

<令和6年度助成>

経皮的乳酸菌投与によるアトピー性皮膚炎マウスモデルの バリア機能への影響研究

山本 貴和子¹⁾・神保 智里¹⁾・大矢 幸弘^{2,3)}

(¹⁾ 国立研究開発法人 国立成育医療研究センター アレルギーセンター
²⁾ 名古屋市立大学大学院 医学研究科 環境労働衛生学、³⁾ 藤田医科大学 ばんだね病院 総合アレルギー科)

背景

アトピー性皮膚炎 (AD: atopic dermatitis) の予防や治療において、乳酸菌をはじめとしたプロバイオティクスが効果的である可能性が示唆されている。母体や乳幼児への経口投与におけるエビデンスは確立されつつあるが、外用の効果についての報告はまだ少ない。Immuno-LP20 は、加熱処理した *Lactobacillus plantarum* (HK-L-137) を用いた経口乳酸菌製剤であるが、投与によってドライスキンマウスモデルにて経表皮水分蒸散量 (TEWL) を減少させる効果や、食物アレルギーマウスモデルで血清 IgE 値を減少させるなどの効果が認められてきた。そこで今回我々は、AD マウスモデル (NC/Nga マウス、皮膚炎自然発症) を用いて、乳酸菌製剤を経皮的に投与することによる、AD 所見や免疫学的特徴や皮膚バリア機能への影響を検討した。

方法

NC/Nga マウス、10 週齢 (皮膚炎自然発症) の雄 30 匹を入荷し、体重測定、皮膚炎観察および掻き行動測定を行い、11 週齢で 7 匹ずつ 3 群に振り分けた。28 日間にわたって、Vehicle 群にはエタノールを 50 μ L/day、乳酸菌塗布群には乳酸菌製剤 Immuno-LP20 を 5 μ g/50 μ L/body/day 塗布し、乳酸菌経口投与群には乳酸菌製剤 Immuno-LP20 を 50 mg/10 mL/kg/day 経口投与した。体重測定を週 1 回、皮膚炎観察および TEWL 測定を 2 週間に 1 回、掻き行動測定を投与開始 4 週間後に行い、投与期間終了後に採血および皮膚採取を行った。得られた血清中の IgE 抗体濃度を測定し、採取した皮膚の H.E. 標本を作製して病理組織学的検査を行った。

皮膚炎は表 1 のスコアに沿って評価した。TEWL はババースキャン (AS-VT100RS; 日本アッシュ株式会社) を用いて、掻き行動は掻痒測定システム (MicroAct Ver. 2.15A; 株式会社ニューロサイエンス) を用いて測定した。

表 1 皮膚炎スコア

所見	スコア		
	0	1	2
発赤 掻爬痕	なし	1/3 未満の面積にあり (散在)	1/3 以上の面積にあり (散在)
浮腫 苔癬化、肥厚	なし	1/3 未満の面積にあり	1/3 以上の面積にあり
出血 痂皮形成	なし	1/3 未満の面積にあり (散在)	1/3 以上の面積にあり (散在)
糜爛	なし	1/3 未満の面積にあり	1/3 以上の面積にあり
落屑	なし	1/3 未満の面積にあり (散在)	1/3 以上の面積にあり (散在)

各値は、群ごとに平均値および標準偏差を算出し、SAS (Ver. 9.4 ; SAS Institute Inc.) を用いて検定を実施した。Vehicle 群と乳酸菌塗布群、Vehicle 群と乳酸菌経口投与群のそれぞれの群間で、Mann-Whitney U 検定 (Wilcoxon rank-sum test) を行った。また、それぞれの群の投与前値と各時点の値について、Wilcoxon の符号付き順位検定を行った (P<0.05 を有意差あり)。

結果

1. 一般状態

投与期間中、Vehicle 群および乳酸菌塗布群では、一般状態の変化はみられなかった。乳酸菌経口投与群の 1 例では、Day 14 から下腹部の腫瘤と陰茎の突出がみられたが、偶発的な所見であり、その他の異常や大きな体重減少を伴わなかったことから、皮膚炎等の評価には影響しないものと考えた。

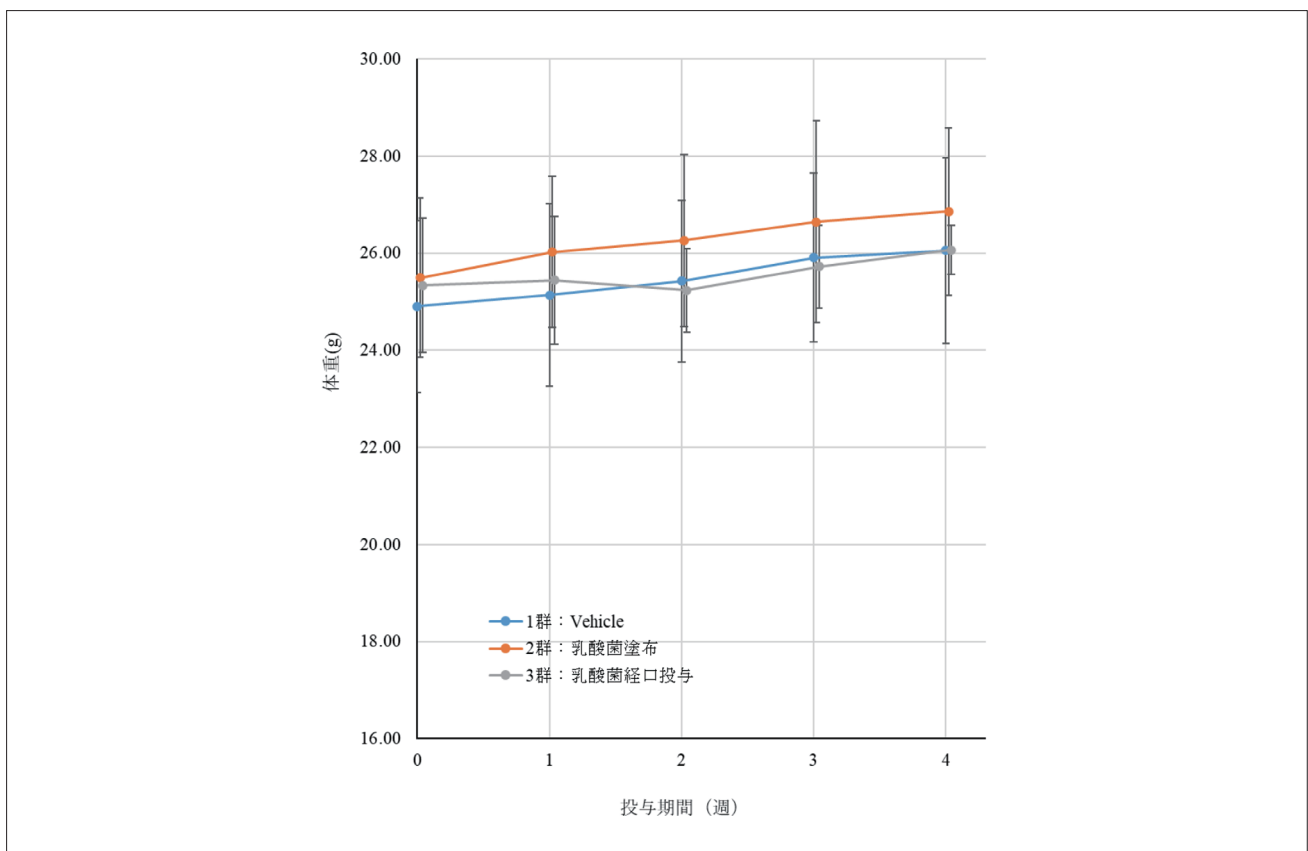


図1 体重

表2 体重変化

群	投与経路	投与量	匹数		投与期間 (週)					
					0	1	2	3	4	
1	Vehicle	塗布	50 μ L/body	7	Mean	24.90	25.14	25.42	25.91*	26.06
					S.D.	1.77	1.88	1.67	1.73	1.91
2	乳酸菌塗布	塗布	5 μ g/50 μ L/body	7	Mean	25.49	26.02	26.26	26.65	26.85
					S.D.	1.64	1.56	1.78	2.08	1.73
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	7	Mean	25.33	25.44	25.24	25.72	26.06
					S.D.	1.38	1.32	0.86	0.85	0.50

*: P<0.05, 投与開始前との間に有意差あり (Wilcoxon signed rank test)

2. 体重

投与期間中の体重を図1、表2に示した。Vehicle群では、経時的に緩やかな体重増加がみられ、投与開始3週間後には、投与開始前と比較して有意に高値であった。乳酸菌塗布群でも、経時的に緩やかな体重増加がみられたが、いずれの時点も投与前と比較して有意な差は認められなかった。乳酸菌経口投与群では、投与開始2週間後にわずかに体重減少した後に増加がみられ、いずれの時点も投与前と比較して有意な差は認められなかった。なお、群間の比較において、乳酸菌塗布群および乳酸菌経口投与群

ともに、Vehicle群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。

3. 皮膚炎スコア

皮膚炎スコアを図2、表3に示した。Vehicle群および乳酸菌経口投与群の皮膚炎スコアには経時的にわずかな減少がみられた。一方、乳酸菌塗布群の皮膚炎スコアには、明らかに経時的な減少がみられた。なお、群間の比較および投与開始時との比較において、乳酸菌塗布群と乳酸菌経口投与群のいずれも統計学的に有意な差は認められなかった。

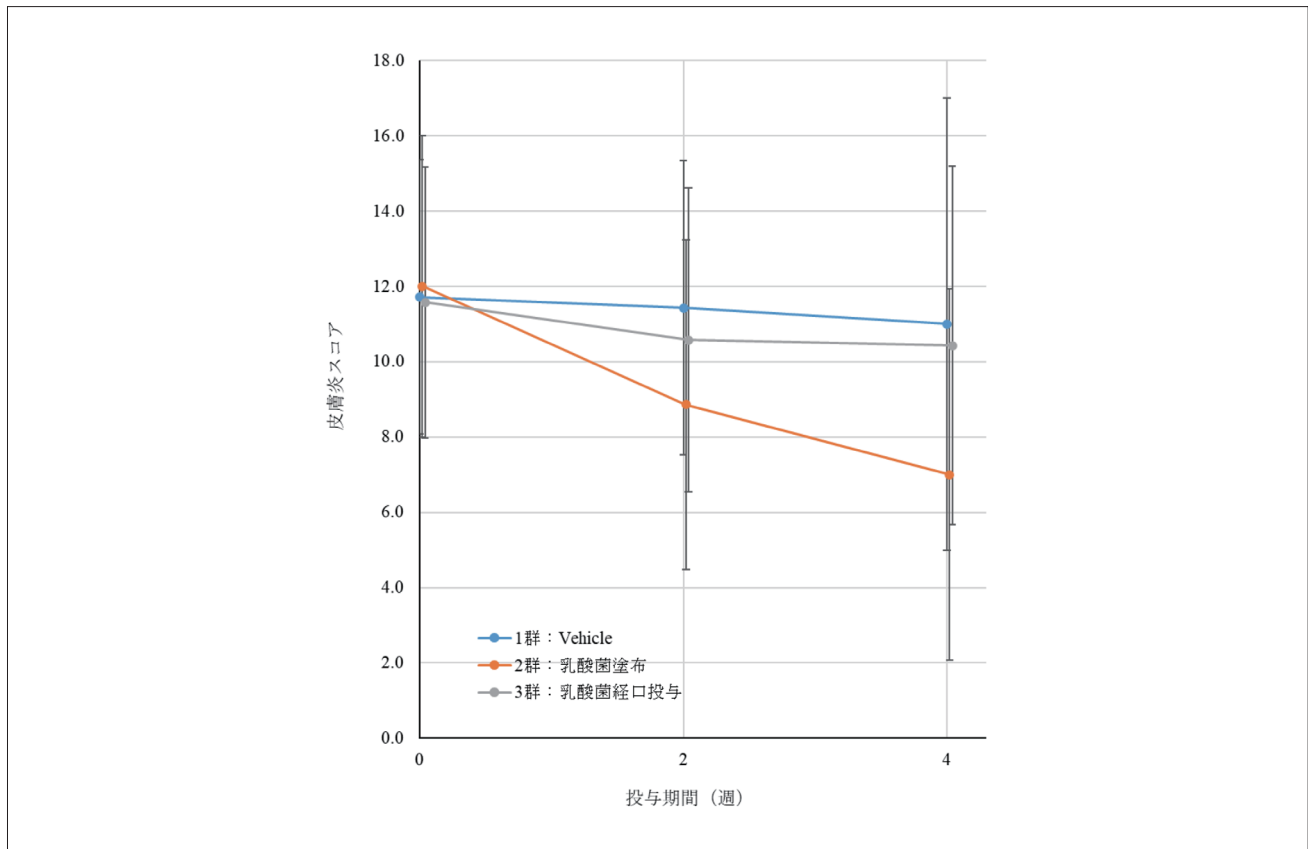


図2 皮膚炎スコア

表3 皮膚炎スコア変化

群	投与経路	投与量	匹数	投与期間 (週)				
				0	2	4		
1	Vehicle	塗布	50 μL/body	7	Mean	11.7	11.4	11.0
					S.D.	3.6	3.9	6.0
2	乳酸菌塗布	塗布	5 μg/50 μL/body	7	Mean	12.0	8.9	7.0
					S.D.	4.0	4.4	4.9
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	7	Mean	11.6	10.6	10.4
					S.D.	3.6	4.0	4.8

4. 経表皮水分蒸散量

経表皮水分蒸散量を図3、表4に示した。Vehicle群では、経表皮水分蒸散量の経時的な減少がみられ、投与開始4週間後に投与開始前と比べて統計学的に有意な減少が認められた。乳酸菌塗布群および乳酸菌経口投与群でも経表皮水分蒸散量の経時的な減少がみられ、Vehicle群との間には統計学的に有意な差は認められなかったものの、両群ともに、投与開始2週間後に各群7例中5例で大きく減少し、投与開始2週間後と4週間後に投与開始前と比べて統計学的に有意な減少が認められた。

5. 掻き行動

掻き行動回数(Beats)を図4、表5に示した。Vehicle群と乳酸菌塗布群の掻き行動は、投与開始4週間後に減少がみられた。乳酸菌経口投与群では、7例中2例で投与開始4週間後に掻き行動が大きく増加し、群の平均値は投与開始前と比べて高値となった。なお、群間の比較および投与開始前との比較において、乳酸菌塗布群と乳酸菌経口投与群のいずれも統計学的に有意な差は認められなかった。

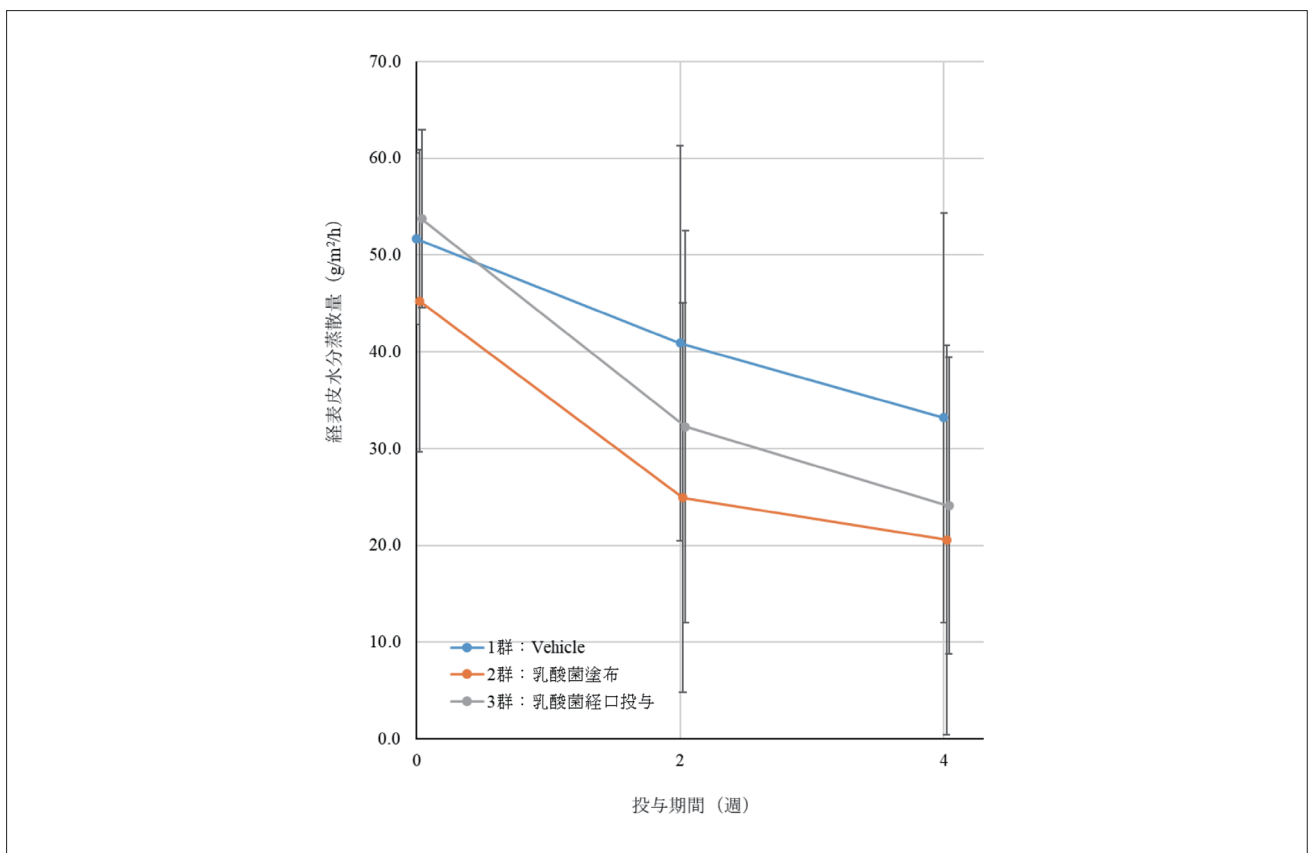


図3 経表皮水分蒸散量

表4 経表皮水分蒸散量変化

群	投与経路	投与量	匹数		投与期間(週)			
					0	2	4	
1	Vehicle	塗布	50 μL/body	7	Mean	51.7	40.9	33.2*
					S.D.	8.9	20.4	21.2
2	乳酸菌塗布	塗布	5 μg/50 μL/body	7	Mean	45.3	24.9*	20.6*
					S.D.	15.6	20.1	20.1
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	7	Mean	53.8	32.3*	24.1*
					S.D.	9.2	20.2	15.3

*: P<0.05, 投与開始前との間に有意差あり (Wilcoxon signed rank test)

6. 血清中 IgE 抗体濃度

血清中 IgE 抗体濃度を図 5、表 6 に示した。Vehicle 群、乳酸菌塗布群および乳酸菌経口投与群の血清中 IgE 抗体濃度は同程度の値であり、群間に統計学的に有意な差は認められなかった。

7. 頸背部皮膚の病理組織学的検査

頸背部皮膚の病理組織学的検査の結果を表 7 に示した。

Vehicle 群では、表皮の肥厚、炎症性細胞の浸潤、皮下線維増生および痂皮形成 / 過角化が認められた。

乳酸菌塗布群では、これらの変化の抑制がみられた。乳酸菌経口投与群では、痂皮形成 / 過角化の抑制はみられなかったものの、表皮の肥厚、炎症性細胞の浸潤および皮下線維増生の若干の抑制がみられた。

考 察

乳酸菌製剤 Immuno-LP20 の経口および経皮投与は、AD モデルマウスにおいて皮膚状態を改善させた。また、経口投与と比較して経皮投与が、有意に AD の皮膚炎症状、TEWL および皮膚組織の変化を

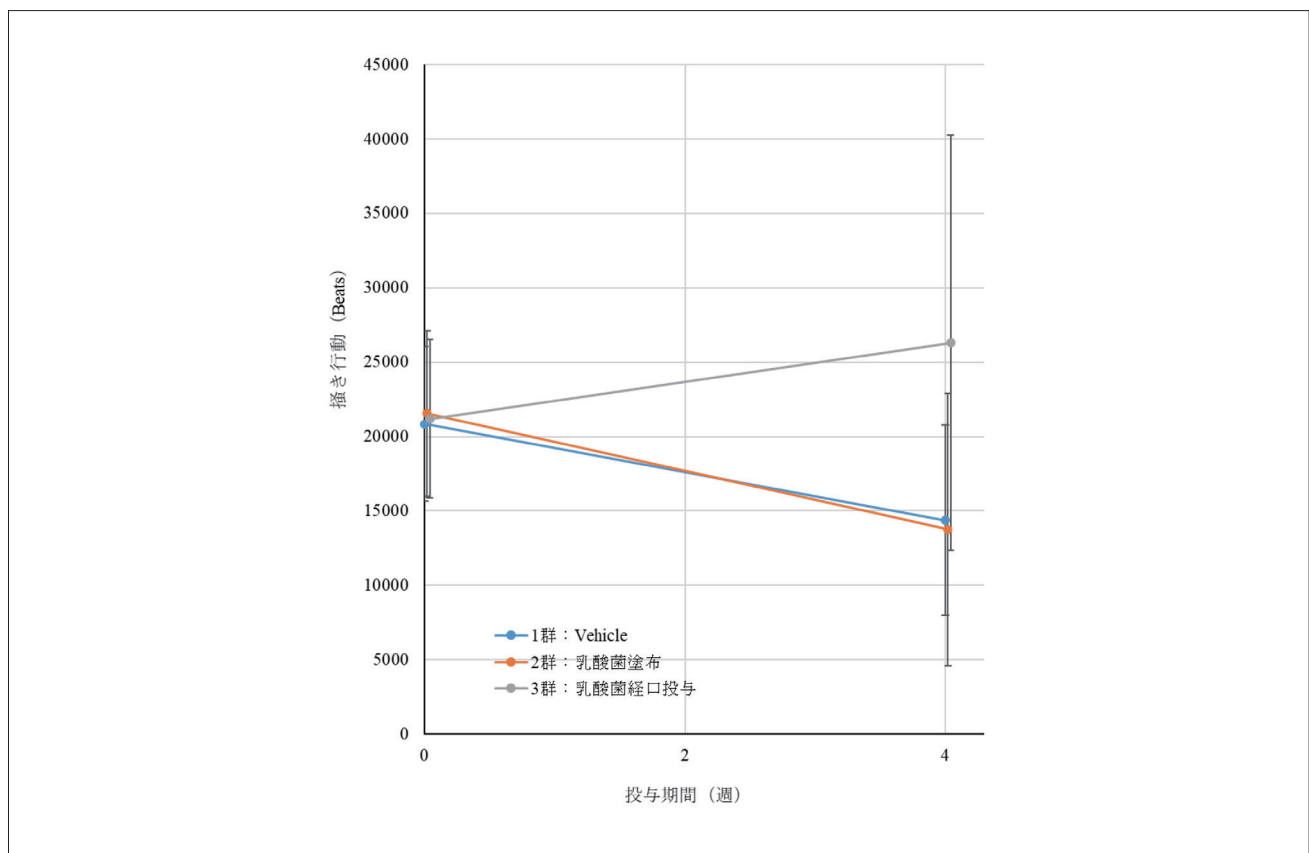


図 4 搔き行動

表 5 搔き行動変化

群	投与経路	投与量	匹数	投与期間 (週)		
				0	4	
1	Vehicle	塗布	50 μ L/body	7	Mean	20844
					S.D.	5189
2	乳酸菌塗布	塗布	5 μ g/50 μ L/body	7	Mean	21553
					S.D.	5581
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	7	Mean	21182
					S.D.	5326
						14367
						6387
						13755
						9141
						26301
						13957

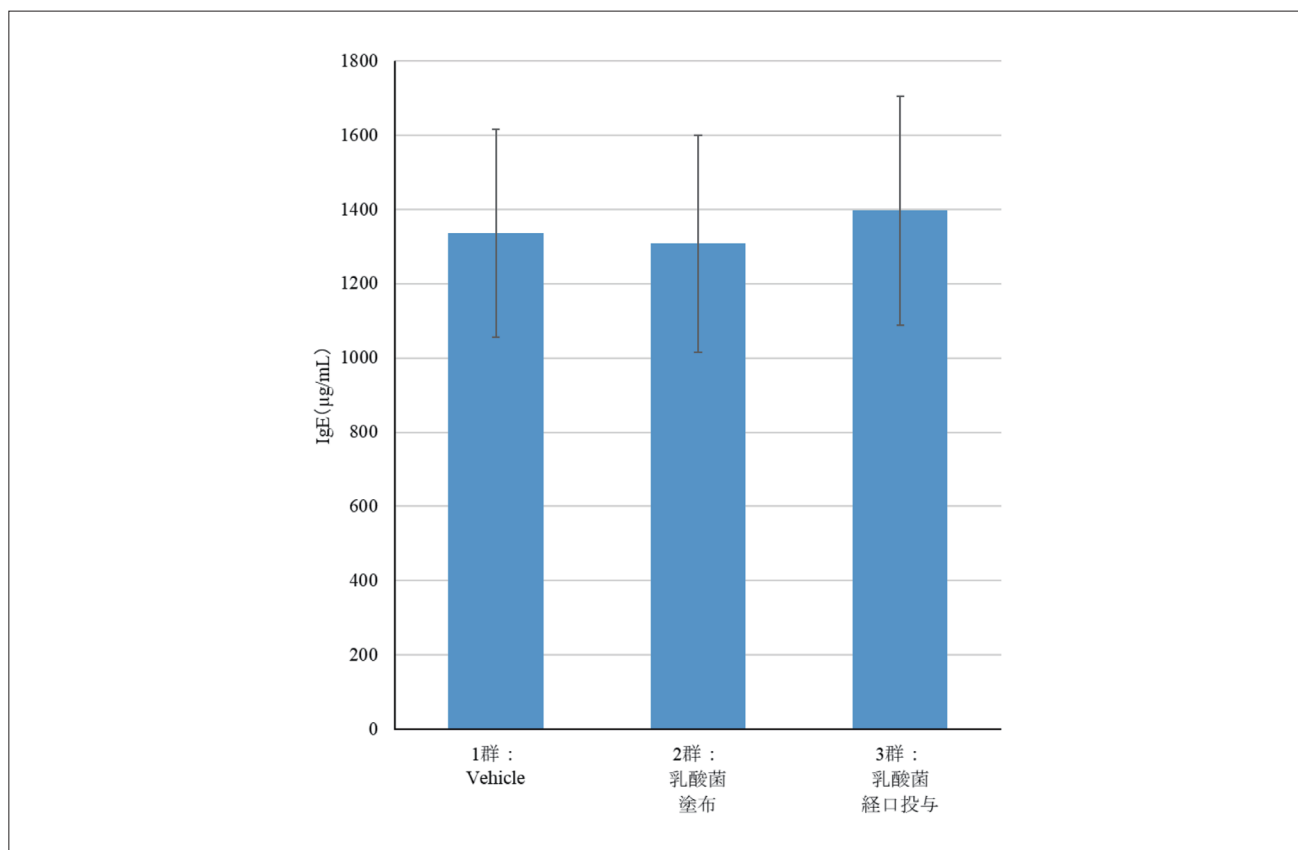


図5 血清IgE抗体価

表6 血清IgE抗体価

群	投与経路	投与量	匹数	血清中IgE (µg/mL)
1	Vehicle	塗布	50 µL/body	Mean S.D.
2	乳酸菌塗布	塗布	5 µg/50 µL/body	Mean S.D.
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	Mean S.D.

表7 病理学的所見

群	投与経路	投与量	匹数	変化強度	H.E. 染色標本による所見 (発生例数)			
					表皮の肥厚	炎症性細胞の浸潤	皮下線維増生	痂皮形成 / 過角化
1	Vehicle	塗布	50 µL/body	—	2	2	3	3
				±	0	0	0	0
				+	1	1	3	4
				++	4	4	1	0
2	乳酸菌塗布	塗布	5 µg/50 µL/body	—	3	3	5	6
				±	2	2	1	0
				+	1	1	0	0
				++	1	1	1	1
3	乳酸菌経口投与	経口	50 mg/10 mL/kg	—	1	3	4	1
				±	3	1	0	2
				+	2	2	3	4
				++	1	1	0	0

変化強度： —：正常範囲内、±：軽度、+：中等度、++：強度

抑制した。

プロバイオティクスがADの予防および治療に有効であるという報告は数多く存在し、メタアナリシスにおいてもその有効性が示されている。外用による効果も研究されているが、そのエビデンスは経口投与に比べてはるかに限られている。Herbertらは、外用が皮膚の微生物多様性を回復させる可能性を示した。健常皮膚由来の常在菌である *Staphylococcus hominis* A9, *Roseomonas mucosa*, *B244 ammonia-oxidizing bacteria* などのいくつかの菌株は、アトピー性皮膚炎患者において湿疹の重症度を改善し、かゆみを軽減することが報告されている。本研究で用いた *Lactobacillus* 属菌は皮膚の常在菌とはみなされていないが、出生時に母体腔内から新生児皮膚に定着し、健常者の皮膚マイクロバイオームにも検出されることから、「キーストーン・マイクロバイオーム」である可能性が示唆されている。実際、*Lactobacillus reuteri* を含む外用プロバイオティクス軟膏や、*Lactobacillus* 属菌を用いたプロバイオティクス浴は、AD患者においてSCORADスコアを改善したと報告されている。さらに、*Lactobacillus sakei* はAD患者で経表皮水分蒸散量 (TEWL) およびかゆみを改善し、IgE値や *Staphylococcus aureus* の増殖を抑制する可能性も示唆された。

本研究では、*Lactobacillus plantarum* の外用および経口投与のいずれもが、TEWLの改善とともに、表皮肥厚、炎症細胞浸潤、皮下線維化といった組織学的変化を抑制した。これらの結果は既報の知見と概ね一致している。これまでに、プロバイオティクスの外用と経口投与の有効性を直接比較した研究は存在せず、本研究が初の報告である。我々の研究では、外用投与の方が経口投与よりも有意に湿疹スコアを低下させた。理由の一つとして、外用は腸一皮

膚軸を介するよりも速やかに皮膚へ作用し、吸収・代謝・排泄の影響を受けずに局所でより高濃度に作用できるためと考えられる。*Lactobacillus plantarum* は加熱死菌であるが、Toll様受容体2/6を介してIL-12産生や抗菌ペプチド誘導を促すことで、特に *Staphylococcus aureus* とのバランスに影響を与え、皮膚バリア機能を改善した可能性がある。

本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、マウスの数が比較的少なく、統計的検出力は限定的である。第二に、治療および観察期間が比較的短く、長期投与による効果の差を十分に評価できていない可能性がある。第三に、本研究は動物モデルで行われたため、ヒトでの検証、特にランダム化比較試験による確認が今後必要である。

結 論

本研究によって、乳酸菌製剤Immuno-LP20の外用は、経口投与と比較して有意に皮膚バリア機能を改善する可能性が示された。経口製剤だけでなく外用製剤も有用であれば、より幅広い治療選択肢を提供できる可能性がある。今後は、効果的かつ安定した配合の開発を進め、ヒトでの臨床応用を目指した研究が望まれる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。本研究は日本エスエルシー株式会社が受託研究を実施しました。

Topical Lactobacillus Versus Oral Administration for Improving Skin Barrier Function in Atopic Dermatitis

Kiwako YAMAMOTO-HANADA¹⁾, Chisato JIMBO¹⁾, and Yukihiro OHYA^{2,3)}

¹⁾ Allergy Center, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

²⁾ Department of Occupational and Environmental Health,
Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University, Aichi, Japan

³⁾ Division of General Allergy, Bantane Hospital, Fujita Health University, Aichi, Japan

Background: Probiotics have been considered to be potentially beneficial in the treatment of atopic dermatitis (AD). Evidence regarding the topical application of probiotics is still scarce compared with oral administration, and whether it is more effective remains to be determined.

Methods: The NC/Nga mouse was used as an AD model. We administered Immuno-LP20 (containing *Lactobacillus plantarum* HK-L-137) either by topical application or par oral, or vehicle as a control for 4 weeks. Afterwards, we evaluated changes in the following outcomes: body weight, eczema score, trans-epidermal water loss (TEWL), and scratching behavior. We also checked serum IgE levels and pathological changes after 28 days.

Results: A total of 21 AD model mice were included in the analysis, with 7 mice in each group. While the eczema score (mean \pm SD) improved significantly after 4 weeks in the topical application group (from 12.0 ± 4.0 to 7.0 ± 4.9), there were no statistical differences between the groups. TEWL declined in all groups, while scratching behavior improved in both the vehicle and topical application groups. However, no significant differences were observed between the groups. There were no longitudinal changes in serum IgE levels in any group. In skin histological sections obtained after the treatment period, crust formation/hyperkeratosis were observed in the vehicle group, but were significantly suppressed in the topical application group.

Conclusion: Topical application of Immuno-LP20 may improve skin barrier function in an AD mouse model more effectively than oral administration.