発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み

大阪大学大学院医学研究科情報統合医学皮膚科学教室

室田 浩之

Abnormal sweating has been thought to contribute to pathogenesis of various dermatoses in diverse ways. Exploration of novel sweating-regulating factors may provide a clue to formulate treatment strategies for these patients. Previously, we reported that decreased sweating contributed to pathogenesis of atopic dermatitis. If we could determine the factor influencing sweating in atopic dermatitis, it might be applied to treatment for patients with abnormal sweating. Thus, we explored the factors influence sweating in atopic dermatitis. Firstly, we focused on histamine, which is known as to play wide range roles in allergic dermatoses. The impact of histamine to acethylcholine-induced sweating response was measured with counting the number of active sweat gland by starch-iodin reaction, dynamic optical coherence tomography, visualizing sweat by two-photon excitation fluorescence microscopy, and quantitative sudomotor axon reflex test. Histamine demonstrably inhibited the acethylcholine-induced sweating in both murine and human via H1 receptor-mediated signaling. These results might provide basis for understanding pathogenesis and formulating novel therapeutic approach for dermatoses with dysregulated homeostasis.

1．緒　言

発汗は温度調節、感染防御、保湿という重要な機能を担う皮膚の生理機能であり、発汗過多は多汗症や低体温、乏汗はうつ熱・易感染性・皮膚乾燥に繋がる。発汗機能異常を制御する方法が確立できれば様々な皮膚のトラブルを改善できると想像される。現在のところ塩化アルミニウムによる汗管閉塞、水道水によるイオントフォレーシスが多汗症に応用されているが無効例も少なくなく、乏汗は未だ有効な治療方法がないのが実情である。発汗を制御する方法が確立されればスキンケアはもとより様々な皮膚疾患の治療に応用できると期待される。

発汗はコリン作動性の交感神経支配を受けているが、具体的な制御機構は不明の点が多い。少なくともコリン誘導性発汗に影響を与える因子の探索は発汗制御因子の同定に繋がると期待される。これまでに私達はアトピー性皮膚炎患者におけるアセチルコリン反応性発汗機能を測定し、その中でアトピー性皮膚炎においてアセチルコリン誘導性発汗量が減少していることを報告してきた[1)]。アトピー性皮膚炎でコリン性発汗が減少しているメカニズムを解明することにより、発汗機能を制御できる因子の同定に繋がるはずだ。先行する研究成果において、アトピー性皮膚炎は外用薬や抗ヒスタミン薬の内服によって症状が改善すると発汗機能も改善することが報告されている。このことからアレルギー炎症に関わる化学伝達物質が発汗を抑制するのではないかと推察される。本研究では特にヒスタミンが発汗に与える影響について検討を行った[2)]。

Maintenance of skin homeostasis via regulating sweating

Hiroyuki Murota

Department of Dermatology Course of Integrated Medicine Graduate School of Medicine, Osaka University

2．実　験

2.1　動　物

11－12週齢のC57BL6およびH1RKOマウスを用いた。マウスの全身麻酔はドミトール、ベトロファール、ドルミカム三種混合薬を腹腔内投与することで実施した。動物の管理は大阪大学のガイドラインに基づいて行った。

2.2　試　薬

ピロカルピン塩酸塩（50μg/20μl/mice）、ヒスタミン（120μg/20μl）を用いた。ヒスタミン受容体拮抗薬としてピリラミン（700μg/body）、フェキソフェナジン（600μg/body）、シメチジン（400μg/body）を腹腔内投与した。

2.3　in vivo発汗試験

マウスを用いたミノール法変法（ヨウ素澱粉反応）により発汗量を半定量化する試みを行った。ヨウ素澱粉反応による発汗の評価方法は文献３を参照した。

2.4　光コヒーレンストモグラフィー（OCT）

マウスの足底の発汗の動態をOCTによって評価した。OCTのイメージはBモードOCTから得られたx-z planeより作成した。

2.5　二光子顕微鏡

マウス足底の生体における汗腺動態は二光子顕微鏡を用いて観察した。方法と条件は文献４を参照した。汗腺はM3受容体抗体、APQ5抗体を用いて、核はhoechst33342、

血管をTexas redラベルされたデキストランを静脈内投与することで可視化した。画像はVolocity 3Dイメージ解析ソフトを用いて作成された。

2.6　統計解析

Prism5ソフトウェアを用いて解析した。Bonferroni's multiple comparison testによって評価し、$^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$を有意とした。

3．結　果

3.1　発汗評価方法の妥当性に関する検討

マウスの発汗を評価する方法としてミノール法変法がある。ピロカルピンをマウス足底に皮下注射し数分後のヨード澱粉反応点の数を評価したところ、ピロカルピン投与後に顕著な数の増加が確認された（図1A）。さらに表皮内から皮膚表面への汗の動態をOCTによって観察した。その結果、表皮内汗管に沿って上行し、皮膚表面に間欠泉のように吹き出す汗の様子が観察できた（図1B）。

3.2　ヒスタミンがピロカルピン誘導性発汗に与える影響

上述した発汗評価法を用い、ヒスタミンが発汗に与える影響を観察した。ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与されたマウスではミノール法変法において皮膚表面への発汗が著しく減少しているのが確認された（図1A）。OCTによる観察では、ヒスタミン投与後、皮膚表面はもとより表皮内汗管を通る汗も確認されなくなった（図1B）。ヒスタミンの発汗抑制作用はどの受容体を介して発揮されるのかを調べるために各種ヒスタミン受容体拮抗薬を投与し、ミノール法変法によって評価した（図2）。この抑制作用はH1受容体拮抗薬（ピリラミン、フェキソフェナジン）で阻害されるが、H2およびH4受容体拮抗薬では阻害さ

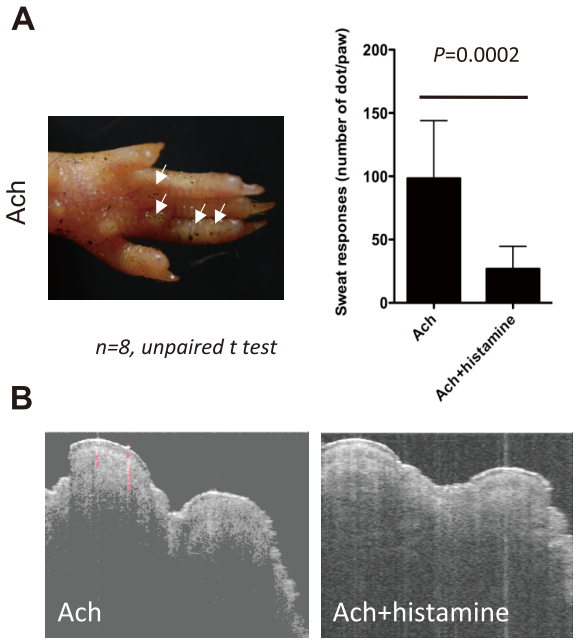

図1　マウスの足底の発汗動態の解析結果
A. ミノール法変法による発汗評価。Ach: ピロカルピン。
B. OCT による汗の動態観察結果。

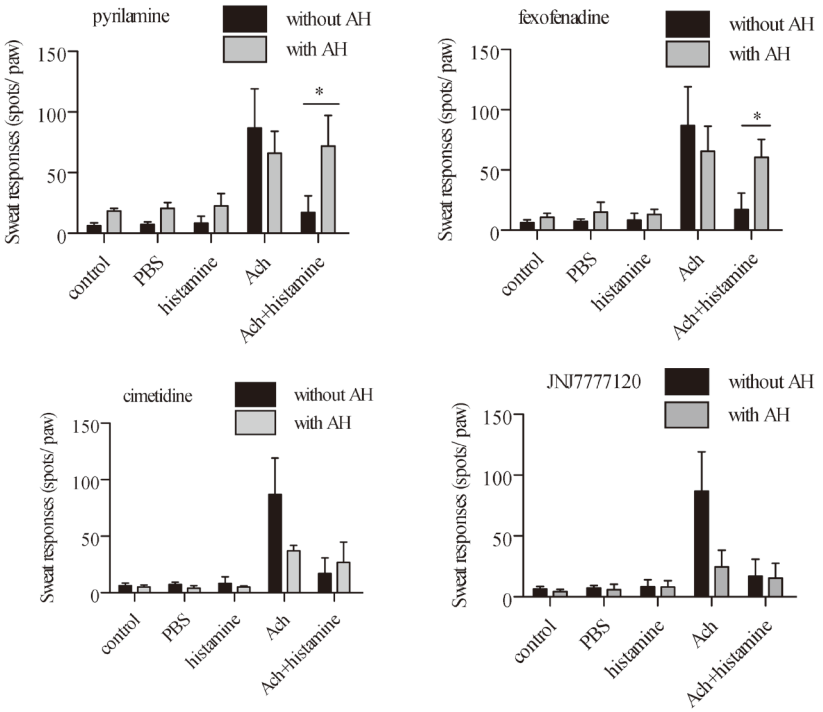

図2　ヒスタミン受容体拮抗薬の効果
ミノール法変法を用いて各種ヒスタミン受容体拮抗薬の影響を確認した。AH : antihistamine. PBS : phosphate buffered saline. Ach : pirocarpin。

れない（図２）。このことからヒスタミンはH1受容体を介して抑制すると考えられた。実際にH1RKOマウスではヒスタミンによる発汗抑制作用は著しく減弱していた（data not shown）。

次にヒスタミンはどのように発汗を阻害するのかに疑問がのこる。ミノール法変法やOCTによる観察では表皮内汗管の汗も確認されなかったことからヒスタミンは汗腺に作用することで発汗を抑止すると想像される。しかし既存の評価方法では汗管よりも表皮側の領域しか観察することができない（図３）。そこで二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察を試みることとした。

3.3　二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察

二光子顕微鏡で観察した汗腺の動態観察結果を図４に示す。ピロカルピンを腹腔内投与し約10分後から発汗活動が観察される。汗腺に存在する汗腺分泌細胞が腫大し、縮まる際に黒いドット（opaque spot）様のFITC強度の退色が確認される。FITCの蛍光強度低下は汗の酸性によって生じるのではないかと想像され、このopaque spotが汗をあらわしていると考えた（図４Ａ）。一方、ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与した際、汗腺の拡張は確認されたが、opaque spotは確認されなかった（図４Ｂ）。さらに汗腺の拡張は数十分続くことから、汗腺分泌細胞から汗管への汗の移動が損なわれているものと考えられた（図４Ｃ）。つまりヒスタミンは汗腺分泌細胞に作用することで汗の分泌を止めるものと考えられた。

４．考　察

上述したように私達はアトピー性皮膚炎で乏汗が生じている事をアセチルコリンによる定量的軸索反射発汗試験を

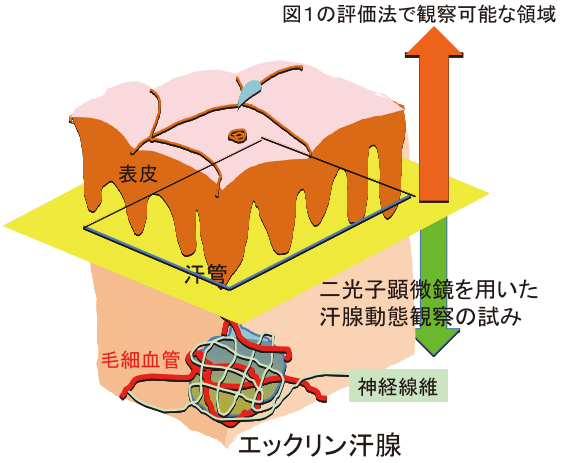

図３　汗腺の微小環境とこれまでの実験結果の小括のシェーマ

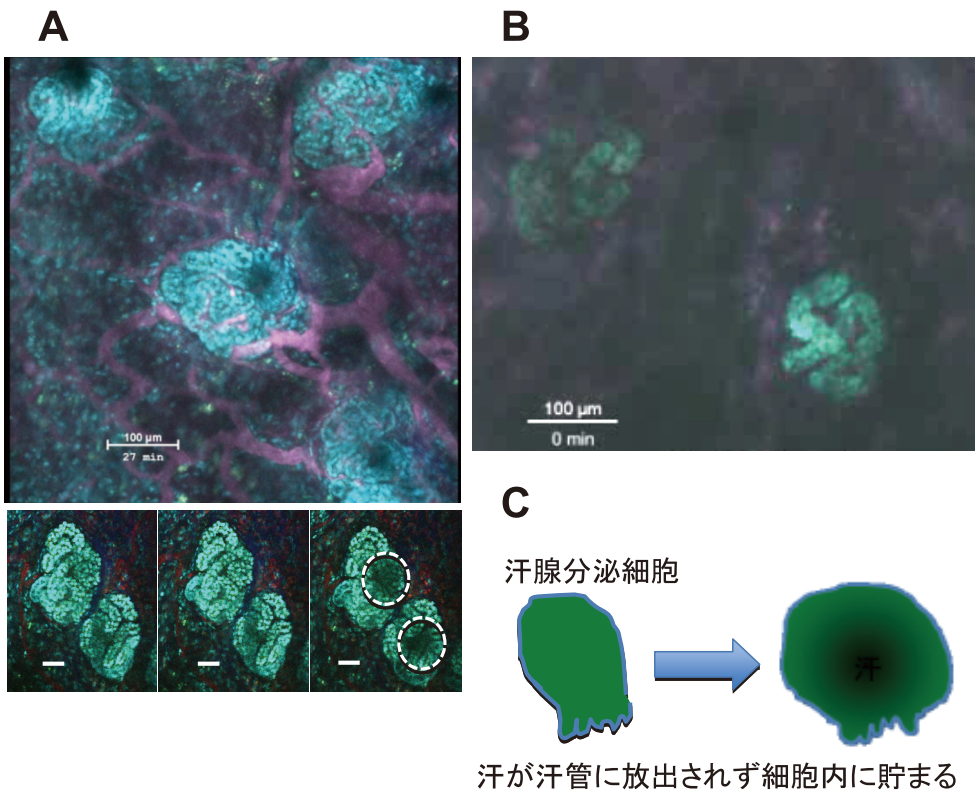

図４　二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察

A. ピロカルピン投与後の汗腺。緑：汗腺。赤：血管。点線でかこんだ黒いopaque spotは汗を示す。B. ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与した際の汗腺の動態。C. ヒスタミン投与後の汗腺分泌細胞の動態に関するシェーマ。

用いて証明してきた[1]。アトピー性皮膚炎患者でみられる発汗量の低下は皮膚の恒常性を損なうことで症状悪化に関わると考えられる。発汗量が低下する機序として（A）汗の排出異常、（B）汗腺からの汗の産生および分泌の異常、の２つがある。（A）の原因として汗孔の角栓形成に伴う閉塞、あるいは汗管から組織中への汗の漏出が考えられている。（B）の原因として、自律神経失調や発汗誘発因子であるアセチルコリンへの反応の低下が報告されている。アセチルコリン応答性発汗は定量的軸索反射性発汗試験（Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test：QSART）で詳細な評価が可能である。この試験ではアセチルコリンをイオントフォレーシスによって皮膚に浸透させ、末梢神経の軸索反射を介して生じた発汗量（軸索反射性発汗量）と発汗に要する時間が測定できる。この結果、軸索反射性発汗量はアトピー性皮膚炎で少なく、健常人の約半分であることが分かった[1]（図４）。さらにアセチルコリン投与から発汗までの時間がアトピー性皮膚炎群では健常人よりも長時間かかる[1]（図４）。このように、アトピー性皮膚炎は乏汗状態にあり、発汗すべき時に少しずつまばらにしか汗が出ていないと想像できる。乏汗は皮膚に熱をこもらせ、乾燥させ、病原体への抵抗性を損なうため皮膚炎症状を悪化させる。乏汗の背景として自律神経の失調、患者の不安性格傾向、アレルギー炎症の関与が考えられている[1]。より詳細に乏汗のメカニズムが解明されれば、具体的な指導箋の確立に有益な情報になろう。私たちはアレルギー炎症の病態形成に関わる因子が発汗を抑制すると考え、乏汗を引き起こす因子の探索を行った[1]。その結果、ヒスタミンはアセチルコリン誘導性発汗を抑制する事を確認した。この現象はヨウ素澱粉反応と光コヒーレンストモグラフィーを用いた汗そのものの生体内動態イメージングで観察された[2]。さらに二光子顕微鏡を用いたエックリン汗腺の生体内動態解析より、ヒスタミンは汗腺細胞からの汗の分泌を阻害しており、この現象はヒスタミンが汗腺分泌細胞内でグリコーゲン合成酵素の活性に影響する結果であることを確認した[1]（data not shown）。このヒスタミンによる汗分泌阻害作用はH1受容体を介しており、抗ヒスタミン薬はヒスタミンの関与する乏汗を改善する効果が期待される[1]。ヒスタミンがアトピー性皮膚炎で見られる乏汗にどのくらい関与するかについては懸案事項であるが、これらの知見は原因不明とされる後天性特発性全身性無汗症にもヒスタミンの関与する症例があるのではないかと想像させる。実際に、後天性特発性全身性無汗症の確立された治療方法はないが、ステロイドパルス治療の奏功する症例のあることから本治療が適用されてきた。しかし、ステロイドパルス治療にも抵抗性を示す症例も少なくない。本研究成果よりステロイドパルス治療抵抗性を示す後天性特発性全身性無汗症症例の中に抗ヒスタミン薬の有効例があるかもしれないと考えた。QSARTおよび全身ミノール法によって無汗症の確認された後天性特発性全身性無汗症２症例に抗ヒスタミン薬を投与したところ、投与量を通常量から増量していく過程でQSARTにおいて検出可能なレベルの発汗が確認されるようになった。その後徐々に入浴や運動等によって患者の自覚できる発汗を促したところ、日常生活に支障のないレベルまで発汗が改善した。本研究の成果から着想に至った後天性特発性全身性無汗症の治療経験から、私たちはステロイドパルスを行う前に抗ヒスタミン薬の適宜増量と発汗を促す指導を施行することを推奨している（Suma A et al. Acta Derm Venereol, accepted）。発汗を制御することで皮膚恒常性維持に貢献できた具体的な事例となり、今後他疾患への応用も検討していく予定である。

５．総　括

無汗・乏汗症にはまだまだ未知の病態が隠されている。発汗機能を評価する科学的手法も進歩しており、これらを用いることで臨床現場での皮膚科医の些細な疑問や発見が病態の解明につながり、発汗による皮膚のホメオスタシス改善が新しい治療のアウトカムになりうるものと期待される。最後に謝辞として、このような貴重な機会を与えてくださったコスメトロジー研究振興財団、そして本研究にご協力ご指導をくださった大阪大学保健学　近江雅人先生、大阪大学医学系研究科免疫細胞生物学　石井　優先生に拝謝する。

（引用文献）

１）Kijima A, Murota H, Matsui S, Takahashi A, Kimura A, Kitaba S, Lee JB and Katayama I: Abnormal axon reflex-mediated sweating correlates with high state of anxiety in atopic dermatitis. Allergol Int, 2012; 61: 469-473.

２）Matsui S, Murota H, *et al*.Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acethylcholine-iduced sweating via GSK3b activation. J Invest Dermatol. 2013;134:326-334.

３）Nejsum LN, Kwon TH, Jensen UB, *et al*. Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002,99:511-6.

４）Ishii M, Egen JG, Klauschen F, *et al*. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009, 458:524-8.