

北里大学保健衛生専門学院紀要

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

第 24・25 卷

プロジェクト学習による学びのプロセスと成果

野上 聡子（北里大学保健衛生専門学院 保健看護科）他

後腎における TGF- β シグナルの役割

西村 裕介（北里大学保健衛生専門学院 臨床工学専攻科）

新潟県佐渡市両津湾から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻のドウモイ酸生産

小林 健司（北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科）

臨床検査技師に必要な統計学について（第 6 報）

ーバリデーションに必要な精度管理用語の基礎理解ー

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）他

KITASATO JUNIOR COLLEGE
OF HEALTH AND HYGIENIC SCIENCES

Vol. 24・25

2020

北里大学保健衛生専門学院紀要
第 24・25 卷 2020 (令和 2) 年
目 次

〔原著論文〕

- プロジェクト学習による学びのプロセスと成果 …………… 1
野上 聡子 (北里大学保健衛生専門学院 保健看護科) 他
- 後腎における TGF- β シグナルの役割 …………… 7
西村 裕介 (北里大学保健衛生専門学院 臨床工学専攻科)
- 新潟県佐渡市両津湾から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻のドウモイ酸生産 …………… 17
小林 健司 (北里大学保健衛生専門学院 管理栄養科)

〔活動報告〕

- 臨床検査技師に必要な統計学について (第 6 報) …………… 25
ーバリデーションに必要な精度管理用語の基礎理解ー
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) 他

〔雑 報〕

- 作成基準・執筆要領 …………… 37

〔編集後記〕

- 小林 健司 (学術委員会委員長) …………… 41

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

Vol.24・25

2020

Contents

[Original Article]

Process of learning and outcomes by Project based learning

NOGAMI Satoko et al. (Department of Nursing, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

The role of TGF- β signaling in metanephros

NISHIMURA Yuusuke (Department of Medical Technology, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

Domoic acid production of *Pseudo-nitzschia* sp. isolated from Ryotsu bay in Sado island, Niigata

KOBAYASHI Kenji (Department of Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

[Activity Report]

Statistics required for a medical laboratory technologist (Part 6)

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

[Information]

Instruction to Authors

Editor's postscript

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

プロジェクト学習による学びのプロセスと成果

野上聡子, 佐藤美恵子, 岡本亜希

北里大学保健衛生専門学院 保健看護科
〒949-7241 新潟県南魚沼市黒土新田 500 番

要旨

A 看護専門学校では 2017 年度より、リメディアル教育として、学習方法に関するプロジェクト学習を実施している。授業終了後のアンケートには、ほとんどの学生が「成果があった」と回答しており、この学習方法に一定の成果があると認識している。

そこで、学生の学びのプロセスを明らかにし、学習支援のあり方への示唆を得たいと考え、半構成的インタビューによる調査を行った。

結果、以下のプロセスが明らかになった。

プロジェクト学習の開始当初は、【課題に対する受け身の姿勢】【イメージできない課題】という概念が抽出された。一方で、【目標設定してやる気で臨む】という概念も抽出され、学生は<個人により異なる課題の捉え>をしていた。そして、学生それぞれが【うまくいかない過去の学習方法】を振り返り、【新しい学習方法を求める思い】を抱き<学習方法変容への希求>を始めていた。それが<他者と比較しての自分への気づき>という体験となり、<主体的課題認識>へと変化し<効果的な学習方法の探求>、<学習の習慣化>へとつながっていた。この変化は<共に学びあう学習方法の獲得>や<危機感>、<教員の支援への肯定的な認識>によって促進されていた。

以上のプロセスで明らかになった学生の変化の様子は「内発的動機付けの強まり」「主体性の高まり」と捉えられ、プロジェクト学習が学生の学習方法や学習習慣に有用な変化をもたらしていたと考えられる。

キーワード

プロジェクト学習, 学習方法, 看護学生

投稿日：2020 年 4 月 27 日 / 受理日：2020 年 7 月 3 日

1. 序文

A 看護専門学校では 2017 年度より、新入生に対する初年次教育として学習方法に関するプロジェクト学習を実施している。専門的な学習において継続的に自己を成長させるための効果的な学習方法を獲得することを狙ったものである。授業終了後のアンケートには、ほとんどの学生が「成果があった」と回答しており、この学習方法に一定の成果があると認識している。

プロジェクト学習は「学習者が自ら課題を発見し、目標を明確にして情報を集め、課題解決していく手法」⁽¹⁾であり近年、看護基礎教育でも盛んに行われ、プロジェクト学習によって学生が主体的に変化したという研究報告も多い^(2~4)。しかし、それらを含めた研究の多くは各看護領域の教育にプロジェクト学習をとり入れた効果に関するものであり、学生自身の学習方法の転換に焦点を当てた報告は見当たらない。

そこで今回、学習方法の転換をねらったプロジェクト学習において、学生がどのようなプロセスを体験し、どんな学びを得ているのかを明らかにすると共に、学習支援のあり方

への示唆を得たいと考えた。

プロジェクト学習の進め方は以下の通り(図 1)。

科目名：スタディスキルズ(全 15 回)。開講時期は 4 月末～11 月。

授業開始当初から、学生 4～5 人のグループに対し 1 人の教員がアドバイザー(以下、チューター)となる。学生は、はじめの 2 回の授業で科目担当教員から動機付けを目的として、プロジェクト学習の説明を受ける。その後、他の科目の授業を受けながら「学習状況記録シート(授業の感想や理解度、学習に対する思い、自己学習の状況を記入する用紙)」に日々の学習状況を 3 週間程度記載し、それを参考に自分の学習方法の適切さや意欲、学習への取り組み状況等を振り返り、課題を見つける。その課題を達成するための学習方法について情報収集し、それを実践しながら効果的な学習方法を探る。その間の進捗状況は、スタディスキルズの授業内で毎回グループメンバーに報告し、互いにアドバイスしあう。またチューターと定期的に面談しアドバイスを受ける。最終的に得られた自分にとって効果的な学習方法をクラス内でプレゼンテーション

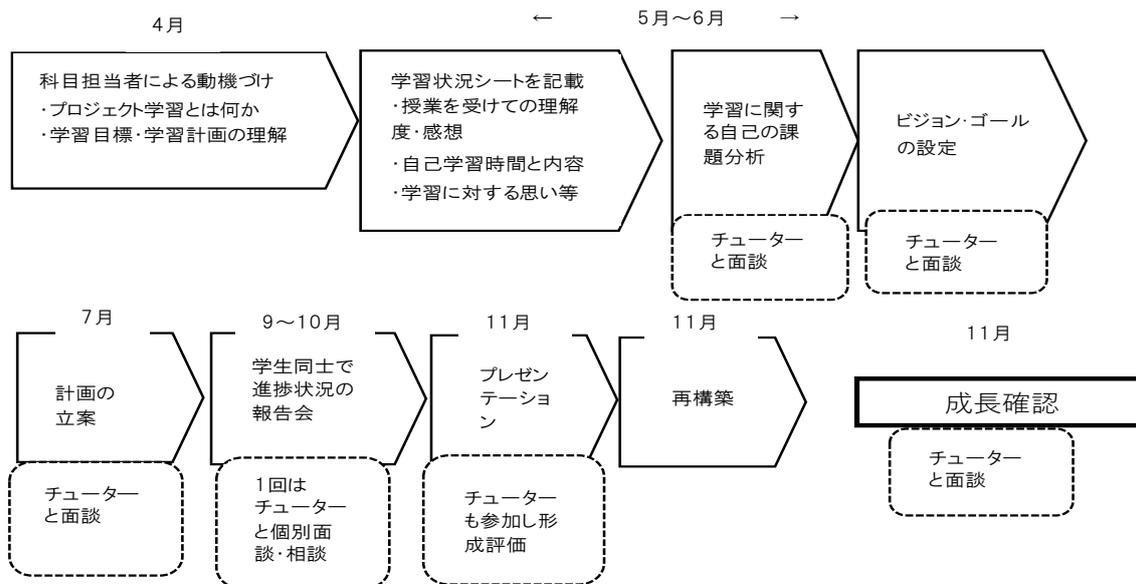


図 1 . 学習方法に関するプロジェクト学習 授業の進め方

ョンし、プレゼンテーションを聞いた学生や教員の評価を参考に、自己の取り組みを俯瞰し成果を A3 サイズの用紙にまとめる(図 1-再構築)。最終回ではチューターと面談を行い、自己の成長を確認する。

1. 方法

1) 研究デザイン：半構成的インタビューによる質的帰納的研究

2) 調査実施期間：2018 年 3 月

3) 研究対象者

A 看護専門学校の見護学生で、2017 年度のスタディスキルズを 1 年次に履修した学生のうち、研究趣旨を理解したうえで研究協力を同意した学生 9 名。

4) データ収集方法

インタビューは、研究者と研究対象者 1 対 1 で行い、プロジェクト学習で研究対象の学生が含まれるグループを担当していない者が行った。インタビューの内容は、プロジェクト学習への取り組みの経緯、学生自身が感じている自分の変化の有無と内容、学習方法が変化するまでにどんな経験や思いを抱いたかとし、「成果」「効果」等の言葉で誘導することがないよう、事前に研究者間で打ち合わせた。インタビューは研究対象者ごとに 1 回ずつ行い、許可を得て IC レコーダーで録音し、その内容から逐語録を作成し分析データとした。

5) データ分析方法

Modified Grounded Theory Approach(M-GTA)⁽⁵⁾を参考に分析、解釈した。

逐語録全体のデータを概観した後、分析テーマを「プロジェクト学習による学びのプロセスと成果」に設定し、学生にとってそのデータが持つ意味について、解釈・分析することで概念を生成した。生成した概念や概念間の関係を検討し、カテゴリーを生成し、プロジェクト学習における学びのプロセスを形成した。

分析に当たっては、1 名の研究者が質的

研究経験豊富な他校の見護教員に指導を受けたのち、共同研究者とデータ分析方法について学習会を行って臨んだ。また、分析結果は、博士課程在籍者および博士の学位を持つ質的研究者のスーパーバイズを受け、妥当性と信頼性を高めた。

6) 倫理的配慮

本研究の開始にあたり、A 看護専門学校の内部倫理審査委員会において、倫理的に問題がない旨の回答を得た(2018 年 4 月 9 日通知、受付番号 29-006)。研究実施時期は研究協力の有無が研究対象者の成績評価に影響しない、スタディスキルズの成績評価が確定した後とした。また、研究対象者には、研究目的、方法、自由意志での参加、不参加や中断、および調査終了後に辞退しても不利益のないこと、データの取り扱いと処分方法、プライバシーの保護、研究成果の公表について全体に文書とともに口頭で説明し、研究対象者である学生自らの同意書の提出にて同意とみなした。逐語録を作成後、音声データは削除し、その他のデータは A 看護専門学校教員室内の施錠が出来るところで厳重に管理した。

3. 結果

分析の結果、20 の概念、9 のカテゴリーが生成された。(図 2) 9 のカテゴリーは、①学習に関する変化を開始する段階 ②取り組むことにより生ずる変化 ③取り組みのプロセスに促進的な影響を与えていた要因に大別された。以下、その学習のプロセスを①～③ごとに述べる。概念は【 】、カテゴリーは<>で示した。また、変化の方向を→、影響の方向を➡で示した。

①学習に関する変化を開始する段階

学生は、スタディスキルズが単位認定の対象になることや、学習方法のプレゼンテーションが課せられていることを意識し、取り組まざるを得ない状況となり、【課題に対する受け身の姿勢】であった。また、取り組み開始

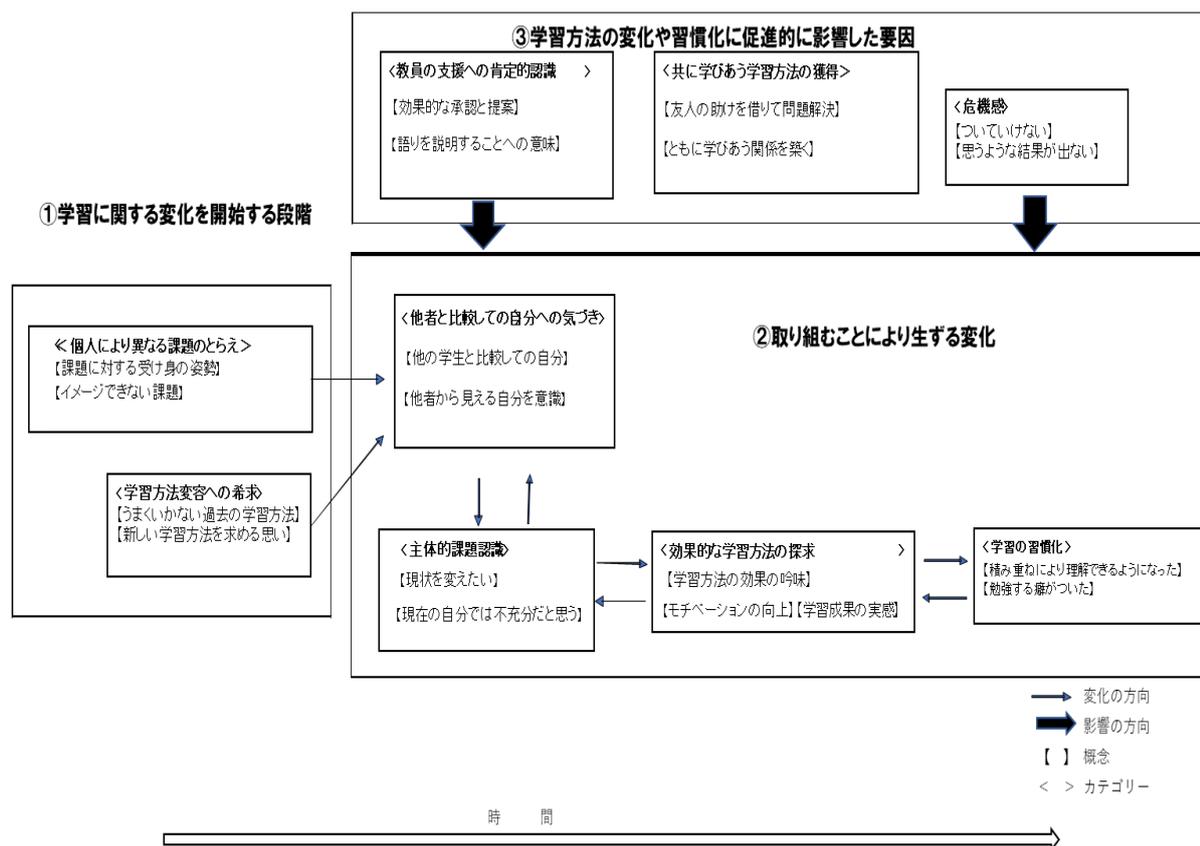


図 2. 学習方法に関するプロジェクト学習 学びのプロセス

時には【イメージできない課題】に対する戸惑いや必要性が納得できない思いの学生もいた。一方で、【目標設定してやる気で臨む】学生もおり、同じ説明でも＜個人により異なる課題のとらえ＞をしていた。その状態から、学生個々が【うまくいかない過去の学習方法】を振り返り、【新しい学習方法を求める思い】を抱き＜学習方法変容への希求＞を始めていた。

② 取り組むことにより生ずる変化

取り組まざるを得ない状況により、学習に関心が向き、いつ学習すると効果的か、どのような方法が理解しやすいか、集中しやすい環境はどこか等を考えながら【他の学生と比較しての自分】や【他者から見える自分を意識】し、＜他者と比較しての自分への気づき＞を体験していた。それにより、【現状を変えたい】と思ったり、【今の自分では不十分だと思った】りして、自ら必要性を認識する＜主

体的課題認識＞へと変化していた。そして、＜効果的な学習方法の探求＞を行いながら、試験結果に成果が表れたり、授業が理解できるようになったりして、【学習成果の実感】や【モチベーションの向上】が得られ【学習方法を吟味】する姿勢に変化していた。そして学習が強化され、日常的に学習するという＜学習の習慣化＞につながっていた。

③ 学習方法の変化や習慣化に促進的に影響した要因

学生同士が途中経過を報告しアドバイスしあう時間の中で、学生は【友人の助けを借りて問題解決】したり、友人の取り組みからヒントを得たり、励ましあいながら【共に学びあう関係を築く】行動を取り、＜共に学びあう学習方法の獲得＞をしていた。また、取り組み期間中に、【思うような結果が出ない】といった体験を通し、このままでは【ついていけない】という＜危機感＞をもち、それが学

習行動につながっていた。さらに、定期的に教員に進捗状況を報告する際に【効果的な承認と提案】をうけ、肯定的結果予知ができ、考えを整理することにつながり、【語り、説明することへの意味】を感じていた。その結果、＜教員の支援への肯定的認識＞が生まれ、取り組みを促進させていた。

4. 考察

少子社会を背景に、大学全入時代といわれ、入学生の多様化が進む中で、看護学の学習に必要な基礎学力の補いやコミュニケーション能力の育成が教育上の大きな課題となっている。(6~7) また、「高校までの学習と大学における学習で求められることのギャップ（受け身の学習から能動的な学習スタイルへの変化）についていけず、学習意欲が減退してしまう学生の存在がある」とも言われている(8)。

そのような状況にある学生に対し、限られた修業年限のなかで看護者となるべく実力をつけるための「学習方法に関するプロジェクト学習」というきっかけが、学習に対して受け身の状態の学生にとって、学習の習慣化への出発点となっていた。そして、取り組みと試行錯誤、失敗や危機感を、自らの経験を通して身に染みて感じる体験が、学生を主体的に変化させる可能性を持つことが分かった。

桜井は学習に関する基本的欲求理論について、自分の能力とその証明への欲求である「有能さ」、周囲との関係に関する欲求である「関係性」、自己の行動を自分自身で決めることへの欲求である「自律性」、これら3つの欲求が満たされることで、人間は十分に発達し、健康であり、効果的に機能できると説明している(9)。今回のプロジェクト学習開始当初の学生は、課題だからやらざるを得ないという外発的動機付けが強い状況からの出発であった。しかし取り組むことにより得られた気づきや成果を実感し「有能さ」を得て、さらに友人や教員との相互作用から「関係性」の欲求も満たされ、他者に相談しながらも自分自身で

決定し行動するという「自律性」の欲求も満たされた結果、取り組んだ成果や価値を感じられるようになり、内発的動機付けが促進され、それが学習の習慣化につながったと考える。

大久保らは、看護学導入時期の学生が感じる困難性を検討した結果、「5つのカテゴリーが抽出でき、最もデータ件数が多かったのは【今までとは異なる学習方法】(中略)であった。」(10)と述べている。その時期の学生にとって、学習方法の転換に焦点を当てたプロジェクト学習は、学生の学習への取り組みや習慣化を促す効果がみられたという点で、大久保ら示した【今までとは異なる学習方法】という学習方法の困難性へのサポートになっていると考えられる。

また、坂下らは入学間もない看護学生について、「学生は、看護とは何かという具体的なイメージがないので、(中略)その重要性が認識されないまま有効に学習されない可能性がある」(11)と述べている。実際、このプロジェクト学習においても、結果①(学習に関する変化を開始する段階)に示すように、学生から「イメージできない」「なぜこんなことをするのかわからない」と訴えがあり、説明を加えたことが何度かあった。このように訴えた学生は、坂下らの主張と同様の状況であったことが予測される。学習開始時に、看護とは何かというイメージを持たせる工夫を行い、なぜこの学習に取り組む必要があるのかを学生自身が納得して始められれば、早期に効果的な取り組みが開始され、さらなる成果につながると考える。

プロジェクト学習で育てたい力は「変化する目の前の現実と向き合い、考え、判断し、行動できる力」(12)である。看護が、目の前の対象に向き合い、看護の必要性を判断し働きかける力を必要とするという意味では、育てたい力は共通である。これを学生と教員が共通認識し本プロジェクト学習に取り組むこと

により、その後に学ぶ各看護学への「足場架け」⁽¹³⁾の役割を果たすと考える。

5. 結論

学習方法の転換をねらったプロジェクト学習において、開始当初、学生は<個人により異なる課題の捉え>をしていた。その状態から、学生それぞれが【うまくいかない過去の学習方法】を振り返り、【新しい学習方法を求める思い】を抱き<学習方法変容への希求>を始めていた。そしてそれが<他者と比較しての自分への気づき>という体験につながり、自ら必要性を認識する<主体的課題認識>へと変化し<効果的な学習方法の探求>へとつながっていた。それが、<学習の習慣化>にもつながっていた。そしてそのような変化は<共に学びあう学習方法の獲得>や<危機感>、<教員の支援への肯定的な認識>に後押しされ促進されていた。

以上のプロセスで明らかになった学生の変化の様子は「内発的動機付けの強まり」「主体性の高まり」と捉えられ、プロジェクト学習が学生の学習方法や学習習慣に有用な変化をもたらしていたと考えられる。

6. 謝辞

本研究を実施するにあたりご助言をいただきました皆様に心より御礼申し上げます。

引用文献

- (1)鈴木敏恵・プロジェクト学習の基本と手法・東京：教育出版、2014；12.
- (2)久保善子、嶋澤純子他、ポートフォリオを用いた主体的学習態度獲得を支援するための教育の評価、慈恵医大誌、2014；129：119-127.
- (3)濱田真由美、上原奈々、3年間で全員合格！願いをかなえたプロジェクト学習、看護教育、2015；56：1184-1189.
- (4)末永由理、篠木絵理他、看護専門職として主体的に学ぶ力を育成する看護基礎教育における教育実践とその評価、東京医療保健大学紀要、2016；11：37-44.

- (5)木下康仁・ライブ講義M-G T A・東京：弘文堂、2009
- (6)久司一葉、看護専門学校生の多様化と初年次教育、佛教大学院紀要、2011；3：1-18.
- (7)島崎昌子、看護学生の学習実態と成績との関連—入学前教育の在り方に関する考察—、松本短期大学研究紀要、11-20.
- (8)川上華代、現大学生の特徴と学生相談についての一考察、和光大学現代人間学部紀要、2013；3：141-152.
- (9)桜井茂男・自ら学ぶ意欲の心理学・東京：有斐閣、2009；99-115.
- (10)大久保暢子、佐竹澄子他、看護学導入時期の学生が感じる困難性の検討、聖路加看護学会誌、2011；9-15.
- (11)坂下玲子、内布敦子他、看護形態機能学における教育方法の検討、兵庫県立看護大学紀要、2004；11：57-66.
- (12)鈴木敏恵・プロジェクト学習の基本と手法・東京：教育出版、2014；10.
- (13)週刊医学界新聞、2017；12.11：第3252号

後腎における TGF- β シグナルの役割

西村 裕介

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：

腎臓発生において Transforming growth factor- β (TGF- β) は、尿管芽の分岐を制御調整する報告もあるが未解明の部分も多く、特に定量的な解析は皆無である。そこで本研究は、後腎内の尿管芽に発現する TGF- β シグナルの役割を解明することを目的とした。

マウス胎生期において TGF- β 関連遺伝子の発現時期と局在を調べたが、顕著な発現量の変化は見られなかった。次に TGF- β I型レセプターキナーゼ阻害剤を用いて解析すると、尿管芽の分岐数の増加と管壁の形態の乱れが観察された。次に半定量的 RT-PCR 解析により原因遺伝子を探索した。その結果、阻害剤処理した後腎は、c-Ret、Wnt11、Sema3a、Gpc3、Zo1 の発現が顕著に減少した。

TGF- β は後腎において c-Ret、Sema3a や Gpc3 などの転写制御を介して尿管芽の分岐を抑制し、さらに ZO1 などの細胞接着因子を制御することで、尿管芽管壁の形態を制御、安定化すると考えられる。以上のことから TGF- β は後腎発生期で尿管芽の分岐・成熟に関わる重要な因子であると考えられる。

key words：

後腎, 尿管芽, TGF- β , SB431542

投稿日：2020年4月27日／受理日：2020年7月3日

1. 序文

腎臓再生において、組織の3次元構造の構築は大変困難である。さらに腎臓は尿細管系、血管系、神経系などが高度かつ複雑に構築されている。近年、iPS細胞から分化誘導した腎臓構成細胞を生体内に移植する細胞療法が報告されている⁽¹⁾。しかし、腎臓の発生過程におけるシグナルは、複数の促進因子と抑制因子がネットワーク状にバランスをとりながら進むと考えられている。そのため、細胞を適切に分化誘導するためには、このシグナルネットワークの解明が不可欠となり、各因子のシグナルの表現型への影響のデータの大量蓄積とデータベース化が必要となる。

そこで本研究では、後腎発生シグナルネットワーク解明のため、TGF- β シグナルがどのような機能を担っているのかを定量的、形態計測学的に解析し、尿管芽発生（集合管及び尿管）に関わる分子機構の解明を目的とした。

2. 方法

2-1 後腎の摘出と *in vitro* 培養

ICRマウス胎仔の腎臓（後腎）を実体顕微鏡下で摘出し、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）の中に浸けた。Transwellの各wellに腎臓培地（DMEM（Sigma）、HamF12（Sigma）、ITS（R&D Systems）、10% FBS（Bio Whittaker）、1% penicillin/streptomycin（Sigma））を800 μ lずつ入れ、5%CO₂インキュベーター内において培地の温度37°C、pH7.0に最適化した。採取した後腎をwellに播種し、5%CO₂インキュベーター内で72hr培養した。本研究は、筑波大学の動物実験倫理委員会によって承認された。

2-2 阻害剤処理

各wellに終濃度10 μ M~100 μ Mとなるように阻害剤（SB431542）溶液の濃度を調整し、添加した。この時の添加量は培地量の100分の1に統一した。コントロールとして、組織

を阻害剤の添加量と同量の溶媒（DMSO）で処理した。

2-3 凍結切片染色

後腎をPBSで3回洗浄した。組織を3cm培養皿に移し、10%中性ホルマリンを用いて室温で20~40分間固定した。10%中性ホルマリンを廃液ビンに捨て、10% sucrose 溶液に室温で2時間浸けた。10% sucrose 溶液を捨て、20% sucrose 溶液を入れて室温で2時間浸けた。同様に30% sucrose 溶液に1晩浸けた。組織をOCTコンパウンド（Sakura Finetek）に入れて4°Cで30分間冷やした。その後、液体窒素で組織を凍結させ、-80°Cにて保存した。続いてマイクロトーム（Leica CM3050SIII）で厚さ10 μ mの切片を作成した。切片上に冷アセトンに乗せ4分間固定し、蒸留水で3回洗浄した。ヘマトキシリンで1分間染色した後、蒸留水で3回、超純水で1回洗浄した。エオシンで1分間染色した後、蒸留水で1回、超純水で1回洗浄した。70%、90%、95%、100%のエタノール（Wako）で十分に脱水した。キシレンに2回置換し、非水溶性封入剤とカバーガラスで封入し、風乾させた。その後、倒立顕微鏡（Olympus, IMT-2）、カメラ（Keyence, VB-7010）で観察した。

2-4 免疫蛍光染色

作成した切片に0.01%サポニン溶液（Sigma）をのせて、シェーカー上で15分間反応させた。サポニン溶液を洗浄した。続いて、0.1%BSA/PBSにて3時間ブロッキングした。BSA溶液を洗浄した。続いて、100倍希釈した1次抗体を1.5時間反応させた。1次抗体を洗浄した。続いて、400倍希釈した蛍光ラベルの2次抗体を1.5時間反応させた。2次抗体を洗浄し、風乾した後、封入剤を用いて封入した。

2-5 共焦点顕微鏡観察

免疫蛍光染色したサンプルは共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss）にて観測した。Alexa488およびAlexa568は488と543nmの波長を励

起させ観察した。

2-6 染色画像の画像解析

染色画像を接眼観察により尿管芽の管の数を数え、単位面積あたりの管の数を算出した。染色画像を Adobe Photoshop にて色調反転、2階調化（閾値 200）しモノクロ画像に変換した。Image Jにて、Surface Plot または Particle Analyze を行った。

2-7 RT-PCR

後腎の mRNA は、RNA 抽出キット (Isogen、Nippon Genes) を使用し、微量分光光度計 (Thermo) を用いて RNA 定量化を行った。適量の mRNA を cDNA に逆転写し、各プライマーは、SuperScript III One-Step キット (Invitrogen) で増幅した。各プライマーは、表に示した。GAPDH は、コントロールとして使用し、cDNA 増幅は 95°C で 60 秒、56°C で 45 秒、72°C で 1 分間、4°C で冷却した。

表 PCR用プライマー

Name	Fw/Rv	Secense		Product Size
		5'	3'	
<i>Alk-5</i>	Fw	ggctctgccatcttcacat		315
	Rv	agaacacgcgtcgcaattt		
<i>c-Ret</i>	Fw	tggcaattgagtccttttc		327
	Rv	gtgagtcggaaggtgtgat		
<i>GAPDH</i>	Fw	tgttctaccaccaatgtgt		396
	Rv	tgtgaggagatgctcagtg		
<i>Gpc3</i>	Fw	ccaacatgctgctcaagaaa		322
	Rv	ctggaagaggtgtcgaac		
<i>Sema3a</i>	Fw	caacctgaacacgatggatg		378
	Rv	tgatctctgcaagcgttgg		
<i>Tgf-β1</i>	Fw	ctgctcttttccctcaac		340
	Rv	gactggcgagccttagtttg		
<i>Tgf-β2</i>	Fw	gacccacatctctgctaa		373
	Rv	ttcgatctggcgctatttc		
<i>Tgf-βr2</i>	Fw	gcaagttttcgatgtgaga		360
	Rv	tgacaccgtcacttgata		
<i>Wnt11</i>	Fw	acctgctgacctggagaga		342
	Rv	cccatggcatttacacttc		
<i>Zo1</i>	Fw	agcggcaggaagctatatga		385
	Rv	aggaccgtgtaatggcagac		

3. 結果

3-1 RT-PCR および蛍光染色による TGF-β 関連遺伝子の解析結果

発生期の臓器では、様々な因子が未分化細胞に働きかけることで細胞が増殖・分化し、形態形成が進行する。また、これらの因子は発現時期、発現部位および発現量が変化し、その違いが特定の組織構造の形成に深く関係している。腎臓発生では尿管芽が伸展・分岐し、その先端に後腎間葉系が凝集塊を形成する。さらにその凝集間葉系細胞がコンマシェイプ、S シェイプに変化し、血管内皮細胞の侵入によって糸球体となる⁽²⁾。この一連の形態形成にも様々な因子が介在しており、尿管芽の先端部分に局在している *c-Ret* とそのリガンドである *GDNF* が尿管芽の伸展を誘導する。また凝集塊の形成には *FGF-2* とそのシグナルの下流にある *Shh*、そして血管内皮細胞の侵入には *VEGF* の局所的発現が関与している。これらのことから、発生過程において遺伝子発現が変化する因子は、特定の組織構造形成に深い関わりがあるものと考えられる。

本実験では、マウス後腎発生期の E13.5 から E19.5 (13.5 日から 19.5 日) までの後腎中における TGF-β に関連する遺伝子の発現を調べ、さらに E15.5 後腎における TGF-β の局在を調べた。

TGF-β リガンドである TGF-β1,2 および TGF-β レセプターである *Alk-5*⁽³⁻⁵⁾、*Tgf-βr2* の遺伝子発現はそれぞれ後腎発生初期の E13.5 から E19.5 のすべてで確認できた。しかし、これらの因子で発生の進行に伴う発現量の顕著な変化は見られなかった (Fig.1)。

次に、未だにはっきりとしていない TGF-β の発現部位を特定するため、TGF-β 抗体と尿管芽の特異的マーカーである *DBA* とによる蛍光免疫二重染色を行った。染色の結果、TGF-β は E15.5 後腎全体に分布していることが分かった (Fig.2A)。特に、尿管芽やその周辺の後腎間葉系細胞に強く発現が見られた。表面解析結果のヒストグラムでも、後腎の中央に位置する尿管芽の周りで *DBA* と TGF-β のヒストグラムの重なりが多く見られ

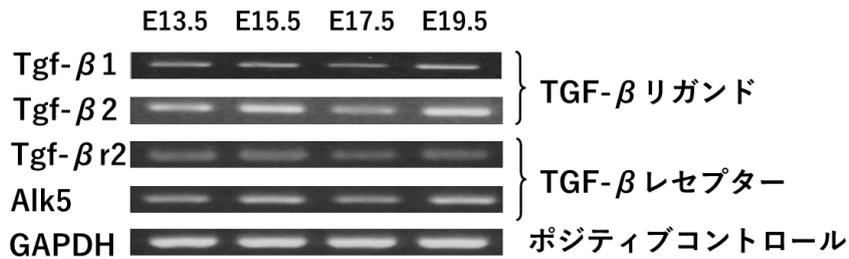


Fig.1 後腎発生期におけるTGF- β 関連遺伝子のRT-PCR
 後腎に発現するTGF- β リガンドおよびTGF- β レセプターの
 遺伝子発現

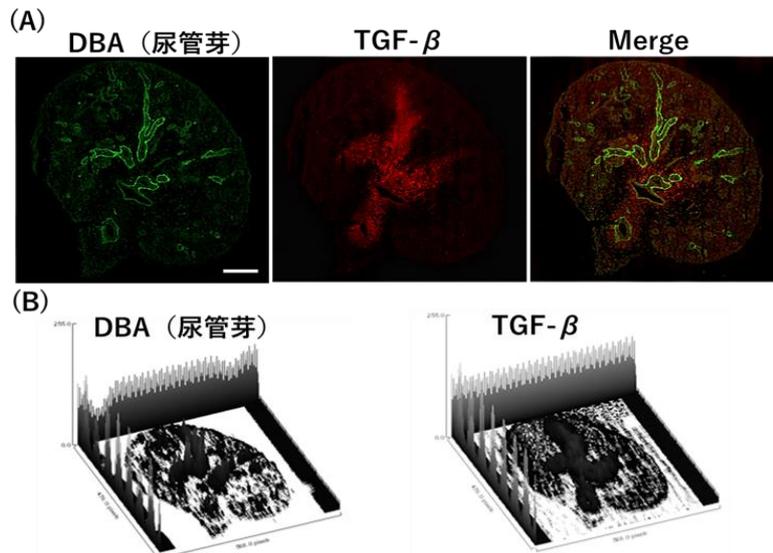


Fig.2 後腎発生期におけるTGF- β 発現の局在
 15.5日目の後腎（マウス胎仔腎臓）(A)免疫蛍光染
 色画像、DBA（尿管芽）（左）、TGF- β （中央）、合成画像
 （右）Scale bar=200 μ m (B)表面解析ヒストグラム画
 像、DBA（尿管芽）（左）、TGF- β （右）

(Fig.2B)。

3-2 SB431542 が尿管芽発生に与える影響 の形態計測学的解析結果

3-1 の後腎発生における TGF- β 関連遺伝子の RT-PCR の結果から TGF- β が腎臓発生、特に尿管芽の形成に深く関係していることが考えられる。そのため、TGF- β の作用が尿管芽の形成にどのように関係しているかを直接的に調べるため、TGF- β のシグナル伝達を特異的に阻害する SB431542 を用いて以下の実験を行った。SB431542 は TGF- β I 型レセプターキナーゼを特異的に阻害する。これを培地に添加した状態で摘出した後腎を *in vitro* 培養し、TGF- β シグナルが尿管芽発生に与える影響を観察した。

最初に、培養後腎の HE 染色を行い、組織の全体的な様子を観察した。この結果から、コントロールにおいて、*in vitro* 培養によると考えられる影響がみられる。糸球体や毛細血管構造が見られない。また中心部分は細胞密度が低いのに対し、皮質部分は細胞が密に存在する。次に、阻害剤処理をした切片の画像では、コントロールに比べて、管構造が多く見られ、管の周りには凝集した細胞群が見られた。しかし、こちらでも糸球体や毛細血管構造は観察されなかった (Fig.3)。

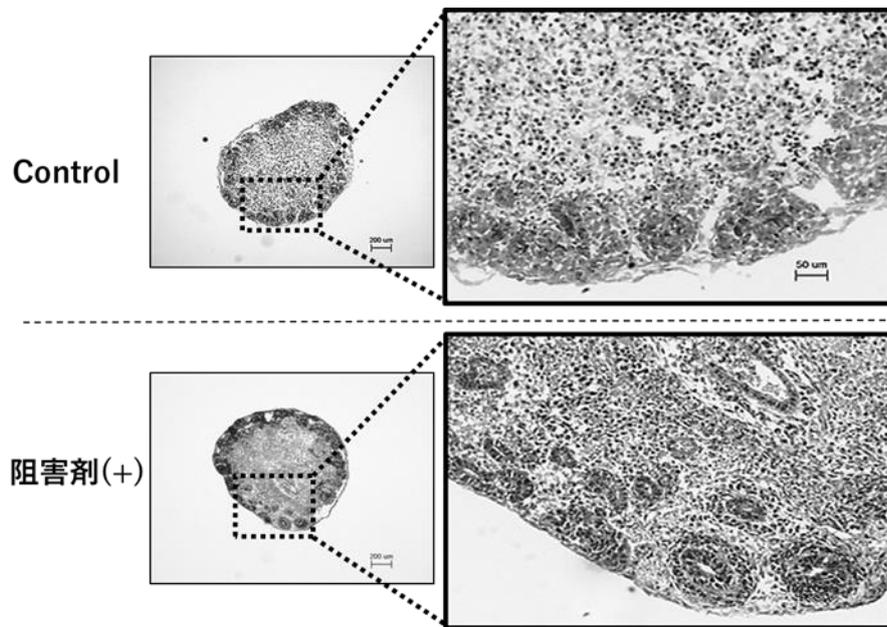


Fig.3 *in vitro* 実験によるE15.5後腎組織切片のHE染色観察
Controlの後腎全体画像（左）、拡大した後腎（右）
阻害剤(+)の後腎全体画像（左）、拡大した後腎（右）

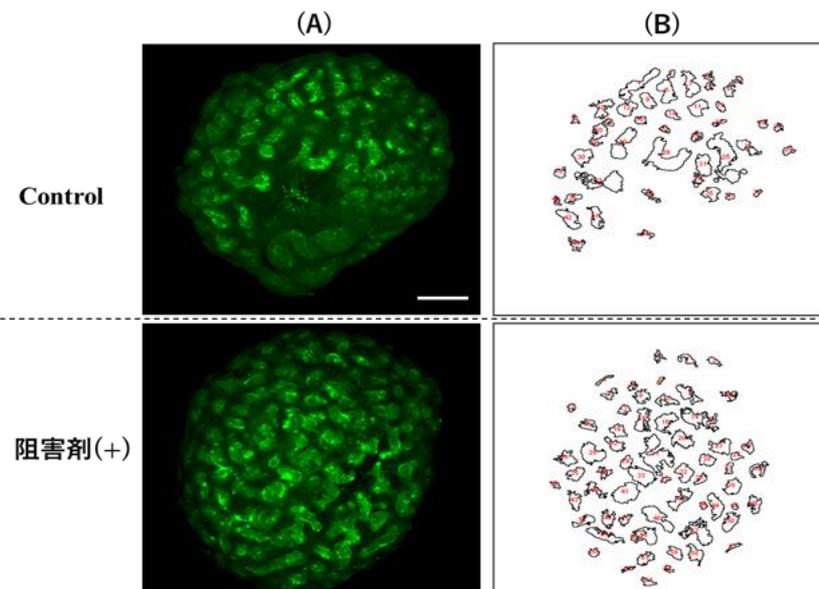


Fig.4 *in vitro* 実験によるE15.5後腎組織の顕微鏡観察
(A)DBA（尿管芽マーカー）染色による後腎全体画像、
(B)染色画像の尿管芽を小片解析した画像
Scale bar=200μm

次に、TGF- β 型レセプター阻害剤 SB431542 による尿管芽の形態変化を観察するため、E15.5 後腎において尿管芽特異的マーカーである DBA 染色を行い観察した。結果を Fig.4A に示す。この染色画像を小片解析した結果、DBA の蛍光を放つ塊がコントロールは44個、阻害剤では64個確認され、阻害剤処理したも

のの方が、尿管芽の数が増える事が判明した (Fig.4B)。

さらに詳しく尿管芽の形態を観察するために、DBA と Phalloidin による多重染色を行った。まず髄質部分では尿管芽はほとんど観察されなかった。コントロールのサンプルでは、皮質部分にも少数の尿管芽しか観察されず、

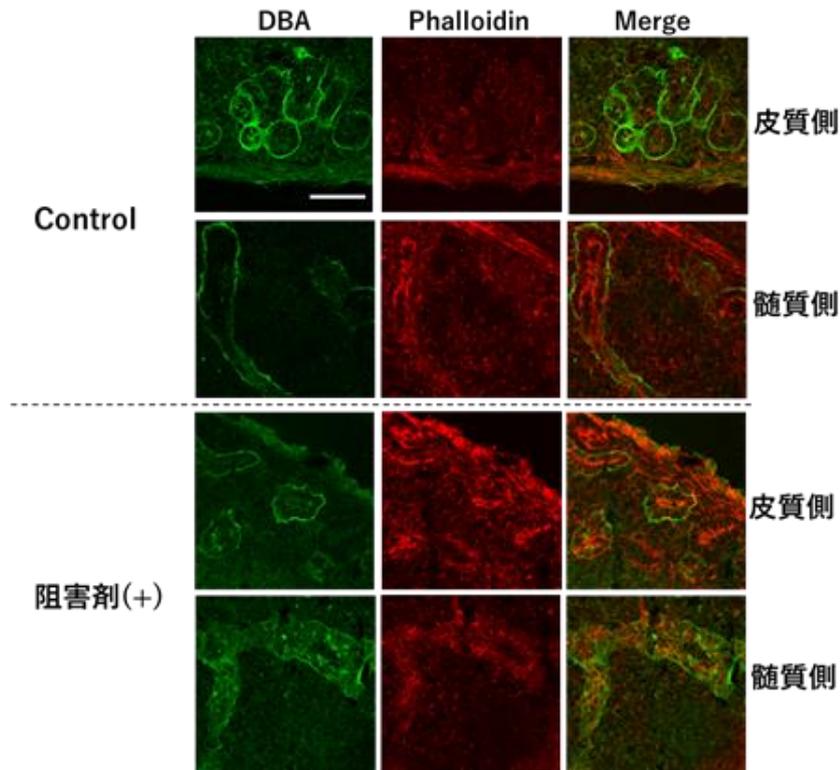


Fig.5 *in vitro*実験によるE15.5後腎組織切片の免疫蛍光染色観察
Controlおよび阻害剤(+)の後腎をDBA（尿管芽マーカー）とPhalloidin（アクチンマーカー）で染色した皮質側と髓質側の免疫染色画像 Scale bar=50 μ m

存在する尿管芽も 3~4 個の管がある程度密集して存在していた。また、管の形は安定しており、円形を示していた。一方、阻害剤処理したサンプルは、皮質部分に、満遍なく尿管芽の管構造が観察された。またその数もコントロールに比べて多かった。しかし、管の形は安定せず、円形よりもゆがみ、管壁がギザギザになっていることが観察された (Fig.5)。

これらの観察された現象を、定量的に解析するために、DBA の染色画像を用い、画像解析を行った。まず、確認される管構造の数は、コントロールで平均 15 個/ mm^2 、阻害剤処理したもので平均 29 個/ mm^2 となった (Fig.6)。このことから、阻害剤処理することで、管の数の増加傾向がみられた。また、次に小片解析を行った。結果を Fig.7 に示す。画像解析の結果、アスペクト比の短辺/長辺比 (A) は、コントロールが 0.87 ± 0.08 、阻害剤処理が

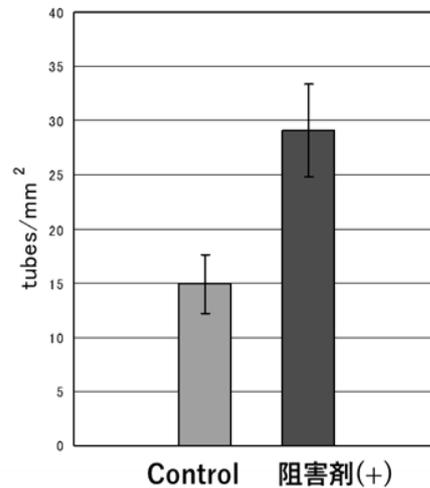


Fig.6 阻害剤処理による尿管芽数への影響
Controlと阻害剤(+)の尿管芽の管腔構造の数を比較したグラフ (n=7)

0.82 ± 0.13 となり、最適楕円の短軸/長軸比 (B) は、コントロールが 0.77 ± 0.07 、阻害剤処理したものが 0.72 ± 0.14 共に阻害剤処理したほうが、平均値が低い傾向がみられた (Fig7A,B)。次に複雑度では、コントロールが 54 ± 11 、阻害剤処理が 150 ± 69 となった。円型度におい

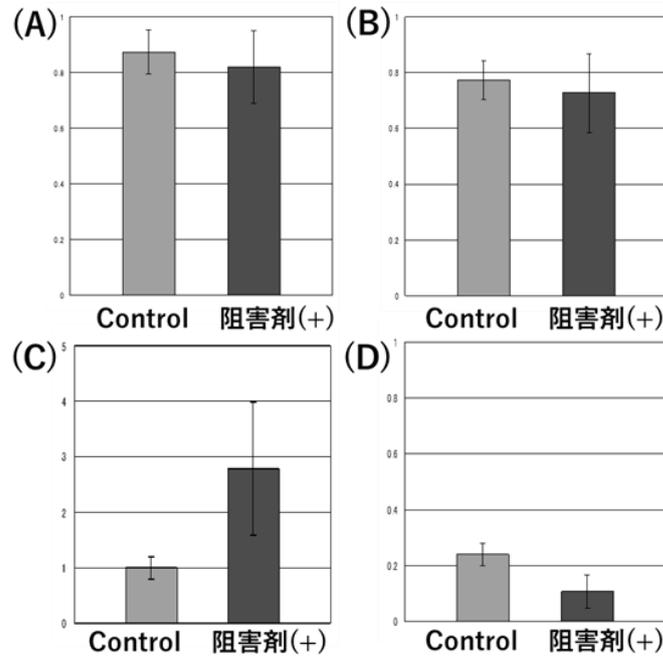


Fig.7 培養後腎組織切片の画像解析
 (A)アスペクト比 (短辺/長辺)、(B)最適楕円短軸/長軸、(C)複雑度、(D)円形度 (n=6)

ではコントロールが 0.24 ± 0.04 、阻害剤処理したものが 0.11 ± 0.06 となった (Fig.7C,D)。

3-3 SB431542 が尿管芽発生に与える影響の分子生物学的解析結果、染色画像の画像解析結果を裏付け、形態変化の原因を特定するため、尿管芽の発生に関連する遺伝子の半定量的 RT-PCR 解析を行った。結果、GAPDH 比の数値から c-Ret はコントロール 0.38 ± 0.07 、阻害剤処理 0.24 ± 0.08 となり Wnt-11 はコントロール 0.24 ± 0.06 、阻害剤処理 0.13 ± 0.05 となり阻害剤処理によって発現量が半減した。Sema3a はコントロール 0.28 ± 0.12 、阻害剤処理 0.04 ± 0.03 となり顕著に減少した。Gpc3 はコントロール 0.42 ± 0.13 、阻害剤処理 0.30 ± 0.04 となり減少傾向が見られる。Zo1 はコントロール 0.50 ± 0.12 、阻害剤処理 0.04 ± 0.04 となり顕著に減少した (Fig.8)。

4. 考察

本研究では、最初にマウス胎生期 (E13.5～E19.5) において TGF- β ⁽⁶⁾ の遺伝子発現時期と局在を調べた結果、TGF- β リガンド、レセプ

ターともに顕著な遺伝子発現量の変化は見られなかった。また E15.5 後腎凍結切片を用いた蛍光染色の結果、TGF- β I の尿管芽周囲での局在がみられた。次に TGF- β 1 型レセプターキナーゼの阻害剤である SB431542 を用いて E15.5 後腎を *in vitro* 培養し、遺伝子発現の変化を観察した。まず培養した E15.5 後腎に対して、尿管芽を特異的に染色する DBA 染色を行った。染色画像を解析した結果、尿管芽の数が阻害剤処理により約 2 倍に増え、尿管芽の複雑度が約 2.5 倍上昇し、円形度が 0.5 倍低下した。このことから、TGF- β シグナル阻害剤によって、尿管芽の分岐数の増加と管腔形態の不安定化が観察された。次に半定量的 RT-PCR 解析により、染色画像で観察された表現型の変化の原因遺伝子を探索した。その結果、TGF- β シグナル阻害剤処理により、c-Ret、Wnt11、Sema3a、Gpc3、Zo1⁽⁷⁻¹¹⁾ の発現が顕著に減少した。これらの結果から c-Ret は尿管芽先端部に局在化し、Wnt11 などを発現させ分岐を促進する因子であるが、発現が低下したことにより尿管芽先端への局在化が進

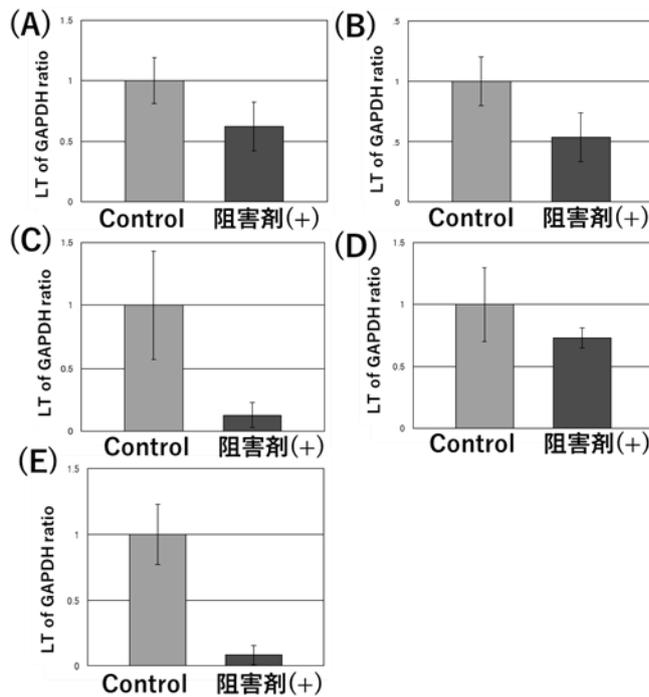


Fig.8 阻害剤処理による尿管芽発生関連遺伝子への影響
 (A)c-Ret、(B)Wnt11、(C)Sema3a、(D)Gpc3、(E)Zo1 (n=5)

み、さらに分岐抑制因子である Sema3a が減少したことで、分岐数が増加したものと考えられる。また、シグナルを抑制する Gpc3 の発現低下により、レセプターに結合できる GDNF が増加したことも考えられる。ZO1 は細胞間接着因子で上皮細胞などにおいて TJ の形成にかかわっている。この Zo1 が低下したことで、尿管芽上皮細胞で構成されている管壁の形が乱れたものと考えられる。

以上の実験結果から、本来 TGF-β シグナルは後腎において c-Ret、Sema3a や Gpc3 などの転写制御を介して尿管芽の分岐を抑制した。さらに ZO1 などの細胞間接着因子を制御することで、尿管芽を構成する尿管芽上皮細胞の apical 部位の tight junction を維持し、管壁の形態を安定化することが示唆された。

肺の発生では、TGF-β1 は肺発生の初期にあたる E11 から遺伝子発現が見られ、原始的な気管の枝分かれと成熟化に深く関係し、TGF-β1 の局在が未分化な管の柄の部分と、分岐の際にできる割れ目部分にみられる⁽¹²⁾。

また、ラット後腎から単離した尿管芽の *in*

vitro 培養での TGF-β 添加実験⁽¹³⁾は、尿管芽の伸展・分岐などへの影響があると言われている。しかし、FGF2 とともに TGF-β を添加した場合、顕著に尿管芽の伸長、分岐阻害が見られるが、FGF7 とともに TGF-β を添加するとより生体の正常に近い尿管芽形成がなされる。

以上のことから、TGF-β シグナルは後腎発生期の尿管芽の分岐、尿管芽の成熟および管壁の形態維持・安定化に重要な役割を果たしていると考えられる。

今回は mRNA の発現に焦点を当て解析を進めたが、mRNA は転写後、翻訳されずに分解されたり、翻訳されたタンパク質が、すぐにユビキチン化され分解されていたりしている可能性がある。そのため Western blot や Zymography により、タンパク量や酵素活性を調べる必要もあると考えられる。

今回の実験では、培養後腎 HE 染色において、コントロール、阻害剤処理共に中心部分は細胞密度が低いのに対し、皮質部分は細胞が密に存在する。尿管芽の周りに凝集した細

胞が見られるが、コンマシェイプやSシェイプは観察されなかった。また、糸球体や毛細血管構造が見られない。また、DBAとPhalloidinによる免疫蛍光染色結果で、髄質部分では尿管芽はほとんど観察されなかった。これらはTGF- β シグナルの影響ではなく、今回の*in vitro*培養条件によるものと考えられる。後腎の*in vitro*培養系の確立はまだ研究段階である。現在、Transwellを用いたDMEM/Ham-F12/5%FBSでの培養法が一般的であるが、この方法ではE15以降の大きい後腎では組織中心部の発生がうまくいかない。これは培地成分が、組織の中心部まで浸透しないためだと考えられている。そのため、シリンジやマイクロピペットなどで組織に穴を開ける方法が採られているが、細胞傷害によるネクロシスを起こす危険性がある。今回の実験でも、培地の栄養成分などが組織中心部への浸透が不十分であるため尿管芽は組織中心部で観察されなかったものと思われる。

また従来の方法では皮質部分においてもコンマシェイプ、Sシェイプ以降は観察されていない。これは、糸球体内皮細胞、メサンギウム細胞、尿細管を取り巻く毛細血管網などの血管系の構築がうまくいかないためと思われる。その原因としては、培地成分が血管系の培養に適していなかったためと考えられる。腎臓は臓器の中でも特に血管網が高度に発達した臓器である。腎臓の発生において微細な毛細血管網の形成はネフロン形成においても重要なイベントの一つである。Sシェイプの間隙には未熟なポドサイトが存在しており、VEGF-Aを産生している。このVEGF-Aの作用を阻害すると、Sシェイプの間隙に存在する糸球体内皮細胞の増殖・分化が阻害される^(14,15)。このことから、培地にVEGFを添加することにより、より血管構築に適した培養条件になると考えられる。さらに現在、TGF- β は後腎発生中の血管形成に対する役割も知られている。TGF- β 1が血管内皮細胞の細

胞遊走性とアポトーシスに深く関係していると報告されている。新生児マウスの腎臓にTGF- β 中和抗体を注入すると、Sシェイプの間隙への血管前駆細胞の遊走が阻害される。またTGF- β は*in vitro*において糸球体内皮細胞の凝集とアポトーシスの誘導により、血管のキャピラリー形成を誘導することが知られており^(16,17)、*in vivo*においてもラット後腎における糸球体形成時に、TGF- β が誘導するアポトーシスが管腔形成に関係することが分かっている。これらの点から、TGF- β は腎臓の再生において、尿管芽と血管系を同時に構築する要となる因子としての可能性がある。

今回の実験で得られたデータは、将来的に統計処理が可能で、他の実験との比較検討がより正確に行える。今後研究を進めていくことで、腎臓再生に大きく貢献できるものと考えている。

参考文献

- (1) Toyohara T, Mae SI, Sueta SI, Inoue T, Yamagishi Y, Kawamoto T, Kasahara T, Hoshina A, Toyoda T, Tanaka H, Araoka T, Sato-Otsubo A, Takahashi K, Sato Y, Yamaji N, Ogawa S, Yamanaka S, Osafune K. Cell therapy using human induced pluripotent stem cell-derived renal progenitors ameliorates acute kidney injury in mice. *Stem Cells Translational Medicine*. 2015; 4: 980-92.
- (2) O'Brien LL, McMahon AP. Induction and patterning of the metanephric nephron. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36:31-8.
- (3) Robert OS, Kevin TB and Sanjay KN. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5649-5654.
- (4) Schwab K, Patterson LT, Aronow BJ, Luckas R, Liang HC, Potter SS. A catalogue of gene expression in the developing kidney. *Kidney Int*. 2003; 64:1588-604.
- (5) Challen G, Gardiner B, Caruana G, Kostoulas X,

- Martinez G, Crowe M, Taylor DF, Bertram J, Little M, Grimmond SM. Temporal and spatial transcriptional programs in murine kidney development. *Physiol Genomics*. 2005; 23: 159-71.
- (6) Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 2003; 425:577-84.
- (7) Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell*. 2010; 18:698-712.
- (8) Frank C. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation*. 2006; 74:402-421.
- (9) Rosemary VS and Sanjay KN. Implications of Gene Networks for Understanding Resilience and Vulnerability in the Kidney Branching Program. *Physiology (Bethesda)*. 2004; 19: 339-347.
- (10) Robert OS, Kevin TB and Sanjay KN. Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 5649-5654.
- (11) Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17:453-8.
- (12) Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77: 3494-8.
- (13) Bush KT, Sakurai H, Steer DL, Leonard MO, Sampogna RV, Meyer TN, Schwesinger C, Qiao J, Nigam SK. TGF-beta superfamily members modulate growth, branching, shaping, and patterning of the ureteric bud. *Dev Biol*. 2004; 15;266: 285-98.
- (14) Takahashi T, Huynh-Do U, Daniel TO. Renal microvascular assembly and repair: power and promise of molecular definition. *Kidney Int*. 1998; 53: 826-835.
- (15) Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 2003; 111:707-716.
- (16) Chen S, Lee JS, Iglesias-de la Cruz, MC, Wang A, Izquierdo-Lahuerta A, Gandhi NK, Danesh FR. Angiotensin II stimulates $\alpha 3(\text{IV})$ collagen production in mouse podocytes via TGF- β and VEGF signalling: implications for diabetic glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20:1320-1328.
- (17) Leslie G and Roy Z. How does TGF- β mediate tubulointerstitial fibrosis? *Semin Nephrol*. 2012; 32: 228-235.

新潟県佐渡市両津湾から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻のドウモイ酸生産

小林 健司

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

要旨：

【目的】記憶喪失性貝毒はドウモイ酸が原因物質であり、珪藻 *Pseudo-nitzschia multiseries* が原因生物として明らかにされている。現在では世界の多くの海域から分離された複数種の珪藻にドウモイ酸の存在が認められている。*P. multiseries* は培養可能であるため、多くの研究により同種のドウモイ酸生産の特徴が報告されてきたが、その詳細に不明な点が多い。本研究の目的は同種によるドウモイ酸生産の詳細を明らかにし、記憶喪失性貝毒の発生を防ぐことにあるが、今回は新潟県佐渡市における記憶喪失性貝毒の発生の可能性を明らかにすることとした。

【方法】佐渡市両津湾からプランクトンを採取し、*Pseudo-nitzschia* 属様珪藻の細胞が認められた場合は分離し、培地中で保温した。増殖が認められた培養株は 15℃で培養し、定期的に細胞数とドウモイ酸量を観察した。10℃で培養したものを対照とした。

【結果と考察】プランクトンサンプルを観察したところ、*Pseudo-nitzschia* 属を含む複数種のプランクトンが確認された。観察された *Pseudo-nitzschia* 属様珪藻を培地中で保温したところ増殖が確認された。得られた培養株を 15℃で培養したところ、*P. multiseries* と同様に生長したが、ドウモイ酸は検出されなかった。一方、10℃では、生長速度は低下したが、少量のドウモイ酸が認められた。以上の結果は佐渡市において記憶喪失性貝毒の発生を示唆するものである。しかし、今回得られた培養株は高度にドウモイ酸を生産する種ではないと考えることができた。

キーワード：

記憶喪失性貝毒，ドウモイ酸，羽状目珪藻，*Pseudo-nitzschia multiseries*

投稿日：2020年4月27日／受理日：2020年7月3日

1. 目的

記憶喪失性貝毒は 1987 年にカナダ東岸のプリンスエドワード島でムラサキイガイの摂食により引き起こされた貝毒であり、神経興奮性アミノ酸の一種であるドウモイ酸が原因物質であることが明らかにされた^(1,2)。また、中毒発生時に周辺の海域から分離された羽状目珪藻 *Pseudo-nitzschia multiseries* の培養株にドウモイ酸の存在が確認されたことから、同種が原因生物として同定された⁽³⁾。その後の研究により、世界の多くの海域から分離された *P. multiseries* を含む複数種の *Pseudo-nitzschia* 属にドウモイ酸の存在が明らかにされてきた^(4~6)。また、これまでの研究で新潟県の新潟市や上越市の海域にも *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の存在が確認されている (data not shown)。

ドウモイ酸は紅藻ハナヤナギ *Chondria armata* の駆虫活性を持つ成分として発見されたものであるが⁽⁷⁾、Kotaki らはベトナムのエビ養殖池より分離した新種の底生性珪藻 *Nitzschia navis-varingica* が多量のドウモイ酸を生産することを報告した⁽⁸⁾。これらの事実はドウモイ酸を生産する種が *Pseudo-nitzschia* 属珪藻ばかりではなく、底生性珪藻にもおよぶことを示している。

記憶喪失性貝毒の原因生物である *P. multiseries* は培養可能であることから、多くの研究により同種のドウモイ酸生産の特徴が報告されている^(9, 10)。すなわち、*P. multiseries* のドウモイ酸生産は培養液中の栄養塩を使い果たした定常期後期に急激に起こること、また、同種の毒生産に環境中の細菌が関与することである^(11~15)。これらの事実から、定常期にはいり栄養塩を使い果たし光合成が困難になった *P. multiseries* は環境中に存在する細菌を取り込みエネルギー源とする、この際、細菌がドウモイ酸を構成成分とする生体成分を持つとすれば、本成分の消化によりドウモイ酸が *P.*

multiseries の細胞内に蓄積すると考えることができた。本研究の大きな目的はこの仮説を証明することで珪藻によるドウモイ酸生産の詳細を明らかにし、次の記憶喪失性貝毒の発生を未然に防ぐことにある。そこで今回は新潟県内で牡蠣の養殖が盛んな佐渡島において記憶喪失性貝毒の発生の可能性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

プランクトンのサンプリングと単種培養株の作製

プランクトンのネットサンプルは、2019 年 5 月 5 日に新潟県佐渡市両津港で採取した (図 1)。すなわち、両津港の海岸からプランクトンネット (SANSYO, 5512-C, ϕ 30 cm, メッシュサイズ 20 μ m) を 10 m 引き、ネット内の全てを 100 mL 容量のプラスチック容器に移し、海水で 100 mL に定容したものをネットサンプルとした。ネットサンプルは実験に用いるまで 10°C 前後で保存した。

得られたネットサンプルの一部を顕微鏡で観察し、*Pseudo-nitzschia* 属様の細胞が確認された場合は、キャピラリー洗浄法で同細胞を 3 回洗浄し、各ウェルにケイ酸濃度 107 μ M、0.05% の Tris - HCl 緩衝液 (pH 7.2) の f/2 培地 1 mL を含む 24 ウェルマイクロプレート (Thermo Fisher Scientific, BioLite 24 well Multidish)、15 °C、LD cycle 16 : 8、100 μ mol photons/m²/sec の条件で 2 週間保温した。増殖が認められた株は 20 mL の同様の f/2 培地を含む細胞培養フラスコ (Thermo Fisher Scientific, BioLite 25 cm Flask) に全量を移し、同じ条件でさらに 4 週間保温し、増殖の認められたものを単種培養株とした。

単種培養株の生長とドウモイ酸生産における培養温度の影響

得られた単種培養株の一部をケイ酸濃度 $107 \mu\text{M}$ 、0.05%の Tris - HCl 緩衝液 (pH 7.2) の f/2 培地 80 mL を含む 100 mL 容の三角フラスコに移し、 15°C 、LD cycle 16 : 8、 $100 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ の条件で保温した。保温中は 7 日毎に細胞を含む培養液 13 mL を

採取し、細胞の生長とドウモイ酸量を測定した。細胞の生長は、光学顕微鏡下で細胞数を計数した。細胞数の多い場合は海水で 10 倍に希釈したものを用いた。 10°C で培養したものを対照とした。実験はそれぞれ同様に調整した 3 個の三角フラスコで行った。

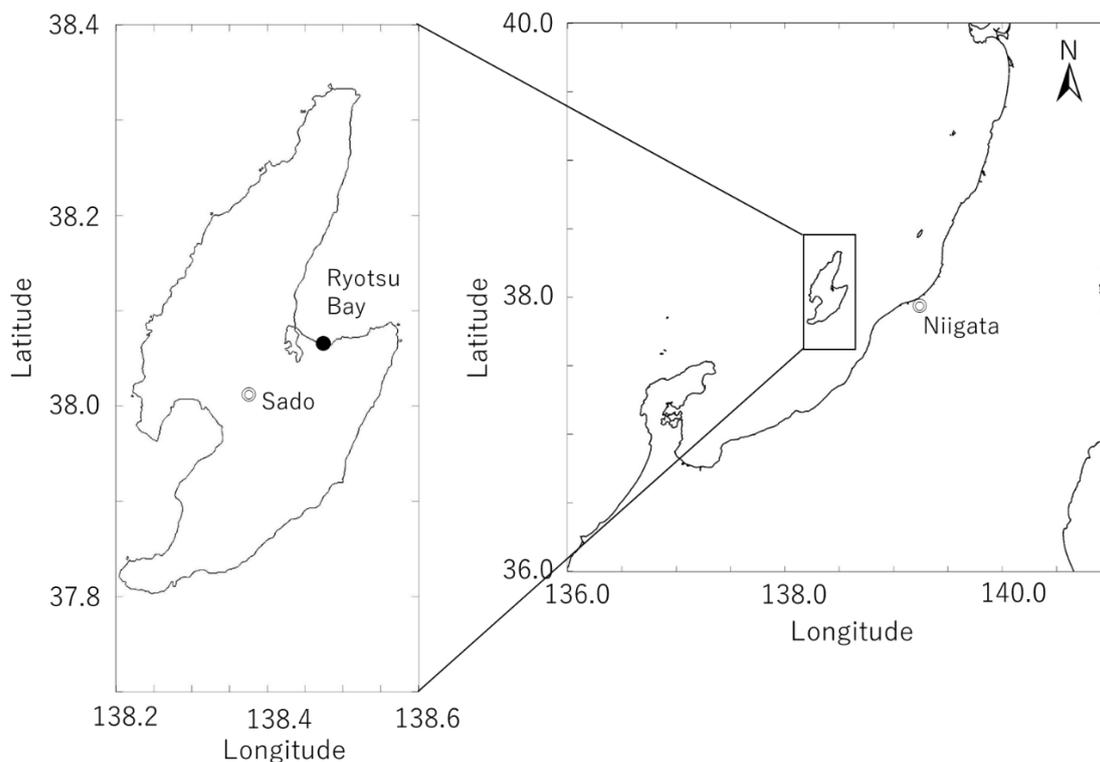


図 1. 新潟県佐渡島の地図。● : プランクトンのネットサンプルの採取場所

培養株のドウモイ酸の測定

培養株のドウモイ酸は、Pocklington ら及び Kotaki らの方法を参考に分析した^(6, 16)。すなわち、培養株の細胞を含む培養液 10 mL を 15 mL 容量のプラスチック容器 (エルエム, PP 容器 No.4) に移し、氷冷しながら超音波 (BRANSON, SONIFIER cell disruptor 200 : output 7, 1 min) で細胞を破壊した。得られた抽出液 1 mL を 1.5 mL 容量のマイクロチューブ (SANSYO, STF-15) に移し、遠心分離 (TOMY, ECO-Fuge EF-1300, 10 min, 4°C) により細胞の破片を取り除いた。得られた上清 $200 \mu\text{L}$ を 5 mL 容量のスクリー付きガラス試験管に移し、50

μL の 1 M ホウ酸緩衝液 (pH 6.2) を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。次にアセトニトリル (Wako, 特級) に溶解した 15 mM 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl, Wako, ペプチド合成用) を $250 \mu\text{L}$ 加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、45 秒間静置して反応させた。反応後、余分な FMOC-Cl を取り除くため、 $500 \mu\text{L}$ の酢酸エチル (Wako, 高速液体クロマトグラフ用) を加えボルテックスミキサーで攪拌し、45 秒間静置した後、上層の酢酸エチル層を取り除いた。余分な FMOC-Cl を取り除くため、この操作をさらに 2 回行った後、得られた下層の反応液を蛍光 - HPLC の試

表 1. 両津湾から分離した単種培養株

Species	Strain
<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	S. RP-E-1
	S. RP-E-2

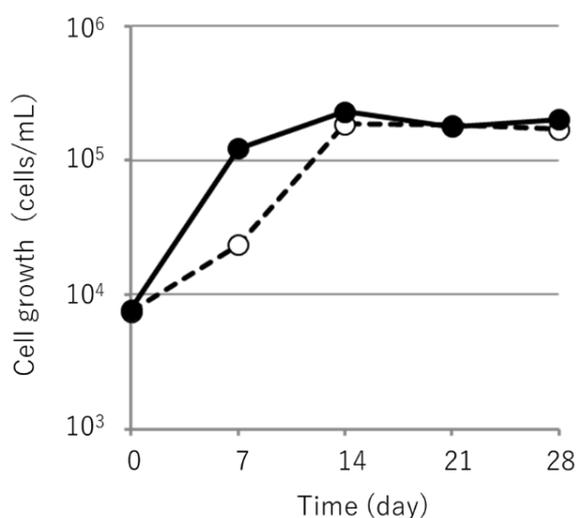


図 2. 両津湾から分離した S. RP-E-2 株を LD cycle 16 : 8、100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ 、15°C (●) および 10°C (○) で培養した場合の細胞の生長

料とした。

得られた反応液の 25 μL はポンプ (Jasco, PU-1580, Flow 1.1 mL/min)、蛍光検出器 (Waters 474, 励気波長 264 nm, 蛍光波長 313 nm)、短波長カットフィルター (朝日分光, 300 nm)、カラムオーブン (Tosho, CO-8020, 55°C)、ガードカラム (Tosho, TSKguardgel ODS-100V(5), ϕ 3.2 mm x 15 mm)、カラム (Wako, wakosi15c8, ϕ 4.6 mm x 250 mm) および移動相として 40%アセトニトリル (Wako, 特級)、20 mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) を用いた蛍光 - HPLC に付した。蒸留水で 10 ng/mL に希釈したドウモイ酸 (TOCRIS bioscience) を同様に処理し、培養株のドウモイ酸を定量した。

3. 結果と考察

両津湾から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の単種培養株

新潟県佐渡市両津湾南側の海岸からプランクトンネットでネットサンプルを得た。採取時の水温は 17.2°C、塩分濃度は 34 practical salinity unit (PSU)であった。得られたネットサンプルの一部を光学顕微鏡下で観察したところ、*Pseudo-nitzschia* 属様珪藻を含む複数種の植物性プランクトンと動物性プランクトンが観察された。観察された *Pseudo-nitzschia* 属様珪藻の細胞をキャピラリー洗浄法で 3 回洗浄した後、それぞれのウェルにケイ酸濃度 107 μM 、0.05%の Tris - HCl 緩衝液 (pH 7.2) の f/2 培地 1 mL を含む 24 ウェルマイクロプレートへ 1 細胞ずつ移し、15 °C、LD cycle 16 : 8、100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ の条件で 2 週間保温したところ、2 株の *Pseudo-nitzschia* 属様珪藻の増殖が確認された。増殖の認められた株は、20 mL の同 f/2 培地を含む細胞培養フラスコに全量を移し、同じ条件で 4 週間保温したところ、増殖が確認された (表 1)。この結果は新潟県の佐渡市の海域は *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の生存可能な環境であることを示すものである。得られた培養株のうち、比較的細胞の増殖の良好な S. RP-E-2 株を単種培養株として以降の実験に用いた。

両津湾から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の生長とドウモイ酸生産

佐渡市の海域から分離した *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の単種培養株 S. RP-E-2 株を 80 mL の f/2 培地を含む三角フラスコで 15 °C、LD cycle 16 : 8、100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ の条件で保温したところ、培養開始の 0 日目の $7,756 \pm 227$ cells/mL から急激に増加し 7 日目に $122,444 \pm 14,041$ cells/mL に達した。その後、14 日目に最大の細胞数の $230,667 \pm 6,600$ cells/mL を示し定常期に達したと考えられた。その後、細胞数は培養の最終日となる 28 日目まで大きな変化は認められなかった (図 2)。一方、10°C で培養した場合、培養開始の 0 日目の $7,467 \pm 237$ cells/mL から 7 日目に $23,556$

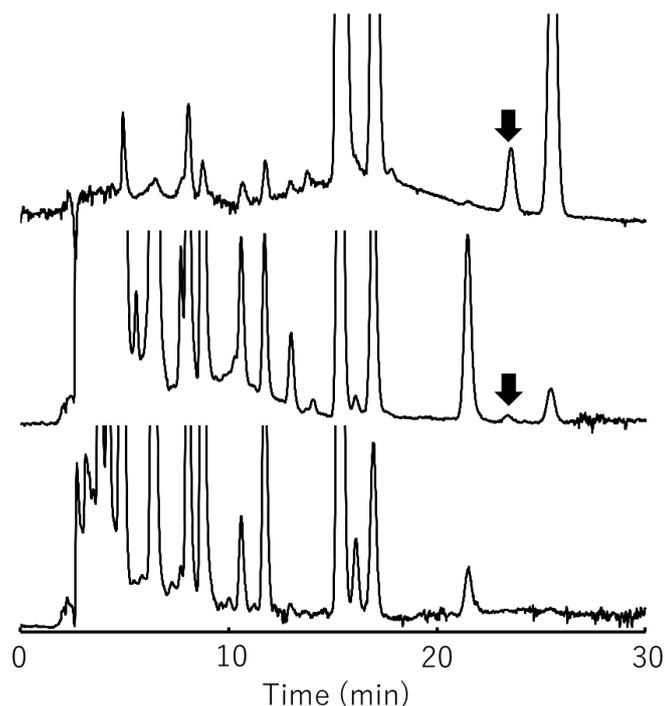


図 3. 両津湾から分離した *S. RP-E-2* 株を LD cycle 16 : 8、100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{sec}$ で培養した場合の細胞を含む培養液の蛍光 - 高速液体クロマトグラフィーによる分析結果。矢印はドウモイ酸のリテンションタイム。上：ドウモイ酸標準品 10 ng/mL、中：*S. RP-E-2* 株、10°C、培養 21 日目、下：*S. RP-E-2* 株、15°C、培養 21 日目

表 2. 両津湾から分離した *S. RP-E-2* 株のドウモイ酸生産、 $n = 3$

Day	Domoic acid (ng/mL)			
	Temperature		Temperature	
	10°C		15°C	
	Mean \pm S. D.	-	Mean \pm S. D.	-
0	N.D.	-	N.D.	-
7	N.D.	-	N.D.	-
14	N.D.	-	N.D.	-
21	1.23	0.31	N.D.	-
28	N.D.	-	N.D.	-

S.D. = Standard deviation,

N.D. = Not detected

$\pm 2,200$ cells/mL と徐々に増加し、14 日目に最大の細胞数の $186,889 \pm 15,533$ cells/mL を示し定常期に達した。その後、細胞数は培養の最終日まで大きな変化は認められなかった (図 2)。記憶喪失性貝毒の原因生物で

ある *P. multiseris* を 15°C で培養した場合、培養 7 日目程度で最大増殖量を示し定常期に達する^(15,17)。また、10°C で培養した場合は細胞の生長速度が低下する⁽¹⁷⁾。これらの事実は、本実験で用いた単種培養株の生長の特徴は *P. multiseris* のものと良く一致したことを示している。15°C で培養した場合のドウモイ酸生産は培養開始から検出限界以下となり、その後も検出されなかった (表 2、図 3)。一方、10°C で培養した場合のドウモイ酸生産は培養開始から 14 日目まで検出限界以下であったが、21 日目に 1.23 ± 0.31 ng/mL となった (表 2、図 3)。1 細胞当たりのドウモイ酸量として 6.7 fg/cell と著しく低い値であった。その後、培養終了日となる 28 日目に再び検出限界以下となった (表 2)。*P. multiseris* を 15°C 程度で培養した場合、ドウモイ酸生産は定常期に達してから徐々に増加する。その後定常期後期

に急激に増加し、1細胞当たり 1~10 pg/cell 程度を示す^(15,17)。また、*P. multiseri* を 15°C より低温で培養するとドウモイ酸の生産量は減少する⁽¹⁷⁾。これらの事実は、本実験で用いた *Pseudo-nitzschia* 属珪藻 S. RP-E-2 株のドウモイ酸生産の特徴は *P. multiseri* と大きく異なることを示している。

記憶喪失性貝毒の原因生物である *P. multiseri* はカナダの海域ばかりではなく、世界の多くの海域に認められており、日本においてもホタテの養殖が盛んな岩手県の大船渡湾などに認められ、高度なドウモイ酸生産が確認されている^(4~6)。本研究の結果は新潟県佐渡市の海域は *Pseudo-nitzschia* 属珪藻の生存可能な環境であり、記憶喪失性貝毒が発生する可能性を示唆するものであるが、本研究で得られた *Pseudo-nitzschia* 属珪藻のドウモイ酸生産量は *P. multiseri* と比較して著しく低い値であった。

4. 謝辞

本研究は 2019 年度北里大学保健衛生専門学院学内研究の助成により行われたものである。

引用文献：

(1) Wright J. L. C., Boyd R. K., Freitas A. S. W. D., Falk M., Foxall R. A., Jamieson W. D., Laycock M. V., McCulloch A. W., McInnes A. G., Odense P., Pathak V. P., Quilliam M. A., Ragan M. A., Sim P. G., Thibault P., Walter J. A., Gilgan M., Richard D. J. A., Dewar D., Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.*, 1989 ; 67 : 481 - 490.

(2) Bates S. S., Bird C. J., deFreitas A. S. W., Foxall R., Gilgan M., Hanic L. A., Johnson G. R., McCulloch A. W., Odense P., Pocklington R., Quilliam M. A., Sim P. G., Smith J. C., Subba Rao D. V., Todd E. C. D., Walter J. A., Wright J.

L. C., Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1989 ; 46 : 1203 - 1215.

(3) Subba Rao D. V., Quilliam M. A., Pocklington R., Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1988 ; 45 : 2076 - 2079.

(4) Bates S. S. Bloom dynamics and physiology of domoic-acid - producing *Pseudo-nitzschia* species. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, pp. 267 - 292. Edited by D. M. Anderson A. D. Cembella G. M. Hallegraeff, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1998.

(5) Bates S. S., Hubbard K. A., Lundholm N., Montresor M., Chui Pin Leaw C. P., *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: New research since 2011, *Harmful Algae*, 2018 ; 79 : 3-43.

(6) Kotaki Y., Koike K., Sato S., Ogata T., Fukuyo Y., Kodama M., Confirmation of domoic acid production of *Pseudo-nitzschia multiseri* isolated from Ofunato Bay, Japan. *Toxicon*, 1999 ; 37 : 677 - 682.

(7) Daigo K. Studies on the constituents of *Chondria armata*. II. Isolation of an anthelmintical constituent. *Chem. Pharm. Bull.*, 1958 ; 2 : 353- 356.

(8) Kotaki Y., Koike K., Yoshida M., Thuoc C. V., Huyen N. T. M., Hoi N. C., Fukuyo Y., Kodama M., Domoic acid production in *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae) isolated from a shrimp-culture pond in Do Son, Vietnam. *J Phycol.*, 2000 ; 36 : 1057-1060.

(9) Bates S. S., de Freitas A. S. W., Milley J. E., Pocklington R., Quilliam M. A., Smith J. C., Worms J., Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseri* in

- culture: Nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1991 ; 48 : 1136 - 1144.
- (10) Douglas D. J., Bates S. S., Bourque L. A., Selvin R. C., Domoic acid production by axenic and non-axenic cultures of the pennate diatom *Nitzschia pungens f. multiseriis*. In *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, pp. 595 - 600. Edited by Smayda T. J. & Shimizu. Y., Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V. 1993.
- (11) Bates S. S., Douglas D. J., Doucette G. J., Leger C., Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis.*, *Natural Toxins*, 1995 ; 3 : 428 - 435.
- (12) Bates S. S., Douglas D. J., Doucette G. L., Leger C., Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia pungens f. multiseriis*. In *Harmful Marine Algal Blooms*, pp. 401 - 406. Edited by Lassus P., Arzul G., Denn E. E.-L., Gentien P. & Baut. C. M.-L., Paris: Londres. 1995.
- (13) Douglas D. J., Bates S. S., Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by an axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens f. multiseriis* Hasle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1992 ; 49 : 85 - 90.
- (14) Osada M., Stewart J. E., Gluconic acid/gluconolactone: physiological influences on domoic acid production by bacteria associated with *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 1997 ; 12 : 203 - 209.
- (15) Kobayashi K., Takata Y., Kodama M. Direct contact between *Pseudo-nitzschia multiseriis* and bacteria is necessary for the diatom to produce a high level of domoic acid., *Fisheries Science*, 2009 ; 75 : 771-776.
- (16) Pocklington R., Milley J. E., Bate S.S., Bird, C.J., De Freitas A.S.W., Quilliam M.A., Trace determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by high-performance liquid chromatography of the fluorenylmethoxycarbonyl (FMOC) derivative. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1990 ; 38 : 351-368.
- (17) Bates S. S., Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production, In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, pp. 406 - 426. Edited by Anderson D. M., Cembella A. D., Hallegraeff G. M., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. 1998.

**Domoic acid production of *Pseudo-nitzschia sp.* isolated from Ryotsu bay in Sado island,
Niigata**

KOBAYASHI Kenji

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

Abstract :

Amnesic shellfish poisoning caused by the domoic acid that is kind of a neuroexcitatory amino acid, the causative organism was identified as *Pseudo-nitzschia multiserias* of pennate diatom. At the present, domoic acid was detected several species of diatom belonging to the genus *Pseudo-nitzschia* isolated from ocean around the world. After that, domoic acid was found in a new species of benthic diatom, *Nitzschia navis-varingica*, and suggest that possibility of amnesic shellfish poisoning widely distributed. On the other hand, many studies have been reported on the production of domoic acid by *P. multiserias*, causative species, in many culture experiments. However, in the detail of domoic acid production by these species of diatoms is still unknown. The purpose of my study, describe of domoic acid production mechanism by causative diatom species for prevention of next amnesic shellfish poisoning event. In the present study show that, possibility of amnesic shellfish poisoning in Sado island, Niigata.

Phytoplankton was collected from Ryotsu bay in Sado island. The genus *Pseudo-nitzschia* like cell was isolated from plankton sample using glass capillary. Isolated culture was incubated in f/2 media at 15 °C, LD cycle 16 : 8, 100 µmol photons/m²/sec. Cell growth and domoic acid was measured in culture period, regularly. Culture was incubated in 10 °C, as a control.

Cell growth of *Pseudo-nitzschia sp.* culture isolated from Ryotsu bay was coincide with *P. multiserias*. Domoic acid production of this strain incubate at 15 °C was not detected in total culture period. On the other hand, domoic acid was detected in culture with 10 °C. However, domoic acid production of this strain quite smaller than *P. multiserias*.

These results suggested that, possibility of amnesic shellfish poisoning event in Sado island. But, *Pseudo-nitzschia sp.* isolated from Ryotsu bay was considered with low toxic species, in this study.

Keyword :

Amnesic shellfish poisoning, Domoic acid, Pennate diatom, *Pseudo-nitzschia multiserias*

Received : April 27, 2020 / Accepted : July 3, 2020

臨床検査技師に必要な統計学について（第 6 報）
ーバリデーションに必要な精度管理用語の基礎理解ー

小林浩二，小丸圭一

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：

これまで筆者らは、臨床検査に必要な統計学的手法について本紀要に連載してきた。今回は、臨床検査技師から要望があったバリデーションについて報告をする。平成 30 年 12 月 1 日に「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令」の施行があり、従来に増して臨床検査における精度管理が厳格化された。日常業務で実施している内部精度管理や外部精度評価（コントロールサーベイ）はもとより、改めて検査法のバリデーション（ベリフィケーション）がフォーカスされている。定量測定に関するバリデーション指針（2011）によれば、バリデーションとは、測定法の信頼性、一貫性や正確性によりその妥当性を確認するための一連の操作と定義している。この操作をするための統計解析ソフト「定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5」が一般財団法人日本臨床化学会のクオリティマネジメント専門委員会から配布されており、活用されている。しかし、精度管理は統計学的手法が根底にあるため、一部のプログラム理論はブラックボックスとなっている。精確にデータを測定し、適切に処理をして、適確に結果を読み取るためには精度管理用語の意味とその背景にある基礎理論を避けることはできない。このため、臨床検査技師が生化学及び免疫血清検査におけるバリデーションの理解をサポートする目的で、精度管理用語について解説を行った。

キーワード：

精度管理、バリデーション、Validation-Support/Excel Ver.3.5、厚生労働省関係省令

投稿日：2019 年 4 月 26 日／受理日：2019 年 7 月 1 日

1. はじめに

筆者らは、臨床検査に必要な統計学的手法について実例を交えて本紀要に連載してきた⁽¹⁻⁵⁾。今回は臨床検査技師から要望のあったバリデーションに必要な精度管理用語について解説する。平成30年12月1日より「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令」が施行され、従来に増して臨床検査における精度管理の重要性が高まった⁽⁶⁻⁷⁾。これに先立ち、臨床化学会は認定臨床化学・免疫化学精度保証管理検査技師制度を立ち上げ、精度保証に対応できる臨床検査技師の育成に取り組んでいる。従来は検査値の質を確保し維持するための業務を「精度管理 (Quality Control)」と呼んでいた。現在では施設内部で行う内部精度管理 (Internal Quality Control)、施設間で測定値を比較する外部精度管理 (External Quality Control) だけではなく、分析前後処理課程を含めた意味での総合的精度管理 (Total Quality Control) や精度保証 (Quality Assurance; QA) の概念が定着している。三宅 (2012) は、施設としての検査への取り組み方、設備、機器、人員の配置、教育などを含めた検査の信頼性に影響を与えるすべての要因を精度管理業務の対象とした精度マネジメント (Quality Management) という概念 (図1) を示した⁽⁸⁾。精度マネジメントの観点からも、臨床検査のバリデーションは欠かすことができない。

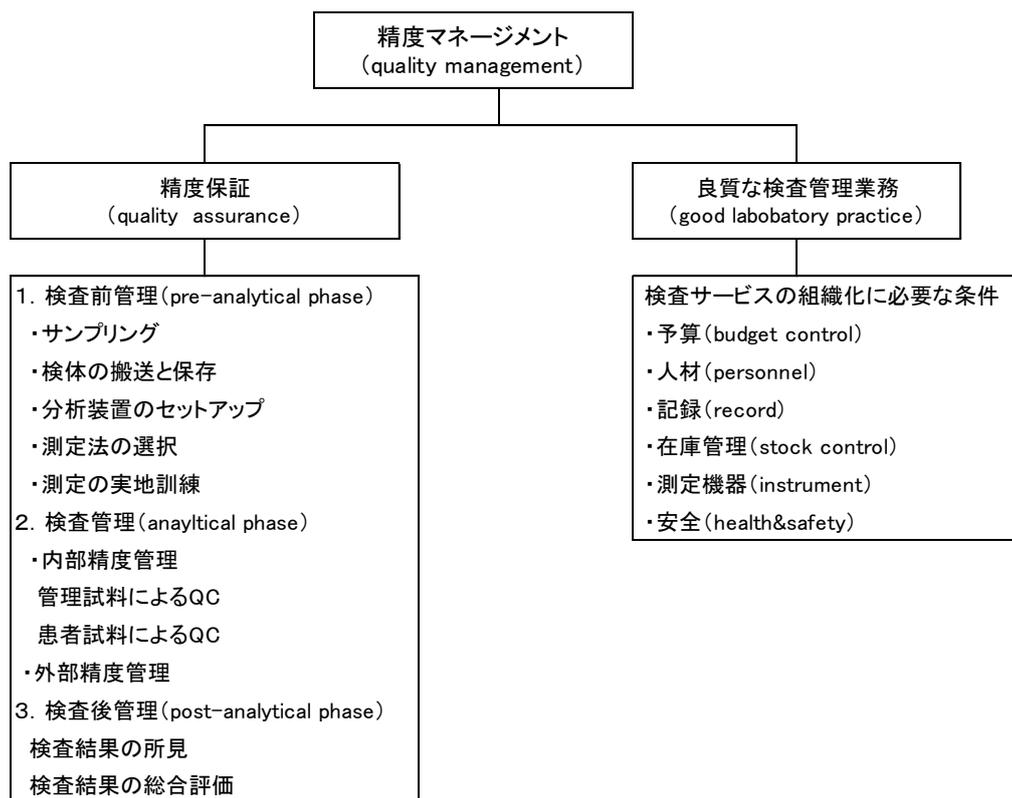


図1. 精度マネジメント体系

バリデーション項目は、表1に示すように真度 (正確さ)、精度 (併行精度、室内再現精度、室間再現精度)、検出限界 (Limit of Detection ; LoD)、定量限界 (Limit of Quantitation ; LoQ)、直線性、範囲、頑健性、トレーサビリティと不確かさがあり、NCCLS(CLSI)EP7-A、ISO5725 や JSCC 検出限界・定量限界操作法に遵守して実行される

(9)。これらを実行するために、一般財団法人日本臨床化学会のクオリティマネジメント専門委員会が作成した「定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5」が臨床化学会から配布されている⁽¹⁰⁾。尚、一般にバリデーションはメーカーが実施し、検査室でその検証を行うことをベリフィケーションと呼ぶが、本稿では区別せずにバリデーションとした。

表 1 バリデーション特性と評価法

バリデーション特性	バリデーション特性の評価法
真度、正確さ	日臨技:臨床化学における定量検査の精密さ・正確さ評価法
併行精度	JIS Z8402 (ISO5725と同じ)測定法及び測定閣下の精確さ
室内中間精度	JIS Z8402 (ISO5725と同じ)測定法及び測定閣下の精確さ
室間再現精度	JIS Z8402 (ISO5725と同じ)測定法及び測定閣下の精確さ
直線性	NCCLS EP6-A: Evaluation of the linearity
特異性・選択性	NCCLS EP7-A: Interference testing in clinical chemistry
検出限界	JSCC: 定量分析法における検出限界および定量限界の評価法
定量限界	JSCC: 定量分析法における検出限界および定量限界の評価法
範囲	JSCC: 定量限界の評価法、およびNCCLS EP6-A: Linearity
頑健性	日本化学試験所認定機構テクニカルノート
トレーサビリティ 不確かさ	JSCC: キャリブレーションおよびQA用試料の不確かさ評価法 臨床検査における測定の不確かさ・ケース別推定法

2. 省令の改正

医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令（平成 30 年厚生労働省令第 93 号）が、同年 7 月 27 日に公布、12 月 1 日より施行された⁽⁶⁾。省令の改正により、追加された見直しに関する事項は以下の 3 つである。まず第 1 に医療機関が自ら実施する検体検査について、品質・精度管理に係る基準を定めるための根拠規定を新設すること。第 2 にブランチラボや衛生検査所に業務委託される検体検査について、精度管理に係る行政指導等の実効性を担保するため、品質・精度管理に係る基準を省令で定める旨を明確化すること。そして第 3 に検査分類の新たな検査技術に対する精度管理や安全性等について柔軟かつ迅速に対応することができるよう検体検査の分類を省令委任とし分類に遺伝子関連検査を追加することがそれである。また、改正省令として医療機関等が自ら検体検査を実施する場合における精度の確保のために設けるべき基準(歯科医療機関、助産所に対しても適用)が明記された。その内容は、①精度の確保に係る責任者の配置(医師または臨床検査技師)、②精度の確保に係る各種標準作業書・日誌等の作成、③検体検査の精度の確保のために努めるべき事項、である。また、遺伝子関連検査・染色体検査精度の確保のため、①遺伝子関連検査・染色体検査の責任者の配置、②内部精度管理の実施、適切な研修の実施義務、③外部精度管理調査の受検、④その他、検査施設の第三者認定を取得すること(ISO 15189 の取得)を当面勧奨する、といった事項が設置基準とされた。

3. 臨床検査室におけるバリデーション

法改正に伴い臨床検査にかかわる精度管理が今まで以上に厳格化された。ルーチンで実施している \bar{X} -Rs-R 管理図をはじめとする内部精度管理、日本臨床衛生検査技師会や日本医師会主催のコントロールサーベイといった外部精度評価はもとより、特に臨床検査のバリデーションが改めてフォーカスされている。ISO9000 (2000) では、バリデーションの定義を「客観的証拠を提示することによって特定の意図する用途、または適用に関する要求事項が満たされていることを確認すること」と定めている⁽¹¹⁾。また、定量測定に関するバリデーション指針 (2011) によれば、バリデーションとはメーカーが測定法の信頼性、一貫性、正確性によりその妥当性を確認するための一連の操作としている⁽¹²⁾。これは意図した用途に合致する信頼性の高い測定結果が得られることを保証する目的で実施されており、分析化学の領域では、測定法の性能特性と限界を確定するプロセス及びこれらの特性を変化させる影響因子とその程度を同定することを意味している。すなわち、どのようなマトリックス共存下や妨害下において、その測定対象成分を定量できるかを調べ、各条件においてどの程度の精度と真度が得られるかを明らかにすることと定義している (図 2)。これら妥当性特性の項目は、真度 (正確さ)、精度 (併行精度、室内再現精度、室間再現精度)、検出限界、定量限界、直線性、範囲、頑健性、トレーサビリティと不確かさがあり、NCCLS(CLSI)EP7-A、ISO5725、JSCC 検出限界定量限界操作法に遵守して実行される。

一方、既にバリデーションが行われている測定法を臨床検査室で使用する場合は、その妥当性を検証する必要がある。これをベリフィケーションと呼び区別する場合がある。各種特性の試験法は、バリデーションと同様であるが、校正手順及び精度管理法が適正化のために、検査の測定環境及び担当者スキルを含めたベリフィケーションは重要である。ISO15189 臨床検査室の品質と能力に関する特定要求事項における技術的要求事項の検査手順 (5.5 Examination procedures) においても、検査室における妥当性の必要性を明記しており、その認定基準に関しては JAB RM300 (2014) に記載されている⁽¹³⁾。

これら精度管理の手法には数理統計学が多用されており、数式に不慣れな場合は理論展開が完全にブラックボックス化されてしまう。精確にデータを測定し、適切に処理をして、適確に結果を読み取るためには、精度管理に用いられる統計学的指標の基礎理解を避けることはできない。このため、我々は臨床検査技師より要望があった「Validation-Support/Excel Ver.3.5 で用いられる精度管理用語」に関して解説した。定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5 は、一般財団法人日本臨床化学会のクオリティマネジメント専門委員会が配布しているマクロを含んだ Excel ファイルである。このプログラムの妥当性は、作成したクオリティマネジメント専門委員会によって確認されているが、一部不具合の修正を定期的に行っている。そのため、改めてプログラムの検証を事前に JMP14 (SAS Institute) により実施し、重大な問題点がないことを確認している。尚、実データを用いた統計解析やグラフ描写による実用例に関しては、バリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver3.5 の操作方法第 13 版⁽¹⁴⁾を参照されたい。

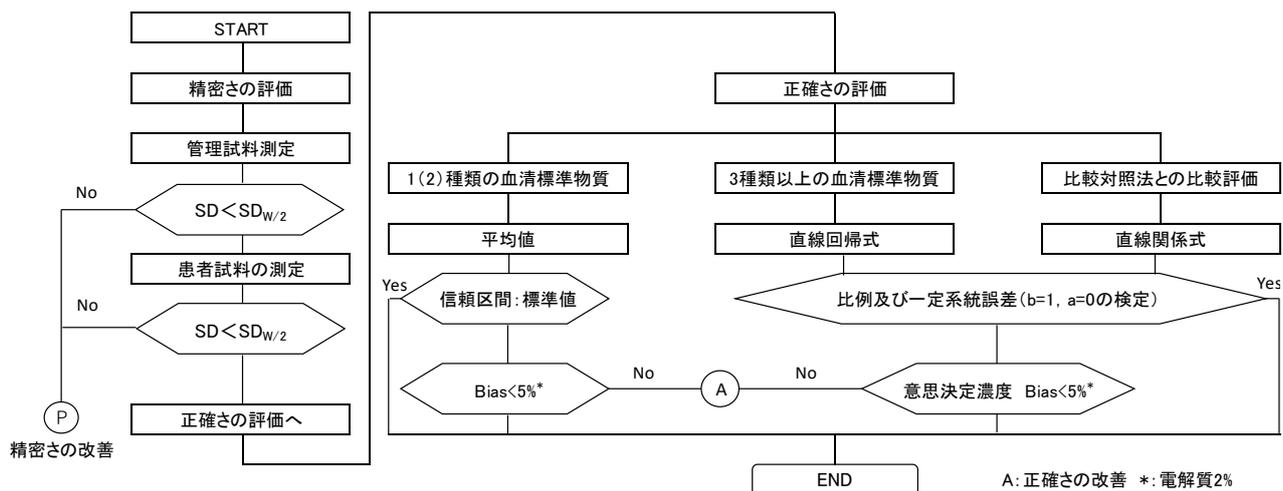


図 2. 精密さ・正確さ評価法のフローチャート

4. バリデーションのための精度管理用語について

VS/E3.5 は、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会が作成したバリデーション算出用プログラムである。本プログラムの特徴は、1) グラフを確認しながらデータ処理が可能、2) 各シートの「解説セル」によって実施手順や注意点などを提示、3) 報告書シートの添付、である。また、ブートストラップ法を用いて線形関係式の信頼区間を算出する部分のみマクロ処理を行っている。このプログラムによって直接検証できる項目は、①真度、正確さ (trueness)、②精度 (precision) : 併行精度 (repeatability) ・室内再現精度 (intermediate precision) ・室間再現精度 (reproducibility)、③検出限界 (Limit of Detection)、④定量限界 (Limit of Quantitation)、⑤直線性 (linearity) である。これらの理解のためには基本的な統計学的指標の知識が必要である。

臨床検査の精度管理は、測定結果に正規分布を仮定しているため、平均値 (\bar{x})、標準偏差 (SD)、標準誤差 (SE)、相関係数 (r)、決定係数 (R^2)、線形回帰係数 (切片 a, 傾き b など) が頻回に用いられる。そこで必要に応じて一部解説を加えた。尚、測定回数や検体数、すなわち標本の大きさを示す用語はサンプルサイズ (sample size) であり n で表される。これは、サンプル数ではないことに注意していただきたい。サンプル数とは the number of samples が示すように、標本の大きさではなく、標本の数 (サンプルの群の数) である。サンプルサイズをサンプル数として記載している場合があるが、全く異なる意味なので注意してほしい。各用語の定義については、臨床検査精度保証教本⁽¹⁵⁾、臨床検査精度管理教本⁽¹⁶⁾、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会 (2011)⁽¹²⁾、細萱 (2014)⁽¹⁷⁾、及び VS/E3.5 の操作方法第 13 版⁽¹⁴⁾ を参考に記載した。

4.1 真度、正確さ (trueness)

真度は、無限反復測定の測定平均値と標準物質の値の一致度の度合いであり、バイアスの程度を評価している。すなわち、標準物質の認証値とそれを反復測定した平均値との差である。真度評価には、標準物質の測定、測定範囲の評価、添加回収試験、妨害物質の影響試験、基準測定法との比較がある。ここでは、真度評価の根幹である標準物質の測定に関して述べる。VS/E3.5 では、1 濃度から 3 濃度の実試料標準物質による評価が可能である。各濃度の標準物質を 10 回測定し、その平均値及び標準誤差から平均値の 95% 信頼区間 (平均値 $\pm t (df = n - 1, \alpha/2) \times SE$) を算出する。標準誤差とは、平均値の推定精

度を示す指標であり、 SD/\sqrt{n} として求める。また、サンプルサイズにより t 値は変化することに注意してほしい。t 値とは、基準範囲（健常者の 95%が含まれる区間）を算出する際に使う平均値 $\pm 2 \times SD$ の 2（正確には 1.96）と同じ意味をもつ包含係数である。サンプルサイズが 20 以下の場合、正規分布を仮定して得られる「2」ではなく、t 分布を仮定した t 値を使用した方が推定精度は良い⁽¹⁸⁾。結果の評価は、以下の 2 つある。一つは、算出した平均値の 95%信頼区間（以後 95%CI）に、表示されている認証値が収まっていれば真度は保たれているとする。尚、VS/E3.5 では、測定結果の分散と認証値の不確かさ（分散）を合成して平方根をとった合成標準偏差を標準偏差の算出に使用している。

もう一つは、平均値と認証値との差が生理的変動に基づき設定した誤差許容限界（ B_A ）内であれば真度は保たれているとする評価法である⁽¹⁹⁾。誤差許容限界（ B_A ）は、生理個体内変動（ CV_I ）と生理的個体間変動（ CV_G ）を 2 乗した和（分散の加法性）の平方根に 1/4 を乗じて得られる。これは、 B_A 以下であれば、異なる検査室で基準値を観測する際に測定値の「ゆらぎ」を 10%以下（実際は 9%）に抑えることができるためである。すなわち、測定値に含まれる誤差の影響が 10%以下であれば、臨床的にも許容できる誤差とみなしている。前者の方法で評価後、基準を満たさない場合は後者の方法で評価する。尚、3 種類以上の標準物質を入手可能な場合は、サンプルサイズ（最低 3 回）をそろえて回帰直線による直線性の評価を実施し、一定系統誤差（切片）と比例系統誤差（傾き）の評価を行う。その解釈は、次項で述べる相関分析及び直線性の評価における解説を参照されたい。

4.2 精度、精密さ（precision）

指定された条件下で、同一または類似の対象について反復測定によって得られる測定値の一致の度合いを表す。精度は、標準偏差（もしくは分散）や変動係数によって表現する。ISO5725：測定方法及び測定結果の精確さによる精度の分類では、1) 併行精度、2) 室内中間精度、3) 室間再現精度に分類されている。VS/E3.5 では、これらすべてを実証可能である。

1) 併行精度（repeatability）

同時再現性と同意であり、測定対象、測定者、測定手順、測定機器、測定条件や測定場所がすべて同一で、短時間に複数回測定で構成される繰り返し条件下での測定の精密さを示す。信頼性の高い精密度を得るためには、3 濃度以上の試料を 20 回以上測定することが望ましい⁽¹⁸⁾。得られる変動（CV）は精度分類の中で最小であり、日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会が日本人の生理的変動に基づき設定した誤差許容限界（ CV_A ）内であれば精度は保たれているとする⁽¹⁹⁾。 $CV(\%) = SD/\bar{X} \times 100(\%)$ と定義される。CV 自身は単位を持たない無名数であるため、その大きさから測定単位の異なる項目の精度を比較することが可能である。誤差許容限界（ CV_A ）は、生理個体内変動（ CV_I ）に 1/2 を乗じて得られたものである。これは、誤差変動の許容限界を生理的個体内変動（ CV_I ）の半分以下とすれば、生体内変動が約 12%の揺らぎで観察可能となるためである。

2) 室内中間精度（intermediate precision）と室間再現精度（reproducibility）

室内中間精度は、併行精度と同様に各種同一条件下で長時間に複数回測定で構成され

る繰り返し条件下の測定の精密さを示す。通常、同一試料を最低1日2回15日間測定する。また、室間再現精度は、試料は同一であるが他の条件が全て異なる場合を含んだ条件下における精密さを示し、変動は最大となる。臨床検査室において、室内再現精度は日内変動と日間変動を含んでいるため、ルーチン検査における患者検体測定値の一般的な誤差を反映している。VS/E3.5では、分散分析法により、日内変動と日間変動を個別に推定しているので、F検定により有意な日間変動の存在を確認することができる。総合精密度（日内変動と日間変動の和）が、併行精度と同様に誤差許容限界（ CV_A ）以下であれば、精密度は保たれていると評価する。その他、測定試料が標準物質の場合に限り、標準物質の拡張不確かさと総合精密度を用いて「日常検査における不確かさの推定」を算出している。

4.3 方法間比較 (method comparison)

評価対象濃度全域を占める異なる50検体以上の患者試料を、比較対照法と評価対象測定法で測定する方法である。この場合、必ず比較対照法（基準）をX軸、評価対象測定法をY軸とする。まず直線性を評価し（4.4に解説）、直線性が確認できれば、その傾きから比例系統誤差、切片から一定系統誤差の有無と程度を確認する。VS/E3.5では、以下の2つの場合に分けた評価が可能である。

1) 比較対照法の測定誤差が無視できる場合

最小二乗法による直線回帰式の推定は、X軸の測定値に誤差が無く、測定値のバラツキを全てY軸の測定値が持つ誤差としてパラメータ推定を行っている。複数濃度の標準物質測定による真度評価がこれに当たる。この場合、比例系統誤差は「傾き=1」の検定を行い、有意差が無ければ比例系統誤差は認められないとする。また、一定系統誤差は「切片=0」の検定を行い、有意差が認められなければ一定系統誤差はないとして評価する。直線関係の適合度は、残差プロット、標準誤差や決定係数（ R^2 ）を参考にする。尚、同時に算出される相関係数は、直線関係の程度を示しているだけであり、真度評価には適切な指標ではないことに留意されたい。

2) 比較対象法の測定誤差が無視できない場合

どのような測定法もバラツキを持っている。その誤差が無視できない場合は線形回帰式を用いる。VS/E3.5では、デミング回帰と標準主軸回帰の2種類が用意されている。デミング回帰は2方法間の精度（分散）が異なる場合、その分散比（ λ ）を任意に設定でき、分散の小さいほうに重みを置いて直線のパラメータ（切片・傾き）を推定する。標準主軸回帰は2方法間の精度が同一であるとみなしてパラメータを推定する。この場合、回帰式はマハラノビスの等確率楕円の長軸に一致する。マハラノビスの等確率楕円とは、2変量の各測定値平均を中心に確率的に95%のデータが入る範囲を示した楕円である。標準化残差同様に2変数の外れ値の存在を視覚的に確認するためのものである。一般的に、相関係数（ r ）が0.95未満の場合、1)の直線回帰式とこれら線形関係式は視覚的なずれを生じる。そのため、ブートストラップ法により求めた線形関係式のパラメータの95%CIに直線回帰式のパラメータが入らない場合は、両直線式は有意に異なると判定し、方法間比較の評価には線形関係式を用いる。ブートストラップ法とは、シミュレーションの一つであり、所与の測定結果と同じサンプルサイズの新たな標本を復元抽出により作成し、目的とする統計量を計算する技法である。患者検体を用いた場合、その測定値

分布に正規分布を仮定することが困難であるため、線形関係式の 95%CI はこの技法を用いて最低 500 以上のデータセットを発生させ、求めた回帰係数を使って算出されている。

4.4 直線性 (linearity)

測定値が、測定範囲全域で直線性を保っているかを確認する。高濃度試料の希釈系列を最低 4 段階以上作り、3 回以上複数回測定する。試料の理論値 (X 軸) と測定値 (Y 軸) として直線回帰式を求める。全データの平均値からの変動を総変動として、これを回帰変動、残差変動、級間変動、純誤差変動に分解し、各変動を自由度で除して分散を求め、 $F = \text{残差分散} / \text{純誤差分散}$ として F 検定を実施する。p<0.001 の時に有意差があるとみなし、直線性が保たれていないとする。この場合は、高濃度のデータを削除し、非有意な測定点までを直線性があるとみなす。この方法は、NCCLS (CLSI) EP6-A ガイドライン⁽²⁰⁾ による方法である。ただしこのような検定を実施せず、プロット図および偏差率から直線性を観察し、許容される偏差率 (例えば回帰予測と実測平均の差が 5%) から直線性を評価している場合も多い。これらに関する数理的詳細は、細萱 (1997、2000) が詳しい⁽²¹⁾。

4.5 特異性・選択性 (specificity・selectivity)

特異性は、諸成分の中に存在すると予測される測定対象成分を明確に区別する能力であり、選択性は一定の測定条件下において、サンプルマトリックスの多成分中から目的の対象成分を正確に測定する能力である。対照試料に、5 段階以上濃度調整した干渉物質を添加し、添加試料の混合系列を作成する。添加濃度が 0 である場合を基準として、添加した場合の各測定値と変化率から評価する。臨床化学検査の場合、干渉物質としてビリルビン、乳び、溶血、抗凝固剤、薬物が検討されている。VS/E3.5 では、影響物質の濃度と測定結果を入力すると自動的に変化率 (%) と測定値がグラフ化される。変化率 (%) は、 $(\text{添加試料の値} - \text{対照試料の値}) \times 100 / \text{添加試料の値}$ として算出される。これは原理的に添加回収試験と同一である。

4.6 定量限界・検出限界 (Limit of Quantitation・Limit of Detection)

定量限界とは、分析対象物質が許容される精密さで定量的に測定できる最低の値であり、検出限界とは、分析対象物質が定量的ではないが有ということが高い信頼度でいえる最低の値である。またブランク上限 (Limit of Blank ; LoB) とは、分析対象物質を含まない、あるいは無視できる濃度である試料の測定値分布において、あらかじめ定めた確率 α (有意水準) に対応する値である⁽²²⁾。定量限界は、定量限界に近い濃度の試料を複数用意し、各 5 回程度の反復測定を実施して PP (precision profile) を求め、CV 値が 10% (実行感度と呼び、任意の値とする場合がある) の点から推定する。検出限界は、高感度測定が要求される腫瘍マーカーやホルモンなどの免疫関連物質の一部で実施される。まず被験物質を含まない試料を数種類、5 日間以上測定しブランク上限を求める。この際の測定総数は 60 以上が望ましいとされている。ブランク上限は、 $\text{平均値} + 1.645 \times \text{SD}$ として算出するが、下限がマイナスデータとなる場合は、ノンパラメトリック法 (percentile 法) によって上限 5% の値を求める。その後、検出限界に近い試料を複数使用して複数日にわたる測定値を用い、各日の標準偏差を足し合わせて合成標準偏差として算出する。以上より、 $\text{検出限界} = \text{得られたブランク上限} + 1.645 \times \text{合成標準偏差}$ として算出する。尚、係数 1.645 は、有意水準 0.05 の際の上側 Z (α) 値であり、上側 5% 点の

分岐を意味する係数である。

5. おわりに

今回は、バリデーションに必要な統計学的指標を定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5 に準拠して解説した。この検証から得られた情報に基づき、実情に合致した内部精度管理法を選択（表 2）し、外部精度評価に参加することで信頼できる検査値を臨床に提供できる⁽¹⁷⁾。

表 2 誤差特性に応じた精度管理法の分類

精度管理の対象(誤差特性)	精度管理手法
○内部精度管理	
1. 測定誤差の管理	ばらつきとかたより
1) 日内誤差変動の管理	・ \bar{X} -Rs管理図(実時間管理)
2) 日間誤差がない測定法の管理	・ \bar{X} -R管理図
3) 日間誤差がある測定法の管理	・ \bar{X} -Rs-R管理図
4) 継続的なかたよりの管理	累積和管理図
5) 患者測定値のかたよりの管理	正常者平均法
2. 個別データの管理	
1) 極端値の管理	範囲チェック(高低チェック)
2) 検査過誤の管理	前回値チェック、項目間チェック
○外部精度管理	
1. 精度管理調査(日本医師会、技師会など)	コントロールサーベイ
2. 継続的正確さの評価	技能試験(PT)

バリデーション以外にも精度管理に有用なプログラムは無償で配布されている。一般社団法人千葉県臨床検査技師会のホームページから、統計解析用ソフト StssV/Excel2007 Ver. 18 及び血液算定における室内精度管理プログラム Ver6.7 がダウンロードできる⁽²³⁾。また、斎藤（2008）は ISO15189 において必要とされる日常検査の不確かさの推定に関して、実データに対して分散分析を用いた手法を解説しており⁽²⁴⁾、その不確かさの計算プログラムは日本臨床検査標準協議会（JCCLS）から配布されている⁽²⁵⁾。その他、 \bar{X} -Rs-R 管理図の作成については、佐藤（2008）の作成した資料及びプログラムが有用である⁽²⁶⁾。今後の臨床検査技師教育においても、これら解析ソフトを有効に利用し精度管理向上に努めることが急務と考える。

引用文献

- (1) 小林浩二、鈴木英明、石田真一、坂西清、木村明、臨床検査技師に必要な統計学について（活動報告）、北里大学保健衛生専門学院紀要、2014；第 19 号：93-99.
- (2) 小林浩二、臨床検査技師に必要な統計学について（第 2 報）、北里大学保健衛生専門学院紀要、2015；第 20 号：59-64.
- (3) 小林浩二、臨床検査技師に必要な統計学について（第 3 報）、北里大学保健衛生専門学院紀要、2016；第 21 号：61-65.
- (4) 小林浩二、臨床検査技師に必要な統計学について（第 4 報）、北里大学保健衛生専門学院紀要、2017；第 22 号：55-62.

- (5) 小林浩二、五十嵐康之、笹岡悠一、大西秀典、小丸圭一、臨床検査技師に必要な統計学について（第5報）、北里大学保健衛生専門学院紀要、2018；第23号：43-49.
- (6) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について〔臨床検査技師等に関する法律〕、
https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc3586&dataType=1&pageNo=1
- (7) 一般社団法人日本臨床衛生検査技師会、会報 JAMT、2018；Vol24；No.17.
- (8) 三宅一徳、臨床検査の精度管理事業、日本臨床検査医学会（2012）、
https://www.jslm.org/2012text/2012_04.pdf
- (9) 細萱茂美、臨床化学検査法に適した精度管理法の選択と実践、検査と技術、2013；Vol141；No4；261-265.
- (10) 一般財団法人日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会（代表 細萱茂実）、定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel Ver.3.5、
http://jscc-jp.gr.jp/?page_id=1145
- (11) 一般財団法人 日本規格協会、日本工業規格 ISO9000：2015 品質マネジメントシステムー基本及び用語
- (12) 山本慶和、細萱茂実、桑克彦、定量測定法に関するバリデーション指針-日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会 定量測定法に関するバリデーション指針プロジェクト、臨床化学、2011；Vol40；No2；149-157.
- (13) 公益財団法人日本適合性認定協会、「認定の基準」についての指針ー臨床検査室ー JAB RM300：2014（第3版）
- (14) 一般財団法人日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会（代表 細萱茂実）、定量測定法のバリデーション算出用プログラム Validation-Support/Excel 解説書 V35、
http://jscc-jp.gr.jp/?page_id=1145
- (15) 社団法人日本臨床衛生検査技師会、臨床検査精度保証教本第1版（2010）
- (16) 社団法人日本臨床衛生検査技師会、臨床検査精度管理教本（2000）
- (17) 細萱茂美、精度管理に必要な統計学、臨床検査、2014；Vol58；No5；592-597.
- (18) 荒木秀夫、竹島秀美、山舘周恒、測定試薬の正しい評価法、Medical Technology、2007；Vol35；No4；395-400.
- (19) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会、生理的変動に基づいた臨床化学検査 36項目における測定の許容誤差限界、臨床化学、2006；Vol35；144-153.
- (20) THOLEN Daniel W., KROLL Martin, ASTLES J. Rex, CAFFO Albert L. NCCLS EP6-A: evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures, a statistical approach. Approved guideline (2003).
- (21) 細萱茂実、臨床検査に必要な統計処理法 2 直線性の評価と試料希釈誤差補正法、検査と技術、2000；Vol28；No2；131-134.
- (22) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会、定量分析法における検出限界および定量限界の評価法、臨床化学、2006；Vol35；280-294.
- (23) 一般社団法人千葉臨床検査技師会、統計解析用ソフト StssV/Excel2007 Ver. 18 及び血液算定における室内精度管理プログラム Ver6.7、http://www.chiringi.or.jp/camt/?page_id=2179
- (24) 斎藤篤、臨床検査における測定の不確かさ算出・活用マニュアル（濃度系成分の不確かさ推定事例）、日本臨床検査自動化学会、2008；Vol33；41-45.

(25) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)、不確かさの計算プログラム、

http://www.jccls.org/active/calculation_soft.html

(26) 佐藤宏美、簡単・簡便な X-Rs-R 管理図の作成について、公益財団法人大阪府臨床検査技師会

<http://www.osaka-amt.or.jp/lecture/kanrizu/index.html>

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、邦文又は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最終頁に表題、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頁目から、序文、方法、結果、考察、結論、謝辞、引用文献、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) に保存したものを郵送してください。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 様式 1) 原稿審査依頼書 (指定様式) 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、引用文献あるいは脚注として明示、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

昨年、北里大学保健衛生専門学院紀要第 24 巻への投稿は 1 報にとどまり、やむなく発行を断念し、本年投稿いただいた 3 報と合わせ、第 24・25 巻合併号として発行することとなりました。

御投稿をいただいた皆様に心より感謝を申し上げます。

根拠に基づく医療 (EBM, evidence-based medicine) は、1991 年にカナダのマクマスター大学のグループにより提唱されたものであり、「最新で最良の科学的根拠に基づいて臨床上的意思決定を行うこと」と定義されました。現在、新型コロナウイルス感染症の拡大により世界が大きな被害を受ける中、科学的根拠に乏しい多くの医療・医学情報が世界中に広がっております。

本学院を含む医療にかかわる者を養成する機関では、科学的根拠に基づく医療を実践できる人材を育成し、世の中に供給することが求められております。

本学院が主催する北里大学保健衛生専門学院紀要及び魚沼シンポジアは、それらを学び実践する上で得られた研究成果を、教員及び在校生、卒業生が科学的根拠として発表する機会となるものです。

今後とも多くの御投稿・御発表をいただきますよう、どうぞよろしくお願ひ申し上げます。

2020 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 山口 聖 子（臨床検査技師養成科）
委員 保 住 建太郎（管理栄養科）
委員 南 雲 陽 子（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 24・25 卷 2020

2020 年 8 月 31 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 株式会社 いんぱん

〒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 KOBAYASHI Kenji (Department of Applied Clinical Dietetics)
Editors KANEKO Hiroshi (Department of Medical Technology)
YAMAGUCHI Kiyoko (Department of Medical Technology)
HOZUMI Kentaro (Department of Applied Clinical Dietetics)
NAGUMO Yoko (Department of Nursing)
BANZAI Miyoko (Administrative Office)

KITASATO DAIGAKU HOKEN-EISEI-SENMONGAKUIN KIYO

Vol 24・25 2020

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)