

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450459

研究課題名(和文)色素沈着症に対する評価系モデルの臨床応用研究

研究課題名(英文)Clinical application study on evaluating models for skin pigmentation

研究代表者

木村 透 (Kimura, Tohru)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：80419027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの2種類の実験動物(ヘアレス犬およびニホンザル)を用いた皮膚科および形成外科学領域の研究成果をもとに、ヘアレス犬では、長波長紫外線UVA照射後の色素沈着および色素過剰性肥厚性瘢痕の評価系を樹立した。ニホンザルでは、真皮メラノサイトーシスの実験系を確立して臨床応用へ発展できる研究を行った。研究期間内に、次のことを明らかにした。

1.ヘアレス犬を用いたUVA色素沈着の誘発モデルの評価、2.ヘアレス犬を用いた色素過剰性肥厚性瘢痕の誘発モデルの評価および3.ニホンザルの真皮メラノサイトーシスを用いた脱色素剤の評価

研究成果の概要(英文)：The author previously reported dermatological and plastic surgical research results using 2 kinds of laboratory animals (hairless dogs and Japanese monkeys). Based on the use of hairless dogs, the author established an excellent system to evaluate pigmentation after ultraviolet A (UVA) exposure and hyperpigmenting hypertrophic scar. Additionally, clinical research was done using an experiment model of dermal melanocytosis in Japanese monkeys. During the present study period, the author elucidated the following issues: 1. evaluation of UVA-induced pigmentation model with hairless dogs, 2. evaluation of hyperpigmenting hypertrophic scar model provoked in the skin of hairless dogs and 3. Evaluation of depigmenting drugs using dermal melanocytosis in Japanese monkeys.

研究分野：実験動物学

キーワード：メラノサイト メラニン顆粒 肥厚性瘢痕 実験モデル 皮膚 形成外科

1. 研究開始当初の背景

メキシカンヘアレスドッグは、アステカ文明時代からメキシコに伝わる無毛犬である。この無毛皮膚性状に着目し、まず無毛形質をビーグル犬に導入するために両犬種の交配を計画し、実験用ヘアレス犬を確立した。並行してヘアレス犬の遺伝様式や一般生理学的性状を明らかにした。次に、皮膚の特性を調べ、表皮にメラノサイトを有することと明瞭な皮膚色素沈着を呈することを明らかにした。2つの特性を活かして、皮膚科学・形成外科学領域における実験動物としての有用性について研究を続けてきた。これまでの研究成果から、以下の評価系実験動物として確立し得た：日焼け反応、サンスクリーン剤の防御効果、美白効果、面皰治療薬、発毛促進薬、皮膚毒性試験(染毛剤、皮膚染色剤)、環境毒性評価試験、接触アレルギー反応、皮膚老化、経皮吸収試験、創傷・熱傷治療および皮膚移植などである。このように、皮膚科学分野の研究の一助として役立ってきたが、紫外線照射に対する皮膚の反応、特に長波長紫外線 UVA に対する知見は未解明の残された領域である。UVA 照射で色素沈着を示す実験動物はなく、ヒトの皮膚を利用しなければならないのが現状である。また、形成外科の実験中に観察された硬く盛り上がった色素沈着を来した創傷治療痕はヒトの肥厚性癬痕に類似した病変であり、実験動物では殆ど認められないものである。

表皮メラノサイトを有する実験動物は確立できたが、真皮層にメラノサイトを有する実験動物は今まで知られていなかった。そのため、真皮メラノサイトに起因するヒトの疾患は、動物実験が難しく、発生機序、診断法および治療法に係わる研究がなかなか進展しなかった。真皮メラノサイトを持つ実験動物を探索している中で、ニホンザルの体表に不規則な暗青色ないし暗緑色の色素斑・斑紋を呈することに気がついた。

この色素紋は、真皮深層に存在するメラノサイトに起因することを突き止めた。

皮膚深く浸透する UVA が引き起こす色素沈着や皮膚傷害は一般社会でも大きな関心事である。形成外科学では、肥厚性癬痕やケロイドは身体機能に支障をもたらす重要な疾患であり、発生に表皮メラノサイトの働きとの関連が指摘されている。真皮メラノサイトが引き起こす母斑(痣)も審美的な面で深刻な問題である。そこで、表皮または真皮にメラノサイトを有する2種の実験動物の特性が、UVA 照射後に生じる色素沈着、肥厚性癬痕および真皮メラノサイトーシスの発生機序、診断・治療の根本的解決に役立つのではないかと着想し、本研究を行った。

2. 研究の目的

ヘアレス犬では、UVA 照射後の色素沈着および色素過剰性肥厚性癬痕の評価系を樹立することを目的として試験を行った。ニホンザルでは、真皮メラノサイトーシスの実験系を確立して臨床応用へ発展できる研究を行った。

(1)ヘアレス犬を用いた UVA 色素沈着の誘発モデルの評価

長波長紫外線 UVA (320-400 nm)を照射した場合の色素沈着の条件を明らかにする。皮膚の**最少黒化量**(最も少ない UVA 照射量で、7 日後までに色素沈着を示すエネルギー量)を求める。照射条件を段階的に変えて、色素沈着の変化を客観的に定量化(数値化)して評価できる様にする。色素沈着(メラニン顆粒の沈着)を病理組織学的に調べ、ヒトとの相同性を明らかにする。

(2)ヘアレス犬を用いた色素過剰性肥厚性癬痕の誘発モデルの評価

採皮部位に肥厚性癬痕を確実に誘導し、ヒトの病変との相同性を明らかにする。

現在経験的に用いられているステロイド剤による治療を適用して、治療経過を確認

しつつ、病理組織学的検査を行い、膠原線維・弾力線維の正常化の程度を明らかにする。この成績から、根拠のある治療法を提起する。

(3)ニホンザルの真皮メラノサイトーシスを用いた脱色素剤の評価

真皮メラノサイトが活動している細胞であることを形態学的に明らかにする。

真皮メラノサイトーシスに脱色素剤を投与して、色素斑の改善効果を定量化して明らかにする。併せて、病理組織学的検査によって、治療効果の程度を形態学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) UVA 照射によるヘアレス犬の表皮メラノサイトの反応確認

UVA 照射後、ヒトと同様に色素沈着を起こす条件を求め、皮膚の変化を定量化（数値化）し、メラノサイトを形態学的にも解析する。

(2) ヘアレス犬を用いた色素過剰性肥厚性癬痕の実験的誘導の確立

採皮部位に生じる色素過剰性肥厚性癬痕の構造を調べ、ヒトの病変との相同性を解明し、ステロイド剤による治療法への応用を図る。

(3) ニホンザルの真皮メラノサイトーシスの実験モデル化

ネットワークを構成する真皮メラノサイトの活性化を調べ、脱色素剤での治療効果も確認する。

4. 研究成果

(1) ヘアレス犬の表皮メラノサイトの反応確認

表皮にメラノサイトを持つヘアレス犬を用いて、UVA 照射に対する本犬の皮膚の反応（色素沈着・黒化反応）を観察し、皮膚の色と変化を定量化しつつ、最後に病理組織学的検査で実証した。

UVA 照射に対する皮膚の反応（色素沈着・黒化反応）についての解析

表皮にメラノサイトを有するヘアレス犬の皮膚は、太陽光（UVB+UVA）および人工光のUVBに敏感に反応し、色素沈着を呈することを明らかにした。長波長紫外線UVA（320-400 nm）を皮膚に照射して、確実に色素沈着が誘導できる条件を設定した。確実に色素沈着を誘導できる実験系を作り上げるために、UVAを10, 20, 30, 40, 50および60 kJ/m²と段階的に照射して、色素沈着を中心とした皮膚の反応が確実に現れる照射量を求めた結果、10 kJ/m²であり、ヒトと近似することがわかった。

UVA 照射に対する皮膚色素沈着の定量化（数値化）

UVA照射量を段階的に変えて、最少黒化量（最も少ないUVA照射量で、7日後までに色素沈着を示すエネルギー量）を始めとする皮膚の反応を定量的に評価して調べた。照射強度、照射時間および照射量を測定して、ヒトの値と比較し、類似性あるいは相違点を解明した。1)肉眼観察、2)色彩色差計による皮膚色の評価、3)マイクロスコープによる表皮微細観察および4)メラニン・紅斑測定装置と油分計、水分計、pH計・温度計一体型測定装置による測定を行った。皮膚色は1)と2)の明度で相関性が高かった。3)と4)は動物の皮膚で明瞭な結果を得られなかった。

UVA 照射に対する皮膚組織の形態学的解析

2)の試験の最終評価として、皮膚を生検し、病理組織学的検索に供した。一般染色、特殊染色および免疫組織学的染色を施した。さらに、UVAの皮膚深部への影響を確かめるために、真皮層深部における膠原線維および弾力線維の形態的变化（太さや断裂など）も調べた。その結果、ヘアレス犬の色素沈着（黒化反応）は7日目に変化が生じ、メラノサイトの増加が顕著な変化であった。UVA照射に対するヒトの皮膚の反応と比較し、類似性を認めた。UVA照射量が少ないことから膠原線維

および弾力線維には大きな変化を認めなかったものの、ヘアレス犬がUVAの光医学・光生物学領域において応用可能な実験動物であることを提起できた。

(2) ヘアレス犬を用いた色素過剰性肥厚性癬痕の実験的誘導の確立

ヘアレス犬の皮膚に色素過剰性肥厚性癬痕が確実に誘導でき、組織構造が形態的にヒトの病変と類似することを明らかにした。次に、この色素過剰性肥厚性癬痕を用いて、治療方法を探索した。

色素過剰性肥厚性癬痕の実験的誘導の確立

ヘアレス犬の採皮部位に色素沈着を現して盛り上がる病変が自然発生することを突きとめたが、今回の研究では、全層採皮部位(6 × 6 cm)の治療過程で自然発生する肥厚性癬痕が確実に誘導できることが確認できた。さらに、この病変がヒトの肥厚性癬痕の性状と類似することを臨床的にかつ病理組織学的に明らかにする。

色素過剰性肥厚性癬痕は1-2か月で病変が生じ、ヒトの色素過剰性肥厚性癬痕と病理組織学的検査で膠原繊維と弾性繊維の構成からヒトの病変と類似性を持つことがわかった。ヘアレス犬の本病変が色素過剰性肥厚性癬痕を研究する上で役立つモデルである。

ヘアレス犬の皮膚に誘導した色素過剰性肥厚性癬痕を用いた治療方法への応用

色素過剰性肥厚性癬痕に対して、効力の高いステロイド剤(strong以上)を選び、局所塗布あるいはテープ剤密封療法を施した。ステロイド剤を1か月間投与し、病変の消退(縮小、軟化、平坦化など)を認めた。メラニン顆粒は減少し正常に回復するとともに、膠原線維および弾力線維は微細になり、形態的变化を明らかにできた。ステロイド剤の治療方法は有効であることがわかり、ヒトの病変への治療応用を確実なものにした。

、 の試験成績から、色素過剰性肥厚性

癬痕を誘導できる実験モデル系を確立し、ヒトの同病変の治療方法の応用に発展させることができた。

(3) ニホンザルの真皮メラノサイトーシスの実験モデル化

ニホンザルの真皮メラノサイトの活性化

真皮メラノサイトを有する実験動物は知られていない。ニホンザルの皮膚には色素斑があり、この部位の真皮層にはメラノサイトが存在することを発見した。この真皮メラノサイトは神経細胞の様にネットワークを形成していた。真皮メラノサイト活性に対して刺激を与える物質を投与してその形態的变化を調べた。メラノサイト刺激ホルモン(MSH)を0, 10, 100, および1000 μg/mlで段階的に投与した結果、最高濃度でメラノサイトの活性化(細胞の大きさ、メラニン顆粒の量、樹枝状突起の発達など)が現れた。この成績から、真皮メラノサイトが休眠細胞でないことを明らかにした。

ニホンザルの真皮メラノサイトーシスを用いた脱色素剤の治療効果の評価

真皮メラノサイトーシスの薬物療法、即ち脱色素剤の効果の評価としては、候補薬剤であるハイドロキノンおよびその誘導体の効力を評価した。脱色素剤ハイドロキノン、5%濃度局所投与は安全であり、メラノサイト数の減少および活性化の低下を認めた。脱色素剤をレーザー照射治療と併用することで、実際の真皮メラノサイトーシス治療にさらなる改善が見込まれることが明らかとなった。

、 の試験から、真皮メラノサイトを有する実験動物の意義を示し、真皮メラノサイト病変の適切な治療への応用モデルを提起することができた。

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 件)

〔学会発表〕(計 2件)

木村 透. ニホンザルの真皮メラノサイ

トーシスに対するハイドロキノンの治療改善効果、第45回日本比較臨床医学会学術集会、2015年3月1日、東京農工大学（東京都・府中市）
木村 透、実験動物医学からの皮膚科学領域へのアプローチ、第46回日本比較臨床医学会学術集会、2016年3月1日、日本獣医生命科学大学（東京都・武蔵野市）
〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 透 (Kimura Tohru)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：80419027

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：