

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670914

研究課題名(和文)スキンプロットティング法の原理と応用 - ベッドサイドで実施できる皮膚評価技術の確立

研究課題名(英文)Principle and application of skin blotting method

研究代表者

峰松 健夫(MINEMATSU, Takeo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00398752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)スキンプロットティングの原理：角質細胞間脂質のラメラ構造の電子顕微鏡観察が必要であるが、従来の試料作製法では不可能である。そこで新たな試料作製法を考案し、通常電顕で観察ができることを明らかにした。また、タイトジャンクションについては、Claudin1の組織染色性が変化することからスキンプロットティングによる一時的な開裂が示唆された。

(2)褥瘡の超早期発見を実現するためのスキンプロットティングに用いるバイオマーカーの選択を動物実験で行い、虚血・リンパ還流障害・虚血再灌流障害・組織変形を示すバイオマーカーとしてそれぞれPAI1、VEGF-C、IL1、HSP90を同定した。

研究成果の概要(英文)：(1)The principle of skin blotting: We could not fully reveal the principle of skin blotting within this period. Conventional techniques are not enough for the analysis of the effect of skin blotting on the inter-corneocyte lipid lamellae structure. Therefore, we developed new fixation technique of skin tissue, which can keep the structures of inter-corneocyte lipid, epidermis and dermis. Furthermore, the temporal structural change by skin blotting was suggested by immunofluorescence for claudin-1, a tight junction protein.

(2)In the animal experiment, we identified the biomarkers for early detection of pressure ulcer development by skin blotting. The biomarkers are PAI1, VEGF-C, IL1a, and HSP90a, which reflected the ischemia, lymphatic dysfunction, ischemia-reperfusion injury, and deformation of tissue, respectively.

研究分野：創傷治癒

キーワード：スキンアセスメント 褥瘡 スキンケア

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、生体と外界を隔てる境界として機能する人体最大の器官である。その機能は生命維持に直結するだけでなく、その損傷や異常は患者の QOL を著しく損なうものである。看護師は、日々患者の皮膚に直に触れ観察できる存在であり、日常的スキンケアの主たる担い手である。しかし、どのようなケアが適切か、多くの看護師は悩みながら試行錯誤を繰り返しているのが実情である。これはひとえに皮膚の中で何が起きているのか？それを知る手だてがないためである。

これまで、さまざまな皮膚の評価技術が開発されている。スキン pH メーターや経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) は皮膚バリア機能を反映する。高周波エコーや光干渉断層法 (Optical Coherence Tomography, OCT) は非侵襲的に皮膚内部の構造を観察することが出来る。しかし、いずれも機能の低下や構造変化をもたらす原因を明らかにすることはできない。求められるのは介入の本質的ターゲットとなり得る生理的变化を評価できる技術である。

『スキンプロットティング法』とは、近年申請者が開発した新たな皮膚評価技術である (Minematsu et al. in press)。プロットティング・メンブレンとは実験室で一般的に用いられる静電気を帯びた濾紙であり、タンパク質を強力に吸着・保持する。このようなプロットティング・メンブレンを湿潤下で皮膚表面に 10 分間貼付するだけで、皮膚内部のタンパク質を採取することが出来る。

これまで、動物実験および健常人を対象にした研究により、表皮および真皮浅層に分布する蛋白質は表皮を透過して、真皮深層および皮下脂肪層に分布するタンパク質は毛包を経由してメンブレンに吸着され、前者はびまん性シグナルとして、後者は強いスポット状シグナルとして検出されること (図 2)、皮膚組織の炎症マーカーとして Tumor Necrosis Factor (TNF) α を用いると、肉眼的には認識されない潜在的炎症を同定できることが証明された (Minematsu et al. in press)。

今後、本手法を臨床応用可能な技術として確立するためには、本手法により分子量の大きいタンパク質が皮膚を透過できる詳細なメカニズムの解明と、具体的な応用例の提示が必要である。

2. 研究の目的

(1) スキンプロットティング法のアイディアは皮膚浸軟 (いわゆる「ふやけ」) に由来する。6 時間の皮膚浸軟は、角質細胞間脂質の構造、および表皮角化細胞間の結合を変化させ、分子量の大きい物質の皮膚透過を可能にする (Minematsu et al. 2011)。一方、スキンプロットティング法では 10 分でタンパク質の皮膚透過を可能にする。従って、プロットティング・メンブレンの極性が表皮の構造変

化およびタンパク質の皮膚透過を促進すると仮説を立て、その証明を試みる。

(2) 褥瘡はその重症度によりステージ 1~4 に分類される (図 4)。ステージ 1 とは「皮膚欠損を伴わない消退しない発赤」と定義されており (日本褥瘡学会)、皮膚の内部では出血もしくは血球の漏出を伴う組織損傷が起きていると考えられる。褥瘡の超早期検出とはステージ 1 に至る以前の細胞レベルの変化を捉えようとするものである。褥瘡は、外力が局所の血流を遮断し、低酸素状態が持続することで発生する組織障害である。低酸素下では血管新生やアポトーシス、糖代謝の変化などが誘発される。従って、低酸素状態により制御され、これらの減少に関与し、かつ皮膚組織での発現が証明されている分泌タンパク質がマーカー候補となり得る。本研究では、文献調査より、Stanniocalcin1、VEGF、Relaxin、PDGF、Adrenomedullin、PAI-1 をマーカー候補とし、スキンプロットティング法による検出および外力負荷との関連を調査することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)-1. スキンプロットティングが表皮角質細胞間脂質のラメラ構造に及ぼす影響

当初 Cryo-TEM 法を用いることを計画していたが、必要な機器などの入手が困難であり、計画の変更を迫られた。そこで、通常透過型電子顕微鏡による評価を可能とする新たな組織固定法 (乾湿固定法) の開発に着手した。

C57BL/6J マウス (雄、7 週齢) の背部中央より採取した皮膚組織をろ紙上で伸展し貼付した。真皮側からの固定としての紙に固定液 (2% GA、2% PFA、30 mM HEPES) 0.1 mL を滴下した (湿式固定法) 後、四酸化オスミウムの結晶を約 100 mg 入れた試料瓶上部に保持し、角層側からオスミウムガスで固定した (乾式固定法)。また、比較対象として皮膚組織を湿式および乾式固定法のみで固定した。

(1)-2. スキンプロットティング法が表皮タイトジャンクションに及ぼす影響

C57BL/6J マウス (雄、7 週齢) の背部を除毛後、ニトロセルロースメンブレンを 10 分間貼付し、除去直後、5 分後、10 分後に同部位皮膚組織を採取した。皮膚組織は未固定凍結切片とし、Claudin-1 染色に供した。

(2) ICR マウス (雄、9 週齢) の背部を除毛後、皮膚を 1,000 mmHg で 1 または 6 時間圧迫した。圧迫解除後 30 分、60 分、90 分、12 分、24 時間、および 48 時間後にスキンプロットティングを実施し、皮膚組織を採取した。組織学的解析、RT-PCR、ならびにスキンプロットティング法により、褥瘡発生に関与するバイオマーカーを開発した。

4. 研究成果

(1)-1 薄切片をトルイジンブルー染色に供し顕微鏡レベルで観察したところ、乾式固定のみでは真皮の固定が十分ではないことが示された。また超薄切片の TEM 観察により、湿式固定のみでは角質細胞間脂質が流出している様子が観察されたが、新たな乾湿固定法では真皮・表皮ともに良好に固定されており、角質細胞間脂質のラメラ構造も明瞭に観察された。今後、この手法を応用してスキンプロットングによる角質細胞間脂質の変化を検討する予定である。

(1)-2 無処理皮膚において Claudin1 は表皮に網目状に観察されるが、スキンプロットングによって染色性および染色の連続性が著しく低下した。この変化は5分後まで維持されたが、10分後には部分的に染色性が回復する様子が観察された。染色性の変化は間接的ではあるが、Claudin1 の分子構造の変化を示唆しており、表皮タイトジャンクションが一時的に開裂していることを示すものである。今後、その他のタイトジャンクションタンパク質の染色などを用いて、更なる解析を予定している。

(2) 1,000 mmHG で6時間圧迫すると翌日には消退しない発赤、つまり1度の褥瘡が形成された。褥瘡発生に関わる因子として PAI-1、IL-1、VEGF-C、HSP90 の発現解析、ならびにスキンプロットング法による経皮的検出を試みたところ、IL-1、VEGF-C、HSP90 が対象群に比べて有意に強く検出され、褥瘡の超早期検出バイオマーカーとして有用である可能性が示された。本成果は米国の特許出願にいたっている。

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3件)

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. 査読あり, 37: 425-432. 2015. doi: 10.1111/ics.12217

Kaneko M, Minematsu T, Yoshida M,

Nishijima Y, Noguchi H, Ohta Y, Nakagami G, Mori T, Sanada H. Compression-induced HIF-1 enhances thrombosis and PAI-1 expression in mouse skin. Wound Repair Regen. 査読あり, 23: 657-663. 2015. doi: 10.1111/wrr.12312.

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. 査読あり, [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/ics.12312

[学会発表](計2件)

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

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

[図書](計1件)

峰松健夫. 5.4 スキンプロットング. 看護理工学(真田・森編). 東京大学出版会. 2015

[産業財産権]

出願状況(計1件)

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

発明者：真田弘美，仲上豪二郎，峰松健夫
権利者：同上
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：国外

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://www.rounenkango.m.u-tokyo.ac.jp/>

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・講師
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

森 武俊 (MORI, Taketoshi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20272586

仲上 豪二郎 (NAKAGAMI, Gojiro)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70547827

野口 博史 (NOGUCHI, Hiroshi)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：50431797

玉井 奈緒 (TAMAI, Nao)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80636788

(3) 連携研究者

()

研究者番号：