

平成30年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11578

研究課題名(和文) 糖尿病患者を対象とした足白癬アセスメントツールの開発

研究課題名(英文) The development of tinea pedis assessment tool for diabetic patients

研究代表者

竹原 君江 (TAKEHARA, KIMIE)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：70709865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者にとって足白癬は糖尿病足病変の前駆症状となりうることから、早期発見し治療・ケアにつなげることが重要となる。そこで、本研究ではブロットイング技術に着目し、白癬菌が分泌する酵素を可視化することにより足白癬のアセスメントが可能なツールを開発することとした。研究の結果、実験的に白癬菌が分泌する酵素の検出および酵素活性の評価が可能であることを確認した。足白癬保有者においても検出できる可能性が示唆された。しかし、評価の際に特殊な光源が必要だったため、簡便性に欠けるものであった。次に、特殊な光源を必要としない方法を検討した。その結果、金コロイドを用いた染色方法により検出できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is because tinea pedis can be a risk to diabetic foot for diabetic patients that it is important to detect it early and lead to treatment and care. Therefore, in this research, we focused on blotting technology and tried to develop a tool that could assess tinea pedis by visualizing the enzyme secreted by Trichophyton. As a result, it was confirmed that it was possible to detect the enzyme secreted by Trichophyton and evaluate the enzyme activity experimentally. Additionally, it was suggested that the enzyme could be detected in the patient who had tinea pedis. However, since special light was necessary for detection, above method was not convenient. Next, a method which does not require a special light source was examined. As a result, it was suggested that tinea pedis could be detected by a staining method using colloidal gold.

研究分野：糖尿病足病変

キーワード：フットケア 糖尿病足病変予防 足白癬 早期発見 アセスメントツール

1. 研究開始当初の背景

糖尿病合併症の一つである糖尿病足病変、中でも感染や潰瘍といった重症の糖尿病足病変は下肢切断に至る危険性がある。実際、毎年世界で100万人以上の糖尿病患者が下肢切断を経験している¹⁾。糖尿病足病変はQOLの低下や医療経済の負担につながるため²⁾、その予防は喫緊の課題である。足白癬、胼胝、亀裂などの非潰瘍性足病変は非糖尿病患者にもみられるありふれたものだが、糖尿病患者では糖尿病足病変の前駆症状となりうるため、その予防と早期からのケアが鍵となる。特に足白癬は感染症であるにも関わらず、必ずしも十分なケアが行われていない現状がある。

研究代表者はこれまで足白癬の予防ケアに焦点をあて研究を進め^{3,4,5)}、予防ケア方法の確立については研究が進んできた。一方、足白癬は自覚症状が乏しく、臨床所見があっても乾燥などとして扱われ見過ごされて受診行動にすらつながらないことが少なくない。また、たとえ治療を始めたとしても自覚症状や鱗屑などの所見が消失すると治療を自己中断し、再発を繰り返すことも多い。皮膚科を受診した患者3万人を対象に足疾患の実態を調査した研究⁶⁾においても、足部の白癬が確認された者のうち半数以上が白癬に気づいておらず、気づいていたとしても治療を行っていた者は半数以下であったことが報告されている。このように、白癬に関するコンコダンスは十分ではなく、これを実践するための教育システムの構築が必要であると考へた。

足白癬に対する治療の自己中断は、症状の自覚が乏しいことに起因するため、自覚可能な方法論を確立し患者がモチベーションを継続できることが必要である。その手法として、「可視化」、「非侵襲」、「リアルタイム」、「フィードバック可能」という4つの条件が有効であると考えた。これまで足部の白癬菌を可視化する方法としてFoot-press法⁷⁾が確立されている。この方法では、足底をスタンプした寒天培地を培養し、白癬菌のコロニーの分布を示すことができる。しかし培養には1-2週間かかることが問題であり、教育ツールとしては不十分である。

そこで本研究ではプロットング技術に着目した。プロットングとは正に荷電したシート(プロットングメンブレン)に負に荷電した分子を静電的に吸着させ可視化する一般的な方法である。実験室ではタンパク質や核酸の生化学的解析に広く用いられている。私たちの研究グループでは、皮膚および創部のタンパク質を非侵襲に吸着・検出し、それぞれの生理学的状態の評価法を確立しており^{8,9)}、これらの方法で酵素活性の評価

等も可能である。

白癬菌は、角層で定着・増殖する際にケラチナーゼを分泌し角層の主成分であるケラチンを分解している。従って、プロットング技術を応用してケラチナーゼ活性の分布を可視化することが可能と考えられる。本研究では、こうした技術(『In situ ケラチンゼイモグラフィー』と呼ぶ)を開発し、妥当性を検証することとした。

2. 研究の目的

- (1) In situ ケラチンゼイモグラフィーを用いた足白癬アセスメントツールを開発すること。
- (2) 足白癬アセスメントツールの妥当性を検証すること。

3. 研究の方法

- (1) ケラチナーゼ活性のプロットング技術による検出

ゼイモグラフィーとは、主にゼラチンやカゼインを基質とするコラーゲン分解酵素の活性を測定する技術である。ケラチンを基質とするケースは極めて稀ではあるが、Mazotto et al.¹⁰⁾が報告している。私たちの研究グループでは既に、創傷表面からプロットング技術で採取した滲出液中のコラーゲン分解酵素活性の創面分布を、ゼイモグラフィーの原理を応用して可視化する方法を確立している。In situ ケラチンゼイモグラフィーは、これら既存の技術を組み合わせることで実現できるものと考えられる。

ケラチナーゼを段階希釈したものをプロットングメンブレンに滴下して試料とする。Mazotto et al.¹⁰⁾の方法に準じてケラチンを含む10%アクリルアミドゲルを作製し、試料に重層し、40℃で24時間保温した後に、アクリルアミドゲルを総蛋白質染色に供する。ゲル全体が濃い青色に染色されるが、ケラチンが分解された部分ではタンパク質濃度が低くなっているため染色されず白く抜けたシグナルを示す。シグナルの有無により、このケラチナーゼ活性検出技術の感度を明らかにする。

- (2) In situ ケラチンゼイモグラフィーの併存妥当性の検証

糖尿病足外来受診者の足部(足底、趾間)にメンブレンをあて、タンパク質を吸着させた後、ドットプロットを行う。

足部の病変部より検体を採取し、直接鏡検法および培養法にて白癬菌の存在を確認する。

In situ ケラチンゼイモグラフィーの感度・特異度を算出する。

4. 研究成果

まず、白癬菌が角層に侵入する際に分泌するケラチナーゼに着目し、プロットング技術とザイモグラフィの技術を用いて、ケラチナーゼが存在する部分が脱色する方法を実験的に検証した。まず、蛍光標識法という感度の高い方法を用いてタンパク質を標識し、確かにケラチナーゼが検出できること、活性の評価も可能であることが確認できた(図1)。しかしこの方法はケラチナーゼを確認するために特殊な光源が必要であり簡便性という点で課題があった。

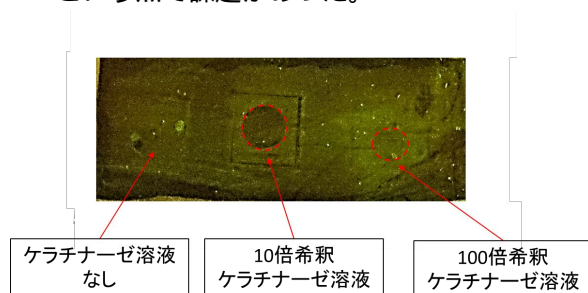


図1.ケラチナーゼ溶液の濃度と蛍光強度

そこで次に、特殊な光源を用いずにケラチナーゼが検出できる方法を検討した。さまざまな染色方法を検討した結果、金コロイドを用いた染色法によりケラチナーゼの検出が可能であることが確認できた(図2)。

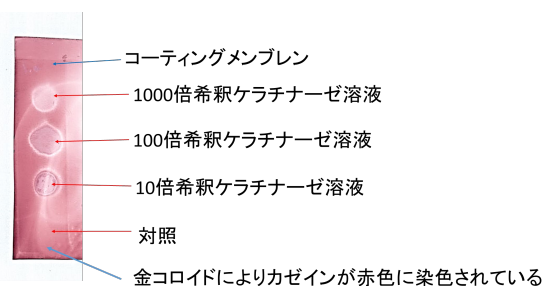


図2.染色結果

この方法は可視化が簡便である一方、基質タンパク質をコーティングする際にムラが発生し、ケラチナーゼ検出の感度が低下するという課題があった。この課題についてコーティング方法をさまざま検討しているところである。

引用文献

- 1) Bakker K, Schaper NC; International Working Group on Diabetic Foot Editorial Board. The development of global consensus guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28:116-118.
- 2) Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005;366:1719-1724.
- 3) Takehara K, Amemiya A, Mugita Y,

Tsunemi Y, Seko Y, Ohashi Y, Ueki K, Kadowaki T, Oe M, Nagase T, Ikeda M, Sanada H. Association between tinea pedis and feet washing behavior in diabetic patients: A cross-sectional study. *Adv Skin Wound Care.* 2017 ;30(11):510-6.

- 4) Takehara K, Amemiya A, Mugita Y, Tsunemi Y, Seko Y, Ohashi Y, Ueki K, Kadowaki T, Oe M, Nagase T, Ikeda M, Sanada H. Association between washing residue on the feet and tinea pedis in diabetic patients. *Nursing Research and Practice.* 2015; Article ID 872678, 7 pages. doi:10.1155/2015/872678.
- 5) Sanada H, Nakagami G, Takehara K, Goto T, Ishii N, Yoshida S, Ryu M, Tsunemi Y. Antifungal Effect of Non-Woven Textiles Containing Polyhexamethylene Biguanide with Sophorolipid: A Potential Method for Tinea Pedis Prevention. *Healthcare.* 2014;2:183-91.
- 6) Watanabe S1, Harada T, Hiruma M, Iozumi K, Katoh T, Mochizuki T, Naka W; Japan Foot Week Group. Epidemiological survey of foot diseases in Japan: results of 30,000 foot checks by dermatologists. *J Dermatol.* 2010;37:397-406.
- 7) Maruyama R1, Katoh T, Nishioka K. Demonstration of dermatophyte dissemination from the infected soles using the foot-press method. *Mycoses.* 1998;41:145-151.
- 8) Minematsu T, Horii M, Oe M, Sugama J, Mugita Y, Huang L, Nakagami G, Sanada H. Skin blotting: A noninvasive technique for evaluating physiological skin status. *Advances in Skin and Wound Care.* 27: 272-279. 2014.
- 9) Minematsu T, Nakagami G, Yamamoto Y, Kanazawa T, Huang L, Koyanagi H, Sasaki S, Uchida G, Fujita H, Haga N, Yoshimura K, Nagase T, Sanada H. Wound blotting: A convenient biochemical assessment tool for protein components in exudate of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration.* 21: 329-334. 2013.
- 10) Mazotto AM1, Cedrola SM, Lins U, Rosado AS, Silva KT, Chaves JQ, Rabinovitch L, Zingali RB, Vermelho AB. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Lett Appl Microbiol.* 2010;50:89-96.

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1件)

- 1) 竹原 君江, 真田 弘美. 特集: ビジュアル化への挑戦 糖尿病足潰瘍教育への応用を目指して 足白癬予防のための足部の洗い残し・拭き残しの可視化. 日本フットケア学会雑誌. 2018;16(1):18-22.(査読なし)

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 竹原君江, 大江真琴, 野口博史, 峰松健夫, 福田真祐, 大橋優美子, 門脇孝, 真田弘美. シンポジウム4「フットケアを深める臨床研究」, インターディシプリナリーアプローチを用いた足白癬の早期発見方法と予防ケアの開発. 第16回日本フットケア学会年次学術集会. 2月9-11日, 2018. 福岡.
- 2) 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. 第46回日本創傷治癒学会. 東京大学伊藤国際学術研究センター/安田講堂, 2016-12-09.
- 3) 竹原君江, 峰松健夫, 駒形和典, 池田真理, 真田弘美, 武村雪絵. 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.

〔図書〕(計1件)

- 1) 竹原君江, 大江真琴. 足病の予防・ケア. スキンケアガイドブック. 照林社編集, 269-79, 2017, 5月.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

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, 峰松健夫, 真田弘美

権利者: 竹原君江, 峰松健夫, 真田弘美

種類: 特許

番号: 2015-201258

出願年月日: 2015.10.9

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 君江 (TAKEHARA, Kimie)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 70709865

(2) 研究分担者

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

大江 真琴 (OE, Makoto)

東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号: 60389939

常深 祐一郎 (TSUNEMI, Yuichiro)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00361478