

原著論文

シヨウキョウ抽出液の眼瞼周囲部しわに対する
予防および改善効果

塚原 和枝* 中川 秀己** 大槻マミ太郎*
森脇 繁*** 藤村 努*** 武馬 吉則***
芋川 玄爾***

要 約

我々は既にシヨウキョウ抽出液が線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害し、光老化動物モデルへの塗布により、真皮弾性線維の直線性を維持し、皮膚弾力性の低下を抑え、しわ形成を抑制することを報告している。今回、本シヨウキョウ抽出液のヒト眼瞼部位への、しわ、皮膚弾力性および角層水分量に及ぼす影響を検討した。被験者には、平均年齢37.6歳の健常な日本人男性20名を用いた。ハーフフェイス・二重盲検法にて1%シヨウキョウ抽出液配合処方およびプラセボ処方を1日2回、12ヶ月間塗布した。しわへの効果を検証するために、塗布開始前および12ヶ月後にしわの目視評価、レプリカ採取、皮膚弾力性測定、角層水分量測定を行った。レプリカは画像解析によるしわの定量に用いた。

今回の結果により、本シヨウキョウ抽出液の1年間の塗布によって男性被験者において角層水分量の変化を伴わずに、眼瞼周囲部の皮膚弾力性の低下を抑制し、しわの形成を予防、改善することが明らかになった。

(キーワード：光老化、しわ、シヨウキョウ、エラスターゼ)

I. はじめに

我々は以前、ラット足底皮膚に1 MED (Minimal Erythema Dose：最小紅斑量) 以下のUVB (Ultraviolet-B：中波長紫外線) を連続照射することで真皮弾性線維がその三次元構造を変えて湾曲化し、皮膚弾力性が低下することを報告した^{1,2)}。ラット足底皮膚に1 MED 以下のUVB を連続照射すると線維芽細胞エラスターゼ活性が上昇するが³⁾、UVB 照射直後に線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害する合成化合物あるいはワレモコウエキスを塗布することで、真皮弾性線維の直線性の低下と皮膚弾力性の低下を抑制し、しわの形成を予防できることを報告した^{3,4)}。さらに我々は、皮膚刺激性の原因であると報告されている6-gingerol⁵⁾を除く処理を施したシヨウキョウ抽出液が、線維芽細胞エラ

スターゼ活性の上昇を阻害し、ラット足底皮膚と、しわのモデル動物として広く用いられているヘアレスマウス背部皮膚⁶⁾に連続塗布することで、1 MED 以下のUVB を連続照射しているにも関わらず、しわの形成と皮膚弾力性低下を抑制し、ラット足底皮膚の弾性線維が直線性の高い三次元構造を維持することができたことを報告している⁷⁾。

一方、線維芽細胞エラスターゼは、線維芽細胞の継代を重ねることにより活性が上昇するとのin vivoでの報告がある⁸⁾。さらにヘアレスマウス皮膚では光老化だけでなく、自然老化においても線維芽細胞エラスターゼ活性が上昇することが報告されている⁹⁾。またmid-dermal elastolysisは非露光部に縮緬皺ができる皮膚病であるが、UVB照射とは関係なく患部の線

* 自治医科大学皮膚科学教室
** 東京慈恵会医科大学皮膚科学教室
*** 花王株式会社生物科学研究所

維芽細胞エラストラーゼ活性が高く、しかも真皮中層の elastic tissue が消失していることも報告されている¹⁰⁾。従って、年間を通じて紫外線防御を行わない生活をして、線維芽細胞エラストラーゼ活性が上昇し、しわがより形成されやすくなる可能性が考えられる。

今までに、線維芽細胞エラストラーゼ活性の阻害剤が配合された処方を塗布することによるしわ形成抑制あるいはしわ改善効果をヒト顔面で検証した例は見当たらない。そこで我々は、積極的に紫外線防御を行っていない健常男性を対象に、目尻および下眼瞼部位にショウキョウ抽出液配合処方を1年間塗布することによる、しわ、皮膚弾力性、角層水分量へ及ぼす影響を検討した。

II. 方法

A. 対象

被験者には、目尻および下眼瞼部位にしわを有し、週末を比較的アウトドアで過ごすことの多い健常日本人男性(27-49歳:平均年齢37.6歳)20名を対象にした。本試験は花王株式会社東京研究所内にて実施し、被験者には試験内容について充分説明して同意を得て、被験者の人権と安全を十分に配慮した上で行った。

B. ショウキョウ抽出液

ショウキョウ抽出液は、我々の以前の方法に準拠した⁷⁾。すなわち、中国雲南省産ショウガ科ショウキョウ(Tochimoto Co., Osaka, Japan)200gに20%EtOHを1000ml加え、室温で1週間静置して濾過した。次に30gの活性炭を用いて、バッチ法にて室温、2時間攪拌後、濾過した。得られた濾液は減圧濃縮し、ショウキョウ抽出液(固形残分(3%w/v))を得た。

C. 外用方法

1%(w/w)ショウキョウ抽出液配合処方、ハーフフェイス・二重盲検法にて1日2回、12ヶ月塗布した。被験者のショウキョウ抽出液配合処方塗布側とプラセボ塗布側については、塗布開始前の測定時に被験者全員に対して評価した左右目尻のしわスコア(方法はE-4に記す)を基に、各塗布側のしわスコアの平均値がほぼ同レベルになるように設定し、決定した。ショウキョウ抽出液を除いたプラセボ処方をコントロール

として用い、もう片側に塗布した。プラセボ処方、Emanon CH60; PEG-60 hydrogenated castor oilを0.5weight/weight(w/w)%, methylpolysiloxane(2.0w/w%), carboxyvinylpolymer(0.20w/w%), potassium hydroxide(0.07w/w%)を含み、防腐剤としてmethylparaben(0.2w/w%)を加え、精製水で調製したものである。

D. 皮膚性状測定方法

しわ予防、改善効果を評価するために、塗布開始前および12ヶ月後に皮膚性状測定を行った。まず、液体洗顔料(Kao Corporation, Tokyo, Japan)にて洗顔後、20°C、50%の恒温室で20分間順化を行った。その後角層水分量測定、皮膚弾力性測定、写真撮影、しわ目視評価、レプリカ採取の順に測定を行った。なお、塗布開始前と12ヶ月後に2回ずつ測定を行い平均値を算出した。各測定の際には皮膚性状やしわの日内変化^{11,12)}を考慮し、塗布開始前と、12ヶ月後の測定時刻を一致させた。なお、測定は二重盲検法にて行った。

E. 皮膚の評価法

E-1 角層水分量

角層水分量は、皮表角層水分量測定装置(Skin Surface Hygrometer) Skicon-200[®](I·B·S Co., Hamamatsu, Japan)を用いた高周波電気伝導度法で行った。測定は1部位に対して5回ずつ行った。

E-2 皮膚弾力性

皮膚弾力性測定は、Takemaらの方法¹³⁾に一部準拠した。すなわち、測定にはCutometer SEM575[®](Courage and Khazaka, Cologne, Germany)を用いた。200mbarで8秒間吸引後解除し、その後2秒間の計10秒間の変位を測定した。測定は1部位に対して5回ずつ行った。得られるパラメーターとして、Agacheら¹⁴⁾により報告されているUe(瞬間弾性変位)、Uv(遅延弾性変位)、Ur(瞬間回復変位)、Uf(最終変位)があり、その中でも老化の指標として用いられているUr/Uf(生物学的弾性)のパラメーター¹³⁾について値を求めた。

E-3 写真撮影

しわ接写写真撮影は、我々の以前の方法を用いて行った¹⁵⁾。すなわち、被験者は座位にて軽く

目を閉じた状態で行った。撮影にはミノルタ $\alpha 707si$ (Minolta, Tokyo, Japan) および Fuji color super G Ace 100 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を使用し、顎を眼科用固定台に乗せ、カメラは三脚に固定して斜め45度方向に配置し、被写体との距離を一定にして左右両方向から撮影した。その後、シャッター速度60, 絞り22で接写した。なお、使用した各フィルムの先頭に標準色見本を撮影し、同様になるように現像を行った。

E-4 しわ目視評価

使用した写真スケールは、以前我々の報告に従い作成し¹⁵⁾, 専門パネラー1名により評価を行った。目尻, 下眼瞼のそれぞれの写真スケールを基に被験者のしわについて、以下に示す5段階の基準 (0:しわがない, 1:わずかにしわがある, 2:しわがある, 3:はっきりとしわがある, 4:かなり深いしわがある) を用いて, スコア評価を行った。

E-5 レプリカ採取および画像解析方法

レプリカは、Takema らの方法¹⁶⁾に準拠し採取と評価を行った。すなわち、歯科用印象剤 (hydrophilic vinyl silicon impression material: GC Exffine, GC Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、仰臥位にて目を軽く閉じた状態で眼瞼周辺部位から採取した。採取したレプリカを直径1.8cmにくり抜き、裏面を同様のレプリカ剤で平坦に加工した。

レプリカの画像解析は、Imokawa と Takema の方法¹⁷⁾に準拠した。すなわち、画像解析装置 PIAS LA-555 (PIAS Corp., Osaka, Japan) を用い、レプリカに30度方向から光をあて、上方より CCD カメラにて画像を取り込み、シェーディング等各種補正後単純二値化を行い、その後二値化領域の面積比を求めたものをしわの画像解析面積比(%)とした。

F. 統計処理

しわ目視評価およびレプリカ画像解析値の統計処理は、塗布開始前の値と塗布12ヶ月後の値との差について、ショウキョウ抽出液側とプラセボ側とを比較した。また、皮膚弾力性と皮膚水分量についてはショウキョウ抽出液側, プラセボ側ともに試験開始時の値と塗布後の値とを比較した。平均値は標準偏差 (S.D.) で算出し、しわに関する検定は Wilcoxon の符号付順位和検定にて行い、レプリカ画像解析, 皮膚弾力性および皮膚水分量に関する検定は t-検定の1対検定にて行った。

III. 結果

A. 目尻および下眼瞼部位への目視によるしわスコア評価

5段階の写真スケールを用いて専門パネラーがブラインドにてしわの目視評価を行った結果、目尻では、塗布前の値と比較して12ヶ月後では、プラセボ側のしわスコアが有意に増加

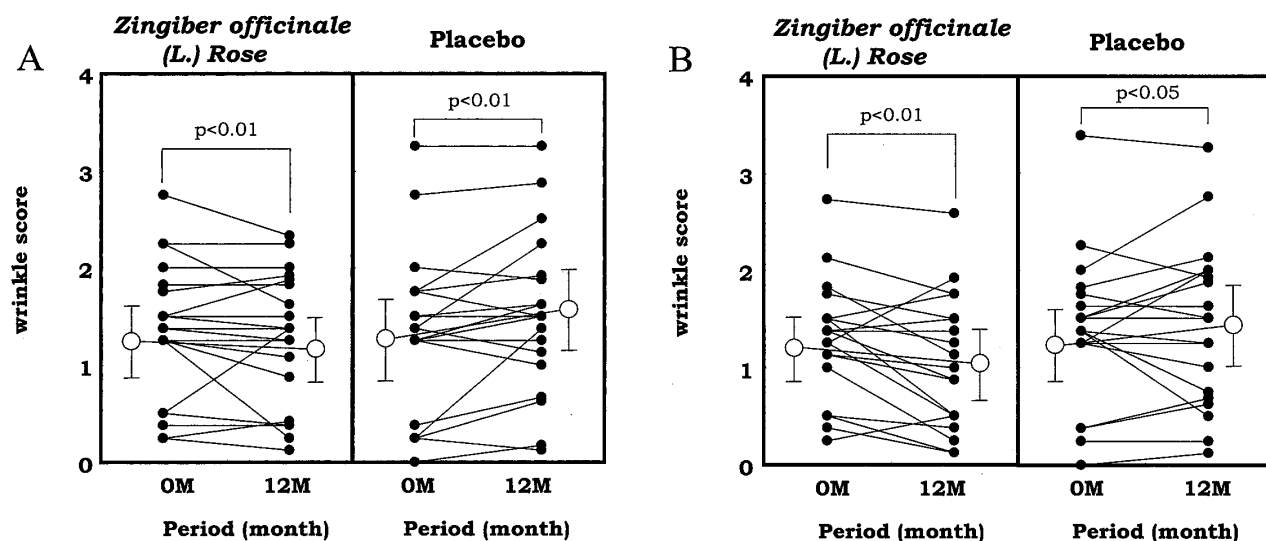


図1 0-4まで5段階基準で評価したしわの目視評価。(A):目尻, (B):下眼瞼。図の表示は mean±S.D. で示した。

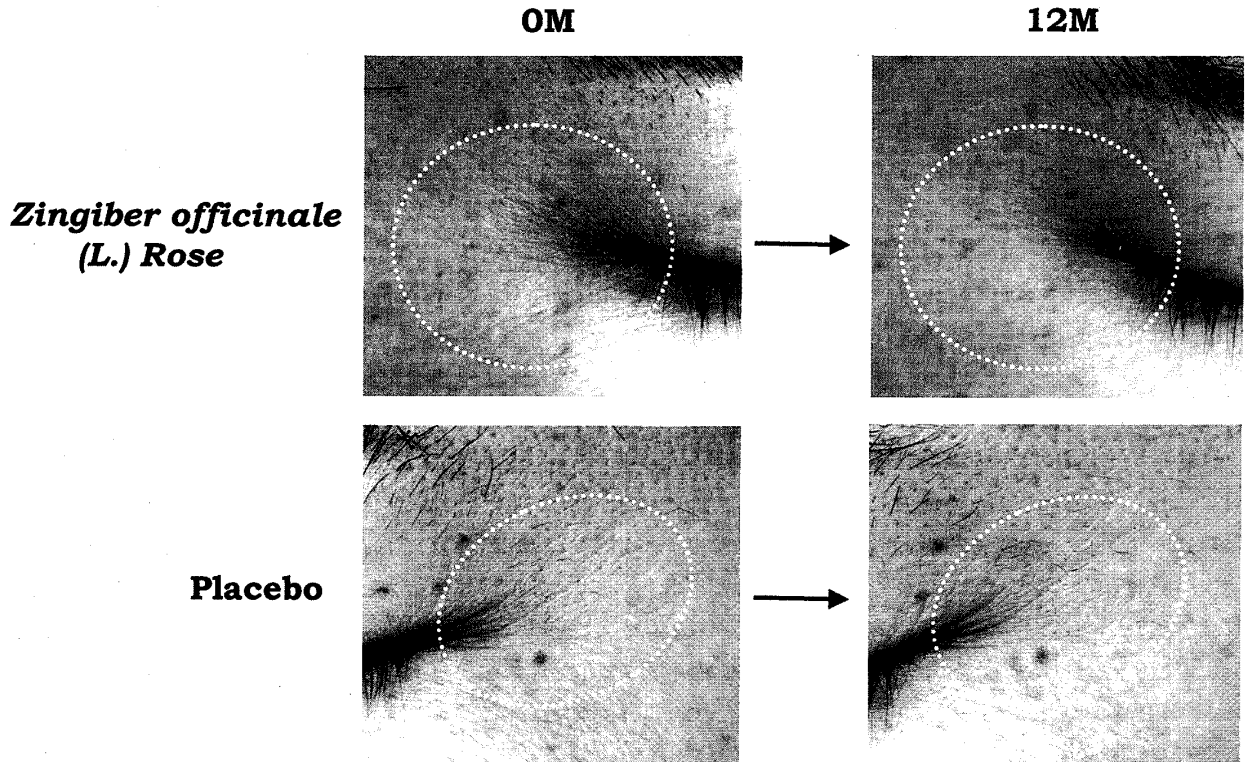


図2 ショウキョウ抽出液配合処方あるいはプラセボを塗布する前と12ヶ月後の眼瞼周囲部しわの代表的な接写写真。35歳。

($P < 0.01$) しており、ショウキョウ抽出液側のしわスコアが有意に減少 ($P < 0.01$) していた(図1 A)。一方、下眼瞼部位においても塗布前の値と比較して塗布から12ヶ月後では、プラセボ側ではしわスコアの有意な増加 ($P < 0.05$) が認められ、ショウキョウ抽出液側では有意な減少 ($P < 0.01$) が認められた(図1 B)。サンプル塗布前と12ヶ月後の目周辺部位について代表的な接写写真を図2に示した。

B. 目周辺部位のレプリカ画像解析

採取したレプリカの画像解析を行った結果、プラセボ側は塗布前と比較して12ヶ月後では有意な画像解析面積比(%)の増加 ($P < 0.001$) が認められた。一方ショウキョウ抽出液側では、塗布前と比較して12ヶ月後では有意な減少 ($P < 0.001$) が認められた(図3)。サンプル塗布前と12ヶ月後の眼瞼周辺部位について代表的なレプリカの写真を図4に示した。

C. 目尻の皮膚弾力性への影響

プラセボ側では、塗布前と比較して12ヶ月後に有意な低下 ($P < 0.05$) を示していた。一方ショウキョウ抽出液側では、塗布前と比較して

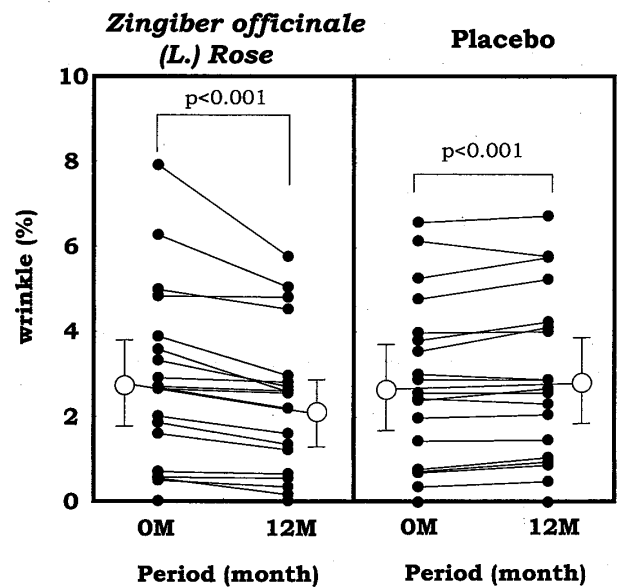


図3 レプリカ画像解析結果。ショウキョウ抽出液配合処方あるいはプラセボ塗布前と12ヶ月後と比較。図の表示は mean ± S.D. で示した。

12ヶ月後の値は、塗布前と同程度の値を維持していた(図5)。

D. 目尻の角層水分量への影響

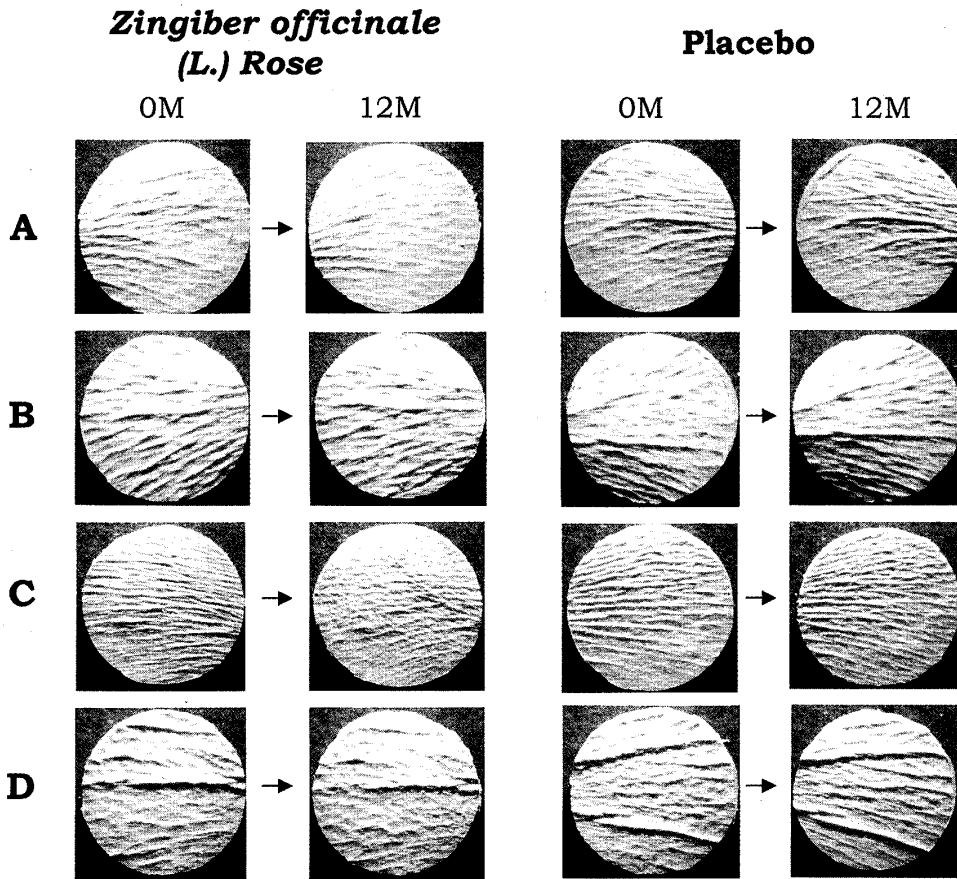


図4 ショウキョウ抽出液配合処方あるいはプラセボ塗布前と12ヶ月後における眼瞼周囲部しわのレプリカの代表的な写真。(A)：42歳，(B)：38歳，(C)：38歳，(D)：37歳。

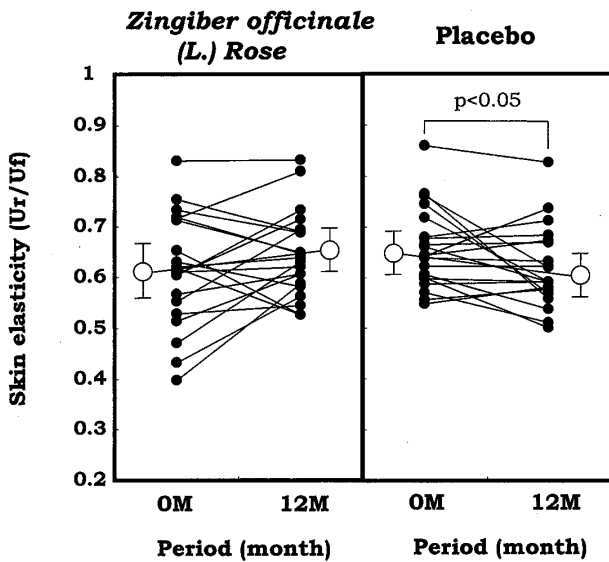


図5 ショウキョウ抽出液配合処方あるいはプラセボ塗布前と12ヶ月後の目尻皮膚弾力性について比較した結果。Cutometer[®]を用いて測定し、老化の指標となり生物学的弾性を表すパラメーターであるUr/Ufについて示した。図の表示はmean±S.D.で示した。

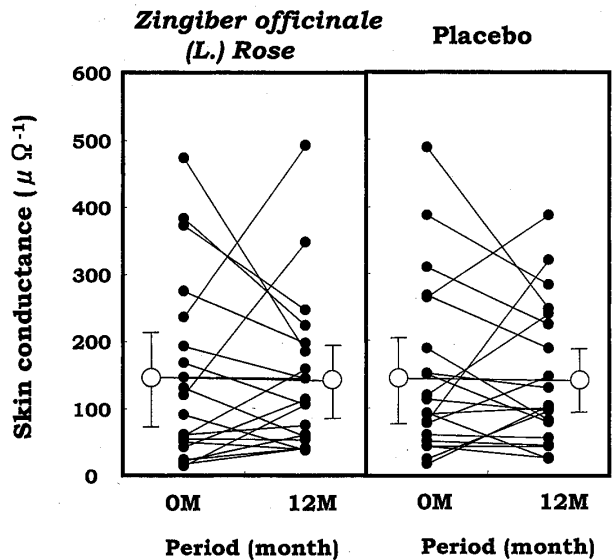


図6 ショウキョウ抽出液配合処方あるいはプラセボ塗布前と12ヶ月後の目尻の角層水分量について比較した結果。図の表示はmean±S.D.で示した。

角層水分量の測定を行った結果、プラセボ側、ショウキョウ抽出液側ともに塗布前と比較して12ヶ月後には有意差を認めなかった(図6)。

IV. 考察

今回我々は、線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害する効果を有するショウキョウ抽出液のヒト眼瞼周囲部しわに対する予防および改善効果について成人男性被験者を用いて検討した。その結果、写真スケールを用いたしわの目視評価とレプリカの画像解析によりプラセボ側では有意なしわの悪化が示され、Cutometer®にて測定した皮膚弾力性の有意な低下が認められた。一方ショウキョウ抽出液側では、1年間の塗布によりしわの有意な改善が認められ、皮膚弾力性の低下を抑制していることが明らかになった。しかしその一方で、角層水分量はプラセボ側もショウキョウ抽出液側も1年間で変化は認められなかった。

皮膚の老化の促進を予防する方法として、サンスクリーンによる紫外線防御が有効であることが、実験動物皮膚¹⁸⁻²⁰⁾やヒト皮膚²¹⁾において既に証明されている。しかし、紫外線曝露後の皮膚の老化促進に対しても有効である治療法を確立することは、紫外線により惹起されるしわ形成メカニズムを明らかにする上で重要であると考えられる。我々は以前、ラット足底皮膚へのUVBの連続照射により真皮弾性線維がその三次元構造を変えて湾曲化し、皮膚弾力性が低下して、しわが形成されることを報告している¹²⁾。この光老化は、線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害する合成化合物³⁾やワレモコウエキス⁴⁾をUVB照射後の皮膚に塗布することで、光老化動物モデル系で真皮弾性線維三次元構造変化、皮膚弾力性の低下およびしわ形成を回避できることも報告した。今回用いたショウキョウ抽出液は、6-gingerolなど刺激となる油溶性成分⁵⁾を除去することで、皮膚への刺激性を軽減し、さらに線維芽細胞エラスターゼ活性の阻害効果を有することを確認している⁷⁾。このエキスをUVB連続照射で誘導したヘアレスマウス背部皮膚とラット足底皮膚に用いることで、しわ形成、皮膚弾力性の低下、真皮弾性線維の湾曲化から見た光老化抑制に有効であることが確

認された⁷⁾。さらに今回の結果から、線維芽細胞エラスターゼ阻害効果を有する製剤は、実験動物皮膚だけでなく、ヒト皮膚においても光老化の抑制が可能であることが明らかになった。従ってショウキョウ抽出液は、刺激がなく慢性の日光曝露部位である顔面の光老化予防に有効であると考えられた。

一方、ImokawaとTakemaは以前、30-40歳の女性30名について、目尻における小じわ(目視によるスコアが1から2までの範囲)のレプリカ画像解析面積比(%)が高い人ほど角層水分量が少なく、小じわの発生要因に皮膚の水分保持能が大きく関与していることを報告している¹⁷⁾。従って皮膚の乾燥を防ぎ、保湿することにより、小じわの改善が可能であると考えられる。さらに我々は角層水分量を上昇させるアミジノプロリンをヒト目尻に塗布することにより、目尻周辺部位の角層水分量が有意に上昇し、フォトスケールを用いたしわの目視評価やレプリカの画像解析から、小じわの改善を明らかにしている²²⁾。これらの結果からも、小じわの発生や改善に角層水分量が大きく関与しているものと考えられるが、今回の結果から、線維芽細胞エラスターゼ活性を阻害する植物エキスは、保湿効果とは異なるメカニズムでしわ形成を抑制し、皮膚弾力性を維持するものと考えられる。

さらに男性被験者の目尻における1年間の光老化の進行度に着目すると、プラセボ側では1年前と比較して、しわスコアが約0.15悪化し、しわの画像解析においても面積比(%)が約0.2%悪化することが認められた(単純に10年間でしわスコアが1.5、画像解析面積比が2%悪化)。プラセボを塗布していることから、正確な値ではないと考えられるが、男性被験者で積極的に紫外線防御をせずに生活すると、1年間でも、わずかではあるが皮膚の老化が進行することが示された。

以上より、ショウキョウ抽出液は男性被験者に対して、刺激を伴わず眼瞼周囲部のしわ予防および改善に優れた製剤であることが明らかになった。

文献

- 1) Imayama S, Nakamura K, Takeuchi M et

- al. : Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats. *J Dermatol Sci* 7 : 32-38, 1994.
- 2) Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y et al. : Degree of Ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J Invest Dermatol* 105 : 254-258, 1995.
 - 3) Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S et al. : Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol* 117 : 671-677, 2001.
 - 4) Tsukahara K, Moriwaki S, Fujimura T et al. : Inhibitory effect of an *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet-B-induced photodamage of rat skin. *Biol Pharm Bull* 24 : 998-1003, 2001.
 - 5) Suekawa M, Ishige A, Yuasa K et al. : Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharm Dyn* 7 : 836-848, 1984.
 - 6) Bissett DL, Hannon DP and Orr TV: An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 46 : 367-378, 1987.
 - 7) Tsukahara K, Nakagawa H, Moriwaki S et al. : Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: Implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles. *Int J Dermatol* in press.
 - 8) Homsy R, Pelletier-Lebon P, Tixier JM et al. : Characterization of human skin fibroblast elastase activity. *J Invest Dermatol* 91 : 472-477, 1988.
 - 9) Labat-Robert J, Fournanier A, Boyer-Lafargue B et al. : Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin effect of UV-irradiation. *J Photochem Photobiol B* 57 : 113-118, 2000.
 - 10) Fimiani M, Mazzatenta C, Alessandrini C et al. : Mid-dermal elastolysis : an ultrastructural and biochemical study. *Arch Dermatol Res* 287 : 152-157, 1995.
 - 11) Tsukahara K, Takema Y, Moriwaki S et al. : Dermal fluid translocation is an important determinant of the diurnal variation in human skin thickness. *Br J Dermatol* 145 : 590-596, 2001.
 - 12) Tsukahara K, Moriwaki S, Hotta M et al. : A study of diurnal variation of wrinkles in the human face. *Arch Dermatol Res* 296 : 169-174, 2004.
 - 13) Takema Y, Yorimoto Y, Kawai M et al. : Age-related changes in the elastic properties and thickness of human facial skin. *Br J Dermatol* 131 : 641-648, 1994.
 - 14) Agache PG, Monneur C, Leveque JL et al. : Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. *Arch Dermatol Res* 269 : 221-232, 1980.
 - 15) Tsukahara K, Takema Y, Kazama H et al. : A photographic scale for the assessment of human facial wrinkles. *J Cosmet Sci* 51 : 127-139, 2000.
 - 16) Takema Y, Tsukahara K, Fujimura T et al. : Age-related changes in the three-dimensional morphological structure of human facial skin. *Skin Res Tech* 3 : 95-100, 1997.
 - 17) Imokawa G and Takema Y: Fine wrinkle formation: Etiology and prevention. *Cosmet Toilet* 108 : 65-77, 1993.
 - 18) Kligman LH, Akin FJ and Kligman AM: Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol* 78 : 181-189, 1982.
 - 19) Kligman LH, Akin FJ and Kligman AM: Sunscreens promote repair of ultraviolet radiation-induced dermal damage. *J Invest Dermatol* 81 : 98-102, 1983.
 - 20) Bissett DL, McBride JF, Hannon DP et al. : Time-dependent decrease in sunscreen protection against chronic photodamage in

- UVB-irradiated hairless mouse skin J Photochem Photobiol B 9 : 323-334, 1991.
- 21) Boyd AS, Naylor M, Cameron GS et al. : The effects of chronic sunscreen use on the histologic changes of dermatoheliosis. J Am Acad Dermatol 33 : 941-946, 1995.
- 22) Shishido E, Kawashima, M, Tsukahara K et al. : Effects of amidino-L-proline on fine wrinkles at the eye corners. Skin Res (Hifuno Kagaku) 1 : 355-362, 2002.

A clinical effect of *Zingiber officinale* (L.) Rose on facial wrinkles and skin elasticity

Kazue Tsukahara*, Hidemi Nakagawa**, Mamitaro Ohtsuki*,
Shigeru Moriwaki***, Tsutomu Fujimura***, Yoshinori Takema***,
Genji Imokawa***

Abstract

We previously reported that extract of *Zingiber Officinale* (L.) Rose after removing irritant components inhibits fibroblast-derived elastase activity, and its topical application to animal skin after UVB irradiation inhibits wrinkle formation and decrease in skin elasticity and maintains the linearity of dermal elastic fibers. In this study, the clinical effects of this extract on wrinkles, skin elasticity and the water content of the stratum corneum were evaluated in areas around the eyes in humans.

The subjects were 20 healthy Japanese male volunteers, mean age 37.6 years. Either a preparation containing a 1% extract of *Zingiber officinal* (L.) Rose or placebo was topically applied by the half-face and double blind methods twice daily for 12 months. Before, as well as 12 months after the initiation of topical application, wrinkles were visually assessed, replicas were collected, and skin elasticity and the water content of the stratum corneum were measured. The replicas were used for the measurement of wrinkles by image analysis.

After 1 year of topical application, while the wrinkle score and the image analysis area ratio (%) of wrinkles, significantly increased in eye corner and lower eyelid areas on the placebo side, it significantly decreased in each area on the extract side. Skin elasticity evaluated in terms of U_r/U_f , a parameter of aging, significantly decreased after 1 year on the placebo side alone, and its decrease was inhibited on the extract side. The water content of the stratum corneum did not differ between the extract and placebo sides throughout the measurement period.

These results demonstrate that this extract of *Zingiber officinale* (L.) Rose inhibits the decrease in skin elasticity and thereby prevents and improves human wrinkle formation in the area around the eye corner by inhibiting fibroblast-derived elastase activity without changing the water content of the stratum corneum.

Key words: Photoaging, Wrinkle, *Zingiber officinale* (L.) Rose, Elastase

* Department of Dermatology, Jichi Medical School
** Department of Dermatology, Jikei Medical School
*** Biological Science Laboratories, Kao Corporation