

臨床化学検査法の開発と発想法

大澤 進*

はじめに

新しい発想による技術革新は世の中を改変させる力を持っている。臨床検査の世界でも RIA 法¹⁾の発見は血液中の微量なホルモンを定量する道筋を開き、内分泌代謝や病態が解明され、そして治療法が確立された。PCR による核酸の増幅法²⁾は遺伝子のレベルでの検査法を飛躍的に普及させ、種々の遺伝的疾患の同定やウイルス、細菌の迅速な診断法への道を開いた。これらの技術革新は、普段の研究の中から偶然の発見によって導かれることも多い。いずれの技術もノーベル賞を授与されているが、検査技術に利用されている測定原理は、名も知れない多くの科学者や技術者の努力と創造性から生み出されている。臨床検査室に勤務する技師や保健学科の教員、大学院生にもこれらのチャンスは訪れているが、その偶然を生かすか否かは我々の心の持ち方や考え方にかかっている。

生化学検査は検体検査の中でも種類や依頼件数が最も多く、患者の診断や予後の判定、そして治療効果の判定として多用されている。そのため多くの試薬メーカーから多種類の試薬が開発され、検査室で利用されている。昭和 40 年代は生化学検査が用手法で行われ、自家製による試薬が作製されていた環境もあり、技師が試薬を工夫して改良を加え、精度・特異性の向上や測定時間の短縮などの技術成果を学会へ発表することが盛んに行われていた³⁾。この時代から約 40 年を経る間に、

生化学検査室に勤務する技師にとっては、これらの試薬は既に完成された製品であり、自分たちには手の出せない世界と考える人が多くなってしまった。若い技師は自分の知識や経験が生きると思う形態学検査や生理学的検査に興味を持ち、ロボット化した生化学検査業務に興味を失う時代となった。しかし、検体検査の 60~80%は生化学検査であり、その依頼件数からも日常診療における重要性は不変であり、その重要性は益々増大することが見込まれる。それ故に個々の検査法の特徴や原理を理解し、その特性を心得て日常検査を行うとすれば、いろいろな問題点が発見できる。試薬メーカー開発者は最良の試薬を開発する目的で研究しているが、検査室の現場でどのような問題点があり、どのような方向で試薬を改良・開発したらよいか、完全には掌握できてはいない。検査室で働く技師やその教育者は各種疾患の検体と試薬がどのようなときに問題が発生するか、また各種疾患における検査データの問題点を実体験で知っている。この経験を生かして試薬の改良や開発に目を向けることにより、さらに新しい検査法や診断法への発展につながる。そして、患者の立場からの発想で新しい検査法も生まれる。例えば、胃の粘膜の器質的障害を調べる検査はバリウムを飲む X 線検査がスクリーニング検査として利用されている。しかし、放射線を浴びることやその読映は医師の技量に左右される。放射線を浴びずに簡単な胃のスクリーニング検査法があれば、患

*九州大学大学院医学研究院保健学部門 検査技術科学分野生体情報検査領域臨床化学研究室 osawas@shs.kyushu-u.ac.jp

者にも喜ばれる。この発想のもとに文献を漁ると、スクロース(砂糖)を経口摂取すると胃粘膜に器質的障害があると直接血液中に移行し、尿中に排泄される。尿中のスクロース量から胃粘膜の障害の程度が判定できる報告⁴⁾がある。著者らは HPLC で分析する方法に代わって高感度な酵素的測定法を作り、血液中の濃度を測定して短時間に胃粘膜の障害の程度を把握することが可能となることを実証した。

検査室に勤務する技師やその教育者は医師の不得意な分野に挑戦することで、新しい生体情報を医師に提供し、医療や患者に貢献することができる。新しい検査法は医師の診断方法を変える力を持つことによって、より信頼性の高い医療を提供することを忘れてはいけない。また、全国に勤務する技師やその教育者が検査試薬の改良や開発に目を向けて、より良い試薬や新しい検査法を医療の世界に提供することで、臨床検査学の発展も進展して活性化され、保健学も確立できる。我々は新しい検査法を開発することで、医学への貢献が可能であり、その使命は大きいと言える。従って臨床検査に携っている我々はそれぞれの立場で、疾病に特異的な検査法の開発に協力することも重要な仕事と言える。

一般に試薬の改良や開発は手が出しにくいと考えることが一般的であるが、日常使用している試薬の問題点を感じたならば、「必要は発明の母」の諺のごとく、先ず手を動かすことから始めることが肝心である。ここでは、新しい試薬を創造するわけであるから、そのための頭の使い方を訓練することから始める必要がある。記憶力は 20 歳前後をピークとして加齢とともに衰退するが、創造性は年齢に関係なく、かなりの高年齢まで知的活動として続けることができる⁵⁾。発想法を身につけるためには「問題意識を持つこと」、その問題を解決するために「数多く発想すること」、その発想を「記録すること」、そして「整理してレビューすること」、さらに「仲間とのブレインストーミング」が必要⁶⁾である。

この総説では生化学の試薬改良や開発にいたるまでの思考法とその実例を提示し、全国の生化学

検査室の技師や教職にある教員が、これらの発想法を身につけることで、臨床医に新しい検査情報を提供することで医療に貢献できれば、この総説の目的を達することができる。

アルビン トフラー、曰く「最上の power は知識や情報(新しい生体情報)であり、金力や暴力に勝る」と述べている⁷⁾。

I. 発想法

発想法⁸⁾⁹⁾には種々の方法が考案されているが、その中からほぼ共通した 13 事項を挙げた。発想法は訓練により後天的に身につけることができる。基本的には数多くの駄作アイデアを出すことから始まる。数を打てばいつかは花が開き、実を結ぶ。そのためには、思いついたアイデアはまめに、目的、原理、応用方法、文献などを書きとめ、カードやコンピュータに記憶させて整理し、定期的に読み直し、頭にインプットして、脳内の熟成を待つ。この訓練により種々の問題に直面したとき、突然「ひらめき」が出てくるようになる。では、具体的な発想法について主な手法を列挙¹⁰⁾する。

1) 特性列挙法

ある測定法の特性を整理して、現在の特性と特徴を明確にすることにより、その問題を整理して解決するために種々の特性を組み合わせで解決する方法。

2) 問題点列挙法

問題のある事例をならべ、本来どのような条件が満たされれば性能の良い測定法になるかを考える。

3) 目的達成願望法

理想を掲げて、発想する。この理想を達成するには現在の技術や試薬を改良するのではなく、本来に必要な技術や試薬を原点に戻って広く調査をし、それらの技術や知見を組み合わせで思考すること。

4) 反骨精神思考法

負けてたまるかの精神であるが、ある意味では人と同じ考えではなく、全く違ったアプローチで物事を考え、それに必要な文献を探し、実験を行うことである。新しいことを発見するには青色ダ

イオード実用化のような執念も必要である。

5) 好奇心法

何にでも興味を持ち、その原理や特徴を調べることである。一見、関係ない科学的な発見や技術に興味を持ち、異分野の情報を自分の世界に応用できるかを考える方法である。

6) 否定精神法

人の言うことを真に受けない。これは反骨精神思考法と同じであるが、文献に記載されていることを鵜呑みにせず、先ず疑い否定したところから物事を考える方法である。

7) 異質結合法

全く関係ない同士を結合させる。カメラと電話は全く目的が違うが、これを一体化したことにより携帯電話が新しい価値を持ち、世界で急速に普及した。

8) 既成要素組み替え法

各種の要因を組み替えて反対にしてみる。ある目的で定量試薬に利用されていた原理を酵素活性の検出系に利用することや、遺伝子の増幅技術を免疫学的測定に酵素の代わりに応用することである。

9) サイズ変更法

大きさを変えて、適用する。SONY がお得意とする発想法で音楽を持ち歩くために大型のテープレコーダーを小型のウォークマンにして歩きながら音楽を楽しめる装置にしたのがこの発想で、現在は Apple の iPod である。

10) 自然界模写法

問題の解決を自然界から学ぶこと。マジックテープは野山にある草の種がセータにからみついたことをヒントに作られたものである。生理学や生物学から得られた原理を臨床検査に応用する。

11) 視点変更法

見る場所や視点を変えて考えること、また本来の目的とは違う方向で利用できないかと考えることである。CD は音楽や記憶をする媒体であるが、これを臨床検査の分析用材料として考えてみる。

12) 原点帰属法

大もとに帰って考える。そこに利用されている測定原理に立ち戻って、再考すること。免疫学的

測定法の原理は抗体と抗原が結合して大きさがかわることに注目すれば免疫比濁法やラテックス凝集法を考えることができる。

13) 破壊法

総ての事実がないとして考えることで、「否定精神法」に近い発想法である。今までの人が築き上げた方法を打ち壊して、求められるニーズから新しいものを考える。

発想法を身につけるためには上記の発想法を適応して考える習慣をつけることである。発想法による考え方が身に付くまでは、考えついたらメモする習慣をつけること。そして日常での身近な事柄についても考えてみることで、種々の発想を数多く出すことである⁶⁾。この時、この発想は実現性がないなどと、自己規制をせずに突飛なことでも良しとし、最初は質より量を優先する。そして科学技術に関連する情報や巷に溢れる新しい商品など、常に興味を持ち、その原理や本質を調べてその応用を考え抜く。

II. 具体的な検査法開発の実例と考え方¹⁰⁾

1. 物まね、改良からの事始め

最初から素晴らしい絵を描くことは、天才を除けば我々凡人にはできない。しかし、凡人である我々も、その発想法を身につけることで非凡な才能を持つことはできる。まずは現実に困っている問題を着眼し、解決することから始める。

これから示す例は、昭和 48 年前後の自動分析装置が導入される前の事例である。その当時のブドウ糖の測定は酵素法 (Glucose oxidase・POD 法) が用いられていたが、その最終発色系は生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ (POD) で 4-アミノアンチピリン (4-AA) とフェノールを酸化縮合発色させる方法である (図 1)。

この発色は 500nm に極大吸収があり、綺麗な赤色である。その当時は 1 試薬系の測定であるため、高ビリルビン (極大吸収 450nm) 検体や溶血検体では、測定波長に近い吸収を持つそれらの色調による正誤差があるはずだが、実際にはほとんど影響がない (これはビリルビンの色調による正誤差とビリルビンの還元性による負誤差が相殺さ

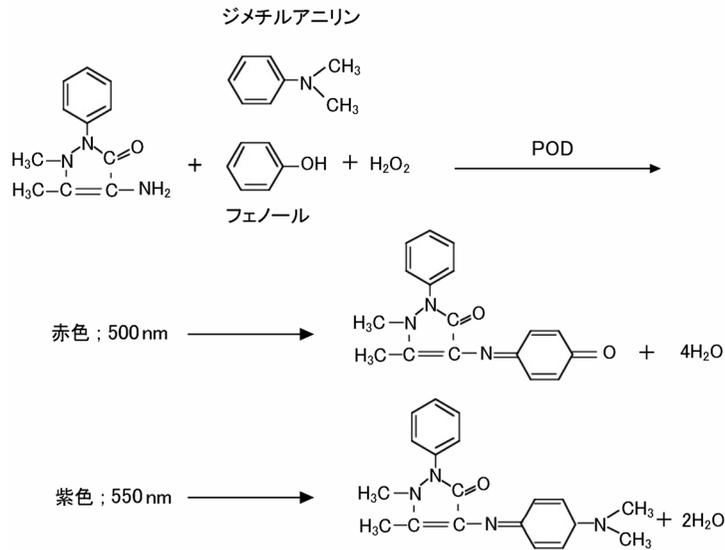


図1 酸化縮合発色剤の改良

れていたことは、後に判明する)。

そこで、ビリルビンや溶血による影響を受けない長波長の呈色試薬があれば解決できると考えた。まずはフェノールの代わりに違う化合物を利用することを考え、フェノールに類似した試薬であるベンゼン核を持った物質を中心に選んだ。最初は4-AAを用いる Trinder 試薬の文献¹¹⁾を調べた。スクリーニングであるから、試験管に入れた試薬緩衝液に各物質を薬匙で少し加え、溶解させて準備し、これに4-AA溶液を適当にいれ、酸化剤として過ヨウ素酸の粉末を薬匙で加えて、どのような色がでるか調べる。黄色から緑まで各種の発色が出現する。その中から、青色系統の試薬を作るわけであるが、黄色から緑に長波長の順番に物質の化学式を書いてならべてみると、ベンゼン核の置換基(電子供与性基: $-OH$, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-Cl$, $-N(CH_3)_2$ など)の種類に法則があることが分かる。しかし、発色の原理的なことを調べるため染料関係の本を調べると、発色のメカニズムには、まずベンゼン核のような芳香環が必要なこと、そして発色団($-N=N-$, $-C=N-$, $-C=O$ 主に2重結合)と助色団($-OH$, NH_2 , $-OCH_3$, $-Cl$, $-N(CH_3)_2$)によって各種の色調が生じることが記載されている。

そこで、図2の中からベンゼンに電子供与性

置換基が付いたジメチルアニリン(DMA)を選んで、検討を開始した。

最初は4-AAとDMAの混合比から検討し、その最適比は1:1.5であった。そして、グルコース濃度800mg/dlまでの直線性を確保するのに必要な色素濃度を選択した。次に20分で反応が終了するのに必要なGODおよびPODの最適量を求め、最終的な測定系を組み上げた。そして、2つの酵素や発色試薬の至適pHの検討から、pHは6.2に決定した。この試薬はグルコース測定試薬として発売され、さらにこの発色系はコレステロールにも応用された。グルコース測定試薬では、従来から問題になっていたビリルビンの色調による影響は回避され、さらに呈色感度も上昇したことから精度も改善された。同様な海外での報告は数年遅れてDu Pont aca用試薬¹²⁾、また国内では東洋紡から、それぞれコレステロール測定系に利用された。

現在ではアニリン系やアニシジン系化合物に水溶性基($-SO_3^-$)を導入し、臨床検査の目的(長波長、高感度、安定性、水溶性など)に合致した試薬について系統的な開発がTamaokuら¹³⁾(同仁化学研究所)によって行われ、数多くの試薬(図2)に利用されている。

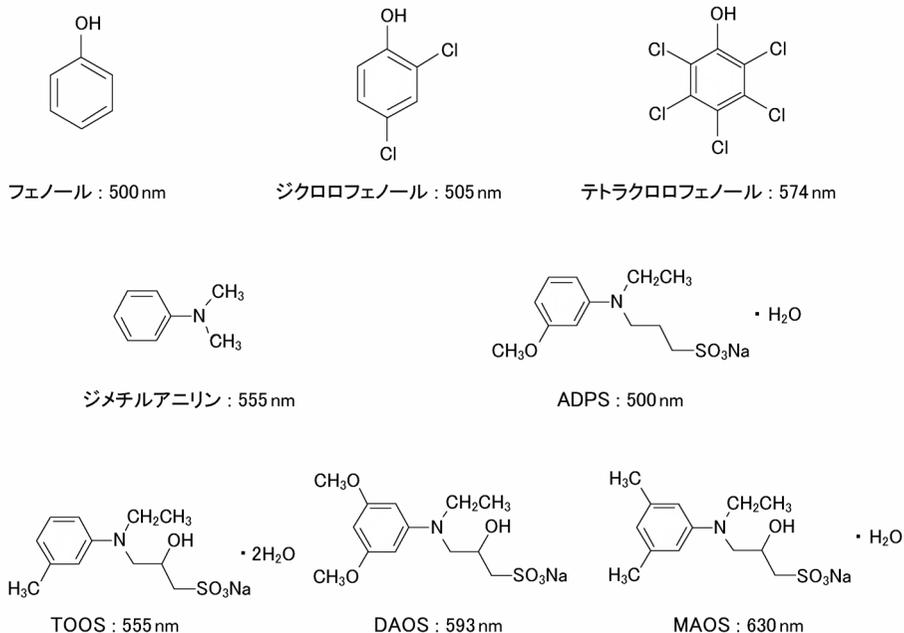


図2 各種芳香族化合物と4-アミノアンチピリンとの発色

2. 目的達成願望法による方法

昭和50年代のはじめの頃、ようやく自動分析装置の導入が始まる時期であったが、まだ主流は用手法の時代である。尿酸の測定法はそのほとんどが除タンパク操作を必要とする還元法で酸化縮合系酵素法は開発されていなかった。リンタングステン酸ブルーによる還元法は血清量も多く、特異性に乏しかった。また唯一の酵素法はウリカラ-400でハンチ反応を用いた方法¹⁴⁾である。特異性は高い方法であったが検体盲検を必要とし、血清量も0.4mlと多く、しかも測定に1時間近く必要であった。

このような現状から、直接法で特異性が高く、微量で高感度、そして生体色素の影響を受けにくい、長波長に発色する方法が必要と考えた。つまり目的がはっきりしていたわけである。Clin Chemの雑誌に、この目的に合致した論文が眼に止まった。Morinらが報告した方法¹⁵⁾で、酸性条件下で尿酸1モルが鉄4モルを還元し、生成した鉄2価イオンをキレート試薬で発色させる方法である。私は図3に示した鉄のキレート試薬で青色に発色するTPTZに変えて測定系を組み立てた。

この改良した方法を臨床病理学会に報告¹⁶⁾をしたが、やはり血清中の他の還元物質であるアスコルビン酸やビリルビンによる影響がみられた。但し、血清量はその当時としては20 μ lと非常に微量であった。そこで、アスコルビン酸やビリルビンの影響を押さえる更なる改良へ挑戦した。その当時、アスコルビン酸オキシダーゼは存在しない。リンタングステン酸法では古くから、血清をアルカリ処理することでアスコルビン酸を破壊する方法が報告されていたので、この方法にも利用してみたがアスコルビン酸の影響は回避されたが、ビリルビンの影響が増大する問題が生じた。そこでアスコルビン酸の性質や文献を調べると銅イオンで分解されることが記載されていた。しかし、鉄イオンを測定する試薬に銅イオンを共存させると発色剤のキレート試薬と反応し妨害をすることが予想された。TPTZの文献にも銅イオンが測定できるとある。普通ならば賢い方はここで銅イオンを利用することをあきらめることになる。しかし、目的を達成する願望を強く持てば、何とかしようとする意志が働く。そこでpHや銅イオン濃度など、種々の条件で検討すると、図4のように

銅イオンによるアスコルビン酸の分解方法

Oxidation of ascorbic acid with acid cupric ions

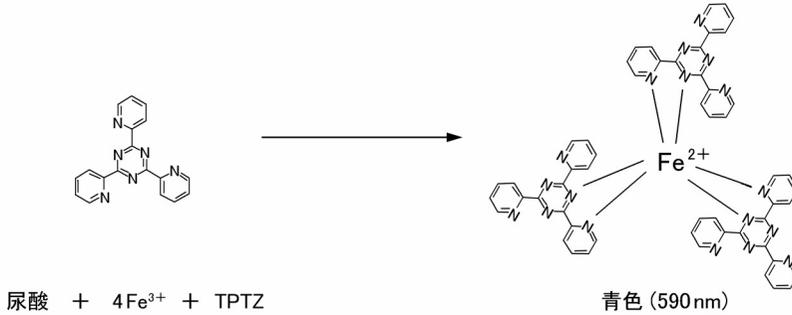
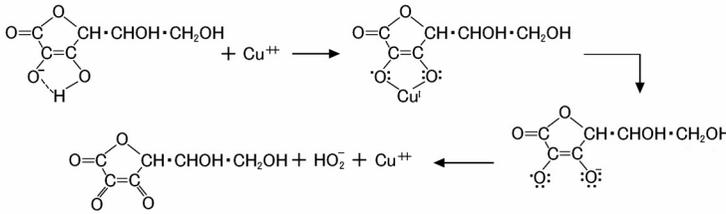


図3 尿酸の高感度直接法

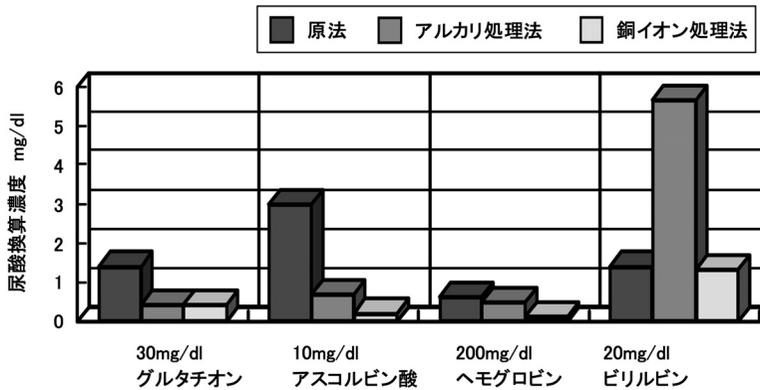


図4 鉄・TPTZ法による尿酸の高感度直接測定法

アスコルビン酸、ビリルビンの両者ともに影響をかなり抑える試薬条件を見つけることができた。この頃になって試薬メーカーから共同開発の話があり、最終的に発売されるようになった。

少しの障害も目的を達成する願望を強く持てば「成せばなる」と言える。また鉄と銅を共存させる測定系は矛盾するが、既成概念に捕らわれず実験を行うことが必要で、たとえ失敗しても、その結果はいつか他の実験で活用することができるか

も知れない。どんな実験でも失敗はない。目的とした結果が得られなかっただけであり、実験から得られた情報は貴重と言える。

3. 反骨精神思考法の事例

反骨精神思考法、つまり負けてたまるかの精神である。昭和50年頃 RI 検査が急速に普及し始めた。RI 処理の設備を持つ施設は全国でも少なく、これらの特殊検査はどちらかと言えば大手の特殊検査センターへ外注するのがその当時の中小検査

室の現状であった。ある先輩の施設では RI 検査室を早くから導入し、この分野の先駆的な病院の一つであった。その先輩から、「これからは RI 検査の時代だよ」と言われた。しかし、当時の勤務していた都立職員共済組合病院では、そんな施設はない。

負けてたまるかの精神である。そこで EIA 法が研究され始めた時期であったので、私も抗体に酵素を標識して EIA 法で対向しようと考えた。しかし、そんな簡単にはいかない、ほどなく挫折してしまった。では、別なことを考えようと発想転換をした。基本に戻って抗原抗体反応はどのような反応なのかを調べるため、緒方富雄著の「理論血清学」を購入して勉強した。しかし、良いヒントが見つからない。そこで再び、基本に戻って抗原抗体反応は抗原と抗体が結合することである。抗原と抗体の二つが一つになることである。つまり大きさが変わることでもある。この考えから大きさの違いを測定できれば良いと発想した。

そこで、妊娠反応に使われている赤血球凝集反応を利用すれば結合した血球と未結合の血球の大きさは違うから、血球カウンターで凝集と非凝集

の血球を数えれば良い。しかも血球カウンターはどここの検査室にもあり、RI の設備も要らない。妊娠反応試薬を用いて陽性と陰性の反応液を血球カウンターで血球検出信号の大きさをスレッシュホールドを変えて測定したが両者の計測数に差がでない。混合すると血球は剥がれてしまうことが分かった。そこでラテックス粒子を用いれば結合した粒子が剥がれないと考えた。その当時、ラテックス粒子を使用した定性用の RF 試薬を使って実験してみると、結合した粒子は大きくなり、未結合の粒子は小さい。用いたコールターの血球計数装置にはスレッシュホールドのダイヤルがあり、**図 5** に示したようにある大きさ以上の信号のみを計数する仕組みが備わっていたので、RF 陰性試料と陽性試料の両者の計測値が最も違いを生じるスレッシュホールド値を求めた。そして標準物質を希釈して測定すると綺麗なシグモイドカーブが得られた。「世紀の大発明である」と思い、喜び勇んである試薬会社の開発担当者に説明すると、それとほぼ同じ原理でテクニコンのフロー方式で抗原抗体反応をさせ、血球カウンターで測定する方法をベルギーの研究者が 2 年前に報告¹⁷⁾して

ヒント: 抗原抗体反応は抗体と抗原が結合して大きさが変わる

- 1) 赤血球凝集反応の利用
抗体標識赤血球と抗原が結合して体積が大きくなる→血球カウンターで数を計測
失敗: 赤血球は大きく抗原抗体反応の結合力では離れる
- 2) ラテックス凝集反応の利用(コールター血球計数装置で測定)

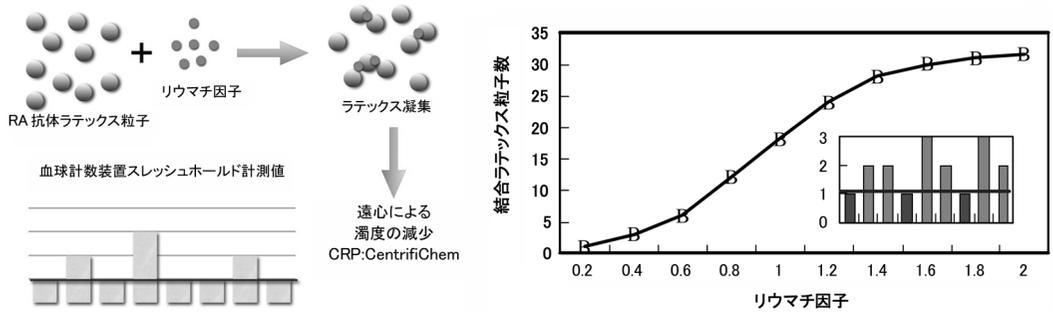


図 5 粒子計測イムノアッセイの開発

いるとのことであった。世紀の発明もこの瞬間、砕け散ったが、その後我が国でもラテックスの免疫凝集反応により生じる凝集ラテックスをカウントする PAMIA がシスメックスから発売されたことを考えれば、着眼点は良かったのである。諦めずに血球計数機で論文を報告しておけば、我が国最初の栄誉を受けたはずである。実験をしたら論文にすることの大切さを味わった。

4. アイデアを他人に話して反応を見る事例(ブレインストーミング)

ラテックスの凝集を血球カウンターで測定する世紀の大発明は不発に終わった。

ラテックス凝集を用いての血球カウンターのアイデアが既に報告¹⁷⁾され、がっかりしていることを友達に話すと、彼は凝集したラテックスと非凝集ラテックスは遠心力による沈降速度が違うのではと助言を戴いた。お互いの脳を刺激し合う、ブレインストーミングの活用である。昭和54年、千葉大には遠心型の自動分析装置 Centrifichem 400 があった。本装置は 950rpm の回転数で試料と試薬を瞬時に混合し、速度分析ができる装置である。そこで、CRP ラテックス試薬を用いて陰性と陽性の検体が何回転で分離できるかを調べた。

すると 900rpm 付近で分離することが分かった。Centrifichem の回転数は遠心機の直径は小さいが 950rpm である。早速、CRP について実験すると定量することができた。原理は図 6 に示した。則ち、抗原抗体反応が進行するに従い、ラテックスの凝集塊が大きくなると遠心力でセルの底に集まる。遠心力と直角の方向から、この濁度を測定すると経時的な速度分析が可能になる。この方法は技師会の学会で報告¹⁸⁾したが注目はされなかった。また、Centrifichem の製造元の学術担当の方がアメリカから来日した際に説明したが、免疫比濁法が既に開発されていたのか、興味を示してくれなかった。すべてがうまく行くとはい限らない。時代のニーズに合致したアイデアでなければ受け入れられないが、時代や環境が変化することで生き返る場合もあるので、心の片隅に記憶しておくことも蘇ることもある。

5. 異質結合法による事例

平成に年号が変わって日本経済がバブルの頃、どこの会社も金回りが良いのか異種業への進出が盛んであった。大手の有名な出光石油化学会社が、CD ディスクを製造しており、これを用いて臨床検査の世界に進出したいと相談に来られた。目的

ヒント; 抗原抗体反応は抗体と抗原が結合して重くなる

ラテックス凝集塊を遠心すると凝集塊は早く沈降し、非凝集ラテックスは遅く沈降する

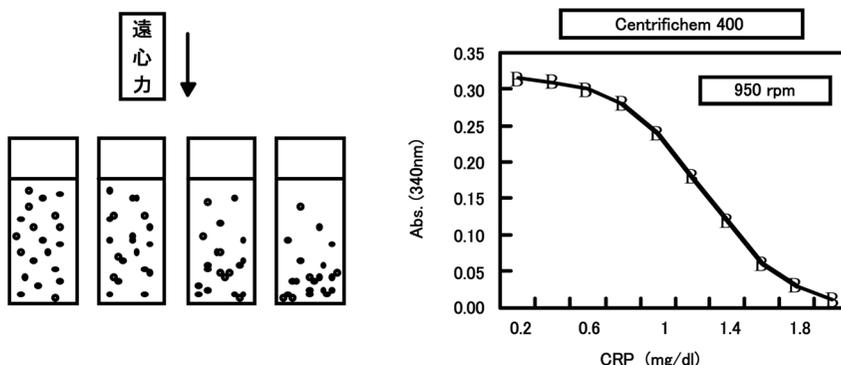


図 6 遠心力を利用したラテックスイムノアッセイ

は CD ディスクの表面を利用して各種の反応を行い、レーザー光線で検出する装置を作りたいとのことであった。できれば免疫部門に関連した測定装置を作りたいとの要望であった。CD の検出原理は CD 表面に凹凸を付け、その $1\mu\text{m}$ の溝の有無で信号を取り出し音楽や映像を作り出している。もちろん検出用レーザー光線は $1\mu\text{m}$ の大きさを識別できる。

そこで閃いたのは、CD の表面に抗体を付け、次に検体中の抗原を結合させ洗浄する。そして、直径 $1\mu\text{m}$ のラテックス標識抗体を反応させ、固相抗体・抗原・ラテックス抗体の複合体を生成させて未反応ラテックスを洗い流す。最終的に図 7 に示したレーザー光線で結合粒子数をカウントすれば直接抗原数が検出できるはずである。CD の表面に区画(セクタ)を付け、測定したい抗体を結合させれば多種類の物質の測定が一度に測定できる利点もある。CD の検出器は目的の場所にランダムアクセスできるからである。

CEA 5ng/ml を試料として血清 $50\mu\text{l}$ 中のモル濃度は 5.6×10^{-17} モルとなるが、1 モルには 6.0×10^{23} 個の分子があるので、理論的には血清 $50\mu\text{l}$ 中には CEA が 10 万個存在するので、酵素で増幅することなく数を数えれば良いことになる。検出

のための酵素反応時間が不要になるので分析時間も更に短縮できる。

このアイデアに基づいて会社では特許申請¹⁹⁾を行い自動試作器が作られ、約 3 年をかけて測定ができるまでになり、その名も Digital Immuno Assay (DIA 法) と命名された、しかしバブルが弾けこの開発は途中で中止になった。また開発を進める中で問題点も見つかった。ラテックスは直径 $1\mu\text{m}$ である。CD 表面に固相化した免疫グロブリンの大きさは 10nm 前後とするとラテックスが複合体を形成した固相下には約 100 個の固定化免疫グロブリンが隠れてしまうことが考えられ、ラテックスを検出に利用すると 100 倍感度が落ちることになる。今であればラテックスの代わりに蛍光色素標識第二抗体を用いれば良い。数年前には CD を用いたマイクロ分析法が報告され、我々の開発は 10 年早すぎたのである。

ここで大事なのは、全く異質なものにも興味を持ち、自分の世界に利用できないかと考えることである。この発想は現在の DNA チップやプロテインチップによる分析法にも発展できる可能性があっただけに、簡単にあきらめない意志力と忍耐力、そして資金力が必要である。

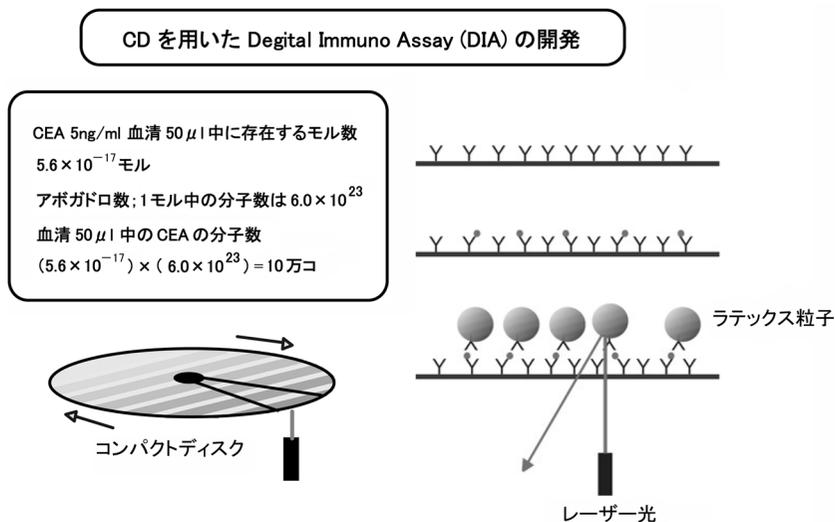


図 7 CD による免疫学測定法の開発

6. 既成要素組み替え法の事例

昭和50年代の前半、未だ測定は用手法のころ、中性脂肪の測定は化学的原理(ハンチ反応)を用いた方法で測定に半日かかる時代であった。この頃より酵素を用いた測定法が流行し始め、Y社が発売した酵素法は抽出操作が要らない、直接法で僅か15分測定が可能であった。爆発的な売れ行きで瞬く間に普及したが、普及したところから小型の自動分析装置が利用されはじめ、これに応用するとセルに不溶性のホルマザン色素が沈着して問題になった。最終検出系は生成したNADH₂をジアホラーゼでニトロテトラゾリウムブルーを還元してジホルマザンの青紫色を測定する原理である。この還元発色試薬はもともと不溶性でアイソザイムの染色に用いられていたものを水溶液中で比色分析したことに無理があった。

そこで既成要素組み替え法の常道に従って、水溶性の還元発色試薬を捜しEllman試薬を見つけた。臨床検査では既にEllman試薬がコリンエステラーゼ測定に用いられていた。ブチルチオコリンを基質として生成するチオコリンのSH基の水素イオンによってEllman試薬の-SS-結合が開裂してSH基を持つ色素を生成する方法である。この発色試薬は5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid): DTNBで、この生成物は5-Mercapto-2-nitrobenzoic acidの黄色色素であるため、ビリルビンや溶

血の影響を受けやすい欠点がある。そこでEllman試薬の類似化合物に図8の2,2'-Dithiodipyridine: 2-PDSを用いて中性脂肪の測定系を作り上げた。生成物の2-thiopyridoneは343nmに吸収を持つため、NADHの検出に用いられる同じ波長(340nm)で検出できる利点がある。測定法としては完成し、水溶性発色でセルに吸着しない方法として日臨技の松本学会²⁰⁾で発表した。しかし、2-PDSはSH基と反応する。用いる酵素は蛋白であり、酵素蛋白中のSH基と反応し試薬調整後2時間程度で試薬ブランクが上昇するため実用にならなかった。その後、ペルオキシダーゼ・酸化縮合発色系(トリンダー試薬)に導く酵素(オキシダーゼ類)が数多く開発されはじめ、還元系の発色試薬は見捨てられ、ごく最近まで良い試薬が開発されなかった。

何か新しい試薬を作るのは容易でないように思われるが、最初は試薬の一部を組み換えて測定系をつくるのも入門の手がかりとしては良い方法である。現在の2試薬系で試薬を作るのであれば、今でも利用可能な反応系である。この検出系の経験はその後、コリンエステラーゼ測定試薬で生かされることになる。

7. 古いアイデアは時代や環境の変化で蘇る事例

先に述べた中性脂肪の測定試薬として用いた2-PDSは酵素と発色して試薬ブランクが上昇し、

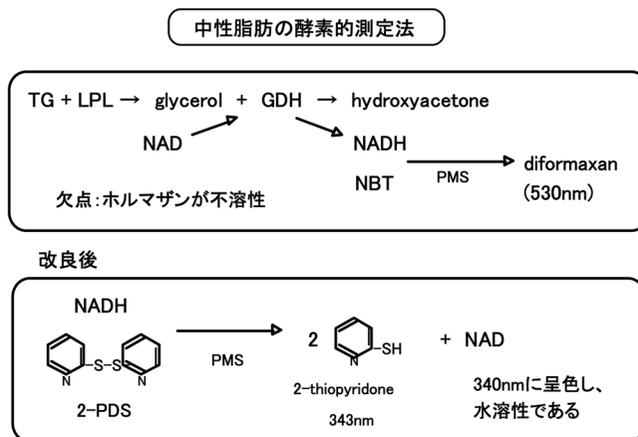


図8 2-PDSを検出系とした中性脂肪の紫外測定法の開発

実用に耐えない結果であった。その後、昭和 50 年代に入ると自動分析装置に用いる試薬は 2 試薬で統一され、試薬保冷庫が完備されるに至った。中性脂肪の開発時期は用手法が主であるため、1 試薬系の試薬で室温でも安定であることが要求されていた。この古いアイデアも時代の変化に伴い、検査室の環境(分析装置)が変わったことで蘇る。2-PDS は単独の試薬として用いることができるようになった。

熱心な MR が定期的に訪れ、新しい試薬の開発について議論をしていた。その中で新規のコリンエステラーゼ試薬を開発したいと相談され、それであれば 2-PDS を発色試薬として利用したら、340 nm で速度分析ができ、2-PDS 自体も DTNB よりも安定であることからこの試薬を推薦した。

図 9 に示すように基質にはベンゾイルチオコリンを用い、酵素作用で生成するチオコリンに 2-PDS を作用させ 340 nm に吸収を持つ 2-thiopyridone の変化量を速度分析する方法で市販化²⁾までに至った。

過去に問題であった試薬でも、環境や経年的な変化によって古くても蘇ることの事例である。

8. 問題点列挙法事例：すべての商品は更に進化する

どんな検査試薬でもこれでよいと言えるものは

ない。時代や環境が変化すると更に新しい性能が求められる。まして、問題を持つ方法であればなおさらである。昭和 60 年代のはじめ、酸性ホスファターゼの測定試薬は Kind-King 法による用手法の試薬のみであった。また、前立腺特異抗原のキットも発売されていない。二つの試薬メーカーでは自動分析装置に適用可能な速度分析試薬として、4-ニトロフェニルリン酸にクロール基を 1 つから 2 つ導入して、酸解離定数(pKa)を低い pH に移行させ pH 5 付近でも水解生成物が完全解離発色する基質が合成され、感度も高い測定ができるようになった。しかし、酸性下で測定するため溶血血清ではヘモグロビンの吸収特性が経時的に変化するため、活性の低い酸性ホスファターゼではその影響が大であった。また、基質も電子吸引性のニトロ基が導入されており、不安定であった。

その当時、臨床検査薬に新たに進出した試薬メーカーは化学合成の優れた技術をもった会社で、何か新しい検査試薬を開発したいと相談に来られた。そこで現状の酸性ホスファターゼ基質には多くの問題があるので、ニトロ基の代わりに異なる基を導入してヘモグロビンの影響のない 340 nm に吸収のある基質を作製することを提案した。彼らは図 9 に示したニトロ基の代わりにアセチル基(-COCH₃)を導入した、4-アセチル-2,5-ジクロ

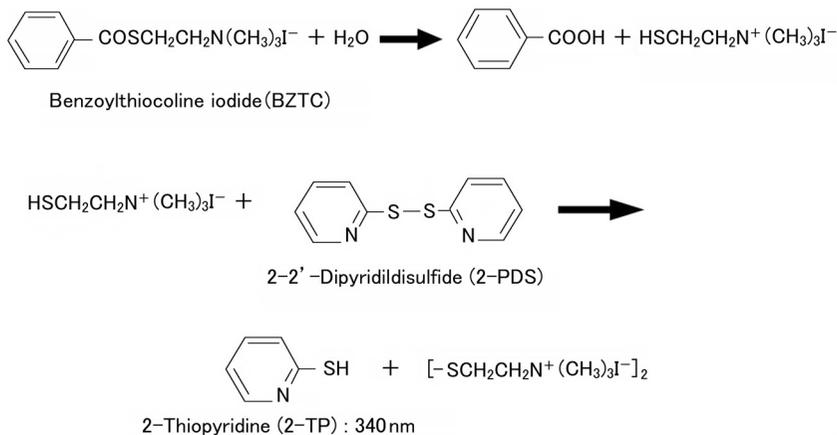


図 9 2-PDS を検出系にしたコリンエステラーゼ活性測定法の開発

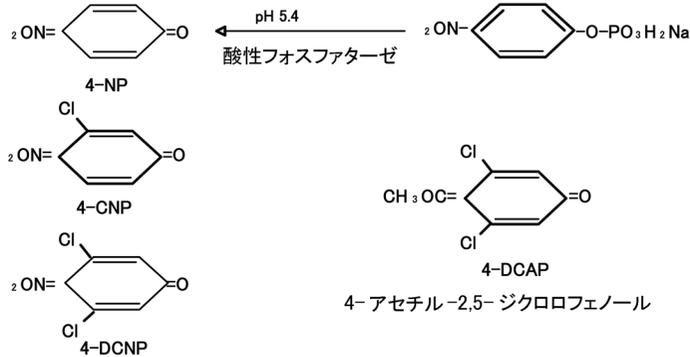


図 10 酸性ホスファターゼ用基質の開発

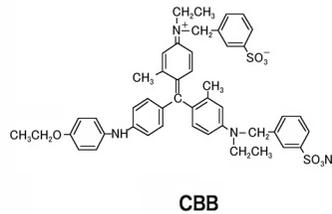
尿蛋白測定法の問題点

- 1) スルホサリチル酸比濁法: 蛋白種の反応性に差異がある
- 2) 自動分析装置に適用できない: 比色法の必要性
- 3) 色素法: CBB-G250色素のセル吸着
- 4) 直線性: 色素法は彎曲、直線域が短い
- 5) 温度: 温度によって各蛋白の反応性に影響がある

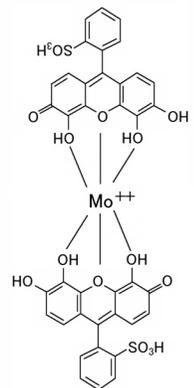
尿蛋白測定法のあるべき姿

- 1) 蛋白種による反応差異が少ないこと
- 2) 蛋白の分子量に反応性が影響しないこと
- 3) 直線性が良いこと
- 4) 温度の影響を受けないこと
- 5) 自動分析装置に適用可能なこと
- 6) 色素が水溶性であること
- 7) 長波長で呈色すること

色素の分子がCBBより小さい
水溶性色素でセルに付着しにくい
青色発色
蛋白種の違いが少ない
直線性がある
自動分析装置に適用可能



ピロガロールレッド



ピロガロールレッド

図 11 尿蛋白測定法の開発コンセプト

ロフェニルリン酸を合成した。この基質を酸性ホスファターゼで加水分解すると 4-アセチル-2,5-ジクロロフェノールが生成し 340 nm に吸収を示す。この方法は開発時点で最も優れた方法²²⁾となり広く利用されるようになった(図 10)。

現在は前立腺特異抗原の普及により酸性ホスファターゼ測定は行われなくなったが、骨粗鬆症のマーカーとして骨由来酸性ホスファターゼ活性測定にこの方法が現在も利用されている。

9. 問題点列举法の事例 問題意識が情報を引き寄せる

昭和 60 年ごろ、当時東京医科歯科大学の芝先生が「尿蛋白測定にまつわる問題点」をテーマにして講演された原稿を拝見する機会を得た。

そこには尿蛋白測定の問題点が述べられていた。この当時の蛋白測定法はそのほとんどがスルホサリチル酸を用いた比濁法で、唯一の色素法である Coomassie Brilliant Blue G250 を用いた方法も色素がセルに吸着することや検量線が彎曲し、測定可能範囲が狭いなどの欠点を持っていた。尿蛋白測定法として解決すべき問題点を列举してみると、図 11 の上段に示した項目が挙げられる。

このような問題意識を持っているとき、日本分析化学会の雑誌に大阪薬科大学の藤田先生が英文報告²³⁾した蛋白測定法が眼に止まった。その検討データから今までの測定法の問題点を解決できる方法として、早速検討したところ目的の性能をほぼ満たす方法であることが分かった。

しかし、尿中のシュウ酸などのカルボン酸類による負誤差を生じることが分かったため、W社との共同開発により、種々の改良を加えて発売することになった。現在では測定法の約80%はこの市販化されたピロガロールレッド・モリブデン錯体発色法(PR-Mo法)が利用され、測定値の施設間差が大幅に改善された。開発にあたっては蛋白の種類による反応性の違いを極力少なくするためにpH、界面活性剤などの検討を行い、最終的にpH 2.2とすることで免疫グロブリンの反応性を向上させた。

図11のようにピロガロールレッドはCoomassie Brilliant Blue G250よりベンゼン核が3つ少なく水溶性であること、しかしモリブデンがピロガロールレッドと錯体を作り感度が高いこと、そしてアルブミンとグロブリンの反応性が近似するようなpHで測定条件を組み立てたことなどが大きな特徴である。この試薬の開発では蛋白測定法の問題点を列挙して、そのほとんどを解決することを目標として検討したため、多くの技師に支持をされたものと考えられる。また自動分析装置に応用できたことも普及を早めた要因である。検査室の現場で困っていることや問題点を常に心に刻み、新しい試薬や技術に関心を持つことが重要である。藤田先生は薬学博士号の研究で雑誌に報告していたが、この試薬を臨床検査の世界に導入したことは「他人の種で相撲を取る」とも言えるが、我々の臨床化学の分野は色々な世界の技術を応用して医療に貢献することを考えれば、臆することはない。

このPR-Mo法が普及したことを知った藤田先生からはお礼の言葉を頂いた。最近では藤田先生からBence-Jones蛋白の反応性を向上させた新しい測定法が報告²⁴⁾されている。

以上具体的な発想法を利用した臨床検査法の改良・開発事例をまとめたが、最初から誰でも簡単に発想はできない。最初は発想法の事例に基づいて解決すべき問題に適用して考えることを繰り返して思案することから始める。考えるだけでなく着想したら実験をして、感を磨く(経験からの知識の蓄積)ことも重要である。

10. 逆転の発想事例

HDL-コレステロール値は虚血性心疾患のリスク因子として重要な検査であるが、現在の直接法が開発されるまでは、ポリアニオン(デキストラン硫酸、ヘパリン)と金属イオンを血清に加え、塩基性アポリポ蛋白(apo-B)の陽イオンが含まれるカイロマイクロン(CM)、VLDLおよびLDLリポ蛋白と結合させて不溶性の複合体を生成させ、これらを遠心器で沈殿させ、その上清中のHDLコレステロールを自動分析装置で測定する方法であった。当時、唯一自動化ができない生化学検査項目であった。多くの企業が長年にわたって挑戦した検査試薬であったが、試薬メーカーの開発者からは直接法は開発されなかった。

K社は4試薬で測定できる直接法を開発し、我々はこれを自動化学会で報告し、会場に入れなほどの聴衆が集まった。この方法は従来の沈殿試薬を用いて、沈殿塊を作り酵素がLDLなどに作用できなくする。溶解しているHDLコレステロールは添加した酵素により発色をさせ、その後、白濁したりポ蛋白複合体は塩酸グアニジンで溶解して透明化し、HDL-コレステロールを定量する方法である。この発表の約1年前、KM社の開発部長からHDL-コレステロールの直接法の実験データを見せられた。彼の説明によるとHDL-コレステロールはコール酸で特異的に溶解できるのでHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを反応できなくすれば良い。この研究は熊本大学検査部の杉内先生との共同研究で陽イオンに荷電したアポB蛋白にシクロデキストラン硫酸(CD)とMgイオンを作用させて、アポB蛋白・CD・Mgの可溶化架橋複合体を作ること、酵素が作用できないようにする原理である。検討データを見せていただくと、LDLコレステロールが徐々に反応していることが問題で、製品化にたどり着けないとのことであった。図12にこの直接法の原理を示すが、私はCM、VLDL、LDL粒子の表面にアポB蛋白・CD・Mgの架橋複合体を形成させても完全に包囲することができず、一部の隙間に酵素が作用すると考えた。そこで、用いる酵素にポリエチレングリコール(PEG)を標識した酵素は酵

素蛋白表面が PEG で覆われているので、直接 LDL 粒子に接触しないのではとアドバイスした。数ヶ月後、開発部長が来られ、製品が完成したと教えられた。世界で初めての HDL-コレステロール直接法²⁵⁾が市販化されたのである。この方法の業績は杉内先生であることは自明のことであるが、その開発に関与できたことは密かな私の喜びである。このアイデアは逆転の発想と言える。

実はこの数年前に、私たちも図 13 のような HDL-コレステロールの自動化法を考えていた。アポ B 蛋白・CD・Mg の架橋複合体を形成させる方法として磁性体微粒子の表面にデキストラン硫酸を結合させ、磁石でこのアポ B 蛋白複合体

を分離する方法である。しかし、デキストラン硫酸標識磁性体微粒子を作成して血清と混合しても LDL リポ蛋白類は沈殿しない。この方法の検討を諦めようとしたが、最後にデキストラン硫酸と Mg、そして血清を混合した溶液に同時に無標識の磁性体微粒子を共存させて、磁石で沈降させると見事に分離することができた²⁶⁾。上清の HDL-コレステロールは自動分析装置のサンプルノズルでサンプリングして隣のセルに分注し、酵素試薬を加えて発色させるシステムである。もちろん、自動分析装置には磁石を組み込む必要がある。そこで大手臨床検査機器メーカーの H 社に開発を依頼し、共同で特許申請をして開発に取りかかっ

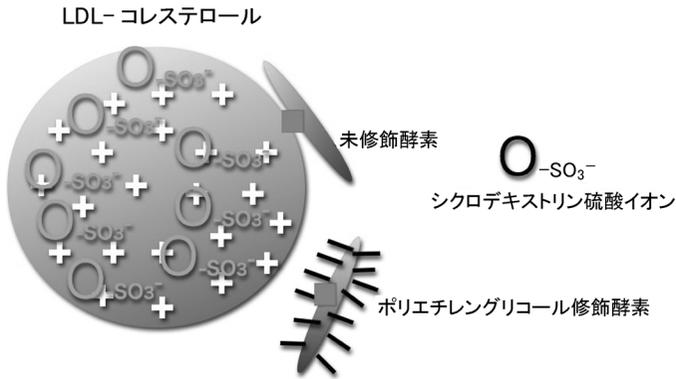


図 12 HDL-コレステロール直接法の開発

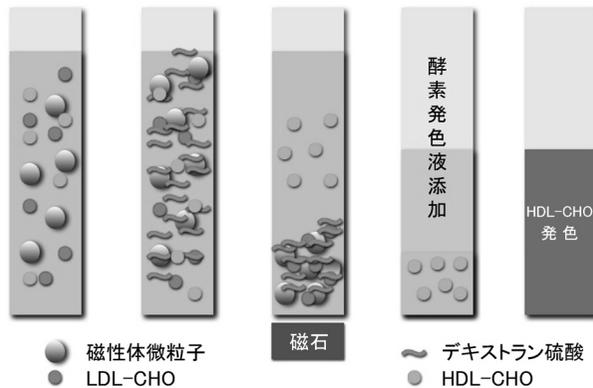


図 13 HDL-コレステロールの磁気分離測定法

た。しかし、全く同様の原理の試薬が外国の企業で開発されていることが分かり、この話は中止になった。自動分析装置に磁石を組み込むことは将来の EIA 法へ応用できるという背景も合致した。その後、磁石を組み込んだ自動酵素免疫測定器機が専用器機として開発されたことは承知の事実である。何か新しいことを進める場合、磁性体分離機能などの共通の測定機構を常に考えていくことは機器の開発改良の面からも重要と言える。

HDL-コレステロールの直接法の開発が測定技術のブレイクスルーとなり、LDL-コレステロールや他社も同様な試薬を開発する呼び水になった。

11. 必要は発明の母

40歳の頃、胃の健診 X 線検査で撮像に陰があり、内視鏡検査による精密検査を受けた。内視鏡の検査の結果、良性のポリープで一安心であったが、毎年 X 線を浴びることを考えると生化学的な検査で胃の器質的な検査ができないかと考えるようになった。胃ガンの検診検査としてはペプシノゲン I と II を東大の三木先生が開発され実用化していた。その当時は RIA 検査で EIA 検査法ができると検診などに普及すると考え、和光純薬の開発に話をし、三木先生を紹介した。その後この試薬は EIA 法として発売され、検診にも利用されるようになった。しかしこの検査は癌の発見を主体とした検査である。胃粘膜の器質的な病変

を捕らえる検査が低価格な試薬と生化学の自動分析装置で測定できれば良いと考えるようになった。

米国 Clinical Chemistry の学会抄録を見ていると、sucrose 水溶液(砂糖水)を飲み、尿中に排泄される sucrose を HPLC 法で測定し、胃の粘膜の器質的な病変を調べる方法が眼に止まった。この検査法は砂糖水を飲み、胃壁を sucrose で満たす。図 14 に示すように健全な胃粘膜であれば、sucrose はほとんど胃粘膜から吸収されず、小腸に流れて小腸粘膜の glucosidase でブドウ糖と果糖に分解され、血液中に吸収される。しかし、胃の粘膜に炎症や癌、潰瘍などがあると粘膜が失われ、sucrose は血液中に吸収され、尿中に排泄される。これは私が探していた生化学的な手法による胃の検査法と考え、種々の試薬メーカー開発者に話をした。あるメーカーが興味を示し、酵素法で sucrose を高感度に測定する図 15 に示した原理の方法を開発した。この方法では Thio-NADH が 2 モル生成し、そのモル吸光係数も NADH の 2 倍であるので血液中の微量な sucrose を定量できる²⁷⁾。

この高感度な方法を用いて sucrose 負荷後の血液中の濃度を測定すると図 16 のように 60 分で血中濃度が最高値になることが分かり、胃の粘膜の障害により血液中濃度も異なることが分かった。また種々の胃の疾患でも血液中の sucrose 濃度が

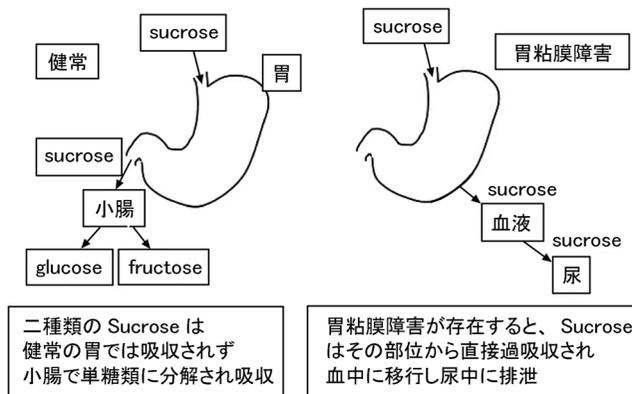


図 14 sucrose を用いた胃の検査法

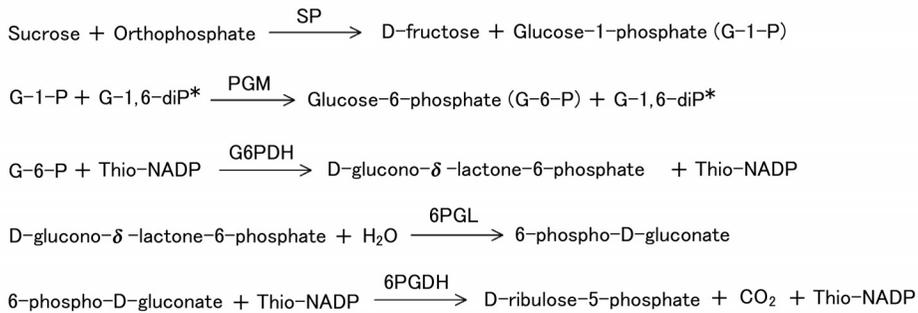


図 15 sucrose の高感度測定法

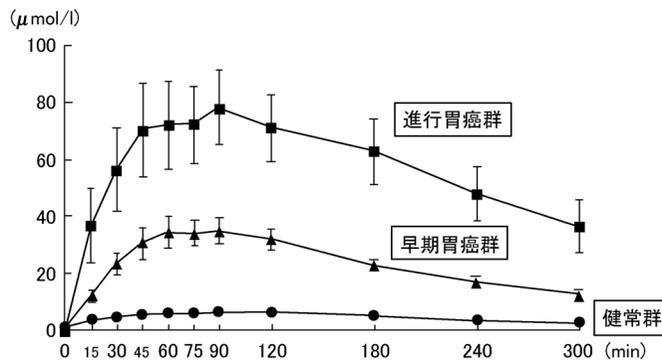


図 16 胃の疾患と血中 sucrose 濃度

上昇することを確認した²⁸⁾。今後はこの方法を家庭でできる胃の検査に応用することを考えている。つまり、sucrose と郵送検診²⁹⁾の採血器具を送り、sucrose 負荷後 60 分で手指から微量の血液を採取して郵送してもらい、検査センターで sucrose 濃度を測定する。濃度が高い人は内視鏡検査を勧める。この検査法が普及すればバリウムを飲む必要もなくなり、放射線も浴びる必要はない。しかも自宅でもできる患者に優しい検査法になる。

将来はあらゆる物が自動化され、技師の考えることが不要な時期がくるのかも知れない。現に生化学検査は自動化が進み、新人技師から見ると魅力がないらしくあまり希望しなくなった。しかし、いくら自動化されようが、所詮その機器を作ったのは人間である。今後、益々我々に求められるのは人間だけに備わっている**創造性**である。

千葉大時代の恩師であった、故降矢 震名誉教授は「間違っても小利口者になってはならぬ、記憶力のみ優れた者でも優等生として通用している。勿論、記憶力も大切だが、それにも増して大切なのは推理力、想像力で、発想の転換をなしうる軟らかい頭脳を持つ事だろう」と述べている。私も創造性を持つための著書をかなり読破したが、降矢名誉教授の考え方、生き方に触発され、そして育ててくれたことは大変大きな力になった。いかに良い師に学ぶかが重要とも言える。また降矢先生は著名な先生に学ぶ期間は 2 年でよい、あまり長く仕えようと兵隊根性になるので、その先生の考え方を理解したら、自分の頭で考えるようにしなさいとも指導して頂いた。

論語の言葉に『**学ばざれば則ち罔く、思わざれば則ち殆う**』とある。学問の知識だけを得ても自分のものにしなければ、知識は暗くて何もならないということである。また、自分一

人で考えて他のことを勉強しなければ、独りよがりになってしまうこと。自分で考えて研究しようと思ったならば、ある程度勉強し、その上にたって独自の研究をすれば良いと言える。つまり、知識では無く知恵を付けること。ただ習うのみで、知識が増えただけでは宝の持ち腐れである。それをどのように生かして創造し、実行するかが重要である。

最後に臨床検査技師教育に関する元九州大学病院検査部の濱崎教授の提言を引用³⁰⁾させて頂く。これは臨床検査技師の生き方や臨床検査技師教育にも共鳴する内容であり、本総説の目的でもある。

「臨床検査技師の基盤は 1)有機化学、2)分析科学、3)生命科学なのである。有機化学、分析学、生命科学、についての基本的な学力と観察力、洞察力、分析力がなければ、多くの不思議な現象を見逃してしまうのである。臨床検査の現場で出会う不思議な現象に気付き分析し、新しい発見に繋げる能力をもった臨床検査技師を育てることが臨床検査技師教育には必須なのである。

医療に携わる集団の共通の基盤学問は“生命科学”であり、決して、“病気の症候学”ではない。臨床検査医学に専任する臨床検査技師が“生命科学”を知らなくては臨床家(医師)と分業はできない。だからといって、医師と同じような方法で医学医療の分野で実力をつければ良いかといえば、その答えは否である。」

まさに臨床検査の大学及び大学院教育に必要な指針と言える哲学である。

ここに記述した試薬の改良・開発での発想法を基礎として、臨床検査技師や教員が更に新しい診断が可能な測定法の開発や日々の検体からの新しい生体情報の発見への挑戦となれば幸いである。その結果として保健学科の教員や卒業生が臨床検査学を構築してくれると期待している。

この総説を書くにあたり、故 降矢名誉教授、東京理科大の中先輩、前畑先輩のご指導、そして千葉大学の検査部のスタッフのご協力、さらに検査試薬や機器企業の開発部門の方々のご援助に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Berson SA, Yalow RS. Isotopic tracers in the study of diabetes. *Advan Bio Med Phy* 1958; 6: 349-430.
- 2) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method in Enzymology* 1987; 155: 335-50.
- 3) 栢森裕三, 片山善章. 検査技術の進歩 3. 化学・免疫学 4) 機械化/自動化技術, 我が国の臨床検査の歴史. 東京: エスアールエル 2000: 48-57.
- 4) Sutherland LR, Verhoef M, Wallace JL, Van Rosendaal G, Crutcher R, Meddings JB. A simple, non-invasive marker of gastric damage: sucrose permeability. *Lancet* 1994; 343: 998-1000.
- 5) 恩田 彰, 野村健二. 創造性の開発. 東京; 講談社 1975.
- 6) 樋口健夫. アイデア発想が湧き出る本. 東京; ダイヤモンド社 1993.
- 7) Alvin Toffler. パワーシフト—21 世紀へと変容する知識と富と暴力. 徳山二郎(訳). 東京; 中央文庫 1993.
- 8) 西澤潤一. 独創開発論. 東京; 工業調査会 1988.
- 9) 森田昌宏. 発明ビジネス. 東京; パルス出版 1992.
- 10) 大澤 進. 生化学検査試薬の改良と開発. *日本臨床検査自動化学会誌* 2004; 29: 575-83.
- 11) Friestad HO, Ott DE, Gunther FA. Automated colorimetric microdetermination of phenols by oxidative coupling with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone. *Anal Chem* 1969; 41: 1750-4.
- 12) Rautela GS, Liedtke RJ. Automated enzymic measurement of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1978; 24: 108-14.
- 13) Tamaoku K, Murao Y, Akiura K. New water-soluble hydrogen donors for enzymatic spectrophotometric determination of hydrogen peroxide. *Anal Chim Acta* 1982; 136: 121-7.
- 14) Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. *Clin Chim Acta* 1970; 31: 421-6.
- 15) Morin LG. Determination of serum urate by direct acid Fe^{3+} reduction or by absorbance change (at 293 nm) on oxidation of urate with alkaline ferricyanide. *Clin Chem* 1974; 20: 51-6.
- 16) 大澤 進, その他. 鉄キレート反応系を応用した尿

- 酸測定法に関する検討. 臨床病理 1974; 22: 203.
- 17) Cambiaso CL, Leek AE, Steenwikel DE, Billen J, Masson PL. Particle counting immunoassay. I. A general method for the determination of antibodies, antigens, and haptens. J Immunol Methods 1977; 18: 33-44.
- 18) 澤部祐司, 大澤 進, 大木晶二, 降矢 震. ラテックス凝集法による CRP 定量法への試み. 衛生検査 1981; 30: 478.
- 19) 大澤 進, その他. 免疫学的定量分析方法. 特許出願平 3-198784
- 20) 大澤 進, 平 由子, 富田 博. LPL・GDH・Diaphorase・2-PDS 反応系を用いた中性脂肪定量法(UV法)の検討. 衛生検査 1979; 28: 438.
- 21) Osawa S, Kariyone K, Ichihara F, Arai K, Takagasa N, Ito H. Development and application of serum cholinesterase activity measurement using benzoylthiocholine iodide. Clin Chim Acta 2005; 351: 65-72.
- 22) Osawa S, et al. Prostatic acid phosphatase assay with self-indicating substrate 2,6-dichloro-4-acetylphenyl phosphate. Clin Chem 1995; 41: 200-3.
- 23) Fujita Y. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum(IV) complex and protein. Bunseki Kagaku 1983; 72: 379-86.
- 24) Yamaguchi T, et al. Spectrophotometric determination of urinary protein with *o*-sulfophenylfluorone-metal complex. Anal Sci 2005; 21: 1237-40.
- 25) Sugiuchi H, et al. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. Clin Chem 1995; 41: 717-23.
- 26) Iida S, Osawa S, Yonemitsu H. A new precipitation method with magnetic separation for high-density-lipoprotein cholesterol assay. Clin Chim Acta 1994; 228: 133-42.
- 27) Seimiya M, Osawa S, Hisae N, et al. A sensitive enzymatic assay for the determination of sucrose in serum and urine. Clin Chim Acta 2004; 343: 195-9.
- 28) Hishido T, Aguchi TY, Okada T, Seimiya M, et al. Significance of a novel sucrose permeability test using serum in the diagnosis of early gastric cancer. World J Gas 2005; 44: 6905-9.
- 29) 堀田正敏, 杉本晋哉, 外園栄作, 大澤 進. 自己採血による即時血漿分離輸送検査システムの構築—採取量の異なる試料への内部標準による希釈率算定法—. 臨床病理 2008; 56: 577-83.
- 30) 濱崎直孝. 臨床検査技師の学部教育ならびに大学院教育—有機化学, 分析科学, 生命科学を柱とした教育体制—. 臨床病理 2004; 52: 435-7.