

皮膚吸引浸出液の生化学検査試料としての有用性について

防衛医科大学校泌尿器科学講座 (主任 : 中村 宏教授)

中島 史雄, 浅野 友彦, 中村 宏

慶應義塾大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 田崎 寛教授)

晶

亮

THE SUCTION EFFUSION FLUID IS USEFUL AS A SAMPLE FOR BLOOD BIOCHEMISTRY

Fumio Nakajima, Tomohiko Asano and Hiroshi Nakamura

From the Department of Urology, National Defense Medical College

Makoto Hata

From the Department of Urology, School of Medicine, Keio University

We examined whether the suction effusion fluid could be used as a new sample for blood biochemistry. The fluid was obtained from the skin surface of female mongrel dogs by transcutaneous suction after removal of the horny substance. The appropriate intraluminal pressure for suction was 300 mmHg at which the effusion fluid flow rate was $0.6 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}^2$. The blood biochemistry examination revealed that the creatinine (Cr) and urea (BUN) concentrations in the suction effusion fluid were similar to those in plasma and that the protein and lipid concentrations were much smaller than those in plasma. The six-hour study showed that the effusion fluid could be obtained for hours at the same skin area and that the Cr and BUN concentrations were consistently close to those in plasma. In uremia models, the Cr and BUN concentration in the suction effusion fluid was similar to and had an extremely high correlation ($r=0.985$ and 0.982 respectively) to that in plasma through out the range for clinical practice. The skin biopsy revealed that the regeneration of the horny substance had started at one week after the suction and complete recovery was seen at four weeks. The invasiveness of the suction seemed to be small.

The suction effusion fluid is a reliable material for measurement of Cr and BUN in plasma and, as it contains much less proteins and lipids, will be a good sample for biosensors.

(Acta Urol. Jpn. 37: 717-723, 1991)

Key words: Suction effusion fluid, Interstitial fluid, Transcutaneous suction

緒 言

今日の医療において、臨床検査の果たす役割はきわめて重要である。とりわけ血液生化学検査は、診断と治療方針決定に不可欠な検査である。近年、自動分析装置の開発などによりその作業は大幅に能率化され、大規模の病院では中央検査室を持ち検査が中央化されている施設が少なくない。

しかし医療の質の向上にともない、中央化とは別に、血液ガス分析や電解質検査などベッドサイドでの即時的検査の必要性も強く認識され、装置も開発されている。

一方、このような分析法がめざましく進歩し正確かつ迅速になった反面、試料採取の方法は、依然として血管を穿刺して血液を得る方法が中心であり、患者の苦痛や検査の反復性の限界など改善すべき点も少なくない。

血液生化学検査の理想は、時々刻々変化する血液の生化学情報を、即座にかつできるだけ少ない侵襲で得ることであり、近年この目的でごく微量の試料から生化学情報をえる微量分析装置（バイオセンサ）が開発されつつある。

本研究は、抜気吸引法により生体皮膚表面で得られるごく少量の浸出液の、生化学検査試料としての有用

性を検討したものである。検査項目は、腎機能検査の基本的項目である血中クレアチニン、BUN に特に注目した。本研究では、動物実験により血漿と皮膚浸出液との相関を検討したが、当初の目的通り、非観血的にしかも連続して血液生化学情報が得られることが確認された。しかも、吸引浸出液中では蛋白質濃度は血漿の約2分の1であり、また血球を含まないことから、センサの寿命を大幅に延長させる事が期待される。現在、開発されつつあるクレアチニン、BUN バイオセンサの試料採取法として用いれば、既存の検査法では不可能な経時的、低侵襲の検査が施行可能と考える。

対象および装置

対象は雑種雌成犬（体重 9.0～16.5 kg）とし、合計20頭用いた。後述の各実験群毎の使用頭数は方法の項で述べる。20頭の内4頭は同一の犬を二つ以上の実験に用いたが、使用する皮膚の部位は重ならないようにした。

装置は、防衛医科大学校医用電子工学講座で開発した皮膚抜気吸引装置を用いた。皮膚は装着する吸引セルはアクリル樹脂製で、円柱形の中に浸出液の経路およびリザーバーが1本の管として空けられており、これはまた、抜気の経路を兼ねている（Fig. 1）。直接皮膚に当たる面には、皮膚への密着性を増し、また侵襲を弱める目的でリング状のシリコンゴムが貼られている。このシリコンゴムに囲まれたくぼみにステンレス製のメッシュ（JIS 規格、網ふるい250、目開き 250 μm 、線径 173 μm ）を置き、下面に突き出た金属性パイプを抜気ポンプに連結する。このような形状の吸引セルを用いることにより、円形の皮膚面から、均一にしかもほとんど皮膚の変形をきたすことなく吸引が可能となる。浸出液はセル内を流れ、リザーバーに貯えられる。

方 法

犬を、pentobarbital sodium 静注法（25 mg/kg）により全身麻酔する。以後は、呼吸状態、体動をみながら適宜追加投与する。バリカンで毛を刈り、剃刀および電気カミソリを用いて可及的に剃毛を行う。続いてビニールテープを用いてストリップング、すなわち表皮の角質除去を行う。皮膚の前処理を行った犬をケージに仰臥位で固定し、側腹部に吸引セルを装着する。抜気ポンプを作動させ、一定時間吸引を行う。抜気吸引終了後、リザーバーに貯った浸出液を注射器で集め、生化学検査試料とする。血漿はヘパリン採血し

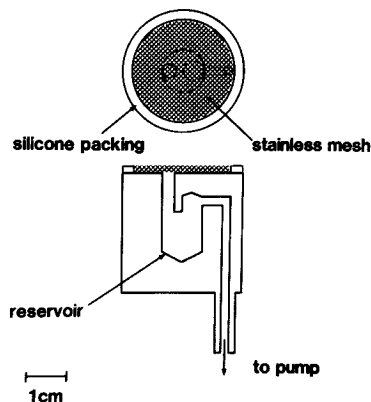


Fig. 1. Structure of the suction cell.

た血液より得る。測定は浸出液採取当日行うか、あるいは試料を凍結保存し一週間以内に行うこととし、浸出液、血漿共に2回ずつ行い、平均値をとる。クレアチニン測定はFolin-Wu法によりBUN測定はウレアゼ・インドフェノール法により行い、ともに和光純薬工業株式会社製キットを用いた。また、高濃度の試料については、透過率の低下から測定誤差が大きくなるため、精製水で希釈して測定した。つぎの5実験群を設定し、実験を行った。

実験1

回路内圧を300 mmHgに固定して抜気吸引を行い、5分毎に浸出液量を測定して単位時間当りの浸出液量の変化を観察した。

続いて、皮膚の同一部位で、回路内圧を200～500 mmHgの範囲で100 mmHgずつ変えて抜気吸引を行った。浸出液量を正確に測定するため、前述のものは別の、1 mlのピペット付き吸引セルを使用した。

実験2
7頭の犬を対象として、浸出液の多項目生化学検査の結果を、血漿の値と比較した。測定には多項目自動分析装置（日立736）を用いた。

実験3

3頭の犬を対象とし、皮膚の同一部位で連続吸引を行って1時間毎に浸出液を採取し、これを計6時間まで施行した。浸出液量およびクレアチニン、BUN濃度について検討した。

実験4

11頭の犬を対象として、血中の濃度が変化する際の、吸引浸出液中濃度応答について検討した。11頭中2頭については浸出液のクレアチニン濃度を、残りの9頭についてはクレアチニン、BUN濃度を測定し、血漿濃度と比較した。回路内圧300 mmHg、1回の

吸引時間は1時間とした。実験は各5日間予定し、実験第1日目に、吸引実験に引き続いて両側腎摘除術を

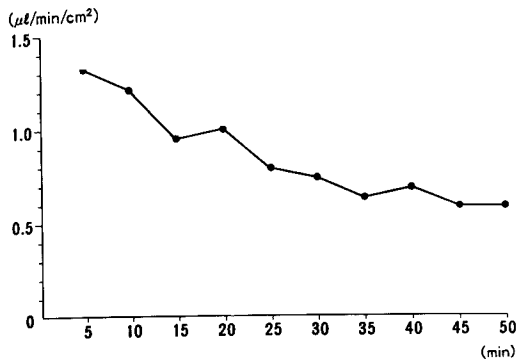


Fig. 2. Flow rate of the suction effusion fluid at the intraluminal pressure of 300 mmHg.

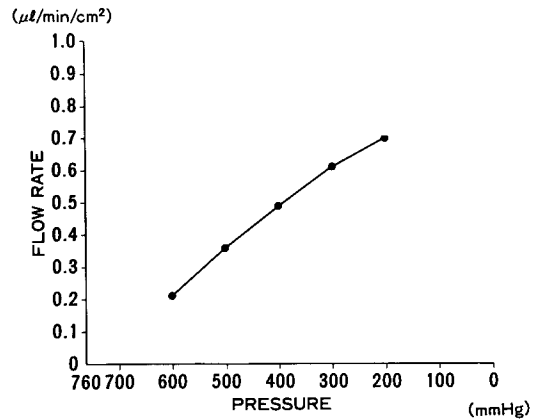


Fig. 3. Flow rate at various intraluminal pressures.

Table 1. The data of bloodchemistry of the suction effusion fluid and plasma.

DOG No.	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	No.15	No.17
TOTAL PROTEIN (g/dl)	3.2 8.0	2.8 5.9	3.3 6.4	3.2 6.4	3.3 5.9	1.3 5.9	2.8 6.6
ALBUMIN (g/dl)	1.2 2.7	1.4 2.3	1.5 2.9	1.6 3.1	1.3 2.4	0.5 2.6	1.3 2.5
BILIRUBIN (mg/dl)	0.2 <0.1	0.2 0.1	<0.1 <0.1	0.1 <0.1	0.1 <0.1	0.1 <0.1	<0.1 <0.1
LIPID (mg/dl)	121 595	151 602	358 800	230 681	279 613	83 529	133 547
GOT (mU/ml)	213 65	385 20	168 66	122 23	98 54	124 26	783 38
GPT (mU/ml)	181 349	41 15	71 29	43 24	98 259	41 23	117 46
AMYLASE (U)	840 2125	1680 3160	1080 2050	1200 2610	830 2150	1120 2590	2020 2100
BUN (mg/dl)	11 15	19 17	31 25	12 14	20 20	36 35	26 18
CREATININE (mg/dl)	0.4 0.6	0.6 0.7	0.7 0.9	0.5 0.6	0.7 0.5	0.6 1.0	1.4 0.8

← effusion fluid
plasma

施行した。第2日目から第5日目にかけては、連日、1時間の吸引実験を行った。血中のクレアチニン、BUN濃度が上昇していく際の浸出液濃度について、血漿との相関を検討した。

実験5

皮膚吸引の物理的刺激が皮膚に及ぼす影響を知るため、ストリッピング前、ストリッピング後、皮膚吸引(1時間)施行直後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後に皮膚生検を行い、侵襲の程度とその回

復について検討した。

結 果

実験1

回路内圧を300 mmHgに固定して吸引を続けると、最初1.32 μl/min/cm²であった浸出速度が漸減し、約30分経った時点で0.6 μl/min/cm²程度に安定した(Fig. 2)。さらに回路内圧を100 mmHg毎に変化させて観察すると、200 mmHg~500 mmHgの範

囲では、回路内圧が低いほど浸出速度は大きかった (Fig. 3). しかし、回路内圧 200 mmHg では吸引セル周囲から空気混入がみられた. 以上から 300 mmHg 程度が適当な回路内圧と考えられた. この条件では、浸出液は $0.6 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}^2$ 程度得られることになる.

実験 2

得られた浸出液を多項目生化学分析し、血漿の値と比較した結果が Table 1 である. 各数字の上段は浸出液、下段は血漿の濃度を示す. GOT, GPT, アミラーゼ等では両者に高い相関は見られないが、クレアチニン, BUN に関しては近似する値が得られた. また、浸出液では、総蛋白、アルブミン、総脂質濃度は血漿の約 2 分の 1 であることがわかった.

実験 3

1 時間毎の採取浸出液量では、継続して十分な量が得られると分かった (Fig. 4). また浸出液のクレアチニン, BUN 濃度を血漿濃度と比較すると、10%程度高い値が得られた (Fig. 5). 図に示した Dog No. 5 では輸液を 150 ml/hr で行っており、血漿濃度に並行して速やかに浸出液濃度が低下して行くのが観察された.

実験 4

対象の 11 頭中 4 頭は、5 日間の終了以前に死亡した. 腎不全状態で、血漿クレアチニン, BUN 濃度が上昇する際に、浸出液濃度も近い値をとりながら上昇していく結果が得られた (Fig. 6). また、すべての測定値に関して浸出液濃度と血漿濃度の関係を見るときわめて高い相関がみられ、相関係数はクレアチニンで 0.985, BUN で 0.982 であった (Fig. 7).

実験 5

ビニールテープによるストリッピングで、ほぼ完全に角質が除去されているのが確認された. また吸引直後の皮膚の上皮細胞には空胞変性がみられた. 吸引 1 週間後の皮膚では、すでに角質が再生され初めており、4 週間後では完全にもとの状態に回復していた (Fig. 8). 肉眼的には、吸引直後でも皮膚の変形や皮下出血は認められなかった.

考 察

1. 吸引浸出液の浸出速度について

吸引開始後、単位時間当りの浸出液量が漸減し、約 30 分間で安定するメカニズムは解明されていないが、次のような理由が推測される.

(1) 皮膚表面と毛細血管の間に存在する間質液がまず浸出する. これは毛細血管から浸出する液に比べて

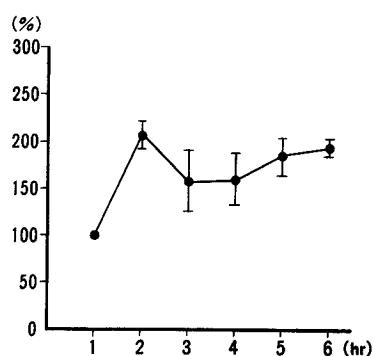


Fig. 4. The suction effusion fluid was obtained continuously in the six-hour suction study at the same skin area. mean $\pm$ S.D

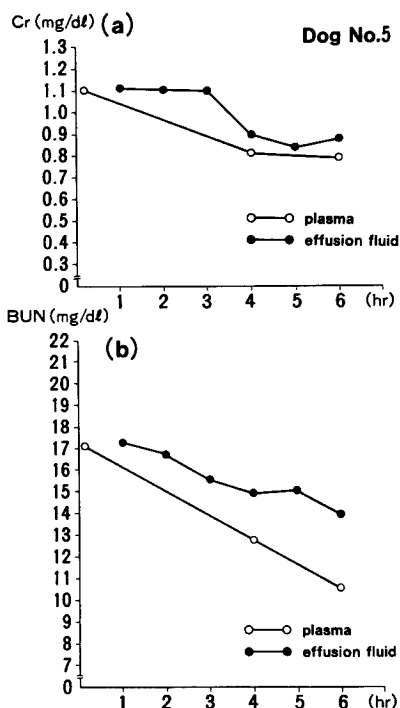


Fig. 5. Concentration of creatinine (a) and BUN (b) in the six-hour suction study.

血管壁の抵抗を受けずに吸引されるため浸出速度は大きい. 続いて毛細血管から吸引される液が浸出してくるが、これは血管壁抵抗により浸出速度が小さい. 約 30 分後にはこの毛細血管からの浸出液のみになり浸出速度はほぼ一定となる.

(2) 剃毛, ストリッピングという皮膚の前処置の段階での物理的刺激により、皮膚の血流量および毛細血

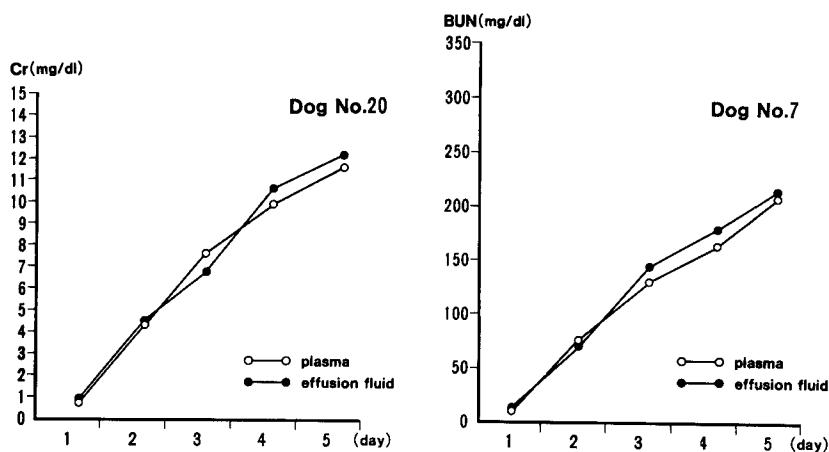


Fig. 6. Concentration of creatinine (a) and BUN (b) in azotemia following bilateral nephrectomy.

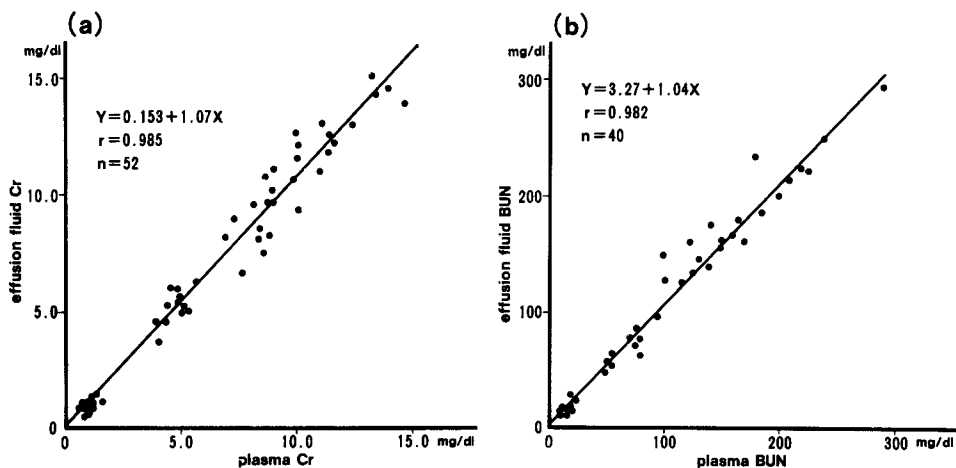


Fig. 7. Correlation of the concentration of creatinine (a) and BUN (b) between the suction effusion fluid and plasma.

管壁の透過性が上昇しており、はじめは浸出液量が多いが約30分後には定常状態に戻る。

荒井らは、家兎での皮膚吸引法において、グルコースを静脈注射すると血中濃度の上昇に約15分遅れて浸出液濃度が上昇するとの結果を得たが、この遅れを皮膚組織の間質容積による緩衝効果を用いて説明している¹⁾。

2. 浸出液の多項目生化学分析結果について

Fig. 1 に示したとおり、クレアチニン、BUN など分子量の小さいものでも血漿濃度と浸出液濃度は近似した値を示したが、分子量の大きい蛋白、アルブミン、脂質などは浸出液濃度の方が約2分の1であった。血管壁、間質、皮膚という層を浸出液が通過する際に濾過作用を受け、大きな分子は通過しにくい結果

と考えられた。このように、蛋白濃度が血漿に比較して低いこと、皮膚の表面を陰圧にすることで得られることを考えると、浸出液の全部あるいはほとんどの部分は従来からいわれる exudate ではなく transudate であると思われた。しかし GOT, GPT では概して浸出液濃度の方が大きく、濾過作用だけではなく他の要素が関与していることが示唆された。したがって、吸引浸出液により血漿濃度を代用しうる項目は限られているが、クレアチニン、BUN は適当な項目と考えられた。

3. 皮膚の同一部位で吸引可能な時間について

皮膚吸引法を用いて血液中の物質濃度を経時的に測定するには、皮膚の同一部位である程度の時間連続して浸出液が得られ、同時にその濃度が血漿濃度と継続

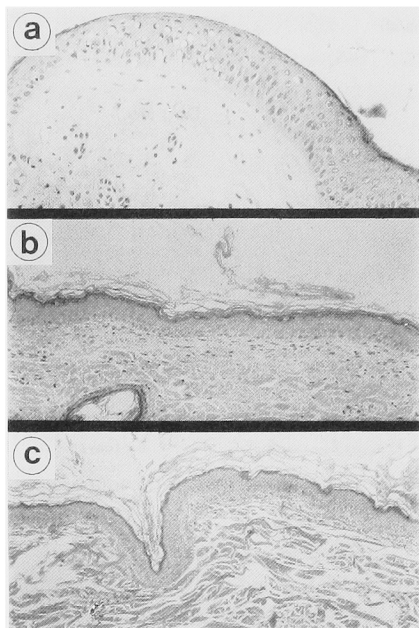


Fig. 8. Photomicrography of the skin immediately after the suction (a), one week after the suction (b) and four weeks after the suction (c).

して一致することが必要条件である。グルコースを対象とした研究では、筋肉内に埋め込んだセンサーが約5日間有効に測定を続けるとの報告がある²⁾。本実験においては、設定した6時間の範囲では浸出液量変化は小さく、またクレアチニン、BUN濃度もよく血漿濃度を反映した。

4. クレアチニン、BUNの測定可能濃度範囲について

クレアチニン、BUNの臨床的意義を持つ範囲は大きい、本実験において作成した尿毒症の状態では、クレアチニン 0.8~15.5 mg/dl, BUN 10.0~295 mg/dlの範囲で測定がなされており、ヒトでも正常者から腎機能の廃絶した状態までがこの範囲にはいると考えて差し支えない。その相関係数はクレアチニンで0.985, BUNで0.982ときわめて高く、この濃度域では吸引浸出液が十分に血液材料の代用になりうると考えられた。

5. 皮膚抜気吸引の皮膚組織に与える変化について

ストリッピング、抜気吸引施行後1週間で角質の再生は良好に開始しており、4週間ではほぼ元の状態に復帰していた。肉眼的観察では、ストリッピングだけを行った皮膚とさらに抜気吸引を行った皮膚では施行後の状態、回復して行く過程に差がみられないことから、実験における皮膚侵襲のほとんどはストリッピン

グによるものと推察された。

6. 他種の動物およびヒトへの応用について

荒井らは、家兎を対象として抜気吸引法を施行し、血糖値と浸出液グルコース濃度について検討し¹⁾、吸引浸出液が良好に採取され(回路内圧 400 mmHg で $0.4 \mu\text{l}/\text{min}/\text{cm}^2$) 浸出液のグルコース濃度は、良く血糖値と一致すると報告している。また荒井らの行ったボランティアによる実験では、ヒトの上腕内側で浸出液が得られることが確認されている。ヒトに応用する際には、汗腺から分泌される汗の影響や、ストリッピング時の被検者の苦痛の程度なども考慮する必要があると思われる。

7. バイオセンサ試料として

バイオセンサは、酵素や抗体あるいは微生物を用いたリセプターと物理、化学量を電気信号に変換するトランスデューサーとからなるセンサのことで、医療分野ではまさにベッドサイドでのあるいは患者に携帯された状態での生化学分析を目的として開発された装置である。近年の、酵素固定化技術の発達によりその実用化が近い将来可能と思われるものも少なくない³⁾。

尿素センサもその一つである。現在、このバイオセンサの臨床応用を妨げている最大の障害の一つに、その寿命がある。すなわち、試料として多用される血液は生化学検査において最も多くの基本的情報を与えるが、反面、血球や蛋白質のセンサへの付着により、測定誤差が生じやすく、さらには測定不能になるという大きな欠点をもっている。また反復する採血による患者の苦痛は無視できず、カテーテルを血管内に留置した場合に感染の誘導が問題となりうる。

皮膚吸引法を用いた本実験では、吸引浸出液の血漿クレアチニン、BUN濃度測定試料としての信頼性は高く、しかも脂質、蛋白濃度が血漿の約2分の1であることから、バイオセンサに適した生体試料と考える。

結 論

1. 皮膚を抜気吸引して得られる微量の浸出液に注目し、その生化学検査試料としての有用性を検討するために実験を行った。対象は雑種雌成犬とし、検査項目は血漿クレアチニン、BUNに特に注目した。

2. 吸引に適した回路内圧は 300 mmHg であり、皮膚の同一部位で行った6時間の吸引実験では、継続して安定した液量が得られた。

3. 尿毒症モデルで、臨床問題となる全濃度域で、浸出液のクレアチニン、BUN濃度は血漿濃度とよく一致した。

4. 吸引実験後の皮膚は、1週間後で良好な角質の

再生を示し, 4週間後には完全に元の状態に回復していた。

5. 吸引浸出液の血漿クレアチニン, BUN 濃度測定試料としての信頼性は高く, とくにバイオセンサ試料として適していると考えられた。

稿を終えるにあたり, 本実験にご協力いただいた本校, 医用電子工学講座, 菊地眞教授, 荒井恒憲助手, 富田靖彦技官に心から感謝致します。また, 実際の実験に協力を戴いた教室の今井貴美子嬢, 鳥越千加嬢に感謝の意を捧げます。

本論文の要旨は, 第442回日本泌尿器科学会東京地方会, 第51回日本泌尿器科学会東部総会, 第29回日本腎臓学会総会において報告した。

文 献

- 1) 荒井恒憲, 根岸直樹, 富田靖彦, ほか: 経皮的血中濃度測定のための吸引浸出液取得法と性状に関する研究. 医用電子と生体工学 **25**: 220-226, 1987
- 2) Shichiri M, Kawamori R, Goriya Y, et al.: Glycaemic control in pancreatectomized dogs with a wearable artificial endocrine pancreas. Diabetologia **24**: 179-184, 1983
- 3) 相澤益男: バイオセンサ技術の展望. 電子通信学会誌 **68**: 896-901, 1985

(Received on August 20, 1990)
(Accepted on December 27, 1990)