

富山大学学位論文

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

井浪 義博

富山大学大学院 医学薬学教育部 生命薬科学専攻  
応用薬理学  
(指導：倉石 泰 教授)

Ph.D. Dissertation

**Pharmacological studies on surfactant-induced itching and the involvement  
of histamine released from keratinocytes**

**Yoshihiro Inami**

Department of Applied Pharmacology,  
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences,  
University of Toyama  
(Supervisor: Professor Yasushi Kuraishi)

1. 本論文は、2013年4月~5月に富山大学大学院医学薬学教育部生命薬科学専攻において審査されたものである。

主査 倉石 泰 教授 (応用薬理学研究室)

副査 清水 忠道 教授 (皮膚科学講座)

門脇 真 教授 (消化管生理学研究室)

新田 淳美 教授 (薬物治療学研究室)

2. 本論文は、学術情報雑誌に公表および公表予定の以下の論文を基礎とするものである。

基礎となる報文

- ① **Yoshihiro Inami**, Tsugunobu Andoh, Atsushi Sasaki, and Yasushi Kuraishi

Topical surfactant-induced pruritus: Involvement of histamine released from epidermal keratinocytes

*J Pharmacol Exp Ther.* **344**: 459-466. (2013)

- ② **Yoshihiro Inami**, Tsugunobu Andoh, Atsushi Sasaki, and Yasushi Kuraishi

Surfactant-induced itching and the involvement of histamine released from keratinocytes

*Yakugaku Zasshi* **132**: 1225-1230. (2012) (Review: Japanese)

- ③ **Yoshihiro Inami**, Tsugunobu Andoh, and Yasushi Kuraishi

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 **Yoshihiro Inami**, Atsushi Sasaki, Tsugunobu Andoh, and Yasushi Kuraishi

Pruritus induced by repeated topical application of surfactant: Involvement of increases in histamine in the keratinocytes

(Manuscript in preparation)

3. 本論文の研究は、倉石 泰 教授の指導の下に富山大学大学院医学薬学教育部生命薬科学専攻およびホーユー株式会社総合研究所において行われた。

## 目次

緒言	p. 1
界面活性剤と痒み	p. 1
背景	p. 2
1. 痒み	p. 2
1-1. 痒みの表現	p. 2
1-2. 痒みの分類	p. 3
1-3. 痒みの悪循環 (itch-scratch vicious cycle)	p. 3
1-4. 動物を用いた痒みの評価法	p. 4
1-5. 末梢における痒みの伝達経路 (ヒスタミン依存的/ヒスタミン非依存的経路)	p. 5
1-6. ヒスタミン生合成とヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)	p. 6
1-6-1. マスト細胞内の貯蔵型ヒスタミンとヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)	p. 7
1-6-2. マクロファージ内の誘導性ヒスタミンとヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)	p. 8
2. 化粧品および医薬部外品によって生じる痒み	p. 10
2-1. 化粧品において記載できる痒み症状に対する表現	p. 10
2-2. 薬用化粧品において記載できる痒み症状に対する表現	p. 11
2-3. 化粧品および医薬部外品によって生じる痒み	p. 12
3. 界面活性剤	p. 14
3-1. 界面活性剤の分類	p. 14
3-2. 界面活性剤による一次刺激性接触皮膚炎と刺激蓄積性接触皮膚炎	p. 14
3-3. アニオン性界面活性剤の洗浄作用と皮膚保湿成分の流出	p. 15
3-4. アニオン性界面活性剤による皮膚乾燥および皮膚荒れの出現と痒みとの関係	p. 15
3-5. アニオン性界面活性剤の皮膚浸透性と細胞障害性	p. 16
3-6. 洗浄剤開発ストラテジー	p. 16
3-7. 敏感肌と界面活性剤	p. 17
3-8. 生活環境と界面活性剤	p. 17
<b>第1章 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</b>	<b>p. 18</b>
<b>第1節 ラウリン酸ナトリウム誘発掻き動作</b>	<b>p. 18</b>
1-1. 実験材料および実験方法	p. 19
1-2. 実験結果	p. 24
1-2-1. 界面活性剤水溶液単回塗布による掻き動作の誘発	p. 24
1-2-2. ラウリン酸ナトリウム単回塗布による掻き動作の誘発	p. 25
1-2-3. アニオン性界面活性剤誘発の即時性掻き動作に対する naloxone の影響	p. 28
1-2-4. ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作に対する	

	naloxone および terfenadine の影響.....	p. 29
1-2-5.	ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性搔き動作の 発生時における組織学的検討.....	p. 30
1-2-6.	水酸化ナトリウム単回塗布による搔き動作への影響.....	p. 31
1-3.	考察.....	p. 33
第2節	ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性搔き動作へのヒスタミンの関与.....	p. 36
2-1.	実験材料および実験方法.....	p. 36
2-2.	実験結果.....	p. 38
2-2-1.	ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性搔き動作へのマスト細胞の関与.....	p. 38
2-2-2.	ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性搔き動作発生時における 血管透過性亢進の関与.....	p. 39
2-3.	考察.....	p. 39
第3節	ケラチノサイトにおけるヒスタミン産生・遊離の促進機構.....	p. 40
3-1.	実験材料および実験方法.....	p. 40
3-2.	実験結果.....	p. 43
3-2-1.	ラウリン酸ナトリウムの皮膚内ヒスタミン含有量および HDC 発現量に及ぼす影響.....	p. 43
3-2-2.	マスト細胞欠損マウスにおけるラウリン酸ナトリウムの 皮膚内ヒスタミン含有量に及ぼす影響.....	p. 45
3-2-3.	ラウリン酸ナトリウム刺激後のケラチノサイトにおけるヒスタミン産生.....	p. 46
3-3.	考察.....	p. 47
第1章・小括	.....	p. 49
第2章	染井吉野の葉抽出エキス及びクロロゲン酸の鎮痒効果.....	p. 51
第1節	染井吉野 ( <i>P. yedoensis</i> ) の葉抽出エキスおよびクロロゲン酸の ラウリン酸ナトリウム誘発搔き動作の抑制.....	p. 51
1-1.	実験材料および実験方法.....	p. 52
1-2.	実験結果.....	p. 54
1-2-1.	染井吉野の葉抽出エキスの ラウリン酸ナトリウム誘発遅発性搔き動作の抑制.....	p. 54
1-2-2.	染井吉野の葉抽出エキス中に含まれるクロロゲン酸の定量.....	p. 55
1-2-3.	クロロゲン酸のラウリン酸ナトリウム誘発遅発性搔き動作の抑制.....	p. 56
1-3.	考察.....	p. 57



総括	p. 93
謝辞	p. 94
参考文献	p. 95
論文要旨	p. 106

本論文では以下のような略号を用いた（アルファベット順）

ATP: adenosine triphosphate

Bis-Tris: bis (2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane

cDNA: complementary DNA

CGRP: calcitonin gene-related peptide

EIA: enzyme immunoassay

HDC: L-histidine decarboxylase

HE: hematoxylin and eosin

HPLC: high performance liquid chromatography

Ig: immunoglobulin

MAP: mitogen-activated protein

MOPS: 3-morpholinopropanesulfonic acid

NGF: nerve growth factor

NO: nitric oxide

NOS: nitric oxide synthase

PAR: protease-activated receptor

PBS: phosphate-buffered saline

PBS-T: PBS containing 0.1% Tween 20

PVDF: polyvinylidene difluoride

SC: stratum corneum

SDS: sodium dodecyl sulfate

SEM: standard error of the mean

TB: toluidine blue

TBS: tris-Buffered Saline

TEWL: transepidermal water loss

## 緒言

### 界面活性剤と痒み

界面活性剤による洗浄の基本性能とは、皮膚表面に付着した塵埃等の汚れや皮脂の分解物、剥離した角質細胞などを取り除くことである。この洗浄行為により皮膚は健やかに美しく保たれ、皮膚の生理機能を活発に維持することができる。そのため、日常生活の中で皮膚の洗浄は重要な行為である。

しかし、皮膚洗浄剤の使用によって痒みを感じるヒトが増加しているのは事実である。痒みの感じ方に特徴があり、健常皮膚の場合は洗浄中や洗浄後に一過性の痒みを生じる。そのような場合、消費者は使用した皮膚洗浄剤が自身の皮膚に合わなかったものと考えたり、その日の体調などの影響と結論付けたりしてしまい積極的な対応をすることは殆どない。確かに、私達はこのように日常生活で感じる持続しない痒みを取り上げて大きく問題視することはそう多くはない。現実的に問題になる痒みは、持続的な強い痒みである。このような痒みを感じる皮膚は健常皮膚というよりは乾燥皮膚や荒れ皮膚、敏感皮膚である場合が殆どである。界面活性剤による洗浄行為を頻繁におこなっている理・美容師や看護師、主婦などの頻回使用者に手湿疹を罹患している方が多く、慢性的な痒みに苦しんでいる (Inoue et al., 2008)。

昨今、生活環境が良くなり、快適な生活になるにつれて洗浄剤の使用頻度が増加している。生活環境が変化した時には、今まで大きな問題になっていなかったことが問題化することがある。その一つに洗浄剤（界面活性剤）という日常生活に欠かせない原料によって誘発される発赤、皮膚乾燥、痒みなどの皮膚トラブルがある。

パーソナルケア製品（化粧品や日用品）に対する疫学調査によると、皮膚有害反応事例の約 70%が非アレルギー性の刺激によるものであることが示されている (Simion and Allen, 1994) が、明確な原因の特定にまで至ったケースは少ない。多くの場合、消費者は外部からの物理刺激や化学刺激に対して初めは明確な臨床症状を伴わない感覚的な症状を訴える (Groot et al., 1987; Paquet et al., 1998; Berne et al., 1996)。この不快感としてツッパリ感、痒み、チクチク感、灼熱感などがあり、これらを単独あるいは複合して感じる。このような主観的感覚は先でも述べたように微弱な徴候で一時的なものであれば大きく問題視されることはないが、パーソナルケア製品は日常的に使用するため、微弱であった不快感に連続性が生まれると、やがて皮膚荒れ、皮膚乾燥、発赤などの肉眼的に確認できる症状へ移行する (Simion et al., 1995)。その原因と考えられているパーソナルケア製品として皮膚洗浄剤（主成分がアニオン性界面活性剤）がある (Simion et al., 1995)。これらの知見から、痒みの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が、界面活性剤によって誘発される痒みの発生機序の詳細は不明である。

そこで本研究では、アニオン性界面活性剤が直接痒みを発生する刺激となり得るのかとその痒みの発生機序を検討した。



## 背景

### 1. 痒み

#### 1-1. 痒みの表現

痒み (Pruritus) は, ドイツ人医師である Samuel Hafenreffer によって 1660 年に “unpleasant sensation” と定義されている。

また, 他に痒みは “An unpleasant sensation that provokes the desire so scratch” (Rothman, 1941), 「搔爬衝動に駆られる不快な感覚」と表現されている。しかし, 不快かどうかは主観的な感覚であり, Savin (1998) は “A sensation that, if sufficiently strong, will provoke scratching or the desire to scratch”, 「十分に強ければ, 搔爬または搔爬行動に駆られる感覚」と説明している。

痒みは皮膚表層及び皮膚に隣接した粘膜や角膜に固有の搔爬欲求を伴う不快な感覚であり, 痛みなどと並ぶ生理学的体性感覚の一種である。痒みは, 古くから認識されてきた感覚であるにも関わらず, 生命に直接関わる程の緊急性が高くなかったことなどの理由で, 痒みの研究は未だ途上にある。痒みは主観的な感覚であることから, 痒みを「痒い」という表現だけではなく, より具体的に表すことが難しい。このような痒みの表現の多様性から青木と岡田 (2001) は痒みの性質を表す表現として 8 種類を挙げ, Yosipovitch ら (2000) は 10 種類挙げている (Table 1)。

Table 1. 痒みの表現

青木敏之と岡田茂樹, 2001	
as insect crawl	虫が這うような
chiku-chiku	チクチク
iji-iji	イジイジ
muzu-muzu	ムズムズ
piri-piri	ピリピリ
stinging	刺すような
burning	焼けるような
tsun-tsun	ツンツン

Yosipovitch et al., 2000	
tickling	くすぐったい
stinging	ピリピリ
crawling like ant	ムズムズ
stabbing	刺すような
pinching	摘みたい
burning	灼熱感
bothersome	やっかいな
annoying	イライラする
unbearable	耐えきれない
worrisome	気をもます

## 1-2. 痒みの分類

皮膚由来の痒み感覚の多くは、表皮真皮境界部に存在する一次求心性ニューロン（C線維）の自由神経終末（軸索末端）が物理的・化学的刺激などによって活性化されて、生じたインパルスが脊髄後角へ入力され、脊髄後角で二次ニューロンに伝達され、脊髄視床路を上行し、大脳皮質感覚野に到達することで認識される。この痒み伝達経路を介して発生する痒みを①pruritoceptive itch（末梢性搔痒）とし、炎症や皮膚乾燥、皮膚障害によって生じる。乾皮症、蕁麻疹、虫刺され、乾癬など多数の皮膚疾患による痒みが該当する。上記で述べた痒みの求心性経路のどこかで障害性刺激が生じて発生する痒みを②neuropathic itch（神経障害性搔痒）とし、帯状疱疹後の搔痒、脳血管障害、多発性硬化症、脳腫瘍に伴う搔痒が該当する。神経に病理的異常が認められずに中枢で生じる痒みを③neurogenic itch（中枢性搔痒）とし、胆汁うっ滞による搔痒、慢性肝疾患、慢性腎疾患が該当する。この中枢性搔痒にはオピオイド受容体の関与がいられている。精神的な異常によっても痒みが発生し、この痒みを④psychogenic itch（心因性搔痒）とし、寄生虫忌避症における妄想や脅迫性障害、うつ病、ストレスによって生じる。痒みを成因から上記のように4種類に分類する提唱がなされている（Yosipovitch et al., 2003; Twycross et al., 2003; Ikoma et al., 2006）。

## 1-3. 痒みの悪循環（itch-scratch vicious cycle）

ヒトは痒みにより「掻きたい、あるいは掻かずにおられない」という衝動を抱く（生駒，2006）。そして、掻くことが掻きたい衝動を更に引き起こすが、掻き動作の繰返しで痒みは治まる。しかし、搔爬行為が皮膚を物理的に傷つけ、外部刺激から生体を守るバリア機能を脆弱化させる。皮膚が障害を受けると表皮細胞から interleukin-1 や tumor necrosis factor- $\alpha$ などのサイトカインが放出される。これらの炎症性サイトカインはマスト細胞や血管内皮細胞の活性化を介して炎症を誘発し、皮膚症状を悪化させる（Pastore et al., 2000）。さらに、C線維（知覚神経）を上行したインパルスの一部が遠心性に神経に伝わることによって、神経終末から substance P（アミノ酸 11 個）や calcitonin gene related peptide（CGRP, アミノ酸 37 個）などの神経ペプチドが遊離される。この遊離された神経ペプチドが炎症を増幅させると考えられている（Jarvikallio et al., 2003）。炎症が生じると炎症部位やその周辺から炎症性サイトカインなどの化学物質が放出され、それらが原因で再び痒みを生じるようになる。その結果、痒みが強くなり、搔爬により皮膚炎を悪化させるという悪循環（itch-scratch vicious cycle）に陥る（Wahlgren, 1999; Yosipovitch and Papoiu, 2008）。つまり、皮膚の修復を待たずして再び搔爬することで皮膚が修復されない、むしろ皮膚炎が進行し感染症の原因になってしまう場合もある。また、執拗な激しい痒みは集中力の低下や睡眠障害を招き、生活の質（quality of life, QOL）を著しく低下させる（Ayres, 1964）のみならず、外見が気になり外出を躊躇うなどの見た目問題にも繋がる。痒みはストレスなどの心理的な要因によっても発生し、掻くことで皮膚炎を誘発し痒みが悪化する（stress-scratch cycle）。誰もが経験したことがあるように、冬期などの空気が乾燥している時期に皮膚が乾燥し痒みを感じる。このことから皮膚乾燥が痒み

を誘発する要因の一つであることは周知されている。

#### 1-4. 動物を用いた痒みの評価法

Histamine やマスト細胞脱顆粒促進物質 (compound 48/80) などの起痒物質の皮下注射がヒトの痒みモデルとして伝統的に使われている (Fjellner and Hägermark, 1985; Woodward et al., 1995)。しかし、ヒトを対象とした研究には、被験者として参加するヒトの人権や安全などに関する倫理的な問題があるため、積極的に研究対象にするには限界がある。また、痒みは主観的な感覚であることから客観的な評価が困難であった。しかし、Kuraishi ら (1995) は、前肢や舌で触れることができず、後肢のみで触れることができるマウスの吻側背部皮膚に、ヒトで痒みを起こす起痒物質 (compound 48/80 と substance P) を皮下注射すると、注射部位やその周辺への後肢による掻き動作が惹起されるが、発痛物質 (capsaicin と formalin) を皮下注射しても掻き動作が引き起こされないことを見出し、掻き動作が痒み関連行動である可能性を示している。つまり、マウスの掻き動作を指標に痒みの程度を客観的に評価することが可能となった。

痒みの主要なメディエーターの一つである histamine は古くから知られており (Lewis, 1927), 臨床では痒みに対する第一選択薬として H<sub>1</sub> ヒスタミン受容体遮断薬が処方されるが、急性蕁麻疹を除くアトピー性皮膚炎などの慢性掻痒を伴う痒みには効果が低い。動物においても histamine の皮内注射で掻き動作を示すのは ICR, ddY, BALB/c, C57BL/6, WBB6F1 などの限られた系統のマウスであることが報告されている (Inagaki et al., 2001)。これらの結果から、マウスでは histamine が共通の起痒物質でないことを示唆している。

Kondo ら (1964) によって確立された近交系 NC/Nga マウスは、無菌 (specific pathogen free, SPF) 環境下では皮膚炎を発症しないが微生物コントロールや飼育用ケージなどの器具等の滅菌をしていない (conventional) 環境下での飼育により皮膚炎を自然発症する。NC/Nga マウスは皮膚炎の発症に伴い掻き動作が誘発されること、血中 IgE 濃度の上昇、皮膚の病理組織学的形態など多くの点でアトピー性皮膚炎患者と類似している (Matsuda et al., 1997)。そして、この掻き動作が  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬で抑制される (Maekawa et al., 2002)。ヒトにおいても  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬は、胆汁うっ滞、慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの掻痒性疾患患者の掻き動作を抑制し (Mansour-Ghanaei et al., 2006; Monroe, 1989), 健常者における histamine 誘発性の痒み (Bernstein et al., 1982) など様々な原因によって誘発される痒みを抑制する。動物においても、 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬は様々な起痒物質の皮内注射によって誘発される掻き動作を抑制し (Inagaki et al., 2000), 痒みを伴う疾患マウスモデルで観察される自発的掻き動作も抑制する (Miyamoto et al., 2002; Maekawa et al., 2002)。以上より、 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬の効果を検討することは、観察される掻き動作が痒みに起因するものかを判断する有効な手段と考えられる。

### 1-5. 末梢における痒みの伝達経路（ヒスタミン依存的／ヒスタミン非依存的経路）

末梢においてマスト細胞が産生・放出する histamine, tryptase や神経終末から放出される substance P および CGRP, ケラチノサイトが産生・放出する leukotriene B<sub>4</sub> および一酸化窒素 (nitric oxide, NO), 活性化 CD4 陽性 T 細胞が産生・放出する interleukin-31 なども痒み発生因子や痒み増強因子として作用している (Ando and Kuraishi, 1998, 2003; Ando et al., 1998, 2004, 2009; Yamaguchi et al., 1999; Dillon et al., 2004; Ui et al., 2006)。皮膚内 histamine は蕁麻疹や皮膚肥満細胞症, 薬疹などの皮膚疾患に伴う痒みのメディエーターとして知られている。H<sub>1</sub> ヒスタミン受容体遮断薬はヒトと動物の両方において histamine 誘発性の痒みに有効である (Ohtsuka et al., 2001; Ui et al., 2006; Jauregui et al., 2007)。しかし, 抗 histamine 薬は急性蕁麻疹には著効を示すが (Ferguson et al., 1985), アトピー性皮膚炎などの掻痒性皮膚疾患においては有効ではない (Klein and Clark, 1999)。Histamine は痒みとともに, 直接的血管拡張作用や, histamine 感受性 C 線維の軸索反射により血管拡張作用のある神経ペプチド (substance P や CGRP) を放出することで皮膚に紅斑をもたらす。しかし, 日常的に体験する痒みには必ずしも紅斑を伴わない。これより, histamine 非依存的なシグナル伝達経路の存在が推測される。Cowhage (mucuna pruriens, 八升豆の鞘を覆う産毛状の棘) を皮膚に接触させると痒みは生じても紅斑は生じない。またヒトでの実験で, カプサイシンを皮膚に投与して末梢神経の脱感作を起こした場合, cowhage の痒みは抑制しても histamine の痒みは抑制しないことが報告されている (Johanek et al., 2007)。これらの知見から現在のところ histamine 依存的および histamine 非依存的な 2 種類の経路があると考えられている (Davidson et al., 2007; Johanek et al., 2007; Namer et al., 2008; Nakano et al., 2008; Davidson and Giesler, 2010)。

Protease-activated receptor (PAR) は PAR-1~PAR-4 の 4 つのサブタイプが知られており, いずれの受容体も, tryptase などのプロテアーゼが作用するとアミノ末端の細胞外領域の特定部位が限定分解され新しく現れたアミノ末端の領域が, 自らの第二細胞外ループの領域に結合して, 細胞内に情報が伝達される (Ossovskaya and Bunnett, 2004)。PAR-1~PAR-4 の各受容体のペプチド性アゴニストを NC 系マウスの皮膚に投与すると, PAR-2 アゴニストのみが用量依存的に痒み関連行動を誘発する (Tsuji et al., 2008, 2009)。Tryptase 誘発掻き動作および compound 48/80 誘発掻き動作は抗 PAR-2 抗体 (プロテアーゼ切断部位をエピトープとする抗体) および PAR-2 拮抗薬で抑制される (Ui et al., 2006)。これらの結果から, マスト細胞の脱顆粒によって放出された tryptase が一次求心性ニューロンの PAR-2 受容体に作用して痒みシグナルを発生させる可能性が考えられ, histamine 非依存的な経路の一つであると思われる。

脂質メディエーターの一つである leukotriene B<sub>4</sub> は, マウスでは histamine よりも強力な起痒物質であり, 一次求心性ニューロンの BLT1 受容体への結合が起痒作用の一つと考えられる (Ando et al., 1998, 2004, 2009)。皮膚において NO は L-arginine から nitric oxide synthase (NOS) によって生合成される (Palmer et al., 1988)。Substance P は NOS 発現細胞に作用して NO を産生する (Bull et al., 1996)。Substance P 誘発掻き動作を NOS 阻害剤が抑制する。しかし, NO の基質である L-arginine や NO ドナーである NOR3 の皮内注射では掻き動作が起きないが,

substance P 誘発搔き動作を増強する。これより NO は痒み増強因子であることが示唆されている (Ando and Kuraishi, 2003)。

表皮真皮境界部辺りには substance P および CGRP 含有一次求心性線維が広く分布しており, substance P, CGRP は皮内注射により痒みを生じることから, 一次求心性線維の興奮により, 一次求心性線維の神経終末から遊離される substance P や CGRP が痒みを惹起する可能性が示唆されている。これらは主にマスト細胞を刺激し, histamine を遊離させる作用によると考えられている (Hägermark et al., 1978)。しかし, ヒトで痒みを誘発させる濃度の substance P (Fjellner and Hägermark, 1981) をヒト皮膚マスト細胞に作用させても histamine 遊離は起こらない (Ebertz et al., 1987)。また, CGRP をヒトの皮膚に投与しても, 皮膚内 histamine 量の増加は確認されていない (Weidner et al., 2000)。これらの研究から, マスト細胞由来の histamine が substance P 誘発の痒みや CGRP 誘発の痒みに重要ではないことが推測されるが詳細は不明である。

Interleukin-31 トランスジェニックマウスは自発的に皮膚炎と痒み関連搔き動作を誘発する (Dillon et al., 2004)。アトピー性皮膚炎患者の血中 interleukin-31 レベルは重症度と相関して増加している (Ezzat et al., 2011)。Transient receptor potential (TRP) チャネルなども痒み発生に関与することが報告されている (Alenmyr et al., 2009; Steinhoff and Bíró, 2009)。これらの報告より, histamine 非依存的なシグナル伝達経路は複数存在する可能性が考えられる。

まとめると, 多くの搔痒性皮膚疾患において複数の因子が痒み発生や痒み増強に関与していると考えられ, 末梢の痒み発生機構が十分に解明されているとは言い難い。そのため本研究では, 界面活性剤という誰もが日常的に使用する物質を研究対象にし, 末梢性搔痒の新たな痒み発生経路の証明に取り組んだ。

## 1-6. ヒスタミン生合成とヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)

Histamine はアミノ酸の L-histidine に特異的で, かつ高親和性の L-histidine decarboxylase (HDC) により産生される。Histamine 産生・貯蔵細胞には, マスト細胞や好塩基球, エンテロクロマフィン様細胞などがあり, histamine は顆粒内に貯蔵され, 刺激に応じて細胞外へ放出されて生理作用を示すとする考え方が一般的とされている。一方, 顆粒内に貯蔵されている histamine とは異なり, 細胞刺激により細胞内で生合成される誘導性 histamine の存在様式が指摘され, 免疫機能との関連性が示唆されている (Kahlson and Rosengren, 1968; Takamatsu et al., 1996)。

誘導性 histamine は貯蔵型 histamine と異なり, 細胞内で histamine の生合成が確認されるものの, histamine 貯蔵顆粒や細胞内において histamine の検出が難しいタイプの様式である。Histamine の生合成に必須の HDC は lipopolysaccharide や炎症性サイトカイン刺激によって誘導されることが報告されている (Endo, 1989; Endo et al., 1992)。誘導性 histamine は生合成されたのちに, 直ちに細胞外へ放出されるという特徴があり, 組織損傷や組織修復過程, タンパク合成が盛んな組織において検出される (Kahlson et al., 1960; Schayer and Ganley, 1959;

Nishibori et al., 2001) ことから、生体防御との関連性が示唆されている。HDC 発現細胞として、マスト細胞以外にケラチノサイト (Fitzsimons et al., 2001), T 細胞 (Oh et al., 1988; Aoi et al., 1989), B 細胞 (Oh et al., 1988), マクロファージ (Kawaguchi-Nagata et al., 1988; Takamatsu and Nakano, 1994; Hirasawa et al., 2001), 好中球 (Shiraishi et al., 2000b), 血管内皮細胞 (Tippens and Gruetter, 2004) の免疫担当細胞が明らかにされている。

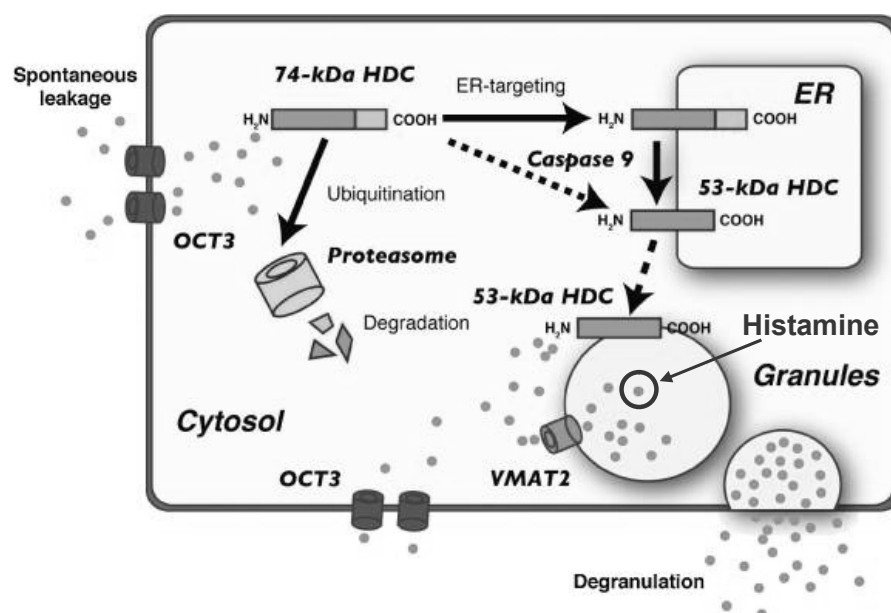
#### **1-6-1. マスト細胞内の貯蔵型ヒスタミンとヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)**

マウスの癌化マスト細胞 (mastocytome P-815 細胞) から精製された HDC は分子量 110-kDa で、分子量 53-kDa のサブユニットの二量体であり、L-histidine のみを基質とし、補酵素として pyridoxal phosphate を必要とするという特徴がある (Ohmori et al., 1990)。精製酵素のアミノ酸配列をもとに、癌化マスト細胞 P-815 細胞の cDNA ライブラリーからマウス HDC cDNA のクローンを単離し、単離した cDNA は全長 2371 塩基対からなり、翻訳領域 (1896 塩基) の塩基配列から推定されるアミノ酸残基は 662 個で、ここから計算される HDC タンパクの分子量は 74071 (74-kDa) である (Yamamoto et al., 1990)。サザンブロット解析よりマウス HDC mRNA は単一バンド (2.7kb) であることから HDC mRNA は 1 種類しか存在しないと考えられる。74-kDa HDC の C 末端部分 (21-kDa) が欠落したものが 53-kDa HDC であることが報告されている (Yamamoto et al., 1993)。これらのことから、74-kDa HDC は前駆体であり、プロセッシングの結果、53-kDa HDC が生成すると推定されている (Yamamoto et al., 1993)。このプロセッシングをセリンプロテアーゼ阻害剤の diisopropyl fluorophosphate (DFP) と benzamidine により阻害されることから、プロセッシング酵素として benzamidine 感受性セリンプロテアーゼが推定されている (Tanaka et al., 1995; Ichikawa et al., 1998)。プロセッシングに要する時間は、高い HDC 活性を有するラット好塩基球細胞株 RBL (rat basophilic leukemia) -2H3 細胞においては、約 2-30 分という非常に速やかな翻訳後プロセッシングが起こることが報告されている (Tanaka et al., 1998)。ヒトマスト細胞株 HMC (human mast cells) -1 および mouse bone marrow-derived mast cells (BMMC) においては、細胞刺激から 4 時間以上経過したのちにタンパク翻訳が確認されている (Jeong, et al., 2009)。動物種や細胞種の差異や実験条件によってタンパク翻訳に要する時間が異なると推測されるが詳細は不明である。

Percoll を用いた密度勾配遠心分画により、74-kDa HDC はサイトゾル・小胞体を含む画分に、53-kDa HDC は小胞体・ゴルジ・顆粒を含む画分にそれぞれ存在しており、HDC 活性はサイトゾルおよび顆粒にそれぞれ検出されることが示されている (Tanaka et al., 1998)。また、サポニンであるジキトニンを処置 (細胞内に外部から物質を容易に導入するための方法) することで部分的に物質透過を可能にした細胞膜を有するセミインタクト細胞を作製し、トリプシンを作用させたところ 74-kDa HDC は完全に消化されるのに対し 53-kDa HDC は抵抗性を示している。つまり、74-kDa HDC はサイトゾルあるいはサイトゾルに接した領域に分布し、53-kDa HDC はプロテアーゼによる消化から免れる領域 (オルガネラの内腔側) に存在することを示唆している (Ichikawa et al., 2010)。

53-kDa HDC は顆粒内で histamine を生成し貯留すると考えられている。74-kDa HDC はサイトゾルで histamine を生成し、細胞外へ 12 回膜貫通型有機カチオンのトランスポーターである organic cation transporter-3 (OCT-3) を通って放出され、サイトゾル内の histamine 量が細胞外 histamine 量よりも低い場合は細胞外から histamine 取込みにも関与し細胞内の histamine 濃度の維持に作用しているかもしれない (Ichikawa et al., 2010)。サイトゾルで生合成された histamine は 2 型小胞モノアミン輸送体 (Vesicular Monoamine Transporter Subtype 2, VMAT2) を介して顆粒に取り込まれる (Ichikawa et al., 2010)。サイトゾルに存在する 74-kDa HDC は ubiquitin-proteasome により ATP 依存的に速やかに代謝される (Tanaka et al., 1997)。一方、53-kDa HDC はプロテアーゼに抵抗性を示すことから安定な分子種であると推測される。

以上の内容を模式化したものが Fig. 1 である。



**Fig. 1.** マスト細胞におけるヒスタミンの細胞内生合成とヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) (Ichikawa et al., 2010 より引用, 一部改変)

### 1-6-2. マクロファージ内の誘導性ヒスタミンとヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)

マウスのマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞において、小胞体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤タプシガージン処置により一過性の HDC 誘導が生じること、74-kDa HDC のみが検出されることが報告されている (Hirasawa et al., 2001)。マクロファージ様細胞内で生成された histamine は細胞内でほとんど検出されず、生合成後直ちに細胞外に放出されることを明らかにしている (Hirasawa et al., 2001)。マクロファージでは、HDC がプロセッシングにより活性化されるのではなく、74-kDa HDC が histamine 産生を制御していることが示唆される。

HDC mRNA 発現は、p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase によって強く制御されており、p38 MAP kinase の関与は小さいことが示されている (Shiraishi et al., 2000a)。ヒト胃癌細胞 AGS 細胞においてもガストリン刺激によって誘導される HDC にも p44/p42 MAP kinase が大きく関与している (Höcker et al., 1997)。これらの知見より、マクロファージの HDC の発現に p44/p42 MAP kinase の関与が大きいかもしれないが、種々の細胞で共通の機構であるかの詳細は不明である。



## 2. 化粧品および医薬部外品によって生じる痒み

### 2-1. 化粧品において記載できる痒み症状に対する表現

化粧品として記載できる表現は 56 項目存在（2013 年 3 月時点）し、痒みに関するものは 2 項目であり、顕在化している痒み症状を軽減する表現の記載は認められている（Table 2）。

Table 2. 化粧品として記載できる効能効果表現の範囲

1) 頭皮，毛髪を清浄にする	29) 肌を柔らげる
2) 香りにより毛髪，頭皮の不快臭を抑える	30) 肌にはりを与える
3) 頭皮，毛髪をすこやかに保つ	31) 肌にツヤを与える
4) 毛髪にはり，こしを与える	32) 肌を滑らかにする
5) 頭皮，毛髪にうるおいを与える	33) ひげを剃りやすくする
6) 頭皮，毛髪にうるおいを保つ	34) ひげそり後の肌を整える
7) 毛髪をしなやかにする	35) あせもを防ぐ
8) クシどおりをよくする	36) 日やけを防ぐ
9) 毛髪につやを保つ	37) 日やけによるシミ，ソバカスを防ぐ
10) 毛髪につやを与える	38) 芳香を与える
11) ふけ，痒みがとれる	39) 爪を保護する
12) ふけ，痒みを抑える	40) 爪をすこやかに保つ
13) 毛髪的水分，油分を補い保つ	41) 爪にうるおいを与える
14) 裂毛，切毛，枝毛を防ぐ	42) 口唇の荒れを防ぐ
15) 髪型を整え，保持する	43) 口唇のキメを整える
16) 毛髪帯電を防止する	44) 口唇にうるおいを与える
17) 皮膚を清浄にする	45) 口唇をすこやかにする
18) ニキビ，アセモを防ぐ	46) 口唇を保護する。口唇の乾燥を防ぐ
19) 肌を整える	47) 口唇の乾燥によるカサツキを防ぐ
20) 肌のキメを整える	48) 口唇を滑らかにする
21) 皮膚をすこやかに保つ	49) ムシ歯を防ぐ
22) 肌荒れを防ぐ	50) 歯を白くする
23) 肌をひきしめる	51) 歯垢を除去する
24) 皮膚にうるおいを与える	52) 口中を浄化する
25) 皮膚的水分，油分を補い保つ	53) 口臭を防ぐ
26) 皮膚の柔軟性を保つ	54) 歯のやにを取る
27) 皮膚を保護する	55) 歯石の沈着を防ぐ
28) 皮膚の乾燥を防ぐ	56) 乾燥による小ジワを目立たなくする

## 2-2. 薬用化粧品において記載できる痒み症状に対する表現

薬用化粧品は、薬事法によって医薬部外品として認められた効能・効果をもち、かつ、化粧品と同様の使用目的・使用方法を有する。

薬用化粧品では「痒みの予防」という表現が使用できる（Table 3）。

化粧品の効能効果表現のみを標榜するものは、薬用化粧品としては認められない。

Table 3. 薬用化粧品として記載できる効能効果表現の範囲

種類	効能・効果
シャンプー	<b>ふけ・痒みを防ぐ</b>
	毛髪・頭皮の汚臭を防ぐ
	毛髪・頭皮を清浄にする
	毛髪・頭皮を健やかに保つ 毛髪・頭皮をしなやかにする
リンス	<b>ふけ・痒みを防ぐ</b>
	毛髪・頭皮の汚臭を防ぐ
	毛髪の水分・脂肪を補い保つ
	裂毛・切毛・枝毛を防ぐ
	毛髪・頭皮を健やかに保つ 毛髪・頭皮をしなやかにする
化粧水	あせも・しもやけ・ひび・あかぎれ・にきびを防ぐ
	剃刀まけを防ぐ
	日やけによるしみ・そばかすを防ぐ
	肌をひきしめる
	肌を清浄にする
	肌を整える 皮膚を健やかに保つ。皮膚に潤いを与える
クリーム、乳液、ハンドクリーム、化粧用油	あせも・しもやけ・ひび・あかぎれ・にきびを防ぐ
	剃刀まけを防ぐ
	日やけによるしみ・そばかすを防ぐ
	肌をひきしめる
	肌を清浄にする
	肌を整える
	皮膚を健やかに保つ
	皮膚に潤いを与える 皮膚を保護する、皮膚の乾燥を防ぐ

ひげそり用剤	剃刀まけを防ぐ 皮膚を保護し、ひげを剃りやすくする
日やけ止め剤	日やけ・雪やけによる肌荒れを防ぐ 日やけ・雪やけを防ぐ 日やけによるしみ・そばかすを防ぐ 皮膚を保護する
パック	にきびを防ぐ 日やけによるしみ・そばかすを防ぐ 肌をなめらかにする 皮膚を清浄にする
薬用石けん（洗顔料を含む）	【殺菌剤主剤のもの】 皮膚の清浄・殺菌・消毒 体臭・汚臭及びにきびを防ぐ 【消炎剤主剤のもの】 皮膚の清浄，にきび，剃刀まけ及び肌荒れを防ぐ

### 2-3. 化粧品および医薬部外品によって生じる痒み

化粧品や医薬部外品では痒みの抑制や予防を表記できることから、各企業は製品開発時において痒みへのアプローチに取り組んではいるものの、重要項目として積極的に検討することは多くなく製品性能を重要視していることが多い。しかし、近年、界面活性剤の皮膚刺激性や皮膚蓄積性による皮膚トラブルが増加している。その背景に、先進国を中心とした清潔で快適な生活への意識向上、女性の社会進出、男性の化粧品使用の増加などが考えられる。具体的には、美観意識の向上による化粧行為や使用した化粧品のクレンジング行為が日常におこなわれている。このような背景から洗浄剤（界面活性剤）の使用が増加していると推測され、痒み、皮膚乾燥および皮膚荒れなどの皮膚トラブルに関与していると思われる。

洗浄剤などの外来性物質が皮膚に接触することで生じる皮膚炎（接触皮膚炎）は生体の異物排除機構によって生じる。この接触皮膚炎は時代の流れに沿った生活習慣や生活環境などと密接な関係にあり、その原因物質に変遷がある。現代の先進国では、清潔で快適な生活が習慣化される時代になっていることから、洗浄剤（界面活性剤）が接触皮膚炎の原因物質の一つであると推測される。海老原（2007）は最近目立つ刺激性接触皮膚炎を誘発する物質としてアニオン性界面活性剤を挙げており、シャンプー（主剤がアニオン性界面活性剤）による美容師などの職業性皮膚炎が増加していると述べている。

化粧品使用に対するアンケートによれば、消費者は自身の皮膚に「痒み」、「発赤」、「ひりひり感」、「乾燥」などを感じている場合が多い。さらに皮膚トラブルを発生させた原因として「特定の化粧品」、「環境」、「石鹸／洗浄剤」などが考えられる（坂本，2000）。しかし、このアンケート結果から洗浄剤自体が痒みや発赤などの皮膚トラブルの直接的な原因かは不明

である。なぜなら、通常洗剤は泡立てて使用する製品であることから、スポンジなどを使って泡立てる行為を行う。その後、泡立った洗剤の付いたスポンジなどで皮膚の表面を擦りながら洗う。この擦る行為が皮膚の表面を傷つける可能性がある。最近の皮膚洗剤は皮膚への刺激性を低減することを消費者のニーズから考慮されて処方設計がなされている場合が多い。皮膚の低刺激性を実現するためには界面活性剤の配合濃度を下げる必要がある。その結果、なかなか泡立たなくなるなどの不具合が生じる。すると、皮膚の汚れを洗い流す時にゴシゴシ洗うことに繋がってしまう。つまり、この洗うという行為が皮膚トラブルに繋がっている可能性も考慮しないといけない。

最近では、洗剤の製剤処方だけでなく、容器にも多くの工夫がなされている。これまでの手の平などで泡立たせてから使用する様式だけではなく、ポンプ式の容器を使用することで手の平に取る時には既に泡の状態で使用できるような工夫が組み込まれているものも存在する。このように消費者の使用実態の調査などから消費者の抱える不具合を改善する試みが多く見受けられるのも事実である。

スキンケアのための化粧品や医薬部外品の開発はQOLをあげるために重要であるが、これらの製品の使用頻度が増す中、顕在化してきている洗剤（界面活性剤）による皮膚トラブルを検討することがより良い製品開発を進めることに繋がると思われる。

### 3. 界面活性剤

#### 3-1. 界面活性剤の分類

界面活性剤は医薬品や医薬部外品、化粧品、食品、農薬などの広範囲な産業分野で機能性素材として多用されており日常生活に欠くことのできない原料となっている (Corazza et al., 2010; Szüts and Szabó-Révész, 2012)。一般的に界面活性剤は1分子中に親油基と親水基からなる構造をしており、溶解性及び親水基の特性によって Table 4 のように分類される。中でもアニオン性界面活性剤が、最も洗浄力が強いといわれている。

Table 4. 界面活性剤の分類

溶解性による区別	水溶液中でイオン性による区別	界面活性を示す部分のイオン性で区別
水溶性界面活性剤	イオン性界面活性剤	アニオン性界面活性剤
		カチオン性界面活性剤
		両性界面活性剤
非イオン性界面活性		
脂溶性界面活性剤		

#### 3-2. 界面活性剤による一次刺激性接触皮膚炎と刺激蓄積性接触皮膚炎

刺激性接触皮膚炎は大きく一次刺激性接触皮膚炎と刺激蓄積性接触皮膚炎に分けられる。界面活性剤は、ケラチンタンパクと結合する特徴を有するため (Imokawa et al., 1975)、洗浄しても完全に洗い流されず皮膚に吸着し残留する。この界面活性剤残渣は通常皮膚のターンオーバー (新しい角質層の生成 [皮膚の新陳代謝]) によって垢として排出されていく。界面活性剤は脂質構造や皮膚バリア機能に作用することで皮膚刺激性を有する (Ananthapadmanabhan et al., 2004; Wihelm et al., 1994; Imokawa and Mishima, 1979)。界面活性剤の皮膚刺激性は、界面活性剤暴露頻度や暴露時間、濃度、種類などによって変化する。

皮膚刺激性が強い界面活性剤の場合、一回の接触で急性毒性皮膚炎 (一次刺激性接触皮膚炎) が生じることがある。皮膚刺激性が弱い界面活性剤の場合、一回の接触で皮膚炎は発症しないが、繰り返す同じ部位に接触することで慢性障害性皮膚炎 (刺激累積性接触皮膚炎) が生じることがある。

通常、化粧品や医薬部外品は消費者が自由に選択し、何ら制限なく使用できるものであることから安全無害でなければならない。しかし、洗浄剤の使用が増加している昨今、界面活性剤の皮膚刺激性や皮膚蓄積性による皮膚トラブルが増加しているのは事実であり、皮膚の抵抗力が弱くなっている。そのため化粧品や医薬部外品による一次刺激性接触皮膚炎や刺激蓄積性接触皮膚炎が生じ易くなっていると推測される。

### **3-3. アニオン性界面活性剤の洗浄作用と皮膚保湿成分の流出**

健常肌の最外層の角層では、無核の角層細胞が一様に重なり合って配列しており、そこに水分が保持されている。この水分を保持する生理機能を保湿能と呼ぶ (Blank, 1952)。皮膚の保湿には、①皮脂腺分泌物 (皮脂膜) による水分蒸散抑制作用、②角層細胞中にあるアミノ酸、ミネラル、ピロリドンカルボン酸、尿素、乳酸塩などの天然保湿因子による保湿能、③角層細胞間に存在する両親媒性の脂質 (角層細胞間脂質) の保水能およびバリア機能の3つの因子が主に関与していると考えられている。角層細胞間脂質は表皮細胞が分化して角層細胞になる過程で供給されることから皮脂由来の脂質とは構成成分が異なり、細胞膜構成リン脂質の酵素分解生成物であるセラミド、コレステロール、脂肪酸などから構成されている。

アニオン性界面活性剤の洗浄作用によって、角層細胞間脂質、天然保湿因子の流出が生じる。アニオン性界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (SDS) の5%水溶液を皮膚に処理 (カップシェイク法) すると、処理時間に依存して角質細胞間の層状構造に損傷をきたす (芋川, 1990)。5% SDS 水溶液をヒト前腕皮膚表面に1分間カップシェイクした後の洗浄液には皮脂腺由来脂質が検出されるのに対し、5% SDS 水溶液を10-30分間カップシェイクした後の洗浄液には角層細胞間脂質が検出される。5% SDS 水溶液による洗浄前後で角層を10層程度剥離し四酸化ルテニウム染色 (角層細胞間像を観察するための染色) による電子顕微鏡観察においても、角層細胞間脂質が抜けていることが確認されている (Imokawa et al., 1989)。洗浄によって失われた保湿成分の回復には皮膚のターンオーバーにかかる時間が必要になる (Imokawa et al., 1991)。保湿機能の低下した皮膚に細胞間脂質を塗布すると、皮膚の水分保持機能が回復することが確認されている (Imokawa et al., 1986)。これらのことから、細胞間脂質は健常肌を保つためには必須成分であることが示唆される。

通常の私達がおこなう洗浄行為は、上記の実験のように数十分もアニオン性界面活性剤水溶液に皮膚が洗浄され続けていることはないが、洗浄行為を頻繁におこなえば保湿成分の喪失が増大すると推測できる。

### **3-4. アニオン性界面活性剤による皮膚乾燥および皮膚荒れの出現と痒みとの関係**

アニオン性界面活性剤の洗浄によって保湿機能が低下すると細胞間脂質の働きが不十分になり、角層水分量の減少、角層の形状・形態の乱れが生じ、バリア機能が低下した乾燥皮膚になる。このような皮膚バリアが破壊された乾燥皮膚では、外来異物や細菌等の皮膚内への侵入や洗浄剤成分 (主にアニオン性界面活性剤) の皮膚浸透性が高まり、表皮細胞が刺激されやすい。その結果、種々のサイトカイン、ケモカインが放出され、炎症反応が引き起こされる (Mizumoto et al., 2003; Denda et al., 2002)。そして時に皮膚荒れを認める (Groot et al., 1987; Berne et al., 1996)。洗浄力の異なるアニオン性界面活性剤で皮膚を洗浄した際に、洗浄液中に遊離した細胞間脂質成分 (コレステロール量) と皮膚荒れの程度に相関性が確認されている (Imokawa et al., 1989)。このことから、アニオン性界面活性剤の洗浄力が皮膚荒れの誘発因子の一つであることが示唆される。

Miyamoto ら (2002) は動物皮膚を 1 日 1 回アセトンとジエチルエーテルの混液による処理 (AE 処理) を数日繰り返すことで脱脂した乾燥皮膚を作製し、さらに AE 処理直後に水処理 (W 処理) を追加することで天然保湿因子などの保湿成分までも減少させた乾燥皮膚を作製している。興味深いことに AE-W 処理を繰り返した動物のみが痒み関連行動を認めている。バリア機能が破壊された皮膚を界面活性剤で洗浄すると細胞間脂質や天然保湿因子の流出が生じ、痒みを伴うことが知られている (Groot et al., 1987; Berne et al., 1996)。前述したが、界面活性剤による洗浄では皮脂腺由来の皮脂が洗い流され、洗浄時間や洗浄回数の増加に伴い細胞間脂質も洗い流されてしまう。これらのことから界面活性剤の洗浄行為において細胞間脂質や天然保湿因子の流出が生じることで痒み発生に繋がる可能性が考えられる。

しかし、皮膚乾燥や皮膚荒れを伴わない健常皮膚においても、洗浄剤使用中や使用後に痒みを感じることは少なくない。この痒みは洗浄剤直後に感じるものもあれば数時間経過した後に感じる場合もある。頭皮頭髮洗浄剤 (シャンプー) を使用した翌日の夕方や夜に頭皮が痒いという消費者がいるのも事実である。健常皮膚であれば角層細胞間脂質や天然保湿因子の流出が少ないことから、界面活性剤が直接的に痒み発生に関与している可能性が推測できる。

### **3-5. アニオン性界面活性剤の皮膚浸透性と細胞障害性**

アニオン性界面活性剤の低濃度溶液はタンパク変性作用が低く、バリア機能破壊作用も小さい。これは角質ケラチンとのイオン結合などによりアニオン性界面活性剤が角層上で留まり、角層下にほとんど侵入できないことに由来しており (Scala et al., 1968)、皮膚浸透性に濃度が重要な因子の一つであることが示唆される。アニオン性界面活性剤の特徴の一つに膜脆弱化能がある (Imokawa and Mishima, 1981)。角層下まで侵入できる濃度の場合、膜破壊による細胞障害性が生じると考えられる。これがアニオン性界面活性剤による炎症作用に起因していると推測できる。これらのことから、実験的に健常皮膚の角層下にアニオン性界面活性剤を侵入させるにはある程度の濃度を用いる必要があると思われる。

### **3-6. 洗浄剤開発ストラテジー**

近年、スキンケアに対応した研究開発が盛んに行われている。皮膚を清潔に保つことを担保した上で「選択洗浄」や「低刺激性」の洗浄剤の開発が期待されている。これらは肌荒れなどを防ぐ重要な因子である角層細胞由来脂質を比較的多く残し、皮脂腺由来脂質を汚れとともに洗浄するものや、天然保湿因子や細胞間脂質の除去、界面活性剤の付着・残留をできるだけ低減するものである。しかし、低刺激性を実現した製品サンプルは洗浄力が弱く、洗浄剤の基本性能を十分担保できない場合が多い。また、使用する界面活性剤の種類や濃度、組合せなども洗浄力、皮膚刺激性に関与するため、「選択洗浄」と「低刺激性」の両ストラテジーを叶える製品開発は難航しているのが実情である。さらに、使用するヒトの皮膚状態によっても刺激性に大きな違いが生まれることも開発を難しくしている要因の一つである。し

かし、界面活性剤が痒み発生の直接的な原因になり得る可能性を上述したが、界面活性剤の皮膚刺激性との関係性について詳細は明らかとなっていない。

### **3-7. 敏感肌と界面活性剤**

近年、敏感肌という言葉が日常的に使われるようになってきているが、皮膚の状態を表す科学的用語として確立したものではない。敏感肌は、化粧品や皮膚洗浄剤、外用医薬品などに対する消費者の主観的な感覚を表現する際に用いられることが多い。Paye ら（1999）は洗浄剤（界面活性剤）の影響を受けやすい手掌と自分自身が敏感肌と思うかという自己診断との関係について報告している。その結果、母集団（女性 150 名）のうち 35%が敏感肌、40%が非敏感肌と認識している。臨床所見および生体計測結果（発赤度合い、角層水分量）に相関性が確認されている。興味深いことに「乾燥感を感じる」、「しっとりしている」などの使用時の感覚が明らかに異なる皮膚洗浄剤を、敏感肌のヒトが使用しても感覚的な識別に差は認められていない。これより、界面活性剤の使用時には敏感肌および非敏感肌の両方において、感覚に大きな違いがなく使用後のケアが重要であることが考えられる。

某化粧品メーカーの調査報告によると、自身の肌が敏感肌と思うかという自己申告調査の結果、敏感肌と認識している女性が 1980 年には約 20%であったのに対し、1992 年には約 33%に、1998 年には約 43%と増加している（伊藤, 2000）。この中には思い込みによる敏感肌の割合が含まれていると思われるが、年々増加していると考えて間違いなさそうである。

### **3-8. 生活環境と界面活性剤**

季節の変化が皮膚の変化と密接に関係していることは多くの疫学調査報告により知られている（Uter et al., 1998）。特に冬期には、ドラッグストアなどの店頭で数多くのスキンケア剤（保湿剤など）が並べられ、年間を通して最もスキンケア剤の販売量が多くなることから皮膚乾燥を感じている消費者が多数存在することを推測される。

日本においては、高度経済成長期（1950 年代~1960 年代）以降は、道路舗装の普及により、降雨によって蓄えられた水分を大気中に放出し大気中の湿度低下を防ぐ役目を担っていた地面の土や樹木が失われている。都市化に伴い空気の乾燥や大気汚染も進行している。住居においてはエアコンの普及により低湿度環境下で日常を生活している。さらには食生活の欧米化など生活環境が大きく変化している。このように生活が快適になるに従い、私達は清潔を求めるようになり、皮膚の過剰な手入れによる皮膚洗浄剤の使用増加、化粧品の使用増加に伴うクレンジング行為の増加など、日常生活において界面活性剤の使用回数は急増していると思われる。

日常生活を営みながら、いっさいの刺激を取り除くことは不可能である。そこで、今後の化粧品や洗浄剤開発において、製品の安全性や安定性は勿論のことながら消費者の生活環境に則し、皮膚状態をより考慮した製品開発が、化粧品技術者が取り組むべき課題の一つであろう。



## 第1章 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

### 第1節 ラウリン酸ナトリウム誘発搔き動作

ラウリン酸ナトリウムは、脂肪酸塩類に属する界面活性剤である。脂肪酸塩は高級脂肪酸（炭素数 12-18 の飽和および不飽和がおもに使用され、対イオンとしてはナトリウム、カリウムなどがある）のアルカリ塩として身体の洗浄に最も古くから使用されている石鹼の主成分（R-COONa）である。Saint-Martory ら（2008）の報告によると、敏感肌と自覚している被験者らが、敏感肌のトリガー因子の一つとして石鹼を挙げている。また、敏感肌の被験者の主訴は痒みである。Misery ら（2008）の報告によると、敏感頭皮と自覚している被験者らが、敏感頭皮のトリガー因子の一つとしてシャンプーと挙げ、主な症状は痒みである。これらのことから、アニオン性界面活性剤のラウリン酸ナトリウムが痒み誘発に寄与している可能性が推測される。ただし、ラウリン酸ナトリウムの痒みに対する基礎的な検討報告は可及的に検索したが該当するものはなかった。そこで、ラウリン酸ナトリウムによる痒み発生機序を解明することを目的として、マウスを用いて検討した。

アニオン性界面活性剤はシャンプーなどの日常的に使う洗浄製品に多く配合されている。樋渡ら（2004）はモデルシャンプー（界面活性剤の総量が 12.5%）を作製し、洗髪時のモデルシャンプーの希釈率を調べたところ 7 倍である（界面活性剤の濃度は 1.8%）と報告している。そこで、予め刈毛・除毛したマウスの吻側背部皮膚へ 10%アニオン性界面活性剤水溶液を単回局所塗布し、搔き動作（痒み関連行動）を引き起こすか検討した。本章では、予備実験において搔き動作を増加しなかったアニオン性界面活性剤として *N*-ラウロイルサルコシナトリウムを比較対照として用い、ラウリン酸ナトリウムによって誘発される搔き動作から得られた知見をまとめる。また皮膚の状態を知る目的で、角層水分量、水分蒸散量 (TEWL)、皮膚表面 pH および皮膚炎症スコアの測定を行った。

## 1-1. 実験材料および実験方法

### 1-1-1. 実験動物

雄性 ICR マウスは日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入し、試験に 7-8 週齢を用いた。購入した動物は温度 21-23°C、湿度 45-65%、12 時間毎の明暗周期（明期: 7 時-19 時）の恒温恒湿飼育室で自由給水下に固型飼料（CE-2; 日本クレア, 東京）を用いて飼育した。

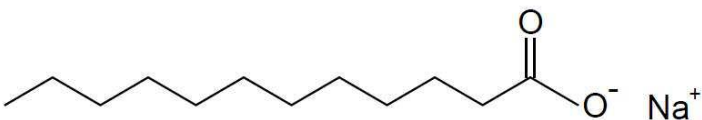
### 1-1-2. 使用薬物

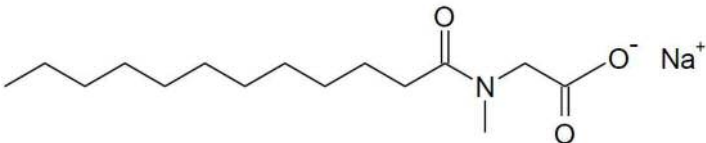
Sodium laurate および *N*-lauroylsarcosine sodium salt はナカライテスク（京都）より購入した。Sodium methyl laurate alaninate（川研ファインケミカル, 東京）, sodium methyl lauroyl taurate（日光ケミカルズ, 東京）および sodium lauroyl aspartate（旭化成ケミカルズ, 東京）は香粧品原料を使用した。（Table 5）

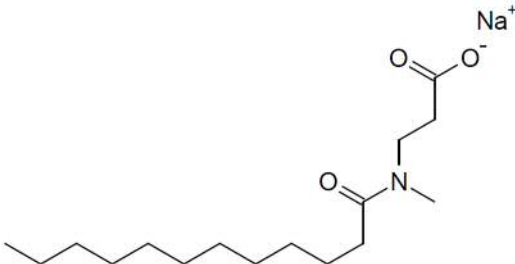
Terfenadine および naloxone hydrochloride は Sigma（St. Louis, MO, USA）より購入した。1 M Sodium hydroxide solution は和光純薬工業（大阪）より購入した。

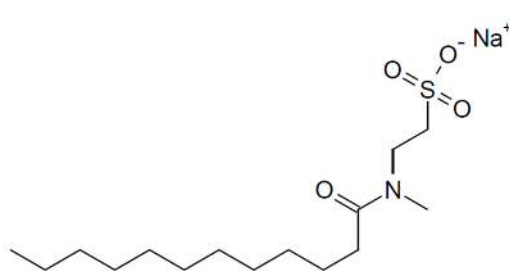
ラウリン酸ナトリウム, *N*-ラウロイルサルコシンナトリウム, ラウロイルメチルアラニンナトリウム, ラウロイルメチルタウリンナトリウムおよびラウロイルアスパラギン酸ナトリウムは蒸留水に溶解し, 50  $\mu$ L の用量で刈毛・除毛した吻側背部皮膚に塗布した。調製した界面活性剤水溶液は冷蔵庫で保存した。低温保存によって界面活性剤が析出した場合は 37°C の湯浴で温めて溶かしてから使用した。Terfenadine は 0.5% sodium carboxymethyl cellulose（和光純薬工業）に懸濁し, マウスの体重 10 g あたり 50  $\mu$ L の用量でビデオ撮影の 30 分前に経口投与した。Naloxone hydrochloride は生理食塩水（大塚製薬, 東京）に溶解し, マウスの体重 10 g あたり 0.1 mL の用量でビデオ撮影の 15 分前に尾側背部に皮下注射した。1 M Sodium hydroxide solution は蒸留水で希釈し, 薄紙（2.5  $\times$  2 cm）に 50  $\mu$ L 浸み込ませたものを, エーテル軽麻酔下に除毛部位皮膚に 30 秒間適用した。

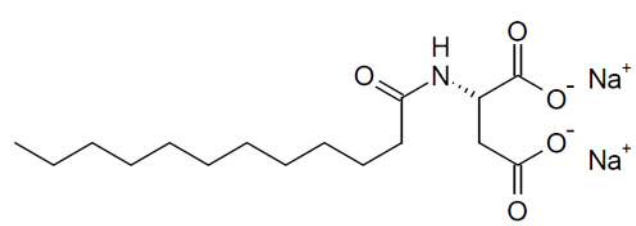
**Table 5. Molecular formula, composition formula, molecular weight, CAS number, and structural formula of anionic surfactants**

Sodium laurate	
Molecular formula	$C_{12}H_{23}NaO_2$
Composition formula	$C_{11}H_{23}COONa$
Molecular weight	222.30
CAS number	629-25-4
Structural formula	
	

<i>N</i> -Lauroylsarcosine sodium salt	
Molecular formula	$C_{15}H_{28}NNaO_3$
Composition formula	$C_{11}H_{23}CON(CH_3)CH_2COONa$
Molecular weight	293.38
CAS number	137-16-6
Structural formula	
	

Sodium methyl laurate alaninate	
Molecular formula	$C_{16}H_{30}NNaO_3$
Composition formula	$C_{11}H_{23}CON(CH_3)C_2H_4COONa$
Molecular weight	307.40
CAS number	21539-58-2
Structural formula	
	

Sodium methyl lauroyl taurate	
Molecular formula	$C_{15}H_{30}NNaO_4S$
Composition formula	$C_{11}H_{23}CON(CH_3)C_2H_4SO_3Na$
Molecular weight	343.46
CAS number	4337-75-1
Structural formula	

Sodium lauroyl aspartate	
Molecular formula	$C_{16}H_{27}NNa_2O_5$
Composition formula	$C_{11}H_{23}CONHCH(OONa)CH_2COONa$
Molecular weight	359.37
CAS number	41489-18-3
Structural formula	

### 1-1-3. 行動実験

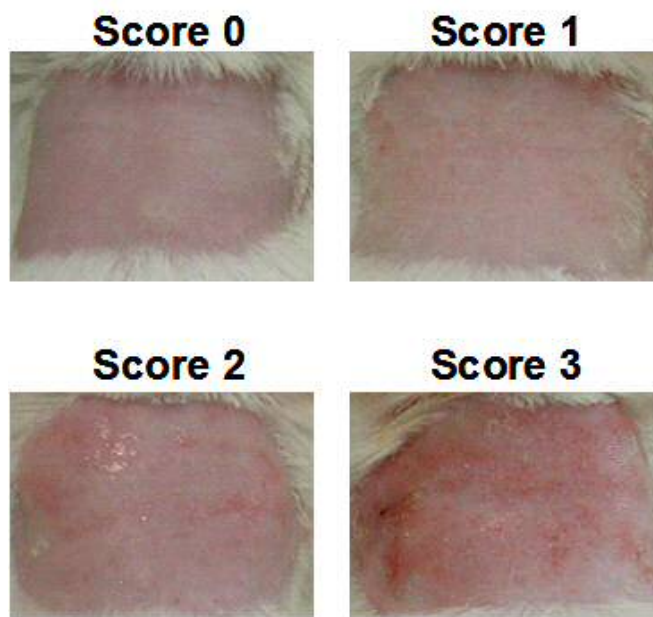
実験の少なくとも 3 日前までに、マウスの吻側背部を刈毛・除毛し、実験当日に吻側背部に傷がないマウスを実験に用いた。4 区画されたアクリル製ケージ (1 区画; 13 × 9 × 35 cm) に 1 匹ずつ入れ、無人環境下で少なくとも 30 分以上撮影環境に馴化した後、マウスの行動をビデオカメラで 60 分間撮影した。撮影は界面活性剤水溶液または vehicle (蒸留水) の塗布前、塗布 2, 24 時間後に行った。ビデオテープの再生により界面活性剤水溶液または vehicle (蒸留水) 塗布部位およびその近傍の搔き動作の行動観察を行った (Kuraishi et al., 1995)。後肢で吻側背部およびその近傍を搔き、後肢を床におろすという一連の搔き動作の回数を 1 回の搔き動作として目視にて数えた (Tsuji et al., 2008)。

### 1-1-4. 角層水分量, 水分蒸散量 (TEWL), 皮膚表面 pH および皮膚炎症状の測定

角層水分量, TEWL, 皮膚表面 pH および皮膚炎症状の測定・判定は界面活性剤水溶液の塗布前, 塗布 2, 24 時間後に行った。

角層水分量は Moisture Checker MY-808S (Scalar Corp., Tokyo, Japan) を用いて, TEWL は VapoMeter (model SWL4002; Keystone Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 15 秒間における測定値として, 皮膚表面 pH は pH meter with flat probe (model 6261-10c; Horiba Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて測定した。

炎症スコアは Fig. 2 に示すように, 0 : 変化なし, 1 : 軽度な発赤, 2 : 中程度の発赤, 3 : 重度な発赤としてスコア化した。



**Fig. 2. Typical examples for the evaluation of skin condition.**

These skin conditions were prepared with the cutaneous treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS) solutions for 24 hours: score 0, water; score 1, 10% SDS; score 2, 20% SDS; score 3, 30% SDS. These solutions were applied at the volume of 50  $\mu$ L per mouse skin.

#### 1-1-5. 病理組織学的検討

界面活性剤水溶液の塗布2時間後に、マウスを sodium pentobarbital (80 mg/kg, intraperitoneally, Sigma) で麻酔し、心血液循環系を利用してリン酸緩衝生理食塩水 (0.1 M phosphate-buffered saline; PBS, タカラバイオ, 滋賀) で十分に灌流し、脱血した。脱血後、4% paraformaldehyde (和光純薬工業) を再灌流し組織の前固定を行った。その後、界面活性剤適用部位 (皮膚) を採取し、24 時間 4% paraformaldehyde で浸漬固定を行った。固定組織をパラフィンに埋没させ切片厚 3  $\mu$ m で皮膚切片を作製した。皮膚切片は hematoxylin and eosin (HE) 染色および toluidine blue (TB) 染色を行い、光学顕微鏡 (BZ-8000; Keyence, Osaka, Japan) で観察した。マスト細胞数は組織標本 (TB 染色) 0.58 mm<sup>2</sup> (field size: 662.0  $\times$  879.3  $\mu$ m) あたりの細胞数として示した。

#### 1-1-6. 統計学的解析

実験成績は各群の平均値および標準誤差 (SEM) で示した。有意差検定には Bonferroni's test, Dunnett's multiple comparisons もしくは Student's *t*-test を用いた。有意水準は 5% とした。統計解析に使用したソフトとして StatLight (Yukms Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

## 1-2. 実験結果

### 1-2-1. 界面活性剤水溶液の単回局所塗布による掻き動作の誘発

予め刈毛・除毛したマウスの吻側背部皮膚へ 10%ラウリン酸ナトリウム, 10%*N*-ラウロイルサルコシンナトリウム, 10%ラウロイルメチルアラニンナトリウム, 10%ラウロイルメチルタウリンナトリウムおよび 10%ラウロイルアスパラギン酸ナトリウムを単回塗布し, 塗布 2 時間後に掻き動作を引き起こすか検討した。その結果, 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布のみに vehicle (蒸留水) と比較して有意に掻き動作回数の増加が認められた (Table 6)。

**Table 6. Topical application of anionic surfactant solution increases scratching in ICR mice.**

Sample	Concentration (% w/v)	Solution pH	Scratch bouts/hour
VH (distilled water)	—	—	19.2 ± 5.3
Sodium laurate	10	10.1	40.3 ± 4.8 *
<i>N</i> -Lauroylsarcosine sodium salt	10	7.7	20.2 ± 4.9
Sodium methyl laurate alaninate	10	8.1	15.8 ± 6.7
Sodium methyl lauroyl taurate	10	7.1	15.2 ± 5.1
Sodium lauroyl aspartate	10	7.3	16.3 ± 6.3

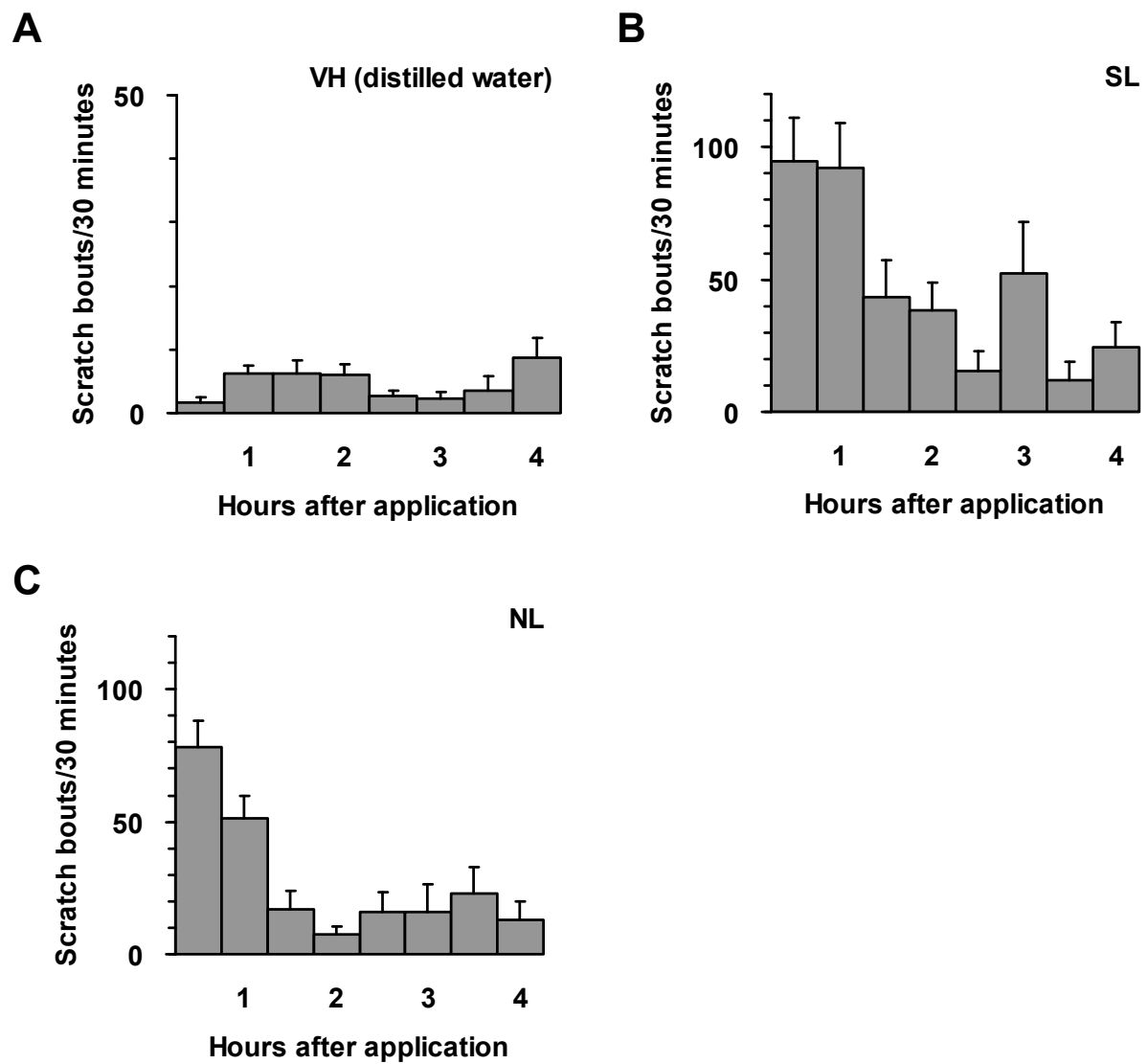
Vehicle (VH, distilled water), or 10% anionic surfactant solution was applied topically to the shaved skin in a volume of 50  $\mu$ L, and scratching bouts were counted for 1 hour. Values represent the mean  $\pm$  SEM for six animals. \* $P$  < 0.05 vs. VH (Dunnett's test)

## 1-2-2. ラウリン酸ナトリウム単回局所塗布による掻き動作の誘発

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ナトリウム水溶液（10% 溶液が pH 7.7）の単回塗布が、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回数を増加させ（即時相, Figs. 3B and 3C）、1.5 時間程度で減少したが、その後再び掻き動作回数が増加し（遅発相, Figs. 3B and 3C）、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回数を増加させたが、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。軟膏基剤の塗布においても即時性の掻き動作回数の増加が認められることから、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。

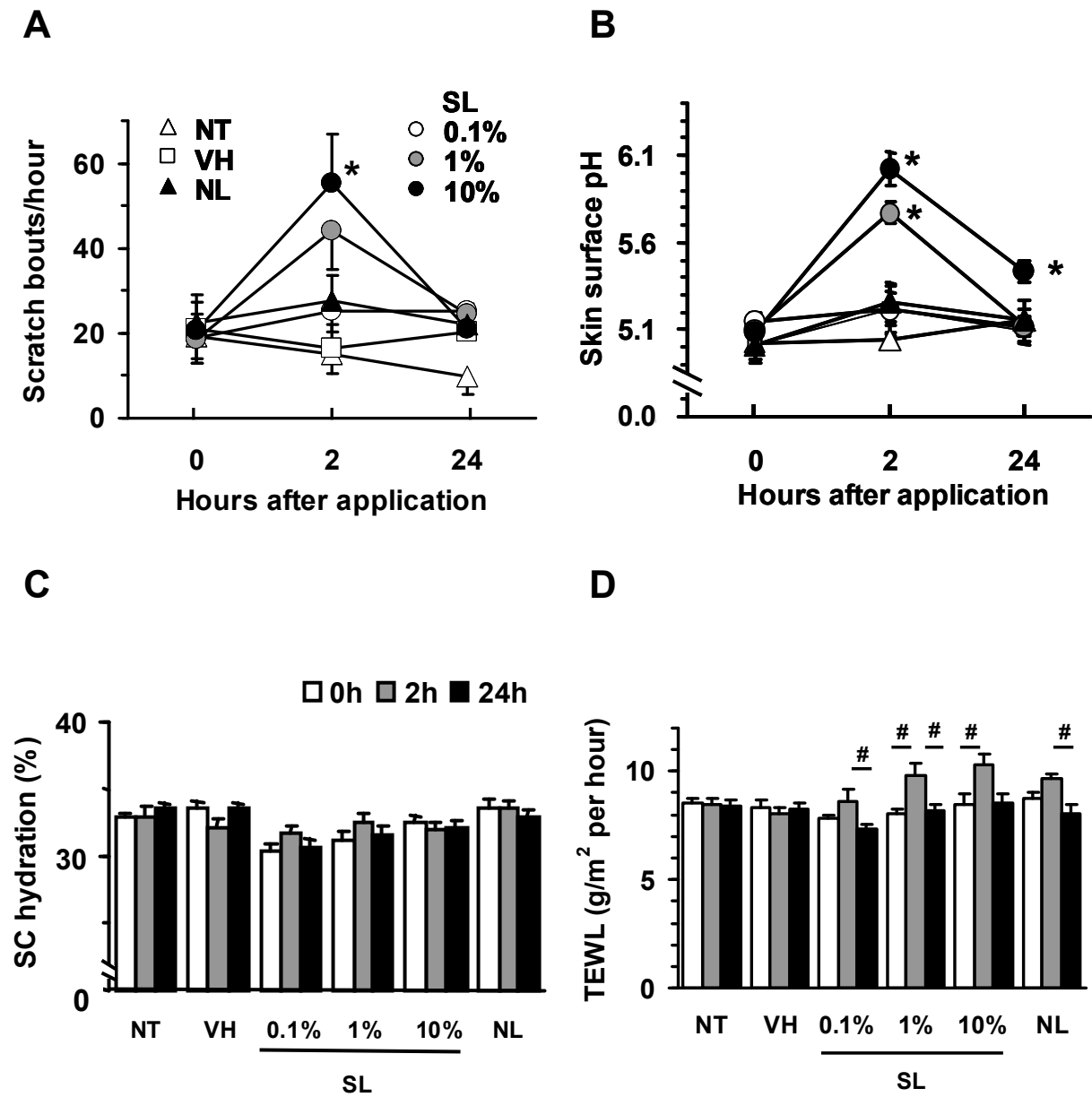
次に、ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作を検討したところ、1%ラウリン酸ナトリウムも遅発性の掻き動作を引き起こしたが、0.1%では観察されなかった。塗布 24 時間後には、いずれの群も掻き動作回数が塗布前レベルまで戻った (Fig. 4A)。皮膚の状態を知る目的で、角層水分量、TEWL および皮膚表面 pH の測定、臨床所見および HE 染色による病理組織学的検討を行った。ラウリン酸ナトリウム（0.1-10%）は、角層水分量、臨床所見および HE 染色に影響しなかった。1%および 10%ラウリン酸ナトリウムは塗布 2 時間後の TEWL を vehicle（蒸留水）塗布と比較して有意に増加させたが、24 時間後には塗布前レベルまで戻った。10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウムはいずれのパラメーターも変化がなかった (Figs. 4C and 4D)。皮膚表面 pH（無処置の皮膚表面 pH 5.0）は、ラウリン酸ナトリウムの塗布 2 時間後にアルカリ性側へ移行した（1%, 10% 溶液が各々皮膚表面 pH 5.8, 6.0）が、塗布 24 時間後には塗布前レベル付近まで戻った。一方、10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウムは塗布 2 時間後および 24 時間後の皮膚表面 pH に影響を及ぼさなかった (Fig. 4B)。





**Fig. 3. Topical application of sodium laurate (SL) and *N*-lauroylsarcosine sodium salt (NL) increases scratching in ICR mice.**

Vehicle (VH, distilled water) (A), 10% SL (B), or 10% NL (C) was applied topically to the shaved skin in a volume of 50  $\mu$ L, and scratching bouts were counted for 4 hours. Values represent the mean  $\pm$  SEM for eight animals.



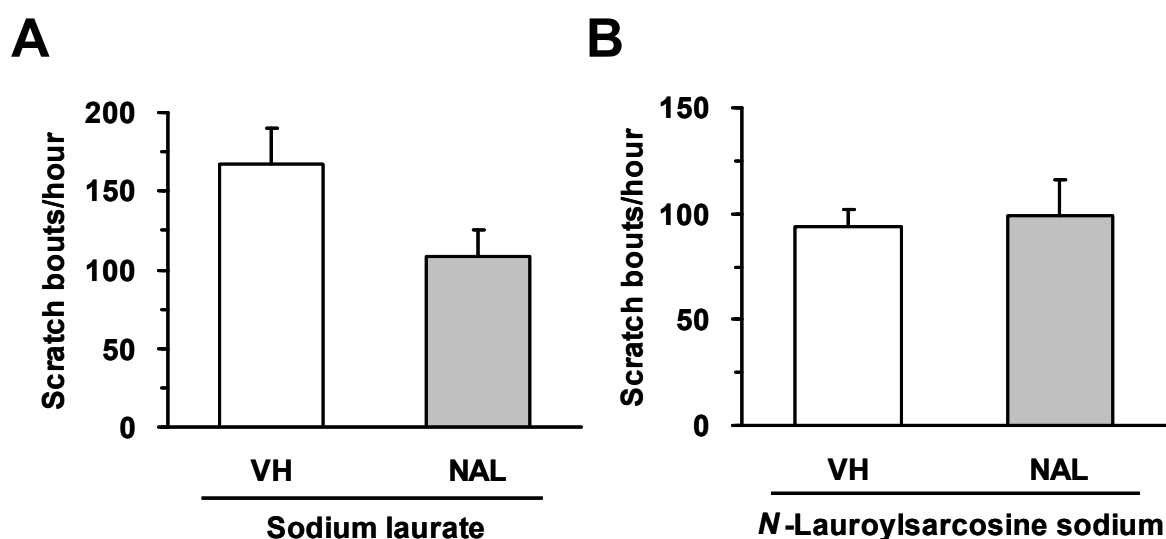
**Fig. 4. Effects of topical applications of sodium laurate (SL) and *N*-lauroylsarcosine sodium salt (NL) on scratching, pH of the skin surface, stratum corneum (SC) hydration and transepidermal water loss (TEWL) in ICR mice.**

SL (0.1%, 1%, and 10%), NL (10%), or vehicle (VH, distilled water) was applied topically to the rostral part of the back in a volume of 50  $\mu$ L. (A) Surfactant-induced scratching. Scratching bouts were counted for 1 hour before, and 2 and 24 hours after treatment. Effects of surfactants on pH of the skin surface (B), SC hydration (C) and TEWL (D). Values represent the mean  $\pm$  SEM for eight animals. NT, non-treated. \* $P$  < 0.05 vs. VH (Dunnett's test), # $P$  < 0.05 (Bonferroni's test).

### 1-2-3. アニオン性界面活性剤誘発の即時性掻き動作に対する naloxone の影響

10%ラウリン酸ナトリウムまたは 10%*N*-ラウロイルサルコシンナトリウムの塗布直後に誘発された即時性掻き動作に及ぼす  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬 naloxone の影響を検討した。Naloxone はビデオ撮影の 15 分前に 1 mg/kg の用量を尾側背部に皮下注射し、60 分間のビデオ撮影をおこなった。

Naloxone はラウリン酸ナトリウム誘発の即時性掻き動作および *N*-ラウロイルサルコシンナトリウム誘発の即時性掻き動作に影響を及ぼさなかった (Figs. 5A and 5B)。



**Fig. 5. Effect of naloxone (NAL) on surfactant-induced early phase scratching in ICR mice.**

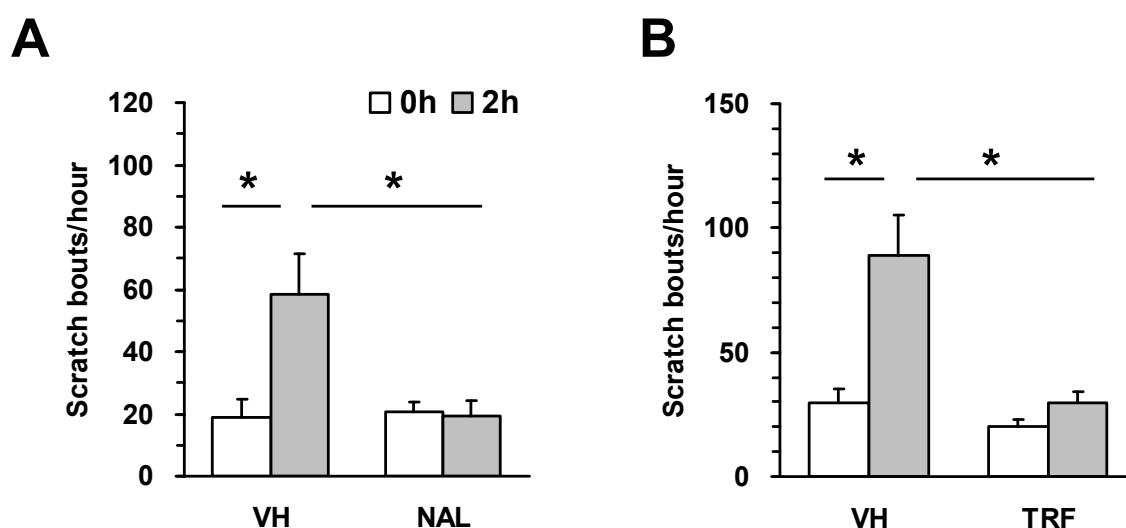
10% surfactant solution was applied topical to the skin and scratching bouts were counted for 1 hour and from immediately after surfactant solution application. (A) Sodium laurate-induced early phase scratching. (B) *N*-lauroylsarcosine sodium salt-induced early phase scratching. Naloxone (1 mg/kg) or vehicle (VH, saline) was injected subcutaneously 15 min before the start of behavioral observations. Values represent the mean  $\pm$  SEM of six animals.

#### 1-2-4. ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作に対する naloxone および terfenadine の影響

10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作に及ぼす $\mu$ オピオイド受容体拮抗薬 naloxone およびH<sub>1</sub>ヒスタミン受容体遮断薬 terfenadine の影響を検討した。

Naloxone はビデオ撮影の15分前に1 mg/kgの用量を尾側背部に皮下注射し, Terfenadine はビデオ撮影の30分前に30 mg/kgの用量を経口投与した。ビデオ撮影は10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後から60分間おこなった。

Naloxone は10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作を vehicle (生理食塩水) 投与と比較して有意に抑制した (Fig. 6A)。Terfenadine も10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作を vehicle (0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution) 投与と比較して有意に抑制した (Fig. 6B)。



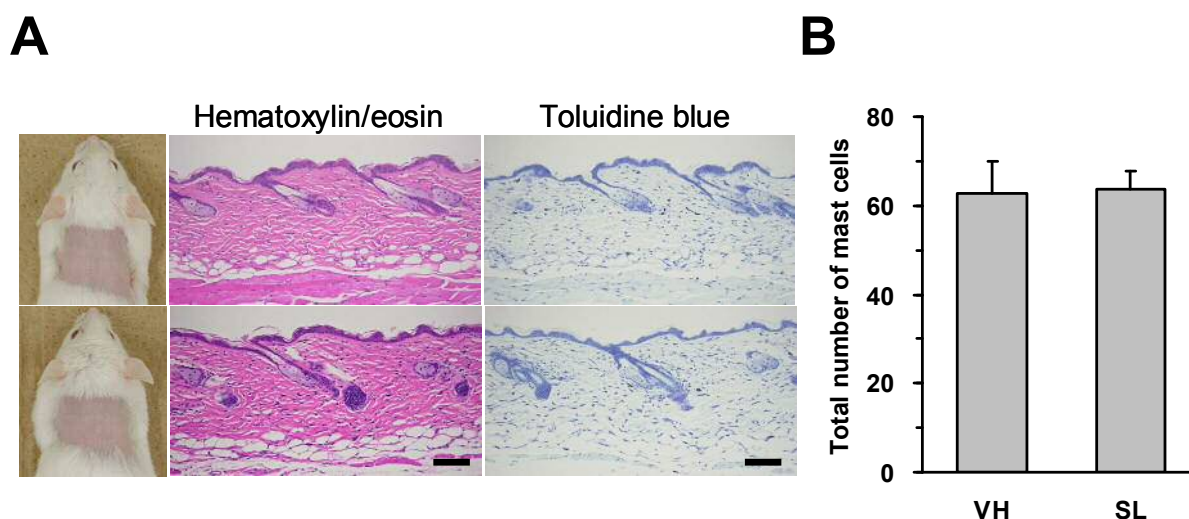
**Fig. 6. Effects of naloxone (NAL) and terfenadine (TRF) on sodium laurate-induced delayed phase scratching in ICR mice.**

10% Sodium laurate was applied topical to the skin and scratching bouts were counted for 1 hour before (open columns) and from 2 hours after (closed columns) sodium laurate treatment. (A) Naloxone (1 mg/kg) or vehicle (VH, saline) was administered subcutaneously 15 min before the start of behavioral observations. (B) Terfenadine (30 mg/kg) or vehicle (VH, 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution) was administered orally 30 min before the start of behavioral observation. Values represent the mean  $\pm$  SEM of eight animals. \* $P$  < 0.05 (Bonferroni's test).

### 1-2-5. ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作の発生時における組織学的検討

10%ラウリン酸ナトリウムの塗布により掻き動作回数の増加が観察された塗布 2 時間後において皮膚表面の臨床所見および皮膚切片のHE染色およびTB染色による組織学的検討を行った。その結果、紅斑（皮膚の外観）と真皮内への炎症性細胞の浸潤は認められなかった（Fig. 7A）。

TB染色像を用いて、皮膚1枚に対してランダムに選ばれた9枚の画像に存在するマスト細胞数を数えた。同じ作業を各群3匹ずつ行い、平均値を算出しその平均値をその群のマスト細胞数とした。その結果、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布はマスト細胞数に影響を及ぼさなかった（Fig. 7B）。



**Fig. 7. Effects of topical application of sodium laurate (SL) on inflammatory cell infiltration and mast cells in the skin in ICR mice.**

Vehicle (VH, distilled water) or 10% SL was applied topically to the shave skin, which severed for experiments after 2 hours. (A) Hematoxylin and eosin staining (middle panels) and toluidine blue staining (right panels) of the skin topically applied with VH (upper panels) or SL (lower panels). Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Total number of mast cells in the skin. Mast cells were counted in nine randomly chosen cutaneous sections per animal. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three animals.

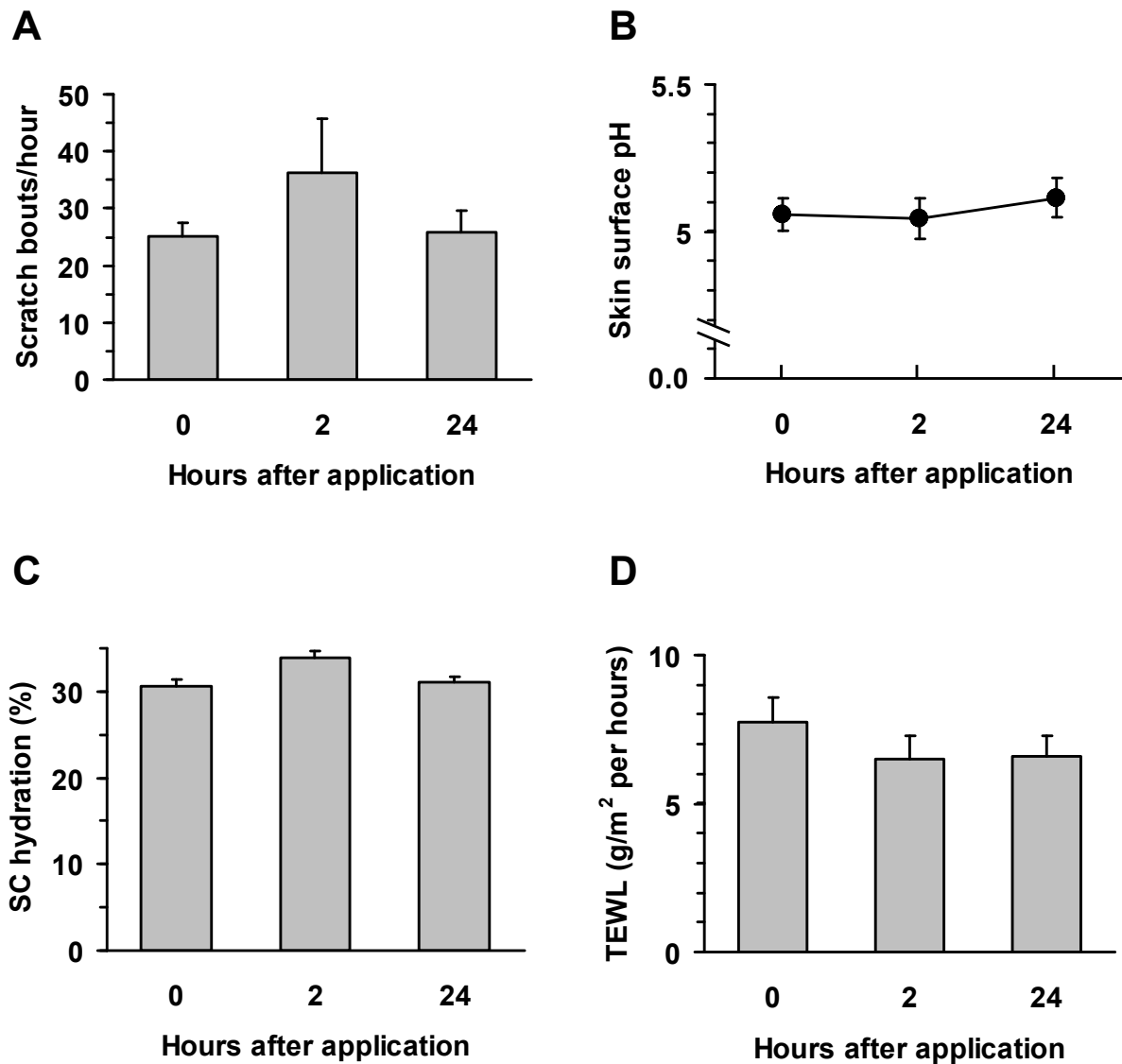
## 1-2-6. 水酸化ナトリウム単回塗布による掻き動作への影響

*N*-ラウロイルサルコシナトリウム[CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CO-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-COONa]は構造的にラウリン酸ナトリウム[CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-COONa]と類似しているが、水溶液の pH はラウリン酸ナトリウム水溶液がアルカリ性（10%溶液が pH 10.1）であるのに対し、*N*-ラウロイルサルコシナトリウム水溶液は中性（10%溶液が pH 7.7）である。これまでの検討からラウリン酸ナトリウムは遅発性掻き動作を誘発したが、*N*-ラウロイルサルコシナトリウムは遅発性掻き動作を誘発しなかった。これより、界面活性作用のみでは急性の痒み反応（遅発性掻き動作）は生じないことと、アルカリ性と界面活性作用の両作用を有することが痒み発生に関与していることが示唆される。

しかし、*N*-ラウロイルサルコシナトリウム水溶液の pH をアルカリ性にするためにアルカリを加えるとアルカリ加水分解が生じる。また、ラウリン酸ナトリウム水溶液の pH を酸性にするために酸を加えるとラウリン酸ナトリウムが析出する。そこで、界面活性作用をもたないアルカリ溶液として水酸化ナトリウム水溶液を用いてラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作の主要因がアルカリ性の影響かを検討した。

界面活性剤は親水基と親油基を同一構造中に有することから皮膚になじみ易い。しかし、水酸化ナトリウム水溶液には界面活性作用がないため皮膚に塗布し難い。そこで、薄紙（2.5 × 2 cm）に 0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液（pH 10.2）を 50 μL 浸み込ませ、30 秒間皮膚に適用した。その結果、0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液の適用 2 時間後に掻き動作は誘発されなかった（Fig. 8A）。

また皮膚表面 pH および角層水分量、TEWL を測定した結果、0.1 mM 水酸化ナトリウム水溶液はいずれの測定値においても影響を及ぼさなかった（Figs. 8B, 8C and 8D）。



**Fig. 8. Effect of topical application of sodium hydroxide solution on scratching, pH of the skin surface, SC hydration and TEWL in ICR mice.**

A thin paper ( $2.5 \times 2$  cm) applied with  $50 \mu\text{L}$  of  $0.1 \text{ mM}$  sodium hydroxide (pH 10.2) was placed on the shaved skin for 30 sec. (A) Scratching bouts toward the shaved skin was counted for 1 hour before, and 2 and 24 hours after treatment. Effects of surfactants on pH of the skin surface (B), SC hydration (C) and TEWL (D). Values represent the mean  $\pm$  SEM of four (B, C, D) to eleven (A) animals.

### 1-3. 考察

#### アニオン性界面活性剤の単回塗布直後に観察された即時性掻き動作が痒み関連行動である可能性

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 時間程度で減少したが、その後、再び掻き動作回数が増加し（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。

10%ラウリン酸ナトリウム誘発および 10%N-ラウロイルサルコシナトリウム誘発の即時性掻き動作は  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬 naloxone (1 mg/kg) で抑制されなかった。 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬は、胆汁うっ滞、慢性蕁麻疹、アトピー性皮膚炎などの掻痒性疾患患者の掻爬行動を阻害する (Mansour-Ghaneaie et al., 2006; Monroe, 1989)。動物に関しても、 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬は様々な起痒物質の皮内注射によって誘発される掻き動作 (Inagaki et al., 2000) だけでなく、痒みを伴う疾患マウスモデルで観察される自発的掻き動作も抑制する (Miyamoto et al., 2002; Maekawa et al., 2002)。これより  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬で抑制される掻き動作は痒み関連行動の可能性が高い。軟膏基剤の塗布も即時性の掻き動作回数の増加を生じる。以上のことから、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。

#### 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布後に観察された遅発性掻き動作が痒み関連行動である可能性とその痒み発生機序

10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作が naloxone (1 mg/kg) によって抑制されたことから痒み関連行動であると考えられる。末梢性の痒み伝達経路には、histamine 依存的な経路と histamine 非依存的な経路の2種類の経路が存在することが知られている (Davidson et al., 2007; Johaneck et al., 2007; Namer et al., 2008; Nakano et al., 2008; Davidson and Giesler, 2010)。そこで、10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作が histamine 依存的な反応か、histamine 非依存的な反応かを  $H_1$  ヒスタミン受容体遮断薬 terfenadine (30 mg/kg) を用いて検討した。その結果、terfenadine で強く抑制されたことから histamine 依存的な痒み関連行動であると示唆される。30 mg/kg の用量の terfenadine は、ICR マウスにおいて histamine 誘発の血管透過性亢進および histamine 誘発の掻き動作を抑制することが報告されている (Inagaki et al., 1999; Ohtsuka et al., 2001; Ui et al., 2006)。しかし、ICR マウスにおいて nociceptin や sphingosylphosphorylcholine などの起痒物質による掻き動作は抑制しない (Andoh et al., 2004, 2009)。これより、30 mg/kg の用量の terfenadine は、鎮静作用を示さずに末梢性の抗ヒスタミン作用によって痒みを抑制することが示唆される。

Histamine は真皮に存在するマスト細胞の脱顆粒によって放出されることが知られており、このマスト細胞から放出された histamine が知覚神経終末に存在する  $H_1$  ヒスタミン受容体に結合して痒みを発生させることは周知の事実である。Poly-L-lysine や morphine などのアニオ



ン性物質はマスト細胞の脱顆粒に関与している (Church et al., 1991)。これより、10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作にマスト細胞の脱顆粒によって放出される histamine が関与している可能性が示唆される。

ラウリン酸ナトリウム (1%および 10%溶液) および *N*-ラウロイルサルコシナトリウム (10%溶液) は、塗布 2 時間後に高値の TEWL を示した。皮膚表面 pH の中和は角質層のバリア機能を脆弱化させる (Hachem et al., 2003)。これより、ラウリン酸ナトリウムの塗布 2 時間後は、おそらく皮膚バリア機能が一時的に弱くなったことにより TEWL が高値を示した可能性を考えられるが詳細は不明である。しかし、塗布 24 時間後の TEWL の値は塗布前と同程度の値を示したことから持続的にバリア機能を弱める作用はないと思われる。

界面活性剤は、親油基と親水基を有する両親媒性化合物であることから皮膚に馴染み易い。つまり、皮膚表層の環境を変化させる可能性が考えられる。この皮膚表層の変化が痒み発生に関与している可能性が推測される。そして、アトピー性皮膚炎患者や足白癬患者、急性湿疹病変部などの痒みを主訴とする皮膚疾患患者の病変部の皮膚表面 pH は健常部 (弱酸性) (Jolly et al., 1961) よりもアルカリ側に移行し、中性付近の pH を示している (Chikakane and Takahashi, 1995; Knor et al., 2011)。そこで、皮膚表面 pH に着目し検討したところ、10%ラウリン酸ナトリウム (pH 10.1) の塗布 2 時間後に皮膚表面 pH が 6.0 であり塗布前の皮膚表面 pH 5.0 からアルカリ性側に移行していた。塗布 24 時間後 (皮膚表面 pH が 5.2) には塗布前 (皮膚表面 pH が 5.0) レベルまで戻っていた。この経時的変化と掻き動作回数の経時的変化に対応が認められたことから 10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発された急性の痒み関連行動に皮膚表面 pH のアルカリ化に関与しているかもしれない。皮膚表面 pH の中和は角質層のバリア機能を脆弱化させることが報告されている (Hachem et al., 2003) ことから、皮膚表面 pH がアルカリ性側に移行した場合、ラウリン酸ナトリウムの経皮吸収が高まった可能性が考えられる。その結果、ラウリン酸ナトリウムが表皮に直接作用し得る環境になっていたのかもしれない。

皮膚表面の臨床所見および皮膚切片の HE 染色による組織学的検討を行ったところ、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布により掻き動作回数が増加した塗布 2 時間後において紅斑 (皮膚の外観) や真皮内への炎症性細胞の浸潤 (HE 染色) は認められなかった。以上のことから 10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作にマクロファージなどの炎症性細胞の関与は小さいと推測される。

親油基の炭素数が 12 個の直鎖でラウリン酸ナトリウムと類似構造を有し、親水基部分が異なる *N*-ラウロイルサルコシナトリウムの塗布は遅発性の掻き動作を誘発しなかった。これより界面活性作用が痒み誘発に重要であるとは推測し難い。両界面活性剤の差異に水溶液の pH がある。そこで、10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウム水溶液 (pH 7.7) の pH をアルカリ性側に移行させようとアルカリを加えることを考えたが、*N*-ラウロイルサルコシナトリウムの構造にアミド結合があることからアルカリ加水分解を生じてしまう。また、10%ラウリン酸ナトリウム水溶液 (pH 10.1) の pH を酸性側に移行させようと酸を加えるとラウリ

ン酸ナトリウムが析出してしまう。そのため、両界面活性剤の pH 変化による検討は困難であった。そこで、10%ラウリン酸ナトリウム (pH 10.1) とほぼ同一の pH である 0.1 mM 水酸化ナトリウム (pH 10.2) によって掻き動作が誘発されるか検討した。その結果、0.1 mM 水酸化ナトリウムの外用適用では掻き動作回数の増加は観察されなかった。ラット皮膚への水酸化ナトリウム水溶液の塗布は皮下 pH を 7 から 10 にまで上昇させる (Andrews et al., 2003; Yano et al., 1993)。これより、水酸化ナトリウムの経皮吸収は少なくとも生じていることが考えられ、表皮内の細胞外 pH もアルカリ性側に移行していると推測される。以上のことから、ラウリン酸ナトリウムによって誘発された痒み関連行動は界面活性作用とアルカリ性の両作用を有することが重要であると示唆される。そして、痒み発生には表皮内の細胞外 pH のアルカリ化は重要ではなく、細胞内 pH の上昇が痒み発生に寄与している可能性がある。

## 第2節 ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作へのヒスタミンの関与

Histamine はヒトに痒みを起こす最も古くから知られている物質であり (Lewis, 1927), 血管, 消化管, 神経, 免疫系などに対し多様な作用をもつことが明らかとなっている (Schneider et al., 2002)。皮膚内の histamine は, 主にマスト細胞 (Falcone et al., 2006) の顆粒中に貯蔵されており, 抗原結合刺激などにより脱顆粒とともに細胞外へ放出される。そして, 急性蕁麻疹などの痒みの主要な発生病機構と考えられている (Ferguson et al., 1985)。

第1章・第1節において, 10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作が  $H_1$  ヒスタミン受容体遮断薬で抑制されたことから, 10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作にマスト細胞由来の histamine の関与が示唆された。そこで, 本節ではマスト細胞欠損マウス (WBB6F1  $W/W^v$  マウス) を用いて, 10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作におけるマスト細胞の関与を検討した。

### 2-1. 実験材料および実験方法

#### 2-1-1. 実験動物

第1章・第1節・1-1-1 記載の実験動物以外を下記に示す。

雄性マスト細胞欠損マウス (WBB6F1- $W/W^v$  マウス) およびその健常同腹仔マウス (WBB6F1-+/+マウス) は日本エスエルシー株式会社より購入し, 試験に7週齢を用いた。飼育方法は, 第1章・第1節・1-1-1 に準じた。

#### 2-1-2. 使用薬物

第1章・第1節・1-1-2 に準じた。

#### 2-1-3. 行動実験

第1章・第1節・1-1-3 に準じた。

#### 2-1-4. 皮膚表面pHの測定

第1章・第1節・1-1-4 に準じた。

#### 2-1-5. 血管外色素漏出量の検討

10%ラウリン酸ナトリウム塗布 40 分後に、1% evans blue (東京化成工業, 東京) 生理食塩水溶液 150  $\mu\text{L}$  をマウス尾静脈内へ注射した。注射 80 分後 (10%ラウリン酸ナトリウム塗布 2 時間後) に頸椎脱臼により安楽死させ、界面活性剤塗布部位の皮膚を直径 8 mm の円状に生体パンチで削り貫いた。採取した皮膚片を入れたマイクロチューブに dimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬工業) 200  $\mu\text{L}$  を加え室温で一晩放置して皮膚片内の evans blue を抽出した。遠心分離後、上清の 620 nm における吸光度を測定した (Andoh et al., 2010)。Evans blue 溶液を用いて作成した検量線により、それぞれの色素漏出量を算出した。

#### 2-1-6. 統計学的解析

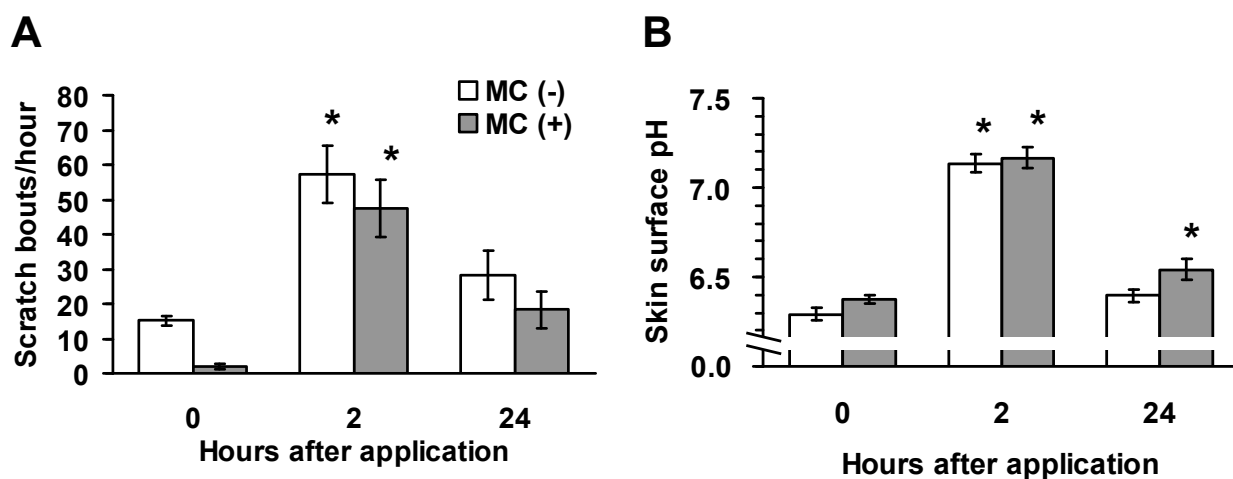
第 1 章・第 1 節・1-1-6 に準じた。

## 2-2. 実験結果

### 2-2-1. ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作へのマスト細胞の関与

予め刈毛・除毛したマウスの吻側背部皮膚へ10%ラウリン酸ナトリウムを単回局所塗布し、遅発性掻き動作を引き起こすか検討した。その結果、マスト細胞欠損マウス(WBB6F1-*W/W<sup>v</sup>*マウス)およびその健常同腹仔マウス(WBB6F1-*+/+*マウス)はともに10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後に塗布前と比較して有意な掻き動作回数の増加を示した(Fig. 9A)。また、両マウスの掻き動作回数は同程度であった。ICRマウスでの実験と同様、塗布24時間後には塗布前レベルまで戻った(Fig. 9A)。

マスト細胞欠損マウスおよびその健常同腹仔マウスの無処置の皮膚表面は各々pH 6.3と6.4であったが、10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後の皮膚表面はそれぞれpH 7.1と7.2であった(Fig. 9B)。

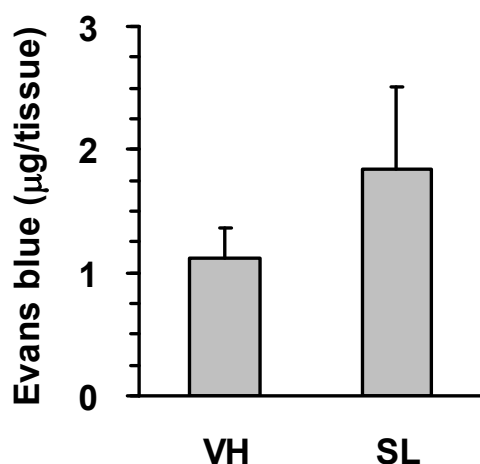


**Fig. 9. Effects of mast cell (MC) deficiency on sodium laurate-induced scratching and pH of the skin surface in WBB6F1 mice.**

10% Sodium laurate was applied topically to the rostral part of the back. Scratching behavior (A) and skin surface pH (B) were evaluated before, 2, and 24 hours after the application in MC-deficient mice (WBB6F1-*W/W<sup>v</sup>*, open columns) and the normal littermates (WBB6F1-*+/+*, closed columns). Values represent the mean  $\pm$  SEM for seven animals. \* $P < 0.05$  vs. time point 0 hour (Dunnett's test).

## 2-2-2. ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作発生時における血管透過性亢進の関与

予め刈毛・除毛したマウスの吻側背部皮膚へ 10%ラウリン酸ナトリウムを単回局所塗布し、遅発性掻き動作が観察された塗布 2 時間後に血管透過性の亢進が認められるか検討した。その結果、10%ラウリン酸ナトリウムは血管透過性に影響を及ぼさなかった (Fig. 10)。



**Fig. 10. Effects of topical application of sodium laurate (SL) on plasma extravasation in ICR mice.**

Vehicle (VH, distilled water) or 10% SL was applied topically to the shave skin, which severed for experiments after 2 hours. Evans blue was injected intravenously 40 min after application. Values represent the mean  $\pm$  SEM of four to five animals.

## 2-3. 考察

### 10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作へのマスト細胞の関与の可能性

第1章・第1節において、10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作は、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 (TB染色) はほとんど観察されなかった。さらに、マスト細胞欠損マウスおよび健常同腹仔マウスの両マウスにおいて遅発性掻き動作が観察され、掻き動作回数も同程度であった。予想に反して、マスト細胞の関与が小さいことが明らかとなった。つまり、マスト細胞非依存的な痒みの発生メカニズムの関与が示唆される。

### 第3節 ケラチノサイトにおけるヒスタミン産生・遊離の促進機構

Histamine は L-histidine decarboxylase (HDC) により L-histidine が脱炭酸されて生合成される。HDC は低酵素活性の 74-kDa と、そのプロセッシングで生じる高酵素活性の 53-kDa HDC の2つの分子サイズがある (Tanaka, 2003)。皮膚内の histamine は、主にマスト細胞 (Falcone et al., 2006) の顆粒中に貯蔵されており、脱顆粒とともに細胞外へ放出されるが、脱顆粒とは異なる histamine 放出機序として、好中球 (Shiraishi et al., 2000b)、マクロファージ (Takamatsu and Nakano, 1994; Hirasawa et al., 2001)、T 細胞 (Aoi et al., 1989)、軟骨細胞 (Maślińska et al., 2004) は炎症刺激に伴い HDC が誘導され、histamine が産生・放出される。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 (Fitzsimons et al., 2001)。

これまでの結果およびこれまでの報告から、10%ラウリン酸ナトリウム刺激によってケラチノサイトが histamine を産生する可能性を考えた。

#### 3-1. 実験材料および実験方法

##### 3-1-1. 実験用組織

ヒト正常ケラチノサイトを分化、重層化したヒト 3 次元培養表皮モデル (LabCyte Epi-Model) は株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (愛知) より購入し試験に用いた。このヒト 3 次元培養表皮はヒト皮膚に類似した構造をしており、基底層、有棘層、顆粒層、角質層を有する (Fig. 11)。

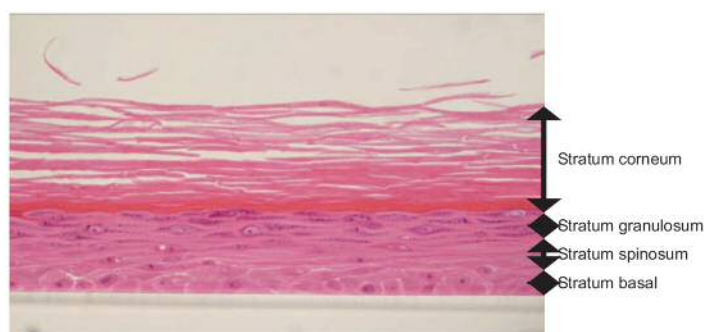


Fig. 11. 培養表皮切片の HE 染色像 (×40)

(Katoh et al., 2009 より引用)

##### 3-1-2. 使用薬物

第1章・第1節・1-1-2 に準じた。

### 3-1-3. Histamine 量の測定 (EIA)

#### マウス皮膚からの測定サンプル溶液の調製

マウスを sodium pentobarbital (80 mg/kg, intraperitoneally) で麻酔し、心血液循環系を利用して PBS で十分に灌流した。脱血後、界面活性剤適用部位 (皮膚) を直径 18 mm の円状の生体パンチで削り貫き採取した。皮膚は界面活性剤の塗布前, 塗布 2, 24 時間後に採取した。採取した皮膚片を 60°C の PBS に 30 秒間浸した後, 4°C の PBS 中で表皮と真皮に分けた (Kolev et al., 2008)。

採取した表皮および真皮に, ホモジナイズバッファー (4 M perchloric acid) を添加 (表皮, 300  $\mu$ L; 真皮, 1500  $\mu$ L) し, Precellys 24 tissue homogenizer (Bertin Technologies, Montigny, France) にて組織を破碎し, 遠心分離 (10,000  $\times$  g, 10 min, 4°C) 後, 上清を回収し測定サンプルとした。

#### 培養表皮からの測定サンプル溶液の調製

培養表皮を専用の輸送容器から取り出し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間 pre-incubation を行った。その後, 培養表皮にラウリン酸ナトリウム (0.1-1% w/v) を角質層側から 1 分間適用し, その後, ラウリン酸ナトリウムを回収した。回収直後, 蒸留水 500  $\mu$ L を角質層側に添加し回収するという操作を 3 回繰返して培養表皮を洗浄した。その後 3 時間 post-incubation を行った。ラウリン酸ナトリウム暴露 3 時間後に, 培養表皮および培養液を回収した。

回収した培養表皮に, ホモジナイズバッファー (mammalian cell lysis kit, Sigma) を 250  $\mu$ L を加え Pellet Pestle (Kimble Chase, Vineland, NJ) にて組織を破碎した後, 遠心分離 (10,000  $\times$  g, 10 min, 4°C) を行い, 上清を回収し測定サンプルとした。

マウス表皮および真皮の測定サンプル, 培養表皮の測定サンプルおよび培養液中の histamine 量を histamine enzyme immunoassay (EIA) kit (Immunotech, Marseilles, France) を用いて測定した。使用した kit の cross-reactivities は 3-methyl histamine が 0.038%, methyl histamine が 0.01%, histidine が 0.01%未満であり, histamine の検出限界が 0.1 nM であった。

### 3-1-4. HDC 発現量の測定 (western blotting)

#### マウス皮膚からの測定サンプル溶液の調製

皮膚片の採取方法および採取した皮膚片の表皮および真皮への分離は, 第 1 章・第 3 節・3-1-3 に準じた。

採取した表皮および真皮に, ホモジナイズバッファー (mammalian cell lysis kit) を添加 (表皮; 300  $\mu$ L, 真皮; 1500  $\mu$ L) し, Precellys 24 tissue homogenizer にて組織を破碎し, 遠心分離 (10,000  $\times$  g, 10 min, 4°C) 後, 上清を回収し測定サンプルとした。



### 培養表皮からの測定サンプル溶液の調製

培養表皮の測定サンプル調製は、第1章・第3節・3-1-3に準じた。

### 測定サンプル溶液中のタンパク定量と western blotting 条件

測定サンプル中に含まれるタンパク量を 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, NJ, USA) を用いて測定した。一定のタンパク量 (マウス表皮および真皮; 各 20  $\mu\text{g}$ , 培養表皮; 7  $\mu\text{g}$ ) を NuPAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) にアプライし, 展開溶媒として MOPS buffer を用いて 200 V で 100 分間電気泳動を行った。次にゲル中に分離したタンパクを PVDF メンブレン (Millipore) に転写用溶媒として NuPAGE<sup>®</sup> transfer buffer (Invitrogen) を用いて 30 V で 1 時間転写した。転写後, 約 50-kDa でメンブレンを切断し blocking buffer (1% skim milk 含有 PBS-T [PBS containing 0.1% Tween 20]) に浸し室温で 1 時間振とうした。PBS-T で洗浄 (10 min  $\times$  3) 後, 高分子サイズ側のメンブレンに 1 次抗体として Can Get Signal 1 (Toyobo Co. Ltd., Osaka, Japan) で希釈した rabbit polyclonal anti-L-histidine decarboxylase (HDC) antibody (Cat# 16045, 1/1000; Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) を, 低分子サイズ側のメンブレンに 1 次抗体として Can Get Signal 1 で希釈した rabbit polyclonal anti- $\beta$ -actin antibody (Cat# ab8227, 1/1000; Abcam, Tokyo, Japan) を 4°C で振とうしながら一晩反応させた。PBS-T で洗浄 (10 min  $\times$  3) 後, 各メンブレンに 2 次抗体として Can Get Signal 2 (Toyobo) で希釈した alexa fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Cat# A21206, 1/1000; Invitrogen) を室温で振とうしながら 2 時間反応させた。PBS-T で洗浄 (10 min  $\times$  3) 後, fluorescence scanner (Typhoon; GE Healthcare, Munich, German) でバンドの検出を行った。その後, 検出されたバンドを画像解析ソフト Scion Image (Scion. Corp., Frederick, MD, USA) を用いて定量した。

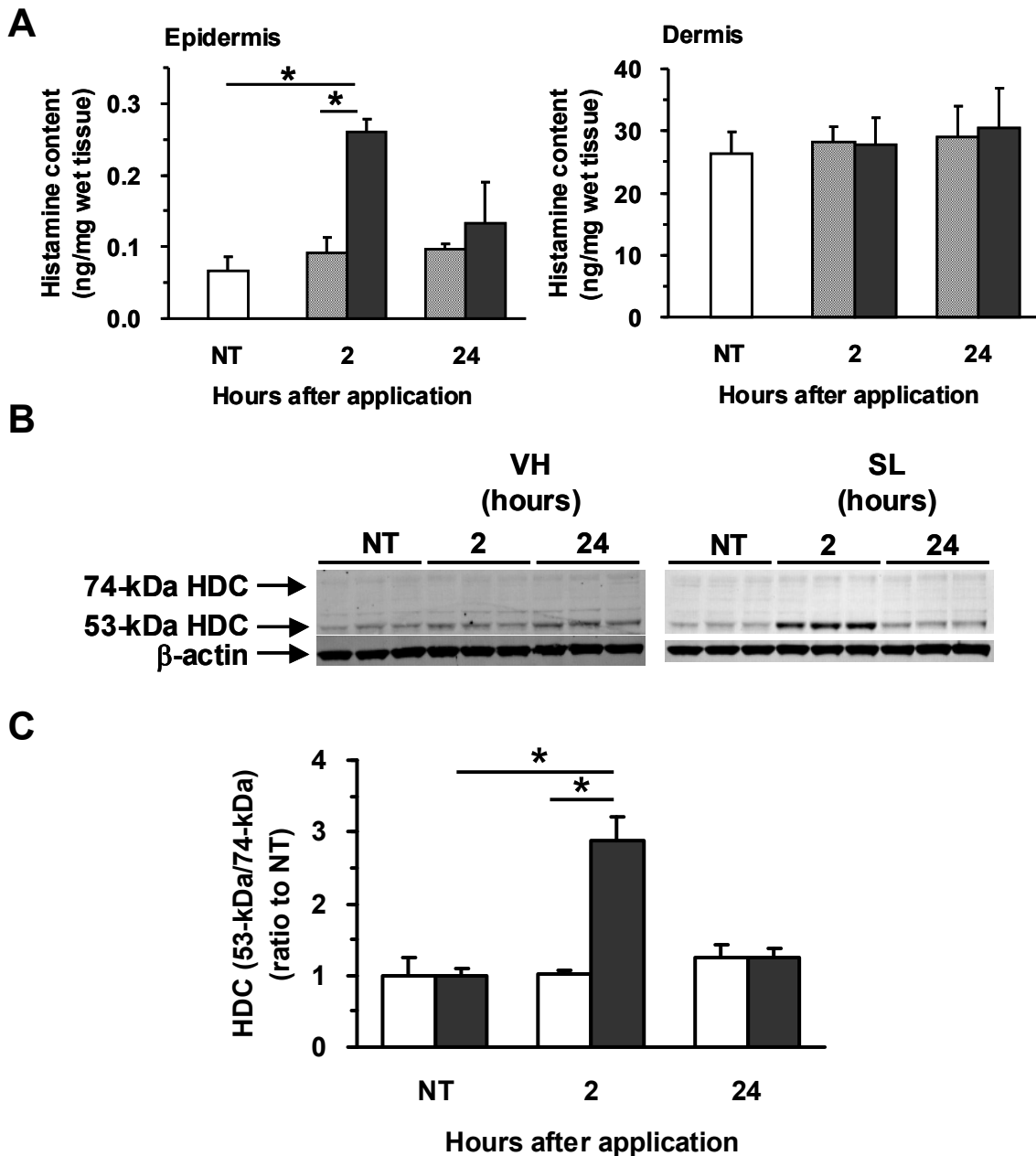
#### 3-1-5. 統計学的解析

第1章・第1節・1-1-6に準じた。

## 3-2. 実験結果

### 3-2-1. ラウリン酸ナトリウムの皮膚内ヒスタミン含有量および HDC 発現量に及ぼす影響

10%ラウリン酸ナトリウムの塗布前, 掻き動作回数の増加が観察された塗布 2 時間後, および掻き動作回数が塗布前レベルまで戻っていた塗布 24 時間後の 3 点における表皮および真皮の histamine 含有量を測定した。健常マウス表皮の histamine 含有量 (0.07 ng/mg wet tissue) は真皮の histamine 含有量 (26.2 ng/mg wet tissue) の 374 分の 1 であったが, 10%ラウリン酸ナトリウム塗布 2 時間後に表皮の histamine 含有量 (0.26 ng/mg wet tissue) は塗布前と比較して 3.7 倍に増加した (Fig. 12A)。また, 10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 2 時間後の 53-kDa/74-kDa HDC の比は塗布前と比較して 2.9 倍に増加したが, 24 時間後には 1.2 倍にまで下がった (Figs. 12B and 12C)。一方, 真皮の histamine 含有量に変化は認められなかった (Fig. 12A)。



**Fig. 12. Effects of topical application of sodium laurate (SL) on histamine content and L-histidine decarboxylase (HDC) level in the skin of ICR mice.**

10% SL or vehicle (VH, distilled water) was applied topically to the rostral part of the back. (A) Histamine content in the epidermis and dermis. Open column, non-treated (NT); hatched columns, vehicle; closed columns, sodium laurate. (B) Western blot analysis of the expression level of HDC and  $\beta$ -actin in the epidermis. (C) The ratio of 53-kDa HDC to 74-kDa HDC in the epidermis. The value was normalized to the average of the ratio in non-treated vehicle group. Open columns, vehicle; closed columns, sodium laurate. Values represent the mean  $\pm$  SEM for three animals. \* $P < 0.05$  vs. time point 0 hour (Dunnett's test).

### 3-2-2. マスト細胞欠損マウスにおけるラウリン酸ナトリウムの皮膚内ヒスタミン含有量に及ぼす影響

マスト細胞欠損マウスにおいても、ICR マウスと同様 10%ラウリン酸ナトリウム塗布により遅発性の掻き動作が観察された。そこで第 2 章・2-1-2 と同様の実験を行った。その結果、マスト細胞欠損マウスの表皮の histamine 含有量 (0.1 ng/mg wet tissue) は真皮の histamine 含有量 (0.85 ng/mg wet tissue) の 9 分の 1 であり、10%ラウリン酸ナトリウム塗布 2 時間後に表皮 histamine 含有量 (0.19 ng/mg wet tissue) は 1.9 倍に増加した。一方、真皮の histamine 含有量に変化は認められなかった (Figs. 13A and 13B)。

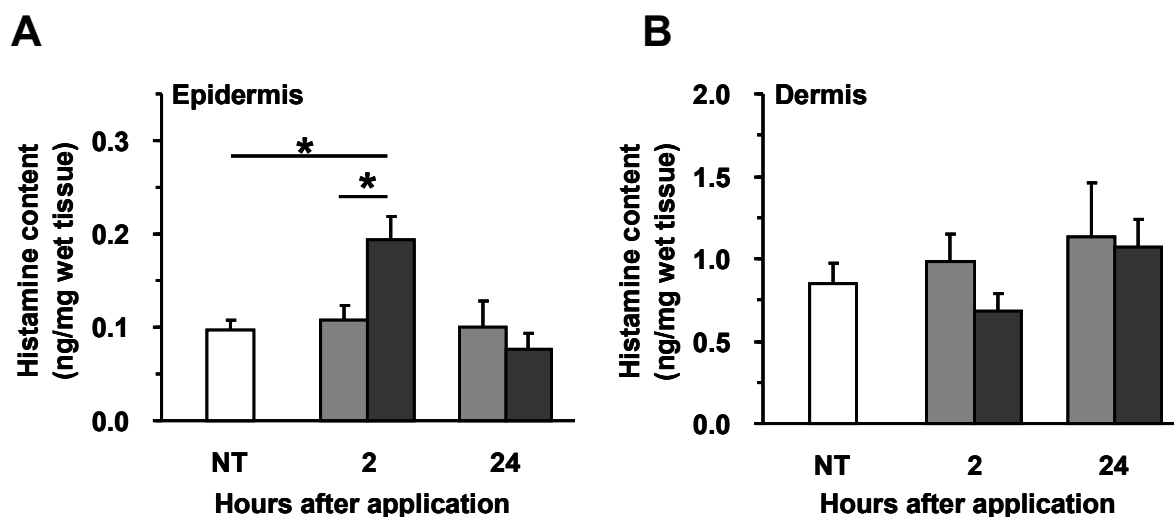
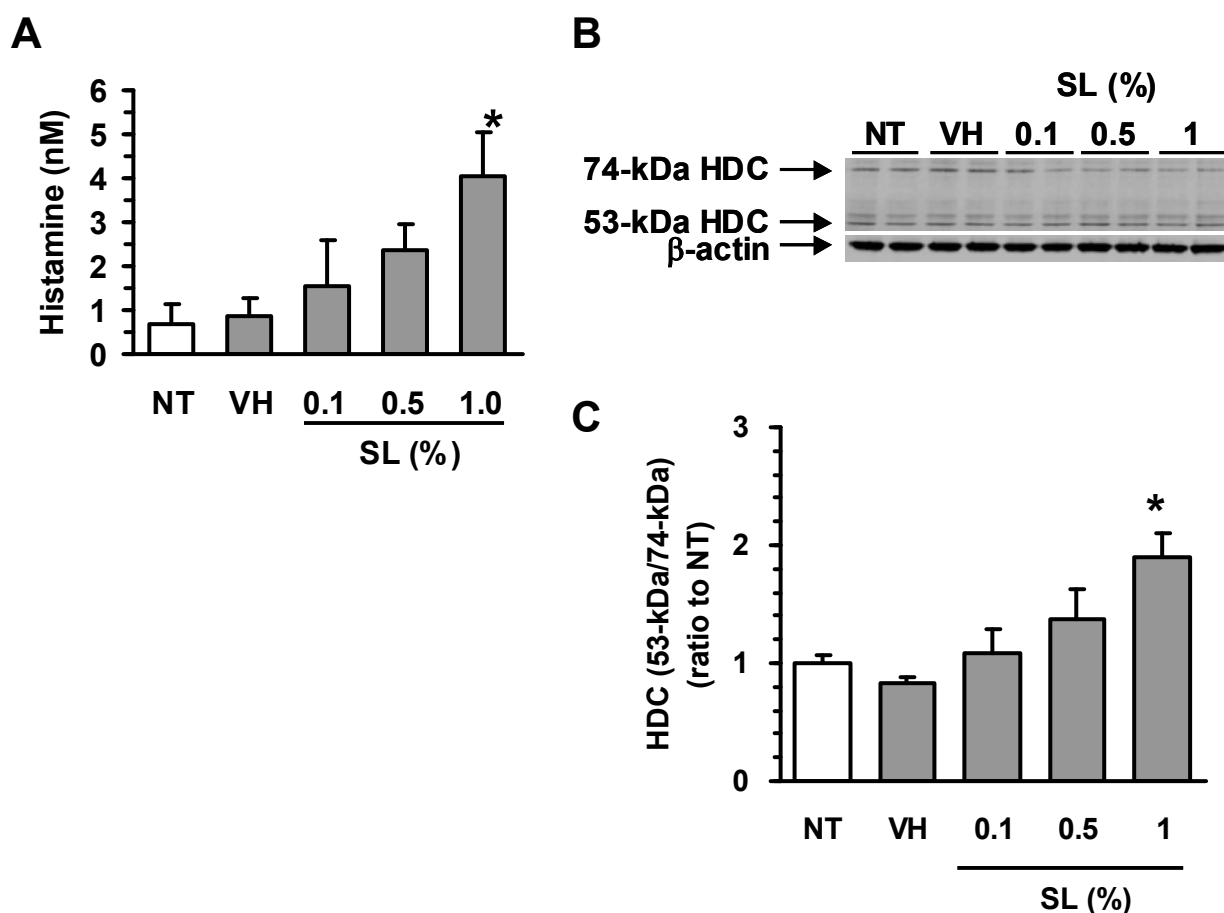


Fig. 13. Cutaneous histamine level after the treatment with sodium laurate (SL) in mast cells-deficient WBB6F1- $W/W^v$  mice.

10% SL or vehicle (VH, distilled water) was applied on the shaved skin at a volume of 50  $\mu$ L. NT shows the data obtained from non-treated group. Open column, non-treated (NT); hatched columns, vehicle; closed columns, sodium laurate. Values represent the mean  $\pm$  SEM of three animals. \* $P < 0.05$  (Dunnett's test).

### 3-2-3. ラウリン酸ナトリウム刺激後のケラチノサイトにおけるヒスタミン産生

ヒト由来の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、ラウリン酸ナトリウム水溶液 (0.1%, 0.5%, 1% 溶液が各々 pH 7.6, 8.9, 9.8) を 1 分間暴露し 37°C・5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養 3 時間後に培養表皮ならびに培地を回収した。1%ラウリン酸ナトリウムは vehicle (蒸留水) と比較して histamine 産生量 (培養組織と培養液中の histamine の和) を 4.7 倍に増加させ、53-kDa/74-kDa HDC 比は 1.9 倍に増加させた (Fig. 14)。いずれの濃度においても細胞毒性は認められなかった。



**Fig. 14. Histamine release and L-histidine decarboxylase (HDC) level in the 3-dimensional human epidermal culture.**

Sodium laurate (SL) and vehicle (VH, distilled water) were applied topically to the epidermal culture for 1 min, washed out, left to stand 3 hours, and served for assays. (A) The concentration of histamine in the culture medium. (B) Typical example of western blotting of HDC and  $\beta$ -actin. (C) The ratio of 53-kDa HDC to 74-kDa HDC. The value was normalized to the average of the ratio of non-treated (NT) group. Values represent the mean  $\pm$  SEM for four samples. \* $P$  < 0.05 vs. VH (Dunnett's test).

### 3-3. 考察

#### ケラチノサイトからの histamine 産生機構について

これまでに、マウス表皮内で HDC 活性が確認されている (Taguchi et al., 1982)。そして、マウスのケラチノサイト由来 PB 細胞に HDC mRNA 発現が確認されている (Fitzsimons et al., 2001)。健常 ICR マウスの表皮において、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布は 53-kDa HDC 発現を強く増大させ、histamine 含有量を増加させた。マスト細胞欠損マウスの表皮においても、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布は histamine 含有量を増加させた。一方、ICR マウスおよびマスト細胞欠損マウスの真皮内の histamine 含有量に変化は認められなかった。ヒト由来の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は濃度依存的に 53-kDa/74-kDa HDC 比および histamine 産生量を増加させた。これらの結果から、表皮内の histamine 含有量の増加はケラチノサイト内での histamine 産生によるものであると示唆される。マスト細胞内には 74-kDa HDC および 53-kDa HDC が存在し、53-kDa HDC が高酵素活性で、74-kDa HDC が低酵素活性であることが知られており (Ichikawa et al., 2010)、生合成した histamine は顆粒に貯蔵していることが知られている。マクロファージには 74-kDa HDC のみが存在し (Hirasawa et al., 2001)、histamine 産生を制御しているがアミン貯蔵顆粒の存在は見出されていない。以上より、ケラチノサイトはマスト細胞やマクロファージとは異なる histamine 産生機構を有することが示唆される。

#### ラウリン酸ナトリウムによって誘発される HDC のプロセッシング

ラウリン酸ナトリウム誘発の HDC タンパクの調節メカニズムを検討する目的で、ラウリン酸ナトリウム処置によるヒト培養表皮内の HDC mRNA 発現レベルを real time RT-PCR にて検出しようと試みたが、HDC mRNA 発現レベルが低く、再現性よく HDC mRNA を検出できなかった。Jeong ら (2009) の報告では、新生 HDC タンパク合成は細胞刺激から HDC mRNA の転写まで 4 時間以上必要である。これより、10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発された 53-kDa HDC の増加に HDC mRNA が重要な役割を果たしていない可能性が考えられる。つまり、10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発された急性の痒み反応は HDC の遺伝子発現の増加を介した反応ではなく 74-kDa HDC から 53-kDa HDC へのプロセッシングが増大したことによって histamine 産生を亢進した結果生じた反応と示唆される。Benzamidine によって阻害されるセリンプロテアーゼ (benzamidine 感受性セリンプロテアーゼ) が HDC プロセッシングに関与していることが報告されている (Tanaka et al., 1995; Ichikawa et al., 1998) が、benzamidine 感受性セリンプロテアーゼは pH 8-9 で活性化される (Ichikawa et al., 1998; Demartini et al., 2007)。本研究で使用したラウリン酸ナトリウムで痒み関連行動を誘発した 1% と 10%溶液の pH は各々 9.8 と 10.1 であり、痒み関連行動を誘発しなかった 0.1%ラウリン酸ナトリウム水溶液と 10%N-ラウロイルサルコシナトリウム水溶液の pH は各々 7.6 と 7.7 であった。これらより、10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発された HDC プロセッシングの

詳細は不明である。

以上まとめると、ラウリン酸ナトリウムは直接ケラチノサイトに作用し、ケラチノサイト内で HDC のプロセッシングを亢進し、その結果生成された活性型 HDC が主に histamine 生合成に関与し、生合成された histamine が痒み反応に関係していると思われる。つまり、アニオン性界面活性剤の中には直接痒みを誘発するものがあり、その痒み発生メカニズムにマスト細胞ではなくケラチノサイト由来の histamine が関与することが明らかとなった。

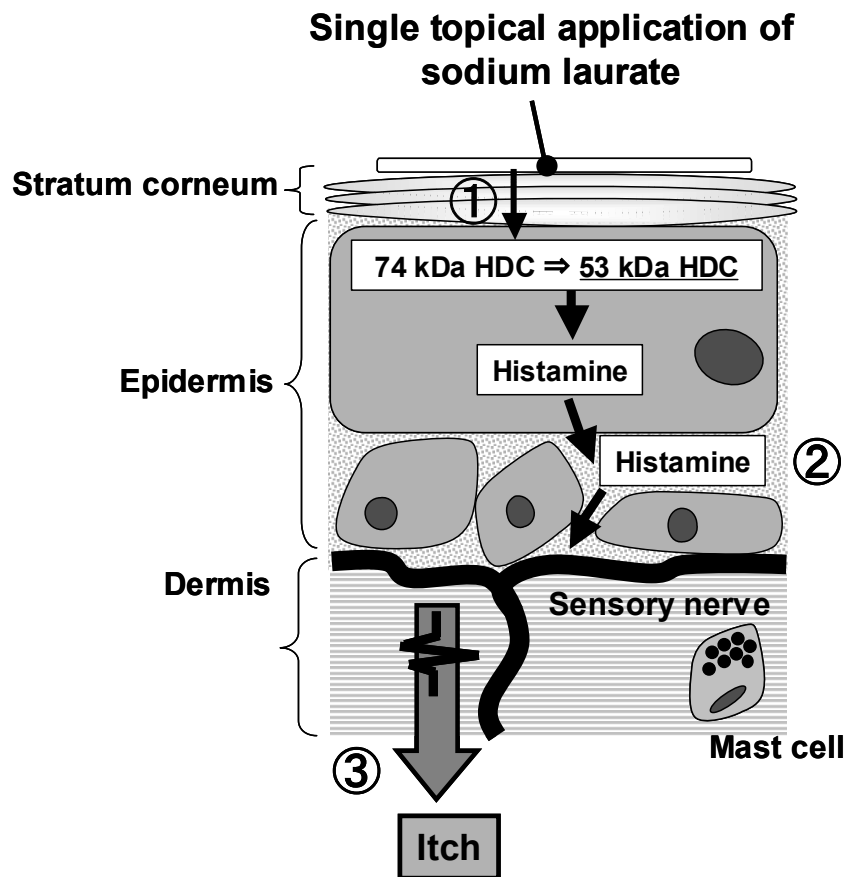
## 第1章・小括

- 10%ラウリン酸ナトリウム (pH 10.1) または 10%N-ラウロイルサルコシナトリウム (pH 7.7) の塗布直後に誘発された即時性の掻き動作は **naloxone** で抑制されなかった。
- 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布は遅発性の掻き動作を誘発したが、10%N-ラウロイルサルコシナトリウムの単回塗布は遅発性の掻き動作を誘発しなかった。
- 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布によって誘発された遅発性掻き動作は **naloxone** および **terfenadine** で抑制されたが、マスト細胞欠損では抑制されなかった。
- 1 mM 水酸化ナトリウム水溶液 (pH 10.2) の単回適用は遅発性掻き動作を誘発しなかった。
- 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布は血管透過性亢進に影響を及ぼさなかった。
- 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布は表皮内の **histamine** 含有量を増加させ、53-kDa HDC 発現量を増加させた。
- ラウリン酸ナトリウムは濃度依存的にケラチノサイト内で **histamine** 産生を増加させ、53-kDa HDC/74-kDa HDC 比を上昇させた。

以上より、アニオン性界面活性剤の中には直接痒みを発生させる刺激を有するものがあることを見出した。10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布によって誘発される遅発性掻き動作にマスト細胞非依存的かつ **histamine** 依存的な痒みの発生メカニズムが関与していると思われる。ラウリン酸ナトリウムが直接ケラチノサイトに作用し、ケラチノサイト内で HDC のプロセッシングを亢進し、53-kDa HDC によって **histamine** 合成が促進され、合成された **histamine** は細胞外に放出され、放出された **histamine** が痒みを発生させると示唆される。

その痒み発生機序の概略図を Fig. 15 に示す。





**Fig. 15.** ラウリン酸ナトリウムによって誘発される急性の痒み発生メカニズムの模式図

①ラウリン酸ナトリウムの局所塗布が表皮ケラチノサイト内で74-kDa HDCから53-kDa HDCへのプロセッシングを亢進し histamine 産生増加。②表皮ケラチノサイト内で産生された histamine の放出。③表皮真皮境界部に存在する一次求心性ニューロンの  $H_1$  ヒスタミン受容体に作用し痒みシグナルを発生。

(Inami et al., 2012 より引用)

## 第2章 染井吉野の葉抽出エキス及びクロロゲン酸の鎮痒効果

### 第1節 染井吉野 (*P. yedoensis*) の葉抽出エキスおよびクロロゲン酸のラウリン酸ナトリウム誘発掻き動作の抑制

桜は、主に北半球の温暖な気候地域に分布しているバラ科サクラ属サクラ亜属の落葉植物であり、日本の国花となっていることから世界的にも有名な植物である。

染井吉野は日本を象徴する桜として古くから親しまれ、春霞満開の花は美しく広く観賞用の桜として愛されている。染井吉野の葉は食用としても利用されており、塩漬けされた桜の葉は「さくら葉」と呼ばれ、心地よい香りを持つことから、香り付け食材としてアイスクリームやクッキーに混ぜたり、和菓子の桜餅の包みに用いられたりしている。また、さくら葉の抗酸化作用により桜餅の保存性が高まることが知られている (Inoue et al., 2011)。これまでに、染井吉野の葉に活性酸素消去作用、過酸化脂質生成抑制作用、抗酸化作用、抗炎症作用、色素沈着抑制作用などの薬理学的作用を有することが報告されており (Wang et al., 1999; Matsuda et al., 1994; Lee et al., 2008)、抗酸化作用を示す主成分が **chlorogenic acid** である (Inoue et al., 2011)。そして、染井吉野の葉抽出エキスが痒み抑制を期待した化粧品原料として販売されている。抗酸化作用や抗炎症作用を有する生薬の中には、鎮痒作用を示すものが存在する (Ando et al., 2010; Matsuda et al., 2002)。しかし、染井吉野の葉の薬効と作用機序の詳細は明らかにされていない。

そこで本節では、前節で述べたアニオン性界面活性剤のラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作に対する染井吉野の葉抽出エキスおよび **chlorogenic acid** の効果について検討した。

## 1-1. 実験材料および実験方法

### 1-1-1. 実験動物

第1章・第1節・1-1-1に準じた。

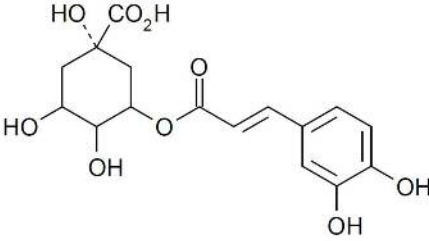
### 1-1-2. 使用薬物

徳島県で採取した染井吉野の乾燥葉 15 g を室温で7日間 150 mL の 50%エタノールで1回抽出した。ろ過後、50%エタノール染井吉野葉抽出液（乾燥残分 2.33%，CAS 928156-32-5）を調製し、4°C で保管した。この抽出操作、精製操作は一丸ファルコス株式会社（岐阜）で行われ、提供を受けた。Chlorogenic acid (Table 7) はナカライテスクより購入した。

これ以外の使用薬物は第1章・第1節・1-1-2に準じた。

刈毛・除毛済みのマウス吻側背部に 10%ラウリン酸ナトリウムを 50 μL 塗布した。10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 90 分後に、50%エタノール染井吉野葉抽出液または 50%エタノールで 1, 5% w/v に調製した chlorogenic acid を、10%ラウリン酸ナトリウムを塗布した同一部位に 50 μL 塗布した。

**Table 7. Molecular formula, molecular weight, CAS number, and structural formula of chlorogenic acid**

Chlorogenic acid	
Molecular formula	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
Molecular weight	354.31
CAS number	327-97-9
Structural formula	

### 1-1-3. 行動実験

行動観察の方法は、第1章・第1節・1-1-3に準じた。

10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 90 分後に 50%エタノール染井吉野葉抽出液または chlorogenic acid (1, 5%) をラウリン酸ナトリウムと同一部位に塗布した。撮影は 50%エタノ

ール染井吉野葉抽出液または chlorogenic acid (1, 5%), vehicle (50%エタノール) 塗布 30 分後 (10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 2 時間後) に行った。ビデオテープの再生により掻き動作回数を数えた (Kuraishi et al., 1995; Tsujii et al., 2008)。

#### 1-1-4. Chlorogenic acid の HPLC (high performance liquid chromatography) 解析

50%エタノール染井吉野葉抽出液を 0.45  $\mu\text{m}$  のシリンジフィルター (model Millex-LH; Millipore corp., Billerica, MA, USA) でろ過した。主成分である chlorogenic acid は, photodiode array (PDA) 検出器 (model 996; Nihon Waters Waters Co. Ltd., Osaka, Japan) が装備されている HPLC (model 2690; Nihon Waters) で検出した。分析カラムは capcell pak C18 UG120 (4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, particle size 5  $\mu\text{m}$ , Shiseido Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用し, 移動相はアセトニトリルと 0.1%リン酸水溶液の混合液でグラジエント分析 (Table 8) を行った。データは解析ソフト Millennium (Nihon Waters) を用いて解析した。

**Table 8.** グラジエント分析プロトコールと HPLC 条件

Time (min)	Acetonitrile (%)	0.1% Phosphoric acid (%)	Profile
0	10	90	linear-gradient
30	100	0	
35	100	0	—

Flow rate	1.0 mL/min
Detection wavelength	340 nm
Column temperature	40°C
Injection volume	10 $\mu\text{L}$

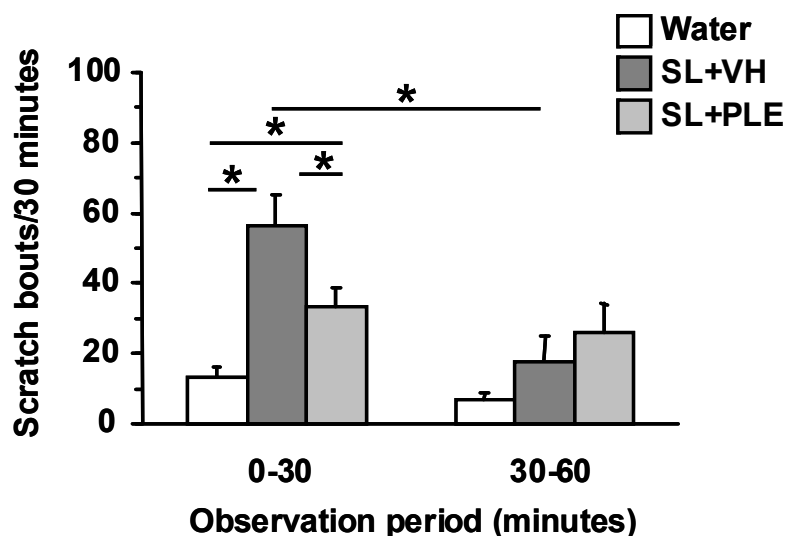
#### 1-1-5. 統計学的解析

第 1 章・第 1 節・1-1-6 に準じた。

## 1-2. 実験結果

### 1-2-1. 染井吉野の葉抽出エキスのラウリン酸ナトリウム誘発遅発性掻き動作の抑制

10%ラウリン酸ナトリウム塗布90分後の50%エタノール染井吉野葉抽出液の同一部位への局所塗布は、ビデオ観察前半30分（10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後からの30分間）ではvehicle（50%エタノール）塗布と比較して有意に抑制したが、後半30分（10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間半後からの30分間）では抑制しなかった（Fig. 16）。



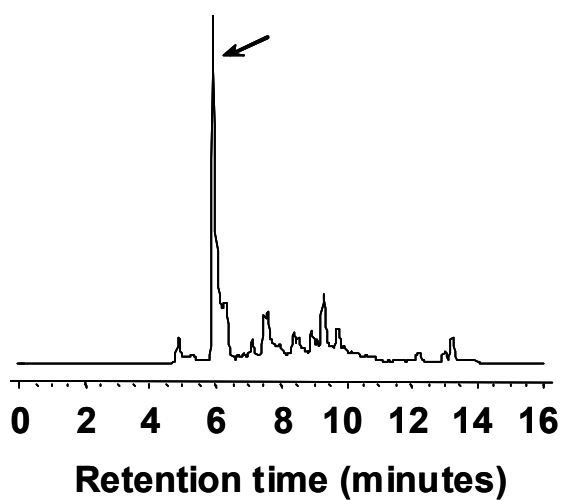
**Fig. 16. Effect of topical application of *P. yedoensis* leaf extract (PLE) on sodium laurate-induced delayed phase scratching in mice.**

10% Sodium laurate (SL) or vehicle (water) was applied topically to the shaved skin, and hind-paw scratching of the treated site was counted for 1 hour from 2 hours after the application. PLE (1.115 mg/site) or vehicle (VH, 50% ethanol) was applied topically in a volume of 50  $\mu$ L 30 min before the start of observation (1.5 h after sodium laurate application). Values represent the means  $\pm$  SEM of six to eight animals. \* $P$  < 0.05 (Bonferroni's test).

### 1-2-2. 染井吉野の葉抽出エキス中に含まれるクロロゲン酸の定量

染井吉野の葉に含まれる抗酸化作用を有する成分として chlorogenic acid が同定されている (Inoue et al., 2011)。そこで、50%エタノール染井吉野葉抽出液中の chlorogenic acid 量を測定した。その結果、chlorogenic acid の保持時間は 5.9 分で、濃度は 0.092%であった。乾燥残分が 2.33%であることから chlorogenic acid は乾燥残分の 3.9%を占めていた。

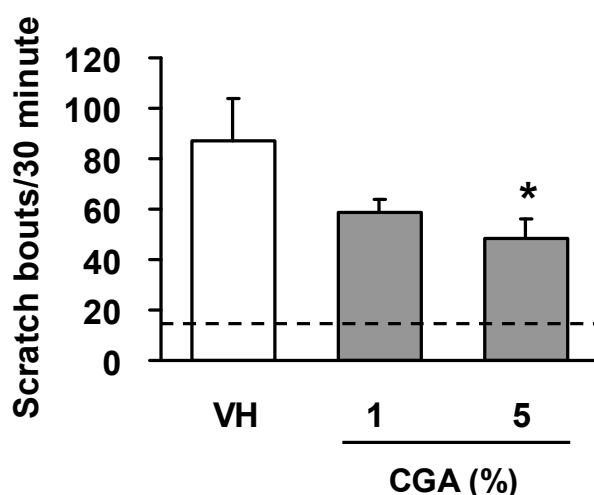
クロマトグラムを Fig. 17 に示した。



**Fig. 17. Chromatogram of 50% ethanol extract of *P. yedoensis* leaf.**  
Arrow represented chlorogenic acid peak.

### 1-2-3. クロロゲン酸のラウリン酸ナトリウム誘発遅発性掻き動作の抑制

10%ラウリン酸ナトリウム塗布90分後の50%エタノール染井吉野葉抽出液の同一部位への局所塗布は、ビデオ観察前半30分（10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後からの30分間）でvehicle（50%エタノール）塗布と比較して有意に抑制した（Fig. 16）ことと、50%エタノール染井吉野葉抽出液の主成分がchlorogenic acidであった（Fig. 17）ことから、10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後からの30分間のビデオ撮影でchlorogenic acidの痒み関連行動への影響を検討した。その結果、10%ラウリン酸ナトリウム塗布90分後のchlorogenic acidを局所塗布は、10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作を濃度依存的に抑制した（Fig. 18）。



**Fig. 18. Effect of topical application of chlorogenic acid (CGA) on sodium laurate-induced delayed phase scratching.**

CGA or vehicle (VH, 50% ethanol) was applied topically in a volume of 50  $\mu$ L to the sodium laurate-treated skin 90 min after sodium laurate application (30 min before the start of behavioral observation). The scratching bouts were counted for 30 min from 2 hours after the sodium laurate application. A broken line denotes the number of scratching bouts in the water-treated group. Values represent the means  $\pm$  SEM of six to eight animals. \* $P < 0.05$  (Dunnett's test).

### 1-3. 考察

#### 染井吉野葉抽出液中のクロロゲン酸の鎮痒効果の可能性

10%ラウリン酸ナトリウム塗布の90分後に50%エタノール染井吉野葉抽出液を局所塗布すると、10%ラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性掻き動作が観察時間の前半30分（10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間後から30分間）で抑制効果を認めたが、後半30分（10%ラウリン酸ナトリウム塗布2時間半後から30分間）では抑制効果を認めなかった。50%エタノール染井吉野葉抽出液の乾燥残分中の3.9%が chlorogenic acid であった。染井吉野の葉に含まれる主成分として chlorogenic acid が同定されている報告（Inoue et al., 2011）とも合致していた。Chlorogenic acid の塗布が濃度依存的にラウリン酸ナトリウムによって誘発される遅発性掻き動作を抑制したことから染井吉野葉抽出液の塗布による鎮痒効果を発揮した成分の一つが chlorogenic acid であると示唆される。



## 第2節 クロロゲン酸のヒスタミン産生・遊離の促進機構への作用

第2章・第1節で chlorogenic acid の塗布が濃度依存的にラウリン酸ナトリウムによって誘発される遅発性搔き動作を抑制することを明らかにした。また、10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発される遅発性搔き動作に表皮内 53-kDa HDC レベルおよび histamine 含有量の増加が関与していることが示唆されている（第1章）。そこで、chlorogenic acid の表皮内 53-kDa HDC レベルおよび histamine 含有量の増加に及ぼす影響を第2節で検討した。

Chlorogenic acid (25 mg/kg) の経口投与は、マスト細胞の脱顆粒促進によって誘発される搔き動作および histamine 注射によって誘発される搔き動作を抑制するが、その抑制効果は弱いことが報告されている (Trinh et al., 2010)。

第1章で、10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発される遅発性搔き動作に histamine と H<sub>1</sub> ヒスタミン受容体が関与すること、および histamine を産生・遊離する細胞が表皮ケラチノサイトであることを見出した。

そこで本節では、第2章・第1節で明らかになった 5% chlorogenic acid のラウリン酸ナトリウムによって誘発される遅発性搔き動作の抑制効果の作用点を検討した。

### 2-1. 実験材料および実験方法

#### 2-1-1. 実験動物

第1章・第1節・1-1-1 に準じた。

#### 2-1-2. 使用薬物

Histamine は和光純薬工業より購入した。

Histamine は生理食塩水（大塚製薬）に溶解し、マウスに 100 nmol/site で皮内注射した。Chlorogenic acid（ナカライテスク）は、50%エタノールに溶解し、皮膚に 50  $\mu$ L 塗布した。

その他の使用薬物は第1章・第1節・1-1-2 に準じた。

#### 2-1-3. 行動実験

##### 塗布部位（吻側背部）への後肢による搔き動作

行動観察の方法は、第1章・第1節・1-1-3 に準じた。

刈毛・除毛済みのマウス吻側背部に histamine (100 nmol/site) を 20  $\mu$ L の用量で皮内注射し、直ちにアクリル製ケージに入れマウスの行動を 60 分間ビデオ撮影した。ビデオテープの再生により histamine 投与部位およびその近傍の後肢による搔き動作の行動観察を行った (Kuraishi

et al., 1995; Tsujii et al., 2008)。評価薬物は histamine 投与 30 分前に投与した。

#### 塗布部位（頬）への前肢による擦り動作および後肢による搔き動作

刈毛・除毛済みのマウス頬に chlorogenic acid を 50  $\mu$ L 塗布後、直ちにアクリル製ケージに入れマウスの行動を 60 分間ビデオ撮影した。ビデオテープの再生により薬物塗布部位およびその近傍の前肢による擦り動作および後肢による搔き動作の行動観察を行った (Shimada and LaMotte, 2008)。

#### 2-1-4. 血管外色素漏出量の検討

1% Evans blue 生理食塩水溶液 150  $\mu$ L をマウス尾静脈内へ注射した 20 分後に、刈毛・除毛済みのマウス吻側背部に histamine (100 nmol/site) を 20  $\mu$ L の用量で皮内注射した。Histamine 投与 20 分後に頸椎脱臼により安楽死させ、histamine 投与部位の皮膚を直径 8 mm の円状に生体パンチで切り貫いた。採取した皮膚片を入れたマイクロチューブに dimethyl sulfoxide (DMSO) 200  $\mu$ L を加え室温で一晩放置して皮膚片内の evans blue を抽出した。遠心分離後、上清の 620 nm における吸光度を測定した (Andoh et al., 2010)。Evans blue 溶液を用いて作成した検量線により、それぞれの色素漏出量を算出した。評価薬物は histamine 投与 30 分前に投与した。

#### 2-1-5. Histamine 量の測定 (EIA 法)

皮膚は chlorogenic acid の塗布 30 分後 (10%ラウリン酸ナトリウム塗布 2 時間後) に採取した。この皮膚の採取タイミング以外は、第 1 章・第 3 節・3-1-3 に準じた。

#### 2-1-6. HDC 発現量の測定 (western blotting)

##### マウス皮膚からの測定サンプル溶液の調製

皮膚は chlorogenic acid の塗布 30 分後 (10%ラウリン酸ナトリウム塗布 2 時間後) に採取した。この皮膚の採取タイミング以外は、第 1 章・第 3 節・3-1-4 に準じた。

各 8  $\mu$ g のタンパク量を泳動した。

##### 培養表皮からの測定サンプル溶液の調製

Chlorogenic acid は、 $1 \times 10^{-2}$  M となるよう dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させた。その後、滅菌精製水を用いて  $1 \times 10^{-6}$  M (DMSO の濃度が 0.01% v/v) まで希釈した。この溶液 200  $\mu$ L を培養皮膚上に滴下した。Vehicle 溶液は DMSO を 0.01% 含む滅菌精製水を用いた。

その他の試験方法は、第 1 章・第 3 節・3-1-4 に準じた。

各 15  $\mu\text{g}$  のタンパク量を泳動した。

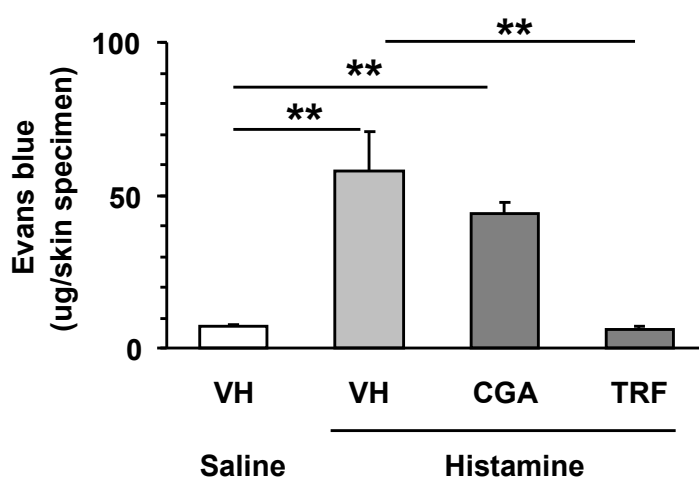
#### 2-1-7. 統計学的解析

第 1 章・第 1 節・1-1-6 に準じた。

## 2-2. 実験結果

### 2-2-1. ヒスタミン注射後の血管透過性亢進に対するクロロゲン酸の効果

5% Chlorogenic acid は histamine (100 nmol/site) の皮内注射 30 分前に刈毛・除毛済みのマウス吻側背部に塗布した。5% Chlorogenic acid は histamine 誘発の血管透過性亢進に影響を及ぼさなかった。陽性対照の terfenadine (30 mg/kg, orally, -30min.) は histamine 誘発の血管透過性亢進を強く抑制した (Fig. 19)。

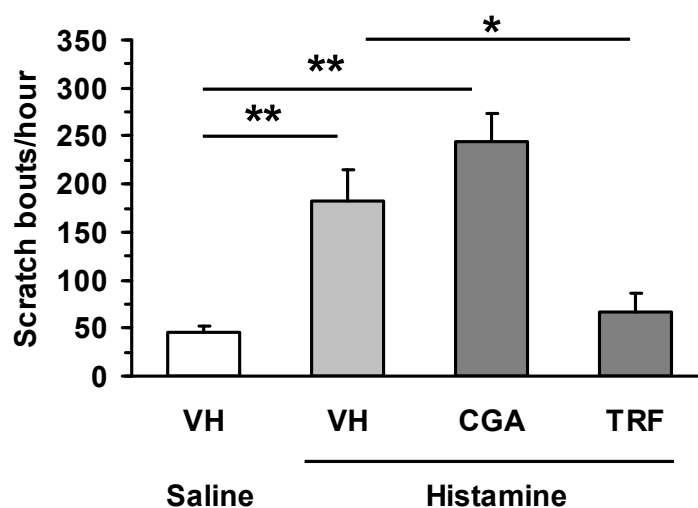


**Fig. 19. Effects of topical application of chlorogenic acid (CGA) on the histamine-induced plasma extravasation in mice.**

Histamine (100 nmol/site) was injected intradermally and plasma extravasation was determined 20 min later. 5% CGA was applied topically and terfenadine (TRF, 30 mg/kg) was administered orally 30 min before histamine injection. Values represent the means  $\pm$  SEM of four animals.  $**P < 0.01$  (Bonferroni's test).

## 2-2-2. ヒスタミン誘発掻き動作に対するクロロゲン酸の効果

5% Chlorogenic acid は histamine (100 nmol/site) の皮内注射 30 分前に刈毛・除毛済みのマウス吻側背部に塗布した。5% Chlorogenic acid は histamine 誘発掻痒反応に影響を及ぼさなかった。陽性対照の terfenadine (30 mg/kg, orally, -30min.) は histamine 誘発掻痒反応を強く抑制した (Fig. 20)。

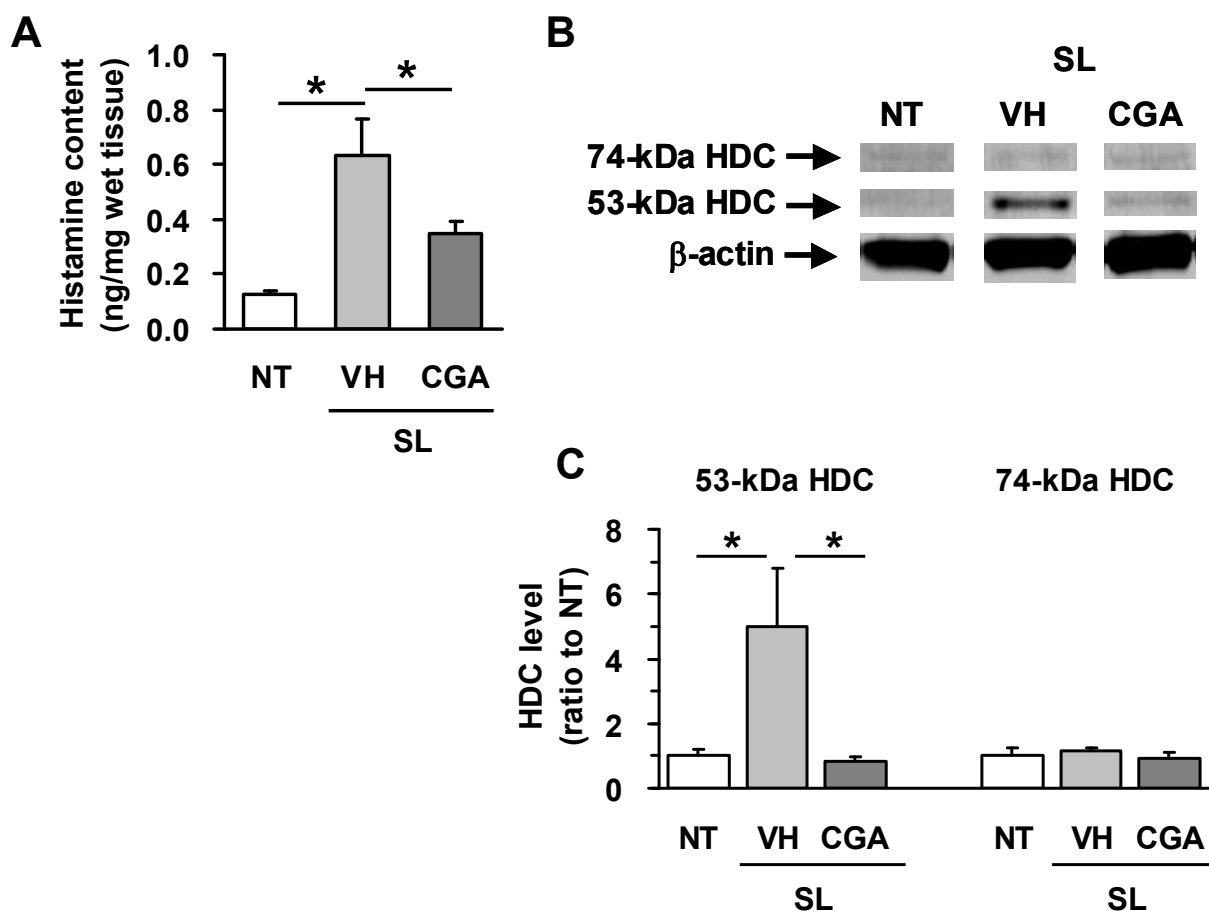


**Fig. 20. Effect of topical application of chlorogenic acid (CGA) on scratching elicited by histamine injection in mice.**

Histamine (100 nmol/site) was injected into rostral back and scratch bouts were counted for 1 hour. 5% CGA was applied topically and terfenadine (TRF, 30 mg/kg) was administered orally 30 min before histamine injection. Values represent the means  $\pm$  SEM of six animals. \*, \*\* $P < 0.05, 0.01$ , respectively (Bonferroni's test).

### 2-2-3. マウス表皮内のヒスタミン含有量および HDC 発現量に対するクロロゲン酸の効果

5% Chlorogenic acid は 10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 90 分後に、10%ラウリン酸ナトリウムの塗布部位と同一部位に塗布した。10%ラウリン酸ナトリウムの塗布 2 時間後に皮膚を回収し表皮と真皮に分離し、表皮中の histamine 含有量と HDC 発現量を検討した。5% Chlorogenic acid は表皮内 histamine 含有量の増加および 53-kDa HDC 発現の増大を vehicle (50% エタノール) 塗布と比較して有意に抑制した (Fig. 21)。

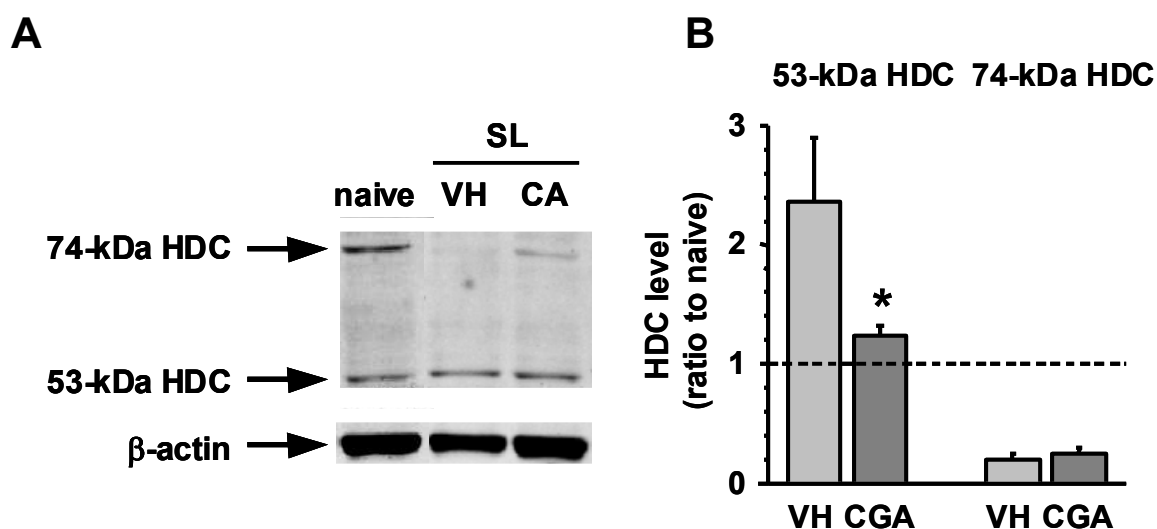


**Fig. 21. Effects of topical application of sodium laurate (SL) and chlorogenic acid (CGA) on the histamine content and L-histidine decarboxylase (HDC) level in the epidermis.**

1% SL was applied topically to the shaved skin, which was isolated 2 hours later for assays. 5% CGA or vehicle (VH, 50% ethanol) was applied 90 min after SL application. (A) Histamine content. Values represent the means  $\pm$  SEM of five animals. (B) A typical example of western blotting of HDC and  $\beta$ -actin. (C) The levels of 53-kDa and 74-kDa HDCs. The value (HDC/ $\beta$ -actin) was normalized to that of non-treated (NT) group. Values represent the means  $\pm$  SEM of six (NT), four (VH), and six (CGA) animals. \* $P$  < 0.05 (Bonferroni's test).

#### 2-2-4. ヒト3次元培養表皮内のHDC発現量に対するクロロゲン酸の効果

1%ラウリン酸ナトリウムを1分間暴露し、3時間インキュベーション後に1  $\mu$ M chlorogenic acid を2時間適用し培養表皮内のHDC発現量を検討した。1  $\mu$ M Chlorogenic acid は培養表皮内の53-kDa HDC発現量をvehicle (DMSOを0.01%含む滅菌精製水)適用と比較して有意に減少させた (Fig. 22)。



**Fig. 22. Effect of topical application of chlorogenic acid (CGA) on the L-histidine decarboxylase (HDC) level in a 3-dimensional human keratinocyte culture treated with sodium laurate.**

1% Sodium laurate was applied topically to a keratinocyte culture for 1 min, following which the culture was washed, left to stand for 3 hours, and then used for the assays. 1  $\mu$ M CGA or vehicle (VH) was treated in a volume of 200  $\mu$ L for 2 hours. (A) A typical example of western blotting of HDC and  $\beta$ -actin. (B) The levels of 53-kDa and 74-kDa HDCs. The value (HDC/ $\beta$ -actin) was normalized to that of naïve group. A broken line denotes the naïve level. Values represent the means  $\pm$  SEM of six animals. \* $P$  < 0.05 vs. VH (Bonferroni's test).

## 2-2-5. クロロゲン酸の掻き動作誘発および擦り動作誘発の検証

痛み刺激は痒み刺激を抑制する (Ikoma et al., 2004)。そこで、マウス頬に 5% chlorogenic acid を 50  $\mu$ L 塗布し、直ちにマウスの行動(掻き動作, 擦り動作)を 60 分間観察した。5% Chlorogenic acid の塗布は痒み指標である掻き動作回数に影響を及ぼさなかった。また、痛み指標である擦り動作は観察されなかった (Table 9)。

**Table 9. Scratch and rub-inducing effects of chlorogenic acid.**

	Vehicle (50% ethanol)	5% Chlorogenic acid
Scratch bouts/hour	11.0 $\pm$ 5.2	10.8 $\pm$ 2.4
Rub bouts/hour	Not counted	Not counted

## 2-3. 考察

### クロロゲン酸の鎮痒作用について

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、遅発性掻き動作が抑制された (第 2 章・第 1 節)。Chlorogenic acid (25 mg/kg) は全身性投与 (経口投与) により弱い抗ヒスタミン効果を有すると報告されている (Trinh et al., 2010)。5% Chlorogenic acid の塗布は、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。5% Chlorogenic acid の塗布は、擦り動作を誘導しなかった。これらのことから、5% chlorogenic acid の塗布は抗 histamine 作用を発揮せず、痛み刺激を誘発しないことが示唆される。

一方、5% chlorogenic acid の塗布は、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。また、1  $\mu$ M chlorogenic acid はラウリン酸ナトリウムによって誘発されるヒト培養表皮内の 53-kDa HDC レベルの増加を抑制した。これより、chlorogenic acid はケラチノサイトに作用して、ケラチノサイト内の HDC のプロセッシングを抑制することで histamine 産生を抑制したと示唆される。

以上まとめると、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。



## 第2章・小括

- ・ 染井吉野葉抽出エキスの塗布および5% chlorogenic acid の塗布はラウリン酸ナトリウム誘発の遅発性搔き動作を抑制した。
- ・ 5% Chlorogenic acid の塗布はラウリン酸ナトリウム誘発性の表皮内の 53-kDa HDC 発現量および表皮内の histamine 含有量の増加を抑制した。
- ・ 5% Chlorogenic acid の塗布に抗ヒスタミン作用および発痛作用は認められなかった。
- ・ Chlorogenic acid はケラチノサイトに作用して、ラウリン酸ナトリウムによって誘発された HDC のプロセッシングを抑制した。

以上より、chlorogenic acid の塗布は、ラウリン酸ナトリウム誘発性の表皮内の 53-kDa HDC 発現量および表皮内の histamine 含有量の増加を抑制することで痒み抑制効果を発揮したと示唆される。これより、アニオン性界面活性剤を含有する化粧品や医薬部外品等に HDC 活性化を抑制する天然成分の配合が痒みの予防に有効かつ有用であることが考えられる。

### 第3章 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

#### 第1節 SDS 誘発掻き動作

皮膚の健全性を維持するためには、皮膚を清潔に保つことが重要である。そのために各種身体用洗剤が古くから用いられてきている。近年、洗剤の皮膚低刺激性への関心が高まっている中、化粧品を製造・販売しているメーカーは共通して、①使用原料の皮膚刺激性をパッチテストなどによる厳選 (Nicander et al., 1996; Tupker et al., 1997)、②不要原料の除去、③配合界面活性剤濃度の減少などの工夫をおこない皮膚低刺激性を目指している。これらは皮膚への刺激性を低減するには重要なことであるが、製品としての保存安定性などを低下させることに繋がるのみならず、洗剤成分 (界面活性剤) の配合濃度の減少によって泡立ちが悪くなり、そのために皮膚を擦る頻度が増加してしまう危険性がある。つまり、皮膚刺激性の低減と製品の性能維持の両方が満たされなければならない。これは現実的に非常に難しい課題である。その結果、製品としての洗浄性能を優先せざるを得なくなり、界面活性剤の配合濃度の減少は十分達成できていないのも事実である。

近年、生活が清潔で快適になっていることや働く女性が増加していること、男性が化粧品を使用する頻度が増加していることなどから、美観向上のためなどに皮膚に使用するファンデーション等の化粧品の消費が増加している。これらの化粧品は一定時間後には洗浄する必要がある。そのため、最近の皮膚洗剤は塵や埃などの汚れの除去や除菌だけではなく、このような化粧品のクレンジング機能も考慮する必要があると思われる。つまり、より強い洗浄力が求められる傾向にあるともいえる。

第1章において、アニオン性界面活性剤のラウリン酸ナトリウムが痒み関連行動を誘発することを明らかにした。しかし、この反応は一過性の反応であり、これだけでは実生活において問題となる洗剤 (界面活性剤) 使用に伴う慢性的な痒みを十分に説明することが出来ない。現実的に、理・美容師のような洗剤の頻回使用者は、皮膚炎や皮膚の乾燥に加え、痒み症状を頻繁に認める (Inoue et al., 2008)。日常的に使用する界面活性剤の潜在的刺激要因を減少させることは製品開発において重要なことであるが、界面活性剤の繰り返し使用によってもたらされる皮膚への有害作用のメカニズムを理解することも重要である。

界面活性剤は1分子中に親水基と親油基を有することから皮膚になじみ易く、ケラチンタンパクに結合し易い (Imokawa et al., 1975; Scala et al., 1968) ことから洗い流す作業を行っても完全には洗い流されず皮膚に界面活性剤が残留してしまう。通常は皮膚のターンオーバーによって垢と一緒に界面活性剤残渣は排出されるので皮膚へ有害反応にもたらしは殆どない。しかし、洗浄後に皮膚が健全な状態に戻る前に繰り返し洗浄行為を行うと皮膚が次第に荒れてきたり、乾燥してきたりする。このような乾燥皮膚や荒れ皮膚の状態では洗剤を使用した時に感じる痒みについて本章で検討した。

アニオン性界面活性剤の中でも強力な皮膚刺激性を有する 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 (Wigger-Alberti et al., 2000; Agner and Serup, 1990)。SDS が痒みを伴う皮膚トラブルに関与していると推測されるが、痒みの発生メカニズムは明らかになっていない。そこで、SDS を反復塗布することで皮膚炎や皮膚乾燥を誘発し、これらの症状に伴い痒み関連行動が観察されるか検討した。

## 1-1. 実験材料及び実験方法

### 1-1-1. 実験動物

第1章・第1節・1-1-1 および第2節・2-1-1 に準じた。

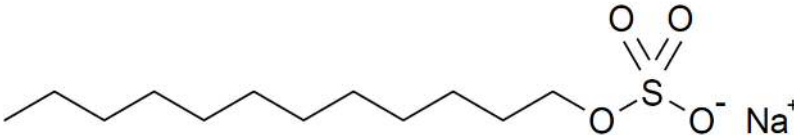
### 1-1-2. 使用薬物

Sodium dodecyl sulfate (SDS, Table 10) はナカライテスクより購入した。

SDS は蒸留水で 10% w/v の濃度となるよう溶解し、使用するまでは 4°C 保存しておいた。使用時に界面活性剤が析出していた場合は 37°C の湯浴で温めて溶かしてから使用した。10% SDS は、予め除毛したマウス吻側背部に 50  $\mu$ L の用量で 1 日 1 回繰返して塗布した。また、塗布後の洗浄操作は行わなかった。

その他の使用薬物は第1章・第1節・1-1-2 に準じた。

**Table 10. Molecular formula, composition formula, molecular weight, CAS number, and structural formula of sodium dodecyl sulfate**

Sodium dodecyl sulfate	
Molecular formula	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S
Composition formula	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> OSO <sub>3</sub> Na
Molecular weight	288.38
CAS number	151-21-3
Structural formula	

### 1-1-3. 行動実験

実験の少なくとも 3 日前までに、マウスの吻側背部を刈毛・除毛し、実験当日に吻側背部に傷がないものを実験に使用した。4 区画されたアクリル製ケージ (1 区画; 13 × 9 × 35 cm) に 1 匹ずつ入れ、無人環境下で少なくとも 30 分以上撮影環境に馴化した後、マウスの行動をビデオカメラで 60 分間撮影した。10% SDS または 10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウムは、予め除毛したマウス吻側背部に 50  $\mu$ L の用量で 1 日 1 回繰返して塗布した。撮影は界面

活性剤水溶液または vehicle (蒸留水) 塗布前, 塗布 1, 2, 3, 4 日後の界面活性剤水溶液または vehicle (蒸留水) 塗布前に行った。ビデオテープの再生により 10% SDS または vehicle (蒸留水) 塗布部位およびその近傍の掻き動作の行動観察を行った (Kuraishi et al., 1995)。後肢で吻側背部およびその近傍を掻き, 後肢を床におろすという一連の掻き動作の回数を 1 回の掻き動作として目視にて数えた (Tsuji et al., 2008)。

#### 1-1-4. 角層水分量, TEWL, 皮膚表面 pH 及び皮膚炎症状の測定

測定は界面活性剤水溶液の塗布前に行った。  
測定機器は第 1 章・第 1 節・1-1-4 に準じた。

#### 1-1-5. 病理組織学的検討

皮膚は 10% SDS 溶液塗布 4 日目 (Day 3) の 24 時間後 (Day 4) に採取した。  
操作方法は第 1 章・第 1 節・1-1-5 に準じた。

#### 1-1-6. 表皮厚の測定

病理組織学検討によって作製した皮膚切片を HE 染色し, 光学顕微鏡 (model BZ-8000; Keyence) で観察・撮影 (field size: 662.0 × 879.3 μm) した。撮影した各画像の最大表皮厚 (角質層下底から基底層下底までの距離) を求め, 各画像の最大表皮厚の平均値をその群の表皮厚とした。

#### 1-1-7. Histamine 量の測定 (EIA)

第 1 章・第 3 節・3-1-3 に準じた。

#### 1-1-8. HDC 発現量の測定 (western blotting)

##### マウス皮膚からの測定サンプル溶液の調製

第 1 章・第 3 節・3-1-4 に準じた。  
各 5 μg のタンパク量を泳動した。

##### 培養表皮からの測定サンプル溶液の調製

第 1 章・第 3 節・3-1-4 に準じた。  
各 15 μg のタンパク量を泳動した。

### 1-1-9. RNA 抽出と RT-PCR

#### RNA 抽出

マウスを sodium pentobarbital (80 mg/kg, intraperitoneally) で麻酔し、開胸後、心血液循環系を利用して PBS で十分に灌流脱血後、界面活性剤適用部位の皮膚を採取した。採取した皮膚片を 60°C の PBS に 30 秒間浸した後、4°C の PBS 中で表皮と真皮に分けた (Kolev et al., 2008)。

採取した表皮に TRIzol Reagent (Invitrogen) を 200  $\mu$ L 加え、十分ホモジナイズした後に TRIzol Reagent を 300  $\mu$ L (total volume 500  $\mu$ L) 加え vortex 後、室温にて 5 分間インキュベートした。その後、油層と水層に分離させるために chloroform を 100  $\mu$ L 加え、vortex 後、室温で 3 分間インキュベートした。遠心分離 (12000 rpm [14170  $\times$  g], 15 min, 4°C) 後、上清を新しいエッペンチューブに移し、この上清に 250  $\mu$ L の isopropanol (和光純薬工業) を加え室温で 1 時間以上インキュベートした。遠心分離 (12000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を捨て 70% ethanol を 300  $\mu$ L 加え vortex した。遠心分離 (12000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を捨て 100% ethanol を 300  $\mu$ L 加え vortex した。遠心分離 (12000 rpm, 10 min, 4°C) 後、上清を捨て 37°C インキュベーター内で十分風乾した。Diethyl pyrocarbonate (ナカライテスク) で処理した滅菌精製水 (DEPC-d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) を 50  $\mu$ L 加え、ペレットを溶かした後、Table 11 の組成の溶液を 50  $\mu$ L 加えた。

Table 11. RNA 抽出過程で用いる溶液

組成	メーカー	液量	最終濃度
10 $\times$ DNase I buffer	Takara, 滋賀	10 $\mu$ L	1 $\times$
DNase I (5000 units)	Thermo Fisher Scientific, 横浜	1 $\mu$ L	50 units
DEPC-d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O		39 $\mu$ L	
		50 $\mu$ L	

Vortex 後、軽く遠心し、37°C で 1 時間インキュベートした。Phenol chloroform isoamyl alcohol (ナカライテスク) を 100  $\mu$ L 加えた。遠心分離 (12000 rpm, 10 min, room temperature) 後、上清 (3 層に分離、上から水層、タンパク層、油層で水層を回収) を新しいエッペンチューブに移した。この上清に 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 5.2) を 12  $\mu$ L 加え、軽く混ぜた後に 100% ethanol を 300  $\mu$ L 加えた。Vortex 後、-80°C で 30 分間インキュベートした。遠心分離 (12000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を捨て、70% ethanol を 300  $\mu$ L 加えた。遠心分離 (12000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を捨て、100% ethanol を 300  $\mu$ L 加えた。遠心分離 (12000 rpm, 15 min, 4°C) 後、上清を捨て 37°C インキュベーター内で十分風乾した。ここに DEPC-d<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O を 20  $\mu$ L 加え、55°C で 5 分間加温してペレットを十分溶解させた後、Nano Drop (エル・エム・エス, 東京) で RNA 濃度を測定した。

### 逆転写酵素反応 (RT)

逆転写反応は、total RNA 量が 0.4 µg/µL または 0.2 µg/µL になるように Table 12 に示す組成で溶液を作製し、サーマルサイクラー (Takara) を用いて 70°C で 5 分間反応させ、その後 4°C で急冷した。この溶液 (RNA-oligo dT solution) に Table 13 に示す組成の溶液を添加し、サーマルサイクラーを用いて 25°C で 5 分間、37°C で 1 時間、72°C で 15 分間の順で反応させた。

**Table 12. RT reaction with oligo-dT primer**

組成	液量	
	0.4 µg/µL	0.2 µg/µL
採取した total RNA 溶液	2 µL	4 µL
Oligo dT <sub>16</sub> primer (50 pmol/µL)	1 µL	1 µL
DEPC-d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O	2 µL	0 µL
	5 µL	5 µL

**Table 13. RT reaction**

組成	メーカー	液量	最終濃度
5 × Reaction Buffer	和光純薬工業	4 µL	1 ×
25 mM MgCl <sub>2</sub>	和光純薬工業	2.4 µL	3 mM
dNTP (2 mM each dNTP)	ABI, USA	5 µL	0.5 mM
RNase Inhibitor	東洋紡積	0.5 µL	1 U/µL
ReverScript III	和光純薬工業	0.5 µL	
DEPC-d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O		2.6 µL	
		15 µL	

### ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

RT 産物を Table 14 に示す組成の溶液に混合し、Table 15 に示した条件で反応させた。用いた primer の配列は Table 16 に示した。PCR 産物を 2%アガロースゲルを用いて、100 V で電気泳動した後、ethidium bromide で 30 分間染色し、302 nm の UV で検出したバンドをポラロイドフィルムで撮影した。検出したバンドは glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正した。

**Table 14. PCR 反応溶液組成**

組成	メーカー	液量	最終濃度
RT product		1 $\mu$ L	
5 $\times$ Reaction Buffer	和光純薬工業	10 $\mu$ L	1 $\times$
25 mM MgCl <sub>2</sub>	和光純薬工業	3.5 $\mu$ L	1.75 mM
dNTP (2 mM each dNTP)	ABI, USA	5 $\mu$ L	0.5 mM
Primer-sense (50 pmol/ $\mu$ L)	Invitrogen	1 $\mu$ L	1 pmol/ $\mu$ L
Primer-antisense (50 pmol/ $\mu$ L)	Invitrogen	1 $\mu$ L	1 pmol/ $\mu$ L
Taq DNA polymerase	Promega	0.5 $\mu$ L	
d <sup>2</sup> H <sub>2</sub> O (滅菌精製水)		28 $\mu$ L	
		50 $\mu$ L	

**Table 15. PCR 反応条件**

ステップ	反応温度	反応時間	最終濃度
Initial denaturation	94°C	5 min.	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec.	35 cycles
Annealing	60°C	30 sec.	
Extension	72°C	30 sec.	
Final extension	72°C	7 min.	1 cycle
Soak	4°C	Indefinite	1 cycle

HDC, GAPDH とも同一条件

**Table 16. Primer 配列**

Gene type (species)	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Product size (bp)
HDC (mouse)	AGCACAAGCTGTCGTCCTTT	GTGGATCACGAAGACCCTGT	460 bps
GAPDH (mouse)	CCAAGGTCATCCATGACAAC	TTACTCCTTGGAGGCCACGT	422 bps

#### 1-1-10. 統計学的解析

第1章・第1節・1-1-6 に準じた

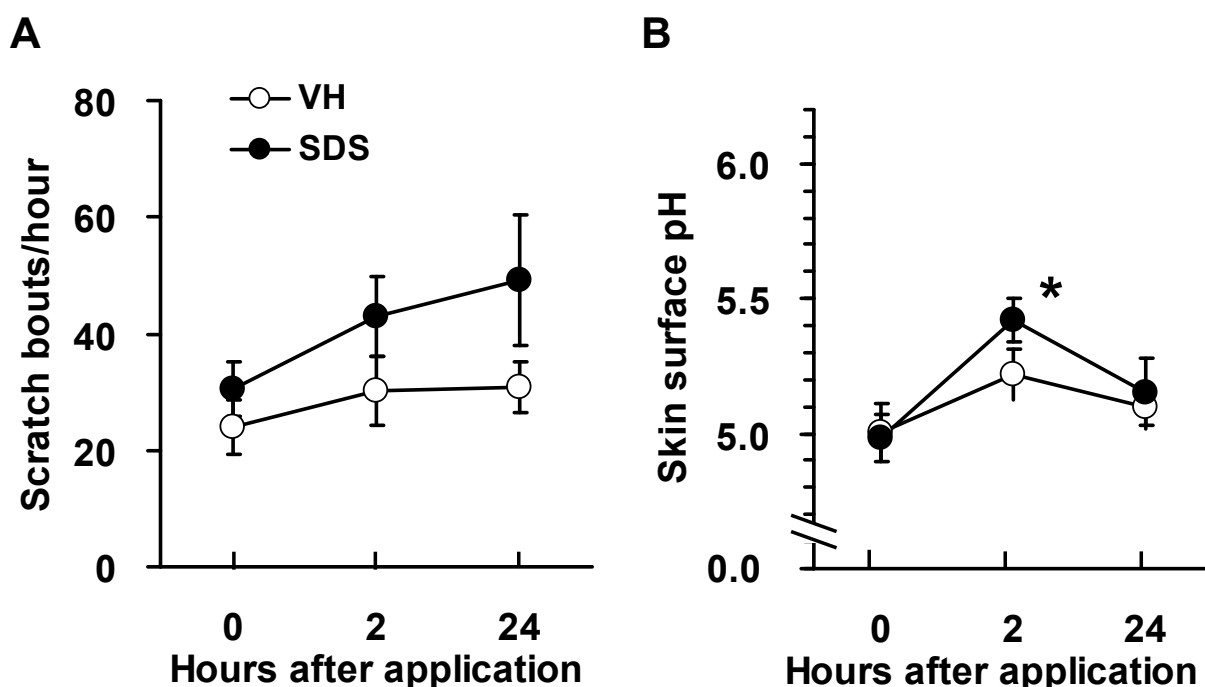


## 1-2. 実験結果

### 1-2-1. SDS 単回塗布による掻き動作および皮膚表面 pH への影響

第 1 章で行った同一の試験方法（第 1 章・第 1 節・1-1-3）を用いて、10% SDS の単回塗布が遅発性の掻き動作を誘発するか検討した。その結果、10% SDS の単回塗布は遅発性の掻き動作を誘発しなかった（Fig. 23A）。

10% SDS は塗布 2 時間後に vehicle（蒸留水）塗布と比較して有意な皮膚表面 pH の上昇を認めたが、塗布 24 時間後には塗布前レベル付近まで減少した（Fig. 23B）。



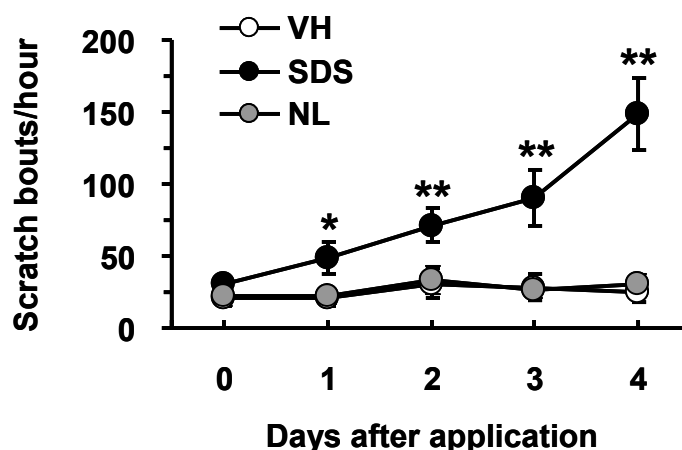
**Fig. 23. Effects of topical applications of sodium dodecyl sulfate (SDS) on scratching and pH of the skin surface in ICR mice.**

10% SDS or vehicle (VH, distilled water) was applied topically to the rostral part of the back in a volume of 50  $\mu$ L. (A) 10% SDS-induced scratching. Scratching bouts were counted for 1 hour before, and 2 and 24 hours after treatment. (B) Effects of 10% SDS on pH of the skin surface. Values represent the mean  $\pm$  SEM for eight animals. \* $P < 0.05$  vs. VH (Dunnett's test)

## 1-2-2. SDS 反復塗布による掻き動作, 皮膚炎, 皮膚乾燥の誘発, 皮膚表面 pH 変化

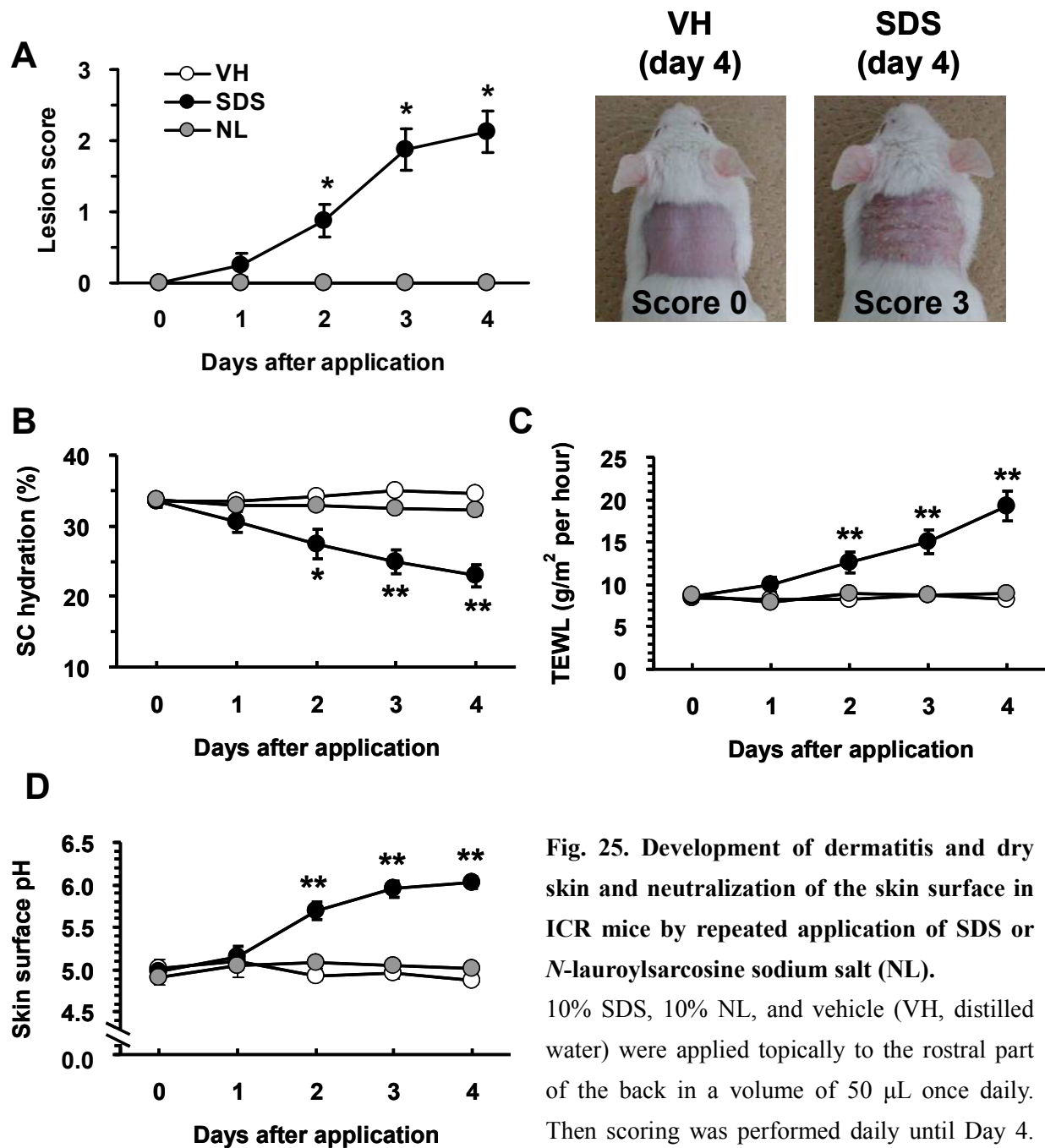
SDS はヒトや動物に皮膚炎や皮膚乾燥を誘発することが知られており (Wigger-Alberti et al., 2000; Agner and Serup, 1990), SDS が痒みを含む皮膚トラブルに関与していると推測される。しかし, SDS によって発生する痒みのメカニズムについては不明である。そこで, 予め刈毛・除毛した ICR マウスの吻側背部皮膚に 10% SDS (pH 6.5) を 1 日 1 回繰返し塗布し掻き動作を引き起こすか検討した。比較対照として 10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウム (pH 7.7) を用いた。

10% SDS を 1 日 1 回繰返して塗布すると, 各塗布前 (塗布 22-24 時間後) の掻き動作回数が塗布開始から少なくとも 4 日間経日的に増加した (Fig. 24)。皮膚炎スコア, 皮膚乾燥, 皮膚バリアの破壊の度合いも経日的に増大し, 皮膚表面 pH も経日的にアルカリ性側に移行した。これら 4 つのパラメーターが塗布開始 2 日後から vehicle (蒸留水) 塗布と比較して有意となったのに対して, 掻き動作回数の増加は塗布開始の翌日から有意となった (Fig. 25)。一方, 10%*N*-ラウロイルサルコシナトリウムはこれらのパラメーターに影響を及ぼさなかった (Figs. 24 and 25)。



**Fig. 24. SDS-induced scratching in ICR mice.**

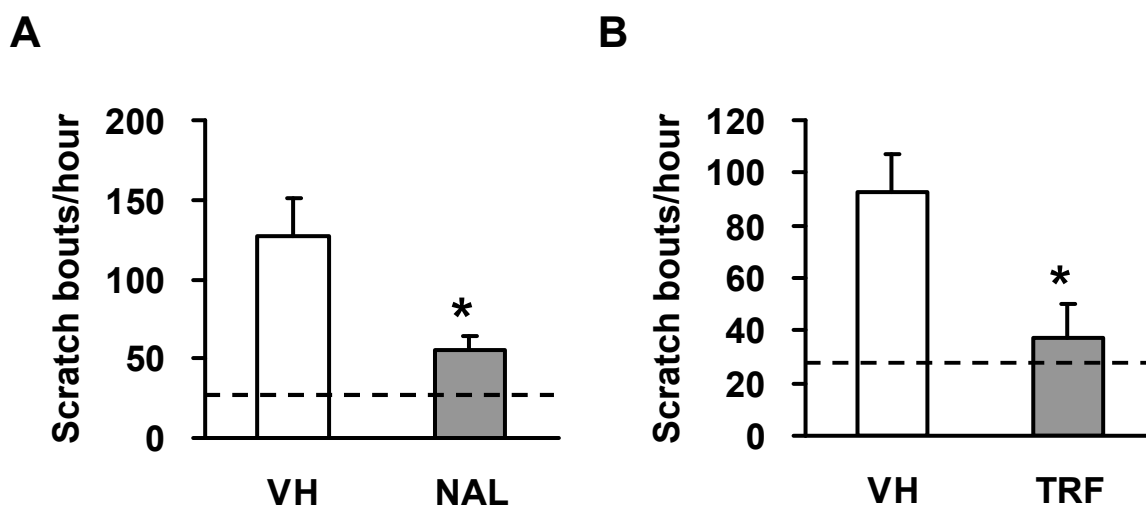
10% SDS, 10% *N*-lauroylsarcosine sodium salt (NL) or vehicle (VH, distilled water) was applied topically to the skin once daily and bouts of scratching were counted for 1 hour. Values represent the mean  $\pm$  SEM of six to eight animals. \*, \*\* $P < 0.05, 0.01$ , respectively, vs. VH (Dunnett's test).



**Fig. 25. Development of dermatitis and dry skin and neutralization of the skin surface in ICR mice by repeated application of SDS or *N*-lauroylsarcosine sodium salt (NL).** 10% SDS, 10% NL, and vehicle (VH, distilled water) were applied topically to the rostral part of the back in a volume of 50  $\mu$ L once daily. Then scoring was performed daily until Day 4. The effects of surfactants on skin severity score and clinical features (A), SC hydration (B), TEWL (C) and skin surface pH (D). Values represent the mean  $\pm$  SEM of eight animals. \*, \*\* $P < 0.05, 0.01$ , respectively, vs. VH (Dunnett's test).

### 1-2-3. SDS 反復塗布によって誘発される掻き動作に対する naloxone および terfenadine の影響

10% SDS を 1 日 1 回繰り返し塗布し、塗布 4 回目 (Day 3) の 24 時間後に観察される掻き動作に及ぼす  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬 naloxone および  $H_1$  ヒスタミン受容体遮断薬 terfenadine の影響を検討した。Naloxone および terfenadine は SDS 反復塗布によって誘発される掻き動作を vehicle 投与と比較して有意に抑制した (Fig. 26)。

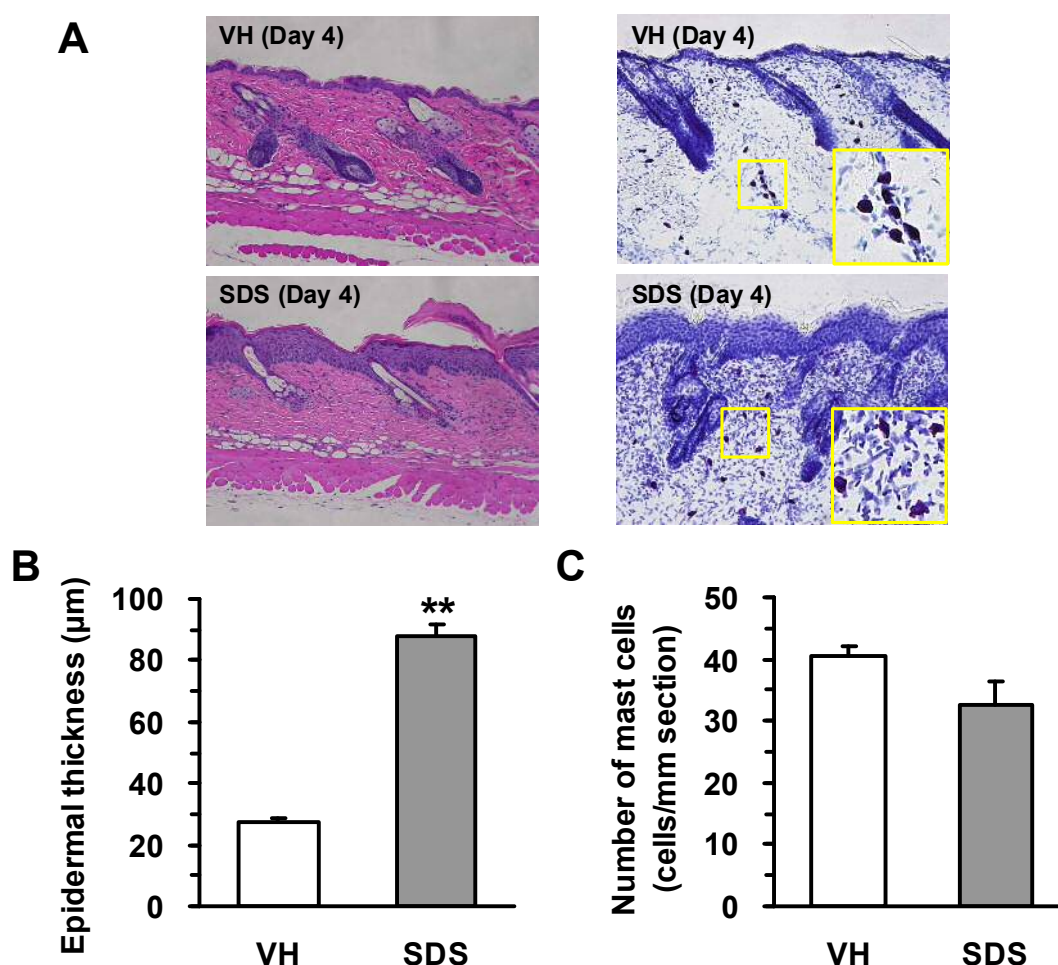


**Fig. 26. The effects of naloxone (NAL) and terfenadine (TRF) on SDS-induced scratching behavior.**

10% SDS was applied topically to the skin in ICR mice. SDS treatments were repeated once daily for 4 days. (A) NAL (1 mg/kg) or vehicle (VH, saline) was administered subcutaneously 15 min before the start of behavioral observations. (B) TRF (30 mg/kg) or vehicle (VH, tap water containing 0.5 % sodium carboxymethyl cellulose) was administered orally 30 min before the start of behavioral observations. A broken line denotes the number of scratching bouts in the water-treated group. Values represent the mean  $\pm$  SEM of seven to eight animals. \* $P < 0.05$  vs. VH (Student's  $t$ -test).

#### 1-2-4. SDS 反復塗布によって誘発される掻き動作発生時における組織学的検討

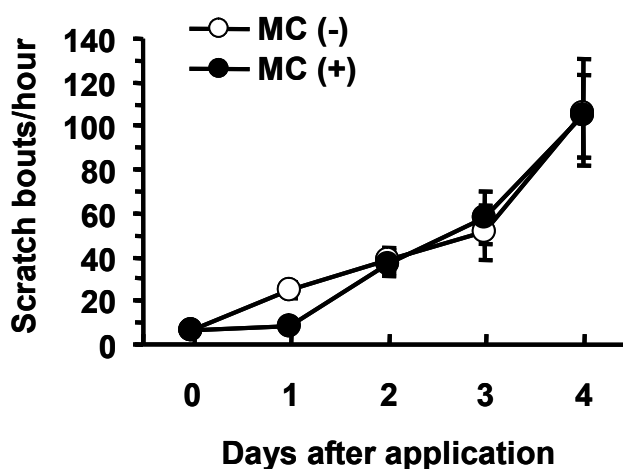
10% SDS を 1 日 1 回繰返し塗布し、塗布 4 回目 (Day 3) の 24 時間後に皮膚の病理組織学検討をおこなった。作製した皮膚切片 (各個体 2 切片) を HE 染色し、光学顕微鏡で観察・撮影 (field size: 662.0 × 879.3 μm) した。ランダムに選んだ 8-14 枚の各デジタル画像の最大表皮厚から平均値を算出し、その平均値をその群の表皮厚とした (Figs. 27A and 27B)。10% SDS の反復塗布は、vehilce (蒸留水) の反復塗布と比較して有意に表皮厚を増加した。TB 染色像から皮膚内のマスト細胞数を検討した。その結果、10% SDS の反復塗布は、真皮内のマスト細胞数に影響を及ぼさなかった (Fig. 27C)。



**Fig. 27. The change in epidermal thickness and the number of mast cells of the SDS-treated skin.** The skin was treated with vehicle (VH, distilled water) or 10% SDS for 4 days. (A) Hematoxylin and eosin staining (left panels) and toluidine blue staining (right panels) of the skin to which VH or SDS had been topically applied. Scale bar = 100 μm. (B) Epidermal thickness was measured in hematoxylin and eosin-stained sections. (C) Number of mast cells in the skin. Values represent the mean ± SEM of four animals. \*\* $P < 0.01$  vs. VH (Student's  $t$ -test).

### 1-2-5. マスト細胞欠損マウスにおける SDS 反復塗布によって誘発される掻き動作

予め除毛・剃毛しておいたマスト細胞欠損マウス (WBB6F1- $W/W^v$  マウス) およびその健常同腹仔マウス (WBB6F1-+/+ マウス) の吻側背部皮膚へ 10% SDS を 1 日 1 回繰返し塗布し、掻き動作を引き起こすか検討した。その結果、マスト細胞欠損マウスおよびその健常同腹仔マウスはともに経日的に掻き動作回数の増加を示した。また、両マウスの掻き動作回数は同程度であった (Fig. 28)。

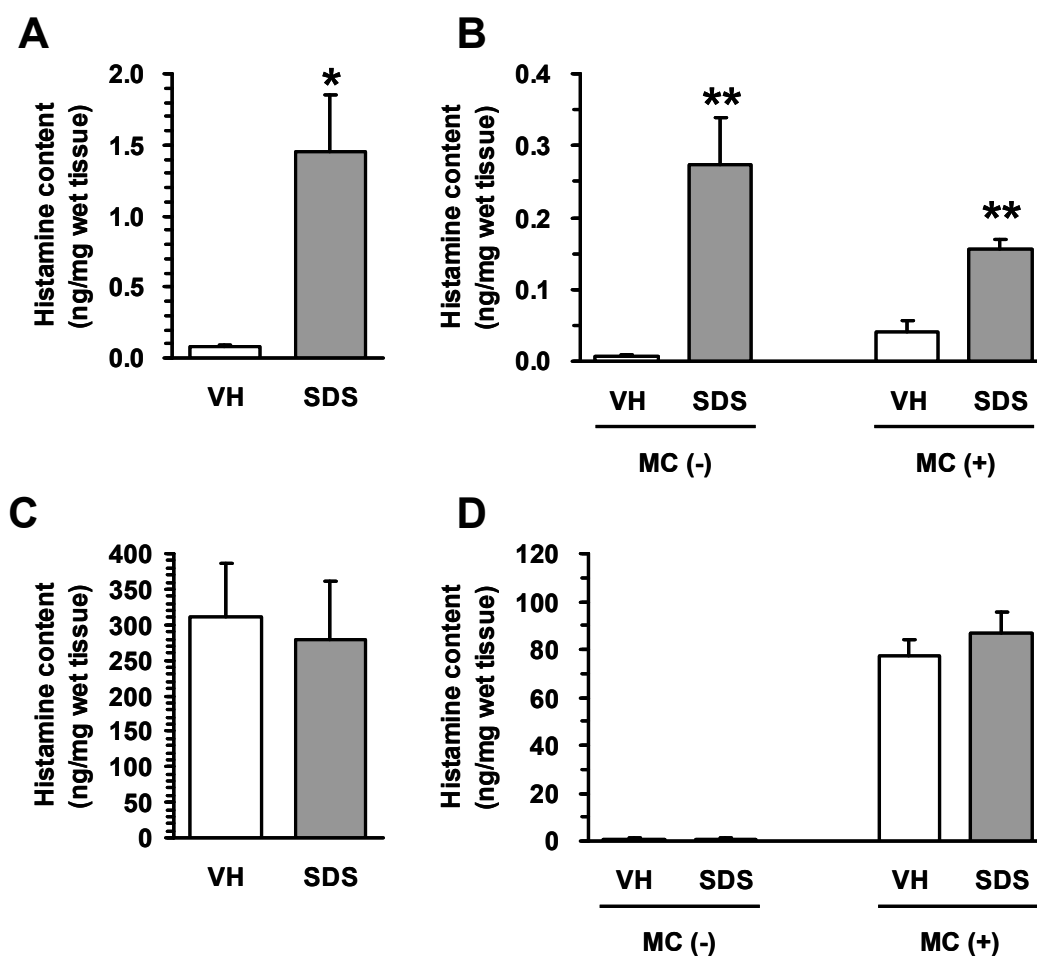


**Fig. 28. The effects of mast cell (MC) deficiency on SDS-induced scratching behavior.**

MC-deficient mice (WBB6F1- $W/W^v$ , open columns) and their normal littermates (WBB6F1-+/+, closed columns) received once daily application of 10% SDS to the skin for 4 days. Time-dependent change in scratching after repeated SDS treatment to the skin. Values represent the mean  $\pm$  SEM of six to seven animals.

### 1-2-6. SDS 反復塗布による皮膚内のヒスタミン含有量の変化

10% SDS を 1 日 1 回繰り返して塗布し、塗布 4 回目 (Day 3) の 24 時間後の ICR マウス、マスト細胞欠損マウスおよびその健常同腹仔マウスの表皮内および真皮内の histamine 含有量を測定した。その結果、10% SDS 反復塗布によっていずれのマウスにおいても表皮内の histamine 含有量は vehicle (蒸留水) の反復塗布と比較して有意に増加したが (Figs. 29A and 29B), 真皮内の histamine 含有量に変化はなかった (Figs. 29C and 29D)。

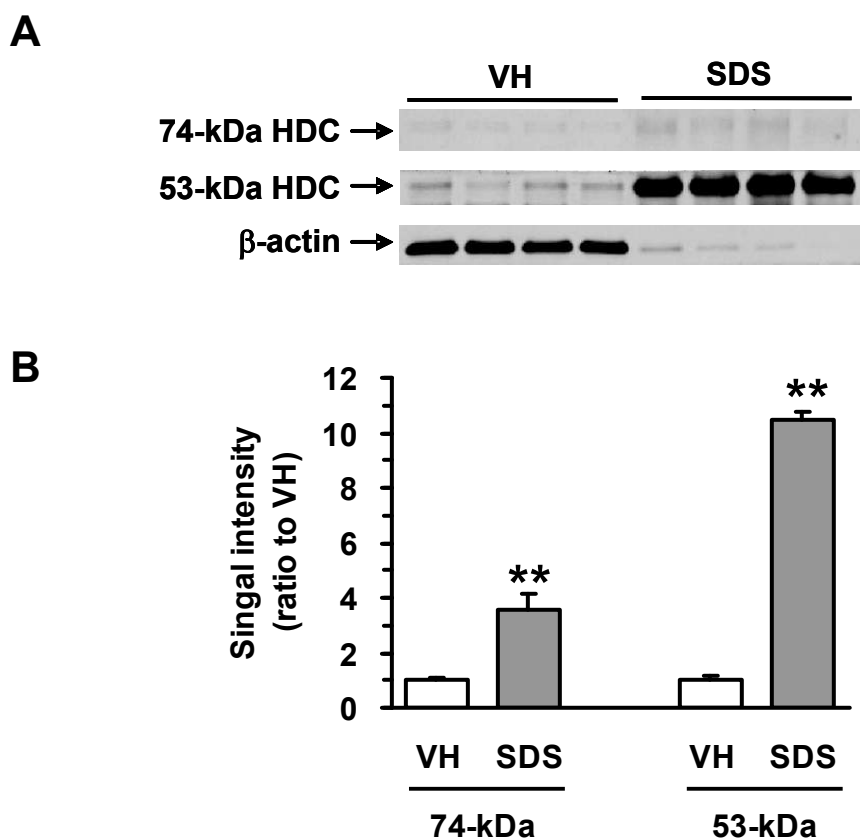


**Fig. 29. The change in histamine production in the epidermis and in the dermis of the SDS-treated skin.**

10% SDS was applied topically to the skin in ICR mice, mast cell (MC)-deficient mice (WBB6F1-*W/W<sup>v</sup>*) and their normal littermates (WBB6F1-*+/+*). 10% SDS, or vehicle (VH, distilled water) treatments were repeated once daily for 4 days. The histamine content in the epidermis (A and C) and in the dermis (B and D) was measured by enzyme immunoassay and was normalized by weight of tissues. Values present as the mean  $\pm$  SEM of four animals. \*, \*\*  $P < 0.05, 0.01$ , respectively, vs. VH (Student's *t*-test).

### 1-2-7. SDS 反復塗布による表皮内の HDC 発現量の変化

10% SDS を 1 日 1 回繰返し塗布し、塗布 4 回目 (Day 3) の 24 時間後の ICR マウスの表皮内の HDC 発現量を検討した。その結果、10% SDS の反復塗布は vehicle (蒸留水) の反復塗布と比較して 53-kDa HDC 発現量は 10.5 倍増加し、74-kDa HDC 発現量は 3.6 倍増加した (Fig. 30)。



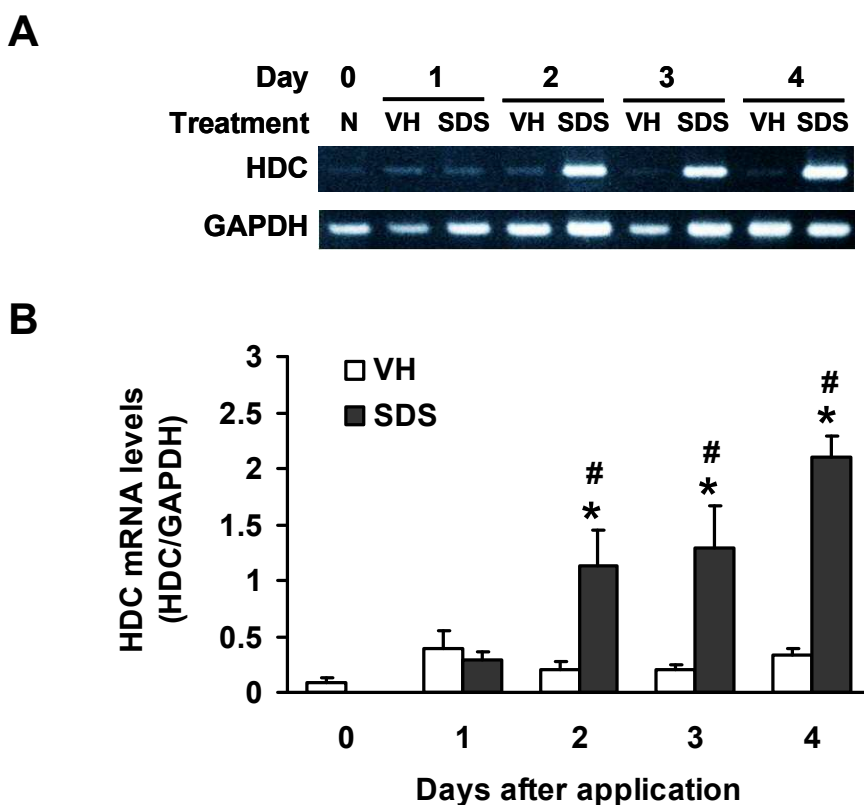
**Fig. 30. Effects of cutaneous repeated treatment of SDS on the expression of L-histidine decarboxylase (HDC) in the epidermis.**

ICR mice received once daily application of 10% SDS or vehicle (VH, distilled water) to the skin for 4 days. (A) The scanned images of western blots for HDCs (53 and 74-kDa) and  $\beta$ -actin in the epidermis. (B) Quantitative analysis of western blots for HDC in the epidermis. The density of immunoreactive bands associated with HDCs (53 and 74-kDa) was analyzed using Scion Image. Values present as the mean  $\pm$  SEM of four animals of ratio to vehicle. \*\* $P < 0.01$  vs. VH (Dunnett's test).



### 1-2-8. SDS 反復塗布による表皮内の HDC mRNA 発現量の変化

10% SDS の塗布前，開始 1 日後，2 日後，3 日後および 4 日後に ICR マウスの表皮を採取し，表皮内の HDC mRNA 発現量を検討した。その結果，HDC mRNA 発現量が 10% SDS の塗布開始 2 日後から vehicle（蒸留水）塗布と比較して有意となり少なくとも実験終了日までは持続的に増加していた（Fig. 31）。



**Fig. 31. The time-course change in L-histidine decarboxylase (HDC) mRNA expression in the epidermis of the SDS-treated skin.**

ICR mice received once daily application of 10% SDS or vehicle (VH, distilled water) to the skin for 4 days. In addition to the prior to the application (Day 0), total RNA from the epidermis was extracted 24 hours after SDS or vehicle application each day. (A) The typical examples of the bands of RT-PCR for the expression of HDC and GAPDH mRNAs in the epidermis. (B) Quantitative analysis of the bands of RT-PCR for HDC mRNA in the epidermis. The expression level was normalized to the level of GAPDH mRNA. Open and closed column show vehicle- and SDS-treated group, respectively. Values present as the mean  $\pm$  SEM of three to five animals. \* $P < 0.05$  vs. Day 0 (Dunnett's test), # $P < 0.05$  vs. VH on each day (Student's *t*-test).

### 1-3. 考察

#### SDS の検討濃度を 10% w/v にした理由

SDS による皮膚炎や皮膚乾燥の誘発作用は、SDS の暴露時間や暴露頻度に依存する (Agner and Serup, 1990)。Hos: HR-1 ヘアレスマウスに 10% SDS を 1 日 1 回繰り返し塗布すると皮膚炎、皮膚乾燥、皮膚バリア機能の破壊が誘発される (Baba et al., 2010)。また、第 1 章で検討したアニオン性界面活性剤自身の痒み誘発能のスクリーニング試験に用いた濃度も 10%であったことから、SDS 水溶液の検討濃度を 10% w/v と設定した。

#### 10% SDS の単回塗布が痒み関連行動を誘発しなかった結果について

10% SDS (pH 6.5) および 10%N-ラウロイルサルコシナトリウム (pH 7.7, 第 1 章) の単回塗布は急性の痒み関連行動を認めなかったが、10%ラウリン酸ナトリウム (pH 10.1) の単回塗布は急性の痒み関連行動を認めた (第 1 章)。この 10%ラウリン酸ナトリウムによって誘発された痒み関連行動には界面活性作用と水溶液のアルカリ性の 2 つの性質が関与していると示唆される (第 1 章)。これより 10% SDS の pH が中性付近であることから皮膚刺激性の強いアニオン性界面活性剤であったとしても健康皮膚への単回塗布では直接痒みを誘発する刺激とはなり得ず、皮膚刺激性と痒み誘発能は必ずしも一致しないのかもしれない。奥田と吉池 (2000) はアルカリ性界面活性剤水溶液 (pH 9) の角層バリア機能の破壊作用が、弱酸性界面活性剤水溶液 (pH 5) よりも強いことを示している。つまり、界面活性剤を長時間作用させた場合、アルカリ性の方が角層バリア機能の破壊を促し、界面活性剤の経皮吸収を促進させる可能性が考えられる。上記でも述べたが、第 1 章で 5 種類のアニオン性界面活性剤 (親油基が炭素数 12 の直鎖構造) の痒み誘発能を検討したが (Table 6)、その中で急性の痒み関連行動を誘発したのはラウリン酸ナトリウム (10%溶液が pH10.1) のみであった。残りの 4 種の 10%溶液の pH が 7.1-8.1 であったことから、10% SDS (pH6.5) の単回塗布が急性の痒み関連行動を誘発しなかった理由として界面活性剤水溶液の pH が関与していることを強く示唆する。

#### 10% SDS の反復塗布によって誘発される痒み関連行動と界面活性剤の皮膚刺激性

10% SDS の反復塗布は経日的に痒み関連行動を増強したが、10%N-ラウロイルサルコシナトリウムの反復塗布は痒み関連行動を誘発しなかった。10% SDS の反復塗布は皮膚炎、皮膚乾燥および皮膚バリア機能の崩壊を促したが 10%N-ラウロイルサルコシナトリウムの反復塗布はこれらに影響を及ぼさなかった。これより反復塗布の場合は、皮膚刺激性の強弱が痒み誘発に関与している可能性が考えられる。Miyamoto ら (2002) は予め刈毛・除毛しておいた ICR マウスの吻側背部皮膚に 1% SDS を脱脂綿に湿られて 60 秒間適用する処置を 1 日 2 回 (午前 9 時と午後 5 時) 繰り返し 5 日間行ったが処置 5 日目の掻き動作回数は増加しなかったと報告している。1% SDS の反復適用により皮膚バリア機能の破壊や皮膚乾燥が誘発される

ことから皮膚刺激性は確認され (Miyamoto et al., 2002), 皮膚バリア機能の破壊程度は, 適用方法が異なるため一概に比較できないが, 1% SDS の反復適用 5 日後の TEWL が約 20 g/m<sup>2</sup> per hour (Miyamoto et al., 2002) に対し 10% SDS の反復塗布 4 日後に TEWL が 19.3 g/m<sup>2</sup> per hour となった (Fig. 25C)。同程度の TEWL となるまでに要した時間が 10% SDS の方が短いことから, 10% SDS の皮膚バリア機能の破壊作用がより強いと考えられる。皮膚バリア機能の破壊が同程度でも 1% SDS の繰返し適用では掻き動作回数が増加しなかった (Miyamoto et al., 2002) ことから, SDS の濃度が掻き動作の誘発に関与していると示唆される。

#### 10% SDS の反復塗布によって誘発される痒み関連行動へのマスト細胞の関与

10% SDS の反復塗布によって誘発される痒み関連行動は H<sub>1</sub> ヒスタミン受容体遮断薬で抑制されたが, マスト細胞欠損では抑制されなかった。本研究では行動観察を 10% SDS 塗布 22-24 時間後に実施した。界面活性剤はマスト細胞の細胞膜や細胞質の変性を促し histamine を細胞外へ放出させる (Prottey and Ferguson, 1976)。マスト細胞の脱顆粒による histamine の放出は顆粒内の histamine が枯渇すれば放出されなくなることから持続的にマスト細胞が histamine を放出し続けるとは考え難い。これより, 10% SDS の反復塗布によって誘発される掻き動作にマスト細胞は少なからず関与していると推測されるが, 本研究デザインで検討した掻き動作 (10% SDS 塗布 22-24 時間後の掻き動作) に限って述べるとマスト細胞非依存的かつ histamine 依存的な痒み関連行動を観察したと思われる。そして, この経路は痒みの発生だけでなく痒みの増強や痒みの維持に重要な役割を果たしているとし唆される。

#### 10% SDS の反復塗布によって誘発される痒み関連行動への表皮内の histamine と表皮内の HDC の関与

10% SDS の反復塗布によって誘発される掻き行動はマスト細胞非依存的かつ histamine 依存的な経路が働いていることを見出し, 10% SDS の反復塗布が表皮内の histamine 含有量を増加させ, 74-kDa および 53-kDa HDC 発現量を vehicle (蒸留水) 群と比較してそれぞれ 3.6 倍, 10.5 倍に増加させた。つまり, 53-kDa HDC の増加率が高いことから HDC のプロセッシングが亢進していると考えられる。10% SDS の反復塗布は表皮内の HDC mRNA 発現量も増加させた。この HDC mRNA 発現量の増加を誘導した刺激が何かは今後の課題だが, 10% SDS の反復塗布による慢性の痒み発生のメカニズムに, 表皮内の HDC mRNA の増加とそれに伴う 74-kDa HDC 発現の増加, さらに HDC のプロセッシングの亢進により生成した 53-kDa HDC 発現の増加が関与していると思われる。その結果, histamine の産生が増加し, 遊離された histamine が主に 10% SDS の反復塗布によって誘発される慢性の痒みに関与することが示唆される。

この表皮内の histamine 含有量の増加に表皮肥厚が関与していると思われる。これまでに表皮肥厚による未分化ケラチノサイトの増殖が考えられ, ケラチノサイトの数自体の増加だけでなく, 未分化ケラチノサイトは分化ケラチノサイトよりも HDC mRNA 発現が増加してい

る (Fitzsimons et al., 2001) ことが報告されている。10% SDS の反復塗布により表皮の単位重量 [mg] あたりの histamine 含有量が増加していた (Figs. 29A and 29C)。つまり histamine 産生が亢進しており表皮肥厚が認められていることから表皮中に存在する histamine 含有量が多いことが類推できる。

#### 10% SDS の反復塗布による表皮内の $\beta$ -actin 発現量に著しい減少について

本研究において 10% SDS の反復塗布によって表皮内の $\beta$ -actin 発現量に著しい減少が観察された。Human papillomavirus をトランスフェクションし、不死化したヒトケラチノサイトにおいても同様の現象が確認されている (Yue et al., 2011)。このヒト不死化ケラチノサイトの細胞増殖は、casein kinase 2-MEK-extracellular signal-regulated kinase-Rho pathway を介したアクチン細胞骨格繊維の形成によっておこなわれている (Yue et al., 2011)。この経路が 10% SDS によって誘発される細胞増殖に関与しているかもしれない。 $\beta$ -actin は細胞骨格に関わるタンパクであり、多くの実験で内因性コントロールとして用いられている。しかし、10% SDS の反復塗布においては内因性コントロールとして用いることは適していないと思われた。そのため、74-kDa と 53-kDa HDC の発現量はそれぞれのバンドの定量値によって評価した。この $\beta$ -actin 発現量の著しい減少理由の詳細は不明だが、少なくとも細胞へのダメージが大きいことは推測できる。

#### 10% SDS の反復塗布によって誘発される痒み関連行動への皮膚表面 pH のアルカリ化の関与

10% SDS の反復塗布によって皮膚炎や皮膚乾燥が誘発された。皮膚炎や皮膚乾燥によって皮膚表層の恒常性が崩壊され、その結果、皮膚表面 pH が健常時の弱酸性 (Jolly et al., 1961) から中性付近まで移行したと考えられる。第 1 章で 10%ラウリン酸ナトリウムの単回塗布によって誘発される痒み関連動作はラウリン酸ナトリウムの界面活性作用とアルカリ性の両作用が痒み発生に関与すると示唆している。つまり、ラウリン酸ナトリウムの塗布自体が痒みを発生し得る刺激となり得ることを見出したが、10% SDS の反復塗布は、SDS の界面活性作用に結果的に皮膚表面 pH の中和が加わることで痒みを誘発したと考えられる。

## 第2節 SDS 反復塗布の表皮内神経線維分布への影響

10% SDS の反復塗布によって誘発される掻き動作に表皮ケラチノサイト内での histamine 産生が関与していることを明らかにした。アトピー性皮膚炎，乾皮症，乾癬，腎疾患，胆汁うっ滞性肝障害などの抗 histamine 薬抵抗性の皮膚疾患では，知覚神経線維の表皮内侵入，バリア機能の低下により外的刺激に対して過敏な皮膚状態になっている。つまり，痒みを伝える求心性インパルスが生じやすい知覚過敏状態にあると考えられる。洗浄力の強いアニオン性界面活性剤 SDS の反復適用はヒトや動物において皮膚炎や皮膚乾燥を誘発する (Effendy and Maibach, 1995; Agner and Serup, 1990; Moon et al., 2001)。また，本研究から 10% SDS の反復塗布が慢性の痒みを誘発することも分かった。SDS 誘発皮膚炎や SDS 誘発皮膚乾燥の増悪とともに掻き動作回数が増えていることから，難治性の痒みを呈する皮膚疾患と同様表皮内知覚神経線維の増加が生じているのではないかと推測できる。

表皮内への神経線維の侵入は表皮内の神経伸長因子と神経反発因子のバランスによって調節されており，健全皮膚では神経反発因子が優位となっているため表皮内への神経伸長はほとんど観察されない (Jarvikallio et al., 2003)。しかし，持続的な痒みを感じる乾燥肌患者やアトピー性皮膚炎患者では神経伸長因子が優位となり，表皮内へ感覚神経が侵入している (Jarvikallio et al., 2003)。神経線維の表皮内侵入メカニズムの一つとしてケラチノサイトの産生する nerve growth factor (NGF) の増加が関与し (Horiuchi et al., 2005; Tominaga et al., 2007)，表皮内の神経反発因子である semaphorin3A 発現の減少が関与している (Tominaga et al., 2008)。

そこで，本節では SDS の反復塗布によって知覚神経線維の表皮内侵入が誘導されているかの検討と，神経伸長に関わる神経伸長因子である NGF と神経反発因子である semaphorin3A について免疫組織化学染色法を用いて検討した。

## 2-1. 実験材料及び実験方法

### 2-1-1. 実験動物

第1章・第1節・1-1-1 に準じた。

### 2-1-2. 使用薬物

第3章・第1節・1-1-2 に準じた。

### 2-1-3. 免疫組織学的検討

マウスを sodium pentobarbital (80 mg/kg, intraperitoneally) で麻酔し、開胸後、心血液循環系を利用して PBS で十分に灌流し、脱血後 4% paraformaldehyde で再灌流し組織の前固定を行った。その後、界面活性剤適用部位を採取し、4% paraformaldehyde に 4°C で 12 時間（最低 4 時間以上）浸漬固定を行った。その後、凍結時にできる氷晶による組織傷害を防ぐために組織を、30%スクロースを含む PBS に浸し 4°C で 2 日間放置し、スクロース置換を行った。その皮膚を OTC-コンパウンド (Tissue Tek<sup>®</sup>, サクラ精機, 東京) に包埋後、-80°C にて凍結し、クリオスタット (model CM1850; Leica, Nußloch, Germany) にて皮膚切片 (切片厚 40 μm) を作製した。

各抗体および希釈溶媒 (希釈率), 反応時間, 反応温度を Table 17-19 に示した。

**Table 17. Nerve growth factor (NGF) の免疫蛍光組織染色に使用した抗体と反応条件**

	抗体名	希釈溶媒 (希釈率)	反応 時間	反応 温度
1 次 抗体	Rabbit polyclonal anti-NGF antibody (Cat# AB1526, Millipore, Billerica, MA, USA)	Can Get Signal A (1/100; Toyobo)	24-48 h	4°C
2 次 抗体	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Cat# A21206, Invitrogen)	Can Get Signal A (1/1000)	2 h	室温

**Table 18. Semaphorin3A の免疫蛍光組織染色に使用した抗体と反応条件**

	抗体名	希釈溶媒 (希釈率)	反応 時間	反応 温度
1 次 抗体	Goat polyclonal anti-semaphorin3A antibody [Cat# (N-15) sc-1148, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA]	Can Get Signal B (1/100; Toyobo)	24-48 h	4°C
2 次 抗体	Alexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG antibody (Cat# A11055, Invitrogen)	Can Get Signal B (1/1000)	2 h	室温

**Table 19. Protein gene product 9.5 (PGP9.5) の免疫蛍光組織染色に使用した抗体と反応条件**

	抗体名	希釈溶媒 (希釈率)	反応 時間	反応 温度
1 次 抗体	Rabbit polyclonal anti-PGP9.5 antibody (Cat# RA95101, Ultraclone, Isle of Wight, UK)	1.5% FBS を含む PBS-T (1/1000)	24-48 h	4°C
2 次 抗体	Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Cat# A21206)	1.5% FBS を含む PBS-T (1/1000)	2 h	室温

1 次抗体反応後および 2 次抗体反応後には TBS で洗浄 (10 min × 3) を行った。2 次抗体反応後の洗浄操作終了後に、皮膚切片をスライドガラスに貼り付け、スライドガラスに固着したことを確認後、封入剤を滴下しカバーガラスで覆い、固化するまで遮光しながら 4°C で水平に保ちプレパラートを作製した。共焦点レーザ走査型顕微鏡 (model TCS-SP5; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) で観察・撮影 (field size: 662.0 × 879.3 μm) した。

各抗原 (PGP9.5, NGF, semaphorin3A) に対する皮膚切片を vehicle 処置群および 10% SDS 処置群それぞれ 2 枚ずつ作製した。各切片から無作為に 4-8 画像 (magnification: ×20) を撮影した。Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて、定量的画像解析を行った。

#### 2-1-4. 統計学的解析

第 1 章・第 1 節・1-1-6 に準じた。

## 2-2. 実験結果

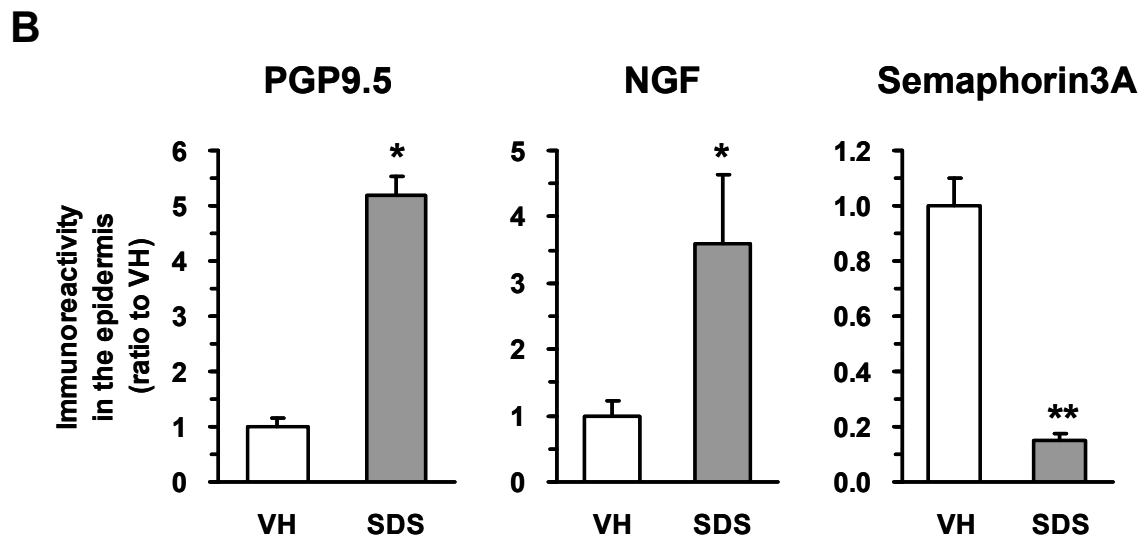
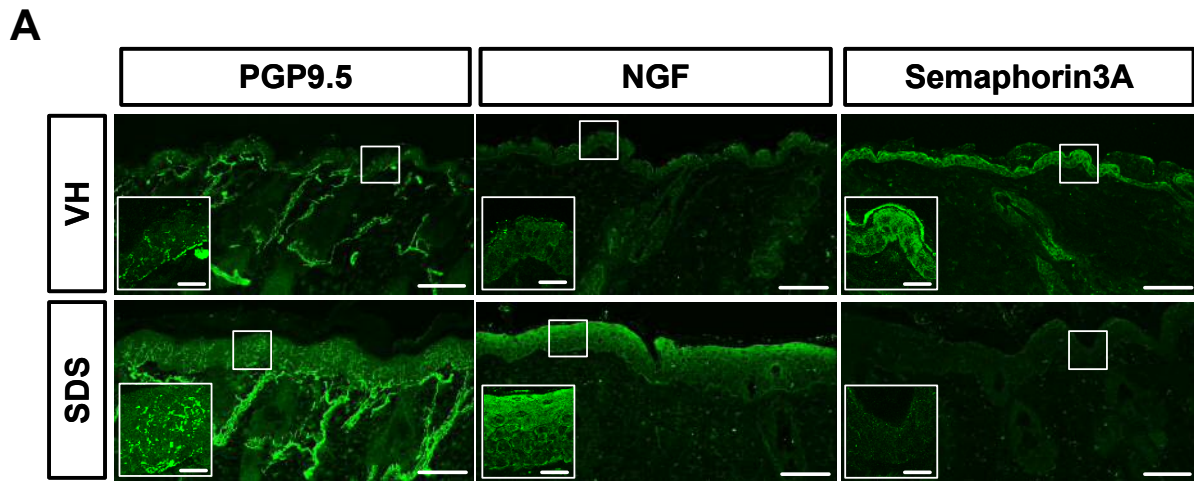
### 2-2-1. 表皮内神経線維の制御機構に対する SDS の効果

10% SDS を 1 日 1 回繰返し塗布し、塗布 4 回目 (Day 3) の 24 時間後に ICR マウスの吻側背部皮膚を採取した。採取した皮膚の皮膚切片を pan-axonal marker PGP9.5 (Thompson et al., 1983), NGF と semaphorin3A に対する各々の抗体で免疫組織染色した。

10% の SDS の反復塗布は vehicle (蒸留水) の反復塗布と比較して表皮内の神経成長因子 NGF が顕著に増加し、神経反発因子 semaphorin3A が顕著に減少し、表皮内の PGP9.5 陽性神経線維の数が有意に増加した (Fig. 32)。

NGF 発現は、特に基底層よりも上層の有棘層、顆粒層で強く誘導された。





**Fig. 32. Immunoreactivity for PGP9.5, NGF and semaphorin3A in the SDS-treated skin.**

ICR mice received once daily application of 10% SDS or vehicle (VH, distilled water) to the skin for 4 days. Skin sections were immunostained with anti-PGP9.5, anti-NGF and anti-semaphorin3A antibodies. (A) Typical images of immunohistochemical staining of PGP9.5, NGF and semaphorin3A in the skin (scale bar = 100  $\mu$ m). Insets depict higher magnification of the image delineated by the rectangles (scale bar = 20  $\mu$ m). (B) Quantitative analysis of immunoreactivities in the epidermis. Values present as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  or 4) of ratio to VH. \*, \*\* $P < 0.05$ , 0.01, respectively, vs. VH (Student's  $t$ -test).

## 2-3. 考察

### 10% SDS の反復塗布によって誘発された表皮内への神経伸長について

アトピー性皮膚炎などの難治性掻痒を生じる慢性炎症性皮膚疾患 (Stander and Steinhoff, 2002) の表皮内には知覚神経線維の侵入が認められ、皮膚の過敏性を高めている (Lonne-Rahm et al., 2004)。神経線維の表皮内侵入メカニズムの一つとして、神経伸長因子と神経反発因子の量的バランスの制御がある (Ikoma et al., 2006; Tominaga et al., 2008)。神経線維の表皮内侵入に関与する因子は軸索ガイダンス分子と呼ばれ、神経伸長因子として NGF, amphiregulin, gelatinase, artemin, 神経反発因子として semaphorin3A (Negi et al., 2012), anosmin-1 (Tengara et al., 2010) などが知られている。

健康皮膚の表皮内では神経反発因子が優位となっているため、表皮内への神経線維の侵入を抑制している。その結果、神経線維の終末は表皮基底膜近傍にとどまっているが、アトピー性皮膚炎などの表皮内では神経伸長因子が優位となっているため (Raychaudhuri et al., 1998; Kinkelin et al., 2000), 神経線維が表皮内へ侵入する (Urashima and Mihara, 1998; Steinhoff et al., 2003; Dou et al., 2006)。表皮内に侵入した神経線維は CGRP や substance P などの神経ペプチドを発現しており (Naukkarinen et al., 1989; Chan et al., 1997), 少なからず刺激への反応性が亢進していると考えられ、痒み刺激に対する反応性も変化していると推測される。

10% SDS の反復塗布は、表皮内の NGF の発現を増加し、semaphorin3A の発現を減少した。神経伸長因子と神経反発因子のバランスが崩れた結果、表皮内への神経線維が侵入したと思われる。Histamine 刺激によりヒト由来ケラチノサイトにおいて NGF 産生が亢進する (Kanda and Watanabe, 2003)。また、histamine 刺激によりマウス由来ケラチノサイトにおいて semaphorin3A 発現を抑制する (Ohsawa and Hirasawa, 2012) ことから、10% SDS の反復塗布によって増加した表皮内の histamine が表皮内への神経伸長に関与しているとかもかもしれない。

まとめると、10% SDS の反復塗布は外部刺激に対する反応性が亢進した敏感皮膚の形成を促し、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。

### NGF と表皮肥厚について

NGF は表皮ケラチノサイトの増殖に関わっているが、マウスにおいては毛周期によってその作用が異なる (Paus et al., 1994)。マウスの皮膚の組織培養において、NGF 刺激によって表皮ケラチノサイトの増殖が、ヘアサイクルが休止期の皮膚で確認されるのに対し、成長期の皮膚では表皮ケラチノサイトの増殖を抑制し、この抑制が NGF の中和抗体で阻害される (Paus et al., 1994)。本研究ではマウスのヘアサイクルが休止期に刈毛・除毛し試験に用いているため NGF による表皮肥厚が観察されたのかもかもしれない。NGF 産生にはケラチノサイトへの histamine 刺激が関与するが (Kanda and Watanabe, 2003), 本研究において観察された表皮内の histamine 産生の増加と表皮内の NGF 発現量の増加との関係性は不明であり、今後の課題である。

## 第2章・小括

- 10% SDS の単回塗布は痒み関連行動を誘発しなかった。これより 10% SDS の単回塗布は直接的に痒みを発生する刺激になり得なかった。
- 10% SDS 反復塗布は皮膚炎、皮膚乾燥および皮膚バリア機能の崩壊を誘発した。
- 10% SDS 反復塗布によって誘発された掻き動作は naloxone および terfenadine で抑制されたが、マスト細胞欠損では抑制されなかった。
- 10% SDS 反復塗布は表皮内の histamine 含有量を増加させ、74-kDa および 53-kDa HDC 発現量を増加させた。
- 10% SDS 反復塗布は表皮内の HDC mRNA 発現量を増加させた。
- 10% SDS 反復塗布は表皮内の NGF 発現量を増加させ、表皮内の semaphorin3A 発現量を減少させ、表皮内の PGP9.5 陽性神経線維を増加させた。

以上より、10% SDS の反復塗布は、表皮内で HDC mRNA 発現の増加と 74kDa HDC 発現量の増加、および HDC のプロセッシングの亢進を介した 53kDa HDC 発現量の増加を促した。その結果、histamine 合成が促進され、合成された histamine が痒み反応に関係していると示唆される。10% SDS の反復塗布は皮膚炎や皮膚乾燥を誘発した。皮膚の恒常性が崩壊した結果、皮膚表面 pH のアルカリ化が生じたと思われる。そして結果的に、皮膚表面の中和と SDS の界面活性作用が組合わされることで痒みの発生や、痒みの維持が生じたと考えられる。さらに、10% SDS の反復塗布によって外部刺激に対する反応性が亢進した敏感皮膚を形成することを見出した。この敏感皮膚の状態が表皮内 histamine による痒みを増強したと推測される。

## 総括

本研究で得られた成果を以下にまとめる。

- 1) アニオン性界面活性剤のラウリン酸ナトリウムの単回塗布が直接痒みを誘発する刺激となり得ることを明らかにした。その痒みの発生メカニズムにマスト細胞というよりむしろケラチノサイトにおける HDC の活性化を介した histamine 産生が関与することを見出した。
- 2) Chlorogenic acid の塗布はラウリン酸ナトリウム誘発の急性の痒み反応を抑制した。Chlorogenic acid の鎮痒作用はラウリン酸ナトリウムによって誘発された表皮内の 53-kDa HDC の発現の増加と表皮内の histamine の産生増加の抑制であることを明らかにした。
- 3) アニオン性界面活性剤の SDS の単回塗布は痒み反応を誘発しなかったが、反復塗布は慢性の痒み反応を誘発した。その慢性の痒み発生に表皮内の HDC mRNA の増加と 74-kDa HDC の増加、HDC のプロセッシングの亢進を介して生成した 53-kDa HDC の増加によって産生亢進された histamine が主に関与することを明らかにした。また、SDS の反復塗布は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を見出した。これらが複合的に作用して痒みの発生、増強、維持が生じることを示した。

本研究により、一部のアニオン性界面活性剤が直接痒みを誘発する刺激となり得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、使用後の皮膚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、表皮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有用かつ有効であると示唆される。

## 謝辞

本研究に関し、終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました富山大学大学院 医学薬学研究部 応用薬理学研究室の倉石 泰 教授に謹んで深厚なる感謝の意を表します。また、終始多くの貴重なご助言ならびにご指導を賜りました同大学大学院 医学薬学研究部（薬学）応用薬理学研究室の安東 嗣修 准教授、佐々木 淳 助教に心より深く感謝申し上げます。

副査として貴重なご助言を賜りました同大学大学院 医学薬学研究部（医学）皮膚科学講座の清水 忠道 教授、同大学大学院 和漢医薬学総合研究所 消化管生理学研究室の門脇 真 教授、同大学大学院 医学薬学研究部（薬学）薬物治療学研究室の新田 淳美 教授に心より感謝申し上げます。

本研究は富山大学ならびにホーユー株式会社総合研究所において行われたものであり、本研究の機会を与えて下さいました同社に深く感謝申し上げます。

お世話になりながらもここにお名前を言上することができなかつた同大学大学院 医学薬学教育部 応用薬理学研究室の皆様や同社の多くの方々に心から厚くお礼申し上げます。

最後に、社会人と学生の両立および毎月の富山での単身赴任による研究生生活を終始にわたり応援し、陰ながら支え続けてくれた家族に心より感謝申し上げます。

2013 年 4 月

## 参考文献

- Agner T, Serup J., (1990). Sodium lauryl sulphate for irritant patch testing—a dose–response study using bioengineering methods for determination of skin irritation. *J Invest Dermatol.* **95**, 543–547.
- Alenmyr L, Högestätt ED, Zygmunt PM, Greiff L., (2009). TRPV1-mediated itch in seasonal allergic rhinitis. *Allergy.* **64**, 807–810.
- Ananthapadmanabhan KP, Moore DJ, Subramanyan K, Misra M, Meyer F., (2004). Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol Ther.* **17**, 16–25.
- Andoh T, Kuraishi Y., (1998). Intradermal leukotriene B<sub>4</sub>, but not prostaglandin E<sub>2</sub>, induces itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol.* **353**, 93–96.
- Andoh T, Kuraishi Y., (2003). Nitric oxide enhances substance P-induced itch-associated responses in mice. *Br J Pharmacol.* **138**, 202–208.
- Andoh T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y., (1998). Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **286**, 1140–1145.
- Andoh T, Saito A, Kuraishi Y., (2009). Leukotriene B<sub>4</sub> mediates sphingosylphosphorylcholine-induced itch-associated responses in mouse skin. *J Invest Dermatol.* **129**, 2854–2860.
- Andoh T, Yageta Y, Takeshima H, Kuraishi Y., (2004). Intradermal nociceptin elicits itch-associated responses through leukotriene B<sub>4</sub> in mice. *J Invest Dermatol.* **123**, 196–201.
- Andoh T, Zhang Q, Yamamoto T, Tayama M, Hattori M, Tanaka K, Kuraishi Y., (2010). Inhibitory effects of the methanol extract of *Ganoderma lucidum* on mosquito allergy-induced itch-associated responses in mice. *J Pharmacol Sci.* **114**, 292–297.
- Andrews K, Mowlavi A, Milner SM., (2003). The treatment of alkaline burns of the skin by neutralization. *Plast Reconstr Surg.* **111**, 1918–1921.
- Aoi R, Nakashima I, Kitamura Y, Asai H, Nakano K., (1989). Histamine synthesis by mouse T lymphocytes through induced histidine decarboxylase. *Immunology.* **66**, 219–223.
- Ayres S Jr., (1964). The fine art of scratching. *JAMA.* **189**, 1003–1007.
- Baba H, Masuyama A, Yoshimura C, Aoyama Y, Takano T, Ohki K., (2010). Oral intake of *Lactobacillus helveticus*-fermented milk whey decreased transepidermal water loss and prevented the onset of sodium dodecylsulfate-induced dermatitis in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**, 18–23.
- Berne B, Boström A, Grahnén AF, Tammela M., (1996). Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish Medical Products Agency 1989-1994. *Contact Dermatitis* **34**, 359–362.
- Bernstein JE, Swift RM, Soltani K, Lorincz AL., (1982). Antipruritic effect of an opiate antagonist,

- naloxone hydrochloride. *J Invest Dermatol.* **78**, 82–83.
- Blank IH., (1952). Factors which influence the water content of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* **18**, 433–440.
- Bull HA, Hothersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM., (1996). Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* **106**, 655–660.
- Chan J, Smoller BR, Raychauduri SP, Jiang WY, Farber EM., (1997). Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* **289**, 611–616.
- Chikakane K, Takahashi H., (1995). Measurement of skin pH and its significance in cutaneous diseases. *Clin Dermatol.* **13**, 299–306.
- Corazza M, Lauriola MM, Zappaterra M, Bianchi A, VirgiliSurfactants A., (2010). Surfactants, skin cleansing protagonists. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **24**, 1–6.
- Church MK, Okayama Y, El-Lati S., (1991). Mediator secretion from human skin mast cells provoked by immunological and non-immunological stimulation. *Skin Pharmacol.* **4**, 15–24.
- Davidson S, Zhang X, Yoon CH, Khasabov SG, Simone DA, Giesler GJ Jr., (2007). The itch-producing agents histamine and cowhage activate separate populations of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurosci.* **27**, 10007–10014.
- Davidson S, Giesler GJ., (2010). The multiple pathways for itch and their interactions with pain. *Trends Neurosci.* **33**, 550–558.
- Demartini DR, Wlodawer A, Carlini CR., (2007). A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. *J Exp Bot.* **58**, 521–532.
- Denda M, Inoue K, Fuziwara S, Denda S., (2002). P2X purinergic receptor antagonist accelerates skin barrier repair and prevents epidermal hyperplasia induced by skin barrier disruption. *J Invest Dermatol.* **119**, 1034–1040.
- Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin SD, LeCiel C, Waggie K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J, Gross JA., (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol.* **5**, 752–760.
- Dou YC, Hagstromer L, Emtestam L, Johansson O., (2006). Increased nerve growth factor and its receptors in atopic dermatitis: an immunohistochemical study. *Arch Dermatol Res.* **298**, 31–37.
- Ebertz JM, Hirshman CA, Kettelkamp NS, Uno H, Hanifin JM., (1987). Substance P-induced histamine release in human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol.* **88**, 682–685.
- Effendy I, Maibach HI., (1995). Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact*

- Dermatitis*. **33**, 217–225.
- Endo Y., (1989). Induction of histidine and ornithine decarboxylase activities in mouse tissues by recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Biochem Pharmacol.* **38**, 1287–1292.
- Endo Y, Kikuchi T, Nakamura M., (1992). Ornithine and histidine decarboxylase activities in mice sensitized to endotoxin, interleukin-1 or tumour necrosis factor by D-galactosamine. *Br J Pharmacol.* **107**, 888–894.
- Ezzat MH, Hasan ZE, Shaheen KY., (2011). Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* **25**, 334–339.
- Falcone FH, Zillikens D, Gibbs BF., (2006). The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp Dermatol.* **15**, 855–864.
- Ferguson J, MacDonald KJ, Kenicer KJ., (1985). Terfenadine and placebo compared in the treatment of chronic idiopathic urticaria: a randomised double-blind study. *Br J Clin Pharmacol.* **20**, 639–641.
- Fitzsimons C, Engel N, Durán H, Policastro L, Cricco G, Martín G, Molinari B, Rivera E., (2001). Histamine production in mouse epidermal keratinocytes is regulated during cellular differentiation. *Inflamm Res.* **50** Suppl 2, S100–101.
- Fjellner B, Hägermark O., (1981). Studies on pruritogenic and histamine-releasing effects of some putative peptide neurotransmitters. *Acta Derm Venereol.* **61**, 245–250.
- Fjellner B, Hägermark O., (1985). Experimental pruritus evoked by platelet activating factor (PAF-acether) in human skin. *Acta Derm Venereol.* **65**, 409–412.
- Groot A. C., Nater J. P., Van der Lende R., Rijcken B., (1987). Adverse effects of cosmetics and toiletries: a retrospective study in the general population. *Int J Cosmet Sci.* **9**, 255–259.
- Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM., (2003). pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol.* **121**, 345–353.
- Hägermark O, Hökfelt T, Pernow B., (1978). Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol.* **71**, 233–235.
- Hirasawa N, Murakami A, Ohuchi K., (2001). Expression of 74-kDa histidine decarboxylase protein in a macrophage-like cell line RAW 264.7 and inhibition by dexamethasone. *Eur J Pharmacol.* **418**, 23–28.
- Höcker M, Henihan RJ, Rosewicz S, Riecken EO, Zhang Z, Koh TJ, Wang TC., (1997). Gastrin and phorbol 12-myristate 13-acetate regulate the human histidine decarboxylase promoter through Raf-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-related signaling pathways in gastric cancer cells. *J Biol Chem.* **272**, 27015–27024.
- Horiuchi Y, Bae S, Katayama I., (2005). Nerve growth factor (NGF) and epidermal nerve fibers in



- atopic dermatitis model NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* **39**, 56–58.
- Ichikawa A, Funakoshi E, Tanaka S, Nemoto K, Fukui T., (1998). Benzamidine-sensitive proteinase in activated cleavage of recombinant 74-kDa histidine decarboxylase into its 53-kDa form in mastocytoma cells. *Inflamm Res.* **47** Suppl 1, S46–47.
- Ichikawa A, Sugimoto Y, Tanaka S., (2010). Molecular biology of histidine decarboxylase and prostaglandin receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* **86**, 848–866.
- Ikoma A, Fartasch M, Heyer G, Miyachi Y, Handwerker H, Schmelz M., (2004). Painful stimuli evoke itch in patients with chronic pruritus: central sensitization for itch. *Neurology.* **62**, 212–217.
- Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M., (2006). The neurobiology of itch. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 535–547.
- Imokawa G, Akasaki S, Hattori M, Yoshizuka N., (1986). Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol.* **87**, 758–761.
- Imokawa G, Akasaki S, Minematsu Y, Kawai M., (1989). Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res.* **281**, 45–51.
- Imokawa G, Kuno H, Kawai M., (1991). Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol.* **96**, 845–851.
- Imokawa G, Mishima Y., (1979). Cumulative effect of surfactants on cutaneous horny layers: lysosome labilizing action. *Contact Dermatitis.* **5**, 151–162.
- Imokawa G, Mishima Y., (1981). Cumulative effect of surfactants on cutaneous horny layers: lysosomal activity of human keratin layers in vivo. *Contact Dermatitis.* **7**, 65–71.
- Imokawa G, Sumura K, Katsumi M., (1975). Study on skin roughness caused by surfactants: II. Correlation between protein denaturation and skin roughness. *J Am Oil Chem Soc.* **52**, 484–489.
- Inagaki N, Nagao M, Igeta K, Kawasaki H, Kim JF, Nagai H., (2001). Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* **14**, 87–96.
- Inagaki N, Nakamura N, Nagao M, Musoh K, Kawasaki H, Nagai H., (1999). Participation of histamine H1 and H2 receptors in passive cutaneous anaphylaxis-induced scratching behavior in ICR mice. *Eur J Pharmacol.* **367**, 361–371.
- Inagaki N, Nakamura N, Nagao M, Kawasaki H, Nagai H., (2000). Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis-associated scratching behavior by mu-opioid receptor antagonists in ICR mice. *Int Arch Allergy Immunol.* **123**, 365–368.
- Inami Y, Andoh T, Sasaki A, Kuraishi Y., (2012). Surfactant-induced itching and the involvement of histamine released from keratinocytes. *Yakugaku Zasshi.* **132**, 1225–1230. [Article in Japanese]
- Inoue K, Kimura T, Kojima H, Oyama M, Inuma M, Oka H, Hino T., (2011). Purification of antioxidant from cherry leaves by high-speed counter-current chromatography and on-line HPLC/DPPH radical scavenging assay. *Jap J Food Chem.* **18**, 71–76.

- Inoue T., Yagami A., Sano A., Inaba Y., Nakagawa M., Abe M., Sowa J., Matsunaga K., (2008). Occupational allergic contact dermatitis resulting from exposure to plural surfactants. *J Environ Dermatol Cutan Allergol.* **2**, 182–187.
- Jarvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A., (2003). Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res.* **295**, 2–7.
- Jauregui I, Ferrer M, Montoro J, Davila I, Bartra J, del Cuvillo A, Mullol J, Sastre J, Valero A., (2007). Antihistamines in the treatment of chronic urticaria. *J Investig Allergol Clin Immunol.* **17** Suppl 2, 41–52.
- Jeong HJ, Moon PD, Kim SJ, Seo JU, Kang TH, Kim JJ, Kang IC, Um JY, Kim HM, Hong SH., (2009). Activation of hypoxia-inducible factor-1 regulates human histidine decarboxylase expression. *Cell Mol Life Sci.* **66**, 1309–1319.
- Johanek LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, Ringkamp M., (2007). Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch. *J Neurosci.* **27**, 7490–7497.
- Jolly HW Jr, Hailey CW, Netick J., (1961). pH determinations of the skin. Readings under normal and abnormal conditions. *J Invest Dermatol.* **36**, 305–308.
- Kahlson G, Rosengren E., (1968). New approaches to the physiology of histamine. *Physiol Rev.* **48**, 155–196.
- Kahlson G, Nilsson K, Rosengren E, Zederfeldt B., (1960). Wound healing as on rate of histamine formation. *Lancet.* **30**, 230–234.
- Kanda N, Watanabe S., (2003). Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* **121**, 570–577.
- Katoh M, Hamajima F, Ogasawara T, Hata K., (2009). Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for in vitro skin irritation testing according to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol. *J Toxicol Sci.* **34**, 327–334.
- Kawaguchi-Nagata K, Watanabe T, Maeyama K, Yamatodani A, Okamura H, Tamura T, Shoji K, Kitamura Y., (1988). Increase of histidine decarboxylase activity in murine myelomonocytic leukemia cells (WEHI-3B) in parallel to their differentiation into macrophages. *Biochim Biophys Acta.* **972**, 249–256.
- Kinkel I, Mötzing S, Koltzenburg M, Bröcker EB., (2000). Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema. *Cell Tissue Res.* **302**, 31–37.
- Klein, P. A., and Clark, R. A., (1999). An evidence-based review of the efficacy of antihistamines in relieving pruritus in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol.* **135**, 1522–1525.
- Knor T, Meholfjić-Fetahović A, Mehmedagić A., (2011). Stratum corneum hydration and skin surface pH in patients with atopic dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat.* **19**, 242–247.
- Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, Hu B, Lefort K, Lambertini C, Neel V, Dummer R,

- Wagner EF, Dotto GP., (2008). EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol.* **10**, 902–911.
- Kondo K, Nagami T, Teramoto S., (1964). Differences in haematopoietic death among inbred strains of mice. In Bond, S. V., Sugahara, T. (Eds.), *Comparative Cellular and Species Radiosensitivity*. Tokyo, Igakushoin. 20.
- Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M., (1995). Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. *Eur J Pharmacol.* **275**, 229–233.
- Lee J, Ham I, Choi H., (2008). Effect of *Prunus yedoensis* on free radical scavenging activity and anti-inflammatory properties in Raw 264.7 cells. *Planta Med.* 74–PA261.
- Lewis, T., (1927) The blood vessels of the human skin and their responses. London: Shaw and sons.
- Lonne-Rahm S, Berg M, Mårin P, Nordlind K., (2004). Atopic dermatitis, stinging, and effects of chronic stress: a pathocausal study. *J Am Acad Dermatol.* **51**, 899–905.
- Maekawa T, Yamaguchi-Miyamoto T, Nojima H, Kuraishi Y., (2002). Effects of naltrexone on spontaneous itch-associated responses in NC mice with chronic dermatitis. *Jpn J Pharmacol.* **90**, 193–196.
- Mansour-Ghanaei F, Taheri A, Froutan H, Ghofrani H, Nasiri-Toosi M, Bagherzadeh AH, Farahvash MJ, Mirmomen S, Ebrahimi-Dariani N, Farhangi E, Pourrasouli Z., (2006). Effect of oral naltrexone on pruritus in cholestatic patients. *World J Gastroenterol.* **12**, 1125–1128.
- Maślińska D, Gujski M, Laure-Kamionowska M, Szukiewicz D, Wojtecka-Lukasik E., (2004). Subcellular localization of histamine in articular cartilage chondrocytes of rheumatoid arthritis patients. *Inflamm Res.* **53** Suppl 1, S35–36.
- Matsuda H, Ido Y, Hirata A, Ino Y, Naruto S, Amamiya T, Kubo M., (2002). Antipruritic effect of *Cnidii Monnieri Fructus* (fruits of *Cnidium monnieri* CUSSON). *Biol Pharm Bull.* **25**, 260–263.
- Matsuda H, Nakamura S, Kubo M., (1994). Studies of cuticle drugs from natural sources. II. Inhibitory effects of *Prunus* plants on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull.* **17**, 1417–1420.
- Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio J, Saito S, Askenase PW, Ra C., (1997). Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* **9**, 461–466.
- Misery L, Sibaud V, Ambronati M, Macy G, Boussetta S, Taieb C., (2008). Sensitive scalp: does this condition exist? An epidemiological study. *Contact Dermatitis.* **58**, 234–238.
- Mizumoto N, Mummert ME, Shalhevet D, Takashima A., (2003). Keratinocyte ATP release assay for testing skin-irritating potentials of structurally diverse chemicals. *J Invest Dermatol.* **121**, 1066–1072.
- Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, Nakahashi T, Kuraishi Y., (2002). Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice. *Jpn J Pharmacol.* **88**, 285–292.
- Monroe EW., (1989). Efficacy and safety of nalmefene in patients with severe pruritus caused by

- chronic urticaria and atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* **21**, 135–136.
- Moon SH, Seo KI, Han WS, Suh DH, Cho KH, Kim JJ, Eun HC., (2001). Pathological findings in cumulative irritation induced by SLS and croton oil in hairless mice. *Contact Dermatitis.* **44**, 240–245.
- Nakano T, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y., (2008). Different dorsal horn neurons responding to histamine and allergic itch stimuli. *Neuroreport.* **19**, 723–726.
- Namer B, Carr R, Johaneck LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M., (2008). Separate peripheral pathways for pruritus in man. *J Neurophysiol.* **100**, 2062–2069.
- Naukkarinen A, Nickoloff BJ, Farber EM., (1989). Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. *J Invest Dermatol.* **92**, 126–129.
- Negi O, Tominaga M, Tenggara S, Kamo A, Taneda K, Suga Y, Ogawa H, Takamori K., (2012). Topically applied semaphorin 3A ointment inhibits scratching behavior and improves skin inflammation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **66**, 37–43.
- Nicander I, Ollmar S, Eek A, Lundh Rozell B, Emtestam L., (1996). Correlation of impedance response patterns to histological findings in irritant skin reactions induced by various surfactants. *Br J Dermatol.* **134**, 221–228.
- Nishibori M, Kohka-Takahashi H, Mori S., (2001). Regulation of cytokine production by histamine through H<sub>2</sub>-receptor stimulation. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* **118**, 29–35. [Article in Japanese]
- Oh C, Suzuki S, Nakashima I, Yamashita K, Nakano K., (1988). Histamine synthesis by non-mast cells through mitogen-dependent induction of histidine decarboxylase. *Immunology.* **65**, 143–148.
- Ohmori E, Fukui T, Imanishi N, Yatsunami K, Ichikawa A., (1990). Purification and characterization of L-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. *J Biochem.* **107**, 834–839.
- Ohsawa Y, Hirasawa N., (2012). The antagonism of histamine H<sub>1</sub> and H<sub>4</sub> receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in NC/Nga mice. *Allergy.* **67**, 1014–1022.
- Ohtsuka E, Kawai S, Ichikawa T, Nojima H, Kitagawa K, Shirai Y, Kamimura K, Kuraishi Y., (2001). Roles of mast cells and histamine in mosquito bite-induced allergic itch-associated responses in mice. *Jpn J Pharmacol.* **86**, 97–105.
- Ossovskaya VS, Bunnnett NW., (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev.* **84**, 579–621.
- Paquet F, Piérard-Franchimont C, Fumal I, Goffin V, Paye M, Piérard GE., (1998). Sensitive skin at menopause; dew point and electrometric properties of the stratum corneum. *Maturitas.* **28**, 221–227.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S., (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* **333**, 664–666.

- Pastore S, Mascia F, Giustizieri ML, Giannetti A, Girolomoni G, (2000). Pathogenetic mechanisms of atopic dermatitis. *Arch Immunol Ther Exp.* **48**, 497–504.
- Paus R, Lüftl M, Czarnetzki BM., (1994). Nerve growth factor modulates keratinocyte proliferation in murine skin organ culture. *Br J Dermatol.* **130**, 174–180.
- Paye M, Dalimier C, Cartiaux Y, Chabassol C., (1999). Consumer perception of sensitive hands: what is behind it? *Skin Res. Tech.* **5**, 28–32.
- Prottey C, Ferguson TF., (1976). The effect of surfactants upon rat peritoneal mast cells in vitro. *Food Cosmet Toxicol.* **14**, 425–430.
- Raychaudhuri SP, Jiang WY, Farber EM., (1998). Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta Derm Venereol.* **78**, 84–86.
- Rothman S., (1941). Physiology of itching. *Physiol Rev.* **21**, 357–381.
- Saint-Martory C, Roguedas-Contios AM, Sibaud V, Degouy A, Schmitt AM, Misery L., (2008). Sensitive skin is not limited to the face. *Br J Dermatol.* **158**, 130–133.
- Savin JA., (1998). How should we define itching? *J Am Acad Dermatol.* **39**, 268–269.
- Scala J, McOsker DE, Reller HH., (1968). The percutaneous absorption of ionic surfactants. *J Invest Dermatol.* **50**, 371–379.
- Schayer RW, Ganley OH., (1959). Adaptive increase in mammalian histidine decarboxylase activity in response to nonspecific stress. *Am J Physiol.* **197**, 721–724.
- Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M., (2002). Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol.* **23**, 255–263.
- Shimada SG, LaMotte RH., (2008). Behavioral differentiation between itch and pain in mouse. *Pain.* **139**, 681–687.
- Shiraishi M, Hirasawa N, Kobayashi Y, Oikawa S, Murakami A, Ohuchi K., (2000a). Participation of mitogen-activated protein kinase in thapsigargin- and TPA-induced histamine production in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Br J Pharmacol.* **129**, 515–524.
- Shiraishi M, Hirasawa N, Oikawa S, Kobayashi Y, Ohuchi K., (2000b). Analysis of histamine-producing cells at the late phase of allergic inflammation in rats. *Immunology.* **99**, 600–606.
- Simion FA, Allen Rau AH., (1994). Sensitive skin: what it is and how to formulate for it. *Cosmet Toiletries.* **109**, 43–49.
- Simion FA, Rhein LD, Morrison BM Jr, Scala DD, Salko DM, Kligman AM, Grove GL., (1995). Self-perceived sensory responses to soap and synthetic detergent bars correlate with clinical signs of irritation. *J Am Acad Dermatol.* **32**, 205–211.
- Stander S, Steinhoff M., (2002). Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview. *Exp Dermatol.* **11**, 12–24.
- Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T., (2003). Modern aspects of

- cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol.* **139**, 1479–1488.
- Steinhoff M, Bíró T., (2009). A TR(I)P to pruritus research: role of TRPV3 in inflammation and itch. *J Invest Dermatol.* **129**, 531–535.
- Szűts A, Szabó-Révész P., (2012). Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems-a mini-review. *Int J Pharm.* **433**, 1–9.
- Takamatsu S, Nakano K., (1994). Histamine synthesis by bone marrow-derived macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* **58**, 1918–1919.
- Takamatsu S, Nakashima I, Nakano K., (1996). Modulation of endotoxin-induced histamine synthesis by cytokines in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol.* **156**, 778–785.
- Taguchi Y, Tsuyama K, Watanabe T, Wada H, Kitamura Y., (1982). Increase in histidine decarboxylase activity in skin of genetically mast-cell-deficient *W/W<sup>v</sup>* mice after application of phorbol 12-myristate 13-acetate: Evidence for the presence of histamineproducing cells without basophilic granules. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**, 6837–6841.
- Tanaka S, Fukui T, Yamamoto J, Shima Y, Kume T, Ohgo M, Ichikawa A., (1995). Processing and activation of recombinant mouse mastocytoma histidine decarboxylase in the particulate fraction of Sf9 cells by porcine pancreatic elastase. *Biochim Biophys Acta.* **1253**, 9–12.
- Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ohmura S, Ichikawa A., (1997). Degradation of the 74-kDa form of L-histidine decarboxylase via the ubiquitin-proteasome pathway in a rat basophilic/mast cell line (RBL-2H3). *FEBS Lett.* **417**, 203–207.
- Tanaka S, Nemoto K, Yamamura E, Ichikawa A., (1998). Intracellular localization of the 74- and 53-kDa forms of L-histidine decarboxylase in a rat basophilic/mast cell line, RBL-2H3. *J Biol Chem.* **273**, 8177–8182.
- Tanaka S., (2003). Physiological function mediated by histamine synthesis. *Yakugaku Zasshi.* **123**, 547–559. [Article in Japanese]
- Tengara S, Tominaga M, Kamo A, Taneda K, Negi O, Ogawa H, Takamori K., (2010). Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycoprotein encoded by the X-linked Kallmann syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **58**, 64–71.
- Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J., (1983). PGP9.5-a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res.* **278**, 224–228.
- Tippens AS, Gruetter CA., (2004). Detection of histidine decarboxylase mRNA in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Inflamm Res.* **53**, 215–216.
- Tominaga M, Ozawa S, Ogawa H, Takamori K., (2007). A hypothetical mechanism of intraepidermal neurite formation in NC/Nga mice with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* **46**, 199–210.
- Tominaga M, Ogawa H, Takamori K., (2008). Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* **158**, 842–844.

- Trinh HT, Bae EA, Hyun YJ, Jang YA, Yun HK, Hong SS, Kim DH, (2010). Anti-allergic effects of fermented *Ixeris sonchifolia* and its constituent in mice. *J Microbiol Biotechnol.* **20**, 217–223.
- Tsuji K, Andoh T, Lee JB, Kuraishi Y., (2008). Activation of proteinase-activated receptors induces itch-associated response through histamine-dependent and -independent pathways in mice. *J Pharmacol Sci.* **108**, 385–388.
- Tsuji K, Andoh T, Ui H, Lee JB, Kuraishi Y., (2009). Involvement of Tryptase and Proteinase-Activated Receptor-2 in Spontaneous Itch-Associated Response in Mice With Atopy-like Dermatitis. *J Pharmacol Sci.* **109**, 388–395.
- Tupker RA, Willis C, Berardesca E, Lee CH, Fartasch M, Agner T, Serup J., (1997). Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis.* **37**, 53–69.
- Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepietowski JC, Zyllicz Z., (2003). Itch: scratching more than the surface. *QJM.* **96**, 7–26.
- Ui H, Andoh T, Lee JB, Nojima H, Kuraishi Y., (2006). Potent pruritogenic action of tryptase mediated by PAR-2 receptor and its involvement in anti-pruritic effect of nafamostat mesilate in mice. *Eur J Pharmacol.* **530**, 172–178.
- Urashima R, Mihara M., (1998). Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch.* **432**, 363–370.
- Uter W, Gefeller O, Schwanitz HJ., (1998). An epidemiological study of the influence of season (cold and dry air) on the occurrence of irritant skin changes of the hands. *Br J Dermatol.* **138**, 266–272.
- Wahlgren CF., (1999) Itch and atopic dermatitis: an overview. *J Dermatol.* **26**, 770–779.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Booren AM, Gray JI., (1999). Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *J Agric Food Chem.* **47**, 840–844.
- Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, Petersen LJ, Schmelz M., (2000). Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin—a microdialysis study. *J Invest Dermatol.* **115**, 1015–1020.
- Wigger-Alberti W, Krebs A, Elsner P., (2000). Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br J Dermatol.* **143**, 551–556.
- Wihelm KP, Wolff HH, Maibach HI., (1994). Effects of surfactants on skin hydration. In: Elsner P, Berardesca E, Maibach HI, eds. *Bioengineering of the Skin: Water and the Stratum Corneum.* Boca Raton, FL: CRC Press, 257–274.
- Woodward DF, Nieves AL, Spada CS, Williams LS, Tuckett RP., (1995). Characterization of a behavioral model for peripherally evoked itch suggests platelet-activating factor as a potent pruritogen. *J Pharmacol Exp Ther.* **272**, 758–765.

- Yamaguchi T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y., (1999). Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT<sub>2</sub> receptors in mice. *Neurosci Res.* **35**, 77–83.
- Yamamoto J, Fukui T, Suzuki K, Tanaka S, Yatsunami K, Ichikawa A., (1993). Expression and characterization of recombinant mouse mastocytoma histidine decarboxylase. *Biochim Biophys Acta.* **1216**, 431–440.
- Yamamoto J, Yatsunami K, Ohmori E, Sugimoto Y, Fukui T, Katayama T, Ichikawa A., (1990). cDNA-derived amino acid sequence of L-histidine decarboxylase from mouse mastocytoma P-815 cells. *FEBS Lett.* **276**, 214–218.
- Yano K, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H., (1993). Experimental study on alkaline skin injuries - periodic changes in subcutaneous tissue pH and the effects exerted by washing. *Burns.* **19**, 320–323.
- Yosipovitch G, Goon A, Wee J, Chan YH, Goh CL., (2000). The prevalence and clinical characteristics of pruritus among patients with extensive psoriasis. *Br J Dermatol.* **143**, 969–973.
- Yosipovitch G, Greaves MW, Schmelz M., (2003). Itch. *Lancet* **361**, 690–694.
- Yosipovitch G, Papoiu AD., (2008). What causes itch in atopic dermatitis? *Curr Allergy Asthma Rep.* **8**, 306–311.
- Yue J, Shukla R, Accardi R, Zanella-Cleon I, Siouda M, Cros MP, Krutovskikh V, Hussain I, Niu Y, Hu S, Becchi M, Jurdic P, Tommasino M, Sylla BS., (2011). Cutaneous human papillomavirus type 38 E7 regulates actin cytoskeleton structure for increasing cell proliferation through CK2 and the eukaryotic elongation factor 1A. *J Virol.* **85**, 8477–8494.
- 青木 敏之, 岡田 茂樹, (2001). アトピー性皮膚炎と透析患者の痒み. 第11回国際痒みシンポジウム記録集. 38–40.
- 生駒 晃彦, (2006). 痒みは何のためにあるのか? 痒み最前線 メディカルレビュー社. 18–21.
- 伊藤 正俊, (2000). 皮膚科医からみたセンシティブスキン. 化粧品誌. **24**, 190–194.
- 芋川 玄爾, (1990). 角質細胞間脂質の機能とその応用. フレグランスジャーナル. **4**, 26–32.
- 海老原 全, (2007). 接触皮膚炎—最近の動向—. 日皮会誌. **117**, 1411–1415.
- 奥田 峰宏, 吉池 高志, (2000). 皮膚洗浄方法の角層バリア機能に及ぼす影響について. 日皮会誌. **110**, 2115–2122.
- 坂本 一民, (2000). 化粧品科学からみたセンシティブスキン. 化粧品誌. **24**, 175–180.
- 樋渡 佳子, 吉田 克典, 坪 隆宏, 藪 桃, 岩井 滋, (2004). カチオン性高分子と界面活性剤のコアセルベートに関する研究—シャンプー使用感へのコアセルベートの影響—. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan.* **38**, 211–219.