

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659989

研究課題名(和文) ユズ種子オイルによるアトピー性皮膚炎症状緩和塗布剤の開発

研究課題名(英文) Development of an anti-atopic dermatitis agent using yuzu seed oil

研究代表者

山脇 京子 (YAMAWAKI, Kyoko)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：10516165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いた機能性試験では、P815細胞へのA23187刺激に伴うヒスタミン放出試験の結果、未精製オイルに顕著なヒスタミン放出阻害効果が認められた。Nc/Ngaマウスを用いたアトピー性皮膚炎モデルで検証した結果、皮膚スコア、耳介の腫脹、血清ヒスタミン量は、未精製、精製ともに塗布による抑制効果が認められた。ヒト介入試験では精製オイルの塗布でアトピー性皮膚炎患者7症例中3症例、老人性乾皮症患者16例の全症例が奏効し、有害事象は認められなかった。以上の結果より、ユズ種子オイルの塗布はアトピー性皮膚炎様症状に対して症状緩和効果を有していることが検証された。

研究成果の概要(英文)：A histamine release test involving stimulating cultured P815 cells with A23187 demonstrated the significant inhibitory effects of a crude oil on histamine release. An Nc/Nga mouse model of atopic dermatitis demonstrated the inhibitory effects of crude and purified oils on skin scores, ear swelling, and serum histamine levels. In a human intervention trial, the purified oil was effective in 3 of 7 patients with atopic dermatitis and all 16 patients with senile xerosis, without any adverse event. Thus, yuzu seed oil alleviated atopic dermatitis-like symptoms.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：看護学・臨床看護学

キーワード：ユズ種子オイル塗布剤 アトピー性皮膚炎 症状緩和効果 開発

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は痒みを伴う湿疹性変化を主な病変とし、軽快・増悪を繰り返す皮膚の炎症性疾患である。現段階で、アトピー性皮膚炎を完治させる治療方法は無い。アトピー性皮膚炎の主要な発症機序としては、皮膚のバリア機能障害と免疫機構の異常の二つが挙げられる。バリア機能障害により水分保持能が低下し外部からの刺激、たとえばアレルギーや細菌が侵入しやすい状態になっており、皮膚に炎症が起こりやすくなっている。また、免疫機構の異常としては、ヘルパーT細胞のアンバランス、つまり、急性期ではTh1/Th2の比が上昇し、慢性期では低下することが原因と考えられている。治療の基本は、痒みのコントロールが中心となっている。皮膚炎を抑えるための局所療法としては、抗ヒスタミン軟膏、ステロイド軟膏、免疫抑制効果を有するタクロリムス軟膏塗布が行われているが、どの薬剤にも副作用があるため、長期間の使用は難しい。

他方、ユズは日本人が千年以上の食経験を有する素材であることに加え、我々の安全性試験からもユズ種子オイルは長期使用が可能であると考えられる。また、その効果は多岐にわたっており、多種類の塗布剤の併用と同等以上の効果を発揮する可能性がある。

2. 研究の目的

研究(1)：培養細胞を用いた機能性試験を実施し、マウス肥満細胞(P-815細胞)のヒスタミン放出の検証を行う。

研究(2)：Nc/Nga マウスを用いたアトピー性皮膚炎(AD)モデルによるユズ種子オイル塗布剤の症状緩和効果の検証を行う。

研究(3)：ユズ種子オイルをアトピー性皮膚炎患者及び老人性乾皮症患者に塗布し、症状緩和効果及び、有害事象の検証を行う。

3. 研究の方法

研究(1)：試験管レベルでは、P815細胞(マウス肥満細胞株) 2×10^6 cells/200 μ l に対し 2.5 μ l のユズ種子オイルを添加し、16時間共培養を行った後、終濃度 10 mM の A23187 を添加し、15 分間のヒスタミン放出量を E LISA 法で測定した。

研究(2)：動物モデルでは、AD 様症状を呈する Nc/Nga マウスを用いた。Nc/Nga マウスに 100mg のダニ抗原を 2 週間に 6 回塗布し AD を発症させた。惹起と同時にオイルを 4 週間塗布した。ユズ種子オイルは未精製(以下、未精製)と、蒸留した精製(以下、精製)の 2 種類を用い、対照群にはオリーブオイルを塗布した。評価には、皮膚炎症状、耳介の腫脹、組織化学的解析、末梢血 IgE 量、及び病巣のヒスタミン量測定を用いた。皮膚炎症状について、紅斑、浮腫・肥厚、出血・掻破痕、

乾燥の 4 項目を設け、各項目について、無症状(0点)、軽度(1点)、中度(2点)、重度(3点)の評価を行い、合計 12 点満点でスコア化した。

研究(3)：対象者は、すでにアトピー性皮膚炎及び老人性乾皮症と診断され、現在外用薬、光線治療、内服治療を行っていないが、掻痒の出現している患者とした。最も掻痒のある部分に患者自身でユズ種子オイルを均一に、1日2回、28日間塗布してもらった。認知症患者には、看護師に塗布を依頼した。塗布前後には、皮膚症状の聴取と患部のカメラ撮影を行った。質問票は、QOL 評価のための Skin index-16 と GHQ28 を行い、痒みは Visual analogue scale (VAS) を用いて評価した。認知症の患者に対しては、カメラ撮影のみとした。

4. 研究成果

研究(1)：P815細胞に対する A23187 に伴うヒスタミン放出試験では、16h では、対照群 10.58 \pm 0.299 nM、未精製 0.02 \pm 0.172 nM、精製 11.4 \pm 0.29 nM、未精製に顕著なヒスタミン放出阻害効果があった(図1)。

この結果、ユズ種子オイルは、痒みの原因となるヒスタミンの放出阻害、つまりアトピー性皮膚炎の患部の痒みを軽減する可能性が示唆された。

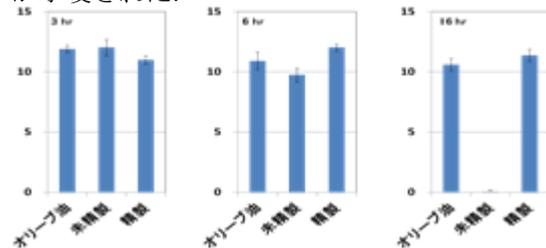


図1 ヒスタミン放出阻害効果

研究(2)：ユズ種子オイル塗布 4 週間後に、有意にアトピー性皮膚炎様症状の緩和効果が確認された。

図2はネガティブコントロールのオリーブオイル群と未精製、精製群の患部の写真である。オリーブオイル塗布では、患部の明らかな肥厚が認められ、痒搔傷からの出血も認められた。それに対し、未精製群ではわずかな肥厚、出血が認められたが、明らかに症状は軽減していた。最も効果があった精製群では、わずかな肥厚が認められたが、出血は全く認められなかった。



図2 皮膚症状

図3は、ユズ種子オイル塗布4週間後の皮膚スコアの結果である。皮膚スコアでも、未精製群、精製群で症状の緩和効果が認められた。ダニ抗原を塗布していない無感作群ではアトピー性皮膚炎様症状を発症していなかった。オリーブオイル群の皮膚スコアは、 6.0 ± 2.12 (\pm SD) 点に対し、未精製群では 3.6 ± 1.52 点、精製群では 2.8 ± 1.10 点であった。オリーブオイル群に対する t 検定の p 値は、未精製群で $p=0.037$ 、精製群で $p=0.009$ と統計学的有意差が認められた。ポジティブコントロールとして用いた医薬品のリンデロン(ステロイド軟膏)群の皮膚スコアは 0.4 ± 0.55 点であった。ステロイド軟膏には及ばないものの、ユズ種子オイルには十分な効果があると考えた。

図4には、ユズ種子オイル塗布4週間後の患部(耳介)の厚みを示した。耳介厚の増加は、皮膚炎によって生じる患部の肥厚を反映している。耳介厚も皮膚スコアと同傾向であった。無感作群では 0.30 ± 0.02 mm (\pm SD) であったのに対し、オリーブオイル群の耳介の厚さは 0.48 ± 0.10 mm とアレルギーに伴う患部の腫脹が認められた。未精製群では 0.39 ± 0.03 mm、精製群では 0.36 ± 0.05 mm と、オリーブオイルと比較し腫脹が軽減していた。オリーブオイル群に対する t 検定の p 値は、未精製群で $p=0.007$ 、精製群で $p=0.001$ と統計学的有意差が認められた。リンデロン(ステロイド軟膏)群の皮膚スコアは 0.29 ± 0.02 mm であった。

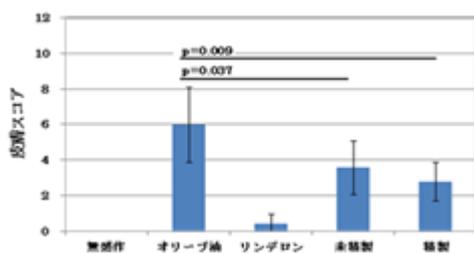


図3 皮膚炎スコア

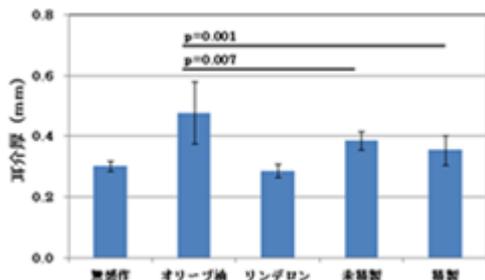


図4 耳介の厚み

図5に血清中の総IgE量を示した。無感作群では 0.2 ± 0.02 μ g/ml (\pm SD) であったのに対し、オリーブオイル群では 2.0 ± 0.20 μ g/ml とIgE量が上昇していた。これに対し、未精製群では 2.8 ± 0.04 μ g/ml、精製群では

0.8 ± 0.16 μ g/ml であった。オリーブオイル群に対する t 検定の p 値は、未精製群で $p=0.002$ 、精製群で $p=0.000$ と統計学的有意差が認められた。ただし未精製群では、IgEの上昇で有意差が認められた。現時点でこのIgE上昇理由は不明である。仮説としては、未精製オイルの中に含まれる何らかの成分に対するIgEが産生された可能性が考えられる。この点については今後の解析が必要である。精製群では、IgEの低下で統計学的有意差が認められた。リンデロン群は 1.7 ± 0.33 μ g/ml であった。

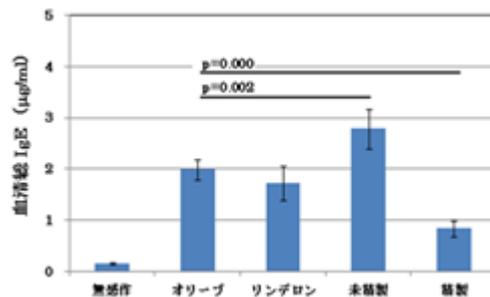


図5 血清中の総IgE量

図6に血清中のヒスタミン量を示した。未精製群、精製群とも血清中ヒスタミン量が低下していた。無感作群では 0.28 ± 0.047 n \cdot (\pm SD) であったのに対し、オリーブオイル群では 0.67 ± 0.076 n μ とヒスタミン量が上昇していた。これに対し、未精製群では 0.54 ± 0.022 n μ 、精製群では 0.50 ± 0.047 n μ であった。オリーブオイル群に対する t 検定の p 値は、未精製群で $p=0.067$ 、精製群で $p=0.040$ と未精製群では傾向が、精製群では統計学的有意差が認められた。リンデロン群は 0.23 ± 0.028 n μ であった。

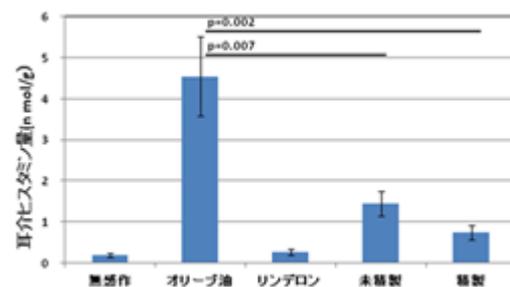


図6 耳介ヒスタミン量

研究(3): 研究対象者は、アトピー性皮膚炎患者7名、老人性乾皮症患者16名の合計23名であった。男性は8名、女性は15名であった。平均年齢は、アトピー性皮膚炎患者は29.4歳、老人性乾皮症患者は86.3歳であった。対象者の属性を表1に示す。アトピー性皮膚炎患者の基本属性は表2に示す。

アトピー性皮膚炎患者のユズ種子オイル塗布前の状態は表3に示す。

表 1 対象者の基本属性

項目	区分	人数 (%)
疾患名	アトピー性皮膚炎	7(30.4)
	老人性乾皮症	16(69.6)
性別	男	8(34.8)
	女	15(65.2)
平均年齢		69.7(±27.5)
	アトピー性皮膚炎	29.4(±10.2)
	老人性乾皮症	86.3(±7.0)
有害事象	あり	0(0)
	なし	23(100)
症状緩和	アトピー性皮膚炎	3(42.9)
	老人性乾皮症	16(100)

表 2 アトピー性皮膚炎患者の基本属性

項目	区分	人数 (%)
性別	男	2(28.6)
	女	5(71.4)
平均年齢		29.4(±10.2)歳
	最小値	21.0歳
	最大値	49.0歳
罹患期間		258.0(±76.8)ヶ月
	最小値	144.0ヶ月
	最大値	360.0ヶ月
平均睡眠時間		5.6時間
	最小値	4.0時間
	最大値	6.5時間

表 3 塗布前の状態

Case	性別	年齢	塗布部位	罹患期間(月)	重症度	皮膚炎スコア	Skindex-16平均	QHQ合計	VASスケール
1	女	31	下肢	360	3	7	51.4	6	70
2	女	23	頸部	264	1	6	45.8	4	50
3	男	21	上肢	252	2	8	91.7	9	55
4	男	23	肩	144	1	3	26.0	0	100
5	女	36	頸部		1	2	42.7	5	50
6	女	49	顔面		3	8	55.2	5	70
7	女	23	上肢	270	1	5	63.9	10	60

アトピー性皮膚炎患者 7 名中 3 名の患者は、症状の改善が見られた。奏効症例の患者には、頸部の掻痒の消失、皮膚の乾燥の改善、弾力性の改善が見られた。

ユズ種子オイル塗布前後による Skindex-16 の平均値の比較では、感情の平均値が $p=0.042$ ($p<0.05$)、合計の平均値が $p=0.043$ ($p<0.05$) と有位差がみられた (図 7)。このことは、アトピー性皮膚炎による精神的苦痛の緩和により QOL が向上したことを示唆している。

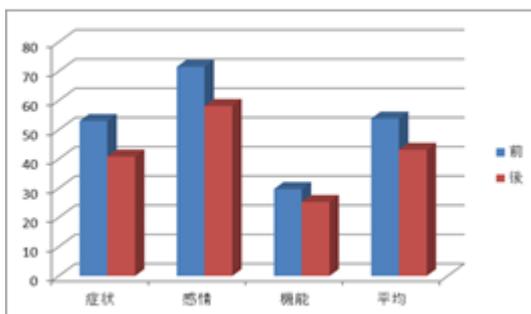


図 7 ユズ種子オイル塗布後の Skindex-16 の平均値

アトピー性皮膚炎患者の塗布前後の GHQ28 に差は認められなかった。

ユズ種子オイル塗布前の VAS スケールの平均値は 65 で、ユズ種子オイル塗布後の VAS スケールの平均値は 52 であった。ユズ種子オイル塗布前後の比較において有意差はなかった。老人性乾皮症患者 16 名全員に皮膚の乾燥の改善と、鱗屑の消失が確認できた。また、老人性乾皮症の患者の掻破痕の消失が見られ、掻痒が改善したことが推察された。改善症例の写真を図 8 に示す。



図 8 塗布前後の写真

これらの結果により、ユズ種子オイルが AD 症状を緩和することに効果があることが示唆された。また細胞レベル、マウスにおいて精製オイルと未精製オイルで効果の違いが見られた。このことは、ユズ種子オイルが AD 症状を緩和する複数の有効成分を含有していることを示唆している。

ユズは日本人が千年以上の食経験を有する素材であることに加え、我々の安全性試験からも長期間使用できると予想され、予防的使用で AD 患者の掻痒によるストレスの軽減及び老人性乾皮症の症状緩和の可能性が示唆された。

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)

① 山脇 京子、渡辺 嘉哉、溝渕 俊二、浅野 公人、峠 篤士、東谷 望史、抗アトピー性皮膚炎塗布剤としてのユズ種子オイルの可能性、aromatopia、査読無、vol. 21、No. 5、2012、pp56-59

[学会発表] (計 3 件)

① Kyouko Yamawaki, Yoshiya Watanabe, Asano kimoto, Sanae Aoki, Ken-ichiro Terasita, Eiko Takahashi, Mochifumi Toutani, Shunji Mizobuchi, Topical application of the yuzu seed oil inhibits mite-antigen induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. 15th International Congress of Immunology, 2013. 8. 22-27, MiCo-Milano Congress, Milan Italy

② 山脇 京子、寺下 憲一郎、青木 早苗、高橋 永子、溝渕 俊二、ユズ種子オイルの抗アトピー性皮膚炎に対する基礎的研究、第 32 回日本看護科学学会学術集会、2012. 11. 30-12. 1、東京国際フォーラム、東京

③山脇 京子、渡部 嘉哉、浅野 公人、峠 篤士、東谷 望史、溝渕 俊二、ユズ種子オイルの抗アレルギー性皮膚炎効果に関する研究、第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会、2012. 5. 12-13、大阪国際会議場、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山脇 京子 (YAMAWAKI KYOKO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：10516165

(2) 研究分担者

溝渕 俊二 (MIZOBUCHI SHUNJI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：00209785