報 文

ポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油系非イオン
界面活性剤のベシクル形成性について

堀内 照夫・田嶋 和夫*

ライオン株式会社第一開発研究室 (〒130 東京都墨田区本所 1-3-7)

* 神奈川大学工学部化学教室 (〒221 横浜市神奈川区六角橋 3-27)

Vesicle Formation of Poly(oxyethylene) hydrogenated
Castor Oil having Nonionic Surfactant Properties

Teruo HORIUCHI and Kazuo TAJIMA*

Development Laboratory I, Lion Corporation

(3-7 Honjyo 1 chome, Sumida-ku, Tokyo, 〒130)

* Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Kanagawa University
(3-27, Rokkakubashi, Kanagawa-ku, Yokohama-shi, 〒221)

Vesicle formation of poly(oxyethylene) hydrogenated castor oil derivatives was studied by polarized microscopy, freeze-fractured electron microscopy, particle size analysis, ESR spin labelling, and small angle X-ray diffraction.

It comes to conclusions that poly(oxyethylene) (10) hydrogenated castor oil (HCO-10), in to which 10 moles of oxyethylene moieties of are incorporated, has liquid crystals at 5~60 wt % of concentration below 40°C. A multilamellar vesicle with *ca.* 400 nm of an average diameter of was formed at a HCO-10 concentration below 20 wt%. The properties of the HCO-10 vesicle membrane are discussed in terms of anisotropy in the ESR spectra and long spacing observed by X-ray diffraction.

1 緒 言

1965年, 英国のBanghamは天然由来のリン脂質を過剰の水に分散させると, 二分子膜から成る閉鎖小胞体(closed bilayer)が形成されることを見だし, これをリポソーム(liposome)と命名した¹⁾。このリポソーム膜の脂質マトリックスの基本構造は生体膜と類似の隔壁性を有することから, 生体膜のモデル膜として注目された。そこで, このリポソームはイオンの透過性の研究²⁾を初めとし, 薬物の担体(DDS)^{3), 4)}や反応場(物質, エネルギー, 晶析)^{5)~7)}などとしての使用が可能のため多くの基礎研究や実用化のための応用研究が行われている。

リポソーム膜を構成しているリン脂質, 特にレシチンを膜形成化合物の観点から眺めると, レシチンは天然由来の両親媒性化合物であるため, 生体適合性, 標的指向性の点では優れた特徴を有している。しかし, その反面, レシチンは天然由来であるがために医薬品または,

各種工業分野への応用を考えるさいその化学構造に制限され, 機能付与のため化学修飾が行いづらく, その上, リポソームの調製が煩雑でしかも化学的及び物理的に不安定であることなど多くの問題を内在している。

Kunitake⁸⁾らは, 生体膜を構成する脂質マトリックスの基本構造が2本の長鎖アルキル基と親水基に基づくと仮定し, ジアルキルアンモニウム塩の水溶液中の会合状態について検討したところ, 安定な閉鎖2分子膜小胞体(ベシクル)が形成されることを見いだした。その後, 化学構造の異なる一連の両親媒性化合物について, それらの水溶液中での分子集合状態が広範囲に研究されている。その結果, 一鎖型の両親媒化合物に(1) rigid segment, (2) 尾部アルキル鎖長, (3) アミドやエステル結合のような分子間相互作用基, (4) スペーサルアルキル基, (5) 親水基の構造などを導入したり, 変えることにより, 一鎖型の化合物でもベシクル, 球状, ひも状, ディスク状の様々な分子集合体を形成するということが報告されている⁹⁾。この事により, 2分子膜を形成する現象は, 生体膜由来のレシチン特有の性質でなく,

連絡者: 堀内照夫

リポソーム膜構築のための基本構造さえ備えていれば、広範囲な有機化合物に一般的に見られることがわかり、リポソーム膜の構成成分の多様化が可能となった。

最近、膜を形成する両親媒性の化合物の中で、特に、非イオン性の両親媒性化合物が synthetic tailor-made lipid として注目されている。それはイオン性の両親媒性化合物と比較して、生理的安全性が高く、その上、種々の機能付与のための分子設計が比較的容易なことなどによるからである。

Handjani-Vila¹⁰⁾ らは、モノマー型非イオン性の両親媒性化合物、ポリグリセリンエーテルから成るリポソーム(ニオソーム)について興味ある研究を報告している。このニオソームに ^{14}C で標識したピロリドンカルボン酸を埋め込み、その経皮吸収性をエマルションやミセル等の剤型と比較して、リポソーム剤型はピロリドンカルボン酸の皮膚に対する浸透性を著しく向上するというを見いだしている。また、Baillie¹¹⁾ らは、ポリグリセリン誘導体を用い、5(6)-カルボキシルフルオレセイン(CF)の放出挙動を報告している。Okahata¹²⁾ らは、一連の二鎖型のポリ(オキシエチレン)ジアルキルグリセリン誘導体を合成し、ベシクル形成性に対するアルキル鎖長の長さやエチレンオキシド(EO)の付加モル数の関係について報告している。しかし、オリゴマー型の非イオン性の両親媒性化合物によるベシクルの形成性やベシクル膜の会合状態についての研究はこれまで、ほとんど報告がない。

我々は、化粧品または医薬品などの乳化剤や可溶化剤などの基剤として古くから使用されているオリゴマー型の非イオン性両親媒性化合物であるポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油誘導体に注目し、その水溶液中での分子集合状態について研究を行っている^{13), 14)}。

本研究では、ポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油のベシクル形成性を偏光顕微鏡像、凍結断面電子顕微鏡、粒子径測定、相図、小角散乱 X 線回折、ESR スピラベル法などによって検討したので報告する。

2 実 験

2.1 試 料

Fig.-1 に示すエチレンオキシド(EO)付加モル数の異なるポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油誘導体(一般に、HCO-E と略し、 E はエチレンオキシド(EO)の付加モル数を示し、 $E=l+m+n+x+y+z$)は、日光ケミカル(株)から購入し、そのまま用いた。

Fig.-2 は用いたポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油誘導体の EO 付加モル数と HLB 値及び有機概念図法¹⁵⁾をもとに計算した IOB 値(inorganic/organic balance)の関係を示す。

2.2 ベシクルの調製

Fig.-1 Chemical structure of poly(oxyethylene) hydrogenated castor oil.

Fig.-2 Relationship between HLB or IOB and EO number of HCO.

ベシクル形成性を調べるため、分散溶液は所定量のポリ(オキシエチレン)硬化ひまし油誘導体を蒸留水に添加し、かくはん機で 100 rpm, 30 min 良く混合し調製した。また、ベシクル形成の確認は必要に応じその分散溶液の偏光顕微鏡及び凍結断面法電子顕微鏡観察並びに粒子径測定により行った。

2.3 測 定

2.3.1 液晶の観察

相図作成のため、各分散溶液中における界面活性剤の会合状態は偏光顕微鏡(オリンパス製, BH 型)を用いて観察した。すなわち、種々の濃度に調製した試料(約 2 mg)をスライドガラスの上に取り、カバーガラスでその上面を覆い、水分の蒸発を防ぐため、周囲をコロジオン膜でシールした。また、分散溶液の状態は必要に応じ、自製の加熱ステージ(昇温速度: 約 1°C/min)を用いて観察した。

2.3.2 ベシクル粒子の観察

各分散溶液のベシクル形成性は凍結断面法による電子顕微鏡観察(日立製, H-600 型)により判定した。ま

た、それらのベシクルの平均粒子径はサブミクロンパーティクルサイザー (Brookhaven Instruments Co., BI-90) で測定した。

2・3・3 層間距離の測定

ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油の濃度 (wt%) が異なる分散溶液の層間距離の測定は密封セル (マイラーフィルム, スペーサー: 1 mm) を用い, 小角散乱X線回折装置 (理学電機製, RAD-RB型) で行った。

2・3・4 ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油の会合状態

ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油の会合状態はESR スピンラベル法によって評価した。スピンラベル法は常法に従い次のように行った。まず, 5-, 12-, 及び 16-ドキシルステアリン酸 (5 NS, 12 NS, 16 NS, Sigma Chem. Co.) のスピンプローブをエタノールに溶かして各 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の溶液を調製した。この溶液 2 g を 10 mL のバイアル瓶に取り, 60~70°C の水浴上で EtOH を留去した後, あらかじめ調製しておいた各種ベシクル分散溶液 2 g を取り, ミキサーを用い 2 日間良く振とうし, 混合溶解させた。そして, これらの試料をガラス製のキャピラリー (内径: 0.85 mm) に少量取り, 両端をよう(熔)封して, 電子スピン共鳴装置 (日本電子製, JES-FE) で ESR スペクトルを測定した。異方性パラメーターは ESR スペクトルから, $2A_{//}$ 及び $2A_{\perp}$ を読み取り,

異方性パラメーター (G) = $2(A_{//} - A_{\perp})$ (1) より計算した。

3 結果及び考察

3・1 ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油のベシクル形成性

セッケン, レシチン等の両親媒性化合物は一般にその濃度や温度によって, 種々な分子集合体を形成すること

が知られている¹⁶⁾。

ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油は, ひまし油の主成分であるリシノール酸 (ricinoleic acid) の特性^{17), 18)} を生かしたオリゴマー型の非イオン性両親媒性化合物であり, 低刺激, 低毒性で安全性が大変高いことから, 脂溶性薬物の注射用及び内服用可溶化剤を初め, 化粧品基剤として, 古くから使用されている¹⁸⁾。

Table-1 は偏光顕微鏡観察により, ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油誘導体 (HCO-E) の会合状態に対する (EO) 付加モル数とその濃度の影響を示したものである。

それぞれの誘導体の分散溶液中で, 層状構造 (ラメラ相液晶, N) が観察されたのはポリ(オキシエチレン) (10) 硬化ひまし油 (HCO-10) のみで, しかも濃度 5~60 wt% の領域であった。(EO) 付加モル数が少ないポリ(オキシエチレン) (5) 硬化ひまし油 (HCO-5) は親水性が充分でないため, 沈殿もしくは, 液状の凝集物となり, 水に分散しなかった。また, (EO) 付加モル数が高い HCO 誘導体は, Table-1 の太線に示すように, 低濃度領域で等方性溶液となり, 高濃度領域ではゲル溶液となった。

以上の結果, ポリ(オキシエチレン) 硬化ひまし油誘導体の層状構造は, IOB=0.69 で, 5~60 wt% の濃度範囲の大変狭い領域でのみ出現する事が示された。

Fig.-3 はポリ(オキシエチレン) (10) 硬化ひまし油の会合状態に対する温度の影響を示したものである。

HCO-10 の室温における外観は, 無色または微黄色の油状物質である。これを水に添加すると, 濃度によって, HCO-10 の外観が変化する。すなわち, 外観は 10~20 wt% の濃度範囲で乳濁色を呈した分散溶液となり, 30~60 wt% の濃度範囲で, 半透明な粘ちょうな溶液となる。そして, 80 wt% 以上では均一な透明粘ちょう溶液となる。一方, 偏光顕微鏡で観察すると, HCO-

Table-1 Phase changes of mixtures of HCO-E and water at 25°C

wt % HCO-E	5	10	15	20	30	40	50	60	70	80	90	100
5	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S	O.S
10	N	N	N'	N	N	N	N	N	I(G)	I(G)	I(G)	I
20	I	I	I	I	I	I	M	M	I(G)	I(G)	I(G)	I
30	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I
40	I	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I
50	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I
60	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I
80	I	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I
100	I	I	I	I	I	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I(G)	I

O.S : Oil susp., I : Isotropic soln., N : Neat, I(G) : Isotropic gel soln. M : Middle.

Fig.-3 Phase diagram of poly(oxyethylene) (10) hydrogenated castor oil.

10 の濃度 10~60 wt %, 転位温度 (T_c) が 40℃ 以下の広範囲でニート相液晶が認められた。しかし、その液晶のテクスチャーは HCO-10 の濃度に応じて変化した。HCO-10 の濃度が 10 wt % 近傍で十字ニコル像が観察され、10~20 wt % で十字ニコル像と oily streak texture となり、20~60 wt % では oily streak texture のみとなった。

Fig.-3 に示す 10~20 wt % の濃度領域の HCO-10 分散溶液は外が乳濁状態で、しかもその偏光顕微鏡像が十字ニコル像を示すので、ベシクル (ニオソーム) 形成の可能性が示唆される。そこで、HCO-10 分散溶液について、凍結切断法による電子顕微鏡観察を行った。

10 wt % の HCO-10 分散溶液から採取した検体を液体窒素に浸し、瞬時に凍結させる。次に凍結した固体試料を適当な部位でカットする。この際、疎水性相互作用は温度が低くなると弱くなるので、その破砕面は二分子膜の疎水性ドメインで切断される。Fig.-4 (A) に 10 wt % の HCO-10 分散溶液の凍結切断法による電子顕微鏡写真の一例を示すように同心円状の多重膜ベシクルを形成していることが観察された。

またサブミクロンパーティクルサイザーによる HCO-10 ベシクルの粒子径は約 50~2,000 nm の広範囲に分布し、その平均粒子径は約 430 nm であった。しかし、30 wt % 以上で、偏光顕微鏡像が oily streak texture を示すニート相液晶領域ではベシクルは観察されず、Fig.-4 (B) に示すような繊維状の分子集合体が観察されただけであった。

以上の結果より、Fig.-3 に示す D 領域 (HCO-10 濃度: 10~20 wt %) は concentric lamella 型の液晶形

A : HCO-10 concentration is 10 wt% below T_c .
B : HCO-10 concentration is 40 wt% below T_c .
Fig.-4 Freeze-fracture electron micrograph of HCO-10 samples.

Fig.-5 Effect of HCO-10 concentration on $2(A_{//} - A_{\perp})$ for 5 NS with various temperature.

成領域であると結論した。

3.2 HCO-10 ベシクル分散溶液の会合状態

HCO-10 は濃度 10~60 wt %, 温度 40℃ 以下の広範囲な領域でニート相液晶を示す。しかし、ニート相液晶の texture は HCO-10 の濃度に応じて変化することがわかった。その会合構造は Fig.-4 に示すように、閉鎖二分子膜小胞体であるベシクルから二分子膜のニート相液晶へ変化することが凍結切断法電子顕微鏡観察の結果から確認された。そこで、これらの分子集合体の会合状態と層間距離に対する HCO-10 の濃度の影響を ESR スピンプロブ法と小角散乱 X 線回折法によって検討した。

Fig.-5 は HCO-10 の分子会合体に標識したスピンプロブ (5 NS) の異方性パラメーター [$2(A_{//} - A_{\perp})$] に対する HCO-10 の濃度と温度の影響を示したものである。25℃ におけるスピンプロブ (5 NS) の異方性パラメーターは、HCO-10 の濃度が 5~60 wt % の範囲ではほぼ一定となるが、60 wt % 以上となると増加した。

このことは、Fig.-3 に示したように、ニート相液晶から粘ちょうなゲル溶液に転移するため、HCO-10 の分子運動性が束縛されることと、HCO-10 の濃度上昇に伴い、分子内または分子間水素結合が形成されるためと考えられる。一方、温度が上昇する場合、異方性パラメーターの値は 25°C のときと、ほぼ同じパターンで減少した。しかし、温度が 45°C より以上で、HCO-10 の濃度が 80~100 wt % の領域において、異方性パラメーターは急激に減少した。これは、HCO-10 の分子内または、分子間水素結合が切断し、HCO-10 分子の熱運動性が急に増加するためと考えられる。

Fig.-6 Plots of long spacing as a function of HCO-10 concentration at 25°C.

Concn. : 10 wt % for each run
Fig.-7 Plots of $2(A_{//} - A_{\perp})$ for various spin probes against IOB values of HCO at 25°C.

Fig.-6 は 25°C における小角 X 線回折測定による HCO-10 の濃度と長面間隔の関係を示す。長面間隔は HCO-10 の濃度が 10~60 wt% で、170~180 Å とほぼ一定であった。しかし、70 wt% 以上では 130 Å に減少した。水分含有量が 30 wt% 以下の等方性ゲル溶液では自由水が存在せず、すべて HCO の結合水になっているが、水分含有量が 40 wt% 以上の液晶状態では一部が自由水となり、二分子層間に浸入したため長面間隔が増加したと思われる。

Fig.-5 及び Fig.-6 に示すように、Fig.-3 に示したニート相液晶内でのベシクル形成領域と二分子膜（ラメラ液晶）形成領域における会合状態の差異は本研究で行った ESR による異方性の測定及び小角散乱 X 線回折法では識別することができなかった。この理由は HCO-10 ベシクルが MLV 構造で、平均粒子径約 430 nm と大きく、その曲率が小さくなるので、ベシクル状態の HCO-10 分子の配向状態は二分子膜（ラメラ液晶）状態の配向性とミクロな視野では変わらないためと推定される。

一方、Table-1 に示したように、HCO のベシクル形成性には、HCO 分子の IOB 値が重要な役割を果たしていると考えられる。

Fig.-7 は HCO 誘導体の IOB 値と各種スピンプローブの異方性パラメーターとの関係を示す。IOB 値が大きくなると（すなわち、HCO 分子の親水性部位の割合が増す）と、HCO 会合体の深さ方向に標識した各種スピンプローブの異方性パラメーターの値はいずれも連続的に減少した。この異方性パラメーターは、IOB 値の増加と共に HCO 会合体の表面近傍（5 NS）と会合体の内部（16 NS）では単調に減少するのに対して、HCO 会合体の中間部位（12 NS）では著しく減少した。すなわち、HCO 会合体は均一な膜構造ではなく、HCO 分子の長鎖中間部位すなわち長鎖に付加している（EO）基が分散媒等の極性に対し、極めて感応しやすい部位であることが明らかになった。

〔平成 4 年（1992 年）3 月 24 日受理〕

文 献

- 1) A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238 (1965)
- 2) V. K. Miyamoto, T. E. Thompson, *J. Colloid and Interfac. Sci.*, **25**, 16 (1967)
- 3) Y. Toyoshima, K. Kurihara, *Yukagaku*, **26**, 597 (1977)
- 4) S. Noro, F. Ishi, *Yukagaku*, **31**, 146 (1982)
- 5) 国武豊喜, 岡畑恵雄, 化学の領域, **34**, 480 (1980)
- 6) J. Sunamoto, H. Kondo, A. Yoshimatsu, *Biochim. Biophys. Acta.*, **510**, 52 (1978)
- 7) S. Mann, J.P. Hannington, R.J.P. Williams, *Nature*, **1324**, 565 (1986)

- 8) T. Kunitake, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3860 (1977)
 - 9) T. Kunitake, Y. Okahata, M. Shimomura, S. Yasunami, K. Takarabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5401 (1981)
 - 10) R.M. Handjiani-Vila, A. Ribier, B. Rondot, C. Vanlerberghie, *I.J. Cosmet. Sci.*, **1**, 303 (1979)
 - 11) A.J. Baillie, A.T. Florence, L.R. Hume, G.T. Muirhead, A. Rogerson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 863 (1985)
 - 12) Y. Okahata, S. Tanamachi, M. Nagai, T. Kunitake, *J. Colloid and Interfac. Sci.*, **82**, 401 (1981)
 - 13) K. Tajima, E. Takagi, T. Horiuchi, M. Tanaka, Proceedings of Section Lectures and Scientific Presentations on ISF-JOCS World Congress, Vol. II, 741 (1988)
 - 14) M. Tanaka, H. Fukuda, T. Horiuchi, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **67**, 55 (1990)
 - 15) 藤田 穆, 化学の領域, **11**, 719 (1957)
 - 16) J.W. McBain and W.W. Lee, *Oil and Soap*, **20**, 17 (1943)
 - 17) 水沼仁宏, 粧技誌, **3**, 10 (1966)
 - 18) 山口潮三, 早川 勉, 油脂, **37** (12), 77 (1984)
-