

セルロース系多糖高分子からのハニカム型薄膜の作製とその構造特性

近藤 哲男*

1. はじめに

1.1 セルロースとは

植物細胞壁の主成分であるセルロースは、地球上で最も豊富に存在する再生産可能なバイオマス資源である。セルロースの利用の歴史をさかのぼると、約5000年前にインドで木綿繊維が用いられ始めたのが祖とされる。人造繊維としても1884年フランスのChardonnetの硝酸セルロースからの人造絹糸の工業化が創始とみなされており、すでに100年以上の歴史がある。しかし、この高分子は生合成過程で結晶構造を形成し、熱的に安定であり広い用途に用いられる材料への加工は容易ではない。そのため、誘導体化による機能材料としての利用はあるものの、主に紙パルプや木質建材等に要求される構造材料的機能を中心として用いられてきた。1970年代からの石油危機から始まるエネルギー問題、そして80年代から地球環境の問題が大きく社会にクローズアップされ、これまでの機能を重視した材料設計の考え方に大きな転換が要求された。すなわち、バイオマスをエネルギー、または製品として活用することで、化石資源への依存を低減し、持続的に発展可能な社会を目指すことが現在求められている。そのためセルロースを有効利用していくことは、環境調和およびエネルギー循環の両方面において重要である。

セルロース分子(一次構造)は、グルコース残基が(1→4)- β グリコシド結合して直鎖状に結合したホモ多糖である。セルロース分子の両末端のグルコース残基は、中間の残基とは異なり片末端のC(1)位の水酸基は還元性を示すので還元性末端基、一方のグルコース末端基でC(4)位の水酸基は還元性を示さないので非還元性末端基と称する。グルコース残基は、3つの異なる極性を持つ水酸基(2,3位の2級、6位の1級水酸基:図1)を有しており、全て

*九州大学バイオアーキテクチャーセンターおよび大学院生物資源環境科学府 バイオマテリアルデザイン分野

の水酸基はグルコピラノース環に対して水平方向(equatorial方向)に配置され、一方、垂直方向(axial方向)にはC-H基が向くことになり、セルロースは分子内に親水性面と疎水性面の両サイトを有することになる(図1)^{1,2)}。この親水性と疎水性の両性の相乗作用によって結晶構造が形成される。親水性面が固体表面に現

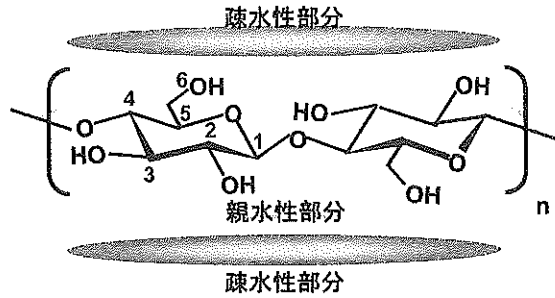


図1 セルロース一次構造と
その親水性部分と疎水性部分

れれば水と親和するが、疎水性面が表面に配列した場合、その表面はテフロン並みの撥水性を有する³⁾。このようにセルロース分子中のグルコピラノース面の向きを任意に変えることができれば、新しい性質を持った材料形成の可能性が見出され、さらにセルロースの有効利用につながることになる。このコンセプトを基に筆者らは、セルロースから、ナノ/マイクロスケールで構造を制御した材料形成に焦点をあて、得られる構造と機能との相関の検討を行っている。

最近、自己組織化を利用して、セルロース分子鎖の配向を制御したハニカムパターンを有するセルロースの薄膜を作製することに初めて成功し、さらにこの薄膜がユニークな性質を有していることが明らかになった^{4,5)}。本稿では、そのハニカム型セルロース薄膜の作製からその構造特性にいたるまでを紹介する。

1.2 自己組織化によるマイクロパターンの構築

多孔質高分子薄膜はマイクロエレクトロニクス、バイオテクノロジー、フォトニクスなどの様々な分野において有用であり⁶⁻⁹⁾、また、コンポジット材料の合成のための足場として、新しいマテリアルの創出のためにも使用されている。

多孔質薄膜は、主としてリソグラフィ等に代表されるトップダウン型ナノテクノロジーにより作製されてきた^{7,8)}。最近、このトップダウン型ナノテクノロジーに代わって、分子を積み上げてナノ、マイクロ構造を構築するボトムアップ型ナノテクノロジーを活用したナノ、マイクロファブリケーションが注目され、自己組織化を利用した多孔質薄膜の作製が行われるようになってきた。すなわち、高湿度中で高分子の希薄溶液を固体基板の上にキャストするか、または

W/Oエマルジョンを調製しキャストすることによって、多孔質薄膜の形成が見出された¹⁰⁻¹²⁾。高分子が水不溶の揮発性有機溶液に溶解され、周辺の湿度が高められると、潜熱を奪われた水は結露し、これが高分子溶液の界面に留まる。その後、溶媒が蒸発して水滴の周りに高分子だけが残り、結果として水滴を鋳型としたハニカム構造が形成される。この方法は、フォトリソグラフィのような多段階にわたる工程や、クリーンルームでの作業を必要しないため、簡便な作製法である。筆者らは、この分子の自己組織化法を利用して、三酢酸セルロース/クロロホルム溶液と水とのW/Oエマルジョンを調製し、親水基板上にキャストさせ、飽和水蒸気下でハニカム型三酢酸セルロース薄膜を作製し、これをアルカリ水溶液で脱アセチル化することによってセルロースのハニカム型薄膜を得た⁴⁾。

2. ハニカム型三酢酸セルロース薄膜

ハニカム型三酢酸セルロース薄膜の光学顕微鏡写真を図2に示す。この薄膜の調製は、まず三酢酸セルロース(WAKO Chemicals CO)を0.5 mg/mlの濃度になるようクロロホルムに溶解させ、この溶液5mlに、500mlの超純水を加え、超音波処理によりW/Oエマルジョンを調製する。このW/Oエマルシ

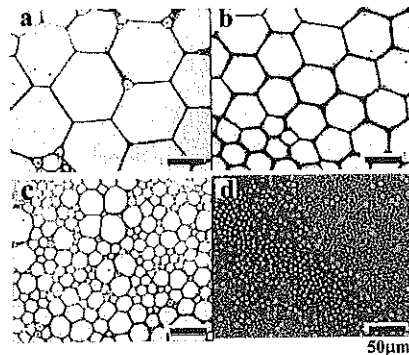


図2 ハニカム型三酢酸セルロースフィルムの表面構造

保持時間* : (a) 0min. (b) 1min. (c) 4min. (d) 10min.
*振とうしてから展開するまでの時間

ョン200mlをスライドガラス上に展開し、室温、飽和水蒸気下で放置することで、ハニカム型三酢酸セルロース薄膜が得られる。このW/Oエマルジョンは、超音波処理・振とうによって、クロロホルム中に水の粒子を分散させて調製する。これをガラス基板上に展開すると、水の粒子が鋳型となってハニカム構造が作られる。このとき、三酢酸セルロースは疎水性であり、乳化剤を加えていないため、エマルジョンは不安定である。そのため、大きな径の水の粒子は、比重の違いから浮上して凝集し、すぐに相分離を生じる。これは界面の表面積を減らして、界面自由エネルギーを低下させようとする作用から引き起こされる。粒子径が小さくなると、ブラウン運動の影響が現れるために、

液中に拡散され、凝集速度が遅くなる。そのため、小さい粒子径のものは液中に残ることになる。エマルション形成後ガラス基板への展開までの時間が長くなると、まだ系中に残存している水の粒子径の小さい鑄型が基板に形成され、結果として、ハニカム型フィルムの孔径は小さくなる。以上のように、エマルションの保持時間を変えることで、ハニカムの孔径(直径1-100 μ m)をコントロールできる可能性が示唆された。

3. ハニカム型セルロース薄膜

得られたハニカム型三酢酸セルロース薄膜を、室温下で14%アンモニア水溶液に2週間以上浸漬して脱アセチル化処理を行い、その後水洗した。脱アセチル化処理前では、このフィルムは、容易にスライドガラスから剥がれるが、処理終了後、再びスライドガラスに移しとると、アセチル基が水酸基に置き換わったことにより、ガラスとの親和性が増し、再び水につけても剥がれなくなる。

脱アセチル化の確認は顕微赤外法で行った。その経時変化に伴うスペクトル変化を図3に示す。脱アセチル化が進むにつれ、アセチル基由来のC=Oの伸縮振動(1753 cm^{-1})が減少していき、最終的にほとんどピークが見られなくなった。代わりにOHの伸縮振動(3400 cm^{-1} 付近)が増加していき、脱アセチル化が進行していることを示した。また、セルロースのグルコシド結合由来のC-O-Cの逆対称伸縮振動が1162から1158 cm^{-1} へシフトしており、酢酸セルロースのグルコース骨格から再生セルロースのグルコース骨格へと変化していることが示された。このように、ハニカム型三酢酸セルロース薄膜は完全に脱アセチル化され、ハニカム型セルロース薄膜が得られた。

このハニカム型セルロース薄膜を原子間力顕微鏡(AFM)で観察を行ったところ(図4)、脱アセチル化過程によるハニカムパターンに変化がなく、酢酸セルロース薄膜の構造が保持さ

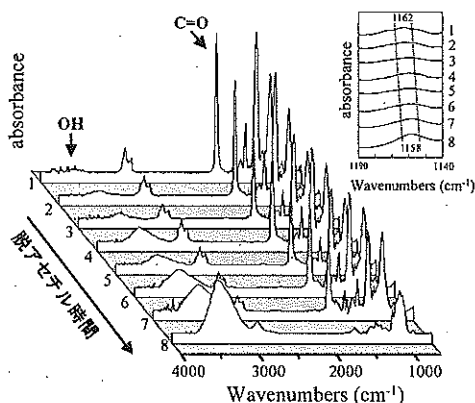


図3 脱アセチル化過程によるFT-IRスペクトルの変化
(1) 0hr, (2) 1hr, (3) 6hr, (4) 12hr, (5) 24hr, (6) 128hr, (7) 176hr, (8) 273hr
グリコシド結合のC-O-C逆対称振動のシフト (右上)

れていることが証明された。薄膜の膜厚はおよそ2-3mm、表面粗さは1mmで、表裏(空気側とスライドガラス面側)を観察すると、その構造は微妙に異なっていた。これはW/Oエマルジョン(特に水粒子)とスライドガラスとの間の相互作用によるものであると考えられる。

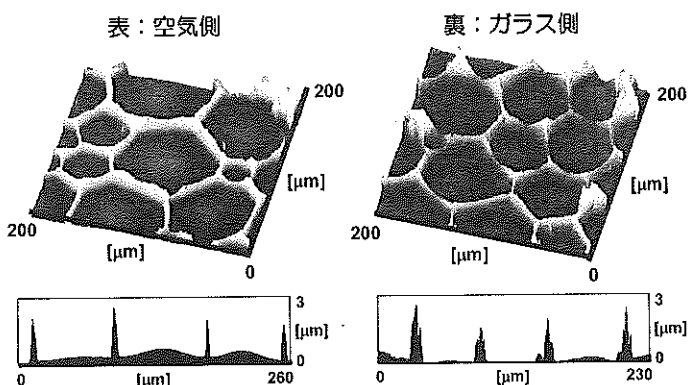


図4 ハニカム型セルロースフィルムのAFM像

次に、酢酸セルロースの脱アセチルプロセスがどの様に進行しているのか検討した。偏光顕微レーザーラマン分光を用いてハニカム骨格中のアセチル基に由来するCH₂とCH₃伸縮振動(2930cm⁻¹付近)の0°と90°の吸収バンドから強度比を、また図3の赤外スペクトルのC=Oの伸縮振動(1753cm⁻¹付近)の吸光度から置換度(DS)を求め、脱アセチル化の進行に伴ってこれらがど

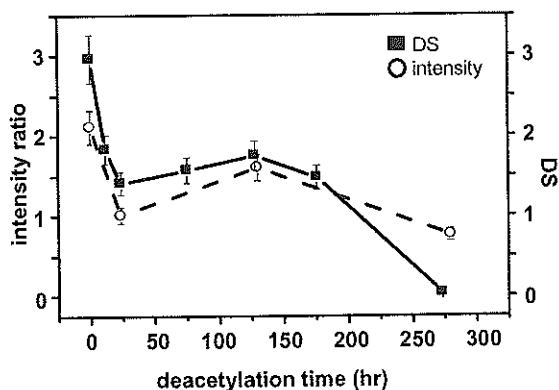


図5 脱アセチルに伴う強度比と置換度(DS)の変化

偏光顕微レーザーラマン分光よりハニカム骨格中のアセチル基に由来するCH₂とCH₃伸縮振動(2930cm⁻¹付近)の0°と90°の吸収バンドから強度比を、また図3の赤外スペクトルのC=Oの伸縮振動(1753cm⁻¹付近)の吸光度から置換度(DS)を求めた。

の様に変化していくのか調べた(図5)。脱アセチル化が進行するにつれて強度比が減少していき、しだいにアセチル基の配向が見られなくなったが、処理24時間後から176時間後の間でプラトーが現れ、強度比とDSとも変化がほとんど見られなかった。C(6)位とC(3)位のアセチル基はけん化されにくいことが報告されており^{13,14)}、脱アセチル化に時間がかかるためではないかと考えられる。さらに、ハニカム型三酢酸セルロース薄膜とその脱アセチル化により得られたハニカム型セルロース薄膜の両方の膜において、骨格中のセルロース分子鎖の配向を偏光顕微鏡観察により検討した(図6)。両薄膜は複屈折を示し、骨格部分が光学的に正

であったことからセルロース分子鎖がハニカム骨格の方向に沿って配向していることが示唆され、結晶性を有することが考えられたが、このセルロース薄膜を、7%の低濃度NaOH水溶液に浸漬したところ、完全に溶解した。通

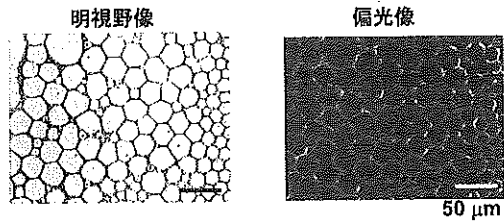


図6 ハニカム骨格中におけるセルロース分子鎖の配向

常、結晶セルロースは通常14%濃度のNaOH水溶液に浸漬しても、溶解せずに膨潤することから、この薄膜が結晶性であるとは考えにくい。さらに、X線反射法で両薄膜を測定したところ、共に非結晶に起因する散漫散乱(ハロー)のみが観測された。X線測定結果に関して、薄膜の厚さや空気散乱等の影響が考えられるために、薄膜が非結晶性であるこの結果からだけでは断定できないが、セルロース薄膜中のハニカム骨格について、セルロース分子鎖が良好に配向しているが、非結晶性を示すといったユニークな構造を有することは示唆された。

また、セルロースだけでなくキトサンをブレンドさせたハニカム型薄膜の調製を試みた¹⁵⁾。キチンはセルロースに次ぐ、豊富なバイオマス資源であり、N-アセチル-D-グルコサミンが(1→4)-βグルコシド結合した直鎖型の多糖類で、主にカニやエビの甲殻などに含まれており、キトサンはこのキチンを脱アセチル化したものである。生体に無害なため、これを使ってハニカム型薄膜が作製できれば更なる展開が考えられる。この場合、水相部分に超純水の代わりにキトサン酢酸水溶液を用いた。セルロース薄膜の場合と同様の方法でハニカム型フィルムを調製したところ、キトサンの濃度が高くなるにつれてハニカムの孔径が小さくなり、同時に均一になる傾向が見られた。キトサン濃度が0.1、0.2、0.3wt%では、ハニカムの径は50-100mmで、0.4、0.5wt%では10mm以下であった。これは、キトサンの濃度が高くなると水溶液の粒子がより細かく分散し、界面活性剤の役割を果たし、ハニカム構造形成に影響するためであると考えられる。このようにセルロースだけでなく他の多糖類でもハニカム型薄膜の創製が可能であることが示され、現在それらの応用を検討している。

4. 今後の展開 -3次元ハニカムセルロース膜の創製-

最近筆者らは、このハニカム型セルロース薄膜を足場として用いて、独自の3次元構造体の構築法を提案した。これは、高分子と生物体とのナノスケールでの相互作用に着目した方法である。つまり、得られたハニカム骨格上のみで、菌体外にセルロースナノ繊維生産機能を有する酢酸菌を

培養することによって3次元構造体を構築した。酢酸菌は、大腸菌の一種で、菌体外に40-60nmの幅を持ったバクテリアセルロースナノ繊維を分泌し、その際の噴出力を駆動力として、それぞれ菌体が通常培養液中で自由に動くことにより¹⁶⁾、緻密な網目構造を形成しゲル状の膜をつくる(図7)。これは食品の分野

でナタデココとして知られている。この酢酸菌をハニカム型セルロース薄膜上で培養したところ、ハニカム骨格の上のみ酢酸菌が走行することが分かった¹⁷⁾(図8)。なぜこのような現象が起こるのかについては、ハニカム骨格表面のセルロース分子鎖が配向しているが非結晶であるという特性が影響していると筆者らは考えている。この推定には、以下のような背景がある。これまで筆者らはネマチックオーダーセルロース(NOC)と呼ばれるセルロースフィルムテンプレートを開発しており¹⁸⁾、これがハニカム型セルロース薄膜と同様に、セルロース分子鎖が一方向に良好に配向しているが非結晶性を示す。さらにテンプレート表面において、配向しているグルコース環が表面に対してほぼ垂直に立っており、そのためグルコース環にエクアトリアル結合している水酸基もまた垂直に立ち上がる。その結果、表面に水酸基の親水性レールが形成されることになる。これをテンプレートにして表面で酢酸菌を培養すると、この親水性レールに沿って菌が走行する現象が見出された¹⁹⁾。これは、テンプレート表面の親水性レールと、生合成直後のセルロースナノファイバーとが強く相互作用し、これがアンカーと

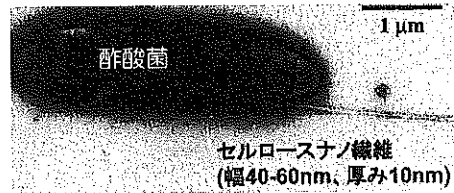


図7 酢酸菌と菌体外に分泌されたセルロースナノ繊維

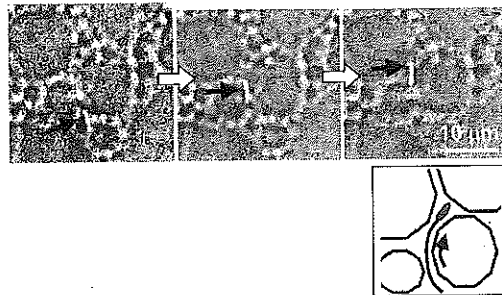


図8 ハニカム型セルロース薄膜上を運動する酢酸菌のタイムラプス像

なって酢酸菌の運動が制御されるという機構によるものであることが同時に示された。そのため、この産生されるバクテリアセルロースナノ繊維がレーンに沿ってエピタキシャル的に堆積されていき、足場の構造を維持したままビルドアップした3次元構造が自動的に構築されることになる。この一連の作用は、ナノスケールでの相互作用にはじまり、マイクロスケールでの3次元構造制御を可能にするものであった。すなわち、まず特定の方向に相互作用を促す足場をつくり、その上に酢酸菌を制御走行させると同時に、ナノサイズの繊維を積み上げていくというビルドアップ型プロセスを提案するものであった。上述のようにハニカム型セルロースフィルムでもまた、このプロセスが応用され、3次元ハニカム構造体が低エネルギーで自動構築される²⁰⁾。

以上のように、特異なナノ/マイクロスケールの2次元構造を有する足場をまず作製し、そのパターンの上のみ酢酸菌のナノ繊維分泌と走行方向が制御できることを明らかにした。この知見は、パターン化した足場と分泌ナノ繊維との強い相互作用によって、階層的に組織化された3次元構造形成を可能とする。このプロセスは、自然界ではたとえば植物の細胞壁形成などですでに存在するものであり、それを我々は人工的に行うことに成功したことになる。しかし、このプロセスを提案したばかりで、まだ展開の途にあり、今後、このユニークなナノ/マイクロ3次元構造と新規機能発現との相関をあきらかにする必要がある。それが可能となったとき、初めて、新しい環境調和型低エネルギープロセスとしての3次元構造材料の創製法を社会に提供できる。

参考文献

- 1) セルロース学会編:セルロースの事典、朝倉書店、p77 (2000)
- 2) 磯貝明編:セルロースの科学、朝倉書店、p2 (2003)
- 3) 岡島邦彦、吾郷万里子、平成17年度繊維学会予稿集、217(2005)
- 4) W. Kasai and T. Kondo, *Macromolecular Bioscience*, **4**, 17 (2004)
- 5) W. Kasai, T. Kondo, M. Morita, *229th American Chemical Society Meeting (ACS) Abstract*, CELL 58 (2005)
- 6) C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides and D. E. Ingber, *Science*, **276**, 1425 (1997)

- 7) S. Noda, A. Chutinan, M. Imada, *Nature*, **407**, 608 (2000)
- 8) C. Miller, H. Shankes, A. Witt, G. Rutkowski and S. Mallapragada, *Biomaterials*, **22**, 1263 (2001)
- 9) T. Nishikawa, J. Nishida, R. Ookura, S. -I. Nishimura, S. Wada, T. Karino, M. Shimomura, *Mater. Sci. Eng. C*, **C8-9**, 495 (1999)
- 10) G. Widawski, M. Rawiso, B. François, *Nature*, **369**, 387 (1994)
- 11) T. Nishikawa, J. Nishida, R. Ookura, S. -I. Nishimura, V. Scheumann, M. Zizlsperger, R. Lawall, W. Knoll, M. Shimomura, *Langmuir*, **16**, 1337 (2000)
- 12) A. Imhof, D. J. Pine, *Adv. Matr.*, **10**, 697 (1998)
- 13) T. Kondo, D. G. Gray, *J. Appl. Poly. Sci.*, **45**, 417 (1992)
- 14) P. Zugenmaier, *Cellulose Acetate: Properties and Applications*; P. Rustemeyer, Ed., Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004; p 88.
- 15) 笠井稚子、近藤哲男、森田光博 セルロース学会第11回年次大会要旨集 p17 (2004)
- 16) R. M. Brown Jr., J. H. M. Willison, C. L. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 4565 (1976)
- 17) 笠井稚子、近藤哲男、森田光博 平成16年度日本生物工学会大会要旨集 p221 (2004)
- 18) T. Kondo, E. Togawa, R. M. Brown Jr. *Biomacromolecules*, **2**, 1324 (2001)
- 19) T. Kondo, M. Nojiri, Y. Hishikawa, E. Togawa, D. Romanovicz, R. M. Brown Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 14008 (2002)
- 20) 笠井稚子、森田光博、近藤哲男 セルロース学会第12回年次大会要旨集 p1 (2005)