

エレクトロスピンニングによるキトサン・ナノ繊維の製造

吉川 毅, 金野 克美, 三田村智行, 大市 貴志, 澤山 一博, 長尾 信一
田中 勝*, 大熊 恒雄**, 石川 和裕**, 境 義勝**

Manufacturing Chitosan Nanofiber by Electrospinning Process

Takeshi KIKKAWA, Katsumi KONNO, Tomoyuki MITAMURA, Takashi OHICHI
Kazuhiro SAWAYAMA, Shinichi NAGAO, Masaru TANAKA*
Tsuneo OHKUMA**, Kazuhiro ISHIKAWA**, Katsuyoshi SAKAI**

抄 録

エレクトロスピンニングを用いて、ナノ繊維を自動作製するナノ繊維製造装置を開発した。本装置を使用して、キトサン・ナノ繊維成形体であるナノ繊維シートならびにカバーガラス製細胞培養基材を作製することができる。

また、キトサン・ナノ繊維成形体の評価方法について検討を行い、繊維径、繊維率、配向度、引張強度および1/2偏平強さの5項目によって、シート、チューブおよび細胞培養基材の物性評価を行う方法を確立した。

キーワード：エレクトロスピンニング、キトサン、ナノ繊維

Abstract

We have developed the nanofiber manufacturing apparatus, which produces the nanofiber automatically by the electrospinning process. Using this apparatus, we can manufacture chitosan nanofiber sheets and cell culture substrates which are made of the chitosan nanofiber cover glasses.

In addition, we have developed an evaluation method of the physical properties of the chitosan nanofiber sheet, the mesh tube and the cell culture substrate. This is done with the fiber diameter, fiber ratio, orientation, tensile strength and the 50% flat strength methods.

KEY-WORDS : electrospinning, chitosan, nanofiber

1 はじめに

蟹などから得られる海洋性キトサンは、天然高分子として生体親和性が高く、生分解性も有することから、生体組織の再生を促進する再生医療用材料として利用する研究が進められている。

一方、エレクトロスピンニングは、高分子溶液などに高電圧を印加することによって液をスプレーしつつ、溶媒を蒸発させることにより、電気的に紡糸する方法である(図1)。1930年代に報告された技術¹⁾ではあるが、近年、簡単にナノ～サブミクロンスケールの直径を持つ繊維を作製できる技術

として注目されている。

我々は北海道大学等と共同で、キトサン・ナノ繊維を再生医療用材料として応用展開することを目指し、経済産業省の地域新生コンソーシアム研究開発事業「キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発」(平成17～18年度)において、創傷被覆材、神経再生チューブおよび細胞培養基材などの足場材料の研究開発を行った²⁾。本報では、本研究開発の分担課題である、ナノ繊維製造装置の開発およびキトサン・ナノ繊維成形体の物性評価方法を検討した結果について報告する。

* 早坂理工(株)

* Hayasaka RiKoh Co.,Ltd.

** 北海道曹達(株)

** Hokkaido Soda Co.,Ltd.

事業名：外部資金活用研究

課題名：キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発

2 ナノ繊維製造装置

エレクトロスピンングを用いて、ナノ繊維シートを自動的に作製する装置を試作開発した。開発に際しては、ナノ繊維の用途開発に対応できる十分なシート作製能力を備え、かつ、研究用途向けに様々な作製条件が設定できるように配慮した。以下に、本装置の概要を述べる。

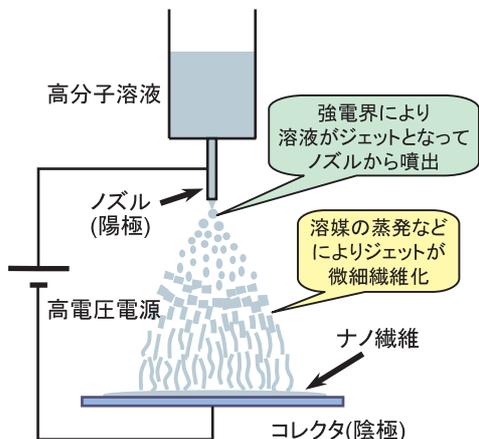


図1 エレクトロスピンングの原理

2.1 装置の構成

開発したナノ繊維製造装置は装置本体、操作制御盤、ユニット型温湿度空気供給装置、耐酸ファンとコンパクトスクラバーから構成される。

本研究では、キトサンをTFA（トリフルオロ酢酸）に溶解した溶液をエレクトロスピンングに用いている。このため、製造環境条件および空気清浄度を維持するために、装置本体をクリーンブース化して温湿度空気供給装置を設置し、TFAの蒸発ガス処理用としてコンパクトスクラバーを設置している。また、装置構成部材はステンレスを多用するなど、耐腐食、耐酸性に配慮した。図2および図3に装置の主要構成と全景を、図4に回転電極を用いたエレクトロスピンングの様子を示す。

[主な仕様]

- ・全体寸法： 幅4.5×奥行1.5×高さ2.1(m)
- ・使用電源： AC100V および AC200V 3相
- ・高圧直流電源： 0～30kV（操作制御盤で設定・表示）
- ・本体
 - ノズル： 金属ニードル（内径0.5, 0.8, 1.0mm）
2個 取付可能
 - シリンジポンプ： ステッピングモータ駆動、PLC制御
ガラス製シリンジ 20ml（内径18.85mm）
シリンジ筒数 2筒 取付可能
吐出量設定 0.01ml/h～5010ml/h(1.39ml/s)

内径18.85mm使用時

- コレクタ電極： 平面電極，回転電極
 - 平面電極 幅180×高さ130(mm)，SUS304製
 - 回転電極 直径100×長さ150(mm)，SUS304製
 - 回転数 30～3000回転/分
 - ブラシレスDCモーター(定格出力200W)
- 電動スライダ駆動により電極を上下・左右移動可能
 - 上下： 平面電極のみ移動可能
 - 移動幅 最大150mm
 - 移動速度 最大300mm/s
 - 左右： 平面電極，回転電極共に移動可能
 - 移動幅 最大200mm
 - 移動速度 最大100mm/s
- ・操作制御盤： JIS規格準拠 自立型
タッチパネルディスプレイによる運転操作
- ・ユニット型温湿度空気供給装置
 - 温度制御範囲0～50，湿度制御範囲30～95%RH
 - プレフィルタ，HEPAフィルタ（0.1μm 99.97%）
 - 装置本体内部クリーン度 CLASS 1000相当以下
 - 初期運転時にノズル付近で測定した結果である。
- ・コンパクトスクラバー（耐酸ファンを含む）
硬質塩ビ製，ブース内部のガス浄化・排気
- ・安全対策： 本体スライド式ガラスドアに安全スイッチ付

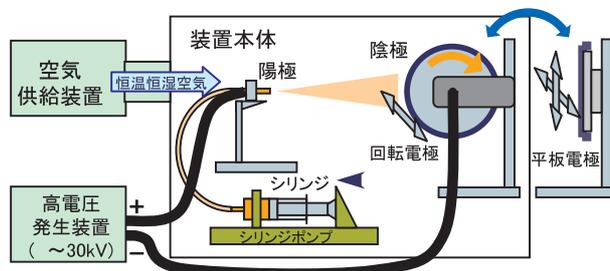


図2 ナノ繊維製造装置の主要構成



図3 ナノ繊維製造装置 全景

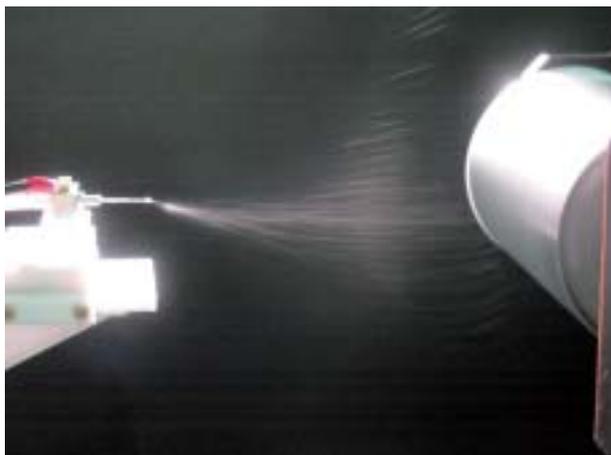


図4 エレクトロスピンニングの様子（回転電極使用）

2.2 キトサン・ナノ繊維成形体の作製

本装置を使用して、ナノ繊維シートならびにカバーガラス製細胞培養基材のキトサン・ナノ繊維成形体を作製することができる。

・ナノ繊維シート

ナノ繊維シートは平面電極または回転電極を使用して作製され（図5）、再生医療用の創傷被覆材や神経再生チューブの素材として使用することを検討している。本シートの作製に際して、平面電極の場合は上下・左右方向に、回転電極の場合は左右方向に電極を往復移動させることにより、ナノ繊維シートの厚さおよび密度の均一化を図る。

また、図4に示した回転電極の場合は、回転ドラムの周速度を変えることにより、繊維が同一方向に配向するものからランダムなものまで、幅広い性状のシートが作製可能である。

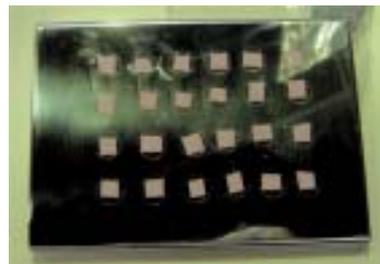


（電極表面に取り付けたアルミ箔上に固定化）

図5 キトサン・ナノ繊維シート

・カバーガラス製細胞培養基材

平面電極に細胞培養基材用のカバーガラスを貼付した状態でエレクトロスピンニングを行うことにより、所定量のキトサン・ナノ繊維をカバーガラス上に直接、固定化する（図6）。この際、平面電極を上下・左右方向に往復移動させてナノ繊維の固定量の均一化を図る。



平面電極上に
カバーガラス
（φ13mm）
を貼付



エレクトロスピンニング
によりキトサン・ナノ
繊維を固定化した状態

図6 カバーガラス製細胞培養基材の作製

3 エレクトロスピンニング条件の確立

エレクトロスピンニングによりナノ繊維を作製する時、溶液濃度、電極間電圧、電極間距離、送液量、ノズル内径、雰囲気条件（温度、湿度）などが影響因子となる¹⁾。これらの作製条件を適切に制御することによって、常に良好で、かつ、必要とする形状のナノ繊維を得ることが出来る。

3.1 キトサン・ナノ繊維の作製条件

本装置を用いてエレクトロスピンニング試験を行った結果、キトサン・ナノ繊維は下記の諸条件下において良好に作製できることを確認した。なお、使用したキトサン原料を表1に示す。

表1 使用したキトサン原料（北海道曹達㈱製）

試料品番	脱アセチル化度 (DAc)	分子量 (Mw)	0.5%酢酸溶液 粘度
ZK-5	80%	439,000	15.4 mPa·s
AJK-2	92%	156,000	10.7 mPa·s
AJK	93%	249,000	15.7 mPa·s

・キトサン溶液

ZK-5 : 濃度9.6w/v% (TFA : DCM = 4 : 1)

AJK-2 : 濃度6.4w/v% (TFA : DCM = 4 : 1)

AJK : 濃度4.8w/v%, 6.4w/v% (TFA : DCM = 4 : 1)

DAc : 脱アセチル化度

DCM : ジクロロメタン (塩化メチレン)

・電極間電圧 : 12 ~ 27 kV

- ・電極間距離： 105 ~ 160 mm
- ・送液量： 1 ~ 8 ml/h
- ・ノズル径： 内径 0.5 ~ 1.0 mm
- ・温度： 25 ~ 35
- ・相対湿度： 25 ~ 35 %RH

なお、通常は電極間電圧20kV、電極間距離155mm、ノズル内径 0.5mmおよび送液量 2 ~ 8 ml/hの条件下で、キトサン・ナノ繊維の作製試験を実施している。

3.2 キトサン試料と雰囲気湿度の影響

キトサン分子量および雰囲気湿度が繊維化に及ぼす影響について試験を行った結果を以下に述べる。本試験における雰囲気温度は26 および29℃，相対湿度は29%，31%，33%，35%，40%の各条件下でエレクトロスピニングを行った。なお、電極間電圧20kV、電極間距離150mm、送液量 2 ml/h、ノズル内径 0.5mmを固定条件とした。

AJK-2とAJKを用いたキトサン溶液に対する湿度と繊維径の関係を図7に示す。相対湿度では、同じ湿度でも温度により空気中の水蒸気量が異なるため、ここでは絶対湿度を横軸として表した。

AJK-2、AJK共に、絶対湿度が高くなると繊維径が細くなるのが分かった。しかし、繊維の外観を顕微鏡で観察すると、繊維が細くなるにつれてビーズ状の玉が見られるようになり、良好な繊維が得られなかった(図8)。

図7の両図を比較すると、同じ絶対湿度ではAJKの方が繊維径は太いことが分かる。キトサンをエレクトロスピニングした場合、溶液粘度が高くなると繊維径が太くなると報告されている。本試験で使用したキトサン(表1を参照)においても、AJKはAJK-2よりも溶液粘度が高いことから、繊維径が太くなったと考えられる。

また、絶対湿度が低くなるとノズル先端に鞘状の液ダレが付着する(図9)。これが大きく成長すると先端より脱落してコレクタ電極へ飛び散るため、繊維上に液滴が付着する原因となる。この液ダレ除去の対策として、ノズル上方にエアブローノズル(図9)を設置して適時、液ダレの除去を行うこととした。

このように、良好な繊維を得るためには、キトサン分子量の管理と共に、装置内の湿度コントロールが重要であることが分かった。

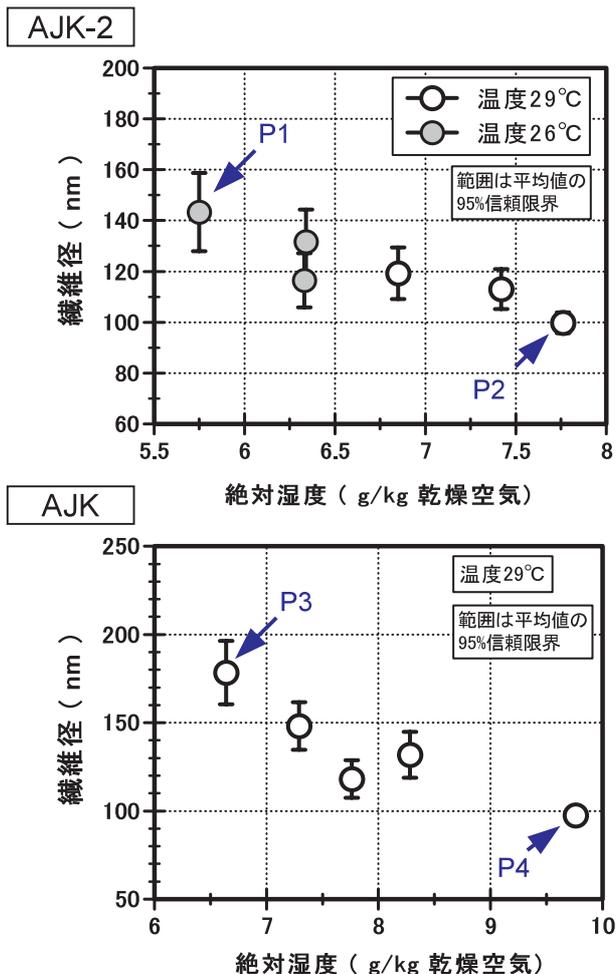
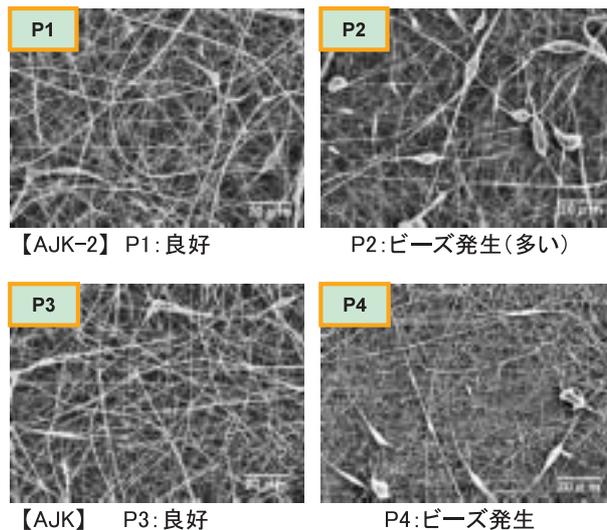


図7 湿度と繊維径



注. P1 ~ P4は図7中のP1 ~ P4に対応

図8 湿度と繊維状態

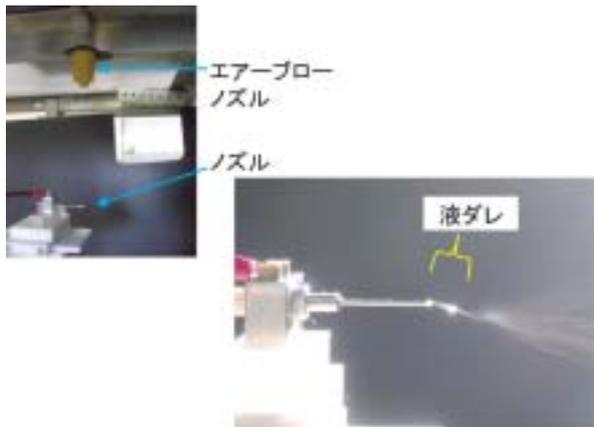
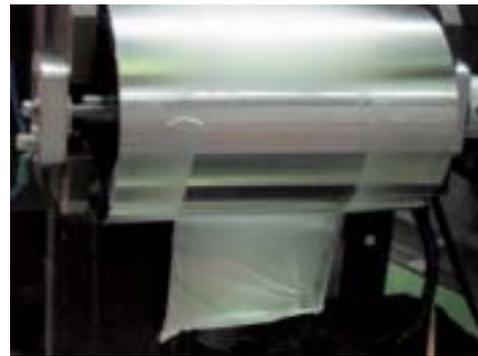


図9 鞘状の液ダレ・エアブローノズル



(一部を電極表面から剥離させて撮影)
周速度 10.6m/s (回転数 2024rpm)

図10 回転電極に付着したキトサン・ナノ繊維

4 配向化技術の開発

回転電極を高速回転させた状態でエレクトロスピンングを行うことにより、同一方向に配向したナノ繊維シートを作製できる。図4に回転電極へのエレクトロスピンングの様子を、図10に回転電極に付着したキトサン・ナノ繊維を示す。

ここで、ナノ繊維がどのように電極上に配向するかを確認するために、回転電極の回転数、即ち、周速度を変化させてキトサン・ナノ繊維シートを作製し、電子顕微鏡により観察した。本試験には、キトサン(AJK, DAc93%)をTFAとDCMの混合溶液(TFA : DCM = 4 : 1)で溶かして濃度6.4 w/v%としたキトサン溶液を用い、電圧23kV、電極間距離155mm、送液量4ml/h、電極の周速度0~15.7m/secの条件でエレクトロスピンングを行った。図11に、周速度0.2m/sおよび15.7m/sにおいて作製されたキトサン・ナノ繊維のSEM画像を示す。

周速度が遅い0.2m/s (回転数34rpm)時は繊維に配向性が見られない無配向な状態であるが、15.7m/s (回転数3000rpm)時は明らかに一定方向に繊維が配向しているのが分かる。なお、詳細については本紙の研究ノート¹⁾を参照されたい。

このように、回転電極の回転数を制御して周速度を変えることにより、配向・無配向と様々な繊維状態を有するナノ繊維シートを作製できることが確認された。

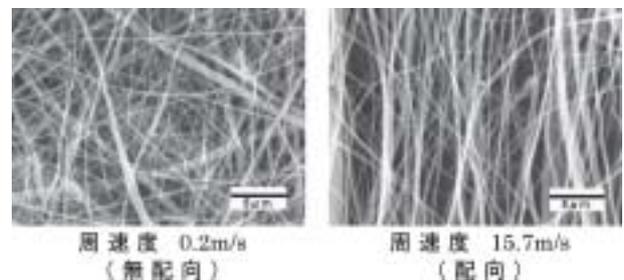


図11 回転電極により作製されたキトサン・ナノ繊維

5 物性評価方法の確立

ナノ繊維製造装置により所定のキトサン・ナノ繊維成形体を安定かつ大量に製造するためには、エレクトロスピンング条件を適切に管理すると共に、作製された成形体を定量的に評価することが重要である。そこで、キトサン・ナノ繊維成形体の作製方法の開発と並行して、物性評価方法の検討を行った。

5.1 繊維径

エレクトロスピンングにより作製されたナノ繊維の繊維径を測定するため、SEM画像を用いて画像解析ソフト(“A像くん”; 旭化成エンジニアリング株)の[針状物解析]を適用して測定した。図12に手動により繊維を選定した画像例を示す。図中の長方形で囲われた部分が選定した繊維の一部であり、この短辺の長さから繊維径を求めると。

この画像処理ソフトを使うことで繊維径の測定が可能となった。



画像解析ソフト「A像くん」を使用

図12 繊維径・配向度の測定例

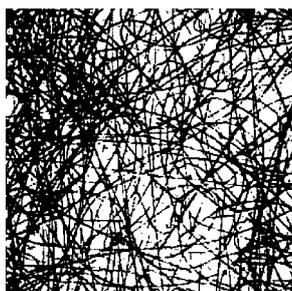
5.2 繊維率

細胞培養基材を作製する場合、基材に対する繊維固定量を定量的に管理する必要がある。しかし、ナノ繊維の質量は極めて小さく、かつ、固定量も微量であるため、質量では管理できない。そこで、基材に対してどのくらいの割合で繊維が固定化しているのかを数値化する方法を検討した。

顕微鏡で基材上の繊維を観察すると、繊維が基材より黒く見えることが分かった。そこで、得られた画像を2値化して繊維部分を抽出した後、画面上の黒(繊維)と白(基材)の各画素数の比率を「繊維率」と定義し、繊維の固定量を管理する数値とした。ただし、閾値の決め方によって2値画像は異なり、繊維率が変化するため、顕微鏡撮影条件や画像処理条件



繊維率 17.9%



繊維率 54.0%

図13 2値化されたナノ繊維画像と繊維率

を同一にする必要がある。図13に2値化されたナノ繊維画像と繊維率の事例を示す。

このように、繊維率によって細胞培養基材に最適な繊維固定量を決定することができる。

5.3 配向度

回転電極を高速回転させることでナノ繊維を同一方向へ配向させることが出来ることを述べたが、どの程度配向している(同じ方向を向いている)のかを表す必要がある。

前述の画像解析ソフトの[針状物解析]により繊維の方向を測定し(図12を参照)、尖度という統計的指標をもって配向度を評価できることを確認した。図14に、周速度と配向度(尖度)の関係を示す。なお、詳細は本紙の研究ノートを参照されたい。

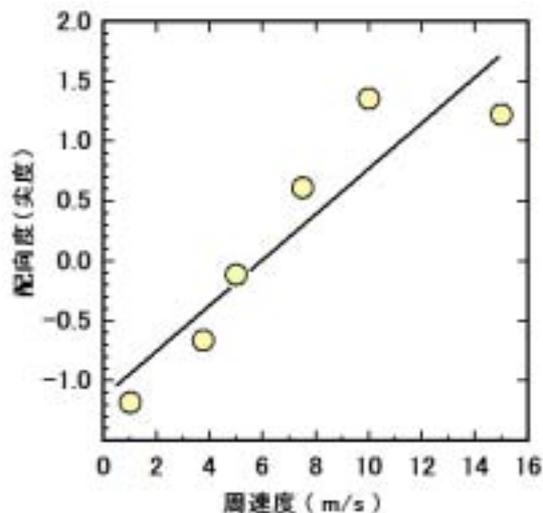


図14 回転電極の周速度と配向度(尖度)

5.4 引張強度

キトサン・ナノ繊維シートについて引張試験を行い、引張強度によって物性評価が可能であることを確認した。作製可能なシートサイズおよび試験機性能を考慮して、試験片は

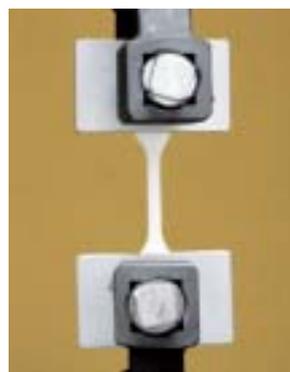


図15 ナノ繊維シートの引張試験

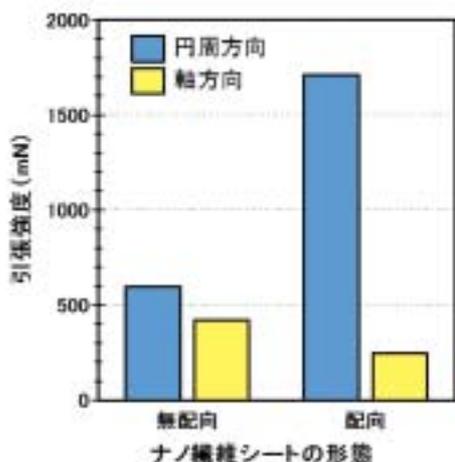


図16 キトサン・ナノ繊維シートの引張強度例

JIS K6251「加硫ゴムの引張試験方法」に規定のダンベル状6号形とし、打ち抜き刃により繊維シートから打ち抜いて作製した。図15に引張試験の様子を、図16に回転電極を用いて作製したシートの引張強度例を示す。詳細は本紙の研究ノート¹⁾を参照されたい。

5.5 1/2偏平強さ

神経再生チューブは、生体内に移植後、神経が再生するまでの間はチューブ形状を保つ必要があり、適度な圧縮強度が求められる。そこで、つぶれに対する耐力を評価するため、偏平試験を行った。偏平試験において、チューブの軸方向とは直角方向に幅15mmの圧子押し付け、チューブ内径が1/2 (0.6mm) つぶれた時の荷重を1/2偏平強さとした。図17に偏平試験の様子を、図18にチューブ形態 (作製方法の違い) による1/2偏平強さの事例を示す。この結果から、金属芯に直接、エレクトロスピニングを行ってチューブを作製するよりは、一度、ナノ繊維シートを作成し、それを金属芯に巻き付けてチューブを作製した方がつぶれに対する耐力があることが分かった。ただし、この場合は配向、無配向には差が見られなかった。

このように、1/2偏平強さによって神経再生チューブなどのナノ繊維成形体の圧縮強度を評価することができる。



図17 神経再生チューブの偏平試験

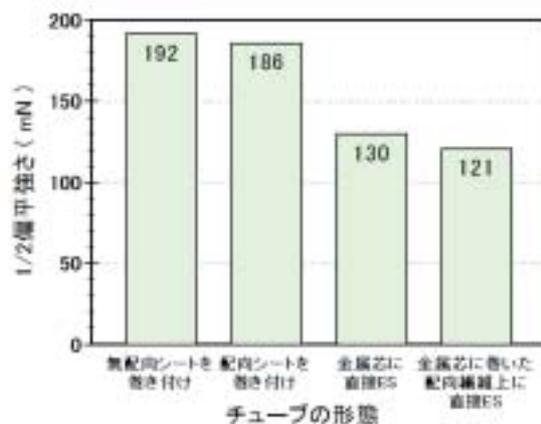


図18 チューブ形態による1/2偏平強さ

6 まとめ

エレクトロスピニングを用いて、ナノ繊維を自動作製するナノ繊維製造装置を開発した。本装置を使用して、キトサン・ナノ繊維成形体であるナノ繊維シートならびにカバーガラス製細胞培養基材を作製することができる。併せて、配向したナノ繊維シートも作製できることを確認した。

また、今回の開発対象である創傷被覆材、神経再生チューブおよび細胞培養基材の3つのキトサン・ナノ繊維成形体の評価方法について検討を行った。その結果、繊維径、繊維率、配向度、引張強度および1/2偏平強さの5項目により、これらのキトサン・ナノ繊維成形体の物性評価を行う方法を確立した。

本報告は経済産業省地域新生コンソーシアム研究開発事業 (平成17~18年度、「キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発」) により得られた成果をまとめたものである。

引用文献

- 1) A. Formhals, "Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads", U.S. Patent 1, 975, 504, 1934
- 2) 大熊恒雄・石川和裕・境勝義・松田篤・伊藤聡一郎・田中順三: キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発 - マトリックスの調整法 -, キチン・キトサン研究, Vol.12 No.2, pp.190-191, (2006)
- 3) 松田篤・城野理佳子・加々田剛・大熊恒雄・伊藤聡一郎・田中順三: キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発 - マトリックスの物性評価 -, キチン・キトサン研究, Vol.12 No.2, pp.192-193, (2006)
- 4) 伊藤聡一郎・王巍・大熊恒雄・松田篤・四宮謙一・秦維郎・田中順三: キトサン・ナノ繊維を用いた神経再生促進型マトリックスの開発 - in vivo 評価 -, キチン・

- キトサン研究, Vol.12 No.2, pp.194-195, (2006)
- 5) 王巍・伊藤聡一郎・大熊恒雄・松田篤・四宮謙一・田中順三・秦維郎：二重構造キトサンチューブを用いた神経再生実験, キチン・キトサン研究, Vol.12 No.2, pp. 219, (2006)
 - 6) 谷岡明彦：工業材料, Vol.51 No.9, pp29-33, (2003)
 - 7) 山下義裕：加工技術, Vol.40 No.2, 3, 4, 6, 7, 11, (2005)
 - 8) Kousaku Ohkawa, et al. : Electrospinning of Chitosan, Macromol. Rapid Commun., 25, pp.1600-1605, (2004)
 - 9) 大川浩作, 他 : Polymer Preprints, Japan Vol.55 No.1, (2006)
 - 10) 金野克美・吉川毅・三田村智行・大市貴志・澤山一博・長尾信一・他 : エレクトロスピンニングによるキトサン・ナノ繊維の配向化, 北海道立工業試験場報告, No.306, pp.159-163 (2007)