

氏名（本（国）籍）	島田 健一郎（東京都）
主指導教員名	東京農工大学 教授 岩崎 利郎
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第311号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	犬の皮膚バリア機能に関する研究
審査委員	主査 岐阜大学 教授 深田 恒夫 副査 帯広畜産大学 教授 山田 一孝 副査 岩手大学 教授 安田 準 副査 東京農工大学 教授 岩崎 利郎 副査 岐阜大学 教授 鬼頭 克也

## 論文の内容の要旨

皮膚はアレルゲンや微生物など外界からの種々の刺激から生体を守り、体内の水分蒸散を制御している。皮膚の最外層に位置する角質層は、バリア機能として重要な役割を担っている。角質層は脱核扁平化した角質細胞とその間をセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸などから成る角質細胞間脂質が埋めることにより緻密な層構造を形成し、バリア機能を発揮する。

近年、アトピー性皮膚炎（AD）患者において皮膚バリア機能の低下とともにセラミドやフィラグリンの産生が十分に行われていないことが明らかになったが、犬の正常およびADにおけるバリア機能についての知見は非常に乏しい。またヒトでは皮膚のバリア機能の定量的な評価方法として非侵襲的な方法が用いられているが、犬におけるバリア機能の非侵襲的評価法は知られていない。本研究では犬の皮膚バリア機能を理解するために、非侵襲的で定量的な測定方法を研究するとともに、皮膚バリア機能に重要な役割を果たしていると考えられる角質細胞間脂質について解析を実施した。

まず第2章では犬の皮膚バリア機能を定量的に評価するために、ヒトの皮膚バリア機能の指標として知られる経表皮水分蒸散量（TEWL）が犬にも応用可能かどうかを検討した。健康犬10頭の腰部と鼠径部の皮膚にテープストリッピング（TS）を行い角質層を除去すると、部位に関わらずTS回数に伴い角質層の厚さは減少し、フルオレセイン色素の角質層への浸透性も増加した。またTSを5, 10, 15, 20回実施した皮膚では、いずれも未処理の部位と比較してTSの回数に伴いTEWLが有意に上昇した。このことからTEWLが犬の皮膚バリア機能を反映すると示唆された。

次に第3章では、犬の TEWL 測定における影響因子について検索した。ヒトでは皮膚バリア機能と角質水分量が密接に関連していることが知られているため、同一部位で TEWL と併せて角質水分量も測定した。健常犬 33 頭を用いて性別、犬種、月齢、体重、測定季節および測定部位による違いについて検討した。TEWL に関しては性別、犬種および測定季節（7 月および 2 月）の違いによって差はなく、月齢および体重とも相関関係は認められなかった。しかし測定部位の比較では、頭部と頸部の TEWL が腰部、腋窩部および鼠径部よりも有意に高く、さらに腰部が鼠径部よりも有意に高い TEWL を示した。以上の結果から、犬の TEWL は測定する部位により絶対値に差があると考えられた。また角質水分量に関しては、性別および犬種に差はなく、月齢および体重との間に相関関係は認められなかった。しかし、2 月に測定した皮膚の角質水分量が 7 月よりも有意に低下しており、測定環境湿度も同様に 7 月より 2 月で低かった。さらに測定部位による違いでは、頭部、頸部および腰部の角質水分量は腋窩部と鼠径部よりも有意に低下していた。このことから犬の角質水分量は測定環境の湿度と測定部位により差が生じることが示された。

ヒトの AD 患者では、原因あるいは病態の一つとして皮膚のバリア機能が低下していると考えられ、病変部のみならず非病変部の皮膚でもバリア機能障害を起こしていることが知られている。

そこで第4章では、AD 犬の病変部、非病変部および健常犬の鼠径部皮膚の TEWL と角質水分量を比較し、犬の AD とバリア機能の関連について検討した。AD 犬群の病変部および非病変部の TEWL は健常犬群と比較して有意に増加していた。また AD 犬の病変部の角質水分量は健常犬群と比べて有意に低下していた。以上より、AD 犬では非病変部皮膚においても健常犬よりバリア機能が低下していることが示され、皮膚バリア機能低下が AD の発症あるいは症状悪化の一因となっている可能性が示唆された。

第5章では健常犬と AD 犬の角質細胞間脂質の構成を明確にするために、特にセラミド、コレステロールおよび遊離脂肪酸について薄層クロマトグラフィー法による脂質解析を行った。AD 犬群の病変部および非病変部皮膚における脂質中のセラミドの相対比は健常犬群と比べて有意に低かったが、コレステロールおよび遊離脂肪酸については同比較にて有意差はなかった。また第4章で得られた TEWL と本章で解析した3種の角質細胞間脂質との関連について調べた結果、セラミドでのみ TEWL と負の相関関係を認めた。このことから、AD 犬の病変部および非病変部皮膚では、健常犬に比べて角質細胞間脂質中に占めるセラミド成分の割合が減少していることが示唆された。また角質層に依存するセラミド量は、AD 犬ではバリア機能低下と密接に関連すると考えられた。

本研究により、TEWL は犬の皮膚バリア機能を知るために有用な指標であり、その測定の際は測定部位を同一にすべきであることが示された。また、AD 犬の皮膚バリア機能低下の要因としてセラミド成分の減少が関連する可能性が示唆された。これら犬の皮膚バリア機能に関する知見は、犬の AD の発症原因を解明するうえでも重要な基礎的資料を提供するものである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は犬においてはじめて皮膚バリア機能の非侵襲的評価法を明確にし、また犬のアトピー性皮膚炎 (AD) の皮膚バリア機能障害を客観的に証明すると

ともに、脂質解析の手法を用いて皮膚バリア機能と角質細胞間脂質の関連について研究したものである。

最初に、ヒトの皮膚バリア機能の指標として知られる経表皮水分蒸散量 (TEWL) が犬の皮膚でも応用可能かどうか検討した。テープストリッピング (TS) により皮膚の角質層を除去すると、角質層の厚さは減少し、フルオレセイン色素の浸透性が増加した。また、TEWL は TS 回数の増加に伴い有意に上昇した。この結果から TEWL が犬の皮膚バリア機能を反映することを証明している。

次に、健康犬を用い TEWL 測定と角質水分量測定に影響を与える因子について検討している。性別、犬種、月齢、体重、測定季節および測定部位の違いについて調べた結果、TEWL および角質水分量ともに測定部位の違いにより絶対値に差がみられる可能性を示した。また、角質水分量は測定季節によって影響を受けやすいことを見出した。さらに、AD 犬の病変部、非病変部および健康犬の鼠径部皮膚の TEWL と角質水分量をそれぞれ比較した結果、AD 犬では病変部および非病変部のどちらの皮膚においても健康犬と比較してバリア機能が低下していることを明らかにした。このことから、犬 AD の発症要因および悪化要因の一つとして皮膚バリア機能が関与する可能性が示唆された。

最後に、AD 犬と健康犬の角質細胞間脂質について比較検討した結果、AD 犬の病変部および非病変部皮膚では健康犬群と比べてセラミドの相対比が有意に低いことを示した。また、セラミドが TEWL と負の相関関係があることを観察し、皮膚のセラミド量は AD 犬でのバリア機能低下と密接に関連することを見出した。本研究の知見は、今後の犬における皮膚バリア研究ならびに犬 AD の病態解明に不可欠な基盤となるものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があるものと認めた。

#### 基礎となる学術論文

1) 題 目 : Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog

著 者 名 : Shimada, K., Yoshihara, T., Yamamoto, M., Konno, K., Momoi, Y., Nishifuji, K. and Iwasaki, T.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 70(8) : 841-843, 2008

2) 題 目 : Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis

著 者 名 : Shimada, K., Yoon, Ji-Seon, Yoshihara, T., Iwasaki, T. and Nishifuji, K.

学術雑誌名 : Veterinary Dermatology

巻・号・頁・発行年 : 20(5-6) : 541-546, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Microbial flora in the ears of healthy experimental beagles  
著 者 名 : Aoki-Komori, S., Shimada, K., Tani, K., Katayama, M., Saito, TR. and Kataoka, Y.  
学術雑誌名 : Experimental Animals  
卷・号・頁・発行年 : 56(1): 67-69, 2007
  
- 2) 題 目 : A new method of measuring the transepidermal water loss (TEWL) of dog skin  
著 者 名 : Yoshihara, T., Shimada, K., Momoi, Y., Konno, K. and Iwasaki, T.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 69(3) 289-292, 2007