

人の皮膚の力学刺激応答と力学物性に関する臨床および単一細胞レベルの研究

| | |
|---------|---|
| 著者 | 川端 崇広 |
| 著者別表示 | KAWABATA Takahiro |
| 雑誌名 | 博士論文本文Full |
| 学位授与番号 | 13301甲第5706号 |
| 学位名 | 博士（融合科学） |
| 学位授与年月日 | 2023-03-22 |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/00069989 |



博士論文

人の皮膚の力学刺激応答と力学物性に関する臨床および単一細胞レベルの研究

北陸先端科学技術大学院大学
金沢大学大学院新学術創成研究科
融合科学共同専攻

| | |
|--------|------------|
| 学籍番号 | 2022012002 |
| 氏名 | 川端崇広 |
| 主任指導教員 | 高橋康史 教授 |
| 指導教員 | 福間剛士 教授 |
| 副指導教員 | 塚原俊文 教授 |
| 副指導教員 | 飯山宏一 教授 |
| 提出年月日 | 令和5年1月 |

目次

| | |
|---|----------|
| 第1章 褥瘡予防研究の序論 | 1 |
| 1.1 除圧の研究背景と本研究の目的 | 1 |
| 1.2.1 予防的スキンケアの課題 | 3 |
| 1.2.2 皮膚保湿の解明に関わる研究と本研究の方法 | 3 |
| 1.2.3 乾燥肌の根本的な治癒のために、弾力のある CE 形成が保湿 を高める CLE を構築する理由 | 5 |
| 1.2.4 AFM を用いた角質細胞の硬さ測定の研究背景と本研究の目的 | 5 |
| 1.3 博士論文に関わる融合科学の観点 | 7 |
| 1.4 博士論文の構成 | 8 |
| | |
| 第2章 側臥位でのマットレス内気圧と接触圧分布の関連性 | |
| 2.1 研究背景と目的 | 10 |
| 2.2 実験方法 | 12 |
| 2.2.1 アクティブエアマットレス | 12 |
| 2.2.2 接触圧力センサー | 12 |
| 2.2.3 測定位置 | 12 |

| | |
|--|----|
| 2.3 測定手順 | 16 |
| 2.3.1 測定プロトコル | 16 |
| 2.3.2 圧力再分布測定 | 17 |
| 2.3.3 倫理的配慮 | 17 |
| 2.3.4 結果 | 20 |
| 2.3.4.1 接触圧の測定サンプル | 20 |
| 2.3.4.2 マットレス内部空気圧による体重変化による 最大接触圧の変化 | 20 |
| 2.3.5 ディスカッション | 25 |
| 2.3.6 結論 | 26 |
| 2.3.7 利益相反 | 26 |
| 2.4 考察実験 | 26 |
| 2.4.1 実験方法 | 26 |
| 2.4.2 能動型エアマットレス | 27 |
| 2.4.3 面圧分布測定センサー | 27 |
| 2.4.4 レーザー距離計 | 29 |
| 2.4.5 沈み込み距離計測の設計 | 30 |
| 2.4.6 接触圧測定と接触面積測定の設計 | 30 |

| | | |
|-------|---------------------|----|
| 2.5 | 測定手順 | 30 |
| 2.5.1 | 測定プロトコル | 30 |
| 2.6 | 圧力再分配機能測定 | 31 |
| 2.6.1 | 評価項目：沈み込み量、包み、最大接触圧 | 31 |
| 2.7 | 倫理的配慮 | 31 |
| 2.8 | 利益相反 | 31 |
| 2.9 | 結果 | 31 |
| 2.9.1 | 沈み込み量 | 31 |
| 2.9.2 | ピーク圧力分布 | 34 |
| 2.9.3 | 考察 | 35 |
| 2.10 | 今後の展望 | 35 |

第3章 人の単一角質細胞の弾性率分布評価手法および湿度制御原子間力顕微鏡

(AFM) の開発および保湿剤の効果の検証

| | | |
|---------|-------------------|----|
| 3.1 | 研究背景と目的 | 36 |
| 3.2 | 大気中における角質細胞の弾性率計測 | 38 |
| 3.2.1.1 | 皮膚角質の研究背景 | 38 |
| 3.2.1.2 | ヘルツ接触 | 41 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.2 | 目的 | 43 |
| 3.2.3 | 方法 | 43 |
| 3.2.4 | 結果と考察 | 45 |
| 3.2.5 | まとめ | 49 |
| 3.3 | 湿度制御原子間力顕微鏡(AFM)の開発と皮膚模倣下での単一角質細胞のヤング率を応用した保湿評価 | |
| 3.3.1 | 研究背景 | 50 |
| 3.3.2 | 研究目的・内容等 | 50 |
| 3.3.3 | 湿度制御可能な AFM の開発 | 51 |
| 3.3.4 | 結果と考察 | 52 |
| 3.3.5 | まとめ | 53 |
| 3.3.6 | 保湿剤成分塗布前後での単一角質細胞のヤング率と湿度依存の検証 | 54 |
| 3.3.6.1 | 目的 | 54 |
| 3.3.6.2 | 単一角質細胞への保湿剤の塗布と除去の方法の検討 | 54 |
| 3.3.6.3 | 単一角質細胞への保湿剤の塗布方法 | 55 |
| 3.3.6.4 | 結果と考察 | 56 |
| 3.3.6.5 | まとめ | 59 |

| | |
|-----------------------------|----|
| 3.3.7 異なるサイズのビーズによる押し込み量の比較 | 59 |
| 3.3.7.1 目的 | 59 |
| 3.3.7.2 方法 | 59 |
| 3.3.7.3 結果と考察 | 60 |
| 3.4 本章のまとめ | 62 |
| 4章 結論 | |
| 4.1 2章で得られた知見 | 64 |
| 4.2 3章で得られた知見 | 64 |
| 5章 結論と展望 | 65 |
| 5.1 考察 | 65 |
| 5.2 今後の展望 | 66 |
| 参考文献 | 67 |
| 謝辞 | 72 |

第 1 章 褥瘡予防研究の序論

褥瘡予防は、身体とマットレスの接触圧（外力）を取り除く除圧および予防的スキンケアと栄養から成る。除圧は、クッションや体圧分散寝具を用いて外力を取り除くことで、体圧分散用具の使用と同時に、看護学では 2 時間おきの体位変換の実施が基本である。予防的スキンケアは、褥瘡好発部位、例えば、仰臥位で仙骨部、側臥位で大転子部、座位で座骨結節部で、寝たきり高齢者の方のオムツ内での排泄物の付着と乾燥を防ぐために、清潔にして、保湿することである。栄養は、たんぱくおよびエネルギー、ビタミンやミネラルを摂取することで身体内部から自然治癒力を高めることである。

本博士論文は、褥瘡予防に関わる除圧と予防的スキンケアについて研究した内容をまとめた。

1.1 除圧の研究背景と本研究の目的

褥瘡は、「身体に加わった外力は骨と皮膚表層の間の軟部組織の血流を低下、あるいは停止させることであり、この状況が一定時間持続すると組織は不可逆的な阻血性障害に陥り褥瘡となる」と褥瘡学会では定義されている⁽¹⁾。褥瘡の発生を予防するには、①外力の大きさを減少させる、②外力の持続時間を短縮することが原則である⁽²⁾。具体的には、ポジショニング、クッションまたはマットレス選択、体位変換である。体圧分散用具について、NPUAP(National Pressure Ulcer Advisory Panel)の作業部会 support surface standard initiative で、support surface とは、組織への外力を管理するための圧再分配、寝床内環境調整、その他の機能を特別に設計された用具である⁽²⁾と述べている。体圧分散用具の 1 つに、能動型エアマットレスが分類される。能動型エアマットレスは、“沈める”、“包む”、“経時的な接触部分の変化”の圧再分配機能を利用する体圧分散用具である⁽²⁾。日本褥瘡学会の実態調査委員会の報告⁽³⁾によると、体圧分散用具で、臨床現場で多用されているのが、エアマットレスである。

圧再分配とは、身体と体圧分散用具の接触領域に加わる圧を、次の 3 つの機能によって分配し、1 点に加わる圧を低くすることである。“沈める”とは⁽²⁾、身体を体圧分散用

具内に沈める機能を指す。沈むことによって、ある特定の骨突出部位に集中していた圧を、他の領域に分配する。沈み込みが大きいほど接触面積がより拡大し、圧が分散することで接触圧が低くなる。沈み込み機能は、体圧分散用具を構成する素材の圧縮特性と寸法（厚み）に関連する⁽⁴⁾。“包む”とは⁽²⁾、骨突出部など身体の凹凸に対する体圧分散用具の変形能を指す。須釜⁽⁴⁾は、「変形することで身体と体圧分散用具との接触面積を拡大させることができる。素材が水や空気などの流動体であると、変形能が優れている。」ことを説明している。“経時的な接触部分の変化”とは⁽²⁾、接触領域が時間に従い変化する概念である。エアマットレスが、周期的に膨張と収縮を繰り返すことで接触部分が変化する⁽⁴⁾。

マット内圧とは、エアセルが膨張収縮を繰り返してエアセルにエアが注入されるときのポンプ内の圧力のことである。適正内圧の設定が重要であり、エアマットレスの製品で基準値が様々である。適正内圧とは、最大体圧を最も低値に保ち、体圧分散機能が最適な状態を保つ内圧と操作上の定義と定める。

マット内圧の先行研究には次のような報告がされている。真田ら⁽⁵⁾（1995）は、セル式圧切替型マットレスを使用して、健康人で比較して仰臥位、側臥位の姿勢時で、マット内圧と最大体圧の関係性について準実験研究を行った。また、Sasaki et al.⁽⁶⁾（2012）は、試作エアマットレスを使用して、マット内圧と体圧の関係性について調べた。仙骨部体圧を測定することで、セルのマット内圧のカットオフ点（底つき）を調べ、マット内圧が高いと体圧が高く、カットオフ点を超え、マット内圧が低い場合も体圧が高くなること、及び、体圧とマット内圧の関係性がU曲線を形成することを示唆した。しかし、臨床環境では、マット内圧の設定は、体重値やマットレスの硬さで設定されていることが多い。硬さでマット内圧を決めている場合、硬さの種類には、硬い、普通、柔らかいと区別される。臨床では、硬さは普通のマットレスが使用されていることが多い。マット内圧の設定の仕方に基準がないことが臨床上的の問題である。

近年、45 度に頭側挙上すると、姿勢によってマット内圧が変わることがわかってきたことで、上半身の体重が臀部に圧が集中するので、マット内圧を上げて体圧管理している⁽⁷⁾。側臥位は仰臥位に比べて接触面積が狭く最大体圧値が高くなる。しかし、側臥位に関しては、仰臥位と同じマット内圧のまま使用しているのが実際である。本研究では、仰臥位及び 90 度側臥位におけるエアマットレスのマット内圧の違いによる体圧分散機能の変化を調べることで、仰臥位から 90 度側臥位へ姿勢を変更したときの側臥位のマット内圧の管理について調べることを研究目的とする。

マット内圧と体圧分散機能の関連性について新たな知見を得ることで、寝たきり高齢者の褥瘡予防のためのエアマットレスのマット内圧設定について新しい基準を示唆することができる。日本褥瘡学会のガイドラインに追加事項としてコンセンサスが得られれば、褥瘡ケアとして有益である。

1.2.1 予防的スキンケアの課題

Aoki et al.⁽⁸⁾は、スキンケアの課題について、次のことを述べている。

「保湿剤を使った乾燥肌ケアの効果はすでに実証されている。乾燥肌の症状を軽減するには、保湿剤の使用⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾と標準化されたスキンケアレジメン⁽¹⁵⁾とが効果的である。1日2回のスキンケアにより、皮膚の裂傷（スキン-テア）の発生率が低下する⁽¹⁶⁾。しかし、それでも改善しない乾燥肌の人がいる。臨床現場では、スキンケア介入とスキンケア製品の選択はエビデンスに基づいていない⁽¹⁷⁾。保湿の頻度と毎日適用する保湿剤の量に関して利用可能な証拠がない。」

スキンケア製品で使用されている保湿剤の主流が、セラミド配合である。Aoki et al.⁽⁸⁾は、ラットの皮膚に塗布したセラミドの保湿剤が角質層で保持されるかを報告した。Aoki et al.は、塗布したセラミドの保湿剤は、時間の経過に伴い、真皮層に浸透することを考察の中で述べている。

上記を踏まえて、予防的スキンケアの課題は、2点である。第一に、スキンケアの実施回数や塗布量にエビデンスが無い。第二に、臨床で使用されている保湿剤はセラミド配合の細胞間脂質に作用するものが主流であるが故に、乾燥肌の根本的な治癒に至らないのでケアの継続が必須になる。

1.2.2 皮膚保湿の解明に関わる研究と本研究の方法

1.2.1の最後に、細胞間脂質に作用する保湿剤では、乾燥肌の根本的な治癒に至らないことを述べた。乾燥肌の根本的な治癒を実現するためには、皮膚保湿機構の解明が必要である。しかしながら、皮膚保湿機構の議論の是非について、昨今でも正しい理解には至っていない。次のような議論が展開されている。

保湿剤は人の皮膚の水分を維持し、肌を柔らかく、みずみずしい状態に維持する効果があり、化粧品や乾燥肌の対策のために利用されている。保湿剤は、角質細胞の内部に入り込んでケラチン繊維の配向を整え、ケラチン間の水分を維持する働きがあるとする説がある一方で、細胞間脂質に入り込んで細胞外の水分を維持する働きが主なもので細

胞内への効果はほとんどないとする説もある。このような仮説を検証し、保湿機構を解明することは、保湿剤の効果を向上させるために極めて重要である。

次に、私が、皮膚角質層 (stratum corneum: SC)の保湿機構解明の着眼点について、先行研究による根拠を示しながら本研究の方法について議論を展開する。私が考える“乾燥肌の根本的な治癒“のための予防的スキンケアは、角質細胞内部に保湿因子を補充することが最適な方法である。“乾燥肌の根本的な治癒“を実現するためには、角質細胞の CE(Cornified Envelope:角化エンベロープ)の硬さを検証することで角質細胞だけでなく細胞間脂質の保湿機構までも将来展望として考察できると考えている。近年では、試料表面計測は、液中計測や低真空中観察も可能となってきたが、それでも、試料や液膜の厚さの制限や、電子線が試料表面に与えるダメージの問題は存在する。一方で、走査型プローブ顕微鏡 (SPM: Scanning probe microscopy) の一種である原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic force microscopy) ⁽¹⁸⁾は、近年の飛躍的な装置改良により、電子顕微鏡による真空中だけではなく大気中・液中など、様々な環境下で原子分解能観察が可能となった。また、試料表面の形状測定だけではなく、試料表面の様々な物理量 (電位・エネルギー・弾性・磁性等) の情報も計測できるため、AFM の応用分野は多岐にわたるために、単一角質細胞の硬さ測定には、AFM を採用した。“乾燥肌の根本的な治癒“を実現するためには、角質細胞の CE の硬さを検証することの重要性について以下で、述べていく。

T.KUNII et al.⁽¹⁹⁾は、次のことを述べている。「CE(角化エンベロープ)の外側の角化脂質エンベロープ (Cornified Lipid Envelop: CLE)は、脂質が豊富な細胞間マトリックスが層状構造に組織化されるテンプレートを形成すると仮定される。」 Takeshi Matsui and Masayuki Amagai⁽²⁰⁾は、次のことを報告している。「ケラチノサイトが角化して角質層の形成プロセス、角質細胞の分化が成熟すればCEが頑丈となる。CEの頑丈さが、脂質エンベロープとタンパク質との架橋に寄与している。角質細胞内のケラチンネットワークや NMF(天然保湿因子)の産生について言及している。また、角質細胞の落屑について、接着分子であるデスモソームが分解されることで、成熟した角質細胞が角質層から剥がれる現象であることを説明している。」 Hyun Kyung Choi et al.⁽²¹⁾⁽²²⁾は、「フィトスフィンゴシンが、フィラグリン代謝経路を調節することによって皮膚保湿効果を有することを示し、角質細胞エンベロープと NMF の協調形成に不可欠な役割であることが示唆された」ことを報告した。

1.2.3 乾燥肌の根本的な治癒のために、弾力のある CE 形成が保湿を高める CLE を構築する理由

CE と CLE の合成について、次に説明する。

成熟した角質細胞の硬さは、角質細胞の機械的強度 CD(Corneodesmosome: コルネオデスモソーム)と SC の機械的抵抗 CE に寄与する他の 2 つの成分を考慮する必要がある⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾。簡単に言えば、角化プロセスは、ケラチノサイトの原形質膜の下の未熟な CE の合成から始まる。

角化エンベロップ (CE) は、特定の前駆体タンパク質(インボルクリン、ロリクリン、およびプロリンリッチタンパク質など)の共有結合によって成熟し、非常に硬い構造を生成する⁽²⁶⁾。トランスグルタミナーゼ活性は、エンベロップを強化する γ - γ -グルタミル- ϵ -リジンイソペプチド結合を介したタンパク質の架橋を可能にする⁽²⁷⁾。一部の著者は、CE の組成は可変であり、トランスグルタミナーゼに利用可能な基質の種類に依存することを観察しており⁽²⁸⁾、CE 成熟の後半に CD タンパク質が組み込まれる可能性を検討している著者もいる⁽²²⁾。さらに、CE の成熟は、セラミド、脂肪酸などがインボルクリンおよびロリクリンに共有結合することで完成して、疎水性コーティングを形成する⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾。これらの結合脂質は CLE と呼ばれ、SC の細胞間脂質の足場であると考えられており⁽³¹⁾⁽³²⁾⁽³³⁾、この最上層の可塑性をさらに安定化および促進する。

さらに、CE の成熟は SC における角質細胞の動きに追随し、多くの著者が顕微鏡と免疫染色技術を用いて成熟した CE と未成熟の CE を区別しようと試みてきた。異なる SC 深さからの CE は、Nomarski コントラスト顕微鏡によって最初に観察され、「壊れやすい」と「弾力性のある」という 2 つの異なる CE 集団を同定することができた⁽²⁸⁾。これらの 2 つの成熟状態は、SC の最も表層に見られるが、脆弱な CE の量は正常な皮膚では少なく、乾燥肌では上昇する⁽³⁴⁾。炎症性皮膚疾患の場合の回復力のある CE と脆弱な CE の比率は、乾癬とアトピー性皮膚炎で減少することがわかっている⁽³⁵⁾。

成熟した角質細胞は、マトリックスを構成するケラチン束のタイプだけでなく、CE で発生する架橋のために硬くなることについて、CE の成熟が角質細胞の硬さと密接に関連する⁽²⁹⁾⁽³²⁾。すなわち、頑丈な CE は、角質細胞の内部と CLE の頑丈さは関連する。

1.2.4 AFM を用いた角質細胞の硬さ測定の研究背景と本研究の目的

はじめに、AFM を用いた角質計測の先行研究を以下で紹介する。次に、単一角質細

胞の硬さ測定の課題について議論する。

角質細胞は他の細胞型に比べて硬い細胞であり、例えば、筋細胞や線維芽細胞のヤング率は典型的には数 kPa であるのに対し、角質細胞の弾性率は数百 MPa 程度と報告されている⁽³⁶⁾。さらに、これらの皮膚細胞には、角質細胞エンベロープ(100~250 MPa)とケラチンマトリックス(250~500 MPa)の2つの異なる機械的領域がある⁽³⁶⁾。

さらに、単一細胞の機械的特性を理解することは、皮膚の機械的抵抗、完全性の維持、および損傷プロセスの根底にある現象を描写するのに役立つ。角質細胞は容易に折りたたまれることが観察されたが、伸長力に強く抵抗し⁽³⁷⁾、ヤング率は約 0.45GPa と計算された。その後、マイクロマニピュレーション技術を使用して、CE を圧縮するために必要な力に基づいて、正常な皮膚で角質細胞の弾力性(833 ± 431 μN)と脆弱な CE(135 ± 32 μN)⁽³⁸⁾が特定された。乾燥肌では壊れやすい CE と弾力性のある CE の比率が高くなった。

最近では、角質細胞の機械的特性は、主に AFM を使用して押し込み荷重曲線を測定し、接触力学モデル(Hertz-Sneddon、DMT、JKR⁽³⁹⁾)を適用してヤング率を求めることで、単一角質細胞の硬さを議論している。次に、単一角質細胞の硬さ測定の課題について、先行研究を示しながら議論する。

角質細胞について決定されたヤング率には大きなばらつきがあり、1.34 MPa から 0.4 GPa まで⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾である。AFM の力分光法モードでは、接触力学モデルとプローブの形状が結果に大きく影響するように、方法の優れた制御とデータの厳密な分析が必要である。Milani P et.al.⁽⁴³⁾による研究は、ヘルツモデルをくぼみの関数として力の間隔に適用することにより、さまざまな深さの見かけのヤング率を計算した。考慮すべきもう一つの重要な点は、カンチレバーの剛性である。カンチレバーの剛性が、サンプルよりも柔らかい場合、測定された剛性は主にプローブの剛性になる。このような根拠から、細胞計測では、AFM のカンチレバーの探針に、コロイダル探針が汎用されている。例えば、ピラミッド型および円錐形のプローブは、公称半径が通常割り当てられる小さなくぼみの球または回転放物面と見なすことができる。ただし、小さなくぼみの場合、プローブは、くぼみの深さに依存する半角を持つ円錐またはピラミッドとして扱うことができる。考慮すべきもう一つの重要な点は、カンチレバーの剛性である。それがサンプルよりも柔らかい場合、測定された剛性は主にプローブの剛性になる。Milani P et.al.⁽⁴³⁾による研究は、ヘルツモデルをくぼみの関数として力の間隔に適用することにより、さまざまな深さの見かけのヤング率を計算した。ピラミッド型プローブと 2.5 N/m の剛

性カンチレバーを使用して、3つの異なる SC 深さ(第 1、第 7、および第 14 テープストリップ)からのセルの剛性を測定した。第 1 ストリップについては、CE で約 250 MPa、ケラチン束で 300~520 MPa の見かけの弾性率が計算され、SC のより深い細胞については、CE で約 150 MPa、ケラチンマトリックスで約 250~300 MPa のモジュラスが計算された。ほとんどの著者はテープストリッピング法を使用して細胞を収集するが、AFM 力曲線のコンプライアンスに対するテープの影響はまだ説明されていない。さらに、Richter et.al⁽⁴⁴⁾は、細胞をシリコン基板にしっかりと付着させるシラン化技術を使用して、AFM タッピングモードによる角質細胞の腫脹を研究した。

上記の先行研究から、AFM を用いた単一角質細胞のヤング率計測の方法に関する課題は、2点である。1点目は、AFM 計測におけるサンプリング作製の課題である。テープに接着した角質細胞を AFM で計測して得られたヤング率は大きく誤差を含むため、テープストッピングにより採取された角質細胞のサンプルから単離して、別のガラス基板に角質細胞を移すための方法を見出すことが必要である。2点目は、単一角質細胞のヤング率導出には、ヤング率分布マップから得られたヒストグラムをガウスフッティングするときシングルピークフッティングでは誤差が大きいため、マルチピークフッティングが必要である。その根拠は、次による。角質細胞の基底側に数百ナノメートルの小さな円形突起 (Circular Nano-Object 円形ナノオブジェクト: CNO) が観察される⁽⁴⁵⁾。CNO で覆われているために、角質細胞の構造の分布は均質ではない (Franz et.al.⁽⁴⁶⁾)。

本博士論文の 4 章は、はじめに、人の皮膚から採取した角質細胞の硬さを AFM により測定する方法を議論する。AFM を用いた角質細胞の硬さ測定の方法が確立した後は、皮膚の実環境下を模倣した実験環境の中で作製することが重要である。皮膚は、周囲の湿度や温度の変化によって、角質細胞の硬さは変化する。次に、AFM のサンプル設置場所に湿度制御機構を開発する。角質細胞の硬さは周囲の湿度に大きく依存するため、周囲の湿度を 30~90 %の範囲で変化させながら、それに対する応答 (ヤング率) を測定する。湿度応答性が、保湿剤の適用前後でどのように変化するかを調査する。これにより、保湿剤が単一角質細胞に与える効果を明らかにする。

1.3 博士論文に関わる融合科学の観点

私の博士論文は、除圧と単一角質細胞の保湿の内容で構成される。博士論文の課題は、以下の 4 点から構成される。この 4 点の課題は、従来の看護学の手法では解決できない内容で、融合科学の手法を用いることで成し遂げることができた。

1. エアマットレスのマット内圧の違いによる体圧分散機能の変化を調べる。
2. AFM を用いた単一角質細胞のヤング率計測の方法を確立する。
3. 湿度制御 AFM の開発。
4. 湿度制御 AFM を用いて角質細胞の湿度を変えた時の保湿剤の効果を調べる。

課題 1 の融合科学の観点について述べる。課題 1 では、従来の看護学の研究手法では、2 章で展開した体圧（接触圧）を点圧計測計の携帯型接触圧力測定器で計測することでしか議論できなかった。そこで、Tissue viability society⁽⁴⁷⁾が提唱している圧再分配の考えを体圧分散測定に導入した。圧再分配は、沈む、包む、経時的な接触領域の変化の概念からなる⁽⁴⁷⁾。身体がエアマットレスに沈む量を、レーザー計測器を用いた。また、包む、および経時的な接触領域の変化量を、面圧分布測定センサーを用いて取得したデータ解析により考察した。3 章の臀部モデルを用いた体圧分散の議論は、看護理工学手法を用いた融合科学である。

課題 2 は、ヤング率解析のソフトにマルチピークフィッティングのプログラムを導入した。課題 3 は、皮膚環境下を模倣するために湿度制御機構を AFM に搭載した。そのため、密閉空間の作製、乾燥空気のフロー調節機構、温度と相対湿度のモニタリングを開発した。課題 4 は、単一角質細胞の湿度を低湿度（20 %）～高湿度（90 %）の範囲で、保湿剤を塗布した前後のヤング率を比較することで保湿剤の効果を調べた。単一角質細胞のマイクロオーダー領域のヤング率分布を解析することで考察した。つまり、課題 2～4 は、ナノ計測工学手法を用いた融合科学である。

1.4 博士論文の構成

本博士論文の構成は、以下のとおりである。

- 1章 序論：褥瘡予防の課題と融合科学の観点について述べる
- 2章 各論：健康人を対象として、エアマットレス上で仰臥位から側臥位に体位変換した時の最大接触圧を最大限抑制するマット内圧を調べた。
- 3章 各論：(1) AFM を用いた単一角質細胞のヤング率計測の方法を開発した。
：(2) 湿度制御 AFM を開発した。
：(3) 湿度制御 AFM を用いて高湿度から低湿度と湿度を変化させた時の単一角質細胞に保湿剤塗布したときの効果をヤング率で比較検討した。

4章 考察：序論の目的を踏まえた博士論文の考察を述べる。

5章 結論と展望

：博士論文を融合科学の観点から結論を述べる。最後に、将来展望を述べる。

第2章 側臥位でのマットレス内気圧と接触圧分布の関連性

2.1 研究背景と目的

原則として、褥瘡の発症を防ぐには外力の大きさを減らすこと、及び外力の持続時間の短縮の2つの方法がある⁽²⁾。サポートサーフェスは、組織への外力、ベッド環境の調整、およびその他の機能を制御するための圧力再分配用に特別に設計されたデバイスである^{**}。アクティブエアマットレスは、サポートサーフェスとして分類される。アクティブエアマットレスは、「沈む」、「包む」、および「時間の経過に伴う接触領域の変化」を通じて圧力の再分配を提供できる。圧力再分配の「時間の経過に伴う接触領域の変化」の機能は、マットレスの内部空気圧に大きく影響されます。マットレスの内部空気圧は、エアセルが繰り返し膨張および収縮して空気を注入するときのポンプ内の圧力である。そのため、適切なマットレスの内部空気圧を設定する必要があり、アクティブエアマットレス製品にはさまざまな基準値が設定されている。適切なマットレスの内部空気圧は、最大接触力を最小値に維持し、接触圧分布を最適な状態に維持するために必要なポンプ圧力として操作上で定義される。

Sanada et al.⁽⁵⁾は、セルタイプの圧力切り替えマットレスを使用して、マットレスの内部空気圧と、健康な個人の仰臥位および側臥位での最大接触力との関連性に関する準実験的研究を実施した。Sasaki et al.⁽⁶⁾は、また、プロトタイプのエアマットレスの内部空気圧と接触圧の関連性を評価した。仙骨部接触圧の測定に基づいて、内部空気圧が高い、または低いときに接触圧が高く、接触圧対内部空気圧プロットがU曲線を形成していることを報告した。別の研究^{**}では、頭部を45°に上げると、姿勢に応じて内部空気圧が変化することが示されている。頭部を上げると上半身の体重が臀部を中心に重くなり、内部空気圧が上昇して接触圧を制御した。ただし、側臥位は仰臥位よりも接触面積が小さく、最大接触圧が高くなる。Matsuo et al.⁽⁴⁸⁾による研究結果は、側臥位での最大接触圧が仰臥位での最大接触圧の約2倍であることを示した。現在、臨床現場で接触圧を制御するための追加の操作は実行されていない。これは、仰臥位と同じ内部空気圧にも関わらず、側臥位で褥瘡を発症するリスクが高いため、臨床上の問題である。

この研究は、アクティブエアマットレスの内部空気圧変化中の接触圧力変化と、褥瘡を防ぐために側臥位での高い接触圧を低減する効果を明らかにすることを目的として

いる。この目的のために、仰臥位の仙骨部と側臥位での左腸骨稜部、および左大転子部の接触圧を、さまざまな高い内部空気圧で 10 人の健康な成人に対してエアマットレスで測定した。さらに、アクティブエアマットレスの動作中の接触圧力の変化、および接触圧力と体重およびマットレスの内部空気圧との関連性が調査された。

本研究で得られた知見を考察する上で、Tissue Viability Society のコンセンサスドキュメント⁽⁴⁷⁾で提唱している圧再分配の「沈む」、「包む」、「経時的な接触領域の変化」で検討した。「沈み込みの定量化」では、Yuko Yamamoto et al.⁽⁴⁹⁾の先行研究に着眼した。Yamamoto et al.⁽⁴⁹⁾(2011)は、16 個の独立制御のエアセルから構成された Fitting Layer (Fitting Mode) を有するエアマットレスの沈み込み量を計測するのに、床から 1993 mm の上空にレーザ計測器(Leica DISTO™ lite5; Leica Geosystems AG, Switzerland)を設置して、沈み込み量を定量化した。この Yamamoto et al.⁽⁴⁹⁾(2011)の先行研究により圧再分配機能の沈み込みについて定量的に調査可能となった。本研究の知見を考察する実験では、Yamamoto et al.⁽⁴⁹⁾(2011)の先行研究で採用されたレーザ計測器を参考にして DISTO X310 (Leica)を用いて、沈み込み量を定量化した。補足として、他のレーザ計測器を採用した先行研究としては、Yuki Ogawa et al.⁽⁵⁰⁾が挙げられる。Ogawa et al.⁽⁵⁰⁾(2015)の研究では、ベッドの足側と頭側にレーザスキャナーを設置して人の臥床時の沈み込みを定量化した。複数の先行研究でもレーザ計測器を用いて沈み込み量を計測していることから、レーザ計測器による沈み込みの定量化は科学的合理性を有する。「包むの定量化」では、Junko Matsuo et al.⁽⁵⁰⁾の先行研究で、圧力マッピングシステム (CONFORMat® system; NITTA Corp., Osaka, Japan) を使用して臀部モデルを用いて接触圧と接触面積を測定して、マットレス内圧との関係性について調べた。Matsuo et al.⁽⁴⁸⁾(2011)は、低いマットレス内圧の時に接触面積が大きく、最大接触圧は低いことを、一方で、高いマットレス内圧の時に接触面積が小さく、最大接触圧は大きいことを示唆した。「包むの定量化」については、Matsuo et al.⁽⁴⁸⁾の先行研究で示唆されているので、本研究の得られた知見の考察する実験では「包むの可視化」のために、体圧分布測定装置(BIG-MAT, NITTA)を採用した。

「接触部分の経時的な変化量」は、本研究で得られた知見の考察する実験では、最大接触圧の経時変化から検討した。Junko Matsuo et al.⁽⁴⁸⁾の先行研究では、成人女性の樹脂製骨盤モデルを用いて、二層式交圧式エアマットレス (トライセル®、Cape Ltd.、横浜、日本) 上での接触面積および最大接触圧の経時変化を検討することで報告している。

上記の研究背景を踏まえて、金属平板をエアマットレスに載せた時の圧再分配の3機能を評価することで、マット内圧を変化させたときの側臥位の体圧分散について考察に必要な実験も順次実施した。

2.2 実験方法

この研究は準実験的であり、参加者は健康な男性だった。

2.2.1 アクティブエアマットレス

この研究で使用したエアマットレスは、84×191×10 cmの完全独立2層式エアマットレス（8 cm幅で、1サイクルあたり10分間の膨張と5分間の収縮を繰り返し、3つのセルで1つのユニットで形成され24個のエアセルの構成）であるAir Master Tri-cell E (Cape Co., Ltd., Yokosuka, Japan) (図 2-1)。3つのセルのうち2つは常に膨らみ、体を支える。セル膨張のための高い内部空気圧は、5kg刻みで20から90kgまでの体重値として割り当てられる。ハンモック現象を除外するためにカバーやシートは使用されていない。代わりに、健康な被験者はアクティブエアマットレスのセルに直接、臥床された。

圧力センサーを圧力コントローラーからチューブの1つに接続して内部空気圧を測定し、その結果を表 2-1 に示す。体重設定は5 kg刻みで20~90 kgですが、マットレス内部空気圧は設定体重に比例して変化しない。したがって、膨張時と収縮時の内部空気圧をそれぞれ高い内部空気圧と低い内部空気圧と仮定する。

2.2.2 接触圧力センサー

携帯圧力測定機器 (Palm Q 7 ; Cape Co., Ltd., Yokosuka, Japan) (図 2-2) を使用して、仰臥位での仙骨部接触圧、及び左側臥位での左腸骨稜部接触圧、左大転子部接触圧を測定した。この機器は、正方形のパッド上に直径3 cmの5つのセンサーで構成されている。センサー1は、中央に配置され、他の4つのセンサーは中央のセンサーの周囲に配置されている。外側のセンサー間の距離は10 cmだった。このセンサーは、0~200 mmHgの範囲の圧力を測定できる。

2.2.3 測定位置

標準の仰臥位は、腹部に手を折りたたみ、両脚の間を10 cmの間隔を空けて

外転とした。図 2-3 は、外転枕を上肢に配置して固定した仰臥位の概要図を示している。仰臥位では、左右の腸骨稜、仙骨、脊柱を結ぶ線が互いに直交するように携帯型圧力センサーを固定した（センサー1：仙骨部、センサー5：3 時方向）。左側臥位での測定位置は、図 2-4 に示すように定義された。仙骨部と大転子部（センサー1）がセルの水平面の中心に配置された位置をマークすることにより、再現性が担保された。

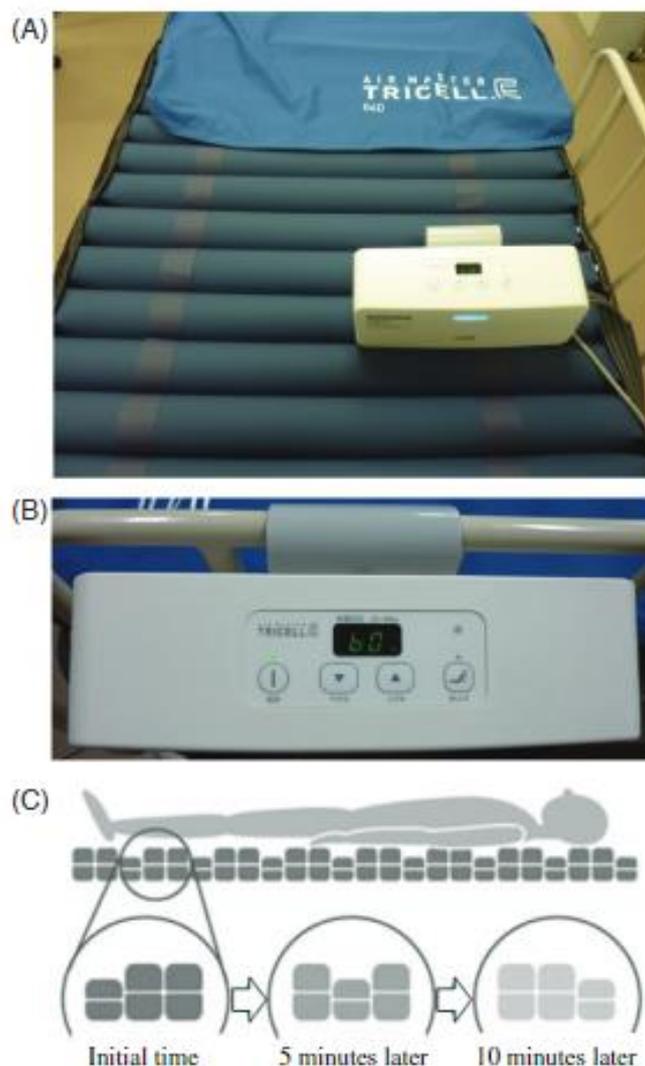


図 2-1 エアーマスタートライセル E (図 1A) と付属ポンプ (図 1B) のイメージ図。エアーマスタートライセル E は、褥瘡予防のためのエアマットレスである。完全独立型の 2 層式エアセル 24 個と電子制御ポンプで構成され、背上げ時の底付きに対応する「背上げサポート機能」も備えている。重量は 20 kg から 90 kg まで 5 kg 刻みで設定可能である。図 2-1C の引用元 URL は "<https://www.cape.co.jp/products/pdt004>" である。

表 2-1 体重設定に応じた内部空気圧

| Body weight setting (kg) | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 |
|------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| High internal air pressure (mm Hg) | 16 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 22 | 23 | 23 | 24 | 24 | 25 |
| Low internal air pressure (mm Hg) | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

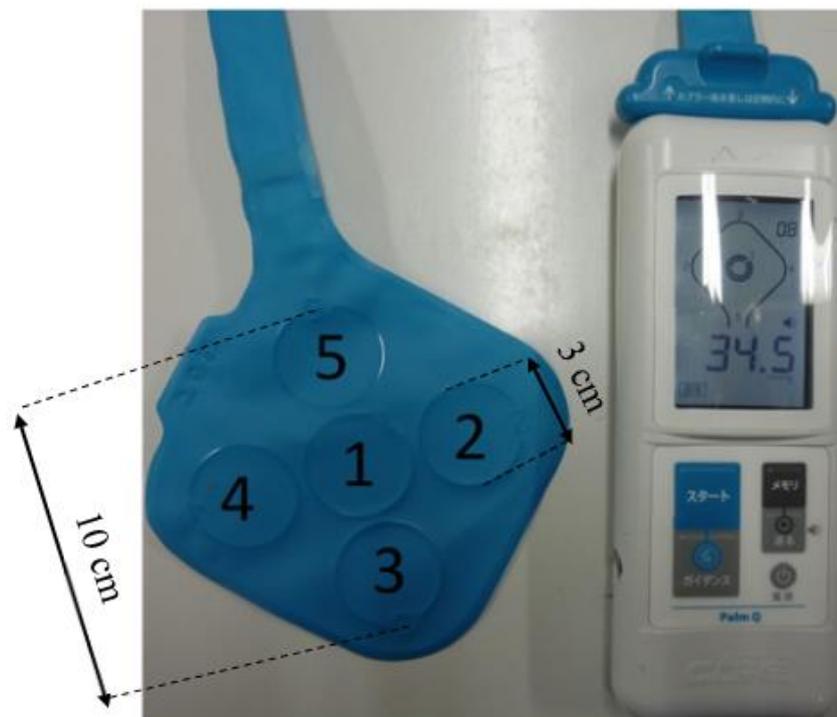


図 2-2 パーム Q のイメージ図 1~5 点を任意に選択し、連続的に面圧を測定することができる。成人の仙骨の平均的な大きさを考慮すると、パッドの測定範囲は 10 cm である。本装置は、正方形のパッドに直径 3 cm のセンサーを 5 つ配置したものである。センサー 1 は中央に配置し、他の 4 つのセンサーは中央のセンサーの周囲に配置する。このセンサーは 0~200 mmHg の範囲の圧力を測定することができる。

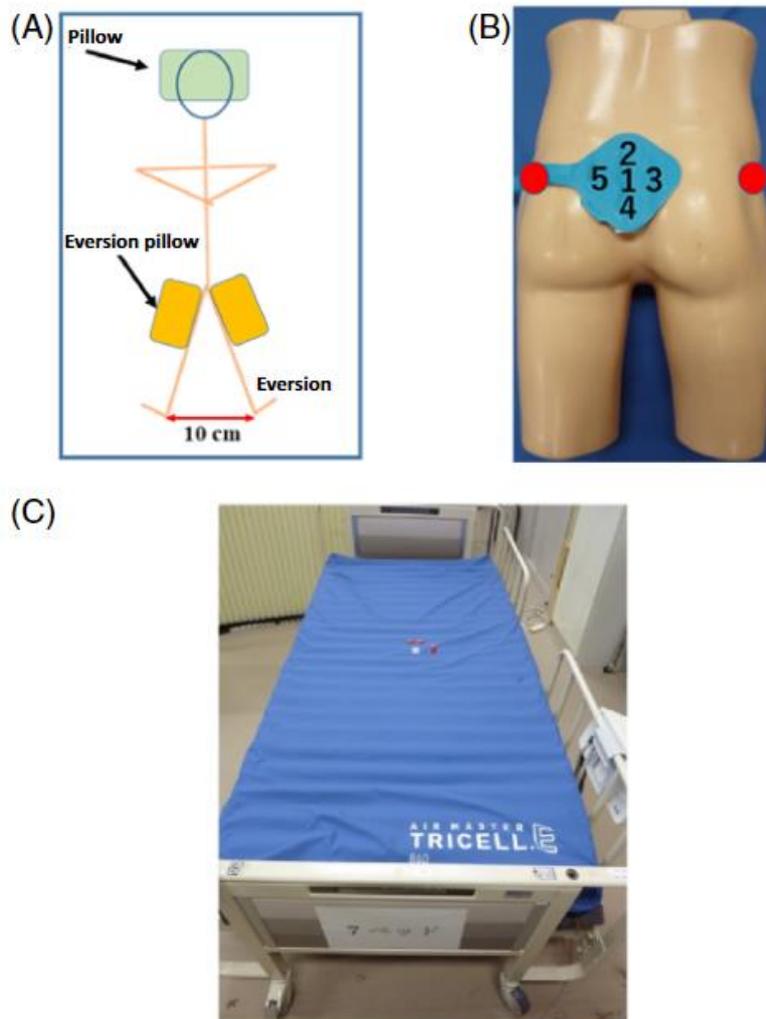


図 2-3 仰臥位 (A) と部位 (B) の測定、および測定結果の再現のためにエアマットレスにマーキングテープを貼る (C)。A, 仰臥位での測定。仰臥位とは、仰向けに寝て、外転脚の間を 10 cm にし、両手を腹部で組んだ状態をいう。上肢の上に倒立枕を置き、固定した。実際の計測では、センサパッドを計測部位に固定した。B, 仰臥位にて、左右の腸骨稜、仙骨、脊柱を結ぶ線が直交するように携帯型インターフェース圧機器を固定 (センサー1: 仙骨部、センサー5: 3 時方向)。C, 仙骨部および大転子部の測定部位の再現性を確保するため、エアマットレスの中央にマーキングテープを設置した。

2.3 測定手順

2.3.1 測定プロトコル

参加者の特徴を表 2-2 に示す。研究者は、手順が実行される 1 日前に参加者に手順を説明した。参加者は性別と年齢を確認し、測定された体重と身長に基づいて、ボディマス指数 (BMI) を計算した。疾患の有無に関する情報は事前に入手した。エアマットレスは膨らませたままにし、実験室の温度は 25 °C に維持した。マットレスの内圧は、測定前に参加者の体重に応じて 20 分以上設定した。その後、安全のために参加者の血圧と脈拍を測定した。研究者は、参加者を左側臥位に配置して、仙骨に触れ、固定位置が確認された後、圧力センサーを固定した。センサーは倫理的な配慮に基づいて衣服に取り付けられた。続いて、参加者の脚間の 10 cm の距離が測定され、その距離を維持するように促された。その後、参加者の左右の太ももの間に外転枕を固定した。参加者は仰臥位で 5 分間休むように促された。この 5 分間は、参加者の姿勢を落ち着いて安らかな状態にするために重要だった。4 分間の休息の後、研究者は時間、温度、湿度の値を記録した。仙骨部圧は 1 分ごとに 20 分間記録された。仰臥位での測定の最後に、圧力センサーを取り外した。10 分間の休憩の後、研究者は参加者に左側臥位をとるように求めた。研究者は定位置を確認してから、左大転子部と左腸骨稜に触れ、圧力センサーを固定した。研究者は、ゴニオメーターを使用して、左側臥位の角度を 90°、左右の膝関節の角度、股関節の角度を 120° に固定し、参加者に左側の位置で 5 分間休むように依頼した。この 5 分間は、参加者の姿勢を落ち着いて安らかな状態にするために重要である。時間、温度、湿度の測定値は、4 分間の休息後に記録された。さらに、研究者は、左腸骨稜部圧と大転子部圧を 1 分ごとに 20 分間測定した。安全のため、参加者の血圧と脈拍も測定した。最後に、圧力センサーが取り外された。

上記のプロトコルを 1 つの従属変数として、他の体重設定を含む合計 5 つの変数で褥瘡好発部位の接触圧の測定を実施した。従属変数である高い空気内圧は、体重 W 、 $W \pm 5$ kg、および $W \pm 10$ kg に応じて割り当てられた。表 2-1 の設定体重と内圧の関係に従って、各参加者の体重に割り当てられた高い内圧を図 2-6 に示す。

2.3.2 圧力再分布測定

Tissue viability society⁽⁴⁷⁾は、コンセンサス文書で圧力再分配指数を定義した。接触圧分布の主な評価属性⁽⁴⁷⁾には、最大接触圧、最小接触圧、接触圧力変化率、圧力再分配指数、および範囲が含まれる。これらの 5 つの属性は、仙骨部、左腸骨稜部、および左大転子部での値を比較するために評価された。最大接触圧⁽⁸⁾の定義は、「1 周期にわたって接触部で記録された最大接触圧」である。

2.3.3 倫理的配慮

本研究は、金沢大学医学倫理委員会の承認を得た(承認番号 66)。

この調査は約 1 か月間続いた (2019 年 11 月 18 日から 2019 年 12 月 19 日まで)。金沢大学関係者に周知の上、個人を募集した。参加者はインフォームドコンセントを提供した。パンフレットを作成し、参加者に配布した。研究者の性別を選択できることを参加者に知らせることで尊厳が保証され、性差に関する苦痛がなくなった。調査中に痛みが発生した場合、参加者は調査が直ちに中止されることを通知された。調査は 1 日 1 回、1 時間行い、5 日間で合計 5 時間の拘束が必要でした。全ての参加者は 18 歳以上の健康な人でした。従って、研究には同伴者は不要でした。参加者は、いつでも調査を取り下げることができると通知された。最終的に、調査から辞退された方はいなかった。

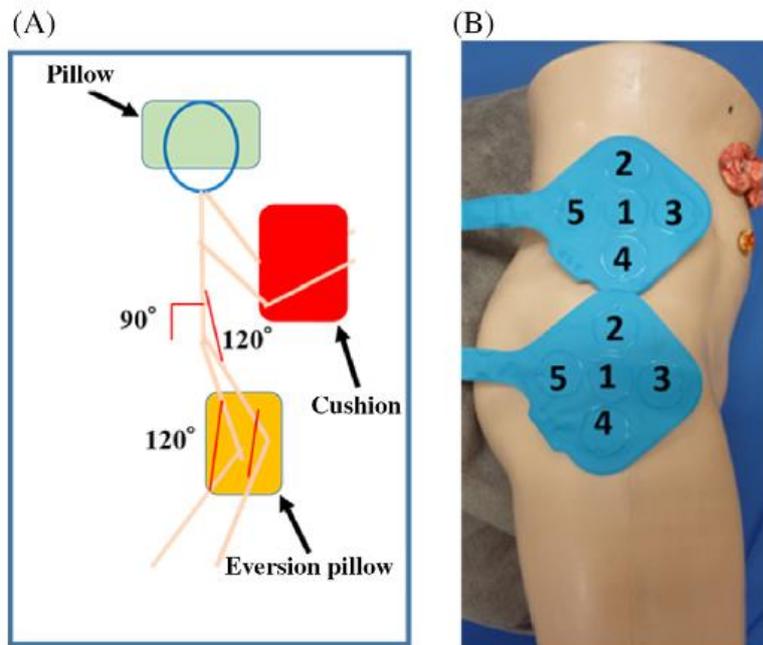


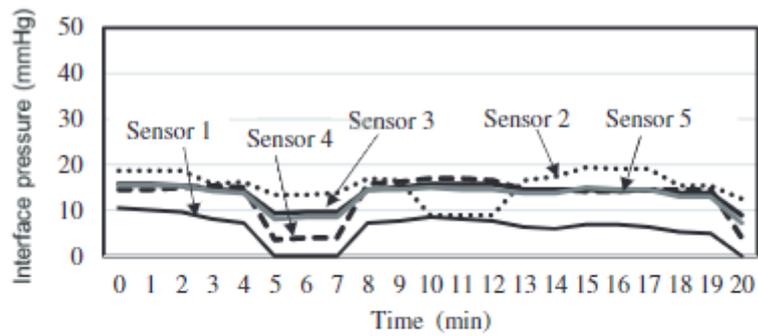
図 2-4 左側臥位の測定位置 (A) と (B)。A, 左側臥位 90° の角度での測定位置。大転子と股関節は 120° で屈曲した。B, 左側臥位では、圧力センサーが左腸骨稜部と左大転子部に固定された。圧力センサーは、圧力センサー 1、3、および 5 が水平セル上にあることを確認するために、測定点の上から固定された。

表 2-2 参加者の特徴

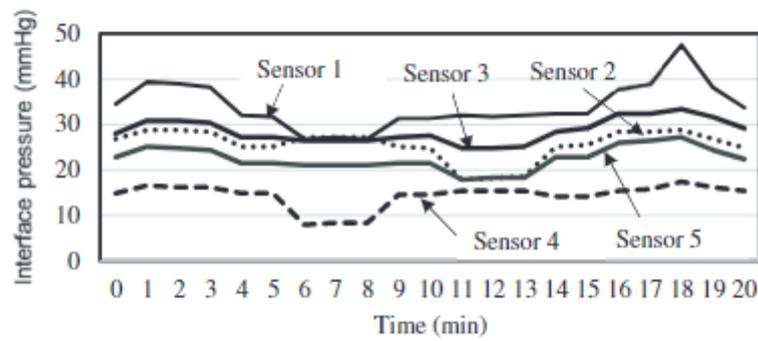
| | |
|--------------------------|--------------|
| Sex: Male | 10 (100) |
| Age (years) | 27.1 ± 9.6 |
| Body height (cm) | 169.0 ± 11.4 |
| Bodyweight (kg) | 64.2 ± 9.8 |
| BMI (kg/m ²) | |
| ≤18.4 | 0 (0) |
| 18.5-24.9 | 8 (80) |
| ≥25.0 | 2 (20) |

Note: Numerical values are presented as mean ± SD or number of people (%).

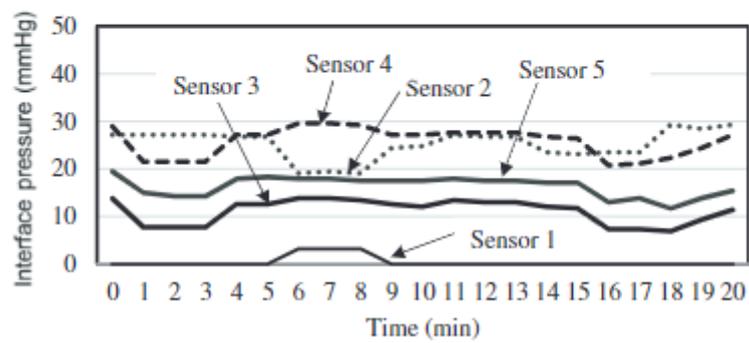
Abbreviation: BMI, body mass index.



(A) Sacrum in the supine position



(B) Greater trochanter in the lateral position



(C) Iliac crest in the lateral position

図 2-5 ID 1 で測定された接触圧 (高い内部空気圧 23 mmHg)。23 mmHg の高い内部空気圧で体重 70 kg の成人で測定された典型的な接触圧の図が示されている。

2.3.4 結果

2.3.4.1 接触圧の測定サンプル

23 mmHg の高い内部空気圧で体重 75 kg の成人で測定された典型的な接触圧の図を図 2-5 に示す。

図 2-5A は、5 つのセンサーで 20 分間測定した仰臥位の仙骨部の接触圧の結果を示す。センサー 2 は、5 つのセンサーの合計測定時間で 15 分間に 19.4 mmHg の最大接触圧を記録した。

図 2-5B は、5 つのセンサーで 20 分間測定した左側臥位の大転子部の接触圧の結果を示す。センサー 1 は、5 つのセンサーの合計測定時間で 18 分間に 47.5 mmHg の最大接触圧を記録した。

図 2-5C は、5 つのセンサーで 20 分間測定した左側臥位の腸骨稜部での接触圧の結果を示す。センサー 4 は、5 つのセンサーの合計測定時間の 6 または 7 分で 29.6 mmHg の最大接触圧を記録した。

2.3.4.2 マットレス内部空気圧による体重変化による最大接触圧の変化

マットレス内部空気圧における仙骨部、大転子部、腸骨稜部の最大接触圧の変化を図 2-6 に示す。さらに、図 2-6 は、各参加者の体重設定と高い内部空気圧との関係も示している。

識別 (ID) 1 の仙骨部の最大接触圧が最も低い設定は、60 kg の体重設定 (体重 -10 kg) で、18 mmHg の高い内部空気圧の時に 13.9 mmHg でした。大転子部での最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 65 kg (体重-5 kg) で 22 mm Hg の高い内部空気圧の時に 27.2 mm Hg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 60 kg (体重-10 kg) で 18 mm Hg の高い内部空気圧の時で 20.3 mm Hg でした。

ID 2 の仙骨部の最大接触圧が最も低い設定は、55 kg の体重設定 (体重 -10 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時で 13.8 mmHg でした。体重設定 75 kg (体重 +10 kg) で 23 mmHg の高い内部空気圧の時に、大転子部の最大接触圧が最も低い設定は、23.5 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 70 kg (体重 +5 kg) で 23 mmHg の高い内部空気圧の時で 19.4 mmHg でした。

ID 3 の仙骨部の最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 55 kg (体重) で 18 mm Hg の高い内部空気圧の時で 12.6 mm Hg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い設

定は、体重設定 45 kg (体重-10 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時 14.2 mm Hg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も値は 23.9 mm Hg で、体重設定は 45 kg と 65 kg (各体重 ± 10 kg) で、内部空気圧設定はそれぞれ 18 mm Hg と 22 mm Hg でした。

ID 4 の仙骨部の最大接触圧が最も低い設定は、45 kg の体重設定 (体重 -5 kg) で 18 mm Hg の高い内部空気圧の時 15.0 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 45 kg (体重 -5 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時 33.3 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は 17.4 mmHg で、体重設定は 55 kg (体重 +5 kg) で、内部空気圧設定は 18 mmHg と高かった。

ID 5 の仙骨部の最大接触圧が最も低い設定は、体重設定 35 kg (体重 -10 kg) で 16 mmHg の高い内部空気圧の時 11.4 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い値は、体重設定 35 kg (体重-10 kg) で 16 mm Hg の高い内部空気圧設定で 16.6 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は 19.1 mm Hg で、体重設定は 40 kg (体重 -5 kg) で、内部空気圧設定は 18 mmHg と高かった。

ID 6 の仙骨部の最大接触圧が最も低い値は、体重設定 85 kg (体重 +5 kg) で 24 mm Hg の高い内部空気圧の時に 13.4 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧の最も低い値は、体重設定 85 kg (体重 +5 kg) で 24 mm Hg の高い内部空気圧の時に 28 mm Hg でした。左腸骨稜部での最大接触圧の最も低い値は、体重設定 80 kg (体重) で 24 mmHg の高い内部空気圧の時に 21.1 mm Hg でした。

ID 7 の仙骨部の最大接触圧が最も低い値は、50 kg の体重設定 (体重 -10 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 13.8 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い値は、55 kg の体重設定 (体重 -5 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 15.8 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は、体重設定 60 kg (体重) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 14.6 mm Hg でした。

ID 8 の仙骨部の最大接触圧は、50 kg の体重設定 (体重 -10 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 10.6 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い値は、55 kg の体重設定 (体重 -5 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 12.9 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は、体重設定 55 kg (体重-5 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 12.9 mmHg でした。

ID 9 の仙骨部の最大接触圧が最も低い値は、体重設定 60 kg (体重) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 13.0 mmHg でした。左大転子部での最大接触圧が最も低い値は、

体重設定 65 kg (体重 +5 kg) で 22 mmHg の高い内部空気圧の時に 26.8 mmHg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は 12.9 mmHg で、体重設定は 55 kg (体重 -5 kg) で、内部空気圧設定は 18 mm Hg と高かった。

ID 10 の仙骨部の最大接触圧が最も低い値は、60 kg の体重設定 (体重 -10 kg) で 18 mmHg の高い内部空気圧の時に 10.9 mmHg でした。体重設定 80 kg (体重 +10 kg) で 24 mmHg の高い内部空気圧の時に、左大転子部の最大界面圧が最も低い値は 23.9 mm Hg でした。左腸骨稜部での最大接触圧が最も低い値は、体重設定 75 kg (体重 +5 kg) で 23 mmHg の高い内部空気圧の時に 17.9 mmHg でした。

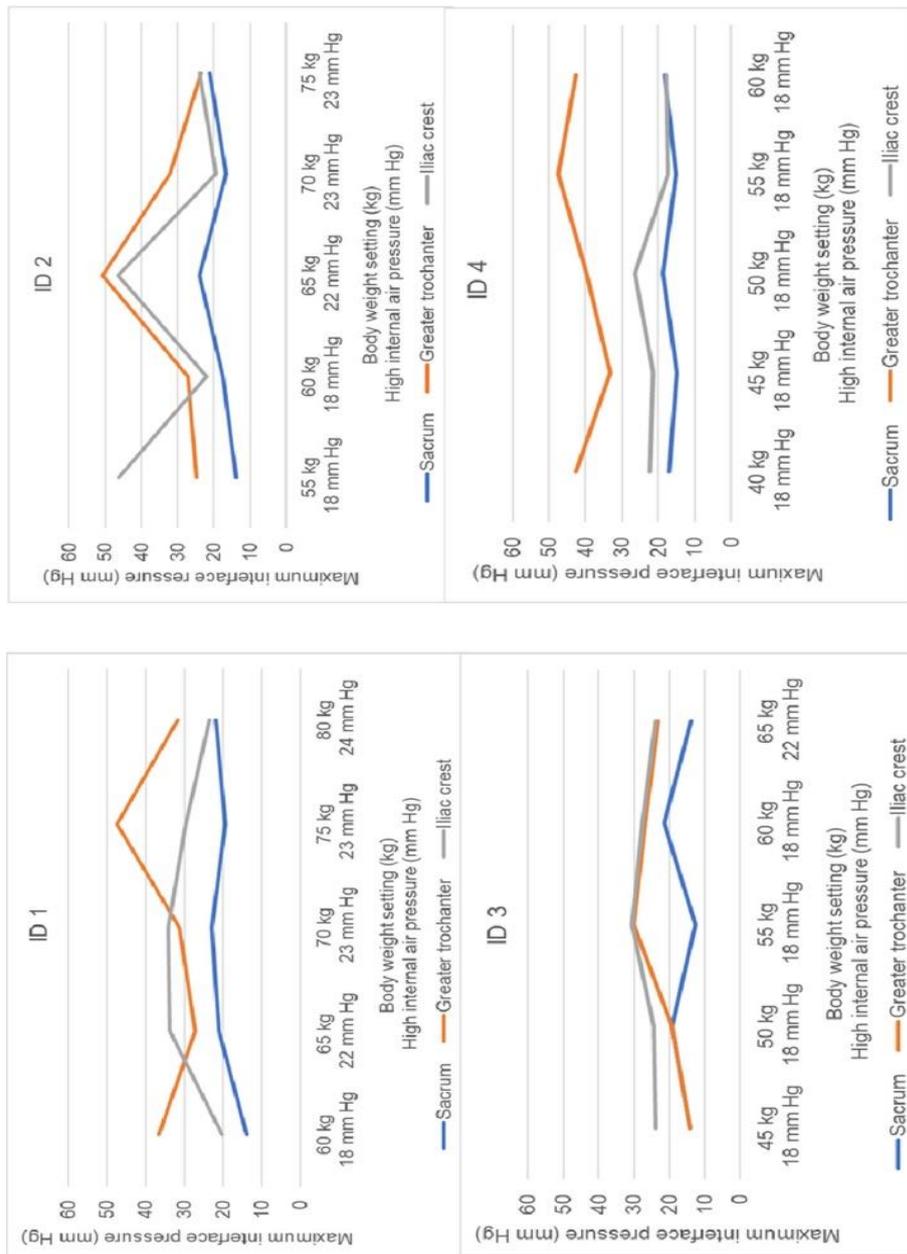


図 2-6 内部空気圧での体重による最大接触圧の変化。様々な内部空気圧における、体重に対する最大接触圧の変化を示す。

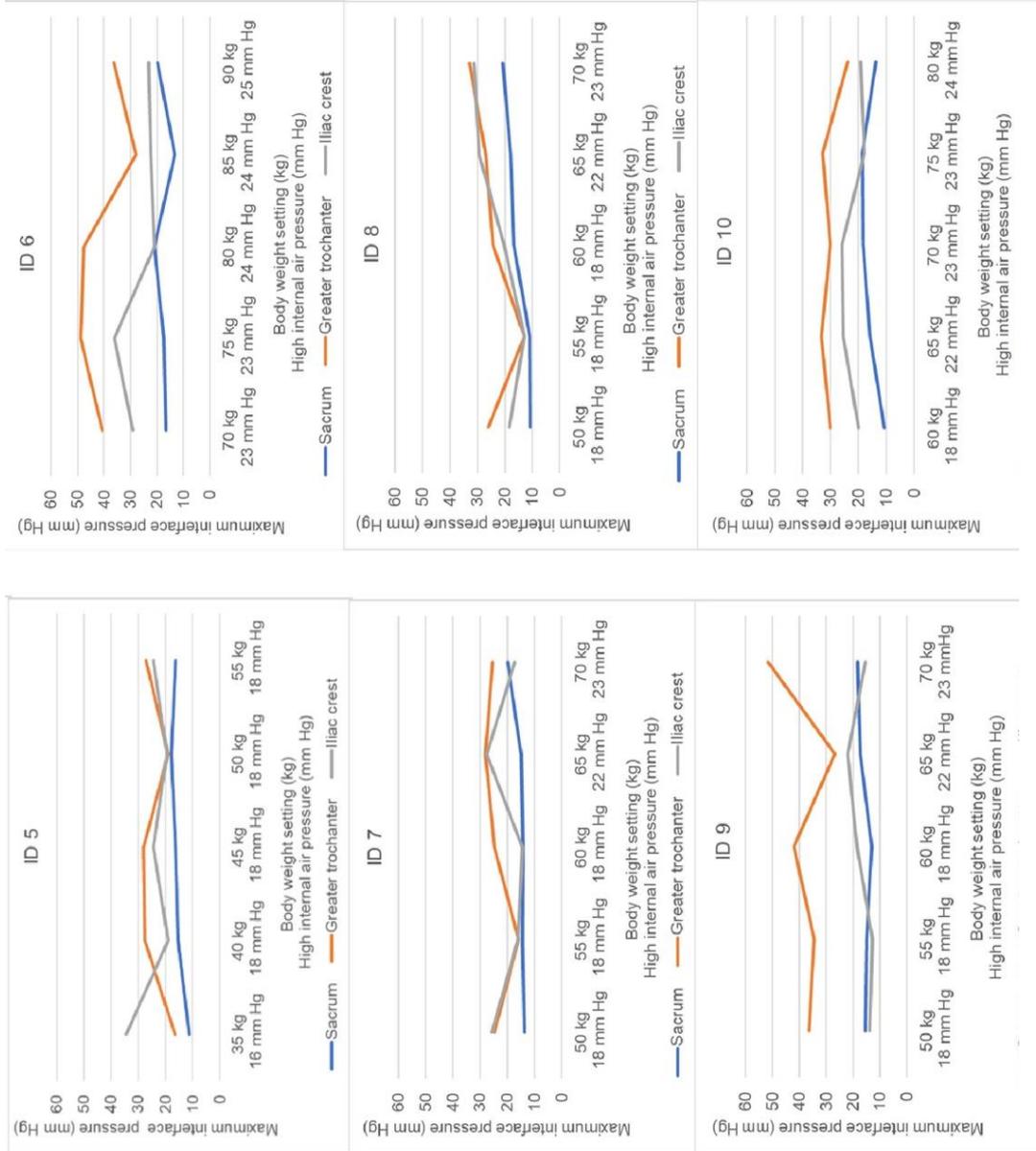


図 2-6 (続き) 内部空気圧での体重による最大接触圧の変化。様々な内部空気圧における、体重に対する最大接触圧の変化を示す。

2.3.5 ディスカッション

この研究では、側臥位での接触面の圧力を下げるために、マットレスの内部空気圧を増減する必要があるかどうかを調査した。

図 2-6 に示すように、側臥位では最大接触圧は腸骨稜部よりも大転子部の方が高くなる。従って、大転子部の側臥位での接触圧管理を考慮することは合理的である。仙骨部と大転子部との間の最大接触圧の比は約 2 倍高く、これは Matsuo et.ら⁽⁵⁰⁾の結果と一致している。従って、仙骨部の最大接触圧の結果は、-10 kg の体重設定がこの研究の他の設定よりも優れていることを示唆している。大転子部の最大接触圧の結果は、10 名中 7 名の参加者で、仰臥位における仙骨部の体重設定よりも高い体重設定が最大接触圧の低減に効果的であることを示唆した。仰臥位での最大接触圧に関するこれらの結果は、仰臥位では身体とエアセルの間の接触面積が増加することを示唆している。従って、仰臥位では接触圧が低下し、体重設定が低くなる。同様に、エアセルは圧力を再分配して、内部の空気圧を下げることで身体を包み込む。一方で、側臥位での最大接触圧の結果は、身体とエアセルの間の接触面積が側臥位で減少することを示している。従って、側臥位での接触圧が上昇することは、エアセルが設定体重を増加させ、内部の空気圧を増加させることで身体を支えていることを示唆している。

この研究にはいくつかの制限があった。健康な成人男性のみが登録され、BMI は主に正常範囲内でした。従って、選択バイアスがあった。選択バイアスは、参加者の割り当てにおけるバイアスを示す。この研究では、1 人の研究者のみが研究を行ったため、実行バイアスと検出バイアスが存在する可能性がある。実行バイアスは、比較対象のグループで介入またはケアの実行に系統的な違いがある場合に発生する。検出バイアスは、比較対象のグループの結果測定値に体系的な違いがある場合に発生する。

90° 側臥位 のみが調査されたため、研究の限界は臨床的に推奨されている 30° 側臥位 が未調査である。体重±10 kg に基づく内部空気圧の設定も、この研究の限界だった。なお、ハンモック現象の影響は除外した。今後の実験は、専用のカバーとリネンがエアマットレスを囲む臨床環境に適した設定で実行する必要がある。ヒステリシスとクリープは調査されていないため、これはこの研究のもう 1 つの制限である。この研究は、褥瘡予防ケアにおける接触圧分布に基づいて実施されたものであり、安全性と快適性の要因は含まれていない。様々な内部空気圧での測定は、異なる日に行われた。従って、接触圧センサーの付け直しにより、測定位置に若干の差異が生じる場合がある。この研究は非常に低い圧力値を測定しようとしており、エラーがより影響を与えるため、

これも制限である。

2.3.6 結論

以前の研究では、患者が側臥位で臥床されていると最大接触圧が増加することが示されている。しかし、側臥位での最大接触圧を下げるには、内部空気圧を上げるのと下げるのとではどちらが良いのか不明であったため、本研究ではこの点について検討を行った。図 2-6 は、側臥位における内部空気圧を増加させることが、最大接触圧を下げるのに最良であることを示している。

この研究で使用したエアマットレスは、完全独立二層式エアセルであり、仰臥位と比較して内部の空気圧が増加することにより、側臥位の最大接触圧が低下することが示唆された。

2.3.7 利益相反

本研究の利益相反はない。

2.4 考察実験：マット内圧を変化させた時の圧再分配機能の評価

2.4.1 実験方法

エアマットレス用の金属平板（金属製，長径 45 cm，短径 25 cm，重さ 4.4 kg）を用いて図 2-7 のように圧再分配機能の評価した。



図 2-7 金属平板の外観

2.4.2 能動型エアマットレス

考察実験では、引き続き、能動型エアマットレスとして、エアマスタートライセル E (Cape Ltd.、横須賀、日本)を採用した。

エアマットレスの付属ポンプの体重設定によるマット内圧の関係を、表 2-1 に付属ポンプの体重設定の上下限值までを加えたものを表 2-3 に示す。

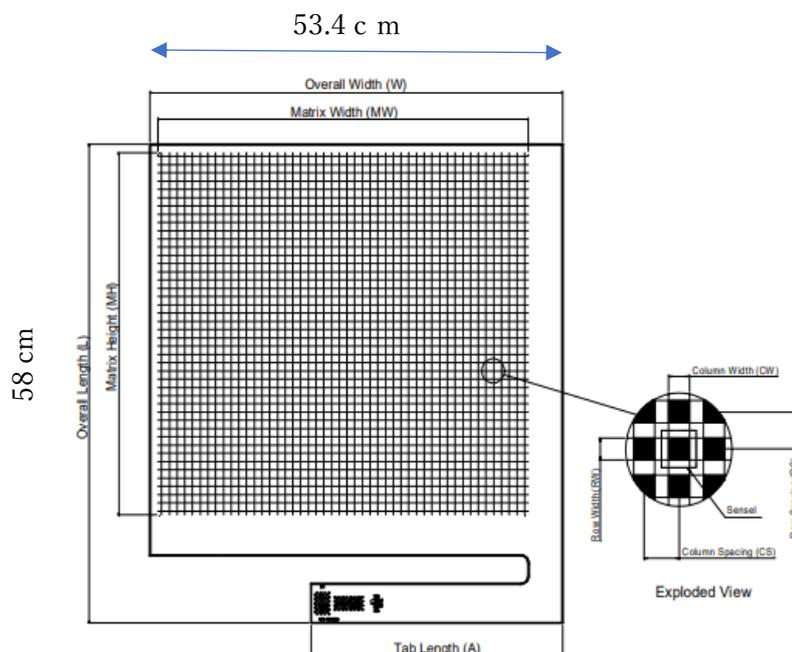
表 2-3 体重設定によるマットレス内圧

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Body weight setting(kg) | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 |
| High internal air pressure(mmHg) | 13 | 14 | 15 | 16 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 22 | 23 | 23 | 24 | 24 | 25 |
| Low internal air pressure(mmHg) | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |

2.4.3 面圧分布測定センサー

考察実験では、圧再分配機能の1つである経時的な接触部分の変化をとらえることが重要であることから、面圧分布測定センサー (BIG-MAT 2000, Nitta) (図 2-8, 図 2-9) を採用して能動型エアマットレスと身体の接触部分の面圧分布を測定した。BIG-MAT は、各センサーの寸法が 1 cm² で、センサー点数が 2112 (44 行×48 列)を装備している。薄いポリエステル(厚さ 0.1 mm)の感圧マットが含まれている。センサーの配置は、行と列のグリッドで表示される。センサーに圧力が加わると、力検出点の電気抵抗がデジタル値に変換され、コンピューターに送られる。データは、色分けされた 2D または 3D 圧力マップで表示できる。測定範囲は 0~20 kPa、精度±10 %、クリープ弾性率 17.2 %、ヒステリシス 4.4 %、直線性 5.0 %でした。BIG Mat[®]システムは、製品マニュアル (NITTA Corp.、大阪、日本) に記載されているメーカーの推奨に従って較正された。追跡機能により、BIG Mat[®]はモデルを包み込み、測定への影響が少ないハンモックのような形状を想定しません。

Sensor Type: **BIGMAT**



| Type | Map | General Dimensions | | | Sensing Region Dimensions | | | | Summary | | | | | |
|-----------|------|--------------------|-----------------|--------------|---------------------------|------------------|------------|---------|---------|---------|---------------|---------------------------------|------|-----|
| | | Overall Length L | Overall Width W | Tab Length A | Matrix Width MW | Matrix Height MH | Columns CW | CS Qty. | Rows RW | RS Qty. | No. of Senses | Sense Density (sense per sq-cm) | | |
| BIGMAT | 5350 | 580 | 534 | 325 | 480 | 440 | 6.0 | 10.0 | 44 | 6.0 | 10.0 | 48 | 2112 | 1.0 |
| BIGMAT1/4 | 5340 | 362 | 295 | 295 | 240 | 220 | 3.0 | 5.0 | 44 | 3.0 | 5.0 | 48 | 2112 | 4.0 |

Application Examples:
Special Features:

図 2-8 BIGMAT システムの仕様。(提供元：Nitta Co.,Ltd.)



図 2-9 面圧分布測定センサー (BIG-MAT 2000, Nitta) の外観

2.4.4 レーザー距離計

考察実験では、レーザー距離計 (DISTO X310, Leica)を採用して、エアマットレスの沈み込み量を図 2-10 のように計測した。

レーザー距離計 (DISTO X310, Leica)の測定範囲は 0.05 m – 80 m で、測定精度は ± 1.0 mm で、最小値/最大値 (水平値や対角の測定において自動的に連続測定) を表示する。レーザー距離計 (DISTO X310, Leica)の本体サイズ・重量は、122 mm×55 mm×31 mm (H×D×W)/155 g である。



図 2-10 レーザー距離計 (DISTO X310, Leica)の外観

2.4.5 沈み込み距離計測の設計

沈み込み距離計測には、レーザー距離計(DISTO X 310, Leica)を採用した。レーザーを使用して上空から金属平板の距離を計測した。図 2-11 のように、沈み込み計測のためのレーザーを固定した。

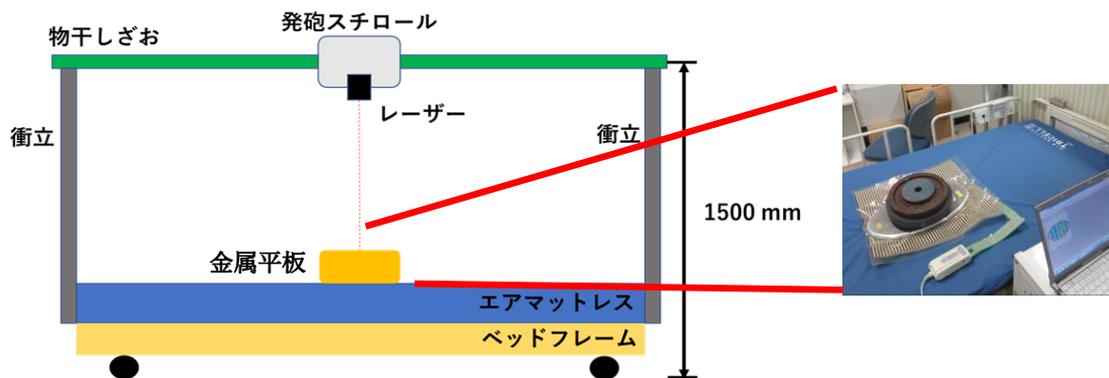


図 2-11 金属平板を用いた圧再分配機能計測の概要図

2.4.6 接触圧測定と接触面積測定的设计

面圧分布測定センサー (BIG-MAT 2000, Nitta) 1 枚を使用して、金属平板の接触圧と接触面積の測定を 1 つのマットレス内圧値に対して 30 分間の測定を行った。(全てのマットレス内圧値を独立変数として、面圧分布の測定を行った。)

2.5 測定手順

2.5.1 測定プロトコル

エアマットレスに空気を入れた状態に維持しておく。

実験日

1. 実験室は温度 (25°C) に設定。(実験開始 30 分前には暖房 ON)
2. 20 分間以上ポンプの電源 ON にする。
4. 圧力センサーマットをエアマットレス上に敷く。
5. 金属平板を設置する

6. 金属平板の位置にマット上でテーピングによるマーカを付与する。
7. 金属平板に重りを載せて 23 kg の荷重にした。
8. 金属平板の沈み込み距離を 1 分おきに 30 分間測定。

2.6 圧力再分配機能測定

2.6.1 評価項目：沈み込み量、包み、最大接触圧

2007 年に NPUAP により圧再分配の概念が提唱された⁽⁵¹⁾。

2.7 倫理的配慮

金属平板を用いているため倫理的配慮は不要。

2.8 利益相反

使用した金属平板は株式会社モルテンから無償貸与されたので、利益相反はあった。

2.9 結果

2.9.1 沈み込み量

図 2-12 は、マット内圧 (MIAP) を 13-25 mmHg を独立変数としたときの 30 分間の経時的な金属平板がエアマットレス上での沈み込みの変化量を示す。全ての MIAP で沈み込みが確認された。13-16 mmHg の場合は、1.8-5.0 cm の沈み込みで、18-22 mmHg で、1.4-3.3 cm の沈み込みで、23-25 mmHg の場合、1.1-2.5 cm の沈み込みが確認できた。

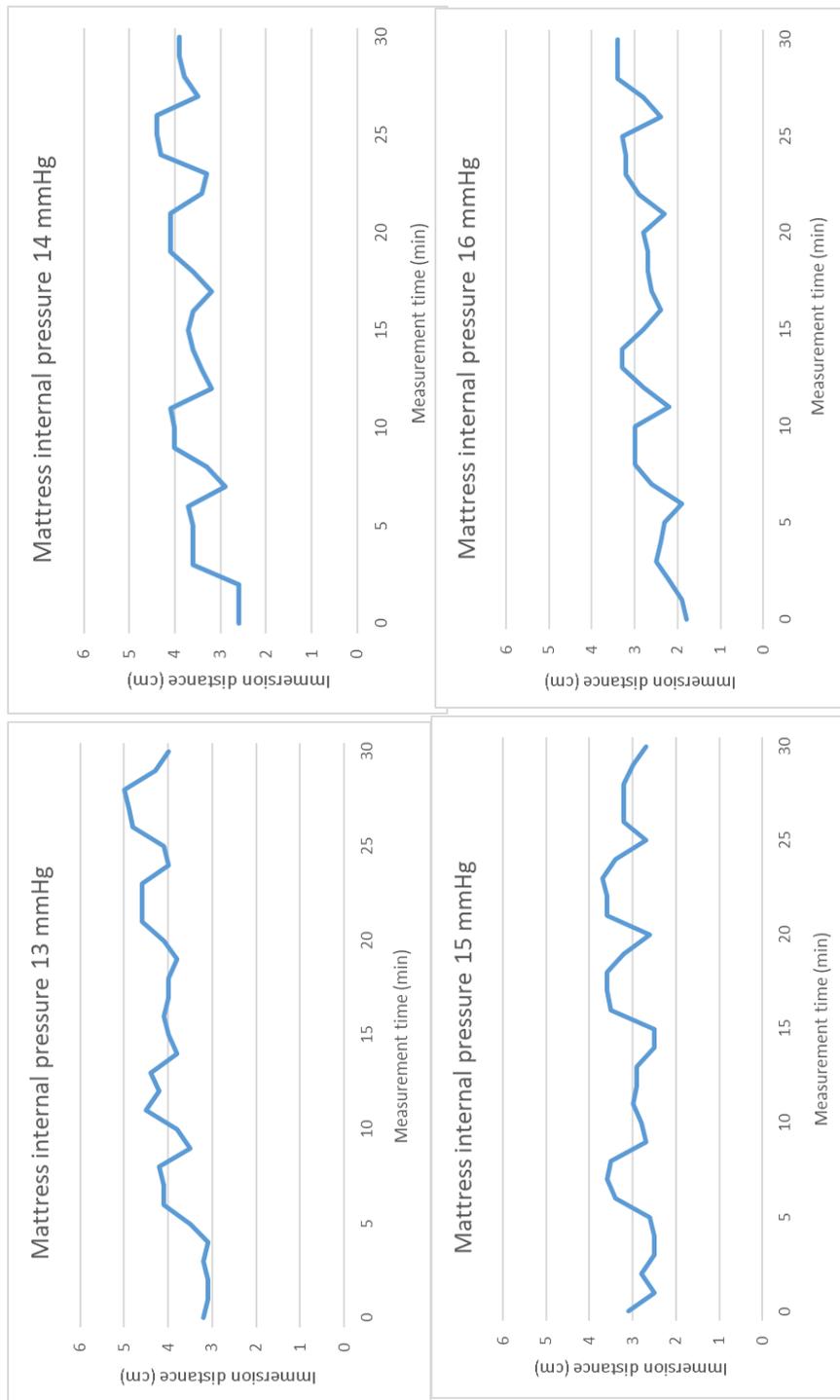


図 2-12 経時的な沈み込みの変化量

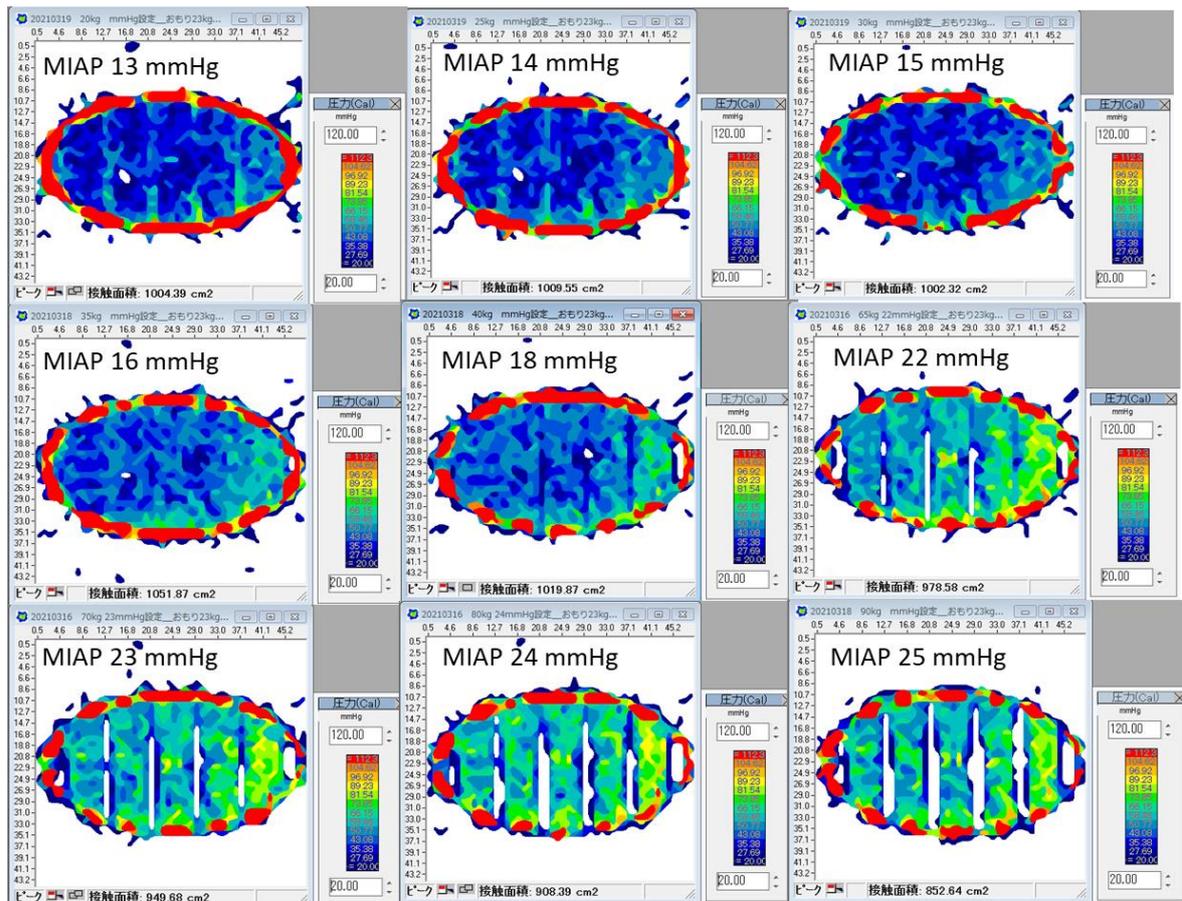


図 2-12 (続き) 経時的な沈み込みの変化量

2.9.2 ピーク圧力分布

図 2-13 は、金属平板とエアマットレスとのピーク圧力と接触面積の分布を示す。ピーク圧力とは、測定時間 30 分の各エアセルの最大接触圧力と定義する。図 2-13 の結果は、次の 4 点を示唆する。

- 1) マット内圧を上げると接触圧力が増加する。
- 2) マット内圧を上げると接触面積は減少する。
- 3) マット内圧を上げると隣接するエアセルの接触部分に低い圧力分布（白い領域）が出現する。
- 4) 金属平板を設置して測定しているため、場所依存のピーク圧力差が無い。
- 5) エアマットレスの製造側の理由から、MIAP 19～21 mmHg の設定ができないので、MIAP 18 mmHg から 22 mmHg で図 2-13 のピーク圧力分布が飛躍して見える。



2.9.3 考察

金属平板を用いて測定した圧再分配機能について考察実験を検討した。金属平板の特性から沈み込み量は、場所に依存しない。金属平板のエッジに応力集中が出現する。

図 2-12 から、MIAP が低いとき例えば 13 mmHg では沈み込み量は 4.0 cm 程度が、MIAP が上がると例えば 25 mmHg では沈み込み量は、2.0 cm 程度に変化が示された。図 2-13 から MIAP が 13~15 mmHg と低いときは、接触ピーク圧力は 27~35 mmHg 程度を示すが、MIAP 16~18 mmHg では、接触ピーク圧力は 35~53 mmHg 程度を示す。MIAP 22~25 mmHg では、接触ピーク圧力は 50~96 mmHg 程度を示す。図 2-12 の沈み込み量と図 2-13 の接触ピーク圧力分布から本研究で使用したエアマットレスの特性が次のように示唆された。MIAP が低い時 (13~15 mmHg) は、金属平板がエアセルに沈み込むことで包まれて接触面積が増加した。その結果、圧力の再分配が起きて接触圧力が分散されたと考察できる。一方、MIAP が高い時 (22~25 mmHg) は、エアセルの膨張率がさらに増加することでエアセルの表面の凹凸が形成されることが、低い接触圧力領域 (図 2-13 の白い領域) が確認されたと考察できる。さらに、図 2-13 から次のことが考察できる。MIAP 22~25 mmHg に上げた時の接触圧力が低い白い領域 (図 2-13) が出現すること、つまり、各エアセルが独立して金属平板を支えていることが示唆された。これら示唆されたことは 2.3.6 の結論で示唆した「仰臥位から側臥位に体位変換する時に最大接触圧を最小限に抑制するにはマット内圧を上げた方が有効である」の根拠になると考察できる。

2.10 今後の展望

今後は、健康人で得られた知見を高齢者に適応することで、測定結果から健康人と高齢者で比較検討することで看護ケアに活用していくことを考えている。

第3章 人の単一角質細胞の弾性率分布評価手法および 湿度制御原子間力顕微鏡（AFM）の開発および 保湿剤の効果の検証

3.1 研究背景と目的

昨今、老若男女問わず、スキンケアの需要は高い。皮膚トラブルの多くは外部環境や心身のストレスによるものが多く、個人差が大きい。ヒトの体は皮膚の角質で覆われており、角質層のバリア機能により水分が保湿される（図 3-1）。これまでの研究では、角質の保湿は組織や分子レベルでの評価であり、細胞レベルでの保水機能の機構解明や、角質の含水量分布は技術的に難しい。そこで申請者は、個々の皮膚トラブルに有効なスキンケア開発のために、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた健常人の皮膚の保水機能の定量化を行う。

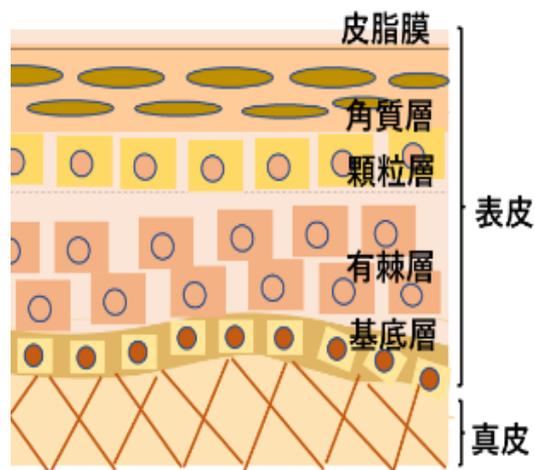


図 3-1 皮膚の構造

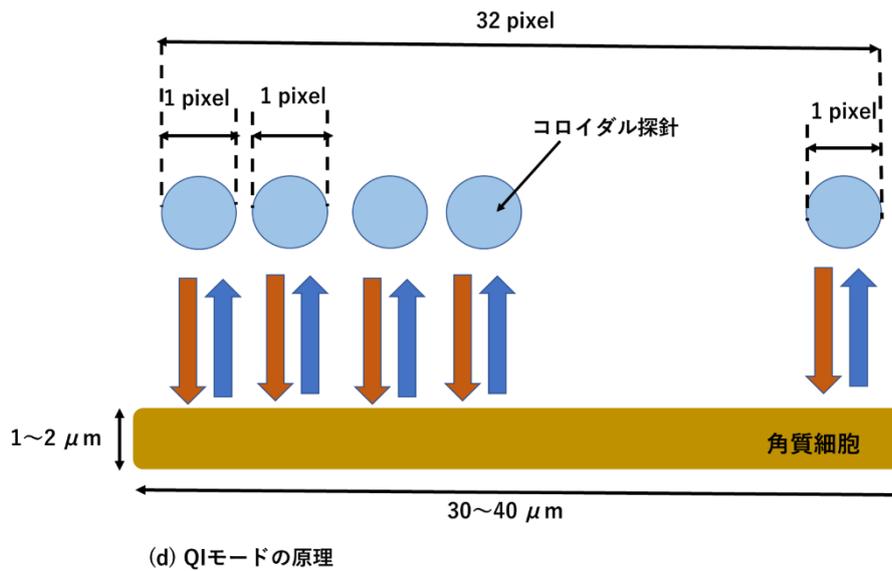
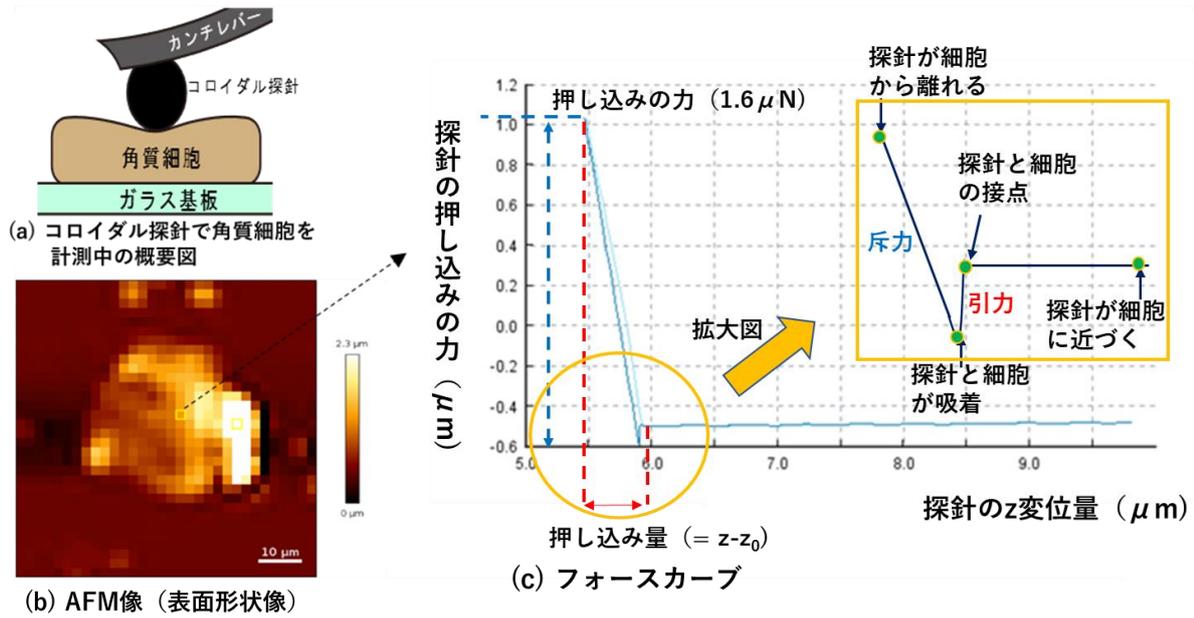


図 3-2 AFM を用いたヤング率計測の原理

角質の保水機能は、単一角質細胞のヤング率分布により評価する。従来の引っ張り試験等のヤング率計測器と比べて、AFM では、kPa オーダーの小さいヤング率測定も可能で、角質細胞に直接応用できる。AFM は、図 3-2 のように、球状のコロイド探針を角質細胞に押し込み (図 3-2 (a))、その時に探針にかかる相互作用力を計測することで角質細胞のヤング率計測が可能である (フォースカーブ計測, 図 3-2 (c))。図 3-2(c)で示すように、(1) 探針が角質細胞に近づくプロセス、(2) 探針と角質細胞の接点、(3) 探針に引力が働き、探針と細胞が吸着した点、(4) 探針に斥力が働き、探針が角質細胞から離れる点を示す。また、図 3-2(c)のフォースカーブから探針の押し込み量は、数 100 nm、押し込みの力は、1.6 μ N を示し、図 3-2 (b) で示す AFM 像のカラースケールから角質細胞の厚みは、1~2 μ m であることが解釈できる。図 3-2 (d)は、AFM で角質細胞のフォースカーブ計測中の動作原理を示す。本研究では、AFM のスキャンエリアを 32×32 の点のフォースカーブを取得している。その時の動作モードは、QI モードを実行している。QI モードは、図 3-2 (d)で示す通り、z 方向にアプローチして、リトラクト後に、一定の z 方向の位置に戻り、x 方向に移動して、同様に動作を実行する。X 方向の端までスキャンが終われば、y 方向に移動する。サンプルの左端から右端にスキャンされる動作原理である。

加齢、皮膚の水分補充や角質層に関連する病状などの様々な皮膚状態を低侵襲で評価できるが、これまでの AFM を用いた角質細胞のヤング率計測は、温度と湿度が制御されていない環境下で行われていた。しかし、角質細胞の保水機能を正確に理解するためには、温度と湿度を制御できる密閉空間内で角質細胞のヤング率を評価する必要がある。

そこで、本研究では、AFM を用いた単一角質細胞の弾性率計測の方法の確立、および温度と湿度制御可能な AFM の開発、人肌程度の温度に制御した状態で保湿剤成分を塗布した前後の単一角質細胞のヤング率の湿度依存性、を計測する。

3.2 大気中における角質細胞の弾性率計測

3.2.1.1 皮膚角質の研究背景

角質細胞の保湿に関わる様々な報告が以下のようにされている。

Quan Yang & Richard H. Guy⁽⁵²⁾の報告では、健康な人間のボランティアの天然保湿因子 (NMF) の構成要素は、角質層のテープ剥ぎ取りサンプルから逆イオントフォレシスによって抽出した。21 の成分が識別され、質量分析検出を備えた液体クロマトグラフィーによって定量化したことが示唆された。

Niranjana Dhandapani et al.(2020)⁽⁵³⁾ や、Grubauer G. et al.(1989)⁽⁵⁴⁾ や

Visscher M.O.(2003)⁽⁵⁵⁾の報告では、角質層の脂質や NMF の組成分析について詳細に示唆している。さらに、細胞間脂質のラメラ構造と側方充填配列構造を調べた報告⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾や、セラミドと角質水和との関連についての報告⁽⁵⁸⁾や細胞間脂質の組成分析の報告⁽⁵⁹⁾などで代表される。しかし、最近では、皮膚角質の保湿は、角質細胞の外殻 (CE)が頑丈であることが良質な細胞間脂質を産出するという報告⁽⁶⁰⁾がされている。上記のように角質細胞や脂質の組成分析の報告は、他にも類似研究は過去から数多く報告されかなり明らかになっている。

しかしながら、上記の先行研究のように保湿剤の効果が得られる理由として、保湿剤が皮膚表面の角質細胞に作用しているとする説と、その間の細胞間脂質に作用しているとする説について、未だ正確な理解には至っていない。角質の保湿機能を解明することが本研究のゴールである。

AFM を用いた先行研究では、人の皮膚にテープを押し付けて、それを剥がすことによって角質細胞を採取する、いわゆるテープストリッピング法を用いて、単一角質細胞の硬さを AFM により測定できることが以下で報告されている。

ヒトの角質採取は、例えば James D. Beard et al.の先行研究⁽⁶¹⁾のようにテープストリッピング法が広く用いられてきた。テープストリッピング法の欠点は、接着したテープから角質を剥がす工程が化学的あるいは物理的に加わることで、本来の角質の情報とは少なからず異なることが懸念される。この採取方法についての課題を解決することは、角質の情報を正確に取得するうえで重要である。Pascale Milani et.al (2018)⁽⁴³⁾の報告では、次のような実験手法を報告している。

角質細胞の採取はテープストリッピングを用いられた。実験の詳細は、夫々の角質細胞を両面粘着テープを使用してガラススライドに貼り付けてサンプル作製して冷凍保存した。AFM 測定前に、テープストリップを AFM の制御された雰囲気 (相対湿度 = 45 %、温度 = 24 °C) で 30 分間平衡化させた。各実験は、異なる角質細胞で実施された。異なる成熟段階の角質細胞で行われた研究は、連続ストリッピングによって角質層の異なる深さで採取された細胞をテープストリップで行われた。全ての AFM 計測は、標準的なピラミッド型チップ (MPP-21100、Bruker AFM probes, Inc.) を使用して実行された (先端半径は 8 ~ 12 nm)。さらに、Pascale Milani et.al (2018)⁽⁴³⁾の報告では、最上層から 2 層目、7 層目、14 層目の角質細胞の硬さを AFM で評価している 0 ~ 50 nm の範囲のくぼみに Hertz-Sneddon モデルを適用して、各曲線から弾性率の定量的データを抽出した。

Julie Fredonnet et al. (2014)⁽⁶²⁾は、次のような実験方法を提案している。

下にある細胞と直接接触している角質細胞表面の分析が可能になるという論理から、同じ皮膚部位で 10 回連続してテープを剥がして皮膚表面から角質細胞を収集し、テープをガラススライドに固定し、追加の処理を行わずにいくつかの個々の細胞をテープに直接イメージングした。実際に、同じ年齢の 5 人の異なる健康な女性から SC (角質層) への 3 つの異なるストリッピング深さで 2 つの異なる解剖学的領域から得られた角質細胞を定性的および定量的に比較した。

Charles Roudit et al. (2009)⁽⁶³⁾は、AFM のフォース ボリューム モードを使用して、スティフネストモグラフィイメージング技術を生細胞に適用した。

James D. Beard et al. (2013)⁽⁶⁴⁾の報告では、次のように主張している。

「角質細胞の内部構造の機械的特性の測定値を提示し、ナノニードルが表面下の深さの範囲にわたって細胞剛性の「トモグラフィ」プロファイルを作成できることを示している。この技術は、細胞の構造特性を高い空間分解能でマッピングし、AFM 測定を 3 次元に拡張することで、ナノスケールでの生理学および薬理学への応用の可能性を広げることができる。特に、この方法は、細胞エンベロープを介したナノプローブの浸透を検出し、細胞内構造の弾性特性を決定することを可能にする。負荷曲線は主にセル材料の剛性に関する情報を提供するが、除荷曲線はその弾性反応 (回復) について報告する。」

R. M. Gaikwad et al. (2010)⁽⁶⁵⁾の報告では、テープストリッピングで採取したヒト角質細胞を AFM を用いた硬さ評価について述べている。R. M. Gaikwad et al. (2010)の報告では、ヒト角質細胞の AFM 計測で、プローブで表面をトレイスとリトレイスしたときでは、リトレイスでは細胞とプローブでの吸着現象が示唆された。Yanping Cao et al. (2009)⁽⁶⁶⁾の報告では、ポアソン比 0.1, 0.39, 0.46 の軟質基板と硬質基板を比較してヤング率に著しい差異が見られたことを示唆している。このことはガラスに両面接着したテープよりもガラス基板上でのヤング率計測値は高くなることが推測できる。

一方で、テープストリッピングから採取した角質から粘着性テープを除去した上で、単一細胞を単離してガラス基板上で、その硬さを測定した例は過去に報告がない。つまり、従来の角質細胞の採取方法は、両面の粘着性テープによるテープストッピング法を用いてることで、粘着テープから直接、ガラス基板に張り付けて、単離しないで、AFM でフォースカーブを取得するか、テープストッピング法から採取された角質細胞を直接、剥がして、別のガラス基板に単離はされているが、傷の付いた角質細胞を張り付けて、

AFM でフォースカーブを取得している。粘着性テープを用いたテープストッピング法だと角質細胞のヤング率計測時に粘着性の物質を取り除くのが難しい。ケミカルに除去すれば角質細胞の成分が変わる、また、物理的に除去すれば角質細胞が損傷することから角質細胞の採取方法としてテープストッピング法は不適切と考えた。

さらに、AFM で測定した単一角質細胞の弾性率（ヤング率）は、AFM 探針を細胞表面に押し付けて、へこませる（インデンテーション）過程において、探針の垂直位置に対する探針にかかる力の依存性（フォースカーブ）を測定し、その曲線をヘルツモデルなどの接触力学モデルの式でフィッティングすることで弾性率を求める。この方法は、細胞の硬さ評価に広く用いられており、過去の角質細胞の硬さ評価においても、同様の方法が用いられてきた [Gaikwad, R. M.⁽⁶⁷⁾]。しかしながら、従来の先行研究の知見は、イメージングエリアに単一角質細胞だけでなく複数の細胞やガラス基板の情報が入ることや粘着テープの影響を受けることからヤング率分布にマルチピークの導入が必要であるが、その解析方法も未だ明らかにされていないのが課題である。また、単一角質細胞レベルでも、細胞内部のケラチン分子の配列や無数の円形突起のためにヤング率分布が広い。この背景を考慮すると、単一角質細胞のヤング率測定のためには、マルチピークフィッティングプログラムの開発が必要である。

3.2.1.2 ヘルツ接触

角質細胞にコロイダル探針をインデンテーションする時に、ヘルツ接触理論が適用できる。

図 3-3 は、ヘルツ接触理論の説明図を示す。コロイダル探針を曲率半径 R の球、カンチレバーのバネ定数を k として表している。コロイダル探針で角質細胞をインデンテーションする時に探針が受ける力 F は、フックの法則

$$F = k\Delta \quad (3.1)$$

で計算できる。AFM 計測では、カンチレバーのたわみ量 Δ は、フォトディテクトにて測定されるので既知量である。コロイダル探針と角質細胞の接触点 $(z_0, 0)$ からインデンテーションした変位量 $(z - z_0)$ は常に Δ と一致するが、角質細胞が弾性変形してしまう実線のような場合は、

$$\delta = (z - z_0) - \Delta \quad (3.2)$$

から角質細胞の変形量 (δ) が見積もられる。 $\Delta - z$ プロットから導かれた(b)の実線の

フォースカーブに対して、ヘルツ接触式でフッティング（回帰分析）すると弾性率（ヤング率）が求まる。

$$a = (FR/K)^{1/3}, \delta = (F^2/K^2R)^{1/3} \quad \text{よって, } F = KR^{1/2} \delta^{3/2} \quad (3.3)$$

ここで a は接触径（contact radius）, K は複合弾性率 E^* を用いて以下のように定義される。

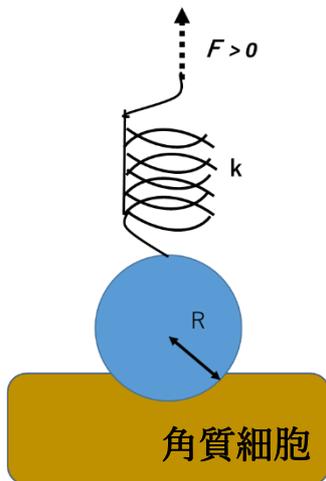
$$K = (4/3)E^* = (4/3)[((1 - \nu_1^2)/E_1) + ((1 - \nu_2^2)/E_2)]^{-1} \quad (3.4)$$

E と ν はそれぞれヤング率（Young's modulus）とポアソン比（Poisson's ratio）で、数字の 1 は角質細胞と数字の 2 は探針を表す。 E_2 は、シリカビーズで、 E_1 は、角質細胞のヤング率であるので、

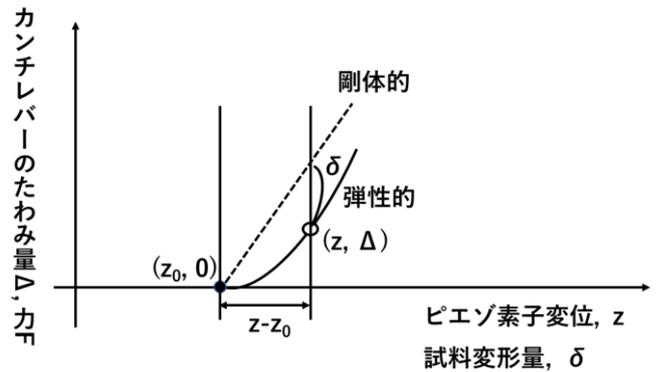
$$E_2 \gg E_1$$

$k, z, z_0, R, \Delta, E_2$ は、既知であり、 F, δ は計測値である。

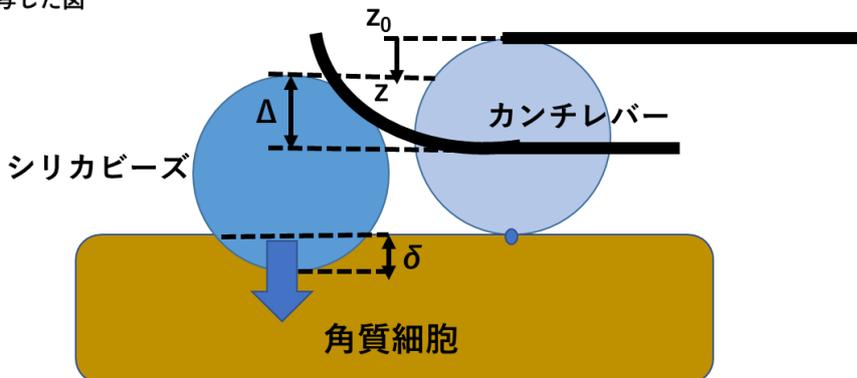
従って、(3.4)式から E_1 が計算できる。



(a) コロイダル探針を角質細胞に押し込み過程を模式的に描写した図



(b) カンチレバーのたわみ量 Δ およびフォースカーブの曲線



(c) カンチレバーを角質細胞に押し込んだ時のたわみ量 Δ と押し込み量 $z - z_0$, 角質細胞の変形量 δ の概要図

図 3-3 ヘルツ接触理論の説明図⁶⁸

3.2.2 目的

本研究では、スライドガラスで角質を採取する方法、角質細胞をガラス基板に固定する方法、AFM で硬さ測定をする方法、得られた AFM 像からヤング率を導出するための解析方法を検討して確立することを目的とする。

3.2.3 方法

(1) 研究のデザイン

本研究は、軽微な侵襲を伴う観察研究である。

(2) 研究対象者及び選定方針

適格基準：

- ① 本研究の参加に関して同意が文書で得られる健常者
- ② 同意取得時の年齢が 20 歳以上の健常者
- ③ 研究対象者の目標数： 健常者 3 人

最低限、得られた結果に対して個人差が極端に影響を与えていないことを確認するためには最低限 3 人の結果を比較することが望ましいため、3 人とした。

除外基準：

- ① 皮膚疾患のある者

(3) 角質細胞の採取と AFM 観察用の測定試料の準備

研究対象者の顔および上腕内側をボディークリームで 30 秒間洗浄後、30 分間自然乾燥する。セロハンテープを用いたテープストリッピング法で、角質層の最上層を剥離する。その箇所に、ガラススライドを優しくこすりつけることで、角質細胞を採取する。その後、ガラススライドに付着した細胞から、比較的サイズが大きく、凹凸が少ない角質細胞を 6 つ選定し、それらをマイクロマニピレータで採取し、別のガラススライド上に等間隔で吸着させる。この際、角質細胞とガラススライドの間に空気が入ったり、細胞が折れ曲がったりしないように注意する。サンプル作製は、AFM 計測の直前に実施し、保存は行わない。

(4) コロイド探針の作製

市販の AFM 探針は、先端がナノレベルで尖っており、高分解能に表面構造を観察す

るには有利であるが、一方で、細胞のような柔らかく、不均一な表面構造を持つ対象の硬さを測定する場合、再表面のわずかな構造によって測定される弾性率が大きく変わってしまい、計測の信頼性や再現性を著しく低下させる。そこで、細胞の硬さ測定には、AFM カンチレバーの先端にマイクロビーズを取り付けたコロイド探針がしばしば使われる。本研究では、以下の手順でコロイド探針を作製し、弾性率測定に利用する。まず、探針のない市販のカンチレバー (TL-NCH, Nanoworld 社) の先端に、直径 8 μm の SiO_2 コロイド粒子を接着剤 (353ND, Epo-Tek 社) にて取り付ける。この作業には、マイクロマニピュレータ (Axis Pro, マイクロサポート社) を用いる。作製したコロイド探針と接着剤の形状は、走査型電子顕微鏡 (SEM) (SU5000, 日立ハイテク社) を用いて確認する。

(5) AFM による角質細胞の弾性率の評価

AFM (JPK Instrument Corp., Nano Wizard4) により、試料の弾性率を 6 個すべての細胞に対して計測する。AFM による弾性率評価は以下の方法で行う。コロイド探針を用いて、細胞全体を含む 50 μm x 50 μm の観察範囲内に、32 x 32 点のアレイ状に配置した XY 位置でそれぞれフォースカーブを取得する。得られたフォースカーブに対してヘルツモデルの式をフィッティングすることで各位置における弾性率 (ヤング率) を求める。それらの値をヒストグラムとして表し、それをガウス関数によりマルチピークフィッティングして、最大面積を持つピークに対応するフィッティングカーブから得られたピーク値をその細胞の硬さとする。なお、マルチピークフィッティングプログラムは、ナショナルインスツルメンツ社製の LabVIEW を用いて開発した。

(6) 測定細胞数 :

細胞ごとの物性のばらつきや、再現性確認の必要性を考慮して、異なる試料提供者に対して、それぞれ 10-20 個の細胞を測定する。過去の AFM を用いた細胞弾性率計測の事例を参考にして、10 個以上の細胞を測定すれば、統計的に有意な評価結果が得られると判断した。

(7) 評価項目

主要評価項目 :

AFM により測定した角質細胞の弾性率

副次評価項目：

該当なし

3.2.4 結果と考察

図 3-4 は、顔の角質採取した時の光学顕微鏡像（上段）と上腕の角質採取した時の光学顕微鏡像（下段）を示す。顔の角質は、形態が様々であるのに対して、上腕の角質の形態は均一、四角、大きく、平坦な特徴を示した。

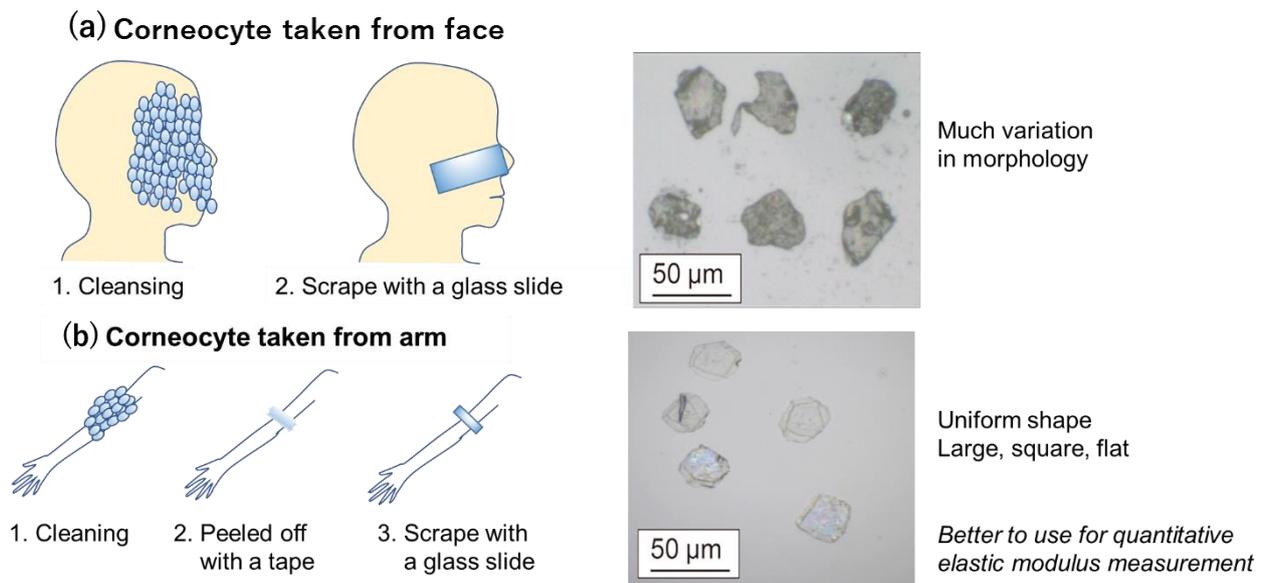


図 3-4 角質採取の部位別比較

図 3-5 は、マイクロマニピレーターによる角質細胞の単離の概要図（左）と角質細胞の選定（右）および角質細胞の高さ像と弾性率分布図（下）を示す。比較的同じサイズで、大きめで、傷がなく、平坦で、平板状の細胞を選択して、それらを 9 つスライドガラス上にマニピュレータで配置した。

図 3-6 は、コロイドプローブの SEM 像を示す。 $\phi 8 \mu\text{m}$ の SiO_2 のビーズを接着剤「353ND」でマイクロマニピレーターを用いて TL-NCH のカンチレバーに取り付ける。最後にホットプレートを用いて 150°C で 1 時間加熱することで、ガラスコロイドを固定させる。

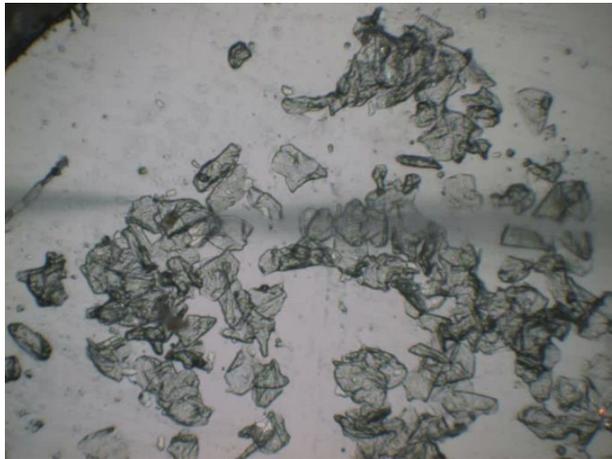
図 3-7 は、QI モードで単一角質細胞を測定した時の典型的なフォースカーブを示す。

図 3-7 は、 $20 \times 20 \mu\text{m}$ と $10 \times 10 \mu\text{m}$ のスキャン範囲での角質細胞の AFM 像および光学顕微鏡像を示す。

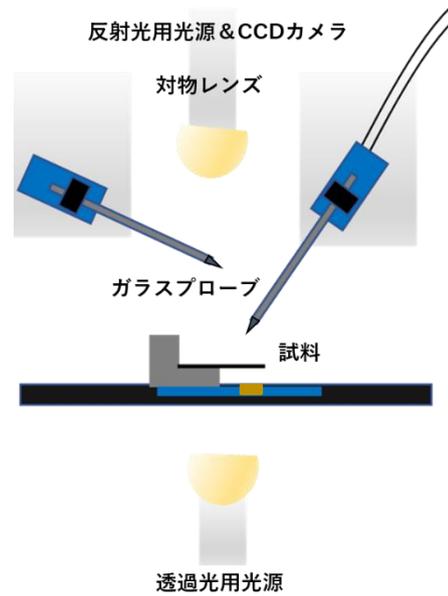
図 3-8 は、 $20 \times 20 \mu\text{m}$ と $10 \times 10 \mu\text{m}$ のスキャン範囲での角質細胞のマルチピーク

とシングルピークのヤング率分布およびヒストグラムを示す。

図 3-9 は、作成したフィッティングプログラムの概要を示す。



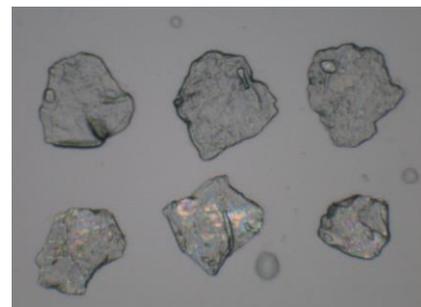
(a) ガラスで剥離した角質細胞の試料



(b) マイクロマニピレータの外観図



(c) ガラスプローブによる単離の様子



(d) 選定した角質細胞のサンプル

図 3-5 (a) ガラスで剥離した角質細胞の試料, (b) マイクロマニピレータの外観図.

(c) ガラスプローブによる単離の様子, (d) 選定した角質細胞のサンプル。

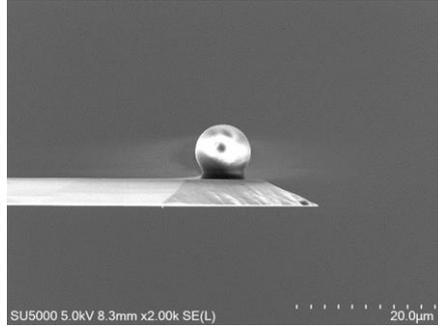


図 3-6 コロイドプローブのSEM写真

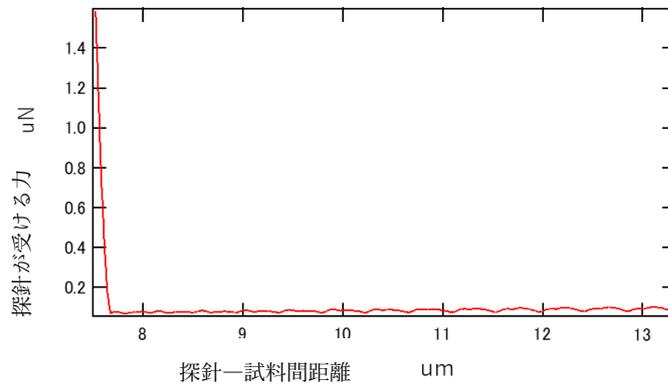
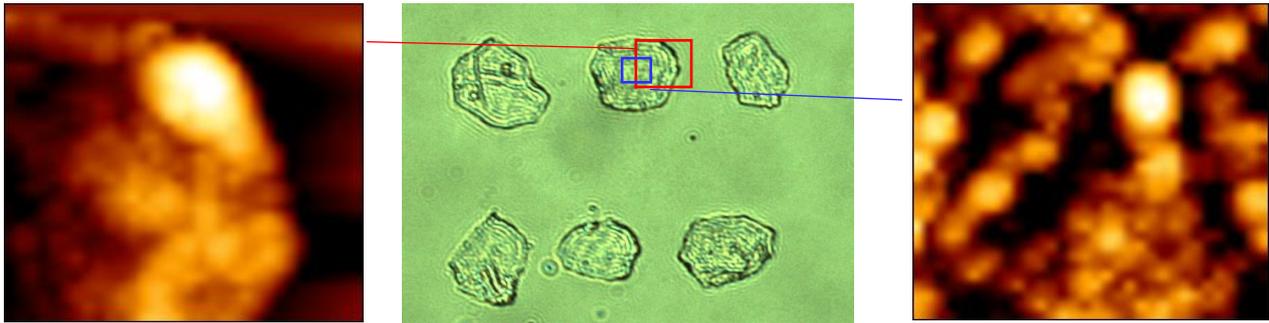


図 3-6 角質計測の典型的なフォースカーブ

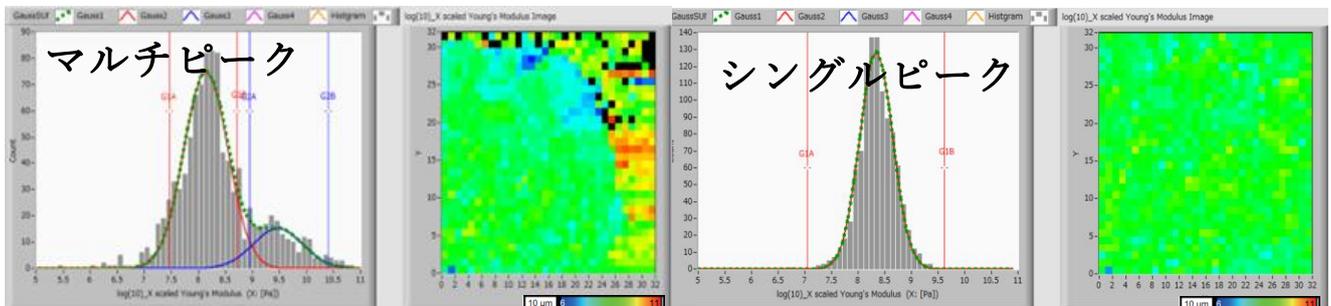


(a) $20 \times 20 \mu\text{m}$

(b) $10 \text{ mm} \times 14 \text{ mm}$

(c) $10 \times 10 \mu\text{m}$

図 3-7 角質細胞の AFM 像および光学顕微鏡像



(a) $20 \times 20 \mu\text{m}$

(b) $10 \times 10 \mu\text{m}$

図 3-8 マルチピークとシングルピークのヤング率分布およびヒストグラム

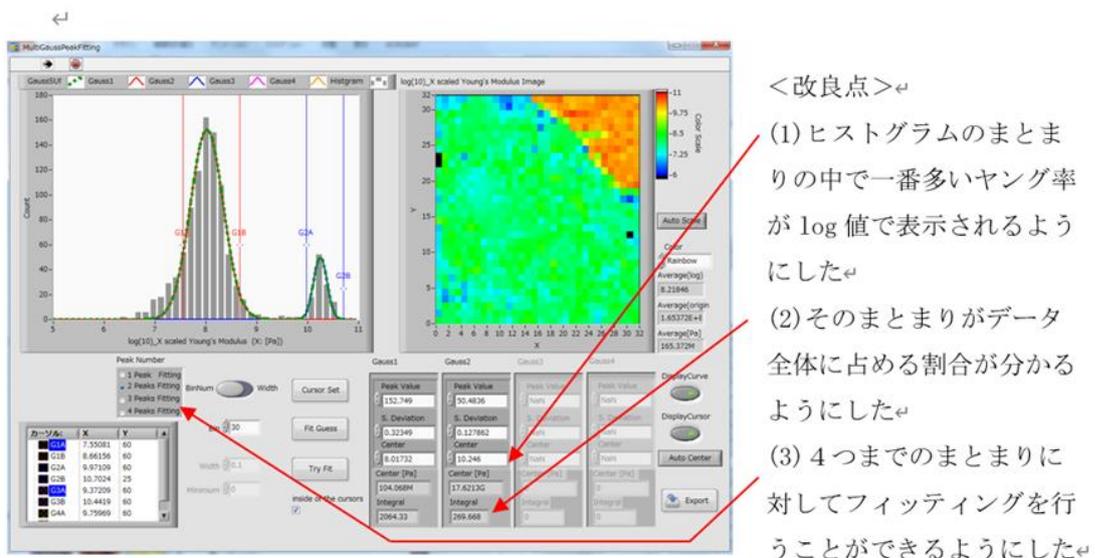


図 3-9 作成したフィッティングプログラムのユーザーインターフェース

3.2.4 の結果から、上腕の角質を採取して、マイクロマニピレーターにて、別のスライドガラス上に、細胞を傷を付けずに再現性よく単離できた。なお、マイクロマニピレータを用いたガラスプローブによる採取された試料からの角質細胞の単離は、静電気による引力を原理としている。できるだけ同一条件で採取した複数の細胞の硬さ分布を異なる統計解析の手法で評価することが重要と考えた。また、単離した角質細胞の内部のヤング率に分布があること、細胞の周辺はヤング率が高く、内部の方がヤング率が低いという測定結果から、フッティングプログラムに、マルチピークフッティングプログラムの開発が必要と考えた。ピーク値の選定は、マルチピークフィッティングの最大面積のピークの値をとるのが、再現性の点で有利と考えられる。同様の方法で採取した細胞の硬さが概ね同じ値になれば再現性であると考えた。

3.2.5 まとめ

AFM で単一角質細胞の硬さを再現性良く計測するための適切な細胞採取、試料作製、計測、解析方法を確立した。採取部位は、今後、上腕に決めた。

3.3 湿度制御原子間力顕微鏡(AFM)の開発と皮膚模倣下での単一角質細胞のヤング率を応用した保湿評価

3.3.1 研究背景

人間の体は角質で構成される皮膚で覆われており、皮膚角質層のバリア機能により水分が保湿されている。この保湿機能により、皮膚の構造と機能が保持されている。角質層バリア機能に関与する保湿因子は角質細胞中の天然保湿因子（NMF）と細胞間脂質（主にセラミド）である。角質層バリア機能の状態を良好に維持するサポートをするのが化粧品の役割である。化粧品の成分配合は、「水」、「モイスチャライザー（水溶性の潤い）成分」、「エモリエント（油性の潤い）成分」が配合されている。そのために、スキンケアの3アイテムである化粧水・乳液・クリームは、この3成分が配合されて作られている。しかし、化粧品による保湿効果は明らかにされていない。単一角質細胞への保湿剤成分の塗布により、細胞内のNMFにモイスチャライザー成分が補充されて保湿が改善したかは未検証である。

保湿評価法として原子間力顕微鏡（AFM）を使用して、様々な角質層の深さから採取されたヒト角質細胞の弾性率計測の手法により、加齢、皮膚の水分補充や角質層に関連する病状などの様々な皮膚状態の低侵襲評価に使用できる。AFMは探針を試料に近づけた際に受けた力と探針と試料間の距離の関係から、試料の硬さを取得することも可能である。角質細胞に保湿剤成分が塗布されたときに角質細胞内のNMFが補充されることで細胞内に水分が増えることで弾性率が低下して細胞は柔らかくなることが推測できる。しかし、AFMによる弾性率計測の先行研究（Anne J. Keurentjes et al. (2020)⁽⁶⁹⁾; Pascale Milani et al. (2018)⁽⁴³⁾ など）は、制御された皮膚の外部環境下（温度と湿度）で単一角質細胞の弾性率が計測されていないことが問題である。

3.3.2 研究目的・内容等

(1) 研究目的

研究目的は、単一角質細胞の保水機能を理解するために、温度と湿度制御可能な環境制御AFMの開発と、AFMによる弾性率計測を組み合わせることで、高湿度（入浴後の化粧水使用時）と低湿度（乾燥肌）におけるスキンケア商品の保湿剤成分を塗布した前後での単一角質細胞の弾性率の温度と湿度依存を明らかにすることである。

(2) 研究方法

細胞に適した直径 8 μm のシリコンビーズを使いコロイダル探針を作製して AFM による弾性率計測を行う。取得したアプローチでのフォースカーブから弾性率を算出して保湿剤成分の塗布による保湿効果を調べることができる。予備実験では図 4-9 で示す方法による単一角質細胞の弾性率計測を行う。

(3) 研究内容

① 温度と湿度の制御可能な AFM の開発：

課題 1：温度と湿度の制御された密閉空間及び水の貯蓄タンクの作製

課題 2：マスフローコントローラーの制御機構の開発

② 保湿剤成分を塗布した前後での単一角質細胞の弾性率の温度と湿度依存性の検討

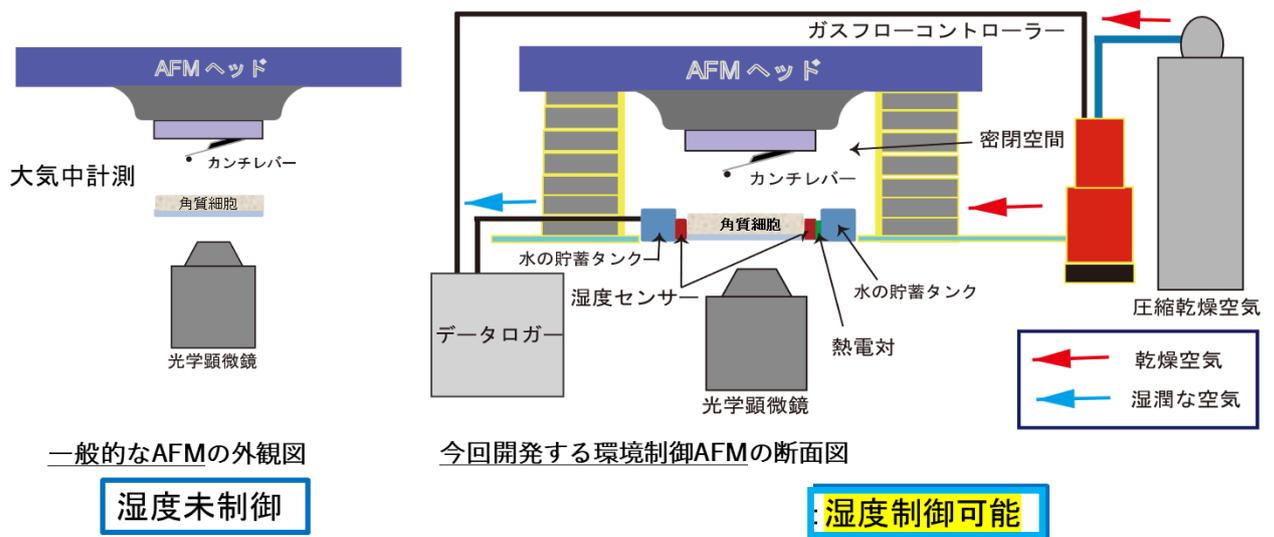
3.3.3 湿度制御可能な AFM の開発

課題 1：温度と湿度の制御された密閉空間及び水の貯蓄タンクの作製

図 3-10 に示す通り、試料と AFM 探針の周囲をゴム製のメンブレンで取り囲み密閉空間をつくる。メンブレンは、AFM ヘッド側および試料側に磁石で固定する。この内部には 6~8 ml 程度の貯水機構を設ける。貯水機構から自然蒸発した水分によって密閉空間内の湿度を上昇させるため、時間応答性の高い湿度制御機構を実現することができる。この密閉空間内には、熱電対とペルチェ素子からなる温度センサーと湿度センサーを挿入して、温度と湿度をモニタリングする。

課題 2：マスフローコントローラーの制御機構の開発

密閉空間の温度と湿度を制御するために、乾燥空気を密閉空間内にフローさせる。乾燥空気の流量はマスフローコントローラーで調整する。マスフローコントローラーを制御するために、LabVIEW で温度と湿度制御プログラムを組む。このプログラムでは、温度と湿度の値を一定に保つように PI 制御でマスフローコントローラーのバルブの開閉量を調節する。これにより、実験者が温度と湿度の時間変化を任意に設定することができる。また、温度センサーと湿度センサーをデータロガーに接続することで、温度と相対湿度の時間変化をデータとして記録できるようにする。



【湿度制御機構の開発】
 ・開発の主要ポイント

- 密閉空間の作製
- 乾燥空気のフロー調節機構の開発
- 温度と相対湿度のモニタリングの開発

図 3-10 環境制御 AFM 開発の概要

3.3.4 結果と考察

図 3-11 は、湿度制御機構の概要図とサンプルホルダー周囲の機構を示す。サンプルホルダー機構は、密閉空間にしている。湿度分布は、空気の入り口である In let が最大値で、出入り口の Out let で最小値になることがわかっている。そこで、in let と Out let の中央にあるサンプルホルダーの位置が相対湿度の中央値になるように、サンプルホルダーを配置した。

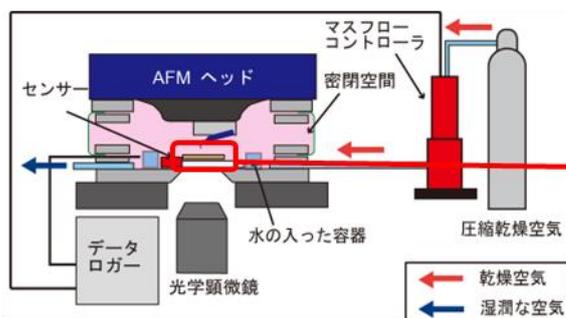


図3-11 サンプルホルダー周囲の機構

湿度制御機構の密閉性の確認実験を行った。その結果、密閉性と相対湿度 20～90 % の湿度制御および速い湿度応答を確認した。これにより、湿度制御機構が完成した。

3.3.5 まとめ

密閉空間の作製、乾燥空気のフロー調節機構の開発、温度と相対湿度のモニタリングの開発を行い、湿度制御 AFM が完成した。

3.3.6 保湿剤成分塗布前後での単一角質細胞のヤング率と湿度依存の検証

3.3.6.1 目的： AFM を用いた湿度 30 % と 90 % で健常人の角質に保湿剤の塗布前後における保水機能の定量化を行う。

3.3.6.2 単一角質細胞への保湿剤の塗布と除去の方法の検討

図 3.12(b) のようにグリセリンは、粘性が高く少しでも量が多いとカンチレバーがグリセリンに浸漬してしまいフォースカーブをうまく取得することができなかった。そこでグリセリンの滴下量を調整を試みたが、少しでも少ないと細胞が露出してしまい、少しでも多いとカンチレバーが浸漬してしまうため、再現性を取る上でこの手法では計測できないと考えた。そこで細胞が浸漬した状態での計測ではなく、図 3.12(d) のようにグリセリンに浸漬させた後にマイクロマニピュレータを用いて細胞周りのグリセリンを退かす方法を一度行うこととした。この手法を行う際、プローブで細胞を傷つけないよう十分注意する必要がある。

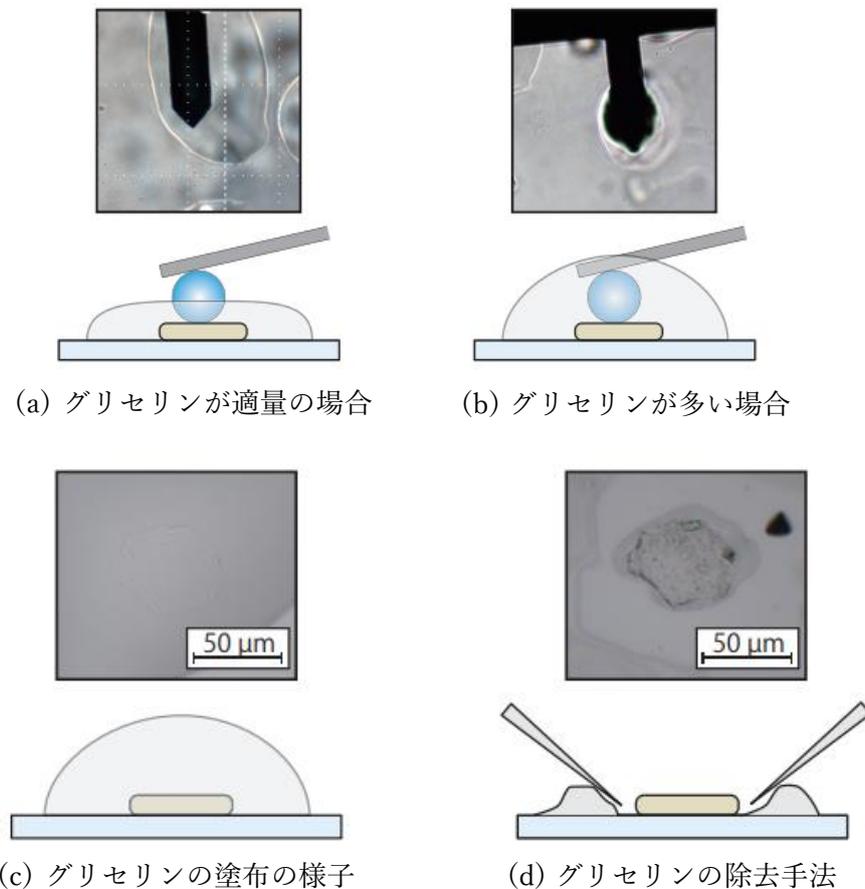
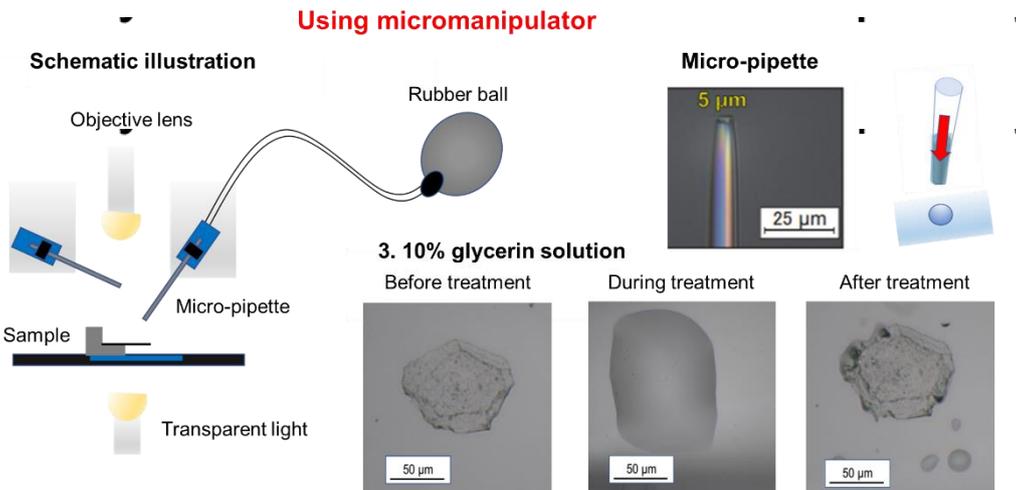


図 3-12 グリセリンを塗布した際の問題点[(a),(b)].
グリセリンの除去手法[(c),(d)].

3.3.6.3 単一角質細胞への保湿剤の塗布方法

スライドガラス上に採取した個々の角質細胞が十分に浸漬される程度の量の保湿剤を、マイクロマニピュレータのマイクロインジェクション機能により滴下し、10 分間その状態を維持した後、液滴をマイクロインジェクターにより吸引することで除去する。保湿剤としては、1 %ヒアルロン酸ナトリウム水溶液、グリセリン 10 %溶液とグリセリン 10 %と 0.1 %ヒアルロン酸ナトリウムの混合液のそれぞれについて実験を実施する。(図 3-13)



Easy to control the size of droplet by exhalation and suction of moisturizer using micromanipulator

図 3-13 角質細胞への保湿剤の塗布および除去の概要。
保湿剤塗布の前中および除去後の光学顕微鏡像。

3.3.6.4 結果と考察

1 %ヒアルロン酸ナトリウム水溶液を用いて計測を行った。細胞に塗布する際に、ヒアルロン酸ナトリウム水溶液はマイクロインジェクターを用いて滴下すると量が少なくてすぐに揮発してしまい、十分に浸漬させることができなかった。そのため、ピペットマンを用いて十分量滴下し、自然に揮発するまでの約 20 分浸漬させた。この時のヤング率計測結果を図 3.14 に示す。

10 %グリセリン溶液を用いてヤング率計測を行った。次に、市販の化粧品では様々な保湿剤を混合しているため、今回はヒアルロン酸ナトリウムとグリセリンを混合してみた。それぞれの濃度は、ヒアルロン酸ナトリウムが 0.1 %、グリセリンが 10 %となるようにした。しかし、マイクロインジェクターを使用する場合、滴下時には水がほとんど揮発しているためグリセリンがほとんどを占めている。また、グリセリン塗布時と同様に一定時間浸漬させた後にプローブで細胞周りの溶液を除去した。弾性率を計測した結果を図 3.15 に示す。グリセリン 10 %溶液（上段）とグリセリン 10 %と 0.1 %ヒアルロン酸ナトリウム (HA)の混合液（下段）の 2 種類の保湿剤を角質細胞に塗布したときのヤング率を測定した結果を図 3-15 は示している。角質細胞への保湿剤塗布前後の光学顕微鏡像（左）と湿度 30 %と 90 %での保湿剤の塗布前後のヤング率分布（右）を示す。ヤング率分布の平均値と標準偏差（左下）に示す。湿度 30 %と 90 %共に、保湿剤の塗布前後でヤング率の減少を確認した。

1 % sodium hyaluronate

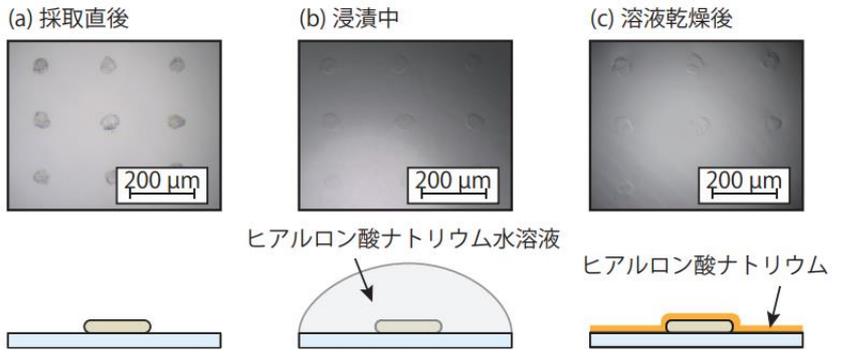
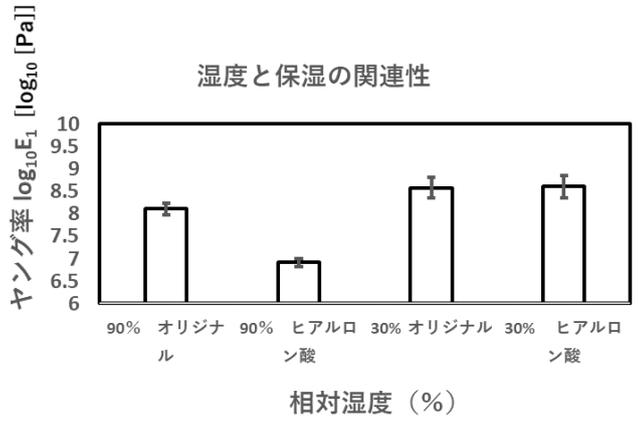
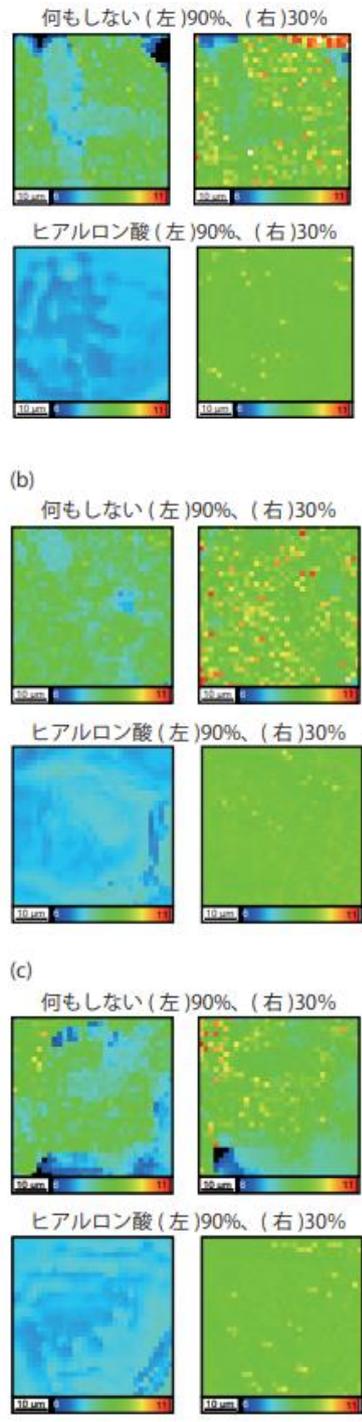


図 3-14 湿度 30 %と 90 %での保湿剤の塗布前後のヤング率 分布 (左) , ヤング率分布の平均値と標準偏差 (右上) , ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の塗布の様子 (右下) 。

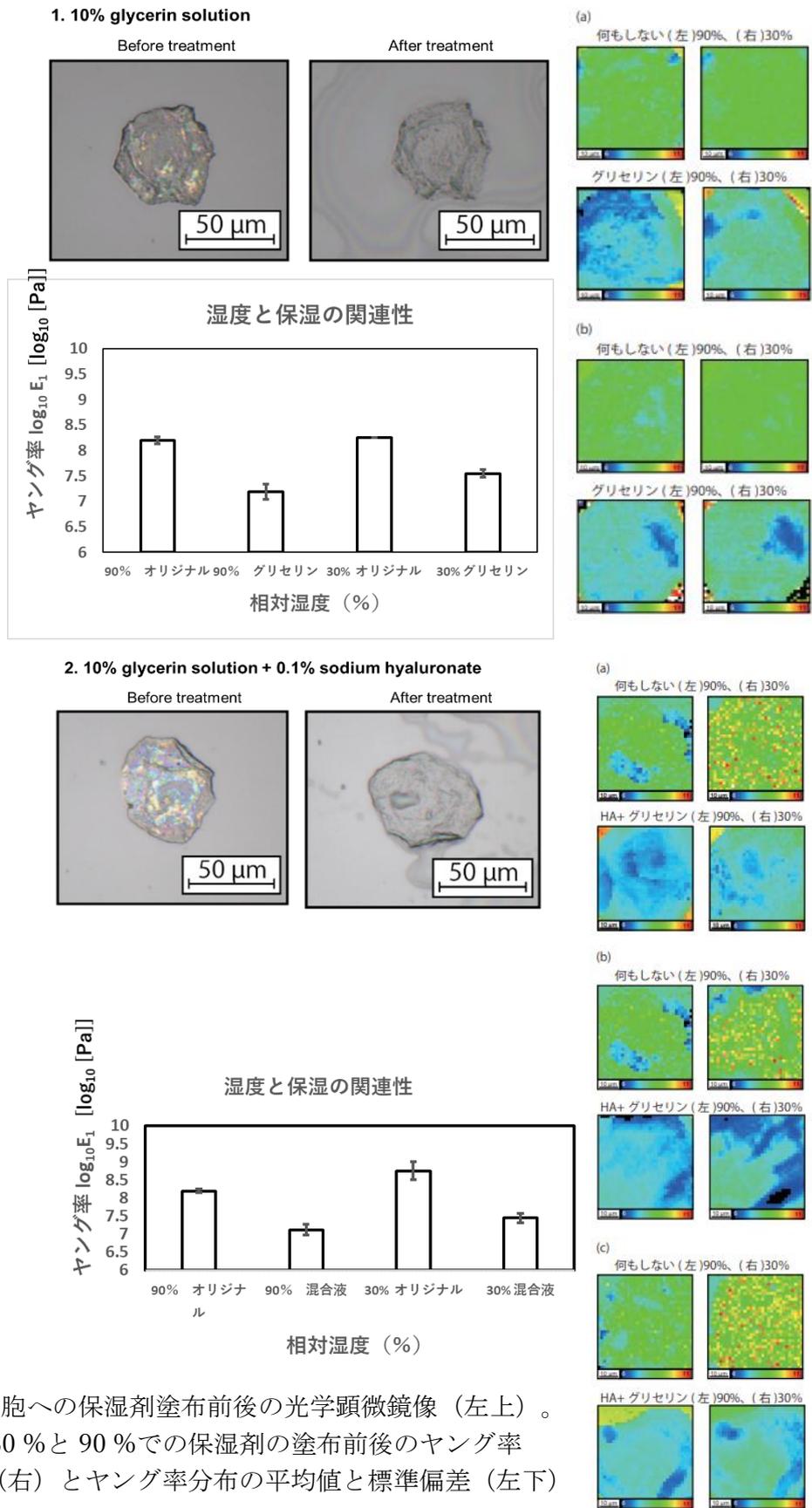


図 3-15 角質細胞への保湿剤塗布前後の光学顕微鏡像 (左上)。湿度 30% と 90% での保湿剤の塗布前後のヤング率分布 (右) とヤング率分布の平均値と標準偏差 (左下)

結果は、高湿度の時にヤング率が低くなっていた。しかしながら、ヒアルロン酸を塗布する際に図 3.14 に示すように細胞上にヒアルロン酸ナトリウムの層が形成されており、ヒアルロン酸ナトリウムの硬さを計測している可能性がある。そのために、高湿度ではヒアルロン酸ナトリウムが水を含むことでヤング率が低くなり、低湿度では、3 個の細胞でヤング率が一致しており、水が抜けてヒアルロン酸ナトリウムのみの硬さが計測されたと考えられる。

グリセリンへの浸漬時間は 1 時間とした。結果としてはグリセリンを塗布することで高湿度、低湿度共にヤング率が小さくなり、特に高湿度で変化量が大きく出た。このことから、グリセリンは角質細胞を柔らかくする作用を持つことがわかった。

グリセリンと HA の混合液では、グリセリン塗布時と同様に高湿度、低湿度共にヤング率は低くなった。異なる点として、グリセリン塗布時は高湿度で顕著にヤング率が低下したが、ヒアルロン酸を混合したグリセリンでは低湿度において高湿度と同程度のヤング率の低下が見られた。このことからヒアルロン酸を配合することで低湿度においても高湿度と同様の硬さを維持する作用があると考えられる。

3.3.6.5 まとめ

以上の結果よりグリセリンを塗布した場合は角質細胞が柔らかくなり、特に高湿度で顕著に差が出た。また、グリセリンにヒアルロン酸ナトリウムを配合することで低湿度においても高湿度同様の変化が出た。一方で今回の実験結果は条件の調整段階であったため再現性の確認が不十分であり今後条件を整理し、再現性を取る必要がある。

3.3.7 異なるサイズのビーズによる押し込み量の比較

3.3.7.1 目的：角質細胞は深さによって構造が異なり、ケラチンや天然保湿因子が含まれる深さの硬さを得るには 30 から 50 nm 押し込む必要がある⁽⁴³⁾ため計測条件を調整する。

3.3.7.2 方法

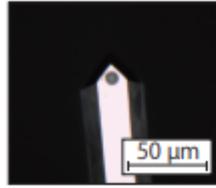
押し込み量を増やすにあたり今回は使用するビーズのサイズを 8 μm から 2 μm にすることで接触面積を小さくした。2 μm のビーズを取り付けるにあたり、TL-NCH では計測時にカンチレバーの先端が試料にぶつかる可能性がある。そのため探針の付い

たカンチレバーを使用し、探針先端を集束イオンビーム (Focused Ion Beam : FIB) を用いて切断し、切断面にビーズを取り付けた。計測条件はエタノール処理した細胞を使用し、湿度は 30 %、90 %とした。得られたデータから無作為に 5 本のフォースカーブを選び、それぞれのフォースカーブについて押し込み量とその時のヤング率を求めプロットした。結果を図 3.16 に示す。

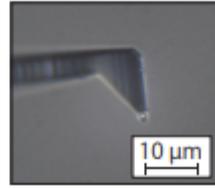
3.3.7.3 結果と考察

結果としてはビーズの大きさによる押し込み量の差はほとんどなく、それよりも湿度による細胞の硬さ変化による押し込み量の差の方が大きかった。以前の実験からエタノール処理をしていない細胞はエタノール処理をした細胞より柔らかく出ている結果が得られていたので、8 μm のビーズ、湿度 30 %の条件でエタノール処理をしていない細胞に対して同様の実験を行い、その結果を図 3.17 に示す。結果としては、図 3.16(c) と比較して押し込み量が大きく増加した。また、約 20 μm 以上押し込むと得られるヤング率がほとんど一定となることが分かった。これらの結果から、エタノール処理によって細胞が硬くなってしまうこと、細胞を押し込む量は 20 μm 程度で十分であることが分かった。

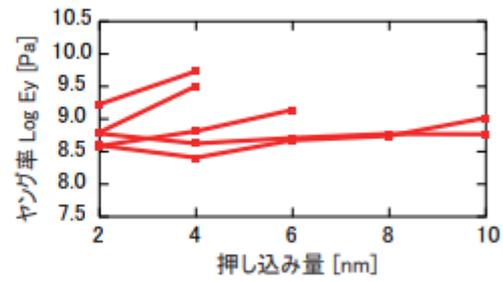
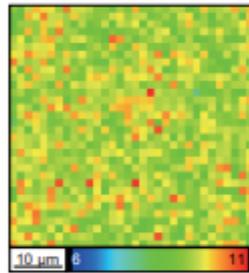
(a)8 μ m ビーズのカンチレバー



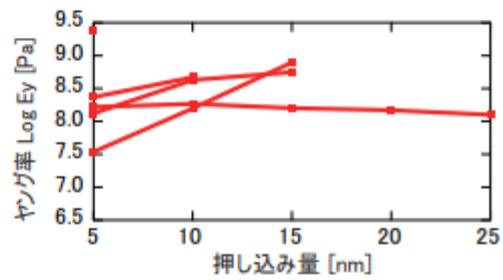
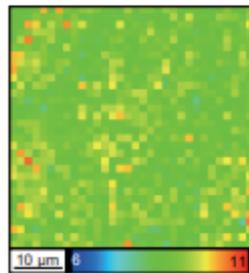
(b)2 μ m ビーズのカンチレバー



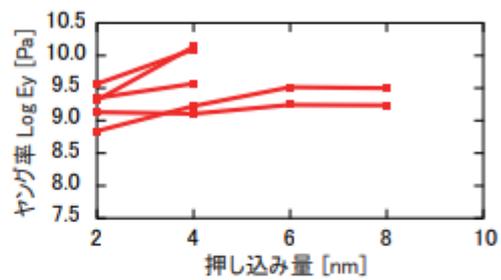
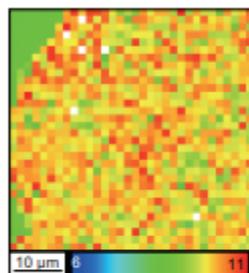
(c)8 μ m ビーズ、RH30



(e)8 μ m ビーズ、RH90



(d)2 μ m ビーズ、RH30



(f)2 μ m ビーズ、RH90

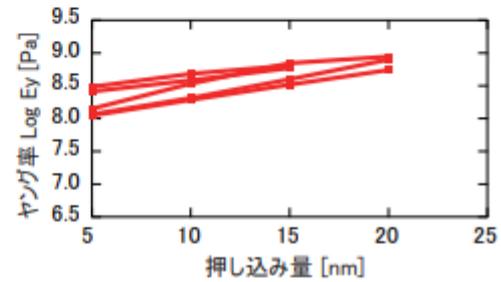
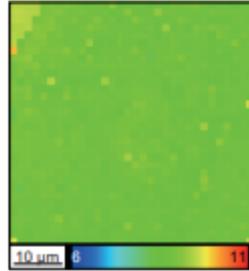


図 3-16 異なるサイズのビーズによる押し込み量の比較

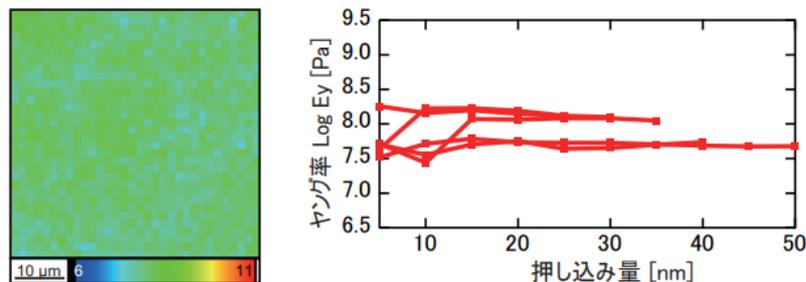


図 3-17 エタノール処理をしていない細胞の押し込み量

3.4. 本章のまとめ

皮膚の保水機能を司る角質層は角質細胞と細胞間脂質から構成される。角質細胞および細胞間脂質の吸湿・保湿メカニズムを解明することは、皮膚の保水性能を向上させるための医療品や化粧品などの開発のために重要である。これまでに、引張試験による人工皮膚膜の弾性率測定が行われており、湿度の増加にともなって膜の弾性率が低下することが報告されている。しかしながら、湿度の変化に伴う単一角質細胞レベルの弾性率の変化をとらえることは困難であった。

そこで、本研究では、独自に開発した湿度制御可能な原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、単一角質細胞の弾性率分布を計測する手法を開発した。まず、スライドガラスでヒトの上腕をこすって角質細胞を取得し、マイクロマニピュレーターを用いて単一角質細胞を取得してスライドガラス上に配置した。また、JPK 社製の Nanowizard3 の QI モードを利用し、スライドガラス上の角質細胞の高さ画像と弾性率分布を取得できる湿度制御機能を備えた AFM を開発しました。ここで、探針は直径 8 μm 程度のシリカビーズを接着固定した自作コロイドプローブを用いて計測を行い、角質表面の構造を貫くことなく細胞自体の弾性分布を測定した。弾性率分布をガウス分布でフィッティングしたところ、単一のガウス分布では必ずしも上手くフィッティングできない場合があった。これは、単一角質細胞内においても複数の弾性率のピークが存在することが要因であった。そこで、異なるパラメーターを用いた複数のガウス分布で弾性率分布をフィッティングする自作プログラムを作成した。これにより、単一角質細胞表面における複雑な弾性率分布もガウス分布でフィッティングできるようになり、単一角質細胞内で興味のある硬さをもつ部分の弾性率のみを取得するこ

とが可能となった。

本手法を用いることにより、湿度制御環境下において単一角質細胞レベルの弾性率を取得することが可能となった。今後、医療品や化粧品塗布前後における乾燥および湿潤環境下の単一角質細胞の弾性率計測を行うことで、単一角質細胞の保水機能のメカニズムの解明に繋がることが考えられる。これにより、皮膚の保水性能を従来よりも向上させる医療品・化粧品の開発に貢献することが期待される。

第4章 結論

本博士論文の各論で得られた知見は、以下に集約できる。

4.1 側臥位でのマットレス内気圧と接触圧分布の関連性 (2章)

仰臥位から側臥位に体位変換した時は、マット内圧を増加させることが、最大接触圧を最小限に抑制する上で有効であることが示唆された。

4.2 湿度制御 AFM を用いた人の単一角質細胞の硬さとその湿度依存性に与える保湿剤の影響に関する研究 (3章)

AFM を用いた人の単一角質細胞のヤング率計測の方法を確立した。さらに、皮膚環境を模倣化した実環境を構築するための湿度制御 AFM の開発に成功した。保湿効果を調べるためにグリセリン 10% 溶液および 0.1% ヒアルロン酸ナトリウム、さらに、グリセリン 10% と 0.1% ヒアルロン酸ナトリウムの混合液の 3 種類の保湿剤を角質細胞に塗布した前後のヤング率を計測した。その結果から、全ての保湿剤で角質細胞のヤング率の減少が確認できた。

5章 結論と展望

5.1 本博士論文の全体を踏まえた考察を以下とする。

本博士論文の構成は、褥瘡予防における仰臥位から側臥位に体位変換した時の身体とエアマットレスとの接触圧を取り除く除圧の研究と角質細胞の保湿剤の効果を調べた研究である。予防的スキンケアを中心に本博士論文の知見を考察する。

保湿剤の効果は、皮膚の細胞間脂質に作用する説と角質細胞に作用する説があることは、序論で言及した。4章の実験結果から、保湿剤の塗布後は、角質細胞のヤング率は低くなり、柔らかくなっていることが示唆された。

さらに、以下のヤング率の公式(式5-1)に適用して、エアマットレスを用いた褥瘡予防に予防的スキンケアとして保湿ケアを実施すると、本博士論文の結果から、ヤング率の低下、応力はエアマットレスと接触領域の身体に対する圧力に相当すること考慮しても、ひずみは増加することが理解できる。

$$\text{ヤング率} = \text{応力} / \text{ひずみ} \cdots \cdots \cdots \text{(式5-1)}$$

つまり、保湿剤塗布により、単一角質細胞のヤング率は低下することは、言い換えると。単一細胞の弾力性が増すことで、エアマットレスからの圧力に対する耐久性が増す。

従って、3章の実験結果で相対湿度90%およびグリセリン10%溶液、グリセリン10%と0.1%ヒアルロン酸ナトリウムの混合液で、単一角質細胞のヤング率の低下は、単一細胞の弾力性が増加したと結論付けることができる。

マルチの角質細胞から構成される角質層では、次の報告がされている。CD(コルネオデスモソーム)の消化は、相対湿度の増加とともに増加する⁽⁷⁰⁾。また、湿度が高い(相対湿度80%)が、低い湿度(相対湿度44%)では、グリセロールがCD消化をさらに促進することも報告されている⁽⁷⁰⁾。従って、単離された角質細胞では、保湿剤の塗布によるヤング率の低下は、材料力学の単純なモデルに当てはめることが可能となり、コロイダル探針の押し込んだ時の角質細胞の変形量 δ (=ひずみ量)から、保湿剤の効果は細胞の弾力性が増すと結論付けられる。

本博士論文の結論は、以下である。
単一角質細胞に保湿剤を塗布することで、単一細胞の弾力性が増して、圧力に対する耐

久力も同時に増す。このことは、皮膚とエアセルの双方での伸張力およびせん断力に対する耐性が増加することに繋がり、保湿ケアの実施が褥瘡予防に寄与することを示唆する。

5.2 今後の展望

褥瘡予防の本研究では、健康人でデータ取得から知見を得る段階まで終えた。今後は、高齢者でマットレス内圧と側臥位での大転子部の最大接触圧の測定を行い、健康人の知見と比較して体位変換ケアに活用していくことが期待される。

保湿の本研究では、健康人で保湿効果について検討した段階まで終えた。今後は、高齢者で角質の硬さおよび保湿剤の効果を測定して、健康人との比較検討することで、乾燥肌になりやすい職場環境にいる方や高齢者の保湿ケアに活用していくことが期待される。さらに、科学的根拠に基づく有効な保湿剤や化粧品の開発に活用されることが期待される。

参考文献

- (1) 一般社団法人日本褥瘡学会(2016)：褥瘡ガイドブック-第2版褥瘡予防・管理ガイドライン（第4版）準拠,pp.8, 照林社.東京都.
- (2) 一般社団法人日本褥瘡学会(2016)：褥瘡ガイドブック-第2版褥瘡予防・管理ガイドライン（第4版）準拠,pp. 159-160, 照林社.東京都.
- (3) 日本褥瘡学会実態調査委員会(2018)：第4回（平成28年度）日本褥瘡学会実態調査委員会報告2療養場所別自重関連褥瘡の有病率，有病者の特徴，部位・重症度およびケアと局所管理，褥瘡会誌(Jpn J PU)，20(4), 446-485.
- (4) 須釜淳子，看護理工，2(2):90-94, 2015.
- (5) 真田弘美,須釜淳子, 稲垣美智子他（1995）：高齢者におけるエアマットレスの内圧と接触圧の関係，医器学, Vol.65, No. 9, 419-427.
- (6) Natsu Sasaki, Gojiro Nakagami, Kozue Sakai et al. (2012) : Determining the optimal inner air cell pressure for the effective reduction of interface pressure, *Journal of Tissue Viability*, 21, 47-53.
- (7) 真田弘美, 市岡滋, 溝上祐子:進化を続ける！褥瘡・創傷治療ケアアップデート, pp. 35, 照林社, 東京都.
- (8) *Skin Res Technol.* 2019;25:158-164.
- (9) Ishikawa J, Yoshida H, Ito S, et al. Dry skin in the winter is related to the ceramide profile in the stratum corneum and can be improved by treatment with a Eucalyptus extract. *J Cosmet Dermatol.* 2013;12(1):3-11.
- (10) Domoto N, Koriyama T, Chu BS, Tsuji T. Evaluation of the efficacy of orange roughly (*Hoplostethus atlanticus*) oil in subjects with dry skin. *Int J Cosmet Sci.* 2012;34(4):322-327.
- (11) Shim JH, Park JH, Lee JH, Lee DY, Lee JH, Yang JM. Moisturizers are effective in the treatment of xerosis irrespectively from their particular formulation: results from a prospective, randomized, double-blind controlled trial. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(2):276-281.
- (12) Heinrich U, Koop U, Leneveu-Duchemin MC, et al. Multicentre comparison of skin hydration in terms of physical-, physiological and product-dependent parameters by the capacitive method (Corneometer CM 825). *Int J Cosmet Sci.* 2003;25(1-2):45-53.
- (13) Kalaaji AN, Wallo W. A randomized controlled clinical study to evaluate the effectiveness of an active moisturizing lotion with colloidal oatmeal skin protectant versus its vehicle for the relief of xerosis. *J Drugs Dermatol.* 2014;13(10):1265-1268.
- (14) Kottner J, Lichterfeld A, Blume-Peytavi U. Maintaining skin integrity in the aged: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2013;169(3):528-542.
- (15) Hahnel E, Blume-Peytavi U, Trojahn C, et al. The effectiveness of standardized skin care regimens on skin dryness in nursing home residents: a randomized

- controlled parallel-group pragmatic trial. *Int J Nurs Stud.* 2017;70:1 - 10.
- (16) Carville K, Leslie G, Osseiran-Moisson R, Newall N, Lewin G. The effectiveness of a twice-daily skin-moisturising regimen for reducing the incidence of skin tears. *Int Wound J.* 2014;11(4):446 - 453.
- (17) Kottner J, Boronat X, Blume-Peytavi U, Lahmann N, Suhr R. The epidemiology of skin care provided by nurses at home: a multicentre prevalence study. *J Adv Nurs.* 2015;71(3):570 - 580.
- (18) G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 56, p. 930, 1986.
- (19) *British Journal of Dermatology* 2003; 149: 749–756. 共著 : T.KUNII, T.HIRAO,* K.KIKUCHI AND H.TAGAMI.
- (20) Takeshi Matsui and Masayuki Amagai: Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum, *International Immunology*, Vol. 27, No. 6, pp. 269–280.
- (21) Hyun Kyung Choi · Young Hoon Cho · Eun Ok Lee · Jin Wook Kim · Chang Seo Park; Phytosphingosine enhances moisture level in human skin barrier through stimulation of the flaggrin biosynthesis and degradation leading to NMF formation, *Arch Dermatol Res* (2017) 309:795–803.
- (22) Lin TK, Crumrine D, Ackerman LD, Santiago J-L, Roelandt T, Uchida Y, et al. Cellular changes that accompany shedding of human corneocytes. *J Invest Dermatol.* 2012;132(10):2430–9.
- (23) Ishida-Yamamoto A, Igawa S. The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res.* 2015;360(3):477–82.
- (24) Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015;27(6):269–80.
- (25) Eckhart L, Lippens S, Tschachler E, Declercq W. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3471–80.
- (26) Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(4):328–40.
- (27) Eckert RL, Sturniolo MT, Broome A-M, Ruse M, Rorke EA. Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol.* 2005;124(3):481–92.
- (28) Michel S, Schmidt R, Shroot B, Reichert U. Morphological and biochemical characterization of the cornified envelopes from human epidermal keratinocytes of different origin. *J Invest Dermatol.* 1988;91(1):11–5.
- (29) Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1989; 93(1):169–72.
- (30) Guneri D, Voegeli R, Gurgul SJ, Munday MR, Lane ME, Rawlings AV. A new approach to assess the effect of photodamage on corneocyte envelope maturity using combined hydrophobicity and mechanical fragility assays. *Int J Cosmet Sci.* 2018;40(3):207–16.
- (31) Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med.*

1999; 31(1):5–19.

- (32) López O, Cócera M, Wertz PW, López-Iglesias C, de la Maza A. New arrangement of proteins and lipids in the stratum corneum cornified envelope. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768(3):521–9.
- (33) Elias PM, Gruber R, Crumrine D, Menon G, Williams ML, Wakefield JS, et al. Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841(3):314–8.
- (34) Harding CR, Long S, Richardson J, Rogers J, Zhang Z, Bush A, et al. The cornified cell envelope: an important marker of stratum corneum maturation in healthy and dry skin. *Int J Cosmet Sci*. 2003;25(4):157–67.
- (35) Hirao T, Terui T, Takeuchi I, Kobayashi H, Okada M, Takahashi M, et al. Ratio of immature cornified envelopes does not correlate with parakeratosis in inflammatory skin disorders. *Exp Dermatol*. 2003;12(5):591–601.
- (36) Ana S. Évora, Michael J. Adams, Simon A. Johnson, Zhibing Zhang; Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties, *Skin Pharmacol Physiol* 2021;34:146–161.
- (37) Lévêque JL, Poelman MC, de Rigal J, Kligman AM. Are corneocytes elastic? *Dermatologica*. 1988;176(2):65–9.
- (38) Harding CR, Long S, Richardson J, Rogers J, Zhang Z, Bush A, et al. The cornified cell envelope: an important marker of stratum corneum maturation in healthy and dry skin. *Int J Cosmet Sci*. 2003;25(4):157–67.
- (39) Jacobs T, Mate C, Turner K, Carpick R. Understanding the tip-sample contact: an overview of contact mechanics at the nanoscale. In: Yablon DG, editor. *Scanning probe microscopy for industrial applications: nanomechanical characterization*. Wiley; 2013. p. 15–48.
- (40) Gaikwad RM, Vasilyev SI, Datta S, Sokolov I. Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction. *Skin Res Technol*. 2010;16(3):275–82.
- (41) Dulińska-Molak I, Lekka M, Lewandowska M, Pasikowska M, Tyszczyk B, Eris I. Preliminary studies on the characteristics of corneocytes using atomic force microscopy (AFM). *Pol J Cosmet*. 2012;15:50–7.
- (42) Luengo G, Potter A, Ghibaud M, Baghdadli N, Enea R, Song Z. Stratum corneum biomechanics (mechanics and friction): influence of lipids and moisturizers. In: Humbert P, Fanian F, Maibach H, Agache P, editors. *Agache’s measuring the skin; non-invasive investigations, physiology, normal constants*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 373–87.
- (43) Milani P, Chlasta J, Abdayem R, Kezic S, Haftek M. Changes in nano-mechanical properties of human epidermal cornified cells depending on their proximity to the skin surface. *J Mol Recognit*. 2018;31(9):ee2722.
- (44) Richter T, Müller JH, Schwarz UD, Wepf R, Wiesendanger R. Investigation of the swelling of human skin cells in liquid media by tapping mode scanning force

- microscopy. *Appl Phys A*. 2001;72(1):S125–S28.
- (45) Évora A, Zhang Z, Adams M. Forthcoming. 2021.
- (46) Franz J, Beutel M, Gevers K, Kramer A, Thyssen JP, Kezic S, et al. Nanoscale alterations of corneocytes indicate skin disease. *Skin Res Technol*. 2016;22(2):174–80.
- (47) Tissue Viability Society. Laboratory measurement of the inter-face pressure applied by active therapy support surfaces: a consensus document. *J Tissue Viability*. 2010;19:2-6.
- (48) Junko Matsuo, Junko Sugama, Hiromi Sanada, Mayumi Okuwa, Toshio Nakatani, Chizuko Konya, Jirou Sakamoto; Development and validity of a new model for assessing pressure redistribution properties of support surfaces, *Journal of Tissue Viability* Volume 20, Issue 2, May 2011, Pages 55-66.
- (49) Yuko Yamamoto et al., *J. Jpn. WOCM.*, Vol. 15, No. 3, pp239- 249, 2011.
- (50) Yuki Ogawa et al., *Disabil Rehabil Assist Technol*, 2015; 10(1): 81–88).
- (51) National Pressure Ulcer Advisory Panel Support Surface Standards Initiative :Terms and Definitions Related to Support Surfaces Ver.01/29/2007.
- (52) Quan Yang & Richard H. Guy; Characterisation of Skin Barrier Function Using Bioengineering and Biophysical Techniques, *Pharm Res* (2015) 32:445–457)
- (53) Niranjana Dhandapani, Kristin Samuelsson, Maria Sköld, Katarina Zohrevand, Guy K. German; Mechanical, compositional, and microstructural changes caused by human skin maceration, *Extreme Mechanics Letters* 41 (2020) 101017, 1-7
- (54) Grubauer G., Feingold K.R., Harris R.M., Elias P.M. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier *J. Lipid Res.*, 30 (1989), pp. 89-96
- (55) Visscher M.O., Tolia G.T., Wickett R.R., Hoath S.B. Effect of soaking and natural moisturizing factor on stratum corneum water-handling properties *J. Cosmet. Sci.*, 54 (2003), pp. 289-300)
- (56) H. Nakazawa, A. Yamagishi, T. Imai, Y. Ban, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato; Study on Regional Differences of Stratum Corneum Structure in Human Skin by Electron Diffraction, *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol 154 (2008).
- (57) H. Nakazawa, I. Hatta, N. Ohta, S. Kato; Structural Analysis of the Skin Stratum Corneum by Solution Injection Cell, *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol 149 (2007).
- (58) Imokawa, G., Surfactant-induced depletion of ceramides and other intercellular lipids: Implication for the mechanism leading to dehydration of the stratum corneum, *Exogenous Dermatology* 3(2), pp. 81-98, 2004
- (59) The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids, NANNA Y. SCHURER, PETER M. ELIAS, *Advances in Lipid Research* Volume 24, 1991, 27-56.
- (60) Lipid Metabolic Events Underlying the Formation of the Corneocyte Lipid

- Envelope, Wertz, P.W., *Skin Pharmacology and Physiology* 34(1), 38-50, 2021.
- (61) James D. Beard, Richard H. Guy, Sergey N. Gordeev, *The Society for Investigative Dermatology*, 133, 1565–1571, 2013.
- (62) Julie Fredonnet, Géraldine Gasc, Guy Serre, Childéric Séverac, Michel Simon; Topographical and nanomechanical characterization of native corneocytes using atomic force microscopy, *Journal of Dermatological Science*, Volume 75, Issue 1, 63-65, July 2014.
- (63) Charles Roudit, Serguei Sekatski, Giovanni Dietler, Stefan Catsicas, Frank Lafont, and Sandor Kasas; Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy, *Biophysical Journal* Volume 97, 674–677, July 2009.
- (64) James D. Beard, Richard H. Guy, Sergey N. Gordeev; Mechanical Tomography of Human Corneocytes with a Nanoneedle, *Journal of Investigative Dermatology* Volume 133, Issue 6, 1565-1571, June 2013.
- (65) R. M. Gaikwad, S. I. Vasilyev, S. Datta, I. Sokolov; Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction, *Skin Research and Technology*, 16, 275–282, 2010
- (66) Yanping Cao, Duancheng Ma, Dierk Raabe; The use of flat punch indentation to determine the viscoelastic properties in the time and frequency domains of a soft layer bonded to a rigid substrate, *Acta Biomaterialia* Volume 5, Issue 1, 240-248, January 2009.
- (67) Gaikwad, R. M.; Vasilyev, S. I.; Datta, S.; Sokolov, I., Atomic force microscopy characterization of corneocytes: effect of moisturizer on their topology, rigidity, and friction. *Skin Res Technol* 2010, 16 (3), 275-82.
- (68) 走査プローブ顕微鏡—正しい実験とデータ解析のために必要なこと—, 責任編集 重川秀実・吉村雅満・河津璋, 共立出版.
- (69) Anne J. Keurentjes, Kornelis D. de Witt, Ivone Jakasa, Lars Rütger, Patrick M. J. H. Kemperman, Sanja Kezic, Christoph Riethmüller; Actinic keratosis and surrounding skin exhibit changes in corneocyte surface topography and decreased levels of filaggrin degradation products, *Experimental Dermatology*. 2020;29:462–466.
- (70) Rawlings A, Sabin R, Harding C, Watkinson A, Banks J, Ackerman C. The effect of glycerol and humidity on desmosome degradation in stratum corneum. *Arch Dermatol Res*. 1995;287(5):457–64.

謝辞

本研究は、修士課程から博士後期課程 1 年までは本学須釜淳子教授の指導下で、博士後期課程 2 年から 3 年までは、福間剛士教授の指導下で行われたものです。また、修士課程から博士後期課程まで副指導教員として北陸先端科学技術大学院大学の塚原俊文教授には、本研究にあたり有益な指導をしていただきました。また、博士後期課程の本学の副指導教員の飯山宏一教授からも本研究にあたり有益な指導をいただきました。AFM に関する実験にあたり、宮澤佳甫助教に指導をしていただきました。そして、主任指導教員の高橋康史教授には、須釜教授の異動に伴い主任教員として引き受けていただきました。博士論文の審査員である浅川雅准教授には、論文指導会で、有益なコメントを頂きました。AFM を用いた角質計測の研究では、修士修了生の原田昌征さんに、実験の引継ぎをして頂きました。

本研究をまとめるにあたり、関係者各位の先生方、皆様に感謝申し上げます。最後に、修士課程から博士後期課程 1 年まで指導頂いた須釜淳子教授および博士後期課程 2 年から 3 年まで指導頂いた福間剛士教授に、感謝申し上げます。