

マイクロエマルジョンを利用したポリフェノールの皮膚へのデリバリーと光老化防御

神戸薬科大学

北河 修治

To improve the efficiency of the intradermal delivery of polyphenols, we tried to clarify the usefulness of microemulsion by *in vitro* study on excised guinea pig dorsal skin and Yucatan micropig skin. Using microemulsion consisting of isopropyl myristate, 150mM NaCl solution, Tween 80 and ethanol as a vehicle, the solubility of all the polyphenols such as quercetin, genistein and chlorogenic acid markedly increased and significant amounts of polyphenols were delivered to the skin. For hydrophobic polyphenols water-in-oil microemulsion was more effective. On the other hand, for hydrophilic polyphenols oil-in water microemulsion was more effective. Polyphenols retained in the skin significantly inhibited lipid peroxidation *in vitro* dose-dependently. Furthermore, pretreatment of guinea pig dorsal skin with polyphenols such as genistein and chlorogenic acid, which were contained in microemulsion gel, prevented UV irradiation-induced erythema formation. These findings indicate the potential use of microemulsion for the delivery of polyphenols to protect skin against UV-induced oxidative damage.

1. 緒言

種々の物質の中で抗酸化剤として知られ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。ポリフェノールは水にも有機溶媒にも溶解しにくい化合物であり、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いことから皮膚への移行性は低い。したがって、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。近年、マイクロエマルジョンが薬物の経皮吸収に有用であることが明らかにされてきた。マイクロエマルジョンは、油相、水相、界面活性剤、補助界面活性剤より構成される熱力学的に安定な分散系であるが、薬物の溶解度を増大するとともに経皮吸収性を増加することから^{1,2)}、水にも有機溶媒にも難溶性のポリフェノールの皮膚への効率的なデリバリーを目指す場合、有望な促進系であると考えられる。

そこで、本研究では、分子量、化学構造、疎水性の異なる種々のポリフェノール (Fig. 1に構造を示す) の皮膚へのデリバリーについてさらに研究を行い、マイクロエマルジョンによるポリフェノールの皮膚移行性に対する改善効果を観察した。マイクロエマルジョンには水中油型 (o/w型) と油中水型 (w/o型) があるが、ポリフェノールの疎水性と有効な型についても観察した。また、局所作用を期

待するこれらのポリフェノールは、できるだけ皮膚に留まり、血中へは移行しないことが要求されるため、皮膚透過性についても検討を行った。また、ポリフェノールの皮膚移行に伴う、皮膚の過酸化反応に対する防御作用、紫外線照射による皮膚の紅斑形成に及ぼす影響について *in vitro* 及び *in vivo* で観察した。

2. 実験

2.1. 実験試料

ポリフェノールは試薬会社より購入したものをを用いた。神戸薬科大学動物実験指針に従ってハートレー系モルモット (オス、3週齢) 皮膚より麻酔下、バリカンによる除毛後、背部皮膚を摘出し、脂肪を除去して用いた^{3,4)}。ユカタンマイクロピッグ皮膚は日本チャールスリバーより購入し、脂肪及び皮下組織を藤井らに従って除去して用いた⁵⁾。

2.2. マイクロエマルジョンの調製

油相としてミリスチン酸イソプロピル (IPM)、水相として150 mM NaCl水溶液、界面活性剤としてポリオキシエチレンモノオレエート (Tween80)、補助界面活性剤としてエタノールを用いた。これらをふた付き試験管に加えて、37℃に加温し、ボルテックスミキサーにより攪拌を行い調製した。マイクロエマルジョンとしては、IPM、150mM NaCl水溶液、Tween80、エタノールの質量比が8:25:20:47及び4:51:30:15でo/w型のマイクロエマルジョンA及びK、上記構成成分の質量比が33:7:30:30でw/o型のマイクロエマルジョンDを用いた。

2.3. 溶解度の測定

ポリフェノールをマイクロエマルジョンA、D、K、IPM、150mM NaCl水溶液に過剰量加え、37℃で20時間インキュベーションを行った後、12,000×gで1分間遠心



Enhanced skin delivery of polyphenols by microemulsion and prevention against photoaging

Shuji Kitagawa

Kobe Pharmaceutical University

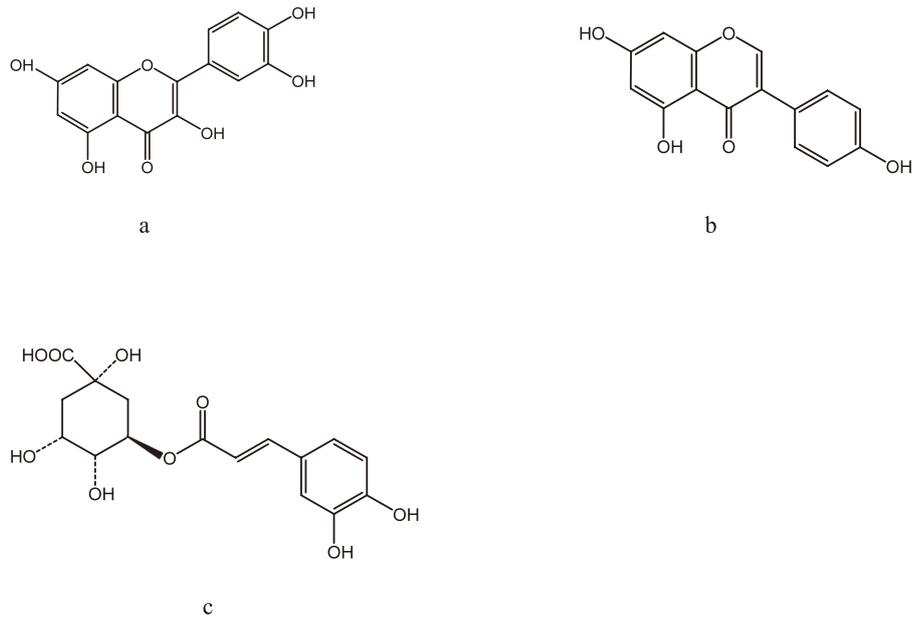


Fig.1 Polyphenols tested in this study
(a) quercetin, (b) genistein, (c) chlorogenic acid.

を行い、上清のポリフェノール濃度をHPLC（島津LC-10-AS）で測定した。HPLC分析には、逆相カラムRP-18 GP（4.6mm i.d.、150 mm）を用い、ケルセチン及びゲニステインの定量は、移動相として、水、メタノール、りん酸（容積比100：100：1）を用いた。クロロゲン酸の定量は、移動相としては、水、メタノール、りん酸（容積比140：60：1）を用いた。UV検出器の波長は、ケルセチンは360 nm、ゲニステインは260 nm、クロロゲン酸は327 nmとした。*trans*-フェルラ酸を内部標準とした。

2. 4. マイクロエマルジョンの粒子径の測定

マイクロエマルジョンの粒子径の測定は、粒径アナライザー（大塚電子FPAR-1000）によって行った。マイクロエマルジョンA、D、Kの平均粒子径は、それぞれ39.8、42.5、12.3 nmであった。

2. 5. 皮膚中移行量の測定

ポリフェノールの皮膚中移行量の測定は、中央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を装着したフランツ型拡散セルを用いて行った。12時間皮膚をプレトリートメント後、ドナー側にポリフェノールを懸濁した試料を入れ、モルモット皮膚の場合は20時間後、ユカタンマイクロピッグの場合は40時間後、皮膚を取り出し、氷冷メタノールで洗浄後、皮膚をホモジェナイズし、抽出試料を遠心し、上清のポリフェノール濃度を上述の条件でHPLCによって測定した。

2. 6. 脂質過酸化の測定

ポリフェノールを2時間インキュベーションし皮膚に移

行させ、脂質過酸化に及ぼす影響について、硫酸アンモニウム鉄（II）とクエン酸ナトリウムを用いてチオバルビツール酸試験によって観察を行った。

2. 7. UV照射による紅斑形成の観察

モルモットの背部皮膚を除毛後、ぬるま湯につけて垢取りを行った。24時間後、ポリフェノールを含有し、ゲニステインについては8.3%エアロジルR972によってゲル様としたマイクロエマルジョンを、クロロゲン酸については、1.0%カルボポール987によってゲル化したマイクロエマルジョンを、それぞれモルモット背部の片側に、もう一方にポリフェノールを含有しないマイクロエマルジョンゲルを塗布した。20時間後、マイクロエマルジョンゲルをふき取り、皮膚を乾燥後、 $138\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の強度でUV-Bランプ（GL20SE）による24時間のUV照射を行った。紅斑形成の評価は写真及び色差計による赤みの計測によって行った。

3. 結果

3. 1. マイクロエマルジョンによる溶解度の改善

Table 1に示すように、疎水性の高いポリフェノールであるケルセチン、ゲニステインともIPM、150 mM NaCl水溶液における溶解度は低く、飽和溶解度でポリフェノールを適用した場合、マイクロエマルジョンを用いることで有意に改善した^{3,4)}。特にw/o型のマイクロエマルジョンDはo/w型のマイクロエマルジョンAに比べて、より効果的であった。一方、親水性のポリフェノールであるクロロゲン酸は、150 mM NaCl水溶液においても比較的高い溶解度を示した。マイクロエマルジョンを用いることで溶解度はさらに増大したが、疎水性のポリフェノール

とは異なり、o/w型のマイクロエマルジョンAを用いることで溶解度は、150 mM NaCl水溶液に比べて約8倍に増大し、より顕著に改善した。皮膚刺激性を減少するためにアルコール含量を減らしたo/w型のマイクロエマルジョンKでは、クロロゲン酸の溶解度は 344.9 ± 8.1 mMと、マイクロエマルジョンAよりは少し低いものの、150 mM NaCl水溶液に比べて溶解度は約7倍に増大し、顕著な溶解度改善効果を示した。

3.2. マイクロエマルジョンによる皮膚中移行の改善

Fig. 2にケルセチンについて、Table 2にゲニステインの結果を示すように、マイクロエマルジョンを用いることで、これらの疎水性のポリフェノールの皮膚中移行量は顕著に増大した^{3,4)}。また、Fig. 2にケルセチンについて示すようにマイクロエマルジョンの構成成分であるTween80やエタノールの単独での皮膚移行促進効果は小さく、マイクロエマルジョンとして皮膚移行を促進してい

ることが示唆された。また、Table 2にゲニステインについて示すように、これらの疎水性フェノールについては、w/o型のマイクロエマルジョンDの方が、o/w型のマイクロエマルジョンAよりも、皮膚移行性の改善効果がより大であった。

一方、親水性のポリフェノールであるクロロゲン酸については、Fig. 3に結果を示すように、150 mM NaCl水溶液をvehicleとした場合にも $1.49 \mu\text{mol/g skin}$ とケルセチンやゲニステインに比べて高い皮膚移行量が得られた。この理由の一つとして、150 mM NaCl水溶液でもクロロゲン酸が比較的高い溶解度を示すことがあげられる。しかしながら、150 mM NaCl水溶液からのクロロゲン酸の皮膚移行量は、Fig. 2、Table 2に示したマイクロエマルジョンDをvehicleとして用いた場合のケルセチン、ゲニステインの皮膚移行量よりも少なく、そのためマイクロエマルジョンによる改善を試みた。その結果、Fig. 3に示すように、特にo/w型のマイクロエマルジョンAあるいはKを用い

Table 1 Effects of Microemulsions on Solubility of Polyphenols

Vehicle	Solubility (mM)					
	Quercetin		Genistein		Chlorogenic Acid	
150 mM NaCl	0.31	± 0.15	0.059	± 0.011	42.6	± 2.0
IPM	0.64	± 0.14	0.959	± 0.097	0.012	± 0.003
Microemulsion A	29.2	$\pm 3.1^{***}$	80.27	$\pm 4.63^{***}$	406.4	$\pm 19.4^{***}$
Microemulsion D	78.6	$\pm 8.9^{***}$	140.5	$\pm 13.1^{***}$	90.9	$\pm 3.7^{***}$

Data are the means \pm S.D. of four experiments. *** , $p < 0.001$, significantly different from the values in NaCl solution and IPM.

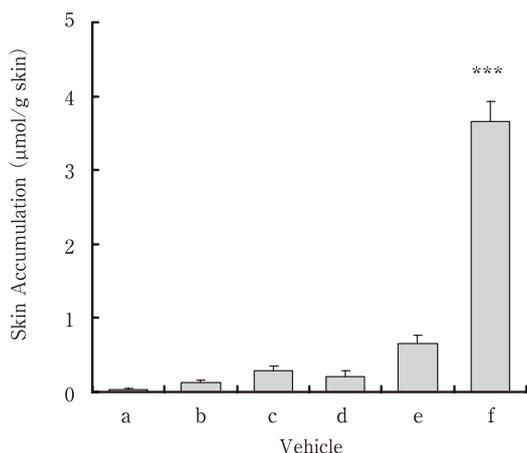


Fig.2 Effects of microemulsion on skin accumulation of quercetin in guinea pig skin applied as a suspension in either 150 mM NaCl solution (a), or isopropyl myristate (b), in a vehicle consisting of Tween80 and 150 mM NaCl solution (30:70) (c), in a vehicle consisting of ethanol and 150 mM NaCl solution (30:70) (d), at 20 mM in microemulsion D (e), at saturated concentration (78.6 mM) in microemulsion D (f). Data are the means \pm S.D. of four experiments. $^{***}p < 0.001$, significantly different from the values in other conditions.

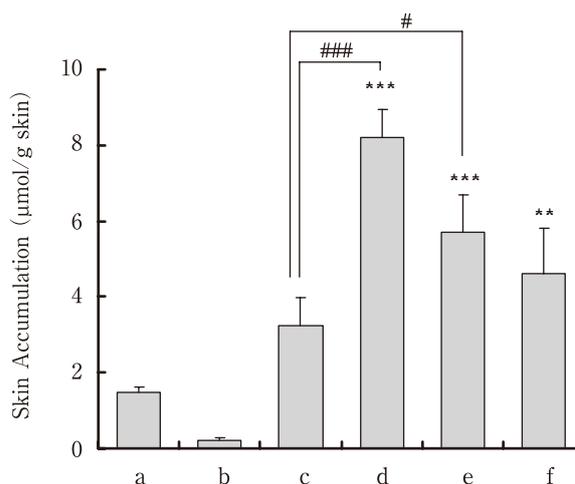


Fig.3 Skin accumulation of chlorogenic acid in guinea pig skin applied at saturated concentration in 150 mM NaCl solution (a), isopropyl myristate (b), microemulsion D (c), microemulsion A (d), microemulsion K (e), and microemulsion K gel (f). Data are the means \pm S.D. of four experiments. $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, significantly different from the values in NaCl solution and isopropyl myristate. $\#p < 0.05$, $^{###}p < 0.001$, significant difference present between data.

ることで、150mM NaCl水溶液に比べて5.5倍あるいは3.8倍と顕著に移行量が增大した。また、その際の皮膚移行量は、マイクロエマルジョンDをvehicleとして用いた場合のケルセチン、ゲニステインの皮膚移行量と比べて同等あるいはそれ以上であった。マイクロエマルジョンを皮膚に塗布する場合には、ゲル化することが必要であるが、Fig.3にマイクロエマルジョンKをゲル化した場合の例を示すように、ゲル化することで約80%に皮膚移行量が減少したものの、顕著な皮膚移行性が観察された。

モルモット皮膚の場合、毛穴が多く、そこからマイクロエマルジョンが皮膚内に移行する可能性も考えられる。そこで、ヒト皮膚に性状が類似しているユカタンマイクロピッグの皮膚⁶⁾を用いて同様な検討を行った。Fig. 4にゲニステインの例を示すように、ユカタンマイクロピッグの皮膚を用いた場合にもマイクロエマルジョンによる皮膚移行の改善が観察された^{3, 4)}。また、ケルセチンやゲニステインのような疎水性のポリフェノールではw/o型のマイクロエマルジョンが、クロロゲン酸のような親水性のポ

リフェノールではo/w型のマイクロエマルジョンがより有効であり、モルモット皮膚の場合と同様な結果が得られた。

また、これらのポリフェノールはフランツセルのレセプター側への移行は観察されず、皮膚中に留まることがわかった。さらに、皮膚の凍結切片を調製し、切片中のポリフェノール量を測定することで、皮膚の各深さでのポリフェノールの移行量を求めた。その結果、これらのポリフェノールは、皮膚表面付近に多く存在するものの、皮膚の深部へも移行していることがわかった³⁾。

3. 3. 皮膚脂質過酸化に及ぼす皮膚中に移行したポリフェノールの影響

そこで、マイクロエマルジョンによって皮膚中に移行したポリフェノールの皮膚中での抗酸化作用の発現を観察するために、鉄(II)とクエン酸イオンを用いて、マロンジアルデヒドの形成を観察することによって、皮膚の脂質過酸化に及ぼす影響を観察した。その結果、Fig. 5にゲニス

Table 2 Effects of Microemulsions on Intradermal Delivery of Genistein at Saturated Concentration

Vehicle	Skin Accumulation (μmol/g skin)
150 mM NaCl	0.10 ± 0.01
IPM	0.25 ± 0.05
Microemulsion A	3.55 ± 0.60***
Microemulsion D	5.92 ± 1.48***
Microemulsion D#	2.58 ± 0.55***

Data are the means ± S.D. of three experiments. ***, $p < 0.001$, significantly different from the values in NaCl solution and IPM. D#, gel-like microemulsion D.

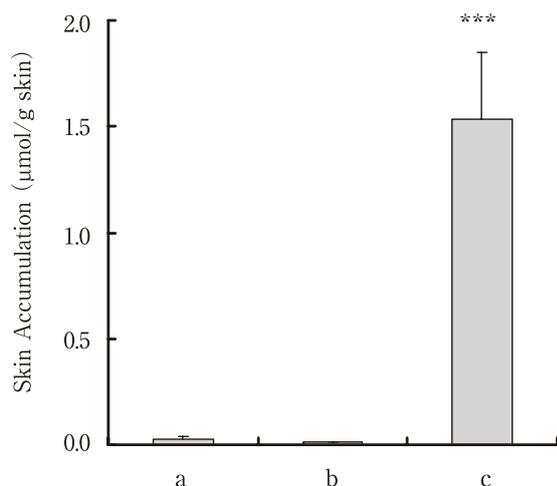


Fig.4 Skin accumulation of genistein in Yucatan micropig skin when applied as a Suspension in either 150 mM NaCl solution (a) or isopropyl myristate (b) and microemulsion D at saturated concentration (140 mM) (c). Data are the means ± S.D. of four experiments. *** $p < 0.001$, significantly different from the values in NaCl and isopropyl myristate.

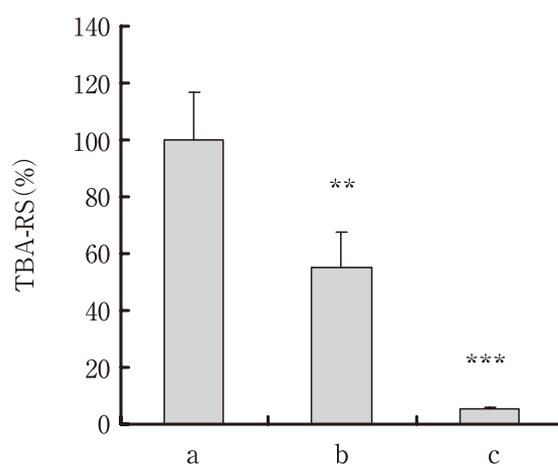


Fig.5 Effect of genistein on lipid peroxidation tested by ammonium iron(II) sulfate and sodium citrate when applied with microemulsion D at 0 mM (a), 20 mM (b) or saturated concentration (140 mM) (c). Data are the means ± S.D. of four experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from the value in the absence of genistein.

テインの例を示すように、皮膚に取り込まれたポリフェノールによって、脂質の過酸化が抑制されていることがわかった^{3,4)}。

3. 4. UV 照射による紅斑形成に及ぼすポリフェノールの影響

ポリフェノールを含有し、ゲル様としたマイクロエマルジョンを皮膚に塗布し、UV照射による紅斑形成に及ぼす影響を観察した。ゲニステインを飽和濃度で含有しエアロジルR972によってゲル様としたマイクロエマルジョンDあるいはクロロゲン酸を飽和濃度含有しカルボポール987によってゲル化したマイクロエマルジョンKをモルモット皮膚に塗布することによって、紅斑形成が抑制されることが肉眼観察及び色差計による赤みの指標 a*値の観察(ゲニステインの場合、コントロール値 4.5 ± 1.7 、飽和濃度の塗布下での値 $1.0 \pm 0.7^{**}$ (n=6, $^{**}p < 0.01$)⁴⁾、クロロゲン酸の場合、コントロール値 5.0 ± 0.8 、飽和濃度の塗布下での値 $0.2 \pm 0.2^{***}$ (n=6, $^{***}p < 0.001$)によって確認された。

4. 考 察

以上の結果より、マイクロエマルジョンによって、ポリフェノールの溶解度が改善し、皮膚移行も顕著に増大し、皮膚中に移行したポリフェノールは抗酸化作用を発現し、UVによる障害を防御することがわかった。また、疎水性のポリフェノールではw/o型の、親水性のポリフェノールではo/w型のマイクロエマルジョンがより有効であることがわかった。例えば、クロロゲン酸においては、vehicle中に添加したクロロゲン酸のうち皮膚に移行した割合は、150 mM NaCl水溶液、マイクロエマルジョンD、マイクロエマルジョンA、マイクロエマルジョンKで、それぞれ0.31%、0.32%、0.18%、0.15%であり、o/w型のマイクロエマルジョンでは、少しではあるが減少することがわかった。これらの結果を総合して考えると、溶解度の増大がマイクロエマルジョンによるポリフェノールの皮膚移行改善の最大の要因であることが推定される。しかしながら、一般に、媒体中の溶解度の増加は、媒体中での化合物をエネルギー的に安定化させ、皮膚への分配性を下げ、皮膚移行量の増大には結びつかない。マイクロエマルジョンの場合は、溶解度の増加とともに皮膚移行量も増大する。その理由は明らかでない。一つの可能性は、マイクロエマルジョンが高密度で皮膚表面に吸着し、界面を中心に存在するポリフェノールの皮膚移行性を上げることである。マイクロエマルジョンの成分が皮膚の角質層脂質と相互作用し、ポリフェノールの角質層への分配性と角質層の透過性を促進している可能性も考えられる^{1,7)}。現在、マイクロ

エマルジョンによるポリフェノールの皮膚移行の改善機構についてさらに検討を進めるとともに、イオン性の界面活性剤を用いたマイクロエマルジョンによるより効率的な皮膚取りこみについて検討を進めている。

5. 総 括

以上の結果、ポリフェノールを含有するマイクロエマルジョンは、ポリフェノールの溶解性を改善し、皮膚移行性を顕著に高めることによって皮膚の光老化を防御するための有用な製剤となりうる事が明らかとなった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究を実施するにあたり協力いただいた神戸薬科大学製剤学研究室の大学院生、卒業研究生の諸氏に深謝します。

(参考文献)

- 1) Pappinen S, Urtti A: Microemulsions in topical drug delivery, In : Smith EW, Maibach HI (eds) : Percutaneous penetration enhancers 2nd ED, CRC, Boca Raton, 2006, 109 - 116.
- 2) Heuschkel S, Goebel A, Neubert RHH: Microemulsions - modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, J. Pharm. Sci. 97, 603 - 631, 2008.
- 3) Kitagawa S, Tanaka Y, Tanaka M, et al. : Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion, J. Pharm. Pharmacol., 61, 855 - 860, 2009.
- 4) Kitagawa S, Inoue K, Teraoka R *et al.*: 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.
- 5) Fujii M, Yamanouchi S, Hori N, *et al.*: Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an in vitro model for skin permeation study, Biol. Pharm. Bull. 20, 249 - 254, 1997.
- 6) Kurihara-Bergstrom T, Woodworth M, Feisullin S, *et al.* : Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for pharmaceutical applications, Lab. Animal Sci. 36, 396 - 399, 1986.
- 7) Delgado-Charro MB, Iglesias-Vilas G., Blanco-Mendez J, *et al.* : Delivery of a hydrophilic solutes through the skin from novel microemulsion systems, Eur. J. Pharm. Biopharm, 43, 37 - 42, 1997.