

電解水の製剤および化粧品添加物
としての有用性に関する研究

甲第40号

北村 敏彦

電解水の製剤および化粧品添加物
としての有用性に関する研究

北村 敏彦

目次

略号と記号	1
緒言	2
第1章 電解水の基本的物性評価	4
第1節 電解水の生成原理と調製	5
第2節 実験方法	7
1. 実験材料	7
2. pH測定	7
3. 酸化還元電位測定	7
4. 溶存酸素測定	8
5. 電気伝導率測定	8
6. 浸透圧測定	8
7. 表面張力測定	8
8. ナトリウムイオン濃度測定	9
9. クロロイオン濃度測定	9
10. pHおよびORP安定性評価法	9
第3節 結果	10
1. 基本的物性	10
2. pHおよびORP安定性	10
第4節 考察	13
第5節 小括	14
第2章 薬物皮膚透過に及ぼす電解水の影響	15
第1節 実験方法	15
1. 実験材料	15
2. 実験動物	16

3. <i>In vitro</i> 薬物皮膚透過実験法	16
4. 薬物の定量法	17
5. <i>In vitro</i> 皮膚インピーダンス測定法	18
6. <i>In vitro</i> 皮膚タンパク質漏出試験法	19
7. MTT 試験法	19
8. <i>In vitro</i> 皮膚リン脂質漏出試験法	20
9. データ解析	21
第2節 結果	22
1. <i>In vitro</i> 薬物皮膚透過実験	22
2. <i>In vitro</i> 皮膚インピーダンス測定	28
3. <i>In vitro</i> 皮膚タンパク質漏出試験	29
4. MTT 試験および <i>in vitro</i> 皮膚リン脂質漏出試験	30
第3節 考察	30
第4節 小括	31
第3章 電解水の乳化作用	32
第1節 実験方法	33
1. 実験材料	33
2. 実験動物	33
3. 表面張力および界面張力測定法	33
4. 界面活性剤フリーエマルションの調製法	33
5. 界面活性剤フリーエマルションの pH 測定法	34
6. 界面活性剤フリーエマルションの顕微鏡下観察法	34
7. 分離度試験法による界面活性剤フリーエマルションの安定性評価法	35
8. タービスキャンによる界面活性剤フリーエマルションの安定性評価法	35
9. <i>In vitro</i> 薬物皮膚透過実験法	36
第2節 結果	36

1. 基本的物性	36
2. 界面活性剤フリーエマルションの顕微鏡下観察	38
3. 分離度試験法による界面活性剤フリーエマルションの安定性評価	38
4. タービスキャン（溶液安定性評価装置）による安定性評価	43
5. <i>In vitro</i> 皮膚透過実験	46
第3節 考察	48
第4節 小括	51
第4章 電解水の抗酸化作用	52
第1節 実験方法	53
1. 実験材料	53
2. スーパーオキシドアニオン消去能測定法	53
3. DPPH フリーラジカル消去能測定法	54
4. SOD 換算（相当）活性値の算出法	55
5. アスコルビン酸換算（相当）活性値の算出法	55
6. データ解析	55
第2節 結果	56
1. スーパーオキシドアニオンおよび DPPH 消去能測定	56
2. SOD 換算活性値およびアスコルビン酸換算活性値の算出	60
第3節 考察	63
第4節 小括	65
第5章 電解水の抗菌作用	66
第1節 実験方法	66
1. 実験材料	66
2. 基本的物性	66
3. 使用菌株	67
4. 培地作成法	67

5. 菌液調製法	68
6. Time kill assay 法	68
第2節 結果	69
1. 基本的物性	69
2. Time-kill assay による抗菌作用評価	69
第3節 考察	72
第4節 小括	74
結論	75
謝辞	81
引用文献	82

略号と記号

略号		DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical
EOW	Acidic electrolyzed oxidizing water		
ERW	Alkaline electrolyzed reducing water	DRSA	DPPH radical-scavenging activity
PW	Purified water	AsA	L(+)-Ascorbic acid
IS	Injection solvent	ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
ORP	Oxidation-reduction potential	FRAP	Ferric reduction ability of plasma
DO	Dissolved oxygen	TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
DH	Dissolved hydrogen		
LC	Lidocaine	SPW	Sterile purified water
BA	Benzoic acid	HW	Hydrogen water
ISMN	5-Isosorbide mononitrate	IFO	Institute for Fermentation, Osaka
M.W.	Molecular weight	HIA	Heart infusion agar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide	O.D.	Optical density
		BSG	Buffered saline with gelatin
ROS	Reactive oxygen species		
ESR	Electron spin resonance spectroscopy	記号	
PB	pH7.4 phosphate buffe	$K_{o/w}$	<i>n</i> -オクタノール/水分配係数
HPX	Hypoxanthine	κ	電気伝導率
DTPA	Diethylenetriamine- <i>N, N, N', N'', N'''</i> -pentaacetic acid	Π	浸透圧
		γ	表面張力
DMPO	5, 5-Dimethyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxide	Q	単位面積あたりの累積透過量
XOD	Xanthine oxidase	P	permeability coefficient, 透過係数
SOSA	Superoxide scavenging activity	P_i	イオン型 (解離型) 透過係数
SOD	Superoxide dismutase	P_u	非イオン型 (非解離型) 透過係数

緒言

電気分解水（電解水）は、純水や常水を原水として、これに微量の塩類を添加した水溶液を電気分解して得られる水と定義される¹⁾。電解水は、添加する塩の種類と量、電解槽の構造および電解条件によって異なった化学組成の水溶液となり、様々な物性や機能を示す。電解水は食品²⁾、農業³⁾、水産⁴⁾、畜産、医療⁵⁾など幅広い分野で応用されており、使用目的に基づいて主に殺菌消毒やアストリンゼント効果を持つ酸性電解水（acidic electrolyzed oxidizing water, EOW）（強酸性電解水、微酸性電解水、酸性イオン水）と、主に胃酸過多・便秘異常などの胃腸症状の改善や洗浄に使われるアルカリ性電解水（alkaline electrolyzed reducing water, ERW）（強アルカリ性電解水、電解次亜水、アルカリイオン水）に大別される。代表的な電解水を Table 1 に示す。なお、酸性電解水およびアルカリ性電解水は、それぞれ、酸化水および還元水とも呼ばれる。

また、本邦では薬事許可を得た 2 種類の EOW があり、その効能は手指洗浄消毒と内視鏡の洗浄消毒^{6, 7)}である。一方、ERW は油脂の乳化作用⁸⁾や抗酸化作用^{9, 10)}を持つことが報告されている。しかし、電解水の物性と効果については十分研究されているわけではない。

そこで、本研究では電解水の医薬品製剤および化粧品添加物としての有用性について焦点を絞り、5 章に分けて定量的に評価した。まず、第 1 章では電解水の基本的物性について、第 2 章では電解水の薬物皮膚透過制御作用について評価した¹¹⁾。また、第 3 章では電解水を用いて界面活性剤フリーエマルションを作成し、その薬物皮膚透過制御作用について評価した¹²⁾。さらに、第 4 章では電解水の抗酸化作用について、第 5 章では電解水の抗菌作用について検討した。以下、得られた結果を論述する。

Table 1 Typical electrolyzed water

	Electrolyte cell		Ingredient	pH	ORP (mV)	Available chlorine concentration (ppm)	Application	Rp.*
	Diaphragm	Electrode						
Strongly acidic electrolyzed oxidizing water	+	Anode	NaCl	2.2-2.7	1100	20-60	Sterilization, deodorizing	EOW 1-4
Acidic ion water	+	Anode	Calcium lactate	4-6	-	-	Astringent	
Slightly acidic electrolyzed oxidizing water	-	-	2-6% HCl	5-6.5	800	10-30	Sterilization	
	-	-	NaCl	5-6	-	50-80	Sterilization	
Strongly alkaline electrolyzed reducing water	+	Cathode	NaCl	11-11.5	-900	<1	Cleaning, emulsification, antioxidation	ERW 1-5
Alkaline ion water	+	Cathode	Calcium lactate	9-10	-	-	Pathological condition improvement	
Hypochlorous electrolyzed water	-	-	NaCl	8-9	-	80-100	Sterilization	

*: Classification of the electrolyzed water used in the present study

第 1 章 電解水の基本的物性評価

電解水の効能・効果について定量的に論じる前に電解水の物性とその特徴について知る必要がある。そこで、電解水の基本的物性を明らかにするために、種々電解水の pH、酸化還元電位 (ORP)、溶存酸素 (DO)、電気伝導率 (κ)、浸透圧 (Π) および表面張力 (γ) を測定した。また、物性に影響を与える可能性のあるイオン種と考えられるナトリウムイオンおよびクロルイオンの濃度も測定した。さらに、浸透圧に影響を与える可能性のあるイオンとして、アルカリ性電解水では OH^- の、酸性電解水では H^+ の濃度をそれぞれの電解水の pH から算出した。加えて、pH および ORP 安定性についても評価した。

第 1 節 電解水の生成原理と調製

Fig. 1 に電解水を調製する電解槽について図示する。Fig. 1a に示したように、電解水を作る電解槽にはフローセル（連続流水）式とバッチ（貯水）式があり、また、Fig. 1b に示したように、それぞれに無隔膜 1 室型、有隔膜 2 室型および有隔膜 3 室型がある。例えば、Fig. 1c に示すように、3 室型電解槽では隔膜で仕切られた陽極室（プラス極側）と陰極室（マイナス極側）およびこれらに中間室がある。陽極室および陰極室には超純水、純水または常水を供給し、中間室には純水または塩化ナトリウム水溶液などを充填して電解を開始すると、電流に比例して Na^+ 、 Cl^- 、 H^+ 、 OH^- などのイオンが中間室から陽極室または陰極室に移行する (Fig. 1c)。なお、3 室型電解槽は 2 室型電解槽に比べて、得られる電解水中のイオン濃度を極限まで低減するのに向いている。

塩化ナトリウム水溶液を有隔膜電解した時の主な電極反応を eqs. 1-6 に示す。陽極では水 (H_2O) から酸素 (O_2) と水素イオン (H^+) (eq. 1)、また、塩素イオン (Cl^-) から塩素 (Cl_2) が生じる (eq. 2)。生じた塩素は水と反応して次亜塩素酸 (HOCl) と塩酸 (HCl) になる (eq. 3)。その結果、陽極室中の水溶液は酸性化し、溶存酸素 (DO) が上昇する。一方、陰極では水 (H_2O) から水素 (H_2) と水酸化イオン (OH^-) が生じる (eq. 4)。また、酸素と水から過酸化水素と水酸化イオンが生じる (eq. 5)。さらに、過酸化水素は水酸化イオンとなる (eq. 6)。その結果、陰極室中の水溶液はアルカリ性化し、溶存酸素は低下、溶存水素は上昇する (eqs. 4-5)。このように陽極室から酸性電解水が、陰極室からアルカリ性電解水が生成される。

Electrode reaction of anode



Electrode reaction of cathode

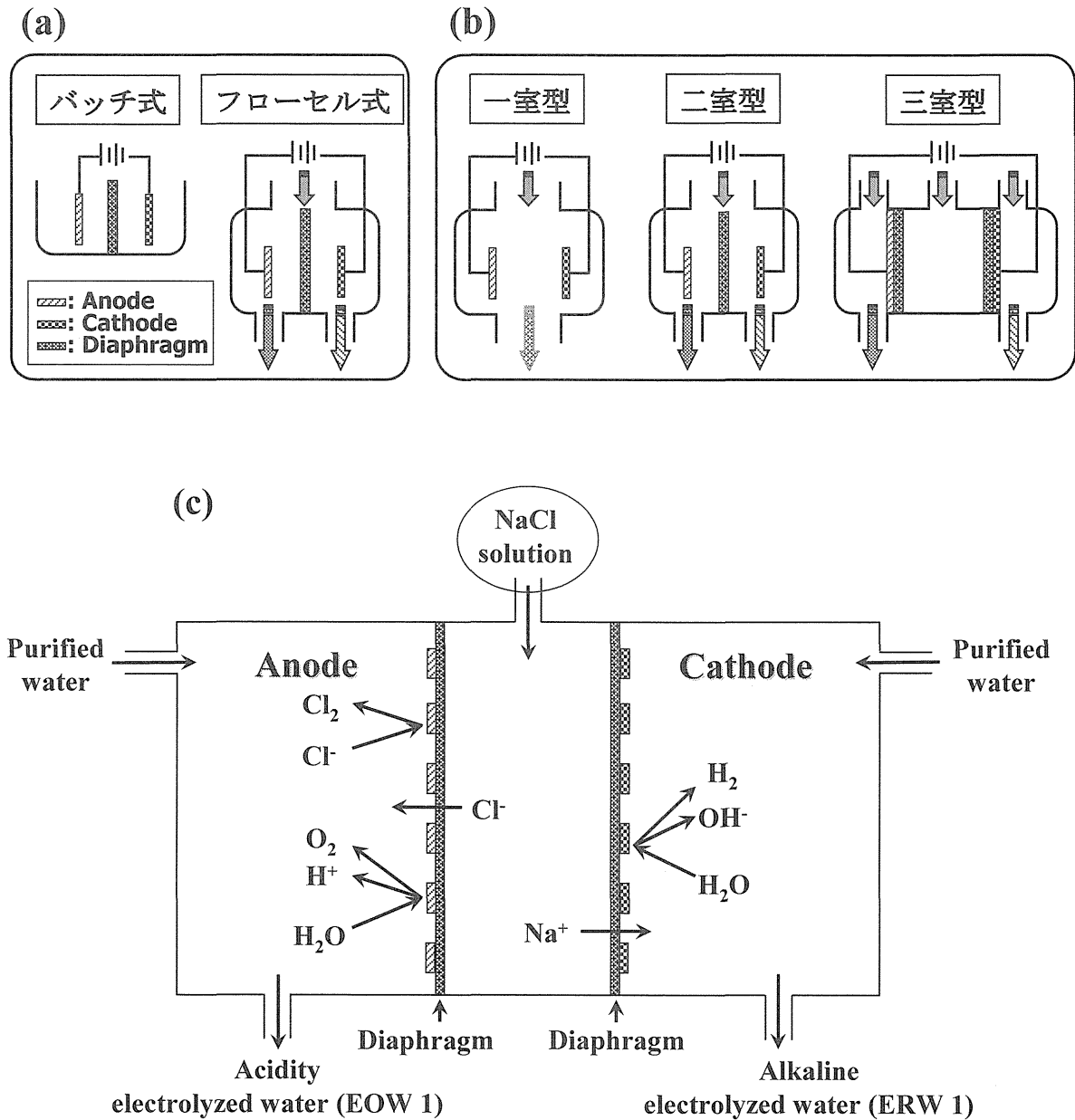
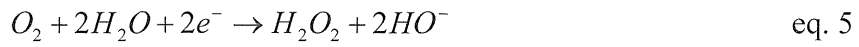


Fig. 1 Three-cell model for preparation of electrolyzed water

第2節 実験方法

1. 実験材料

強酸性電解水 (EOW 1) および強アルカリ性電解水 (ERW 1) は、フローセル式3室型電解槽を有するレドックスウォータータイプ 1S'生成器 ((株) ウォーターデザイン研究所, 東京) を用いて用時調製した. なお, これらの原水には蒸留水製造装置 (STILL ACE SA-2000A, 東京理化器械 (株), 東京) から得られた精製水 (PW) を用いた. また, 電解補助剤として塩化ナトリウム (和光純薬工業 (株), 大阪) を使用し, その飽和溶液を中間室に供じた. さらに, 3種類の強酸性電解水 (EOW 2-4) は(株) ウォーターデザイン研究所から, 強アルカリ性電解水の1つである ERIC S-100 は(株) エー・アイ・システムプロダクト (春日井, 愛知) から, 同じく強アルカリ性電解水の種類であり化粧水として市販されている2種類のアクティブミクロンウォーター+ (ERW 3, 4) は(株) ジモス (福岡) から, クエン酸などの有機酸を電解補助剤として生成されたボトルドウォーター α -H₂O- α (ERW 5) は(有) スプリング (東京) から供与された. 注射用水 (IS) は大塚製薬 (株) (東京) から購入した.

2. pH 測定

電解水の pH はガラス電極 HGS-2005, 比較電極 HS-205C, 温度センサ THP1008S を取り付けた, イオン・pH メーター (IM-55G, 東亜ディーケーケー (株), 東京) を用いて測定した. なお, 測定は 100 mL バイアル瓶に電解水を約 50 mL 加え, その中に電極を静置し 30 秒後に行った.

3. 酸化還元電位測定

電解水の酸化還元電位は金属電極 HP-105, 比較電極 HS-205C, 温度センサ THP1008S を取り付けた, イオン・pH メーター (IM-55G) を用いて測定した. なお, 測定は 100 mL バイアル瓶に電解水を約 50 mL 加え, その中に電極を静置し 5 分後に行った.

4. 溶存酸素測定

電解水の溶存酸素濃度はポータブル溶存酸素計 P シリーズ (DO-14P, 東亜電波工業 (株), 東京) を用いて測定した。100 mL バイアル瓶に電解水を約 50 mL 加え, その中に測定プローブを静置し, スターラーバーおよびマグネティックスターラーを用いて攪拌条件下, 3 分後の値を測定した。ゼロ校正は 10% 亜硫酸ナトリウムをゼロ液として用いて, スパン校正は大気中で行った。

5. 電気伝導率測定

電解水の電気伝導率は電気伝導率計 G シリーズ (CM-30G, 東亜電波工業 (株)) により測定した。用いた電気伝導率セル CT-57101A のセル定数は 935 m^{-1} であった。測定は 100 mL バイアル瓶に電解水を約 50 mL 加え, その中に電極を静置し 1 分後に行なった。

6. 浸透圧測定

電解水の浸透圧は浸透圧測定装置オズモスタット (OM-6040, アークレイ (株), 京都) を用いて測定した。測定原理は超過冷却方式による氷点降下法で, 校正は 0, 300 および 1000 mOsm の 3 点で行った。

7. 表面張力測定

電解水の表面張力は全自動表面張力計 (CBVP-Z, 協和界面科学 (株), 新座, 埼玉) により測定した。なお, この測定原理は Wilhelmy 法である。測定は試験液 5 mL をシャーレ (Non-treated dish, 35×10 mm, 旭テクノグラス (株), 東京) に移し, 室温下で行った。

8. ナトリウムイオン濃度測定

電解水中の Na⁺濃度は原子吸光分光光度計 (AA-6500, (株) 島津製作所, 京都) を用いて測定した.

9. クロロイオン濃度測定

電解水の Cl⁻濃度の測定に使用したイオンクロマトグラフシステム (non-suppressor type) を以下に示す.

Pump	LC-9A ((株) 島津製作所, 京都)
Electrical conductivity detector	CDD-6A ((株) 島津製作所)
Integrator	C-R5A ((株) 島津製作所)
Column oven	CTO-6AS ((株) 島津製作所)
IC column	Shim-pack IC-A1, 4.6 mm i.d.×100 mm ((株) 島津製作所)

なお, 流速は 1 mL/min, カラムオーブンは 40°C に設定した. 電気伝導度検出器のポラリティはプラス, 信号出力は STD, 測定感度は 4 μS/cm FS (gain: 1 μS/cm, range: 4) に設定した. また, 移動相は 1.0 mM *p*-hydroxybenzoic acid + 1.1 mM *N,N*-dimethylaminoethanol solution を用いた.

10. pH および ORP 安定性評価法

100 mL バイアル瓶に空気が入らない蓋をして 5°C 静置条件下で保存したサンプルを, 前項 2 および 3 と同様に, 生成直後, 1, 4, 12, 24 および 48 週間後に pH および ORP を測定し, 電解水の pH および ORP の安定性を評価した.

第3節 結果

1. 基本的物性

Table 2 に電解水の基本的物性測定結果を示す。精製水 (PW) の純度を確認するために、PW の物性と注射用水 (IS) の物性を比較したところ、大きな違いはみられなかった。EOW は酸性 pH を、ERW は ERW 5 を除いてアルカリ性 pH を示した。また、EOW の ORP は正の値を、ERW の ORP は負の値を示した。Na⁺濃度は ERW で高値を、EOW で低値を示した。反対に、Cl⁻濃度は EOW で高値を、ERW では低値を示した。また、浸透圧に影響を与える可能性のあるイオンとして、EOW では H⁺濃度、ERW では OH⁻濃度をそれぞれの電解水の pH から算出したが、Na⁺、Cl⁻、H⁺および OH⁻濃度だけで電解水の浸透圧を完全には説明することはできなかった。しかし、浸透圧および電気伝導率は Na⁺および Cl⁻濃度を反映していた。また、ほとんどの EOW および ERW の表面張力は精製水とほぼ同様の値を示したが、EOW 3 および ERW 2 では極めて低い値を示した。

2. pH および ORP 安定性

pH および ORP 安定性評価の結果を Fig. 2 に示す。EOW 1 および ERW 1 の pH は生成後 48 週まで安定であった (Fig. 2a)。また、EOW 1 の ORP も 48 週まで安定であった (Fig. 2b)。一方、ERW 1 の ORP は 1 週間で著しく上昇するものがあり、4 週以降、約-300 mV を維持した (Fig. 2b)。

Table 2 Physicochemical properties of several electrolyzed waters

Rp	pH	ORP (mV)	DO (mg/L)	κ (mS/m)	Na ⁺ (mEq/L)	Cl ⁻ (mEq/L)	<i>I</i> (mOsm)	H ⁺ or OH ⁻ (mEq/L)	<i>r</i> (mN/m)	
EOW 1	2.49	955.9	12.16	216	1.6×10^{-1}	5.3	10	3.2	65.6	Redox Water type 1S'
EOW 2	3.37	864.5	10.84	40.3	8.7×10^{-1}	1.4	6	4.2×10^{-1}	68.4	Water Design Lab.
EOW 3	2.53	329.4	8.80	52.1	5.7×10^{-2}	1.3	N.D.	3.0	39.2	Water Design Lab.
EOW 4	3.22	817.4	13.47	62.9	9.1×10^{-2}	1.1	2	6.0×10^{-1}	69.5	Water Design Lab.
ERW 1	12.15	-1068	5.50	245	10	5.1×10^{-1}	20	8.3×10^{-1}	69.3	Redox Water type 1S'
ERW 2	11.96	-216.6	7.56	722	86	8.2	113	5.3×10^{-1}	29.2	A. I. System Products
ERW 3	11.67	-203.8	10.54	62.4	4.0	N.D.	8	2.7×10^{-1}	69.2	Jimos
ERW 4	12.63	-262.8	9.43	244	49	7.3×10^{-2}	92	2.5	69.7	Jimos
ERW 5	4.61	-675.5	3.81	1.04	8.7×10^{-3}	9.4×10^{-2}	0	2.4×10^{-2}	–	Spring
PW	5.71	193.2	6.91	0.28	1.7×10^{-3}	3.2×10^{-2}	0	1.9×10^{-3}	70.8	STILL ACE SA-2000A
IS	5.70	177.1	6.65	0.17	–	–	0	2.0×10^{-3}	70.6	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

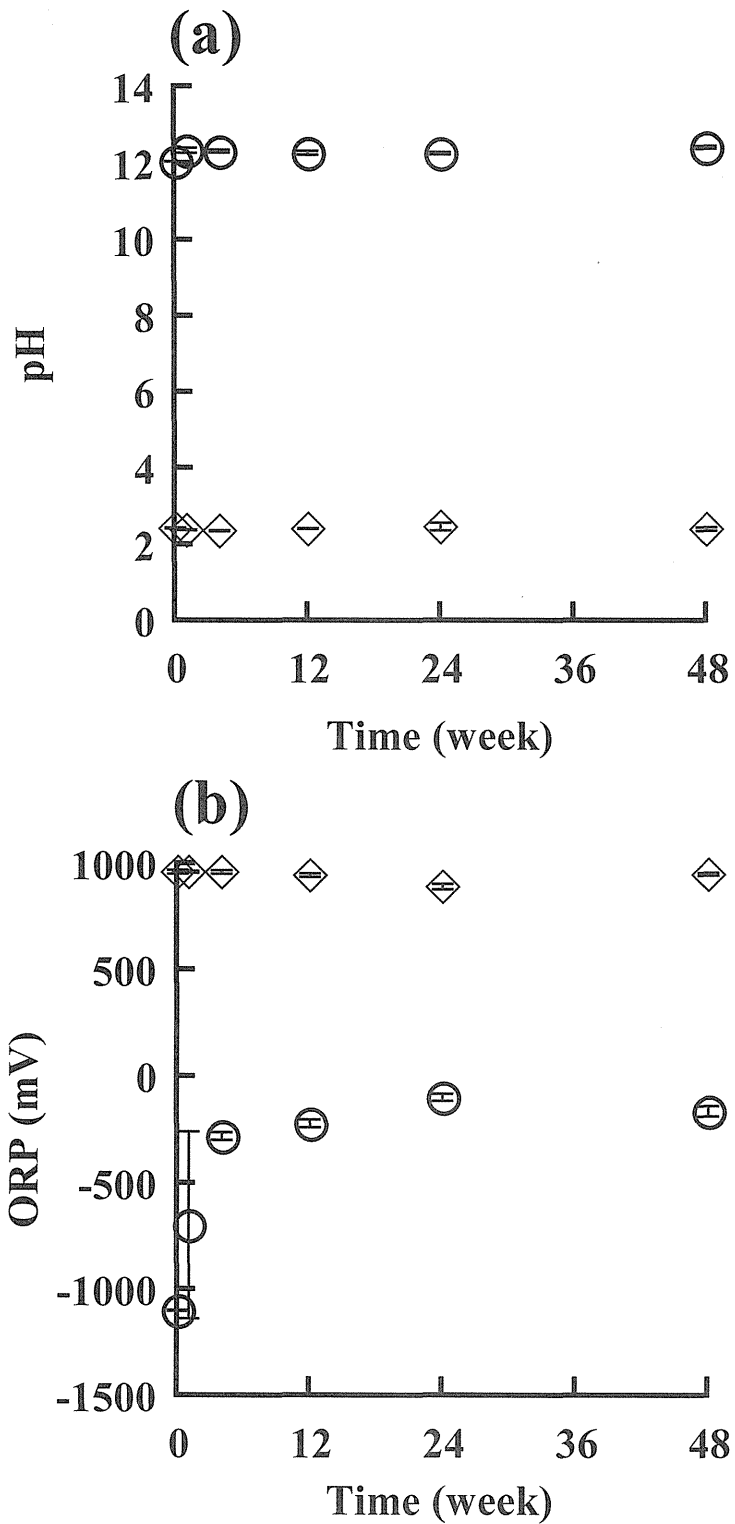


Fig. 2 Changes in pH (a) and ORP (b) of electrolyzed waters at 5°C in a closed container

Symbols: \diamond : EOW 1, \circ : ERW 1

Each point represents the mean \pm S. E. of 4 experiments.

第4節 考察

EOW で酸性 pH を示したのは eq. 1 および 3 に従い生成した H^+ が、また、ERW でアルカリ性 pH を示したのは eq. 4-6 に従い生成した OH^- が原因である。一方、ERW 5 で弱酸性 pH を示したのは、電解補助剤として NaCl の代わりにクエン酸などの有機酸を使用したためであると考えられる。

また、ORP は DO と DH のバランスや共存イオンにより決定されることが報告されている¹³⁾。EOW の DO は ERW よりも高値を示し、eq. 1 を裏付ける結果となった。今回、DH は測定していないが、ERW では eq. 4 により高値を示すことが予想される。

ERW で Na^+ 濃度が高く、EOW で Cl^- 濃度が高い理由は、電解槽の中間室に加えた NaCl 由来の Na^+ と Cl^- が、それぞれ陰極または陽極に静電的に移動したためであると考えられる。また、EOW の電気伝導率と浸透圧は Cl^- 濃度との間にそれぞれ良い相関が認められた。一方、ERW の電気伝導率と浸透圧は Na^+ 濃度との間にそれぞれ良い相関が認められた。特に、すべての電解水の浸透圧および電気伝導率は Na^+ と Cl^- 濃度を反映していた。さらに、EOW 1 と同じ pH をもつ 0.01 M HCl の Cl^- 濃度は 10 mEq/L であるが、これに比べて EOW 1 の Cl^- 濃度は半分に低減できることがわかった。また、ERW 1 と同じ pH をもつ 0.02 M NaOH の Na^+ 濃度は 20 mEq/L であるが、これと比べて ERW 1 の Na^+ 濃度は半分に低減できることがわかった。通常、pH 緩衝液には共存イオンが多く含まれるが、EOW や ERW は Na^+ および Cl^- が少なくても、低 pH や高 pH を示すため、緩衝液（溶媒）の代替として利用できるかもしれない。なお、ERW 2 のように弱い緩衝作用を有するものも存在する（data not shown）。ERW 2 では Na^+ や Cl^- 以外のイオンが存在することがイオンクロマトグラフィーにより確認されている（data not shown）ので、これらのイオンが浸透圧や緩衝作用に関係していると考えられる。EOW 3 で浸透圧を測定できなかった理由は、添加物として加えているグリセリンの影響により、氷晶形成しなかったためであると考えられた。

EOW 3 および ERW 2 で極めて低い表面張力を示したが、EOW 3 が低値を示した理

由は高い粘度が影響したためであると考えられた。一方、ERW 2 で低値を示した原因は不明である。

ERW の ORP 安定性には DH が深く関係し、5°C 閉鎖系静置条件下でも DH が減少し ORP の上昇をもたらしたと思われた。また、EOW 1 および ERW 1 の ORP に及ぼす窒素バブリングの影響を調べたところ、EOW 1 では 928.4 から 963.4 mV と変化は認められなかったが、ERW 1 では -1097.4 から 2.6 mV へ著しく上昇が認められた。これは、水中の飽和溶存水素濃度 (1.55 mg/L, 25°C, 1 atm) が飽和溶存酸素濃度 (8.11 mg/L, 25°C, 1 atm) よりはるかに小さく、そのため、ERW 1 では窒素バブリングにより DH が抜けやすいことより、より大きな影響を受けたのではないかと思われる。

第 5 節 小括

電解水は電気分解反応を反映した水溶液であることが明らかとなった。また、電解水の Na^+ および Cl^- 濃度は、同様の pH を有する 0.02 M NaOH や 0.01 M HCl に比べると半減できることがわかり、緩衝液としての代替となる可能性も示唆された。

第2章 薬物皮膚透過に及ぼす電解水の影響

薬物の皮膚透過・経皮吸収性は角層のバリアー機能のために低く、electroporation, iontophoresis, phonophoresis のような物理的促進法、およびテルペン類や脂肪酸などの促進剤の使用やプロドラッグ化など化学的促進法が考えられている^{14,15)}。しかし、皮膚透過性に及ぼす溶媒（基剤）の影響に関する研究¹⁶⁾は思いのほか少ない。電解水は医薬品や化粧品のユニークな基剤成分の1つとして利用可能であると思われるが、得られる効果や主成分の活性に対する影響などについてほとんど研究されていない。

そこで、本章では薬物や化粧品有効成分の皮膚透過性に及ぼす種々電解水の影響を明らかにすることを目的として、塩基性、酸性および非解離性モデル薬物としてリドカイン（LC）、安息香酸（BA）、一硝酸イソソルビド（ISMN）をそれぞれ選択し、そのヘアレスラット摘出皮膚を介した皮膚透過性に及ぼす基剤として用いた電解水の影響を調査した。また、透過係数に対するイオン型および非解離型薬物の寄与を、それぞれイオン型リドカインおよび非解離型リドカインの透過係数を決定することにより見積もった。加えて、皮膚バリアー能に及ぼす電解水の影響を角層および真皮側に電解水を適用し皮膚インピーダンスを測定することにより評価した。さらに、種々電解水の皮膚刺激性を評価するために、ヘアレスラット皮膚角層側に電解水を適用しタンパク漏出量を測定した。また、ヘアレスラット摘出皮膚の MTT 試験およびリン脂質漏出試験を行った。

第1節 実験方法

1. 実験材料

LC, ISMN および tris (hydroxymethyl) aminomethane は東京化成販売（株）（東京）から購入した。BA および 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol は和光純薬工業（株）（大阪）から購入した。3,3-dimethylglutaric acid および Toriton X-100 reduced は Sigma-Aldrich

Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した. その他の試薬および溶媒は市販の特級および HPLC 用を用いた. これらの試薬は精製せずにそのまま使用した.

2. 実験動物

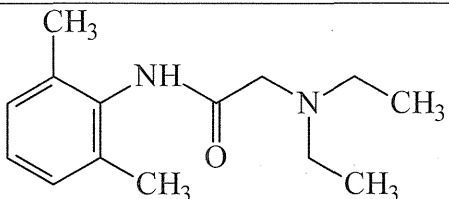
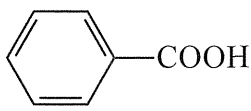
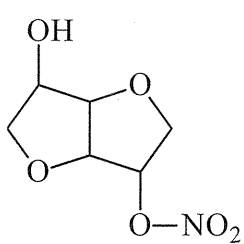
雄性ヘアレスラット (WBN/ILA-Ht, 体重 220-250 g) は城西大学生命科学研究センター (坂戸, 埼玉) または石川実験動物研究所 (深谷, 埼玉) から購入した. なお, 動物実験は城西大学生命科学研究センターの倫理規定に従って行った.

3. *In vitro* 薬物皮膚透過実験法

ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下, ヘアレスラット腹部皮膚を剃毛後左右から 1 枚ずつ摘出した. この新鮮なヘアレスラットの皮膚サンプルは摘出後直ちに使用した. これらの皮膚を 2-チャンバー横型拡散セル (有効透過面積 0.95 cm²)¹⁷⁾ に挟み, 角層側に 0.1% 薬物を溶解した種々電解水 (EOW 1, ERW1 および ERW2) 2.5 mL を, 真皮側に生理食塩液 2.5 mL を適用した. 両セル内はセル中のスターヘッド型攪拌子をマグネティックスターラー (マルチスターラー M-1, (株) 井内栄盛堂, 東京) により 500 rpm で回転させることで攪拌した. また, 両セルはウォータージャケットに温水を流すことにより 32°C に維持した. 真皮側チャンバーから経時的に 0.5 mL を採取し, その都度, 同量の溶液を補充した. 採取した溶液をサンプル溶液とした. すべての透過実験は 6 時間行った.

Table 3 に本研究に用いた LC, BA および ISMN の構造式, 分子量 (M.W.), p*K*_a および log *n*-オクタノール/水分配係数 (*K*_{ow}) を示す. また, 種々 pH 溶液 (pH 3.5, 6.3, 7.3, 8.3, 9.3, 10.3) の調製には 3,3-dimethylglutaric acid, tris (hydroxymethyl) aminomethane および 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol の等モル溶液である GTA 広域緩衝液を用い, pH の調整には 1M HCl または 1M NaOH を使用した.

Table 3 Chemical structures and physicochemical properties of model compounds

Compound	Structure	M.W.	pKa	log $K_{o/w}$
LC		234.34	8.30	2.44
BA		122.12	4.18	1.87
ISMN		191.14	-	-0.15

イオン型および非解離（分子）型 LC の皮膚透過係数は得られた全透過係数に対する、それぞれの型の寄与を評価することにより算出した¹⁸⁾。本試験では表計算ソフト Microsoft® Excel 中のソルバー機能を用いて皮膚透過係数 P を pH の関数とした eq. 7 に、非線形最小二乗法（algorithm ; 準ニュートン法）処理を行うことによりイオン型および非解離型 LC の透過係数 P_i および P_u を算出した。

$$P = P_u \alpha + P_i (1 - \alpha) = \frac{P_u}{1 + 10^{pKa - pH}} + P_i \cdot \frac{1}{1 + 10^{pKa - pH}} \quad \text{eq. 7}$$

4. 薬物の定量法

皮膚透過実験で得られたサンプル溶液の LC, BA および ISMN 濃度は HPLC を用いて測定した。なお、前処理として内部標準物質を含有したアセトニトリルと容量比 1 : 1 で混和し、遠心分離 (4°C, 18800×g, 5 min) した上清 20 μL を HPLC 測定に供じた。使用した HPLC システムを以下に示す。

System controller	SCL-10AVP ((株) 島津製作所)
Pump	LC-10AD ((株) 島津製作所)
UV detector	SPD-10A ((株) 島津製作所)
Auto injector	SIL-10AXL ((株) 島津製作所)
Integrator	C-R3A ((株) 島津製作所)
Column oven	CTO-10A ((株) 島津製作所)
ODS column	Wakopak Wakosil-II 5C18 HG, 4.6 mm i.d.×250 mm, (和光純薬工業 (株))

なお、流速は 1 mL/min, カラムオーブンは 40°C に設定した。

HPLC 分析に用いた移動相, 検出波長および内部標準物質を Table 4 に示す。また, 得られた濃度から薬物皮膚透過量を算出した。

Table 4 HPLC conditions for the drug determination

	Mobile phase	Detection (nm)	Internal standard
	Acetonitrile : 0.1% phosphoric acid solution		
LC	+ 5 mM sodium 1-heptane sulfonate 35 : 65	230	Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
BA	Acetonitrile : 0.05 M glycine buffer solution (pH 2.5) 50 : 50	230	Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate
ISMN	Acetonitrile : water 10 : 90	220	Absolute calibration method

5. *In vitro* 皮膚インピーダンス測定法

透過実験と同様に、ヘアレスラット腹部皮膚をペントバルビタールナトリウム麻酔下剃毛し、生理食塩液で清拭した後、左右から 1 枚ずつ摘出した。摘出皮膚を透過実

験と同様の 2-チャンバー横型拡散セルに挟み、角層側および真皮側に種々電解水 2.5 mL を適用した。両セル内はセル中のスターヘッド型攪拌子により攪拌した。また、両セルは 32°C に維持した。角層側および真皮側セルに銀-塩化銀電極を入れ、インピーダンスメータ (Sinusoidal 10 Hz, ADVANCE R&D Co., LTD., 東京) を用い、経時的に皮膚インピーダンスを測定した^{19,20)}。

6. *In vitro* 皮膚タンパク質漏出試験法

ヘアレスラット腹部皮膚を麻酔下剃毛し、生理食塩液で清拭した後、左右から1枚ずつ摘出した。摘出した皮膚を角層がレシーバ溶液側を向くように2-チャンバー横型拡散セルに挟んだ (通常の透過実験と逆向き)。角層側 (レシーバ側) セルに種々電解水を、真皮側セルには生理食塩液を、それぞれ2.5 mLずつ適用した。また、実験中、レシーバ側のみスターラーで攪拌し、セルは透過実験と同様32°Cに維持した。実験開始後0, 3および9 hにレシーバ溶液を0.5 mLサンプリングし、その都度、同量の電解水を補充した。採取した溶液をサンプル溶液とし、サンプル溶液のタンパク質を Bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A.) を用いて定量した^{21,22)}。測定原理は、アルカリ条件下でタンパク質とCu²⁺が反応し、Cu⁺を生じる反応 (ビウレット法) と、1 molのCu⁺と特異的に反応するBCA 2 molから 562 nmに吸収を持つ複合体を形成する反応からなり、この複合体を分光光度計により定量する。なお、今回はenhanced test tube protocolに従って試験を行った。また、反応試薬を妨害しないように、適宜サンプルを希釈して測定した。

7. MTT 試験法

ヘアレスラット腹部皮膚をペントバルビタールナトリウム麻酔下剃毛し、生理食塩液で清拭した後、セロテープ (ニチバン (株), 東京) を用いて角層を 20 回テープストリッピングした。試験液である精製水、種々電解水、0.02 M NaOH, 0.01 M HCl および各試験液に NaCl を加えて等張化したものを直径 15 mmφのパッチテスト用絆創

膏（鳥居薬品（株），東京）に 200 μ L 染みこませて腹部皮膚に適用した．ネガティブコントロールには生理食塩液を採用した．絆創膏が腹部から剥がれないようにサージカルテープを用いて固定し，24 時間暴露した．暴露後，再びペントバルビタールナトリウム麻酔下，適用部位皮膚を摘出し真皮側の脂肪を除去してからその中央部をバイオプシーパンチで直径 8 mm ϕ にくり抜いた．これを生理食塩液で洗浄し，0.33 mg/mL MTT アッセイ培地溶液 2 mL に浸潤させ，5% CO₂，37°C 条件下で 3 時間インキュベートした後，生理食塩液で洗浄し試験管に移した．この試験管に 0.04 M HCl-イソプロパノール溶液 1 mL を添加し，室温暗所で 12 時間放置してホルマザンを抽出した．ホルマザン濃度は紫外可視分光光度計（UV-160A，（株）島津製作所）を用いて検出波長 570 nm で測定した^{23, 24}）．

8. *In vitro* 皮膚リン脂質漏出試験法

ヘアレスラット腹部皮膚をペントバルビタールナトリウム麻酔下剃毛し，生理食塩液で清拭した後，左右から 1 枚ずつ摘出した．摘出した皮膚を角層がレシーバ溶液側を向くように 2-チャンバー横型拡散セルに挟んだ．角層側（レシーバ側）セルに種々電解水を，真皮側セルには生理食塩液を，それぞれ 2.5 mL ずつ適用した．また，実験中，レシーバ側のみスターラーで攪拌し，セルは透過実験と同様 32°C に維持した．実験開始後 0, 3 および 9 h にレシーバ溶液を 500 μ L サンプルングし，その都度，同量の電解水を補充した．採取した溶液中のリン脂質をリン脂質 C-テストワコー（和光純薬工業（株））を用いて定量した²⁵）．測定原理は，まず，リン脂質をホスホリパーゼ D により加水分解しコリンを遊離させる．生成したコリンをコリンオキシダーゼによりベタインに酸化し，同時に過酸化水素を生じさせる．生じた過酸化水素はペルオキシダーゼにより DAOS（*N*-ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline）と 4-aminoantipyrine とを定量的に酸化縮合させ，青色の色素を生成させるものである．600 nm に吸収を持つこの色素を定量することによりリン脂質濃度を求めた．

9. データ解析

データ数 $n = 3-4$ とし、図および表には平均値 \pm 標準誤差を示した。透過速度は lag time 法により 4-6 h の累積透過プロファイルから算出し、得られた透過速度を用いて透過係数を算出した。また、必要に応じて unpaired Student's t -test, 一元配置分散分析 (One-factor ANOVA) および Tukey-Kramer 法により統計学的解析を行った。なお、有意水準 $\alpha = 0.01$ または 0.05 とした。

第 2 節 結果

1. *In vitro* 薬物皮膚透過実験

Fig. 3a に種々電解水溶液からヘアレスラット皮膚を介して透過した LC の累積量プロファイルを示す. 塩基性薬物である LC はコントロールである精製水を溶媒と用いた時に比較して, ERW 1 および ERW 2 を用いた場合, 6 時間累積透過量はそれぞれ 5.2 倍および 2.5 倍という高い透過性を示した. 一方, 強酸性電解水 EOW 1 を用いた場合, 透過は抑制 (精製水と比較して 6 時間累積透過量は 0.071 倍) された.

Fig. 3b に種々電解水溶液からヘアレスラット皮膚を介して透過した BA の累積量プロファイルを示す. 酸性薬物である BA は, 精製水からの透過に比較して, 6 時間累積透過量は EOW 1 を用いた場合 1.8 倍の透過性を示した. 反対に, ERW 1 および ERW 2 を用いた場合, 透過は抑制 (同様にそれぞれ 0.13 倍および 0.13 倍) された.

弱電解質の皮膚透過では当然, イオン型 (解離型) 薬物より非イオン型 (非解離型) 薬物の寄与が大きい. 当研究室でインドメタシンを用いて行った皮膚透過実験の結果では, 透過係数で比較するとイオン型の寄与は全透過量の 1/190 くらいにすぎないことが明らかになっている. そこで, 次に非解離型水溶性薬物である ISMN をモデル透過薬物として用いた. Fig. 3c に種々電解水溶液からヘアレスラット皮膚を介した ISMN の累積透過量-時間プロファイルを示す. ISMN は精製水を溶媒と用いた時に比較して, 6 時間累積透過量で比べると, ERW 1 および ERW 2 を用いた場合, それぞれ 57 倍および 12 倍という高値を示した. なお, EOW 1 を用いた場合, 2.7 倍の値を示した. Table 5 に定常状態におけるそれぞれの薬物の透過係数をまとめて示す. また, それぞれの透過実験中のドナー溶液の pH 変化を Table 6 に示す. Table 6 から明らかのように, 実験開始前および終了後でドナー溶液の pH 変化はほとんど認められなかった.

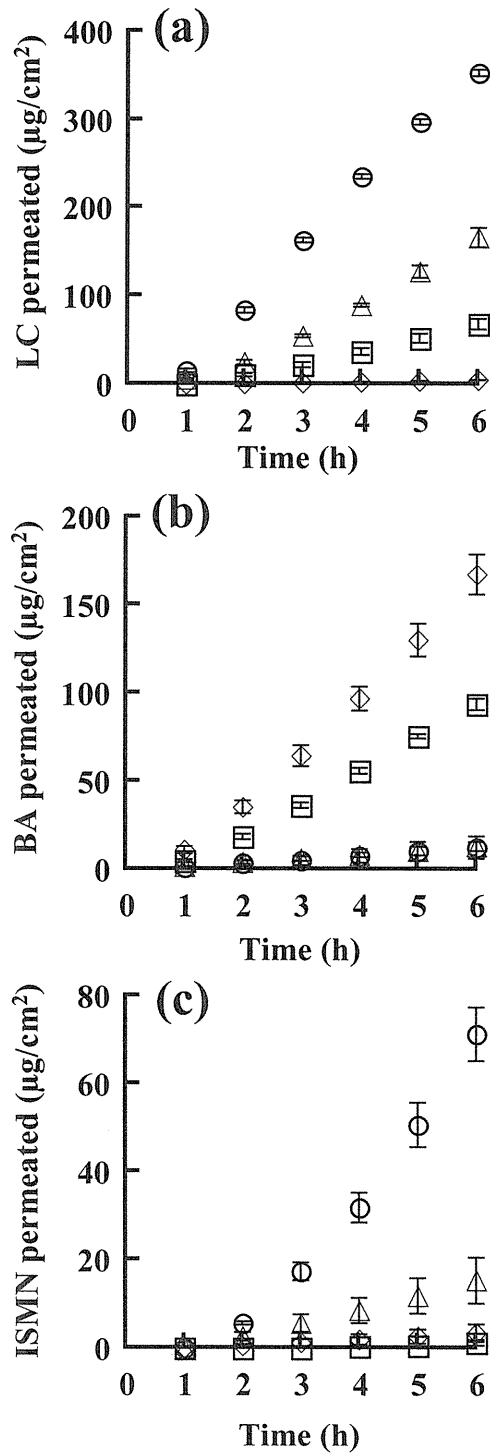


Fig. 3 Effect of electrolyzed waters on the permeation of LC (a), BA (b) and ISMN (c) through excised hairless rat skin

Symbols: \square : PW, \circ : ERW 1, \triangle : ERW 2, \diamond : EOW 1

Each point represents the mean \pm S. E. of 3-4 experiments.

Table 5 Permeability coefficient (cm/s) of model compounds

Rp.	LC	BA	ISMN
PW	4.34×10^{-6} (1.0)	5.48×10^{-6} (1.0)	1.22×10^{-7} (1.0)
ERW 1	2.11×10^{-5} (4.9)	7.18×10^{-7} (0.13)	5.49×10^{-6} (45)
ERW 2	1.24×10^{-5} (2.9)	6.56×10^{-7} (0.12)	9.51×10^{-7} (7.8)
EOW 1	3.26×10^{-7} (0.075)	9.79×10^{-6} (1.8)	2.05×10^{-7} (1.7)

Numbers in parentheses show the ratio of the permeability coefficient to purified water.

Table 6 pH changes of the donor solution before and after *in vitro* skin permeation experiment

Rp.	LC		BA		ISMN	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
PW	9.42	8.50	3.19	3.27	6.22	6.29
ERW 1	12.03	11.70	11.08	10.11	12.35	11.87
ERW 2	11.89	11.70	11.55	11.34	12.25	11.98
EOW 1	4.10	4.48	2.41	2.43	2.46	2.50

Table 7 Effect of donor pH on the permeability coefficient of LC and ISMN through excised hairless rat skin

LC		ISMN	
Final pH	P (cm/s)	Final pH	P (cm/s)
6.6	3.48×10^{-7}	3.6	2.05×10^{-7}
7.5	1.02×10^{-6}	7.0	1.87×10^{-7}
8.3	2.61×10^{-6}	9.7	2.41×10^{-7}
9.2	3.81×10^{-6}	11.2	8.62×10^{-7}
10.1	4.64×10^{-6}	12.0	1.26×10^{-6}
11.1	6.31×10^{-6}		
11.7	1.43×10^{-5}		
12.1	1.71×10^{-5}		

定常状態での皮膚透過速度に対するイオン型および非解離型薬物の寄与を LC を用いて調べた。すなわち、LC のイオン型および非解離型の透過係数 P_i , P_u を見積るために、種々 pH 緩衝溶液 (pH6.3-12.1) からヘアレスラット皮膚を介して透過した LC の累積量プロファイルを求めた。その結果を Fig. 4a に示す。図から明らかなように溶媒 pH の増加に伴い、LC の皮膚透過量も増加した。なお、定常状態でのそれぞれの皮膚透過係数を Table 7 に示す。一方、種々 pH 緩衝溶液 (pH3.5-12.1) からヘアレスラット皮膚を介した ISMN の累積透過量-時間プロファイルを Fig. 4b に、定常状態での皮膚透過係数を Table 7 に示す。溶媒 pH に依存して透過量および皮膚透過係数の増加が認められた。特に、pH11 以上で大きな上昇がみられた。

次に、pH の関数として LC の定常状態での皮膚透過係数を算出し、eq. 7 により LC のイオン型および非解離型薬物透過係数 P_i , P_u の寄与を見積もった (Fig. 5a)。その結果、 P_i と P_u はそれぞれ 2.50×10^{-7} および 5.17×10^{-6} (cm/s) であった。つまり、 P_i の寄与は P_u の 1/20 であった。当研究室のインドメタシンに関する以前の報告¹⁸⁾では、イオン型透過係数 P_i と非解離型透過係数 P_u は、それぞれ 1.50×10^{-7} および 2.79×10^{-5} (cm/s) で、 P_i の寄与は P_u の 1/190 であった。インドメタシンの場合と比較すると P_i の寄与が大きいことが明らかとなった。

また、Fig. 5a より ERW 1 からの LC の透過係数は、ERW 1 と同様の pH を示す緩衝液からのそれよりも大きかった。さらに、Fig. 5b より ERW 1 を用いた場合の ISMN の透過係数は、同様の pH を示す緩衝液を用いた場合に比べて、LC の場合以上に著しく大きいことがわかった。

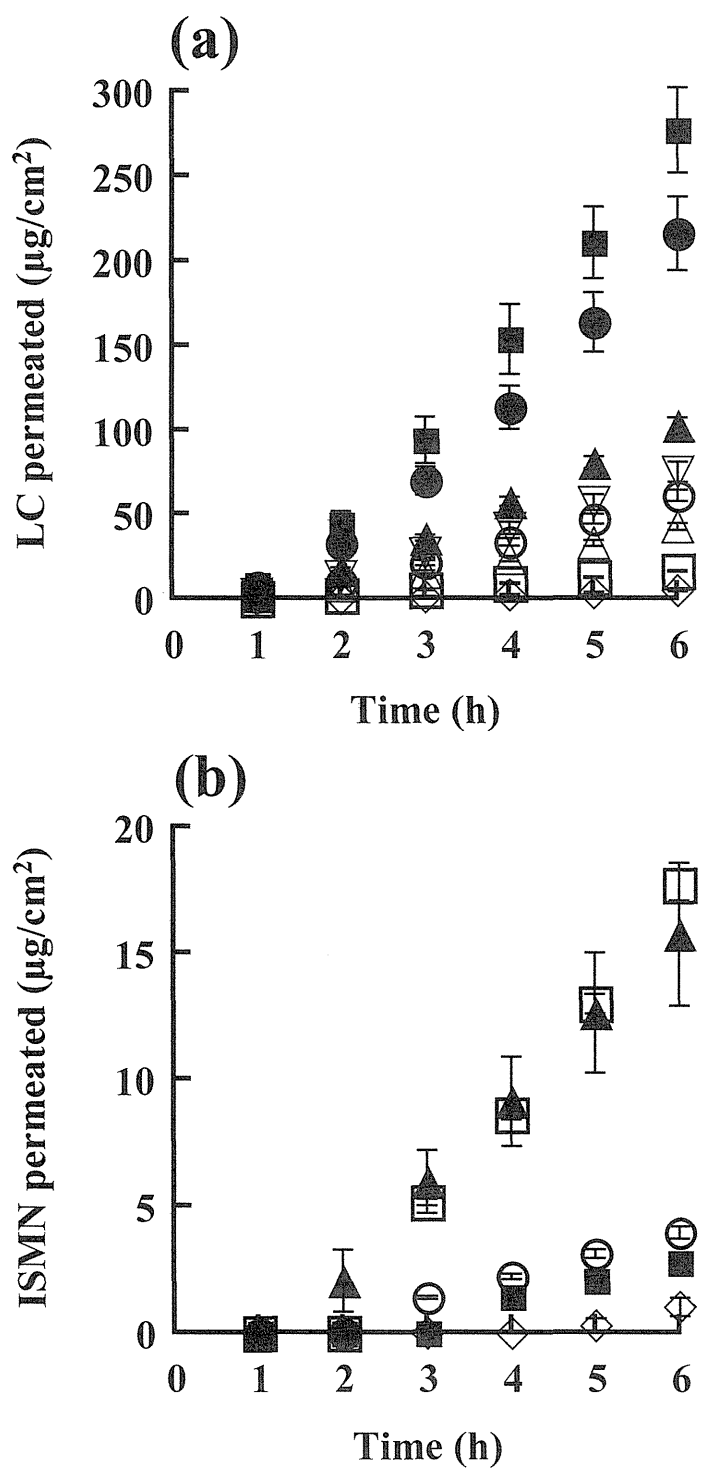


Fig. 4 Effect of donor pH on the permeation of LC (a) and ISMN (b) through excised hairless rat skin

Symbols: (a) ■: pH12.1, ●: pH11.7, ▲: pH11.1, ▽: pH10.3, ○: pH9.3, △: pH8.3, □: pH7.3, ◇: pH6.3, (b) □: pH12.1, ▲: pH11.2, ○: pH10.0, ■: pH7.0, ◇: pH3.5

Each point represents the mean \pm S. E. of 3-4 experiments.

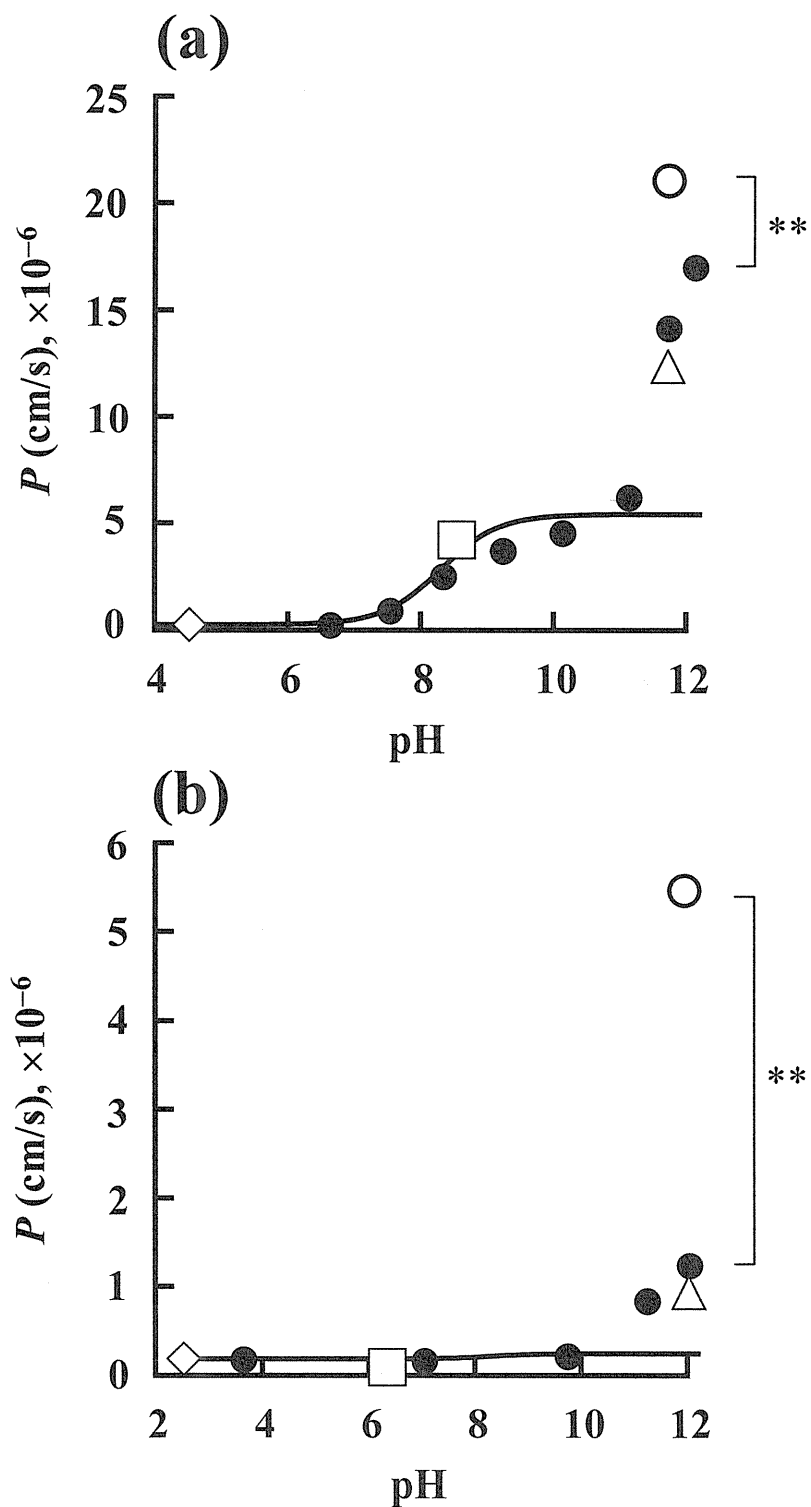


Fig. 5 Relationship between the skin permeability coefficient of LC (a) and ISMN (b) and donor pH

Symbols: □: PW, ○: ERW 1, △: ERW 2, ◇: EOW 1, ●: buffer

Line was obtained by curve fitting. ** $p < 0.01$

2. *In vitro* 皮膚インピーダンス測定

皮膚バリアーに及ぼす電解水の影響をヘアレスラット皮膚角層および真皮側に電解水を適用し皮膚インピーダンスを測定することにより評価した。Fig. 6に皮膚インピーダンス測定結果を示す。電解水適用後、6 h まで皮膚インピーダンスを測定したが、適用後2時間までは皮膚の初期水和の影響によりインピーダンスが安定化しなかったため、2時間目のインピーダンスを100%として示した。生理食塩液およびERW 2でわずかなインピーダンスの低下が認められ、また、ERW 1, EOW 1 および0.01 M HClでは経時的に減少が認められた。一方、0.02 M NaOHでは60%にまで著しい低下が観察された。

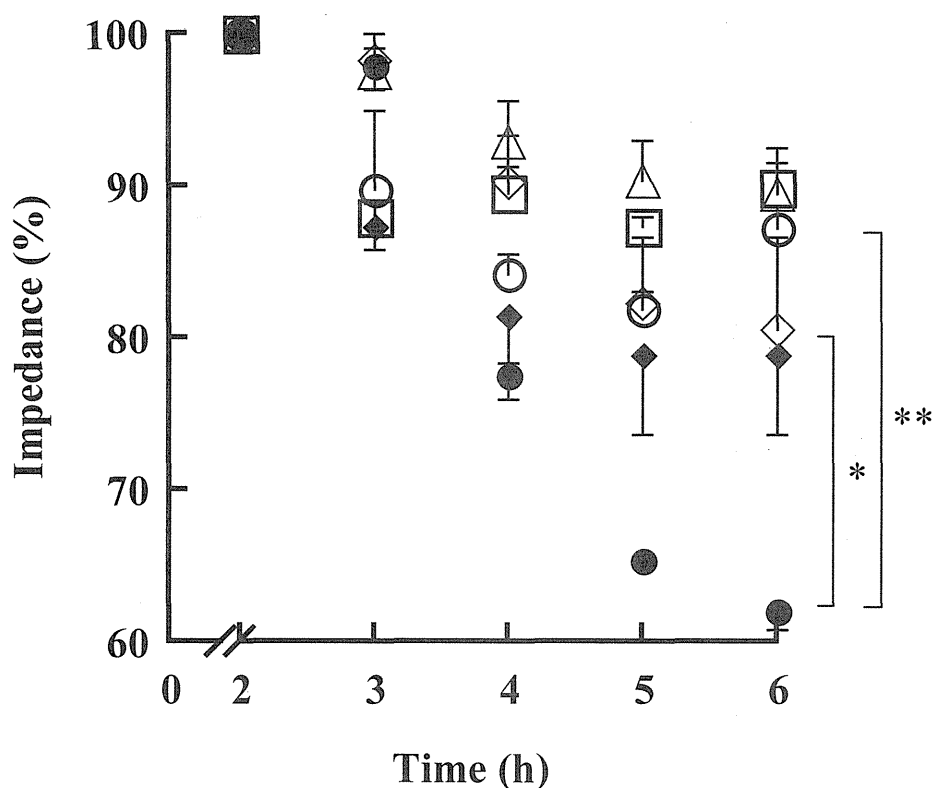


Fig. 6 Effect of electrolyzed waters on the *in vitro* skin impedance

Symbols: □: physiological saline, ○: ERW 1, △: ERW 2, ◇: EOW 1, ●: 0.02 M NaOH, ◆: 0.01 M HCl

Each point represents the mean \pm S. E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3. *In vitro* 皮膚タンパク質漏出試験

Fig. 7に電解水の皮膚傷害性の有無を調べるために、ヘアレスラット皮膚角層側に電解水を適用し、電解水中に漏出してくるタンパク量を経時的に測定した結果を示す。EOW 1およびこれと同pHを示す0.01 M HClは精製水と同様なタンパク漏出挙動を示した。一方、ERW 1およびERW 2では精製水よりも高値を示したものの、同pHを示す0.02 M NaOHや皮膚刺激性評価のポジティブコントロールとして用いられている1% Triton X-100²⁶⁾と比較すると有意に低いタンパク漏出量を示した。なお、1% Triton X-100水溶液では顕著なタンパク漏出を示さなかったため、pH12.0の緩衝液を溶媒に用いた。

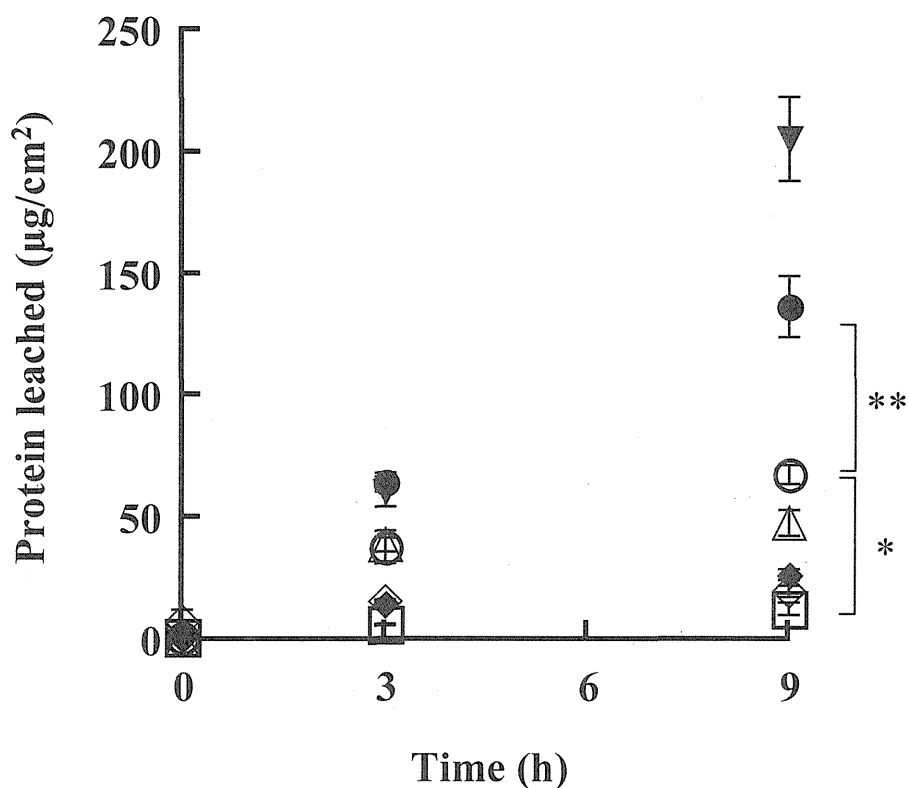


Fig. 7 Influence of electrolyzed water on the protein leaching from excised hairless rat skin

Symbols: □: PW, ○: ERW 1, △: ERW 2, ◇: EOW 1, ●: 0.02 N NaOH, ◆: 0.01 N HCl, ▼: Triton X-100 (pH12.0)

Each point represents the mean ± S. E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4. MTT 試験および *in vitro* 皮膚リン脂質漏出試験

In vitro ヘアレスラット皮膚 MTT 試験およびリン脂質漏出試験では、種々電解水の皮膚刺激性は陰性を示した (data not shown).

第 3 節 考察

種々電解水からの LC および BA の透過は pH 分配仮説により説明可能であるようにみられた。つまり、コントロールである精製水に比べて、アルカリ性である ERW 1 および ERW 2 からの LC の皮膚透過性は高く、酸性である EOW 1 からの皮膚透過性は低かった。一方、EOW 1 からの BA の皮膚透過性は高く、ERW 1 および ERW 2 からの透過性は低かった。非解離性モデル薬物である ISMN は、本来、溶媒の pH の違いによってその皮膚透過性は変わらないはずである。すなわち、pH 分配仮説だけでは説明がつかない結果となった。これにより、電解水が皮膚に何らかの作用を及ぼし透過促進効果を示している可能性が示唆された。

そこで pH の影響を調べたところ、種々 pH 緩衝溶液からの LC の皮膚透過は pH 分配仮説に従った。つまり、pH が高くなるに従い非解離型 LC の割合が増し皮膚透過量も増大した。一方、種々 pH 緩衝溶液からの ISMN の皮膚透過も溶媒 pH に依存して増加した。特に pH11 での上昇が大きかった。pH11 以上で eq. 7 を用いた理論曲線よりも大きな透過係数を示したことから皮膚傷害が引き起こされていると考えられた。加えて、緩衝液自体には皮膚透過促進効果がないことが確認された。

インピーダンスの変化はイオン性物質の皮膚透過性を反映し、また水溶性物質の皮膚透過性にも関係していると考えられる²⁷⁾。したがって、ERW 1 および EOW 1 は皮膚の hydrophilic pathway に影響を及ぼし、インピーダンスの低下をもたらしたと考えられる。そのために、ERW 1 からの水溶性物質である ISMN の透過性が上昇したと考えられるが、EOW 1 からの ISMN の皮膚透過性が上昇しなかった理由は不明である。また、水溶性物質は毛嚢などの皮膚付属器官を通る割合が高いと考えられるので²⁸⁾、

ERW 1 は特に毛嚢経路の皮膚透過性が大きくなっていると思われた。

タンパク漏出は皮膚表面の大部分を占める角層の構造破壊に関係していると考えられ、アルカリ、特に 0.02 M NaOH は角層の可溶化や破壊を引き起こしていると考えられた。また、物質の pK_a が上昇するに従い、つまり、アルカリ性が増すにつれ皮膚刺激性が増すという報告²⁹⁾とも一致する。一方、ERW 1, ERW 2 および EOW 1 は MTT 試験陽性の界面活性剤や同 pH を持つ 0.02 M NaOH などに比べはるかに皮膚刺激性が低いものと考えられた。

第 4 節 小括

電解水には薬物の皮膚透過促進効果があることがわかった。そのメカニズムは pH 分配仮説に従う透過に加え、皮膚インピーダンスの低下によるものと考えられた。なお、電解水のインピーダンス低下およびタンパク漏出作用は 0.02 M NaOH よりも軽微であったが、透過促進作用は大きくなることがわかった。このように電解水は高い透過促進能をもつばかりか、皮膚に対する安全性も高いことが確認された。以上、電解水は薬物や化粧品有効成分の皮膚透過を促進または抑制できることから、放出促進・制御能を有するユニークな新規基剤として医療や化粧品分野で応用可能であることが示唆された。

第3章 電解水の乳化作用

水は必ずと言って良いほど化粧品中に含まれており、必須成分の1つとあってよい。また、最近では海洋深層水や温泉水など機能性を持つ水が化粧品基剤として用いられることもある。さらに、外用剤や化粧品の代表的剤形の1つである乳剤（エマルジョン）には物理安定性保持のために、通常界面活性剤が配合されている。しかし、界面活性剤には生体膜を溶解したり、タンパク変性を起こすことがあるため、皮膚刺激性や細胞毒性^{30,31)}など安全面への配慮が必要である。特に顔面への使用やアトピー性皮膚炎患者に対する使用では、化粧品および化粧品中の成分に起因する皮膚刺激による患者のQOL低下が問題となることがある。

近年、実用化されているエマルジョンには高い保存安定性、液の澄明性、低粘度など多くの優れた性質を持つものが多くなっているが、用いる界面活性剤の種類によっては皮膚刺激性に注意が必要なものもある。また、高温保存時などでは有効成分によっては乳化系が壊れて分離・分解してしまうことがあるため、界面活性剤の種類や濃度の選択が難しくなるなどの欠点がある。

我々は予備実験により、ある種の強アルカリ性（還元性）電解水が低い表面張力を示すことや、けん化作用を有することなどを既に見いだしており、このような電解水が乳化剤の水相として利用可能であると考えた。そこで、初めに、幅広い化粧品や医療への応用を考え、化粧品や医療用外用剤として汎用されているO/W型エマルジョンを電解水を用いて作成することとした。また、作成した界面活性剤フリーエマルジョンの乳化安定性について評価を行った。さらに、乳剤基剤としての応用を検討するため、モデル皮膚浸透・透過物質としてリドカイン塩基およびリドカイン塩酸塩を用いて、これら作成したエマルジョンの皮膚透過制御作用について評価を行った。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

瞬間ゲルイオン水 GE-100 は (株) エーアイシステムプロダクトから供与された。オリーブ油は関東化学 (株) (東京) から購入した。Polyoxyethylene sorbitanmonolaurate (Tween 20) は ICN Biochemicals, Inc. (Aurora, OH, U.S.A.) から, sorbitan monostearate (Span 60) は東京化成販売 (株) から購入した。リドカイン塩酸塩 (LC HCl) は Sigma-Aldrich Co.から購入した。

2. 実験動物

第 2 章第 1 節実験方法 2. 実験動物に準じた。

3. 表面張力および界面張力測定法

種々電解水を用い, それぞれの電解水単独の表面張力, オリーブオイルを飽和させた電解水の表面張力および電解水とオリーブ油の界面張力を測定した。なお, 表面張力は第 1 章第 2 節 7. 表面張力測定方法に従い測定した。種々電解水とオリーブ油を 1:2 の割合で混合し, マグネティックスターラーで 24 h 攪拌することによりオリーブ油を飽和させた電解水を調製した。

界面張力の測定は接触角計 (DM 500, 協和界面科学 (株)) を用いて行った。界面張力測定では, 表面張力測定と同様にオリーブオイルを予め飽和させた電解水を試験液とし, 試験液約 1 mL を測定用注射筒にとり, 懸滴法 (ペンダントドロップ法) で室温下のオリーブオイルとの界面張力を測定した。なお, 逆針を用いた反転測定を行い, 画像処理により Young-Laplace 式をフィッティングさせて解析した。

4. 界面活性剤フリーエマルジョンの調製法

Table 8 に示した処方により各エマルジョンを作成した³²⁾。安定な O/W 型エマルシ

ジョンを作成するために適した HLB 値は 8~15 とされているので、本研究では一般的な界面活性剤として Tween 20 (HLB = 16.7) と Span 60 (HLB = 4.0) を選択し、HLB = 10 になるようこれら界面活性剤を混合して界面活性剤入りサンプルとした (Rp. 2). 連続相 (水相) と分散相 (油相) をそれぞれ 90 : 10 または 55 : 45 の比率で合計 20 mL となるように混合し、ホモジナイザー (Polytron PT-MR 3100, Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) を用いて 13,000 rpm, 5 min, 氷冷下で乳化を行い、O/W 型エマルジョンを得た.

Table 8 Recipe of emulsion preparations

Rp.	Continuous phase	Dispersed phase
1	PW (cont.)	Olive oil
2	Tween 20 in PW (cont.)	Span 60 in olive oil
3	ERW 1	Olive oil
4	ERW 2	Olive oil
5	GE-100	Olive oil
6	0.02 M NaOH (cont.)	Olive oil
7	EOW 1	Olive oil
8	0.01 M HCl (cont.)	Olive oil

5. 界面活性剤フリーエマルジョンの pH 測定法

調製したエマルジョンの pH は第 1 章第 2 節実験方法 2. pH 測定法に準じて測定した.

6. 界面活性剤フリーエマルジョンの顕微鏡下観察法

調製直後のエマルジョン約 5 μ L をスライドガラスに広げて顕微鏡 (CKX41, オリパス (株), 東京) で粒子径を観察した. なお, カバーガラスで試料を覆うと, 粒子を潰してしまう恐れがあるため今回は使用しなかった.

7. 分離度試験法による界面活性剤フリーエマルジョンの安定性評価法

調製直後のエマルジョンを比色管に移し、室温静置下で経時的（0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72 h）に離水層の厚さを比色管の目盛りにより目視で読み取り、エマルジョンから分離される離水層比を測定した⁸⁾。

8. タービスキャンによる界面活性剤フリーエマルジョンの安定性評価法

溶液安定性評価装置（Turbiscan MA2000, 英弘精機（株）、東京）により安定性を評価した^{33, 34)}。タービスキャンの測定条件を Table 9 に示す。なお、測定は調製直後のエマルジョンを専用のサンプル管に移し、調製後 30 min まで行った。本方法では分散したサンプルに光をあて、透過光と後方散乱光（反射光）を測定するもので、光源および検出器がサンプル管にそって上下動することで光の強度を 40 μm のピッチでスキャン測定し、高さ方向で強度分布を得ることができる。この測定を任意の時間インターバルを繰り返すことでサンプル内の粒子移動（クリーミングや沈降）や粒径変化（凝集や合一）を光の強度分布変化として測定した。

Table 9 Measurement condition of Turbiscan MA2000

Measuring method	Light multiple scattering method (transmitted light, backscattered light)
Light source	Pulsed LED
Wavelength	850 nm
Sample cell size	16 ϕ mm
Diameter range	0.05-1000 μm
Maximum particle concentration	~60 v/v% (~95 % at emulsion)

9. *In vitro* 薬物皮膚透過実験法

連続相と分散相比を 55:45 とし、脂溶性であるリドカインは分散相中に、水溶性であるリドカイン塩酸塩は連続相中に溶解し、それぞれエマルジョン含量中に 1.0%となるようにして、薬物封入エマルジョンを前述の方法で調製した。得られたエマルジョンを用いて第2章第1節実験方法3. *in vitro* 皮膚透過実験法に準じて透過試験を行った^{35,36)}。薬物の定量は第2章第1節実験方法4. 薬物の定量法と同様に行った。

第2節 結果

1. 基本的物性

電解水の表面張力および電解水とオリーブ油との界面張力を Table 10 に示す。試験液単独では、ERW 2 および GE-100 で特に低い表面張力を示した。また、オリーブ油で飽和させた試験液では、どれもほぼ 50 mN/m 以下の低い値を示した。

一方、EOW 1 および 0.01 M HCl では、精製水と同様の界面張力を示した。0.02 M NaOH では精製水よりも低値を示した。なお、ERW 1, ERW 2 および GE-100 では界面張力は測定できなかった。

Table 10 Surface tension and interfacial tension of electrolyzed water

	Surface tension (mN/m)		Interfacial tension (mN/m)
	Alone	Saturated with olive oil	
PW	69.17	47.24	26.3
ERW 1	68.60	38.03	N.D.
ERW 2	35.47	36.99	N.D.
GE-100	38.70	32.51	N.D.
0.02 M NaOH	68.83	38.03	2.5
EOW 1	56.40	42.85	28.5
0.01 M HCl	65.37	49.06	28.5

連続相と分散相を 90 : 10 および 55 : 45 で混合し, 作成した各処方のエマルションについて pH を測定した結果を Table 11 に示す. いずれの処方の pH も混合割合による違いは見られなかった.

Table 11 pH of emulsion preparations

Rp	Mixing ratio*	
	90 : 10	55 : 45
1	5.41	5.90
2	6.86	7.21
3	12.44	12.61
4	12.52	12.54
5	12.27	12.61
6	12.91	12.90
7	2.39	2.62
8	2.53	2.15

*: continuous phase : dispersive phase

2. 界面活性剤フリーエマルジョンの顕微鏡下観察

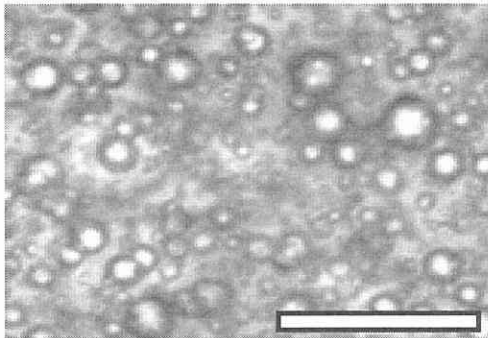
顕微鏡観察の結果から、混合割合 90 : 10 のエマルジョン (Fig. 8) と比較して 55 : 45 のエマルジョン (Fig. 9) では、より微細で均一な粒子を得られるようになった。また、粒子密度も高かった。混合割合 90 : 10 では、エマルジョンの分散相粒子を全く観察出来なかった (Rps. 3, 4, 7, 8 in Fig. 8) が、混合割合を 55 : 45 にすることで分散相粒子を観察できるようになった (Rps. 3, 4, 7, 8 in Fig. 9)。

3. 分離度試験法による界面活性剤フリーエマルジョンの安定性評価

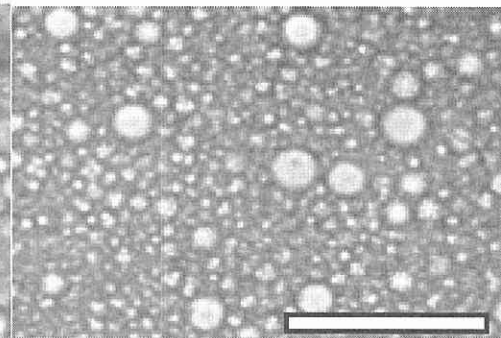
分離度試験では、分離下層を観察するので、混合割合 90 : 10 のエマルジョン (Fig. 10) と比較して 55 : 45 のエマルジョン (Fig. 11) は、処方間の安定性の差異が明確になった。はじめに、連続相と分散相の混合割合 90 : 10 のエマルジョンでは、いずれの処方においても 1 h 以降で大きな変化は見られなかった。チキソトロピー性を有する GE-100 を含む Rp. 5 のみ、分離下層は観察されず、極めて安定であった (alkaline Rp. in Fig. 10)。

一方、混合割合 55 : 45 のエマルジョンでは、コントロール Rp. 1 と界面活性剤入りコントロール Rp. 2 の差が明確であり (control Rp. in Fig. 11)、その他の処方は、その間の値を示した。Fig. 11 のアルカリ性処方では、ERW 2 を含む Rp. 4 のみで穏やかな分離が見られたが、他は全く分離しなかった。Fig. 11 の酸性処方では、アルカリ処方と比較すると大きな分離がみられたが、0.01 M HCl を含む Rp. 8 よりも強酸性電解水を含む Rp. 7 でわずかに分離が小さくなる傾向を示した。

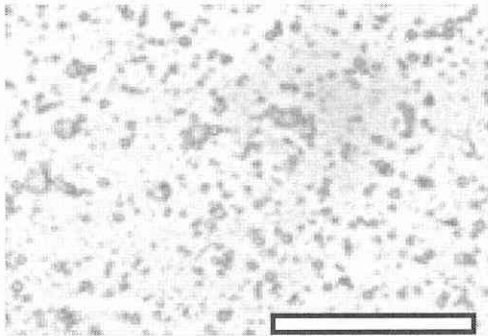
Rp. 1



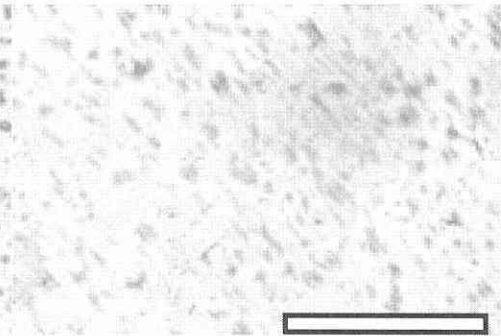
Rp. 2



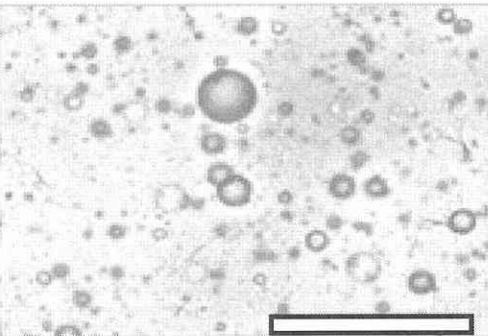
Rp. 3



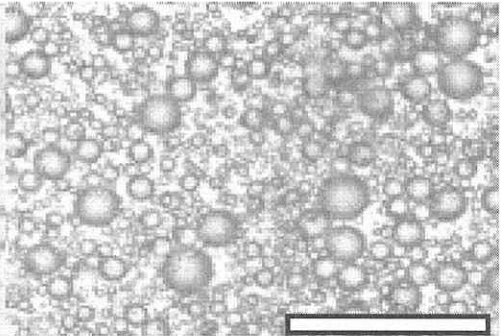
Rp. 4



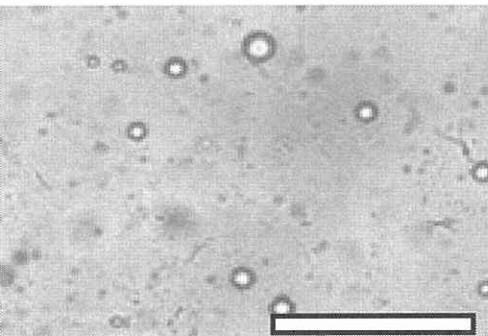
Rp. 5



Rp. 6



Rp. 7



Rp. 8

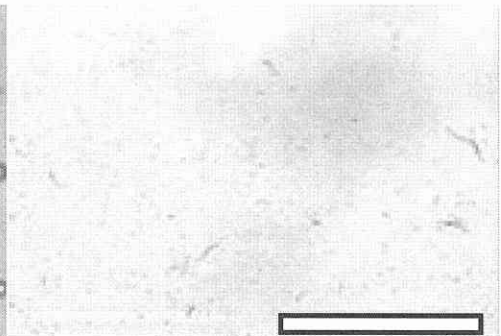


Fig. 8 Photomicrographs of emulsions prepared at mixing ratio = 90 : 10
Bars indicate 100 μm .

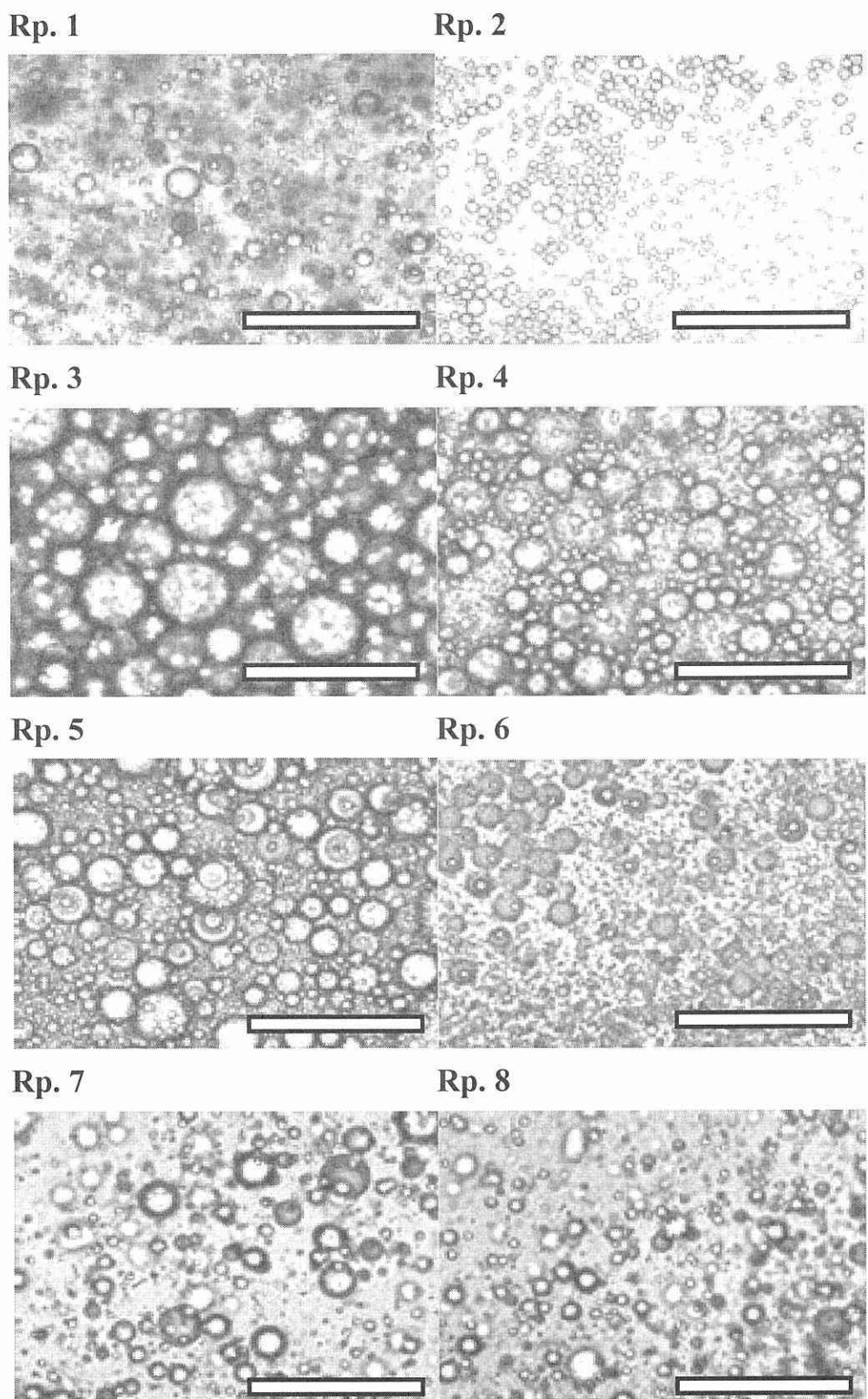
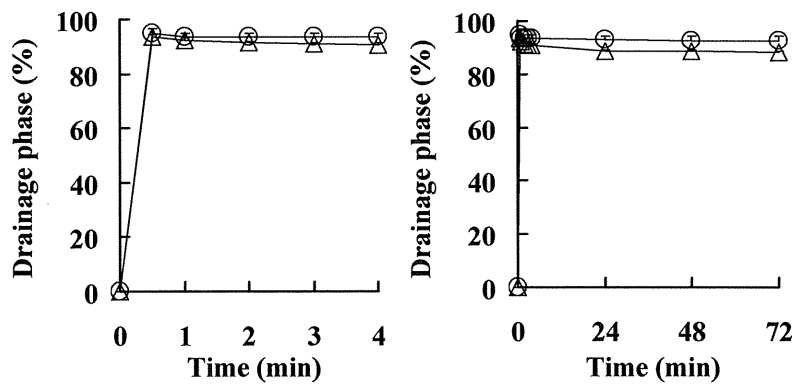
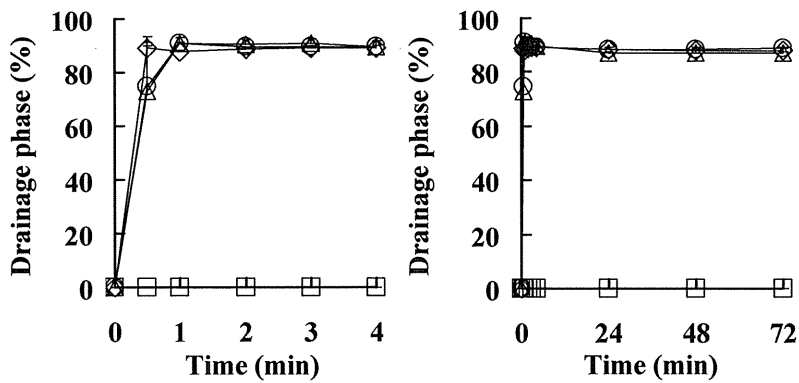


Fig. 9 Photomicrographs of emulsions prepared at mixing ratio = 55 : 45
Bars indicate 100 µm.

Control recipe



Alkaline recipe



Acidic recipe

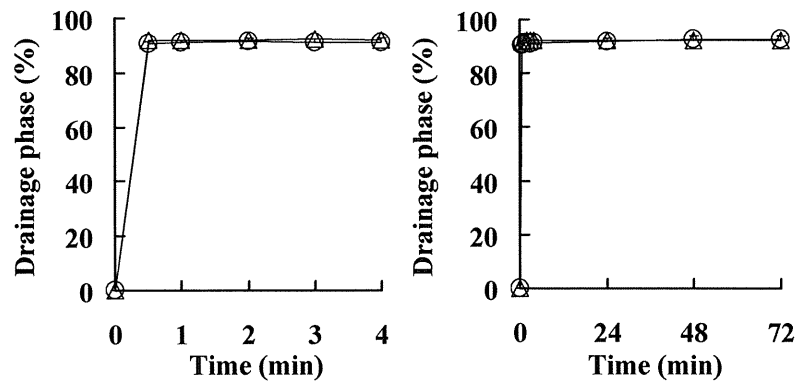
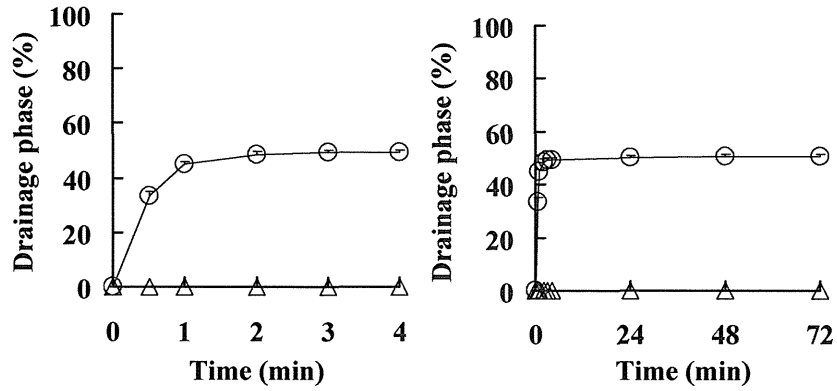


Fig. 10 Relationships between height of drainage phase and time at mixing ratio = 90 : 10

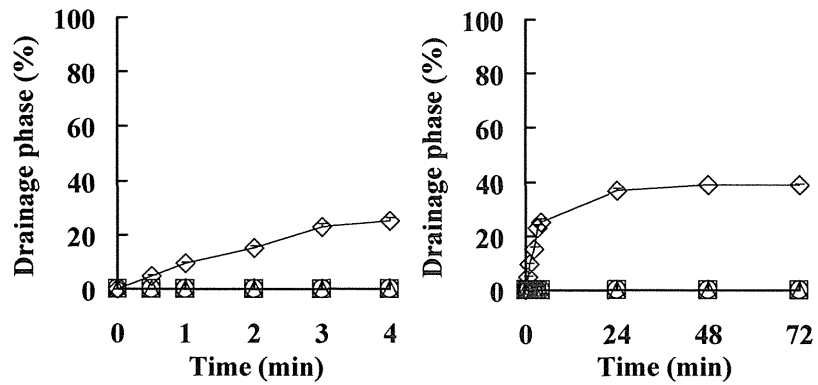
Symbols: control Rp. ○: Rp. 1, △: Rp. 2, alkaline Rp. △: Rp. 3, ◇: Rp. 4, □: Rp. 5, ○: Rp. 6, acidic Rp. △: Rp. 7, ○: Rp. 8

Each point represents the mean ± S. E. of 3 experiments.

Control recipe



Alkaline recipe



Acidic recipe

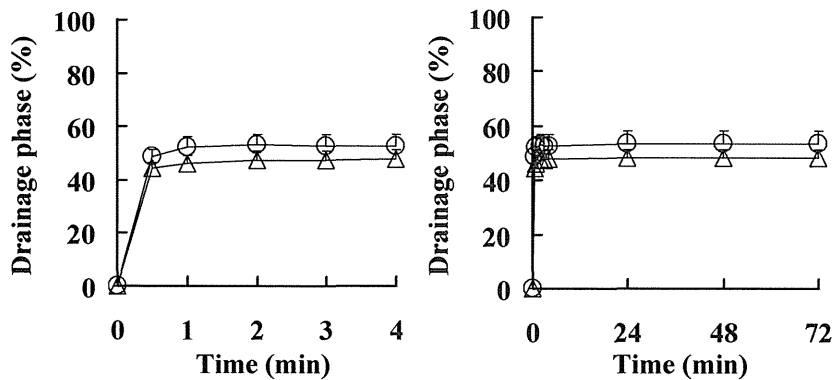


Fig. 11 Relationships between height of drainage phase and time at mixing ratio = 55 : 45

Symbols: control Rp. ○: Rp. 1, △: Rp. 2, alkaline Rp. △: Rp. 3, ◇: Rp. 4, □: Rp. 5, ○: Rp. 6, acidic Rp. △: Rp. 7, ○: Rp. 8

Each point represents the mean \pm S. E. of 3 experiments.

4. タービスキャン（溶液安定性評価装置）による安定性評価

タービスキャンの測定結果を Fig. 12 に示す。グラフの横軸はサンプル管の位置を示している。すなわち、左側がサンプル管の下部、右側が上部を示す。50 mm の表示はサンプル管下部から 50 mm の位置にあることを意味する。縦軸は、上方のグラフでは透過光強度、下方のグラフでは後方散乱光強度を示している（負の値として記述）。また、線の色はエマルション調製直後からの時間経過を示している（Fig. 12 のそれぞれの時間を示す色を参照）。酸性処方（Rps. 7, 8 in Fig. 12）とアルカリ性処方（Rps. 3-6 in Fig. 12）では、エマルションの分離挙動が著しく異なった。すなわち、Rps. 7, 8 ではサンプル管下部で透過光強度に変化が認められ、さらに、初期の段階から後方散乱光強度にも変化が認められた。一方、Rps. 3-6 では透過光強度に変化は認められないが、Rps. 3, 4, 6 でサンプル管上部と下部で後方散乱光強度に経時変化が認められた。さらに、Rp. 5 ではわずかに後方散乱光強度の低下が観察された。

次に、タービスキャンを用いたエマルション安定性の測定結果を用いて、沈降の速度論的解析を行った。得られた結果を Fig. 13 に示す。アルカリ性処方の Rp 3, 4, 6 では、沈降分離の開始時間はほぼ同時であるが、最終的に Rp. 6 と比較して Rp. 4 は安定で、Rp. 3 はさらに安定であった（Fig. 13a）。一方、酸性処方では、Rp. 7 と比較して Rp. 6 は分離が速い段階で始まっているが、最終的にはわずかに安定であった（Fig. 13b）。

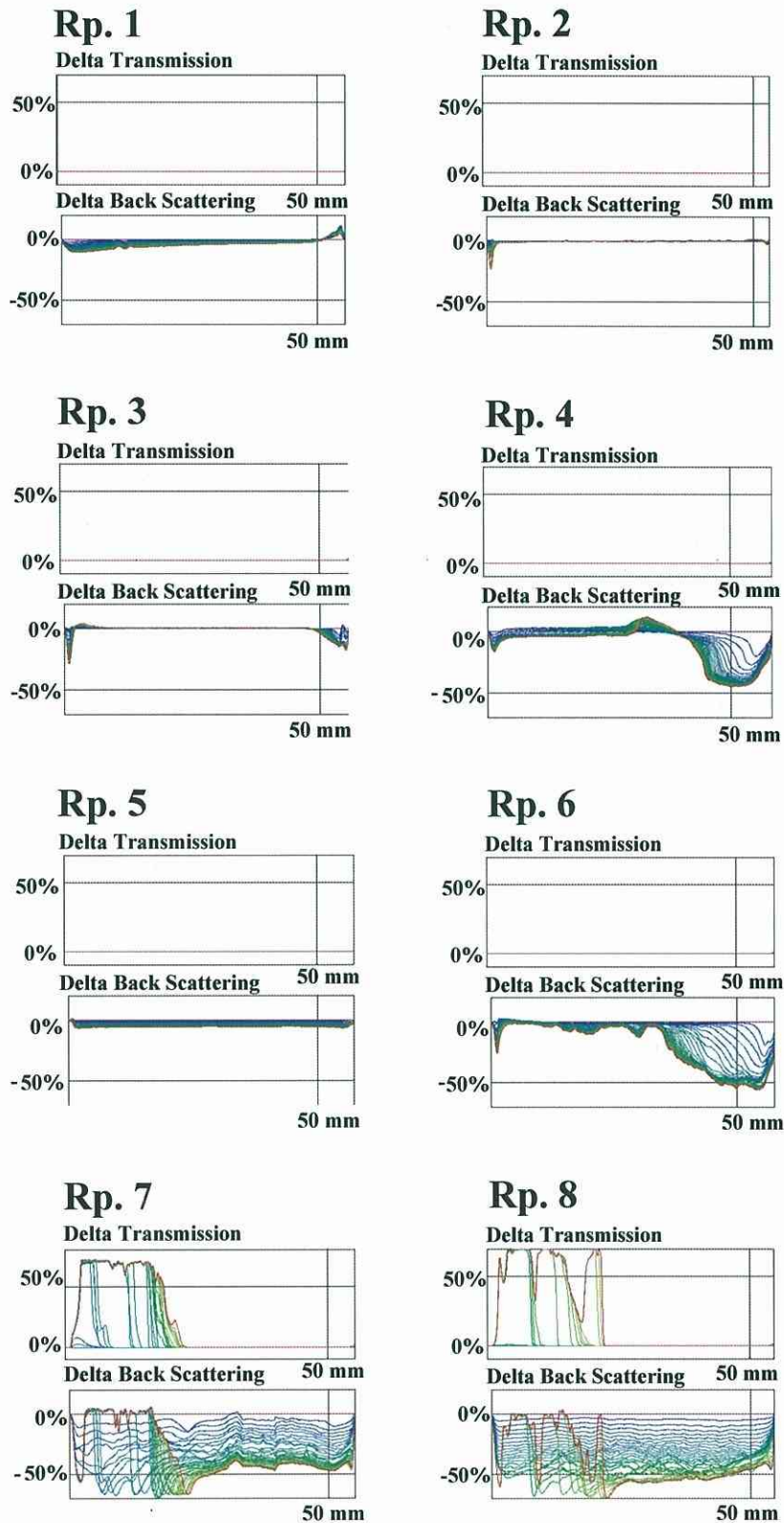


Fig. 12 Time course of emulsion stability by Turbiscan MA2000
 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 (min)

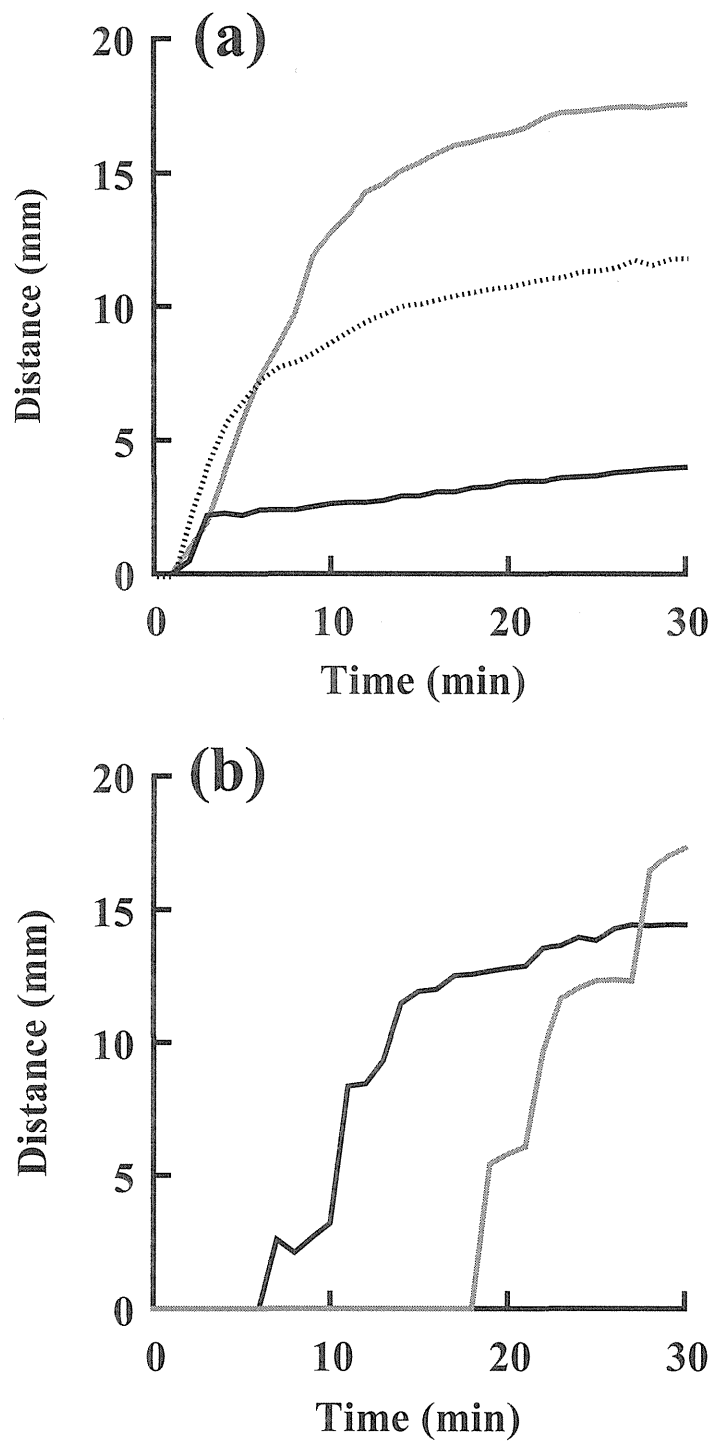


Fig. 13 Sedimentation speed of emulsions on delta transmission

a) alkaline recipe —: Rp. 3, ····: Rp. 4, -·-·: Rp.6, b) acidic recipe —: Rp. 7, -·-·: Rp. 8

5. *In vitro* 皮膚透過実験

Fig. 14にリドカイン塩基とリドカイン塩酸塩適用後のリドカインの *in vitro* 皮膚透過実験の結果を示す。脂溶性物質であるリドカイン塩基と水溶性物質であるリドカイン塩酸塩の皮膚透過性を比較すると、リドカイン塩基の方が全体的に5倍程度高い皮膚透過を示した。また、Rp. 1とRp. 2を比較するとリドカイン塩基ではRp. 1の方が高い皮膚透過を示した (Fig. 14a) が、リドカイン塩酸塩ではRp. 2の方が高い皮膚透過を示した (Fig. 14b)。アルカリ性処方と酸性処方を比較すると、両モデル物質ともにアルカリ性処方で高い皮膚透過性を示す傾向にあったが、両モデル物質間で累積皮膚透過量のランクオーダーは一致しなかった (Fig. 14c-f)。また、リドカイン塩基では0.02 M NaOHを用いたRp. 6で高い皮膚透過性を示した (Fig. 14c)。

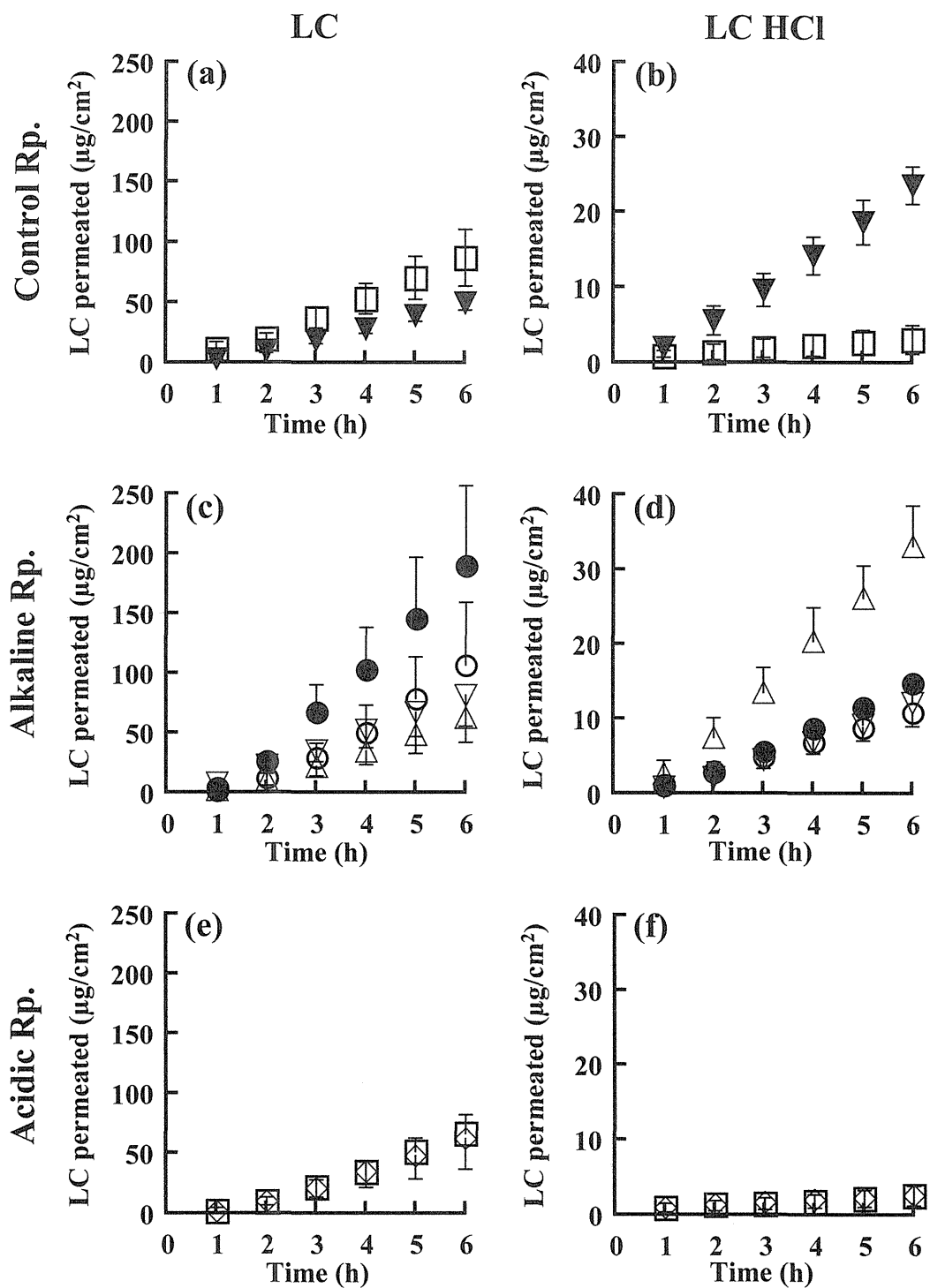


Fig. 14 Time course of changes in cumulative amount of drugs permeated excised hairless rat skin

Symbols: a, b) □; Rp. 1, ▼; Rp. 2, c, d) ○; Rp. 3, △; Rp. 4, ▽; Rp. 5, ●; Rp. 6, and e, f) ◇; Rp. 7, □; Rp. 8

Each point represents the mean ± S.E. of 3-5 determination.

第3節 考察

電解水の表面張力を測定したところ、第1章でも示したが、試験液単独では ERW 2 で特に低い表面張力が認められたが、この原因はわかっていない。GE-100 で低値を示したのは高い粘度の影響を受けたためであると考えられた。また、表面張力低下にアルカリによる油脂のけん化が関与するのであれば、アルカリ性溶液のみでオリーブ油を飽和させた場合に、表面張力低下が観察されると予想される。しかし、本研究ではアルカリ性溶液のみならず、全ての試験液で低下が認められたことから、これはアルカリによる油脂のけん化ではなく、オリーブ油の表面張力 (35.8 mN/m, 20°C) の影響であると考えられる。

界面張力を測定したところ、EOW 1 および 0.01 M HCl では精製水と同様の値を示した。また、0.02 M NaOH では精製水よりも低い値を示した。これは NaOH のけん化作用に起因しているのかもしれない。また、ERW 1, ERW 2 および GE-100 で測定できなかったのは、それぞれのけん化作用により水相が濁ってしまったため、測定原理的にデータを得ることができなかったと考えられる。なお、正方向測定の場合では全てのサンプルでオリーブ油の濁りにより測定不可能であった。また、今回測定できなかった3サンプルは Wilhelmy 法でも界面が不鮮明となることから測定は困難であると思われた。

連続相と分散相の混合割合が 90 : 10 の処方と比較して、55 : 45 の処方は評価を行いやすく、より安定かつ粒子径の小さなエマルションを得やすいことがわかった。詳細は示さないが、混合割合が 25 : 75 の処方、つまり W/O 型エマルションの作成も可能であることがわかった。さらに、25 : 75 の処方は 55 : 45 の処方よりも安定であった。

タービスキャンによる安定性評価により酸性処方では後方散乱光強度が初期段階で全体的に下方へシフト、後半では横軸に対してランダムに増加していることから凝集が起きたと考えられる。一方、アルカリ性処方では、サンプル管上部と下部で後方散乱光強度が変化していることから凝集・沈降が起きたことが分かる。さらに、Rp. 4 で

は、サンプル管上部から底部へ向かって後方散乱光が低下、増加、低下と3段階に変化していることから、新たな層の形成が示唆された。GE-100を用いたRp.5は、後方散乱光強度がわずかに下方にシフトしただけであることから、他のアルカリ性処方と比較して安定であった。つまり、粒子径の増大は観察されたものの、チキソトロピー性を有するGE-100の高い粘度のために分離は全く観察されなかった。安定なエマルションを形成するGE-100は化粧品や医薬品の基剤として極めて興味深い。エマルションの安定性に関しては、分散相の粒子径のほか連続相の粘度も重要な因子と考えられる。Rp.5はチキソトロピー性を持つことから、今後、粘度についても検討が必要であると思われる。

次に、脂溶性物質であるリドカイン塩基と水溶性物質であるリドカイン塩酸塩の *in vitro* 皮膚透過性を比較した。その結果、リドカイン塩基を皮膚に適用した時の方が高い皮膚透過性を示したが、これは脂溶性が高い塩基の方が皮膚に分配しやすく、結果として高い皮膚透過性を示すためである。また、リドカイン塩基を含有したエマルション間 (Rp.1と2) を比較すると、Rp.1の方が高い透過を示した (Fig.14a)。これは、Rp.1のエマルションの安定性が低いため、リドカイン塩基が分散相から連続相中へ移動し、連続相中濃度が増加することに起因していると思われる。一方、リドカイン塩酸塩を含有したエマルション間 (Rp.1と2) で比較すると、Rp.2の方が高い透過性を示した (Fig.14b)。これは、安定な分散相中にリドカイン塩酸塩が移動しにくいいため、連続相中のリドカイン塩酸塩濃度が増加したことに起因していると思われる。また、リドカイン塩酸塩を含有したエマルション間では、Rp.4が最も高いリドカイン透過性を示したことも同様の理由が考えられるが、Rp.3,5で低い透過性を示した理由は不明である。

さらに、アルカリ性処方と酸性処方のリドカインの皮膚透過性を比較すると、両モデル物質ともにアルカリ性処方で透過が高い傾向にあったが、これは、pH分配仮説により説明することができる。さらに、溶液を用いた場合¹¹⁾に比べて、エマルションを用いた場合には、リドカインの透過は低下した。これによりエマルションの安定性の

関与や油相中の分子型リドカインの寄与が示唆された。すなわち，Fig. 15 に示すように，エマルションを用いた場合，水相中の分子型リドカインの一部が油相中に移動し，結果として水相中の分子型リドカイン濃度が低下して，リドカインの皮膚透過も低下したと考えられる。また，0.02 M NaOH を用いた Rp. 6 (Fig. 14c) で最も高いリドカイン透過が観察されたが，この原因としては皮膚傷害性の関与が考えられた。また，水溶液を用いた場合よりもエマルションを用いた場合の方が，高い透過性が得られるという報告^{37,38)}もあることから，今後，連続相と分散相の比率を変更し W/O 型エマルションを用いて皮膚透過実験を行うことにより，放出制御メカニズムがより詳細に明らかとなるであろう。これら電解水を用いたエマルションにより皮膚透過性が制御されることが明らかとなったが，今後は，エマルションを用いた皮膚刺激性についても詳細に検討する必要があると思われる。

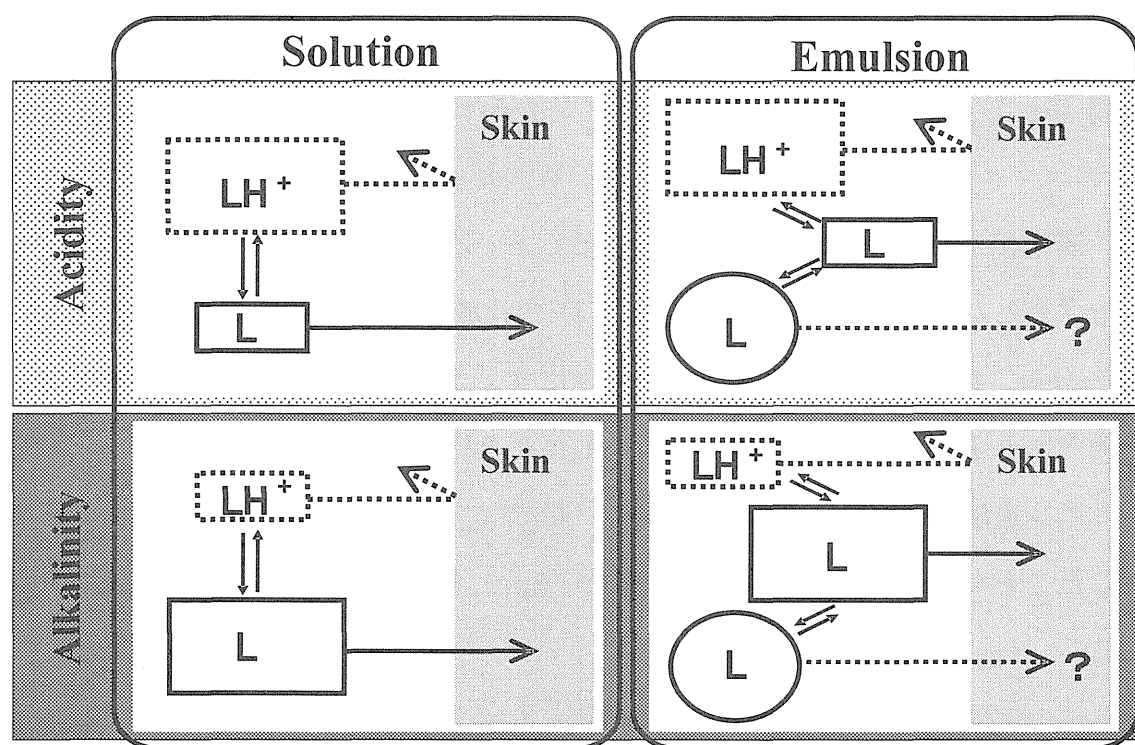


Fig. 15 Schematic representation of the distribution of lidocaine base and salt (L and LH^+) between solution and skin

□: Molar conc. in water phase, □: Ionic conc. in water phase, ○: Molar conc. in oil phase

第4節 小括

本研究で用いた電解水，特に，各種アルカリ性電解水には強い界面活性作用を有することが明らかとなり，電解水を用いて界面活性剤フリーエマルションを作成することが可能であった．これら電解水を用いることで，エマルション作成時に添加する界面活性剤を低減できる可能性が示唆された．また，電解水を用いてエマルション化した場合，水溶性薬物のみならず脂溶性薬物の放出制御に有用であることが示唆され，医薬品や化粧品基剤として有効成分の放出制御に有望であろう．

第4章 電解水の抗酸化作用

生体のレドックス反応（酸化還元反応）は恒常性維持や酸化ストレス防御に対して重要な役割を担っている。すなわち、活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）やフリーラジカルは、生体内で好中球やマクロファージなどの免疫系細胞により産生され、ウイルスやガン細胞などの殺菌に利用されている。一方、生体内の器官の中で皮膚や肺は、紫外線や電離放射線または好氣的環境により常に ROS やフリーラジカルに曝されている。つまり、ROS は生体防御、遺伝子発現やシグナル伝達機能に関与するが、過度の代謝負荷や紫外線などにより消去しきれない ROS が発生すると、脂質過酸化や遺伝子変異などの悪影響をもたらす。さらに、心筋梗塞、慢性肝炎、光アレルギー反応や炎症性皮膚疾患などの様々な疾患にも酸化ストレスに起因するタンパク質や脂質障害の関与が広く知られている。

ERW はこのような状態や疾患に関係する抗酸化作用^{39, 40)}や抗高血糖作用⁴¹⁾などを持つことが報告されている。また、Shirahata らは活性原子水素説による活性酸素の消去能や DNA 酸化損傷防止効果を報告している^{42, 43)}、しかし、Hiraoka らは、抗酸化活性は水素分子および、または、還元型バナジウムによってもたらされると報告⁴⁴⁾している。また、ERW 自身には抗酸化作用はないがアスコルビン酸のようなプロトドナーの抗酸化作用を増強するという報告^{45, 46)}や、ERW はアスコルビン酸の酸化を抑制することにより間接的に抗酸化作用を示すという報告⁴⁷⁾もある。しかし、電解水の抗酸化作用については、さらに詳細に検討を行う必要があると思われる。そこで、電子スピン共鳴分光法（electron spin resonance spectroscopy, ESR）を用いて活性酸素・フリーラジカル消去活性を測定することにより、種々電解水の抗酸化作用を評価することとした。そこでまず、活性酸素のうちスーパーオキシドアニオンを、また、抗酸化剤のフリーラジカルスカベンジャー活性または抗酸化活性を検出するためのスクリーニングツールとして使用されている DPPH フリーラジカルを選択した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

Diethylenetriamine-*N,N,N',N'',N''*-pentaacetic acid (DTPA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical (DPPH), L(+)-ascorbic acid (AsA) は和光純薬工業 (株) から, hypoxanthine (HPX) は関東化学 (株) から, 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) はラボテック (株) (東京) から, xanthine oxidase (XOD) は Sigma-Aldrich Co.から, それぞれ購入した.

2. スーパーオキシドアニオン消去能測定法

一般的に活性酸素種はその寿命の短さから ESR においても直接的に観察することは困難である. そこで, 活性酸素種を安定なラジカルに変換後に測定するスピントラップ法^{48, 49)}が確立されている. 今回, 活性酸素のスピントラップ剤として DMPO を用いた. DMPO はトラップした活性酸素種により異なったシグナルパターンと超微細結合定数を示すことから得られる情報が多くなる.

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により酸素を一電子還元反応させスーパーオキシドアニオンを発生させ, 次に, これを DMPO にトラップさせ DMPO-OOH アダクトとして検出し (Fig. 16), スーパーオキシドアニオン消去能 (superoxide scavenging activity: SOSA) を求めた^{50, 51)}.

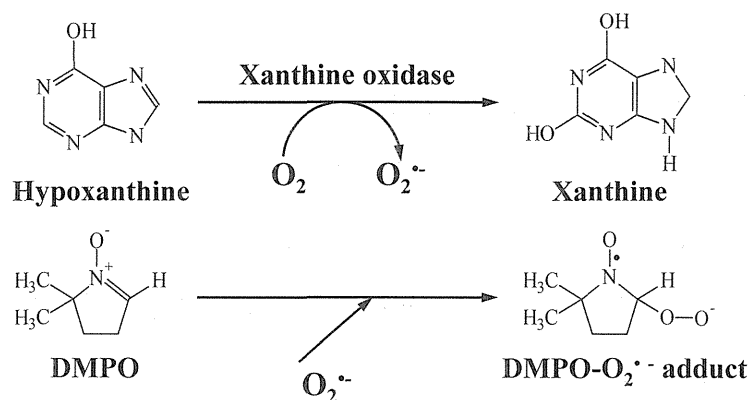


Fig. 16 Spin trap reaction on HPX-XOD system

測定サンプルは2 mM HPXを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.4, PB) 50 μ L, 10 mM DTPAを含む0.1 M PB 20 μ L, 試験液50 μ L, 50% DMPO 50 μ Lおよび0.25 U/mL XOD 30 μ Lをこの順で10 mL試験管に加えて全量200 μ Lとして, すばやく攪拌後, 測定用扁平セルに移し測定した. なお, XODを加えてから1分後のESRスペクトルを測定した. また, 電解水サンプルは反応系の至適pHを考慮し予めpH7.4に中和してから測定に用いた. ESRスペクトルはJEOL X-band spectrometer (JES-FE3XG, 日本電子 (株), 東京) を用いて記録した. なお, 測定時に外部標準としてMn²⁺をドープしたMnOを装着した. Mn²⁺のシグナル高さ (h_2) とDMPO-OOHの第1シグナル高さ (h_1) の比 (h_1/h_2) を相対シグナル強度 (I) とし, なお, コントロールのシグナル強度を I_0 とした. 詳細な測定条件をTable 12に示す.

Table 12 Measurement condition of spin trap and direct method by ESR

	O ₂ ^{•-}	DPPH
Filed	3353 \pm 100 G	
Sweep time	2 min	
Modulation	100 kHz 2 G	100 kHz 1 G
Amplitude	1.25 \times 1000	
Response	0.1 sec	
Output power	8 mW	

3. DPPH フリーラジカル消去能測定法

一般的にラジカルは短寿命かつ不安定であるのに対して, DPPHは常温で安定なラジカルで試薬として入手可能である. なお, DPPHは抗酸化剤から水素原子を引抜きみずから消滅する (Fig. 17). そこで, DPPHをESRにより直接検出し, DPPH消去能 (DPPH radical-scavenging activity: DRSA) を評価した⁵²⁾.

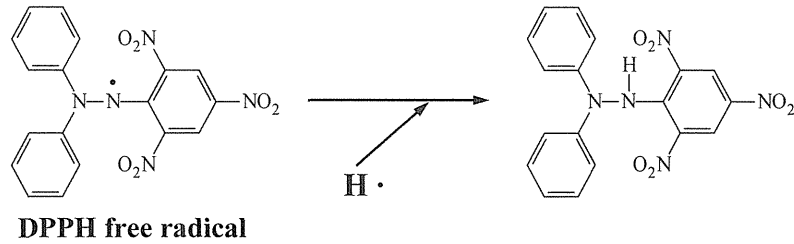


Fig. 17 DPPH free radical reaction

30 μM DPPH EtOH溶液100 μL と予めpH7.4に中和した種々電解水100 μL を10 mLガラス試験管に加えて、すばやく攪拌し、これを測定用扁平セルに移しESRスペクトルを測定した。また、電解水サンプルは予めpH7.4に中和してから測定に用いた。なお、 Mn^{2+} のシグナル高さ (h_2) とDPPHのシグナル高さ (h_1) を測定し、この比 (h_1/h_2) を相対シグナル強度 (I) とした。詳細な測定条件をTable 12に示す。

4. SOD 換算 (相当) 活性値の算出法

SODを標準物質として検量線を作成し、種々電解水の抗酸化能を相対的に評価した⁵⁰⁾。すなわち、2. 項同様に、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によりスーパーオキシドアニオンを発生させ、一定濃度のDMPOと種々濃度のSODを競争反応させる。その結果、DMPO-OOHのシグナル強度とSOD活性値の関係を求めることができる。この関係式より電解水のSOSA値をSOD換算活性値として求めた。

5. アスコルビン酸換算 (相当) 活性値の算出法

SOSA 値同様に、アスコルビン酸 (AsA) を標準物質に用いてDRSA 値をAsA 活性値として相対的に評価した⁵³⁾。

6. データ解析

データ数 $n = 3-4$ とし、図および表には平均値 \pm 標準誤差を示した。また、必要に

応じて一元配置分散分析 (One-factor ANOVA) および Tukey-Kramer 法により統計学的解析を行った。相関関係に関してはピアソンの相関係数の検定を行った。なお、有意水準 $\alpha = 0.01$ または 0.05 とした。

第 2 節 結果

1. スーパーオキシドアニオンおよび DPPH 消去能測定

電解水はそれぞれ異なった pH および ORP を有するので、反応系の至適 pH を考慮して、予め pH7.4 に中和してから測定に用いた。その結果を Fig. 18 に示す。つまり、すべてのサンプルは同 pH を有し、ORP のみ異なる条件で測定されたことになる。なお、Fig. 18a はスーパーオキシドアニオン測定時、Fig. 18b は DPPH 測定時の電解水の pH および ORP の関係を、それぞれ示している。また、曲線は 0.01 M HCl および 0.02 M NaOH を用いて滴定を行って得られた pH と ORP の値の近似曲線を示している。中和により EOW 1 の ORP は、この曲線に向かい低下し、反対に ERW 1, ERW 2 および ERW 5 の ORP は上昇した。

Fig. 19a にスーパーオキシドアニオンの、Fig. 19c には DPPH の典型的な ESR チャートを示す。なお、Fig. 19a および Fig. 19c はリン酸緩衝液中でのそれぞれのラジカルの様子を示している。また、Fig. 19b は EOW 1 を用いた時のスーパーオキシドアニオンチャートを示している。Fig. 19b ではヒドロキシラジカルと思われるピークが観察された (図中の丸印参照)。

Fig. 20 に種々電解水の SOSA (a) および DRSA (b) 測定結果を示す。ERW 5 はコントロールである pH7.4 リン酸緩衝液 (PB) に比べて有意にスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) および DPPH ラジカルを消去することがわかった。また、有意差はないものの、ERW 1 および ERW 2 にも $O_2^{\cdot-}$ を消去する傾向が認められた。また、EOW 1 で低値を示した。

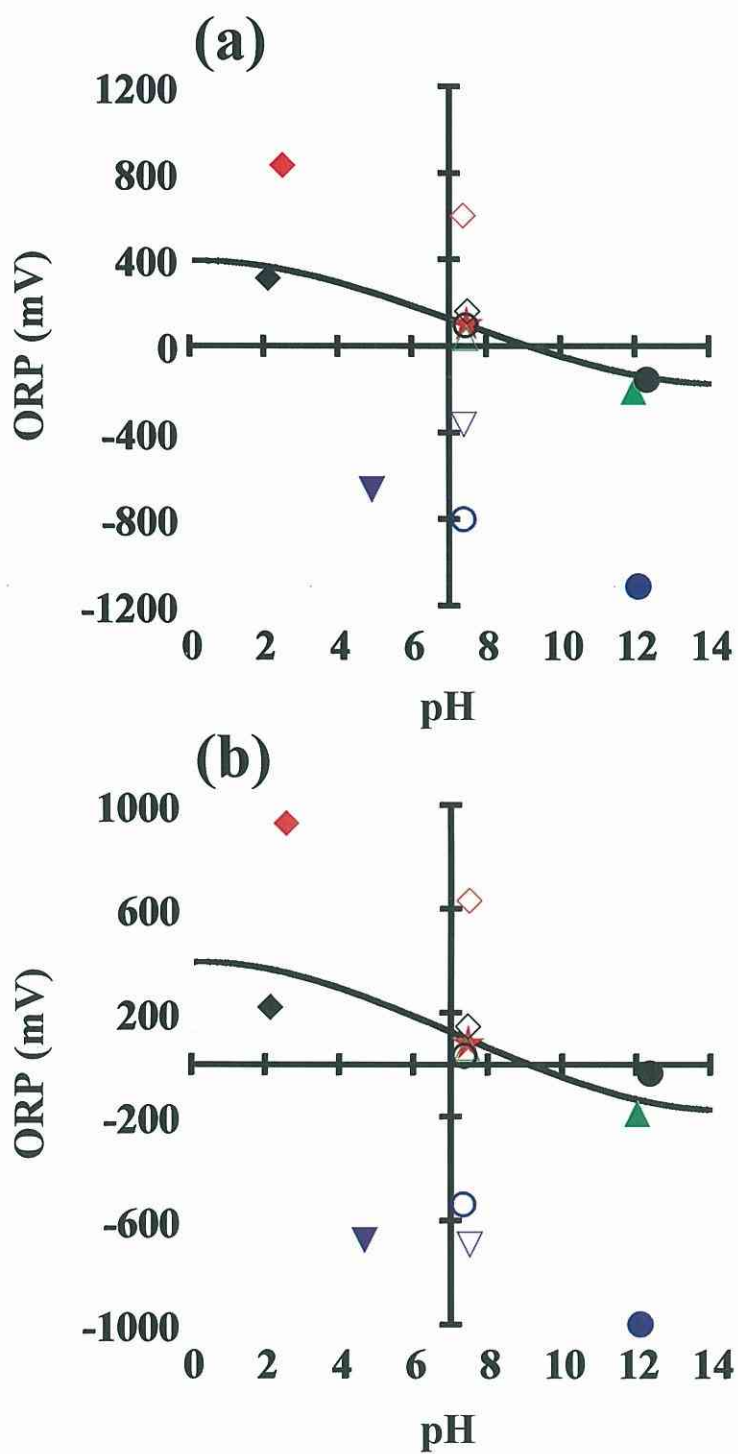


Fig. 18 pH profile of ORP of electrolyzed waters before and after neutralization in measurement of $O_2^{\bullet-}$ (a) and DPPH (b)

Symbols: ★: PB, ●: ERW 1, ▲: ERW 2, ▼: ERW 5, ◆: EOW 1, ●: 0.02 N NaOH, ◆: 0.01 N HCl

Closed symbol: before neutralization, opened symbol: after neutralization

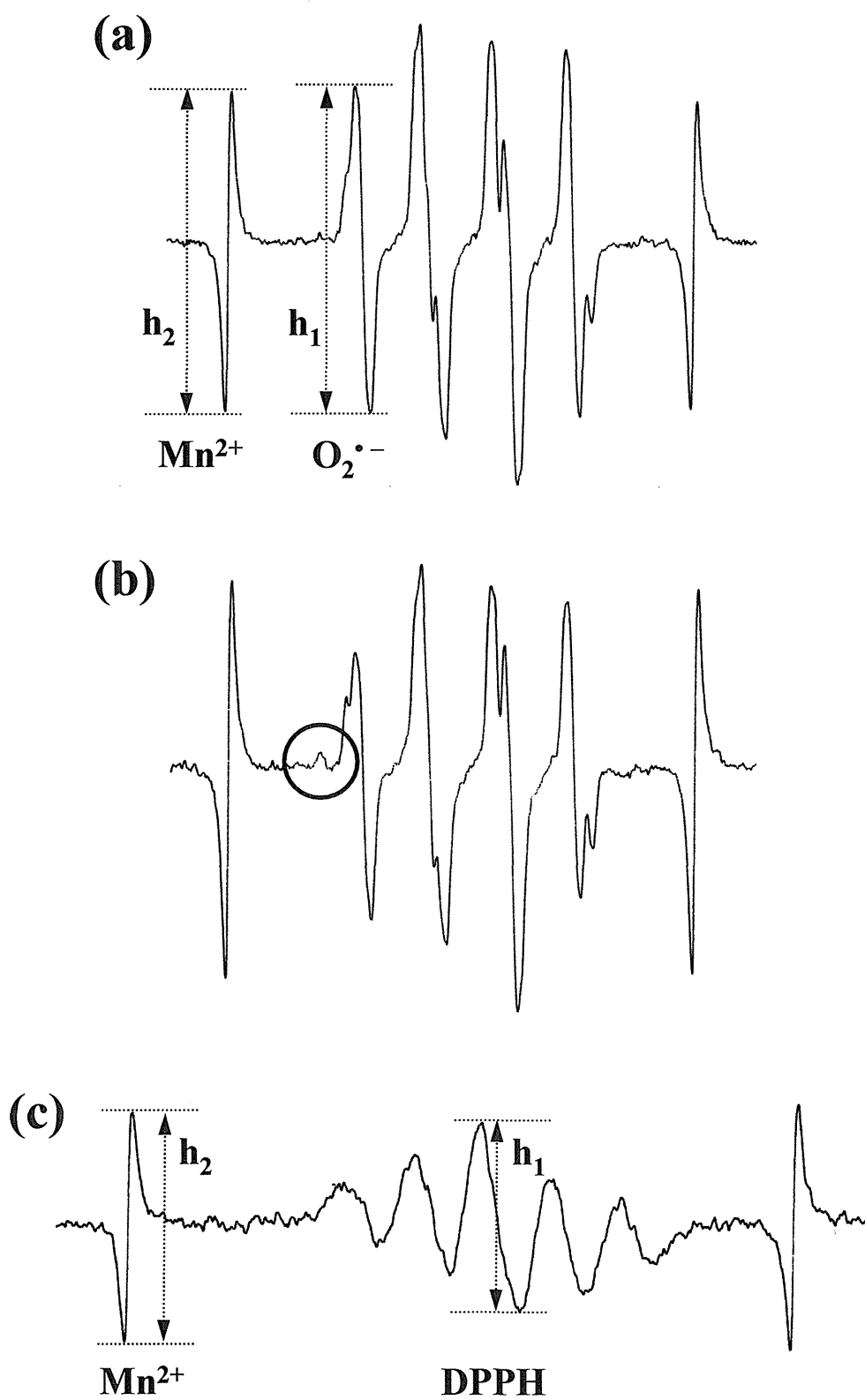


Fig. 19 Typical ESR chart of $\text{O}_2^{\bullet-}$ (a, b) and DPPH (c)

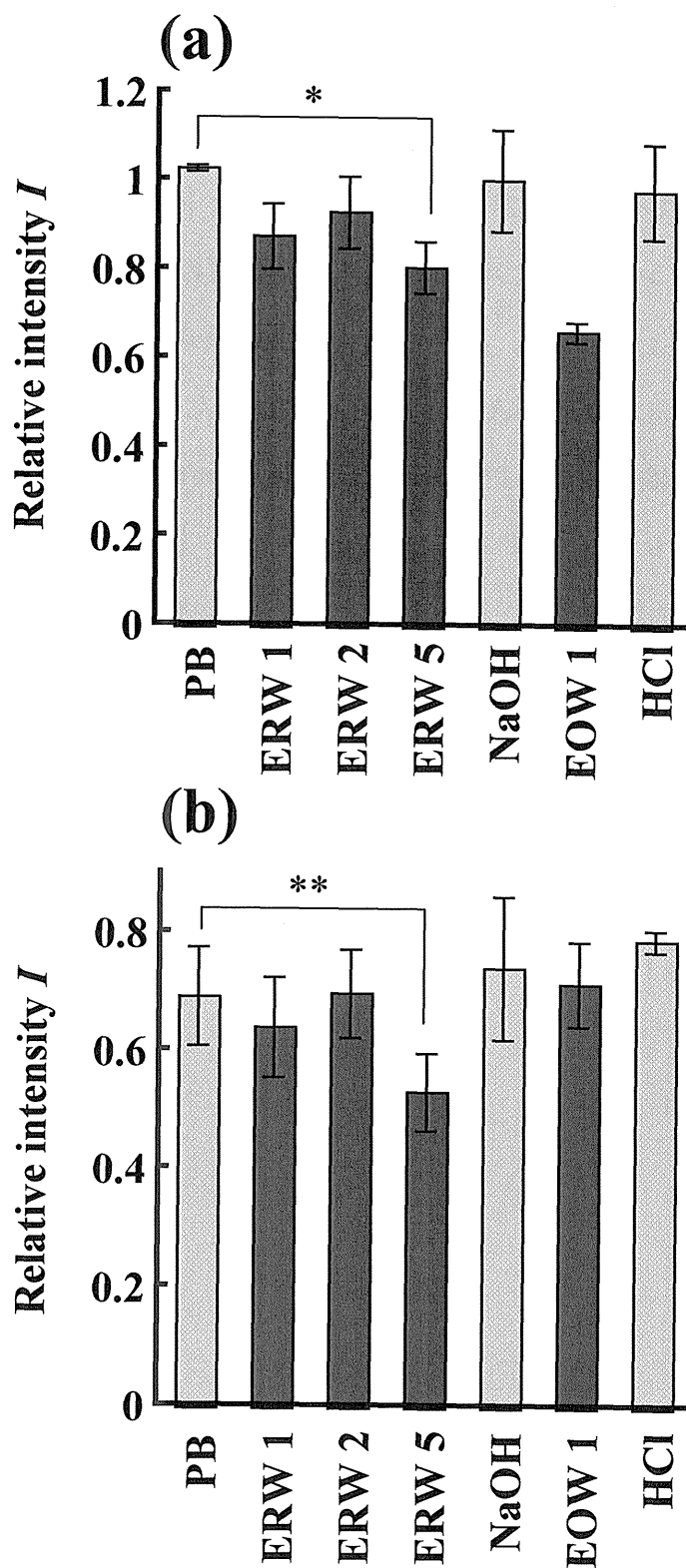


Fig. 20 SOSA (a) and DRSA (b) of electrolyzed waters

Each bar represents the mean \pm S. E. of 3-4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

2. SOD 換算活性値およびアスコルビン酸換算活性値の算出

Fig. 21a および Fig. 21b に、それぞれ DMPO-OOH のシグナル強度と SOD 濃度の関係および DPPH ラジカルのシグナル強度と AsA 濃度の関係を示す。なお、Fig. 21c および Fig. 21d は、それぞれ Fig. 21a, b を直線化プロットしたものである。すなわち、SOD 濃度 “0” のブランクシグナル強度 (I_0) と各濃度の相対シグナル強度 (I) から、シグナル減少率 ($I_0/I-1$) を求め、原点を通る一次回帰式を得た。得られた一次式から種々電解水の SOSA および DRSA 値として、SOD または AsA 活性値を算出した。その結果、SOD 換算活性値では、PB の 0.03 ± 0.07 (unit/mL) に比べて、ERW 1 および ERW 5 は、それぞれ $0.82 \pm 0.20^*$ および $1.29 \pm 0.25^{**}$ (unit/mL) と有意に高値を示した。また、AsA 換算活性値では、PB の 0.22 ± 0.09 ($\mu\text{g/mL}$) に比べて、ERW 5 は $0.98 \pm 0.20^{**}$ ($\mu\text{g/mL}$) と有意に高い値を示した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

Fig. 22 に相対シグナル強度と種々電解水の中和直後の ORP の関係を示す。図から明らかのように、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ および DPPH ラジカル消去能と ORP に有意な相関性が認められた。

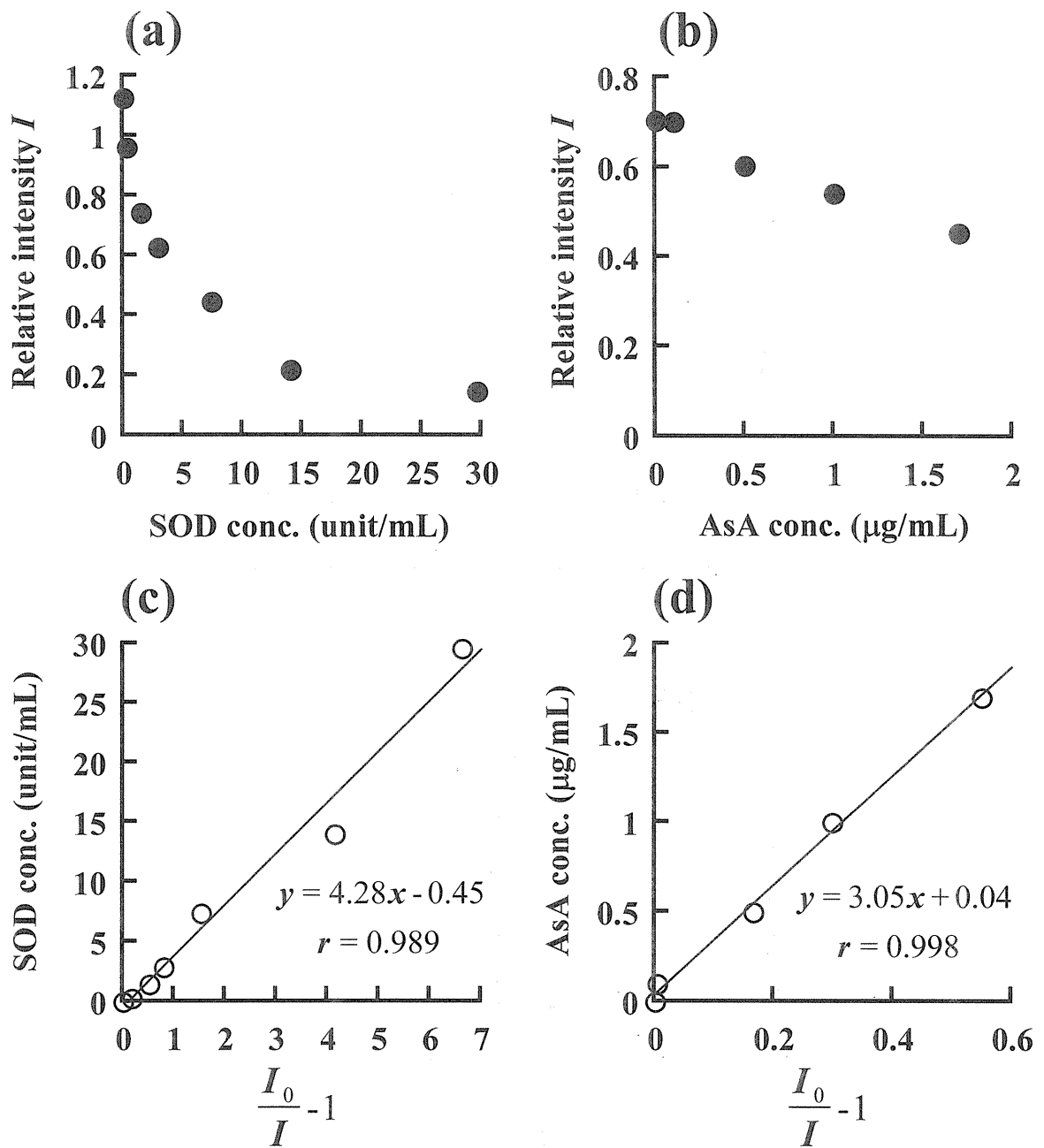


Fig. 21 Relationship between the relative intensity and SOD (a) and AsA (b) concentration

I : relative intensity, I_0 : relative intensity in the control (non SOD and AsA)

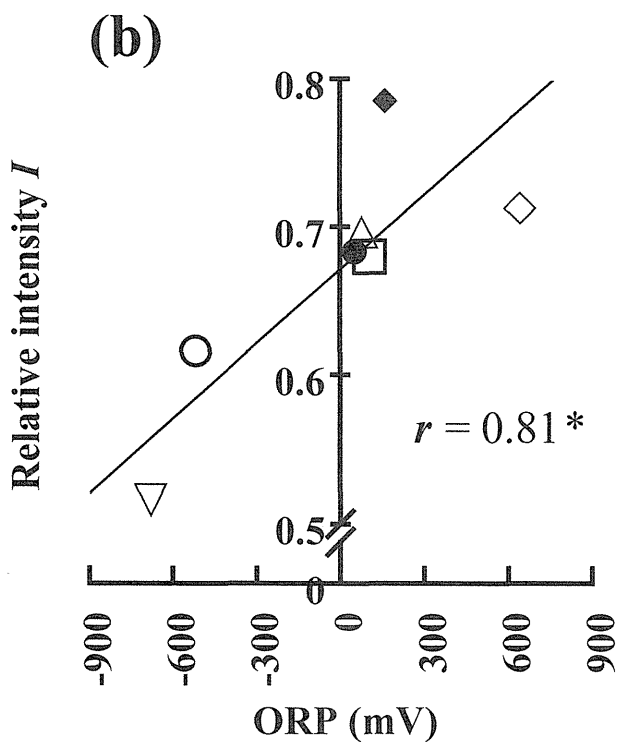
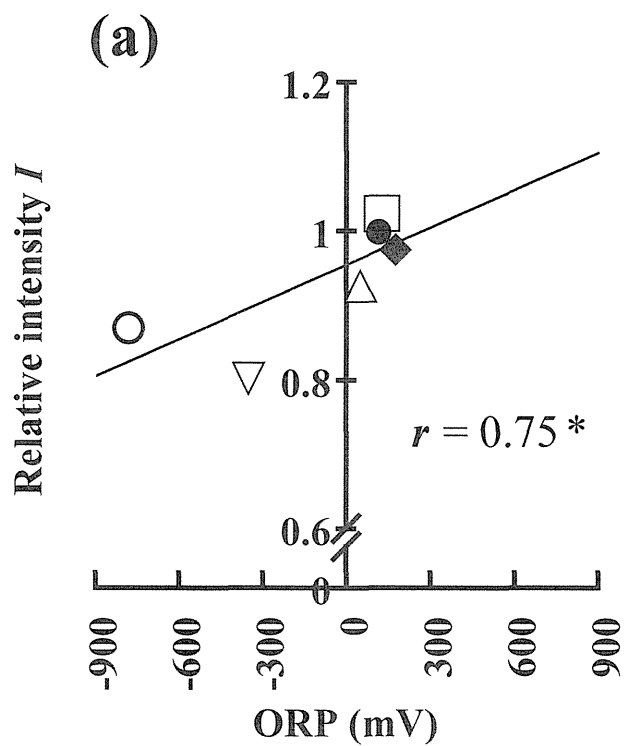


Fig. 22 Relationship between the relative intensity and ORP value of electrolyzed waters after neutralization in case of O_2^- (a) and DPPH (b)

Symbols: ○: ERW 1, △: ERW 2, ▽: ERW 5, ◇: EOW 1, ●: 0.02 N NaOH, ◆: 0.01 N HCl

* $p < 0.05$

第3節 考察

ERW 5はコントロールであるPBに比べて有意に $O_2^{\cdot-}$ およびDPPHラジカルを消去することがわかった。また、有意差はないもののERW 1およびERW 2にも $O_2^{\cdot-}$ を消去する傾向が認められた。しかし、ERW 2にはDRSAは認められなかった。すなわち、種々電解水の抗酸化能はラジカル種により異なることが明らかとなった。

なお、詳細な結果は示さないが、中和により電解水中に含まれる Na^+ および Cl^- の抗酸化能に及ぼす影響を調べるために、電解水よりも高濃度に Na^+ および Cl^- を含む生理食塩液を用いて評価した。その結果、これらのサンプルはPBと同様のシグナル強度を示し、抗酸化能が無いことを確認している。

また、EOW 1は低いSOSA値を示したものの、ヒドロキシラジカル($OH\cdot$)の生成の関与が示唆され、 $O_2^{\cdot-}$ 消去能は無いと考えられた。HPX-XOD系では、反応を開始すると、まず $O_2^{\cdot-}$ が発生し、5 min後から $OH\cdot$ が発生することが報告されている⁵⁰⁾。そのため、反応開始1 min後から2 min間測定を行った。つまり、通常 $OH\cdot$ は観察されないはずであるが、EOW 1を用いた場合、Fig. 19bに示すように $OH\cdot$ と思われるピークが認められた。この結果より、EOW 1は $OH\cdot$ の生成を促進している可能性が考えられた。そのため、 $O_2^{\cdot-}$ 発生量が減少し見かけ上SOSA値が低下したと思われた。

一般的に物質の抗酸化能を評価する際に、適当な標準物質がある場合、その物質を用いて相対的に評価を行う。 $O_2^{\cdot-}$ ではSODを、DPPHではビタミンEの誘導体であるTrolox⁵⁴⁾やAsA⁵³⁾を標準物質に用いることが多い。また、適当な標準物質が無い場合には、一定量発生させたラジカルを50%消去する試料濃度(ID_{50})を、シグナル強度の用量依存曲線から算出し抗酸化能の指標として用いる⁵⁵⁾。なお、 ID_{50} から試料とラジカル反応速度定数も算出可能である。本研究では、系内の電解水濃度を変化させることは困難であるため、相対的に種々電解水の抗酸化を評価した。

$O_2^{\cdot-}$ およびDPPHラジカル消去能と電解水中和直後のORP値に有意な相関性が認められた。すなわち、負のORPを有する電解水がより強い抗酸化作用を示すことが明

らかとなった。さらに、負の ORP には DH が深く関与¹³⁾し、H₂が抗酸化能を示すという報告⁵⁶⁾もあることから、電解水の抗酸化能には DH が関与している可能性が示唆された。しかし、Fig. 22a にみられるように、SOSA と ORP のランクオーダーが必ずしも一致しないこともあることから、抗酸化能の要因として ORP 以外の関与も示唆された。今後は DH に影響を及ぼすと考えられる水素微小気泡⁵⁷⁻⁵⁹⁾の影響についても検討する必要があるかもしれない。

また、詳細は示さないがヨウ素デンプン反応およびメチレンブルー還元性試験を用いて種々電解水の抗酸化作用を評価することはできなかった。

スーパーオキシドアニオンは生体内で発生しうる活性酸素の一種である。今回 *in vitro* での評価であるが *in vivo* での電解水の抗酸化作用も期待できると考えられた。一方、DPPH は人工的に合成された有機ラジカルであることから、必ずしも生体内の反応を反映するとは限らないが、*in vivo* での電解水の抗酸化作用を評価するスクリーニング材料の 1 つになり得ることも明らかとなった。通常、DPPH は 517 nm における吸収を利用した呈色反応により抗酸化作用を評価することが多い⁶⁰⁾。しかし、この方法は 30 min の加温インキュベートが必要であり、試験中に電解水の性質が変化するため電解水の本来の能力を正しく評価することができなかった。また、AsA やシステインは比較的速い反応により抗酸化作用を示すが、グルタチオンは反応が遅いため 30 min のインキュベートではラジカル消去能を示さないという報告もあることから、ESR による反応開始直後での評価は電解水の抗酸化作用を過小評価している可能性も考えられた。同様に、今回 SOSA および DRSA を評価する際に、予め中和した電解水を用いたが、中和により ORP が変化したことから抗酸化作用を過小評価しているかもしれない。しかし、それでもなお ERW 5 のようにコントロールに比べて有意に高い SOSA や DRSA を示すものがあることが明らかとなった。今後、アルカリあるいは酸性条件下でも評価できる反応系が確立され、反応時間なども考慮することにより、今回、抗酸化作用を見いだせなかった電解水も抗酸化作用を持つことが明らかとなる可能性が考えられた。

食品分野でも酸化ストレスと生活習慣病との関係から、抗酸化食品が注目され機能性食品として利用されている。また、食品の抗酸化能を評価する統一あるいは公定法化された指標および分析法の確立が進められている。この中では oxygen radical absorbance capacity (ORAC)⁶¹⁾が最も優れた方法であると考えられているが、DPPHを利用するものや ferric reduction ability of plasma (FRAP) および total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) など複数の方法があり、それぞれ長所と短所がある⁵⁴⁾。これら複数の方法を組み合わせ多角的に、電解水に対しても利用し評価できよう。また、現在汎用されているラジカル捕捉型の抗酸化物質は抗酸化(アンチオキシダント)作用と同時に反対の作用である酸化促進(プロオキシダント)作用を有するものもあり、摂取量によっては酸化ストレスになるものがあることが報告されている^{62,63)}。よって、電解水の摂取量や慢性毒性に関しても今後検討していく必要があると思われる。

既に ERW は酸化が関与する病気に有効であることが報告⁶⁴⁾されているが、多くの生活習慣病にも生体酸化が関与する⁶⁵⁾ため、生活習慣病にも ERW の抗酸化効果が期待できるかもしれない。また、抗癌剤使用により副作用として発症する口内炎にはラジカルの関与が示唆されている⁶⁶⁾。現在、この口内炎に対してアロプリノールやメシル酸カモスタット含嗽液が使用されているが^{67,68)}、抗腫瘍効果の減弱や苦みの問題がある。ERW を飲用あるいは含嗽に用いることでラジカル消去剤の代替となる可能性も考えられた。

第4節 小括

電解水の抗酸化作用を評価するための評価系を確立し、電解水、特に ERW の中には抗酸化作用を有するものがあることがわかった。また、その作用はラジカル種により異なることが明らかとなった。さらに、抗酸化能の要因の1つとして ORP の関与が示唆された。抗酸化を有する電解水は、含嗽液、化粧水や飲用として、医療、化粧品あるいは日常生活など様々な分野で応用可能であると思われた。

第 5 章 電解水の抗菌作用

1996 年に手指洗浄消毒, 1997 年には内視鏡の洗浄消毒を目的に EOW 生成装置が薬事法に基づいて医療用具として認可されている。そして, 2002 年には EOW が次亜塩素酸水として食品添加物として認められた。また, 食品の安全確保のために HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) 対策が求められている中で, 電解水は生野菜類や食品加工機械器具類の殺菌に有効であることも確認されている^{69, 70)}。電解水は, このような効能を有しているものの, 生体・環境に対する影響は少なく, ランニングコストが安いなどの利点を有する⁶⁾。しかしその一方で, 電解水の抗菌作用に関する報告⁷¹⁾は増えつつあるものの, その殺菌機序や抗菌スペクトルには不明な点が多い。

そこで, 第 5 章では電解水の種々細菌に対する抗菌作用を time-kill assay により検討し, 電解水の消毒剤としての有効性を評価した。

第 1 節 実験方法

1. 実験材料

滅菌精製水 (SPW) は蒸留水製造装置 (STILL ACE SA-2000A) から得られた精製水をオートクレーブ MODEL AS-30L ((株) 池田理化, 東京) を用いて高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 min) したものとした。70% EtOH は和光純薬工業 (株) より購入した特級エタノールにより調製した。水素水 (HW) は (株) フレンディア (東京) より提供されたドクター・水素水・スティックを滅菌精製水 500 mL に 1 本加え 24 h かけて作成した。0.01 M HCl および 0.02 M NaOH は, 滅菌精製水で希釈して調製した。

2. 基本的物性

電解水の pH および ORP に及ぼす, 試験中の攪拌およびインキュベートの影響を調べるために, 0 h (試験前) および 12 h (試験後) に pH と ORP を, 第 1 章に準じて

測定した。

また、電解水中の残留塩素濃度は Pocket Colorimeter (Hach Co., Loveland, CO, U.S.A.) を用いて測定した。なお、測定原理は DPD 法である。

3. 使用菌株

電解水の示す抗菌スペクトルの広域性を検討するため、代表的な 4 菌種 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa* を選択した。各菌のグラム染色性および芽胞の有無を Table 13 に示す。なお、菌株はすべて城西大学薬学部病原微生物学講座で継代している (財) 発酵研究所 (大阪) (Institute for Fermentation, Osaka; IFO) 由来株を用いた。

Table 13 Characteristics of microorganism

Bacterial strain	Gram stain	Spore
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	positive	+
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	positive	-
<i>Escherichia coli</i> IFO 3972	negative	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13275	negative	-

4. 培地作成法

Difco™ heart infusion agar (HIA) を用いて、斜面培地および平面培地の 2 種類を作成した。HIA は培地 1 L あたり beef heart (infusion from 500 g) 10.0 g, tryptose 10.0 g, 塩化ナトリウム 5.0 g および寒天 15.0 g から成る。なお、最終 pH 7.4 ± 0.2 at 25°C であった。初めに、HIA に精製水を加え、オートクレーブを用いて加温溶解した後、固まらないうちに試験管に分注しシリコセン ((株) エスケー, 東京, 日本) をした。これを、オートクレーブで高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 min) し、室温で斜面を形成するよう冷やし固めて斜面培地を作成した。また、平面培地は HIA に精製水を加え、オートクレーブで高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 min) した後、攪拌し、温浴中で 60°C 前後まで温

度を下げてから、クリーンベンチ内で無菌的に滅菌シャーレ（浅型 90 × 15 mm, 旭テクノガラス（株））に 30 mL ずつ分注して、冷やし固めた。

5. 菌液調製法

HIA 斜面培地に、細菌（*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa*）を火炎滅菌した白金耳で接種し、37°C, 17 h 培養した。培養後、滅菌生理食塩液を加えて菌を浮遊させ、光電比色計（Spectronic educator, (株) 島津理化, 東京）を用いて光学濃度（optical density, O.D.）0.10 の菌液を作成した。これを、buffered saline with gelatin（BSG）で適当に希釈して HIA 平面培地にコンラージ棒（日水製薬（株）, 東京）を用いて播種し、37°C, 17 h 培養後にコロニー数をカウントした。この値から、4 菌種がそれぞれ 10^8 CFU/mL となるときの O.D. 値を予め算出した。Time-kill assay を行う前日、同様にして HIA 斜面培地に細菌を播種し、37°C, 17 h 培養した。培養後、滅菌生理食塩液を加えて菌を浮遊させ、光電比色計を用いて 10^8 CFU/mL になるよう予め計算した O.D. 値に調製した。これを、滅菌生理食塩液で 10 倍に希釈して 10^7 CFU/mL の菌液を調製し、time-kill assay^{72, 73)} に用いた。

6. Time kill assay 法

予めオートクレーブで高圧蒸気滅菌した 100 mL の三角フラスコに、試験液を 50 mL ずつクリーンベンチ内で無菌的に分注した。これに、前述の方法で作成した 10^7 CFU/mL の菌液 500 μ L を加えて、試験開始濃度を 10^5 CFU/mL とし、25°C にてシェーカーを用いて攪拌しながらインキュベートした。経時的（0.5, 1, 3, 6 および 12 h）に 500 μ L ずつサンプリングを行い、BSG を用いて適当に希釈（ 10^{-1} , 2×10^{-2} , 10^{-2} ）した。サンプリング原液および希釈液を HIA 平面培地各 3 枚に 100 μ L ずつコンラージ棒で播種し、37°C, 17 h 培養後コロニー数をカウントした。この 1 ポイントあたり HIA 平面培地 3-12 枚の平均値を $n = 1$ として扱った。

なお、0 h の値として、試験に用いた 10^7 CFU/mL の菌液を BSG で適当に希釈した

後、同様に HIA 平面培地に播種して 37°C, 17 h 培養後のコロニー数を試験開始濃度である 10^5 CFU/mL 当りに換算した値を用いた。

第 2 節 結果

1. 基本的物性

Time-kill assay を行う際の電解水の物性を確認するため、生成直後 (0 h), 12 h 室温静置後および time-kill assay と同条件で 12 h 攪拌インキュベートしたサンプルの pH と ORP を測定した結果を Table 14 に示す。EOW 1 は強酸性, ERW 1, ERW 2 および HW はアルカリ性を示した。また、コントロールとして用いた SPW, 70%EtOH および 0.01 M HCl に対して EOW 1 は著しく高い ORP を示した。ERW 1, ERW 2, ERW 5 および HW は負の ORP を示した。HW では pH 低下および ORP 上昇, ERW 5 では pH のわずかな上昇および ORP 上昇がそれぞれ 12 h 後に認められた。また, ERW 1 ではわずかな ORP の上昇が認められた。しかしながら, その他のサンプルでは, 静置, あるいは攪拌とインキュベートという条件に関わらず, 12 h で大きな物性値の変化は認められなかった。

2. Time-kill assay による抗菌作用評価

Time-kill assay の結果を Fig. 23 に示す。コントロールとして用いた SPW (Fig. 23a) は, いずれの菌に対しても抗菌作用を示さなかった。EOW 1 (Fig. 23c) の抗菌作用は, 一般的に消毒剤として汎用されている 70% EtOH (Fig. 23b) と同様に芽胞非産生菌 (*S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa*) に対して著しく強い抗菌作用を示し, 反応 0.5 h 後には CFU は検出限界以下となった。さらに, EOW 1 は 70% EtOH と異なり, 芽胞産生菌 (*B. subtilis*) に対しても芽胞非産生菌に対する作用と同様の著しく強い抗菌作用を示した。EOW 1 のこの抗菌作用は, 同等の pH を示す 0.01 M HCl (Fig. 23d) よりも強かった。一方, ERW 1 (Fig. 23e) および ERW 2 (Fig. 23f) は, グラム陰性菌 (*E. coli*

および *P. aeruginosa*) に対しては強い作用を示すが, グラム陽性菌 (*B. subtilis* および *S. aureus*) に対しては EOW 1 よりも弱い作用を示した. また, 芽胞産生菌に対して抗菌作用は認められなかった. ERW 5 (Fig. 23g) では, いずれの菌でもほとんど減少が認められなかった. HW (Fig. 23h) は, 好気性細菌である *P. aeruginosa* および *S. aureus* で SPW より減少が認められたが, その作用はあまり強くなかった. また, ERW 2 を除くアルカリ性サンプルは, いずれの菌においても同等の pH を示す 0.02 M NaOH (Fig. 23i) より作用が弱かった.

Table 14 Physicochemical properties of several electrolyzed waters

	0 h		After 12 h			
	pH	ORP (mV)	Without stirrer		With stirrer	
			pH	ORP (mV)	pH	ORP (mV)
SPW	6.32	134.68	6.14	137.23	6.22	130.56
70% EtOH	7.39	-81.64	7.36	-76.31	7.39	-80.38
EOW 1	2.71	885.46	2.71	880.65	2.72	880.50
0.01 M HCl	2.02	354.64	2.02	347.76	2.02	354.25
ERW 1	11.89	-287.04	11.84	-230.94	11.92	-212.27
ERW 2	12.52	-170.81	12.52	-177.70	12.52	-172.76
ERW 5	5.25	-80.51	5.30	-17.14	5.48	4.77
HW	10.07	-169.10	9.34	-82.15	9.02	-42.90
0.02 M NaOH	12.27	-160.54	12.28	-159.20	12.28	-163.46

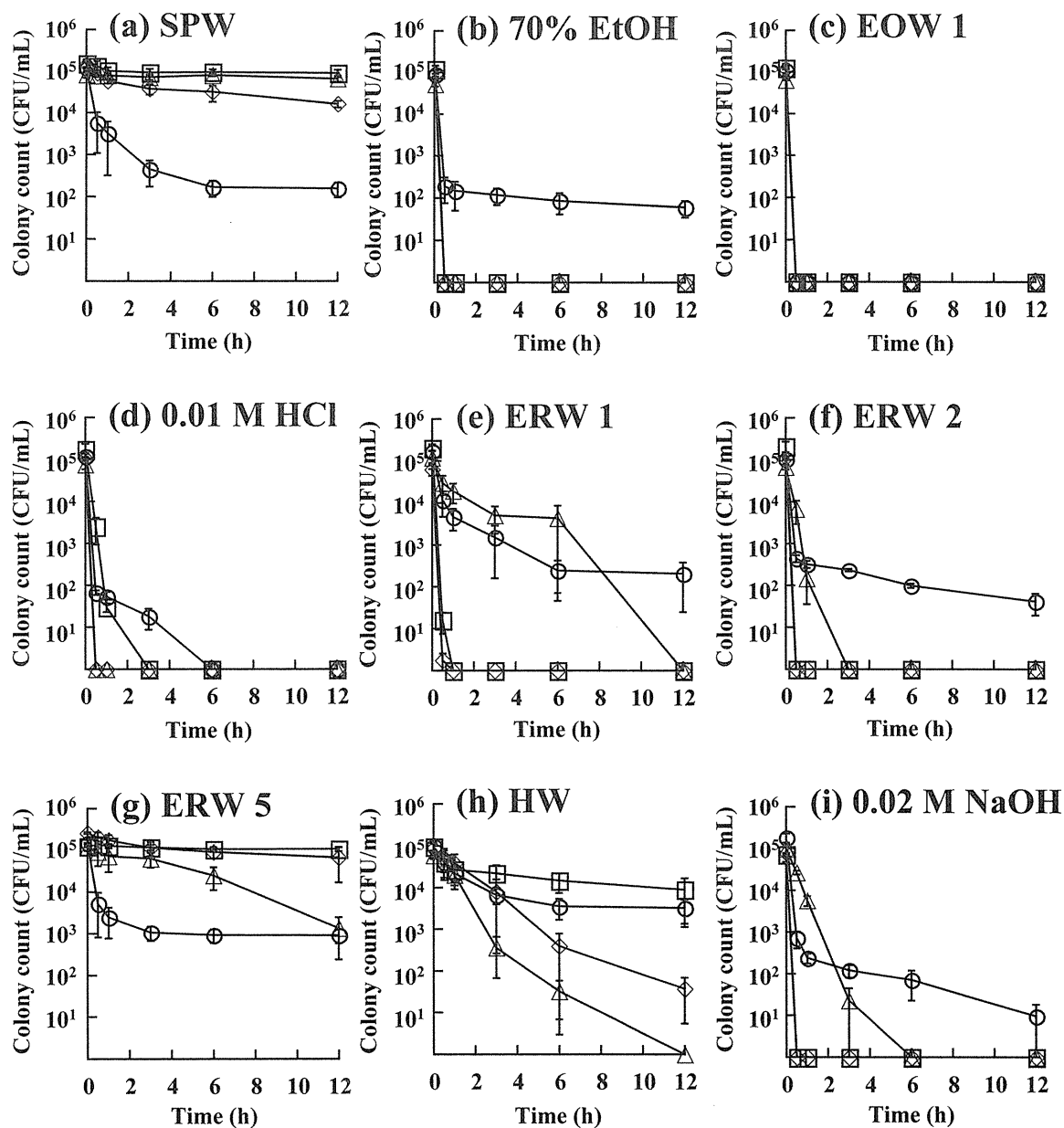


Fig. 23 Time-kill curves of electrolyzed waters and against representatives of gram positive and negative bacteria

Symbols: \circ ; *B. subtilis*, Δ ; *S. aureus*, \square ; *E. coli*, \diamond ; *P. aeruginosa*

Each point represents the mean \pm S. E. of 3 experiments.

第3節 考察

HW では pH 低下および ORP 上昇が、また、ERW 5 では pH のわずかな上昇および ORP の上昇がそれぞれ 12 h 後に認められた。これらのサンプルは溶存水素を多く含む可能性がある。水素は酸素と比較して水への溶解度も小さいことから非常に揮発しやすいので、これらのサンプルでの pH や ORP には溶存水素が大きく寄与していると考えられた。さらに、ERW 5 は本来アルカリ性を示す陰極水を臨床応用を考慮して弱酸性にシフトさせて生成しているので、pH や ORP 値が変化しやすいと考えられた。また、その他のサンプルでは、12 h の静置あるいは攪拌インキュベート下、共に大きな物性値の変化は認められなかった。つまり、少なくとも pH と ORP に関して閉鎖系 25°C、12 h で電解水は安定であり、かつ機能性を保持したまま使用できることが示唆された。

B. subtilis は芽胞産生菌で、増殖が可能である栄養型と抗菌物質に対して抵抗性を有する芽胞型の 2 種類の存在形態を有する。つまり、栄養型は試験液中で溶菌し、残った芽胞型が培地に発現したため、減少傾向が見られたと考えられる。

EOW 1 は 70% EtOH と異なり、芽胞産生菌 (*B. subtilis*) に対しても芽胞非産生菌に対する作用と同様の強い抗菌作用を示した。EOW 1 のこの抗菌作用は、同等の pH を示す 0.01 M HCl (Fig. 23d) よりも強く、抗菌作用の発現メカニズムについては、pH による影響だけではなく、次亜塩素酸やオゾンの酸化作用などの関与が示唆された。高い ORP 値⁷⁴⁾、あるいはヒドロキシラジカル ($\text{HO}\cdot$) や過酸化水素の関与も推測されるが、次亜塩素酸の酸化作用が主要因であるとする考え方が支配的である⁷⁵⁾。また、芽胞産生菌は消毒剤に対して非常に強い抵抗性を有し滅菌の指標ともなる。次亜塩素酸系消毒剤には芽胞産生菌に対して抗菌作用を示すものではなく、芽胞産生菌に有効なアルデヒド系消毒剤は人体には使用できないという問題がある。さらに、医療現場で問題となる *P. aeruginosa* に対しては、通常 70% EtOH と塩化ベンザルコニウムなどを併用することが多く、人によってはエタノール自身の刺激性（皮膚刺激性を含む）が問題になることもある。一方、EOW 1 は第 2 章のタンパク漏出の結果から皮膚刺激性

は極めて少ない。つまり、既存の消毒剤と比較しても電解水単独でも高い有用性が期待できる。

また、塩素イオン (Cl^-) 以外の塩素量の指標となる有効塩素濃度は次亜塩素酸 (HClO)、次亜塩素酸イオン (ClO^-) および塩素 (Cl_2) の和として表せるので、有効塩素濃度が同じであっても殺菌作用が異なることがある。すなわち、 HClO の殺菌作用は ClO^- よりも著しく強く、殺菌作用には有効塩素の組成が重要となる。有効塩素の組成は pH に依存し、強酸性下では $\text{HClO} : \text{Cl}_2 = 8 : 2$ で、弱酸性下ではほぼ HClO のみ、アルカリ性下では $\text{HClO} : \text{ClO}^- = 1 : 9$ となる。なお、有効塩素濃度 $40 \mu\text{g/mL}$ の EOW は $1000 \mu\text{g/mL}$ の次亜塩素酸ナトリウム液に匹敵する殺菌作用を示すことが報告されている¹⁾。つまり、EOW 1 は少量の塩素を最大限有効活用することで、強力かつ広範な抗菌スペクトルを示したと考えられる。なお、EOW 1 および ERW 1 の残留塩素濃度は、それぞれ 30.6 および $0.03 \mu\text{g/mL}$ であった。

一方、ERW 1 (Fig. 23e)、ERW 2 (Fig. 23f) は、グラム陰性菌に対しては強い作用を示すが、グラム陽性菌に対しては EOW 1 よりも弱く、また、芽胞産生菌に対して抗菌作用は認められなかった。なお、ERW 2 を除くアルカリ性サンプルは、いずれの菌においても同等の pH を示す 0.02 M NaOH (Fig. 23i) より作用が弱かった。一般的にグラム陰性菌はグラム陽性菌よりも消毒剤の浸透性が低くかつ薬剤の排出能力が高い傾向にあるため、グラム陰性菌は低水準消毒剤に対する感受性が陽性菌より低いことが認められている。また、グラム陽性菌の細胞壁はペプチドグリカンから構成される 1 層構造であるのに対して、グラム陰性菌ではペプチドグリカン層の外側にリン脂質・リポ蛋白・リポ多糖で構成される外膜が存在する。この外膜は容易に壊れ、中のペプチドグリカン層が薄いために溶菌が起こりやすく、電解水の抗菌作用を受けやすい。このように、グラム陽性菌と陰性菌の細胞壁をはじめとした細菌構造の違いにより抗菌作用の程度も異なることが考えられた。なお、EOW が外膜の障害および細胞質酵素の不活化を引き起こすという報告もある⁷⁶⁾。また、細菌性食中毒 (*E. coli*, *Salmonella* spp.) や水系感染症、院内感染 (*P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *L. pneumophila*)

および歯周病 (*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*) はグラム陰性菌に起因することが多く、選択的な抗菌作用は耐性菌の観点からも有用であると考えられた⁷⁷⁾。また、ERW 2 では 0.02 M NaOH よりもわずかに強い抗菌作用が認められた。洗浄作用を有する超還元性水が殺菌作用を示すという報告⁷⁸⁾があり、クリーナーとして用いられている ERW 2 の抗菌作用も洗浄・剥離作用に起因していると考えられた。さらに、HW (Fig. 23h) の場合、好気性細菌である *P. aeruginosa* で減少が認められた原因として、HW は水素が過剰状態にあり、酸素供給が不十分である事が考えられた。一方で、*S. aureus* でも減少が認められたことから、酸素供給以外の要因も作用していると考えられた。

EOW は有機物存在下で効果が低下するが、洗浄作用を有する ERW で予め有機物を取り除いておくことで、EOW がより効果的に作用するという報告^{79,80)}がある。また、遊離塩素濃度の高い EOW は強い殺菌作用を示すものの医療器具の錆・腐食や塩素ガス発生の問題がある。一方、遊離塩素濃度の低い EOW は保存安定性の面では優れるという報告もある⁷⁶⁾。よって、電解水の特性を踏まえてこれらを応用することで、その機能性を最大限に活用することができよう。

今後は、pH や ORP だけでなく溶存オゾン、溶存塩素および溶存水素などをモニタリングし、より詳細にメカニズムを解明するとともに、電解水の長期安定性や安全性などについても多面的に検討を行う必要があると考えられる。

第 4 節 小括

本研究により、どの電解水も菌種に選択的な抗菌作用を有することが明らかとなり、電解水単独あるいは既存の消毒剤との併用により、有用に活用できる可能性が示唆された。さらに、第 2 章の結果より電解水は皮膚刺激性も少ないことから、医薬品製剤または化粧品に添加される防腐剤の代替あるいは添加量を減量できる可能性も考えられた。

結論

電解水には様々な効能・効果があり、幅広い分野で応用されている。しかし、科学的根拠に乏しいだけでなく、詳細な作用メカニズムなど不明な点も多く残されており、十分に検討されているとは言えない。

そこで、著者は電解水は製剤および化粧品添加物になり得ると考え以下の項目について定量的に評価した。

- 1) 電解水の基本的物性について
- 2) 電解水の薬物皮膚透過制御作用について
- 3) 電解水の乳化作用について
- 4) 電解水の抗酸化作用について
- 5) 電解水の抗菌作用について

以下に、その要約を示す。

- 1) 電解水の基本的物性について

電解水の効能・効果について定量的に評価する前に電解水の物性とその特徴について知る必要がある。そこで、電解水の基本的物性を明らかにするために、種々電解水の pH、酸化還元電位、溶存酸素、電気伝導率、浸透圧および表面張力を測定した。また、物性に影響を与える可能性のあるイオン種と考えられる Na^+ および Cl^- の濃度も測定した。さらに、pH および ORP 安定性についても評価した。その結果、電解反応を反映し、EOW は酸性 pH を、ERW はアルカリ性 pH を示し (ERW 5 を除く)、EOW は Cl^- の濃度が、ERW は Na^+ 濃度がそれぞれ高値を示した。また、同様の pH を示す 0.01 M HCl や 0.02 M NaOH に比べると、共存イオンを半減できることがわかった。さらに、浸透圧および電気伝導率は Na^+ および Cl^- 濃度を反映していた。一部の ERW に極めて低い表面張力を示すものがあったが、ほとんどの電解水は精製水と同様の値を示した。また、5°C 閉鎖系静置条件下で EOW の pH および ORP 安定性は、少なく

とも 48 週まで確保された。一方、ERW の pH 安定性は高かったが、ORP は変化しやすかった。

以上より、電解水は電気分解反応を反映した水溶液であることが明らかとなった。また、電解水中の共存イオンは同 pH を示す HCl や NaOH と比較すると半減できることがわかり、緩衝液の代替となり得る可能性が示唆された。さらに、ERW の ORP 安定性は低いものの、EOW の ORP、EOW および ERW の pH 安定性は高いことがわかった。

2) 電解水の薬物皮膚透過制御作用について

塩基性、酸性および非解離性モデル薬物としてリドカイン (LC)、安息香酸 (BA)、一硝酸イソソルビド (ISMN) をそれぞれ選択し、そのヘアレスラット摘出皮膚を介した皮膚透過性に及ぼす基剤として用いた電解水の影響を調査した。また、皮膚バリア能に及ぼす電解水の影響を調べるために皮膚インピーダンスを測定した。さらに、電解水の皮膚刺激性を評価するために皮膚タンパク漏出量を測定した。その結果、種々電解水からの LC および BA の透過は pH 分配仮説で説明可能であるように思えた。しかし、興味深いことに電解水からの ISMN の透過も増加した。本来、非解離性薬物である ISMN の透過性は溶媒 pH によらず一定となるはずである。つまり、pH 分配仮説だけでは説明できない結果となり、電解水が皮膚に何らかの作用を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、次に pH の影響を調べるために種々 pH 緩衝液からの LC および ISMN の透過性を評価した。得られた累積透過プロファイルからそれぞれの定常状態での透過係数を算出したところ、ERW 1 からの LC および ISMN の透過係数は、同様の pH を示す緩衝液の透過係数よりも有意に高い値を示した。よって、電解水の透過促進効果に pH 以外の関与が示唆された。さらに、皮膚インピーダンスを測定したところ、ERW 1 および EOW 1 で低下が認められた。インピーダンスの変化はイオン性物質の皮膚透過性を反映し、水溶性物質の皮膚透過性にも関係しているため、ERW 1 および EOW 1 は皮膚の hydrophilic pathway に影響を及ぼし、インピーダ

ンスの低下をもたらしたと考えられる。そのために、ERW 1 からの水溶性物質である ISMN の透過性が上昇したと考えられた。また、ERW 1 は特に毛嚢経路の皮膚透過性が大きくなっている可能性が推察された。さらに、電解水の皮膚刺激性を調べたところ、同 pH を有する NaOH や Triton X-100 に比べると有意に低いタンパク漏出を示した。

以上より、pH 分配仮説により説明できない皮膚透過性の上昇を示したことから、電解水は皮膚インピーダンスを下げ薬物や化粧品有効成分の皮膚透過性を促進することがわかった。なお、電解水のインピーダンス低下およびタンパク漏出作用は、NaOH よりも軽微であったが、その透過促進作用は有意に大きいものであった。また、吸収促進剤としての電解水の皮膚に対する安全性は高いことが確認された。

3) 電解水の乳化作用について

化粧品や外用医薬品の代表的な剤形の 1 つであるエマルションには、通常、界面活性剤が含まれているが、しばしばその皮膚刺激性が問題となる。電解水の中には極めて低い表面張力を示すものもあり、電解水が乳化剤の水相として利用可能であると考えた。そこで、界面活性剤フリーエマルションを作成し、エマルションの安定性およびリドカイン皮膚透過性について評価した。その結果、連続相と分散相 90 : 10 および 55 : 45 で混合しエマルションを調製したところ、55 : 45 の場合で、特に ERW を用いると界面活性剤を含むサンプルと同程度の安定性をもつエマルションを作成できることが明らかとなった。また、EOW を用いた場合にも安定性は低いもののエマルションを作成できることがわかった。さらに、リドカイン塩基およびリドカイン塩酸塩を含有したエマルションを用いて皮膚透過実験を行った。その結果、脂溶性物質であるリドカイン塩基と水溶性物質であるリドカイン塩酸塩を比較すると、リドカイン塩基の方が高い透過性を示した。これは脂溶性の高い塩基の方が皮膚に分配しやすいためであると考えられた。また、アルカリ性処方と酸性処方を比較すると、両物質ともにアルカリ性処方で高い傾向にあったが、これは pH 分配仮説により説明することが

できた。さらに、溶液に比べてエマルションを用いた場合リドカイン透過は低下した。これにより、エマルションの安定性の関与や分散相中の分子型リドカインの寄与が示唆された。すなわち、連続相中の分子型リドカインの一部が分散相中に移動し、連続相中の分子型リドカイン濃度が低下し、リドカインの皮膚透過も低下したと考えられる。

以上より、ERW を用いて界面活性剤フリーエマルションを調製できることがわかった。また、これを用いることでエマルション調製時に添加する界面活性剤濃度を低減できることが示唆された。さらに、有効成分封入型エマルションにより、水溶性および脂溶性薬物の放出制御が可能であることも明らかとなった。

4) 電解水の抗酸化作用について

陰極側に生成される ERW は ORP が負であることから、生体への抗酸化作用が期待されている。しかし、電解水の抗酸化能に関する科学的根拠は十分ではない。そこで、スーパーオキシドアニオンおよび DPPH ラジカルを選択し、種々電解水の SOSA および DRSA を ESR により評価した。なお、電解水の抗酸化作用を評価するための評価系は確率されておらず、植物抽出成分や食品成分などの評価系を改変して用いることにした。その結果、ERW 5 はコントロールである PB に比べて有意に高い SOSA および DRSA を示した。また、ERW1 および ERW 2 にも有意差はないものの SOSA を示す傾向が認められたが、DRSA はさらに小さい値を示した。さらに、SOD および AsA を標準物質として用いた相対的評価においても、ERW 5 で有意に高い SOD および AsA 換算活性値を示した。また、抗酸化能の要因として ORP の関与が示唆された。

いまだ、電解水の抗酸化作用を評価するための十分な評価系はない。今回、電解水の抗酸化作用を評価し得る評価系を確立することができた。さらに、抗酸化能の有無だけでなく、定量的な評価を行うことも可能となった。今後は、詳細な抗酸化メカニズムの解明を行う必要があると考えられる。

以上より、電解水の抗酸化作用を評価するための評価系を確立し、電解水、特に

ERW の中には抗酸化作用を有するものがあることがわかった。また、その作用はラジカル種により異なることが明らかとなり、さらに、抗酸化能の要因の 1 つとして ORP や DH の関与が示唆された。

5) 電解水の抗菌作用について

強酸性電解水は、抗生物質による治療が困難な MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）などの病院内感染対策において、手洗い、院内環境の整備、内視鏡・透析装置の洗浄消毒に用いられている。しかし、電解水の殺菌機序や抗菌スペクトルには不明な点が残されている。そこで、電解水の抗菌スペクトルの広域性を評価するために、グラム陽性菌として *B. subtilis* および *S. aureus* を、グラム陰性菌として *E. coli* および *P. aeruginosa* を選択し、time-kill assay により検討し、電解水の消毒剤または防腐剤としての有効性を評価した。その結果、EOW 1 は芽胞非産生菌 (*S. aureus*, *E. coli* および *P. aeruginosa*) だけでなく、芽胞産生菌である *B. subtilis* に対しても 70%EtOH よりも強い抗菌作用を示した。また、この作用は、0.01 M HCl よりも強いことから pH による影響だけではなく、次亜塩素酸やオゾン酸化の関与が示唆された。さらに、*P. aeruginosa* に対して 70% EtOH 単独では無効なこともあり、EOW 1 の高い有用性が示唆された。一方、ERW 1 および ERW 2 はグラム陰性菌 (*E. coli* および *P. aeruginosa*) に対して強い抗菌作用を示したが、グラム陽性菌 (*B. subtilis* および *S. aureus*) に対しては EOW よりも弱く、芽胞産生菌 (*B. subtilis*) に対して抗菌作用は認められなかった。さらに、細菌性食中毒、院内感染および歯周病はグラム陰性菌に起因することが多く、選択的な抗菌作用は耐性菌の観点からも有用であると考えられた。

以上より、種々電解水は菌種選択的な抗菌作用を有することが明らかとなった。また、皮膚刺激性も少ないことから消毒剤とだけでなく、水の代替として電解水を利用することで、医薬品製剤あるいは化粧品に添加される防腐剤を減量できる可能性が示された。

以上、電解水は薬物や化粧品有効成分の皮膚透過を制御、特に促進することがわかった。また、ERW の乳化作用を利用することで界面活性剤フリーエマルジョンを調製することができ、有効成分封入エマルジョンにより有効成分の放出制御が可能であることが明らかとなった。さらに、ERW の抗酸化作用によりアンチエイジングやラジカル消去能などの機能性を有する新規化粧品や医薬品への応用が期待できることがわかった。さらに、電解水には70% EtOH よりも強力な作用を有するものや、医療現場で問題となるグラム陰性菌に選択的に作用することが明らかとなり、消毒剤としてのみならず防腐剤の代替として利用できることが示唆された。

詳細な作用メカニズムや最終的な製剤としての作用の有無や安定性など不明な点やさらに検討しなければならないことも残されているが、電解水はユニークな新規素材として、特に、製剤および化粧品添加物として有用であると考えられた。

謝辞

終わりに望み、本研究に際して終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬粧品動態制御学講座教授杉林堅次先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり終始有益な御指導、御助言を賜りました城西大学薬粧品動態制御学講座助手藤堂浩明先生ならびに助手石井宏先生に心から感謝の意を表します。

さらに、本研究を行うにあたり電解水について御教授いただきました株式会社ウォーターデザイン研究所所長久保田昌治博士に厚く御礼申し上げます。

さらに、ERIC S-100 および GE-100 を御供与していただきました株式会社 A. I. system product CEO 岡島眞裕氏に厚く御礼申し上げます。

さらに、抗菌作用に関して time-kill assay を行うにあたり御指導・御助言いただきました城西大学病原微生物学講座教授近藤誠一先生ならびに助教一色恭徳先生に心より感謝の意を表します。

また、本論文作成にあたり御教示と御校閲をいただきました城西大学医薬品情報学講座教授小林大介先生ならびに城西大学食毒性学講座教授加園恵三先生に感謝の意を表します。

最後に、有益なご意見ならびに実験にご協力いただいた城西大学薬粧品動態制御学講座吉田（旧姓代永）恵氏・小池真理子氏を始め関係諸氏に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Hotta K., "A comprehensive guide to denkaisui," ed. by The Scientific Board of Functional Water Foundation, Functional Water Foundation, Tokyo, 2001.
- 2) Park C. M., Hung Y. C., Lin C. S., Brackett R. E., Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs, *J. Food Prot.*, **68**, 986-990 (2005).
- 3) Okull D. O., Demirci A., Rosenberger D., Laborde L. F., Susceptibility of *Penicillium expansum* spores to sodium hypochlorite, electrolyzed oxidizing water, and chlorine dioxide solutions modified with nonionic surfactants, *J. Food Prot.*, **69**, 1944-1948 (2006).
- 4) Kashiwagi M., Yuka M., Tanaka H., Yoshioka M., Ueno R., Hoshiai G. I., Hatai K., Deno H., Nakamura M., Fungicidal effect of weak alkaline electrolyzed solution on a fish-pathogen oomycete, *Saprolegnia parasitica*, *Suisan Zoshoku*, **48**, 565-569 (2000).
- 5) Yahagi N., Kono M., Kitahara M., Ohmura A., Sumita O., Hashimoto T., Hori K., Ning-Juan C., Woodson P., Kubota S., Murakami A., Takamoto S., Effect of electrolyzed water on wound healing, *Artif. Organs*, **24**, 984-987 (2000).
- 6) Tsuji S., Kawano S., Oshita M., Ohmae A., Shinomura Y., Miyazaki Y., Hiraoka S., Matsuzawa Y., Kamada T., Hori M., Maeda T., Endoscope disinfection using acidic electrolytic water, *Endoscopy*, **31**, 528-535 (1999).
- 7) Sakurai Y., Ogoshi K., Okubo T., Kaku M., Kobayashi I., Strongly acidic electrolyzed water: Valuable disinfectant of endoscopes, *Digestive Endoscopy*, **14**, 61-66 (2002).
- 8) Konomatsu A., Sugibayashi K., Okajima M., Ishii F., Preparation and stability of surfactant free emulsions using electrolyzed deoxidized and ionized water, *Material Technology*, **21**, 273-285 (2003).
- 9) Miyashita K., Yasuda M., Ota T., Suzuki T., Antioxidative activity of a cathodic

- solution produced by the electrolysis of a dilute NaCl solution, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 421-423 (1999).
- 10) Nara E., Kubouchi H., Kobayashi H., Kotake M., Suzuki T., Miyashita K., Inhibitory effect of cathodic solution produced by the electrolysis of a dilute NaCl solution on the oxidation of squalene, vitamin A and β -carotene, *J. Oleo Sci.*, **50**, 575-581 (2001).
 - 11) Kitamura T., Todo H., Sugibayashi K., Effect of several electrolyzed waters on the skin permeation of lidocaine, benzoic acid and isosorbide mononitrate, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, (2008), accepted.
 - 12) Kitamura T., Koike M., Todo H., Okajima M., Ishii F., Sugibayashi K., Preparation of surfactant-free emulsions using electrolyzed water and its regulation effect on the skin permeation of compounds, *J. Jpa. Cosmet. Sci. Soc.*, (2008), in press.
 - 13) Pourbaix M., "Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions," NACE, Houston, 1974.
 - 14) Barry B. W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, 101-114 (2001).
 - 15) Asbill C. S., El-Kattan A. F., Michniak B., Enhancement of transdermal drug delivery: Chemical and physical approaches, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **17**, 621-658 (2000).
 - 16) Herkenne C., Naik A., Kalia Y. N., Hadgraft J., Guy R. H., Effect of propylene glycol on ibuprofen absorption into human skin *in vivo*, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 185-197 (2008).
 - 17) Okumura M., Sugibayashi K., Ogawa K., Morimoto Y., Skin permeability of water-soluble drugs, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1404-1406 (1989).
 - 18) Hayashi T., Sugibayashi K., Morimoto Y., Calculation of skin permeability coefficient for ionized and unionized species of indomethacin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3090-3093 (1992).
 - 19) Yamamoto T., Yamamoto Y., Electrical properties of the epidermal stratum corneum,

- Med. Biol. Eng. Comput.*, **14**, 151-158 (1976).
- 20) Ngawhirunpat T., Hatanaka T., Katayama K., Yoshikawa H., Kawakami J., Adachi I., Changes in electrophysiological properties of rat skin with age, *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1192-1196 (2002).
 - 21) Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85 (1985).
 - 22) Brown R. E., Jarvis K. L., Hyland K. J., Protein measurement using bicinchoninic acid: Elimination of interfering substances, *Anal. Biochem.*, **180**, 136-139 (1989).
 - 23) Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
 - 24) Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Itagaki H., Sugibayashi K., Utility of MTT assay in three-dimensional cultured human skin model as an alternative for Draize skin irritation test: Approach using diffusion law of irritant in skin and toxicokinetics-toxicodynamics correlation, *Pharm. Res.*, **19**, 669-675 (2002).
 - 25) Tomita M., Hayashi M., Horie T., Ishizawa T., Awazu S., Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route, *Pharm. Res.*, **5**, 786-789 (1988).
 - 26) Sugibayashi K., Watanabe T., Hasegawa T., Takahashi H., Ishibashi T., Kinetic analysis on the *in vitro* cytotoxicity using Living Skin Equivalent for ranking the toxic potential of dermal irritants, *Toxicol. In Vitro*, **16**, 759-763 (2002).
 - 27) Karande P., Jain A., Mitragotri S., Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers, *J. Control. Release*, **110**, 307-313 (2006).
 - 28) Ogiso T., Shiraki T., Okajima K., Tanino T., Iwaki M., Wada T., Transfollicular drug delivery: Penetration of drugs through human scalp skin and comparison of penetration between scalp and abdominal skins *in vitro*, *J. Drug Target.*, **10**, 369-378 (2002).

- 29) Nangia A., Andersen P. H., Berner B., Maibach H. I., High dissociation constants (pKa) of basic permeants are associated with *in vivo* skin irritation in man, *Contact Dermatitis*, **34**, 237-242 (1996).
- 30) Wilhelm K. P., Cua A. B., Wolff H. H., Maibach H. I., Surfactant-induced stratum corneum hydration *in vivo*: Prediction of the irritation potential of anionic surfactants, *J. Invest. Dermatol.*, **101**, 310-315 (1993).
- 31) Slotosch C. M., Kampf G., Löffler H., Effects of disinfectants and detergents on skin irritation *Contact Dermatitis*, **57**, 235-241 (2007).
- 32) Noro S., Takamura A., Koishi M., Evaluation of emulsion stability. Effect of Tween group emulsifiers on stability of o/w type emulsions, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 309-316 (1979).
- 33) Mengual O., Meuniera G., Cayréa I., Puecha K., Snabreb P., TURBISCAN MA 2000: Multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis, *Talanta*, **50**, 445-456 (1999).
- 34) Roland I., Piel G., Delattre L., Evrard B., Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *Int. J. Pharm.*, **263**, 85-94 (2003).
- 35) Padula C., Colombo G., Nicoli S., Catellani P. L., Massimo G., Santi P., Bioadhesive film for the transdermal delivery of lidocaine: *In vitro* and *in vivo* behavior, *J. Control. Release*, **88**, 277-285 (2003).
- 36) Montenegro L., Carbone C., Condorelli G., Drago R., Puglisi G., Effect of oil phase lipophilicity on *in vitro* drug release from o/w microemulsions with low surfactant content, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **32**, 539-548 (2006).
- 37) Lee P. J., Langer R., Shastri V. P., Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs, *Pharm. Res.*, **20**, 264-269 (2003).
- 38) Sintov A. C., Botner S., Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous

- systems: Influence of skin storage conditions on the *in vitro* permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems, *Int. J. Pharm.*, **311**, 55-62 (2006).
- 39) Huang K. C., Yang C. C., Lee K. T., Chien C. T., Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water, *Kidney Int.*, **64**, 704-714 (2003).
- 40) Yanagihara T., Arai K., Miyamae K., Sato B., Shudo T., Yamada M., Aoyama M., Electrolyzed hydrogen-saturated water for drinking use elicits an antioxidative effect: A feeding test with rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1985-1987 (2005).
- 41) Kim M. J., Kim H. K., Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice, *Life Sci.*, **79**, 2288-2292 (2006).
- 42) Shirahata S., Kabayama S., Nakano M., Miura T., Kusumoto K., Gotoh M., Hayashi H., Otsubo K., Morisawa S., Katakura Y., Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 269-274 (1997).
- 43) Nishikawa R., Teruya K., Katakura Y., Osada K., Hamasaki T., Kashiwagi T., Komatsu T., Li Y., Ye J., Ichikawa A., Otsubo K., Morisawa S., Xu Q., Shirahata S., Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation, *Cytotechnol.*, **47**, 97-105 (2005).
- 44) Hiraoka A., Takemoto M., Suzuki T., Shinohara A., Chiba M., Shirao M., Yoshimura Y., Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of "active hydrogen", *J. Health Sci.*, **50**, 456-465 (2004).
- 45) Hanaoka K., Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions, *J. Appl. Electrochem.*, **31**, 1307-1313 (2001).
- 46) Hanaoka K., Sun D., Lawrence R., Kamitani Y., Fernandes G., The mechanism of the enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water

- produced by electrolysis, *Biophys. Chem.*, **107**, 71-82 (2004).
- 47) Lee M. Y., Kim Y. K., Ryoo K. K., Lee Y. B., Park E. J., Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **135**, 133-144 (2006).
- 48) Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Paxton J., Spin trapping of superoxide, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 676-685 (1979).
- 49) Masaki H., Sakaki S., Atsumi T., Sakurai H., Active-oxygen scavenging activity of plant extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 162-166 (1995).
- 50) Ogura R., Ueta H., Sugiyama M., Hidaka T., Distribution of superoxide dismutase activity in the epidermis: Measurement with electron spin resonance spin trapping, *J. Invest. Dermatol.*, **94**, 227-229 (1990).
- 51) Al-Mamun M., Yamaki K., Masumizu T., Nakai Y., Saito K., Sano H., Tamura Y., Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern Japan determined using electron spin resonance spectrometry, *Int. J. Biol. Sci.*, **3**, 349-355 (2007).
- 52) Ueda Y., Komatsu M., Hiramatsu M., Free radical scavenging activity of the Japanese herbal medicine Toki-shakuyaku-san (TJ-23) and its effect on superoxide dismutase activity, lipid peroxides, glutamate, and monoamine metabolites in aged rat brain, *Neurochem. Res.*, **21**, 909-914 (1996).
- 53) Kim D. O., Lee K. W., Lee H. J., Lee C. Y., Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3713-3717 (2002).
- 54) Prior R. L., Wu X., Schaich K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4290-4302 (2005).
- 55) Mitsuta K., Mizuta Y., Kohno M., Hiramatsu M., Mori A., The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances,

- Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 187-191 (1990).
- 56) Ohsawa I., Ishikawa M., Takahashi K., Watanabe M., Nishimaki K., Yamagata K., Katsura K., Katayama Y., Asoh S., Ohta S., Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals, *Nat. Med.*, **13**, 688-694 (2007).
- 57) Kikuchi K., Takeda H., Rabolt B., Okaya T., Ogumi Z., Saihara Y., Noguchi H., Hydrogen particles and supersaturation in alkaline water from an alkali-ion-water electrolyzer, *J. Electroanal. Chem.*, **506**, 22-27 (2001).
- 58) Kikuchi K., Takeda H., Rabolt B., Okaya T., Ogumi Z., Saihara Y., Noguchi H., Hydrogen concentration in water from an alkali-ion-water electrolyzer having a platinum-electroplated titanium electrode, *J. Appl. Electrochem.*, **31**, 1301-1306 (2001).
- 59) Kikuchi K., Tanaka Y., Saihara Y., Maeda M., Kawamura M., Ogumi Z., Concentration of hydrogen nanobubbles in electrolyzed water, *J. Colloid Interface Sci.*, **298**, 914-919 (2006).
- 60) Mensor L. L., Menezes F. S., Leitão G. G., Reis A. S., Dos Santos T. C., Coube C. S., Leitão S. G., Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method, *Phytother. Res.*, **15**, 127-130 (2001).
- 61) Monagas M., Hernández-Ledesma B., Garrido I., Martín-Álvarez P. J., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B., Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *vitis vinifera* L. grape seeds, *Nutr. Cancer*, **53**, 244-254 (2005).
- 62) The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group, The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers, *N. Engl. J. Med.*, **330**, 1029-1035 (1994).
- 63) Omenn G. S., Goodman G. E., Thornquist M. D., Balmes J., Cullen M. R., Glass A., Keogh J. P., Meyskens F. L., Jr., Valanis B., Williams J. H., Jr., Barnhart S., Cherniack

- M. G., Brodtkin C. A., Hammar S., Risk factors for lung cancer and for Intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial, *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 1550-1559 (1996).
- 64) Huang K. C., Yang C. C., Hsu S. P., Lee K. T., Liu H. W., Morisawa S., Otsubo K., Chien C. T., Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients, *Kidney Int.*, **70**, 391-398 (2006).
- 65) Ratnam D. V., Ankola D. D., Bhardwaj V., Sahana D. K., Kumar M. N., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *J. Control. Release*, **113**, 189-207 (2006).
- 66) Sinha B. K., Free radicals in anticancer drug pharmacology, *Chem. Biol. Interact.*, **69**, 293-317 (1989).
- 67) Porta C., Moroni M., Nastasi G., Allopurinol mouthwashes in the treatment of 5-fluorouracil-induced stomatitis, *Am. J. Clin. Oncol.*, **17**, 246-247 (1994).
- 68) Suda N., Konno Y., Morita Y., Nakata H., Sugawara M., Miyazaki S., Miyazaki K., Development and evaluation of rapidly disintegrating tablets containing camostat mesilate for the prevention of occurrence of stomatitis during cancer chemotherapy, *Jap. J. Pharm. Health Care Sci.*, **29**, 705-710 (2003).
- 69) Koseki S., Itoh K., Prediction of microbial growth in fresh-cut vegetables treated with acidic electrolyzed water during storage under various temperature conditions, *J. Food Prot.*, **64**, 1935-1942 (2001).
- 70) Achiwa N., Nishio T., The use of electrolyzed water for sanitation control of eggshells and GP center, *Food Sci. Technol. Res.*, **9**, 100-103 (2003).
- 71) Shimmura S., Matsumoto K., Yaguchi H., Okuda T., Miyajima S., Negi A., Shimazaki J., Tsubota K., Acidic electrolysed water in the disinfection of the ocular surface, *Exp. Eye Res.*, **70**, 1-6 (2000).
- 72) May J., Chan C. H., King A., Williams L., French G. L., Time-kill studies of tea tree

- oils on clinical isolates, *J. Antimicrob. Chemother.*, **45**, 639-643 (2000).
- 73) Carson C. F., Mee B. J., Riley T. V., Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1914-1920 (2002).
- 74) Sale A. J. H., Hamilton W. A., Effects of high electric fields on microorganisms : I. Killing of bacteria and yeasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 781-788 (1967).
- 75) Tsuchiya K., Hotta K., A critical review on the chemical bactericidal factors of the acidic electrolyzed water, *Bull. Sci. Eng., Takushoku Univ.*, **9**, 21-30 (2004).
- 76) Kiura H., Sano K., Morimatsu S., Nakano T., Morita C., Yamaguchi M., Maeda T., Katsuoka Y., Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration, *J. Microbiol. Methods*, **49**, 285-293 (2002).
- 77) Lee S. H., Choi B. K., Antibacterial effect of electrolyzed water on oral bacteria, *J. Microbiol.*, **44**, 417-422 (2006).
- 78) Katsuragi H., Ohtake M., Kurasawa I., Suzuki A., Saito K., Bactericidal effect against several genera of bacteria and cytotoxicity of newly developed super reductive water, *Jap. J. Oral Biol.*, **43**, 166-174 (2001).
- 79) Ayebah B., Hung Y. C., Frank J. F., Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel, *J. Food Prot.*, **68**, 1375-1380 (2005).
- 80) Ayebah B., Hung Y. C., Kim C., Frank J. F., Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter, *J. Food Prot.*, **69**, 2143-2150 (2006).

