角質細胞間脂質リポソームの融合に及ぼす Ca^{2+} イオンおよび Limonene の影響

炭田康史・宮嶋孝一郎*

鐘紡(株)化粧品研究所 ☎250-0002 神奈川県小田原市寿町 5-3-28

*京都大学薬学部薬品物理化学 ☎606-8501 京都市左京区吉田下阿達町

Effects of Ca^{2+} ion and Limonene on the Fusion of Stratum Corneum Lipid Liposomes

Yasushi Sumida and Koichiro Miyajima*

Cosmetics Laboratory, Kanebo Ltd.,

5-3-28, Kotobuki-cho, Odawara-shi, Kanagawa 250-0002, Japan

*Faculty of Pharmaceutical Science, Kyoto University,

Shimoadachi-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8501, Japan

The effects of the addition of Ca^{2+} ion and/or limonene on the fusion of stratum corneum lipid liposomes (SCLL) were investigated. SCLL were prepared with ceramide, palmitic acid, cholesterol and cholesterol sulfate. The fusion of SCLL was estimated by using of fluorescent probes in terms of the fusion of the membrane and the mixing of the inner phase of liposomes. The Ca^{2+} ion, which was often used to induce the fusion of liposomes, induced the fusion of SCLL dependently on its concentration. Furthermore, the addition of limonene to SCLL before the addition of Ca^{2+} ion promoted the fusion of SCLL, while the addition of tricaprylin or liquid paraffin gave no effect on the fusion of SCLL. In order to elucidate the factors which bring about the promotion of the fusion, microfluidity of the liposome membrane and the zeta potential of the liposome were studied. Both the increasing microfluidity near the hydrophilic moiety of the liposome membrane by the addition of limonene and the decreasing of surface charge of the liposome by the addition of limonene and Ca^{2+} ion were considered to contribute to the promotion of the fusion of SCLL.

Keywords : stratum corneum lipid / liposome / fusion / Ca^{2+} ion / limonene / microfluidity / zeta potential

1. 緒 言

角質層細胞間の脂質は角層でラメラ構造を形成しており、この構造が角質層のバリア能に大きく寄与していると言われている。これらの脂質組成に関しては Elias や Downing らによって研究がなされ、主にセラミド、コレステロール、脂肪酸、

コレステロール硫酸から構成されていることが明らかとなった^{1, 2)}。

角質細胞間脂質を用いたりポソームに関しては、角質層のバリア能を理解することを目的としたいいくつかの報告がある。まず Gray ら、Downing らはこれらの脂質を用いてリポソームが調製できることを報告しており^{3, 4)}、また Weiner ら

は脂質組成とリポソーム形成能の相関を検討している⁵⁾。さらに宮嶋らはこのリポソームを用いて、薬物透過性を評価するための角層モデルとしての検討を行なっている⁶⁾。著者らは、前報で角質細胞間脂質リポソームの脂質組成と温度感受性の相関について報告した⁷⁾。

一方、リポソームの融合に関する研究は、その評価方法に関する研究とともに多くの報告がなされている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、これらの研究は主にホスファチジルセリン、ホスファチジン酸等の酸性リン脂質を単独で用いたものがほとんどであり、角質細胞間脂質リポソームのような混合脂質での報告は数少ない^{11, 12)}。角質細胞間脂質リポソームの融合挙動を研究することは、角層に存在するシート状ラメラ構造の形成メカニズムを理解する上で非常に重要である。

本報では、角質細胞間脂質リポソームの融合挙動を蛍光プローブを用いて評価した。融合誘起剤として汎用されるCa²⁺イオンの効果を評価するとともに、経皮吸収促進剤としてよく知られているLimoneneを用い、融合に対する影響を他の油剤と比較した。また、これらの現象をリポソーム膜の微視的流動性およびリポソーム粒子のゼータ電位から考察した。

2. 実験

2.1 試料

2.1.1 脂質

Ceramide (Type IV), Cholesterol, Palmitic acid (Na salt), Cholesterol-3-sulfate (Na salt) は、Sigma社製のものをそのまま用いた。

2.1.2 蛍光プローブ

膜流動性評価に用いた1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) は和光純薬社製のものを、3-(4-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl) phenylpropionic acid (DPH propionic acid), 2-(9-Anthroyloxy)stearic acid (2-AS), 12-(9-Anthroyloxy)stearic acid (12-AS) は Molecular Probes社製のものをそのまま用いた。膜融合性評価に用いたN-(7-nitro-2,1,3-benzoxadia-

zol-4-yl)-phosphatidylethanolamine (N-NBD-PE) は Molecular Probes社、N-(lissamine rhodamine B sulfonyl)-phosphatidylethanolamine (N-Rh-PE) は Avanti Polar Lipids社、Terbium (III) chloride (TbCl₃) は Aldrich社、2,6-Pyridinedicarboxylic acid (DPA) は和光純薬社よりそれぞれ購入し、そのまま用いた。

2.1.3 油剤

L-Limonene (LM) は高砂香料社のものを蒸留して用い、Tricaprylin (TC), Liquid paraffin (LP) は和光純薬社製のものをそのまま用いた。

2.1.4 融合誘起剤

融合誘起剤としての塩化カルシウムは和光純薬社製のものをそのまま用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 リポソームの調製

本報にて検討したリポソームの脂質組成は Downing ら⁴⁾ が報告した角質層脂質リポソームの組成であり、モル比にしてCeramide : Cholesterol : Palmitic acid : Cholesterol-3-sulfate = 3.25 : 3.25 : 4.5 : 1.0 (総脂質濃度; 3.7mM) とした。リポソームはBangham らの方法¹³⁾ によって調製した。すなわち、ナス型フラスコ中、脂質混合物 (7.42 μmol) をクロロホルムに溶解した後、ロータリーエバポレーターによってクロロホルムを留去して脂質のフィルムを得た。このフィルムを真空下、約3時間乾燥させ、そこへ100 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH7.5) 2 mLを加えて相転移温度以上 (約80℃) にて振盪してフィルムをはがした後、プローブ型超音波照射器 (BRANSON 社製) にて10分間処理して、目的とする角質層脂質リポソームを得た。

2.2.2 融合の測定

融合誘起剤として300 mM CaCl₂を用いた。また、油剤はエタノール溶液 (0.2wt%) として用いた。融合に対する油剤の影響を測定する場合には、油剤は融合誘起剤添加前に系に加えた。

測定は、膜の融合で評価する方法 (NBD/Rh法)¹⁴⁾ と内水相の融合で評価する方法 (Tb/DPA法)¹⁵⁾ の2法を用いた。測定はすべて25℃にて行

った。

< NBD/Rh 法 >

2.2.1 項のリポソーム組成中に蛍光脂質である N-NBD-PE, N-Rh-PE を各 2 mol% 加え, ラベル化リポソームを調製した。100 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH7.5) 2 mL にラベル化リポソームおよび非ラベル化リポソームをそれぞれ所定量加え, これに融合誘起剤 (および油剤) を加えたときの NBD 蛍光の変化 ($E_x=470\text{ nm}$, $E_m=524\text{ nm}$) を蛍光光度計 (HITACHI Fluorescence Spectrometer F-4010) にてモニターした。融合の程度を表す尺度として Transfer Efficiency (エネルギー移動効率) を式 (1) によって算出した。

$$\text{Transfer Efficiency} = 1 - (F - F_s) / (F_0 - F_s) \quad (1)$$

ここで, F は融合誘起剤 (および油剤) を添加したときの蛍光強度, F_s は融合誘起剤添加前の蛍光強度, F_0 は 20 wt% Triton X-100 を添加したときの蛍光強度を表わす。

< Tb/DPA 法 >

2.2.1 項のリポソーム調製時のバッファーとして 15 mM TbCl_3 /150 mM Na Citrate/20 mM Tris-HCl (pH7.5) を用い, Tb 内包リポソームを調製した。これとは別に, バッファーとして 150 mM DPA/20 mM Tris-HCl (pH7.5) を用いた DPA 内包リポソームを調製した。それぞれのリポソームを 1.0 mM EDTA/100 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH7.5) を溶離液としてゲル濾過 (Sephadex G-50) し, 外相の Tb あるいは DPA を取り除いた。0.1 mM EDTA/100 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH7.5) 2 mL にこれらのリポソームを 200 μL ずつ加え, これに融合誘起剤 (および油剤) を加えたときの Tb 蛍光の変化 ($E_x=300\text{ nm}$, $E_m=546\text{ nm}$) をモニターした。融合の程度を表す尺度として Tb Fluorescence を式 (2) によって算出した。

$$\text{Tb Fluorescence (\%max)} = [(F - F_s) / (F_0 - F_s)] \times 100 \quad (2)$$

ここで, F は融合誘起剤 (および油剤) を添加したときの蛍光強度, F_s は融合誘起剤添加前の蛍光強度, F_0 は Tb および DPA を両方内包したリポソームの蛍光強度を表わす。

2.2.3 粒子径の測定

リポソームの粒子径の測定は光散乱光度計 (大塚電子製, ELS-800) を用い, 動的光散乱法 (DLS) により, 25 $^{\circ}\text{C}$ にて行った。

2.2.4 膜流動性の測定

リポソーム膜構造の微視的な流動性は蛍光プローブ法により検討した^{16, 17)}。リポソーム膜中に取り込ませた蛍光プローブの蛍光偏光度 (P ; Fluorescence polarization) を測定することによって膜流動性が評価できる。

DPH および DPH propionic acid を用いて膜流動性を評価する場合には, リポソーム調製後に DPH あるいは DPH propionic acid のテトラヒドロフラン溶液を加え, 相転移温度以上にて 60 分間加熱してこれらの蛍光プローブを膜中に取り込ませ, 測定に供した。この場合, 脂質に対するプローブのモル量を 1/1000 となるよう調整した。

2-AS および 12-AS を用いて膜流動性を評価する場合には, 脂質とこれらの蛍光プローブをあらかじめ混和してからリポソームを調製した。この場合は, 脂質に対するプローブのモル量を 1/100 となるよう調整した¹⁸⁾。測定はすべて 25 $^{\circ}\text{C}$ にて行った。

また, 各蛍光プローブに対する励起波長および蛍光波長は, DPH の場合 $E_x=360\text{ nm}$, $E_m=428\text{ nm}$, DPH propionic acid の場合 $E_x=366\text{ nm}$, $E_m=434\text{ nm}$, 2-AS および 12-AS の場合 $E_x=365\text{ nm}$, $E_m=439\text{ nm}$ とした。得られた蛍光強度から P 値を前報と同様に算出した⁷⁾。

2.2.5 ゼータ電位の測定

ゼータ電位の測定は大塚電子 ELS-800 を用い, 電気泳動光散乱法により行った。測定は 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温下で行い, バッファーは 20mM Tris-HCl (pH7.5) を用いた。

Fig. 1 Effect of the concentration of Ca^{2+} ion on the fusion of the stratum corneum lipid liposome.

The mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome was 1/40.

Fig. 2 Effect of the mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome on the fusion of the stratum corneum lipid liposome.

The concentration of Ca^{2+} ion was 10mM.

3. 結果および考察

3.1 融合に対する Ca^{2+} イオンの影響

まず、融合誘起剤として汎用されている Ca^{2+} イオンが本リポソームに対して融合誘起するかどうかを検討した。

Fig. 1に Ca^{2+} イオン濃度と融合度 (Transfer Efficiency; TE) の関係を示す。横軸は Ca^{2+} イオンを添加してからの経過時間である。ラベル化リポソームと非ラベル化リポソームの比率は1:40とした。いずれの Ca^{2+} イオン濃度においても、時間の経過とともにTE値の低下、つまり融合度の増加が観察され、また Ca^{2+} イオン濃度の上昇にともなってTE値は低下した。 Ca^{2+} イオン濃度20mMではTE値は約0.5まで下がり、また、これ以上の Ca^{2+} 濃度では外観上著しい凝集が観察され、測定不能であった。Fig. 2にラベル化リポソームと非ラベル化リポソームの比率と融合度の関係を示す。 Ca^{2+} イオン濃度は10mMとした。非ラベル化リポソームの量が増えるほどTE値は低下し、1:60以上の比率ではこれ以上の低下は観察されなかった。ラベル化リポソームどうしの融合ではTE値は低下しなかったことから、ラベル化リポソームと非ラベル化リポソームの間の融合頻度がTE値の低下に影響することが確認された。これらの傾向は融合に関する従来の報告に一致しており、角質細胞間脂質リポソームが Ca^{2+} イ

Fig. 3 Relation between transfer efficiency and Tb fluorescence on the fusion of the stratum corneum lipid liposome.

The mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome was 1/40. Each measurement was carried out at 1 minute after the addition of Ca^{2+} ion.

オンによって融合誘起されることは明らかである。

Fig. 3に Ca^{2+} 濃度に対する膜融合および内水相融合の関係を示す。グラフから明らかなように、 Ca^{2+} 濃度の上昇にともなって膜融合度の上昇 (TE値の低下) および内水相融合度の上昇 (Tb^{3+} 蛍光強度の増加) が観察され、両方法による評価結果は一致した。この結果からも角質細胞間脂質リポソームが Ca^{2+} イオンによって融合誘起されることを確認した。 Ca^{2+} 高濃度域において内水相融合度が低下傾向にあるのは、融合に伴う内包物の漏出が影響しているものと考えられる。

Fig. 4 Effect of the addition of oils on the fusion of the stratum corneum lipid liposome. The mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome was 1/40. The concentration of Ca^{2+} ion was 10mM.

Fig. 6 Relation of Ca^{2+} concentration and LM concentration on the fusion of the stratum corneum lipid liposome. The mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome was 1/40. Measurement was carried out at 1 minute after the addition of Ca^{2+} ion.

3.2 融合に対するLimoneneの影響

融合に対するLimonene (LM) の影響を評価するため、比較としてTricaprylin (TC), Liquid paraffin (LP) を用いた。 Ca^{2+} イオン添加前に各油剤 (LM, TC, LP) を所定量 ($1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-3}$ wt%) 加えてリポソームに取り込ませてから、 Ca^{2+} イオンによって融合誘起した結果をFig. 4に示す。 Ca^{2+} 濃度は10mMとした。LM添加の場合には、添加量の増大にともなって融合の促進 (TE値の低下) が観察され、また 3×10^{-3} wt% 以上の添加では外観上著しい凝集が観察された。一方、TC, LPの場合には添加量にかかわらず、融合度に変化はみられなかった。

また、LMの添加だけでは融合は起こらず、

Fig. 5 Relation between transfer efficiency and Tb fluorescence on the fusion of the stratum corneum lipid liposome enhanced by the addition of LM.

The mixing ratio of the labelled liposome to the no-labelled liposome was 1/40. The concentration of Ca^{2+} ion was 10mM. Each measurement was carried out at 1 minute after the addition of Ca^{2+} ion.

Ca^{2+} イオンの添加によってはじめて融合が起こったことから、LMは融合誘起の作用は有さず、融合促進効果を有するものと考えられる。

同じ条件での融合を内水相で評価した結果を、膜融合の結果とともに示す (Fig. 5)。LM濃度の上昇にともなって膜融合度の上昇 (TE値の低下) および内水相融合度の上昇 (Tb^{3+} 蛍光強度の増加) が観察され、両方法による評価結果は一致した。この結果からも角質細胞間脂質リポソームがLMによって融合促進されることが示唆された。

融合度とLM濃度との相関を、各 Ca^{2+} 濃度ごとに示す (Fig. 6)。すべての Ca^{2+} 濃度においてLMは濃度依存的に融合を促進した。また、 Ca^{2+} 濃度が高いほど、LMの融合促進効果は大きくなった。また、高 Ca^{2+} 濃度ではLM添加によって著しい凝集が観察された。つまり、 Ca^{2+} とLMはそれぞれ融合誘起と融合促進という関係を有しながら、融合に対して相乗的に作用するものと考えられる。

3.3 膜流動性に対するLM, TCの影響

Fig. 7に、蛍光プローブとしてDPHおよびDPH propionic acidを用い、蛍光偏光度を測定した結果を示す。図に示すようにDPHは二分子膜の奥深くに¹⁹⁾、DPH propionic acidは極性基近くに取り込まれる。DPHのP値は油剤の添加

Fig. 7 Effect of the addition of oils on microfluidity of the membrane of the stratum corneum lipid liposome, measured by using DPH or DPH propionic acid. Measurement was carried out 1 minute after the addition of oil.

Fig. 9 Effect of the concentration of Ca^{2+} ion on the zeta potential of the stratum corneum lipid liposome.

量に依存して低下したが、P 値の低下傾向は LM よりも TC の方が大きかった。つまり、TC の方が膜の流動性をより上昇させていることになる。一方、DPH propionic acid の場合では、逆に LM の方が膜を流動化させ、TC はほとんど影響しなかった。したがって、TC が膜の奥深くに侵入するのに対して、LM は膜の浅い部分に留まっていることが示唆された。

蛍光プローブとして 2-AS および 12-AS を用いた場合の結果を Fig. 8 に示す。2-AS はアンスロイロキシ基が親水基近くに結合しており、二分子膜の極性基近傍の流動性を反映する。12-AS はアンスロイロキシ基が疎水基のほぼ中心に結合しており、二分子膜の中心近傍の流動性を反映する^{18, 19)}。グラフから明らかなように、2-AS, 12-AS とともに、LM の方が P 値を低下させ、つまり

Fig. 8 Effect of the addition of oils on microfluidity of the membrane of the atratum corneum lipid liposome, measured by using 2-As or 12-As. Measurement was carried out 1 minute after the addition of oil.

Fig. 10 Relation of Ca^{2+} concentration and LM concentration on the zeta potential of the stratum corneum lipid liposome.

膜の流動性を上昇させた。この結果からも、LM が膜の浅い部分から疎水基中心付近に留まっていることが示唆された。これらの膜流動性の評価結果から、油剤を添加したときのリポソーム膜の状態は、油剤によってかなり異なっているものと考えられる。

一般に経皮吸収促進剤として用いられる物質がリポソームの膜流動性を高めるという報告はいくつかなされている^{20, 21)}。また、融合と膜状態との関係についても、いくつかの報告があり^{22, 23)}、膜の相分離、膜中での intrabilayer particle の生成、および逆ヘキサゴナル相の生成が融合過程において重要な要因であることが示唆されている。

本実験において観察された LM による融合促進のメカニズムは明らかではないが、このような膜状態の変化が融合促進に関わっているものと考え

られる。

3.4 ゼータ電位に対する Ca^{2+} イオン, LM の影響

Ca^{2+} および LM を添加したときの表面的な状態を観察するため, リポソーム粒子のゼータ電位を測定した。

本報のリポソームに Ca^{2+} を加えていくと, その濃度に依存してゼータ電位は約 -80mV から 0 方向へ上昇した (Fig. 9)。これはリポソーム粒子表面への Ca^{2+} イオンの吸着によるものである²⁴⁾。上述の Ca^{2+} 誘起による融合に対しては, ゼータ電位の絶対値の減少, つまり粒子の反発力の低下が一次的な要因として大きく寄与しているものと考えられる。

Fig. 10 に LM 添加によるゼータ電位変化を Ca^{2+} 濃度ごとに示す。いずれの Ca^{2+} 濃度においても, LM 濃度の増加にともなってゼータ電位の絶対値は減少した。このことから, LM を添加することによってリポソーム粒子への Ca^{2+} イオンの吸着量が増大したものと考えられる。この理由は明らかではないが, LM 添加によるゼータ電位の絶対値の減少, すなわち表面のアニオン濃度の減少によって Bridging が起こりやすくなり, 融合が促進されたものと予想される。

4. 結 論

角質細胞間脂質リポソームの融合に及ぼす Ca^{2+} イオンおよび Limonene の効果を評価した。角質細胞間脂質リポソームは Ca^{2+} イオンの添加によって濃度依存的に融合誘起され, 融合過程においては膜の融合および内水相の融合が確認された。また, リポソームへの Tricaprylin あるいは Liquid paraffin の添加では融合促進効果は得られなかったが, Limonene の添加により, 濃度依存的に融合促進効果が得られた。Limonene はリポソーム膜表面近傍の流動性を上昇させ, Ca^{2+} イオン添加によるゼータ電位の絶対値の減少を促進した。これらの結果, 融合が促進されたものと考えられる。

文 献

- 1) S. Grayson, P. M. Elias: *J. Invest. Dermatol.*, **78**, 128 (1982)
- 2) P. W. Wertz, D. T. Downing: *J. Lipid Res.*, **24**, 759 (1983)
- 3) G. M. Gray, R. J. White: *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 1129 (1979)
- 4) P. W. Wertz, W. Abraham, L. Landmann, D. T. Downing: *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 582 (1986)
- 5) D. Kittayanond, C. Ramachandran, N. Weiner: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **43**, 149 (1992)
- 6) K. Matsuzaki, T. Imaoka, M. Asano, K. Miyajima: *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 575 (1993)
- 7) 炭田康史, 西尾裕幸, 岩本美子, 宮嶋孝一郎: 膜 (MEMBRANE), **21**, 326 (1996)
- 8) P. Vanderwerf, E. F. Ullman: *Biochim. Biophys. Acta*, **596**, 302 (1980)
- 9) P. S. Uster, D. W. Deamer: *Arch. Biochem. Biophys.*, **209**, 385 (1981)
- 10) S. Maezawa, T. Yoshimura, K. Hong, N. Duzgunes, D. Papahadjopoulos: *Biochemistry*, **28**, 1422 (1989)
- 11) W. Abraham, P. W. Wertz, L. Landmann, D. T. Downing: *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 212 (1987)
- 12) W. Abraham, P. W. Wertz, D. T. Downing: *J. Invest. Dermatol.*, **90**, 259 (1988)
- 13) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins: *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 14) D. K. Struck, D. Hoekstra, R. E. Pagano: *Biochemistry*, **20**, 4093 (1981)
- 15) J. Wilschut, N. Duzgunes, R. Fraley, D. Papahadjopoulos: *Biochemistry*, **19**, 6011 (1980)
- 16) F. J. Aranda, A. Coutinho, M. N. Berberan-Santos, M. J. E. Prieto, J. C. Gomez-Fernandez: *Biochem. Biophys. Acta*, **985**, 26 (1989)
- 17) 松村秀敏, 岡村浩, 今榮東洋子, 岩本融: 油化学, **43**, 243 (1994)
- 18) T. Inoue, Y. Muraoka, K. Fukushima, R. Shimozawa: *Chem. Phys. Lipids*, **46**, 107 (1988)
- 19) Y.-H. Kim, W. I. Higuchi, J. N. Herron, W. Abraham: *Biochim. Biophys. Acta*, **1148**, 139 (1993)
- 20) C.-K. Kim, M.-S. Hong, Y.-B. Kim, S.-K. Han: *Int. J. Pharm.*, **95**, 43 (1993)
- 21) S. Kitagawa, M. Sawada, H. Hirata: *Int. J. Pharm.*, **98**, 203 (1993)
- 22) 半田哲郎: 薬学雑誌, **111**, 410 (1991)
- 23) P. R. Cullis, B. D. Kruijff: *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399 (1979)
- 24) 古澤邦夫, 小幡千春, 松村英夫, 桑村常彦: 油化学, **41**, 142 (1992)

(受付 2000年7月19日 掲載決定 8月21日)