The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	生体高分子と水の相互作用に関する基礎的研究-陽電子消滅法と熱分析を用いた検討-
Author(s)	秋山, 庸子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2057
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

生体高分子と水の相互作用に関する基礎的研究
－陽電子消滅法と熱分析を用いた検討－

2007 年度

大阪大学大学院　工学研究科

秋山　庸子

第１章　　序論

1.1　生体組織におけるメゾスコピックな構造評価の重要性

生体組織のほとんどは 70～80%の水を含む生体高分子ゲルであるといえる．生体組織中の水は，物質代謝やイオン輸送，組織構造の維持，熱的あるいは化学的変性からの保護といった作用を担っており，生体機能の発現に大きく寄与している [1)-2)]．一例として Table 1-1 に大腸菌の分子成分を示す．この表に示すとおり，生体組織は水をはじめとして，蛋白質や糖質・脂質などの生体高分子を主成分としている．生体の生命活動の多くは水を媒質として行なうため，生体中の水の束縛状態は生体機能の発現に大きく関与している．したがって，生体機能の発現・維持において，主成分である水と生体高分子の相互作用を理解することは重要である．特に生体機能の維持において不可欠な要素である組織の巨視的物性は，水と生体高分子の相互作用に依存すると考えられる．なぜならば，生体組織への応力負荷を想定した場合，応力場における材料の変形特性を細分割していけば最終的には分子どうしの相互作用に行き着くと考えることができるからである．ここで水と生体高分子の相互作用が重要となる．

Table 1-1 Molecular components in escherichia coli bacterium[2)].

Molecular Components	(wt.%)
Water	70
Protein	15
Nucleic Acid（DNA）	1
Nucleic Acid（RNA)	6
Carbohydrate	3
Fat	2
Constituent unit and Intermediate	2
Inorganic Ion	1

本論文においては，人体において最大の表面積と重量を占める生体軟組織である皮膚・皮下組織と，それらに含まれる線維状蛋白質を対象として，生体高分子と水の相互作用について議論し，巨視的物性との関係を検討する．

生体組織の巨視的物性である粘弾性や摩擦特性は，老化や疾病の診断指標の 1 つとして利用されている．例えば皮膚の老化の診断に用いられる皮膚粘弾性測定 [3)-5)]，乳ガン [6)]や皮膚の状態 [7)]の診断のために用いられる触診などが挙げられる．しかし，加齢や病変による組

織の粘弾性の変化がどのようなメカニズムに起因するかは未だ明らかになっていない．その原因として，生体組織を連続体として見た巨視的スケールの研究，すなわち粘弾性や摩擦特性の解析と，生体組織を非連続体として見た微視的スケールでの研究，すなわち生体高分子のコンホメーション解析や水分子の運動性評価とが互いに独立して研究されており，それらを繋ぐべきメゾスケールの解析，すなわち生体組織を分子の集合体として見た場合の，水和状態や架橋構造の解析，およびメゾスケールの解析と微視的・巨視的スケールの特性との関係づけが十分に進んでいないことが挙げられる．ここで，メゾスケールとは，微視的・巨視的スケールの中間という意味であり，分子の集合体どうしの相互作用に相当する．微視的・巨視的スケールの中間に位置する研究としては，生物学や医学における組織学的研究や病理学的研究[8)]が挙げられるが，これらの学問領域の観点は，組織が分子の集合体であるという観点とは異なるものであり，物理学的特性である粘弾性や摩擦特性に関連付けることは困難である．したがって，若干の系の単純化は必要となるが，生体組織を材料としての観点から見直し，物理化学的見地から研究を行うことにより，組織の粘弾性・摩擦特性の変化の機構がより明確になると考える．

生体組織は様々な種類の複数の分子が構造化した集合体であるため，巨視的特性の変化機構を明らかにするには，生体高分子と水分子の相互作用を考慮した，メゾスケールの水和状態や架橋構造の解析が必要となる．本研究では，生体高分子ゲルの水和状態や架橋構造を評価するための手法として，主に陽電子消滅法と熱分析を用いた．

陽電子消滅法は，物質中に存在する 10^{-10}～10^{-8}m の大きさの微小空隙を測定するために有力な手法であり，X線回折や中性子散乱等の分光学的手法では捕らえにくいとされる，規則的結晶構造を持たないアモルファス物質にも適用可能であることが特徴である．この手法は，複数の成分の混合物である生体組織における空間構造を追跡するために最適な手法の一つであるといえる．陽電子消滅法によって得られた微小空隙の情報，および従来から用いられている水の束縛状態の解析法である熱分析と，巨視的物性である粘弾性や摩擦特性とを相互に関係付けることにより，外部環境や加齢，疾病による生体組織の巨視的物性の変化機構を明らかにすることができると考えられる．

1.2　生体組織の粘弾性

皮膚・皮下組織の力学特性の特徴は，粘弾性体であること，大変形を起こすことの 2 点である．したがって変形挙動が時間依存性を持ち，金属や木材などの材料よりも，変形に関する解釈が複雑となる．生体軟組織のレオロジーは粘性率と弾性率を用いて表すことができる．弾性をフックの法則に従うバネ，粘性をニュートンの粘性法則に従うダッシュポットで表すと，単純化された粘弾性物体としての力学模型を構築できる．バネとダッシュポットを直列につないだ模型を Maxwell モデルといい，並列につないだ模型を Voigt モデルという[9)]．生体組織の中には，血液のように，非ニュートン流体として扱う必要のある組織も多いが，本研究で取り上げる皮膚・皮下組織に関しては，一般に，このようなバネとダ

ッシュポットのモデルを直列あるいは並列に複数個組み合わせることによって，粘弾性パラメータを推定することが可能である[3)].

1.3　生体組織の摩擦特性

摩擦特性は，触感の感覚受容器が存在する皮膚において，巨視的物性として欠かせないもう一つの要素であるといえる．摩擦とは，物体が外部の力によって移動するときに，その運動を妨げる方向に生じる抵抗力であり，大別して乾燥摩擦，流体摩擦，境界摩擦の三種類がある[10), 11)]．乾燥摩擦は二つの固体表面に汚れの存在しない場合の摩擦である．流体摩擦は，摩擦面間に十分に厚い流体膜が存在する場合の摩擦の状態で，この場合，摩擦係数は主に粘性流動膜の粘性率に依存するとされている．境界摩擦は流体摩擦の状態から粘性流動膜が欠如した状態で，流体膜としては流体の分子が接触している固体面に吸着してできる，吸着分子膜のみが残留している．したがって流体膜は薄く，固体面に吸着しているため粘性流動ができず，その変形抵抗は粘性流動膜に比べて大きくなる．

本研究で対象としている皮膚の摩擦について考えると，皮膚の表面には皮脂や水が存在するため，固体材料との摩擦を想定すると，境界摩擦の状態であるといえる．またエマルションを塗布した状態は，その膜の厚さに依存して境界摩擦あるいは流体摩擦の状態となる．境界摩擦の場合，皮膚の摩擦特性は表面に存在する流体膜，特に角層水分量や皮脂量に依存することが予想される．さらに，前項で述べたように粘弾性体である生体の粘弾性においては，生体表面付近の粘弾性が無視できなくなる[12)]．したがって，角層水分量が角質層に存在する角層間脂質の量に依存するという報告などから推察すると，摩擦においても，粘弾性と同じく生体高分子と水の相互作用が重要であると考えられる．

1.4　生体組織の水和構造

本研究では，生体組織の巨視的物性である粘弾性，および摩擦特性を決定づける因子として生体高分子と水の相互作用に着目し，巨視的物性とメゾスコピックな物性との関係を明らかにすることを目的としている．

一般に，水の束縛状態の解析には，核磁気共鳴，X 線回折，分光分析，中性子散乱などの，直接的に水の構造を解析する手法，および比熱，相転移の潜熱，粘性，比重測定など，巨視的パラメータによって間接的に水の構造を推定する手法が用いられてきた[13)]．しかし，前者の直接的な手法においては，ハイドロゲルのような周期構造を持たない混合物の測定は困難である．また，後者の間接的手法による結果との相違が見られ，例えば結合水は氷に近い結晶構造を持っているにもかかわらず，結合水の増加に伴い比重が増加する場合があるなどの矛盾が生じており，新しい手法による水の空間構造，電子状態の高精度な解析が求められている．

水の束縛状態の解析に最も広く用いられている手法は，核磁気共鳴法(NMR；Nuclear Magnetic Resonance)[14)-17)]と示差走査熱量分析法 (DSC；Differential Scanning Calorimeter)[18),19)]である．^{1}H-NMR においては，緩和時間から計算される水分子の回転の相関時間によって水の束縛状態を分類され，水の束縛状態の指標の一つとなっている．Fig. 1-1 に示すように，結合水が 10^{-7} 秒，自由水が 10^{-12} 秒とされており，それらの中間の相関時間を持つ水分子は中間水と呼ばれる．一方，示差走査熱量分析法による水の束縛状態の解析は，溶質分子に強く束縛された水が純水に比較して凍結しにくいことを利用した手法であり，水の凍結温度や氷の融解エンタルピーを用いて水の束縛状態を分類することが可能である [20)-23)]．一般に上述の中間水は－25℃付近で凍結するが，結合水は-190℃においても凍結しないという報告がある．[2)]

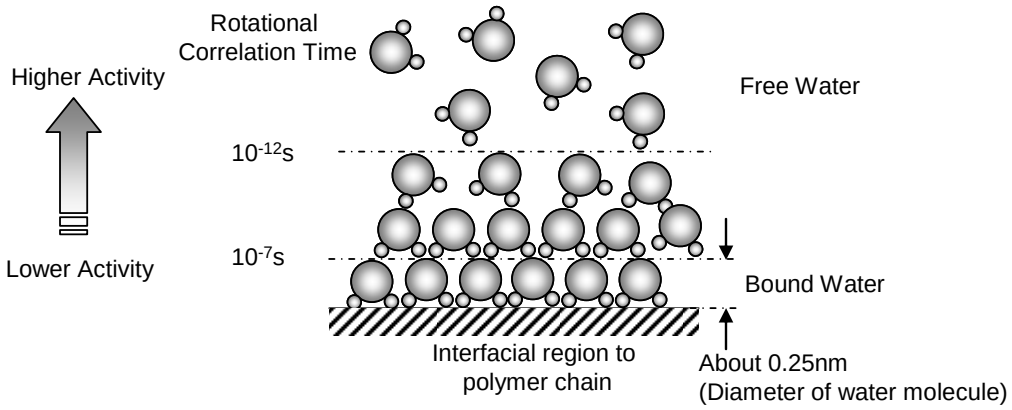


Fig. 1-1 Water Classification in Biopolymer.

本研究で使用したもう一つの評価法は陽電子消滅寿命測定法である．陽電子消滅法は，陽電子の寿命によって材料中に存在する 10^{-10}～10^{-8}m のスケールの空隙評価を行うことができ，同時に消滅 γ 線の光電ピーク形状評価の指標である *S* パラメータによって，対消滅電子の運動量評価を行えるという特徴を持つ [24)]．

物質中に入射した陽電子は，原子・分子のイオン化や励起により熱エネルギー程度まで減速され，この過程は熱化とよばれる．熱化した陽電子は，物質中を拡散し，消滅位置の電子密度に逆比例する寿命で電子と対消滅する．この現象を検出することで，材料の空間構造解析を行うことができる．高分子材料中では，ポジトロニウム(Ps)と呼ばれる電子と陽電子の水素様の束縛状態の形成・消滅過程が加わる．特に陽電子と電子のスピンが平行な状態のオルソポジトロニウム(*o*-Ps)は，材料中の自由空間(空隙)に捕捉され，空隙内部の電子と相互作用し，1～4 ns(10^{-9} 秒)の寿命で消滅する．この *o*-Ps の寿命とその形成率は，空隙のサイズや高分子の構造的・化学的特徴を反映したもので，これらの情報は，陽電子の材料への入射時刻と電子との対消滅時刻の測定(陽電子寿命測定法)により得られる [24)-27)]．

本研究における陽電子寿命測定は，放射性同位元素の一つである ^{22}Na の β^{+}崩壊により得られる広範囲のエネルギー分布を持つ白色で高速の陽電子(^{22}Na の場合，0～540 keV，平均

エネルギー240 keV)を直接利用して行った．陽電子は材料表面から内部(～100μm)まで広く分布し消滅するので，陽電子寿命測定法は材料の表面および内部のナノ空間構造の情報を得るための手法であるといえる．しかし未だ汎用性の高い手法としては浸透しておらず，その測定対象は主に合金，金属酸化物などが中心である．特に，含水した高分子のような混合系における研究は比較的少ない．

本論文においては，幅広い含水率のサンプルを同一の測定装置で評価可能であるという点から，示差走査熱量分析を用いた．さらに，陽電子消滅寿命測定法による空間構造の解析を合わせて行い，生体高分子と水の相互作用について検討した．これらの結果を前述の生体組織の粘弾性・摩擦特性と関連付けて考察した．

1.5　本研究の目的

これまでの研究においては，生体高分子と水の集合体としての生体組織のメゾスコピックな空間構造と，その巨視的な物性である粘弾性や摩擦特性との関係について考察する試みがほとんど行われてこなかった．

本研究では，生体組織の粘弾性および摩擦特性を決定する因子を，生体高分子と水の相互作用の観点から明らかにすることを目的としている．最終的には加齢や疾病による生体組織の力学特性の変化機構を明らかにすることで，工学的視点からの予防・診断・治療に展開させることを視野に入れている．

本論文の主な特徴として以下の 3 点が挙げられる．

① 熱分析を用いた水の束縛状態の解析に，陽電子寿命測定による微小空隙評価を組み合わせ，含水率をパラメータとして生体高分子と水分子の相互作用の検討を行った．

② 上記の結果に基づき，生体高分子の架橋構造をパラメータとして，その膨潤収縮特性の変化について，生体高分子と水分子の相互作用の観点から検討を行った．

③ 生体高分子と水分子の相互作用と，巨視的特性である粘弾性，摩擦特性との関係について，皮膚・皮下組織を対象に検証・考察を行った．

1.6　論文の構成

本論文の第 2，3 章は，生体高分子の水和状態の解析と，その含水，架橋による変化に関する基礎的研究，第 4，5 章がそれらの結果を基にした皮膚・皮下組織の粘弾性・摩擦特性との関係付けとなっており，以下のように構成されている．

第 2 章では，陽電子消滅法による生体高分子ハイドロゲルの微小空隙評価と，示差走査熱量分析を用いた水の束縛状態解析に基づき，生体高分子の含水膨潤過程および凍結融解過程における水と生体高分子の相互作用について述べる．

第 3 章では，加齢や病変に伴う活性酸素種による生体組織中の生体高分子の架橋構造の変化を想定し，量子線照射による繊維状蛋白質ゲルの架橋構造変化とそれに伴う膨潤収縮特性の変化に関して検討を行う．

第 4 章では，皮膚・皮下組織の粘弾性を対象として，第 2 章～第 3 章で議論した生体高分子と水の相互作用を踏まえて，加齢およびエマルション塗布による皮膚粘弾性の変化機構について考察する．

第 5 章では，皮膚の巨視的物性のもう一つの要素である摩擦特性に焦点を当て，第 2 章～第 3 章で議論した生体高分子と水の相互作用を踏まえて，表皮損傷およびエマルション塗布による摩擦特性の変化機構について考察する．

最後に，第 6 章で全体の総括を行う．

参考文献

1) Hazlewood, C. F., Cell-Associated Water, pp.165-259, Academic Press, New York, (1979).
2) 上平恒，逢坂昭，“生体系の水”, p.117, p.133，講談社, (1989).
3) Dobrev, H., *Skin Res. Technol.*, **6**, 239, (2000).
4) Draaijers, L. J., Botman, Y. A., Tempelman, F.R., Kreis, R.W., Middelkoop, E., van Zuijlen, P.P., *Burns*, **30**, 109, (2004).
5) Diridollou, S., Partat, F., Gens, F., Vaillant, L., Black, D., Lagarde, J. M., Gall, Y., Berson, M., *Skin Res. Technol.*, **6**, 214, (2000).
6) 植野映，日本医事新報, **4147**, 10, (2003).
7) 新井香奈子，石垣和子，日本生理人類学会誌,**10** (特別号 1), 76, (2005).
8) 菅野恵美,渡辺皓,日本褥瘡学会誌,**5**, 515, (2003).
9) 松本孝芳,“コロイド化学のためのレオロジー”, pp.17-25，丸善, (2003).
10) 桜井俊男,“潤滑の物理化学”,pp.2-3,株式会社幸書房,(1974).
11) 加藤孝久，益子正文,“トライボロジーの基礎”, pp.99-108，培風館, (2004).
12) 広中清一郎，フレグランスジャーナル,**240**, 53, (2000)
13) Mentré, Pascal,“細胞の中の水”, p.77，東京大学出版会, (2006).
14) 曾我勝，恵良聖一，亘弘，日本生理学雑誌,**50**, 53, (1988) .
15) Quin, F. X., Kampff, E., Smith, G., Mcbierty, V. J., *Macromolecules*, **21**, 3191, (1988).
16) Yamada-Nosaka, A., Ishikiriyama, K., Todoki, M., Tanzawa, H., *J. Appl. Polym. Sci.*, **39**, 2443, (1990).
17) Maquet, J., Thevenean, H., Djabunov, M., Leblond, J., Papon, P., *Polymer*, **27**, 1103, (1986).
18) Kim, S. J., Lee, C. K., Kim, S. I., *J. Appl. Polym. S*ci., **92**, 1467, (2004).
19) Kim, S. J., Park, S. J., Kim, S. I., *Reactive & Functional Polymers*, **55**, 53, (2003).

20) Hatakeyama, T., Quinn, F. X., Thermal Analysis: fundamentals and applications to polymer science, pp.98-105, Wiley, England, (1994).
21) 大森豊明, 技術教育出版,“水　～基礎・ヘルスケア・環境浄化・先端応用技術～”, p.46, エヌ・ティー・エス,(2006).
22) 水ハンドブック編集委員会,“水ハンドブック”, pp.27-32, 丸善, (2003).
23) 日本熱測定学会,“熱量測定・熱分析ハンドブック”, p.244, 丸善, (1998).
24) Jean, Y. C., Schrader, D. M., Positron and Positronium Chemistry, p.91, Elsevier, Amsterdam, (1988).
25) 日本アイソトープ協会,“陽電子計測の科学”, pp.15-22, 丸善, (1993).
26) 上殿明良, *SCAS NEWS* 2004-Ⅰ,3, (2004).
27) 田畑米穂,“原子力工学シリーズ 7　放射線化学”, pp.105, 東京大学出版会, (1978).

第２章　　陽電子消滅法と熱分析を用いた生体高分子と水の相互作用の検討

2.1　緒言

本章の目的は，生体高分子の含水膨潤過程，および凍結融解過程における，生体高分子と水との相互作用を明らかにすることである．

第 1 章で述べたように，生体組織中の水は，生命活動を支える重要な役割を担っており，含水率や水の束縛状態が細胞活性 [1)]や粘弾性 [2)]に影響することが示されている．本論文では生体組織の粘弾性との関連付けを念頭においているため，生体高分子として，皮膚や関節，腱などに含まれ，組織の粘弾性に深く関わっているとされているコラーゲンの変性物ゼラチンを用いた．本実験でゼラチンを用いた理由は，生体に多く含まれ，生体の水分保持や粘弾性の維持に大きく貢献している物質であることである．さらに，食品，医療，写真など幅広い分野に用いられているため様々な形態が入手しやすく，幅広い含水率のサンプルが均一な状態で調製可能な物質であるためである．

陽電子消滅法(PALS)を用いて微小空隙の評価，示差走査熱量分析(DSC)を用いて水の束縛状態の評価を行い，含水膨潤過程，および凍結融解過程における生体高分子と水の相互作用について考察を行った．

2.2　示差走査熱量分析による水の束縛状態の評価

示差走査熱量分析(DSC；Differential Scanning Calorimetry)は，試料の温度を変化させながら，試料の吸発熱量を測定する手法である．Fig. 2-1 に，DSC の測定系の模式図を示す．測定試料と基準試料とを一定の速度で昇温または降温した時に，測定試料がある温度で吸熱反応あるいは発熱反応を起こすと，基準試料との間に温度差を生じる．この温度差は試料が載っている金属プレートを通して流れる熱流によって緩和されていく．このとき，試料に単位時間当たりに流入する，または試料から放出される熱量は，試料と基準物質との温度差に比例する．従って，この温度差 ΔT が生じてから，再びゼロになるまでの ΔT を時間について積分すれば，試料に出入りした熱量を評価することができる [3), 4)]．

本研究では低温 DSC を用い，液体窒素を用いて一定速度で試料を-80℃まで冷却し，同じ速度で室温まで戻すときの吸発熱量を連続的に測定した．この手法は前章でも述べたとおり，水の束縛状態の解析に広く用いられている手法である．

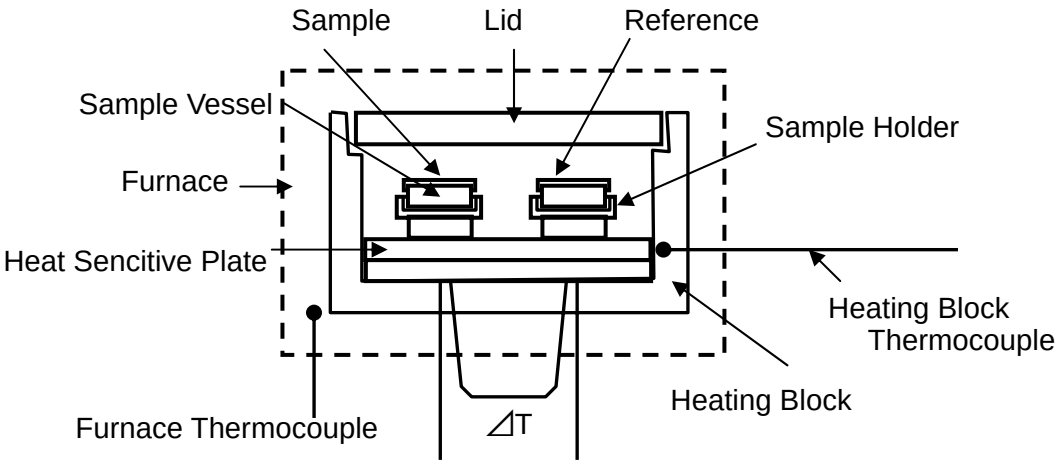


Fig. 2-1 Schematic diagram of DSC.

2.3　陽電子消滅法による微小空隙評価

陽電子消滅寿命測定(PALS ; Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy)は，材料中における陽電子の消滅寿命によって，物質の微構造を評価する手法である．PALS では試料中の 10^{-10}～10^{-8}m の大きさの空孔(自由体積空孔半径)を測定することが可能である．PALS を用いて高分子ハイドロゲル中の自由体積空孔半径を調べることにより，ハイドロゲルの網目構造や水和状態を推定できることが予想できる．

陽電子(e^{+}，positron)とは電子の反粒子である．すなわち電子と同じ質量と反対の電荷を持つ素粒子であり，高エネルギー放射線による対生成や放射性同位体から得る事ができる．陽電子は物質中に入射すると電子と対消滅するが，消滅により質量がエネルギー(光子)に転換され，2 本のγ線がほぼ 180°方向に放出される．

陽電子は気体や有機溶液，ポリマー，イオン結晶，分子性結晶などの中で電子と対になってポジトロニウム(Ps)を形成する．Ps とは電子と陽電子の束縛状態で，水素原子とよく似た性質を持つ準安定な状態である．Fig. 2-2 に示すように，Ps にはスピンの向きが反平行なパラポジトロニウム(*p*-Ps)と，平行なオルソポジトロニウム(*o*-Ps)があり，生成確率の比は 1：3 となる．Fig. 2-3 に陽電子および Ps の消滅過程とその寿命を示す．真空中では *p*-Ps は平均寿命 125ps で 2 光子消滅をする．一方 *o*-Ps は平均寿命 142ns で 3 光子消滅をし，*p*-Ps にくらべて 1000 倍ほど長い寿命を持つ．*o*-Ps は寿命 1～10ns のピックオフ消滅や，スピン変換により *p*-Ps に変化したのち消滅する場合もある．ここで，ピックオフ消滅とは Ps を形成している電子以外の周囲物質のスピンの平行な電子との 2 光子消滅である．スピン変換消滅は，不対スピンを有する常磁性物質(遷移金属元素，遊離基，O_2，NO_2 など)が存在する場合に起こり，*o*-Ps がスピン交換反応を起こして *p*-Ps に変換され，自己消滅(2 光子消滅)する．ピックオフ消滅では，物質中の自由空間の体積が小さいほど Ps と電子とが相互作用

する領域が相対的に高くなり，消滅が早くなるため，*o*-Ps のピックオフ消滅の寿命を測定することにより空孔の大きさを評価できることがわかっている [5), 6)].

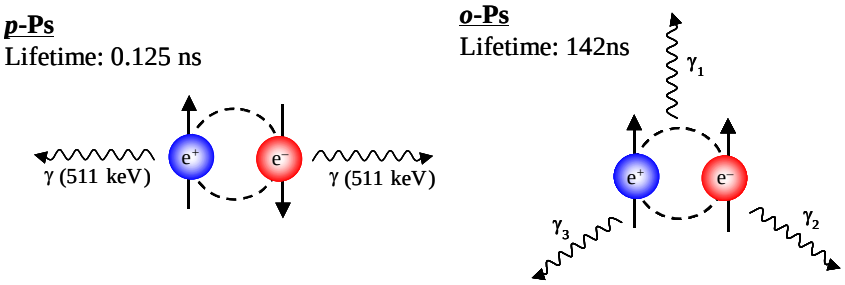


Fig. 2-2 Schematic model of *p*-Ps and *o*-Ps.

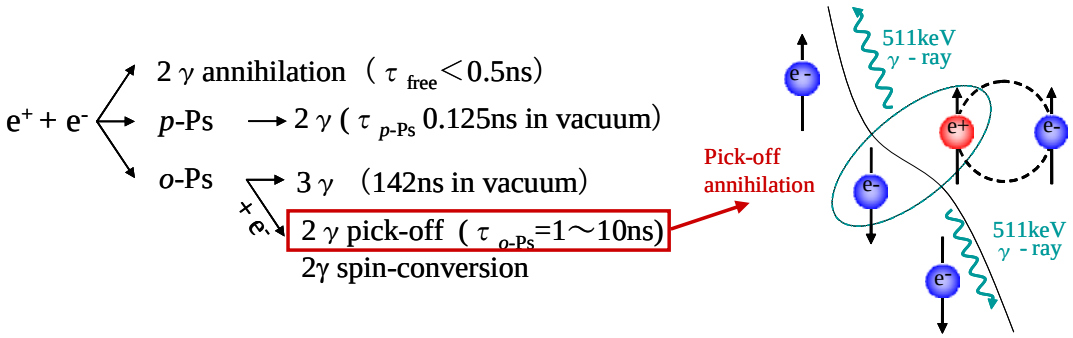


Fig. 2-3 Decay patterns of positron and positronium.

陽電子線源には，^{22}Na を用いる．Fig. 2-4 に示すように，^{22}Na は β^+崩壊を起こすと，陽電子を放出して ^{22}Ne の励起状態に遷移し，約 0.3ps という短い寿命で 1.27MeV の γ 線を放出して ^{22}Ne の基底状態に遷移する．約 0.3ps という寿命は物質中の陽電子の寿命に比べて 2-3 桁短いため，この γ 線の放出は陽電子の放出と同時であると見なすことができる．すなわち，この γ 線をシンチレーション検出器で捕らえれば陽電子発生時刻を知ることができる．また陽電子の消滅時刻は，対消滅によって放出される γ 線をシンチレーション検出器で捕らえることによって知ることができる．

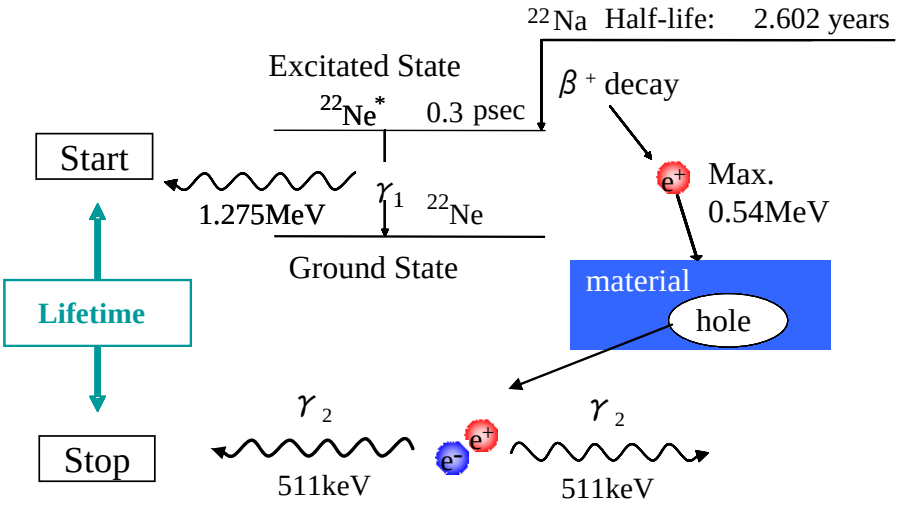


Fig. 2-4 Energy level diagram of β^+ decay of ^{22}Na.

Fig. 2-5 に陽電子寿命測定装置の測定系を示す．陽電子寿命測定法では，高速の信号処理が必要である．シンチレータには減衰時間の短いプラスチックシンチレータ，BaF_2 シンチレータが，また光電子倍増管には立ち上がり時間の短いものが用いられる．

光電子倍増管からの電気信号は，Constant Fraction Differential Discriminator (CFDD)で波高値を弁別されると同時に高速のロジック信号に変換される．start 側のロジック信号と stop 側のロジック信号の時間差を，Time-to-Amplitude Converter(TAC)で電圧に変換し，マルチチャンネルアナライザー(MCA)でスペクトル化し，コンピュータに転送する．

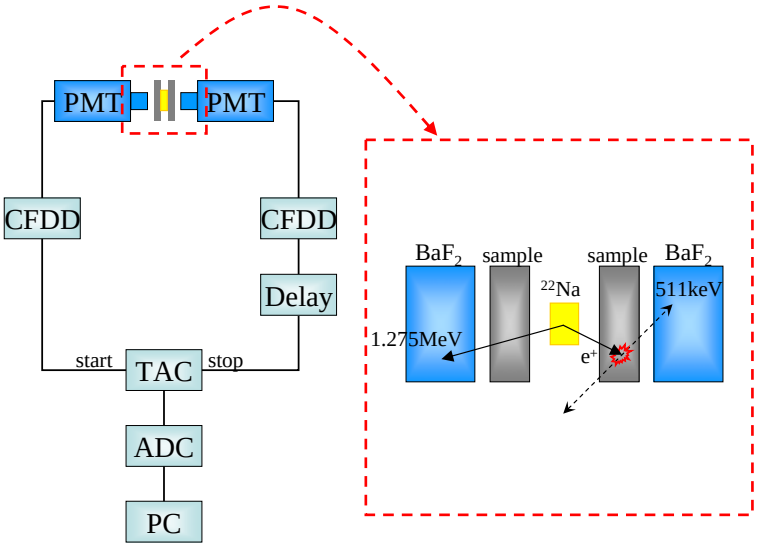


Fig. 2-5 Measurement system of positron annihilation spectroscopy.

得られた陽電子寿命スペクトルは Fig. 2-6 のようになる．通常，得られたスペクトルは非線型最小二乗法によって，Eq. 2-1 に示すように，3 ないし 4 個の指数関数成分の和として分解され，各寿命成分の平均寿命と相対強度(全体の陽電子数に対するそれぞれの指数関数成分として消滅した陽電子の割合)が求められる．*n* 成分の和としてスペクトル関数を表すと，次の式で表される．

$$N(t) = \sum_{1}^{n} A_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) + B.G.. \qquad \text{(Eq. 2-1)}$$

ここで，それぞれの成分の相対強度 I_i は次の式で定義される．

$$I_i = A_i.\tau_i / \sum_{1}^{n} A_k \tau_k . \qquad \text{(Eq. 2-2)}$$

ただし，これらの式では分解能関数は考慮していない．この解析では，指数関数の成分数(陽電子がとり得る状態の数)をあらかじめ指定する必要がある．3 成分解析では，最長寿命成分の寿命 τ_3 から *o*-Ps の寿命(ピックオフ寿命)が，その相対強度 I_3 から *o*-Ps の生成率が求められる．指数関数解析には PATFIT プログラム [7),8)]および CONTIN プログラム [9)]が一般に用いられる．

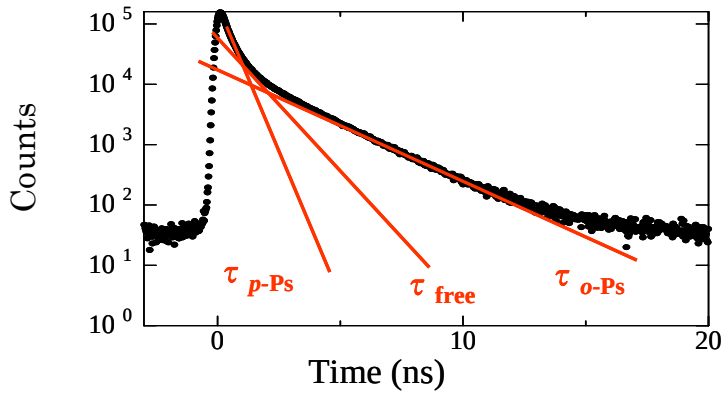


Fig. 2-6 Positron annihilation lifetime spectroscopy and spectrum analysis.

o-Ps の寿命 τ_3 と自由体積空孔半径 *R* は Tao-Eldrup の式と呼ばれる半経験式によって関係付けられている．空孔中の *o*-Ps は，ポテンシャル障壁が無限大の球対称井戸型ポテンシャル中に存在し，境界から一定厚さの電子層にある電子とだけ相互作用し消滅するとみなすと，*o*-Ps の寿命と空孔の大きさとを関係づける簡単な数式を誘導できる．

Fig. 2-7 に示すように，井戸型ポテンシャルの半径を R_0，中心から電子層表面までの距離

を R，電子層の厚さを⊿R(=R_0 - R)とすると，基底状態の Ps の波動関数 ϕ は

$$\phi(r) = \frac{1}{\sqrt{2\pi R_0}} \frac{1}{r} \sin\left(\frac{\pi r}{R_0}\right) \quad (0 < r \le R_0). \tag{Eq. 2-3a}$$

$$= 0 \quad (R_0 < r). \tag{Eq. 2-3b}$$

Ps のエネルギーE は,

$$E = \frac{h^2}{16mR_0^2}. \tag{Eq. 2-4}$$

となる．ここで，m は電子の質量である．Ps が電子層にしみだす確率 P は

$$P = \int_R^{R_0} 4\pi r^2 \phi(r)^2 dr$$

$$= 1 - \frac{R}{R_0} + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\frac{2\pi R}{R_0}\right). \tag{Eq. 2-5}$$

と計算されるので，電子層内の電子密度が一様であるとすれば，o-Ps の寿命 τ_3 は

$$\tau_3 = (\pi r_0^2 c\rho P)^{-1}$$

$$= \left[\pi r_0^2 c\rho \left\{1 - \frac{R}{R_0} + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\frac{2\pi R}{R_0}\right)\right\}\right]^{-1}. \tag{Eq. 2-6}$$

となる．ここで，c は光速，r_0 は古典電子半径，ρ は電子層内の電子の密度である．簡単のために，電子層中の Ps の寿命が 0.5ns で一定と仮定すると，

$$\tau_3 = 0.5\left\{1 - \frac{R}{R_0} + \frac{1}{2\pi} \sin\left(\frac{2\pi R}{R_0}\right)\right\}^{-1}. \tag{Eq. 2-7}$$

が得られる．空孔体積 v は

$$v = \frac{4\pi}{3} R^3. \tag{Eq. 2-8}$$

で与えられる．Fig. 2-7 に示すように，電子層の厚さ⊿R を一定として，ゼオライトなど大きさが既知の空孔サイズが再現できる物質の測定値から，⊿R=0.166nm が得られる [10]. ⊿R=0.166nm とした Eq. 2-7 を Tao-Eldrup の式と呼ぶ [11), 12)]．この式は，材料中の自由体積空孔の大きさを求めるために広く用いられている．

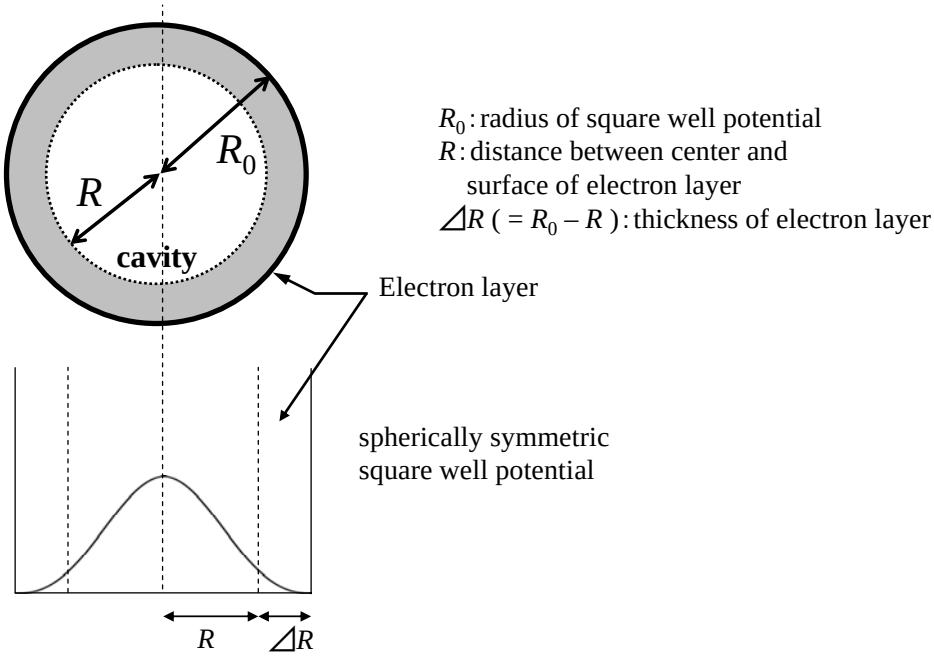


Fig. 2-7 Tao-Eldrup model.

2.4　消滅γ線のドップラー拡がり

陽電子－電子対消滅の際，511 keV のエネルギーを持つγ線が 2 本反対方向に放出されるが，反応前の電子の運動エネルギーおよび運動量も消滅後のγ線に反映されるために，γ線のエネルギーはドップラー効果により変化する(Fig. 2-8).

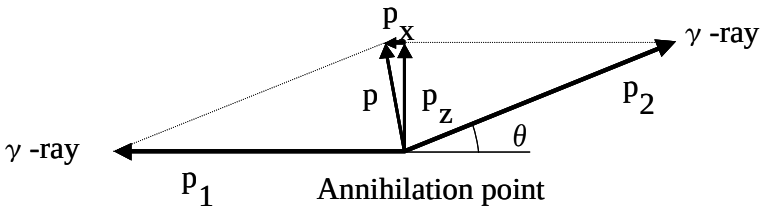


Fig. 2-8 Schematic Diagram of Doppler Broadening.

電子の静止質量を m，電子対の全運動量を P とし，対消滅により生成した 2 つの光子の運動量を p_1 および p_2 とし，p_1 に平行な成分 p_x と，p_1 に垂直な成分 p_z に分け，運動エネルギーと運動量の保存を考えると，

$$2mc^2 = cp_1 + cp_2 . \qquad \text{(Eq. 2-9)}$$

$$p_x = p_1 - p_2 \cos\theta . \qquad \text{(Eq. 2-10)}$$

$$p_z = p_2 \sin\theta . \qquad \text{(Eq. 2-11)}$$

の式を得る．ここで，c は光速，m は電子の静止質量，θは p_1 と p_2 間の 180°からのずれを表す．Eq. 2-9 および 2-10 より以下の式,

$$p_2(1+\cos\theta) = 2mc - p_x . \qquad \text{(Eq. 2-12)}$$

が求めることができ，$mc >> p_x$ とすることにより

$$\sin\theta = \frac{p_z}{p_2} \approx \frac{p_x(1+\cos\theta)}{2mc} << 1 . \qquad \text{(Eq. 2-13)}$$

となるため， Eq. 2-11 を

$$p_z = p_2\theta = mc\theta . \qquad \text{(Eq. 2-14)}$$

のように変換することができる. このθと p_z との関係を用いて p_z の評価を行う方法を角相関法という．また， Eq. 2-12 より，p_2 は

$$p_2 = \frac{2mc - p_x}{1+\cos\theta} \approx mc - \frac{p_x}{2} \quad . \qquad \text{(Eq. 2-15)}$$

と求めることが出来るので，このエネルギーE_2は

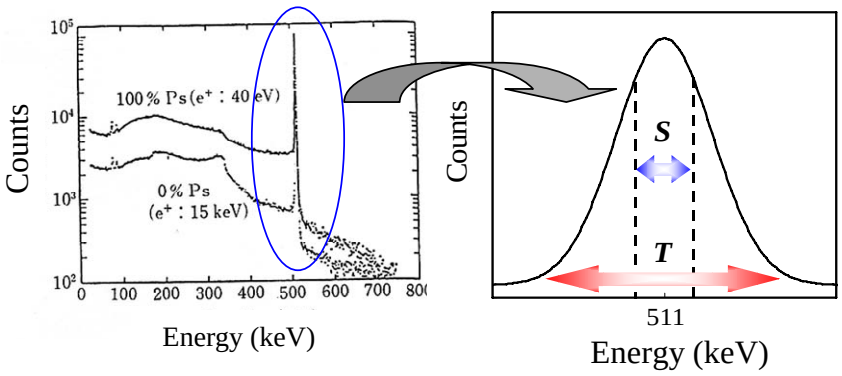
$$E_2 = cp_2 = mc^2 - \frac{cp_x}{2} . \qquad \text{(Eq. 2-16)}$$

となる [13)].

このことは，放出された光子がドップラー効果により mc^2(=511keV)からずれることを意味しており, 同時にγ線のエネルギースペクトルから対消滅の相手電子の運動量を知ることができる．陽電子は，進入した試料中に空孔や空隙が存在しているとその中に捕捉されやすい性質を持っているが，この空隙サイズが大きくなると対消滅を起こす電子の運動エネルギーが減少するため， Eq. 2-16 で表されているエネルギースペクトルの拡がりは鋭くなる傾向を示す．以下に示すような任意のエネルギースペクトル幅内部分のカウント数を全カウント数で割った値を S パラメータと呼ぶ(Fig. 2-9).

$$S\text{-parameter} = \frac{\text{Central area of the photopeak}}{\text{Total area of the photopeak}} . \qquad \text{(Eq. 2-17)}$$

空孔型欠陥に陽電子が捕獲されると，S の値は大きくなる．S は消滅サイトの電子状態に依存して変化し，また空孔サイズが大きくなるほど S は大きくなる．このようにして，消滅γ線のドップラー拡がりによって物質の電子状態や空孔サイズを評価することができる.



S-parameter＝S/T

Fig. 2-9 Definition of *S*-parameter.

2.5　ゼラチンの構造と性質

本研究では，コラーゲンの変性物であるゼラチンを用いた．コラーゲンは動物の骨，皮，腱などの結合組織に広く分布している線維状蛋白質の一つであり，脊椎動物が含有するタンパク質の 3 分の 1 を占めるといわれている．コラーゲンの構造はそれぞれ約 10 万の分子量をもったポリペプチド鎖が 3 本集まったらせん構造であるが，70℃～90℃に加熱することで分子構造が壊れ，ランダムコイル状の分子に分かれる．しかし，ゲル状態においては，その一部が元のコラーゲンと同じらせん構造を再構築する [14]．すなわち，ゼラチンとコラーゲンは, 一次構造(アミノ酸組成)は同じだが二次構造が異なる物質である. Table 2-1 にゼラチン(コラーゲン)のアミノ酸組成を示す．アミノ酸の中で最も単純な構造を持つグリシンが多くを占めていることが分かる．このことが後述するゼラチンの親水性に大きな役割を果たしている．

Table 2-1 Amino acid profile of gelatin

amino acid	pig skin	bovine hide	beef bone
glycine	330	332	335
alanine	112	112	117
valine *	26	20	22
leucine *	24	23	24
isoleucine *	10	12	11
serine	35	36	33
threonine *	18	17	18
asparatic acid	45	46	47
glutamic acid	72	71	73
cystine	0	0	0
methionine *	4	6	4
lysine *	27	28	28
oxylysine	6	6	4
arginine *	49	46	48
histidine	4	5	4
phenylalanine *	13	12	14
tyrosine	3	2	1
triptophan *	0	0	0
proline	131	129	124
oxyproline	91	97	93

通常，ゼラチンは乾燥した粉末状態では室温，空気中で安定である．水を加えると膨潤し，また，水とともに 40℃以上に加熱するとゼラチン分子は水中に分散し，ゼラチンゾルとなる．ゼラチンゾルを冷却するとランダムコイル状の分子は部分的に三重らせん構造の網目を形成し，ゲル化する．したがってゼラチンゲルは生体組織におけるコラーゲンの架橋構造に類似した構造を持っており，生体組織の模擬物質として適切であると言える．室温においては，約 5%(w/w)以下のときにゾル状態，それ以上の濃度ではゲル状態となる．また，1%(w/w)の濃度でも 4℃程度に温度を下げることによってゲル化する．

ゼラチンゲルにおける陽電子の消滅挙動については数例の報告 [15), 16)]があるが，乾燥状態からゾル状態に至る広範囲の含水率におけるゼラチンの構造変化に関しては未だ議論がなされてこなかった．

ゼラチンはブタやウシの皮膚や腱，魚の鱗などから得られ，タイプ A とタイプ B の 2 種類に分けられる．タイプ A はコラーゲンの酸処理によって得られ，等イオン点 7 から 9 である. 一方, タイプ B はアルカリ処理によって得られ, 等イオン点は 4.8 から 5.2 である[13]．本研究では，ブタ皮膚由来タイプ A の粉末状およびフィルム状のゼラチンを用いた.

2.6 含水膨潤過程における水の束縛状態の変化

2.6.1 実験方法

ゼラチン粉末(Merck 社製)およびゼルフィルム(ファイザー製薬)を用い，含水率約 5.0(未処理)～99.0 %(w/w)のゼラチンゾルおよびゼラチンゲルを調製した．2 種類の形態のゼラチンを用いた理由は，粉末を用いた場合，含水率 50%(w/w)以下のサンプルを調整しようとすると均一なサンプルを調整するのが困難であり，フィルムを膨潤させた場合は 50%(w/w)以上の水分を含ませることができないためである．ゼラチン粉末の溶解法については，ゼラチン粉末を室温において水中で膨潤させたのち，加熱溶解する膨潤溶解法を用いた．蒸留水にゼラチン粉末を入れ，25℃で 10 分静置し，ゼラチンを膨潤させた．膨潤したゼラチンを 40℃で 30 分間撹拌しながら加熱した後，25℃に静置し，ゼラチンゾルまたはゼラチンゲルを得た．ゼラチンフィルムについては，40℃で 30 分間膨潤させたのち，室温に冷却して測定を行った.

示差走査熱量計(DSC8230 株式会社リガク)を用い，調製したゼラチンゾル，ゲルの温度変化(-80℃～25℃)に伴う吸熱，発熱反応について調べた．本研究では第 1 章で述べた方法によりゼラチンゲル中の水の束縛状態を氷の融解エンタルピーによって調べるため，液体窒素を用いて室温より低温の領域で測定を行った．DSC8230(リガク)を使用し，温度プログラム(昇温降温速度 5 K/min，温度走査範囲 -80℃～25℃)に従って，温度変化に伴う各含水率のゼラチンの吸発熱量変化を調べた．サンプルパンは密封アルミニウムパンを用い，基準試料 Al_2O_3 を用いて窒素雰囲気で測定を行った．Fig. 2-10 に模式図で示すように，ゼラチンゾルおよびゲルは降温するにしたがって，ゾルおよびゲル中の水の凍結に伴う発熱ピークを示し，昇温するにしたがって，氷の融解に伴う吸熱ピークを示す．Fig. 2-11 に，得られた吸熱ピークの典型的な例を示す．吸熱ピークの面積から，氷の融解エンタルピーが算出される.

氷の融解に伴う吸熱量すなわち氷の融解エンタルピーの値より，以下の式を用いてゼラチン中の自由水，結合水の全含水率に対する比率(重量%)を求めた[17)-19)].

$$W_{nf}(\%) = W_t(\%) - \frac{Q_{endo}}{Q_f} \times 100 . \qquad \text{(Eq. 2-18)}$$

ここで， W_{nf} は不凍結合水量(重量%)，W_t は全含水率(重量%)，Q_{endo} は試料中の自由水の融解エンタルピー，Q_f は氷の融解エンタルピー (334J/g)である.

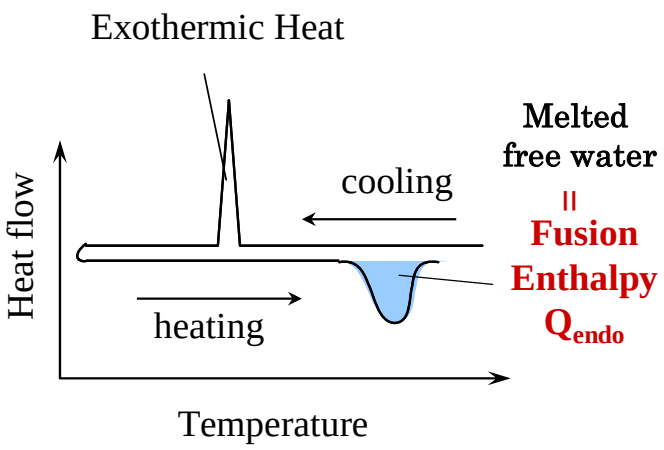


Fig. 2-10 Schematic model of DSC hysteresis.

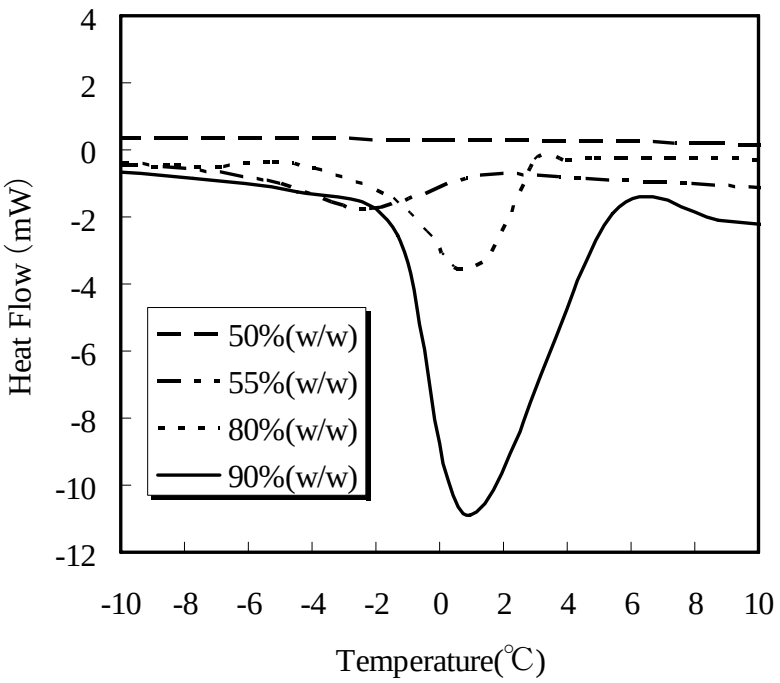


Fig. 2-11 Typical DSC curves of gelatin with different water content.

ここで，不凍結合水とは，結合水のうち，温度を下げても凍らない水のことであるが，一般には広義で結合水として扱われることが多いため，以下結合水とする．純水のエンタルピーは，水の熱伝導度が小さいために測定条件に依存する．そこで実験条件を揃えて比較を行うために，上式における氷の融解エンタルピーには，今回測定に用いた装置により同じ測定条件で測定した超純水の融解エンタルピーの実測値を代入した．

2.6.2　結果と考察

含水率変化に伴うゼラチン中の水の束縛状態の変化を調べるため，DSC を用いてゼラチンゾルおよびゲルの熱分析を行った．吸熱ピークが表す融解エンタルピーから，各含水率における自由水，結合水の全含水率に対する比率を求めた．その結果を Fig. 2-12 に示す．この図において，各点は 1 回の測定値から算出した自由水・結合水の比率を示しており，点線はそれらの点から推察した，含水率に対するおよその変化傾向を示している．横軸はゼラチンの含水率，縦軸は結合水と自由水の比率である．含水率の増加に伴い，結合水の比率は減少し，自由水の比率は増加した．昇温速度を 2K/min，10K/min に変化させた実験を行ったが，実験データは誤差範囲内で一致していた．また，含水率 40%(w/w)以下では，自由水はほとんど存在せず，ほぼ全てが結合水となることが分かった．これらのことから，生体中の水の束縛状態は含水率に依存して変化することが推定される．

また，ゼラチンと第 4 章，第 5 章で取り上げる皮膚組織中の水の束縛状態を比較するため，ブタの皮膚切片を用い，表面から数百 mm の表皮(porcine epidermis)と表面から数ミリの真皮(porcine dermis)を分離し，ゼラチンと同様の条件で低温 DSC 測定を行った．Fig. 2-12 の矢印に示すように，表皮については，結合水はほぼ 100%(w/w)であり，対応する含水率のゼラチンの近似曲線にほぼ一致した．一方，真皮については結合水の比率が約 70%(w/w)となり，同じ含水率のゼラチンよりも数十%高い値を示した．これは真皮に存在するヒアルロン酸などのコラーゲン以外の成分が結合水の保持に関与していることを示している．この結果は，実際の生体組織に含まれる水の束縛状態は，等しい含水率をもつゼラチン中とまったく一致するわけではないが，含水率の増加に伴って結合水が減少し，自由水が増加する傾向は同じであると考えることができる．

Fig. 2-12 より，含水率の増加によるゼラチン中の水の束縛状態の変化は，結合水が増加していく含水率領域(<40%(w/w))と，結合水の量が飽和に達し，自由水が増加していく含水率領域(>40%(w/w))に大きく分けられると考えられる．この 2 つの含水率領域において，ゼラチンの巨視的物性がどのように変化するかということを水の束縛状態の観点から考える．ゼラチンのレオロジー特性は，含水率の減少によりに急激に増加することが分かっており，また Ruiz-Cabera らの報告[20]によると，ゼラチンの重量密度は，結合水が増加していく含水率領域(<40%(w/w))において顕著な変化を示し，自由水が増加していく含水率領域(>40%(w/w))においてはその変化が緩やかになっている．これらのマクロ物性の変化は，水の束縛状態に間接的に影響を受けていると考えられるが，Fig. 2-12 の水の束縛状態の変化のみでは十分な説明ができない．これらの巨視的物性は，含水によるゼラチンの網目構造の変化に起因しており，その網目構造の変化がゼラチン中の水の挙動によるものだとすれば，本節の DSC 測定の結果と陽電子消滅法を用いた網目構造の解析を組み合わせることによって巨視的物性の変化を説明できると考えられる．このことについて次節で議論する．

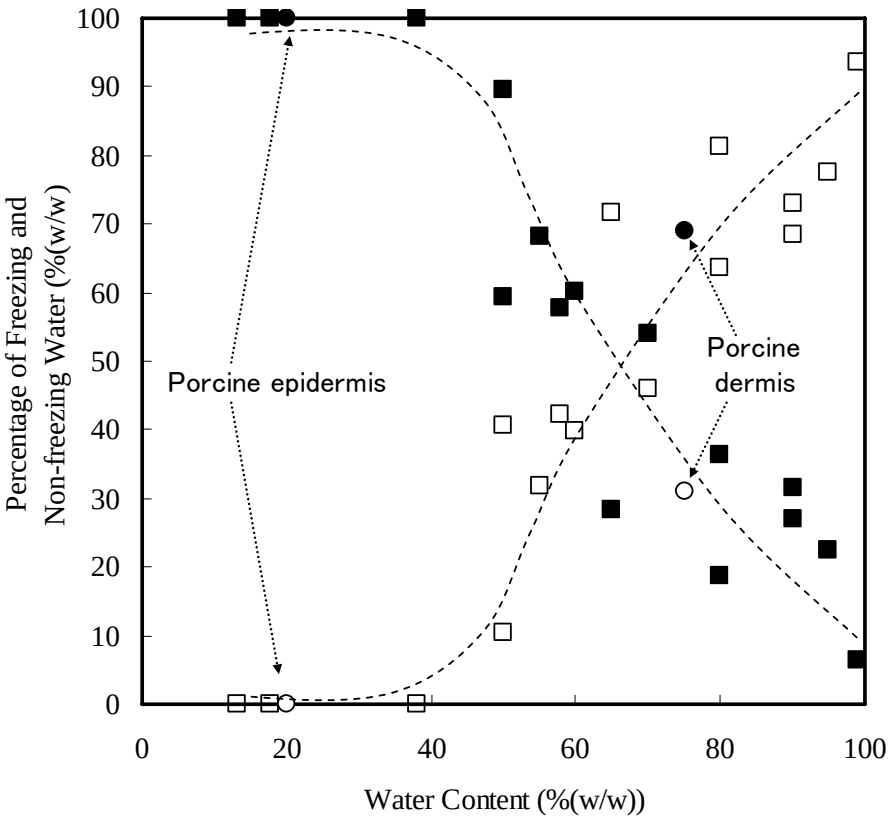


Fig. 2-12 Percentage of freezing water (open square) and non-freezing water (close square) calculated from the fusion enthalpy measured by low temperature DSC as a function of gelatin concentration. Open and close circle corresponds to freezing water and non-freezing water in porcine epidermis and dermis.

2.7 含水膨潤過程における生体高分子の微小空隙評価

2.7.1 実験方法

含水率による自由水，結合水の全含水率に対する比率の変化は，ゼラチンの網目構造の変化に起因すると考えられる．そこで，高分子網目の微細構造を評価するため，陽電子消滅法を用いた自由体積空孔評価を行った．ゼラチンの陽電子測定は以下の方法で行った．含水率 50%(w/w)～80%(w/w)のゼラチンゲルについては，内径 13mm，高さ 20mm のアルミニウム製の円筒内に作製した．線源と試料が直接接触することを防ぐため，試料と線源の間に厚さ 0.8μm のアルミニウム箔を挟んだ(Fig. 2-13)．アルミニウム箔は短寿命成分しか示さないため，自由体積空孔半径に関連する成分にはほとんど影響しない．また，もう一方の端はゼラチンゲルの乾燥を防ぐためにパラフィルムで覆った．線源としては膜厚 5.0μm のカプトン膜で密封した 30μCi および 100μCi の ^{22}Na 線源を用い，室温 20±1℃，湿度 50±5%の部屋で測定を行った．測定装置の写真を Fig. 2-14 に示す．測定結果の解析には PATFIT-88 プログラムおよび CONTIN プログラムを用いた．

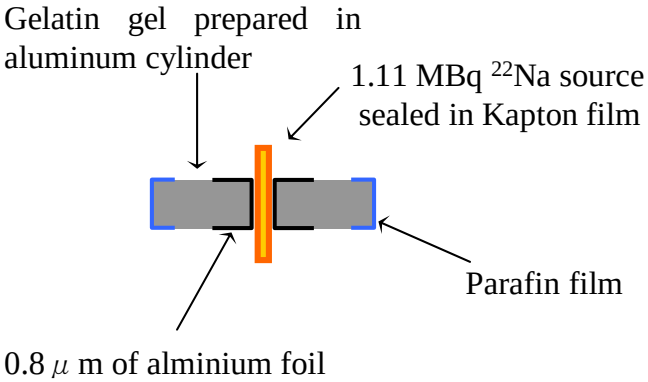


Fig. 2-13 Sample arrangement of measurement of gelatin.

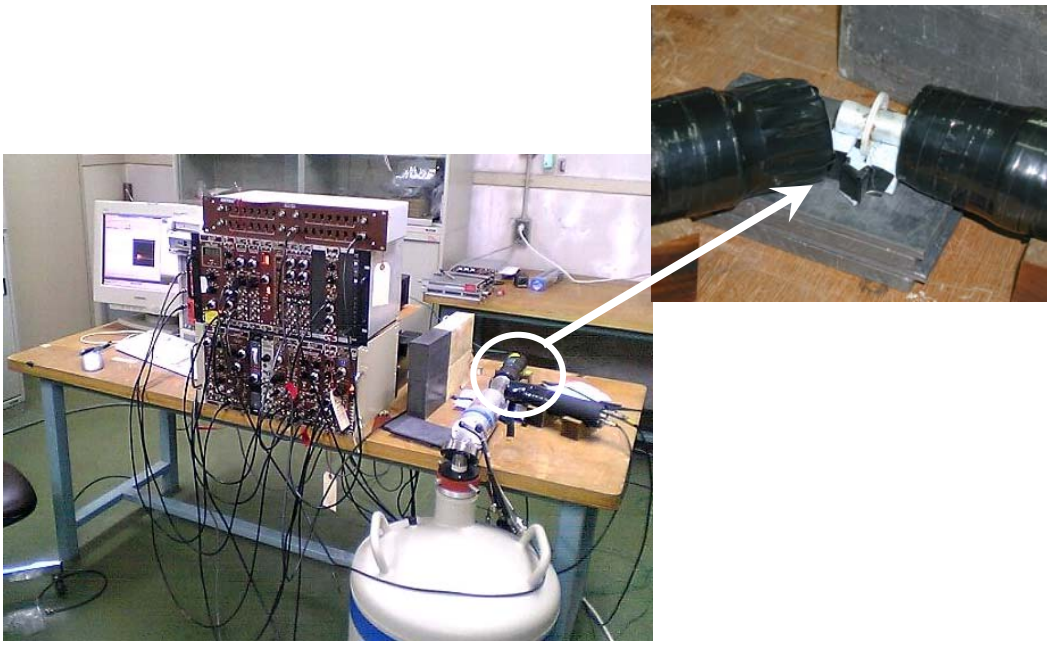


Fig. 2-14 Positron annihilation lifetime measurement system.

2.7.2　結果と考察

陽電子寿命を測定し，カウント数を時間に対してプロットしたものを Fig. 2-15 に示す.

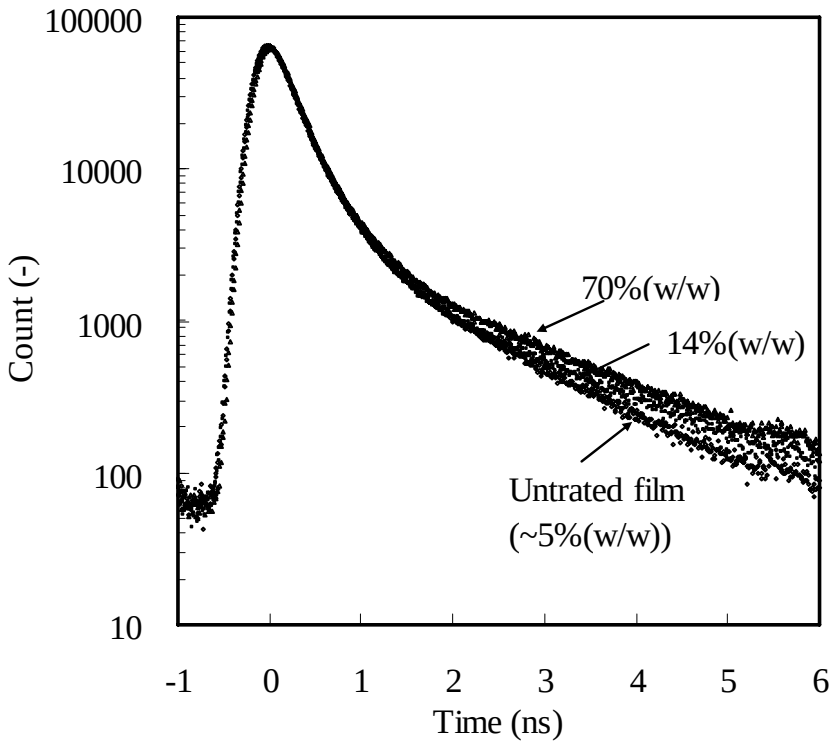


Fig. 2-15 Positron annihilation lifetime spectra of different water content.

このピークを PATFIT-88 プログラムにより 3 成分解析し, ゼラチン中における陽電子の各消滅過程の寿命(τ_1～τ_3)を求めた．3 成分解析の結果および，陽電子寿命と自由体積空孔半径との関係を表す Tao-Eldrup の式(Eq. 2-7)より見積もった自由体積空孔半径を Table 2-2 に示した．寿命 τ_3 より求めた含水率 約 5%(乾燥ゼラチン)の時の自由体積空孔半径は 0.227±0.001nm であり，含水率が高いほど自由体積空孔半径は大きくなった.

Table 2-2 Results of analysis of positron annihilation spectroscopy with PATFIT-88 program and estimated free volume radius from *o*-Ps lifetime.

Water content (%(w/w))	Results of analysis with PATFIT-88						Estimated free volume radii
	τ_1 (ns)	I_1 (%)	τ_2 (ns)	I_2 (%)	τ_3 (ns)	I_3 (%)	from τ_3 (nm)
as purchased (~5)	0.203	55.8	0.408	29.8	1.437	14.5	0.227
13.6	0.211	58.8	0.415	27.7	1.601	13.6	0.246
24.5	0.202	53.2	0.391	33.0	1.728	13.8	0.259
50.0	0.186	41.9	0.364	42.0	1.766	16.1	0.263
70.0	0.163	43.3	0.366	40.1	1.766	16.5	0.263
80.0	0.195	51.6	0.408	32.1	1.771	16.3	0.264

o-Ps の寿命 τ_3 および DSC で測定した融解エンタルピーから求めた自由水の比率を含水率に対してプロットしたものを Fig. 2-16 に示す．最も含水率の高い 80%においてもその自由体積空孔半径は純水の自由体積空孔半径として報告されている 0.272nm[21)-27)]に比べ小さかった．Uchiyama らの研究 [15)]によるとゼラチンは含水率約 90%のとき自由体積空孔半径は 0.269nm という報告があり，今回の結果を合わせると，含水率 80%以上では純水の自由体積空孔半径(約 0.271～0.275nm)とほぼ同じとなることが分かる．したがって，含水率の増加に伴って純水の自由体積空孔半径に近づいていくことが分かる．また τ_3 の変化は含水率に対して線形ではなく, ほぼすべての水が結合水として存在する含水率領域(＜40%(w/w))では含水率の増加に伴い τ_3 は顕著に増加し，結合水とともに自由水も存在する含水率領域(＞40%(w/w))では含水率に依存せずほぼ一定となった．このことから，含水率が 40%(w/w)以下の領域でゼラチンのナノ空間構造に変化が起こっていると考えられる．含水率 40%(w/w)以上では，自由水・結合水の比率が変化しているにもかかわらず τ_3 が純水に近い値でほとんど変化していないことから，自由水と結合水が両方存在する場合は，*o*-Ps が自由水として存在する水分子の近傍で消滅する確率が高いことを示唆している．

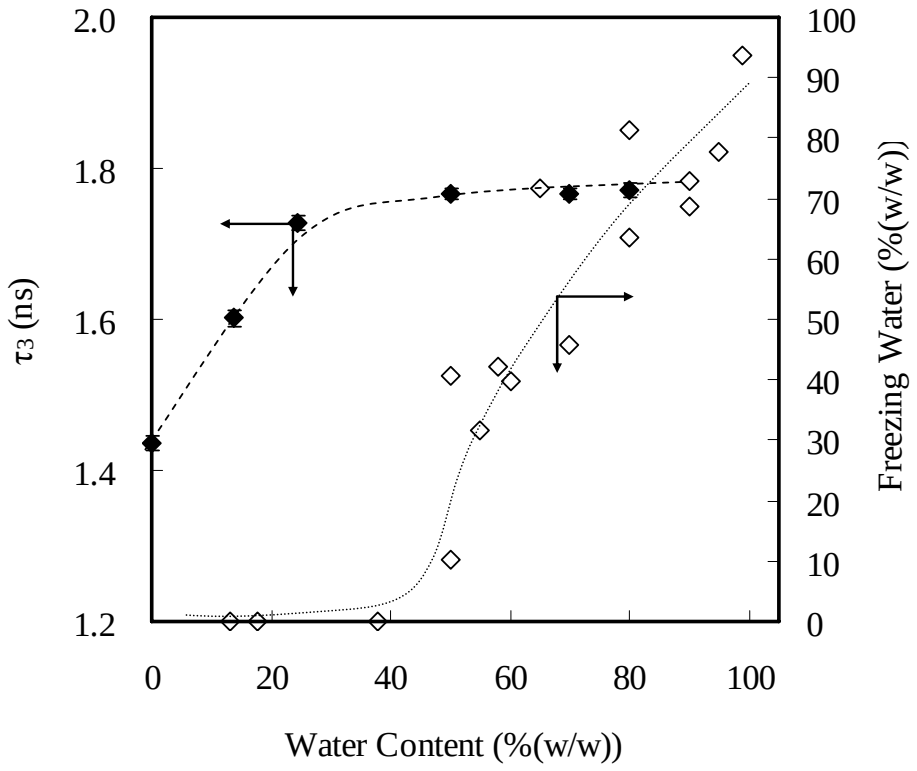


Fig. 2-16 Percentage of freezing water (open lozenge) and lifetime of *o*-Ps (close lozenge) as a function of gelatin concentration.

また，CONTIN を用いた解析[28), 29)]によって，τ_3 の確率密度分布を示したものを Fig. 2-17 に示す．ピーク位置は含水率の増加とともに τ_3 が長い方向，すなわち自由体積空孔半径の大きい方向にシフトしていることが分かる．含水させていないゼラチンの τ_3 の分布幅に対して含水したゼラチンの分布幅が若干広いことから，含水によって，自由体積空孔半径が不均化していることが分かる．特に，ヘリックス構造が広がっていく領域にある 10%(w/w) の分布幅が広く，それ以上の含水率においては再び分布幅が狭くなる傾向があることから，含水の初期段階において自由体積空孔半径の不均化が起こり，その後再び均一になる傾向があることが分かる．

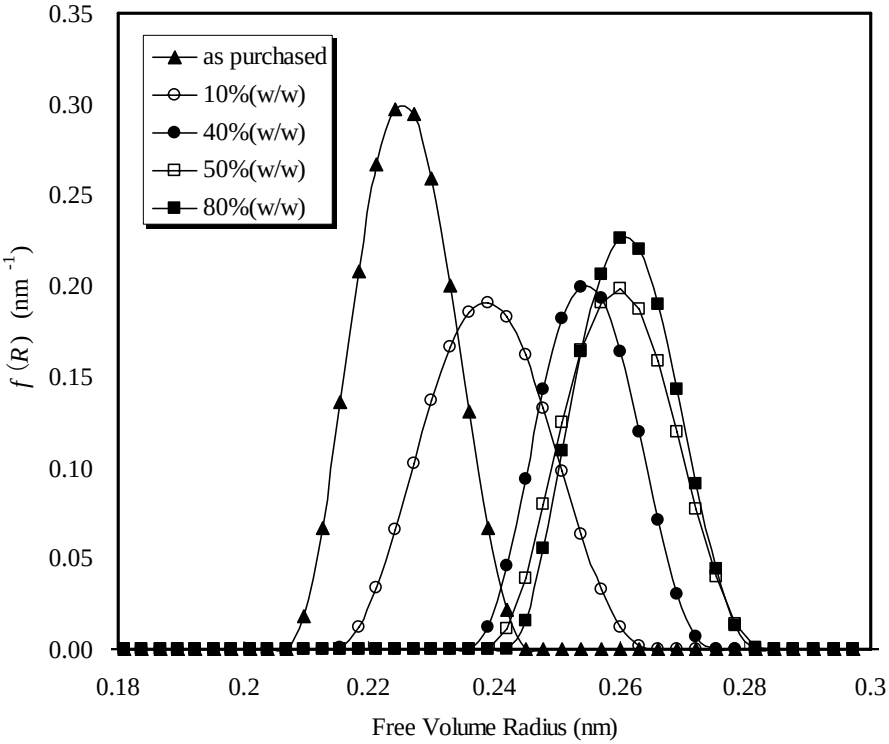


Fig. 2-17 Probability density functions of annihilation lifetimes calculated by CONTIN program.

これらの結果を元に，ゼラチンの含水過程について考察する．ゼラチンはコラーゲンの変性物であり，コラーゲンのヘリックス構造が崩れてランダム構造になったものであるが，ゲル状態において，架橋領域はコラーゲンに類似したアミノ酸約 1000 残基(分子量約 10 万)のポリペプチド鎖が縒り合わさってできたヘリックス構造をもつといわれている．1 つのヘリックス構造は直径約 1.5nm，長さ 300nm の円筒状の形をしている．この円筒の中心軸側には，Table 2-1 に示したように，アミノ酸の中で最も単純な構造を持つグリシン(NH_2CH_2COOH)のみがあり，それ以外の疎水性の残基は立体障害のため外側を向いている[30), 31)]．

ヘリックス構造の内側は親水基であるカルボキシル基(-COOH)が多いため親水性であり，

外側は疎水性残基が露出しているため疎水性である．このことより，乾燥状態のゼラチン中で消滅した *o*-Ps はヘリックス構造を形成する 3 本の分子間で消滅していると考えられる．水分子は疎水性であるヘリックス構造どうしの間よりも，親水性であるヘリックス構造の内側に優先的に入り込み，カルボキシル基と水素結合を形成することによってヘリックス構造が押し広げられると考えられる．この場合，*o*-Ps の消滅サイトとしては，ヘリックス構造とその中に入っている水分子との間，およびヘリックス構造内の水分子どうしの間が考えられる．さらに含水が進むと，ゼラチン網目のゴム弾性と水分子が網目を押し広げようとする力が釣り合うと考えられ，ヘリックス構造内にはそれ以上水分子が入らなくなり，疎水性であるヘリックス構造間に水分子が入ると考えられる．ヘリックス構造間には親水基は少ないが，1 本のヘリックス構造の長さが約 300nm であることから推定すると，ヘリックス構造どうしの間には数十～数百 nm オーダーの空孔が存在すると考えられる．そこに水分子が自由水として入ると考えられる．この場合，*o*-Ps の多くは自由水として存在する水分子どうしの間で消滅すると考えられ，消滅寿命が純水に近い値となると考えられる．自由水中で *o*-Ps の消滅を考えるときには，バブル形成について考慮する必要がある．液体中でポジトロニウムが生成すると，ポジトロニウムが液体中で周囲の分子を押しのけてバブルと呼ばれる空孔を形成するため，純水の場合は，陽電子寿命法により求めた自由体積空孔半径は，実際の空孔よりも大きな値となると考えられている [32]．したがって低含水率のゼラチンにおいて τ_3 が純水に比べて小さいことは，ゼラチンゲルの自由体積空孔半径が純水に比べて小さいことによる効果と，水が高分子鎖に束縛されて分子運動が制限され，バブルが形成されにくくなる効果の 2 つが考えられる．どちらの場合においても，含水率の増加に伴う τ_3 の増加は，40%(w/w)以下の含水率のゼラチンにおいて，ヘリックス構造内で水が束縛された状態にあること，このときヘリックス構造内に存在する水の近傍で *o*-Ps が消滅していることを示している．

また Table 2-2 の第 3 成分の相対強度 I_3 に着目すると，含水率 24.5%(w/w)と 50.0%(w/w)の間において I_3 が有意に増加していることが分かる．40%(w/w)以下の含水率ではほぼ全ての水が結合水として存在するという DSC の結果と合わせて考えると，ゼラチンゲル中に自由水が存在する方が *o*-Ps が生成しやすいことを意味している．純水中での I_3 は約 28%であり [22]ゼラチンゲル中ではどの含水率においても純水中より低い値となっている．したがって *o*-Ps は結合水あるいは親水基近傍よりも自由水として存在する水分子どうしの間において生成しやすい傾向があると考えられる．

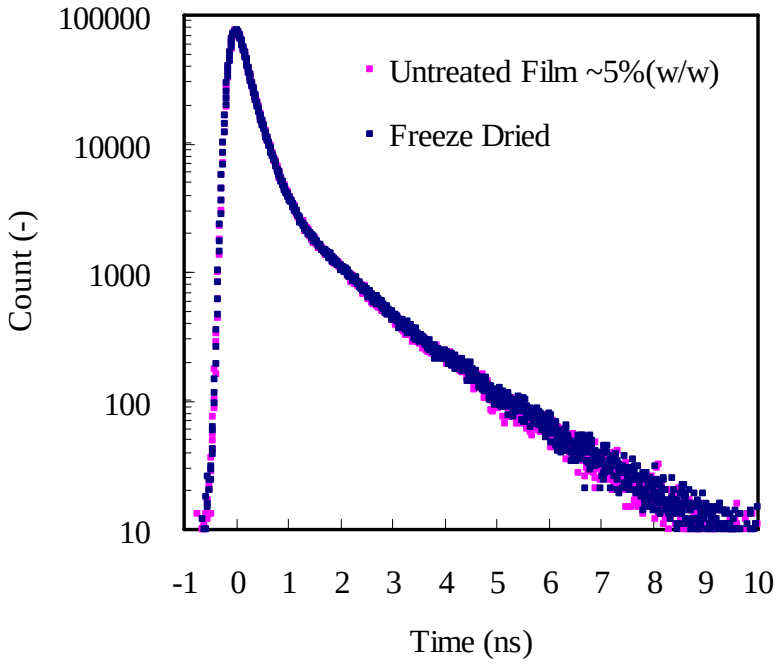


Fig. 2-18 Positron Annihilation Lifetime Spectra of untreated and freeze dried film.

また，膨潤過程の可逆性を調べるため，-50℃，15Pa において，乾燥状態から蒸留水による膨潤，凍結真空乾燥を 3 回繰り返した前後の陽電子消滅寿命スペクトルの比較を行ったところ，Fig. 2-18 に示すように，ほとんど違いは見られなかった．未処理のゼラチンとほとんど消滅寿命が同じであったことから，含水による構造変化は，凍結真空乾燥を行った場合においては可逆的であるといえる．しかし，温度のみを変化させた凍結融解過程においては必ずしも可逆的であるとはいえず，生体組織や食品の凍結保存を困難にしている．このことについては次節で取り上げる．

以上の結果から，DSC の吸熱ピークから求めたゼラチンゲル中の自由水と結合水の比率と陽電子寿命測定を組み合わせることは，生体高分子の含水過程における水分子と高分子鎖の空間配置の変化を調べるために有用な方法であり，さらにこの方法によって，ゼラチンと自由水，結合水が共存する状態での *o*-Ps の消滅位置を推定することができた．

次に，ゼラチンゲル中における陽電子あるいはポジトロニウムの消滅相手電子のエネルギーを明らかにするため，ドップラー拡がり測定を行い，*S* パラメータによる消滅相手電子の運動エネルギーの評価を行った．含水率に対する *S* パラメータの変化を，前述した自由水の比率と合わせて Fig. 2-19 に示す．

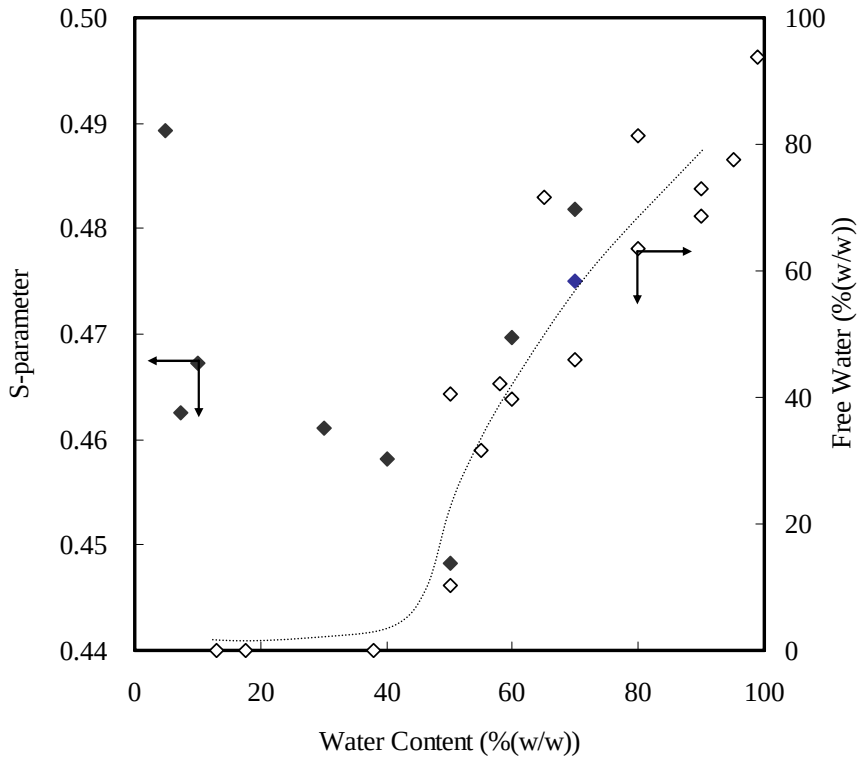


Fig. 2-19 S-parameter of gelatin as a function of water content.

この結果と DSC，陽電子消滅寿命の測定結果を合わせると，結合水のみが存在する含水率40%(w/w)までの領域では含水率の増加に伴って *S* パラメータが減少したが，自由水が存在し増加していく 40%(w/w)以上の含水率領域では，含水率の増加に伴って *S* パラメータが増加することが分かる．この現象は，結合水のみの領域と，自由水が増えていく領域では陽電子およびオルソポジトロニウムの消滅サイトが異なっている可能性，およびその消滅サイトの電子状態が含水によって連続的に変化している可能性を示唆している．しかし，具体的な変化に関しては，AMOC(寿命運動量相関)法を用いて各消滅過程における *S* パラメータを求めることにより，検討する必要がある．

2.8　凍結融解過程における蛋白質中の水の束縛状態の変化

生体組織は，第 1 章で述べた高い含水率が原因となり，凍結融解を行うと，氷の結晶成長や塩濃度の不均一化を要因として容易に変性する．食品の離水などはその典型的な例であり，このことを利用したのが凍結切除である．離水の現象は，前述した水による膨潤過程に密接に関連していると考えられる．そこで，凍結融解時の吸発熱量の差を凍結融解過程における水の束縛状態の変化と捉え，含水率および降温・昇温速度による吸発熱量の差の変化を検討した．

Fig. 2-20 に，DSC 曲線の模式図を示す．吸発熱量の差 S_t-S_f は，凍結融解過程において束

縛状態が不可逆に変化する水の量に対応すると考えられる．凍結融解過程におけるこのような不可逆な水の束縛状態の変化は，氷の結晶成長や離水に起因するものと考えられる．この方法により，凍結融解過程における不可逆な水の束縛状態およびその変化を定量化することができると考えられる．

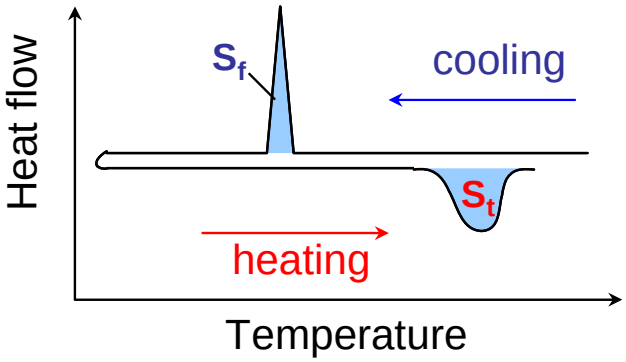


Fig. 2-20 Schematic diagram of DSC curve.

熱量の変化率 C は以下の式によって求めた．

$$C = \frac{S_t - S_f}{S_t} \times 100 \quad (\%). \qquad \text{(Eq. 2-19)}$$

含水したゼラチンの凍結時，融解時の熱量の変化率を求めた結果を Fig. 2-21 に示す．グラフの横軸は含水率，縦軸は熱量の変化率である．含水率が 30～70 %(w/w)の範囲において，凍結時と融解時の吸発熱量の差が顕著に現れていることが分かる．凍結した水が単に融解すると仮定すると，凍結時と融解時の吸発熱量は同じになるはずである．ここで，第 1 章で Fig. 1-1 を用いて述べたように，生体高分子中の水には，-190℃でも凍らない結合水と，純水と同じ性質を持つ自由水，および結合水と自由水の中間層に存在し，-25℃付近で凍結する中間水がある．本研究では，DSC 測定において-80℃まで降温しているため，中間水は凍結する．吸発熱量に差が現れるのは，自由水と中間水が凍結・融解するために必要なエネルギーがそれぞれ異なると考えられること，および凍結時と融解時において，自由水と中間水の比率が異なっているためであると考えられる．すなわち水の束縛状態の不可逆な変化が熱量差として反映されると考えられる．

中間水から自由水への不可逆な変化は，氷の結晶成長によって，ゼラチン分子との相互作用が凍結融解過程において変化し，融解時に元の束縛状態の復元が不完全であることを示す．吸発熱量の差が現れる領域において，含水率が小さいほど，また昇温降温速度が大きいほど変化率は大きくなる傾向が見られた．このことは，含水率が小さいほど，また昇温降温速度が大きいほど，水の束縛状態の不可逆な変化が起こりやすいことを示している

と考えられる．

以上のように，DSC の温度プログラムにおける冷却加熱過程をそのまま凍結融解過程として考えることにより，吸発熱量の変化率を求めることで，凍結融解に伴う含水ゼラチン中の不可逆な水の変化を定量化することが可能であるといえる．この手法は，生体組織の凍結治療あるいは凍結保存の温度プログラム設定において，有用な指標となると考えられる．

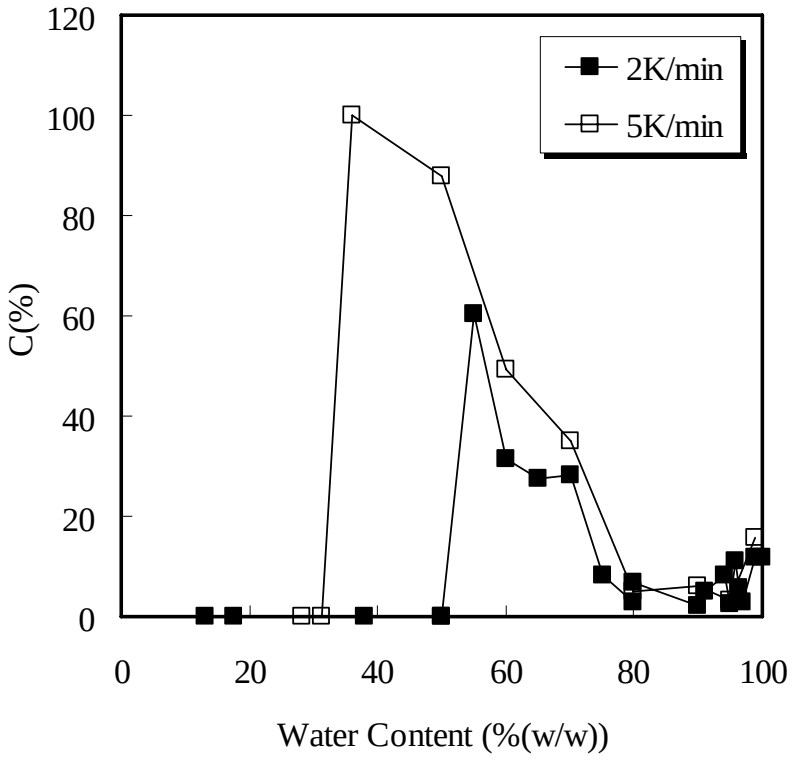


Fig. 2-21 Difference in endothermic and exothermic enthalpy and as a function of water content.

2.9　結言

含水膨潤過程および凍結融解過程における，生体高分子と水との相互作用を明らかにするため，示差走査熱量測定 (DSC)と陽電子消滅寿命測定 (PALS)を用いて，含水率に伴う生体高分子中の水の束縛状態および高分子構造の変化を調べた．モデル物質として，生体の粘弾性に関わっているコラーゲンの変性物ゼラチンを用いた．その結果として，結合水のみが存在する含水率領域で自由体積空孔半径に顕著な変化が見られ，自由水と結合水が共存する含水率領域では *o*-Ps の消滅寿命の変化は小さいことが分かった．これは，結合水のみが存在する含水率領域において，ヘリックス構造が水によって徐々に押し広げられるためと考えられる．また *o*-Ps は結合水のみが存在する場合はヘリックス内部，自由水が存在

するとヘリックス構造どうしの間に存在する自由水近傍で消滅する傾向が見られた．陽電子およびオルソポジトロニウム(*o*-Ps)の消滅サイト，および消滅サイトの電子状態に関しては，AMOC 法を用いることで更なる情報が得られると考えられる．

さらに，ゼラチンゲルの凍結融解過程において，不可逆な水の束縛状態の変化を，示差走査熱量分析の吸熱ピークと発熱ピークの差から評価する手法を確立した．この評価法を用いて，水の束縛状態が不可逆に変化する割合が，ゼラチンの含水率および凍結融解速度に依存して変化するということが分かった．このことは，生体組織の凍結治療あるいは凍結保存における温度プログラム設計における有用な評価法であると考えられ，陽電子消滅法と合わせることにより，凍結融解に関してもさらに詳細な検討が可能になると考えられる．

参考文献

1) Ramos-Sanchez, M. C., Martin-Gill, J., Barrio-Arredondo, M. T., Martin-Gill, F. *J.*, *Thermochim Acta*, **325**, 19, (1999).
2) Ota, T., Ueno, N., Yanaki, T. *Polymer*, **41**, 6055, (2000).
3) Hatakeyama T. and Quinn, F. X., Thermal Analysis: fundamentals and applications to polymer science, pp.98-105, Wiley, England, (1994).
4) 日本熱測定学会,“熱量測定・熱分析ハンドブック”, p.244, 丸善, (1998).
5) Jean, Y.C., Mallon, P. E., Schrader, D. M. Principles and applications of positron & positronium chemistry, World Scientific, Singapore, (2003).
6) Jean, Y. C., Schrader, D. M., *Positron and Positronium Chemistry*, p.91, Elsevier, Amsterdam, (1988).
7) Kirkegaard, P., Eldrup, M., Mogensan, O.E., Pederson, N. J., *Comp. Phys. Comm.*, **23**, 307, (1981).
8) Provencher, S. W., *Comp. Phys. Comm.*, **27**, 229, (1982).
9) Gregory, R.B., Zhu, Y., *Nucl. Instr. Meth.*, **A290**, 172, (1990).
10) Nakanishi, H., Wang, S. J., Jean, Y. C., “Microscopic surface tension studied by positron annihilation, positron annihilation studies of fruids”, (Shama, S. C. ed.), pp.292-298, World Scientific, Singapole, (1987).
11) Tao, S. J., *J. Chem. Phys.*, **56**, 5499, (1972).
12) Eldrup, M., Lightbody, D., Sherwood J. N., *Chem. Phys.*, **63**, 51, (1981).
13) 日本アイソトープ協会,“陽電子計測の科学”, p.9, 丸善, (1993).
14) Nijienhuis, K., *Adv. Polym. Sci.*, **130**, 160, (1997).
15) Uchiyama, Y., Ito, K., Li, H. L., Ujihira, Y., Jean, Y. C., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **211**, 111, (1996).
16) Liu, W.G., Yao K. D., *Polymer*, **42**, 3943, (2001).

17) Kim, S. J., Lee, C. K., Kim, S. I., *J. Appl. Polym. Sci.*, **92**, 1467, (2004).
18) Kim, S. J., Park, S. J., Kim, S. I., *React. Funct. Polym.*, **55**, 53, (2003).
19) Hatakeyama, T., Quinn, F. X., *Thermal Analysis: fundamentals and applications to polymer science*, pp98-105, Wiley, England, (1994).
20) Ruiz-Cabrera, M. A., Foucat, L., Bonny, J. M., Renou, J. P., Daudin, J.D., *J. Food. Eng.*, **68**, 209, (2005).
21) Ujihira, Y., Ryuo, T., Kobayashi, Y., Nomizu, T., *J. Appl. Phys.*, **16**, 71, (1978).
22) Morgensen, O.E., *Electrochim Acta*, **33**, 1203, (1988).
23) Lévay, B., Vértes, A., Hautojärvi, P., *J. Phys. Chem.*, **77**, 2229, (1973).
24) Billard, I., Abbé, J. C., Duplâtre, G. *J. Phys. Chem.*, **95**, 2501, (1991).
25) Mogensen, O. E., *Positron Annihilation in Chemistry*, Spriger-Verlag, p 73, New York, (1995).
26) Buchikhin, A. P., Goldanskii, V. I., Tatur, A.O., Shantarovich,V. P., *Zh Exsp Teor Fiz*, **60**, 1136, (1971).
27) Mogensen, O. E., Jacobsen, F. M., *Chem. Phys.*, **73**, 223, (1982).
28) Jean, Y. C., Deng, Q., *J. Polym. Sci. Polym. Phys.*, **30**, 1359, (1992).
29) Provencher, S.W., *Comp. Phys. Comm.*, **27**, 213, (1982).
30) Bornstein, P., Traub, W., *The proteins: Composition, Structure, and Function*, Vol. IV. pp.411-632, Academic, New York, (1979).
31) Ramachandran, G. N., Chemistry of Collagen (Treatise on Collagen, Vol 1), pp 103-184, Academic, New York, (1967).
32) Ito, K., Wakabayashi, Y., Uchiyama, Y., Li, H. L., Ujihira, Y., *Radioisotopes*, **47**, 19, (1998).

第３章　　量子線照射による生体高分子と水の相互作用の変化

3.1　緒言

本章の目的は，生体高分子ハイドロゲルの架橋構造に着目し，架橋に伴う水和状態の変化，およびそれに伴う膨潤収縮特性の変化について検討し，その粘性率との関係を明らかにすることである．

前章で述べたゼラチンの含水過程において，水分子が生体高分子の構造を熱運動によって押し広げていることが明らかになった．この考えに基づくと，高分子網目のゴム弾性と，水分子が網目を押し広げる力の釣り合いによって，生体高分子の構造が決定しているといえる．またこのことが，含水率に伴う巨視的物性変化と密接に関係していると予想される．前章においては，含水率をパラメータとして変化させた場合の生体高分子と水の相互作用について議論したが，一方で，生体高分子の架橋構造を意図的に変化させることによって高分子網目のゴム弾性を変化させることができると考えられる．これは生体組織における異常架橋とそれに伴う老化や病変に関連している．

そこで本章では，続く第 4 章で焦点となる組織の粘弾性との関連を念頭に置き，まず照射による粘性率の変化を調べ，その変化要因を検証していく形で考察する．まず量子線照射によって線維状蛋白質の架橋構造を変化させ，それに伴う物性変化について調べた．さらに，その膨潤収縮特性の変化について調べ，ゲルの状態方程式をもとに，その架橋構造による変化について議論した．モデル系としては，前章と同じくゼラチン水溶液を用いた．

3.2　生体組織における線維状蛋白質の異常架橋

線維状蛋白質の架橋構造，特に皮膚や腱，靭帯などに含まれるコラーゲンの架橋構造は，皮膚の粘弾性に大きく関与しており，加齢や紫外線による架橋構造の変化(異常架橋)により，組織の病的状態が引き起こされる．例えば，コラーゲンの異常架橋には低度架橋と高度架橋の 2 種類がある．低度架橋は，弱くて脆いコラーゲン線維を形成して皮膚障害や関節脱臼のような疾患を引き起こす．一方高度架橋は，硬いコラーゲン線維を形成して，皮膚弾性の低下や関節硬化など，主に老化に関連した疾患を引き起こす．

異常架橋の典型的な例は，紫外線による皮膚の老化である．皮膚の紫外線は，その波長により，UVC(200～280nm)，UVB(280～320nm)，UVA(320～400nm)に分類される．短波長の紫外線は，大気圏上層にあるオゾン層で吸収散乱され，地上まで到達しない．皮膚が受ける紫外線のうち，最短のものは，290～300nm であり，UVB のエネルギーは UVA の平均約 1/15 である．皮膚内部に到達する紫外線量は波長により異なり，長波長になるほど真皮深くまで到達するといわれている．比較的波長の短い UVB は，真皮までは到達しにくいが，エネルギーが高いため，皮膚に強く作用して，急性の炎症を起こしやすい．一方，波長の長い UVA は，比較的エネルギーは低いが，真皮にまで到達し，弾性線維の架橋構造を変化

させるといわれている[1)].

皮膚の構成成分で粘弾性に深く関わっているとされるのが，コラーゲン，エラスチン，ケラチンなどの線維状蛋白質である．したがって，前章に引き続き，線維状蛋白質のモデル系としてコラーゲンの変性物であるゼラチンを用い，架橋構造の変化と粘弾性の変化を調べた．

3.3　放射線の生体高分子への作用

放射線による高分子の構造や特性の変化は，主にその化学作用によって誘起される．放射線が照射された際に起こる主要過程は，まずイオン化，励起および化学結合の解離によるラジカルの生成がある．次に，イオン分子反応，ラジカル反応によって共有結合の解離や結合などが起こり，高分子の場合は，分子鎖切断，側鎖の解離，分子鎖間の架橋が起こる．生体高分子のうち，蛋白質の多くは架橋が起こりやすい架橋型，多糖類などのセルロース系高分子は切断型に分類されているが，濃度や反応条件により架橋型においても切断が起こったり，切断型においても架橋が起こったりする場合もある．

水を含む生体高分子の場合，溶媒である水分子から生じるラジカルと高分子との反応による間接効果と，生体高分子の直接のイオン化による直接効果に分類される．生体組織における生体高分子の架橋や分解においては，生体組織の 70～80%を占める水による間接効果が重要であると考えられている．水の放射線分解により発生するラジカルを Fig. 3-1 に示す[2)].

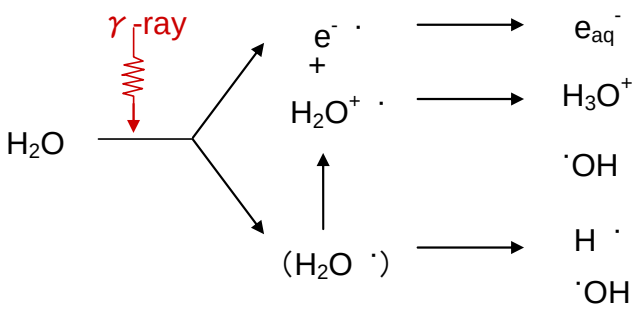


Fig. 3-1 Radical species genelated by nuclear irradiation.

これらのラジカル化学種が高分子鎖に作用し，高分子ラジカルが生成することによって，架橋あるいは切断が起こる．

3.4　量子線照射による粘性率の変化

3.4.1　実験方法

本研究では，ゼラチンの希薄溶液をモデル系として用いた．今回マクロゲルではなく水溶液を用いたのは，第 2 章の Fig. 2-16 において，含まれる水の約 80-90%(w/w)が自由水であり，水分子によるヘリックス構造の押し広がりを考慮しなくて良い領域で実験を行うためである．また，マクロゲルに比較してレオロジー特性を再現性良く測定可能であること，およびその分散状態と音速測定によって，架橋構造の変化を推定可能であることも理由として挙げられる．

出発物質としては，ゼラチン粉末(Merck)を用いた．ゼラチン粉末は蒸留水を加え，濃度 0.1～5.0%(w/w)に調整して水中で 10 分間膨潤させた後，40℃で 30 分間攪拌しながら加温して完全に溶解させ，室温まで冷却したものを用いた．サンプルは大阪大学産業科学研究所の ^{60}Co γ 線照射施設にて, 密閉容器内, 室温下で γ 線照射を行った. 吸収線量は 0～10.0kGy, 吸収線量率は 0～20kGy/h の条件で行った．脱気などの処理は特に行わなかった．

調製した試料の pH を, 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液(Nacalai Tesque, Inc)および 0.1N 塩酸(Nacalai Tesque, Inc)を用いて pH4.0~11.0 に調整した．また pH 測定は pH メーター(HM-60, TOA-DKK)を用い，室温にて測定した．また温度応答性については，恒温槽を用いて 15～35℃の所定の温度に調整して行った．温度精度は約±0.5℃で行った．

ゼラチン水溶液の粘性率測定はビスコメイト(山電)を用いて測定した．粒度分布は，動的光散乱法(FOQELS, HV-Brookhaven 社)を用い，散乱角 153°，レーザー光源 10mW，671nm，温度応答性以外の実験においては，温度 25℃で測定した．測定結果は 3 回測定の平均値を採用した．また，プルーブ顕微鏡(Nanopics1000, SII Nanotechnology 社製)を用いて，生成したナノゲルの凍結乾燥物の観察，超音波共鳴法(Resoscan, Resonic)を用いて超音波音速と吸収の測定を行った．超音波音速と吸収は約 10 秒毎に 100 秒間測定し，その間の平均値を採用した．

3.4.2　結果と考察

0.1～5.0%(w/w)の濃度のゼラチン水溶液に ^{60}Co γ 線を照射し，粘性率を吸収線量に対してプロットしたものを Fig. 3-2 に示す．1.0%(w/w)以上の濃度においては，吸収線量の増加に伴い，粘性率が増加する傾向が見られた．一方，0.5%(w/w)では，吸収線量の増加により若干減少する傾向が見られた．また，3%(w/w)以下の濃度においても，吸収線量 1kGy 以下の領域では若干減少する傾向が見られた．

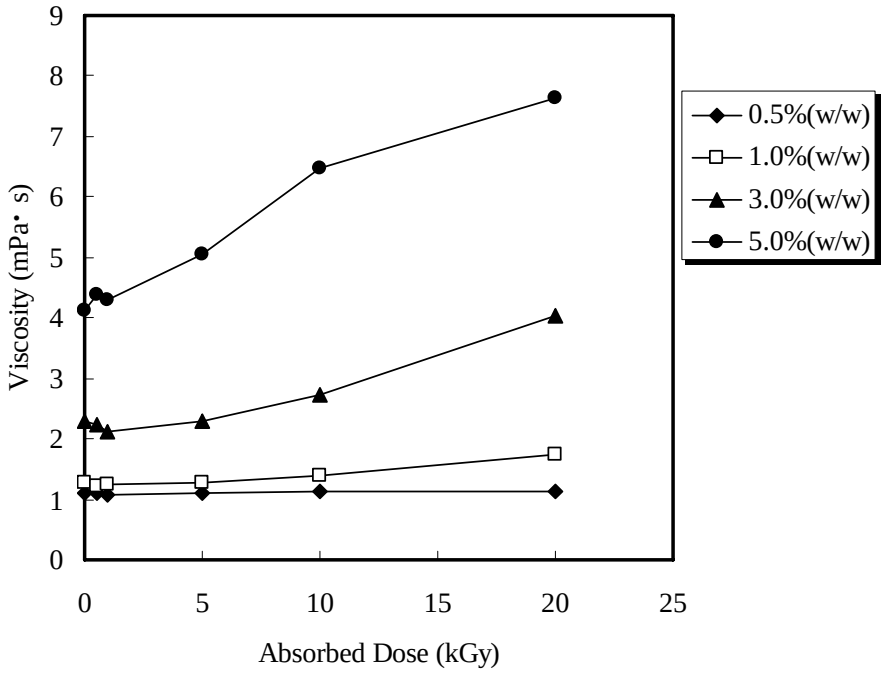


Fig. 3-2 Change in viscosity of gelatin solution.

3.5　量子線照射による粒度分布の変化

そこで，このような粘性率の変化が起こる要因を調べるため，動的光散乱法により測定した粒子の平均粒子径を吸収線量に対してプロットしたものを Fig. 3-3(a)に示す．これらの水溶液はγ線照射前後のいずれにおいても巨視的には流動性を持ち，ゾル状態であるが，動的光散乱法による粒度分布測定により，平均粒子径が照射前 20～35nm，照射後 20～65nm 程度の粒子が存在していることが確認された．また動的光散乱法により得られた結果が粒子の大きさなのか網目の大きさなのかを確認するため，プルーブ顕微鏡観察を行ったところ，粒子径数十 nm の粒子が分散していることが確認されたことから，水溶液中でゼラチン分子がナノサイズの粒子を形成していると考えられる．以下この粒子を蛋白質ナノゲルと呼ぶことにする．この図より，5.0%(w/w)では吸収線量の増加に伴って粒子径が顕著に増加した．一方， Fig. 3-3(b)に拡大図を示すように，吸収線量 0～5.0kGy では，0.5%(w/w)～3.0%(w/w)では吸収線量の増加に伴って粒子径が減少した．ただし，吸収線量 10～20kGy では 0.1%(w/w)～3.0%(w/w)の濃度でも吸収線量の増加に伴って粒子径がやや増加する傾向が見られた．これらのことから，今回実験を行った条件の中で，相対的に低濃度，低吸収線量の条件では, γ線照射によって粒子径が減少し, 相対的に高濃度, 高吸収線量の条件では, γ線照射によって粒子径が増加したと言える．この結果は Fig. 3-2 の粘性率の結果とほぼ一致しており，粒子径の増加に伴って粘性率が増加しているといえる．

0.5%(w/w)および5.0%(w/w)のγ線照射前のサンプルの粒度分布(体積基準分布)をそれぞれ

Fig. 3-4(a)，Fig. 3-4(c)に示す．いずれのサンプルも 10～20nm 付近(Peak 1)と数十～300nm 付近(Peak 2)にそれぞれピークが見られた．Fig. 3-3(a),(b)に示した粒子径は，これらを平均した径である．この 2 つのピーク位置の吸収線量による変化を調べたところ，Peak 1 の粒子径はほとんど変化しなかったが，Peak 2 の粒子径が 0.5%(w/w)では減少し(Fig. 3-4(b))，5.0%(w/w)では増加していることが分かった(Fig. 3-4(d))．このことから，低濃度，高濃度のいずれにおいても，γ 線照射により，比較的大きい粒子の粒子径が減少あるいは増加していることが分かる．

アクリル酸モノマー水溶液を出発物質として γ 線照射を行う実験も行ったが, この場合は, 濃度に関わらず吸収線量の増加に伴って粒子径が増加する結果が得られた．モノマーを出発物質とする場合と異なり，初めから高分子鎖として水溶液中に存在するゼラチン水溶液の場合，濃度によって，γ 線照射に誘起される反応が異なることが示唆された．

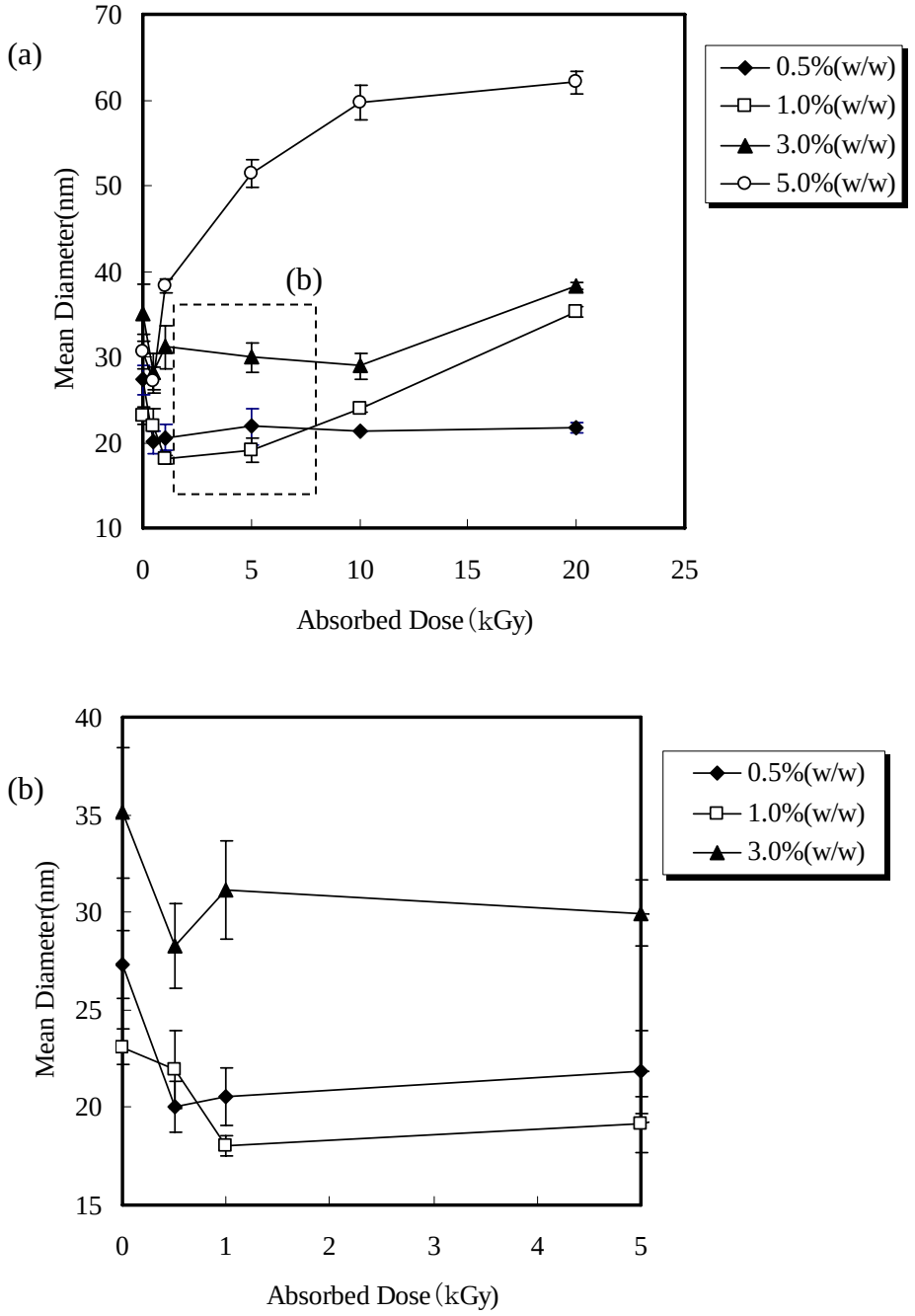


Fig. 3-3 Relation between the absorbed dose and mean diameter of gelatin nanogel (a), and that at lower dose (b).

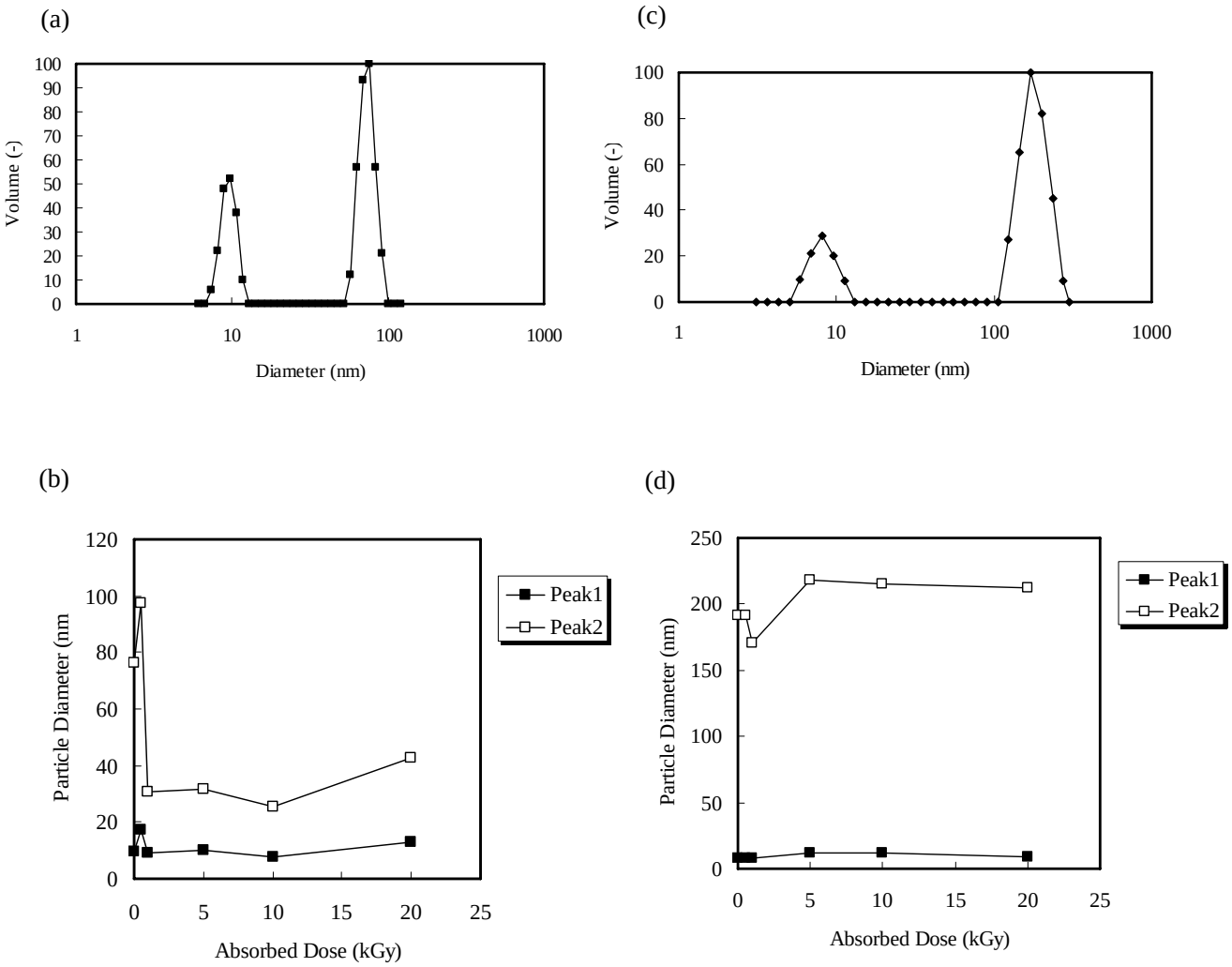


Fig. 3-4 Particle size distribution of 0.5%(w/w) and 5.0%(w/w) gelatin nanogel before irradiation(a,c) and shift of Peak 1 and Peak 2 with the absorbed dose (b,d). (a) and (b) corresponds to 0.5%(w/w) gelatin nanogel, and (c) and (d) corresponds to 5.0%(w/w) gelatin nanogel.

3.6　量子線照射による膨潤収縮特性の変化

量子線照射によるゼラチンナノゲルの架橋構造の変化と，それに伴う粘性率の変化が確認された．高分子ゲルの多くは外部刺激応答性を持っていることが確認されており，本研究で調製したゼラチンナノゲルにおいても，温度や pH 変化により膨潤・収縮する可能性が考えられる．このことは，生体組織における蛋白質の機能発現機構と，その異常架橋による変化について明らかにする上で，重要な性質であると考えられる．そこで，ゼラチンナノゲルの温度および pH 変化による膨潤・収縮特性を調べるため，pH，温度を変化させて動的光散乱法により粒子径を測定した．測定結果は 3 回の測定結果の平均値であり，エラーバーは±10-20nm 程度であったが，本節の図では，図を見やすくするために省略してある．5.0%(w/w)のゼラチンナノゲルの pH 応答性を調べたところ，温度上昇に伴ってナノゲルの粒子径は減少し，再び温度を下げるとナノゲルの粒子径は増加した．このようにナノゲルは温度によって可逆的に膨潤・収縮をすることが分かった．同様に，pH 変化についても可逆的な膨潤・収縮が確認された．

吸収線量を変化させた場合の，濃度 5.0%(w/w)のナノゲルの pH および温度応答性についてそれぞれ Fig. 3-5，3-6 に示す．濃度 5.0%(w/w)では，未照射のサンプル，γ 線照射を行ったサンプルともに温度応答性を示し，平均粒子径は最大 8 倍程度に増加した．さらに，その体積相転移点は吸収線量の増加とともに高温側にシフトした．また pH 応答性については，未照射のサンプル，γ 線照射を行ったサンプルともに pH 応答性を示し，平均粒子径は最大 5 倍程度に増加した．さらに，その体積相転移点は吸収線量の増加とともに低 pH 側にシフトした．

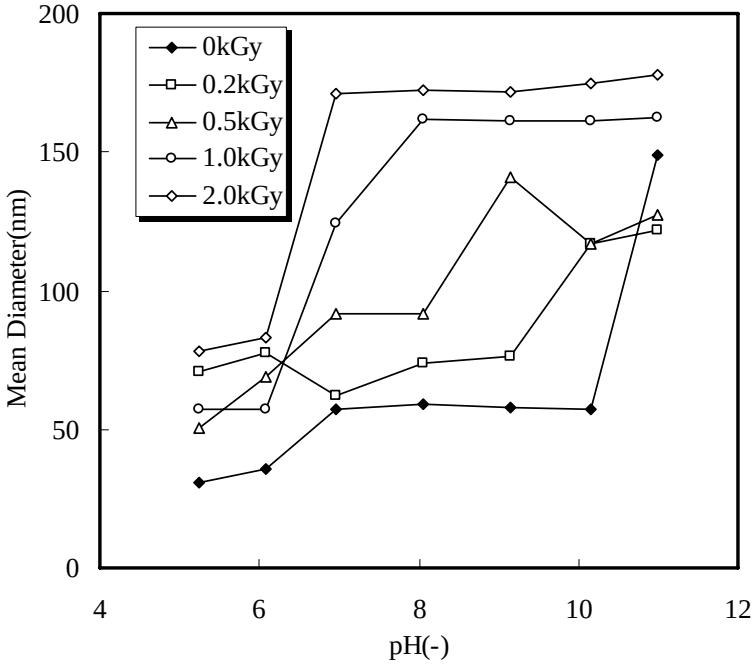


Fig. 3-5 Relation between pH and mean diameters of 5.0%(w/w) gelatin nanogels during pH increasing process.

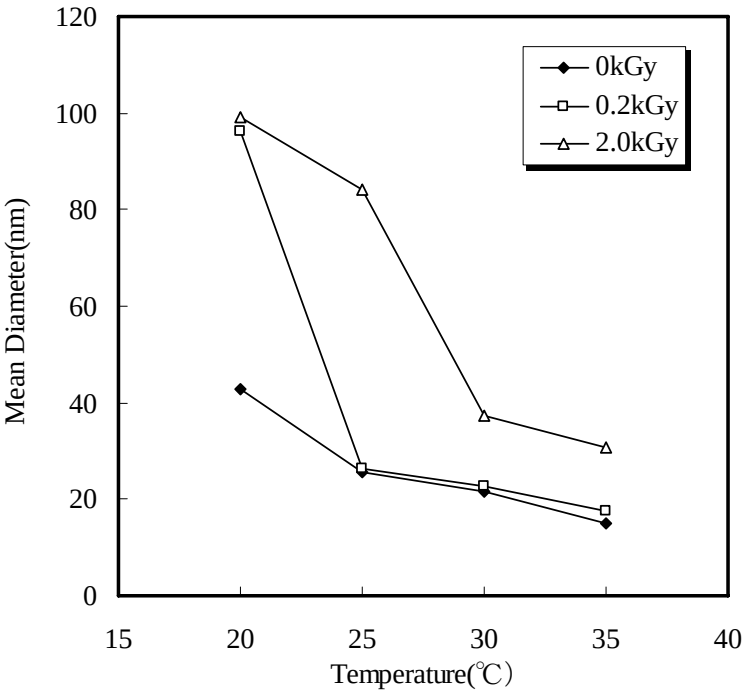


Fig. 3-6 Relation between temperature and mean diameters of 5.0%(w/w) gelatin nanogels during heating process.

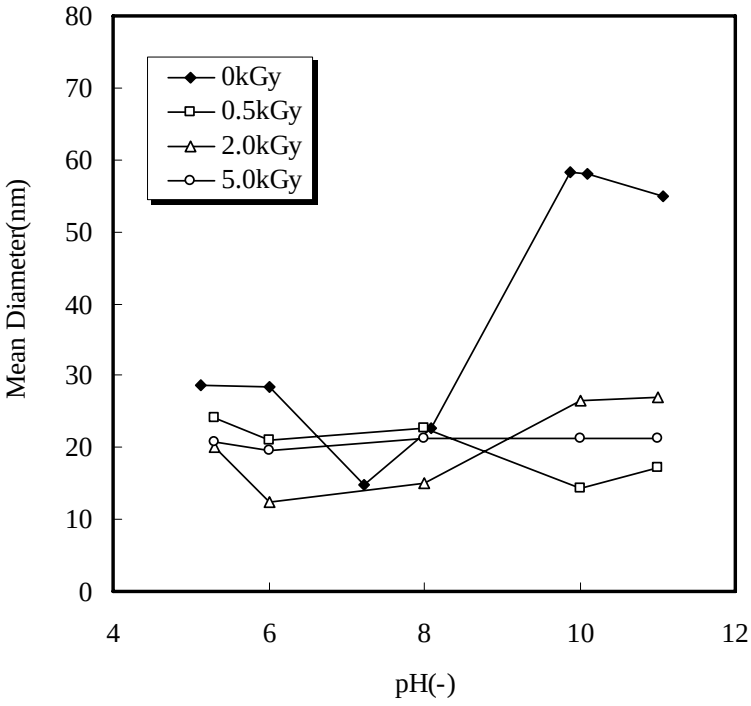


Fig. 3-7 Relation between pH and mean diameter of 0.5%(w/w) gelatin nanogels during pH increasing process.

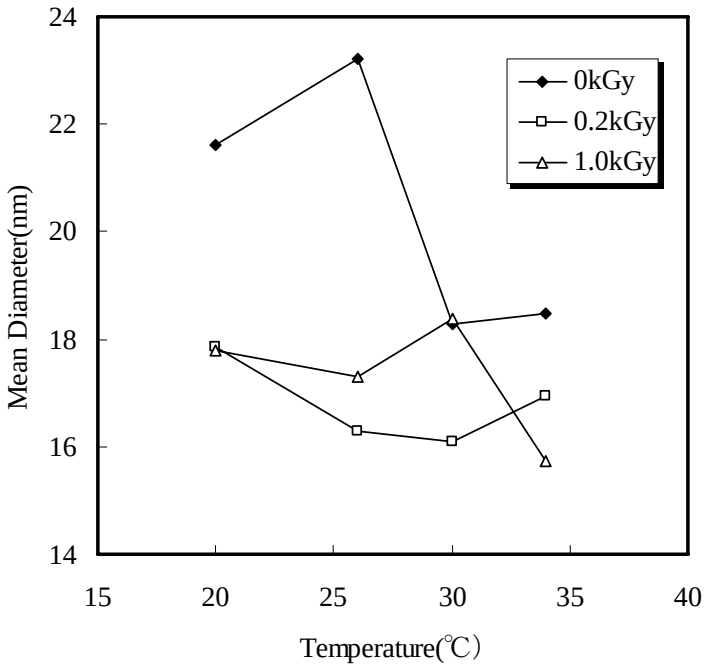


Fig. 3-8 Relation between temperature and mean diameter of 0.5%(w/w) gelatin nanogels during heating process.

γ線照射によるモノマーからの高分子の合成についてはいくつか報告があり，また一般的に合成高分子については pH，温度応答性が確かめられている [3)-6)]．　例えば，NIPA (N-isopropyl acrylate)系温度応答性ゲルにおいては粒子径でおよそ 2.4 倍程度 [7)]，PMAA (polymethacryl amide)で 6 倍程度 [8)]の膨潤度を示すという報告がある．しかし，生体高分子の応答性に関してはほとんど研究がなされておらず，ゼラチンに関しても，γ線を用いたナノサイズのゲルの調製は試みられているものの [9)]，その刺激応答性に関してはほとんど議論が行われていなかった．この原因として，ゼラチンが 40～50℃で水に溶解するため耐熱性に乏しく，そのため熱応答性を示さないとされていたことが挙げられる [10)]．　しかし，本研究ではゼラチンゲルのような蛋白質でも合成高分子と同等かそれ以上の膨潤度を示すことが分かった．この要因として，架橋により耐熱性が増加したことが挙げられる．架橋による水溶性の減少は，ドラッグデリバリーシステムの担体へのゼラチンの利用に関する研究において，グルタルアルデヒドによる架橋によって 37℃以上における水への溶解性が減少したことによっても示されている [11)-12)]．水への溶解性が減少したことにより，高温でも網目構造が保持され，熱応答性が出現したと考えられる．

5%(w/w)においては，未照射・照射サンプルともに温度および pH 応答性を示した．しかし，比較的低濃度である 0.5%(w/w)では，Fig. 3-7，3-8 に示すように，未照射のサンプルは温度および pH 応答性を示し，γ線照射を行ったサンプルは pH 応答性をほとんど示さなかった．これらの結果から，ナノゲルは温度，pH に対して膨潤収縮特性を示し，さらに吸収線量によって体積相転移点が変化することが分かった．しかし，比較的低濃度である 0.5%(w/w)においては，γ 線照射によって膨潤・収縮をほとんど示さなくなったことから，ゼラチン濃度によってもその応答性が変化することが明らかになった．

高分子水溶液にγ線を照射すると，水の放射線分解で生じた H･や･OH によりカルボキシル基やヒドロキシル基などからの水素引き抜き反応が起こり，高分子鎖にラジカルが生成する．高分子鎖のラジカル反応は，主鎖切断，側鎖切断，架橋結合の生成の 3 つが考えられる．ゼラチン水溶液の濃度が 0.5%(w/w)の濃度では吸収線量の増加により粒子径が減少し，5.0%(w/w)以上の濃度では吸収線量の増加により粒子径が増加したが，これは低濃度においては粒子内架橋，高濃度においては粒子間架橋が優先的に起こっているためと考えられる．

粒子内架橋が起こるか，あるいは粒子間架橋が起こるかは，粒子間の距離に依存すると考えられるため, それぞれの濃度について, およその粒子間距離を見積もった. Fig. 3-4(b),(d)のデータから，濃度や吸収線量に多少依存するが，ピーク 1 が 1 次粒子，ピーク 2 が 2 次粒子であるとすれば，1 次粒子は 約 15nm 程度の大きさの粒子を形成していることが分かる．

そこでゼラチンナノゲルを 1 分子から成る単分散の球状粒子と仮定し，ゼラチンの占める体積分率を求めた．ここで，粒子の直径を D(Å)，分子量 M_w，粒子の重量濃度 C(%(w/w))の溶液において，粒子の占める体積分率は,

$$\phi = \frac{\pi D^3}{6} \cdot \frac{N_A}{M_w} \cdot C \times 10^{-26}. \qquad \text{(Eq. 3-1)}$$

で求めることができる[13]．　ここで，N_Aはアボガドロ数である．この体積分率を用いて，1個の粒子が占有できる体積を球として近似した時の球の直径 b は，

$$b = \frac{D}{\sqrt[3]{\phi}}. \qquad \text{(Eq. 3-2)}$$

と表され，b-D により粒子間距離を求めることができる．このようにして求めた粒子間距離は，0.5%(w/w)では約 25nm，5.0%(w/w)では約 3.5nm となる．粒子径を 15nm と仮定したので，0.5%(w/w)においては粒子径に対して粒子間距離が大きく，5.0%(w/w)では粒子径に対して粒子間距離が小さいということになる．したがって低濃度では γ 線照射により粒子内架橋が優先的に起こり，高濃度になるに従って粒子間架橋が優先的に起こる傾向が現れたのではないかと考えられる．

3.7　ゲルの状態方程式を用いた膨潤収縮特性の検討

次に，ゼラチンナノゲルの pH および温度応答性について考察する．Flory-Huggins の式によると，ゲルの浸透圧 π は(Eq. 3-3)で与えられる[14]．

$$\pi = \nu kT\left\{\frac{\phi}{2\phi_0} - \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^{1/3}\right\} - \frac{\Delta F}{V}\phi^2 - \frac{kT}{V}\left\{\ln(1-\phi) + \phi\right\} + f\nu kT\frac{\phi}{\phi_0}. \qquad \text{(Eq. 3-3)}$$

ここで，k はボルツマン定数，ν は単位体積当たりの高分子の数，V は高分子 1 個の体積 T は絶対温度，ϕ は高分子鎖の体積分率，ϕ_0 は高分子鎖がランダムコンフォメーションをとったときの体積分率，f は高分子鎖一本あたりの解離している対イオンの数，ΔF は網目の高分子と液体との相互作用に基づく自由エネルギーである．ここで，ϕ/ϕ_0 は膨潤率の逆数に対応する．この式の第 1 項は架橋点間高分子のゴム弾性による圧力，第 2 項は高分子と液体の相互作用による圧力，第 3 項は高分子網目と液体の混合エントロピーによる圧力，第 4 項は高分子網目の持つ対イオンによる圧力である．

高 pH 域でゲルが膨潤するのは，第 4 項の f すなわち架橋点間の鎖あたりの解離している対イオンの数が増加するため，式全体が正の効果を持つためである．ゼラチンゲルの場合，カルボキシル基が解離すると考えられる．Ogawa ら[15]は，NIPAAM ゲルにおいて，COO^- どうしののクーロン反発力もまた膨潤に関与すると考えており，これはゼラチンゲルにも適用できると考えられる．また温度の上昇は第 1 項，第 3 項，第 4 項に影響するが，第 4 項の正の効果に比べて第 1 項，第 3 項の負の効果が大きいことが考えられるため収縮が起こる．バルクゲルに用いられるこのゲルの状態方程式は，蛋白質ナノゲルの結果にも適用できることが分かる．

次に，吸収線量により体積相転移点が変化したことについて検討する．ゲルが水溶液中で平衡状態にあるとすると，Flory-Huggins の式におけるゲルの浸透圧 π をゼロとすることによって次の式が得られる [14]．

$$\tau \equiv 1-\frac{\Delta F}{kT}=-\frac{Vv}{N\phi^{2}}\left[(2f+1)\left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)-2\left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^{1/3}\right]+1+\frac{2}{\phi}+\frac{2\ln(1-\phi)}{\phi^{2}}. \qquad \text{(Eq. 3-4)}$$

(Eq. 3-4)の左辺は換算温度と呼ばれ，T と ΔF が含まれることから，絶対温度と溶媒組成の関数であり，温度を変えることと，溶媒組成を変化させることは物理的に同じ意味であることを示している．ゼラチンにγ線照射することによって架橋が進み，f が小さくなると転移の換算温度は高くなる．これは転移温度が高くなることを示す．また同様にして架橋が進むことによって pH による体積相転移の pH 値が低くなることも説明できる．

また，膨潤率について検討すると，粒子内架橋していると考えられる 0.5%(w/w)の濃度では，γ線照射によって得られるゲルは，ほとんど応答性を示さなかった．これは，粒子内架橋が主に起こることにより，高分子鎖の自由度が減少するためであると考えられる．一方で粒子間架橋していると考えられる 5.0%(w/w)の濃度では，明らかな応答性を示した．これは，粒子間架橋が優先的に起こっているため，架橋により高分子鎖の自由度はほとんど変化しないことを示している．

3.8　ゲルの架橋構造による水の束縛状態の変化

粒子内架橋と粒子間架橋について確認するため，超音波共鳴法により超音波音速測定を行った．超音波音速を用いて，Eq. 3-5 より，断熱圧縮率 β を求めることができる．

$$\beta=\frac{1}{\rho V^{2}}. \qquad \text{(Eq. 3-5)}$$

ここで，ρ は密度，V は音速である．断熱圧縮率 β は，Eq. 3-6 に示すように，体積弾性率の逆数となっている．つまり，断熱圧縮率 β が大きいほど，体積弾性率が小さく，圧縮されやすいことを示している [16), 17)]．

$$\beta=\frac{1}{V}\cdot\frac{\partial P}{\partial V}. \qquad \text{(Eq. 3-6)}$$

高分子を含む水溶液の場合，水溶液の断熱圧縮率 β は，高分子の体積分率 ϕ_p，水の体積分率 ϕ_w，高分子の断熱圧縮率 β_p，水の断熱圧縮率 β_w を用いて次のように表される [17), 18)]．

$$\beta=\phi_p\beta_p+\phi_w\beta_w. \qquad \text{(Eq. 3-7)}$$

ナノゲル溶液の音速には水とゼラチンの両方の断熱圧縮率が関与しているが，本研究の

場合，Eq. 3-7 における高分子の体積分率は，今回用いた最も濃度の高い 5.0(w/w)の溶液においても 0.05 以下であり，水の断熱圧縮率の寄与が大きいと考えられる．特に，同じ濃度において比較する場合，溶液全体の断熱圧縮率の変化は，主にゼラチン分子による水の束縛状態の変化に伴って起こる，水の断熱圧縮率の変化によるものとして考えることができる．

Fig. 3-9 に，ゼラチン濃度による断熱圧縮率の変化を示す．断熱圧縮率は，濃度の変化に伴い直線的に減少していることが分かる．このことはゼラチン濃度の増加に伴って水が圧縮しやすくなること，すなわち水の構造の剛直性が増加することを示している．これはランダムに配向し運動性の高い自由水が，ゼラチンを加えることにより結合水へと変化し，構造化することによって体積弾性率が増加し，圧縮率が減少したと考えられる．すなわち，断熱圧縮率の減少は結合水の増加を示すと考えることができる．この図の濃度範囲は，第 2 章の Fig. 2-12 における含水率 95-100%に対応し，この範囲ではゼラチン濃度に比例して結合水が増加していることとも合致している．

そこで，各濃度および吸収線量のナノゲル溶液に対して，γ 線照射前に対する断熱圧縮率を Eq. 3-6 によって求め，各濃度における 0kGy に対する断熱圧縮率の変化率 R を Eq. 3-8 によって計算し，吸収線量に対してプロットした結果を Fig. 3-10 に示す．

$$R = (\beta - \beta_0)/\beta_0 . \qquad \text{(Eq. 3-8)}$$

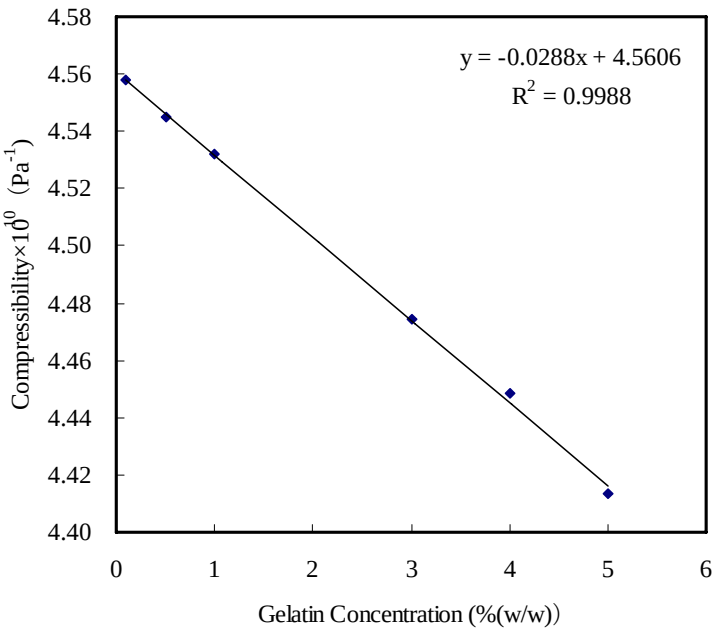


Fig. 3-9 Relation between concentration and compressibility of gelatin solutions calculated from sound velocity.

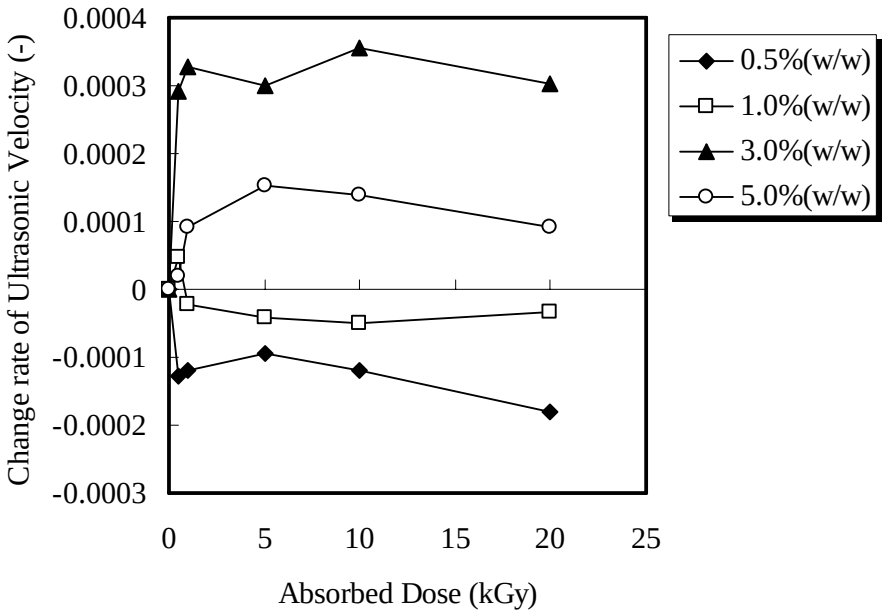


Fig. 3-10 Relation between absorbed dose and change rate of compressibility of gamma-ray irradiated gelatin aqueous solutions calculated from sound velocity.

0.5%(w/w)，1.0%(w/w)においては，γ線照射によって断熱圧縮率が増加した．これは，ゼラチンナノゲルが粒子内架橋により密で小さくなり，それに伴って結合水が減少したことを示唆している．一方，3.0%(w/w)，5.0%(w/w)においては，γ線照射によって断熱圧縮率が減少した．これは，ゼラチンナノゲルが粒子間架橋により疎で大きくなり，それに伴って結合水が増加したことを示唆している．

そこで，実際に粒子内・粒子間架橋によって結合水が増減しているかどうかを確かめるため，示差走査熱量分析(DSC)を用いて，第 2 章で述べた手法により，結合水の比率を求めた．その結果を Fig. 3-11 に示す．

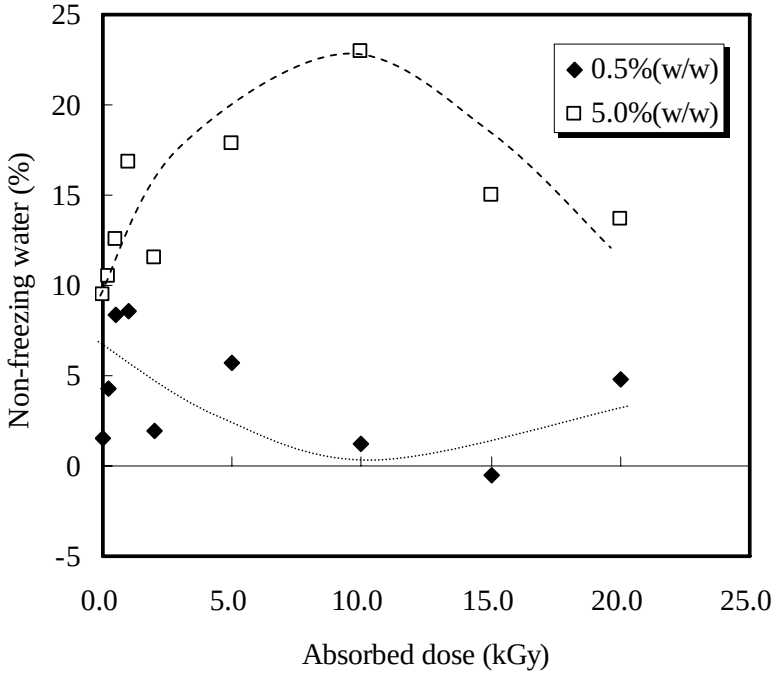


Fig. 3-11 Percentage of non-freezing water as a funcrion of absorbed dose.

超音波音速によって求めた断熱圧縮率の傾向と大まかには一致し，比較的濃度の低い0.5%(w/w)においては，γ線照射によって結合水が減少する傾向が見られ，5.0%(w/w)においては，γ線照射によって結合水が増加する傾向が見られた．このことは，断熱圧縮率が結合水の比率の増減を反映していることを示している．また，断熱圧縮率および結合水の比率の吸収線量による変化傾向をさらに詳しく見ると，結合水の増減は5～10kGyの範囲で最大となり，それ以上の吸収線量では未照射に近い状態に戻る傾向が見られた．このことは，粒子径に対して粒子間距離が大きい場合には粒子内架橋，粒子径に対して粒子間距離が小さい場合においては粒子間架橋が起こると説明したが，実際には粒子内架橋と粒子間架橋が競争的に起こっており，また架橋が起こることによって粒子径および粒子間距離が連続的に変化するため，それぞれの反応の寄与の度合いが変化すると考えられる．たとえば5.0%(w/w)の場合，低吸収線量では粒子間架橋の寄与が大きいが，粒子間架橋によって粒子間距離が広がるため，高吸収線量においては粒子間架橋したものがさらに粒子内架橋することも考えられる．

以上のように，ゼラチンナノゲル水溶液の粘性率，および外部刺激による膨潤収縮特性は，ゼラチン濃度およびγ線の吸収線量により変化し，その変化機構には架橋構造の違いおよびそれに伴う水の束縛状態の変化が密接に関わっていることが分かった．

3.9　結言

ナノサイズの生体高分子ゲルが分散したナノゲル水溶液の粘性率は，吸収線量および濃度に依存して変化することが分かった．γ 線照射によって粘性率が変化する機構について，粒度分布測定を用いて考察し，粒子間架橋および粒子内架橋が粘性率の増減に関わっていることを明らかにした．またこのナノゲルが外部刺激による可逆的な体積相転移を起こすことを確認した．さらに，pH や温度によるナノゲルの膨潤収縮挙動を調べたところ，体積相転移点や膨潤率は，吸収線量および生体高分子の濃度によって変化することが分かった．このことから，加齢や病変に伴う線維状蛋白質の異常架橋と，それに伴う生体組織の粘弾性や生体機能の変化の因果関係が推定された．今回の実験では，対象が溶液の状態であるため，密封線源を用いた陽電子消滅法による検証が不可能であり，動的光散乱法を中心にメゾスコピックな構造の評価を行った．今後，非密封線源を用いた陽電子消滅寿命測定系を構築することで，架橋によるナノ空間構造の変化の評価も合わせ，更に詳細な検討が可能になると考えられる．

参考文献

1) 吉川敏一，河原雅弘，海原一子，“活性酸素・フリーラジカルのすべて”，pp.64-67，丸善, (2000).
2) 田畑米穂,“原子力工学シリーズ 7　放射線化学”，pp.87-88，東京大学出版会, (1978).
3) Ulanski, P., Janik, I., Rosiak, J.M., *Radiat. Phys.* Chem., **52**, 289, (1998).
4) Ulanski, P., Kadlubowski, S., Rosiak, J.M., *Radiat. Phys. Chem*., **63**, 533, (2002).
5) Ole Kiminta, D. M., Luckham, P.F. *Polymer*, **36**, 4827, (1995).
6) Ogawa Y., Ogawa, K. Kokufuta, E., *Langmuir*, **20**, 2546, (2004).
7) Harmon, M.E., Kuckling, D., Frank, C. W., *Macromolecules*, **36**, 162, (2003).
8) Ito, S., Ogawa, K., Suzuki, H., Wang, B., Yoshida, R., Kokufuta, E., *Langmuir*, **15**, 4289, (1999).
9) Furusawa, K., Terao, K., Nagasawa, N., Yoshii, F., Kubota, K., Dobashi T., *Colloid Polym. Sci*., **283**, 229, (2004).
10) Dhara, D., Rathna, G.V.N., Chatterji P.R., *Langmuir*, **16**, 2424, (2000).
11) Tabata, T., Ikeda Y., *Adv. Drug Delivery Rev*., **31**, 287, (1998).
12) Tabata, T., Nagano, A., *Biomaterials*, **19**, 1781, (1998).
13) Hara, K., Sugiyama, M., Yasunaka, M., Sanada, M. *Proceedings of the 35th meeting of Kyoto University Research Reactor Institute*, **9**, (2001).
14) Hirose, Y., *TOYOTA research center R&D review* **27**, 1, (1992).
15) Ogawa, K., Ogawa, Y., Kokufuta, E., *Colloids and Surfaces* A, **209**, 267, (2002).

16) Koda, S., Nomura, H., *Surface*, **33**, 734, (1995).
17) Ikeda, H., Higashi, M., *Polymer International*, **53**, 1538 (2004).

第４章　　生体高分子と水の相互作用が生体組織の粘弾性に及ぼす影響

4.1　緒言

本章の目的は，実際の生体軟組織である皮膚・皮下組織を対象として，第 2 章，第 3 章で議論した水和状態や架橋構造を踏まえて，加齢およびスキンケア用エマルションの塗布による粘弾性の変化機構を明らかにすることである．

第 2 章，第 3 章において，生体組織に含まれる線維状蛋白質のモデル系としてゼラチンを用い，含水率および架橋構造変化に伴う空間構造，レオロジー特性，膨潤収縮特性の変化機構について議論した．本章で取り上げるのは皮膚・皮下組織の粘弾性であるが，皮膚・皮下組織の粘弾性が水分量や繊維状蛋白質の架橋構造に関連していることは古くから指摘されている．しかし，その関係について未だ定量的な評価ができない原因は，レオロジー特性を非侵襲的かつ定量的に評価しようとすると，皮膚表面からの情報しか得られないということである．本章では，粘弾性モデルを用いた測定結果の解析，および二つの異なる手法の組み合わせにより，表皮と，真皮・皮下組織の粘弾性を個々に評価することを試み，さらにその手法を用いて，加齢，およびエマルションの皮膚浸透に伴う皮膚粘弾性の変化機構について，水和構造・架橋構造を踏まえて考察した結果を述べる．ここで，皮膚の老化は第 3 章で述べた生体高分子の架橋と対応し，エマルションの皮膚浸透は第 2 章で述べた生体高分子の含水膨潤に関連することを補足しておく．

4.2　皮膚と皮下組織の構造と水分量

皮膚は一般に，Fig. 4-1 に示す構造をしており，厚さ 0.1～0.3mm の表皮，厚さ 2～3mm の真皮，およびその下層の皮下組織から成る [1)]．物理的・化学的な刺激から生体を守る働きを担っているのは，表皮の最外層を覆っている角質層である．表皮の角化過程で作られるケラチン線維の束やそれを囲む角質肥厚膜が，機械的刺激に対して強固であると同時に化学物質に対しても強い抵抗性を持っている．角質層は生体の最外層に位置しているため，生体内部に比べ乾燥した外部環境に曝されている．角質層は 10～15%の水分を持っているが，外部環境に曝された状態でこの水分を保持し(水分保持機能)，また生体内部の水分が失われないようにする機能(水分バリア機能)が備わっている．角質層の水分保持に重要な役割を担っているのは，角質層中に存在する水溶性の成分で，これを天然保湿因子(Natural Moisturizing Factor：NMF)とよんでいる．その主要成分はアミノ酸やピロリドンカルボン酸などのアミノ酸代謝物である．角質層の水分は温度や湿度などの外部環境によって変化しやすく，含水率が 10%以下になると，角質層は柔軟性を失い，硬く脆くなり，ひび割れや落屑を生じるといわれている [2)]．

一方真皮・皮下組織は，70%程度の水を含み，この水は真皮を通る毛細血管から供給される．したがって，真皮の水分量は毛細血管からの水分供給の積分量であるため，短時間に変化することはなく，数分単位でゆっくりと変化している．

第 2 章の Fig. 2-12 に示したように，含水率約 20%の角質層に含まれる水はほとんど結合水であり，一方で含水率 70%程度の真皮・皮下組織には自由水が存在し，これはゼラチンゲルを用いたモデル実験の結果ともおよそ合致している．このことに基づき，ゼラチンにおける含水膨潤過程が生体組織にもにも適用可能であると仮定すれば，真皮において，もし水分量が変化したとしても，Fig. 2-16 に示すように，真皮・皮下組織の含水率付近においては，自由水が増加していく領域であり，コラーゲンのヘリックス構造自体の拡がりはほぼ定常状態に達していると考えられるため，水分量が変化したとしても，ヘリックス構造自体の構造変化はほとんどないと考えられる．したがって，真皮の粘弾性は水分量というよりはむしろ弾性繊維であるコラーゲン・エラスチンの架橋構造[3)]に依存すると予想される．

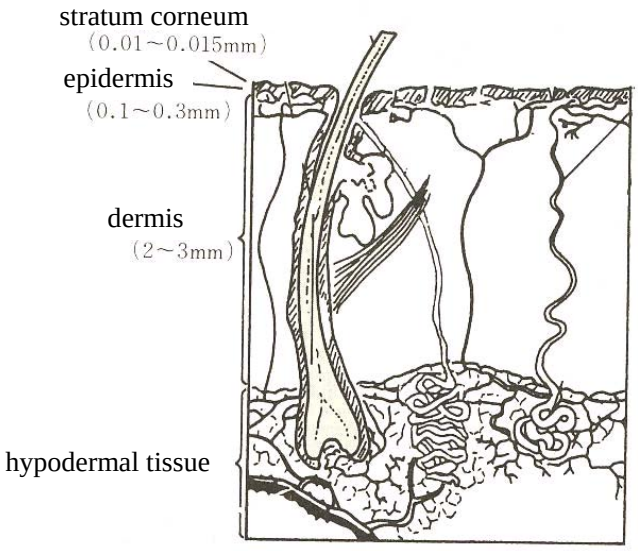


Fig. 4-1 General structure of human skin[1)].

4.3　皮膚・皮下組織の粘弾性の評価

4.3.1　実験方法

シリコンゴムで作製した皮膚モデルおよびヒト皮膚の粘弾性測定には Venustron (Axiom 社製)および Cutometer MPA580 (Courage and Khazaka 社製)を用いた. Venustron は一定周波数で振動する振動子を皮膚に押し込んだときの共振周波数変化によって[4)], 一方 Cutometer は, 皮膚表面を一定陰圧で一定時間吸引・開放した時の吸引高さと戻り率の時間変化によって[5),6)]，皮膚の粘弾性を測定するものである．

まず，皮膚吸引，および振動子押込み時の共振周波数変化の測定による皮膚変形のシミュレーションを行った．有限要素法(FEM)による変形量の解析には有限要素法シミュレーションソフト ANSYS10.0 (Cybernet Systems Co., Ltd.) を使用した．次に，シリコンゴムを用いて表皮・真皮の弾性率の異なる皮膚モデルを作製した．シリコンモデルの作製には KE-12(信越シリコーン)を用いた．実際の皮膚の弾性率を模擬し，表面から約 300μm の部分を表皮(約 200kPa)，その下 20mm を真皮および皮下組織(約 100kPa)としたモデルを作製した．Table 4-1 に示すように，表皮部分が 120kPa，真皮が 80kPa のモデルも作製し，前述の 2 つの手法で粘弾性の測定を行った．

Table 4-1 Elastic modulus of skin model made by silicone rubber.

Upper Layer (Epidermis)	Lower layer (Dermis, hypodermal tissue)
200kPa	100kPa
120kPa	100kPa
200kPa	80kPa
120kPa	80kPa

皮膚測定は，高齢者 10 名(男性 5 名，女性 5 名)，平均年齢 68 歳，若年者 8 名(男性 6 名，女性 2 名)，平均年齢 24 歳を対象として行った．十分なインフォームドコンセントを行ったのちに実験を行った．皮膚測定は温度 26±0.8℃，相対湿度 65±5％の室内で行った．先に述べた 2 手法による皮膚粘弾性測定とともに，角層水分量，TEWL(経皮水分蒸散量)，および皮脂量の測定を行った．測定箇所は，前腕内側，頬，仙骨部の 3 箇所である．皮脂量・TEWL は各 1 回，角層水分量，皮膚粘弾性は各部位につき 3 回ずつ測定を行い，平均値と標準偏差を算出した．

4.3.2 共振周波数変化による皮膚粘弾性測定

本実験では，接触インピーダンス法といわれる原理で弾性率を測定する測定機器(ビーナストロンシステム，AXIOM 社)を用いた．Fig. 4-2 にその概略図を示す．接触インピーダンス法による測定原理は，以下の通りである．一定の周波数で振動する棒状の接触子が物体表面に押し込まれると，半球状の先端が対象表面と接触し，これによって周波数が変化する．これは対象物が振動子と一緒に振動をするためである．これを共振周波数変化という．振動ピックアップセンサーがこの周波数変化を検出し，また同時にロードセルにより反力検出を行う．これにより，押し込みに伴う反力および周波数変化を測定することができる[7), 8)]．

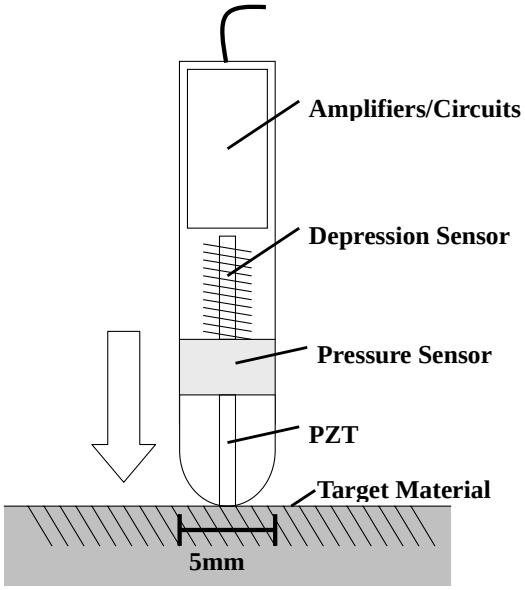


Fig. 4-2 Basic structure of measurement system of hrequency change.

一定の周波数で振動する圧電振動子の周波数 f_r(Hz)は，その振動子の等価質量を m，等価スティフネスを s とすると，Eq. 4-1 のように書ける．

$$f_r = \frac{1}{2\pi\sqrt{\frac{m}{s}}}. \qquad \text{(Eq. 4-1)}$$

この振動子を，生体などの軟組織に押しつけると，固有振動数の違いから周波数が変化する．この変化後の周波数 f_r' (Hz)は，Eq. 4-2 のように書ける．

$$f_r' = \frac{1}{2\pi\sqrt{\frac{m+m_L}{s+s_L}}}. \qquad \text{(Eq. 4-2)}$$

ここで m_L は対象となる軟組織の等価付加質量，s_L は対象となる軟組織の等価付加スティフネスである．Eq. 4-2 が示すように，m_L は周波数を減少させる因子であり，逆に s_L は周波数を増大させる因子である [9)-11)]．そしてこの Eq. 4-2 は，以下のような等価回路から説明することができる．

圧電振動子の振動系を電気的等価回路に置き換えると，非接触の状態では Fig. 4-3 のようになっており，この回路において，R_1 が等価振動損失 r，L_1 が等価質量 m，C_1 が等価スティフネスの逆数 $1/s$ に対応する．この振動子が物質に押し付けられると，等価回路は Fig. 4-4 のように変化する．R_x は等価付加振動損失 r_L，L_x は等価付加質量 m_L，C_x は等価付加スティフネス $1/s_L$ の逆数に対応する．この回路全体でのゲインが最大となる周波数，すなわちインピーダンスが最小となる周波数が，前述の共振周波数 f_r'である．

一般に金属など, 振動子と比較して硬い物質にプローブを押し当てた場合, f_r'は増加する．これは硬い物質ほどスティフネス s_L が大きいため，f_r'が Eq. 4-1 の f_r と比べて分母の値が小さくなるためである．逆に人体やゴムなどの柔らかい物質に対しては，f_r'は逆の原理から減少する．また，人体など，振動子と比較して弾性率の小さい物質を測定対象とした場合には，Eq. 4-2 は特に m_L が支配的になることが知られている．この m_L は対象物質の弾性率など力学的特性に依存する．本実験ではこれを利用し，共振周波数 f_r の変化量を測定することによって，皮膚の弾性率の推定を試みた．Fig. 4-5 に，ヒト皮膚の共振周波数変化の典型的な例を示す．皮膚はプローブ先端の振動子よりも柔らかいため，振動子の元の周波数よりも押込み時の共振周波数変化は減少するため，Δf_r はマイナスとなる．このとき押込み時の共振周波数変化が弾性率を反映しており，弾性率と周波数変化はほぼ比例関係にあり，弾性率の増加に伴い周波数変化の絶対値は減少する．また同じ押し込み圧における押込み時と引上げ時の往復周波数差は往路・復路における皮膚と振動子との接触面積の違いに起因し，粘性率 η の減少に伴って増加する．この原理を用いて，皮膚の粘弾性を評価することが可能である．

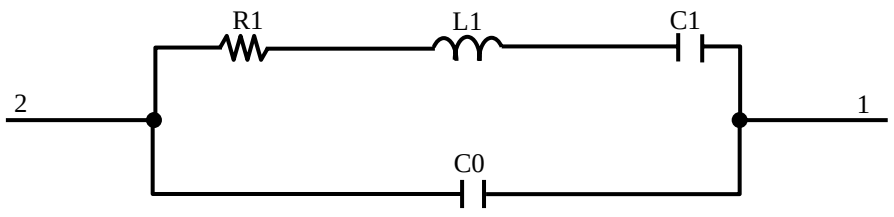


Fig. 4-3 Equivalent circuit of vibrating transducer.

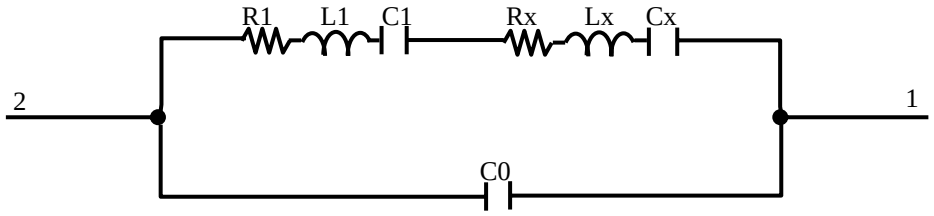


Fig. 4-4 Equivalent circuit of transducer and target material.

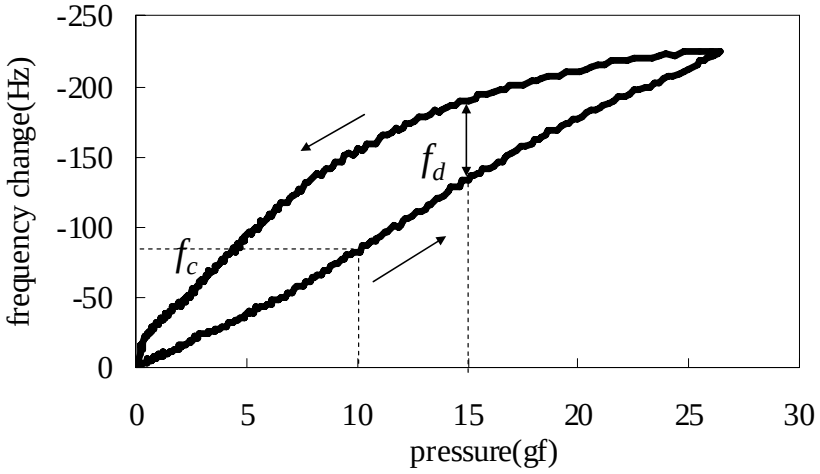


Fig. 4-5 Typical hystelysis of frequency change of human skin.

4.3.3 皮膚吸引高さによる皮膚粘弾性測定

皮膚吸引高さの測定は，直径 2mm の穴が開いたプローブを皮膚に軽く押し付けた状態で,陰圧 45kPa での吸引と開放を 2 秒毎に繰り返したときの皮膚変形量の測定を行った．プローブのの模式図を Fig. 4-6 に示す. また変形挙動の典型的な例を示す. 一般的には, Fig. 4-7 中に示した *Uv*, *Ue*, *Ur*, *Uf* などのパラメータや面積をそのまま結果として使用する場合が多いが [12), 13)]，皮膚の変形挙動を物理的に明確な意味を持つパラメータとして解析することが必要であると考え，後述の 3 要素粘弾性モデルを用いて解析を行い，粘性率および弾性率を算出した.

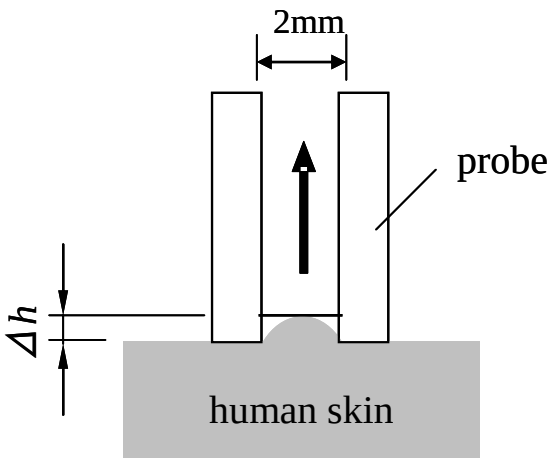


Fig. 4-6 Sckematic model of measurement prove of skin deformation.

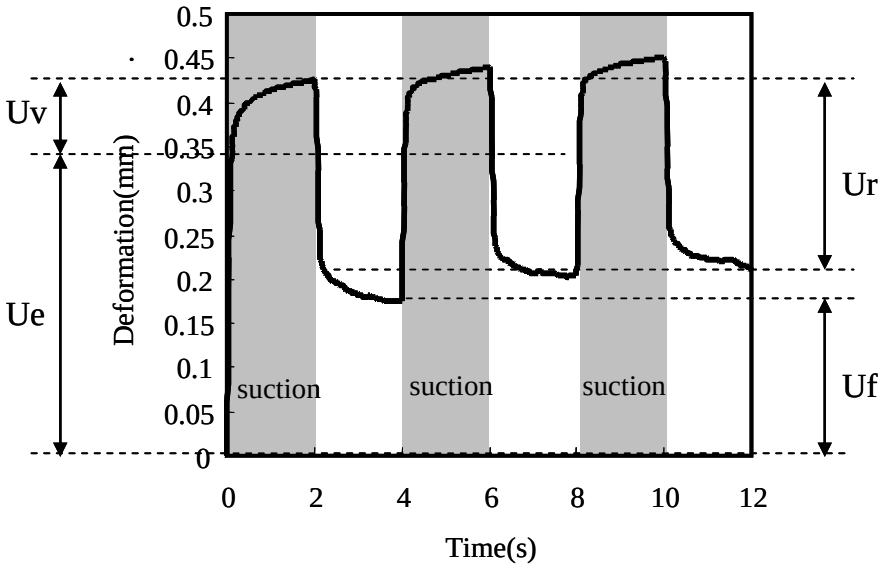


Fig. 4-7 Typical temporal skin deformation by suction.

4.3.4 結果と考察

皮膚の粘弾性測定の手法として，ここでは吸引高さおよび押込み時の共振周波数変化を採用した．しかし，これらの手法によって生体のどの部分の粘弾性の情報を得ることができるのかは定量的に明確になっていない．そこで，まずそれぞれの手法を用いて測定している皮膚の深さ方向の範囲を特定するため，吸引高さと押込み時の共振周波数変化による皮膚の変形のシミュレーションを行った．材料の弾性率は実際の皮膚を想定し，表面から 300μm の，表皮に相当する部分を平均的な表皮の弾性率 200kPa，それ以外の部分を真皮・皮下組織の平均的な弾性率 100kPa，ポアソン比を一般的な生体組織に相当する 0.49 に設定して有限要素法解析を行い，吸引および押し込み時の皮膚の変位分布を調べた．この結果を Figs. 4-8，4-9 に示す．陰圧によって変形する部分は主に表面から 1mm 以内の表皮部分であり(Fig. 4-8)，押し込みによる変形は，表面から数 mm～数 cm の真皮・皮下組織部分まで広がっていることが分かった(Fig. 4-9).

そこで，実際に表皮付近と，真皮および皮下組織の粘弾性を反映したデータが得られるのかどうかを調べるため，シリコンゴムで表皮，真皮の弾性率の異なる皮膚モデルを作製し，それぞれの手法で測定を行った．シリコンモデルでは，実際の皮膚の弾性率を模擬し，表面から 300μm の部分を表皮(約 200kPa)，その下 20mm を真皮および皮下組織(約 100kPa)として，シリコンゴムでモデルを作製した．表皮部分が 200kPa および 120kPa の場合について，先の 2 つの手法で粘弾性測定を行った．その結果を Figs. 4-10，4-11 に示す．この結果から，表皮部分の弾性率が高い場合，吸引高さにより測定した弾性率は明らかに増加したが，共振周波数変化による測定では，共振周波数に大きな変化は見られなかった．このことから，吸引高さは主に表皮付近の弾性率，押し込み時の共振周波数変化は主に真皮・皮下組織の弾性率を反映していることが確認できた．

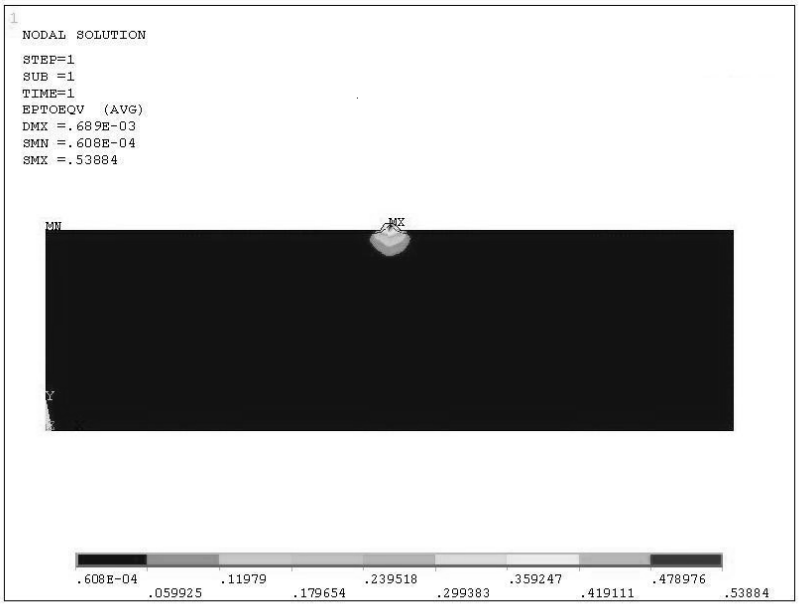


Fig. 4-8 Displacement distribution by skin suction.

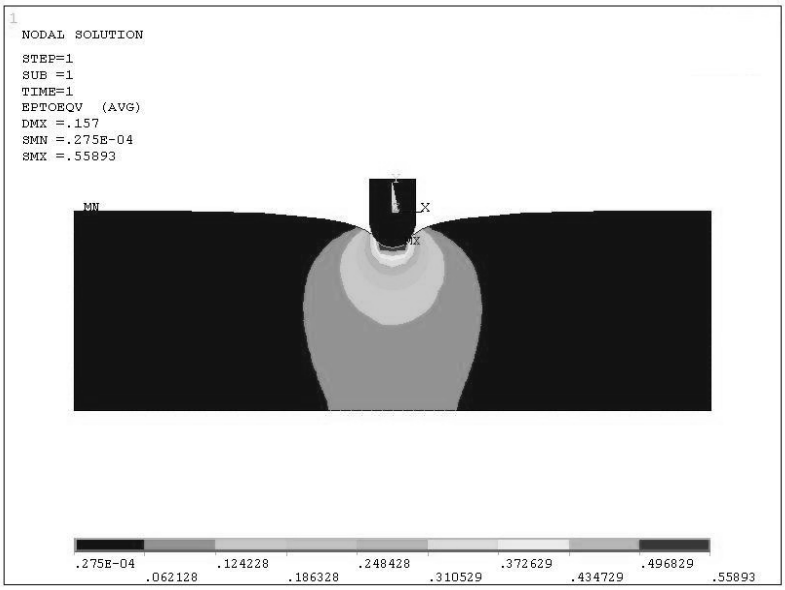


Fig. 4-9 Displacement distribution by probe indentation.

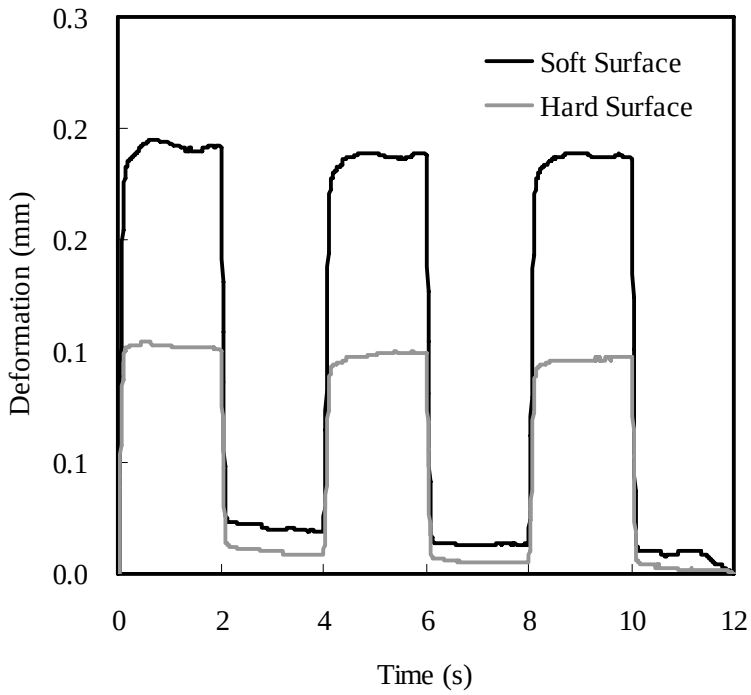


Fig. 4-10 Skin deformation by suction of skin model made by silicone rubber.

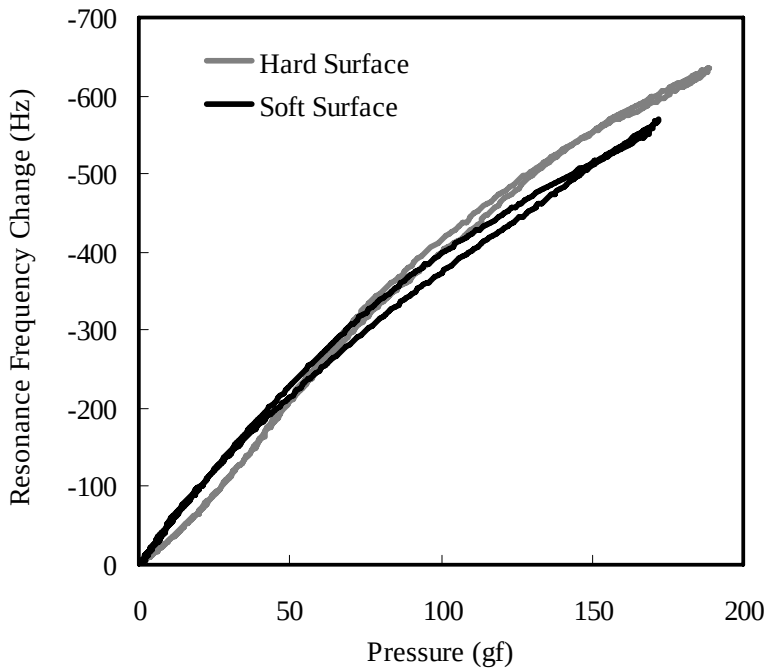


Fig. 4-11 Resonance frequency change of skin model made by silicone rubber.

4.4　加齢による皮膚粘弾性の変化

以上の結果から，これら 2 つの手法を用いて皮膚の粘弾性測定を行うことにより，表皮付近と真皮・皮下組織付近の粘弾性を個別に評価することが可能であることが分かった．そこで，高齢者と若年者を対象に，頬，前腕内側，仙骨部の 3 つの部位の皮膚について皮膚吸引高さおよび共振周波数変化の測定を行い，比較した．

Cutometer を用いて測定した高齢者と若年者の皮膚の吸引高さの典型的な例を Fig. 4-12 に示す．測定したどの部位においても若年者に対して高齢者の皮膚吸引高さが低い傾向を示したことから，皮膚の弾性率が加齢により増加していることが推定される．

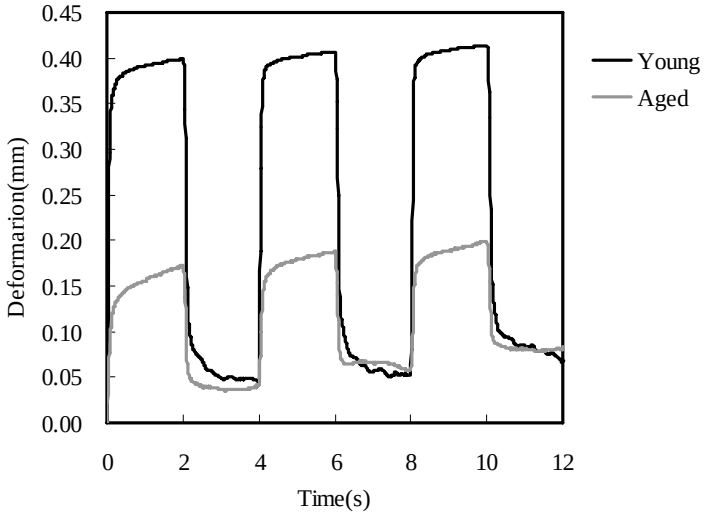


Fig. 4-12 Skin deformation by suction of young and elderly persons (sacral region).

そこで，皮膚吸引高さの経時変化のデータについて Fig. 4-13 に示す 3 要素粘弾性モデルでフィッティングを行い，粘弾性パラメータ E_1，η_1，および η_2 を算出した．この 3 要素モデルにおいて，応力 P は次のように表される．

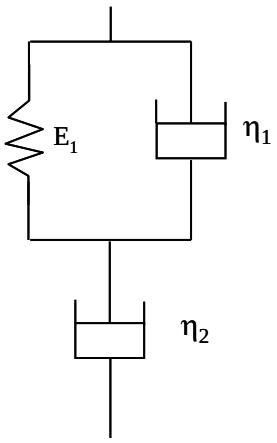


Fig. 4-13 Three-elements viscoelastic model.

$$P = E_1\gamma_1 + \eta_1 \frac{d\gamma_1}{dt}. \qquad \text{(Eq. 4-3)}$$

$$P = \eta_2 \frac{d\gamma_2}{dt}. \qquad \text{(Eq. 4-4)}$$

これらの式からひずみを導出すると，

$$\gamma_{total} = \gamma_1 + \gamma_2 = \frac{P}{E_1}\left(1 - e^{-\frac{E_1}{\eta_1}t}\right) + \left(\frac{P}{\eta_2}\right)t \cdot \qquad \text{(Eq. 4-5)}$$

となる[14), 15)]．　Eq. 4-3 を用いて曲線のフィッティングを行い，算出した粘弾性パラメータ E_1 と　η_1 を Fig. 4-14，4-15 に示す．この結果から，皮膚吸引高さにより測定できる表皮の粘弾性に関しては，加齢によって弾性率と粘性率が共に増加していることが分かった．

一方，共振周波数変化によって測定した仙骨部の典型的な測定結果を Fig. 4-16 に示す．またこの結果より 0.05gf 押込み時の共振周波数変化および往復周波数差を求めた結果を Figs. 4-17,4-18 に示す．高齢者のほうが若年者と比較して，押し込み圧-共振周波数変化のグラフの傾きが大きくなっていることが分かる．共振周波数変化は，振動子と対象物質との接触面積に依存するため，共振周波数変化の絶対値が大きくなることは，皮膚の変形が大きく，皮膚と振動子の接触面積が大きいことを示す．また押し込み圧-共振周波数変化のグラフの傾きの増大は，皮膚の弾性率の減少に対応していることが分かっている．したがって，共振周波数変化により測定できる部位，すなわち真皮と皮下組織の部分については，加齢により弾性率が減少していることが分かった．

このような加齢による皮膚の粘弾性変化について, 皮膚の他のパラメータである TEWL，皮脂量，角層水分量の測定結果と関連付けるため，これらの皮膚パラメータの測定を行った．その結果を Figs. 4-19, 4-20, 4-21 に示す.

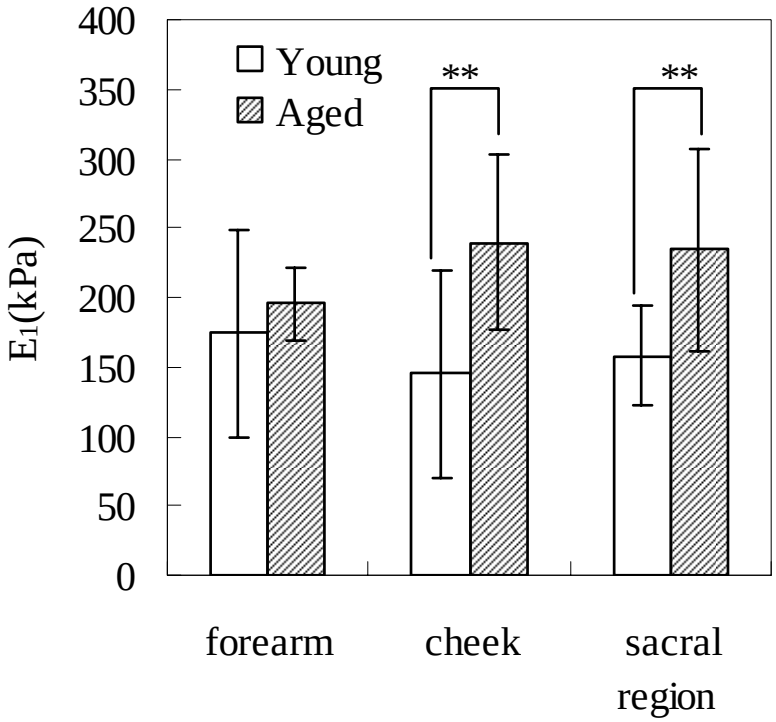


Fig. 4-14 Elastic modulus E_1 of young and aged skin, *p<0.05, **p<0.01.

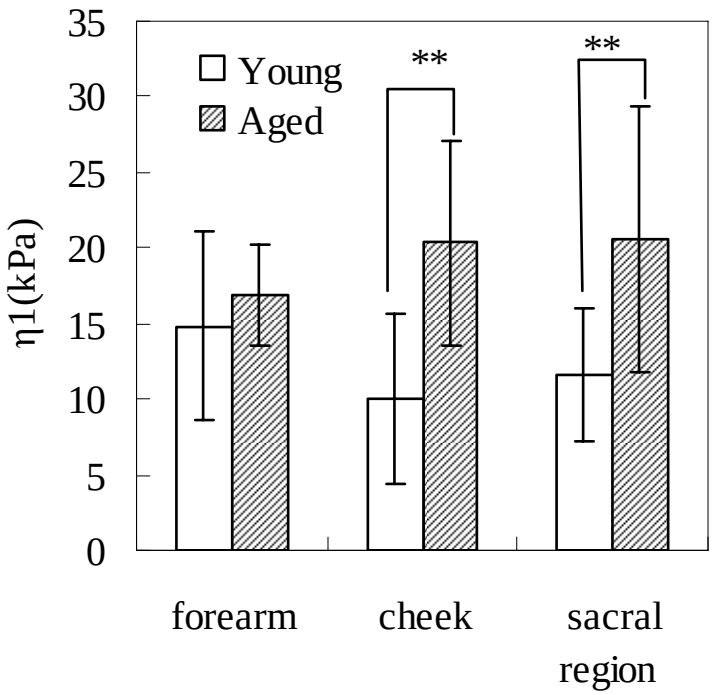


Fig. 4-15 Viscosity coefficient η_1 of young and aged skin, *p<0.05, **p<0.01.

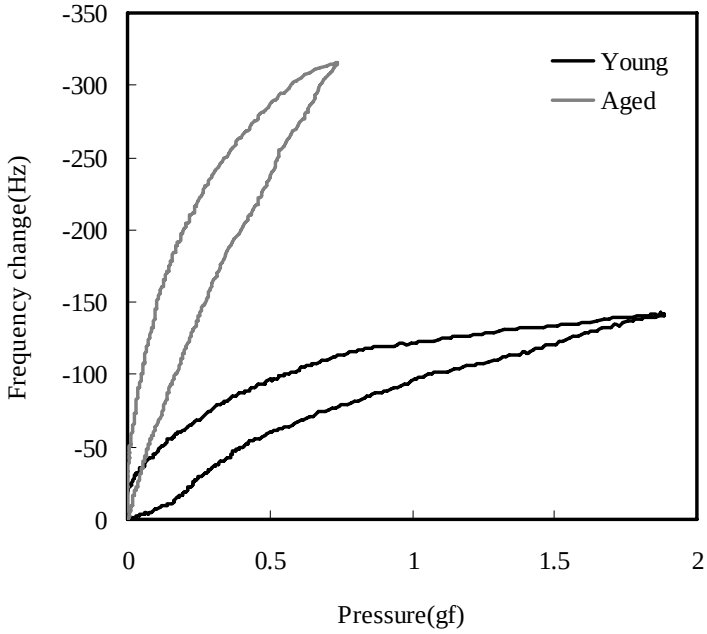


Fig. 4-16 Resonance frequency changes of young and elderly persons as a function of pressure (sacral region).

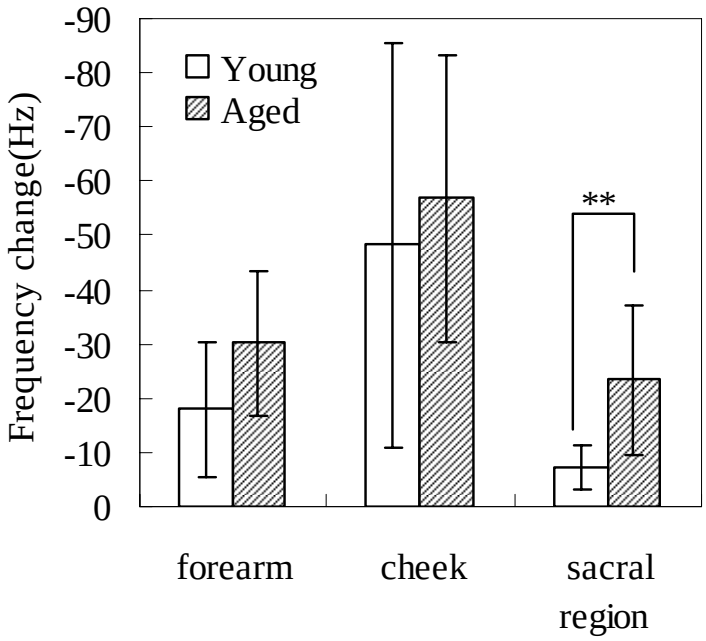


Fig. 4-17 Resonance frequency changes of young and elderly persons as a function of pressure (sacral region) , *p<0.05, **p<0.01.

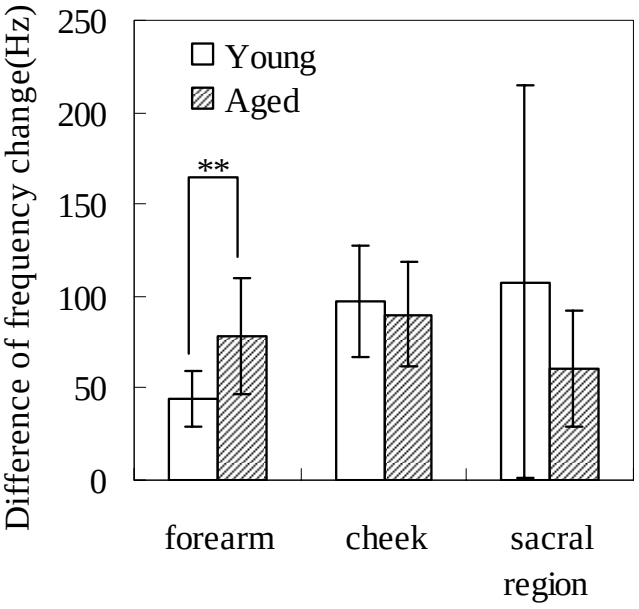


Fig. 4-18 Difference of frequency change in young and aged skin, *p<0.05, **p<0.01.

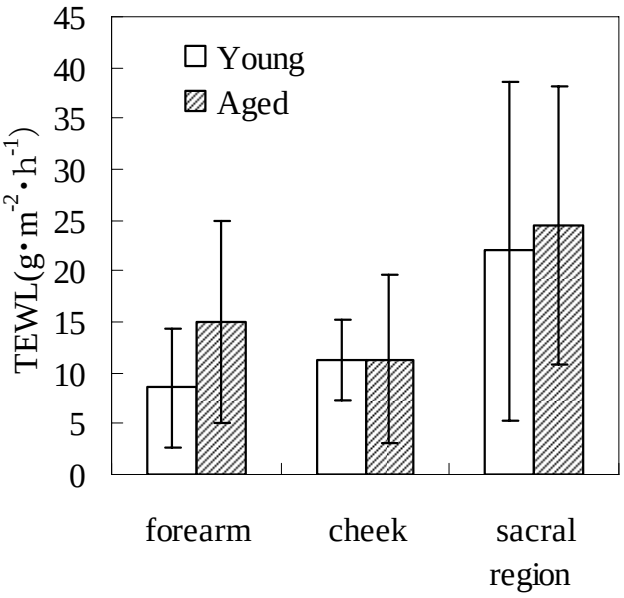


Fig. 4-19 Transepidermal water loss of young and aged skin.

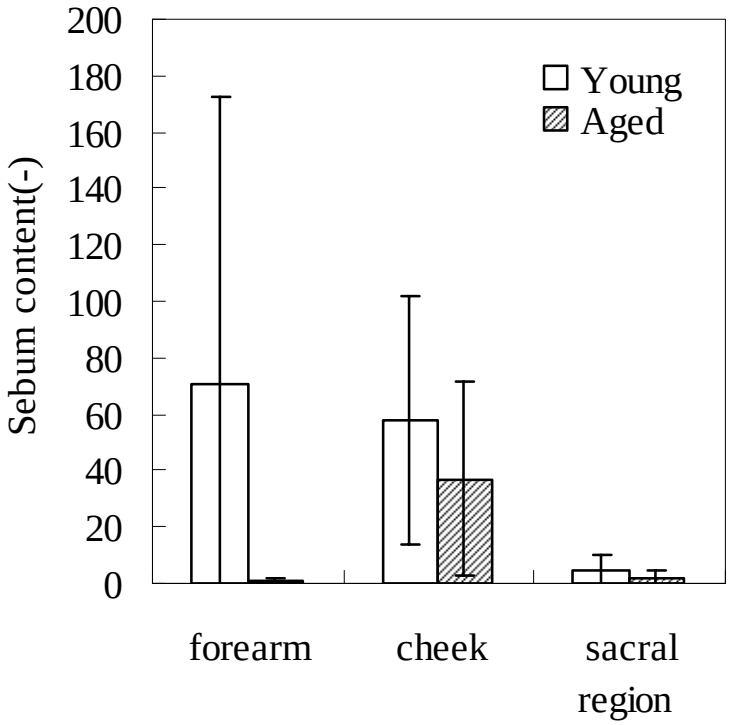


Fig. 4-20 Sebum content of young and aged skin.

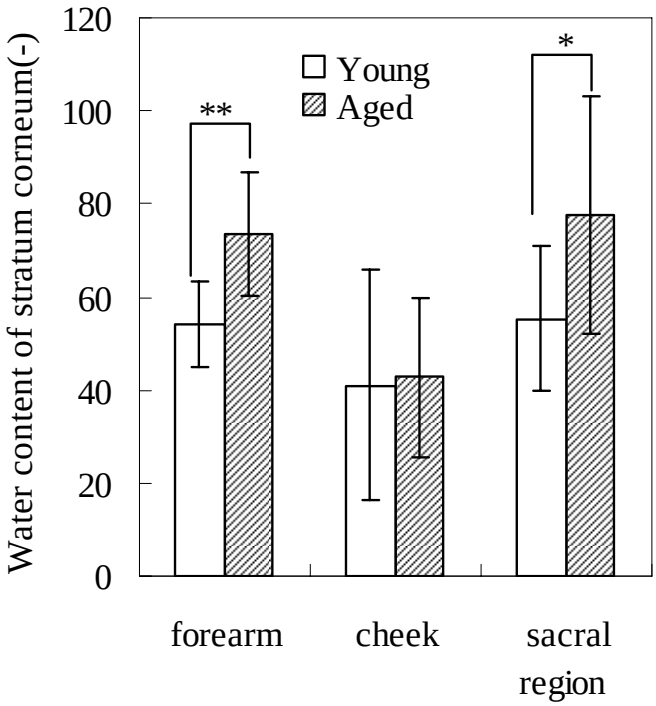


Fig. 4-21 Water content of stratum corneum of young and aged skin, *p<0.05, **p<0.01.

高齢者と若年者の皮脂量と TEWL を比較すると，前腕内側，頬，仙骨部のいずれにおいても高齢者の皮脂量の減少と TEWL の増加の傾向が見られた．これは皮膚のバリア機能の低下を示す．また，角層水分量を比較した結果から，高齢者のほうが若年者と比較して，特に衣服内の仙骨部の角層水分量が過剰であることが分かった．このことから，加齢による表皮の弾性率の増加は，表皮のバリア機能の低下により，表皮の柔軟性を保っている角層間脂質が減少するためと考えられる．また真皮の弾性率の減少は，衣服内の湿度上昇による皮膚浸軟によると考えられるが，真皮の弾性を保持しているコラーゲンの減少による影響も考えられる．

以上の結果から，加齢に伴って表皮の弾性率・粘性率は増加し，真皮・皮下組織の弾性率は減少することが 2 種の皮膚粘弾性測定により推定できた．加齢によって表皮と真皮の弾性率の違いが増大し，そのために引き起こされる皮膚表面の剥離・損傷が褥瘡発生の原因となっている可能性が示された．

4.5 エマルション塗布による皮膚の粘弾性変化

4.5.1 実験方法

被験者は 20 代の男女 5 名である，全ての実験は室温 25±2℃，湿度 60±5％での部屋で行った．皮膚の測定部位は，前腕内側の肘から 10cm 付近で行った．皮膚の粘弾性測定には Cutometer MPA580 (Courage and Khazaka 社製)を用いた．実験条件は，前節と同じく 450mbar の陰圧による吸引と開放を 2 秒毎に 3 回繰り返した．またその他の皮膚特性として，角層水分量，TEWL(経皮水分蒸散量)，皮脂量，および屈折率によるエマルションの皮膚浸透性の測定を行った．角層水分量の測定には Coneometer CM825，TEWL の測定には Tewameter TM300，皮脂量の測定には Sebumeter SM815(いずれも Courage and Khazaka 社製)，屈折率の測定は OCT スキャナ SkinDex300(ISIS Optronics GmbH 社製)を用いて行った．

まず何も塗布しない状態で前腕内側の測定を行ったのち，一般にスキンケアに用いられるエマルションとして市販のスキンケア製品(O/W ローション, O/W クリーム, W/O 乳液)，および対照サンプルとして蒸留水，オリーブオイルをそれぞれ所定量塗布し，10 分後に皮膚表面を軽く拭き取り，その直後から 2 時間後までの 30 分毎に皮膚特性の測定を行った．また, 洗剤によって損傷した皮膚を再現するため, 被験者の前腕内側に 10%(w/w)の SDS 1ml をペーパータオルに浸したものを 5 分間貼り付け，剥がしたのち，30 分間放置して実験を行った．

4.5.2 結果と考察

まず，何も処理しない皮膚に対して，損傷した状態と，スキンケアを行った皮膚について吸引法による変形量を比較した．Fig. 4-22 は，界面活性剤の一つである SDS によって人工的に損傷させた皮膚と処理前の皮膚を比較したものであり, Fig. 4-23 は市販のスキンケア

クリーム塗布 60 分後と塗布前の皮膚とを比較したものである.

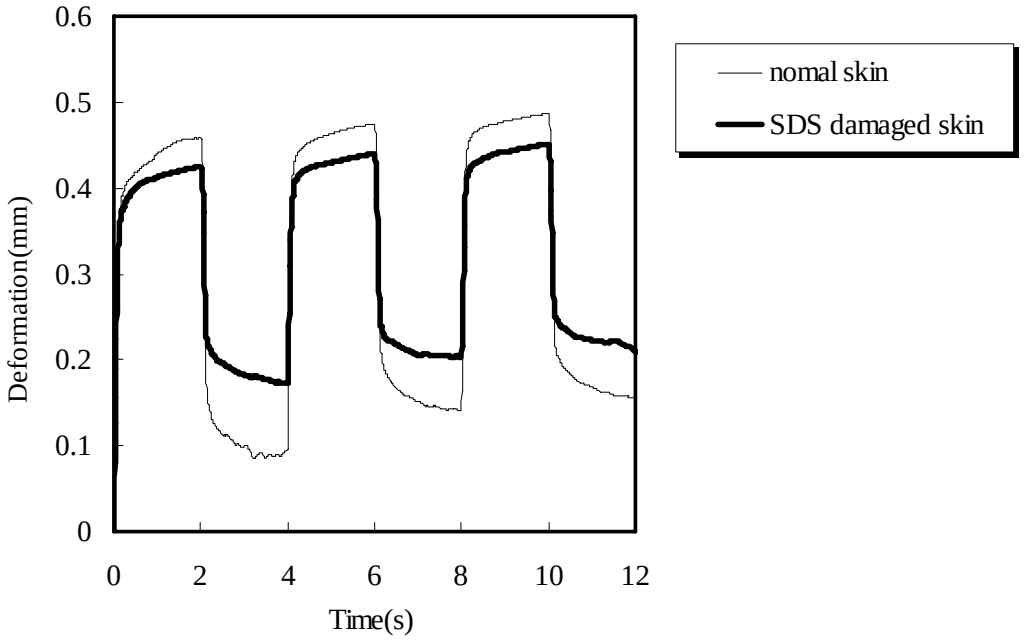


Fig. 4-22 Human skin deformation before and after SDS treatment.

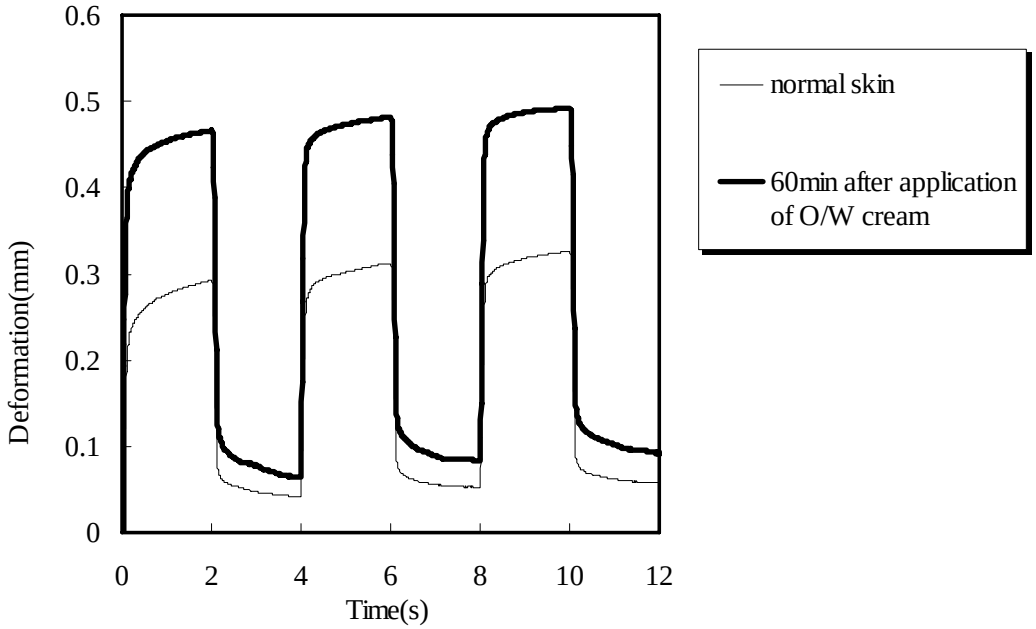


Fig. 4-23 Human skin deformation before and after application of skin care cream.

SDS を塗布することにより，吸引高さが減少し，戻り率も減少する傾向が見られた．一方, スキンケアクリーム塗布後には, 吸引高さと戻り率は SDS 処理時とは逆の傾向を示し，吸引高さと戻り率が増加する傾向を示した.

これらのデータから皮膚の粘弾性パラメータを算出するため，前節と同じく粘弾性モデルを用いて解析を行った．前節においては，皮膚吸引によって変形する領域(表面から 1mm)を 1 つの領域として解析したが，今回は，角質層と表皮(真皮の上層付近を含む)へのエマルションの皮膚浸透と関連付けるため，表皮をさらに分割し，角質層と表皮の粘弾性を個々に評価できるモデルが必要となった．そのため，Fig. 4-24 に示すように，Voigt モデルを直列に 2 つ並べた粘弾性モデルによって実験値をフィッティングし，ヤング率 E_1, E_2 および粘性率 η_1，η_2 を求めた.

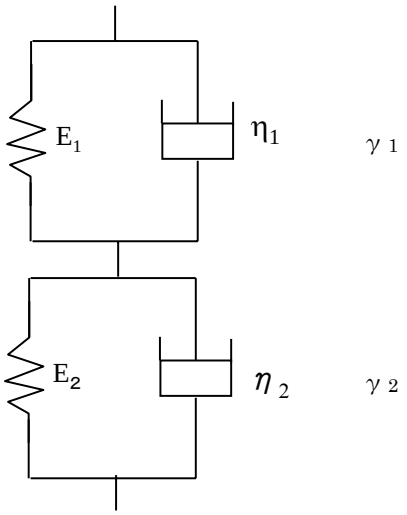


Fig. 4-24 Two-stage Voigt model.

以下の Eq. 4-6 の式の第 1 項の要素が，1 個の Voigt モデルのひずみであるから，2 段 Voigt モデルにおいては，上段の変形量 γ_1 と，下段の変形量 γ_2 を合わせたものが全体の変形量となるため,

$$\gamma_{total} = \gamma_1 + \gamma_2 = \frac{P}{E_1}\left(1 - e^{-\frac{E_1}{\eta_1}t}\right) + \frac{P}{E_2}\left(1 - e^{-\frac{E_2}{\eta_2}}\right). \qquad \text{(Eq. 4-6)}$$

となる．ここで，ひずみ γ_1 と γ_2 をそれぞれ変形量に換算し，測定値をフィッティングする際，上段の厚さを角質層の平均的な厚さである 0.15mm，下段の暑さを表皮と真皮上層にあたる 1mm に設定して計算を行った.

粘弾性パラメータの解析の結果，Fig. 4-25 に示すように，SDS の塗布により角質層のヤング率 E_2 と表皮の粘性率 η_1 が増加していることが分かった．同様にして，エマルション塗布後のそれぞれのパラメータの変化量を求め，SDS の結果と比較して Fig. 4-25 に示す．全てのエマルションおよびオリーブオイルの塗布によって，ヤング率および粘性率が減少する傾向が見られたが，特にクリームの塗布後の E_2 および η_1 の減少，および乳液塗布後の E_2 の減少が顕著であった．これらのパラメータは SDS の塗布により増加したパラメータであり，皮膚の損傷による粘弾性変化を回復させる効果が現れたことを示す.

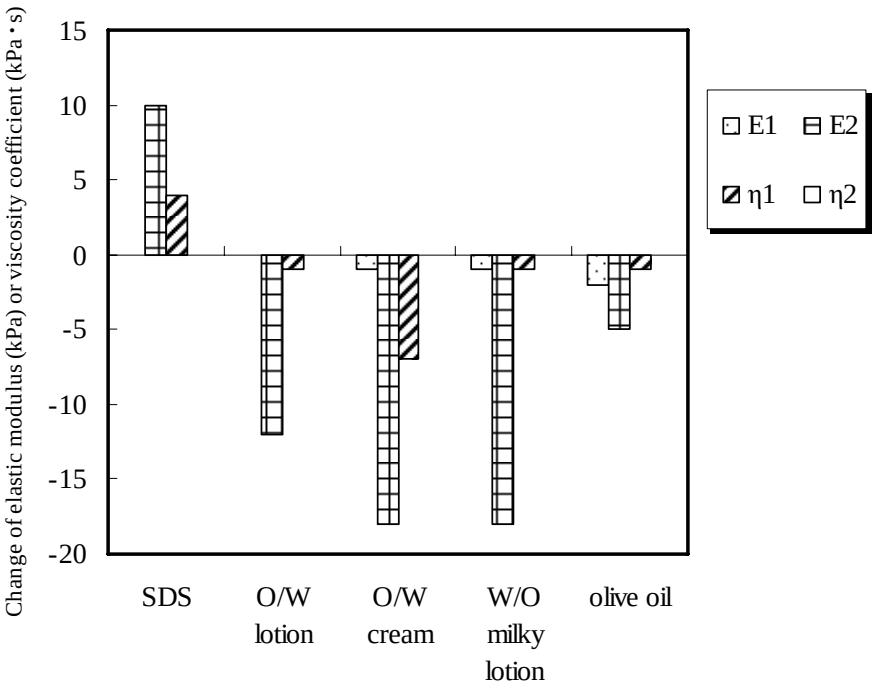


Fig. 4-25 Change of viscoelastic parameters after application of skin care products.

このような方法で，皮膚変形量から粘弾性パラメータを得ることができた．そこで，これらのパラメータがエマルションと皮膚の相互作用を考察するために有用かどうか調べるため，ヤング率，粘性率に加え，塗布前後の水分量，TEWL(経皮水分蒸散量)，および皮脂量の経時変化を測定し，それらの関係を検討した．まず水分量，TEWL，および皮脂量の測定結果を Figs. 4-26，4-27，4-28 に示す．ローションを塗布した場合の水分量は，塗布直後には増加したが，30 分後には殆ど元の水分量まで減少した．この減少は，蒸散によるものであることが TEWL の結果から示される．一方クリーム及び乳液も，塗布後 30 分の間に減少が見られたが，減少量はローションに比べて小さく，その後は 2 時間後まで水分量はほぼそのまま保たれた．またオリーブオイルの塗布後の水分量は時間とともに増加する傾向を示した．皮脂量については，乳液とクリームは時間とともに減少したのに対し，オリーブオイルとローションでは減少は緩やかで，2 時間後まで表面に残存していた.

Sebumeter は皮膚表面に存在する皮脂を検出する機器であるため，クリームと乳液における皮脂量の減少は皮膚浸透によるものである可能性がある．そこでそれぞれのエマルションの浸透性を調べるため，OCT スキャナを用いて角質層付近の屈折率の測定を行った．それぞれのエマルションを塗布した場合の皮膚屈折率(約 100μm 深さ)の変化を Table 4-2 に示す．オリーブオイル塗布時は，塗布前と比較して屈折率が変化していないのに対し，O/W ローション，O/W クリーム，W/O 乳液を塗布した場合は屈折率の変化が見られ，皮膚に浸透していることが確認された．この結果と皮脂量測定の結果とを合わせて考えると，特にクリームと乳液の皮膚浸透性が高いと考えられる．

以上の結果から，各皮膚パラメータと皮膚粘弾性パラメータについて相関性を調べた結果を Table 4-3 に示す．η_2 についてはどの条件においても変化が見られなかったため，解析の際に除外した．今回の実験で SDS 処理およびクリーム，乳液塗布により大きな変化が見られた角質層のヤング率 E_2 と表皮の粘性率 η_1 は，いずれも角層水分量および皮脂量と負の相関を示した. すなわち角層水分量および皮脂量が増加すれば E_2, η_1 は減少すると言える．さらに，角層水分量と皮脂量が高い正の相関を持つことから，水分保持のためには皮脂が必要不可欠であることが分かる．

今回の実験で，皮膚屈折率は約 100μm の深さで算出したが，2 次元断層画像における屈折率分布の測定によって，200μm 程度までの浸透が確認された．この結果と Fig. 4-25 の結果を合わせて考えると，浸透の確認されたローション，クリーム，乳液は主に E_2 に大きく影響し，浸透の確認されなかったオリーブオイルの E_1 変化が他の塗布物に比較するとわずかではあるが大きいことから，浸透深さに応じて皮膚の粘弾性パラメータが変化している傾向が読み取れる．

これらの結果から水分や油脂の浸透が粘弾性に及ぼす影響について考える．皮膚は単純化して考えると，第 2 章，第 3 章でモデル系として扱った，弾性繊維等の蛋白質からなる一種の高分子ハイドロゲルとみなすことができる．高分子の弾性は鎖状分子の熱運動に基づくエントロピー弾性が寄与しており，一方粘性は分子間相互作用による摩擦力の発現が寄与しているといわれている [4)]．　水，油脂の浸透により組織が膨潤し，組織を形成する蛋白質分子の自由度が増大することが弾性係数と粘性係数の減少を引き起こすと考えられる．それゆえに皮膚への成分浸透が粘弾性パラメータを変化させる大きな要因となっていると考えられる．

そこでこのことに基づいて，どのようなエマルションが皮膚に浸透し易いかということについて考察する．エマルションの効果は，皮膚の表面を覆って水分蒸散を抑制する効果と，浸透する効果の二つに大きく分けられると考えられる．スキンケア製品のほとんどはエマルションであり，これらの効果の大きさは，エマルションに含まれる水分，油分の存在量と存在状態に依存すると考えられる. それぞれのエマルションの O/W 比に注目すると，油層の比率が大きくなるほど表面を覆って水分蒸散を抑制する効果は大きくなるが，極端に油層が多くなると浸透性は減少する．例えばオリーブオイルを用いた結果から，油脂のみでは皮膚に浸透せず，また油脂で表面を覆っただけでは皮膚の粘弾性に大きな影響を与

えないことが分かる．逆に，水層の比率が大きくなるほど皮膚への浸透性は大きくなるが，極端に水の比率が多くなると浸透に優先して蒸散が起こる．例えば水層が大部分を占めるローションの場合，TEWL と角層水分量および皮脂量の測定結果が示すように，塗布後 30 分の間に水分の多くが浸透しないで蒸散し，油層のみが皮膚表面に残存する．このことから，皮膚に水分が浸透するためには，水分は必要であるが，浸透速度よりも蒸発速度を小さくすることが必要である．エマルションに含まれる水は，W/O エマルションの場合は油層中に分散したミセル中に水が囲い込まれた形になっているため，また O/W エマルションの場合はミセル表面の親水基に結合水が存在するために，純水と比較して蒸発しにくいと考えられる．したがって，皮膚浸透を促進するためには，エマルジョンの状態にするなどの方法により，塗布物の結合水を増加させることが重要であると考えられる．

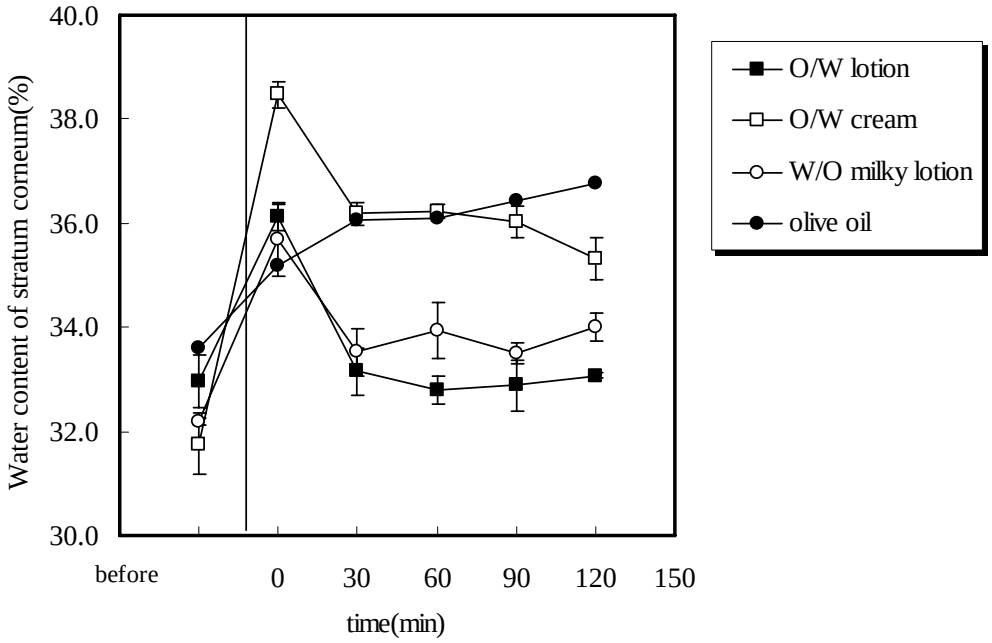


Fig. 4-26 Water content of stratum corneum before and after application of skin care products.

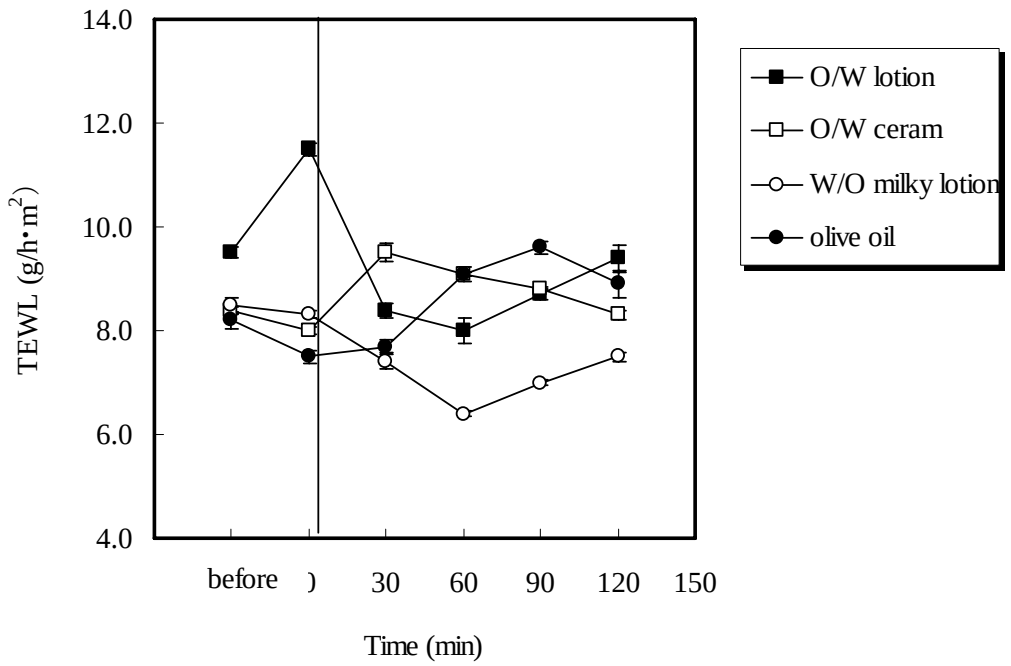


Fig. 4-27 Transepidermal water loss before and after application of skin care products.

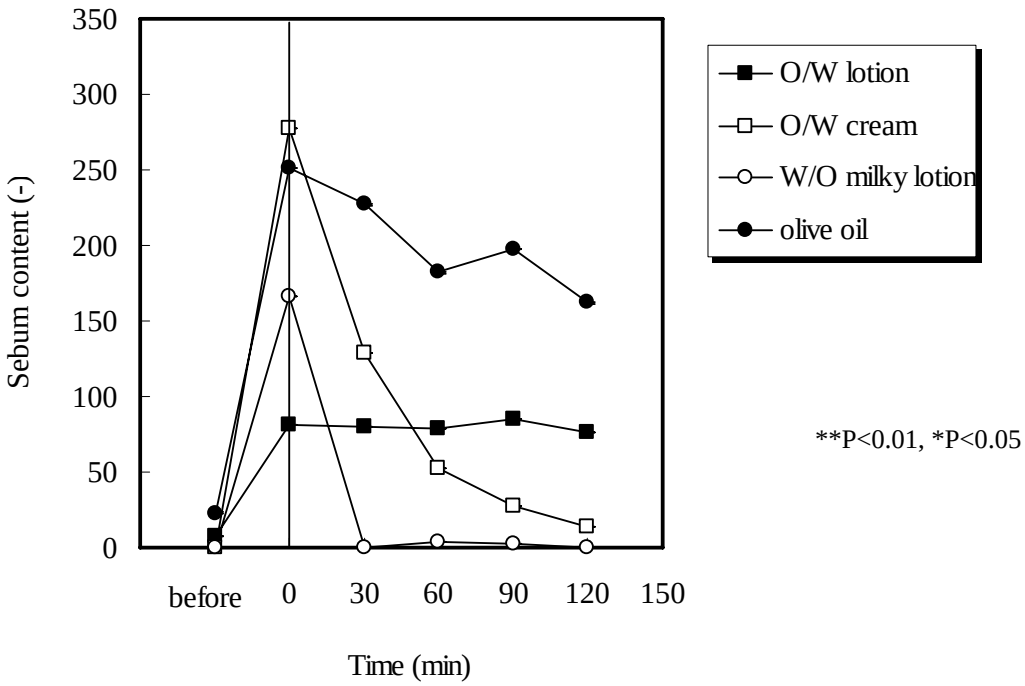


Fig. 4-28 Sebum content before and after application of skin care products.

Table 4-2 Refractive index of stratum corneum before and 10min after application of skin care products.

nomal skin	O/W lotion	O/W cream	W/O milky lotion	olive oil
1.395	1.420	1.443	1.552	1.395

Table 4-3 Correlation coefficients between skin parameters, **P<0.01, *P<0.05.

	water content	TEWL	sebum content	η1	E1	E2
water content	−					
TEWL	0.347	−				
sebum content	** 0.617	0.165	−			
η1	* -0.467	-0.402	* -0.499	−		
E1	0.282	0.425	0.260	-0.387	−	
E2	-0.350	0.013	-0.201	0.353	0.148	−

4.6　結言

本章では，まず皮膚・皮下組織の粘弾性の非侵襲的な解析手法を確立し，次に加齢およびエマルション塗布に伴う粘弾性の変化について，生体組織中の生体高分子と水の相互作用，および架橋構造の観点から考察した．皮膚・皮下組織の粘弾性測定により，加齢によ表皮の弾性率・粘性率は増加し，一方真皮の弾性率は減少する傾向が確認できた．さらに，結合水を多く含み皮膚浸透性の高いエマルションが表皮を柔軟にする効果が高い可能性が示唆された．

これらの結果から，加齢により，真皮・皮下組織においては線維状蛋白質の何らかの異常架橋が起こり，それによって弾性率が減少すること考えられる．一般的には，架橋による可溶性コラーゲンの不溶化が原因であるといわれている[1)]．一方，表皮においては，加齢に伴ってそのバリア機能が低下し，水分が蒸散することによって弾性率が減少することが考えられる．またエマルションによる水分の皮膚浸透により，表皮および真皮・皮下組織の弾性率を変化させることが可能であることが示された．このことは，スキンケアによる老化予防の可能性を定量的に示唆するものである．生体組織の熱分析，陽電子寿命測定の測定手法を確立することができれば，これらの手法と組み合わせることにより，第 2 章，第 3 章における生体高分子と水の相互作用のモデル実験の妥当性を生体組織で検証することができると考えられる．

参考文献

1) 光井武夫編,“新化粧品学 第２版”, p.13, 南山堂, (2001).
2) Choi, E.H., Kim, M.J., Ahn, S.K., Park, W.S., Son, E.D., Nam, G.W., Chang, I., Lee, S.H., *Brit. J. Dermatol.*, **14**, 244, (2002).
3) Monnier, V.M., Mustata, G.T., Biemel, K.L., Reihl, O., Lederer, M.O., Zhenyu, D., Sell, D.R., *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1043**, 533, (2005).
4) Leveque, J.L., Dreslar, J., Ribot-Ciscar, E., Roll, J., Poelman, C., *J. Invest. Dermatol.* **115**, 454, (2000).
5) Silver, F.H., Freeman, J.W., DeVore, D., *Skin Res. Technol.*, **7**, 18, (2001).
6) Vexler, A., Polyansky, I., Gorodetsky, R., *J. Invest. Dermatol.*, **113**, 732, (1999).
7) Tanaka, M., Leveque, J.L., Tagami, H., Kikuchi, K., Chonan, S., *Skin Res. Technol.*, **9**, 131, (2003).
8) Saskai, S., Sasai, S., Endo, Y., Matue, K., Tagami, H., Inoue, S., *Skin Res. Technol.*, **6**, 128, (2000).
9) Aoyagi, R., *IEICE Technical Report*, **9**, 67, (2003).
10) Maeno, T., Kobayashi, K., Yamazaki, N., *The Journal of Japan Society of Mechanical Engineers* (C), **63**, 881, (1997).
11) Kleesattel, C., Gladwell, G.M.L., *Ultrasonics*, **6**, 175, (1968).
12) Dobrev, H., *Skin Res. Technol.*, **6**, 239, (2000).
13) Draaijers, L.J., Botman, Y.A., Tempelman, F.R., Kreis, R.W., Middelkoop, E., van Zuijlen, P.P., *Burns*, **30**, 109, (2004).
14) Diridollou, S., Partat, F., Gens, F., Vaillant, L., Black, D., Lagarde JM, Gall Y, Berson M, *Skin Res. Technol.*, **6**, 214, (2000).
15) Schlandgen, L.J.M., Brokken D, Kemenade PM, *Skin Res. Technol.*, **9**, 122, (2003).

第５章　　生体高分子と水の相互作用が生体組織の摩擦特性に及ぼす影響

5.1　緒言

本章の目的は，生体組織のうち表皮を対象とし，皮膚のもう一つの要素である摩擦特性に焦点を当て，第 2 章，第 3 章で議論したメゾスコピックな水和状態を踏まえて，表皮損傷，およびスキンケア用エマルションの塗布による皮膚表面の摩擦特性の変化機構を明らかにすることである．

前章において，皮膚・皮下組織の粘弾性が，表皮の含水状態および線維蛋白質の架橋構造と密接な関係を持つことが分かった．皮膚表面に存在する角質層の水和状態は，皮膚表面の摩擦特性にも大きく影響すると考えられる．一般に，皮膚疾患や加齢によって，皮膚の摩擦特性が変化することは経験的に知られており，さらに皮膚の状態によって，スキンケアに用いられるエマルションの触感が変化するともいわれる．このことは，第 1 章で述べた流体摩擦にも，皮膚の表面特性が寄与している可能性を示唆している．しかし，皮膚の状態と摩擦特性の関係については未だ定量的な検討がなされていない．そこで，皮膚の表面の水和状態が皮膚の摩擦特性，さらには皮膚の摩擦特性に深く関わるスキンケア用エマルションの触感に与える影響について，皮膚表面における生体高分子と水の相互作用の観点から，界面化学的手法も取り入れて議論する．

5.2　界面活性剤処理による皮膚摩擦特性の変化

5.2.1　実験方法

皮膚の表面損傷を模擬するため，界面活性剤の一つである SDS(sodium dodecyl sulfate)を用いて人工的に皮膚を損傷させた．SDS 処理は，乾燥や洗剤の使用などによる角質層のバリア機能の低下を模擬するために一般に用いられている手法である [1)-3)]．被験者の前腕内側に 10%(w/w)の SDS 水溶液 1ml をペーパータオルに浸したものを 5 分間貼り付け，はがしたのち，30 分間放置し，後述の皮膚測定および官能評価を行った．SDS 水溶液の代わりに 1ml の蒸留水をペーパータオルに浸したものを用いて同様の実験を行い，対照実験とした．

SDS 処理前後の皮膚について，角層水分量，経皮水分蒸散量(TEWL)を測定し比較した．測定は室温 25±2℃，湿度 60±5%に保たれた部屋で実験を行った．測定部位はいずれも前腕内側である．角層水分量は Corneometer CM825 (Courage and Khazaka, Germany)を用いて 5 回測定を行い，その平均値を測定値とした．また経皮水分蒸散量(TEWL)は，Tewameter TM210 (Courage and Khazaka, Germany)を用いて測定した．30 秒間の測定を行い，安定した部分の平均値を測定値とした．また皮脂量は，Seubmeter SM815 (Courage and Khazaka, Germany)を用いて測定した．3 箇所測定し，その平均値を測定値とした．

摩擦特性の測定は KES-SE(カトーテック社製)を用いて行った．センサを一定速度で皮膚に

対して水平に動かし，移動時の平均摩擦係数(以下 MIU)と摩擦係数の変動(以下 MMD)を測定した．平均摩擦係数(MIU)が小さく，かつ摩擦係数の変動(MMD)が小さい試料のほうが，皮膚表面がなめらかであることを示す[4)].

SDS 処理前後でこのような官能値の違いがなぜ現れたのかを明らかにするため，皮膚表面の物理的特性が実際にどのように変化しているかを調べた．まず摩擦特性を測定した結果を Fig. 5-1 および Fig. 5-2 に示す．平均摩擦係数 MIU(Fig. 5-1)は，SDS 処理前と比較して SDS 処理後の皮膚のほうが有意に減少し， 摩擦係数の変動 MMD(Fig. 5-2)については，有意な差は見られなかった．また，処理前後の角層水分量，皮脂量および経皮水分蒸散量(TEWL)を比較した結果を Fig. 5-3 から Fig. 5-5 にそれぞれ示す．角層水分量(Fig. 5-3)および皮脂量(Fig. 5-4)については処理後に減少が見られ，TEWL(Fig. 5-5)については増加が見られた．

これは，皮膚の水分を保持する役割を担っている皮膚表面の皮脂膜および角質層に存在する角層間脂質が SDS によって取り除かれたため[5)]，皮膚表面から水分が蒸散し，結果として角層水分量が減少したことを示す．この傾向は，前章において測定した加齢に伴う変化と類似しており，加齢が皮膚のバリア機能低下を伴っていることを裏付けている．

また，未処理の皮膚および界面活性剤処理を行った皮膚について，摩擦係数の測定を行ったところ，摩擦係数 MIU は SDS 処理により増加することを予測していたが，結果としては逆に減少していた．これは，表面の皮脂や水分が取り除かれたために，境界摩擦から乾燥摩擦に変化したためと考えられる．これらの結果は，角層水分量や皮脂量が皮膚の摩擦特性に深く関わっていることを示唆している．

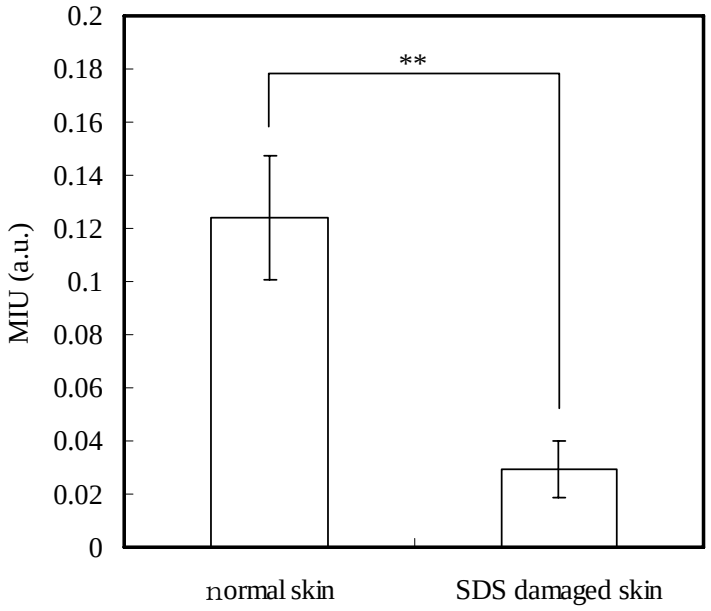


Fig. 5-1 Mean friction coefficient (MIU) of normal skin and SDS damaged skin (**p<0.01).

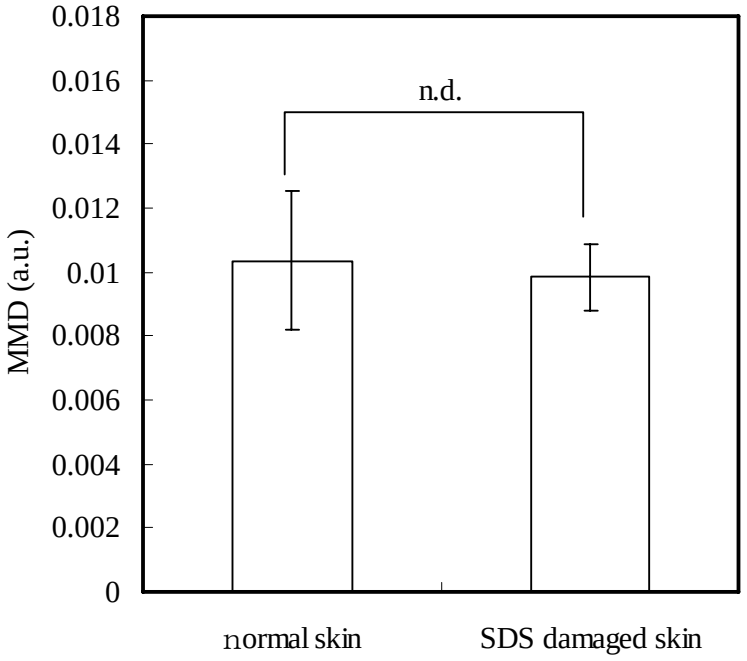


Fig. 5-2 Mean deviation of friction coefficient (MIU) of normal skin and SDS damaged skin.

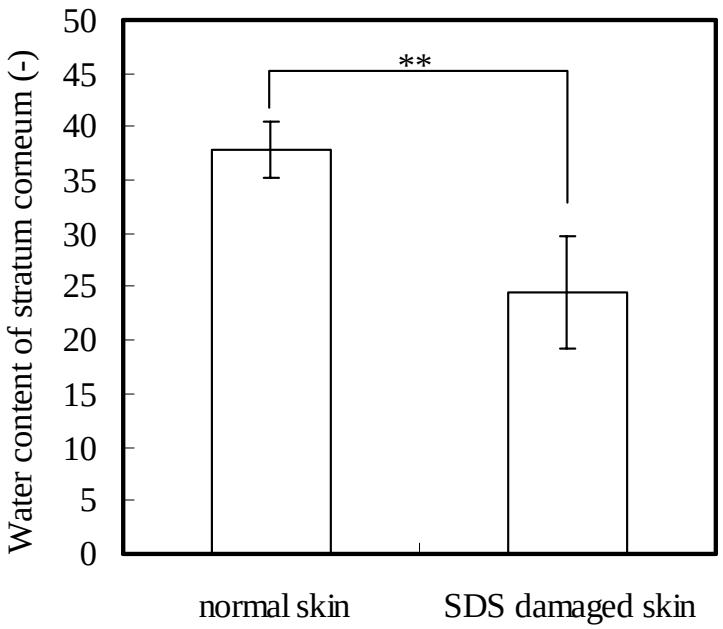


Fig. 5-3 Water content of stratum corneum of normal skin and SDS damaged skin, (**p<0.01).

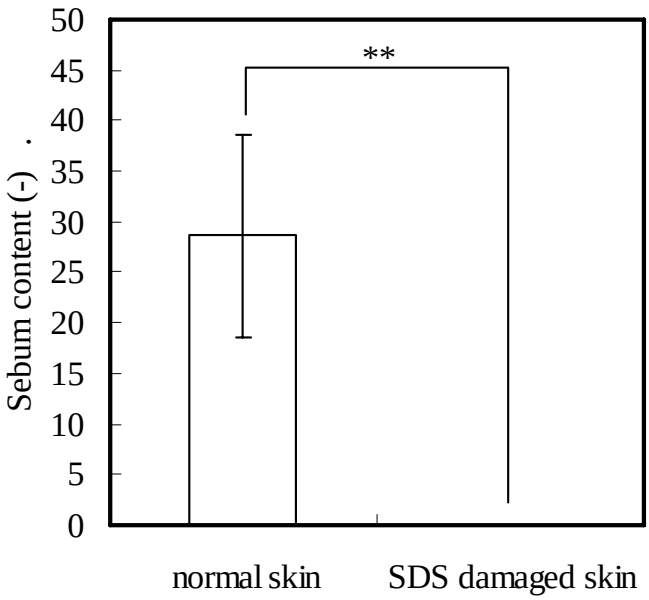


Fig. 5-4 Sebum content of normal skin and SDS damaged skin, (**p<0.01).

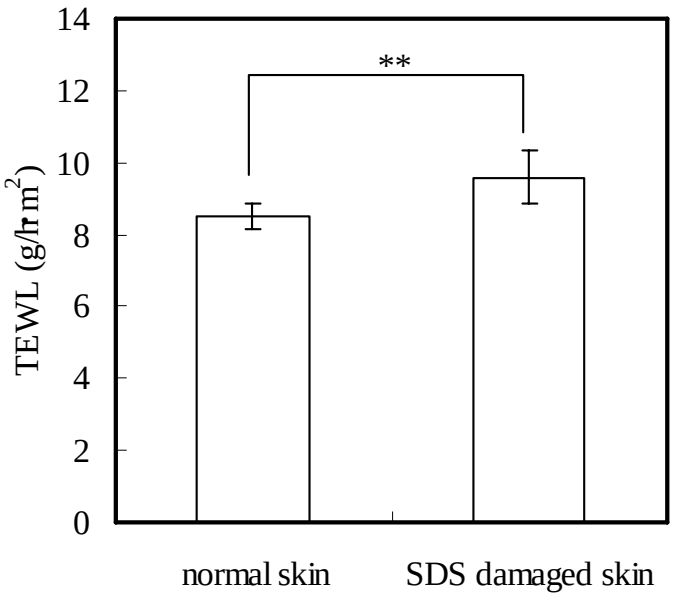


Fig. 5-5 Transepidermal water loss (TEWL) of normal skin and SDS damaged skin, (**p<0.01).

5.3　エマルション塗布時の皮膚摩擦特性

前節においては，乾燥摩擦および境界摩擦の状態における，皮膚の摩擦特性について述べた．本節では，エマルションが皮膚表面に存在する流体摩擦の場合の摩擦特性について調べる．ここでの摩擦特性についても，摩擦力試験機による測定を試みたが，エマルションの皮膚表面における膜圧の不均一性が原因と思われるばらつきが生じたため，比較的ばらつきの少なかった官能評価による検討を行った．

スキンケア用エマルションは，乾燥や老化予防を目的として用いられる．皮膚に塗布されて初めてその機能を発揮するものであり，保湿や乾燥からの保護などの効果[6)-7)]が期待されることは言うまでもないが，それらと同様に要求されるのが塗布時に感じる皮膚触感の心地良さである．．塗布時の皮膚触感が優れているかどうかが，使う人にとって，　良いスキンケア製品であるかどうかの判断基準のひとつになっており，また塗布時の心地良さは，アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患を持つ患者にとっては，痒みや痛みといった刺激によるストレスを抑制する効果の一助にもなると考えられるため，スキンケア製品の開発には欠かすことのできない因子である[8)-10)]. 触感の心地よさはエマルション塗布時の皮膚摩擦特性に関連していると予想される．

エマルションの塗布後の皮膚特性に関する研究は，最近の皮膚計測技術の進歩により，角層水分量，皮脂量，TEWL(経皮水分蒸散量)に加え，粘弾性や摩擦特性の評価も可能になり，その効果を定量化する試みが数多くなされている[11-12)]．　一方，エマルションの塗り心地に関しては，官能評価とレオロジー特性の相関性を調査した研究がいくつか見られるが[13-14)]，塗布時の塗り心地には製品のレオロジー特性のみならずさまざまな因子が関与しているため，製品の良し悪しを決定する大きな因子であるにも関わらず，塗り心地を定量化する手段は未だ確立されていないのが現状である．

ここでは，エマルションの中でも特にアトピー性皮膚炎，乾燥肌，手荒れの予防・治療のために多く用いられ，また塗り心地が製品評価の重要な要素となるクリーム状の市販スキンケア製品を対象とした．以下エマルションという記述は，クリーム状のスキンケア製品を示す．エマルションの塗り心地は皮膚表面におけるエマルションの摩擦特性，およびレオロジー特性を反映したものであるといえるが，エマルションの物性と官能評価との相関性の調査のみならず，前節で取り上げた皮膚の表面特性も関与していると考えられるため，これまであまり焦点の当たらなかった皮膚表面とエマルションとの相互作用の定量化を試みた．

5.3.1　実験方法

市販されている 3 種のハンドクリームを用いた．これらをサンプル A，B，C と呼ぶこととする．各サンプルの pH および不揮発性成分を Table 5-1 に示す．サンプルの pH は pH メーター(HM-60G，TOA-DKK)を用いて測定した．またサンプルに含まれる不揮発性成分の割合の測定は，電気炉で 120℃，5 時間加熱した時の重量変化により求めた．

Table 5-1 Sample data of skin care products.

Sample	S.T.*1	pH	NVM*2(%)
A	O/W	5.2	42
B	O/W	4.7	28
C	Oil	5.9	100

*1 S. T.; Sample type
*2 NVM; Nonvolatile matter

官能評価は皮膚健常者である男性被験者4名により各試料を評価項目ごとにSD法により1-5の5段階で評価した. 実験は全て気温25±1.0℃, 湿度60±10%に保たれた部屋で行った. また官能評価は 0.05g の試料を被験者の前腕内側，肘線から約 5cm-10cm の指定した1cm×5cmの部位に塗布するという条件で行った．官能評価項目は,「伸びの軽さ」,「なじみの早さ」,「なめらかさ」,「あぶらっぽさ」,「みずみずしさ」,「膜厚感」,「べたつき」,「しっとり感」の 8 項目である．また参考のため，一般被験者に有効であるとされるオノマトペ(擬態語)による官能評価，および総合評価「心地良い - 悪い」，嗜好性「好き - 嫌い」の官能評価も同時に行った．塗布は右手人差し指の第一関節部を用いて行った．このような方法で自分の前腕内側に塗布した場合の官能評価は，塗布する側の指と塗布される側の皮膚の両方の感覚の合成による官能評価と捉えることができる．また一方で，塗布する側の指先のみの感覚を抽出するため，ガラス板および合成皮革の 2 種の基板について，同じ面積に同量のサンプルを塗布した場合についても官能評価を行った.

サンプルの剪断流動実験は，レオメーター(AR1000，TA instruments)を用い，直径 40mmのフラットプレートで，体温付近の温度(35±1℃)および室温付近の温度(20±1℃)において測定した．剪断速度は，8～800(1/s)の間で測定を行った.

各サンプルの降伏応力を調べる為，一定荷重をかけた時の広がり直径の経時変化を測定した[15]．実験の模式図をFig. 5-6に示す.

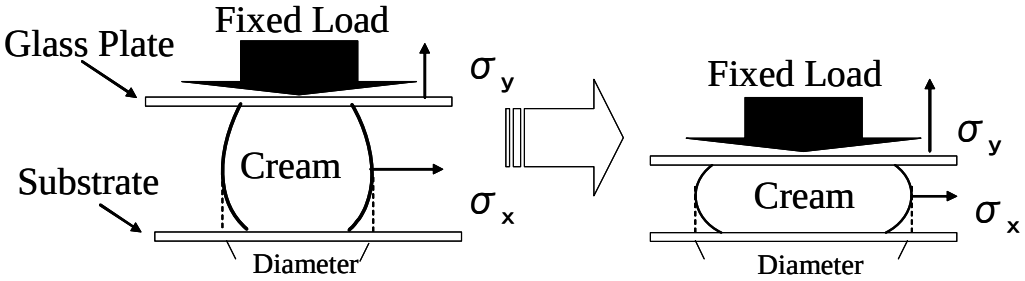


Fig. 5-6 Schematic model of fluidity test.

図のように 0.01ml の試料を 2 枚のガラス板の間に挟み，その上から 25g のおもりを載せることにより荷重を負荷した. 荷重負荷後の試料の広がり直径を 2 分毎に測定した. 基板(下側の板)は，ガラス板(ソーダ石灰ガラス)，およびヒトの皮膚の摩擦特性と類似した摩擦特性を持つ合成皮革(クラリーノ(銀付)，㈱クラレ)を用いて測定を行った.

流動性試験において，最大せん断応力を受ける作用面は，荷重の主応力の方向に対して 45° の角度をなしている．したがって，荷重が増加すると，試料は外側に向かって広がり始める．この広がり直径の最大値から試料の降伏応力を計算することができる [15].

エマルションの主応力を σ_x，σ_y とすると，エマルションの最大せん断応力 τ_{max} は次式のように書ける.

$$\tau_{\max} = \frac{|\sigma_x - \sigma_y|}{2} \quad \text{(Eq. 5-1)}$$

ここで，流動性試験では $\sigma_x = 0$ となるので Eq. 5-1 は Eq. 5-2 のように簡略化できる.

$$\tau_{\max} = \frac{\sigma_y}{2} \quad \text{(Eq. 5-2)}$$

さらに応力が均衡状態に達すると $\tau_{max} = \tau_0$ となるので,

$$\tau_0 = \frac{\sigma_y}{2} \quad \text{(Eq. 5-3)}$$

ここで，τ_0 はエマルションの降伏応力である．この時の荷重を F とすると，降伏応力 τ_0 は，エマルションの広がり直径の最大値と D_{max} と Eq. 5-4 のような関係にある.

$$\tau_0 = \frac{2F}{\pi D_{\max}^{\ 2}} \quad \text{(Eq. 5-4)}$$

このように，試料の降伏応力 τ_0 は $1/D_{max}^2$ に比例する.

皮膚， ガラス板， 合成皮革， およびエマルションの表面自由エネルギーを評価するた

め，皮膚，ガラス板，合成皮革，および所定量のエマルションをガラス板上に塗布したものの上に水およびドデカンを滴下したときの接触角を測定し，それぞれの親水性と親油性の指標とした．接触角の測定法としては，液滴法を用いた．Fig. 5-7 のように，固液界面(水平線)と，液滴端での接線の二つの線がなす角を θ(接触角)とする．基板が滴下した液体にぬれ易い場合は，θ は 0 に近くなり，逆にぬれにくい場合は θ が大きくなる．このことを利用して接触角を測定した．このとき，接触角 θ と，γ_{LS}(固体表面張力)，γ_S(固液界面張力)，γ_L(液体表面張力)との間には次のような関係が成り立つ [16)].

$$\gamma_{LS} = \gamma_L \cos\theta - \gamma_S \quad . \qquad \text{(Eq. 5-5)}$$

この式により求められる γ_{LS} は，固液界面の表面自由エネルギーあるいは界面張力と呼ばれ，基板の「ぬれ」に関するパラメータである．基板と液滴それぞれの表面自由エネルギーが近い値の場合，接触角 θ はゼロに近づく．逆に考えると，θ がゼロに近づけば近づくほど，基板と液滴の表面自由エネルギーが近い値であることを示す [17)].

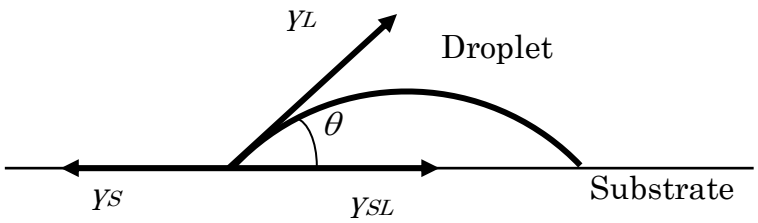


Fig. 5-7 Schematic model of contact angle measurement.

皮膚の表面損傷を模擬するため，界面活性剤の一つであるSDS(sodium dodecyl sulfate)を用いて人工的に皮膚を損傷させた．SDS処理は，乾燥や洗剤の使用などによる角質層のバリア機能の低下を模擬するために一般に用いられている手法である[8)-10)]．被験者の前腕内側に10%(w/w)のSDS 水溶液1mlをペーパータオルに浸したものを5分間貼り付け，はがしたのち，30分間放置し，後述の皮膚測定および官能評価を行った．SDS水溶液の代わりに1mlの蒸留水をペーパータオルに浸したものを用いて同様の実験を行い，対照実験とした．

5.3.2 結果と考察

まず，3 種のエマルションを皮膚に塗布したときの摩擦特性の評価を試みたが，皮膚表面におけるエマルションの厚さの不均一，個人差によるばらつきが大きく定量化が困難であった．そこで，スキンケア塗布時の摩擦特性に関しては，予備実験において摩擦特性よりも感度の高かった官能評価によって評価することにした．

A, B, C の 3 種のエマルションを皮膚に塗布した場合の官能検査の結果を Fig. 5-8 に示す．数字は 1-5 の 5 段階で，高い数値ほどその項目を強く知覚したことを示す．これは，全被験

者の各項目の官能値の平均値をプロットしたものである．この図より，「伸びの軽さ」，「なじみの早さ」，「なめらかさ」，「みずみずしさ」で試料間の差が大きく，そのいずれの項目においても，B＞A＞C の順に評価が高いことが分かる．

一方，「膜厚感」と「あぶらっぽさ」に関してはほとんど差が見られず，「べたつき」に関してのみ評価の順が C＞A＞B の順になった．これは，塗る面に対して「伸び」や「なじみ」の良いサンプルは同時に塗る側の指に対しても「伸び」や「なじみ」が良いことになるため，塗る側の指にもサンプルが付着することによって「べたつく」という感触として知覚されたと考えられる．したがって，塗る指からの離れやすさ，すなわち塗り易さという観点においても，塗り心地とは別に検討すべきであると思われる．

本報告においては，それらのうち，塗り心地の良さという観点から検討を行った．総合評価，嗜好性の官能評価は共に官能値の高い順にいずれも B＞A＞C となったため，塗り心地の良さは先に述べた，「伸びの軽さ」，「なじみの早さ」，「なめらかさ」，「みずみずしさ」の 4 項目によって決定していると考えられる．そこで，塗り心地に大きく関係していると思われるこの 4 項目のうち，サンプルによる差が最も顕著に現れた「なめらかさ」に着目した．

各試料を皮膚，ガラス板および合成皮革に塗布した場合の「なめらかさ」の官能値を Table 5-2 に示す．皮膚に対する官能値は Fig. 5-8 から抽出したものである．皮膚および合成皮革に対する官能値では，B＞A＞C の順でなめらかと感じている．ガラス板に対しては A のみ顕著になめらかさを感じている．これは，合成皮革の表面の摩擦特性がヒトの皮膚の摩擦特性に近く，ガラス板の表面の摩擦特性はヒトの皮膚や合成皮革と大きく異なることに起因すると考えられる．このことについては，摩擦感テスター(KES-SE，カトーテック社製)を用いた摩擦係数(MIU)と摩擦係数の変動(MMD)の測定によって確認した．また，本研究を始める際に，塗布時の感覚は塗布する側の指先による感覚なのか，それとも塗布される側の皮膚の感覚なのか，あるいはそれらが複合的に関与した感覚なのかとの疑問があった．そこで，被験者が自分の皮膚に塗布した結果と合成皮革に塗布した結果を比較すると，なめらかさの順位は同じであるが，絶対値は異なっていた．このことから，相対的になめらかであるかどうかの判断は指先の感覚によるものであるが，その度合いに関しては塗られる側の皮膚の感覚も寄与していると考えられる．

Table 5-2 Sensory scores of “smoothness” of skin care products.

Sample	Skin	Glass	Artificial Leather
A	3.5	4.8	2.8
B	4.5	3.3	3.5
C	2.5	3.5	2.5

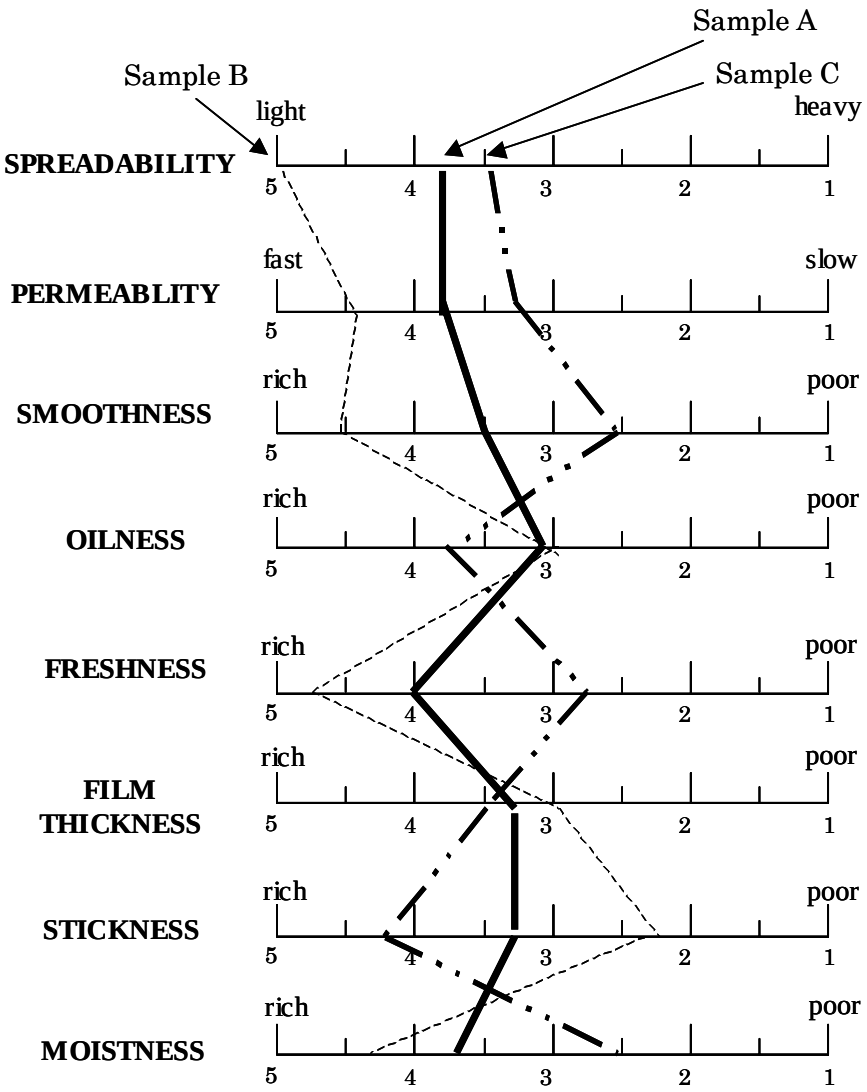


Fig. 5-8 Results of sensory evaluation of application feeling of skin care products (SD method).

Fig. 5-9 に，官能検査に使用した各サンプルの剪断流動実験の結果を示す．ここで，剪断流動実験のデータと，「なめらかさ」の官能検査結果との相関性を調べてみる．官能試験の結果は，「なめらかさ」について，皮膚および合成皮革に塗布した場合は，官能値の大きい順に B＞A＞C の順となっている．また，ガラス板に塗布した場合は，A＞C＞B となった．これに対して，剪断流動実験の結果では，粘性率の大きい順に C＞A≒B となった．C の粘性率が最も高いことと皮膚および合成皮革に塗布した場合の，サンプル C のなめらかさの官能値が最も低いことから，粘性率が高いほどなめらかさの官能値が低いという傾向は見られるが，粘性率のデータからは，サンプル A と B に対する官能値に明らかな差が現れたことは説明できない．またガラス板に塗布した結果とも相関性は見られない．これらのことから，官能値の「なめらかさ」は，単にエマルションそのもののレオロジー特性のみに依存しているわけではないことが分かった．

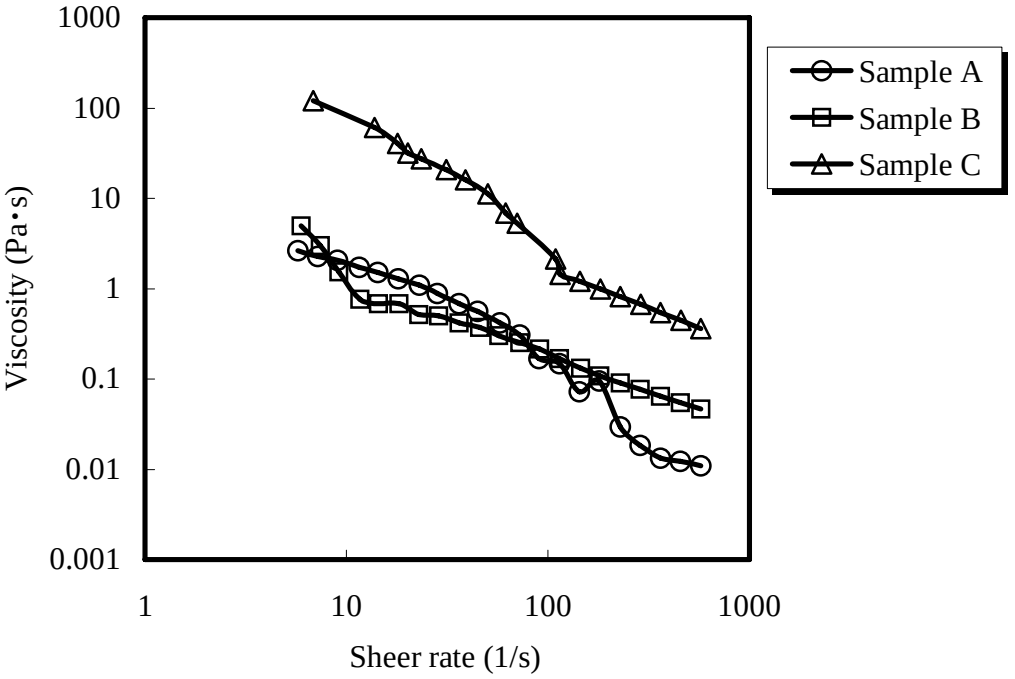


Fig. 5-9 Shear viscosity curves of skin care products at 20℃.

剪断流動実験はプレート間の距離が 300μm で行ったが，実際の塗布においては，塗布の往復回数を経るにしたがって薄くなり，最終的には数十 μm 程度にまで薄くなっている [18]. したがって，塗布する対象すなわち基板の表面特性の影響は無視できないと考えられる.

エマルションの物性のみならず基板の物性をも反映でき，より実際の使用状況に即した方法として，基板としてガラス板および合成皮革を用いて流動性試験を行った．流動性試験の結果を Fig. 5-10，5-11 に示す．0.01ml の試料に 25g の荷重をかけた場合の経時変化を，基板としてガラス板を用いた場合を Fig. 5-10 に，合成皮革を用いた場合を Fig. 5-11 に，それぞれ示した．ガラス板を基板として用いた場合の降伏応力は A＜C＜B の順であり，合成皮革を基板として用いた場合は B＜A＜C の順であった．降伏応力は基本的にはエマルション自体の特性であるが，実際には基板の影響を大きく受けていることが分かる.

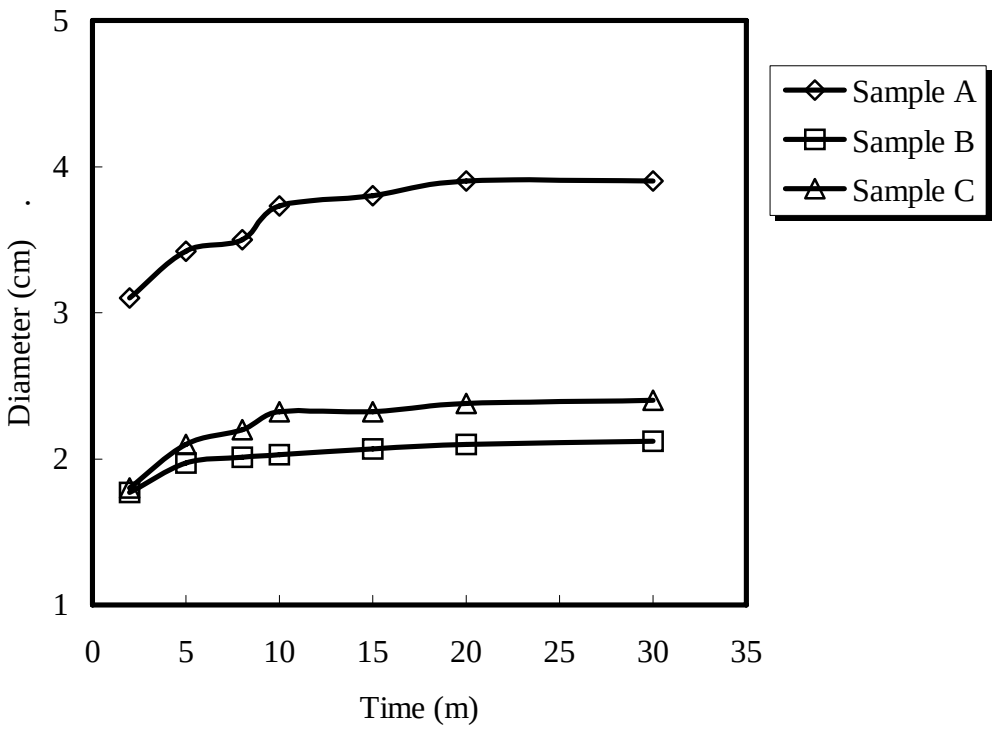


Fig. 5-10 Time dependency of spread diameter of each sample on the glass plate at 25℃.

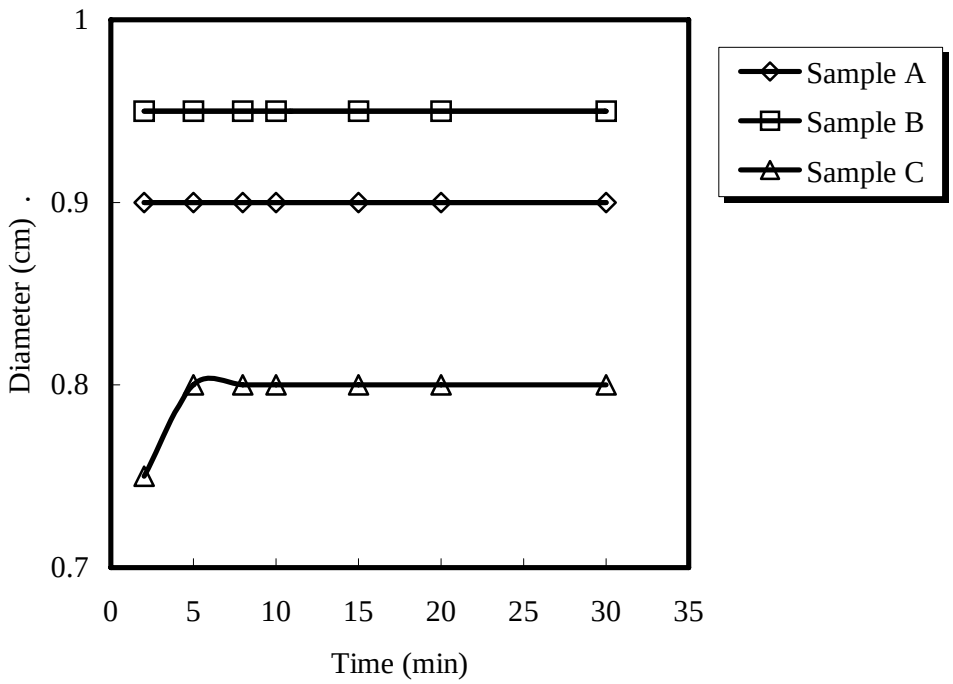


Fig. 5-11 Time dependency of spread diameter of each sample on the artificial leather at 25℃.

また，これらの結果とガラス板，合成皮革を用いた官能評価の結果を比較すると，それぞれの基板における Table 5-2 に示した「なめらかさ」の官能値と一致しており，降伏応力が小さい順に「なめらかさ」の官能値が高いことが分かった．これらの結果は，塗布時のエマルションの皮膚表面での厚さが数十 μm であるのに対し，Fig. 5-9 の流動性試験における平衡状態での広がり直径から，上下のプレート間の距離が約 10～30μm 程度と計算され，流動性試験におけるエマルションの状態が実際の使用状況に類似していることによると考えられる．

さらに，被験者が自分の皮膚に塗布した際の官能値と合成皮革を用いた流動性試験の結果が一致していることから，ヒトの皮膚に近い表面特性を持つ合成皮革を用いることによって，ヒトの皮膚を模擬することが可能であることが示された．したがって，エマルションの官能特性は，合成皮革を用いた流動性試験によって予測できることが示された．

流動性試験と官能的特性の結果が一致したことから，エマルションを塗布する対象である基板の表面特性が官能的特性や流動性に大きな影響を与えることが明らかになった．そこで，材料の表面特性を定量化するための指標として用いられる親水性・親油性のバランスによってこの影響を説明できるのではないかと考え，接触角測定により表面自由エネルギーを調べた．各試料に対する，水およびドデカンの接触角を Table 5-3 に示す．この表より，エマルションの親水性は A＞B＞C，親油性は B＞C＞A の順となっていることが分かった．

Table 5-3 Contact angles between the skin care products and fluids.

Contact angle(degree)	A	B	C
Water	0.0	23.0	68.0
Dodecane	42.5	27.5	29.0

Table 5-4 Contact angles between the substrates and fluids.

Contact angle(degree)	Skin	Glass	Artificial leather
Water	82	40	120
Dodecane	0	0	0

基板の親水性に関してはTable 5-4に示すように，合成皮革＞皮膚＞ガラス板の順に水との接触角が大きくなっているので，基板の親水性はガラス板＞皮膚＞合成皮革の順になっていることが分かった．

以上の結果をまとめると，ガラス板は皮膚に比べて親水性が高く，一方でエマルションの中で親水性が最も高かったのは試料Aであった. Figs. 5-10, 5-11の結果と比較してみると，親水性の強いもの同士の組み合わせのときに高い流動性を示し，また官能評価においても「なめらかさ」の官能値が高かった．一方，親油性が高い合成皮革では，Aに比べて親油性の高い B が，ガラス板上での実験と比べて高い流動性を示し，また「なめらかさ」の官能値が高かった．従って，この場合には親油性の強いものどうしの組み合わせのときに高い流動性が得られ，結果として塗り心地が良いと感じられたと言える．

この結果を，流動性試験の結果と合わせて考察する．基板とエマルションの親水性・親油性のバランスが大きく異なっている場合，すなわち基板がエマルションにぬれにくい場合は，エマルションと基板との界面の状態は Fig. 5-12(a)に模式的に示したようになり，流動性は小さくなる(降伏応力は大きくなる)．一方，基板とエマルションの親水性・疎水性のバランスが類似している場合，すなわち基板がエマルションにぬれやすい場合は，界面の状態はFig. 5-12(b)のようになり，流動性は大きくなる(降伏応力は小さくなる)．これらのことから，基板の違いによる官能的特性や流動性の違いは，エマルションと基板との親水性，親油性のバランスの違いによって引き起こされると考えられる．

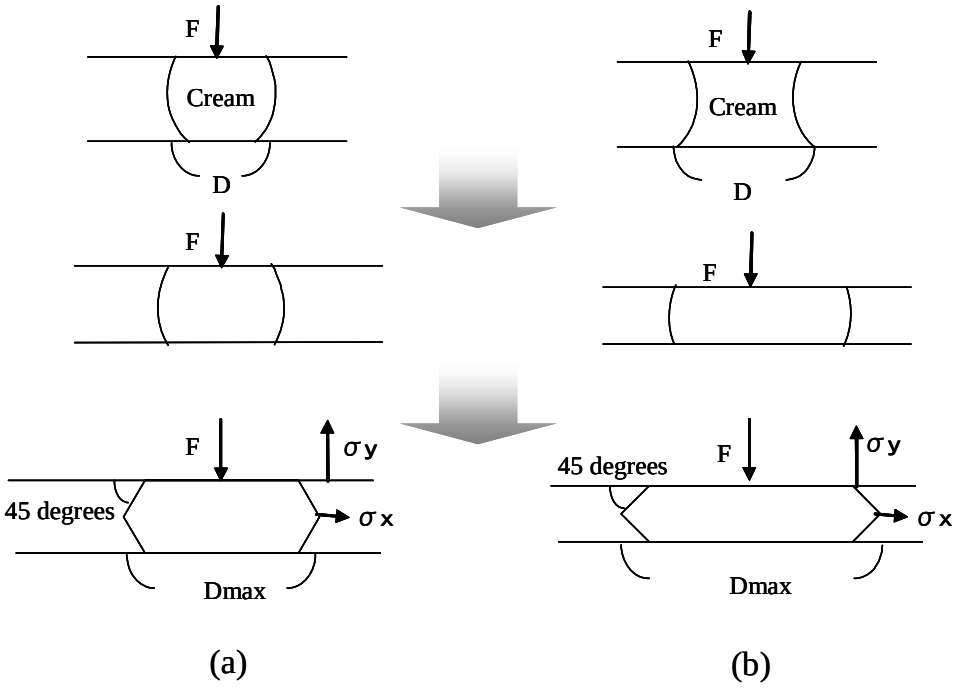


Fig. 5-12 Schematic model of relation between sheer stress, main stress and surface free energy at (a) low wettability and at (b) high wettability.

このように，皮膚とエマルションの界面における相互作用の観点からエマルションの塗り心地を物理化学的に検討することは，エマルションの塗り心地を定量化するために有用であることが示された．この手法によって，個々の消費者の皮膚表面特性に応じた，塗り心地の良いエマルションの設計も可能であると考えられる．

5.4　皮膚の表面特性とエマルション塗布時の摩擦特性

また，SDS 処理によって皮膚損傷を模擬した皮膚では，健常な皮膚に比べて塗り心地の官能評価にどのような変化が見られるかを調査した．今回は，より薄い膜厚における皮膚とスキンケアクリームとの相互作用の影響を見るため，人差し指で 10 往復塗布した場合の官能評価を行った．その結果を Fig. 5-13 に示す．

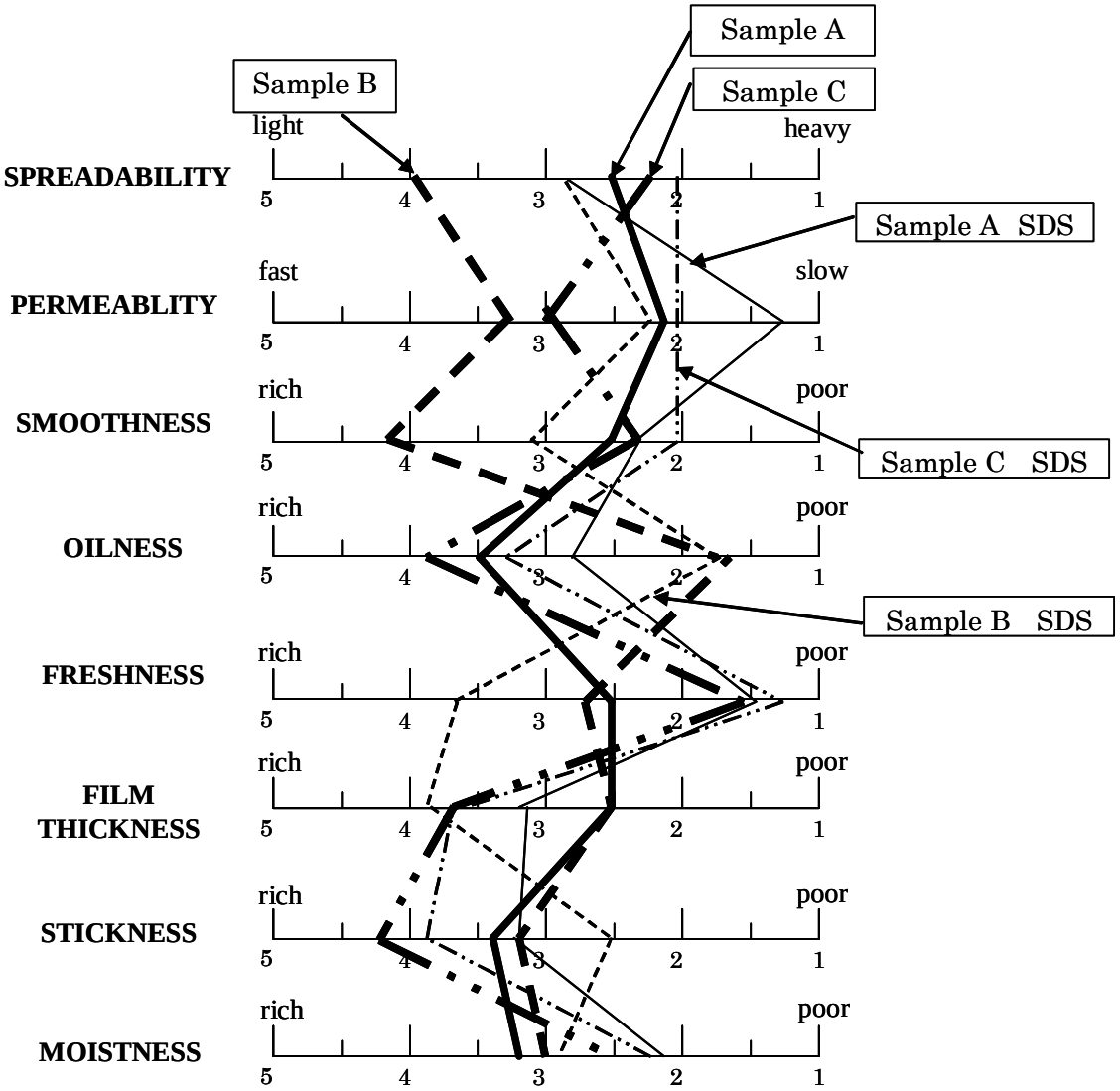


Fig. 5-13 Results of sensory evaluation of application feeling of skin care products (SD method) with normal skin and SDS damaged skin.

SDS 処理後に関しては，どのサンプルにおいても「なじみのよさ」,「なめらかさ」,「みずみずしさ」などの快適性を示す項目について，官能値が減少する傾向を示し，このことは SDS 処理によって塗り心地が悪くなることを示している. 特に, Fig. 5-14 に示すように,「なじみのよさ」についてはその差が顕著に現れた.

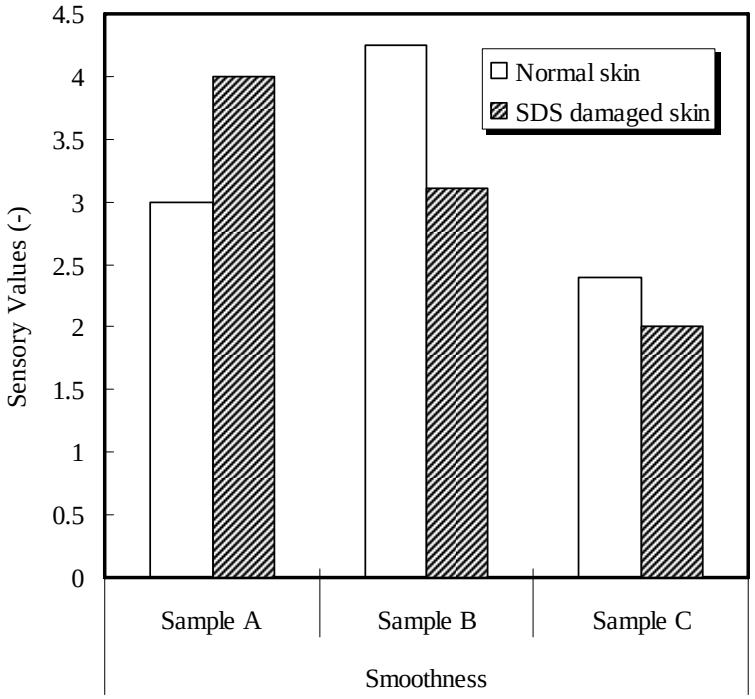


Fig. 5-14 Sensory values of “smoothness” with normal skin and SDS damaged skin.

サンプル A は 3 つのサンプルの中で最も親水性が高く，サンプル B および C は比較的親水性が低いことが，接触角測定により確認されている．したがって，SDS 処理による皮脂の除去に伴い，親水性が高くなることで，親水性の高いサンプル A にぬれ易く，親水性の低いサンプル B と C にぬれにくくなり，結果としてサンプル A のなめらかさの官能値が増加し，サンプル B と C の官能値が減少したと考えられる.

前節において，本実験と同一の 3 つのサンプルによる差が最も顕著に現れた「なめらかさ」の官能値に着目し，塗布されたエマルションと基板との間の表面自由エネルギーの相対的な大小関係がエマルションの流動性 [13)]を変化させ，結果として官能特性を支配していることを明らかにした．この結果に基づいて今回の結果を検討する．前述の結果より，接触角測定 [14)]によって，エマルションの親水性は A＞B＞C，親油性は B＞C＞A の順となっていることを確認している．さらに，親水性の大きいものどうし，親油性の大きいものどうしの組み合わせの時にスキンケアクリームの流動性が大きくなり，結果として「なめらかさ」の官能値が大きくなることが示されている．SDS 処理で皮脂や角層間脂質が取り除かれることにより, 皮膚の親油性は減少すると考えられる. Fig. 5-14 の結果の「なめらかさ」

の官能値に着目すると, SDS 処理前後の変化が大きいものから順に B＞C＞A となっており，これは親油性の大きいサンプルの順と一致する．このことは，皮膚の親油性が減少した結果，親油性の大きいサンプルと皮膚との表面自由エネルギーの差が大きくなり，流動性が小さくなった結果，なめらかさを感じにくくなったと考えられる．

以上のことから，SDS 処理によって皮膚表面の摩擦係数は減少したにもかかわらず，処理後の「なめらかさ」の官能値が減少したのは，皮脂や角層間脂質の除去により皮膚の親油性が減少したためであることが推定される．したがって，さまざまな状態の皮膚の表面自由エネルギーを見積もり，その表面自由エネルギーに近いエマルションを O/W 比の調整などにより設計することによって皮膚表面摩擦特性を制御し，それぞれの皮膚の状態に合わせて塗り心地の良いエマルションを設計することが可能であると考えられる．

5.5　結言

本章では，まず皮膚の含水状態による皮膚の摩擦特性の変化を調べるため，界面活性剤処理前後の皮膚の摩擦特性，および角層水分量，経皮水分蒸散量，皮脂量の変化を調べた．その結果，摩擦係数 MIU は界面活性剤処理により減少した．この原因は，他の皮膚パラメータの測定結果に基づくと，表面の皮脂や水が取り除かれたために，境界摩擦から乾燥摩擦に変化したためと考えられ，角層水分量や皮脂量が皮膚の摩擦特性に深く関わっていることが示された．

次に，エマルション塗布時の皮膚摩擦特性について，官能評価を用いて調べたところ，流動性試験との照合により，エマルションを塗布する対象となる材料の表面特性が，塗布時の摩擦特性に大きな影響を与えていることが明らかになった．さらに，塗布されたエマルションと塗布対象となる材料との間の表面自由エネルギーの相対的な大小関係が，エマルションの流動性を変化させていることが明らかになった．

また，この結果に基づいて，先の界面活性剤処理によるエマルション塗布時の摩擦特性について調べたところ，処理していない皮膚による官能評価の結果と比較した．その結果，界面活性剤処理を行った皮膚の摩擦特性は処理前に比べて有意に変化し，皮脂や角層間脂質が取り除かれた結果として皮膚の親油性が減少するために，皮膚表面におけるエマルションの流動性が変化することに起因すると考えられる．角質層の水分保持機能と，それによる表面の親水性・疎水性のバランスが，摩擦特性に大きな影響を与えることが分かった．したがって，角質層およびエマルションの水和構造の解析も組み合わせることにより，その変化機構を更に明確にすることができると考えられる．

参考文献

1) Korting, H. C., Braun-Falco, O., *Dermatology*, **14**, 23, (1996).
2) Denda, M., Tsuthiya, T., Br. *J. Dermatol.*, **142**, 881, (2000).
3) Paepe, K. De, Roseew, D., Rogiers, V., *Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **16**, 587, (2002).
4) Egawa, M., Oguri, M., Hirao, T., Takahasi, M., Miyakawa, M., *Skin Res. Technol.*, **8**, 41, (2002).
5) Imokawa, G., Kuno, H., Kawai, M., *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 845, (1991).
6) Prasch, T. H. Knubel, G., Schmidt-Fonk, K., Ortandeal, S., Nieveler, S., Forster, T.H., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **22**, 371, (2000).
7) Bettinger, J., Gloor, M., Vollert, A., Kleesz, P., Fluhr, J., Gehring, W., *Skin Res. Technol.*, **5**,21, (1999).
8) 光井武夫編,“新化粧品学 第 2 版”, pp.244-258, 南山堂, (2001).
9) Suganuma, K., Niwa, M., *J.Soc. Cosmet. Chem. Japan*, **24**, 212, (1991).
10) Shibata, Y., Ikeda, H., Kondou, Y., Kihira, K., *Yakugaku Zassi*, **125**, 397, (2005).
11) Dobrev, H., *Skin Res. Technol.*, **6,** 239, (2000).
12) Egawa, M., Oguri, M., Hirao, T., Takahasi, M., Miyakawa, M., *Skin Res. Technol.*, **8**, 41, (2002).
13) Rawlings, A.V., Int. *J. Cosmet. Sci.*, **25**, 63, (2003).
14) Blummer, R., Godersky, S., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **152**, 89, (1999).
15) 中江利昭監修,“レオロジー工学とその応用技術”, pp.419-420, フジ・テクノシステム, (2001).
16) 柳田博明監修,“微粒子工学大系 (第 1 巻(基本技術))”, pp.461-463, フジ・テクノシステム, (2001) .
17) 渡辺信淳, 渡辺昌, 玉井康勝,“表面および界面”,pp.122-129, 共立出版, (1973).
18) Dussert, A. S., Goori s, E., *International Journal of Cosmetic science*, **19**, 119, (1997).

第6章　　総括

6.1　本論文の総括

本研究は，生体高分子と水の集合体としての生体組織のメゾスコピックな空間構造と，巨視的な物性である粘弾性および摩擦特性の関係を明らかにすることにより，生体組織の粘弾性および摩擦特性の変化機構を検討した．

第 1 章においては，生体高分子の含水状態のメゾスコピックな空間構造を解析することの重要性について述べ，メゾスコピックな空間構造を巨視的物性である粘弾性および摩擦特性に関連付けるという本研究の観点，および工学的視点からの予防・診断・治療への応用について述べた．

第 2 章においては，陽電子消滅法および熱分析を用いて，生体高分子の含水膨潤過程，および凍結融解過程における，生体高分子と水との相互作用について検討した．その結果，ゼラチンの膨潤過程において，結合水のみが存在する濃度領域において，水分子の分子運動に起因するヘリックス構造の変化が起こっていることが示された．

第 3 章においては，生体高分子ハイドロゲルの架橋構造に着目し，架橋構造と粘性率，および膨潤収縮特性の関係について検討した．その結果，生体高分子の粒子間架橋および粒子内架橋が，粘性率の変化および膨潤収縮特性に関わっていることを明らかにした．

第 4 章においては，生体組織のうち皮膚・皮下組織を対象にし，加齢・エマルション塗布による粘弾性の変化機構について，水和状態や架橋構造の観点から検討した．その結果，加齢により真皮においては線維状蛋白質の架橋，表皮においては含水率の変化がそれぞれ粘弾性に影響をおよぼしている可能性が示された．

第 5 章においては，生体組織のうち表皮を対象とし，皮膚の摩擦特性と皮膚表面の水和状態との関連について検討した．その結果，皮脂量や角層水分量の皮膚の摩擦特性に関与していることが明らかになり，また皮膚の表面自由エネルギーがエマルションの塗り心地も含めた摩擦特性に影響していることが分かった．

第 6 章においては，本論文の総括を行った．

これらの結果を総括すると，第 2 章で議論した生体高分子の含水過程が主に表皮の粘弾性や摩擦特性に影響しており，第 3 章で議論した生体高分子の架橋構造の変化が主に真皮・皮下組織の粘弾性に影響している傾向が示された．生体組織においては常に生命活動が行われており，また複数の成分が不均一に存在する系であるため，生体高分子ゲルのモデル系と比較すると，経時的な変化を持ち，また構造も複雑であるが，陽電子消滅法と熱分析の組み合わせにより，生体高分子中に存在する親水基と水分子の相互作用を選択的に評価できる可能性が示されたため，これらの手法を実際の生体組織にも適用できれば，予防・診断・治療のための基礎研究の 1 手法として有用な手法になると考える．

6.2　結論

以上より本論文では次の結論を得た.

① 陽電子消滅法と熱分析により，水と生体高分子の相互作用とそれに伴う網目構造の変化を追跡することが可能である.

② 生体高分子水溶液の量子線照射により，濃度と吸収線量に依存して粒子内架橋あるいは粒子内架橋が形成され，架橋の種類によって粒子径，溶液の粘性率，膨潤収縮挙動が変化する.

③ 生体組織の巨視的物性には，水の束縛状態と生体高分子の架橋構造が寄与するが，それぞれの寄与率は組織の含水率によって異なると考えられ，また架橋構造は水の束縛状態にも影響する.

業績リスト

本論文は以下の論文をまとめたものである.

1.　主論文（原著論文）

1) 秋山庸子，霍田安弘，武田真一，泉佳伸，西嶋茂宏，スキンケア製品の塗り心地とそのレオロジー特性，日本レオロジー学会誌，34 [3]，pp. 171-175 (2006). (第 5 章)

2) 秋山庸子，霍田安弘，武田真一，泉佳伸，西嶋茂宏，皮膚表面特性によるスキンケア製品の塗り心地の変化, 日本レオロジー学会誌, 34 [4], pp. 241-244 (2006). (第 5 章)

3) 三町 博子，秋山 庸子，武田 真一，泉 佳伸，誉田 義英，西嶋 茂宏，陽電子消滅寿命測定法および熱分析を用いた生体高分子ゲルの膨潤過程の解析, *Radioisotopes*, **55**, 525-531, (2006).　(第 2 章)

4) Y. Akiyama, T. Fujiwara, S. Takeda, Y. Izumi, S. Nishijima, Preparation of Stimuli-responsive Protein Nanogel by Quantum-ray Irradiation, *Colloid Polym. Sci.* **285**, 801–807, (2007).　(第 3 章)

5) Y. Akiyama, Y Shibahara, S. Takeda, Y. Izumi, Y Honda, S Tagawa, S. Nishijima, Analysis of Swelling Process of Protein by Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry, *J. Polym. Sci. Polym Phys*, **45**, 2031-2037, (2007).　(第 2 章)

6) Y. Akiyama, Y. Shibahara, S. Takeda, Y. Izumi, Y. Honda, S. Nishijima, The Investigation of Swollen Process in Gelatin Gel by Using Positron Annihilation Spectroscopy, *Physica Status Solidi (C)*, in Press.　(第 2 章)

7) Y. Akiyama, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Takeda, Y. Izumi, H. Kimura, S. Nishijima, Analysis of Viscoelasticity of Human Skin for Prevention of Pressure Ulcers, *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, in Press.　(第 4 章)

2. 関係論文(原著論文)

1) Y. Akiyama, S.Takeda, I.Tari, Formation Process of Kaolinite under Hydrothermal Condition, *J. Ceram. Soc. Japan*, **107** ,433-436, (1999).

2) Y.Akiyama, S.Takeda, I.Tari, Synthesis of Kaolinite under Saturated Steam at 220℃, *J. Mater. Sci. Letters*, **19**, 885-887, (2000).

3) 武田真一，西嶋茂宏，ウルス・ハフェリ，寺園文吾，秋山庸子，泉佳伸，江間喜美子，蛋白質への強磁性粒子の接着とその磁気移動制御，日本生体磁気学会, **16**, 84-85 (2003).

4) Y. Honda, Y. Shibahara, Y. Akiyama, N. Kimura, G. Isoyama, S. Tagawa, S. Takeda, Y. Izumi, S. Nishijima, Study on Polymer Electrolyte Membrane for Fuel Cell by using AMOC technique, *Physica Status Solidi (C)*, in Press.

5) 山本洋志郎，秋山庸子，武田真一，泉佳伸，西嶋茂宏，生体軟組織の弾性率分布イメージング，生体医工学，**45**（3）掲載決定.

3. 関係論文(Proceedings)

1) S. Takeda, Y. Akiyama, I. Tari, Formation Mechanism of Kaolinite under Hydrothermal Condition, *Proceedings of Joint 6th International Symposium on Hydrothermal Reactions & 4th International Conference on Solvo-Thermal Reactions*,484-486, (2001).

2) S. Takeda, S. Takami, Y. Akiyama, I. Tari, Synthesis of Double Oxides by Vapor-Phase Transport Method, *Proceedings of Joint 6th International Symposium on Hydrothermal Reactions & 4th International Conference on Solvo-Thermal Reactions*,403-406, (2001).

3) Y. Akiyama, S. Takeda, K. Ema, Y. Izumi, S. Nishijima, Peneration of Skin Care Products to Human Skin and Sensory Properties aftar Application, *IFMBE Proc.2004*, **7**, 69-72, (2004).

4) R. Ohtsuka, Y. Akiyama, S. Takeda, K. Ema, Y. Izumi, S. Nishijima, Sensory Properties and Physical Properties of Human Skin Surface Before and After Skin Treatment, *IFMBE Proc.2004*, **7**, 73-76. (2004).

5) T.Tsuruda, Y.Akiyama, S.Takeda, K.Ema, Y.Izumi, S.Nishijima, Application Feelings of Skin Care Emulsions and Their Physical Properties, *IFMBE Proc.2004*, **7**, 49-52, (2004).

6) Y. Akiyama, T. Fujiwara, S. Takeda, Y. Izumi, S. Nishijima, Preparation of Natural Polymer Nanogel Induced by Quantum-Ray and its Biomedical Application, The 12th International Conference on Biomedical Engineering *IFMBE Proc.2005*, **12**, 132-135, (2005).

7) Y. Yamamoto, Y. Akiyama, Y. Doi, S. Takeda, Y. Izumi, H. Kimura, S. Nishijima, Simulation of Stress Distribution for Prevention of Bedsore, *Proceedings of the 15th International Conference on Mechanics in Medicine and Biology*, P0225, (2006).

8) Y. Akiyama, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Takeda, Y. Izumi, H. Kimura, and S. Nishijima, Analysis of Viscoelasticity of Human Skin for Prevention of Pressure Ulcers, *Proceedings of the 15th International Conference on Mechanics in Medicine and Biology*, P0211, (2006).

4. 関係論文(会議報告)

1) 秋山 庸子, 武田 真一, 泉 佳伸, 江間 喜美子, 西嶋 茂宏, 皮膚の力学的特性に及ぼす塗布エマルションの効果, 第 56 回コロイド及び界面化学討論会講演要旨集 p.247, (2003).

2) 秋山 庸子, 武田 真一, 西嶋 茂宏, 泉 佳伸, 江間 喜美子, スキンケア化粧品のレオロジー特性と官能的特性, 第 51 回レオロジー討論会講演要旨集 p.5‐6, (2003).

3) 秋山 庸子, 武田 真一, 泉 佳伸, 江間 喜美子, 西嶋 茂宏, 皮膚の力学的特性に及ぼす塗布エマルションの効果, 福祉工学シンポジウム講演論文集, p.217-218, (2003).

4) 秋山 庸子, 武田 真一, 泉 佳伸, 江間 喜美子, 西嶋 茂宏, 各種環境における高分子ゲルの力学的特性に関する基礎的研究,日本化学会第 84 回春季年会講演予稿集, p.287, (2004).

5) 秋山 庸子，武田 真一，泉 佳伸，江間 喜美子，西嶋 茂宏，各種環境における皮膚の粘弾性挙動の解析，日本生体医工学会誌，43(特別号)，p.304, (2005).

6) 秋山 庸子，藤原 敬博，武田 真一，泉 佳伸，江間 喜美子，西嶋 茂宏，量子線を用いた天然高分子ゲルの創製と医用材料への応用，日本生体医工学会誌，43(特別号)，p.284, (2005).

7) 秋山 庸子，三町 博子，武田 真一，泉 佳伸，西嶋 茂宏，生体組織の低温保存のための基礎的研究，日本生体医工学会誌，44(特別号)，p.722, (2006).

8) 秋山 庸子, 武田 真一, 泉　佳伸, 木村 裕和, 西嶋 茂宏, 褥瘡予防を目的とした皮膚の粘弾性測定　人と福祉を支える技術フォーラム予稿集 (2006).

9) 秋山 庸子，藤原 敬博，武田 真一，泉 佳伸，西嶋 茂宏，量子線を利用した高分子ナノゲルの機能性制御と医用材料への応用，　生体医工学シンポジウム 2005 講演予稿集, 17-3,　(2005).

5. その他の業績(解説)

1) 西嶋 茂宏，　秋山 庸子,「使用感設計に用いる官能評価」，COSMETIC STAGE Vol.1, No.2 pp.15-20 (2006).

6. その他の業績(依頼講演)

1) 秋山 庸子，西嶋 茂宏,「スキンケア製品の塗り心地と物理化学的特性」，情報機構，大田区産業プラザ，2006.11.15.

2) 秋山 庸子「スキンケア製品の塗り心地と物理化学的特性」，技術情報協会，きゅりあん(東京)，2007.6.26.

7. その他の業績(受賞)

1) Y. Akiyama, Y. Yamamoto, Y. Doi, S. Takeda, Y. Izumi, H. Kimura, S. Nishijima, Analysis of Viscoelasticity of Human Skin for Prevention of Pressure Ulcers, 15th International Confrernce on Mechanics in Medicine and Biology (ICMMB) Young Investigator Award, 6-8 Dec. 2006, Singapole.

2) 三町 博子，秋山 庸子，武田 真一，泉 佳伸，誉田 義英，西嶋 茂宏，「陽電子消滅寿命測定法および熱分析を用いた生体高分子ゲルの膨潤過程の解析」2006 年度 Radioisotopes 誌論文奨励賞

謝　辞

本論文を作成するにあたり，終始ご指導・ご議論を賜りました大阪大学大学院工学研究科　西嶋茂宏教授に心より感謝いたします．また論文を完成させるにあたり貴重なご助言・ご指導を頂きました，大阪大学大学院工学研究科　粟津邦男教授，池道彦教授，泉佳伸准教授に深く感謝いたします．また陽電子測定に関して終始親切なご指導を賜りました大阪大学産業科学研究所の譽田義英准教授に深く感謝いたします．また量子線照射実験についてご協力頂きました，大阪大学産業科学研究所の池田稔治助教に感謝いたします．

皮膚測定実験に関してご支援くださいました，大阪府立産業技術総合研究所の木村裕和氏，片桐真子氏，山本貴則氏，四谷任氏に厚く感謝の意を表します．

大学時代より終始ご指導ご鞭撻を賜りました元大阪大学大学院工学研究科　武田真一氏，生物系の研究に関してご指導賜りました元大阪大学大学院工学研究科　江間喜美子氏に深く感謝いたします．また論文執筆に関してアドバイスを頂きました東洋紡総合研究所の山中淳彦氏，陽電子計測に関してご協力を頂きました西嶋研究室卒業生の三町博子氏と，在学生の芝原雄司氏，宮内啓成氏，ゲルの照射実験にご協力頂きました同研究室卒業生の藤原敬博氏，皮膚測定実験にご協力頂きました在学生の山本洋志郎氏，土井佑介氏，感性材料関連の実験にご協力頂きました同研究室卒業生の霍田安弘氏，大塚廉太郎氏に感謝いたします．研究生活を様々な面でご支援いただいた西嶋研究室の鈴木一代氏，古谷須美子氏，板谷菜緒子氏，伊藤愛氏，仮屋直子氏に感謝いたします．最後に，互いに切磋琢磨し，時には実験の被験者としてもご協力いただきました西嶋研究室在学生の三島史人氏，寺田隆哉氏，朴明珠氏，松尾陽一郎氏，猪上慎介氏，安冨琢也氏，福井慎二氏，石崎彩氏，上田雄義氏，中尾良輔氏，阿部武志氏，坂口芙美氏，中井裕樹氏に感謝いたします．