〔原 著 論 文〕

噴霧式凍結乾燥法による水溶性多糖類ナノファイバーの創製

脇坂 浩^{*1}・王 奕寒^{*1}

(受付 2015 年 12 月 17 日・審査終了 2016 年 2 月 11 日)

(早期公開 2016 年 4 月 6 日・DOI:10.1295/koron.2015-0082)

要 旨 ナノファイバーは、その優れた特性から幅広い分野への応用が期待され、多様な原材料や創製方法に関する研究開発が盛んである。原材料には、生分解性や生体適合性の観点から、天然多糖類が注目されている。新たなナノファイバー創製方法として、希薄なポリマー水溶液を冷却基板上に噴霧し、液体窒素を用いて急速凍結後に凍結乾燥させる方法により、0.4 wt% のキトサン水溶液からナノファイバーの形成をこれまでに確認している。本研究では、キトサン以外の水溶性多糖類(アルギン酸、 β 1,3-グルカン、デンプン、ヒアルロン酸)に対して、同手法を適用した。凍結乾燥体の構造は多糖類の種類により異なっていた。アルギン酸、 β 1,3-グルカン、ヒアルロン酸水溶液の濃度が0.4 wt% 以下の希薄な場合には、ある程度向きの揃ったナノファイバーが得られた。デンプンの場合には、ナノファイバーが得られるものの配向性が失われ、凝集が観察された。

1 結 言

ナノファイバーは、その優れた特性から幅広い分野への応用が期待されており、多様な原材料や創製プロセスに関する研究開発が盛んに行われている¹⁾。原材料の多様性に関して、生分解性や生体適合性の観点から、再生可能な天然多糖類が注目されている²⁾。なかでもキトサンは、エビやカニなど甲殻類の殻に含まれるキチンを脱アセチル化することにより得られるカチオン性多糖であり、金属の吸着や抗菌性といった機能性を期待して、食品包装や創傷被覆材などへの応用がこれまでに数多く検討されている³⁾。一方、キトサンからのナノファイバー創製プロセスに関しては、ウェットスピニング⁴⁾あるいはエレクトロスピニング⁵⁾による検討事例が数多く報告されている。しかしながら、これらの紡糸プロセスには、装置構成が複雑なことや高電圧を必要とすることがそれぞれ課題として挙げられる。さらに、キトサンの場合にはカチオン性多糖であるため紡糸液の表面張力が大きくなることもエレクトロスピニング法の適用を妨げる要因である。そこで、キトサンへの適用を可能にする新たなナノファイバー創製プロセスとして、水中カウンターコリジョン法⁶⁾、湿式微粒化⁷⁾、ロータリージェットスピニング⁸⁾、ハンドスピニング⁹⁾、溶液噴霧法¹⁰⁾な

どが提案されてきた。ところが、これらの方法では揮発性の溶媒を使用するため、医療や食品分野への応用に際しては、より溶媒使用量の少ない手法が望まれる。そこで注目した方法が、水を主要な溶媒として水を鋳型とする凍結法である¹¹⁾。一般的な凍結鋳型プロセスでは、まずポリマー水溶液もしくは懸濁液を適当な冷媒で凍結させた後に、氷結晶を昇華させると、氷結晶間にポリマーが凝集し、膜や繊維状の構造を形成すると考えられる。最終的な構造は鋳型となる氷結晶に大きく依存するため、ポリマー水溶液の濃度や凍結速度といった氷結晶の成長にかかわる条件の制御が重要となる。ここで筆者らは、ナノサイズの繊維状構造を得るためには、希薄なポリマー水溶液を急速凍結することが有効と考え、冷却基板上にポリマー水溶液を噴霧し、液体窒素を用いて急速凍結後に凍結乾燥させるプロセスを着想した。そこで、0°C に冷却した0.4 wt% のキトサン (分子量 22 kDa) 水溶液を、超音波噴霧器でシリコン基板上に吹き付け、液体窒素で凍結させたところ、直径 100 nm 以下で配向性を有するナノファイバーの形成を確認した¹²⁾。

本研究では、キトサン以外の水溶性多糖類(アルギン酸、 β 1,3-グルカン、デンプン、ヒアルロン酸)に対しても、溶液噴霧と凍結鋳型法の組合せによりナノファイバーの創製が可能か検討を行った。

^{*1} 九州工業大学大学院生命体工学研究科 (☎ 808-0196 北九州市若松区ひびきの2-4)

2 実 験

2.1 試料

アルギン酸ナトリウム, β 1,3-グルカン, デンプン (じゃがいも由来, アミロース型, 溶性), ヒアルロン酸ナトリウム (平均分子量約 100 万) は, 和光純薬工業 (株) 製の試験研究用グレードを使用した。溶液を噴霧して凍結させる冷却面として, 直径 10 cm の円形シリコンウェハーを使用した。

2.2 多糖類水溶液の調製方法

アルギン酸, β 1,3-グルカン, デンプン, ヒアルロン酸は, 所定の濃度 (0.1 wt%, 0.2 wt%, 0.4 wt%, 0.8 wt%) となるように蒸留水に加え, スターラーで均一にかくはんして溶解させた。

2.3 溶液噴霧と凍結鑄型法によるナノファイバーの作製

Figure 1 に操作手順を示す。溶液噴霧には, 音波式電動歯ブラシ Sonicare AirFloss (PHILIPS 製) を使用した。音波式電動歯ブラシのノズルの先端はシリコンウェハーの中央から 5 cm の位置とし, ウェハー表面と並行に溶液が噴霧されるような角度に固定した。液体窒素を注いだステンレスシャーレの上面をシリコンウェハーで覆い, その表面が凍結する直前に, 音波式電動歯ブラシを用いて溶液をシャーレ上に数回噴霧した。直後に, ウェハーを凍結乾燥機 FDU-1200 (東京理化器械 (株) 製)

に移し, -52°C で 3 時間水結晶を昇華させた。

2.4 分析

凍結乾燥後の試料は, ウェハーから導電性テープで剥離し, 白金蒸着後に走査型電子顕微鏡 S-3000N ((株) 日立製作所製) で観察した。撮影した画像は, フリーソフトウェア ImageJ を用いて解析した。画像中からランダムに選択された少なくとも 100 本以上の繊維状構造体について直径を計測した。

3 結果と考察

3.1 アルギン酸

Figure 2 に, 所定の濃度に調製したアルギン酸水溶液を噴霧・凍結乾燥後の電子顕微鏡写真を示す。まず, 先行研究におけるキトサンの場合と同様の条件を採用することにより, いずれの濃度においてもナノスケールの繊維状構造が観察された。繊維径は濃度依存的に変化し, 0.1 wt% アルギン酸水溶液では 119 ± 28 nm, 0.2 wt% アルギン酸水溶液では 138 ± 45 nm, 0.4 wt% アルギン酸水溶液では 180 ± 51 nm, 0.8 wt% アルギン酸水溶液では 245 ± 56 nm であった。また, 0.4 wt% 以上では, 部分的に膜状の構造も観察された。

3.2 β 1,3-グルカン

Figure 3 に, 所定の濃度に調製した β 1,3-グルカン水溶液を噴霧・凍結乾燥後の電子顕微鏡写真を示す。0.4 wt% 以下の濃度においては, ナノスケールの繊維状構造

Figure 1. (Color online) Schematic illustration of ultrasonic atomization-freeze casting of polysaccharide nanofibers. (i) The PSAF nozzle was kept parallel to the silicon wafer surface, cooled using liquid nitrogen, and the aqueous polysaccharide solution was atomized along the edge. The solution droplets froze rapidly into ice crystals, which grew perpendicular to the cold surface, displaced, and phase separated the polysaccharide in an orderly manner, essentially templating the polysaccharide molecules; (ii) Subsequently, these crystals were removed by lyophilization and (iii) the concentrated polysaccharide assembled into a nanofiber film.

Figure 2. SEMs of samples with different alginate concentrations. (A) 0.1 wt%, (B) 0.2 wt%, (C) 0.4 wt% and (D) 0.8 wt%.

Figure 3. SEMs of samples with different β -1,3-glucan concentrations. (A) 0.1 wt%, (B) 0.2 wt%, (C) 0.4 wt% and (D) 0.8 wt%.

が観察された。0.1 wt% 水溶液では 135 ± 37 nm, 0.2 wt% 水溶液では 195 ± 58 nm, 0.4 wt% 水溶液では 211 ± 59 nm と濃度依存的に繊維径が上昇した。0.8 wt% 水溶液では、繊維状構造が観察されず、蜂の巣様の多孔質構造が得られた。

3.3 デンプン

Figure 4 に、所定の濃度に調製したデンプン水溶液を噴霧・凍結乾燥後の電子顕微鏡写真を示す。いずれの濃度においてもナノスケールの繊維状構造が観察された。繊維径は濃度依存的に変化し、0.1 wt% デンプン水溶液では 124 ± 31 nm, 0.2 wt% デンプン水溶液では 168 ± 42 nm, 0.4 wt% デンプン水溶液では 278 ± 73 nm, 0.8 wt% デンプン水溶液では 290 ± 66 nm であった。また他の多

糖類と異なる点として、結節点のような凝集が確認された点が挙げられる。

3.4 ヒアルロン酸

Figure 5 に、所定の濃度に調製したヒアルロン酸水溶液を噴霧・凍結乾燥後の電子顕微鏡写真を示す。0.4 wt% 以下の濃度においては、今回検討した中で最も良好な繊維形成能と配向性を示した。繊維径は、0.1 wt% 水溶液では 157 ± 45 nm, 0.2 wt% 水溶液では 171 ± 37 nm, 0.4 wt% 水溶液では 198 ± 31 nm となり、バラつきや濃度による変化も小さい。しかしながら、0.8 wt% 水溶液になると粘度が上昇したため、繊維状構造が観察されず、蜂の巣様の多孔質構造が得られた。

Figure 4. SEMs of samples with different starch concentrations. (A) 0.1 wt%, (B) 0.2 wt%, (C) 0.4 wt% and (D) 0.8 wt%.

Figure 5. SEMs of samples with different hyaluronic acid sodium salt concentrations. (A) 0.1 wt%, (B) 0.2 wt%, (C) 0.4 wt% and (D) 0.8 wt%.

4 結 論

溶液噴霧と凍結乾燥の組合せによりナノファイバーを創製する手法は、キトサン水溶液のみならず、他の水溶性多糖類に対しても適用可能であった。しかしながら、凍結乾燥体のモルフォロジーは多糖類の種類によって異なっていた。アルギン酸、 β 1,3-グルカン、ヒアルロン酸水溶液の濃度が0.4 wt% 以下の希薄な場合には、ある程度向きの揃ったナノファイバーが得られた。デンプンの場合には、ナノファイバーが得られるものの配向性が失われ、結節点のような凝集が観察された。

本研究では Figure 1 に示すとおり、多糖類の水溶液を冷却基板上に噴霧し、液体窒素を用いて急速凍結後に凍

結乾燥させる際に氷結晶が鋳型となり構造が変化する。そのため氷結晶の形状が凍結乾燥体のモルフォロジーに大きく影響する。先行研究において、キトサンの濃度や分子量およびキトサン水溶液の粘度の影響を検討したところ、濃度や分子量および粘度が高いと繊維状構造が得難くなることを確認している。とくに粘度が高くなると、噴霧速度が小さくなり、冷却板上での氷結晶成長がより緩慢あるいは不均一になることが原因と推察している。今回、アルギン酸、 β 1,3-グルカン、ヒアルロン酸水溶液で濃度の影響を検討した際に同様の傾向が確認されたことから、今後これらの分子量あるいは粘度を検討することにより、この仮説の妥当性が支持されるものと考えている。また、デンプンの場合に凝集らしき構造が

観察された理由としては、製造工程において分解が進むことにより低分子量体が含まれるために他の多糖類よりも分子量のバラつきが大きく、低分子量体が凝集様構造として観察されたのではないかと考えている。

一方で、冷媒を充填した回転式の円筒型容器表面に溶液を噴霧して凍結させた後に掻きとり凍結乾燥すればナノファイバー製造工程の連続化や大規模化も可能と考えられる¹³⁾。今回検討した水溶性多糖類以外にも天然および合成高分子に対して本手法の有効性が今後検討されることが期待される。

文 献

- 1) 磯貝 明, 繊維学会誌, **69**, 122 (2013).
- 2) K. Iijima and M. Hashizume, *Trends Glycosci. Glycotech.*, **27**, 67 (2015).
- 3) Y. Yoshikawa, T. Narita, and S. Osawa, *Kobunshi Ronbunshu*, **70**, 668 (2013).
- 4) K. Iijima, K. Yuyama, K. Asaine, K. Irie, and M. Hashizume, *Kobunshi Ronbunshu*, **71**, 11 (2014).
- 5) 大川浩作, 繊維学会誌, **69**, 139 (2013).
- 6) 近藤哲男, 日本ゴム協会誌, **85**, 400 (2012).
- 7) S. Ifuku, *Kobunshi Ronbunshu*, **69**, 460 (2012).
- 8) M. R. Badrossamay, H. A. McIlwee, J. A. Goss, and K. K. Parker, *Nano. Lett.*, **10**, 2257 (2010).
- 9) K. Watanabe, B. S. Kim, Y. Enomoto, and I.-S. Kim, *Macromol. Mater. Eng.*, **296**, 568 (2011).
- 10) R. F. Liu, X. L. Xu, X. P. Zhuang, and B. W. Cheng, *Carbohydr. Polym.*, **101**, 1116 (2014).
- 11) D. Y. Lee, C. Y. Zhang, and H. F. Gao, *Macromol. Chem. Phys.*, **215**, 669 (2014).
- 12) Y. Wang and M. Wakisaka, *Carbohydr. Polym.*, **122**, 18 (2015).
- 13) J. Spender, A. L. Demers, X. F. Xie, A. E. Cline, M. A. Earle, and L. D. Ellis, *Nano. Lett.*, **12**, 3857 (2012).

[Original Papers]

Polysaccharide Nanofibers Fabricated by Combined Ultrasonic Atomization and Freeze Casting

Minato WAKISAKA^{*1} and Yihan WANG^{*1}

^{*1}Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology (2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0196, Japan)

Nanofibers with diameters between 100 nm to 200 nm were easily prepared from various water-soluble polysaccharides by combining ultrasonic atomization with freeze casting. Scanning electron microscopy demonstrated that fiber diameter and morphology are largely different between the types as well as the concentrations of polymers. Nanofibers of uniform orientation were obtained from alginate, β -1,3-glucan and hyaluronic acid with lower concentrations below 0.4 wt%. Nanofibers of random orientation were obtained from starch with 0.1 wt%. Simple combination of this ultrasonic atomization and freeze casting process can be applied to nanofiber fabrication not only for water-soluble polysaccharides but also for other natural and synthetic polymers.

KEY WORDS Polysaccharide / Nanofiber / Freeze Casting /

(Received December 17, 2015; Accepted February 11, 2016; Advance Publication April 6, 2016) [*Kobunshi Ronbunshu*, **73**, 233—237 (2016)]

©2016, The Society of Polymer Science, Japan