

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860970

研究課題名(和文)多汗症に対する外用治療薬の効果と作用機序の解明

研究課題名(英文)The mechanism of the antiperspirant action of aluminum chloride for treatment of hyperhidrosis

研究代表者

柳下 武士(Yanagishita, Takeshi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：40387816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：掌蹠多汗症に塩化アルミニウム(AC)の外用療法が奏効するがその作用機序は明らかにされておらず、本研究ではその作用機序を明らかにする目的で研究を遂行した。

AC外用治療後の皮膚組織を用いて組織学的変化を観察し角質塊が表皮内汗管内を閉塞する事で、治療効果を発揮することが考えられた。またAC自体が表皮角化細胞に角化を促している可能性が示唆され、表皮角化培養細胞を用いAC処理前後で角化マーカー発現を解析した結果、その発現亢進を確認した。AC添加により表皮角化細胞に角化亢進を促し角質塊の形成、閉塞を生じている可能性が示唆され、AC外用療法の作用機序に新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：There has been no report on the mechanism of the antiperspirant action of topical aluminum chloride (AC) for treatment of palmo-plantar hyperhidrosis. In this study, we investigated the mechanism of the antiperspirant action of AC.

Histological examination revealed that the eccrine sweat duct in the stratum corneum after AC treatment was filled with keratinous materials. It is suggesting that the antiperspirant action of AC for treatment of palmar hyperhidrosis was caused by blockade of the keratinous materials. The levels of marker molecules relating keratinization were increased by AC treatment in vitro. These results were indicated that AC treatment stimulates the keratinization and consequently blockade of the keratinous materials. In summary, our results provide new insights into the mechanism of the antiperspirant action of AC for treatment of hyperhidrosis.

研究分野：発汗障害の原因解明と新規治療法の開発

キーワード：多汗症 汗腺 汗管 塩化アルミニウム 角化

## 1. 研究開始当初の背景

原発性局所多汗症は、局所多汗症のうち基礎疾患がなく、手、足、腋窩、顔などの発汗過剰を認める疾患である(参考文献1, 2)。疫学調査では5750人の調査でその有病率は5.8%とかなりの高頻度に及ぶ(参考文献1, 2)。特に掌蹠の多汗症では精神的苦痛を伴うことが多い。例えば小児の場合ペンが滑る、プリントが汗でにじむなどの勉強に与える影響があり、また成人では握手ができない、労働意欲の減退など、社会における労働生産性の低下を招くことがある。高頻度の有病率から社会全体で考えた場合、その労働生産性の低下は計り知れないものと推察される。

精神的苦痛を伴うことが多い掌蹠多汗症に対して、種々の治療法が試みられており、一定治療効果をあげている。中でも塩化アルミニウムの外用療法はその簡便さから治療の第一選択となっている(日本皮膚科学会ガイドライン：原発性局所多汗症診療ガイドライン)。しかしながら、治療としての長い歴史がありながらその作用機序は未だ明らかにされておらず、不明な点が多い。またアルミニウムの体内蓄積はアルツハイマー病発症との関連性が指摘された経緯があることから、外用によるアルミニウムの皮膚における局所分布を明らかにすることはアルミニウム外用の安全性を推察する上で手がかりになるため、治療を発展、啓蒙していくうえで、重要である。

## 2. 研究の目的

上述の研究開始当初の背景の通り、原発性局所多汗症は、手、足、腋窩、顔などの発汗過剰を認める疾患で有病率の高い疾患である。特に掌蹠の多汗症では精神的苦痛を伴うことが多く、労働生産性の低下を招くことがある。掌蹠多汗症に対して種々の治療法が試みられており、塩化アルミニウムの外用療法が奏効する。しかしその作用機序は明らかにされておらず、本研究では塩化アルミニウム外用治療によるアルミニウムの組織学的局在、進達度の解析、細胞レベルでの分子生物学、生化学的变化を観察することで、発汗抑制効果の作用機序を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)塩化アルミニウム外用後の皮膚組織の組織学的変化ならびに分子生物学、生化学的解析

塩化アルミニウム外用治療後の皮膚生検組織(手掌や前腕)と正常皮膚(未治療)のパラフィンまたは凍結組織を用いて組織学的変化を観察する。塩化アルミニウム外用により角質や表皮の上層にアルミニウムが作用し角化の亢進を生じる可能性がある。そこで、

好酸性無構造物質が角栓であるかの確認、角化マーカー蛋白の発現量変化を解析した。

好酸性無構造物質が角栓であるかの確認は、種々のケラチン抗体を用いた免疫組織染色を行って確認する。またケラチンのみならず、その他の成分(ムコ多糖類など)も含有しているかどうか調べるため特殊染色(PAS染色)を行う。

角化の亢進は表皮角化培養細胞(HaCaT細胞や初代培養ケラチノサイト)と生検皮膚組織を用いて検討する。

角化マーカーであるケラチン1,10やフィラグリン、インボルクリンを、リアルタイム Polymerase chain reaction (PCR)を用いて塩化アルミニウム処理による発現量の変化を分子生物、生化学的に解析する。また塩化アルミニウム治療前後での汗腺組織の形態学的変化をより詳しく解析するため、電子顕微鏡を用いた解析も行う。

(2)塩化アルミニウム外用後の皮膚組織におけるアルミニウムの局在

従来からアルミニウムの組織染色にはアルミニオン、クロムアズロールSなどの呈色試薬やモリンなどの蛍光試薬が用いられてきたが、これらの試薬はアルミニウムのみならず、共存する鉄、銅などとも類似の有色複合体を形成するため、微量のアルミニウムのみを選択的に識別することは困難である。特に皮膚では鉄、銅が存在する組織であるため、これらの試薬を用いることができない。そこで、アルミニウムと選択的に結合することによって強い蛍光を発するo,p,o-トリヒドロキシアゾ化合物のルモガリオン誘導体(参考文献3)を用いて塩化アルミニウム外用後の皮膚組織切片上のアルミニウムの局所分布、進達度を調べ、どの部位に、どの様に、どの細胞に局在しているか蛍光顕微鏡を用いて検討する。局所分布の解析は作用機序、作用している局在を推察するうえで非常に有益な情報を与えてくれる。またアルミニウムの局所分布が判れば、体内への吸収とゆう点で安全性に言及できる。

## 4. 研究成果

(1)塩化アルミニウム外用後の皮膚組織の組織学的変化ならびに分子生物学、生化学的解析結果

塩化アルミニウム塗布により発汗量の現象を確認し(図1a)、角質内の汗の開口部(汗管)に好酸性無構造物を認めた(図1b, c)。この無構造物はPAS染色陽性で、汎ケラチンAE1/3(図1e)、サイトケラチン(CK)5/6(図1f)で陽性に染色されることから、ムコ多糖類やケラチンを含む角質からなることがわかった。この角質塊が角層内汗管内に閉塞するように存在し、塩化アルミニウムが塗布されていない皮膚切片では見られないことから、塩化アルミニウム塗布により、表皮内汗管内を閉塞する事で、治療効果を発揮することが考えられた(図1)。また、真皮内汗管やさらに下部の汗管や汗腺に形態的变化は認めら

れなかった。一方前腕皮膚においても表皮内汗管内に閉塞するように存在する角質塊を確認し真皮内や汗腺組織に形態的变化は認められなかった。

の結果をふまえ、表皮角化培養細胞を培養し塩化アルミニウム処理前後で角化マーカー(ケラチン 1,10、フィラグリン、インポルクリン)の発現変化を解析した。汗管上皮細胞も角化することは知られており、塩化アルミニウムの汗管上皮細胞への角化に対する影響も解析を行いたかったが、汗管上皮細胞のみの培養は本研究では行えず、今後の課題としたい。

まず表皮角化培養細胞の塩化アルミニウム処理の条件検討を行い MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)アッセイで細胞死を起こさない塩化アルミニウム水溶液の適切な濃度を決定し、実験には 0.005%と 0.05%を用いた。これらの濃度で表皮角化培養細胞を培養し経時的に早期角化マーカーであるケラチン 1 と 10、晩期角化マーカーであるフィラグリン、インポルクリンの発現をリアルタイム PCR にて解析した結果、塩化アルミニウム暴露 12 時間後、24 時間後で塩化アルミニウム濃度依存的にケラチン 1 と 10 の発現が亢進した(図 2)。一方、フィラグリン、インポルクリンに関しては発現の変化は認めなかった(図 2)。培養系では角化シグナルは迅速に行われるため、長期間の培養が行えれば、晩期角化マーカーの変動もとらえられた可能性はある、以上のことから、塩化アルミニウムは表皮ケラチノサイトに対して角化を亢進させることがわかり、塩化アルミニウム自体による角化の亢進が表皮内汗管内を閉塞する事でその治療効果を発揮していると考えられた。

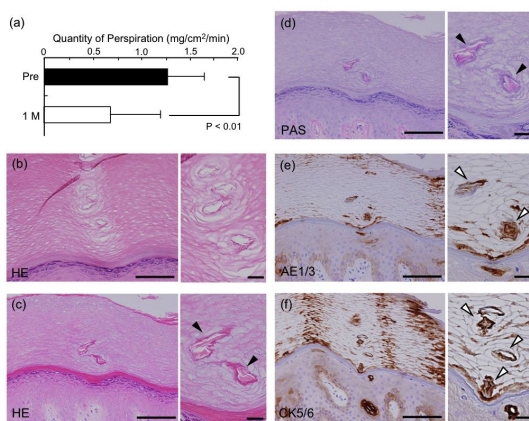


図 1 (a)塩化アルミニウム塗布 1 ヶ月後の発汗量の変化, (b)コントロール(塩化アルミニウム未塗布), (c)塩化アルミニウム塗布 1 ヶ月後のヘマトキシリン・エオジン染色, (d) 塩化アルミニウム塗布 1 ヶ月後の PAS 染色 (e) 塩化アルミニウム塗布 1 ヶ月後の汎ケラチン AE1/3 免疫染色, (f) 塩化アルミニウム塗布 1 ヶ月後のサイトケラチン(CK)5/6 免疫染色。矢印は角化物を示す。

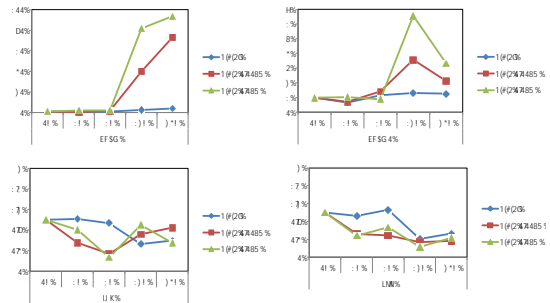


図 2 塩化アルミニウムによる角化マーカーの発現量の経時変化: 塩化アルミニウム濃度依存的にケラチン 1 と 10 の発現亢進を認める。

## (2) 塩化アルミニウム外用後の皮膚組織におけるアルミニウムの局在解析結果

アルミニウムと選択的に結合することによって強い蛍光を発するルモガリオン誘導体を用いた蛍光染色で解析を行い、上述の表皮内汗管内に閉塞するように存在する角質塊に一致して蛍光が得られたこと、表皮ケラチノサイト内には蛍光は確認されなかったが、角層下の表皮ケラチノサイト近傍まで蛍光が確認されたことから、塩化アルミニウム自体がケラチノサイトに角化を促している可能性が示唆された。また前腕皮膚における解析においても、塩化アルミニウム塗布により角層が厚くなり、その部に一致してルモガリオンの蛍光を確認した。

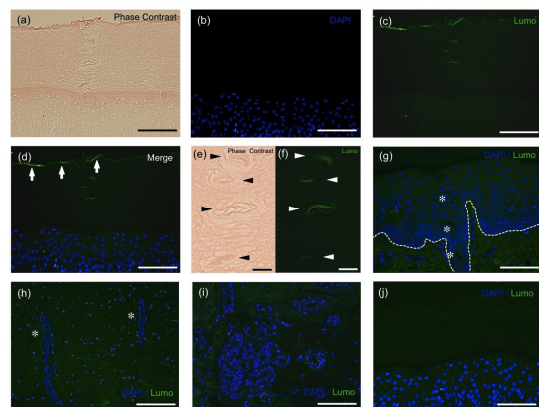


図 3 ルモガリオン染色によるアルミニウムの局在 (a) 表皮角層部の光顕像, (b) 表皮角層部の核染色, (c) 表皮角層部のルモガリオン染色, (d) b と c の合成像, (e) 角層内汗管の光顕拡大像, (f) 角層内汗管のルモガリオン染色, (g) 表皮内汗管 (h) 真皮内汗管, (i) 汗腺腺体部, (j) コントロール(塩化アルミニウム未塗布)

さらに本研究で得られた結果をもとに、塩化アルミニウム治療前後での形態学的変化をより詳しく解析を行った。塩化アルミニウム外用により、汗腺の変性を生じたとの報告が 1 報(参考文献 4)あるが、本研究において角質層の変化はあるものの、深部に存在する汗腺の腺体自体に変化は観察されなかった。このことから、塩化アルミニウム外用による汗腺組織の微細構造の変化有無をとらえる

べく、塩化アルミニウム塗布1ヶ月経過した皮膚と1年以上長期にわたって外用を行った皮膚を用いて電子顕微鏡を用いた解析を行った。電子顕微鏡解析では塗布1ヶ月、1年経過した皮膚ともに汗腺組織に構造的変化は観察されなかった。このことより塩化アルミニウム外用により汗腺組織自体への影響はないことが示された。

最後に本研究の成果をまとめると、塩化アルミニウムを塗布すると、表皮内汗管細胞や表皮ケラチノサイトの角化が亢進されムコ多糖類やケラチンを含む角質塊が形成され表皮内汗管を閉塞することで、発汗が抑制される。また塩化アルミニウムの局在解析から表皮内汗管までしか浸透せず、汗腺自体の変性は生じないため、長期間の塩化アルミニウムの外用によって塩化アルミニウムの蓄積は生じないと考えられた。

#### <引用文献>

1. 田中智子, その他 原発性局所多汗症診療ガイドライン. 日本皮膚科学会誌 : 120, 1607-1625, 2010
2. 玉田康彦: 原発性局所多汗症診療ガイドラインの概要. 日本皮膚科学会誌 : 120, 2892-2895, 2010
3. Uchiumi A et al, *Analyst* 1998; 123: 759-762.
4. Hölzle E et al, *Br J Dermatol.* 1984. 110: 399-403.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

発表者名: 柳下武士、大嶋雄一郎、  
伊東慶子、玉田康彦、  
秋田洋一、渡辺大輔  
発表課題: 塩化アルミニウム外用による  
角化への影響  
学会等名: 第65回日本皮膚科学会中部  
支部学術大会  
発表年月日: 2014年10月25日~2014  
年10月26日  
発表場所: グランフロント大阪北館  
B2Fナレッジキャピタル  
コングレコンベンションセン  
ター(大阪市北区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下 武士 (YANAGISHITA Takeshi)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40387816

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし