

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15367

研究課題名(和文) 深共融溶媒内包エマルジョンによるポリフェノールの経皮デリバリーと皮膚透過機構

研究課題名(英文) Transdermal delivery of polyphenol using microemulsions containing deep eutectic solvents and their skin permeation mechanism

研究代表者

櫻木 美菜(水谷美菜)(Sakuragi, Mina)

崇城大学・工学部・准教授

研究者番号：90646829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：経皮吸収キャリアとして、マイクロエマルジョン(ME)が用いられるが、球状以外のMEについては、その超分子構造と経皮吸収率の関係性が不明である。本研究では、深共融溶媒(DES)を用いて構造制御を行ったMEを用い、その形状と皮膚透過率の関係を評価した。その結果、球状MEの方が棒状よりも皮膚浸透率は高かったが、薬剤の透過量は、薬剤取り込み量の多い棒状MEの方が高いことが示された。次に、異なる水分量の角層にMEを適用したときの作用機構を調べた。水分量の多い角層では、角層中の水をMEが取り込むことで、ラメラ構造の周期が減少し、乾燥条件下ではME内の水が角層に放出されることで、ラメラ構造の周期が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで形が一般的でなく議論されていなかった球状以外のMEを、イオン液体の一種の深共融溶媒を用いて調製し、MEの構造と薬剤内包量、皮膚浸透性との関連性を明らかにした。また、これまでMEの構成成分やMEに内包された有効成分が皮膚のどの層まで浸透しているか、顕微鏡を用いた皮膚断面の観察によるメカニズムの検討は行われているが、分子レベルでの作用機構がわかっていなかった。本研究にて、皮膚バリアの角層を透過する過程で生じる、MEや皮膚バリアのラメラ層の経時的な構造変化をリアルタイムで観察した。本研究成果は、今後の経皮デリバリーの分野の発展に大きく貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Microemulsions (MEs) are commonly used as a carrier to enhance the skin permeability of drugs. However, the relationship between the structural properties and skin permeabilities is still unknown. We investigated the effects of the structural properties of MEs containing deep eutectic solvent (DES) on the skin permeabilities. The results showed that the cylindrical ME could improve the skin penetration amount of a drug compared to that of spherical ME because a drug was more contained in cylinder ME. Next, we investigated the impact of stratum corneum (SC) water content on the skin penetration mechanism of ME. We found that the inner water of MEs was released to the SC when applying MEs to the dry SC, resulting in an increase in the repeat distance of SC lamellar. Conversely, when MEs are applied to hydrated SC, the MEs absorb the water from the SC into their inner phases, causing a decrease in the repeat distance of SC lamellar.

研究分野：超分子化学

キーワード：深共融溶媒 マイクロエマルジョン ポリフェノール 角層 放射光X線散乱 経皮デリバリー

1. 研究開始当初の背景

皮膚のバリア機能として知られる角層は、強靱な繊維であるケラチンからなる角質細胞と、角質細胞間の脂質層から構成され、有効成分は、主に角質細胞間の脂質層を透過すると考えられている。そのため、一般的には油状基剤に溶けた疎水性物質の方が皮膚透過しやすく、親水性で分子量が高くなるほど皮膚透過が難しくなる。有効成分の経皮吸収を促進するためのキャリアとして、マイクロエマルジョン(ME)がよく用いられる。しかし、これまでの ME を用いた経皮デリバリーの研究例では、生物学的実験に重点が置かれ、球状構造以外の ME についての検討や、ME 内の有効成分の存在位置の特定といった詳細な構造解析は行われていない。また、ME の構造と経皮浸透性との関係や、経皮浸透後の ME と皮膚成分との相互作用の詳細なメカニズムが不明である。経皮デリバリー手法の発展のためには、ME の形状、薬剤内包量、経皮透過性との関係性を解明し、経皮浸透能の高いキャリアを化学的に設計する必要がある。

ME の構造に依存した経皮浸透メカニズムを解明するためには、まず ME の構造制御を行う必要がある。我々は、界面活性剤の疎水基との疎溶媒性相互作用により、界面活性剤の凝集特性を大きく変えると報告されている深共融溶媒(Deep eutectic solvents, DES)に着目した。DES は、天然物である塩化コリンをベースとしており、尿素や有機カルボン酸、グリセリンを加えると水素結合により自己会合し、融点が下がる。イオン液体と類似の性質を有する一方で、安価であり、生体毒性がなく、生分解性を有するなどの利点があり、イオン液体の代替溶媒として近年注目されている。我々は、DES と水の混合溶媒を ME 内相へ導入したときの ME の構造を、放射光小角 X 線散乱(SAXS)を用いて解析し、界面活性剤の組成と、内包させる DES と水の混合比を変化させることで、様々な大きさ、形状を有する ME を調製できることをすでに報告している(Sakuragi et al. *Langmuir* 2018, 34, 12635)。これらの異なる構造を有する ME を用いて、本研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では、ポリフェノールの新たな経皮デリバリーキャリアの創製を目的としている。ポリフェノールは、紫外線透過による皮膚の酸化ストレスを予防することが可能であるが、水や皮膚に適した油状基剤への溶解性が低いため、経皮デリバリーが難しい。一方で、DES はポリフェノールの溶解性が著しく高いことが報告されるため、ポリフェノールを高濃度に内包した DES/Oil 型 ME はポリフェノールの経皮デリバリーに有効であると期待している。

本研究では、申請者が見出した形状の異なる DES/Oil 型 ME にポリフェノールの一種であるレスベラトロール(RSV)を内包させたときの、ME の構造変化と経皮浸透性の関係性を評価する。次に、皮膚浸透の律速段階である角層に焦点を絞り、ME を皮膚に適用した際の、角層中の脂質層の構造の経時変化、脂質層に浸透した ME の構造の経時変化を放射光 X 線散乱、中性子散乱を用いて追跡することで、ME の角層浸透メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

RSV 内包 DES/Oil 型 ME の作製と皮膚浸透性、構造評価

溶媒の油状基剤として、皮膚への刺激性が少なく、経皮浸透を高めるミリスチン酸イソプロピル(IPM)、界面活性剤として、IPM に対して親和性がよく、安定な ME を形成できる Tween-80、Span-20 の二種類を用いた。IPM に Tween-80、Span-20 を溶解させ、RSV を溶解した DES (塩化コリン:グリセロール=1:2)/水の混合溶媒を滴下し、過剰量の RSV を加え、超音波分散を行った。その後、遠心分離により未内包の RSV を取り除いた。Tween-80/Span-20 を重量比で 1:3 あるいは 3:1 とし(それぞれ T1S3、T3S1 と記載する) DES/H₂O の混合比を変えたサンプルを数点作製した。IPM/界面活性剤/内相の重量比は、76/20/4 とした。この ME における、RSV 飽和量、皮膚透過試験、小角 X 線散乱(SAXS)測定 (SPring-8 BL40B2) を行った。

ME の角層浸透メカニズムの測定

の実験より、球状の ME で粒子径の小さい方が、皮膚浸透率自体は高いことがわかった。しかし、後に で検討した組成の ME では数時間は構造が安定しているが時間経過に伴い構造が

変化し、最終的に分離することが判明した。MEの角層内での構造変化を観察する際には、角層と作用させる前のME自身が安定に分散している必要がある。そこで、組成を再検討したところ、塩化コリン/グリセロール=1:2のDESを混合すると長時間の分散安定性に劣ることが判明したため、DESを添加していない球状のw/o型ME (Tween80/Span20=1/1、IPM/界面活性剤/水 = 77/20/3)を用いて、MEの角層透過メカニズムの基礎検討を行うこととした。MEの角層適用時におけるMEの構造の経時変化はJRR-3のSANS-U、ME適用時の角質細胞間脂質のラメラ層の経時変化はJ-ParcのTAIKANにて測定を行った。

4. 研究成果

Rsv内包DES/Oil型MEの作製と皮膚浸透性、構造評価

Fig.1aは各組成のMEに対するRSVの取り込み量の結果である。DESを内相に含むものは、水を内相に含むものよりもRSV内包量が高いことが示された。界面活性剤にもRSVは溶解するが、Tween80の方がSpan20よりも溶解性が高い (Tween80 : 49.3、Span20 : 4.9 mg ml⁻¹) のに対して、Tween80の割合の高いT3S1の方が内包量が少ない結果となった。これは、過剰量のRSVがTween80と作用し、不安定な成分が精製の際行った遠心分離により取り除かれてしまった可能性が挙げられる。そこで、以後の実験では、RSV取り込み量の高いT1S3を用いることとした。

Fig.1bにRSVを取り込んだMEのSAXS測定の結果を示す。理論曲線を用いたフィッティングの結果より、DESを含む時は棒状、水の場合は球状を形成しており、水を3割加えたDESの時にDES単独と比べて棒の断面の径が大きいことが示された (DES/H₂O = 0/1 : 9nm、DES/H₂O = 7/3 : 10nm)。DES/H₂O=7/3の組成はRSV取り込み量が最も高いため、MEの内相が大きいとRSV内包量が増加すると言える。

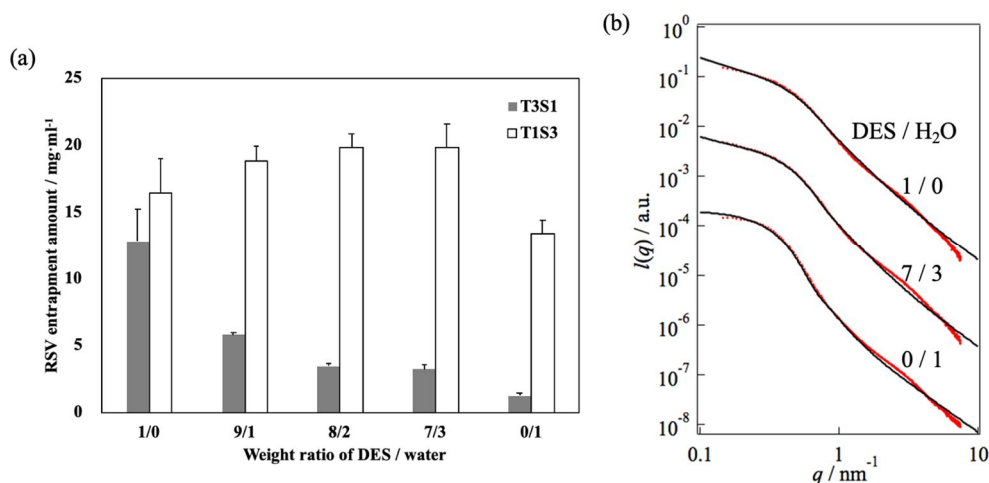


Fig.1 (a) 各組成のMEに対するRSVの飽和溶解度、(b) RSVを飽和量取り込んだT1S3のSAXSプロファイル。黒：理論曲線、赤：実験データ。

Fig.2に、専用のフランツセルにヘアレスマウスの皮膚を固定し、MEの皮膚透過試験を行った結果を示す。その結果、DES/H₂O=7/3の時最も透過量が多いことがわかった。これは、RSVが高濃度であるため、皮膚透過性も高くなったと考えられる。しかし、水よりもRSV内包量の高かったDESを内包したMEはW/O型MEよりも皮膚透過量が少なくなる結果になった。W/O型MEは、RSV内包量は少ないが、球状でDES/O型MEよりも小さい構造

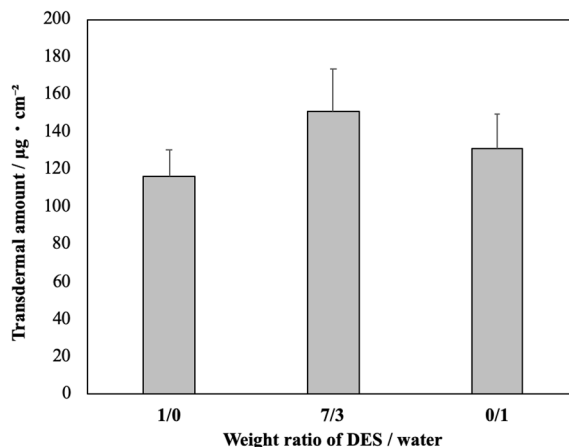


Fig.2 RSV内包MEの皮膚浸透量

であるので、角質細胞間の脂質の狭い通路を通りやすかったと考えられる。

ME の角層浸透メカニズムの測定

ME の角層透過ルートである角質細胞間脂質は、周期 13.6nm の長周期ラメラ(L-La)と周期約 6nm の短周期ラメラ(S-La)が X 線にて検知される。S-La は角層の水分保持機能に関係していると言われ、角層の水分量に依存して周期や規則性が大きく変化すると報告されている。角層水分量に依存して、ラメラの構造の状態が異なれば、ME の角層透過機構にも影響すると考えられるが、これまでに ME が角質細胞間脂質とどのように相互作用して構造変化を起こし、崩壊していくのか、の詳細なメカニズムの解明は行われていない。 の実験では、皮膚浸透性の高く分散安定性に優れた球状 ME について、角層浸透メカニズムを評価した。

まず、異なる湿度条件下(10%RH、50%RH、90%RH)でインキュベートした皮膚に ME を適用し、皮膚浸透量を評価したところ、湿度が高いほど ME の浸透量が多いことがわかった。WAXS 測定において、水分量が高い角層ほど脂質分子の配列が乱れることがわかったため、高湿度条件下では角質細胞間脂質の構造の乱れが多いために ME が浸透しやすいと考えられる。ME を角層に適用した時の ME のサイズを SAXS にて評価したところ、乾燥した角層では ME のサイズが時間と共に小さくなり、水和した角層では ME のサイズが大きくなる傾向にあった。JRR-3 の中性子散乱(SANS)の実験では、ME の内相の水を重水に置き換え、角層中における ME 内相からの散乱を得ることに成功した。SANS の結果は、SAXS の結果とよく一致しており、ME は乾燥した角層中では内相の水を放出しながら浸透し、水分量の多い角層中では内相の水を取り込みながら浸透することが示された。

次に、ME を適用した時の角層中の S-La のピークを SAXS にて観察することを試みたが、ME の形状因子の強度が強く、角層のラメラのピークを明確に得ることができなかった。そこで、湿度調節装置にて、角層の入ったセル内の重水の量をコントロールし、S-La の親水相を重水に置き換えたところに ME を適用し、SANS 測定を行った(TAIKAN BL15, J-Parc)。水分量の高い角層では、ME が S-La の水分を内相に取り込むために S-La の周期が減少した一方、乾燥した角層では S-La の周期が増加することがわかった (Fig.3)。

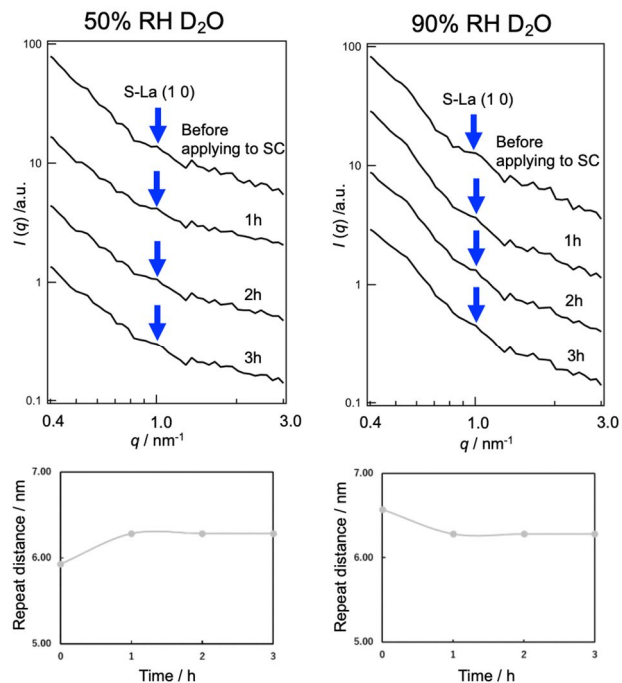


Fig.3 ME を適用した時の 50 %RH D_2O 条件下 (左上)と 90%RH D_2O 条件下の角層の SANS プロファイル。下は各湿度条件下における S-La の周期の経時変化を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mina Sakuragi	4. 巻 53
2. 論文標題 Evaluation of the supramolecular structure of drug delivery carriers using synchrotron X-ray scattering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 1335-1344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-021-00533-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakuragi Mina, Maeda Emika, Kusakabe Katsuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Penetration Process of a Hydrated Deep Eutectic Solvent Through the Stratum Corneum and its Application as a Protein Penetration Enhancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemistryOpen	6. 最初と最後の頁 953 ~ 958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/open.202000114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sakuragi Mina, Yano Reina, Hasnol Sabrina Binti Mohamed, Kusakabe Katsuki	4. 巻 59
2. 論文標題 Evaluation of microemulsions containing a large amount of a deep eutectic solvent as a potential transdermal carrier of resveratrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 095004 ~ 095004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/abaa94	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mina Sakuragi, Hana Yoshimura, and Katsuki Kusakabe	4. 巻 59
2. 論文標題 Effects of structures of microemulsions containing a deep eutectic solvent on the entrapment amount and the skin permeation of resveratrol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ab6b74	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 櫻木美菜、前田笑伽、草壁克己
2. 発表標題 Penetration process of deep eutectic solvent through stratum corneum and application for transdermal protein delivery
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻木美菜、吉村花、草壁克己
2. 発表標題 The relationship between structure of microemulsions, entrapment amount of resveratrol, and skin permeation
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻木美菜、吉村花、矢野玲奈、草壁克己
2. 発表標題 Characterizaion of microemulsions containing large amount of deep eutectic solvent as a potential transdermal carrier of resveratrol
3. 学会等名 ACS Fall 2020 Virtual Meeting & Expo.（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻木美菜、矢野玲奈、草壁克己
2. 発表標題 マイクロエマルションの深共融溶媒内包量に依存した薬物内包量・構造特性・皮膚浸透性の評価
3. 学会等名 日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻木美菜
2. 発表標題 Physicochemical characterization of deep eutectic solvents-in-oil microemulsions
3. 学会等名 The Polymer Society of Korea 2019 Spring Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻木美菜、堤信介、濱松宏太、Sabrina Binti Mohamed Hasnol、草壁克己
2. 発表標題 放射光散乱を利用した深共融溶解媒内包マイクロエマルションの角層透過機構の解明
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱松宏太、櫻木美菜
2. 発表標題 放射光散乱を利用したマイクロエマルションと角層の相互作用
3. 学会等名 第30回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村花、櫻木美菜
2. 発表標題 レスベラトロールを内包したマイクロエマルションの物理化学的特性
3. 学会等名 第30回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻木美菜、濱松宏太、堤信介、Sabrina Binti Mohamed Hasnol、草壁克己
2. 発表標題 The relationship between the structure of microemulsions and the skin penetration mechanism
3. 学会等名 Sojo-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻木美菜、濱松宏太、Sabrina Binti Mohamed Hasnol、堤信介、草壁克己
2. 発表標題 The penetration mechanism through the stratum corneum depending on the structure of microemulsions
3. 学会等名 ACS National Meeting & Exposition (zoomを用いたweb開催) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村絵里佳、櫻木美菜
2. 発表標題 水分量変化に伴う W/O 型マイクロエマルションの角層透過機構
3. 学会等名 九州地区高分子若手研究会・夏の講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村絵里佳、櫻木美菜
2. 発表標題 Skin penetration process of microemulsions depending on the water content in the stratum corneum
3. 学会等名 The 5th International Union of Materials Research Societies International Conference of Young Researchers on Advanced Materials (ICYRAM 2023) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村絵里佳、櫻木美菜
2. 発表標題 Influence of the water contents on the permeation mechanism of W/O type of microemulsions through the stratum corneum
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川実衣菜、櫻木美菜
2. 発表標題 水和深共融溶媒内包マイクロエマルションのポリフェノールの経皮デリバリーへの応用
3. 学会等名 九州地区高分子若手研究会・冬の講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村絵里佳、櫻木美菜
2. 発表標題 Elucidation of skin permeation mechanism of microemulsions depending on the water content in the stratum corneum
3. 学会等名 33th International Symposium on Chemical Engineering (ISChE) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村絵里佳、岩瀬裕希、有馬寛、櫻木美菜
2. 発表標題 ドラッグキャリアの角層浸透メカニズムに与える水分量の影響
3. 学会等名 量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap
https://researchmap.jp/mina_sakuragi

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------