

笹川保健財団 研究助成
助成番号：2022A－006

2023 年 3 月 7 日

公益財団法人 笹川保健財団
会長 喜 多 悦 子 殿

2022 年度笹川保健財団研究助成 研 究 報 告 書

標記について、下記の通り研究報告書を添付し提出いたします。

記

研究課題

皮膚タウリン濃度のスキンプロッティング検査による在宅高齢者の慢性脱水のモニタリング方法の開発

所属機関・職名 東京大学大学院医学系研究科 健康科学・看護学専攻 創傷看護学分野
修士課程 2 年

氏名 土屋悠

1. 研究の目的

高張性脱水とは、高ナトリウム血症を伴う、体内の水分量が正常以下になった状態である（日本救急医学会, 2009）。65 歳以上の高齢者は、体水分量の減少、尿濃縮能力、認知機能、口渴感の低下といった加齢による変化や嚥下障害などにより、高張性脱水に陥りやすい。さらには、利尿剤・下剤の内服といった医原性のリスク要因もある。実際に、高齢者の高張性脱水の有病率は 21.6–38.3%であり、高齢者の有病率が高いことが明らかとなっている。そして、高張性脱水は、高齢者を認知機能の低下や虚弱などのリスクを高め、高齢者の QOL を著しく低下させる。さらに、高齢者の高張性脱水は入院期間の延長や死亡率の上昇のリスクを高めることも知られ、生命に影響を与える。これらの悪影響は、適切な検査方法がないために、発見が遅れていることが原因と考えられている。従って、高張性脱水の早期発見のための方法を確立する必要がある。

高張性脱水の診断には、採血による血清浸透圧が 300mOsm/L 以上の基準が用いられている。しかし、採血は刺入による疼痛があり、採取が難しい高齢者は繰り返しの穿刺に伴う苦痛や侵襲が大きい。さらには脱水に伴う循環血液量の減少は採血を非常に困難にする。検査には、据え置き型の装置を必要とするため、検査可能な場所が限られており、結果を得るまでに時間を要するため、在宅や療養型施設など検査室へのアクセスが困難な場所では、速やかな脱水の同定を行うことが難しい。そのため、高張性脱水を同定するための非侵襲的で迅速なポイントオブケアテストが求められる。

非侵襲的な方法として、尿検査、唾液検査、フィジカルアセスメントがある。尿検査とフィジカルアセスメントは迅速に高張性脱水を同定することができるが、血清浸透圧をスタンダードとして算出した AUC が 0.43–0.53 と同定精度が十分でない。唾液検査は非侵襲的に迅速に高張性脱水を同定することができる。血清浸透圧をゴールドスタンダードとして算出した AUC は 0.56–0.76 である。しかし、高齢者は加齢による変化や薬物療法に伴い唾液量が減少していることから、十分な唾液採取が困難である。また、食事摂取時間が結果に影響を与えることも明らかとなっている。

そこで、私たちの研究グループで開発したスキンプロッティング法を用いることとした。スキンプロッティング法とは、ニトロセルロース、ナイロン、陰イオン交換膜など数種類の膜でできたスキンプロッティングユニットを皮膚に貼付し、皮膚内部から分子を回収する方法である。陰イオン交換膜は、高張性脱水の指標であるタウリンを吸着することが可能である。タウリンは皮膚の表皮に存在するアミノ酸の一種で、主要な浸透圧物質である。タウリンを皮膚から採取し、ニンヒドリン溶液で陰イオン交換膜を染色することで、タウリンを定量的に評価し、高張性脱水の有無を判別することができることが先行研究にて明らかとなっている。スキンプロッティング法を用いた高張性脱水の同定精度は、感度 77.3%、特異度 81.8%、AUC0.789 であり、同定精度は高い。しかし、スキンプロッティング法を臨床現場で使用するためには測定時間・測定場所が課題となる。陰イオン交換膜を染色するためには、2%ニンヒドリン溶液に 20 分浸漬し、40 分自然乾燥させる。そして、乾燥した陰イオン交換膜を蒸留水で満たした 96 ウェルプレートにセットし、分光光度計で 450nm の吸光度を測定する。ポイントオブケアテストとして使用するためには、染色・測定時間が 1 時間以上かかること、染色・測定場所が限定されることが課題である。

そこで、皮膚タウリン迅速測定機器（エアープラシユニット・ハンドヘルド分光器）を開発した。染色方法はエアープラシユニットを用いた噴霧法に変更、乾燥もエアープラシユニットに搭載されている温熱乾燥に変更し、測定はハンドヘルド分光器を用いた透過度測定に変更した。試料ホルダーに陰イオン交換膜をセットし、エアープラシユニットにセットするだけで設定した時間での自動噴霧、40℃の温熱乾燥が可能となる。また、エアープラシユニットからハンドヘルド分光器に試料ホルダーを移動するだけで、瞬時に透過度を測定することが可能となった。このように、陰イオン交換膜上のタウリンを迅速かつ容易に染色し、測定することが可能となり、皮膚タウリン迅速測定機器の総重量が2.1kgと携帯性にも優れているため、ポイントオブケアテストとしての臨床応用が期待される。しかし、皮膚タウリン迅速測定機器を用いたタウリンの染色条件や新しい皮膚タウリン測定法の信頼性・妥当性については明らかになっていない。そこで、本研究では、皮膚タウリン濃度を定量するための染色条件を決定し、新しい皮膚タウリン測定法の信頼性・妥当性を検証することを目的とした。さらに、噴霧法や測定方法が信頼性・妥当性に影響を与えるかどうかを確認するため、画像解析によりタウリン濃度を定量することとした。

2. 研究の内容・実施経過

【研究内容】

■ 研究概要

- 研究 1-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた染色・測定条件の決定
- 研究 1-2：画像解析を用いて染色方法や測定方法の結果への影響を確認
- 研究 2：新しい皮膚タウリン測定法の信頼性と従来法との併存妥当性の検証
- 研究 3-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた血清浸透圧との併存妥当性の検証
- 研究 3-2：健常人の皮膚タウリン濃度を経時的に調査し、健常人の皮膚タウリン濃度推移の探索
- ※研究 1-1 実施前にプレテストを実施し、下記内容を検討し、固定条件を決定した。（表 1）

表 1. 固定条件の決定

検討項目	検討条件	結果	固定条件
ニンヒドリン濃度	2%、4%、5%、10%、15%	濃度が高いと噴霧が中断した	2%
噴霧時間	1-10秒	2秒以上、2 cm以上は測定部にニンヒドリンが均一に付着しなかった	1秒以下
噴霧距離	1 cm、2 cm、3 cm、4 cm		1 cm
乾燥時間	1分、3分、5分、10分	乾燥に要する時間は最短1分であった	1分
噴霧・乾燥の繰り返し回数	1回、2回、3回、4回、5回、1分乾燥追加	1-5回繰り返しでは透過度がタウリン濃度依存的になっていない範囲があった	5回繰り返し、1分乾燥追加

■ 皮膚タウリン迅速測定機器

- 試料ホルダー（図 1a）

サイズ：4×1×1.2 cm

陰イオン交換膜をセットすることができる。ハンドヘルド分光器に挿入し、透過度測定が行えるよう直径 7 mm の貫通穴があいている。

- エアーブラシユニット（図 1b）

サイズ：11×19×13 cm

コンプレッサー用タイマーが付属しており、0-10 秒間自動でニンヒドリン溶液を自動噴霧可能。試料ホルダー挿入箇所が温調ホルダーとなっており、40℃に温度が設定されており、染色後の陰イオン交換膜の乾燥を促進している。

- ハンドヘルド分光器（図 1c）

サイズ：12×5.5×6 cm

波長範囲：380-780 nm

分解能：1.5 nm 以下

測定項目：透過度

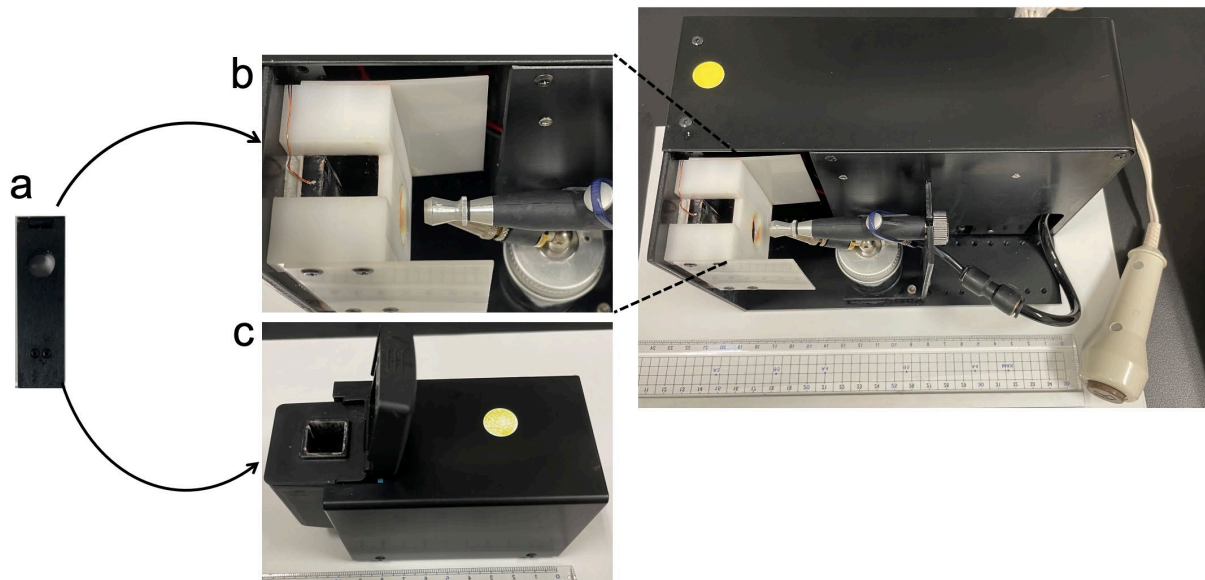


図 1. 皮膚タウリン迅速測定機器

a. 試料ホルダー b. エアーブラシユニット c. ハンドヘルド分光器

■ 研究 1-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた染色・測定条件の決定

- サンプル

200-6400 μM のタウリンを均一に吸着させた陰イオン交換膜を各濃度 3 枚

- 検討条件：染色溶液

70、80、90、100%エタノールで希釈した 2%ニンヒドリン

- 検討条件：噴霧時間

0.5 秒、1 秒を 5 回噴霧

- 解析方法

ピアソンの相関係数

- 染色条件決定方法
透過度がタウリン濃度に濃度依存的に測定できるよう、染色条件ごとにタウリン濃度と透過度（460 nm）の相関を算出した。相関が強い範囲をタウリンの測定可能範囲とした。また、測定可能範囲に健康人の皮膚タウリン濃度である 400–800 μM を含み、相関が一番強い条件を最適な条件とした。
- 実験手順：
 1. 各濃度のタウリン溶液に濾紙を 2 分間浸漬した。
 2. 陰イオン交換膜の上にタウリン溶液を含ませた濾紙を 10 分間乗せた。
 3. 濾紙を陰イオン交換膜から外し、優肌絆に陰イオン交換膜を貼付した。
 4. 試料ホルダーに優肌絆ごと陰イオン交換膜を貼付し、エアブラシユニットに挿入。
 5. 2%ニンヒドリン溶液を各条件で噴霧し、1 分間乾燥した。
 6. 手順 5 を 5 回繰り返した後、追加で 1 分間乾燥した。
 7. ハンドヘルド分光器に試料ホルダーを移し、透過度を測定した。

■ 研究 1-2：画像解析を用いて染色方法や測定方法の結果への影響を確認

- サンプル
研究 1-1 で決定した条件で染色した陰イオン交換膜のスキャン画像
- 解析方法
ピアソンの相関係数
- 手順
 1. 画像解析ソフトに染色後の陰イオン交換膜のスキャン画像を取り込む
 2. B チャンネルを選択
 3. 画像を白黒反転
 4. 直径 7mm 円の範囲の輝度を測定

■ 研究 2：新しい皮膚タウリン測定法の信頼性と従来法との併存妥当性の検証

- 研究デザイン：横断観察研究
- 対象者：健康人 30 人
- 選択基準：20 歳以上
- 除外基準：前腕に皮膚疾患がある人
- スキンプロットングユニット：
陰イオン交換膜とニトロセルロースを優肌絆で貼り合わせ、スキンプロットングユニットとした。
- 手順
 1. 対象者の手首から肘の midpoint にマーキングした。
 2. 一方の腕に 2 ヶ所（妥当性検証のため）、もう一方の腕に 3 カ所（信頼性検証のため）スキンプロットングユニットを貼付した。
 3. 20 分間貼付後にスキンプロットングユニットを剥がした。
- 測定方法
従来法

1. 陰イオン交換膜を丸くカットする。
2. 100%エタノールで溶解した 2%ニンヒドリン溶液に陰イオン交換膜を 20 分間浸漬した。
3. 浸漬後の陰イオン交換膜を 40 分間ペーパーの上で自然乾燥させた。
4. 96 ウェルプレートに乾燥した陰イオン交換膜をセットし、蒸留水を添加した。
5. Oリングを用いて陰イオン交換膜が浮かないように設置した。
6. プレートリーダーを用い、吸光度（450 nm）を測定した。

新規法

測定方法は研究 1-1 に準ずる。

画像解析

測定方法は研究 1-2 に準ずる。

- 標準化タウリンの算出方法
3200、1600、800、400 μM のタウリン濃度をスタンダードとして測定し、作成した近似曲線の式に吸光度、透過度、輝度を代入して算出した。
- 分析方法
基本属性：記述統計
併存妥当性：陰イオン交換膜 2 枚の標準化タウリンをピアソンの相関係数、ブランドアルトマン分析にて解析した。
信頼性の確認：陰イオン交換膜 3 枚は ICC（1,1）にて解析した。
- 倫理的配慮
本研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を受けて実施した。

■ 研究 3-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた血清浸透圧との併存妥当性の検証

- 目的
新しい皮膚タウリン測定法の信頼性と従来法との併存妥当性の検証
- 研究デザイン
横断的観察研究
- 対象者：30 人
選択基準：20 歳以上の健常人
除外基準：前腕に皮膚疾患がある人
- 標準化タウリンの算出方法
3200、1600、800、400 μM のタウリン濃度をスタンダードとして測定し、作成した近似曲線の式に吸光度、透過度、輝度を代入して算出した。
- 調査項目
年齢、性別、既往歴、服薬状況、排泄状況、身長、体重、血清浸透圧、ナトリウム、カリウム、尿素窒素、クレアチニン、頭痛、めまい、倦怠感、口渇感、口腔粘膜の乾燥、皮膚ツルゴール、末梢血管再充満時間、皮膚タウリン濃度（標準化タウリン）
- 標準化タウリンの算出方法
3200、1600、800、400 μM のタウリン濃度をスタンダードとして測定し、作成した近似曲線の式

に透過度、輝度を代入して算出した。

- 倫理的配慮

本研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を受けて実施した。

- 測定方法

新規法

測定方法は研究 1-1 に準ずる。

画像解析

測定方法は研究 1-2 に準ずる。

- 分析方法

対象者属性：記述統計

血清浸透圧と標準化タウリン：ピアソンの相関係数

■ 研究 3-2：健常人の皮膚タウリン濃度を経時的に調査し、健常人の皮膚タウリン濃度推移の探索

- 研究デザイン

縦断的観察研究

- 対象者：健常人 13 人

選択基準：20 歳以上

除外基準：前腕に皮膚疾患がある人

- 調査項目

排泄状況、体重、頭痛、めまい、倦怠感、口渇感、口腔粘膜の乾燥、皮膚ツルゴール、末梢血管再充満時間、皮膚タウリン濃度（標準化タウリン）

- 標準化タウリンの算出方法

3200、1600、800、400 μM のタウリン濃度をスタンダードとして測定し、作成した近似曲線の式に吸光度を代入して算出した。

- 調査方法

週に 3 回、ベースライン調査とあわせて合計 6 回スキンプロッティングを実施し、上記調査項目も同時に取得した。

- 測定方法

従来法

測定方法は研究 2 に準ずる。

- 倫理的配慮

本研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を受けて実施した。

【実施経過】

研究 1-1、研究 1-2、研究 2、研究 3-1 は実験、調査、解析まで終了し、修士論文として提出した。

研究 3-2 に関しては調査終了し、標準化タウリンの測定は終えたが、現在解析途中である。

当初は研究 2、研究 3-1、研究 3-2 は訪問看護を利用している在宅高齢者を対象とする予定だったが、新型コロナウイルス感染症の関係で中止となった。そのため、療養型病院で入院している高齢者を対象に変更し、療養型病院への研修までは行っていたが、新型コロナウイルス感染症の関係で、調査が中止とな

り、健常人調査に変更となった。

3. 研究の成果

■ 研究 1-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた染色・測定条件の決定

噴霧時間を 0.5 秒または 1 秒、2%ニンヒドリンの溶解液を 70、80、90、100%エタノールで検証したところ、2%ニンヒドリンを 90%エタノールで溶解し、0.5 秒間噴霧した条件で測定可能範囲が広く、最も相関が強かった（表 2）。また、タウリン濃度が高いほど、陰イオン交換膜は濃く染色されていた（図 1）。エタノールの揮発性の特性から、90%エタノールで溶解したニンヒドリン溶液は 100%エタノールで溶解したニンヒドリン溶液と比較し、付着時間が長くなったことで、濃度依存的に陰イオン交換膜を染色することが可能になったと考えられる。80、70%EtOH の場合、乾燥が不十分になり、乾燥の状態が陰イオン交換膜ごとに異なってしまったことが結果に影響を与えた可能性がある。噴霧時間が 1 秒と比較し、0.5 秒と短いことで、陰イオン交換膜周囲への拡散を防ぎ、ハンドヘルド分光器の測定場所である陰イオン交換膜の中心部を染色することができた。1 秒間噴霧した場合はニンヒドリン溶液の吹き付け時間が長くなり、溶液が周囲まで広がってしまい、測定部分である中心部分にニンヒドリン溶液が均一に残らず、染色ムラになってしまったと考えられる。研究 1-1 の結果から、2%ニンヒドリンを 90%エタノールで溶解し、0.5 秒間噴霧した条件に染色条件は決定した。

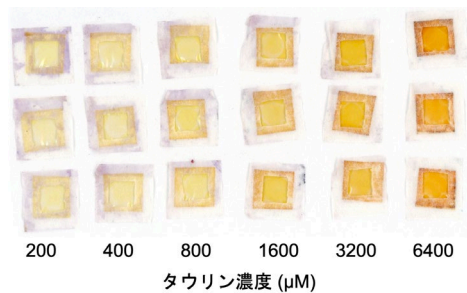


図 1. 染色後の陰イオン交換膜

表 2. 各染色条件の相関係数

染色条件		結果		
1回の 噴霧 時間 (秒)	エタノール濃度 (%)	測定可能な タウリン濃度 (μM)	<i>r</i>	<i>p</i>
0.5	100	400–6400	-0.879	<0.001
0.5	90	400–6400	-0.982	<0.001
0.5	80	1600–6400	-0.975	<0.001
0.5	70	400–6400	-0.947	<0.001
1	100	800–6400	-0.920	<0.001
1	90	800–6400	-0.932	<0.001
1	80	400–6400	-0.976	<0.001
1	70	800–6400	-0.899	<0.001

■ 研究 1-2：画像解析を用いて染色方法や測定方法の結果への影響を確認

2%ニンヒドリンを 90%エタノールで溶解し、0.5 秒間噴霧した条件で染色した陰イオン交換膜のスキャン画像で画像解析を行った。タウリン濃度と輝度の相関係数を確認したところ、相関係数は 0.978 であったことから、相関は強かった（図 2）。健常人のタウリン濃度 400–800 μM の範囲が測定可能範囲に含まれていたことから新しい皮膚タウリン測定法の臨床応用の可能性があると考えられる。しかし、タウリンが均一に吸

着するようスタンダードサンプルは作成したが、噴霧法の影響からわずかに染色ムラが生じていた。ヒトからのサンプルはタウリンの吸着が不均一なため、さらに染色ムラが生じる可能性が高いため、研究 2 以降も画像解析を行うこととした。

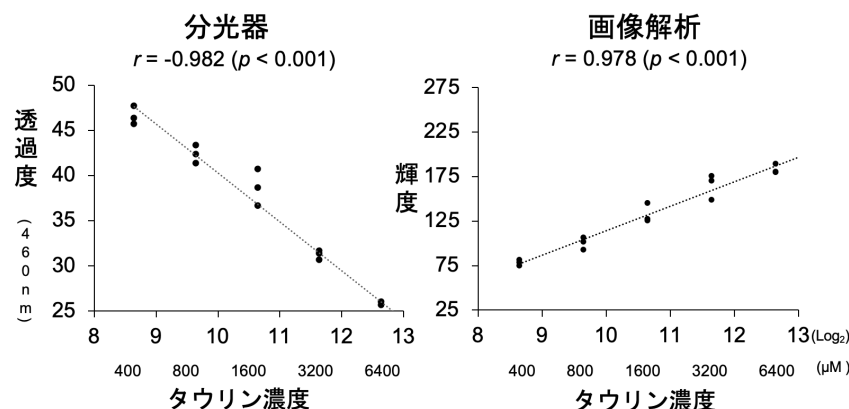


図 2. タウリン濃度と透過度または輝度との相関係数

■ 研究 2：新しい皮膚タウリン測定法の信頼性と従来法との併存妥当性の検証

30 名全員を解析対象とした。対象者の年齢の中央値は 28.5 歳、女性は 73.3%、BMI の平均値は 20.54 kg/m^2 であった。

信頼性の結果

信頼性は分光器の ICC(1,1)は 0.48、画像解析の ICC(1,1)は 0.81 であり、画像解析の方が分光器と比較し、信頼性が高かった。分光器では中央 1 点のみの測定、画像解析では直径 7 mm の面積を測定している。タウリンが均一に吸着されないヒトからのサンプルのタウリンを測定する場合は、広い面積を測定することでより信頼性の高い値が得られることが明らかとなった。

併存妥当性の結果

従来法で算出した標準化タウリンと噴霧法・透過度から算出した標準化タウリンのピアソンの相関係数は 0.53、従来法で算出した標準化タウリンと噴霧法・輝度から算出した標準化タウリンのピアソンの相関係数は 0.609 であった（図 3）。従来法で算出した標準化タウリンと噴霧法・分光器から算出した標準化タウリンのブランドアルトマン分析では 1 点、誤差の許容範囲から外れており、従来法で算出した標準化タウリンと噴霧法・画像解析から算出した標準化タウリンのブランドアルトマン分析では 3 点、誤差の許容範囲から外れていた（図 4）。

従来法と分光器または画像解析との相関は中程度であったが、健常者のみを対象としたため、タウリン濃度の幅が狭かった可能性が考えられる。幅広いタウリン濃度を用いて解析することで、より適切に妥当性を検証することが期待できる。

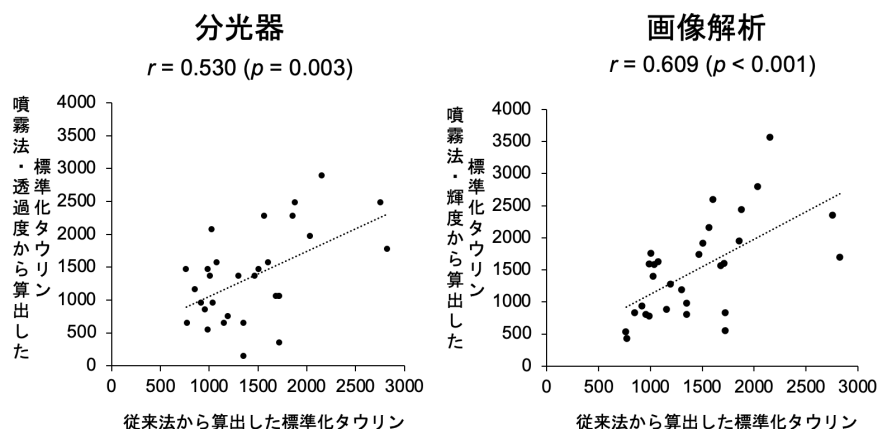


図 3. 従来法と噴霧法・透過度または輝度から算出した標準化タウリンの比較

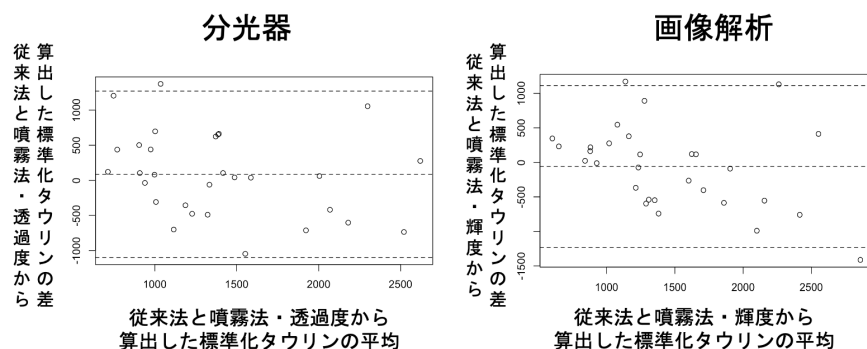


図 4. 従来法と噴霧法・透過度または輝度から算出した標準化タウリンのブランドアルトマン分析

■ 研究 3-1：新しい皮膚タウリン測定法を用いた血清浸透圧との併存妥当性の検証

噴霧の中断があった 2 名、陰イオン交換膜の汚れがあった 1 名を除いた 27 名を解析対象とした。

参加者の年齢の平均値は 34.1 歳、77.8%が女性、BMI の平均値は 21.3 kg/m^2 であった (表 3)。

下剤や利尿剤を使用している参加者はいなかった。参加者の血清浸透圧の平均値 ($\pm$ 標準偏差) は $285 \pm 4.0 \text{ mOsm/L}$ で、脱水の指標となる血清浸透圧 300 mOsm/L を超えている参加者はいなかった。

血清浸透圧と噴霧法・透過度から算出した標準化タウリンの相関係数は、 0.067 - 0.197 (図 5)、血清浸透圧と噴霧法・輝度から算出した標準化タウリンとの相関係数は 0.065 - 0.160 であった (図 6)。

研究 3-1 の結果では、血清浸透圧と標準化タウリンの相関係数が先行研究の相関係数の 0.57 より低かった。さらに、血清浸透圧が 300 mOsm/L 以上の高張性脱水の参加者がいなかったため、新しい皮膚タウリン測定法を用いた標準化タウリンのカットオフ値の算出と感度や特異度といった同定精度を明らかにすることができなかった。今回の研究の参加者の年齢の平均値は 30 歳であり、高張性脱水のリスクが高い人よりも若い年齢層であった。先行研究の参加者は 65 歳以上の高齢者で、血清浸透圧の平均値 ($\pm$ 標準偏差) は $295 \pm 11 \text{ mOsm/L}$ であった。相関係数が低い理由は、参加者の血清浸透圧の範囲が狭かったためと考えられ、妥当性を確認するためには、さらなる研究が必要である。

表 3. 研究 3-1 の参加者属性

変数	平均値 (± 標準偏差) or N (%)
年齢 (歳)	34.1 (± 11.4)
性別 (女性)	21 (77.8)
BMI (kg/m ²)	21.3 (± 2.6)
脱水に関連する症状	
口渇感	7 (25.9)
下痢	3 (11.1)
頭痛	3 (11.1)
倦怠感	2 (7.4)
目眩	0 (0.0)
皮膚ツルゴール > 2 s.	0 (0.0)
末梢血管再充満時間 > 3 s.	0 (0.0)
血液検査	
血清浸透圧 (mOsm/L)	285 (± 4.0)
ナトリウム (mEq/L)	140.7 (± 1.7)
カリウム (mEq/L)	4.4 (± 0.4)
尿素窒素 (mg/dL)	12.6 (± 3.8)
クレアチニン (mg/dL)	0.61 (± 0.1)
ナトリウム/カリウム	32.4 (± 3.3)
尿素窒素/クレアチニン	21.3 (± 7.6)

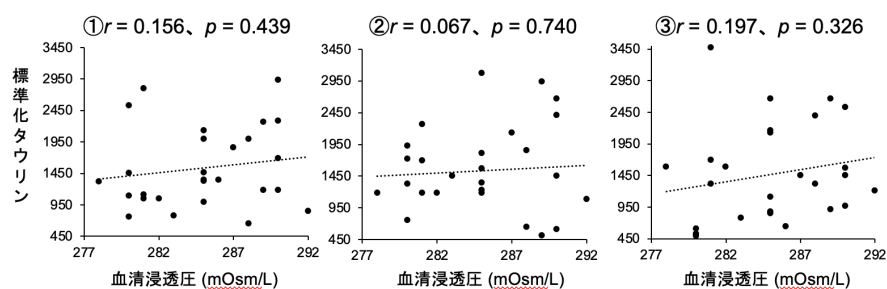


図 5. 貼付位置別の血清浸透圧と噴霧法・透過度から算出した標準化タウリンの相関係数

①手首側に貼付②真ん中に貼付③肘側に貼付

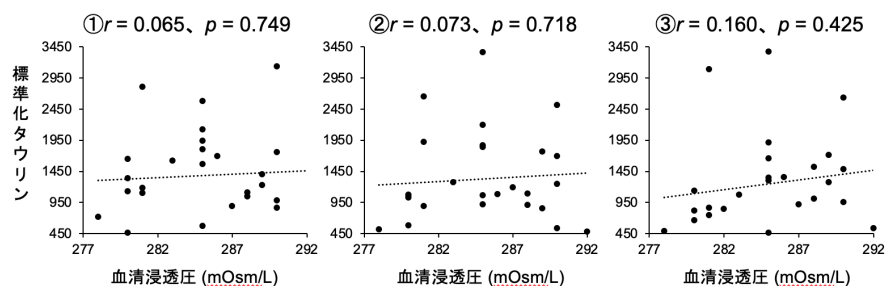


図 6. 貼付位置別の血清浸透圧と噴霧法・透過度から算出した標準化タウリンの相関係数

①手首側に貼付②真ん中に貼付③肘側に貼付

4. 今後の課題

本研究では高張性脱水の対象者を含めることができず、高張性脱水を判別するためのカットオフ値や同定精度を明らかにすることができなかった。今後は、高張性脱水のリスクが高いとされている高齢者や医療を利用している患者などリクルートし、研究を行う必要がある。

今回の研究を経て、ヒトから採取したサンプルを測定する際は画像解析が適していることが明らかとなった。ポイントオブケアテストとして使用するためには、画像撮影・画像解析機能を搭載した染色デバイスや、アプリケーションを搭載したスマートフォンの開発が求められる。そのためにはまずはカットオフ値の決定、画像撮影搭載型噴霧器の開発、アプリケーションの開発が必要である。

5. 研究の成果等の公表予定（学会、雑誌）

■ 学会

Haruka Tsuchiya, Sanai Tomida, Mari Abe, Shiho Higashimura, Takeo Minematsu, Hiromi Sanada, Gojiro Nakagami, Development and evaluation of a rapid taurine concentration measurement method for skin blot examination for early detection of dehydration, 第 26 回 EAFONS2023 発表

■ 雑誌

International Journal of Older People Nursing に投稿予定