

イオン導入時の微弱電流による皮膚組織炎症への影響と安全性の検証

徳島大学大学院医歯薬学研究所

小暮 健太郎

Iontophoresis is a non-invasive transdermal drug delivery technology using weak electric current. Although iontophoresis is widely used in beauty field, its safety has not been investigated. From the previous our research, it was predicted that iontophoresis will induce inflammation via activation cell signaling. In this study, we tried to study the effect of weak electric current at iontophoresis on the skin tissue inflammation and safety. The skin cross section after iontophoresis was compared with non-treated skin. There was no difference in skin tissue between before and after iontophoresis. Furthermore, to check the inflammation induction by iontophoresis, the amounts of various mRNAs relating inflammation, such as tumor necrosis factor- α and interleukin (IL) -1 β . Although statistical significant difference was not recognized, mRNAs of inflammatory cytokines was not activated by iontophoresis. Interestingly, anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA showed the tendency to increase after iontophoresis. From these results, it was suggested that iontophoresis does not induce any inflammation in the skin tissue. In conclusion, iontophoresis is safety technology for transdermal drug delivery and skin beauty.

1. 緒言

微弱な電流 (0.3 ~ 0.5 mA/cm²) を用いて皮膚内にイオン性の物質を送達する技術としてイオントフォレシスが知られており、美容領域においては「イオン導入」として一般には認知されている。様々なデバイスが開発されており、美容整形外科等で用いられている。イオントフォレシス(イオン導入)に関しては、これまで低分子薬物を対象とした研究が盛んに行われており、通常切り取った動物皮膚および市販のヒト皮膚をフラント型セルにセットし、上層から皮膚を透過して下層に移行した薬物量を定量する研究が主である。また、現在の国内化粧品企業では、動物個体を用いた研究が行えない状況にある。そのため、「死んだ皮膚」を用いることが多く、皮膚の物理的損傷に関しては検討されているが、生理的影響、特に炎症性サイトカイン産生やシグナル伝達系タンパク質の活性化等は観察することができない。ヒトでモニターする場合も、皮膚表面の発赤くらいしか検討できない。しかしながら、イオン導入における微弱電流の皮膚への影響を検討するには、「生きた皮膚」を用いることが必須であり、特に皮膚組織生理への影響に関しては個体レベルでモニターすることが重要である。インターネット等でイオン導入に関する記事をよく目にするが、すべて「ビタミンC等の美容成分を皮膚内に非侵襲的に導入することができる」という点のみを述べており、イオン導入(微弱電流処理)が皮膚にどのような影響を及ぼすのか、

に関するものは皆無と言ってよい。すなわち、薬学的観点および化粧品開発の観点において、イオン導入の皮膚に及ぼす影響については、ほとんど手付かずと言ってよいのが現状である。

我々は、2005年からイオントフォレシス(イオン導入)の高分子薬物送達への展開に取り組んできた¹⁻³⁾。当初は、他の研究者同様に切り取った(死んだ)皮膚を用いて、低分子薬物(抗炎症剤)の皮膚透過について検討を行っていたが、主たる研究者の専門であったナノ粒子(リポソーム)とイオントフォレシスとの組み合わせを検討する過程において、生きた皮膚(動物個体)を用いた時、それまで不可能であると考えられていた高分子・ナノ粒子が皮膚内に送達可能であることを発見した¹⁻³⁾。従来、イオントフォレシスによる皮膚内への薬物送達機構は、電気的発熱とイオンの動きに伴う水の流れ(電気浸透流)であると考えられていたが、主たる研究者の検討の結果、皮膚組織細胞のシグナル伝達系が活性化され、細胞間隙が開裂することによって発見するに至った⁴⁾。すなわち、微弱電流によって皮膚組織の生理機能が変化することが、イオントフォレシス(イオン導入)による薬物の皮内浸透メカニズムであることが明らかになったわけである。さらに、検討を重ねた結果、微弱電流刺激は、皮膚組織細胞間隙を開裂させるだけでなく、細胞の取り込み機構(エンドサイトーシス)を誘起し、細胞外の物質を細胞内に取り込ませることも発見している⁵⁻⁸⁾。これらのことから、イオントフォレシスにおける微弱電流処理は、皮膚組織・細胞におけるシグナル伝達経路を活性化し、組織レベルおよび細胞レベルでの生理機能を変化させることが明らかとなり、薬物送達に繋がっていることが示唆されている。そのため我々は、上記検討から薬物送達に繋がる細胞シグナル伝達以外にも、微弱電流は様々なシグナル伝達、特に安全性に関与する炎症関連シグナルを活性化するのではないかと考えた。そこで本研究では、美容領



Study of the effect of weak electric current at iontophoresis on the skin tissue inflammation and safety

Kentaro Kogure

Graduate School of Biomedical Sciences,
Tokushima University

域等で汎用されているイオン導入（微弱電流による皮膚処理）が、皮膚組織の生理機能、特に炎症性サイトカインの発現等に与える影響を検討することで、イオン導入（イオントフォレシス）の安全性を検証することを目的とした。

2. 方法

2.1. 微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討

Wister ラット（当初計画では、マウスを予定していたが、mRNA 定量に必要な量の RNA を抽出するために、より大きいラットに変更して行った）背部皮膚の毛を刈り、露出した皮膚上に PBS を浸透させた脱脂綿を置き、その上から心電図用の Ag/AgCl 電極を用いて、これまでの検討で用いてきた条件（0.34 mA/cm²、1 時間）により微弱電流処理を行った。微弱電流処理を施した部分の皮膚を回収し、OCT コンパウンド中で凍結固定させたものをクライオスタットを用いて凍結切片とした。得られた切片をヘマトキシリン・エオシン（HE）によって染色し、染色後の皮膚切片を顕微鏡で観察することで、皮膚の組織学的変化について検討した。皮膚の採取は、微弱電流処理後 3 時間および 24 時間後とし、それぞれ回収した皮膚について組織切片観察を行った。

2.2. 微弱電流処理した皮膚における炎症性サイトカイン mRNA 量の検討

毛を刈った Wister ラットの背部皮膚上に心電図用 Ag/AgCl 電極を置き、微弱電流処理（0.34 mA/cm²、1 時間）

を行った。微弱電流処理を施した部分の皮膚を回収し、キットを用いて RNA を抽出した後、Real-time PCR 法によって炎症性サイトカイン等（インターフェロン（INF）- γ 、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、インターロイキン（IL）-6、IL-1 β 、IL-33、シクロオキシゲナーゼ（COX）-2）および抗炎症性サイトカイン（IL-10、腫瘍成長因子（TGF）- β ）の mRNA 量を定量解析した。皮膚の採取は、微弱電流処理後 3 時間および 24 時間後とし、各 5 匹以上のラットから回収した RNA について解析を行った。さらに、より強力な電流強度（1.0 mA/cm²、1 時間）において処理したラット皮膚について、処理後 3 時間におけるこれら炎症性サイトカイン等（IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β ）の mRNA 発現を定量解析した。

3. 結果

3.1. 微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討

微弱電流処理後、HE 染色を行った皮膚切片について顕微鏡観察したところ、写真で示すように、3 時間後の皮膚切片は、未処理皮膚と同じであり、微弱電流処理による皮膚組織への目立った影響は確認されなかった（図 1A）。さらに、微弱電流処理 24 時間後の皮膚についても同様に HE 染色した組織切片観察を行ったが、24 時間後においても未処理皮膚と同じであり、微弱電流処理による組織への影響は認められなかった（図 1B）。アトピー性皮膚炎や乾癬、紫外線障害等の炎症病態では、皮膚表皮領域の肥厚化が確認されるが、微弱電流処理後の皮膚においては、そのよう

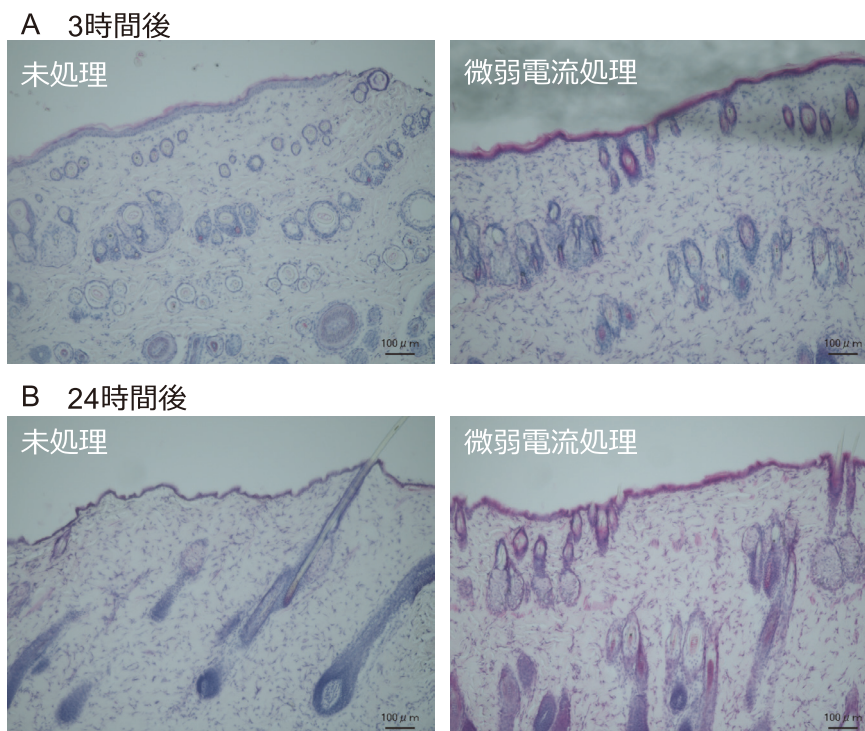


図1

な変化は認められなかった。

3. 2. 微弱電流処理した皮膚における炎症性サイトカイン mRNA 量の検討

微弱電流処理した皮膚中の RNA を回収し、Real-time PCR 法によって炎症性サイトカイン等の炎症関連因子 (INF- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-33、COX-2 および抗炎症性サイトカイン (IL-10、TGF- β) の mRNA 量を定量解析した。微弱電流処理 3 時間後における皮膚組織中の各因子 mRNA を比較すると、それぞればらつきが大きいですが、以下のようなようになった。COX-2 および IL-6 は、変動は見られなかった。IL-1 β 、IL-33、TGF- β 、TNF- α は、若干減少しているようであった。一方 IL-10 は、増加する傾向が認められた。さらに、微弱電流処理 24 時間後における皮膚中の各因子 mRNA について定量したところ、3 時間では若干減少していた IL-1 β 、IL-33、TGF- β 、TNF- α は、3 時間時点よりも多くなり、IL-1 β と TGF- β は、コントロールレベル、TNF- α は、コントロールよりも若干高めになっていた。3 時間において増加傾向が認められた IL-10 は、やや減少していた。しかし、これらの変動は、ばらつきが大きいので、いずれも統計的に有意な変化ではなかった。これらのことから、通常イオン導入処理条件 (0.3–0.5 mA/cm²) では、大きな負の影響は示さないことが示唆されたため、当初計画にも示したように、通常条件よりも強力な電流強度 (1.0 mA/cm²、1 時間) による処理の皮膚炎症に及ぼす影響を追加検討した。ここでは、IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β に絞って電流処理 3 時間後の皮膚における mRNA 発現量の定量解析を行った。その結果、検討したすべてのサイトカイン mRNA 発現量が大きく増加することが明らかとなった。

4. 考 察

我々のこれまでの検討によって、イオン導入 (イオントフォレシス) 処理時の微弱電流が、組織細胞におけるシグナル伝達系を活性化し、様々なタンパク質のリン酸化を誘起することで、細胞間隙の開裂やエンドサイトーシスが誘導されることを見出してきた^{4–9)}。そのため、イオン導入時の微弱電流は、皮膚組織における炎症性サイトカイン遺伝子等の発現にも影響を及ぼすのではないかと考えるに至り、本研究を実施することとした。過去の検討において、ラット皮膚に炎症を誘起してアトピー性皮膚炎モデルおよび乾癬モデルを作成した場合、皮膚の表皮層の顕著な肥厚化が認められていたため、微弱電流処理によって皮膚に炎症が誘起される場合には、同様に皮膚組織の肥厚化が見られるのではないかと考え、微弱電流処理の有無による皮膚組織像の比較を行った。その結果、微弱電流処理 24 時間

後においても、皮膚組織に目立った変化は認められなかったことから、微弱電流処理による顕著な炎症反応等は誘起されないことが示唆された。

このことを、より厳密に評価するために、炎症に関与する種々の因子の遺伝子発現について定量解析を試みた。今回は、炎症性サイトカインとして INF- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-33、炎症関連因子として COX-2、抗炎症性サイトカインとして IL-10、TGF- β に着目した。本研究で着目した因子であるが、以下のような特徴を有する。IL-1 β は、アトピー性皮膚炎において、アレルギー感作性の亢進と角質層内 IL-1 β の増加との間に関連性があると報告されている。IL-33 は、IL-33 が著しく増大したマウスはアトピー性皮膚炎様症状を発症することが報告されている。掻破された皮膚が、IL-33 を分泌し Th2 炎症を引き起こすことも報告されている。TNF- α は、関節リウマチや乾癬に関与することが知られている。また、I 型および III 型コラーゲンの産生を抑制する特性を有することも報告されている。IL-6 は、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカイン両方の作用を有する。TNF- α や IL-1 によって産生が誘導されるが、それらの活性化を抑制するとともに、それらの内因性阻害物質 (sTNFR や IL-1ra) の産生を高める。COX-2 は、炎症時にサイトカインや増殖因子等の刺激により発現が誘導されるため、COX-2 を介して炎症反応を進行させる PGE2 や PGI2 等の産生が亢進することが知られている。一方、抗炎症性サイトカインの IL-10 は、創傷部の炎症環境では COX-2 が活性化し、プロスタグランジン E2 (PGE2) の産生が上昇することによって、IL-10 産生が上昇することが知られている。IL-10 は、炎症性サイトカインの産生 (マクロファージからの IL-1 β や TNF- α 等) を抑制することができる。また、TGF- β は、線維芽細胞によるコラーゲン合成に必要なサイトカインである。そのため、TGF- β の変化は、皮膚中コラーゲンの減少や弾性の低下に繋がることが予想される。これらの因子について、微弱電流処理後の皮膚から抽出した RNA を用いて各 mRNA 量を定量解析した。その結果、得られた結果は、ばらつきが大きく、有意な変化は認められなかったものの、炎症性サイトカイン類に関しては、若干減少する傾向がみられ、また抗炎症性サイトカインの IL-10 は、増加する傾向が認められた。このことは、組織観察の結果と一致しており、微弱電流処理によって、少なくとも炎症が誘起されないことを示唆している。むしろ、抗炎症性サイトカインの IL-10 が増える傾向が得られたことから、微弱電流処理は炎症を鎮める効果を有する可能性も考えられる。

微弱電流処理による炎症惹起に閾値があるのか確かめるため、より強力な電流強度 (1.0 mA/cm²、1 時間) で処理した皮膚における炎症性サイトカイン等の発現を追加検討した結果、調査したすべてのサイトカイン (IL-6、IL-10、

TNF- α 、TGF- β) の mRNA 量が大きく増大することが明らかとなった。このことから、通常条件よりも強力な電流強度では、やはり皮膚に大きなストレスをかけるため、炎症性サイトカイン等の発現が上昇し、炎症が惹起される可能性が確認された。すなわち、通常条件 (0.3-0.5 mA/cm²) を超えるような電流強度を用いなければ、炎症惹起は防げることが示唆された。

当初、炎症性サイトカインが上昇すると予想していたため、それに関連する炎症性シグナル関連タンパク質の活性化や皮膚のアポトーシス等を検討することも考えていたが、1時間という長時間の微弱電流処理にもかかわらず、通常条件 (0.3-0.5 mA/cm²) でのイオン導入 (イオントフォレシス) であれば炎症性サイトカイン等の炎症関連因子の大きな変動もなかったことから、これらの検討は行うに至らなかった。しかし、抗炎症性サイトカイン IL-10 の若干の増加等の傾向もみられたことから、今後より詳細な検討を行う必要があると考えている。また、微弱電流が皮膚組織細胞のシグナル伝達系を活性化することから、皮膚の機能性に関連する因子、すなわちセラミドやコラーゲン・エラスチン等が変化している可能性も考えられる。今後、これらの皮膚機能性に関する因子についても検討を行いたいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kigasawa K, Kajimoto K, Hama S, Saito A, Kanamura K, Kogure K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. *Int. J. Pharm.* 383, 157-160 (2010).
- 2) Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. *Int. J. Pharm.* 403, 57-65 (2011).
- 3) Kigasawa K, Kajimoto K, Nakamura T, Hama S, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *J. Control. Release.* 150, 256-265 (2011).
- 4) Hama S, Kimura Y, Mikami A, Shiota K, Toyoda M, Tamura A, Nagasaki Y, Kanamura K, Kajimoto K, Kogure K. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J. Biol. Chem.* 289, 2450-2456 (2014).
- 5) Hasan M, Nishimoto A, Ohgita T, Hama S, Kashida H, Asanuma H, Kogure K. Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm. *J. Control. Release* 228, 20-25 (2016).
- 6) Hasan M, Tarashima N, Fujikawa K, Ohgita T, Hama S, Tanaka T, Saito H, Minakawa N, Kogure K. The novel functional nucleic acid iRed effectively regulates target genes following cytoplasmic delivery by faint electric treatment. *Sci Technol Adv Mater* 17, 554-562 (2016).
- 7) Hasan M, Hama S, Kogure K. Low electric treatment activates Rho GTPase via heat shock protein 90 and protein kinase c for intracellular delivery of siRNA. *Sci. Rep.* 9, 4114 (2019).
- 8) Torao T, Mimura M, Oshima Y, Fujikawa K, Hasan M, Shimokawa T, Yamazaki N, Ando H, Ishida T, Fukuta T, Tanaka T, Kogure K. Characteristics of unique endocytosis induced by weak current for cytoplasmic drug delivery. *Int. J. Pharm.* 576, 119010 (2020).