

下肢静脈瘤患者における搔痒発症の機序に関する研究

2017

高井 靖

Biological mechanism of skin itchy in patients with varicose veins

2017

Yasushi Takai

目次

緒言	1
第1章 下肢静脈瘤患者における掻痒と炎症メディエーターの関係	
第1節 下肢静脈瘤患者における乾燥皮膚と炎症メディエーターの関係	
緒言	2
研究方法	3
結果	5
考察	12
小括	15
第2節 下肢静脈瘤患者における掻痒発症時の炎症メディエーターの性差	
緒言	16
研究方法	17
結果	19
考察	26
小括	30
第2章 下肢静脈瘤患者における掻痒と血清亜鉛の関係	
緒言	31
研究方法	32
結果	34
考察	41
小括	43
結語	44
引用文献	45
謝辞	51
英文要旨	52

緒言

下肢静脈瘤は、一般的な下肢の静脈疾患である。成人人口に対しての発症率は論文によって異なるが、加齢とともに増加することが知られている [1-3]。また立ち仕事や妊娠経験者に多いことも明らかにされている [1-4]。下肢静脈瘤は、静脈弁の機能不全により静脈血の逆流で生ずる。静脈弁の機能不全は、何らかの素因により炎症が引き起こされ、マトリックスメタロプロテナーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) の活性化により、静脈壁が拡張されることで生じると考えられている。[5-8]。

下肢静脈瘤では、痛み、腫れ、むずむず感、掻痒などの多様な症状が認められている [1-3]。その中でも掻痒を訴える患者は、エジンバラ静脈瘤研究において、下肢静脈瘤患者では女性の 25.3%と男性の 19.0%に認められ、さらに女性では、年齢が上がるほど掻痒を訴える患者が有意に増加することが報告されている [9]。三重ハートセンターの下肢静脈瘤患者で、掻痒に伴う Quality of life (QOL)の低下を訴える患者が非常に多い。しかし、下肢静脈瘤に伴う掻痒の発症機序は明らかでなく、治療法が確立していないのが現状である。そこで、本研究では、下肢静脈瘤患者における掻痒発症機序の解明を目的とした。まず第 1 章第 1 節では、下肢静脈瘤部位の乾燥皮膚と炎症性メディエーターの相関性について解析した。第 2 節では、下肢静脈瘤患者の掻痒発症機序における性差を解明するため、 β エンドルフィン (β -endorphin) と副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropic hormone : ACTH) を中心に解析した。第 2 章では、下肢静脈瘤患者における掻痒発症と血清亜鉛との関係について解析した。以下、本研究から得られた新知見について紹介する。

第1章

下肢静脈瘤患者における掻痒と炎症メディエーターの関係

第1節

下肢静脈瘤患者における乾燥皮膚と炎症メディエーターの関係

緒言

近年、非侵襲的で患者への負担が少ない簡易型皮膚肌水分測定器が普及し、角層水分量と経表皮水分喪失量を測定することにより、容易に皮膚状態を客観的に調べることができるようになった。この皮膚測定器を用いた研究としては、小腸炎症によりヘアレスマウスの皮膚バリア機能障害が発現したという大井らの研究報告がある [10]。この研究では、経表皮水分喪失量 (transepidermal water loss: TEWL) の上昇と角層水分量の低下が、血中ヒスタミンと免疫グロブリン E (immunoglobulin E: IgE) 濃度上昇と関係すること、また皮膚中のマスト細胞を介してトリプターゼと MMP-9 が増加することを明らかにしている。また、Fisher らは、MMP-9 が紫外線による皮膚の炎症および老化に関わることを明らかにし、皮膚を含めた多臓器での MMP-9 発現が生体内の炎症に関わることを示唆している [11]。そこで第1節では、下肢静脈瘤部位の乾燥皮膚と炎症メディエーターの相関性について解析した。

研究方法

1. 患者および対照被験者

対象は2014年3月から2014年12月の期間に、三重ハートセンターで下肢静脈瘤と診断され、硬化療法を受けた患者とした。対象患者には、年齢、性別、喫煙の有無、2型糖尿病の有無、高血圧の有無、家族歴、出産歴を調査した。下肢静脈瘤の診断は、下肢静脈超音波検査により行った。静脈瘤の重症度分類は、1994年、米国静脈フォーラム (American Venous Forum) 支援の国際コンセンサス会議で作成され、その後、改訂されたCEAP分類により行った [12-13]。静脈瘤は以下の7つの臨床徴候に特徴づけられている。C0 (無症状)、C1 (網目状静脈瘤)、C2 (静脈瘤、症候性)、C2a (静脈瘤、無症候性)、C3 (浮腫)、C4 (皮膚病変有)、C5 (治癒した潰瘍がある)、C6 (活動性潰瘍がある)。硬化療法は、治療する静脈瘤の部位に、1%ポリドカノールを注入して静脈瘤を固める手術を行った [14]。対照被験者は、疾患を有していないことを確認した健常人ボランティアとした。参加するすべての対象患者と対照被験者から、説明文書による参加同意を得た。本研究のプロトコルは、三重ハートセンター倫理委員会によって承認された (承認番号; 2014-07-068)。

2. 研究デザイン

同意が得られた対象患者に対して、硬化療法の前後での角層水分量、経表皮水分喪失量、掻痒の変化を測定した。また、硬化療法前後での採血にて炎症性メディエーターとしてサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、トリプターゼ、MMP-9 の測定を行った。また、同意が得られた対照被験者に対しては、同意を得た日に、角層水分量と経表皮水分喪失量を測定し、採血にてサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、トリプターゼ、MMP-9 の測定を行った。

3. 掻痒の測定

硬化療法の施行前と最終手技の 1 週間後に、下肢静脈瘤部位の掻痒を対象患者のみ評価した。下肢静脈瘤部位の掻痒の評価は、掻痒がないことを示す 0 から最大強度の掻痒を示す 4 までの 5 点フェイススケールを用いて行った [15]。

4. 血液の分離

各対象患者および対照被験者から 6mL 採血した。血漿は 1/10 量の 3.8%クエン酸 Na の存在下に 4°C で 3000 × g、10 分間の遠心分離を行い、分析まで -80°C で凍結保存した。

5. サブスタンス P、ヒスタミン、および IgE 濃度の分析

凍結保存した血漿を用いて、サブスタンス P (Enzo, Farmingdale, NY)、ヒスタミン (Bertin Pharm, Montigny-le-Bretonneux, France)、および IgE (Abcam, Tokyo, Japan) を、ELISA 分析キットを使用して鈴鹿医療科学大学薬学部実験室で測定した。

6. 角層水分量および TEWL の測定

硬化治療の前後で、皮膚測定装置[Tewameter TM300 および Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)]を用いて、測定プローブを患部に直接あてて角層水分量および TEWL を測定した。測定は室温 (22°C~26°C) で 20%~40%の湿度範囲で行った。

7. トリプターゼと MMP-9 の分析

トリプターゼと MMP-9 は、ウエスタンブロット法を用いて以下に示す方法で分析した[10]。採血液を溶解緩衝液 (Kurabo, Osaka, Japan) で均質化し、8000 × g で 10 分間遠心分離した後、その上清を分離し、分析まで-80°C で凍結保存した。解凍後、一定量の血清 (タンパク質 12.5µg/lane) を電気泳動し、分離後、4°Cで、5% skim milk で一晩ブロッキングした。ブロッキング後、泳動膜は、トリプターゼ (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、MMP-9 (1:1000; Abnova, Taipei, Taiwan)、β-actin (1:5000; Sigma, Saint Louis, MO, USA) に対する一次抗体で 25°C 1 時間インキュベートした。その後、二次抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を用いて 25°C 1 時間インキュベートした後、ImmunoStar Zeta (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて可視化した。画像は、Multi-Gauge software (FUJIFILM, SC, USA) を用いて得た。

8. 統計的分析

すべてのデータを平均±標準偏差として示した。Student's *t* 検定を用いて 2 群 (対象患者の硬化療法前と硬化療法後) を比較し、危険率が 1%未満の場合を統計的に有意と判断した。統計解析は IBM SPSS Statistics24 にて実施した。

結果

対象患者は、男性 8 名、女性 19 名、年齢は 42~77 歳（平均年齢 64.2 ± 10.3 歳）であった。その対象症例の内訳は、喫煙者は 4 名（男性 3 名、女性 1 名）、2 型糖尿病患者は 2 名（男性 1 名、女性 1 名）、高血圧症患者は 4 名（男性 1 名、女性 3 名）であったが、下肢静脈瘤の家族歴がある患者はいなかった。対照健常人は男性 4 例、女性 5 例、年齢は 29~50 歳（平均年齢 41.0 ± 6.9 歳）であった。すべて健常人に喫煙歴はなく、高血圧、2 型糖尿病の病歴および下肢静脈瘤家族歴も認められなかった。健常人のすべての女性に出産歴があった。(Table. 1)

患者は、CEAP 分類では、C2 と C3 が多く (81.5%)、C4 の重症患者は少なく (18.5%)、C5 および C6 の最重症に分類される患者はいなかった。(Table. 2)

掻痒は、27 名中 19 名 (70.4%) の患者が訴えていた。硬化療法後はすべて訴えが消失あるいは軽減した。掻痒の平均点数も、硬化療法前は 1.41 ± 1.28 点であったが、硬化療法後は 0.18 ± 0.47 点へと有意に減少していた ($p < 0.01$)。(Fig. 1)

皮膚測定結果については、角層水分量は、硬化療法前の $27.04 \pm 12.54 \mu\text{s}$ から硬化療法後は $37.74 \pm 12.81 \mu\text{s}$ ($p < 0.01$) へと有意に上昇し、同様に TEWL は、硬化療法前の $13.43 \pm 8.64 \text{ g/m}^2/\text{h}$ から硬化療法後は $9.78 \pm 5.60 \text{ g/m}^2/\text{h}$ へと有意に減少していた ($p < 0.01$)。(Fig. 2)。

炎症性メディエーターの分析結果については、サブスタンス P は、硬化療法前の $21.86 \pm 10.91 \text{ pg/mL}$ から硬化療法後は $6.87 \pm 6.44 \text{ pg/mL}$ 、ヒスタミンは、硬化療法前の $67.05 \pm 18.97 \text{ nM}$ から硬化療法後は $15.28 \pm 9.90 \text{ nM}$ 、IgE は、硬化療法前の $21.41 \pm 9.15 \text{ ng/mL}$ から硬化療法後は $14.14 \pm 5.62 \text{ ng/mL}$ へと共に有意に低下していた ($p < 0.01$) (Fig. 3)。

トリプターゼと MMP-9 については、コントロールとして用いた β -actin に対する比率に比して明らかな差が認められた。トリプターゼは、硬化療法前の 210.0 ± 67.27 から硬化療法後は 182.9 ± 58.55 へと低下し、特に MMP-9 は、硬化療法前の 0.34 ± 0.06 から硬化療法後は 0.12 ± 0.04 へと有意に低下しており ($p < 0.01$)、硬化療法後ではほとんど健常人のレベルに低下していた (Fig. 4)。

Table. 1. Characteristics of Research Patients and Controls.

Parameter	Study group	Healthy individuals group
Number of patients, n	27	9
Female/male	19/8	5/4
Age (years), mean \pm SD	64.2 \pm 10.3	41.0 \pm 6.9
Smoker, n (%)	4 (14.5)	0 (0)
Type 2 diabetes mellitus, n (%)	2 (7.4)	0 (0)
Hypertension, n (%)	4 (14.5)	0 (0)
Family history of varicosis, n (%)	0 (0)	0 (0)
Birth number>1, n (%)	19 (70.4)	5 (56)

Table. 2. CEAP Classification of Research Patients and Controls.

CEAP class	Study group, n		Healthy individuals group, n	
	Male	Female	Male	Female
C0	-	-	-	-
C1	0	1	-	-
C2s	0	6	-	-
C2a	0	0	-	-
C3	7	8	-	-
C4	1	4	-	-
C5	-	-	-	-
C6	-	-	-	-

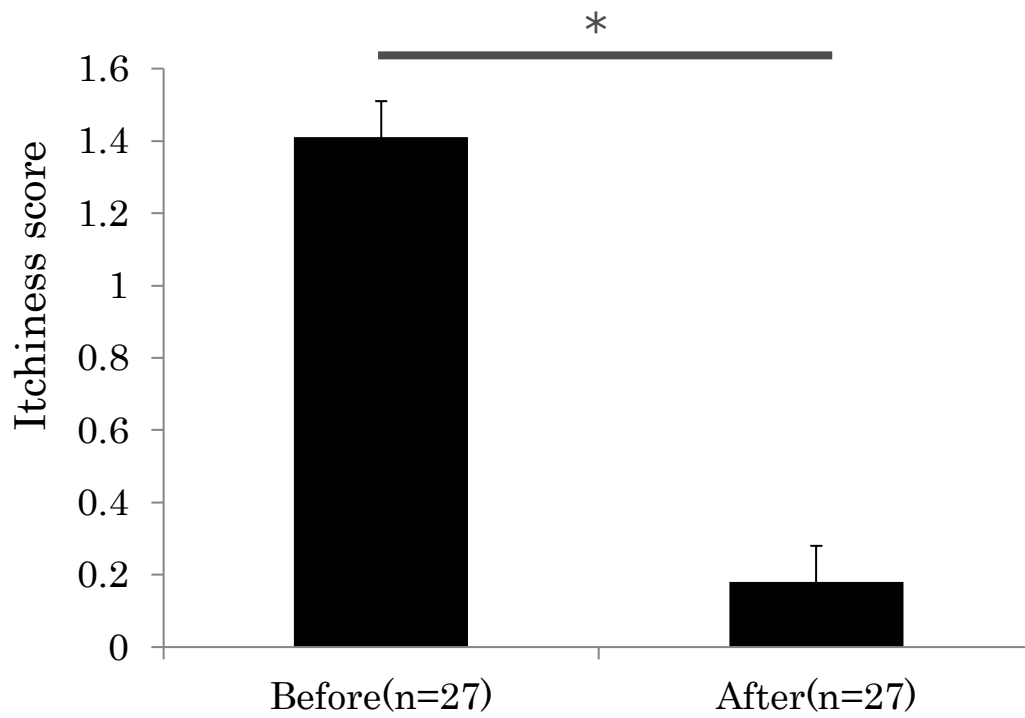


Fig. 1. Itchiness Score Before and After Sclerotherapy

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to compare pre-treatment to post-treatment. * $p < 0.01$

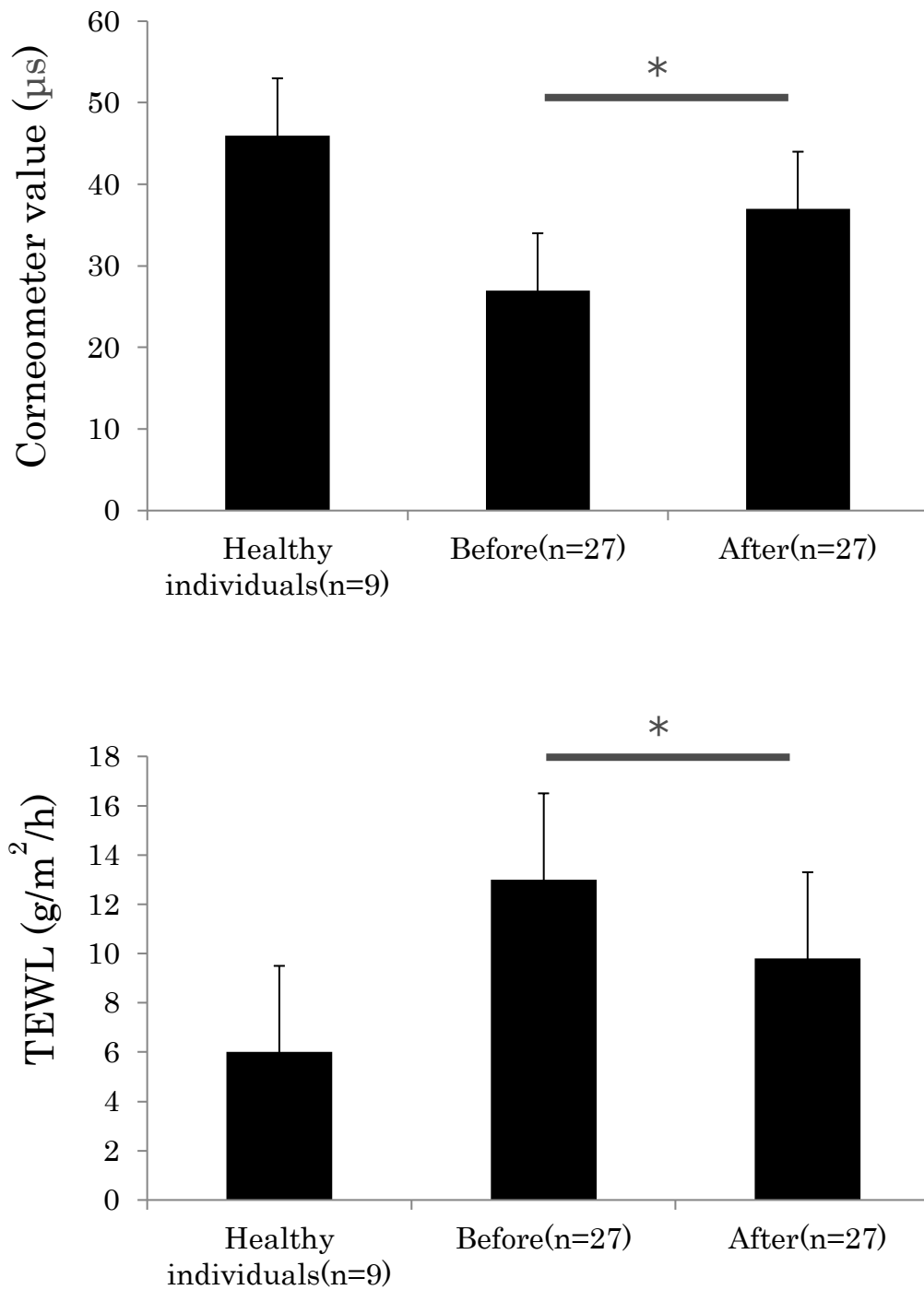


Fig. 2. Corneometer and TEWL Levels Before and After Sclerotherapy

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to compare pre-treatment to post-treatment. * $p < 0.01$

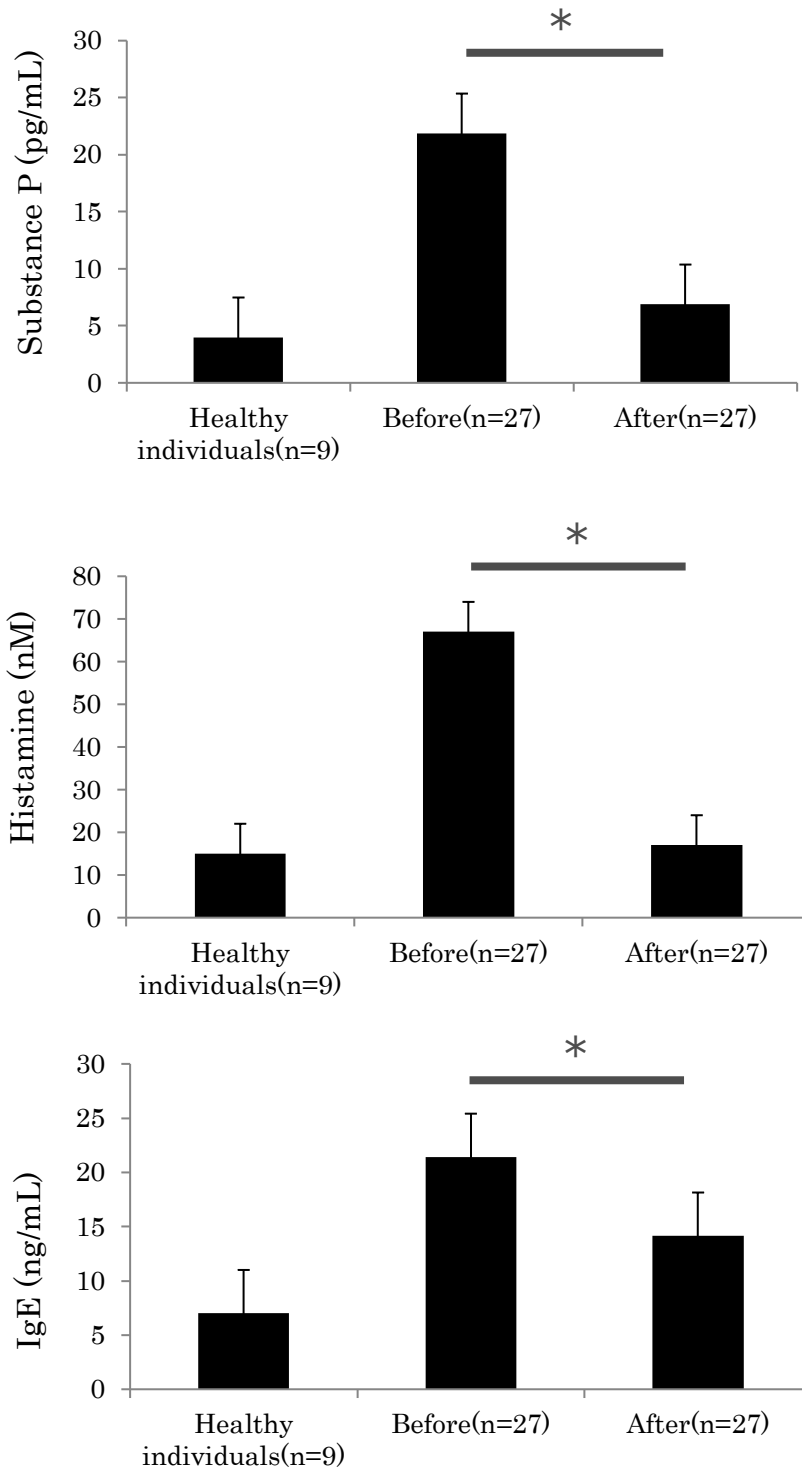


Fig. 3. Substance P, Histamine and IgE Before and After Sclerotherapy

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to compare pre-treatment to post-treatment. **p* < 0.01

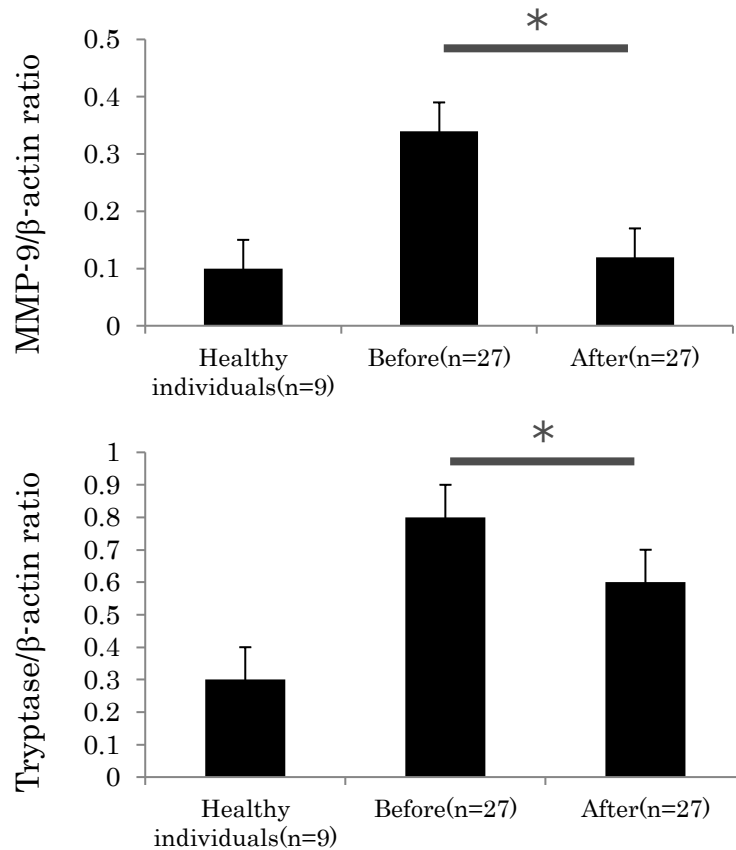
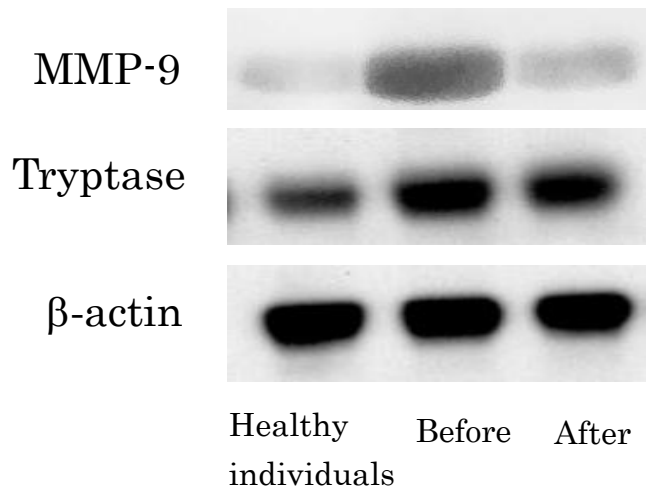


Fig. 4. Expression of MMP-9 and Tryptase Before and After Sclerotherapy

Values of MMP-9 and tryptase in skin before and after treatment. Values represent the mean \pm standard deviation. Student's *t*-test was used to compare pre-treatment to post-treatment. * $p < 0.01$

考察

皮膚の角層は、外部からの異物侵入を防ぐほか、皮膚内部からの水分蒸発を防ぐ重要な生理機能を担っている。TEWLは、角層から蒸発してくる水分であり、角層のバリア機能を評価するのに用いられる。一般的に、アトピー性皮膚炎を代表とする乾燥性の皮膚疾患では、バリア機能が低下しているため、TEWLは高値を示す[16]。我々の研究では、TEWLは硬化療法前では高値を示していたが、硬化療法後は治療前に比して有意に低下し、健常人と変わらなくなったことより、硬化療法前にはバリア機能が低下していたことを示している。また、アトピー性皮膚炎の患者と健常人で比較調査した研究によると、アトピー性皮膚炎患者では、病変部で皮膚バリア機能の有意な低下、つまり角層水分量の低下が認められている[17]。本研究結果においても、角層水分量が病変部では、硬化療法前は低値であったが、硬化療法後は治療前に比して有意に上昇しており、バリア機能が回復していると考えられた。したがって、下肢静脈瘤患者では、TEWLの上昇および角層水分量の低下があり、皮膚バリア機能の低下が起きていることを初めて明らかにした。

本研究では、喫煙、高血圧または糖尿病の影響を調べることはできなかった。下肢静脈瘤の危険因子であるこれらの習慣や病歴を有する患者では、結果が異なる可能性がある。将来の研究において、喫煙、高血圧または糖尿病患者におけるかゆみの発症の違いを調べることは重要であると考えられる。

アトピー性皮膚炎患者では、乾燥皮膚による掻痒の訴えが多く認められるように[18]、我々の結果においても、70%の患者が掻痒を訴えていた。アトピー性皮膚炎の掻痒発症の機序として、多数のメディエーターが掻痒につながる求心性神経を刺激することによると報告されている[16]。本研究では、血中メディエーターのヒスタミン、IgE、トリプターゼ、サブスタンスPの増加が認められた。これらの因子の増加より下肢静脈瘤においては以下のことが考えられる(Fig. 5)。まず下肢に何らかの要因で炎症が起こると、マスト細胞が刺激されて、細胞表面にあるIgE高親和性レセプターにIgEが結合し、脱顆粒を起こし、ヒスタミンやトリプターゼが放出される[19]。放出されたヒスタミンやトリプターゼは神経末端の受容体に結合して信号を脳に送り、掻痒が誘発される[20]。また、神経末端にはIgE受容体があり、抗原が結合すると興奮してサブスタンスPが放出される。サブスタンスPは痛覚の伝達物質であり、知覚神経C線維末端に貯蔵されている神経ペプチドの一種であり、血管透過性亢進作用をもち、マスト細胞からヒスタミンを遊離させる[21-22]。さらにヒスタミンは知覚神経を刺激し、C線維末端からサブスタンスPが放出され、その周囲のマスト細胞

胞に作用してさらに大量のヒスタミンを遊離させる [23-25]。このようにヒスタミンとサブスタンス P の相互作用が起こることにより、下肢静脈瘤における搔痒が誘発され悪化すると考えられた。さらに、搔破することによって皮膚バリアを傷つけ、炎症性サイトカインの放出および軸索反射によるサブスタンス P の増加などを引き起こし搔痒がさらに助長される。本研究では、患者の下肢静脈瘤部位の搔破の具合を測定してはいないが、下肢静脈瘤における搔痒を起こす十分な要素として考えられた。

本研究では、血中 MMP-9 の増加が認められたが、この血中 MMP が皮膚の炎症部にどれだけ影響を及ぼすかは不明である。MMP-9 は表皮と真皮の基底層にあり、IV型コラーゲンを分解する働きがあることから [26]、IV型コラーゲンの分解は、マトリックスリモデリングに重要な損失をきたすため、MMP-9 の増加も皮膚搔痒の一要因と考えられる。

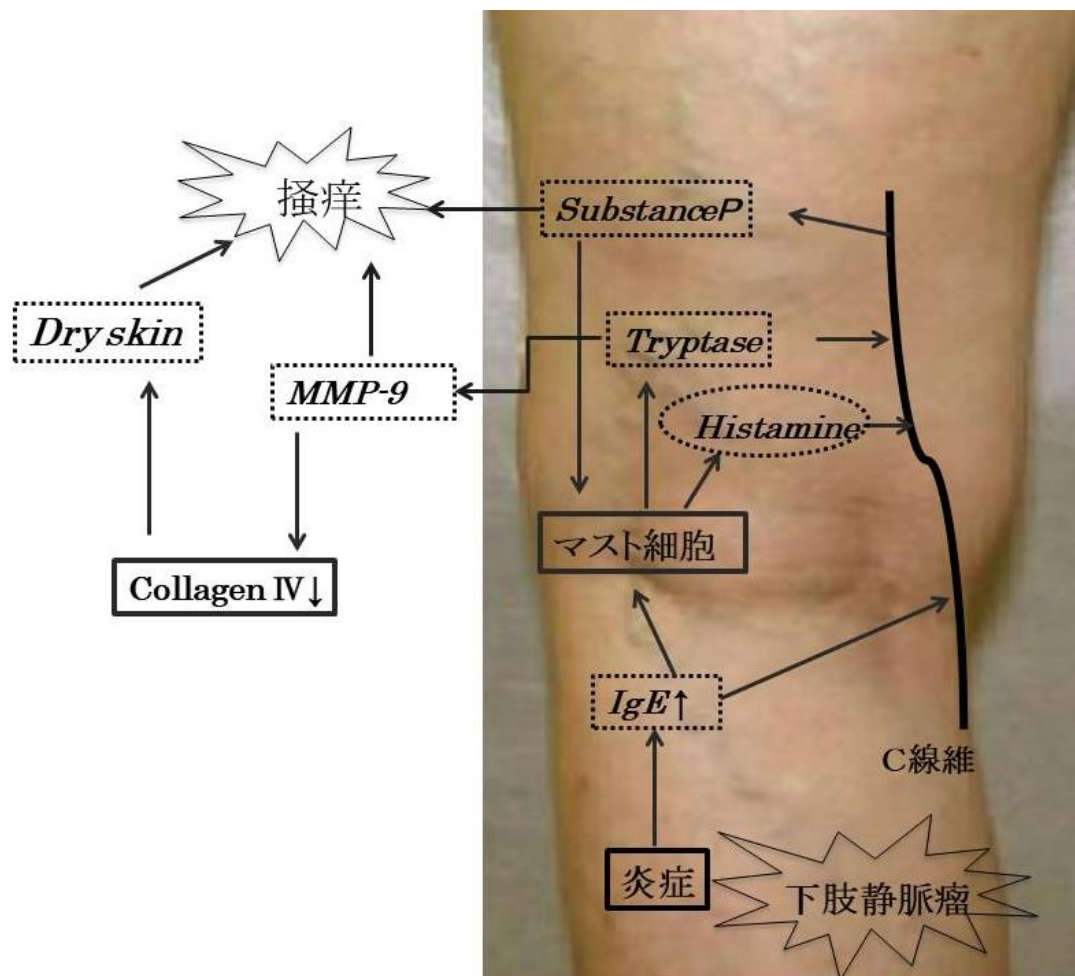


Fig. 5. 下肢静脈瘤における掻痒発症の機序

本研究で測定した項目と因子を点線枠内に示す。

下肢静脈瘤箇所では炎症が生じると、マスト細胞が刺激されてIgEが分泌され、このIgEがマスト細胞表面のIgE高親和性受容体に結合して脱顆粒を起し、細胞からヒスタミンやトリプターゼが放出される。このヒスタミンやトリプターゼは神経末端の受容体に結合して信号を脳に送り、掻痒が誘発される。また、神経末端にはIgE受容体があり、IgEが結合すると痛覚伝達物質のサブスタンスPが放出され、血管透過性亢進やマスト細胞からのヒスタミン遊離が起きる。このヒスタミンはさらに知覚神経を刺激し、C線維末端からサブスタンスPが放出され、周囲のマスト細胞から大量のヒスタミンを遊離させる。このようなヒスタミンとサブスタンスPの相互増幅的な産生促進作用より、下肢静脈瘤における掻痒が誘発され増悪化するものと考えられる。

小括

第 1 節では、下肢静脈瘤部位の皮膚の乾燥と炎症メディエーターの相関性について解析した。

患者群ではマスト細胞に深く関与しているサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、トリプターゼが健常人群に比べて有意に上昇していたことから、下肢静脈瘤の患者ではこれらの物質が求心性神経を刺激して掻痒を引き起こしたものと考えられた。本研究から、下肢静脈瘤患者の掻痒発症においても、マスト細胞を介した炎症が起因していることが明らかとなった。

第 2 節

下肢静脈瘤患者における掻痒発症時の炎症メディエーターの性差

緒言

下肢静脈瘤患者には発症における性差があることが知られているが [9]、下肢静脈瘤患者における掻痒発症と性差の関連性については、明らかではない。下肢静脈瘤患者は、痛みやかゆみのストレスを受けている [27]。ストレスは β -endorphin と副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を介して掻痒を引き起こすことが知られている [28]。またストレスの感受性には、男女差があると報告されている [29-30]。そこで、第 2 節では、下肢静脈瘤患者の掻痒発症機序における性差の解明を目的として、ストレスによって変動する β -endorphin と ACTH を中心に解析した。

研究方法

1.患者と対照被験者

第1節で同意を得た対象患者および対照被験者の協力を得て研究を行った。具体的には、2014年3月から2014年12月の期間に、三重ハートセンターで下肢静脈瘤と診断され、硬化療法を受ける患者を対象とした。硬化療法は第1節と同様に静脈瘤の部位に、1%ポリドカノールを注入して静脈瘤を固める手術を行った。対象患者には、年齢、性別、喫煙の有無、2型糖尿病の有無、高血圧の有無、家族歴、出産歴を調査した。静脈瘤の診断は、下肢静脈超音波検査により行った。対照被験者は、疾患を有していないことを確認した健常人ボランティアとした。参加するすべての対象患者と対照被験者から、説明文書による参加同意を得た。

2.研究デザイン

同意が得られた対象患者に対して、硬化療法の前後での角層水分量、経表皮水分喪失量、掻痒の変化を測定した。また、硬化療法前後での採血にて炎症性メディエーターとしてサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、MMP-9、トリプターゼに加えて、免疫グロブリン A (IgA)、ACTH、 β -endorphin の測定を行った。また、同意が得られた対照被験者に対しては、同意が得られた日に、角層水分量と経表皮水分喪失量を測定し、採血にてサブスタンス P、ヒスタミン、IgE、MMP-9、トリプターゼ、ACTH、 β -endorphin の測定を行った。

3.掻痒の測定

硬化療法の開始前と最終手技終了1週間後において、下肢静脈瘤部位の掻痒を評価して採血を行った。下肢静脈瘤部位の掻痒の評価は、第1節と同様の方法で対象患者のみに行った。

4.血漿の調整

各対象患者および対照被験者から6mLの採血をした。血漿は、1/10量の3.8%クエン酸Naの存在下に、4°Cで3000×gで10分間の遠心分離を行い、血漿分画は、分析まで-80°Cで凍結保存した。

5.サブスタンス P、ヒスタミン、IgA、IgE濃度の測定

凍結保存した血漿を用いて、サブスタンス P (Enzo, Farmingdale, NY)、ヒスタミン (Bertin Pharm, Montigny-le-Bretonneux, France)、およびIgAとIgE (Abcam, Tokyo, Japan)を、ELISA分析キットを使用して鈴

鹿医療科学大学薬学部実験室で測定した。

6.角層水分量、TEWL の測定

角層水分量と TEWL は、第 1 節と同様の手法を用いて測定した。皮膚測定条件は、室内を 22°C から 26°C、湿度は 20%から 40%の範囲に保ち測定した。

7. MMP-9 とトリプターゼの分析

MMP-9 とトリプターゼは、第 1 節と同様にウエスタンブロット法を用いて以下の方法で分析した[10]。採血液を溶解緩衝液 (Kurabo, Osaka, Japan) で均質化し、8000 × g で 10 分間遠心分離した。各試料から上清を分離し、分析まで -80°C で凍結保存した。解凍後、一定量の血清 (タンパク質 12.5µg/lane) を電気泳動し、分離後、4°Cで、5% skim milk で一晩ブロッキングした。ブロッキング後、泳動膜は、MMP-9 (1:1000; Abnova, Taipei, Taiwan)、トリプターゼ (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)、β-actin (1:5000; Sigma, Saint Louis, MO, USA) に対する一次抗体で 25°C 1 時間インキュベートした。その後、二次抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を用いて 25°C 1 時間インキュベートした後、ImmunoStar Zeta (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて可視化した。画像は、Multi-Gauge software (FUJIFILM, SC, USA) を用いて得た。

8.統計的分析

すべてのデータを平均値±標準偏差として示した。Student's *t* 検定を用いて 2 群 (対象患者の硬化療法前と硬化療法後) を比較し、危険率が 5%未満の場合を統計的に有意と判断した。統計解析は IBM SPSS Statistics24 にて実施した。

結果

対象患者は女性 19 名 (平均年齢 66.7 ± 7.3 歳)、男性 8 名 (平均年齢 58.2 ± 14.6 歳) であった。その対象症例の内訳は、喫煙者は 4 名 (男性 3 名、女性 1 名)、2 型糖尿病患者は 2 名 (男性 1 名、女性 1 名)、高血圧症患者は 4 名 (男性 1 名、女性 3 名) であったが、下肢静脈瘤の家族歴ある患者はいなかった。対象患者のすべての女性には、出産歴があった (Table. 1)。

掻痒発症の頻度は、男性患者 8 名中 4 名 (50%) に比して女性患者は 19 名中 14 名 (74%) に認められ、女性患者に高い傾向が認められた。掻痒の平均点数は、男性では硬化療法前は 1.25 点、女性では硬化療法前は 1.47 点で、掻痒の強さには性差は認められなかった。

皮膚測定結果については、角層水分量と経表皮水分喪失量は、ともに硬化療法前は男女間で有意差はなかった。

掻痒発症の性差の分子機序を解明するために種々の生化学的マーカーを測定した。その結果、サブスタンス P、ヒスタミン、IgA、IgE はそれぞれ硬化療法前では高値を示したが、男女間で有意差がなかった (Table. 2)。次に、下肢静脈瘤において炎症と関係する MMP-9 を測定した。MMP-9 は、男女とも硬化療法前に健常人に比して増加していた。硬化療法後は男女とも健常人と同じレベルに低下していた。硬化療法前後とも男女間に性差はみられなかった (Fig. 1)。第 1 節で、下肢静脈瘤患者でトリプターゼの増加がみられたことから、掻痒の変動を反映する可能性のあるトリプターゼを測定した。トリプターゼは、男性では治療前においては健常人と差がなかったが、女性では健常人と比して明らかに上昇していた。硬化療法後では男女ともにほとんど健常人と同じレベルに低下していた (Fig. 2)。さらに、本疾患がストレスと関係があると考えられるため、ACTH を測定した。ACTH は、男性では硬化療法前は高値を示し、硬化療法後においては低下していた。女性では硬化療法前後において差がなかった (Fig. 3)。 β -endorphin は、硬化療法前は男女ともに増加していたが、女性に比して男性は高かった。硬化療法後には男女ともに同じレベルに低下していた (Fig.4)。

Table. 1. Patient Characteristics According to Sex

Parameter	Study group		healthy individuals group	
	Male	Female	Male	Female
Number of patients	8	19	4	5
Age (years; mean \pm SD)	58.3 \pm 14.6	66.7 \pm 7.3	38.7 \pm 8.9	42.8 \pm 6.2
Smoker, n (%)	3 (37.5)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
Type 2 diabetes mellitus, n (%)	1 (12.5)	1 (5)	0 (0)	0 (0)
Hypertension, n (%)	1 (12.5)	3 (15.8)	0 (0)	0 (0)
Family history of varicosis, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Number of births > 1, n (%)	0 (0)	19 (100)	0 (0)	5 (100)

Table. 2. Examination Findings According to Sex, Before and After Sclerotherapy

		Before	After
Itch score	Male	1.25 ± 1.75	0.37 ± 0.74
	Female	1.47 ± 1.12	0.10 ± 0.31
Corneometer value (µs)	Male	25.13 ± 17.33	35.62 ± 13.44
	Female	27.84 ± 10.80	38.63 ± 13.14
Transepidermal water loss (g/m ² /h)	Male	16.04 ± 9.82	13.04 ± 9.17
	Female	12.29 ± 8.35	8.40 ± 2.75
Histamine (nM)	Male	66.97 ± 17.24	7.63 ± 6.57
	Female	68.82 ± 13.81	11.14 ± 6.04
Substance P (pg/mL)	Male	20.26 ± 7.91	4.39 ± 1.99
	Female	16.49 ± 8.67	4.61 ± 5.28
IgA (ng/mL)	Male	68.00 ± 2.71	58.54 ± 3.33
	Female	68.93 ± 2.99	62.35 ± 4.91
IgE (ng/mL)	Male	25.48 ± 6.19	11.50 ± 7.74
	Female	21.17 ± 4.74	14.05 ± 3.59

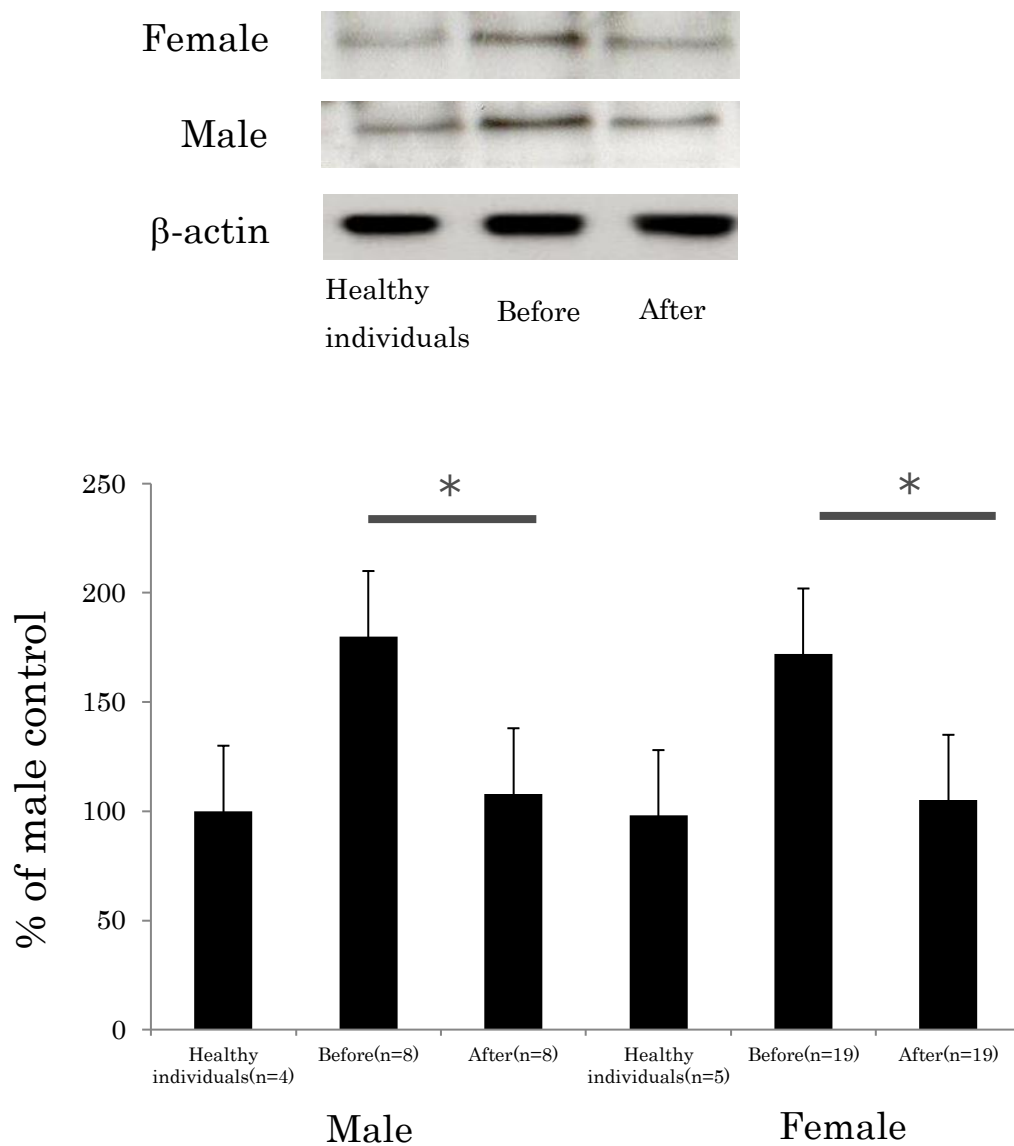


Fig. 1. MMP-9 Levels Before and After Sclerotherapy, According to Sex

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's t-test was used to compare pre-treatment and post-treatment values. * $p < 0.05$

The value in the parenthesis shows absolute value.

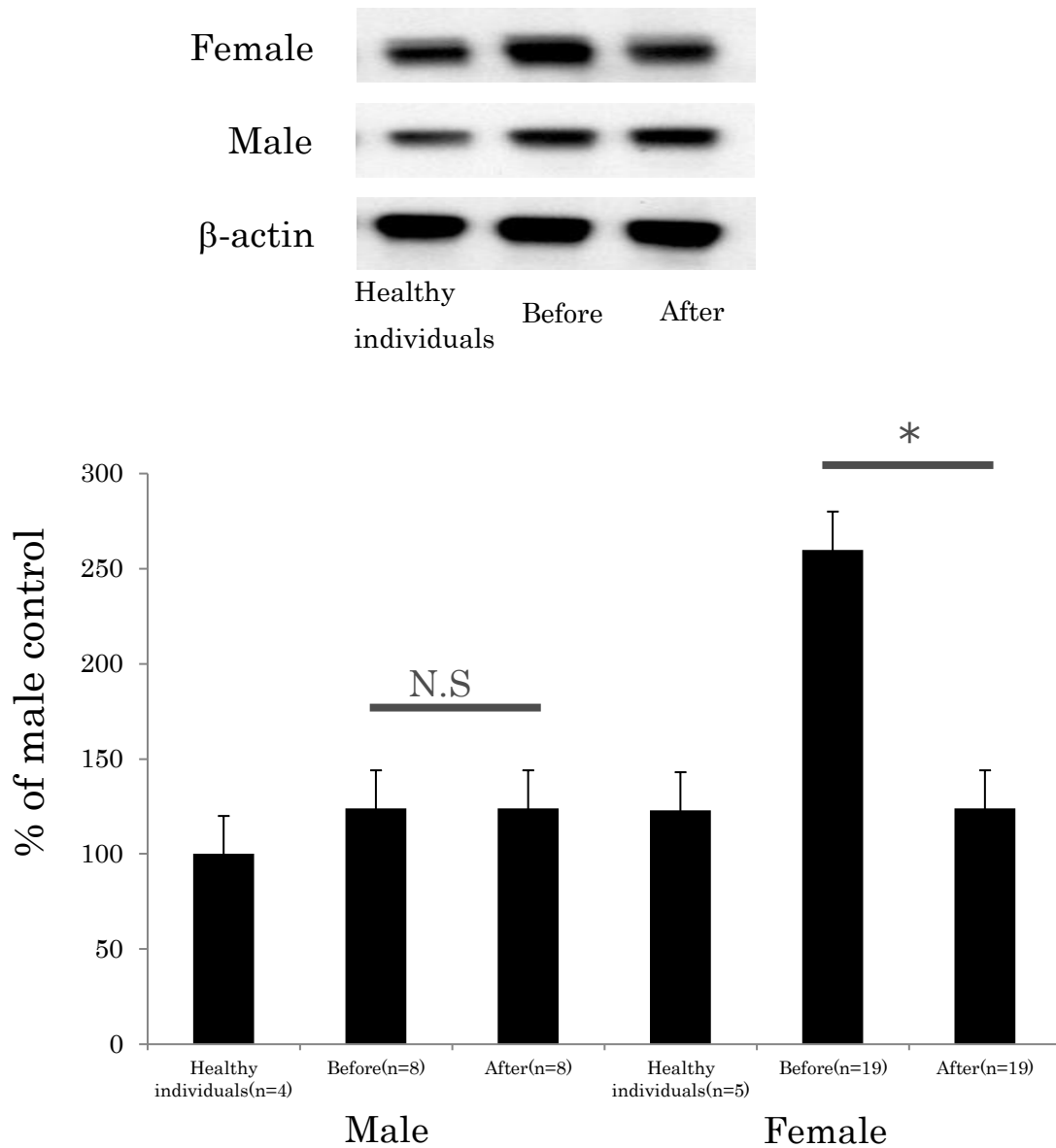


Fig. 2. Tryptase Levels Before and After Sclerotherapy, According to Sex

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's t-test was used to compare pre-treatment and post-treatment values. * $p < 0.05$

The value in the parenthesis shows absolute value.

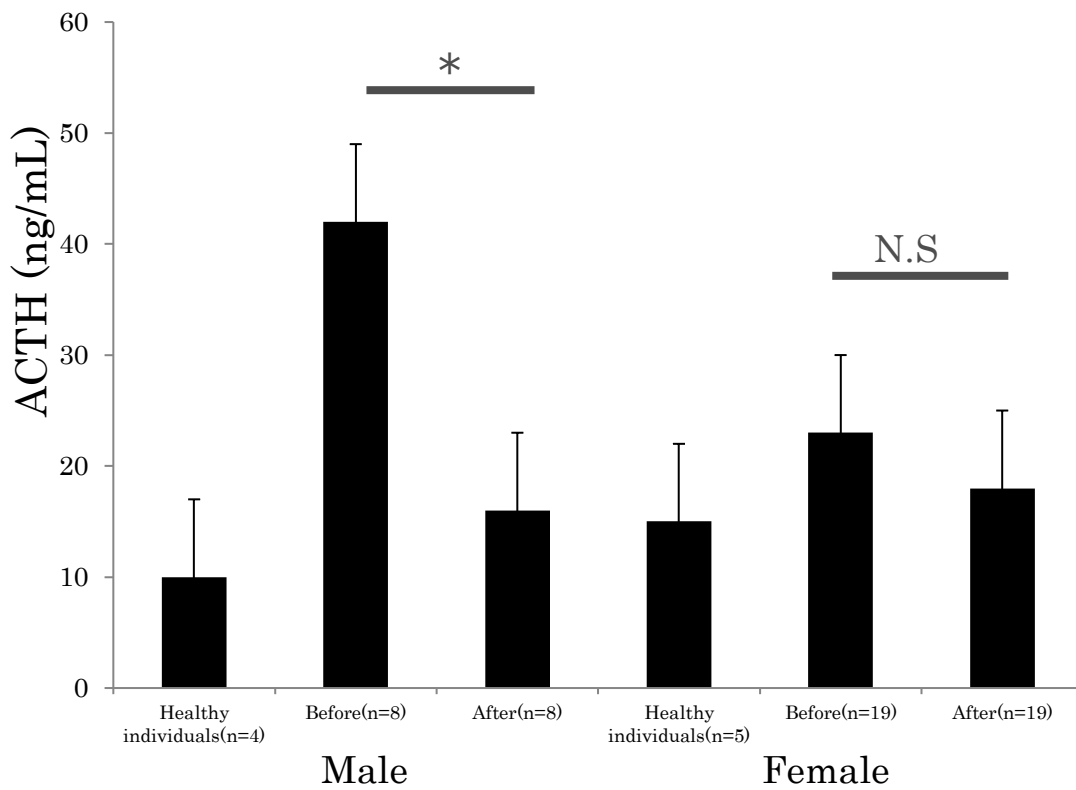


Fig. 3. ACTH Levels Before and After Sclerotherapy, According to Sex

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's t-test was used to compare pre-treatment and post-treatment values. * $p < 0.05$

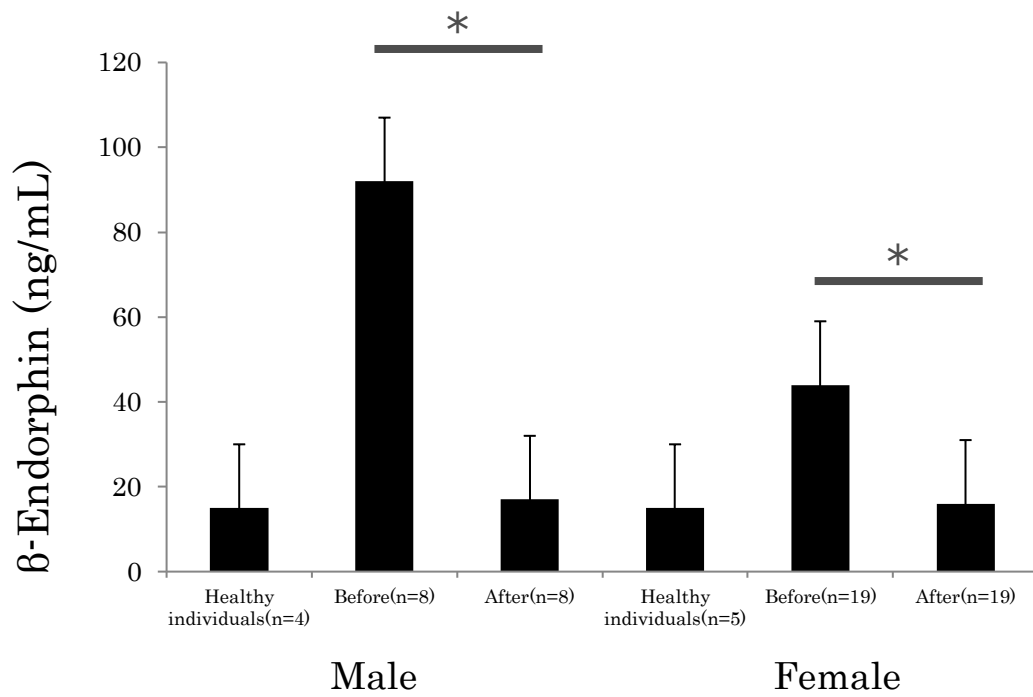


Fig. 4. β -Endorphin Levels Before and After Sclerotherapy, According to Sex

Values represent the mean \pm standard deviation. Student's t-test was used to compare pre-treatment and post-treatment values. * $p < 0.05$

考察

本研究における掻痒のスコア調査により、下肢静脈瘤患者では性差に関係なく掻痒の症状があることが示された。硬化療法前では、皮膚の角層水分量は低値、TEWLは高値を示し、血中のヒスタミン、サブスタンス P、IgE、MMP-9は、各値とも高値を示したが、女性は血中トリプターゼが効果療法前は男性より高値を示した。男性はACTHと β -endorphinが硬化療法前は女性より高値を示した。なお、本研究において、掻痒の訴えを起こした患者は、男性患者が4名(44%)に対して、女性患者は14名(74%)と明らかに多かった。下肢静脈瘤の患者は、女性の方が多疾患であり[9]、本研究においても同様であり、男性患者を十分に検討できなかったこと、男女数および掻痒を訴えた患者数と平均年齢は異なるが当院で硬化療法を受けたすべての患者を用いて解析した。

その結果、下肢静脈瘤患者は、性差に関係なく乾燥皮膚を誘導し、末梢性の掻痒が起こることが示唆された(Table. 2)。下肢静脈瘤患者において、MMP-9とサブスタンス Pは、掻痒発症および乾燥皮膚発現に関係が深いマーカーであるが、本研究では性差は認められなかった(Fig. 1)。また本研究においてトリプターゼは、男性では健常人群と硬化療法前では差がなく、硬化療法前後での差もなかった(Fig. 2)。これに対して女性では、血中トリプターゼとヒスタミン量において、硬化療法前は健常人群と比して有意に上昇し、硬化療法後は有意に低下していた(Fig. 2)。この結果から、女性において掻痒発症要因は、ヒスタミンとトリプターゼが重要な役割を果たしていると考えられた。ヒスタミンは掻痒の因子であるサブスタンス Pの放出を増加させることが知られている[31]。また、トリプターゼは皮膚のコラーゲンIおよびIVを分解し、乾燥皮膚を誘導し、掻痒を増加させると考えられた[32]。一方、男性においては、ヒスタミンの増加はみられたが、トリプターゼの増加はみられなかった。この女性においてのみトリプターゼが増加する(もしくは男性では増加しない)機構は明らかではないが、以下のことが考えられる。女性の場合は、女性ホルモンであるプロゲステロンが即時型アレルギーの活性化を誘導し、マスト細胞は即時型であるため、女性の場合はより活性化され、トリプターゼが増加したと考えられる[33]。しかし、高齢者が多く閉経患者もみられるため、これだけでは説明がつかない。また、男性では β -endorphinが増加したが、 β -endorphinはマスト細胞の活性化を抑制する報告がある[34]。そのため女性に比べると男性の方がトリプターゼの量が少なくなる。しかしながら、トリプターゼの性差については更なる研究が必要である。なお、トリプターゼは健常人において性差がないと報告されており[35]、本研究の対照群においても性差はみられなかった。

一方、MMP-9 の発現は健常人で性差があり、男性は女性よりも高いと報告されている [36]。本研究では、健常人の男性と女性間に有意差はなかった。この理由として、本研究で使用した男性と女性の背景が異なる可能性が考えられる。また、血液中の MMP-9 の量は、他の報告では ELISA 法で測定されているが、本研究ではウエスタンブロッティング法で測定している。従って、測定方法の違いが影響を与えた可能性も考えられる。

皮膚掻痒症では、ストレス負荷がかかりプロオピオメラノコルチン (POMC) 系が動くことが報告されている [27]。そこで、POMC 由来で掻痒と密接に関係する ACTH と β -endorphin を測定したところ、男女とも硬化療法前で ACTH と β -endorphin が上昇していた (Fig. 3、Fig. 4)。ストレス時に視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin releasing factor : CRF) が分泌されると、下垂体前葉から POMC から切り出されて ACTH と β -endorphin が 1:1 の割合で放出されることが知られている [28]。一般に、ストレスに対しては、男性の方が女性に比べて弱いという報告が多い [29-30]。今回、下肢静脈瘤によるストレスが特に男性に強くかかり、それに伴い ACTH と β -endorphin が上昇したと考えられた。また、ACTH と β -endorphin を比較すると、明らかに β -endorphin の方が高くなっていた (Fig. 3、Fig. 4)。 β -endorphin が ACTH に比べ高くなる理由として、 β -endorphin はマクロファージや好中球など免疫系の細胞からも分泌されるため、下肢静脈瘤患者においては炎症が誘発されているため、免疫担当細胞の浸潤が増加し β -endorphin が多量に分泌されると考えられた。さらに、 β -endorphin は、肥厚性癬痕の患者では値が高く、掻痒の過程で重要な役割を示すとの報告がある [37]。また透析患者では、掻痒の強い患者ほど β -endorphin 濃度が高い傾向を示すと報告されている [38]。通常、 β -endorphin は、健常人においては男性より女性の方が高いとされており [39]、例えば成人喘息患者では、有病率と重症度はともに機序は不明であるが、 β -endorphin は女性の方が高いとされている [40-41]。しかし、今回の研究において、下肢静脈瘤患者では、男性の方が女性より β -endorphin が有意に高値であった (Fig. 4)。この理由の一つとして β -endorphin の上昇は、CD4+T 細胞が関与している可能性がある [42-44]。本研究において、血清中の CD4+T 細胞は、男性の方が女性より高値であった (データ示さず) ことから、男性では CD4+T 細胞の増加が、 β -endorphin の上昇を促しているものと考えられた。しかし、下肢静脈瘤の病態において、CD4+T 細胞が男性において高くなる理由は明らかではなく、今後解明すべき課題であろう。

一方、ACTH はケラチノサイトを刺激し、ヒスタミン分泌を増加させることが報告されている [45-46]。このことから男性においては下肢静脈瘤による ACTH の増加も掻痒誘発の原因の一つと考えられた。しかし、ACTH のヒスタ

ミン分泌増加のメカニズムはまだ明白ではなく更なる検討が必要である。

今回の研究成果に基づく、下肢静脈瘤における男性および女性の搔痒誘発経路の違いを **Fig. 5** に示した。

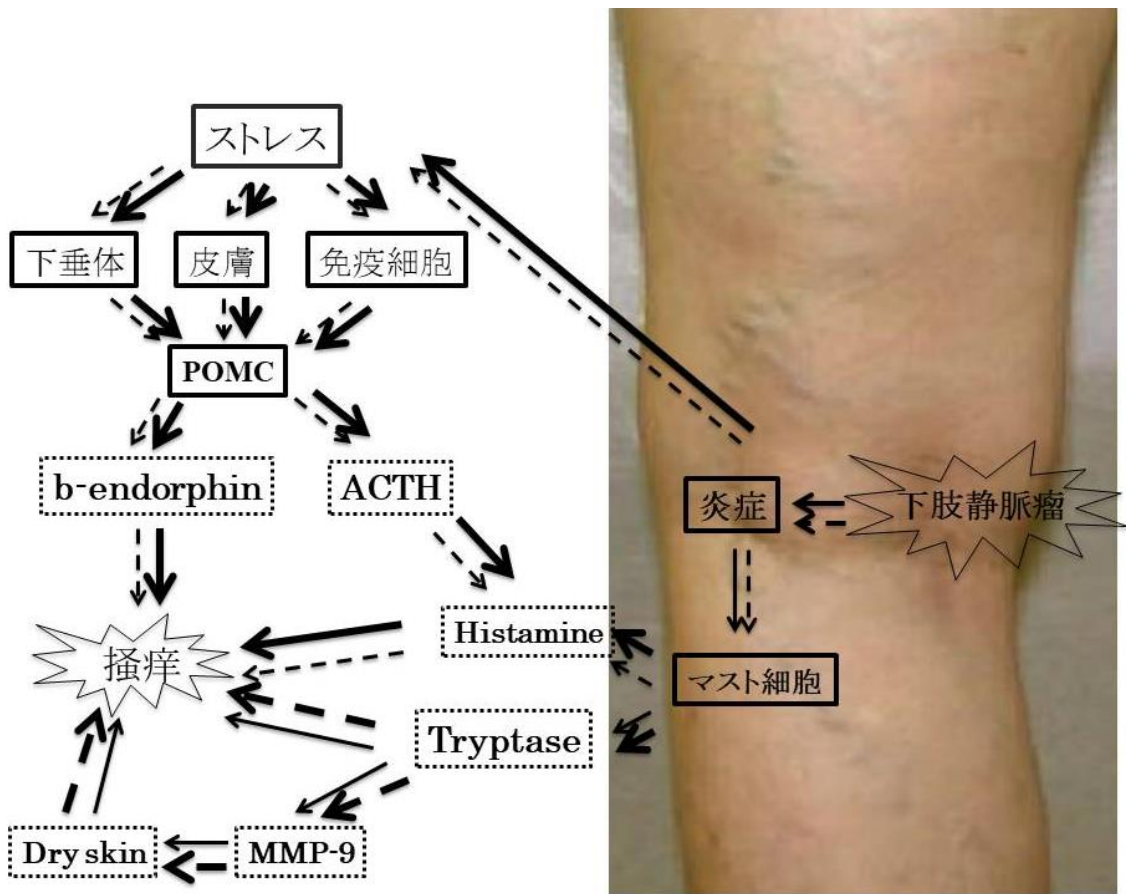


Fig. 5. 下肢静脈瘤における掻痒発症の性差

本研究で測定した項目と因子を点線枠内に示す。

実線→は男性の掻痒誘発経路を示す。(線の太さは強さを示す。)

点線→は女性の掻痒誘発経路を示す。(線の太さは強さを示す。)

小括

第 2 節では、下肢静脈瘤患者の掻痒発症機序における性差の解明を目的として、主に β -endorphin と ACTH の解析を行った。下肢静脈瘤における掻痒発症には性差があり、女性はトリプターゼの上昇が原因であり、男性は β -endorphin の上昇が掻痒の原因であることが示唆された。

第2章

下肢静脈瘤患者における掻痒と血清亜鉛の関係

緒言

近年、皮膚障害と亜鉛欠乏との関連が強く示唆されている [47-48]。微量必須元素である亜鉛は、生体維持に不可欠な栄養素であり、何らかの要因で欠乏状態になると、味覚障害や味覚異常、発育遅延や発育異常、貧血、食欲不振や減退、創傷治癒遅延、皮膚症状など、さまざまな症状が起きることが報告されている [49-50]。特に、主要臓器の中で皮膚には筋肉や骨に次いで亜鉛が多く含まれており [51]、皮膚は亜鉛欠乏の影響を受けやすく、透析患者の痒みを和らげるために亜鉛を補充することが提案されている [52]。さらに亜鉛は、マスト細胞からのヒスタミンの脱顆粒を抑える働きがあることが知られている。そこで第2章では、下肢静脈瘤患者における掻痒発症の機序について、第1章の炎症とストレスに加えて血清亜鉛との関係を解明することを目的とした。

研究方法

1.患者と対照被験者

対象は、2014年3月から2014年12月の期間に、三重ハートセンターで下肢静脈瘤と診断され、硬化療法を受けた患者とした。対象患者には、年齢、性別、喫煙の有無、2型糖尿病の有無、高血圧の有無、家族歴、出産歴を調査した。下肢静脈瘤の診断は、下肢静脈超音波検査により行った。対照被験者は、疾患を有していないことを確認したボランティアとした。参加するすべての対象患者と対照被験者から、亜鉛含有のサプリメントと亜鉛を多く含む食物（例えば、カキ、チーズなど）を摂取していないことを確認し、説明文書による参加同意を得た。

2.研究デザイン

同意が得られた患者に対して、角層水分量、TEWL、血清亜鉛を測定した。また、掻痒を訴える患者については、掻痒の強度をフェイススケールで評価した。対照被験者として健常人の協力を得た。

3.掻痒の測定

下肢静脈瘤部位の掻痒の評価は、掻痒が無い場合を0とし、最も掻痒が強い場合を4とした5段階のフェイススケールを用いて行った [15]。

4.血清亜鉛含有量の測定

対象患者と対照被験者から6ml採血した。採血液は、4°Cで10分間、3000×gで遠心分離を行い、その上澄み液（血清）をエッペンドルフチューブに採取して、分析まで-80°Cで凍結保存した。血清亜鉛含量は、(ACCURAS AUTO Zn)を用いた比色法により測定した [51]。

5.角質水分量およびTEWLの測定

角層水分量とTEWLは、第1章と同様に皮膚測定装置[Tewameter TM300 および Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)]を用いて測定し、測定プローブを患部に直接あてて行った。皮膚測定条件は、室内を22°C~26°C、湿度は20%~40%の範囲に保ち測定した。

6.統計的分析

掻痒有の群、掻痒無の群、対照被験者群の3群に分けて比較した。全てのデ

ータは平均±標準偏差として示した。検定は一元配置分散分析（ANOVA）を実施してから、**Tukey-Kramer**法を用いた。危険率が5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。ピアソンのモーメント相関係数を用いて血清亜鉛との相関を評価した。統計解析はIBM SPSS Statistics24にて実施した。

結果

対象患者は、掻痒有の群 11 名（男性 2 名、女性 9 名、平均年齢 65.9 ± 9.4 歳）、掻痒無の群 13 名（男性 6 名、女性 7 名、平均年齢 59.3 ± 9.5 歳）であった。対照被験者としての健常人群（疾患を持たない患者）は 9 名（平均年齢 41.7 ± 7.0 歳）であり、下肢静脈瘤の家族歴ある患者はいなかった。対象患者のすべての女性には出産歴があった。掻痒有の群での掻痒のスコアは、平均 1.6 ± 0.9 点であった。（Table. 1）

まず、掻痒有の群と掻痒無の群で角層水分量に差があるか比較検討した。掻痒有の群は $26.7 \pm 10.6 \mu\text{s}$ で、掻痒無の群の $36.3 \pm 10.6 \mu\text{s}$ に比して有意に低値であった（ $p < 0.05$ ）。さらに、健常人群の $48.8 \pm 8.4 \mu\text{s}$ に比して両群とも有意に低値であった（ $p < 0.05$ ）（Fig. 1）。

次に、TEWL についても同様に差があるか検討した。掻痒有の群では、 $19.1 \pm 5.2 \text{ g/m}^2/\text{h}$ で、掻痒無の群の $14.0 \pm 6.6 \text{ g/m}^2/\text{h}$ に比して有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）。さらに、健常人群の $8.9 \pm 1.6 \text{ g/m}^2/\text{h}$ に比して両群とも有意に高値であった（ $p < 0.05$ ）（Fig. 2）。

血清亜鉛については、掻痒有の患者群では $72.5 \pm 7.1 \mu\text{g/dL}$ で、健常人群の値（ $79.1 \pm 8.1 \mu\text{g/dL}$ ）に比して有意に低かったが（ $p < 0.05$ ）、掻痒無の患者群は $79.3 \pm 7.4 \mu\text{g/dL}$ で健常人群と有意差はなかった（Fig. 3）。さらに、すべての参加者において角層水分量と TEWL と血清亜鉛との関係を調べた。角層水分量と血清亜鉛との間には相関（ $r = 0.588$ 、 $p = 0.003$ ）があり（Fig. 4）、TEWL と血清亜鉛との間には逆相関（ $r = -0.565$ 、 $P = 0.004$ ）が認められた（Fig. 5）。

Table. 1. Background of Patients and Control Subjects

Parameter	Study group(itching)		Study group(without-itching)		healthy individuals group	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Number of patients, n	2	9	6	7	2	7
Age (year; mean±SD)	75.0 ± 2.8	63.8 ± 9.1	53.5 ± 10.1	64.2 ± 5.7	49.0 ± 0	39.5 ± 7.1
Itch score	2	1.5	0	0	0	0
Smoker, n	2	1	1	0	0	0
Type 2 diabetes mellitus, n	1	1	0	0	0	0
Hypertension, n	0	2	1	1	0	0
Family history of varicosis , n	0	0	0	0	0	0
Birth number >1, n	0	9	0	7	0	0
Hemoglobin, (g/dL; mean±SD)	13.2 ± 0.6	12.7 ± 0.8	12.7 ± 0.8	13.1 ± 0.9	14.6 ± 0.6	13.7 ± 0.7

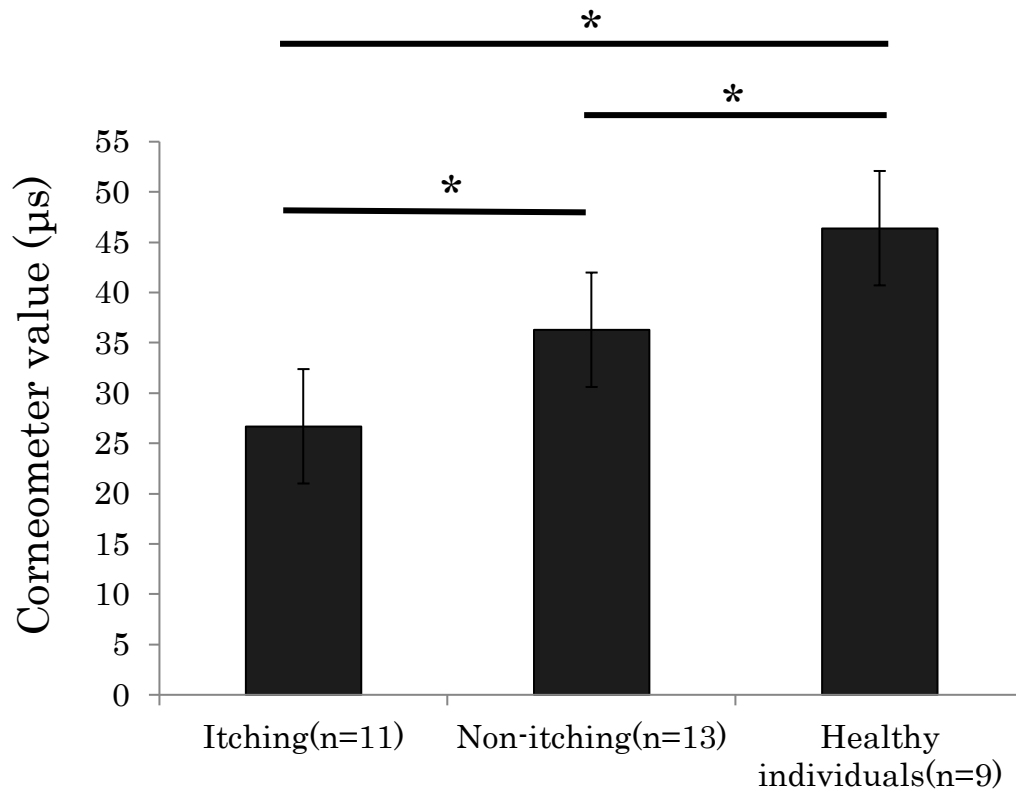


Fig.1. Hydration Levels of the Skin in Patients with Varicose Veins

Values represent the mean \pm standard deviation. Tukey-Kramer method was used to compare between each groups. *, $p < 0.05$.

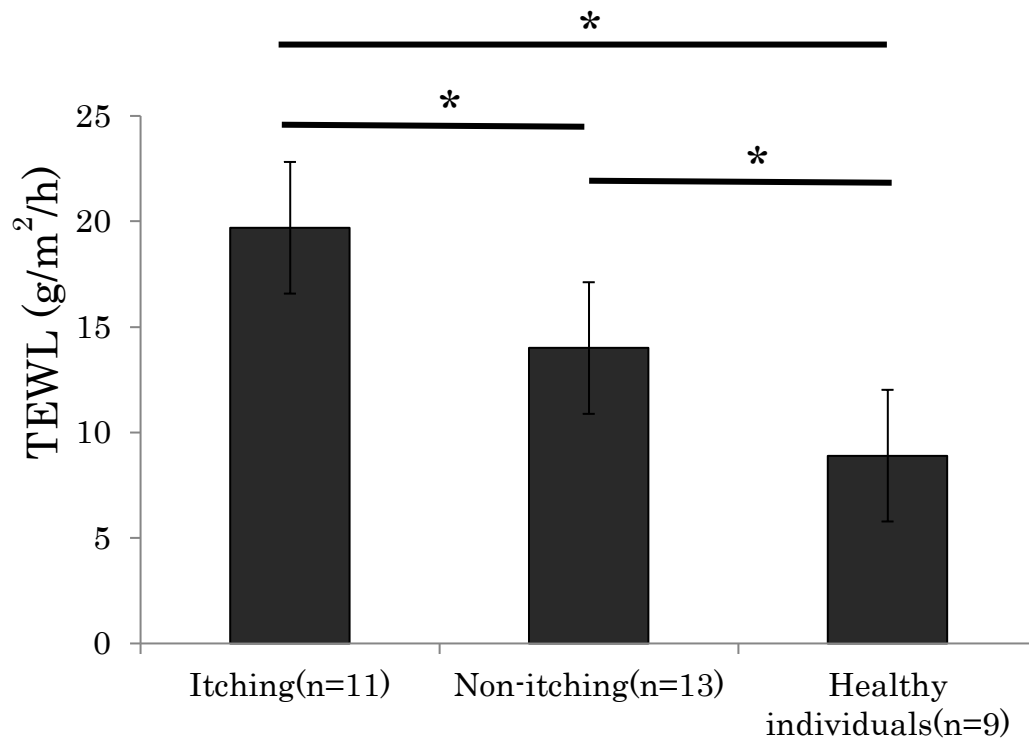


Fig. 2. TEWL Levels on Skin in Patients with or without Itching

Values represent the mean \pm standard deviation. Tukey-Kramer method was used to compare between each groups. *, $p < 0.05$.

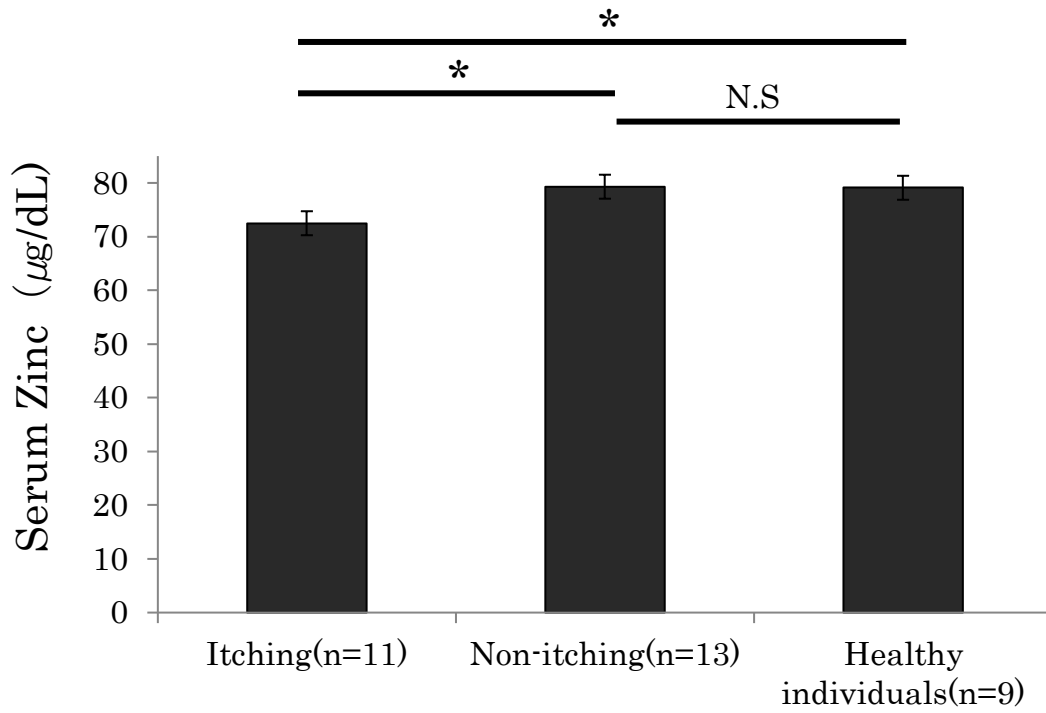


Fig. 3. Serum Zinc Levels in Patients with or without Itching

Values represent the mean \pm standard deviation. Tukey-Kramer method was used to compare between each groups. *, $p < 0.05$.

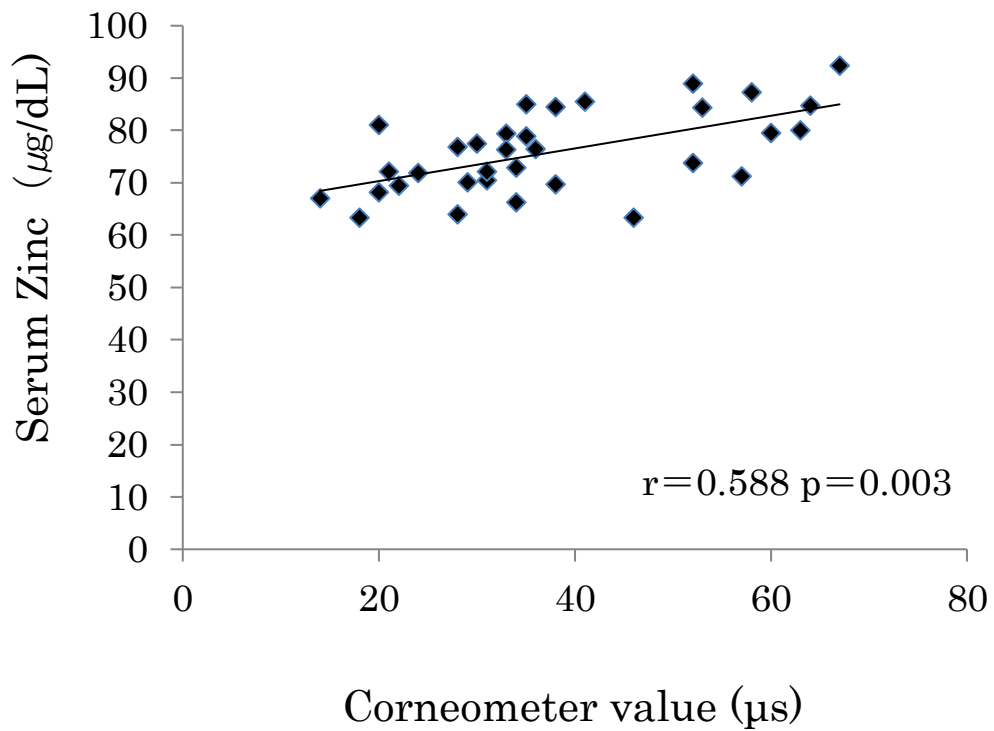


Fig. 4. Correlation between the Stratum Corneum Water Content and Serum Zinc Level

Relationship between serum zinc and corneal water content is shown by scatter plot and regression line.

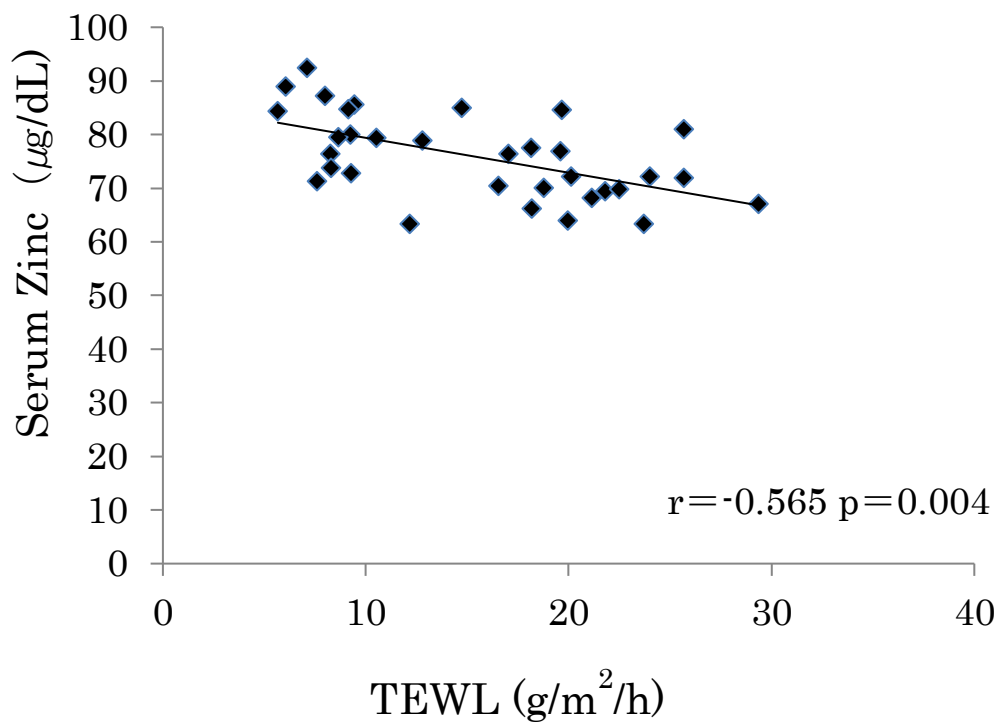


Fig. 5. Correlation between TEWL and Serum Zinc Level

Relationship between serum zinc and TEWL is shown by scatter plot and regression line.

考察

本研究では、乾燥皮膚が下肢静脈瘤患者の掻痒と関連している可能性を示した。これに加えて、角層水分量および TEWL が、血清亜鉛と相関することを示した。これらの結果は、皮膚バリア機能低下が血清亜鉛によって影響されることを示唆している。

下肢静脈瘤の患者は健常人群より角層水分量が有意に低値を示したことから (Fig. 1)、乾燥皮膚の状態であることが示唆された。特に掻痒が有る患者は、掻痒が無い患者よりも角層水分量が有意に低値であり、乾燥皮膚が進行した状態にあると考えられた。

次に、TEWL は掻痒が有る患者群は掻痒が無い患者群より有意に高値を示し、両群とも健常人群に比して有意に高値であった (Fig. 2)。一般に、TEWL は、皮膚のバリア機能が損なわれているアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患において高値を示すことが知られている [54]。本研究でも、下肢静脈瘤の患者で掻痒がある患者は、健常人群および掻痒無の患者に比べて、角層水分量は、低値を示し TEWL が高値を示したことは、掻痒がある患者では皮膚バリア機能が低下していたことが示唆された。

さらに、亜鉛欠乏と皮膚疾患との関係に注目し、亜鉛の血清濃度と下肢静脈瘤に起因する掻痒との関連を検討した。亜鉛欠乏性皮膚疾患としては、腸性肢端皮膚炎のような特定の皮膚疾患があげられる。亜鉛欠乏と掻痒や皮膚炎を主症状とするアトピー性皮膚炎については、亜鉛欠乏が皮膚バリア機能や免疫システムに影響を与え [55]、亜鉛欠乏はアトピー性皮膚炎の増悪因子の一つになるとの報告がある [56]。また、掻痒のある透析患者では血清亜鉛値の低下と血清ヒスタミン値の上昇がみられ、それらの間には負の相関があるとの報告もある [57]。本研究においても、掻痒が有る患者群は、掻痒が無い患者群および健常人群に比して、血清亜鉛値の低下が認められた (Fig. 3)。しかし、掻痒が無い患者群と健常人群では差はみられなかった。亜鉛はマスト細胞からのヒスタミンの脱顆粒を抑える働きがあることが知られており [58]、亜鉛が低下することにより、下肢静脈瘤の患者では健常人に比してヒスタミン値が上昇していたと推測された。以上から、下肢静脈瘤患者においても亜鉛欠乏が掻痒の原因の 1 つであると考えられた。しかし、硬化療法後の亜鉛を測定していないため、硬化療法後にヒスタミン値が低下していたのか、亜鉛が上昇していたかは明らかでない。

亜鉛欠乏の要因には、亜鉛の摂取不足、吸収不足、需要増大、排泄増加などがある。本研究では、すべての対象者が通常食を食べていたにも関わらず、掻

痒が有る下肢静脈瘤患者にのみ亜鉛低下が認められた理由については、今後の検討が必要であろう。

また、亜鉛欠乏の診断指針（亜鉛欠乏症の診療指針 2016：一般社団法人日本臨床栄養学会編集）によると、60～80 $\mu\text{g}/\text{dL}$ は潜在性亜鉛欠乏とされ、亜鉛補充の適応とされる。本研究では、掻痒が有る患者群では平均 70 $\mu\text{g}/\text{dL}$ であったことから、亜鉛の補充適応となるものと考えられた。

なお、本研究では、対象とした 3 つの群（掻痒が有る患者群、掻痒が無い患者群、健常人群）に年齢差があり、特に男性と女性の間の年齢差が大きかった。これは、患者数が少なく、治療を受けたすべての患者を対象としたことによる。また、高齢者で健康な条件の整ったボランティアを集めることが困難であったためでもある。

小括

第 2 章では、下肢静脈瘤患者における搔痒発症と血清亜鉛との関係性について検討を行った。その結果、本研究により、血清亜鉛の低下が、下肢静脈瘤に起因する搔痒を誘発する要因の 1 つであることが明らかになった。今後、亜鉛の補給は、下肢静脈瘤患者の搔痒を改善する効果的な治療法になる可能性がある。また本研究の成果は、下肢静脈瘤による搔痒発症機序を解明するための重要な基礎的情報を提供し得たものと考えられる。

結論

下肢静脈瘤患者では、角層水分量の低下および TEWL の上昇がみられ、掻痒の誘発と関係していることが明らかとなり、掻痒発症の機序には性差があることが示唆された。さらに、下肢静脈瘤患者における掻痒の発症には、血清亜鉛の低下が関与することが示唆された。本研究の成果は、下肢静脈瘤に対する新しい治療法開発の可能性を示唆するものと考えられた。

引用文献

- 1) Bartholomew JR, King T, Avisesh S, Vidimos AT. Varicose veins: newer, better treatments available. *Cleve. Clin. J. Med.*, **72**, 312–328 (2005).
- 2) Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann. Epidemiol.*, **15**, 175–184 (2005).
- 3) Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PDC, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Mechanism of disease: chronic venous disease. *N. Engl. J. Med.*, **355**, 488–498 (2006).
- 4) Kohno K, Niihara H, Hamano T, Takeda M, Tamasaki M, Mizumoto K, Nabika T, Morita E, Shiwaku K. Standing posture at work and overweight exacerbate varicose veins: Shimane CoHRE study. *J. Dermatol.*, **41**, 964–968 (2014).
- 5) Zhou D, Lee HS, Villarreal F, Teng A, Lu E, Reynolds S, Qin C, Smith J, Sung KL. Differential MMP-2 activity of ligament cells under mechanical stretch injury: an in vitro study on human ACL and MCL fibroblasts. *J Orthop Res.*, **23**, 949-957(2005).
- 6) Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Gskis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **284**, H1778-1784(2003).
- 7) Milkiewicz M, Haas TL. Effect of mechanical stretch on HIF-1{alpha} and MMP-2 expression in capillaries isolated from overloaded skeletal muscles: laser capture microdissection study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, **289**, H1315-1320(2005).
- 8) Schmid-Schönbein GW, Takase S, Bergan JJ. New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency. *Angiology.*, **52(suppl.1)**, S27-34(2001).
- 9) Bradbury A, Evans C, Allan P, Lee A, Ruckley CV, Fowkes FG. What are the symptoms of varicose veins? Edinburgh vein study cross sectional population survey. *BMJ*, **318**, 353–356 (1999).
- 10) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impaired Skin Barrier Function in Mice with Colon Carcinoma Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 947-950(2015).

- 11) Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.*, **337**, 1419-1428(1997).
- 12) Beebe HG, Bergan JJ, Bergqvist D, Eklof B, Eriksson I, Goldman MP, Greenfield LJ, Hobson RW 2nd, Juhan C, Kistner RL, Labropoulos N, Malouf GM, Menzoian JO, Moneta GL, Myers KA, Neglen P, Nicolaides AN, O'Donnell TF, Partsch H, Perrin M, Porter JM, Raju S, Rich NM, Richardson G, Sumner DS. Classification and grading of chronic venous disease in the lower limbs: a consensus statement. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, **12**, 487–491 (1996).
- 13) Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, Carpentier PH, Gloviczki P, Kistner RL, Meissner MH, Moneta GL, Myers K, Padberg FT, Perrin M, Ruckley CV, Smith PC, Wakefield TW, American Venous Forum International Ad Hoc Committee for Revision of the CEAP Classification. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J. Vasc. Surg.*, **40**, 1248–1252 (2004).
- 14) Nael R, Rathbun S. Effectiveness of foam sclerotherapy for the treatment of varicose veins. *Vasc. Med.*, **15**, 27–32 (2010).
- 15) Kurihara M, Shimizu H, Tsuboi K, Kobayashi K, Murakami M, Eguchi K, Shimozuma K. Development of quality of life questionnaire in Japan: quality of life assessment of cancer patients receiving chemotherapy. *Psychooncology*, **8**, 355–363 (1999).
- 16) Kikuchi K, Kobayashi H, Le Fur I, Tschachler E, Tagami H. The Winter Season Affects More Severely the Facial Skin than the Forearm Skin: Comparative Biophysical Studies Conducted in the Same Japanese Females in Later Summer and Winter. *Exo Dermatol.*, **1**, 32-38(2002)
- 17) Tanja K, Ajsa MF, Aida M. Stratum Corneum Hydration and Skin Surface pH in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Dermatovenerol Croat.*, **19(4)**, 242-247(2011).
- 18) Takamori K. Mechanism of Itch in Atopic Dermatitis. *J. Pediat. Dermatol.*, **22(2)**, 49-51(2003)
- 19) Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol.*, **17**, 931-972(1999).
- 20) Leknes SG, Bantick S, Willis CM, Wilkinson JD, Wise RG and Tracey I. Itch and motivation to scratch: an investigation of the central and peripheral correlates of allergen- and histamine-induced itch in humans. *J Neurophysiol.*, **97**, 15-22(2007).
- 21) Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, Paus R,

- Scholzen TE. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol.*, **126**,1937–1947(2006).
- 22) Toyoda M, Makino T, Kagoura M, Morohashi M. Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. *Arch Dermatol Res.*, **292**,418–421(2000).
 - 23) Hosogi M, Schmelz M, Miyachi Y, Ikoma A. Bradykinin is a potent pruritogen in atopic dermatitis: a switch from pain to itch. *Pain.*, **126**,16–23(2006).
 - 24) Fjellner B, Hagermark O. Studies on pruritogenic and histamine-releasing effects of some putative peptide neurotransmitters. *Acta Derm Venereol.* , **61**,245–250(1981).
 - 25) Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B. Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol.*, **71**,233–235(1978).
 - 26) Iddamalgoda A, Le QT, Ito K, Tanaka K, Kojima H and Kido H. Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins. *Arch Dermatol Res.*, **300(suppl.1)**,S69-76(2008).
 - 27) Snyder RJ. Venous leg ulcers in the elderly patient: associated stress, social support, and coping. *Ostomy Wound Manage.*, **52**, 58–66, 68 (2006).
 - 28) Solomon S. POMC-derived peptides and their biological action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **885**, 22–40 (1999).
 - 29) Hiramoto K, Homma T, Jikumaru M, Miyashita H, Sato EF, Inoue M. Fasting differentially modulates the immunological system: its mechanism and sex difference. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **43**, 75–81 (2008).
 - 30) Urbach F, Forbes PD, Davies RE, Berger D. Cutaneous photobiology: past, present and future. *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 209–224 (1976).
 - 31) Shim WS, Oh U. Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Mol. Pain*, **4**, 29 (2008).
 - 32) Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol.*, Jul; 78(1): 43-8 (2003).
 - 33) Zierau O, Zenclussen AC, Jensen F. Role of female sex hormones, estradiol and progesterone, in mast cell behavior. *Front Immunol.*, Jun 19; 3: 169 (2012).
 - 34) Hiramoto K, Sugiyama D, Takahashi Y, Mafune E. The amelioration effect of tranexamic acid in wrinkles induced by skin dryness. *Biomed Pharmacother.*, May; 80: 16-22 (2016).
 - 35) Sahiner UM, Yavuz ST, Buyuktiryaki B, Cavkaytar O, Arik Yilmaz E, Tuncer A, Sackesen C. Serum basal tryptase levels in healthy children:

- correlation between age and gender. *Allergy Asthma Proc.*, **35**, 404-8 (2014).
- 36) Kusnierova P, Vsiansky F, Pleva L, Plevova P, Safarcik K, Svagera Z. Reference intervals of plasma matrix metalloproteinases 2, 3, and 9 and serum asymmetric dimethylarginine levels. *Scand J Clin Lab Invest.*, **75**, 508-13 (2015).
- 37) Zhu J, Cheng B, Liu H, Tang J, Xiang X, Peng Y. [Expression of beta-endorphin in hypertrophic scar and its relationship with pruritus]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, **26**, 731–734 (2012).
- 38) Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL. Mu-opiate receptor and beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin. *Dermatol.*, **209**, 183–189 (2004).
- 39) al’Absi M, Wittmers LE, Ellestad D, Nordehn G, Kim SW, Kirschbaum C, Grant JE. Sex differences in pain and hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses to opioid blockade. *Psychosom. Med.*, **66**, 198–206 (2004).
- 40) Goto T, Tsugawa Y, Camargo CA Jr, Hasegawa K. Sex differences in the risk of hospitalization among patients presenting to US emergency departments with asthma exacerbation, 2010-2012. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, **4**, 149–151 (2016).
- 41) Keselman A, Heller N. Estrogen signaling modulates allergic inflammation and contributes to sex differences in asthma. *Front. Immunol.*, **6**, 568 (2015).
- 42) Okuyama K, Hamanaka Y, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. T cell subsets related with a sex difference in IL-5 production. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **155** (Supplement 1), 21–26 (2011).
- 43) Okuyama K, Kashimura T, Kawano T, Ohkawara Y, Takayanagi M, Kikuchi T, Ohno I. Higher sensitivity of male CD4+ T cells to suppressive effects of CD8+ T cells on IL-5 production compared to female CD4+ T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **158** (Supplement 1), 35–41 (2012).
- 44) Verma-Gandhu M, Verdu EF, Bercik P, Blennerhassett PA, AL-Mutawaly N, Ghia JE, Collins SM. Visceral pain perception is determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. *Gut*, **56**, 358–364 (2007).
- 45) Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S,

- Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol.*, Jul; 3(7): 673-80 (2002).
- 46) Hiramoto K, Yamate Y, Sato EF. The Effects of Ultraviolet Eye Irradiation on Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice. *Photochem Photobiol.*, Sep; 92(5): 728-34 (2016)
- 47) Higurashi K, Iizuka N, Yoshimura H, Tanaka T, Nomoto S. Evaluation of colorimetric method for zinc, using clinical chemistry analyzer. *Biomed Res Trace Elements.* Oct;18(4): 380-5 (2007).
- 48) Ogawa Y, Kawamura T, Shimada S. Zinc and skin biology. *Arch Biochem Biophys.* Dec; 611: 113-119 (2016).
- 49) Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Am Coll Nutr.* Jun; 28(3): 257-65 (2009).
- 50) Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr.* Mar 1; 4(2): 176-90 (2013).
- 51) Jackson NJ. Physiology of Zinc: General Aspects. In: *Zinc in Human Biology.* Springer, London; p1-14 (1989).
- 52) Najafabadi MM, Faghihi G, Emami A, Monghad M, Moeenzadeh F, Sharif N, Davarpanah Jazi AH. Zinc sulfate for relief of pruritus in patients on maintenance hemodialysis. *Apr;16(2): 142-5 (2013).*
- 53) Sanada S, Kuze M, Yoshida O. Beneficial effect of zinc supplementation on pruritus in hemodialysis patients with special reference to changes in serum histamine levels. *Hinyokika Kyo.* Dec; 33(12): 1955-60 (1987).
- 54) Kurihara M, Shimizu H, Tsuboi K, Kobayashi K, Murakami M, Eguchi K, Shimozuma K. Development of quality of life questionnaire in Japan: quality of life assessment of cancer patients receiving chemotherapy. *Psychooncology.* Jul-Aug; 8(4): 355-63 (1999).
- 55) Kanekura T, Tashiro M. Zinc deficiency: report of three cases. *Cutis.* Aug; 48(2): 161-4 (1991).
- 56) Wiegand C, Hipler UC, Boldt S, Strehle J, Wollina U. Skin-protective effects of a zinc oxide-functionalized textile and its relevance for atopic dermatitis. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* May; 6: 115-21 (2013).
- 57) Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael DJ, Ruben B, Fazel N. Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J Am Acad Dermatol.* Jan; 56(1): 116-24 (2007).

58) Chvapil M. Effect of zinc on cells and biomembranes. Med Clin North Am.
Jul; 60(4): 799-812 (1976).

謝辞

本研究に臨み親切なご指導、ご鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 臨床薬理学教室 大井 一弥 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究をまとめるにあたり有益なご指導、ご助言を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 平本 恵一 助教、鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 免疫制御学研究室 西田 圭吾 准教授に深く感謝いたします。

本学論文の審査にあたり、ご教示とご校閲を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 飯田 靖彦 教授、鈴木 宏治 教授、半田 哲郎 教授、三輪 高市 教授、坂 晋 助教に深く感謝いたします。

最後に、本研究の実施にご協力いただきました三重ハートセンター 西川 英郎 院長、西村 善幸 心臓血管外科部長をはじめとする三重ハートセンター関係諸氏、並びに鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 病態・治療学分野 関島 秀久 助手、五島 健児 大学院生に心より感謝いたします。

Biological mechanism of skin itchy in patients with varicose veins

Introduction

Varicose veins are a common disorder of the lower extremities. Varicose veins are responsible for a wide range of lower extremity symptoms, including aching, swelling, a tickling sensation, and pruritus [1,2]. In particular, pruritus may lead to a decreased quality of life. As varicose veins progress, pigmentation and dermatitis become common complications. However, no reports have described the relationship between varicose veins and pruritus. We previously reported that organ inflammation induces dry skin [3-6]. In the present study, we aimed to elucidate the mechanism of pruritus onset in patients with varicose veins.

Chapter 1

Section 1

In this study, we investigated the correlation of dry skin and inflammatory mediators with skin symptoms in patients with varicose veins. Dry skin evaluation included measurement of the stratum corneum water content and transepidermal water loss (TEWL) before and after sclerotherapy. Additionally, the levels of substance P, histamine, immunoglobulin E (IgE), tryptase, and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were measured as inflammatory mediators before and after sclerotherapy. The mean age of the 27 patients in this study (8 men, 19 women) was 64 years. The mean age of the 9 healthy individuals (control group; 4 men, 5 women) was 41 years. Clinical signs were evaluated according to the Clinical, Etiologic, Anatomic, and Pathophysiologic classification. In this study, substance P, histamine, IgE, tryptase, and MMP-9 were significantly lower after sclerotherapy. In addition, the reduction of these substances was correlated with the intensity of pruritus. The stratum corneum water content was low before sclerotherapy. However, it was significantly increased after sclerotherapy. TEWL was high before sclerotherapy but significantly lower after sclerotherapy. In patients who complained of itching, all signs of pruritus disappeared after sclerotherapy. Therefore, in patients with varicose veins, the reduction of inflammatory mediators via mast cells after sclerotherapy induced an increase in the stratum corneum water content and a decrease in TEWL. These changes were considered to be related to the disappearance of

pruritus. Therefore, in this study, inflammation due to activation of mast cells was found to be involved in dry skin in patients with varicose veins.

Section 2

An epidemiological investigation of pruritus revealed sex-related differences in patients with varicose veins. In our study, the incidence of pruritus in patients with varicose veins was higher in women (70.4%) than in men (50.0%). However, the mechanisms of these sex-related differences in pruritus were unclear. Therefore, we aimed to clarify the sex-related differences in the mechanism of pruritus onset in patients with varicose veins. Patients with varicose veins experience stress associated with both pain and pruritus [7]. Stress causes pruritus via β -endorphin and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [8]. A sex-related difference in susceptibility to stress has been reported [9]. Therefore, we measured β -endorphin and ACTH in men and women with varicose veins and pruritus. Before sclerotherapy, the stratum corneum moisture content was low and TEWL was high in both men and women. After sclerotherapy, these values significantly improved in both men and women. No significant differences in the skin measurement parameters (stratum corneum water content and TEWL) were found between men and women at the site of lower extremity varices. In the evaluation of inflammation, the levels of substance P, histamine, IgE, and MMP-9 were higher before than after sclerotherapy. There were no significant differences in these parameters between men and women. Before sclerotherapy, tryptase was significantly higher in women than men. After sclerotherapy, tryptase decreased to the same level as in healthy individuals in both men and women. Before sclerotherapy, the β -endorphin and ACTH levels were significantly higher in men than women. After sclerotherapy, ACTH decreased to the same level as in healthy individuals in both men and women. Based on our findings, a sex-related difference exists in the mechanism of varicose vein-related pruritus. In women, increased levels of tryptase induced itching, while in men, increased levels of β -endorphin and ACTH induced itching.

Chapter 2

Studies in recent years have suggested that zinc is an essential trace element for maintenance of a healthy body [10,11]. Zinc suppresses chemical

mediators such as histamine from mast cells [12]. The aim of this study on the development of pruritus caused by varicose veins was to elucidate the correlation between the serum zinc concentration and pruritus. This study included 11 patients with pruritus (mean age, 65.9 ± 9.4 years) and 11 patients without pruritus (mean age, 59.3 ± 9.5 years). The non-patient control group comprised 9 healthy individuals without varicose veins (mean age, 41.7 ± 7.0 years). The water content of the stratum corneum was significantly lower in patients with than without pruritus. Moreover, the water content was significantly lower than that measured in healthy individuals. TEWL was significantly higher in patients with than without pruritus. Moreover, TEWL in both patient groups was significantly higher than that in healthy individuals. These findings suggest that the affected part of the lower limb was in a dry state and that the patients with pruritus had particularly dry skin. The zinc content was significantly lower in the patients with than without pruritus. However, no significant difference was observed in the zinc content between patients without pruritus and the healthy individuals. Our study showed for the first time that a low serum zinc level is a risk factor for varicose vein-induced pruritus.

Conclusion

In patients with varicose veins, a decreased stratum corneum water content and increased TEWL are related to both the onset of pruritus and the reduction of inflammatory mediators via mast cells. Furthermore, a sex-related difference in the mechanism of pruritus induction appears to exist. A low serum zinc level was shown to be a risk factor for varicose vein-induced pruritus. The results of our research are considered to be valuable for proposing a new treatment method for pruritus in patients with lower extremity varicose veins.

References

- [1] Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann. Epidemiol.*, **15**, 175–184 (2005).
- [2] Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Smith PDC, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Mechanism of disease: chronic venous disease. *N Eng J Med.*, **355**, 488-498 (2006).

- [3] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp Dermatol.*, **23(9)**: 659-63, (2014). doi: 10.1111/exd.12499.
- [4] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impairment of skin barrier function via cholinergic signal transduction in a dextran sulphate sodium-induced colitis mouse model. *Exp Dermatol.*, **24(10)**: 779-84, (2015). doi: 10.1111/exd.12775. Epub 2015 Aug 18.
- [5] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Impaired skin barrier function in mice with colon carcinoma induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Biol Pharm Bull.*, **38(6)**: 947-50, (2015). doi: 10.1248/bpb.b15-00208.
- [6] Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Chronic liver injury in mice promotes impairment of skin barrier function via tumor necrosis factor-alpha. *Cutan Ocul Toxicol.*, **35(3)**: 194-203, (2016). doi: 10.3109/15569527.2015.1076433. Epub 2015 Aug 28.
- [7] Snyder RJ. Venous leg ulcers in the elderly patient: associated stress, social support, and coping. *Ostomy Wound Manage.*, **52**, 58-66, 68 (2006).
- [8] Dalgard F¹, Stern R, Lien L, Hauser S. Itch, stress and self-efficacy among 18-year-old boys and girls: a Norwegian population-based cross-sectional study. *Acta Derm Venereol.* Sep; **92(5)**: 547-52 (2012). doi: 10.2340/00015555-1309.
- [9] Urbach F, Forbes PD, Davies RE, Berger D. Cutaneous photobiology: past, present and future. *J. Invest. Dermatol.*, **67**, 209-224 (1976).
- [10] Prasad AS. Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Am Coll Nutr.*, Jun; **28(3)**, 257-65 (2009).
- [11] Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease. *Adv Nutr.*, Mar; **4(2)**, 176-90 (2013).
- [12] Sanada S¹, Kuze M, Yoshida O. Beneficial effect of zinc supplementation on pruritus in hemodialysis patients with special reference to changes in serum histamine levels. *Hinyokika Kyo.* Dec; **33(12)**, 1955-60 (1987).