2016年発行
『別府大学大学院紀要』第21号　抜刷

別府明礬「湯の花」の皮膚への効果

仙波　和代　　二宮　香織　　瀬口　まゆ
本浪　歩実　　三ヶ尻聡美　　岩瀬　伸子
谷口　秀樹　　山本　展久　　新名　宏二

【研究レポート】

別府明礬「湯の花」の皮膚への効果

仙波　和代[1)]　二宮　香織[1)]　瀬口　まゆ[1)]
本浪　歩実[1)]　三ヶ尻聡美[1)]　岩瀬　伸子[2)]
谷口　秀樹[3)]　山本　展久[3)]　新名　宏二[4)]

1）別府大学食物栄養科学部
2）別府岡本屋旅館
3）大分県産業科学技術センター
4）株式会社ゆふ・は

【はじめに】

別府市明礬温泉の「湯の花」は、湯の花小屋で栽培されている。その結晶成分にはハロトリカイトが多く含まれており、様々な生理学的効能があると推測される。そこで我々は「湯の花」の皮膚に対する効果を検証したので研究レポートとして報告する。これまでも「私学助成金報告書」「サイエンス・インカレ2018」「シオノ健康財団助成金報告書」「健康365」などで既に経過報告を行っているが、研究出版物として出版されていないため、明礬地区の方々から「湯の花の宣伝やアピールのために、研究内容がまとまって記載されている印刷物が欲しい」との要望を受け、本研究レポートとしてまとめて報告する経緯に至った。

【キーワード】

湯の花、ミョウバン、アトピー性皮膚炎、ハロトリカイト

【研究目的と背景】

全国各地の温泉地域に「湯の花」というものがあるが、大分県別府市の明礬温泉の「湯の花」は独特な方法で栽培されており、その「湯の花製法」は重要無形民俗文化財に指定されている。湯の花製法を簡単に述べると、湯の花小屋と呼ばれる藁葺き屋根の小屋を建て、その中に青粘土を敷き詰め、青粘土の下から硫黄温泉ガスを均等に小屋内に噴出させることで、硫黄噴気と青粘土の化学反応を誘導し、結晶物を得る方法である。結晶は１日に１mm程度成長し、２ヶ月経過したあたりで採取、精製し製品化する。湯の花製法は1660年代から試みられ、現在も湯の花製法で得られた「湯の花」は入浴剤として販売されている。

「湯の花」の効能表示を見ると「あせも・いんきん・うちみ・肩こり・くじき・神経痛・しっしん・しもやけ・痔・ただれ・たむし・冷え性・水虫・腰痛・リウマチ・かいせん」と記載されている。しかしながら、湯の花の効能を科学的に検証した研究論文はほとんど無い。以上のことから私達は、別府特有の「湯の花」が、皮膚を介して本当に私達の健康に影響を与えているのか科学的に研究することを試みた。

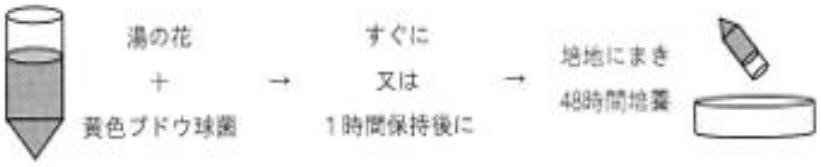
【研究方法】

(1)「湯の花」使用者のモニタリング調査

ミョウバンは民間療法として以前よりアトピー性皮膚炎などの皮膚炎症性疾患の症状緩和に利用されている。そこで申請者らは、2016年4月～8月まで、別府岡本屋旅館において、皮膚トラブルに対する民間療法として湯の花を購入・使用する方々で、本調査に同意を得られた8名の方に対し、湯の花使用前後の症状の経過観察を行った（倫理委員会2016-01）。内訳はアトピー性皮膚炎と診断されている方が4名、座瘡の方が2名、酒さ様皮膚炎と診断されている方が1名、基底細胞癌（90歳のため手術はせず経過観察中）と診断されている方が1名であった。

(2)「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

アトピー性皮膚炎では黄色ブドウ球菌が繁殖していることが多く、症状緩和には黄色ブドウ球菌をコントロール必要がある。そこで湯の花が黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すのか、*in vitro*で検討を行った。湯の花を濃度依存的に添加した黄色ブドウ球菌液（10^6）を作製し、作製直後と25℃ 1時間保持後の菌液を、卵黄加マンニット食塩寒天培地で37℃、48±2時間培養し、それぞれの菌数を計測した。また今後クリームや石鹸の開発を目指すため、添加物となるティートリーオイルを加えて検討も行った。



(3) 湯の花の免疫活性機能の探索

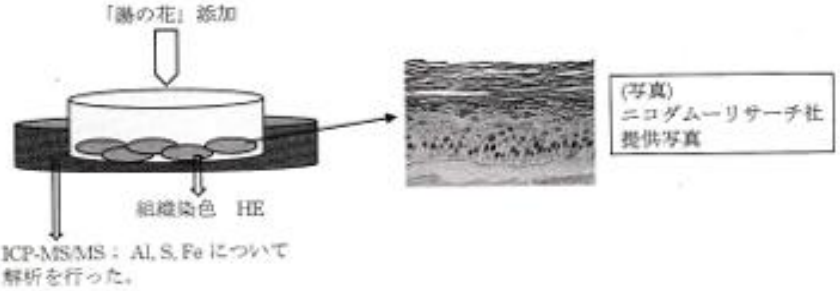
免疫を司るヘルパーT細胞には、体液性免疫を導くサイトカインを産生するTh 2細胞と、細胞性免疫を導くサイトカインを産生するTh 1細胞とがある。Th 1とTh 2はシーソーのような関係で、生体内で片方が上昇すれば片方が下降するという関係にある。アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギーはTh 2が優位になっている状態で、炎症を抑える為には、アレルゲン除去だけでなくTh 1 /Th 2バランスを整えることも重要であると考えられる。そこで私達は、湯の花の刺激がTh 1 /Th 2バランスに影響を与えているのか調べるために、樹状細胞を用いて、湯の花の免疫活性機能の探索を行った。骨髄系樹状細胞を6 ×10^5/ 5 ml/wellの濃度で6 wellプレートに播種し、GM-CSF加RPMI培地を用いて24時間培養を行った。24時間後に湯の花DMSO溶解液を、最終濃度50 μg/wellとなるように添加して、さらに48時間培養を行った。48時間後に樹状細胞を回収し、RNA抽出を行い、変動する遺伝子の網羅的解析を行った。

(4) 湯の花の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

「湯の花」のお湯に浸かることで、湯の花の成分が皮膚を浸透し、血中に入り生理活性作用を発揮する可能性があるのかどうか、湯の花の皮膚細胞への影響と皮膚透過性の実験を*in vitro*にて行った。

ニコダムリサーチ社の三次元組織ヒト表皮モデルを用いて実験を行った。ヒトケラチノサイトを12穴プレートに添加し、3次元培養表皮モデル EpiSkin-LM (EpiSkin) を設置し、角化過程を

経て、角層機能を持つ再生表皮を形成させた。その後、「湯の花」のDMSO溶解液を25μg/wellとなるように添加し、48時間培養を行った。48時間後に、鏡染色を行って細胞を観察するとともに、培地をICP-MS/MS解析することにより、湯の花成分が皮膚細胞と基底層を通過して溶液中に出ているのか検討を行った。



組織染色方法

EpiSkinの表面をPBS（−）にて洗浄し、4％パラホルムアルデヒドに一晩浸漬し固定を行った。次に、パラフィンブロックを作成後、ミクロトームにて5μmの厚さで薄切して切片をスライドガラスに貼り付けた（組織切片の作成）。染色後の組織切片をマリノール封入し、顕微鏡画像を撮影した。以下、染色手順について記す。スライドガラスに張り付けた組織切片をマイヤーのヘマトキシリン溶液に10分間処理し、精製水にて洗浄した。次いで、0.5％エオシンYを含有したPBS（−）にて5分間処理し、精製水にて洗浄した（HE染色）。

【結果・考察】

(1)「湯の花」使用者のモニタリング調査

「湯の花」使用者8名に対してモニタリング調査を行った。その結果8名とも皮膚症状の改善傾向を認めた。基底細胞癌と診断されていた女性は、湯の花継続使用2週間後、一部が痂皮化、落屑し、正常組織に戻るといった経緯も認めた。8名のうち写真を掲載することに承諾して下さった4名の方々の写真を以下に示す。

【写真1】

湯の花使用前　使用35日目

2歳10ケ月の男の子でアトピー性皮膚炎と診断されていた。湯の花継続使用35日で、ほぼアトピーの症状は消失した。

【写真２】

湯の花使用前

使用９日目

使用33日目

幼少期から重篤なアトピー症状が続いている30歳男性の肘写真である。様々な処方薬を使用してきたが、結局コントロールできずに現在に至った経緯がある。湯の花を継続使用することで改善傾向を認めた。

【写真３】

湯の花使用前

使用９日目

使用33日目

小学校高学年にアトピー性皮膚炎と診断された17歳女性。ミノマイシンとフラビタンを使用中であったが改善していなかった。クリーム使用後は良くなってきたため薬剤は使用していない。

【写真４】

湯の花使用前

使用36日目

11歳女子。幼少期にアトピー性皮膚炎と診断されたが、ステロイドが嫌だったため、そのままとなっていた。クリーム使用後に丘疹と紅斑が消失した。

これらのモニタリング調査により、別府「湯の花」にはアトピー性皮膚炎に対して何らかの有効成分が含まれているのではないかという事が推測できた。今回は医療機関で臨床治験として調査を行った訳ではないので、１人１人の詳細な経緯やコントールデーターなどは調査できていないが、私達は８名の方の「湯の花」使用前後の症状を調べることにより、研究の方向性を決めることができたと考えている。

(2)「湯の花」の黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用

サンプルは以下のように調整を行った。

① 「湯の花」濃度は温度25℃以下の滅菌精製水100mlに0.1ｇ、0.5ｇ、1.0ｇ、2.0ｇ、3.0ｇ添加溶解した。また0.1ｇ/100ml溶液は、別途ティートリーを加えた。

② 「湯の花」0.1ｇ/100mlにティートリーを添加・撹拌し、相分離を確認する。相分離が確認された時点の濃度を飽和溶液とした。

培地の変化についての写真を示す

試験区	開始時	25℃1時間保持後
A		
B		
C		
D		

試験区	開始時	25℃1時間保持後
E		
F		
G		
H		

A：滅菌精製水　　B：湯の花2.0 g /100ml（菌－）　　C：湯の花0.1 g /100ml
D：湯の花0.1 g /100ml＋ティートリー　　E：湯の花0.5 g /100ml
F：湯の花1.0 g /100ml　　G：湯の花2.0 g /100ml　　H：湯の花3.0 g /100ml

黄色ブドウ球菌数の結果を以下に示す（A－Hは「培地変化」の成分と同じである）

試験区	開始時の黄色ブドウ球菌数（CFL/ml）	25℃ 1時間保持後の黄色ブドウ球菌数（CFL/ml）
A	2.8×10^{5}	2.4×10^{5}
B	0	0
C	2.2×10^{5}	1.0×10^{3}
D	1.6×10^{5}	2.4×10

試験区	開始時の黄色ブドウ球菌数（CFL/ml）	25℃ 1時間保持後の黄色ブドウ球菌数（CFL/ml）
E	1.6×10^{4}	8.4×10^{2}
F	1.3×10^{4}	7.6×10
G	1.4×10^{4}	0
H	1.8×10^{5}	0

コントロールでは1時間の保持に関わらず、測定48時間後の黄色ブドウ球菌数には変化が認められなかった。また湯の花と混合させてすぐに培地に移した群にはあまり菌数の変化が認められなかったのに対し、湯の花と混合させて1時間保持した後に培地に移した菌群では、湯の花の濃度依存的に、測定菌数の減少を認めた。

19世紀後半にドイツの医師Karl August von Burowにより収斂・消毒剤としてブロー氏液という薬剤が考案された。pH約3の13%酢酸アルミニウム溶液であるが、タンパク質に接すると「タンパク－金属複合体」を形成し、殺菌、肉芽形成促進などの作用を発現させる。欧米では現在も医療に使用されているが、日本では1920年発行の薬局方にまでは収載されていたが、抗生物質の普及とともに使用頻度が減少し、1971年に削除された。しかしながら2000年に発表された

Thorpらの論文によると、慢性可能性中耳炎患者に非常に有効であるということから、日本でも耳鼻科領域において抗菌性の高さと耐性菌の問題から、再び脚光をあび始めている。ブロー氏液は、ミョウバンと同様にアルミニウムの溶液であり、細菌、真菌の種類を選ばずMRSAや緑膿菌にも有効であるというスペクトルの広い抗菌作用を有し、さらに現存する抗生物質とは作用機序も異なっており、副作用の報告もほとんど無い。

以上の結果より我々は ①湯の花は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を有する、②その抗菌作用は湯の花と長時間混合させることにより発現することから、ブロー氏液と同様に「金属—タンパク複合体形成」によるものではないかと推測した。

(3) 湯の花の免疫活性機能の探索

In vitroにおいて、湯の花を樹状細胞に添加し、樹状細胞の遺伝子を網羅的に解析することで、湯の花が、どのような免疫機能に影響を与えているのか検討した。

表は、15倍以上の差を認めた遺伝子を示している。特にIrak-4遺伝子の発現は142倍と群を抜いて高かった。Irak-4はInterleukin-1 receptor associated kinase 4であり、2002年に同定された分子である。

Irak-4が欠損すると、Il-1R、IL-18R刺激、TLR2,3,4,9刺激に対する反応が欠損し、ブドウ球菌に対する感染抵抗性が著しく低下することが既に報告されている。TLR2,3,4,9刺激は基本的にTh 1を優位に導く経路であるため、湯の花はTh 2に傾いているアレルギー症状をTh 1へ傾けている可能性が示唆された。つまり「湯の花」には、①アトピー性皮膚炎の主要原因である黄色ブドウ球菌に対する生体側の抵抗性を向上させる、②Th2に傾いている免疫バランスをTh 1に傾ける、という効果があると考えられる。

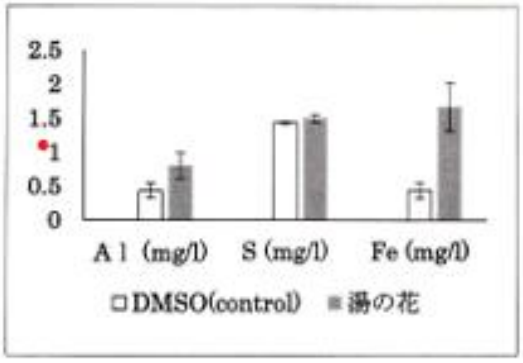
GeneName	FoldChange
Irak4	142.5574415
Gdap1	27.41435832
Defb42	26.35255063
Slit2	23.70448591
AK131781	20.12829826
5730457N03Rik	19.69499301
Saxo1os	19.62609305
chr1:93755492-93755643_R	19.08248299
Nr2e3	16.47537274
Cpxm2	16.26775203
Myh3	16.17723344
C230037E05Rik	15.71060464
Mpp6	15.39805261
Wdhd1	15.33276521
Krt36	15.31954772

(4) 湯の花の皮膚細胞への影響と皮膚浸透性

湯の花添加後の皮膚組織切片（HE染色）

試　料	切 断 面 像
DMSO	
サンプルHU	

湯の花添加後の培地のICP-MS/MS解析



DMSO 適用後の皮膚モデルと比較して、湯の花（サンプル HU）の角層および表皮層の厚みは薄かった。またDMSO 適用後と比較して、角層では下部が膨潤し、表皮層の厚みが薄くなった。ICP-MS/MS解析では、溶液中のアルミニウム、硫黄、鉄について調べた。アルミニウムと鉄において、皮膚基底層を通過して真皮層まで浸透している可能性が示唆された。

【本研究の社会貢献と発展性】

(1) 皮膚疾患に対する治療選択肢を増やすことができる

H26の厚労省の報告によれば、アトピー性皮膚炎の患者数は約46万人存在し、その数は年々増加している。現在、皮膚の炎症には「ステロイド薬」「プロトピック」などが使用されており、また開発中のものとして「IL-4Ra抗体」「IL-31R抗体」がある。いずれも掻痒感や炎症に対して効果があるが、菌交代現象や日和見感染症などの副作用が生じるケースも多く、自己判断で治療を辞めてしまう人も多い。アトピー性皮膚炎の主原因が黄色ブドウ球菌であると報告されたことから、ターゲットを細菌にした新しい治療薬の開発は急務である。特に長期抗生物質の使用が現実的でないことから、漢方薬やハーブなどを利用した黄色ブドウ球菌コントロール薬が求められる。湯の花成分のミョウバンは決して新しい物質ではないが、モニタリング調査、耳鼻科領域での温故知新、インフラマソーム活性化、IRAK-4分子発現などから考慮すると、抗菌作用を併せ持つ免疫誘導物質であると推測できる。よってミョウバンの作用や作用発現メカニズムを解明することは、皮膚疾患に対する治療選択肢を広げることにつながると考えている。

(2) 湯の花を使った感染防御に有効な石鹸や含嗽剤などの開発

昨今、医療現場では「抗生物質耐性菌による院内感染」の問題が深刻になりつつある。1961年にMRSAが出現して以来、現在では、MDR、VRE、VRSAもあり、欧米では年間2万人の患者がこれら耐性菌で亡くなっている。院内感染は医療従事者の手指や飛沫を介して微生物が患者に移行するケースが多い。よって医療従事者の手指消毒・厳による確実な感染防御体制の確立は急務である。もし「湯の花」がMRSAや多剤耐性緑膿菌に対して有効であるならば、それは新規な知見であり、石鹸液や手洗い液として使用することで、院内感染を劇的に制御できるかもしれない。またインフルエンザなどのウイルスに有効であれば、含嗽剤やスプレー剤として使用し、市中での大流行を弱めることができるとも考えられる。そしてその作用メカニズムは既存の抗生物質や抗ウイルス薬とは異なることが想定できるので、併用することも可能であろうと考えている。

(3) IRAK-4発現増減の意義

2006年に理研よりIRAK-4分子が自然免疫と獲得免疫の両者に共通した分子であることが発表された[9]。しかしながら、IRAK-4分子の定常発現量の差が、感染防御や免疫疾患にどのように関与しているのか報告は少ない。よって本研究を発展させることで、感染防御や免疫疾患に関するIRAK-4分子の新規知見を得ることができる。特に高齢マウスなどを用いて、正常ではあるけれど免疫力が低下している場合、「湯の花」を用いてIRAK-4分子を発現させることで、日和見的な感染症を予防できるのかどうか検討を行う。湯の花入浴剤を使用すると、免疫力が向上し、健康寿命が延長できれば、学術面だけでなく地域の活性化にも繋がると考えている。

【参考文献】

1）笹原 武志，井上 松久
新規殺菌セラミックによる Legionella pneumophila 殺菌効果に及ぼす温泉水泉質の影響
感染症誌 79 p157-160 (2005)

2）SENBA. K, WU Xianglin, MARUOKA. N, HOKAZONO. H, IKEBE. Emi, YONEMOTO.T.
Effects of Fermented Barlry Extract on Antioxidant Status in JAWS II cells.
Bulletin of Beppu University Graduate School No.18 p89-93 (2016)

3）Senba,K., Ohga,Y.,Kimura,Y., Asada,N., Nakamura, H., Hase, M., Ohtsubo,M., Nishizawa,C.
The effects of Jigokumushi to the health in SAMP8 mice.
Bulletin of Beppu University Graduate School No.16 p29-38 (2014)

4）環境省HP

5）瀬野錦蔵
別府湯の花（明ばん）の生成過程，大分県温泉調査研究会報告，14，19-20，(1963)

6）Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA.
Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminiumadjuvants.
Nature. Jun 19;453 (7198)：1122-6. doi：10.1038/nature06939. Epub 2008 May 21. (2008)

7）TetsuroKobayashi, MartinGlatz, KeisukeHoriuchi, HiroshiKawasaki, HaruhikoAkiyama Daniel H.Kaplan, Heidi H.Kong, MasayukiAmagai and KeisukeNagao
Dysbiosis and Staphyloccus aureus Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis
Immunity, Volume 42, Issue 4, 21 April, Pages 756-766 (2015)

8）Pharmaceutical and Pharmacological Evaluation of Burow's Solution (Aluminum Acetate Solution), a Hospital Preparation, and Development of Its Rapid Preparation Method1. 石橋祐子，高野幹久，他10名．
Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 124(11), 833-840 (2004)

9）IRAK-4--a shared NF-kappaB activator in innate and acquired immunity.
Suzuki N1, Saito T. Trends Immunol. Dec;27(12):566-72. (2006)

【謝　辞】

本研究は文部科学省私学助成金，別府大学研究助成金，シオノ健康財団助成金で行われました。心より御礼を申し上げます。