

大会長講演

臨床検査の現場に還元する研究を目指して

松下 誠*

〔Key Words〕 実践研究、研究環境、教育と研究のつながり

はじめに

臨床検査技師免許を取得後、5年間の大学病院の検査室経験を基に母校の埼玉県立衛生短期大学の教員に着任し、30年以上が経過した。臨床検査技師としての私の経験は検査の実務および教育のすべてで臨床化学であり、他の領域の検査は日当直業務のみであった。以下に私の研究を振り返り、また、私の研究活動に対する考え方・思いをご紹介します。

1. 私の研究活動を振り返る

1. 大学病院時代

5年間臨床化学検査室(昭和大学藤が丘病院)に勤務した。今思い返してみれば、私の研究に対する考え方はここで身についたものと思われる。当時は自動分析法と用手法が混在し、自動分析機が故障した場合は自分で修理、また泊まり込んで用手法で検査したこともあった。当時の前畑英介技師長は、ときには厳しく、ときにはやさしく、研究の面白さを教えていただき、5時までは業務、またそれ以降は研究という日々でした。3年目になると、自分で研究テーマを考えるようになり、初めての原著論文は『酵素法によるエステル型コレステロールの直接定量法』であり、その原理を

図1に示した。この研究成果は日本臨床検査自動化学会誌や *Clinica Chimica Acta* などに掲載されたが¹⁾²⁾、当時、血清中の遊離グリセロールを消去するトリグリセライド測定法が話題であり、これが参考になった。

2. 教員時代のスタート

このような研究実績が評価され、6年目から母校の埼玉県立衛生短期大学衛生技術学科の助手に着任した。当時、私は短大卒であり、私の着任には恩師である入野 勤教授のたいへんなご尽力があったものと推察される。入野教授は、私に研究は自由にやってよい、しかし、①大学を卒業すること、②学位を取得すること、の2点は念を押された。そして、翌年から東京理科大学(Ⅱ部)理学部化学科2年次に編入学した。

3. ニッケル-ピウレット反応の考案

編入した翌年、『無機化学』や『錯体化学』の講義を聴いている際、1つの考えが浮かんだ。蛋白質のピウレット反応は平面四角形状錯体を形成しているが、これは遷移金属の中でもd軌道に電子9個有する銅イオンより、それが8個となるニッケルイオンの方が安定化する、ことであった。ここからはたいへんな苦労があったが、結果としてニッケル-ピウレット反応を組み立てることに成功した。このニッケル-ピウレット反応は従来の

*埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 検査技術科学専攻 matsushita-m@spu.ac.jp

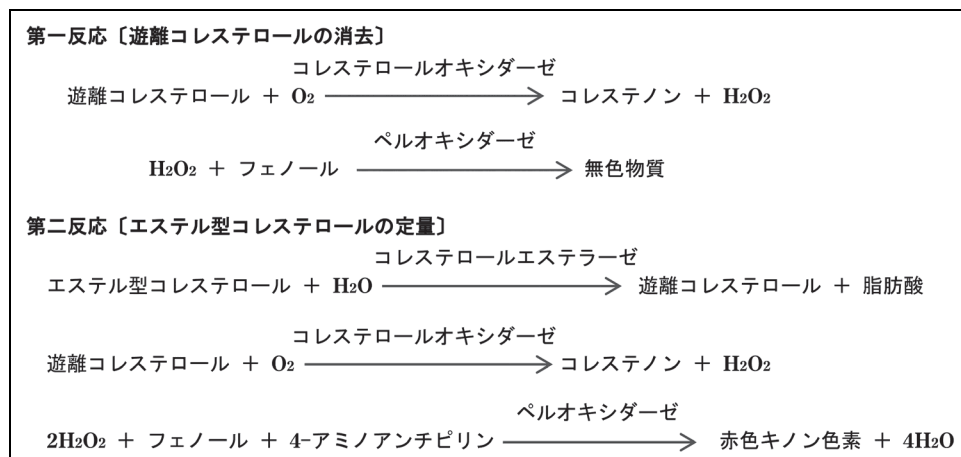


図1 エステル型コレステロールの直接定量法の原理

表1 ニッケル-ビウレット反応の特異性

	相対呈色度*(%)			
	Cu-ビウレット法	Cu-ビウレット法 (ブランク試薬**)	Ni-ビウレット法	Ni-ビウレット法 (ブランク試薬**)
ヒトアルブミン	100.0	0.0	100.0	0.0
グリシルグリシン	53.0	19.0	0.0	0.0
L-セリン	36.0	28.2	0.0	0.0
L-スレオニン	38.2	30.8	0.0	0.0
L-アスパラギン	30.7	25.6	0.0	0.0
L-ヒスチジン	52.2	34.8	0.0	0.0
D-グルコース	6.1	0.0	0.0	0.0
D-ガラクトース	9.0	0.0	0.0	0.0
D-マンノース	14.7	0.0	0.0	0.0
D-グルコサミン	20.3	0.0	0.0	0.0
D-ガラクトサミン	35.8	0.0	0.0	0.0
N-アセチル-D-グルコサミン	3.3	0.0	0.0	0.0

* それぞれのビウレット法におけるヒトアルブミンの呈色度を100%としたときの相対呈色度

**それぞれのビウレット試薬から酸化ナトリウムのみを除いたブランク試薬(弱酸性試薬)

銅-ビウレット反応に比べ、極めて蛋白質に対する特異性が高い特徴を有していたため(表1)、それを血清総蛋白測定法に応用した。それから25年以上が経過したが、この方法の自動化を可能とした研究論文が平成29年度の『日本臨床検査自動化学会論文賞』を受賞することになった。

4. 学位取得を目指して

東京理科大学を卒業し、直ちに埼玉医科大学

化学教室の専攻生となり、学位取得を目指すことになった。当初、ニッケル-ビウレット反応を考案し、その成果を臨床化学や *Clinica Chimica Acta* などに5編程度の論文も書いていたこともあり^{3)~5)}、この研究をさらに進展させることで学位取得が可能と考えていた。しかし、指導教授の菰田二一先生から医学部では分析法の考案では学位取得はできない、と言われ、大きなショックを受けたこと

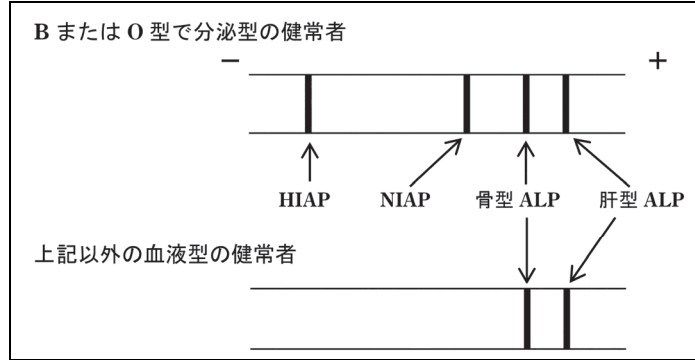


図2 トリトン X-100 を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動法による空腹時血清 ALP アイソザイムパターンと血液型との関係

を覚えている。菰田先生はアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の糖鎖構造の解明で有名であったこともあり、私の研究テーマは小腸型ALPと決まった。しかし、埼玉医科大学までは片道2時間以上かかり、また短大の授業も忙しかったため、年に数回程度(忘年会や特別な行事)訪問するだけで、最初の2年間はほとんど研究が進展しなかった。3年目を迎えたとき、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いるALPアイソザイム分析法を改良している際、トリトン X-100 を含むゲル条件を設定することで、小腸型ALPを2つのアイソフォームに分離することが可能となった。この電気泳動法によるALPアイソザイムパターンを図2に示したが、2種の小腸型ALPアイソフォームとは、高分子小腸型ALP(high molecular mass intestinal ALP; HIAP)とノーマル分子サイズ小腸型ALP(normal molecular mass intestinal ALP; NIAP)である。NIAPは脂肪食摂取後に急激に上昇する性状を有し、またHIAPは脂肪食摂取の影響をほとんど受けない。この両者は共にBまたはO型の分泌型に依存して血中に出現し、それ以外の血液型ではわずかに検出されるのみであった。また、小腸型ALPが上昇する代表的疾患である肝硬変や糖尿病では、主にNIAPが上昇し、HIAPと疾患との関連性は低いものであった。これらの一連の研究成果が、*Clinica Chimica Acta*, *Ann Clin Biochem*, *J Electrophoresis* などに掲載され^{6)~8)}、無事に学位取得の目標を達成した。

5. 臨床検査の現場に還元する研究に方向転換

その後、HIAPおよびNIAPの構造解析および遺伝子の特定などを試みたが、研究が進展しない。ここで、基礎研究から実践研究へと思考を変えることにした。当時ALP活性は日本臨床化学会(JSCC)勧告法で測定されていた。そして、このJSCC法は日本でのみ使用され、国際的に普及しているALP活性測定法の中では、最も小腸型ALPを測り込む方法であった。私たちのこれまでの検討結果からは、BまたはO型の分泌型の健常者の脂肪食摂取後に上昇する小腸型ALPと肝硬変などの疾患で上昇する小腸型ALPを区別することは困難であることが分かっており、JSCC法は大きな問題を抱えている方法であることは明白であった。これをきっかけに、10年以上に亘り、私の卒業研究はマクドナルドのハンバーガーを食べ、その前後のALP活性とALPアイソザイム分析を実施する研究テーマとなった。協力をお願いした学生は延べ300人以上、てりやきバーガーのL.Lセット(脂質65g, 1100kcal)を食べる卒業研究が学科内で話題となった。なお、主な研究成果は下記の通りである^{9)~11)}。

- ①早朝空腹時のALP活性はBまたはO型の分泌型が約20%以上高値となる。
- ②脂肪食摂取後のALP活性は6時間後がピークとなる。
- ③BまたはO型の分泌型では脂肪食摂取6時間後のALP活性は20~50%高値となる。

- ④前夜の夕食に高脂肪食を摂取すると翌朝の空腹時 ALP 活性が高値となる。
- ⑤小腸型 ALP の影響は国際臨床化学連合(IFCC) 勧告法では JSCC 法の 60%程度に軽減される。
- ⑥小腸型 ALP が高値で ALP 活性が異常値(350 U/L 以上)となる健常者を血液型依存性高 ALP 血症と定義付けし、B または O 型の分泌型の人の約 5%がそれに該当する。
- ⑦この当時の ALP アイソザイム分析では骨型 ALP と HIAP が重なることから、B または O 型の分泌型の人の骨型 ALP は高値となる。
- ⑧上記⑦の影響を受けない新たな ALP アイソザイム分析法を考案し、現在の ALP アイソザイム検査法として普及している。

6. JSCC 法から IFCC 法へ

このような血液型が関与する問題と酵素活性測定グローバルハーモナイゼーションから、現在日本臨床化学会では ALP 活性測定法を JSCC 法から IFCC 法へと変更することが進行している。私が小腸型 ALP を測定しない方がよいことを提案してから、実に 15 年以上の年月が経過したが、私たちの研究成果が勧告法の変更につながったことには達成感がある。

II. 教育研究に対する基本的な考え・思い

1. デメリットはメリットと考える

本学の検査技術科学専攻の教員配置には特徴がある。現在 12 名の教員で運営しているが、全員が講師以上であり、助教は配置されていない。そのため、一人一人の教員は独立し、講義や実習は原則一人で担当する。私も教授に昇任して 13 年目となるが、この間臨床化学実習 2 単位(90 時間)、卒業研究 4 単位(180 時間)などの実習科目の準備や指導は一人で実施している。このシステムが好ましいかどうかについては、議論の余地があるが、講義と実習の実質的責任者が同じであることから、両科目間での矛盾がなくなり、学生にとっては理解が深まるものと考えている。また、講義と実習を 1 人で担当することによって新たに見えてくることもある。例えば、現在の私の研究テーマの 1 つとなっている電気泳動法と自動分析法における

A/G 比の逆転現象の解明は、総蛋白、アルブミンを自動分析機で測定し、並行して実施した蛋白分画との結果を比較する実習の際、定説とは異なる矛盾した結果が得られたことがスタートとなっている。

また、本学には医学部や附属病院は設置されていない。当然、継続した研究活動を維持していくには大きなハンディキャップとなる。附属病院がある施設における研究は、当然、症例や患者試料を使用することを前提として計画がなされ、患者試料を使用しない研究を考える研究者は少ない。このような研究環境であれば、最初から患者試料を用いない研究テーマを考える必要があり、大学ならではの健常者の検査データにスポットを当てることにした。このような考えにより、健常者の ALP 活性および ALP アイソザイムと血液型に関する研究がスタートした。

2. 大学研究室に自動分析機は不可欠である

現在の病院の検査室では、さまざまな症例や最新の検査装置が導入されているが、必ずしも研究環境が整っているわけではない。それは、検査室では、①試薬等を購入することは困難である、②自動分析機等を研究に使用することは困難である、③分光光度計やクロマトグラフィ等の基礎的装置がない、などである。一方、大学の研究室は臨床材料や最新の装置を保有していない。このような状況では、大学の研究室が実践的研究を行うのは不可能となる。また大学における実践的研究にもある程度の精度が必要となる。本学臨床化学教室では、30 年前から自動分析機を導入し、学生の教育研究に使用している。ちなみに、1 台目は Impact 400 E(1987 年に大宮赤十字病院から寄贈)、2 台目はコバスマラプラス(1999 年、本学の備品として購入)、3 台目は現在の CA-270 plus(2013 年に更新)である。また、2014 年にはエバライザ 2 Jr(自動電気泳動装置)も配備し、教育研究の幅を広げている。

3. 教育と研究のつながりを創る

大学教員の業務は教育と研究が中心となる。教育ではメイン科目とサブの科目を担当することになるが、私のメイン科目は臨床化学の講義と実習

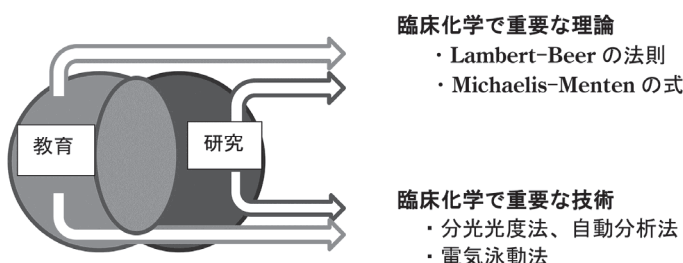


図3 教育と研究のつながりを創る

である。私は常々、教育と研究が分離してはいけないと考え、図3に示すように教育と研究で同じ理論、同じ技術を使用することを基本としてきた。教育と研究で理論や技術が異なることは、教育と研究で頭を完全に切り替える必要があり、またこれらを習得するために、2倍の時間が必要となる。さらに、講義、学内実習および臨地実習で学んだことがその後の卒業研究や大学院特別研究のテーマと大きく異なることになり、学生にとっても分かりにくいものとなる。私は、臨床化学を支えている大切な理論は、Lambert-Beerの法則とMichaelis-Mentenの式と考えている。現在の臨床化学自動分析機は二波長法や2-ポイント法が中心であり、また異常反応を見極めるためには反応タイムコースモニターが読めることは重要であり、そのためにはLambert-Beerの法則を熟知することが必要となる。また、現在の臨床化学のキーワードは酵素であり、これは目的成分が酵素である場合の活性測定理論や酵素が試薬となる酵素法を理解するためには、Michaelis-Mentenの式が応用できるかどうかが大切となる。私は、臨床化学の講義や実習では、これらの式の基礎を学ぶことを中心に授業を進め、また卒業研究や大学院特別研究はこれらの理論をさらに応用することが必要となる研究テーマを設定している。

4. 卒業研究は学会で発表する

以前から、大学や短大における卒業研究テーマが実践から離れた内容で実施されていることに違和感をもっていた。本学が短期大学の時代(2000年ごろ)から、私の卒業研究テーマは『臨床検査の実践的なテーマを設定し学会で発表する』ことを

スローガンにそれを実践してきた(表2)。当初、学生発表コーナーではなく、一般演題の中での発表となり、学生にとっても大変な緊張であった。特に、4月にスタートした卒業研究を抄録締め切りの5月に間に合わせるのは大変であった。なお、現在までに、延べ87人が私の臨床化学教室の卒業研究を履修し、36名が学会発表(日本臨床検査学教育学会学術大会13名、日本臨床検査自動化学会8名、関東甲信地区医学検査学会7名、埼玉県医学検査学会7名、国際学会1名)を実施している。ちなみに、その内7名は優秀発表賞等を受賞、また別の4名は学会誌に論文投稿している。

5. 大学院では実践的研究をする

現在、臨床検査技師養成の大学は55校を超え、さらに大学院を設置しているところも多い。私が学位を取得した20年前では、臨床検査技師が学位を取るためには、領域の異なる大学院へ進学、あるいは大学の研究室の研究員になることであり、私は後者で乙の学位である。その当時から違和感をもっていたことは、研究テーマが直接検査に関わらないものが多く、また研究成果が検査の実践に活用されていないことであった。現在では臨床検査技師養成の大学に大学院が併設されているため、進学する選択の幅は広がっている。しかし、大学院での研究テーマは基礎研究的なテーマが多く、臨床検査の実践に関わるテーマで学位取得となる研究室は少ない。これは、大学院では基礎研究をテーマにしている指導教員が多いことに起因しているものと思われる。また、臨床検査の実践にも解明・解決しなければならないさまざまな課題がある。これらの研究を行っていくためには、

表2 臨床化学教室の卒業研究履修者数と研究テーマ

	履修者数	卒業研究テーマ
埼玉県立衛生短期大学 (1993～1998年)	15人	臨床検査の実践に関わるテーマ 【ALP検査の実践】 ・ALPと血液型との関係の解明 ・ALP活性測定 of 血液型に関わる問題点 ・新たなALP活性測定法の考案 ・ALPアイソザイム検査法の考案
埼玉県立大学短期大学部 (1999～2008年)	30人	【蛋白質、脂質検査の実践】 ・ビウレット法における総蛋白測定の問題点 ・新たなビウレット法の考案
埼玉県立大学 (2009～2017年)	42人	・アルブミン測定の問題点 ・蛋白分画測定の問題点 ・新たなリポ蛋白分画検査法の考案

大学や大学院の協力は不可欠であると考え。これからの教員は、基礎研究、検査理論、および検査の実践を基に、研究テーマを構築していくことが必要であり、これらの研究領域の架け橋的役割を果たすことが大切と考える。少なくとも私は、これらを踏まえ検査の実践を研究テーマとした学位取得者を輩出することを目指していきたいと考えている。

おわりに

私が臨床検査技師の資格を取得して実に37年もの年月が経過したが、今振り返ってみれば、私の教育研究活動の原点は、病院検査室に勤務しているときに築かれたものと考えている。検査の実践を学んだ最初の5年間、毎日のように夜遅くまで、検査の実践的疑問点を自分なりに追及していた。当時、臨床検査技師が学ぶ大学院などはなかったが、研究活動が活発であった検査室がある意味では大学院教育の役割を担っていたものと考えられる。現在では、臨床検査技師の大学・大学院教育が当たり前の時代となったが、これからは、病院の検査室と教育機関が連携して、実践的な臨床検査学の教育研究を構築していくことが大切と考える。

文 献

- 1) 松下 誠, 前畑英介, 青木良雄. 酵素法によるエステル型コレステロールの直接定量法. 日本臨床検査自動化学会誌 1984; 9: 695-9.
- 2) Matsushita M, Irino T, Maehata E. Enzymatic determination of serum total and esterified cholesterol with the same reagents. Clin Chim Acta 1990; 191: 97-100.
- 3) 松下 誠, 村本良三, 櫛下町 醇, 入野 勤. ニッケル-ビウレット反応を用いる血清総蛋白質の定量. 臨床化学 1990; 19: 300-6.
- 4) Matsushita M, Irino T. Stable nickel/biuret reagent for determination of total proteins in serum. Clin Chem News 1992; 18: 16.
- 5) Matsushita M, Irino T, Komoda T, Sakagishi Y. Determination of proteins by a reverse biuret method combined with the copper-bathocup-roine chelate reaction. Clin Chim Acta 1993; 216: 103-11.
- 6) Matsushita M, Irino T, Minowa M, Komoda T, Stigbrand T. Properties of high-molecular weight placental alkaline phosphatases in normal pregnancy sera. Ann Clin Biochem 1998 ; 35 : 515-21.
- 7) Matsushita M, Irino T, Stigbrand T, Nakajima T, Komoda T. Changes in intestinal alkaline phosphatase isoforms in healthy subjects bearing the blood group secretor and non-secretor. Clin Chim Acta 1998; 277: 13-24.
- 8) Matsushita M, Irino T, Oh-ie K, Komoda T. Specific gel electrophoresis method detects two isoforms of human intestinal alkaline phosphatase. Electrophoresis 2000; 21: 281-4.
- 9) Matsushita M, Irino T, Kawaguchi T, Komoda T. The

- effect of different buffers and amounts of intestinal alkaline phosphatase isoforms on total alkaline phosphatase activity. *Clin Chim Acta* 2002; 319: 49-55.
- 10) Matsushita M, Irino T, Kamiyama K, Muramoto Y, Komoda T. Evaluation of a method for measuring tissue non-specific alkaline phosphatase activity in healthy subjects. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 544-8.
- 11) 松下 誠, 原尻早苗, 田端詩織, 行正信康, 村本良三, 菰田二一. B または O 型で分泌型の人アルカリ性ホスファターゼ活性は前夜の脂肪食摂取量によって変動する. *臨床病理* 2013; 61: 307-12.