

令和 4 年 9 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22744

研究課題名（和文）組織障害を光で知らせる褥瘡予防用皮膚被覆材の開発

研究課題名（英文）Development of skin dressing for pressure ulcer prevention to show the tissue damage

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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：褥瘡の前駆状態を同定する方法として、ATPを標的としたスキンプロット検査の確立を試みた。

まず、ニトロセルロースおよびナイロンメンブレンを用いてATPのプロットングへの適用可能性を検証したところ、ナイロンメンブレンで低いバックグラウンドと高い吸着性を示し、定量的測定が可能な範囲が示された。続いて反応性充血、紅斑、紫斑を呈するモデルマウスにおいて、ナイロンメンブレンを用いたスキンプロットング法にてATPの検出を試み、本手法が圧迫による皮膚障害を鋭敏かつ定量的に評価できることが示された。これらの結果は、本手法が圧迫による組織損傷を同定し、褥瘡発生予測に応用できる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褥瘡は、プレデンスケール等を用いた発生予測に基づいて予防的ケアが提供されるが、その特異度が低く、過剰なケアを行わなければならないことが問題となっている。本成果は、スキンプロットングによるATP検査が外力による皮膚組織損傷を鋭敏に同定・評価できることを示すものであり、褥瘡予測の特異度を高めることで、医療資源を必要な患者に集中させ、効果的かつ効率的な褥瘡予防の実現に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish the skin blot examination for ATP as a method to identify a precursor condition of pressure injury.

First, we investigated the applicability of ATP for blotting using nitrocellulose and nylon membrane. Nylon membrane showed low background, high adsorbability, and quantitativity in ATP blotting. Then, we performed skin blotting by nylon membrane on the compressed skin of the hyperemia, erythema, and purpura model mice, and measured ATP on the samples. Tissue damage was detected in all models, and detection intensity reflected the severity of skin damage. These results suggested the applicability of ATP examination by skin blotting with nylon membrane for prediction of pressure injuries.

研究分野：看護理工学

キーワード：褥瘡 ATP DAMPs スキンプロットング 反応性充血 紅斑 紫斑

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化の進展、医学の急速な進歩に伴い、疾患や障害を有したまま地域で療養生活を送る高齢者が急増しており、病院中心のケアから在宅中心のケアへの転換、すなわち地域包括ケアシステムの確立が求められている。病院では患者に24時間寄り添ったケアが可能であるが、在宅ケアではわずか1時間の訪問時間で様々なケアを行わなければならない。つまり看護ケアの飛躍的な効率化が地域包括ケアシステム確立の鍵と言える。

褥瘡は主に長時間の臥床により生じる代表的な慢性創傷である。褥瘡対策はまずリスクアセスメントツールを用いてハイリスク患者を同定し、リスクに応じた予防ケアを講じることに始まる。しかし近年、各国よりアセスメントツールの特異度の低下が指摘されている。これは高機能エアマットレスを始めとする褥瘡予防機器・技術の発展によるものと考えられるが、その結果、過剰な褥瘡予防ケアによる在宅ケア効率の低下を招いているのである。特に在宅療養高齢者ではこの傾向が顕著であり、新たなリスク同定技術の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

褥瘡に至る前の軽微な組織損傷に対する細胞・組織反応(褥瘡前駆反応)を同定することができれば、個人差に関わらず、本当に予防ケアが必要な高齢者を同定することができる。これまで2015年度科研費基盤研究(B)などの助成を受け、新たな非侵襲的スキンアセスメント技術としてスキンプロットティングの開発・確立に取り組んできた(Minematsu, 2014)。スキンプロットティングとは、皮膚組織より非侵襲的にタンパク質を抽出し、種々のマーカーの特異的免疫染色によって病態を推定する方法である。しかし、タンパク質染色は実験室で数時間かけて行われるため、在宅ケアの効率化のためには不十分である。

そこで本研究では、その場ですぐに結果が見えるシステムを開発すべく、褥瘡前駆反応としてアデノシン三リン酸(adenosine triphosphate, ATP)の逸脱に着目した。ATPは細胞内のエネルギーの遷移や貯蔵に用いられるが、細胞障害に伴って細胞外に逸脱するDAMPs(damage associated molecular patterns)の一つである。食品衛生などの分野では細菌汚染の指標として、ルシフェラーゼ反応を利用した高感度かつ簡便なATP測定法が確立されている。本研究では、ルシフェラーゼ反応を応用して逸脱ATPを捉え、褥瘡前駆反応を光として検出する皮膚保護材の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1. in vitro におけるシステムの開発

本研究で開発する褥瘡前駆反応検知機能付き創傷被覆材の構造を右図に示す。最下層に位置するプロットティングメンブレンは、スキンプロットティングの原理により皮膚バリア機能ATPを一時的に開裂させ、非侵襲的にATPを吸着する。その上層に配したハイドロゲルにはルシフェラーゼ等が含まれており、吸着されたATPと反応し発光する。本システムの開発に当たっては、プロットティングメンブレンの素材の検討(ニトロセルロース、PVDF、ナイロンなど)、吸着されたATPとルシフェラーゼの反応性の検討、抽出効率と反応性を最適化する構造の検討を行う。

### 2. 褥瘡モデルマウスを用いた有効性の検討

当教室では褥瘡モデルマウス作成のための独自の装置を開発し、褥瘡発生メカニズムの解明などに用いている(Kaneko, 2015)。100~1000 mmHgの圧力で0.5~3時間、圧力を負荷した背部皮膚に開発した皮膚保護材を1~24時間貼付し、ルシフェラーゼ反応の有無と程度を観察する。また、皮膚組織を採取し逸脱したATP量を測定し、開発品の基準関連妥当性を評価する。

### 3. 褥瘡ハイリスク患者における褥瘡の予測妥当性の検討

長期療養型病院に入院する要介護度4以上の高齢者を対象とする。開発した皮膚保護材を骨突出部に貼付し、24時間後に評価、回収する。2週間フォローし、褥瘡発生の有無を観察、ルシフェラーゼの検出の有無、検出強度と褥瘡発生との関連を解析する。

## 4. 研究成果

### 1. in vitro におけるシステムの開発

検査対象分子を非タンパク質DAMPsに広げ、プロットティングによる検出可能性を検討した。対象としたDNA、RNA、ATP、および尿酸はそれぞれSybr Green I、Syber Green II、ルシフェラーゼ反応、およびウリカーゼ反応により検出・測定した。いずれも迅速かつ簡便な測定法である。

プロットティングメンブレンとしてニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)およびナイロンメンブレンが広く用いられているが、疎水性であるPVDFメンブレンは使用直前にメタノールを用いた親水化処理が必要であるため、人体への適用は適さないと考え、本研究ではニトロセルロースおよびナイロンメンブレンを材料とした。なお、ニトロセルロースメンブレンは

これまでスキンプロットングに標準的に用いられているが、ナイロンメンブレンをスキンプロットングに応用した例はない。

### バックグラウンドの検討

プロットングを行っていないニトロセルロースおよびナイロンメンブレンを、洗浄なし、洗浄直後、洗浄 1 時間後の 3 条件でそれぞれの検出方法に適用し、発光/蛍光強度を測定した。その結果、ニトロセルロースメンブレンにおける Sybr Green II、およびナイロンメンブレンにおけるウリカーゼ反応で比較的高いバックグラウンドが検出された ( 図 1 )。

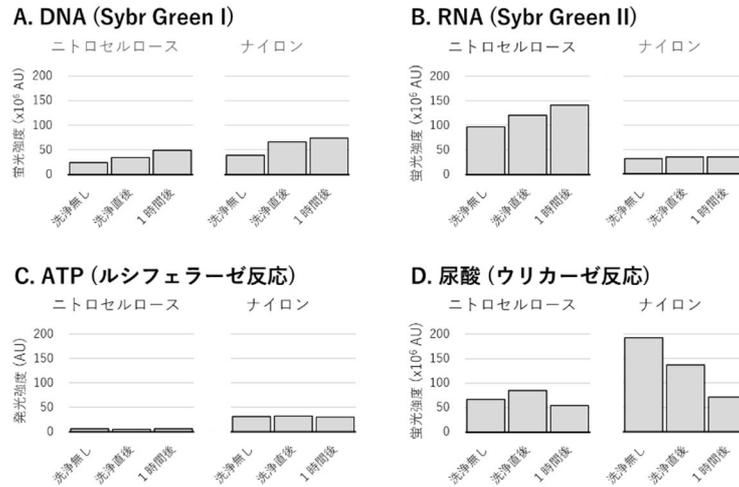


図1 非タンパク質DAMPs検出法におけるバックグラウンド

### 吸着性の検討

各プロットングメンブレンに DNA (40 ng/μL)、RNA (40 ng/μL)、ATP (2 μg/μL)、尿酸 (10 μM) を 1 μL ずつ滴下し、洗浄なし、洗浄直後、洗浄 1 時間後の 3 条件で検討した。洗浄直後および 1 時間後では、遊離した各分子を含む洗浄液も測定に供した。その結果、DNA、RNA および ATP はナイロンメンブレンでほとんど遊離がなく、高い吸着性が示された。一方、尿酸ではいずれのメンブレンにおいても遊離が多く、かつメンブレンの測定値がマイナスとなり、プロットングでの検出には適さないことが示された ( 図 2 )。

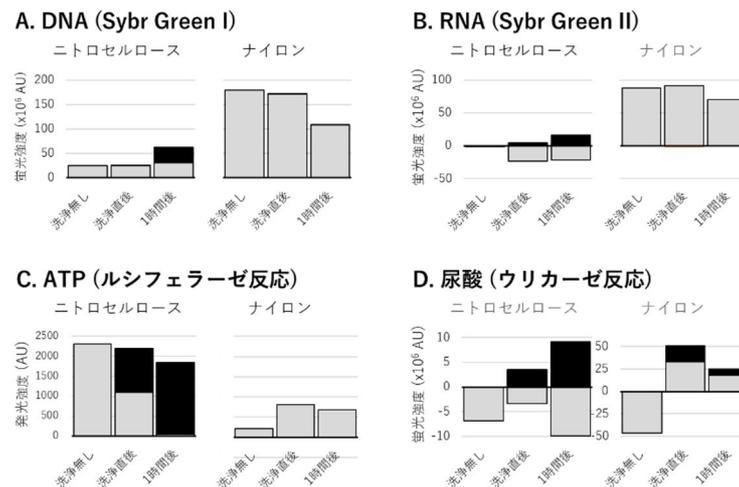


図2 非タンパク質DAMPsの吸着性

■ メンブレン ■ 洗浄液

### 定量性の検討

ナイロンメンブレンに、DNA (39 pg/μL – 40 ng/μL)、RNA (31 ng/μL – 1 μg/μL)、ATP (6.4 pg/μL – 2 μg/μL)、尿酸 (9.8 nM – 10 μM) をそれぞれ 1 μL ずつ滴下し、洗浄直後に測定した。その結果、DNA は 78 pg/μL ~ 20 ng/μL の範囲で、RNA は 62.5 ng/μL ~ 500 ng/μL の範囲で、ATP は 0.8 ~ 1.5 μg/μL の範囲で、それぞれの濃度と検出強度の間に高い相関が認められた。一方、尿酸では相関が認められず、定量性を有していないことが明らかとなった ( 図 3 )。

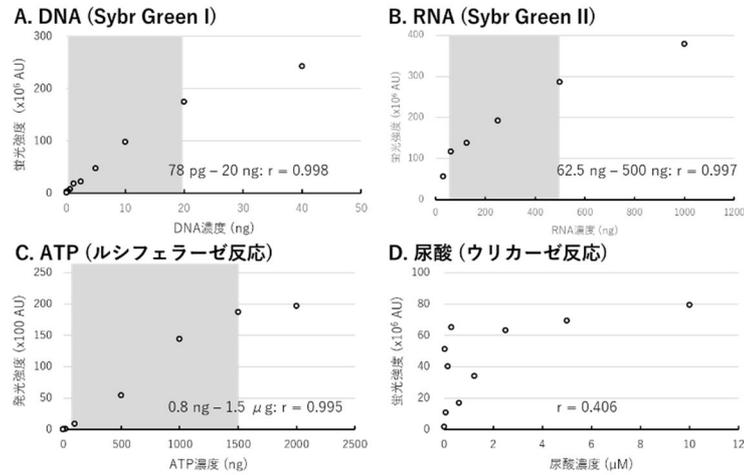


図3 ナイロンメンブレンにおける非タンパク質DAMPsの定量性

以上より、非タンパク質 DAMPs の内、DNA、RNA および ATP がプロットング検査に適用できることが示された。

## 2. 褥瘡モデルマウスを用いた有効性の検討

予備検討の結果、DNA および RNA は圧迫による皮膚障害への反応性が低く、ATP の反応性が高いことが明らかとなったため、ATP に絞って動物実験を実施した。

当教室では、マウス背部皮膚において圧迫強度と時間を厳密に管理することで、反応性充血 (300 mmHg, 5 min)、紅斑 (300 mmHg, 240 min)、紫斑 (1,500 mmHg, 240 min)の作製方法を確立している (中井ら, 2021)。それぞれのモデルマウスの圧迫前および 24 時間後に、生理食塩水で水和したナイロンメンブレンを圧迫部皮膚に貼付し、抽出された ATP を測定した。その結果、いずれのモデルにおいても圧迫前に比べて圧迫後の ATP の検出強度は有意に高く、またその増分比は紫斑モデルにおいて他の 2 つのモデルより有意に高い値を示した (図 4)。

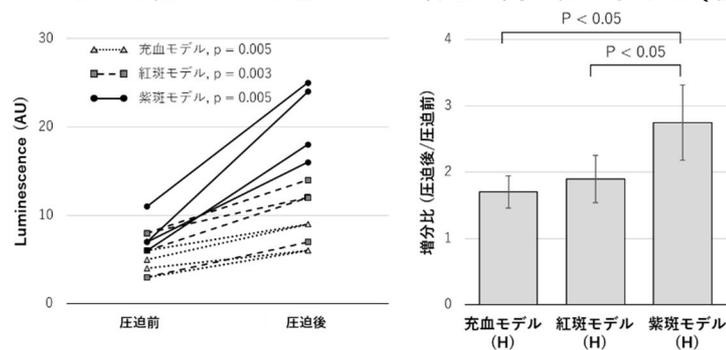


図4 圧迫部皮膚におけるATPのスキンプロットング検査

以上より、ATP のスキンプロットング検査は、圧迫による皮膚障害を鋭敏に捉え、褥瘡の前駆状態を同定できる可能性が示された。

## 3. 褥瘡ハイリスク患者における褥瘡の予測妥当性の検討

コロナ禍の中、臨床調査を実施することはできなかった。

## 引用文献

- 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.* 23: 657-663. 2015.
- 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 (6): 272-279. 2014.
- 中井彩乃, 峰松健夫, 許維真, 新田汐里, 真田弘美. マウス圧迫皮膚における持続する発赤を判別するためのスキンプロットングマーカーの開発. 第 51 回日本創傷治癒学会, 2021/11/26-



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakai A, Minematsu T, Tamai N, Sugama J, Urai T, Sanada H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Prediction of healing in category I pressure ulcers by skin blotting with plasminogen activator inhibitor 1, interleukin-1 alpha, vascular endothelial growth factor C, and heat shock protein alpha: A pilot study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Viability	6. 最初と最後の頁 87-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtv.2019.02.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 コウ偉杰, 仲上豪二朗, 北村言, 峰松健夫, 臺美佐子, 柏原康佑, 國光真生, 中井彩乃, 野寄修平, 新田汐里, 真田弘美.
2. 発表標題 皮膚生理状態の非侵襲的評価のためのスキンプロットティング検査法の信頼性検証.
3. 学会等名 第29回日本創傷・オストミー・失禁管理学会学術集会.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minematsu T, Tsukatani T, Kuang W, Nakai A, Tomida S, Nakagami G, Sanada H.
2. 発表標題 Intra-rater reliability of albumin measurement by skin blotting in healthy volunteers.
3. 学会等名 8th Asia Pacific Enterostomal Therapy Nurse Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 峰松健夫, 尾形道隆, 玉井奈緒, 藪中幸一, 前田智徳, 仲上豪二朗, 野口博史, 真田弘美.
2. 発表標題 車椅子バスケットボール選手における深部組織傷害の実態：深部組織傷害に関連する皮膚特性.
3. 学会等名 第28回日本創傷・オストミー・失禁管理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉井奈緒, 前田智徳, 峰松健夫, 松本勝, 真田弘美
2. 発表標題 車いすバスケットボール選手における深部組織損傷の非侵襲的アセスメント方法の検討
3. 学会等名 第7回看護理工学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakai A, Noyori S, Koudounas S, Weller C, Minematsu T, Sanada H.
2. 発表標題 Instruments to distinguish between category I pressure ulcers and blanchable redness: A scoping review.
3. 学会等名 9th Asia Pacific Enterostomal Therapy Nurse Association (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰松健夫, 中井彩乃, 富田早苗, Kousounas S, 仲上豪二郎, 真田弘美.
2. 発表標題 I度褥瘡モデル動物における非タンパク質DAMPsの検出.
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 峰松健夫, 中井彩乃, Sofoklis Koudounas, 仲上豪二郎, 真田弘美.
2. 発表標題 非たんぱく質ダメージ関連分子パターン (DAMPs)のプロテオミクス検査への応用可能性: In vitro試験.
3. 学会等名 第9回看護理工学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井彩乃, 峰松健夫, 許維真, 新田汐里, 真田弘美.
2. 発表標題 マウス圧迫皮膚における持続する発赤を判別するためのスキンプロテイングマーカーの開発.
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井彩乃, 峰松健夫, 許維真, 新田汐里, 真田弘美.
2. 発表標題 マウス圧迫皮膚における反応性充血、紅斑、および紫斑モデルの作製.
3. 学会等名 第23回日本褥瘡学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科社会連携講座スキンケアサイエンス  <a href="http://skincare.science.m.u-tokyo.ac.jp/index.html">http://skincare.science.m.u-tokyo.ac.jp/index.html</a>          東京大学大学院医学系研究科社会連携講座スキンケアサイエンス  <a href="http://skincare.science.m.u-tokyo.ac.jp/index.html">http://skincare.science.m.u-tokyo.ac.jp/index.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	真田 弘美  (Sanada Hiromi)  (50143920)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授    (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	玉井 奈緒  (Tamai Nao)  (80636788)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授     (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関