

# 皮膚バリア機能障害を伴う皮膚疾患を対象とした ラマン分光装置を用いた角層天然保湿因子の解析

大阪医科大学皮膚科

谷崎 英昭

Stratum corneum (SC) is important to maintain the skin surface humidity and barrier function. Recent progress in confocal Raman spectrometer has enabled us to noninvasively assess the concentration of water, natural moisturizing factor (NMF) and lipids of the SC in vivo. Topical steroid has been widely used for a variety of skin inflammatory diseases including atopic dermatitis, but the effect on the SC compositions has not been elucidated yet. We sought to evaluate the effect of topical steroid on the profiles of SC of mouse and human skin. We evaluated the SC components of the skin of healthy donors, atopic dermatitis (AD) patients, C57BL/6 mice, and *filaggrin* knockout mice in the presence or absence of topical steroid treatments using a confocal Raman spectrometer. The depth-dependent profiles of SC were calculated from the respective spectra. Ceramide, pyrrolidone carboxylic acid, urea, and lactic acid, of AD patients were significantly decreased compared to healthy donors. In addition, long-term topical steroid treatment decreased the profiles of SC components in human. Consistently, SC components were lower in *Filaggrin* knockout mice when compared to C57BL/6 mice, and even after by topical steroid treatment. In addition, the recovery of SC components after degreasing treatment was markedly delayed in the steroid application group. We have demonstrated that topical steroid treatment decreased the components of SC of the skin in mice and humans. Although topical steroids are beneficial for controlling skin inflammation, we need to consider the risk of barrier disruption.

## 1. 緒言

表皮は、厚さが0.2mm程度の人体の最外層に位置する膜であり、角化プロセスによって細胞分裂と分化を日々繰り返している。その中でも角質層は外界と体内との境界部に位置して、皮脂膜と天然保湿因子：Natural Moisturizing Factor (NMF)、細胞間脂質をバランスよく保持することによって、「バリア機能」と「水分保持機能」という皮膚の機能における中心的な役割を担っている。フィラグリン蛋白は角層NMFの産生源として重要であり皮膚のバリア機能に必須の蛋白である。アトピー性皮膚炎は、遺伝的要因として乾燥肌を有し環境中の多様な因子が絡んで発症するが、フィラグリン遺伝子変異の有無がアトピー性皮膚炎の発症因子の中で最も頻度の高い因子であると近年報告されている<sup>1)</sup>。

皮膚における水分・アミノ酸・脂質など各成分ごとの測定方法は、光工学による計測技術の進歩によって著しく発展している。従来、テープストリッピングなどによる皮膚剥離を行った後に蛋白量などを測定していたのに対し、共焦点ラマン分光装置の出現によって角層内の深さ分布や薬剤の皮膚への浸透性を非侵襲かつ無標識に高感度で詳細

な解析が可能となった<sup>2-4)</sup>。今回、皮膚の重要な機能である「バリア機能」と「水分保持機能」において中心的な役割を担っているNMFに注目し、共焦点ラマン分光装置を用いて、角質層におけるNMF含有量と皮膚表面から内部にかけての分布について非侵襲かつ無標識に詳細な解析を行った。加齢や気候による生理的な変化に加え、強い乾燥やかゆみをとまなうアトピー性皮膚炎、難治性の掌蹠角化症、慢性皮膚粘膜カンジダ症など何らかの皮膚免疫異常を呈する状態、更には外用剤治療前後の比較などさまざまな皮膚状態を対象とし、ヒト臨床検体と各モデルマウスを用いてNMFの機能解析・経皮水分蒸散量・pHなどの測定を通して、バリア機能障害の成因に総合的に迫りたいと考えている。

## 2. 方法

### 2.1. 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認

アトピー性皮膚炎の治療の第一選択は、かゆみや炎症を速やかに抑制するためのステロイド外用剤である<sup>5)</sup>。症状や病変部位に応じて各レベルのステロイド外用を使用し、適宜タクロリムス軟膏や保湿剤への変更が望ましいとされるが、長期間のステロイド外用によって生じる皮膚萎縮、毛細血管拡張、潮紅、酒皸様皮膚炎、ステロイド紫斑、瘡瘡、多毛、感染症の増悪などについても日常診療においてしばしば経験する。今回、長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について、超音波を用いて測定・比較し皮膚萎縮について評価した。



Effect of topical steroid on the stratum corneum compositions by using confocal Raman microscopy

Hideaki Tanizaki

Department of Dermatology, Osaka Medical College

## 2. 2. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

外用剤塗布時はチューブより薬剤を一定量（例えば1FTU量）出し、両手を用いることが多い。今回30年以上両手を用いて外用を継続しているアトピー性皮膚炎患者（39歳男性）と右示指のみを用いて外用を十数年以上継続しているアトピー性皮膚炎患者（35歳男性）の指腹について、pHや経皮水分蒸散量（transepidermal water loss：TEWL）について解析を行った。pHは堀場製作所製ポータブルpHメーターを用いて、TEWLは室温23度、湿度40-50%に保たれた部屋に入室後VAPOSCAN AS-VT100RS（Asahi Biomed社製）を用いて測定した。

## 2. 3. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子について解析

2. 2. と同患者を用い、River Diagnostics社製ラマン分光光度計confocal Raman microspectroscopyを用いて天然保湿因子とその関連分子について測定・解析を行った。測定は、左右の指腹を用いて任意の5点について各点の角質表層から4μm間隔で160μmまで測定し、解析はRiver Diagnostics社製ソフトウェアSkinToolsを使用した。

## 3. 結果

### 3. 1. 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認

測定部位については、いずれの患者も軽度乾燥と苔癬化をとまっていたが、明らかな掻破痕などを認めない部位で測定した。長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について超音波像を示す（図1A）。健康人（Healthy）では $1.22 \pm 0.8$ mmの皮膚厚であったのに対し、アトピー性皮膚炎患者（AD）の平均値は $0.83 \pm 0.22$ mmと有意差をもって低下していた（図1B）。

## 3. 2. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

はじめに、ステロイド外用を日常的に行っていない同年代の健康者の左右の指腹の臨床像を示す（図2A）。両側において、指紋がはっきりと認められ乾燥の所見なども認められない。一方、30年以上両手を用いて外用を継続しているアトピー性皮膚炎患者（39歳男性）においては、両側の指紋が不明瞭となり、皮膚の乾燥による粗造が顕著に認められた（図2B）。右示指のみを用いて外用を十数年以上継続しているアトピー性皮膚炎患者（35歳男性）においては、外用を継続していた右側の指紋が不明瞭であり、左側と比較して皮膚の乾燥による粗造が顕著に認められた（図2C）。さらに、図2C患者におけるpHとTEWLにおいても、右側でpHの低下とTEWLの増加を認め、いずれも皮膚バリア障害の結果差が生じたと考えられた。

### 3. 3. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子NMFについて解析

最後に、長期間のステロイド外用によって生じたと考えられた皮膚バリア障害NMFについて図2C患者を中心に評価を行った。天然保湿因子全体においては、外用を行っていなかった左側において表層から30μmにかけて増加を認め、以後角層の深層にむかって低下する健康者（結果は示さず）と同様のパターンを示したのに対し、外用を行っていた右側では、角層の最外層から低下を示し表層から104μmにおいてほとんど測定限界値以下を示した（図3A）。その中でも天然保湿因子における主要構成成分であるピロリドンカルボン酸（pyrrolidone carboxylic acid: Pca）と尿素（urea）についても解析を行ったところ、天然保湿因子全体の結果を裏付ける変化を伴っていたことが判明した（図3B）。さらに水分保持量（water content）についても外用していた右側で優位に低下しており、角層直下の

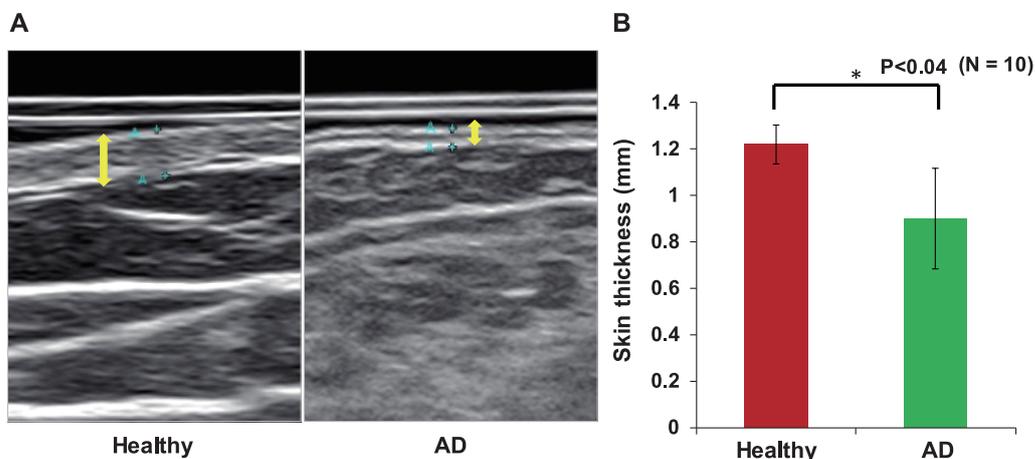


図1 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認  
 (A, B) 長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について、超音波を用いて測定・比較した。

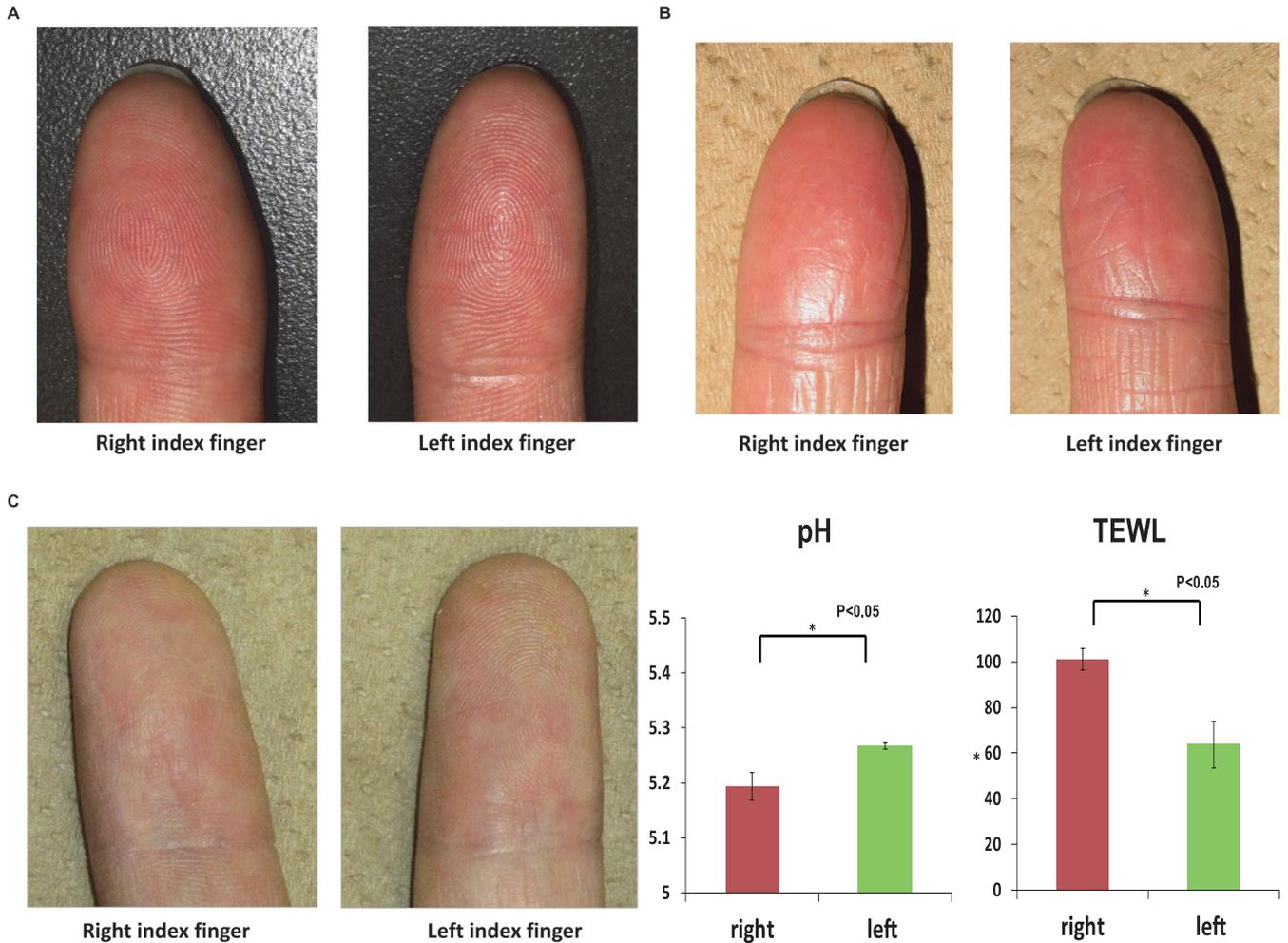


図2 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

左右の指腹の臨床像を示す(A:健康者、B:アトピー性皮膚炎患者。両手を用いて外用を継続。C:アトピー性皮膚炎患者。右手のみを用いて外用を継続)。D:図2C患者におけるpHとTEWLの手指の左右差を示す。

顆粒層を位置する部位からも角層厚の低下を示す結果であった(図3C)。

#### 4. 考察

皮膚のバリア機能は、天然保湿因子の含有量、角層含水量、経皮的角質水分蒸散量などで総合的に評価する必要がある。また、皮膚における水分・アミノ酸・脂質など各成分の測定は、光工学による計測技術の進歩によって著しく発展している。従来、テープストリッピングなどによる皮膚剥離を行った後に蛋白量などを測定していたのに対し、共焦点ラマン分光装置の出現によって角層内の深さ分布や薬剤の皮膚への浸透性を非侵襲かつ無標識に高感度で詳細な解析が可能となった。特にヒト検体においては、症状に苦しんでいる皮膚の状態そのままを短時間で測定できることに加え、皮膚生検や皮膚剥離などの検体採取時の影響をほぼ受けることなく評価できるように進歩してきている。長期間のステロイド外用剤使用においては、皮膚の局所副

作用は皮膚萎縮をはじめとして毛細血管拡張、潮紅、酒皸様皮膚炎、ステロイド紫斑、痤瘡、多毛、感染症の増悪などが従来知られており、図1のとおり今回超音波検査を併用することで再認識できた。さらに、比較的皮膚構造の厚い手指を用いて同一個体内で長期間のステロイド外用剤使用における評価を行えたことは貴重な機会であり、ステロイド外用によって皮膚の菲薄と天然保湿因子が低下していることが判明したことは、生体の最外層の重要な役割の一つである皮膚バリア障害がいかに低下し、感染症の増悪の一因となっているかが示されていると考えている。アトピー性皮膚炎患者における皮膚免疫バランスは、フィラグリン蛋白の発現低下にともなって生じるpHの低下、続発する皮膚バリア機能異常、付随して生じるTh2よりシフトすると考えられる各種サイトカインなどのアレルギー反応が複雑にからみあっている(図4)<sup>6,7)</sup>。ステロイド外用剤の使用は上記における炎症反応を抑制する効果的な治療法であることは間違いがないが、長期使用や誤った乱用によ

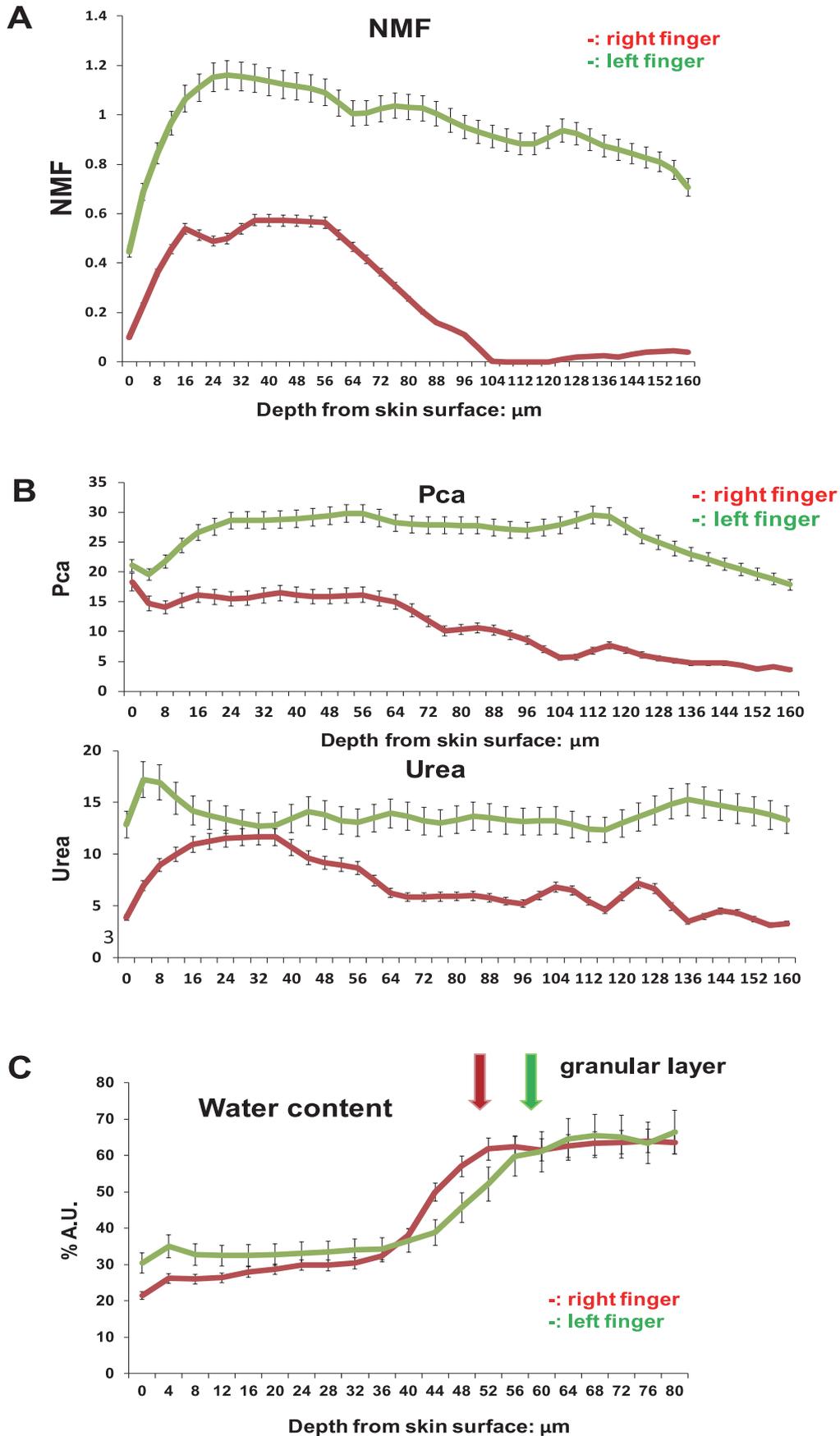


図3 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子について解析  
(A-C) ラマン分光光度計を用いて図2C患者における NMF、pyrrolidone carboxylic acid : Pca、Urea、water content の左右差を示す。

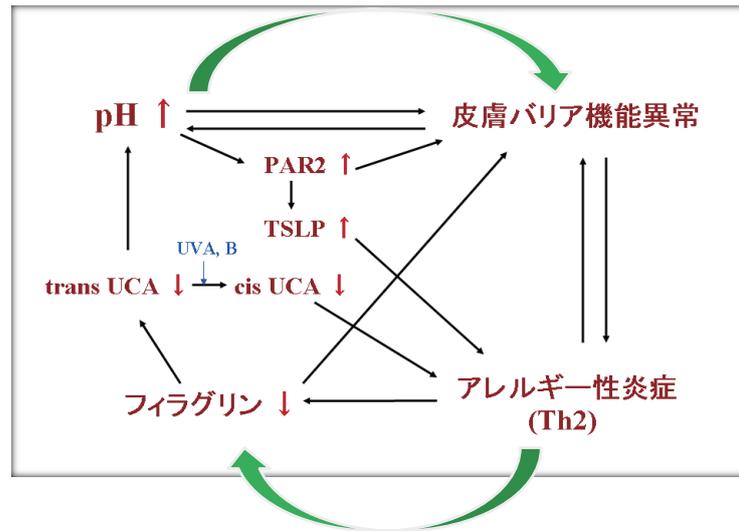


図4 アトピー性皮膚炎患者における皮膚免疫バランス  
皮膚免疫応答を中心としたバリア機能異常、アレルギー性炎症、pH などのサイクル図を示す。

って皮膚の菲薄と天然保湿因子が低下につながり、図4のサイクルをより悪化させる可能性があることが今回の研究によってより鮮明になった。今回の研究で更に詳細な解明を行うことによって新たな側面で迫れたのみならず、健常皮膚をもつヒトの経時的な変化についても迫っていきたいと考えている。

#### (引用文献)

- 1) Osawa R, Konno S, Akiyama M, et al. Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma: JID, 130, 2834-2836, 2010.
- 2) Tanizaki H, Nakashima C, Shimizuhira C et al. Performance comparison of a novel intradermal injection system with the Mantoux technique: J Dermatol Sci., 79, 310-313, 2015.
- 3) Amano W, Nakajima S, Kunugi H, et al. The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling: J Allergy Clin Immunol., 136, 667-677, 2015.
- 4) Egawa M, Tagami H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration: Br J Dermatol., 158, 251-260, 2008.
- 5) 古江増隆, 佐伯秀久, 古川福実, 他6名: アトピー性皮膚炎診療ガイドライン: 日皮会誌, 119, 1515-1534, 2009
- 6) Demerjian M, Choi EH, Man MQ et al. Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis: Exp Dermatol., 18, 643-649, 2009.
- 7) Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C et al. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation: J Biol Chem., 282, 4021-4032, 2007.