

動物園動物カピバラおよび実験動物モ  
ルモットを用いた温泉入浴が生体に  
及ぼす効能の実証研究

山口大学大学院共同獣医学研究科

井中 賢吾

2023年3月

## 目 次

諸 論.....	4
第一章 カピバラの冬季の荒れ肌に対し温泉入浴が及ぼす美肌効果及びリラクゼーション 効果の実証研究.....	7
1.1. 緒 論.....	7
1.2. 材料および方法.....	9
1.2.1. 温泉水の解析.....	9
1.2.2. 使用動物.....	9
1.2.3. 皮膚性状検査.....	9
1.2.4. 皮膚の病理組織学的検査.....	11
1.2.5. 温泉入浴試験のスケジュール.....	12
1.2.6. 快適度の評価.....	12
1.2.7. サーモグラフィ検査.....	13
1.2.8. 統計学的解析.....	13
1.2.9. 倫理声明.....	14
1.3. 結 果.....	14
1.3.1. 温泉水の解析.....	14
1.3.2. 夏季と冬季の皮膚性状.....	14
1.3.3. 皮膚の病理組織学的検査.....	15
1.3.4. 温泉入浴試験.....	16
1.3.5. 快適度の評価.....	17
1.3.6. サーモグラフィ検査.....	17
1.4. 考 察.....	18
小 括.....	25
第二章 モルモットを用いた温泉入浴が創傷治癒及び保温効果に及ぼす影響に関する比較 対照実験.....	26
2.1. 緒 論.....	26
2.2. 材料および方法.....	28
2.2.1. 温泉水の分析.....	28
2.2.1.1. 成分分析.....	28
2.2.1.2. pH, ORP の測定と平衡 ORP.....	28
2.2.1.3. 温泉水のエイジング.....	28
2.2.2. 創傷治癒試験.....	29
2.2.2.1. 使用動物.....	29
2.2.2.2. 実験スケジュール.....	29
2.2.2.3. 血液学的検査および血清生化学検査.....	30

2.2.2.4.	血漿アミノ酸組成の分析	31
2.2.2.5.	創傷部位の肉眼所見および画像解析検査	32
2.2.2.6.	病理組織学的検査	32
2.2.3.	皮膚サーモグラフィ試験	33
2.2.3.1.	使用動物	33
2.2.3.2.	実験スケジュール	33
2.2.3.3.	サーモグラフィ検査	34
2.2.4.	統計学的解析	34
2.2.5.	倫理声明	35
2.3.	結 果	35
2.3.1.	温泉水の分析	35
2.3.1.1.	成分分析	35
2.3.1.2.	pH, ORP の測定と平衡 ORP	35
2.3.1.3.	温泉水のエイジング	36
2.3.2.	創傷治癒試験	36
2.3.2.1.	血液学的検査および血清生化学検査	36
2.3.2.2.	血漿アミノ酸組成の分析	37
2.3.2.3.	創傷部位の肉眼所見および画像解析検査	37
2.3.2.4.	病理組織学的検査	38
2.3.3.	皮膚サーモグラフィ試験	38
2.3.3.1.	サーモグラフィ検査	38
2.4.	考 察	39
	小 括	48
	総合考察	49
	総 括	51
	謝 辞	54
	参考文献	55
	付図・付表	72
	参考画像	100

## 緒 論

温泉は西洋医学が発展した19世紀よりも遥かに以前から心身の健康を整える為に人々に習慣的に利用されてきた歴史がある [1]。温泉とは、「地中からゆう出する温水、鉱水及び水蒸気その他のガス(炭化水素を主成分とする天然ガスを除く)。」と定義されている物質である。その為、温泉は地下水を熱することができる火山がある地域に多く湧出する傾向がある。とりわけ日本は100を超える活火山を有し、世界の活火山のおよそ7%が存在する世界有数の火山国であることから、昔から特に温泉と馴染みが深い国である。それ故、温泉入浴は娯楽や湯治を目的として日本に強く根付いている文化であり、温泉の効果・効能にまつわる神話や逸話も全国各地で数多く言い伝えられている [2-4]。人々はそういった温泉への入浴によって得られる肉体的もしくは精神的な改善効果を温泉療法として長年扱ってきた。

しかし、これらの温泉入浴作用は我々の経験則からの知見や現象面のみの評価に基づいて述べられている効能も少なくなく、それら効果・効能を科学的に裏付けるデータが十分ではないのが現状である。その理由の一つとして、入浴という操作の都合上、動物実験が難しく実験動物を用いた温泉入浴試験は適切な実験系が確立されていない点が挙げられる。例えばヒトを対象とした温泉入浴試験の報告は幾らか存在するが、統一された試験条件の設定が困難であることや実施できる検査が限定されている、などといった点が制約として見受けられる。山口大学にある我々の研究施設の近傍に位置する湯田温泉もまた、「白狐が見つけた美肌の湯」として古くから皮膚への効能が謳われ、美肌効果や創傷治癒

効果があるとされているが、それに対して科学的な検証が行われていない現状があった。

そういった現状の中で我々はカピバラという動物に着目した。カピバラ（学名：*Hydrochoerus hydrochaeris*, 和名：オニテンジクネズミ）は南アメリカ東部のアマゾン川流域を中心に川や湖近くの水辺や草原、熱帯雨林のジャングルなどに生息している世界で最も大きい齧歯類である。主に朝と夕方に活動する草食獣であり、日中は水の中で過ごす時間が多い動物である。また、水中での生活に適応している証拠に小さな水かきを備えており、5分以上の潜水も可能とされている。しかし、本来の熱帯アマゾンの高温多湿な生息環境とは全くの正反対である日本の低温低湿な冬季の厳しい環境では、水中での生活を営む事が困難になるうえ、皮膚が荒れ肌状態になってしまうという飼育上の問題が元来存在していた。それ故近年、こういった問題を解決すべくカピバラに対して冬の期間に温泉入浴を施すことで、飼育環境の改善を図ると同時にイベントとして集客をはかる日本ならではの取り組みが全国各地で徐々に見られるようになった。しかし、カピバラの温泉入浴が実際に効果・効能を発揮しているのかに対しては依然科学的な解明はなされていない状況であった。我々は、こういった現状とおとなしく人に慣れやすいカピバラの性質を鑑みて、新たな形の動物を用いた温泉入浴試験の着想に至った。

そこで本研究ではまず、冬季になると自然に乾燥した荒れ肌状態を呈し、水浴を好むカピバラという動物と、「美肌の湯」と古くから謳われている山口県の湯田温泉を用いて、温泉入浴が生体に与える効果・効能の科学的根拠の手がかりを実証研究から探ることとした。その後、実験室レベルの制御された環境下にてカピバラと近縁な動物であるモルモッ

トを用いて水道水と温泉水の比較対照実験を更に行うことで、詳細な科学的データに基づき温泉の美肌効果や創傷治癒効果などといった効果・効能について検討を深めることを研究の目的とした。

## 第一章 カピバラの冬季の荒れ肌に対し温泉入浴が及ぼす美肌効果及びリラクゼーション効果の実証研究

### 1.1. 諸 論

ヒトは心身ともに健康状態を整える為に温泉を利用してきた歴史が古くからある。温泉は心地よい気分をもたらす事は勿論、長期治療による副作用がほとんど認められない安全な療法である。ヒトを対象とした温泉療法に関する研究報告はいくつか存在し、その中でもアトピー性皮膚炎、魚鱗癬、乾癬などといった特に皮膚科学的な分野で有益な作用があるとされている [5-11]。日本は火山が多いことから、昔から多様な種類の温泉が全国各地で湧出する温泉大国である。それ故、日本古来の温泉郷では、さまざまな野生動物が傷の治りに効く温泉を見つけた、という伝承も各地に存在する。しかし、皮膚に対する温泉入浴のこれらの治療効果は、完全には解明されていないのが現状である。その理由は、温泉入浴試験が既存の実験動物では難しいと考えられており、その効果を皮膚科学的に評価できる動物がいなかった為である。

一方、日本では近年動物園やサファリランドでカピバラという動物をしばしば見かける。飼育されているカピバラは基本的におとなしく、人にも慣れやすいため、扱いが比較的容易である。そういった性質から人気を博し、日本では年々飼育頭数が増えている。カピバラはもともと南米アマゾン熱帯雨林の水辺に生息する世界最大のげっ歯類であり、日中は本来水の中で時間を過ごす事が多い。しかし環境が全く異なる低温かつ低湿な日本の

冬季では、皮膚が乾燥し肌荒れを起こす現象が認められる。それに対し、カピバラを温泉に入浴させることで冬季の飼育環境の改善や皮膚機能の改善を図る独自の取り組みが日本では見られる。温泉療法は、ヒトの患者に対してリラクゼーション効果を提供すると言われているが[12-14]、カピバラも温泉に浸かりながら一見リラックスしたような表情を浮かべている。しかしながら、温泉入浴しているカピバラは実際に心身共に健康状態が改善されているのかに対して科学的な実証はされていない。そこで我々は、「白狐が見つけた美肌の湯」と古くから謳われる湯田温泉に入浴することでカピバラの冬季の肌荒れが改善するのか、という点に主に着目し多角的な視点から温泉効果の実証研究を行った。第一章の研究の目的は大きく分けて以下の3点である。

1. 湯田温泉水の特徴・機能を明らかにすること
2. カピバラの冬季の皮膚（荒れ肌状態）と夏季の皮膚（本来の状態）の違いを皮膚科学的に調査し、カピバラの皮膚の特性を病理組織学的観点も交えて明らかにする事
3. 冬季の荒れ肌状態のカピバラの皮膚に対し、温泉入浴が皮膚科学的に効果を示すの  
かに加えて、温泉入浴中のカピバラの心理状態を定量的に評価することで心身の両  
面から温泉の効果を検証すること

以上3点を中心に検証を試みた。



## 1.2 材料および方法

### 1.2.1 温泉水の解析

本研究では湯田温泉配給協同組合から供給された湯田温泉水（山口県山口市）を使用した。湯田温泉は非火山温泉に分類されるが、温泉湧出時の温度は72～76℃と高く、1日あたり約2000トンの湧出量を誇る。温泉成分の分析調査は山口県環境保健研究センターによって行われた。

### 1.2.2. 使用動物

秋吉台サファリランド（山口県美祢市）の協力のもと、2～12歳のカピバラ9頭（♂:4頭, ♀:5頭）を本実験に使用した。カピバラは試験期間中もサファリランドで飼育されており、飼育室の温度は24.2～27.9℃に維持されていた。日中は屋外の開放スペースにて飼育されている。飼料としてチモシー、キャベツ、ニンジン、ペレットを与えられた。水分はいつでも自由に各個体が摂取できるような環境を用意した。

### 1.2.3. 皮膚性状検査

カピバラの皮膚性状は高温多湿環境の夏季と低温低湿環境の冬季にそれぞれ計測した。夏季は本来の生息環境と類似している為、夏季に計測した皮膚性状を基準値として、冬季の肌荒れ状態の皮膚性状と比較を行った。測定部位はカピバラの腰背部とした。測定項目と用いたプローブ・機器は以下のとおりである。

- I. 皮膚水分量 (Corneometer CM825; Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)
- II. 皮膚 pH (Skin-pH-Meter PH905; Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany)
- III. 皮脂量 (Sebmeter SM815; Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).
- IV. メラニン (Mexameter MX18; Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).
- V. 紅斑 (Mexameter MX18; Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany).

I から III のプローブは Derma Unit SSC3 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) 、IV 及び V の測定で用いたプローブは Multi Display Devices MDD4 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) にそれぞれ接続し、測定を行った。各プローブの測定原理と測定値の解釈を以下に簡単に説明する。

皮膚水分量 (Corneometer CM825) : プローブ先端部のガラス板を介し、電界を皮膚に発生させ静電容量を計測する。水の誘電率は高いため、皮膚に水分を多く含有していると静電容量が大きくなる。その値の大きさに応じて 0~120 の相対値で算出される。

皮膚 pH (Skin-pH-Meter PH905) : ガラス電極と参照電極の電位差を利用した一般的

なガラス電極法で測定する。

皮脂量 (Sebmeter SM815) : 皮膚の表面から分泌された皮脂を吸収したテープの光透過率により測定される。測定値の範囲は 0~300 で、単位は  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  である。

メラニンおよび紅斑 (Mexameter MX18) : プローブから 3 つの異なる波長の光が測定部位に照射され、その反射光からメラニンとヘモグロビン (紅斑) の密度を定量化する。各項目の測定値は 0~999 の相対値で表示され、値が大きいほど肌の黒さや赤みが強いことを意味する。

#### 1.2.4. 皮膚の病理組織学的検査

皮膚組織は、メデトミジン (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ドミツール, 日本全薬工業株式会社, 郡山, 日本)、ミダゾラム (0.15  $\text{mg}/\text{kg}$ , ミダゾラム注射液 0.5% [F], 富士製薬工業株式会社, 東京, 日本)、ケタミン (1.5  $\text{mg}/\text{kg}$ , ケタミン注 5% [フジタ], フジタ製薬株式会社, 東京, 日本) の混合麻酔 (i.m.) による全身麻酔下で背側と腹側の皮膚の両部位から得た。これらの標本は皮膚性状検査を行ったカピバラとは別に、怪我の治療の為に全身麻酔が必要な個体から採取したものであり、カピバラの正常な皮膚の形態的構造を調べるのに使用した (採取したサンプルは怪我の箇所ではなく正常な部位の皮膚)。組織標本は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定され、4 $\mu\text{m}$  の薄さでパラフィン切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、フォンタナマッソン (FM) 染色、ワンギーソン (vG) 染色、ワイゲルト (WG) 染色でそれぞれ染色を施した。

### 1.2.5. 温泉入浴試験のスケジュール

一連の実験は秋吉台サファリランドにて冬季に行われた。温泉入浴試験のスケジュールを図 I-1 に示す。入浴試験を開始する前に、カピバラの皮膚が荒れ肌状態になっている事が確認された。その後、21 日間に渡り 1 日 30 分以上の温泉入浴がカピバラに毎日施された。皮膚の状態は試験の 1 日目、7 日目、21 日目の朝にその日の入浴試験を始める前に計測した。つまり、1 日目の測定値は入浴試験を始める前の肌荒れ状態の皮膚を反映しており、この入浴試験の皮膚性状値のベースラインとなる。温泉の温度は約 35°C に調整し試験を行った。

### 1.2.6. 快適度の評価

カピバラが温泉に入浴している際の快適度を評価するために、カピバラの表情のスコアリング試験を行った。カピバラは主に目と耳に典型的な状態変化を示したため、スコアリングの対象は「目」と「耳」とした。この研究では、さまざまな環境条件下で撮影した写真をスコアリングする事で、カピバラの温泉入浴時の心理状態を評価した。各部位の快適度は「0: 標準 (ベースライン)」、「1: 適度な快適状態」、「2: 明らかな快適状態」の 3 段階に分類された。

目のスコアは目の形に基づいて評価を行い、以下のように基準を定義した。

“0” = 完全に目が開いている, “1” = 半分だけ目が開いている, “2” = 完全に目を閉じている

耳のスコアは以下のように評価基準を定義した。

“0” = 耳が前を向いている, “1” = わずかに尾側に耳を引いている, “2” = 尾側に耳を大きく引き、耳が横を向いている

#### 1.2.7. サーモグラフィ検査

カピバラの入浴前後の体表面温度を、サーモグラフ FLIR E4 (FLIR Systems, Inc., オレゴン, アメリカ)を用いて経時的に撮影した。撮影時点は、入浴前、入浴直後、入浴 10 分後、20 分後、30 分後に設定した。皮膚表面温度は頭部、体幹部、四肢末端部の 3 か所でそれぞれ温度変化を測定した。撮影した画像データは FLIR Tools(FLIR Systems, Inc., オレゴン, アメリカ)によってそれぞれ解析され、皮膚表面温度の変化を平均値 ± 標準偏差で示した。

#### 1.2.8. 統計学的解析

全てのデータの統計学的解析は Statcel 4 (オーエムエス出版, 埼玉県, 日本)を用いて行った。夏季と冬季の皮膚性状の比較では t 検定、温泉入浴による皮膚性状の変化とサーモグラフィ試験についてはダネットの多重比較検定、快適度の評価ではウィルコクソンの順位和検定によって有意差を判定した ( $p < 0.01$  および  $p < 0.05$ )。相関係数は、スピアマンの順位相関係数によって算出された。 ( $p < 0.05$ )。

### 1.2.9. 倫理声明

本試験における動物を用いる全て実験過程は山口大学動物使用委員会によって承認されており（承認 No. 284：2018年4月13日）、山口大学における動物使用に関する規則に則って行われている。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. 温泉水の解析

本試験に用いた湯田温泉の成分を表 I-1 に示す。成分分析表より、陽イオンの主成分はナトリウムイオンであり、陰イオンの主成分は塩化物イオンであった。温泉水の pH は 9.30 とアルカリ性の泉質を示していた。

### 1.3.2. 夏季と冬季の皮膚性状

夏季と冬季の実験から得られたカピバラの背側皮膚の肉眼所見を図 I-2 に示す。夏季の背側皮膚は赤黒く皮膚表面は滑らかに見えた。一方で冬季のカピバラの皮膚の状態は悪化しており、夏季と比較して表面が痂皮や鱗屑を伴った荒れ肌状態を呈していた。

夏季と冬季のカピバラの皮膚性状の比較を図 I-3 に示す。結果は平均値 ± 標準偏差で示している。冬季の皮膚水分量 (7.85 ± 6.10) は有意に夏季の皮膚水分量 (30.55 ± 25.27) よりも低く ( $p < 0.01$ )、冬にはほぼ 4 分の 1 に減少していた。皮膚 pH についても夏季 (8.26 ± 0.90) と冬季 (7.25 ± 0.70) で有意差が見られた ( $p < 0.01$ )。夏季の測定値か

ら、カピバラの元々の正常な皮膚は弱アルカリ性であった。冬季の皮膚メラニン値 (647.27 ± 61.45) は、夏季 (707.27 ± 71.77) よりも有意に低かった ( $p < 0.01$ )。皮膚紅斑値も同様の傾向を示し、夏季 (262.15 ± 41.85) よりも冬季 (210.33 ± 51.88) で有意に低かった ( $p < 0.01$ )。皮脂量については両季節間で有意差は認められなかった。カピバラの皮脂量は年間通して  $0\sim 2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  と極めて微量であった。

### 1.3.3. 皮膚の病理組織学的検査

カピバラの皮膚の病理組織学的検査の結果、表皮は5~10層の表皮細胞から構成されており、角質層、顆粒層、有棘層及び基底層の4層構造が明確に観察できた (図 I-4)。表皮層の厚さは  $40\sim 120 \mu\text{m}$  であった。表皮突起や真皮乳頭が発達していなかった為、表皮と真皮の境界は平坦で、真皮層は分厚く見られた。真皮層にエクリン汗腺は観察されず、汗腺の数も少数であった。その他には、メラニン顆粒が背側皮膚表皮層の全層に観察され、特に基底層において顕著に見られた (図 I-5)。一方で、腹側皮膚の表皮層の構造は背側皮膚と違いは見られなかったのにもかかわらず、メラニン顆粒が全く見られなかった。真皮層では、コラーゲン線維の密度が背側皮膚では部分的に疎であったことが腹側の皮膚との大きな違いであった (図 I-6)。そのうえ腹側皮膚の真皮では微細な弾性線維が上層から下層まで均一に観察された一方で、背側皮膚の弾性線維は、腹部の皮膚よりも太く、密に絡み合っていたのが特徴的であった (図 I-7)。

#### 1.3.4. 温泉入浴試験

温泉入浴試験は冬季の寒冷な気候下で行われた（平均気温： $4.98 \pm 2.10^{\circ}\text{C}$ ）。参考として、夏季の正常な状態の皮膚性状の測定を行った際の平均気温は  $24.47 \pm 2.20^{\circ}\text{C}$  であった。温泉入浴試験期間中の肉眼所見の変化を図 I-8 に示す。7 日目の時点では、まだ全体的に皮膚の鱗屑が目立ち、皮膚は荒れているように見えた。しかし、温泉入浴試験開始から 21 日後の肉眼所見では、鱗屑を伴っていたカピバラの荒れ肌はより滑らかな表面の皮膚に変化していた。肌の色も変化し、元の赤みがかった黒色に近づいていた。さらに、入浴により皮膚と被毛によりツヤが見られ、温泉入浴試験前の肌の状態と比較して肌の質感が大幅に改善された。

温泉入浴期間中のカピバラの皮膚性状の変化を図 I-9 に示す。結果は平均値  $\pm$  標準偏差で示す。試験開始前の段階では、カピバラは真冬の環境下であったため明らかな乾燥肌を発症しており、皮膚の水分量が著しく低下していたことが明らかとなった。その後、皮膚水分量は温泉入浴試験を通して経時的に増加し、1 日目 ( $8.49 \pm 6.23$ ) と 21 日目 ( $27.86 \pm 17.8$ ) の水分量の値の間に有意差が見られた ( $p < 0.01$ )。カピバラの皮膚 pH は、実験開始前では中性状態であった。21 日間の入浴実験の間に、皮膚 pH に有意な変化は見られなかった。メラニン値は、入浴の過程で徐々に減少し、21 日目の値は 1 日目と比較して有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。紅斑値は、1 日目では  $215.0 \pm 59.1$  であったが、7 日目に  $216.2 \pm 31.5$  まで変動した。21 日目の紅斑値  $255.9 \pm 40.0$  は、入浴前の初日に得られた測定値よりも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。皮脂量は、夏季と冬季の皮



膚性状の比較試験と同様にこのテストでも常時  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  未満であり、カピバラの皮膚からの皮脂の分泌は殆ど見られなかった。

### 1.3.5. 快適度の評価

カピバラの温泉入浴時の快適度の評価試験の結果を図 I-10 に示す。快適度の評価は、今回我々が作成した快適度の基準表 (表 I-2) にしたがって表情を点数化する方法により行われた。

入浴前の目のスコア ( $0.49 \pm 0.69$ ) は、「ベースライン」と「わずかに快適」の間に分類された。一方で、入浴中の目のスコア ( $1.80 \pm 0.40$ ) は入浴前の 3 倍以上高く、有意差も見られた ( $p < 0.01$ )。入浴前の耳のスコア ( $1.00 \pm 0.86$ ) は「わずかに快適」状態を示していたが、温泉入浴中の耳のスコア ( $1.59 \pm 0.55$ ) は、入浴前と比較して上昇し、「わずかに快適」状態と「明らかに快適」状態の間に分類された。しかし、それらの間に有意差は見られない結果となった ( $p = 0.19$ )。目のスコアと耳のスコアの間には有意な正の相関が見られ ( $p = 0.001$ )、スピアマンの順位相関係数(rs)は 0.35 であった。

### 1.3.6. サーモグラフィ検査

サーモグラフィ試験の結果を図 I-11 に示す。温泉入浴前の時点では、頭部、体幹部、四肢末端部の 3 部位全てにおいてサーモグラフィは低値を記録した (頭部:  $28.83 \pm 3.38^\circ\text{C}$ , 体幹部:  $29.34 \pm 4.09^\circ\text{C}$ , 四肢末端部:  $15.34 \pm 3.87^\circ\text{C}$ )。温泉入浴の前後で頭部の皮膚表面温

度に大きな変化は見られず、入浴前と比較して入浴直後、入浴 10~30 分後それぞれの間で有意差はなかった。体幹部の皮膚表面温度は温泉入浴により入浴後 30 分後まで 32℃付近に保たれており、入浴前の温度と比較した結果、入浴直後、入浴後 10~30 分後の全ての時点で有意な温度上昇が認められた。四肢末端部の入浴前の皮膚温度は他の部位より約 15℃低く、顕著に低温であることが確認された。入浴直後、四肢末端温度は 30℃近くにまで急激に上昇した。その後の皮膚温度は徐々に時間の経過と共に低下していったものの、皮膚温度は 30 分間 20 °C 以上のレベルで常に維持され、入浴前と比較して有意に高値であった( $p < 0.01$ )。

#### 1.4. 考 察

我々が今回実験に使用した湯田温泉は、非火山性温泉でありながら源泉の湧出時温度は 70℃を超え、温泉の基準値に比べて非常に高値であった。また、湯田温泉の pH は日本の温泉の平均 pH よりも高くアルカリ性であった [15]。温泉の成分分析では、総溶存物質量は 1000mg/kg 未満であるうえ、主成分はナトリウムイオンと塩化物イオンであった為、湯田温泉はアルカリ性単純温泉に分類された。この泉質から、肌への刺激が少ない温泉だという特徴が明らかとなった。湯田温泉に伝承される皮膚への治療効果は、温泉水と皮膚の表面構造との間の局所的な相互作用にある可能性が考えられた。

カピバラの皮膚水分量は冬季と比較して夏季の方が有意に高値であった。ヒトを対象とした過去の研究によると、皮膚水分量は季節変化により影響を受けることが述べられてお

り [16, 17]、日本の動物園で飼育されているカピバラにとって、夏季の本来の生息域に近い環境は皮膚の保湿に良い影響をもたらす事が示された。また、カピバラは南米アマゾンの有機物が豊富な熱帯雨林に生息している動物であるが、ヒトでは人種や居住地域によって表皮水分蒸散量や皮膚水分量などの皮膚性状は異なるといった報告がされている [16, 18]。それ故、年間通じて温暖湿潤な地域に生息しているカピバラは元来、皮膚に高い水分保持能を必要としない動物である可能性が考えられた。これらから、彼らの皮膚は気温や湿度の変化に影響を受けやすく、日本の冬期の気候は明らかな荒れ肌状態を引き起こしていた。

皮膚 pH についても同様に季節変化の影響が見られた。まず、マウスやラット、モルモットなどのげっ歯類の皮膚は通常弱酸性である一方で [19, 20]、カピバラの皮膚は夏季の健康な状態で弱アルカリ性の性質を有していた。これは、犬や猫といったコンパニオンアニマルの皮膚 pH と似たものであり [20, 21]、カピバラの皮膚 pH はげっ歯類の中では特異的であった。冬場の肌荒れ状態では、皮膚水分量の減少に伴い pH も大幅に低下した。ヒトにおいても、皮膚の健康状態が悪化すると皮膚 pH にも変化が生ずることが報告されている [22-24]。今回のデータから、カピバラの肌荒れの指標として、水分量と pH の両方のパラメータが利用可能であることが明らかになった。

今回使用した比色計 (Mexameter) は、皮膚の視覚的な色素沈着の変化を定量的に評価することを可能にし、夏季のカピバラの皮膚メラニン値は冬季と比較して有意に高いことを明らかにした。皮膚におけるメラニンの生成は、特に夏季に照射量が増える紫外線によ

り引き起こされる皮膚への有害なダメージからの生物学的防御反応の一種である [25, 26]。カピバラの夏季と冬季での背側皮膚の色素沈着の変化は、夏季の紫外線に対しての生理的な防御反応がカピバラでも行われている事を示唆した。

皮膚の紅斑値についてもメラニンと同様の傾向を示し、夏季の方が冬季よりも高値を示した。紅斑値は一般的に、測定部位の皮下に循環している血液（毛細血管）中のヘモグロビン濃度を表し、皮膚の赤みを定量的に評価したものである。この皮膚紅斑値の季節差は、夏季の高い気温環境が皮膚の毛細血管の循環を促進させていた、もしくは冬季の寒冷な環境が循環を抑制していたことを示唆した。

今回の皮膚性状検査では、カピバラの皮脂量の測定も行ったが、皮脂量は季節を問わずほぼ検出されなかった。一般的にヒトやイヌ、ネコなどの動物では皮脂腺を通じて表皮に皮脂が絶えず分泌されているが、カピバラではほとんど見られなかったことは特異的であった。皮脂には、肌から水分が蒸発するのを防ぎ、肌の水分を保つ役割がある。それ故、皮脂量の分泌が不十分である場合、冬場の乾燥肌や肌荒れのリスクが高くなる。しかし、自然環境下のカピバラの場合、水陸を行き来して生活を行う為、分泌した皮脂が水浴により容易に喪失してしまう可能性、水浴そのものにより皮膚の乾燥を直接的に防ぐことが出来る可能性、あるいは熱帯の高温多湿な環境下ではそもそも乾燥肌の危険性を考慮する必要があまりない可能性などが考えられ、これらからカピバラは皮脂をあまり必要としない動物に適応進化したのではないかと考えられた。

以上のカピバラの夏季と冬季の皮膚の比較試験より、カピバラの冬季の皮膚は肉眼的に

も皮膚性状的にも荒れ肌を示していたことが明らかとなった。

組織病理学的検査では、カピバラの皮膚組織の構造にいくつかの特徴的な所見が認められた。1つ目は、カピバラは他のげっ歯類よりも比較的厚い表皮を持っていたことである。本研究で調査したカピバラの表皮の厚さと表皮を構成する層の数は、以前の研究で報告されているものとおおよそ一致していた [27]。通常、密に細かい被毛で覆われた動物は、表皮が薄くなる傾向がある。例えば猫や犬の表皮は2~3層で構成されており [28]、モルモットやマウスなどの表皮も3層以下である [29]。これは、被毛により外的刺激からの防御が十分に可能であるからと考えられる。しかし、カピバラの場合は表皮が5~10層であった。その理由として、カピバラの被毛は密ではなく外的刺激から身を守る能力が乏しい為、代償的に表皮が分厚く進化したのではないかと考えられた。2つ目の特徴は、メラニン顆粒が背側皮膚のみに見られたことである。メラニン値の検査の項で述べた通り、皮膚のメラニン色素は、太陽光の有害な紫外線から生体を保護する上で重要な役割を果たしている [25, 26, 30]。特に被毛を殆ど持たないヒトにとっては、進化的および生理学的に大いに意味がある機能である。対照的に、被毛を持つ哺乳類の多くは、表皮にメラニン形成活性のあるメラノサイトを欠いている事が報告されている [30]。一方でカピバラは、被毛を持ちながらもそれが疎である為、十分に紫外線を防御できない理由からか、紫外線から肌を守るメラニン顆粒の産生能を日光があたる背中部分でのみ獲得したようであり、特徴的な皮膚組織所見であった。

温泉入浴試験では、21日間の湯田温泉への入浴により肉眼的に肌荒れが劇的に改善さ

れ、肌の外観や質感は夏季の状態に近づくような変化が見られた。ヒトでは、温泉入浴によって肌荒れの見え目が改善されることが過去に報告されている [31]。さらに、カピバラの被毛も入浴によりツヤを取り戻した。カピバラは長時間水中で過ごす動物であり、本来は疎水性のワックスで覆われた艶のある毛をしている [32]。温泉入浴を通して、皮膚に加えてカピバラの被毛も良好な見た目へ変化していたことが明らかとなった。

温泉入浴試験前後の皮膚性状においても、温泉へ入浴することで荒れた肌の皮膚水分量が大幅に改善されていた。入浴試験開始から 21 日後の皮膚の水分量は夏季の水分量に近い値であった。アルカリ性温泉への入浴により、皮膚の水分量が増加することがヒトの研究でも述べられていることから [33]、同様の効能がはたらいたと考えられる。

皮膚 pH は、温泉入浴開始 21 日後の時点では大きな変化はなく、本来の弱アルカリ性には達していなかった。しかし、見た目や皮膚水分量に改善は見られたことから、それに伴って将来的には継続的な温泉入浴により徐々に夏季の皮膚 pH まで値が上昇していくことが予想された。

皮膚メラニン値は温泉入浴試験を通じて有意に減少した。アルカリ性温泉には余分な角質を取り除き皮膚の表面を滑らかにし、皮膚のターンオーバーを手助けする機能、いわゆるピーリング作用があるとされている。カピバラの皮膚の組織学的所見では、角質層にもメラニン顆粒が豊富に分布していることがわかる (図 I-5)。そのため、こういった余分な角質中のメラニン顆粒が毎日の温泉入浴によって徐々に除去され、メラニン値の減少が見られたと考えられた。その他にも、白斑といった脱色素障害に対しても温泉療法が有

効である報告や、温泉水に含まれる硫黄成分によって皮膚のメラニン形成を抑制されることが報告されている [34-37]。これらから、温泉入浴は表皮のメラニンに対して一定の調節効果を持つ可能性がある。

紅斑値も温泉入浴 21 日後には夏季に示した値と同等にまで有意に上昇していた。ヒトを対象に行った短期間（数分から数時間）な試験では、温泉入浴による温熱効果により皮膚の血流が増加することが報告されている [38, 39]。しかし、今回の試験はそれらよりも長期的に行ったもの、かつ入浴前に皮膚性状を測定していた為、短期的な温熱効果では完全には説明できない結果である。それ故、この結果は継続的な温泉入浴が皮膚の微小循環を長期的に正常化する可能性を示唆した。

カピバラの表情を定量的に評価した結果、温泉入浴はカピバラにとっても快適なものであることが科学的にも証明された。耳の位置の評価は、動物のポジティブな感情を評価するためにさまざまな動物種で広く研究が行われ利用されている [40-44]。カピバラと同じ齧歯類に分類されるラットについても耳にポジティブな感情が反映されやすい傾向があると過去に報告されているが [45]、一方で目に関しては有意な変化は見られなかったと報告されている。それに対して我々の研究結果は、目のスコアはポジティブな状態の指標としてカピバラにとっては有用であることを示したが、耳のスコアには有意な変化はなかったことを示した。これらから、同じげっ歯類であっても感情をあらわしやすい体の部位は異なることが示唆された。

サーモグラフィ試験では、温泉入浴後のカピバラの体温は一定時間保温されている事が

明らかとなった。特に四肢末端部にて顕著に見られたこれらの結果は、入浴後の体の冷えを防ぐ可能性を示した。塩化ナトリウムなど塩化物を含む温泉水は、入浴後の保温性に優れていることが知られている [46-49]。この研究で使用した湯田温泉水には、塩化ナトリウムを含む数種類の塩が含まれていた。過去のいくつかの研究報告では、これらの塩が体表面を薄い膜で覆い、表皮タンパク質に結合した塩が体温の放散を防いでいる可能性を指摘していた [46,49,50]。一方で、カピバラには非常に少数しかエクリン汗腺が存在しないことが過去に報告されている [27]。今回の我々の研究においてもカピバラの胴部の皮膚組織にはエクリン汗腺が殆ど見られないことが同様に確認できたため、少なくとも汗腺は熱の放散には関与していなかったと考えられるが、温泉の保温効果の詳細なメカニズムを解明するには更なる研究が必要と考えられた。

以上の本研究結果から、アルカリ性温泉への継続的な入浴は、肉眼所見や皮膚性状検査、快適度な指標、保温効果などから鑑みて、カピバラの冬季の肌荒れ改善に対し有効にはたらき、温泉が有意に皮膚科学的効果を示すことを実証した。これらの知見は、温泉入浴が人間の肌へ及ぼす改善効果への手がかりにつながる可能性も示唆した。



## 小 括

第一章では、冬季に肌荒れを起こすカピバラを用いて、温泉入浴がもたらす効果を主に皮膚科学的観点から明らかにすることを目的に研究を行った。夏季と冬季のカピバラの皮膚を比較した所、冬季の皮膚は肉眼的及び皮膚性状的にも荒れ肌状態を示していた。荒れ肌状態のカピバラに 21 日間の温泉入浴試験を行った結果、荒れた肌が肉眼的にも皮膚科学的にも改善していることが確認できた。さらに、入浴中の表情を数値化した快適度が有意に上昇し心理的な改善も見られ、入浴 30 分後までの保温効果も実験を通して確認された、これら結果から、温泉がカピバラの冬季に荒れ肌を改善し、皮膚科学的に有意な効果を示すことを実証した。

## 第二章 モルモットを用いた温泉入浴が創傷治癒及び保温効果に及ぼす影響に関する比較

### 対照実験

#### 2.1. 緒 論

温泉療法は化学的な薬品を必要とせず、利用に際して副作用もほとんど見られない療法であり [51, 7]、潜在的な健康上のリスクを引き起こすことなく、長期間安全に治療を行うことが利点として挙げられる。そのうえ、特殊な医療技術や高価な器具も必要としないことから、長く人々に親しまれてきた。それ故、日本ではそういった温泉の効能に関する様々な逸話や伝説が各所に存在し、それらに対する科学的証明が試みられてきた [1-4, 52]。特に皮膚に関しては、温泉入浴により様々な治療効果が期待できると報告されている。例えば、酸性泉はアトピー性皮膚炎の症状の改善効果で知られている他 [10, 11, 51, 53, 54]、硫黄泉や死海には皮膚のメラニン産生を調節する作用がある [35-37]。更に、乾癬や魚鱗癬などといった様々な皮膚疾患に対する温泉療法の効果なども報告されている [7-11, 55-57]。一方で、アルカリ性の温泉は酸性泉よりも皮膚への刺激性が少なく皮膚表面を滑らかにするとされているが、この効能が完全に解明されているわけではない。我々が研究に供用している湯田温泉もまたアルカリ性の温泉であり [58]、美肌の湯として皮膚をすべすべにするという美肌効果が古くから伝承されている。また、傷の治りを早める創傷治癒効果にまつわる逸話もあることから、多くの人々がそれらの効能を求めて来訪している。

第一章の研究では、我々はカピバラを用いて温泉入浴試験を行い、湯田温泉の入浴により、皮膚水分量の増加や保温効果などをはじめとした皮膚性状の改善を実証した [58]。しかし、カピバラの試験は屋外で行われた厳密にコントロールされた環境下のものではなかったうえ、温泉入浴個体群の比較対照群の設定が困難であった。そのため湯田温泉が単純な水道水などと比較して優れた効能を有しているかどうかは実証できていない。

モルモットは古くから実験動物として様々な分野で広く使用されている動物種である。そのうえ、カピバラと同じ齧歯目テンジクネズミ科に属しており、非常に種として近縁な動物として知られている。これら理由から、我々は予備実験においてモルモットに入浴を施したところ、カピバラと同様に穏やかな状態で入浴が出来ることを確認できた。それ故、我々はモルモットが研究室レベルでより詳細な温泉入浴試験を行うために最適な動物だと考えた。本研究の目的は大きく分けて以下の3点である。

- 1) 湯田温泉と水道水の特性の違いを pH に加えて酸化還元電位 (ORP) の要素を加えて2つの観点から明らかにする。
- 2) コントロールされた同一条件下で温泉水と水道水を比較することで、温泉の創傷治癒効果を評価する。
- 3) 水道水との比較対照実験により温泉の保温効果を検証する。

## 2.2. 材料および方法

### 2.2.1. 温泉水の分析

#### 2.2.1.1. 成分分析

第一章と同様、湯田温泉（山口県山口市）を本研究でも使用した。同じ湯田温泉ではあるが、異なる源泉から採取した温泉を使用したため、再度成分分析を行った。分析は山口県衛生環境研究所（山口県，日本）によって行われた。

#### 2.2.1.2. pH, ORP の測定と平衡 ORP

水道水と温泉水の pH と酸化還元電位（ORP）をそれぞれ測定した。pH は、pH メーター “PH-208”（佐藤商事株式会社，神奈川県，日本）、ORP は ORP メーター “SOTA-ORP”（佐藤商事株式会社，神奈川県，日本）を用いて測定した。それらの測定値に基づいて、以前に大河内ら [59, 60, 61]により発表された研究の手法に則って水道水と温泉水それぞれの平衡 ORP の図を作成した。

#### 2.2.1.3. エージング

水質の劣化、いわゆる「エージング」の評価を試みた。水道水と温泉水を 8 日間空気に触れる状態で室内冷暗所に放置し、その間の両検体の pH と ORP の計測を毎日行った。

## 2.2.2. 創傷治癒試験

### 2.2.2.1. 使用動物

SPF化された Hartley 系モルモットを本研究では使用した。動物は九動株式会社（佐賀，日本）から購入した。動物は二匹ずつペアで飼育を行い、ポリスルホン製のケージ（CL-0143, W 355 × D 499 × H 198 mm, 日本クレア株式会社，東京，日本）、再生パルプから作られた床敷“エコチップ”（日本クレア株式会社，東京，日本）を飼育機材として使用した。飼育室は温度: 24 ± 2°C、相対湿度: 50 ± 5% に維持されており、1 時間に 10～15 回自動で換気が行われる。明暗サイクルは 12 時間/12 時間（点灯 07:00～19:00）とした。飼料として“CLEA モルモットダイエット CG-7”（日本クレア株式会社，東京，日本）と水道水を十分に与え、それらは自由に摂食、給水できるような環境を整えた。施設に導入し数週間の馴化を行った後、モルモットは生後約 8 週齢で創傷治癒試験に用いられた。

### 2.2.2.2. 実験スケジュール

温泉入浴群と水道水入浴群の 2 群に 6 頭ずつ、計 12 匹のモルモットを本試験に使用した。入浴試験中は水温を 40 ± 1°C に調整維持した。実験スケジュールを図 II-1 に示す。

試験開始前日（0 日目）: 電動バリカンを用いて腹部の被毛の一部分を粗く剃毛した後、電動シェーバーで更に細かく剃毛を行った。その後、吸入麻酔イソフルラン（MSD

Animal Health, 東京, 日本)による全身麻酔下で、8mm の無菌生検パンチ (貝印株式会社, 東京, 日本)を使用して、腹部の皮膚 4 箇所(腹膜などの皮膚以外の組織を傷つけることなく創傷を作製した。麻酔からの覚醒を確認後、床敷きを全て交換しケージを飼育室へと戻した。

試験期間中 (1 日目から 7 日目): 両群のモルモットへ毎日 15 分間、水道水と温泉水それぞれに入浴を施した。入浴完了後、後日に画像解析を行うために腹部の創傷部位を毎日撮影した。1 日の実験スケジュール完了後は毎日床敷きを交換し、清潔な飼育環境を維持した。この手順を 1 週間連続で行った。

試験最終日 (8 日目): 7 日目までと同様に入浴を行い、腹部創傷部位の写真撮影を行った。その後、4.5%イソフルランで麻酔導入し、3%イソフルランで麻酔を維持した。全身吸入麻酔下で、モルモットの後大静脈から全採血を行い血液サンプルの採取を行った。採取した血液は各種血液用採取管に素早く入れ、血液学的検査、血清生化学検査及びアミノ酸組成分析に用いた。腹部皮膚のすべての創傷部位から皮膚組織標本をサンプリングした他、肝臓、腎臓、脾臓、および副腎も病理組織学的検査のために採材を行った。

### 2.2.2.3. 血液学的検査および血清生化学検査

血液学的検査では、動物用自動血球計数装置 “Microsemi LC-662” (堀場製作所, 京都, 日本) を使用し、以下の項目を調べた: 白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン濃度 (Hgb), ヘマトクリット値 (PCV), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン

量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), 赤血球容積粒度分布幅 (RDW), 血小板数 (PLT), 平均血小板容積 (MPV), 血小板クリット (PCT) および血小板分布幅 (PDW)。

血清生化学検査では、動物用生化学自動分析装置 “Fuji DRY-CHEM NX500V” (富士フイルム, 東京, 日本) を使用し、以下の項目を測定した: アルカリホスファターゼ (ALP), コリンエステラーゼ (ChE), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT), アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT),  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), 乳酸脱水素酵素 (LDH), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), アミラーゼ (AMYL), グルコース (GLU), クレアチンホスホキナーゼ (CK), 血中尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRE), 電解質 (Na, K, Cl, Ca, Mg), 尿酸 (UA), 総タンパク質 (TP), アルブミン (ALB), グロブリン (GLOB), 総コレステロール (TCHO), トリグリセリド (TG), 総ビリルビン (TBIL) および無機リン (IP)。

#### 2.2.2.4. 血漿アミノ酸組成の分析

ヘパリン管に血液サンプルを採取し、それを遠心分離にかけ血漿の回収を行った。それを用いて血漿中の遊離アミノ酸組成を質量分析計で分析した。測定項目は以下の通りである: アルギニン (ARG), グルタミン (GLN), シトルリン (CIT), アンセリン (ANS), セリン (SER), アスパラギン (ASP), プロリルヒドロキシプロリン (PHP), 4-ヒドロキシプロリン (HYP), 3-メチルヒスチジン (3MHIS), 1-メチルヒスチジン (1MHIS), グリシン

(GLY), グリシルプロリン (GPR),スレオニン (THR),  $\beta$ -アラニン(bALA), アラニン (ALA), サルコシン (SAR),  $\delta$ -ヒドロキシリジン (HLY),  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA),  $\beta$ -アミノイソ酪酸 (bAIB),  $\alpha$ -アミノ酪酸 (ABA), オルニチン (ORN), カルノシン (CAR), メチオニン (MET), プロリン (PRO), リジン (LYS), アスパラギン酸 (ASP), ヒスチジン (HIS), チオプロリン (TPR), バリン (VAL), グルタミン酸 (GLU), トリプトファン (TRP),  $\alpha$ アミノアジピン酸 (AAA), フェニルアラニン (PHE), ロイシン (LEU), イソロイシン (ILE), アミノピメリン酸 (APA), シスタチオニン (CTH), シスチン (CYS2), チロシン (TYR), キヌレニン (KNU), 芳香族アミノ酸, 分岐鎖アミノ酸, Fischer 比, 5-アミノレブリン酸 (REB)。

#### 2.2.2.5. 創傷部位の肉眼所見および画像解析検査

創傷部位の撮影を試験期間中毎日行い、肉眼所見の評価を行った。また、創傷部の面積の変化を画像処理ソフトウェア ImageJ® [62, 63] を用いて解析した。各グループの創傷面積は、平均値  $\pm$  標準偏差 (SD)として表された。

#### 2.2.2.6. 病理組織学的検査

試験終了後、剖検により得られたすべての組織標本は 10%中性緩衝ホルマリンで固定され、4  $\mu$ mの厚さで組織切片を作製した。皮膚の組織切片は、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色)、ワンギーソン染色、ワイゲルト染色の 3 種類で染色を行った。その他の



組織切片は、HE 染色でのみ染色を行った。表皮および真皮の病理学的所見を重症度から、無視できる程度の変化 (-)、わずかな変化 (±)、軽度の変化 (+)、中等度の変化 (++)、及び著しい変化 (+++) と 5 段階の評価を行った。

### **2.2.3. 皮膚サーモグラフィ試験**

#### **2.2.3.1. 使用動物**

皮膚サーモグラフィ試験では 12 匹のモルモットを水道水入浴群と温泉入浴群の 2 群に各 6 頭ずつ分けて用いた。飼育条件や飼料は、上記の創傷治癒試験で述べた内容と同じものである。

#### **2.2.3.2. 実験スケジュール**

入浴時の水温は両群共に  $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に調整した。実験のスケジュールを簡潔にまとめたものを図 II-2 に示す。

試験開始前日 (0 日目): モルモットの腹部被毛の一部を電気バリカンで剃毛し、その後シェーバーにより更に細かく剃毛を行った。

試験期間中 (1 日目から 7 日目): 入浴を実施する前に、腹部のサーモグラフ写真を撮影し、平常時の皮膚温度の測定を行った。その後、水道水入浴群と温泉水入浴群のモルモットにそれぞれ 15 分間入浴を施した。入浴後の腹部皮膚表面のサーモグラフィは、入浴直後、入浴 10 分後、20 分後および 30 分後に撮影を行った。その後、床敷交換を行い、飼

育室に戻した。以上の手順を1日目から7日目まで1週間連続で行った。

試験最終日(8日目):7日目までと同様に入浴30分後のサーモグラフ撮影まで行った後、イソフルランによる全身麻酔下で後大静脈から全採血を行った。その後、前述の創傷治癒試験と同様、諸臓器のサンプリングも行った。これらの検体は、サーモグラフィ検査とは別に、血液学的検査、血清生化学的検査および病理組織学的検査に用いられ、水道水入浴群と温泉水入浴群に生理的な違いが見られるのかどうかの検討材料とした。

#### 2.2.3.3. サーモグラフィ検査

体表面温度は、サーモグラフィ FLIR E4 (FLIR Systems, Inc., オレゴン, アメリカ) を用いて撮影した。撮影した画像データは、画像解析ソフト FLIR Tools (FLIR Systems, Inc., オレゴン, アメリカ)により解析され、水道水入浴群と温泉入浴群の入浴前後の腹部皮膚表面温度の推移を比較した。データは平均値 ± 標準偏差で表した。

#### 2.2.4. 統計学的解析

全てのデータの統計学的解析は Statcel 4 (オーエムエス出版, 埼玉県, 日本)を用いて行った。創傷治癒試験における創傷面積の両群比較では t 検定、サーモグラフィ試験についてはダネットの多重比較検定によって有意差を判定した ( $p < 0.01$  および  $p < 0.05$ )。

### 2.2.5. 倫理声明

本試験における動物を用いる全て実験過程は山口大学動物使用委員会によって承認されており（承認番号 409: 2022 年 5 月 20 日）、山口大学における動物使用に関する規則に則って行われている。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 温泉水の分析

#### 2.3.1.1. 成分分析

湯田温泉の成分分析の結果を表 II-1 に示す。表 II-1 より、陽イオンはナトリウムイオン、陰イオンは塩化物イオンが主成分であり、それらに加えて硫黄成分も比較的豊富に含まれていた。これら結果により、湯田温泉はアルカリ性単純温泉に分類された。

#### 2.3.1.2. pH, ORP の測定と平衡 ORP

測定 1 日目のフレッシュな状態の各検体の pH は、水道水:  $7.10 \pm 0.08$ 、温泉水:  $8.96 \pm 0.05$  (図 II-3A)であった。ORP 値は、水道水:  $397 \pm 52.4$  mV、温泉水:  $-295 \pm 9.69$  mV (図 II-3B) であった。これら測定値に基づいて計算された平衡 ORP を図 II-4 に示す。赤色の領域は、水が酸化状態にあることを示している。一方で青色の領域は、水が還元力のある状態にあることを意味している。この図から、湯田温泉水は水道水と比べて非常に還元性が高いことが明らかとなった。

### 2.3.1.3. 温泉水のエイジング

1日目のpHは、上記のとおり水道水:  $7.10 \pm 0.08$ 、温泉水:  $8.96 \pm 0.05$ であったが、3日目までには両検体共にpHは8周辺に収束した。その後は8日目まで両サンプルの測定値はほぼ一定に推移し、pH 8周辺を常時維持していた(図II-3A)。

ORP値は水道水では初日から高値を記録し、その後も1週間大きな変化は見られなかった(約+400mV)。一方、温泉水の1日目のORP値は顕著に低い値(-300 mV)を示した。その後、1週間かけて徐々にORP値は上昇したものの、最終日のORP値は依然として水道水よりも有意に低値であった(約+170mV)(図II-3B)。

## 2.3.2. 創傷治癒試験

### 2.3.2.1. 血液学的検査および血清生化学検査

血液学的検査および血清生化学検査の結果を表II-2示す。両群間の白血球数に有意差は見られなかった。赤血球系のパラメータ(RBC, Hgb, PCV, MCH, MCHC)は、温泉入浴群の方が水道水入浴群に比べて有意に高かった。一方で、血小板に関するパラメータ(PLTs, PCT)は、温泉入浴群より水道水群の方が高い結果となった。

血清生化学検査では、各項目で2つのグループ間に有意差はほとんど見られなかった。その中でグルコース(GLU)とクレアチニン(CRE)にのみ有意差が見られ、水道水入浴群のグルコースは温泉入浴群の測定値より低値であった。一方でクレアチニンに関しては、水道水入浴群の方が温泉入浴群のよりも有意に高値であった。

### 2.3.2.2. 血漿アミノ酸組成の分析

表Ⅱ-3に今回検査した41種類の血漿アミノ酸組成の比較を示す。両群間で12項目のアミノ酸に有意差が認められた。またその中で、11種類のアミノ酸（CIT, SER, HYP, GLY, THR, AABA, ORN, PRO, TPR, VAL, TYR）で温泉入浴群が水道水入浴群より有意に高いアミノ酸濃度を示していた。これらの各項目の結果が反映され、芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、総アミノ酸量にも両群間で有意差が見られた。

### 2.3.2.3. 創傷部位の肉眼所見と画像解析検査

創傷部位の肉眼的所見と創傷面積の推移を図Ⅱ-5に示す。試験1日目の創傷面積は両群ともおよそ同じ大きさであった（水道水:  $0.48 \pm 0.09 \text{ cm}^2$ 、温泉:  $0.48 \pm 0.04 \text{ cm}^2$ ）。試験2日目から4日目までの間は、2群間の創傷面積に有意差は認められなかったが、5日目以降、水道水入浴群と比較して温泉入浴群で有意に創傷面積が減少していた（5日目:  $p < 0.05$ 、6日目から8日目:  $p < 0.01$ ）。最終的な1週間の入浴を経た8日目の創傷面積は、水道水入浴群:  $0.059 \pm 0.023 \text{ cm}^2$ 、温泉入浴群:  $0.024 \pm 0.008 \text{ cm}^2$  という結果であり、温泉入浴群の方が有意に創傷治癒は促進されていた（図Ⅱ-5B）。

また肉眼所見では、3日目、4日目、および5日目には水道水入浴群の創傷部位が温泉入浴群よりも強い炎症反応を呈していた（図Ⅱ-5C）。

#### 2.3.2.4. 病理組織学的検査

創傷治癒試験の病理組織学的所見を以下に示す（図Ⅱ-6, 7, 8）。まず、水道水入浴群の皮膚の創傷部位は、温泉入浴群よりも十分な再上皮化が認められなかった（図Ⅱ-6）。真皮の弾性線維は、水道水入浴群では再生像が認められなかったが、温泉入浴群では弾性線維の再生が起こり、弾性線維が創傷部の真皮内各所に確認できた（図Ⅱ-7）。また、膠原線維の配列の所見は、2つのグループ間で顕著な違いを示した。水道水入浴群では膠原線維が不規則に乱れて配列している所見であったのに対し、温泉入浴群ではコラーゲン線維が表皮と平行に規則的に配列していた（図Ⅱ-8）。これらの病理組織学的所見は表Ⅱ-4に示すように評価された。皮膚組織以外に採取した検査材料(腎臓、副腎、肝臓および脾臓)については、2群間で病理組織学的所見に明らかな差異は認められなかった。

#### 2.3.3. 入浴後のサーモグラフィ試験

##### 2.3.3.1. サーモグラフィ検査

サーモグラフィ検査の結果を図Ⅱ-9に示す。サーモグラフィ検査では、温泉入浴と水道水入浴の間で体表面温度の変化に顕著な違いがあることを明らかにした。まず、同時間帯の2群間の皮膚表面温度を比較したところ、入浴前と入浴直後の体表面温度に有意差は見られなかった。しかし、10分後から30分後にかけては、温泉入浴群は水道水入浴群に比べて有意に高い温度を維持していた ( $p < 0.01$ )。

水道水入浴群の体表面温度は入浴直後には一時有意に上昇したが、入浴10分後には一転

して温度が低下し、入浴前の体表面温度よりも有意な温度低下が見られた ( $p < 0.01$ )。一方、温泉入浴群は入浴後 30 分間通して有意に高い体表面温度を維持しており、コントロールされた空調下では 30 分間温泉入浴前の温度に戻ることはなかった ( $p < 0.01$ )。上記のサーモグラフィ検査と併せて、血液学および生化学的検査も行われたが、両群ですべて正常範囲内であった。病理組織検査でも異常所見は認められなかった。

## 2.4. 考 察

湯田温泉の成分分析の結果、溶存物質の総量が 1000mg/kg 未満で、ナトリウムイオンや塩化物イオンが比較的豊富なアルカリ性単純温泉に分類された。この結果は 1 章で行った分析とほぼ同様の結果であり、やはり湯田温泉の pH は日本の温泉の平均 pH よりも高い傾向を示した [15]。一方で、ORP 値は他の温泉と比較して低いことも新たに明らかとなった [61, 64, 65]。平衡 ORP は水道水よりも新鮮な湯田温泉の方が明確に高い還元性を有している事が明らかとなった。還元性が高い温泉に入浴することで、皮膚の ORP 値が低下し、その結果、酸化や老化が抑えられ、肌の弾力性が向上した、という研究報告がされている [6, 66-69]。我々は 1 章にて湯田温泉に継続的に入浴すると、皮膚の水分量をはじめとしたいくつかの皮膚性状が改善されることを報告した [58]。今回の実験で明らかになった湯田温泉の還元力の高さは、肌への刺激が少ないというアルカリ性単純温泉の性質に加えて、美肌効果に関係していることを示唆した。

一般的に温泉は時間の経過と共に酸化され、泉質が劣化することで温泉の効果が失われ

ていく、と考えられているため、多くの人は新鮮な源泉かけ流し温泉を好む傾向にある。

この研究では、ORP 値の観点から温泉水の劣化、いわゆるエージングを検証した。水道水

の ORP 値は測定初日から高値を記録したが、これは塩素系消毒薬の影響が考えられた。

塩素系消毒薬は水を酸化させることが知られているため、これにより ORP 値の上昇が引

き起こされる [61]。一方、湯田温泉は水道水と比較して 1 週間後でも比較的低い ORP

値、すなわち高い還元性を維持していることが明らかとなった。

今回の一連の温泉と水道水の水質比較試験により、湯田温泉の源泉は肌に優しいアルカリ性の泉質に加え、高い還元力かつ劣化しにくい特性を有していることが判明した。これらの温泉の特性は、温泉入浴が創傷治癒に対しても効果的に機能する可能性があることを十分に示唆した。

創傷治癒試験の血液学的検査では、7 項目で両群間に有意差が認められた。水道水入浴群の赤血球数、ヘモグロビン量、およびヘマトクリット値は、過去の本モットの血液学的検査の正常範囲を調査した文献と比較してわずかに低かった [70, 71]。実験期間中の生活ルーティンの変化や皮膚生検などが原因として考えられたが、一方で温泉入浴群の血液学的検査の結果は正常値範囲内であった。ヒトを対象とした温泉入浴の研究では、温泉のストレス軽減効果や鎮痛効果が報告されており [12-14, 58, 72-74]、血液学的検査の結果はこれらの効果との関連性を示唆した。

生化学検査では、2 群間のグルコースとクレアチニン値に有意差が認められたが、過去の研究データ [70, 71]と比較検討したところ、いずれも正常値の範囲内であったことが明



らかとなり、血清生化学的な異状は両群では見られなかったと言える。

本研究では温泉入浴群と水道水入浴群の血漿中アミノ酸濃度の比較を試みた。我々の知る限り、本研究が温泉入浴による創傷治癒試験において血漿アミノ酸組成の変化を網羅的に調査した最初の研究である。血漿中のアミノ酸は体内の各組織にアミノ酸を供給し、それらが組織中のタンパク質の構成成分となるため、血漿アミノ酸濃度の増加は創傷治癒に有益であると一般的に考えられる。アミノ酸の供給が創傷治癒に対して有効的であること [75-78]、一方でアミノ酸欠乏は創傷治癒を遅らせる [79-81]ことは過去に報告されている。その他にも、アミノ酸の供給によって創傷治癒が促進され、血漿中のアミノ酸レベルが上昇することも知られている [82, 83]。このように、創傷治癒と血漿アミノ酸には密接な関連性があると言える。また、ヒトあるいは動物を対象としたいくつかの研究では、温泉入浴がホルモンやタンパク質などの生体物質の代謝を変化させる可能性も指摘されている [84-87]。この研究では、温泉入浴群の血漿アミノ酸組成は、11の項目（シトルリン、セリン、ヒドロキシプロリン、グリシン、スレオニン、 $\alpha$ -アミノ酪酸、オルニチン、プロリン、チオプロリン、バリン、チロシン）で有意に高い値を示した。以下、それらの項目に絞ったアミノ酸組成比較試験の考察を順に記す。

シトルリンは表皮の天然保湿因子 (NMF)を構成するアミノ酸の1種である。NMFは角質中に存在するアミノ酸やピロリドンカルボン酸、乳酸、尿素などの低分子を主成分とする水溶性の物質であり、肌の水分を保持する役割を持つ。NMFは皮膚の潤いを保ち、乾燥肌などの皮膚疾患を防ぎ、肌の恒常性を保つ重要な物質である。その為、NMFの成分

であるシトルリンの血漿濃度の上昇は、創傷治癒の促進に有益であると推測された。またシトルリンは、代謝される過程で一酸化窒素 (NO) を生成する。NO は血管を拡張して血液循環を促進する機能を持つ [88-90]。NO 産生による血流の改善は、体温上昇や保温効果にも寄与することから、サーモグラフ試験で温泉入浴群にのみ見られた保温効果は血漿アミノ酸濃度の変化と関連している可能性が示唆された。

セリンは NMF を構成するアミノ酸の中で最も多くの割合を占めるアミノ酸であり [91, 92]、皮膚の恒常性維持に大きく関与する。セリンは肌の保湿に対して有効なアミノ酸であることは知られている [93, 94]。我々はこれまでの研究で、温泉への継続的な入浴が皮膚の保湿に寄与することを示している [58]。温泉への入浴により血漿中のセリン濃度が上昇したことから、本研究では温泉の保湿効果にアミノ酸代謝が関連していることが示唆された。その他に、セリンは睡眠の質の改善にも関連しているという報告もされている [95]。温泉入浴が睡眠の質を高める研究報告もなされている事から[96]、温泉入浴と睡眠の質の改善の因果関係の要因の1つとしてセリンの血漿中濃度の変化が考えられた。

ヒドロキシプロリンはコラーゲン (膠原線維)の主成分の1つであり、プロリンと合わせるとコラーゲンを構成する全てのアミノ酸の約 20%を占める。コラーゲンは、真皮の大部分を構成する線維性タンパク質であり、コラーゲン生合成の活性化は創傷治癒過程において重要な要素である。コラーゲンの合成能は加齢と共に低下するが、それに伴ってヒドロキシプロリンの血中濃度も低下することが明らかとなっている[97, 98]。そのため、血中のヒドロキシプロリンの濃度がコラーゲンの合成能の指標となると推測される。それに加

えて、ヒドロキシプロリンの生体内への投与は創傷治癒を促進することから[99]、温泉入浴による有意なヒドロキシプロリンの血中濃度の上昇は、コラーゲンの合成を活性化させ、創傷治癒の促進に貢献したと思われた。

コラーゲタンパク質のペプチド鎖を構成するアミノ酸残基はグリシン残基が3残基ごとに繰り返す構造をなしているため、グリシンはコラーゲンを構成するアミノ酸配列の3分の1を占めるアミノ酸である[100]。そのうえ、グリシンはNMF中で2番目に多くの割合を占めるアミノ酸でもある[91]。これらから、温泉入浴による血漿グリシン濃度の有意な増加は、真皮層のコラーゲン線維の早期正常化や表皮角質層の保湿因子の早期再構築などに関連している可能性が考えられた。

スレオニンもNMFを構成するアミノ酸として、またコラーゲンやエラスチンなどの重要な皮膚タンパク質の材料として生体内で利用される。しかし、スレオニンは体内では十分量合成できない必須アミノ酸であるため、温泉入浴自体が本研究で見られた有意差には直接影響しないと推測された。必須アミノ酸は食物から摂取することにより補完できるため、温泉入浴群の摂食行動の増加などが原因として考えられたが、これを検証するには更なる研究が必要である。

$\alpha$ -アミノ酪酸は、アミノ酪酸の異性体の1つである。アミノ酪酸は、表皮のヒアルロン酸の産生を有意に促進することが報告されている[101]。ヒアルロン酸は肌の保湿力や弾力性の向上に大きく貢献していることから、温泉が皮膚の水分量や弾力性を高める要因の一つにアミノ酪酸が関係している可能性が考えられた。

温泉入浴群の血漿オルニチン濃度は有意に上昇していた。オルニチンの投与は創傷部位のコラーゲンの生成を増加させ、その結果創傷治癒を早めるという研究報告がある [102, 103]。また、オルニチンはアルギニンの代謝産物でもあり、アルギニン自体も創傷治癒に効果的に機能することが知られている [104]。これらは、オルニチンとアルギニンの両方が成長ホルモン分泌を刺激する効果があるためである。成長ホルモンは、タンパク質合成を促進し創傷治癒に効果的にはたらく [105]。その他にも、オルニチンはコラーゲン合成に必須のアミノ酸であるプロリンに変換され、創傷治癒に貢献することが報告されている [102]。したがって、循環血液を介しての創傷部へのオルニチン供給量の有意な増加は、温泉の創傷治癒促進効果に関与していることが考えられた。

プロリンはヒドロキシプロリンの前駆体であり、ヒドロキシプロリンとともに真皮のコラーゲンを構成する皮膚に関連の深いアミノ酸である [106]。プロリンの経口または腹腔内投与は創傷治癒を促進することがわかっており [75, 77]、温泉浴による血中プロリン濃度の上昇が局所プロリン生合成を促進し、創傷治癒を促進することが示唆された。また上でも述べたように、プロリンはオルニチンから生成されるアミノ酸である。今回の温泉入浴試験により引き起こされたこれらオルニチン、プロリン、ヒドロキシプロリンといった一連の皮膚の構成に深く関与しているアミノ酸の血漿濃度の上昇は、創傷治癒の促進に大いに貢献しているのではないかと推測される。

プロリンの誘導体であるチオプロリンも温泉入浴群において有意な血漿中濃度の上昇が見られたが、通常皮膚にはほとんど見られないアミノ酸である。チオプロリンと発がん抑

制効果についての研究報告は発見できたが [107, 108]、チオプロリンと創傷治癒の関係性について言及した報告は著者が調べた限りは見つからなかった。そのため、チオプロリンの血漿濃度の上昇が創傷治癒に与える影響については現在のところは不明である。

チロシンはドーパミンの前駆体であり、ストレスはドーパミンレベルを低下させ、無気力やうつ病を引き起こす。チロシンの生体内での増加はストレスを軽減する効果があることから [109-111]、温泉入浴による血漿中チロシン濃度の上昇は、心理的な改善効果があることが示唆された。温泉のストレス緩和効果については、過去にヒトでの報告がいくつか存在したが [12-14]、この研究は、血中アミノ酸濃度の変化という観点から、温泉のストレス緩和効果に対する新たな考察を提供した。

芳香族アミノ酸と分岐鎖アミノ酸の血漿濃度は2群間で有意に異なっていたが、フィッシャー比に有意差は見られなかった。フィッシャー比は芳香族アミノ酸と分岐鎖アミノ酸の比率により算出される数値であり、フィッシャー比の異常は肝臓でのアミノ酸代謝の異常の指標となることがわかっている [112, 113]。現在のところ、健常なモルモットのフィッシャー比に関するデータは我々の知る限り存在しないが、水道水入浴群と温泉入浴群のフィッシャー比に有意差は見られなかったことから、今回の温泉入浴試験で観察された血漿中アミノ酸濃度の変化は、正常範囲内のバランスのとれた変化であると言える。

創傷部位の肉眼所見は、画像解析の結果水道水入浴群に比べて温泉入浴群の方が8日目の創の大きさが有意に縮小しており、炎症に伴う紅斑の程度も軽度であることが明らかとなった。水道水入浴は、創傷部位を清潔に保てる点と温熱作用により血流促進に貢献でき

るといふ点で創傷部の環境改善に有益と一般的に考えることが出来る。これらの効果は、創傷治癒を遅らせるのではなく、むしろ早める方向にはたらくと考えるのが妥当である。

しかし、この研究では温泉入浴がそれよりもさらに高い創傷治癒効果を示したことは注目に値した。

病理組織学的検査では、表皮層と真皮層の両方で2群間に違いが見られた。表皮層の病理所見では、温泉入浴群の方が明らかに表皮の再上皮化が進んでいたのに対して、水道水入浴群では上皮の構造が十分に構築されておらず、再上皮化が不明瞭な像が目立っていた。真皮層では、弾性線維の再生とコラーゲン線維の規則的な配列が温泉入浴群でのみ観察され、総合的に判断して温泉入浴群の方が創傷治癒の段階が進行しているように見受けられた。これらの違いが生じた要因として以下の3点が可能性として考えられた。1つ目は、温泉入浴による創部の血行改善である。今回のサーモグラフィ試験やこれまでの研究で実証された温泉の保温効果は、創部の毛細血管を拡張させて血流改善に寄与している [58]。ラットでは温泉に入浴すると、単なる温水よりも創傷部位周辺の皮膚の温度が上昇することが確認されている [114]。創傷治癒を遅らせる要因の一つである血行不良に対して、温泉入浴がより効果的にはたらいたと考えられる。2つ目は、温泉の抗炎症作用と殺菌作用である。温泉の抗炎症効果や湯田温泉に含まれる硫黄の殺菌効果がヒトでは報告されている [7, 115-118]。これらの効果は、傷の炎症の抑制や清潔な環境の維持に寄与していた可能性がある。3つ目は、血漿アミノ酸濃度の変化である。前述のように、本研究では創傷治癒に関連するいくつかのアミノ酸の血漿中濃度が、温泉入浴群では有意に増加して

いた。これらのアミノ酸が創部に豊富に供給された結果、創傷治癒が早まったのではないかと推測された。これら3点をまとめると、温泉の創傷治癒効果は、炎症を抑え、患部の血流を改善し、循環血液から創傷治癒に補助的にはたらくアミノ酸が豊富に供給されることで得られるのではないかと考えられた。

皮膚組織以外に採材した諸臓器の病理組織については両群とも異常な所見は認められなかった。血液学的検査や血清生化学検査で大きな異常が見られなかった事と併せて考えると、今回の温泉入浴試験は被験動物に明確な有害作用や副作用を及ぼさなかった。

サーモグラフ試験では、入浴後の体表面温度の推移が2群間で明らかに異なっていた。第一章の温泉入浴試験は比較実験ではなく、温泉の保温効果のみを実証を行ったが [58]、今回の研究ではコントロールされた同一の空調条件下で、温泉は水道水と比較して優れた保温効果を持つことが明らかとなった。これは第一章での考察と同様に、湯田温泉に豊富に含まれるナトリウムイオンや塩化物イオンが保温効果に有効に働いたと推察されるが、やはりこの仮説を裏付けるにはより詳細な試験が必要である。

本研究の結論として、温泉は水道水と比較して創傷治癒を有意に促進し、更に保温効果も高めていることが本実験を通して実証された。また、温泉入浴群では、創傷治癒に関連するいくつかのアミノ酸の血漿濃度が有意に高いことも本研究で新たに判明し、還元性温泉の入浴による保温効果と血漿中アミノ酸濃度の変化が、温泉の創傷治癒促進効果に寄与している可能性を示唆した。

## 小 括

第二章の研究は、同一条件下で水道水と温泉の比較対照実験を行うことで、温泉入浴の効果を更に詳細に実証検討することを目的とした。その結果、モルモットの腹部に作製した創傷は、水道水入浴群よりも温泉入浴群の方が有意に収縮しており、病理組織学的な所見からも創傷治癒が促進されることが確認された。また、創傷治癒に深く関わりを持つ主要なアミノ酸の濃度に2群間で有意な違いがあることが明らかとなり、その多くで温泉入浴群の方が高値であった。サーモグラフィ試験では、温泉入浴群にのみ入浴30分後まで保温効果が見られた。結論として本研究は、温泉入浴は水道水入浴よりも創傷治癒を促進し保温効果も高めることを比較対照実験により実証した。



## 総合考察

温泉は、古くから娯楽や湯治を目的として特に日本に強く根付いた文化であり、入浴によって得られる肉体及び精神的な改善効果を温泉療法として主に扱ってきた。しかし、温泉医学ではこれらの温泉入浴作用を主に経験則からの知見および現象面に基づく効果として扱ってきており、それら効能を科学的に裏付けるデータが十分ではないのが現状である。その理由の一つとして、実験動物を用いた温泉入浴試験は適切な実験系が確立されていない点が挙げられる。我々が研究に用いている湯田温泉も、「白狐が見つけた美肌の湯」として古くから皮膚への効能が謳われ、美肌効果や創傷治癒効果があるとされているが、科学的な検証が行われていない現状があった。そこで本研究では動物を用いた温泉入浴試験を通じて温泉の効能の科学的な検証を試みた。

第一章では、冬季の寒冷な環境下では肌荒れを引き起こすカピバラという動物を用いて、中長期的な温泉入浴が及ぼす効能について皮膚科学的観点を中心として検討を行った。その結果、温泉入浴はカピバラの皮膚の水分量や上昇などといった皮膚性状の改善をもたらし、肉眼的にも科学的にも荒れ肌の改善に貢献しうる事を明らかにした。加えて、温泉入浴中は動物にも快適な状態をもたらし、精神的な面での有効性も明らかとした。

第二章では実験室レベルでモルモットを用いて、同一の条件下で水道水と温泉の比較対照試験を行うことで、カピバラの入浴試験では実証することは出来なかった温泉そのものが水道水と比べて特異的に有効性を発揮するのかどうかの検証を行った。その結果、水道水入浴群と比較して温泉入浴群の方が創傷の治癒が促進していたことが明らかとなった。

また、血漿中のアミノ酸濃度がいくつかの皮膚に関連する項目で温泉入浴群のほうが高値を示していたことや、温泉入浴群にのみ保温効果が確認されたことも明らかとなり、本研究により第一章で示唆された温泉の有効性を更に補強、実証することを達成した。

本研究を通して、まず筆者らは新たに動物を用いた温泉入浴試験の試験系を確立することが出来た。これにより今後、ヒトを対象とした試験では困難である厳密な試験条件下において、温泉の更に詳細な効能やメカニズムの解明を動物で行う事が可能となり、温泉療法に関する研究の多様化、研究データのエビデンスの質の向上に繋がる事が期待できる。

また、温泉の皮膚への作用をはじめとした有効性も実証する事も出来た。我々は今回、地元湯田温泉を研究対象として取り上げ、古来より人々により言い伝えられてきた美肌効果や創傷治癒効果、そして保温効果を科学的データに基づいて示すことが出来た。

しかし一方で、各動物に対して最も適切な入浴温度、入浴時間、どれほどの期間試験を行うのが妥当であるのか、などといった細かい部分の動物実験系を構築していく事は、動物福祉や科学的根拠を高めるうえでも今後の課題であり、実験動物からの外挿を正しく実施し、ヒトの場合での効能を推定する手がかりとしていくためにも重要である。併せて、湯田温泉とは異なる泉質を持ったその他の温泉に対して、各温泉、各泉質それぞれに対して科学的検証を試みエビデンスの収集に努める事が今後の研究を発展させていくためには必要であると言える。

## 総 括

温泉は近代医学が発展した 19 世紀よりも遥かに以前から人々により心身の健康を整える為に利用されてきた歴史がある。しかし、我々の経験に則って言い伝えられてきた効果・効能に対し、科学的な解明が十分ではないのが温泉療法の現状である。本研究は、「白狐が見つけた美肌の湯」として肌への効果が長年謳われている山口県の湯田温泉を研究対象の一例として取り上げ、温泉の主に皮膚に対する効能を動物園動物カピバラや実験動物モルモットなどの動物を用いて実証する事を目的とした研究である。

カピバラは高温多湿なアマゾンに生息する世界最大のげっ歯類である。その為、低温低湿な日本の冬では、皮膚が乾燥し肌荒れを起こす現象が認められる。そこで我々は「美肌の湯」と古くから謳われる湯田温泉に入浴することで肌荒れが改善するのか、という点に着目し多角的な検証を第一章では試みた。

第一章は、はじめに温泉水の分析から行った。その結果、湯田温泉は非火山性温泉であり、ナトリウムイオンと塩化物イオンを豊富に含むアルカリ性 (pH 9.3) の水質を示した。次に、夏季の良好な状態と冬季の肌荒れ状態のカピバラの皮膚性状を比較したところ、冬季の皮膚は夏季より水分量、皮膚 pH が有意に低下しており、肉眼的にも明らかな肌荒れ状態が確認できた。また、カピバラの皮膚は本来弱アルカリ性であること、表皮層が厚く背側皮膚にのみメラニン顆粒が見られる事が特徴として挙げられた。最後に、冬季の荒れ肌状態のカピバラに 21 日間温泉入浴してもらい、皮膚性状の変化、リラクゼーション効果及び保温効果を検証した。その結果、肉眼的に荒れ肌の改善が見られ、皮膚性状検査で

は皮膚水分量の増加や、メラニン色素の濃さを表すメラニン値の低下、皮膚の血行状態を示す紅斑値の増加がそれぞれ有意に見られた。リラクゼーション効果は、入浴時の表情・行動に点数（スコア）を付け数値化することで評価した。カピバラの目と耳の状態に着目し統計学的に解析したところ、温泉入浴中の目のスコアは有意に上昇しており、耳のスコアも上昇傾向と判明し、心地よく寛いだ状態であった。保温効果は、入浴後 30 分間の皮膚表面温度の変化をサーモグラフで計測し評価した。入浴直後は体幹部と四肢末端部で有意な温度上昇が見られた。その後も体温の低下は抑えられ、30 分間入浴前より有意に高い温度を維持し続け、保温効果が見られた。

これらから、温泉入浴によりカピバラの肌荒れは改善し美肌効果を数値から捉え証明することができた。また、入浴中の表情を数値化した快適度も有意に上昇し心理的な改善も見られた。入浴 30 分後まで保温効果も本研究にて確認され、第一章の研究結果は、カピバラの冬季の肌荒れに対して温泉が科学的に改善効果をもたらしたことを示した。

第二章の研究は、同一条件下で水道水と温泉の比較実験を行うことで、創傷治癒効果をはじめとする温泉の皮膚に対する効果を更に詳細に実証検討することを目的とした。

まず、湯田温泉は第一章で示した泉質に加えて、高い還元性を有する温泉である事を酸化還元電位および平衡 ORP の観点から新たに明らかとした。創傷治癒試験では、モルモットを温泉入浴群と水道水入浴群に分け、腹部に創傷を作製し、1 日 15 分、8 日間の入浴試験をそれぞれ行った。その結果、画像解析によりモルモットの腹部創傷の面積は、水道水入浴群よりも温泉入浴群の方が有意に収縮しており、病理組織学的な所見からも創傷治

癒が促進されていたことが認められた。また、入浴試験後の2群間の血漿アミノ酸組成を比較したところ、創傷治癒に関連するいくつかのアミノ酸の濃度に有意な違いがあることが明らかとなり、そのほとんどで温泉入浴群の方が高値であった。サーモグラフィ試験では、入浴後の体表面温度の変化を両群で比較した。入浴後、水道水入浴群では保温効果が見られなかったのに対し、温泉入浴群では入浴後30分まで保温効果が高かった。結論として第二章の研究では、水道水入浴と比較して、温泉入浴は有意に創傷治癒を促進し、高い保温効果を有することが示された。

一連の本研究により、温泉入浴が皮膚の美肌効果や創傷治癒効果、加えて保温効果にも貢献していることが新たに確立された温泉入浴の動物実験系を通じて科学的に実証することができた。全国各地のそれぞれの温泉・泉質に対して個々に検証を試み知見を深め、科学的根拠を蓄積していく事が我々の研究を含め当該分野を発展させていくためには今後重要であると考えられ、我々の研究がそういった発展の一助となる事と思われる。

## 謝 辞

本論文作成にあたり、ご指導賜りました山口大学共同獣医学研究科の木村透教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたって、多大なご協力、助言を賜りました山口大学共同獣医学研究科の森本将弘教授に心より感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたって、多大なるご協力を賜りました山口市（ふるさと創生部）様、秋吉台自然動物公園サファリランド様、湯田温泉旅館協同組合・配給組合様ならびに名勝山水園様に心より感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Hishikawa, A. A hot spring discovery legend : The case of Hirayu hot spring, Gifu Prefecture and a monkey. *Memoirs of the Community Research Institute of Aichi University*. **63**, 23-40 (2018).
2. Hishikawa, A. Hot spring discovery legend and animals: Case of Kakeyu hot spring, Ueda city, Nagano prefecture. *Memoirs of the Community Research Institute of Aichi University*. **60**, 71-84 (2015).
3. Sekido, A. Legends about the origin of Kusatsu Spa and the formation of historical consciousness. *Annual reports of the Faculty of Education, Gunma University*. **66**, 65-78 (2017).
4. Tarui, Y. The possibility of hot spring folklore: focusing on customs and traditions of bathing. *Journal of the School of History*. **10**, 43-50 (2020).
5. Kagamimori, S. Health Effects of Spa with Special Reference to It's Chemical Content. *J. J. A. Phys. M. Baln. Clim.* **69**, 223-233 (2006).
6. Ohnami, H., *et al.* Effects of Bathing in the Hot Spring Waters with Reductive Characteristic on the Elasticity of the Skins: Nozawa Spa of Nagano Prefecture. *J. Hot Spring Sci.* **57**, 215-225 (2008).
7. Matz, H., Orion, E., & Wolf, R. Balneotherapy in dermatology. *Dermatol Ther.* **16**, 132-140 (2003).

8. Lee, Y. B. *et al.* m effects of balneotherapy with hae-un-dae thermal water on imiquimod-induced psoriasis-like murine model. *Ann Dermatol.* **26**, 221-230 (2014).
9. Lee, Y. B. *et al.* Immunomodulatory Effects of Deokgu Thermomineral Water Balneotherapy on Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis Murine Model. *Ann Dermatol* **28**, 192-198 (2016).
10. Kubota, K. *et al.* Effects of Balneotherapy on Atopic Dermatitis at Kusatsu. *Jpn. J. Rehabil. Med.* **34**, 40-45 (1997).
11. Kubota, K., Kurabayashi, H., Tamura, K. & Tamura, J. Treatment of 100 Cases of Adult-type Atopic Dermatitis with Kusatsu Balneotherapy. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **62**, 71-79 (1999).
12. Ohtsuka, Y., Nakaya, J. & Oikawa, T. Stress Relieving Effect and Immunological Changes by Balneotherapy with a Simple Thermals. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **65**, 121-127 (2002).
13. Yanaga, K., *et al.* The Study of Stress Relieving Action of Artificial Hot Spring Using Psychologic Sweating Measurement. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **61**, 202-207 (1998).
14. Yokota, S., *et al.* Psychological investigation on spa therapy in patients with bronchial asthma]. *Arerugi.* **46**, 511-519 (1997).



15. Muramatsu, Y. Characteristics and origin of Japanese hot spring components.  
*Chem. Educ.* **59**, 398–401 (2011).
16. Lee, K. Y. & Shimagami K. baA STUDY ON SEASONAL VARIATION OF SKIN  
HYDRATION IN JAPANESE AND KOREAN WOMEN IN THEIR 20'S. *Jpn J  
Physiol Anthropol.* **11**, 87-91 (2006).
17. Matsumoto, M., *et al.* Evaluation of the Stratum Corneum Exfoliated by Tape  
Stripping Method (Part 2) -Seasonal and age related difference of exfoliated  
pattern-. *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.* **24**, 1-6 (2000).
18. Wilson, D., Berardesca, E. & Maibach, H. I. In vitro transepidermal water loss:  
differences between black and white human skin. *Br J Dermatol.* **119**, 647-652  
(1988).
19. Mayer, W. Comparison of skin pH in domesticated and laboratory mammals. *Arch.  
Dermatol. Res.* **283**, 16-18 (1991).
20. Draize, J. H. The determination of the pH of the skin of man and common  
laboratory animals. *J. Invest. Dermatol.* **5**, 77-85 (1942).
21. Ajito, T., Suzuki, K., Okumura, J. & Hatano, N. Skin pH of Domestic  
Animals. *Japanese Journal of Veterinary Clinics.* **24**, 9-12 (2001).
22. Abe, T., Mayuzumi, J., Kikuchi, N. & Arai, S. Seasonal Variations in Skin  
Temperature, Skin pH, Evaporative Water Loss and Skin Surface Lipid Values on

- Human Skin. *Chem. pharm. bull.* **28**, 387-392 (1980).
23. Murakami, Y. *et al.* Decreased Level of Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> Exchanger 1 (NHE1) Affects Skin Moisturizing and Barrier Function. *Fragrance journal.* **42**, 79-84 (2018).
24. Thune, P., Nilsen, T., Hanstad, I. K., Gustavsen, T. & Lövig Dahl, H. The water barrier function of the skin in relation to the water content of stratum corneum, pH and skin lipids. The effect of alkaline soap and syndet on dry skin in elderly, non-atopic patients. *Acta Derm Venereol.* **68**, 277-283 (1988).
25. Hölzle, E. & Hönigsmann, H. UV-radiation--sources, wavelength, environment. *J Dtsch Dermatol Ges.* **3**, 3-10 (2005).
26. Brenner, M. & Hearing, V. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. *Photochemistry and photobiology.* **84**, 539-549 (2008).
27. Pereira, J.N., Jenkinson, D.M. & Finley, E. The structure of the skin of the capybara. *Acta Cient Venez.* **31**, 361-364 (1980).
28. William, H. M., Craig, E. G & Karen, L. C. Small Animal Dermatology 7th edition. *ELSEVIER.* 8-12 (2012).
29. Hans, J. H. The Laboratory Mouse second edition. *ELSEVIER.* 201-203 (2012).
30. Slominski, A., Tobin, D.J., Shibahara, S. Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* **84**, 1155-1228 (2004).
31. Uchino, E., *et al.* Health Promotion Using Hot Springs. *J. Hot Spring Sci.* **62**, 66-84

(2012).

32. Rahman, N., *et al.* Clay Nanotube Immobilization on Animal Hair for Sustained Anti-Lice Protection. *Pharmaceutics*. **13**, 1477 (2021).
33. Watanabe, S. *et al.* Studies on Skin Elasticity, Viscoelasticity and Hydration State of Stratum Corneum after Water Immersion with Alkaline Salts. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med*. **57**, 272-277 (1994).
34. Najeeba, R. & Faiz, R. A. Spa therapy in dermatology, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol*. **77**, 128-134 (2011).
35. Czarnowicki, T., *et al.* Dead Sea climatotherapy for vitiligo: a retrospective study of 436 patients, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. **25**, 959-963 (2011).
36. Okouchi, S., *et al.* Effect of suppress melanin formation by reductive hot spring water system (sulfur hot springs). *J. hot spring Sci*. **59**, 2-10 (2009).
37. Okouchi, S., *et al.* Influence of aging of hot spring waters on the melanin formation suppressing effect. *J. hot spring Sci*. **59**, 273-281 (2010).
38. Okada, R., *et al.* Effect of body-warming on epidermal physiological function: from the viewpoint of stratum Corneum water-holding capacity and transepidermal water loss. *Bulletin Ehime Prefectural University of Health Sciences*. **3**, 45-49 (2006).
39. Shirakura, T., *et al.* Effect of Sodium Sulfate • Sodim Bicarbonate Bathing on

- Body Surface Temperature, Cutaneous Blood Flow and Circadian Variation in Blood Pressure. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **59**, 230-235 (1996).
40. Boissy, A. et al. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. *Physiology & Behavior.* **92**, 375-397 (2007).
41. Reefmann, N., Bütikofer Kaszàs, F., Wechsler, B. & Gygax, L. Ear and tail postures as indicators of emotional valence in sheep. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **118**, 199-207 (2009).
42. Lambert, H. & Carder, G. Can ear postures reliably measure the positive emotional state of cows? *Appl. Anim. Behav. Sci.* **161**, 1 (2014).
43. Lambert, H. & Carder, G. Positive and negative emotions in dairy cows: Can ear postures be used as a measure? *Behavioural processes.* **158**, 172-180 (2019).
44. Bremhorst, A., Sutter, N. A., Würbel, H., Mills, D. S. & Riemer, S. Differences in facial expressions during positive anticipation and frustration in dogs awaiting a reward. *Sci. Rep.* **9**, 19312 (2019).
45. Finlayson, K., Lampe, J. F., Hintze, S., Würbel, H. & Melotti, L. Facial Indicators of Positive Emotions in Rats. *PLoS One.* **11**, e0166446 (2016).
46. Shimizu, T., et al. Changes of Body Temperatures and Heart Rate while Bathing in Sea Water. *J Health Sci.* **17**, 103-108 (1995).
47. Shimizu, T., Fujishima, K., Ueda, T., & Agishi, Y., Effects of Concentration of Sea

- Water Components on Body Temperature by Bathing. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **61**, 195-201 (1998).
48. Kagamimori, S., *et al.* Psycho-physiologic Effects of Deep Sea Water Bathing. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **65**, 73-82 (2002).
49. Horikiri, Y., *et al.* Effects of High Concentration Mineral Water Bathing on Deep Body Temperature and Circulatory Function. *J Jpn Soc Balneol Climatol. Phys Med.* **63**, 181-186 (2000).
50. Tanaka, N., *et al.* Effects of Artificial Mineral Spring (Basukurin) on Hemodynamic Functions, Deep Body Temperature, Autonomic Nervous Functions and Blood Gas Concentration, *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **50**, 187-196 (1987).
51. Inoue, T., Inoue, S. & Kubota, K. Bactericidal activity of manganese and iodide ions against *Staphylococcus aureus*: a possible treatment for acute atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* **79**, 360-362 (1999).
52. Yamamura, J. Present significance of health spas and its problems in Japan. *Japanese journal of tourism studies.* **1**, 21-31 (2002).
53. Kubota, K., Machida, I., Tamura, K., Take, H., Kurabayashi, H., Akiba, T. & Tamura, J. Treatment of refractory cases of atopic dermatitis with acidic hot-spring bathing. *Acta Derm Venereol.* **77**, 452-454 (1997).
54. Tamura, K. & Kubota, K. Effect of the Kusatsu balneotherapy on pruritus of atopic

- dermatitis. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **65**, 19 (2001).
55. Elkayam, O., Ophir, J., Brener, S., Paran, D., Wigler, I., Efron, D., Even-Paz, Z., Politi, Y. & Yaron, M. Immediate and delayed effects of treatment at the Dead Sea in patients with psoriatic arthritis. *Rheumatol Int.* **19**, 77-82 (2000).
56. Huang, A., Seité, S. & Adar, T. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol.* **36**, 363-368 (2018).
57. Kubota, K., Tamura, K. & Kurabayashi, H. Balneotherapy for psoriasis at Kusatsu -Value of balneotherapy as alternative and complementary medicine. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **65**, 89-92 (2002).
58. Inaka, K. & Kimura, T. Comfortable and dermatological effects of hot spring bathing provide demonstrative insight into improvement in the rough skin of Capybaras. *Sci Rep.* **11**, 23675 (2021).
59. Okouchi, S. Aratana mizu no hyoukahou (A new way to assess water quality). *J. Soc. Inorg. Mater. Jpn* **12**: 416-422 (2005).
60. Okouchi, S., Mizuno, H., Kusabuka, K., Ishihara, Y. & Kanroji, Y. Changing of redox potentials with aging of hot spring waters. *J. Hot Spring Sci.* **48**, 29-35 (1998).
61. Okouchi, S., Onami, H., Kohmura, K., Morimoto, T. & Ikeda, S. ORP evaluation of the qualities of chlorinated hot spring waters. *J. Hot Spring Sci.* **54**, 155-162 (2005).
62. Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland,

USA. <http://imagej.nih.gov/ij/> (1997-2012).

63. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. **9**, 671-675 (2012).
64. Amita, K., Nagakubo, K., Osawa, S. & Mishima, T. Survey on the current state of artesian spring in Beppu City.  
<https://www.pref.oita.jp/uploaded/attachment/2059722.pdf> (2019).
65. Tei, S. A study on the relationship between the physical and chemical properties of thermal waters and their medical effects. *The Shinshu Medical Journal*. **5**, 92-100 (1956).
66. Okouchi, S. Effects of Nozawa spa (sulfur hot spring water) with reductive characteristic on the skin. *J. Hot Spring Sci.* **60**, 65-77 (2010).
67. Okochi, S., Kanno, K., Katsumoto, M., Suzuki, M., Kanroji, Y. & Urushihata, O. Relationships between ORP (Redox Potentials) and pH in hot and cold spring waters and in human skins. *J. Hot Spring Sci.* **49**, 59-64 (1999).
68. Okochi, S., Ohnami, H., Shoji, M., Ohno, Y., Ikeda S, Agishi Y, Hagiwara T, Suzuki T. 2005. Effects of electrolyzed-reduced water as artificial hot spring water on human skin and hair. *J. Hot Spring Sci.* **55**, 55-63.
69. Onami, H. Effects of bathing in reductive hot spring waters on human skin. *J. Hot Spring Sci.* **61**, 139-143 (2011).

70. Charles River Laboratories International, Inc. Hartley guinea pig hematology and biochemistry.
- <https://www.criver.com/sites/default/files/Technical%20Resources/Biochemistry%20and%20Hematology%20Hartley%20Guinea%20Pig%20Colonies%20in%20North%200American%20for%20January%202008%20%E2%80%93%20December%202008.pdf> (2012).
71. Spittler, A.P., Afzali, M.F., Bork, S.B., Burton, L.H., Radakovich, L.B., Seebart, C.A., Moore, A.R. & Santangelo, K.S. Age- and sex-associated differences in hematology and biochemistry parameters of Dunkin Hartley guinea pigs (*Cavia porcellus*). *PloS one* **16**, e0253794 (2021).
72. Antonelli, M. & Donelli, D. Effects of balneotherapy and spa therapy on levels of cortisol as a stress biomarker: a systematic review. *Int J Biometeorol.* **62**, 913-924 (2018).
73. Buskila, D., Abu-Shakra, M., Neumann, L., Odes, L., Shneider, E., Flusser, D. & Sukenik, S. Balneotherapy for fibromyalgia at the Dead Sea. *Rheumatol Int.* **20**: 105-108 (2001).
74. Nguyen, M., Revel, M. & Dougados, M. Prolonged effects of 3 week therapy in a spa resort on lumbar spine, knee and hip osteoarthritis: follow-up after 6 months. A randomized controlled trial. *Br J Rheumatol.* **36**, 77-81 (1997).



75. Aydin, H., Tatar, C., Savas, O.A., Karsidag, T., Ozer, B., Dursun, N., Bekem, A., Unal, A. & Tuzun, I.S. The effects of local and systemic administration of proline on wound healing in rats. *J Invest Surg.* **32**, 523-529 (2019).
76. Ota, Y., Noguchi, T. & Matsubara, Y. Experience with the use of arginine-added concentrated liquid nutrient food in a patient with intractable decubitus. *J. Jpn Dietetic Association.* **51**, 436-442 (2008).
77. Ponrasu, T., Jamuna, S., Mathew, A., Madhukumar, K.N., Ganeshkumar, M., Iyappan, K. & Suguna, L. Efficacy of L-proline administration on the early responses during cutaneous wound healing in rats. *Amino acids.* **45**, 179-189 (2013).
78. Song, H., Zhang, S., Zhang, L. & Li, B. Effect of orally administered collagen peptides from bovine bone on skin aging in chronologically aged mice. *Nutrients.* **9**, 1209 (2017).
79. Baker, D.H. Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino acids.* **37**, 29-41 (2009).
80. Barbul, A. Proline precursors to sustain Mammalian collagen synthesis. *J Nutr.* **138**, 2021S-2024S (2008).
81. Williams, J.Z. & Barbul, A. Nutrition and wound healing. *Surg Clin North Am.* **83**, 571-596 (2003).

82. Nakao, M., Kusahata, M., Hara, K., Igarashi, M., Yamazaki, N. & Koyama, Y.  
Effects of collagen peptide ingestion on healing of skin wound in a rat model of  
pressure ulcer. *Jpn Pharmacol Ther.* **41**, 587-596 (2013).
83. Wada, A., Sonoda, C., Makino, Y., Hama, Y., Nagahama, A. & Harada, D. Effects of  
parenteral amino acid administration on the postoperative nutritional status and  
wound healing of protein-malnourished rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* **64**, 34-40  
(2018).
84. Arichi, S. Effect of thermal bath (Shirahama) on lipid metabolism. *J Jpn Soc  
Balneol Climatol Phys Med.* **35**, 30 (1971).
85. Haga, M. Experimental and clinical studies on the effect of hot-spring bathing on  
the metabolism of vitamin B1 in rheumatoid arthritis patients. *J Jpn Soc Balneol  
Climatol Phys Med.* **26**, 149-170 (1962).
86. Imo, T. Effect of hot spring serial bathing on plasma metabolites. *Institute for  
Thermal Spring Res, Okayama Univ.* **51**, 49-52 (1981).
87. Wang, H. & Kagamimori, S. Review on Japanese articles of spa's health promotion  
effects in past 20 years. *J Jpn Soc Balneol Climatol Phys Med.* **69**, 81-102 (2006).
88. Kobayashi, Y., Narita, K., Chiba, K., Takemoto, H., Morita, M. & Morishita, K.  
Effects of L-citrulline diet on stress-induced cold hypersensitivity in mice.  
*Pharmacognosy Res.* **6**, 297-302 (2014).

89. Shatanawi, A., Momani, M.S., Al-Aqtash, R., Hamdan, M.H. & Gharaibeh, M.N. L-citrulline supplementation increases plasma nitric oxide levels and reduces arginase activity in patients with type 2 diabetes. *Front Pharmacol.* **11**, 584669 (2020).
90. Uyanga, V.A., Wang, M., Tong, T., Zhao, J., Wang, X., Jiao, H., Onagbesan, O.M. & Lin, H. L-Citrulline influences the body temperature, heat shock response and nitric oxide regeneration of broilers under thermoneutral and heat stress condition. *Front. Physiol.* **12**, 671691 (2021).
91. Horii, I., Kawasaki, K., Koyama, J., Nakayama, Y., Nakajima, K., Okazaki, K. & Seiji, M. Histidine-rich protein as a possible origin of free amino acids of stratum corneum. *Curr Probl Dermatol.* **11**, 301-315 (1983).
92. Maeno, K. Direct quantification of natural moisturizing factors in stratum corneum using direct analysis in real time mass spectrometry with inkjet-printing technique. *Sci Rep.* **9**, 17789 (2019).
93. Kim, H., Ro, J., Barua, S., Hwang, D.S., Na, S.J., Lee, H.S., Jeong, J.H., Woo, S., Kim, H., Hong, B., Yun, G., Kim, J.H., Yoon, Y.H., Park, M.G., Kim, J., Sohn, U.D. & Lee, J. Combined skin moisturization of liposomal serine incorporated in hydrogels prepared with carbopol ETD 2020, rhesperse RM 100 and hyaluronic acid. *Korean J Physiol Pharmacol.* **19**, 543-547 (2015).

94. Nakagawa, N., Naito, S., Yakumar, M. & Sakai, S. Hydrating effect of potassium lactate is caused by increasing the interaction between water molecules and the serine residue of the stratum corneum protein. *Exp Dermatol.* **20**, 826-831 (2011).
95. Ito, Y., Takahashi, S., Shen, M., Yamaguchi, K. & Satoh, M. Effects of L-serine ingestion on human sleep. *SpringerPlus.* **3**, 456 (2014).
96. Latorre-Roman, P.A., Rentero-Blanco, M., Laredo-Aguilera, J.A. & Garcia-Pinillos, F. Effect of a 12-day balneotherapy programme on pain, mood, sleep, and depression in healthy elderly people. *Psychogeriatrics.* **15**, 14-19 (2015).
97. Mays, P.K., McAnulty, R.J., Campa, J.S. & Laurent, G.J. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* **276**, 307-313 (1991).
98. Murakami, T., Yamane, H., Kurauchi, I., Kusaba, I. & Furuse, M. Plasma amino acid concentrations in randomized select dogs. *J. Pet Anim. Nutr.* **12**, 15-16 (2009).
99. de Aquino, P., de Souza, T., Santos, F.A., Viana, A., Louchard, B.O., Leal, L., Rocha, T.M., Evangelista, J., de Aquino, N.C., de Alencar, N., Silveira, E. & Viana, G. The wound healing property of *N*-Methyl-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-Hydroxy-L-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is related to its anti-inflammatory and antioxidant actions. *J Evid Based Integr*

- Med.* **24**, doi:10.1177/2515690X19865166 (2019).
100. Okuyama, K. & Kawaguchi, T. Molecular and fibrillar structure of collagen. *Japanese Journal of Polymer Science and Technology*. **67**, 229-247 (2010).
101. Kracie. Confirmed the effect of GABA on the epidermis. [https://www.kracie.co.jp/release/pdf/071029\\_gaba1.pdf](https://www.kracie.co.jp/release/pdf/071029_gaba1.pdf) (2007).
102. Barbul, A., Rettura, G., Levenson, S.M. & Seifter, E. Wound healing and thymotropic effects of arginine: a pituitary mechanism of action. *Am J Clin Nutr*. **37**, 786-794 (1983).
103. Shi, H.P., Fishel, R.S., Efron, D.T., Williams, J.Z., Fishel, M.H. & Barbul, A. Effect of supplemental ornithine on wound healing. *J Surg Res*. **106**, 299-302 (2002).
104. Debats, I.B., Wolfs, T.G., Gotoh, T., Cleutjens, J.P., Peutz-Kootstra, C.J. & van der Hulst, R.R. Role of arginine in superficial wound healing in man. *Nitric Oxide*. **21**, 175-183 (2009).
105. Kim, S.H., Heo, E.J. & Lee, S.W. The effect of topically applied recombinant human growth hormone on wound healing in pigs. *Wounds*. **21**, 158-163 (2009).
106. Karna, E., Szoka, L., Huynh, T. & Palka, J.A. Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cell Mol Life Sci*. **77**, 1911-1918 (2020).
107. Kumagai, H., Mukaisho, K., Sugihara, H., Miwa, K., Yamamoto, G. & Hattori,

- T. Thioproline inhibits development of esophageal adenocarcinoma induced by gastroduodenal reflux in rats. *Carcinogenesis*. **25**, 723-727 (2004).
108. Tahira, T., Ohgaki, H., Wakabayashi, K., Nagao, M. & Sugimura, T. The inhibitory effect of thioproline on carcinogenesis induced by N-benzylmethylamine and nitrite. *Food Chem. Toxicol.* **26**, 511-516 (1998).
109. Avraham, Y., Bonne, O. & Berry, E.M. Behavioral and neurochemical alterations caused by diet restriction—the effect of tyrosine administration in mice. *Brain Res.* **732**, 133-144 (1996).
110. Banderet, L.E. & Lieberman, H.R. Treatment with tyrosine, a neurotransmitter precursor, reduces environmental stress in humans. *Brain Res Bull.* **22**, 759-762 (1989).
111. Hao, S., Avraham, Y., Bonne, O. & Berry E.M. Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. *Pharmacol Biochem Behav.* **68**, 273-281 (2001).
112. Fischer, J.E., Yoshimura, N., Aguirre, A., James, J.H., Cummings, M.G., Abel, R.M. & Deindoerfer, F. Plasma amino acids in patients with hepatic encephalopathy. Effects of amino acid infusions. *Am J Surg.* **127**, 40-47 (1974).
113. Soeters, P.B., Fischer, J.E. Insulin, glucagon, aminoacid imbalance, and hepatic encephalopathy. *Lancet.* **2**, 880-882 (1976).

114. Liang, J., Kang, D., Wang, Y., Yu, Y., Fan, J. & Takashi, E. Carbonate ion-enriched hot spring water promotes skin wound healing in nude rats. *PloS one*. **10**, e0117106. (2015).
115. Carbajo, J.M. & Maraver, F. Sulphurous mineral waters: new applications for health. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2017**, 8034084 (2017).
116. McMurtry, C.W. Dermatologic therapeutics: sulfur. *J Cutan Dis*. **322**, 399-408 (1913).
117. Nasermoaddeli, A. & Kagamimori, S. Balneotherapy in medicine: A review. *Environ Health Prev Med*. **10**, 171-179 (2005).
118. Rodrigues, L., Ekundi-Valentim, E., Florenzano, J., Cerqueira, A.R., Soares, A.G., Schmidt, T.P., Santos, K.T., Teixeira, S.A., Ribela, M.T., Rodrigues, S.F., De Carvalho, M.H., De Nucci, G., Wood, M., Whiteman, M., Muscará, M.N. & Costa, S.K. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. *Pharmacol Res*. **115**, 255-266 (2017).

## 付図・付表





図 I-1 カピバラの温泉入浴試験のスケジュール

カピバラは試験期間中、毎日少なくとも 30 分は温泉入浴を行った。皮膚性状などのデータは実験初日、7 日目、21 日目にサファリランドにて入浴開始前に計測した。

表 I-1 湯田温泉の成分分析表 (カピバラの入浴試験)

湧出温度 (°C)	74.50
pH	9.30
成分 (mg/L)	
Na <sup>+</sup>	204.00
K <sup>+</sup>	4.10
Mg <sup>2+</sup>	0.00
Ca <sup>2+</sup>	8.10
Sr <sup>2+</sup>	0.10
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	0.00
Mn <sup>2+</sup>	0.00
Al <sup>3+</sup>	0.04
Zn <sup>2+</sup>	0.00
Cu <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0.01
H <sup>+</sup>	0.00
Li <sup>+</sup>	0.20
F <sup>-</sup>	10.00
Cl <sup>-</sup>	261.30
Br <sup>-</sup>	0.70
I <sup>-</sup>	0.00
HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	11.00
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19.90
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	18.30
HS <sup>-</sup>	2.00
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.40
OH <sup>-</sup>	0.30
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.02
BO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4.50
非解離成分 (mg/L)	
H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	85.90
成分総計	630.80

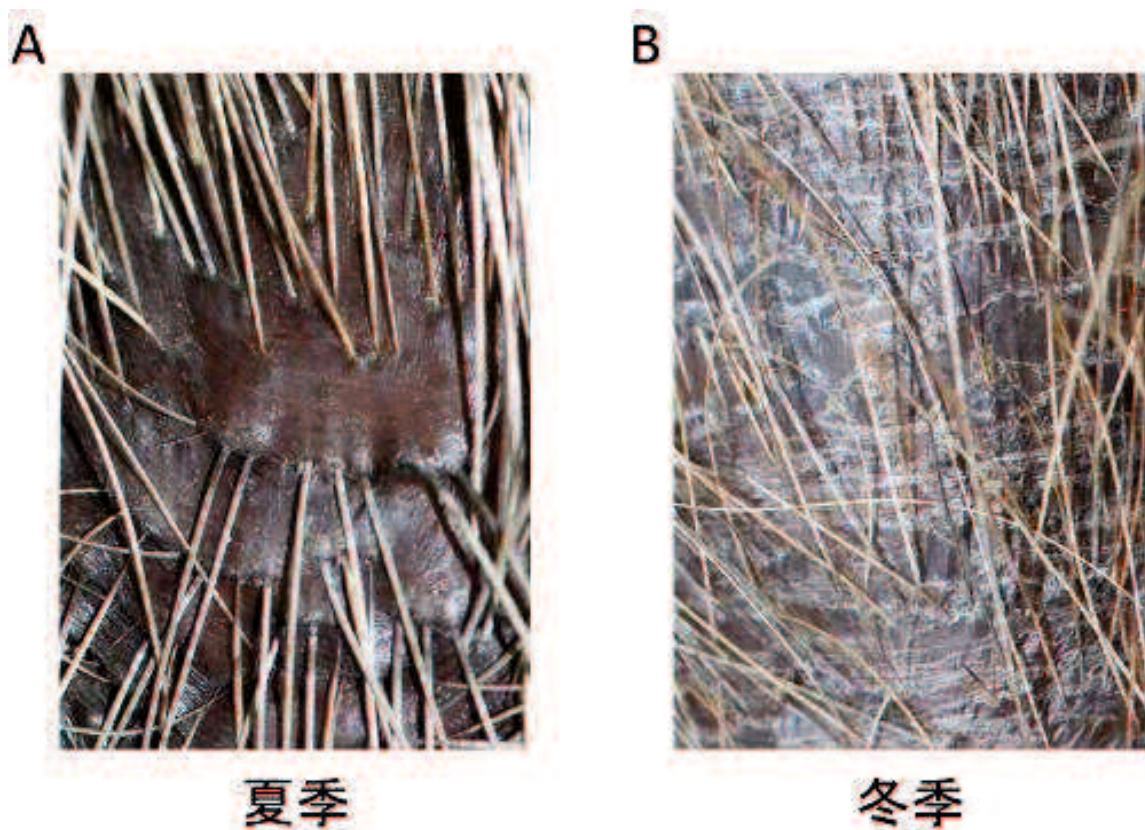


図 I-2 カピバラの皮膚所見の夏季と冬季の比較 (背側皮膚)

カピバラの被毛は硬いうえに径も太く毛根もしっかりしており、毛の密度が薄いことが特徴的である。(A) 夏季のカピバラの皮膚は表面がつやつやと光沢があるように見えるほど滑らかであり、そのうえ赤黒く血色が良い様子であった。(B) 一方で冬季のカピバラの皮膚は明らかに状態が夏季と比較して悪化しており、皮膚表面に痂皮や鱗屑が目立ち、典型的な荒れ肌状態となっていた。

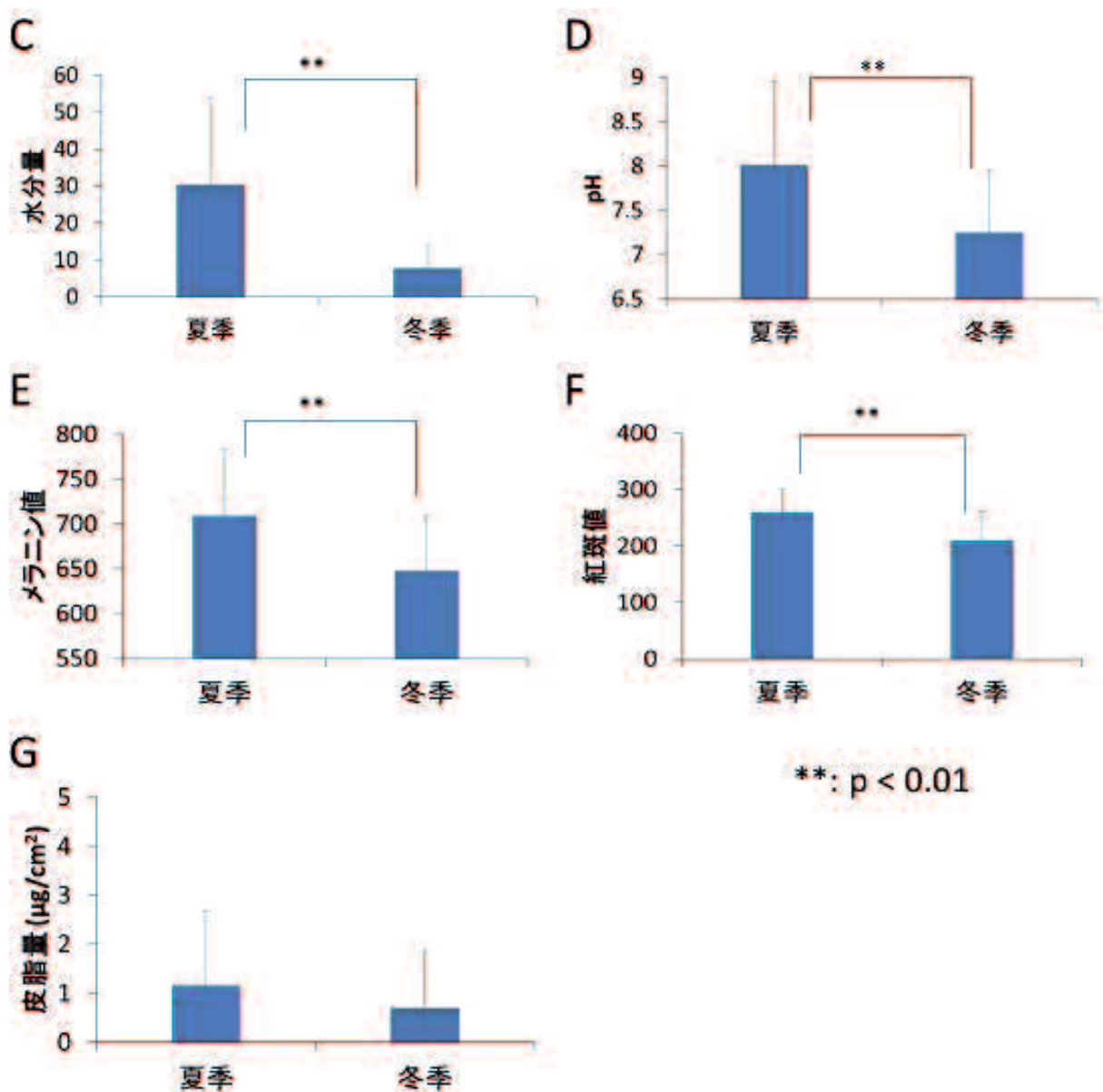


図 I-3 カピバラの夏季と冬季の皮膚性状検査結果の比較

(C) 冬季の皮膚水分量は、夏季の水分量の約 4 分の 1 でありそれらに有意差が見られた ( $p < 0.01$ )。 (D) 冬季の皮膚 pH は夏よりも有意に低かった ( $p < 0.01$ )。夏季の皮膚 pH は 8.26 であったことから、本来のカピバラの皮膚は弱アルカリ性であった。 (E) 冬季のメラニン値は夏季より有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。 (F) 紅斑値も冬季の方が有意に低値であった ( $p < 0.01$ )。 (G) 皮脂は年間通じてほぼ検出されず有意差は見られなかった。

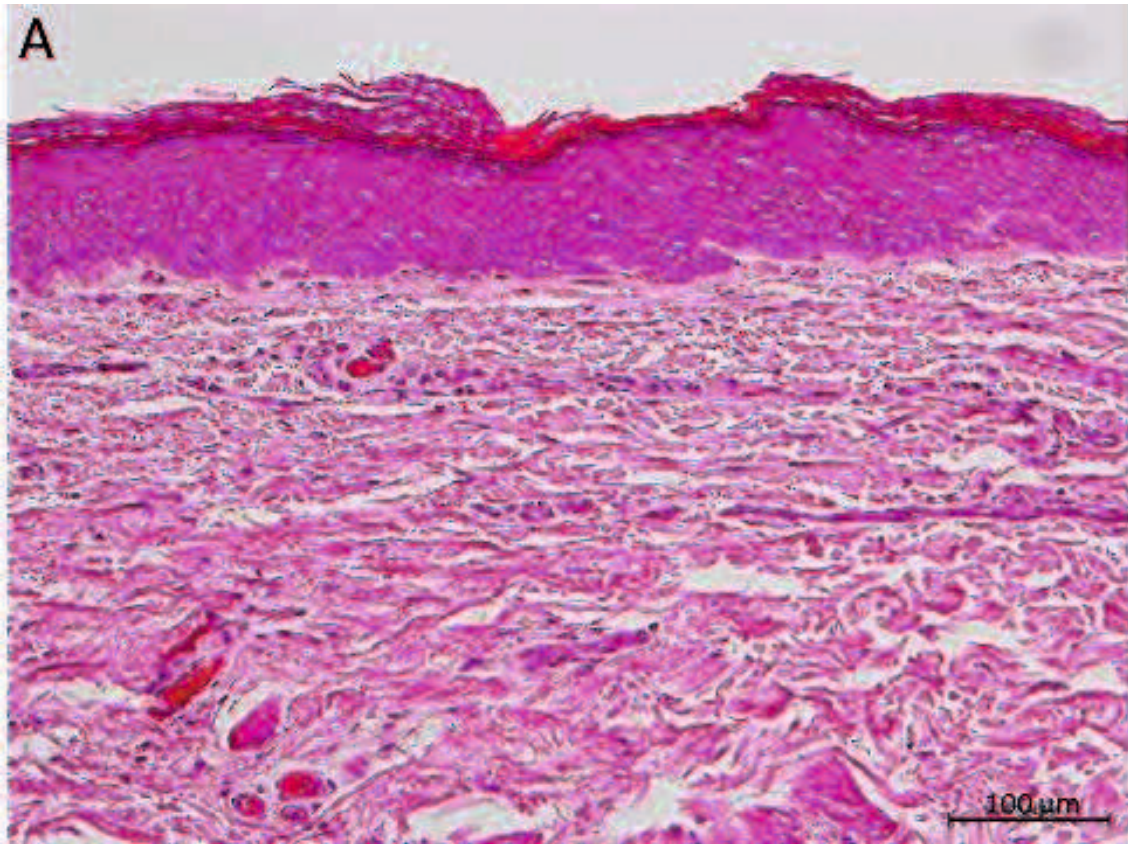


図 I-4 カピバラの背側皮膚の病理組織像（ヘマトキシリン・エオシン染色）

カピバラの表皮層は厚く、角質層、顆粒層、有棘層、基底層の表皮の4層構造は比較明瞭に確認できた。表皮・真皮間の真皮乳頭突起もしくは表皮突起はあまり見られず、平坦な境界面を形成していた。真皮層ではエクリン汗腺は認められず、それに加え皮脂腺は少数のみ観察できた (Bar = 100 μm)。

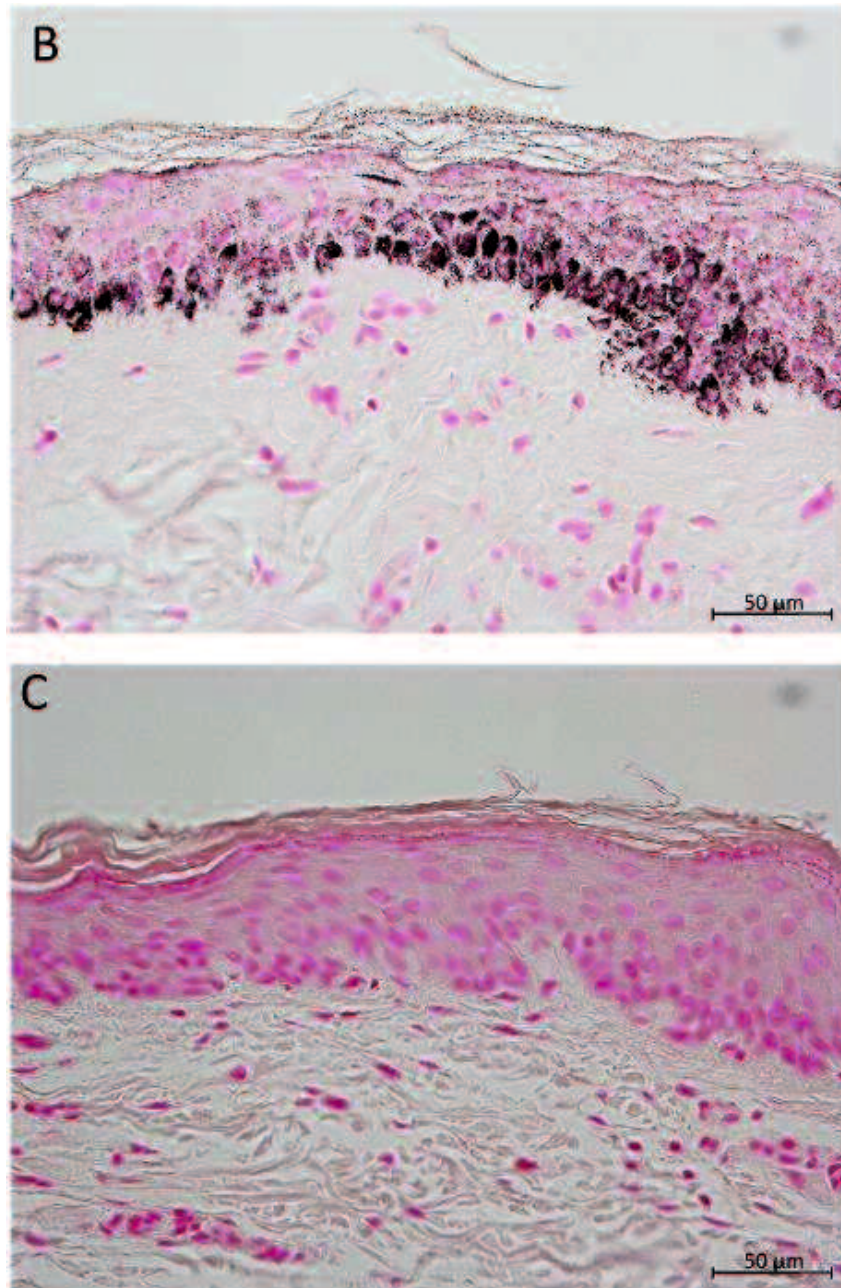


図 I-5 カピバラの皮膚の病理組織像 B: 背側皮膚, C: 腹側皮膚

(フォンタナマッソン染色)

(B) 背側皮膚の表皮層にはメラニン色素が沈着しており、特に基底層に多く見られた (Bar = 50 μm)。(C) 腹側皮膚は背側皮膚と基本的な皮膚構造は同様であったが、メラニン色素が全く見られなかった (Bar = 50 μm)。

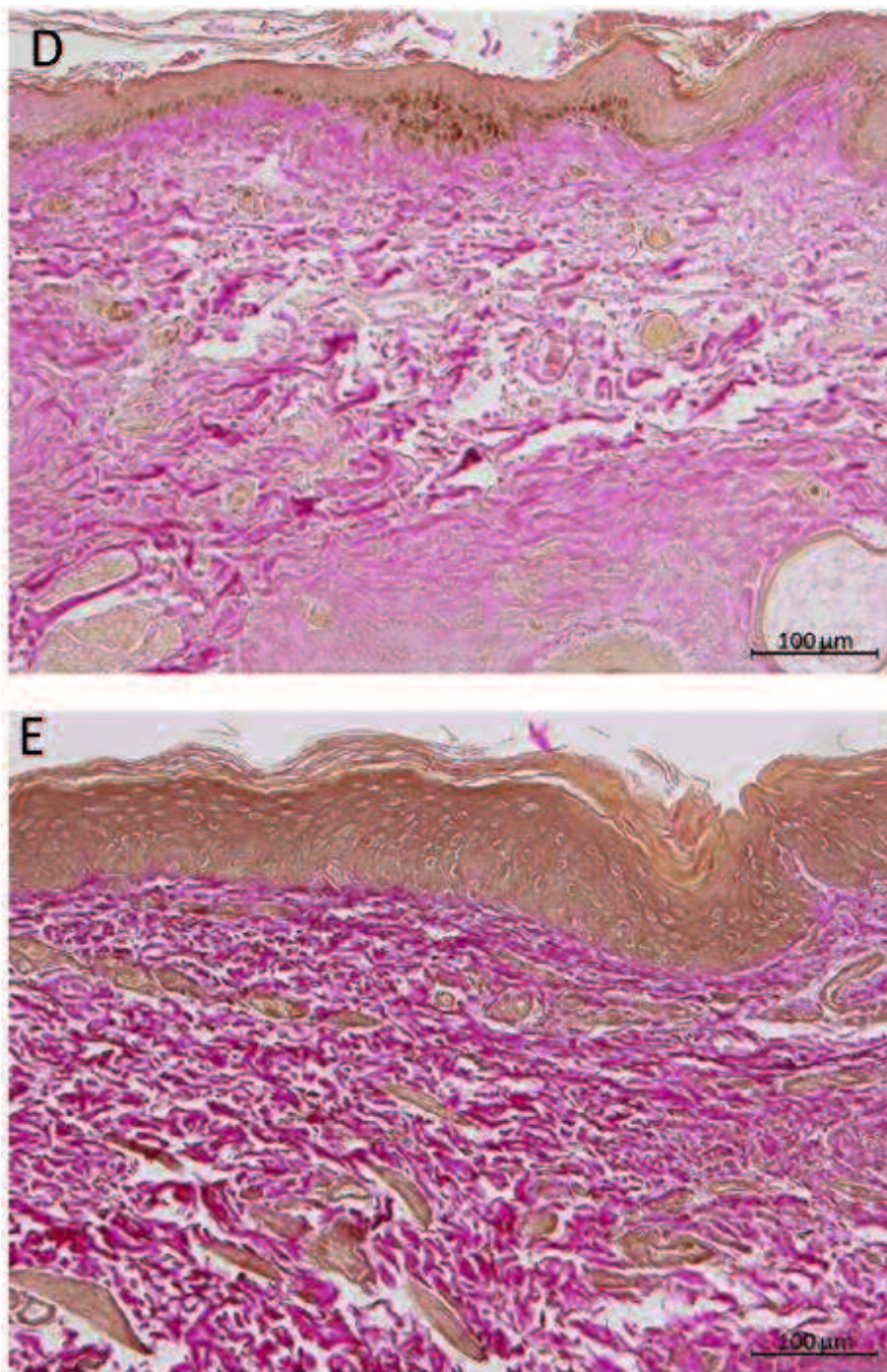


図 I-6 カピバラの皮膚の病理組織像 D: 背側皮膚, E: 腹側皮膚 (ワンギーソン染色)

(D) 背側皮膚真皮中の膠原線維は密度が部分的に低く、線維の分布が不均等に見られた

(Bar = 100 μm)。 (E) 腹側皮膚の膠原線維は比較的均一に分布していた (Bar = 100 μm)。

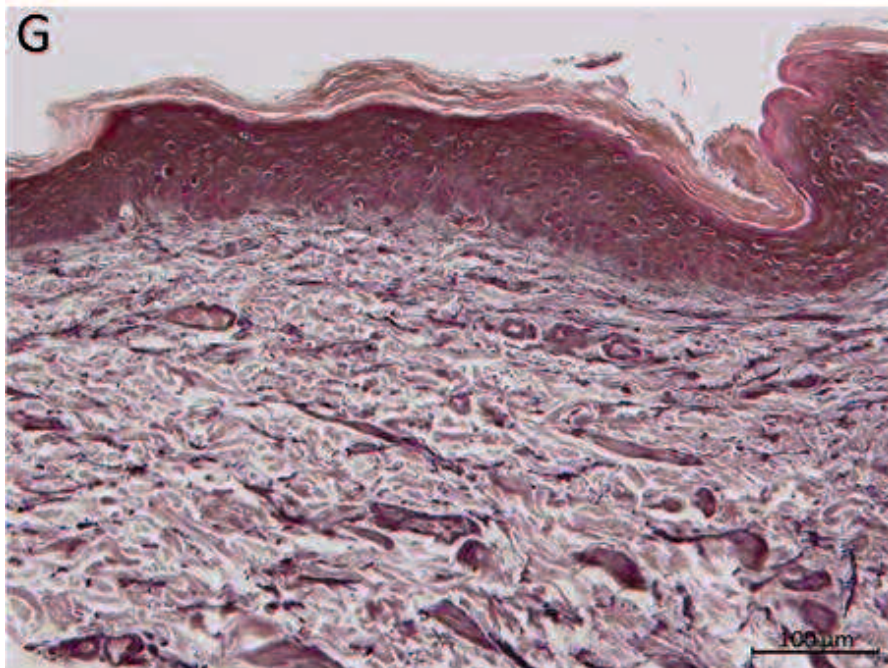
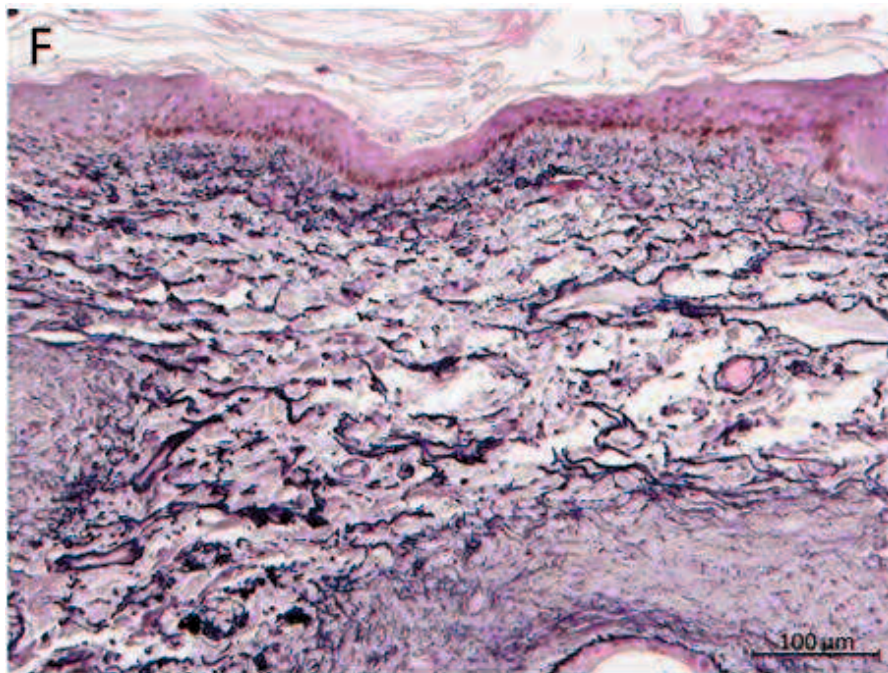


図 I-7 カピバラの皮膚の病理組織像 F: 背側皮膚, G: 腹側皮膚 (ワイゲルト染色)

(F) 背側皮膚の弾性線維は太く紐状になっている像が目立ち、真皮組織全体に分布していた (Bar = 100  $\mu$ m)。 (G) 腹側皮膚の弾性線維は全体的に細かい線維で構成されており、背側の弾性線維と所見が異なっていた (Bar = 100  $\mu$ m)。



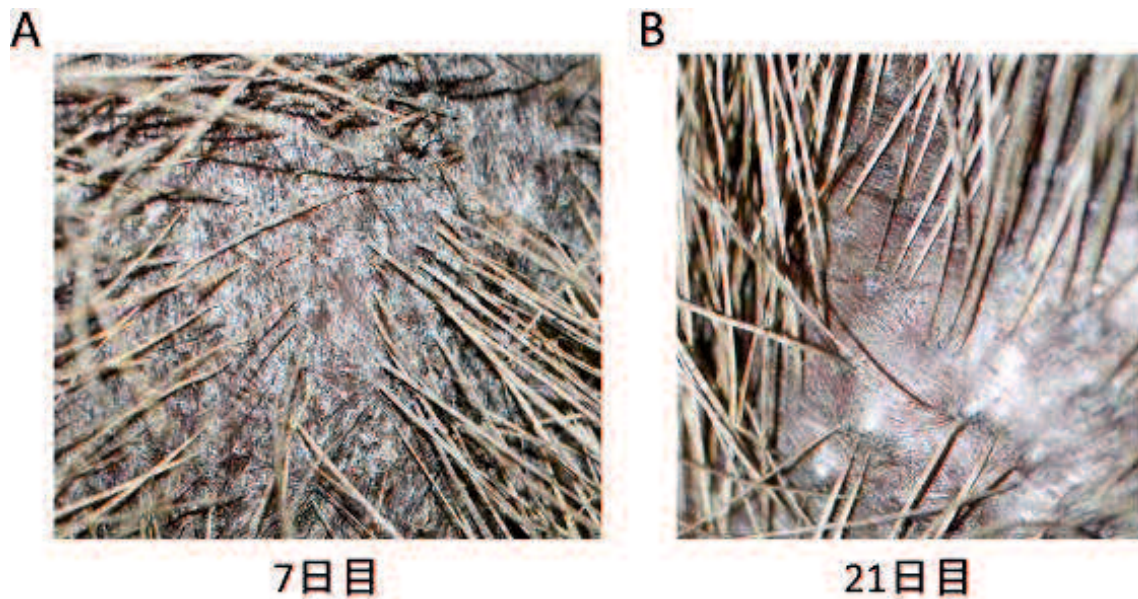


図 I-8 温泉入浴試験中のカピバラの皮膚肉眼所見の変化

(A) 入浴試験 7 日目のカピバラの皮膚はまだ鱗屑が目立っており、肌の質感もカサカサしたような乾燥肌であった。入浴試験前と比較して肉眼上では明らかな変化は認められなかった。(B) 入浴 21 日目では、鱗屑が目立たなくなり、皮膚の表面が滑らかに変化していた。皮膚の色味や質感も夏季の良好な状態に近づいているような様子が見受けられた。

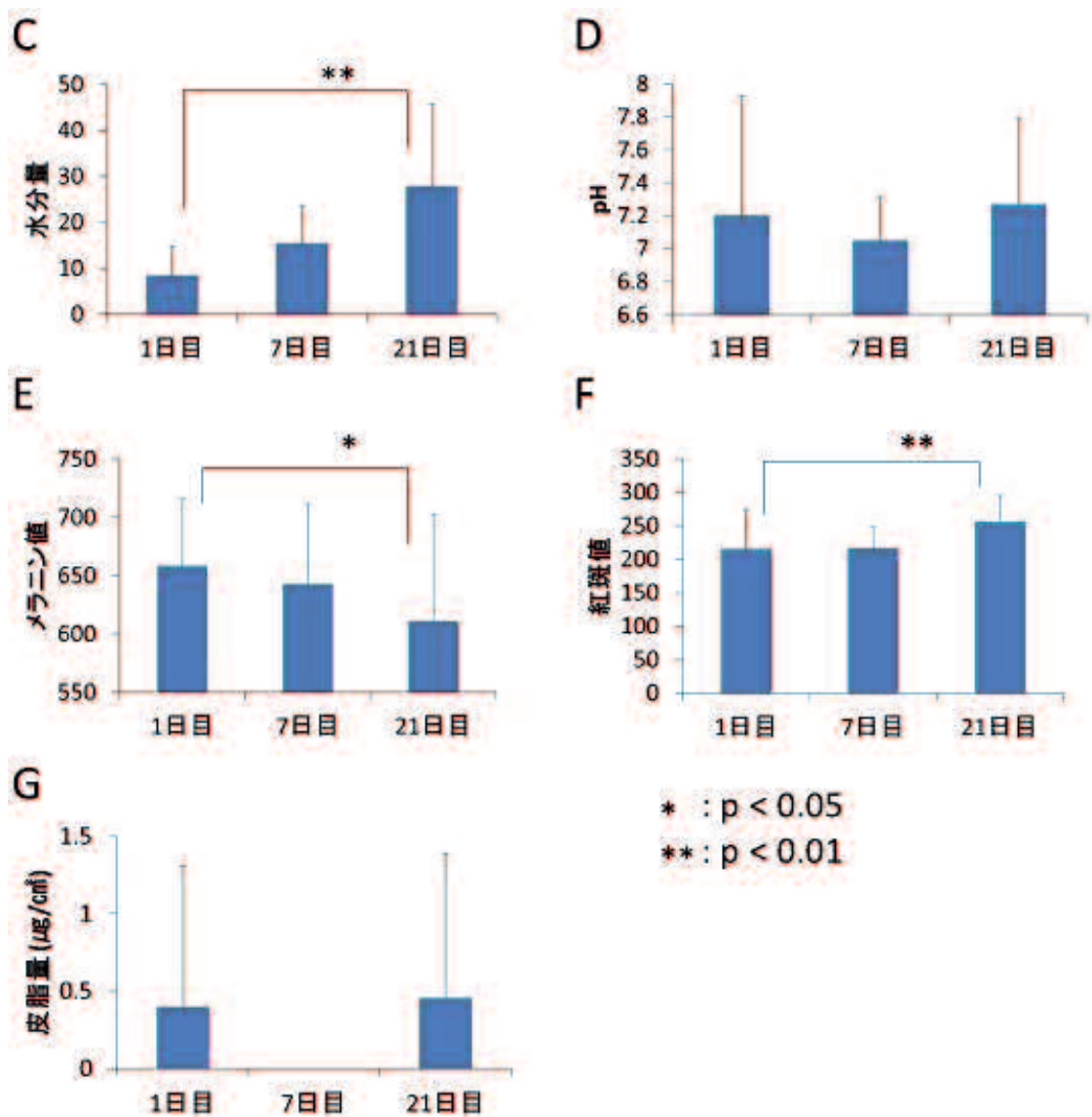


図 I-9 温泉入浴試験中のカピバラの皮膚性状の推移

(C) 温泉入浴試験を通して皮膚水分量は日ごとに増加し、1日目と21日目の間で有意差が見られた。(D) 皮膚 pH は試験期間中ほぼ中性を維持しており、有意な変化はなかった。(E) メラニン値は試験中徐々に減少していき、21日目の測定値は1日目よりも有意に低値であった。(F) 紅斑値には増加傾向が見られ、1日目と21日目の間には有意差が見られた。(G) カピバラの皮脂量は温泉試験中も変わらずほぼ 0 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )であった。

表 1-2 カピバラの快適度のスコアリング表

スコアリング	0	1	2
	平常時(基準)	僅かに快適な状態	明瞭に快適な状態
目と瞼 ・ 穏やかな目			
耳の位置 ・ 耳を尾側へ引く			

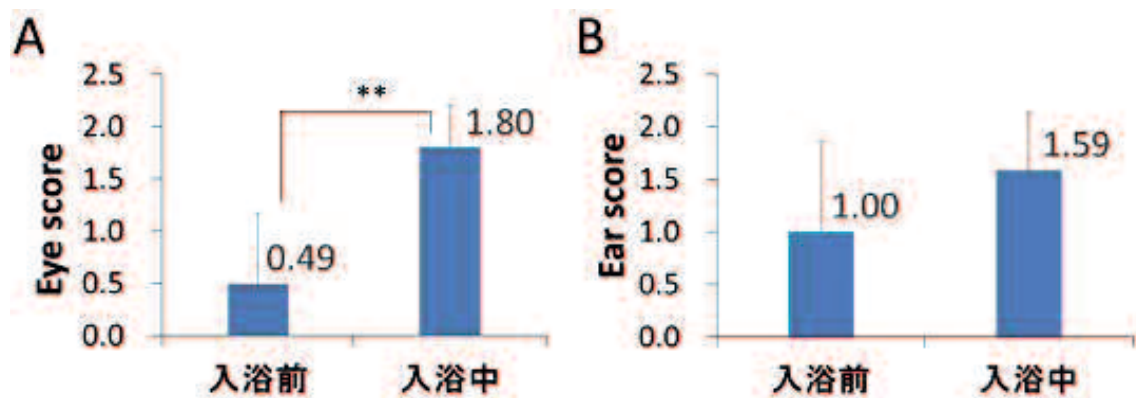


図 I - 10 入浴前と入浴中の快適度スコアの比較

(A) 目のスコアは、入浴前と入浴中の間で有意差を示した ( $p < 0.01$ )。

(B) 耳のスコアは、入浴中になると上昇傾向を示したが、入浴前との比較で有意差は示さなかった。

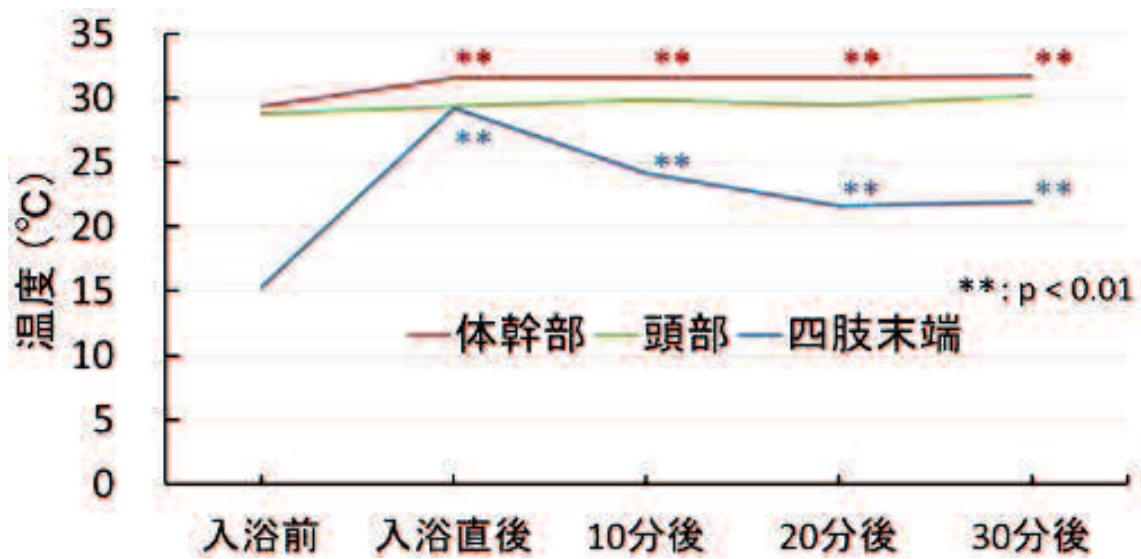
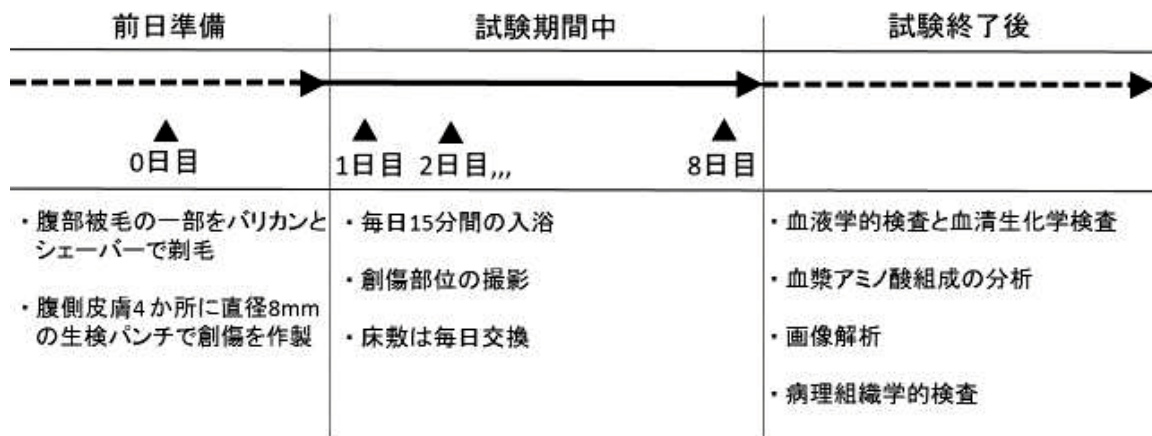


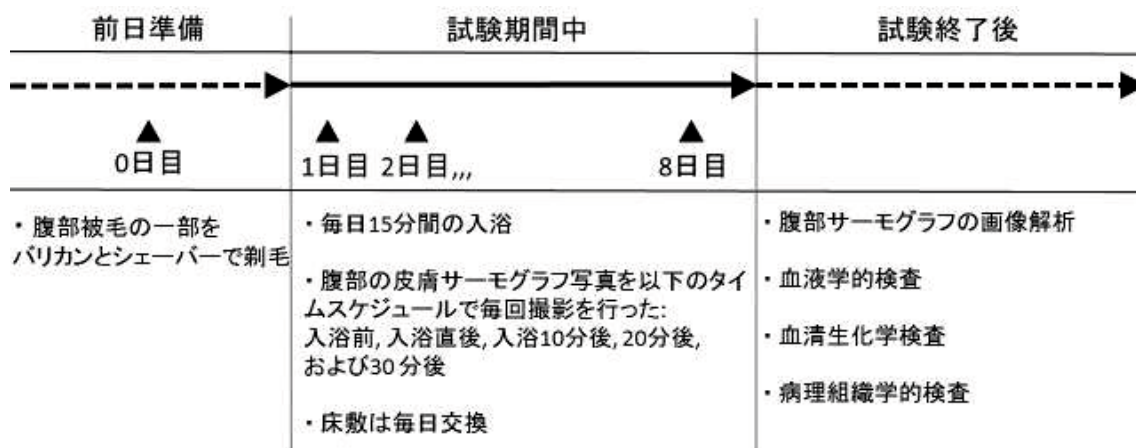
図 I-11 温泉入浴後 30 分間の部位ごとの皮膚温度推移 (有意差は入浴前との比較)

体幹部温度は入浴前と比較して 30 分間コンスタントに有意な高温が維持されていた。頭部のサーモグラフは入浴前後で有意な温度変化は観察されなかった。四肢末端部の皮膚温度は入浴前非常に低温であった。入浴直後は急激に温度が上昇したが、その後は徐々に低下した。しかし、30 分間入浴前と比較して有意に高い温度を保っていた。



図II-1 創傷治癒試験の実験スケジュール

試験開始前日(0日目)に腹部の被毛を一部剃毛し、直径8mmの生検パンチで4箇所  
の皮膚生検を行った。入浴試験は1週間(1日目から8日目)行い、モルモットは1日15分  
間の入浴を行った。検査した項目は、血液検査、血清生化学検査、血漿アミノ酸組成分析、  
画像解析検査、病理組織検査の5つである。



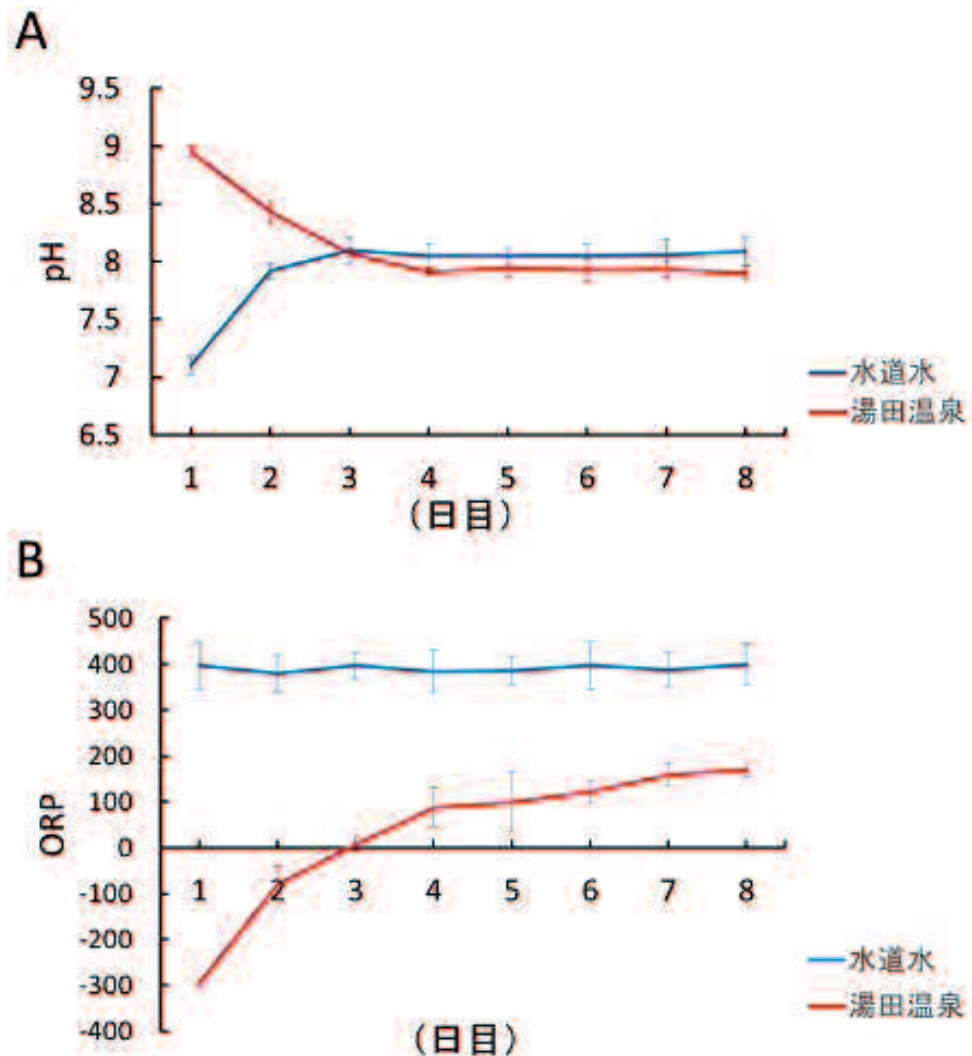
図II-2 サーモグラフ試験の実験スケジュール

試験前日 (0日目)にモルモットの腹部被毛の一部分をバリカンとシェーバーで剃毛を行った。試験期間中 (1日目から8日目)まで、モルモットに1日15分間の入浴を毎日行い、入浴前、入浴直後、入浴10分、20分、30分後のタイムスケジュールにて腹部のサーモグラフ写真を撮影した。一連のサーモグラフ試験終了後、血液検査、血清生化学検査、サーモグラフィの画像解析、病理組織学的検査を行った。

表 II-1 湯田温泉の成分分析表 (創傷治癒試験及びサーモグラフ試験)

湧出温度 (°C)	71.20
pH	9.20
成分 (mg/L)	
Na <sup>+</sup>	212.80
K <sup>+</sup>	4.20
Mg <sup>2+</sup>	0.00
Ca <sup>2+</sup>	8.50
Sr <sup>2+</sup>	0.10
Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	0.00
Mn <sup>2+</sup>	0.00
Al <sup>3+</sup>	0.02
Zn <sup>2+</sup>	0.00
Cu <sub>2</sub> <sup>+</sup>	0.00
H <sup>+</sup>	0.00
Li <sup>+</sup>	0.20
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.07
F <sup>-</sup>	12.00
Cl <sup>-</sup>	288.00
Br <sup>-</sup>	0.70
I <sup>-</sup>	0.00
HCO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	12.30
CO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	16.90
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	22.10
HS <sup>-</sup>	1.30
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.80
OH <sup>-</sup>	0.30
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.00
BO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	4.80
非解離成分 (mg/L)	
H <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	90.20
成分総計 (mg/L)	675.20





図Ⅱ-3 8日間の水道水と湯田温泉の水質変化の比較

(A) 1日目のpHはそれぞれ、水道水: 7.10, 温泉水: 8.96であった。実験開始から2日後の3日目には両サンプルのpHは8付近に収束しその後大きな変化はなかった。(B) 水道水のORP値は1日目から高い値を示し(397 ± 52.4 mV)、2日目以降も同様に高い値を示した。1日目の新鮮な温泉水のORP値は-295 ± 9.69mVと低値であった。2日目以降、ORP値は徐々に上昇を続けたが、8日目の時点でも水道水より有意に低いORP値であった。

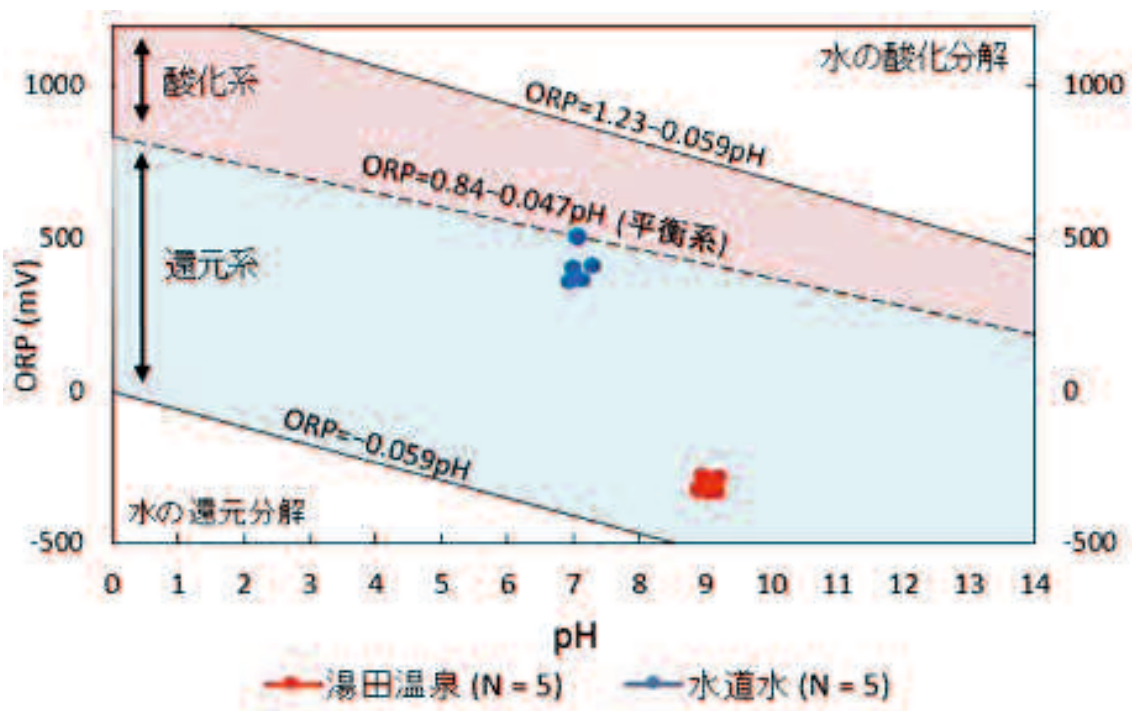


図 II-4 水道水と湯田温泉の平衡 ORP

1 日目の pH と ORP 値に基づいて、平衡 ORP 図を作成した。その結果、湯田温泉水は水道水と比較して高い還元性を有していることが明らかとなった。

表II-2 血液学的検査及び血清生化学検査の比較 (創傷治癒試験)

試験項目	平均値 ± 標準偏差		P値
	水道水群 (N = 6)	温泉群 (N = 6)	
WBC( $10^9$ /L)	2.92 ± 1.02	3.33 ± 0.75	0.44
RBC( $10^{12}$ /L)	4.52 ± 0.17	5.24 ± 0.43	0.003
Hb(g/L)	114 ± 4.3	138 ± 11.5	0.0007
PCV ratio	0.37 ± 0.02	0.43 ± 0.04	0.011
MCV(fL)	82.0 ± 1.73	81.1 ± 1.79	0.40
MCH(pg)	25.2 ± 0.69	26.4 ± 0.66	0.013
MCHC(g/L)	308 ± 6.3	325 ± 3.5	0.0001
RDW(%)	12.8 ± 0.63	13.1 ± 0.46	0.37
PLT( $10^9$ /L)	574 ± 65	441 ± 49	0.003
MPV(fL)	5.80 ± 0.28	5.62 ± 0.18	0.20
PCT(%)	0.33 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.005
PDW(%)	12.1 ± 0.54	11.6 ± 0.53	0.10
ALP(U/L)	293.5 ± 67.4	332 ± 46.7	0.28
CHE(U/L)	10.2 ± 0.75	10.8 ± 1.83	0.43
GOT(U/L)	29.5 ± 6.25	62 ± 65.2	0.25
GPT(U/L)	21.2 ± 3.43	27 ± 8.72	0.16
GGT(U/L)	27.2 ± 10.1	24.5 ± 7.06	0.61
LDH(U/L)	118 ± 64.3	157 ± 84.8	0.39
LAP(U/L)	508 ± 19.7	508 ± 63.3	0.995
AMS(U/L)	2,024 ± 400	2,081 ± 407	0.4
GLU(mmol/L)	8.44 ± 0.58	13.2 ± 0.58	0.001
CK(U/L)	268 ± 178	296 ± 245	0.82
BUN(mmol/L)	6.28 ± 0.70	6.46 ± 0.90	0.73
CRE( $\mu$ mol/L)	40.7 ± 14.1	23.9 ± 1.77	0.02
Na(mmol/L)	130 ± 7.74	129 ± 12.5	0.81
K(mmol/L)	4.12 ± 0.33	4.85 ± 1.50	0.27
Cl(mmol/L)	93.2 ± 5.49	94 ± 9.70	0.89
UA( $\mu$ mol/L)	87.4 ± 13.7	85.1 ± 29.7	0.88
TP(g/L)	40.5 ± 2.10	42.0 ± 5.90	0.57
ALB(g/L)	18.2 ± 1.20	19.3 ± 4.10	0.52
TCHO(mmol/L)	1.49 ± 0.13	1.08 ± 0.29	0.06
TG(mmol/L)	0.65 ± 0.16	0.63 ± 0.17	0.88
TBIL(mg/dl)	1.71 ± 0	1.71 ± 0	1
Ca(mmol/L)	2.06 ± 0.20	2.28 ± 0.39	0.25
IP(mmol/L)	2.61 ± 0.37	2.61 ± 0.33	0.98
Mg(mmol/L)	1.45 ± 0.21	1.52 ± 0.36	0.67

表 II-3 血漿アミノ酸組成検査の比較 (創傷治癒試験)

分析項目 (nmol/mL)	平均値 ± 標準偏差		P値
	水道水群 (N = 6)	温泉群 (N = 6)	
アルギニン (ARG)	57.0 ± 39.6	48.4 ± 43.7	0.73
グルタミン (GLN)	158.9 ± 47.6	186.9 ± 27.1	0.24
シトルリン (CIT)	21.4 ± 9.04	42.1 ± 2.59	0.0003
アンセリン (ANS)	2.19 ± 0.74	1.61 ± 0.65	0.18
セリン (SER)	143 ± 23.7	179 ± 18.3	0.01
アスパラギン (ASN)	0	0	-
プロリルヒドロキシプロリン (PHP)	4.63 ± 0.45	4.42 ± 0.58	0.48
4-ヒドロキシプロリン (HYP)	24.7 ± 5.08	31.5 ± 4.20	0.03
3-メチルヒスチジン (3-MHIS)	2.22 ± 0.21	1.96 ± 0.27	0.08
1-メチルヒスチジン (1-MHIS)	10.8 ± 0.50	7.76 ± 1.89	0.003
グリシン (GLY)	414 ± 77.2	550 ± 90.2	0.02
グリシルプロリン (GPR)	0.25 ± 0.14	0.17 ± 0.13	0.32
スレオニン (THR)	102 ± 13.2	145 ± 21.4	0.002
β-アラニン (bALA)	3.01 ± 0.53	2.65 ± 0.68	0.32
アラニン (ALA)	294 ± 65.1	276 ± 44.7	0.58
サルコシン (SAR)	0.87 ± 0.22	1.12 ± 0.32	0.15
δ-ヒドロキシリジン (HLY)	0.71 ± 0.29	0.75 ± 0.26	0.81
γ-アミノ酪酸 (GABA)	2.96 ± 0.87	4.16 ± 1.48	0.12
β-アミノイソ酪酸 (bAIBA)	0	0.33 ± 0.58	0.2
α-アミノ酪酸 (AABA)	2.62 ± 0.53	3.69 ± 0.79	0.02
オルニチン (ORN)	78.7 ± 13.4	135 ± 36.3	0.005
カルシノン (CAR)	0.09 ± 0.15	0	-
メチオニン (MET)	28.9 ± 4.61	34.4 ± 5.30	0.08
プロリン (PRO)	102 ± 24.7	130 ± 16.9	0.05
リジン (LYS)	146 ± 38.7	162 ± 33.1	0.47
アスパラギン酸 (ASP)	12.74 ± 7.53	17.8 ± 3.77	0.17
ヒスチジン (HIS)	54.2 ± 9.23	51.0 ± 8.94	0.56
チオプロリン (TPR)	0.10 ± 0.16	0.45 ± 0.08	0.0006
バリン (VAL)	253 ± 16.6	300 ± 33.8	0.01
グルタミン酸 (GLUT)	172 ± 33.1	206 ± 37.1	0.12
トリプトファン (TRP)	47.2 ± 8.51	57.6 ± 11.6	0.11
α-アミノアジピン酸 (AAA)	3.00 ± 0.69	3.62 ± 0.58	0.12
フェニルアラニン (PHE)	61.7 ± 8.13	69.6 ± 9.63	0.15
ロイシン (LEU)	146 ± 11.5	158 ± 18.1	0.2
イソロイシン (ILE)	109 ± 10.5	115 ± 11.8	0.38
アミノピメリン酸 (APA)	0	0	-
シスタチオニン (CTH)	0.94 ± 0.30	0.82 ± 0.10	0.38
シスチン (CYS2)	65.9 ± 12.3	61.0 ± 9.12	0.45
チロシン (TYR)	50.6 ± 8.01	66.9 ± 8.25	0.006
キヌレニン (KNU)	2.50 ± 1.28	1.82 ± 0.40	0.24
5-アミノレブリン酸 (5-ALA)	0	0	-
芳香族アミノ酸	112 ± 15.2	137 ± 17.0	0.03
分岐鎖アミノ酸	507 ± 33.8	572 ± 62.1	0.05
フィッシャー比	4.56 ± 0.39	4.21 ± 0.23	0.08
総アミノ酸量	2,580 ± 349	3,057 ± 334	0.04

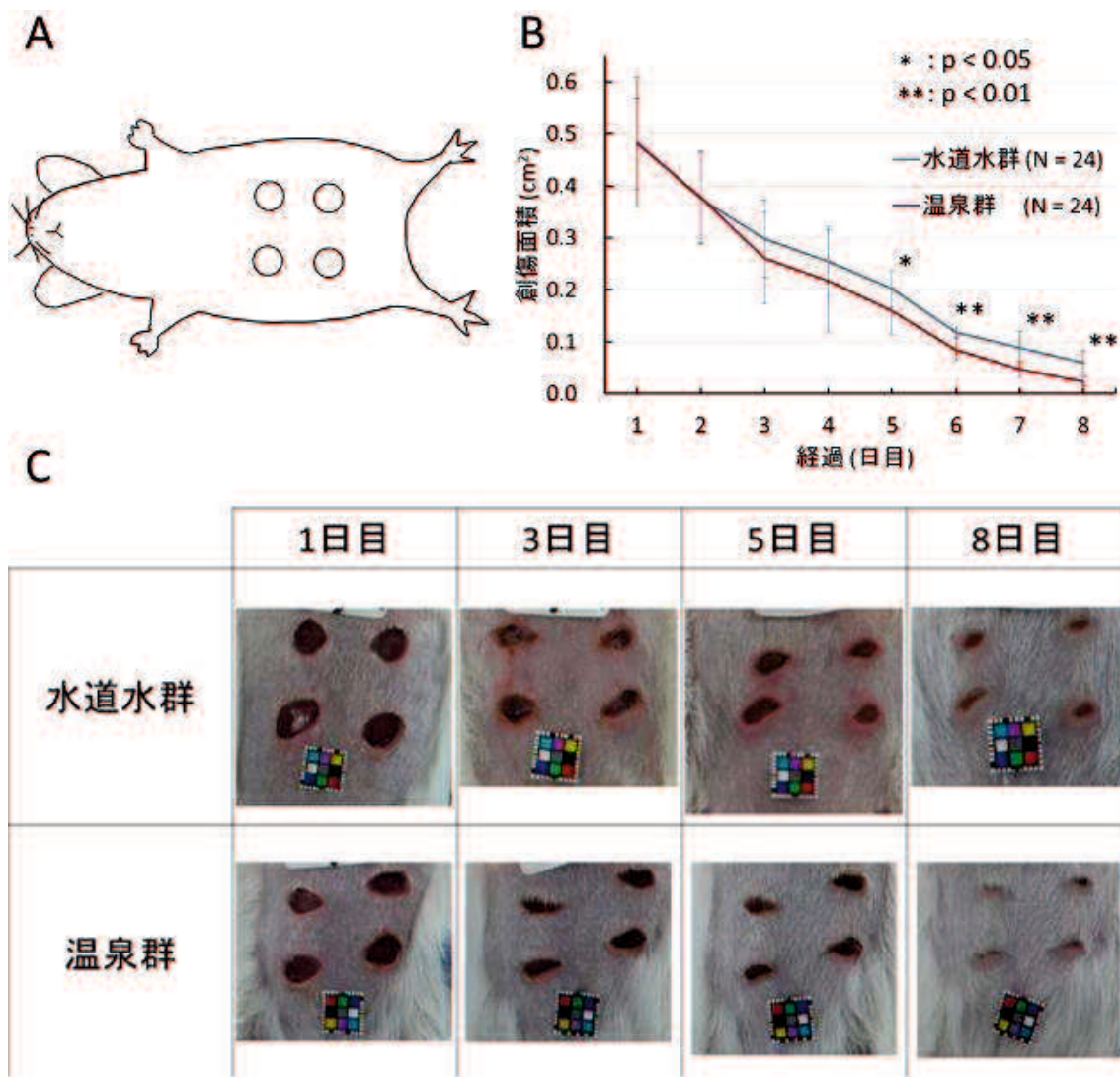
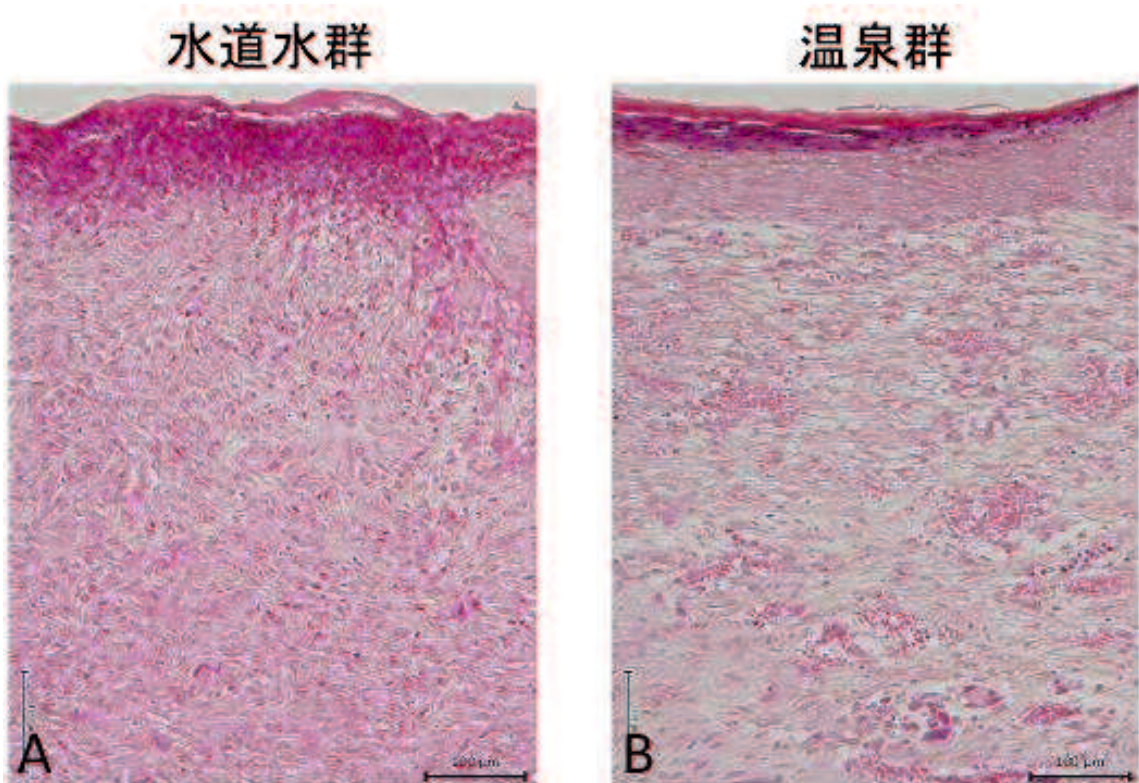


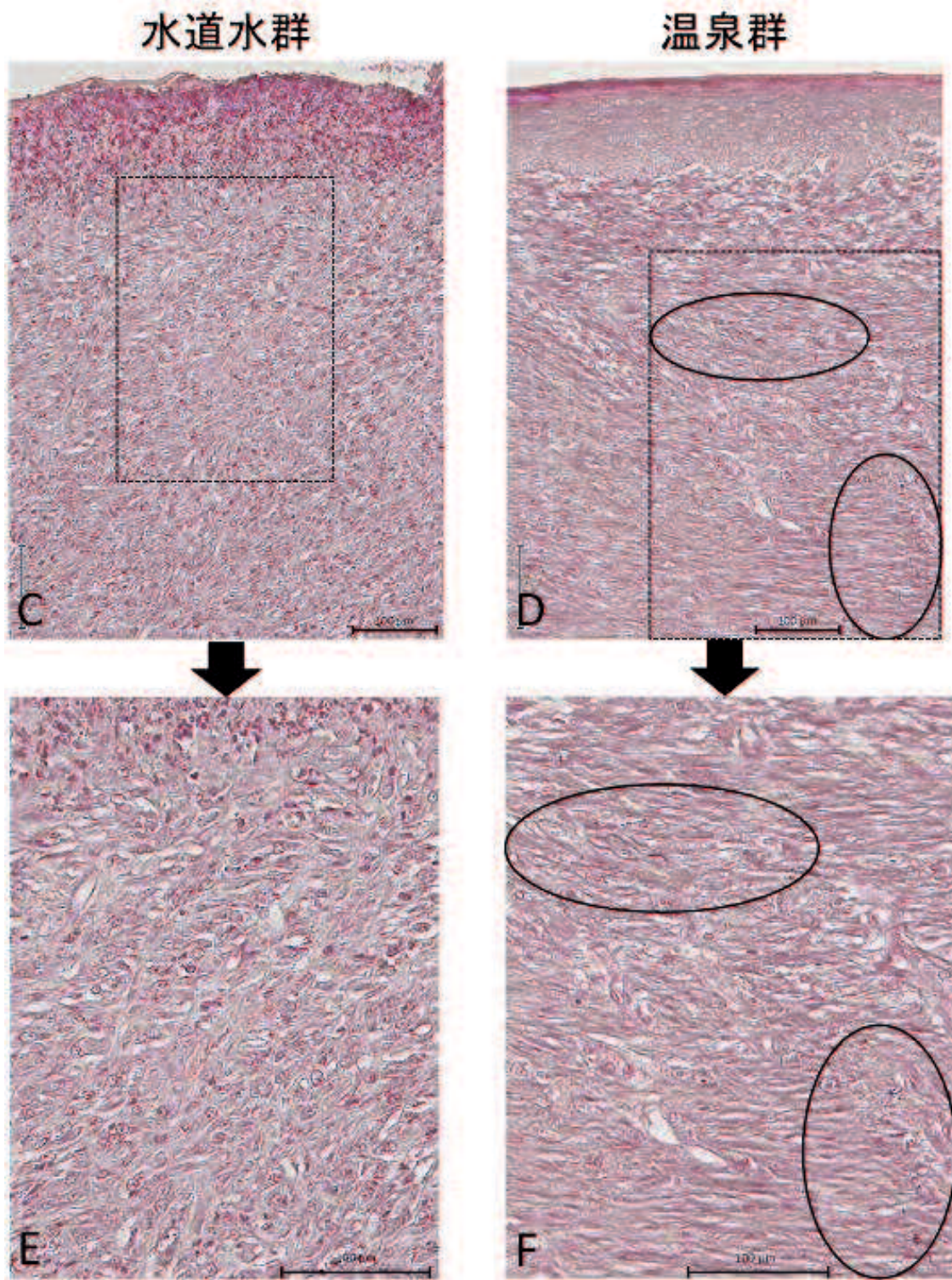
図 II-5 創傷部位の画像解析の結果と肉眼所見

(A) モルモットの腹部生検の模式図。創傷は、直径 8 mm の滅菌生検パンチを使用して作製した。(B) 創傷面積の推移の比較した結果、最初の 4 日間は 2 群間の創傷面積に有意差は見られなかった。しかし、5 日目以降は有意差が見られ、温泉入浴群の方が傷の塞がりが有意に早かった。(C) 創傷部位の典型的な肉眼所見の一部を示している。水道水入浴群では、3 日目から 5 日目にかけて炎症反応が強く見られた。最終日の創傷面積は、水道水入浴群よりも温泉入浴群の方が小さいことが肉眼でも確認された。



図Ⅱ-6 皮膚創傷部位の病理組織所見の比較 (HE 染色)

(A) 水道水群の創傷部皮膚組織, 表皮の再上皮化が不十分であり、表皮の層構造も不明瞭であった。炎症性細胞も豊富に見られた (Bar = 100 μm)。 (B) 温泉群の創傷部皮膚組織, 水道水群と比較して表皮の再上皮化が促進されており、表皮の層構造も形成され始めていた。また、ケラトヒアリン顆粒も明瞭に確認できた (Bar = 100 μm)。



図Ⅱ-7 皮膚創傷部位の病理組織所見の比較（ワイゲルト染色）

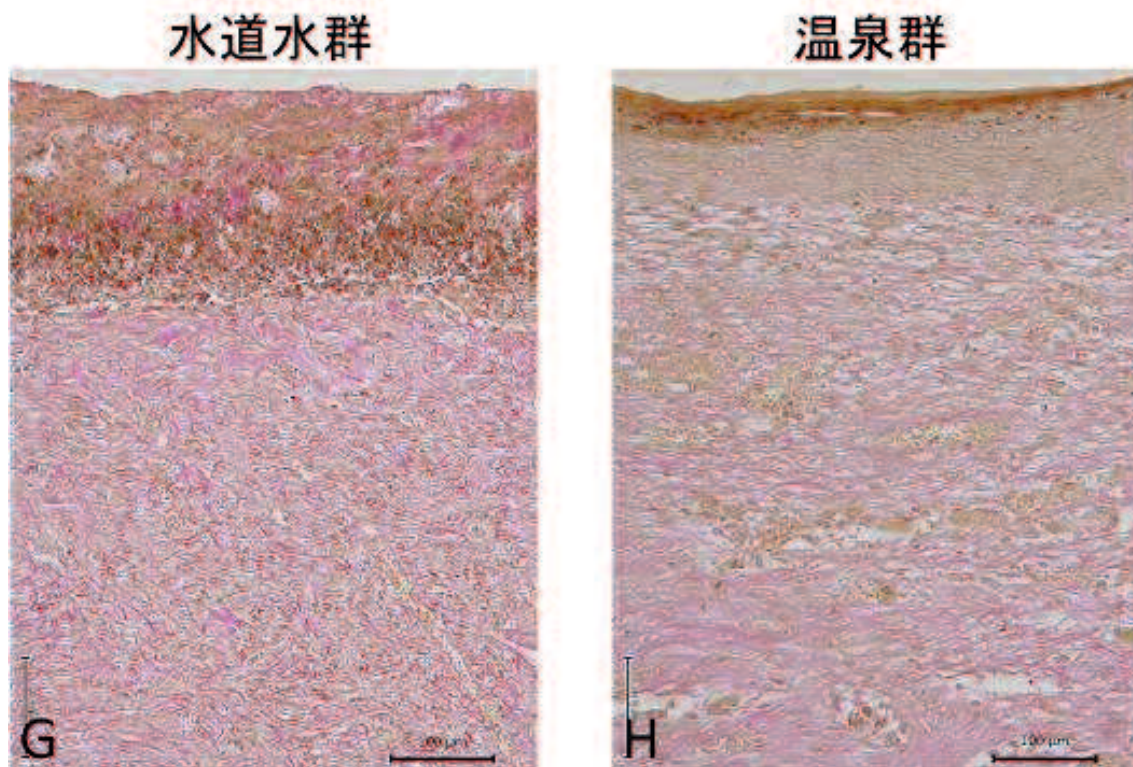
(C) 水道水群の創傷部皮膚組織の弱拡大像 (Bar = 100 μm)

(D) 温泉群の創傷部皮膚組織の弱拡大像 (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )

(E) C の破線部拡大像, 水道水群の真皮層には弾性線維がほとんど確認できなかった (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )。

(F) D の破線部拡大像, 温泉群の真皮層には、弾性線維が各所で散見され、弾性線維の再構築が始まっていた (Bar = 100  $\mu\text{m}$ )。



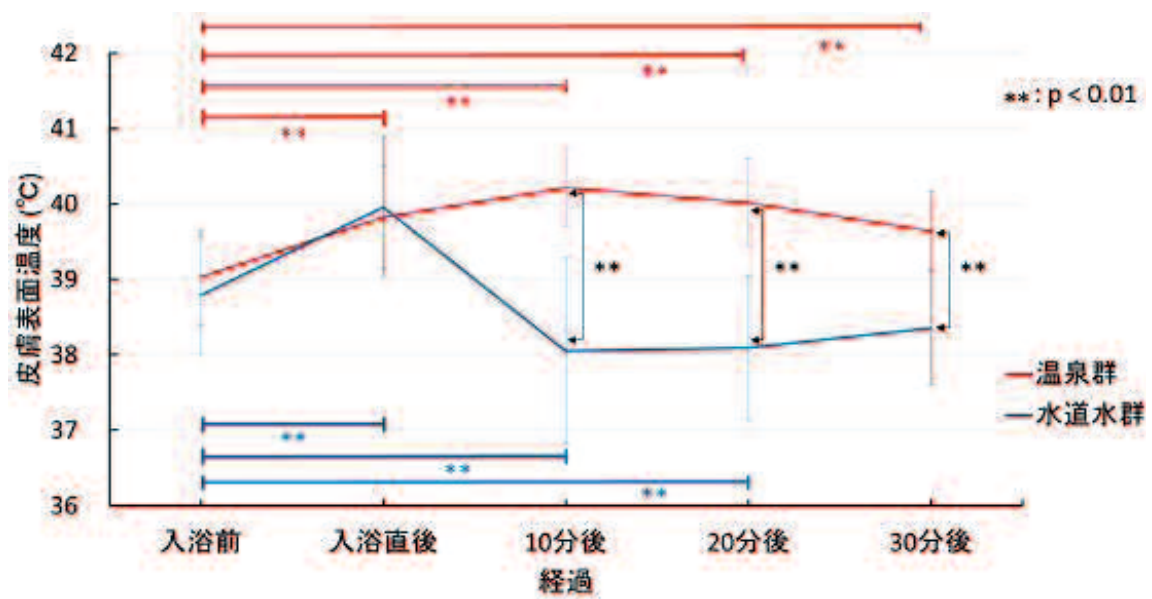


図Ⅱ-8 皮膚創傷部位の病理組織所見の比較（ワンギーソン染色）

(G) 水道水群の創傷部皮膚組織，水道水群の真皮中の膠原線維は配列がバラバラで不規則な像が目立っていた（Bar = 100  $\mu$ m）。(H) 温泉群の創傷部皮膚組織，温泉群の膠原線維は表皮層と平行な方向へ規則正しく配列しており、通常の皮膚の膠原線維の配列と近似していた（Bar = 100  $\mu$ m）。

表Ⅱ-4 創傷部位の皮膚組織の評価表

	水道水群	温泉群
表皮		
再上皮化	++	+++
ケラトヒアリン顆粒	+	+++
角化異常	±	±
炎症性細胞の浸潤	+	—
肥満細胞	—	—
真皮		
肉芽形成	+++	+
血管新生	++	++
炎症性細胞浸潤	+++	++
肥満細胞	—	—
膠原線維の配列	+	++
弾性線維の再生	+	++



図Ⅱ-9 温泉群と水道水群の入浴前後の体表面温度の変化の比較

同じ時間帯同士で両群の体表面温度を比較したところ、入浴後のすべての時間帯で両群間に有意差が認められ、温泉入浴群の方が有意に体表面温度は高かった（黒米印）（ $p < 0.01$ ）。また、入浴前に測定した体表面温度と入浴後に測定した体表面温度を同じ群間で比較した結果、温泉入浴群は入浴後 30 分まで有意に高い温度を維持していたのに対して（赤米印）、水道水入浴群は入浴後有意に温度が低下していた（青米印）（ $p < 0.01$ ）。

参考画像

