

生体関連両親媒性物質およびその誘導体
の自己組織化と水溶液物性

*Solution Properties and Self-Organization of
Biocompatible Amphiphiles and Their Derivatives in Water*

内藤 昇

Naoto Noboru

横浜国立大学附属図書館



11737162

2008年3月

51



寄贈者：内藤昇

11737162
生態関連両親媒性物質およびその誘
導体の自己組織化と水溶液物性

377.51
NA

生体関連両親媒性物質およびその誘導
体の自己組織化と水溶液物性

平成18年3月

内藤 昇

横浜国立大学附属図書館



11737162

目次

要旨	1
第1章 序章	
1 緒言	
1.1 リン脂質	7
1.1.1 リン脂質の会合体とその特性	7
1.1.2 素材としての安定性	8
1.1.3 乳化剤としての応用	8
1.1.4 リポソームとしての応用	9
1.2 コレステロール	9
1.3 フィトステロール	10
第2章 実験(理論)	
2.1 相図作成	13
2.2 電子スピン共鳴(ESR)	13
2.3 小角X線散乱(SAXS)	18
2.4 示差走査熱量分析(DSC)	21
2.5 レオロジー	23
第3章 リン脂質の過酸化によるリポソーム水分散液のpH低下	
3.1 序論	33
3.2 実験	33
3.2.1 試料	33
3.2.2 リポソームの調製	34
3.2.3 脂質過酸化の測定方法	34
3.2.4 脂質の分析方法	34
3.3 結果	
3.3.1 卵黄PCからなるリポソーム分散液のpH低下	35
3.3.2 リポソーム分散液中のカルボニル化合物の生成	35
3.3.3 pH、カルボニル化合物とTBA・RSの経時変化	37
3.3.4 カルボニル化合物の分配	37
3.3.5 リポソーム中のリン脂質の組成変化	37
3.4 考察および結論	37

第 4 章 ホスファチジルコリンから成るリポソームの加水分解におけるジアルキルリン酸鎖長の影響

4.1 序論	41
4.2 実験	
4.2.1 試料	42
4.2.2 リポソームの調製	42
4.2.3 脂質の分析方法	42
4.2.4 その他の分析方法	42
4.2.5 ジアルキルリン酸の合成方法	43
4.2.6 メチルジパルミチルリン酸の合成方法	43
4.3 結果	
4.3.1 ジアルキルリン酸によるリポソーム化した PC の加水分解	43
4.3.2 PC の加水分解に及ぼすジアルキルリン酸のアルキル鎖長の影響	44
4.3.3 PC の加水分解に及ぼす温度の影響	45
4.3.4 リポソームの加水分解に対するジアルキルリン酸濃度及びコレステロール挿入の影響	45
4.4 考察	46

第 5 章 短鎖長ポリオキシエチレンコレステリルエーテルからなるベシクル構造

5.1 序論	51
5.2 実験	52
5.2.1 試料	52
5.2.2 相図	52
5.2.3 ベシクルの調製	52
5.2.4 小角 X 線散乱 (SAXS) 測定	52
5.2.5 示差走査熱量測定	53
5.2.6 共焦点レーザー顕微鏡観察	53
5.2.7 電子スピン共鳴 (ESR) 測定	53
5.2.8 蛍光スペクトル	54
5.2.9 光散乱	54
5.2.10 コレステロール基の体積分率の計算	54
5.3 結果と考察	
5.3.1 ChEO_3 /水の相図	55
5.3.2 小角 X 線散乱データ解析	56
5.3.3 ESR 解析	57
5.3.4 DSC 解析	58

5.3.5	ChEO ₃ のベシクル形成	59
5.4	結論	61
第6章	ポリオキシエチレンフィトステロール／ポリオキシエチレンドデシルエーテル の混合系相挙動	
6.1	序論	63
6.2	実験	
6.2.1	試薬	64
6.2.2	相図	64
6.3	結果と考察	
6.3.1	PhEO ₁₀ ／水およびPhEO ₁₀ ／C ₁₂ EO ₄ ／水系の相挙動	64
6.3.2	PhEO ₂₀ ／水およびPhEO ₂₀ ／C ₁₂ EO ₄ ／水系の相挙動	67
6.3.3	5%のPhEO _m ／水系の相挙動	68
6.4	結論	69
第7章	ポリオキシエチレンフィトステロール／ポリオキシエチレンドデシルエーテル の混合系で生成するひも状ミセルのレオロジー特性	
7.1	序論	71
7.2	実験	
7.2.1	試薬	72
7.2.2	相図	72
7.2.3	レオロジー測定	72
7.3	結果と考察	
7.3.1	相図	73
7.3.2	PhEO ₂₀ +C ₁₂ EO ₄ 系でのC ₁₂ EO ₄ の濃度に対するレオロジー	73
7.3.3	PhEO ₂₀ +C ₁₂ EO ₄ 系の濃度に対するレオロジー	76
7.3.4	親水性界面活性剤の親水基のサイズに対するレオロジー	77
7.4	結論	78
第8章	総括	81
	謝辞	82
	本論文を構成する報文等	83
	略歴	84

[Solution Properties and Self-Organization of Biocompatible Amphiphiles and Their Derivatives in Water]

Abstract

Biocompatible amphiphiles and surfactants in water were investigated about stability, self-organized structures and their viscoelastic behavior.

First, the effects of peroxidation and hydrolysis of phospholipid (phosphatidylcholin) were investigated. The liposome, which is self-organized structure of phospholipid, becomes unstable due to the peroxidation of unsaturated hydrocarbon chain of phospholipid. As the result, pH decreases continuously with time. By introducing the anti-oxidants or bubbling nitrogen, the decomposition is prevented and the pH of the solutions are maintained in a neutral range. The effects of added dialkylphosphate or stearylamine on the hydrolysis of liposome composed of phospholipid with saturated hydrocarbon chain were investigated. Only dialkylphosphate hydrolyzed the liposome and stearylamine has no effect. When the hydrocarbon chain of dialkylphosphate is the same as that of phospholipid, the liposomes are hydrolyzed fast. It is considered that the head group of dialkylphosphate would catalyze the hydrolysis. The influence of incorporated cholesterol on the stability of liposome was also investigated.

Second, the self-organized structures of cholesterol and phytosterol-derivative surfactants in water were studied. Trioxyethylen cholesterol ether forms a lamellar liquid crystal in which the bilayer is more rigid than that of conventional surfactant and forms vesicle in water. Polyoxyethylen phytosterol ether forms worm-like micelles in water together with lipophilic amphiphile or cosurfactant. Phase and rheological behavior of the worm-like micelles were extensively investigated.

「生体関連両親媒性物質およびその誘導体の自己組織化と水溶液物性」

要旨

生体関連脂質であり両親媒性を示すリン脂質、コレステロールやフィトステロールは化粧品分野をはじめ、医薬品や食品などの分野で古くから様々な用途（保湿剤、乳化剤、顔料の分散剤、結晶抑制剤等）に用いられてきた。これらの用途の中で、特に界面活性剤としての利用は、安全性や生分解性の観点や、従来一般的である石油系原料由来のものと比較し、エネルギー資源や環境保全への配慮と再生産可能なバイオマス利用体系の構築という面からも重要である。最近ではこれらの脂質を用いたカプセル状の形態をもつリポソームへの応用も図られ、その機能化の観点でも注目されてきている。特に生体膜構成物質であるリン脂質及びコレステロールやフィトステロールにポリオキシエチレンを付加した界面活性剤は、疎水部が2本の炭化水素鎖やステロイド骨格を持ったものであり、一般に使用されている合成系界面活性剤や植物油から作る石鹸とは化学構造が大きく異なる。従ってその溶解挙動や溶液物性にも特徴があると考えられる。これは2本鎖を持つリン脂質は水中に2分子膜が閉じた小胞体（リポソームあるいはベシクル）を形成する事からも分かる。またコレステリル基は炭化水素鎖と異なり、嵩高く柔軟性が低いため液晶構造を形成しやすいと予測される。

そこで、本研究は上記生体関連両親媒性物質およびその誘導体、具体的にはリン脂質、ポリオキシエチレンコレステリルエーテル、ポリオキシエチレンフィトステリルエーテルに注目し、その水中での自己組織化現象、またその安定性と更にはひも状ミセルの粘弾性挙動に関して研究をまとめたものである。

第1章では緒言として研究背景と研究対象である生体関連脂質に関して概説した。第2章では用いた分析評価手法の一般理論を概説した。第3章、4章ではリン脂質の自己組織体であるリポソームの長期保存安定性について、前者では構成脂質の酸化劣化によるpH変化の要因を、後者ではイオン性物質のリポソーム膜への挿入による非酵素的加水分解の要因について、それぞれ化学分析の手法を用いて明らかにした。第5章では短鎖長ポリオキシエチレンコレステリルエーテルと水とで形成されるベシクル様の自己組織体構造を共焦点顕微鏡、小角X線回折、示差走査熱量分析、ESR、蛍光スペクトル分析等にて明らかにした。第6章、7章ではポリオキシエチレンフィトステロールと水によって形成される自己組織体である液晶やひも状ミセルの構造解析について述べた。第6章では溶液物性を相図と小角X線散乱を用いて明らかにし、第7章では粘弾性を静的、動的レオロジー測定により明らかにした。第8章で全体を総括した。以下に各章の構成と要旨を列挙する。

第1章 序章

まず生体関連脂質であるリン脂質の組成や、基本的な水溶液中での自己組織体やその中の一つであるリポソームについて概説した。また、同様の生体関連脂質であるコレステロー

ルやフィトステロールに関してその構造や用途、またリン脂質との相互作用などについて概説した。さらにはこれらの脂質が形成する自己組織体の研究を行った背景について記述した。

第2章 実験（理論）

本研究において形成され自己組織体構造解析にあたり、相図の作成方法と、さらには自己組織体の微視的構造・性質・運動性や巨視的な物性変化等に用いられる物理的解析手法である、ESR（電子スピン共鳴）、SAXS（小角 X 線散乱）、DSC（示差走査熱量分析）、レオロジー測定についてその理論を記述した。

第3章 リン脂質の過酸化によるリポソーム水分散液の pH 低下

リン脂質は水中で 2 分子膜が閉じた小胞体であるリポソームを形成する。ここでは自己組織体であるリポソームの分散安定化に大きく関わるリン脂質の化学安定性に関して検討した。卵黄ホスファチジルコリン（PC）から調製されたリポソームを用い長期保存安定性を pH の変化を基にして検討した。卵黄 PC リポソームを 40°C の恒温層に放置すると、外観の変化（濁度が上昇し沈殿が生じる）と共に pH 低下が起きる。この pH 低下は卵黄 PC の不飽和アルキル鎖の過酸化により起きている事が示された。さらに酸化防止剤である α -トコフェロールのリポソーム中への添加やリポソーム分散液に窒素バブリングを施す事により、中性領域からの pH 低下を防ぐ事が出来る。また完全水素添加大豆リン脂質（CH-SoyaPC）を用いる事で同条件下において、pH 変化は見られない。脂質の酸化と pH 低下との関連は、チオバルビツール反応生成物（TBA-RS）やリポソーム中のカルボニル化合物の生成においても見られる。TBA-RS は 5 日で最大値を示し、その後徐々に減少したが pH は減少を続ける。一方でカルボニル化合物は 20 日の間増え続ける。この事より、TBA-RS は直接 pH 低下と関連せず、むしろ TBA-RS がカルボニル化合物のような第二の過酸化生成物に分解し、これがリポソーム分散物の pH 低下につながったと考えた。この事はリポソームを長期間維持する上で極めて重要な情報となる。

第4章 ホスファチジルコリンから成るリポソームの加水分解におけるジアルキルリン酸鎖長の影響

リン脂質の自己組織体であるリポソームの分散状態を長期間維持させるために荷電物質の添加は不可欠である。しかし、長期安定性にどの様に関与しているかは不明な点が多い。リポソーム中のホスファチジルコリン（PC）には、リポソーム分散液の凝集を防ぐ目的でジアルキルリン酸やステアリルアミンのようなイオン性の両親媒性物質が、負または正の電荷を付与するために添加される。そこで飽和系脂質からなる PC リポソームの長期保存安定性に対するイオン性両親媒性物質の影響を検討した。40°C 保存において負電荷を有する脂質であるジアルキルリン酸の添加によって PC は徐々に加水分解されるが、一方で正電荷を有

する脂質であるステアリルアミンや荷電物質無添加の PC は加水分解されない。種々の炭素鎖長 (C=10,12,14,16,18,20) のジアルキル燐酸を用いて、アルキル鎖長の異なる PC (C=14,16,18) 加水分解を検討した。加水分解率は PC の鎖長とジアルキル燐酸の鎖長がほぼ同じ場合に最大を示す。すなわち、ジミリストイル PC とジパルミトイル PC から成るリポソームの加水分解は、それぞれジミリスチル燐酸とジパルミチル燐酸の添加によって最も加速される。ジステアロイル PC の加水分解はジステアリル燐酸とジミリスチル燐酸の添加により同様な効果が得られる。ジパルミチル燐酸の代わりに、メチルジパルミチル燐酸を添加した時や、エタノールでリポソーム構造を壊した時には加水分解は起きない。これはリポソーム中のジアルキル燐酸と PC の頭部と尾部が並んでいる事、そして燐酸の親水部位が PC のエステル部の加水分解を起こしている事を示している。

PC の 2 分子膜にコレステロールを挿入すると、PC の相転移温度 (T_c) 以上で起きる加水分解を抑制するが、 T_c 以下では加速する。PC のジアルキル燐酸による加水分解は 2 分子膜の流動性に関与し、流動性が増す事により加速すると考えられる。これはコレステロールがリポソームの T_c 以上では流動性を抑制し、 T_c 以下ではこれを増す事と対比される。この様にコレステロールはリン脂質で形成される分子集合体の安定性に大きく関連している事を明らかにした。

第 5 章 短鎖長 POE コレステリルエーテルからなるベシクル構造

リン脂質と複合体を形成するコレステロールは、そのままでは水に不溶性であるが POE などの親水基を付与する事によって界面活性剤として用いる事ができる。コレステロール基は界面活性剤としては疎水鎖としての役割を持つ。非イオン界面活性剤であるトリオキシエチレン POE コレステリルエーテル (ChEO_3) と水の自己組織化を顕微鏡、小角 X 線回折、示差走査熱量分析、ESR、蛍光スペクトル分析にて解析した。75%以上の濃度でラメラ液晶固有の相が得られる。この相は典型的 L_α 相と比較し剛直でより配向性が高い 2 分子膜で構成されていると思われる。しかし同じ長さの EO 鎖を持った非イオン界面活性剤系で出来る L_β 相のものと比較するとそこまでは至らない。この相の特質は界面活性剤の親油鎖が剛直で嵩高い事による。この液晶相の水の分散物は、比較的濃度が薄いところから多様な粒子形態で安定なベシクルを形成する。この様なコレステロールの構造特性は第 4 章で示唆されたリン脂質との複合化の特性に関連していると思われる。

第 6 章 ポリオキシエチレンフィトステロール/ポリオキシエチレンドデシルエーテルの混合系相挙動

天然で植物性の疎水基を持つポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m) はコレステロールに類似しており、水中での相挙動とポリオキシエチレンドデシルエーテル (C_{12}EO_n) を添加した系の相挙動について検討した。 PhyEO_{10} /水の 2 成分系においてはミセル溶液 (W_m) や、同定できない光学的に異質な液晶相 (X) とラメラ相が、室温領域

で界面活性剤濃度が上昇すると順次形成される。より親水的な PhyEO_{20} の場合、水との 2 成分系で W_m 及びキュービックミセル相とヘキサゴナル相が形成される。この 2 種の PhyEO_m タイプの界面活性剤希薄溶液に C_{12}EO_4 を添加する事により、高い粘弾性を示すひも状ミセルが形成される。さらに X 相に C_{12}EO_4 を添加すると、広い濃度領域で L_α 相が形成される。 $\text{PhyEO}_{10}/\text{C}_{12}\text{EO}_4/\text{水系}$ においては X 相から L_α 相への転換は長方形のリボン相を通して起きる。また 5% の PhyEO_m ($m=5-20$) の相挙動を広い温度領域 ($20-100^\circ\text{C}$) で調べた。 $m < 8$ では全温度領域で相分離が見られる。中程度の EO 鎖 ($11 < m < 16$) の場合、温度上昇に伴い小さなミセルは一次元的に著しく成長し、粘弾性を示すひも状ミセルが形成されその後相分離を起こす。一方、長鎖 EO の場合全温度領域で小さな凝集体であるミセルが形成される。コレステロールに比較して生じる特性の差異は、形成される自己組織体の構造が末端分岐構造の高さによって生じているものと思われる。

第 7 章 ポリオキシエチレンフィトステロール/ポリオキシエチレンドデシルエーテルの混合系で生成するひも状ミセルのレオロジー特性

第 6 章で論じたポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m $m=10$ and 20) の希薄溶液とポリオキシエチレンドデシルエーテル (C_{12}EO_n) 系では、一次元的にミセル成長し急激な粘弾性の上昇が観察される。 $\text{PhyEO}_m + \text{C}_{12}\text{EO}_n$ ($n=2-5$) の静的・動的粘弾性測定によれば混合する C_{12}EO_n の EO 鎖が短くなるに従ってミセルの一次元的な成長は増大する。しかし EO 鎖が非常に短い場合、ミセル成長が起きる前の低濃度領域において相分離が観察される。 C_{12}EO_3 と C_{12}EO_4 の添加系における溶液の粘弾性はマクスウェルモデルと良く一致する。これはひも状ミセルにずりをかけると、へびがうねるような (reptation) 動きにより応力が緩和される事を示唆している。 PhyEO_m の濃度が増したりこの EO 鎖が短くなったりすると一次元的なミセル成長は促進される。コレステロール系界面活性剤においても、 C_{12}EO_n の添加とともにひも状ミセルが形成され粘弾性が上昇するが、フィトステロール系界面活性剤の方がより粘弾性が増大する事が明らかとなった。これも前章で示唆した分子構造の差による、自己組織化の違いによるものと考えられる。

第 8 章 総括

本研究で得られた結果をまとめ、今後の展望について記述した。

第1章 序章

1. 緒言

本研究は、生体関連両親媒性物質の自己組織化と水溶液物性研究に関するもので、生体関連両親媒性物質としてはリン脂質、コレステロール、フィトステロールおよびそのポリオキシエチレン付加物を研究対象とした。リン脂質は代表的な脂質で生体由来の界面活性剤であり、安全性や機能性において優れ様々な応用例が報告されている。その中でも組織化された分子集合体としてのリポソームは、その機能性を駆使した応用研究において注目を集めている⁽¹⁾。

また細胞膜中で関連の深い脂質であるコレステロールおよびフィトステロールは、組織化された分子集合体中の疎水鎖としての挙動については興味深く、また親水基を付与した界面活性剤は環境適合性や安全性が高く、様々な応用化が図られている。しかしながらこれらの自己組織体の水溶液物性に関しては報告が少ないのが現状であり、界面活性剤としての応用例はそれ程多くはない。これは通常用いられている疎水基である脂肪酸鎖との機能性や界面化学特性における差が明確ではない事や、一般の界面活性剤に比較して安価ではない事に因ると思われる。

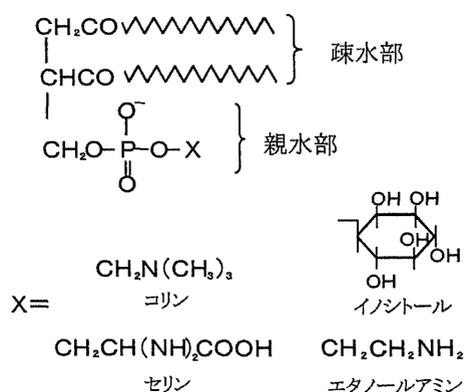


図1.1-1. リン脂質の構造式

1.1 リン脂質

リン脂質は生体膜構成成分として自然界に広く存在するが、原料として主な供給源は、植物系では大豆が、動物系では卵黄が挙げられる。大量かつ安価に入手できる大豆リン脂質に対し、卵黄リン脂質はそれほど安価ではないものの、乳化作用のあるPC（ホスファチジルコリン）が比較的高濃度含まれるという特徴がある。図1.1-1と表1にリン脂質の一般的な構造式と、大豆および卵黄リン脂質の組成を示す⁽²⁾。

1.1.1 リン脂質の会合体とその特性

リン脂質は、リン酸のエステルからなる親水部分とアシル基からなる親油部分を有する両親媒性の物質である。水和している極性基と非極性基の占める容積により、図1.1-2に示

表 1. 卵黄および大豆リン脂質の組成⁽²⁾

成分名	卵黄リン脂質	大豆リン脂質
PC(ホスファチジルコリン)	83.3(%)	33.3(%)
PE(ホスファチジリエタノールアミン)	11.9	14.1
PI(ホスファチジリンシトール)		16.8
PA(ホスファチジン酸)		6.4
SPM(スフィンゴミエリン)	1.9	
LPC(リゾホスファチジルコリン)	1.9	0.9
その他のリン脂質		14.3
糖脂質		14.3

す3種類の会合体に大きく分類される⁽³⁾。これらの会合体の構造や形態は、極性基と非極性基のバランスだけでなく、水相のpHや塩の存在によっても異なる。特にシリンダー型分子の場合、単独または組み合わせにより、2分子膜からなるリポソームを形成する。

またリン脂質は水の存在により層状構造を形成し、層間に水を保持する事が可能となる。Chapmanら⁽⁴⁾はPCの結合水が約20%であり、PC1分子あたりに約10分子の水が結合していると報告している。

皮膚柔軟性という観点から検討した例では、対照として用いたグリセリン単独系よりも、リン脂質添加系の方が皮膚柔軟効果の持続性を有する事が認められている⁽⁵⁾。この性質は、皮膚に塗布した場合に、リン脂質が保湿剤としても有効である事を示している。

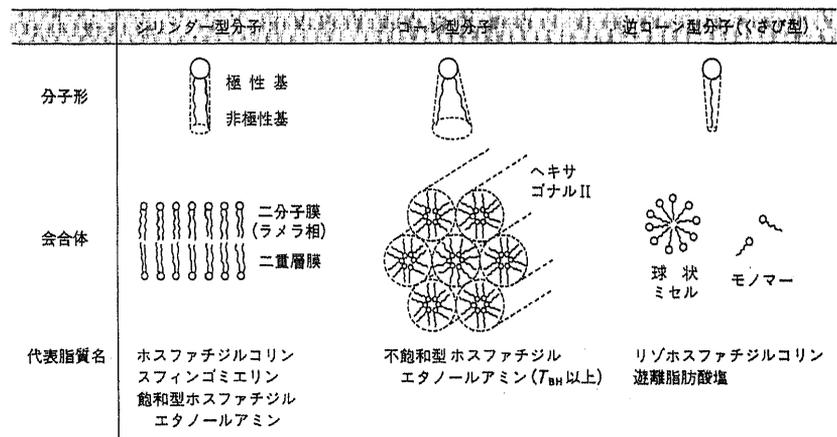


図 1.1-2. 脂質の分子形状とその会合状態⁽³⁾

1. 1. 2 素材としての安定性に関して

リン脂質の応用化に際しては、化粧品の様な外用剤として用いる場合などは長期にわたり室温を中心とした幅広い温度領域で品質を保証しなければならない。しかし天然のリン脂質は不飽和脂肪酸残基を有する為、酸化による経時安定性に問題が生じる。その為用いるリン脂質には、特に水分散系では物理的変化(凝集・粒径・沈降など)および化学変化(着色・変臭・脂質分解など)を最小限に抑えなければならない。菊池らは、リポソームの水分散系での長期保存安定性について、以下の条件でその品質を良好に保つ事が出来ると述べている⁽⁶⁾。

- ・過酸化価の低いものを選定する
- ・窒素置換を行う
- ・初期pHを6~7に設定する
- ・等張剤として糖やポリオールを用いる

化粧品分野でリポソームを応用する場合は、さらに酸素・熱・光などに対して、放置条件を問わず長期間(室温度3年間)の安定性確保が必要である。また様々な分散剤に対しても、長期保存の影響を知る事は意義がある。

1. 1. 3 乳化剤としての応用

リン脂質エマルションの応用例としては、食品、化粧品、医薬品などが挙げられる。食

品で利用されるエマルションに関しては、マヨネーズやマーガリンと言った O/W 型や W/O 型のエマルションが挙げられるが、不飽和脂肪酸鎖主体のリン脂質を用いており長期保存に関する知見が少なく、長期保存での品質を保証している化粧品とはこの点で大きく異なる。医薬品関連ではいわゆるリピッドエマルションが応用例として挙げられる。この剤型は基剤として大豆油を 10~20%、乳化剤としてリン脂質を約 0.8~1.8%、等張化剤としてグリコール類を 2.5%以上含んだ O/W 型のエマルションである⁽⁷⁾。現在の典型的な処方骨格は 1961 年に Wretling らにより開発された Intralipid が基本になっている⁽⁸⁾。リピッドエマルションは経口での栄養補給が困難な患者に対して、静脈に栄養剤としてカロリー補給を行うために開発されたものである。従って、このエマルションを静脈注射用の製剤として用いるときは、毛細血管を閉塞させないために 1 μ m 以上の粒径の油滴を含まない、平均粒径が 0.2~0.3 μ m のものが必須条件となる。これらの研究は Davis らや Benita らが精力的に報告している⁽⁹⁾。

医療分野では、卵黄リン脂質が検討されてきているが、化粧品分野においては長期保存安定性において品質上の問題がある。最近では高度に水素添加された、高純度のリン脂質が比較的安価に手に入るようになり、酸化劣化などの欠点が大幅に解消され安定性が向上した。このため化粧品分野でもリン脂質は幅広い応用が可能となってきた。

リン脂質は水にも油にも溶けにくい、HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) のつりあった乳化剤である。水中で殆どの分子が会合体を形成している事もあり、経皮吸収を促進するとは考えにくく、その結果として皮膚に対する安全性は高いと言える。また被乳化油の HLB を考慮する必要が少なく、化粧品の製剤開発において有利な特性を多く備えている有用な脂質であると言える。

1. 1. 4 リポソームとしての応用

1960 年代中ごろ、イギリスの Bangham は生体膜の構成成分のひとつであるリン脂質を単離し、これを再び水中に分散させ、閉鎖型の小胞体 (ベシクル) を形成させる事を見出した⁽¹⁰⁾。このリン脂質からなるベシクルを脂質の意味の lipo と細胞体の soma との合成語としてリポソームと称された。医薬品に関してはターゲッティングや毒性低減の DDS (drug delivery system) 製剤として活発に研究されてきている⁽¹¹⁾。化粧品でもその機能性の面から応用化検討はされているが、前述したように長期間にわたり物理的・化学的変化のない事が要求される為、実用化は難しいのが現状である。

1. 2 コレステロール

コレステロールは生体に必須の脂質であり、界面活性剤として用いた時の生体適合性の高い疎水基としても興味深い。すなわち、胆汁酸などは疎水基としてコレステロール骨格を持ち、生体内界面活性物質として脂質の吸収に大きく関与している⁽¹²⁾。また POE (Polyoxyethylene) 鎖の付加した界面活性剤としての溶存状態についても通常の炭化水素

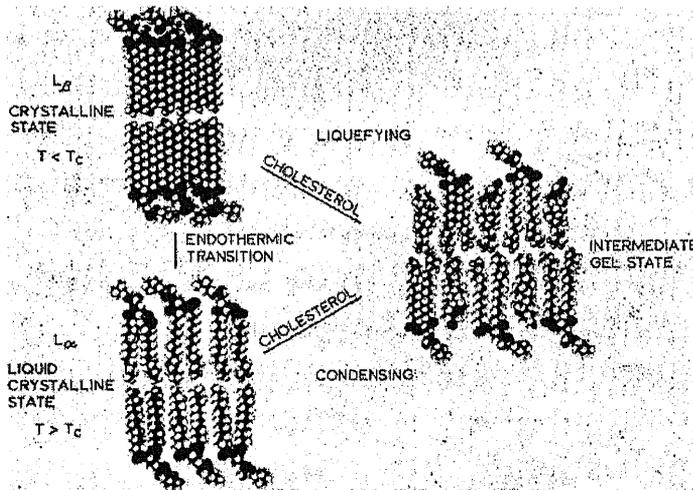


図 1.2-1. リン脂質とコレステロール相互作用⁽¹⁵⁾

また前述したように天然由来の水素添加リン脂質は通常の使用温度領域に T_c があり、この温度領域での保存は膜の相分離が生じ、リポソーム自身の凝集や内包物質の透過を引き起こす。これに対して、リン脂質 1 モル当たり 0.2 モル以上のコレステロールの添加により、 T_c の主転移が消失し⁽¹⁴⁾膜の安定化が図られる (図 1.2-1) ⁽¹⁵⁾。

このように生体適合性脂質であるコレステロールやこれを疎水鎖とした界面活性剤分子集合体の自己組織化の検討を行う事は極めて有意義であると考ええる。

1. 3 フィトステロール

動物の細胞膜中ではコレステロールが主要なステロールであるが、植物細胞膜では β -シトステロールやカンペステロールに代表されるフィトステロールが主要なステロールである。構造的にはコレステロール骨格の C_{24} 位に種々の置換基を持ち、生理的役割はこの為に大きく異なる⁽¹⁶⁾。

コレステロールと同様に疎水鎖としての役割を期待し、生体適合性の高い界面活性剤として市販されているものの、その分子集合状態はあまり研究されていない。これはコレステロールと分子の組織化挙動にあまり差がないと見なされている事によると思われる。しかしながらこの僅かな構造の違いによる溶液物性の差については興味深い研究もなされており⁽¹⁷⁾、また昨今の動物関連の疾患 (BSE やウイルス感染症など) に対する危惧から、植物性ステロールの需要が高まっている。すなわちこの疎水鎖からなる界面活性剤の自己組織化と水溶液物性を知る事は今後の様々な応用化に際し極めて有意義であると考ええる。

鎖にない興味深い挙動を示している⁽¹⁸⁾。

また生体膜との相互作用も研究され、リン脂質との疎水的作用については興味深い知見もある。リン脂質には熱履歴によるゲル-液晶相転移 (T_c) が見られるが、コレステロールは T_c 以下ではリン脂質の疎水基間の相互作用を弱め (fluidizing)、 T_c 以上ではこれを強めるため (condensing)、膜を安定化し、内包した薬剤の膜透過性を抑制する事はよく知られている。

[参考文献]

- 1) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 “リポソーム”, 南江堂 (1988).
- 2) 佐藤清隆, 他監修, “機能性脂質の開発と応用”, シーエムシー (1992).
- 3) P.R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim.Biophys.Acta.*, 559, 399 (1979).
- 4) D.Chapman, et al (ed.), “Formation and Function of Phospholipids”, Elsevier Scientific, 117 (1973).
- 5) 鹿子木, 西山聖二, 山口道弘, *Fragrance Journal*, 19, 49 (1991).
- 6) 菊地寛 他, 第1回製剤と粒子設計シンポジウム 講演要旨集, 60 (1987).
- 7) 石井文由, 材料技術, 11, 11 (1993).
- 8) O. Schuberth, A. Wretling, *Acta. Chir. Scand. Suppl.*, 278, 3 (1961).
- 9) C. Washington, S. J. Taylor, S. Davis, *Int. J. Pharm.*, 46, 25 (1988).
L. Illum, P. West, C. Washington, S. Davis, *Int. J. Pharm.*, 54, 41 (1989).
M. Y. Levy, S. Benita, *Int. J. Pharm.*, 54, 103 (1989).
M. Y. Levy, L. Langerman, S. Gottschalksabag, S. Benita, *Pharma. Res.*, 6, 510 (1989).
- 10) A. D. Bangham, M. M. Standish, J.C. Watkins, *Mol. Biol.*, 13, 238 (1965).
- 11) 例えば M. Furusawa, E. Kumazawa, K. Morisita, K. Murakami, S. Shibamura, S. Maeda, S. Hirota, H. Kikuchi, K. Yachi and M. Sawada, Studies on techniques for intercellular introduction of macromolecules, in: Recent Progress of Life Science Technology in Japan, Academic Press, Tokyo, 225 (1989).
- 12) 矢後和男, 篠田耕三, 油化学, 38 (3), 27 (1989).
- 13) H. Soderlund, J. Sjoblom, T. Warmheim, *J. Dispersion Sci. Technol.*, 10 131 (1989).
- 14) B. D. Landbrooke, R. M. Willoams, D. Chapman *Biochim.Biophys.Acta.*, 150, 333 (1968).
- 15) R. A. Demel, and B. De Kruijff, : *Biochem. Biophys. Res. Acta.*, 457, 109 (1976).
- 16) C. V. Vahouny et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 37, 805 (1983).
- 17) B. Folmer, M. Svensson, K. Holmberg, W. Brown, *J. Colloid Interf. Sci.*, 213 112 (1999).

第2章 実験（理論）

2. 1 相図作成

各種試料を精密秤量し、アンプル中に封入した後に熱を加えながらヴォルテックスミキサーを用いて十分に攪拌する。粘性が高いサンプルに関してはミキサーでは十分な混合が行えないため、中間部分を細めたサンプルを作成し、遠心分離を用いて狭部を繰り返し強制的に通過させることでサンプルの均一性を高める。サンプルは平衡状態に達するまで、25°Cの恒温槽に数日から数週間放置する。その後目視にて相平衡図を作成する。液晶の検出は偏光板とアンプルに光を透して観察する。液晶の型は偏光顕微鏡観察と小角 X 線散乱 (SAXS) 測定より同定する。

2. 2 電子スピン共鳴 (ESR)

電子スピン共鳴 (electron spin resonance ; ESR) とは、電子スピンの示す磁気共鳴現象であり、不対電子を有するイオンや分子が測定対象となる。その測定は有機ラジカルの構造、電子の移動、反応中間体および反応過程の研究に威力を発揮するほか、スペクトル解析により得られるパラメーターは分子運動や周りの状態を反映するという事実から、物性を調べる研究手段としても利用される^(1,2,3)。

本研究では界面活性剤溶液の微視的集合状態を研究する目的で、微量のスピンプローブ剤（脂肪酸骨格にニトロキシラジカルが付加したもの）を導入し、会合体の界面膜の分子状態について検討を行った。以下にこのスピンプローブ法とスペクトル解析により得られる各種パラメーターの算出方法と意味について説明する。なお ESR の共鳴原理、 g 値、線幅、強度、超微細構造（電子スピンと核スピンの相互作用）および微細構造（電子スピンの分裂：ビラジカルや三重項状態）については総説などを参照されたい⁽²⁾。

スピンプローブ法

不対電子を持たない系は ESR の測定対象とならない。これを逆に利用したのがスピンプローブ法である。すなわち対象となる反磁性物質の系に、不対電子を持った化合物をプローブあるいはラベルとして共存させ、スピンの磁氣的挙動を通して元の物質の構造、機能や物性などを知る方法である。スピンプローブとしては例外的に安定で、構造の明らかなラジカル種を用いる。本研究ではニトロキシラジカル誘導体を用いた。スピンプローブ法において対象となる系を最もよく知る手がかりはラジカル部分の運動性である。従って運動性の変化が如何に ESR スペクトルへ反映されるかを、理論的且つ実験的に解明する事が重要となる。

ニトロキシラジカルの場合 ESR スペクトルは、電子スピンの磁気モーメントが ^{14}N 核スピン（磁場中では量子化され $-1, 0, +1$ の状態をとる）の磁気モーメントと相互作用するために図 2.2-1 で示される様な 3 本の吸収線に分裂する（超微細結合）。そして回転拡散の速さにより、ラジカルの速やかな等方的回転ブラウン運動により、異方性が平均化された

パターン (図 2.2-1 (E)、溶液スペクトル) から中間の複雑なスペクトルを通り、運動性が束縛されあらゆる向きのラジカルからの寄与の重ね合わさったパターン(図 2.2-1 (D)、粉末スペクトル) へ変化する。これ以上遅い運動となると、ESR スペクトルに変化がなくなり議論できなくなる。ここで運動性の早遅の表現は相対的なものであり、異方性を平均化するほど早いかどうかということである。 N 核中、超微細構造の異方性の大きさは $\Delta T = A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy}) \approx 30 G$ であり、これは周波数に換算すると $10^8 Hz$ に相当する。従って $10^{-8} s$ という時間に比べて早い遅いによりスペクトル線形は変化する。分子運動の速さは回転拡散運動の相関時間 τ_R で定義される。通常 ESR スピンプローブ法では $10^{-11} s < \tau_R < 10^{-6} s$ の時間領域の回転を測定することができる。その中でも $10^{-11} s < \tau_R < 10^{-9} s$ の時間領域は **rapid tumbling limit** と呼ばれ、図 2.2-1 (E) に近いスペクトルを与える。 $10^{-9} s < \tau_R < 10^{-6} s$ の時間領域は拡散運動が遅い場合で、異方性の残った複雑なスペクトルとなる。

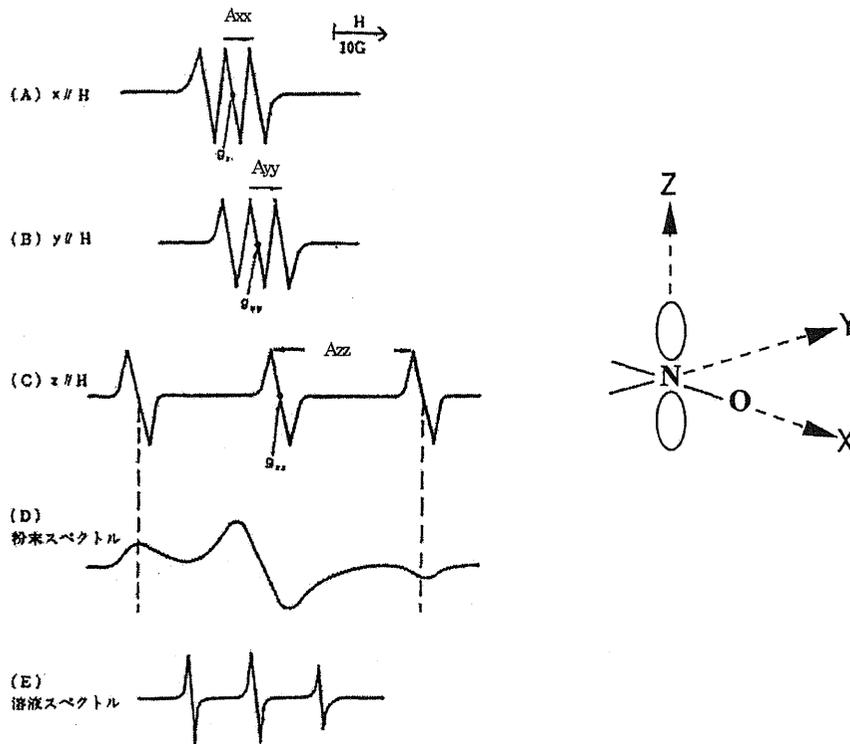


図 2.2-1. ニトロキシラジカルによる ESR スペクトル。(A) (B) (C) はそれぞれ外部磁場がラジカルの主軸系 (X, Y, Z) に向いている場合で、それぞれの場合に得られる共鳴中心 g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , そしてスペクトル分裂幅 A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} が g および T テンソル主値である。(D) は遅い運動、(E) は早い運動状態の場合のスペクトルである。

ニトロキシラジカルの ESR スペクトル \mathcal{H} は、電子のゼーマン相互作用と、 N 核スピンの超微細相互作用の総和であり、次式により記述される。

$$\mathcal{H} = \beta \cdot H \cdot g \cdot S + S \cdot \mathcal{T} \cdot I$$

ここで、 H は磁場ベクトル、 S および I は電子および核スピンの演算子、 g は g テンソル、 \mathcal{T} は超微細結合テンソルである。スピンプローブ法の場合、核ゼーマン項は無視されることが多い。

A ; 運動が速い場合

この領域にあるプローブの ESR スペクトルは triplet である。各線幅の広がりには平均化の影響が現れ、運動が速いほど線幅が狭く、運動が遅いほど線幅が広がり、ばらつきが出てくる。運動が速い場合、中心の線幅 (δH) と 3 本線の相対的な高さ ($I(+1), I(0), I(-1)$) から回転拡散の相関係数 τ_R を求めることができる(4, 5)。

$$\tau_R = 6.5 \times 10^{-10} \left(\left(\frac{I(0)}{I(-1)} \right)^{1/2} - 1.0 \right) \delta H$$

τ_R は理想的な等方性回転の場合、Einstein-Stokes の式より ($\tau_R = 4\pi r^3 \eta / 3kT$) から計算することも出来る。 η は媒体の粘度、 $4\pi r^3 \eta$ はラジカル分子の半径である。

12-ドキシルステアリン酸をスピンプローブとして用いた界面活性剤溶液の ESR 測定では速い運動性を示すスペクトルが得られ、上記式により回転拡散運動の相関時間を算出し、界面活性剤分子の運動性の検討が出来る (図 2.2-2)。

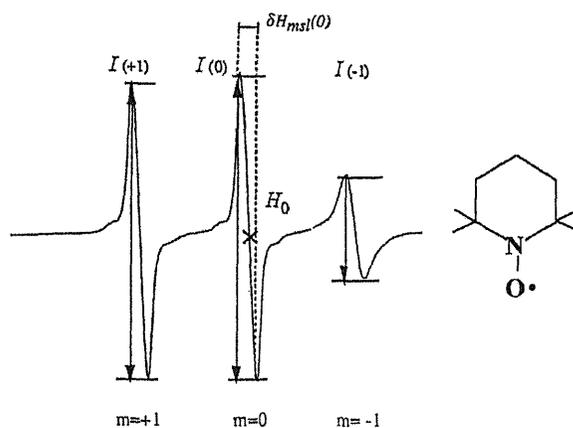


図 2.2-2. ラジカル (TEMPO) の ESR スペクトル

B ; 運動が遅い場合

液晶など分子が配向して長距離秩序を持つ系では、種々の相が形成されこの秩序の度合いを評価するオーダーパラメーターが重要となる。 Z 軸が時間平均としてどの程度回転軸の方向に揃っているかを示すオーダーパラメーター (S) は次のように定義される。

$$S = (3 \cos^2 \theta - 1) / 2 = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / [A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})]$$

ラジカル分子の Z 軸が全て回転軸の方向に配向している時は、 $S=1$ ($\cos \theta=1$) で、完全に等方的な回転をしている場合には $S=0$ ($\cos \theta=1/\sqrt{3}$) になる。

実測の ESR スペクトル (図 2.2-3) においては、種々の原因により A_{\perp} の正しい値が求まらないことが有るがスペクトルの最少分裂幅とほぼ一致する。一方 A_{\parallel} の正確な値は、スペクトルの両端の吸収極大と一致することから、容易に求めることが出来る。

そこで $a_N = (1/3)(A_{\parallel} + 2A_{\perp})$ の関係を用いて上式を書き換え、

$$S = (3/2)(A_{\parallel} - a_N) / [A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})]$$

として S 値を求めることも多い。ただし、座標軸の変換によりテンソルの値は変わらないので、 a_N の値は次式から求める。

$$a_N = (1/3)(A_{zz} + A_{xx} + A_{yy})$$

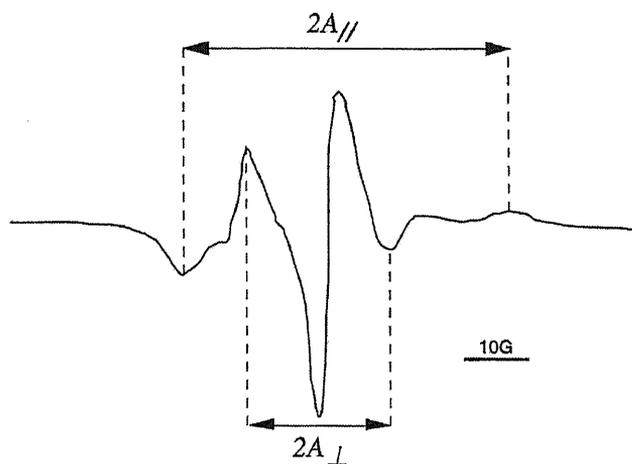


図 2.2-3. ラメラ液晶中での5-ドキシルステアリン酸のESRスペクトル

但し、ラジカルの等方性超微細結合定数の値 a_N はラジカルのおかれる極性環境によって大きく変化するよって次式により補正を行う。

$$S = \{ (A_{\parallel} - A_{\perp}) / [A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})] \} (a_N / a_{N'})$$

上式で a_N は上式中の関係から求め、 $a_{N'}$ の値は実測値を用い下記の式より求める。

$$a_{N'} = (1/3)(A_{\parallel} + 2A_{\perp})$$

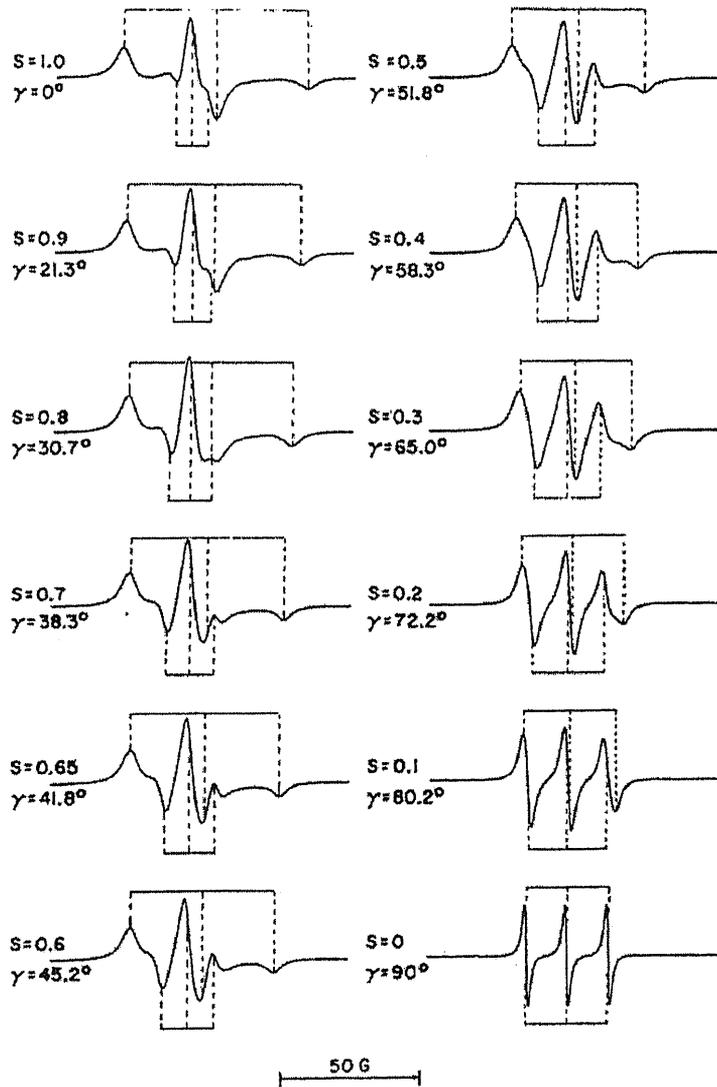


図 2.2-4. オーダーパラメーター S によるスペクトル線形の変化

本研究で用いたドキシルステアリン酸ラジカルの超微細結合テンソルの主値はそれぞれ $A_{xx}=6.3$, $A_{yy}=5.8$, $A_{zz}=33.6G$ である。 S 値の変化に伴うスペクトルの線形変化を図 2.2-4 に示す。

2. 3 小角 X 線散乱 (SAXS)

X 線は 0.1nm オーダー程度の非常に短い波長を有する電磁波である。その回折現象を利用し 1912 年に Bragg 父子が結晶回折を行って以来、種々の物質の構造解析に利用されている。しかし X 線散乱というとその大部分が単結晶あるいは粉末結晶を試料としたもので、得られる情報は原子の配置である。結晶以外の系（液体、溶液、コロイドやミセル、アモルファス固体等）を対象とした測定では、原子や分子がどの程度はなれているという微視的な見方より、もう少し広い範囲で系を眺める必要がある。このような目的で行う測定が小角 X 線散乱 (small-angle X-ray scattering; SAXS) であり、微視的情報は得にくい、広い空間での状態（凝集状態や分布など）をとらえる事が出来る。すなわち、電子密度のゆらぎに起因する 1~100nm 程度のサイズの構造が評価できる。

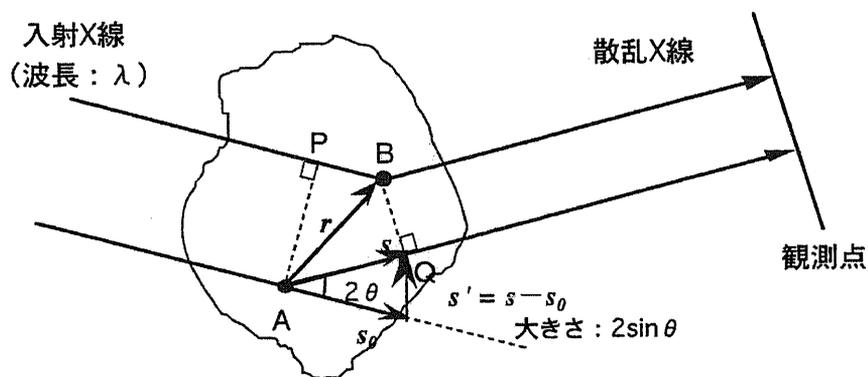


図 2.3-1. 単独粒子による散乱波の干渉

空間的に広い範囲を見るためになぜ小角散乱を用いるかと言うと、X 線回折現象では、電子の分布（実空間ではディメンションは[長さ]）をフーリエ変換した逆空間（ディメンションは[長さ]⁻¹）を見ており、大きな実空間の情報は小角領域にある（散乱ベクトルの小さい領域）にあるという相反則によるものである。

観測にかかる逆空間の位置は散乱ベクトル q で示される。ある物質内の散乱点 A、B を考え、図 2.3-1 のように、入射 X 線ビーム方向の単位ベクトルを s_0 、散乱角方向の単位ベクトルを s とする（散乱角 2θ 、 $s' = s - s_0$ ）。散乱点 A と B を通って観測点へ来る波の間には行路差がある。

$$\text{行路差} = \overline{AQ} - \overline{BP} = (s - s_0) \cdot r$$

この行路差に対応して 2 つの波はずれ、その分だけ位相差を持つことになる。行路差が 1 波長 λ に等しいときの位相差を 2π であると定義すると、

$$\begin{aligned} \text{位相差} &= 2\pi / \lambda \cdot \text{行路差} \\ &= 2\pi / \lambda \cdot (s - s_0) \cdot r \\ &= q \cdot r \end{aligned}$$

となる。この式の q が散乱スペクトルであり、次式で定義され、SAXS 測定で得られる規則構造の面間隔 d と反比例の関係になる。

$$q = 4\pi / \lambda \sin \theta = 2\pi / d$$

また Bragg の式から

$$\sin \theta = n\lambda / 2d \leq 1$$

であるので、少なくとも $\lambda < 2d$ で無ければ回折は起こらない。式中の n は反射次数を表しているが、この代わりに面間隔が d/n であるような仮想的な結晶面 (hkl) からの 1 次反射と考える習慣になっている。

小角領域には粒子間干渉と粒子内散乱による、2 つのタイプの散乱現象が見られる。

- (1) 長距離周期性に由来するシャープなピークを持つ散乱 (長周期構造の解析)
- (2) 角度とともに次第に強度が減少する散乱 (溶液構造の解析)

後者は周期性によるのではなく媒体の電子密度の不均一性に由来し、この場合粒子同士に相互作用が無く、溶液中に粒子が完全にランダムに分布しているという仮定で粒子 1 個の大きさ、形状、構造を解析するものである。以下にそれぞれについて説明する。

(1) 長周期構造の解析

ある程度高濃度である場合や、粒子が電荷を帯び静電相互作用を及ぼしうる場合には、相互作用の影響で粒子が規則的な空間分布をとる。この場合、粒子間干渉によるピークが現れる^(6,7,8)。逆にいえば粒子間干渉ピークを解析すれば粒子間距離、規則構造の格子系、規則性の高さ、さらにはそれらの根源となる相互作用の本質について知見を得ることが出来る。

界面活性剤分子の形成する液晶構造には、一次元 (ラメラ液晶)、二次元 (シリンダー、ヘキサゴナル液晶) および三次元格子を組むもの (キュービック液晶; discontinuous 型, bicontinuous 型) が知られている。これらの構造由来の散乱は会合体の粒子間干渉効果に

より特徴的な散乱ピークを持つ。すなわち会合体が形成する擬似結晶格子の特徴的な (hkl) 格子面からの Bragg 反射が観測される。十分な数の散乱ピークが観察されれば、それら散乱スペクトルの大きさ q の比から、ラメラ、ヘキサゴナル等のマイクロドメインのモルホロジーを、またピーク位置から Bragg の式 ($n\lambda = 2d\sin\theta$) により規則構造の間隔 d を求めることが出来る。

表 2.3-1 に種々のモルホロジーとそれらが示す散乱ピークの q の比およびそれらを与える結晶面の Miller 指数を示した。

表 2.3-1. ミクロドメインのモルホロジーと Bragg 反射位置との関係

格子の次元	モルホロジー	ピークの位置の q の比 (格子面の Miller 指数)
一次元	ラメラ	1 : 2 : 3 : 4 : ... (1) (2) (3) (4)
二次元	シリンダー(六方)	1 : $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{7}$: ... (10) (11) (20) (21)
三次元	球 単純立方 (SC)	1 : $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: ... (100) (110) (111) (200)
	体心立方	1 : $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: ... (100) (110) (111) (200)
	面心立方	1 : $\sqrt{8/3}$: $\sqrt{11/3}$: $\sqrt{12/3}$: ... (100) (220) (311) (222)
	bicontinuous	1 : $\sqrt{4/3}$: $\sqrt{7/3}$: $\sqrt{8/3}$: $\sqrt{10/3}$: ...

ラメラおよびヘキサゴナル液晶のマイクロドメイン構造はラメラ界面あるいはシリンダー軸がフィルム表面に平行に配向するため、高度に配向した散乱パターンを持つ。それぞれのモルホロジーに対し、一次ピークの Bragg 面間隔 d ($=2\pi/q = \lambda/2\sin\theta$) よりマイクロドメイン間隔 D を次の様に求めることが出来る。

$$\begin{aligned} \text{ラメラ} ; D=d & \qquad \qquad \text{シリンダー (ヘキサゴナル)} ; D=\sqrt{4/3}d \\ \text{球(sc)} ; D=d & \qquad \qquad \text{球 (bcc)} ; D=\sqrt{3/2}d \end{aligned}$$

(2) 溶液構造の解析

通常の溶液の SAXS がカバーする散乱角 2θ の範囲は $2\theta \approx 3^\circ \sim 6^\circ$ ($1\text{mrad} \sim 0.1\text{rad}$) 程度である。Cu-K α 線 (波長 1.54\AA) を用いると、この範囲は散乱スペクトルの大きさにして $q=0.004 \sim 0.4\text{\AA}^{-1}$ 、あるいはブラッグ間隔にして千数百 $\text{\AA} \sim$ 十数 \AA に相当する。これ以上のスケールは光散乱の領域となり、SAXS は光散乱と相補的であるといえる。

散乱により得られるデータは、構造に関する逆空間の情報であるので、散乱曲線を図 2.3-1 のように q の値によって大きく三つに分けて考えると、 q の小さい領域 I は粒子全体の平均としての大きさを反映しており、中間領域 II は形状による効果を、 q の大きい領域 III

はさらに小さなディメンション構造、すなわち粒子表面の構造、粗さに関する情報を含んでいる。よって界面活性剤溶液系の散乱曲線からは、ミセルのような会合体のサイズ、形状、界面の状態を明らかにすることが出来る。ただし、これらの形状の兼ね合いにより決まるものである。なお、大きさ、形状、および表面構造の評価法は本章では省略する。

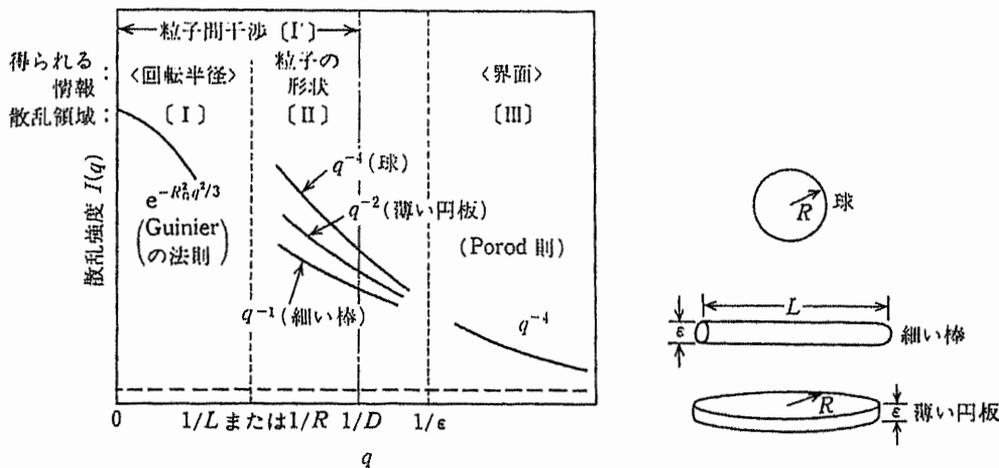


図 2.3-1. 各散乱領域と得られる情報

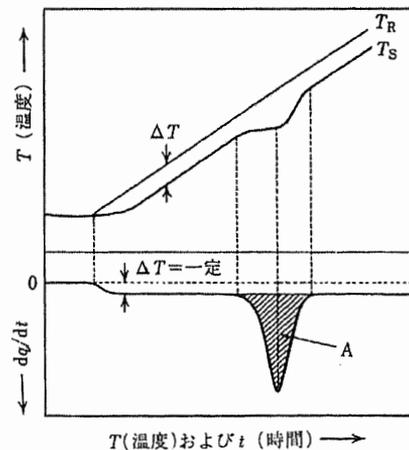
[日本化学会編、コロイド科学VI、東京化学同人（1996）より転載]

2. 4 示差走査熱量分析 (DSC)

示差走査熱量計は、昇温・降温時すなわち温度走査を行いながら、発生するまたは吸収する熱量を測定する装置である。すなわち温度走査による系の相変化を、熱量変化により測定するものである。

DSC の原理⁹⁾

DSC と DTA の違いは、後者が試料と基準物質との熱挙動の差で生じる温度差をそのまま記録するのに対し、DSC ではこの温度差を補償回路のヒーターで打ち消し、その補償量を記録する点である。現在はこの熱補償型 DSC と、熱流速型 DSC の 2 種がある。図 2.4-1 にてこの原理を説明する。試料に融解や相転移が生じると、加えられた熱はこれらの相転移に費やされ、その結果試料・基準物質間に温度差 ($\Delta T = T_S - T_R$) が生じる (図中の上図参照)。熱流



T_R , T_S は基準物質および試料の温度を示す。試料と基準物質間の温度差 ($\Delta T = T_S - T_R$) (上図) を単位時間当たりの熱量差 (dq/dt) で表示する (下図)。面積 A が相変に必要とされる熱量 (エンタルピー変化量) に相当する。

図 2.4-1. DSC の原理を示す模式図

速 DSC はこの温度差を時間 (t) あるいは温度 (T) の関数として測定するが、これは融解熱既知の標準物質*1を用いて試料-基準物質間の単位時間あたりの熱量差 (dq/dt) に換算される (図の下図参照)。この手法は定量 DTA (熱分析) とも呼ばれるが、一般には温度差が負のとき、すなわち吸熱変化を示すピークは下向きに、逆に温度差が正の発熱変化を示すピークは上向きに表示することが ICTA (国際熱分析連合) によって定められている。熱補償型 DSC は熱補償用ヒーターを用いて電気エネルギーを加減することで試料-基準物質間の温度差をゼロに制御する。したがってチャート上にはこの制御に要した単位時間あたりの熱量が温度の関数 (dq/dT) として直接記録される。

DSC から得られるこの dq/dt を昇温速度 (dT/dt) で割ると

$$dq/dt \times (dt/dT) = dq/dT = \Delta C_p$$

となり、試料-基準物質間の熱容量差 (ΔC_p) が得られる。この熱容量差を温度の関数として表示するときは、図 2.4-2 (a) に示すように一般には吸熱ピークを上向きに表示する。

DSC と熱力学的状態量との関係

図 2.4-2 (a) は上記式に基づき得られた界面活性剤-水系のゲル-ミセル溶液相転移近傍の熱容量差 (ΔC_p) ~ 温度 (T) 曲線を模式的に示す。ここでは、転移前後でのゲルおよびミセル溶液相の熱容量曲線から基線を求め、その ΔC_p をゼロと定めている。ゲル-ミセル溶液相転移に伴われるエンタルピー変化量 (ΔH) は図中の斜線に示す面積に相当し、これは次式で与えられる。

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT$$

ここで示す T_1 、 T_2 は転移の開始および終結の温度を示す。一方 $\Delta C_p \sim T$ 曲線の積分形である $\Delta H \sim T$ 曲線を図 2.4-2 (b) に示すが、 ΔH はミセル溶液のエンタルピー (H_m) とゲル相のエンタルピー (H_g) の差 ($\Delta H = H_m - H_g$) に相当することが理解される。ミセル溶液相およびゲル相の Gibbs の自由エネルギー (G_m 、 G_g)、エンタルピー (H_m 、 H_g) およびエントロピー (S_m 、 S_g) の熱力学的状態量の相関関係は

$$G_m = H_m - TS_m \quad \text{および} \quad G_g = H_g - TS_g \quad (2.4-1)$$

で表される。見せる溶液相とゲル相の Gibbs の自由エネルギー差 (ΔG) は

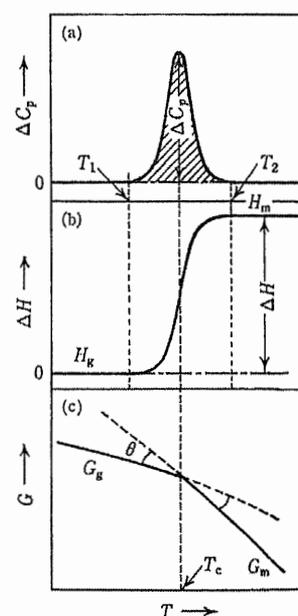


図 2.4-2.ゲル-ミセル溶液相転移近傍での $\Delta C_p \sim T$ (a)、 $\Delta H \sim T$ (b) および $G \sim T$ (c) 曲線の相関関係

$$\Delta G = G_m - G_g = (H_m - H_g) - T(S_m - S_g) = \Delta H - T\Delta S$$

となる。転移温度 ($T = T_c$) では $\Delta G = 0$ が成立するので、ゲル-ミセル溶液相転移に伴われるエントロピー変化量 (ΔS) は次式で与えられる。

$$\Delta S = \Delta H / T_c \quad (2.4-2)$$

ゲル-ミセル溶液相転移が Clausius の式に従う一次転移であると仮定すると、

$$\partial G_m / \partial T = -S_m \quad \text{および} \quad \partial G_g / \partial T = -S_g$$

が成立し、これより次式が導かれる。

$$\Delta S = S_m - S_g = (\partial G_g / \partial T) - (\partial G_m / \partial T) \quad (2.4-3)$$

この式より、 $G_m \sim T$ および $G_g \sim T$ 曲線の勾配はまさしくミセル溶液およびゲル相のエントロピーにそれぞれ相当することが示される。従って、式 (2.4-3) からゲル-ミセル溶液に伴われるエントロピー変化量が転移温度近傍でのミセル溶液とゲル相の Gibbs 自由エネルギー曲線によって作られる角度 (θ) に依存する量であることが理解される。以上のことから、式 (2.4-2) を用いてゲル-ミセル溶液相転移に伴われるエントロピー変化量を算出し、これと転移温度をもとにして、図 2.4-2(c) に示す “ $G \sim T$ ” 曲線の模式図が描かれることになる。

2.5 レオロジー⁽¹⁰⁾

理想的粘弾性の力学モデル

自己組織化溶液は高分子物質様の粘弾性体 (viscoelastic body) の性質を示すことが多い。粘弾性体とは粘性と弾性の両方の性質を併せ持つ物質である。ここでは理想粘弾性について述べる。

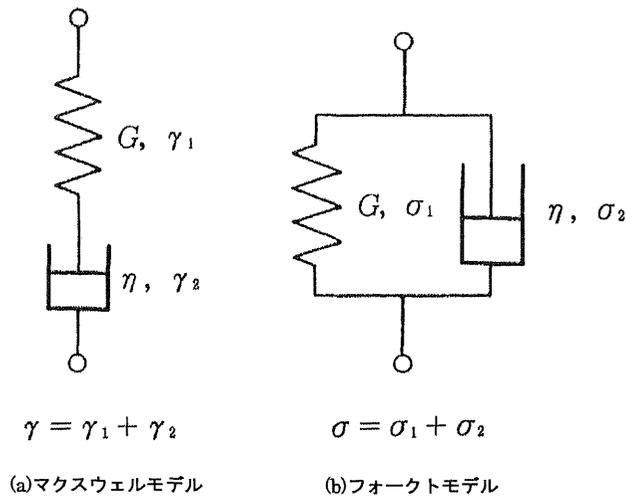


図 2.5-1. 粘弾性の力学模型

図 2.5-1 で示すように、フック弾性（弾性率 G ）をスプリングで、ニュートン粘性（粘性率 η ）をダッシュポットで表し、この組み合わせで力学模型を作る。この図の (a) は直列に、(b) は並列に結合したもので、それぞれマクスウェルモデル (Maxwell Model) およびフォークトモデル (Voigt Model) と呼んでいる。これらは粘弾性物質の最も簡単な力学模型である。

まず、マクスウェルモデルにおけるひずみ γ と応力 σ の間の関係を求める。ばねとダッシュポットのひずみを γ_1 、 γ_2 とすると、共通の σ に対してフックの法則とニュートンの法則が成り立つので、次式の (2.5-1) および (2.5-2) 式が得られる。

$$\sigma = \gamma_1 G = \eta d\gamma_2/dt, \quad \gamma = \gamma_1 + \gamma_2 \quad (2.5-1)$$

$$d\gamma/dt = (1/G) \times (d\sigma/dt) + \sigma/\eta \quad (2.5-2)$$

同様にしてフォークトモデルでは (b) を参照して

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2 = G\gamma + \eta d\gamma/dt \quad (2.5-3)$$

これらの式はそれぞれ両モデルの応力とひずみの間の関係を表す基本方程式である。例えばこれらの要素に加えられたひずみ（または要素）が時間の関数として与えられると、これを式 (2.5-2) または (2.5-3) に代入して得られる微分方程式を解くことにより、応力（またはひずみ）が時間の関数として求まる。ここでこれらのモデルに対する重要な関数について述べる。

マクスウェルモデルに $t=0$ で $\gamma = \gamma_0$ (一定) のひずみを与えた後、これを保たせた場合

には、 $t > 0$ で $d\gamma/dt = 0$ を式 (2.5-2) に代入して解けば。

$$\sigma(t) = \sigma_0 e^{-t/\tau}$$

が得られる。ただし、 $\tau = \eta/G$ 、 $\sigma_0 = G\gamma_0$ である。この式から分かるように、応力は時間とともに指数関数的に減少する。この現象を応力緩和 (stress relaxation) といい、その様子は図 2.5-2 (a) で示されている。

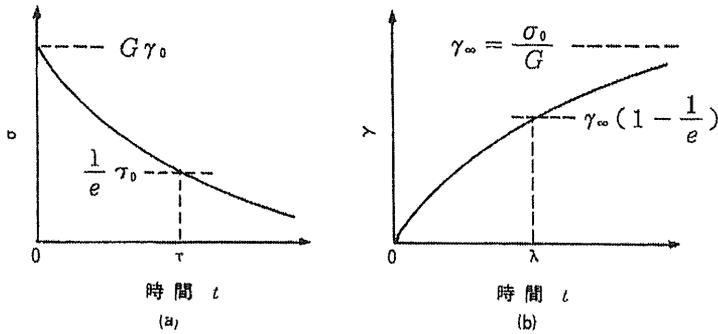


図 2.5-2. マクスウェルモデルの応力緩和(a)とフォークトモデルのクリープ(b)

模型 (物体) に固有な時間 $\tau = \eta/G$ は応力が緩和する速さの尺度とみなすことが出来、緩和時間 (relaxation time) と呼ばれている。 $T = \tau$ で応力が $t=0$ における値の $1/e$ (= 0.368) まで低下する。ここでも弾性率は応力とひずみの比として定義され、緩和する応力 $\sigma(t)$ の、印加したひずみの γ_0 に対する比は時間とともに変化する弾性率として

$$G(t) = \sigma(t) / \gamma_0 = G e^{-t/\tau}$$

を与え、これを緩和弾性率 (relaxation modulus) という。

つぎに、マクスウェルのモデルにおいて、正弦的な周波数である

$$\gamma(t) = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

を与えたとき、式 (2.5-2) の定常解は

$$\begin{aligned} \sigma(t) &= 1 / (1 - i/\omega\tau) \times G\gamma_0 e^{i\omega t} \\ &= (\omega_2 \tau_2 / (1 + \omega_2 \tau_2) + i\omega\tau / (1 + \omega_2 \tau_2)) G\gamma_0 e^{i\omega t} \end{aligned}$$

である。応力とひずみの比で定義される弾性率 G^* は複素数となり、その実数部 G' と虚数部 G'' は角周波数 ω の関数となり、

$$G^*(i\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

$$G' = G\omega_2\tau_2 / (1 + \omega_2^2\tau_2^2), \quad G'' = G\omega\tau / (1 + \omega_2^2\tau_2^2)$$

となる。ここで G^* を複素弾性率 (complex modulus)、 G' および G'' をそれぞれ動的弾性率 (dynamic modulus) および損失弾性率 (loss modulus) という (J' 、 J'' については後述)。図 2.5-3 (a) には上記式で与えられる関係が示されているが、 G'/G 、 G''/G の周波数の変化が、横軸に $\omega\tau$ をとることにより換算されることがわかる。

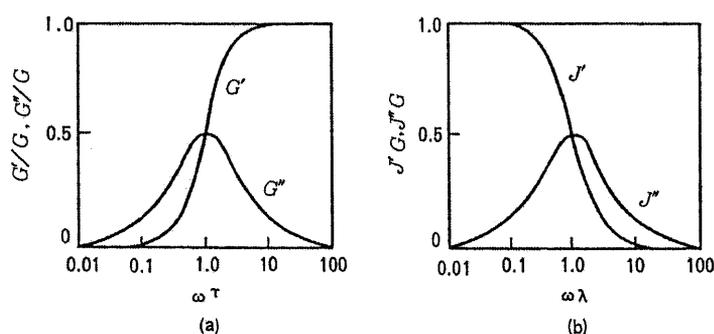


図 2.5-3. マクスウェルモデル (a) とフォークトモデル (b) の挙動

また $\omega\tau \approx 1$ の領域で系が粘弾性的 (viscoelastic) であることもわかる。さらに上記式は

$$\sigma(t) = |G^*| \gamma_0 e^{i(\omega t + \delta)} \quad (|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2})$$

$$\tan \delta = G''/G' = 1/\omega\tau$$

と表すことも出来る。上式の $\sigma(t)$ は粘弾性体にひずみを与えたときの応答応力は同じ周波数の振動であるが、その位相が変わることを意味している。すなわち応力の位相がひずみに対し δ だけ進んでいる。この δ は $\omega\tau \rightarrow 0$ で $\pi/2$ 、 $\omega\tau \rightarrow \infty$ で 0 であり、中間で $\pi/2 \sim 0$ の値をとる。また純粘性液体では $\delta = \pi/2$ 、理想弾性体では $\delta = 0$ である。

フォークトモデルに一定応力 $\sigma = \sigma_0$ ($t > 0$) を作用させたとき、式 (2.5-3) の解は

$$\gamma(t) = \sigma_0/G (1 - e^{-t/\lambda}), \quad \lambda = \eta/G$$

となる。ひずみは時間とともに増大し、長時間の後一定値 $\gamma_\infty = \sigma_0/G$ に達する。このような一定応力下でのひずみの時間変化をクリープ (creep) という。この場合には、 $\lambda = \eta/G$ は遅延時間 (retardation time) と呼ばれ、階段関数的に一定のひずみ σ_0/G が生じる

理想弾性体の挙動に対して、ひずみが遅れて生じる程度を表している (図 2.5-2 (b))。応力に対するひずみの比は、クリープコンプライアンス (creep compliance) であり、

$$J(t) = \gamma(t) / \sigma_0 = 1/G (1 - e^{-t/\lambda})$$

となる。フークトとモデルに正弦振動応力 $\sigma = \sigma_0 e^{i\omega t}$ を与えたときの定常的な応答は

$$\begin{aligned} \gamma(t) &= 1/G (1 + i\omega\lambda) \times \sigma_0 e^{i\omega t} \\ &= 1/G (1/(1 + \omega^2\tau^2) - i\omega\tau/(1 + \omega^2\lambda^2)) \sigma_0 e^{i\omega t} \end{aligned}$$

であり、複素コンプライアンス (complex compliance) は

$$J^*(i\omega) = J'(\omega) + iJ''(\omega)$$

の実数部と虚数部はそれぞれ

$$J' = 1/G \times 1/(1 + \omega^2\lambda^2), \quad J'' = 1/G \times \omega\tau/(1 + \omega^2\lambda^2)$$

であり、この周波数依存性は図 2.5-3 (b) で示した。

$$\gamma(t) = |J^*| \sigma_0 e^{i(\omega t - \delta)} \quad (|J^*| = \sqrt{J'^2 + J''^2})$$

$$\tan \delta = J''/J' = \omega\lambda$$

が得られる。この場合にもひずみの位相が応力のそれよりも δ だけ遅れる。

静的粘弾性測定法

静的粘弾性 (static viscoelasticity) 測定法には、一定のひずみ γ_0 を与えて応力 $\sigma(t)$ を測定する応力緩和法と、一定の応力 σ_0 を与えてひずみ $\gamma(t)$ を測定するクリープ法がある (図 2.5-4)。

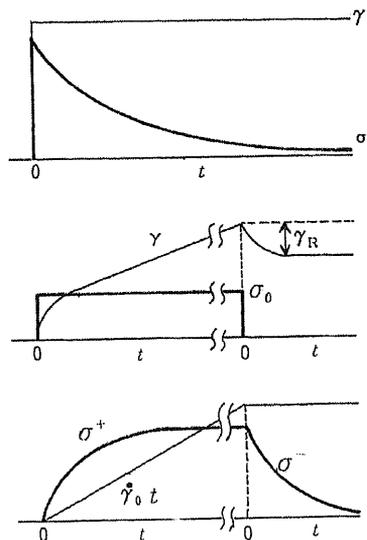


図 2.5-4. 上から順に、応力緩和、クリープとクリープ回復、および定速ひずみ型粘弾性測定法。細い線はひずみ、太い線は応力

これらの測定量から次の様な粘弾性関数が求まる。

$$G(t) = \sigma(t) / \gamma_0$$

$$J(t) = \gamma(t) / \sigma_0$$

$G(t)$ は緩和弾性率 (relaxation modulus)、 $J(t)$ はクリープコンプライアンス (creep compliance) と呼ばれる。いずれも γ_0 や σ_0 によらない、時間 t だけの関数で、 G は減少関数、 J は増加関数であり、単位はそれぞれ Pa、Pa⁻¹ である。

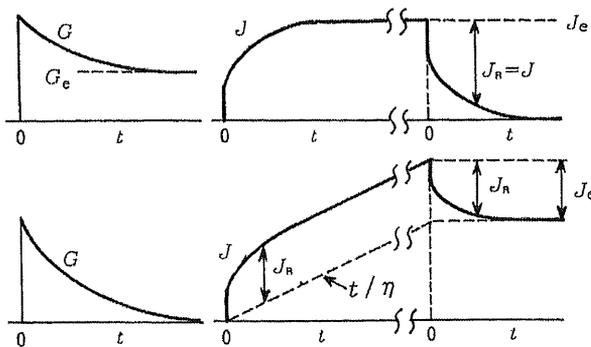


図 2.5-5. 粘弾性の固体(上)と液体(下)の挙動。応力緩和(左)およびクリープとクリープ回復(右)

レオロジーの分野では、固体と液体とは $t \rightarrow \infty$ の極限での振る舞いで区別する。一定の応力の下では限りなく変化しつづけ、どんな形にしておいても応力が必ず緩和してしまうのが液体である。逆に一定の応力に対して一定の形になり、形を定めるとそれに対応した応力状態に到達するものが固体である (図 2.5-5)。粘弾性関数で表すと、粘弾性液体では G は緩和してしまつて 0 になり、 J は限りなく増加する。粘弾性固体では $t \rightarrow \infty$ で G も J

も 0 でない一定の値 $G_e \times J_e$ になり $G_e \times J_e = 1$ の関係が成立する。したがつて

$$G(t) = G_R(t) + G_e \quad (\text{粘弾性固体})$$

$$J(t) = J_R(t) + t/\eta \quad (\text{粘弾性液体})$$

ここで G_R は完全に緩和してしまふ関数であり、 J_R はクリープコンプライアンスの弾性的な回復性ひずみの成分であり、 η は粘度である。

J_R は定性的にはフォークトモデルから導かれるクリープコンプライアンスのような関数であり、粘弾性液体では $G_e = 0$ 、粘弾性固体では $\eta = \infty$ となる。

動的粘弾性測定法

動的粘弾性 (dynamic viscoelasticity) 測定法は、周波数 ν で振動するひずみ (応力) を与える測定法である。ひずみは角周波数 (angular frequency) $\omega = 2\pi\nu$ を用いて次式のように表す。これは、図 2.5-6 で時間の原点 $t=0$ を I とすることに相当する。

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos \omega t$$

応力も同じ周波数で振動するが、位相が δ だけ進んだものになる。

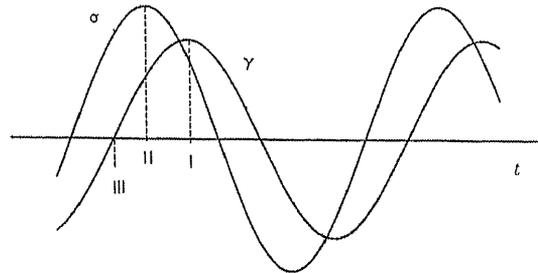


図 2.5-6. 動的粘弾性測定のみずみと応力

$$\begin{aligned}\sigma(t) &= \sigma_0 \cos(\omega t + \delta) \\ &= \sigma_1 \cos \omega t - \sigma_2 \sin \omega t \\ \sigma_1 &= \sigma_0 \cos \delta, \quad \sigma_2 = \sigma_0 \sin \delta\end{aligned}$$

これより次のような関数が定義される。

$$G'(\omega) = \sigma_1(\omega) / \gamma_0, \quad G''(\omega) = \sigma_2(\omega) / \gamma_0$$

$$\tan \delta = G'' / G'$$

G' は前出のように貯蔵（あるいは動的）弾性率（storage or dynamic modulus）、 G'' は損失弾性率（loss modulus）、 $\tan \delta$ は損失正接（loss tangent）と呼ばれ、いずれも角周波数の関数である。

同じ測定で見方を変えて、応力を与えてひずみを測定すると考えることも出来る。図 2.5-6 で原点 $t=0$ を II に選ぶと、応力とひずみは次のように表すことが出来る。

$$\begin{aligned}\sigma(t) &= \sigma_0 \cos \omega t \\ \gamma(t) &= \gamma_0 \cos(\omega t - \delta) \\ &= \gamma_1 \sin \omega t - \gamma_2 \cos \omega t\end{aligned}$$

これより次のような関数が定義される。

$$J'(\omega) = \gamma_1(\omega) / \sigma_0, \quad J''(\omega) = \gamma_2(\omega) / \sigma_0$$

それぞれこれも前出のように、貯蔵 (あるいは動的) コンプライアンス (storage or dynamic compliance)、損失コンプライアンス(loss compliance)と呼ばれる。

[参考文献]

- 1) L.J.Berliner ed., Spin Labelling Theory and Applicatuin, Academic Press, Vol. 1 (1979).
- 2) 桐野豊、小沢俊彦。エッセンス ESR、廣川書店 (1990)。
- 3) 高分子学会編、新高分子実験学 5、高分子の構造(1), 磁気共鳴方法, 共立出版 (1995)。
- 4) D.Kivelson, *J. Chem. Phys.*, 33, 1107 (1960)。
- 5) N.S. Kommareddi, V. J. Jhon, Y. Y. Waguespack, G. L. Mcpherson, *J. Phys. Chem.*, 97, 5752 (1993)。
- 6) K.Fontell, Liquid Crystal & Plastic Crystal, G. W. Gray, P. A. Winsor eds., vol. 2, Chapter 4, Jhon Wiley & Sons, New York (1974)。
- 7) A. Gunier, G. Fournet, Small-angle Scattering of X-rays, Wiley, New York (1955)。
- 8) X線結晶学, 仁田勇編, 4章, 丸善 (1961)。
- 9) 日本化学会編, 実験化学講座 1 3, 表面・界面, 233, 丸善 (1993)。
- 10) 日本レオロジー学会編, 講座・レオロジー, 高分子刊行会 (1992)。

第3章 「リン脂質の過酸化によるリポソーム水分散液の pH 低下」

要旨

卵黄ホスファチジルコリン (PC) から調製されたリポソームを用い長期保存安定性を検討した。卵黄 PC リポソームを 40℃の恒温層に放置すると、外観の変化と共に pH 低下が起きる。この pH 低下は卵黄 PC の不飽和アルキル鎖の過酸化より起きている事が示された。その理由として以下の点が挙げられた。1)酸化防止剤である α -トコフェロールのリポソーム中への添加やリポソーム分散液に窒素バブリングを施す事により中性領域からの pH 低下を防ぐことが出来る。2)完全水素添加大豆リン脂質 (CH-SoyaPC) を用いることで同条件下において、pH 変化は見られない。脂質の酸化と pH 低下との関連は、チオバルビツール反応生成物 (TBA-RS) やリポソーム中のカルボニル化合物の蓄積においても見られる。TBA-RS は 5 日で最大値を示しその後徐々に低下するが、pH は減少を続ける。一方でカルボニル化合物は 14 日の間増え続ける。このことより、TBA-RS は直接 pH 低下と関連せず、むしろ TBA-RS がカルボニル化合物のような第二の過酸化生成物に分解したものである。そしてこれがリポソーム分散液の pH 低下につながったと考える。

3. 1 序論

リン脂質からなるリポソームは生体膜の構造や機能に関する研究対象として広く用いられてきている⁽¹⁾。リポソームの 2 分子膜中には親水性と親油性の有効な薬剤をその中にトラップする事が可能であり、この事は薬物到達システム (DDS) などの様々な応用にも検討されてきている⁽²⁾。この様に、リポソームは薬物の毒性低減や特定臓器へのターゲティングなどにおいて高い注目を集めてきている⁽³⁾。また化粧品の様な外用剤としても有効であると報告されている⁽⁴⁾。

しかしながら、様々な条件下で保存した時のリン脂質の分解によるリポソームの不安定性は、医薬品での実用化における大きな問題となっている。この問題を解消するために多くの研究がなされている。菊池らはリポソーム分散液を長期保管 (例えば 25℃, 6ヶ月) しても、窒素バブリングを施す事で安定性を維持することが出来ると報告している⁽⁵⁾。しかし、この方法は化粧品としては実用的ではない。pH の変動はリポソームの物理化学的安定性に対して重要な因子であり、保存期間中のリポソームの pH 変動を検討する事は極めて重要である。ここでは保存されたリポソーム分散物の pH 低下の要因に関して検討した。

3. 2 実験

3. 2. 1 試料

卵黄 PC (ヨウ素価 66, POV 値 1.6 (meq/kg))、完全水素添加大豆リン脂質 (ヨウ素価 0.1, POV 値 0.6 (meq/kg))、CH-SoyaPC) は日本油脂社製を用いた。ジセチルホスフェート (DCP) はシグマケミカル社製を、 α -トコフェロール、1,1,3,3-テトラエト

キシプロパン、2-チオバルビツール酸、2,4-ニトロフェニルヒドラジン、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は和光純薬社製を用いた。3-*t*-ブチル-4-ヒドロキシアニソール (BHA) は東京化成社製を用いた。全ての化合物、試薬は市販グレードをそのまま用いた。

3. 2. 2 リポソームの調製

多重層リポソーム分散液は菊池らの方法を用いた⁽⁶⁾。すなわち多価アルコール中に脂質 (各種リン脂質と DCP) を加え、相転移温度 (T_c) 以上に加熱した。混合物は予め T_c 以上に加熱した 0.1% *p*-安息香酸メチルを添加した 200ml の水溶液に加え、3 分間混合した。リン脂質と DCP の濃度はそれぞれ、10mM と 1mM になるよう調整した。脂質の分散には市販の卓上型ホモミキサーを用い T_c 以上の温度で 6000rpm、3 分間攪拌して行った。リポソーム分散物の pH は 1N の NaCl で 7.60 ± 0.05 に調整した。リポソームの粒径は準弾性光散乱 (QELS) による測定装置 (Coulter model N4SD ; コールターカウンター社製) にて測定した。平均粒径はおおよそ 200nm を示した。

3. 2. 3 脂質過酸化の測定方法

Buege らの方法⁽⁷⁾によるチオバルビツール酸反応生成物 (TBA-RS) の生成量は、マロンジアルデヒド (1,1,3,3-テトラエトキシプロパンの加水分解物) の量と等しい。カルボニル化合物は Lappin らの方法⁽⁸⁾によって生じる、2,4-ニトロフェニルヒドラジンの誘導体の生成量によって検出される。0.05% 2,4-ニトロフェニルヒドラジンのメタノール溶液と一滴の濃塩酸混合物を、希釈した 1ml のリポソーム分散液に等量加えた。その後 50°C で 30 分間保った後に 10% HCl を 5ml 加え混合した。混合物は 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した後、480nm の吸光度を測定した。リポソーム分散物へのカルボニル化合物の分配を見るために、5 当量のクロロホルム-メタノール (1:1) 溶液を、1 当量のリポソーム分散液に加えた。非極性と水溶性の化合物はそれぞれクロロホルム相と水相に分配された。それぞれの相へのカルボニル化合物の分配は前述の方法で求めた。

3. 2. 4 脂質の分析方法

PC 量は酵素法 (Phospholipids C-test Wako Kit, 和光純薬社製) により求めた。2 種の PC の構成脂肪酸はガスクロマトグラフィーを用いて検出した。リン脂質は 20ml の 3.5% (v/w) KOH エタノール-水 (100:2) 溶液に溶かし 80°C で加水分解した。その後混合物を冷却しエタノールを減圧下で蒸発させた。さらに 20ml の水をこれに加え、6N の塩酸で酸性状態にし、50ml のジエチルエーテルで 3 回抽出した。抽出液は 20ml の水で 3 回洗浄し、水を蒸発させた。残留物は、*N-N* ジメチルホルムアミド (DMF) -ジメチルアセテートにてメチル化させ、Chromosorb WAW DMCS 中、5% Silar10C カラム (3mm \times 2m) (ガスクロ工業社製) にて測定した。

3. 3 結果

3. 3. 1 卵黄 PC からなるリポソーム分散液の pH 低下

卵黄 PC からなるリポソーム分散液を初期の pH を 1N の水酸化ナトリウムにて 7.6 に調整した。40°C 2 週間保存すると、この間 pH は徐々に 6.5 まで低下する (Fig.1)。

しかし卵黄 PC の代わりに CH-SoyaPC を用いた時には pH 低下は起きない。卵黄 PC

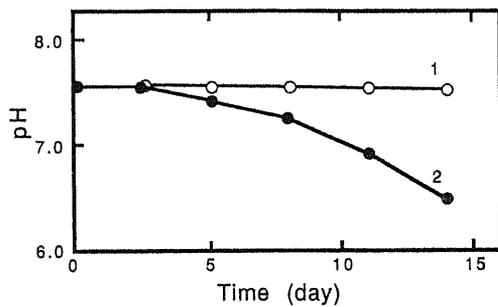


Fig. 1. pH Change in an Egg PC Liposomal Dispersion during Storage

The plots show the change in pH of egg PC and CH-Soya PC liposomal dispersions during incubation for 2 weeks at 40°C in air. Line 1, CH-Soya PC; line 2, egg PC.

Table 1. Fatty Acid Compositions of Egg PC and CH-Soya PC

Lipid	Fatty acid composition (%)					
	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:4}	C _{22:6}
Egg PC	32.5	13.5	29.2	13.6	3.0	4.4
CH-Soya PC	11.0	88.0	0	0	0	0

Egg PC and CH-Soya PC were hydrolyzed and esterified as described in the experimental section. Values are expressed as mol% total fatty acids.

Table 2. Effects of Ferrous Chloride (FeCl₂) and Antioxidants on the pH Change of Egg PC Liposomal Dispersions

Treatment	pH after storage
No addition	6.45
FeCl ₂ (20 μM)	6.18
N ₂ gas	7.30
BHA (2 mM)	7.23
VE (2 mM)	7.38
VE (2 mM), N ₂ gas	7.72

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at 40°C after the indicated treatments. The initial pH of the liposomal dispersions was adjusted to 7.60 ± 0.05 by adding 1N NaOH.

は脂肪酸部に不飽和結合を持ち、CH-SoyaPC は全くこれを含んでいない (Table1)。この事より、pH 低下は不飽和脂肪酸鎖に拠るものであると推測される。

Table2 で示した様に 20 μM の FeCl₂ の添加でリポソーム分散液の pH 低下が加速する。恒温槽へ放置する前にリポソーム分散液に窒素バブリングを施すと pH 低下は抑制される。また BHA や α-トコフェロールをリポソームに挿入すると、同様に pH 低下が抑制される。α-トコフェロールの添加と窒素バブリングの併用は抑制に対しより効果的であった。これらの結果は pH の低下が不飽和脂肪酸鎖部の過酸化によるものである事を示している。

3. 3. 2 リポソーム分散液中のカルボニル化合物の生成

Table 3. Relationship between the Amount of Carbonyl Compounds and pH

Incubation temperature (°C)	Carbonyl compounds ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol PC}$)	pH
30	0.6250	6.96
40	0.7132	6.72
50	0.8194	6.35

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at the indicated temperature in air. The initial pH of the liposomal dispersions was adjusted to 7.60 ± 0.05 by adding 1 N NaOH. The amount of carbonyl compounds is expressed as μmol acetaldehyde per μmol PC.

Table 4. Relationship between the Amount of Carbonyl Compounds and pH under the Various Conditions

Treatment	Carbonyl compounds ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol PC}$)	pH
No addition	0.7132	6.72
N ₂ gas	0.0217	7.42
BHA (2 mM)	0.2534	7.26
FeCl ₂ (20 μM)	0.8352	6.42

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at 40°C after the indicated treatments. The initial pH of liposomal dispersions was adjusted to 7.60 ± 0.05 by adding 1 N NaOH. The amount of carbonyl compounds is expressed as μmol acetaldehyde per μmol PC.

ソーム分散液の pH 低下はカルボニル化合物の蓄積によるものである事を示している。この事と不飽和脂肪酸の関係については考察にて述べる。

Table3 と 4 には、2 週間後の卵黄 PC リポソーム分散液中のカルボニル化合物生成量と、pH 変化を示す。pH は温度上昇と共に低下し、一方でカルボニル化合物の生成は上昇する (Table3)。

卵黄 PC 中のカルボニル化合物の生成量を様々な条件で検討した (Table4)。酸素の存在下では、窒素置換を施したものと BHA を添加したものに比べ、よりカルボニル化合物生成は増加し pH は低下する。20 μM の FeCl₂ を添加したものは、同様に pH が低下しカルボニル化合物は増加する。これらの結果は、長期保存されたリポ

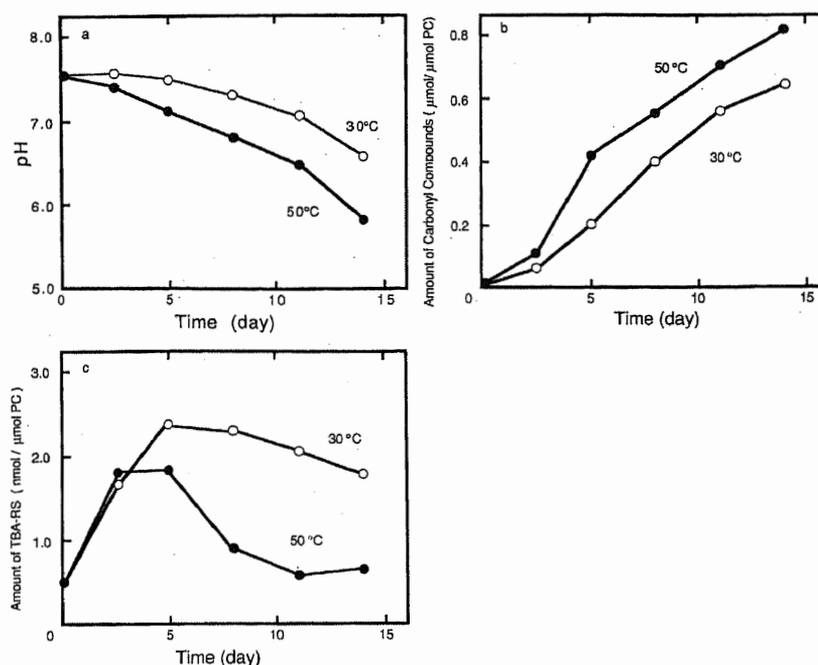


Fig. 2. Time-Courses of pH Change (a), Carbonyl Compound Production (b), and TBA-RS Production (c)

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at 30°C or 50°C in air. The amount of TBA-RS is expressed as nmol malondialdehyde per μmol PC. The amount of carbonyl compounds is expressed as μmol acetaldehyde per μmol PC.

3. 3. 3 pH、カルボニ化合物および TBA-RS の経時変化

卵黄 PC リポソーム分散液を 30°C にて長期保存した時、過酸化物の指標である TBA-RS は当初直線的に増加し、5 日で最大を示した後徐々に低下する。より高い温度 (50°C) において TBA-RS 量は増えるが、やはり 5 日過ぎると急激に減少する (Fig.2(c))。一方 pH 低下とカルボニ化合物の生成量は測定の日間において逆の相関を示している (Fig.2(a)、2(b))。この事より pH 低下に関しては、TBA-RS は直接には関連せずその代わり不飽和脂肪酸は更なる酸化を受けカルボニ化合物となり pH 変化に影響していると思われる。

3. 3. 4 カルボニ化合物の分配

リポソーム分散液中でのカルボニ化合物の分配状況を測定するため、一定期間保存した後にクロロホルム-メタノール溶液で抽出させた。

Table5 で示されるように、カルボニ化合物は有機溶媒と水溶液中にどちらも検出されるが、クロロホルム相の方が多い。この事は脂溶性であるリン脂質の脂肪酸部の酸化がまず進行した事を示唆している。すなわち、保存期間中に脂溶性のアルデヒドグループを持つホスファチジルコリン誘導体が形成され、そして不飽和脂肪酸が脂質鎖の酸化開裂後に極性の高い水溶性のアルデヒド類を作っていると思われる。

Table 5. Distribution of Carbonyl Compounds in Liposomal Dispersions

Treatment	Carbonyl compounds ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol PC}$)	
	Organic layer	Water layer
No addition	0.5463	0.1670
N ₂ gas	0.0170	0.0051
FeCl ₂ (20 μM)	0.6258	0.2183

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at 40°C after the indicated treatments, and then the distribution of carbonyl compounds in the dispersions was examined by extraction with chloroform-methanol (1:1) after incubation. The amount of carbonyl compounds in each layer was determined as described in the experimental section, and is expressed as μmol acetaldehyde per $\mu\text{mol PC}$.

Table 6. Change in Liposomal Phospholipids after Storage

Treatment	PC ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)
No addition	9.54
N ₂ gas	9.96

Egg PC liposomal dispersions were incubated for 2 weeks at 40°C in air or nitrogen. The initial value of PC was 10 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. One ml of liposomal dispersion was diluted with ethanol to 10 ml, then the amount of PC was measured by enzymatic assay.

3. 3. 5 リポソーム中のリン脂質の組成変化

保存期間中での PC 含有量を酵素法にて求めた (Table6)。過酸化を受けた PC と、そうでない PC とでは PC 含量にそれほど差はない。これは保存期間中に作られたカルボニ化合物は PC 構造をもっている事を示している。これらの PC は ω 位に位置するアルデヒドグループを持つアシル残基を含んでいると考えられる。

3. 4. 考察および結論

リポソームは応用化に際して広い温度領域で長期の保存安定性を確保する事が重要であ

る。しかしながら長期保存に関してのリン脂質の分解に関する報告は極めて少ない。ここではリポソーム分散液の長期安定性に対して、最も重要な因子である pH 変化についての詳細な報告を行っている。我々は保存期間中に不飽和脂肪酸の過酸化がリポソームの pH 低下の間に起きている事を示した。水素添加または部分的に水素添加されたリン脂質はリポソームの構成脂質に良く用いられるが、これらの PC には僅かに不飽和脂肪酸が含まれる為、長期安定性に関して問題がある。僅かでも不飽和脂肪酸を含むリン脂質をリポソームに用いた時、pH 低下を伴った脂質の過酸化は調製法や粒子径またはリポソームのラメラ形成性に限らず生じる。α-トコフェロールのリポソーム膜への導入は、pH 低下に対して効果的であるが、卵黄 PC リポソーム分散液では黄色く変色を起こす。またこの変色は窒素で酸素を置換しても防げない。

これらの結果より長期保存される化粧品用途のリポソームに対しては、極めて低いヨウ素価および POV 値を有する水素添加 PC か、DPPC の様な合成脂質が適していると言える。

また我々はリン脂質の過酸化とその後のカルボニル化合物の生成は、卵黄 PC のリポソームが長期間保管され pH が低下した時に起きる事を示している。カルボニル化合物の生成量は pH 低下と逆の相関があり、一方で TBA-RS とは関連性が見出せなかった。12 日放置後には PC 1 μmol 当たり 0.8 μmol のカルボニル化合物が生成するが、これは TBA-RS の生成量 (約 2.0 nmol / μmol PC, Fig.2b) を遥かに超えている。カルボニル化合物の生成は窒素バブリングや抗酸化剤の添加で抑制され、pH 低下も起きない。

多くの酸化物が脂質の過酸化中に作られる事は良く知られている。過酸化の最初の生成物であるモノヒドロパーオキサイドは不安定で、すぐに他の化合物へと分解および転換する。このモノヒドロパーオキサイドは、連続的な分割、再配列そして酸化反応により、極性・非極性のアルデヒド (カルボニル化合物) を含む様々な生成物に変換される事も良く知られている⁽⁹⁾。これらカルボニル化合物の生成によりリポソーム分散液の pH 低下が生じると思われる (Fig.3)。

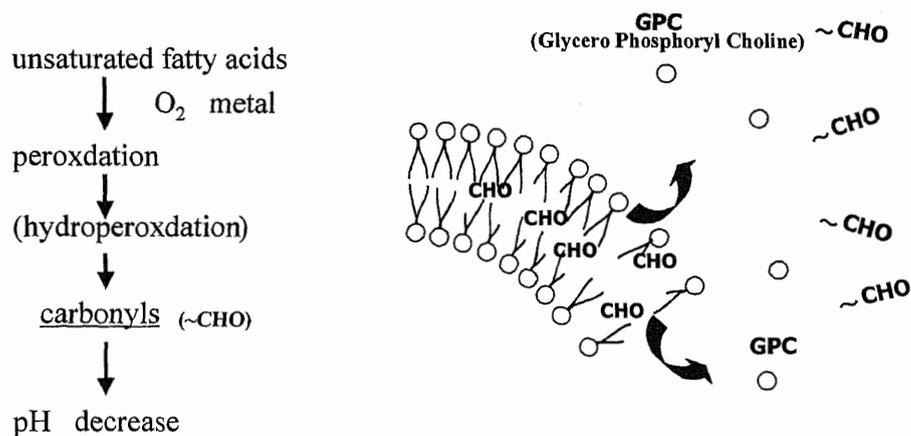


Fig. 3. Proposed Mechanism of pH Decrease in Egg PC Liposome

保存後のカルボニル化合物の分配と脂質の分析結果から、カルボニル化合物は主に PC の脂肪酸残基より生成し、少量の極性アルデヒド（PC の不飽和アシル基の過酸化生成物）がリポソーム膜より放出される。我々は、カルボニル化合物が更に酸化されて生じたであろう、極性および非極性の脂肪酸を定量した。少量の極性脂肪酸（C=4,6,8）、非極性脂肪酸（C=16,18 他）と同定できない非極性の脂肪酸がクロロホルム-メタール溶媒中から検出された。今後は更に正確な、pH に影響を与えるカルボニル化合物の同定が必要であると考えている。

[参考文献]

- 1) D. Papahadjopoulos (ed.), "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", 308, New York Acad. Sci., New York (1978). ; Yagi K. (ed.), "Medical Application of Liposomes", Japan Scientific Soc., Press, Tokyo (1986).
- 2) G. Gregoriadis (ed.), "Liposome Technology", 1, 2 and 3 , CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1984) ; G. Gregoriadis (ed.), "Drug Carrier in Biology and Medicine", American Press, Inc., London (1979).
- 3) P. Marcy, L. Leserman, (eds.), "Liposomes in Cell Biology and Pharmacology", John Libbey, Inc., London/Paris (1987).
- 4) M. Mezei, V. Gulasekharan, *Life Science*, 26, 1473 (1980) ; M. Mezei, "Topics in Pharmaceutical Sciences", ed. by D. D Breimer, P. Speiser, Elsevier Amsterdam, 345 (1985).
- 5) H. Kikuchi, A. Carlsson, K. Yachi, S. Hirota, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1018 (1991).
- 6) H. Kikuchi, H. Yamauchi, U. S. Patent 4687661 (1987). [*Chem. Abstr.*, 102, 137821 (1983)]
- 7) J. A. Buege, S. D. Aust, *Methods Enzymol.*, 52, 302 (1978).
- 8) G. R. Lappin, L. C. Clark, *Anal. Chem.*, 23, 541 (1951).
- 9) H. Esterbauer, K. H. Cheeseman, M. U. Dianzani, G. Poli, T. F. Slater, *Biochem. J.*, 208, 129 (1982).

第4章「ホスファチジルコリンから成るリポソームの加水分解における ジアルキルリン酸鎖長の影響」

要旨

リポソーム中のホスファチジルコリン (PC) には、リポソーム分散液の凝集を防ぐ目的で、負電荷を付与するジアルキルリン酸や正電荷のステアリルアミンの様なイオン性の両親媒性物質が添加される。ここでは飽和系脂質からなるリポソームの長期保存安定性に対するイオン性両親媒性物質の影響を検討した。40℃保存において負電荷の脂質であるジアルキルリン酸の添加によって、PCは徐々に加水分解される。一方、正電荷の脂質であるステアリルアミンや荷電物質が無添加のPCにはこれが起きない。このPCの加水分解において、様々な炭素鎖長 (C=10,12,14,16,18,20) のジアルキルリン酸の影響を、アルキル鎖長の異なるPC (C=14,16,18) に対して検討した。加水分解率はPCの鎖長とジアルキルリン酸の鎖長がほぼ同じ場合に最大を示す。すなわち、ジミリストイルPCとジパルミトイルPCから成るリポソームの加水分解は、それぞれジミリスチルリン酸とジパルミチルリン酸の挿入によって最も加速される。ジステアロイルPCの加水分解はジステアリルとジミリスチルリン酸の挿入により同様な効果が得られる。ジパルミチルリン酸の代わりに、メチルジパルミチルリン酸を挿入した時や、エタノールでリポソーム構造を壊した時には加水分解は起きない。これはリポソーム中のジアルキルリン酸とPCの頭部と尾部が並んでいる事、そしてリン酸の親水的な部位がPCのエステル部の加水分解を起こしている事を示している。

PCの2分子膜にコレステロールを挿入すると、PCの相転移温度 (T_c) 以上で起きる加水分解を抑制した一方で T_c 以下ではやや加速する。PCのジアルキルリン酸による加水分解は2分子膜の流動性に関与し流動性が増す事により加速する。これはコレステロールがリポソームの T_c 以上では流動性を抑制し T_c 以下ではこれを増加させる事と一致している。

4. 1 序論

リポソームは医薬品としていくつか上梓されているが、実際の使用に際しての長期間の安定性に関してはリポソームの物理化学的特性に依存している⁽¹⁾。不飽和脂肪酸残基を持つPCのリポソームは、長期間の保存で酸化分解を起こしpH低下を引き起こす事が報告されている。また、飽和系のPCからなるリポソームは保存中に加水分解を受けるがそのメカニズムは良く分かっていない。

正電荷や負電荷を持つ両親媒性物質は、リポソーム分散液の凝集を防ぐためにしばしば用いられる⁽²⁾。我々は負電荷を持つジアルキルリン酸がリポソーム化したPCの加水分解を引き起こす事を見出した。ここではこのPCの加水分解において、様々な炭素鎖長 (C=10,12,14,16,18,20) のジアルキルリン酸の影響を、アルキル鎖長の異なるPC (C=14,16,18) に対して検討した。

4. 2 実験

4. 2. 1 試料

H-SoyaPC (水素添加大豆リン脂質, PC 純度 95%)、DMPC、DPPC、DSPC (ジミリストイル, ジパルミトイル, ジステアロイルホスファチジルコリン, PC 純度 99%) は日本油脂社製を用いた。ジパルミチル燐酸、ペルオキシダーゼ、GPC (グリセロホスファチジルコリン) はシグマケミカル社製を用いた。ステアリルアミン、4-アミノアンチピリンは東京化成工業社製を用いた。コリンオキシダーゼはフナコシ社製を用いた。その他の化合物、試薬または市販グレードのものをそのまま用いた。

4. 2. 2 リポソームの調製

多重層リポソーム分散液は Bangham らの方法を用いた^(2a)。すなわち脂質をクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を入れた丸底フラスコに加え溶解させた後、減圧下で溶媒を除去し、乾燥したフィルムを得た。その後 0.1% の安息香酸メチルを添加した水溶液で水和させた。その後ボルテックスミキサーにて、脂質膜がフラスコからはがれるまで 5 分以上攪拌した。その間、温度はそれぞれの脂質のゲル-液晶相転移温度 (T_c ; DMPC23°C, DPPC41°C, DSPC55°C) 以上に加熱した。リポソーム分散物の pH は 1N の NaOH で 7.00 または 7.50 ± 0.05 に調整した。

4. 2. 3 脂質の分析方法

PC 量は酵素法 (Phospholipids C-test Wako Kit, 和光純薬社製) により求めた。GPC の量は戸倉らによる方法⁽³⁾の、ペルオキシダーゼによる quinoneimine dye の形成によって測定した。すなわち、0.4U の GPC ホスホジエステラーゼ、5U のコリンオキシダーゼ、1mM の CaCl_2 とペルオキシダーゼを反応系 (総量 3ml) に含有させた。ペルオキシダーゼ系 (2.0ml) には 5.0U のペルオキシダーゼ、2.25mM の 4-アミノアンチピリン、3.15mM のフェノール、0.5% の TritonX-100 と 0.1M の Tris-HCl 緩衝液 (pH8.0) を含有させた。この反応系に対しては、およそ 0.1mM に希釈したリポソーム分散液を加え、37°C で 15 分間インキュベートした。コリンオキシダーゼによるコリンから作られる過酸化水素は過酸化による quinoneimine dye の形成によって測定した。quinoneimine dye の形成は紫外可視分光光度計を用い 500nm でモニターした。リポソーム分散液に代えて、コリン塩化物を含有する混合物を標準として用いた。

4. 2. 4 その他の分析方法

加水分解物として生成する脂肪酸はガスクロマトグラフィーにて定量した。脂肪酸分析には Fused Silica Megapore column (0.53mm×15m)、DB-1 (J&W Co.) で 60°C から 250°C までの条件で行った。ヘリウムの流量は 52.5ml/min で行った。リン脂質のリン量は Heflmayr らの方法⁽⁴⁾で Phospholipids C-TEST WAKO Kit (和光純薬製) を用いて行っ

た。

4. 2. 5 ジアルキルリン酸の合成方法

全ての化合物はシグマ社および東京化成工業社製の試薬グレード品を用いた。アルキルアルコールに 5 酸化リンを滴下し反応混合物を 80°C にて 24 時間攪拌した。室温まで冷却した後に反応性生物は吸引しながらろ過した。残渣は水で 100ml を 5 回にわけ、厳格に洗浄し酢酸エチルにて再結晶させた。以下にジアルキルリン酸の計算値と測定値を示す。

C10 ; C ₂₀ H ₄₃ O ₄ P ;	計算値 C63.46%,H11.44% ;	測定値 C63.15,H11.71%,mp44°C
C12 ; C ₂₄ H ₅₁ O ₄ P ;	計算値 C66.32%,H11.82% ;	測定値 C66.03,H12.12%,mp57°C
C14 ; C ₂₈ H ₅₉ O ₄ P ;	計算値 C68.53%,H12.11% ;	測定値 C68.24,H12.36%,mp66°C
C16 ; C ₃₂ H ₆₇ O ₄ P ;	計算値 C70.22%,H12.42% ;	測定値 C69.92,H12.71%,mp70°C
C18 ; C ₃₆ H ₇₅ O ₄ P ;	計算値 C71.71%,H12.53% ;	測定値 C71.42,H12.80%,mp76°C
C20 ; C ₄₀ H ₈₃ O ₄ P ;	計算値 C72.89%,H12.69% ;	測定値 C72.69,H12.90%,mp85°C

4. 2. 6 メチルジパルミチルリン酸の合成

150ml のクロロホルム中に分散させたジパルミチルリン酸溶液にジエチルエーテル中に溶かしたジアゾメタン溶液を、ビューレットを用い 0°C で毎分 2ml のスピードで滴下し、ジアゾメタンの黄色が数分間消えなくなるまで攪拌した。反応生成混合物は数分間室温で放置し、ジパルミチルリン酸をろ過して除いた後に、溶媒を蒸発させ乾燥させた。残渣は白粉状になるまで減圧下で乾燥させ、冷メタノールにて再結晶させた。

4. 3 結果

4. 3. 1 ジアルキルリン酸によるリポソーム化した PC の加水分解

リポソーム分散液中の脂質の分解は PC、グリセロホスホリルコリン(GPC)と脂肪酸(FA)を定量する事で測定した。飽和脂肪酸の PC から成るリポソーム分散液にジパルミチルリン酸を挿入し、40°C でインキュベートすると、脂肪酸からなる化合物の沈殿が生じた。Table1 に水素添加大豆ホスファチジルコリン(H-SoyaPC)から成るリポソームに荷電物質を添加し、40°C で 28 日放置した時の加水分解後の PC 含量を示した。

正電荷脂質であるステアリルアミンは PC の安定性に影響は無いが、負電荷の脂質であるジパルミチルリン酸では PC の分解が生じる。H-SoyaPC にジパルミチルリン酸を挿入した時の、PC の分解状況を Table 2 に示した。保存期間中、PC 含量が減少すると共に GPC と FA 含量が増加する。GPC は PC の減量に関して 1:1 の相関があり、FA は 2:1 の相関があった。この結果は PC が完全に GPC と FA に分解している事を示している (Fig.1)。

Table 1. Effect of Charged Amphiphiles on Decomposition of PC in H-Soya PC Liposomes

Treatment	Residual PC(%)
No addition	96
Stearylamine(1mM)	97
Dipalmitylphosphate(1mM)	77

H-Soya PC liposomes incorporating stearylamine (1 mM) or dipalmitylphosphate (1mM) were incubated for 28 d at 40 °C. The initial pH of the liposomes was adjusted to 7.50 + 0.05 by the adding 1 N NaOH. The initial value of H-Soya PC was 10mM.

Table 2. Decomposition of PC in H-Soya PC Liposomes

	0d	7d	14d	28d
PC (mM)	9.5	8.5	7.9	6.6
GPC(mM)	0.1	1.2	1.7	2.9
FA (mM)	0.2	2.5	3.4	5.8

H-Soya PC liposomes incorporating stearylamine (1 mM) or dipalmitylphosphate (1mM) were incubated for 28 d at 40 °C. The initial pH of the liposomes was adjusted to 7.50 + 0.05 by the adding 1 N NaOH. The initial value of H-Soya PC was 10mM.

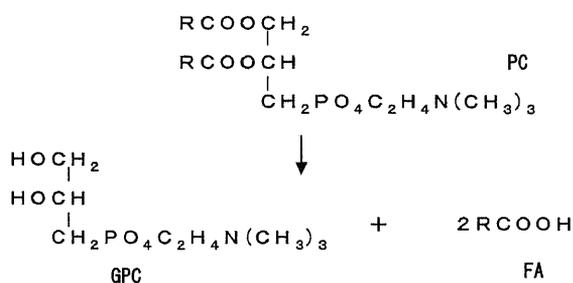


Fig. 1. Hydrolysis Reaction of PC

脂肪酸とコリン結合はこの条件下では分解していない。これは GPC 中のリンの量と、クロロホルム-メタノールを用いてリポソーム分散液を抽出した水相中のリン脂質のリン量が等しい事による。脂肪酸はこの反応系では生じない。それ故に、GPC は水相中で唯一のリン脂質由来のリン化合物である。

4. 3. 2 PC の加水分解に及ぼすジアルキル脂肪酸のアルキル鎖長の影響

様々な鎖長のジアルキル脂肪酸を挿入させたりリポソームを 40°C に放置し、生成した GPC 量を測定した。Fig.2 に PC の加水分解に対しジアルキル脂肪酸の鎖長の影響を検討した。ジ

ミリスチル PC (DMPC:C14) とジパルミトイル PC (DPPC:C16) から成るリポソーム

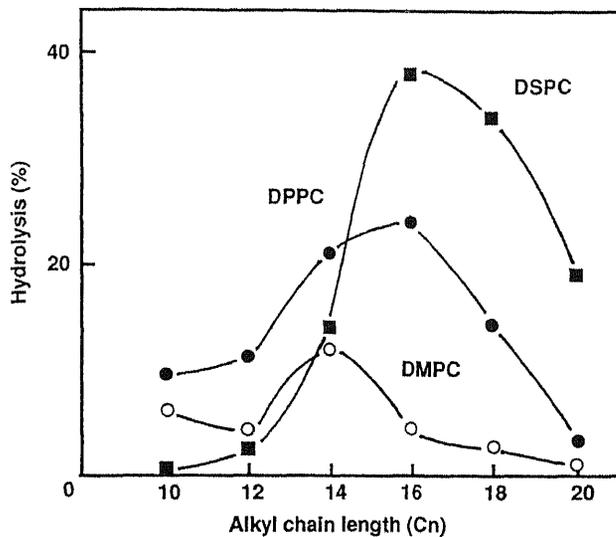


Fig. 2. Effect of Alkyl Length of Dialkylphosphate on Hydrolysis of PC
Liposomes incorporating dialkylphosphate (2mM) were incubated for 7 d at 40°C. The initial pH of liposomes was adjusted to 7.00 ± 0.05 by the addition of 0.1 N NaOH. The initial concentration of DMPC, DPPC or DSPC was 10 mM.

の加水分解は、それぞれジミリスチルリン酸 (C14) とジパルミチルリン酸 (C16) の挿入によって最も加速される。ジステアロイル PC (DSPC:C18) の加水分解はジステアリルリン酸 (C18) とジミリスチルリン酸 (C16) の挿入により、同様な結果が得られる。この結果は、PC の加水分解は PC の脂肪酸鎖長とジアルキルリン酸のアルキル鎖長がほぼ等しいときに最も起き易く、炭素鎖長が 2 ないし 4 変わる事で大きく減少する。また最大加水分解率は脂肪酸鎖長が長くなると増加する。

4. 3. 3 PC の加水分解に及ぼす温度の影響

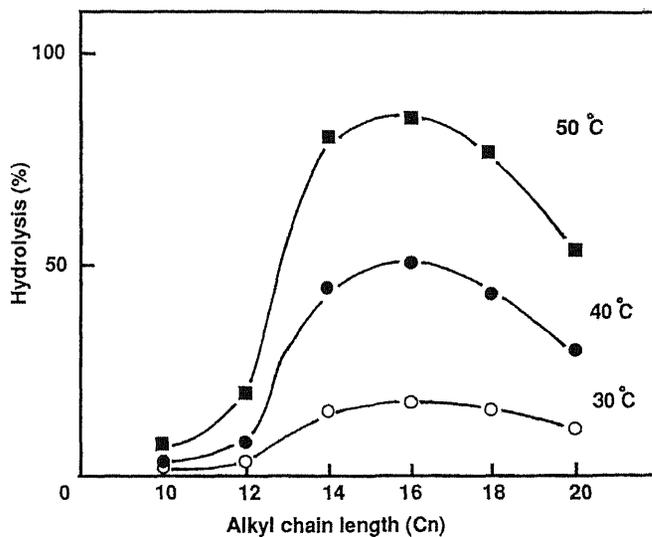


Fig. 3. Effect of Temperature on Hydrolysis of DPPC Liposomes
DPPC liposomes incorporating dialkylphosphate (2mM) were incubated for 7 d at 40°C. The initial pH of liposomes was adjusted to 7.00 ± 0.05 by the addition of 0.1 N NaOH. The initial concentration of DPPC was 10 mM.

DPPC から成るリポソームに様々な鎖長のジアルキルリン酸を挿入し、加水分解に及ぼす温度の影響を観察した。Fig.3 に示したように、PC の加水分解はインキュベーション温度の上昇と共に増加する。PC のジアルキルリン酸による加水分解はリポソームの膜の流動性に大きく影響している事を示している。最大加水分解を示すアルキル鎖は保存温度に抛らず炭素数が 16 近辺のところを示している。

4. 3. 4 リポソームの加水分解に対するジアルキルリン酸濃度及びコレステロール挿入の影響

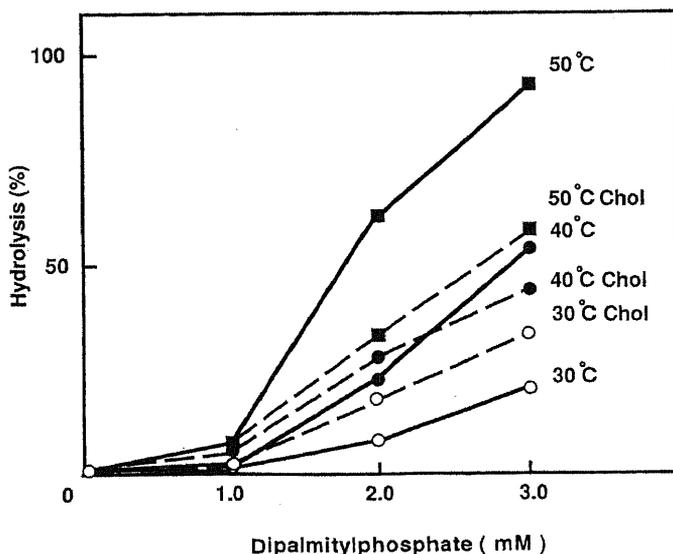


Fig. 4. Effect of Dipalmitylphosphate Concentration and Cholesterol Incorporation on Hydrolysis of DPPC Liposomes

DPPC liposomes incorporating cholesterol (molar ratio cholesterol/DPPC=0.75) and dipalmitylphosphate were incubated for 7 d at 40°C. The initial pH of liposomes was adjusted to 7.00 ± 0.05 by the addition of 0.1N NaOH. The initial concentration of DPPC was 15 mM.

の流動性が上がると加水分解が促進される。この事は、PCの親水部での立体的ストレスに対し、コレステロールが何らかの役割を果たしていると考えている。

4. 4 考察および結論

リポソームの応用では広い温度領域での長期安定性の確保は極めて重要である。PCの加水分解はpH、温度、緩衝剤の種類と濃度に対して行われてきた⁶⁾。しかしPCの化学安定性に関して、荷電物質の影響を検討した報告はない。本報告で負電荷脂質の存在で飽和脂肪酸のPCから成るリポソームの長期安定性に関して検討した。飽和PCは中性のpH領域では最も安定である事は良く知られている⁶⁾。しかしながら、我々は飽和系PCが中性領域においても、ジアルキルリン酸の存在で急激に加水分解される事を見出した。ジアルキルリン酸を挿入しない、または正電荷のステアリルアミンを挿入すると加水分解が起きないが、これはジアルキルリン酸によって加水分解が引き起こされている事を示している。

負電荷の脂質、特にジパルミチルリン酸はリポソームの凝集防止に汎用されている。しかし、ジパルミチルリン酸によるPCの加水分解はリポソームの構造を壊し、内容物の放出を促す事が明らかとなった。それ故に負電荷脂質で、特にPCと同程度のアルキル鎖長のものはリポソームの長期安定性を確保する上で避けるべきである。ジアルキルリン酸によるPCの加水分解は、保存前にエタノールを添加してリポソーム構造を壊しても起きない。またジパ

Fig.4に、DPPCリポソームの加水分解に対するジパルミチルリン酸とコレステロール挿入の影響を示す。DPPCの加水分解は温度によらずジパルミチルリン酸濃度が増すと加速する。これは、DPPCリポソームの加水分解がジパルミチルリン酸によって引き起こされる事を強く裏付けている。PCに対し75%mol濃度のコレステロールをリポソームに挿入すると、加水分解は50°C (DPPCのTcより高い)では抑制し、30°C (Tc以下)では促進する。この結果は、ジアルキルリン酸によるPCの加水分解が膜の流動性による事を示しており、膜

ルミチル燐酸の代わりにメチルジパルミチル燐酸を用いても同様に変化が無い。これらの結果より、これら PC の加水分解はリポソーム膜中のリン脂質のパッキング、特にジアルキル燐酸のヘッドグループと PC の位置に関連があると思われる。Kensil と Dennis ら⁽⁷⁾は様々な凝集状態（混合ミセル、多重層、ベシクルそしてモノマー）における PC へのヒドロキシオンアタックに対してアルカリ加水分解率や活性化エネルギーを測定した。そして加水分解が脂質の凝集状態によって決定的に影響を受ける事を報告している。そこでは卵黄 PC から成る単層および多層 2 分子膜ベシクルは、TritonX によって構造を破壊された PC や PC モノマーより加水分解を受けにくい事を示している。これらの結果はジアルキル燐酸による PC の加水分解とは分解機構が異なるが、ジアルキル燐酸によるリポソーム中の PC の加水分解は、リン脂質のリポソーム構造が必要である事を示唆している。

この研究では、PC の加水分解は PC の脂肪酸鎖長とジアルキル燐酸のアルキル鎖長がほぼ等しいときに最も起き易く、炭素鎖長が 2 ないし 4 変わる事で大きく減少する事を示した。ジアルキル燐酸のヘッドグループと PC のエステル部の位置が加水分解に対して大変に重要であると思われる。二つの脂質の脂肪酸鎖長が 2 ないし 4 のみ異なる時は理想的な混合形態が得られるが⁽⁸⁾、これは鎖長が 2 ないし 4 異なる場合、PC の相分離を引き起こさない状態では加水分解が大きく減少する事を示している。すなわち、PC とジアルキル燐酸はリポソーム中で頭部と尾部が硬く並び、立体的ストレスがかかり燐酸基部位が PC のエステル部位の加水分解を起こしている事を示している (Fig.5)。

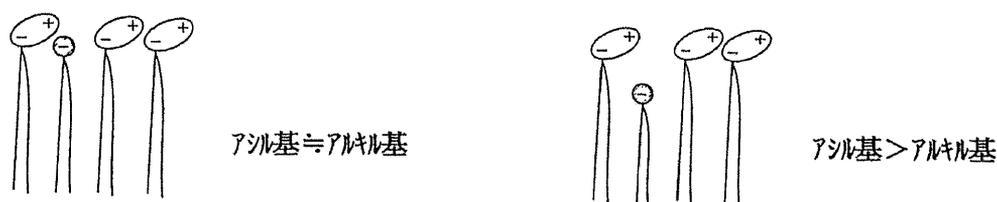


Fig.5. Surface Structure Models of Liposome Membrane

加水分解率は温度依存性である (Fig.3)。またコレステロールをリポソームに挿入すると、加水分解は T_c より高い時は抑制し、 T_c 以下では促進した。コレステロールはリポソームの構造維持と安定化のために良く用いられる⁽⁹⁾。これはコレステロールが脂質 2 分子膜において、炭化水素部の流動性を制御する機能がある事を意味している。これらはジアルキル燐酸によってもたらされる PC の加水分解が、膜流動性や膜中の基質の側方への拡散性に影響される事を示している。

以上、ここでは負電荷脂質による飽和系 PC から成るリポソームの長期安定性について報

告した。40°Cの保存において、ジアルキル燐酸の存在により飽和系の PC から成るリポソームは中性領域においても激しく加水分解を起こす。ジアルキル燐酸が無い場合や正電荷の脂質であるステアリルアミンが挿入された場合は、PC の加水分解が起きないが、これはジアルキル燐酸によって加水分解が引き起こされている事を示している。

PC の加水分解は PC の脂肪酸鎖長とジアルキル燐酸のアルキル鎖長がほぼ等しい時最大となる。この分解はリン脂質のパッキング、特に PC 位置とジアルキル燐酸のヘッドグループの位置に影響される。

加水分解率は温度依存性であり、コレステロールをリポソームに挿入すると、加水分解は T_c より高い時は抑制し、 T_c 以下では促進する。この分解は膜の流動性に影響され、流動性が増すと加速される。この事は、コレステロールは T_c 以上では膜の流動性を抑制し、 T_c 以下では高める事からも分かる。

[参考文献]

- 1) a) D. Papahadjopoulos (ed.), "Liposomes and Their Use in Biology and Medicine", 308, New York Acad. Sci., New York (1978). ; b) K. Yagi (ed.), "Medical Application of Liposomes", Japan Scientific Soc., Press, Tokyo (1986). ; c) K. Inoue, T. Kitgawa, *Biochim. Biophys. Acta.*, 363, 361 (1974). ; d) J. E. Smolen, S. B. J. Shoehet, *Lipid Res.*, 15, 273 (1973). ; e) P. G. Kibat, H. Stricker, *Pharm. Ind.*, 48, 1184 (1985). ; f) K. Arakane, K. Hayashi, N. Naito, K. Iwanaga, S. Yamashita, N. Oku, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 27, 216 (1993).
- 2) a) A. D. Bangham, M. M. Standish, J. C. Watkins, *Mol. Bio.*, 13, 238 (1965). ; b) J. Sunamoto, K. Iwamoto, "The Liposome", ed. by S. Nojima, J. Sunamoto, K. Inoue, Nankodo, Tokyo, 21 (1988). ; c) C. J. Kirby, G. Gregorias, "Liposome Technology", Vol I, ed. by G. Gregorias, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 27, 19 (1984).
- 3) Y. Tokura, K. Nishimura, S. Iwamura, H. Misaki, *J. Jpn. Med. Soc. Bio. Interface*, 14, 75 (1983).
- 4) J. Hoeflmayr, R. Fried, *Med. und Ern.*, 7, 9 (1966).
- 5) a) R. J. Y. Ho, M. Shumetz, D. W. Deamer, *Lipids*, 22, 156 (1987). ; b) M. Grit, J. H. D. Smidt, A. Struik, D. J. A. Crommelin, *International J. Pharm.*, 50, 1 (1989). ; c) J. M. A. Kemps, D. J. A. Crommelin, *Pharm. Weekbl.*, 123, 355 (1988). ; d) J. Gutknecht, A. Walter, *Biochim. Biophys. Acta*, 641, 183 (1981). ; e) Y. Nozaki, C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78, 4324 (1981). ; f) M. A. Wells, *Biochemistry*, 13, 2248 (1974).
- 6) S. Frøkjær, E. L. Hjorth, O. Wørts, "Liposome Technology", Vol. I ed. by Gregorias G., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 245, 235 (1984).
- 7) C. R. Kensil, E. A. Dennis, *Biochemistry*, 20, 6079 (1981).
- 8) S. Mabrey, J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 73, 3862 (1976).
- 9) a) B. D. Ladbroke, D. Chapman, *Chem. Phys. Lipids*, 3, 304 (1969). ; b) K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 390 (1974).

第5章「短鎖長ポリオキシエチレンコレステリルエーテル からなるベシクル構造」

要旨

非イオン界面活性剤であるトリオキシエチレンコレステリルエーテル (ChEO₃) と水の混合系での自己組織体を偏光顕微鏡、小角 X 線回折、示差走査熱量分析、ESR、蛍光スペクトル分析にて解析した。75%以上の濃度でラメラ液晶固有の相が得られる。この相は典型的 L_α相と比較し柔軟性が低くより配向性が高い 2 分子膜で構成されていると思われる。しかし同じ長さの EO 鎖を持った非イオン界面活性剤系で出来る L_β相と比較するとそこまでは至らない。この相の特質は界面活性剤の親油鎖が強固で嵩高い事による。この液晶相の水分散物は比較的濃度が薄いところで多様な粒子形態をとり安定なベシクルを形成した。

5. 1 序論

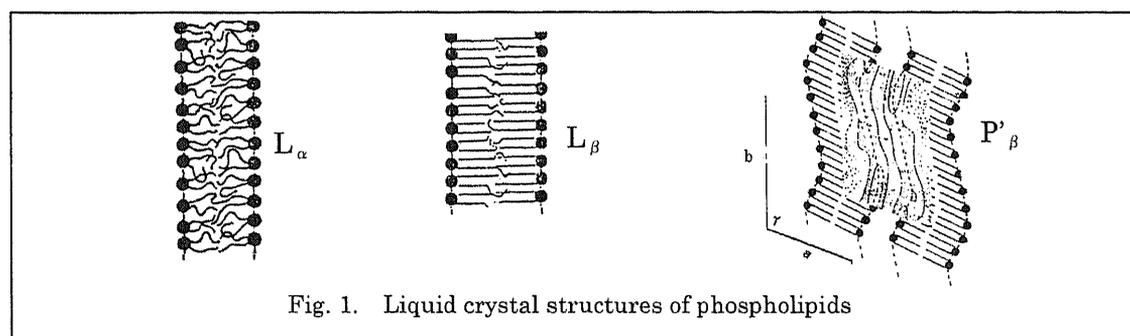
合成の界面活性剤で、親油鎖が芳香族の様に短鎖で嵩高く親水性と親油性のつり合ったものは、応用分野では良く用いられているが、毒性や生分解性においては懸念がある事も知られている。この様な観点において、ステロール系の化合物は自然界にある物質であり、環境にやさしく、且つ合成系界面活性剤の性質に似たものを作る事が可能である。特にコレステロールは細胞膜やリポプロテイン中に多く含まれ、原料としては豊富に存在している。

一方、特徴的な自己組織体であるベシクルやリポソームは閉じた 2 分子膜であり (ベシクルは界面活性剤による集合体であり、リポソームはベシクルの中でも特にリン脂質によるものを指す)、細胞膜や生体膜のモデルとして考えられ、生化学の分野において重要な研究対象になってきている。更には、新しい薬剤の到達システムとしても研究されてきている。このベシクルの特性は液晶構造による所が大きい事は良く知られている。リン脂質におけるいくつかの液晶構造は以下に示す様に分類されている (Fig.1) (1-4)。

L_α : 一次元的なラメラ格子骨格で炭化水素鎖はラメラ面に対し垂直で液状である

L_β : 一次元的なラメラ格子骨格で炭化水素鎖はラメラ面に対し垂直 (時として掌状) で固体状である

P_β : 二次元的な単斜晶系の格子骨格で周期的な波状形でねじられている 2 分子膜からなる



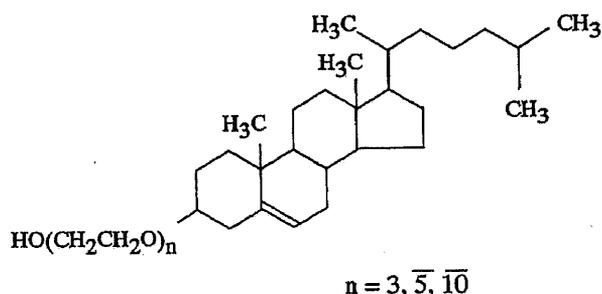
ここでプライム記号 (L'_β, P'_β) はラメラ面に対して炭化水素鎖が傾いている時に用いられる。コレステロールからなるサーモトロピック液晶の特性は良く知られているが、リオトロピック液晶の研究は少なく、比較的長鎖の POE (Polyoxyethylen) 部を有する物の研究が数件見られるのみである^(5,6)。更には POE 短鎖のコレステロール誘導体の研究は、精製する事が困難なため更に少ないのが現状である。

これらの背景に鑑み、本研究では短鎖 POE コレステリルエーテル ($ChEO_n$) を市販の界面活性剤と比較検討し、自己組織体である液晶構造の特徴を明らかにする事を目的とした。

5. 2 実験

5. 2. 1 試料

ポリオキシエチレンコレステリルエーテル (Scheme1, $ChEO_n$) は日本エマルジョン社



Scheme 1. Chemical structure of polyoxyethylene cholesterol ether. The line over the number of oxyethylene groups (n) indicates an average value.

製を用いた。単一鎖長の $ChEO_3$ は 98%以上の純度であった。

単一鎖長のトリオキシエチレンモノドデシルエーテル ($C_{12}EO_3$) とトリオキシエチレンモノヘキサエチンドデシルエーテル ($C_{16}EO_3$) は日光ケミカルズ社製を用いた。

2種のスピンプローブ、5-及び12-ドキシルステアリン酸はAldrich Chemical社製を用いた。

蛍光プローブであるピレンは東京化成工業社製のものを、エタノールで2回再結晶させてから用いた。精製水は2回蒸留して用いた。

5. 2. 2 相図

すべてのサンプルは試料チューブ精秤した後封入させた。相変化はサンプルを直接目視にて観察するか、偏光版を通して観察した。

5. 2. 3 ベシクルの調整

水と界面活性剤をボルテックスミキサーで混合した後、分散液をプローブタイプ超音波装置 (島津製作所社製; USP-50) にて出力 23W で一分間、二回処理した。

5. 2. 4 小角X線散乱 (SASX) 測定

相間距離を測定するために SAXS を用い、測定は RINT-2500 粉末エックス線回折装置

(理学電気社製) を用い出力 15kW、25°Cで測定した。

5. 2. 5 示差走査熱量測定

示差走査熱量測定のために、サーモプラスコンピュータ解析システムを備えた DSC8240 (理学電気社製) を用いた。サンプルはアルミニウム製のパンに入れ、その後密封した。測定は 1°C/分の昇温速度にて行った。界面活性剤は測定前に数日間真空下にて乾燥させて用いた。

5. 2. 6 共焦点レーザー顕微鏡観察

サンプルは Lasertec VH2000 Blue Laser Confocal Microscope にて観察した。光源の波長は 410nm を用いた。

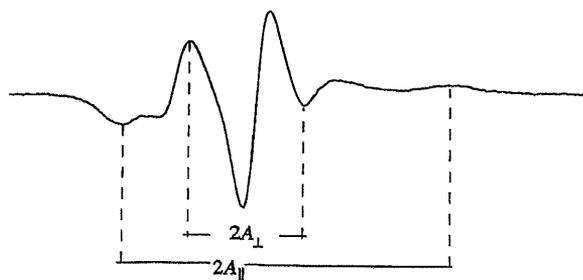


Fig. 2. A typical ESR spectra of 5-doxyl stearic acid in a liquid crystal.

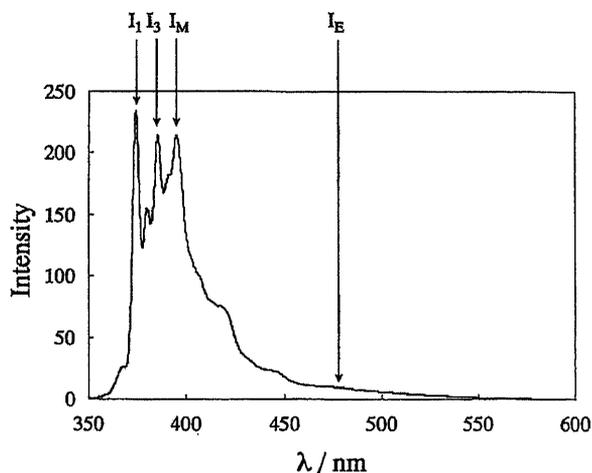


Fig. 3. A typical steady-state-emission spectra ($\lambda_{\text{excitation}} = 335$ nm) of pyrene in mixtures of ChEO₃ and water.

5. 2. 7 電子スピン共鳴 (ESR) 測定

サンプルはメタノール中にスピンプローブ (ドキシルステアリン酸) を溶解して以下のように調製した。サンプルに所定量の溶液を入れ、真空下にて溶媒を蒸発させた後、界面活性剤-水混合溶液を加える。この溶液はサンプルの管の細いところを遠心機にて繰り返し通す事により均一性化させた。プローブ濃度は 10^{-4}M となるように調製した。

ESR スペクトルは JEOL-ME-3X スペクトルメーター (変調周波数 100kHz) にて 25°Cで測定した。マイクロ波出力は 4mW とした。

ESR スペクトルはオーダーパラメーター S を用いて解析した。これはラベルされた位置周辺の、炭化水素鎖の強固さの程度を示している。大きな S 値はプローブの低い移動性と高い配向性を示している。 S 値は以下の式にて求められる⁽⁷⁾。

$$S = (A_{\parallel} / A_{\perp}) / A_{zz} - 1/2 (A_{xx} + A_{yy}) \times a_o / a_n$$

Fig.2はパラメーター A_{\perp} と A_{\parallel} の見積もり範囲を示している。用いたニトロオキシラジカルに対し超微細結合テンソルの主値はそれぞれ $A_{XX}=6.3\text{ G}$ 、 $A_{YY}=5.8\text{ G}$ 、 $A_{ZZ}=33.6\text{ G}$ であり a_o/a_n は極性関連因子であり、 a_o と a_n は次の式で表される。

$$a_n = (A_{\parallel} / A_{\perp}) / 3$$

$$a_o = (A_{XX} + A_{YY} + A_{ZZ}) / 3$$

5. 2. 8 蛍光スペクトル

試料はエタノールにピレンを溶解した後サンプルチューブに十分な試料を入れた後、溶媒を蒸発させて用いた。その後に界面活性剤水溶液を加えた。分散液はバスタブタイプの超音波装置で5分間処理する。全ての溶液は 25°C で24時間保管した後に測定した。

ピレンの蛍光スペクトルは蛍光分析装置（島津社製；RF5300PC）を用いて測定した。スペクトルは全て2回スキャンさせた平均値をとった。Fig.3は典型的なスペクトルを示し、これより I_1/I_3 比を求める。 I_1 と I_3 の波長はそれぞれ 375 と 386 nm である。この比は微細環境の極性を示しており、界面活性剤内部の会合状態の情報が得られる⁽⁸⁾。また I_M と I_E の波長はそれぞれモノマーからのピーク 390 nm 、エキサイマーとしてのピーク 475 nm を示している。この比はミセル中の局所情報が得られ、この微視的環境の粘性が下がるとこの値も下がる。

5. 2. 9 光散乱

動的な光散乱測定装置はDSL-6000HL（大塚電子社製；コンピュータ制御のステッピングモーター付ゴニオメーター、He-Neレーザー、 $\lambda = 632.8\text{ nm}$ ）を用いた。全ての測定は散乱角度を 90 度とし、 $30^{\circ}\text{C} \pm 0.2$ で 21 mm セルを用いた。測定値は積分にて計算した。ベシクルは球状と仮定し、分散偏差と平均粒径をアインシュタインストークスの法則を用いて計算した。

5. 2. 10 コレステロール基の体積分率の計算

界面活性剤の親油鎖の体積分率 ϕ_L は以下の式で計算した。

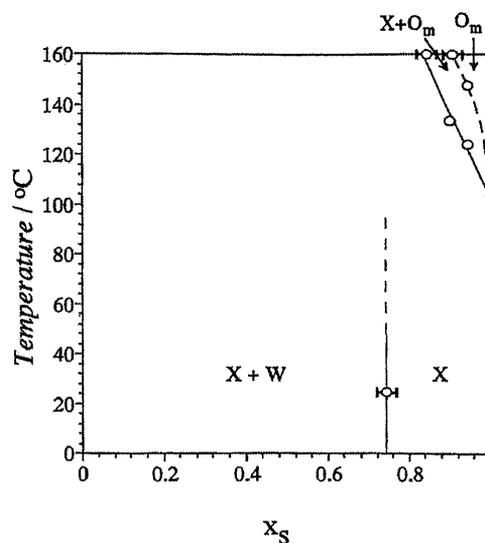


Fig. 4. Phase behavior of ChEO₃/water systems. The melting point of the pure surfactant was obtained from DSC data. x_s is the weight fraction of ChEO₃ in the system. O_m , reverse micellar surfactant phase or surfactant liquid; W, excess aqueous phase; X, phase with lamellar structure.

$$\phi_L = v_L / \{v_S + (M_S / \rho_W) (1 - x_S) / x_S\}$$

v_L と v_S は親油鎖と界面活性剤の分子容積を示す。 M は界面活性剤の分子量、 ρ_W は水の密度、 x_S は界面活性剤の重量分率を示す。 v_L と v_S はそれぞれ 384 と $506 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ である⁽¹⁰⁾。

5. 3 結果と考察

5. 3. 1 ChEO₃/水の相図

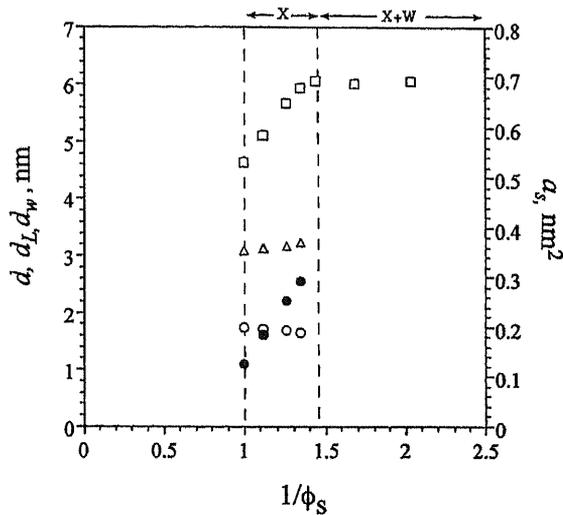


Fig. 5. SAXS data of ChEO₃/water systems at 25°C. ϕ_s is the volume fraction of surfactant in the system. \square , Interlayer spacing, d ; Δ , effective cross-sectional area per surfactant molecule, a_s ; \circ , length of hydrophobic moiety, d_L ; \bullet , length of the hydrophilic thickness of the bilayer, d_w .

以下で比較的安定な分散物が得られる。X相の最大水和量は、典型的な L_a 相のそれに比較して低い。この事は、X相中の界面活性剤層が比較的強固であり、それは親油基が多環状の骨格を持つ事によると思われる。

5. 3. 2 X線散乱データ解析

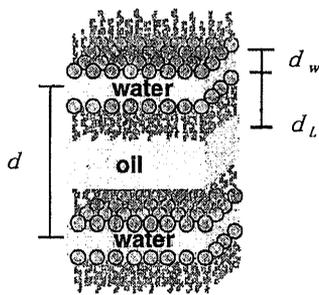


Fig.6-1. Model of lamella structure

X相の構造を解析するため、SAXS測定を行った。SAXS間隔比 ($1:1/2:1/3$) はラメラ構造を示している。Fig.5は界面活性剤濃度による各パラメーターの変化を示している。 d_L は2分子膜の疎水部の長さ、 d_w はその親水部の長さ、 a_s は界面活性剤分子の疎水-親水界面における実効断面積を示し、 L_a 相中に2分子膜が平行に並んでいると仮定し (Fig.6-1)、以下の式を用いて求めた⁽¹¹⁾。

Fig.4はChEO₃/水の相図を示した。これは短鎖のEOをもつフィトステロールのものと似ており、界面活性剤分子が比較的高い臨界パッキングパラメータを持つ事に関連している。界面活性剤の融解温度は目視観察では難しいので、DSCにて求めた。XとW+Xの境界は、特に高温では目視判定が困難なため、常温でSAXSにて求めた結果を示す。Xで示されている相は界面活性剤濃度が75%以上のところに現れ、非常に粘稠で濁度が高く偏光で観察しても区別しにくい。この相は偏光顕微鏡下ではラメラ状態のパターンを示し、高い温度安定性を示している。75%以下では過剰の水相である白い沈殿物が生成する。1%

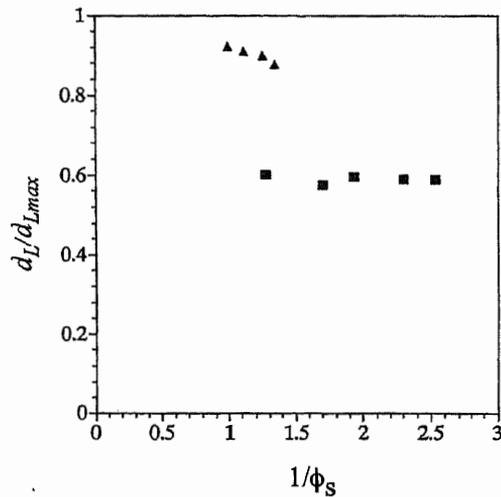


Fig.6-2. Relative extension of the hydrophobic chain as a function of ϕ_s , at 25°C. $d_{L,max}$ is the fully extended length of the hydrophobic chain. The data for $C_{12}EO_3$ systems were obtained from Huang et al. [11]. ▲, $ChEO_3$; ■, $C_{12}EO_3$.

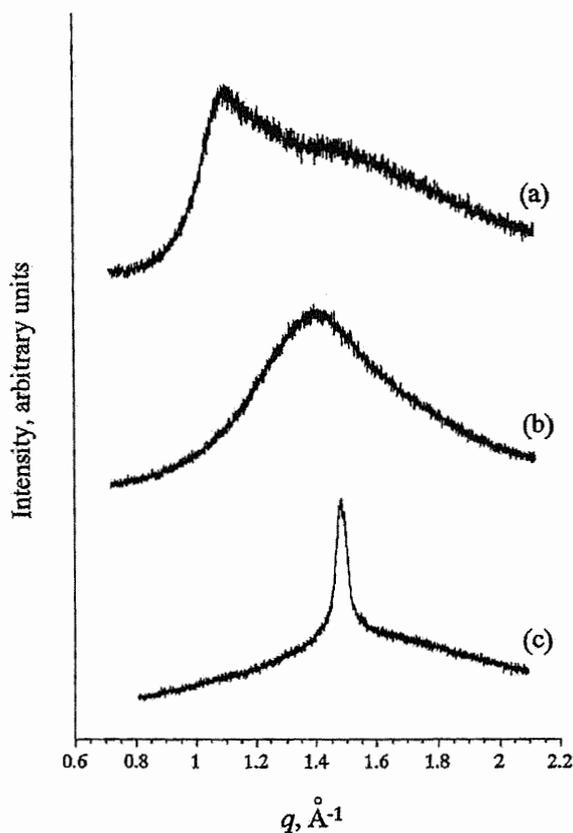


Fig. 7. Wide angle X-ray diffraction patterns of samples at 25°C containing 75% of nonionic surfactant. q is the length of the scattering vector. (a) $ChEO_3$; (b) $C_{12}EO_3$; (c) $C_{16}EO_3$.

$$d_L = d \phi_L / 2$$

$$d_w = d - 2d_L$$

$$as = v_L / (N_A d_L)$$

ここで d は SAXS ピークの最も強いものを用いた。 N_A はアボガドロ数である。ここではすべての水が 2 分子膜に含まれていると考えられるので、式は一相領域のみ当てはまる。

2 分子膜の親水部の厚さは、水が溶解している飽和限界時のラメラ構造から過剰な水が分離して出てくるまで、水分含量の増加とともに増え続ける。面間隔 d は 2 相領域において一定になる。従ってこの屈折点が 1 相の境界になる。

as 値は $C_{12}EO_3$ 系と類似しており⁽¹²⁾ 水の濃度が増してもほとんど変化しない。この事はほぼ理想的に 2 分子膜が膨潤している事を示している。また d_L の変化を $C_{12}EO_3$ 系のそれと比較した。水和していない界面活性剤中の親油鎖 (コレステリル基) は部分的に伸びたコンフォメーションを持つ。すなわち $d_L = 1.75\text{nm}$ (全面的に伸びた場合 $d_{L,max} = 1.9\text{nm}$) である⁽¹⁾。 $d_L/d_{L,max}$ で表わされる親油鎖の相対伸張度は $C_{12}EO_3$ からなるラメラ液晶のそれよりも大きい。これは 2 分子膜の配向状態がよりコンパクトになっている事によると思われる (Fig.6-2)。すなわち、 $C_{12}EO_3$ と比較してより結晶に近い構造といえる。また得られた第二ブラッグ反射は比較的強く、界面活性剤鎖長の運動性の低さと広い領域での周期

性を示していると言える。Ravey は、もしエチレンオキサイド鎖が伸びた状態であればこの反射は強くなるであろうと示唆している⁽¹³⁾。

Fig.7 は広角の X 線回折のパターンで、同じ EO 鎖長の非イオン界面活性剤によるものを示した。以前に報告されている $C_{16}EO_3$ からなる L_β 相は鋭いピークを示している⁽¹⁴⁾。これ

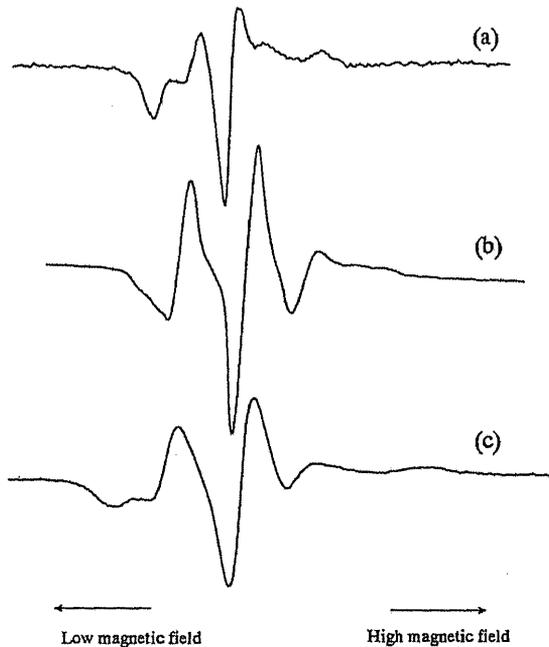


Fig. 8. ESR spectra of 5-doxylstearic acid in samples at 25°C containing 75% of nonionic surfactant. (a) $ChEO_3$; (b) $C_{12}EO_3$; (c) $C_{16}EO_3$.

は α ゲルと呼ばれる固体構造である。反対に $C_{12}EO_3$ からなる L_α 相はブロードなピークを示し、これは分子の短い範囲でのパッキング状態が液状である事を示している。すなわち典型的なラメラ液晶である。 $ChEO_3$ の場合、主ピークは同様にブロードであるが、濃度に関係なく 5.7nm 付近に現れる。これは報告されているエトキシレートコレステロール⁽¹⁵⁾、水和したコレステロール⁽¹⁶⁾ のものと良く一致している。この事は $ChEO_3$ の結晶性は L_β 相よりやや劣っている事を示している。

5. 3. 3 ESR 解析

前出の界面活性剤について ESR の測定を行った。Fig.8 で示したように全てのスペクトルは等方性ではなかった。 $C_{12}EO_3$ で得られた低磁場領域での極小単一ピークは 2 分子膜の高い流動性を示している。一方で $C_{16}EO_3$ のものはゲル状のパターンを示している⁽¹⁷⁾。 $ChEO_3$ のスペクトルはヘキサゴナル相に似ていてショ糖モノ脂肪酸エステルで生じる L_β 相に近い⁽¹⁸⁾。Fig.9 は 2 種類のスピンプローブのオーダーパラメーターを示し、このプローブでの層状構造を示す値はすでに知られている⁽¹⁹⁾。表面近くの組織体の柔軟性は 5-ドキシルスチアリン酸で、親油部の深部の柔軟性情報は 12-ドキシルスチアリン酸のスペクトルで得られる。12-ドキシルスチアリン酸のオーダーパラメーターは 5-のそれよりも低い。これは 2 分子膜の炭化水素の動きやすさを示している。

得られた S 値は濃度に対してそれほど変化しない。これは界面活性剤分子の水和に大きな変化がない事を示している。

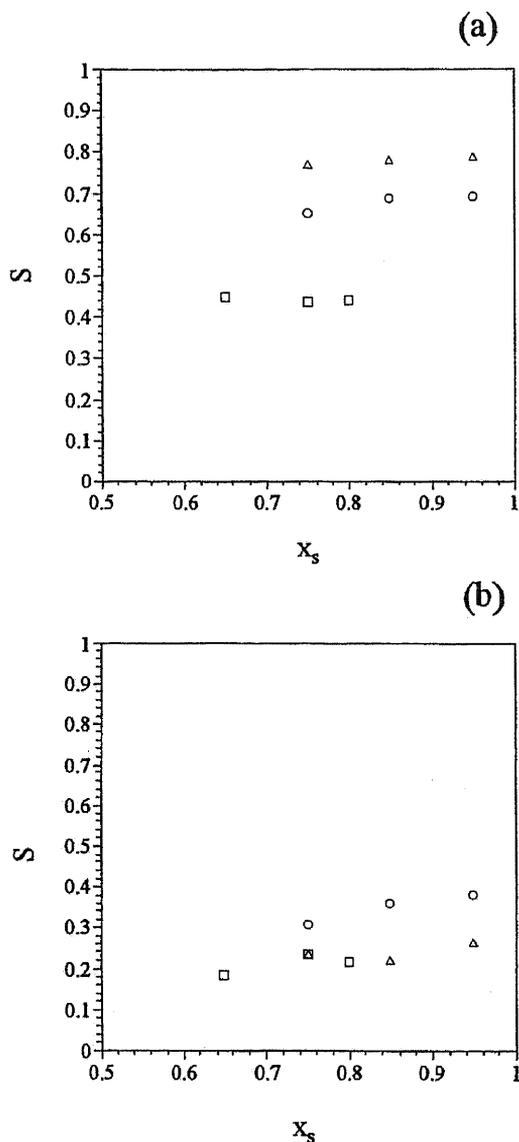


Fig. 9. Apparent order parameter, S , for (a) 5-doxylstearic acid and (b) 12-doxylstearic acid as a function of surfactant weight fraction, x_s . Δ , ChEO_3 ; \square , C_{12}EO_3 ; \circ , C_{16}EO_3 .

5. 3. 4 DSC 解析

ChEO_3 100% の DSC 結果を Fig. 10 に示した。これと比較するために、 ChEO_8 (これは分子量当たり 8 モルの EO 鎖になるように、 ChEO_5 と ChEO_{10} を混合したもの) で出来る L_α 相も測定した。 ChEO_3 系では一つのピークのみ現れ、これはラメラ相から一相領域への転移であるが、この温度領域では液晶相は一つである事を示している。ラメラ相状態から一相状態への転移点でのエンタルピー変化は典型的な L_α 相のそれよりは大きい、 L_β のそれよりは小さい。界面活性剤中へのコレステロールの挿入は 2 分子膜中で、ゲル-液晶転移

ChEO_3 の系では親油的なコレステロール鎖は比較的不均質なため、界面活性剤親油部のプローブの位置によって劇的に変化していると思われる。この親油鎖は 5-ドキシルステアリン酸に対し比較的剛直であり、これはプローブがエチレンオキシド鎖と剛直なステロール骨格の間に位置している事を示していると思われる (Fig. 9(a))。一方で 12-ドキシルステアリン酸はアルキル鎖の末端付近に位置し、そこでは分岐してよりフレキシブルなため、このプローブの S 値は低い (Fig. 9(b))。

鎖長が長くなれば分子パッキングが親水基の立体障害を受けずに界面活性剤相は剛直になる。この現象はシヨ糖脂肪酸エステル系の界面活性剤系でも観測されている (21)。

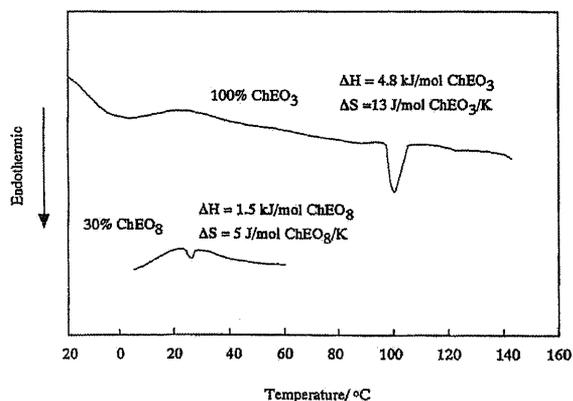


Fig. 10. Differential scanning calorimetry curves for ChEO_8 /water (30% ChEO_8) and pure ChEO_3 .

のエンタルピーを減少させる事が報告されている⁽²⁴⁾。コレステロールの一水和物の液晶相転移エンタルピーは比較的大きく(約 10kJ/mol)⁽¹⁶⁾、ChEO₃の親油鎖の融点は他の一般的な非イオン界面活性剤に比較して 149°Cと、かなり高い。この事がここで示した温度に対する特性要因であると思われる。

5. 3. 5 ChEO₃のベシクル形成

ChEO₃からなる液晶構造は、過剰の水の存在中で分散されベシクルを形成する。層状構造を水に浸すと、ミエリン構造が現れ自発的にベシクルを形成する。これよりベシクルを形成している 2 分子膜の特性はラメラ構造に近い事が推定される。Fig.11(a)に希薄系でのベシクルの分散状態を示した。界面活性剤の濃度が低い時にはサブミクロンオーダーの粒径の小さいベシクルと、チューブ様のベシクルが存在する。界面活性剤濃度が上昇すると会合が進み、大きな球状のベシクルが生成する (Fig.11(b))。

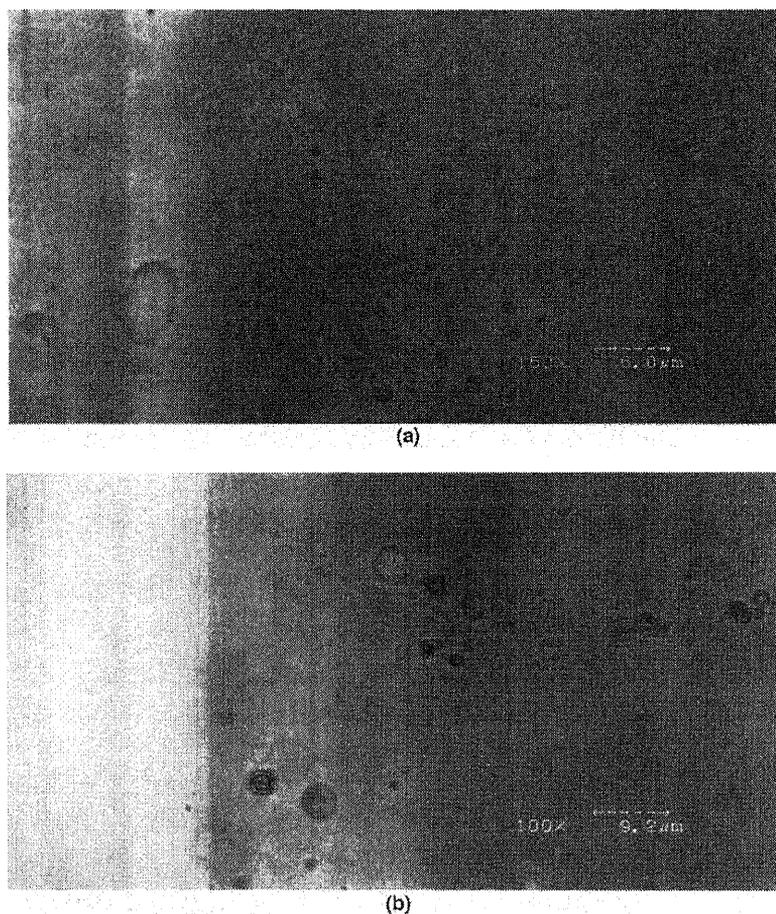


Fig. 11. Photomicrographs of sonicated ChEO₃ vesicular dispersions. (a) 1 mM ChEO₃; (b) 10 mM ChEO₃.

共焦点顕微鏡を用いて観察した、この図の右下領域のものは、会合体で平板状ものが観察される。これは短鎖 EO のヘキシルデシルエーテルと長鎖 EO コレステルルエーテルの混合系でも観察されている⁽²⁵⁾。Fig.12 は DLS 測定の結果を示している。平均粒径は初期の段階で小さくなり、その後は比較的長期間一定を保っている。この事は、このベシクルが極めて安定である事を示している。初期の粒子径の減少はおそらく大きい粒子の沈降に拠ると思われる。非イオン界面活性剤系からなるベシクルにコレステロールを添加すると、安定性が増し、粒径が減少する事が報告されている⁽²⁴⁾。

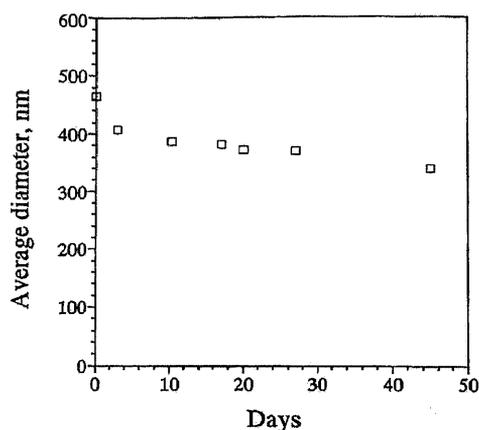


Fig. 12. Change in vesicle size with time measured by dynamic light scattering at 30°C for a ChEO₃ vesicular dispersion. Concentration, 0.2 mM ChEO₃.

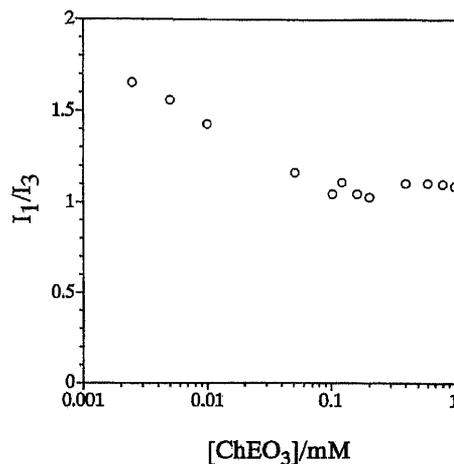


Fig. 13. Plot of the I_1/I_3 ratios as a function of ChEO₃ concentration at 25°C.

液状状態のベシクル (2 分子膜が液状) は反発力の減少からゲル (固体) 状のそれと比較して、安定性が悪い事が知られている。それ故、2 分子膜中にコレステロールが存在すると、膜の融合を減少させる。この事は、炭化水素鎖の流動化が抑制される事によるものと考えられる。

ChEO₃系の蛍光分析に結果を Fig.13, 14 に示す。Fig.13 に示される、界面活性剤低濃度領域での I_1/I_3 比のシャープな減少はピレン周辺の極性状態の減少か可溶化内部の会合化を示している。この事より、かなりの低濃度領域から会

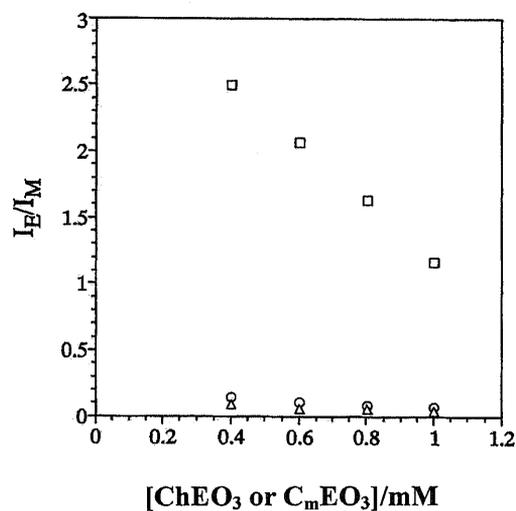


Fig. 14. Plot of the I_E/I_M ratios as a function of surfactant concentration at 25°C. Δ , ChEO₃; \square , C₁₂EO₃; \circ , C₁₆EO₃.

合状態が生じる事が推定される。また界面活性剤濃度が上昇すると、 I_1/I_3 は一定となるが、これはベシクル内部の微視的な極性が変わらない事を示している。

Fig.14 は ChEO_3 と C_mEO_3 の系の界面活性剤濃度による I_E/I_M を示している。 I_E/I_M 値は界面活性剤濃度が増すと減少するが、これはより界面活性剤の会合体が増し、この中でのピレンの有効濃度が減少し、エキサイマーが作り難くなる事による。 C_{12}EO_3 の I_E/I_M 値に比べ、 ChEO_3 と C_{16}EO_3 のそれはかなり小さいが、これは後者の界面活性剤会合体の数が相当大きいか、会合体内部の微視的な粘性がより大きい事を示している。

5. 4 結論

単一分布の ChEO_3 -水系は、粘稠で熱に安定な層状構造を示す液晶相が形成される。この相は、 L_α 相と同様の高い配向性を示しながらも、 L_α 相と L_β 相の中間的な構造を持つと推定された。この事は界面活性剤分子中のコレステロール骨格の強固でかさ高い構造によるものと思われる。

また ChEO_3 -水系の希薄領域では、様々な形態を示すベシクルが形成される。これらのベシクルは極めて安定であり、これは 2 分子膜の硬さがベシクル形成に適しているものと考えられる。

[参考文献]

- 1) M. Janiak, D. Small, G. Shipley, *J. Biol. Chem.*, 254, 6068 (1979).
- 2) J Ulmius, H. Wennerström, G. Lindblom, G. Arvidson, *Biochemistry*, 16, 5742 (1977).
- 3) M. Ruocco, G. Shipley, *Biochim. Biophys. Acta.*, 684, 59 (1982).
- 4) B. Mddler, H. Binder, G. Klose, *J. Colloid Interf. Sci.*, 202, 124 (1998).
- 5) H. Söderlund, J. Sjöblom, T. Wärnheim, *J. Dispers. Sci. Technol.*, 10, 131 (1989).
- 6) B. Folmer, M. Svensson, K. Holmberg, W. Brown, *J. Colloid Interf. Sci.*, 213, 112 (1999).
- 7) W. L. Hubbell, H. M. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 314 (1971).
- 8) N. Turro, P. Kuo, P. Somasundaran, K. Wong, *J. Phys. Chem.*, 90, 288 (1986).
- 9) A. Soutar, J. Pownall, A. Hu, L. Smith, *Biochemistry*, 13, 2828 (1974).
- 10) H. Kunieda, A. Akahane, K. Hagiwara, submitted for publication.
- 11) H. Kunieda, G. Umizu, Y. Yamaguchi, *J. Colloid Interf. Sci.*, 218, 88 (1999).
- 12) K. Huang, K. Shigeta, H. Kunieda, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 110, 171 (1998).
- 13) J.C Ravey, M. J. Stébé, S. Sauvage, C. Elmoujahid, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspec.*, 99, 221 (1995).
- 14) C. Adam, J. Durrant, M. Lowry, G. Tiddy, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 180, 789 (1984).
- 15) C. Müller Goymann, *Pharm. Res.*, 4, 154 (1984).
- 16) C. Loomi, G. Shipley, D. Small, *J. Lipid Res.*, 20, 525 (1979).
- 17) K. Tajima, Y. Imai, T. Horiuchi, M. Koshinuma, A. Nakamura, *Langmuir*, 12, 6651 (1996).
- 18) N. Kanei, T. Imai, K. Kihara, T. Tagawa, H. Kunieda, *Yukagaku*, 45, 849 (1996).
- 19) N. Nakamura, T. Tagawa, K. Kihara, I. Tobita, H. Kunieda, *Langmuir*, 13, 2001 (1997).
- 20) C. Tanford, *J. Phys. Chem.*, 78, 2469 (1974).
- 21) D. Abran, F. Boucher, T. Hamanaka, K. Hitaki, Y. Kito, K. Koyama, R. H. Leblanc, H. Machida, G. Munger, M. Seidou, M. Tesser, *J. Colloid Interf. Sci.*, 128, 230 (1989).
- 22) B. Anderson, G. Olofsson, *Colloid Polym. Sci.*, 265, 318 (1987).
- 23) H. Hauser, F. Paltauf, G. Shipley, *Biochemistry*, 21, 1061 (1982).
- 24) J. Bouwstra, D. Van Hall, H. Hofland, H. Junginger, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspec.*, 123, 71 (1997).
- 25) I. Uchebgu, J. Bouwstra, A. Florence, *J Phys. Chem.*, 96, 10548 (1992).
- 26) M. Bohorquez, C. Koch, T. Trygstand, N. Pandit, *J. Colloid Interf. Sci.*, 216, 34 (1999).

第6章「ポリオキシエチレンフィトステロール／ポリオキシエチレン ドデシルエーテルの混合系相挙動」

要旨

生体適合性が高く環境問題にやさしい界面活性剤であるポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m) の水中での相挙動と、ポリオキシエチレンドデシルエーテル (C₁₂EO_n) を加えた系の自己組織化について検討した。PhyEO₁₀/水の 2 成分系においてはミセル溶液 (W_m)、同定できない光学的に異方性の液晶相 (X) とラメラ相が常温領域で界面活性剤濃度を増すと順次形成される。より親水的な PhyEO₂₀ の場合水との 2 成分系で W_m、ミセルキュービック相とヘキサゴナル相が形成される。この 2 種の PhyEO_m タイプ界面活性剤の希薄溶液に、C₁₂EO₄ を添加する事により、高い粘弾性を示すひも状ミセルが形成される。さらに液晶相に C₁₂EO₄ を添加すると広い濃度領域で L_α 相が形成される。また PhyEO₁₀/C₁₂EO₄/水系において、X-L_α 相への転換は長方形のリボン相を経て起きる。

更に 5% の PhyEO_m (m=5-20) の相挙動を広い温度領域で調べた。m<9 では全温度領域で相分離が見られる。中程度の EO 鎖の場合 (11<m<16)、温度上昇に伴い小さなミセルから一次元的ミセルの成長が起こり粘弾性を示しその後相分離を起こす。一方 EO が長鎖の場合、全温度領域で小さな自己組織体である通常のミセルが形成される。新油

6. 1 序論

界面活性剤は洗浄剤や家庭用のクレンザーもしくは化粧品はもとより、工業用途においても広く用いられている。それゆえに人の体に使用する事だけではなく、環境における影響を考慮する事も大変に重要となってきた。同様に、化粧品やパーソナルヘルスケア製品への応用に関しては生体適合性の要素は重要である。

ポリオキシエチレンステロール系界面活性剤は、親油部がコレステロールやフィトステロールで構成される。ステロール類は天然由来であり、これらの界面活性剤は生体適合性が良く、皮膚に対してマイルドであり毒性が低い⁽¹⁾。これらの界面活性剤は乳化剤として用いられ一般に市販されている。またステロール基の嵩高さや剛直な面は溶媒中でのこれらの界面活性剤の相挙動や自己組織化に影響を及ぼしていると考えられる。ポリオキシエチレンコレステリルエーテル (ChEO_m, m=10 or 15) の水と水/界面活性剤助剤との相挙動では、広い組成中でリボン相 (R₁) の様な興味深い相が形成される^(2,3)。この液晶相は多少楕円状になった断面形状を持ち、非常に長いひも状の自己組織体で形成されている。R₁ 相の形成は界面活性剤や界面活性剤助剤濃度の上昇とともに、ひも状凝集部位の円状の断面形状をゆがめる事の可能な、強固で嵩高い親油部の構造によるものである。実際に界面活性剤は濃度が低くても、ミセル凝集体の形状を球からひも状へと変化させる⁽⁴⁾。さらにポリオキシエチレンドデシルエーテル (C₁₂EO_n) や N-メチルエタノールアミド (NME-n) のような親油的な非イオン界面活性剤をポリオキシエチレンステロール系界面活性剤の希

薄溶液に添加すると、親油的部位でのパッキング力が強まり、小さなミセル凝集体が急速な一次元的ミセル成長を伴い、特徴的な自己組織体であるひも状ミセルを形成する^(4,5)。長いひも状ミセルが絡まる濃度以上では、ミセルは一時的なネットワークを形成し、劇的に粘弾性が増加する。またステロール基の末端部での分岐構造はミセルの成長を促し、粘弾性挙動を大きく変える事は知られて来ている。

このような応用例におけるステロール系界面活性剤の魅力的な特徴にも関わらず、これらの相挙動に関する報告はそれほど多くない^(2,3,6-9)。この点を背景に本研究ではポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m) / 水、および PhyEO_m / C₁₂EO_n / 水の相挙動を広い温度領域と濃度領域で検討した。本研究では、まず PhyEO₁₀ 系の検討を行い、続いて PhyEO₂₀ の系を検討した。その後で 5%PhyEO_m の水系の相挙動を示す。

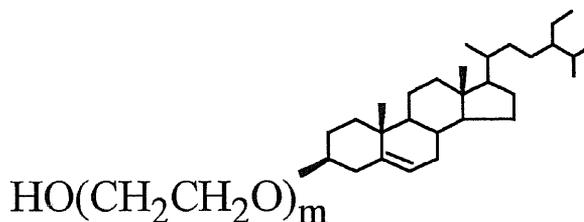
6. 2 実験

6. 2. 1 試薬

ポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m, m=10 or 20) とポリオキシエチレンドデシルエーテル (C₁₂EO_n, n=1-4) は日光ケミカルズ社製をそのまま用いた。PhyEO_m の EO 鎖長の調整は PhEO₅, PhEO₁₀, PhEO₂₀ のものを適宜混合して行った。PhyEO_m の分子構造は Scheme1 に示す。

6. 2. 2 相図

相図作成には、所定量をアンプルに秤量し密封しかき混ぜた後に、ミセルの場合は 25°C の恒温水槽に 2~3 日、液晶の場合は 2~3 週間、系が平衡に達するまで放置した。相の決定は目視観察で行った。液晶の同定はニコン社製の偏光顕微鏡または小角 X 線回折装置 (SAXS ; Nanoviewer (理学電気社製), 40kV-20mA、回転アノードゴニオメーター) を用いて測定した。試料は測定に当たりプラスチックフィルム (マイラーシール法) で覆った。



Scheme 1. Molecular structure of polyoxyethylene-phytosterol (PhyEO_m).

6. 3 結果と考察

6. 3. 1 PhEO₁₀ / 水および PhEO₁₀ / C₁₂EO₄ / 水系の相挙動

Fig.1 に PhEO₁₀ / 水系の温度に対する相図を示す。ミセル相 (W_m) の濃度領域は比較的狭く、室温領域で光学的に異方性を示す液晶相 (X で表示される) に移行する。さらに界面活性剤の濃度が増すとラメラ液晶相 (L_α) が形成される。またより高温領域になると、目視では L_α と X の境界は区別が付かなくなる。同様の系で、Folmer らは、PhEO₁₀ の濃度上昇に伴い狭い W_m 相、ネマティック相とヘキサゴナル相を経てさらに広いゲル領域が形成

される事を報告している⁽¹⁰⁾。

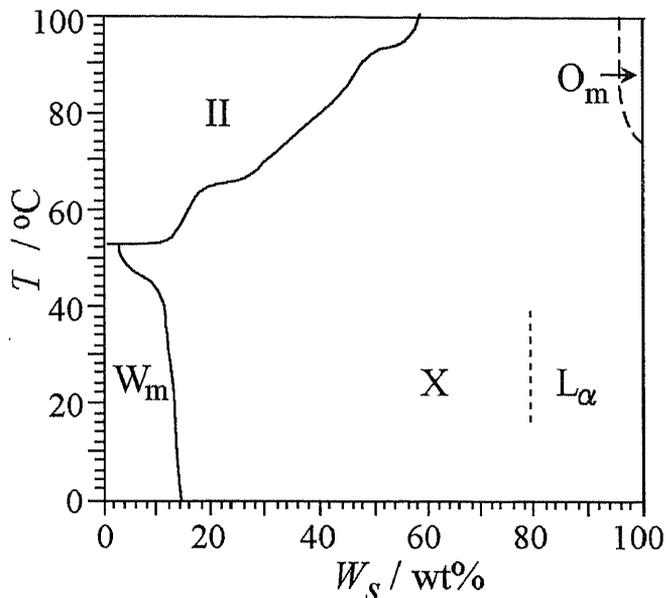


Fig. 1. Phase diagrams of PhyEO₁₀/water binary systems. W_m and O_m represent normal and reverse micellar phases respectively, L_α stands for the lamellar liquid crystal phase. X is the optically anisotropic liquid crystal phase of unknown structure and II is the two-phase region. W_s is the concentration of surfactant in the system.

X 相の領域でこの構造を評価するために界面活性剤濃度 (W_s (wt%)) に対しての SAXS 測定を行った (Fig.2)。ここで示した SAXS パターンは、良く観察される H₁ や L_α の様な液晶構造のそれと完全には一致しない。また界面活性剤の濃度変化による SAXS パターンも示しているが、これは連続的な構造変化を示しており、最終的にはラメラ構造へと変換する。X 相の内部の中間的な相の構造は正確には判明できないが、Fig.3 で示した PhEO₁₀/C₁₂EO₄/水系で得られる相図から、いくつか示唆が得られる。また W_m 中の高い粘度を示す領域を図中の斜線で示した。

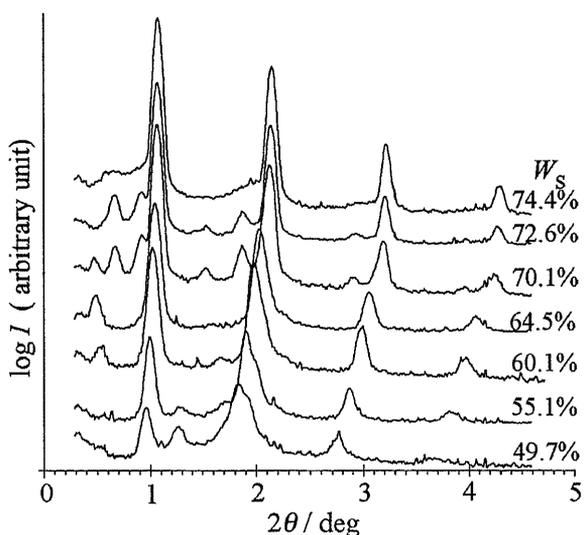


Fig. 2. SAXS pattern of the X phase formed in the water/PhyEO₁₀ system at different surfactant concentrations, W_s (in wt%) at 25 °C.

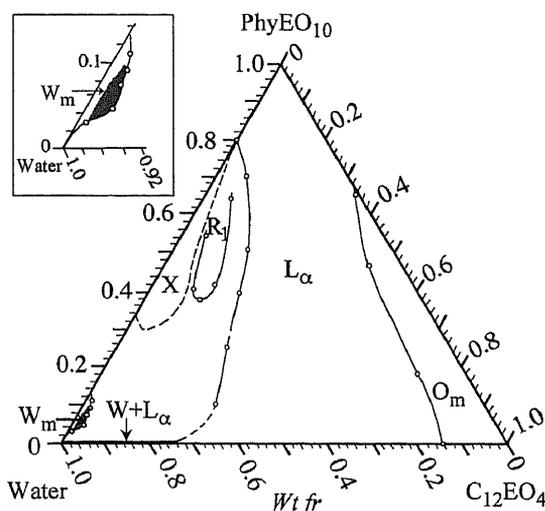
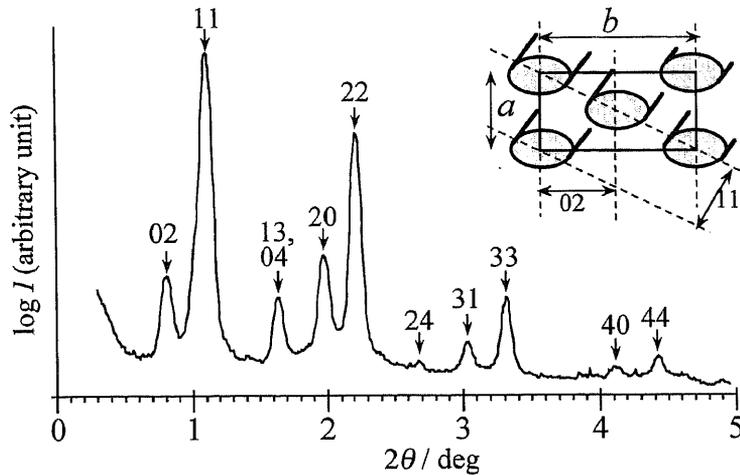


Fig. 3. Phase diagrams of PhyEO₁₀/C₁₂EO₄/water system at 25°C. R₁ is the rectangular ribbon phase and W is water. Other notations are same as in Figure 1. A magnified view of the W_m domain and the viscoelastic region of wormlike micelles (shaded area) are shown in the inset.

Fig.3 で示した PhEO₁₀/C₁₂EO₄/水系の相図より、PhEO₁₀ の希薄なミセル水溶液に、親油的な界面活性剤である C₁₂EO₄ を添加していくと、ひも状ミセルが形成し急激な粘度上昇が見られる。さらに C₁₂EO₄ を添加していくと相分離を起こし、ミセル相にベシクルが共存した白濁状の溶液となる。



PhEO₁₀/水の 2 相系の界面活性剤濃度が高い領域で生じる X 相に、C₁₂EO₄ の様な親油的な界面活性剤を加えると、L_α 相に移行する間に中間の液晶相が現れる。この相の SAXS パターンは典型的な R₁ 相を示す (Fig.4)。R₁ の Bragg 反射距離に関しては次の式で得られる⁽¹⁰⁾。

Fig. 4. SAXS pattern of the intermediate phase formed in the PhEO₁₀/C₁₂EO₄/water system at total surfactant weight fraction, $W_s = 64.8$ wt% and PhEO₁₀/C₁₂EO₄=90/10 by wt. The schematic diagram of the structure of the rectangular ribbon (R₁) phase with *cmm* symmetry is also shown.

$$d_{hk} = (h^2/a^2 + k^2/b^2)^{-1/2} \quad (1)$$

d_{hk} は hk 面による反射に一致する距離を示し、 a と b は単一セルの長方形のパラメーターを示し、Fig.4 の図中に示した。Fig.4 中の長方形の *cmm* 対称形では、 $h+k=2n$ ($n \geq 0$) である。一方で *pgg* 対称では Miller 指数の h と k は、 $h=0 \cdot k=2n$, $k=0 \cdot h=2n$ の制限の中でどのような正整数 n も可能である。*pgg* 対称は *cmm* 対称と異なり、単一セルの側面に対しやや傾いた組織体の断面を持つ。Fig.4 で示された全てのピークは *cmm* と *pgg* 対称の双方のものに当てはめられる。しかしながら、12 と 21 面に関するピークの欠落はこの構造が *cmm* である可能性を示している。

R₁ 領域はかなり広く、界面活性剤の濃度が増す方向の界面活性剤-水軸方向に伸びている。実際に、Fig.2 で示された PhEO₁₀/水系での界面活性剤濃度が高い ($W_s=70.1, 72.6$ wt%) 領域での X 相の SAXS パターンは、R₁ 相のそれ近づいている。この事は、この界面活性剤高濃度領域では、R₁ 相と X 相が似た構造を取っている事を示している。通常 R₁ 相は界面活性剤の相図では、いわゆる H₁ 相と L_α 相の間に位置している。しかしこの系ではヘキサゴナルのパッキング状態を示す現象が見られない。いずれにせよ X 相は、これに親油的な界面活性剤を添加すると R₁ 相が出現するが、棒状の組織体からなっていると考

られる。X相中ではステロール骨格のような嵩高い親油基の為に、棒状の会合体の断面形状は円形ではなく楕円状になると思われる。その構造は界面活性剤や界面活性剤助剤の添加によって、徐々に R_1 相に変わっていく。同様の相図のパターンが $ChEO_{10}$ /親油的界面活性剤/水系でも得られている⁽²⁾。

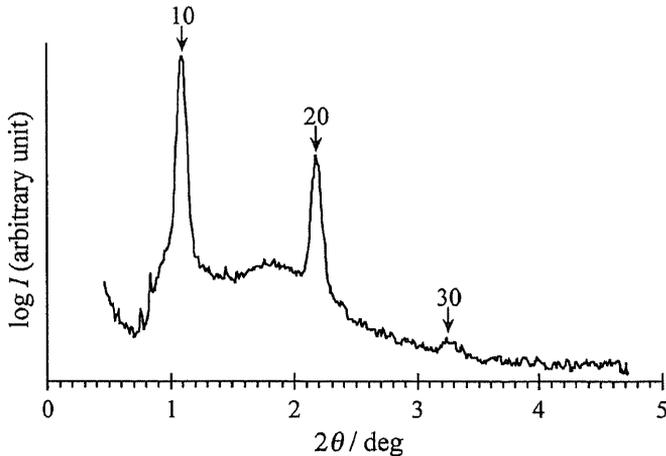


Fig.5. SAXS pattern of a sample in the $PhEO_{10}/C_{12}EO_4$ / water system at $W_s=45wt\%$ and $PhEO_{10}/C_{12}EO_4 = 65/35$ by wt.

Fig.5 は、 $PhEO_{10}$ が低濃度の時の W_m と L_α の間の領域での典型的な SAXS パターンを示した。ここでは、散乱位置のピーク比が、広い分散バンドに沿って、 $1 : 1/2 : 1/3$ とシャープに現れている。これは恐らく回折とは関連のないミセル領域を貫通した、ラメラ構造の存在によるものと思われる。界面活性剤や助剤の濃度が上昇すると分散されたバンドは徐々に消失し、明確なラメラ様の SAXS パターンが出現する。 L_α 相は、水- $C_{12}EO_4$ 軸から広い界面活性剤

濃度領域に広がっている。ここでは示していないが、 $PhEO_{10}$ は単独でも典型的な L_α の SAXS パターンを示している。これはこの分子の親水基と嵩高い親油基が適度につり合っ

てラメラ様の組織体構造を形成している事による。

6. 3. 2 $PhEO_{20}$ /水および $PhEO_{20}/C_{12}EO_4$ /水系の相挙動

Fig.6 は $PhEO_{20}$ /水の 2 成分系の相図を示している。界面活性剤の濃度が上昇すると W_m 相はミセルキュービク相⁽¹¹⁾へと変わり、さらには広い濃度領域を占める H_1 相が現れる。これは恐らく、この広い領域で正の曲率の組織体を維持しうる両親媒部の親水基の大きなヘッドグループによるものとも思われる。非常に高い濃度領域では低い温度で固形相を示し、高い温度では逆ミセル相を示す。この図で示された I_1 と S 相の領域は Folmet ら⁽⁷⁾ の報告されたものよりかなり広い。

Fig.7 に $PhEO_{20}/C_{12}EO_4$ /水系の相図を示した。 $PhEO_{10}$ 系の W_m の場合に比較しかなり領域が拡大している。また粘弾性を示すミセル領域は $C_{12}EO_4$ の添加量が比較的多く必要である。この事は $PhEO_{20}$ の長い EO 鎖が、 $PhEO_{10}$ に比べ高い正の曲率を示す事による。しかしながら $PhEO_{20}$ の様に大きなヘッドグループを持ち、正の曲率を維持しようとするにもかかわらず、一次元的なミセル成長が起こる事は興味深い。これはフィトステロールの様な親油的な部位が強固な骨格を持つと同時に嵩高いアルキルグループを持つ為に、界面活性剤が球状に凝集するのを阻害している事によると思われる。 $C_{12}EO_4$ をさらに添加すると、ミセル溶液とベシクル分散物が共存する白濁した溶液が形成される。さらに添加を続

けると 2 成分系で液晶相が形成され、界面曲率は減少して水の多い希薄な領域まで液晶相が広がる。H₁ 領域は広い組成比で形成されるが、これは剛直で分岐した親油鎖と界面曲率を正にする大きな親水基の効果が相殺した結果起きていると考えられる。H₁ 領域が、シリ

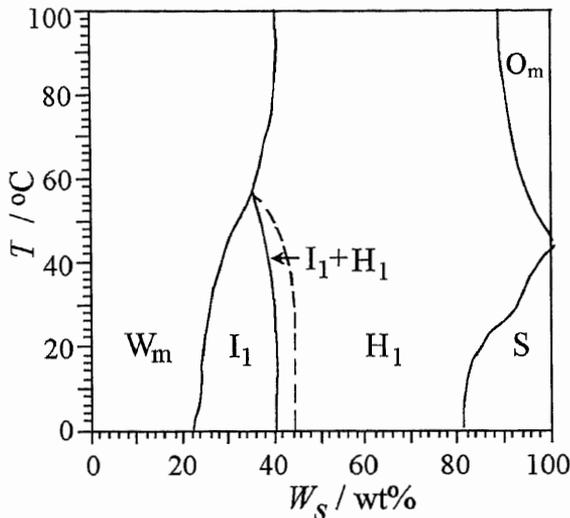


Fig. 6. Phase diagrams of water/PhyEO₂₀ binary systems. I₁ and H₁ are the isotropic discontinuous (micellar) cubic and hexagonal liquid crystal phases. S is the solid-present region. Other notations are same as in Figure 1.

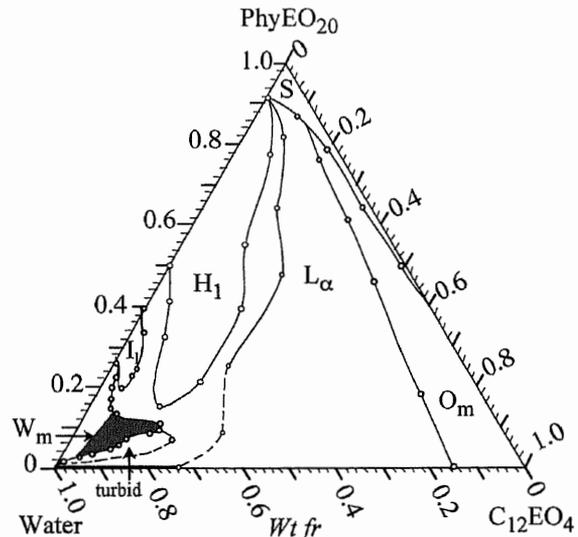


Fig. 7. Phase diagram of PhyEO₂₀/C₁₂EO₄/water systems at 25°C. The phase notations have usual meaning, as mentioned in Figures 1 and 6. The shaded area inside the W_m domain corresponds to the high-viscosity region of wormlike micelles.

ンダー状の自己組織体である、ひも状ミセルからなる高い粘弾性を示す W_m 領域に向かっている事は興味深い。さらに C₁₂EO₄ を H₁ 相に添加すると L_α 相への変換が起きる。C₁₂EO₄ 濃度の非常に高い領域では、PhEO₂₀ の広い濃度範囲で逆ミセル溶液が形成される。

6. 3. 3 5%PhyEO_m/水系の相挙動

Fig.8 に 5%PhyEO_m/水系の温度に対する相図を示した。界面活性剤の平均 EO 数が 9 以下の場合、水系中では親油性が強すぎて一相が形成されない。よって全ての温度において相分離が見られる。より EO 鎖が長くなるとミセル水溶液が形成される。2 相系とミセル相は狭い液晶相によって分けられている。EO 数が 11~16 のこの領域では、高い温度領域で粘弾性を示すひも状ミセルが形成する。温度上昇に伴う EO 鎖の脱水和の促進は、組織体の界面曲率を減少させ、結果として球形から棒状へと形状を変化させ、一次元的なミセル成長を引き起こす。ひも状ミセルの形成は、界面活性剤の固有の親水性と親油性バランスによるものである事は大変に興味深い。界面活性剤が親油性であれば、界面曲率は急速に減じ、二次元的 (例えばラメラ液晶の様な) 自己組織体が形成される。一方で界面活性剤がより親水的であれば、界面曲率はわずかしか減らず、一次元的なミセル成長する事は出来ない。

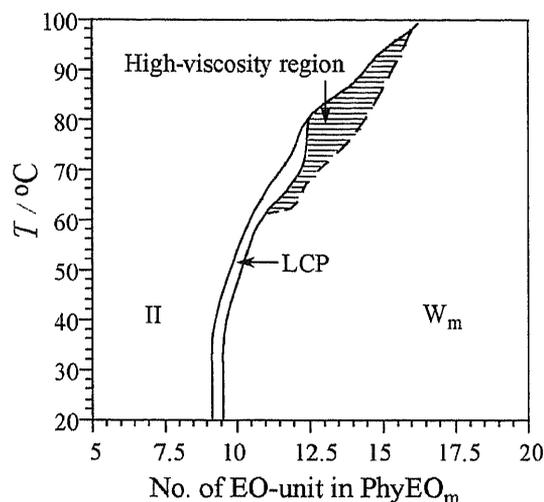


Fig. 8. Phase diagram of 5%PhyEO_m aqueous solution as a function of the number of EO-unit in PhyEO_m. LCP is the liquid-crystal-present region.

6. 4 結論

ポリオキシエチレンフィトステロールエーテルは、ステロール基が剛直で嵩高い事により、その水溶液系や親油性界面活性剤添加系で特徴ある相挙動を示す。ステロール骨格による強いパッキングにより、希薄ミセル溶液中で親油性界面活性剤の添加や単に温度を上げる事で、球状から棒状へ、そして一次元的ミセル成長が起きる。親水性界面活性剤である PhEO₂₀ の水溶液系では、その大きなヘッドグループにより W_m、キュービックミセルとヘキサゴナル相が形成される。しかしながら PhEO₁₀ の水溶液系では W_m、光学的に異方性の液晶相(X) (この相には球状ではない、断面形状が棒状の組織体とラメラ相 (L_α) の共存が推定される) が界面活性剤濃度の上昇とともに形成される。2成分系で形成されたこの液晶相にさらに C₁₂EO₄ を添加すると、L_α相が形成される。X相と L_α相の間には棒状の自己組織体から成る長方形のリボン相が形成される。この様な自己組織体の特徴は、応用化に際して有用な情報を与えるものである。

[参考文献]

- 1) B. M. Folmer, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 103, 99 (2003).
- 2) Md. K. Hossain, D. P. Acharya, T. Sakai, H. Kunieda, *J. Colloid Interface Sci.*, submitted for publication.
- 3) T. Sato, Md. K. Hossain, D. P. Acharya, O. Glatter, A. Chiba, H. Kunieda, *J. Phys. Chem. B.*, in press.
- 4) D. P. Acharya, H. Kunieda, *J. Phys. Chem. B.*, 107, 10168 (2003).
- 5) D. P. Acharya, Md. K. Hossain, Jin Feng, T. Sakai, H. Kunieda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6, 1627 (2004).
- 6) H. Soderlund, J. Sjoblom, T. J. Warnheim, *Dispersion Sci. Technol.*, 10, 131 (1989).
- 7) B. M. Folmer, M. Svensson, K. Holmberg, W. Brown, *J. Colloid Interface Sci.*, 213, 112 (1999).
- 8) C. Rodriguez, N. Naito, H. Kunieda, *Colloids Surf. A.*, 181, 237 (2001).
- 9) M. A. Lopez Quintela, A. Akahane, C. Rodriguez, H. Kunieda, *J. Colloid Interface Sci.*, 247, 186 (2002).
- 10) S. Gustafsson, P. O. Quist, *J. Colloid Interface Sci.*, 180, 564 (1996).
- 11) H. Hagslatt, O. Soderman, B. Jonsson, *Liq. Crystals*, 12, 667 (1992).

第7章「ポリオキシエチレンフィトステロール／ポリオキシエチレンドデシルエーテルの混合系で生成するひも状ミセルのレオロジー特性」

要旨

ポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m) の希薄溶液にポリオキシエチレンドデシルエーテル (C₁₂EO_n) を加えると、粘度上昇が観察される。これは C₁₂EO_n によって引き起こされるひも状ミセルが生成する事による。振動ずり速度依存による PhyEO_m + C₁₂EO_n の粘弾性測定によれば C₁₂EO_n の EO 鎖が減じるに従いミセルの一次元的な成長は増大する。しかし EO 鎖が非常に短い場合、ミセル成長が起きる前の低濃度領域において相分離が観察される。C₁₂EO₃ と C₁₂EO₄ の添加系において、生成するひも状ミセルにより幅広い振動ずり速度の範囲でマクスウェルモデルが適合する、動的なレオロジー特性を有する一時的な粘弾性ネットワークが形成される。PhyEO_m の濃度が増したり EO 鎖が短くなったりすると一次元的なミセル成長は促進される。コレステロール系の同様な構造の界面活性剤との比較においてはフィトステロール系の方がミセル成長は効果的である。これはフィトステロール系界面活性剤の疎水部に分岐があり、この分子構造の違いによって生じたと思われる。

7. 1 序論

界面活性剤分子は自己組織化し球状ミセル、ひも状ミセルやヘキサゴナル液晶等々の様々な自己組織体を形成する。粘弾性を有するひも状ミセルは基礎的研究や実際の応用研究がなされている。長鎖アルキルカチオン界面活性剤 (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド; CTAB⁽¹⁻⁶⁾, ヘキサデシルピリジウムクロライド⁽⁷⁻¹¹⁾) が、対イオンとしてサリチル酸や臭化物イオンを加える事で、ひも状ミセルが形成される事はよく知られている。ある臨界濃度 (いわゆるオーバーラッピング濃度) を超えるとひも状ミセルは一時的に絡み合いネットワークを形成し粘弾性を示す⁽¹²⁾。これは高分子溶液に見られる現象と似ている。

最近、ポリオキシエチレンコレステリルエーテルの希薄ミセル溶液に、ポリオキシエチレンドデシルエーテル (C₁₂EO_n, n=EO (オキシエチレン) 数) やドデカノイル N-メチルエタノールアミドの様な親油的な非イオン界面活性剤を加える事により、形成されるひも状ミセルの粘弾性特性に関して報告されている^(13,14)。非イオン界面活性剤によって引き起こされた一次元的なミセル成長は、界面活性剤親水部の頭部平均断面積が減少する事による。非イオン界面活性剤混合系での粘弾性ミセルの形成は、基礎的な研究だけでなく、イオン性の物質を添加せずに系の粘弾性を向上させる事が求められる様な応用研究においても有用である。さらにステロール系界面活性剤の様な天然素材からなる両親媒性物質は、生体適合性が高く環境にやさしいと言える。

ChEO_m と同様、ポリオキシエチレンフィトステロール類 (PhyEO_m) は疎水鎖が天然由

来であり、ステロール部に分岐構造がある以外は ChEO_m と同様な構造を持っている。しかしながら、親油部における分岐構造は両親媒部の自己組織化に影響を与えると考えられる。このような観点で、 $\text{PhyEO}_m/\text{C}_{12}\text{EO}_n$ 混合系での粘弾性特性を把握し、コレステロール系界面活性剤と比較する事は応用化に際しても重要であると考えられる。

本研究では PhyEO_m と短い EO 鎖を有する C_{12}EO_n 混合系で形成される特徴的な自己組織体あるひも状ミセルの相変化と粘弾性特性を示した。また非イオン界面活性剤混合系におけるレオロジー特性において、その親水部および疎水部の影響を検討した。

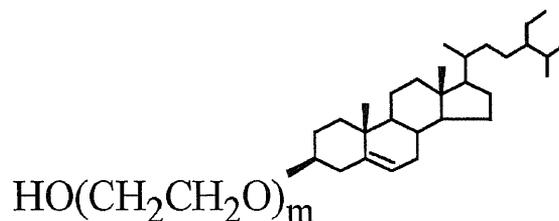
7. 2 実験

7. 2. 1 試薬

ポリオキシエチレンフィトステロール (PhyEO_m , $m=10$ and 20) とポリオキシエチレンドデシルエーテル (C_{12}EO_n , $n=1\sim 4$) 日光ケミカルズ社製をそのまま用いた。 PhyEO_m は Scheme 1 に示す。

7. 2. 2 相図

相図作成には、所定量をアンプルに秤量し密封しかき混ぜた後に、ミセルの場合は 25°C の恒温水槽に 2~3 日、液晶の場合は 2~3 週間、系が平衡に達するまで放置した。相の決定は目視観察と小角 X 線回折



Scheme 1. Molecular structure of polyoxyethylene phytosterol (PhyEO_m)

(SAXS ; Nanoviewer、理学電気社製) により測定した。試料は測定に当たりプラスチックフィルム (マイラーシール法) で覆った。

7. 2. 3 レオロジー測定

サンプルのレオロジー測定は、適量濃度の PhyEO_m 水溶液 (5-10ml) に C_{12}EO_n を加えて行った。サンプルは混合した後、平衡状態になるよう 25°C の恒温水槽に少なくとも 48 時間放置した。レオロジー測定は ARES レオメータ (Rheometric Scientific 社製) を 25°C にて行い、アタッチメントはクエット (カップ径: 34mm, bob 径: 32mm, bob 長: 33.3mm) とコンプレート (直径: 50 または 25mm, コーン角: 0.04rad) を、粘性に応じて用いた。動的振動ずり速度依存の測定は試料が線形粘弾性を示す領域で行った。

レオロジー特性に及ぼす界面活性剤の濃度効果や親水基部位の大きさの効果を調べるために、静的および振動ずり速度依存の測定を行った。これらには PhyEO_m の濃度 (wt% で表されている) は固定し、 C_{12}EO_n (総界面活性剤中における濃度として W と表示) の濃度を変えて行った。

7. 3 結果と考察

7. 3. 1 相図

水/PhyEO_m/C₁₂EO_n (m=20,10 ; n=4,3) 系の 25°Cで水の多い領域の相図を Fig.1 に示した。水-PhyEO_m の 2 成分系では、ミセル相 (W_m) は 27w%と 14w%まで、それぞれ PhEO₂₀ と PhEO₁₀ の水溶液系で広がっている。界面活性剤濃度が増すに従い、PhEO₂₀ 系では 27%以上の濃度領域でミセルキュービック相⁽¹¹⁾、PhEO₁₀ 系では光学的に等方性でない構造不確定の液晶相に変化する。これらの液晶相は Fig.1 に示していないが、詳細は文献⁽¹⁵⁾にて示されている。PhEO₁₀/C₁₂EO₃/水の 3 成分系では W_m 領域は狭い。C₁₂EO₃ を C₁₂EO₄ に置き換えると、W_m の C₁₂EO_n の可溶化量が上昇する。PhEO₂₀ においては、ミセル領域は格段に広がる。実際に両親媒性物質の親水基を大きくすると会合体の曲率が大きくなる。Fig.1 に W_m 領域の内部において非常に粘性の高い領域を斜線で示した。これらの高い粘性をもつ試料は、ひずみをかけると偏光性は示すが光学的に等方性である。C₁₂EO_n の濃度が増すと相分離が起こり多相領域でベシクルの分散物が観察された。最終的には界面活性剤曲率がゼロの液晶相となる。

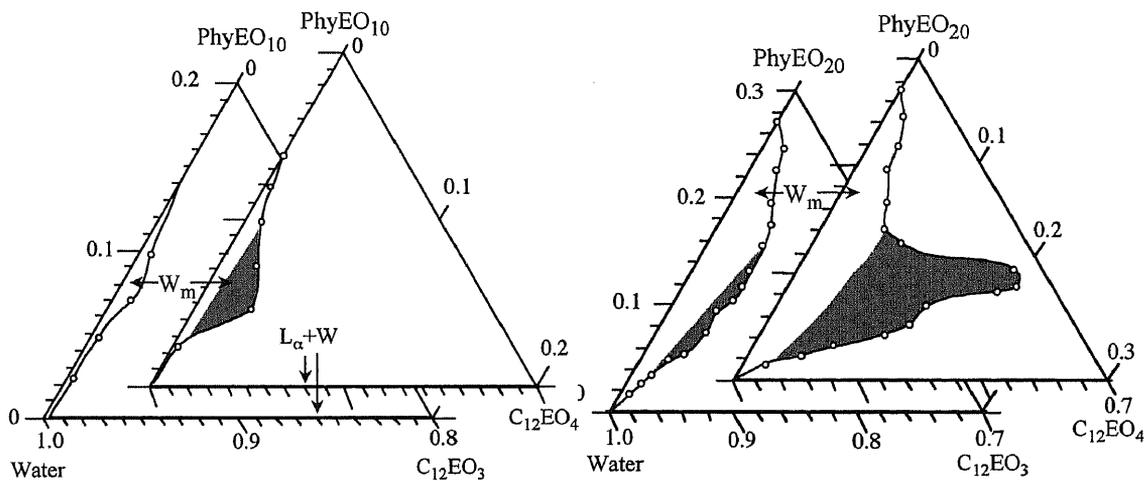


Fig.1. Partial phase diagrams of water/PhyEO_m/C₁₂EO_n systems in dilute region at 25°C. The notation W_m represents a micellar phase and L_α stands for lamellar liquid crystal phase. The region of high viscosity within the W_m phase region is tentatively shown by shaded area.

7. 3. 2 PhEO₂₀+C₁₂EO₄系での C₁₂EO₄ の濃度に対するレオロジー

ここでは、まず 5%の PhEO₂₀+C₁₂EO₄ 系における C₁₂EO₄ の添加効果を調べる。さらにこの系での PhEO₂₀ の濃度に対する効果を検討する。さらに PhEO₂₀+C₁₂EO_n と PhEO₁₀ の系のレオロジー特性を比較し、界面活性剤の親水鎖長の効果も示す。

Fig.2 では静的条件で 5%の PhEO₂₀+C₁₂EO₄ 系の粘度のずり速度依存性を、各 C₁₂EO₄ の濃度(W)で測定した。C₁₂EO₄ の濃度が低いときには粘度は極めて低く、ずり速度で粘度

の変化はない（ニュートン流動）。 $C_{12}EO_4$ を段階的に加えていくと、低いずり速度の領域で急激に粘度が上昇する。そして高い濃度の領域ではずり速度の上昇による粘度低下が見られる。これは巨大なひも状ミセルの形成を示していると思われる。 W が0.444以上では粘度値は最大を超え、それ以上 $C_{12}EO_4$ を添加すると粘度は低下し高いずり速度の領域でもニュートン流動の領域が広がる。この粘度の最大領域を超えての減少は組織体構造の変化を示している。

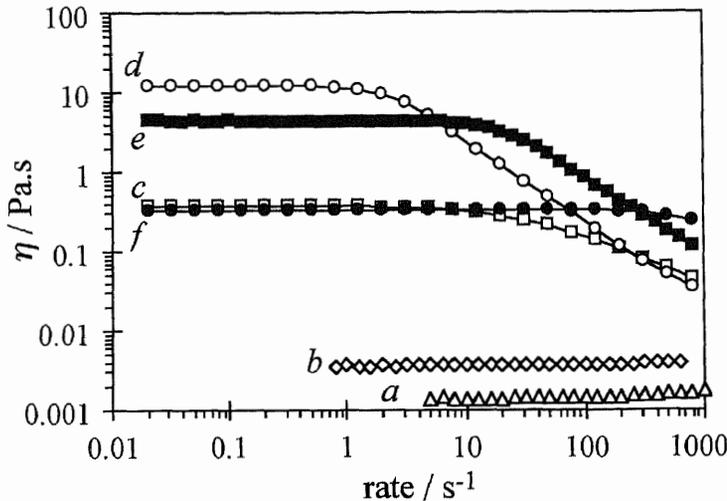


Fig.2. Steady shear-rate - viscosity plots of the micellar solution of 5% PhyEO₂₀ + C₁₂EO₄ systems at various weight fraction of C₁₂EO₄ in total surfactant (W): (a) 0, (b) 0.286, (c) 0.375, (d) 0.444, (e) 0.545, and (f) 0.615.

同じポリオキシエチレン単位を持った、同様の構造であるコレステロール系の界面活性剤 (ChEO₂₀) 系では、短鎖EOの $C_{12}EO_n$ 添加による粘度の急上昇が見られない事は興味深い。この2種の界面活性剤の、一次元的なミセル成長に対する差は、フィトステロールの分岐構造によるものと思われる。アルキル鎖は会合体のコア部に残っているので、アルキル部での分岐の程度が増えればそれだけ立体的障害が増し、 $C_{12}EO_n$ の添加によりミセル中

で球状からひも状への形態変化が起こると考えられる。

最大粘性を示す領域では試料は粘弾性を示す。ミセル溶液試料の粘弾性特性を把握するために振動ずり速度依存の測定を行った。Fig.3に最大の粘性を示した、 $C_{12}EO_4$ の混合比が0.444のときの振動ずり速度 (ω) に対する弾性または貯蔵弾性率 (G') と粘性または損失弾性率 (G'') を示す。この図から、低い振動ずり速度領域では液体状の挙動 ($G' < G''$) が見られ、 ω の上昇と共に G' と G'' 双方とも上昇し、高い振動ずり速度領域では、弾性の挙動 ($G' > G''$) が見られる。低い振動ずり速度領域で絡まりあったミセルの粘弾性特性は単一緩和時間 τ を用いたマクスウェルモデルで説明する事が出来る。

$$G'(\omega) = \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} \times G_0 \quad (1)$$

$$G''(\omega) = \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \times G_0 \quad (2)$$

$$|\eta^*| = \frac{\sqrt{G'^2 + G''^2}}{\omega} \quad (3)$$

緩和時間 (τ) は G' と G'' の交差した時の振動ずり速度の逆数で得られる。一方、高い振動

ずり速度領域で G' の限界値である平坦な弾性値、 G_0 が見られるが、式 (1) と (2) の実験データからも求められる。高い振動ずり速度の時には、ひも状ミセルの粘弾性の値がマックスウェルモデルの特性から外れる点は注目すべき点である。ここではマックスウェルの式では単調に減少すべき G'' が、上昇している。また G' も振動ずり速度の時に到達すべき値にはない (Fig.3)。この理論式からの乖離は、現実にはローズモードの様な付加的なより早い緩和プロセスを取る事による。それゆえに理論式から得られる G_0 は下限値であると考えられる。複素粘度 $|\eta^*|$ は複素シヤモジュール ($G^* = (G' + G'')^{1/2}$) に関連した振動ずり速度に対する粘性を表し、この値は流体がシヤを受けたときの時間当たりの貯蔵および損失エネルギーを示している。

よび損失エネルギーを示している。

平らになったモジュール G_0 は次式で表される、からみ状態の密度係数 (ν) に関連している ($G_0 = \nu kT$; k =ボルツマン定数、 T =温度) (16)。またマックスウェルの式から得られる緩和時間 (τ) はひも状ミセルの長さを反映している (17)。それ故 Fig.4 で示されている $C_{12}EO_4$ の混合比である W に対してこれらのパラメータはシステム中の会合体の構造変化についての情報を与えている。

Fig.4 は最大粘性を示す領域を超えて W が増すとネットワーク密度 (G_0) は継続的に上昇する。一方で τ は減少する。例えば $W=0.375$ の場合、振動ずり速度限界 ($\omega = 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$) まで G' と G'' の交わりは起こらない。それ故その領域では G_0 と τ 値を用いる事は適当ではない。しかしながらこの事は $W=0.375$ の場合の τ 値は非常に

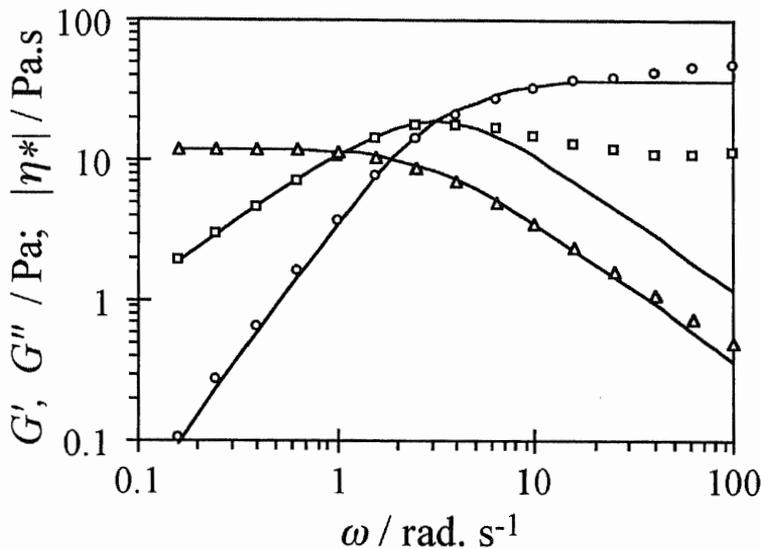


Fig.3. Variation of storage modulus, G' (circles) and loss modulus, G'' (squares) and modulus of complex viscosity, $|\eta^*|$ (triangles) as a function of oscillatory shear frequency (ω) in 5% PhyEO₂₀-C₁₂EO₄ systems at $W=0.444$. The corresponding solid lines are the Maxwell fit. Maxwell fitting of the data points (shown by solid lines) at low ω gives $G_0=37.5$ Pa and $\tau=0.32$ s.

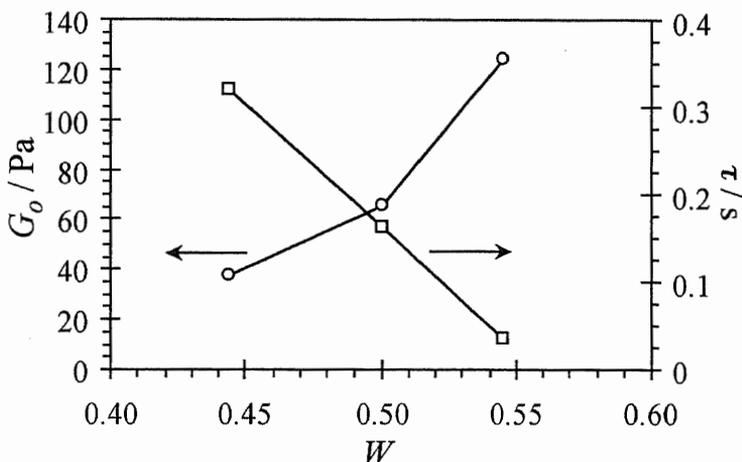


Fig. 4. Variation of plateau modulus, G_0 (circle) and relaxation time, τ (square) with the mixing fraction of $C_{12}EO_4$, W in 5% PhyEO₂₀+C₁₂EO₄ systems.

大きい事を暗示している。 $W=0.375$ から 0.444 が増えるとき、一次元的なミセル成長がおきる。継続的に $C_{12}EO_4$ を加え、 $W>0.444$ になると τ は減少するがネットワーク密度は上昇する。この事は、ネットワーク構造は壊れないで、会合体が応力緩和の過程による構造変化が生じている事を示している。一般的にひも状ミセルの粘弾性構造における応力緩和は、ひも状ミセルが爬虫類のへびの様に動く (reptaion) 事によって起きると考えられている。結果として応力緩和過程は遅くなる。 $W>0.444$ での τ 値の急激な減少は、ミセル接合部の鞍部のような部分の形成で説明される。負のガウス曲率の強い反発がなければ、界面活性剤は容易にこのタイプの相互連結を形成する。高分子溶液と異なり、界面活性剤分子は化学結合ではない。それゆえミセルの長径方向に、容易にスリップして応力が緩和される(18,19)。多くの界面活性剤系において(20-23)そのようなミセルの接合や分岐点の現象は、特に界面活性剤や対イオンの濃度上昇に伴って生じる最大粘度値の後の粘度低下領域において見られる。

7. 3. 3 PhEO₂₀+C₁₂EO₄系の濃度に対するレオロジー

Fig.5 (a) は総界面活性剤濃度が 5% と 10% (wt) で、PhEO₂₀ の濃度の違いが、C₁₂EO₄ の重量比 (W) で表された時のゼロシア粘度 (η_0) を示している。低い粘度のニュートン流動時の η_0 はゼロシアレートに対しての外挿法で求められる。次式より、 $|\eta^*|$ を ω がゼロに対して外挿し η_0 が求められる。

$$|\eta^*| = \eta_0 / \sqrt{1 + \omega^2 + \tau^2} \quad (4)$$

マックスウェルモデルの弾性を示す時、低振動ずり速度時の η_0 は次に式より求められる。

$$\eta_0 = G_0 \tau \quad (5)$$

Fig.5 (a) から、2種の界面活性剤総量の濃度と C₁₂EO₄ の添加によるオーバーラッピング濃度 (C^*) は同じである。しかし C^* 濃度以上になると η_0 は界面活性剤総量が 10% の時により急激に上昇する。界面活性剤濃度が上昇すると凝集体中の両親媒部位の有効断面積が減少する事が知られている。このことはより高い濃度で PhEO₂₀ に C₁₂EO₄ を添加するとミセル成長がより効果的に起こると考えられる。最大粘度を示す領域では、10% の系ではより高い粘弾性を示し、広い振動ずり速度の範囲でマックスウェルモデルが当てはまる。Fig.5 (b) は PhEO₂₀+C₁₂EO₄ の総界面活性剤濃度が 10% と 5% の系で、 W に対しての G_0 と τ 値を示している。この図から、PhEO₂₀ の濃度が高い時は低い時に比較して G_0 と τ 値の双方とも高く、この事はミセルの平均の長さが増したと同時にネットワーク密度が上昇した事と関連する。また界面活性剤総濃度が高い時に τ 値はより迅速に減少するが、これはミセルの分岐部分の重なりが多くなりネットワーク密度は高くなるがミセルの部分的

融合が起こる為、結果的にミセルのひもの長さがより減少する事によると思われる。

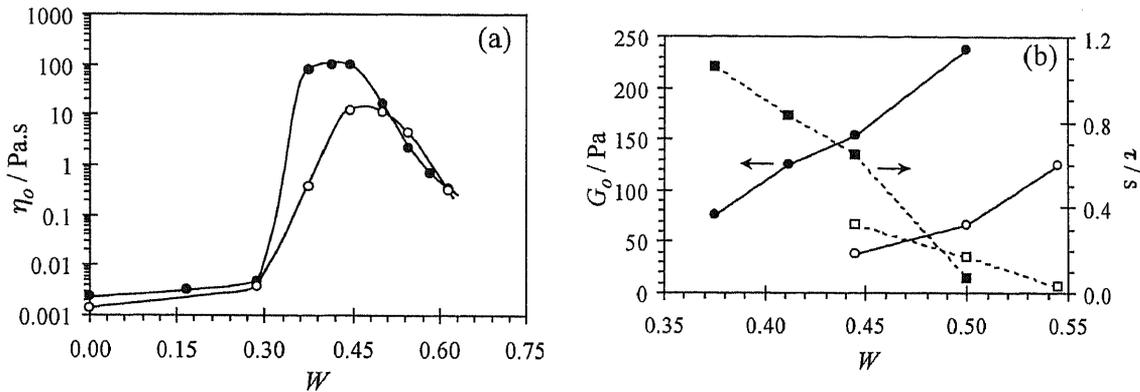


Fig.5. (a) Variation of zero-shear viscosity (η_0) with the wt fraction of $C_{12}EO_4$ (W) in 5% PhyEO₂₀ + $C_{12}EO_4$ (open symbols) and 10% PhyEO₂₀ + $C_{12}EO_4$ (filled symbols) systems. (b) Variation of G'_0 (filled circle) and τ (filled square) with W in 10% PhyEO₂₀ + $C_{12}EO_4$ system. Corresponding values for 5%PhyEO₂₀ + $C_{12}EO_4$ system (open symbols) are shown for comparison.

7. 3. 4 親水性界面活性剤の親水基のサイズに対するレオロジー

Fig.6 (a) は 5%PhEO₂₀ + C₁₂EO_n (n=2-5) 系における W 比による η_0 の値を示している。EO 鎖が減少すると、 η_0 はより急激に増加するが、これはこの系でのミセル成長のしやすさが次の順 (C₁₂EO₃ > C₁₂EO₄ > C₁₂EO₅) になっている事を表す。短鎖 EO を付加した親油的な界面活性剤である C₁₂EO_n の添加は、界面活性剤の平均有効断面積を減少させる。これは混合系での会合体の界面曲率を減少させる事になる。この為、より小さな EO 鎖は一次元的なミセル成長を促し、より効果的に粘性を増加させると思われる。しかしながら、C₁₂EO₂ の場合相分離が起きてしまうために大きな粘度上昇は見られない。

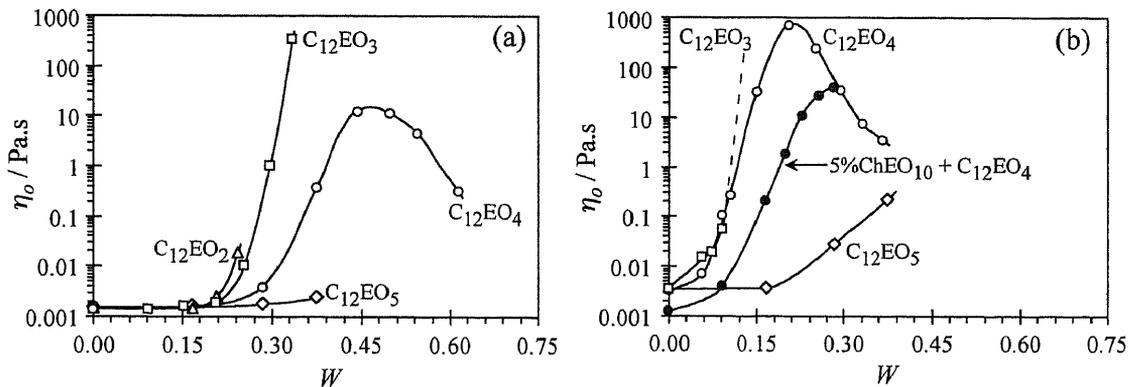


Fig. 6. Variation of zero-shear viscosity (η_0) with mixing fraction of $C_{12}EO_n$ (W) in 5% PhyEO₂₀ + $C_{12}EO_n$ (a), and 5% PhyEO₁₀ + $C_{12}EO_n$ systems (b). The viscosity data for 5%ChEO₁₀ + $C_{12}EO_4$ system (filled circles) are obtained from Ref 13.

Fig.6 (b) は 5%PhEO₁₀+C₁₂EO_n (n=3-5) 系の W 比による η_0 の値を示している。(a) と比較すると、PhyEO_m の EO 鎖長が短くなるとオーバーラッピング濃度 (C^*) がかなり低下する事が分かる。さらに η_0 値はより急激に上昇しより高い値になる。

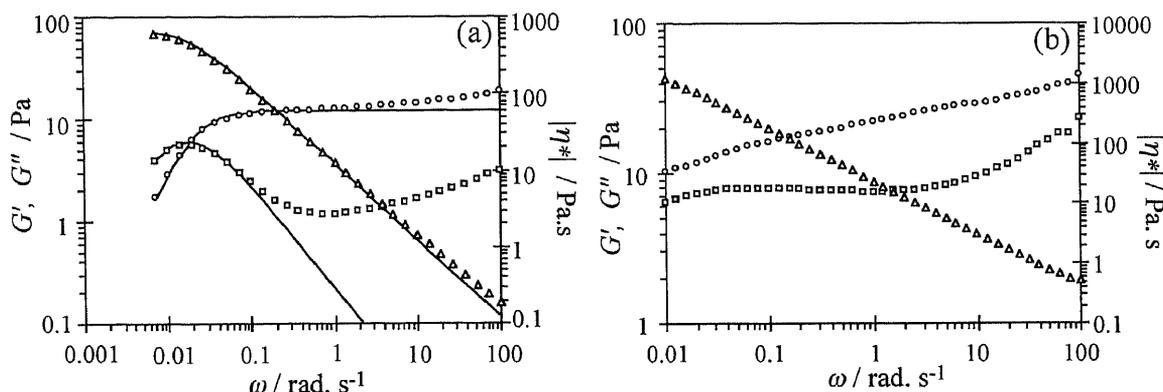


Fig. 7. Variation of G' (circle), G'' (square) and $|\eta^*|$ (triangle) as a function of ω for the most viscous sample of the 5%PhyEO₁₀+C₁₂EO₄ system ($W= 0.206$) (a) and 5%PhyEO₁₀+C₁₂EO₃ system ($W= 0.104$) (b). Maxwell fitting (solid lines) of the data points at low ω in (a) gives $G_0= 12.2$ Pa and $\tau=54.7$ s.

Fig.7 (a) に 5%PhEO₁₀+C₁₂EO₄ 系の最大粘度を示す $W=0.206$ 時の振動ずり速度依存の測定結果を示した。これによれば、 G' と G'' の交点は極めて低い振動ずり速度の領域にあり、非常に長い緩和時間を示している。もちろん PhEO₂₀ の同じ系での最大粘性を示した $W=0.444$ 時の測定結果 (Fig.3) による時間よりも著しく長い。この結果は、PhyEO_m において EO 鎖が短い場合、一次元的ミセルがより成長がしやすい事を示している。

Fig.7 (b) は 5%PhEO₁₀+C₁₂EO₃ 系での高い粘性を示した領域で、振動ずり速度依存の測定を行った。この振動ずり速度の範囲では G' は G'' より常に大きい値を示す。このパターンはゲルの挙動を表し、緩和時間が非常に長い。

これらの結果は ChEO_m+C₁₂EO_n 系の結果の傾向によく一致している⁽¹³⁾。実際に C₁₂EO_n は ChEO₁₀ 系よりも PhEO₁₀ 系の方がよりミセル成長を促している。これに関しては比較データを Fig.6(b) の中に C₁₂EO₄ の濃度比による PhEO₁₀ と ChEO₁₀ の η_0 値を示した。さらには、5%の ChEO₁₀+C₁₂EO₄ 系で最大粘性を示した $W=0.286$ 時の振動ずり速度依存測定結果により、 $G_0=21$ Pa、 $\tau=1.8$ s が得られている。この値は Fig.7(a) で得られた 5%PhEO₁₀+C₁₂EO₄ ($W=0.206$) の値と比較し、 G_0 はやや小さい。これは W 値が小さいので妥当である。一方 τ 値は 30 倍長くこれはミセル長が非常に長い事に関連している。ここで示されるミセル成長の差はフィトステロール骨格の分岐鎖によるところが大きいと思われる。

7. 4 結論

PhEO₂₀ と PhEO₁₀ の希薄溶液は、親油的な界面活性剤の C₁₂EO_n を添加する事で粘度の上昇がみられる。この粘度上昇は、C₁₂EO_n が混合界面活性剤の自己組織体において平均断面積を減少させ、一次元的なミセル成長を引き起こし、結果としてひも状ミセルを形成す

る事によって起こる。静的または振動ずり速度依存による粘弾性測定により、PhyEO_m+C₁₂EO_n (n=2-5) の混合系でC₁₂のEO鎖が減じる事で一次元的ミセル成長が容易に促される。しかしC₁₂EO₂の様に短くなりすぎるとミセル成長が促される前に相分離が生じてしまう。

一方、混合系でC₁₂EO₄の濃度が増すと粘性は上昇し、最大値を示した後減少し最後に相分離が起こる。この混合系での最大粘性を示す領域では、ひも状ミセルが絡まりあって一時的なネットワーク構造を形成している。動的粘弾性測定から、この溶液は測定した振動ずり速度の範囲においてマクスウェルモデルが適合する。また混合界面活性剤の濃度が増すかPhyEO_mのEO鎖が減じた時、一次元的なミセル成長が促される。同様の骨格を持つChEO_mとの比較において、同じ混合界面活性剤濃度領域でC₁₂EO_nの全ての濃度領域においてPhyEO_m系は高い粘性を示している。この粘度上昇を表すミセル成長の増加は、親油部であるフィトステロール骨格の持つ分岐構造によるものと思われる。

[参考文献]

- 1) F. Kern, P. Lemarechal, S.J. Candau and M.E. Cates, *Langmuir*, **8**, 437 (1992).
- 2) A. Khatory, F. Lequeux, F. Kern, and S.J. Candau, *Langmuir*, **9**, 1456 (1993).
- 3) M.S. Vethamuthu, M. Almgren, W. Brown, and E. Mukhtar, *J. Colloid Interface Sci.*, **174**, 461 (1995).
- 4) W. J. Kim, S. M. Yang, and M. Kim, *J. Colloid Interface Sci.*, **194**, 108 (1997).
- 5) W. J. Kim and S. M Yang, *J. Colloid Interface Sci.*, **232**, 225 (2000).
- 6) S. Imai and T. Shikata, *J. Colloid Interface Sci.*, **244**, 399 (2001).
- 7) H. Rehage and H. Hoffmann, *J. Phys. Chem.*, **92**, 4712 (1988).
- 8) J.F.A. Soltero, J.E. Puig, and O. Manero, *Langmuir*, **12**, 2654 (1996).
- 9) S.R. Raghavan and E.W. Kaler, *Langmuir*, **17**, 300 (2001).
- 10) G. Montalvo, E. Rodenas, and M.Valiente, *J. Colloid Interface Sci.*, **227**, 171 (2000).
- 11) A. Ponton, C. Schott, and D. Quemada, *Colloid Surf. A.*, **145**, 37 (1998).
- 12) J. Lin, J. Cai, L.E. Scriven, and H.T. Davis, *J. Phys. Chem.*, **98**, 5984 (1994).
- 13) D. P. Acharya and H. Kunieda, *J. Phys. Chem. B.*, **107**, 10168 (2003).
- 14) D. P. Acharya, Md. K. Hossain, Jin Feng; T. Sakai, and H. Kunieda, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 1627 (2004).
- 15) N. Naito, D. P. Acharya, J. Tanimura and H. Kunieda, *J. Oleo Sci.*, **54**, 7 (2005).
- 16) R. G. Larson, Ch. 3, Oxford University Press, New York, (1999).
- 17) M. E. CATES, *J. Phys. France*, **49**, 1593 (1988).
- 18) A. Khatory, F. Kern, F. Lequeux, J. Appell, G. Porte, N. Morie, A. Ott and W. Urbach, *Langmuir*, **9**, 933 (1993).
- 19) S.J. Candau and R. Oda, *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **183-185**, 5 (2001).
- 20) Z. Lin, *Langmuir*, **12**, 1729 (1996).
- 21) D. Danino, Y. Talmon, H. Levy, G. Beinert, R. Zana, *Science*, **269**, 1420 (1995).
- 22) M. In, O. Aguerre-Chariol, and R. Zana, *J. Phys. Chem. B.*, **103**, 7747 (1999).
- 23) R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **97**, 203 (2002).

第8章 総括

本研究は、生体関連両親媒性物質の自己組織化と水溶液物性研究に関するもので、両親媒性物質としてはリン脂質とコレステロール、フィトステロールおよびこれらのポリオキシエチレン付加物を研究対象とした。

第1章は全体の要旨を示し、第2章は実験の理論的背景について概説した。第3章、4章ではリン脂質の水溶液中での自己組織体である、リポソームの長期保存安定性に関する研究を行った。これらの結果より、不飽和脂肪酸部位の酸化安定性を増す事により常温で分子集合状態が維持され、長期保存安定性を確保しうる事が判明した。また脂肪酸部位が飽和であっても、分散安定化を促す荷電物質の添加は、分散の安定性は向上するものの非酵素的分解を受け化学的安定性が低下する事が判明した。さらにリン脂質とコレステロールから形成される自己組織体は、その膜特性によって化学安定性が異なる事がわかり、これらの生体関連両親媒性物質が強く相互作用している事が示唆された。

第5章では短鎖 POE コレステロール誘導体の相挙動と微細構造について検討した。疎水鎖としてのコレステロール骨格は、炭化水素鎖に比較し高高く剛直である。それ故、短鎖 POE コレステロール誘導体/水系では極めて粘稠で安定な液晶構造を示す。液晶構造は L_{α} と L_{β} の中間的構造を示し、疎水鎖としてのコレステロール骨格の特異性を表していると考えられた。また希薄系では多様で安定な自己組織体であるベシクル構造をとり、この骨格が2分子膜構造を形成するための適度な硬さを持っている事が示唆された。

第6章、7章では植物性でステロール骨格を有する POE フィトステロールエーテルの相挙動と粘弾性について検討した。水との2成分の相挙動では界面活性剤濃度が増す事によって順次液晶構造が現れるが、これに親油的な界面活性剤である $C_{12}EO_4$ を添加する事により、高い粘弾性を示すひも状ミセルが形成される。また水との2成分でも中程度の EO 鎖を持つ場合、温度上昇に伴いひも状ミセルが形成される。これらの溶液の粘弾性特性は概ねマクスウェルモデルに適合する。このひも状ミセルの形成は同様の界面活性剤であるコレステロール系でも形成されるが、フィトステロール系の方がより効率的な組織化が起こり、粘弾性が増す。この事は疎水鎖の分子構造がステロール骨格である特性を表すものであり、更にはフィトステロールの末端分岐構造の高さに由来していると推察した。

以上、本研究では生体関連両親媒性物質についてその自己組織化と水溶液物性を検討した。リン脂質については現在様々な応用化が図られているが、その機能性向上の可能性を高める意味で本研究は非常に有益なものであると考える。さらにはステロール骨格を持つ界面活性剤の基礎的知見については、通常の疎水鎖を有する市販の界面活性剤には見られない特性があり、今後の応用化に際し有益な情報を与えるものである。

また、リン脂質やステロール骨格を持つ界面活性剤の自己組織化に及ぼす相互作用などは興味深く、詳細にこれを検討する事でより環境にやさしい、安全性や機能性の高い製剤設計において有益な情報が得られるものと考えている。

謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、横浜国立大学大学院環境情報研究院、故國枝博信教授に多大なご指導を賜りました事にここに深く感謝申し上げますと共に、心より哀悼の意を表します。

また有益なご討論を頂きました、横浜国立大学院環境情報研究院、原孝夫教授、目黒竹司教授、鈴木淳史教授、車田研一助教授に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究にご指導とご協力頂いた荒牧賢治助教授、及び関連の諸先生方、さらには國枝研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

本論分を構成する報文等

報文

- 1) pH Lowering in Liposomal Dispersions Induced by Phospholipid Peroxidation, K. Arakane, K. Hayashi, N. Naito, T. Nagano, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 1755 (1995).
- 2) Alkyl Chain Length Dependency in Hydrolysis of Liposomal Phosphatidylcholine by Dialkylphosphate, K. Hayashi, K. Arakane, N. Naito, T. Nagano, M. Hirobe, *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 1751 (1995).
- 3) Structure of vesicles in homogeneous short-chain polyoxyethylene cholesterol systems, Carlos Rodriguez, Noboru Naito, Hironobu Kunieda, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, 181, 237 (2001).
- 4) Phase Behavior of Polyoxyethylene Phytosterol / Polyoxyethylene Dodecylether / Water Systems, Noboru Naito, Durga P. Acharya, Junichi Tanimura, Hironobu Kunieda, *J. Oleo Sci.*, 54 No. 1, 7 (2005).
- 5) Rheological Behavior of Wormlike Micellar Solutions in Mixed Nonionic Systems of Polyoxyethylene Phytosterol · Polyoxyethylene Dodecyl Ether, Noboru Naito, Durga P. Acharya, Junichi Tanimura, Hironobu Kunieda, *J. Oleo Sci.*, 53 No.12, 599 (2004).

口頭発表

- 1) The Long-Term Stability of Liposomes and Topical Effect of the Water Soluble Ingredients on the Skin by Liposome Encapsulation
Noboru Naito, Kumi Arakane, Kzunori Iwanaga, Sinnji Yamasita, Naoto Oku,
THE FIFTH LIPOSOME RESERCH DAYS, Shizuoka (1996).

ポスター発表

- 1) 第50回コロイドおよび界面化学討論会 (佐賀) (1997)
萩原賢一、中村尚代、内藤昇、國枝博信