

角質保湿剤ヒアルロン酸ナトリウムの皮膚浸透に及ぼす超音波照射の影響

李 梅花・上田秀雄・杉林堅次・森本雍憲*

The effect of ultrasonic irradiation on the skin penetration of a potent humectant, sodium hyaluronate

The effects of ultrasonic irradiation on the skin-moisturing and the skin penetration of sodium hyaluronate(HA) were measured in hairless rats. Ultrasound(2.15 MHz) with different power and pulse duty was applied for 10 min on the abdominal site which was pretreated with 1% HA for 3 h. Relative conductance on the skin surface was increased by the ultrasonication. The content of HA in the stratum corneum(measured using fluorescence-labeled HA) was also increased by the treatment. In addition, a good relationship was observed between the two values. The ultrasonic treatment may be utilized as a new tool to increase the HA penetration and the humectant efficacy into and on the skin surface.

Meihua Li · Hideo Ueda ·

Kenji Sugibayashi · Yasunori Morimoto*

key words : sodium hyaluronate, ultrasound, skin moisturizing effect, skin penetration

肌あれや肌の乾燥を防止するために、現在グリセリン、尿素、乳酸塩、あるいはアミノ酸類など種々化合物が保湿剤として用いられている¹⁾。しかし、これら保湿剤は高湿度環境下では高い効果を発揮するが、低湿度環境下では効果が低く、また皮膚刺激を起こしやすいことも問題となっている。最近、生体由来の高分子であるヒアルロン酸ナトリウム(HA)が低湿度環境下でも保湿効果を有することが明らかにされたが^{2,3)}、HAは皮膚に浸透しにくいため、十分な保湿効果を期待するためにはHAの皮膚浸透性を高める必要がある。

一方、適度な強度の超音波照射は皮膚への薬物移行を増大し^{4~12)}、たとえば局所に適用した関節炎やリウマチなどの治療薬の皮膚浸透性を高め、治療効果が改善されたことが報告されている^{7,8)}。

そこで本研究では、HAの皮膚保湿効果増強を期待して、ヘアレスラットにHAを塗布し超音波(2.15 MHz)を照射することによって皮膚保湿効果の増強を図った。また、吸収促進剤*l*-メントールと超音波の併用効果¹⁰⁾についても試験した。

方 法

(1) 材料と実験動物

医薬品グレードのHA(平均分子量約80万)は明治製薬より提供された。HAの蛍光標識化剤である6,7-dimethoxy-1-methyl-2(H)-quinoxalinone-3-propionohydrazide(DMEQ-hydrazide)および縮合剤である1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)は、それぞれ和光純薬工業およびナカライテスクより購入した。また、*l*-メントールは和光純薬工業から購入したものを用いた。その他の試薬はすべて特級または分析用グレードを用いた。

また、実験動物としては城西大学生命科学研究中心で生産された雄性ヘアレスラット(WBN/Ht、体重300~350 g)を用いた。

(2) HAの蛍光標識化

DMEQ-hydrazideおよびEDCを用い、HAのカルボキシル基を蛍光標識した。すなわち、7.6 mg/ml HA水溶液50 mlにピリジン1.5 mlおよび9 mg/ml EDC水溶液5 mlを混合し、1.24 mg/ml DMEQ-hydrazideのジメチルホルムアミド溶液25 mlを加えて室温で2時間攪拌した。反応液

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,
1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02 城西大学薬学部

Offprint requests to : Yasunori Morimoto, Ph. D.

表 1 Comparison of ultrasonic maximum powers among different conditions
(a) 3.4 cm² transducer

Pulse mode(ms/10 ms)	2	4	6	8	Continuous
Electric power(W)	1.05	1.80	2.55	2.85	4.50
Ultrasonic power(mW/cm ²)	54.92	86.84	134.61	150.22	225.42
(SD)	(2.53)	(0.38)	(0.12)	(2.00)	(3.40)
(b) 2.3 cm ² transducer					
Pulse mode(ms/10 ms)	2	4	6	8	Continuous
Electric power(W)	0.69	1.23	1.61	1.95	3.17
Ultrasonic power(mW/cm ²)	32.78	56.88	72.34	85.35	128.89
(SD)	(0.40)	(0.30)	(0.26)	(0.23)	(0.65)

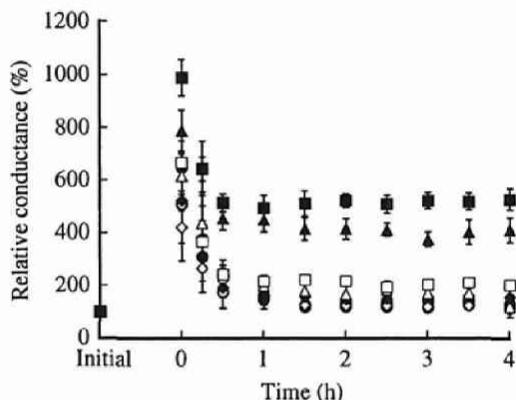


図 1 Typical time course of relative conductance on the surface of stratum corneum after treatment with water, HA and ultrasound

○: water, ◇: l-menthol, △: HA, □: l-menthol and HA, ●: ultrasound, ◆: l-menthol with ultrasound, ▲: HA with ultrasound, ■: l-menthol and HA with ultrasound

Ultrasonic irradiation condition: 3.4 cm² transducer, continuous

Each data point represents the mean±SE of three experiments.

に水 50 ml を加え透析チューブに入れ、水を外液として透析を行い未反応の DMEQ-hydrazide, EDC, およびその他の低分子物質を除去した。透析は約 12 時間ずつ 4 回行った。透析終了後、透析チューブ(Viskase Sales Corp., Chicago, USA)内の溶液を凍結乾燥し蛍光ラベル化 HA 粉末を得た。

(3) 超音波発生装置

2.15±0.04 MHz の超音波を発生する超音波発

生装置(電気的発振器、電力計およびトランスデューサー [先端は平らな円形で 2.3 または 3.4 cm²] から構成、第一高周波工業)を用いた。本装置は、超音波発振器のダイアルを調節することにより、連続波およびパルス波(10 ms 中それぞれ 2, 4, 6 または 8 ms の duty)を発生することができるが、出力は超音波の各モードと各トランスペッシャーにおいて安定な最大値のみを用いた。なお、超音波出力は Rooney の方法¹³⁾に従って測定した。

(4) 角質表面水分量^{14,15)}と角質内 HA 量の測定

角質内水分量は角質表面の電気伝導度と相關することが報告されている。そこで、SKICON-200 (IBS) を用いて角質表面のコンダクタンスを測定し、角質内水分量の指標とした。また、角質内 HA 量は蛍光標識体を用いて測定した。

まず、ヘアレスラットを 25% ウレタン溶液(6 ml/kg)で麻酔し、腹部を除毛したのち背位固定した。腹部を乾いた脱脂綿でよく拭き取り、37°C の水を循環したガラスセル(有効透過面積 12.56 cm²)をアロンアロファ[®]で接着した。コンダクタンス測定の実験では、先に試験溶液適用前の皮膚コンダクタンスを測定しこれを初期値とした。つぎに、ガラスセルに水、1% HA(角質内 HA 量の測定の際には蛍光標識体を適量添加した)、1% l-メントール、または 1% HA+1% l-メントール水溶液 10 ml を加え、適用 3 時間後から超音波を 10 分間照射した。超音波トランスペッシャーと皮膚の距離は 5 mm とした。その後、ただちにセル

表 2 Comparison of relative conductance(%) at steady state after ultrasound treatment with several conditions

Area (cm ²)	Applied vehicle	Wave mode				Continuous	
		Pulse(ms/10 ms)					
		2	4	6	8		
3.4	HA	193±4	226±3	288±7	349±9	397±9	
3.4	<i>l</i> -menthol	128±2	—	144±11	—	154±3	
3.4	HA+ <i>l</i> -menthol	221±11	230±7	401±47	381±38	515±36	
2.3	HA	177±5	209±6	246±5	312±5	325±3	

Each value represents the mean±SE of three experiments.

表 3 Effect of ultrasonic irradiatio on the HA content in stratum corneum

Area (cm ²)	Applied vehicle	Wave mode				Continuous	
		Pulse(ms)					
		2	4	6	8		
3.4	HA	43±4	90±11	199±12	600±18	709±35	
3.4	HA+ <i>l</i> -menthol	—	—	—	—	904±83	
2.3	HA	36±4	46±2	114±7	391±17	571±16	

ng HA/mg stratum corneum

control(non-ultrasound, without *l*-menthol) : 32±8 ng/mg

Each value represents the mean±SE of three experiments.

内の溶液を除き、残った HA を乾いた脱脂綿で拭き取り、さらに蒸留水で皮膚表面を洗ったのち、再び乾いた脱脂綿にて拭き取った。

この時点をゼロ時間として経時的に皮膚のコンダクタンスを測定した。コントロールの実験は、超音波照射を除きすべて同様に操作した。角質水分量の指標として、個々のイニシャルコンダクタンスに対する処理後のコンダクタンスの比、すなわち相対コンダクタンス(%)を用いた。

また、HA 量の定量では、まず約 4×5 cm の粘着テープを用いて 20 回テープストリッピングして角質層を剥離した¹⁶⁾。つぎに、このテープを 50 ml の遠沈管に入れ、クロロホルム/メタノール(1:1)混液 10 ml を用いてテープから角質を分離した。テープを取り除いたのち、溶媒を減圧留去し、角質重量の指標とした。つぎに、再び同混液および蒸留水各 5 ml を加え、10 分間振盪後、遠心分離し水相を分取した。水相を凍結乾燥し、蒸留水 0.5 ml を加えて蛍光標識 HA を再溶解したのち、HPLC 法により蛍光標識 HA 量を測定した。角質内 HA 量は剥離した角質重量に対する量として算出した。

蛍光標識 HA の定量は HPLC(LC-10A シリーズ、島津製作所)によった。なお、カラムには Shodex Asahi pak GS-620HQ(旭化成)、移動相には 0.1 M 塩化ナトリウムを用いた。また、検出波長は励起波長 365 nm および蛍光波長 447 nm とした。

結果と考察

(1) 超音波出力の測定

本実験で用いた超音波装置は電気出力をモニターできるが、この値がトランスデューサーからの超音波出力を反映しているわけではない。そこで、トランスデューサーから放射される安定な超音波最大出力を天秤法により測定した。表 1 a および b は、それぞれ直径 3.4 および 2.3 cm² トランスデューサーからの超音波最大出力を示している。それぞれの wave mode(10 ms 中 2, 4, 6 または 8 ms の duty のパルス、および連続波)に関し表 1 a と b の結果を比較することにより、トランスデューサーによって超音波出力に差があることが明らかとなった。また、3.4 cm² トランスデューサー超音波平均最大出力は 54.92(2 ms)

～225.42(continuous) mW/cm² の範囲にあるのに対し、2.3 cm² トランスデューサーでは 32.78(2 ms)～128.89(continuous) mW/cm² であり、超音波出力範囲にも差があることが明らかとなった。以後これらの超音波照射条件で実験を行った。

(2) 角質表面水分量に対する超音波の影響

図1は、種々処理後の角質層表面の相対コンダクタンス(%)の経時変化を示している。いずれの場合も、処理直後に高い相対コンダクタンス値を示し、1時間以降にはほぼ定常状態となった。処理直後の相対コンダクタンスは処理の違いにより値が異なる傾向を示したが、誤差が大きいため定常状態の値(1～4時間の平均値を用いた)を保湿効果の指標として用いることとした。

まず、l-メントール溶液の適用のみや水を適用し超音波(3.4 cm² トランスデューサー、連続波)処理した群では水処理とほとんど同じで、高い保湿効果は観察されなかった。しかし、HAのみの処理では相対コンダクタンス値がわずかではあるが上昇し、HAの有用性が確認された。これに対し、HAにl-メントールを併用すると保湿効果が上昇し、これはl-メントールのHA角質浸透性の促進に起因しているものと推定された。これらの処理に対し、HAに前述の条件で超音波の照射を併用すると著しく高い効果が得られ、超音波照射の併用が角質層の保湿性維持にきわめて有用であることが示唆された。また、HAにl-メントールを併用しさらに超音波を照射すると、今回試験した系のなかではもっとも高い相対コンダクタンスが得られた。

つぎに、超音波の照射方法(パルス波または連続波)やトランスデューサー面積の影響についてさらに試験した。その結果を表2に示す。Dutyの増加に従って相対コンダクタンス値は上昇し、連続波で最大の効果が得られた。また、トランスデューサーの比較では面積が広いほうが高い効果が得られることが示唆された。

(3) 角質内 HA 量

前述の結果から超音波がHAの保湿効果を増強することが示唆されたため、つぎに、蛍光標識HAを用いて超音波処理後の角質層中HA量を

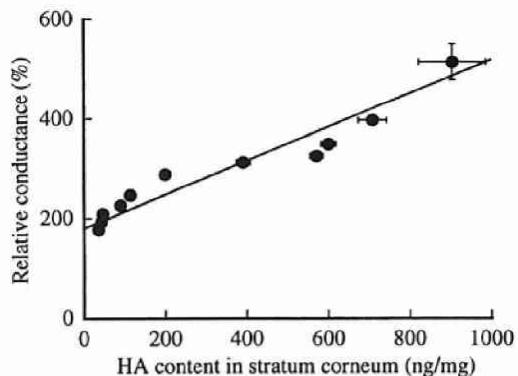


図2 Relationship between HA content in stratum corneum and relative conductance(%)

Each data point represents the mean±SE of three experiments.

測定した。

表3は、それぞれ角質層中HA量に対する種々超音波照射条件の影響について比較したものである。超音波未処理のときの角質層中のHA量(32±8 ng/mg)にくらべ、すべての超音波処理で角質層中HA量が増加した。Wave modeが同じであるとき、トランスデューサーの面積が大きいほう、すなわち超音波出力が高いほうが角質層中HA量が顕著に増加した。また、同じトランスデューサーで比較すると、dutyが大きいほどHA量は高くなり、連続波でもっとも高いHA量が得られた。さらに、ほぼ同じ出力下(表1参照)でwave modeの影響を比較した場合、duty cycleが高いほうがHA量が高くなることもわかった(55 mW/cm²のとき p<0.05、約86および約130 mW/cm²のとき p<0.01、出力値については表1参照)。加えて、l-メントールの併用によって超音波照射(連続波)の効果はさらに増強し、角質層中HA濃度は約900 ng/mgと今回試験した系では最大値を示した。なお、ほとんどのHAがストリッピングの最初の数枚に存在していたこと、HAの分子量がきわめて高いことを考えると、HAは角質細胞の隙間などに多く分布したものと推定される。

以上より、出力が高くかつdutyが高いほど、また浸透促進剤であるl-メントールを併用したば

うが、HAの角質移行性は高くなると思われた。つぎに相対コンダクタンス(%)（表2）と角質内HA量（表3）の関係についてプロットした。結果を図2に示す。相対コンダクタンスは角質内HA量に依存する傾向が認められ、このことから保湿効果が角質内HA量に関係しているものと思われた。また、L-メントールが配合されているものも同じ直線上にプロットされることが明らかとなつた。

結論

超音波照射はHAの皮膚保湿効果を増強した。さらにこの効果はL-メントールの併用によりさらに改善された。また、これらの保湿効果の改善は角質内のHA量の増加に関係していることが示唆された。

本研究の一部は中富研究振興財団研究補助金によった。HAをいただきその蛍光標識化法をご教示いただいた明治製薬、ならびに超音波発生装置を製作していただいた第一高周波工業に感謝する。また、研究の一部を手伝っていただいた城西大学針谷美加さんにも感謝する。

文献

- 1) Rawlings A, Harding C, Watkinson A, Banks J, Ackerman C et al.: The effect of glycerol and humidity on desmosome degradation in stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* 287: 457-464, 1995.
- 2) Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S: Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 162-163, 1997.
- 3) 赤坂日出道, 山口敏二郎:バイオポリマーとしてのヒアルロン酸の特性と応用. *フレグラシスジャーナル* 14: 42-58, 1986.
- 4) Tyle P, Agrawala P: Drug delivery by phonophoresis. *Pharm. Res.* 6: 355-361, 1989.
- 5) Ueda H, Sugibayashi K, Morimoto Y: Skin penetration-enhancing effect of drugs by phonophoresis. *J. Controlled Rel.* 37: 291-297, 1995.
- 6) Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R: Ultrasound-mediated transdermal protein delivery. *Science* 269: 850-853, 1995.
- 7) Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R: Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm. Res.* 13: 411-420, 1996.
- 8) Kost J, Plikuett U, Mitragotri S, Yamamoto A, Langer R et al.: Synergistic effect of electric field and ultrasound on transdermal transport. *Pharm. Res.* 13: 633-638, 1996.
- 9) Bommannan D, Menon GK, Okuyama H, Elias PM, Guy RH: Sonophoresis II. Examination of the mechanism(s) of ultrasound-enhanced transdermal drug delivery. *Pharm. Res.* 9: 1043-1047, 1992.
- 10) Ueda H, Isshiki R, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y: Combined effect of ultrasound and chemical enhancers on skin permeation of aminopyrine. *Int. J. Pharm.* 143: 37-45, 1996.
- 11) Ueda H, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y: Change in the electrochemical properties of skin and the lipid packing in stratum corneum by ultrasonic irradiation. *Int. J. Pharm.* 137: 217-224, 1996.
- 12) Ueda H, Ogihara M, Sugibayashi K, Morimoto Y: Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs. *Chem. Pharm. Bull.* 44: 1973-1976, 1996.
- 13) Rooney JA: Determination of acoustic power outputs in the microwatt and milliwatt range. *Ultrasound Med. Biol.* 1: 13-16, 1973.
- 14) 田上八郎:皮膚表面における水分計測. *皮膚臨床* 25: 151-158, 1983.
- 15) Leveque JL, De Rigal J: Impedance methods for studying skin moisturization. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 34: 419-428, 1983.
- 16) Washitake M, Yajima T, Anmo T, Arita T, Hori R: Studies on percutaneous absorption of drugs. III. Percutaneous absorption of drugs through damaged skin. *Chem. Pharm. Bull.* 21: 2444-2451, 1973.