

合成ポリマーの表面改質による新しい 細胞接着性スキャフォールドの開発

戸倉 清一、谷本 憂太郎、藤村 俊秀*、瀬尾 寛、佐々木 恒治**、山田幸司、久保木 芳徳、
北海道大学・院・地球環境科学研究所

*株式会社ショウワ

**北海道マイクロエナジー

戸倉等は、合成高分子化合物と天然高分子化合物との共通溶媒を探求する過程で、ナイロン繊維の表面にキチンをコーティングする技術を開発した。この際の共通溶媒法（塩化カルシウム・2水塩飽和メタノール、又は臭化カルシウム・2水塩飽和エタノール）の応用によってナイロン繊維にキチンの誘導体であるキトサンをコーティングさせて抗菌性や、環境に有害な金属イオン吸着能を付与することが出来た。今後、この手法によればケラチン繊維、不溶性コラーゲン繊維、金属チタン繊維等にもキトサンをコーティングさせる可能性があり、新しい3次元再生医療用のスキャフォールドを創生する可能性が出てきた。

生体親和性は高いが物理的強度が低い
甲殻類の外壁支持多糖キチンを強度は高いが
生体親和性が低い合成高分子化合物の表面被
覆に使い 新しい細胞接着性スキャフォールド
を開発したい！！！！

しかし、甲殻類の外壁支持多糖キチンは生体親和性が高いにもか
かわらず結晶構造が強いため **不溶性で繊維やフィルムへの成形が
難しい** アミノ多糖である。

このアミノ多糖類に合成高分子化合物も溶解できる新しい溶媒
(**共通溶媒**) を見付けたい！！！！

製造されたキチン繊維やフィルムからメタノール顔料を消去して
医用関連の用途を！！！！

ビスコース法で作られたキチン-セルロース繊維は生分解性に加えて抗菌性が良いので主に医学分野での被服として使われた。

ギ酸法で作られたキチン繊維は生分解性縫合糸に使えることが示めされている。

塩化カルシューム・2水塩飽和メタノール法で作られた繊維や膜は、メタノールが使われているため医用材や食用材には不向きであるが、他の用途には十分使用できる。また繊維や膜をエタノールに浸し蒸溜を繰り返してアルコール変性を促し生物用材料に変えることも考えられる。

臭化カルシューム・2水塩飽和エタノール法でキチンゲルを調製した場合、医用関連材料化することが可能になる。

キトサン (Chitosan)は食品廃棄物の甲殻類外壁の支持多糖キチンの脱アセチル化合物で、酢酸やアルギン酸等の酸性化合物と塩を作り水溶性になるアミノ多糖で生体親和性は高く、抗菌性や重金属イオン吸着性等の特性をを持ってはいるが繊維や膜などに加工しても物理強度、特に水中での強度が低い欠点を持っている。

一方合成高分子化合物は物理強度も高く溶解度も高いが生体親和性に欠ける欠点がある。この合成高分子化合物を生体親和性の高い天然高分子化合物で包接できれば細胞接着性スキャフォールド
が発現できることになる。

キトサンによるアルギン酸繊維の機能化

海藻多糖のアルギン酸紡糸の際、キトサンをコーティング或いは混
合性も繊維ポリ-乳酸に應用すれば、更に広いキトサンの應用が見込まれる。
多糖の機能化する簡単なプロセスで調製出来ている。キトサンを混合したアルギン酸
多糖の機能化はさらに簡単な紡糸法で繊維になる。これらのプロセスを
海藻多糖の機能化に適用すれば、更に広いキトサンの應用が見込まれる。
多糖の機能化はさらに簡単な紡糸法で繊維になる。これらのプロセスを
海藻多糖の機能化に適用すれば、更に広いキトサンの應用が見込まれる。

塩化カルシウム・2水塩飽和メタノール（CAS 溶媒）を使って調
製した異なる活性化も観察されるようになった。
塩化カルシウム・2水塩飽和メタノール（CAS 溶媒）を使って調
製した異なる活性化も観察されるようになった。
塩化カルシウム・2水塩飽和メタノール（CAS 溶媒）を使って調
製した異なる活性化も観察されるようになった。

DMF和キチンとポリウレタンとで出来るポリマーアロイを（DMF
を共通溶媒として）酵素処理してキトサンーポリウレタンアロイに変
えるプロセスも考えられている。

Coagulation systems for chitosan as filament

Previous processes

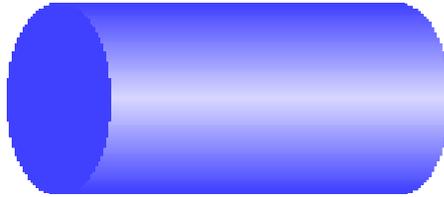
1. **Chitosan viscose method (finally chitosan viscose and cellulose viscose were mixed to prepare the chitosan fiber)**
2. **5-20%(W/v) NaOH aqueous solution : ethanol = 7:3 (v/v)**
3. **2M CuSO₄:1M H₂SO₄ = 1:1 (v/v)**
4. **2M CuSO₄:conc. NH₄OH = 1:1 (v/v)**

S. Tokura, S-I.Nishimura, N. Nishi, K. Nakamura, O. Hasegawa, H. Sashiwa, H. Seo, Sen-i Gakkaishi, 43, 288-293 (1987).

These processes are hard to maintain molecular weight of chitosan constant during spinning procedures due to drastic condition.

Various filaments from polysaccharides

1. Alginate



Dope soln.

Coagulation bath

Alginate in H₂O

3%CaCl₂ in H₂O

2. Chitosan

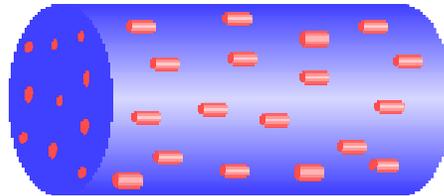


Chitosan in acetic acid

sat. CaCl₂ in H₂O/MeOH

New coagulation method

3. Chitosan oligomer - alginate



Chitosan oligo & Alginate in H₂O

3%CaCl₂ in H₂O

Mixed spinning

4. Chitosan coated - alginate



Alginate in H₂O

3%CaCl₂ & chitosan in H₂O

Simultaneous coagulation & coating

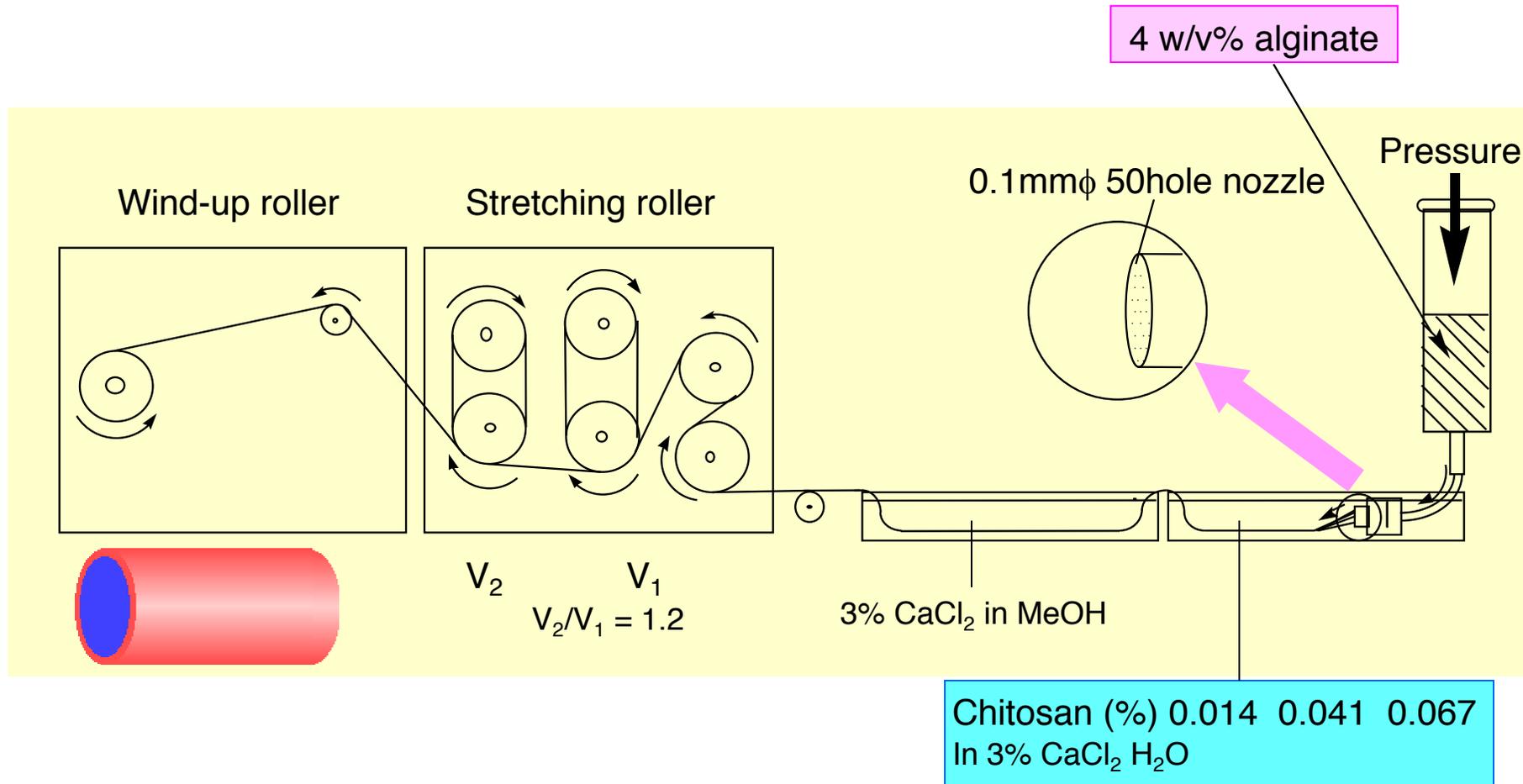
合成ポリマー表面を組織培養が可能な面に変換する

合成高分子化合物と天然高分子化合物とに共通な溶媒を探し出して、合成高分子化合物の表面を組織培養ができる面に変換する研究を提供する。

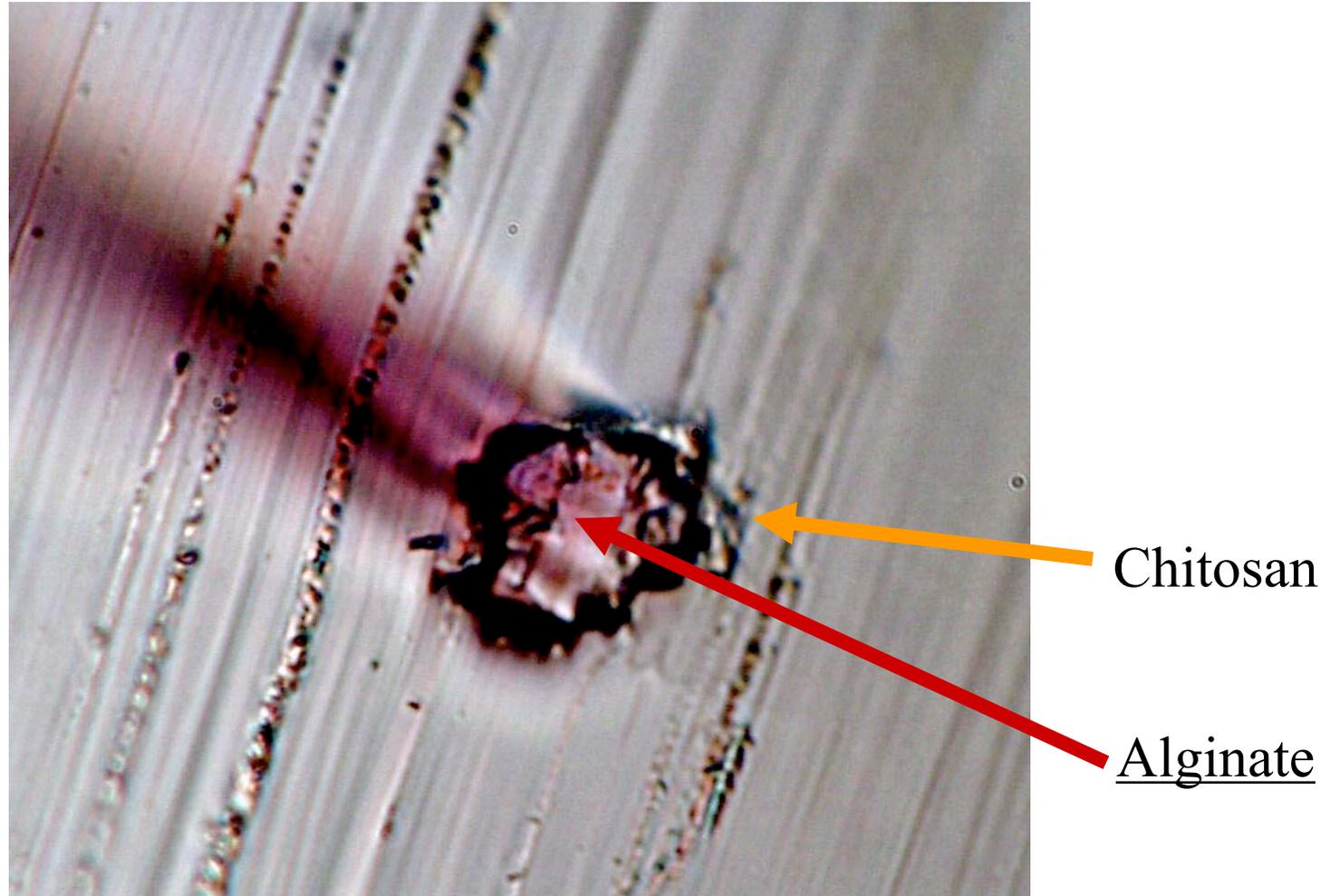
まず、ナイロンの表面にキチンの誘導体であるキトサンをコートすることにより、ナイロンに抗菌性や金属イオン吸着能を付与することができた。

この手法により、ゼラチン繊維や膜表面にもキトサンをコートする可能性が出ている。さらには、ケラチン繊維についても同じプロセスが期待できる。

Wet spinning of chitosan coated alginate fiber



Cut surface of chitosan coated alginate filament



Ninhydrin color development

キトサンコートしたアルギン酸フィルム、繊維、ビーズの 抗菌性と金属イオン吸着能

キトサンコートしたBCの作成： BC膜（ナタ・デ・ココ薄膜）を作成する際、培地にセルロース、酸性セルロース誘導体（例えばCM-セルロース、CM-キチン等）、マンニユロン酸等を加えて順応培養した酢酸菌で酸性BC膜を作りキトサンコートをする、抗菌性BC膜（食品包装材）が作成できる？ 養殖魚の餌・支持材として、家畜の餌包装材

ポリアクリル酸フィルムを、キトサンコートしてから γ 線照射しキトサンをポリアクリル酸フィルムに固定化して抗菌性フィルムや抗菌性水槽等を作る。ポリアクリル酸フィルムを作り部分的に酸クロリド化してキトサンを結合させて抗菌性表面を持つポリアクリル酸を作り出す。環境汚染物質（重金属類、タンパク質複合体等）を吸着するポリアクリル酸繊維、ビーズ、膜等を作り出す。ポリエチレン薄膜にコロナ放電或は γ 線照射してからキトサン溶液をスプレーしてキトサンを固定化することも可能である。

この膜をアセチル化してキチンコートポリアクリル酸膜とすることも可能である。！！！！

キトサンをコートしたフィルム、繊維、ビーズ等の作成-2

- リン酸化キチン調製に際して、ヘキサンやエタノールを溶媒とする温和な条件下でリン酸化が反応が進行した。
- リン酸化キチン、アルキル化キチンと共通溶媒を持つポリマーとを混合して均一分散させたポリマーアロイを熱アルカリで処理してキトサンに変え、重金属やタンパク質吸着型繊維、ビーズ、フィルム等にして環境汚染に備える。抗菌性素材として多くの利用が見込まれる。
- 未利用或は廃棄多糖類（セルロース、アセテート等）とキチン・キトサンをスチレンオキシドやブチレンオキシド等で架橋して溶融性（200-270°C）に変え、ポリプロピレン（融点240-280°C）等と混融しナイロン、ポリウレタン等と共融する際のマスターチップを作る。溶融紡糸、フィルム化
- ハイドロオキシアパタイトにリン酸化キチンを吸着させ多糖類やたんぱく質の不整型を選択吸着に應用する。また、この吸着で逆に不整型の推定をすることもできると思われる。リン酸化キトサンでは？
- 貝殻の粉末（炭酸カルシウム？）とリン酸化キチン或はリン酸化キトサンとを混合した場合、不整吸着（不斉吸着？）の流れは？リン酸化キチンの場合、アパタイトとはリン酸機とのみ相互作用がある。したがって、キチン性は残っている（酵素の吸着等）。一方、リン酸化キトサンの場合は？
- 溶融性ポリマーにキトサン粉末を混合して溶融展開してキトサン混入合成ポリマー膜を作り架橋剤やγ線照射してキトサンを合成ポリマー膜に固定化する。抗菌性合成ポリマー膜として食品包装材料に使用できる。
- ゼラチン繊維にキチンをコートして創傷カバー材への道を（共通溶媒の利用）
- ゼラチン水性ゲルにキトサン水溶液を混合し加熱溶解後ゲル紡糸で抗菌性ゼラチン繊維を作ること

高強度のナイロン繊維やネットに抗菌性や 重金属イオン捕集性を！！！！

キチンとナイロンには共通通溶媒（CAS：塩化カルシューム・2水塩飽和メタノール、或いは臭化カルシューム・2水塩飽和エタノール）があるので、**ナイロン繊維や膜などの表面をキチンでコーティングして合成高分子化合物のナイロン表面を生体親和性に変換できる。！！！！**

市販キトサンは70-80%脱アセチル化製品で20-30%はキチン領域で

キチンとナイロンには共通通溶媒（CAS：塩化カルシューム・2水塩飽和メタノール）があるのでナイロンーキトサン溶液でナイロン繊維やネットをコーティングできる。物理強度の高いナイロンに抗菌性や重金属イオン捕集能を持たせることが可能！！！！

キトサンーアルギン酸フィルム調製の例；

アルギン酸水溶液 2 - 4 % (w · v) を硝子板にキャストし、少時静置して脱泡し硝子板ごと凝個浴 (塩化カルシウム・2水塩飽和メタノール) に浸して凝固させる。2-3度メタノールで洗浄した後、キトサンー蔞酸希薄水溶液 (0.001%程度) を噴霧してキトサン薄膜を形成させる。この際、アルギン酸膜の一面は硝子板でブロックされているのでキトサン液には触れない。水洗後架橋剤を噴霧して40°C程度に過熱後水洗して架橋剤を洗い流して乾燥する。この場合、凝個浴の組成が問題になるが (メタノールの使用)、これは、塩化カルシウムの溶解度が高いメタノールの優位性のためである。塩化カルシウムー蒸留水系でも凝固する。これに対してアルギン酸水溶液2%にキトサンを加えて混合し架橋剤 (デナコール等) を加えた液を硝子板にキャスト後40°Cに加熱 (約1時間) して架橋を完成させることも可能である。両者について抗菌性を調べる。更にフィルム強度、加熱処理の影響 (例えば熱変性)、FT-IRスペクトル、紫外線透過性等を調べる必要がある。

養殖魚や家畜の餌として酒粕を使用する

対象とする酒粕は、トウモロコシや米麦類を使い数次の醸造と蒸留を経た残渣なので動物餌として使う場合栄養価バランスが不十分である。そこでゼラチンをバインダー兼栄養バランスーとして、キトサンを腐敗防止因子として使うことに出来た。従ってゼラチンは精製純度が低いクラス更には乾燥前の物で十分である。また、魚類を含む食用動物の内臓（湿潤状態）を加えることも考えられる。また、キチンの精製度が低い人工餌の場合には、ザリガニの甲殻に含まれるアスタキサンチンが錦鯉や鯛等の着色に効果が出ることを期待したものも考えられている。

酒粕主体の人工餌の輸送や貯蔵に際して湿潤状態では形態保持困難と考えられる。しかし、キトサンを混合しての抗菌性を考えた場合、乾燥度は形態保持を念頭にしたものでも十分である。

一方、ゼラチンの価格が高い場合、アルギン酸や澱粉で酒粕の形態保持を行い、最外殻部に薄いゼラチン膜を使うことも考慮すべきであろう。或は、バインダーにゼラチンを使い最外殻にアルギン酸等を使うことも考えられる。

酒粕の乾式紡糸（成形）テスト

キトサン溶液：キトサン10 g を400m l の蒸留水に懸濁しこれに20 g のクエン酸を加え加温下攪拌溶解させる。

ゼラチン溶液；ゼラチン10 g を100m l の蒸留水に懸濁し、40－60℃で攪拌溶解させる。

アルギン酸液；アルギン酸10 g を100m l の蒸留水に懸濁し、40－60℃で攪拌溶解させる。

澱粉溶液； 澱粉10 g を100m l の蒸留水に懸濁し、40－60℃で攪拌溶解させる。

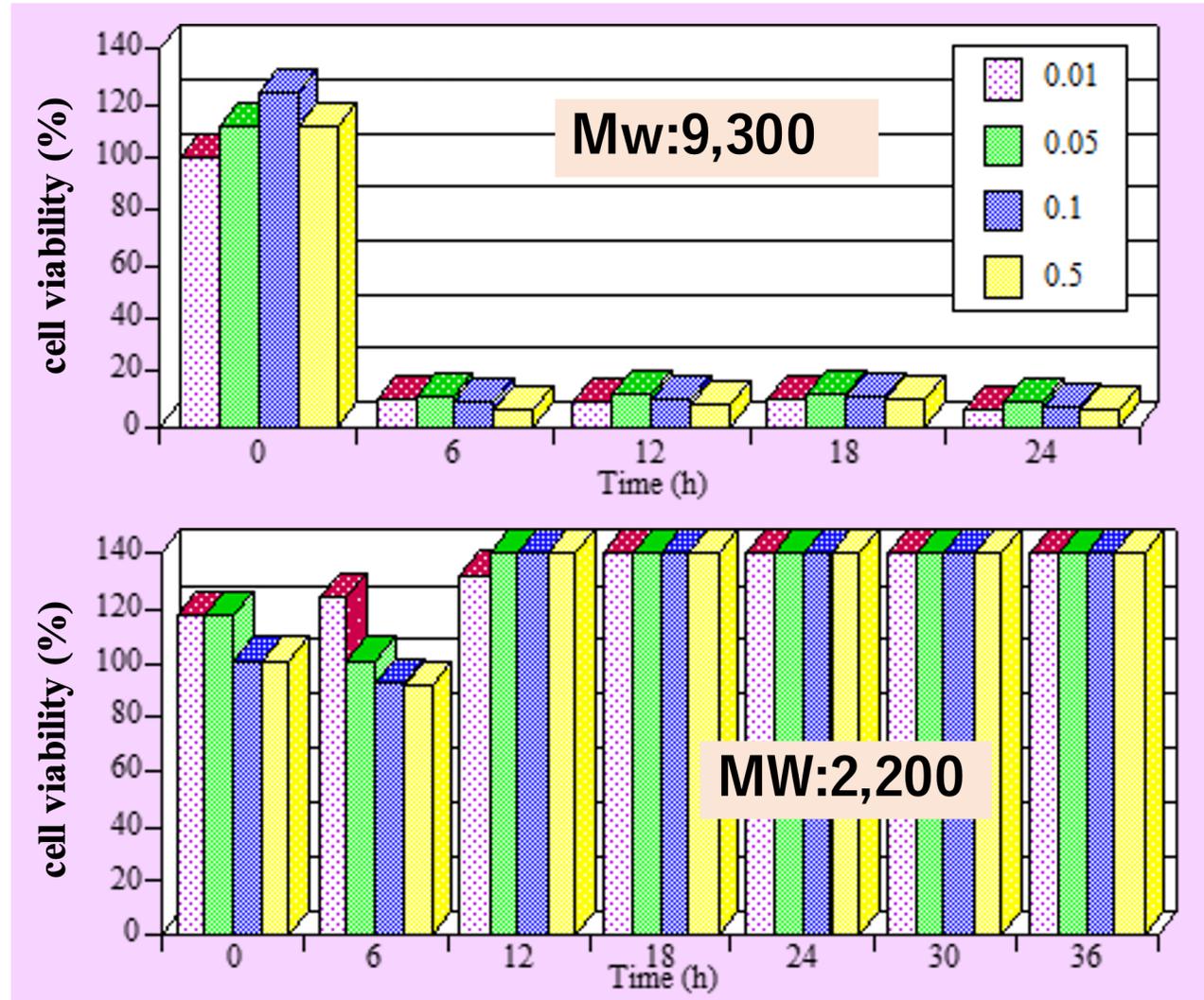
成形原液調整；キトサン溶液とゼラチン溶液（又はアルギン酸溶液か澱粉溶液）を混合し、これに酒粕1 k g を加えて60－80℃で練り合わせる。最終的にグリセリン20m l を加えて練り合わせ紡糸管に詰め60－80℃で10－20時間の減圧で脱泡操作を行う。

酒粕混液成形；脱泡された成形原液の温度を50－60℃に下げ半径2－5mmのパイプから空気中に押し出して固化させる。固化した棒状酒粕は10cm毎にカットして貯蔵する。

ゼラチンを成形原液に使わない場合、アルギン酸の場合は塩化カルシューム/50%プロパノール水で凝固させることが出来るので成形後に熱ゼラチン溶液をスプレーして外側をゼラチン薄膜でカバーすることも考えられる。澱粉形態保持の場合は、キトサン混合成形後加熱乾燥してから熱ゼラチン溶液をスプレーして外側をゼラチン薄膜でカバーすることが考えられる。

大腸菌の成育へのキトサン濃度及びその分子量の効果

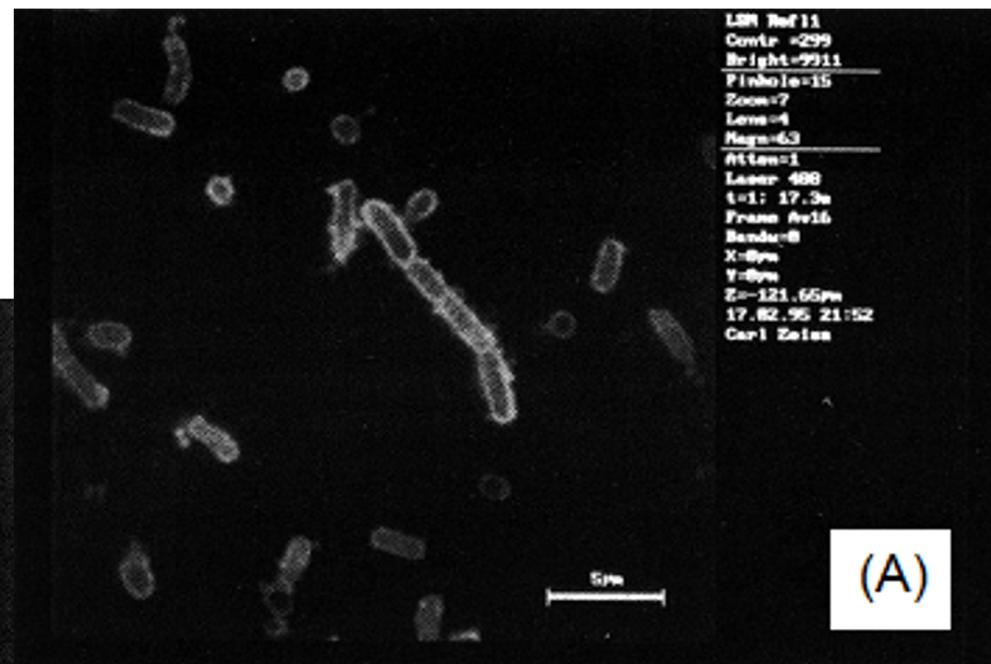
雑菌の繁殖を抑え
植物の生育を支援
するオリゴマーの
分子量域



植物の発根作用支
援、活性維持に働
く分子量域

蛍光ラベルしたキトサンのE.coliへの作用

(A) Mw 9,300 抗菌性あり
High anti-microbial activity



(B) Mw 2,200 抗菌性希薄
Poor anti-microbial activity

キトサン溶液の試験例

対象植物	キトサン溶液の使用法	結 果
コチョウラン シンビジュウム デンドロビウム エビネ ウチョウラン シュンラン セントポーリア	生育期に100培養液を10日毎に 生育期に100培養液を週一で 同上 100培養液を週一で 生育期に100培養液を10日毎 100培養液を灌水として 同上	腐敗例もなく、新芽が生育 根腐れなしで新芽が 黒斑病、軟腐病無しで新芽が 軟腐病、ウイルス感染もなしに 軟腐病、白絹病もなく生育 花命が伸びた 新芽が出来、花命が伸びた
バラ サツキ ゼラニウム キク チューリップ グラジオラス	80-100培養液水代わりに散布 同上 同上 同上 4倍液で球根を洗い、風乾して植 同上	ウドンコ病、黒点病、根頭癌病無し べト病、花腐れ病もなし 灰色カビ病、根腐れなく健康に 白さび病、黒斑病、褐斑病なしで 腐敗無しで根の成長10%増 同上
ダイコン キュウリ イチゴ エンドウ ピーマン トマト	6倍液で種子を洗い、風乾後植え 100倍液を10日ごとに散布 100倍液を果実、葉面散布 100倍液を灌水として定期散布 同上 同上	菊黄病、軟腐病無く健全に 灰色黴病、ウドンコ、黒星病なし 灰色果は収縮硬化し伝染せず 褐紋病、立枯病もなく清浄生育 疫病、斑点病もなく健全 葉カビ病が僅か発生
ポトス ベンジャミン	同上 同上	樹勢、葉色の改善あり 同上

キトサンオリゴマーによるウイルス制御の試み

センダイバイラスの活性を70%脱アセチル化キチン（市販のキトサン）で抑圧できることを見出した。

キトサン分子中に20-30%のキチン領域があるので、キチン分解酵素のリゾチームでキトサンを加水分解し分子量の異なるキトサンオリゴマー群を調製し、蛍光ラベルを付けて大腸菌への作用を蛍光顕微鏡で追跡したところ、分子量3,000以下のオリゴマー群は大腸菌の細胞膜を透過して大腸菌の活性を高めたが、分子量9,000以上のオリゴマー群は細胞壁に纏わりついて大腸菌の活性を阻害したことが示された。このような働きを、には鳥や豚にまつわるインフルエンザの活性制御に使うことを考えた。

これまで高分子量域のキトサンオリゴマーはウイルスの制御に加えて昆虫幼生の胎盤離脱阻害（孵化阻害も含めて）等で害虫の発生を抑えることが報告されている。また、放線菌の発生を促進して農業土壌の活性化をすることも知られている。又、低分子量域のキトサンオリゴマーは植物の発根を促進する作用等も報告されている。

新しい細胞接着性スキャフォードの製造へ！！！！

食品廃棄物に含まれる甲殻類の外壁構成多糖キチンの利用で環境汚染緩和を図るとともに

新しい細胞接着性スキャフォード創出の可能性を探る研究のきっかけになる可能性が高い