

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500434

研究課題名（和文） 皮膚系機能解析のための簡易的バイオマーカー計測法の開発

研究課題名（英文） Development of rapid biomarker measurement system for functional analysis of human skin.

研究代表者

吉田 敏（YOSHIDA SATOSHI）

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：50158440

研究成果の概要（和文）：ヒト皮膚表面には脂肪酸や糖化物質などの生理的状態のマーカーとなる分子が現れるので、それらを非侵襲的かつ非破壊的に簡便に計測する（皮膚機能解析）方法を開発することを目標として研究を行った。その結果、主要な成果として3つ得られた： 1）乳酸マグネシウムは定常的に皮膚表面に出てそれは効果的に皮下のヒスタミン合成を低下させた、 2）摂取した DHA 脂肪酸が口唇表面に現れる様子には男女差があった、 3）糖尿病のマーカーである HbA1c 値を FTIR 測定法で予測することができるようになった。

研究成果の概要（英文）： I have investigated to develop a non-invasive/non-destructive and instantaneous measurement system of human skin (Skin Function Analysis) as a measurable site of physiological marker materials including fatty acids, glycated end-products and many biomolecules appeared on the skin surface. As a consequence, I have obtained mainly three important results: (1) By loading certain amount of magnesium lactate (Mg-lac) on arm skin surface, the amount of skin surface histamine synthesized was significantly decreased. Mg-lac which appears continuously on the skin surface seems to function to control the histamine synthesis in the skin. (2) Dietary fatty acid, DHA (docosahexaenoic acid), could be observed by FTIR to appear on the lip surface after 1~2 hours later. The appearance profile of DHA on the lip surface was different between males and females, and the significant appearance was observed more clearly for males than females. (3) The prediction of HbA1c values for diabetes patients became possible by measuring with FTIR directly the glycated end-products (such as carboxymethylated (CM) arginine and phosphatidyl-ethanolamine (PE)) on the human lip vermilion surface, using PLS regression method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：検査診断システム、バイオマーカー、赤外分析、口唇、糖尿病、多変量解析

1. 研究開始当初の背景

皮膚は体内の様々な代謝的变化の影響を受けやすい部位であるが、その皮膚の生体分子の変化を非侵襲的に効果的に計測するシステムはあまり無かった。それに対して我々は FTIR 法によって直接非侵襲的に皮膚角質層の生体分子を測定するシステムを開発した。これによって顔面皮膚や口唇表面の生体分子の変動を簡便にモニターできるようになった。

2. 研究の目的

皮膚表面に現れる脂肪酸やヒスタミンや乳酸や最終糖化産物(AGEs)など生理的状態のマーカーとなる分子を非侵襲的かつ簡便に測定できる方法を開発し、病態診断あるいは体調管理に応用することである。特に新しい糖尿病診断(スクリーニング)のために HbA1c 値の予想を口唇測定により非侵襲的に行うことを大きな一つの目標とした。

3. 研究の方法

対象によって測定方法は異なるが、まず 1) 皮膚ヒスタミン量の測定、2) 皮膚表面に出てくる摂取脂肪酸の測定、3) 口唇表面の AGEs の測定と HbA1c 値の予想、の 3 つの研究の方法について以下に述べる。

1) 皮膚のヒスタミン量はごく微量なので、テープストリッピングで採取した皮膚角質層から抽出したヒスタミンは、赤外分析では計測できず、ヒスタミンをエキシマ蛍光剤(PSE プレン誘導体)でラベルして HPLC-蛍光分析法によって検出するやり方をとった。この方法だと理想的にはフェムトモル程度のヒスタミンの検出が可能と考えられている。

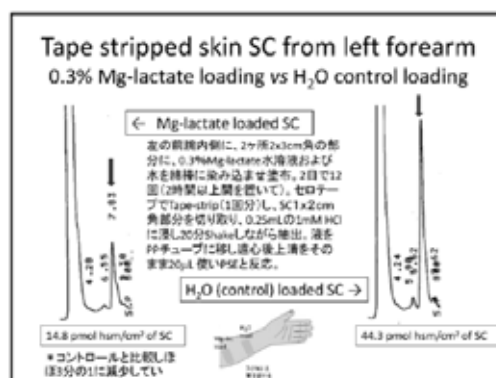
2) 我々が開発した口唇などの皮膚測定用の FTIR-ATR 法のアダプタを用いて、皮膚表面の赤外スペクトルを測定し、DHA などの高度不飽和脂肪酸が示す 3010cm⁻¹ 付近のシス型二重結合の赤外吸収を中心に解析すると、口唇表面に出てきた DHA を検出できるので、ボランティアの男女計 7 名を対象に DHA 入りヨーグルトを摂取後の口唇のその赤外吸収の強度から計算した DRI 値(DHA-相対強度: *cis-alkene* / *methyl* 比に相当)の時間経過を計測した。

3) 大学病院の外来で、担当医師の協力を得ながら、測定装置を持ち込んで糖尿病の患者を含む被験者 28 名の口唇の赤外ス

ペクトルを測定した。特に最終糖化産物であるカルボキシメチル(CM)化アミノ酸や CM-リン脂質は 1300~1400cm⁻¹ 付近に比較的強い赤外吸収を持っているのでその辺りの波数領域を含んで PLS 解析を行なって HbA1c 値の予想をおこなった。

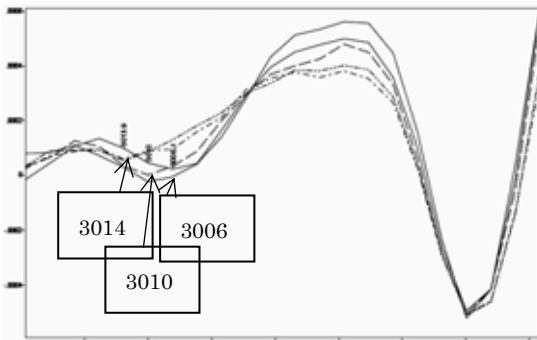
4. 研究成果 皮膚の様々な生体分子は、体内の状態を反映して量的質的なパターンを変動させる。特に 1) 皮膚ヒスタミン量は、ヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の量や活性状態を反映しているので、通常のヒスタミン量を測ることでアレルギー症状の出やすさの目安に使える可能性を考え、2) 摂取 DHA が口唇表面に出現する時間経過を測定すると、摂取後の脂肪酸の腸吸収 血流に乗り輸送 末梢組織細胞(口唇等)に取り込み、という代謝スピードと個人差について計測できる可能性を考え、3) 口唇表面の最終糖化産物を含めた生体分子の変動を計測することによって血中の HbA1c 値との相関を測定し HbA1c 値を予測し糖尿病の 6.5%以上 HbA1c 値というスクリーニングがどれほどの確率で可能かどうか、について評価をおこなった成果を述べる。

1) PSE エキシマ蛍光法によるヒスタミンの検出は極めて感度が高いが、ガラスバイアル瓶に依存してバラつきが大きいことが判明したので、良好なバイアル瓶を 10 本程度選択し実験を行った。その結果、10fmol 程度の検出限界をもってヒスタミンの検出が可能となった。そして、前腕内側の皮膚角質層(テープストリッピング 1 枚分の 2cm 角四方の面積から; 61 歳男性)の中に含まれるヒスタミン量(ほぼ 40pmol)を感度良く検出した。この値は、皮膚の場所そし



て日にち時間が異なるとかなり変動することも判明した。皮膚に乳酸マグネシウム (Mg-lactate) 液 (0.3%、2日間で12回) を塗布したあとから抽出したヒスタミン量と、同時にその近傍の皮膚に水だけを塗布した部分 (コントロール) でのヒスタミン量とを比較したところ、Mg-lactate を塗布した所のほうがおおよそ30~50%程度に減っていた。(上図) これは Mg-lactate に HDC 活性を抑制する作用があることを確認したものである。また、テープstripping法により角質層1~2枚程度の採取によりその中の HDC 活性の測定を試みたがこれはうまく測定できなかった。(未発表)

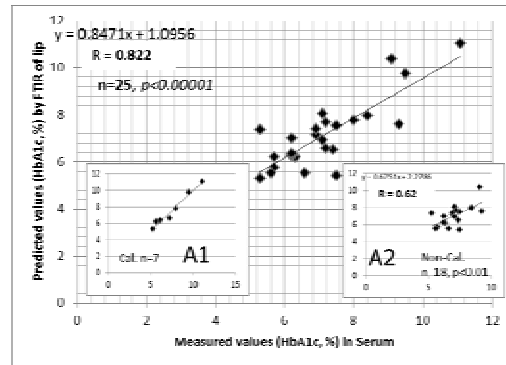
- 2) 男性の被験者4名に関しては、DHA含有ヨーグルトの摂取後30分、1時間、2時間と時間依存的に DRI 値の増加傾向が見られ((下図) DHA が口唇表面に増加している傾向を示す) 3時間後には有



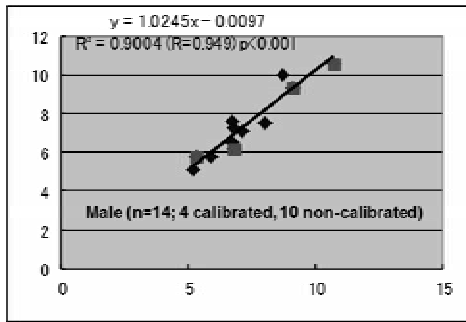
意に ($p=0.019$) 増加していた。このような増加は DHA を含まないプレーンヨーグルトでは起こらなかった。ところが女性の被験者3名に関しては、DHA 摂取後 DRI 値の増加傾向は見られるものの3時間経っても有意な増加とはならなかった。この原因として考えられることは、女性被験者の場合男性よりも明らかに口唇表面のオレイン酸量が多いことが FTIR スペクトルから分かるので、女性の口唇細胞間ラメラの脂質脂肪酸量が多いところに摂取脂肪酸が少し入り込んでも相対的に少ないので、変化が明瞭には見えなくなっている、ということである。これは、口唇を対象とした脂質脂肪酸代謝の非侵襲的測定は男性被験者には適しているが、女性被験者では困難な点がある、ことを示している。(投稿準備中)

- 3) 糖尿病の診断、特に HbA1c 値 6.5%以上 (国際基準) のスクリーニングのために FTIR による口唇の測定を行った。

その結果、まず HbA1c 値が 6.5%以上のグループとそれ以下のグループの口唇の赤外スペクトルを比較すると、その差スペクトルパターンはカルボキシメチルアルギニンとカルボキシメチル化フォスファチジルエタノールアミン (PE) の和の赤外スペクトルとよく似ていた (これらは皮膚に存在することが知られている AGEs である)。ただし、よく知られているカルボキシメチルリジンとはあまり相関しなかった。被験者の測定 FTIR スペクトルに、PLS 法を適用して (キャリブレーションは7名で行った) 各被験者の HbA1c 値を予測した所、相関係数 $R=0.82$ と非常に良く予測することができた (下図; $n=25$)。またその予測のときに出た擬陰性の人たち2名 (16名中) は、さらに口唇のトランス型不飽和脂肪酸由来の 968cm^{-1} の赤外吸収強度による分類を付け加えることですべて見出し、高 HbA1c 値 (6.5%以上) の被験者を 100%スクリーニングすることが可能であった。(J. Pharm. Biomed. Anal. 76 (2013) 169-176. 発表)



- 4) 上記の糖尿病の診断に関連して、PLS法を用いた HbA1c 値の予測の男女差、および同様の方法による血中 Glucose 値とトリグリセリド (TG) 値の予測の男女差を検討した。その結果、上記のように男女を一緒に検討すると HbA1c 値の予測に関して $R=0.82$ と比較的高い相関が得られたが、男性だけで同じプロトコルで予測すると $R=0.95$ ($n=14$) と極めて高い精度で予測できることがわかった (下図)。一方、女性だけで同様な予測をすると $R=0.44$ ($n=14$) と低い予測率となった。また、血中 Glucose 値の予測に関しても、男性だけだと $R=0.83$ と高い精度



の予測になったが、女性だけだと $R=0.67$ と若干低かった（が有意な相関はあり）。さらに、血中 TG 値の予測でも、男性では $R=0.79$ と比較的高い予測精度が得られたが、女性では $R=0.40$ と有意な相関は得られなかった。

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 3 件)

1. Yoshida S, Yoshida M, Yamamoto M, Takeda J. Optical Screening of Diabetes Mellitus using Non-invasive Fourier-transform Infrared Spectroscopy Technique for Human Lip. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 76, 169– 176 (2013).査読あり
2. 吉田敏、脂質・脂肪酸アセスメントにおける非破壊的計測法の課題. *脂質栄養学*, 20(2), pp.117 (2011).査読なし
3. Sakuyama S, Hirabayashi C, Hasegawa J, Yoshida S. Analysis of human face skin surface molecules in situ by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Skin Res. Technol.*, 16(2): 151-160 (2010).査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 五十川みのり、吉田敏、下澤伸行、FTIR を用いた血清極長鎖脂肪酸濃度予測および DHA 濃度によるペルオキシソーム病のスクリーニング評価、日本脂質栄養学会、9月8日、麻布大学 (2012)
2. 五十川みのり、吉田敏、下澤伸行、FTIR による血清極長鎖脂肪酸濃度予測法の開発、日本脂質栄養学会、9月8日、麻布大学 (2012)
3. Yoshida S, in *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (Honolulu, Hawaii), ANYL#276 symposium (invited), 15

Dec., (2010).

〔図書〕(計 1 件)

1. Yoshida S, Koike K. (Book) Chapter one - Lipid and Membrane Dynamics in Biological Tissues Infrared Spectroscopic Studies, in *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, (Elsevier; Edited by Dr. Aleš Iglič) Vol. 13, pp.1-32 (2011)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www1.gifu-u.ac.jp/~xyosida/rsrch/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 敏 (Yoshida Satoshi)
岐阜大学・工学部・教授
研究者番号：50158440

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：