

ポリフェノールの皮膚デリバリーシステムとしての  
マイクロエマルジョンの有用性に関する研究

2015

湯谷 玲子



# 目 次

序論	1
本論	
第 1 章 Polysorbate を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー改善と UV により誘導される皮膚の酸化障害に対する防御効果	5
第 1 節 緒言	5
第 2 節 結果	7
第 1 項 Tween 80 を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの溶解性及び皮膚デリバリー改善	7
第 2 項 Polysorbate/ethanol/IPM/NaClaq 系の相挙動と Tween 85 を用いたマイクロエマルジョンの調製	9
第 3 項 Tween 85 を用いたマイクロエマルジョン及びマイクロエマルジョンゲルによるレスベラトロールの皮膚デリバリー改善	13
第 4 項 レスベラトロール含有マイクロエマルジョンゲルによる皮膚中の脂質過酸化抑制効果	14
第 5 項 レスベラトロール含有マイクロエマルジョンゲルによる UV 照射により誘導される紅斑生成の抑制効果	15
第 3 節 考察	16
第 4 節 小括	18
第 2 章 エアロゾル OT を用いたマイクロエマルジョンによるポリフェノール及び界面活性剤の皮膚への取り込みと皮膚中分布	19
第 1 節 緒言	19
第 2 節 結果	22
第 1 項 エアロゾル OT を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロール及びクルクミンの溶解性と皮膚デリバリー	22
第 2 項 モルモット皮膚におけるポリフェノールとエアロゾル OT の分布	25
第 3 項 ユカタンマイクロピッグ皮膚におけるポリフェノールとエアロゾル OT の分布	27
第 3 節 考察	29
第 4 節 小括	30

第3章	シヨ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ポリフェノールの皮膚デリバリー効率の改善と皮膚中分布	31
第1節	緒言	31
第2節	結果	32
第1項	SL/ethanol/water/IPM系の相挙動とシヨ糖ラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンの調製	33
第2項	シヨ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ポリフェノールの皮膚デリバリーと皮膚中分布	35
第3節	考察	38
第4節	小括	39
第4章	シヨ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー効率の改善	40
第1節	緒言	40
第2節	結果	41
第1項	シヨ糖脂肪酸エステルを用いたマイクロエマルジョンの調製	41
第2項	シヨ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー	44
第3項	シヨ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによる浸透促進機構の検討	48
第3節	考察	51
第4節	小括	52
総括		53
実験の部		55
第1章の実験		55
第2章の実験		60
第3章の実験		63
第4章の実験		65
参考文献		69
謝辞		74
付記		75

## 略語表

Aerosol OT: di-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate  
IPM: Isopropyl myristate  
MMP: Matrix metalloproteinase  
NaCl<sub>aq</sub>: NaCl aqueous solution  
Polysorbate: Polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester  
ROS: Reactive oxygen species  
SL: Sucrose laurate  
SM: Sucrose myristate  
SO: Sucrose oleate  
SP: Sucrose palmitate  
SS: Sucrose stearate  
TBA: Thiobarbituric acid  
TBA-RS: Thiobarbituric acid reactive substance  
Tween 20: Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate  
Tween 21: Polyoxyethylene (4) sorbitan monolaurate  
Tween 40: Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate  
Tween 60: Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate  
Tween 61: Polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate  
Tween 65: Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate  
Tween 80: Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate  
Tween 85: Polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate  
UV: Ultra violet

本論文中では、マイクロエマルション及びマイクロエマルションゲルの略称として、以下のものを使用した。

#### 第 1 章

METw80-o: Tween 80:ethanol:IPM:NaCl<sub>aq</sub>=30:30:33:7

METw85: Tween 85:ethanol:IPM:NaCl<sub>aq</sub>=30:10:53:7

ME gel: METw85 + 6.5% AEROSIL<sup>®</sup>200

#### 第 2 章

METw80-o: Tween 80:ethanol:IPM:NaCl<sub>aq</sub>=30:30:33:7

MEAOT: Aerosol OT:ethanol:isopropyl palmitate:NaCl<sub>aq</sub>=33.3:15.2:31.3:20.2

#### 第 3 章

MESL: SL:ethanol:IPM:water=25:10:5:60

METw80-w: Tween 80:ethanol:IPM:NaCl<sub>aq</sub>=30:15:4:51

#### 第 4 章

MESL: SL:ethanol:IPM:water=25:10:5:60

MESP-E: SP:ethanol:IPM:water containing 0.5% dipotassium glycyrrhizate  
=15:15:65:5

MESP-P: SP:1-propanol:IPM:water containing 0.5% dipotassium glycyrrhizate  
=15:15:65:5

MESO-E: SO:ethanol:IPM:water=15:15:65:5

MESO-P: SO:1-propanol:IPM:water=15:15:65:5

## 序 論

太陽からの紫外線 (UV) は、皮膚に損傷を与える主たる環境要因であり、UV 照射は、紅斑、浮腫、色素沈着、免疫抑制、皮膚癌など多くの皮膚疾患と関連している<sup>1-5)</sup>。UV は波長によって、短波長の UVC (200-280 nm)、中波長の UVB (280-320 nm)、長波長の UVA (320-400 nm) の 3 領域に分類される。そのうち、UVC は、オゾン層によって吸収されるため、ほとんど地表に届かない。一方、UVA 及び UVB は太陽光が引き起こす皮膚疾患の主な原因となるものである。地表に到達する UV の約 95% は UVA であり、その約 20-30% が、皮膚をおよそ 1,000  $\mu\text{m}$  透過し、真皮の深部まで到達する。一方、UVB は、皮膚のおよそ 160-180  $\mu\text{m}$  の厚さを透過し、約 20% が表皮層に、約 10% が表皮を通過して真皮上層に到達する (Fig. 1)<sup>3,4,6)</sup>。UVB は、わずか 0.5% 程度しか地表に届いていないにもかかわらず、最も有害であることが知られている<sup>3)</sup>。

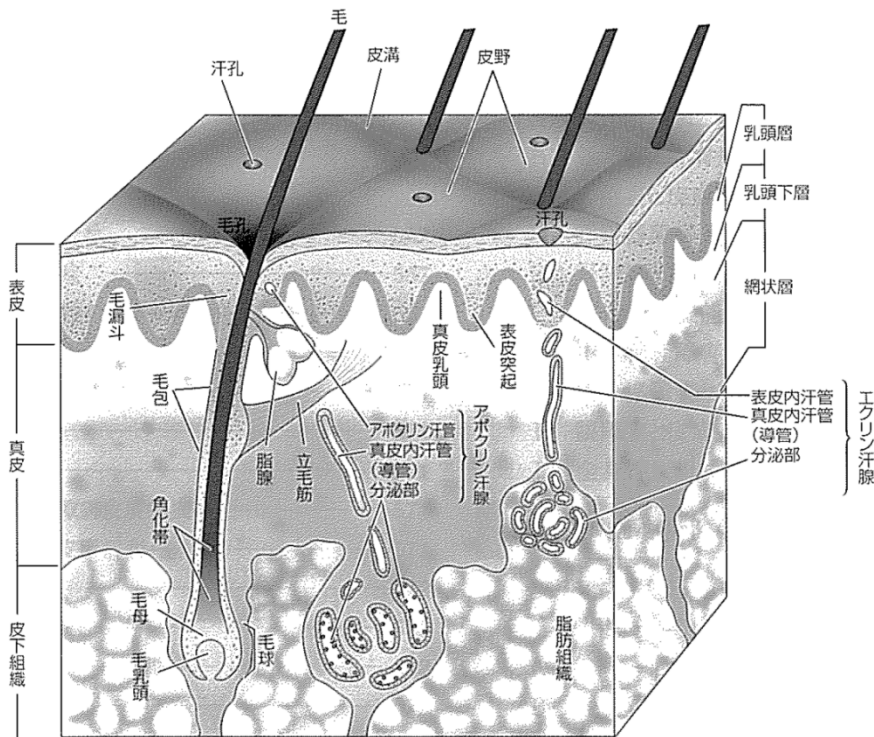
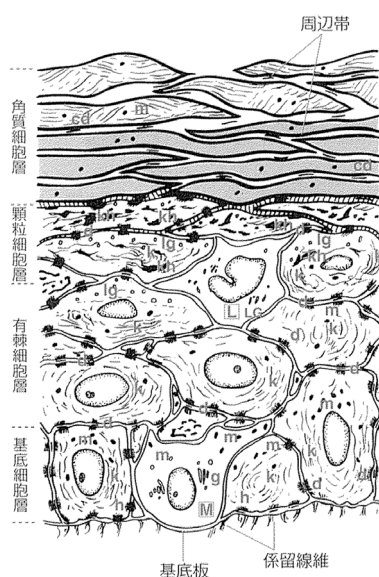


Fig. 1 皮膚の構造

(参考文献7) より一部改変)



d : デスモソーム, cd : コルネオデスモソーム, g : Golgi 装置, h : ヘミデスモソーム, k : ケラチン線維, kh : ケラトヒアリン顆粒, lg : 層板顆粒, L : Langerhans 細胞, LG : Langerhans 顆粒, m : メラノソーム, M : メラノサイト

Fig. 2 表皮の構造

(参考文献 8) より一部改変)

UVBは、暴露量や暴露時間に依存して、光老化といわれる早期の皮膚老化を引き起こす<sup>2-5)</sup>。即ち、慢性的なUVの暴露により、大小の皺や皮膚の乾燥、肥厚、毛細血管拡張症あるいは黒子、メラニン増加症、メラニン減少症を含む色素異常などの老化変化が加速される。UVBは、主として表皮基底細胞層 (Fig. 2) に作用する。DNAは260 nm付近に吸収極大を持つことから、一部の波長域のUVB暴露により、DNA損傷が引き起こされる。このため、表皮基底層にあるメラノサイトでは、UVからDNAを保護するためにチロシナーゼ活性が上昇し、メラニンが通常より多く産生され、色素沈着が引き起こされ、しみが生じる<sup>3)</sup>。一方、UVAは真皮深層まで到達することから、近年、光老化における重大な寄与が報告されている<sup>6)</sup>。UVAやDNAの紫外外部吸収がないUVB波長域の一部は、主に活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) の発生によりDNA損傷を引き起こす<sup>3,6)</sup>。即ち、UV照射により細胞内では酸素から $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{LOO}\cdot$ 、 $\text{NO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ などのROSが生成する光酸化反応が誘導される。元来、皮膚中には、ROSから生体を防御する抗酸化機構が備わっており、ラジカルを消去するスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素群、トランスフェリン、ラクトフェリンなどの高分子抗酸化物質あるいは、ラジカル捕捉能をもつトコフェロール、アスコルビン酸、グルタチオンなどの低分子の抗酸化物質などに富んでいることから、ROSを消去・捕捉し安定化させ、生じた損傷を修復・再生することができる<sup>1,3)</sup>。しかし、過剰にUVに暴露し、過剰量のROSが産生されると、消費された抗酸化物



質が再生・補給されず、抗酸化機構が障害され、皮膚中のタンパク質や他の高分子に酸化ストレスや酸化的光損傷を引き起こす<sup>1-5)</sup>。また、これらのROSにより、光老化に関連のある一連のmatrix metalloproteinases (MMPs) が誘導される。MMPsは、真皮のコラーゲンのネットワーク構造や他の皮膚結合組織を分解し、その結果、深い皺が生じる。このように、皮膚の光老化の主たる原因は、UV照射により産生されたROSであり、それらが慢性的に皮膚に障害を与え、皮膚の構成成分に機能的、構造的変化をもたらした結果であると考えられる<sup>2,6)</sup>。

近年、UVによるこれらの酸化障害からの皮膚の防御及び損傷の修復を目的として、抗酸化物質を皮膚に適用し、皮膚中の抗酸化機構を補うことが有効であることが報告されている<sup>1-5)</sup>。中でも、ポリフェノールは自然界に広く分布し、強い抗酸化作用とフリーラジカル捕捉作用を有することから、光老化や光発癌の防御を目的とした皮膚への適用が期待されている<sup>2-5)</sup>。しかしながら、皮膚、特に最外層の角質層は、外界からの機械的刺激、UVなどの物理的侵襲、刺激物、アレルゲンなどの化学的侵襲、細菌、真菌類、ウイルスなどの微生物による侵襲から生体を防御するバリアとなる器官であることから、物質を透過しにくい性質がある<sup>9-11)</sup>。ポリフェノールは、水や一般的に皮膚に適用される油剤に溶解しにくいものが多いことから<sup>12-14)</sup>、角質層を通過しにくいことが予想される。ROSの消去やMMPsの阻害を目的とするためには、角質層を通過し、真皮までポリフェノールを送達することが望ましい。

薬物の皮膚デリバリーを改善する方法としては、イオン対形成、吸収促進剤、イオントフォoresis、エレクトロポレーション、マイクロニードルなど多岐にわたるが<sup>9,10,15-17)</sup>、本研究ではマイクロエマルジョンに着目した。マイクロエマルジョンは、水相、油相、界面活性剤、補助界面活性剤から成る熱力学的に安定な微粒子分散系であり、一般にFig. 3に示すような構造を形成すると考えられている。調製が容易で、安定性に優れ、また親油性、親水性両薬物の溶解性改善作用を有し、様々な薬物の皮膚デリバリーにおける有用性が報告されている<sup>18-21)</sup>。以上より、本研究では光老化防御を目的としたポリフェノールの皮膚デリバリーにおけるマイクロエマルジョンの有用性を検討した。

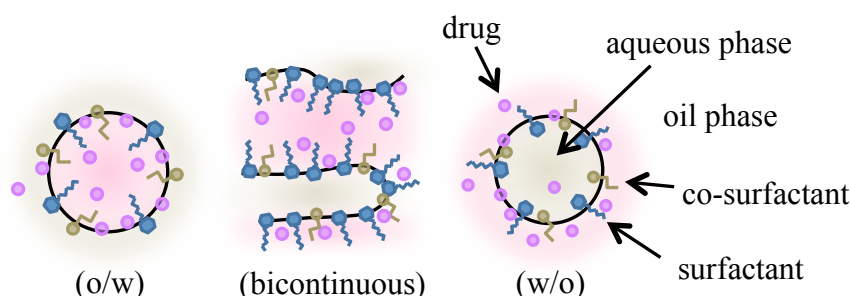


Fig. 3 マイクロエマルジョンの構造

第1章では、非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（以下、polysorbate とする）を界面活性剤として用いたマイクロエマルジョン及びマイクロエマルジョンゲルを調製し、親油性ポリフェノールであるレスベラトロールの溶解性と皮膚デリバリー改善効果を検討した。その後、マイクロエマルジョンゲルを用いてレスベラトロールを皮膚に適用したときの皮膚の酸化障害に対する防御効果を評価し、レスベラトロールの皮膚デリバリーにおけるマイクロエマルジョンの有用性を明らかにすることを試みた。

第2章では、マイクロエマルジョンによって皮膚に取り込まれたレスベラトロールが、実際に皮膚中で主としてどの部位まで浸透しているかを検討し、他のポリフェノールとの浸透部位の違いを明らかにすることを試みた。同時に、浸透促進効果及び安全性の観点から、マイクロエマルジョン中の界面活性剤成分の皮膚への取り込みを陰イオン性界面活性剤であるエアロゾル OT を用いたマイクロエマルジョンを利用して検討した。

第3章では、界面活性剤としてより生体適合性の高いものを用いることが望ましいことから、生分解性の非イオン性界面活性剤であるシヨ糖脂肪酸エステルの中で比較的水溶性の高いシヨ糖ラウリン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を利用し、レスベラトロールの皮膚取り込み効率の改善を試みた。同時にこのマイクロエマルジョンによる親水性のポリフェノールの皮膚デリバリー改善効果についてクロロゲン酸を対象として検討した。

第4章では、レスベラトロールのデリバリー効率を更に改善することを目的として、より鎖長の長い脂肪酸で構成されるシヨ糖脂肪酸エステルを用いてマイクロエマルジョンを調製し、レスベラトロールの皮膚デリバリーを検討した。その中で最も改善効果の高かったマイクロエマルジョンについて、その要因の解明を試みた。

以下に、得られた結果について論述する。

# 本 論

## 第 1 章 Polysorbate を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー改善と UV により誘導される皮膚の酸化障害に対する防御効果

### 第 1 節 緒言

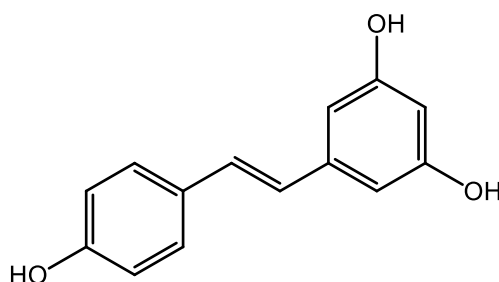


Fig. 4 レスベラトロールの構造式

ポリフェノール的一种であるレスベラトロール (Fig. 4) は、ブドウの果皮・種子やベリー類、ピーナッツの薄皮などに多く含まれ、植物が UV や病害などの外部ストレスにさらされた際に自身を守るために作り出す生体防御物質である<sup>22,23</sup>)。レスベラトロールは、強い抗酸化活性を有し、抗炎症作用、抗癌作用を示すほか、皮膚においてチロシナーゼ阻害作用、MMP 阻害作用、セラミド合成促進など様々な生理活性を示すことから、光老化防御作用をはじめとした局所適用による効果が期待される<sup>2,22-28</sup>)。しかしながら、水や皮膚に適用可能な油剤への溶解性が低いことが知られている<sup>29</sup>)。一方、マイクロエマルジョンは、水相、油相、界面活性剤、補助界面活性剤から成る熱力学的に安定な微粒子分散系であり、難溶性薬物の溶解性を増大させ、皮膚デリバリー及び経皮吸収性を改善することが報告されている<sup>18-21</sup>)。レスベラトロールは、分子量 228.24、 $\log P = 3.024$  の疎水性ポリフェノールである。Kitagawa らは、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Tween 80) を界面活性剤、エタノールを補助界面活性剤、150 mM NaCl 水溶液 (NaCl<sub>aq</sub>) を水相、ミリスチン酸イソプロピル (IPM) を油相とし、それぞれ 30:30:33:7 の割合で混合して調製したマイクロエマルジョン (以下、METw80-o とする) が、同じく疎水性のポリフェノールであるケルセチン (分子量 302.24、 $\log P = 1.989$ ) やゲニステイン (分子量 270.24、 $\log P = 3.114$ ) の溶解性改善と皮膚デリバリー促進に有用であることを報告している<sup>12,13</sup>)。

本章では、はじめに、METw80-o を用いてレスベラトロールの溶解性改善効果と皮

膚デリバリー促進効果を検討した。次いで皮膚刺激性の観点から、METw80-o のエタノール含量を減らすことを目的として、界面活性剤成分である polysorbate の親水性及び疎水性がマイクロエマルジョンの形成領域に及ぼす影響を検討し、より *in vivo* での使用に適した組成のマイクロエマルジョンを調製した。その後、製剤が局所に滞留しやすいようゲル化を行い、マイクロエマルジョンゲルを用いてレスベラトロールを適用したときの皮膚デリバリー改善効果と、UV により誘導される皮膚の酸化障害に対する防御効果を評価した。

## 第2節 結果

### 第1項 Tween 80 を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの溶解性及び皮膚デリバリー改善

まず METw80-o を用いて、レスベラトロールの溶解性改善効果と皮膚デリバリー促進効果を検討した。モデル皮膚として、経皮吸収実験によく用いられ、ヒトの皮膚透過性を予測するモデルとして有用であることが報告されているモルモットの背部摘出皮膚<sup>30)</sup>及びユカタンマイクロピッグの皮膚<sup>31,32)</sup>を用いた。また、皮膚デリバリーの評価には、フランチ型拡散セルを用いた<sup>12,13,33)</sup>。

レスベラトロールの NaClaq 及び IPM に対する溶解性は、ケルセチン(それぞれ、約 0.31 mM、0.64 mM)<sup>12)</sup>やゲニステイン(約 0.059 mM、0.96 mM)<sup>13)</sup>と同様に低かった。一方、METw80-o に過量のレスベラトロールを添加するとマイクロエマルジョンが不安定化したため、レスベラトロールの飽和溶液は調製できなかったが、NaClaq あるいは IPM と比較して、METw80-o は、レスベラトロールの溶解性を約 576 倍あるいは約 125 倍改善した (Table 1)。

Table 1 NaClaq、IPM、METw80-o に対するレスベラトロールの溶解性

Vehicle	Solubility (mM)
NaClaq	0.259 ± 0.005
IPM	1.19 ± 0.04
METw80-o	149.1 ± 7.1 <sup>***, a</sup>

Mean ± S.D., n=4, <sup>\*\*\*</sup>*p* < 0.001 (NaClaq、IPM と比較)

<sup>a</sup>溶解可能な最大濃度を示す

Table 1 に示した濃度で適用した時のレスベラトロールの皮膚への取り込みは、モルモット背部皮膚 (Fig. 5(a))、ユカタンマイクロピッグ皮膚 (Fig. 5(b)) のいずれにおいても METw80-o を用いることで顕著に改善した。レセプターセルへの移行量を皮膚透過量とすると、レスベラトロールの皮膚取り込み量と透過量の合計値 (以下、総取り込み量とする) は、モルモット皮膚において、NaClaq、IPM のそれぞれ約 5.4、2.3 倍、ユカタンマイクロピッグ皮膚において、約 6.9、5.1 倍であった。METw80-o による促進効果は、毛穴からの薬物の取り込みの影響が少なく、角質層のバリア能がより高

いとされるユカタンマイクロピッグ皮膚<sup>31)</sup>において、より顕著であった。

以上より、METw80-oを用いることで、レスベラトロールの溶解性と皮膚デリバリーが改善されることを示した。

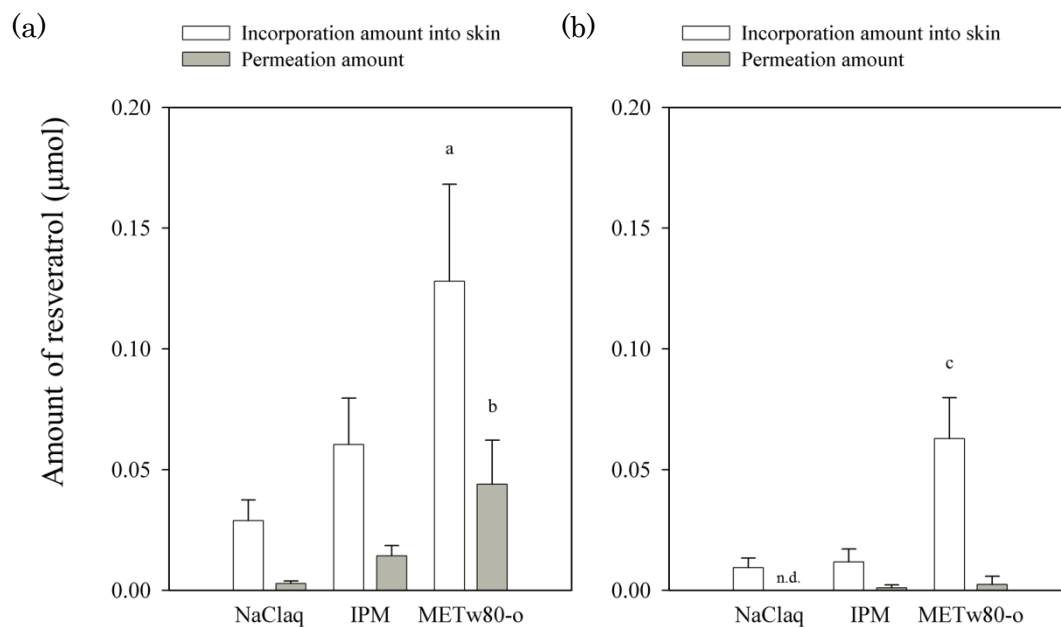


Fig. 5 NaClaq、IPM、METw80-o を用いてモルモット背部皮膚に 20 時間適用後のレスベラトロールの皮膚取り込み量と透過量(a)及びユカタンマイクロピッグ皮膚に 40 時間適用後のレスベラトロールの皮膚取り込み量と透過量(b)

Mean ± S.D., n=4-8,

<sup>a</sup> $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  (それぞれ NaClaq、IPM の皮膚取り込み量と比較),

<sup>b</sup> $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  (それぞれ NaClaq、IPM の皮膚透過量と比較),

<sup>c</sup> $p < 0.001$  (NaClaq 及び IPM の皮膚取り込み量と比較)

第 2 項 Polysorbate/ethanol/IPM/NaClaq 系の相挙動と Tween 85 を用いたマイクロエマルジョンの調製

次に METw80-o をエタノールの少ない組成に変更することを目的として、Tween 80 を含めた 8 種の polysorbate (Fig. 6) を界面活性剤、エタノールを補助界面活性剤、IPM を油相、NaClaq を水相として使用し、擬三成分相図を作成して、マイクロエマルジョンの調製が可能な一相領域を検討した。今回用いた polysorbate を Table 2 に示す。

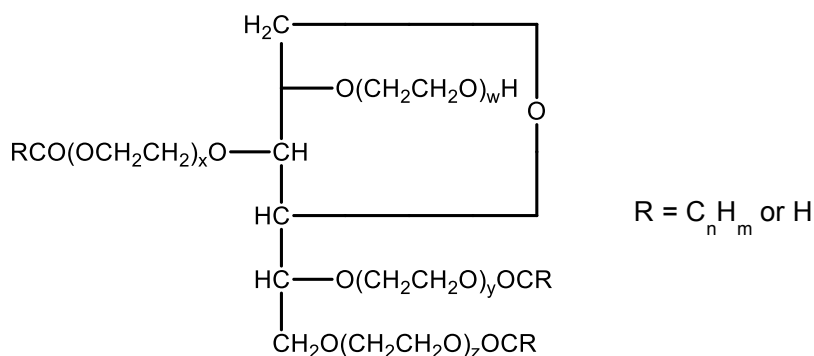


Fig. 6 Polysorbate の構造式

Table 2 Polysorbate の種類

	w+x+y+z	R
Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20)	20	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> , H, H
Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate (Tween 40)	20	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> , H, H
Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80)	20	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> , H, H
Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate (Tween 60)	20	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> , H, H
Polyoxyethylene (4) sorbitan monolaurate (Tween 21)	4	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> , H, H
Polyoxyethylene (4) sorbitan monostearate (Tween 61)	4	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> , H, H
Polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate (Tween 85)	20	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> , C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> , C <sub>17</sub> H <sub>33</sub>
Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate (Tween 65)	20	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> , C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> , C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>

Polysorbate は、親水基であるエチレンオキシドの重合度が増加するほど親水性が増大し、親油基である脂肪酸の炭素数あるいは置換度が増加するほど親油性が増大する。

エチレンオキシドの重合度が 20 かつ脂肪酸のモノエステル体である Tween 20、Tween 40、Tween 80、Tween 60 において、一相領域は、polysorbate の脂肪酸の炭素数が増加するにつれて、 $\text{Tween 20} < \text{Tween 40} < \text{Tween 80} < \text{Tween 60}$  の順にわずかに増大した (Fig. 7(a)-(d))。

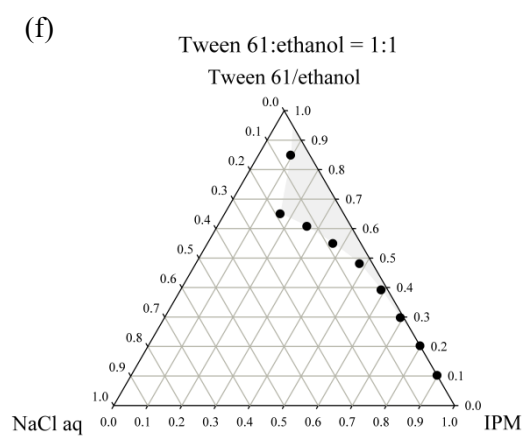
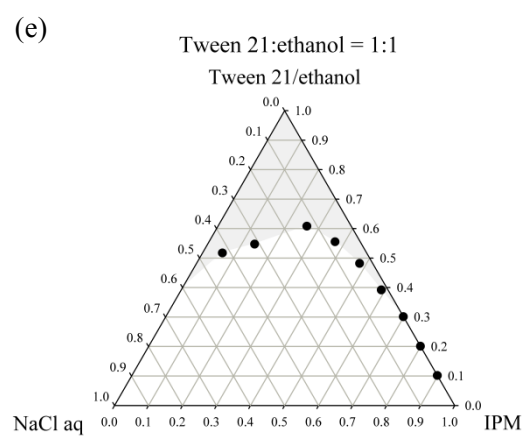
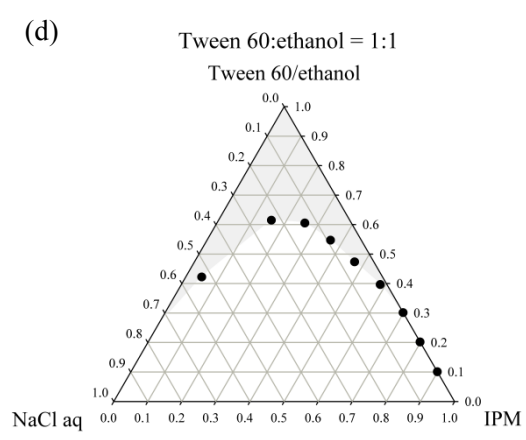
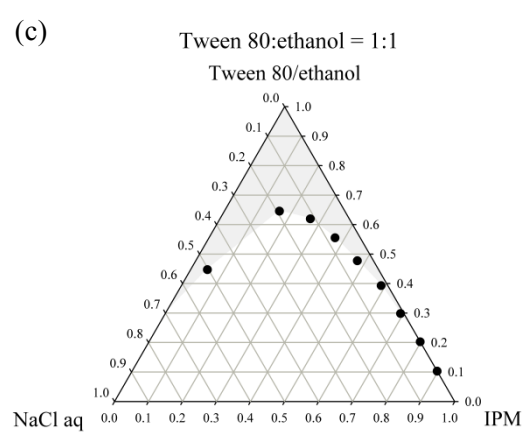
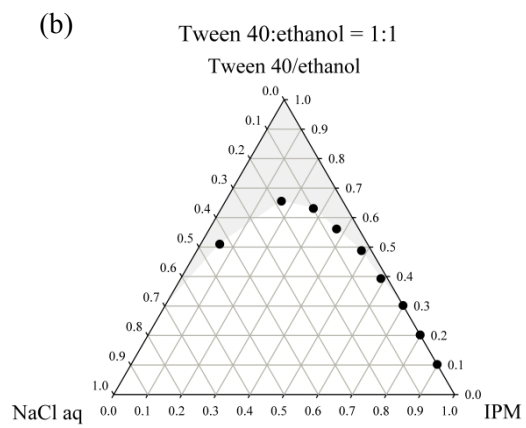
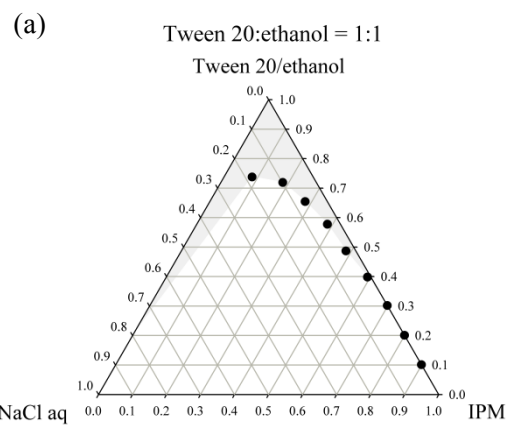
より親水基の小さい Tween 21 と Tween 61 では、Tween 21 は、Tween 20 よりも広い一相領域が得られた (Fig. 2(a), (e)) が、Tween 61 は、Tween 60 よりも一相領域が狭かった (Fig. 7(d), (f))。また、Tween 21、Tween 61 共に NaCl<sub>aq</sub> を多く含む領域が狭くなった。

より親油性が大きな Tween 85 及び Tween 65 では、IPM を多く含む領域が、Tween 80 及び Tween 60 と比較して拡大した (Fig. 7(c), (d), (g), (h))。特にトリオレイン酸エステル体である Tween 85 を用いた場合に最も一相領域が広がった (Fig. 7(g))。また、Tween 85 とエタノールの混合比率を 1:1 から 3:1 に変更すると、IPM を多く含む領域は更に拡大した (Fig. 7(g), (i))。

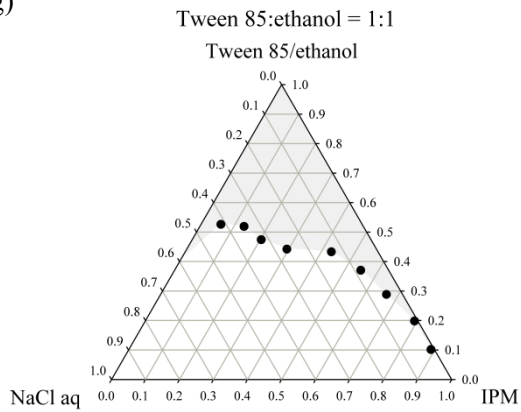
以上より、低エタノール含量のマイクロエマルジョンとして、Tween 85/ethanol=3:1 の相図から、METw80-o の組成を改変し、Tween 85:ethanol: IPM:NaCl<sub>aq</sub>=30:10:53:7 (Fig. 7(i) (★), 以下、METw85 とする) の組成を選択した。

METw85 に対するレスベラトロールの溶解度は、 $254.9 \pm 2.7 \text{ mM}$  (n=4)であり、METw80-o と比較して、約 1.7 倍レスベラトロールの溶解性が増大した。

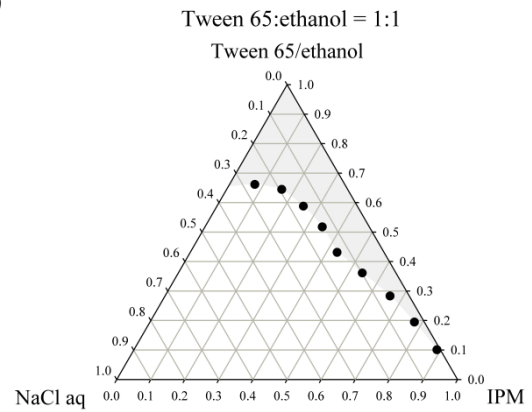




(g)



(h)



(i)

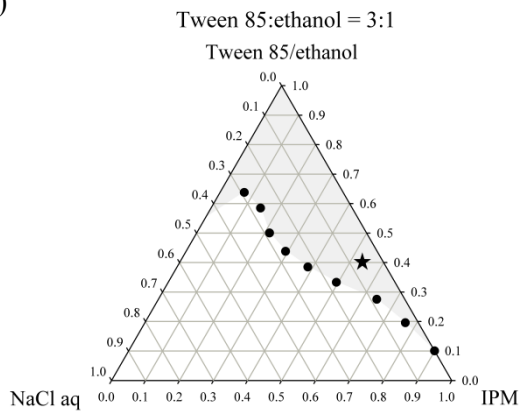


Fig. 7 Polysorbate/ethanol/IPM/NaCl aq 系の擬三成分相図

- (a) Tween 20:ethanol = 1:1, (b) Tween 40:ethanol = 1:1, (c) Tween 80:ethanol = 1:1,  
(d) Tween 60:ethanol = 1:1, (e) Tween 21:ethanol = 1:1, (f) Tween 61:ethanol = 1:1,  
(g) Tween 85:ethanol = 1:1, (h) Tween 65:ethanol = 1:1, (i) Tween 85:ethanol = 3:1

グレーの部分が一相領域を示す

第3項 Tween 85 を用いたマイクロエマルジョン及びマイクロエマルジョンゲルによるレスベラトロールの皮膚デリバリー改善

METw85 にゲル化剤として AEROSIL®200 を 6.5% 添加したマイクロエマルジョンゲル（以下、ME gel とする）を調製し、METw85 及び ME gel の皮膚デリバリー能を評価した。それぞれに 200 mM のレスベラトロールを溶解させ、適用時間は、6 時間あるいは、モルモット皮膚への取り込み量が最大値に達する 20 時間とした。

IPM と比較して、METw85、ME gel は共に、レスベラトロールの皮膚への取り込みを顕著に増大させ、20 時間適用後の皮膚取り込み量は、IPM の約 8 倍及び 7 倍となった（Fig. 8(b)）。ME gel を用いた時の総取り込み量は、6 時間適用時、20 時間適用時で、METw85 のそれぞれ約 62%、78% であり、ゲル化によりレスベラトロールの皮膚への移行性は低下したが、METw80-o (Fig. 5(a)) より改善が見られた。

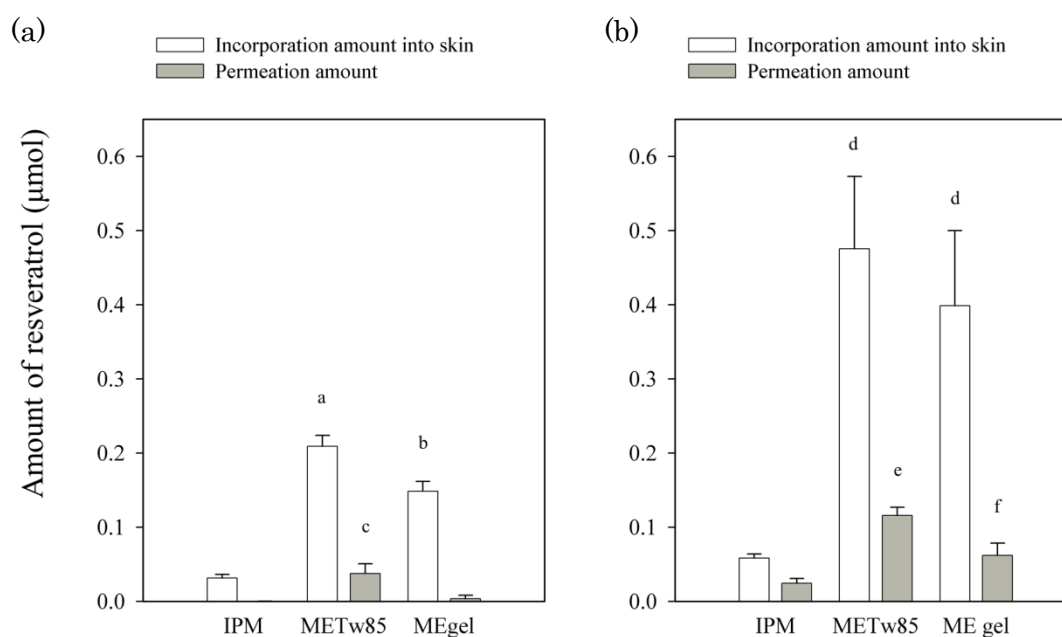


Fig. 8 IPM、METw85、ME gel を用いて 6 時間(a)及び 20 時間(b)適用後のレスベラトロールの皮膚取り込み量と透過量

Mean ± S.D., n=3-4, <sup>a</sup>  $p < 0.001$  (IPM 及び ME gel の皮膚取り込み量と比較), <sup>b</sup>  $p < 0.001$  (IPM の皮膚取り込み量と比較), <sup>c</sup>  $p < 0.01$  (IPM 及び ME gel の皮膚透過量と比較), <sup>d</sup>  $p < 0.001$  (IPM の皮膚取り込み量と比較), <sup>e</sup>  $p < 0.001$  (IPM 及び ME gel の皮膚透過量と比較), <sup>f</sup>  $p < 0.01$  (IPM の皮膚透過量と比較)

#### 第4項 レスベラトロール含有マイクロエマルジョンゲルによる皮膚中の脂質過酸化抑制効果

200  $\mu\text{mol}$  のレスベラトロールを含む ME gel をモルモット皮膚に 20 時間適用後、皮膚に取り込まれたレスベラトロールの脂質過酸化抑制効果を *in vitro* でチオバルビツール酸 (TBA) 試験を行い評価した。TBA 試験は、脂質過酸化生成物の総合的な測定に最も汎用される方法である<sup>34-36)</sup>。

レスベラトロールを含まない ME gel を適用した時に生成した TBA 反応性物質 (TBA-RS ; 脂質過酸化生成物) の量を 100% とすると、200  $\mu\text{mol}$  のレスベラトロールを含有する ME gel により、脂質過酸化物の生成は、約 29.5% に抑制された (Fig. 9)。

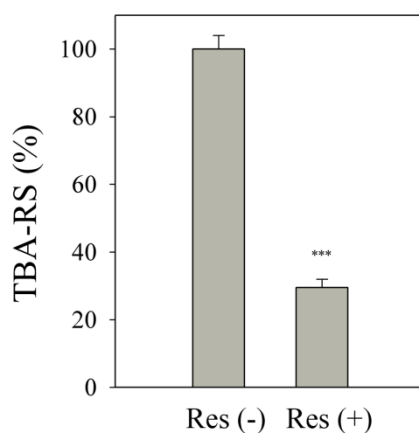


Fig. 9 レスベラトロール含有 ME gel 適用時の皮膚の脂質過酸化抑制効果

Mean  $\pm$  S.D., n=4, \*\*\*  $p < 0.001$

Res(-); レスベラトロールを含まない ME gel 適用時

Res(+); 200  $\mu\text{mol}$  レスベラトロールを含む ME gel 適用時

第5項 レスベラトロール含有マイクロエマルジョンゲルによるUV照射により誘導される紅斑生成の抑制効果

モルモット背部皮膚に 200  $\mu\text{mol}$  のレスベラトロールを含有する ME gel を 24 時間適用後、UV を照射し、皮膚に取り込まれたレスベラトロールによる紅斑生成の抑制効果を評価した。

レスベラトロールを含まない ME gel を適用した左背部では、UV 照射後に明らかな紅斑生成が見られたが、200  $\mu\text{mol}$  のレスベラトロールを溶解させた ME gel を適用した右背部では、紅斑生成がほぼ完全に抑制された (Fig. 10(b))。またこの時、照射前後の皮膚の赤みの差を表す  $\Delta a^*$  は、左背部で約 2.9、右背部で約 0.3 であり、皮膚の赤みの増加が抑制されたことを確認した。

(a)



(b)



Fig. 10 レスベラトロール含有 ME gel による紅斑生成抑制効果  
(a)UV 照射前のモルモット背部写真、(b)UV 照射後のモルモット背部写真  
左背部 (各写真の下部) ; レスベラトロールを含まない ME gel を適用  
右背部 (各写真の上部) ; 200  $\mu\text{mol}$  レスベラトロールを含む ME gel を適用

### 第3節 考察

第2項で示したように、Tween 80 を用いて調製した METw80-o は、レスベラトロールの飽和溶液は調製できなかったものの NaClaq あるいは IPM と比較して、レスベラトロールの溶解性を約 576 倍あるいは約 125 倍改善した。この改善効果は、これまでに報告されているケルセチン（それぞれ約 253 倍、123 倍）<sup>12)</sup>やゲニステイン（それぞれ約 2381 倍、147 倍）<sup>13)</sup>と同様に非常に大きい。また、第3項で示したように Tween 85 を用いて調製した METw85 のレスベラトロールの溶解度は約 254.9 mM であり、この値は NaClaq の約 984 倍、IPM の約 214 倍である。モルモット皮膚に 20 時間適用したときのレスベラトロールの皮膚への取り込み効率（皮膚取り込み量/添加量×100）は、METw80-o で約 0.15%、METw85 で約 0.23%であった。これは METw80-o を用いた時のケルセチンの取り込み率（約 0.4%）<sup>12)</sup>あるいは親水性ポリフェノールであるクロロゲン酸の取り込み率（約 0.32%）<sup>33)</sup>と近い値である。

序論に述べたように薬物の皮膚透過は、角質層透過が律速過程である。シンク条件下で角質層を単位時間、単位面積あたりに透過する薬物の定常状態における FLUX ( $dm/dt$ ) は式(1)で表される<sup>9,10)</sup>。

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DKC_v}{h} \quad (1)$$

$m$  = cumulative mass of diffusant passing per unit area through stratum corneum

$D$  = diffusion coefficient

$K$  = partition coefficient of solute between vehicle and stratum corneum

$C_v$  = solute concentration in vehicle

$h$  = thickness of stratum corneum

式(1) シンク条件下、定常状態における単位時間、単位面積当たりの薬物の角質層透過量

式(1)より薬物の皮膚への取り込み速度は、薬物の角質層中での拡散係数 ( $D$ )、薬物の vehicle-皮膚間の分配係数 ( $K$ ) 及び vehicle 中の薬物濃度 ( $C_v$ ) によって決定される。本章第2項あるいは第2章で述べるように、マイクロエマルジョンによる皮膚デリバリー促進効果は、拡散障壁となる角質層のバリア能が大きいユカタンマイクロピッグの皮膚においてより顕著である。また、レスベラトロール（分子量 228.24）と比較して、分子量の大きなクルクミン（分子量 368.38）において促進効果が高い。これらのことから、マイクロエマルジョンには薬物の角質層中での拡散を促進する作用があるも

のと考えられる。

また、polysorbate を用いたマイクロエマルジョンによる皮膚デリバリー改善効果は、polysorbate の高い可溶化能に起因した vehicle 中の高い薬物濃度 ( $C_v$ ) によることが考えられる。Polysorbate、特に Tween 85 は、その構造内に大きな親水領域及び疎水領域を持つことから、マイクロエマルジョン中で内相、外相間に大きな界面領域を形成し、多量の薬物を取り込むことが予想される<sup>18,21)</sup>。しかし、一般に vehicle に対する溶解性の改善は、必ずしも皮膚デリバリーの改善につながるとは限らない<sup>33)</sup>。Vehicle に対する薬物の溶解性 ( $C_v$ ) の増加は、vehicle 中での薬物の熱力学的安定性を増加させるため、見かけの分配係数 ( $K$ ) は逆に低下する。したがって polysorbate マイクロエマルジョンの優れた可溶化能はマイクロエマルジョン中でのレスベラトロールの安定性を増大させたと考えられることから、皮膚への分配は低下し、溶解性の増加による効果を相殺することが予想される。しかし、これまで METw80-o をケルセチンやゲニステインに用いた場合<sup>12,13)</sup>、あるいは本章において METw80-o や METw85 を用いた場合に、レスベラトロールの皮膚取り込み量が顕著に増大したことから、これらのマイクロエマルジョンの成分には拡散係数 ( $D$ ) を増加させることに加え、分配係数 ( $K$ ) を増加させる因子があるものと考えられる<sup>33)</sup>。マイクロエマルジョン中の成分と角質層脂質との相互作用、あるいはマイクロエマルジョンの成分自体が皮膚へと浸透することで、角質層中での薬物の拡散や角質層中での薬物の溶解性を高め、皮膚への分配を向上させているものと考えられる<sup>18,21)</sup>。

UVB は表皮の全層を透過して、真皮の上部まで到達し、過剰に ROS を産生させることで、紅斑、浮腫、皮膚の肥厚、免疫抑制、そして遂には皮膚癌を引き起こす<sup>1-5,22,23)</sup>。この光障害に対し、皮膚に抗酸化物質を補うことが有効であるとされているが、第4項及び第5項において、ME gel により皮膚に取り込まれたレスベラトロールが皮膚の酸化障害を防ぐことを示した。この効果は、レスベラトロールの高い活性酸素消去能やシクロオキシゲナーゼ阻害作用に起因していると考えられる<sup>2,4,22,37)</sup>。

#### 第4節 小括

Polysorbate を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー改善と UV により誘導される皮膚の酸化障害に対する防御効果を検討した結果、以下の結論を得た。

1. Tween 80 を用いて調製した METw80-o を利用することで、レスベラトロールの溶解性と皮膚デリバリーが改善した。
2. Tween 85 を界面活性剤として用いることで、エタノール含量の少ないマイクロエマルジョンを調製することができた。
3. Tween 85 を用いて調製した METw85 及び ME gel を用いることで、レスベラトロールの皮膚デリバリーは、METw80-o より更に改善した。
4. ME gel を用いてレスベラトロールを皮膚に適用することで、脂質過酸化及び UV 線照射による紅斑生成が抑制された。

以上より、本章において Tween 80 及び Tween 85 を界面活性剤として用いたマイクロエマルジョンはレスベラトロールの溶解性と皮膚デリバリーを改善し、低エタノール含量の ME gel を用いて皮膚に適用したレスベラトロールは、UV 照射により誘導される皮膚の酸化障害を効果的に防ぐことを示した。



## 第2章 エアロゾルOTを用いたマイクロエマルジョンによるポリフェノール及び界面活性剤の皮膚への取り込みと皮膚中分布

### 第1節 緒言

第1章において、polysorbateを用いたマイクロエマルジョンを利用してレスベラトロールを皮膚に適用することで、UVによる酸化障害を効果的に防ぐことを示した。レスベラトロールをはじめとして、一般にポリフェノールは、様々な生理活性を有することから、浸透部位によって得られる作用が異なると考えられる。例えば、表皮基底層まで浸透することでチロシナーゼを阻害し、メラニンの生成を抑制する、あるいは、真皮まで浸透することでMMPsを阻害し、コラーゲン等の真皮を構成するタンパク質の構造変化を防ぐことが挙げられる<sup>2,4,5,38)</sup>。ポリフェノールは多様な分子量及び疎水性を有することから、化合物によって標的とし得る部位も異なると考えられるが、これまでレスベラトロールをはじめ、ポリフェノールの浸透部位については明らかにされていない。

一方、これまで薬物の皮膚デリバリーのvehicleとして様々な成分を用いたマイクロエマルジョンが使用されているが<sup>18-21)</sup>、マイクロエマルジョン成分自体の皮膚への取り込みについては、ほとんど検討されていない。

これらのことから本章では、まずレスベラトロールを含めた親油性ポリフェノールの皮膚中での浸透部位について検討した。またマイクロエマルジョンを構成する界面活性剤の皮膚への浸透についても同様に明らかにすることを試みた。モデル皮膚として、モルモット背部摘出皮膚及びユカタンマイクロピッグの皮膚を用いた。マイクロエマルジョンの界面活性剤としては、定量が容易な陰イオン性界面活性剤である di-2-ethylhexyl sodium sulfosuccinate (エアロゾルOT、Fig. 11)を用いた。マイクロエマルジョンは、Junyaprasertらの組成<sup>39)</sup>を改変し、Aerosol OT:ethanol:isopropyl palmitate:NaClaq=33.3:15.2:31.3:20.2の質量比で混合したものを用いた(以下、MEAOTとする)。

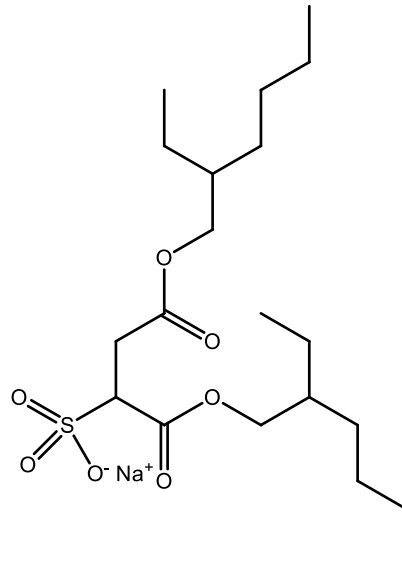


Fig. 11 エアロゾル OT の構造式

ポリフェノールとして、レスベラトロール（分子量 228.24、 $\log P = 3.024$ ）と、同じく親油性で分子量がより大きく、皮膚デリバリーに吸収促進系を用いることが望まれるクルクミン（分子量 368.38、 $\log P = 3.071$ 、Fig. 12）を用いた。クルクミンは、*Curcuma longa L.* の根茎に含まれる色素であり、局所適用により創傷あるいは皮膚癌に対する治療効果が報告されている<sup>40,41</sup>。まず、MEAOT に対する各ポリフェノールの溶解性及び MEAOT による皮膚デリバリー改善効果を METw80-o と比較検討した。次に、MEAOT を用いて、モルモット皮膚における各ポリフェノール及びエアロゾル OT の浸透量及び浸透深さを検討した。更に、ユカタンマイクロピッグ皮膚を用いた検討において、同じく親油性ポリフェノールで METw80-o によるデリバリーの改善が報告されているケルセチン（分子量 302.24、 $\log P = 1.989$ 、Fig. 13）<sup>12</sup>を含めた 3 種のポリフェノールを用いて、皮膚を表皮、真皮の 2 層に分けて、浸透部位を検討した。

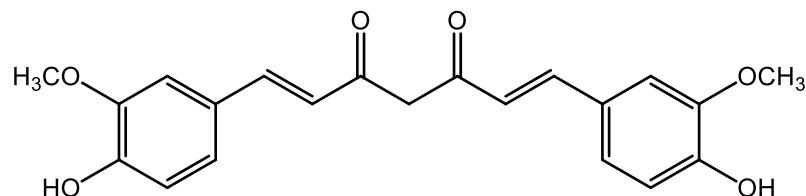


Fig. 12 クルクミンの構造式

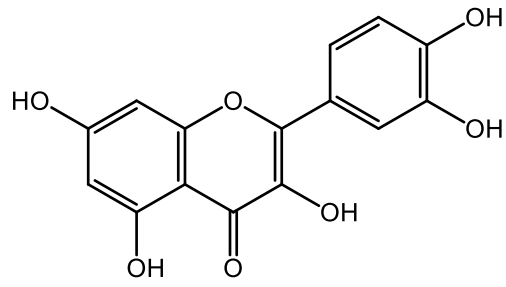


Fig. 13 ケルセチンの構造式

## 第2節 結果

### 第1項 エアロゾル OT を用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロール及びクルクミンの溶解性と皮膚デリバリー

はじめに、各ポリフェノールの MEAOT に対する溶解度を測定した。比較として、IPM 及び METw80-o を用いた。MEAOT に対するレスベラトロールの溶解性は、METw80-o よりも低かったが、IPM より有意に高い値を示した。一方、クルクミンは各 vehicle に対してレスベラトロールよりも溶解しにくかったが、レスベラトロール同様に、MEAOT に対する溶解性は、IPM より高く METw80-o より低くなった (Table 3)。

Table 3 IPM、METw80-o、MEAOT に対する  
レスベラトロール、クルクミンの溶解性

Vehicle	Solubility (mM)	
	Resveratrol	Curcumin
IPM	1.19 ± 0.04	0.52 ± 0.01
METw80-o	149.1 ± 7.1 <sup>***,a,b</sup>	49.9 ± 4.2 <sup>***,a</sup>
MEAOT	56.6 ± 3.7 <sup>***</sup>	5.29 ± 1.02 <sup>***</sup>

Mean ± S.D., n=4, <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  (IPM と比較),  
<sup>a</sup> $p < 0.001$  (MEAOT と比較), <sup>b</sup> 溶解可能な最大濃度を示す

次に MEAOT の皮膚デリバリー能を IPM、METw80-o と比較した。Table 3 に示した濃度で適用した時のモルモット皮膚におけるレスベラトロールの皮膚取り込み量及び透過量は、MEAOT を用いることで、共に IPM、METw80-o よりも顕著に増大した。MEAOT を用いた時の総取り込み量は、IPM の約 11 倍、METw80-o の約 4.8 倍高い値となった (Fig. 14(a))。ユカタンマイクロピッグの皮膚に適用した時に、その効果はより顕著になり、MEAOT を用いた時の総取り込み量は、モルモット皮膚と比較して約 62% に減少したが、IPM、METw80-o のそれぞれ、約 85 倍、約 7.9 倍であった (Fig. 15(a))。

クルクミンについても、モルモットの皮膚において、IPM と比較して MEAOT を用いることで顕著に皮膚取り込み量が増大した。総取り込み量は IPM を用いた時と比べて約 36 倍高くなり、改善効果はレスベラトロールよりも大きかった (Fig. 14(b))。一方、ユカタンマイクロピッグの皮膚においては、IPM を用いた場合、クルクミンは皮膚中から検出されなかった。しかしながら、MEAOT を用いることで、レスベラトロー

ル同様、IPM、METw80-o と比較して取り込みは顕著に増大した (Fig. 15(b))。総取り込み量は、モルモット皮膚と比較して約 35%に減少したが、これは、ユカタンマイクロピッグの角質層のバリア能が高く<sup>31)</sup>、分子量の大きな物質に対してより大きな障壁となるためと考えられる。

MEAOT によるモルモット皮膚への取り込み効率は、レスベラトロールで約 2.2%、クルクミンで約 1.7%であり、METw80-o による約 0.15%、約 0.21%と比較して、顕著に高い値となった。

以上より、MEAOT は、METw80-o よりポリフェノールの溶解性は低かったが、皮膚への取り込みを顕著に増大させた。レスベラトロールにおいては、ユカタンマイクロピッグ皮膚において、その傾向がより顕著であった。また、分子量の大きなクルクミンについても MEAOT を用いることで、皮膚への取り込みが増大した。

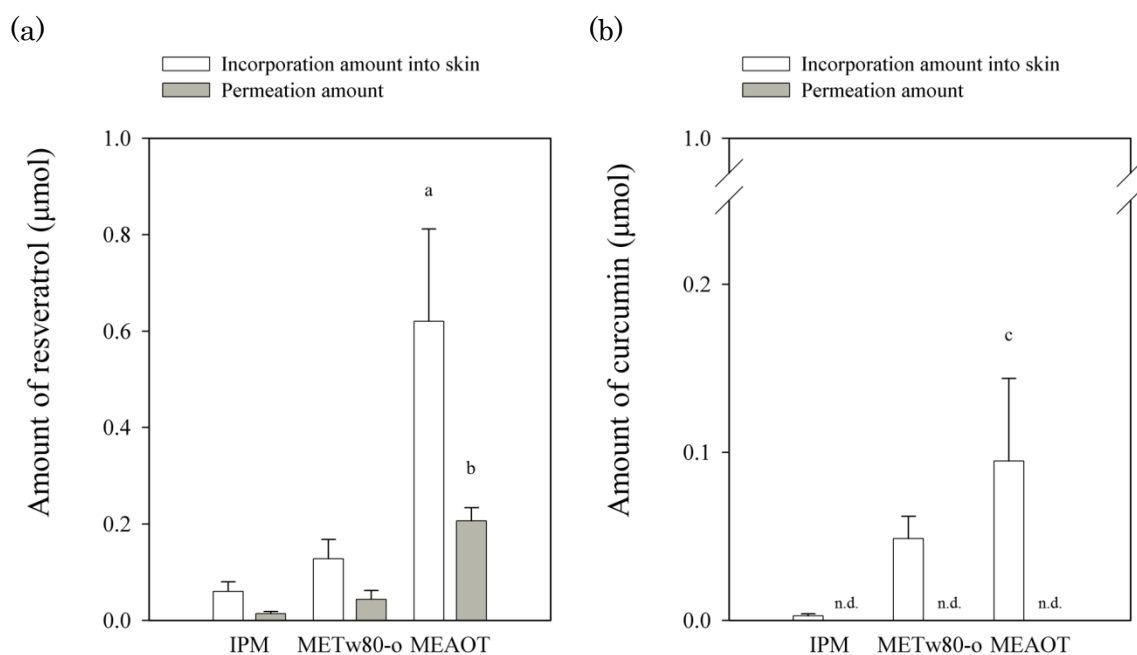


Fig. 14 IPM、METw80-o、MEAOT を用いてモルモット背部皮膚に 20 時間適用後のレスベラトロール(a)及びクルクミン(b)の皮膚取り込み量と透過量

Mean ± S.D., n=4-8, <sup>a</sup> $p < 0.001$  (IPM、METw80-o の皮膚取り込み量と比較) ,

<sup>b</sup> $p < 0.001$  (IPM、METw80-o の皮膚透過量と比較) ,

<sup>c</sup> $p < 0.01$  (IPM の皮膚取り込み量と比較)

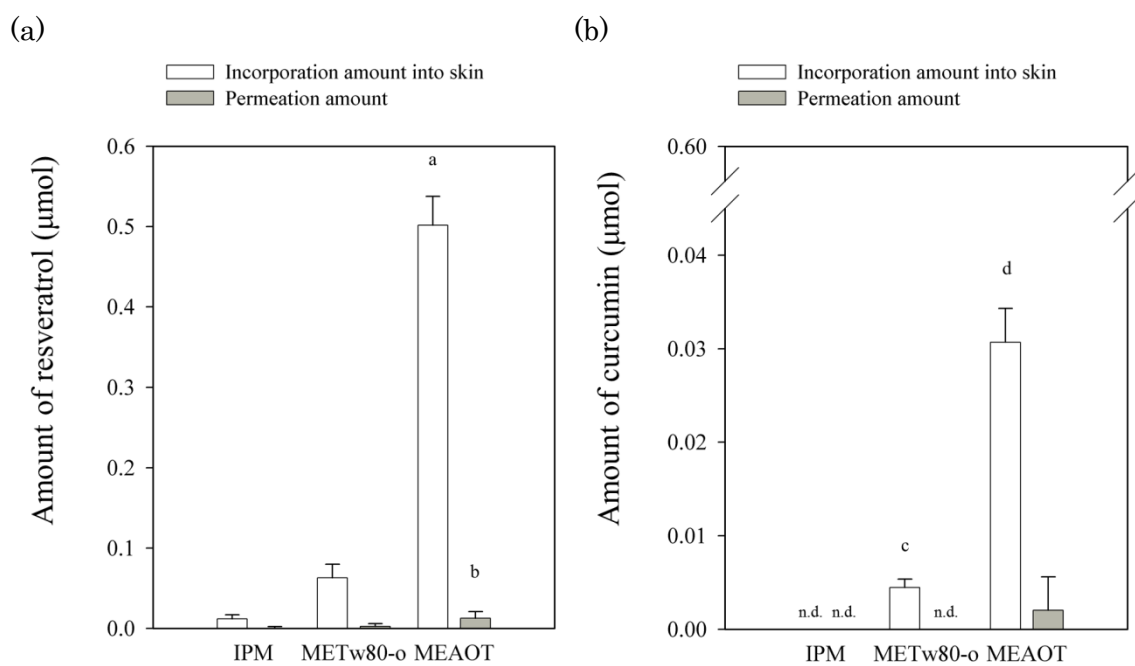


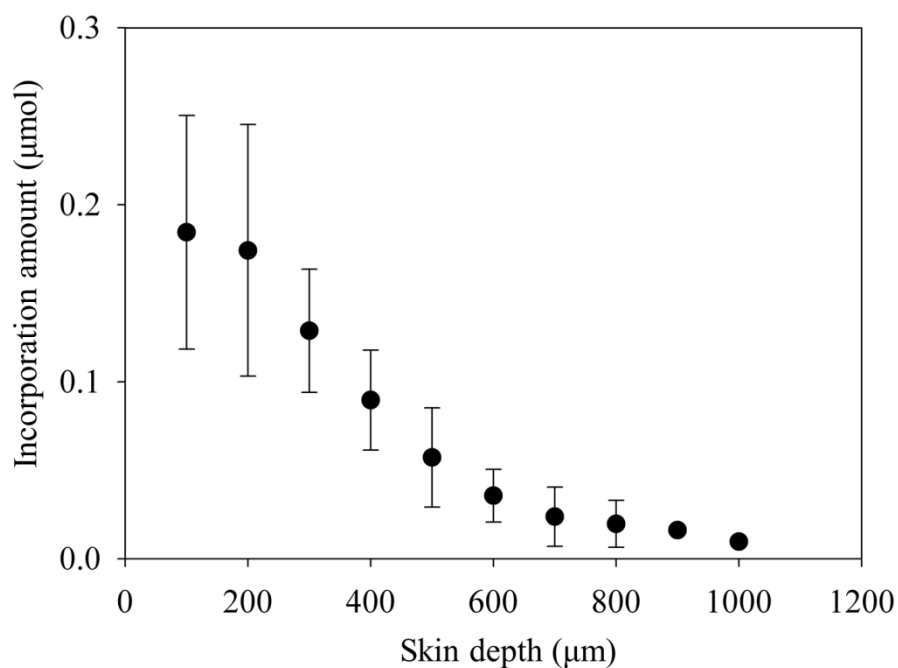
Fig. 15 IPM、METw80-o、MEAOT を用いてユカタンマイクロピッグ皮膚に 40 時間適用後のレスベラトロール(a)及びクルクミン(b)の皮膚取り込み量と透過量 Mean  $\pm$  S.D., n=4-8, <sup>a</sup> $p < 0.001$  (IPM、METw80-o の皮膚取り込み量と比較), <sup>b</sup> $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  (それぞれ IPM、METw80-o の皮膚透過量と比較), <sup>c</sup> $p < 0.05$  (IPM の皮膚取り込み量と比較), <sup>d</sup> $p < 0.001$  (IPM、METw80-o の皮膚取り込み量と比較)

## 第2項 モルモット皮膚におけるポリフェノールとエアロゾル OT の分布

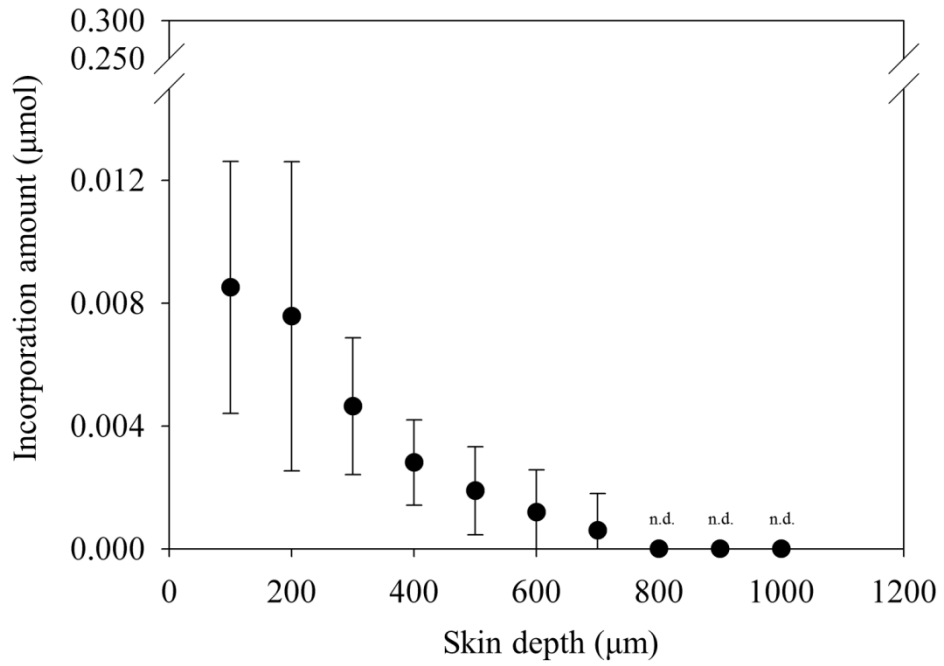
MEAOT を用いてモルモット皮膚に取り込まれたポリフェノールと MEAOT 中に含まれるエアロゾル OT の浸透量及び浸透深さを検討した。モルモット皮膚を、マイクロームを用いて皮膚表面と平行に切断した切片を調製し、各層中の含量を調べた。

皮膚に取り込まれたレスベラトロール、クルクミンは、共に皮膚の表面に近い層に多く分布し、徐々に移行量は減少したが、深部でも分布がみられた (Fig. 16(a)、(b))。特にレスベラトロールでは最深部への移行が見られ、クルクミンと比較して、より深い層に多く取り込まれていた (Fig. 16(a))。一方、エアロゾル OT も多量に皮膚に取り込まれており、皮膚の深部にまで移行が見られた (Fig. 16(c))。各層のエアロゾル OT 含量を積算すると、vehicle から約 0.93% のエアロゾル OT が皮膚へ取り込まれていた。

(a)



(b)



(c)

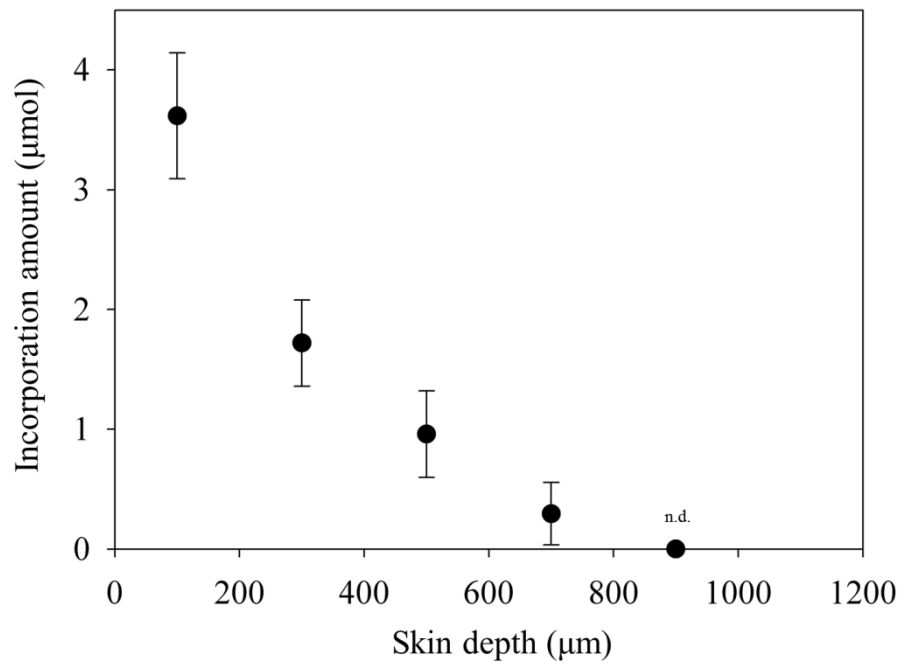


Fig. 16 MEAOT を用いてモルモット皮膚に 20 時間適用後のレスベラトロール(a)、クルクミン(b)、エアロゾル OT(c)の各深さにおける取り込み量

Mean  $\pm$  S.D., n=3



### 第3項 ユカタンマイクロピッグ皮膚におけるポリフェノールとエアロゾルOTの分布

次にユカタンマイクロピッグ皮膚における分布を検討した。ユカタンマイクロピッグ皮膚は、ポリフェノールの浸透が遅く<sup>31,32)</sup>取り込み量が少ないことから、皮膚を表皮と真皮の二層に分けて検討を行った。また、比較として、ケルセチンの分布についても検討した。

Fig. 17に示すように、これらのポリフェノール及びエアロゾルOTはいずれもユカタンマイクロピッグ皮膚の真皮に浸透していた。クルクミンは、真皮の約2倍多く表皮に分布していたが、より低分子量のレスベラトロールは、表皮の約3倍多く真皮に分布していた。両者の中間的な分子量のケルセチンは表皮と真皮にほぼ同程度分布していた。エアロゾルOTも表皮と真皮、両方に分布していたが、取り込み量は表皮が約2倍高かった。

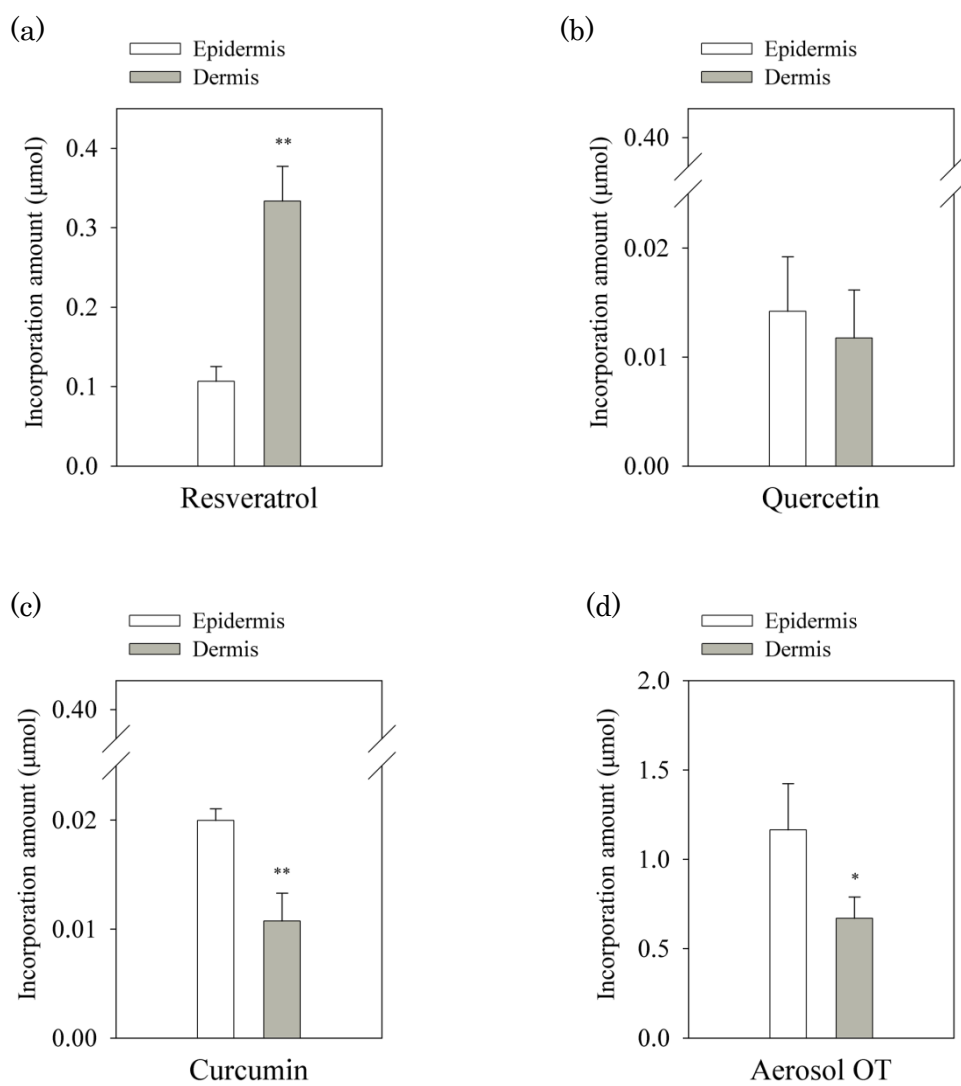


Fig. 17 MEAOT を用いてユカタンマイクロピッグ皮膚に 40 時間適用後の表皮、真皮における取り込み量: (a)レスベラトロール、(b)ケルセチン、(c)クルクミン、(d)エアロゾル OT

Mean ± S.D., n=3, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (それぞれ表皮と比較)

### 第3節 考察

エアロゾル OT を界面活性剤として用いて調製した MEAOT は、Tween 80 を用いて調製した METw80-o と比較して、ポリフェノールの溶解性が低いにもかかわらず、皮膚への取り込みを改善した。よって高い取り込み効率が得られたが、同時に MEAOT を構成するエアロゾル OT が、表皮に多く存在していたものの、皮膚の深部まで浸透していることが明らかとなった。エアロゾル OT と角質層成分が混合されたことで、バリア能が低下し、角質層中のポリフェノールの透過性を高めたことが、取り込み量の増加につながったものと考えられる。

ユカタンマイクロピッグ皮膚を用いた検討において、今回用いた 3 種のポリフェノールは全て真皮まで浸透していることが明らかとなった。特に、分子量の小さなレスベラトロールは真皮に多く分布していた。今回、物質の透過性及び構造が異なる 2 種の皮膚をヒトの皮膚のモデルとして使用した。モルモットの皮膚の表皮の厚さを約 120  $\mu\text{m}$ <sup>42)</sup> とすると、Fig. 16 より、皮膚に浸透したレスベラトロールの約 71.5%、あるいはクルクミンの約 62.5%が真皮に分布したこととなる。同様に、皮膚表面から 500  $\mu\text{m}$  以上浸透したのは、レスベラトロールの約 16.2%、クルクミンの約 6.2%となり、小さな分子ほどより皮膚の深部に浸透しやすいという傾向は、モルモット、ユカタンマイクロピッグの両皮膚において共通していた。しかしながら、ポリフェノール間の分布の差は、モルモットの皮膚でははるかに小さかった。この理由として、モルモット皮膚に毛穴が多数存在すること、角質層のバリア能が比較的低いことが考えられる。

#### 第4節 小括

エアロゾル OT 用いたマイクロエマルジョンを利用して、ポリフェノールとエアロゾル OT の皮膚中分布を検討した結果、以下の結論を得た。

1. エアロゾル OT を用いて調製した MEAOT は、ポリフェノールの溶解性が Tween 80 を用いて調製した METw80-o よりも低いにもかかわらず、皮膚への取り込み量を増大させ、高い皮膚取り込み効率を示した。
2. MEAOT により取り込まれたポリフェノールは、モルモット皮膚の表面から深部にわたって分布し、分子量の小さなレスベラトロールは、より深部へ移行する傾向が見られた。また、エアロゾル OT も皮膚の深部に取り込まれていた。
3. MEAOT により取り込まれたレスベラトロール、ケルセチン、クルクミンは、いずれもユカタンマイクロピッグ皮膚の真皮まで浸透した。分子量の小さなレスベラトロールが最も真皮への移行性が高かった。一方、エアロゾル OT も真皮への移行が見られた。

以上より、MEAOT により取り込みを促進すると、ポリフェノールは、皮膚の深部に浸透し、真皮にまで到達していることが明らかとなった。その際、分子量のより小さなポリフェノールほど真皮への移行性が高い傾向が得られたことから、レスベラトロールは真皮を標的としたデリバリーに、クルクミンは表皮を標的としたデリバリーに適していると考えられる。一方、同時にマイクロエマルジョンを構成するエアロゾル OT が皮膚へと取り込まれていたことから、界面活性剤と角質層成分とが混合し、角質層中のポリフェノールの透過性を高めたことが、取り込み量の増加につながった可能性が考えられる。またこのことから、マイクロエマルジョンの界面活性剤成分には、生体適合性のよいものを選定し、デリバリー促進作用のみならず構成成分の皮膚への浸透についても十分考慮する必要があることが示された。

### 第3章 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ポリフェノールの皮膚デリバリー効率の改善と皮膚中分布

#### 第1節 緒言

第1章において、マイクロエマルジョンによりレスベラトロールの溶解性及び皮膚への取り込みが改善されることを示した。しかしながら、**polysorbate**を用いたマイクロエマルジョンを利用した時のモルモット皮膚への取り込み効率は約0.2%と低く、多量のポリフェノールの添加を必要とした。一方、第2章において、陰イオン性界面活性剤であるエアロゾル OTを用いたマイクロエマルジョンは、ポリフェノールの皮膚への取り込み効率を改善したが、同時にマイクロエマルジョン中に含まれるエアロゾル OTが皮膚に取り込まれることを示した。マイクロエマルジョンには局所製剤として多くの利点がある一方で、調製に比較的多量の界面活性剤を必要とすることから、高い薬物デリバリー能を有すると同時に、皮膚刺激性が少なく安全性の高い成分を使用する必要がある。

そこで、ショ糖を親水基、植物油由来の脂肪酸を疎水基とする生分解性の非イオン性界面活性剤であるショ糖脂肪酸エステル (Fig. 19) を用いることとした。ショ糖脂肪酸エステルは食品、化粧品、医薬品等、様々な分野において利用されており、生体毒性、皮膚刺激性、皮膚感作性が少ないことが報告されている<sup>43-46)</sup>。また、これまで幾つかの薬物について、ショ糖脂肪酸エステルの浸透促進剤としての効果が報告されているが<sup>47-49)</sup>、ショ糖脂肪酸エステルを用いて調製したマイクロエマルジョンを皮膚デリバリーに用いた報告はほとんどない。

以上より、本章では、生体適合性に優れたショ糖脂肪酸エステルの中で、比較的水溶性の高いショ糖ラウリン酸エステル (RYOTO® Sugar Ester L-1695、以下、SL とする) を界面活性剤として用いたマイクロエマルジョンを調製し、ポリフェノールの皮膚取り込み効率の改善を試みた。ポリフェノールとして、レスベラトロール (分子量 228.24、 $\log P = 3.024$ ) と比較的亲水性の高いクロロゲン酸 (分子量 354.31、 $\log P = 0.370$ 、Fig. 20) の2種を用いた。クロロゲン酸は、コーヒーに豊富に含まれ、日常生活において最も多く摂取されるポリフェノールである<sup>50,51)</sup>。皮膚に適用することで抗炎症作用、抗癌作用を示すことが報告されている<sup>52)</sup>。

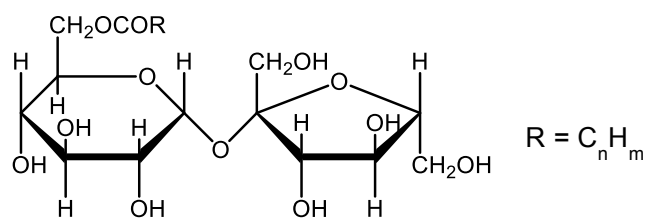


Fig. 19 ショ糖脂肪酸エステルの構造式

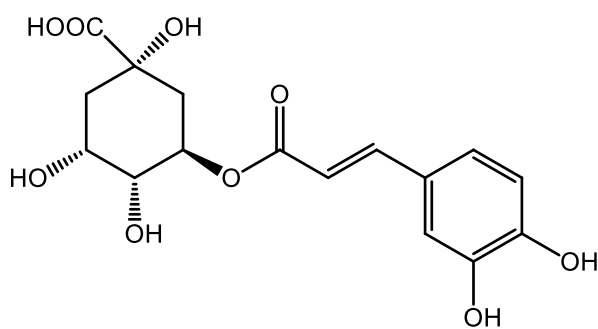


Fig. 20 クロロゲン酸の構造式

## 第2節 結果

### 第1項 SL/ethanol/water/IPM系の相挙動と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の調製

まずマイクロエマルジョンの組成を決定するため、界面活性剤にSL、補助界面活性剤にエタノール、油相にIPM、水相に水を用い、SLとエタノールの混合比を1:1から4:1の範囲で変化させ、擬三成分相図を作成した。

いずれの混合比においても一相領域の面積は相図全体の約27%であり、界面活性剤と補助界面活性剤の混合比は、一相領域の総面積にあまり影響しなかった。一方、水相が多い領域を比較すると、界面活性剤と補助界面活性剤の混合比が1:1から2.5:1では、わずかに増大し、それ以降は減少した (Fig. 21)。以上より、界面活性剤/補助界面活性剤相の含量が少ない組成となるよう、マイクロエマルジョンの組成は、SLとエタノールの混合比が2.5:1の相図から、SL、エタノール、IPM、水の混合比が25:10:5:60 (質量比)のもの (以下MESLとする) を選択した。また、比較として、Tween 80を界面活性剤とし、水相を多く含むマイクロエマルジョン (Tween 80:ethanol: IPM: NaClaq =30:15:4:51、以下METw80-wとする)<sup>33)</sup>を以降の検討に使用した。

次に、vehicle中での薬物の拡散性の指標となる粘度を測定した<sup>53)</sup>。MESLの粘度は、METw80-wの約1/17の低い値であった (Table 4)。

Table 4 MESL、METw80-wの粘度

Vehicle	Viscosity (mPa s)
MESL	7.75 ± 0.14
METw80-w	128.9 ± 1.1

Mean ± S.D., n=3

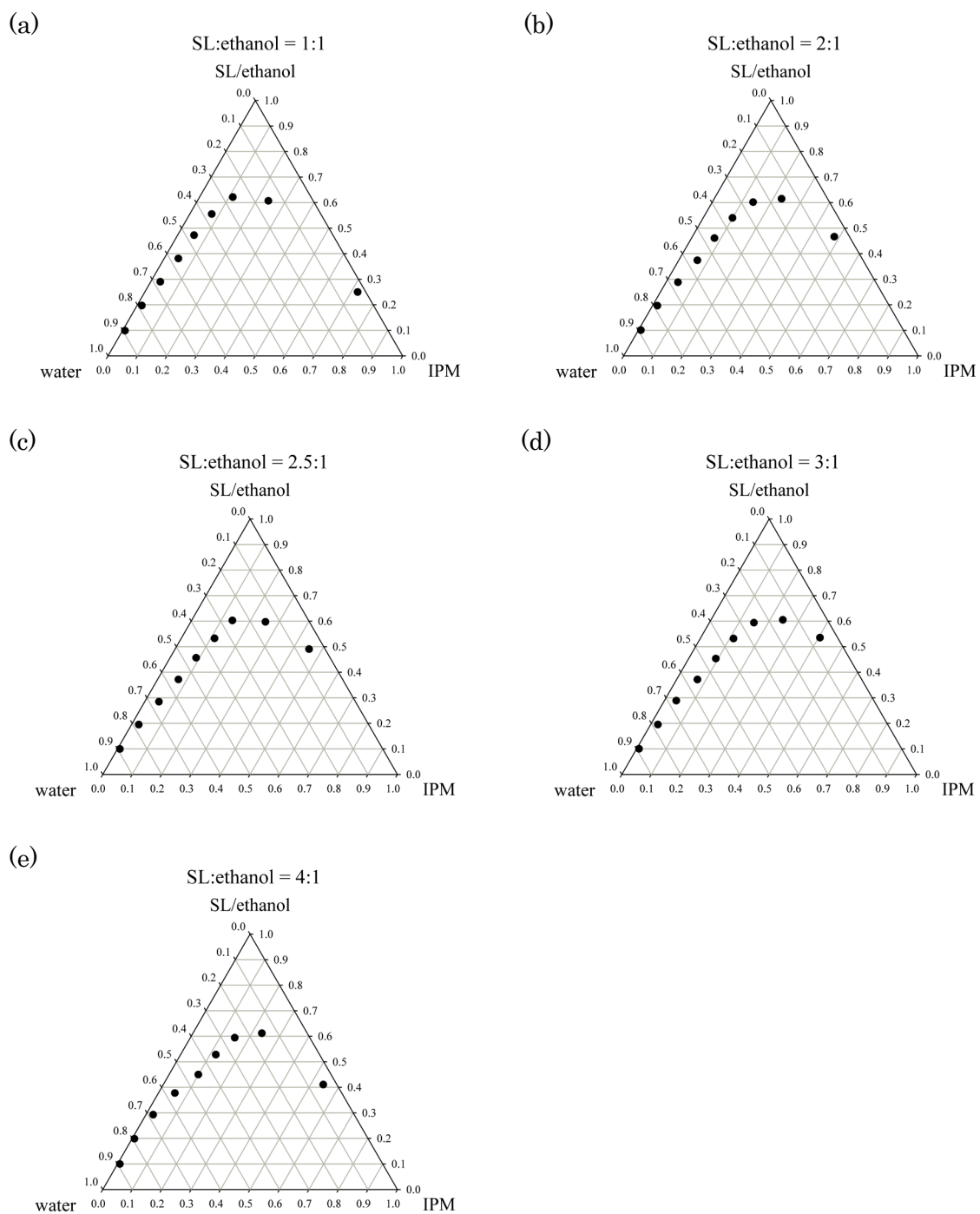


Fig. 21 SL/ethanol/water/IPM 系の擬三成分相図

(a) SL:ethanol = 1:1, (b) SL:ethanol = 2:1, (c) SL:ethanol = 2.5:1,

(d) SL:ethanol = 3:1, (e) SL:ethanol = 4:1

プロットより上側の部分が一相領域を示す



第2項 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ポリフェノールの皮膚デリバリーと皮膚中分布

MESL 及び METw80-w に対するレスベラトロール及びクロロゲン酸の溶解性を検討した。Table 5 に示すように、MESL における各ポリフェノールの溶解度は、METw80-w よりも低く、レスベラトロールでは約 1/18、クロロゲン酸では約 1/7 であったが、それぞれの NaClaq 及び IPM に対する溶解度より高値であった（レスベラトロール：0.0259 mM (NaClaq)、1.19 mM (IPM) (Table 1)、クロロゲン酸：約 50 mM (NaClaq)、約 0.01 mM (IPM) <sup>33)</sup>。

Table 5 MESL、METw80-w に対するレスベラトロール、クロロゲン酸の溶解性

Vehicle	Solubility (mM)	
	Resveratrol	Chlorogenic acid
MESL	14.4 ± 0.7	116.0 ± 6.3 <sup>a</sup>
METw80-w	260.7 ± 2.6	797.6 ± 6.5

Mean ± S.D., n=4,

<sup>a</sup> 溶解可能な最大濃度を示す

次に、MESL によるデリバリー改善効果と両ポリフェノールの皮膚中での分布を検討するため、ユカタンマイクロピッグ皮膚への経時的な取り込みを検討した。適用濃度は、レスベラトロールを MESL で適用するときは、飽和濃度とし、それ以外は十分な溶解性が得られたことから、100 mM とした。

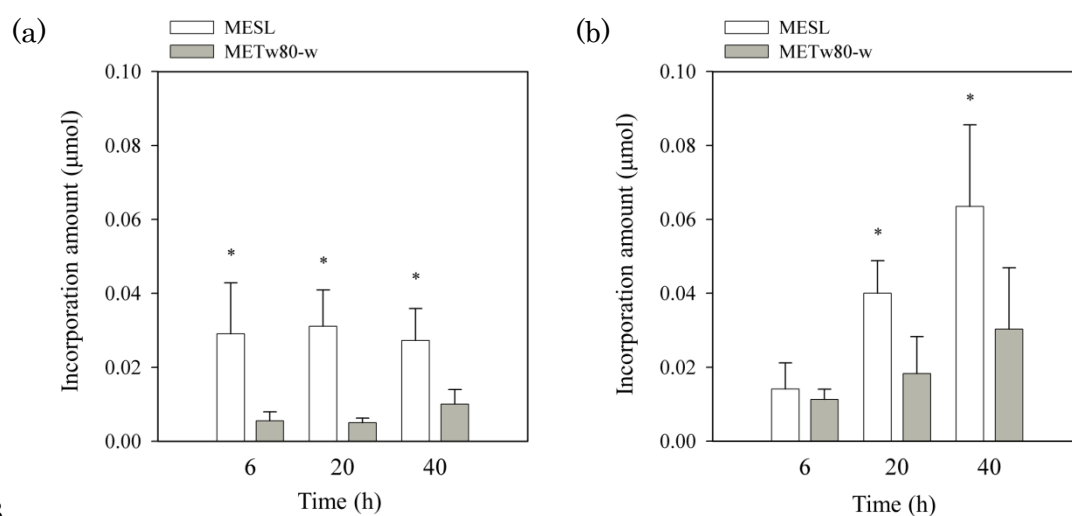
いずれのマイクロエマルジョンを用いた場合も、両ポリフェノールは適用 6 時間で真皮に浸透していた。MESL を用いた場合、両ポリフェノールとも、表皮取り込み量は 6-40 時間でほぼ一定の値を示し、真皮への移行量は時間の経過と共に増大した。一方、METw80-w を用いた場合、表皮、真皮共に、時間の経過に伴って移行量がわずかに増大する傾向が見られた。レスベラトロール、クロロゲン酸共に、MESL を用いた場合、METw80-w に比べて、いずれの時点においても表皮取り込み量が増大し、20、40 時間適用時に真皮取り込み量が有意に増大した (Fig. 22)。

Table 6 に示すように MESL を用いて 40 時間適用時のレスベラトロールの皮膚取り込み効率は、表皮、真皮のそれぞれで METw80-w を用いた時の 19 倍、15 倍高い値を示した。一方、クロロゲン酸についても、MESL を用いた時の表皮取り込み率、真皮

取り込み率は、それぞれ METw80-w より約 6 倍、あるいは 3.5 倍高い値を示し、両ポリフェノールともに MESL を利用することで、顕著に取り込み効率が改善した。改善作用は、疎水性でより分子量の小さなレスベラトロールにおいて大きかった。

MESL を用いて 40 時間適用後のレスベラトロール及びクロロゲン酸の皮膚透過率は、いずれも各々の皮膚取り込み率より低かった (Table 6)。6 時間及び 20 時間適用時の透過率は更に小さく、METw80-w を用いた時は、ほとんど透過は見られなかった。レスベラトロールは、真皮まで浸透しているにもかかわらず、ほとんど皮膚を透過しなかった。

A



B

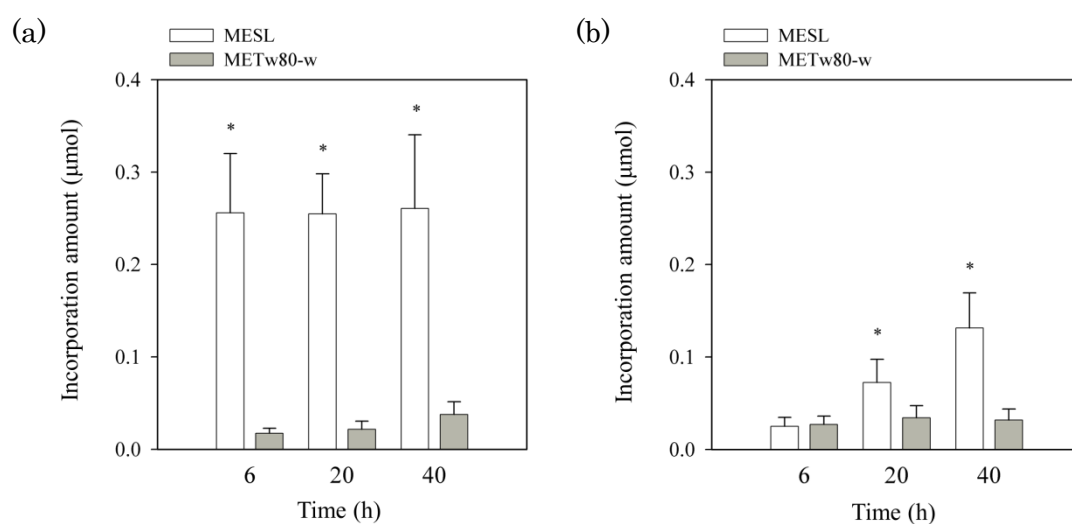


Fig. 22 ユカタンマイクロピッグ皮膚におけるレスベラトロール(A)及びクロロゲン酸 (B)の表皮、真皮取り込み量の経時的推移 : (a)表皮取り込み量, (b)真皮取り込み量  
Mean ± S.D., n=8, \* $p < 0.05$  (それぞれ同時点の METw80-w と比較)

Table 6 METw80-w、MESL を用いて 40 時間適用後の  
レスベラトロール、クロロゲン酸の表皮取り込み率、真皮取り込み率、透過率

	Incorporation efficiency into epidermis (%)	Incorporation efficiency into dermis (%)	Permeation ratio (%)
Resveratrol (MESL)	0.19	0.45	0.018
Resveratrol (METw80-w)	0.010	0.031	0.00085
Chlorogenic acid (MESL)	0.25	0.12	0.081
Chlorogenic acid (METw80-w)	0.040	0.035	0.00039

Fig. 22 より、ポリフェノールの真皮取り込み量と表皮取り込み量の比の対数値 ( $\log(D/E)$ ) を算出し、時間に対してプロットした (Fig. 23)。この分布比は MESL を用いた場合、時間の経過と共に増加し、METw80-w を用いた場合は、20 時間後にわずかに低下する傾向が見られたが、両者は一定の値に近づいた。40 時間経過後、クロロゲン酸は表皮により多く分布していたのに対し、疎水性で低分子量のレスベラトロールは真皮に多く分布していた。

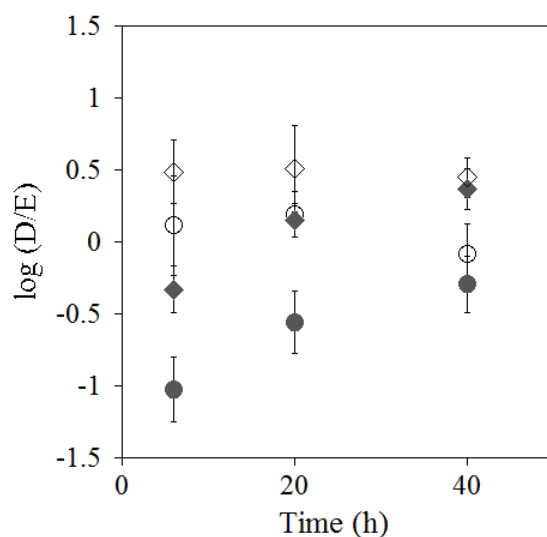


Fig. 23 レスベラトロールとクロロゲン酸の真皮取り込み量(D)と表皮取り込み量(E)の比の対数値 ( $\log(D/E)$ ) の経時的推移: ◆, MESL (レスベラトロール)、◇, METw80-w (レスベラトロール)、●, MESL (クロロゲン酸)、○, METw80-w (クロロゲン酸)

Mean  $\pm$  S.D., n=8

### 第3節 考察

本章において、ポリフェノールの皮膚デリバリーにおける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の有用性を検討した。皮膚取り込み効率を改善すると、皮膚中でポリフェノールが生理活性を示す濃度に少ない適用量で到達することができることから、製剤中の配合量を少なく抑えることができる。MESLは、疎水性のレスベラトロール、親水性のクロロゲン酸の両ポリフェノールの取り込み効率を、METw80-wと比較して顕著に改善した。

MESLを用いることで高い取り込み効率を得られた理由として、幾つかの可能性が挙げられる。第1章、第3節の式(1)より、薬物の皮膚への取り込み速度は拡散係数( $D$ )、分配係数( $K$ )、薬物濃度( $C_v$ )によって決定される。MESLによるポリフェノールの皮膚への取り込みの促進機構としては、マイクロエマルジョン中のショ糖ラウリン酸エステルの一部が皮膚へと浸透し、角質層中で角層細胞あるいは、角質層脂質と相互作用したことで、角質層の流動性が増大し、ポリフェノールの皮膚中への取り込みと皮膚中での拡散を促進したことが考えられる<sup>47,54)</sup>。また、ショ糖ラウリン酸エステルのショ糖部分が角質層の水和に寄与することが報告されていることから、水和によるバリア能の低下も関与しているものと考えられる<sup>55)</sup>。更にMETw80-wと比べMESLはポリフェノールの溶解度が低いにもかかわらず皮膚への取り込みを増大させたことから、薬物濃度の上昇に伴う見かけの分配係数の低下が小さかったものと推測される。またTable 4より、MESLの粘度はMETw80-wより低く、薬物のvehicle中での拡散と薬物の皮膚表面への接触に有利であったことも考えられる<sup>29)</sup>。これらの要素が総合的にポリフェノールの浸透促進作用に寄与していると考えられるが、詳細な機構を明らかにするためには更なる検討が必要である。

本章において、両ポリフェノールが真皮へと移行することを明らかにしたが、特にレスベラトロールの真皮への移行性が高かった。この結果は、第2章において、エアロゾルOTを用いて調製したMEAOTを利用した時と同様であった。このレスベラトロールの特性は、真皮においてMMP阻害作用を示す上で好ましいと考えられる。本章における実験条件下では、レスベラトロールの皮膚透過量はごくわずかであったが、疎水性の高いレスベラトロールは、水に富む真皮マトリックス中を拡散しにくく、また真皮中に存在するタンパク質、特に多量に存在するアルブミンと結合することにより、真皮中の移行速度が低下したことが考えられる<sup>56,57)</sup>。

#### 第4節 小括

シヨ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レスベラトロールとクロロゲン酸の皮膚デリバリー効率の改善と両ポリフェノールの皮膚中分布を検討した結果、以下の結論を得た。

1. シヨ糖ラウリン酸エステルを用いて調製した **MESL** は、溶解性改善効果は **Tween 80** を用いて調製した **METw80-w** より低いながら、親油性のレスベラトロール、親水性のクロロゲン酸のいずれについても皮膚取り込み量及び皮膚取り込み効率を顕著に改善した。改善効果は、特にレスベラトロールにおいて大きかった。
2. **MESL** を用いた場合、クロロゲン酸は、表皮への分布が多かったが、レスベラトロールは真皮中に多く分布した。

以上より、シヨ糖ラウリン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンは親油性のレスベラトロール、親水性のクロロゲン酸のいずれについても皮膚取り込み効率を顕著に改善し、特に、分子量が小さく疎水性のレスベラトロールを真皮に効率的に送達した。

## 第4章 ショ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー効率の改善

### 第1節 緒言

第3章において、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を利用することで、レスベラトロールの皮膚デリバリー効率が顕著に改善することを示した。本章では、更なるデリバリー効率の改善と生体適合性の向上を目的として、より鎖長の長い脂肪酸で構成されるショ糖脂肪酸エステルを用いてマイクロエマルジョンを調製し、レスベラトロールのデリバリー能を評価した。検討に用いたショ糖脂肪酸エステルをTable 7に示す。まず、擬三成分相図を作成して、マイクロエマルジョンの組成を決定し、それらのマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリーをユカタンマイクロピッグの皮膚を用いて評価した。次に、最もデリバリー能が高かったマイクロエマルジョンについて、適用時間あるいは適用濃度を変化させ、取り込み量の変化を検討した。更に、このマイクロエマルジョンの浸透促進効果が高くなった要因を検討するために、マイクロエマルジョンと皮膚との相互作用及びマイクロエマルジョンの構成成分の浸透を評価した。

Table 7 ショ糖脂肪酸エステルの種類

---

ショ糖ラウリン酸エステル (SL; RYOTO® Sugar Ester L-1695)
ショ糖ミリスチン酸エステル (SM; RYOTO® Sugar Ester M-1695)
ショ糖パルミチン酸エステル (SP; RYOTO® Sugar Ester P-1570)
ショ糖ステアリン酸エステル (SS; RYOTO® Sugar Ester S-1570)
ショ糖オレイン酸エステル (SO; RYOTO® Sugar Ester O-1570)

---

## 第 2 節 結果

### 第 1 項 ショ糖脂肪酸エステルを用いたマイクロエマルジョンの調製

ショ糖脂肪酸エステルを界面活性剤、エタノールあるいは 1-プロパノールを補助界面活性剤、IPM を油相、水を水相として用いた擬三成分相図を Fig. 24 に示す。ショ糖脂肪酸エステルの脂肪酸の炭素数が増加するほど水溶性が低下することから<sup>46)</sup>、油相の多い組成のマイクロエマルジョンの調製を検討した。

一相領域の面積は、ショ糖脂肪酸エステルの脂肪酸の炭素数が増加するにつれて、増大した (SL<SM<SP<SO) が、SS は 25°C で IPM 及び水に溶解しなかったため、一相領域は得られなかった。SO を用いた時に最も一相領域が拡大した (Fig. 24(d))。また、補助界面活性剤をエタノールから 1-プロパノールに変更すると、さらに一相領域が拡大した (Fig. 24(e),(f))。相図に基づくこれらの結果より、界面活性剤／補助界面活性剤相の含量が少ない組成となるよう、Table 8 に示す 4 種のマイクロエマルジョンを選択した。また、比較対象として、第 3 章で用いた水相の多い組成の MESL を以降の検討に使用した。

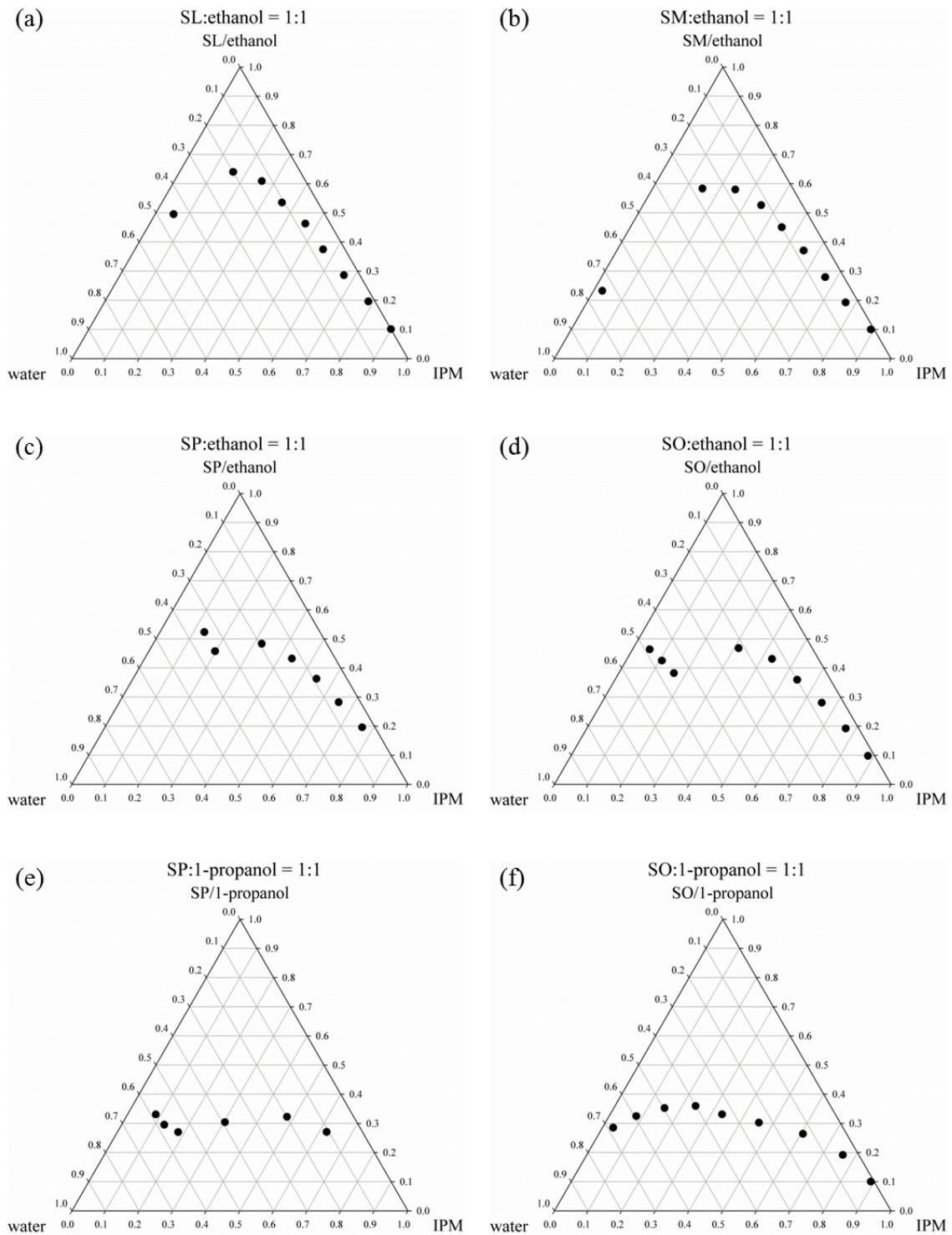


Fig. 24 ショ糖脂肪酸エステルを界面活性剤として用いた系の擬三成分相図  
 (a) SL/ethanol, (b) SM/ethanol, (c) SP/ethanol, (d) SO/ethanol, (e) SP/1-propanol,  
 (f) SO/1-propanol



Table 8 ショ糖脂肪酸エステルを用いたマイクロエマルジョンの組成

Vehicle	Surfactant		Co-surfactant		Oil phase	Aqueous phase
	SP	SO	EtOH	PrOH	IPM	Water
MESP-E	15		15		65	5*
MESP-P	15			15	65	5*
MESO-E		15	15		65	5
MESO-P		15		15	65	5

(質量%)

\*SPは溶解性が低いため、マイクロエマルジョンの安定性向上のために水相に0.5%のグリチルリチン酸二カリウムを添加した

粘度については、いずれのマイクロエマルジョンも、MESL (Table 4) よりわずかに高いものの、これまで用いたマイクロエマルジョンの中では低く、ほぼ同程度の値を示した (Table 9)。

Table 9 MESP-E、MESP-P、MESO-E、MESO-Pの粘度

Vehicle	Viscosity (mPa·s)
MESP-E	10.09 ± 0.14
MESP-P	9.84 ± 0.042
MESO-E	9.81 ± 0.11
MESO-P	9.50 ± 0.28

Mean ± S.D., n=4

第2項 ショ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールの皮膚デリバリー

Table 7 に示した各 vehicle に 10 mM のレスベラトロールを溶解させ、20 時間適用した場合の、表皮取り込み量、真皮取り込み量、レセプターセルへの透過量を比較検討した。対照として用いた MESL と比較して、新たに調製したショ糖脂肪酸エステルマイクロエマルジョンはいずれもレスベラトロールの取り込みを顕著に増大させた。特に、SO とエタノールを用いた MESO-E における増加が大きく、総取り込み量は MESL と比較して約 5 倍高く、他のマイクロエマルジョンと比較しても、有意に高い値を示した (Fig. 25)。

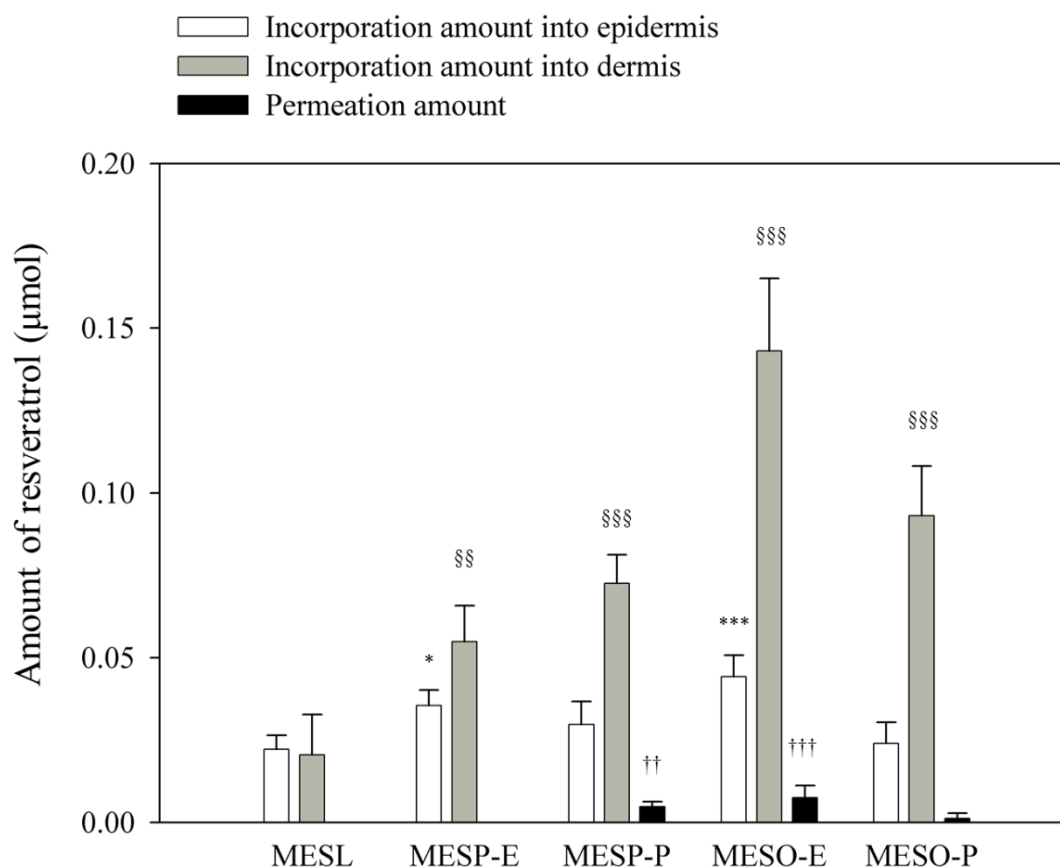


Fig. 25 MESL、MESP-E、MESP-P、MESO-E、MESO-P を用いてユカタンマイクロピッグ皮膚に 20 時間適用後のレスベラトロールの表皮取り込み量、真皮取り込み量及び透過量

Mean ± S.D., n=4-8,

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*  $p < 0.05$  (MESL の表皮取り込み量と比較),

\$\$\$  $p < 0.001$ , \$\$  $p < 0.01$  (MESL の真皮取り込み量と比較),

+++  $p < 0.001$ , ++  $p < 0.01$  (MESL の皮膚透過量と比較)

MESO-E を用いてレスベラトロールの表皮、真皮への取り込み、レセプター溶液への透過を経時的に観察した結果を Fig. 26 に示す。比較として MESL を用いた。MESO-E を用いると、多量のレスベラトロールが皮膚へと取り込まれ、6 時間適用後には、真皮まで浸透していた。更に、いずれの時点でも真皮への取り込み量は表皮への取り込み量より大きかった。一方、20 時間経過後もわずかしか透過は見られなかった。

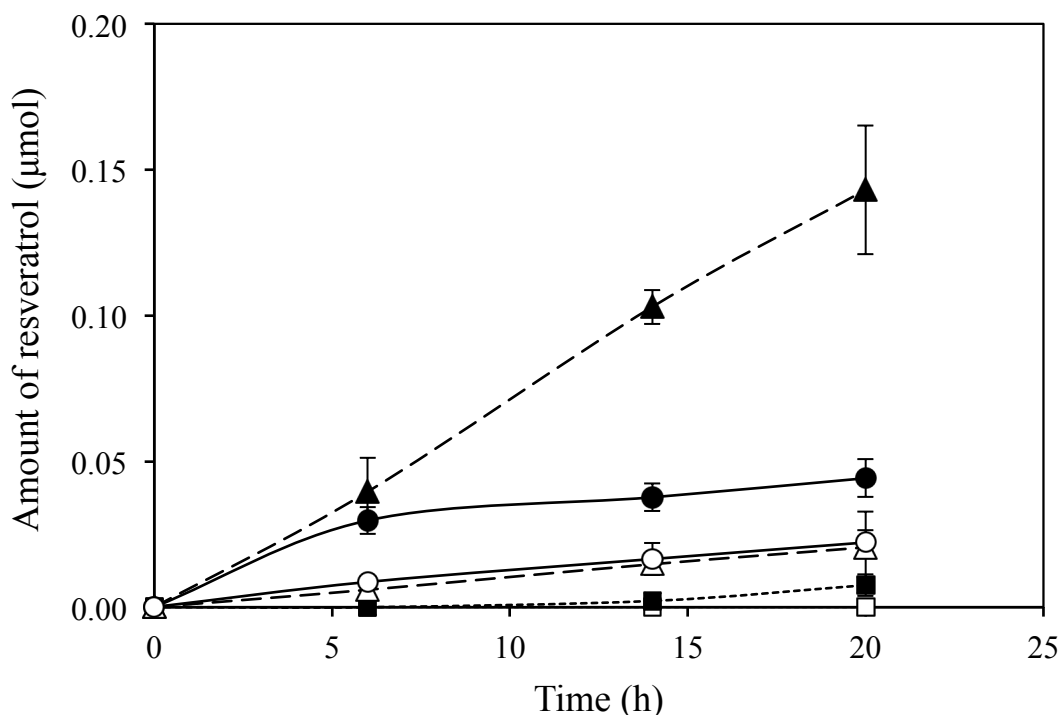


Fig. 26 MESO-E、MESL を用いた時のレスベラトロールの表皮、真皮取り込み量及びレセプターセルへの透過量の経時変化

MESO-E 表皮 (●—●)、MESL 表皮 (○—○)、  
 MESO-E 真皮 (▲---▲)、MESL 真皮 (△---△)、  
 MESO-E 透過量 (■-----■)、MESL 透過量 (□-----□)

Mean ± S.D., n=4-8

次に MESO-E を用いて適用濃度を変化させた時の、20 時間経過後のレスベラトロールの表皮、真皮への取り込み量及び透過量を Fig. 27(a) に示す。低濃度では、適用濃度の増加に伴い、表皮、真皮における取り込み量が増加したが、30 mM を超えると、ほぼ一定の値を示した。MESO-E による総取り込み量の最大値は、MESL の約 11 倍であった (Fig. 25、Fig. 27(a))。一方、MESO-E による取り込み効率率は、適用濃度の増加に伴い減少し、最大値は、5 mM の時の約 2.2% であった (Fig. 27(b))。

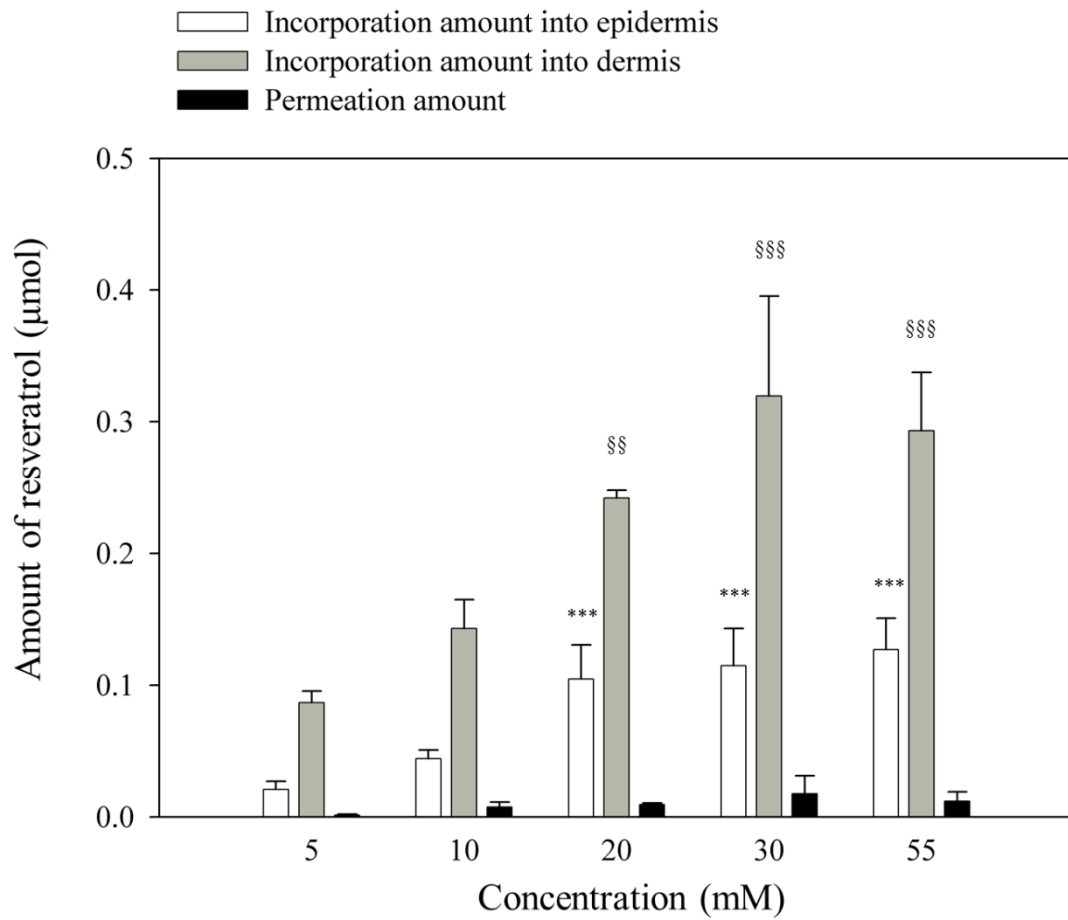


Fig. 27(a) MESO-E を用いて、適用濃度を変化させたときの 20 時間後の表皮  
取り込み量、真皮取り込み量及びレセプターセルへの透過量

\*\*\*  $p < 0.001$  (10 mM 適用時の表皮取り込み量と比較) ,

\*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  (10 mM 適用時の真皮取り込み量と比較)

Mean  $\pm$  S.D., n=4-8

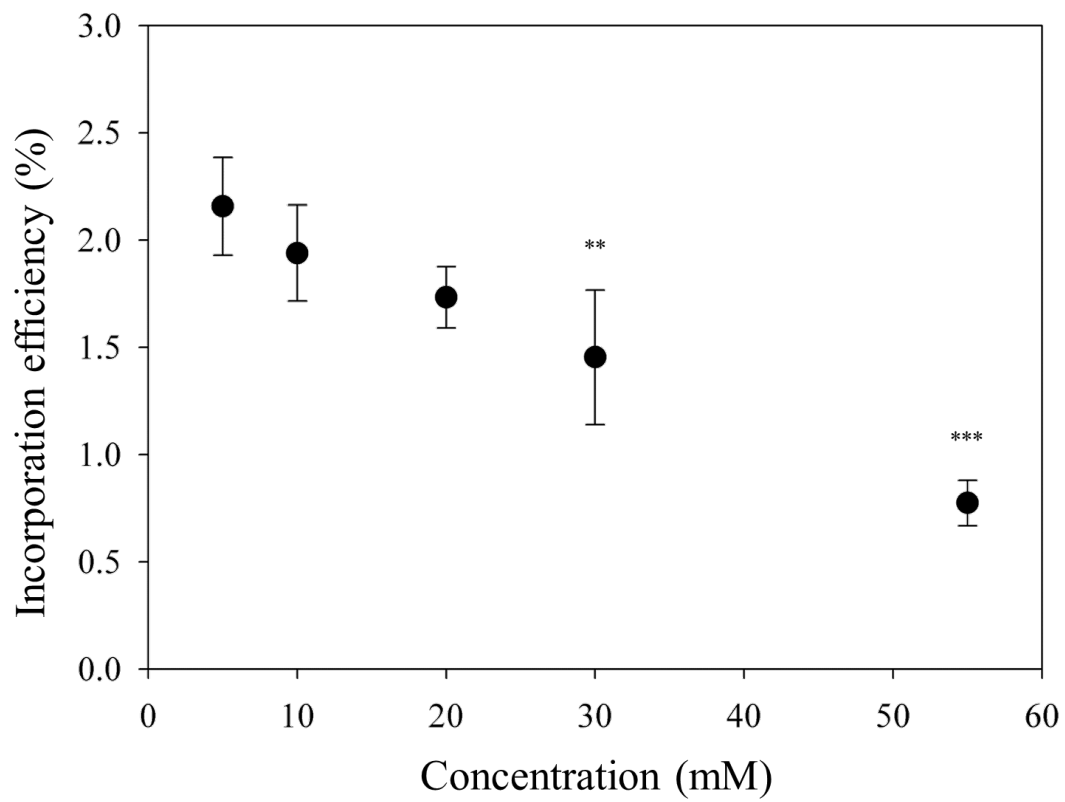


Fig. 27(b) MESO-E を用いて、適用濃度を変化させたときの 20 時間後の  
総取り込み効率

Mean  $\pm$  S.D., n=4-8

\*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  (10 mM 適用時の総取り込み率と比較)

### 第3項 ショ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによる浸透促進機構の検討

MESO-E の浸透促進効果が、他のマイクロエマルジョンと比較して高かった要因を検討するため、マイクロエマルジョンを皮膚に前処理した場合に浸透促進効果が見られるかどうかを検討した。マイクロエマルジョンを前処理することで、vehicle-皮膚間の相互作用による取り込みの促進を評価することができる<sup>58)</sup>。

Fig. 28 に各 vehicle で 2 時間前処理後、10%エタノール溶液にレスベラトロールを懸濁させ適用した時の表皮取り込み量、真皮取り込み量、レセプターセルへの透過量を示す。コントロールとして用いた NaCl aq と比較して、油相の多い MESP-E、MESO-E、MESO-P を前処理した場合に、取り込み量はわずかに増加する傾向が見られ、MESO-E で処理した場合に取り込み量が最も増大した。以上より、マイクロエマルジョン自体と皮膚との相互作用が MESO-E による浸透促進の一因であることが示された。

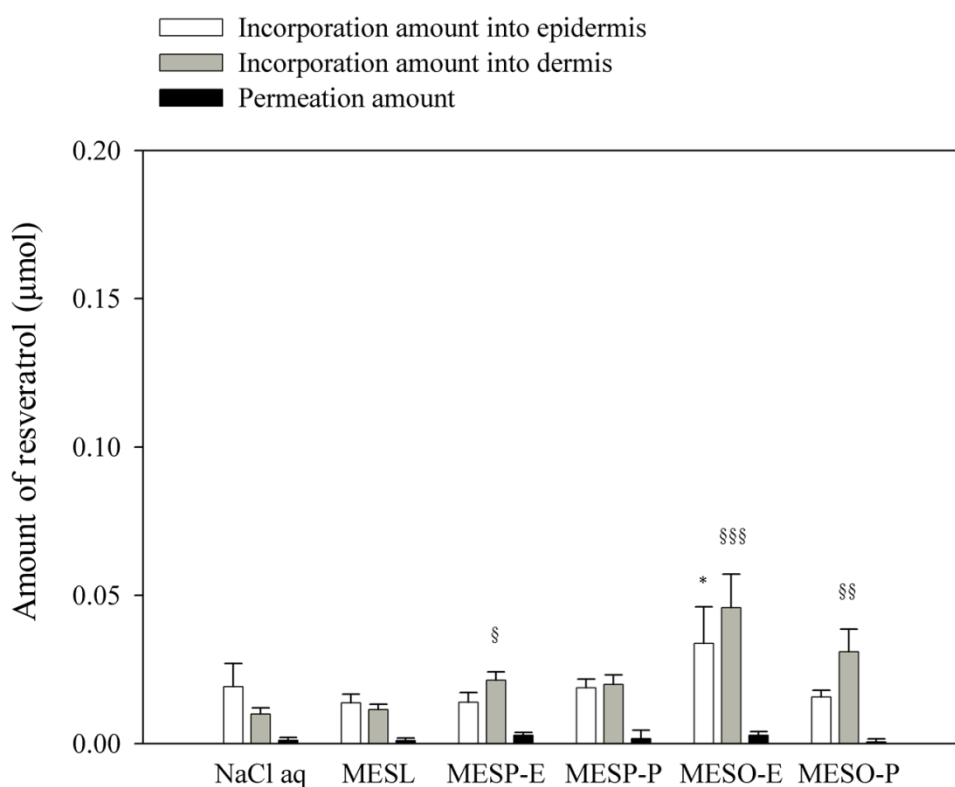


Fig. 28 NaCl aq、MESL、MESP-E、MESP-P、MESO-E、MESO-P で 2 時間前処理後、レスベラトロールを懸濁した 10%エタノール溶液を 20 時間適用した場合の表皮取り込み量、真皮取り込み量、レセプターセルへの透過量

\* $p < 0.05$  (NaCl aq の表皮取り込み量と比較) ,  
 $§§§ p < 0.001$ ,  $§§ p < 0.01$ ,  $§ p < 0.05$  (NaCl aq の真皮取り込み量と比較)

次に、MESO-E を 20 時間適用後の角質層の構造変化を ATR-FTIR スペクトルにより評価した<sup>54,55)</sup>。コントロールとして、NaCl aq、MESL、IPM、エタノールを用いた。未処理の皮膚のスペクトル(a)と比較して、各 vehicle 適用後、角質層のバリア能に関与するとされている角質層脂質アルキル鎖由来の 2920 及び 2850  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークあるいは、アミド由来の 1650 及び 1550  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークに大きな変化は見られなかったことから、適用後も角質層のバリア能は保持されていることが示唆された (Fig. 29(a))。

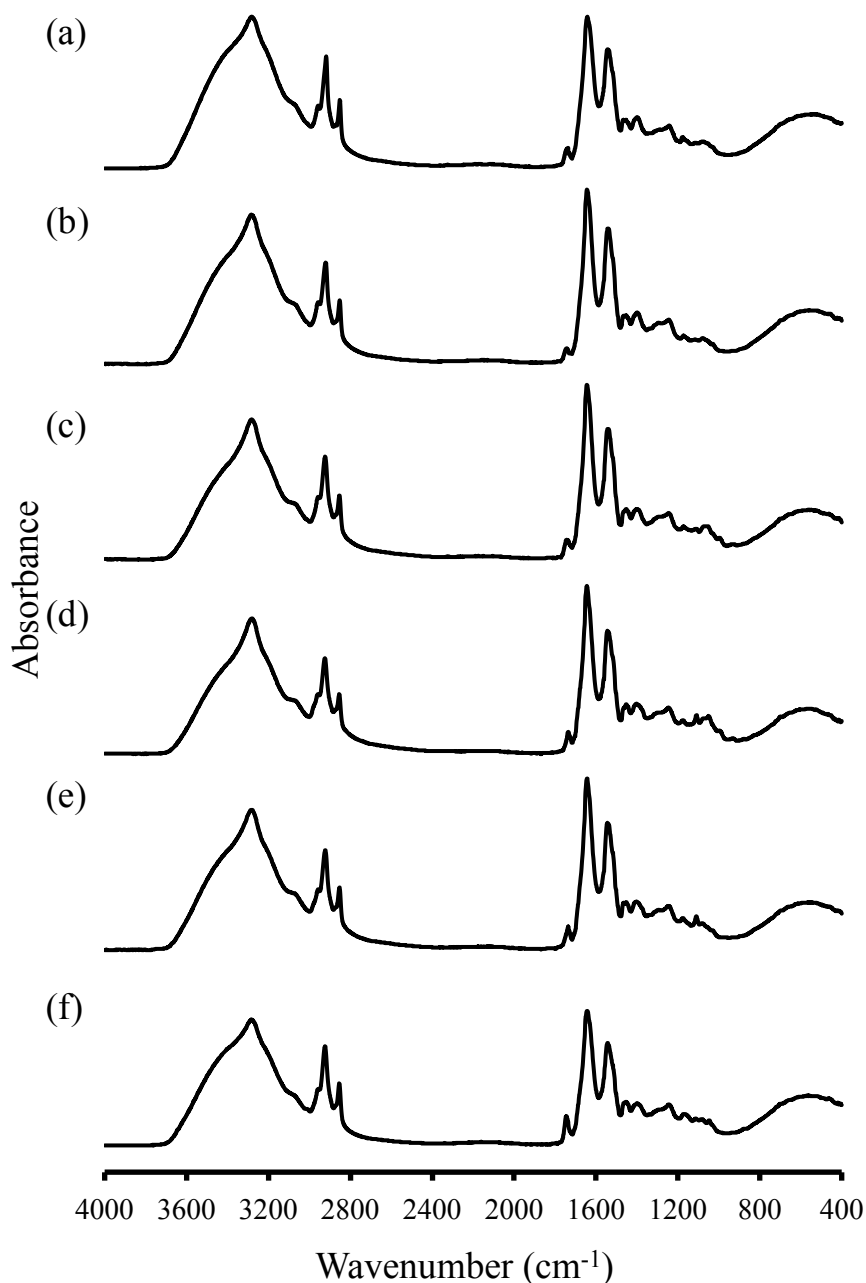


Fig. 29(a) 皮膚表面の ATR-FTIR スペクトル (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ) : (a) 未処理, (b) NaCl aq 適用, (c) MESL 適用, (d) MESO-E 適用, (e) IPM 適用, (f) エタノール適用

一方、MESO-E 適用後のスペクトル(d)において、1150-1000  $\text{cm}^{-1}$ に 2 つの特徴的なピークが見られた。1110  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークは、IPM 適用後のスペクトル(e)、1050  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークは、エタノール適用後のスペクトル(f)において、同様のピークが認められたことから、MESO-E 適用後の皮膚において、IPM 及びエタノールの浸透が示唆された (Fig. 29(b))。

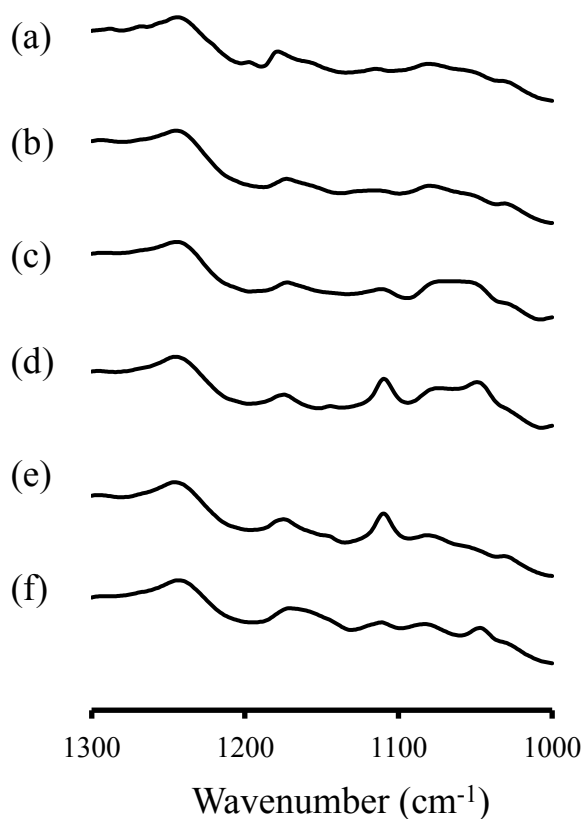


Fig. 29(b) 皮膚表面の ATR-FTIR スペクトル (1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) : (a) 未処理, (b) NaCl aq 適用, (c) MESL 適用, (d) MESO-E 適用, (e) IPM 適用, (f) エタノール適用

次に、MESO-E 中のショ糖モノオレイン酸エステル<sup>1)</sup>の皮膚への取り込みを検討した。10 mM のレスベラトロールを溶解させた MESO-E を 20 時間適用したところ、vehicle 中から約 0.027%、あるいは約 0.0034%のショ糖モノオレイン酸エステルがそれぞれ表皮、真皮に取り込まれていた。透過率は、真皮取り込み率の約 1/400 程度であり、ほとんど透過は見られなかった。これらの数値は、レスベラトロールの表皮取り込み率約 0.44%、真皮取り込み率約 1.42%、透過率約 0.082%と比較しても非常に小さかった。



### 第3節 考察

ショ糖オレイン酸エステル、エタノール、IPM、水を用いて調製した MESO-E は、非常に高いレスベラトロールの皮膚取り込み効率を示した。取り込み効率の最大値である 2.2% は、濃度、時間等の適用条件は異なるが、第3章で用いた METw80-w の約 80 倍、MESL の約 5 倍高い値である。この要因を検討するため、MESO-E と皮膚との相互作用、MESO-E の構成成分の皮膚への浸透を評価した。MESL と比較して、油相である IPM を多く含む MESP-E、MESP-P、MESO-E、MESO-P で総取り込み量が顕著に増大したこと (Fig. 25) 及び MESO-E の ATR-FTIR スペクトル (Fig. 29) において IPM の浸透を示唆するピークが認められたことから、IPM が角質層中に浸透したことにより、疎水性のレスベラトロールの皮膚への分配が高まったものと考えられる。また、MESP-E、MESP-P と比較して、MESO-E、MESO-P において有意な取り込みの増加が見られたこと (Fig. 25) 及び少量のショ糖モノオレイン酸エステルが皮膚に取り込まれており、その大部分は表皮に局在したことから、皮膚に取り込まれた界面活性剤と角質層脂質とが混合され、脂質の流動性が増大し、レスベラトロールの角質層中での拡散が促進されたものと考えられる。ショ糖脂肪酸エステルは、長鎖炭化水素が、角質層脂質二重層間に挿入されると考えられるが<sup>54)</sup>、特にオレイン酸エステルは、*cis* 二重結合を有することにより、細胞間脂質の流動化を一層促進したものとみられる<sup>59)</sup>。しかしながら、MESO-E 適用後の ATR-FTIR スペクトルより、ユカタンマイクロピッグの角質層構造には大きな変化が見られなかったことから、脂質構造への影響はさほど大きくないと考えられる。また、同スペクトルより、エタノールの浸透が示唆された。エタノールは、また、一般的に用いられる浸透促進剤である<sup>60)</sup>。脂肪酸の促進効果は、vehicle に強く影響されることが報告されていることから<sup>59)</sup>、これらの成分の浸透による相乗作用が、MESO-E による高い取り込み効率をもたらしたものと推定される。

MESO-E を用いたとき、レスベラトロールは主に真皮に分布しており、これは、第2章及び第3章で用いた他のマイクロエマルジョンの結果と一致していた。マイクロエマルジョンの構成成分の浸透にかかわらず、ユカタンマイクロピッグ皮膚における表皮、真皮間の薬物分布は、分子量や疎水性といった薬物の特性に依存していることが示唆された。

また、MESO-E を用いたときのレスベラトロールの皮膚への取り込みは、適用濃度が増加するにつれて増大したが、取り込み効率は逆に減少した。この要因としては、第3章でも述べたようにレスベラトロールの真皮中での移行速度が遅いため、皮膚中への取り込みがある程度上昇すると、取り込みに飽和が見られることが考えられる。したがって、取り込み効率の観点からは、同一の取り込み量が得られる 30 mM 以上の濃度領域では、より低い濃度で適用することが望ましい。

#### 第4節 小括

シヨ糖オレイン酸エステルを用いたマイクロエマルジョンによるレスベラトロールのデリバリー効率の改善と、MESO-Eによる浸透促進効果について検討した結果、以下の結論を得た。

1. シヨ糖オレイン酸エステルとエタノールを用いた調製したMESO-Eは、レスベラトロールの取り込み効率の改善に最もすぐれ、最大取り込み効率約2.2%を得た。
2. MESO-Eによる高い促進効果の一因として、構成成分の浸透によるレスベラトロールの角質層への分配性増大と角質層中での拡散の促進が示唆された。

以上より、シヨ糖オレイン酸エステルとエタノールを用いたMESO-Eを用いることで、レスベラトロールを皮膚、特に真皮に更に効率的に送達できることが示された。また、MESO-Eは角質層構造に大きな影響を与えることなく、皮膚デリバリーを促進しているものと推定された。

## 総 括

本研究において、皮膚の光老化防御を目的としたポリフェノールの皮膚デリバリーシステムとしてのマイクロエマルジョンの有用性を検討した結果、以下の知見を得た。

1. Polysorbate を用いて調製したマイクロエマルジョン (METw80-o) は、ポリフェノールの溶解特性に優れ、親油性ポリフェノールであるレスベラトロールの溶解度を著しく増大させ、水性懸濁液及び油性懸濁液と比較して、皮膚デリバリーを改善した。Polysorbate の中で、親油基、親水基が共に大きい Tween 85 を用いることで、多量の水、油を取り込むことが可能となり、補助界面活性剤であるエタノール含量の少ないマイクロエマルジョンを調製することができた。また、このマイクロエマルジョンをゲル化した ME gel を用いて、レスベラトロールを皮膚に適用することで、UV 照射による皮膚の酸化障害を効果的に防御できることを示した。
2. エアロゾル OT を用いて調製したマイクロエマルジョン (MEAOT) は、ポリフェノールの溶解性は polysorbate を用いたマイクロエマルジョン (METw80-o) より低い、親油性ポリフェノールであるレスベラトロール、クルクミンの皮膚デリバリーの改善効果は METw80-o より顕著に高かった。しかしながら、この改善効果は、エアロゾル OT が皮膚に浸透したことによるバリア能の低下による可能性が考えられ、マイクロエマルジョンの成分選択の際には、構成成分の皮膚への浸透を考慮する必要があることを示した。一方、ヒトの皮膚に構造が類似したユカタンマイクロピッグの皮膚を用いて、分子量の異なる 3 種の親油性ポリフェノールの皮膚への浸透を検討した結果、分子量の小さなものほど真皮への移行性が高い傾向が得られ、レスベラトロールが真皮を標的としたデリバリーに適していることを示した。
3. 生体適合性に優れたショ糖ラウリン酸エステルを用いて調製したマイクロエマルジョン (MESL) は、polysorbate を用いたマイクロエマルジョン (METw80-w) より溶解性は低い、親油性のレスベラトロール、親水性のクロロゲン酸のいずれについても皮膚移行性を改善し、高い皮膚取り込み効率を示した。この要因として、ショ糖ラウリン酸エステルが皮膚へ取り込まれたことによるポリフェノールの拡散の促進や MESL がポリフェノールの皮膚中への分配性の改善効果にすぐれていること、MESL が低粘度であることなどが関与していると考えられる。MESL は、特にレスベラトロールを真皮に効率よく送達し、親水性でより分子量の大きなクロロゲン酸は表皮により多く分布した。

4. ショ糖オレイン酸エステルとエタノールを用いて調製したマイクロエマルジョン (MESO-E) を利用することで、レスベラトロールの皮膚取り込み効率を更に改善することに成功した。MESO-E による高い浸透促進効果の一因として、構成成分の浸透によるレスベラトロールの角質層への分配性増大と角質層中での拡散の促進が示唆された。また、MESO-E は角質層構造に大きな影響を与えることなく、皮膚デリバリー促進作用を示すことが明らかとなった。この要因として、MESO-E 中の界面活性剤の皮膚浸透性が低いことが考えられた。

以上の検討結果より、マイクロエマルジョンによるポリフェノールの皮膚デリバリーの促進効果は、マイクロエマルジョン中の界面活性剤の性質に大きく影響されることがわかった。また、生体適合性に優れたショ糖脂肪酸エステルの中で、特にショ糖オレイン酸エステルを用いて調製したマイクロエマルジョンは、多量のレスベラトロールを効率よく真皮に送達することができ、光老化防御を目的とした使用に好適であることが示された。

これらのマイクロエマルジョンは、特殊な調製技術を必要とせず、安定性にも優れている。また、親油性、親水性の両薬物の溶解性を改善し、親油性薬物だけでなく、通常角質層を通過しにくいと考えられている親水性薬物の皮膚デリバリーの改善作用を示した。したがって、今後、化粧品、医薬部外品をはじめ医薬品等、広く外用製剤として、様々な低分子量の薬物の皮膚デリバリーや経皮吸収に応用可能であると考えられる。

## 実験の部

### 第 1 章の実験

#### 1.1 溶解度測定

##### 1.1.1 試料

レスベラトロール、*trans*-フェルラ酸は、東京化成工業(株)から購入した。Tween 80、Tween 85、エタノール、IPM、塩化ナトリウムはナカライテスク(株)から購入した。

##### 1.1.2 マイクロエマルジョンの調製

水相、油相、界面活性剤、補助界面活性剤を所定の割合で蓋付き試験管に加え、室温で混合して調製した。

##### 1.1.3 溶解度測定<sup>12,13,33)</sup>

各 vehicle に、過量のレスベラトロールを添加し、37 °C 水浴中で 20 時間保温した。遠心 (12,000×g, 1 min) 後、上澄みを 100 μL 採取し、サンプル管に内標準溶液 30 μL、移動相 200 μL と共に加えて、レスベラトロール濃度を HPLC により測定した。

##### 1.1.4 HPLC 分析

HPLC 装置は、第 1 項においては、L-6000 Pump、L-7200 Autosampler、L-4000 UV detector、L-7300 Column oven (いずれも HITACHI) を、第 2 項においては、L-2130 Pump、L-2200 Autosampler、L-2420 UV-VIS detector、L-2300 Column oven (いずれも HITACHI) を用いた。

レスベラトロールの濃度を以下の条件で測定した。

カラム： Mightysil RP-18 GP, 3.0 mm i.d., 150 mm (5 μm) (関東化学(株))

カラム温度： 40°C

移動相： メタノール:超純水:リン酸=70:130:1 混液

検出波長： 305 nm

内標準物質： *trans*-フェルラ酸

#### 1.2 皮膚デリバリー実験

##### 1.2.1 試料溶液

第 1 項においては、各 vehicle に過量のレスベラトロールを添加し、試料溶液とした。METw80-o については、Table 1 に示した濃度のレスベラトロールを添加し、試料溶液とした。第 3 項においては、マイクロエマルジョン及びマイクロエマルジョンゲルに 200 mM のレスベラトロールを溶解させたものを試料とした。

## 1.2.2 緩衝液の調製

リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4) を以下の通り調製した。

1 液 : 150 mM NaCl 水溶液 + 10 mM リン酸水素二ナトリウム溶液

2 液 : 150 mM NaCl 水溶液 + 10 mM リン酸二水素ナトリウム溶液

1 液と 2 液を混合して、pH7.4 に調整した。

## 1.2.3 皮膚の調製

### 1.2.3.1 モルモット背部摘出皮膚

第 1 項の実験では、神戸薬科大学動物実験指針に従い、Hartley 系モルモット 3 週齢雄 (日本 SLC(株)より購入) をペントバルビタールナトリウム (Somnopentyl® (共立製薬(株))) で麻酔後、バリカンで除毛し、背部皮膚を摘出した。摘出した皮膚の皮下脂肪を除去した後、直径 2.4 cm の円形にくりぬき、フリーザーで冷凍保存して、1 カ月以内に使用した。皮膚は使用前に PBS に浸して室温に戻した。

第 3 項及び第 4 項の実験においては、Hartley 系モルモット 4 週齢雄の背部をあらかじめバリカンで剃毛した後、摘出し、皮下脂肪を除去した皮膚を、日本 SLC(株)より購入し、同様に使用した。

### 1.2.3.2 ユカタンマイクロピッグ皮膚

-80°C で保存しているユカタンマイクロピッグ 5 カ月齢雌皮膚 (日本チャールス・リバー(株)より購入) を、皮下脂肪面を上に向けて室温で約 15 分間放置し、半解凍状態になったところで、皮下脂肪を除去した<sup>31)</sup>。一辺が約 2.4 cm の四角形に切り取り、直後に使用した。

### 1.2.4 フランツ型拡散セルを使用した皮膚デリバリー実験<sup>12,13,33)</sup>

フランツ型拡散セル (容積約 4.5 mL、口径約 0.64 cm<sup>2</sup>、Fig. 30) にモルモット背部摘出皮膚あるいはユカタンマイクロピッグ皮膚の角質層がドナー側に向くように装着させ、NaCl aq を 2 時間、前適用した。皮膚を洗浄後、ドナー側にはポリフェノールを溶解させた試料 1 mL (第 1 項の実験においては、モルモット皮膚の場合 0.5 mL) を、レセプター側には PBS (pH 7.4) を満たし、37°C でモルモット皮膚の場合は 20 時間、ユカタンマイクロピッグ皮膚の場合は 40 時間適用した。その後、皮膚を取り出し、氷冷メタノールで 3 回洗浄した。その後、皮膚をハサミで細かく刻み、メタノール 10 mL 中に加え Polytron PT3100 (Kinematica) を用いて、5,000 rpm で 1 分間ホモジェナイズし、皮膚に取り込まれたポリフェノールをメタノール中に抽出した。その後サンプルを遠心し、上澄み液中のポリフェノール濃度を、HPLC を用いて測定した。また、20 時間適用後のレセプター溶液を採取し、遠心後、上澄み液を採取し、同様に、皮膚を透過したポリフェノール濃度を測定した。

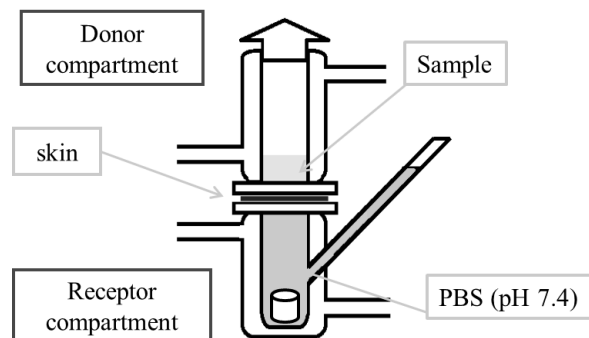


Fig. 30 フランツ型拡散セル

### 1.2.5 HPLC 分析

第 1 項においては、1.1.4 に記載している第 1 項の方法と同様の方法で行った。また、第 3 項においては、1.1.4 に記載している第 2 項の方法と同様の方法で行った。

## 1.3 擬三成分相図

### 1.3.1 試料

Tween 20、Tween 40、Tween 80、Tween 60、Tween 85、エタノール、IPM、塩化ナトリウムはナカライテスク(株)より購入した。Tween 21、Tween 61、Tween 65 はクロージャパン(株)より提供を受けたものを使用した。

### 1.3.2 擬三成分相図の作成

界面活性剤と補助界面活性剤の割合を 1:1、あるいは 3:1 に固定し、界面活性剤／補助界面活性剤／油相混合物の質量比が 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 ((界面活性剤／補助界面活性剤) : 油相) で全量 1 g になるように調製した。この溶液に、水相を 10  $\mu$ L ずつ滴下し、混和した。この操作を透明な溶液が半透明になるか濁るまで行い、その時の質量比を相図上にプロットした。また、一相領域の全体像を確認するため、界面活性剤／補助界面活性剤／水相の混合物についても調製し、一相領域の境界を調べた。

## 1.4 マイクロエマルジョンゲルの調製

200 mM のレスベラトロールを溶解させた METw 85 をスナップカップに加え、スターラーで攪拌しながら 6.5% の AEROSIL<sup>®</sup>200 (日本アエロジル(株)より購入) を徐々に添加した。約 1 時間攪拌後、均一な一相の ME gel を得た。

## 1.5 脂質過酸化抑制試験

### 1.5.1 試薬

2-チオバルビツール酸は、ナカライテスク(株)から購入した。塩化カリウム、硫酸アンモニウム鉄(II)六水和物、クエン酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸、ブチルヒドロキシトルエン (BHT)、塩化鉄(III)六水和物、n-ブタノール、ピリジンは、和光純薬工業(株)から購入した。

### 1.5.2 緩衝液の調製

酢酸緩衝液 (pH 3.5) を以下の通り調製した。

1液 : 3.5 M 酢酸溶液

2液 : 3.5 M 酢酸ナトリウム溶液

1液と2液を混合して、pH 3.5 に調整した。

### 1.5.3 デリバリー実験

1.2.4 と同様の方法で、容積 4.6 mL、口径 0.83 cm<sup>2</sup> のフランツ型拡散セルを用いて行った。試料として 200 μmol のレスベラトロールを含む ME gel を用いて 20 時間適用した。また、コントロールとして、レスベラトロールを含まない ME gel を用いた。氷冷メタノール中で 3 回洗浄後、秤量した。その後、皮膚をハサミで細かく刻み、1.15% KCl 水溶液 10 mL 中に加え Polytron PT3100 (Kinematica) を用いて、5,000 rpm で 1 分間ホモジェナイズした。

### 1.5.4 チオバルビツール酸試験<sup>12,13)</sup>

約 0.2 mg のタンパクを含む試料溶液 1.0 mL を 12 mL のねじ栓付き試験管に加え、そこに 5 mM 硫酸アンモニウム鉄(II)溶液 10 μL、200 mM クエン酸ナトリウム溶液 10 μL を添加して 37°C の水浴中に 30 分間静置した。その後、8.1% SDS 溶液 0.20 mL、pH 3.5 酢酸緩衝液 1.5 mL、0.8% BHT 酢酸溶液 50 μL、0.8% TBA 水溶液 1.5 mL、5 mM FeCl<sub>3</sub> 溶液 0.7 mL をこの順に加え、密栓してよく振り混ぜた。次に密栓した状態のまま、5°C で 60 分間静置し、その後 60°C で 60 分間加熱した。室温で放冷後、超純水 1.0 mL、ブタノール-ピリジン (30:2) 混液 5.0 mL を加え、密栓して振り混ぜた。1,670 ×g で 10 分間遠心後、上澄み液の 532 nm における吸光度 A を測定した。別に、ホモジェナイズした試料を含まない対照液について同様の操作を行い、上澄み液の吸光度 A<sub>0</sub> を測定した。

### 1.5.5 試料溶液中のタンパク定量

#### 1.5.5.1 試薬

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)、Polyoxyethylene (10) Octylphenyl



Ether (TritonX-100 (和光純薬工業(株))) を用いた。

#### 1.5.5.2 タンパク定量

ホモジェナイズした試料溶液中に含まれるタンパク量を BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。96 穴マイクロプレートに standard (0.4, 0.2, 0.1, 0.05 (mg/mL))、blank (超純水)、1% TritonX-100 で希釈した試料溶液を 10  $\mu$ L ずつ加え、standard、blank には 1% TritonX-100 を 10  $\mu$ L ずつ、試料溶液には超純水を 10  $\mu$ L ずつ加えた。さらに、それぞれに発色試液 200  $\mu$ L を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、マイクロプレートリーダー (Model 680, BIO-RAD) を用いて 570 nm における吸光度を測定した。

#### 1.5.6 タンパク 1 mg あたりから生成する赤色色素量 (TBA-RS 量) の算出

次式及び 1.5.5 で求めたタンパク量より、タンパク 1 mg あたりから生成する赤色色素量 (TBA-RS 量) を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{試料湿重量 1 g から生成する赤色色素量 } (\mu\text{mol}) \\ &= \frac{A - A_0}{156,000} \times \frac{5.8}{10^3} \times \frac{10^6}{\text{試料溶液 1 mL 中の皮膚質量(g)}} \end{aligned}$$

\* 156,000: 赤色色素のモル吸光係数

#### 1.6 脂質過酸化抑制率の算出

レスベラトロールを含まない ME gel を適用したときに生成した TBA-RS 量を 100% として、200  $\mu$ mol のレスベラトロールを含む ME gel を適用したときに生成した TBA-RS 量から脂質過酸化抑制率(%)を求めた。

#### 1.7 UV 照射実験<sup>13,33)</sup>

神戸薬科大学動物実験指針に従い実験を行った。UV 照射実験を行う 1 週間前に Hartley 系モルモット 4 週齢雄を搬入し、予備飼育を行った。1 週間後、モルモットの背部の毛をバリカンとシェーバーで刈り取り、微温湯に浸けて、ガーゼを用いて石鹸で垢すりを行った。24 時間後、モルモットの左背部にレスベラトロールを含まない ME gel を、右背部に 200  $\mu$ mol のレスベラトロールを含む ME gel を塗布し、この状態で 24 時間ケージ内に放置した。24 時間後、ゲルを微温湯で湿らせたガーゼでふき取り、約 5 時間置いて乾かした。照射前にモルモット背部の写真を撮り、その後モルモットを板状に張り付けて固定し、照射部以外をアルミホイルで覆って、UV 照射機に入れ、UV を 138  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> の強度で 24 分間照射した (UV-B ランプ, GL20SE (三共電気(株)))。また、照射中はアルミホイルでモルモットに目隠しをした。照射 24 時間後、肉眼観察及びモルモット背部の写真を撮り、測色計 (Color Reader CR-13 (Konica Minolta))

により  $a^*$  を測定し、UV 照射前後の皮膚の赤みの差を表す  $\Delta a^*$  値を算出した。

## 1.8 統計解析

One-way ANOVA、Tukey HSD、unpaired t-test により  $p < 0.05$  を有意差有とした。

## 第 2 章の実験

### 2.1 溶解度測定

#### 2.1.1 試料

レスベラトロール、*trans*-フェルラ酸は、東京化成工業(株)から購入した。クルクミン、ケルセチン二水和物、Aerosol OT、Tween 80、エタノール、IPM、パルミチン酸イソプロピル、塩化ナトリウムはナカライテスク(株)から購入した。

#### 2.1.2 マイクロエマルジョンの調製

1.1.2 と同様の方法で調製した。

#### 2.1.3 溶解度測定

1.1.3 と同様の方法で行い、レスベラトロール、クルクミン濃度を HPLC により測定した。

#### 2.1.4 HPLC 分析

HPLC 装置は、L-6000 Pump、L-7200 Autosampler、L-4000 UV detector、L-7300 Column oven (いずれも HITACHI) を用いた。

レスベラトロールの濃度は、1.1.4 に示した条件で測定した。

クルクミンの濃度は以下の条件で測定した。

カラム： Mightysil RP-18 GP, 3.0 mm i.d., 150 mm (5  $\mu$ m) (関東化学(株))

カラム温度： 40°C

移動相： メタノール:超純水:リン酸=120:80:1 混液

検出波長： 360 nm

内標準物質： ケルセチン

### 2.2 皮膚デリバリー実験

#### 1.2.1 試料溶液

各 vehicle に過量のレスベラトロール又はクルクミンを添加し、試料溶液とした。

## 2.2.2 緩衝液の調製

リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4) を 1.2.2 と同様の方法で調製した。

## 2.2.3 皮膚の調製

### 2.2.3.1 モルモット背部摘出皮膚

Hartley 系モルモット 3 週齢雄 (日本 SLC(株)より購入) の背部皮膚を 1.2.3.1 に示した方法で摘出し、使用した。

### 2.2.3.2 ユカタンマイクロピッグ皮膚

ユカタンマイクロピッグ 5 カ月齢雌皮膚 (日本チャールス・リバー(株)より購入) を、1.2.3.2 と同様の方法で使用した。

## 2.2.4 フランツ型拡散セルを使用した皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.5 mL、口径約 0.64 cm<sup>2</sup>) を用いて、1.2.4 と同様の方法で行った。

## 2.2.5 HPLC 分析

HPLC 装置は、L-6000 Pump、L-7200 Autosampler、L-4000 UV detector、L-7300 Column oven (いずれも HITACHI) を用いた。

レスベラトロールについては、1.1.4 に記載した条件で行った。

クルクミンについては、2.1.4 に記載した条件で行った。

## 2.3 モルモット皮膚中の分布の測定

### 2.3.1 皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.5 mL、口径約 0.64 cm<sup>2</sup>) に、1.2.3.1 に示した Hartley 系モルモット 3 週齢雄 (日本 SLC(株)より購入) の背部摘出皮膚を装着し、ポリフェノールを溶解させた各 vehicle を 1.2.4 と同様の方法で 20 時間適用し、適用後の皮膚を氷冷メタノール中で 3 回洗浄した。

### 2.3.2 ミクロトームによる皮膚切片調製

REM-700 リトラトーム (YAMATO) 上で、ドライアイスとエタノールを用いて精製水を氷結させ水平な氷の膜を作り、その膜上にデリバリー実験後の皮膚を角質層側が下に向くように置き、さらに上から精製水を滴下して氷結させ、氷の膜で挟み込んだ。その後、固定された皮膚を皮膚表面と平行に 100 μm ごとに切断して皮膚切片を調製した。

### 2.3.3 ホモジェナイズ

1.2.4 と同様の方法で、各切片に含まれるポリフェノールをメタノール 10 mL 中に抽出した。

### 2.3.4 HPLC 分析

レスベラトロール、クルクミンについては、1.1.4、2.1.4 と同様の条件で測定した。  
エアロゾル OT については、PU 980 Pump (JASCO)、996 Photodiode array detector (Nihon Waters) を用いて、以下の条件で測定した。

カラム： Mightysil RP-18 GP, 3.0 mm i.d., 150 mm (5 µm) (関東化学(株))

移動相： メタノール:超純水=80:20 混液

検出波長： 210 nm

内標準物質： *trans*-フェルラ酸

## 2.4 ユカタンマイクロピッグ皮膚の表皮と真皮の分離

### 2.4.1 デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.5 mL、口径約 0.64 cm<sup>2</sup>) に、1.2.3.2 に示したユカタンマイクロピッグ 5 カ月齢雌皮膚を装着し、ポリフェノールを溶解させた各 vehicle を 1.2.4 と同様の方法で 40 時間適用し、適用後の皮膚を氷冷メタノール中で 3 回洗浄した。

### 2.4.2 表皮と真皮の分離

洗浄後の皮膚を 60°C に加温したスパーテルで 1 分間挟み、鋭ピンセットを用いて、表皮を剥離した<sup>61)</sup>。

### 2.4.3 ホモジェナイズ

表皮、真皮それぞれをハサミで細かく刻み、1.2.4 と同様の方法で、各層に含まれるポリフェノールをメタノール 10 mL 中に抽出した。

### 2.4.4 HPLC 分析

レスベラトロール、クルクミン、エアロゾル OT については、それぞれ 1.1.4、2.1.4、2.3.4 と同様の条件で測定した。

ケルセチンについては、以下の条件で測定した<sup>12)</sup>。

カラム： Mightysil RP-18 GP, 3.0 mm i.d., 150 mm (5 µm) (関東化学(株))

移動相： メタノール:超純水:リン酸=100:100:1 混液

検出波長： 360 nm

内標準物質： *trans*-フェルラ酸

## 2.5 統計解析

1.8 と同様の手法で行った。

## 第 3 章の実験

### 3.1 擬三成分相図

#### 3.1.1 試料

RYOTO® Sugar Ester L-1695 (SL) は三菱化学フーズ(株)より提供を受けたものを使用した。エタノール、IPM は、ナカライテスク(株)より購入した。

#### 3.1.2 擬三成分相図の作成

界面活性剤と補助界面活性剤の割合を 1:1、2:1、2.5:1、3:1、4:1 に固定し、界面活性剤／補助界面活性剤／水相混合物の質量比が 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 ((界面活性剤／補助界面活性剤) : 水相) で全量 1 g になるように調製した。この溶液に、油相を 10  $\mu$ L ずつ滴下し、混和した。この操作を透明な溶液が濁るまで行い、その時の質量比を相図上にプロットした。

### 3.2 粘度測定

回転粘度計 (TVE-22L (東機産業(株))) に、1° 34'  $\times$  R24 ローターを取り付け、サンプルカップに試料 1.1 mL を加え、25°C で測定した。

### 3.3 溶解度測定

#### 3.3.1 試料

レスベラトロール、*trans*-フェルラ酸は、東京化成工業(株)から購入した。クロロゲン酸は和光純薬工業(株)から購入した。SL は三菱化学フーズ(株)より提供を受けたものを使用した。Tween 80、エタノール、IPM、塩化ナトリウムは、ナカライテスク(株)から購入した。

#### 3.3.2 マイクロエマルジョンの調製

1.1.2 と同様の方法で調製した。

#### 3.3.3 溶解度測定

1.1.3 と同様の方法で行い、レスベラトロール、クロロゲン酸濃度を HPLC により測定した。

### 3.3.4 HPLC 分析

HPLC 装置は、L-2130 Pump、L-2200 Autosampler、L-2420 UV-VIS detector、L-2300 Column oven（いずれも HITACHI）を用いた。

レスベラトロールの濃度は、1.1.4 に示した条件で測定した。

クロロゲン酸の濃度は、以下の条件<sup>33)</sup>で測定した。

カラム： Mightysil RP-18 GP, 3.0 mm i.d., 150 mm (5 μm)（関東化学(株)）

カラム温度： 40°C

移動相： メタノール:超純水:リン酸=60:140:1 混液

検出波長： 327 nm

内標準物質： *trans* フェルラ酸

## 3.4 皮膚デリバリー実験

### 3.4.1 試料溶液

レスベラトロールを MESL で適用するときは、過量のレスベラトロールを添加し、それ以外については、100 mM のレスベラトロール又はクロロゲン酸を溶解させ、試料溶液とした。

### 3.4.2 緩衝液の調製

リン酸緩衝液（PBS; pH 7.4）を 1.2.2 と同様の方法で調製した。

### 3.4.3 皮膚の調製

ユカタンマイクロピッグ 5 カ月齢雌皮膚（日本チャールス・リバー(株)より購入）を、1.2.3.2 と同様の方法で使用した。

### 3.4.4 フランツ型拡散セルを使用した皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル（容積約 5.0 mL、口径約 0.83 cm<sup>2</sup>）にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着し、1.2.4 と同様の方法で、6、20、40 時間適用した。その後、2.4.2、2.4.3 に示した方法で表皮と真皮を分離し、各層中のポリフェノールをメタノール中に抽出した。

### 3.4.5 HPLC 分析

3.3.4 に示した方法と同様の方法で測定した。

## 3.5 統計解析

unpaired t-test により  $p < 0.05$  を有意差有とした。

## 第4章の実験

### 4.1 擬三成分相図

#### 4.1.1 試料

RYOTO® Sugar Ester L-1695 (SL)、M-1695 (SM)、P-1570 (SP)、S-1570 (SS)、O-1570 (SO) は、三菱化学フーズ(株)より提供を受けたものを使用した。エタノール、IPM は、ナカライテスク(株)から購入した。1-プロパノールは、和光純薬工業(株)から購入した。

#### 4.1.2 擬三成分相図の作成

界面活性剤と補助界面活性剤の割合を 1:1 に固定し、1.3.2 と同様の方法で、水相を滴下し、一相領域を検討した。

### 4.2 粘度測定

3.2 と同様の方法で行った。

### 4.3 皮膚デリバリー実験

#### 4.3.1 試料溶液

各 vehicle に 10 mM のレスベラトロールを溶解させ、試料溶液とした。また、MESO-E に 5、10、20、30、55 mM のレスベラトロールを溶解させ、試料溶液とした。酸化防止剤として、すべての試料溶液に、アスコルビン酸ナトリウム (ナカライテスク(株)) あるいは、6-O-パルミトイル-L-アスコルビン酸 (東京化成工業(株)) をレスベラトロールと同濃度添加した。

#### 4.3.2 レセプター溶液の調製

リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4) を 1.2.2 と同様の方法で調製し、1.0 w/v% のウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) を添加した。

#### 4.3.3 皮膚の調製

ユカタンマイクロピッグ 5 カ月齢雌皮膚 (日本チャールス・リバー(株)より購入) を、1.2.3.2 と同様の方法で使用した。

#### 4.3.4 フランツ型拡散セルを使用した皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.6 mL、口径約 0.83 cm<sup>2</sup>) にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着し、1.2.4 と同様の方法で、6、14、20 時間適用した。その後、2.4.2、2.4.3 に示した方法で表皮と真皮を分離し、各層中のレスベラトロールをメタノール中に抽出

した。

#### 4.3.5 HPLC 分析

HPLC 装置は、e2695 separation module、2489 UV/Vis detector (いずれも Nihon Waters) を用いた。

1.1.4 と同様の条件でレスベラトロール濃度を測定した。

#### 4.4 前処理実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.6 mL、口径約 0.83 cm<sup>2</sup>) にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着し、各 vehicle を 2 時間前処理した。その後、皮膚を NaCl aq で洗浄し、10% エタノール溶液にレスベラトロールを懸濁させたものを試料溶液として適用した。20 時間適用後、2.4.2、2.4.3 に示した方法で表皮と真皮を分離し、4.3.5、1.1.4 に示した条件で、レスベラトロール濃度を測定した。

#### 4.5 皮膚表面の ATR-FTIR スペクトル測定

##### 4.5.1 皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.6 mL、口径約 0.83 cm<sup>2</sup>) にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着し、1.2.4 と同様の方法で、レスベラトロールを含まない vehicle を 20 時間適用した。

##### 4.5.2 ATR-FTIR スペクトル測定

適用後、皮膚表面に残った試料溶液をふき取り、超純水で 3 回洗浄した後、水分を拭き取った。皮膚の角質層側を測定部に密着させ、ATR-FTIR スペクトルを以下の条件で測定した。

装置： Frontier (パーキンエルマージャパン)

測定範囲： 4000-400 cm<sup>-1</sup>

波数分解能： 4 cm<sup>-1</sup>

積算回数： 4 回

#### 4.6 ショ糖モノオレイン酸エステルの取り込み量の測定

##### 4.6.1 皮膚デリバリー実験

フランツ型拡散セル (容積約 4.6 mL、口径約 0.83 cm<sup>2</sup>) にユカタンマイクロピッグ皮膚を装着し、1.2.4 と同様の方法で、10 mM のレスベラトロールを溶解させた MESO-E を 20 時間適用した。皮膚は、洗浄後、2.4.2 に示した方法で表皮と真皮に分離し、2.4.3 に示した方法でホモジェナイズした。



#### 4.6.2 固相抽出

回収したレセプター溶液 1 mL を、Oasis® HLB 1cc (Waters) に負荷した。その後、超純水で洗浄し、シヨ糖モノオレイン酸エステルをメタノールで抽出した。37 °C でメタノールを揮発させた後、再度メタノールに溶解させ、平均回収率 80.1% (n=4) でシヨ糖モノオレイン酸エステルを得た。

#### 4.6.3 LC/MS/MS 測定

表皮、真皮、レセプター溶液中のシヨ糖モノオレイン酸エステル量を以下の条件で測定した。

##### LC/MS/MS 条件

##### HPLC 条件

装置： Shimadzu LC-10Avp system、Shimadzu LC-10ADvp pumps、Shimadzu SIL-10ADvp automatic sampler

カラム： COSMOSIL 5C18AR-II, 4.6 ID × 50 mm (ナカライテスク(株))

プレカラムフィルター： 2 µm (GL Sciences)

カラム温度： 35°C

移動相： 0.1%酢酸・メタノール溶液

流速： 0.2 mL/min

注入量： 10 µL

内標準物質： L-α-Lysophosphatidylcholine, stearyl-D35 (18:0-D35-LPC (Malmo))

##### MS 条件

装置： API 3000 LC/MS/MS system (Applied Biosystems)

イオン化法： ESI ネガティブモード

測定モード： MRM

ネブライザーガス： 14 psi

イオンスプレー電圧： -4500.0 V

温度： 450°C

DP： -41 V (シヨ糖モノオレイン酸エステル)、-31 V (18:0-D35-LPC)

EP： -170 V (シヨ糖モノオレイン酸エステル)、-150 V (18:0-D35-LPC)

CE： -26 V (シヨ糖モノオレイン酸エステル)、-26 V (18:0-D35-LPC)

CXP： -25 V (シヨ糖モノオレイン酸エステル)、-19 V (18:0-D35-LPC)

モニターイオン(m/z)： シヨ糖モノオレイン酸エステル 605.4→341.0

18:0-D35-LPC

593.5→543.6

データ解析： Analyst software version 1.4.2

統計解析

One-way ANOVA、Dunnett's test により、 $p < 0.05$  を有意差有とした。

## 参考文献

- 1) Afaq F., Adhami V. M., Mukhtar H., Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **571**, 153-173 (2005).
- 2) Afaq F., Mukhtar H., Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging, *Exp. Dermatol.*, **15**, 678-684 (2006).
- 3) Kobayashi S., UVB-induced skin damage and the protection/treatment –effects of a novel, hydrophilic  $\gamma$ -tocopherol derivative, *Yakugaku Zasshi*, **126**, 677-693 (2006).
- 4) Nichols J. A., Katiyar S. K., Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory antioxidant and DNA repair mechanisms, *Arch. Dermatol. Res.*, **302**, 71-83 (2010).
- 5) Zaid M. A., Afaq F., Syed D. N., Dreher M., Mukhtar H., Inhibition of UVB-mediated oxidative stress and markers of photoaging in immortalized HaCaT keratinocytes by pomegranate polyphenol extract POMx, *Photochem. Photobiol.*, **83**, 882-888 (2007).
- 6) Battie C., Jitsukawa S., Bernerd F., Bino S. D., Marionnet C., Verschoore M., New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types, *Exp. Dermatol.*, **23** (Suppl. 1), 7-12 (2014).
- 7) 飯塚一，標準皮膚科学 第10版（富田靖 監修，橋本隆，岩月啓氏，照井正 編），医学書院，東京，2013，p. 7.
- 8) 伊藤雅章，標準皮膚科学 第10版（富田靖 監修，橋本隆，岩月啓氏，照井正 編），医学書院，東京，2013，p. 8.
- 9) Barry, B. W., Penetration enhancer classification, “Percutaneous Penetration Enhancers,” 2nd ed., ed by Smith E. W., Maibach H. I, CRC, Boca Raton, 2006, pp. 3-15.
- 10) Naik A., Kalia Y. N., Guy R. H., Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function, *Pharm. Sci. Technolo. Today*, **3**, 318-326 (2000).
- 11) Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M., The skin: an indispensable barrier, *Exp. Dermatol.*, **17**, 1063-1072 (2008).
- 12) Kitagawa S., Tanaka Y., Tanaka M., Endo K., Yoshii A., Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion, *J. Pharm. Pharmacol.*, **61**, 855-860 (2009).
- 13) Kitagawa S., Inoue K., Teraoka R., Morita S. Y., Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 398-401 (2010).

- 14) Vicentini F. T. M. C., Simi T. R. M., Ciampo J. O. D., Wolga N. O., Pitol D. L., Iyomasa M. M., Bentley M. V. L. B., Fonseca M. J. V., Quercetin in w/o microemulsion: *In vitro* and *in vivo* skin penetration and efficacy against UVB-induced skin damages evaluated *in vivo*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**, 948-957 (2008).
- 15) Benson H. A. E., Transdermal drug delivery: Penetration enhancement techniques, *Curr. Drug Deliv.*, **2**, 23-33 (2005).
- 16) Han T., Das D. B., Potential of combined ultrasound and microneedles for enhanced transdermal drug permeation: A review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **89**, 312-328 (2015).
- 17) Wong T. W., Electrical, magnetic, photomechanical and cavitational waves to overcome skin barrier for transdermal drug delivery, *J. Control. Rel.*, **193**, 257-269 (2014).
- 18) Kreilgaard M., Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **54**, S77-S98 (2002).
- 19) Lawrence M. J., Rees G. D., Microemulsion-based media as novel drug delivery systems, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **64**, 175-193 (2012).
- 20) Lopes L. B., Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions, *Pharmaceutics*, **6**, 52-77 (2014).
- 21) Pappinen S., Urtti A., Microemulsions in topical drug delivery, "Percutaneous Penetration Enhancers," 2nd ed., ed by Smith E. W., Maibach H. I, CRC, Boca Raton, 2006, pp. 109-116.
- 22) Caddeo C., Teskač K., Sinico C., Kristl J., Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells, *Int. J. Pharm.*, **363**, 183-191 (2008).
- 23) Udenigwe C. C., Ramprasath V. R., Aluko R. E., Jones P. J. H., Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy, *Nutr. Rev.*, **66**, 445-454 (2008).
- 24) Bisht K., Wagner K. H., Bulmer A. C., Cucumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds, *Toxicology*, **278**, 88-100 (2010).
- 25) Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M., Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science*, **275**, 218-220 (1997).
- 26) Lee T. H., Seo J. O., Beak S. H., Kim S. Y., Inhibitory effects of resveratrol on

- melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin., *Biomol. Ther.*, **22**(1), 35-40 (2014).
- 27) Park K., Elias P. M., Hupe M., Borkowski A. W., Gallo R. L., Shin K. O., Lee Y. M., Holleran W. M., Uchida Y., Resveratrol stimulates sphingosine-1-phosphate signaling of cathelicidin production, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, 1942-1949 (2013).
- 28) Woo J. H., Lim J. H., Kim Y. H., Suh S. I., Min D. S., Chang J. S., Lee Y. H., Park J. W., Kwon T. K., Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC  $\delta$  signal transduction, *Oncogene*, **23**, 1845-1853 (2004).
- 29) Hung C. F., Lin Y. K., Huang Z. R., Fang J. Y., Delivery of resveratrol, a red wine polyphenol, from solutions and hydrogels *via* the skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 955-962 (2008).
- 30) Barbero A. M., Frasch H. F., Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review, *Toxicol. in Vitro*, **23**, 1-13 (2009).
- 31) Fujii M., Yamanouchi S., Hori N., Iwanaga N., Kawaguchi N., Matsumoto M., Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an *in vitro* model for skin permeation study, *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 249-254 (1997).
- 32) Takeuchi H., Terasaka S., Sakurai T., Furuya A., Urano H., Sugibayashi K., Variation assessment for *in vitro* permeabilities through Yucatan micropig skin, *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 555-561 (2011).
- 33) Kitagawa S., Yoshii K., Morita S. Y., Teraoka R., Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage, *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 793-796 (2011).
- 34) Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358 (1979).
- 35) Kikugawa K., Kojima T., Yamaki S., Kosugi H., Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid, *Anal. Biochem.*, **202**, 249-255 (1992).
- 36) Casagrande R., Georgetti S. R., Verri Jr. W. A., Borin M. F., Lopez R. F. V., Fonseca M. J. V., *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity, *Int. J. Pharm.*, **328**, 183-190 (2007).
- 37) Park K., Lee J. H., Protective effects of resveratrol on UVB-irradiated HaCaT cells through attenuation of the caspase pathway, *Oncol. Rep.*, **19**, 413-417 (2008).

- 38) Hanamura T., Uchida E., Aoki H., Skin-lightening effect of a polyphenol extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit on UV-induced pigmentation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3211-3218 (2008).
- 39) Junyaprasert V. B., Boonsaner P., Leatwimonlak S., Boonme P., Enhancement of the skin permeation of clindamycin phosphate by Aerosol OT/1-butanol microemulsions, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **33**, 874-880 (2007).
- 40) Fang J. Y., Hung C. F., Chiu H. C., Wang J. J., Chan T. F., Efficacy and irritancy of enhancers on the in-vitro and in-vivo percutaneous absorption of curcumin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **55**, 593-601 (2003).
- 41) Suhaimi H., Ahmad F. B. H., Friberg S. E., Curcumin in a model skin lotion formulation, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 376-380 (1995).
- 42) Nakajima K., Shirakawa T., *Immuno. Tox. Lett.*, **8**, 3-6 (2003).
- 43) Csóka G., Marton S., Zelko R., Otomo N., Antal I., Application of sucrose fatty acid esters in transdermal therapeutic systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **64**, 233-237 (2007).
- 44) Garti N., Clement V., Fanun M., Leser M. E., Some characteristics of sugar ester nonionic microemulsions in view of possible food applications, *J. Agric., Food Chem.*, **48**, 3945-3956 (2000).
- 45) Meng Y. C., Sun M. H., Fang S., Chen J., Li Y. H., Effect of sucrose fatty acid esters on pasting, rheological properties and freeze-thaw stability of rice flour, *Food Hydrocol.*, **40**, 64-70 (2014).
- 46) Szűts A., Szabó-Révész P., Sucrose esters as natural surfactants in drug delivery systems – A mini-review, *Int. J. Pharm.*, **433**, 1-9 (2012).
- 47) Cázares-Delgado J., Naik A., Kalia Y. N., Quintanar-Guerrero D., Ganem-Quintanar A., Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon, *Int. J. Pharm.*, **297**, 204-212 (2005).
- 48) Csizmazia E., Erős G., Berkesi O., Berkó S., Szabó-Révész P., Csányi E., Penetration enhancer effect of sucrose laurate and transcucitol on ibuprofen, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **21**, 411-415 (2011).
- 49) Okamoto H., Sakai T., Danjo K., Effect of sucrose fatty acid esters on transdermal permeation of lidocaine and ketoprofen, *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1689-1694 (2005).
- 50) Clifford M. N., Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 362-372 (1999).
- 51) Fukushima Y., Ohie T., Yonekawa Y., Yonemoto K., Aizawa H., Mori Y., Watanabe M., Takeuchi M., Hasegawa M., Taguchi C., Kondo K., Coffee and

- green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1253-1259 (2009).
- 52) Santos M. D., Almeida M. C., Lopes N. P., Souza G. E. P., Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2236-2240 (2006).
- 53) Kreilgaard M., Pedersen E. J., Jaroszewski J. W., NMR characterization and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems, *J. Control. Rel.*, **69**, 421-433 (2000).
- 54) Ayala-Bravo H. A., Quintanar-Guerrero D., Naik A., Kalia Y. N., Cornejo-Bravo J. M., Ganem-Quintanar A., Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on in vivo human stratum corneum permeability, *Pharm. Res.*, **20**, 1267-1273 (2003).
- 55) Csizmazia E., Erős G., Berkesi O., Berkó S., Szabó-Révész P., Csányi E., Ibuprofen penetration enhance by sucrose ester examined by ATR-FTIR in vivo, *Pharmaceut. Dev. Tech.*, **17**, 125-128 (2012).
- 56) Ibrahim R., Kasting G. B., Improved method for determining partition and diffusion coefficients in huma dermis, *J. Pharm. Sci.*, **99**, 4928-4939 (2010).
- 57) N' soukpoé-Kossi C. N., St-Louis C., Beaugard M., Subirade M., Carpentier R., Hotchandani S., Tajmir-Riahi H. A., Resveratrol binding to human serum albumin, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **24**, 277-283 (2006).
- 58) Manconi M., Caddeo C., Sinico C., Valenti D., Mostallino M. C., Biggio G., Fadda A. M., *Ex vivo* skin delivery of diclofenac by transcutol containing liposomes and suggested mechanism of vesicle-skin interaction, *Eur. J., Pharm. Biopharm.*, **78**, 27-35 (2011).
- 59) Babu R. J., Singh M., Kanikkannan N., Fatty alcohols and fatty acids, "Percutaneous Penetration Enhancers," 2nd ed., ed by Smith E. W., Maibach H. I, CRC, Boca Raton, 2006, pp. 137-158.
- 60) Lane M. E., Skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.*, **447**, 12-21 (2013).
- 61) Kligman A. M., Christophers E., Preparation of isolated sheets of human stratum corneum, *Arch. Dermatol.*, **88**, 702-705 (1963).

## 謝 辞

本論文は、神戸薬科大学 製剤学研究室における研究成果をまとめたものであり、本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北河修治教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、ご指導ならびにご高覧を賜りました徳島大学大学院医歯薬学研究部 製剤分子設計学分野 齋藤博幸教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益なご指導とご助言を賜りました神戸薬科大学 製剤学研究室 寺岡麗子准教授、森田真也助教(現滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部 准教授)に深謝いたします。

本研究の MS 測定に際し、懇切丁寧なご指導とご助言を賜りました神戸薬科大学 中央分析室 竹内敦子准教授に深謝いたします。

本研究にご協力いただきました菊池武友学士、小守佑果学士をはじめとする製剤学研究室の諸氏に心より感謝いたします。

最後に、本研究にご支援とご協力をいただきましたすべての皆様に感謝申し上げます。



## 付 記

本研究は、以下の論文をまとめたものである。

- 1) Yutani R., Morita S. Y., Teraoka R., Kitagawa S., Distribution of polyphenols and a surfactant component in skin during Aerosol OT microemulsion-enhanced intradermal delivery, *Chem. Pharm. Bull.*, 60(8), 989-994 (2012).
- 2) Yutani R., Kikuchi T., Teraoka R., Kitagawa S., 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).
- 3) Yutani R., Teraoka R., Kitagawa S., Microemulsion using polyoxyethylene sorbitan trioleate and its usage for skin delivery of resveratrol to protect skin against UV-induced damage, *Chem. Pharm. Bull.*, 63(9), 741-745 (2015).
- 4) Yutani R., Komori Y., Takeuchi A., Teraoka R., Kitagawa S., Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion, *J. Pharm. Pharmacol.*, 68(1), 46-55 (2016).