver increased and TG in the plasma decreased by TM administration in both normal diet group and high fat diet group. The TG in the plasma was particularly decreased in the normal diet + TM administration group. In addition, as a result of liver Oil Red O staining, more lipids were observed in the normal diet + TM administration group than in the high fat diet + TM administration group. Although the protein expression level of C/EBP-homologous protein (CHOP), one of the ER stress markers, and plasma AST and ALT activity increased with TM administration, no effect of feed composition was observed. Moreover, the protein expression level of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) involved in fatty acid synthesis was not affected by feed or by TM administration.

In conclusion, normal diet which means high carbohydrate diet is more likely to cause endoplasmic reticulum-induced fatty liver than high fat diet.

Keyword

NAFLD, steatohepatitis, tunicamycin, endoplasmic reticulum stress, high fat diet

(Received : April 28, 2017 / Accepted : June 23, 2017)

凍結加温手術装置の基礎研究

二重管構造を用いた手術用プローブの作製と評価

高橋 大志, 田口 洋介, 相田 武則

北里大学保健衛生専門学院 臨床工学専攻科
〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

要旨：

本研究では、手術用プローブを細径化することを目的として、二重管構造を用いた凍結加温手術装置用の手術用プローブを作製し性能を評価した。プローブの作製では、エタノールに耐性のあるポリカーボネートパイプ（内径φ16 mm）に外径φ10 mmのポリカーボネートパイプを挿入し固定した。外筒のポリカーボネートパイプに、アルミニウムで作製したペルチェ素子固定用の治具を取り付けた後、その治具にペルチェ素子を熱伝導性接着剤で取り付けることで二重管構造の手術用プローブを作製した。本手術用プローブを冷媒循環システムに取り付けることで二重管手術用プローブを有する凍結加温手術装置を構築した。手術装置の性能評価では、 -60°C に予冷したエタノールを冷媒として循環させてペルチェ素子に電力を供給した結果、手術用プローブチップの温度は急激に低下し、最低温度は $-44.0 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ （ $n=3$ ）に到達した。その後は緩やかに温度が上昇し、冷媒の循環開始から30分後の実験終了時には -31.8°C まで上昇した。また、循環エタノール温度は冷媒循環を開始した直後から上昇し、実験終了時には -21.6°C まで上昇した。また、本手術装置を温度サイクル試験に供したところ、冷凍と加温ができることを確認し、新規に開発した二重管の手術用プローブにおいても凍結加温手術が実施できる可能性が示唆された。

キーワード：

凍結加温手術, 凍結手術, 温熱療法, ペルチェ素子, 手術装置

(投稿日：2017年4月28日／受理日：2017年6月23日)

1. 諸言

近年、悪性腫瘍に対する外科的治療において、開腹などを伴う一般的な外科手術の他にも、患者に対する負担が少ない低侵襲な内視鏡治療も実施されるようになってきた。悪性腫瘍の外科的治療における低侵襲療法には、先にあげた内視鏡によるもの他にも凍結手術（冷凍手術）や温熱療法といった熱を治療に応用する手法が注目を集めている^(1, 2)。

凍結手術は対象組織を冷凍することで生じる生体反応（凍結壊死）を利用した手術方法である。凍結壊死の発生機序として、組織冷凍によって細胞内外に氷結晶が生じ細胞構造が機械的な傷害を受けるほか、氷結晶生成による細胞脱水や電解質の異常濃縮に伴う pH 変化によるタンパク質の変性、そして微小循環系障害による酸素や栄養の供給停止に伴って壊死が生じると言われている^(3~6)。凍結手術は、低侵襲であることから外科的に切除不能とされた症例に対しても適用できる可能性があることや手術後の機能障害が外科的な切除と比べて少ないこと、さらには冷凍手術後に免疫が誘導される可能性が存在するといった多くの利点があげられている⁽³⁾。しかし、対象組織を確実に凍結壊死させるために組織温度を -20°C （対象組織や部位によって -40°C ）以下にする必要があり、組織冷凍が不十分となった場合には、悪性腫瘍が増悪する可能性があるなど、問題点も指摘されている。特に血管に隣接している悪性腫瘍を治療する場合には、血流によって常に加温効果が生じることとなり凍結手術装置には大きな冷凍能力が必要となる。このようなことから、冷凍源としては液体窒素やアルゴンガスなどが用いられている。しかし、これらの冷凍源を用いた場合には装置が大型化し小型化が難しいことや手術用プローブ温度の精密な制御は困難であると考えられる。

他方、温熱療法は組織を 42.5°C 以上まで加温することで破壊する治療法であり、タンパク質の熱変性などといった直接的な熱影響が組織破壊の機序となっている^(2~5)。温熱療法は放射線療法や化学療法と組み合わせることで、各治療の効果を向上させることができる点や外科的治療と組み合わせることで適用が可能であるといった利点がある。しかし、組織を加温した場合には、加温後に熱ショック蛋白（Heat Shock Protein : HSP）が誘導され、特に温熱耐性に深く関与する HSP70 ファミリーが発現して温熱耐性を獲得してしまう問題がある^(3~5)。また、血管周辺に存在する腫瘍組織の加温においては、血流が凍結手術時の加温作用とは逆の作用、つまり放熱作用として働いてしまうことから対象組織の温度を上昇させることは難しいといった問題もあげられる。

以上の問題点を解決するため、我々はこれまでに凍結手術と温熱療法を組み合わせた手術法である凍結加温手術を提案し、電力供給のみで冷却と加温が可能な電子冷却素子であるペルチェ素子を用いて凍結加温手術が実施可能な手術装置を開発してきた^(3~5, 7~10)。その中で凍結加温手術を生体組織に対して実施した結果、凍結加温手術における組織破壊の様相が凍結手術単体や温熱療法単体と比較して高度であったという結果が得られた^(3~5, 9, 10)。しかし、これまでに作製した手術装置は、スターリングクーラにペルチェ素子を直結させた構造であったり、手術用プローブを塩化ビニル製のパイプ（外径 $\phi 30\text{ mm}$ 程度）と真鍮の円板にペルチェ素子を固定して作製したりしていたことから、プローブサイズが大きく生体内部に適用することは困難であったことやプローブの構造的にも細径化や小型化が困難であった。そこで本研究では、手術用プローブの小型化・細径化を目的として新規な手術用プローブを開発し性能評価を行った。

2. 実験方法

2.1 二重管手術用プローブの作製

これまでの手術用プローブは、手術用プローブ内に小型の冷媒チャンバ（8ml 程度）を設け、さらに上蓋と下蓋を真鍮で作製することによって熱容量を向上させてペルチェ素子の放熱を促す構造としていた。しかし、この構造ではプローブサイズの細径化や小型化が困難であるため、新規のプローブ開発においては手術用プローブにはチャンバを設けない構造で、さらに冷媒がプローブ内に円滑に流入出できる構造にするとした結果、二重管構造による手術用プローブを考案し作製を試みた。

二重管構造の手術用プローブは、太いパイプ（冷媒流出用パイプ）に細いパイプ（冷媒流入用パイプ）が挿入され、その端面にはペルチェ素子を固定した放熱治具が取り付けられた構造となっている（Fig.1）。手術用プローブ内における冷媒循環としては、まず予冷されたエタノールが冷媒チャンバから流入用パイプ内に流入し、ペルチェ素子の放熱治具を冷却した後に、流出用パイプと流入用パイプ間の間隙を通過して冷媒チャンバに戻るといった経路となっている。手術用プローブの材料選定において、本研究では冷媒にエタノールを用いるため、エタノール耐性があるポリカーボネートを採用することとした。手術用プローブの作製では、流出用パイプには内径φ16 mm（外径φ18 mm）のものを、流入側パイプには外径φ10 mm（内径φ6 mm）のものを使用した。流入用パイプを流出用パイプの内側に固定するための治具を、ポリカーボネートを用いて冷媒循環に影響が生じにくいように小型のものを作製して取り付け、接着剤にて固定した。また流出側パイプには横穴をあけ、そこにポリカーボネートパイプを接着剤で固定して流出口とした。この流出口がある側にはエタノールが円滑に流れ込めるようにするため、上蓋をテーパ加工して作製し取り付けした。他方、ペルチェ素子（外形寸法 15×15×3.1 mm、最大吸熱量 14.3W、FPH1-3106NC、Z-MAX 社製）の固定及び放熱治具の作製では、アルミニウムを流出側パイプの内径と同じサイズになるように卓上旋盤を用いて円筒形に切削した後、内側も肉厚が1 mmとなるように卓上旋盤にてザグリ加工を行った。さらに、ペルチェ素子を固定するための溝を卓上フライス盤で加工した。その治具を接着剤で外筒に取り付け、その治具に熱伝導性接着剤を用いてペルチェ素子を固定した。ペルチェ素子のもう一方の端面には、温度測定用の熱電対を挿入するための穴を開けた円錐台形のプローブチップを熱伝導性接着剤で接着した。以上の様に部材を加工し組み上げることで二重管構造を持つ手術用プローブを作製した。

2.2 二重管手術用プローブの性能評価

2.2.1 最低到達温度の計測実験

2.1 で作製した手術用プローブを、これまでに作製した冷媒循環システムに接続して最低到達温度を計測するための実験を行った（Fig.2）。冷媒循環システムは、二台のスターリングクーラ（SC-UD08、ツインバード工業社製）、流量計（P-100、東京計装株式会社製）、自作のフィルターによって構成される。一台のスターリングクーラには冷媒を貯留するためのチャンバが取り付けられ、もう一台は手術用プローブを通過した冷媒を一次冷却するために冷媒流出経路に設置されている。実験中は二台のスターリングクーラは冷媒を冷却し続けるために -80°C に設定して駆動させた。本実験において、冷媒は液体のエタノール 800ml とし、 -60°C 程度まで予冷した後にギアポンプ（GPU-3、アズワン社製）を用いて流量を 200ml/分として循環させた。また、ペルチェ素子への電力供

給及び温度制御にはプログラム温度制御機能を有する正負両極性電源 (TDU-5000A(R/G)、フェローテック社製) を使用して冷却時の最大電流を 3.3A と設定した。手術用プローブの温度条件としては、25°C で 180 秒経過した後、-80°C を達成させるように制御させた。

作製した二重管手術用プローブの性能を評価するため、実験中は手術用プローブチップ温度、チャンバ内の冷媒流出口付近のエタノール温度、二台のスターリングクーラの先端冷却部温度及び室温をそれぞれ低温における直線性が高い T 型熱電対 (ET-3、CHINO 社製) とデータロガー (GL-220、GRAPHTEC 社製) を用いて 10 秒ごとに 30 分間計測し、計測回数は 3 回として実験終了後に平均化した。

2.2.2 温度サイクル試験による性能評価実験

本手術装置の温度サイクル性能を評価するため、二重管手術用プローブを接続した凍結加温手術装置を温度サイクル試験に供した。温度サイクル試験に当たり、プローブチップの設定温度条件を、25°C (180 秒) → -30°C (120 秒) → 38°C (120 秒) → 45°C (120 秒) とし、-30°C から -45°C までを 3 回繰り返すようにプログラムした。また加温時の最大電流を -2.5A とし、その他の条件は 2.2.1 最低到達温度の計測実験と同様とした。

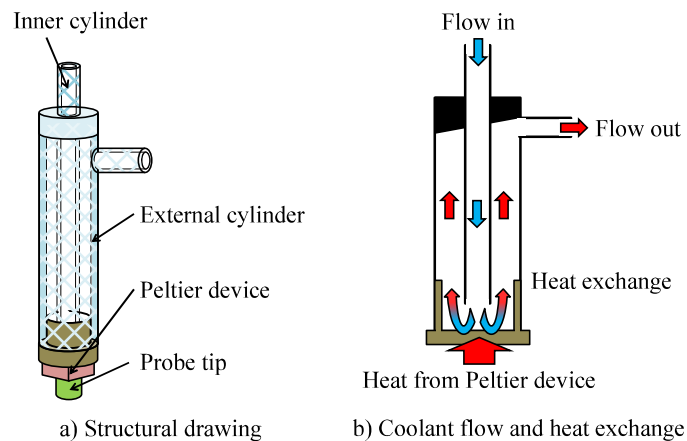


Fig.1 Structure of a double pipe surgical probe

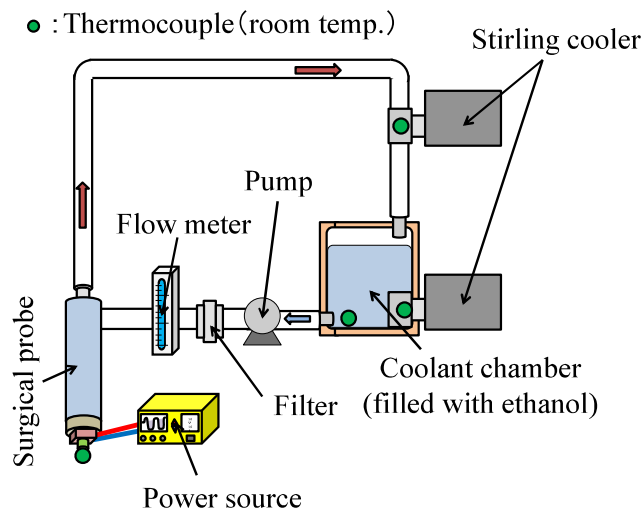


Fig.2 Experimental setup

3. 結果

3.1 二重管手術プローブの作製結果

作製した二重管構造を持つ手術用プローブの写真を Fig.3 に示す。手術用プローブが二重管構造を有していることがわかる。作製後にエタノールを循環させた実験においても、エタノールが漏出するなどの不具合や問題は確認されなかった。

3.2 二重管手術用プローブの評価結果

3.2.1 最低到達温度の測定結果

実験方法 2.2.1 で計測した各点における温度変化を Fig.4 に示す。Fig.4 は冷媒循環を開始した時点から 0 秒としてプロットした結果である。手術用プローブチップの温度は、設定条件である 25℃で 3 分間安定した後に急激に温度が低下し、4 分 40 秒の時点で最低温度となり、その平均温度は $-44.0 \pm 2.4^{\circ}\text{C}$ (n=3) であった。その後は緩やかに温度上昇し、計測終了時点では -31.8°C まで上昇した。温度上昇速度が安定したと考えられる 20 分から 30 分における温度上昇速度は $0.34^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であった。他方、循環エタノールの温度は循環を開始した直後から温度が上昇し、およそ 8 分後からは比較的安定した上昇速度となったことが観察され、実験終了時点では -21.6°C まで上昇した。手術用プローブチップの温度と同様に、温度上昇が安定したと考えられる 20 分から 30 分における平均温度上昇速度は $0.35^{\circ}\text{C}/\text{分}$ であり、手術用プローブチップとほぼ同様であった。また、二台のスターリングクーラの冷却部先端温度は緩やかに上昇したことが観察された。

3.2.2 温度サイクル試験における温度測定結果

温度サイクルに供して温度を測定した結果を Fig.5 に示す (n=1)。Fig.5 より、冷凍と加温が 3 回繰返し実行されたことが確認された。冷凍相 (-30°C 設定) におけるサイクル毎の平均温度は、1 サイクル目が $-29.6 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ 、2 サイクル目が $-30.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、3 サイクル目が $-30.2 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ であった。体温層 (38°C 設定) における平均温度は、それぞれ $38.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、 $37.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $37.8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ であった。加温相 (45°C 設定) における平均温度は、 $43.9 \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ 、 $44.1 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ 、 $43.8 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ であった。冷凍相と体温層では平均温度が設定温度とほぼ同様であったが、加温相では設定温度に対して 1°C 程度の相違が生じていることが観測された。



Fig.3 Photo of the double pipe surgical probe

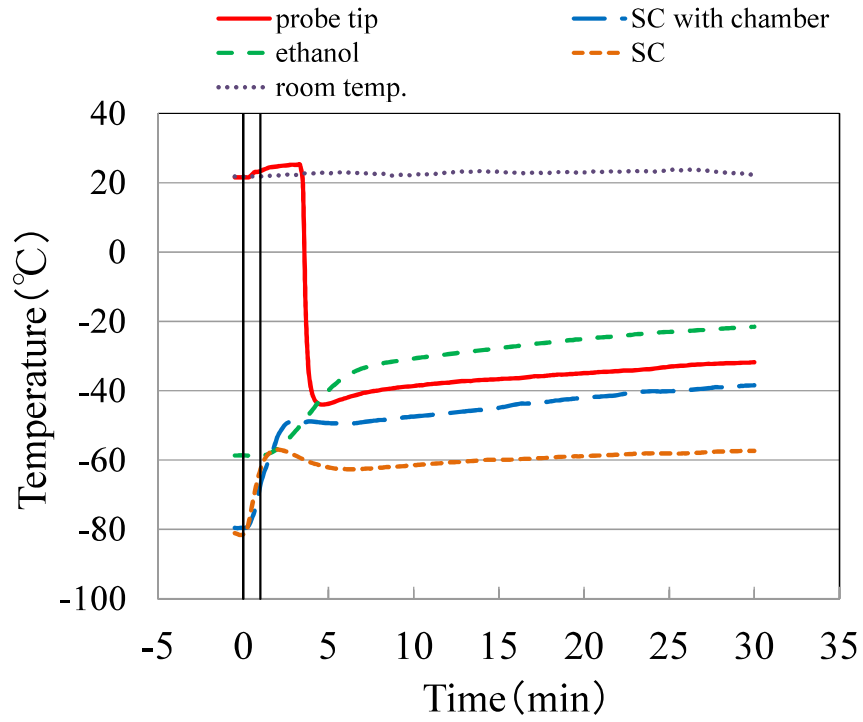


Fig.4 The mean temperature measurements of each point

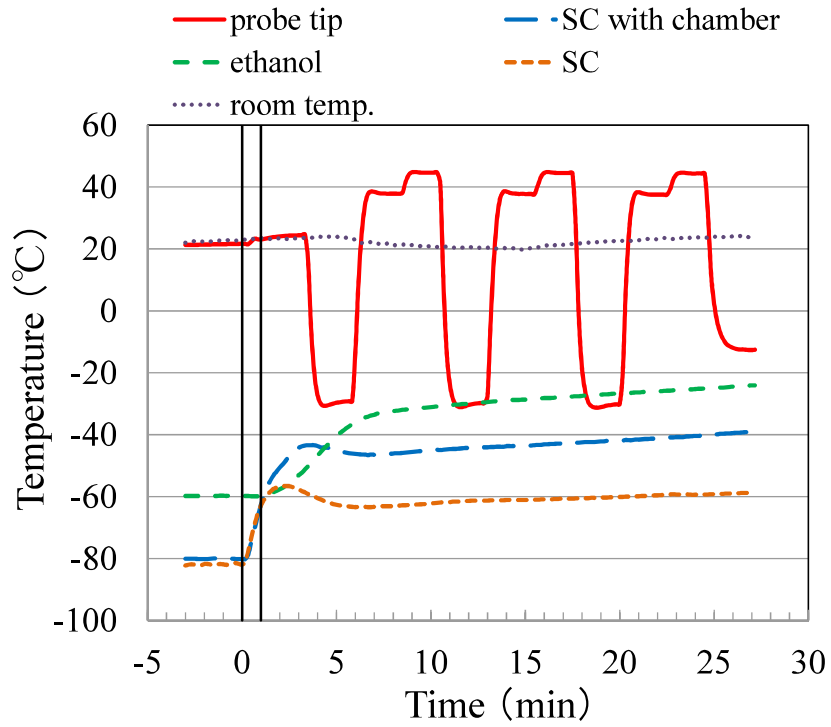


Fig.5 The temperature change in temperature cyclic test

4. 考察

本研究では、手術用プローブの小型化・細径化を目的に、二重管構造を有する手術用プローブを新規に設計し作製した。本研究で開発した二重管手術用プローブには、以前のような小型チャンバがなく、ペルチェ素子に対する放熱能力が低下することが予測されていた。最低温度測定の結果 (Fig.4) において、手術用プローブチップの最低到達温度は平均で -44.0°C であったことが観測され、この最低温度は凍結手術において必要とされる -20°C を下回っており、凍結手術単体としても問題はない結果であった。しかし、以前に報告⁽⁷⁾した小型チャンバ付の手術用プローブを装着した凍結加温手術装置における最低温度は、条件によらず -60°C を下回っており、それと比較するとおよそ 15°C 以上も最低温度が上昇した結果であった。この原因としては、旧型のプローブ構造の様に、真鍮製の上蓋や下蓋が装着された小型チャンバがある場合には、プローブに充填されている冷媒の量や手術用プローブ自体の大きさによって熱容量が大きくなり、本研究で作製した二重管プローブよりも冷熱の蓄熱量によって熱吸収能力 (ペルチェ素子側からみると放熱能力) が高かったことが考えられる。そこで、本研究で開発した二重管プローブにおいても、放熱能力を向上させることで最低到達温度を低下させることが可能であると考えられる。放熱能に関しては、手術用プローブの熱容量を大きくする以外にも、冷媒流量を増加させ放熱部における冷媒流速を上昇させることで放熱能を向上させることができると予測される。以前の報告における冷媒流量はおよそ 150ml/分 であり、本研究では 200ml/分 と1.3倍程度の流量の増加であったことから、チャンバを有さない二重管プローブでは冷媒流量が少なく放熱能力が不足していた結果、大幅な最低温度の上昇につながった可能性が考えられる。また、手術用プローブ及び冷媒エタノールの温度上昇速度が 0.35°C/分 であり、以前の報告⁽⁷⁾のおよそ3倍の温度上昇速度であった。本研究では、手術用プローブに断熱材を装着していなかったことから、旧型プローブに比べて大気中からの熱流入が手術用プローブ部分において多くなったことが最低温度上昇の一因になった可能性が考えられる。また、チャンバからの冷温流入冷媒 (内筒の中の循環冷媒) とペルチェ素子によって加熱された高温流出冷媒 (外筒と内筒間の間隙中の冷媒) が対向流として内筒を介して接触しているため、プローブ内において熱交換が行われていることも原因の一つと考えられる。したがって、今後の研究においては、①冷媒流量を大幅に増加させ放熱能を向上させること、②プローブの断熱構造の検討 (大気からの熱流入を遮断する構造の検討)、③内筒と外筒間における循環冷媒同士の熱交換遮断に関する構造の検討が必要であると考えられる。これらの対策を実施していくことで、十分に最低温度を低下させることができるものと期待される。しかしながら、手術用プローブを小型化する上では放熱能の低下は避けられない課題でもあり、諸言にも記載した通り、凍結手術において対象組織を十分に冷凍できない状態では腫瘍組織が増悪する危険性が高まるといった問題が生じる。そこで、我々は凍結手術と温熱療法を組み合わせることで、凍結手術単体と比較して凍結加温手術では相乗効果によって組織破壊性を向上させることができることを動物実験で確認した^(3-5, 9)。したがって、我々は凍結加温手術においては、一般的な凍結手術に要求される最低温度よりも高い条件で手術が実施されたとしても組織破壊性に対する影響は小さいと考えており、今後は生体組織を対象として冷凍温度と加温温度の組み合わせによる組織破壊効果への影響を調査することが必須な実験になると予想される。この様な開発の方向性に対して、本研究で手術用プロ

ープの小型化の実現性が確認できたことは、今後の装置開発に向けて非常に重要な意味を持っており、今後も手術用プローブの更なる小型化に向けた研究を行っていく予定である。

5. 結論

本研究では、手術用プローブの小型化を目的に、ポリカーボネート製のパイプを用いて二重管構造を持つ手術用プローブを新規に開発した。二重管を用いた手術用プローブの性能を評価した結果、最低到達温度は -44°C であり、凍結手術に要求される最低温度よりも低い結果であったことが確認された。また、温度サイクル試験の結果においても問題なく冷凍-加温サイクルが実行されており、手術用プローブの小型化の実現性が示唆された。今後は最低到達温度を低下させるための手段を検討し、手術用プローブの更なる小型化を進める予定である。

引用文献

- (1) Tian Zhou, Quanwang Li, Xiaoyi Chi, et al., 0°C is better?- Thawing temperature optimization study for cancer cryoablation in a mouse model with green fluorescent protein-labeled Lewis lung cancer. *Cryobiology*, 2017 ; 75 : 80-87.
- (2) Matthew J. Ware, Martyna Krzykawska-Serda1, JasonChak-Shing Ho, et al., Optimizing non-invasive radiofrequency hyperthermia treatment for improving drug delivery in 4T1 mouse breast cancer model. *Scientific Reports*, 2017 ; 7 : 1-9.
- (3) Takahashi D, Takahashi T, Sone K, et al., A Study for Cryosurgery - Hyperthermia Treatment System – The effects of Hyperthermia Treatment Following Cryosurgery-. *Journal of Power and Energy System*, 2008; 2: 1294-1303.
- (4) 高橋 大志, 曾根 和哉, 中村 春樹, 他, 凍結手術後の温熱療法の基礎研究. *生体医工学*, 2007 ; 45 : 11-16.
- (5) 高橋 大志, 曾根 和哉, 福本 一朗, ペルチェ熱電効果を利用した凍結温熱手術の生体組織に対する評価. *日本冷凍空調学会論文集*, 2006 ; 24 : 183-191.
- (6) Omar Kujan, Saleh N. Azzeghaiby, Bassel Tarakji, et al., Cryosurgery of the oral and peri-oral region: a literature review of the mechanism, tissue response, and clinical applications. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 2013; 4: 71-77.
- (7) Daishi TAKAHASHI, Yousuke TAGUCHI, Takenori AIDA, The improvement of the system performance to cool the coolant of cryosurgery and hyperthermia treatment system. *KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO*, 2016 ; 21 : 27-35.
- (8) Daishi TAKAHASHI, Yousuke TAGUCHI, Takenori AIDA, Proposal of the combination treatment system of cryosurgery and hyperthermia treatment using ethanol as coolant. *KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO*, 2015; 20: 19-25.
- (9) Daishi TAKAHASHI, Tomoya TAKAHASHI, Kazuya SONE, et al., The effect of hyperthermic temperature immediately after thawing in cryosurgery to enhance the destruction of mouse liver tissue. *Low Temp. Med*, 2008 ; 34 : 4-8.
- (10) Daishi TAKAHASHI, Haruki NAKAMURA, Kazufumi SHINODA, A basic study of thermal controlling cryosurgery system by Peltier device and free piston stirling cooler. *Low Temp. Med*, 2006 ; 32 : 8-12.

A Basic Study of Double Pipe Surgical Probe Attached to the Combination Treatment System of Cryosurgery and Hyperthermia Treatment

Daishi TAKAHASHI, Yousuke TAGUCHI, Takenori AIDA

Course of Clinical Engineering,
Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences
500 Kurotsuchishinden, Minamiuonuma, Niigata 949-7241, Japan

Abstract :

In this study, a double pipe surgical probe to attach to a combination treatment system of cryosurgery and hyperthermia treatment was fabricated and evaluated. The double pipe surgical probe was made of two Polycarbonate pipes with ethanol resistance. In the fabrication of the probe, the inner cylinder was inserted into the external cylinder attaching Peltier cooling element that the probe tip was boned. The probe was connected to the coolant circulation system. Thus, the combination treatment system of cryosurgery and hyperthermia treatment was developed. In the evaluation of the system performances, liquid ethanol was cooled down to -60 degrees C and was circulated as a coolant. After an electric power was supplied to Peltier device, the temperature of the surgical probe tip rapidly decreased and reached to -44.0 ± 2.4 degrees C (n=3). And the probe tip temperature increased up to -31.8 degrees C. In the result of the temperature cycling test, the process of the freezing and the warming was confirmed three times. These results suggested a possibility that the double pipe surgical probe could performed the combination treatment of cryosurgery and hyperthermia treatment.

Keyword :

Combination treatment, Cryosurgery, Hyperthermia Treatment, Surgical system, Peltier element

(Received : April 28, 2017 / Accepted : June 23, 2017)

嚥下調整食学会分類 2013 を用いた学生の嚥下食評価における

栄養補給法実習の有効性

—主食・主菜間の評価格差から明らかになった教育課題—

柄澤美佳¹⁾、浅田祐一²⁾、佐久間直美¹⁾、野坂匠¹⁾、長谷川美代¹⁾

¹⁾北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科
〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番
²⁾鎌倉女子大学 家政学部管理栄養学科
〒247-8512 神奈川県鎌倉市大船 6 丁目 1 番 3 号

要旨：

わが国の高齢化に伴い、個人の嚥下機能レベルに適合した嚥下食の必要性が増している。この背景のもと日本摂食・嚥下リハビリテーション学会嚥下調整食分類 2013（学会分類 2013）が示され、多くの病院や施設で嚥下食基準作成の取組や施設間連携などが行われている。

本研究では、栄養補給法実習における学会分類 2013 を用いた嚥下食評価を実施し、学生の理解度及び教育課題を検討した。対象者は、平成 26 年～28 年の 3 年間に嚥下障害者に対する栄養補給法実習を受講した学生のうち、解析対象となる 196 名とした。授業は各年において全 2 回実施し、1 回目では講義を行った。2 回目では、主食と主菜から学会分類 2013 において異なるコードに分類される二形態の料理を調理し、学会分類 2013 に基づく主観的評価を行った。統計解析は、学会分類 2013 のコード 0j～4 を 1-6 の 6 段階にコード化し間隔尺度として扱い、学生の各評価から正解の値を減じて変化量とした。料理別の比較に Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc test として Steel-Dwass の方法を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。料理別の比較において主食類で主菜類より正解の値に近く、有意な差があった。

本研究では学会分類 2013 を用いた評価における学生の理解度は主食類で高い一方、主菜類で低く、主菜類の評価について今後の重点教育課題であることが示唆された。

キーワード：

嚥下調整食学会分類 2013、嚥下食、嚥下食評価、栄養補給法実習

（投稿日：2017 年 4 月 28 日／受理日：2017 年 6 月 23 日）

1. 序文

わが国の高齢化率（総人口に占める 65 歳以上人口の割合）は平成 27 年 10 月時点で 26.7% であり、今後も上昇すると推計される⁽¹⁾。死因における肺炎の順位は平成 23（2011）年以降第 3 位となり⁽²⁾、そのうち 97%が高齢者である。更に高齢者の肺炎では、誤嚥性肺炎が 8 割を占めている⁽³⁾。誤嚥性肺炎の発症と嚥下機能との関連が明らかにされており⁽⁴⁾、摂食・嚥下障害者に提供する食事は、個人の摂食・嚥下機能レベルに適合した食事形態を調整した嚥下調整食（嚥下食）が必要である⁽⁵⁾。

現在日本における嚥下食の物性基準として、嚥下食ピラミッド、特別用途食品えん下困難者用食品許可基準、ユニバーサルデザインフード等が存在しているが、統一された嚥下食の段階が存在せず、各病院や施設で多くの名称や段階が混在する現状にある。

このような背景のもと、日本摂食嚥下学会では、2013 年に日本摂食・嚥下リハビリテーション学会嚥下調整食分類 2013（学会分類 2013）の中で、国内の医療・福祉関係者が共通して使用できる嚥下食およびとろみについて段階分類を示した⁽⁶⁾。この段階分類では分類規定に物性測定値を表記せず、食事形態を主体に段階分けを行っている。これは実際の医療・福祉の現場で物性に関する測定を実施出来る機関が多くないからである。学会分類 2013 が提言されたことで、病院や施設での嚥下食基準作成の取組や病診連携、施設間連携などが行われている。

さらに全国の高齢者施設のうち 26.3%の施設では管理栄養士が摂食・嚥下機能に応じた食事提供のみならず、食事形態決定において中心的な役割を担っている⁽⁷⁾との報告があり、今後の管理栄養士養成教育においては、食事形態を主体に各摂食・嚥下障害者の疾患、病態に合わせ対応する能力を獲得させることがますます必要とされる。

こうした社会的要請に対応するために、本学院管理栄養科栄養補給法実習（3 年次前期）では平成 26 年から平成 28 年に各年全 15 回の実習のうち 2 回（360 分間）にわたり、嚥下食をテーマに摂食・嚥下障害者に対する栄養補給法の実際について実習し、嚥下食評価表用紙を用いた学会分類 2013 に基づく主観的評価を行った。

本研究では、回収した嚥下食評価表から嚥下食実習における学生の理解度、および教育課題の検討を目的とした。

2. 方法

(1) 研究期間

平成 26 年 6 月～平成 28 年 7 月

(2) 研究対象

研究対象の選別過程を図 1 に示した。解析項目である嚥下食評価表（図 2）学会分類記入欄が未記入であった 10 名を研究対象から除外した。本研究では、個人の特定を回避するため、連結不可能匿名化した既存情報を用いた。

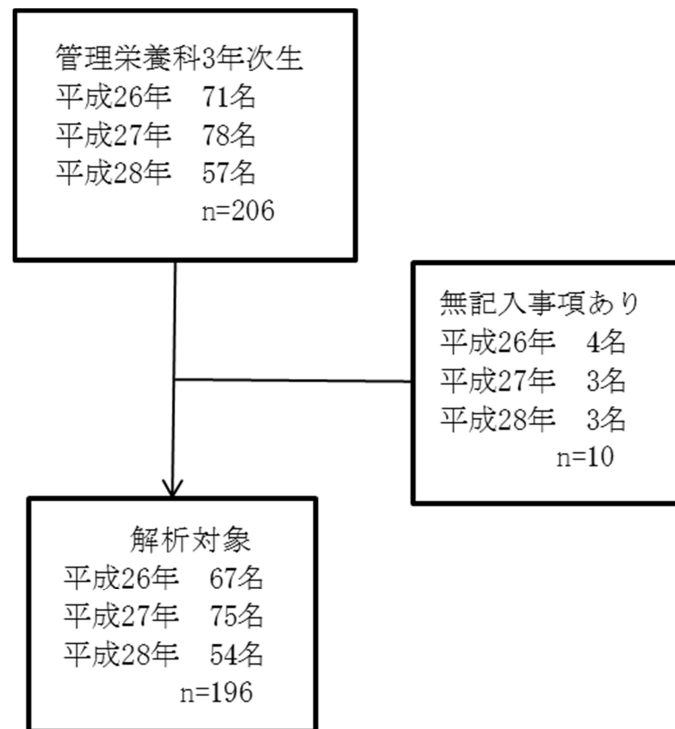


図1 研究対象者選別のフローチャート

(3) 摂食・嚥下障害者に対する栄養補給法実習

摂食・嚥下障害者に対する栄養補給法実習の概要を表1に示した。1回目の授業では、①摂食・嚥下のメカニズム（講義）として摂食・嚥下各期の概要、摂食・嚥下障害の原因、摂食嚥下の評価を説明した。その上で②学会分類2013概要（講義）において、段階分類が簡潔にまとめられた学会分類2013（食事）早見表（表2）を用い、各コード分類別の食事形態・特色・主食の例・必要な咀嚼能力・他の分類との対応を説明した。

学会分類2013に関する知識を得たうえで、④嚥下困難者用食品の試食と学会分類2013に基づく評価（実習）を行った。試食には、物性値が明確であり⁽⁵⁾学会分類2013対応の製品分類が存在することからニュートリー株式会社製品を用いた。各分類コードの形態を理解するため学会分類2013分類コード0j・0t・1j・2-1・2-2に分類されるゼリー状食品4種類（0j：ブイ・クレスゼリー カップタイプ マンゴー（えん下困難者用食品） 0t：アイソトニックゼリー 1j：アイオールソフト 2-1：アイソトニックゼリー 2-2：はい!ババロアチョコレート味）を試食し、評価用紙（筆者らが作成）を用いて学会分類2013に基づく主観的評価を行った。1週間後に行った第2回目の授業では、①嚥下食調理法・留意事項として調理手順と調理作業の標準化について説明し、適合する学会分類コードは開示しなかった。②調理実習は、実際に提供される献立の形式を用い、主食として粥（ソフティアS入り）・粥ゼリー（粒あり）・粥ゼリー（粒なし）、主菜として煮魚（きざみ）・煮魚（New素材 de ソフト）・煮魚ゼリー、副菜としてほうれん草のおひたし・トマトゼリー、汁物として味噌汁ゼリー、主食である粥ゼリーの応用としておはぎを調理した。調理、試食のあ

と嚥下食評価表（筆者らが学会分類 2013 に即して作成）（図 2）を用い、主観的評価を行った。主観的評価は、嚥下食における物性の指標であり既存の嚥下食ピラミッド、特別用途食品えん下困難者用食品許可基準などで用いられているかたさ (N/m^2)、凝集性、付着性 (J/m^3)⁽⁸⁾、均質性の指標とおいしさについてそれぞれ 1~5 の数値を用いた 5 段階評価を記入した。さらに食事形態について学会分類 2013 に基づき適合する学会分類コードを記入した。評価を行った料理の中から献立の中心となる主食と主菜からそれぞれ学会分類において異なるコードに分類される二形態の料理（主食類：粥（ソフティア S 入り）と粥ゼリー（粒なし）主菜類：煮魚（New 素材 de ソフト）と煮魚ゼリー）の学会分類コードを解析に用いた。

(4) 嚥下食調理法

1) 粥（ソフティア S 入り）

精白米 160g に対し容量比 5 倍量の水を加え 30 分間浸漬した後、炊飯器（Panasonic SR-MB101）を使用し、白米コースで自動炊飯した。炊飯した全粥 720g に対して湯 80g を加え、全粥重量の 0.6% のソフティア S（ニュートリー株式会社）^{注1} を添加し、ゴムへらを用いて 1 分間混合した。

2) 粥ゼリー（粒なし）

精白米 180g に対し容量比 5 倍量の水を加え、粥（ソフティア S 入り）と同様に、おかゆコースで自動炊飯した。炊飯した全粥（800g）をミキサー（TESCOM TM836）に入れ、全粥重量の 0.5% のソフティア U（ニュートリー株式会社）^{注2} を添加し、途中ミキサーの壁面についた全粥を適宜ゴムへらで払い落とし、断続的に米粒がなくなるまで 3 分間攪拌した。ミキサーにかけた全粥を鍋に移し、途中ゴムへらで混合しながら 70℃ に加熱した。温度測定には、デジタル温度計（TANITA TT-508）を用いた。

3) 煮魚（New 素材 de ソフト）

New 素材 de ソフト（マルハニチロ株式会社）冷凍メルルーサ^{注3} 1 切れ 60g4 切れを冷凍のまま鍋に入れ、調味液（砂糖 12g・醤油 20g・酒 12g）と魚重量の 30% の水を加え、アルミホイルで落し蓋をしてガスコンロ（Rinnai RS31M3A13R）を用いて弱火で 7 分間加熱した。

4) 煮魚ゼリー

生のメルルーサ 1 切れ 60g4 切れに調味液（砂糖 12g・醤油 20g・酒 12g）と魚重量の 30% の水を加え、煮魚（New 素材 de ソフト）と同様に加熱した。煮魚をミキサー（TESCOM TM836）に入れ、魚重量の 50% のだし汁（かつお節 2%）と魚重量の 1% のソフティア G（ニュートリー株式会社）^{注4} を加え、途中ミキサーの壁面についた煮魚を適宜ゴムへらで払い落とし、断続的にミキサーで 4 分間攪拌した。ミキサーにかけた煮魚を鍋に移し、ガスコンロ（Rinnai RS31M3A13R）を用いて途中ゴムへらで混合しながら 85℃ に加熱した。温度測定には、デジタル温度計（TANITA TT-508）を用いた。加熱後、ラップを用い成型しステンレス製のバットに入れ冷蔵庫（National NR-B52T1）1℃で 40 分間冷やし固めた。

(5) 各料理に適合する学会分類コード

学会分類 2013（食事）早見表（表 2）の主食の例に基づき粥（ソフティア S 入り）をコ

ード3、粥ゼリー（粒なし）をコード2-1とした。煮魚（New 素材 de ソフト）は、ユニバーサルデザインフード(UFD)区分2であることから、学会分類2013（食事）早見表（表2）の他の分類との対応に基づき、コード4とした。煮魚ゼリーは、ニュートリー株式会社の既存レシピを用い自社測定の物性値よりコード3とした。

表1 摂食・嚥下障害者に対する栄養補給法実習の概要

回数	授業内容	授業形式	授業時間
1	①摂食・嚥下のメカニズム（講義）		180分
	②学会分類2013概要（講義）	講義/実習	(2コマ)
	③学会分類2013に基づくところみ調整（実習）		
	④嚥下困難者用食品の試食と学会分類2013に基づく評価（実習）		
2	①嚥下食調理法・留意事項（講義）		180分
	②4～5人グループでの調理実習（実習）	講義/調理実習	(2コマ)
	③試食と学会分類2013に基づく評価（実習）		

表2 学会分類2013（食事）早見表

コード	名称	形態	目的・特色	主食の例	必要な咀嚼能力	他の分類との対応
0	j 嚥下訓練食品0j	均質で、付着性・凝集性・かたさに配慮したゼリー 離水が少なく、スライス状にすくうことが可能なもの	重症の症例に対する評価・訓練用 少量をすくってそのまま丸呑み可能 残留した場合にも吸引が容易 たんばく質含有量が少ない		(若干の送り込み能力)	嚥下食ピラミッドL0 えん下困難者用食品許可基準I
	t 嚥下訓練食品0t	均質で、付着性・凝集性・かたさに配慮したところみ水 (原則的には、中間のところみあるいは濃いところみのどちらかが適している)	重症の症例に対する評価・訓練用 少量ずつ飲むことを想定 ゼリー丸呑みで誤嚥したりゼリーが口中で溶けてしまう場合 たんばく質含有量が少ない		(若干の送り込み能力)	嚥下食ピラミッドL3の一部(ところみ水)
1	j 嚥下調整食1j	均質で、付着性・凝集性・かたさに配慮したゼリー・プリン・ムース状のもの	口腔外で既に適切な食塊状となっている(少量をすくってそのまま丸呑み可能) 送り込む際に多少意識して口蓋に舌を押しつける必要がある 0jに比し表面のざらつきあり	おもゆゼリー、ミキサー粥のゼリーなど	(若干の食塊保持と送り込み能力)	嚥下食ピラミッドL1・L2 えん下困難者用食品許可基準II UFD区分4(ゼリー状)
2	1 嚥下調整食2-1	ピューレ・ペースト・ミキサー食などで、べたつかず、まとまりやすいもの スプーンですくって食べることが可能なもの	口腔内の簡単な操作で食塊状となるもの(咽頭では残留、誤嚥をしにくいように配慮したもの)	粒がなく、付着性の低いペースト状の重湯や粥	(下顎と舌の運動による食塊形成能力および食塊保持能力)	嚥下食ピラミッドL3 えん下困難者用食品許可基準II・III UFD区分4
	2 嚥下調整食2-2	ピューレ・ペースト・ミキサー食などで、べたつかず、まとまりやすいもので不均質なものを含む スプーンですくって食べることが可能なもの		やや不均質(粒がある)でもやわらかく、離水もなく付着性も低い粥	(下顎と舌の運動による食塊形成能力および食塊保持能力)	嚥下食ピラミッドL3 えん下困難者用食品許可基準II・III UFD区分4
3	嚥下調整食3	形はあるが、押しつぶしが容易、食塊形成や移送が容易、咽頭でばらけず嚥下しやすいように配慮されたもの 多量の離水がない	舌と口蓋間で押しつぶしが可能なもの 押しつぶしや送り込みの口腔操作を要し(あるいはそれらの機能を賦活し)、かつ誤嚥のリスク軽減に配慮がなされているもの	離水に配慮した粥など	舌と口蓋間の押しつぶし能力以上	嚥下食ピラミッドL4 高齢者ソフト食 UFD区分3
4	嚥下調整食4	かたさ・ばらけやすさ・張りつきやすさなどのないもの 箸やスプーンで切れるやわらかさ	誤嚥と窒息のリスクを配慮して素材と調理方法を選んだもの 歯がなくても対応可能だが、上下の歯槽提間で押しつぶすあるいはすりつぶすことが必要で舌と口蓋間で押しつぶすことは困難	軟飯・全粥など	上下の歯槽提間の押しつぶし能力以上	嚥下食ピラミッドL4 高齢者ソフト食 UFD区分2およびUFD区分1の一部

咀嚼・嚥下しやすい食物性状(嚥下食とはどのような形態のものをいうの?)
1. 【硬さ】咀嚼・嚥下に配慮したやわらかさ
2. 【凝集性】口腔内でばらつかず、まとまりがよい
3. 【付着性】口腔内で付着せず、喉ごしがよい
4. 【均質性】性質が異なるものが混在しない

1. 主観的嚥下食評価(5段階評価)

	硬さ	凝集性	付着性	均質性	おいしさ	学会分類
評価	硬い⇄柔らかい 5 ⇄ 1	あり⇄なし 5 ⇄ 1	あり⇄なし 5 ⇄ 1	あり⇄なし 5 ⇄ 1	美味しい⇄美味しくない 5 ⇄ 1	コードを記入
味噌汁ゼリー						
粥(ソフティア入り)						
粥ゼリー(粒あり)						
粥ゼリー(粒なし)						
煮魚(きざみ)						
煮魚(デリソフト)						
煮魚ゼリー						
ほうれん草のおひたし						
トマトサラダ						
おはぎ						

2. まとめ(感想)

--

図2 嚥下食評価表

(4) 解析方法

解析は、学会分類 2013 のコード 0t (とろみ水) を除くコード 0j~4 (ゼリー状食品) を 1-6 の 6 段階にコード化し、等間隔性があると仮定し間隔尺度として扱った。本研究では、とろみ水は用いない事から 0t を除外した。学生の各評価の平均値から適合する学会分類コードを示す正解の値を減じて変化量(正解の値との差)とした。正解の値との差としての変化量の分布は正規分布ではなかった為、料理別(主食類、主菜類における3年間の累計)の比較には Kruskal-Wallis 検定を用い、post-hoc test として Steel-Dwass の方法を用いた。統計ソフトは EZRver1.31 を用いた⁽⁹⁾。有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結果・考察

(1) 料理別の学生評価と学会分類 2013 正解の値との差

差が正の値を示す場合、実際のカテゴリコードより嚥下の難易度が高いカテゴリコードを選択したことを示す。例えば、コード 3 に適合する料理をコード 4 と評価する場合である。また負の値を示す場合、実際のカテゴリコードより嚥下の難易度が低いカテゴリコードを選択したことを示す。例えばコード 3 をコード 2-2 と評価した場合である。料理別の学生評価の平均値(3年間の累計)と正解の値との差は、主食類の粥(ソフティア S 入り)で -0.331 ± 0.829 、粥ゼリー(粒なし)で -0.480 ± 0.612 、主菜類の煮魚(New 素材 de ソフト)で -1.561 ± 1.038 、煮魚ゼリーで -1.423 ± 1.047 であった。この結果から、煮魚(New 素材 de ソフト)、煮魚ゼリー、粥(ソフティア S 入り)、粥ゼリー(粒なし)の順に正解の値との差が大きく、主食類(粥(ソフティア S 入り)、粥ゼリー(粒なし))と主菜類(煮魚(New 素材 de ソフト)、煮魚ゼリー)において主食類で主菜類より正解の値に近いことが示された。

また、いずれの料理においても正解の値との差が負の値を示した。これは主観的評価において実際のカテゴリコードよりも嚥下の難易度が低いカテゴリコードを選択したことを示している。実際の食事提供を想定した場合に、摂食・嚥下機能に適合しない食形態の摂食は誤嚥性肺炎のリスクを高める⁽¹⁰⁾ことから、危険な見誤りであると言える。

(2) 料理別の学生評価と学会分類 2013 正解の値との差の比較

料理別に学生の各評価の平均値(3年間の累計)と正解の値との差の比較を図3に示した。主食類について、粥(ソフティア S 入り)と粥ゼリー(粒なし)に有意な差があった($p < 0.001$)。主菜類について、煮魚(New 素材 de ソフト)と煮魚ゼリーに有意な差はなかった。主食類と主菜類について、粥(ソフティア S 入り)、粥ゼリー(粒なし)と煮魚(New 素材 de ソフト)、煮魚ゼリーにそれぞれ有意な差があった($p < 0.001$)。この結果より、主食類と主菜類にそれぞれ有意な差を認めることから、学生評価において主食類では正解の値に近い評価が可能であり、主菜類では適正な評価が比較的難しいことが示唆された。これについて、学会分類 2013 では形態・性状について平易な日本語で表記している⁽²⁾が、食形態の日本語から想起するイメージは個人差が大きく、経験値を有さない学生においては適正な評価が困難であると推察する。また具体的な食品の例として主食の例が表記されているため、主食についてはイメージによる理解を深めやすく、評価に好影響を及ぼしたと考える。以上のことから、①全ての料理の評価において、実際のカテゴリコードよりも嚥下の難易度が低いカテゴリコードを選択していること②特に主菜類において適正な評価が困難であることを教育における重点課題として捉えることが必要であると考えられる。

(3) 本研究の限界と今後の課題

本研究の限界として、学生実習において調理作業や調理技術の標準化が構築されていないこと、それにより評価に用いた各料理の物性を均一にできない事であり、結果の妥当性は低いものとする。また、学生の嚥下食の試食・評価において、これまで実施していないカテゴリコード 3 と 4 について、物性が一定かつ明らかな市販品を用いて行う必要がある。さらに、調理した料理については物性測定器を用い測定することで、客観的指標と学生の

主観的評価を照合させる経験が必要である。これにより、嚥下食における総合的な理解に繋げることができると考えられる。

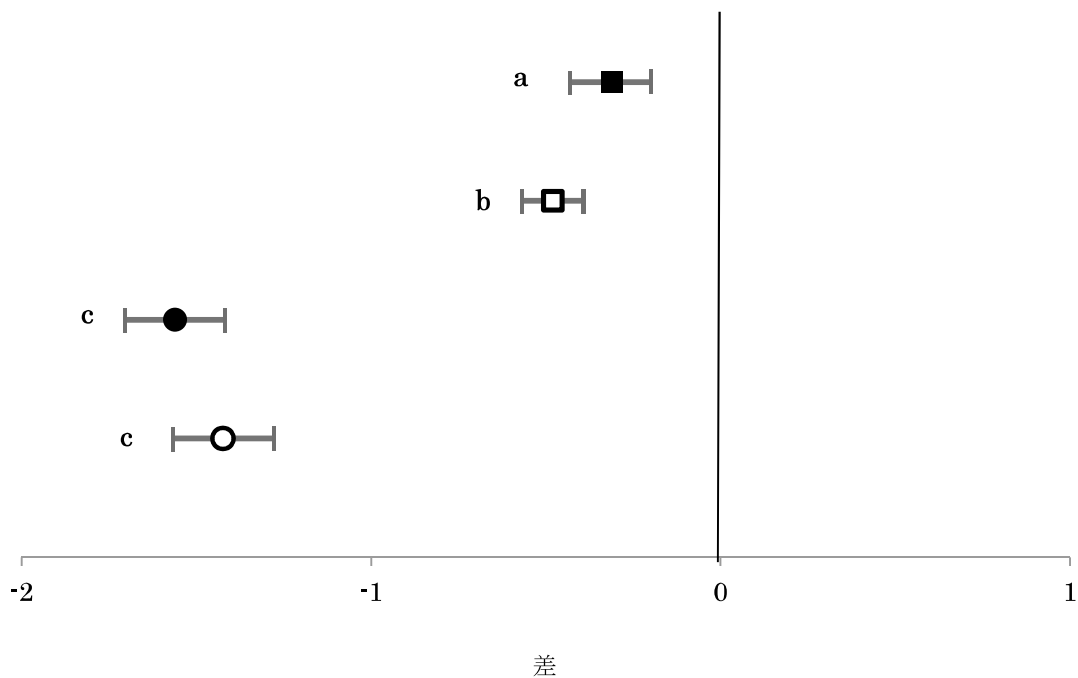


図3 料理別の学生評価と学会分類 2013 正解の値との差
エラーバーは標準偏差を示す。

アルファベットが異なる場合、有意な差を表す ($p < 0.001$)。

■ : 粥 (ソフティア S 入り)、□ : 粥ゼリー (粒なし)、● : 煮魚 (New 素材 de ソフト)
○ : 煮魚ゼリー

5. 結論

学会分類 2013 を用いた評価における学生の理解度は主食類で高かった。一方、主菜類において比較的理解度が低く、今後の重点教育課題となった。

6. 謝辞

本研究をご指導くださいました、北里大学名誉教授石原和彦先生に深謝申し上げます。

引用文献

- (1)内閣府：平成 28 年版高齢社会白書.
- (2)厚生労働省：平成 27 年 (2015) 人口動態統計 (確定数) の概況.
- (3)Teramoto, S. et al., High incidence of aspiration pneumonia in community and hospital-acquired pneumonia in hospitalized patients:a multicenter, prospective study in Japan, J. Am Geriatr Soc, 2008;56:577-579.
- (4)Lobe, M. et al., Risk factors for pneumonia and other lower respiratory tract infections in elderly residents of long-term care facilities, Arch Intern Med, 1999;159:2058-2064.

- (5) 栢下淳ほか, 嚥下調整食学会分類 2013 に基づく市販食品 300 東京:医歯薬出版株式会社. 2015;6-7, 48, 65, 86, 100.
- (6) 日本摂食・嚥下リハビリテーション学会医療検討委員会, 日本摂食・嚥下リハビリテーション学会嚥下調整食分類 2013. 日本・摂食嚥下リハビリテーション学会誌. 2013;17(3):255-267.
- (7) 江川広子ほか, 咀嚼・嚥下機能障害の評価区分に応じて提供している食事形態. 日本咀嚼学会雑誌. 2012;22 巻 2 号:95-103.
- (8) 江頭文江ほか, 嚥下食ピラミッドによる嚥下食レシピ 125 東京:医歯薬出版株式会社. 2012;31.
- (9) Kanda Y, Investigation of the freely available easy-to-use software'EZR' for medical statistics. Bone marrow transplantation, 2013;48:452-458.
- (10) 片山加奈子ほか, 高齢者の食形態と肺炎の発症に関する臨床的研究. 京都医学会雑誌. 2016;第 63 巻 第 1 号:3-7.

脚注

- 注 1 とろみ食用テクスチャー改良材。溶解性と分散性に優れ、すばやくとろみをつけることができる。
- 注 2 お粥ミキサーゼリー用テクスチャー改良材。熱々のおかゆに添加しミキサーにかけるとなめらかなおかゆゼリーを簡単に作ることができる。
- 注 3 メルルーサの骨を丁寧に取り除き、切り身の形をそのまま残して歯ぐきでつぶせるやわらかさに仕上げたもの。ゲル化剤（加工でん粉、カードラン）使用。
- 注 4 ゼリー食用テクスチャー改良材。さまざまな食品を飲み込みやすいゼリー状に加工でき、温め時のゼリーの安定性に優れている。

Effectiveness of the nutrition support practice to the nutrition course-students on the validity evaluation of various deglutitive foods according to “The classification of modified diet for dysphagic persons in 2013”

—Educational tasks revealed from the evaluation gap between the staple food and main dish—

Mika KARASAWA¹⁾, Yuuichi ASADA²⁾, Naomi SAKUMA¹⁾, Takumi NOZAKA¹⁾,
Miyo HASEGAWA¹⁾

¹⁾Department of Applied Clinical Dietetics,
Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences
500 Kurotsuchishinden, Minamiuonuma, Niigata 949-7241, Japan

²⁾ Department of Nutrition and Dietetics Kamakura Womens University
6-1-3 Ofuna, Kamakura, Kanagawa 247-8512, Japan

Abstract:

Deglutitive foods suitable for individual swallowing ability are needed to develop especially with the times when elderly people are increasing in our country. Under this situation, dietitians in many hospitals and other medical care facilities started to make common standard recipes for dysphagic patients and the collaboration among these facilities has been started under the standards shown as “The classification of modified diet for dysphagic persons in 2013”.

In the present study, we trained the nutrition course-students in the nutrition support practice to properly assess the deglutitive foods for dysphagic patients according to the standards described in “The Classification 2013”. In the course of the study, we evaluated the students’ understanding of the standards and tried to elicit the educational subjects on this practice. Total number of the subjects was 196, all of them were the nutrition course-students and took a course in the nutrition support practice on deglutitive foods for dysphagic patients between 2014~2016 in our college. Each student had been on the program twice: the first was a lecture, and the second was a practical work. In the latter, students cooked staple food and main dish each in two different ways corresponding to distinct grade in “The Classification 2013”, and after cooking, each student compared the texture of deglutitive foods subjectively, and answered the assessment according to the classification. For the statistical analyses of the students’ assessments, the grading 0j~4 used in “The Classification 2013” was exchanged numerically to grade 1~6, and treated as interval scale.

As a result, the values of students’ assessments on staple foods were significantly nearer to the proper values of “The Classification 2013” than those of main dish.

In summary, our students revealed a lack of understanding on the main dish assessments. Improvement on this point is a remaining educational issue on the nutrition support practice of us.

Keyword:

The classification of modified diet for dysphagic persons in 2013, deglutitive foods ,
evaluation of deglutitive foods, nutrition support practice

(Received : April 28, 2017 / Accepted : June 23, 2017)

BCG 予防接種後の副作用と思われる左肩腫瘍の一症例

坂西 清¹, 芳賀 博子², 小池 敦¹

¹新潟大学地域医療教育センター・魚沼基幹病院 臨床検査科
〒949-7302 新潟県南魚沼市浦佐 4132

²新潟県立加茂病院 検査科
〒959-1397 新潟県加茂市青海町 1 丁目 9 番 1

要旨

BCG ワクチンは乳幼児が結核菌に接触する前に接種する事が重要な生ワクチンであり、2013 年 4 月から生後 11 か月（1 歳未満）まで定期接種で受けられるようになった。BCG ワクチンは結核菌群である *Mycobacterium bovis* から作成され、乳幼児に接種するほか、膀胱ガンの治療薬としても使用されている。BCG ワクチンは安全性が高いとされているが稀に *Mycobacterium bovis* BCG 感染による副反応が報告されている。今回我々は、BCG 接種後の副反応と思われる症例を経験したので報告する。

キーワード

BCG ワクチン、*Mycobacterium bovis*、結核菌群、*Mycobacterium bovis* BCG 感染

(投稿日：2017 年 4 月 28 日 / 受理日：2017 年 6 月 23 日)

1. 序文

BCG はフランス語で *Bacille de Calmette et Guérin* の略であり、パスツール研究所においてアルベール・カルメット (Albert Calmette) とカミーユ・ゲラン (Camille Guérin) が、*Mycobacterium bovis* (ウシ型結核菌) の Nocard 株を継代培養して弱毒化させ作成したワクチンである。弱毒化ワクチンは弱毒性の微生物が体内に定着することで、効果は 10~15 年持続されるが、細胞内寄生体が実際に細胞内に感染を起こす危険性もある。BCG ワクチンは、幼児が結核菌に接触する前に接種する事が重要な生ワクチンであり、2013 年 4 月から生後 11 か月 (1 歳未満) まで定期接種で受けられるようになり、乳幼児期に接種することで、結核の発症、重篤な髄膜炎や全身性の結核を予防することができると報告されている。BCG ワクチンは安全性が高いとされているが稀に *Mycobacterium bovis* BCG 感染による副反応がある。厚生労働省の報告では発生の割合は 1% 以下で、症状としては局所の潰瘍やリンパ節の腫脹やアナフィラキシー、全身播種性 BCG 感染症、骨炎・骨髄炎、皮膚結核様病変などである。平成 25 年度は約 90 万人が接種されているが、厚生労働省に届けられた定期の BCG ワクチン接種に関する副反応報告数は 174 件で、リンパ節の腫れが 74 件と最も多く、次いで皮膚症状が 40 件、骨炎が 10 件、全身性の BCG 感染症が 2 件報告されている⁽¹⁾。結核菌は細胞内に寄生する病原体であるため細胞性免疫が感染防御に重要である事から弱毒化ワクチンが必要である。今回我々は、BCG 接種後の副反応と思われる左肩腫瘤の一症例を経験したので報告する。

2. 症例

主訴：左肩前面腫瘤

○年齢：1 歳未満 ○既往歴：なし ○家族歴：結核感染者なし

○BCG 接種：有 (時期は不明)

3. 経過

2015 年 5 月下旬： 母親が子供の左肩の前面に腫瘤があることに気付き他院にて受診。
この時、約 1 cm の大きさの腫瘤あり。X 線検査無し。

2015 年 6 月上旬： 紹介にて当院整形外科に受診。約 1 cm の大きさの腫瘤を左肩前面に認めたため、X 線・超音波検査後に、腫瘤を穿刺した。左上肢に BCG 接種の痕跡があった。穿刺検体を培養検査及び抗酸菌培養検査、結核菌群 PCR (LAMP 法) を実施した。検査結果より、2 週間後に再検も考慮。6 月下旬の受診時にはしこりが小さくなってきたため経過観察となる。

2015 年 8 月中旬： 抗酸菌培養にて培地上に 1 コロニーを検出 (図 1 小川培地に発育した *Mycobacterium bovis* コロニー)。追加検査を実施。結核菌群 (+) だが、コロニーを観察したところ、通常の *Mycobacterium tuberculosis* のコロニーより若干濃い黄色のコロニーであるうえ、臨床所見より *Mycobacterium bovis* BCG 感染を疑い結核菌群 (BCG 株) 鑑別 PCR 検査を新潟県保健環境科学研究所細菌科に依頼した。

検査結果は *Mycobacterium bovis* BCG (+) となり、BCG 接種後の副反応である BCG 感染症と診断になった。

4. 検査方法及び結果

(1) 初回受診時検査：2015年6月上旬

○培養検査：採取した腫瘍にて培養検査を実施

①一般培養検査

使用培地：血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BTB寒天培地

検査結果：培養陰性

②抗酸菌検査

抗酸菌塗抹検査：チールネルゼン染色（－）

抗酸菌培養：2%小川P S培地にて培養

③結核菌群 LAMP 法

試薬：Loopamp 結核菌群検出キット（栄研化学）

使用機器：リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA（栄研化学）

検査結果：結核菌群（－）

(2) 追加検査：2015年8月中旬

○初回検査時の抗酸菌培養にて検出されたコロニーを精査

①抗酸菌塗抹検査：チールネルゼン染色（＋）

②結核菌群 LAMP 検査

試薬：Loopamp 結核菌群検出キット（栄研化学）

使用機器：リアルタイム濁度測定装置 LoopampEXIA（栄研化学）

検査結果：結核菌群（＋）

③結核菌群 - 非定型抗酸菌群鑑別 PCR 検査

試薬：マイコバクテリウム核酸キット コバス TaqMan MTB

（ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

マイコバクテリウム核酸キット コバス TaqMan MAI

（ロッシュ・ダイアグノスティックス株式会社）

使用機器：コバス TaqMan 48

結果：結核菌群（＋） *M. avium*（－） *M. intracellulare*（－）

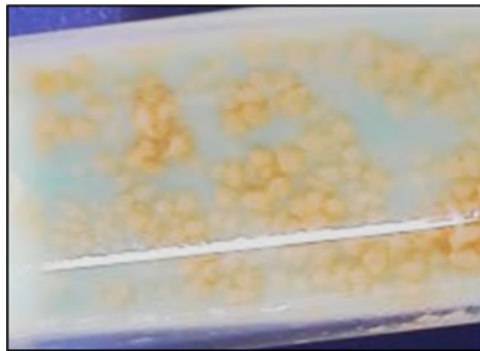


図1 抗酸菌培養より検出したコロニー

(3) 結核菌群鑑別検査

結核菌群 PCR の結果、臨床的所見より *Mycobacterium bovis* BCG を考慮し、結核菌群 (BCG 株) 鑑別 PCR 検査を新潟県保健環境科学研究所 細菌科に依頼。

(追加試験結果) : PCR に IS1561' で (+)・Rv3877/8 (-)、ET1/ET3 (+)・ET/ET3 (-) より *Mycobacterium bovis* BCG と同定した。(表 1 参照)

表 1 *M.bovis*BCG 同定 PCR 試験結果

	文献1		文献2	
	IS1561'	Rv3877/8	ET1/ET3	ET/ET3
患者検体	+	-	+	-
<i>M. bovis</i> BCG	+	-	+	-
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	+

文献 1 : J. Clin.Microbiol.41:1637-1650(2003) ⁽¹⁾

文献 2 : J. Clin.Microbiol.35:566-569(1997)⁽²⁾

5. 考察

現在、抗酸菌の検査は、ツベルクリン反応、抗酸菌染色、抗酸菌培養、結核菌群 PCR、非定型抗酸菌 PCR、抗原インターフェロン- γ 遊離検査 (IGRA : Interferon-Gamma release assay) : クオンティフェロン・T-SPOT、があげられる。抗酸菌の同定において PCR による同定が有効であるが標的 DNA が極微量の場合、検出できない場合もある。また結核菌群は、ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム・アフリカナム (*Mycobacterium africanum*)、ネズミ型結核菌 (*Mycobacterium microti*) の 4 菌種からなる。抗原インターフェロン- γ 遊離検査 (IGRA) についてはこれらの鑑別にも用いる事もあるが、クオンティフェロンにおいては専用採血管の取り扱い、採血量、採血後の混和と保管、その後の培養環境等が、検査精度に影響する可能性も指摘されており本検査の精度管理の問題も課題となっている。更に①接触者健康診断における陽性者からの活動性結核への進展確率、②免疫抑制状態にある患者での診断精度、③小児、特に 5 歳未満を対象とした場合の診断精度、については未だ課題とされている。T-SPOT については診断上の注意点として交差反応がある。*M.kansasii*、*M.szulgai*、*M.marinum*、*M.gordonae* などの感染では陽性の結果を示すことが分かっている。抗原インターフェロン- γ 遊離検査 (IGRA) においては様々な問題があるうえ、小児科 (乳児) においてはある程度採血量を必要とする検査のため実施するのは難しいのが現状である。更に IGRA は感染後、陽性化まで 8-10 週さらに長期間経過後に陽性化することもある事からも抗原インターフェロン- γ 遊離検査 (IGRA) についてはあくまでも結核の補助診断とされている。

厚生労働省に報告された BCG ワクチンの副反応件数を表にまとめた (表 2) ⁽⁴⁾。症状として、腋窩リンパ節腫脹が多く、続いて皮膚結核が多いことがわかる。BCG ワクチンの接種は旧来、接種時期は、幼児期、小学生期、中学生期の 3 回であったが、法改正により 2005 年から接種時期は生後 6 ヶ月未満 (生後 3 ヶ月以降を推奨) の 1 回となり、2013 年からは接種時期が生後 1 年未満 (生後 5 ヶ月以降 8 ヶ月未満を推奨) に変更された。接種時期変更があった 2003 年から副反応の発生率は 0.01~0.02% である。

日本で用いられている BCG ワクチンは弱毒化ウシ型結核菌東京 No172 株で、諸外国で用いられているパスツール株やデンマーク株と比べ抗原性は劣らないが、副反応は非常に少ないとされている⁽⁵⁾。他のワクチンに比べ安全なワクチンであるが、件数は微増してきていることも表 2 より読み取れる。

表 2 年度別 BCG 副反応報告件数⁽³⁾⁽⁴⁾

	H17年 (2005年)	H18年 (2006年)	H19年 (2007年)	H20年 (2008年)	H21年 (2009年)	H22年 (2010年)	H23年 (2011年)	H24年 (2012年)	H25年 (2013年)
接種総数	994037	978075	1089333	1067437	1011720	991011	986844	969941	877419
副反応総数	102	106	113	148	77	92	94	125	174
副反応(%)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
①腋窩リンパ節腫脹(1cm以上)	61	49	75	74	41	42	49	62	
②接種局所の膿瘍	7	8	10	9	1	7	3	6	
③骨炎、骨髄炎	1	4	2	9	2	5	7	6	10
④皮膚結核	23	21	15	39	19	21	21	22	
⑤全身性播種性BCG感染症	0	3	0	2		1	1		2
⑥その他の異常反応	7	16	2	7	5	5	5	18	
⑥A 腋窩以外のリンパ節腫脹	0	8	2	7	3	4	3	4	
⑥B 急性の局所反応	1	4	0		1		1	3	
⑥C その他	6	4	0		1	1	1	11	
⑦基準外報告	3	5	9	8	9	11	8	11	
アナフィラキシー(平成25年度より)									2
皮膚結核様病変(平成25年度より)									40
化膿性リンパ節炎(平成25年度より)									74
その他医師が予防接種との関連性が高いと認める症状(平成25年度より)									46

「感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について」では、届出の定義を”結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*、ただし *Mycobacterium bovis* BCG を除く) による感染症である。”と定められている。現在、病院検査室などで実施されている核酸増幅法は、臨床検体からの抗酸菌検出感度は分離培養検査とほぼ同等であり、塗抹陽性の検体であれば陽性率は高率であるが、増幅反応の阻害物質や核酸抽出効率の問題から偽陰性となる場合がある。仮に結核菌群 PCR が (+) の場合、T-SPOT やクオンティフェロン検査が (-) であっても、抗原インターフェロン- γ 遊離検査 (IGRA) はあくまでも補助診断であり、*Mycobacterium bovis* BCG であるとは言えない。結核菌群鑑別用 PCR (Huard らの方法⁽⁶⁾) は RD 領域の有無より鑑別同定する方法であり (表 3) 有用ではあるが、現在一般的な検査室では実施できず、*Mycobacterium bovis* BCG の鑑別同定は困難である。また、感染制御や、患者家族の心理的な負担、患者の今後の QOLなどを考慮した場合、結核菌群の中で、*Mycobacterium bovis* BCG の鑑別同定は必要であると考えられる。

表 3 An algorithm to identify individual *Mycobacterium tuberculosis complex* subspecies

Organism	IS1561' (Rv3349c)	Rv1510 (RD4)	Rv1970 (RD7)	Rv3877/8 (RD1)	Rv3120 (RD12)
<i>M.tuberculosis</i>	+	+	+	+	+
<i>M.africanum</i> subtype II	+	+	+	+	+
<i>M.canettii</i>	+	+	+	+	-
<i>M.africanum</i> subtype I	+	+	-	+	+
<i>M.caprae</i>	+	+	-	+	-
<i>M.bovis</i>	+	-	-	+	-
<i>M.bovis</i> BCG	+	-	-	-	-
<i>M.microti</i>	-	+	-	+	+
<i>Nontuberculosis mycobacteria</i>	-	-	-	-	-

6. 結論

本症例は抗酸菌培養陽性から *Mycobacterium bovis* BCG の同定までに3週間以上かかってしまった。出来るだけ早期の鑑別は必要であるが、現在、一般的に行われている検査法では、結核菌群の鑑別が出来ない。感染症法上の届け出や、感染対策や治療方法、そして何よりも患者の生活を考慮した場合、結核菌群を鑑別し、*Mycobacterium bovis* BCG を特定することは、医療を提供する側にも患者側にも非常にメリットがある事だと考える。現在 *Mycobacterium bovis* BCG の同定出来る施設は全国的にも少なく、遺伝子の配列の違いを検査する PCR 法での鑑別法のみとなっている事から、今後、簡便な検査法の開発及び普及が望まれる。

引用文献

- (1) J. Clin.Microbiol.41:1637-1650(2003)
- (2) J. Clin.Microbiol.35:566-569(1997)
- (3) 厚生労働省健康局健康課予防接種後副反応報告書集計報告書(平成 25 年 4 月 1 日～平成 26 年 3 月 31 日)
- (4)厚生労働省健康局健康課予防接種後副反応報告書集計報告書 (H17～25 年)
- (5)石垣瑞彦：BCG 接種後に生じた結核疹の 2 例 小児科臨床 Vol65 No5 2012
- (6)Huard RC *et al.*: “PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions,” J Clin Microbiol, 2003; 41: 1637-1650.

2 型糖尿病モデル雄性マウスにおけるローゼル萼の血糖低下作用

岩本 直樹

北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科
〒949-241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

要旨

ローゼルの萼や花および種子の抽出物においては様々な作用が報告されており、1 型糖尿病モデル動物での血糖低下作用についての報告もある。一方で萼の抽出物においては 2 型糖尿病モデル動物では血糖低下作用が見られないとの報告もある。そこで今回、正常および 2 型糖尿病モデル動物を用いてローゼルの萼投与後の血糖値の変化を調べるとともに、耐糖能とインスリン抵抗性への影響について検討した。実験には正常モデル動物 (ddY マウス) および遺伝的 2 型糖尿病モデル動物 (KK-Ay マウス) を供した。また、ローゼルは萼の微粉末を使用した。ddY マウスと KK-Ay マウスに滅菌水道水で溶解したローゼル 100 mg/kg を 6 週間毎日経口投与し、それぞれ滅菌水道水を 6 週間毎日経口投与したコントロール群と血糖値の変化を比較した。また、採血は 0、2、4 および 6 週間後に眼窩から行い、血糖値を測定した。その結果、KK-Ay マウスにおいてはローゼル投与 4 週間後に血糖値の有意な低下が見られた。さらに 6 週間ローゼルの投与した ddY マウスに対して糖負荷試験 (OGTT)、また、6 週間ローゼルの投与した KK-Ay マウスに対して OGTT とインスリン負荷試験 (ITT) を実施した。ddY マウスの OGTT では血糖値上昇抑制作用が認められ、KK-Ay マウスの OGTT でも血糖値上昇を抑制する傾向が見られた。しかし、ITT では有意な差は見られなかった。以上のことからローゼルの萼は 2 型糖尿病モデルマウスにおいて血糖および耐糖能に影響をおよぼすことが示唆された。

キーワード

ローゼル、萼、2 型糖尿病、血糖、耐糖能

(投稿日：2017 年 4 月 28 日 / 受理日：2017 年 6 月 23 日)

1. 序文

2 型糖尿病はインスリン分泌量低下、もしくはインスリン抵抗性を有することで高血糖となり、その治療には、血糖値を下げる必要がある。本研究の目的は日常的に摂取でき血糖値を低下させる抗糖尿病組成物の探索およびその作用機序解明である。ローゼルの萼や花および種子の抽出物においては様々な作用が報告されており⁽¹⁻³⁾、1 型糖尿病モデル動物においてインスリン分泌を増強させ血糖を低下させる作用を有するという報告もある⁽⁴⁾。しかし一方で萼の抽出物は 2 型糖尿病モデル動物において、血糖低下作用が見られないとの報告もある⁽⁵⁾。そこで今回、2 型糖尿病モデル動物においても同様に膵臓からのインスリン分泌を増強させ血糖を低下させると考え、正常および 2 型糖尿病モデル動物を用いてローゼルの萼投与後の血糖値の変化を調べるとともに、耐糖能とインスリン抵抗性への影響について検討した。

2. 方法

正常モデル動物 (ddY マウス) 雄 10 匹 (2 群各 5 匹) および遺伝的 2 型糖尿病モデル動物 (KK-Ay マウス) 雄 12 匹 (2 群各 6 匹) を 5 週齢で購入し 7 日間予備飼育して実験に供した。KK-Ay マウスは、血糖値 300 mg/dl 以上を示したマウスを使用した。マウスは予備飼育期間および実験期間を通して室温 24±3 °C、相対湿度 55±15 %で飼育した。ddY マウスは 5 匹/ケージ、KK-Ay マウスは 1 匹/ケージとし滅菌水道水を給水瓶にて、またマウス用固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌器にて、それぞれ自由に与えた。なお、本実験は北里大学実験動物委員会ガイドラインの基準に合致し、北里大学実験動物委員会の審査に合格し、行った。

ローゼルの萼は微粉末 (インターウィンドウ (株)) を使用した。ddY マウスおよび KK-Ay マウスに滅菌水道水で溶解したローゼル 100 mg/kg を 6 週間毎日経口投与し、それぞれ滅菌水道水のみを 6 週間投与したコントロール群と比較した。また、採血は 0、2、4 および 6 週間後にイソフルラン (エスカイン吸入麻酔液、ファイザー (株)) を用いた吸入麻酔による麻酔下で眼窩から行い、血糖値を測定した。次に 6 週間経口投与した ddY マウスに対して糖負荷試験 (OGTT)、そして 6 週間経口投与した KK-Ay マウスに対しては OGTT とインスリン負荷試験 (ITT) を実施した。それぞれ 18 時間絶食した後、OGTT はグルコース (特級、和光純薬工業 (株)) 2 g/kg を経口投与し、ITT はインスリン (ヒューマリン N 注 U-40、日本イーライリリー (株)) 0.1 U/kg を皮下投与し投与直前と、投与 30、60、120 分後に眼窩から採血し、血糖値を測定した。血糖値の測定には簡易型血糖値測定器 (グルテストエース、(株) 三和化学研究所) を用いた。統計学的分析; 結果は全て平均値±標準誤差にて示した。統計学的検討には Student の t 検定を用いた。血糖低下作用の検定には前値との比較により、その他はコントロール群との比較により $p < 0.05$ から有意な差と判断した。

3. 結果と考察

ローゼルを 6 週間投与した結果、ddY マウスではコントロール群およびローゼル投与群でいずれも前値と比較し血糖値の変化はなかった (Fig. 1)。しかし KK-Ay マウスのローゼル投与群は、投与前の血糖値 451±38 mg/dl に対し、投与 4 週間後に血糖値 348±42 mg/dl を示し有意な低下が認められ、その後も持続的な低下が見られた (Fig. 2)。

6 週間のローゼル投与後の OGTT では ddY マウスにおいてローゼル投与群でグルコース

負荷 120 分に 118 ± 3 mg/dl となり、コントロール群の 137 ± 5 mg/dl に比し血糖値の有意な差が認められた (Fig. 3)。そして、KK-Ay マウスの OGTT では空腹時血糖値で有意な差が認められた (コントロール群 : 129 ± 14 mg/dl、ローゼル投与群 : 90 ± 5 mg/dl) が、グルコース負荷後では有意な差は認められなかった。しかし、ローゼル投与群はコントロール群より低い傾向を示した (Fig. 4)。また、KK-Ay マウスにおける ITT では有意な差は見られなかった。

以上の結果から、ローゼルの萼は正常マウスには影響が及ばず、2 型糖尿病モデルマウスにおいて血糖低下作用を有し、その作用機序についてはインスリン抵抗性を改善するのではなく、耐糖能に影響をおよぼす可能性が示唆された。

ローゼルの花抽出物における血糖低下作用にはインスリンを介さない作用があるという報告⁽⁶⁾ やローゼルの種子には消化管におけるマルトースからグルコースへの変換阻害作用を有し、血糖を低下させるという報告⁽⁷⁾ もあるが、今後、ローゼルの萼の血糖低下のメカニズムを解明するために様々な因子との関連についてさらなる検討が必要である。

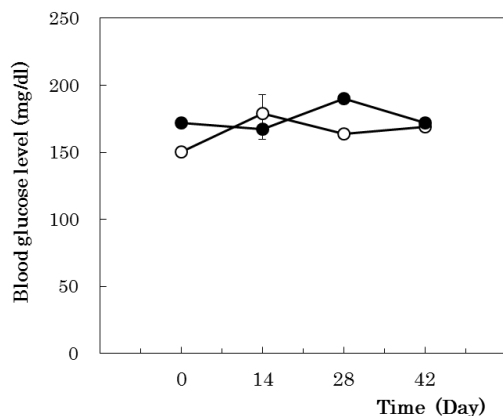


Fig. 1. Effect of roselle on blood glucose level in ddY mice.

Closed circle : Roselle-treated ddY mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 5 mice.

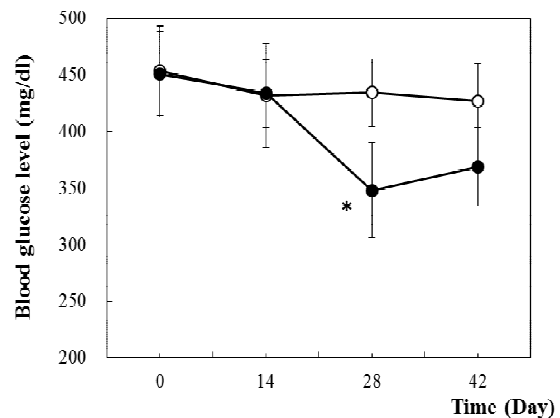


Fig. 2. Effect of roselle on blood glucose level in KK-Ay mice.

Closed circle : Roselle-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 6 mice. Significantly different from the prevalue, * $p < 0.05$.

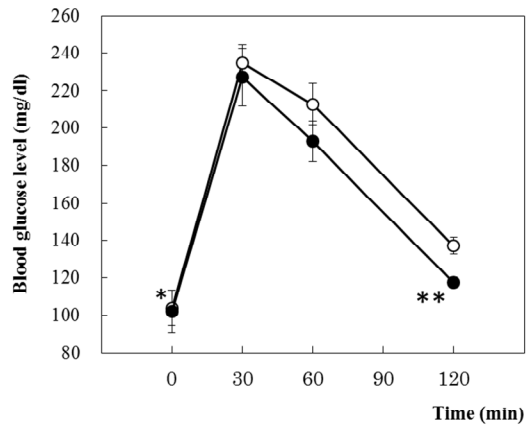


Fig. 3. Effect of roselle on glucose tolerance test in ddY mice.

Closed circle : Roselle-treated ddY mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 5 mice. Significantly different from control, ** $p < 0.01$.

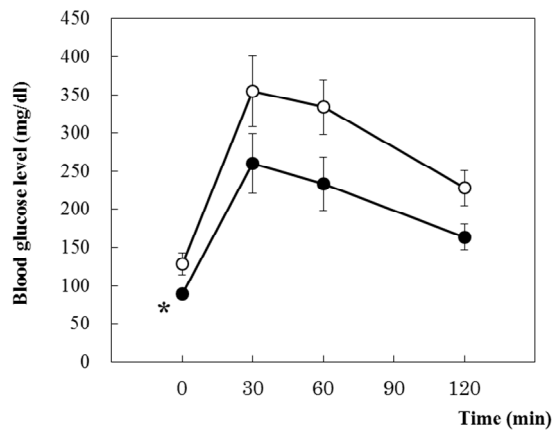


Fig. 4. Effect of roselle on glucose tolerance test in KK-Ay mice.

Closed circle : Roselle-treated KK-Ay mice (100 mg/kg body weight), open circle : control mice. Each point indicates the mean \pm S.E. from 6 mice. Significantly different from the control, * $p < 0.05$.

引用文献

- (1) Ali BH, Al Wabel N, Blunden G, Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytother Res*, 2005 ; 19(5) : 369-375.
- (2) Asgary S, Soltani R, Zolghadr M, Keshvari M, Sarrafzadegan N, Evaluation of the effects of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) on oxidative stress and serum levels of lipids, insulin and hs-CRP in adult patients with metabolic syndrome: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *J Complement Integr Med*, 2016 ; 13(2) : 175-180.
- (3) Kao ES, Yang MY, Hung CH, Huang CN, Wang CJ, Polyphenolic extract from *Hibiscus sabdariffa* reduces body fat by inhibiting hepatic lipogenesis and preadipocyte adipogenesis. *Food Funct*, 2016 ; 7(1):171-182.
- (4) Wisetmuen E, Pannangpetch P, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan U, Yutanawiboonchai W, Itharat A, Insulin secretion enhancing activity of roselle calyx extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res*, 2013 ; 5(2) : 65-70.
- (5) 松坂彰毅、坂本優藏、藤野秀樹、ケナフ類種子の血糖値低下作用について、*FOODFUNCTION*、2009 ; 5(2) : 44-51.
- (6) Pillai SS, Mini S, Petals Modulates Glycogen Metabolism and Glucose Homeostasis Signalling Pathway in Streptozotocin-Induced Experimental Diabetes. *Plant Foods Hum Nutr*, 2016 ; 71(1) : 42-48.
- (7) Adisakwattana S, Ruengsamran T, Kampa P, Sompong W, In vitro inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *BMC Complement Altern Med*. 2012 ; 12 : 110-118.

当院における遺伝子検査の取り組み

畔上 公子

新潟県立がんセンター新潟病院 病理部
〒951-8566 新潟県新潟市中央区川岸町2-15-3

要旨

遺伝子検査室で扱う検体数は年々増加傾向で、2015年は1年間に1572件の解析を行った。主な検査項目は肺癌 *EGFR* 遺伝子解析、大腸癌 *RAS* 遺伝子解析、悪性リンパ腫の免疫関連遺伝子の再構成の検出であるが、保険収載以外の項目も臨床からの要望に応じて行っている。今回、肺癌 *EGFR* 遺伝子解析の院内実施について紹介する。

肺癌 *EGFR* 遺伝子解析では、*EGFR* 遺伝子の exon 18～21 を解析している。点変異は *Cycleave* 法で検出し、exon 19 の欠失変異と exon 20 の挿入変異は、直接塩基配列決定法で確認している。検体は肺癌手術組織検体、気管支鏡下採取検体、胸水で、組織検体はパラフィン切片、細胞検体では主にガラス塗抹標本、胸水はオートスマア処理した標本をそれぞれ解析に用いている。全例で標本中の腫瘍細胞の多寡を確認し、顕微鏡下で腫瘍細胞が10%以上含まれるように用手的に細胞を採取し、DNAを抽出している。2007年～2013年に外注検査が行われた肺腺癌症例810件のうち、細胞診検体における変異検出率は32.75%であったが、42.31%へと上昇した。また、外注検査では報告まで7-10日（平均7.8日）を要したが、院内検査では2日（平均3.7日）の報告も可能となった。院内実施により、検出率の向上や治療方針決定の迅速化、患者負担の軽減につながっている。

キーワード：

遺伝子検査、肺癌、*EGFR* 遺伝子解析、院内実施

（投稿日：2017年4月28日／受理日：2017年6月23日）

序文

病理組織や細胞診検体を用いて行う遺伝子検査は、病理診断や治療方針の決定に重要な役割を果たすようになった。当院では、2012年にリンパ腫の免疫関連遺伝子再構成や軟部腫瘍の融合遺伝子の検索を開始した。その後、大腸癌のRAS遺伝子解析、肺癌のEGFR遺伝子の解析、GIST（消化管間質腫瘍）のKIT/PDGFR遺伝子解析を院内実施している。保険収載以外の胃癌腹水洗浄液のCEA mRNAの検出、脂肪性腫瘍のMDM2/CDK4/p16のmRNAの検出、大腸癌BRAF遺伝子解析など臨床からの要望にも応じている。今回、肺癌EGFR遺伝子解析の取り組みを中心に当院の遺伝子検査を紹介する。

肺癌EGFR遺伝子解析

上皮成長因子受容体 epidermal growth factor receptor (EGFR) は細胞の増殖や成長を制御する上皮成長因子を認識し、シグナル伝達を行う細胞膜貫通型チロシンキナーゼ受容体である。EGFRの発現は上皮系、間葉系、神経系など多様な細胞にみられるが、EGFRに遺伝子増幅や遺伝子変異、構造変化が生じると発がん、がんの増殖、浸潤、転移などに関与するようになる。EGFRは様々な悪性腫瘍で過剰発現がみられるが、肺癌における非小細胞肺癌の40～80%でEGFRの過剰発現が大きく関与している。肺癌におけるEGFR遺伝子変異は非小細胞肺癌の分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害剤と関連性があり、当初から劇的な腫瘍縮小効果が女性、非喫煙者、腺癌の症例に見られた。これまでの研究により、EGFR遺伝子変異を有する症例に薬効が期待できることが明らかとなり、ゲフィチニブに代表されるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤は、肺癌に対する分子標的薬の標準治療として臨床応用されている。変異の特徴として、exon 19欠失変異とcodon 858の点突然変異(L858R)で変異の約90%を占める¹⁻³⁾。この他G719A/C/Sや頻度の低い稀な変異も多数報告されている^{2,3)}。これらの変異は、日本人の肺腺癌の約40%に見られる¹⁻³⁾。変異の種類によりEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の有効性が異なり、exon 19欠失変異の奏効率は81%、L858Rは71%、G719Xは56%である²⁾。現在、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤は、肺癌の標準治療に組み入れられており、治療前の遺伝子検査は不可欠である。ゲフェチニブには、重篤な急性肺障害の副作用があり、EGFR変異陽性者に適応が絞られる一因となっている。ゲフィチニブに抵抗性を獲得した場合は、codon 790の2次性獲得変異やMET遺伝子増幅などが付加することが知られている^{2,4)}。また、2次性獲得変異に対する薬剤オシメルチニブが2016年に発売されたが、この新薬に対する新たな獲得変異の報告もある²⁾。当院では2007年から外注によるEGFR遺伝子解析が開始された。その後、組織検体は2013年から、細胞診検体は2015年からEGFR遺伝子解析の院内実施を始めている。遺伝子検索箇所は複数あり、有変異症例でも変異の検出が難しい場合があり、導入までに様々な検討が必要であった。

使用検体と解析方法

検体は肺癌手術組織検体、気管支鏡下採取検体、胸水である。組織検体はパラフィン切片、細胞検体は主にガラス塗抹標本、胸水はオートスマア処理した標本をそれぞれ解析に用いている(図1)。全例で標本中の腫瘍細胞の多寡を確認し、顕微鏡下で腫瘍細胞が10%以上含まれるように用手的に細胞を採取し、DNAを抽出している。EGFR遺伝子のexon 18

～21(図2) について、点変異は Cycleave 法⁵⁾ で検出し、exon 19 の欠失変異と exon 20 の挿入変異は、直接塩基配列決定法で確認している⁶⁾。

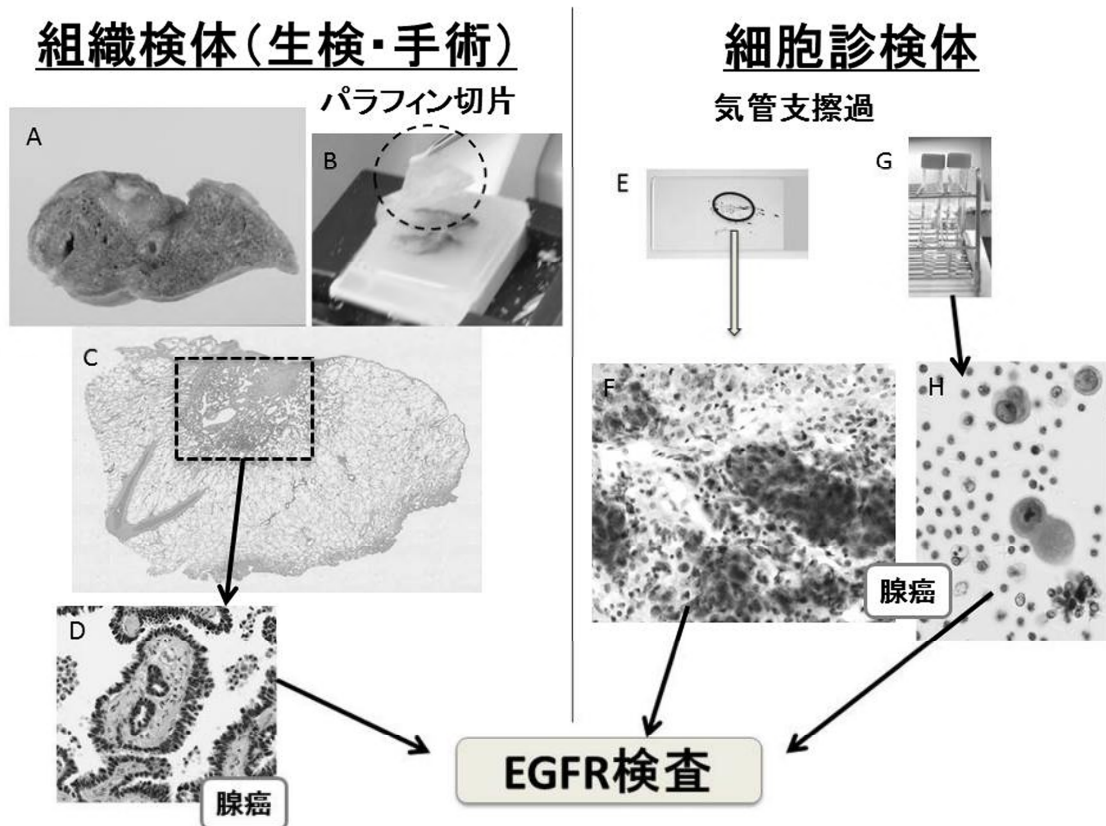


図1. 使用検体について

A : 肺癌手術検体.B : パラフィン切片.C : HE 標本.D:腫瘍部分の拡大 (HE 標本) E: 気管支擦過標本.F: 塗抹部分の拡大 (パパニコロウ染色) .G: 胸水検体.H: 腫瘍細胞の拡大 (パパニコロウ染色) 。

気管支器具洗浄検体は凍結保存し、必要に応じて ALK 検査が行われる。

腫瘍の有無を確認後、10%中性緩衝ホルマリン固定パラフィンブロックの切片 (B) 、気管支擦過標本、胸水中の腫瘍部分 (F.H) から *EGFR* 解析を行う。

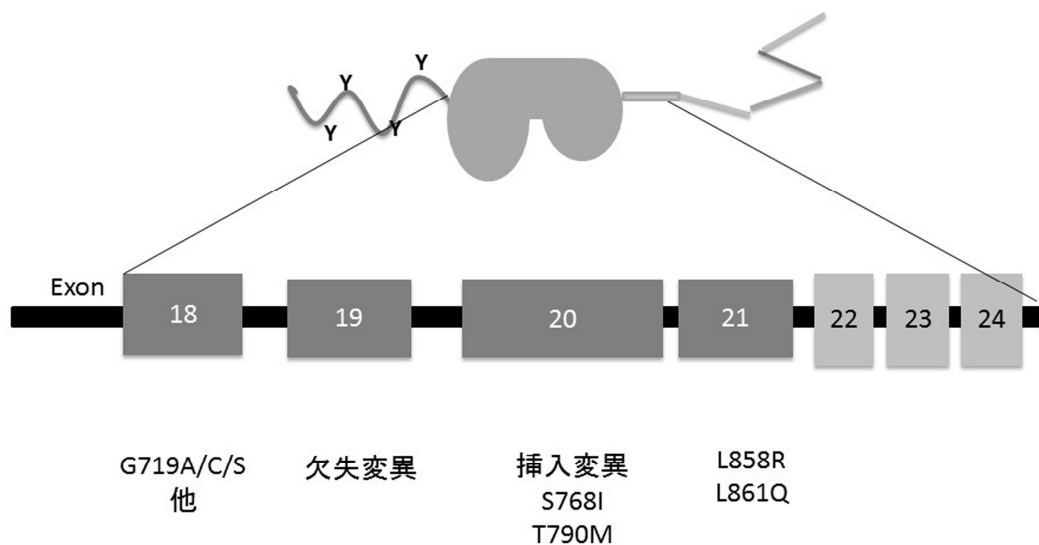


図 2. EGFR 遺伝子変異解析

結果・考察

2007年～2013年に外注検査が行われた肺腺癌症例810件のEGFR変異検出率は36.30%であった。検体種別でみると、組織検体は42.33%に対し、細胞診検体は32.75%であった。外注検査でEGFR変異陰性とされたが、後日組織の採取が行われた25症例について、院内で再検討を行ったところ、25例中2例で変異が検出された。1例は腫瘍細胞が少ないため変異検出が難しく、もう1例は外注検査の検索範囲外変異であった。院内実施では、腫瘍細胞の多い検体の選別、腫瘍細胞をより多く検体から採取、EGFR遺伝子の解析範囲拡大などを行うことで、変異検出率の向上を図った。細胞診検体では、外注検査時と比較して院内検査の変異検出率は32.75%から42.31%へと上昇した(表1)。また、結果報告までの日数が短縮され、外注検査では報告まで7-10日(平均7.8日)を要したが、院内検査では2日(平均3.7日)の報告も可能となった。院内実施により、検出率の向上や治療方針決定の迅速化、患者負担の軽減にもつながっている。

表 1. 肺腺癌症例における院内検査導入前後の変異検出率

外注時 (肺腺癌)				院内実施 (肺腺癌)			
年	件数	変異(+)	変異陽性	年	件数	変異(+)	変異陽性
2007-2013				2013-2015			
全体	810	294	36.30%	全体	192	74	38.54%
細胞	510	167	32.75%	細胞	52	22	42.31%

おわりに

遺伝子検査は遺伝子に対する知識、検査手技、結果判定等、高度な技術や経験が必要である。特定のバイオマーカーに基づく個別化医療が進む今日、良質な検査結果を提供することは必然的な責務である。当院では5年前までは *CEA mRNA* のみの実績であったが、臨床や病理内からの要望で年々検査できる項目を増やすことにより、現在は多種多様な内容の遺伝子検査を行っている。それに伴い、取り扱う検体の種類、検体数が増加した。ここ数年で遺伝子検査の取り巻く環境は大きく変わってきており、新しい診断技術も多数開発されてきている。遺伝情報を網羅的に解析できる次世代シーケンサーにより、癌関連の遺伝子異常の解明とこれらをターゲットとする分子標的の開発が一層進むと考えられる。また、癌組織の代わりに血液検体を代用させるリキッドバイオプシー(liquid biopsy)がある。血液検体でこれまでの癌遺伝子検査と同等の検査もできることから、患者にとっては負担が少なく、非常に有益である。今後も新しい診断技術に目を向け、積極的に取り入れ、様々な情勢に対応し、臨床支援につなげていきたい。

謝辞

これまでご教示いただいた多くの先生方と遺伝子検査室の発展に寄与してこられた検査技師の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 谷田部 恭: 肺癌における遺伝子検査. 日本染色体遺伝子検査学会雑誌. 33(1):41-46, 2015.
- 2) 日本肺癌学会バイオマーカー委員会: 肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き. 第 3.05 版, 2016 年 12 月 1 日. <https://www.haigan.gr.jp/uploads/photos/810.pdf>
- 3) 谷田部 恭, 柴田典子: 肺癌の遺伝子診断と治療選択. 臨床病理. 60(8):786-795, 2012.
- 4) 阿部徹哉, 横山 晶: 肺癌における分子標的治療. 新潟県立がんセンター新潟病院医誌. 50(1): 9-15, 2011.
- 5) Yatabe Y, Hida T, Horio Y et al: A rapid , sensitive assay to detect EGFR mutation in small biopsy specimens from lung cancer. J Mol Diagn. 8(3):335-341, 2006.
- 6) 畔上公子, 神田真志: 当院における遺伝子検査の取り組み-肺癌における EGFR 遺伝子解析-. 新潟県立がんセンター新潟医誌,55(1):27-35,2016

臨床検査技師に必要な統計学について（第4報）

小林 浩二

北里大学保健衛生専門学院 臨床検査技師養成科
〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

要旨：

筆者は、一般社団法人新潟県臨床検査技師会において平成20年より統計学を活用したデータ解析の研修や精度管理業務に携わり、その活動内容、臨床検査上の統計学的検討事項や統計解析ソフトについて本紀要にて報告してきた¹⁾⁻³⁾。今回は、検討事項の一つに取り上げられていた正規性の検定に関する検討結果を述べる。測定値が正規分布に従うか否かの問題に対するアプローチは、グラフ表示（ヒストグラム、p-pプロット）、尖度及び歪度の数値、正規性の検定を利用した解釈の3通りに区分される。その中でも正規性の検定は、測定値の母集団に正規分布を想定できるかといった問題に対し、統計学的仮説検定によりそれを判断する方法論である。一般的な統計学的仮説検定は、帰無仮説を棄却することにより積極的に対立仮説を採用するが、正規性の検定結果はそれとは異なり、やや不確実な判断を導くため注意が必要である。今回は汎用性の高い5種類の正規性の検定に対して、母集団分布に正規分布を設定した乱数及び対数正規分布を設定した乱数のデータセットをそれぞれ作成し、そのデータセットに正規性の検定を適用させたモンテカルロシミュレーションにより検出力を検討した結果を報告する。

正規性の検定に関しては、測定値分布による検出力の相違や検定の特性を利用者は把握しておく必要がある。本報が統計リテラシーを身につけ、「経験」と「根拠」を持って活躍する臨床検査技師の一助になればと考えている。

キーワード：

臨床検査値，正規分布，検定，モンテカルロシミュレーション

（投稿日：2017年4月28日／受理日：2017年6月23日）

1. はじめに

近年は、SASをはじめ、S-plus、JMPやSPSSなどさまざまな統計ソフトが流通し、GUI形式で手軽に統計計算を実行できるようになってきた。この点に関しては、既に本紀要第21巻³⁾にて筆者が紹介した。従来の検定や推定に加え、データマイニングやテキストマイニングに関する技法も充実し、統計学はデータサイエンスとしてその名を変えつつある。しかしそれによって、古典的な統計学的手法が衰えたわけではなく、確固たる研究計画が組まれた研究において必須の解析法である。古典的手法（回帰分析、分散分析やt検定）を扱う中で、課題となるのがデータの正規性である。

臨床検査にとって正規分布は基準範囲の設定をはじめとして頻回に使用される確率分布である。元来、正規分布は統計理論の根幹をなす分布であり、様々な統計理論が正規分布の上に成り立ち、またそこから派生している。所与の測定値が正規分布に従うか否かの問題に対するアプローチは、大きく3通りに分けられる。まず1つはグラフによる方法であり、ヒストグラム、箱ヒゲ図、P-Pプロットによる評価がこれに該当する。2つ目は、尖度や歪度といった数値を指標にする方法であり、これらは0に近ければ正規分布と大きく離れていないと解釈される。そして3つ目は、統計学的仮説検定による手法、いわゆる正規性の検定である。これは客観的に正規性を評価する方法であるが、様々な検定が存在しているため利用者はどの方法を選択することが最良なのかを見極める必要がある。本稿ではこの問題に対し、正規性の検定の検出力についてモンテカルロシミュレーションによる比較検討を試みた。検討に用いた検定方法は汎用性の高い5種類であり、統計解析ソフトとしてR、SAS及びJMPを用いてその評価を行った。

正規分布という分布は実在せず理論上の確率分布であるため、厳密な検定の必要性は乏しく視覚的な情報からの判断で十分であるという統計学者の見解も多い。しかし、正規性の検定に関しては、その特性と結果の解釈を十分理解すべきであり、本検討がその一助になればと考えている。

2. 正規性の検定について

検出力の比較検討を実施した正規性の検定は以下の5つである。 n はデータの個数、 x_i はデータ、 \bar{x} は平均値、 s は標準偏差として①から⑤に示す。

① Anderson darling test⁴⁾⁻⁵⁾

アンダーソンダーリング検定の統計量は以下の数式で算出される。

$$A = -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [2i-1] [\ln(p_{(i)}) + \ln(1-p_{(n-i+1)})]$$

$$(* p_{(i)} = \Phi([x_{(i)} - \bar{x}] / s))$$

p 値は、修正 Z 値を用いた $Z = A(1.0 + 0.75/n + 2.25/n^2)$ から導出される。

② Lillefors test⁶⁾⁻⁷⁾

リリフォース検定の統計量は以下の数式で算出される。

$$D = \max_{i=1, \dots, n} \{D^+, D^-\}$$

$$\left(\begin{array}{l} D^+ = \max_{i=1, \dots, n} \{i/n - p_{(i)}\}, D^- = \max_{i=1, \dots, n} \{p_{(i)} - (i-1)/n\} \\ *p_{(i)} = \Phi([x_{(i)} - \bar{x}] / s) \end{array} \right)$$

p 値は、修正 Z 値を用いた $Z = D(\sqrt{n} - 0.01 + 0.85 / \sqrt{n})$ から導出される。

③ Pearson chi-square test⁸⁾

ピアソンの χ^2 検定の統計量は以下の数式で算出される。

$$P = \sum_{i=1}^n (C_i - E_i)^2 / E_i$$

ここで i は、分布を区分した際のクラスの数という意味している。 C_i は実測値、 E_i は

その期待値である。 p 値は、自由度 $i-1$ の χ^2 分布から導出される。

④ D'Agostino pearson test⁹⁾⁻¹¹⁾

ダゴステイーノピアソン検定の統計量は $D_p = Z_k^2 + Z_s^2$ として算出される。ここで

Z_k はデータセットの尖度、 Z_s は歪度である。 p 値は、自由度 2 の χ^2 分布から導出される。

⑤ Shapiro-Wilk test¹²⁾⁻¹³⁾

シャピロウィルク検定の統計量は以下の数式で算出される。

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)} \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

ここで $x_{(i)}$ は標準正規分布からの順序統計量、 a_i は順序統計量から算出される係数である。 p 値は、 W 値の分布表から導出される。

これらの検定はその性質上、積極的に正規分布をしていることを証明するものではない。ここでは命題に対する帰無仮説 (H_0) は、得られたデータの母集団が正規分布をしているものと仮定し、それに対して対立仮説 (H_1) は母集団が正規分布をしていないとしている。帰無仮説 (H_0) が棄却されない場合、「正規分布をしていないとは言えな

い」といったややまわりくどい結果となるものの、得られた測定値の母集団分布は正規分布しているものと仮定する。ここでは、得られたデータそのものではなく、その背後にある母集団分布について検定している点に注意すべきである。

4.方法

1) 乱数発生

データセットとしては、正規分布の場合は平均 80 かつ標準偏差 10、対数正規分布の場合は対数平均 3、標準偏差 0.3 の対数正規分布 I と対数平均 3、標準偏差 0.5 の対数正規分布 II（対数正規分布 I よりも歪んだ分布）の計 3 つの分布からサンプルサイズ 10、20、30、50、100、500 の乱数を発生させ作成した。臨床検査値を例にすると、正規分布は健常者の空腹時血糖値、対数正規分布 I は健康診断受診者の血清 AST 値、対数正規分布 II は健康診断受診者の血清 ALT 値に類似した分布を想定している。

2) 正規性の検定

各データセットに対して Anderson darling test、Lillefors test、Pearson chi-square test、D'Agostino pearson test、Shapiro-Wilk test を実行した。

3) モンテカルロシミュレーション

1)、2)の操作を 100000 回繰り返し、p 値が有意水準以下 ($\alpha=0.05$ 以下) となる割合 (Proportion) を式 $A = (\text{H}_0 \text{を棄却した回数}) / 100000$ として集約した。

5. 結果

以下にモンテカルロシミュレーションの結果を示す。表 1、2、3 の各数値は、有意水準 ($\alpha=0.05$) 以下となった割合である (式 A の計算結果)。

5-1. 正規分布からの乱数を用いたモンテカルロシミュレーション結果

D'Agostino pearson test を除き、サンプルサイズが 20 以上の場合は有意水準 ($\alpha=0.05$) の近傍に集約されている (表 1、図 1)。

表 1. モンテカルロシミュレーション集約表 1

sample size	method				
	Shapiro-W	Anderson-D	lilliefors	pearson χ^2	D'agostino-p
10	0.0477	0.0487	0.0492	0.0662	0.0565
20	0.0500	0.0506	0.0484	0.0486	0.0518
30	0.0504	0.0507	0.0488	0.0514	0.0488
50	0.0492	0.0501	0.0500	0.0516	0.0456
100	0.0500	0.0503	0.0509	0.0529	0.0422
500	0.0505	0.0497	0.0497	0.0514	0.0402

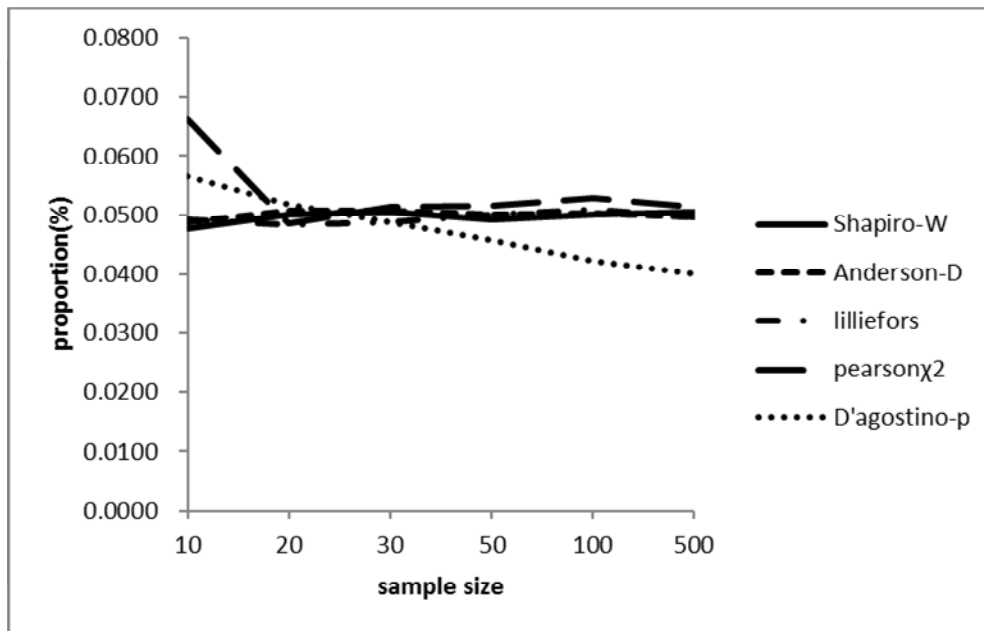


図 1.モンテカルロシミュレーション集約図 1

5-2. 対数正規分布から発生させた乱数を用いたモンテカルロシミュレーション結果

全ての検定に関して、サンプルサイズの増加とともに有意水準 ($\alpha=0.05$) 以下となる割合が単調増加していることが確認できるが、その傾向は Shapiro-Wilk の検定が最も顕著である。正規分布からのひずみが緩やかな対数正規分布 I から作成したデータセットによる結果 (表 2、図 2) よりも、ひずみが大きい対数正規分布 II から作成したデータセットによる結果 (表 3、図 3) ではサンプルサイズの増加と共に急激に検出力が上昇していることが確認できる。

表 2. モンテカルロシミュレーション集約表 2

sample size	method				
	Shapiro-W	Anderson-D	Lilliefors	pearson χ^2	D'Agostino-p
10	0.122	0.116	0.097	0.107	0.132
20	0.247	0.212	0.155	0.109	0.228
30	0.361	0.302	0.212	0.139	0.315
50	0.569	0.473	0.330	0.199	0.484
100	0.874	0.784	0.593	0.360	0.796
500	0.999	0.999	0.999	0.989	0.999

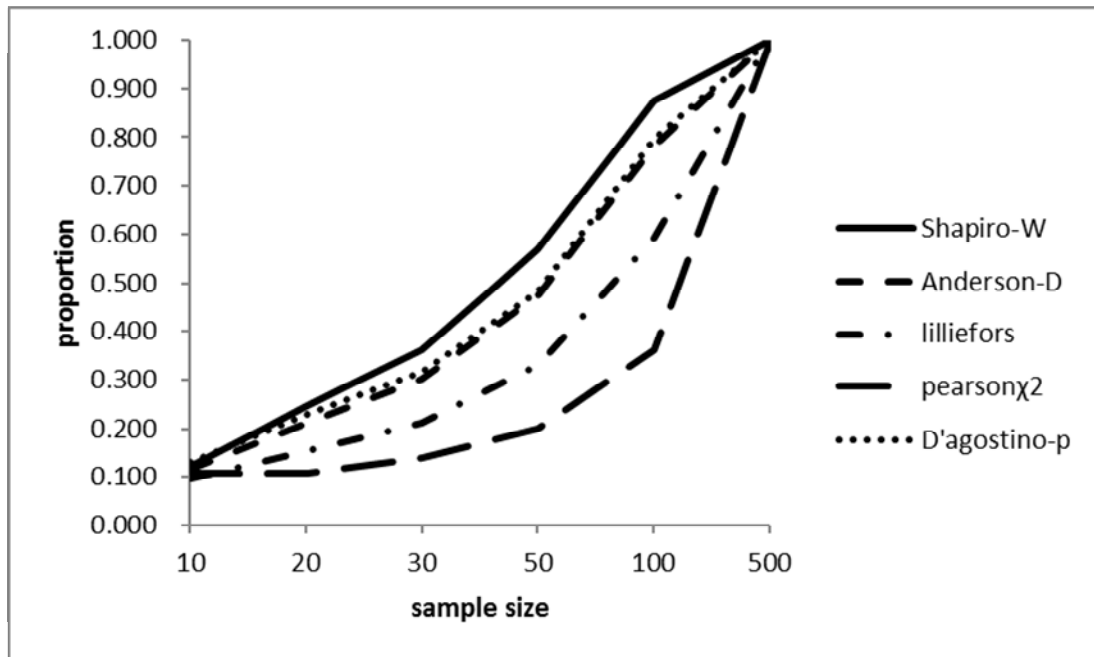


図 3.モンテカルロシミュレーション集約図 2

表 3. モンテカルロシミュレーション集約表 3

sample size	method				
	Shapiro-W	Anderson-D	Lilliefors	pearson χ^2	D'Agostino-p
10	0.247	0.231	0.180	0.197	0.233
20	0.517	0.461	0.335	0.270	0.433
30	0.724	0.652	0.481	0.386	0.597
50	0.924	0.871	0.706	0.587	0.822
100	0.999	0.981	0.951	0.891	0.991
500	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999

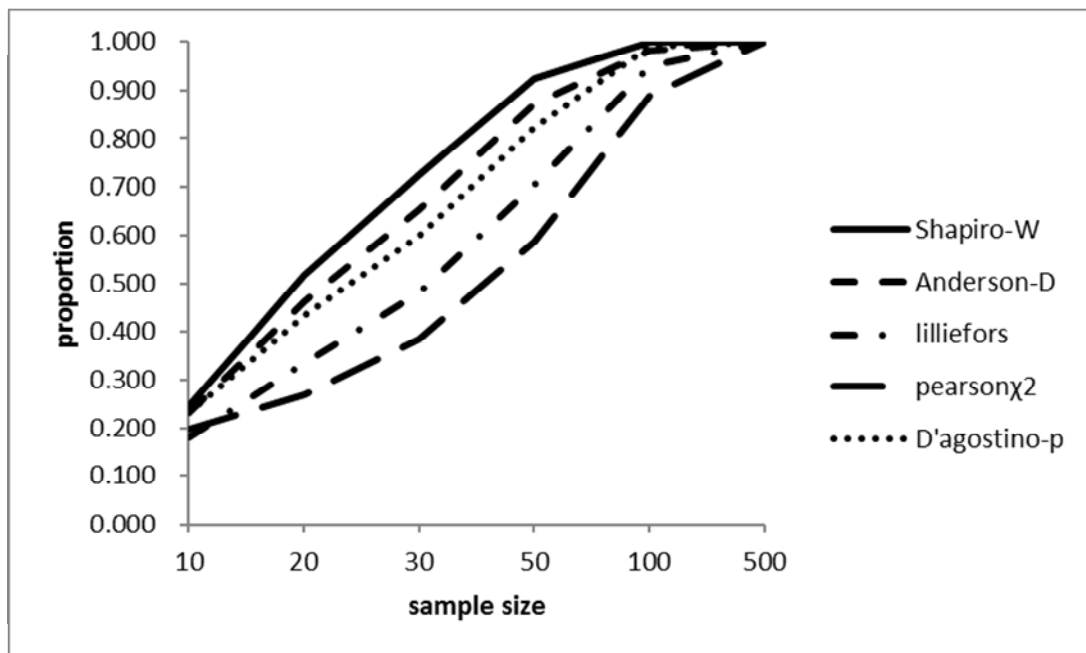


図 3.モンテカルロシミュレーション集約図 3

6. まとめ

正規分布から発生させた乱数を用いたシミュレーション結果から、サンプルサイズが 20 以上の場合には、各検定において有意水準($\alpha=0.05$)の近傍に集約されていることが確認できる。よってどの検定を利用しても、正規性の検定結果は変わらない。それとは対称的に対数正規分布から発生させた乱数を使った 2 つのシミュレーション結果では、5 つの正規性の検定の検出力が異なることが図 2 及び図 3 から確認ができる。ここでの検出力とは、式 A から求められる割合であり、これは有意水準($\alpha=0.05$)の条件下で、母集団分布に正規分布を仮定する帰無仮説 (H_0) を棄却し、母集団分布に正規分布を仮定しない対立仮説 (H_1) を採択した割合のことである。サンプルサイズの増加と共に全ての検定の検出力は上昇しており、Shapiro-Wilk test、Anderson darling test、D'Agostino pearson test、Lilliefors test、Pearson chi-square test の順でサンプルサイズに依存せずに検出力が高いことが確認された。

今回は仮定している母集団分布が分かっている状態で発生させた乱数を用いてシミュレーションを実行している。しかし一般には、所与の測定値の母集団分布が正規分布しているか否かは通常不明である。それを確かめるために検定を行うわけであるが、仮に正規分布をしていた場合、ランダムサンプリングをしたと想定できるならば、サンプルサイズは 20 以上あれば有意水準($\alpha=0.05$)と同じく検定結果を解釈できる。一方、仮に正規分布していない場合（本シミュレーションで用いた対数正規分布の場合）は、サンプルサイズが 100 以上になって初めて Shapiro-Wilk test の検出力が 80%を超えてくることが確認できる(図 2 では 0.874)。同乱数を使用した Pearson chi-square test の検出力はサンプルサイズが 100 の時でさえ検出力は 36%と低い(図 2 では 0.360)。但し、サンプルサイズが小さくても、図 3 に示したように正規分布から大きく逸脱しているデータに関しては、すべての検定において検出力は大幅に上昇する。

以上の点から、検出力が低くなる要因は、正規分布からの逸脱傾向が小さい場合とサン

プルサイズが小さい場合であり、これらに対応する最良の正規性の検定は、シミュレーションの結果より **Shapiro-Wilk test** であると考えられる。

7.おわりに

今回は、正規性の検定に焦点を当てシミュレーション結果を記した。しかし、先に述べた通り、正規性に関しては検定の **p** 値のみで解釈するのではなく、視覚的な測定値分布、正規確率プロット、尖度・歪度などの係数を算出し、総合的に判断するべきである。また **Shapiro-Wilk test** は、統計解析ソフト **JMP** (SAS Institute Japan) や **R-commander** (EZR 含む) に標準装備されているが、エクセルのアドインソフトには **Pearson chi-square test** や **kolmogorov-Smirnov test** が装備されているため、利用者は検定の特性を理解したうえで結果の解釈を行うことを推奨する。

引用文献

- (1) 小林浩二、北里大学保健衛生専門学院紀要第 19 号 (2014)
- (2) 小林浩二、北里大学保健衛生専門学院紀要第 20 号 (2015)
- (3) 小林浩二 北里大学保健衛生専門学院紀要第 21 号 (2016)
- (4) Anderson.T.W. and Darling.D.A. A test of goodness-of-fit.
Journal of the American Statistical Association, Vol49,765-769 (1952)
- (5) Anderson-Darling.A. Goodness of fit Test for Small Samples Assumptions.
Selected Topics in Assurance Related Technologies, Vol10, Number5(2003)
- (6) Dallal. G.E. and Wilkinson.L. An analytic approximation to the distribution of Lilliefors' test for normality. The American Statistician, Vol40, 294-296(1986)
- (7) Lilliefors.HW. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown.
JAm Stat Association, Vol64,399-402(1967)
- (8) Romeu. J.L. The Chi-Square - a Large sample Goodness of Fit. RIAC START, Vol10, Number4(2003)
- (9) D' Agostino. R. B. and Stephen. M. A. Goodness of Fit Techniques. Marcel Dekker, New York (1986)
- (10) D' Agostino . R. B. Tests for the normal distribution, Goodness-of-fit Techniques. Marcel Dekker, New York (1986)
- (11) Ralph B.D' Agostino. A Suggestion for Using Powerful and Informative Tests of normality.
The American Statistician, Vol. 44, No4, 316-321(1990)
- (12) Shapiro.S. and Wilk.M.B. An analysis of variance test for normality.
Biometrika 52,591-611(1965)
- (13) Shapiro SS, Wilk MB, Chen HJ: A comparative study of various tests for normality.
JAm Stat Assoc ,63,1343-72(1968)

北里大学保健衛生専門学院紀要作成基準

平成24年12月18日 制定

北里大学保健衛生専門学院紀要（以下「紀要」という。）は、以下の基準に定めるところにより、作成するものとする。

1 紀要の発行等

- (1) 紀要は、毎年1回以上を発行するものとし、学術委員会が作成を担当する。
- (2) 紀要の編集に当たって、学術委員会の下に編集委員会を置くことができる。

2 投稿資格

紀要に投稿できる者は、本学院同窓生、在校生、教職員、その他学内外から推薦された者とする。

3 紀要に掲載する学術領域

紀要に掲載する学術領域は、健康科学及び医学、看護、医用生体工学など医療系の研究・教育に関するものとし、論文の区分は原著 Original Article、総説 Review Article、症例報告 Clinical Report、論説 Letter などとする。

4 掲載原稿の選考及び決定等

- (1) 学術委員会は、投稿された原稿の査読を行い、掲載予定原稿を選考し、学院長に推薦する。
なお、学術委員会が必要と認めた場合は、原稿の査読を学術委員会委員以外の者に依頼することができる。
- (2) 学院長は、学術委員会から推薦のあった掲載予定原稿を確認し、最終決定する。
- (3) 営利性が認められると判断された論文は、原則として掲載しない。

5 著作権等の取扱い

- (1) 投稿された論文の著作権及び版権は、全て本学院に帰属するものとする。
- (2) 掲載された内容について、第三者の著作権を侵害するなどの指摘があった場合は、原稿執筆者がその責任を負うものとする。

6 インターネット上での公開

紀要は、本学院ホームページに掲載する。

7 執筆要領等

投稿原稿の執筆等に当たっての詳細は、別に定める「北里大学保健衛生専門学院紀要執筆等要領」のとおりとする。

8 事務局

紀要の作成に関する事務局は、学術委員会とする。

9 基準の改廃

この基準の改廃は、学術委員会の議を経て、学院長が承認する。

10 附則

- (1) この基準は、平成24年12月18日から施行する。
- (2) この基準の施行に伴い、「北里大学保健衛生専門学院紀要投稿規程」は廃止する。

北里大学保健衛生専門学院紀要執筆等要領

1 論文の言語

- (1) 論文の原稿は、邦文又は英文で記し、邦文と英文の要旨を付けてください。

2 投稿原稿の原則

- (1) 投稿原稿は、国内外を問わず他紙に未発表のものとしします。
- (2) 論文の内容が倫理的考慮を必要とする場合は、必ず「方法」の項に倫理的配慮を記載してください。
- (3) ヒトを対象にした論文は、1964年のヘルシンキ宣言（以降の改変）に沿い、必要な手続きを行ってください。特に臨床試料を扱う場合には、原則として所属機関の倫理委員会などで認められた研究内容で、同意書等を取得した上で得たデータとしします。
- (4) 動物による論文は、動物愛護の立場から所属機関の実験動物に関する管理に従って行ったことを明記してください。
- (5) 論文の形式は、執筆要領に従ってください。これに反する場合は原則として受け付けません。
- (6) 修正などのために原稿を返却された場合は、返却日から1か月以内に返送してください。期間内に返送されなかったものは不採用としします。また、修正を求められ再投稿する場合は、指摘された事項に対する回答を付記してください。

3 執筆要領

- (1) 論文の書き方等
 - ① 表紙には表題、著者名、所属機関名、所属機関連絡先住所、キーワード（5語以内）、要旨（600字以内）を邦文で記載してください。
 - ② 英文による表記を併記したい場合は2頁目に表題、著者名、所属機関名、所属機関連絡先住所、キーワード（5語以内、原則として英語の小文字・単数形で記載）、要旨（500語以内・シングルスペース）を記載してください。上項ともにポイント数、配置等についてはひな形を参照のこと。
 - ③ 異なる機関に属する者の共著である場合は、所属ごとに番号を付してその番号を著者氏名の右肩に示した上で、氏名欄の下に一括して番号ごとの所属先を記してください。
 - ④ 表紙頁を1頁として、通し番号を付してください。
 - ⑤ 2頁（英文表記をする場合は3頁）目から、序文、方法、結果、考察、結論、謝辞、文献、脚注の順に記載し、原稿の構成も同様としてください。なお、それぞれの見出しの言葉は変更しても構いません。
 - ⑥ 論文はA4普通用紙を使用し、邦文論文は横書きで、英文論文はシングルスペースで記述してください。また、数字及び英字は原則として半角としてください。
 - ⑦ 英文論文は、英語に関して十分な知識を持つ専門家の事前チェックをなるべく受けてください。なお、学術委員会の判断で、受理後の印刷前に英文チェックを行う場合があります。その際の費用は、著者の負担となります。
 - ⑧ 原著原稿は、邦文・英文共に刷り上がりA4普通紙6～10頁程度、これ以外の原稿は6頁までとしします。

- ⑨ 文字使い等は、次のとおりとしてください。
- ・学名はイタリック体を用いるかアンダーラインで明示してください。
 - ・化学物質名・菌名・病名等は省略せずに記述し、略号を用いる場合には文中にその旨を記してください。
 - ・外来語は、片仮名で書いてください。
 - ・外国人名や適当な日本語訳のない術語などは、原綴を用いてください。
 - ・単位は、特別の理由がない限り SI 単位を用いてください。
 - ・数字は、アラビア数字を用いてください。
 - ・表題には商品名を用いないでください。文中に登録商標名を使用する際は、最初を大文字とし、登録商標名のあとに社名を括弧書きして表記してください。
 - ・図・表及び写真は本文に挿入してください。図表は可能な限り白黒とし、組織標本などカラーが必要な場合のみカラーとしてください。
- ⑩ 引用文献の記載様式は、次のとおりとしてください。
- ・引用文献は、本文中の引用箇所右肩に、⁽¹⁾、^(1~3)、^(1,3~5) などの上付き両括弧数字で示し、本文の最後一括して引用番号順に記載してください。
 - ・引用できる文献は、既に発行された書籍、論文とします。
 - ・引用文献の記載は、以下の形式としてください。雑誌名の略記は「医学中央雑誌」及び「Index Medicus」に従ってください。
 - i 学術雑誌の例

[著者名、表題、雑誌名、発行年(西暦)；巻：頁一頁.]

(1) 北里柴三郎、志賀潔、細菌の遺伝子調節予防法、北里研究所雑誌、1868；58：267-274.

(2) Kitasato S, Shiga K, Hata S, Effect of the Toxin on stress and temperature. Arch Kitasato Inst, 1887；55：121-125.
 - ii 単行本の例

[著者名・表題・編者名・書名、発行所所在地：発行所、発行年(西暦)；頁一頁.]

(1) 志賀潔・赤痢菌・北里柴三郎編・細菌検出方法、東京：北里研究所出版、1830；246-258.

(2) Hata S, Kitasato S・Antibiotic and resistant bacteria・Kitasato S ed.・In Method for extracted antibiotic. Tokyo：Kitasato Inst press、1839；101-128.
 - iii 特殊な報告書、投稿中原稿、私信などのほか、インターネットのホームページは、原則として引用文献としては認められません。
- ⑪ 研究実施や原稿作成などの過程で、研究助成、特定の企業、その他の団体の経済的支援を受けた場合は、論文内にその旨を記載してください。
- ⑫ 最後に、頁数、文字フォント、ポイント等が執筆要領及び原稿ひな形に沿って作成されているか確認してください。

4 原稿等の送付方法

- (1) 原稿等は、原則として電子投稿とします。

- (2) 原稿等は、電子メールの添付ファイルとして送付してください。なお、メールの送信については自己責任において行ってください。
- (3) 電子ファイルの保存形式は、Word 若しくは pdf 形式としてください。
- (4) 電子投稿ができない場合は、電子メディア（CD-ROM 等）に保存したものの郵送も可とします。その際は、記憶媒体にラベルを貼り、筆頭著者氏名、保存形式を併記してください。
- (5) 投稿する際は、必ず原稿審査依頼書（指定様式 様式 1）を添付してください。
- (6) 電子投稿の送付先アドレス及び郵送先は、次のとおりです。

E-mail アドレス：symposia@kitasato-u.ac.jp

郵送先：〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

北里大学保健衛生専門学院 学術委員会事務局 宛

電話 025-779-4511

ただし、学内の教職員等が投稿する場合の提出方法は、別途通知します。

なお、郵送する場合は、必ず簡易書留便又は宅配便（メール便は除く）とし、封筒の表に「北里学院紀要原稿」と朱書きしてください。

- (7) 受領した原稿（記憶媒体を含む。）は、返却しません。

5 原稿の校正等

- (1) 掲載原稿の校正は、学術委員会において行います。
- (2) 原稿の掲載は、論文の区分ごとに受理順とします。

6 掲載料等

- (1) 査読料及び掲載料は無料です。
- (2) 組織標本などカラーでの掲載を希望する場合の印刷費用は無料です。
- (3) 発行した紀要は、著者数+1冊を第一著者に贈呈します。

7 掲載内容の使用手続き

- (1) 紀要に掲載された図表など原著性の高い内容を、他の雑誌や書籍刊行物で使用する場合は、指定様式（様式 2）により本学院に必ず書面で許諾申請を行ってください。電子メールでの申請は受け付けません。
- (2) 使用が許可された図表等に関しては、脚注あるいは参考文献として引用文献の明示、謝辞などに記載してください。

8 その他

紀要の執筆等に当たって不明な点は、「学術委員会事務局」までお問い合わせください。

以 上

編 集 後 記

北里大学保健衛生専門学院紀要第 22 巻の編集を無事に終えることが出来ました。御投稿をいただいた先生方に心より感謝を申し上げます。

紀要第 22 巻には、4 報の原著論文、3 報の短報および 1 報の資料が掲載されております。研究内容は臨床検査学、栄養学、臨床工学を基本とし、病理学、工学、生化学、統計学および動物実験など、それぞれの専門分野を活かした方法で行われたものとなっております。また、本巻から採用された短報に複数の御投稿をいただくことも出来ました。

一方で、昨年 12 月に開催された第 25 回魚沼シンポジアにも、本学院の教員などから 9 件の口演発表がありました。特に本学院卒業生による 4 件の御発表は、日々の学院生活の中では経験することが難しい臨床の現場からの貴重な報告であり、教員ばかりではなく在校生にとっても大きな刺激となったことと思います。

北里大学保健衛生専門学院紀要および魚沼シンポジアは、独立した研究者として活躍している教員の成果を発表する場としてばかりではなく、これから学位の取得を考えている教員、在校生および卒業生の勉強の場として、広く開放されているものです。これからも多くの御投稿、御発表がいただけますよう、今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。

平成 29 年 7 月 20 日

学術委員会委員長

小林 健司

北里大学保健衛生専門学院紀要

学術委員会（編集委員会）

委員長 小林 健 司（管理栄養科）
委員 金子 博 司（臨床検査技師養成科）
委員 小丸 圭 一（臨床検査技師養成科）
委員 笹岡 悠 一（臨床検査技師養成科）
委員 三宅 久 枝（保健看護科）
委員 坂西 三代子（事務室）

北里大学保健衛生専門学院紀要（非売品）

第22巻 2017

平成29年7月20日発行

発行人 小幡 文 弥

発行機関 北里大学保健衛生専門学院

〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

発行所 ㈱いんばん

〒949-7302 新潟県南魚沼市浦佐 1140 番地 2

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

Scholarly Committee（Editorial Board）

Editor-in-Chief Kenji KOBAYASHI（Department of Applied Clinical Dietetics）
Editors Hiroshi KANEKO（Department of Medical Technology）
Keiichi KOMARU（Department of Medical Technology）
Yuuichi SASAOKA（Department of Medical Technology）
Hisae MIYAKE（Department of Nursing）
Miyoko BANZAI（Office Worker）

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

Vol 22 2017

Published by

Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences

Printed by

Inpan Corp. Niigata, Japan

北里大学保健衛生専門学院

〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

電話(025)779-4511(代)