

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590060

研究課題名(和文) 微細エマルションによるポリフェノールの皮膚への効率的デリバリーとその機構

研究課題名(英文) Efficient Skin Delivery of Polyphenols by Microemulsions and Its Mechanisms

研究代表者

北河 修治 (Kitagawa, Shuji)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00108911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：有用な生理作用をもつレスベラトロールを初めとするポリフェノールの皮膚適用が検討されているが、取り込みが悪い。その効率を改善する目的で、ポリグリセリン脂肪酸エステル等を界面活性剤とするマイクロエマルションを調製し、ユカタンマイクロピッグ皮膚を用いて検討した。in vitroの実験結果ではあるが、取り込み効率が顕著に改善した。また、皮膚中での分布がポリフェノールによって異なり、分子量が小さく、親油性のレスベラトロールは表皮に比べて真皮により多く分布するのに対して、分子量がより大きく親水性のクロロゲン酸は、大半が表皮に分布することがわかった。目的とする作用によりポリフェノールを選択する必要がある。

研究成果の概要(英文)：To deliver polyphenols such as resveratrol to skin, we prepared microemulsions using polyglycerin fatty acid esters and other surfactants, which are known to be mild to skin. We examined the efficiency of intradermal delivery of polyphenols by in vitro study. The efficiencies of skin accumulation of polyphenols by the microemulsions using tetraglycerin mono-laurate or pentaglycerin mono-laurate as surfactant components were twice or three times more than those by microemulsions using Tween 80 as a surfactant component, which we had used. We also found different skin distribution of the polyphenols. Hydrophobic resveratrol with small molecular weight distributed to the dermis more than to the epidermis. On the other hand, hydrophilic chlorogenic acid with larger molecular weight distributed mostly to the epidermis. Therefore, polyphenols should be selected for purpose of skin application to skin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：マイクロエマルション ポリフェノール レスベラトロール クロロゲン酸 皮膚デリバリー 皮膚中分布 ポリグリセリン脂肪酸エステル

1. 研究開始当初の背景

紫外線の皮膚への曝露は紅斑の形成、深いシワや濃いシミ、炎症の発症さらには皮膚がんを発症することが明らかにされている。オゾン層の破壊とともに今後ますます問題となってくると考えられ、各種のサンスクリーン剤を初めとして、皮膚の紫外線障害を防御する薬剤の開発が進められている。種々の物質の中で抗酸化剤として知られているポリフェノールに光老化に対する防御作用が期待され、培養細胞等でその作用が確認されている。しかしながら、実際にポリフェノールを皮膚に適用する場合には、皮膚移行性が問題となる。ポリフェノールの多くは水にも有機溶媒にも溶解しにくく、また、代表的なポリフェノールであるフラボノイド類は比較的分子量も大きなことから、皮膚への移行性は低い。従って、皮膚への効率的な移行を目的とした場合、何らかの吸収促進系を用いる必要がある。吸収促進系の中で水相、油相、界面活性剤、補助界面活性剤から構成され、熱力学的に安定な系であるマイクロエマルジョンが経皮吸収の促進系として着目され、著者らも Tween80 を界面活性剤とするマイクロエマルジョンを調製し、ポリフェノールの効率的な皮膚デリバリーを可能にする有用な微粒子分散系であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

下記の3点を研究の目的とした。

1 マイクロエマルジョンは高濃度の界面活性剤を使用であることから、できるだけ皮膚障害の少ないものを使用する必要がある。そこで今回、テトラグリセリンモノラウリン酸エステル、ペンタグリセリンラウリン酸エステル等のポリグリセリン脂肪酸エステルやショ糖脂肪酸エステルを界面活性剤として用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールをはじめとするポリフェノールの皮膚デリバリーについて検討した。ポリグリセリン脂肪酸エステルは低濃度で界面活性性を示し、耐塩性、耐酸性に優れ、かつ安全性が高いことから、近年、乳化剤としての応用が盛んに検討されている。

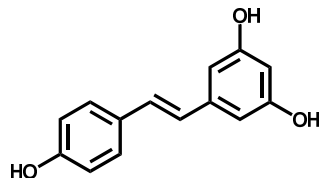
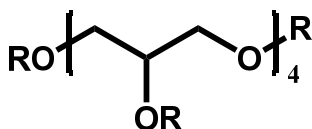


図1. レスベラトロール

図  
ラ  
ン  
リ



2. テ  
ト  
グ  
リ  
セ  
リ  
ン  
モ  
ノ  
ラ  
ウ  
リ  
ン  
酸  
エ  
ス  
テ  
ル

(Rのいずれかがラウリン酸)

2 マイクロエマルジョンによって皮膚に取り込まれたポリフェノールの皮膚中分布及び皮膚を介しての経皮吸収性を明らかにし、ポリフェノールの分子量、親油性との関係について検討し、表皮、真皮、全身循環系への移行しやすさとポリフェノールの物理化学的性質との関係を明らかにする。この研究によって、作用目的によるポリフェノールの選択を可能とする。

3 マイクロエマルジョンによる吸収促進機構を明らかにするため、構成成分、特に界面活性剤の皮膚への移行を明らかにする。

3. 研究の方法

1 テトラグリセリンモノラウリン酸エステルは ML-310 (阪本薬品より提供) を、ペンタグリセリンモノラウリン酸エステルは サンソフト A-121E-C (太陽化学より提供)、ショ糖ラウリン酸エステルは L-1695 (三菱化学フーズより提供) を用いた。擬三成分相図を作成して一相領域を確認し、超純水、ミチスタン酸イソプロピル (油相、以下 IPM と略す)、エタノール (補助界面活性剤、以下 EtOH と略す) と混合し、w/o 型あるいは o/w 型のマイクロエマルジョンを調製した。皮膚デリバリー実験は 37 で中央にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着した Franz 型拡散セルを用いて行い、ドナー側にポリフェノールを溶解させたマイクロエマルジョンを、レセプター側に 1 w/v% アルブミン含有等張リン酸緩衝液を加え、6~40 時間後に皮膚を取り出した。

2 皮膚を洗浄後、表皮と真皮を分離し、氷冷メタノール中でホモジェナイズし、皮膚中に取り込まれたポリフェノールの量を HPLC により測定した。同時にレセプターに移行したポリフェノールの濃度についても測定した。

3 界面活性剤としてエアロゾル OT を用い、1 と同様にして、40 時間後における表皮、真皮での蓄積量を測定した。

4. 研究成果

1 図3に例を示す擬3成分相図を作成し、1相領域からマイクロエマルジョンの形成領域を見出した。

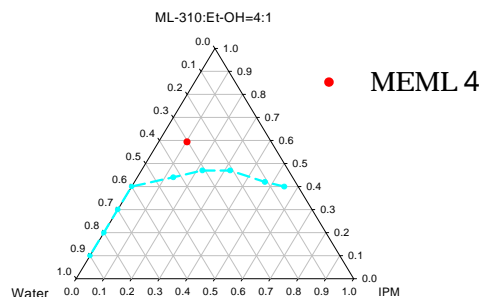


図3. 擬三成分相図の例

表1にテトラグリセリンモノステアリン酸エステルを界面活性剤として調製したマ

イクロエマルション (ME) の組成を示す。安定化のためにグリチルリチン酸二カリウムを 10% 添加した。

表 1 . 調製したマイクロエマルションの組成 (質量組成)

これらのマイクロエマルションを用いた場

ME	水	IPM	ML-310	EtOH
MEML1	30	10	48	12
MEML2	30	10	45	15
MEML3	10	30	45	15
MEML4	10	40	40	10

合、図 4 に 100mM のレスベラトロールを含有する MEML3 についての結果を示すように、レスベラトロールは皮膚に徐々に取り込まれた。一方、経皮吸収し、レセプター側に移行してくる割合は小であった。

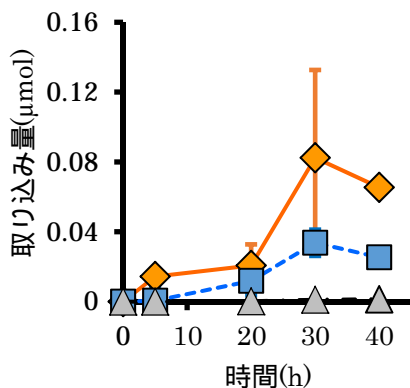


図 4 . MEML3 によるレスベラトロールの皮膚移行

□, 表皮; ◇, 真皮; △, レセプター側

著者らはすでに Tween80 を界面活性剤として調製したマイクロエマルション MED (150 mM NaCl 水溶液 : IPM : Tween 80 : EtOH = 7 : 33 : 30 : 30 (質量比)) がレスベラトロールの皮膚への移行を促進することを明らかにしているが、図 5 に 30 時間後の結果を示すように、テトラグリセリンモノステアリン酸エステルを界面活性剤として調製したマイクロエマルションを用いることによって MED に比べてさらにレスベラトロールの皮膚取り込みを顕著に改善することができた。油相の多い系と、水相の多い系でのレスベラトロールの皮膚取り込みの差異は小さかった。

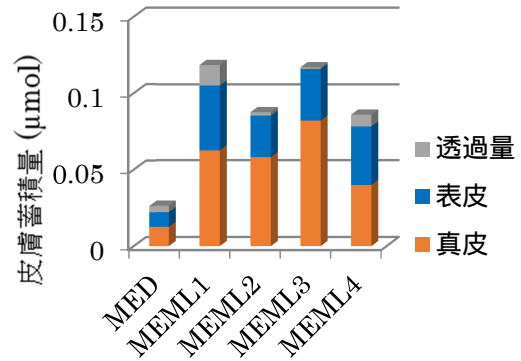


図 5 . テトラグリセリンモノラウリン酸エステルをマイクロエマルションによるレスベラトロールの 30 時間後の表皮、真皮蓄積量および皮膚透過量と Tween80 マイクロエマルションとの比較

同様な結果は、ペンタグリセリンラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルション、シュクロースラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルションでも得られた。

2 前述したように、レスベラトロールはテトラグリセリンモノラウリン酸エステルを界面活性剤として調製したマイクロエマルションを用いることで溶解性が改善するとともに、皮膚取り込みが増大した。表皮、真皮への取り込みとも、これまで用いてきた Tween80 を界面活性剤として用いたマイクロエマルションよりも増大した。

2 マイクロエマルションによって皮膚に取り込まれたポリフェノールの皮膚中分布及び皮膚を介しての経皮吸収性について比較

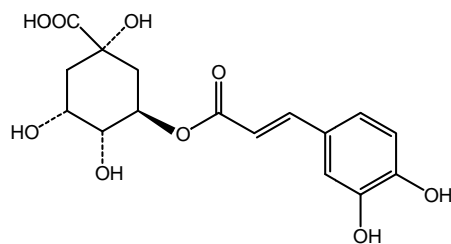


図 6 . クロロゲン酸

考察した。マイクロエマルション MEML3 を例にとり各ポリフェノールについて比較考察した結果を図 7 に示すように、分子量が 228.24 と小さく、オクタノール/水分配係数の対数値が 3.14 と親油性のレスベラトロールは主に真皮に、分子量が 290.27、オクタノール/水分配係数の対数値が -0.079 の (-) エピカテキンは表皮、真皮分布がほぼ均等であり、分子量が 458.37 と大きく、オクタノール/水分配係数の対数値が 0.61 と親油性の

(-)エピガロカテキングレートは主に表皮に、分子量が354.31、オクタノール/水分分配係数の対数値が-2.13と最も親水性のクロロゲン酸は、皮膚蓄積量は多いものの、ほとんどが表皮に分布していることがわかった。皮膚透過量はいずれも少なかった。表皮、真皮への分布には分子量と親油性が関与していることが推定された。また、親水性の高いクロロゲン酸の表皮への高い移行性には、表皮最上層に存在し、皮膚透過のバリアーとなっている角質層の脂質ラメラ層がマイクロエマルションによって水和されることが関与しているものと考えられる。

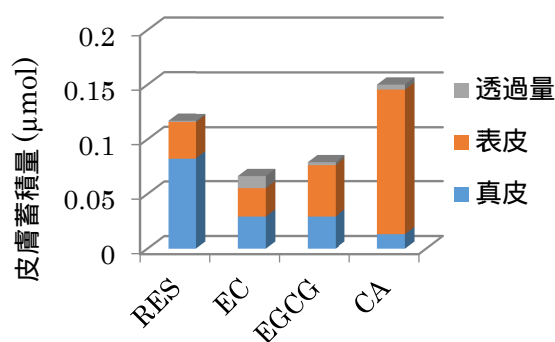


図7．レスベラトロール (RES)、(-)エピガロカテキン (EC)、(-)エピガロカテキングレート (EGCG)、クロロゲン酸 (CA) の 30 時間後の表皮、真皮蓄積量および皮膚透過量

### 3 マイクロエマルションを構成する界面活性剤の皮膚中分布

分析の容易さから、界面活性剤として Aerosol OT を取り上げ、その皮膚中分布について検討した。その結果、Aerosol OT は表皮により多く分布するものの、真皮にまで、かなりの量が到達していることがわかった。したがって、マイクロエマルションによるポリフェノールの吸収促進機構の一つとして界面活性剤と皮膚との相互作用が考えられる。

4 以上の得られた成果は、テトラグリセリンラウリン酸エステルを初めとするポリグリセリン脂肪酸エステルやシュクロース脂肪酸エステルを界面活性剤として調製したマイクロエマルションが効率的にレスベラトロール等のポリフェノールの皮膚取り込みを可能にすることを明らかにしたものである。ポリグリセリン脂肪酸エステルについては国内外で報告がなく、ポリフェノールのみならず難皮膚透過性の生理活性物質の皮膚デリバリー系の開発に結びつくものである。また取り込まれたポリフェノールの皮膚中分布を明らかにしたことも今後、目的に応じたポリフェノールを選択して皮膚への適用を考える上で重要である。

6 今後は、界面活性剤濃度を下げること、補助界面活性剤としてエタノールを使用せず

グリセリンのような皮膚刺激のないものに変更することが必要であり、検討を開始している。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. R. Yutani, T. Kikuchi, R. Teraoka, S. Kitagawa, "Efficient Delivery and Distribution in Skin of Chlorogenic Acid and Resveratrol Induced by Microemulsion Using Sucrose Laurate", *Chem. Pharm. Bull.*, **62**(3), 274-280 (2014) 査読有り
2. R. Yutani, S.-y. Morita, R. Teraoka, S. Kitagawa, "Distribution of Polyphenols and a Surfactant Component in Skin during Aerosol OT Microemulsion-Enhanced Intradermal Delivery", *Chem. Pharm. Bull.*, **60**(8), 989-994 (2012) 査読有り

[学会発表](計 16 件)

1. 小守 佑果, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「シヨ糖脂肪酸エステルを用いたマイクロエマルションによるレスベラトロールの皮膚取り込み改善」, 日本薬学会第 134 年会, 2014.03.30, 熊本
2. 吉住 優里, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「ポリグリセリン脂肪酸エステルマイクロエマルションによるエピガロカテキングレート、レスベラトロールの皮膚取り込みと界面活性剤濃度の影響について」, 日本薬学会第 134 年会, 2014.03.30, 熊本
3. 足立 愛, 河崎 紗穂, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「マイクロエマルションによるクロロゲン酸及びレスベラトロールの皮膚取り込みに及ぼす構成成分の影響」, 日本薬学会第 134 年会 2014.03.30, 熊本
4. 北河 修治, 河崎 紗穂, 檜山 薫, 足立 愛, 吉住 優里, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 「テトラグリセリンラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルションによるレスベラトロール及びその他のポリフェノールの効率的皮膚デリバリー」, 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2013.11.22, 東京
5. 檜山 薫, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「マイクロエマルションを利用したレスベラトロールの皮膚取り込みと表皮・真皮分布」, 日本薬学会第 133 年会, 2013.03.28, 横浜

6. 藤田 奈朋美, 檜山 薫, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「フェノール酸の表皮真皮分布および経皮吸収性の分子量、疎水性への依存性」, 日本薬学会第 133 年会, 2013.03.28, 横浜
7. 河崎 紗穂, 坂本 泰範, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「テトラグリセリンモノラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるポリフェノールの皮膚取り込みと表皮真皮分布」, 日本薬学会第 133 年会, 2013.03.28, 横浜
8. 北河 修治, 藤田 奈朋美, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 「ポリフェノールの真皮移行性及び経皮吸収性を律する物理化学的性質」, 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012.11.15, 京都
9. 北河 修治, 長谷川 巧, 久 知佳, 高島 彩香, 藤田 奈朋美, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 「マイクロエマルジョンによる抗酸化性薬物の皮膚デリバリーと表皮・真皮分布」, 第 37 回日本化粧品学会, 2012.06.07, 東京
10. 藤田 奈朋美, 檜山 薫, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「フェノール酸の経皮吸収」, 日本薬剤学会第 27 年会, 2012.05.26 神戸
11. 藤井 美紀, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「テルペンを加えたマイクロエマルジョンによるエピカテキンの皮膚デリバリー」, 2012.05.24, 日本薬剤学会第 27 年会, 2012.05.26, 神戸
12. 坂本 泰範, 河崎 紗穂, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「ポリグリセリン脂肪酸エステルを用いたマイクロエマルジョンの調製とレスベラトロールの皮膚取り込み」, 日本薬剤学会第 27 年会, 2012.05.24, 神戸
13. 高島 彩香, 長谷川 巧, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「O/W 型マイクロエマルジョンによって促進されたポリフェノールの皮膚取り込みと皮膚中分布」, 日本薬剤学会第 27 年会, 2012.05.24 神戸
14. 湯谷 玲子, 菊池 武友, 川上 健太, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「ショ糖ラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるクロロゲン酸の皮膚デリバリー」, 日本薬剤学会第 27 年会 (2012.05.24 神戸).
15. 長谷川 巧, 湯谷 玲子, 森田 真也, 寺岡 麗子, 北河 修治, 日本薬学会第 132 年会, 2012.03.30, 札幌
16. 田中 アイ, 湯谷 玲子, 寺岡 麗子, 北河 修治, 「1,3-ブタンジオールを補助界面活性剤として用いたマイクロエマルジョンによるクロロゲン酸の皮膚デリバリー」, 日本薬学会第 132 年会, 2012.03.30, 札幌

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北河 修治 (Kitagawa Shuji)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00108911