

リン脂質/高級アルコール混合バイレイヤー系
におけるハイドロゲル形成機構の研究

中川 泰治

要旨

1. 緒言

2. 実験

- 2-1. 試料調製
- 2-2. 粘弾性測定
- 2-3. 偏光顕微鏡観察
- 2-4. 凍結切断電子顕微鏡観察 (FF-TEM)
- 2-5. 放射光 X 線回折測定
- 2-6. 示差走査熱量測定 (DSC)

3. 結果及び考察

3-1. PC70/HD 系におけるゲル形成

- 3-1-1. HD 添加によるゲル化挙動
- 3-1-2. HD 添加によるバイレイヤー形態変化
- 3-1-3. 相転移温度に対する HD 添加効果
- 3-1-4. HD 添加による炭化水素鎖充填構造の変化
- 3-1-5. 考察

3-2. 精製リン脂質 (DSPC/DSPG/HD) 系におけるゲル形成

- 3-2-1. HD 添加によるゲル化挙動
- 3-2-2. DSPG 添加によるゲル化挙動
- 3-2-3. DSPG 添加によるバイレイヤー形態変化
- 3-2-4. 均一なハイドロゲルの微細構造
- 3-2-5. 安定なリン脂質/HD 会合体の形成
- 3-2-6. 炭化水素鎖充填構造に対する HD の効果
- 3-2-7. 考察

3-3. ゲル形成に対するジプロピレングリコール (DPG) 添加の影響

- 3-3-1. DPG 添加によるハイドロゲルの崩壊
- 3-3-2. DPG 添加によるバイレイヤー形態変化と微細構造変化
- 3-3-3. DPG 添加による積層構造の変化
- 3-3-4. DPG 添加による相転移挙動変化
- 3-3-5. 考察

4. 結論

参考文献

謝辭

要旨

複数の両親媒性分子からなるハイドロゲルは化粧品製剤や医薬品外用剤として広く使われており、特に界面活性剤と高級アルコールと水からなる3成分系は保湿クリームやヘアコンディショナー等の処方によく応用されている。我々は界面活性剤として安全性が非常に高い天然由来物質であるリン脂質を用いてハイドロゲルの調製を試みた。その結果、高純度のリン脂質では形成されないにもかかわらず、精製度の低い原料であるPC70を用いることで、高級アルコールの一種であるヘキサデカノール（HD）と均一なハイドロゲルを形成することを見出した。精製度の低い原料の方がゲル形成に好ましいということは、産業におけるコストパフォーマンスの観点からも非常に有用である。このハイドロゲルを産業界で広く応用するためには、ゲル形成メカニズムを明らかにし、その物性を完全に理解すること、さらには添加物である溶媒の影響を把握することが非常に重要である。そこで本研究では3つのステップでゲル形成メカニズムを明らかにした。

まずPC70/HD/水系の構造と物理化学的性質をレオメトリー、凍結切断電子顕微鏡観察、示差走査熱量測定、放射光X線回折を用いて詳細に解析した。この結果、閉じたベシクルからエッジを有する平坦なシート状構造へのバイレイヤー形態変化がゲル化を引き起こしていることが明らかとなった。また、エッジ部分はPC70中の酸性リン脂質で構成されており、HDは膜弾性率を上昇させることで平坦なバイレイヤー形成に寄与していることが推察された。この平坦なシート状バイレイヤーは、PC70由来の適度な電荷を持っているために溶液全体への均一な分配がもたらされ、その結果としてゲル化が生じていると考えられる。本ゲル化のメカニズムとして、シート状バイレイヤーを取り囲む水の連続体構造がゲル中でネットワークとして働くという新しいゲル形成メカニズムを提案した。

次に精製度の低いPC70中のどのリン脂質がゲル化に寄与しているかを調べるために、精製したリン脂質系を用いてゲル形成のメカニズムを定量的に検証した。PC70中の電荷を有するリン脂質がゲル形成において非常に大きな役割を果たすであろうという作業仮説の基に、主成分であるジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）と負電荷を持つリン脂質ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG）を用いて、HDとの相互作用を検討した。試料の状態観察結果から、ゲル化は非常に狭い組成範囲においてのみ生じており、X線回折と凍結切断電子顕微鏡観察による構造及び形態解析から、均一なハイドロゲルを形成するためには下記の2つの条件を満たさなければならないことを明らかにした。1つはバイレイヤーが平坦なシート状形状であること、2つ目は平坦なシート状バイレイヤー表面に、バイレイヤー間の反発に必要とされる適度な電荷密度を持っていることである。これらの条件を満たすことにより、バイレイヤー間相互作用エネルギーは2次極小を持つことなく、シート状バイレイヤーは溶液全体に均一に分配されることがわかった。

さらに、この新しいメカニズムのハイドロゲルを化粧品製剤へ応用することを考慮し、溶媒物性の効果を調べた。ポリオールやアルコール等の水溶性溶媒は保湿効果や感触、防

腐効果を付与するためにほぼ全ての化粧品に配合されており、しばしばハイドロゲル形成を阻害することが知られている。このため溶媒として、影響が大きいと想定される低い誘電率を有するジプロピレングリコール (DPG) を用い、X 線回折や凍結切断電子顕微鏡観察による微細構造とバイレイヤー形態の解析を行った。この結果、多量の DPG を添加することにより、平坦で非常に巨大なバイレイヤーの積層構造が形成され、それに伴いハイドロゲルが崩壊することを見出した。DLVO 理論に基づく準定量的計算から、DPG 添加による水相誘電率の低下がバイレイヤー間のエネルギーバリアを低下させ、積層構造の形成とハイドロゲルの崩壊を引き起こしていることがわかった。水相誘電率の低下はエッジをフタする働きのある酸性リン脂質のプロトン化を促進し、バイレイヤーシートの巨大化も引き起こしていると考えられた。これら結果は、適切な溶媒を選択し水相の誘電率を調整することで、ゲル化、ラメラリティ、形態、相転移等のバイレイヤー会合体挙動をコントロールできることを示唆しており、ハイドロゲル研究のさらなる発展と安定なゲルの調製に貢献すると考えられる。

1. 緒言

ゲルとは固体と液体の中間的性質を有する物質であり、弾性と粘性を兼ね備えた粘弾性体としての性質を示す。その中でハイドロゲルとは水を溶媒としたゲルであり、通常、何らかのネットワーク構造が形成されることにより水が拘束され、溶液全体の流動性が低下し、粘弾性挙動を示す。化粧品や医薬品業界においては、複数の両親媒性分子からなるハイドロゲルが独特な使用感や物性を有するために古くから化粧品、医薬品基剤として広く使われてきた。特に界面活性剤と高級アルコールと水の 3 成分からなるハイドロゲルはヘアコンディショナー[1-2]や保湿用スキンケアクリーム[3-7]等の処方に広く応用されている。例えばヘアコンディショナーには界面活性剤としてカチオン性界面活性剤が使われているが、これは髪表面がマイナスに荷電しているため、反対の電荷を有するカチオン性界面活性剤を含む製剤が髪表面に吸着することで、髪の柔軟性向上や摩擦軽減を目的として製剤設計されている[2,8-9]。一方でスキンケア用保湿クリームには皮膚への刺激が比較的少ないといわれている非イオン性界面活性剤[10]やアニオン性界面活性剤が用いられ、特有の使用感や保湿効果を付与している。

これら一般的な界面活性剤/高級アルコール/水の 3 成分系のハイドロゲルに関しては、産業界で広く応用されていることもあり、古くから光学顕微鏡や電子顕微鏡[11-15]、レオメトリリー[3,6,13,14,16,17]、示差走査熱量測定 (DSC) [3,7,16,18]、NMR[19]、伝導度及び誘電率分析[20-24]、レーザーラマン分光法[25]、X 線回折[4-5]等の様々な手法により精力的に検討され、その構造や物性が特徴付けられてきた。その製剤特徴としては、界面活性剤/高級アルコールからなる会合体が 2 分子膜 (バイレイヤー) を形成し、水溶液全体にわたる廻旋状のバイレイヤーネットワークの形成によって、ゲル化が引き起こされていることがよく知られている。さらにこのバイレイヤーネットワークはマルチラメラ構造を形成しており、バイレイヤーの炭化水素鎖は室温で流動性が低いゲル相 (L_{β}) である。また粘弾性の特性は、バイレイヤーの形態変化と関連する形で、しばしば長時間緩和を示すこともよく知られている[14,26]。

本研究では界面活性剤の代わりに非常に安全性の高い天然素材[27,28]であるリン脂質を用いてハイドロゲルを調製することを試みた。リン脂質は生体膜関連物質であり、その皮膚刺激性の少なさと良好で独特な感触を有することから、化粧品原料としての価値が非常に高い。主に大豆や卵等から抽出、精製されることが多く、天然物由来であるために一般的な合成界面活性剤に比べ値段が高いことがネックであり、高価格化粧品を中心に応用されている。その中でも比較的精製度の低いリン脂質混合物はその高いコストパフォーマンスゆえにリポソームの材料[29-32]や乳化物の乳化剤[33]として化粧品業界、製薬業界、食品業界で広く使われている。これらの精製度の低いリン脂質混合物は主成分であるホスファチジルコリン (PC) に加えて幅広く様々なリン脂質が含まれている[34-38]。例えば本研究で用いた PC70 は主成分である 70%程度のホスファチジルコリンに加え、ホスファチジルエ

タノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール等の様々なリン脂質を含んだ水素添加大豆リン脂質である。精製度としては中程度の原料であるが、適度に様々なリン脂質を含んでいることもあり、商業的な原料として化粧品業界で一般的に使われている。我々は、高純度のホスファチジルコリン (PC) と高級アルコールの 1 種であるヘキサデカノール (HD) や精製度の高い水素添加大豆リン脂質原料 (PC90) と HD の複合バイレイヤーではゲル化は生じないにもかかわらず、精製度の低い水素添加大豆リン脂質原料 (PC70) と HD の複合バイレイヤーでは均一なハイドロゲルが形成されることを見出した[39]。PC70/HD 会合体と高純度 PC/HD 会合体は、ゲル形成やその粘弾性には違いがあるにもかかわらず、相転移挙動はほぼ同じであった。精製度の低い原料の方がゲル形成に好ましいということは、産業におけるコストパフォーマンスの観点からも非常に有用であると思われる。この PC70/HD ハイドロゲルを産業界で広く有効的に使いこなすためには、そのゲル形成メカニズムを完全に理解し、物性をコントロールする必要がある。そこで本研究では、PC70/HD ハイドロゲルのゲル形成メカニズムを明らかにし、その物性を完全に理解すること、さらに化粧品処方中に必ず含まれる溶媒の影響を把握することを目的とした。

まず PC70/HD ハイドロゲルの構造と物理化学的性質をレオメトリー、凍結切断電子顕微鏡観察 (FF-TEM)、DSC、放射光 X 線回折を用いて詳細に解析することでゲル化のメカニズムを解明した。PC70/HD ハイドロゲルにおけるゲル形成メカニズムは、これまで報告されてきた通常の界面活性剤/高級アルコール/水の 3 成分系のメカニズムとは異なっており、我々は新しいゲル形成メカニズムを提案した[40]。さらに精製度の低いリン脂質混合物である PC70 中の各リン脂質成分がどのようにゲル化に寄与しているかについて考察するため、精製したリン脂質系を用いてゲル形成のメカニズムを定量的に検証した。PC70/HD バイレイヤー系のゲル形成メカニズムにおいて、正味の電荷を有する脂質が非常に大きな役割を果たすことが考えられるため、主成分であるジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) と負電荷を持つリン脂質ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG) を用いて、HD との相互作用を検討した。これら精製したリン脂質による詳細な配合組成検討及びその構造解析により、ゲル化に必要な条件を見出した[41]。

最後に、このハイドロゲルの化粧品製剤へ応用を考慮し、溶媒の添加効果を調べた。ポリオールやアルコール等の水溶性溶媒は保湿効果や感触、防腐効果を付与するためにほぼ全ての化粧品に配合されており[42-45]、しばしばハイドロゲル形成を阻害することが知られている。産業的に安定なゲルを調製するためには、ゲル化に対する溶媒の添加効果を明らかにする必要があると考えられる。PC70/HD ハイドロゲルは電荷を持つバイレイヤー間の電気二重層反発力[46]がカギとなっているが、アルコールやポリオール等の低い誘電率を有する水溶性分子はこの電気二重層反発力を変えることが想定されるため、これら溶媒の添加によって PC70/HD ハイドロゲルの物理化学的性質や分子組織構造は変化すると考えられる。比較的低い誘電率であるエタノールは水の極性を変化させる最たる水溶性分子で

あり、ハイドロゲルの物理化学的性質を変化させる可能性があるが、メタノール、エタノール、プロパノール等の低級アルコールは、バイレイヤーの中へ浸透してインターディジテート構造へ膜の構造を変形させてしまうことが知られているため[47-53]、純粋な溶媒の効果を確かめるには不向きである。一方、比較的高い誘電率を有するポリオールはバイレイヤー間の電気二重層反発力に対するインパクトは少ないことが想定される。実際にグリセリンやソルビトール等の高い誘電率を持つポリオールを用いた予備実験の結果では、これらの分子は PC70/HD ハイドロゲル形成や炭化水素鎖の融解転移温度に大きな影響は与えなかった。したがって、我々は溶媒によるバイレイヤー間相互作用を大きく修正する物質としてエタノールと同程度の低い誘電率を有するポリオールの 1 種であるジプロピレングリコール (DPG) に着目し、PC70/HD ハイドロゲルに対する DPG 添加の影響を放射光 X 線回折、示差走査熱量計、光学及び凍結切断電子顕微鏡にて解析した。その結果、多量の DPG 添加により、非常に平坦で巨大なバイレイヤー積層体 (FBS) が形成され、それに伴いハイドロゲルの崩壊が生じることを見出した。ゲル崩壊及び FBS 形成メカニズムに関して、DLVO 理論[54,55]に基づきバイレイヤー間相互作用に対する溶媒誘電率の変化という観点で詳細に議論した[56]。

2. 実験

2-1. 試料調製

水素添加大豆リン脂質 (PC70、PC90) は日本精化株式会社より、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ヘキサデカノール (HD) は Sigma-Aldrich より、ジプロピレングリコール (DPG) は株式会社 ADEKA より購入した。その他の試薬は分析グレードを使用した。全ての試薬は精製せずにそのまま使用した。試料は以下のように調製した。全ての脂質 (リン脂質+HD) を室温～40°C でクロロホルム/メタノール (2:1) に溶解させた。溶解確認後、はじめに溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、その後真空ポンプで約 2 時間除去した。残ったフィルムを純水又は必要な比率の DPG を混合した水相で分散し、80°C で 5～10 分程度ボルテックス攪拌し、その後ゆっくりと攪拌しながら 30°C まで冷却した。試料を完全に水和させるために、この操作を数回繰り返した。最終の脂質濃度は 50mg/ml とした。溶媒添加実験においては、PC70 と HD の比率は、均一なハイドロゲル会合体を形成する比率である PC70/HD= 3:2 (重量比) に固定して実験を行った。

2-2. 粘弾性測定

粘弾性測定は Anton Paar 社製レオメーター(MCR301)にて、コーンプレート(直径 50mm、1°)を用いて行った。複素粘度 ($|\eta^*|$) の線形領域は、周波数 1Hz における 0.01%-100%の範囲のひずみ分散測定より決定した。全ての測定は 25 °C で行った。

2-3. 偏光顕微鏡観察

バイレイヤーの巨視的な形態観察はニコン社製偏光顕微鏡 (Pol E600) を用いて行った。分子配向性は直交ニコル条件下で確認した。試料は希釈することなくそのまま観察した。

2-4. 凍結切断電子顕微鏡観察 (FF-TEM)

スラッシュ状液体窒素の中で急速に凍結させた試料を日本電子株式会社製凍結切断装置 (JFD-9010) にセットし断面が表面に出るように切断した。レプリカフィルムは常法[57]により作製した。切断した断面に対して斜め 45° からプラチナカーボンで影付けした後、カーボンを垂直方向から蒸着した。試料を取り出し、クロロホルム/メタノール (1:1) で試料を溶解させ、浮遊したカーボンフィルムを金属メッシュですくい取り、レプリカフィ

フィルムとした。レプリカフィルムは日本電子株式会社製透過型電子顕微鏡（JEM-1010、JEM-1400）にて加速電圧 80 kV 又は 100 kV で観察した。

2-5. 放射光 X 線回折測定

放射光 X 線回折測定は SPring-8 の BL40B2 にて実施した。試料は直径 1 mm のガラスキャピラリーの中に封入し、測定まで室温にて平衡にした。2 次元回折像は株式会社リガク社製イメージングプレート検出器（R-Axis VII）にて記録した。波長 λ は 0.08857 nm 又は 1.0 nm で露光時間は 30 秒に設定した。カメラ長は小角と広角が同時に測定できるように約 500 mm に設定し、コレステロール結晶を用いて校正した。散乱ベクトルの大きさ ($s = 2\sin\theta/\lambda$ (2θ は散乱角)) を横軸とした 1 次元強度プロファイルは 2 次元回折像の強度を方位角方向に 1 周積算し、 $2\pi r$ で割ることで得た (r はビーム中心からの距離)。

2-6. 示差走査熱量測定 (DSC)

PC70/HD バイレイヤー及び DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの相挙動は示差走査熱量計 (DSC) を用いて測定した。試料はアルミニウムパンに封入し、SII ナノテクノロジー株式会社製 DSC 装置 (DSC6220、DSC6100) にセットした。測定温度は 10°C~85°C までの範囲を PC70/HD 系については昇温速度 5 K/min (DSC6220)、精製したリン脂質/HD 系については 1 K/min (DSC6100) にて昇温させた。便宜上、PC70/HD 系の相転移温度変化の解析には DSC 曲線のピーク温度 (T_m) を用いた。また精製したリン脂質/HD 系における相転移温度変化の解析には DSC 曲線の開始温度 (T_s) と終了温度 (T_e) を用いた。

3. 結果及び考察

3-1. PC70/HD 系におけるゲル形成

3-1-1. HD 添加によるゲル化挙動

HD を添加した際の PC70/HD バイレイヤー水溶液の分散性及び流動性を観察した。図 1 に HD の重量分率 (W_H) を 0~0.4 まで増加させたときの PC70/HD バイレイヤー水溶液の外観写真を示した。これより $W_H = 0\sim 0.4$ の範囲では PC70/HD バイレイヤー水溶液は全て均一であったが、 $W_H = 0.24$ 以上で明らかに流動性の低下 (ゲル化) が観察された。HD だけを水に分散させた場合 ($W_H = 1$) には、HD 凝集体が完全に水相から分離した (data not shown)。



図 1. PC70 バイレイヤーに HD を添加した際のゲル化挙動

バイアル瓶は写真を撮影する数分前に傾けた。撮影した W_H 範囲内においては、PC70/HD バイレイヤー水溶液は全て均一であった。HD の重量分率 (W_H) が 0.24 以上において、明らかな流動性低下を観察した。

定量的にゲル形成の程度を評価するため、PC70/HD バイレイヤー水溶液の動的粘弾性挙動のひずみ分散測定を行った。図 2 には W_H を増加させた際の動的粘弾性ひずみ分散測定における線形領域から求めた複素粘度 ($|\eta^*|$) を示した。 $|\eta^*|$ は W_H の増加と共に徐々に上昇し、0.24 付近以上では一定となった。これらの結果は図 1 で示した溶液全体の流動性低下の結果と関連していた。

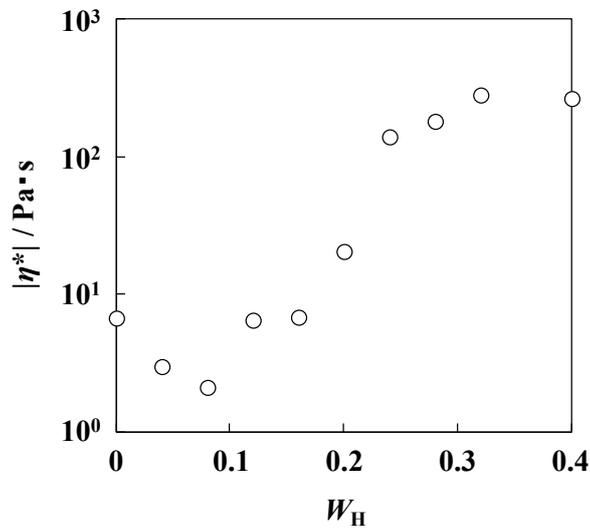


図 2. PC70/HD バイレイヤー水溶液における複素粘度 ($|\eta^*$) の HD 重量分率 (W_H) 依存性

複素粘度の値 ($|\eta^*$) は振動周波数 1Hz におけるひずみ分散測定線の線形領域から決定した。図 1 の外観写真と一致する形で、 $W_H=0.2$ 以上において著しい粘度上昇を観察した。

3-1-2. HD 添加によるバイレイヤー形態変化

HD 添加によるゲル化のメカニズムを調べるため、PC70/HD バイレイヤー水溶液の凍結切断電子顕微鏡観察を行った。図 3 に $W_H=0, 0.16, 0.2, 0.4$ における凍結切断電子顕微鏡写真を示した。HD 無配合 ($W_H=0$) では、小さなベシクル構造を観察した (図 3a)。HD 添加により、ベシクルから比較的大きなシート状構造への形態変化が観察され、ゲル化が生じた W_H の範囲では、PC70/HD 混合バイレイヤーは鋭い末端と平坦な表面を有するシート状構造であった (図 3c、3d)。中間の HD 添加濃度ではベシクルとシート状構造が共存している像が観察された (図 3b)。

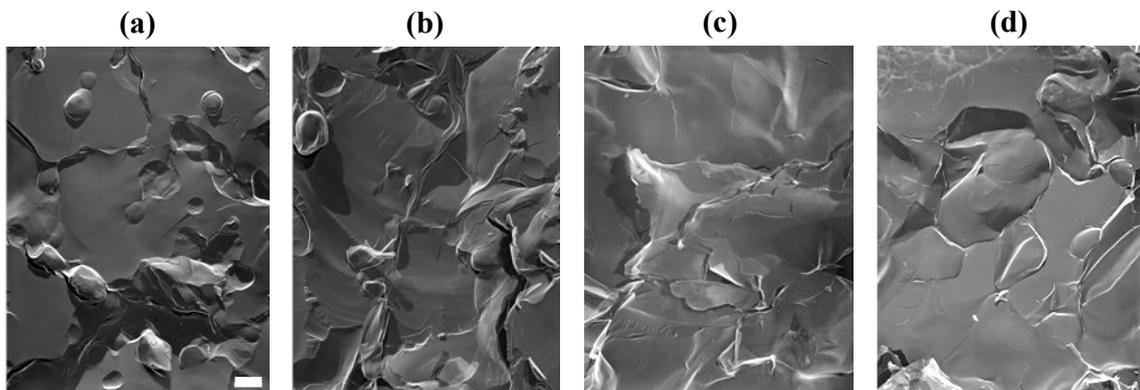


図 3. PC70/HD バイレイヤーの凍結切断電子顕微鏡像

HD の重量分率 (W_H) が (a) 0、(b) 0.16、(c) 0.2、(d) 0.4 における PC70/HD 混合バイレイヤーを観察した。 W_H の上昇に伴い、小さいベシクルから徐々に大きく平坦なバイレイヤーシートへの変形を観察した。スケールバーは 500nm を示す。

図 4 に $W_H = 0.24$ における 2 次元小角 X 線回折像を示した。 $s = 0.152 \text{ nm}^{-1}$ に 2 箇所 of 明るいスポットが矢印で示す特定の方向に強く現れており、異方性が観察された。これは測定したビームサイズの範囲内で、バイレイヤーが特定の方向に偏って配向していることを示しており、図 3 で観察されたシート状構造のサイズは通常のベシクルよりかなり大きいことが示唆された。

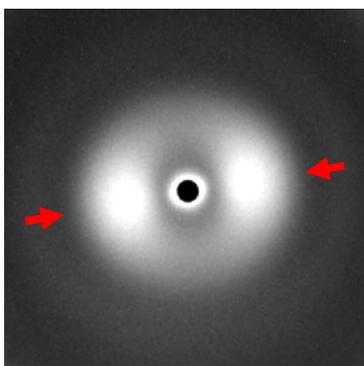


図 4. PC70/HD バイレイヤーの $W_H = 0.24$ における異方性を示す小角 X 線回折像

2 次元小角 X 線回折像からは $s = 0.152 \text{ nm}^{-1}$ において 2 箇所 of 明るいスポットが矢印で示す特定の方向に強く現れており、小角 X 線回折強度に異方性が観察された。

3-1-3. 相転移温度に対する HD 添加効果

熱的相転移挙動に対する HD 添加濃度 (W_H) の影響について、示差走査熱量計 (DSC) を用いて詳細な検討を行った。図 5 に $W_H = 0 \sim 0.5$ における PC70/HD バイレイヤー水溶液の DSC 曲線を示した。HD 無配合 ($W_H = 0$) の場合には、炭化水素鎖の融解転移に伴うブロードな吸熱ピークが 50°C から 56°C に観察された。これらのピークは W_H の増加と共に 0.4 になるまで高温側に移動し、 68.8°C で単一のシャープなピークになった。それ以上の W_H の増加では、上記の転移ピークに加えて、図 5 中の矢印で示すように低温側に 2 つの吸熱ピークが生じた。これらの新しく生じた 2 つのピークは HD の添加量と共に $W_H = 1.0$ に至るまでピーク強度が大きくなった。これは $W_H = 0.4$ 以上で HD 結晶が析出していることを示

峻している。

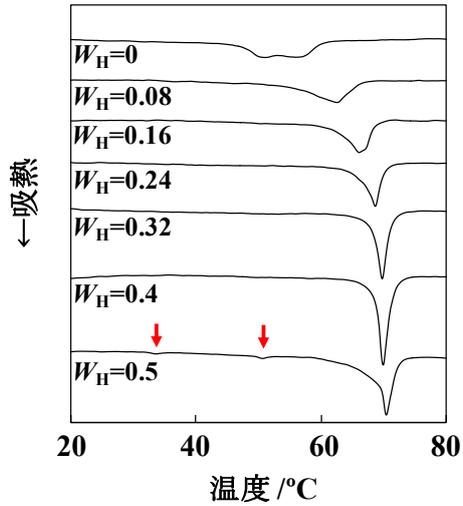


図 5. PC70/HD バイレイヤー水溶液における DSC 曲線

昇温速度 5K/min で 10~85°C の範囲で測定を行った。 W_H の増加と共に炭化水素鎖の融解転移ピークは高温側へ移動した。HD 無配合の場合はブロードな転移であったが、 W_H の増加により、分子組成は不均質であるにもかかわらずシャープな転移に収束した。 $W_H > 0.4$ では、上記の転移ピークに加えて、図 5 中の矢印で示すように低温側に 2 つの吸熱ピークが生じ、HD 添加割合の増加と共にこれらのピーク強度も増大した。

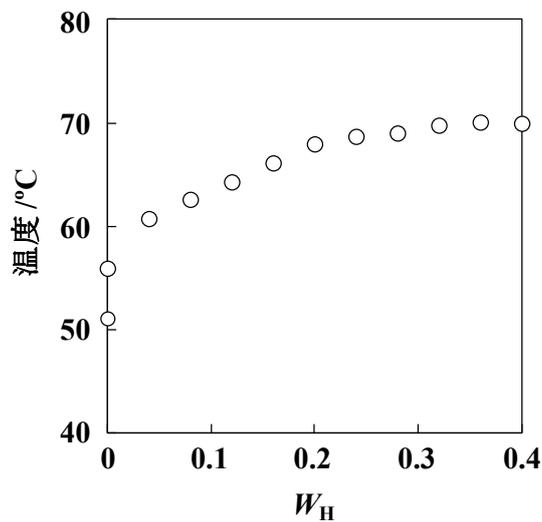


図 6. 炭化水素鎖溶解転移温度の HD 添加濃度 (W_H) 依存性

W_H に対する PC70/HD バイレイヤー水溶液における転移ピーク温度をプロットした。HD 無配合の場合には 2 つのピークが現れた (図 5、 $W_H = 0$ 参照)。転移温度上昇の程度 (傾き)

は $W_H = 0.2$ 付近でゆるくなった。

3-1-4. HD 添加による炭化水素鎖充填構造の変化

PC70バイレイヤーへのHD分子添加による炭化水素鎖充填構造変化に関して放射光X線回折を用いて調査した。 $W_H = 0 \sim 0.2$ における小角X線回折 (SAXD) と広角X線回折 (WAXD) の結果を図7に示した。SAXD測定においては、全ての W_H において $s = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ 付近に非常にブロードなピークが観察された。 $W_H = 0$ から0.2へ上昇するに伴い、SAXDピークは小角側に移動した (図7a、図8)。 W_H の増加に伴うピークトップの位置の小角側への移動は、PC70/HDバイレイヤーの厚みの増加を反映していると考えられる (考察参照)。

一方、WAXDピークは $W_H = 0$ から0.2への上昇に伴い、広角側に移動しシャープになった。 $W_H = 0.2$ では $s = 2.43 \text{ nm}^{-1}$ (0.412 nm)において単一のシャープなピークが観察されており、炭化水素鎖の充填構造はヘキサゴナル構造であることを示唆している。さらにHDを添加してもピーク位置もシャープさもほとんど変化しなかった (data not shown)。

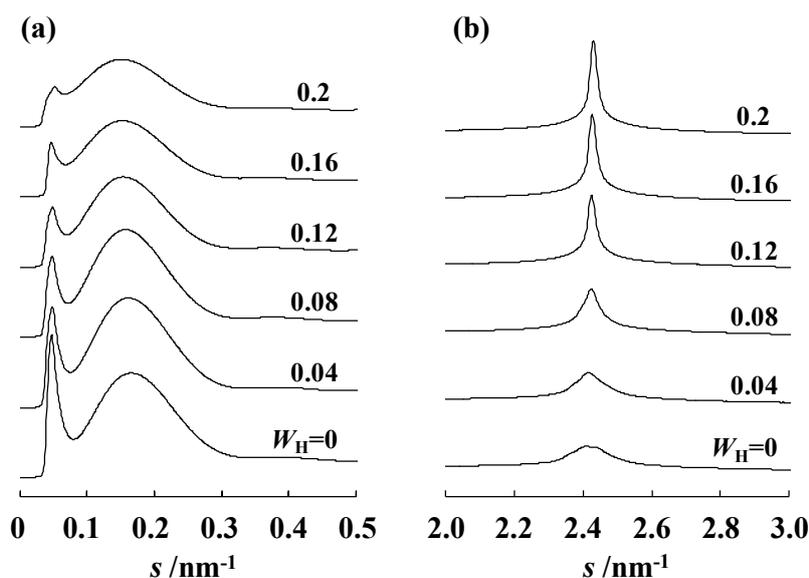


図7. PC70/HDバイレイヤー水溶液の小角X線回折 (SAXD) と広角X線回折 (WAXD)

SAXDは $s = 0.16 \text{ nm}^{-1}$ 付近に非常にブロードなピークを示した。 W_H の上昇に伴い、SAXDブロードピークは小角側に移動した。炭化水素鎖の充填構造を反映するWAXDは $W_H = 0$ から0.2の増加に伴い、 $s = 2.43 \text{ nm}^{-1}$ における単一のシャープピークへ収束した。

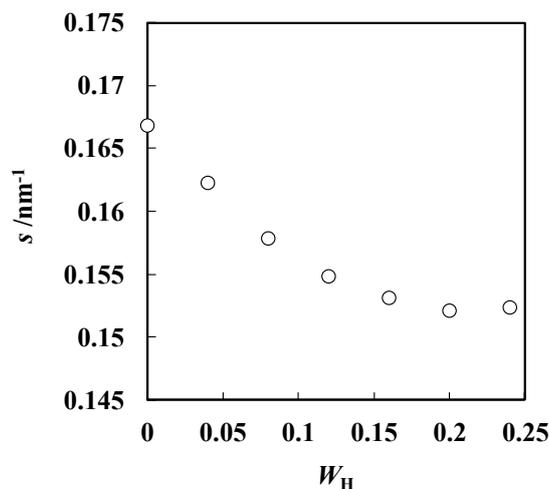


図 8. ラメラ構造に対する HD 添加効果

SAXD のブロードピークの最大強度における s の値を W_H に対してプロットした。 W_H の増加に伴いピークトップの位置は小角側に移動し、 $W_H=0.2$ 以上では一定値となった。

3-1-5. 考察

主成分である DSPC 以外に 30%程度の不純物を含む精製度の低いリン脂質原料である PC70 にヘキサデカノール (HD) を添加することでゲル化を生じることを見出した (図 1、2)。凍結切断電子顕微鏡観察から、HD 添加による粘度上昇に伴い、閉じたベシクル構造から開いたシート状構造へ PC70/HD バイレイヤーの形態が変化していることが明らかとなった (図 3)。ゲル化した試料の小角 X 線 (SAXD) 像は異方性を示し、形成したシート状構造のサイズは非常に大きいことが示唆された (図 4)。これらの結果はゲル化が PC70/HD バイレイヤーの形態変化と密接に関連していることを示唆している。

まず、どのようにして HD 分子が PC70 バイレイヤー中で存在し、構造変化を引き起こしているかについて議論する。バイレイヤーの平坦化は、DPPC/HD 単層膜系[58-60]で良く知られているように炭化水素鎖の傾き減少とバイレイヤーの硬直化と関連していると考えられる。PC70 バイレイヤーが複数のリン脂質を含んでいるため、炭化水素鎖の傾き角度を明瞭に示すことは難しいが、WAXD で観察された W_H の増加に伴う炭化水素鎖充填構造由来の広角ピークの半値幅の減少と広角側への移動 (図 7b) は、炭化水素鎖の傾き減少によると解釈できる。SAXD においても HD 添加によりブロードピークは小角側へ移動しており、これはバイレイヤー膜厚の上昇を意味していると思われる (図 7a)、広角の結果から考えられる炭化水素鎖の傾き減少という考えを支持している。小さな極性頭部を有する HD 分子は PC70 の主成分である DSPC や DSPG のような大きな頭部を有するリン脂質の間に挿入されることで、DPPC/HD 系[58-60]で示されているように頭部と尾部の面積の不釣り合いを取り除

いていると思われる。SAXD ピークの小角側への移動は $W_H = 0.2$ 以上で飽和した (図 8) が、これは PC70 の平均分子量を 800 と想定すると HD のモル分率で約 0.45 以上で炭化水素鎖の膜面の垂直方向に対して傾きがなくなること示唆している。PC70 中の PC や PG のような大きな頭部の脂質の割合を考慮に入れると、DPPC/HD 系[58-60]で示されているように炭化水素鎖の傾き解消にはおよそ等モルの HD が要求される。WAXD のピークは $W_H = 0.2$ まで広角側に移動しているため、頭部面積の不釣り合い軽減は、傾き減少に加えて炭化水素鎖の充填構造をより強固にし、その結果、膜の硬直化をもたらしているだろう。それ故、この系のゲル化は、閉じたベシクルから開いたシート状構造へのバイレイヤー形態変化がトリガーになっていると考えられる。下記で議論するように表面電化密度もある程度制約される必要があるが、この形態変化は HD のような頭部の小さい分子が大きな頭部を有するリン脂質の間を埋めるスペーサーとして働くことによって引き起こされているだろう。

次に通常、ゲル化は構造的なネットワーク形成によって生じているが、上記の形態変化がどのようにしてゲル化を生じているのかについて議論する。ここで我々は PC70/HD バイレイヤーゲルにおける構造的ネットワークとして水連続体というものを提唱したい。これは溶液全体に広がる制限された水のネットワークであり、我々は開いたエッジを有するシート状バイレイヤーがこの水連続体形成を助長していると仮定している。シート状バイレイヤーの均一な分散と水連続体の形成には PC70 に含まれる荷電脂質が非常に重要な役割を果たしているだろう。なぜなら、系中の自由な水の存在を排除するためには、隣り合うバイレイヤーシート間に働く長距離反発相互作用が必要とされるからである。水分子が均等にバイレイヤー間に分配され、広角データからわかる通り全ての炭化水素鎖はヘキサゴナル格子に整列していると想定した場合、膜間の水の厚みは 100nm オーダーであると見積ることができる。この見積もった水層の厚みは、通常のマルチラメラの層間水の厚みよりかなり大きくなる。実際、SAXD からはブロードピークが観察されており、これは膜間距離に規則性が無いことを示している (図 7a)。しかしながら、水分子は結合されていないとしてもバイレイヤー間の空間に制限され、自由な流れは制約されていると思われる。なぜなら水の均一な分配は、膜間静電的反発による自由エネルギー極小を表しているからである。我々はこの水の流れの制約がゲルの弾性の起源になっていると考えている。

本系で提案した上記のゲル化のメカニズムは、カチオン界面活性剤/高級アルコール/水の 3 成分系でよく見られる通常のゲル化メカニズムとは異なっている。これらのゲル化は回旋状に入り組んだバイレイヤーネットワークがカギとなっており、SAXD からこれらバイレイヤーは規則正しいマルチラメラ構造を形成していることが知られている [4,5]。また Warriner らはポリマー脂質系においてラメラバイオゲルという別のタイプのゲルを報告しているが [61]、これは高い曲率領域を有する流動相のバイレイヤーネットワークに基づいている。これに対し、本系の PC70/HD シート状バイレイヤーはゲル相 (L_β) で非常に硬いため、バイレイヤー連続体を形成するための高い曲率領域を作ることはできないのでメカニズムは異なっている。

これまでは $W_H = 0.2$ までの領域に関して議論してきたが、ゲルの粘度挙動は $W_H = 0.2$ 以上においてもさらに上昇しているため (図 2)、PC70/HD ゲルの機械的特性はバイレイヤーの硬さ以外の要因によっても決められていると思われる。手がかりのひとつとして、 $W_H = 0.2$ 以上においても、DSC 曲線の相転移ピークは 0.4 付近までは高温側へ移動し、シャープになっているという事実が挙げられる (図 5、6)。同様の転移温度の HD 濃度依存性は DPPC/HD 系においても観察されている[62,63]。HD が引き起こす転移温度の上昇メカニズムは炭化水素鎖間相互作用、水和、静電的相互作用、分子間結合等様々な形の相互作用による自由エネルギーへの寄与度という観点から議論されるべきであるが、我々は個々の寄与度を評価するための十分なデータは持ちあわせていない。 $W_H = 0.2$ 以下の転移温度の大きな上昇を考慮すると、炭化水素鎖の傾き減少は炭化水素鎖間相互作用の変化及び界面構造の変化によって転移温度上昇に寄与しているだろう。一般的に、水和は頭部に関連した炭化水素鎖の融解転移温度の変化に大きく寄与することが知られている[64]。PC70/HD 系においても水和はキープレイヤーであるに違いないだろう。HD は PC より極性が低いので、結合水の数は W_H の上昇とともに減少すると思われる。一方で静電的相互作用からの寄与は小さいように思われる。なぜなら PC70 より酸性脂質が少ない PC90 を用いた場合においても、HD 添加による相転移挙動は PC70 とほとんど同じ傾向を示しているからである。しかしながら、HD 添加により減少する表面電化密度は、電気二重層の変化を通して膜間反発力に影響を与えているであろう。ゲル化へのこれらの要因の影響を評価するためには、単純脂質系でのさらなる研究が必要であると思われる。

相転移温度上昇が頭打ちになる温度がジステアрилホスファチジルエタノールアミン (DSPE) バイレイヤーの主転移温度に近いので、脂質と HD の水素結合ももしかすると転移温度変化に寄与しているかもしれない。しかしながら、HD 分子は水素結合形成するためのヒドロキシル基を 1 つしかもっていないため、PE バイレイヤーのような水素結合は考えにくい。溶解性の限界点がゲル硬直性の最大値と一致しているように見えるので (図 2、6)、水素結合は PC70 バイレイヤーへの HD の溶解性を高めること、さらに間接的に PC70/HD ゲルの硬直性に寄与しているのであろうと推測している。HD の溶解性については、Juyang Huang[65,66]によって提案されたアンブレラ効果を考えている。これは PC バイレイヤーへのコレステロールの溶解と類似した考え方である。HD 分子が PC バイレイヤーに取り込まれる際には、HD 疎水部が水に曝されないように近傍のリン脂質頭部が覆い防いでいると思われる。

その他、ゲルの硬直性に影響を与える要因としては、バイレイヤーシートの大きさと膜間距離が挙げられる。バイレイヤーシートの大きさはエッジを形成できる分子の数によって決まると考えられる。HD と高純度 PC の混合物はバイレイヤーシートを形成しないので [39]、エッジを形成する分子は PC70 の不純物成分であると考えられる。DMPG や DPPG バイレイヤーはシート状構造を作ることが知られているので [67]、PG 分子はエッジにフタをする強力な候補である (図 9)。もし HD 分子が一つもエッジ形成に関与していないならば、

エッジ形成分子の相対的な数は W_H の増加と共に減少する。これはバイレイヤーシートの大
 大きさの上昇と恐らくゲルの硬直化につながるだろう。膜間距離に関して言えば、PC70 と HD
 の合計重量%を 5wt%に固定しているために水分子の数は変わらないが、 W_H の増加と共に炭
 化水素鎖の数とバイレイヤーの表面積は増加するため、 $W_H=0$ から 0.4 において膜間距離は
 20-30nm 程度減少しており、この減少はゲルの硬直化に寄与していると考えられる。

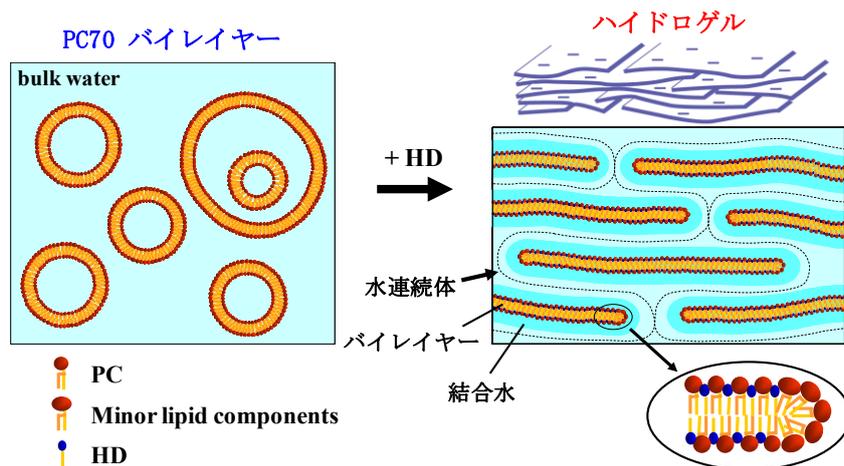


図9. PC70/HD バイレイヤー水溶液におけるハイドロゲル形成の模式図

HD 無配合時には小さなベシクルであるが、HD 添加により大きな頭部を有するリン脂質の
 間に取り込まれることによりバイレイヤーシート構造へ変形した。バイレイヤーシートの
 エッジは不純物であるマイナー脂質によって覆われている。バイレイヤー中には酸性脂質
 が存在しているために近傍のバイレイヤーは出来る限り広がる傾向にある。ゲル化のメカ
 ニズムとして、この形態変化に伴いゲル中でネットワークとして働く水連続体という概念
 を導入した。

3-2. 精製リン脂質 (DSPC/DSPG/HD) 系におけるゲル形成

3-2-1. HD 添加によるゲル化挙動

異なる2つの DSPC/DSPG モル比 (DSPC:DSPG = 10:0, 9:1) において、HD を添加した際の DSPC/DSPG /HD バイレイヤーの分散性と流動性を観察した。図1に HD のモル分率 (M_H) $M_H = 0, 0.2, 0.66$ における DSPC/HD バイレイヤー水溶液 (DSPC:DSPG = 10:0) の外観写真を示した。この系では全ての試料に流動性があり、さらに沈降物や凝集体も観察された。図2に $M_H = 0$ から 0.8 における (DSPC:DSPG = 9:1)/HD バイレイヤー水溶液の外観写真を示した。この系の試料は全て均一であり、 $M_H = 0.60$ と 0.66 の間で、明らかな流動性の低下つまりゲル化が観察された。

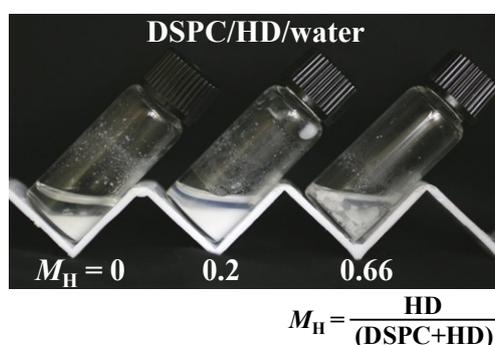


図1. DSPC/HD バイレイヤー水溶液の HD モル分率 (M_H) 依存性の外観写真

全ての試料に流動性があった。さらに全ての試料で沈降と凝集が観察された。

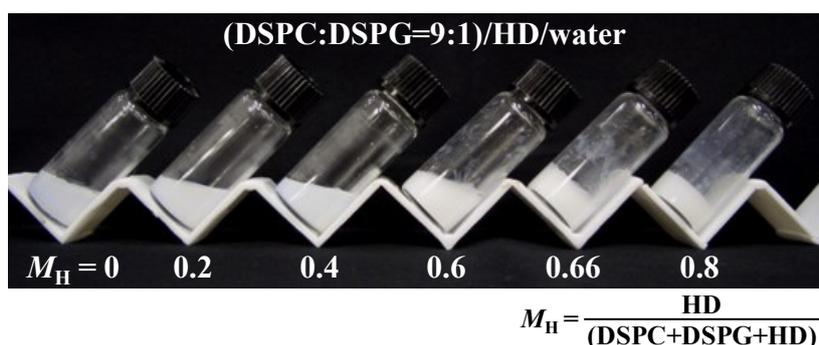


図2. DSPC/DSPG/HD バイレイヤー水溶液の HD モル分率 (M_H) 依存性の外観写真

DSPG のモル分率 (M_{PG}) は 0.1 に固定した (DSPC:DSPG = 9:1)。全ての試料は均一であり、 $M_H = 0.60$ と 0.66 の間で明らかな流動性の低下が観察された。

3-2-2. DSPG 添加によるゲル化挙動

電荷密度の影響を評価するために、様々なDSPCとDSPGのモル比でのDSPC/DSPG/HDバイレイヤー水溶液の分散性と流動性を観察した。図3にHDのモル分率 (M_H) を0.66に固定した際の様々なDSPGモル分率 (M_{PG}) におけるDSPC/DSPG/HDバイレイヤー水溶液の写真を示した。ここで M_{PG} はリン脂質中のDSPGのモル分率と定義した。本系で $M_{PG} = 0$ (DSPG無配合) は図1で示した $M_H = 0.66$ におけるDSPC/HDバイレイヤーと同じ組成であり、 $M_{PG} = 0.1$ は図2で示した $M_H = 0.66$ における(DSPC:DSPG = 9:1)/HDバイレイヤーと同じ組成である。図3より流動性の低い状態 (ゲル化) が、ある特定のDSPGモル分率の範囲で観察された ($M_{PG} = 0.1 \sim 0.3$)。この範囲外の $M_{PG} = 0$ では図1で示したように水から分離した凝集体が観察され、 $M_{PG} = 0.4$ 以上では粘性のある液体状態が観察された (図3、5)。

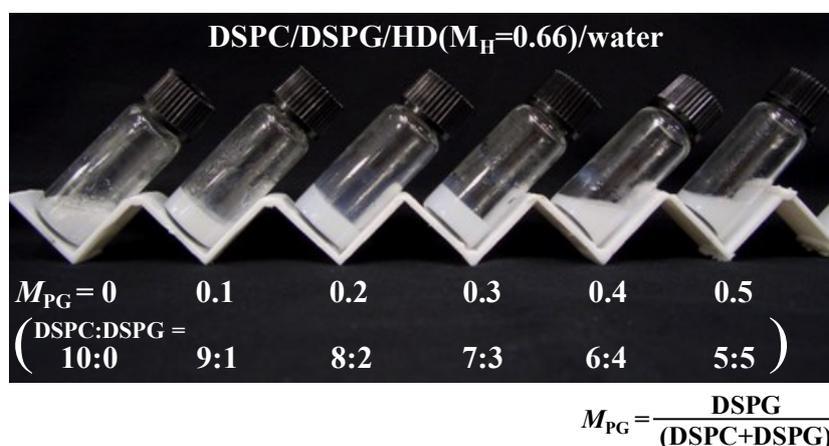


図3. DSPC/DSPG/HD バイレイヤー水溶液の状態の M_{PG} 依存性

HD のモル分率 (M_H) は 0.66 に固定した。明らかな流動性の低下が $M_{PG} = 0.1 \sim 0.3$ の範囲で観察された。 $M_{PG} = 0$ では凝集体が確認でき、 $M_{PG} = 0.4$ では溶液表面の形状から試料が粘性的な液体状態であることを確認した。写真はバイアルを傾けた 3 分後に撮影した。

図4にDSPC/DSPG/HDバイレイヤーの分散性に関する外観をまとめた3成分状態図を示した。白丸 (○) は均一なハイドロゲル状態、×印 (×) は粘性液体や沈降等、均一なハイドロゲルではない状態を示した。ここでの均一なハイドロゲルとは流動性が低く、目視で沈降や凝集がないものと定義した。図4よりゲル化は状態図のかなり狭い範囲 ($M_H \geq 0.66$ かつ $0.1 \leq M_{PG} \leq 0.3$) で起きていることがわかった。

次に目視で確認したハイドロゲル状態のゲル化具合を定量的に評価するために、DSPC/DSPG/HDバイレイヤー水溶液の動的粘弾性ひずみ分散測定を行った。図5はひずみ分散測定の線形領域から求めた複素粘度 ($|\eta^*|$) を M_{PG} に対してプロットした。 $|\eta^*|$ は $M_{PG} \approx 0.05$ と $M_{PG} \approx 0.35$ で急激な変化を示した。この結果は図3の外観写真における流動性状態と一致し

ていた。

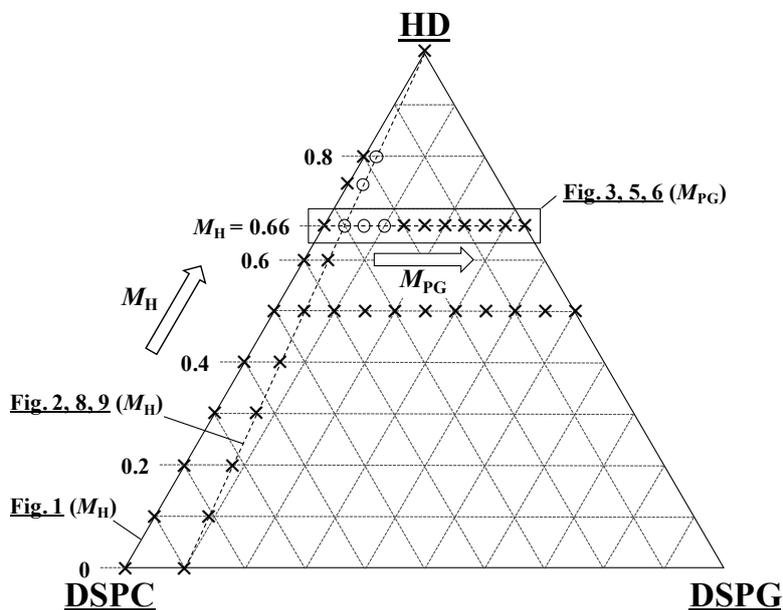


図 4. DSPC/DSPG/HD バイレイヤー3 成分系における外観状態図

白丸 (o) は均一なハイドロゲル状態、×印 (x) は液体状態や不均一状態等、均一なハイドロゲル以外の状態を示した。ゲル化は状態図の中のかかなり狭い範囲 ($M_H \geq 0.66$ かつ $0.1 \leq M_{PG} \leq 0.3$) で生じた。

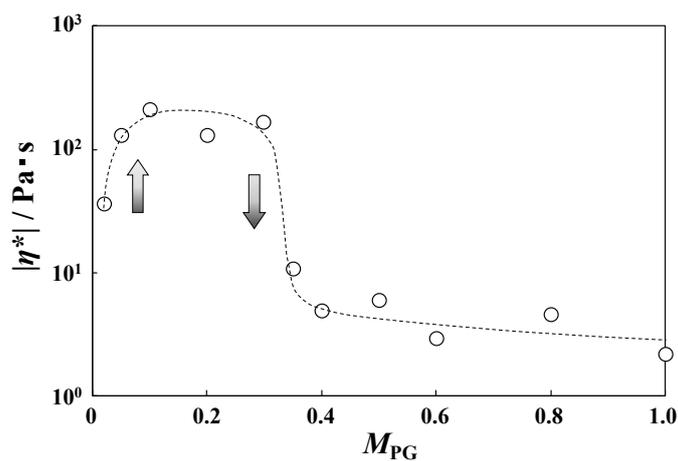


図 5. $M_H = 0.66$ における DSPC/DSPG/HD バイレイヤー水溶液の複素粘度の M_{PG} 依存性

複素粘度は $M_{PG} \approx 0.05$ 付近で上昇し、 $M_{PG} \approx 0.35$ 付近で減少した。溶質が凝集し相分離したために $M_{PG} = 0$ の粘度は測定しなかったが、水と同様な非常に低い粘度であった。点線と矢印はガイドラインである。

3-2-3. DSPG 添加によるバイレイヤー形態変化

ゲル化のメカニズムを調べるために DSPC/DSPG/HD バイレイヤー水溶液の凍結切断電子顕微鏡観察を行った。図 6 に HD のモル分率 (M_H) を 0.66 に固定した際の様々な M_{PG} における DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの凍結切断電子顕微鏡観察像を示した。DSPG 無配合 ($M_{PG} = 0$) では、バイレイヤーが積層したラメラ構造が観察された (図 6a)。小角 X 線回折像で現れた $s = 0.139 \text{ nm}^{-1}$ のシャープピークから、この積層ラメラ構造の層周期は 7.19 nm であった (data not shown)。少量の DSPG 添加 ($M_{PG} = 0.1 \sim 0.3$ の範囲) では、積層したラメラ構造から不規則な水層間距離を有する巨大で平坦なシート状構造への形態変化を観察した (図 6b、c、d)。この M_{PG} 範囲では DSPC/DSPG/HD バイレイヤーはハイドロゲル状態であった (図 4)。 $M_{PG} \geq 0.4$ における DSPG のさらなる添加では、シート状構造から独立した小さなベシクル構造への形態変化が観察された (図 6e、f)。これらの独立した小さなベシクルは、粘性的な液体状態の試料の M_{PG} 範囲で見られた。

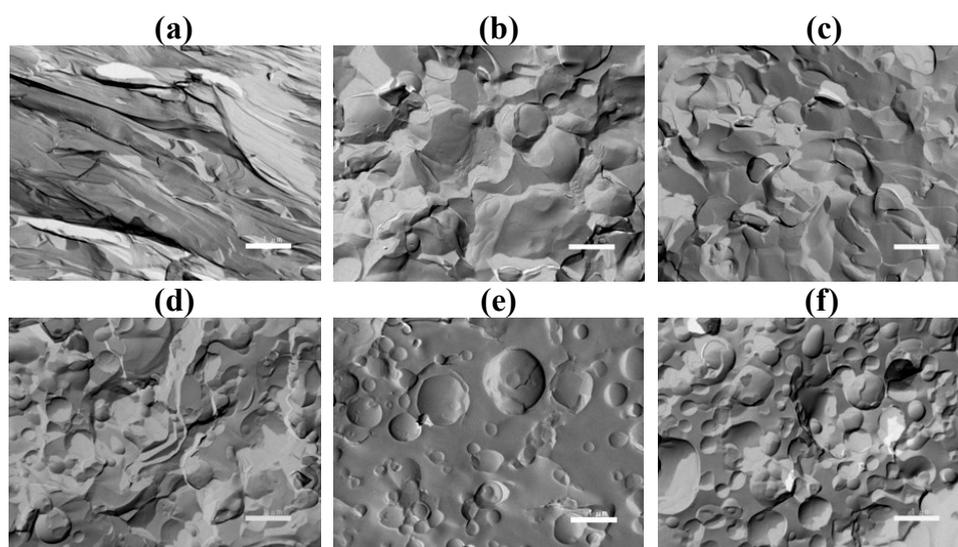


図 6. $M_H = 0.66$ における DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの凍結切断電子顕微鏡観察像

DSPG のモル分率 (M_{PG}) (a) 0, (b) 0.1, (c) 0.2, (d) 0.3, (e) 0.4 (f) 0.5 において観察した。スケールバーは $1 \mu\text{m}$ を示す。DSPG 無配合 ($M_{PG} = 0$) では、バイレイヤーが積層したラメラ構造が観察された (6a)。 $M_{PG} = 0.1 \sim 0.3$ の範囲では、DSPG 添加により積層したラメラ構造から不規則な水層間距離の巨大で平坦なシート状構造への形態変化が観察された (図 6b、c、d)。 $M_{PG} = 0.4$ 以上では独立した小さなベシクルが観察された (図 6e、f)。

3-2-4. 均一なハイドロゲルの微細構造

均一な水ゲルの微細構造を放射光X線回折測定によって解析した。図7に水ゲル状態である $M_{PG} = 0.2$ かつ $M_H = 0.66$ におけるDSPC/DSPG/HDバイレイヤーの小角X線回折 (SAXD) と広角X線回折 (WAXD) の結果を示した。SAXDは $s = 0.141 \text{ nm}^{-1}$ (7.09 nm) にブロードピークを示した。これはバイレイヤー間に相関が無いことを示唆している。一方、WAXDからは $s = 2.44 \text{ nm}^{-1}$ (0.410 nm)に単一ピークが現れた。これは炭化水素鎖の充填構造がヘキサゴナル構造であることを示唆している。

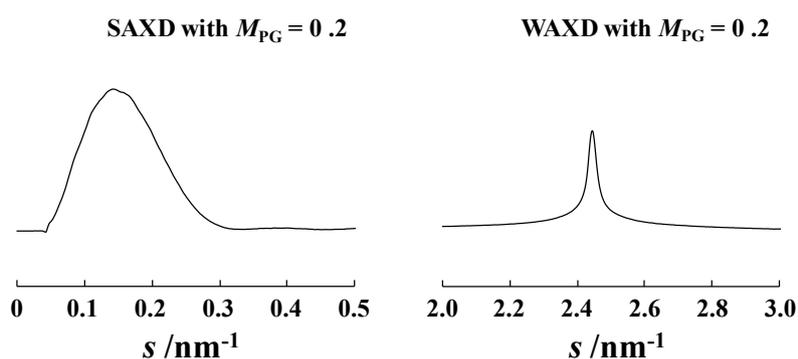


図7. $M_{PG} = 0.2$ におけるDSPC/DSPG/HDバイレイヤーのSAXDとWAXD

均一な水ゲル状態の試料の小角X線回折像 (SAXD) と広角X線回折像 (WAXD) から強度プロファイルを計算した。SAXDは $s = 0.141 \text{ nm}^{-1}$ (7.09 nm) にブロードピークを示した。WAXDでは $s = 2.44 \text{ nm}^{-1}$ (0.410 nm)に単一ピークを観察した。

3-2-5. 安定なリン脂質/HD 会合体の形成

ゲル化へのHD添加の寄与度を明らかにするために、DSPC/DSPG/HDバイレイヤーの熱的相転移挙動を示差走査熱量計 (DSC) にて測定した。図8に M_{PG} を0.1に固定した際のDSPC/DSPG/HDバイレイヤーの炭化水素鎖の融解転移の開始温度 (T_s) と終了温度 (T_e) の M_H 依存性を示した。転移ピーク温度は M_H の増加に従い0.66になるまで単調に上昇し、 $M_H = 0.66$ においては T_s と T_e の差は小さくなった。この $M_H = 0.66$ における転移ピーク幅の狭さは M_{PG} が0、0.2、0.3の場合にも同様に観察された(data not shown)。これらの結果はリン脂質組成にかかわらず、リン脂質 (炭化水素鎖2本) とHD (炭化水素鎖1本) の炭化水素鎖が同数となるモル比1:2で安定的なリン脂質とHDの会合体が形成されていることを示唆している。

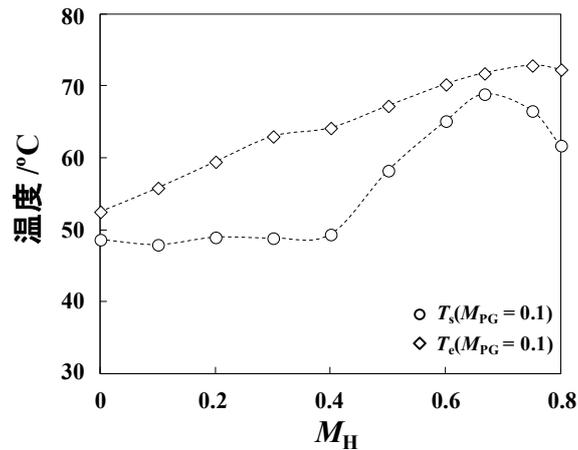


図 8. $M_{PG} = 0.1$ における DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの炭化水素鎖の融解転移の開始温度 (T_s) と終了温度 (T_e)

HD のモル分率 (M_H) を 0 から 0.8 まで変化させた。 M_H の増加に従い $M_H = 0.4$ 付近までは T_s と T_e の差は増加し、その後 0.66 になるまで減少した。これは $M_H = 0.66$ における安定な会合体形成を示唆している。点線はガイドラインである。

3-2-6. 炭化水素鎖充填構造に対する HD の効果

DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの炭化水素鎖充填構造に対する HD の効果を広角 X 線回折 (WAXD) で評価した。図 9 に $M_{PG} = 0.1$ に固定した際の $M_H = 0 \sim 0.8$ までの DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの WAXD 強度プロファイルを示す。 M_H が 0 から 0.66 までの増加に伴い、WAXD のピークはシャープになり広角側に移動した。 $M_H = 0.66$ では $s = 2.44 \text{ nm}^{-1}$ (0.410 nm) にシャープな単一ピークが観察された。これは炭化水素鎖の充填構造がヘキサゴナル構造であることを示唆している。さらなる M_H を増加させてもピーク位置とシャープさはほとんど変化しなかった。

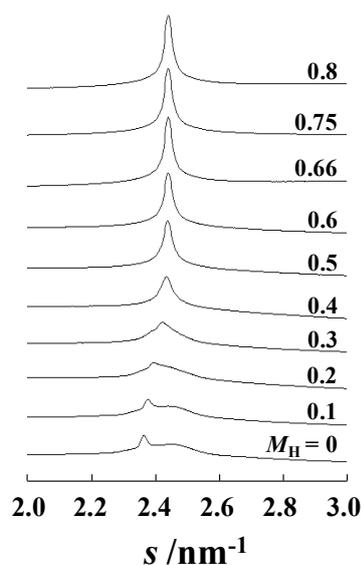


図 9. $M_{PG} = 0.1$ における DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの広角 X 線回折 (WAXD)

HD のモル分率 (M_H) を 0 から 0.8 まで変化させた。 M_H が 0 から 0.66 までの増加に伴い、WAXD ピークは $s = 2.44 \text{ nm}^{-1}$ (0.410 nm) のシャープな単一ピークに収束した。さらに M_H を増加してもピーク位置とシャープさはほとんど変化しなかった。

3-2-7. 考察

精製したリン脂質を用いた DSPC/DSPG/HD バイレイヤー系において、均一なハイドロゲル形成には適量の DSPG が必要とされることを見出した (図 3、5)。凍結切断電子顕微鏡観察より、DSPG のモル比増加に伴い、DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの形態は粘度上昇と並行する形で、一定周期で積層したラメラ構造から比較的大きなシート状構造に変化し、粘度減少と並行する形でシート状構造から独立した小さなベシクル構造へ変化したことがわかった (図 5、6)。これらの結果はゲル化が DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの形態変化と密接に関連していることを示唆している。

問題となるのは何が DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの形態変化をひき起こしているかである。ここで我々は形態変化に影響を与える可能性がある要因としてバイレイヤーの弾性と自発曲率に関して議論する。前章の PC70/HD バイレイヤー系[40]と同様、本系においてもバイレイヤーの弾性は HD 添加により上昇すると思われる。DPPC/HD 系[58-60]で報告されているように、小さい極性頭部を有する HD 分子は、頭部と尾部の面積の不釣り合いを解消するために DSPC や DSPG のような大きな頭部を有するリン脂質の間に取り込まれるだろう。この不釣り合いの軽減は、高い炭化水素鎖充填密度と膜硬直化を生じ、バイレイヤーの平坦化をもたらすと思われる。実際に DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの WAXD ピークは M_H が 0 から 0.66 に増加するのに伴い、シャープになり広角側に移動しており (図 9)、 $M_H =$

0.66 において、表面電荷密度が低い時にはバイレイヤーは平坦な表面形状を有している (図 6a~d)。それ故、HD 分子添加は、炭化水素鎖の充填密度上昇に伴う曲げ弾性率の上昇によって、バイレイヤーの平坦化を引き起こしていると考えられる。

一方でバイレイヤーの自発曲率の上昇は平坦なシート状構造を不安定化させる方向に働く。負の電荷を持つ DSPG 分子は DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの自発曲率の上昇に寄与するに違いない。しかしながら、DSPG 頭部の有効占有面積は隣接する DSPG 分子間の静電的相互作用の影響を受けるので、自発曲率に対する DSPG の効果はそのモル分率に依存しているだろう。DSPG 無配合では、HD 分子によって与えられる高い曲げ弾性率によって、DSPC/HD バイレイヤーは平坦なラメラ構造であった (図 6a)。低い DSPG モル分率 ($M_{PG} = 0.1, 0.2, 0.3$) においては、バイレイヤーの自発曲率は低いままであり、バイレイヤーを曲げるために必要な弾性エネルギー障壁を克服できないと考えられる。なぜならモル分率が低いと DSPG 分子は膜面内でお互いに離れているので静電的な反発力は無視できるためである (図 10 左)。これは M_{PG} が 0.3 以下の時にはシート状構造は維持されるということを明白に説明している (図 6b, 6c, 6d)。さらにこれまでの報告にもあるように[40,67]、DSPG 分子はバイレイヤーシートのエッジ部分をフタすることを助けているだろう。

高濃度 DSPG 存在下では ($M_{PG} \geq 0.4$)、隣接した DSPG 分子間の著しい静電的反発力のために、自発曲率はバイレイヤーを曲げるために十分なくらい大きくなるだろう (図 10 右)。実際、 $M_{PG} = 0.4$ 以上では高い自発曲率を有する独立した小さなベシクルが形成されており (図 6e, 6f)、その結果としてハイドロゲル構造の崩壊が生じている。バイレイヤー中の脂質分子の非対称な配置が脂質混合物の自由エネルギーを下げること[68-71]を考慮に入れると、DSPG 分子のバイレイヤー外層への優先的な分配によって、これらの小さなベシクル形成が促進されていると考えられる。

ハイドロゲル形成に関して言えば、バイレイヤーの形態に加えてバイレイヤー間の相互作用も検討するべきであろう。負の電荷を持つ脂質の添加は、電気二重層理論[53]に基づくバイレイヤー間反発力を生じさせる。バイレイヤー間距離の関数として表わされるこの反発相互作用エネルギーは、無塩系においては通常 2 次極小を持たないので、バイレイヤーは溶液全体に出来る限り広がる傾向にあり、その結果としてシート状の平坦な構造形態を維持したまま、均一な分散状態を形成すると思われる。SAXD 測定 (図 7) で非常にブロードなピークを示していることから、ハイドロゲル状態では平衡となるバイレイヤー間距離を持たないことがわかっている。それ故、この溶液全体へのシート状バイレイヤーの均一な分配によってハイドロゲルが形成されていると考えられる。

前章の PC70/HD 系で述べたように[40]、本系でも水連続体つまりシート状バイレイヤー間に制限された水のネットワークがハイドロゲルに粘弾性挙動を与える構造ネットワークとして働いていると思われる。水連続体という我々が提案したゲル化のメカニズムは、通常のゲル化のメカニズム (SAXD 像から特徴付けられるマルチラメラ構造を有する廻旋状バイレイヤーのネットワーク形成[4,5]) とは異なっている。

PC70 中の荷電脂質のモル比率は、均一なハイドロゲルの形成に必要とされる M_{PG} 範囲に入っているため (図 4)、PC70/HD バイレイヤーのゲル化においても表面電荷密度は重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、DSPC/DSPG/HD バイレイヤーのシート状構造のサイズは PC70/HD のサイズより少し小さいように見える。実際、PC70/HD 系[40]ではバイレイヤーシートの配向を示す異方的な SAXD 像が観察されているが、DSPC/DSPG/HD バイレイヤー系ではほとんど観察されなかった。サイズが大きくなればなるほど、系全体でエッジに必要な分子の数は少なくなることに注目すると、PC70/HD バイレイヤー系におけるバイレイヤーシートの巨大化は、エッジをフタすることができる脂質の不足が原因であると考えられる。

最後にハイドロゲル中の分子間相互作用に関するさらなる知見を得るために、DSPG の代わりにジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA) を、HD の代わりにパルミチン酸 (Pal) を用いて予備的な実験を行った結果、DSPA/DSPC/HD バイレイヤー系でも DSPG/DSPC/Pal バイレイヤー系でも成分比率を調整することでゲル化は生じることがわかった。DSPA は DSPG より小さな頭部を持つ負に荷電した脂質であることを考慮すると、ハイドロゲル形成にとって表面電荷は必須要因であるが、特定の極性頭部間の膜内相互作用は必須要因ではないであろう。これは恐らく HD 分子の挿入によりリン脂質頭部の距離が広がるためであろうと思われる。一方、HD の代わりに Pal を用いた場合にもゲル化が生じるという事実から、ゲル化における HD の必須機能としては、バルキーな頭部のリン脂質間に挿入され膜弾性率を上昇させることが考えられ、界面領域での分子間相互作用の役割は非常に小さいことがわかる。

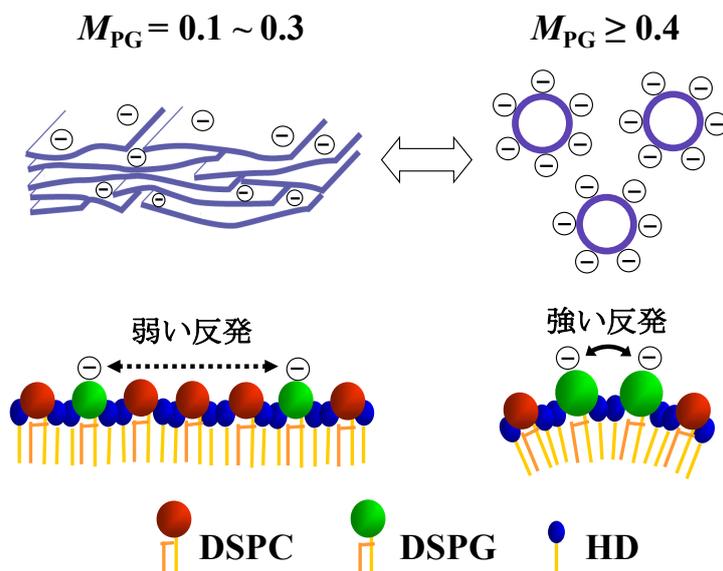


図 10. DSPC/DSPG/HD 系におけるシート状構造からベシクルへの形態変化の模式図

過剰な DSPG 添加はシート状構造からベシクル構造へのバイレイヤー形態変化を引き起こ

した。これは DSPG 分子間静電反発力の上昇がバイレイヤーの自発曲率を上昇させるためであろう。加えて、バイレイヤーの外層への DSPG の優先的な分配は自発曲率の上昇をかなり促進すると考えられる。

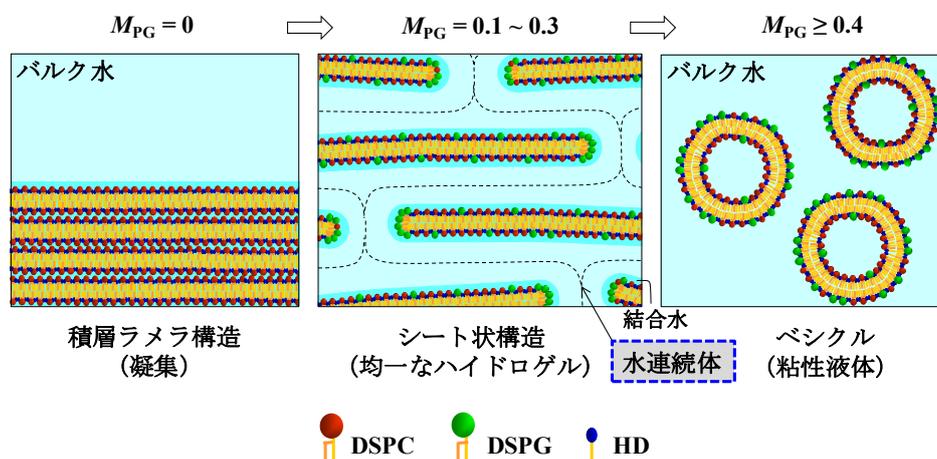


図 11. M_{PG} を増加させた時の DSPC/DSPG/HD バイレイヤーの形態変化の模式図

DSPG 無配合のバイレイヤーは積層したラメラ構造であり、これは HD による高い膜弾性率付与とラメラ間静電反発の欠如によるものと考えられる。負電荷を有する DSPG の添加は表面電荷密度を与え、それによりシート状バイレイヤー間に反発力をもたらし、その結果として水連続体（中心図の点線部）が形成される。この連続体中の水分子はシート状バイレイヤー間のスペースに制約され、その自由な流れは抑圧されるだろう。なぜなら自由水の均一な分配は、バイレイヤー間静電反発による自由エネルギーの最小を表しているからである。この水の流れの制約が水ゲルの弾性の起源であると考えられる。一方で DSPG の過剰添加は、シート状構造から小さなベシクルへの形態変化を引き起こし、水ゲルの崩壊を生じた（図 10）。

3-3. ゲル形成に対するジプロピレングリコール (DPG) 添加の影響

3-3-1. DPG 添加によるハイドロゲルの崩壊

低い誘電率を有する溶媒としてジプロピレングリコール (DPG) を用い、PC70/HD バイレイヤーのハイドロゲルに対する溶媒添加効果を調べた。図 1 に様々な DPG 濃度における PC70/HD バイレイヤー水溶液の写真を示した。DPG 濃度 0~30wt%の試料は均一であったが、40 と 50wt%の試料は明らかに不均一であり、数ヶ月後には離水が観察された。つまり、高濃度の DPG 添加は PC70/HD ハイドロゲルの崩壊を引き起こした。

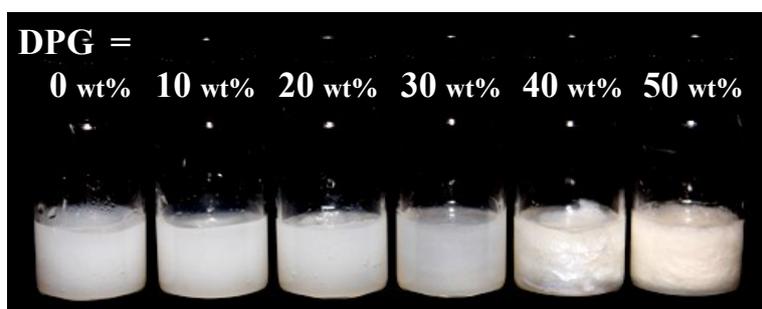


図 1. DPG 添加濃度を増加した際の PC70/HD 水溶液の外観写真

脂質濃度 (PC70+HD) は 5wt%とした。DPG 濃度 0~30wt%の試料は均一なハイドロゲルであったが、40wt%、50wt%の試料は明らかに不均一であった。これらの不均一な試料では数ヶ月後には離水が観察された。

3-3-2. DPG 添加によるバイレイヤー形態変化と微細構造変化

ハイドロゲル状態にある PC70/HD バイレイヤー溶液に DPG を添加したときの構造変化を偏光顕微鏡 (図 2) と凍結切断電子顕微鏡 (図 3) にて観察した。DPG 無配合の場合、偏光顕微鏡では明らかな構造体は観察されなかった (図 2a、2b)。また凍結切断電子顕微鏡では、バイレイヤーは不定形な表面形態を有し、バイレイヤーの規則的積層は観察されなかった (図 3a)。図 2b 中で配向複屈折性が観察されなかったため、光路内で平坦なバイレイヤーは等方的であった。これに対し、DPG40wt%存在下では強い異方性を表すたくさんの明るい線が観察された (図 2c、2d)。これらの線は、試料を回転させた際にポラライザーの偏光軸から 45 度のところで最も明るかった。電子顕微鏡の観察結果からは 10 μm 以上の幅を持つ平坦なシート状バイレイヤーが積層したマルチラメラ会合体の形成が観察された (図 3b)。この観察結果は、偏光顕微鏡で観察された明るい直線が平坦なシート状バイレイヤーに垂直な断面であることを示唆している。この積層したバイレイヤー会合体は端から端までが 10~100 μm で 1 μm オーダーの厚みであると想定される。

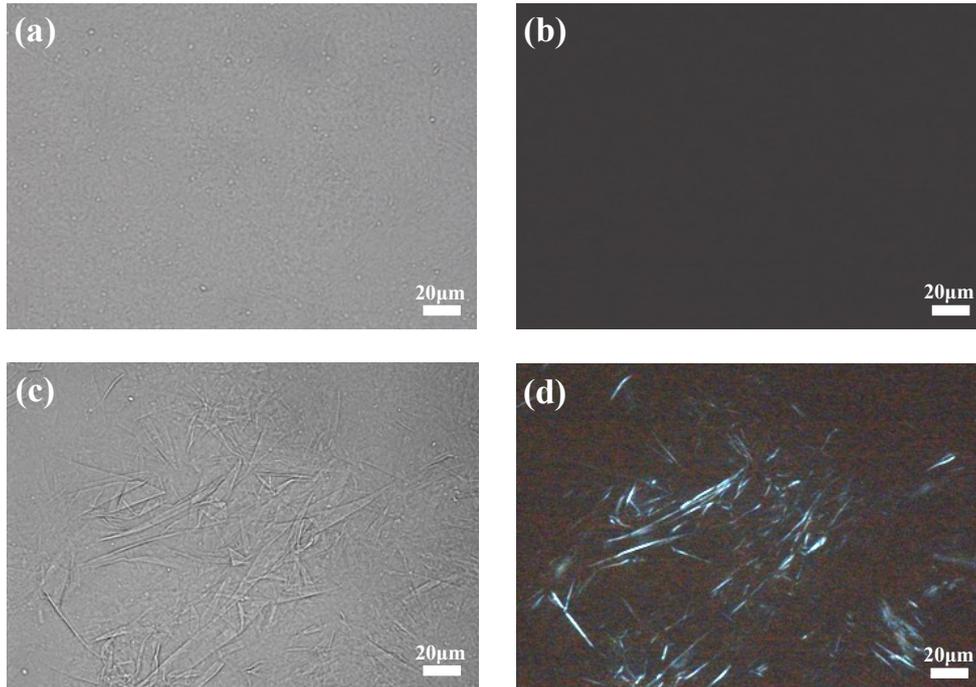


図 2. DPG 無配合 (a, b) 及び 40wt%配合 (c, d) した際の PC70/HD バイレイヤーの偏光顕微鏡像

(b) と (d) の写真は直交ニコル条件下で撮影した。DPG 無配合の場合、偏光顕微鏡からは明らかな構造体は観察されなかったが (a, b)、DPG40wt%存在下では強い異方性を示す沢山の明るい線が観察された (c, d)。この線は、直交ニコル下ではポライザーの偏光軸から 45 度のところで最も明るかった。

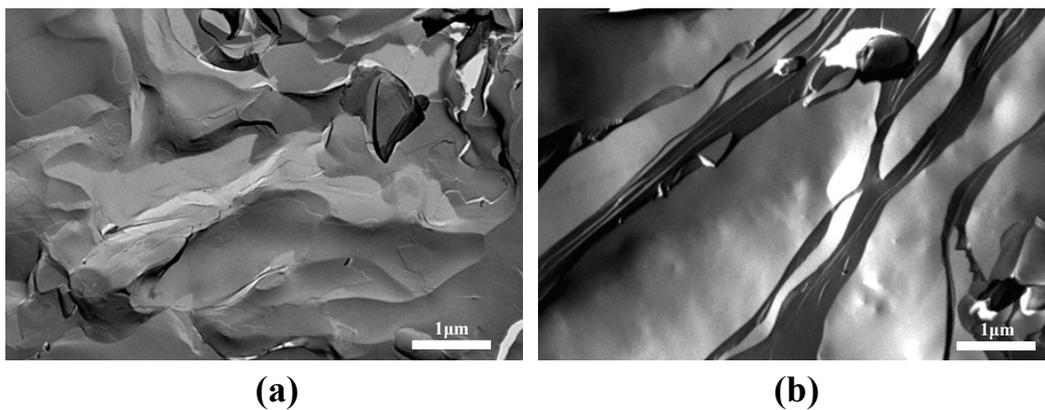


図 3. DPG 無配合 (a) 及び 40wt%配合 (b) した際の PC70/HD バイレイヤーの凍結切断電子顕微鏡像

DPG 無配合 (a) では不定形な表面の小さなシート状構造が観察された。DPG40wt% (b)

存在下では積層した平坦なシート状バイレイヤー（Flat bilayer stack: FBS）からなるマルチラメラ会合体が観察された。

図4にDPG40wt%存在下におけるPC70/HDバイレイヤーの2次元X線回折像を示した。0.159 nm⁻¹において特定方向に強い反射強度（図4の矢印）をもつ不均一な回折像が現れた。これは測定したビームサイズ（200μm×200μm）の範囲内ではランダムに配向できていないということであり、特定方向に平坦な膜が配向していることを意味しており、巨大なFBS形成を支持する結果であった。

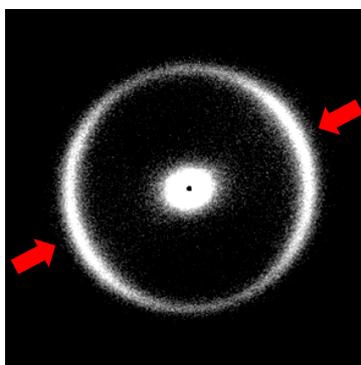


図4. DPG40wt%存在下におけるPC70/HDバイレイヤーの異方的な2次元X線回折像

マルチラメラ会合体の層周期由来の0.159 nm⁻¹の反射（矢印）は、特定方向に最大強度を有する円弧状ピークとして観察された。測定したビームサイズの範囲内では、バイレイヤーシートの配向はランダムではないことが示された。

3-3-3. DPG 添加による積層構造の変化

DPGがもたらすPC70/HDハイドロゲル崩壊のメカニズムを詳細に調べるために、放射光X線測定を行った。図5に様々なDPG濃度におけるPC70/HDバイレイヤー水溶液の小角X線回折（SAXD）と広角X線回折（WAXD）の結果を示した。試料が均一なハイドロゲル状態のDPG = 0~30wt%の範囲では、SAXDはブロードピーク（図5a）を示し、バイレイヤー間の相関は無かった。一方、DPGが40、50wt%の試料のSAXDは0.16 nm⁻¹に非常にシャープなピークを示した（図5a）。これらの結果は、図3bの電子顕微鏡観察結果と合わせると、高濃度のDPG添加により層間距離6.25nmの平坦で巨大なバイレイヤーの積層構造が形成されることを示している。

一方で WAXD は DPG 濃度にかかわらず 2.43 nm^{-1} (0.412 nm) に単一のシャープピークを示しており (図 5b)、DPG 添加による炭化水素鎖のヘキサゴナル充填構造の乱れは観察されなかった。

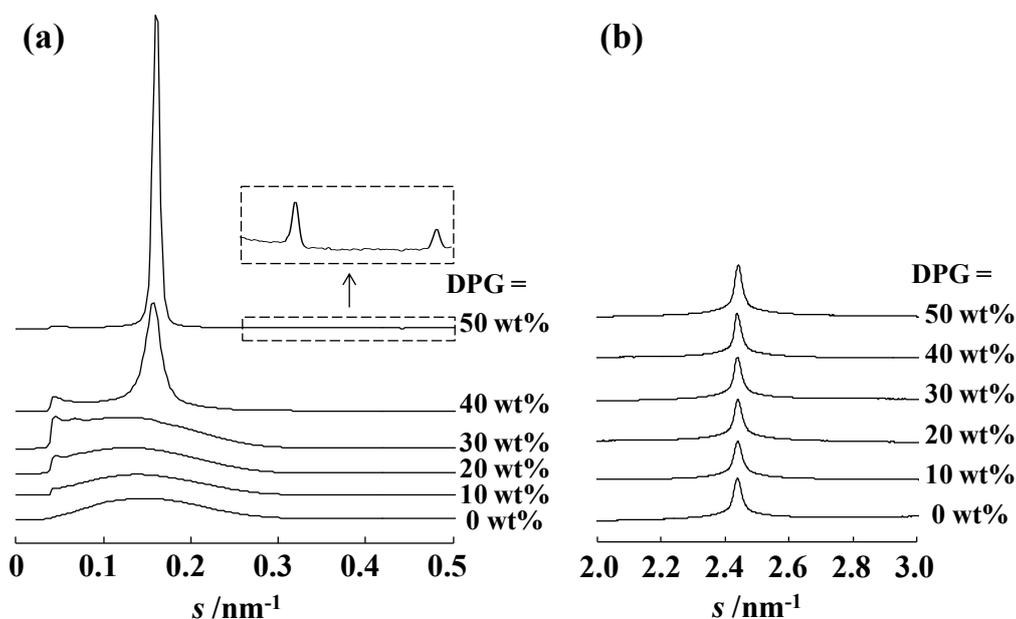


図 5. 様々な DPG 濃度における PC70/HD バイレイヤー水溶液の小角 X 線回折 (SAXD) と広角 X 線回折 (WAXD)

DPG が 0~30wt% の範囲では SAXD はブロードピークであり、バイレイヤー間の相関が無いことを示した。一方、DPG が 40、50wt% の試料の SAXD は 0.16 nm^{-1} に非常にシャープなピークであり、マルチラメラ構造の形成を示した。WAXD は DPG 濃度にかかわらず 2.43 nm^{-1} (0.412 nm) に単一のシャープピークを示し、炭化水素鎖はヘキサゴナル充填構造を取っていることを示唆した。

3-3-4. DPG 添加による相転移挙動変化

ハイドロゲル崩壊の要因となる相互作用を知るために、DPG を添加した際の熱的相転移挙動を示差走査熱量計 (DSC) にて調べた。図 6 には様々な DPG 添加濃度における PC70/HD バイレイヤー水溶液の DSC 曲線、図 7 には DPG 濃度に対する転移温度依存性を示した。DPG 無配合の際には 70.5°C に炭化水素鎖の融解に相当するシャープな吸熱ピークが観察された。炭化水素鎖の融解転移ピーク温度は一定の割合で DPG50wt% まで減少し、その後一定の値となった。ピーク形状は 30wt% くらいまではほぼ一定で 40wt% 以上で若干ブロード

になった。図7の転移温度の DPG 濃度依存性が変化する点は図3や図5で観察されたマルチラメラ構造の出現濃度と一致していた。

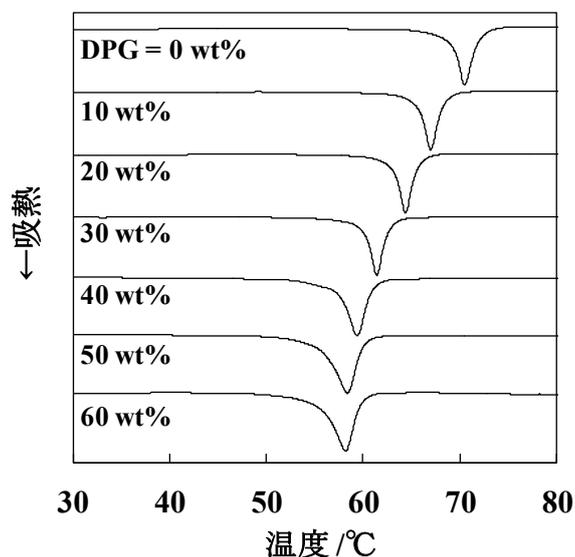


図6. 様々な DPG 添加濃度における PC70/HD バイレイヤー水溶液の DSC 曲線

脂質濃度 (PC70+HD) は 5wt%とした。炭化水素鎖の融解転移ピークは一定の割合で DPG50wt%まで減少しその後一定の値となった。ピーク形状は 30wt%くらいまではほぼ一定で 40wt%以上で若干ブロードになった。

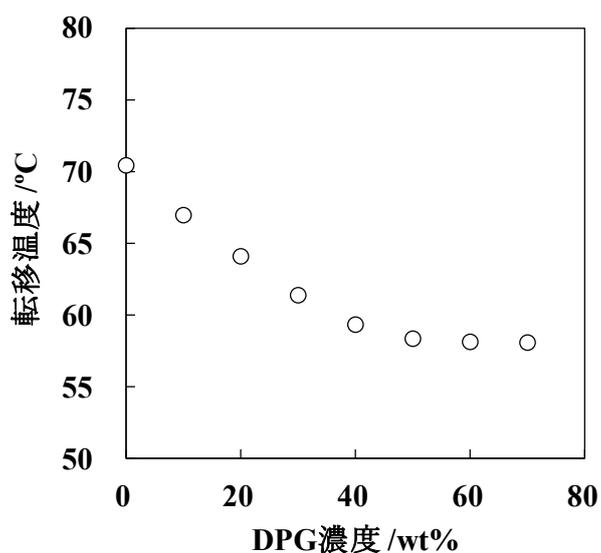


図7. PC70/HD バイレイヤー水溶液における転移温度の DPG 濃度依存性

DPG 濃度に対して転移ピーク温度をプロットした。炭化水素鎖の融解転移ピークは一定の

割合で DPG50wt%まで減少しその後一定の値となった。

PC70/HD バイレイヤーへの DPG 分子の働きを明らかにするために、DPG/水の比率を一定にした条件下で炭化水素鎖の融解転移温度の脂質（PC70+HD）濃度依存性を調べた。DPG と水の重量比率を 1.0 に固定した場合、転移温度は脂質濃度に関わらず 58.9℃でほぼ一定であった（図 8）。さらに DPG/水比率に対する転移温度は、脂質濃度にかかわらず同様の低下挙動であった（図 9）。

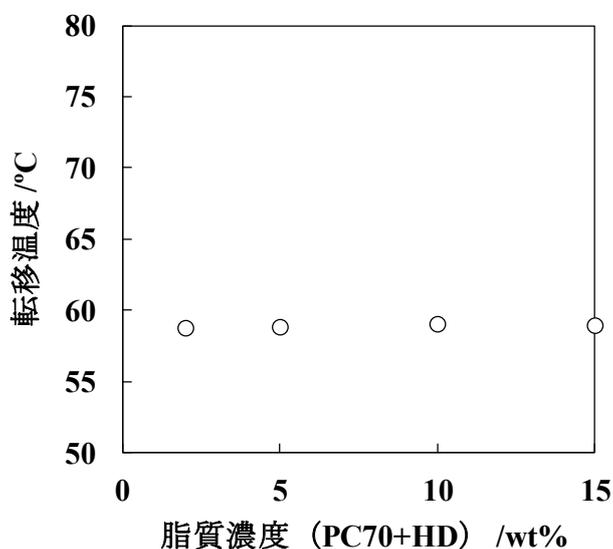


図 8. PC70/HD バイレイヤー水溶液における炭化水素鎖の融解転移温度に対する脂質（PC70+HD）濃度の影響

DPG の重量分率 ($W_{\text{DPG}} = \text{DPG}/(\text{DPG}+\text{water})$) は 0.5 (DPG:water = 1:1) に固定した。炭化水素鎖の融解転移温度は、脂質濃度にかかわらず一定であり、測定した濃度範囲内では脂質濃度に依存していなかった。

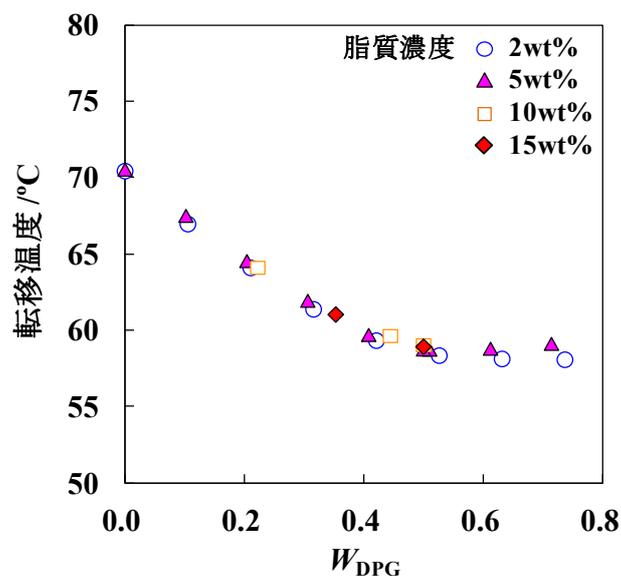


図 9. PC70/HD バイレイヤー水溶液における炭化水素鎖の融解転移温度の DPG の重量分率 (W_{DPG}) 依存性

脂質 (PC70+HD) 濃度は 2~15wt%まで変化させた。転移温度は脂質濃度にかかわらず、DPG 重量分率に依存して減少した。

3-3-5. 考察

高濃度の DPG 添加により、PC70/HD バイレイヤーからなる hidroゲルの崩壊が引き起こされることを見出した (図 1)。凍結切断電子顕微鏡観察と小角 X 線回折測定 (SAXD) からは、DPG 添加による hidroゲルの外観変化と連動する形で、無定形なシート状構造から規則的に積層したマルチラメラ構造 (FBS) へ、バイレイヤーの形態変化が生じていることを明らかにした。非常に大きいこのシート状バイレイヤーの積層構造は偏光顕微鏡写真及び異方性を示した SAXD からも支持される (図 2、4)。これらの結果は hidroゲルの崩壊が膜間距離の減少を伴う FBS の形成によって引き起こされていることを示唆している (図 10)。

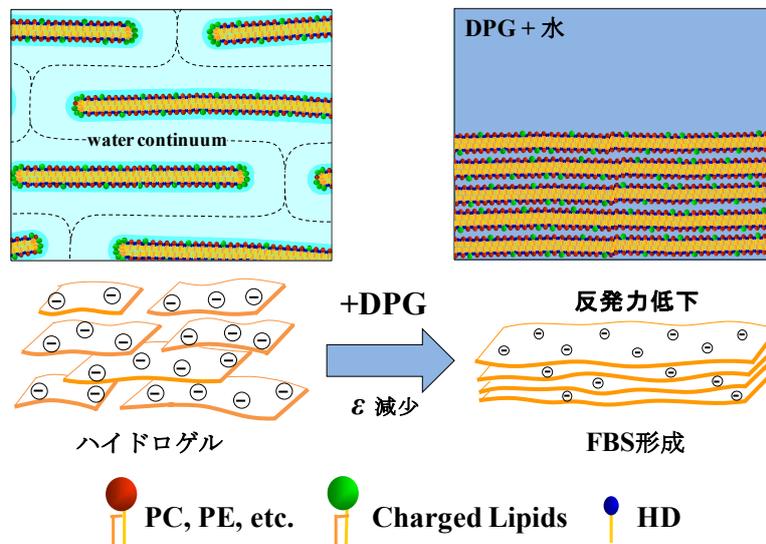


図 10. DPG 添加によって引き起こされる PC70/HD バイレイヤーの形態変化 (模式図)

バイレイヤーは DPG 添加による水相の誘電率 (ϵ) 減少の結果として非常に巨大なフラットバイレイヤー積層体 (FBS) へ変形した。この FBS の形成によりハイドロゲルの崩壊はもたらされた。

FBS の形成メカニズムを考えるにあたり、まず DPG 分子が直接的にバイレイヤーの脂質分子と相互作用しているかどうかを議論する。DPG 添加は WAXD ピークと DSC 曲線の転移ピークのシャープさにほとんど影響を与えていなかったため、DPG はバイレイヤーの脂質分子の炭化水素鎖の充填構造を乱していないと考えられる。これらの結果は 2 つのヒドロキシル基を有する DPG はバイレイヤーの疎水部分へ取り込まれていないことを示唆している。エタノールは DPPC/アルコール系[53]である程度バイレイヤーの疎水部に溶解することが知られているが、DPG はエタノールより親水性が高いため疎水部に入らないであろうと思われる。さらに、脂質濃度にかかわらず、DPG/水の比率が炭化水素鎖の融解転移温度を支配的に決定しているということは (図 8、9)、DPG 分子と脂質分子の間に化学量論的な相互作用が無いことを示している。つまり DPG 分子は脂質分子と直接相互作用するのではなく、DPG は水相の物理化学的性質を変えることで間接的にバイレイヤーの組織化に影響を与えていると考えられる。DPG ($\epsilon=20.38$) [72]に替えてグリセリン ($\epsilon=46.53$) [73]やソルビトール ($\epsilon=35.5$) [73]等の比較的高い誘電率を有するポリオールを添加した場合には相転移温度変化は小さく、ハイドロゲルの崩壊も起こさなかったため、DPG 添加による水相の誘電率低下がハイドロゲルの崩壊に重要な役割を果たしていると考えられる。

次に DLVO 理論[54,55]に従ってバイレイヤー間の相互作用に対する水相の誘電率効果について議論する。以前の研究[40,41]で示したように、DPG 無配合の際には、シート状の

PC70/HD バイレイヤーが溶液全体に均一に分配した結果としてハイドロゲルが形成されている。この均一な分配は負に荷電したバイレイヤー間の反発的な相互作用によってもたらされており、バイレイヤーの負電荷は PC70 混合物中に含まれる酸性リン脂質由来のものである。Gouy-Chapman の電気二重層理論[46]に基づく膜間の反発力がファンデルワールス力よりも十分強いために、全てのシート状バイレイヤーは隣接するバイレイヤーから出来るだけ遠い距離を保とうとし、水は層間に均一に割り当てられ、バイレイヤーは均一に分散していると考えられる。一方、DPG が 40、50wt%の試料の SAXD は 0.16 nm^{-1} に非常にシャープなピークを示しており (図 5a)、図 3b の電子顕微鏡観察結果と合わせて考えると、高濃度の DPG 添加により、層周期 6.25 nm の平坦で巨大なバイレイヤーの秩序だった積層構造が形成され、層間の水を排除することで水相の分離を引き起こしていることがわかる。WAXD は DPG 濃度にかかわらず 2.43 nm^{-1} (0.412 nm) に単一のシャープピークを示しており (図 5b)、炭化水素鎖のヘキサゴナル充填構造は乱れていないので、DPG 添加は水相の物理化学的性質を変えることでマルチメラ構造の形成を引き起こし、均一なハイドロゲルの崩壊を引き起こしていると考えられる。

どのようにして DPG 添加による水相の誘電率低下がこれらの反発力や引力の変化を引き起こしているかについて議論する。誘電率の効果を評価するために、電解質無配合系において、比誘電率 (ϵ) の水相で満たされた表面電荷密度 (σ) の 2 つの荷電表面を有する単純なモデルを考えた。電気二重層理論から、これら 2 つの表面間の圧力 (P) は (1) 式のように表面間の距離 (D) の関数として与えられる。

$$P(D) = 2\epsilon_0\epsilon K^2 \left(\frac{kT}{e} \right)^2, \quad (1)$$

ここで ϵ_0 は真空の誘電率、 k はボルツマン定数、 T は温度、 e は電気素量である。 K の値は (2) 式のように表面における電場 (E_s) から計算される[46]。

$$E_s = (2kTK/e) \tan(KD/2) = -\sigma / \epsilon_0\epsilon. \quad (2)$$

ここでもし D が十分に大きければ、 K は π/D に近似され、相互作用エネルギー ($W_e(D)$) は $P(D) \propto 1/D^2$ を積分することで簡単に計算することができる (Langmuir equation) [46]。

$$W_e(D) = -\int_{\infty}^D P(D) dD \approx -\int_{\infty}^D 2\epsilon_0\epsilon \left(\frac{\pi}{D} \right)^2 \left(\frac{kT}{e} \right)^2 dD = 2\epsilon_0\epsilon \left(\frac{\pi kT}{e} \right)^2 \frac{1}{D}. \quad (3)$$

この近似は、ハイドロゲル状態の PC70/HD の系における層間水の厚みは非常に大きいと見積ることができるため (約 95 nm)、良い近似となっていると考えられる。層間水の厚みは、溶液中の水分子がバイレイヤーの各層間に均等に分配され、炭化水素鎖あたりの表面積は WAXD (0.412 nm) より 0.196 nm^2 と想定して概算した。FBS 形成の定性的な議論をする上で、 K を π/D で近似することは非常に有効である。なぜなら我々の実験条件下 ($\epsilon=20\sim 80$ 、

$\sigma=0.028 \text{ C/nm}^2$ (PC70 の酸性リン脂質より)) においては、たとえ D が 1nm 程度であったとしても、この近似による相対誤差は桁が変わるほど大きくはならないからである。その上 DPG 添加により水相の ε が減少するとより誤差は小さくなる。実際、 π/D の代わりに (2) 式から計算した K の値を使った場合でも、以下の定性的な結論には影響しなかった。(3) 式によれば、DPG 添加による ε の減少に比例して $W_e(D)$ は減少するだろう。例えば DPG ($\varepsilon=20.38$) を等量だけ水 ($\varepsilon=80.10$) [73] に添加した場合、 ε と ε に比例する $W_e(D)$ は 40% 程度減少する。

一方、2 つの平らな表面間の単位面積当たりのファンデルワールスエネルギーは (4) 式で与えられる。

$$W_v(D) = -\frac{A}{12\pi D^2}, \quad (4)$$

ここで A はハマカー定数 [74] である。ハマカー定数はバイレイヤーと溶媒の物質に依存しており、Lifshitz 理論によると我々の系のハマカー定数は次のように書くことができる [74]

$$A = \frac{3}{4} kT \left(\frac{\varepsilon_b - \varepsilon_s}{\varepsilon_b + \varepsilon_s} \right)^2 + \frac{3h\nu_e}{16\sqrt{2}} \frac{(n_b^2 - n_s^2)^2}{(n_b^2 + n_s^2)^{3/2}}, \quad (5)$$

ここで n_b 、 ε_b 、 n_s 、 ε_s はそれぞれバイレイヤーと溶媒の屈折率と比誘電率である。主な電子吸収周波数 ν_e は典型的に $3 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$ である。もし n_b が 1.56 (Huang and Levitt (1997) [75] の表 1 より) であれば、例えば DPG ($n_D^{20}=1.441$) [76] を等量だけ水 ($n_D^{20}=1.333$) [77,78] に加えた場合、ハマカー定数は 40% 程度減少することになる。それ故、DPG の添加はハマカー定数の減少を通してファンデルワールス力の減少をもたらす。

DLVO 理論 [54,55] によると、上記モデル系の単位面積当たりの相互作用エネルギー (W) は次式 (6) で与えられる。

$$W(D) = W_e(D) + W_v(D) \approx 2\varepsilon_0 \varepsilon \left(\frac{\pi kT}{e} \right)^2 \frac{1}{D} - \frac{A}{12\pi D^2}. \quad (6)$$

この関数 $W(D)$ は下記 D_{\max} で極大値を持つ。

$$D_{\max} = \frac{Ae^2}{12\varepsilon_0 \varepsilon \pi^3 (kT)^2} = \alpha \times \frac{A}{\varepsilon}, \quad \alpha = \frac{e^2}{12\varepsilon_0 \pi^3 (kT)^2}, \quad (7)$$

そして極大相互作用エネルギー ($W(D_{\max})$) は下記で表される。

$$W(D_{\max}) = \frac{12\varepsilon_0^2 \varepsilon^2 \pi^5 (kT)^4}{Ae^4} = \beta \times \frac{\varepsilon^2}{A}, \quad \beta = \frac{12\varepsilon_0^2 \pi^5 (kT)^4}{e^4}. \quad (8)$$

(6) 式の膜間相互作用エネルギー ($W(D)$) は 2 次極小を持たないので、もし D_{\max} より大きい層間距離を作れるくらいに溶媒濃度が十分に高ければ、シート状バイレイヤーは出来

る限り広がることになると考えられる。この場合、層間距離の分配は $W(D)$ の極小がないためにそれほど決まった距離にはならないであろう。本系のハイドロゲル状態はこの条件に当てはまっており、実際 DPG が 0~30wt% の SAXD はブロードピークを示しており、これは膜間の相関性が無いことを意味している。

DPG 添加によって ϵ が減少する際には、 A も減少するが、上記で議論したように A の減少割合は ϵ の減少割合とほぼ同じになるため、DPG 添加によって (7) 式の D_{\max} はほとんど変わらないことがわかる。一方で (8) 式の $W(D_{\max})$ は、 ϵ が減少する際には ϵ に比例して減少することがわかる。これは DPG 添加によって、バイレイヤー同士が近づくのを妨げているエネルギーバリアを減少させ、その結果として FBS の形成を容易にしているということの意味している。さらに ϵ の減少は PC70/HD バイレイヤーの表面電荷密度の減少も引き起こしていると考えられる。なぜなら ϵ の減少はバイレイヤー表面付近の電場を強くし、対イオン (H^+) の蓄積を高めることによって付近の pH を減少させるからである。(2) 式を通じて、表面電荷密度の減少は $W(D_{\max})$ の減少を引き起こすので、この効果はエネルギー障壁の低下を促進させると考えられる。

ただ、確かに DPG 添加はエネルギー障壁を低下させるけれども、本系のバイレイヤーシートは $100 \mu\text{m}^2$ 以上と非常に巨大であるので、それでもまだ kT で表される熱エネルギーだけで 10^{-2} J/m^2 オーダーの相互作用エネルギー $W(D_{\max})$ を乗り越えることは非常に難しいと考えられる。それ故、我々は DPG が引き起こすエネルギー障壁の減少は、熱的揺らぎによる膜の部分的な屈曲によって、バイレイヤーシート同士が局所的に D_{\max} の範囲内に近づくことを可能にしているのであろうという仮説を立てている。ハイドロゲルの電子顕微鏡像からもバイレイヤー表面のうねりがはっきりと見えていることは注目に値する (図 3a)。もし近くの接点部分で働く引力がその周りの部分で働く反発力に打ち勝つのに十分強ければ、バイレイヤーシートは FBS を形成できるであろう。引力の強度は $D < D_{\max}$ での $W(D)$ の落ちこみの勾配に依存するので、我々は D_{\max} 付近の相互作用エネルギーの詳細な全容 (本系では 1 nm オーダー) を知らなければならないが、それは本研究で扱うべき範囲を越えている。ここでは DPG の水和力への効果もさらなる理論解析として考慮しなければならないことだけ指摘するに留めておく。

次に SAXD の結果に関して議論する。DPG40wt% 及び 50wt% 存在下では、回折ピークは非常にシャープなピークであるが、30wt% 以下ではかなりブロードである (図 5a)。これらの結果は高濃度の DPG 添加によって FBS が形成されることと一致している。しかしながら、バイレイヤーの膜厚は水層の厚みを含むラメラ層間距離よりも小さいにもかかわらず、FBS 構造からのシャープなピークはハイドロゲル状態のブロードピーク位置よりも広角側に現れている。同じような状況はジパルミトイルホスファチジルグリセロール/NaCl 系でも報告されており [79]、ここでは NaCl 添加によりシングルからマルチラメラ構造へ変化しているが、NaCl 無配合のブロードなピーク位置 (6.48 nm) は高濃度 NaCl 存在下のシャープなピーク位置 (6.1 nm) より小角側に表れている。これらの結果はシンプルな電子密度モ

デルを使ったシミュレーション[80]で説明することが可能である。図 5a の小角 X 線回折像がこのシンプルな電子密度モデルで定性的に説明できるかどうかを検証した結果、シングルラメラ構造由来のブロードピーク位置は、リン原子付近の平均電子密度分布強度 (ρ_p) が小さくなる場合に小角側に表れることがわかった。本系においては PC70 が様々なリン脂質を含み、さらにヘキサデカノールは電子密度の高いリン原子を持っていないので、上記条件は満たされることになると考えられる。

本系における際立った特徴の一つとして、平坦なバイレイヤーシートが異常に巨大なサイズであるということが挙げられる (図 3)。高濃度の DPG 添加により、PC70/HD バイレイヤーの形態は小さく不定形なシート状構造から非常に平坦で巨大なバイレイヤー積層体 (FBS) に変化している。そのため、DPG はバイレイヤーシートのサイズにも影響を与えているように思える。バイレイヤーシートのサイズというのは、エッジ部分を安定化させることができる分子の数によって決まっている。HD と高純度 PC を混合してもバイレイヤーシートを形成しない事[39,40]を考えると、エッジを形成している分子は PC70 の不純物成分であり、曲率の高いエッジ部分をフタするために小さいパッキングパラメータ[81]を持っていると考えられる。ホスファチジルグリセロール (PG) のバイレイヤーはシート状構造であることが知られている[67]ので、PG のような大きな頭部を有する酸性脂質がエッジ形成分子として働いていると思われる。もしその場合には、DPG 添加はエッジ形成分子の数を減らし、バイレイヤーシートのサイズを大きくする方向に働いているだろう。なぜならば既に膜間相互作用についての議論の所で説明したように、DPG が引き起こす誘電率の減少は酸性脂質のプロトン化を促進するからである。さらに加えて、誘電率の減少はバイレイヤーエッジに蓄積する隣同士の荷電した頭部間の反発力を強めることになるだろう。これは有効分子表面積を増加させ、酸性脂質分子のパッキングパラメータは小さくなりバイレイヤーエッジをフタしやすくさせる。それ故、FBS 中の普通ではない平坦で巨大なバイレイヤーは DPG の存在下で誘電率の低下によって安定化されると考えられる。

最後に産業的な観点から考えると、ハイドロゲルを安定化するために溶媒の性質を調整することは非常に重要である。なぜなら多価アルコールのような溶媒は保湿や防腐[42-45]のためにほぼ全ての化粧品や医薬品に配合されているが、このような溶媒添加による水相極性の変化は、しばしばハイドロゲル形成に重大なダメージを引き起こすからである。この意味で言うと、化粧品や医薬品業界にとってユニークかつ機能的で安定したハイドロゲルを作るために、水相の誘電率を変化させることによってハイドロゲルのゲル化、積層具合、バイレイヤー形態、相転移温度をコントロールできるということは非常に有用な情報である。さらに我々は PC70/HD バイレイヤーがその脂質組成が不均一にもかかわらず DPG 存在下でかなり秩序だった FBS を形成することが出来ることを示した。それ故、不純物が沢山入っているような脂質系においても、単に水相溶媒の誘電率を変えることで高い秩序性を有する会合体の形成は可能であることがわかる。これらの結果は様々な脂質多成分系

で構成される化粧品処方や医薬品処方への溶媒の影響を理解する糸口を提供すると考えている。

4. 結論

高純度リン脂質では形成されないにもかかわらず、主成分である DSPC 以外に 30%程度の不純物を含む精製度の低いリン脂質原料である PC70 を用いることで、高級アルコールの一種であるヘキサデカノール (HD) と均一なハイドロゲルを形成することを見出した。HD 添加によるゲル化は、閉じたベシクル構造からエッジを有する平坦なシート状構造へのバイレイヤーの形態変化により引き起こされていることが明らかとなった。エッジ部分は PC70 中の不純物である酸性リン脂質で安定化されており、HD は大きな頭部を持つリン脂質分子の間に取り込まれ、炭化水素鎖の傾きを解消し、膜弾性率を上昇させることでバイレイヤーの平坦化をもたらしていると推察される。この平坦なシート状バイレイヤーは PC70 中の酸性リン脂質由来の負の表面電荷を有するため、バイレイヤー間の反発的な相互作用によって溶液全体への均一な分配がもたらされ、その結果としてハイドロゲルが形成されると考えられる。バイレイヤー間の空間に制限された水の流れがゲルの弾性の起源になっており、この水の連続体がネットワークとして働くことで均一なハイドロゲルが形成されるという新しいメカニズムを提案した。

この PC70/HD ハイドロゲルへの溶媒添加効果を調べた結果、低い誘電率を有する溶媒としてジプロピレングリコール (DPG) を多量添加することにより、非常に平坦で巨大なバイレイヤー積層体 (FBS) が形成され、それに伴いハイドロゲルが崩壊することを見出した。FBS の膜間距離はハイドロゲル状態の膜間距離よりも短いために、水相は膜間のスペースからはじき出され、相分離を引き起こしたと考えられる。膜間相互作用に対する溶媒誘電率の効果を DLVO 理論に基づき準定量的に評価した結果、DPG 添加による水相の誘電率の低下が、膜が接近するのを妨げる相互作用エネルギー障壁及び表面電荷密度を下げることによって、バイレイヤーの形態変化が誘発されていることが示唆された。

PC70 のような精製度の低い原料の方がハイドロゲル形成に好ましいということは、産業におけるコストパフォーマンスの観点からも非常に有用である。高純度リン脂質を組み合わせた結果から、脂質混合物の純度を通してゲル形成能をコントロールできるという可能性が見いだされ、目的に応じて適切な精製度の原料を選ぶことが重要であることがわかった。さらに本系のような不純物を多く含む PC70/HD バイレイヤー系においても、単に溶媒の誘電率を変えるだけで組織的な構造変化を引き起こすことができるということは、複合脂質混合系であってもバイレイヤー会合体挙動 (ゲル化、ラメラリティ、形態、相転移等) は溶液の環境を変えることでコントロールすることが可能であることを示唆している。本系で解明したゲル化のメカニズム及び形成条件、さらに溶媒添加の影響は、複数の両親媒性分子からなるハイドロゲル開発におけるさらなる発展と産業界への応用に必要とされる安定性確保において多大なる貢献をするであろう。

参考文献

- [1] Y. Nagahara, Y. Nishida, M. Isoda, Y. Yamagata, N. Nishilawa, K. Takada, Structure and Performance of Cationic Assembly Dispersed in Amphoteric Surfactants Solution as a Shampoo for Hair Damaged by Coloring, *J. Oleo Sci.*, 56 (2007) 289-295.
- [2] M. Arai, T. Suzuki, Y. Kaneko, M. Miyake, N. Nishikawa, Properties of aggregates of amide guanidine type cationic surfactant with 1-hexadecanol adsorbed on hair, in: Y. Iwasawa, N. Oyama, H. Kunieda (Eds.) *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier, 2001, pp. 1005-1008.
- [3] H.M. Ribeiro, J.A. Moraris, G.M. Eccleston, Structure and rheology of semmisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 26 (2004) 47-59.
- [4] M.D. Barry, R.C. Rowe, The characterisation by small-angle X-ray scattering of a pharmaceutical gel with a lamellar structure, *Int. J. Pharm.*, 53 (1989) 139-143.
- [5] G.M. Eccleston, M.K. Behan-Martin, G.R. Jones, E. Towns-Andrews, Synchrotron X-ray investigations into the lamellar gel phase formed in pharmaceutical creams prepared with cetrimide and fatty alcohols, *Int. J. Pharm.*, 203 (2000) 127-139.
- [6] G.M. Eccleston, The structure and rheology of pharmaceutical and cosmetic creams. Cetrimide creams; The influence of alcohol chain length and homolog composition, *J. Colloid Interface Sci.*, 57 (1976) 66-74.
- [7] S. Fukushima, M. Yamaguchi, F. Harusawa, Effect of cetostearyl alcohol on

stabilization of oil-in-water emulsion : II. Relation between crystal form of the alcohol and stability of the emulsion, *J. Colloid Interface Sci.*, 59 (1977) 159-165.

[8] G. Ran, Y. Zhang, Q. Song, Y. Wang, D. Cao, The adsorption behavior of cationic surfactant onto human hair fibers, *Colloids Surf., B*, 68 (2009) 106-110.

[9] P. Hössel, R. Dieing, R. Nörenberg, A. Pfau, R. Sander, Conditioning polymers in today's shampoo formulations - efficacy, mechanism and test methods, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 22 (2000) 1-10.

[10] L.D. Rhein, C.R. Robbins, K. Fernee, R. Cantore, Surfactant structure effects on swelling of isolated human stratum corneum, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 37 (1986) 125-139.

[11] R.C. Rowe, J. McMahon, The characterisation of the microstructure of gels and emulsions containing cetostearyl alcohol and cetrimide using electron microscopy - a comparison of techniques, *Colloids Surf.*, 27 (1987) 367-373.

[12] H.K. Patel, R.C. Rowe, J. McMahon, R.F. Stewart, A systematic microscopical examination of gels and emulsions containing cetrimide and cetostearyl alcohol, *Int. J. Pharm.*, 25 (1985) 13-25.

[13] B.W. Barry, G.M. Saunders, The self-bodying action of the mixed emulsifier cetrimide/ cetostearyl alcohol, *J. Colloid Interface Sci.*, 34 (1970) 300-315.

- [14] Y. Yamagata, M. Senna, Change in Viscoelastic Behaviors Due to Phase Transition of the Assembly Comprising Cetyltrimethylammonium Chloride/Cetyl Alcohol/Water, *Langmuir*, 15 (1999) 4388-4391.
- [15] Y. Yamagata, M. Senna, Effects of Temperature on the Development of the Internal Structure of the Cetyltrimethylammonium Chloride/Cetyl Alcohol/Water System, *Langmuir*, 15 (1999) 7461-7463.
- [16] G.M. Eccleston, Phase transitions in ternary systems and oil-in-water emulsions containing cetrimide and fatty alcohols, *Int. J. Pharm.*, 27 (1985) 311-323.
- [17] B. W. Barry, Rheology of emulsions stabilized by sodium dodecyl sulfate/long-chain alcohols, *J. Colloid Interface Sci.*, 32 (1970) 551-560.
- [18] S. Fukushima, M. Takahashi, M. Yamaguchi, Effect of cetostearyl alcohol on stabilization of oil-in-water emulsion : I. Difference in the effect by mixing cetyl alcohol with stearyl alcohol, *J. Colloid Interface Sci.*, 57 (1976) 201-206.
- [19] L. Griffiths, R. Horton, I. Parker, R.C. Rowe, NMR pulsed field gradient characterization of the behavior of water in gels and emulsions containing cetostearyl alcohol and cetrimide, *J. Colloid Interface Sci.*, 154 (1992) 238-248.
- [20] L.A. Dissado, R.C. Rowe, A. Haidar, R.M. Hill, The characterization of heterogeneous gels by means of a dielectric technique: I. Theory and preliminary evaluation, *J. Colloid Interface Sci.*, 117 (1987) 310-324.
- [21] P.L. Goggin, R. He, D.Q.M. Craig, D.P. Gregory, An Investigation into the Use of

Low-Frequency Dielectric Spectroscopy as a Means of Characterizing the Structure of Creams Based on Aqueous Cream BP, *J. Pharm. Sci.*, 87 (1997) 559-564.

[22] R.C. Rowe, L.A. Dissado, S.H. Zaidi, R.M. Hill, The characterization of heterogeneous gels by means of a dielectric technique: II. Formulation and structural considerations, *J. Colloid Interface Sci.*, 122 (1988) 354-366.

[23] R.C. Rowe, H.K. Patel, The effect of temperature on the conductivity of gels and emulsions prepared from cetrimide and cetostearyl alcohol, *J. Pharm. Pharmacol.*, 37 (1985) 564-567.

[24] S. Tamburic, D.Q.M. Craig, G. Vuleta, J. Milic, A comparison of electrical and rheological techniques for the characterisation of creams, *Int. J. Pharm.*, 137 (1996) 243-248.

[25] J.D. Loudon, H.K. Patel, R.C. Rowe, A preliminary examination of the structure of gels and emulsions containing cetostearyl alcohol and cetrimide using Laser Raman Spectroscopy, *Int. J. Pharm.*, 25 (1985) 179-190.

[26] Y. Yamagata, M. Senna, Change in the two-step flow behavior on aging the ternary mixture comprising monoalkyl cationic surfactant, long-chain alcohol and water II. Analysis of the creep behavior, *Colloids Surf. A*, 133 (1998) 245-251.

[27] M. Trotta, E. Peira, F. Debernardi, M. Gallarate, Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate, *Int. J. Pharm.*, 241 (2002) 319-327.

[28] M.Z. Fiume, Final report on the safety assessment of Lecithin and Hydrogenated

Lecithin, *Int. J. Toxicol.*, 20 (2001) 21-45.

[29] J. Lang, C. Vigo-Pelfrey, F. Martin, Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholines: fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability, *Chem. Phys. Lipids*, 53 (1990) 91-101.

[30] M. Sentjurc, K. Vrhovnik, J. Kristl, Liposomes as a topical delivery system: the role of size on transport studied by the EPR imaging method, *J. Controlled Release*, 59 (1999) 87-97.

[31] M. Trotta, E. Peira, F. Debernardi, M. Gallarate, Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate, *Int. J. Pharm.*, 241 (2002) 319-327.

[32] V. Erjavec, Z. Pavlica, M. Sentjurc, M. Petelin, In vivo study of liposomes as drug carriers to oral mucosa using EPR oximetry, *Int. J. Pharm.*, 307 (2006) 1-8.

[33] T. Nii, F. Ishii, Dialkylphosphatidylcholine and egg yolk lecithin for emulsification of various triglycerides, *Colloids Surf., B*, 41 (2005) 305-311.

[34] T. Imura, K. Otake, S. Hashimoto, T. Gotoh, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J.F. Rathman, M. Abe, Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method, *Colloids Surf., B*, 27 (2003) 133-140.

[35] Y. Nagasaka, F. Ishii, Interaction between erythrocytes from three different animals and emulsions prepared with various lecithins and oils, *Colloids Surf., B*, 22 (2001) 141-147.

- [36] M. Fujii, K. Shiozawa, Y. Watanabe, M. Matsumoto, Effect of phosphatidylcholine on skin permeation of indomethacin from gel prepared with liquid paraffin and hydrogenated phospholipid, *Int. J. Pharm.*, 222 (2001) 57-64.
- [37] E.J. Weber, Compositions of Commercial Corn and Soybean Lecithins, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58 (1981) 898-901.
- [38] H. Bunjes, M.H.J. Koch, Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles, *J. Controlled Release*, 107 (2005) 229-243.
- [39] S. Mabrey, J.M. Sturtevant, Incorporation of saturated fatty acids into phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* 486 (1977) 444-450.
- [40] Y. Nakagawa, H. Nakazawa, S. Kato, Mechanism of gelation in the hydrogenated soybean lecithin (PC70)/hexadecanol/water system, *J. Colloid Interface Sci.*, 376 (2012) 146-151.
- [41] Y. Nakagawa, M. Ohta, H. Nakazawa, S. Kato, Requirement of charged lipids for the hexadecanol-induced gelation in the phospholipid bilayer system, *Colloids Surf., A*, 443 (2014) 272-279.
- [42] E. Kim, G. W. Nam, S. Kim, H. Lee, S. Moon, I. Chang, Influence of polyol and oil concentration in cosmetic products on skin moisturization and skin surface roughness, *Skin Research and Technology*, 13 (2007) 417-424.

- [43] K. D. Paepe, V. Rogiers, Glycerol as Humectant in Cosmetic Formulations. *Skin Moisturization*, 2nd ed.; CRC Press: 2009; Chapter 17, pp 279–294.
- [44] M. Barr, L. F. Tice, A study of the inhibitory concentrations of glycerin-sorbitol and propylene glycol-sorbitol combinations on the growth of microorganisms, *J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed.*, 46 (1957) 217–218.
- [45] A. Aono, K. Takahashi, N. Mori, H. Shimizu, A. Kobayashi, N. Fujiwara, F. Okada, F. Calorimetric study of the antimicrobial action of various polyols used for cosmetics and toiletries, *Netsu Sokutei*, 26 (1999) 2–8.
- [46] J. N. Israelachvili, *Electrostatic Forces between Surfaces in Liquids. Intermolecular and Surface Forces*, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, 2011; Chapter 14, pp 291–340.
- [47] J. Zeng, K. E. Smith, P. L. Chong, Effects of alcohol-induced lipid interdigitation on proton permeability in L-alpha-dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles, *Biophys. J.*, 65 (1993) 1404–1414.
- [48] E. S. Rowe, Lipid chain length and temperature dependence of ethanol-phosphatidylcholine interactions, *Biochemistry*, 22 (1983) 3299–3305.
- [49] E. S. Rowe, The effects of ethanol on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine, *Mol. Pharmacol.*, 22 (1982) 133–139.
- [50] U. Vierl, L. Löbbecke, N. Nagel, G. Cevc, Solute effects on the colloidal and phase behavior of lipid bilayer membranes: ethanol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures,

Biophys. J., 67 (1994) 1067–1079.

[51] S. A. Simon, T. J. McIntosh, Interdigitated hydrocarbon chain packing causes the biphasic transition behavior in lipid/alcohol suspensions, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 773(1984) 169–172.

[52] E. S. Rowe, Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 813 (1985), 321–330.

[53] L. Löbbecke, G. Cevc, Effects of short-chain alcohols on the phase behavior and interdigitation of phosphatidylcholine bilayer membranes, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1237 (1995) 59–69.

[54] J. T. G. Overbeek, Electrokinetics. In *Colloid Science*; Kruyt, H. R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1952; pp 194–244.

[55] E. Verwey, J. T. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam, 1948; Chapter 7, pp 106–133.

[56] Y. Nakagawa, H. Nakazawa, S. Kato, Effect of Solvent Dielectric Constant on the Formation of Large Flat Bilayer Stacks in a Lecithin/Hexadecanol Hydrogel, *Langmuir*, 32 (2016) 6806-6814.

[57] N.J. Servers, D.M. Shotton, *Rapid Freezing, Freeze Fracture, And Deep Etching* Chapter 1 (1995) 1.

[58] K. Wagner, G. Brezesinski, Modifying dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers

by n-hexadecanol and dipalmitoylglycerol, *Chem. Phys. Lipids*, 145 (2007) 119-127.

[59] K.Y.C. Lee, A. Gospal, Influence of palmitic acid and hexadecanol on the phase transition temperature and molecular packing of dipalmitoylphosphatidyl-choline monolayers at the air-water interface, *J. Chem. Phys.*, 116 (2002) 774-783.

[60] K.B. Chen, C.H. Chang, Y.M. Yang, J.R. Maa, Thermodynamic Behavior and Collapse Kinetics of Mixed DPPC/n-Hexadecanol Monolayers at the Air/Water Interface, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 27 (1996) 455-462.

[61] H.E. Warriner, S.L. Keller, S.H.J. Idziak, N.L. Slack, P. Davidson, J.A. Zasadzinski, C.R. Safinya, The Influence of Polymer Molecular Weight in Lamellar Gels Based on PEG-Lipids, *Biophys. J.*, 75 (1998) 272.

[62] J.M. Boggs, G. Rangaraj, K.M. Koshy, Effect of hydrogen-bonding and non-hydrogen-bonding long chain compounds on the phase transition temperatures of phospholipids, *Chem. Phys. Lipids*, 40 (1986) 23-34.

[63] A.W. Eliaz, D. Chapman, D.F. Ewing, Phospholipid phase transitions. Effects of n-alcohols, n-monocarboxylic acids, phenylalkyl alcohols and quaternary ammonium compounds, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 448 (1976) 220-233.

[64] G. Cevc, D. Marsh, Phospholipid bilayers: physical principles and models Chapter 8 (1987) 231.

[65] J. Huang, Model Membrane Thermodynamics and Lateral Distribution of Cholesterol: From Experimental Data To Monte Carlo Simulation, *Methods Enzymol.*, 455 (2009) 329-364.

- [66] J. Huang, G.W. Feigenson, A Microscopic Interaction Model of Maximum Solubility of Cholesterol in Lipid Bilayers, *Biophys. J.*, 76 (1999) 2142-2157.
- [67] M. Kinoshita, S. Kato, H. Takahashi, Effect of bilayer morphology on the subgel phase formation, *Chem. Phys. Lipids*, 151 (2008) 30-40.
- [68] C. Huang, J.T. Mason, Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 308-310.
- [69] B.J. Litman, Determination of molecular asymmetry in the phosphatidylethanolamine surface distribution in mixed phospholipid vesicles, *Biochemistry*, 13 (1974) 2844-2848.
- [70] C-H. Huang, J.P. Sipe, S.T. Chow, R.B. Martin, Differential Interaction of Cholesterol with Phosphatidylcholine on the Inner and outer Surfaces of Lipid Bilayer Vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71 (1974) 359-362.
- [71] D.M. Michaelson, A.F. Horwitz, M.P. Klein, Transbilayer Asymmetry and Surface Homogeneity of Mixed Phospholipids in Cosonicated Vesicles, *Biochemistry*, 12 (1973) 2637-2645.
- [72] Y. Ikada, Dielectric properties of some diols, *J. Phys. Chem.*, 75 (1971) 1240-1246.
- [73] M. H. William, Fluid Properties, CRC handbook of chemistry and physics 96th ed.; CRC Press, 2015; Section 6, pp 190-196.
- [74] J. N. Israelachvili, Electrostatic Forces between Surfaces in Liquids. Intermolecular and Surface Forces, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, 2011; Chapter 13, pp 253-289.

- [75] W. Huang, D. G. Levitt, Theoretical calculation of the dielectric constant of a bilayer membrane, *Biophys. J.*, 17 (1977) 111-128.
- [76] T-T. Chiao, A. R. Thompson, Densities and Refractive Indices for Glycol-Water Solutions, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1678-1681.
- [77] P. Schiebener, J. Straub, J. M. H. Levelt Sengers, J. S. Gallagher, Refractive index of water and steam as function of wavelength, temperature and density, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 19 (1990) 677-717.
- [78] J. Z. Sun, M. C. E. Erickson, J. W. Parr, Refractive index matching and clear emulsions, *J. Cosmet. Sci.*, 56 (2005) 253-265.
- [79] G. Degovics, A. Latal, L. Lohner, X-ray studies on aqueous dispersions of dipalmitoyl phosphatidylglycerol in the presence of salt, *J. Appl. Crystallogr.*, 33 (2000) 544-547.
- [80] M. R. Brzustowicz, A. T. Brunger, X-ray scattering from unilamellar lipid vesicles. *J. Appl. Crystallogr.*, 38 (2005) 126-131.
- [81] J. N. Israelachvili, Electrostatic Forces between Surfaces in Liquids. Intermolecular and Surface Forces, 3rd ed.; Academic Press: San Diego, 2011; Chapter 20, pp 535–576.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、約10年間と長きにわたり多大なるご指導を頂きました指導教官である関西学院大学工学部教授の加藤知先生に心より御礼申し上げます。またX線データの解析を中心に数多くのご助言を頂きました関西学院大学工学部の中沢寛光氏に厚く御礼申し上げます。さらに、様々なご協力を頂いたクラシエホームプロダクツ株式会社ビューティケア研究所の皆様に変感謝いたします。

本研究におけるX線回折実験は、大型放射光施設SPring-8 のビームラインBL40B2（課題番号：2008A1472、2010A1689、2011B1783、2014B1366、2015A1190、2015A1406）にて実施しました。本研究の一部は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「SPring-8を利用した量子制御に基づくグリーンイノベーション」（S1201027、代表：水木純一郎）の支援を受けて行われました。