

Characterization and Application of Self-aggregates of Hydrophobic Phospholipid Polymers

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7154

疎水性リン脂質ポリマー自己会合体の 特性と応用

山 本 宣 之

平成19年10月

博士論文

疎水性リン脂質ポリマー自己会合体の
特性と応用

金沢大学 自然科学研究科

物質科学 専攻

先端機能物質 講座

学籍番号 0523132315

氏名 山本 宣之

主任指導教員氏名 中本 義章

目次

第1章 緒言

1.1 リン脂質について	1
1.2 リン脂質二分子膜会合体（リポソーム）について.....	1
1.3 リポソームの調製方法	2
1.4 リポソームの生医学的応用.....	2
1.5 リポソームの皮膚外用剤・化粧品への応用.....	3
1.6 リン脂質ポリマーについて.....	4
1.7 リン脂質ポリマーの生医学的応用	4
1.8 リン脂質ポリマーの皮膚外用剤・化粧品への応用.....	5
1.9 本論文の概要.....	5
参考文献.....	13

第2章 疎水性リン脂質ポリマーの合成および自己会合体の調製と可溶化能の評価

2.1 緒言	15
2.2 実験.....	16
2.2.1 試薬	16
2.2.2 ポリマー合成.....	16
2.2.3 PMS 自己会合体の調製.....	16
2.2.4 疎水性化合物の可溶化	17
2.2.5 細胞毒性試験.....	17
2.2.6 測定	17
2.3 結果と考察.....	19
2.3.1 PMS 自己会合体の調製.....	19
2.3.2 PMS 自己会合体のキャラクタリゼーション.....	20
2.3.3 PMS の可溶化能	20
2.3.4 細胞毒性と表面張力	21
2.4 結論	21
参考文献.....	31

第3章 疎水性リン脂質ポリマーフィルム中に形成されるモザイク状ラメラ構造

3.1 緒言	33
3.2 実験	34
3.2.1 試薬	34
3.2.2 ポリマーフィルムの作製	34
3.2.3 示差走査熱量分析	34
3.2.4 ポリマーフィルム中の微細構造の観察	34
3.2.5 X線回折試験	34
3.3 結果と考察	34
3.4 結論	36
参考文献	42

第4章 疎水性リン脂質ポリマーの皮膚機能改善効果

4.1 緒言	43
4.2 実験	43
4.2.1 試薬	43
4.2.2 PMS 多価アルコール溶液の調製	43
4.2.3 細胞毒性試験	43
4.2.4 皮膚刺激性試験	44
4.2.5 皮膚バリア性および保湿性評価	44
4.2.6 皮膚機能測定装置および測定方法	45
4.3 結果と考察	45
4.3.1 細胞毒性低減効果	45
4.3.2 皮膚刺激低減効果	45
4.3.3 皮膚バリア性および保湿性改善効果	46
4.4 結論	46
参考文献	52

第5章 毛髪用化粧品素材としての疎水性リン脂質ポリマーの応用

5.1 緒言	53
5.2 実験	54

5.2.1	試薬	54
5.2.2	自己会合体の調製、粒径測定および表面電位測定.....	54
5.2.3	ダメージ毛髪および PMS 処理毛髪の作製	54
5.2.4	毛髪表面における PMS の吸着性評価	55
5.2.5	蛍光顕微鏡観察	55
5.2.6	毛髪の表面形態観察	55
5.2.7	毛髪の疎水性評価	55
5.2.8	帯電防止性評価	55
5.2.9	褪色防止性評価	56
5.2.10	人工毛髪の表面摩擦係数と表面元素分析	56
5.2.11	測定装置.....	56
5.3	結果と考察.....	57
5.3.1	PMS 自己会合体の調製	57
5.3.2	ヒト毛髪への吸着性と浸透性.....	57
5.3.3	人工毛髪への吸着性と摩擦低減効果	58
5.3.4	ヒト毛髪に対する有用性	58
5.4	結論	60
	参考文献.....	72

第 6 章 繊維加工における疎水性リン脂質ポリマーの吸着性制御と刺激低減機能の評価

6.1	緒言	73
6.2	実験	74
6.2.1	試薬	74
6.2.2	PMS 自己会合体の調製.....	74
6.2.3	PMS 自己会合体の表面電位測定	74
6.2.4	綿生地加工.....	74
6.2.5	X 線光電子分析および蛍光顕微鏡観察	75
6.2.6	洗剤残存性の評価	75
6.2.7	三次元培養皮膚を用いた毒性低減効果の評価.....	75
6.3	結果と考察.....	76
6.3.1	PMS 自己会合体の表面電位.....	76

6.3.2 綿に対する PMS 自己会合体の吸着性	76
6.3.3 蛍光顕微鏡観察	77
6.3.4 洗剤残存性.....	77
6.3.5 毒性低減効果.....	78
6.4 結論	79
参考文献.....	88
第 7 章 結語.....	89
謝辞	91
公表した論文	92

第1章 緒言

1.1 リン脂質について

生体脂質に含まれるリン脂質は、グリセリンを骨格とするグリセロリン脂質と、スフィンゴシンを骨格とするスフィンゴリン脂質に大別される。このうちグリセロリン脂質は、細胞膜を構成する主要な脂質として知られる。代表的なグリセロリン脂質はグリセロールに 2 個の脂肪酸残基とリン酸残基が結合したジアシル型である。脂肪酸残基が 1 個のモノアシル型はリゾリン脂質と呼ばれ、界面活性を示すことが知られている。リン酸残基にはさまざまな極性基（コリン、エタノールアミン、セリン、イノシトールなど）が結合することにより、それぞれホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトールと呼ばれるリン脂質になる (Fig. 1-1) [1]。このうち、ホスファチジルコリンはレシチンとも呼ばれ、最も代表的なリン脂質である。また、後述するリポソームの材料として多く用いられる。

1.2 リン脂質二分子膜会合体（リポソーム）について

リン脂質の多くは両親媒性化合物であり、分子形状によって二分子膜、ヘキサゴナル型、球状ミセル型など様々な会合体を形成することが知られている (Table 1-1) [1]。

生体膜から抽出した脂質分子を水中に懸濁すると、生体膜類似の二重層構造をもつ閉鎖小胞が得られる。この閉鎖小胞は一般にリポソームと呼ばれ、その発見は 1960 年代にまで遡る。1964 年、Bangham と Horne らは卵黄由来のホスファチジルコリンの懸濁液を電子顕微鏡で観察し、ラメラ構造を持つ二分子膜からなる小胞が形成されることを見出した[2]。翌年、Bangham らはこの小胞が水相を内包した閉鎖小胞（リポソーム）であることを明らかにした。こうしたリン脂質の二分子膜構造は、1972 年に Singer-Nicolson が提唱した流動モザイクモデル (Fig. 1-2) [3]に代表されるように、細胞膜の基本構造としてよく知られるようになった。リポソームの発見により生体膜の研究は進み、その後、X 線回折、電子顕微鏡、示差熱分析などの各種評価によって得られた知見はリポソームの応用に還元された。

Bangham らによって初めて報告されたりポソームは積層した二分子膜構造（ラメラ構造）をもつことから、後に多重層リポソーム (Multilamellar Vesicles,

MLV) と称されることになった。また、超音波処理によりリポソームのサイズが小さくなることも Bangham らによって見出された。超音波処理により形成された小胞はサイズが小さく、また一枚膜構造を持つことから Small Unilamellar Vesicles (SUV) と呼ばれる。これに対して、サイズの大きな一枚膜構造のリポソームは Large Unilamellar Vesicles (LUV) と呼ばれる。これらのリポソームの模式図を Fig. 1-3 に示す。

1.3 リポソームの調製方法

リポソームを調製するための方法として、Bangham 法と呼ばれる方法が実験室レベルでは多く用いられる。Bangham 法では、まずクロロホルムまたはクロロホルム／メタノール混合溶媒中にリン脂質を溶解し、これをナスフラスコに入れる。このとき、脂質二分子膜を補強する目的から、有機溶媒中にコレステロールを添加する場合もある。次に、エバポレーターを用いてこの溶液から溶媒を留去して脂質薄膜を作成し、緩衝溶液を加えた後、リン脂質の相転移温度以上に加温した上でボルテックスミキサーで水和、分散させる方法である。これによって調製されるのが MLV であり、さらに超音波照射して粒径の小さな SUV を得ることができる[4]。

しかしながら、この方法では大量生産に向かないことから、Table 1-2 に示したような簡便法が考案されている[5, 6]。この中でも特に、低級アルコール法や多価アルコール法は調製の容易さから、大量生産に適した方法であるといえる。

1.4 リポソームの生医学的応用

リポソームが酵素や薬剤を内包できること、その構成成分が生体成分であるため毒性や抗原性が低く、生体内で代謝可能であることなどの理由から、薬物送達システム (Drug Delivery Systems, DDS) への応用が早くから検討された。1970 年には Sessa と Weissmann がリゾチームをリポソームに内包させ、DDS キャリアとしてのポテンシャルを示した[7]。1973 年には Gregoriadis がペニシリンやアクチノマイシン D (抗がん剤) をリポソームに内包させ、リポソーム化により血中の薬剤濃度が遊離のものに比べて高く保たれることを見出した[8]。今日では、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームに代表される血中安定性や血中滞留時間を改良したリポソームが開発され、DDS 分野で応用

されている。

さて、リポソーム中への薬物の内包化については、用いる薬物の性質によって大きく二つに分けられる。抗癌剤のドキソルビシンなどに代表される親水性薬物については、リポソーム内部の水相に分配される形で内包化される。一方、抗真菌剤のアムホテリシン B に代表される疎水性薬物については、脂質二分子膜中にインターカレートされる形で内包化される (Fig. 1-4)。こうした機構から、脂質分子を利用した疎水性薬物の内包化については必ずしも二分子膜構造が必要ではなく、脂質微粒子によっても実現可能である。この点に着目して、水島らは脂肪輸液として臨床応用されている脂質を用いて多くの検討を行ない、球状ミセル型のリン脂質会合体 (リピッドマイクロスフィア) の有用性を示している [9]。

しかしながら、これらのリン脂質分子会合体を疎水性薬物の DDS に用いる試みは、生体内環境下においては分子集合体の物理的および化学的安定性が低いため、必ずしも成功していない。すなわち、注射から短時間で生理活性物質が血中から消失してしまうために、標的細胞に送達される生理活性物質は微量となる。したがって、これらのリン脂質分子会合体の安定性改善が求められている。

1.5 リポソームの皮膚外用剤・化粧品への応用

皮膚外用剤におけるリポソームの特徴として、薬物の可溶化、吸収促進効果、局所での薬物徐放化などが挙げられる。ヒトの皮膚は角層、真皮、皮下組織の 3 つに区別され、その中でも最表面に位置する表皮は、外層から順に角層、透明層、顆粒層、有棘層、基底層からなる階層構造を有している [10]。リポソームが徐放化機能を示す場合は、表皮最外層の角層にリポソームが密着し、薬物の貯留相となると考えられている (Fig. 1-5)。一方、リポソームが吸収促進効果を示す場合は、リポソームが角層と融合した後、脂質の分布により薬物の濃度勾配を生じさせたり、個々のリン脂質が角層細胞間脂質と相互作用することによって薬物の吸収を促進させるためと考えられている [11]。

また化粧品分野においては、リポソームの原料であるリン脂質は古くから乳化剤や分散剤として配合されており、また保湿性にも優れることから、欧米市場では 20 年以上前からいわゆる「リポソームタイプ」の化粧品として流通してきた。しかしながら、実際に小胞構造の形態を保った状態で配合された例は

少なく、安定性に問題のあるものも多かった。そこで近年、日本国内では厚生省（当時）が安定性に関する承認基準を設定し、この基準を初めてクリアした製品が 1992 年に上市された[12]。また、リポソームの原料であるレシチンについては、その滑沢性を活かして毛髪用化粧品に配合されている。

1.6 リン脂質ポリマーについて

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）は、細胞膜リン脂質と同じ極性基を有するメタクリレート系モノマーである（Fig. 1-6）。1978 年に中林らによって初めて合成された後[13]、日本油脂株式会社によって工業的製法が確立され、1997 年から工業的規模で生産されている。

MPC は両親媒性のモノマーであり、アルコールや有機酸、水に極めてよく溶ける。通常のラジカル重合によりポリマーを得ることができ、前述の溶媒に可溶性モノマーとは任意の組成で共重合が可能である。1989 年以降、石原らによって MPC を主成分としたさまざまなポリマーが合成されており、抗血栓性や蛋白質吸着抑制能など、MPC ポリマーが持つ優れた機能が明らかとなっている[14-18]。各種アルキルメタクリレート、スチレンとの共重合例が報告されているほか、最近ではリビングラジカル重合法により極めて分子量分布の狭いポリマーや、ブロックコポリマーが得られることも報告されている[19, 20]。

これらの中でも特に、*n*-ブチルメタクリレートと MPC からなるランダムコポリマー（PMB）の報告例が多く、共重合組成比によって親水性／疎水性を制御することができる。また、分子量の大小によって水溶性／非水溶性制御することもできる。石原らはこのポリマーを「リン脂質ポリマー」と呼んでいるが[21]、たとえば PMB 中のアルキル基は炭素数 4 の *n*-ブチル基であるのに対して、実際の生体膜リン脂質が炭素数 10～20 程度の中鎖～長鎖アルキル基を持つものがほとんどである。この点において従来のリン脂質ポリマーは、アルキル鎖長の短い特殊な分子形状であるといえる。

1.7 リン脂質ポリマーの生医学的応用

上述の PMB のうち、分子量の大きい非水溶性のポリマー（重量平均分子量で約 30 万以上）については医療機器の抗血栓性コーティング剤として研究が進められ[22]、最近では人工心臓などに応用されている[23]。

一方、PMB のうち、分子量の小さい水溶性ポリマー（重量平均分子量で約 10

万以下) については、疎水性化合物に対する可溶化能が報告されており、DDS 基材としても注目されている[24]。

このように PMB を用いた様々な検討がなされているが、もし PMB 中の n-ブチル基をより長鎖のアルキル基に替えれば、より生体膜リン脂質と構造類似性の高いポリマーが得られると考えられる。このような長鎖アルキル基含有 MPC ポリマーは、疎水性化合物に対してより高い可溶化能をもつことが期待される。しかしその一方で、長鎖アルキル基は疎水性が強いため、水中で安定な会合体を得ることが困難である。これまでの検討においても、長鎖アルキル基の含有割合が低い、水溶性のポリマーしか報告されていない[24]。長鎖アルキル基を高い割合で含む MPC ポリマーを用いて安定な会合体を得ることができれば、より生体膜リン脂質と構造類似性の高い新規なリン脂質ポリマーとして、DDS 分野へのさらなる応用が期待される。

1.8 リン脂質ポリマーの皮膚外用剤・化粧品への応用

水溶性 MPC ポリマーは、その高い保湿性や角層機能改善効果、刺激低減効果などが注目されており、MPC 単独重合体や PMB などを中心として外用剤や化粧品に配合されている[25-27]。このほか、カチオン性基を導入した荷電性 MPC ポリマーは、静電吸着能を活かして毛髪用化粧品などに配合されている[28]。また、長鎖アルキル基を導入した疎水性 MPC ポリマーは、吸湿性と表面滑沢性を活かしてファンデーション用無機粉体の表面処理に用いられている[29]。

1.9 本論文の概要

本論文では、疎水性リン脂質ポリマーを合成し、その自己会合体を形成するための手法を確立するとともに、可溶化能、表面電位制御法、ならびに乾燥皮膚中の微細構造を明らかにし、新規な医薬・化粧品・繊維加工用素材としての有用性について検討することを目的とする。

本論文は、全 7 章で構成されており、以下に概要を示す。

第 1 章では研究背景として、リポソームなどの低分子リン脂質自己会合体とリン脂質ポリマーについて概観し、本研究の疎水性リン脂質ポリマーに期待さ

れる機能について述べる。また併せて、本論文の構成について示す。

第 2 章では、長鎖アルキル基としてステアシル基を有するメタクリレートモノマー (SMA) と MPC との共重合体 (PMS) の合成を行った。得られた共重合体の分子量については、ゲル浸透クロマトグラフィーにより評価した。また、PMS 自己会合体の調製条件について検討し、最適な調製法を見出した。さらに、得られた PMS 自己会合体の粒径、安定性などの物理的性質について検討した。

第 3 章では、PMS 自己会合体を乾燥させて得られるフィルム中の微細構造について、示差走査熱量分析 (DSC)、X 線構造解析、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により検討した。

第 4 章では、細胞やヒトの皮膚を用いて PMS の刺激低減機能について評価し、界面活性剤がもつ細胞毒性や皮膚刺激性を抑制可能であるか検討した。また、PMS の塗布による皮膚機能改善効果について評価した。

第 5 章では、アニオン性またはカチオン性の界面活性剤と複合させた PMS 自己会合体の表面電位と毛髪に対する有用性について評価した。X 線光電子分析 (XPS) による表面元素分析から、毛髪表面に対する PMS 自己会合体の吸着性を評価した。また、毛髪内部への PMS 自己会合体の浸透性・吸着性について、蛍光顕微鏡観察を用いて評価した。このほか、PMS 処理による帯電防止性、褪色防止効果、および摩擦低減効果について検討した。

第 6 章では、pH による PMS 自己会合体の表面電位変化について、電気泳動光散乱法により評価した。また、綿繊維に対する PMS 自己会合体の吸着性、および、PMS 加工生地における洗剤付着防止効果について、XPS により評価した。また、界面活性剤を刺激物質として用いた場合の毒性低減効果について、三次元培養皮膚を用いた評価した。

第 7 章では、本研究で得られた疎水性リン脂質ポリマーの自己会合現象に関する知見とその応用に関して総括する。

Table 1-1 Molecular form and self-assembled structure of phospholipids in aqueous solution [1].


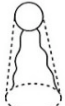

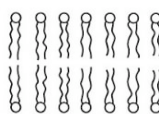
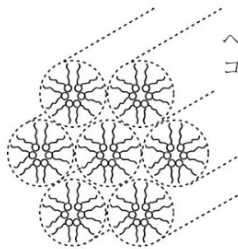
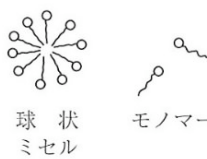
	シリンダー型分子	コーン型分子	逆コーン型分子(くさび型)
分子形状	 極性基 非極性基		
会合体	 二分子膜 (ラメラ相) 二重層膜	 ヘキサ ゴナルII	 球状 ミセル モノマー
代表脂質名	ホスファチジルコリン スフィンゴミエリン 飽和型ホスファチジル エタノールアミン	不飽和型ホスファチジル エタノールアミン (T_{BH} 以上)	リゾホスファチジルコリン 遊離脂肪酸塩

Table 1-2 Various methods for mass production of liposome.

名称	調製方法	特徴
加温法	リン脂質の融点より高い温度にて、脂質粉末を水や緩衝液で瞬時に水和・膨潤させた後、攪拌する方法	コレステロールなど水になじみにくい成分は膜に入りにくい
メカノケミカル法	脂質粉末を少量の水や緩衝液と混合し、機械的剪断力により水和させ、さらに攪拌しながら水分を加える方法	コレステロールが膜に入りやすいが、剪断力に弱い高分子を添加するには不向き
噴霧乾燥法	少量の揮発性有機溶媒を用いて脂質を溶解させ、これに水溶性芯物質（糖類の粉末）を分散させたものを噴霧乾燥し、この乾燥物を水や緩衝液と混合攪拌する方法	表面積が大きいので、水和・膨潤が速やかに起こる
低級アルコール法	脂質をメタノール、エタノール、プロパノールなどの低級アルコールに溶解させた後、脂質溶液を水や緩衝液と混合攪拌する方法	ほとんどの脂質に対応可能であるが、人体に用いる際には溶媒除去操作が必要
多価アルコール法	脂質をグリセリンなどの多価アルコールに溶解させた後、脂質溶液を水や緩衝液と混合攪拌する方法	ほとんどの脂質に対応可能であり、人体に用いる際にも溶媒除去操作が不要（ただし、注射製剤とする場合は等張化が必要）

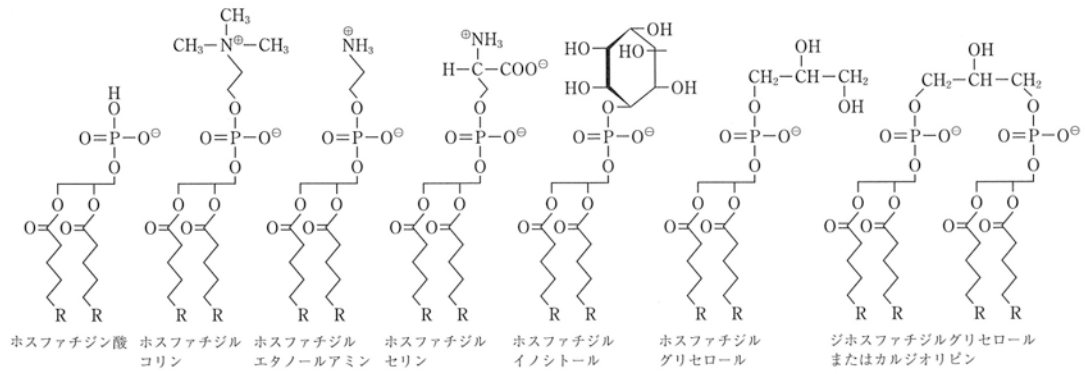


Figure 1-1 Structures of phospholipids [1].

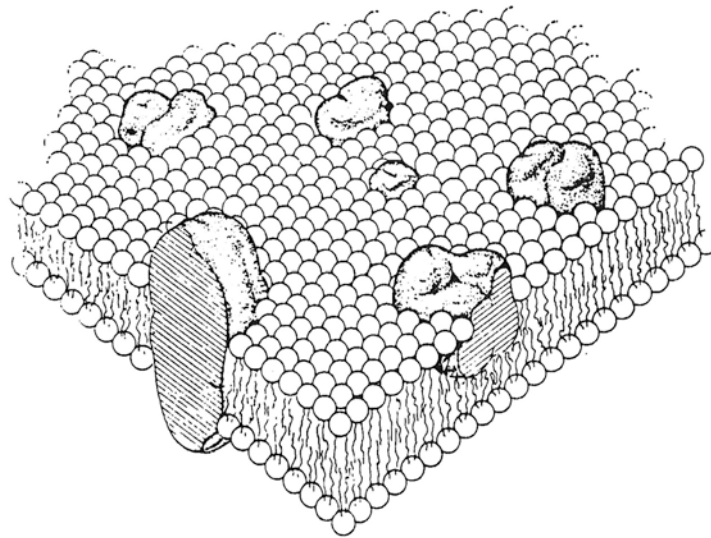


Figure 1-2 The fluid-mosaic model of biomembranes as proposed by Singer and Nicolson [3].

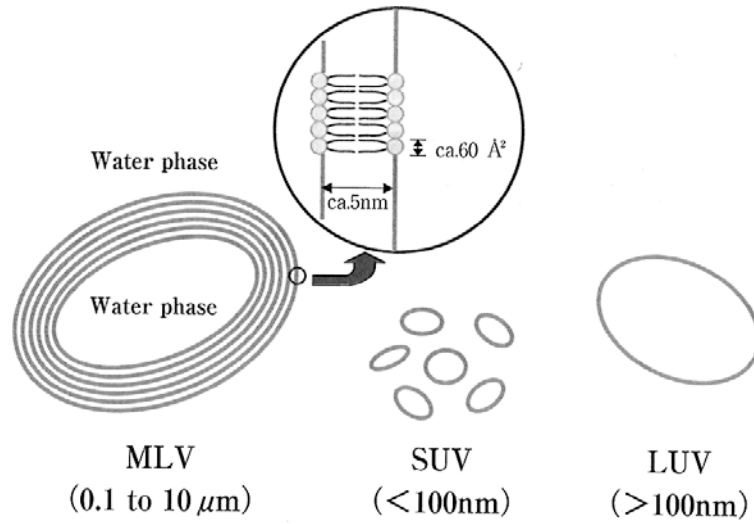


Figure 1-3 Structures of various types of liposomes [4].

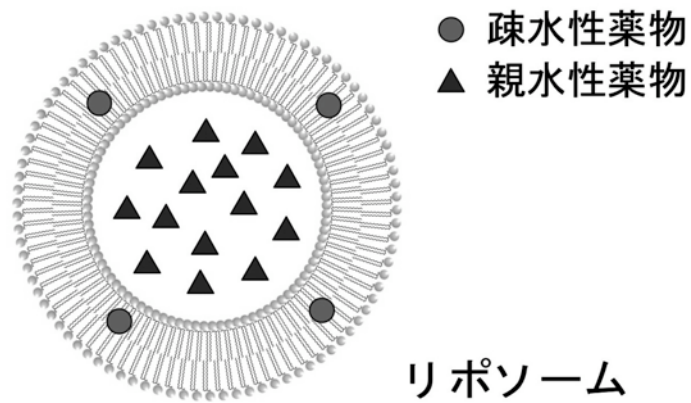


Figure 1-4 Liposome with hydrophilic or hydrophobic drugs.

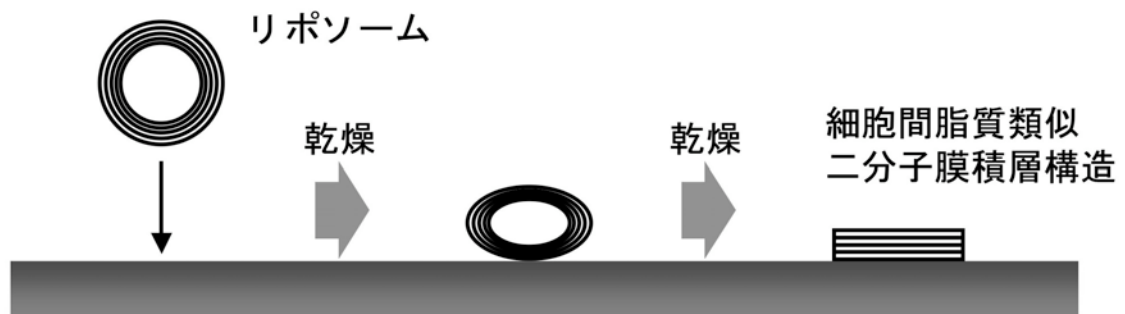


Figure 1-5 Deformation of liposomes through drying process on the skin.

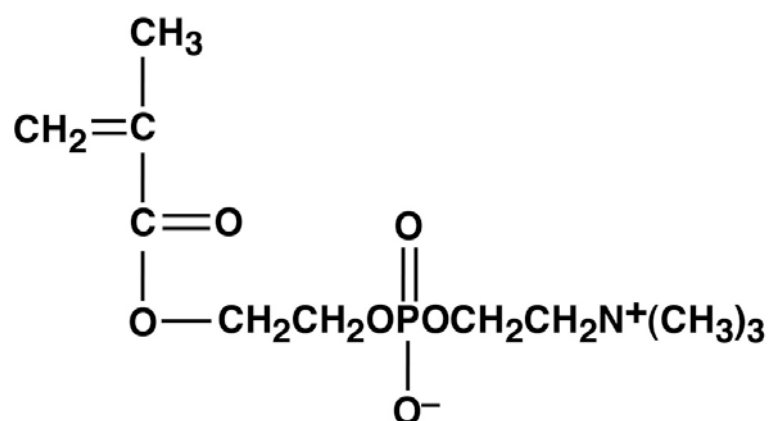


Figure 1-6 Chemical structure of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) [13].

参考文献

1. 秋吉一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開, エヌ・ティー・エス, 14-19 (2005).
2. A. D. Bangham. and R. W. Horne, *J. Mol. Biol.*, **8**,. 660 (1964).
3. S. J. Singer and G. L. Nicolson, *Science*, **175**, 720 (1972).
4. 秋吉一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開, エヌ・ティー・エス, 33-34 (2005).
5. 菊地 寛, *Pharm Tech Japan*, **19**, 99 (2003).
6. S. Batzri and E. D. Korn, *Biochim Biophys Acta.*, **298**(4), 1015 (1973).
7. G. Sessa and G. Weissmann, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3295 (1970).
8. G. Gregoriadis, *FEBS Lett.*, **36**, 292 (1973).
9. 水島 裕, 谷内 昭, 瀬崎 仁 編, ターゲティング療法, 医薬ジャーナル社, 258-265 (1985).
10. 安田利顕, 美容のヒフ科学, 南山堂, 9-13 (1965).
11. 秋吉一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開, エヌ・ティー・エス, 606-611 (2005).
12. 秋吉一成, 辻井 薫 監修, リポソーム応用の新展開, エヌ・ティー・エス, 644-650 (2005).
13. 門磨義則, 中林宣男, 増原英一, 山内淳一, 高分子論文集, **35**(7), 423 (1978).
14. K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 1069 (1990).
15. K. Ishihara, N. P. Ziats, B. P. Tierney, N. Nakabayashi and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1397 (1991).
16. K. Ishihara. H. Oshida, T. Ueda. Y. Endo, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 1543 (1992).
17. Y. Iwasaki, A. Mikami, K. Kurita, N. Yui, K. Ishihara and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**(4), 508 (1997).
18. 上田智子, 石原一彦, 中林宣男, 医器材研報, **25**, 13 (1991).
19. E. J. Lobb, I. Ma, N. C. Billingham and S. P. Armes, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7913 (2001).

20. I. Y. Ma, E. J. Lobb, N. C. Billingham, S. P. Armes, A. L. Lewis, A. W. Lloyd and J. Salvage, *Macromolecules*, **35**, 9306 (2002).
21. K. Ishihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi, *Polym J.*, **31**, 1231 (1999).
22. 例えば, 石原一彦, 生体材料, **9**(6), 296 (1991).
23. 山崎健二, 埼玉医科大学雑誌, **31**(1), 82 (2004).
24. T. Konno, J. Watanabe and K. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **65**, 210 (2003).
25. 大場 愛, 黒田秀夫, 釈 政雄, 高橋慎一, 日本化粧品技術者会誌, **30**(4), 428 (1996).
26. 城井忠洋, 島田邦男, 村田敬重, 石原一彦, 中林宣男, 日本油化学会誌, **48**(6), 577 (1999).
27. 土田 衛, 島田邦男, フレグランスジャーナル, **28**(12), 118 (2000).
28. 猪又 潔, 栗井浩二, 島田邦男, フレグランスジャーナル, **31**(11), 81 (2003).
29. 猪又 潔, 山本宣之, 土田 衛, 島田邦男, 里中研哉, 吉岡隆嗣, フレグランスジャーナル, **31**(8), 113 (2003).

第2章 疎水性リン脂質ポリマーの合成および自己会合体の調製と可溶化能の評価

2.1 緒言

リポソームや脂質微粒子など、低分子量リン脂質から構成される分子集合体は高い血液適合性を有するため、疎水性の生理活性物質を生体内に送達することが可能である[1]。ドラッグデリバリーシステムの開発においてこれらの分子集合体を用いる試みがなされてきたが、生体内環境下においてこれらの分子集合体の物理的および化学的安定性が低いため、そのほとんどが失敗している。すなわち、注射から短時間で生理活性物質が血中から消失してしまうために、標的細胞に送達される生理活性物質は微量となる。したがって、これらのリン脂質分子集合体の安定性改善が求められている。

一方、生体材料の血液適合性を向上させる目的から、石原らによって 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を主成分とした様々なポリマーが合成されている[2-5]。MPC は中林らによって 1978 年に初めて合成された後[6]、日本油脂株式会社によって工業的製法が確立され、1997 年から工業的規模で生産されている。MPC は細胞膜リン脂質と同じ極性基を有するメタクリレート系モノマーであり、通常のラジカル重合法により、様々なビニル系モノマーと共重合させることが可能である。例えば、石原らは、n-ブチルメタクリレートを 30 モル%、MPC を 70 モル%含む水溶性ポリマー (PMB3070) を合成している[7]。この PMB3070 は水中で疎水性相互作用によりポリマー会合体を形成し、疎水性化合物を可溶化できることが知られている。石原らはこのポリマーを「ポリマーリピッド」と呼んでいるが、多くの低分子リン脂質におけるアルキル基は、n-ブチル基よりも鎖長が長い。

n-ブチル基よりも鎖長が長く疎水性の強いアルキル鎖として、ステアシル基が挙げられる。ステアシルメタクリレート (SMA) を 10 モル%、MPC を 90 モル%含むポリマー (PMS9010) が金野らによって合成されているが[8]、この PMS9010 は SMA 含有量が低いため、PMB3070 に比べると疎水性物質に対する可溶化能は低い。SMA を高い割合で含む MPC ポリマーは、より高い可溶化能を示すことが期待されるが、疎水性が極めて強くなるために水中に分散させることが困難であり、詳細な検討がなされていない。

このような背景から、我々は疎水性の高い MPC/SMA コポリマー (PMS)

の自己会合体を簡便に得るための新規な方法について検討を行ってきた[9-10]。本章では、PMS 自己会合体の調製と物理的性質および生体適合性の可溶化剤としての基礎的な性質について検討結果について述べる。

2.2 実験

2.2.1 試薬

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC)、ステアリルメタクリレート (SMA)、n-ブチルペルオキシネオデカノエイト (パーブチル ND) については、日本油脂株式会社から提供されたものをそのまま使用した。その他の試薬や溶媒については、市販の試薬特級品を精製せずに用いた。

2.2.2 ポリマー合成

MPC/SMA コポリマー (以下、PMS_{mn} と略す；"m"および"n"は、それぞれ、MPC と SMA の含有量をモル%で示す) は、通常のラジカル重合法により合成した。合計 20 g の MPC と SMA を 80 g の 1-プロパノール中に溶解させ、フラスコ中で攪拌した。窒素バブリングを行って溶液中から酸素を取り除いた後、重合開始剤として 0.4 g のパーブチル ND を投入した。反応温度を 60°C に保って、6 時間、反応を行った。得られた溶液を大過剰のアセトン中に投入してポリマーを沈殿させ、濾過後、さらにアセトンで洗い、減圧乾燥してポリマー試料を得た (Fig. 2-1)。また、n-ブチルメタクリレート (BMA) を 30 モル%、MPC を 70 モル%含むコポリマー (PMB3070) については、既報の通り合成した[11]。

2.2.3 PMS 自己会合体の調製

PMS 自己会合体の調製に先立って、0.1 g の PMS を 0.4 g の 1-プロパノール中に 40°C にて溶解させた。得られた溶液は無色透明であった。

PMS 自己会合体については、3 段階の手順で調製された。まず、1.6 g のイオン交換水を PMS/1-プロパノール溶液中に添加した ("Step 1")。次いで、この混合物を 60°C にて 20 分間攪拌した。Step 1 で沈殿したポリマーはこの工程で徐々に分散し、溶液は均一となった ("Step 2")。得られた均一溶液を、60°C に加温した 7.9 g のイオン交換水で希釈した ("Step 3")。その後、イオン交

換水を用いて得られた溶液を透析した。

2.2.4 疎水性化合物の可溶化

2.2.4.1 酢酸トコフェロールの可溶化

MPC/SMA 組成比の異なる PMS を用意した。まずポリマー0.1 g、酢酸トコフェロール 10 mg または 50 mg を 0.4 g の 1-プロパノール中に 40°Cにて溶解させ、その後、Step 1 から 3 の方法に従って分散させ、酢酸トコフェロールの全量を可溶化させた。

2.2.4.2 コエンザイム-Q10 の可溶化

PMS5050 と PMB3070 を用意した。まずポリマー0.1 g、コエンザイム-Q10 (CoQ10) 5 mg を 0.4 g の 1-プロパノール中に 40°Cにて溶解させ、その後、Step 1 から 3 の方法に従って分散させ、CoQ10 の全量を可溶化させた。

2.2.5 細胞毒性試験

Tani らの報告[12]に従い、ウサギ眼粘膜由来の細胞 (SIRC) を用いて、ニュートラルレッド法による試験を行った。ニュートラルレッドは、生細胞にのみ取り込まれる性質を持つ色素である。まず、さまざまな濃度の被検物質を含む培地中で SIRC 細胞を 24 時間培養した後、細胞を洗浄し、ニュートラルレッドを含む培地中で 3 時間インキュベーションして、生細胞への色素取り込みを行った。細胞を洗浄した後、細胞内に取込まれた色素を抽出溶媒を用いて抽出し、コントロールサンプル (細胞生存率 100%) とそれぞれの検体から得られた溶液の吸光度を測定して比較することにより、細胞生存率を算出した。

2.2.6 測定

2.2.6.1 モノマーの重合転化率

モノマーの重合転化率については、溶離液にメタノール/n-ヘキサン混合溶媒 (5/5 v/v) を流速 1.0 mL/min.で使用し、カラムに ODS-3 (GL Science) を用いた HPLC により評価した。検出は UV-970 (Jasco ; $\lambda=260$ nm) にて行った。まず、各モノマーについて所定濃度の標準試料を作製し、HPLC 測定を

行って検量線を作製した。次に、重合中の溶液を所定時間毎にサンプリングして HPLC 測定を行い、重合溶液中に残存する各モノマーの濃度を算出した。

2.2.6.2 分子量と分子量分布

PMS の分子量については、ゲル浸透クロマトグラフィー—小角レーザー光散乱装置 (GPC-LALLS) 分析により行った。GPC-LALLS の溶離液としては、5 mM の塩化リチウムと 0.1% (w/v) のリン酸を含むテトラヒドロフラン/1-ブタノール混合溶媒 (8/2 v/v) を流速 0.7 mL/min.にて使用し、カラムには、2 本の TSKgel-GMH_{XL} (トーソー) と 1 本の TSKgel-G2500H_{XL} (トーソー) を直列につないで使用した。LALLS 検出器には、KMX-6 (Chromatix) を使用した。数平均分子量 Mn と多分散度 (Mw/Mn) については、Table 2-1 に示した。

2.2.6.3 粒径

PMS 自己会合体の粒径測定については、動的光散乱法 (DLS) により行った。DLS には、アルゴンイオンレーザーを光源に持つ Nicomp 380ZLS 粒径測定装置 (Particle Sizing Systems) を用いた。測定試料中の PMS 自己会合体濃度は 1 mg/mL に調整した。

2.2.6.4 クライオ透過型電子顕微鏡観察

クライオ透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) については、透析後に濃度調整した 0.1 mg/mL の PMS 自己会合体の溶液を銅グリッドで支持された多孔質カーボンフィルムに乗せ、過剰分をろ紙で取り除いた後、液体窒素で冷却された液体エタン中にグリッドを導入して、測定試料とした (FEI Vitrobot)。Cryo-TEM 装置には FEI Tecnai Palara を用い、測定温度-195°C、加速電圧 300 kV にて観察を行った。

2.2.6.5 表面張力

表面張力については、透析した PMS 自己会合体の溶液を使用し、ウィルヘルミー平板法により、表面張力測定装置 CBVP-A3 (Kyowa Interface Science) を用いて 25°Cにて測定を行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 PMS 自己会合体の調製

PMS 自己会合体については、3段階の手順に従って調製を行い、調製中の混合物を 60°C に保温した状態で緩やかに攪拌した。得られた溶液は無色透明、または、青白く半透明であった。Fig. 2-2 では、PMS5050 を例に挙げて、調製手順と溶液の外観を示している。

多くの低分子量リン脂質の場合、脂質やリポソームの調製のためには、高圧乳化装置や超音波照射を必要とする。1973年、Batzri と Korn は微小なりポソームを得るための簡便な手法について提案した。それは、リン脂質のエタノール溶液を水系溶媒中に急速に注入する方法である[13]。この方法により、粒径が小さく、また、粒径分布の狭いリポソームを調製することができる[14-18]。Ishii らの報告によれば、脂質/アルコール/水の三成分系において、アルコールに 1-または 2-プロパノールを使用することにより、均一な単層ラメラリポソームを得られることが明らかとなっている[19]。この技術の本質は疎水性リン脂質の自己会合であることから、混合溶媒を構成する成分の種類と組成比が極めて重要である。

本研究における PMS 自己会合体の製法では、1-プロパノールに替えてメタノール、エタノール、2-プロパノールを使用した場合、均一な PMS 自己会合体分散液を得ることができなかった。このことは、PMS の自己会合過程は溶媒の化学構造に強く影響されることを示している。短鎖または分岐状の炭化水素鎖を有するアルコールよりも、長鎖または直鎖状の炭化水素鎖を有するアルコールが、PMS に対してより高い親和性を示すために分散性が向上すると考えられる。

PMS 自己会合体の製法"Step 1"において、混合溶媒中の水と 1-プロパノールの組成比が 4:1 の場合に、最も粒径が小さい PMS 粒子が得られた (Fig. 2-3)。水と 1-プロパノールの混合比が 2:1 より少ない場合、あるいは 6:1 より多い場合、均一な PMS 分散液を得ることができなかった。アルコール成分に 1-ブタノールを用いた場合、1-プロパノールを用いた場合以上に良好な分散性を示すことが期待されたが、1-ブタノールは水への溶解性が低いため、混合溶媒としては不適であることがわかった。

PMS 自己会合体の製法"Step 2"において、系の温度が 40°C を下回ると、均一

な分散液は得られなかった。

PMS3070 自己会合体分散液は、"Step 2"の状態です室温にて一週間放置するとゲル化したが、希釈した状態 ("Step 3") では、こうした現象は観察されなかった。この原因についてはおそらく、1-プロパノールが高濃度の場合にはステアリル基の疎水性相互作用による会合が緩められ、疎水性相互作用の緩みにより PMS 粒子間の物理架橋が引き起こされるためと考えられる。

2.3.2 PMS 自己会合体のキャラクタリゼーション

PMS 自己会合体の粒径については、DLS を用いて測定を行った。PMS 中の MPC 含有量の増加に伴って、平均粒径は減少した (Fig. 2-4)。測定に用いた PMS 試料の分子量はほとんど差がないことから、粒径はポリマーの会合数に依存すると考えられる。PMS3070 自己会合体のクライオ-TEM 観察からは、角の尖った粒子形状が確認された (Fig. 2-5)。個々の粒子の周囲に暗く見える領域が存在していることから、粒子の表面近傍にホスホリルコリン基が凝集していることが示唆される。

透析した PMS3565 と PMS5050 自己会合体分散液について保存安定性試験を行ったところ、冷却条件でも加温条件でも粒径変化が無く、極めて高い安定性を示した (Fig. 2-6)。このことから、ステアリル基の凝集により形成された疎水性領域が、ポリマー鎖同士を強く結びつけていることが示唆された (Fig. 2-7)。

2.3.3 PMS の可溶化能

PMS の可溶化能を評価するために、10 mg または 50 mg の酢酸トコフェロール (TA) を 0.1 g の PMS で可溶化した。それぞれの濃度で、TA は完全に可溶化された。Fig. 2-8a および 2-8b に示したように、PMS5050 を用いて可溶化した TA 溶液は最も透明度が高かったことから、PMS シリーズ中、最も優れた可溶化能を有することが示唆された。

次いで、TA よりさらに疎水性の高いコエンザイム Q10 (CoQ10) を用いて、可溶化能について評価した。CoQ10 はユビキノンまたはユビデカレノンとして知られ、多くの臓器の細胞中に存在する脂溶性のビタミン様基質である。CoQ10 は細胞のエネルギーをアデノシン三リン酸の形として生み出すために極めて重要な働きを行う物質であり、酸化防止剤としての機能も持つ[20]。し

かしながら、CoQ10 は極めて疎水性が強いために、水系での可溶化溶液を調製することは極めて困難である。

PMB3070 を用いて調製した CoQ10 可溶化溶液は 60°Cでの保管時、24 時間以内に分離したのに対して、PMS5050 を用いて調製した CoQ10 可溶化溶液は、PMB3070 系に比べて、より透明度が高く安定であった (Fig. 2-9)。この理由については、n-ブチル基に比べてステアリル基の方が CoQ10 との親和性が高いため、PMS5050 を用いて調製した CoQ10 可溶化溶液の方がより安定であったと考えられる。

2.3.4 細胞毒性と表面張力

ウサギの眼粘膜由来細胞 (SIRC) を用いたニュートラルレッド法 (Neutral Red Uptake-assay; NRU) は、*in vitro* での細胞毒性を評価するための有用かつ高感度な方法として知られている。ニュートラルレッドは生細胞膜を通り細胞内に蓄積される性質を持つ色素であるが、細胞膜が損傷を受けるとその取り込みが阻害される。すなわちニュートラルレッドの取り込み総量が生細胞の数に比例するため、間接的に生細胞数を測定できる。本研究においては、この NRU により PMS 自己会合体とリゾリン脂質について、細胞毒性の比較を行った。

リゾレシチンは、レシチンのうち一本のアシル鎖が加水分解された形の化合物であり、元のレシチンと比べて高い可溶化能を示すことが知られている。しかしながら、リゾレシチンは界面活性能が高いために、細胞毒性を示すことが明らかとなっている[21]。本研究では、リゾレシチンの一種であるモノステアロイルホスファチジルコリン (MSPC、Fig. 2-10) を用いて試験を行ったところ、Fig. 2-11 に示したように、約 0.2 mg/mL で細胞毒性を示した。

化学構造の点から考えて、MSPC はホスファチジルコリン基とステアリル基と 1:1 で有することから、PMS5050 と比較することができる。両者は構造的な類似性が高いにも関わらず、PMS5050 は MSPC に比べて著しく低い界面活性能を示し (Fig. 2-12)、実質的に SIRC にまったくダメージを与えなかった。これらの結果は、高分子構造をとることにより、PMS の界面活性能と細胞毒性が極めて低減されたことを示している。

2.4 結論

本章では、1-プロパノールと水の最適な組成比 (1/4 w/w) の混合溶媒を用

いることにより、水中で PMS の自己会合体が得られることを明らかにした。溶媒組成比はこの技術の鍵である。DLS およびクライオ-TEM を用いて測定した PMS 自己会合体の平均粒径は 50 nm 以下であり、この粒径は、ポリマーの会合数に依存することが示唆された。PMS 自己会合体分散液は安定であり、60°C または 4°C にて 3 ヶ月間保管した場合でも、粒径に変化はなかった。酢酸コフェロールを用いて PMS の可溶化能について検討したところ、PMS5050 が最も高い可溶化能を示した。PMS5050 を用いて調製した CoQ10 可溶化液は、PMB3070 を用いた場合に比べて、より安定であった。PMS 自己会合体はリゾレシチンに比べて界面活性が低く、また、極めて低い細胞毒性を示した。以上の結果から、PMS 自己会合体は医療用や化粧品用の生体適合性の可溶化剤としての応用が期待される。

Table 2-1 Synthetic results of PMS.

Code	mol % of monomers (in feed)		Conversion (%)		Yield (%)	M _n ^a	M _w ^b /M _n
	MPC	SMA	MPC	SMA			
PMS7030	70	30	99.1	98.8	85.1	81,300	3.63
PMS5050	50	50	98.9	98.6	84.2	79,200	3.51
PMS3565	35	65	99.0	98.9	86.8	76,700	3.44
PMS3070	30	70	98.8	98.7	85.7	73,300	3.38

^aM_n represents the number average molecular weight. ^bM_w represents the weight average molecular weight.

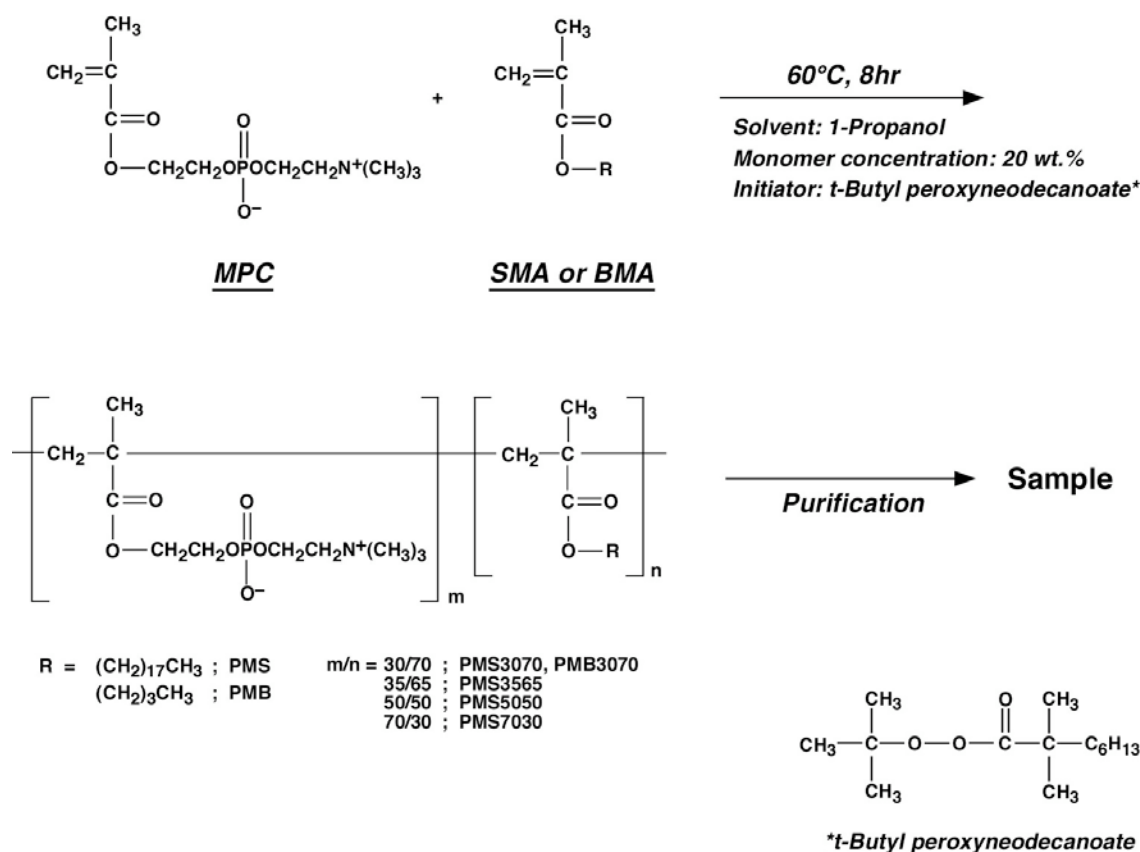


Figure 2-1 Polymerization of MPC co-polymers.

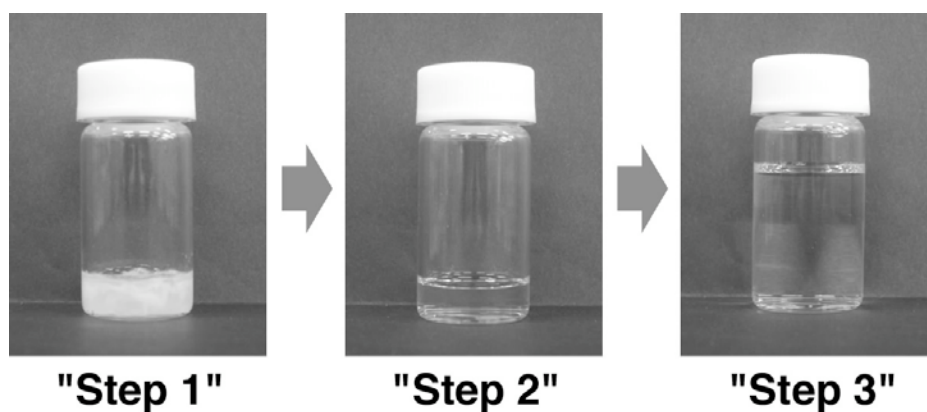


Figure 2-2 Self-aggregation process of PMS. (Step 1) Polymer precipitated when ion-exchanged water was added to the PMS/1-propanol solution. (Step 2) The mixture was stirred at 60 °C for 20 min. and became homogeneous. (Step 3) The solution was diluted with ion-exchanged water at 60 °C.

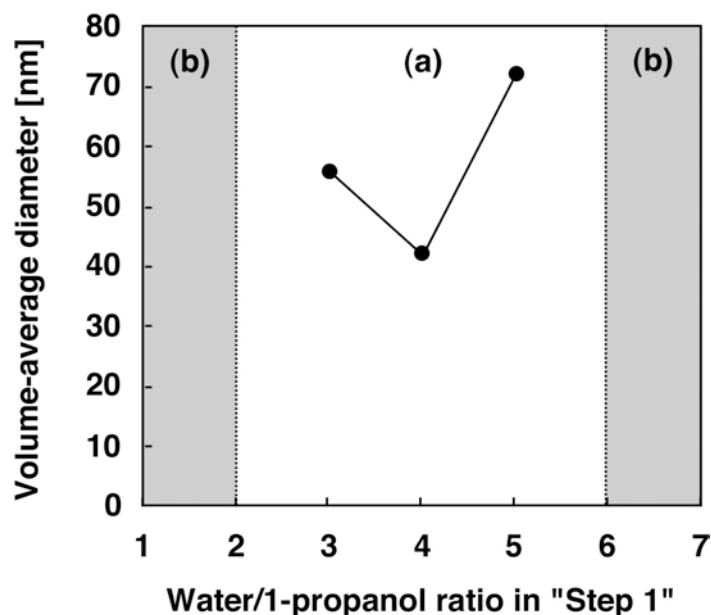


Figure 2-3 Volume-average diameter of PMS3070 self-aggregates as a function of water/1-propanol ratio in the self-aggregation process "Step 1". The solution was; (a) homogeneous, (b) heterogeneous.

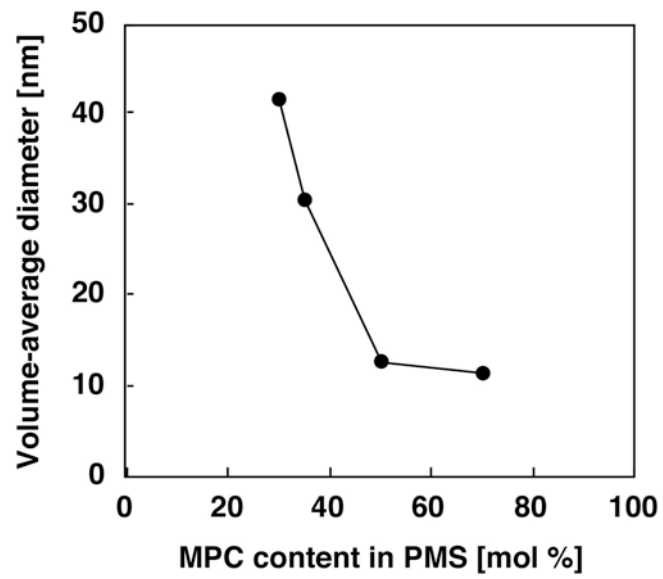


Figure 2-4 Volume-average diameter of PMS self-aggregates as a function of MPC content in PMS.

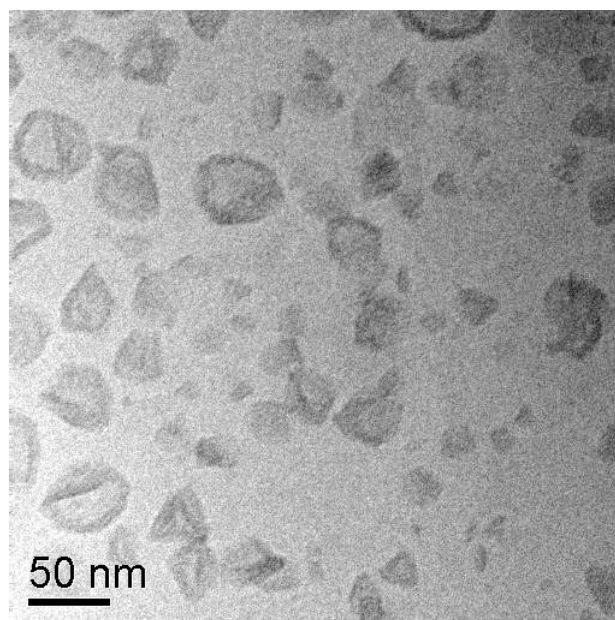


Figure 2-5 Cryo-transmission electron micrograph of PMS3070 self-aggregate.

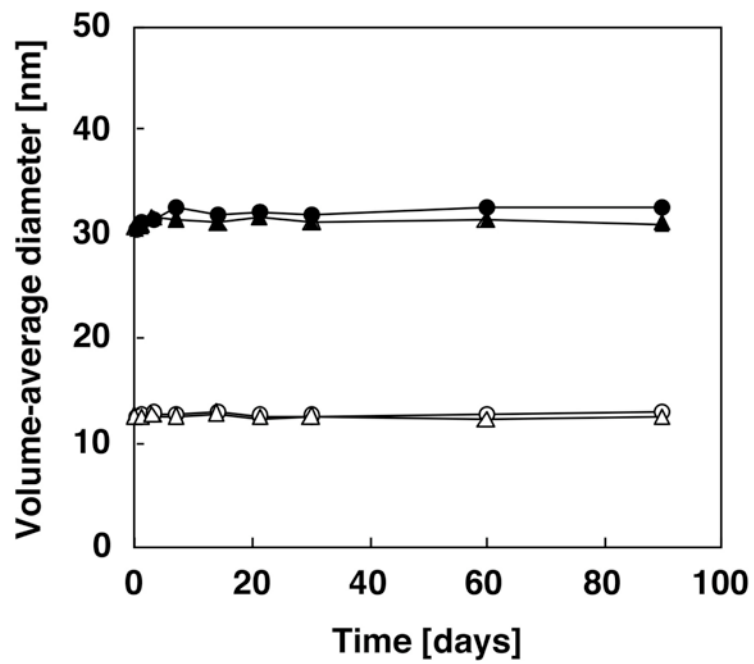


Figure 2-6 Volume-average diameter changes of PMS self-aggregates. (●) PMS3565 at 60 °C, (▲) PMS3565 at 4 °C, (○) PMS5050 at 60 °C, (△) PMS5050 at 4 °C.

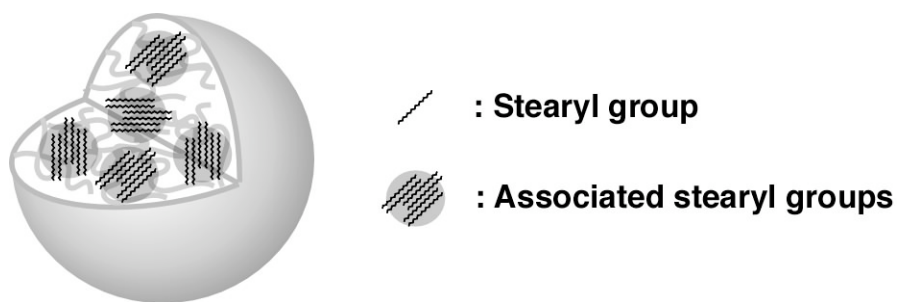


Figure 2-7 A schematic illustration of the PMS self-aggregate.

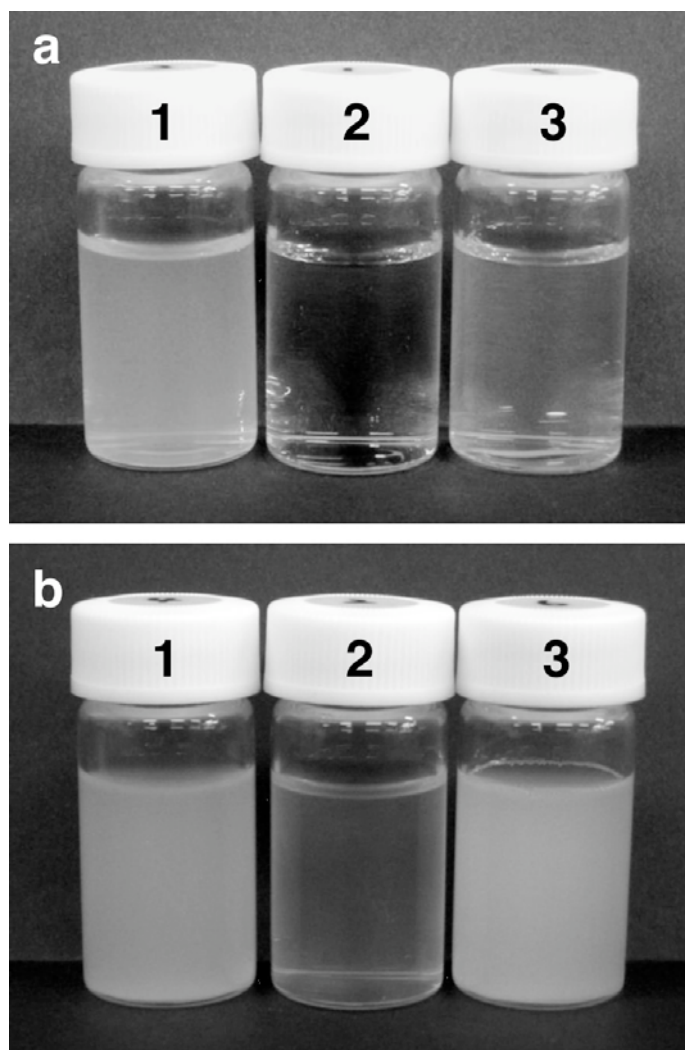


Figure 2-8 Solubilization of tocopherol acetate (TA) with 1 % of PMS; (a) 0.1 % of TA, (b) 0.5 % of TA; (1) PMS3565, (2) PMS5050, (3) PMS7030.

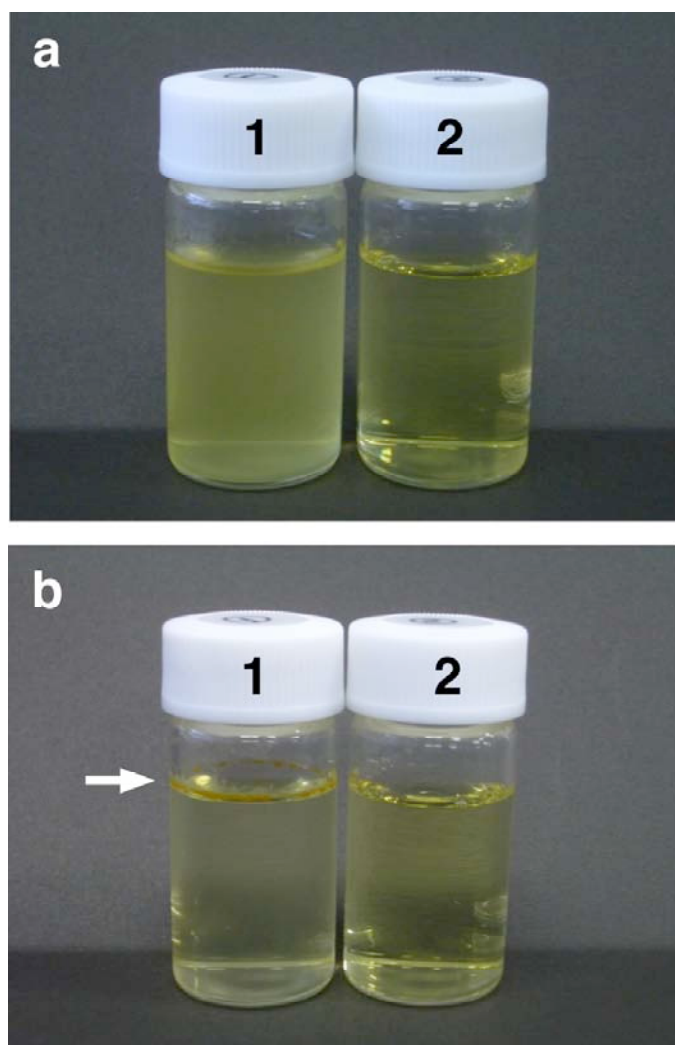


Figure 2-9 Stability of 0.05 % of co-enzyme Q10 (CoQ10) solubilized solution; (a) and (b) are before and after stored at 60 °C for 24 hr; (1) 1 % of PMB3070, (2) 1 % of PMS5050 (→ represents phase-separated CoQ10).

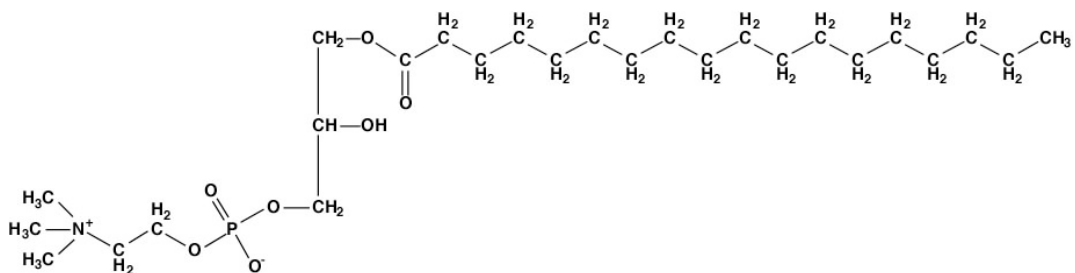


Figure 2-10 Chemical structure of mono-stearoyl phosphatidylcholine (MSPC).

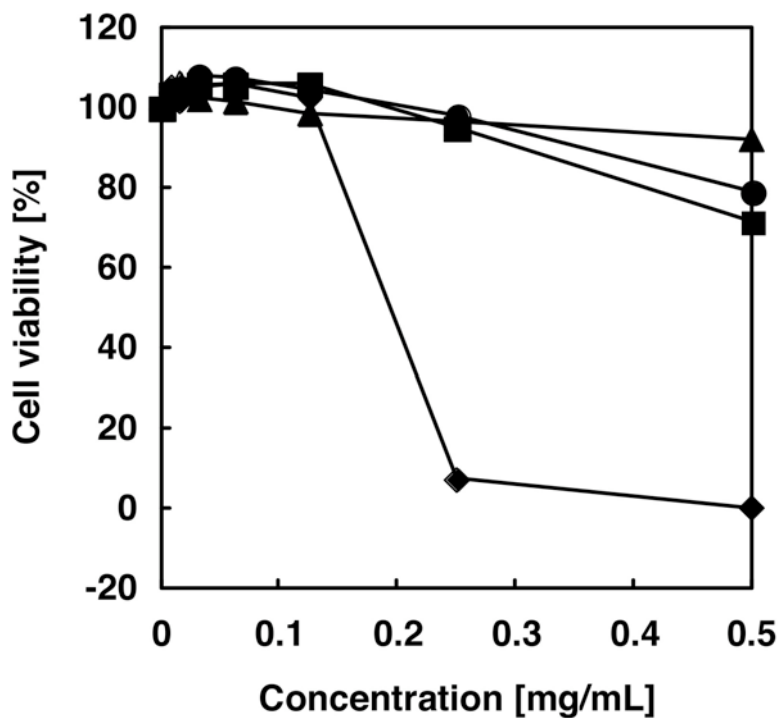


Figure 2-11 Cytotoxicity study of lysolecithin and PMS self-aggregates in SIRC. (●) Water, (▲) PMS5050, (■) PMS3565, (◆) lysolecithin (MSPC).

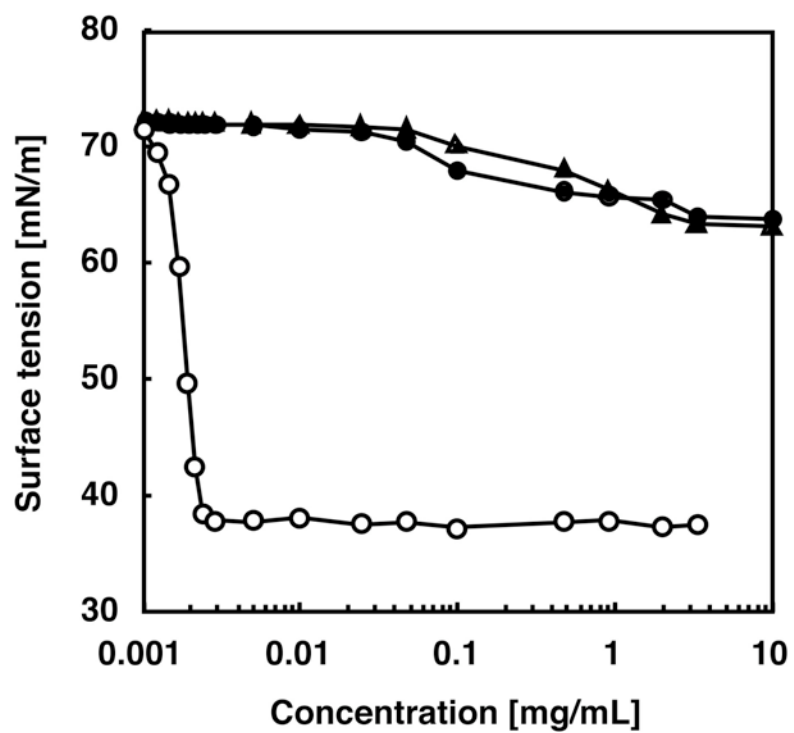


Figure 2-12 Surface tension study of lysolecithin and PMS self-aggregates. (●) PMS5050, (▲) PMS3565, (○) lysolecithin (MSPC).

参考文献

1. Y. Mizushima, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **11**, 595 (1985).
2. K. Ishihara, R. Aragaki, T. Ueda, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 1069 (1990).
3. K. Ishihara, N. P. Ziats, B. P. Tierney, N. Nakabayashi and J.M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 1397 (1991).
4. K. Ishihara, H. Oshida, T. Ueda, Y. Endo, A. Watanabe and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 1543 (1992).
5. Y. Iwasaki, A. Mikami, K. Kurita, N. Yui, K. Ishihara and N. Nakabayashi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 508 (1997).
6. Y. Kadoma, N. Nakabayashi, E. Masuhara and J. Yamauchi, *Kobunshi Ronbunshu*, **35**, 423 (1978).
7. K. Ishihara, Y. Iwasaki and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **31**, 1231 (1999).
8. T. Konno, J. Watanabe and K. Ishihara, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **65**, 210 (2003).
9. N. Yamamoto, H. Fukui, N. Sakamoto, K. Shuto and K. Suzuki, Japan Patent Pending, No.2004-196868.
10. N. Yamamoto and K. Shuto, *Preprints of the 8th SPSJ International Polymer Conference (IPC2005)*, 425 (2005).
11. T. Ueda, H. Oshida, K. Kurita, K. Ishihara and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **24**, 1259 (1992).
12. N. Tani, S. Kinoshita, Y. Okamoto, M. Kotani, H. Itagaki, N. Murakami, S. Sugiura, M. Usami, K. Kato, H. Kojima, T. Ohno, K. Saijo, M. Kato, M. Hayashi and Y. Ohno, *Toxicology in Vitro*, **13**, 175 (1999).
13. S. Batzri and E. D. Korn, *Biochim. Biophys. Acta.*, **298**(4), 1015 (1973).
14. J. M. Kremer, M. W. Esker, C. Pathmamanoharan and P. H. Wiersema, *Biochemistry*, **16**, 3932 (1977).
15. M. Pons, M. Foradada and J. Estelrich, *Int. J. Pharm.*, **95**, 51 (1993).
16. Y. Maitani, H. Soeda, J.P. Wang and K. Takayama, *J. Liposome Research*, **11**, 115 (2001).
17. D. D. Lasic, *J. Colloid interface Sci.*, **124**, 428 (1988).

18. H. Hauser, N. Gains, H. J. Eibl, M. Muller and E. Wehrli, *Biochemistry*, **25**, 2126 (1986).
19. F. Ishii, A. Takamura and Y. Ishigami, *Langmuir*, **11**, 483 (1995).
20. B. Frei, M. C. Kim and B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 4879 (1990).
21. S. R. Bergmann, T. B. Ferguson Jr. and B. E. Sobel, *Am. J. Physiol.*, **240**, H229 (1981).

第3章 疎水性リン脂質ポリマーフィルム中に形成されるモザイク状ラメラ構造

3.1 緒言

ヒトの皮膚は、生体の恒常性維持や外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能の役割を担っており、特に、皮膚の最外層にあたる角質層がバリア機能の主体を担うことが知られている。角質層は、角層細胞間脂質のマトリックス中に角層細胞が配置された「ブロックとモルタル」状の構造を有しており[1]、角層細胞間脂質は脂質二分子膜状の多重層構造（ラメラ構造）を形成することにより角層細胞同士をつなぎ止めるとともに、水分蒸散を防止すると考えられている[2] (Fig. 3-1)。この角層細胞間脂質が減少すると、角層細胞中にある天然保湿因子（NMF）が流出して皮膚水分量が低下し、バリア機能が失われて皮膚障害の引き金となる。

Kanzaki らによって、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）とブチルメタクリレートからなるコポリマー（PMB）を皮膚に塗布することにより、角質層の水分保持能と水分蒸散抑制能が向上し、皮膚バリア機能が改善されることが報告されている[3]。しかしながら、重度のアトピー性皮膚炎など角層細胞間脂質が著しく減少した皮膚においては、PMB と脂質が十分に相互作用することができないため、効果的な皮膚バリア機能の改善が困難になる。

そこで筆者らは、角層細胞間脂質そのものをポリマー材料で代替する目的から、ステアシルメタクリレート（SMA）と MPC の共重合体「PMS」を合成した。PMS は分子鎖中に疎水性の強いステアシル基を含有するため、乾燥状態では水に溶解しないが、水／アルコール混合溶媒中での自己会合現象を利用することにより、均一な分散液が得られる[4]。この分散液を用いれば、皮膚への適用が容易となる。PMS の中でも特に、SMA を 70 mol%含むコポリマー（PMS3070）は、リン脂質極性基とアルキル基の割合がほぼ 1：2 であり、細胞膜を構成するリン脂質と類似性が高い。このため、PMS3070 は角層細胞間脂質類似のラメラ構造をとる可能性が高いと考えられ、皮膚バリア機能の改善に極めて高い効果を示すことが期待されている。

そこで本研究では、PMS 3070 自己会合体を乾燥させてフィルムを調製し、このフィルム中の高次構造について検討した。

3.2 実験

3.2.1 試薬

2.2.2 および 2.2.3 に記載の方法により、MPC と SMA のラジカル共重合体である PMS3070 自己会合体分散液を調製した。その他の試薬については、市販の試薬特級品を用いた。

3.2.2 ポリマーフィルムの作製

PMS3070 自己会合体分散液をテフロンシャーレに展開し、80°C、常圧下にて水分を蒸発させることにより、厚さ約 0.2 mm の PMS3070 ポリマーフィルムを得た。

3.2.3 示差走査熱量分析

PMS3070 ポリマーフィルムを粉碎して測定試料とし、液体窒素を用いて冷却した後、窒素気流下、昇温速度 5°C/min.にて測定を行った。測定には、DSC210 (Seiko Instruments 製) を用いた。

3.2.4 ポリマーフィルム中の微細構造の観察

PMS3070 ポリマーフィルムを樹脂中に包埋し、ダイヤモンドナイフ装着のミクロトームで表面を削って試料を平滑化した。RuO₄を用いて試料表面を蒸気染色した後、超薄切片を作製して試料とした。透過型電子顕微鏡「H-7100FA」(株式会社日立製作所製)を用いて、加速電圧 100kV にて観察を行った。

3.2.5 X 線回折試験

アモルファス PET フィルムに PMS3070 ポリマーフィルムを挟み、測定試料とした。回転陰極型 X 線回折装置「RINT2500」(株式会社リガク製)を用いて、X 線源 CuK α 、管電圧 40 kV、管電流 130 mA、走査速度 10° /min.にて、測定を行った。

3.3 結果と考察

本研究の PMS3070 ポリマーフィルムでは、DSC 測定により 37.2°Cに極大

をもつ吸熱ピークが観測され、この温度以上ではフィルムが軟化した (Fig. 3-2)。この結果から、ポリマー中のステアシル基が凝集して微結晶を形成していることが示唆された。

X 線回折試験からは、広角側と小角側にそれぞれ弱い回折ピークが観測された (Fig. 3-3)。ブラッグ式 (1) から計算した周期長は 5.7 nm および 0.42 nm であり、それぞれ、長周期はポリマーが作る脂質二分子膜状の積層 (ラメラ) 間隔、短周期はステアシル基のパッキング間隔に対応すると考えられる (Fig. 3-4)。

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (1)$$

Hatta らによれば、健全なヘアレスマウスから採取した角質層の X 線回折試験から角層細胞間脂質の周期構造が確認されており、角層細胞間脂質のラメラ長周期は、4.6 から 13.8 nm、角層細胞間脂質分子中の炭化水素鎖のパッキング間隔は 0.38 から 0.42 nm であることが明らかとなっている[5]。PMS3070 が作るラメラ構造は、こうした構造パラメータの点でも、実際の角層細胞間脂質と類似性が高いことが明らかとなった。

また、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、ラメラの積層は長距離の配向性に乏しく、連続的に配向方向を屈曲させたモザイク状のラメラ構造をとることが明らかとなった (Fig. 3-5)。このようなモザイク状のラメラ構造は、乾燥過程において PMS3070 自己会合体が互いに融着し、ポリマー分子鎖が脂質二分子膜状に再配列することにより形成されたと考えられる。

最近の皮膚科学の研究から、角層細胞間脂質が形成するラメラ構造は、流動性の低い結晶性領域と、流動性の高い液晶性境界層から成るとする「ドメインモザイク」モデルが提案されている[6]。このモデルでは、低温時には脂質の流動性が低下することにより水分蒸散を防止するのに対して、高温時には流動性が増して水分蒸散を容易にさせると考えられている[7]。実際の皮膚から抽出した角層細胞間脂質の熱物性や構造解析から、このモデルの妥当性が検証されている[8]。本研究のポリマーフィルムは、TEM 像から明らかのように、結晶領域を含むラメラ構造がモザイク状に存在する点において、ドメインモザイクモデルと類似している。しかしながら、低分子の脂質集合体とは異なり、個々のラメラ層がポリマー鎖によってつなぎとめられているために、ポリマーフィルム

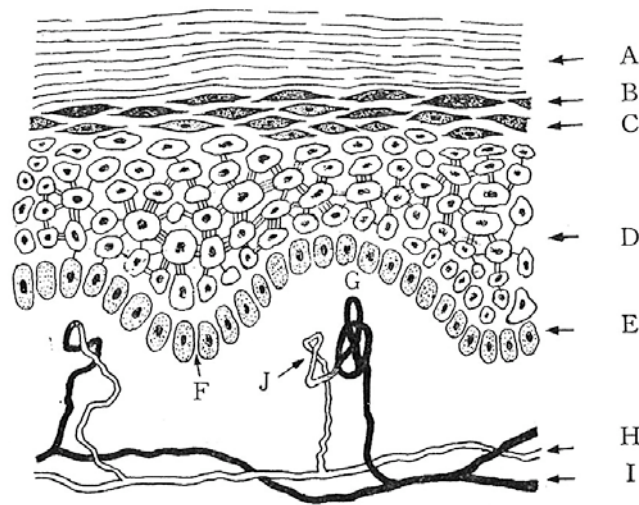
は高温条件下において塑性変形するが流動はしない。このような特徴から、本研究のポリマーを実際の皮膚に塗布した際には、水分蒸散の制御に関して通常の角層細胞間脂質と同様の機能を発揮しつつ、角層全体の物理的強度を高める効果が期待される。こうした機能と構造との相関については、たとえば、角層水分量や経表皮水分蒸散量などの皮膚バリア機能と、皮膚粘弾性などの物性の温度依存性について評価することにより、明らかにしうると考えられる。

3.4 結論

本研究では、MPC と SMA の共重合体 (PMS3070) の自己会合体の分散液を乾燥させてポリマーフィルムを調製した。得られたポリマーフィルムの熱物性について検討したところ、DSC による熱物性評価から体温付近に転移温度を示す吸熱ピークが観測され、ステアリル基が凝集した微結晶の存在が示唆された。X線構造解析の結果、ポリマーフィルム中には、5.7 nm の長周期構造と約 0.42 nm の側鎖のパッキング間隔をもつ、脂質二分子膜類似のラメラ構造が存在することが明らかとなった。また、このラメラ構造は、皮膚中の角層細胞間脂質と類似性の高い構造パラメータを有することがわかった。透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察の結果、モザイク状のラメラ構造が確認された。この構造は、PMS3070 自己会合体の乾燥過程において、ポリマー鎖が脂質二分子膜状に再配列しながら、自己会合体が互いに融着することにより形成されることが考えられる。

以上より、本研究のポリマーは角層細胞間脂質の代替物質として、化粧品のみならず、外用医薬品や創傷治療用の人工皮膚などへの応用が期待される。

(a)



A. 表皮角層, B. 同透明層, C. 同顆粒層 (ケラトヒアリン含有),
D. 同有棘層, E. 同基底層 (メラニン含有), F 表皮突起, G. 真皮
乳頭, H. 乳頭下層動脈, I. 同靜脈, J. 毛細管係蹄

(b)

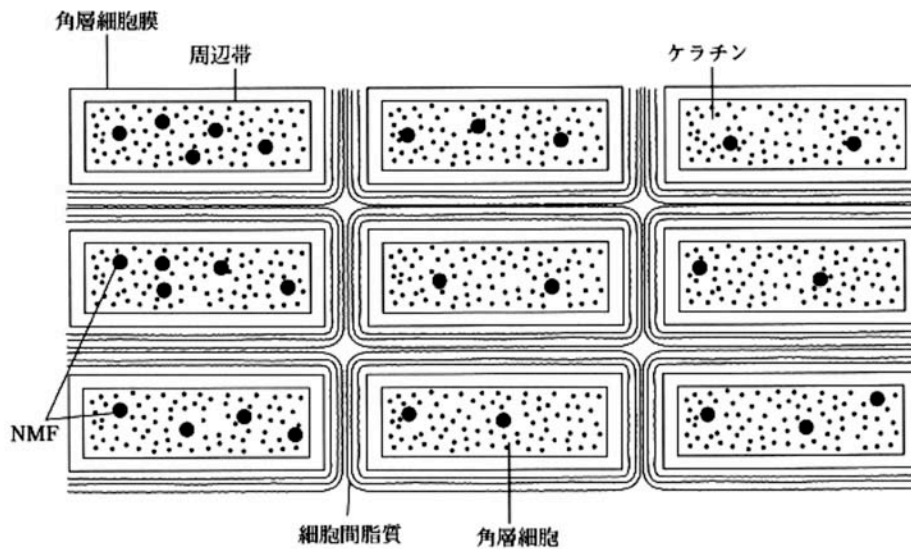


Figure 3-1 Schematic illustrations of human skin; (a) epidermides ("A" represents stratum corneum), (b) the brick and mortar model for the stratum corneum.

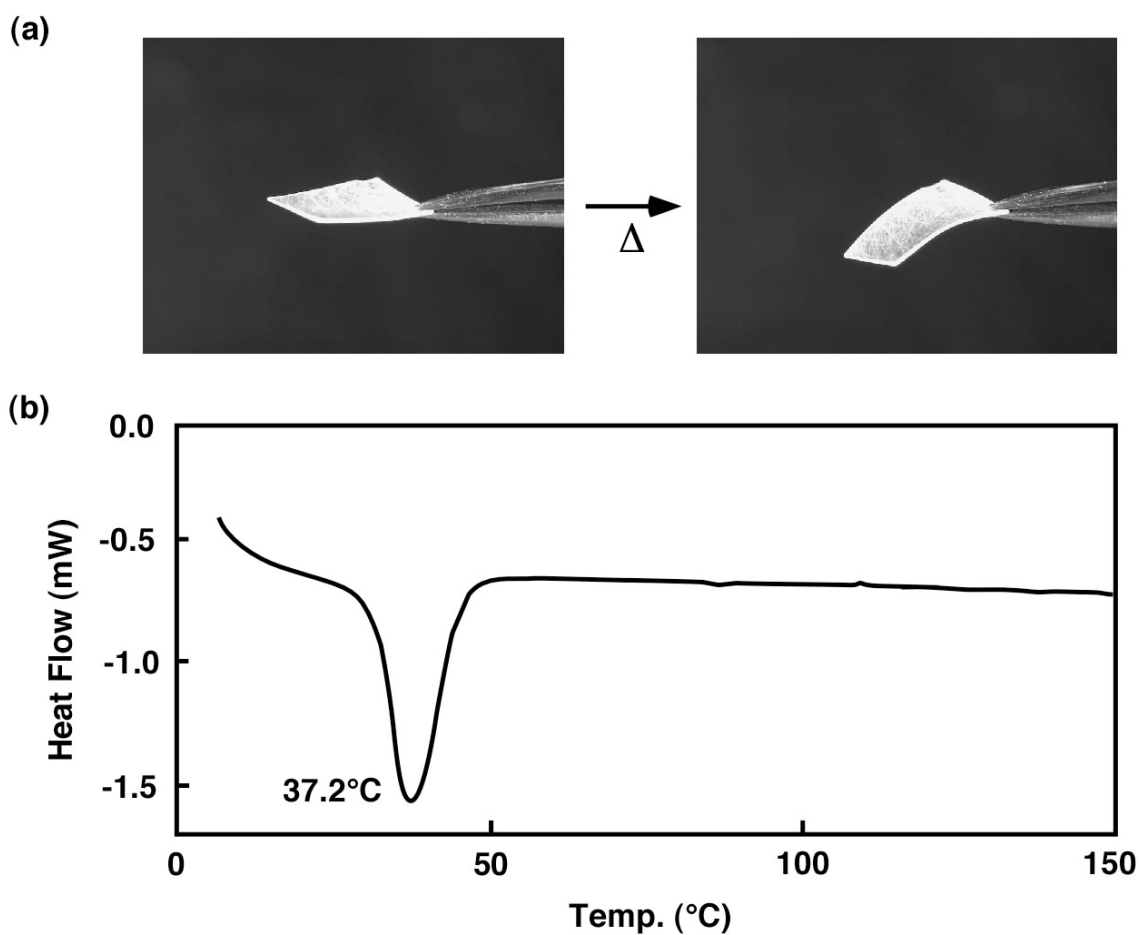


Figure 3-2 Thermal properties of PMS3070 cast film; (a) plastic deformation with heating, (b) differential scanning calorimetric (DSC) curve.

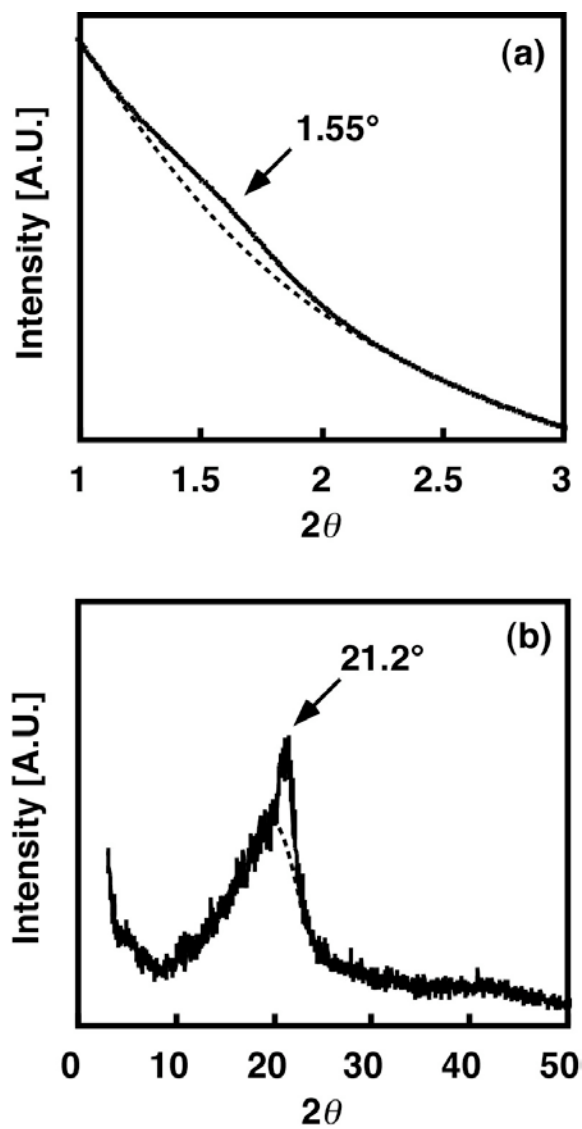


Figure 3-3 X-Ray diffraction patterns of PMS3070 cast film; (a) small angle intensity, (b) wide angle intensity.

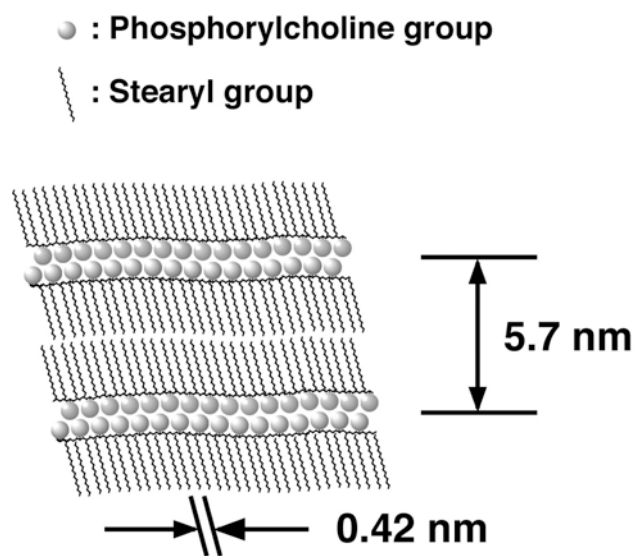


Figure 3-4 A schematic illustration of the nanoscale lamellar structure in PMS3070 cast film.

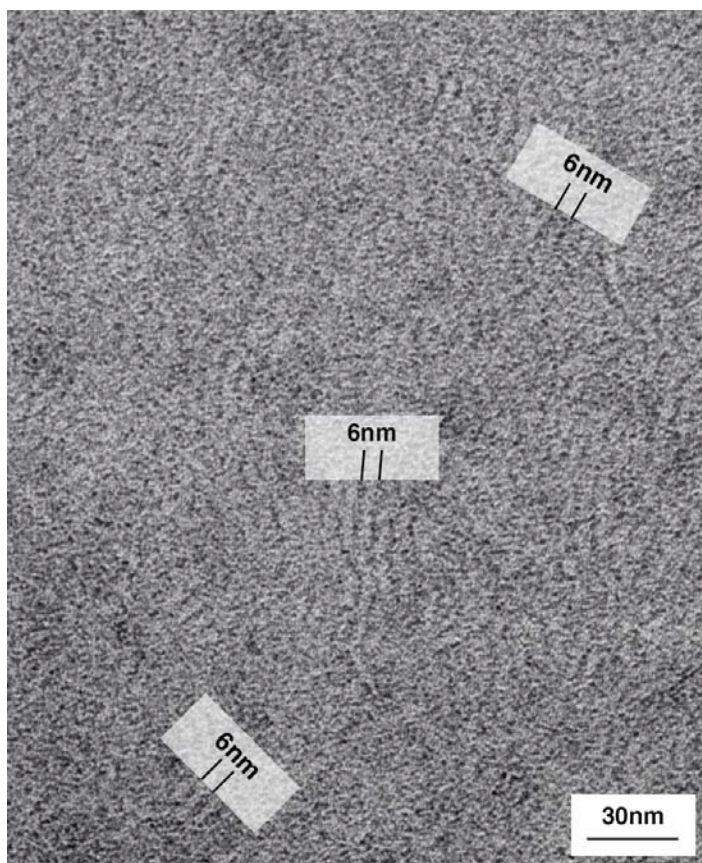


Figure 3-5 Transmission electron micrograph of PMS3070 cast film stained with RuO₄.

参考文献

1. P. M. Elias, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44s, (1983).
2. D. C. Swartzendruber, P. W. Wertz, D. J. Kitko, K. C. Madison and D. T. Downing, *J. Invest. Dermatol.*, **92**, 251 (1989).
3. T. Kanekura, Y. Nagata, H. Miyoshi, K. Ishihara, N. Nakabayashi and T. Kanzaki, *Clin. Exp. Dermatol.*, **27**, 230 (2002).
4. N. Yamamoto, H. Irie, N. Sakamoto, K. Shuto, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Oleo Sci.*, **55**(9), 465 (2006).
5. I. Hatta, N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka and S. Nakata, *Biophys. Chem.*, **89**, 239 (2001).
6. B. Forslind, *Acta Derm. Venereol.*, **74**(1), 1 (1994).
7. B. Forslind, S. Engstrom, J.Engblom and L. Norlen, *J. Dermatol. Sci.*, **14**(2), 115 (1997).
8. C. L. Silva, S. C. C. Nunes, M. E. S. Eusebio, A. A. C. C. Pais and J. J. S. Sousa, *Skin Pharmacol. and Physiol.*, **19**, 132 (2006).

第4章 疎水性リン脂質ポリマーの皮膚機能改善効果

4.1 緒言

皮膚の最表層に位置する角質層は、角層細胞と角層細胞間脂質が積み重なった「ブロックとモルタル」状の構造をもち、体外からの刺激物質の侵入を防ぐとともに、体内からの水分蒸散を防ぐ役割を担っていることが知られている[1]。角層細胞間脂質は、微細な層状構造（ラメラ構造）を形成して角層細胞同士を密着することにより、優れたバリア機能を発揮すると考えられている。

これまでに筆者らは、角層細胞間脂質の代替物質として疎水性リン脂質ポリマー（PMS）を合成し、このポリマーの自己会合体を乾燥させて得られるポリマー皮膜中の高次構造について解析を行なった結果、角層細胞間脂質類似のラメラ構造が自発的に形成されることを明らかにしてきた[2, 3]。このほか、親水性リン脂質ポリマーについては刺激性物質から細胞を保護する効果をもつことも土田らによって報告されている[4]。

そこで本研究では、刺激性物質に対する PMS の毒性低減効果について、細胞を用いた *in vitro* 系、およびヒト皮膚を用いた *in vivo* 系にて評価した。また、皮膚のバリア性と保湿性に及ぼす影響についても評価した。

4.2 実験

4.2.1 試薬

2.2.2 に記載の方法により、MPC と SMA のラジカル共重合体 PMS3070 を合成した。その他の試薬については、市販の日本薬局方適合品または化粧品原料規格適合品を用いた。

4.2.2 PMS 多価アルコール溶液の調製

PMS3070 を 1,3-ブチレングリコール (BG) とグリセリン (GLN) の等量混合物中に濃度 5 wt.%となるように溶解させ、PMS3070 の多価アルコール溶液 (PMS-L) を得た。

4.2.3 細胞毒性試験

家兎眼由来の上皮細胞 (SIRC) の培養液中にドデシル硫酸ナトリウム (SDS)

を 0.01 wt.%、前項で調製した PMS-L を所定濃度（ポリマー濃度 0.001～5 wt.%）にて添加し、インキュベータ内にて 24 時間培養した。また、PMS-L の代わりに各種化粧品用素材を用いて、同様の操作を行った。所定時間後、ニュートラルレッド法[5]により細胞生存率を測定した。

4.2.4 皮膚刺激性試験

PMS-L を 50°C に加温したイオン交換水で 10 倍に希釈した溶液（PMS-AQ）を調製した。PMS-AQ に対して、濃度 0.1～0.5 wt.% の SDS を溶解させ、試験溶液とした。また対照溶液として、同濃度の SDS を含む水溶液を調製した（Control）。皮膚感作テスト用フィンチャンバー（大正製薬株式会社製）を用いて、各溶液 10 μ L を試験用ろ紙に含浸させた後、成人男性（志願者 5 名）の背部に閉塞貼付した。24 時間経過後に試料を剥離し、剥離して 1 時間後および 24 時間後の皮膚反応を目視判定した。SDS により惹起された皮膚刺激反応について、パッチテストに関する標準法にて評点を与え、式(1)に従って皮膚刺激指数を算出した[6]。

$$\text{皮膚刺激指数} = \text{総評点和} / \text{被験者数} \times 100 \quad (1)$$

4.2.5 皮膚バリア性および保湿性評価

2.2 に記載の方法に準じて、ヒアルロン酸を濃度 5 wt.% で含む多価アルコール溶液（HA-L）を調製した。同様にして、スクアランを濃度 5 wt.% で含む多価アルコール溶液（SQ-L）を調製した。また、陰性対照（Control）として 1,3-BG と GLN の等量混合物を調製した。

皮膚バリア性については、皮膚表面から蒸散する水分である「経表皮水分蒸散量」（Transepidermal Water Loss, TEWL）を水蒸気センサーを備えた TEWL 測定装置により評価した。また、皮膚保湿性については、角質層内に蓄えられる水分である「角層水分量」（Water Content of Stratum Corneum, WCSC）を高周波電気伝導度計を備えた WCSC 測定装置により評価した[7]。成人男性（志願者 3 名）の前腕内側部を石鹸で洗浄し、TEWL および WCSC 測定を行った。次いで、被験物質（Control、PMS-L、HA-L、SQ-L）各 10 μ L を測定部位に滴下し、2cm 四方に塗り広げた。塗布して 2 時間後に検体を流水で洗い流し、TEWL および WCSC 測定を行った。

4.2.6 皮膚機能測定装置および測定方法

TEWL 測定については、経表皮水分蒸散量測定装置（Courage+Khazaka 製、Tewameter TM210）を用いた。また、WCSC 測定については、3.5 MHz 高周波伝導度測定装置（IBS 製、SKICON-200）を用いた。被験者はすべて、室温 20℃、湿度 40% の環境下にて 15 分間安静にした後、測定を実施した。

4.3 結果と考察

4.3.1 細胞毒性低減効果

SDS は細胞毒性や皮膚刺激性を示す物質として知られる。本研究では、毒性物質への感受性が高い SIRC 細胞を用いて、細胞が完全に死滅する最低濃度の SDS を培養系に加えた。この系内に各種成分を添加し、毒性低減効果について評価した結果を Fig. 4-1 に示す。化粧品において一般的に使用されている各種成分を共存させた系では、いずれの場合も細胞毒性を低減するような効果は認められなかった。これに対して、PMS 共存系では濃度依存的に生存率が回復したことから、PMS は SDS の細胞毒性を低減する効果をもつことが明らかになった。この理由について、(1)PMS 自己会合体中に SDS が取り込まれたため、あるいは、(2)PMS 自己会合体と細胞膜との相互作用により細胞膜の強度が増加し、細胞中への SDS 取り込みが阻害された、などが考えられる。

4.3.2 皮膚刺激低減効果

前項に示したように、PMS が細胞毒性低減効果をもつことが *in vitro* 評価系から明らかとなった。そこで、次にヒトの皮膚における刺激低減効果について *in vivo* のクローズドパッチテストにて評価した。試験手順の概要と結果を Fig. 4-2 および Fig. 4-3 に示す。SDS により惹起された皮膚刺激反応について、Table 4-1 に示した本邦基準に従って評点を与え、式（1）により皮膚刺激指数を算出した。その結果、SDS 水溶液のみを貼付した部位ではその濃度に依存して皮膚刺激性が高くなることが明らかになった。また、剥離後 1 時間目より 24 時間目の方が、明瞭な紅斑が多く観察された。このような反応の遅れは、皮膚刺激試験においてはよく知られた現象である [6]。一方、SDS 含有 PMS-L 希釈液を接触させた部位でも同様な傾向が認められたが、SDS 単独系と比較すると、

いずれの SDS 濃度においても皮膚刺激性は低減されていた。このことから、PMS は SDS の皮膚刺激性を低減する効果をもつことが明らかになった。

4.3.3 皮膚バリア性および保湿性改善効果

皮膚バリア性とは、体外からの刺激物質の侵入を防ぐ、あるいは体内からの水分蒸散を防ぐ機能を表し、皮膚表面から蒸散する水分の量 (TEWL) を測定することにより、皮膚バリア性の高低を評価することができる。また、皮膚の保湿性は主に皮膚外層の水分保持量に支配されることから、角層水分量 (WCSC) を測定することにより、保湿性の高低を評価することができる。

本研究では、皮膚バリア機能や保湿性に優れた材料として知られるスクワラン及びヒアルロン酸を比較対照として、PMS3070 が皮膚に及ぼす影響について検討した。TEWL および WCSC の測定については、安定した結果が得られやすい前腕内側部を用いて評価した (Fig. 4-4)。各測定部位について、塗布前の数値を 100 とし、塗布後の数値を相対値で評価した (Fig. 4-5)。まず、皮膚バリア性については、多価アルコール液 (Control)、ヒアルロン酸およびスクワランを塗布した場合は TEWL 値の変化は殆ど認められなかったのに対して、PMS-L を塗布した場合は、有意に TEWL 値が減少したことから、皮膚バリア性の向上が認められた。また、保湿性については、いずれの試料を塗布した場合にも WCSC 値が上昇して保湿性の向上が認められたが、その効果は PMS-L が最も高かった。

これらの結果から、PMS3070 は皮膚バリア性と保湿性の両方を向上させることが明らかとなった。皮膚バリア性の向上については、PMS3070 の乾燥皮膜がラメラ層を形成して皮膚からの水分蒸散を防ぐことが考えられる。また、保湿性の向上については、PMS が極めて吸湿性の高いホスホリルコリン基を分子鎖中に含むために、材料自身が保持できる水分量が多いことによると考えられる。PMS はこれら二つの機能を併せもつことにより、皮膚機能を改善する素材として極めて有用であることが示唆された。

4.4 結論

PMS3070 の刺激低減機能について *in vitro* および *in vivo* にて評価したところ、SDS がもつ毒性や皮膚刺激性を抑制できることが確認された。また、PMS3070 の塗布により皮膚からの水分蒸散を防ぐとともに、角層水分量を増

加させることがわかった。皮膚バリア機能の向上は PMS3070 が皮膚上にラメラ層を形成するため、また、保湿性の向上は PMS3070 が分子鎖中に吸湿性の高いホスホリルコリン基をもつためと考えられる。以上の結果から、PMS3070 は皮膚刺激性物質から細胞や皮膚を保護するとともに、皮膚機能を改善する素材として極めて有用であることが示された。

Table 4-1 Skin irritation scale in Japan.

本邦基準	反応	評点
—	反応なし	0
±	わずかな紅斑	0.5
+	明らかな紅斑	1.0
++	紅斑+浮腫、丘疹	2.0
+++	紅斑+浮腫・丘疹+小水疱	3.0
++++	大水疱	4.0

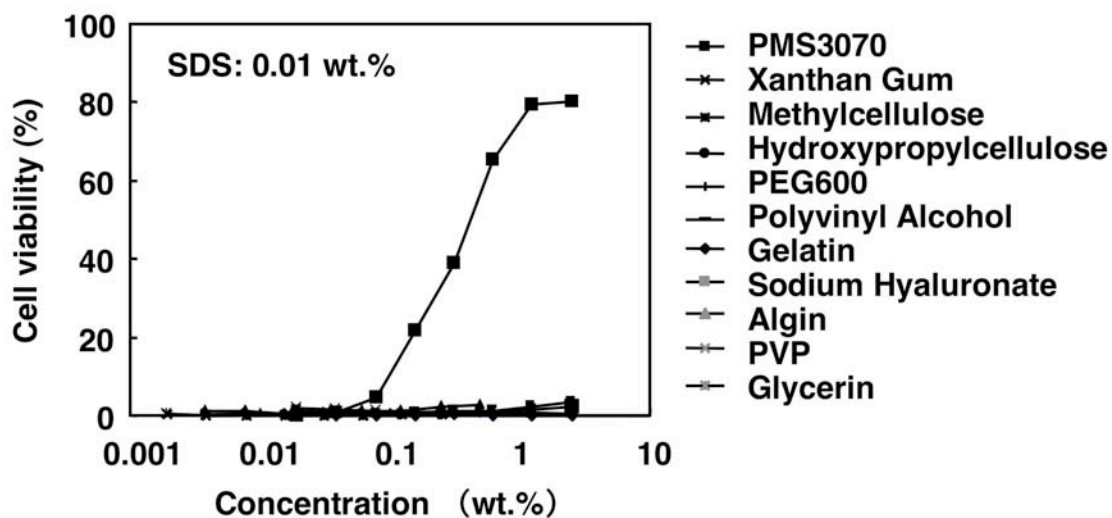


Figure 4-1 The suppressing effect of PMS3070 and various materials against the cytotoxicity of sodium dodecyl sulfate (SDS).

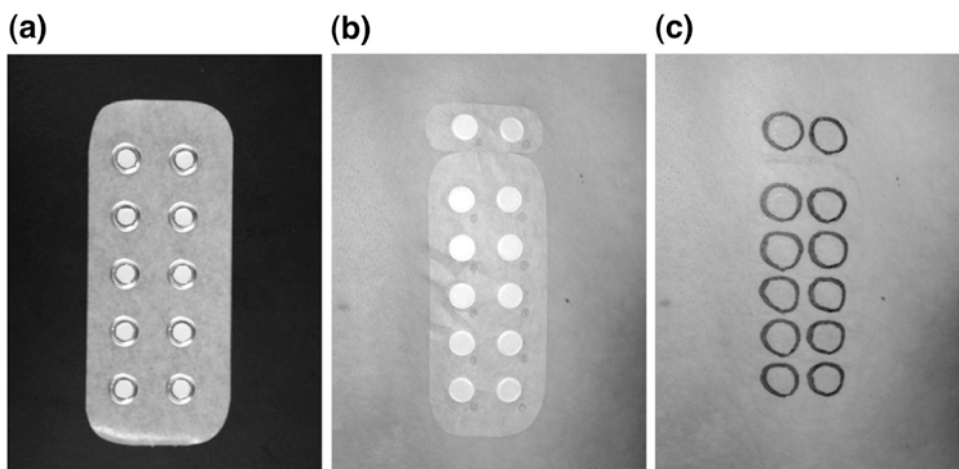


Figure 4-2 Evaluation procedure of skin irritation: (a): put the filter paper with sample liquid on fin-chamber, (b): plast the fin-chamber on the back of trialists, (c): remove the fin-chamber after 24 hr and evaluate the skin irritation.

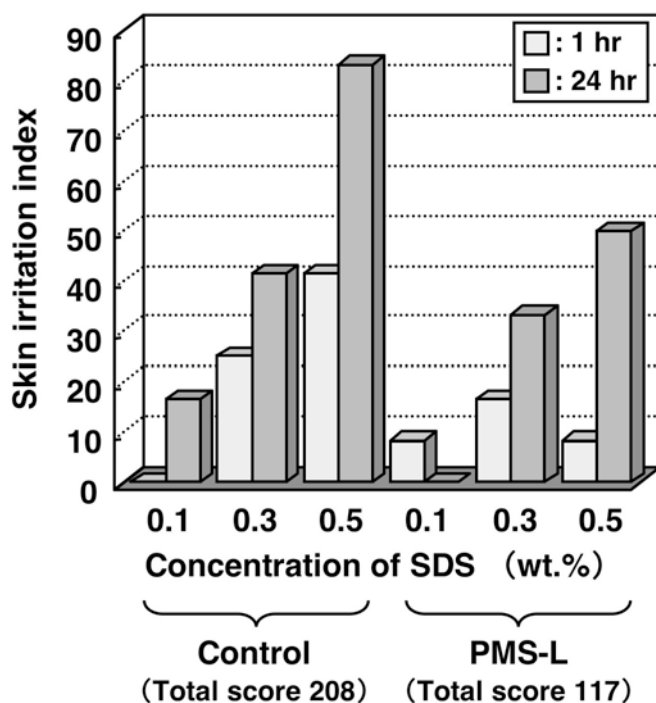


Figure 4-3 Skin irritation index of SDS patched trialists (5 males).

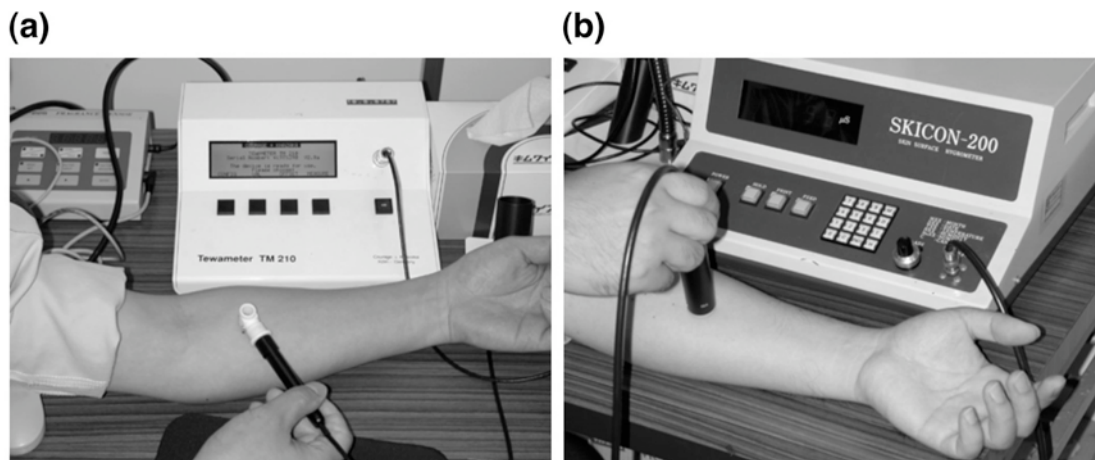


Figure 4-4 Instruments for the evaluation of skin barrier function and skin moisture; (a): Tewameter TM210 for transepidermal water loss (TEWL), (b): SKICON-200 for water content of stratum corneum (WCSC).

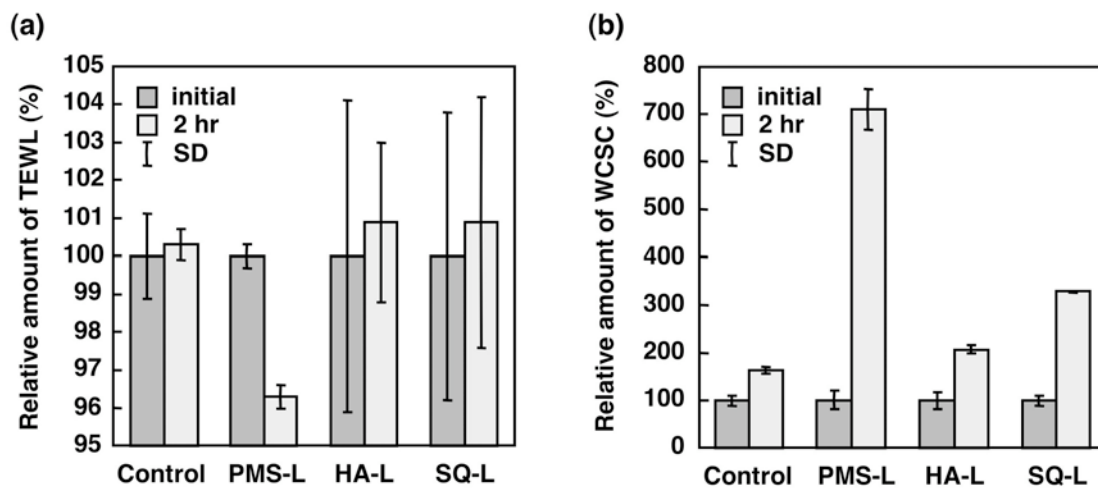


Figure 4-5 Skin barrier function of trialists (3 males) applied to various materials; (a): relative amount of the transepidermal water loss (TEWL), (b): relative amount of the water content of stratum corneum.

参考文献

1. P. M. Elias, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44s, (1983).
2. N. Yamamoto, H. Irie, N. Sakamoto, K. Shuto, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Oleo Sci.*, **55**(9), 465 (2006).
3. 山本宣之, 首藤健志郎, 山岸忠明, 中本義章, 高分子論文集, **64**(2), 115 (2007).
4. 土田 衛, 島田邦男, *Fragrance Journal*, **28**(12), 118 (2000).
5. 動物実験代替法マニュアル, 共立出版 (1994).
6. 皮膚刺激性・感作性試験の実施法と皮膚性状計測および評価, 技術情報協会 (1999).
7. 皮膚の測定・評価マニュアル集, 技術情報協会 (2003).

第5章 毛髪用化粧品素材としての疎水性リン脂質ポリマーの応用

5.1 緒言

毛髪は主に繊維状蛋白質と脂質からなり、外層から順にキューティクル、コルテックス、メデュラと呼ばれる組織から構成される。最外層にあるキューティクルは角化した蛋白質が主成分であり、毛髪の根元側から毛先側に向かってウロコ状の硬い無色透明な細胞が重なり合うようにして存在する。キューティクルの内側にあるコルテックスは毛髪のほとんどの体積を占め、繊維状蛋白質が主成分である。毛髪を中心に位置するメデュラは不定形の組織であり、空洞を含む場合も多いとされる。キューティクルやコルテックスに含まれる細胞は、細胞膜由来の蛋白質と脂質の複合体 (CMC) によって接着されている[1]。また、健康な毛髪のキューティクル表面は F 層と呼ばれる脂質層により覆われており、表面が疎水的に保たれている[2, 3]。しかし、ブリーチ処理やカラーリング処理により損傷を受けた毛髪では、CMC 由来の脂質量が減少したり、あるいは F 層の剥離により下層 (A 層) が露出し、毛髪表面が親水化することが報告されている[4, 5]。

筆者らは、細胞間脂質の代替物質としてリン脂質極性基であるホスホリルコリン基と長鎖アルキル基を有する疎水性リン脂質ポリマー (PMS) を合成し、その特性解析を行なっている。これまでに、PMS が自己会合体を形成すること、自己会合体内部にビタミン類などの疎水性物質を内包化可能であること、さらに、自己会合体の乾燥皮膜が細胞間脂質類似のラメラ構造を自発的に形成することなど、極めてユニークな特徴をもつことを明らかにしてきた (Fig. 5-1) [6, 7]。しかしながら、従来の自己会合体調製法では、化粧品では使用できない種類の低級アルコールを用いる必要があった。

そこで本研究ではこの低級アルコールに代えて、化粧品原料として使用可能な多価アルコールを用いて PMS の自己会合体形成を検討した。また、PMS 自己会合体とカチオン成分との複合化についても検討を行い、ヒト毛髪および人工毛髪に対するカチオン化 PMS 自己会合体の吸着性や各種有用性について検討した。

5.2 実験

5.2.1 試薬

2.2.2 に記載の方法により、MPC と SMA のラジカル共重合体 PMS3070 を合成した。N-ヤシ油脂肪酸アシル L-アルギニンエチル・DL-ピロリドンカルボン酸塩 (CAE) および N-[3-アルキル(12,14)オキシ-2-ヒドロキシプロピル]-L-アルギニン塩酸塩 (Amisafe) は味の素株式会社製、カチオン化ヒドロキシエチルセルロース (JR-400) は Amerchol 社製、シリコーンエマルジョン (KM-902) は信越化学株式会社製を用いた。1,3-ブチレングリコール (BG)、グリセリン (GLN)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ステアリルトリメチルアンモニウム塩酸塩 (STAC)、疎水性蛍光物質のナイルレッド (NR)、その他の試薬については市販の試薬特級品を用いた (Fig. 5-2)。試験用毛髪については、アジア系ヒト毛髪および株式会社帝健製ポリエステル人工毛髪を用いた。

5.2.2 自己会合体の調製、粒径測定および表面電位測定

GLN、BG、およびそれらの等量混合物 (GLN/BG) 中に PMS3070 を濃度 5 wt.% となるように加え、60°C にて全量を溶解させて PMS3070 ポリオール溶液を調製した。Fig. 5-3 に示したように、60°C にてイオン交換水と PMS3070 ポリオール溶液を攪拌混合することにより、濃度 1 wt.% の PMS3070 分散液 (NS-1 ~ NS-3) を調製した。また上記工程中、Step 2 にて SDS または CAE を 0.25 wt.% 添加することにより、界面活性剤成分と自己会合体が複合化したアニオン化 PMS3070 自己会合体分散液 (ANS) およびカチオン化 PMS3070 自己会合体分散液 (CNS) を調製した。さらに、CNS 調製時に PMS3070 ポリオール溶液に対して NR を 100 ppm 添加することにより、NR を内包化したカチオン化 PMS3070 自己会合体分散液 (CNS-NR) を調製した。得られた自己会合体分散液をイオン交換水で 20 倍に希釈し、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) により粒径を測定した。また、電気泳動光散乱法 (Electrophoretic Light Scattering, ELS) により自己会合体の表面電位を測定した。

5.2.3 ダメージ毛髪および PMS 処理毛髪を作製

既報[8]に従い、ヒト毛髪にブリーチ処理を施して人為的に損傷を与えた毛髪 (ダメージ毛髪) を作製した。このダメージ毛髪を CNS の希釈液 (PMS3070

濃度 0.05 wt.%) に 1 分間浸漬し、ため水で洗浄後、乾燥させることにより、PMS 処理毛髪を作製した。

5.2.4 毛髪表面における PMS の吸着性評価

5.2.3.記載の方法にて作製した PMS 処理毛髪について、分析径を 30 μ m まで絞ったマイクロモード XPS にて分析を行った。まず 2 次元元素マッピングにより、試料毛髪一本の表面酸素像を可視化した後、得られた毛髪像の上で 100 μ m 間隔に任意の 3 点を選び、リン原子の光電子スペクトルを測定してピーク強度を比較した。

5.2.5 蛍光顕微鏡観察

CNS-NR の希釈液 (PMS3070 濃度 0.05 wt.%) を用いた以外は、5.2.3.記載の方法に準じて PMS 処理毛髪を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。毛髪の断面像については、試料をクリオモールド中に包埋して-20 $^{\circ}$ Cにて凍結させ、クリオスタットを用いて超薄切片を作製し、観察試料とした。

5.2.6 毛髪の表面形態観察

5.2.3.記載の方法にて作製した PMS 処理毛髪を金蒸着し、試料表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。

5.2.7 毛髪の疎水性評価

CNS および各種ヘアケア素材の希釈液 (固形分濃度: 0.04~0.05 wt.%) を用いて、5.2.3.記載の方法に準じて処理毛髪を作製した。この毛髪表面にマイクロシリンジを用いて水滴を乗せ、顕微鏡観察および静的接触角測定を行った。

5.2.8 帯電防止性評価

5.2.7.記載の方法にて作製した各種処理毛髪を PET フィルムで 30 回擦った後、一定時間毎に摩擦帯電圧を測定した。また、処理毛髪を市販のくしで 5 回とかした後、帯電による毛髪の広がり (ヘアフライ) を観察した。これらの試験はすべて、気温 20 $^{\circ}$ C、相対湿度 45%に調節された室内で行った。

5.2.9 褪色防止性評価

市販の染毛剤（ビューティーラボヘアカラー、ホーユー株式会社製）を用いてヒト白髪束を染色し、染色毛髪を作製した。得られた染色毛髪を CNS 希釈液（PMS3070 濃度 0.05 wt.%）に 1 分間浸漬し、ため水で洗浄後、乾燥させた。その後、シャンプー液（1 wt.% ラウリル硫酸ナトリウム水溶液）に浸漬し、40°C で 5 分間振とう後、水洗し、乾燥させた。この操作（PMS3070 処理→シャンプー洗浄）を計 10 回実施後、写真撮影するとともに、PMS3070 処理の有無による色落ち度合いの変化を色差計にて評価した。

5.2.10 人工毛髪の表面摩擦係数と表面元素分析

試験用毛髪としてポリエステル製人工毛髪を用いた以外は、5.2.3.記載の方法に準じて PMS 処理毛髪を作製し、表面摩擦係数を測定した。また、XPS による解析を行い、表面に存在する全炭素原子に対するリン原子の原子数比（P/C）から、PMS3070 の吸着性を評価した。

5.2.11 測定装置

DLS による粒径測定および ELS によるゼータ電位測定については、アルゴンイオンレーザーを光源に持つ Nicomp 380ZLS（Particle Sizing Systems 社製）を用いて、25° C にて行った。X 線光電子分析（XPS）による表面元素分析については、JPS-9200（日本電子株式会社製）を用いた。蛍光顕微鏡観察については、蛍光モジュール BH2-DMG（励起主波長 546 nm）を備えた落射蛍光顕微鏡 BHS-RFC（Olympus 製）を用いた。SEM 観察には、S-3000N（日立製作所株式会社製）を用いた。水滴を観察するための顕微鏡には、VH-6110（キーエンス株式会社製）を用いた。表面摩擦係数については、摩擦子としてシリコーンゴムを備えた KES-SE（カトーテック株式会社製）を用いた。毛髪の縦方向に摩擦子を滑らせ、その抵抗から表面摩擦係数を測定した。摩擦帯電圧については、静電気計測器 FMX-002（シムコジャパン株式会社製）を試料毛髪に対して所定の距離（25 mm）に置き、非接触にて測定した。色落ち度合いの変化を測定するための色差計には、NF333（日本電色工業株式会社製）を用いた。

5.3 結果と考察

5.3.1 PMS 自己会合体の調製

PMS3070 の多価アルコール溶液から PMS3070 自己会合体の調製を試みた。その結果、GLN 溶液から PMS3070 を分散させた場合には沈殿が生じたが、BG または GLN/BG 溶液から分散させた場合には、粒径が 50 nm 以下の PMS3070 自己会合体が得られることが分かった (Table 5-1)。また、アニオン性界面活性剤 (SDS) およびカチオン性界面活性剤 (CAE) を添加して調整した PMS3070 自己会合体 (ANS, CNS) についても粒径測定を行なったところ、界面活性剤の有無に関わらず粒径はほとんど変化しないことがわかった。表面電位測定の結果、PMS3070 単独で調製した自己会合体の表面は弱い負電荷 (-10 mV) を帯びていたのに対して、アニオン性界面活性剤またはカチオン性界面活性剤の存在下で調製した自己会合体の表面は、それぞれ強い負電荷 (-30 mV) または正電荷 (+21 mV) を帯びていた。これらの結果から、各界面活性剤成分と PMS3070 自己会合体との複合化により、自己会合体の粒径を変えずに表面電位だけを制御できることが明らかとなった。

5.3.2 ヒト毛髪への吸着性と浸透性

一般に毛髪用トリートメント成分として、静電相互作用による効率的な吸着を目的としてカチオン性界面活性剤が多く用いられる。そこで本研究では、カチオン化 PMS3070 自己会合体の分散液 (CNS) を用いて、毛髪に対する効果について評価した。PMS3070 自己会合体と複合化させるカチオン成分としては、安全性が高く化粧品原料としての実績もある CAE を用いた。

まず、CNS 希釈液を用いてダメージ毛髪の治療を行った後、得られた PMS 処理毛髪について XPS による表面元素分析を行った。XPS は、材料表面に軟 X 線を照射し、発生した光電子を真空中で捕らえて運動エネルギーを測定することにより、その材料の最表面に存在する元素を高感度に分析する方法である。通常の XPS では分析径が数 mm 程度であり、その範囲での平均的な元素情報を得る目的で使用されることが多い。一方、本研究では毛髪一本の上での PMS3070 の吸着性について比較検討を行う目的から、分析径を 30 μm まで絞ったマイクロモード XPS にて分析を行った。まず、PMS 処理毛髪について酸素 (O1s) の二次元マッピングを行い、毛髪一本の上で元素分析が可能である

ことを確認した (Fig. 5-4a)。次に、毛髪上の任意の 3 点でリン原子 (P2p) の光電子スペクトル分析を比較したところ、3 点ともほぼ同等のピーク強度を示した (Fig. 5-4b)。ヒト毛髪にはリン原子はほとんど含まれておらず、また、CAE にはリン原子が含まれていないため、検出されたリン原子はすべて PMS3070 に由来すると考えられる。これらの結果から、毛髪表面に対して PMS3070 が均一に吸着したことが示された。

一方、蛍光顕微鏡観察の結果、未処理のダメージ毛髪では弱い自家蛍光が認められたのに対して、CNS-NR で処理した毛髪では強い蛍光が確認された (Fig. 5-5)。本研究で用いた蛍光物質 (NR) は、疎水場において強い蛍光を示すことで知られており、PMS3070 自己会合体は乾燥過程において分子鎖が再配列してラメラ構造を形成することが確認されていることから[7]、ラメラ構造中の疎水場に NR が取り込まれて強い蛍光を発したと考えられる。

また、毛髪はダメージ処理などの外的な刺激によって空隙ができることが知られている。本研究の蛍光観察において毛髪表面 (キューティクル) だけでなく、内部 (メデュラ、コルテックス) にも蛍光が確認されたことから、PMS3070 自己会合体は毛髪の外層のみならず、内部の空隙部分にも浸透・吸着したと考えられる。

これらの結果から、ダメージ毛髪に対するカチオン化 PMS3070 自己会合体の吸着性と高い浸透性が明らかとなった。蛍光物質に代えて疎水性の抗酸化成分や機能性脂質を用いた場合には、これらの物質を保持した PMS3070 のラメラ層を毛髪表面および内部に形成させることができると考えられる。

5.3.3 人工毛髪への吸着性と摩擦低減効果

Fig. 5-6 に PMS3070 処理した人工毛髪の表面リン原子濃度 (P/C) と摩擦係数との相関を示す。ヒト毛髪では太さや縮れ具合が試料間で異なるために、再現性のある結果が得られにくい。そこで本研究では、太さが一定で縮れのないポリエステル製人工毛髪を用いて試験を行った。その結果、PMS3070 自己会合体濃度の増加に伴って表面リン原子濃度も増加し、逆に摩擦係数が低減された。

5.3.4 ヒト毛髪に対する有用性

健康な毛髪のキューティクル表面は F 層と呼ばれる脂質層により覆われてお

り、F層中には18-メチルエイコサン酸(18-MEA)と呼ばれる分岐脂肪酸が毛髪のタンパク質とチオエステル結合により結合した状態で存在している[9]。18-MEAは疎水性の強い脂肪酸であるため、健康な状態では毛髪の表面は撥水性を有しているが、ブリーチ処理やカラーリング処理により損傷を受けた毛髪では、チオエステル結合の加水分解に伴うF層の剥離により、下層(A層)が露出して毛髪表面が親水化することや、毛髪中のCMCに含まれる脂質量が減少することが報告されている[4, 5]。

健康毛髪、ダメージ毛髪、およびPMS処理毛髪の走査型電子顕微鏡による観察像をFig. 5-7に示す。ダメージ毛髪ではキューティクルがめくれて立ち上がりが目立った。これは、ブリーチ処理によりCMC中の脂質が失われて細胞間の接着性が低下したためと考えられる。一方、PMS処理毛髪ではそのようなキューティクルのリフトアップが効果的に抑制され、健康毛髪に近い状態にまで補修されていることが確認された。これは、ブリーチ処理により失われた脂質をPMS3070が補い、細胞間の接着性が向上したためと考えられる。

各種毛髪の表面の水濡れ性を評価した写真をFig. 5-8に示す。健康毛髪では上述したようにその表面が疎水的であるため、水滴が球状を保った状態で表面に存在していた。一方、ダメージ毛髪では水の接触角が低下し、毛髪表面の親水化が見られた。このようなダメージ毛髪をSTACやDMSi等のヘアケア素材で処理しても水濡れ性の変化は殆ど認められなかった。細川によれば、シリコーン類やカチオン性界面活性剤を単独で用いた場合には、A層との親和性が十分でないため大きな撥水効果が得られないが、ジグリコシル没食子酸(DGA)の併用によりA層との親和性が改善されて毛髪表面が再疎水化されると報告されている[5]。本研究では、カチオン化PMS3070自己会合体を用いることにより、ダメージ毛髪表面が健康毛髪に近い状態まで再疎水化されることが明らかとなった。この結果から、カチオン化PMS3070自己会合体はA層に対して高い親和性をもつことが示唆された。また、表面の再疎水化効果については、PMS3070中のステアシル基が表面配向して発現すると考えられる。

PMS処理毛髪および各種ヘアケア素材で処理した毛髪の摩擦帯電圧の減衰曲線をFig. 5-9に示す。PMS処理毛髪の初期帯電圧は、いずれの処理毛髪よりも明らかに低く、また90秒後にはほぼ帯電していない状態にまで減衰した。また、ヘアフライの観察においても、PMS処理毛髪はいずれの処理毛髪よりも明らかに広がりが少なかった(Fig. 5-10)。PMS3070の乾燥皮膜中に形成され

るラメラ構造中にはホスホリルコリン基 (PC 基) が集合した極性層が存在することが明らかとなっている[7]。PC 基は低湿度環境下においても適度な水分を保持することから、摩擦によって生じた静電気はこの極性層に導電することにより帯電が緩和されたと考えられる。毛髪の再疎水化効果と考え合わせると、PMS3070 は毛髪表面においてステアシル基を空気界面に配向させたラメラ構造を形成すると考えられる (Fig. 5-11)。

褪色防止性評価では、単にシャンプーを繰り返した毛髪と比較して、前もって PMS3070 で処理した毛髪は明らかに色落ちが少ないことが確認された (Fig. 5-12)。毛髪表面をポリマー層が覆うことにより、色素流出が妨げられたと考えられる。

5.4 結論

本研究では、化粧品原料として使用可能な多価アルコールを用いた PMS3070 自己会合体の調製について検討し、粒径 50 nm 以下の PMS3070 自己会合体が得られることを明らかにした。また、界面活性剤との複合化により、粒径がほぼ同じで表面電位だけを変化させたアニオン化およびカチオン化 PMS3070 自己会合体が得られることを明らかにした。

ダメージ毛髪をカチオン化 PMS3070 自己会合体で処理したところ、PMS3070 自己会合体が毛髪表面に均一に吸着したことが XPS による表面元素分析から明らかとなった。また、カチオン化 PMS3070 自己会合体は毛髪の表面のみならず内部の空隙部まで浸透・吸着することが蛍光顕微鏡観察から明らかとなった。また、吸着した PMS3070 が毛髪表面でラメラ構造を形成することが示唆された。各種機能性脂質や抗酸化成分などの疎水性成分を PMS3070 自己会合体中に内包化させて毛髪を処理した場合には、ラメラ層中にこれらを貯留あるいは徐放させることも可能であると考えられる。毛髪の表面形態および撥水性評価から、ダメージ毛髪が PMS 処理により健康毛髪とほぼ同等な状態にまで回復した。これは、毛髪表面から失われた F 層を修復するようにラメラ層が形成されたためと考えられる。さらに、PMS 処理による優れた帯電防止性、褪色防止効果、および摩擦低減効果が明らかとなった。今後、PMS3070 自己会合体の特徴的な機能をいかした毛髪用化粧品への応用が期待される。

Table 5-1 Mean diameter and zeta potential of PMS3070 self-aggregates measured by dynamic light scattering and electrophoretic light scattering.

Code	Polyol composition of PMS3070 Solution	Additives	Mean Diameter (nm)	Zeta Potential (mV)
NS-1	GLN	-	N.D. ^a	-
NS-2	GLN/BG	-	38	-10
NS-3	BG	-	47	-
ANS	GLN/BG	SDS	42	-30
CNS	GLN/BG	CAE	41	+21
CNS-NR	GLN/BG	CAE, NR	-	-

^a PMS3070 dispersion was precipitated.

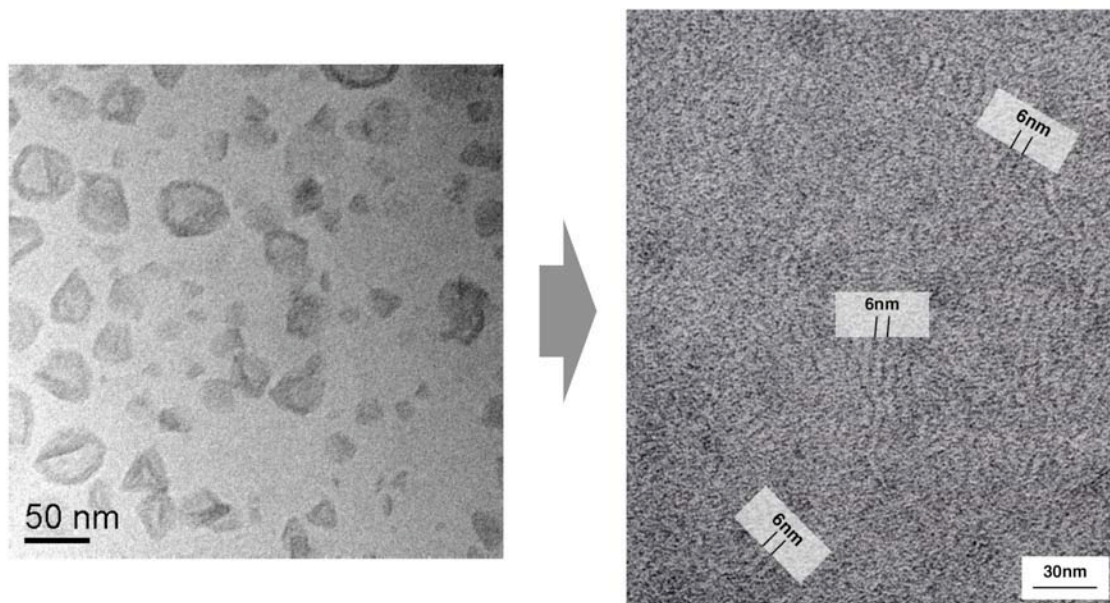


Figure 5-1 Cryo TEM image of PMS3070 self-aggregates (left) and TEM image of its lamellar structure in PMS cast film (right).

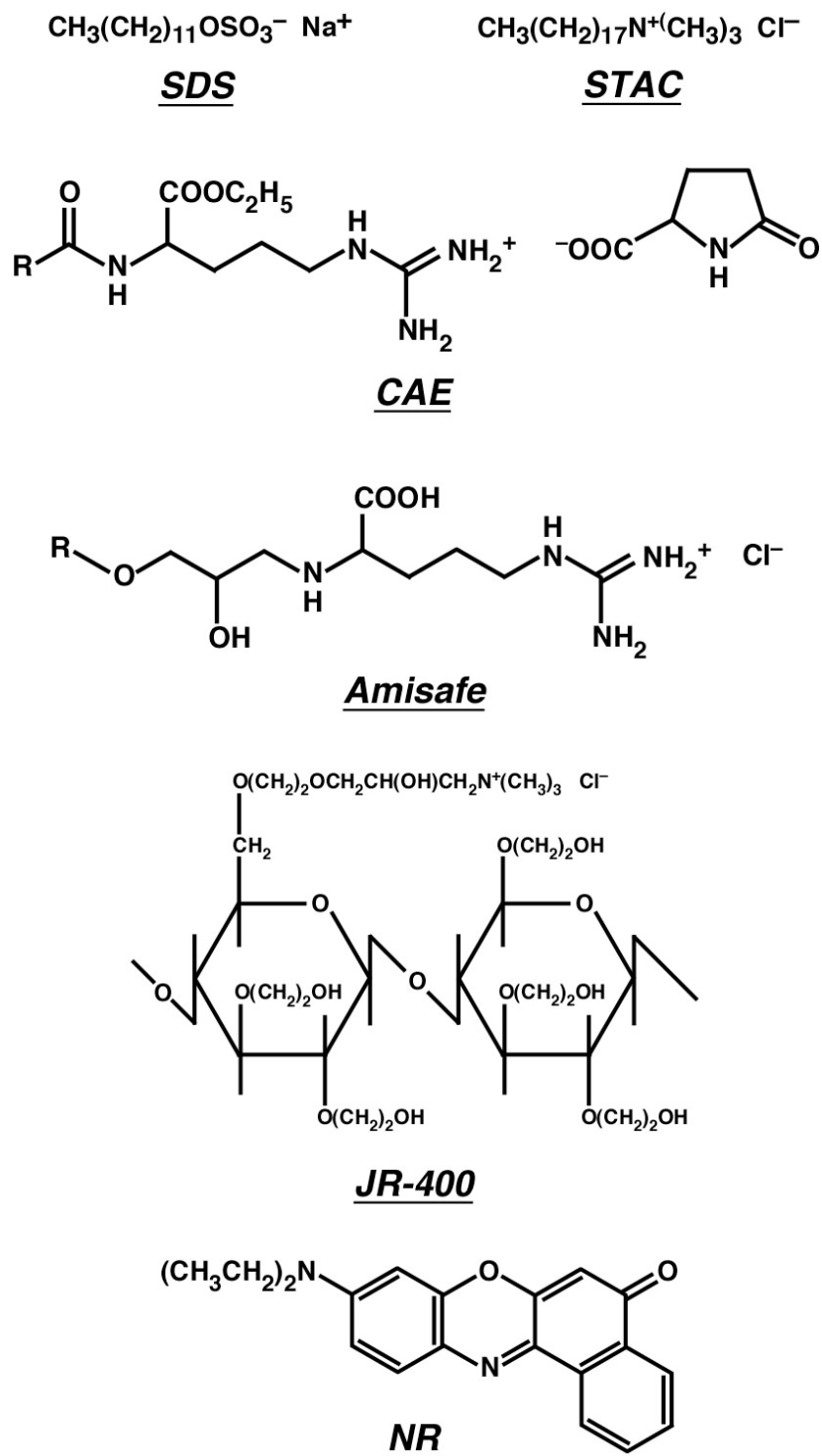


Figure 5-2 Chemical structure of reagents.

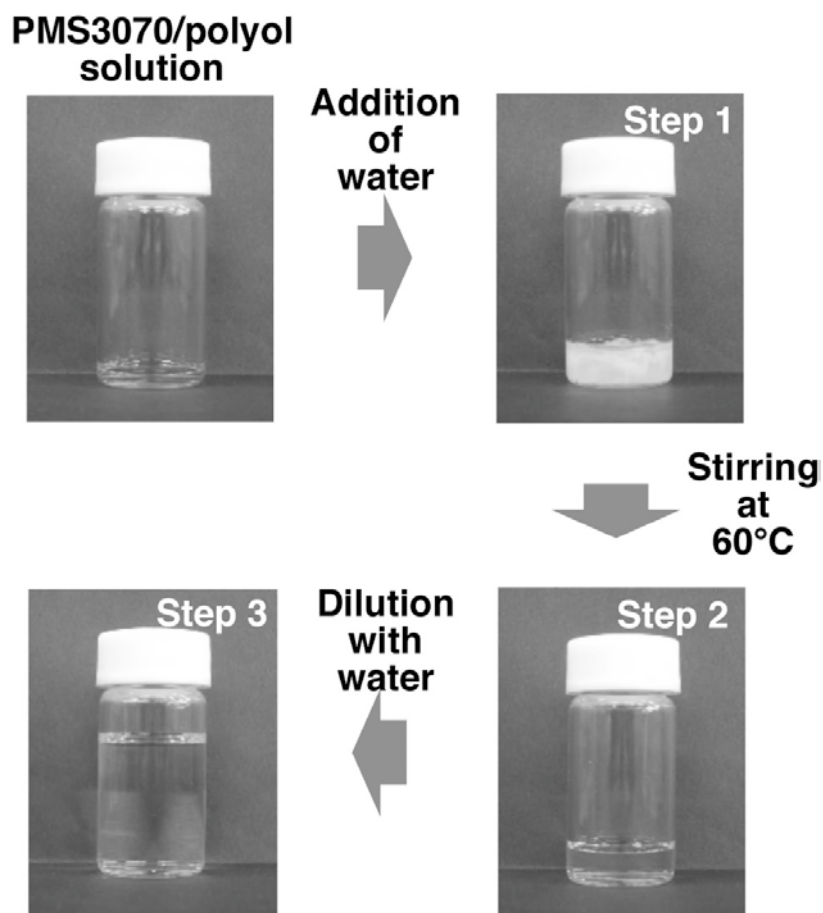


Figure 5-3 Schematic illustration of preparation of PMS3070 self-aggregates. NR was added to PMS3070/polyol for fluorescent PMS3070 self-aggregate (CSN-NR). Surfactants were added in the "Step 2". SDS was used for preparing anionic PMS3070 self-aggregate (ANS). CAE was used for preparing cationic PMS3070 self-aggregate (CNS and CNS-NR).

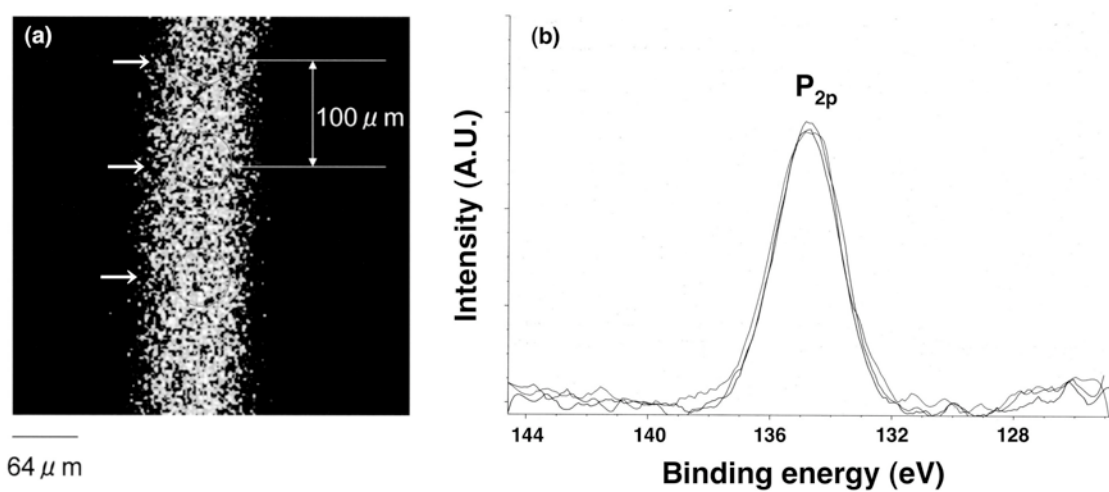


Figure 5-4 XPS analysis of the hair treated with PMS3070; (a) is a two-dimensional mapping image of O1s on the specimen and (b) is XPS spectra of P2p (“→” denotes the point of measurement).

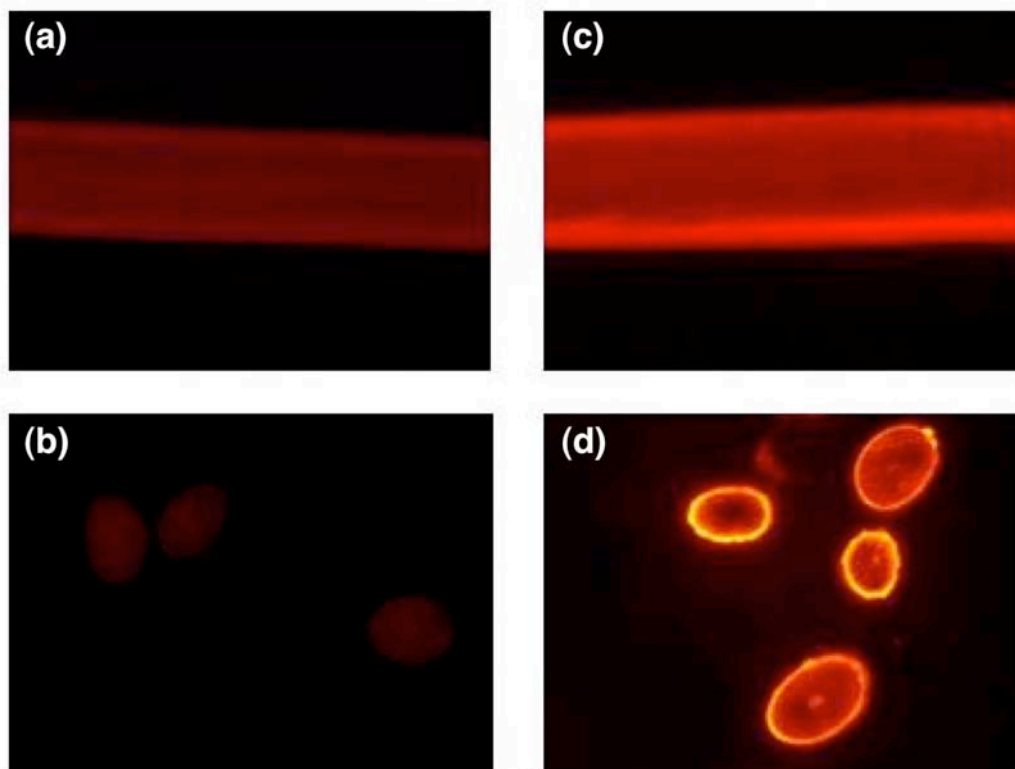


Figure 5-5 Fluorescence micrographs of the side and cross-section of hair: (a) and (b) are non-treated and (c) and (d) are treated with cationic PMS3070 self-aggregates containing Nile Red.

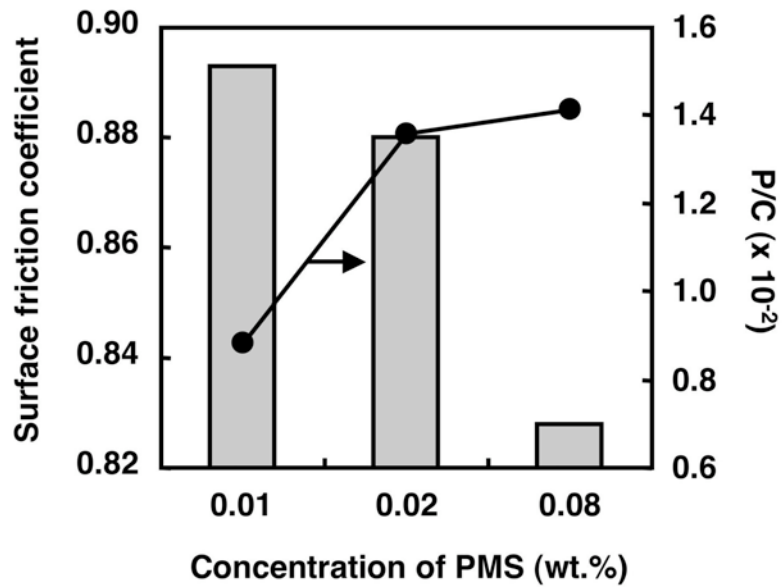


Figure 5-6 Surface friction coefficient of artificial hair treated with cationic PMS3070 self-aggregate (bar) and P/C determined by XPS analysis.

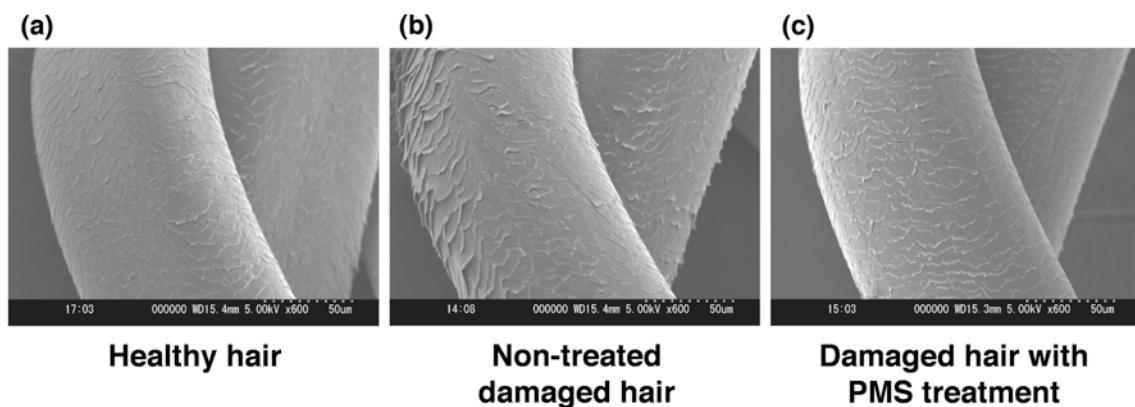


Figure 5-7 Scanning electron micrographs of hair; (a): health hair, (b): damaged hair, (c) damaged hair treated with cationic PMS3070 self-aggregate.

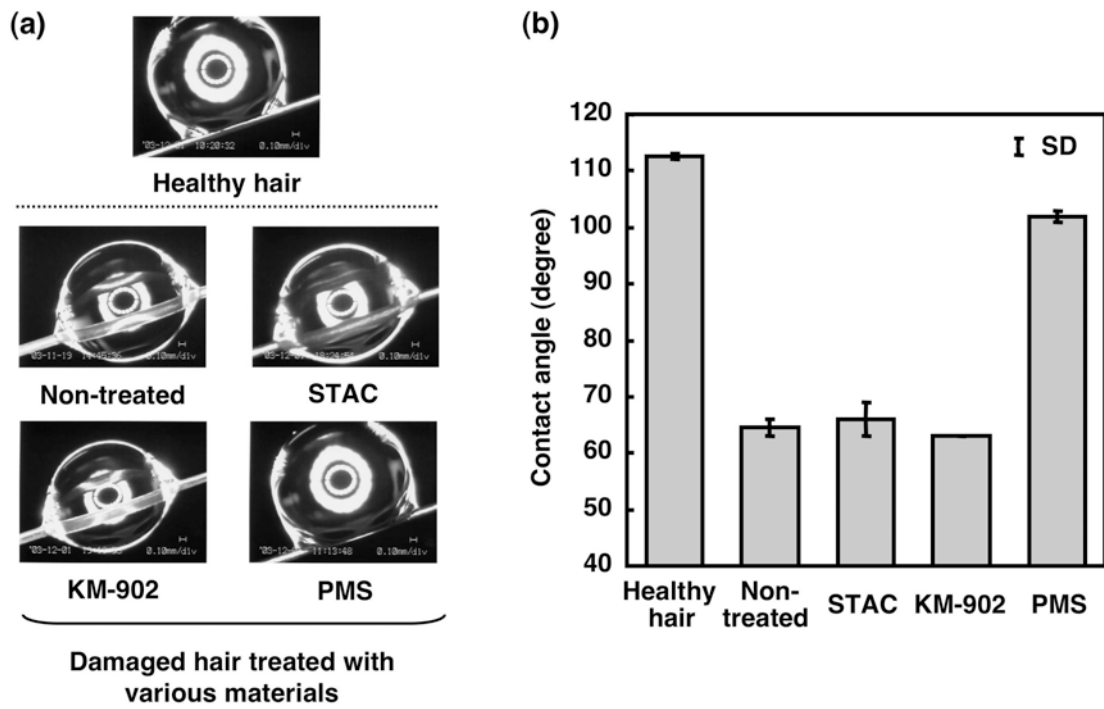


Figure 5-8 Hydrophobicity of healthy and damaged hair treated with various materials (STAC: Stearyl trimethyl ammonium chloride, KM-902: Dimethyl polysiloxane oil emulsion, PMS: cationic PMS3070 self-aggregate); (a) is photographs of specimens and (b) is contact angle for water on each hair surface.

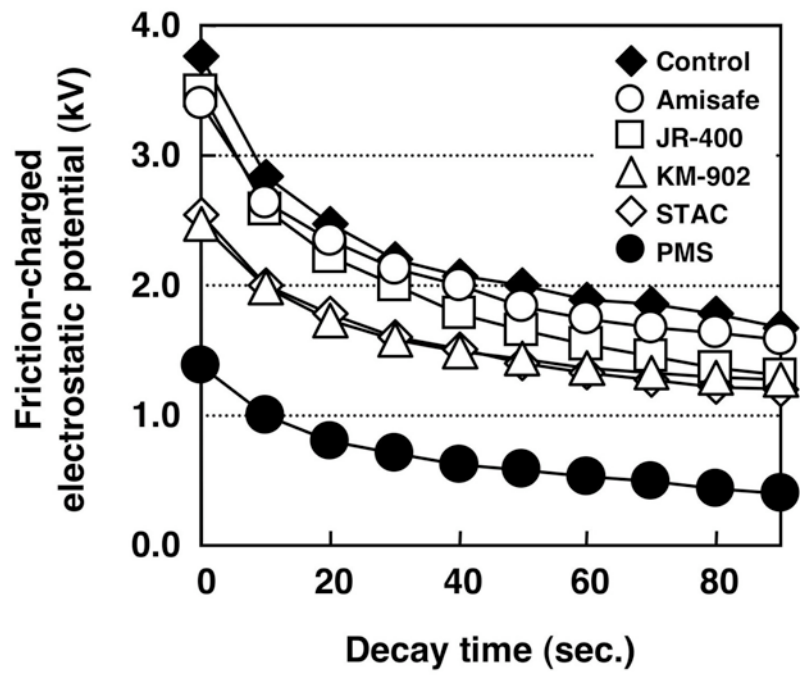


Figure 5-9 Electrostatic decay of damaged hair treated by various materials. Damaged hair without PMS treatment was used as the control.

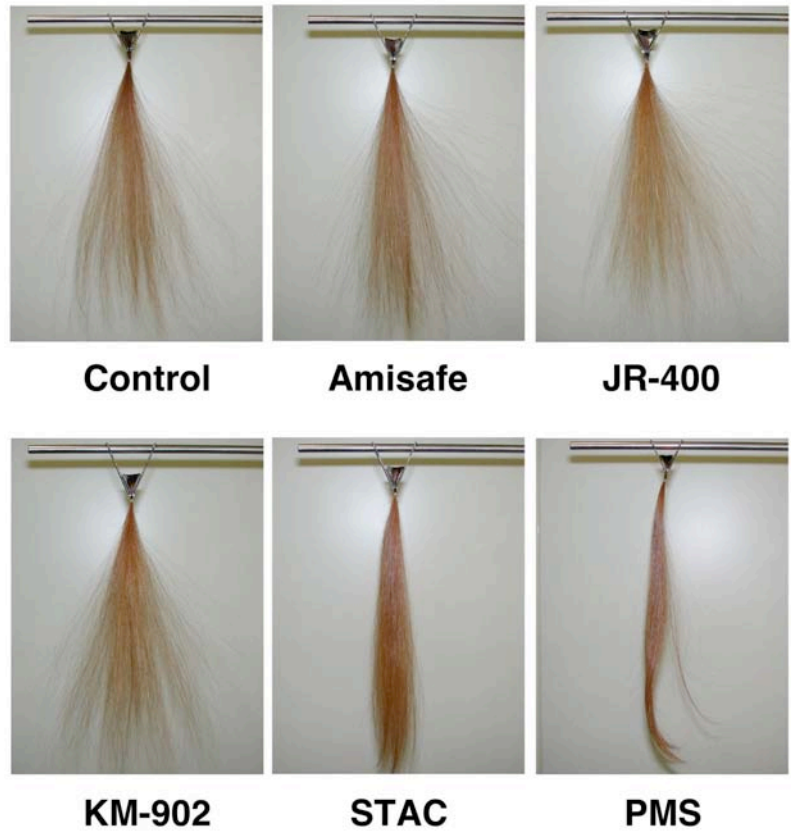


Figure 5-10 Hair fly behavior of damaged hair treated by various materials. Damaged hair without PMS treatment was used as the control.

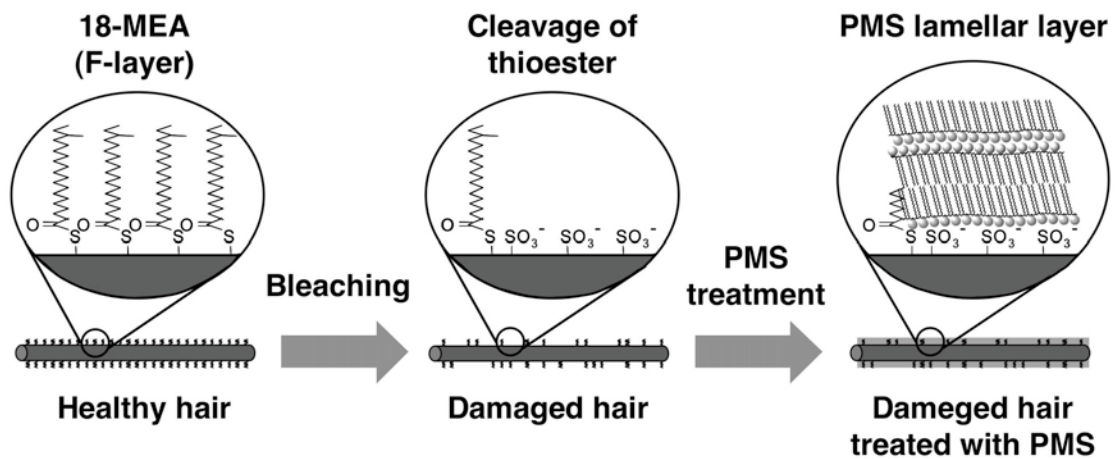


Figure 5-11 Schematic illustration of surface repairing mechanism of damaged hair treated with cationic PMS3070 self-aggregate.

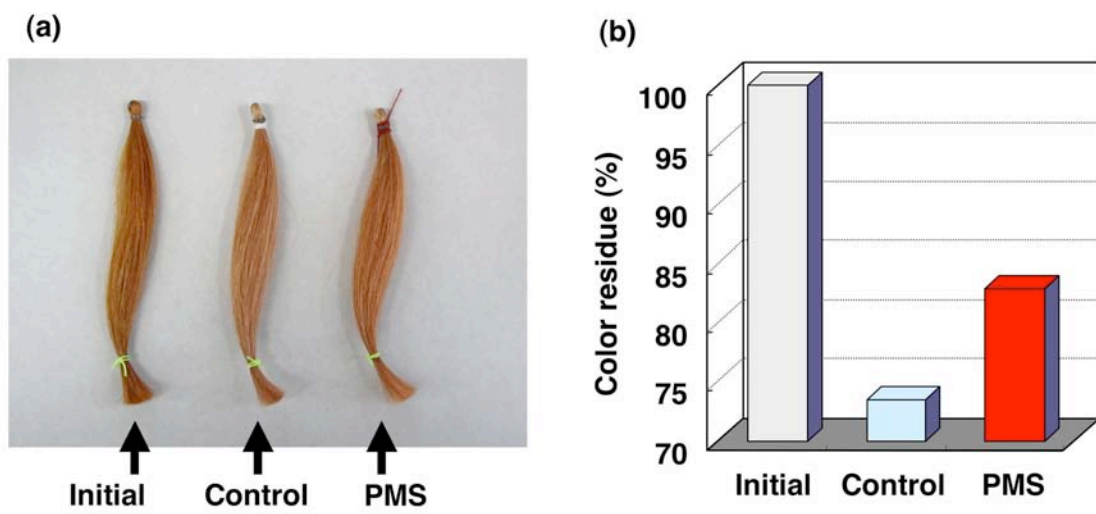


Figure 5-12 Discoloration behavior of dyed hair; (a) is a photograph of specimens and (b) is color residue of specimens. Damaged hair tested without PMS treatment was used as the control.

参考文献

1. 鈴木正人 監修, 機能性化粧品 II, シーエムシー, 159 (1996).
2. A. P. Negri, H. J. Cornell and D. E. Rivett, *Text. Res. J.*, **63**(2), 109 (1993).
3. H. Messinger, H. Hocker and H. Zahn, *Text. Res. J.*, **64**(9), 554 (1994).
4. D. J. Evans and M. Lanczki, *Text. Res. J.*, **67**(6), 435 (1997).
5. 毛髪科学技術者協会 編, 最新の毛髪科学, フレグランスジャーナル社, 219-259 (2003).
6. N. Yamamoto, H. Irie, N. Sakamoto, K. Shuto, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Oleo Sci.*, **55**(9), 465 (2006).
7. 山本宣之, 首藤健志郎, 山岸忠明, 中本義章, 高分子論文集, **64**(2), 115 (2007).
8. 河野弘美, 菅沼 薫, 古川利正, 粧技誌, **33**(4), 377 (1999).
9. J. A. Swifts and J. R. Smith, *J. Microscopy*, **204**(3), 203 (2001).

第6章 繊維加工における疎水性リン脂質ポリマーの吸着性制御と刺激低減機能の評価

6.1 緒言

アトピー性皮膚炎は増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、国内の若年層における有症率は約 10%にのぼることが明らかとなっている[1]。日本皮膚科学会が提唱する「アトピー性皮膚炎治療ガイドライン」によれば、症状緩和のための一項目として「刺激が少ない衣服の着用」が掲げられており[2]、低刺激な衣類の実現を目指して様々な研究が行われている。例えば、アレルゲンの吸着・除去および皮膚上における黄色ブドウ球菌の異常繁殖の抑制を目的とした金属フタロシアニン加工や[3]、繊維と皮膚との摩擦により発生する痒み・かきつきの緩和を目的とした滑り性の高い柔軟剤の開発などについての報告がある[4]。

一方、我々はこれまでに、分子内に生体膜リン脂質と同じホスホリルコリン基を有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) を主成分とする様々なポリマーを開発し、医療用具、生化学用機器、コンタクトレンズケア用品、化粧品などの用途に展開してきた[5]。MPC ポリマーは、高い保湿性や抗蛋白吸着能を示すことが知られているが、近年、界面活性剤の毒性低減効果が実証されるなど、新しい知見も得られている[6]。

最近では、MPC ポリマーの中でも特に、生体膜リン脂質と極めて近い構造を目指して設計されたステアリルメタクリレート (SMA) との共重合体 (PMS) について検討が進められており、これまでに、自己組織化現象を利用した分散法により 50 nm 以下の平均粒径を有する微粒子を形成すること[7]、また、この自己会合体を乾燥させると 6 nm 程度の長周期を持つ微細なラメラ構造を形成することが明らかとなっている[8] (Fig. 6-1)。このラメラ構造は、表皮においてバリア機能を司る角層細胞間脂質と類似性が高く、また、表面摩擦を低減させる機能もあることから、皮膚および毛髪の修復用素材として開発が進められている[9-11]。

これらの知見から、PMS を用いて繊維上に角層細胞間脂質類似のラメラ層を形成させることができれば、肌に対する負担が極めて少ない肌着を実現することができると考えられるが、そのためには、簡便かつ高効率な加工法の確立が必要である。そこで本研究では、PMS 自己会合体の表面電位を制御すること

により、繊維に対して効率良く吸着させる方法について検討した。また、得られた加工生地について、表面分析による PMS の吸着性評価と、蛍光顕微鏡による PMS 皮膜層の観察を行った。また、PMS 加工による洗濯洗剤の付着防止効果、および、界面活性剤の毒性低減効果について評価した。

6.2 実験

6.2.1 試薬

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC)、ステアリルメタクリレート (SMA)、重合開始剤 t-ブチルパーオキシネオデカノエート (商品名「パーブチル ND」) (いずれも日本油脂株式会社製) は、精製せずに用いた。蛍光物質の Nile Red (ICN Biomedicals 製)、および、その他の試薬については、市販の試薬特級品を用いた。

6.2.2 PMS 自己会合体の調製

2.2.2 および 2.2.3 に記載の方法により、MPC と SMA のラジカル共重合体である PMS3070 の自己会合体分散液 (以下、NS) を調製した。また、2.2.4 に記載の方法により、ポリマーに対して蛍光物質 (Nile Red) を 0.1 wt.% 内包化した自己会合体分散液 (以下、F-NS) を調製した。

6.2.3 PMS 自己会合体の表面電位測定

NS をイオン交換水で希釈してポリマー濃度を 1 g/L とした後、塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を適量添加して pH 調整を行い、電気泳動光散乱法 (レーザードロッパー法) により、PMS3070 自己会合体表面の表面電位を測定した。

6.2.4 綿生地の加工

NS または F-NS をイオン交換水で希釈してポリマー濃度を調整し、塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を適量添加して pH 調整を行った。この溶液に JIS 標準白布綿 (以下、JIS 綿) を投入し、室温にて 30 分間攪拌した後、取り出して脱水、乾燥させた。

6.2.5 X線光電子分析および蛍光顕微鏡観察

NS加工（ポリマー濃度 0.1 g/L、pH 3.3、3.8、7.4）した JIS 綿について X線光電子分析（X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS）を行ない、リン原子のピーク強度から、繊維表面に対する PMS3070 の吸着性を評価した。

また、F-NS加工（ポリマー濃度 0.1 g/L、pH 3.3）した JIS 綿をほぐして単繊維とし、蛍光観察用スライドガラスに貼り付けて蛍光顕微鏡観察を行なった。単繊維の断面については、OCT コンパウンド（Tissue-Tek 製）を満たしたクリオモルド（Tissue-Tek 製）中に複数の単繊維を包埋後、 -20°C にて凍結し、クリオスタット（HM500OM、Microm 製）を用いて作製した厚さ約 $5\mu\text{m}$ の凍結切片を蛍光観察用スライドガラスに貼り付けて蛍光顕微鏡観察を行なった。

6.2.6 洗剤残存性の評価

NS加工（ポリマー濃度 0.2 または 0.4 g/L、pH 3.3）した JIS 綿を $5\times 5\text{ cm}$ に切断して試験布とした。アルキル硫酸塩を主成分とする家庭用洗剤をイオン交換水で希釈し、濃度 5 g/L の洗剤溶液を調製した後、この洗剤溶液 50 mL 中に試験布を投入して、5 分間攪拌した。その後、50 mL のイオン交換水中で 5 分間攪拌してすすぎ操作を行った。すすぎ操作 0、1、2 回の試験布について乾燥後に XPS 測定を行い、表面に存在する硫黄原子と炭素原子の存在数比（S/C）を算出した。得られた S/C 値から、試験布表面における洗剤残存性を評価した。

6.2.7 三次元培養皮膚を用いた毒性低減効果の評価

NS加工（ポリマー濃度 0.1 または 0.4 g/L、pH 3.3）した JIS 綿をパンチャーで直径 6.5 mm の円形に打ち抜いて試験布とした。また、JIS L-0848 に従って調製された酸性人工汗液中に、細胞毒性物質としてドデシル硫酸ナトリウム（SDS）7 g/L を溶解させて、試験液とした。

三次元培養皮膚モデルについては、表皮と真皮を併せ持つモデルである「Vitrolife Skin」（24 ウェルタイプ、グンゼ株式会社製）および表皮層のみからなるモデルである「LabCyte EPI-MODEL」（24 ウェルタイプ、ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング製）を使用し、1 検体あたり 3 個の皮膚モデルを用いて評価した。それぞれの皮膚モデルと試験法の概要を Fig. 6-2 に示す。

毒性低減効果の評価については、JIS L-1918 を参考にして、以下の手順にて

行った。まず、培養皮膚表面に試験布を貼付し、この試験布に対して 2 倍重量の試験液を含浸させて、CO₂ インキュベータ内に 24 時間、静置した。生細胞のみを染色する色素 MTT を用いて生細胞を染色した後、皮膚モデルをポンチでくり抜き、所定の抽出溶媒にて色素を抽出して、抽出液の吸光度を測定した。SDS を含まない酸性人工汗液を含浸させた未加工 JIS 綿を陰性対照（細胞生存率 100 %）とし、得られた吸光度から、3 個の皮膚モデルにおける細胞生存率の平均値を算出した。

6.3 結果と考察

6.3.1 PMS 自己会合体の表面電位

生体膜リン脂質に含まれる極性基であるホスホリルコリン基（PC 基）には、リン酸残基とコリン残基が同数存在するために、理論上は電気的に中性であると考えられている。また、ジパルミトイルホスホリルコリンを主成分とする PC リポソームの測定例においても、緩衝液中では表面電位が 0 mV であることが報告されている[12]。しかしながら、液中の塩濃度が極めて低い場合には表面電位は pH に応じて変化し、pH 4 付近を等電点として酸性側では正電荷、中性から塩基性側では負電荷を帯びることが明らかにされている[13、14]。PC リポソームが中性から塩基性条件下で負に帯電する理由については、PC 基の部分的な加水分解や、溶液中に存在する負電荷成分のリポソーム表面への吸着などが考えられる。また、pH の減少に伴って表面電位が上昇する理由については、PC 基中のリン酸残基に対して水素イオンが付加することにより、コリン残基の正電荷が表面電位に影響を及ぼすためと考えられる。これらの知見から、PMS3070 自己会合体中の PC 基について、溶液の pH 調整により荷電状態を制御できる可能性が示唆された。

そこで本研究では、様々な pH における PMS3070 自己会合体の表面電位について電気泳動光散乱法により測定を行った。その結果、PMS3070 自己会合体は pH 3.8 付近を等電点として、酸性側では正電荷、中性から塩基性側では負電荷を帯びることが明らかとなった（Fig. 6-3）。

6.3.2 綿に対する PMS 自己会合体の吸着性

セルロースは分子鎖の末端が酸化されやすく、酸化によりカルボキシル基を

生じる。綿はセルロースの集合組織であるため、綿を水中に置くと表面が負電荷を帯びることが知られている。杉原らによれば、水中における木綿の表面電位は-2 から-10 mV 程度であることが報告されている[15]。この性質を利用して、例えば繊維に柔軟性を付与するために、長鎖アルキル基を有するカチオン性界面活性剤やアミノ変性シリコーンを静電吸着させる方法が広く用いられている。

本研究では、pH 調整により表面の荷電状態を変化させた PMS3070 自己会合体を用いて、綿に対する吸着性を評価した。XPS を用いた表面リン原子の分析から、溶液の pH を 3.3 に制御した系ではポリマーの吸着が見られたのに対して、pH 3.8 以上ではほとんど吸着が見られなかった (Fig. 6-4)。これらの結果から、pH 調整により正に帯電した PMS3070 自己会合体が、水中で表面が負に帯電した綿に対して静電吸着したと考えられる。

6.3.3 蛍光顕微鏡観察

Nile Red を内包化した PMS3070 自己会合体を用いて、酸性条件下にて綿への吸着加工を行なった。得られた試料を単繊維にほぐして蛍光顕微鏡観察を行なったところ、繊維表面における蛍光が確認された (Fig. 6-5)。Nile Red は疎水性の蛍光プローブであり、極性環境下ではほとんど蛍光を発しないが、非極性環境下では強い蛍光を示すことが知られている[16]。本試験において明瞭な蛍光が確認されたことから、PMS3070 中のステアシル基が凝集した疎水場を形成しており、Nile Red はその中に存在すると考えられる。これらの結果から、綿繊維表面における PMS3070 のラメラ層形成が示唆された。また、単繊維の断面観察において繊維の周囲に蛍光が強く見られたことから、PMS3070 が繊維表面を被覆していることが明らかとなった (Fig. 6-6)。PMS3070 被覆層の正確な厚さを断面像から判断することは困難であるが、少なくともサブミクロン程度の厚さをもつことが推察される。

6.3.4 洗剤残存性

アルキル硫酸塩(AS) は優れた洗浄効果を有する界面活性剤であり、洗濯洗剤の主成分として多く用いられている。しかしながら、洗濯後のすすぎが不十分な場合には生地に残留し、皮膚炎症状を増悪させることが指摘されている。「厚生労働科学研究・アトピー性皮膚炎治療ガイドライン 2005」においても「洗

剤はできれば界面活性剤の含有量の少ないものを使用する」ことが推奨されており[1]、また、洗剤を使わずに洗濯が可能な洗濯機が市販されるなど、アトピー性皮膚炎患者のみならず、一般消費者における関心も高い。

本研究では、PMS3070 自己会合体で加工した JIS 綿 (PMS 加工布) を洗濯した際に、繊維表面に残存する AS 量について XPS により評価した。その結果、加工濃度の増加に従って、繊維表面における AS 残存量が減少した (Fig. 6-7)。また 2 回のすすぎを行った試料について、未加工布では AS が検出されたのに対して、PMS 加工布では検出限界以下まで減少した。これらの結果から、PMS 加工布は AS の付着を妨げることに、また、付着した AS についても、すすぎによって容易に除去されることが明らかとなった。

6.3.5 毒性低減効果

三次元培養皮膚はヒト由来の皮膚細胞を三次元的に再構築した細胞モデルであり、近年、化粧品や繊維製品の皮膚一次刺激を予測するための有力な *in vitro* 評価系として多く用いられるようになってきた。皮膚モデルを検体に一定時間接触させた後の細胞生存率と、動物試験における皮膚一次性刺激の評価点数 (Draze 法) は高い相関性を示すことが報告されており[17]、ヒトが繊維製品を着用した際の化学的刺激の有無を予測することが可能な評価法として、JIS L-1918「繊維製品の皮膚一次刺激性試験方法 - 培養ヒト皮膚 モデル法」として標準化されている。本研究ではこれを一部改変し、細胞毒性を示す界面活性剤である SDS を試験布に含浸させて試験を行うことにより、PMS 加工によって SDS の毒性が低減されるか、2 種類の培養皮膚モデルを用いて検討した。

試験の結果、PMS 加工濃度の増加に従って細胞生存率が向上したことから、PMS 加工は SDS の毒性を低減させることが明らかとなった (Fig. 6-8)。Vitrolife Skin は真皮と表皮からなるモデル、LabCyte EPI-MODEL は表皮のみからなるモデルであるが、いずれの培養皮膚モデルにおいても同様な傾向であった。

SDS の毒性を低減させる機構として、(a) ポリマー皮膜中に SDS が吸着されることにより皮膚への移行が妨げられた、(b) 生地から溶出した PMS が SDS と相互作用することにより毒性を低減させた、(c) 生地から溶出した PMS が細胞と相互作用することにより SDS に対する耐性が付与された、などが考えられる。洗剤の残留性試験から、ポリマー皮膜上には活性剤が残留しにくいことが明らかとなっているため、(a) の可能性は低い。従って、PMS 自己会合体

加工による毒性低減機能は、(b) または (c) の機構に基づき、繊維表面に付着したポリマーが少量溶出することにより、発現されると考えられる。

6.4 結論

本研究では、疎水性リン脂質ポリマー (PMS3070) の自己会合体について、表面電位による繊維への吸着性制御、および、吸着加工によりもたらされる洗剤付着防止効果と毒性低減効果について評価した。

まず、電気泳動光散乱法による表面電位測定から、PMS3070 自己会合体は pH に依存して表面電位を変化させ、中性から塩基性条件下ではゼロまたは負に帯電するのに対して、酸性条件下では正に帯電することが明らかとなった。表面が正に帯電する条件で綿繊維を加工することにより、低濃度でも効率よく吸着することが XPS 測定から明らかとなった。また、蛍光顕微鏡観察から、ポリマーが綿繊維の表面を被覆し、ラメラ構造を形成していることが示唆された。

洗剤残存性試験からは、未加工布に比べて PMS 加工布は洗濯洗剤の主成分であるアルキル硫酸塩 (AS) が付着しにくく、また、すすぎにより容易に AS が除去されることが明らかとなった。さらに、三次元培養皮膚を用いた評価から、PMS 加工布は、界面活性剤 (SDS) の毒性を低減させることが明らかとなった。

以上の結果から、PMS 加工布は化学的刺激の原因となる界面活性剤の付着を抑制し、その毒性を低減することが明らかとなった。今後、皮膚障害を持つ患者のための肌着用加工剤として、応用が期待される。

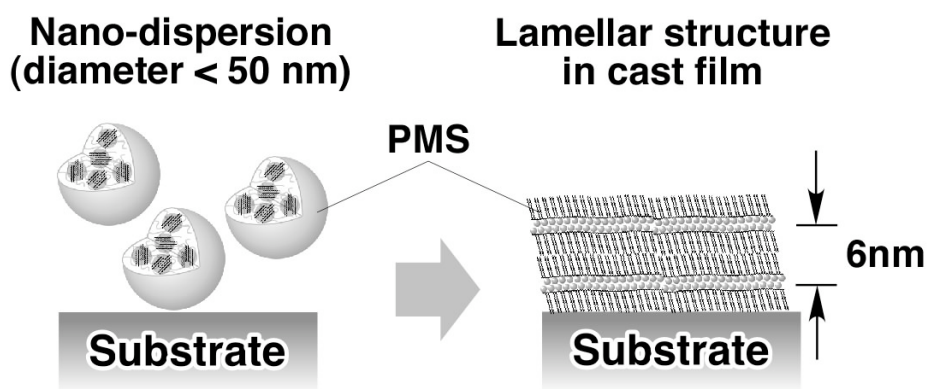


Figure 6-1 A schematic illustration of lamellar structure formed by drying of PMS3070 self-aggregates.

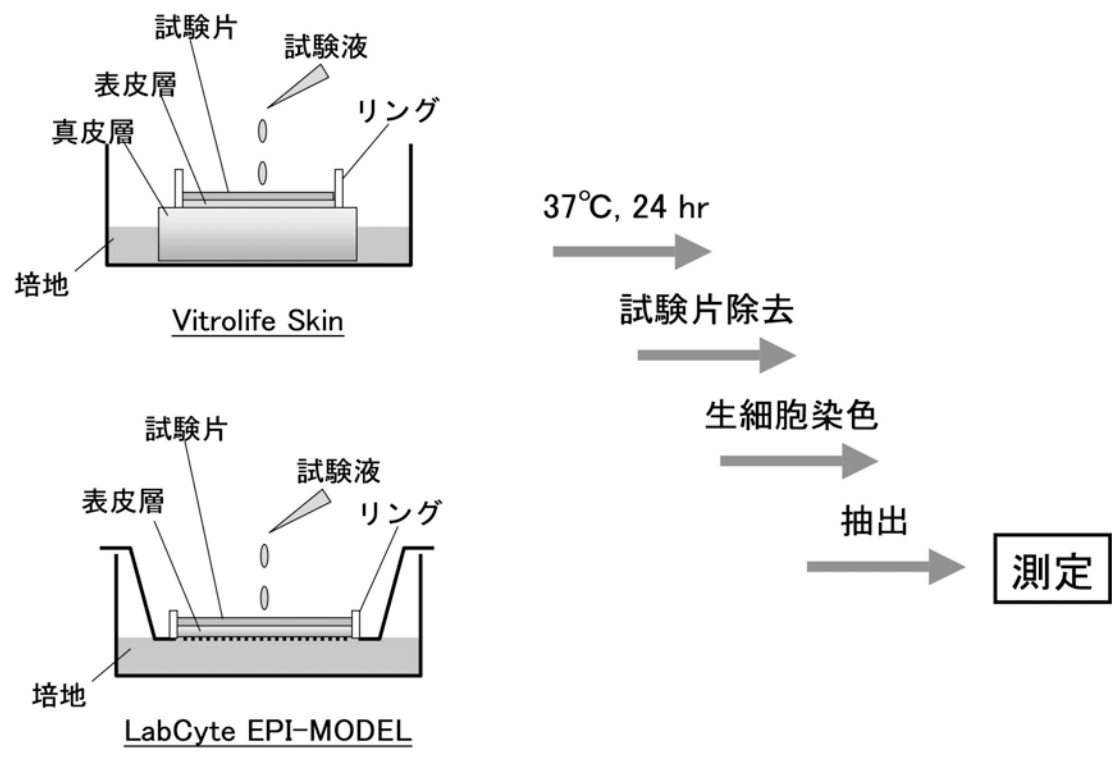


Figure 6-2 A schematic illustration of three-dimensional skin models and outline of the evaluation procedure.

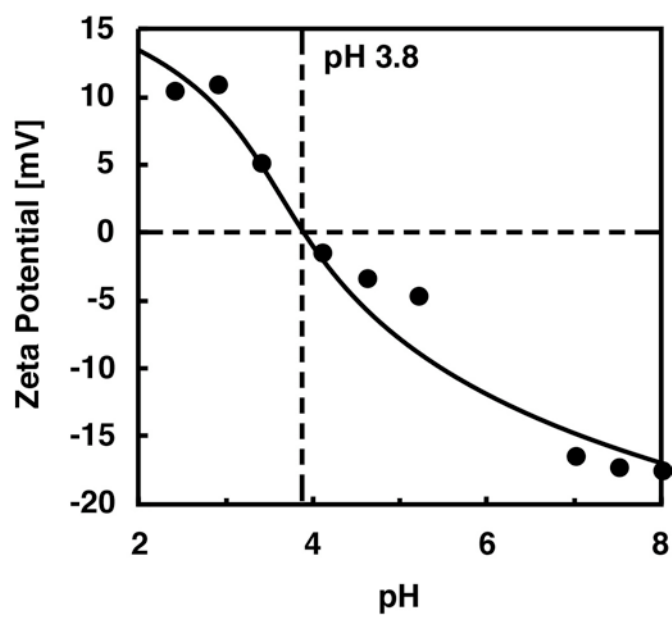


Figure 6-3 Zeta potential profile of PMS3070 self-aggregates as a function of pH.

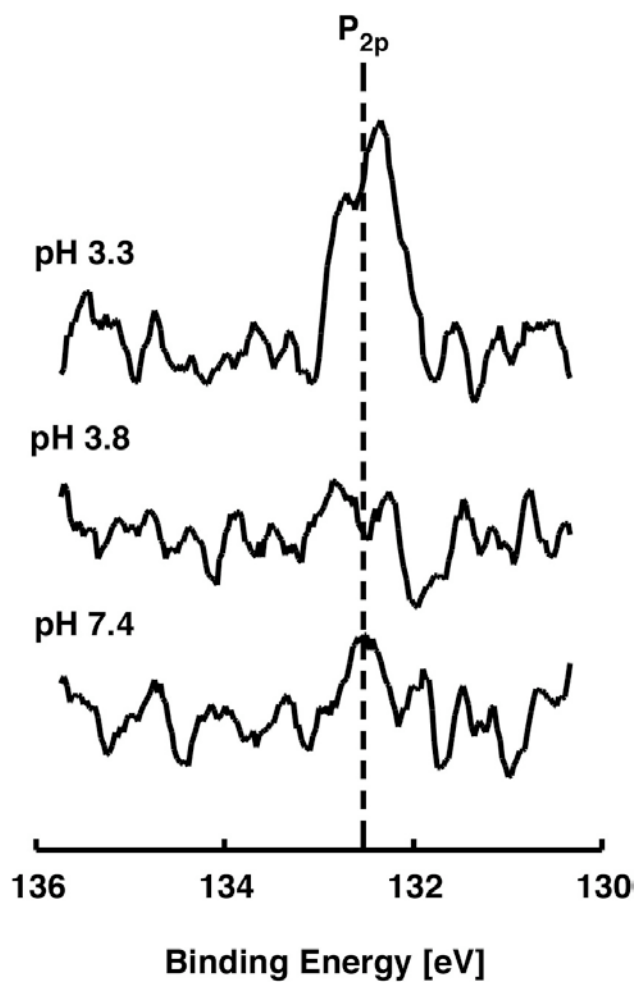


Figure 6-4 XPS spectra of P_{2p} on cotton fabric surface treated with PMS3070 self-aggregates at various pH.

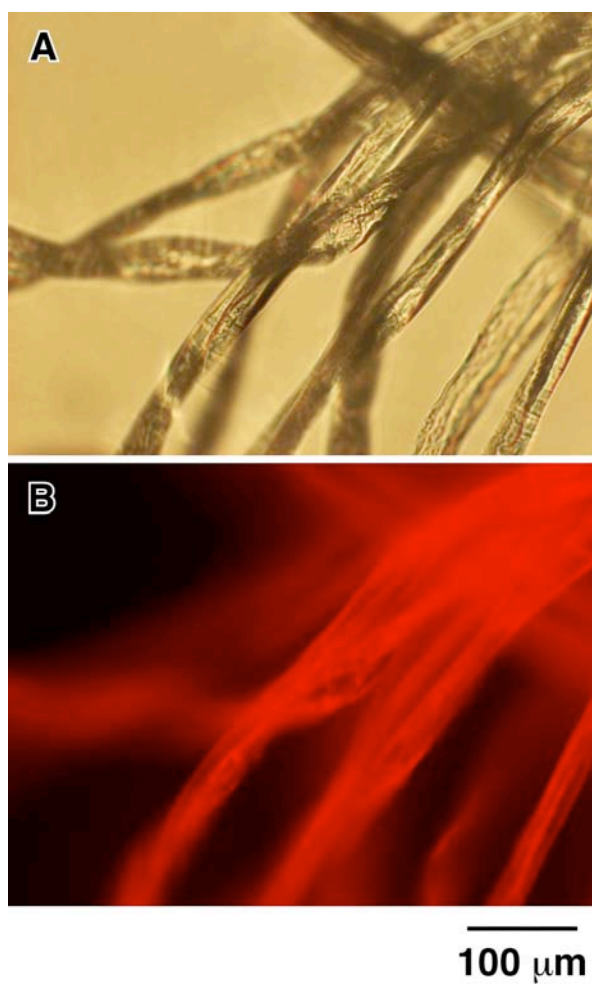


Figure 6-5 Optical micrographs of the surface of JIS cotton fibers treated with PMS3070 self-aggregates containing Nile Red: (A) Brightfield image, (B) Fluorescence image.

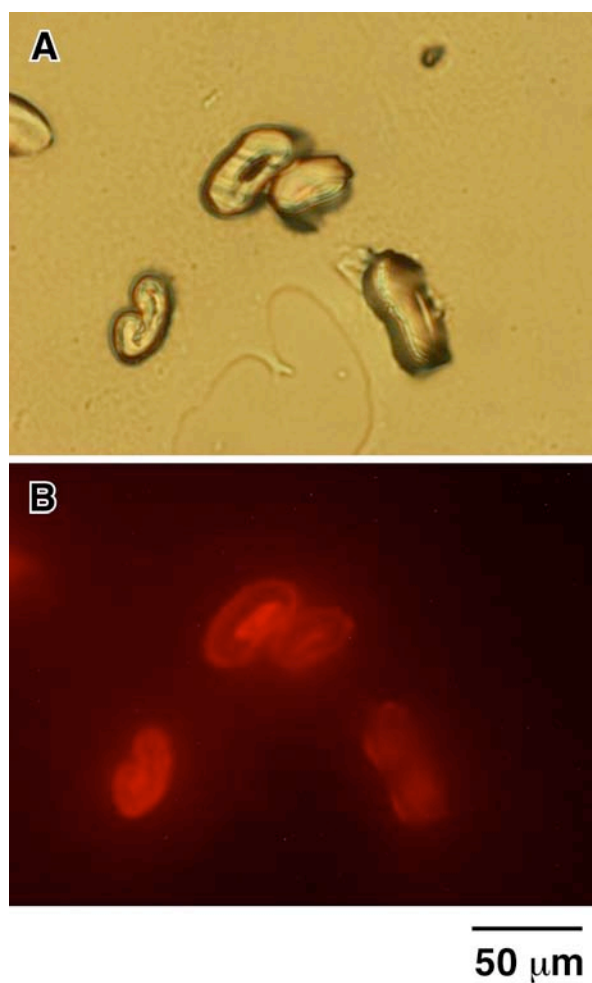


Figure 6-6 Optical micrographs of cross-section of JIS cotton fibers treated with PMS3070 self-aggregates containing Nile Red: (A) Brightfield image, (B) Fluorescence image.

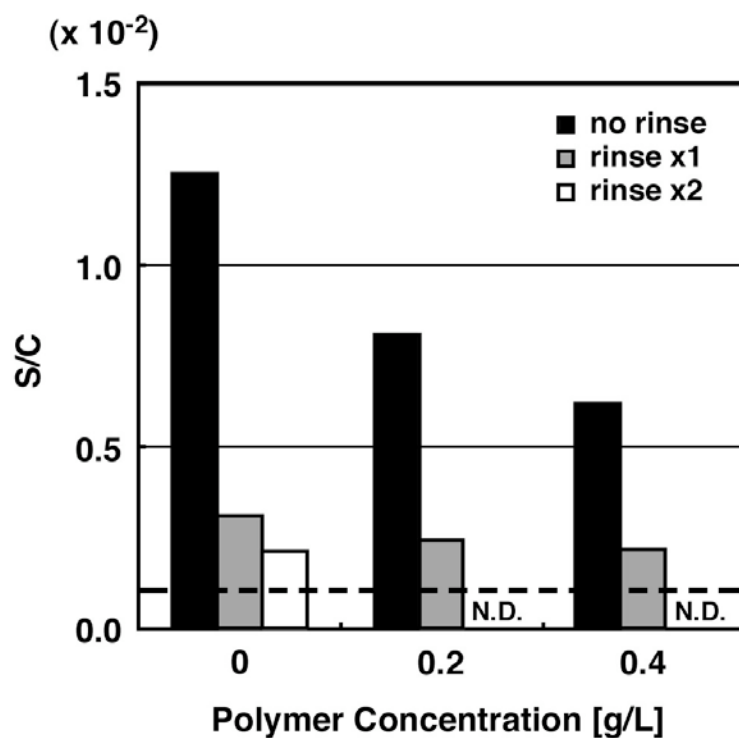


Figure 6-7 S/C obtained from XPS quantitative analysis of PMS3070 treated cotton fabric after washing with laundry detergent. Break line denotes the minimum detectable quantity of S/C (approx. 0.1×10^{-2}).

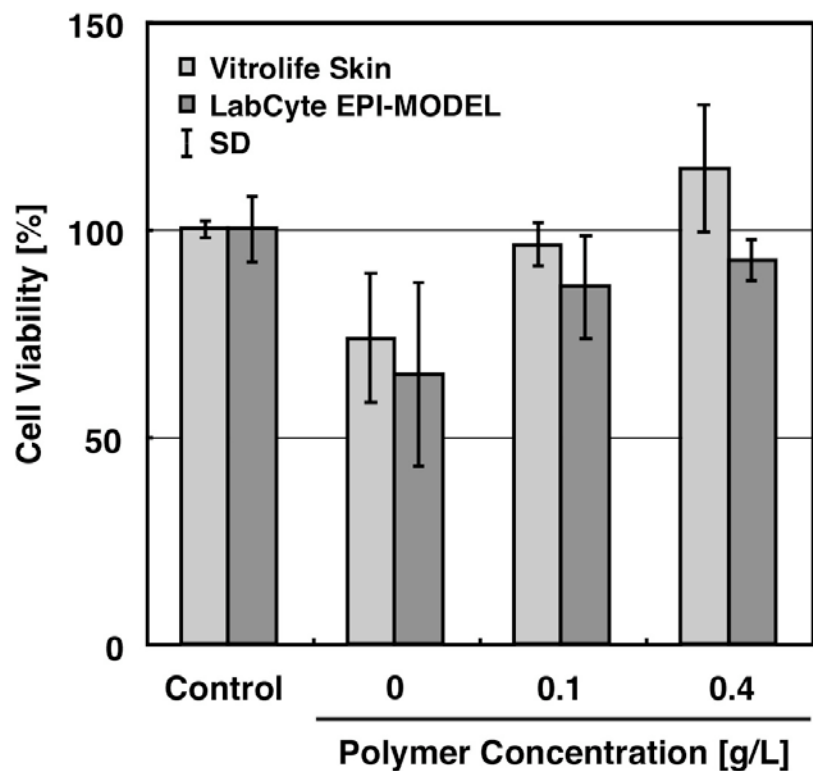


Figure 6-8 Cell viability in three-dimensional skin model attached to PMS3070 treated cotton fabric for 24 hours. The specimen was instilled with artificial sweat containing 7 g/L of sodium dodecyl sulfate as a cytotoxic reagent.

参考文献

1. "Guidelines for Therapy for the Treatment of Atopic Dermatitis 2005", Health Labour Sciences Research (2005).
2. M. Furue, F. Furukawa, M. Hide and K. Takehara, *The Japanese Journal of Dermatology*, **114**(2), 135 (2004).
3. H. Shirai, M. Kimura, T. Tsuiki and T. Sugihara, *Polyfile*, 43(509), 18 (2006).
4. T. Shimizu, Y. Obayashi, Y. Tanaka, Y. Odake, M. Odera and S. Watanabe, *Japanese Journal of Dermatology*, **116**(5), 767 (2006).
5. N. Yamamoto, H. Fukui, S. Yamada and K. Shuto, *JETI*, **53**(1), 147 (2005).
6. M. Tsuchida and K. Shimada, *Fragrance Journal*, **28**(12), 118 (2000).
7. N. Yamamoto, H. Irie, N. Sakamoto, K. Shuto, T. Yamagishi and Y. Nakamoto, *J. Oleo Sci.*, **55**(9), 465 (2006).
8. N. Yamamoto and K. Shuto, *Preprints of the 8th SPSJ International Polymer Conference*, 425, (2005).
9. H. Fukui, K. Awai and K. Shimada, *Fragrance Journal*, **33**(1), 97 (2005).
10. K. Awai, H. Fukui and K. Shimada, *Bio Industry*, **22**(9), 45 (2005).
11. K. Shimada, K. Awai, H. Fukui and N. Yamamoto, *SPC Asia*, **43**, 14 (2006).
12. S. Ando, H. Tsuge and T. Mayumi, *Colloid Polym. Sci.*, **274**(2), 178 (1996).
13. H. Matsumura, F. Mori, K. Kawahara, C. Obata and K. Furusawa, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **92**, 87 (1994).
14. "Application report No. Zeta-SCJ03010", Sysmex (2003).
15. R. Sugihara, H. Tamai, K. Moriyama and T. Suzawa, *Yukagaku*, **40**(1), 32 (1991).
16. P. Greenspan and S. D. Fowler, *J. Lipid Res.*, **26**(7), 781 (1985).
17. K. Morota, N. Morikawa, S. Morita, H. Kojima and H. Konishi, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, **17**, 87 (1998).

第7章 結語

本論文では、疎水性リン脂質ポリマーを合成し、その自己会合体を得るための調製法について検討した。また、この疎水性リン脂質ポリマー自己会合体について、疎水性薬物に対する可溶化能、表面電位の制御法、ならびに乾燥皮膜中の微細構造を明らかにし、新規な医薬品・化粧品・繊維加工用素材としての有用性について評価した。

第1章では研究背景として、リポソームなどの低分子リン脂質自己会合体とリン脂質ポリマーについて概観し、本研究の疎水性リン脂質ポリマーに期待される機能について述べた。

第2章では、疎水性リン脂質ポリマーの合成、自己会合体の調製法の検討、得られた自己会合体の特性について述べた。まず、ホスホリルコリン基含有メタクリレートモノマーとステアシル基含有メタクリレートモノマーをラジカル共重合することにより、疎水性リン脂質ポリマー (PMS) を得た。PMS を特定のアルコールと水の混合溶媒中で加熱攪拌することにより、平均粒径 50 nm 以下の自己会合体が得られることを明らかにした。また、PMS の可溶化能について評価した結果、疎水性の強い生理活性物質を安定に可溶化できることがわかった。PMS は高い可溶化能をもつにもかかわらず、界面活性能が低いために細胞毒性が低く、優れた安全性をもつことが明らかとなった。

第3章では、PMS 自己会合体の乾燥皮膜中に形成される微細構造について検討した。示差走査熱量分析、X線構造解析、透過型電子顕微鏡観察の結果、皮膚や毛髪中の細胞間脂質と構造類似性の高いラメラ層が PMS 乾燥皮膜中に自発的に形成されることが明らかとなった。

第4章では、PMS の刺激低減機能および皮膚に対する有用性について評価した。その結果、PMS の存在により界面活性剤の細胞毒性や皮膚刺激性を低減することができ、また、PMS を皮膚に塗布することにより、皮膚からの水分蒸散を抑制して角層水分量を向上させることがわかった。

第5章では、アニオン性またはカチオン性の界面活性剤と複合化させた PMS 自己会合体の表面電位と毛髪に対する有用性について評価した。PMS 自己会合体は、界面活性剤との複合化により粒径を変化させることなく表面電位のみを変化させることが明らかとなった。パーマやブリーチなどにより損傷した毛髪は、脂質の加水分解により硫酸残基が露出するため、表面がアニオン性となる。そのためカチオン性 PMS 自己会合体は、ダメージ毛髪の表面および内部の空隙に浸透・吸着し、毛髪の表面状態や撥水性を健康毛髪とほぼ同等にまで回復させることが明らかとなった。

第6章では、PMS 自己会合体表面電位の pH 依存性と繊維加工剤としての有用性について評価した。PMS 自己会合体は酸性領域で正に帯電し、綿繊維に対して低濃度でも効率よく吸着することが X 線光電子分析から明らかとなった。また、三次元培養皮膚を用いた評価から、PMS 加工により界面活性剤の毒性を低減させることが明らかとなった。

本研究で得られた PMS 自己会合体は、生体適合性の高い可溶化剤として応用価値が高く、また、乾燥後は薬物保持層として機能することが期待される。また、会合体の表面電位を容易に制御可能であること、ポリマー自身が皮膚や毛髪に対して高い保護・修復機能を示すことから、機能性素材として医薬品・化粧品・繊維加工分野での幅広い応用が期待される。

謝辞

本論文を結ぶにあたり、ご指導、ご協力を頂いた方々に慎んで感謝申し上げます。

本研究の遂行において終始、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました、金沢大学大学院 自然科学研究科 物質科学専攻 先端機能物質講座 中本義章先生、山岸忠明先生に厚くお礼申し上げます。

また、本論文の査読とご助言を賜りました、金沢大学大学院 自然科学研究科 物質科学専攻 先端機能物質講座 加納重義先生、物質科学専攻 物質情報解析講座 宮岸重好先生、浅川 毅先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、日本油脂株式会社の片野まゆみ氏、岩佐 武氏、入江博文氏、坂元伸行氏、田中信治氏から、さまざまなお協力を戴きました。また、同社の福井洋樹氏、首藤健志郎氏をはじめ、ライフサイエンス事業部の皆様から多くの有意義なお助言を戴きました。心より感謝申し上げます。

その他、クライオ-TEM 観察については日本エフ・イー・アイの青山一弘氏にご協力を頂きました。また、マイクロモード XPS による表面分析については、日本電子株式会社・電子光学機器営業本部の飯島善時氏ならびに同社・第1技術本部の皆様にご協力いただきました。深く感謝いたします。

最後に、常に励まし支えてくれた妻・恵子と家族、友人達に心から感謝いたします。

公表した論文

1. 参考論文

1. Nobuyuki Yamamoto, Hirofumi Irie, Nobuyuki Sakamoto, Kenshiro Shuto, Tada-Aki Yamagishi and Yoshiaki Nakamoto, "Self-aggregates of highly hydrophobic phospholipid polymers in aqueous solution", *Journal of Oleo Science*, **55**(9), 465-471 (2006).
2. 山本宣之, 首藤健志郎, 山岸忠明, 中本義章, "疎水性リン脂質ポリマーフィルム中に形成されるモザイク状ラメラ構造", 高分子論文集, **64**(2), 115-118 (2007).
3. 山本宣之, 山岸忠明, 中本義章, "疎水性リン脂質ポリマーの吸着性制御と刺激低減機能の評価", 繊維学会誌, **63**(3), 68-73 (2007).

2. 副論文

なし

国際学会発表要旨

1. Nobuyuki Yamamoto and Kenshiro Shuto, "Aqueous Nanodispersion of Water-insoluble Phospholipid Polymers", *Preprints of the 8th SPSJ International Polymer Conference*, 425 (2005).

講演要旨

1. 山本宣之, "リン脂質ポリマー製品開発における表面分析", JEOL EPMA・表面分析ユーズミーツィング, 131-137 (2006).

専門誌

1. 山本宣之, "生体親和性繊維加工剤『Lipidure (リピジュア)』", 加工技術, **39**(2), 137-140 (2004).
2. 山本宣之, 福井洋樹, 山田 智, 首藤健志郎, "生体適合材料の技術開発", JETI, **53**(1), 147-149 (2005).
3. 三谷元宏, 山本宣之, "『LIPIDURE (リピジュア)』の肌に対する効果", 加工技術, **40**(5), 347-351 (2005).
4. Kunio Shimada, Koji Awai, Hiroki Fukui and Nobuyuki Yamamoto, *SPC Asia*, **43**, 14 (2006).
5. 三谷元宏, 山本宣之, "『リピジュア-NS』加工", 加工技術, **41**(4), 241-247 (2006).
6. 山本宣之, "生体親和性繊維加工剤 -LIPIDURE (リピジュア) -", 染色研究, **50**(3), 76-82 (2006).

出願特許

1. 山本宣之, 福井洋樹, 坂元伸行, 首藤健志郎, 鈴木 憲, "ポリマーナノスフェア、その用途及び製造方法", 特開 2004-196868 (公開日 2004年7月15日) .
2. 福井洋樹, 山本宣之, 坂元伸行, 猪又 潔, 首藤健志郎, "カチオン性ナノ微粒子を含有する化粧品", 特開 2005-336100 (公開日 2005年12月8日) .