

生薬エキスのアトピー性皮膚炎モデルマウス皮膚炎症状に対する作用

高野 憲一,^{*,a} 井野口友紀,^a 倉地道雄^bEffects of Ethanol Extracts of Herbal Medicines on Dermatitis
in an Atopic Dermatitis Mouse ModelNorikazu TAKANO,^{*,a} Yuki INOKUCHI,^a and Michio KURACHI^b

^aMaterials Research & Development, R&D Laboratories, Self Medication Business, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 1-403 Yoshino-cho, Kita-ku, Saitama 331-9530, Japan, and ^bKampo & Herval, R&D Headquarters, Self Medication Business, Taisho Pharmaceutical Co., Ltd., 3-24-1 Takada, Toshima-ku, Tokyo 170-8633, Japan

(Received August 3, 2010; Accepted December 15, 2010; Published online January 18, 2011)

Atopic dermatitis is a chronic and relapsing inflammatory skin disease that is characterized by highly pruritic, eczematous skin lesions. Our previous study elucidated that nerve growth factor (NGF) plays an important role in the pathogenesis of skin lesions and inhibition of the physiological effects of NGF can moderate skin lesions in atopic dermatitis. In this study, we investigated the effects of ethanol extracts of herbal medicines on neuritic outgrowth induced by NGF. Four herbal extracts (*Geranium thunbergii*, *Humulus lupulus*, *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* L.) inhibited NGF-induced neuritic outgrowth in PC12 cells. We also investigated the effects of each herbal extract on dermatitis in NC/Nga, an atopic dermatitis mouse model. The skin lesions of the NC/Nga mice were significantly inhibited by repeated applications of each herbal extract. These results suggested that the four herbal extracts can prevent and moderate the symptoms of atopic dermatitis, and these effects might be appeared by inhibiting the effect of NGF on neuritic outgrowth in lesional skin.

Key words—atopic dermatitis; herbal medicine; neurite outgrowth; NC/Nga mouse

はじめに

アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す、痒みのある湿疹を主病変とする慢性皮膚疾患であり、皮膚の乾燥とバリア機能異常という皮膚の生理学的異常を伴い、多彩な非特異的刺激性反応及び特異的アレルギー反応が関与して生じる。¹⁾ その臨床症状の特徴は、慢性皮膚病変とそれに伴う極度の掻痒感であり、痒みにより誘発される激しい掻破行動は皮膚症状を悪化させ、さらに痒みを増強するという悪循環が起こる。²⁾ さらに、痒みは患者の QOL (quality of life) を著しく低下することからも、痒みを抑制することが治療において重要視されている。³⁾

アトピー性皮膚炎では、通常では痒みを感じない

ような刺激でも痒みを生じる、痒み閾値の低下が起きており、⁴⁾ 通常皮膚の知覚神経は表皮と真皮の境界部までしか伸びていないが、そのような皮膚では表皮内にまで多くの知覚神経線維が伸長している。^{5,6)} このような状態は、ドライスキンや敏感肌といった状態においても起きている。^{7,8)} 皮膚の知覚神経伸長には、表皮細胞が産生する神経成長因子 (Nerve growth factor, NGF) が関与することが報告されている。⁹⁾ そこでわれわれは、その作用を阻害することが症状の改善につながると考え、これまでにアトピー性皮膚炎動物モデルとして汎用されている NC/Nga マウス¹⁰⁾ を用いて検討を行ったところ、抗 NGF 中和抗体及び高親和性 NGF 受容体阻害剤を連続投与することで、NC/Nga マウスの皮膚炎症状が有意に抑制された。^{11,12)} このことから、皮膚において過剰に産生された NGF の作用を阻害することが、皮膚炎症状の改善につながることが示唆された。

^a大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所 探索・開発研究室, ^b大正製薬株式会社セルフメディケーション研究開発本部漢方生薬開発研究室

*e-mail: n.takano@po.rd.taisho.co.jp

アトピー性皮膚炎の炎症に対しては、主にステロイド外用薬やタクロリムス軟膏が用いられ、その有効性は科学的に立証されているが、皮膚萎縮や一過性の刺激感などの副作用も指摘されている。^{13,14)} 本研究では、比較的副作用が少ないと考えられる生薬エキスについて、表皮内への知覚神経伸長を抑制し、皮膚炎症状を改善するものを見い出すため、培養神経細胞及びアトピー性皮膚炎動物モデルを用いて評価を行った。

実験材料及び実験方法

1. 実験材料 各生薬エキスは、以下のように抽出したエキスを松浦薬業㈱より入手した。各生薬を細切し、10倍量 (w/v) のエタノール：水混合液 (1:1) で沸騰後30分間抽出、メッシュにて濾過した後、エバポレータを用いてエタノールを除去したものを軟エキスとし、実験に供した。

ラット褐色腫由来細胞 (PC12細胞) は理化学研究所より入手し、以下のように調製して実験に供した。PC12細胞は、10%ウシ胎児血清、5%ウマ血清、50 U/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, USA) を培地とし、37°C、5%CO₂ 下で培養した。

2. 神経成長因子誘発神経細胞突起伸長に対する生薬エキスの作用 細胞突起伸長の評価は Neurite Outgrowth Quantification Assay Kit (CHEMICON International Inc., USA) を用い、過去の報告に準じて行った。^{15,16)} 300 ng/ml NGF (GIBCO, USA) 及び生薬エキス (乾燥エキス量として 100 µg/ml になるよう調製) を含む無血清培地に、コラーゲンコートした細胞添加用チャンバーを移し、各チャンバーに 2×10⁶ cell/ml の PC12 細胞懸濁液を 100 µl 添加した。3日間培養後、細胞を crystal violet で染色し、伸長した細胞突起のみが残るようチャンバー底部膜上の細胞を綿棒で除去した。その後、溶出液 (25% 0.2 M acetate buffer pH 4.5, 50% reagent alcohol) にて溶出し、540 nm での吸光度を測定することで、細胞突起の量を評価した。各検体の作用評価は1ウェルずつで実施し、下記計算式により抑制率を算出、2回の試験の平均値を示した。

被験物質の細胞突起伸長抑制率 (%)

$$= \frac{(\text{溶媒添加時の吸光度}) - (\text{被験物質添加時の吸光度})}{(\text{溶媒添加時の吸光度})} \times 100$$

3. 実験動物 本研究には日本エスエルシー㈱より購入した NC/Nga 系雄性マウスを用い、一般状態、発育が良好であることを確認した後、試験に供した。飼育環境は、温度を 23±3°C、湿度を 55±15%、照明時間は明暗各 12 時間周期 (照明：7:00 から 19:00) に設定した。飼料 (MF, オリエンタル酵母工業㈱) 及び殺菌水は自由に摂取させた。なお、本動物実験は、大正製薬株式会社が定める「動物実験に関する指針」に従って行った。

4. NC/Nga マウス皮膚炎症状に対する生薬エキスの作用 NC/Nga マウス皮膚炎症状に対する評価は、過去の報告に準じて行った。^{11,17,18)} 本試験に用いた NC/Nga マウスは、既に皮膚炎を発症した NC/Nga マウスと 1 週間同居させることで皮膚炎を誘発させた。各生薬エキスは 50%エタノールを溶媒とし、原生薬量 10% (w/v) に調製し使用した。各検体 100 µl を背部皮膚に 1 日 1 回、1 週間に 5 日、7 週間塗布した。皮膚症状の観察は 1 週間に 1 回行った。皮膚症状は検体塗布部位の状態を 7 段階に分類、それぞれを 0-6 点とした (評点 0: 変化なし, 評点 1: 軽度な落屑, 評点 2: 一部に軽度な炎症及び痂皮, 評点 3: 広範囲に軽度な脱毛, 炎症及び痂皮, 評点 4: 広範囲に軽度な脱毛, 一部に出血を伴う炎症及び痂皮, 評点 5: 広範囲に脱毛, 出血を伴う炎症及び痂皮, 評点 6: 広範囲に脱毛, 出血を伴う激しい炎症及び痂皮)。各群の値は、メジアン及び四分位範囲により示した。また、検体塗布部位の経皮水分蒸散量をテヴァメータ (Courage+Khazaka, Germany) を用いて測定した。各群の値は、平均値及び標準誤差により示した。

5. 統計解析 統計解析は、SAS 前臨床パッケージ ver. 5.0 (SAS Institute Japan ㈱) を用いて実施した。NC/Nga マウスの皮膚炎スコアにおける比較は、Wilcoxon 検定により、経皮水分蒸散量における比較は、まず *F* 検定により等分散性の確認を行い、等分散であった場合は Student の *t* 検定、不等分散であった場合は Welch の *t* 検定により実施し、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

結 果

1. 神経成長因子誘発神経細胞突起伸長に対する生薬エキスの作用 種々の生薬エキスについて評価した結果, Table 1 に示したように, ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*), ホップ (*Humulus lupulus*), ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) 及びセージ (*Salvia officinalis* L.) の4種が高い阻害作用を示した.

Table 1. Inhibitory Effects on NGF-induced Neuritic Outgrowth in PC12 Cells

	Inhibition ratio(%)
<i>Geranium thunbergii</i> (ゲンノショウコ)	78.7
<i>Humulus lupulus</i> (ホップ)	95.9
<i>Rosmarinus officinalis</i> (ローズマリー)	91.4
<i>Salvia officinalis</i> L. (セージ)	98.4

Each value is inhibition ratio compared with the value of vehicle application, and is the mean for two tests.

2. NC/Nga マウス皮膚炎症状に対する生薬エキスの作用 NC/Nga マウスにゲンノショウコ, ホップ, ローズマリー及びセージをそれぞれ背部皮膚に連続投与したときの皮膚炎スコア推移を Fig. 1 に示した. 塗布終了時点において, いずれの生薬エキスも有意な皮膚炎抑制作用を示した. このときの, 各群の背部皮膚症状の一例を Fig. 2 に示した. このように溶媒塗布群では, 広範囲にわたり出血を伴う搔破痕が認められたが, 各生薬エキスの塗布部位では軽度の鱗屑が認められるのみで, 搔破痕が認められる個体は少数であった. また, 8週間経過時における経皮水分蒸散量の測定結果を Fig. 3 に示した. いずれの生薬エキス塗布群においても抑制される傾向があり, ホップ塗布群では有意な抑制作用が認められた.

考 察

NGF には高親和性受容体 (tropomyosin-related kinase A, TrkA) と低親和性受容体の2種類が存在

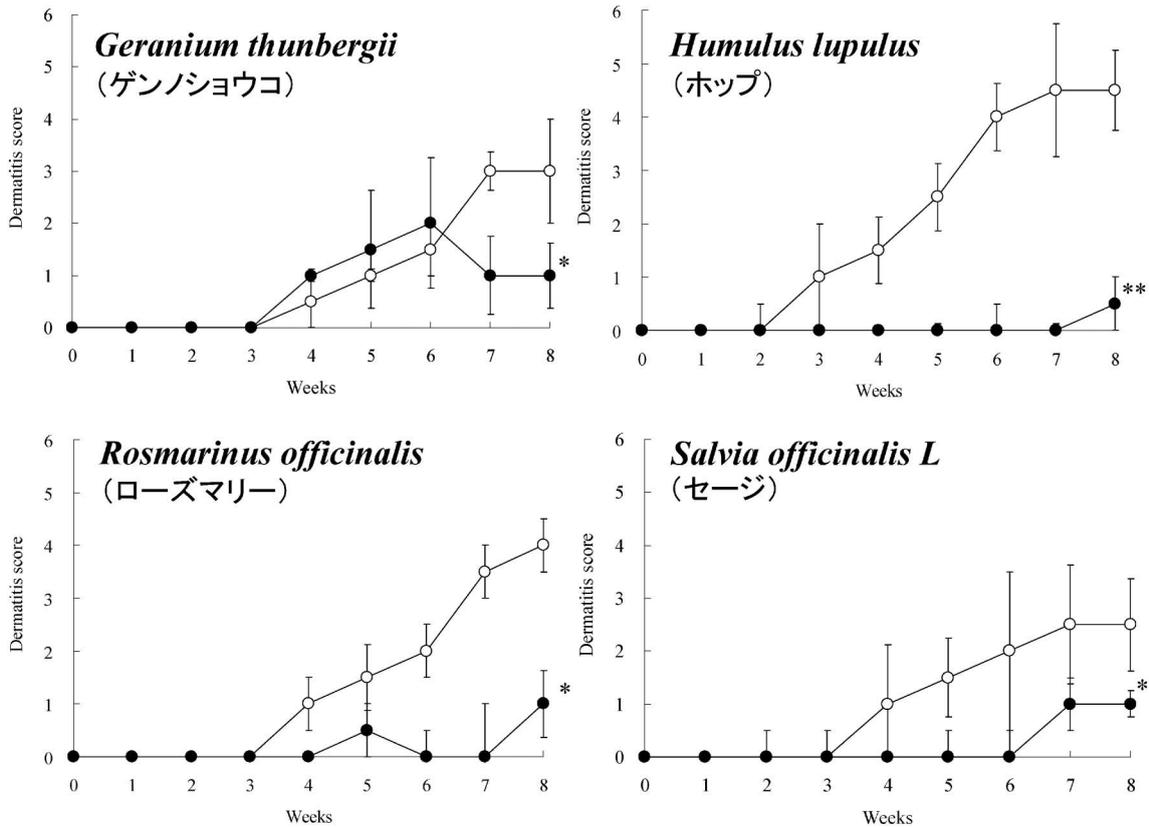


Fig. 1. Effects on Development of Dermatitis in NC/Nga Mice

Open circles: vehicle applied group. Closed circles: herbal extract applied group. Each value is the median and quartile deviation for 7-8 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Wilcoxon's test).

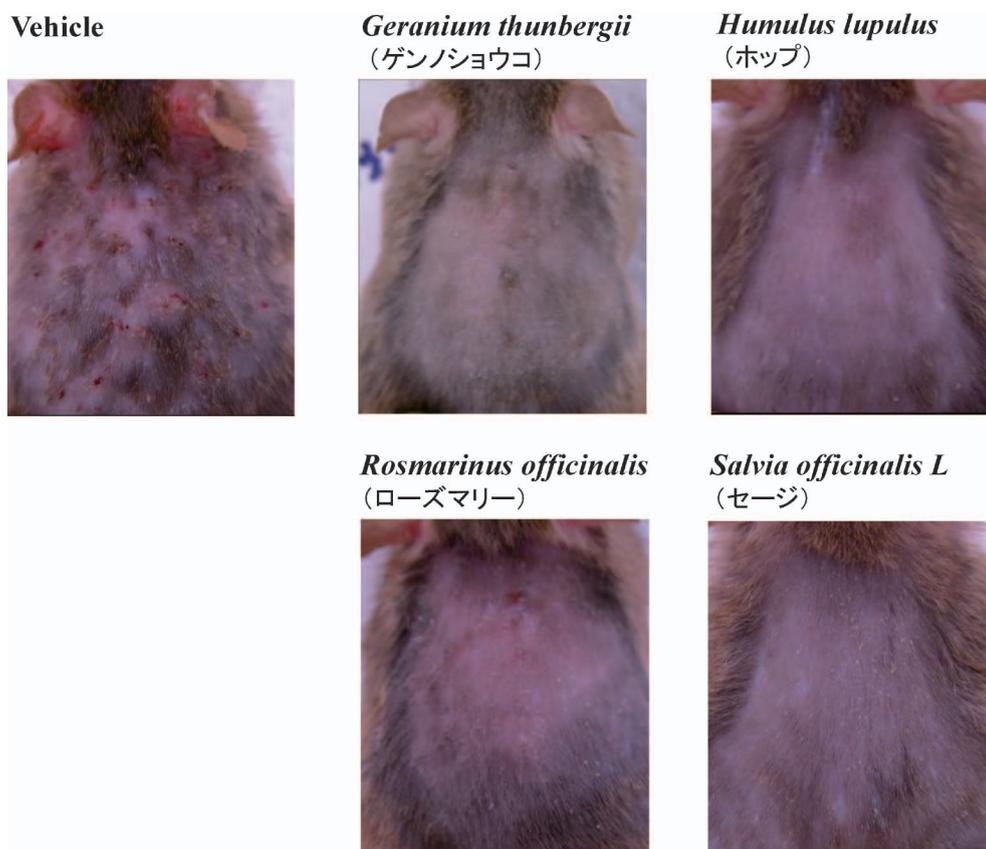


Fig. 2. Symptom of Dermatitis in NC/Nga Mice
Thime back skin image of NC/Nga mouse is a typical example of each group.

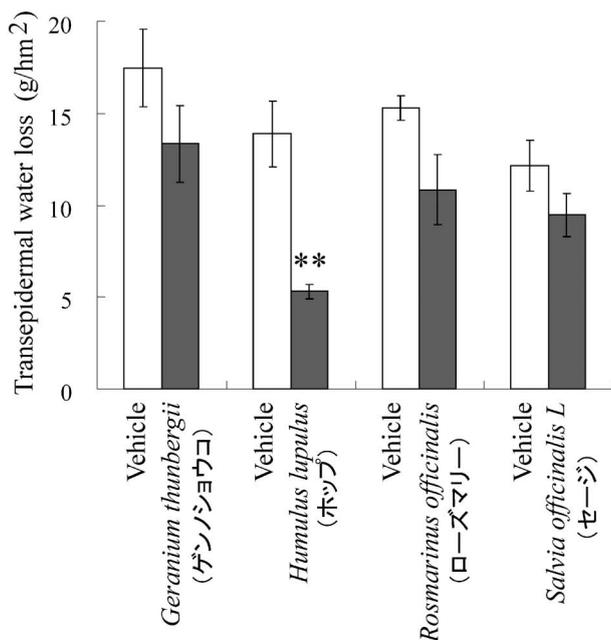


Fig. 3. Effects on Transepidermal Water Loss of NC/Nga Mice

Each value is the mean and S.E. for 7–8 mice. ** $p < 0.01$ (Welch's test).

し、NGFはTrkAに結合することで神経細胞の生存維持や神経突起の伸長、神経伝達物質の合成促進などの作用を誘導する。^{19–21}チロシナーゼ阻害剤であるAG879はNGF-TrkAの反応を阻害する作用を有することが知られており、²²本*in vitro*評価系においてもNGFにより誘発されるPC12細胞突起伸長を濃度依存的に阻害した($IC_{50} = 46.9$ nM)。この評価系において、数種生薬エキスの作用を検討した結果、ゲンノショウコ、ホップ、ローズマリー及びセージの4種に高い阻害作用が認められた。なお、本評価にて、細胞接着に影響を与えていないこと、細胞死が起きていないことを確認している。次に、これらエキスをNC/Ngaマウスに連続塗布を行った結果、いずれも有意な皮膚炎抑制作用を示した。

ゲンノショウコはフウロソウ科の植物で、含有成分はgeraniin, quercetin, kaempferitrinなどが報告されている。^{23,24}本試験では、全草を乾燥したものを使用した。ホップはアサ科の植物で、含有成分は

humulone, lupulone などが報告されている。²⁵⁾ 本試験では、雌花序を乾燥したものを使用した。ローズマリーはシソ科の植物で、含有成分は rosmarinic acid, carnosic acid などが報告されている。²⁶⁾ 本試験では、全草を乾燥したものを使用した。セージはシソ科の植物で、含有成分は carnosic acid, carnosol などが報告されている。²⁷⁾ 本試験では、全草を乾燥したものを使用した。これら生薬についての抗アレルギー作用の報告はいくつかあり、²⁸⁻³⁰⁾ ホップについては水抽出物経口投与のアトピー性皮膚炎抑制作用が報告されているが、³¹⁾ いずれについても外用によるアトピー性皮膚炎抑制作用についての報告はないため、新たな症状改善薬の可能性を見出すことができたと考えている。

本検討において、NGF 誘発 PC12 細胞突起伸長抑制作用は 1 濃度でしか評価していないため、作用の強さを比較するために、今後 IC₅₀ 値を算出する必要があると考える。また、各生薬の有効成分についても、今後さらなる検討により明らかにする必要がある。

以上をまとめると、ゲンノショウコ、ホップ、ローズマリー及びセージエキスは、皮膚炎を抑制する作用を有することが示唆され、ドライスキンや敏感肌、アトピー性皮膚炎などの痒み過敏状態を呈する状態において、有用な予防あるいは治療薬になり得ることが示唆された。そして、その作用は表皮における過剰な神経伸長を抑制する作用が関与している可能性が示唆されたが、直接的な関連性を明らかにするには今後さらなる検討が必要である。

REFERENCES

- 1) Furue M., Saeki H., Furukawa F., Hide M., Ohtsuki M., Katayama I., Sasaki R., Suto H., Takehara K., *Jpn. J. Dermatol.*, **119**, 1515-1534 (2009).
- 2) Wahlgren C.-F., *J. Dermatol.*, **26**, 770-779 (1999).
- 3) Koblenzer C. S., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **104**, S109-S113 (1999).
- 4) Ikoma A., Rukwied R., Ständer S., Steinhoff M., Miyachi Y., Schmelz M., *Arch. Dermatol.*, **139**, 1455-1458 (2003).
- 5) Tobin D., Nabarro G., de la Faille H.-B., van Vloten W.-A., van der Putte S.-C.-J., Schuurman H.-J., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **90**, 613-622 (1992).
- 6) Urashima R., Mihara M., *Virchows Arch.*, **432**, 363-370 (1998).
- 7) Takamori K., *Jpn. J. Clin. Dermatol.*, **54**, 52-56 (2000).
- 8) Takamori K., *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, **29**, 130-133 (2005).
- 9) Toyoda M., Nakamura M., Makino T., Hino T., Kagoura M., Morohashi M., *Br. J. Dermatol.*, **147**, 71-79 (2002).
- 10) Matsuda H., Watanabe N., Geba G.-P., Sperl J., Tsudzuki M., Hiroi J., Matsumoto M., Ushio J., Saito S., Askenase P.-W., Ra C., *Int. Immunol.*, **9**, 461-466 (1997).
- 11) Takano N., Sakurai T., Ohashi Y., Kurachi M., *Br. J. Dermatol.*, **156**, 241-246 (2007).
- 12) Takano N., Sakurai T., Kurachi M., *J. Pharmacol. Sci.*, **99**, 277-286 (2005).
- 13) Smith E.-W., *Curr. Probl. Dermatol.*, **22**, 124-131 (1995).
- 14) Assmann T., Homey B., Ruzicka T., *Expert Opin. Pharmacother.*, **2**, 1167-1175 (2001).
- 15) Smit M., Leng J., Klemke R.-L., *BioTechniques*, **35**, 254-256 (2003).
- 16) Lim M.-S., Nam S.-H., Kim S.-J., Kang S.-Y., Lee Y.-S., Kang K.-S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 903-909 (2007).
- 17) Takano N., Arai I., Kurachi M., *Br. J. Dermatol.*, **154**, 426-430 (2006).
- 18) Suzuki M., Takano N., Kurachi M., Matsumoto K., Ohara Y., *Skin Res.*, **7**, 610-615 (2008).
- 19) Johnson D., Lanahan A., Buck C.-R., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M., Chao M., *Cell*, **47**, 545-554 (1986).
- 20) Kaplan D. R., Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Chao M. V., Parada L. F., *Science*, **252**, 554-558 (1991).
- 21) Hempstead B. L., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 260-267 (2002).
- 22) Ohmichi M., Pang L., Ribon V., Gazit A., Levitzki A., Saltiel A. R., *Biochemistry*, **32**, 4650-4658 (1993).
- 23) Okuda T., Mori K., Hayashi N., *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1143-1149 (1976).
- 24) Nishimoto N., Inoue J., Ogawa S., Takemoto T., *Shoyakugaku Zasshi*, **34**, 131-137 (1980).
- 25) Van Cleemput M., Cattoor K., De Bosscher

- K., Haegeman G., De Keukeleire D., Heyerick A., *J. Nat. Prod.*, **72**, 1220–1230 (2009).
- 26) del Baño M. J., Lorente J., Castillo J., Benavente-García O., del Río J. A., Ortuño A., Quirin K. W., Gerard D., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4247–4253 (2003).
- 27) Cuvelier M.-E., Berset C., Richard H., *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 665–669 (1994).
- 28) Kimura Y., Arichi S., *Farumashia*, **22**, 1120–1123 (1986).
- 29) Tada M., *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, **184**, 33–39 (2000).
- 30) Segawa S., Yasui K., Takata Y., Kurihara T., Kaneda H., Watari J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2990–2997 (2006).
- 31) Segawa S., Kuroda H., Kaneda H., Watari J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 974–981 (2008).