

イオン導入時の微弱電流による皮膚への安全性の厳密な検証と美容効果の検討

徳島大学大学院医歯薬学研究部

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. Based on the previous our research, it was predicted that iontophoresis will induce some negative effects such as inflammation via activation cell signaling. In this study, we tried to study the effect of weak electric current at iontophoresis on the safety and functionality of each skin under cathode and anode. Morphological damage was not observed in the skin after iontophoresis. The amounts of mRNAs relating inflammation, tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-6 and anti-inflammatory cytokine IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β . The amounts of these mRNAs were not affected by iontophoresis under normal conditions (0.34 mA/cm²). However, iontophoresis under more intense conditions (1.0 mA/cm²) showed an increasing trend of IL-6 and IL-10 mRNA. The skin functional components collagen and ceramide were increased by iontophoresis under normal conditions. From these results, it was suggested that iontophoresis under normal conditions does not induce any inflammation in the skin tissue. In conclusion, iontophoresis is a safety and useful technology for transdermal drug delivery and skin beauty.

1. 緒言

イオントフォレシスは、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古くから知られている。美容領域においては、「イオン導入」という呼称で認知されており、様々なデバイスが開発され、美容整形外科などで用いられている。イオントフォレシスに関する研究は、従来抗炎症剤などの低分子薬物を対象としたものが盛んに行われてきた。それらの研究では、動物皮膚切片および市販のヒト皮膚切片をフランツ型セルに装着し、上層に添加した薬物が皮膚を透過して下層に移行する量を定量することで皮膚透過性を評価する研究が主であった。加えて、現在多くの化粧品企業において、動物個体を用いた研究が実施できない状況にある。そのため、それらの研究には「死んだ皮膚」が多く用いられている。イオントフォレシス研究において、皮膚の物理的損傷に関する検討は容易であるが、死んだ皮膚を用いるため生理的な影響、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などを観察することはできない。ヒトの皮膚でモニターを行う場合も、皮膚表面の発赤くらいしか評価することはできない。しかしながら、イオントフォレシス(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ためには、「活きた皮膚」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ついては個体レベルで評価すること

が重要である。WEBなどでイオン導入に関する記事を目にするが、その多くは「ビタミンCなどの美容成分を皮内に導入できる」という点のみに触れたものであり、イオン導入(微弱電流処理)が皮膚に対して及ぼす影響に関するものは皆無である。すなわち、薬学的観点および化粧品開発の観点においては、イオン導入の皮膚に及ぼす影響については、ほとんど手付かずであった。

我々は、これまでイオントフォレシス(イオン導入)による siRNA や抗体などの高分子薬物の皮内送達研究に取り組んできた¹⁻⁵⁾。研究開始当初は、切り取った(死んだ)皮膚を用いて、抗炎症剤などの低分子薬物の皮膚透過について検討を行っていた。ところが、皮内での徐放効果を期待して、主たる研究者の専門テーマであったナノ粒子(リポソーム)とイオントフォレシスとの組み合わせの検討過程において、動物個体(活きた皮膚)を用いた時に、それまで不可能だと考えられていたナノ粒子が、イオントフォレシスによって皮内送達可能であることを発見した^{2,4,5)}。従来、イオントフォレシスによる皮内薬物送達メカニズムは、電極と荷電性薬物との電氣的反発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。しかし、主たる研究者らによる検討の結果、微弱電流によって細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇することで、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り、高分子などが皮内に浸透できるようになることを発見した⁶⁾。すなわち、微弱電流による皮膚組織の生理機能変化が、イオン導入(イオントフォレシス)による高分子の皮内浸透メカニズムであることを明らかにしている。さらに我々は、培養細胞を用いた検討によって、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、ユニークな細胞取り込み機構(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とともに、細胞質に漏出させること



Verification of skin safety and examination of cosmetological effects by weak electric current of iontophoresis

Kentaro Kogure

Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University

も発見している⁷⁻¹⁰⁾。これらの知見から、イオントフォレシス(イオン導入)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、組織レベルだけでなく細胞レベルでの生理機能を変化させることで、高分子などの皮内薬物送達が可能になっていることが示唆されている。これらのことから我々は、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。この仮説に基づき、主たる研究者の小暮は、2018年度に貴財団に採択いただき、動物皮膚に対するイオン導入(微弱電流処理)によって、炎症性サイトカイン産生や皮膚組織変化など負の影響は誘導されないこと、つまりイオン導入は安全性の高い薬物送達技術である可能性を見出した。予定研究期間終了後も、微弱電流処理による安全性評価を継続したところ、用いる電極の陽極と陰極において炎症性サイトカインなどの発現が異なる傾向を見出した(論文投稿準備中)。このことは、科学的に理にかなっており、陽・陰電極の下で起こる事象を個別に評価する必要性を示唆している。そのため、「安全だ」と断言するためには、より厳密な評価が必要であると考えた。そこで本研究では、美容領域などで汎用されているイオン導入(微弱電流による皮膚処理)において、陽・陰電極貼付下の皮膚で個別に起こっている事象を正確に捉え、安全性を厳密に検証したいと考えた。さらに、主たる研究者の小暮は、2019年度にイオン導入(微弱電流処理)による動物皮膚(特に表皮領域)中のセラミド量の増加を世界で初めて見出している¹⁰⁾。また、これまでの安全性評価過程において、皮内コラーゲンが微弱電流処理によって増える可能性も見出している(論文準備中)。これらの結果は、これまで局所麻酔剤やビタミンCなどの物質の皮内送達技術として捉えられてきたイオン導入(イオントフォレシス)が、それ単独で皮膚の保湿改善や弾性向上を誘導可能な美容技術となる可能性を示唆している。本研究では、微弱電流処理時の安全性の厳密な評価と同時に、皮膚機能性に関与する皮内コラーゲンおよびセラミド産生誘導を定量的に評価することで、イオン導入(微弱電流処理)が安全性の高い美容技術となり得ることを証明したいと考えた。

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ラットの背部皮膚の毛を刈り、露出した皮膚上にPBSを浸漬させた脱脂綿を貼付し、その上にヒト心電図用のAg/AgCl電極を設置して、過去の検討で用いてきた通電条件(0.34mA/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化させたものをクライオスタットにより凍結切片とした。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を評価した。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HE染色後、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

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理(0.34mA/cm²、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、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など(腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターロイキン(IL)-6)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、回収したRNAについて解析を行った。さらに、電流強度を増大させた条件(1.0mA/cm²、1時間)において処理したラット皮膚について、上記と同様に陽極および陰極貼付部分の皮膚を回収し、処理後3時間と24時間後における炎症性サイトカインなど(IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β)のmRNA発現をReal-time PCR法によって定量解析した。

2.3. 微弱電流処理した皮膚におけるコラーゲン量変化の検討

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理(0.34mA/cm²、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、OCTコンパウンド中で凍結固化させたものをクライオスタットにより凍結切片とした。得られた切片に対して、ピクロシリウスレッド溶液を添加し、60分間室温でインキュベートした。その後、酢酸およびエタノールで洗浄し、キシレンに15分間、3回浸すことで透徹処理を行った。キシレンが乾く前に疎水性マウント剤をマウントし、カバーガラスで封入した。マウント剤乾燥後、倒立型顕微鏡を用いて観察を行った。得られた画像について、画像解析ソフトを用いてコラーゲンに相当する赤色部分を数値化した。また、コラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリン量を評価するために、イオントフォレシス処理をしたラット背部から皮膚を回収し、ヒドロキシプロリン染色アッセイキットを用いて、皮内のヒドロキシプロリン量を定量した。検量線を用いて吸光度からヒドロキシプロリン濃度を測定した。

2.4. 微弱電流処理した皮膚におけるセラミドの定量と分子種同定の検討

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用

Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理(0.34mA/cm²、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、OCTコンパウンド中で凍結固化させたものをクライオスタットにより凍結切片とした。得られた切片に対して、1次抗体として抗セラミド抗体を用い、2次抗体として蛍光色素結合抗IgG抗体を用いて、免疫染色を行った。免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡により切片中の蛍光を観察した。得られた画像について、画像解析ソフトを用いてセラミドに相当する蛍光量を数値化した。また、培養細胞を微弱電流処理(0.34mA/cm²、15分間)した後、回収した細胞についてLC-MS/MSによる質量分析解析を行い、微弱電流によって増加したセラミドの分子種の同定を試みた。

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、陽極および陰極貼付部分から回収した皮膚について、HE染色を行い顕微鏡観察したところ、写真で示すように、まず微弱電流処理3時間後の皮膚切片は、陽極貼付および陰極貼付下の皮膚ともに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時間後においても陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚の組織像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影響は陽極・陰極いずれにおいても認められなかった(図1B)。炎症皮膚病態(アトピー性皮膚炎や乾癬、紫外線障害など)では、表皮肥厚化が誘起さ

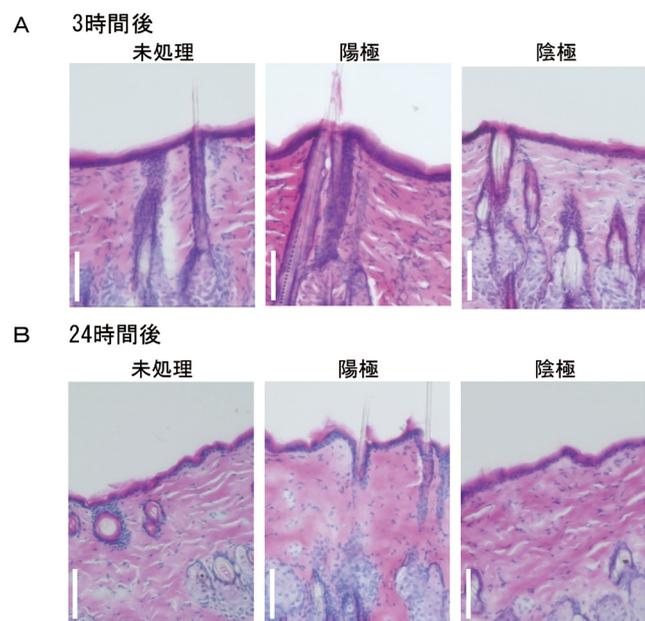


図1 微弱電流処理下皮膚の組織学的変化
白バーは100μmを示す。

れることが知られているが、今回示したように微弱電流処理後の皮膚においては、肥厚化は確認されなかった。

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

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、RNAを抽出した後、Real-time PCR法によって炎症性サイトカインなどの炎症関連因子(TNF-α、IL-6)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時間後における陽極貼付下および陰極貼付下の各皮膚組織中の各因子mRNAを比較すると、ばらつきがあるものの、IL-6、TNF-αおよびTGF-βについては、陽極および陰極に関わらず目立った変動は認められなかった。しかし、IL-10については、陽極貼付下皮膚では、変動は見られなかったが、陰極貼付下の皮膚において、統計的に有意ではないが、増加する傾向が認められた。さらに、微弱電流処理24時間後における陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚における各因子mRNAについて定量した結果、IL-6、TNF-αおよびTGF-βについては、3時間と同様に陽極および陰極に関わらず目立った変動は認められなかった。IL-10については、3時間とは逆に、陰極貼付下皮膚では、変動は見られなかったが、陽極貼付下の皮膚において、統計的に有意ではないが、増加する傾向が認められた。加えて、通常のイオン導入条件よりも強力な条件(1.0mA/cm²)で1時間処理した場合についても検討を行った。その結果、微弱電流処理3時間後においては、IL-6が陽極貼付下および陰極貼付下の両方の皮膚において増加傾向を示した。その他のIL-10、TNF-αおよびTGF-βについてもIL-6ほどではないが、増加の傾向を示した。ところが24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、ばらつきが大きいものの、IL-10が大きく増加していた。

3.3. 微弱電流処理した皮膚におけるコラーゲン量変化の検討

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、組織切片についてピクロシリウスレッド染色を行い、組織切片染色画像の画像解析からコラーゲン量を定量したところ、3時間後の陰極貼付下皮膚におけるコラーゲン量が未処理皮膚よりもわずかではあるが増加している結果が得られた。さらに、24時間後の陽極貼付下および陰極貼付下皮膚中のコラーゲン量を評価したところ、3時間時点ほどではないが陰極貼付下皮膚において増加する傾向が認められた。さらに、コラーゲンの成分として知られるヒドロキシプロリンについて、陽極貼付下および陰極貼付下皮膚中の定量を行ったところ、ピクロシリウスレッド染色の結果とは異なり、3時間後の陽極貼付下皮膚に

において増加していることが確認された。しかし、24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、有意ではないがヒドロキシプロリンの増加傾向が認められたが、陽極貼付下の皮膚では大きな変化は認められなかった。

3.4. 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

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、組織切片について抗セラミド抗体を用いて、組織中セラミド量の変化を評価した。その結果、陽極貼付下の皮膚においては、微弱電流処理直後からセラミド量が増加する傾向が認められた。一方、陰極貼付下の皮膚においては、3時間後にセラミド量の増加傾向が見られ、12時間後および24時間後には有意なセラミド量の増加が確認された。陰極貼付下の皮膚におけるセラミド量は、最大で2倍弱にまで増大した。培養細胞を用いて、微弱電流処理により増大するセラミドの分子種を質量分析手法によって解析したところ、炭素数16のセラミドが有意に増大することが明らかとなった。

4. 考 察

本研究では、イオン導入実施(微弱電流処理)時における、皮膚への影響を厳密に評価するため、陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚に分けて、それぞれの皮膚における組織学的変化、炎症性サイトカインなどの発現、コラーゲンおよびセラミドの産生について詳細な検討を行った。まず、微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討を行った結果、微弱電流処理3時間後および24時間後において、陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚における組織損傷などは認められず、また炎症発生時に生じる表皮の肥厚化も全く認められなかった。これらのことから、微弱電流処理は、皮膚への組織学的変化を誘導しないことが確認された。

さらに、炎症性サイトカインなどの炎症関連因子(TNF- α 、IL-6)および抗炎症性サイトカイン(IL-10、TGF- β)のmRNA量を定量解析した結果、これらの遺伝子発現には大きな変動は認められなかったことから、通常のイオン導入条件(0.3-0.5mA/cm²)では、1時間に及ぶ処理であっても、炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- α)発現誘導は見られず、大きな負の影響は示さないことが示唆された。さらに、抗炎症性サイトカインIL-10の発現が、時間によって陰極と陽極の違いはあったが、増加傾向を示したことから、微弱電流処理は炎症を抑える方向で作用する可能性が推察された。さらに通常のイオン導入条件よりも強力な条件(1.0mA/cm²)で1時間処理した場合、微弱電流処理3時間後においては、各遺伝子発現が増加傾向を示し、さらに24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、IL-10が大きく増加していた。このことは、通常のイオン導入条件

よりも強力な電流で微弱電流処理を行う場合、特に陰極貼付下の皮膚に炎症などを誘起する可能性を示している。皮内への物質浸透は、電流強度に依存すると考えられるが、物質浸透を促進するために電流強度を上げることは、皮膚障害を誘起する危険性があることが明らかとなった。興味深い点は、電極の違いによって、誘起される影響が異なることであり、今回の検討によってはじめて明らかになったことである。

今回、微弱電流処理による皮膚の機能性への影響を検討するため、弾力性など皮膚の構造維持に重要なコラーゲン量の変化を評価した。その結果、微弱電流処理後の陰極貼付下の皮膚において、コラーゲン量がわずかに増加していた。また、コラーゲン成分であるヒドロキシプロリン量が陽極貼付下の皮膚において増加していた。いずれもバラつきもあり、より詳細な検討が必要ではあるが、コラーゲン量やヒドロキシプロリン量が減少するのではなく増加していたことから、イオン導入における微弱電流処理によって皮膚の機能性が負の影響を受けることなく、改善される可能性が示された。

また、微弱電流処理後の皮膚における組織中セラミド量の変化を評価した結果、セラミド量が増加することが確認された。特に、陰極貼付下の皮膚においては、セラミド量は、最大で2倍弱にまで増大することが明らかとなった。セラミドは、肌の保湿に重要な役割を果たすことから、イオン導入時の微弱電流処理によって、皮膚中のセラミド量が大きく増大することで、肌の保湿機能が向上する可能性が示された。さらに、培養細胞を用いた検討から、微弱電流処理によって増大するセラミドの分子種が、炭素数16のセラミド分子であることが明らかとなり、ある決まった分子種の生成が微弱電流処理によって誘導される可能性が示唆された。

以上をまとめると、イオン導入時の微弱電流処理は、通常の条件(0.3-0.5mA/cm²)であれば、懸念された炎症性サイトカインなどの発現を誘導する可能性は極めて低いことが確認された。しかし、皮内への物質送達の効率を向上させるために電流値を増大させると、炎症性サイトカインの誘導を引き起こす危険性があることも明らかとなった。また、皮膚の機能性を担うコラーゲンが微弱電流処理によって増大する可能性が示された。さらに、皮膚の保湿成分であるセラミドが微弱電流処理後の皮膚において増加することを見出した。すなわち、微弱電流処理によって、皮膚の機能性(弾力性と保湿性)が改善される可能性が見出された。今後さらなる検討により、薬物送達技術であったイオン導入が、安全で理想的な肌の美容技術となることが期待される。

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) Hasan M, Khatun A, Fukuta T, Kogure K. Noninvasive transdermal delivery of liposomes by weak electric current. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154-155, 227-235 (2020).
- 5) Hasan M, Khatun A, Kogure K. Iontophoresis of Biological Macromolecular Drugs. *Pharmaceutics* **14**, 525 (2022).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).