

氏 名 い なみ よし ひろ
井 浪 義 博

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 富医薬博甲第113号

学位授与年月日 平成25年6月5日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程
生命薬科学専攻

学位論文題目 **界面活性剤によって誘発される痒みとケラチノサイトによる
histamine 産生に関する薬理学的研究**

論文審査委員

(主査) 教授 倉石 泰 (指導教員)

(副査) 教授 門脇 真

(副査) 教授 新田 淳美

(副査) 教授 清水 忠道

論文内容の要旨

日常生活における洗浄行為は敏感皮膚や痒みのトリガーとなっている可能性がある。洗浄によって清潔な皮膚を維持することは細菌などの感染から身を守るために重要であるが、近年、先進国を中心に、清潔で快適な生活になるにつれて洗浄剤の使用が増えている。洗浄剤の主成分である界面活性剤は、一般に1分子中に親油基と親水基を有する両親媒性化合物であり、親水性部分の電荷によりイオン性（カチオン性、アニオン性、両性）と非イオン性（ノニオン性）に大別される。中でもアニオン性界面活性剤は優れた洗浄力を発揮することから洗浄剤の主成分として多用される。汚れ除去や除菌という洗浄剤の基本性能を持つ反面、肌荒れや皮膚乾燥、痒みなどの原因となることもある。痒み発生に界面活性剤が直接的もしくは間接的に関与している可能性が推測される。しかし、界面活性剤によって誘発される痒み発生機序の詳細は不明である。そこで、界面活性剤によって生じる痒み反応とその発生機序を、マウスを用いて検討した。

1. アニオン性界面活性剤ラウリン酸ナトリウムによって誘発される急性の痒み^{1,2)}

各種アニオン性界面活性剤を用いて、マウス皮膚への単回塗布により痒み関連反応（掻き動作）が生じるか検討し、ラウリン酸ナトリウムが遅発性の掻き動作を引き起こすことを見出した。

1-1. ラウリン酸ナトリウムによるマウスの掻き動作の誘発

予め刈毛・除毛したマウスの吻側背部皮膚へラウリン酸ナトリウム水溶液（0.1%, 1%, 10%溶液が各々pH 7.6, 9.8, 10.1）またはN-ラウロイルサルコシンナトリウム水溶液（10%溶液がpH7.7）を単回塗布し、掻き動作を引き起こすか検討した。10%ラウリン酸ナトリウムの塗布は、塗布直後から掻き動作を増加させ（即時相）、1.5時間程度で減

少ししたが、その後再び掻き動作が増加し（遅発相）、3 時間後には減少した。10%N-ラウロイルサルコシナトリウムの塗布も塗布直後から掻き動作を増加させたが、1.5 時間後にはほぼ治まり遅発性の掻き動作は観察されなかった。軟膏基剤の塗布も即時性の掻き動作増加を生じることから、即時相の掻き動作は皮膚表面の異物に対する反応と考えられる。1%ラウリン酸ナトリウムも遅発性の掻き動作を引き起こしたが、0.1%では観察されなかった。以降の実験では、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布で観察される遅発性掻き動作の機序を解析した。無処置の皮膚表面は pH 5.0 であったが、ラウリン酸ナトリウム（1%と 10%）の塗布 2 時間後の皮膚表面はそれぞれ pH 5.8 と 6.0 であり、掻き動作回数も濃度に依存して増加した。0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液（pH 10.2）の塗布は掻き動作を増加させなかった。以上の結果から、ラウリン酸ナトリウムの塗布による遅発性の掻き動作は、界面活性作用とアルカリ性の両作用が重要であることが示唆される。

1-2. ラウリン酸ナトリウム誘発掻き動作への histamine の関与

マスト細胞からの histamine 遊離は急性蕁麻疹などの痒みの主要な発生機構と考えられている。そこで、ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作における histamine とマスト細胞の関与を検討した。10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作は、H1 ヒスタミン受容体遮断薬 terfenadine によって強く抑制された。しかし、10%ラウリン酸ナトリウム塗布の 2 時間後には、真皮内のマスト細胞の脱顆粒像は観察されなかった。また、マスト細胞欠損と健常同腹仔マウスで同程度の遅発性掻き動作が観察された。以上の結果から、ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作に histamine が関与するが、マスト細胞以外の皮膚内細胞から遊離される histamine が関与すると考えられた。

1-3. ケラチノサイトにおける histamine 産生・遊離の促進機構

Histamine は L-histidine decarboxylase (HDC) によって L-histidine から生合成される。HDC は、低酵素活性の 74-kDa HDC と、そのプロセッシングで生じる高活性の 53-kDa HDC の 2 つがある。HDC mRNA がマウスのケラチノサイト由来 PB 細胞に発現していることが報告されている。そこで、ケラチノサイトにおける histamine 産生を検討した。健常マウス表皮の histamine 含有量は真皮の 1/374 であったが、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布の 2 時間後に 3.7 倍に増加した。また、53-kDa /74-kDa HDC の比も 10%ラウリン酸ナトリウムの塗布の 2 時間後に 2.9 倍に増加した。ヒトケラチノサイトのみで構成されている 3 次元培養表皮において、ラウリン酸ナトリウム処置は濃度依存的に 53-kDa/74-kDa HDC 比および histamine 産生量（培養組織と培養液中の histamine の和）を増加させた。以上の結果は、アニオン性界面活性剤のラウリン酸ナトリウムが表皮ケラチノサイトに作用することにより、ケラチノサイト内での 74-kDa HDC から 53-kDa HDC へのプロセッシングが亢進し、53-kDa HDC の増加が histamine 産生を亢進させたことを示唆する。ケラチノサイトにはアミン貯蔵顆粒などの存在が見出されていないことから、histamine の産生増加は表皮内への histamine 遊離量増加をきたし、痒みの原因の一つとなったと考えられる。

2. Chlorogenic acid の鎮痒作用³⁾

Chlorogenic acid は染井吉野（桜の名称）の葉に含まれる主たる抗酸化物質であり、染井吉野の葉抽出エキスが痒み抑制を期待して化粧品に配合されているが、その薬効と作用機序の詳細は不明である。10%ラウリン酸ナトリウム塗布の 90 分後に 5% chlorogenic acid を局所塗布すると、遅発性搔き動作が有意に抑制された。Chlorogenic acid 塗布は、histamine の皮内注射による搔き動作および血管透過性亢

進を抑制しなかった。一方、chlorogenic acid 塗布は、ラウリン酸ナトリウムによって誘発される表皮内 53-kDa HDC レベルおよび histamine 含有量の増加を抑制した。Chlorogenic acid は全身性投与により弱い抗ヒスタミン効果を有することが報告されているが、ラウリン酸ナトリウム誘発遅発性掻き動作に対する chlorogenic acid 塗布の抑制効果は、主に表皮内の 53-kDa HDC 増加と、それによる histamine の産生・遊離の増加を抑制することにより発揮されると考えられる。

以上より、アニオン性界面活性剤を含有する化粧品等は、HDC 活性化を抑制する天然成分 chlorogenic acid の配合が痒みの予防に有効であることが示唆される。

3. アニオン性界面活性剤ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) によって誘発される慢性の痒み⁴⁾

近年、乾燥肌や荒れ肌、敏感肌のような皮膚トラブルをもつヒトが増加しており、痒みを訴えるヒトが多いことが知られている。SDS は動物実験で皮膚炎や皮膚乾燥を誘発するために使用されているが、SDS によって痒みが誘発されるかは不明である。そこで、SDS 塗布により痒みが誘発されるか検討した。10% SDS (pH 6.5) を毎日1回繰返して塗布すると、各塗布前(塗布 22~24 時間後)の掻き動作が塗布開始から少なくとも4日間経日的に増加した。皮膚炎スコア、皮膚乾燥、皮膚バリアの破壊の度合い、皮膚表面 pH のアルカリ化も経日的に増大したが、これら4つのパラメーターが塗布開始2日後から有意となったのに対して、掻き動作の増加は塗布開始の翌日から有意となった。10% SDS の反復塗布による掻き動作が、terfenadine によって有意に抑制されたが、マスト細胞の欠損では抑制されなかった。さらに、10% SDS 反復塗布は、マスト細胞欠損マウスおよび健常マウスの真皮内 histamine 含有量を変化させなかった。以上の結果から、SDS 反復塗布で誘発される慢性の痒みに histamine が関与するが、マスト細胞由来

histamine の関与は小さいことが示唆される。

10% SDS の反復塗布により、表皮内の HDC mRNA レベル、74-kDa と 53-kDa HDC レベル、および histamine 含有量が上昇した。以上の結果から、SDS 反復塗布による慢性の掻き動作には、表皮内の HDC の遺伝子発現の増加による histamine の産生・遊離の増加が主に関与することが示唆される。この反応は界面活性作用と皮膚表面 pH のアルカリ化の両作用が結果的に組み合わせられたことによって誘導されたと思われる。また、SDS 反復塗布により、表皮内の神経成長因子 nerve growth factor が顕著に増加して、神経反発因子 semaphorin 3A が顕著に減少し、表皮内の protein gene product 9.5 陽性神経線維の数が有意に増加した。以上の結果から、SDS の反復塗布は、皮膚炎と皮膚バリア機能の破壊に加え表皮内神経線維の増加を介して、外部刺激に対する反応性が亢進した敏感皮膚にすることが示唆される。この状態が、表皮ケラチノサイトの histamine による痒みを増強したと推測される。SDS の反復使用による痒みの抑制には、ケラチノサイトによる histamine 産生・遊離の抑制、H1 ヒスタミン受容体の遮断に加え、皮膚炎と表皮内神経線維の増加の抑制と皮膚バリア機能の修復も必要であると考えられる。

4. 結論

本研究により、一部のアニオン性界面活性剤が表皮ケラチノサイトによる histamine 産生・遊離増加を介して痒みを生じることが明らかとなった。アニオン性界面活性剤を使用する場合は、使用後のケアが重要である。また、化粧品等にアニオン性界面活性剤を配合する場合には、ケラチノサイトによる histamine 産生・遊離の抑制が痒みの予防のために重要と考えられる。

参考文献

本要旨内容は、以下の論文にて公表及び公表予定である。

- 1) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Topical surfactant-induced pruritus: Involvement of histamine released from epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 344: 459-466 (2013)
- 2) Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y. Surfactant-induced itching and the involvement of histamine released from keratinocytes. *Yakugaku Zasshi* 132: 1225-1230 (2012) (Review: Japanese)
- 3) Inami Y, Andoh T, Kuraishi Y. Prevention of topical surfactant-induced itch-related responses by chlorogenic acid through the inhibition of increased histamine production in the epidermis. *J Pharmacol Sci.* 121: 242-245 (2013)
- 4) Inami Y, Sasaki A, Andoh T, Kuraishi Y. Surfactant-induced chronic pruritus: role of L-histidine decarboxylase expression and histamine production in epidermis. *Acta Derm Venereol.* (印刷中)

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

日常生活における洗剤を使った洗剤行為は、清潔な皮膚を維持し細菌などの感染から身を守るために重要であるが、敏感皮膚や痒みの原因となる可能性がある。洗剤の主成分である界面活性剤は、一般に1分子中に親油基と親水基を有する両親媒性化合物であり、親水性部分の電荷によりイオン性（カチオン性、アニオン性、両性）と非イオン性（ノニオン性）に大別される。中でもアニオン性界面活性剤は優れた洗浄力を発揮することから洗剤の主成分として多用される。本研究は、アニオン性界面活性剤の皮膚への塗布によって誘発される急性および慢性の痒みを、マウスを用いて再現し、その発生機序を解析した。本研究の内容の骨子および審査結果は次のとおりである。

アニオン性界面活性剤により誘発される急性の痒み

予め除毛したマウスの皮膚に各種アニオン性界面活性剤を塗布して痒み様反応（後肢による掻き動作）を観察したところ、界面活性剤溶液の塗布は直後に掻き動作を誘発したが、この反応は1.5時間後までにはほぼ治まった。ところが、10% sodium laurate のみは、2時間後頃から再び掻き動作を増加させ3時間後にはほぼ治まった。この遅発性掻き動作の回数は1%と10% sodium laurate（各々pH 9.8と10.1）の濃度に依存し、0.1% sodium laurate（pH 7.6）と10% N-lauroylsarcosine sodium（pH 7.7）は遅発性掻き動作を誘発しなかった。無処置の皮膚表面はpH 5.0であったが、1%と10% sodium laurate 塗布2時間後の皮膚表面 pH は各々5.8と6.0へと有意に上昇していた。遅発性掻き動作を誘発しなかった0.1% sodium laurate と10% N-lauroylsarcosine sodium では塗布後2時間で皮膚表面 pH の有意な上昇はなかった。なお、0.1 mM NaOH（pH 10.2）の塗布は遅発性掻き動作を誘発せず、塗布後2時間の皮膚表面 pH も上昇させなかった。以上の結果から、sodium laurate による遅発性掻き動作誘発には、界面活性作用とアルカリ性の両作用が重要であること推論した。

10% sodium laurate による遅発性掻き動作は、末梢性 H1 ヒスタミン受容体遮断薬 terfenadine (30mg/kg 経口) によって顕著に抑制されたが、マスト細胞欠損によって抑制されず、10% sodium laurate 塗布 2 時間後の皮膚でマスト細胞の脱顆粒像は観察されなかった。そこで、真皮と表皮に分けて histamine 含有量を測定し、表皮の histamine 含有量は、真皮の 1/374 と少なかったが 10% sodium laurate 塗布の 2 時間後に 2.9 倍に増加することを見出した。また、histamine の産生に重要な高活性型 (53-kDa) L-histidine decarboxylase (HDC) が表皮で増加 (53-kDa/74-kDa HDC 比が増加) することを明らかにした。ヒトのケラチノサイトのみで構成される 3 次元培養表皮においても、sodium laurate 塗布により 53-kDa/74-kDa HDC 比および histamine 産生の増加を観察した。以上の結果から、ケラチノサイト内での 74-kDa HDC から 53-kDa HDC へのプロセッシングが亢進し、53-kDa HDC の増加が histamine 産生を亢進させたと推論した。

桜 (ソメイヨシノ) の葉抽出エキスが化粧品に配合されているが、それに含まれる主たる抗酸化物質に chlorogenic acid がある。10% sodium laurate の皮膚塗布の 90 分後に同じ部位に 5% chlorogenic acid を局所塗布すると、その 30 分後からの遅発性掻き動作が有意に抑制された。Chlorogenic acid 塗布は、histamine の皮内注射による掻き動作および血管透過性亢進を抑制しなかった。一方、chlorogenic acid 塗布は、sodium laurate によって誘発される表皮内 53-kDa HDC レベルの上昇および histamine 含有量の増加を抑制した。以上の結果から、sodium laurate 誘発遅発性掻き動作に対する chlorogenic acid 塗布の抑制効果は、主に表皮内の 53-kDa HDC 増加と、それによる histamine の産生・遊離の増加を抑制することにより発揮されると推論した。

アニオン性界面活性剤により誘発される慢性の痒み

Sodium dodecyl sulfate (SDS, sodium lauryl sulfate と呼ばれる) も、アニオ

ン性界面活性剤でありシャンプーなどに使用される。動物実験では、その反復塗布により皮膚炎や皮膚乾燥を誘発することが示されている。10% SDS (pH 6.5) の単回塗布の2時間後には掻き動作の増加は観察されなかったが、毎日1回塗布すると、塗布の22～24時間後の掻き動作が、初回塗布翌日から少なくとも4日後まで経日的に増加した。皮膚炎、皮膚乾燥、皮膚バリア破壊と皮膚表面 pH は初回塗布の2日後から4日後まで経日的に増加した。なお、10% N-lauroylsarcosine sodium の反復塗布では掻き動作の増加は観察されなかった。

10% SDS の反復塗布の開始から4日後の慢性の掻き動作は、terfenadine (30mg/kg 経口) によって抑制されたが、マスト細胞の欠損では抑制されなかった。真皮中のマスト細胞の数にも変化がなかった。10% SDS の反復塗布の開始から4日後、表皮内の HDC mRNA レベル、74-kDa と 53-kDa HDC レベル、および histamine 含有量が増加した。以上の結果から、界面活性作用と皮膚表面 pH のアルカリ化の両作用により HDC の遺伝子発現が増加し、その結果 histamine 産生量が増加することが SDS の反復塗布による痒みの主な原因であると推論した。また、10% SDS の反復塗布が、表皮内の nerve growth factor の増加、神経反発因子 semaphorin 3A の減少、protein gene product 9.5 陽性神経線維の増加も来すことを明らかにし、表皮内神経線維の増加がケラチノサイトから放出される histamine による痒みを増強する可能性があるとして推論した。

本研究の成果は、アニオン性界面活性剤の一部が、界面活性作用に加え、皮膚表面（恐らく表皮）の pH を上昇させることにより、ケラチノサイトにおける 53-kDa HDC の増加を介した histamine 産生増大により急性・慢性の痒みを誘発することを示した。

主査および副査は、井浪義博君に面接試験を行うと共に論文内容について審査を行い、博士（薬学）を授けるに値すると判定した。