

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590892

研究課題名(和文)角層カタラーゼ活性系に対する補剤の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) A study on protective ability of a traditional Japanese herbal medicine against oxidative skin stress

研究代表者

小林 裕美 (Kobayashi, Hiromi)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10221243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：補中益気湯は、黄耆、人參、柴胡など10種類の生薬から成る漢方薬で、生体の機能低下を改善する補剤の代表方剤である。本剤は、二重盲検法によりアトピー性皮膚炎治療に有用であることが示されている。そこで、皮膚酸化ストレスに対する本剤の作用を明らかにするため、マウス皮膚に紫外線を照射し、本剤投与が皮膚の機能や形態に及ぼす影響を詳細に検討した。その結果、補中益気湯は、紫外線による皮膚障害を総合的に防御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hochuekkito, a traditional Japanese herbal (Kampo) medicine composed of 10 kinds of crude drugs including Astragalus, Ginseng and Bupleurum, has been used for improvement of functional deterioration of the various organs. A randomized control trial has demonstrated its value in the treatment of atopic dermatitis. In this study, we evaluated the functional and histopathological effects of hochuekkito on ultraviolet B (UVB) irradiated mice skin to examine its protective ability against oxidative skin stress. Hochuekkito comprehensively offered a protective effect against UV-B induced skin damage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：補中益気湯 紫外線 皮膚 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 研究代表者らは、難治慢性皮膚疾患治療において、昭和50年代より漢方薬内服を併用することにより治療効果を高め、その意義について種々の研究を重ねてきた (Kobayashi H, et al.: An alternative approach to atopic dermatitis: Part-I case-series presentation, Evid Based Complement Alternat Med 1:49-62, 2004, 他)。なかでも、補剤とよばれる漢方薬の一群は、現代西洋薬には代替薬がなく、標準治療を補助する効果を示すことが多くの例でみられている。特に、補剤の代表方剤である補中益気湯については、疲労をとまなう難治アトピー性皮膚炎を対象とし、多施設共同二重盲検法による検討を行い、外用薬の使用量を有意に減らすことを明らかにした (Kobayashi H, et al.: Efficacy and safety of a traditional herbal medicine, Hochu-ekki-to in the long-term management of Kikyo (delicate constitution) patients with atopic dermatitis: a 6-month, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study, Evid based Complement Alternat Med, 7: 367-374, 2010.)。このような臨床効果を有する補剤が皮膚に及ぼす作用メカニズムはこれまで明らかでなかったことから、その解明が待たれていた。
- (2) 慢性炎症性皮膚疾患においては、皮膚酸化ストレスが関与することが知られ、漢方薬の抗酸化作用が有用性につながると推測されてきたが、これまでは皮膚の酸化ストレスの評価が困難であった。最近、角層カタラーゼ活性系を指標とした皮膚酸化ストレスの評価が可能であることが示され (Masaki H: Role of antioxidants in the skin; anti-aging effects. J Dermatol Sci 58: 85-90, 2010)、研究代表者らもその測定に成功した。このことから、角層カタラーゼ活性系を用いることは、皮膚疾患の治療薬の評価や皮膚の酸化ストレスに対する作用メカニズムの解明に役立つと考えられた。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎をはじめとする慢性炎症性皮膚疾患治療に有用な漢方方剤は多い。しかし、その作用メカニズムはこれまで明らかではなかった。近年、漢方の抗酸化作用が注目され、検討が試みられているが、皮膚酸化ストレス度の評価はこれまで困難であった。我々はこの問題を解決するために、皮膚の抗酸化能を反映する角層カタラーゼ活性系の測定を非侵襲的におこない、酸化ストレス度を評価するシステムを作成し予備研究において、ADの重症度と相関することを明ら

かにした。本研究は、この評価システムを確立し、二重盲検法にてその有用性を明らかにした補剤に焦点を当て、皮膚への作用メカニズムを解明することを目的としたものである。

3. 研究の方法

- (1) 紫外線照射マウスモデルを用いた検討
角層カタラーゼ活性系を中心とした酸化ストレス評価システムの確立
雄ヘアレスマウスを対象とし、UV-B 70mJ/cm² 単回照射群および非照射群の背部皮膚をテープストリッピングし、得られたサンプルのカタラーゼ活性、カルボニル化蛋白量を測定するとともに、経表皮水分蒸散量、角層水分量測定により皮膚の機能的変化を評価し、病理組織学的変化を観察した。
補中益気湯投与が紫外線照射マウス皮膚に及ぼす影響の検討
6週齢の雄ヘアレスマウスを対象とし、通常飼料、あるいは補中益気湯2%、10%含有飼料を用い2週間飼育したのち、の検討を行った。
- (2) 補中益気湯の抗酸化能評価と皮膚幹細胞に及ぼす変化の検討
補中益気湯抽出液に過酸化水素水を加え各濃度毎の除去率を測定し、アルコールペン酸と比較した。
補中益気湯投与とマウス皮膚のCD29陽性細胞の分布と存在形態、活性酸素消去系蛋白や抗炎症関連因子のmRNA発現をRT-PCRにより測定し、非投与マウスと比較した。
- (3) ヒト皮膚における検討
アトピー性皮膚炎患者および健常人
角層カタラーゼ活性、カルボニル化蛋白量の測定
アトピー性皮膚炎患者および健常人の上腕内側よりテープストリッピングにて採取した角層のカタラーゼ活性、カルボニル化蛋白量を測定し、健常人との差を比較し、ヒト皮膚における酸化ストレス評価系の基礎データを収集した。
難治アトピー性皮膚炎患者における補剤併用効果に及ぼす因子の臨床的検討
補剤が適応となる虚弱体質をとまなうアトピー性皮膚炎に対する実際の診療においては、単に漢方薬内服を加えるのみならず、食事習慣の見直しやリラックスを推奨する。そこで、このような併用療法の効果を評価することが、補剤の作用を明らかにするうえで必須と考え、入院を必要とした難治アトピー性皮膚炎患者を対象とし、1600kcalの伝統的和食の体験入院が皮膚症状やQOLに及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 紫外線照射による皮膚酸化ストレスの客観的評価と補剤による抑制作用

雄ヘアレスマウス背部に UV-B 70mj/cm² を単回照射することにより、経表皮水分蒸散量は有意に増加し、角層水分量は有意に減少した(図 1、2)。また、角層カタラーゼ活性は有意に減少し、カルボニル化蛋白量は有意に増加した(図 3、4)。病理組織学的には、表皮の肥厚、表皮細胞の増数が認められた。このマウスモデルを用いることにより、紫外線照射による皮膚酸化ストレスの影響に及ぼす因子を評価することが可能と考えられた。

補中益気湯投与は、紫外線照射による経表皮水分蒸散量の増加と角層水分量の減少を有意に抑制し(図 1、2)、角層カタラーゼ活性の低下とカルボニル化蛋白量の増加を有意に抑制した(図 3、4)。病理組織学的検討結果においては、表皮肥厚や表皮細胞の増数も抑制した。このことから、補中益気湯内服が、皮膚酸化ストレスによる皮膚の機能低下や形態学的変化の防御に役立つ可能性が示唆された。

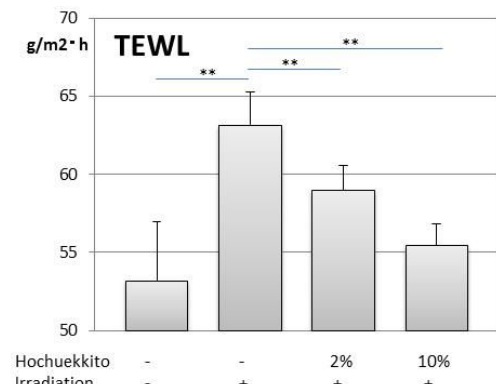


図 1 経表皮水分蒸散量 (TEWL)

左端は紫外線非照射

左より 3 番目、4 番目は補中益気湯投与群
紫外線照射による TEWL 増加が補中益気湯内服により抑制された (p<0.01)。

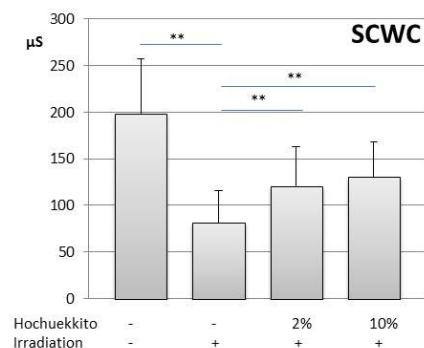


図 2 角層水分量 (SCWC)

左端は紫外線非照射

左より 3 番目、4 番目は補中益気湯投与群
紫外線照射による SCWC 減少が補中益気湯内服により抑制された (p<0.01)。

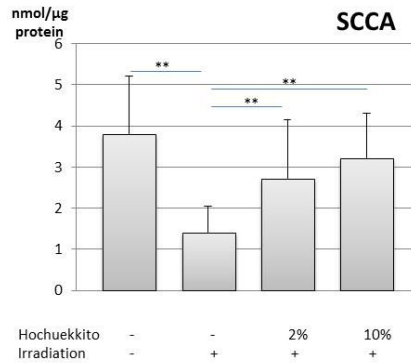


図 3 角層カタラーゼ活性 (SCCA)

左端は紫外線非照射

左より 3 番目、4 番目は補中益気湯投与群
紫外線照射による SCCA 低下が補中益気湯内服により抑制された (p<0.01)。

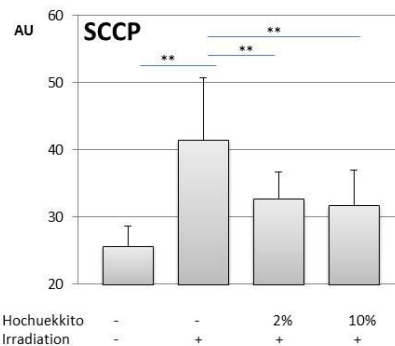


図 4 角層カルボニル化蛋白量 (SCCP)

左端は紫外線非照射

左より 3 番目、4 番目は補中益気湯投与群
紫外線照射による SCCP 増加が補中益気湯内服により抑制された (p<0.01)。

(2) 補中益気湯自体の抗酸化作用を示す過酸化水素消去能はアスコルビン酸と比較して低かった(図 5)。加えて、遺伝子レベルの検索結果において、-glutamylcysteine synthetase, superoxide dismutase, catalase など活性酸素消去系蛋白の mRNA には著変なく、cyclooxygenase-2 の mRNA の有意な減少がみられた。補中益気湯による抗酸化作用には抗炎症作用など他の作用を介した作用が加わっていることが判明した。

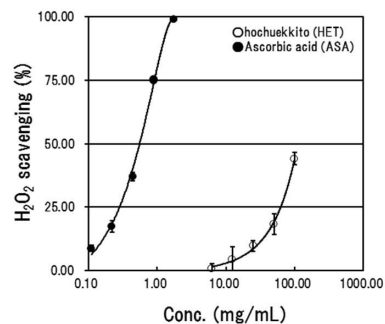


図 5 補中益気湯 とアスコルビン酸 の過酸化水素消去能

生体外では、アスコルビン酸が補中益気湯より高い過酸化水素消去能を有することが示された。

(3) 健常人に比してアトピー性皮膚炎患者では、角層カタラーゼ活性の低下がみられ、重症なほど低下が顕著であった。また、皮膚炎が重症なほど、カルボニル化蛋白の増加もみられた。

難治アトピー性皮膚炎患者を対象とし、薬物治療に食事指導を加える治療を行ったところ、臨床症状、生活の質の両面ともに改善が見られた。さらに、このような療法を外来のみで行った群と3~20日(平均9日)の入院群で比較すると、入院群の方がより早期に改善がみられた(図6)。このことより、ヒトを対象とした皮膚酸化ストレスに関する研究に際して、休養の効果、体験型食事療法の効果を十分に考慮すべきであることが明らかになるとともに、食養生や休養が最近の難治アトピー性皮膚炎治療に有用であることを、客観的評価法により示すことができた。

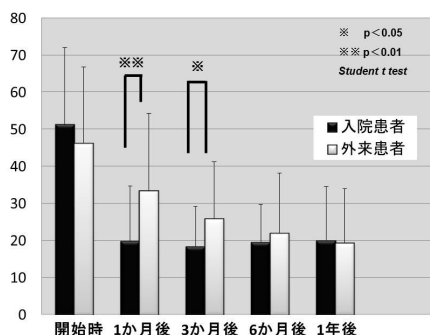


図6 アトピー性皮膚炎患者治療開始前および1か月後、3か月後、6か月後、1年後の重症度(SCORAD)

入院治療により、外来のみの治療に比べ、より早期に改善がみられることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Yanagihara S, Kobayashi H, Tamiya H, Tsuruta D, Okano Y, Takahashi K, Masaki H, Yamada T, Hasegawa S, Akamatsu H, Ishii M, Protective effect of *hochuekkito*, a Kampo prescription, against ultraviolet B irradiation-induced skin damage in hairless mice, J Dermatol, 査読有, Vol.40, 2013, 201-206.

DOI: 10.1111/1346-8138.12050

〔学会発表〕(計 5件)

Kobayashi H, Yanagihara S, Tamiya H, Tsuruta D, Okano Y, Takahashi K, Masaki H, Yamada T, Hasegawa S, Akamatsu H, Ishii M, Histopathological study of

the effect of *Astragalus*, *Bupleurum* and ginseng combination formula, Hochuekkito, a traditional Japanese herbal medicine, against ultraviolet irradiated skin damage in hairless mice, XXXIV Symposium of the International Society of Dermatopathology, 26-28 September 2013, Italy, Florence (Convitto della Calza)

柳原茂人、小林裕美、田宮久詩、岡野由利、鶴田大輔、高橋邦明、森 亮太、正木 仁、山田貴亮、長谷川靖司、赤松浩彦、石井正光、紫外線照射による皮膚酸化ストレスと形態学的変化に対する補中益気湯の抑制効果、第30回和漢医薬学会学術大会、2013年8月31日~9月1日、金沢市(金沢大学自然科学棟他角間キャンパス)。

Yanagihara S, Kobayashi H, Tamiya H, Tsuruta S, Nakanishi T, Okano Y, Masaki H, Yamada T, Hasegawa S, Ishii M, Hochuekkito, a Kampo prescription reduced skin oxidative stress indirectly in ultraviolet B-irradiated mice skin, 第37回日本研究皮膚科学会年次学術大会・総会、2012年12月7~9日、沖縄(ロワジュールホテル&スパタワー那覇、パシフィックホテル沖縄)。

Kobayashi H, Tamiya H, Yanagihara S, Aoki S, Hoshi K, Naruse A, Tateishi C, Nakanishi T, Tsuruta D, Ishii M, A "healthy, low-calorie diet" session for the treatment of recalcitrant atopic dermatitis, 42nd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 19-22 September 2012, Italy, Venice (Palazzo del Casino, Venice Lido Congress Centre)。

Kobayashi H, Yanagihara S, Tamiya H, Tsuruta D, Okano Y, Takahashi K, Masaki H, Yamada T, Hasegawa S, Akamatsu H, Ishii M, Protective effects of a Kampo prescription, hochuekkito, against ultraviolet B-induced oxidative stress in hairless mice skin, 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 7-10 September 2011, Spain, Barcelona (Barcelona International Convention Centre)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 裕美 (KOBAYASHI, Hiromi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 10221243

(2) 研究分担者

田宮 久詩 (TAMIYA, Hisashi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80464634

(3) 研究協力者

柳原 茂人 (YANAGIHARA, Shigeto)
大阪市立大学大学院医学研究科・
後期研究医