

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05916

研究課題名(和文) 樹木に学ぶバイオベースリンクル表面形成手法の確立

研究課題名(英文) Development of bio-based wrinkled surfaces inspired by woods

研究代表者

井澤 浩則 (IZAWA, Hironori)

鳥取大学・工学研究科・助教

研究者番号：50643235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトでは、研究代表者らが開発した『樹木に学ぶバイオベースリンクル表面形成手法』の確立を目指し『乾燥によってリンクルを誘起するスキン層の構造』及び『調製条件によってリンクルサイズが変化するメカニズム』の解明を行った。乾燥によるリンクルは、HRPの触媒作用によって生成したイオン架橋から成るスキン層によって誘起されることが明らかになった。また、リンクルサイズの変化は、調製条件によって生じるスキン層の弾性率の変化によって起こることが分かった。さらに、このスキン層の構造から着想を得てアニオン性高分子によるキトサンフィルム表面のイオン架橋を鍵とする新たなリンクル形成システムの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乾燥を駆動力とするリンクル形成手法の基盤技術の開発に成功した。溶媒の蒸発をトリガーとするリンクル形成手法の報告例は乏しかったが、世界で初めてリンクルのサイズとスキン層の弾性率との系統的な知見が得られた。また、新たに開発したポリイオンコンプレックススキン層によるリンクル形成システムは、乾燥によって誘起されるリンクル表面が、極めて簡単に調製できることを証明した。これらの研究成果は、微細構造表面の開発研究に大きな影響を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple approach for surface wrinkling of chitosan films. In the method, chitosan film is immersed in a solution containing phenolic acids and subsequent horseradish peroxidase-catalyzed reaction produces a skin layer. Upon drying, wrinkles in the micron-scale were gradually form via inhomogeneous shrinking of the surface. In this project, we investigated mechanism of the wrinkling system.

We revealed that wrinkle size with this system is predominately determined by the hardness of the skin layer, and the hardness in turn can be controlled by varying both the molecular structure of the phenolic acid and the immersion temperature. The crosslinking structure in the skin is composed of ionic bonding between chitosan and an oligophenolic residue. In addition, we newly developed a novel surface wrinkling system based on the fabrication of a polyion complex skin layer inspired by the mechanism of the above wrinkling system.

研究分野：高分子化学、材料化学

キーワード：リンクル キトサン 西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ スキン層

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

リンクル（しわ）は、動・植物や材料の表面に現れる凹凸の散逸構造であり、近年、このリンクル形成原理に倣った微細構造表面の形成手法が注目されている。一般的なリンクル形成手法では、スキン層形成は、化学蒸着、UV/O₃ 照射、プラズマ照射などドライプロセスで行われている。また、リンクル形成の駆動力としてよく用いられるのは、外部応力や熱膨張である。

研究代表者は、樹木の細胞壁のデザインに学び、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）を用いて樹木の細胞壁を模倣した硬いスキン層をキトサン（CS）フィルム表面に構築すると、水分蒸発によって微細なリンクル表面が誘起されることを発見した。また、フィルムの調製条件によってリンクルの成否やサイズが変化することが分かった。しかし、そのメカニズムは明らかになっていない。

2. 研究の目的

このような乾燥によって誘起されるリンクル表面の科学的知見は極めて少ない。そこで、本研究では、これまでの実験結果を基に製造条件を効率的に検討することでリンクルの成否とサイズに関する知見を収集する。それらの現象に関連するフィルムの化学構造及び物理的性質を明らかにすることで、『スキン層形成メカニズム』及び『リンクルサイズが変化するメカニズム』を解明する。それらを通して、乾燥によって微細なリンクル表面を構築する基盤技術を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

キトサン（CS）フィルムをフェノール酸（PH）のメタノール溶液に浸漬後（①浸漬）、フィルムを取り出し、水中で HRP と H₂O₂ で反応することによりスキン層を形成する（②スキン層形成）。そのフィルムを乾燥すると（③乾燥）、リンクルフィルムが得られる（図 1）。これまでに、PH の種類と浸漬工程の温度がリンクルの成否とサイズに大きく影響することが分かっている。そこで、これらの条件を網羅的に検討することで、リンクルの成否とサイズに関する知見を収集し、スキン層の構造解析及び弾性率を測定することで、メカニズムの解明を行う。

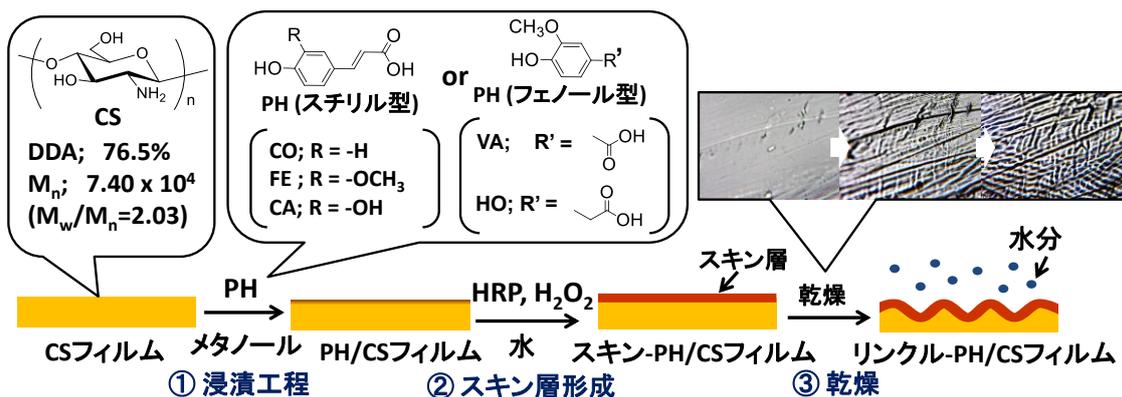


図1 HRPの触媒作用を用いるキトサンフィルム表面へのリンクル形成

4. 研究成果

リンクルフィルムの調製

図 2A-C は、『①浸漬』の処理を *p*-クマル酸 (CO)、フェルラ酸 (FE)、又はカフェ酸 (CA) を用いて 30、40、50、又は 60°Cで行うことで、得られたフィルムの表面の SEM 画像である。CO の場合、30°Cでは波長（リンクルの幅）約 1.5 μm のランダムなリンクル構造が見られ、温度上昇に伴い波長が徐々に短くなった。FE の場合、30°Cでは波長約 1.8 μm のランダムなリンクル構造が見られ、CO と同様に温度上昇に伴い波長が徐々に短くなった。CA の場合は、30°Cではリンクルが見られず、40°Cからリンクルが確認できた。その波長は約 22.4 μm と FE や CO に見られるリンクルよりも 10 倍以上長かった。また、CO や FE と同様に温度上昇に伴い波長が徐々に短くなった。ここでは詳細な数値の議論は割愛するが、全ての系において、振幅（リンクルの高さ）も波長と同様に浸漬温度の上昇に伴い低下した。

p-位の置換基の構造が異なる PH であるバニリン酸 (VA) とホモバニリン酸 (HO) を用いる 30°C又は 40°Cの浸漬処理にてリンクルフィルムの創製も行った（図 2D-E）。40°Cの浸漬処理では、VA と HO とともに、リンクルを確認できたが、HO を用いて 30°Cの浸漬処理で調製したフィルムでは、CA の場合と同様にリンクルの形成は見られなかった。

自然乾燥によってランダムなリンクルが生じる時は、乾燥によって発生する応力（乾燥応力）の方向が制限されない。すなわち、乾燥応力の方向は無秩序なのでランダムなリンクルが発生したと考えられる。一方、乾燥時に一軸方向に外部応力を加えると、外部応力方向への乾燥応力の発生が抑制されるので、外部応力方向に配向したリンクルが発生すると考えられる（図 3A）。そこで、一軸方向に外部応力を加えながらスキン-PH/CS フィルムを乾燥した。すると、予想通

り、リンクルの配向を応力方向に制御できることが分かった (図 3B-C)。また、外部応力の強さによってある程度リンクル波長が制御できることも分かった。

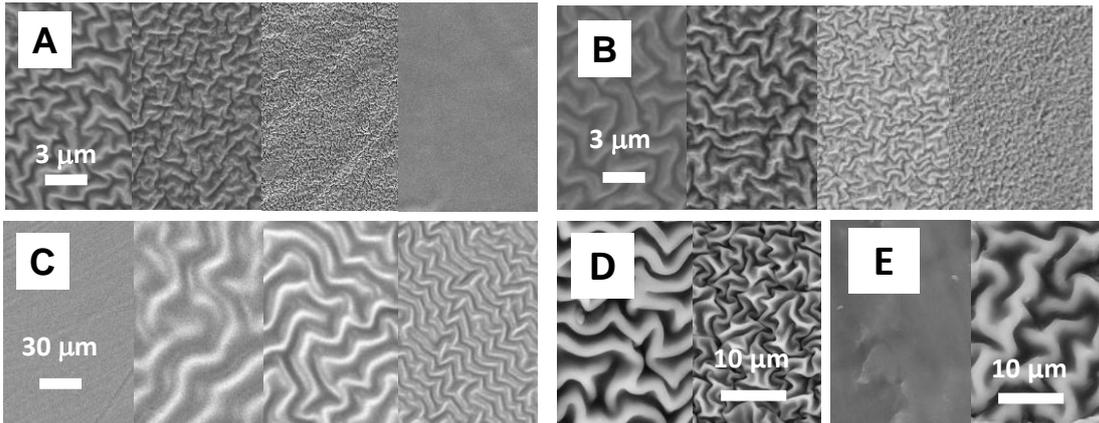


図2 CO (A)、FE (B)、及びCA (C) から得られたフィルム (左から浸漬温度が30、40、50、60°C) 及びVA (D)、HO (E) から得られたフィルム (左から浸漬温度が30、40°C) のSEM画像

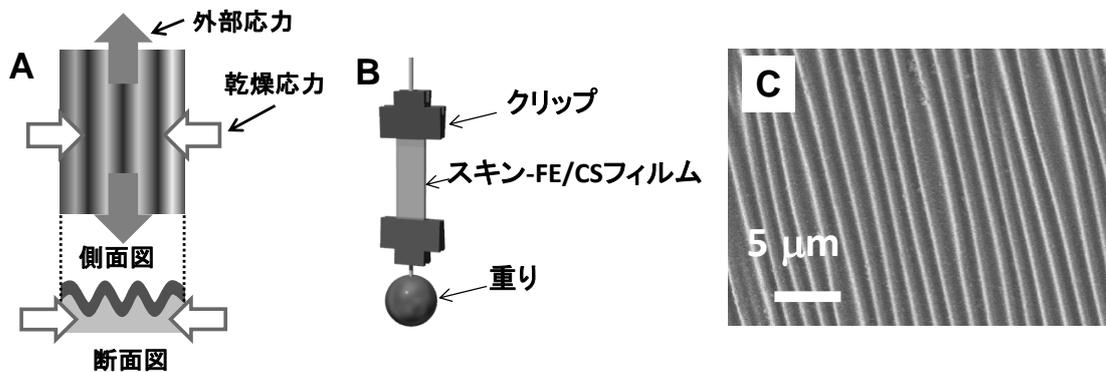


図3 外部応力による配向性リンクルの調製

スキン層形成メカニズムの解明

上の結果から分かるように、『①浸漬』における PH の種類と温度が、HRP を用いる手法におけるリンクルの成否とサイズを決定づける重要な因子となっている。ここで見られた現象を説明するために、浸漬工程後の PH/CS フィルムからソックスレー抽出によって PH を取り除き、十分に乾燥を行った後に ¹H NMR、IR、及び元素分析を行った。その結果、CS フィルムを PH のメタノール溶液に浸漬する工程で、PH と CS との間にアミド結合が形成することが明らかになった。一方、リンクル形成が見られなかった HO の 30°C の浸漬処理では、アミド形成が起きないことが IR 分析により確認された。これは、HO のカルボキシ基のみが二重結合と共役していないので、その反応性が低く、30°C ではアミド結合の形成が起きなかったと考えられた。一方、CA の 30°C では、CS とカテコールが反応することから、シッフ塩基やマイケル付加物が生成することが知られていることから、それらの反応が起こることによって、アミド結合で CA が固定化されなかったことが予想された。すなわち、リンクルが形成するには、『浸漬①』で、PH が CS に固定化される必要があり、それらが酵素反応の基質として働くことで、スキン層が形成されると考えられた (図 4)。

スチリル型の PH (CO、FE、CA) は、水中での酵素反応によってオリゴマーを生じるが、フェニル型の PH (VA、HO) では、構造上の制約によりダイマーのみが生成することが知られている。『①浸漬』後の PH/CS フィルムは、CS フィルムに固定化された PH の約 30-90 倍の PH を含んでいたことから、VA や HO の場合の『②スキン層形成』では、ダイマー側鎖が生成すると考えられる。PH の単独重合で得られるオリゴマーやダイマーを CS フィルム表面に吸着させても、リンクル表面が得られないことが確認されたことと、上述の通り、固定化された PH が存在しない場合は、リンクル形成が起こらないことから、スキン層の架橋構造は、酵素反応で生成するオリゴ PH 側鎖と CS とのイオン結合であると考えられた (図 4)。また、スキン層の厚さは 100 nm 程度であることが、SEM と TOF-SIMS 分析から確認された。

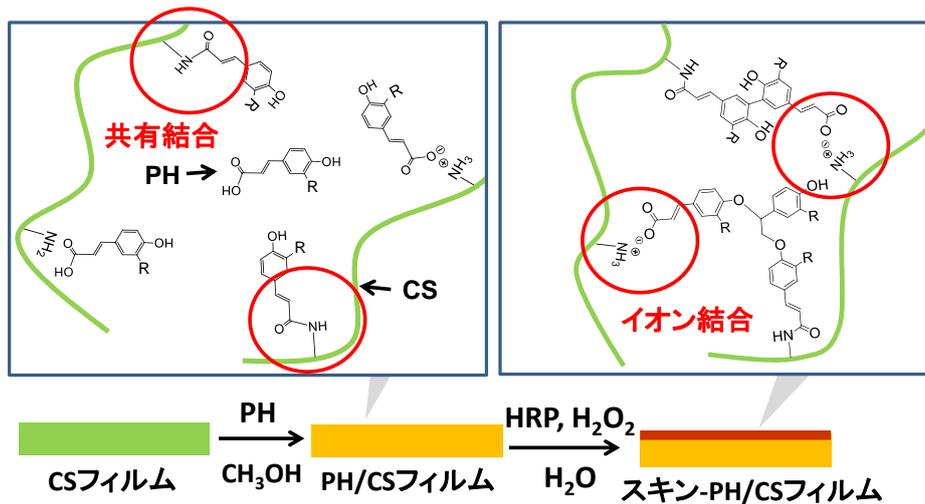


図4 スキン層の形成メカニズム。

リンクルサイズが変化するメカニズムの解明

上述の通り、得られるリンクルのサイズは、『①浸漬』での温度を上げると低下する。その理由は、スキン層形成メカニズムでは説明がつかなかった。そこで、リンクルの基本原理に立ち返って考察することとした。リンクル波長 (λ) は、一般的に下式で表される、

$$\lambda = 2\pi d \left(\frac{\bar{E}_s}{3\bar{E}_f} \right)^{\frac{1}{3}}. \quad (1)$$

d は、スキン層の厚さであり、 \bar{E} は、 $E/(1-\nu^2)$ で表される plane strain modulus である。 E と ν は、それぞれ、弾性率とポアソン比である。下付きの s と f は、スキン層と土台を意味する。一方で、リンクル振幅 (A) は、下式で表される、

$$A = d \left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_c} - 1 \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2)$$

ε と ε_c は、歪みと臨界歪みである。 ε_c は、下式で表される、

$$\varepsilon_c = \frac{1}{4} \left(\frac{3\bar{E}_f}{\bar{E}_s} \right)^{\frac{2}{3}}. \quad (3)$$

スキン層の厚さ (d) は、どの系でも 100 nm 程度であることが確認されている。ポアソン比は、高分子の架橋前後で大きく変化する値ではない。これらのことから、『①浸漬』の温度の違いによって、フィルムの弾性率に違いが生じたことが予想された。そこで、『①浸漬』後の PH/CS フィルムの引張り試験にて弾性率を測定した。その結果、全ての PH において浸漬温度の上昇に伴う弾性率の低下が見られた。PH はカルボキシ基を含む分子なので、浸漬工程における酸によるフィルムの分解が理由と考えられたので、GPC 測定にて CO/CS フィルムの分子量測定を行った。フィルムを酢酸緩衝塩水に溶解し、GPC 測定を行ったところ、CS フィルムと 30°C 浸漬及び 60°C 浸漬のフィルムであまり分子量に違いが見られなかった。そこで、分解が顕著と考えられるフィルム表面 10 μm からサンプルを削り取り、その表面サンプルの測定を行った。その結果、CO-メタノール溶液に浸漬した CO/CS フィルムは CS フィルムよりも低分子化され、30°C よりも 60°C の方がより低分子化が進行していることが分かった。このことから、浸漬工程におけるフィルム表面の CS の分解がスキン層の弾性率の低下を招くことが示唆された。さらに、微小圧縮試験機にてリンクルフィルムの表面硬度を測定した結果、浸漬温度の上昇に伴って徐々に表面硬度が低下することも確認された。これらのことから、『①浸漬』の温度を上げると、CS フィルム表面の分解が進行し、『②スキン層形成』後に生成するスキン層の弾性率が低下することが分かった。このスキン層の弾性率の低下が、リンクルのサイズの低下につながったと考えられる。これらの結果と考察は、自然界のリンクルの基本原則である式 (1)、(2)、(3) とも矛盾しない結果である。一方、CA/CS フィルムは、リンクル形成が見られた 40、50、60°C では、FE や CO よりも顕著に高い弾性率を示した。これは、前述の通り CA の場合はフィルム表面のアミノ基と CA のカテコール部位がシッフ塩基形成やマイケル付加を起こすことに起因すると考えられる。これらの反応が『②スキン層形成』でも伴うと考えられることから、CA では、FE や CO よりも硬いスキン層が形成すると予想される。すなわち、CA の場合、より硬いスキン層がリンクルサイズに影響したと考えられる。

新規なリンクル形成システムの開発

HRP を用いる手法では、スキン層のイオン架橋の重要性が強く示唆された。この事実から、アニオン性高分子による CS フィルム表面のイオン架橋にて、ポリイオンコンプレックス (PIC) スキン層を調製することで、より合理的にリンクル表面が得られると考えられた。そこで、汎用性の高いアニオン性多糖であるアルギン酸ナトリウム (AG) を用いる PIC スキン層の創製と乾燥によって誘起されるリンクル表面について研究を行った (図 5)。CS フィルムを、1.0 wt% AG 水溶液に 30°C で 24 時間浸漬し、余分に付着した AG を取り除くためにフィルムを純水に 30°C で 6 時間浸漬した。得られたフィルムを 40°C に設定した恒温オーブン中で乾燥することで、リンクル-AG/CS フィルムが得られた。図 6 は、異なる分子量の AG (80–120 cps 及び 300–400 cps、10 g/L、25 °C) を用いて得られたフィルムの SEM 画像である。80–120 cps の AG では約 1.1 μm のリンクルが見られた。それに対して、300–400 cps では、同程度の大きさの半球状の凹凸構造が見られた。このように、PIC スキン層を用いることで、リンクルと半球状の凹凸構造が作り分けできることが明らかになった。

この原因を調べるために、フィルム断面の光学顕微鏡観察を行った。リンクル構造が見られた 80-120 cps の AG では、0.7 μm 程度のスキン層が観察されたのに対して、300-400 cps の AG では、スキン層は観察されなかった。このことから、分子量の大きな 300-400 cps の AG は、CS フィルム内部に浸透しにくいので、80-120 cps の AG と比較してスキン層が薄いことが示唆された。リンクルとディンプルの関係式から、スキン層が薄くなったことで、乾燥応力 (σ) が低下し、半球状の凹凸構造が形成したと考えられた。

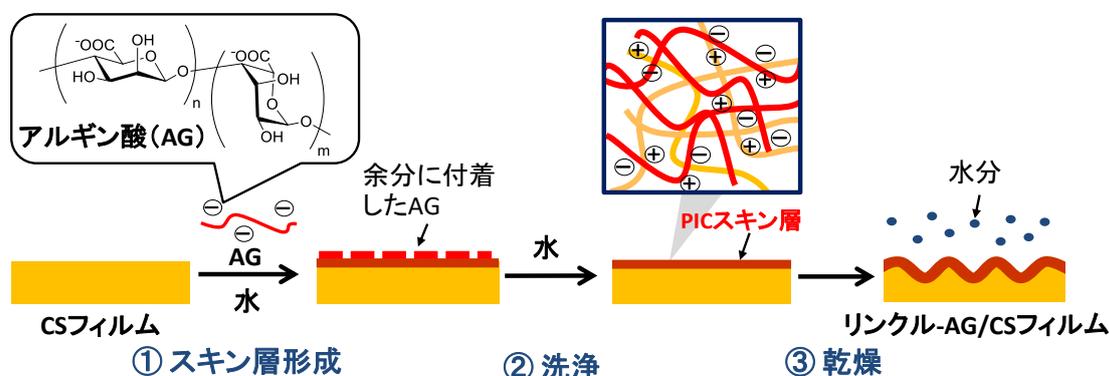


図5 PICスキン層を基軸とするキトサンフィルム表面へのリンクル形成

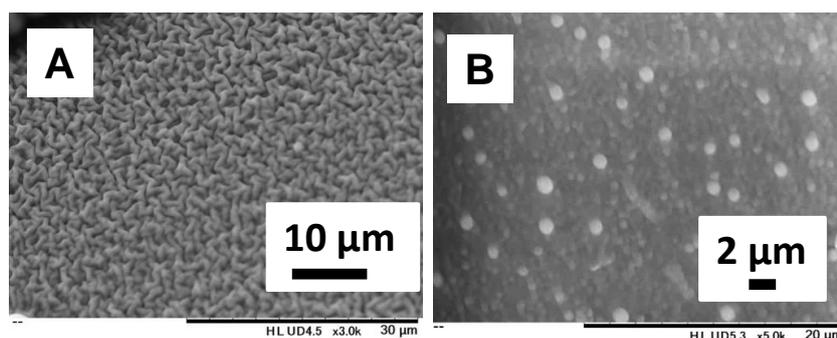


図6 異なる分子量のAG (80-120 cps; A、300-400 cps; B) を用いて得られたフィルム表面のSEM画像

リンクル表面での細胞培養

HRP を用いて得られるリンクル-FE/CS フィルムは、純水やリン酸緩衝液中でスキン層が水とされ、リンクル波長が長くなるが、リンクル自体は長期間保たれることが確認された。そこで、リンクル-FE/CS フィルム上でのダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いる 3T3 細胞の培養を行った。その結果、3T3 細胞がリンクル表面に接着し、増殖することが確認された。一般的に、正電荷と適度な疎水性が細胞接着を促進させることが知られていることから、CS の正電荷とオリゴ FE 側鎖の適度な疎水性が細胞接着に寄与したことが考えられた。また、培養 2 日後の細胞数は、ポリスチレンの細胞培養皿と同程度であることが分かった。興味深いことにこの細胞数は、同じ表面組成でリンクルを持たないスキン-FE/CS フィルム (HRP 処理直後の乾燥

前のフィルム)よりも高かった。リンクル波長(約3 μm)が3T3細胞(約50 μm)よりも小さいので、細胞と基材との接着面積の低下による細胞数の低下が予想されたが、リンクル-FE/CSフィルムは、リンクルがないスキン-FE/CSフィルムよりも良好な性能を有することが分かった。細胞は特定のサイズの微細構造に対して強く接着することが知られており、3T3細胞は、同様なサイズのリンクル上で増殖しやすいことが報告されている。このことから、リンクル構造が3T3細胞との接着性に寄与したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10件)

1. H. Izawa,* Y. Miyazaki, T. Yonemura, N. Ito, Y. Okamoto, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto* “Polysaccharide-based wrinkled surfaces induced by polyion complex skin layers upon drying” *Polymer Journal*, in press (2019). (査読有)
 2. H. Izawa,* N. Okuda, T. Yonemura, K. Kuroda, K. Ochi, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto, M. Noda, K. Azuma,* N. Ito* “Application of Bio-Based Wrinkled Surfaces as Cell Culture Scaffolds” *Colloids and Interfaces*, **2**, 15–25 (2018). (査読有)
 3. H. Izawa* “Preparation of bio-based wrinkled surfaces via lignification mimetic reactions and drying: A new approach to develop surface wrinkling” *Polymer Journal*, **49**, 759–765 (2017). (総説) (査読有)
 4. H. Izawa,* Y. Dote, N. Okuda, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto* “Wood-mimetic skins prepared using horseradish peroxidase catalysis to induce surface wrinkling of chitosan film upon drying” *Carbohydrate Polymers*, **173**, 519–525 (2017). (査読有)
 5. H. Izawa,* N. Okuda, A. Moriyama, Y. Miyazaki, S. Ifuku, M. Morimoto, H. Saimoto* “Biobased wrinkled surfaces induced by wood mimetic skins upon drying: effect of mechanical properties on wrinkle morphology” *Langmuir*, **32**, 12799–12804 (2016). (査読有)
- など

[学会発表] (計 23件)

1. 14th International Chitin and Chitosan Conference 12th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Kansai university (Senriyama campus), 2018年, Chitosan-based wrinkled surfaces: A new strategy for developing microspic wrinkled surfaces by using chitosan, Hironori Izawa (招待講演) .
 2. 日本化学会第97回春季年会 アジア国際シンポジウム 慶応義塾大学 日吉キャンパス(横浜), 2017年, Bio-based Wrinkled Surfaces Harnessed from Biological Design Principle of Wood, Hironori Izawa (招待講演) .
 3. 第31回中国四国支部高分子若手研究会 とりぎん文化会館(鳥取), 樹木の細胞壁を模倣したスキン層が誘起するリンクル形成現象, 2016年, 井澤 浩則 (招待講演) .
 4. 2016年日本化学会中国四国支部大会 香川大会 若手企画セッション「中国四国地方における高分子化学分野での先端研究」香川大学幸町キャンパス(香川), 2016年, 天然資源と酵素触媒から調製されるバイオベースリンクルフィルム, 井澤 浩則 (招待講演) .
- など

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。