

## キトサンの研究レビュー

—構造・物性から nanofiber 製作と応用開発まで—

桜井 謙資

### A Review of Studies on Chitosan

— Structures and Properties on Solid State, and Production and Applications of Nanofibers —

Kensuke SAKURAI

(Received February 1, 2012)

The structures and properties or the production and application of nanofibers on chitosan that I have studied for 30 years or more were reviewed. Chitosan is one of polysaccharides, i.e., deacetylated material of chitin which is usually obtained from crustaceans such as crab, shrimp and prawn. Therefore, chitosan can be regarded as one of natural polymers and possesses the characteristics due to the presence of many free amino groups on the molecule, resulting in a cationic polymer as well as a variety of special properties. That's why chitosan is expected to be potentially useful material, especially for medical applications because of non-toxic and bio-compatible natures.

First, surveying the distribution of chitin on the biological production point, the molecular structures of the polysaccharide family of chitin, chitosan and cellulose, the use application of chitosan, and then some crystal or liquid crystal structures of chitosan will be given. Finally, production of chitosan nanofibers by the electrospinning method and application to an artificial skin are presented.

**Key Words :** Chitosan, Structure and Properties, Solvated Crystal, Nanofibers of Chitosan, Artificial Skin

#### 1. 緒言

これは、私のライフワークの一つとしてこれまで長く行ってきたキトサンに関する研究を振り返り、短く纏めたものである。キトサンはキチンの脱アセチル化物であり、キチンはカニやエビ等の甲殻類の外皮から採取される。したがって、キトサンは天然高分子の一つであり、また分子中に多くのアミノ基があるためカチオン性高分子であると共に反応性に富みいろいろな特性を有する。それ故、キトサンは潜在的に有用な高分子材料となること、特に無毒性や生体適合性のため医用材料への応用に高い期待が寄

せられている。

はじめにキチンの生物生産分布、キトサン、キチン、セルロースの分子構造、キトサンの用途に言及し、その後、キトサンの結晶構造や液晶等について述べる。最後に最近の研究で行ったキトサンの nanofiber とその人工皮膚への応用について述べる。

#### 2. キトサンとは何か

キトサンはキチンの脱アセチル化により得られるバイオマスとして今日よく知られている。キチンはカニやエビ等の甲殻類や昆虫などの生物の外皮や細胞壁などにタンパク質と炭酸カルシウムと複合体として存在しており、キチンの生物生産は年間 1,000 億トンと推定され豊富である。これらのバイオマスの有効利用を目的に多くの研究が行われてきた。しかしながら活発な研究の歴史は比較的浅く、成書

“CHITIN”が発刊<sup>[5]</sup>されたのは1977年のことであり、その後日本では多くの研究成果や企業商品化実績を広範にわたり纏めた「キチン、キトサンハンドブック」<sup>[1]</sup>が1995年に出版され、また、2006年には“Material Science of Chitin and Chitosan”<sup>[20]</sup>が出版されている。

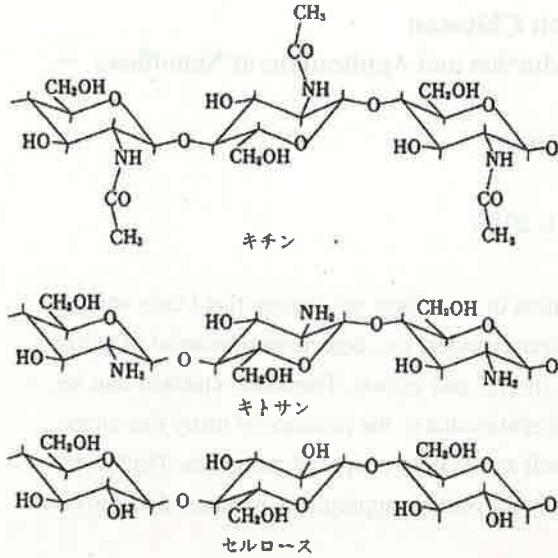


Fig. 1 キチン、キトサン、セルロースの化学構造

キチン [ $\beta$ -(1→4)ポリ-D-N-アセチルグルコサミン]、キトサン [ $\beta$ -(1→4)ポリ-D-グルコサミン]の化学構造は図1に示すようにセルロースに酷似しC2位の-OH基部位のみ異なるだけであるが、その性質は大きく異なる。特にキトサンは-NH<sub>2</sub>基をもつため高い反応性や機能性を示し、酸溶液への溶解性からビーズ、繊維、フィルム等の成形加工性が良い。

キチンは、下等生物(甲殻類、昆虫類、貝類、菌類)の組織繊維成分として生物生産され、生体内では必ずタンパク質や炭酸カルシウムと複合体を作っている。カニの甲羅が大変堅いことを思い出したとき、高分子複合材料(Composite)としても興味をもたれる。キチンの生物分布を表1に示す。また、セルロースが高等植物組織を形成していることを考えると、両者の分子構造と役割の類似性の観点からもキチンは大変興味深い。

キチンは結晶学的には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -formの3種のキチンが存在するが、多くのキチン源からは $\alpha$ キチンが得られる。イカからは結晶構造が少しルーズな $\beta$ キチンが得られる。しかし、興味深いことに脱アセチル化により得られるキトサンは1種類の同じ結晶構造<sup>[6]</sup>のみを持つ。キトサンは現在ほとんどの場合、カニ、エビ殻から図2に示す工程で作られている。すなわち、キチンを強アルカリ処理して得られ

る脱アセチル化キチンをキトサンと言う。

やや本論を外れるが、近年、高齢者の膝関節の軟骨再生に有効と言われている健康食品に「グルコサミン」を良く見かけるようになったが、これはキトサン [ $\beta$ -(1→4)ポリ-D-グルコサミン]の単量体であり、キトサンの消費の中で大きな割合を占めるようになっている。

Table 1 潜在的入手可能なキチン質の推定値 ( $\times 10^3$  t/年)

| キチン源   | 収穫量    | 含キチン廃棄物 |       | 潜在的なキチン量 |
|--------|--------|---------|-------|----------|
|        |        | 湿量      | 乾量    |          |
| カニとエビ  | 1,700  | 468     | 154   | 39       |
| オキアミ   | 18,200 | 3,640   | 801   | 56       |
| 二枚貝とカキ | 1,390  | 521     | 482   | 22       |
| イカ     | 660    | 99      | 21    | 1        |
| 糸状菌    | 790    | 790     | 182   | 32       |
| 昆虫     | 微量     | -       | -     | -        |
| 計      | 22,740 | 5,118   | 1,640 | 150      |

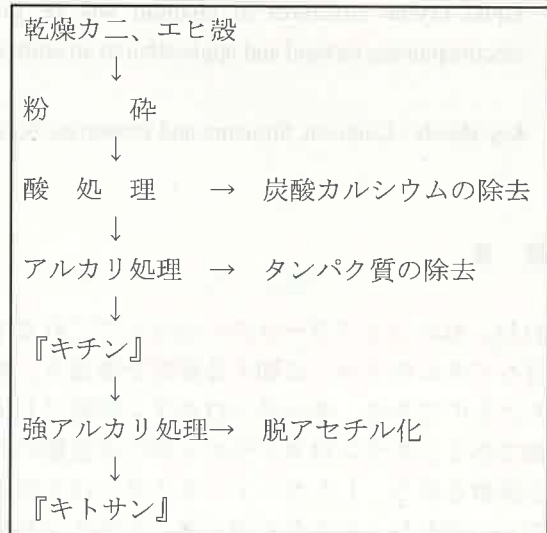


Fig. 2 キチン、キトサンの製造工程

## 2. キチン、キトサン及びその誘導体の用途・機能

キチン、キトサンの有効利用が叫ばれて約20年以上経過したが、ヒット商品が現れていない。上述したように、キトサンの分解反応生成物「グルコサミン」が大量に販売されていることを除いて、この問題点・理由を考えてみよう。

○キチン、キトサンの研究分野は工学、農学、生

物学, 薬学, 医学など広い分野に渡っている。

○セルロースのように大量消費用途をみつけにくい

○薬学, 医学サイドの実用化には他の分野より相当時間がかかる。

○高付加価値化の研究が行われてきたが, 他の既存素材を凌駕できない。他と同程度で, 特異性が発揮されていない。

○特異性を活かす研究の不足。2研究分野以上に渡る学際的な研究が必要のため。例えば, 抗菌性材料の開発には, 高分子材料の知識に加え微生物・薬学の知識が必要。

以上が考えられるが, これらの問題点はそろそろ克服され, 新たな発展段階に来たように感じられる。

さて, キチン, キトサン及びその誘導体の用途・機能を以下に簡単に記述する。

- (1) 廃水処理剤: キトサン/有機酸水溶液: カチオン系凝集剤: 生活廃水, 工業廃水, 食品工業廃水, 活性汚泥の凝集と肥料・試料への再利用
  - (2) キレート化剤: リン酸化キトサン: 重金属イオンの回収, 海中の天然ウランの回収 (ウラニルイオン  $UO_2^{2+}$  の高い吸着性)
  - (3) 化粧品: 水溶性キチン: 髪形のセット, 保温性, トリートメント, 化粧品の制酸性,
  - (4) 酵素固定化担体: ゲル, ビーズ, 膜: バイオリアクター, バイオセンサー, 高い酵素活性の維持
  - (5) 医薬・医用材料: 塩基性多糖, リゾチーム加水分解性: 医薬品原料 (オリゴマー)  
食物繊維素: 胃の制酸, 潰瘍制御, 血中コレステロールの低下  
抗菌性 (キトサン, ニトロ化, 硫酸化, アルキル化)  
抗凝血剤 (硫酸化, ヘパリン代用)  
制癌性 (キチン, キトサン, CM-キチン)  
体内消化性手術糸 (キチン糸, ユニチカ)  
人工皮膚 (キチン繊維の不織布, ユニチカ)  
薬物持効性・徐放性: 膜, カプセル
  - (6) 膜材料: 透析膜, 逆浸透膜, 限外濾過膜, 気体バリアー膜
  - (7) その他:  
食品・飼料添加剤: コレステロールの低下や虫歯予防  
農薬: 植物細胞のキチナーゼ, キトサナーゼ誘導による病原菌耐性  
繊維・紙へのコーティング: 染色・印刷性, 吸湿・耐水性  
スピーカーコーン: 周波数特性の一定性
- さらに, キトサンはリオトロピック液晶も形成し液

晶紡糸<sup>[11]</sup>も試みられた。キチンやキトサンの繊維<sup>[7-10]</sup>はセルロース繊維と同様にビスコース法や銅アンモニア法等の湿式紡糸により得られる。その他, ビーズや膜の固定化酵素担体としての応用<sup>[12,13]</sup>や水-アルコール共沸混合物の浸透気化法による有効な分離膜<sup>[20]</sup>の開発, また, 荷電型限外濾過膜への可能性<sup>[14,15]</sup>も示されて来た。さらに, 疎水化キトサン誘導体の合成物によるLB膜の作製<sup>[16,17]</sup>やキトサンの棒状ナノカプセルの合成<sup>[18]</sup>等についても研究されている。また, キトサンのTgに関する研究<sup>[22]</sup>は150件近くの論文に引用された。

### 3. キトサンの溶媒和

一般的にキチンの結晶性は高く特殊な溶媒にしか溶解せず取扱いにくい。一方, キトサンの結晶性はそれ程高くなく酸水溶液に容易に溶解する。キトサン酸水溶液から溶媒蒸発により溶媒和結晶が生成する。キトサンは分子中に遊離の一級アミノ基を持ち, 希薄な酸水溶液中でこのアミノ基と酸分子の間で複合体すなわち溶媒和が生じ, キトサン酸塩を形成して溶解する。このようなキトサン溶液から溶媒キャストした膜には, 溶媒種により異なる溶媒和結晶が生ずる。

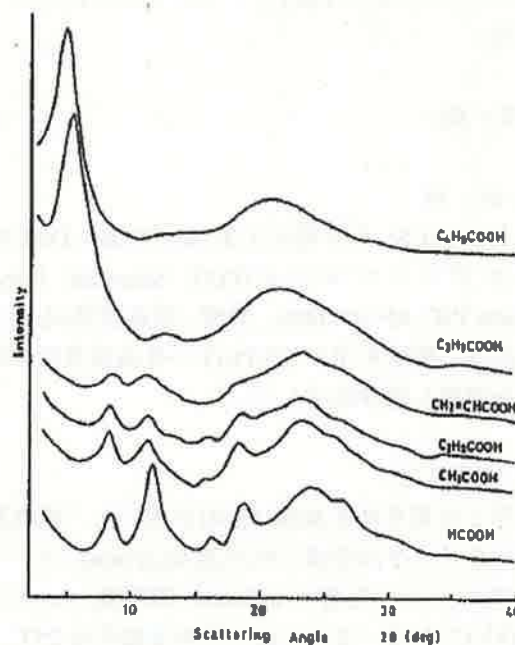


Fig. 3 キトサンの酸水溶液からキャストしたキトサン膜の広角X線回折強度曲線

Fig. 3に溶媒キャスト膜の広角X線回折(WAXD)強度曲線を示す。酸分子の大きさの増大とともに, 結晶性が低下し乱れが増大する。特に, 吉草酸と酪酸の



溶媒系で散乱角 5 度付近の低角領域に強い回折が現れるが、他の回折はブロードで弱くなる。すなわち、酪酸のような大きな酸分子と溶媒和したキトサン酪酸塩結晶では、キトサン分子鎖間に酪酸分子を取り込むため、分子鎖パッキングに対応する面間隔が大きくなり、同時に結晶乱れが増大する。溶媒和結晶の形成は、①溶媒種による WAXD 強度曲線の変化、②キャスト膜の水溶解性、③キャスト膜のメタノール処理やアルカリ処理による不溶化、④キャスト膜の IR 測定によるカルボニルバンドの出現等の事実から支持される。

#### 4. 電界紡糸法による chitosan nanofiber の作製

— CS/PEO nanofiber の調製とモルフォロジー —

##### 4.1 はじめに

近年、nanotechnology による材料開発が盛んになり、繊維に関しても nanofiber が作られてきた。最も一般的な方法は電界紡糸 (Electrospinning) 法<sup>[2-4]</sup>であり、多くの高分子溶液から nanofiber が作られている。我々はキトサンおよび水溶性キチン・キトサン誘導体 (CM-キチン, サクシニル CM-キトサン) に注目し、酸水溶液や水を溶媒としてこれらの電界紡糸を試み nanofiber 作製の紡糸条件を検討してきた。ここでは、キトサン/PEO ナノファイバーについて報告する。

##### 4.2 実験

###### 4.2.1 試料

キトサン(CS; 大日精化工業,  $M=97,000$ , DAC95%), ポリエチレンオキシド(PEO; Scientific Polymer Products INC,  $M=400,000$ ), 酢酸 (特級試薬)を使用した。溶媒に酢酸を用い CS/PEO の各種重量比の紡糸溶液を調製し電界紡糸した。

###### 4.2.2 電界紡糸

試作した電界紡糸装置(Fig.4)を用いた。電界紡糸条件パラメータは溶液の吐出速度( $\mu\text{l}/\text{min}$ ), エアーギャップ(シリンジ先端と collector 間距離, cm)と印加電圧(kV)である。また、紡糸雰囲気温度は  $25^\circ\text{C}$ , 湿度は 45~55%とした。Collector は直径 50mm の回転コレクターも使用した。

###### 4.2.3 モルフォロジー

電界紡糸で得られた nanofiber mat (or sheet) 試料の走査電子顕微鏡観察(SEM)および広角 X 線回折

(WAXD)写真撮影を行った。

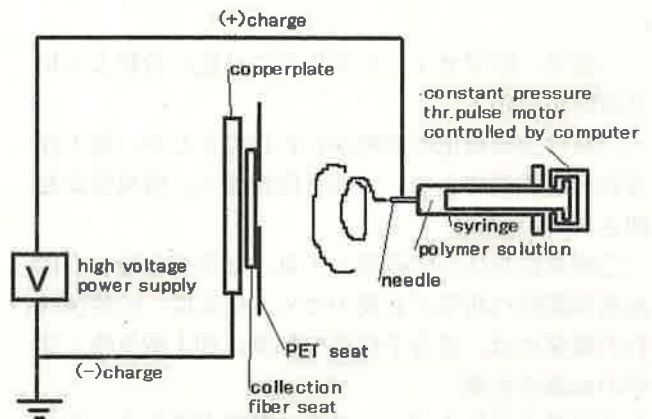
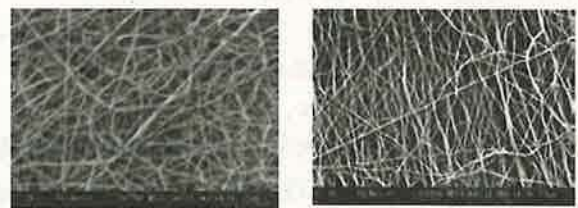


Fig. 4 Electrospinning apparatus.

##### 4.3 結果と考察

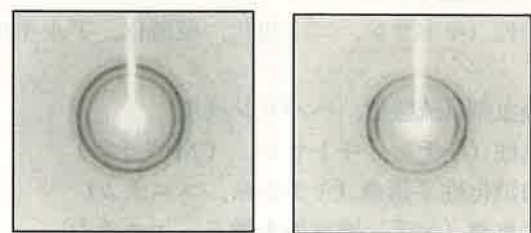
Fig.5, 6 に CS/PEO(2/8) NF sheet の SEM と WAXD 写真をそれぞれ示す。Fig.5 に示すように直線的で綺麗な NF が作製された。繊維直径は約 220nm である。



(a) 500 rpm

(b) 3000 rpm

Fig.5 SEM observation of CS/PEO (2/8)



(a) 500 rpm

(b) 3000 rpm

Fig.6 WAXD Photographs of CS/PEO (2/8)

高回転数(3000rpm)では繊維が配向している。同様に WAXD 写真において、高回転数で繊維図形が見られ分子鎖が配向していることを示した。動的粘弾性測定から得られた NF sheet の見かけの貯蔵弾性率は配向の増大と共に増大した。NF sheet の含水性は GA 蒸気架橋して測定した。CS/PEO NF の CS の混合割合が減少するにしたがい、含水性は減少した。含水測定試料を乾燥後 SEM 観察すると含水性の高い NF sheet では、含水前後の NF の形状変化が少ない。一

方, 含水度の低い NF sheet (PEO 含有量が多い NF sheet) では, NF は部分的に溶解し繊維形状が大きく失われ film 形状に近付いている. 前者では, ナノ繊維間に含水できるナノポイド(空間)が多数存在するが, 後者では多くのポイドが消滅し, 含水量の大きな低下が生じたと考えられる. 創傷治癒効果を示した CS/PEO (8/2) や(10/2) NF sheet では含水しても十分繊維形状を維持し, 多くのナノポイドを持ち, それらの含水度は 700%, 800%以上と非常に高い含水性を示し, これらの事実が創傷治癒促進効果に大きく寄与していると推測された.

次に, 電界紡糸で作製したキトサン複合 nanofiber mat (膜状の不織布) の人工皮膚 (創傷被覆材) への応用を検討した.

## 5. キトサン/セリシン複合ナノファイバー人工皮膚膜 (創傷被覆材) の開発

### 5.1 はじめに

キチン, キトサンは生体適合性高分子であり, 副作用もなく, 鎮痛効果, 止血効果, 殺菌作用があり, さらに新生肉芽細胞の再生促進作用があり, また, 酵素分解による体内吸収性である. いち早くキチン不織布による人工皮膚 (創傷被覆材) をユニチカ㈱が開発・製品化<sup>[19]</sup>し病院等で使用されている. また, キトサンは血圧降下に有効であることが科学的に示され特定保健用食品 (トクホ) として認可されている. このように, キチン, キトサンは生体に対して様々な分野でその応用が大いに期待されている.

ここでは, CS/SER/PEO 複合ナノファイバーを電界紡糸法で作製し, 創傷治癒特性を検討したので報告する.

### 5.2 試料

キトサン(CS), ポリエチレンオキシド(PEO), セリシン(SER), 酢酸 (特級試薬)を使用した. 電界紡糸溶液 (CS/SER/PEO 溶液) は各成分を 4%酢酸水溶液に溶解して準備した. これらを Table 2 に示す.

### 5.3 創傷治癒実験

マウスを用いた創傷治癒実験では, ジエチルエーテル蒸気で麻酔をかけたマウスの背中を金ブラシで擦り, 真皮に達する程度の創傷 (深い傷) を作り, そこに作製した nanofiber mat を貼り付け, 0, 3, 6 日目に治癒状態を観察し, 最終日に皮膚断面切片試料をヘマトキシレン・エオジン染色で染色し, 光学顕微鏡観察から組織再生状態を検討した.

### 5.4 結果と考察

ここで作製したキトサン nanofiber mat の典型例として CS/SER/PEO(8/2/2) の SEM 写真を Fig.7 に示す. 平均直径 170 nm の綺麗なナノファイバーが形成している.



Fig.7 SEM photograph of CS/SER/PEO (8/2/2) nanofibers mat.

Table 2 に示したセリシンを含む溶液の電界紡糸を印加電圧 20~25kV, エアーギャップ 8cm, 溶液の吐出速度 9 $\mu$ l/min の条件で紡糸し, すべての溶液から nanofiber mat (平均直径は 150~200 nm) を得た. WAXD 測定から nanofiber 中のキトサン, セリシンともほぼ非晶状態であった. セリシンは, 主なアミノ酸組成が, セリン(36mol%), アスパラギン酸(21mol%), グリシン(16mol%)からなるシルクタンパク質の一種であり, 高吸湿性, 抗酸化性, 紫外線吸収能などの優れた特性や, ガン抑制, 皮膚炎に対する生理的作用を持つことが報告されている<sup>[21]</sup>. そこで, この複合 nanofiber の創傷治癒効果について動物

Table 2 Weight ratio and concentration in CS/SER/PEO mixtures

| Sample   | CS | SER | PEO | ( /100 g)     |
|----------|----|-----|-----|---------------|
|          |    |     |     | Polymer conc. |
| CSSER100 | 10 | 0   | 2   | 12%           |
| CSSER91  | 9  | 1   | 2   | 12%           |
| CSSER82  | 8  | 2   | 2   | 12%           |
| CSSER73  | 7  | 3   | 2   | 12%           |

実験により検討した。

マウス動物実験から創傷治癒過程のマクロ観察によると、control に比べすべての試料で治癒効果が見られた。特に CS/SER/PEO(8/2/2) nanofiber mat は顕著な効果を示し、3days の時点では剥がした際に多少の出血が見られたが、6days では皮膚の状態が非常に良く、正常皮膚細胞が再生し傷跡が残らない程度まで治癒された (Fig. 8 参照)。

また、皮膚断面写真 (Fig. 9) では、control では表皮の肥厚化と細胞核が崩れ壊死を起こした。しかし 8/2/2 nanofiber mat 使用では表皮が他の組成比の nanofiber mat 試料使用より厚く再生しており、細胞核も正常な形を保っていることが確認できた。

これらは修復期にキトサンの抗菌作用により細菌の増加を防ぎ増殖期での細胞増殖を促すことができ、組織再構築期でセリシンの保湿作用、美肌効果、抗酸化作用により皮膚がきれいに再生したためであると推測された。一方、nanofiber mat 構造の観点からは、繊維がナノファイバーであるため表面積が通常繊維よりも極めて大きく、また、上述したようにナノファイバー間にナノボイド(間隙)が多数存在し、その結果、含水度が 700%以上の保水性を持ち、したがって、体液を保持しやすくし、皮膚と試料が一体化できる等の効果が考えられた。

なお、本研究成果は平成23年9月に特許<sup>[23]</sup>として認められた。

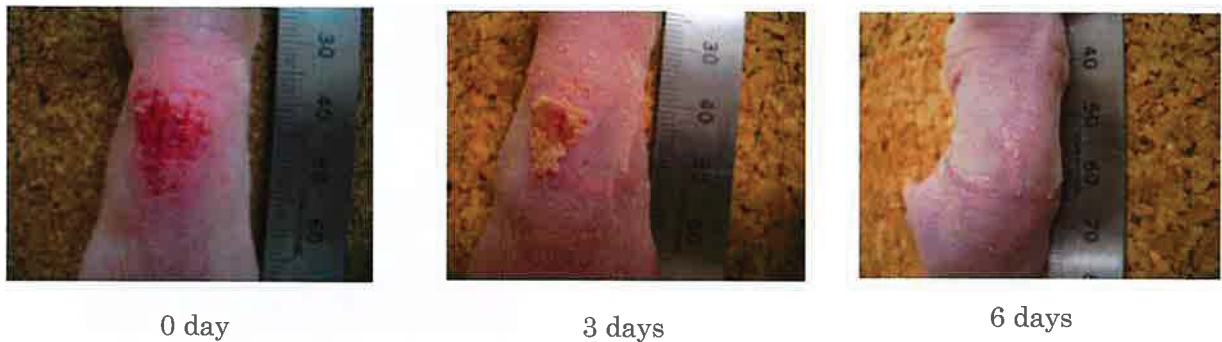


Fig. 8 Wound healing process using nanofiber mat of CS/SER/PEO (8/2/2).

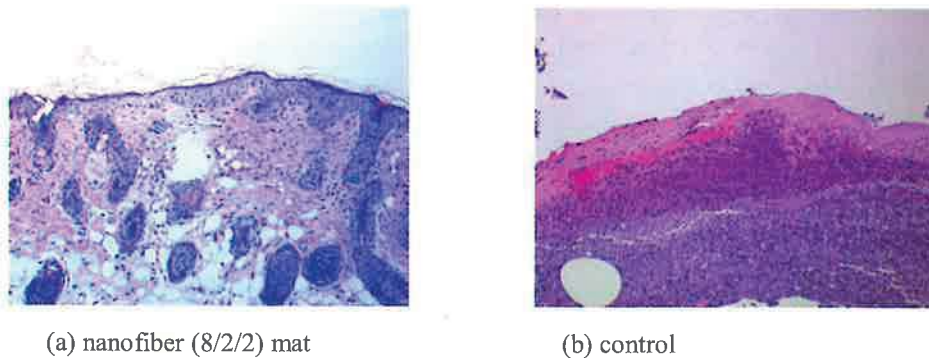


Fig. 9 Optical microscopic observations of cross-sections of skins treated with (a) NF(8/2/2) mat compared with (b) control after 6 days.

#### 参考文献

- [1] キチン、キトサン研究会編: “キチン、キトサンハンドブック”, p.228 (1995) 技報堂
- [2] Salem, D.R.: “Structure Formation in Polymeric Fibers”, p. 225 (2001) Hanser
- [3] Min, B.M., Lee, S.W., Lim, J.N., Lee, T.S., Kang, P.H., Park, W.H.: *Polymer*, **45**, 7137 (2004)
- [4] Bhattarai, N., Edmondson, D., Veisoh, O., Matsen, F., Zhang, M.: *Biomaterials*, **26**, 6176 (2005)

- [5] Muzzarelli, R.A.A. : "CHITIN", (1977) Pergamon Press
- [6] キチン、キトサン研究会編: "キチン、キトサンハンドブック", p.134 (1995) 技報堂
- [7] Tokura, S., Yoshida, J., Hishi, N., Hiraoka, T.: *Polym. J.*, **14**, 527 (1982)
- [8] Tokura, S., Nishimura, S., Nishi, N., Nakamura, K., Hasegawa, O., Sashiwa, H., Seo, H.: *Sen-I Gakkaishi*, **43**, 288 (1987)
- [9] Hirano, S.: *Macromolecular Symposia*, **168**, 21 (2001)
- [10] 平野茂博: *BIO INDUSTRY*, **19**, 62 (2002)
- [11] 桜井謙資, 宮田應則, 高橋利禎: 繊維学会誌, **46**, 79-81 (1990)
- [12] 桜井謙資, 北田和之, 高橋利禎: 福井大工研究報告, **37**, 173-182 (1989)
- [13] 草桶秀夫, 松井典子, 坪倉幸男, 桜井謙資: 繊維学会誌, **46**, 109-114 (1990)
- [14] 桜井謙資, 上田賢司, 高橋利禎: 膜, **16**, 347-351 (1991)
- [15] 桜井謙資, 上田賢司, 高橋利禎: 膜, **16**, 352-355 (1991)
- [16] Wu, Y., Seo, T., Sasaki, T., Irie, S., Sakurai, K.: *Carbohydr. Polym.*, **63**, 493 (2006)
- [17] Wu, Y., Hisada, K., Maeda, S., Sasaki, T., Sakurai, K.: *Carbohydr. Polym.*, **68**, 766 (2007)
- [18] 清水美智, 川南仁史, 吳玉松, 谷川純一, 佐々木隆, 桜井謙資: キチン・キトサン研究, **14**, 124 (2008)
- [19] キチン、キトサン研究会編: "キチン、キトサンハンドブック", p.338 (1995) 技報堂出版
- [20] Uragami, T., Tokura, S.: "Material Science of Chitin and Chitosan", 113 (2006) Kodansha
- [21] Katoh, N., Satoh, S., Yamanaka, A., Yamada, H., Fuwa, N., Nomura, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 145 (1998).
- [22] K. Sakurai, T. Maegawa and T. Takahashi: *POLYMER*, **41**, 7051-7056 (2000)
- [23] 桜井謙資: 特許, 第 4821004 号 (2011)

## 謝 辞

キトサン試料をご提供して頂いた大日精化工業株式会社, CM-キチン, サクシニル CM-キトサンをご提供して頂いた北海道曹達株式会社, また, セリシンをご提供して頂いたセーレン株式会社にお礼申し上げます。

また, 電界紡糸装置試作に大変お世話になりました技術職員の辻正晴氏に, 創傷治癒実験にあたりご協力を頂きました本学医学部の三好憲雄先生に深く感謝いたします。さらに, 卒論・修論として多くの実験に不断の努力を傾けて頂いた本研究室の多くの卒業生の皆さんに心より感謝申し上げます。



