

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05066

研究課題名(和文) スキンブロッティング法による局所/全身状態の包括的評価法の開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive evaluation of local and systemic condition by skin blotting

研究代表者

峰松 健夫 (Minematsu, Takeo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：00398752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚表面より非侵襲的に組織内の可溶性タンパク質を抽出するスキンブロッティング法を皮膚の局所状態および全身状態のアセスメント法として確立するために、動物実験および臨床調査を実施した。その結果、スキンブロッティングにおけるアルブミンの抽出量は皮膚バリア機能の状態を表し、アセスメント法として応用するためにはタンパク質抽出効率を補正する内部標準マーカが必要であること、アルブミンおよびアネキシンA2がその候補マーカであることが示された。また、局所の状態である皮膚掻痒症、ならびに全身状態である脱水症を、それぞれNGF やタウリンなどをマーカとして評価できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To establish the comprehensive assessment of skin local condition and systemic condition by skin blotting method which noninvasively extracts soluble proteins from skin tissue, we conducted the animal experiments and clinical studies. These results indicated that albumin extraction depends on the skin barrier function, and internal standard markers to normalize the extraction efficiency in skin blotting. Albumin and Annexin A2 are the promising internal standard markers. Furthermore, it is reported that skin blotting detecting NGFb and taurine reflects to itching and dehydration in older people.

研究分野：スキンケアサイエンス

キーワード：スキンアセスメント スキンケア スキンブロッティング

1. 研究開始当初の背景

かつてない少子高齢化の進展により、看護は大きな転換期を迎えていると言えよう。平成 26 年 6 月に「地域における医療及び介護の総合的な確保を推進するための関係法律の整備等に関する法律案」が成立し、高度教育を受けた看護師に『特定行為』の実施が認められたのは、その最たる例である。すなわち、看護師はより自立し、責任を負って医療に関与することが求められているのである。従来の看護は、個々の患者を全人的存在として尊重するために、疾病のみならず社会的背景、心理状態、療養環境までを含めた包括的アプローチを重視してきた。これは看護の根幹として決して失ってはならないアイデンティティである。一方で、患者の生物学的側面に対して看護独自のアプローチは少なく、多くの看護ケアに生物学的エビデンスが伴っていないのも事実である。つまり、真に包括的アプローチを確立するためには、生物学的アプローチの確立・発展が不可欠である。生物学的アプローチは、患者が表出する現象の本質やメカニズムを明らかにし、更には介入すべきターゲットを同定することに繋がる。

生物学的看護研究の必要性は世界的にも認識されている。例えば、国際的学術雑誌である“Biological Research for Nursing”誌は 1999 年に創刊され、いまや看護学分野の主要学術雑誌の 1 つとして認識されている。更に申請者らが科研費基盤研究(A)「看護学領域におけるバイオエンジニアリング・ナーシングの構想と展開」(課題番号: 23249088、代表者: 真田弘美)にて「看護理工学入門セミナー」を開催したところ、延べ 200 名余りの看護師・看護学研究者の参加があった。このことは正に生物学的アプローチの需要の高さを物語っている。

『スキンプロットティング法』とは、申請者が開発した革新的な皮膚評価技術である。プロットティングとは、プラスにチャージしたニトロセルロース・メンブレンに、マイナスにチャージした分子(蛋白質など)を吸着・固定する技術である。このメンブレンを湿潤下で皮膚表面に 10 分間貼付すると、皮膚組織間液中の可溶性分子を吸着し、同定・定量することができる(図 1)。本技術は、非侵襲的かつ簡便にベッドサイドで実施できるため、患者を対象とした生物学的アプローチの実施に極めて有効なツールである。スキンプロットティングの応用により、バイオプシーなどの侵襲的な試料採取法を用いずに生物学的研究を実施することができ、また生物学的エビデンスに基づいた看護ケアの提供に繋がる。これまで申請者らは、本技術を潜在的皮膚炎症の同定や、加齢変化に伴う皮膚脆弱性(スキントアの発生)の予測などに応用できることを示してきた。

皮膚は元来 500 Da 以上の分子を透過しないようにバリア機能を有している。スキンプ

ロットティングではニトロセルロース・メンブレンの静電的性質により、バリア機能を構成する角質細胞間脂質、顆粒層タイトジャンクションの構造を変化させ、タンパク質等の経皮的検出を可能にしているものと考えられる。

2. 研究の目的

本手法は、組織間液中の分子を検出・定量する技術である。組織間液は主に血液に由来し、局所の細胞から放出された分子が含まれる。つまり、スキンプロットティング法は皮膚の局所状態だけではなく、全身状態をも評価できる可能性を有している。局所/全身それぞれの状態を理解することは、生物学的側面の包括的理解に繋がる。そこで本研究では、スキンプロットティング法を局所および全身の生物学的状態を包括的に評価する看護技術として確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) スキンプロットティングにおけるタンパク質抽出効率と皮膚バリア機能の関連

正常マウスを用いたド物実験および一般成人を対象とした横断的観察研究を実施した。動物実験では、剃毛したマウス背部皮膚においてテープストリッピングを繰り返し、皮膚バリア機能の指標である計表皮水分蒸散量(TEWL)と、組織間液の主成分で濃度が比較的安定したアルブミンをターゲットとしたスキンプロットティングによる検出強度の相関を解析した。また、一般成人では前腕内側および外側において TEWL の測定およびスキンプロットティングによるアルブミンの検出を行い、それぞれの相関を解析した。

(2) スキンプロットティングによる掻痒症の評価

インドネシアのナーシングホームに入居する高齢者の前腕外側を対象にスキンプロットティング(NGF、IL2、TSLP、アルブミン)角質水分量および皮膚 pH の測定を実施した。また、同部位における掻痒症の有無を調査し、掻痒症の有無と関連する皮膚要因を明らかにした。さらにそれら皮膚要因に関連するスキントア要因を探索した。

(3) スキンプロットティングにおける新規内部標準マーカーの探索

スキンプロットティングを包括的アセスメント法として確立するためには内部標準マーカーが必要であるが、その候補であるアルブミンは高齢者では適切ではないことが明らかとなった。そこで、新たな内部標準マーカーの探索を目的にラットを用いた動物実験を実施した。

4 種類のラット(若齢、加齢、紫外線照射、ドライスキン)の背部皮膚を採取し、mRNA 発現解析を行った。既報のハウスキーピング遺伝子リストより、スキンプロットティングで検出可能な分泌蛋白質をコードする 11 遺伝子を選択しリアルタイム RT-PCR、免疫組織化学

に供した。更に同部位においてスキンプロットティングを実施し、選択された内部ひゅじゅんマーカーの検出を試みた。

(4) スキンプロットティングによる脱水症の同定

スキンプロットティング法を改良し、ニトロセルロースメンブレンと陰イオン交換膜を組み合わせることで、皮膚組織内の有機浸透圧調整物質であるタウリンを検出、定量できるシステムを確立した。

ラット背部皮膚においてスキンプロットティング法によるタウリンの検出を行い、更に同部位の組織間液中タウリン濃度を HPLC にて測定した。

また、在宅療養高齢者を対象に採血ならびにスキンプロットティングを実施し、血漿浸透圧とタウリンの検出濃度の相関を解析した。

4. 研究成果

(1) スキンプロットティングにおけるタンパク質抽出効率と皮膚バリア機能の関連

テープストリッピングを繰り返した正常マウスの背部皮膚および一般成人の前腕内外側いずれにおいても、スキンプロットティングによるアルブミンの検出強度は TEWL と有意に相関した。

この結果は、スキンプロットティングにおけるタンパク質の抽出効率は皮膚バリア機能の状態に影響されることを示しており、同法における皮膚の状態の定量的評価にはバリア機能による抽出効率の差異を補正する内部標準マーカーが必要であること、アルブミンは内部標準マーカー候補の一つであることを示している。また同時に、アルブミンを標的にしたスキンプロットティングは、新たな皮膚バリア機能の評価法として応用可能であることが示された。

(2) スキンプロットティングによる掻痒症の評価

高齢者の前腕の掻痒症の保有に関連する皮膚要因は角質水分量、皮膚 pH、スキンプロットティングによるアルブミンおよび NGF ベータの検出であった。アルブミンの検出協同に関連していたのは年齢のみ、NGF ベータの検出強度に関連していたのはそれまでの日光暴露量、入浴時間であった。角質水分量ならびに皮膚 pH に関連していたのは衣服の交換頻度および衣服のタイプであった。

掻痒症と関連するスキンケア要因が異なる結果は、掻痒症のタイプによって求められるケア内容が異なることを意味しており、掻痒症のケアにおいてスキンプロットティングをはじめとする皮膚アセスメントが重要であることを示している。また、アルブミンの検出強度には年齢のみが関連していたことから、アルブミンは高齢者におけるスキンプロットティングの内部標準としては適切ではないことも明らかとなった。

(3) スキンプロットティングにおける新規内部標準マーカーの探索

リアルタイム RT-PCR により、すべての動物における Ct 値が 30 未満であり、4 群間に有意差が認められず、RT-PCR における従来の内部標準である 18S rRNA と相関する因子を探索したところ Annexin A2 のみに絞り込まれた。免疫組織化学により Annexin A2 は表皮基底層および有棘層に分布していること、スキンプロットティングにより検出可能であることが示され、Annexin A2 がスキンプロットティングにおける内部標準候補であることが示された。

(4) スキンプロットティングによる脱水症の同定

ラット皮膚組織間液タウリン濃度とスキンプロットティングによるタウリンの検出強度は非常に高い相関を示した。また、在宅高齢者の血漿浸透圧とタウリンの検出強度も有意な相関を示し、感度 77.3%、特異度 81.8% で脱水症を同定できるカットオフ値を見出した。

この結果は、スキンプロットティング法が全身状態の評価にも有効であることを示した初めての成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Koyano Y, Nakagami G, Minematsu T, Sanada H. Reliability of the skin blotting method when used on the elderly. International Wound Journal. In press. 査読有
- 2) Minematsu T, Nakagami G, Mugita Y, Tamai N, Sanada H. Development of a distribution analysis method for metalloproteinase activity by combining wound blotting and zymography techniques: A pilot study in mice. Journal of Nursing Science and Engineering. 5: 58-64, 2018. 査読有
- 3) Tamai N, Minematsu T, Tsunokuni S, Aso K, Higashimura S, Nakagami G, Sanada H. Detection of albumin using skin blotting as a measure of skin barrier function. Journal of Nursing Science and Engineering. 4: 116-120. 2017. 査読有
- 4) Nakagami G, Schultz G, Gibson DJ, Phillips P, Kitamura A, Minematsu T, Miyagaki T, Hayashi A, Sasaki S, Sugama J, Sanada H. Biofilm detection by wound blotting can predict slough development in pressure ulcers: a retrospective observational study. Wound Repair Regen. 25: 131-138, 2017. 査読有
- 5) Kitamura A, Nakagami G, Minematsu T,

- Miyagaki T, Sasaki S, Sanada H. Prediction of epithelialization using the wound blotting method based on the distribution of transforming growth factor : a pilot study. Journal of Japanese Society Wound, Ostomy, and Continence Management. 20: 341-348, 2016. 査読有
- 6) Ogai K, Matsumoto M, Aoki M, Minematsu T, Kitamura K, Kobayashi M, Sanada H, Sugama J. Increased level of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) on the skin of Japanese obese males: measured by quantitative skin blotting. International Journal of Cosmetic Science. 38: 462-469. 2016. 査読有
- 7) Koyano Y, Nakagami G, Iizaka S, Minematsu T, Noguchi H, Tamai N, Yamamoto Y, Kitamura A, Tabata K, Abe M, Murayama R, Sugama J, Sanada H. Exploring the prevalence of skin tears and skin properties related to skin tears in elderly patients at a long-term medical facility in Japan. International Wound Journal. 13: 189-197. 2016. 査読有
- 8) Ogai K, Matsumoto M, Minematsu T, Kitamura K, Kobayashi M, Sugama J, Sanada H. Development of an improved method for quantitative analysis of skin blotting: Increasing reliability and applicability for skin assessment. International Journal of Cosmetic Science. 37: 425-432. 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) Sari DW, Minematsu T, Yoshida M, Sanada H. Dermatological study on risk factors for pruritic skin: skin properties of elderly population. 20th International Conference on Nursing and Clinical Practices (ICNCP2018), Tokyo (Japan), 2018/3/28-29.
- 2) Sari DW, Minematsu T, M Yoshida, H Sanada. Skin blotting as a measure of albumin and nerve growth factor can predict presence pruritus among elderly population. 21st East Asian Forum of Nursing Scholars (EAFONS) & 11th International Nursing Conferences (INC), Seoul (Korea), 2018/1/11-12.
- 3) Sari DW, Minematsu T, Yoshida M, Abe M, Sanada H. Properties of pruritus among elderly residents of Panti Werdha, public nursing homes in Indonesia. 9th World Congress on Itch. Wroclaw (Poland), 2017/10/15-17.
- 4) 峰松健夫, 津関早苗, 工藤遥, 玉井奈緒,

- 真田弘美. プロットティング膜貼付による MDCK 単層培養の蛍光標識デキストラン透過性の変化: スキンプロットティング法の原理解明を目指して. 第 5 回看護理工学会学術集会・第 11 回看護実践学会学術集会・国際リンパ浮腫フレームワークジャパン研究協議会第 7 回学術集会 合同学術集会, 金沢大学宝町・鶴間キャンパス(石川県金沢市), 2017/10/12-15.
- 5) 東村志保, 峰松健夫, 玉井奈緒, 真田弘美. 陰イオン交換膜を用いた Skin Blotting 法による皮膚の有機浸透圧調整物質の抽出. 第 5 回看護理工学会学術集会・第 11 回看護実践学会学術集会・国際リンパ浮腫フレームワークジャパン研究協議会第 7 回学術集会 合同学術集会, 金沢大学宝町・鶴間キャンパス(石川県金沢市), 2017/10/12-15.
- 6) 禰屋光男, 山崎浩司, 峰松健夫. スキンプロットティング法によるレジスタントトレーニング後のクレアチンキナーゼの動態の検討. 第 72 回日本体力医学会大会. 松山大学(愛媛県松山市), 2017/9/16-18.
- 7) 北村言, 峰松健夫, 仲上豪二郎, 真田弘美. ラット背部全層欠損創におけるアルカリフォスファターゼ活性. 第 19 回日本褥瘡学会学術集会, 盛岡市民文化ホール/マリオス他(岩手県盛岡市), 2017/9/14-15.
- 8) Nakagami G, Kitamura A, Astrada A, Noyori S, Nakai A, Minematsu T, Miyagaki T, Sasaki S, Hayashi C, Sanada H. A new approach for performing biofilm detection-based wound care: A preliminary observational study. 第 26 回日本創傷・オストミー・失禁管理学会. 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2017/6/2-3.
- 9) Kitamura A, Minematsu T, Nakagami G, Saegusa M, Sasaki S, Sanada H. Peroxidase activity signals of wound exudate could be a marker of invisible inflammation in pressure ulcers. 第 26 回日本創傷・オストミー・失禁管理学会. 幕張メッセ(千葉県千葉市), 2017/6/2-3.
- 10) 竹原君江, 峰松健夫, 大江真琴, 野口博史, 常深祐一郎, 駒形和典, 國江慶子, 武村雪絵, 真田弘美. 糖尿病足潰瘍予防に向けてのケラチナーゼの可視化による足白癬スクリーニングツールの開発. 第 46 回日本創傷治癒学会. 東京大学(東京都文京区), 2016/12/9-10.
- 11) 大貝和裕, 青木未来, 小林正和, 峰松健夫, 真田弘美, 須釜淳子. Skin Blotting 法にタンパク質のサイズ分離を導入する試み. 第 46 回日本創傷治癒学会. 東京大学(東京都文京区), 2016/12/9-10.
- 12) 木村奈緒, 仲上豪二郎, 峰松健夫, 真田

- 弘美. 褥瘡発生予測のための分子マーカーに基づいた局所組織反応の検出による直接的皮膚アセスメント方法の開発. 第46回日本創傷治癒学会. 東京大学(東京都文京区), 2016/12/9-10.
- 13) 峰松健夫, 津國早苗, 麻生くみ, 東村志保, 玉井奈緒, 仲上豪二朗, 真田弘美. スキンプロットティング法によるマウス背部皮膚における皮膚バリア機能の評価. 第4回看護理工学会. 岩手県立大学滝沢キャンパス(岩手県滝沢市), 2016/10/9-10
- 14) Minematsu T, Nakagami G, Kitamura A, Goto T, Sanada H. Evaluation of skin barrier function by skin blotting. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS) 2016, Florence (Italy), 2016/9/25-29.
- 15) Nakagami G, Schultz GS, Gibson DJ, Phillips P, Kitamura A, Minematsu T, Sanada H. Biofilm detection by wound blotting can predict slough development in pressure ulcers: A retrospective observational study. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS) 2016, Florence (Italy), 2016/9/25-29
- 16) Kitamura A, Minematsu T, Nakagami G, Ikeda S, Sanada H. Peroxidase activity during wound healing. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS) 2016, Florence (Italy), 2016/9/25-29
- 17) 金澤寿樹, 峰松健夫, 仲上豪二朗, 真田弘美. 圧力起因性創傷治癒遅延を同定するためのアセスメント技術の開発. 第18回日本褥瘡学会. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016/9/2-3.
- 18) Kitamura A, Minematsu T, Nakagami G, Ikeda S, Sanada H. Alkaline phosphatase activity during wound healing: A time course analysis using wound blotting. European Wound Management Association (EWMA) 2016, Bremen (Germany), 2016/5/11-13.
- 19) 仲上豪二朗, 北村言, 大江真琴, Defa A, Haryanto Y, Suriadi, 大貝和裕, 須釜淳子, 峰松健夫, 真田弘美. 糖尿病性足潰瘍におけるバイオフィーム除去と治癒との関連 - Wound Blotting 法による検証. 第45回日本創傷治癒学会. JPタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区), 2015/11/30-12/1.
- 20) 北村言, 峰松健夫, 池田真一, 仲上豪二朗, 真田弘美. 創傷治癒過程におけるペルオキシダーゼ活性の経時的変化. 第45回日本創傷治癒学会. JPタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区), 2015/11/30-12/1.
- 21) 峰松健夫, 高木孝士, 真田弘美. 角質細胞間脂質の透過型電子顕微鏡観察を目的とした皮膚組織の新たな固定法: 乾湿固定法. 第61回日本病理学会秋期特別総会. 東京大学安田講堂(東京都文京区), 2015/11/5-6.
- 22) 峰松健夫, 仲上豪二朗, 真田弘美. ニトロセルロースメンブレンの極性による表皮タイトジャンクションの変化と回復: スキンプロットティングの原理. 第3回看護理工学会学術集会. 立命館大学朱雀キャンパス(京都府京都市), 2015/10/10-11.
- 23) 竹原君江, 峰松健夫, 真田弘美, 武村雪絵. ケラチナーゼの活性に着目した足白癬スクリーニングツールの開発. 第3回看護理工学会学術集会. 立命館大学朱雀キャンパス(京都府京都市), 2015/10/10-11.
- 24) 樋口幸, 峰松健夫. 早期新生児期における額部の皮膚バリア機能と炎症性サイトカイン発現との関連. 第3回看護理工学会学術集会. 立命館大学朱雀キャンパス(京都府京都市), 2015/10/10-11
- 25) 禰屋光男, 峰松健夫, 松林武生, 中村真理子, 池田真一, 後藤大地, 土肥美智子. スキンプロットティング法を利用した高強度運動時の局所的筋動態の評価. 第70回日本体力医学会. 和歌山県民文化会館/ホテルアバローム紀の国(和歌山県和歌山市), 2015/9/18-20.
- 26) 仲上豪二朗, Schultz G, Gibson DJ, 北村言, 木村奈緒, 峰松健夫, Kumar N, 宮垣朝光, 林明辰, 佐々木早苗, 真田弘美. 創面プロットティング法を用いたバイオフィーム検出によるスラフ形成の予測. 第17回日本褥瘡学会学術集会. 仙台国際センター(宮城県仙台市), 2015/8/28-29.
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計5件)
- 1) 名称: 疾患の診断を補助するための方法及びキット
発明者: 峰松健夫, 真田弘美, 玉井奈緒, 平田善彦, 竜瑞之, 米田友則
権利者: 東京大学、サラヤ株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2018-80666
出願年月日: 平成 30 年 4 月 19 日
国内外の別: 国内
- 2) 名称: 浸透圧調整物質定着用アニオン性イオン交換膜および浸透圧調整物質検出キット
発明者: 峰松健夫, 磯村武範, 真田弘美
権利者: 東京大学、株式会社トクヤマ
種類: 特許
番号: 特願 2017-196598
出願年月日: 平成 29 年 10 月 10 日

国内外の別： 国内

3) 名称：対象の皮膚バリア機能を評価するための方法及びキット

発明者：真田弘美，峰松健夫，仲上豪二郎

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特開 2018-048984

出願年月日：平成平成 28 年 9 月 23 日

国内外の別： 国内

4) 名称：A marker for predicting pressure ulcer development and a use thereof.

発明者：真田弘美，峰松健夫，仲上豪二郎

権利者：東京大学

種類：特許

番号：US62/278,454

出願年月日：2016 年 1 月 14 日

国内外の別： 米国

5) 名称：白癬菌を検出するための方法及びキット

発明者：竹原君江、真田弘美，峰松健夫

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2015-201258

出願年月日：平成 27 年 10 月 9 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://skincare.science.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峰松 健夫 (MINEMATSU, Takeo)

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：00398752

(2) 研究分担者

真田 弘美 (SANADA, Hiromi)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50143920

仲上豪二郎 (NAKAGAMI, Gojiro)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70547827

玉井奈緒 (TAMAI, Nao)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：80636788

吉田美香子 (YOSHIDA, Mikako)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：40382957

山田実 (YAMADA, Minoru)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：30525572

禰屋光男 (NEYA, Mituo)

びわこ成蹊スポーツ大学・スポーツ学部・准教授

研究者番号：30359640

野口博史 (NOGUCHI, Hiroshi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：50431797

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし