

水系 *N*-アルキル化によるキトサンの化学改質に関する研究

栗田侑典

水系 *N*-アルキル化によるキトサンの化学改質に関する研究

目次

第一章 キトサンの <i>N</i> -選択的誘導体化とその利用について	1
1-1 キチン・キトサン	2
1-2 キチン・キトサンの誘導体化	4
1-3 キトサンの <i>N</i> -誘導体化	5
1-4 本論の目的	7
第二章 キトサンの還元的 <i>N</i> -アルキル化	11
2-1 背景	12
2-2 キトサンに対する還元的 <i>N</i> -アルキル化の最適化	13
2-2-1 緒言	13
2-2-2 実験	13
2-2-3 結果および考察	16
2-2-4 結論	30
2-3 キトサン由来の有機ラジカルポリマーの調製	31
2-3-1 緒言	31
2-3-2 実験	33
2-3-3 結果および考察	35
2-3-4 結論	41
第三章 キチン・キトサンの NaHCO_3 による水系 <i>N</i> -アルキル化	45
3-1 背景	46
3-2 キトサンの NaHCO_3 による水系 <i>N</i> -アルキル化	47
3-2-1 緒言	47
3-2-2 実験	48
3-2-3 結果および考察	50
3-2-4 結論	65
3-3 <i>N</i> -カルボキシメチルキトサンの pH 応答性ナノ粒子	66
3-3-1 緒言	66
3-3-2 実験	67
3-3-3 結果および考察	69
3-3-4 結論	85

3-4 キチンの NaHCO_3 による水系 <i>N</i> -アルキル化	86
3-3-1 緒言	86
3-3-2 実験	87
3-3-3 結果および考察	88
3-3-4 結論	94
第四章 総括	97

第一章

キトサンの N -選択的誘導体化とその利用について

1-1 キチン・キトサン

キチン・キトサンは、エビやカニなどの甲殻類、イカ、貝、昆虫、菌類、緑藻類など、極めて多様な生物によって生産される構造多糖の一種である[1-8]。地球上での生産量は、年間 10～1000 億トン規模と推定され、最大のバイオマスであるセルロースに匹敵する持続可能な生物資源である[1]。現在のところ、キチンの原料はカニやエビである。しかし、キチンおよびキトサンはその他の様々な種類の生物から多量収穫可能であると考えられており、Allan らは年間 15 万トン入手可能であると推定している[1]。ところが、セルロースの工業利用が大きく拡大してきた一方で、キチン・キトサンの利用はほとんど進んでいないのが現状である。収穫されたキチン・キトサンの大部分は、現在のところ廃棄されている。地球規模での環境問題が叫ばれる現代において、自然界に豊富に存在し持続可能な資源であるキチン・キトサンの利用法を開発することは非常に重要である。

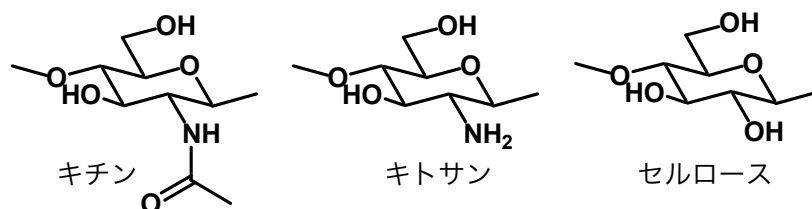


図 1-1-1 キチン、キトサンおよびセルロースの分子構造

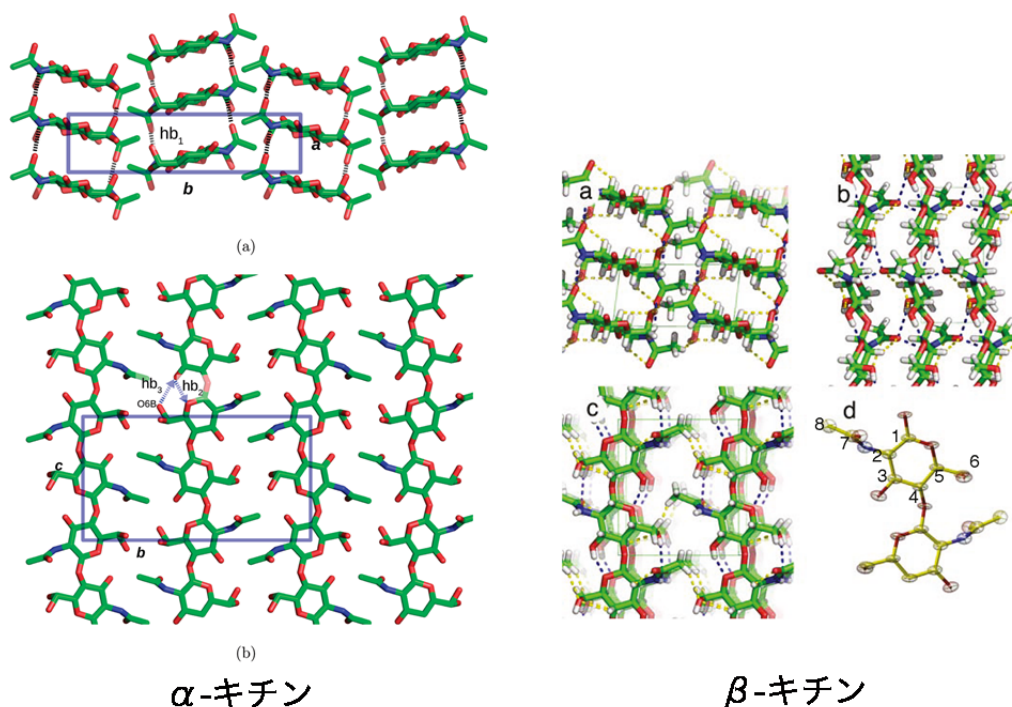


図 1-1-2 α -キチン ($a=0.4749$ nm、 $b=1.899$ nm、 $c=1.033$ nm) および β -キチン ($a=0.4820$ nm、 $b=0.9247$ nm、 $c=1.0390$ nm) の結晶構造[9,10]

キチンは、N-アセチル-D-グルコサミン(2-アセトアミド-2-デオキシ-D-グルコース)が $\beta(1\rightarrow4)$ 結合した多糖である。キトサンはその脱アセチル化物であり、D-グルコサミン(2-デオキシ-D-グルコース)を単位に $\beta(1\rightarrow4)$ 結合している(図 1-1)。すなわち、キチンおよびキトサンは、セルロース C2 位の水酸基がそれぞれアセトアミド基とアミノ基に置き換わった構造をしている。キチン分子内の、アセトアミド基や水酸基といった極性の高い官能基は、規則的にエクソトリアル方向に伸びているため、キチン分子にはエクソトリアル方向の親水面とアキシアル方向の疎水面が存在する。その規則的な構造により生じる強固な水素結合と疎水結合のため、キチンはセルロース同様に硬い結晶をつくり、多くの親水性基を持つにも関わらず水に不溶である。キチンの結晶は α -キチン、 β -キチン、 γ -キチンの三種類が知られているが、 γ -キチンは α と β の混晶であると言われている[1,2,9,10](図 1-2)。

キチンは原料である甲殻類の殻の中で繊維状の結晶の形で存在している[1,3,4,11]。このキチン結晶は一軸に配向し、その配向軸はキチン結晶が積層するにしたがって、らせん状に旋回していく。さらに、キチン結晶のまわりには酸性タンパク質が結合し、その上に炭酸カルシウムが吸着することでしなやかさと高い強度を同時に発現している[1,4,11]。したがって、キチンを単離・精製するには、酸処理によって炭酸カルシウムのような無機物を、アルカリ処理によってタンパク質をそれぞれ除去する[1-6]。またキトサンは、精製されたキチンをさらに熱アルカリ処理し、脱アセチル化することで得られる[1-6]。

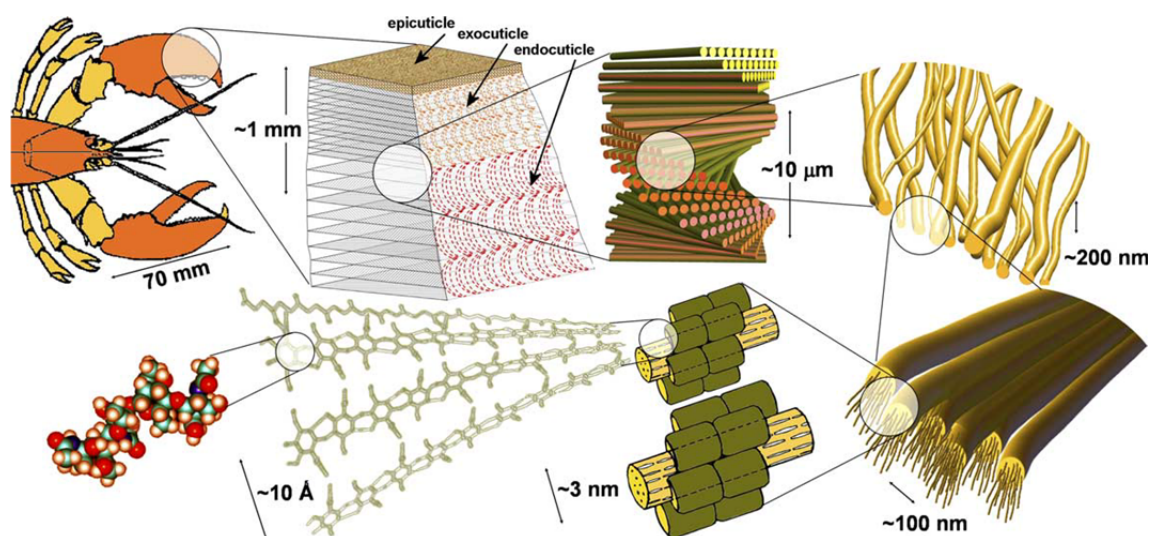


図 1-1-3 甲殻類(アメリカザリガニ) 外殻の階層構造とキチンの高次構造[11]

このように、キチンとキトサンの差はアセチル基の有無である。しかし、両者を明確に区別することは難しい。天然のキチンは、精製された時点でわずかに D-グルコサミン単位を含むヘテロポリマーである。これは C2 位のアミノ基が、酸性タンパク質とペプチド結合していたためだと考えられている。また、キトサンの生成においても、熱アルカリ処理で全てのアセチル基を除くことは難しく、一般的にキトサンも一部アセチル基を含むヘテロポリマーである。したがって、キチンとキトサンはアセチル基の量(N-アセチル化度; 最

大 1.0) によって定義される。アセチル基の多いキチン (N-アセチル化度約 0.6 以上) は溶媒耐性が高く、蟻酸、濃アルカリ、アミド-LiCl 系など非常に限られたものに溶解するのみである。一方、キトサン (N-アセチル化度約 0.4 以下) はアミノ基が多く、酸性水溶液中でアミノ基がカチオン化して溶解する。また、N-アセチル化度が約 0.4~0.6 のものは、あらゆる pH の水に溶けるため水溶性キチンと呼ばれる[1-3,5,6]。

キチン・キトサンは、自然界に豊富に存在する持続可能な天然資源である。他の多糖や天然資源とは異なった部分も多く、そのようなところに注目しながらキチン・キトサンの利用法を開発することで各種環境問題の解決、更には他の資源からは得られない、キチン・キトサン特有の新規材料の開発につながると期待している。

1-2 キチン・キトサンの化学改質

現在キチンの 90% がキトサンに加工され、凝集剤として水処理に利用されていると言われている[1]。しかし、その他多くの用途が開発段階にあり、抗菌性、物質の吸着性、生体親和性、抗原性、などから、主に医薬、食品、化粧品、製紙、などの分野を中心に研究されている[1,3]。

しかし、持続可能な天然資源であるキチン・キトサンの利用拡大のため、更に幅広い用途を見出す必要がある。そのためには、キチン・キトサンそのものの性質だけでなく、化学反応により新しい性質を付与することで、新規応用分野を開拓することも重要である。これまで利用されてきたキチン・キトサンの誘導体化の概要を図 1-2 に示す[1]。

具体的にどのような新しい物性が、化学改質により付与されたかについて述べる。Nishimura らは、キトサンにカルボキシメチル化と硫酸化を施し、N-アセチル化度とそれぞれの官能基の置換度を上手く調節すると、高い抗凝血活性を示すことを見出した[12]。Muzzarelli らは、キトサンのアミノ基に様々な種類のアルキル基を導入し、得られた N-アルキルキトサンは高い金属イオン吸着能を示した[13,14]。Fan らは、TEMPO 酸化によりキチン結晶表面をカルボキシル化することで、 α および β -キチンを水中で分散させ、幅約 10 nm 以下の、由来によって形態の異なるナノファイバーとナノウィスカーを調製した[15,16]。Ghosh らは、キトサンとポリウレタンのネットワークにオキセタン構造を組み込んだ物質で塗膜を形成し、その塗膜の力学的に破壊された箇所が UV 照射によって自己修復するという新しい塗料を開発した[17]。

このように、化学改質によって従来からあるキチン・キトサンの研究を進展・拡大するだけでなく、新しい応用の可能性を開発することができる。自然界に豊富に存在する持続可能な資源であるキチン・キトサンの利用拡大のため、化学改質は有効な方法である。

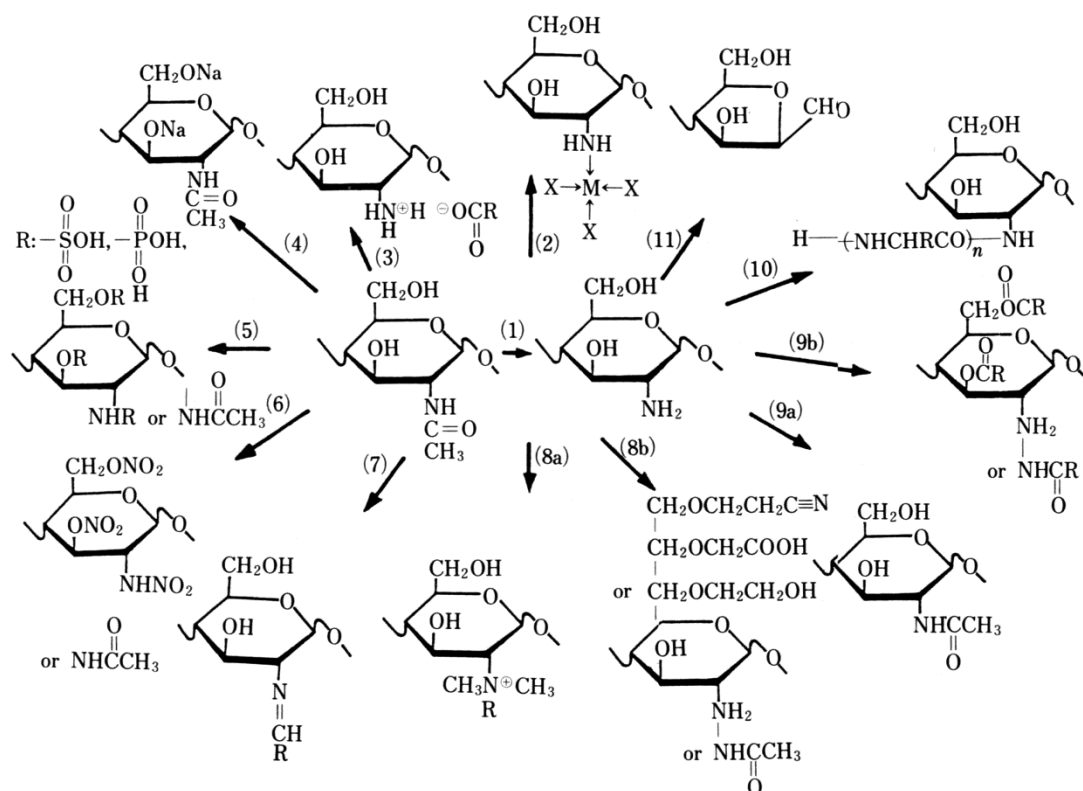


図 1-2 キチン・キトサンの分子設計上有用な化学反応[1]。(1)*N*-脱アセチル化反応、(2)錯体形成反応、(3)塩形成反応、(4)アルコラート反応、(5)*N*-硫酸・リン酸エステル化反応、(6)ニトロ化反応、(7)Schiff 塩基反応、(8a)*N*-アリル化と *N*-アルキル化反応、(8b)*O*-アリル化と *O*-アルキル化反応、(9a)*N*-アシル化反応、(9b)*O*-アシル化反応、(10)グラフト化反応、(11)低分子化と熱分解反応

1-3 キトサンの *N*-誘導体化

キチン・キトサンの誘導体化は、主に C2 アミノ基、C3 水酸基、C6 水酸基への求電子置換反応を利用しておこなわれる。例えば、ハロゲン化アルキルと NaOH を用いたカルボキシメチル化では、三種類の官能基全てに誘導体化が進む[18]。しかし、アミノ基と水酸基の性質の差は大きく、置換基の導入される位置により、生成物の性質に影響が出ることも予想される。また、置換基の立体的な位置が物性に影響を及ぼすこともある。光学異性体を分離するキラルカラムでは、置換基の導入位置により分離性能が変化した[19]。また、キチン・キトサン誘導体のリゾチーム受容性と、置換基分布の関係ははっきりしており、C6 水酸基への置換基導入は受容性に影響ないが、C3 水酸基への置換や C2 アセトアミド基の脱

アセチル化により受容性が明瞭に低下することがわかっている[1]。このように、キチン・キトサンにおいて、置換基の位置を制御することは重要であり、位置選択的な誘導体化による分子構造の制御が求められる。

キチン・キトサンの誘導体化は、アミノ基と水酸基の化学反応を利用しておこなわれる。アミノ基と水酸基は化学的性質が異なるため、比較的容易に選択的な誘導体化が可能である。キトサンのアミノ基は、グルコサミン単位 of C2 位にのみ存在し、選択的 N-誘導体化をすることで位置選択的な置換反応を行うことができる。これまでキトサンに適用された選択的 N-誘導体化法には、還元的 *N*-アルキル化[13,14]、*N*-アシル化[20]、*N*-フタロイル化[21,22]、Michael 反応[23]、水系での *N*-アルキル化[24,25]がある。また、これらの反応はすべて水系反応であり、常温や少しの加温で行われる、環境負荷の少ない誘導体化法である。これは、水中でのアミノ基の反応性が高いためであり、実際に数多くの多様なアミンの水系反応が知られている[26-33]。また、近年の環境問題に対する関心の高まりからグリーン・ケミストリーの分野の活性化により、アミンの水系反応は更に増えてきている。これらの反応には、未だキトサンに適用されないものも多く、新たなキトサンの誘導体化法としての応用が期待される。

キトサンの *N*-選択的誘導体化は、生成物の立体構造を制御し、より複雑な構造の誘導体を得るために欠かせない方法である。また、選択的 *N*-誘導体化は低環境負荷のグリーン・ケミストリーの反応を利用するため、誘導体化の過程で環境に与える付加も小さいと考えられる。

本論の目的

地球規模での環境問題が叫ばれる現代において、天然資源の有効利用は来るべき石油資源問題や環境汚染を解決するため有効な手段である。キトサンは、持続可能な天然資源であり、その生産量は地上最大規模であるが、その利用はほとんど進んでいないのが現状である。キトサンの特徴の1つはアミノ基であり、このアミノ基を選択的に誘導体化することで、誘導体の複雑な分子設計や効率的な物性制御、さらには比較的小さな環境負荷で反応できる。したがって、本研究では持続可能な天然資源であるキトサンのアミノ基に注目し、環境負荷の小さい新規選択的 *N*-誘導体化法の開発や、*N*-誘導体化による新規機能性材料の開発を目指す。

参考文献

- [1] キチン、キトサン研究会編, 最後のバイオマスキチン、キトサン, 技報堂出版 (1988)
- [2] キチン、キトサン研究会編, キチン、キトサンの応用, 技報堂出版 (1990)
- [3] キチン、キトサン研究会編, キチン、キトサン実験マニュアル, 技報堂出版 (1991)
- [4] 矢吹稔, キチン、キトサンのはなし, 技報堂出版 (1992)
- [5] K. Kurita, *Mar. Biotechnol.* 6 (2006) 203-226
- [6] M. N. V. R. Kumar, *React. Func. Polym.* 46 (2000) 1-27
- [7] 磯貝明, セルロースの材料科学, 東京大学出版会 (2001)
- [8] 磯貝明, セルロースの科学, 朝倉書店 (2003)
- [9] P. Sikorski, R. Hori, M. Wada, *Biomacromolecules* 10 (2009) 1100-1105
- [10] Y. Nishiyama, Y. Noishiki, M. Wada, *Macromolecules* 44 (2011) 950-957
- [11] D. Raabe, C. Sachs, P. Romano, *Acta Mat.* 53 (2005) 4281-4292
- [12] S. Nishimura, S. Tokura, *Int. J. Biol. Macromol.* 9 (1987) 225-232
- [13] R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli, S. Mariotti, *Carbohydr. Res.* 107 (1982) 199-214
- [14] R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli, S. Mariotti, *J. Membr. Sci.* 16 (1983) 295-308
- [15] Y. M. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules* 9 (2008) 192-198
- [16] Y. M. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 832-838
- [17] B. Ghosh, M. W. Urban, *Science* 303 (2009) 1458-1460
- [18] X. G. Chen, H. J. Park, *Carbohydrate Polymers* 53 (2003) 355-395
- [19] G. Felix, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 171-184
- [20] S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Carbohydr. Res.* 47 (1976) 315-320
- [21] K. Kurita, M. Uno, Y. Saito, Y. Nishiyama, *Chitin Chitosan Res.* 6 (2000) 43-50
- [22] S. Ifuku, T. Miwa, M. Morimoto, H. Saimoto, *Green Chem.* 13 (2011) 1499-1502
- [23] H. Sashiwa, N. Yamamori, Y. Ichinose, J. Sunamoto, S. I. Aiba, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1250-1254
- [24] P. L. Dung, D. T. Thien, N. T. Dong, T. T. Y. Nhi, N. T. An, M. Rinaudo, M. Milas, *AJSTD* 22 (2005) 261-270.
- [25] N. T. An, P. L. Dung, D. T. Thien, N. T. Dong, T. T. Y. Nhi, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 261-264
- [26] R. F. Borch, M. D. Berstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2897-2904
- [27] C. B. Singh, V. Kavala, A. K. Samal, B. K. Patel, *Eur. J. Org. Chem.* (2007) 1369-1377
- [28] M. Morini, P. C. Schulz, *Langmuir* 18 (2002) 3767-3772
- [29] D. D. I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1 (1961) 8-21
- [30] A. Córdova, *Acc. Chem. Res.* 37 2004 102-112
- [31] L. Shi, Y. Q. Tu, M. Wang, F. M. Zhang, C. A. Fan *Org. Lett.* 6 (2004) 1001-1003

- [32] F. Meng, C. Wang, J. Xie, X. Zhu, Y. Wan, *Appl. Organomet. Chem.* 25 (2011) 341-347
- [33] S. Santra, P. R. Andreana, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 2261-2264

第二章

キトサンの水系還元的 *N*-アルキル化

2-1 背景

キチン・キトサンの誘導体化は、主に C3-OH と C6-OH および C2-NH₂ への求電子置換反応を利用して行われる。これまでキチン・キトサンに適用された *N*-選択的誘導体化法には、還元的 *N*-アルキル化[1-3]、*N*-アシル化[1,2,4]、*N*-フタロイル化[1,2,5,6]、Michael 反応[7]がある。還元的 *N*-アルキル化は、アミノ基とカルボニル基の脱水縮合によって生じる Schiff 塩基（CN 間二重結合をもつ）を、還元することでアミンとして安定化する方法である（図 2-1）[8]。カルボニル化合物は、アミノ基に求電子付加はするが、水酸基には付加しないため、キトサンに適用すれば水系、常温、常圧という温和な条件で *N*-選択的にアルキル化を行うことができる。

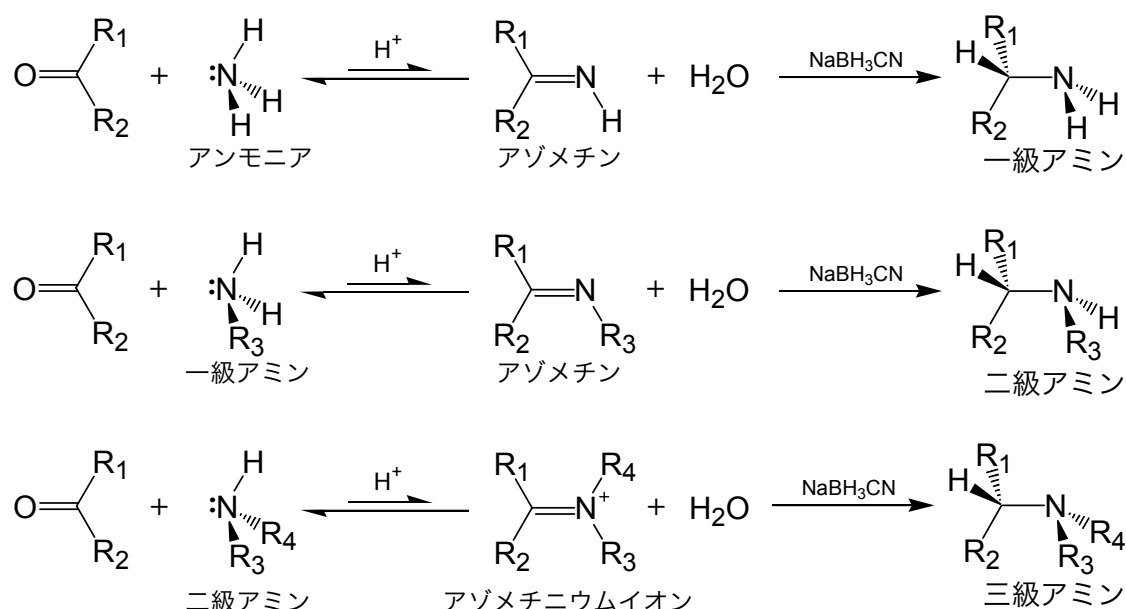


図 2-1 還元的 *N*-アルキル化の反応図

還元的 *N*-アルキル化により、これまで *N*-カルボキシメチルキトサン[1,2,3]、*N*-ヘキシルキトサン[1,2,9]、*N*-ラクチルキトサン[1,2,10,11]、*N*-ベンジルキトサンなど[12]、様々な誘導体が調製されてきた。これらの誘導体は、金属イオン吸着能[3,9]、骨形成基材としてリン酸カルシウムと複合化能[13]、特異なレオロジー特性[11]、植物病原体およびカビに対する繁殖抑制効果[12]など、様々な性質が見いだされてきた。これらの性質は従来のキチン・キトサンにはない機能であり、誘導体化により付与された新しい性質である。

本研究では、持続可能な資源であるキチン・キトサンから、水系・常温・常圧という温和な条件で進行する還元的 *N*-アルキル化を用いて、環境に優しい新規機能性材料を得ることを目指す。

2-2 キトサンの還元的 *N*-アルキル化の最適化

2-2-1 緒言

還元的 *N*-アルキル化は、幅広い官能基をキトサンのアミノ基に選択的に導入できる反応である。しかしながら、キトサンに関する還元的 *N*-アルキル化反応の最適化はほとんど行われていないのが現状である。特に、還元的 *N*-アルキル化の過程でおきる二段階の反応は、それぞれ pH に対して敏感であることが知られる。図 2-1 の左のアゾメチン (Schiff 塩基) の生成は、脱水を伴う平衡反応であり、pH4.5-5 で最速、約 pH6 が最適だと言われている[14]。したがって、そのような弱酸性領域で比較的安定な還元剤である NaBH_3CN が還元的 *N*-アルキル化においてよく用いられる。一方、図 2-1 右の還元反応は、pH3~4 ではケトンやアルデヒドが還元され反応効率が低下するが、pH6 以上ではアゾメチン (水中では水和してアミノールになる) のみを選択的に還元できる。様々な化合物に対してこの還元的 *N*-アルキル化を行った際の最適 pH は 6-8 であり、pH4-10 の間でも進行することが確認された[8]。更に、キトサンはアミノ基の電離に伴い水溶化する多糖であり、アミノ基の pK_a である pH6.5 以上では不溶化による反応効率低下が予想される。このように、pH で水への溶解性に変化するキトサンでは、特に反応系の pH 条件が重要であると考えられる。

したがって、本実験ではキトサンを出発物質とし、様々なカルボニル試薬を用いてなるべく高い置換度 (DS) の *N*-アルキルキトサンを得ることを目指した。反応系の pH など各種反応条件における、生成物の化学構造および分子量について、NMR、サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱検出器を組み合わせた SEC-MALLS を用いて、詳細に検討した。

2-2-2 実験

試料

出発物質として、市販のキトサン (Chitosan 100, Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan、Ch とする) および脱アセチル化処理を行ったキトサンを用いた。キトサンの脱アセチル化については、既報に従ってキトサンを 105°C の 33% NaOH 水溶液中で 3 時間処理を 1 サイクルとし、それを 2 回繰り返した[11]。脱アセチル化されたキトサンを ChDAc とした。各キトサンの ^1H -NMR スペクトル (図 2-2-1) から Hirai らの報告[15]に従い、*N*-アセチル化度 (DNAc) を次の関係式より計算した；

$$\text{DNAc} = \frac{2S_{2.1}}{S_{3.0-4.2}}$$

$S_{2.1}$ は 2.1 ppm に現れるアセチル基のプロトン由来のピーク面積であり、 $S_{3.0-4.2}$ は 3.0 から 4.2 ppm までに出現するグルコサミン単位の水素 H2~H6 のピーク面積である。また Yanagisawa らの報告によれば、キトサン中のアセトアミド基由来の分子間凝集により、正確な分子量分布が評価できない[16]ため、分子量分析用には ChDAc を使い、Ch は化学構造分析用に用いた。

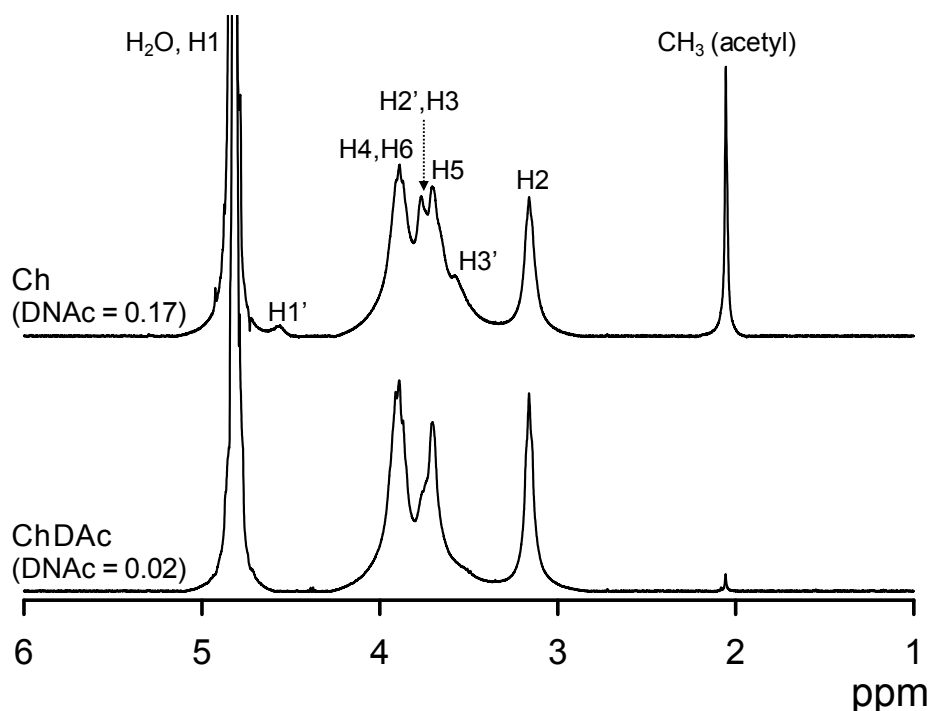


図 2-2-1 キトサン (Ch) と熱アルカリ処理を 2 回行ったキトサン (ChDAc) の希 TFA/D₂O 中での ¹H-NMR スペクトル。H1~H6 はグルコサミン単位、H1'~H3'および H4~H6 は N-アセチルグルコサミン単位に由来する。

カルボニル化合物 (アセトン、レブリン酸；図 2-2-2)、NaBH₃CN およびその他の試薬や溶液 (Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) は試薬グレードのものを、特別な前処理なく用いた。

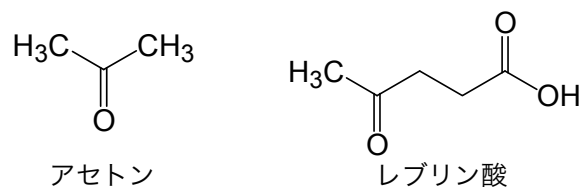


図 2-2-2 アセトンとレブリン酸の化学構造

キトサンの還元的 *N*-イソプロピル化および *N*-カルボキシブチル化

キトサンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-アルキルキトサンを調製した。具体的な手順は以下に示すとおりである。出発物質であるキトサン（アミノ基; 1.0 mmol）を 20mL の脱イオン水に分散させ、カルボニル化合物を攪拌しながら加えた。アセトンカルボニル化合物として用いる場合や、レブリン酸の添加量が少なくキトサンが溶解しない場合は、必要に応じて酢酸を適量加えて均一なキトサン水溶液を得た。キトサン水溶液の pH を、酢酸および 1 M NaOH 水溶液を用いて調整し、NaBH₃CN（10 mmol）を加えて反応開始した。反応停止のため、1 M NaOH 水溶液によって pH を 10 以上に調節した。得られた生成物は、透析・凍結乾燥によって回収した。

反応条件因子として、反応開始時の系の pH、反応時間、カルボニル試薬の添加量を調節した。反応系の pH は 4.0~6.0、反応時間は 1~120 時間、カルボニル添加量はアミノ基に対し 0.25~5.0 モル当量とそれぞれ変化させた。

化学構造解析

¹H-、¹³C-NMR および ¹H,¹H-DQF-COSY は Alpha-500 (JEOL Ltd., Japan) により、溶媒に D₂O、TFA を、内部標準にテトラメチルシラン (TMS) または 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3,-*d*₄ ナトリウム塩 (TSP) をそれぞれ用いて測定した。置換度や DNAc といった化学的定量分析は ¹H-NMR のピーク面積比により求めた。また、IR 吸収スペクトルは FT/IR-6100 (JASCO Corporation, Japan) を用いて、フィルム法によって測定した。

分子量解析

分子量評価には、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、屈折率検出器 (RI)、および多角度光散乱検出器 (MALLS) を組み合わせた SEC-MALLS システムを採用した。機器の構成は既報[16,17,18]をもとに構成した。

本実験で用いた SEC-MALLS システムは、オンラインデガッサー (DGU-12A; Shimadzu, Japan)、高圧ポンプ (LC-10ADVP; Shimadzu, Japan)、0.1 μm のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) メンブレン (Millipore, USA) を用いたステンレス製インラインフィルター、オートインジェクター (SIL-20A; Shimadzu, Japan)、カラムオープン (CTO-10ACVP; Shimadzu, Japan)、0.5 μm のプレカラムフィルターとステンレス製フリット (A-310; Upchurch Scientific, USA)、ガードカラム (SB-G; Shodex, Japan)、ポリヒドロキシメタクリレート充填の SEC カラム (SB-806M HQ; Shodex, Japan)、多角度光散乱検出器 (DAWN EOS, λ=690nm; Wyatt technologies, U.S.A.)、屈折率検出器 (RID-10A; Shimadzu, Japan) から構成される。

SEC パターンは流速 0.5 mL/min で検出し、試料のキトサンおよび生成物溶液 (0.1w/w%) のインジェクション量は 100 μL、カラム温度及び屈折率検出器の温度は 40°C、MALLS 検出器のセル温度は室温にそれぞれ設定した。データの取得及び解析は ASTRA ソフトウェア (Wyatt technologies, U.S.A.) を用いた。MALLS の設定は dn/dc を 0.166 とし、各パラメータを

算出した。サンプル注入の前に、プルラン（分子量 22800）による MALLS 検出器と屈折率検出器の較正及び正規化を行った。

SEC-MALLS の移動相には、酸性の 0.5 M CH_3COOH + 0.1 M NaNO_3 水溶液を採用した。この水溶液の pH は充分高く、常温で一週間置いても試料溶液の分子量は低下しない。試料調製は、試料濃度が 0.2% になるよう 0.5 M 酢酸を加え、24 時間以上静置して十分に溶解させた。その溶液と、0.5 M 酢酸 + 0.2 M NaNO_3 水溶液を等容量混ぜることで、均一 0.1 w/v% の試料溶液を得た。試料溶液は、0.45 μm フィルターによって粗大物を除去した後、SEC-MALLS システムによって分子量測定を行った。

2-2-3 結果および考察

生成物の性質

反応前は均一にキトサンが溶解した溶液であったが、アセトン反応物は全て析出していた。置換度の高いものほど粉状の沈殿物を生じるのに対し、置換度の低いものはキトサンと同様に含水しゲルを形成した。一方、レブリン酸反応物は低置換度では同様にゲルであるが、置換度が高いとある程度濁っているものの溶解した。これらはアセトンとレブリン酸の反応により、生成物がそれぞれ疎水化と親水化したことを示し、反応の進行が示唆された。

化学構造の定性分析

図 2-2-3-1 および図 2-2-3-2 は、それぞれ出発物質であるキトサンとアセトンを反応させたときの生成物の ^{13}C -NMR スペクトルである。アセトンと反応した生成物のスペクトルをみると、21 ppm 付近にメチル基と 55 ppm 付近にアミノ基の隣の脂肪族炭素がある。また、C2 の炭素由来のピークが新たに 63 ppm の C6 炭素のすぐ近くに出現し、キトサンの C2 が出現する 58 ppm 付近で減少していた。これらの、C2 やアミノ基に関わる炭素ピークの出現や変化など、また C2 以外のグルコサミンを構成する炭素のスペクトルに大きな変化が見られないことから、反応はアミノ基に選択的に進行したといえる。側鎖由来のピークは、21 ppm 付近のメチル基と 55 ppm 付近にアミノ基に結合した脂肪族炭素がみられることから、イソプロピル基の導入が確認できる。メチル基ピークは 2 つに分裂しているが、これはキトサン分子のキラリティによるわずかな電子状態の差に由来すると考えられる。イソプロピル基はメチルを 2 つ持つため、このことからイソプロピル基の導入は示唆される。即ち、アセトンを用いた還元的 *N*-アルキル化により、*N*-イソプロピルキトサン (*N*-IPCh) が得られたことがわかった。

これまでの研究によれば、レブリン酸をキトサンに還元的アミノ化を用いて導入し得ら

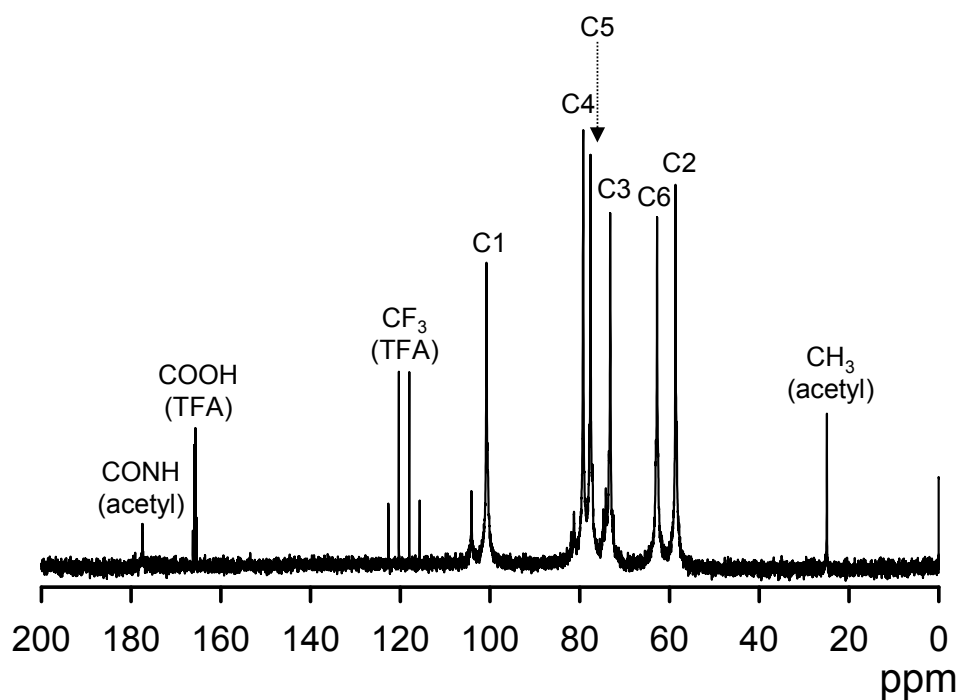


図 2-2-3-1 キトサンの ^{13}C -NMR スペクトル (希 TFA/D₂O 中)

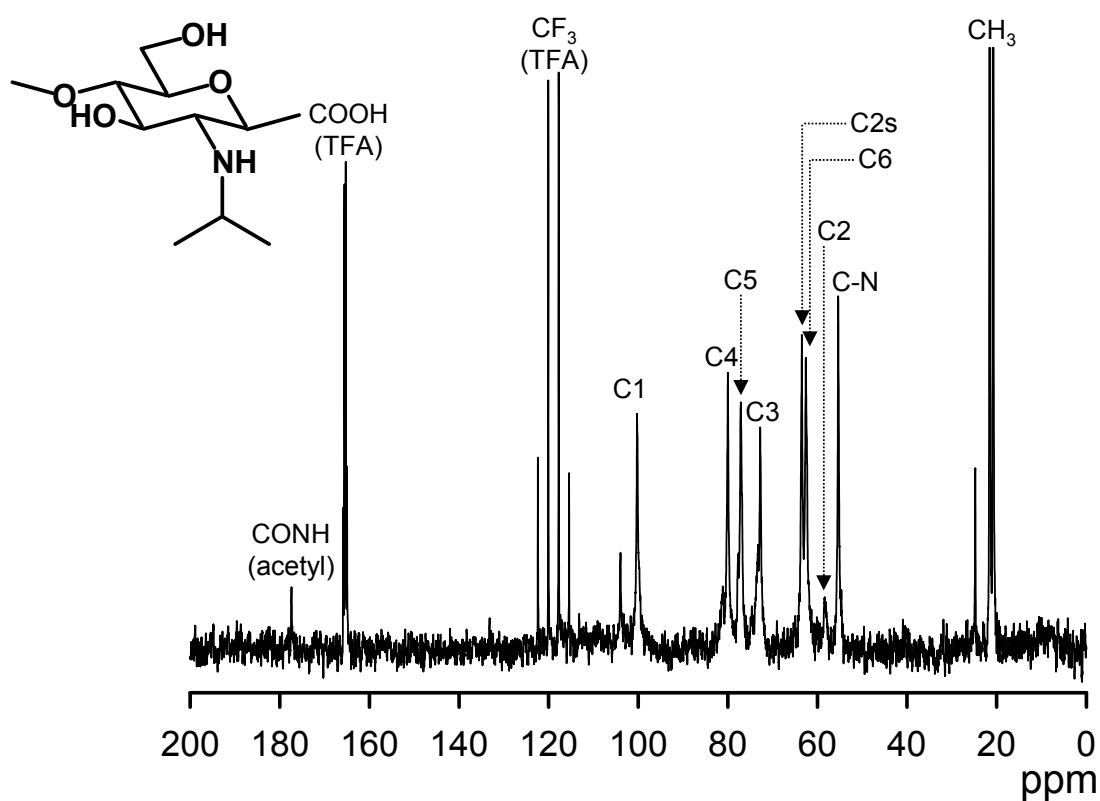
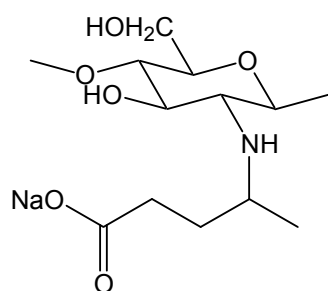
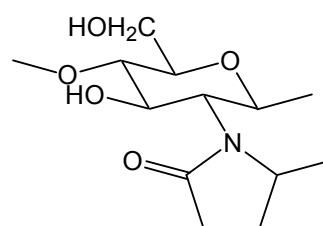


図 2-2-3-2 キトサンとアセトンを反応させた生成物の ^{13}C -NMR スペクトル (希 TFA/D₂O 中)。
C2s はイソプロピル基が置換した *N*-イソプロピルグルコサミン単位、C2 は *N*-グルコサミン単位にそれぞれ由来する。



N-カルボキシブチルキトサン



5-メチルピロリジノンキトサン

図 2-2-3-3 *N*-カルボキシブチルキトサンおよび 5-メチルピロリジノンキトサンの化学構造

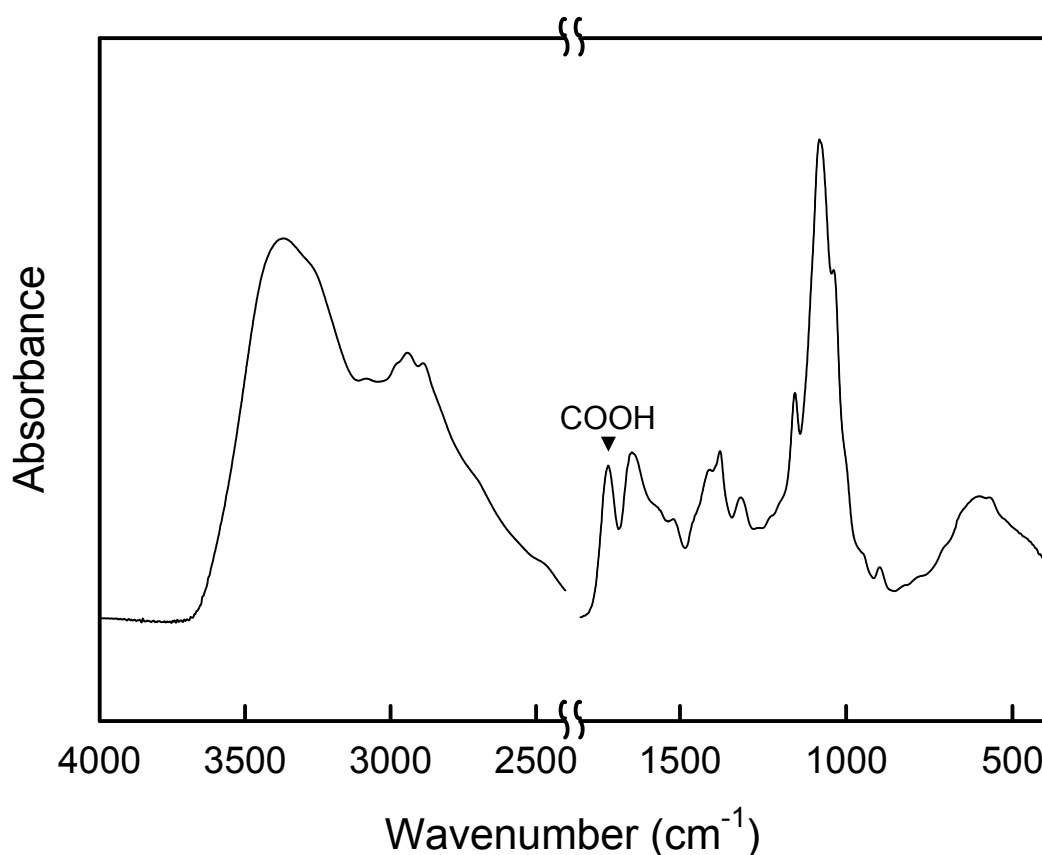


図 2-2-3-4 キトサンとレブリン酸を反応させた生成物の IR 吸収スペクトル。HCl により生成物水溶液の pH を 2 程度まで下げてから作成したキャスト・フィルムを用いた。

れた、*N*-カルボキシブチルキトサンは環状にアミドを形成しやすく、5-メチルピロリジノンキトサンになると言われている（図 2-2-3-3）[18,19]。このことに注意しながら、生成物がいずれの構造をとっているのか、または 2 つの構造が共存しているのか確かめた。レブリン酸との反応から得られた生成物の IR 吸収スペクトルを図 2-2-3-4 に示す。あらかじめ HCl により酸処理したため、約 1720 cm^{-1} に特徴的な COOH のピークが出現した。キトサンに導入された置換基が環状アミドになっているならば、この程度の酸処理では COOH は発生し得ない。したがって、今回得られた生成物は、少なくとも *N*-カルボキシブチルキトサンを

含んでいることが確かめられた。しかし、キトサンに元から含まれるアセトアミド基と 5-ピロリジノン基のアミド結合を見分けることは、赤外吸収スペクトルでは難しい。

したがって、レブリン酸と反応させた生成物の ^{13}C -NMR スペクトルを測定した (図 2-2-3-5)。低磁場側に現れるカルボニル炭素由来のピークに注目すると、166 ppm に溶媒に用いた TFA のカルボキシル基、177 ppm にアミド基、179 ppm にカルボキシル基の三種類が存在した。177 ppm のアミド基はシングルピークであり、ショルダーなどが存在しないことから、アミド基はキトサンのアセトアミド基のみであり、均一な *N*-カルボキシブチルキトサン (*N*-CBCh) が得られたことがわかった。その他のピークも、*N*-CBCh の生成を裏付けている。C2 ピークとほぼ重なって、58 ppm にピークが出現しているが、これはアミノに脂肪族炭素が結合したためだと考えられる。また、63 ppm の C6 炭素由来のピークにほぼ重なって新しい C2 ピークの出現が確認された。以上、C2 やアミノ基に関わる炭素ピークの出現や変化および C2 以外の糖の炭素のスペクトルに変化がないことから、アミノ基に選択的に反応が進行したと示唆される。側鎖由来のピークは、18ppm のメチル基、30 ppm と 33 ppm の脂肪族炭素、58 ppm のアミノ基に結合した脂肪族炭素、179 ppm のカルボキシル基がある。また *N*-IPCh と同様に、18 ppm と 30 ppm のピークにキラリティに起因すると見られる

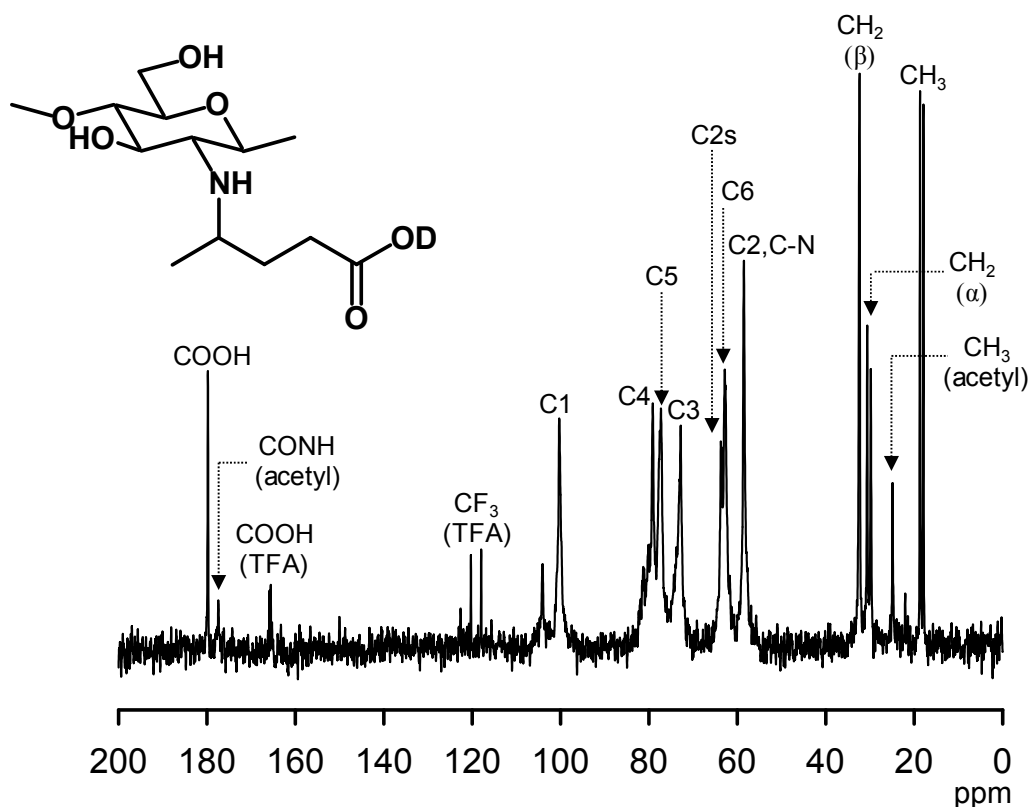


図 2-2-3-5 キトサンとレブリン酸を反応させた生成物の ^{13}C -NMR スペクトル (希 TFA/ D_2O 中)。C2s はカルボキシブチル基が置換した *N*-カルボキシブチルグルコサミン単位、C2 は *N*-グルコサミン単位にそれぞれ由来する。CH₂α、β は、それぞれカルボキシル基からみて α 位と β 位のメチレン炭素。

ピークの分裂があった。側鎖が環状アミドを形成している場合、各炭素のピークは *N*-CBCh とは異なる位置に現れると考えられる。特に C2、メチン、カルボニルの α 位のメチレンは影響が大きいと期待されるが、対応するピークは現れていなかった。今回の反応条件と似た反応条件で還元的 *N*-アルキル化を行なっている先行研究[20]があるが、その条件では環状構造の生成物が得られると結論づけられている。これは先行研究において用いた NMR 測定条件が 80°C と高温であるため、測定中に環状化したと考えられる。したがって、5-メチルピロリジノンキトサンは常温での反応中には精製していない可能性が示唆される。

図 2-2-3-6 は、*N*-IPCh の ^1H -NMR スペクトル測定結果である。約 1.4 ppm に、キトサン

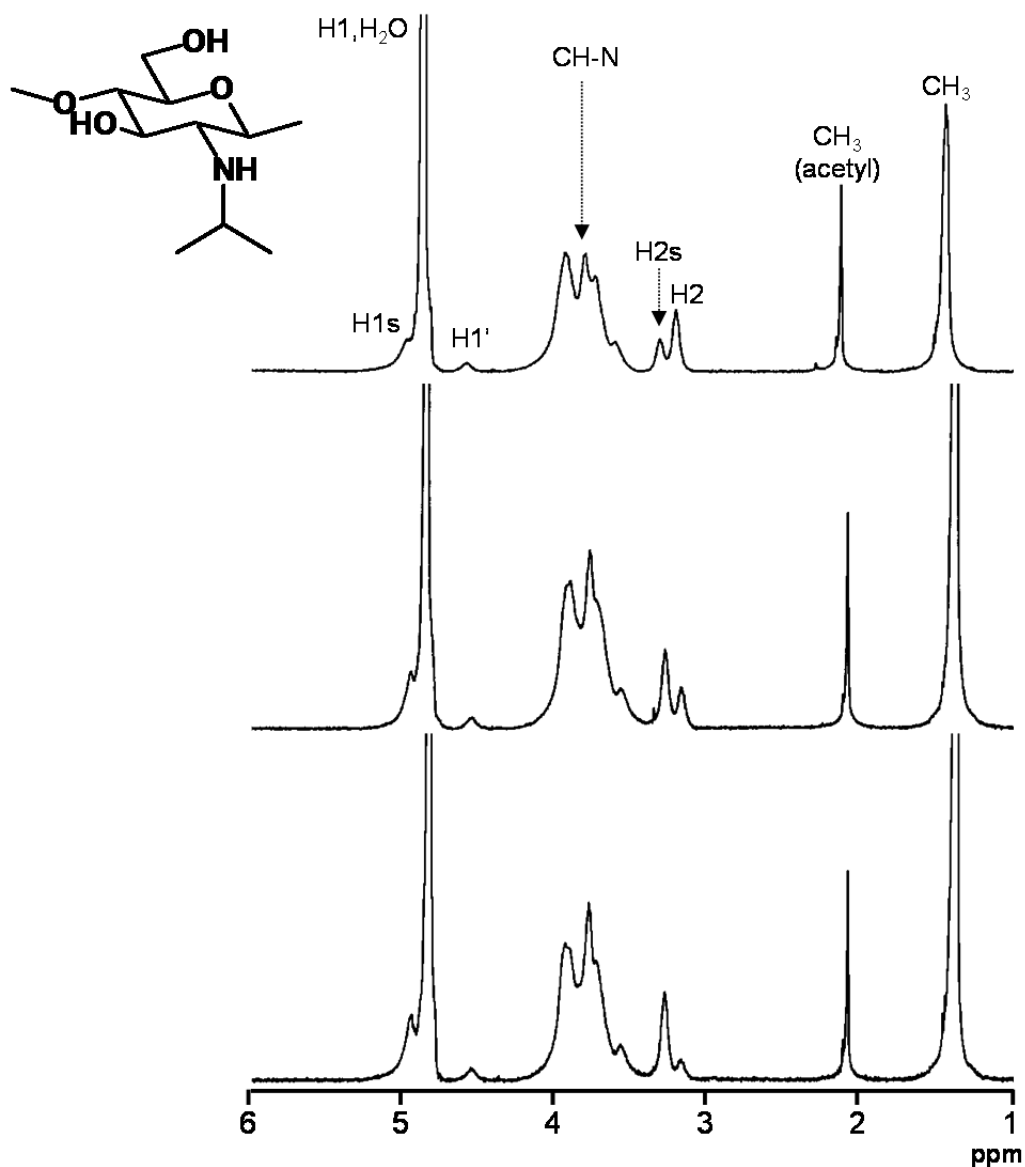


図 2-2-3-6 *N*-イソプロピルキトサンの希 TFA/D₂O 中での ^1H -NMR スペクトル。H1s、H2s は *N*-イソプロピルキトサン単位に、H1、H2 はキトサン単位に、H1'はキチン単位にそれぞれ由来するピークである。

のスペクトル（図 2-2-2）には存在しないメチル基由来のプロトンが確認できる。また、3.3 ppm や 3.8 ppm でも反応の進行に伴うピークの増加が見られた。興味深いことに、3.2 ppm 付近のキトサンの H2 の面積は反応が進行するにつれ減少していた。以下に行うピーク帰属の結果、3.8 ppm に現れるピークがメチン基のプロトン、3.3 ppm に現れるピークが置換体の H2 にそれぞれ対応することが確認された。

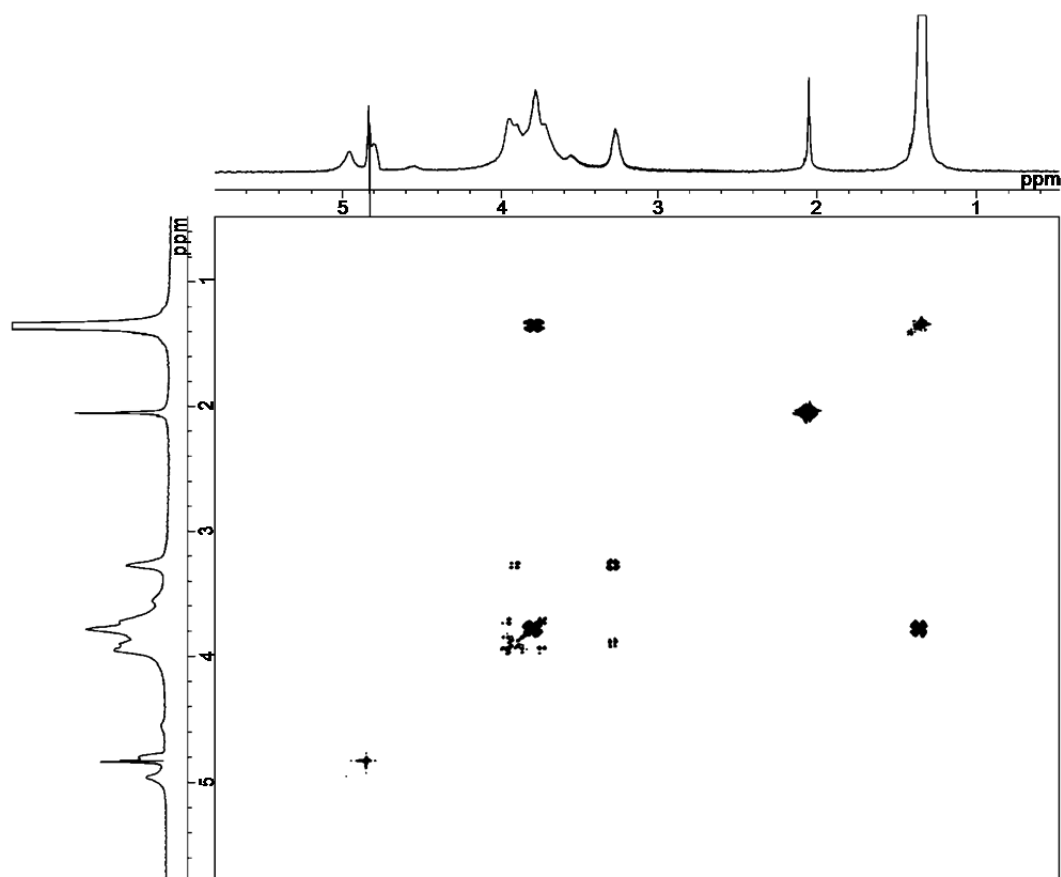


図 2-2-3-7 *N*-イソプロピルキトサンの希 TFA/D₂O 中での ¹H,¹H-DQF-COSY スペクトル。縦軸と横軸には *N*-イソプロピルキトサンの ¹H-NMR スペクトルが表わされており、それぞれのピーク同士の相関、即ち立体的な近さなどをクロスピークとして表わす。

各ピークの帰属を得るため、*N*-IPCh の ¹H,¹H-DQF-COSY（図 2-2-3-7）を測定した。¹H,¹H-DQF-COSY は ¹H 核間のスピン結合を利用することで、隣り合う炭素に結合するプロトンなど、立体的に近いプロトン同士をクロスピークとして検出できる。1.4 ppm のメチル基由来のピークに注目してみると、3.8 ppm のピークとの間にクロスピークが存在した。即ち、1.4 ppm のメチル基と隣り合う 3.8 ppm はメチン基由来である。これにより、イソプロピル基のプロトン由来のピークがすべて明らかになった。また、3.3 ppm 付近のピークは H3 のピークとのクロスピークを示したため、H2 であると考えられる。つまり、キトサン単位の H2 と *N*-イソプロピルキトサンの H2 は、置換による電子状態の変化から共鳴する周波数が異なることがわかる。よって、図 2-2-3-6 に表したとおりにピークが帰属された。

図 2-2-3-8 は *N*-CBCh のスペクトルの比較である。*N*-IPCh と同様に、置換と未置換の二種類の H2 が確認された。1.8~2.7ppm にかけて現れるアセトアミド以外の4つのピークと、1.4ppm のメチル基のピークとの積分比が3 : 4であることから、二種類のメチレン由来であることがわかる。即ち、二種類のメチレンで4つのピークを持っている。

$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -DQF-COSY (図 2-2-3-9) から、1.8 ppm のピークと 2.2 ppm のピークの強い相関および 2.5 ppm と 2.6 ppm のピークの強い相関から、二組のピークが同一の炭素に結合していることが示された。これは ^{13}C -NMR スペクトル同様、キラリティにより同一炭素に結合している2つのプロトンが異なる周波数で共鳴したためだと考えられる。また、1.4ppm 付

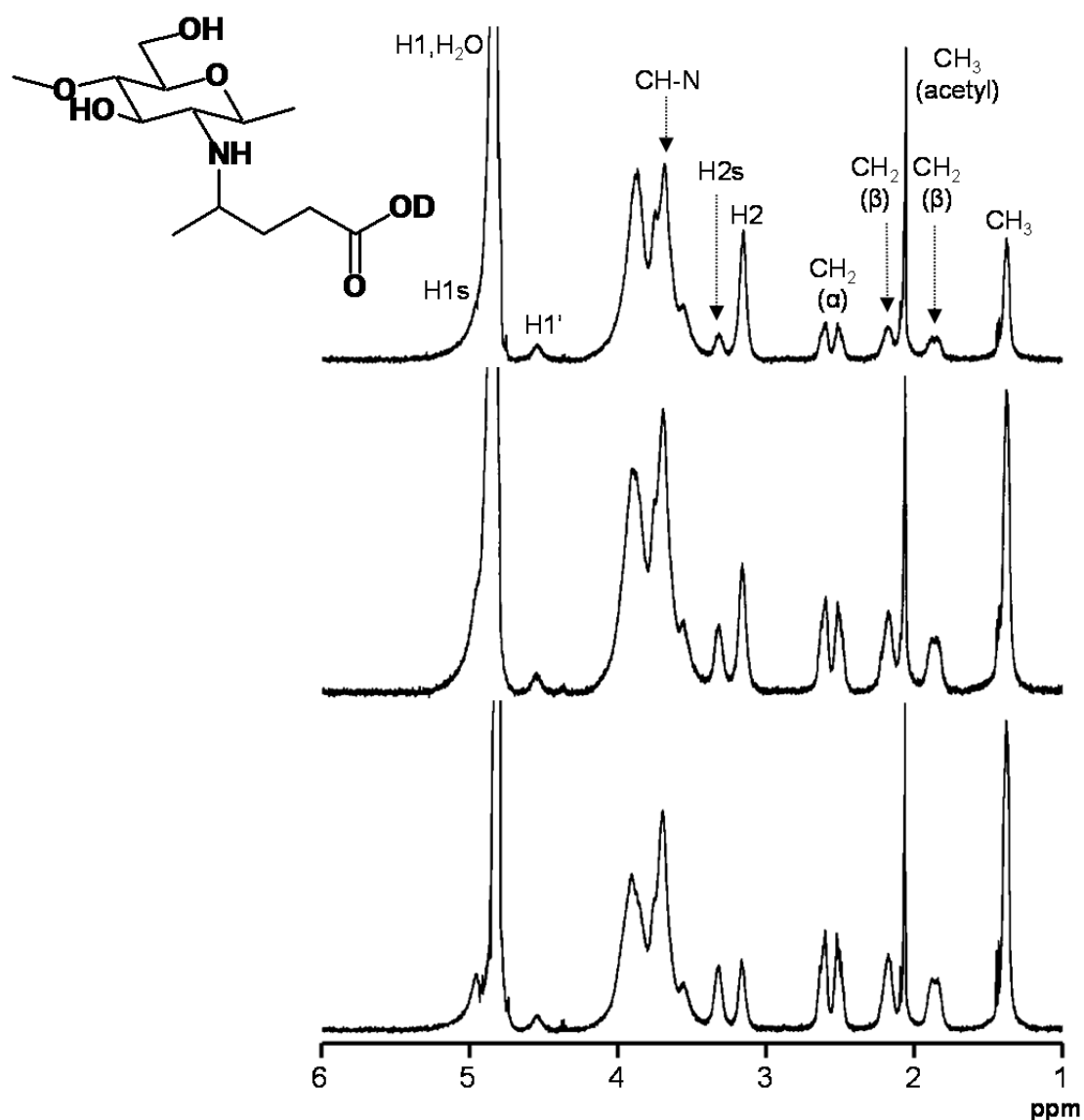


図 2-2-3-8 *N*-カルボキシβチルキトサンの希 TFA/D₂O 中での ^1H -NMR スペクトル H1s、H2s は *N*-カルボキシβチルキトサン単位に、H1、H2 はキトサン単位に、H1'はキチン単位にそれぞれ由来するピークである。CH₂(α)、CH₂(β)はそれぞれ、カルボキシβチル基内のカルボキシル基のそれぞれ α 位、β 位のメチレンで由来のピークを表す。

近のメチル基と 3.8 ppm 付近のメチン基の相関が見られる点は *N*-IPCh と同様である。更にこのメチン基と、1.8 ppm および 2.2 ppm の二組のピーク間の相関から、メチン基と隣り合う位置のメチレンであることがわかった。以上のピーク帰属の結果、1.4 ppm は側鎖のメチル基、1.8 ppm と 2.2 ppm のピークは側鎖のカルボキシル基からみて β 位のメチレン基、2.5 ppm と 2.6 ppm のピークはカルボキシル基から α 位のメチレン基、3.3 ppm は置換体の H2 とそれぞれ確認された。

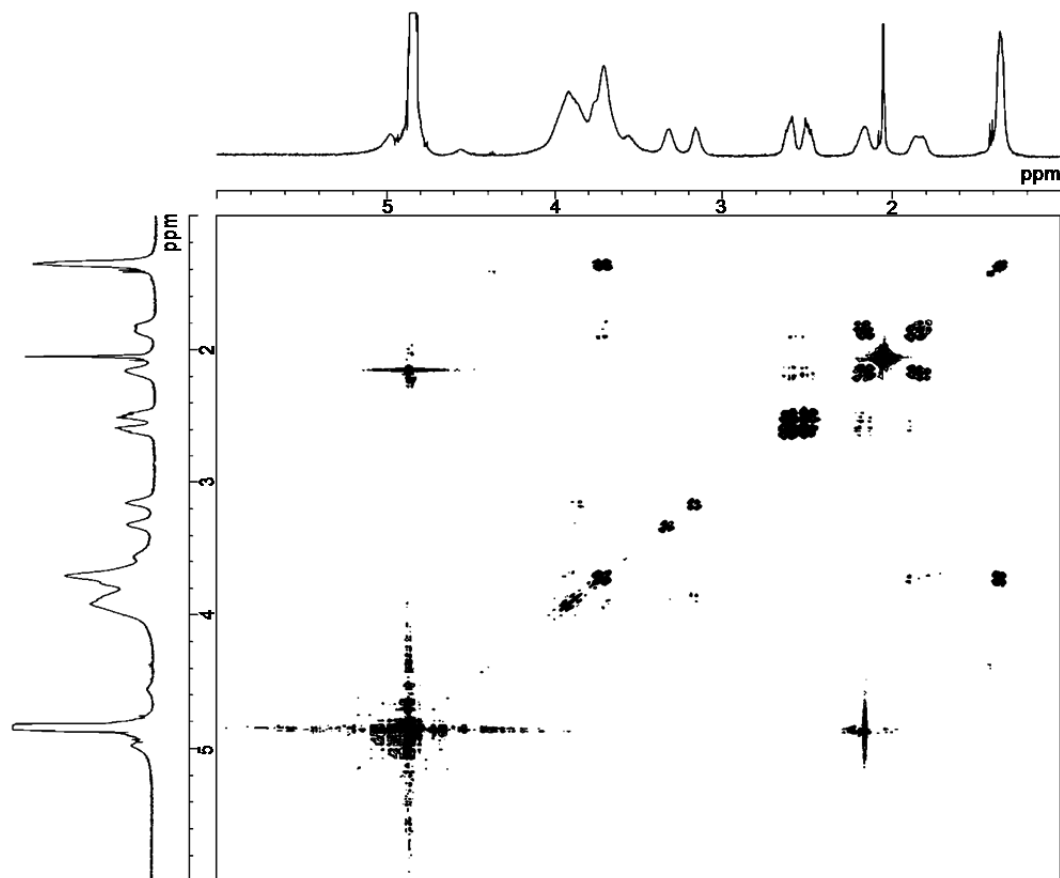


図 2-2-3-9 *N*-カルボキシブチルキトサンの希 TFA/D₂O 中での ¹H,¹H-DQF-COSY スペクトル。縦軸と横軸には *N*-カルボキシブチルキトサンの ¹H-NMR スペクトルが表わされており、それぞれのピーク同士の相関、即ち立体的な近さなどをクロスピークとして表わす。

化学構造の定量評価

以上のピーク帰属を元に、各試料の ¹H-NMR スペクトルのピーク面積を用いた次の関係式により *N*-IPCh と *N*-CBCh の置換度 (DS) および *N*-アセチル化度 (DNAC) が求められる；

$$DS_{IP} = \frac{6S_{1.4}}{6S_{3.0-4.2} - S_{1.4}}$$

$$DNAC_{IP} = \frac{12S_{2.1}}{6S_{3.0-4.2} - S_{1.4}}$$

$$DS_{CB} = \frac{6S_{1.4}}{3S_{3.0-4.2} - S_{1.4}}$$

$$DNAc_{CB} = \frac{6S_{1.7-2.3} - 8S_{1.4}}{3S_{3.0-4.2} - S_{1.4}}$$

$S_{1.4}$ は 1.4 ppm のメチル基由来のピークの面積、 $S_{2.1}$ は 2.1 ppm のアセトアミド基に対応するピーク面積、 $S_{1.7-2.3}$ は *N*-CBCh において 1.7~2.3 ppm に現れるアセトアミド基とメチレン基の 2つのプロトンに由来するピーク面積、 $S_{3.0-4.2}$ は 3.0~4.2 ppm に現れる H2~H6 とメチンプロトン由来のピーク全ての面積をそれぞれ表す。また、置換度を置換と未置換の H2 のピーク面積である $S_{3.3}$ と $S_{3.2}$ を用いて置換率（全アミノ基中の置換の割合）を簡単に算出できるが、置換度（全糖ユニット中の置換の割合）は反応物の DNAc を知る必要がある。

表 2-2-3 *N*-イソプロピルキトサンと *N*-カルボキシブチルキトサンの置換度、*N*-アセチル化度、収率

用いたケトン	反応開始 pH	DS	DNAc	収率 (%)
なし（キトサン）	-	-	0.17	-
アセトン	4.0	0.36	0.17	95.3
	4.5	0.70	0.16	95.9
	5.0	0.67	0.18	97.4
	5.5	0.59	0.17	93.9
	6.0	0.46	0.14	91.8
レブリン酸	4.0	0.05	0.17	92.0
	4.5	0.2	0.15	93.9
	5.0	0.22	0.21	96.0
	5.5	0.18	0.19	94.1
	6.0	0.14	0.16	91.3

表 2-2-3 に、様々な初期 pH から調製された *N*-IPCh と *N*-CBCh の、DS、DNAc の計算結果および収率を記す。カルボニル化合物の添加量、反応時間はそれぞれ 1.25 mmol、72 h にそれぞれ設定した。溶液の pH は、反応開始前に酢酸と水酸化ナトリウムによって調整した。NaBH₃CN による還元では反応中緩やかに pH が上昇するが、一般的に水系反応は塩濃度が高いと反応性が落ちるため、緩衝液によって pH を一定に保つことはしなかった。反応終了時の pH は反応開始時の pH に依存し、7.0~8.0 の間であった。*N*-IPCh と *N*-CBCh は、それぞれ pH 4.5 と pH 5.0 で生成物の置換度が最大となった。これは、NaHBH₃CN による還元で反応系の pH が徐々に上昇するためだと考えられる。pH 4 から開始すると、pH が低く NaHBH₃CN の活性が長く高いまま保たれるので、カルボニルがアルコールに還元される副反応が増え、置換度の低下に繋がる。一方、pH が高いとキトサンおよび生成物が不溶化し

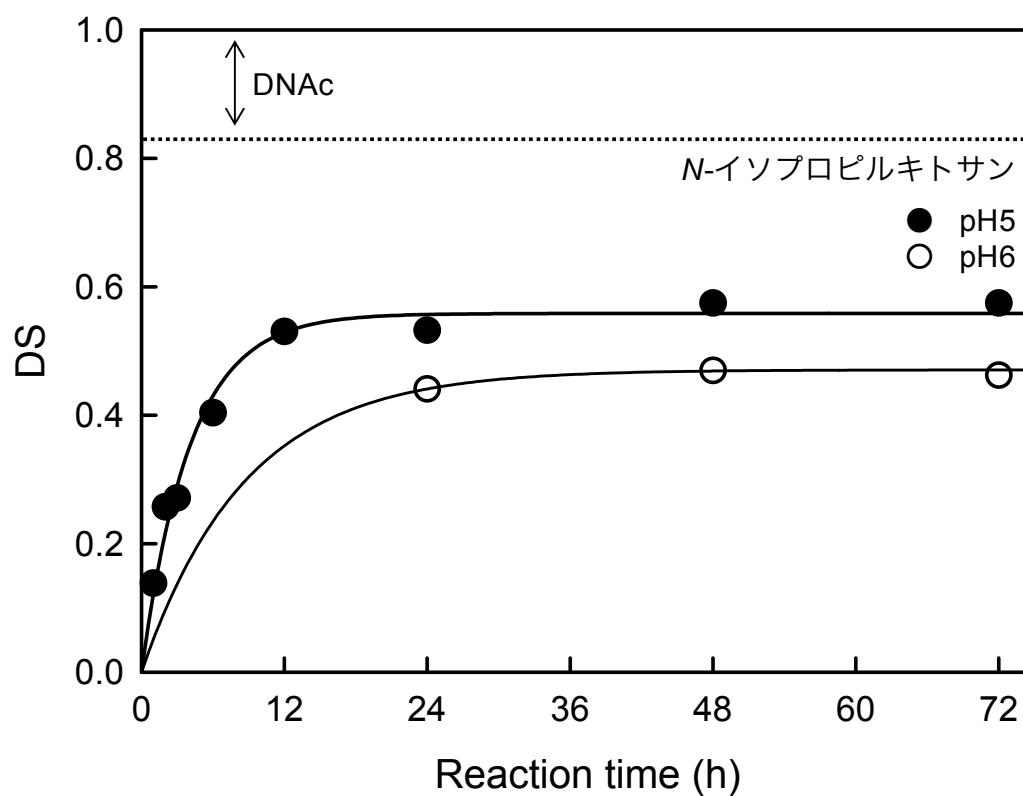


図 2-2-3-10 *N*-イソプロピルキトサンの置換度の経時変化

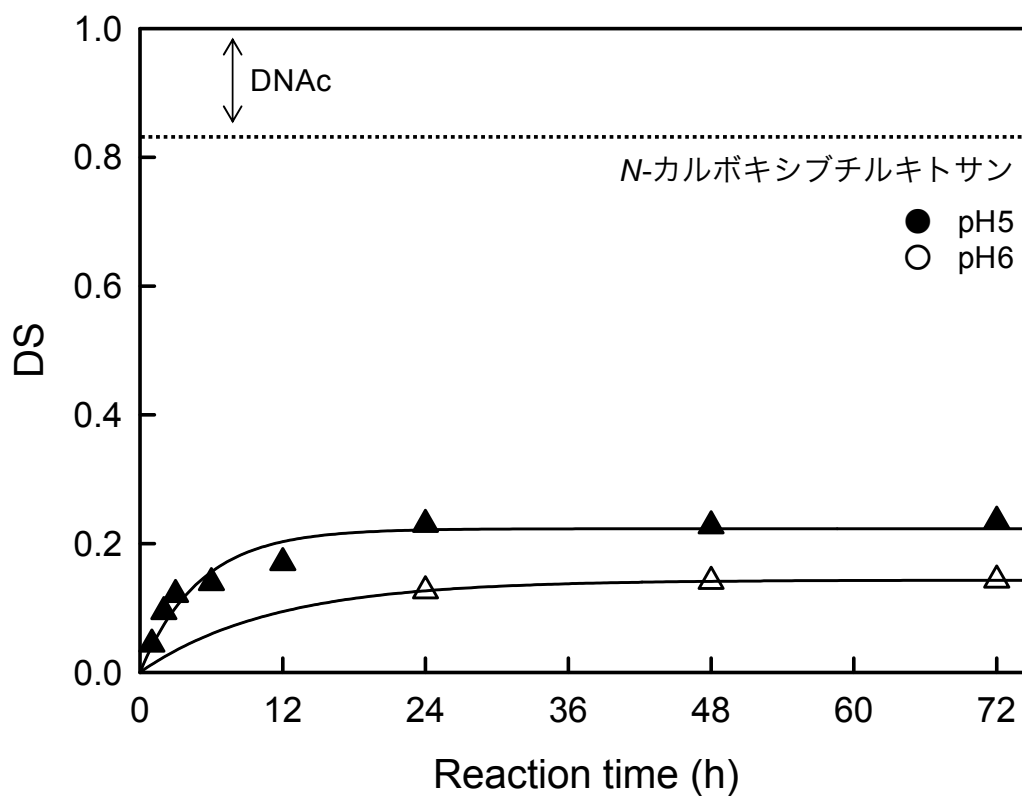


図 2-2-3-11 *N*-カルボキシブチルキトサンの置換度の経時変化

てしまう上反応速度も低下するため、十分な反応効率を得らなかったと推測される。そのため、pH 4.5～5.0 で反応開始するのが最も効率良かったのだと考えられる。また、DNAc はどの試料をとっても、出発物質のキトサンからほぼ変化なかった。水系、常温、常圧という温和な反応条件に加えて、反応系の pH が弱酸性～中性付近であったため、アセトアミド基が反応液中で安定に存在し、加水分解などの化学変化を受けなかったと考えられる。また、すべての条件において収率は 90%以上という高収率であり、わずかなハンドリングロスによる収率低下がみられるのみであった。

一般的に、アゾメチン中間体(水中では水和してアミノールになる)生成の反応速度は pH4.5～5.0 で最速といわれている[14]。従って、より高い pH 条件で調製された *N*-アルキルキトサンが反応終点に達しているか確かめる必要がある。図 2-2-3-10 および図 2-2-3-11 は、*N*-アルキルキトサンの置換度の経時変化を示す。それぞれのカルボニル化合物を 1.25 mol/mol-NH₂ 添加した場合において、反応開始前に設定した pH の置換度の経時変化に与える影響を評価した。いずれのカルボニル化合物、pH においても置換度の上昇は 24 時間でほぼレベルオフしていた。反応時間を長くしても、pH6.0 で調製した *N*-アルキルキトサンの置換度は、pH5.0 で得られる置換度を越えることはなかった。従って、やはり還元的 *N*-アルキル化は pH 4.5～5.0 から反応を開始するのが最適であることが確認できた。

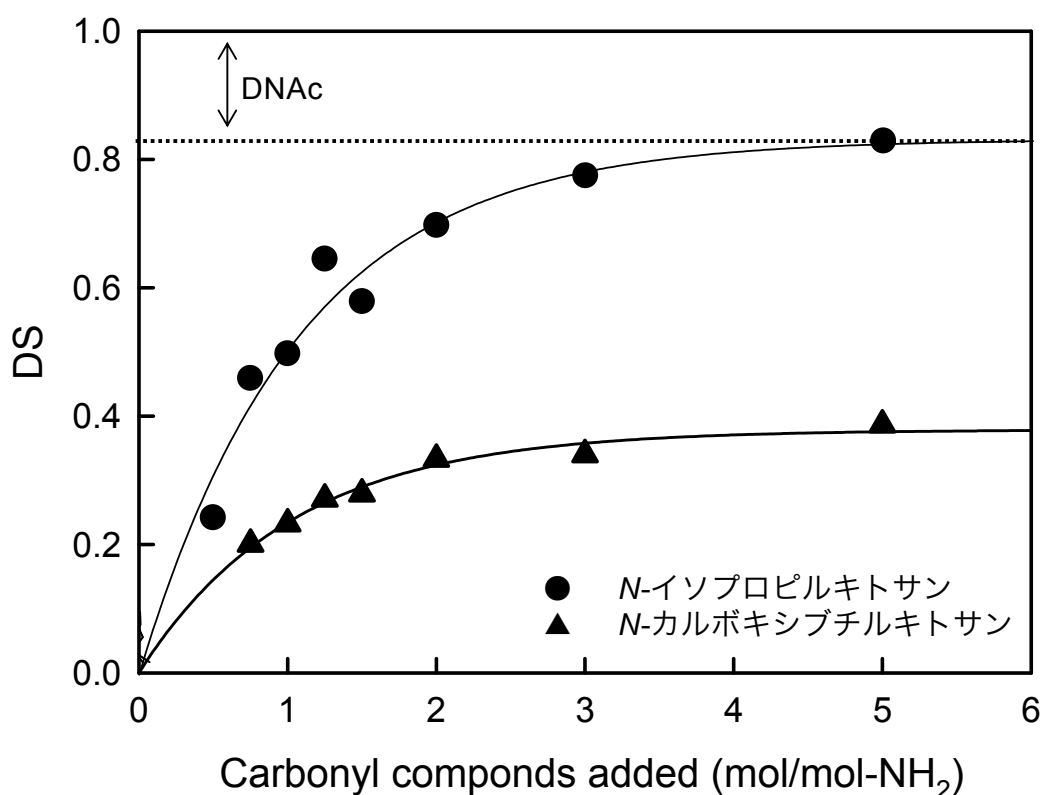


図 2-2-3-12 *N*-イソプロピルキトサンと *N*-カルボキシブチルキトサンの試薬添加量による置換度変化

これまで検討した反応条件では、すべてのアミノ基に官能基を導入することはできなかった。したがって、より高い置換度の *N*-アルキルキトサンを得るために、カルボニル試薬の添加量を変化させた。反応開始時を pH5.0 に、反応時間を 72 時間にそれぞれ設定した。そうして得られた、*N*-アルキルキトサンの置換度を Fig.2-3-2-12 に示す。両カルボニル化合物において、試薬添加量の増加と共に得られる *N*-アルキルキトサンの置換度も増加した。アセトンの添加量がアミノ基に対して 5.0 当量るとき、全てのアミノ基にイソプロピル基が導入された 100%の *N*-イソプロピルキトサンが得られた。

還元的 *N*-アルキル化により直鎖飽和炭化水素をキトサンに導入する先行研究[9]によると、直鎖 *N*-アルキルキトサンは DNAc+DS が 0.5 付近で水に膨潤し、酸性の水に良く溶解する。しかし、*N*-イソプロピルキトサンは酸性溶液には溶解するが、いかなる置換度においても中性の水に膨潤することなく直鎖 *N*-アルキルキトサンとは異なる性質を示した。これはイソプロピル基が嵩高く、アミノ基の水和を阻害したためだと考えられる。このように生成物が水に溶解しづらいにもかかわらず完全な一置換体を得られたのは、おそらくアセトンのカルボニル炭素へのアクセスしやすさと親水性の高さの高さによる考えられる。アセトンはカルボニル炭素の周りにメチル基が2つあるだけで、正に分極したカルボニル炭素とアミノ基が衝突しやすい。一方、レブリン酸は自由運動する-CH₂-CH₂-COOH がカルボニル炭素の立体障害となるため、比較的水溶性の高い生成物が得られるにもかかわらず置換度は最大でも 0.38 だった。またアセトンは親水性であるため、水中で移動速度が早く十分な衝突確率が確保できたと考えられる。例えばキトサンの *N*-ベンジル化では、反応中間体のアゾメチンが比較的安定なベンズアルデヒドを用いながらも、ベンズアルデヒドが水に不溶なため置換度は最大 0.185[12]までしか得られない。

重合度の評価

重合度評価の試料には *N*-IPCh のみを用いた。今回の調製条件では、100%置換された *N*-CBCh は得られず、ヘテロな構造と両性イオン性であることに由来する高い粘度により 0.45 μm のフィルターを通らなかったためである。また本研究の目的は低分子化の有無を確認することが目的であるため、*N*-IPCh の dn/dc 値を求めずキトサンのものを代用した。

分子量評価には、脱アセチル化キトサンと脱アセチル化キトサンより調製した *N*-IPCh を用いた。Yanagisawa らの報告にあるとおり[16]、脱アセチル化していない DNAc=0.17 のキトサンやその誘導体にはアセチル基由来の凝集構造がみられたため、分子量評価には適していなかった。図 2-2-3-13 に各試料の溶出パターンおよび分子量プロットを示す。*N*-IPCh は ¹H-NMR より、すべてのアミノ基がイソプロピル化されていることを確認した (図 2-2-3-14)。多角度光散乱より得られた分子量プロット直線を示し、分子サイズによる分離が確かめられた。分子量プロットと溶出パターンから *N*-IPCh の重合度分布を計算し、図 2-2-3-15 に示した。キトサンと *N*-IPCh の重合度はほとんど変わらず、還元的 *N*-アルキル化によって重合度はほぼ変化しないことが確認された。*N*-IPCh の重合度のほうが、出発物質

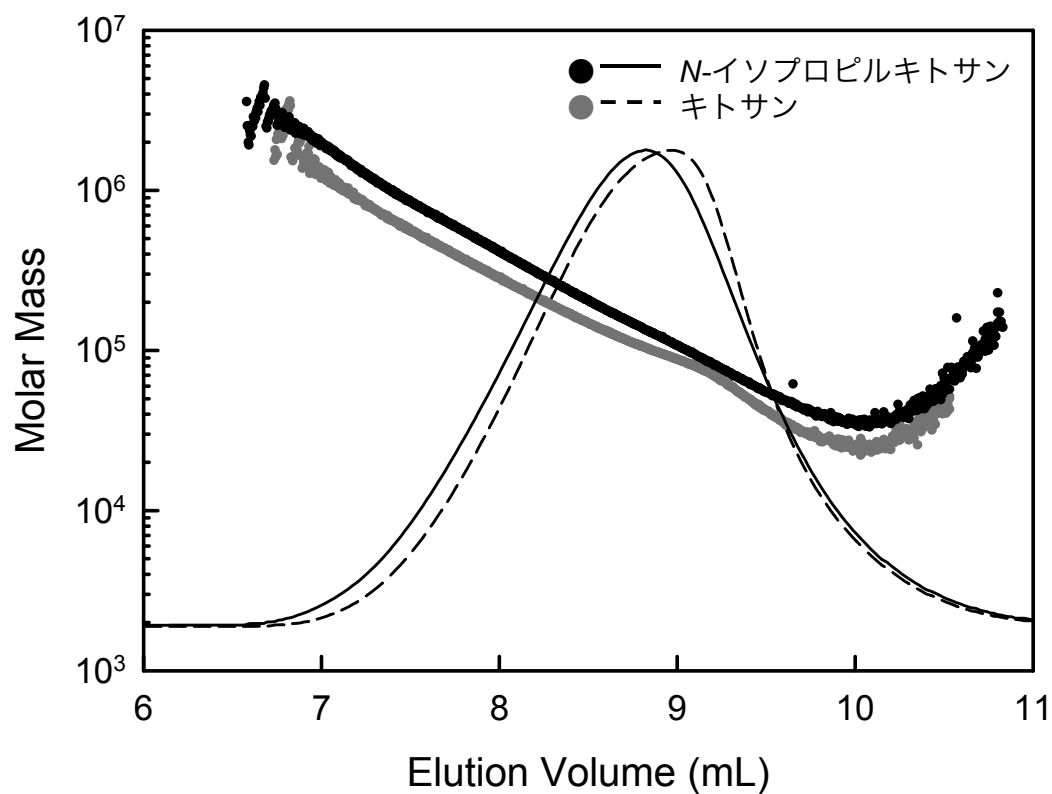


図 2-2-3-13 脱アセチル化キトサンより調製した *N*-イソプロピルキトサンの反応前後での分子量変化

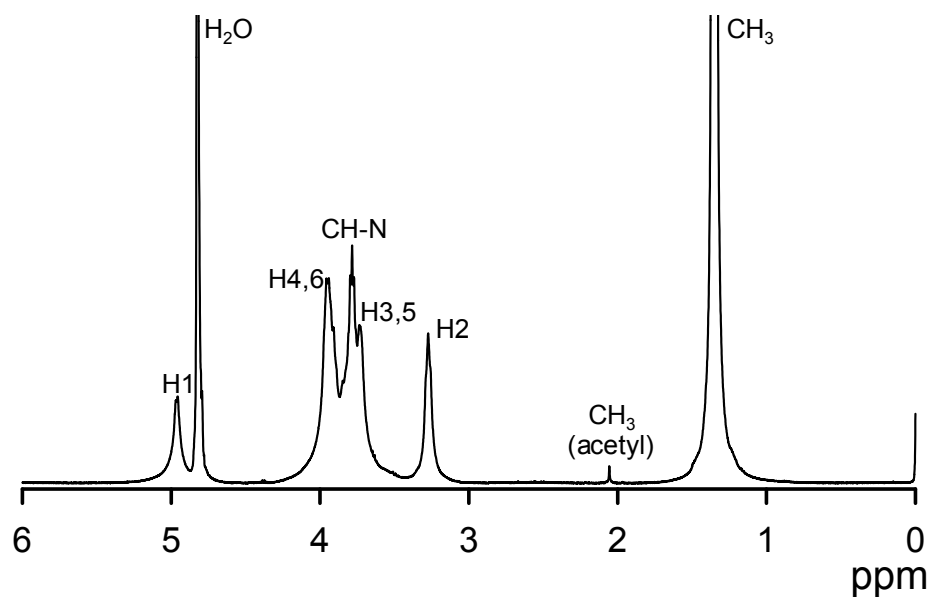


図 2-2-3-14 脱アセチル化キトサンより調製した *N*-イソプロピルキトサンの希 TFA/D₂O 中の ¹H-NMR スペクトル。アセトンを用いて、pH5.0 から反応開始し、24 時間反応させた。

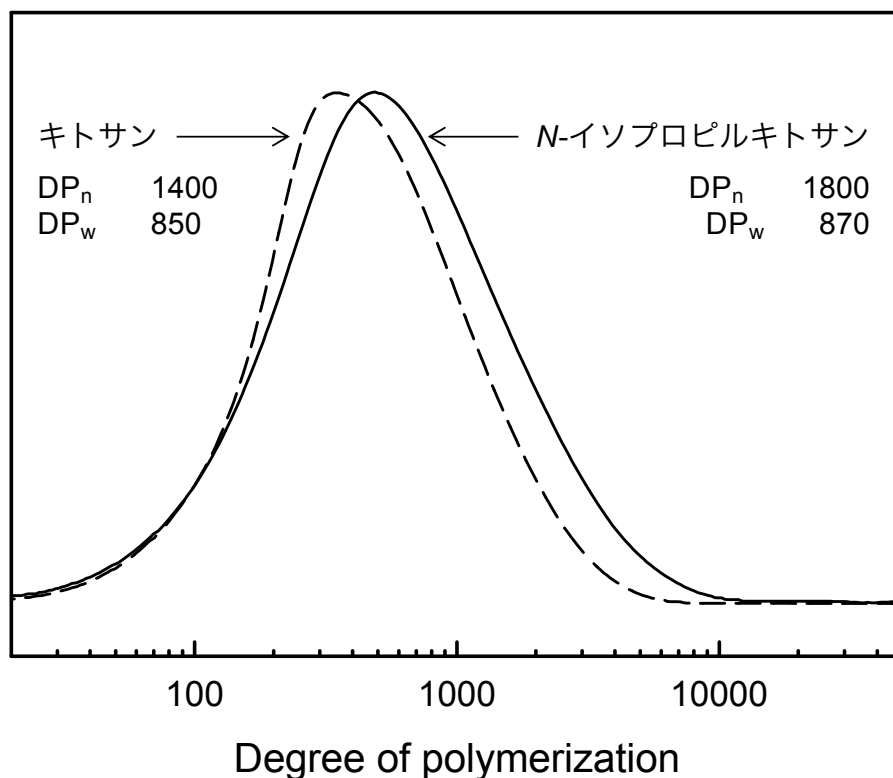


図 2-2-3-15 脱アセチル化キトサンより調製した *N*-イソプロピルキトサンの反応前後での重合度変化

であるキトサンに比べてわずかに高くなっているのは、キトサンと IPCh で共通の dn/dc 値を使ったためによる測定誤差であると考えられる。一方で、糖の還元末端を利用してキトサンに糖を導入できるという報告[10,11]もあるため、キトサン分子同士の還元末端とアミノ基を介した架橋構造がわずかに一部導入されているという可能性も考えられる。

直鎖状高分子と枝分かれ構造のある高分子では、直鎖状高分子の方が伸び切り分子鎖長が長いため、枝分かれ高分子もよりわずかな分子量の変化で溶液中での回転半径が大きく変化することが知られているため、分子量の対数を横軸、根平均二乗半径の対数をとった、コンフォメーション・プロットの傾きから、枝分かれ構造を評価できる[16,17]。図 2-2-3-16 は、キトサンおよび *N*-IPCh のコンフォメーション・プロットを表す。両プロットは理論通りの直線として得られたが、それらの傾きから両試料がこの溶媒中でランダムコイル状の形態をとっていることがわかった。しかし、両プロットの傾きはほぼ変わらず、架橋構造を示すような証拠は得られなかった。これは、架橋構造があまりに少ないため、架橋によるコンフォメーション・プロットに傾きの増加が小さすぎるか、 dn/dc 値をキトサンの値で代用したための誤差であると考えられる。いずれにせよ、還元的 *N*-アルキル化によるキトサン分子量について大きな変化は認められず、架橋について議論するには *N*-IPCh 試料の dn/dc の測定が必要であった。

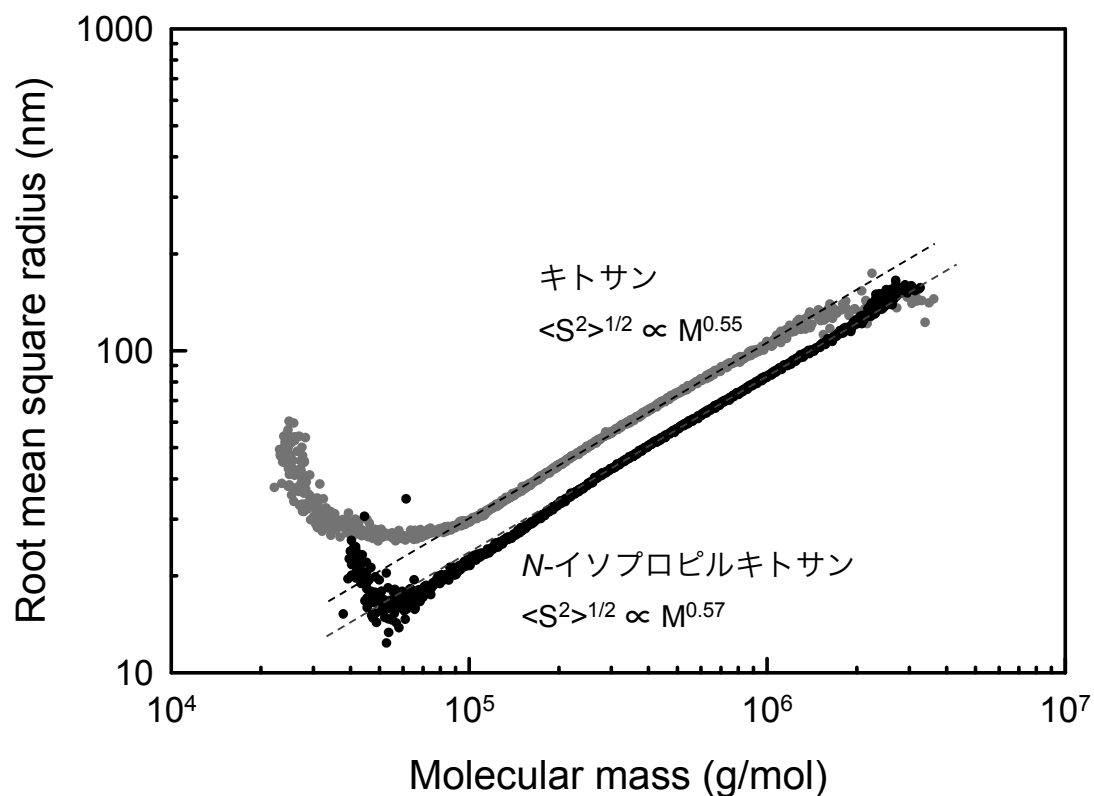


図 2-2-3-16 脱アセチル化キトサンより調製した *N*-イソプロピルキトサンの反応前後での、0.5 M CH₃COOH + 0.1 M NaNO₃ 水溶液中で分子コンフォメーションの変化

2-2-4 結論

アセトンとレブリン酸によって、水系・常温・常圧でキトサンの還元的 *N*-アルキル化により *N*-イソプロピルキトサンと *N*-カルボキシブチルキトサンを得た。反応開始の pH が 4.5-5.0 のとき、得られる *N*-アルキルキトサンの置換度が最も高かった。同じ反応条件では、*N*-イソプロピルキトサンが *N*-カルボキシブチルキトサンの置換度を常に上回っていた。反応中、*N*-アセチル化度には変化がなかった。カルボニル化合物を 5.0 当量用いると、*N*-イソプロピル基と *N*-カルボキシブチル基は、それぞれアミノ基のうちの 100% および 41% に導入された。*N*-イソプロピルキトサンの SEC-MALLS による分子量測定の結果、反応中に低分子化はほぼ起きておらず、反応の前後で重合度はほぼ変化なかった。すなわち、還元的 *N*-アルキル化は幅広い種類の官能基を、水系の温和な条件で導入できる誘導体化法であることが示された。

2-3 キトサン由来の有機ラジカルポリマーの調製

2-3-1 緒言

通常、不対電子を持つラジカルは極めて不安定である。そのため反応性に富み、即座に他の物質と酸化還元反応を起こしてしまう。最も身近なラジカルは空気中の酸素であり、この不対電子のために酸素は様々な金属を腐食する。しかしラジカルを、自然界では植物がリグニンの重合に利用しており[21]、工業的にもラジカル重合により多種多様な合成高分子が開発されてきた[22]。また、比較的安定なラジカル（図 2-3-1-1）も開発されており、その特異な性質が注目されている。例えば、2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシルラジカル（TEMPO）は、ラジカル捕捉剤として反応系中のラジカル捕捉剤[23]や、リビングラジカル重合のキャップ[22]、第一級アルコールを選択的に反応する酸化触媒[24-27]など、広い分野で応用されている。

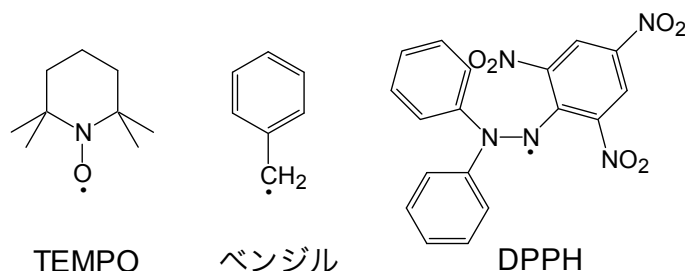


図 2-3-1-1 安定ラジカル種の化学構造

近年、このように安定なラジカルを高分子に導入する試みが行われるようになった。安定ラジカル種である TEMPO をポリエチレングリコール（PEG）の末端に導入した TEMPO 担持 PEG は、低分子の TEMPO と同様に一級水酸基を選択的に酸化する触媒として用いることができ、様々な低分子一級アルコールをアルデヒドへと高い収率で酸化した[28]。この高分子酸化触媒は、TEMPO と違って濾過によって容易に回収できるため、高価な TEMPO のリサイクル利用が行え、経済的な問題を克服できる。また、PEG の代わりに多孔質シリカを用いた TEMPO 担持シリカも開発されており、同様に酸化触媒として作用や触媒としてのリサイクル利用が評価されている[29,30]。

近年、固定化 TEMPO 触媒よりさらに多数の不対電子を分子内に持つ、有機ラジカルポリマーという新しい材料が開発された（図 2-3-1-2）[31-33]。有機ラジカルポリマーは、多数の不対電子をもつため、大量の電子の授受すなわち酸化還元反応を低い活性化エネルギーで繰り返し行えるという特徴がある。このポリマーを正極活物質として用いる有機ラジカル電池は、小型・軽量、フレキシブル、急速充電可能な、これまでにないタイプの新しい電池である[30]。このような新しい特性の電池を開発することは、「いつでも、どこでも、

誰でも」情報やネットワークとつながるユビキタス社会の実現に向けて、重要な意味を持っている。

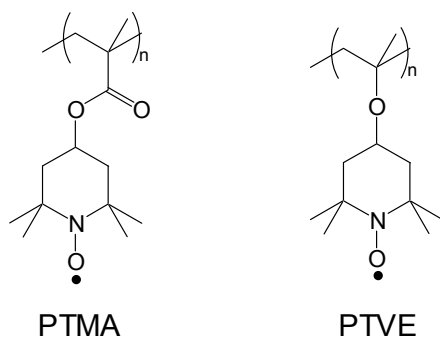


図 2-3-1-2 有機ラジカルポリマーである、ポリテトラメチルピペリジノキシメタクリレート (PTMA) とポリテトラメチルピペリジノキシビニルエーテル (PTVE) の化学構造

有機ラジカル電池の基本的な構造は、リチウムイオン電池と同じであるが、正極にリチウム金属酸化物の代わりに炭素繊維を混合した有機ラジカルポリマーのゲルを用いる。活物質が電子を蓄えられるプラスチックであるため、従来の二次電池に用いられてきた鉛やカドミウムなどの重金属を用いてない。したがって、毒性に伴う諸問題が解決された上、容量を下げずに軽量化ができる。充放電のメカニズムは、ラジカルが繰り返し酸化還元することある (図 2-3-1-3)。すなわち、正極から負極への物質の移動がないので、従来のリチウムイオン電池なら急速充電でも 1 時間半かかっていたところ、30 秒以内で同じ容量を完全に充電できる。

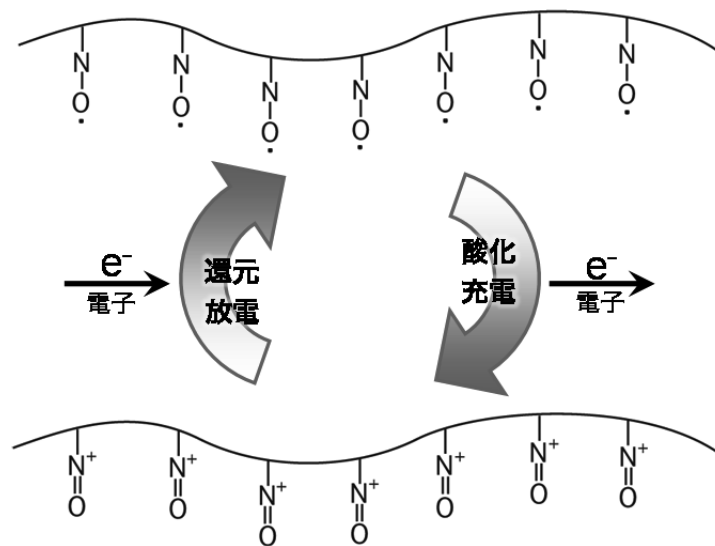


図 2-3-1-3 有機ラジカルポリマーの充放電機構

このように有機ラジカル電池は、次世代を担う電源デバイスであり、有機ラジカルポリマーの普及が期待できる。しかしながら、これまで開発された有機ラジカルポリマーはア

クリル系やビニル系の合成高分子である[31-,33]。そこで本実験では、次世代電源デバイスである有機ラジカルポリマーを、持続可能な天然資源の1つであるキトサンからの調製を目指す。還元的 *N*-アルキル化は TEMPO 担持シリカの調製にも利用されており、前実験の通りキトサンに適用することで幅広い種類の官能基を、水系の温和な条件で導入できる。したがって、キトサンと還元的 *N*-アルキル化の利用により、資源・調製法・廃棄と高い環境安全性をもつ新規の有機ラジカルポリマーの開発が期待できる。

2-3-2 実験

試料

出発物質として、市販のキトサン（Chitosan 100, Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan、Ch とする）および脱アセチル化処理を行ったキトサンを用いた。キトサンの脱アセチル化については、前述のとおり既報に従ってキトサンを熱アルカリ処理した[11]。脱アセチル化キトサンは ChDAc とした。キトサン試料の各種測定値は表 2-3-2 に示すとおりである。DNAc、分子量は、それぞれ ¹H-NMR および SEC-MALLS によって測定した。測定法の詳細に関しては、実験 2-2 または先行研究[15,16]と同様の方法で行った。脱アセチル化処理では熱アルカリを用いるため β-1,4 結合の切断が起こる。しかしアセトアミド基が多いキトサンは溶液中で一部凝集するため、分子量低下は数値上の見かけよりも小さい。

表 2-3-2 出発物質に用いたキトサンの DNAc および分子量

	DNAc	M _n (DP _n)	M _w (DP _w)	M _w / M _n
Ch	0.17	4.03×10 ⁵ (185)	7.56×10 ⁵ (347×10)	1.88
ChDAc	0.02	1.91×10 ⁵ (369)	3.07×10 ⁵ (670)	1.81

カルボニル化合物であり安定ラジカル種である 4-oxo-TEMPO（図 2-3-2）、NaBH₃CN およびその他の試薬や溶液（Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan）は試薬グレードのものを、特別な前処理なく用いた。

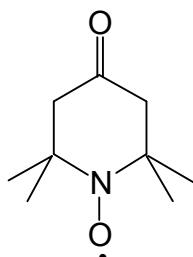


図 2-3-2 4-oxo-TEMPO の化学構造

キトサンの還元的 *N*-TEMPO 化

キトサンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-TEMPO キトサンを調製した。具体的は前実験にならって行った。出発物質であるキトサン（アミノ基; 1.0 mmol）と酢酸を適量、脱イオン水（20mL）に加え、pH4.8 の均一なキトサン溶液を得た。溶液を攪拌しながら 4-オキシ TEMPO をアミノ基に対し 5.0 モル当量加え、充分均一な溶液が得られたら NaBH_3CN （10 mmol）を加えて反応開始した。反応停止のため、1 M NaOH 水溶液によって pH を 10 以上に調整した。得られた生成物は、70%エタノールにより洗浄し、凍結乾燥によって回収した。

反応条件因子として、反応時間を 1~72 時間変化させた。

N-アセチル化

出発物質に *N*-TEMPO キトサンを用いて、*N*-アセチル化を行った。手順は、Hirano らの報告[4]に従った。まず *N*-TEMPO キトサン（アミノ基量; 1 mmol）を 10%の酢酸水溶液 4 mL に加えた。そこに 10 mL のメタノールで混合液を希釈し、5 mmol の無水酢酸を添加した。24 時間後、不溶物を濾過により集め、水でよく洗浄した。生成物は真空乾燥にて回収した。

N,O-アセチル化

出発物質に *N*-TEMPO キトサンを用いて、*N,O*-アセチル化を行った。手順は、Sashiwa らの報告[34]に従った。まず *N*-TEMPO キトサン（アミノ基量; 1 mmol）を 4 mL のメタンスルホン酸中において室温で 1 時間処理した。そこにアミノ基に対し 5 倍量のアセチルクロリドを加え、5 時間室温で攪拌を続けた。その後、反応停止のため 6 g の氷を加えた。

反応混合液は充分希釈したあと、濾過により水で洗浄した。さらに、 NaHCO_3 による中和後、透析によって生成し、真空乾燥によって生成物を回収した。

化学構造解析

IR 吸収スペクトルはフーリエ変換核赤外分光装置 Nicolet MAGNA-IR 860（Thermo Fisher Scientific Inc., Germany）を用いて、KBr 錠剤法によって得られた。生成物の置換度は元素分析器 Flash EA1112（Thermo Fisher Scientific Inc., Germany）の C/N 比により求めた。

電気化学測定

サイクリック・ボルタンメトリーは電気化学を代表する基本的な測定の 1 つである。ポテンシオスタットに接続された 3 つの電極により、試料にかかる電圧を一定に保つことや走査することができたため、ある電圧での電流値を測定可能である。サイクリック・ボルタンメトリーとは、ある決まった領域で低電圧から高電圧へ、高電圧から低電圧へ、再び低電圧から高電圧へと繰り返す測定法である。こうして得られる電圧-電流曲線（サイクリック・ボルタモグラム）からは、酸化還元反応電位、電子移動速度、電位窓、酸化還元

反応の可逆性など、電気化学の基礎的な情報が多く得られる。

本実験で用いた装置は、CHI600B electrochemical workstation (Shanghai Chen Hua Electric Furnace Corp Ltd., China) を使用し、参照極は Ag/AgCl、対電極は白金を、電離液には 0.1 M Bu₄NClO₄/アセトニトリル溶液をそれぞれ用いた。試料を、ITO ガラス上にキャストしてフィルムを形成し、そのフィルムをキャストした ITO ガラスを作用極として測定を行った。

2-3-3 結果および考察

生成物の性質

反応前はキトサンが溶解した均一な溶液であったが、4-oxo-TEMPO との反応物は全て析出していた。置換度の高いものほど沈殿物は粉状に近く、また TEMPO 基由来と考えられる薄橙色をしていた (図 2-3-3-1)。

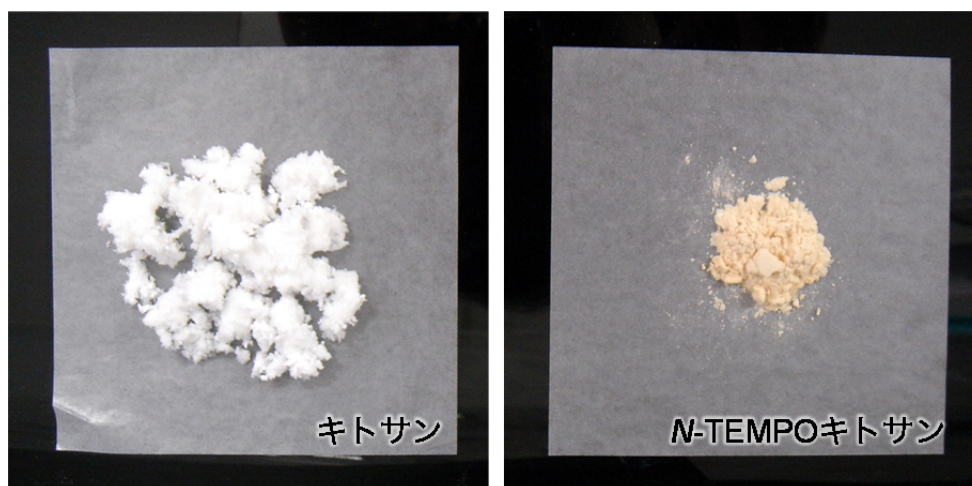


図 2-3-3-1 キトサンおよび生成物の形態。ともに質量 0.1 g。

生成物は水に馴染むが、酸や塩基を用いても水に溶解させることはできなかった。生成物は、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (DMI) にのみ溶解し、性質の近い溶媒である *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMAc)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルフォキシド (DMSO) には溶解しなかった。また反応物の DMI 溶液を加熱すると、溶液の色がオレンジから橙褐色に変化した (図 2-3-3-2)。これは、加熱により空気中の酸素と反応し、酸化されたためと考えられる。

図 2-3-3-3 はキトサンおよび生成物の熱重量分析である。キトサンは約 220°C で熱分解が始まったのに対し、生成物は 200°C 付近から始まる二段階の熱分解が起こるようになった。一段階目は置換基の TEMPO から NO_x の脱離で、二段階目はその他の部分の熱分解だと考えられる。したがって、有機ラジカル電池へ応用するための耐熱性能は充分あった。

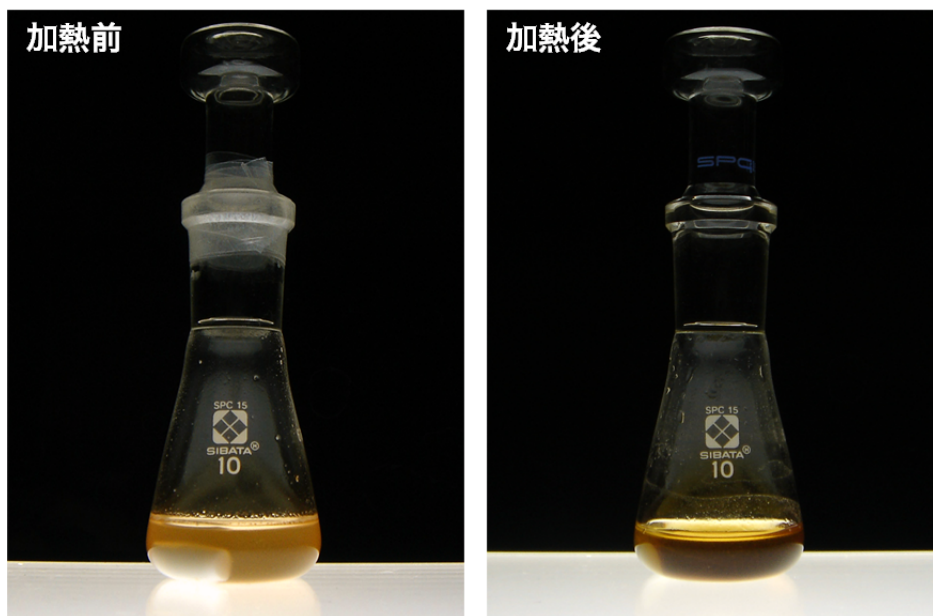


図 2-3-3-2 生成物の DMI 溶液の 80℃の熱処理による色変化

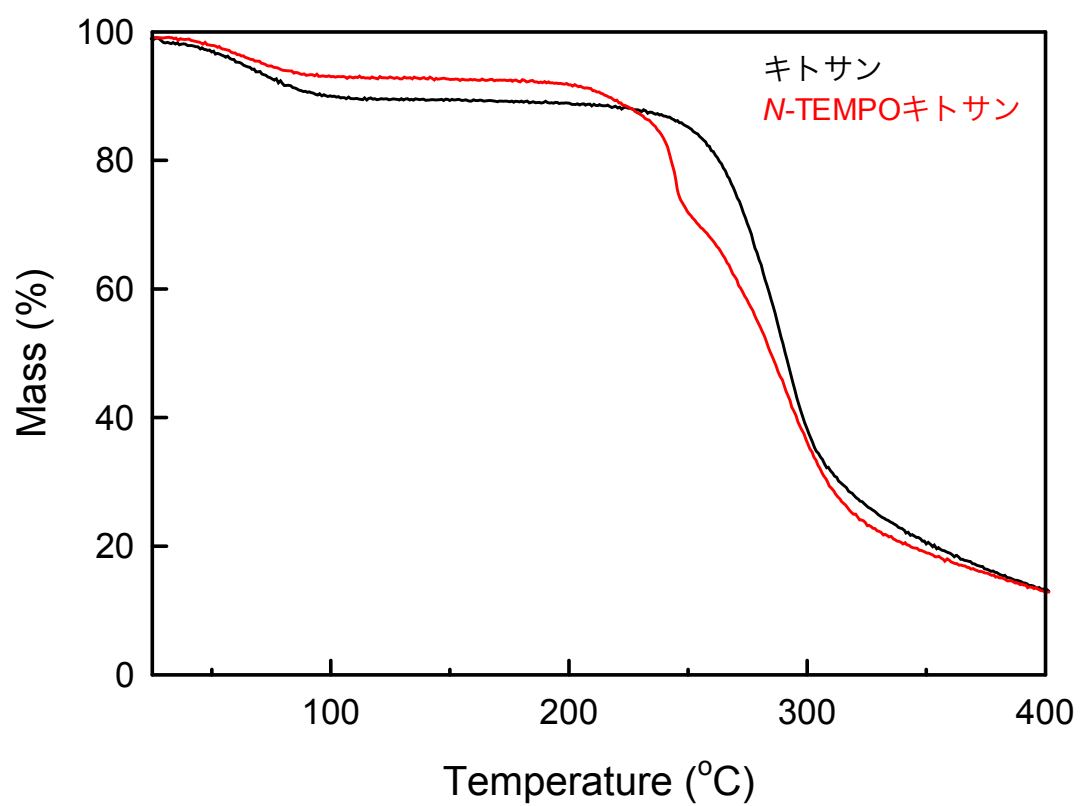


図 2-3-3-3 キトサンおよび生成物の熱重量分析

化学構造分析

図 2-3-3-4 は、キトサンと 4-oxo-TEMPO を用いた還元的 *N*-アルキル化の前後での赤外吸収スペクトルである。生成物のスペクトルは、反応前のキトサンのスペクトルから変化していた。生成物のスペクトルには、約 1380 cm^{-1} にはキトサンに存在しなかったニトロキシ基特有の吸収がみられた。他にも、 2980 、 2940 、 2880 、 1740 、 1240 cm^{-1} にアルキル基由来の吸収の増加、 1680 、 1100 cm^{-1} に C-N 結合由来の吸収の増加、 940 cm^{-1} 付近に一級アミン由来の吸収の減少が確認された。したがって、期待通りの反応が進み、*N*-(2,2,6,6-テトラメチ

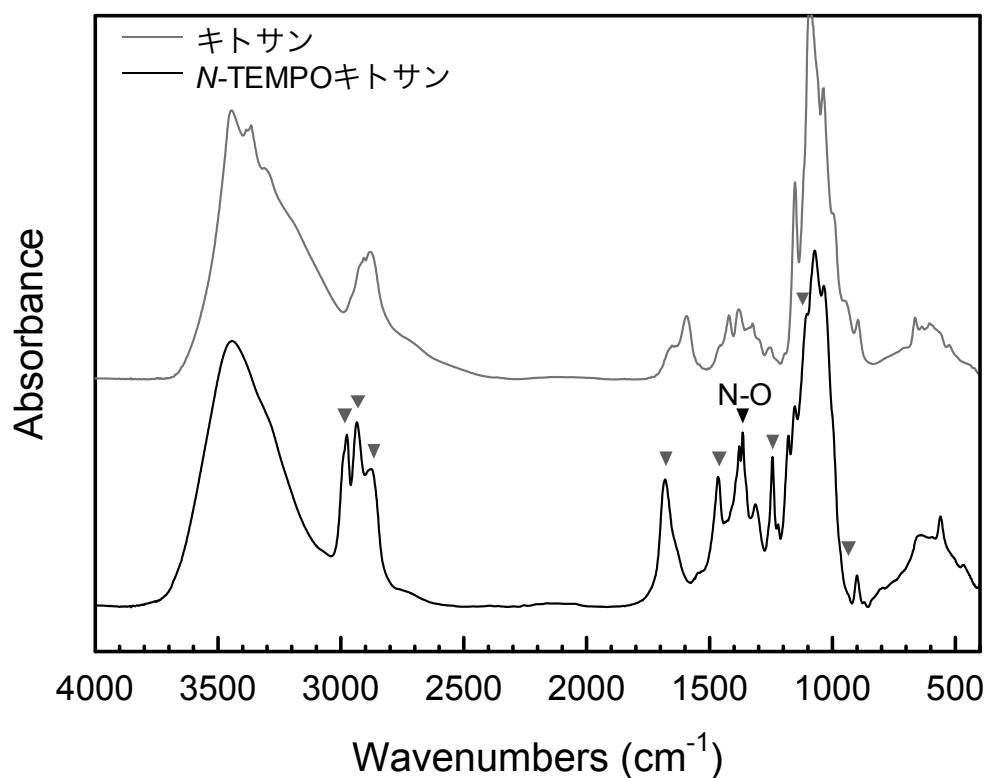


図 2-3-3-4 キトサンと *N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)-キトサンの IR 吸収スペクトル

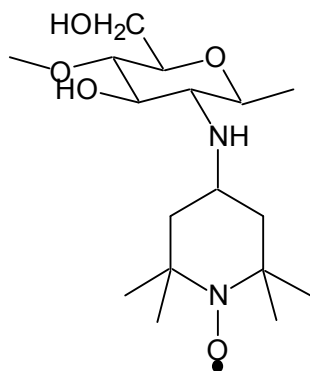


図 2-3-3-5 *N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンの化学構造

ルピペリジノキシ)キトサン (*N*-TEMPO キトサン；図 2-3-3-5 に化学構造を示す) が得られたことが確認された。

化学構造が明らかになったため、置換度の評価が可能である。しかし、ラジカル種のような常磁性の物質は電子スピンと核スピン間の強い相互作用により、NMR 測定が難しい。したがって、元素分析により得られる C/N 比より置換度を計算した。表 2-3-3-1 は、各種反応条件で得られた *N*-TEMPO キトサンの置換度および収率である。高い置換度の *N*-TEMPO キトサンを得るため、4-oxo-TEMPO 添加量は 5.0 mol/mol-NH₂ に設定した。前述の *N*-IPCh および *N*-CBCh の場合と同様、生成物の収率は高く、すべての条件において 90% 以上であった。反応時間の経過とともに置換度は上昇し、48 時間を過ぎると一定になった。すなわち、アセトンやレブリン酸を 1.25 mol/mol-NH₂ 加えたときに比べて、4-oxo-TEMPO は反応完了までに長時間を要した。これは、カルボニル化合物の量が増えたことおよび、ニトロキシラジカル (N-O・) がアミノール (N-OH) に還元されるため、NaBH₃CN が余分に必要となったためだと考えられる。また、試薬添加量を増やすことで、より高い置換度の *N*-TEMPO キトサンを得た。4-oxo-TEMPO を 5.0 mol/mol-NH₂ 加えたとき、キトサンからと脱アセチル化キトサンから調製した *N*-TEMPO キトサンの置換度は、それぞれ 0.47 および 0.89 であった。脱アセチル化により置換度が向上したのは、アセトアミド基はキトサン分子同士の凝集を引き起こすためである。アセトアミド基量が多いほど反応中の早い段階で析出し、反応試薬がアクセスしづらくなったと考えられる。

表 2-3-3-1 *N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンの各条件で得られる置換度と収率

DNAc	反応時間 (h)	DS	収率 (%)
0.17	1	0.01	94.6
0.17	2	0.05	93.1
0.17	3	0.14	97.8
0.17	6	0.13	96.3
0.17	12	0.13	95.5
0.17	24	0.35	96.5
0.17	48	0.47	94.9
0.17	72	0.47	97.1
0.02	72	0.89	95.4

2-2-3 の結果と比較すると、4-oxo-TEMPO はアセトンより得られる *N*-IPCh に比べて置換度は低かったが、レブリン酸より得られる *N*-CBCh と比較するとより高い置換度が得られた。レブリン酸より反応性が良かったことは、前述のとおりカルボニル炭素へのアクセシビリティで説明ができる。レブリン酸の (-CH₂-CH₂-COOH) は自由回転によりカルボニル炭素の障害となるが、4-oxo-TEMPO は六員環を形成して動きが制限されているためカル

ボニル炭素は比較的アクセスしやすい。すべてのアミノ基を置換できなかった原因に関しては、生成物の置換度と水中での不溶化する度合いとの関係や、反応速度の遅さなど様々な要因が考えられるが、詳細は不明である。

電気化学測定

電池に用いる上で、有機ラジカルポリマーに求められる性質として置換度の高さがある。有機ラジカル電池は、ニトロキシラジカルの酸化還元により充放電を行うため、ニトロキシラジカルの数が電池の電気容量に対応する。置換度の高い有機ラジカルポリマーほど、単位質量あたり電気容量が高く、その分軽い電池を作ることができる。したがって、サイクリック・ボルタンメトリーには、最も置換度の高い $\text{DNAc}=0.02$ 、 $\text{DS}=0.89$ の N -TEMPO キトサンを用いた。

図 2-3-3-6 に N -TEMPO キトサンのサイクリック・ボルタモグラムを示す。5回のサイクル全てにおいて、上に凸の酸化ピークと下に凸の還元ピークが両方得られた。即ち、 N -TEMPO キトサンは繰り返し酸化還元つまり充放電が可能であった。 N -TEMPO キトサンの酸化還元による電子の授受の機構は図 2-3-3-7 のように考えられる。

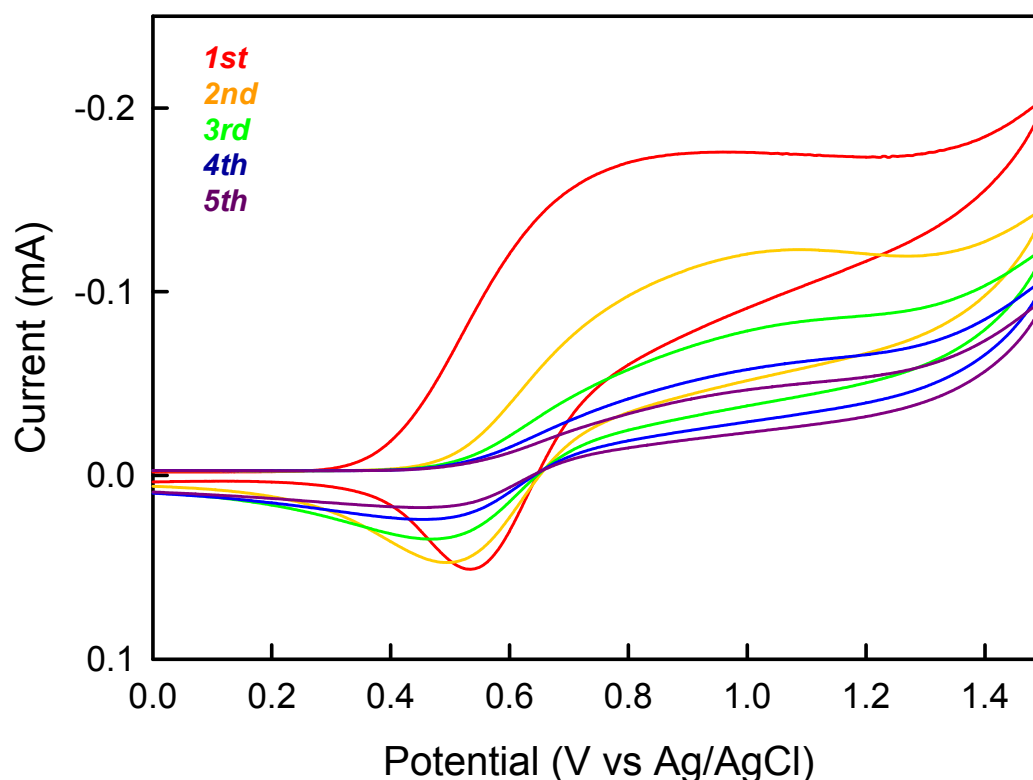


図 2-3-3-6 N -(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)-キトサンのサイクリック・ボルタモグラム。作用極には ITO ガラスを用い、そこに予め試料のキャスト・フィルムを作成し、測定を行った。参照極は銀/塩化銀電極、対電極は炭素電極、電離液は $0.1 \text{ M Bu}_4\text{NClO}_4/\text{アセトニトリル}$ 溶液を用いた。

しかし、図 2-3-3-7 に示すとおり酸化還元反応が進行するならば、放出される電子の量と

授受される電子の量が等しいため、サイクリック・ボルタモグラムの酸化ピークと還元ピークの面積は等しいはずである。実際は酸化ピークが還元ピークに比べて大きく幅広く、回数を重ねるごとにサイクリック・ボルタモグラムのピークは小さくなっていた。これは、酸化により *N*-TEMPO キトサンが分解していることを示唆している。したがって、*N*-TEMPO キトサンをこのまま有機ラジカル電池に応用することは実用上困難である。

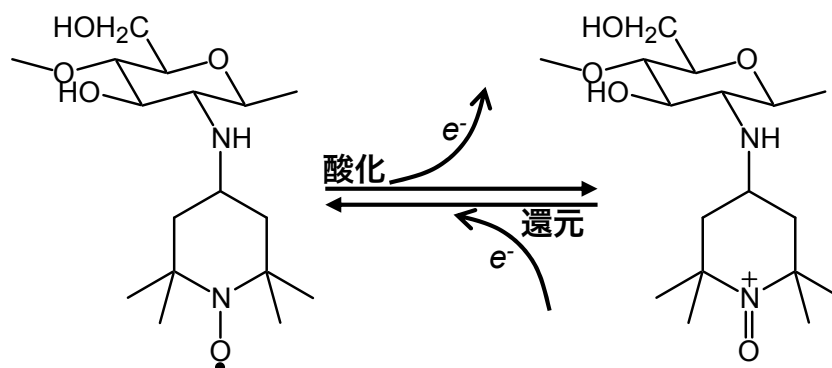


図 2-3-3-7 *N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)-キトサンの酸化還元反応の機構

この原因は、キトサンがもつアミノ基にあると考えられる。Kato らは、キトサンに TEMPO を用いた酸化反応を適用し、一級水酸基すなわち C6 位を選択的に酸化してキトサンよりウロン酸を得ようと試みている[23]。この研究では、様々な種類のセルロースおよびキチン・キトサンに TEMPO 酸化を試みているが、再生セルロース、マーセル化天然セルロース、キチンからウロン酸を得ることはできたが、キトサンからは激しい低分子化によりウロン酸を得ることはできなかった。Kato らはこれを、キトサンに豊富に含まれるアミノ基が原因だと考え、実際に *N*-アセチル化したキトサンからウロン酸を得ることに成功した[33]。TEMPO 担持シリカの場合[27]に自己酸化分解が起きづらかったのは、固体であるシリカ表面に短い炭化水素鎖で結合しているため、ニトロキシラジカルがアミノ基と接触しにくいからだと思われる。しかし、10 回の回収・酸化で徐々に触媒としての活性が落ちていることから、TEMPO 担持シリカでも同様の自己酸化分解は起こっていると考えられる。おそらくアミノ基が電気的に酸化されニトロ基になり、C2 位に生じたニトロ基の電子吸引性により β -1,4 グリコシド結合が開裂していると考えられる。

N-TEMPO キトサンのアセチル化

Kato らは、DNAC の高いキチン・キトサンから TEMPO 酸化により水溶性高分子を得ることに成功した[35]。つまり、C2 位のアミノ基をアセチル化により保護することで、*N*-TEMPO キトサンの放電による自己酸化分解を防ぐことができると考えた。

アセチル化は、Hirano らによる水系での選択的 *N*-アシル化[4]および、Sashikawa らによる *N,O*-アシル化 [34] を参考にした。得られた生成物の DS は表 2-3-3-2 のとおりである。アセチル基の置換度は、元素分析の C/N 比より求めた。*N*-アセチル化、*N,O*-アセチル化の

両方において、アセチル基の増加が確認された。しかし、*N*-アセチル化は充分でなく、すべてのアミノ基をアセチル化することが出来なかった。*N,O*-アセチル化に関しても同様であり、*N*-TEMPO キトサン中のアミノ基のアセチル化による保護は難しかった。これはおそらく、TEMPO が置換したアミノ基の立体障害と、不均一反応であるためであると考えられる。

表 2-3-3-2 アセチル化 *N*-TEMPO キトサンの DS および収率

	DS _{TEMPO}	DS _{acetyl} [*]	収率 (%)
<i>N</i> -アシル化[4]	0.89	0.26	92.8
<i>N,O</i> -アシル化[32]	0.89	2.01	70.2

^{*} *N*-アセチル基と *O*-アセチル基を区別しない

アセチル化した *N*-TEMPO キトサンのアミノ基は完全にはアセチル化されていないため、*N*-TEMPO キトサンと同様にサイクリック・ボルタンメトリー中に大きく幅広い酸化ピークが出現し、繰り返すごとにピーク面積が低下していった。したがって、*N*-TEMPO キトサンを有機ラジカル電池に応用することは困難であると判断した。

2-3-4 結論

キトサン、4-oxo-TEMPO、NaBH₃CN から、水中、常温、常圧という温和な条件で、*N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンを調製した。*N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンは 1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノンに溶解し、溶液中で加熱により色が変わった。4-oxo-TEMPO の添加量が 1.25 mol/mol-NH₂ のとき、反応時間の進行とともに置換度の上昇がみられ、48 時間でレベルオフしていた。脱アセチル化キトサンを 5 mol/mol-NH₂ の 4-oxo-TEMPO と反応させると、*N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンの置換度は 0.89 に達した。この高置換度 *N*-(2,2,6,6-テトラメチルピペリジノキシ)キトサンは、サイクリック・ボルタンメトリーにより繰り返し酸化還元することがわかった。しかし、酸化中に自己分解しており、何百回と繰り返し充放電される二次電池にそのまま使用することは困難と考えられる。これはアミノ基を持つ、キチン・キトサンを出発物質として用いる限り防ぎ難い問題であった。しかしながら本研究により、持続可能な資源であるバイオマスから有機ラジカル電池への応用の可能性が示された。そのため、セルロースなど他のアミノ基を持たないバイオマスに TEMPO を導入することで、新しい生物由来の繰り返し可逆的に酸化還元を繰り返せる有機ラジカルポリマーの調整が期待される。

参考文献

- [1] K. Kurita, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1921-1971
- [2] K. Kurita, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203-226
- [3] R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanualli, S. Mariotti, *Carbohydr. Res.* 10 (1982) 199-214
- [4] S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Carbohydr. Res.* 47 (1976) 315-320
- [5] K. Kurita, M. Uno, Y. Saito, Y. Nishiyama, *Chitin Chitosan Res.* 6 (2000) 43-50
- [6] S. Ifuku, T. Miwa, M. Morimoto, H. Saimoto, *Green Chem.* 13 (2011) 1499-1502
- [7] H. Sashiwa, N. Yamamori, Y. Ichinose, J. Sunamoto, S. I. Aiba, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1250-1254
- [8] R. F. Borch, M. D. Berstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2897-2904
- [9] R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanualli, S. Mariotti, *J. Membr. Sci.* 16 (1983) 295-308
- [10] M. Yalpani, L. D. Hall, *Macromolecules* 17 (1984) 272-281
- [11] M. Yalpani, L. D. Hall, M. A. Tung, D. E. Brooks, *Nature* 302 (1983) 812 - 814
- [12] W. Sajomsang, S. Tantayanon, V. Tangpasuthadol, M. Thatte, W. H. Daly, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 79-87
- [13] R. A. A. Muzzarelli, V. Ramos, V. Stanic, B. Dubini, M. Mattioli-Belmonte, G. Tosie, R. Giardino, *Carbohydr. Polym.* 36 (1998) 267-276
- [14] J. Hine, C. Y. Yeh, *J. Am. Chem. Soc.* 89 (1967) 2669-2676
- [15] A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, *Polym. Bull.* 26 (1991) 87-94
- [16] M. Yanagisawa, Y. Kato, Y. Yoshida, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 192-198
- [17] Y. Yoshida, M. Yanagisawa, A. Isogai, N. Suguri, N. Sumikawa, *Polymer* 46 (2005) 2548-2557
- [18] T. Isogai, M. Yanagisawa, A. Isogai, *Cellulose* 15 (2008) 815-823
- [19] R. A. A. Muzzarelli, P. Ilari, M. Tomasetti, *Carbohydr. Polym.* 20 (1993) 99-105
- [20] M. Rinaudo, J. Desbrières, P. L. Dung, N. T. Binh, N. T. Dong, 46 (2001) 339-348
- [21] L. B. Davin, H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* 275 (1997) 362-366
- [22] C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.* 101 (2001) 3661-3688
- [23] T. A. Seaton, J. M. Cooper, A. H. V. Schapira, *Brain Res.* 777 (1996) 110-118
- [24] A. E. J. de Nooy, A. C. Besemer, H. van Bakkum, *Carbohydr. Res.* 269 (1995) 89-98
- [25] A. Isogai, Y. Kato, *Cellulose* 5 (1998) 153-164
- [26] T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules* 5 (2004) 1983-1989
- [27] T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, A. Isogai, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2485-2491
- [28] G. Pozzi, M. Cavazzini, S. Quici, M. Benaglia, G. Dell'Anna, *Org. Lett.* 6 (2004) 441-443
- [29] C. Bolm, T. Fey, *Chem. Commun.* 9 (1999) 1795-1796
- [30] T. Fey, H. Fischer, S. Bachmann, K. Albert, C. Bolm, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8154-8159

- [31] K. Nakahara, S. Iwasa, M. Satoh, Y. Morioka, J. Iriyama, M. Suguro, E. Hasegawa, *Chem. Phys. Lett.* 359 (2002) 351-354
- [32] H. Nishide, S. Iwasa, Y. J. Pu, T. Suga, K. Nakahara, M. Satoh, *Electrochim. Acta* 50 (2004) 827-831
- [33] T. Katsumata, M. Satoh, J. Wada, M. Shiotsuki, F. Sanda, T. Masuda, *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 1206-1211
- [34] H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, H. Zhu, H. Nagano, Y. Omura, H. Saimoto, Y. Shigemasa, S. I. Aiba *Biomacromolecules* 3 (2002) 1120-1125
- [35] Y. Kato, J. Kaminaga, R. Matsuo, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 58 (2004) 421-426

第三章

キチン・キトサンの NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化

3-1 背景

キチン・キトサンの誘導体化は、主にC3-OHとC6-OHおよびC2-NH₂への求電子置換反応を利用して行われる。このとき、水酸基とアミノ基の反応性の差を利用すれば、アミノ基のみを選択的に誘導体化できる。これまでキチン・キトサンに適用された*N*-選択的誘導体化法には、還元的*N*-アルキル化[1-4]、*N*-アシル化[1,2,5]、*N*-フタロイル化[1,2,6,7]、Michael反応[8]、水系での*N*-アルキル化[9,10]がある。水系*N*-アルキル化は、工業レベルで利用されるキチン・キトサンの誘導体化の*N,O*-アルキル化[1,2,11,12]を元に開発された[9,10]。*N,O*-アルキル化は、カルボキシメチルセルロースの調製に用いられるWilliamson合成と同様の方法で行われ、ハロゲン化アルキルおよびNaOHを用いて水と2-プロパノールの混合溶液中で反応を行う。この方法では、水酸基とアミノ基の両方にアルキル化が進行し、*N,O*-アルキルキトサンが得られる。一般的に、水系での水酸基への求電子置換反応はアルコシキ基 (-O-) から進むといわれているため、強塩基を反応のプロモーターとして用いる。一方、アミノ基はアンモニウム基 (-NH⁺-) になり非共有電子対がなくなる限り、十分な反応性を持つと言われている。従って、水酸基とアミノ基が、それぞれ-OHおよび-NH₂型をとるpHで置換反応を行えば、*N*-選択的誘導体化が可能であると期待できる。キトサンのアミノ基のpK_aは6.5である[2]ため、中性から弱塩基性で反応を行うのが適当であると考えられる。実際、プロピレンオキサイドの開環を利用した*N*-ヒドロキシプロピル化では、pH10以上で反応を行うとC6-OHに主に置換が進むが、pH7付近ではC2-NH₂に反応が進むことが報告されている[2]。

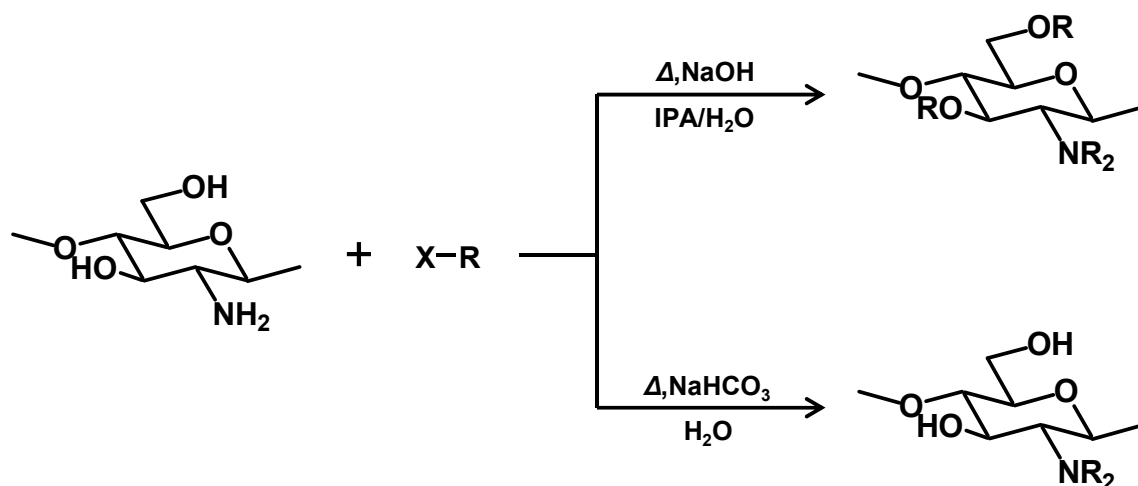


図 3-1 キチン・キトサンの *N,O*-アルキル化と *N*-アルキル化の反応式

簡便なワンポッドの反応であり、塩化アルキルおよびNaHCO₃またはNa₂CO₃をそれぞれアルキル化剤と反応のプロモーターとして用いる (図3-1)。Dungらは*N*-カルボキシメチルキトサンを、この水系*N*-アルキル化により調製し[9]、ほぼ100%の*N,N*-ジカルボキシメチル

キトサンが得られることを見出した[10]。それまで、*N,N*-ジカルボキシメチルキトサンは最も汎用的に用いられる*N*-アルキル化キトサンの調製法である還元的*N*-アルキル化においては、現在のところ全糖ユニットのうち90%までしか*N,N*-ジカルボキシメチルキトサンに変換することができなかった[13]。

このように NaHCO_3 を用いた*N*-アルキル化は水系で進む環境低不可の反応であり、高置換度の*N*-カルボキシメチルキトサン簡便に得られた。したがって、本研究では様々なハロゲン化アルキルを用いて各種条件で反応を行い、 NaHCO_3 を用いたキチン・キトサンの水系*N*-アルキル化に関する知見を深め、新たな機能性材料の開発を目指す。

3-2 キトサンの NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化

3-2-1 緒言

NaHCO_3 を用いた水系*N*-アルキル化は環境低不可の反応であるため、より詳細な検討の必要がある。そのため、アミノ基量の多いキトサンを出発物質とし、様々なアルキル化剤を用いて各種反応条件で得られる生成物の化学構造、重合度などを評価した。これまで NaHCO_3 を用いたキトサンの*N*-アルキル化に用いられたハロゲン化アルキルはモノクロロ酢酸のみであるため、様々な化学的特徴を持つハロゲン化アルキルを採用した。特に、疎水性のハロゲン化ベンジルを用いて高置換度の*N*-ベンジル化を水系で行えるかについては興味深いところである。また、モノクロロ酢酸によるアルキル化は $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応で進行することが知られているが、ハロゲン化ベンジルは $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応で求電子置換する代表的な物質である。Singhらは、水系で NaHCO_3 を用いて低分子アミンと臭化ベンジルと*N,N*-ジベンジルアミンが得られると報告している[14]。しかし、用いられたアミンには他に水酸基などのような求電子置換できる官能基がなかったため、キトサンのような高分子や、アミノ基と水酸基を両方もつような化合物に適用されていない。

したがって、本報告ではキトサンに六種類のハロゲン化アルキルと NaHCO_3 を水中で反応させ、高い置換度の*N*-アルキルキトサンを得ることを目指した。生成物の化学構造および分子量について、IR吸収スペクトル、NMR、元素分析、サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱検出器を組み合わせたSEC-MALLSを用いて、詳細に検討した。

3-2-2 実験

試料

市販のキトサン (Chitosan 50, Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) を出発物質として用いた。ハロゲン化アルキル (モノブロモ酢酸、4-ブロモ酪酸、2-ブロモ吉草酸、2-ブロモエタノール、臭化ベンジル、モノクロロ酢酸; 図 3-2-2)、 NaHCO_3 、tween20 およびその他の試薬や溶液 (Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) は試薬グレードのものを、特別な前処理なくそのまま用いた。

上記ハロゲン化アルキルには、既にキトサンへの適用例のあるモノクロロ酢酸は、求電子試薬としての反応性、水への可溶性、分子の大きさ、生成物の水溶性などを考慮して選択した。

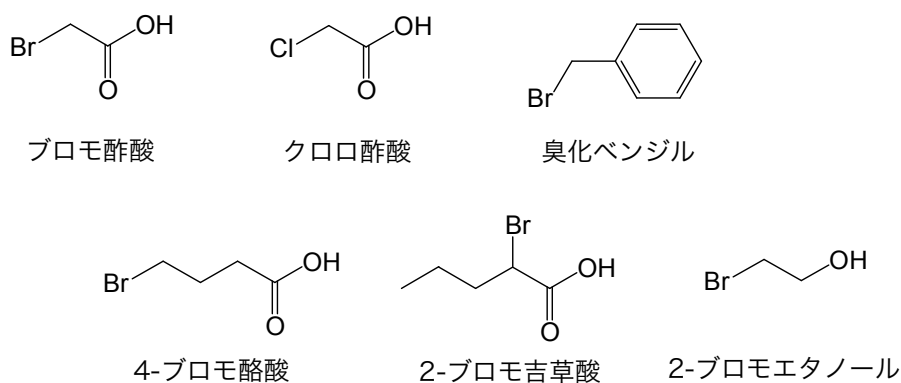


図 3-2-2 ハロゲン化アルキルの化学構造

キトサンの水系 *N*-カルボキシメチル化

キトサンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-カルボキシメチルキトサンを調製した。具体的な手順は、Singh らの報告[14]を参考にした。まず試料 1.0 g (アミノ基量; 5 mmol) と、モノブロモ酢酸またはモノクロロ酢酸を脱イオン水 50 mL に加えた。キトサンが充分溶解し、均一な溶液が得られたら NaHCO_3 (ハロゲン化酢酸の倍モル量) を加え、攪拌しながら温度を 25、60、80°C のいずれか一定に保った。反応終了時には、エタノール 150 mL を加えて反応を停止させた。

得られた生成物は、70%エタノールによる洗浄または透析によって精製した後、凍結乾燥によって回収した。

キトサンの水系 *N*-ベンジル化および *N*-ヒドロキシエチル化

キトサンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-ベンジルキトサンおよび *N*-ヒドロキシエチルキトサンを調製した。前項と同様の反応を用いるが、ハロゲン化アルキルや生成物の性質により多少の変更が必要である。まず試料 1.0 g (アミノ基量; 5 mmol) と、

酢酸（ハロゲン化アルキルの等モル量）を脱イオン水 40 mL に加え、均一なキトサン溶液を得る。この二種類のハロゲン化アルキルは水と混ざらないため、tween20 (50mg) を 10 mL の脱イオン水に加え、均一なハロゲン化アルキル乳濁液を得た。このキトサン水溶液とハロゲン化アルキル乳濁液を混ぜ、充分均一な懸濁液が得られたら NaHCO_3 （ハロゲン化アルキルの倍モル量）を加え、攪拌しながら温度を 25、60、80°C のいずれか一定に保った。

N-ヒドロキシエチル化の場合は、まず生成物にエタノール 150 mL を加えて反応を停止させた。そして 70%エタノールで洗浄し、凍結乾燥によって生成物を精製、回収した。N-ベンジル化の場合は、速やかに濾過することで反応を停止し、水、クロロホルム、ジエチルエーテルの順に洗浄した後、真空乾燥によって生成物を回収した。

キトサンの *N,O*-カルボキシメチル化

N-カルボキシメチル化との比較のため、従来法により *N,O*-カルボキシメチルキトサンを調製した。具体的な手順は、Chen らの報告[12]に則って行った。まず出発物質であるキトサン (1.0 g) と NaOH (1.35 g) を、80%の 2-プロパノール (10 mL) に加え、室温で 1 時間処理した。その後、ウォーターバスを用いて 50°C に昇温し、予め 20 mL の 2-プロパノールに溶かしておいたモノクロロ酢酸 (1.5 g) を 30 分かけて滴下した。滴下後は 50°C で 4 時間攪拌しながら反応させ、70%エタノール (20 mL) を用いて反応を停止させた。

こうして得られた生成物は、70%エタノールによる洗浄または透析によって精製した後、凍結乾燥によって回収した。

化学構造解析

IR 吸収スペクトルは FT/IR-6100 (JASCO Corporation, Japan) を用いて、KBr 錠剤法またはフィルム法によって得られた。 ^1H -および ^{13}C -NMR は Alpha-500 (JEOL Ltd., Japan) により、溶媒に D_2O 、 $\text{DMSO}-d_6$ 、 D_2SO_4 、TFA を、内部標準にテトラメチルシラン (TMS) または 3-(トリメチルシリル)プロピオン酸-2,2,3,3- d_4 ナトリウム塩 (TSP) をそれぞれ用いて測定した。置換度などの定量分析は ^1H -NMR の他に、元素分析器 Flash EA1112 (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) の C/N 比により求めた。

分子量解析

分子量評価には、前章でも用いたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、屈折率検出器 (RI)、および多角度光散乱検出器 (MALLS) を組み合わせた SEC-MALLS システムを採用した。機器の構成は前章および既報[15,16,17]の通りである。試料のキトサンおよび生成物溶液 (0.1w/v%) のインジェクション量は 100 μL 、カラム温度及び屈折率検出器の温度は 40°C、MALLS 検出器のセル温度は室温にそれぞれ設定した。データの取得及び解析は ASTRA ソフトウェア (Wyatt technologies, U.S.A.) を用いた。サンプル注入の前に、プルラン (分子量 22800) による MALLS 検出器と屈折率検出器の較正及び正規化を行った。

各 *N*-カルボキシメチルキトサン試料を 0.1 M NaCl 水溶液に溶解させ、1 mg/mL の試料溶液を SEC-MALLS 測定用の試料とした。また、分子量比較用の試料としてキトサンを酸性水溶液 (0.5 M CH₃COOH + 0.1 M NaNO₃) に溶解させ、同様に 1 mg/mL のキトサン水溶液を調製した。各試料水溶液は 0.45 μm の PTFE フィルターによって粗大物を除去した後、SEC-MALLS システムによって分子量測定を行った。溶離液には、0.1 M NaCl 水溶液 (キトサンの場合は 0.5 M CH₃COOH + 0.1 M NaNO₃ 水溶液) を、カラムには SB-806M HQ (Shodex, Japan) をそれぞれ用いた。

キトサンおよび *N*-カルボキシメチルキトサンの各溶媒中での dn/dc 値は、様々な濃度の溶液の屈折率変化を、Optilab (Wyatt Technology Inc., USA) を用いて測定することで算出した。測定の結果、キトサンおよび *N*-カルボキシメチルキトサン (DS=1.4) の dn/dc は、それぞれ 0.166 と 0.177 mL/g であった。当然ながら、dn/dc は置換度により異なる値であるが、DS1.0 以上でないと溶媒への良好な分散状態が得られず、0.45 μm の PTFE フィルターを通らなかった。実際に測定に用いた *N*-カルボキシメチルキトサンの置換度は 1.0~1.6 であったため、dn/dc による誤差の影響は充分小さいと考え、全ての試料に対して、0.177 mL/mg を用いた。

3-2-3 結果および考察

生成物の性質

各生成物には、反応前後で溶解度に明らかな変化があった (表 3-2-3-1)。ブromo酢酸とクロロ酢酸を用いた場合、生成物は広い pH 域で水溶性を示した。また、2-ブromoエタノールでは生成物の溶解性は低下し、酸性下でも水に不溶になったが、広い pH 域で水に膨潤して透明のゲルを作った。臭化ベンジルでは、水に不溶化したが、比較的極性の高いいくつかの有機溶媒に溶解した。しかし、トルエン、ジエチルエーテル、クロロホルム等の溶媒には溶解しなかった。以上4つの生成物に関しては反応の進行が期待されるが、4-ブromo酪酸および 2-ブromo吉草酸より得られた生成物は、キトサンとの溶解性の差が認められなかった。即ち、これら二種のハロゲン化アルキルを用いた場合、反応が十分に進行しなかった。

表 3-2-3-1 キトサン及び生成物の溶解性の変化

ハロゲン化アルキル	H ₂ O	H ₂ O ^a 酸性	H ₂ O ^b 塩基性	C ₂ H ₅ OH	アセトン	DMSO	DMF
なし (キトサン)	×	○	×	×	×	×	×
モノブromo酢酸	○	○	○	×	×	×	×
モノクロロ酢酸	○	△ ^c	○	×	×	×	×
4-ブromo酪酸	×	○	×	×	×	×	×
2-ブromo吉草酸	×	○	×	×	×	×	×
2-ブromoエタノール	△ ^d	△ ^d	×	×	×	×	×
臭化ベンジル	×	×	×	○ ^e	○ ^e	○	○

a pH4 の酢酸水溶液

b pH11 の NaOH 水溶液

c 水溶液が白濁して一部不溶化する

d 溶解しないが膨潤してハイドロゲルになる

e 溶解するが溶解度は小さい

化学構造の定性分析

生成物の IR 吸収スペクトルを図 3-2-3-1 に示す。4-ブromo酪酸、2-ブromo吉草酸および 2-ブromoエタノールを用いた場合、やはりキトサンからのスペクトル変化がみられなかった。これは反応が進行していない、または置換度が低いと考えられる。キトサンから臭化ベンジルを用いた生成物のスペクトル変化は明瞭であり、3080、1450、1410、750、700 cm⁻¹ に芳香族特有の鋭い吸収が出現した。モノブromo酢酸およびモノクロロ酢酸との反応から得られた生成物は、1740 cm⁻¹ にカルボキシル基由来の吸収を示した。また、770 cm⁻¹ に三級アミンのピークがみられ、特にモノブromo酢酸より得られた生成物ではこの吸収が顕著だった。以上の結果から、臭化ベンジル、ハロゲン化酢酸（ブromo酢酸とクロロ酢酸）からはそれぞれ、ベンジルキトサン (BnCh)、カルボキシメチルキトサン (CMCh) が得られたと考えられる。アルキル基の多くはアミノ基への導入されていることが確認されたが、ヒドロキシル基への導入を示す吸収がある 1100 cm⁻¹ 付近は出発物質であるキトサン自体が大きな吸収をもつため、水酸基への置換反応の有無を議論することは難しかった。

したがって、アルキル基の置換基分布について詳細に検討するため、CMCh の溶液 ¹³C-NMR 測定を行った (図 3-2-3-2)。比較のため、従来法により調製した *N,O*-CMCh のスペクトルも測定した。カルボニル炭素に注目すると (図 3-2-3-3 はカルボニルピークが出現する 170~180 ppm のスペクトルの拡大図)、*N,O*-CMCh には 4 種類のカルボニル基が存在した。これらのピークは低磁場側から順に、元のキトサンに含まれるアセトアミド基 (179 ppm)、C3-*O*-カルボキシメチル基 (178 ppm)、C6-*O*-カルボキシメチル基 (177 ppm)、C2-*N*-カルボキシメチル基 (172 ppm) にそれぞれ由来する。それに対し、NaHCO₃ を用いてアルキル化を行った場合、二山の C2-*N*-カルボキシメチル基とアセトアミド基のピークのみで、

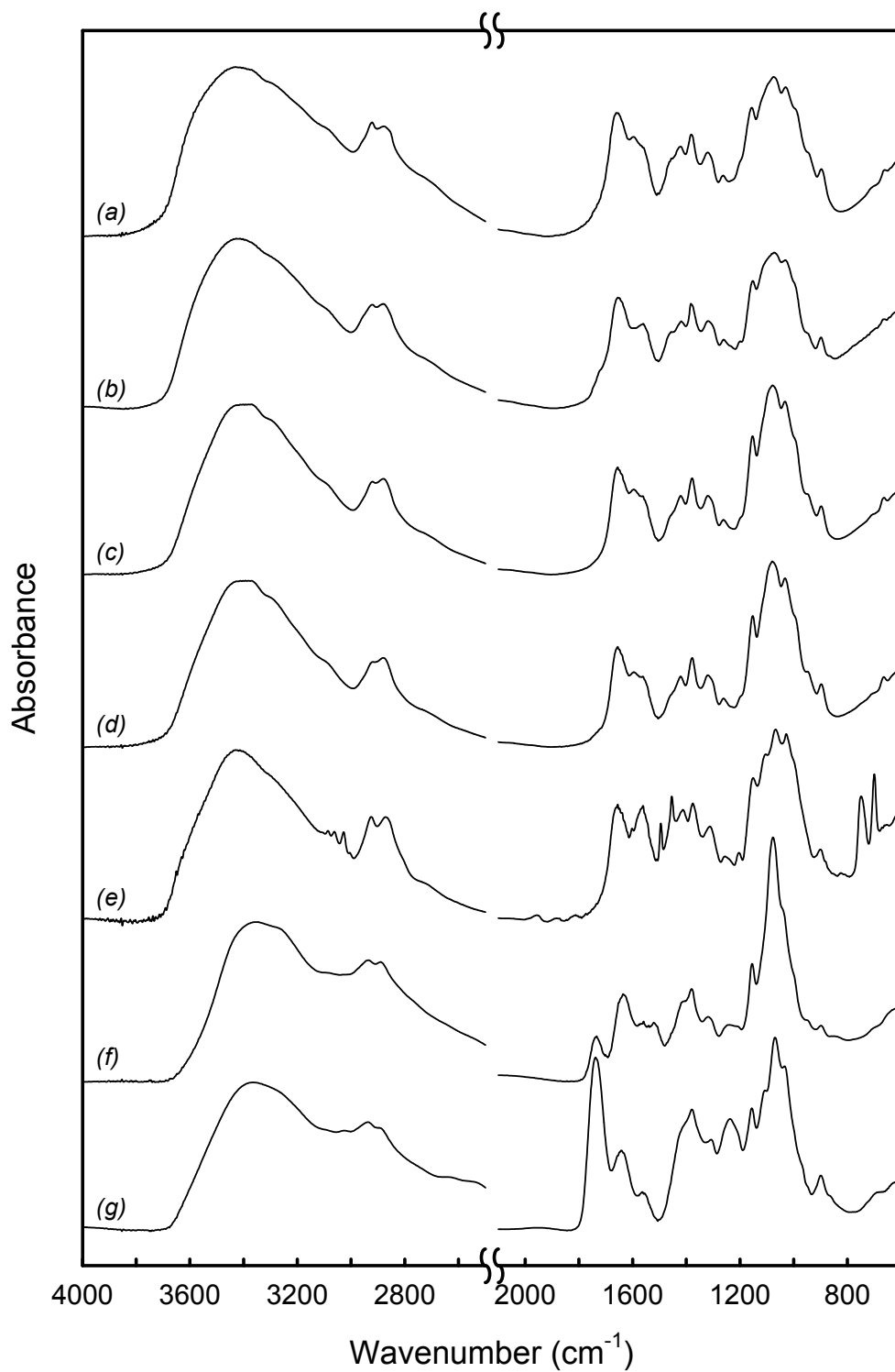


図 3-2-3-1 キトサンおよびキトサン誘導体の赤外吸収スペクトル。(a) はキトサン、その他はハロゲン化アルキルとして (b) 2-ブromoエタノール、(c) 4-ブromo酢酸、(d) 2-ブromo吉草酸、(e) 臭化ベンジル、(f) モノクロロ酢酸、(g) モノブromo酢酸を用いた生成物のスペクトル。

O-カルボキシメチル基は存在しなかった。即ち、 NaHCO_3 を用いた水系アルキル化により、キトサンのアミノ基が選択的に置換された *N*-CMCh が得られたと判断できる。また、 ^{13}C -NMR において *N*-カルボキシメチル基のピークが二山にわかれている (171 および 172 ppm) ことから、1つのアミノ基に2つのカルボキシメチル基が置換した、*N,N*-ジカルボキシメチルキトサンが一部得られたことがわかった (図 3-2-3-4)。

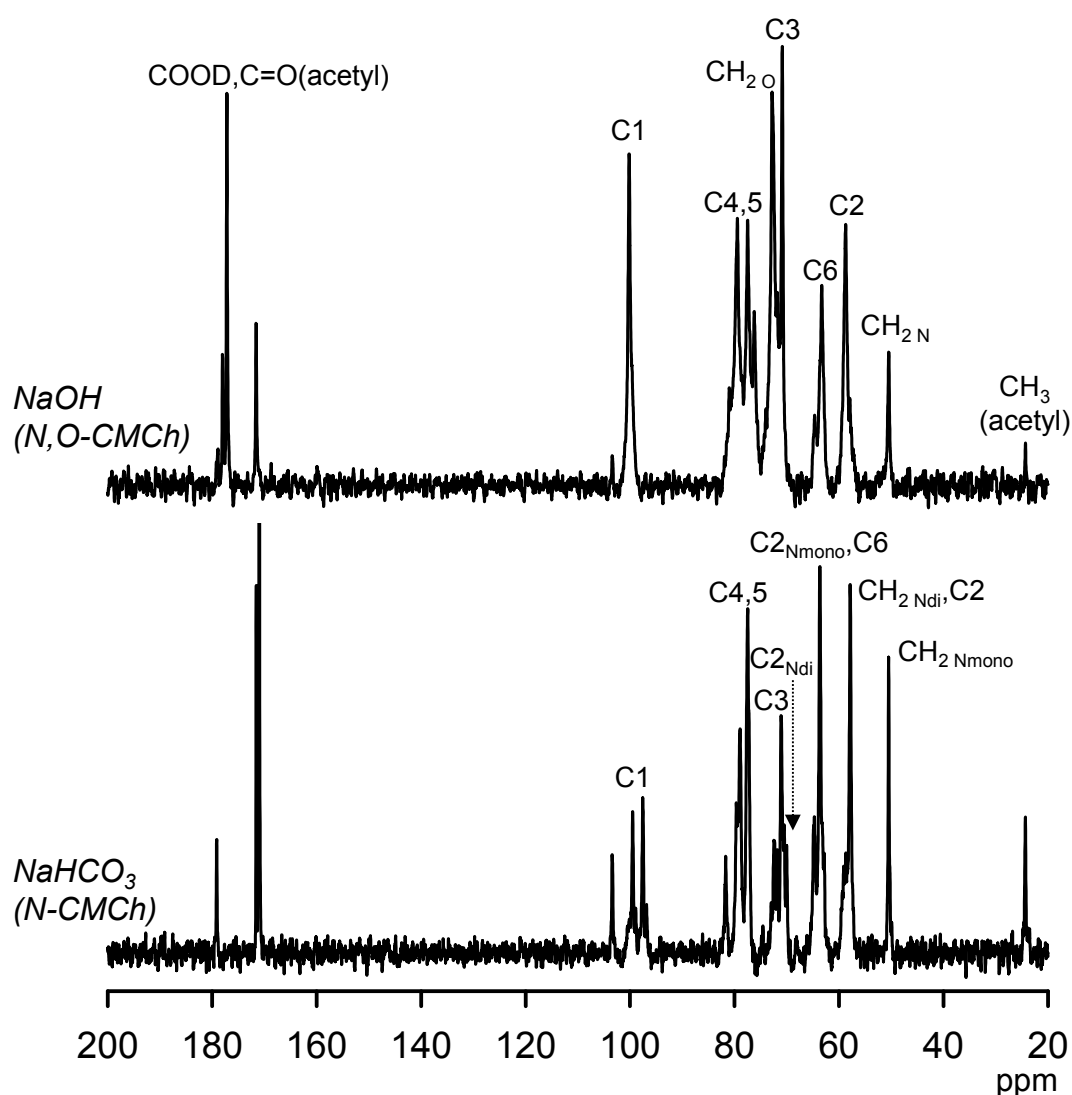


図 3-2-3-2 カルボキシメチルキトサンの 20% $\text{D}_2\text{SO}_4/\text{D}_2\text{O}$ 中の ^{13}C -NMR スペクトル。上が NaOH 、下が NaHCO_3 それぞれを用いてキトサンとモノクロロ酢酸から調製した。

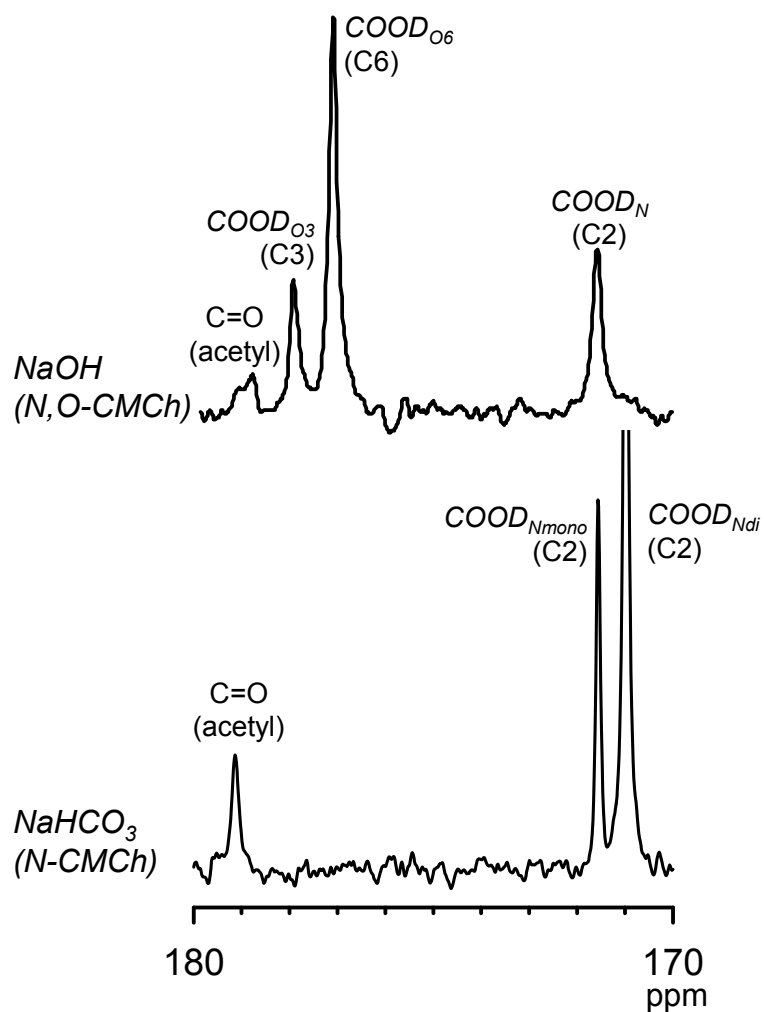


図 3-2-3-3 カルボキシメチルキトサンの 20% D_2SO_4/D_2O 中の ^{13}C -NMR スペクトルの 170 から 180 ppm までの拡大図。上が NaOH、下が $NaHCO_3$ それぞれを用いてキトサンとモノクロロ酢酸から調製した。全体図は図 3-2-3-2 参照。

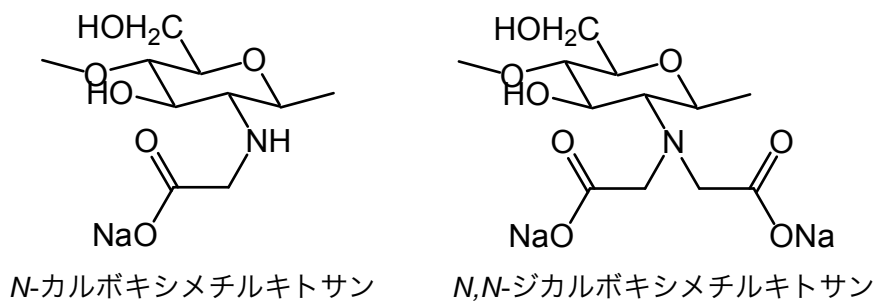


図 3-2-3-4 モノブロモ酢酸およびモノクロロ酢酸を用いたキトサンの水系 N -アルキル化により得られた N -カルボキシメチルキトサンおよび N,N -ジカルボキシメチルキトサンの化学構造。

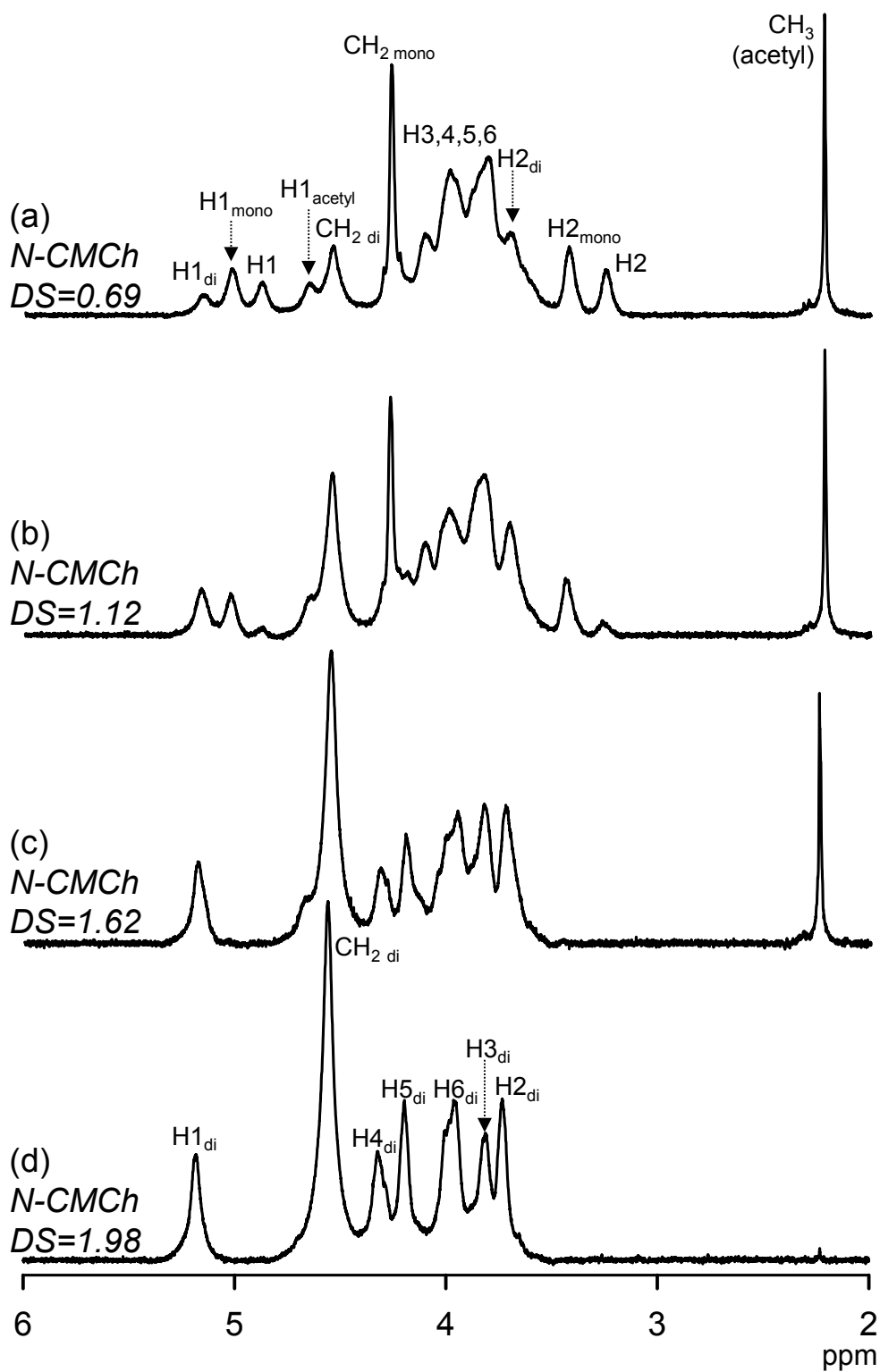


図 3-2-3-5 異なる置換度の *N*-カルボキシメチルキトサンの 20% D_2SO_4/D_2O 中の 1H -NMR スペクトル。(a)、(b)、(c)は *N*-アセチル化度 0.19 のキトサン、(d)は *N*-アセチル化度 0.02 のキトサンよりそれぞれ調製した。(d)は置換度約 2.0 のほぼ均一な *N,N*-ジカルボキシメチルキトサン。

この一置換体と二置換体の存在は、図 3-2-3-5 に示す ^1H -NMR の二種類のメチレンピーク（一置換体; 4.3 ppm、二置換体; 4.6 ppm）などからも確認できる。また、他のピークと重なるの比較的小さい H1 および H2 ピークでは、置換基の数が増えるにつれピークが低磁場側に現れるようになった。未置換の H2 ピークは 3.2 ppm、一置換体の H2 は 3.4 ppm、二置換体の H2 は 3.7 ppm に現れた。H1 の未置換、一置換体、二置換体のピークはそれぞれ、4.9、5.0、5.2 ppm に現れた。図 3-2-3-5 (c) では H1 と H2 の二置換体のピークしか現れていないことがわかり、キトサン単位のほとんどが *N,N*-ジカルボキシメチルキトサン単位に変換されていることがわかる。同条件で、*N*-アセチル化度 0.02 の脱アセチル化キトサンに *N*-カルボキシメチル化を行うと、すべてのアミノ基に完全に反応が進み、ほぼ均一な *N,N*-ジカルボキシメチルキトサンを得ることができた。このようにアミノ基の完全な *N,N*-カルボキシメチル化を達成したのは本研究が初めてである。

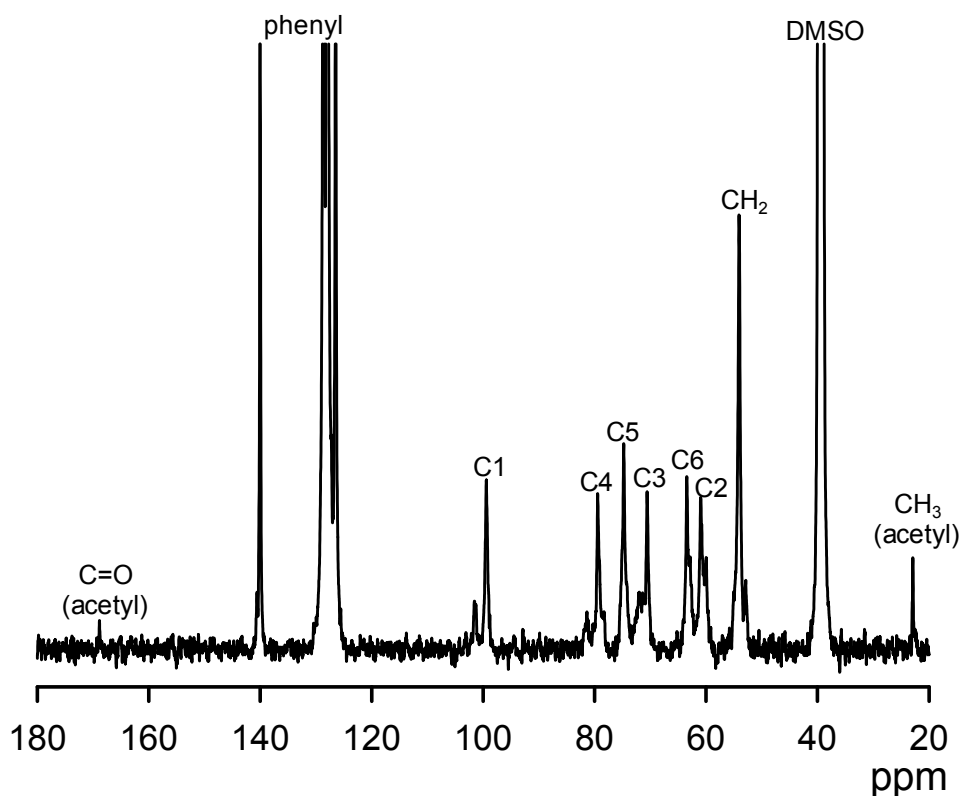


図 3-2-3-6 *N*-ベンジルキトサンの $\text{DMSO-}d_6$ 中での ^{13}C -NMR スペクトル

臭化ベンジルとの反応から得られた生成物の ^{13}C -NMR スペクトルを図 3-2-3-6 に示す。特徴的な芳香族のピークが 126~140 ppm にかけて現れた。更に、メチレン基が 54 ppm 付近に現れ、アミノ基への置換が確認できた。一方で、68.0 および 83.2 ppm に現れる[18]と考えられる *O*-置換体のピークは確認できなかった。したがって、ベンジル化に関しても、アミノ基への選択的な誘導体化が確認され、*N*-ベンジルキトサン (*N*-BnCh) の生成が確認さ

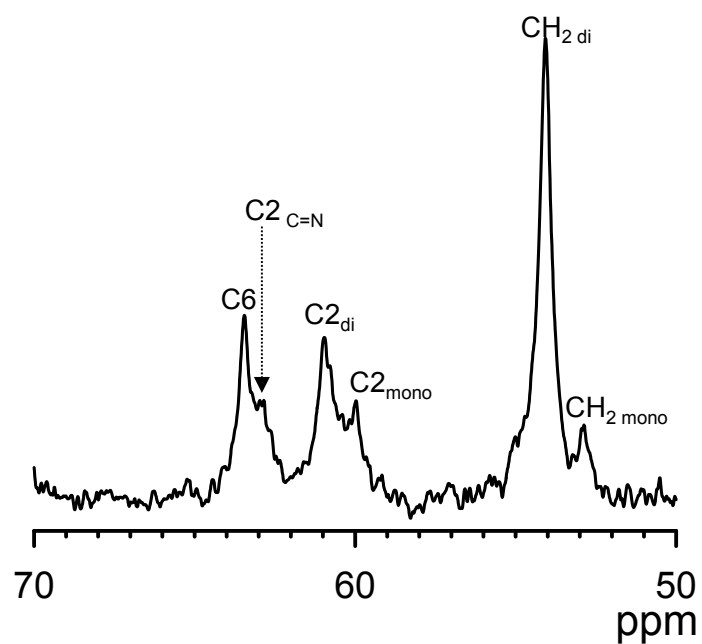


図 3-2-3-7 *N*-ベンジルキトサンの DMSO- d_6 中での ^{13}C -NMR スペクトル 50~70 ppm までの拡大図。全体図は図 3-2-3-6 参照。

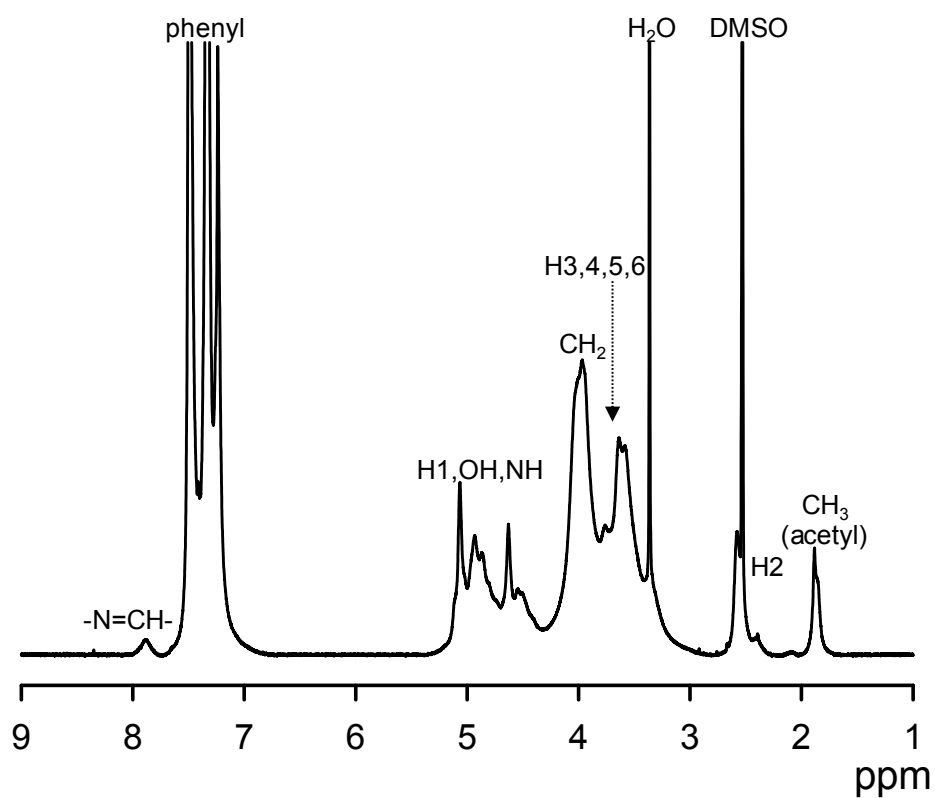


図 3-2-3-8 *N*-ベンジルキトサンの DMSO- d_6 中での ^1H -NMR スペクトル

れた。また、メチレン基および C2 のピークを詳しくみると、ピークがそれぞれ二山ずつあった (図 3-2-3-7)。これは *N*-CMCh 同様、二置換体の存在を示すピークであり、後に記す置換度からも二置換体の存在が確認できた。置換によるピークのシフトが *N*-CMCh に比較して小さいのは、カルボキシル基の極性が高くアルキル化によるアミノ基周辺の電子に大きく影響を与えるが、フェニル基は極性が低く電子状態への影響が少ないためだと考えられる。また C6 ピークの隣、63 ppm に小さなピークの出現が確認できたが、これは副反応で生じた *N*-ベンジリデンキトサンだと考えられる。

図 3-2-3-8 は *N*-BnCh の ^1H -NMR である。芳香族の特徴的なピークは 7.2~7.6 ppm に現れた。メチレン基のピークは、一置換体と二置換体ともに 4.0 ppm 付近に現れ、区別が難しかった。8.9 ppm にわずかにみられるピークは、*N*-ベンジリデンキトサンの水素であった。したがって、この反応により生じる生成物は図 3-2-3-9 に示すとおりである。しかし、糖鎖、DMSO、 H_2O 、水酸基、アミノ基などのピーク同士の重なり合いが激しく、デコンボリューションを用いてもピーク面積からの定量評価は難しかった。

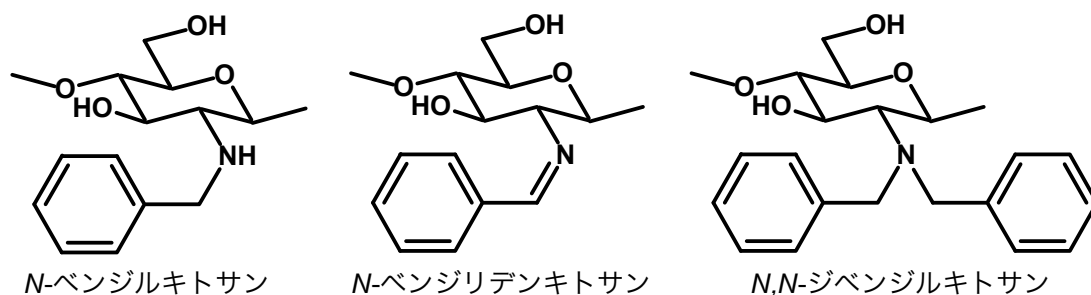


図 3-2-3-9 臭化ベンジルを用いたキトサンの水系 *N*-アルキル化により得られた *N*-ベンジルキトサン、*N*-ベンジリデンキトサンおよび *N,N*-ジベンジルキトサンの化学構造。

図 3-2-3-10 および図 3-2-3-11 は、それぞれ 4-ブロモ酪酸および 2-ブロモ吉草酸との反応より得られた生成物の ^1H -NMR スペクトルである。4-ブロモ酪酸の生成物のスペクトルは出発物質のキトサンから変化なかったが、2-ブロモ吉草酸にはわずかな官能基の導入が認められた。2 章の研究結果や過去の研究報告[16]と比較し、得られたのは *N*-カルボキシブチルキトサン (*N*-CBCh) であることがわかった。

以上より、ブロモ酢酸、クロロ酢酸、臭化ベンジル、2-ブロモ吉草酸からのキトサンの選択的 *N*-アルキル化が確認された。クロロ酢酸は $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応によってアルキル化が進行するが、臭化ベンジルは $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応によってアルキル化が進む。ハロゲン化物イオンの脱離が先行する $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応と、求電子付加が先行する $\text{S}_{\text{N}}2$ という異なる反応機構で同様に *N*-選択性が確認でき、反応機構による生成物の構造などへの影響はなかった。したがって、 NaHCO_3 を用いることでハロゲン化アルキルの反応性が充分であれば、アミノ基に選択的に置換反応が進むと考えられる。

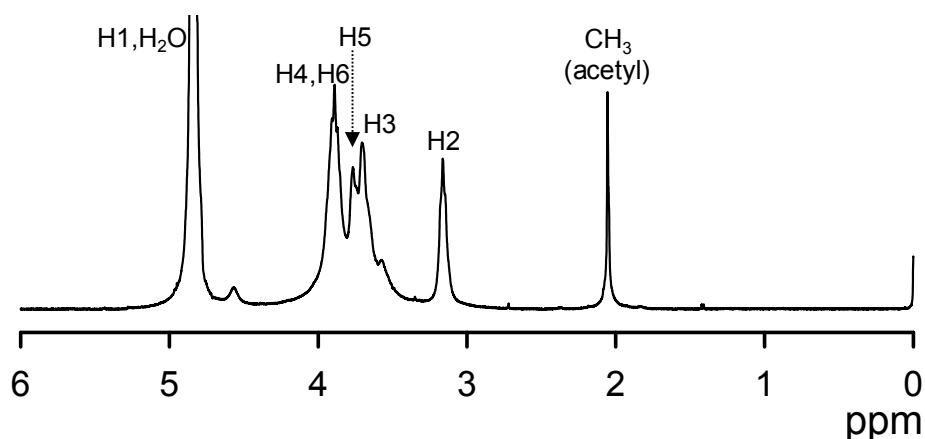


図 3-2-3-10 4-ブロモ酪酸により N-アルキル化を試みたキトサンの希 TFA/D₂O 中での ¹H-NMR スペクトル

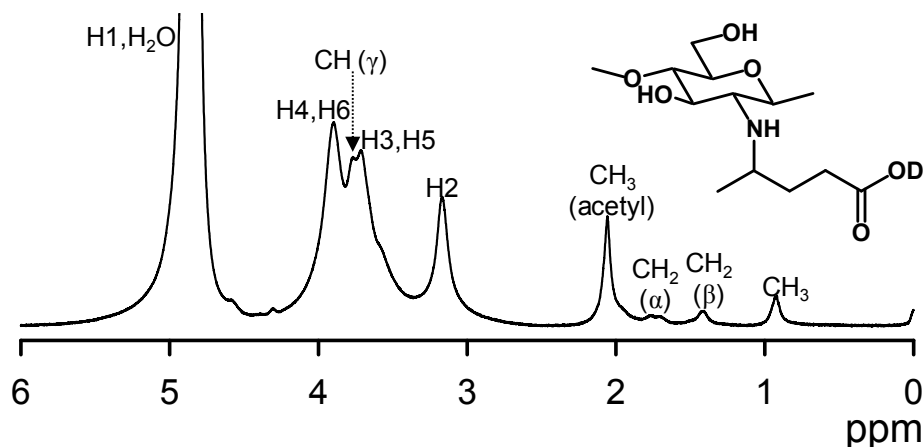


図 3-2-3-11 N-カルボキシブチルキトサンの希 TFA/D₂O 中での ¹H-NMR スペクトル

化学構造の定量分析

N-アルキルキトサンの定量分析は、元素分析による C/N 比および ¹H-NMR のピーク面積を用いて行った。N-CMCh の ¹H-NMR では、溶媒に 20% D₂SO₄ 重水溶液を用いたことで、溶媒のピークが低磁場側にシフト (6.9 ppm) したため H1 由来のピーク面積が正確に測定できるようになった。前述のとおり (図 3-2-3-5) 約 4.7、4.9、5.0、5.2 ppm に現れるピークは、それぞれキチン残渣、未反応キトサン、N-モノカルボキシメチルキトサン、N,N-ジカルボキシメチルキトサンの H1 に由来する。したがって、N-モノカルボキシメチルキトサンおよび N,N-ジカルボキシメチルキトサンの置換度 (DS)、N-アセチル化度 (DNAC) は以下の式を用いて求めた；

$$\text{DNAC} = \frac{S_{4.7}}{S_{4.7} + S_{4.9} + S_{5.0} + S_{5.2}}$$

$$DS_{\text{mono}} = \frac{S_{5.0}}{S_{4.7} + S_{4.9} + S_{5.0} + S_{5.2}}$$

$$DS_{\text{di}} = \frac{S_{5.2}}{S_{4.7} + S_{4.9} + S_{5.0} + S_{5.2}}$$

$$DS_{\text{NMR}} = DS_{\text{mono}} + 2DS_{\text{di}}$$

$S_{4.7}$ 、 $S_{4.9}$ 、 $S_{5.0}$ 、 $S_{5.2}$ はそれぞれ 4.7、4.9、5.0、5.2 ppm 付近に現れる H1 ピークの面積を示す。 DS_{mono} 、 DS_{di} はアセチルグルコサミンを含む全グルコサミンユニット中の *N*-モノカルボキシメチルグルコサミンユニットおよび *N,N*-ジカルボキシメチルグルコサミンユニットの割合を示す。一方、 DS_{NMR} および DS_{EA} はそれぞれ NMR と元素分析によって求めた全グルコサミンユニット中におけるカルボキシメチル基の割合である。

以上をふまえ、各 *N*-アルキルキトサンの官能基導入量や収率などを計算した (表 3-2-3-2)。 ^1H -NMR による *N*-CMCh の各官能基導入量は、元素分析による計算結果とよく一致した。 DS_{mono} および DS_{di} をみると、一置換体と二置換体が混在しながら全 *N*-カルボキシメチル基量が増加していくことがわかる。また、DNAc 値は、出発物質であるキトサンとほぼ同じ値を示した。したがって、 NaHCO_3 を用いた水系 *N*-アルキル化の反応中にアセトアミド基の加水分解は起こらないと考えられた。また、各生成物の収率はすべて 90%以上と高い値を示し、わずかにハンドリングロスによる収率低下がみられるのみであった。

表 3-2-3-2 *N*-アルキルキトサンの置換度、*N*-アセチル化度、収率

資料名	DS_{mono}	DS_{di}	DS_{NMR}	DNAc_{NMR}	DS_{EA}	収率 (%)
キトサン	0	0	0	0.19	0.20	—
N-CMCh	0.22	0.10	0.42	0.20	0.44	97.1
	0.35	0.17	0.69	0.19	0.71	98.5
	0.44	0.21	0.86	0.18	0.80	97.8
	0.37	0.24	0.95	0.18	0.96	95.0
	0.32	0.40	1.12	0.17	1.08	93.4
	0.23	0.58	1.39	0.20	1.37	94.1
N-HEtCh	—	—	—	—	0.16	96.8
	—	—	—	—	0.21	98.1
	—	—	—	—	0.27	96.2
N-BnCh	—	—	—	—	0.85	96.4
	—	—	—	—	1.18	94.9
	—	—	—	—	1.33	98.3
N-CBCh	—	—	0.05	0.19	0.05	96.1
	—	—	0.07	0.19	0.07	94.5
	—	—	0.09	0.19	0.08	95.1

図 3-2-3-12 は、各反応温度におけるモノブロモ酢酸による水系 *N*-カルボキシメチル化の置換度の経時変化である。ブロモ酢酸の添加量は 2.2 mol/mol-NH₂ に設定した。室温から 80℃ まで、全条件で反応が進行し、反応時間とともに得られる *N*-CMCh の置換度が上昇した。期待通り、反応の進行は温度が高いほど早く、80℃では 12 時間、60℃なら 24 時間以内に、置換度が一定になった。室温ではずっと反応の進行は遅かったが、7 日間の反応により、80℃や 60℃で得られる場合と同程度の高置換度の *N*-CMCh を得ることができた。興味深いことに、反応にかかる時間は異なるものの、どの反応温度においても、結局得られる生成物の置換度はほぼ一定であった。

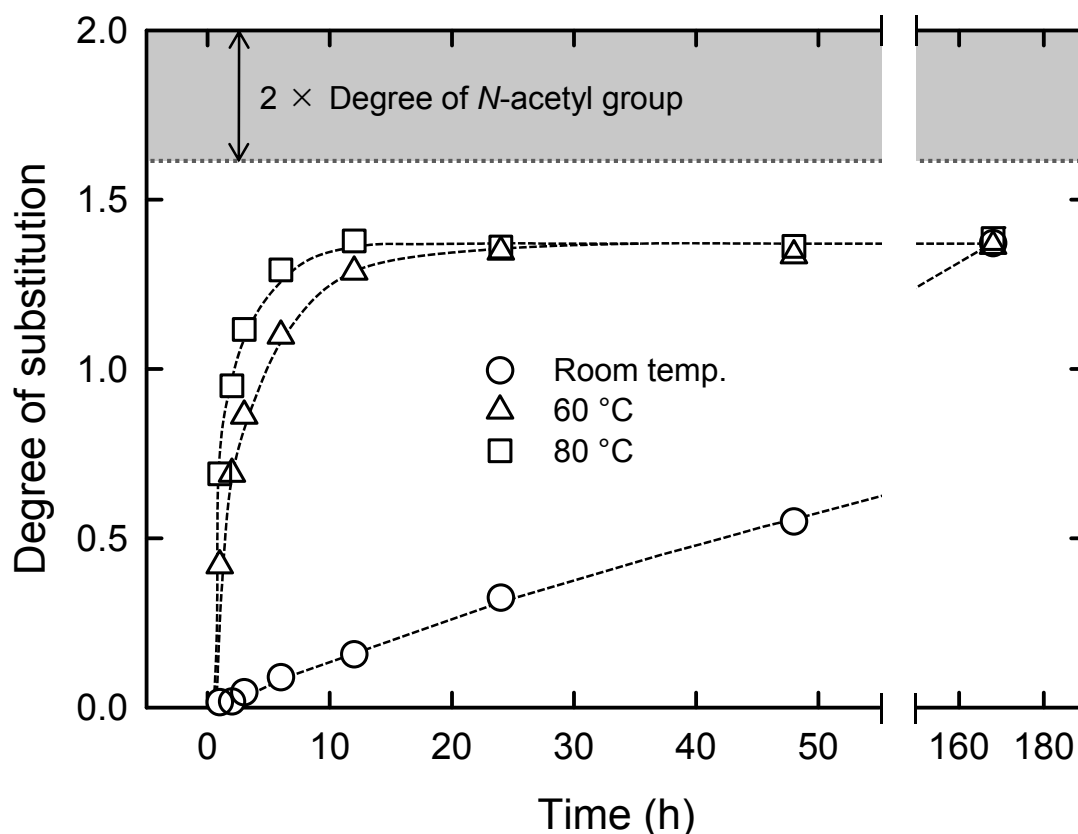


図 3-2-3-12 *N*-カルボキシメチルキトサンの置換度と、温度および反応時間の関係。反応にはモノブロモ酢酸を 2.2 mol/mol-NH₂ 用いた。

続いて、更に高い置換度の *N*-アルキルキトサンを得るため、加えるハロゲン化アルキルの量を変化させた (図 3-2-3-13)。反応温度は 80℃、反応時間は 12 時間に設定した。ブロモ酢酸を 4.0 mol/mol-NH₂ 加えたとき、得られた *N*-CMCh は二置換体の置換度の理論限界値と一致した。¹H-NMR スペクトル (図 3-2-3-5 の DS 1.62 のスペクトル) を確認してみても、完全にすべてのアミノ基が置換された、置換率 200% の *N,N*-ジカルボキシメチルキトサンであった。一方、モノクロロ酢酸を用いた場合でも、試薬添加量を増やすことでより高い置換度の生成物が得られたが、置換度は二置換体の理論限界値に達しなかった。An らは、モノクロロ酢酸と Na₂CO₃ を用いて水系 *N*-アルキル化により高置換度の *N*-カルボキシメチル

キトサンを得ている[10]。ほぼ全てのグルコサミン単位が *N,N*-ジカルボキシメチルグルコサミンに変換されているが、まだ 5% 程度の一置換体が残っていることが、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの 5.07 ppm のピークから確認できる。したがって、今回ブロモ酢酸をアルキル化剤として用いた方法により、従来法より高い置換度の完全な *N,N*-ジカルボキシメチルキトサンを得ることができた。この差は恐らく、モノクロロ酢酸とモノブロモ酢酸の反応性の差に起因すると考えられる。

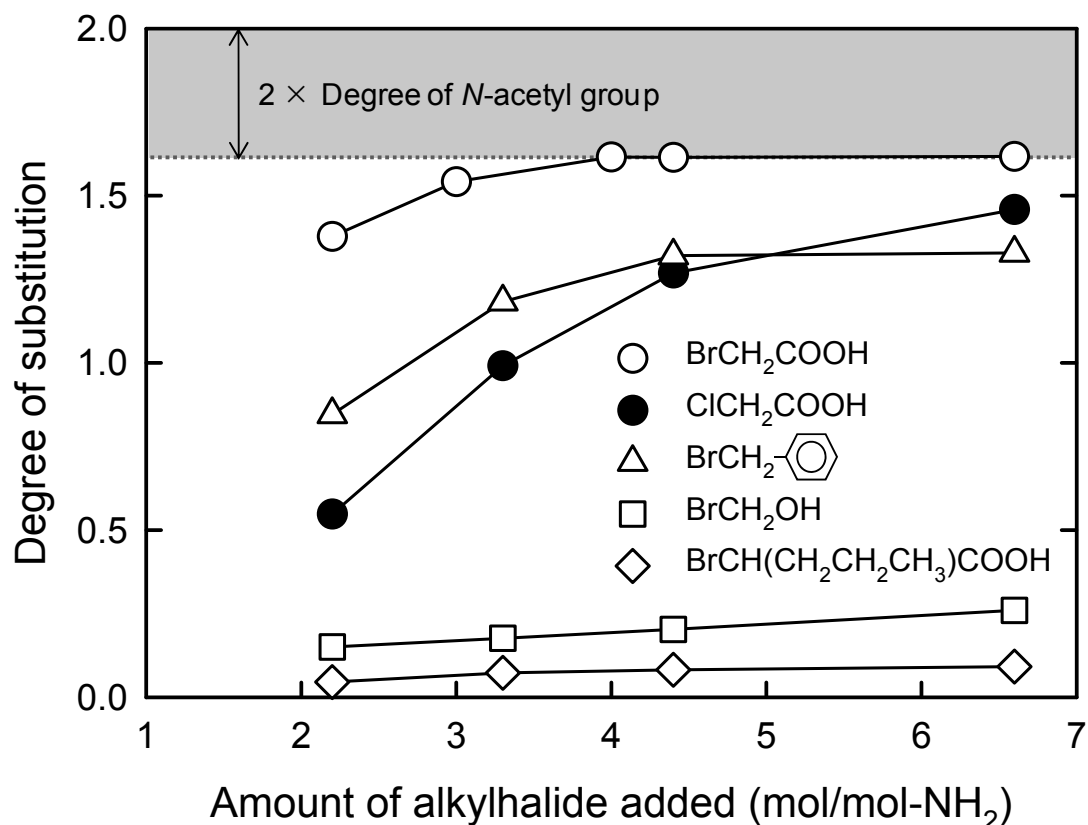


図 3-2-3-13 *N*-アルキルキトサンの置換度と、ハロゲン化アルキルの添加量の関係

その他の *N*-アルキルキトサンについても、ハロゲン化アルキルの添加量を増やすことで、より高い置換度の生成物を得られた。臭化ベンジルの添加量 2.2 mol/mol-NH₂ のとき、*N*-BnCh の置換度はキトサンのアミノ基量である (1-DNAc) を超えており、最大で 1.3 まで達した。*N*-BnCh はベンジルアルデヒドを用いた還元的 *N*-アルキル化によっても得ることができるが、これまで得られた最大の置換度は 0.187 であり、この *N*-BnCh は置換度が低いためキトサン同様酢酸水溶液に溶解した[20]。したがって、この方法により初めて *N,N*-ジベンジルキトサンの調製に成功し、*N*-BnCh の置換度もこれまでで最大の 1.3 (アミノ基量の 1.6 倍) まで得ることができた。しかし、試薬添加量を増加させても、これ以上の置換度の *N*-BnCh を得ることはできなかった。

N-EtCh や *N*-CBCh は、*N*-CMCh と *N*-BnCh に比較し、低い置換度の生成物しか得られな

かった。これは、アルキル化剤の 2-ブロモエタノールと 2-ブロモ吉草酸の反応性が、他のハロゲン化アルキルより弱かったためと考えられる。反応の進行が認められなかった 4-ブロモ酪酸は、カルボキシ基の γ 位にハロゲン原子が結合していたため、更に反応性が低かった。N-CBCh については、還元的 N-アルキル化を用いたほうが高い置換度の生成物を得ることができた[4]。

NaHCO₃ を用いた水系 N-アルキル化は、反応性の十分なハロゲン化アルキルと反応させると高い収率で高置換度の N-アルキルキトサンを得ることができた。しかし、反応性が充分でない場合は従来の還元的 N-アルキル化の方が高い置換度の生成物が得られる場合もあった。したがって、この新規キトサン誘導体化法は、アミノ基にカルボキシメチル基やベンジル系官能基を導入するのに適した反応であるといえる。特に、今回用いた臭化ベンジルは水不溶性であり、生成物の N-ベンジルキトサンも水不溶性であった。したがって、生成物が水に溶解すると期待できるカルボキシベンジル化やスルホベンジル化などを用いれば、置換度 2.0 に近い値が期待できる。

分子量の評価

反応前後での分子量変化を調べるため、SEC-MALLS を用いた。用いた試料は、高い置換度が得られ、反応が良好に進行した各種 N-CMCh である。N-BnCh も反応の進行は良好であったが、DMSO 溶液や DMF 溶液は 0.45 μ m の PTFE フィルターを通らなかったため、N-CMCh のみを今回は用いた。

表 3-2-3-3 様々な条件で調製された N-カルボキシメチルキトサンの重合度

試料	反応時間 (h)	BrCH ₂ COOH 添加量 (mol/mol-NH ₂)	M _w (DP _w)	M _n (DP _n)	M _w /M _n
キトサン	—	—	3.47×10 ⁵ (1590)	1.73×10 ⁵ (793)	2.01
N-CMCh	3	2.2	1.40×10 ⁴ (541)	7.05×10 ⁴ (273)	1.98
	6	2.2	1.82×10 ⁴ (667)	7.64×10 ⁴ (280)	2.38
	12	2.2	1.87×10 ⁴ (669)	8.27×10 ⁴ (296)	2.36
	12	3.3	1.30×10 ⁴ (464)	5.25×10 ⁴ (189)	2.60
	12	4.0	1.09×10 ⁴ (397)	4.21×10 ⁴ (151)	2.36
	24	2.2	1.84×10 ⁴ (662)	7.79×10 ⁴ (280)	2.48
	48	2.2	1.81×10 ⁴ (650)	7.92×10 ⁴ (285)	2.28

表 3-2-3-3 は、様々な条件で調製した N-CMCh の重合度の変化を示す。ブロモ酢酸の添加量 2.2 mol/mol-NH₂ の条件における、N-CMCh の重合度の分布は図 3-2-3-14 のとおりである。出発物質のキトサンと比較し、どの N-CMCh も重合度の低下が見られることから、N-アルキル化反応中に低分子化が起こっていた。しかし、試薬添加量 2.2 mol/mol-NH₂ の条件では、3～72 時間反応したものに関して、溶出パターンはほぼ重なっていて変化がなかった。

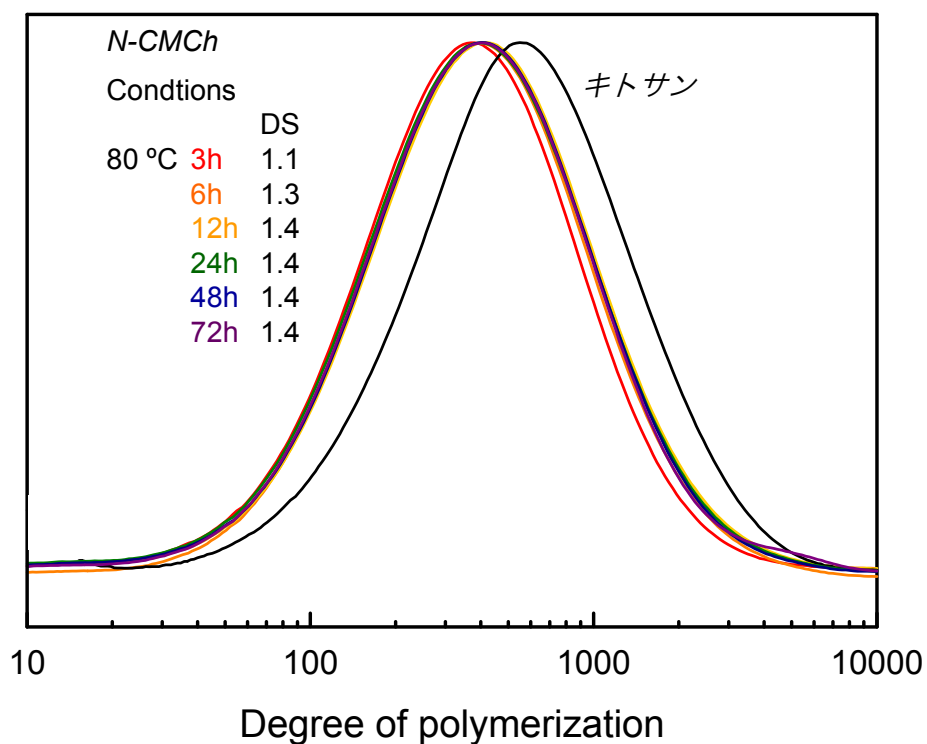


図 3-2-3-14 キトサンおよび *N*-カルボキシメチルキトサンの反応時間による重合度分布の変化。反応条件は、モノブロモ酢酸を 2.2 mol/mol-NH₂ 用いて 80°C で反応させた。

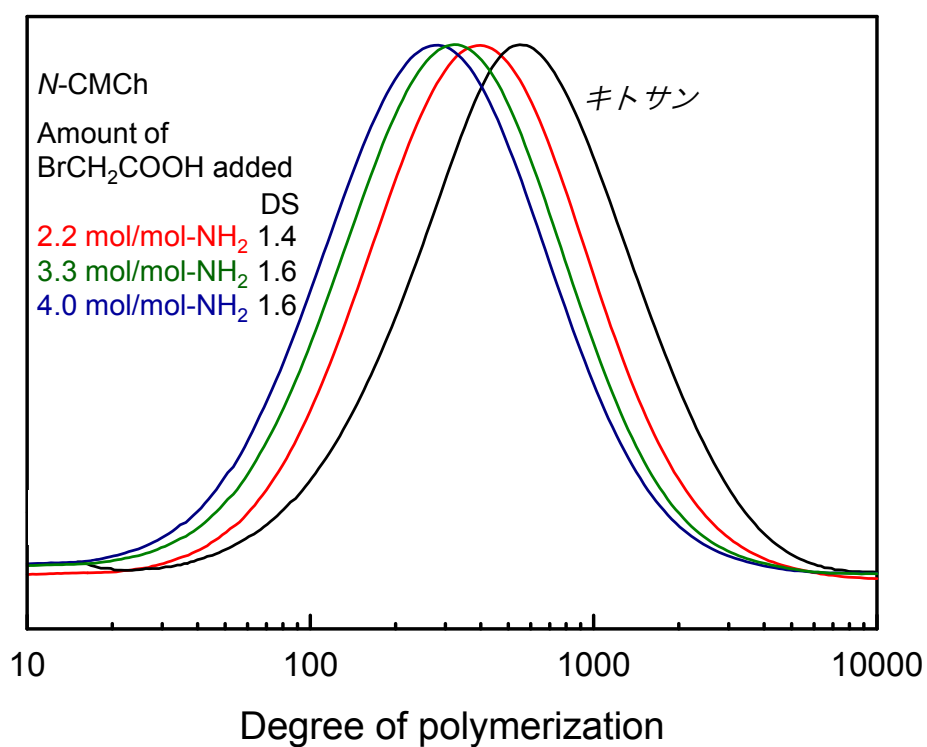


図 3-2-3-15 キトサンおよび *N*-カルボキシメチルキトサンのモノブロモ酢酸の添加量による重合度分布の変化。反応条件は、80°C で 12 時間反応させた。

このことから、反応温度 80°Cでは *N*-CMCh の低分子化は反応の初期段階、少なくとも反応開始から 3 時間以内に起こっていることがわかった。

一方、試薬添加量を変化させた場合の *N*-CMCh の溶出パターン (図 3-2-3-15) には変化がみられた。モノブromo酢酸の添加量の増加にともない、得られる *N*-CMCh の重合度は低下していた。このことから、重合度低下の主な要因は試薬の添加量に関係すると考えられる。反応系の pH8~9 において酸加水分解は考えられないため、脱離基として生成するハロゲン化物イオンが直接の原因ではないかと推測される。

3-2-4 結論

NaHCO₃ を反応のプロモーターとして用いて、水中でキトサンの C2 位のアミノ基を選択的に *N*-カルボキシメチル化、*N*-ベンジル化、*N*-ヒドロキシエチル化、*N*-カルボキシブチル化を行うことに成功した。この方法では *N*-カルボキシメチルキトサンおよび *N*-ベンジルキトサンは、高置換度のものが高い収率で調製できた。また、1 つのアミノ基に 2 つのカルボキシメチル基を導入することが可能であり、脱アセチル化したキトサンを適切な反応条件で反応させれば、置換度 2.0 の *N,N*-ジカルボキシメチルキトサンが得られた。*N*-ベンジル化により同様に、*N,N*-ジベンジルキトサンが得られたが、*N*-アセチル化度 0.19 のキトサンを出発物質に置換度の最大値は 1.33 であった。また、モノブromo酢酸を用いた *N*-カルボキシメチル化は、反応温度 80°Cで試薬の添加量に依存して低分子化した。

3-3 *N*-カルボキシメチルキトサンの pH 応答性ナノ粒子

3-3-1 緒言

キトサンおよびその誘導体から、ナノ粒子が調製できることが知られている。一般に有機物のナノ粒子は、内部に様々な物質を内部に取り込んで安定に分散させたり、取り込んだ物質を放出したりといった性質が注目されている[21-27]。この性質を利用し、ナノサイズ効果により特異な性質を持つ無機ナノ粒子の安定分散[23,24]、ナノ粒子に薬剤を担持・放出させることでドラッグ・デリバリー・システム（DDS）へ応用すること[25-27]などが精力的に研究されている。DDS は、患部へ直接薬剤を届けたり、生理活性を向上させたり、薬剤の効果を患部全体に広げたり、薬剤の酵素や化学的条件に対する安定性を向上させたりと、薬剤の安全性や効能を向上させることに有効である。そして、これらの効果を発揮するためには、DDS 担体が 100 nm 以下の単位で分散していることが必要不可欠である[28]。

キトサン由来のナノ粒子には、他の材料に比較して DDS に有利な点が多い。ナノ粒子の調製に有害な有機溶媒を用いる必要がなく、イオン性のアミンを持つため簡単に架橋させることができ、高い生体親和性をもつ[29]。キトサンからナノ粒子を得る方法として、アルカリ溶液中にキトサン水溶液を圧縮空気によって噴射するコアセルベート法、キトサン水溶液の逆ミセルを架橋剤で固定化する逆ミセル法、激しく攪拌しているポリアニオン水溶液中にキトサン水溶液を滴下するイオンゲル化法、化学結合による架橋法、またはこれらの方法を組み合わせたものなどが知られている[28-34]。特にイオンゲル化法は、簡便で温和な方法であり、キトサンと三リン酸[28]、*N,O*-カルボキシメチルキトサン (*N,O*-CMCh) とカルシウムイオン[33]、*N*-カルボキシメチルキトサン (*N*-CMCh) と *N,N,N*-トリメチルキトサン[34]など、様々な物質の組み合わせでナノ粒子の調製が試みられている。

このように、キトサンを用いて多価アニオンと多価カチオンを混合することで、ナノ粒子を得ることができる。しかし、アニオンとカチオンの両方を含む両性のキトサン誘導体で、検討した例はない。両性のキトサンの水溶性に関して、*N,O*-CMCh が pH に応答して水溶性・水不溶性と変化する性質がわずかに知られるのみである。[12]

したがって本研究では、以前の研究で得た高置換度の *N*-CMCh および *N,O*-CMCh を用いて、ナノ粒子化に関する検討を行った。特に、ナノ粒子の大きさ、均一さなどのナノ粒子の形態は、DDS へ応用する際に重要であるため、動的光散乱 (DLS)、透過型電子顕微鏡観察 (TEM) などを用いて詳細に検討した。また、モデル・ドラッグを用いて、ナノ粒子の薬剤担持性および放出挙動についても調べた。

3-3-2 実験

試料

市販のキトサン (Chitosan 50, Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) を出発物質として用いた。ハロゲン化アルキル (モノブロモ酢酸、モノクロロ酢酸; 図 3-2-2)、 NaHCO_3 およびその他の試薬や溶液 (Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) は試薬グレードのものを、特別な前処理なく物質を用いた。

キトサンの水系 *N*-カルボキシメチル化

キトサンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-カルボキシメチルキトサン (*N*-CMCh) を調製した。具体的な手順は、3-2-2 を参照のこと。

キトサンの *N,O*-カルボキシメチル化

N-カルボキシメチル化との比較のため、従来法により *N,O*-カルボキシメチルキトサン (*N,O*-CMCh) を調製した。具体的な手順は、3-2-2 を参照のこと。

化学構造解析

^1H と ^{13}C -NMR は Alpha-500 (JEOL Ltd., Japan) および元素分析器 Flash EA1112 (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) により、CMCh の化学構造の確認と置換度の計算を行った。具体的な手法は、3-2-2 および 3-2-3 を参照のこと。

濁度測定

N-CMCh および *N,O*-CMCh の各 pH における濁度を、紫外可視近赤外分光光度計 V-600 (JASCO Co., Japan) によって測定した。測定には 0.1% の CMCh 溶液を調製し、それを HCl および NaOH 水溶液を用いて各 pH に合わせた。波長は、*N*-CMCh や水の吸光がない 600 nm に設定した。

動的光散乱とゼータ電位測定

N-CMCh および *N,O*-CMCh の各 pH における流体力学的半径およびゼータ電位を、ゼータ電位・粒度分布測定装置 Desla Nano HC (Beckman Coulter Inc., USA) によって測定した。測定には 0.1% の CMCh 溶液を調製し、それを HCl および NaOH 水溶液を用いて各 pH に合わせた。

DLS では、自己相関関数から粒度分布を返す式として NNLS を使い、データを 200 回積算した。ゼータ電位測定では、換算式には Smoluchowski を使い、データを 10 回積算した。

透過型電子顕微鏡観察

N-CMCh および *N,O*-CMCh の観察に、透過型電子顕微鏡 JEM 2000-EXII (JEOL Ltd., Japan) を用いた。加速電圧は 200 kV に設定し、回折コントラスト法の明視野観察を行った。また、画像の撮影には CCD カメラ Keen View (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) と iTEM ソフトウェア (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) を用いた。

蛍光顕微鏡観察による担持挙動の評価

N-CMCh のモデル・ドラッグとして、蛍光物質であるアクリジンオレンジ (図 3-3-2-1) を用いて薬剤担持性能について評価した。アクリジンオレンジはアミノ基によるイオン結合と芳香環による疎水結合が期待できる。担持の方法は、1 % *N*-CMCh と 0.1 % アクリジンオレンジの混合水溶液を HCl によって pH を調節し、析出させたものを遠心分離で回収し、析出させた pH の HCl 水溶液で良く洗った。

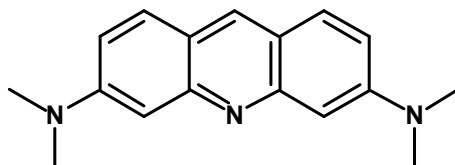


図 3-3-2-1 アクリジンオレンジの化学構造

得られた *N*-CMCh を、共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging Co. Ltd., Japan) を用いて観察した。観察は FITC 観察用の設定によっておこなった。

吸光度測定による放出挙動の評価

マイトマイシン C (図 3-3-2-2) は経口投与する抗がん剤の一種であり、副作用の抑制などのためドラッグ・デリバリー・システムでの研究が行われている[35]。マイトマイシン C はアクリジンオレンジと同様にアミノ基と芳香環を持つため、同様の機構で *N*-CMCh ナノ粒子に担持できると期待される。したがってマイトマイシン C を担持させた *N*-CMCh の、様々な pH 緩衝液中でのマイトマイシン C の放出挙動について調べた。緩衝液には pH2、7、10 の 0.1 % リン酸緩衝液を用いた。担持の方法は、1 % *N*-CMCh と 0.1 % マイトマイシン C の混合水溶液 5 mL を上記のアクリジンオレンジと同様に HCl で pH 調節後、遠心分離により洗浄し、凍結乾燥により乾燥させ、放出挙動評価用の試料とした。*N*-CMCh のマイトマイシン C の放出挙動は、Yan らの方法[27]に従い、*N*-CMCh から溶出したマイトマイシン C の量により評価した。試料は再生セルロース膜に入れ、リン酸緩衝液を 50 mL 中で透析をおこなった。一定時間ごとに、再生セルロース膜の外の液を 5 mL 採取し、新たに新しいリン酸緩衝液を 5 mL 加えた。採取した液中のマイトマイシン C 量は以下の式で表される；

$$\text{マイトマイシン C 放出 (\%)} = \frac{50c_n + 5 \sum c_{n-1}}{W_0} \times 100$$

c_n は n 回目に採取した液中のマイトマイシン C 濃度 (mg/mL)、 c_{n-1} は $n-1$ 回目に採取した液中のマイトマイシン C 濃度 (mg/mL)、 W_0 は N -CMCh 中に担持されたマイトマイシン C の総重量 (mg) をそれぞれ表す。

放出量の測定には紫外可視近赤外分光光度計 V-600 (JASCO Co., Japan) を用い、pH2、7、10 でのそれぞれ 295 nm、311 nm、314 nm におけるマイトマイシン C の検量線をあらかじめ作成し、各液の吸光度からマイトマイシン C の溶出量を求めた。

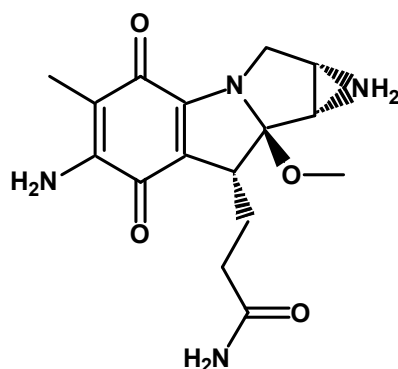


図 3-3-2-2 マイトマイシン C の化学構造

3-3-3 結果および考察

N -カルボキシメチルキトサンと N,O -カルボキシメチルキサンの水溶性

図 3-3-3-1 は、 N -CMCh および N,O -CMCh の各種 pH における水溶性を表す。濃度 0.1%

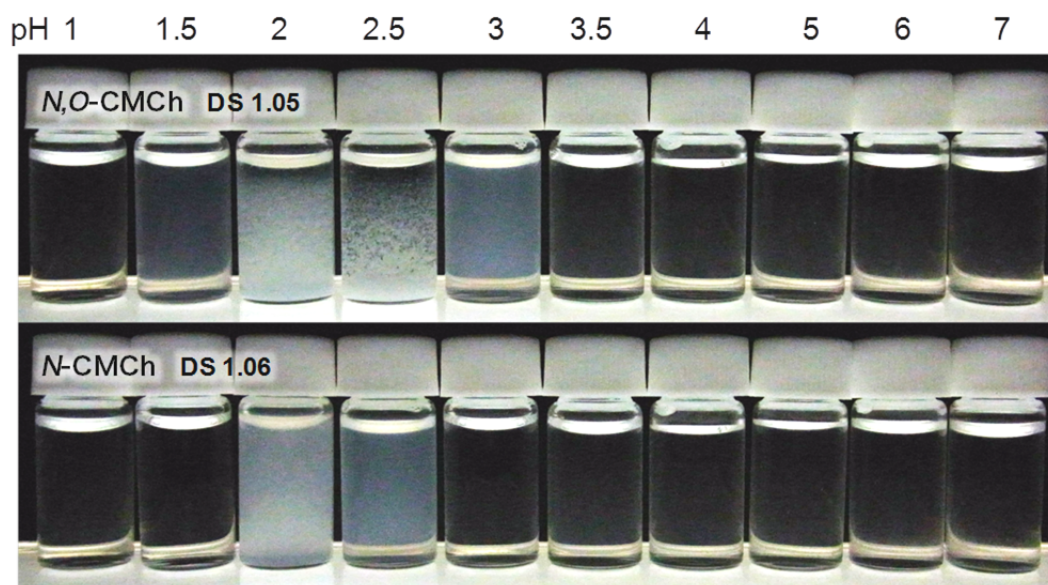


図 3-3-3-1 N -カルボキシメチルキトサンおよび N,O -カルボキシメチルキサンの pH に対する水溶性の変化。カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。

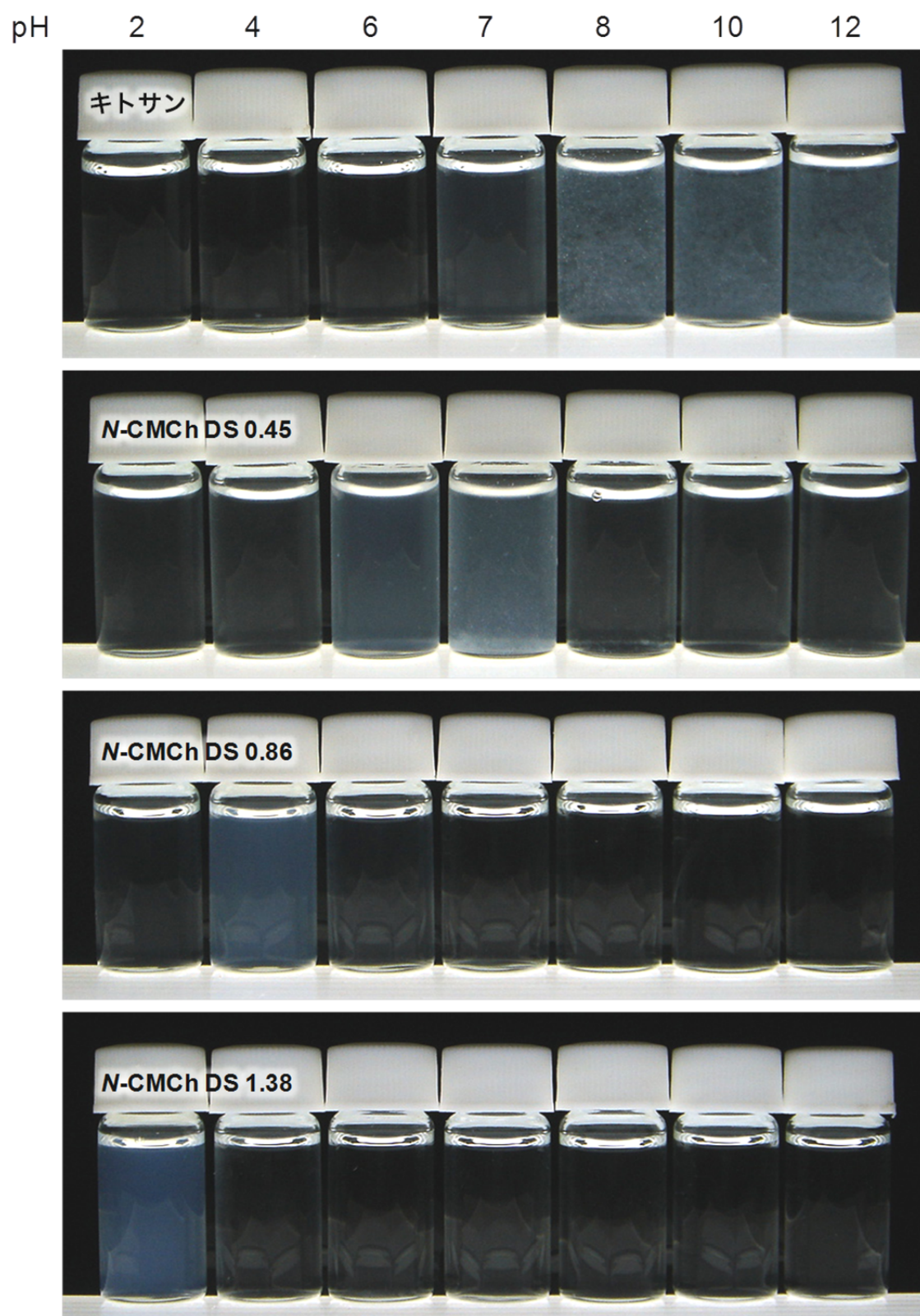


図 3-3-3-2 様々な置換度の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH に対する水溶性の変化。*N*-カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。

CMCh 水溶液を、HCl 水溶液および NaOH 水溶液を用いて pH を変化させた。N-CMCh と N,O-CMCh はともに置換度 1.1 のものを用いた。両試料とも、中性～アルカリ性においては広く水溶性を示したが、酸性の pH 域において沈殿や白濁がみられた。N-CMCh と N,O-CMCh はそれぞれ、pH2～2.5 および pH1.5～3 において沈殿や白濁を生じており、これらの pH 域は近いものの、N-CMCh は N,O-CMCh に比べ狭い pH 域で鋭く応答していた。沈殿の生じ方にも差がみられ、N-CMCh は沈殿が生じる条件でも一晩ほど白濁状態が続いてから沈殿するのに対し、N,O-CMCh は pH 調整から 10 秒程度で完全に沈降した。また両 CMCh とも、一度生じた沈殿や白濁は、液の pH を変化させること短時間で水溶化させることができた。すなわち、これらの沈殿や白濁は pH の調整により可逆的に形成・消失させることができた。

図 3-3-3-2 は、様々な置換度の N-CMCh の 0.1% 水溶液の pH に対する挙動を示す。前述と同様、N-CMCh は酸性～中性のある pH 域において、水不溶化して白濁または沈殿した。しかし、沈殿を生じる pH 域は N-CMCh の置換度に依存し変化した。N-CMCh は置換度が大きいほど、低い pH で水不溶化した。N,O-CMCh も同様に、置換度が高いほど低い pH で沈殿を生じたが、やはり沈殿の生じる pH 域は N-CMCh に比較して広がった。このことから、

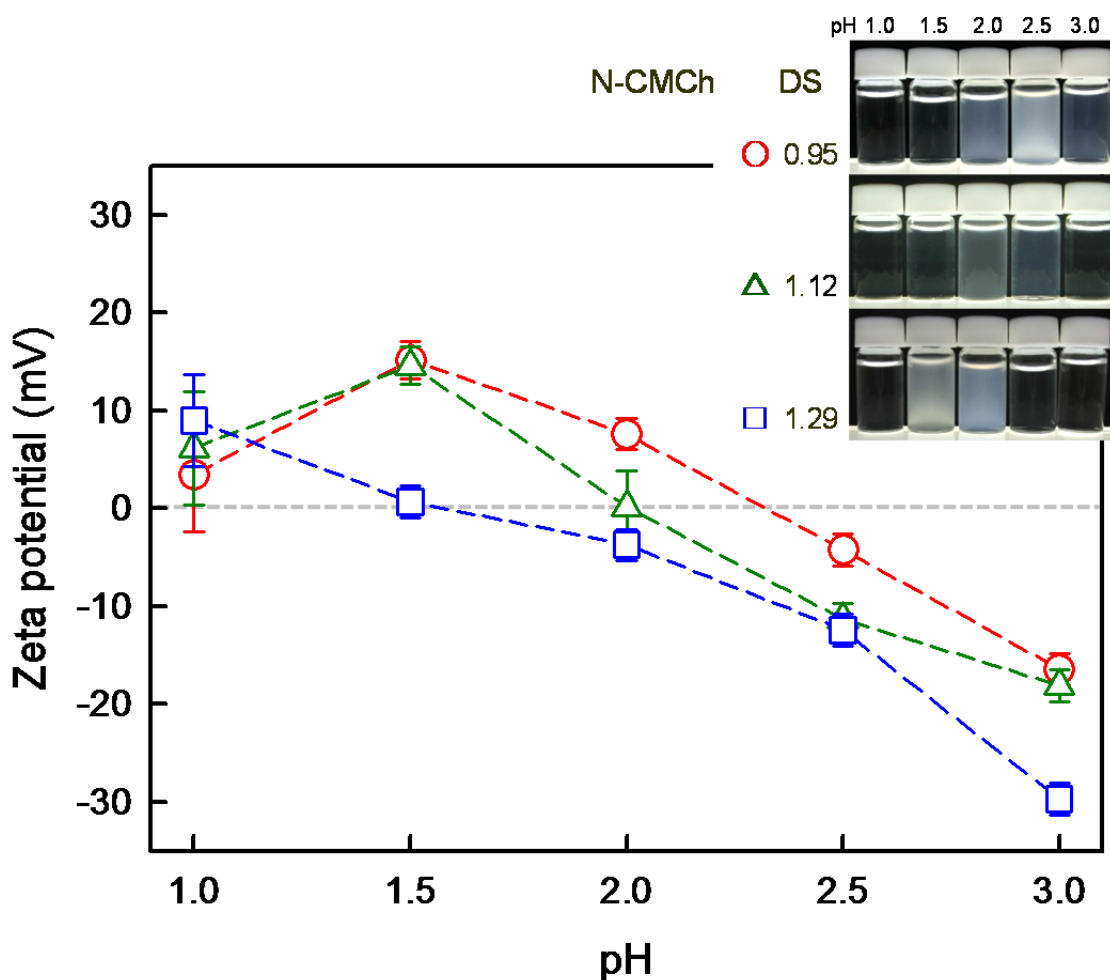


図 3-3-3-3 様々な置換度の N-カルボキシメチルキトサンの pH に対するゼータ電位の変化。N-カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。

CMCh が水不溶化するメカニズムは、分子中のイオン性基であるカルボキシル基とアミノ基に関係すると考え、ゼータ電位測定を行った。

水不溶化した *N*-CMCh のゼータ電位は図 3-3-3-3 のとおりである。置換度の異なる三種の *N*-CMCh を試料に用いて測定した。全ての試料において、最も濁度の高くなる pH でゼータ電位は約 0 mV を示し、それより酸性側では正、塩基性側では負にそれぞれ帯電していた。すなわち、*N*-CMCh の白濁は電離しているカルボキシル基とアミノ基の量比が 1:1 になる等電点付近で起こっていることが示された。等電点付近では、*N*-CMCh の正負の荷電量がほぼ等しくなるため、*N*-CMCh の静電反発が生じず、水に不溶になると考える。しかし、液中の pH を変化させると、ただちに正負の荷電バランスが変化し再び溶解するため、このような pH 応答性を示した。

N-CMCh と *N,O*-CMCh についてもゼータ電位を測定した (図 3-3-3-4)。用いた試料は図 3-3-3-1 に用いたものと同じであり、置換度は同じ 1.1 であった。置換度が等しいため、2 つの試料の間でゼータ電位には大きな違いはなかった。しかし、2 つの試料の挙動は明らかに異なり、*N*-CMCh ではゼータ電位の絶対値が 10 mV を超えると試料は透明になるのに対し、*N,O*-CMCh は約 20 mV でも白濁が観察された。

このような *N*-CMCh と *N,O*-CMCh の差について詳細に検討するため、各試料の濁度を測定し、白濁の度合いを定量的に評価した (図 3-3-3-5)。総じて、*N,O*-CMCh の方が *N*-CMCh

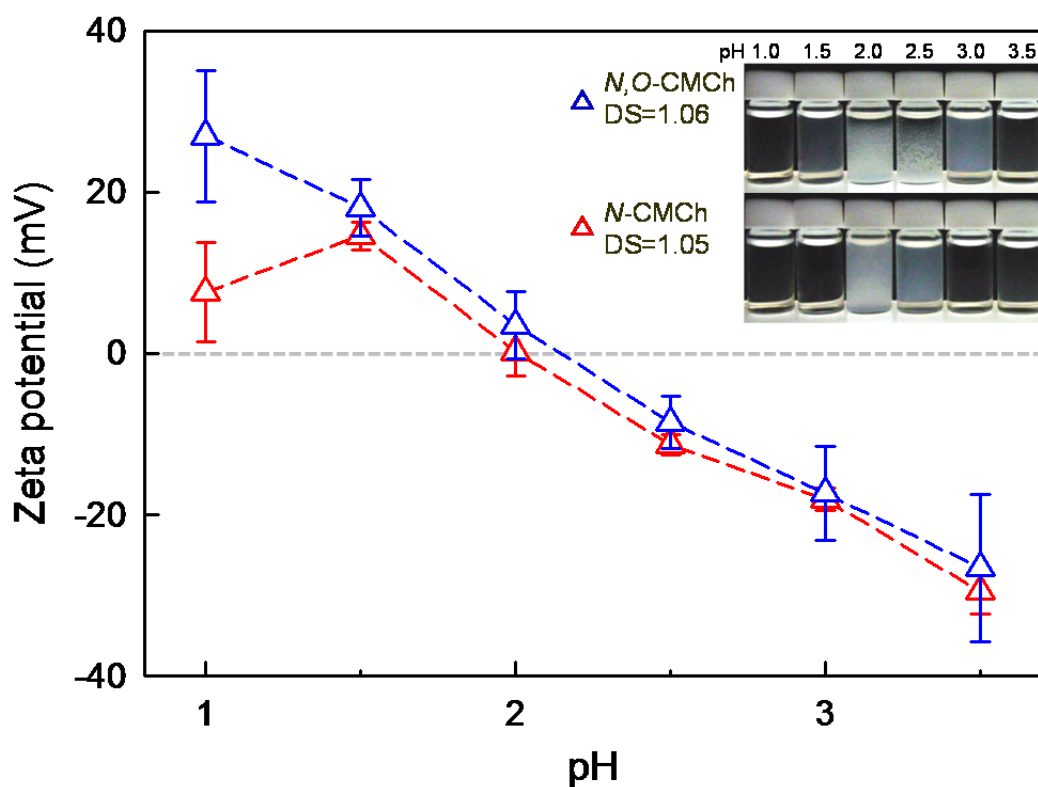


図 3-3-3-4 *N*-カルボキシメチルキトサンと *N,O*-カルボキシメチルキトサンの pH に対するゼータ電位の変化。*N*-カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。

に比べて濁度が高く、特に溶液が透明な pH 域においても同様であった。一般的に、濁度は濃度と溶解している分子の分子量に関係する。CMCh の濃度はともに 0.1% に設定した。一方、*N*-CMCh は 0.45 μm フィルターを通ったのに対し、*N,O*-CMCh は 0.45 μm フィルターを通らなかった。この結果から、分子量の差に注目した。

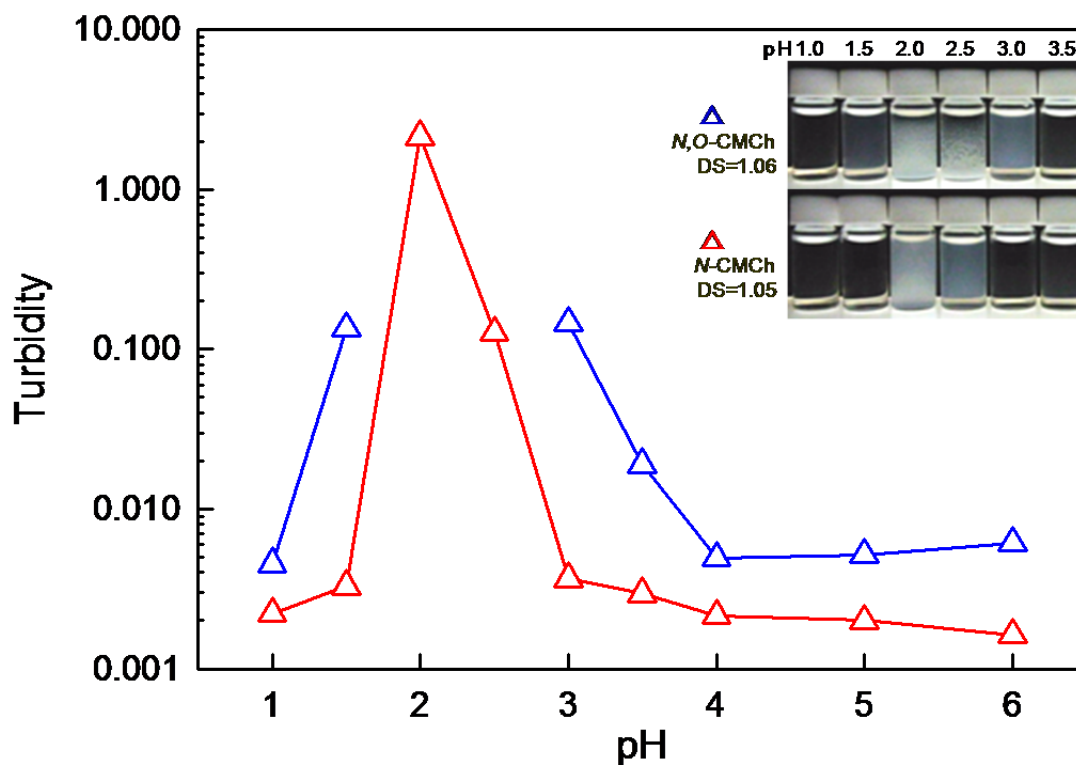


図 3-3-3-5 *N*-カルボキシメチルキトサンおよび *N,O*-カルボキシメチルキサンの各 pH における濁度の変化。カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。*N,O*-CMCh の pH2.5 および 3.0 における濁度は沈殿が早く測定不能であった。

表 3-3-3-1 *N*-カルボキシメチルキトサンおよび *N,O*-カルボキシメチルキサンの pH8 における流体力学的半径および重合平均分子量より求めた伸びきり分子鎖長。カルボキシメチルキトサン濃度は 0.1 重量%。

試料	置換度	流体力学的直径 (nm)	伸びきり分子鎖長 (nm)
<i>N</i> -CMCh	1.05	30.4	139
	1.54	15.8	96
<i>N,O</i> -CMCh	1.06	1063	404*
	1.53	854	404*

**N,O*-CMCh の分子量測定が難しかったため、出発物質のキトサンの重量平均重合度より伸びきり分子鎖長を求めた

N,O-CMCh は分子が大きすぎて SEC-MALLS 測定ができないため、DLS を用いた。得られた流体力学的直径および重量平均重合度から求めた伸びきり分子鎖長を表 3-3-3-1 に示す。*N,O*-CMCh の流体力学的直径は *N*-CMCh よりはるかに大きく、伸びきり分子鎖長を超えていた。*N,O*-CMCh の調製条件である強アルカリ性下では、反応中に副反応で重合が起こるとは考えづらい。したがって、これは *N,O*-CMCh の分子構造に由来すると思われる。*N,O*-CMCh のカルボキシメチル基は C2 アミノ基、C3 水酸基、C6 水酸基に分布しており、Chen らによればその分布は今回用いた反応条件において C2:C3:C6=2:3:6 である[12]。すなわち、約 7 割の未置換のアミノ基が *N,O*-CMCh 中に存在している。そのため、*N,O*-CMCh 分子内には多くのポリカチオンドメイン（アミノ基が密集して続く箇所）が存在し、その部位とポリアニオンドメイン（カルボキシル基が密集して続く場所）がポリイオンコンプレックス状の架橋を形成していると考えられる（図 3-3-3-6）。これが *N,O*-CMCh の流体力学的直径が出発物質の伸びきり分子鎖長より長かった原因だと考えられる。一方で、*N*-CMCh の未置換のアミノ基量は前実験にあるとおり、¹H-NMR から容易に求めることができた。計算によると用いた *N*-CMCh には 0.09、約 1 割のアミノ基が残っているのみであり、均一反応であることから未置換のアミノ基は広く均一に分布していると予想される。また、*N*-CMCh 分子の 9 割のアミノ基はカルボキシメチル基と結合しており、立体障害により *N*-CMCh は凝集しにくい構造であったと考えられる。すなわち、官能基の置換位置の差により、*N,O*-CMCh は静電引力により何分子かが凝集した大きな構造体を常に形成しており比較的析出しやすいが、*N*-CMCh はアミノ基の立体障害により分子分散しておらず比較的析出しにくいためと思われる。これは分子の構造の差が、溶液中での CMCh の大きさ（表 3-3-3-1）、pH 応答性（図 3-3-3-1）などの物性に影響を及ぼしたということを意味する。位置選択的誘導体化による構造の制御は、非常に重要性であるといえる。

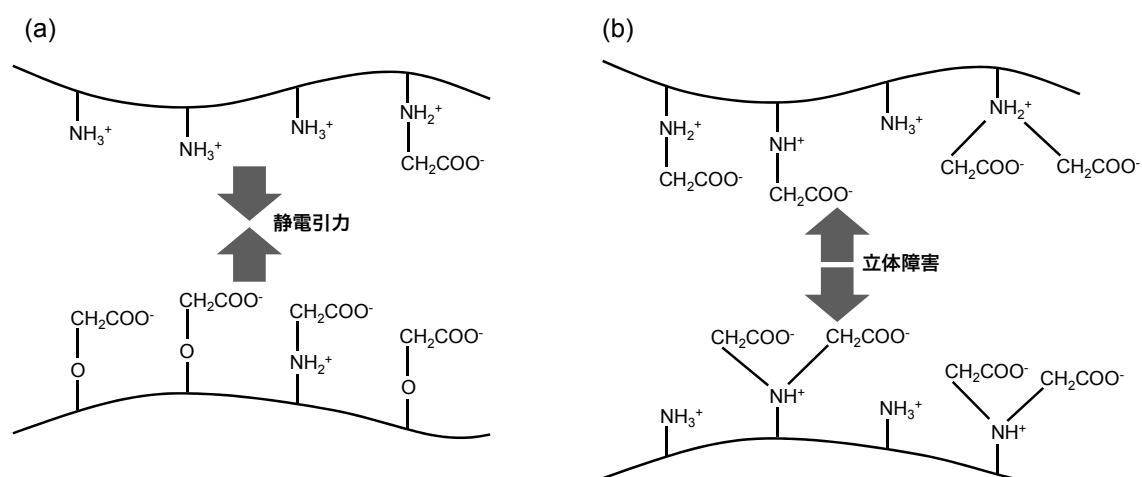


図 3-3-3-6 カルボキシメチルキトサンの構造による凝集性の差の発現モデル。(a) *N,O*-カルボキシメチルキトサンと (b) *N*-カルボキシメチルキトサンでは、カチオン性のアミノ基のアクセシビリティに大きな差がある。

N-カルボキシメチルキトサンの pH 応答性ナノ粒子の性質

N-CMCh の濁度 (図 3-3-3-5) をみると、pH3~3.5 のように目視では液が透明でも、濁度としては比較的高い条件がある。そこで、各試料について DLS による水中での粒度分布測定を行った。測定の結果、*N*-CMCh はナノメートル単位の粒子を形成しており、その大きさは pH に依存していた。pH3~3.5 で生じたナノ粒子は 12 nm 程度と非常に小さかったため、散乱強度が小さく液は透明であった。更に酸を加えて pH を下げると、pH2.5 では白濁し、100 nm 程度の粒子を形成していた。pH2 では粒子は更に大きくなり、数百 nm に達した。等電点である pH2 付近を越えて pH を下げると、粒子径は 10 nm まで小さくなり (図 3-3-3-7)、pH1 に達すると溶解した。この傾向は置換度によらず共通しており、例えば置換度 1.38 の *N*-CMCh では等電点付近の pH1.5 で数百 nm、pH2 では 80nm、pH1 や 2.5~3 では 10 nm 程度のナノ粒子を形成していた (図 3-3-3-8)。また得られたナノ粒子の分布はどれも分布の小さい均一なものが得られていた。

N,O-CMCh についても、同様に DLS を用いて析出物の粒度分布について調べた。置換度 1.06 の *N,O*-CMCh において、pH 1.5 および 3.0 でのナノ粒子の形成が確認された。しかし、得られたナノ粒子は平均で 150 nm 程度と大きく、その大きさの分布は広がった (図 3-3-3-9)。また、このナノ粒子の大きさは、*N,O*-CMCh に塩化カルシウムを滴下して得られるナノ粒子の大きさとよく一致していた [36]。

これらの結果は図 3-3-3-3 にあるゼータ電位と相関性がある。置換度 1.05 および 1.38 の *N*-CMCh は、それぞれ pH1.5 と 2.0 付近が等電点付近であるため、ゼータ電位はほぼ 0 mV である。表面荷電のほとんどない粒子は互いに凝集し、最終的に数 μm 以上の沈殿物を形成した。また、ゼータ電位の絶対値が 10 mV 程度のときは 80~100 nm の、20 mV 程度になると 10 nm のナノ粒子が得られた。これらの動的光散乱は粒子の形成後、ただちに測定された結果であることを考慮する必要がある。例えば、*N*-CMCh 等電点付近では数百 nm の粒子が得られたが、このナノ粒子は安定ではなく、一晩で凝集して沈殿した。一方、80~100nm のナノ粒子に関しては、ゼータ電位の絶対値が小さいためナノ粒子同士の凝集のため粒径は徐々に大きくなり、遠心分離によりただちに沈殿として回収できた。10 nm のナノ粒子分散液はゼータ電位が大きく比較的安定であり、長期の静置や遠心分離を経ても粒径に変化なく安定した分散状態を保った。

N-CMCh ナノ粒子の TEM 観察を行った。TEM 観察によると、ナノ粒子は条件により様々な大きさおよび形態をとっていた (図 3-3-3-10~3-3-3-13)。どの条件でも、ナノ粒子は球に近い形であった。観察された粒子の大きさを、DLS の結果 (図 3-3-3-8) を比較すると、pH1.5 以外はよく一致していた。TEM 像によると、pH1.5 でナノ粒子は約 80 nm ほどのコンペイトウに似た形をしていた。DLS の結果で粒子サイズとして大きな値となったのは、pH1.5 でゼータ電位がほぼ 0 mV であることから、コンペイトウ状粒子がいくつか集まった状態で水中に分散しているためだと考えられる。また、置換度 1.38 の *N*-CMCh の 0.1% 水溶液を濃い HCl 水溶液を用いて一気に pH2.0 に合わせてから、ただちに TEM 観察用グリッドを作製す

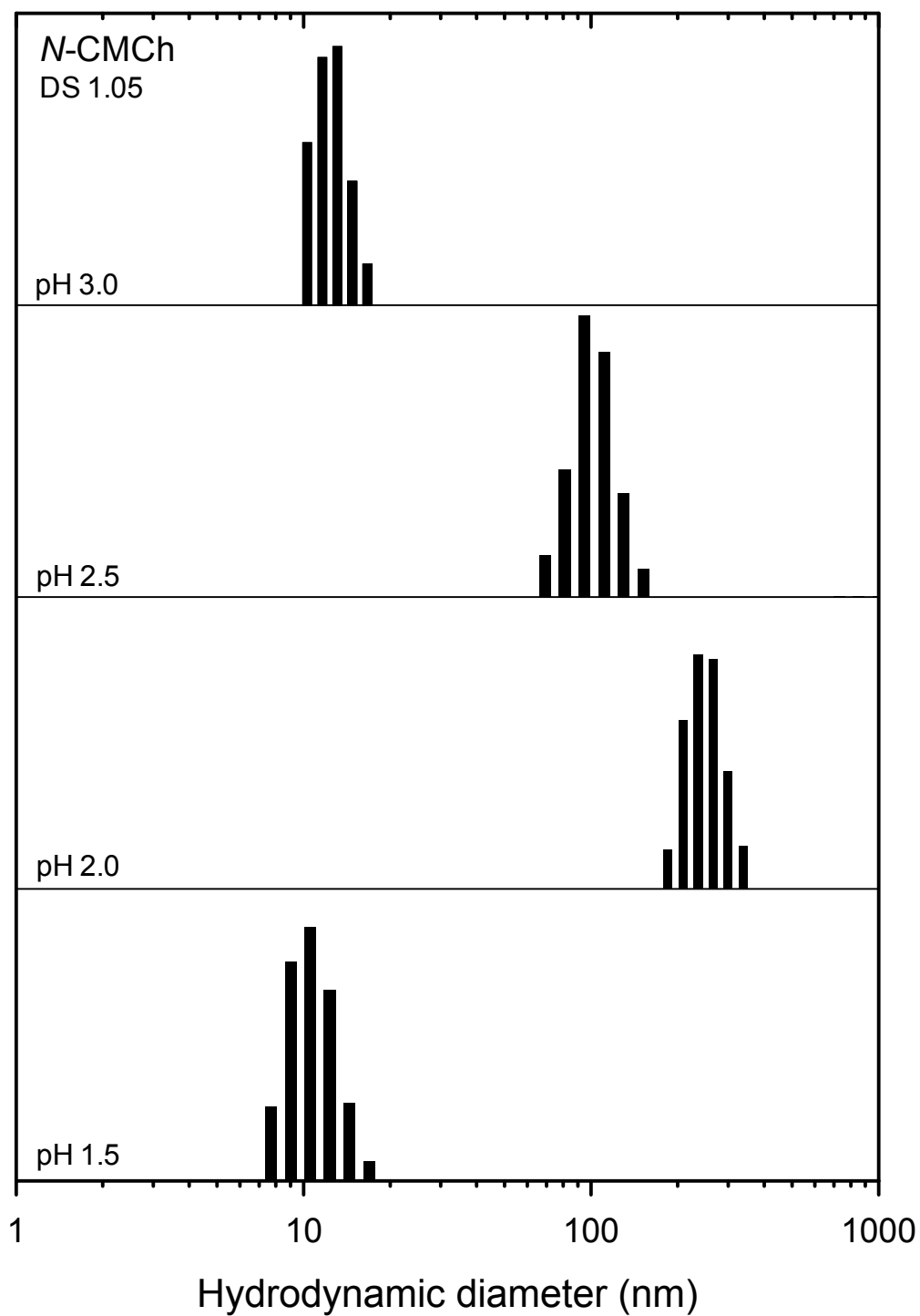


図 3-3-3-7 置換度 1.05 の *N*-カルボキシメチルキトサンの様々な pH におけるナノ粒子の粒度分布。 *N*-CMCh 濃度は 0.1% に設定した。

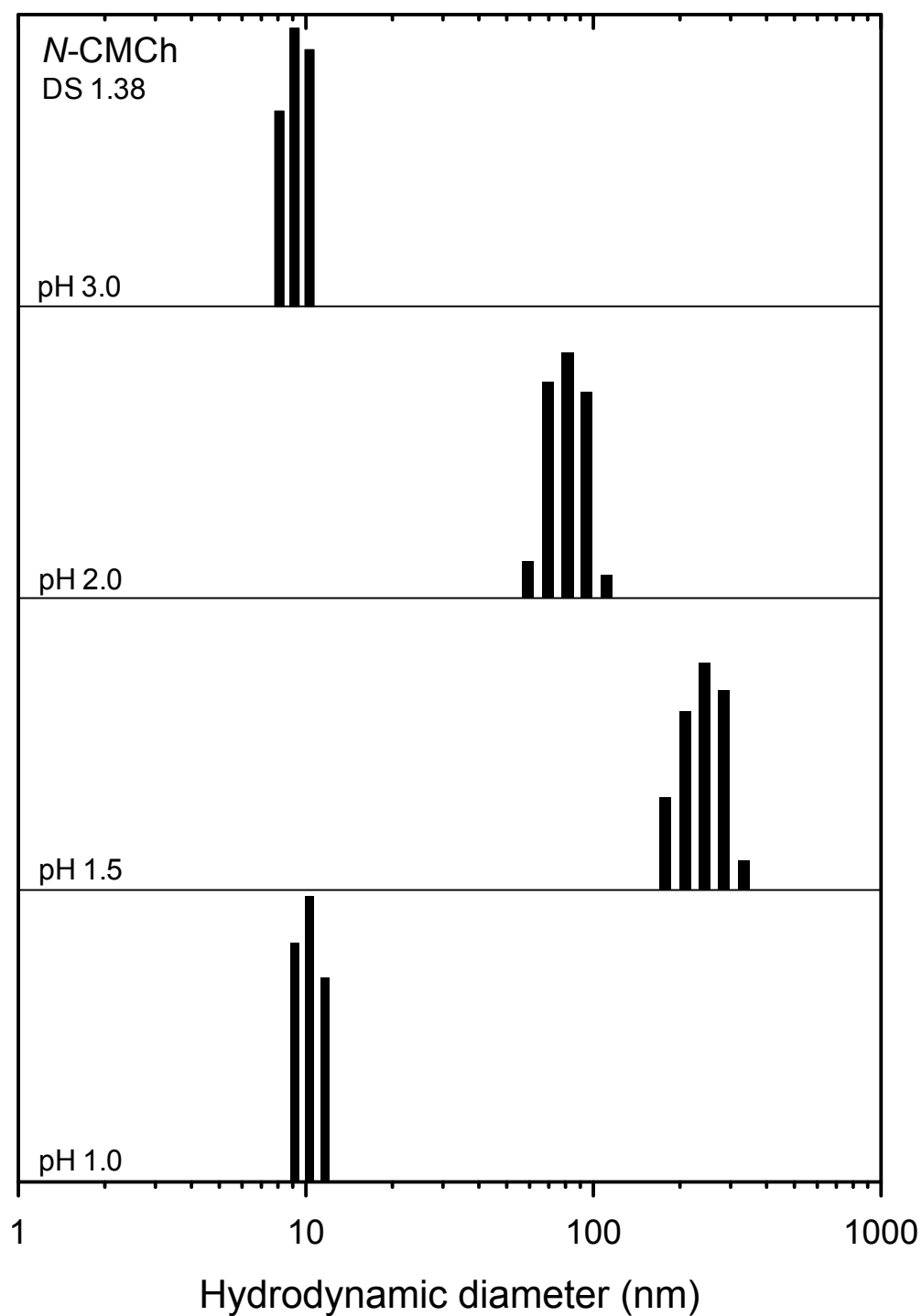


図 3-3-3-8 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの様々な pH におけるナノ粒子の粒度分布。 *N*-CMCh 濃度は 0.1% に設定した。

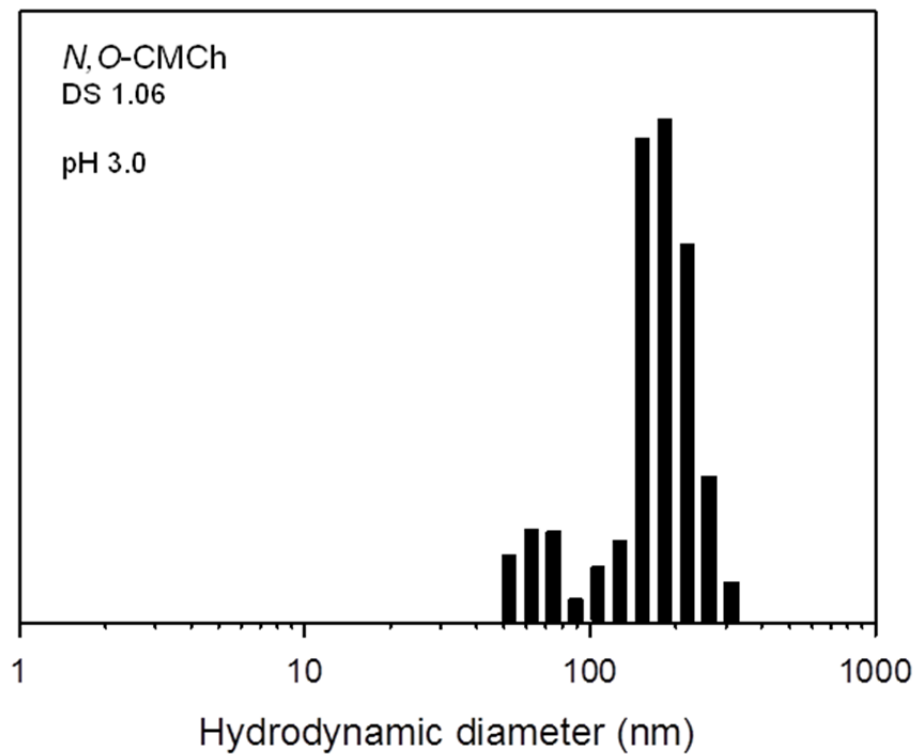


図 3-3-3-9 置換度 1.06 の *N,O*-カルボキシメチルキトサンの pH3.0 におけるナノ粒子の粒度分布。
N,O-CMCh 濃度は 0.1% に設定した。

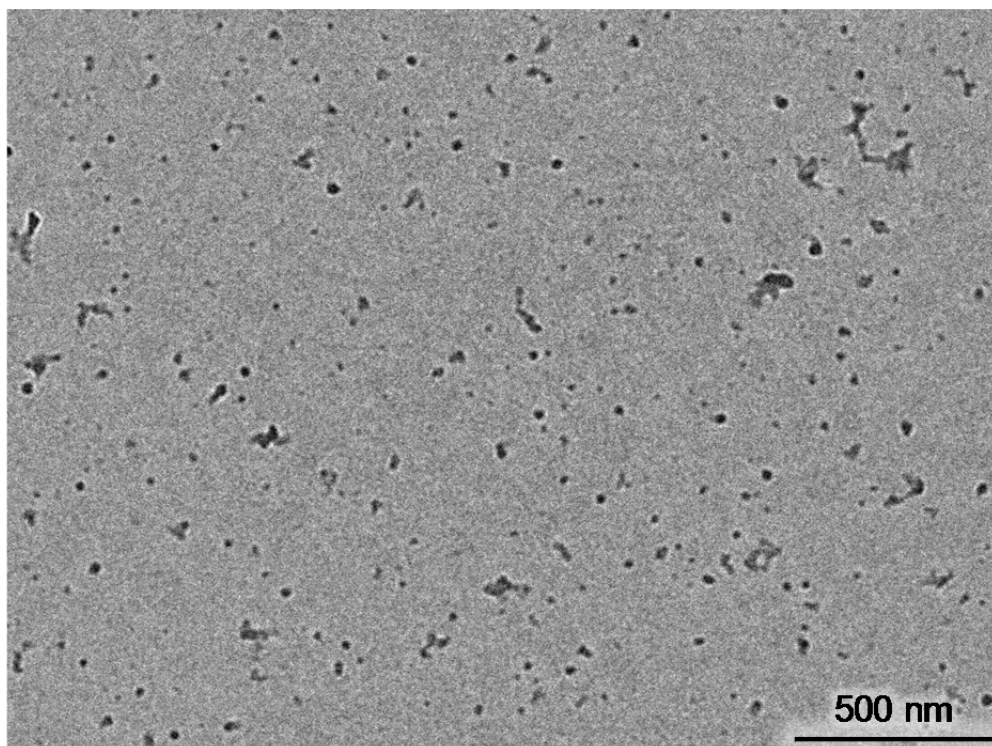


図 3-3-3-10 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH3.0 におけるナノ粒子の TEM 観察像。DLS による粒度分布は図 3-3-3-8 参照。

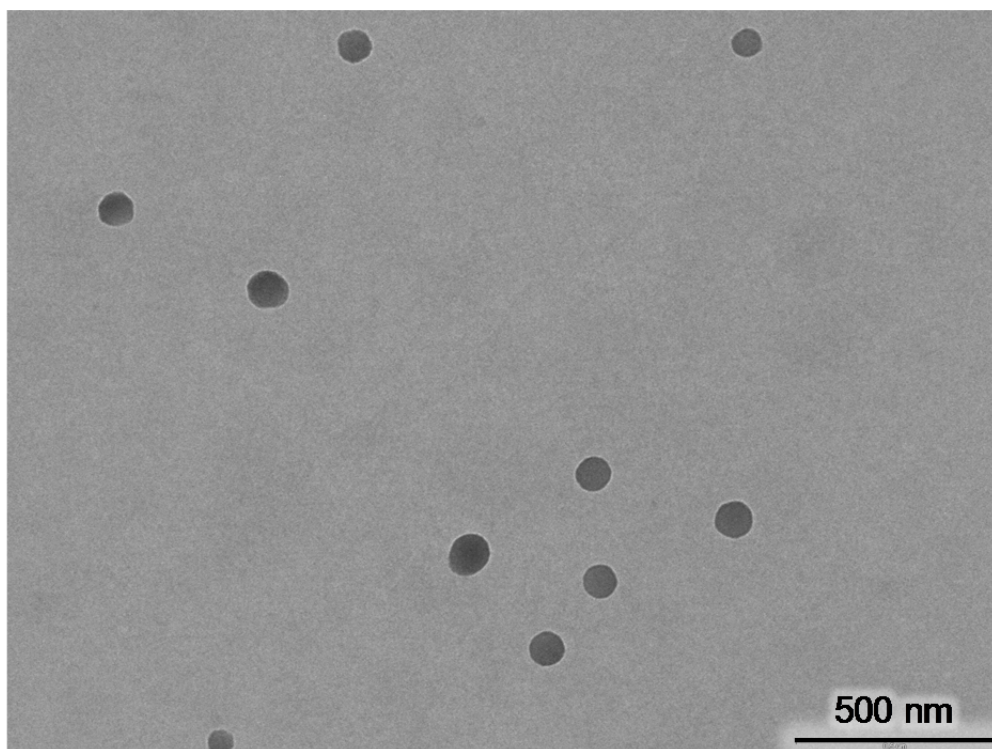


図 3-3-3-11 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH2.0 におけるナノ粒子の TEM 観察像。DLS による粒度分布は図 3-3-3-8 参照。

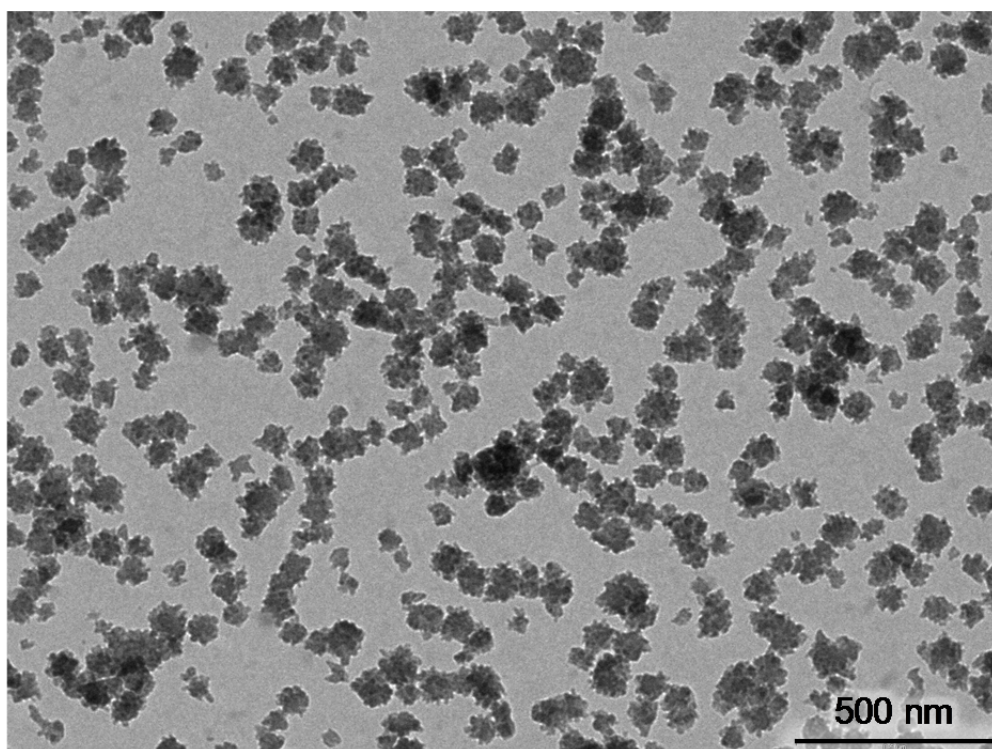


図 3-3-3-12 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH1.5 におけるナノ粒子の TEM 観察像。DLS による粒度分布は図 3-3-3-8 参照。

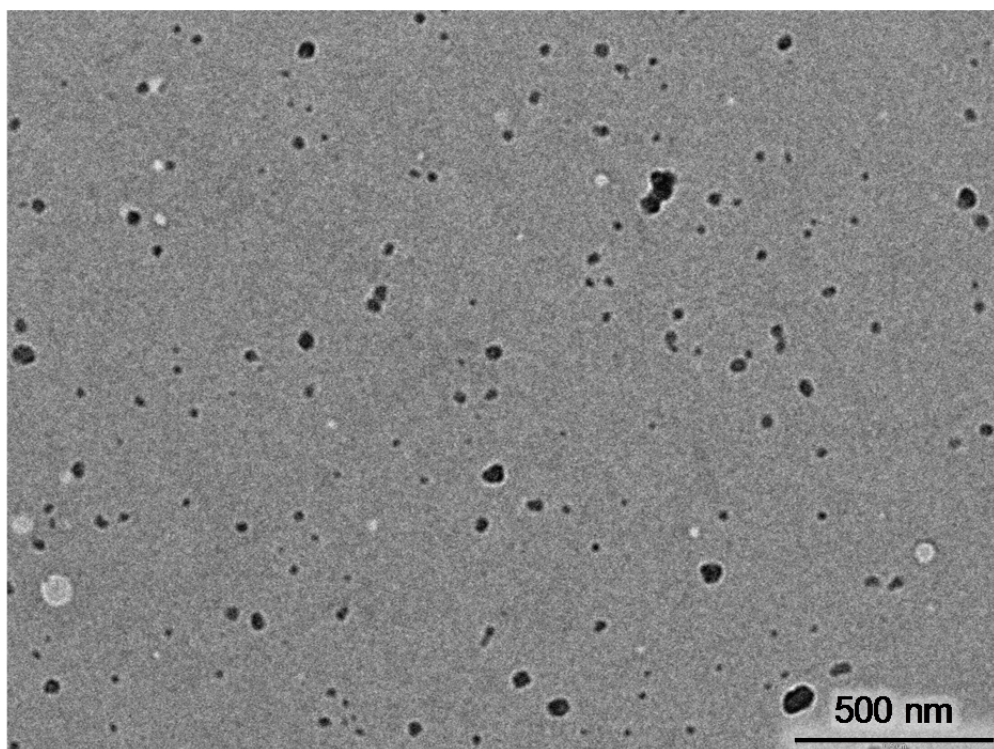


図 3-3-3-13 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH1.0 におけるナノ粒子の TEM 観察像。DLS による粒度分布は図 3-3-3-8 参照。

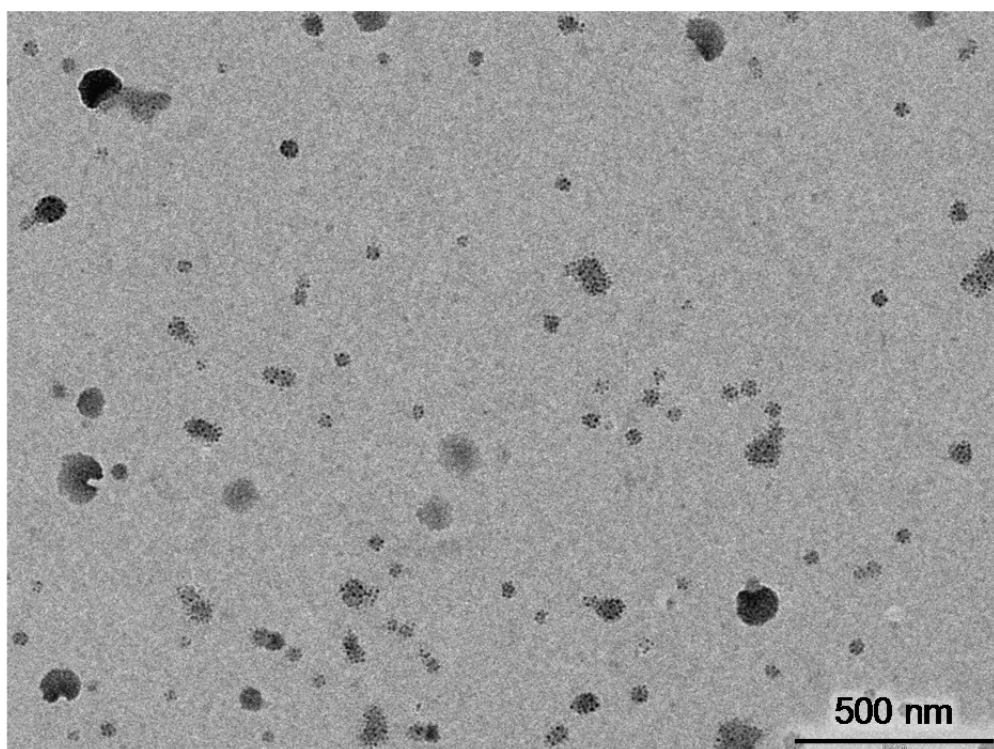


図 3-3-3-14 置換度 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH2.0 におけるナノ粒子の TEM 観察像。濃度の高い HCl 水溶液を用いて一気に pH 調整し、ただちに TEM 試料を作製した。

ると図 3-3-3-14 のような像が観察できた。平衡状態に達する前に TEM 試料を作製したため、図 3-3-3-11 に比較して小さい粒子が得られているが、1つの粒子を詳細に観察すると 10 nm 程度の一次粒子から構成されているのがわかる。すなわち、*N*-CMCh ナノ粒子は、置換度 1.38 なら pH3.0、置換度 1.05 なら pH3.5 で得られる 10 nm 程度ものが一次粒子であり、それ以上の大きさのナノ粒子は一次粒子同士の凝集によって成長するのだと考えられる。これはゼータ電位の結果とナノ粒子の大きさの関係、すなわちゼータ電位の絶対値が小さくなるほど大きなナノ粒子が得られることをよく説明している。一次粒子はゼータ電位が大きければ安定に分散状態を保てるが、ゼータ電位が小さくなるにつれ互いに凝集しやすくなり、0 mV ではただちに凝集して数百 nm の凝集体を作る（図 3-3-3-15）。また図 3-2-2-12 のナノ粒子が他と形状が異なるのは、溶媒和の度合いの差だと考えられる。図 3-2-2-12 ではナノ粒子のゼータ電位は約 0 mV でありよく凝集しているが、他の条件ではゼータ電位は正

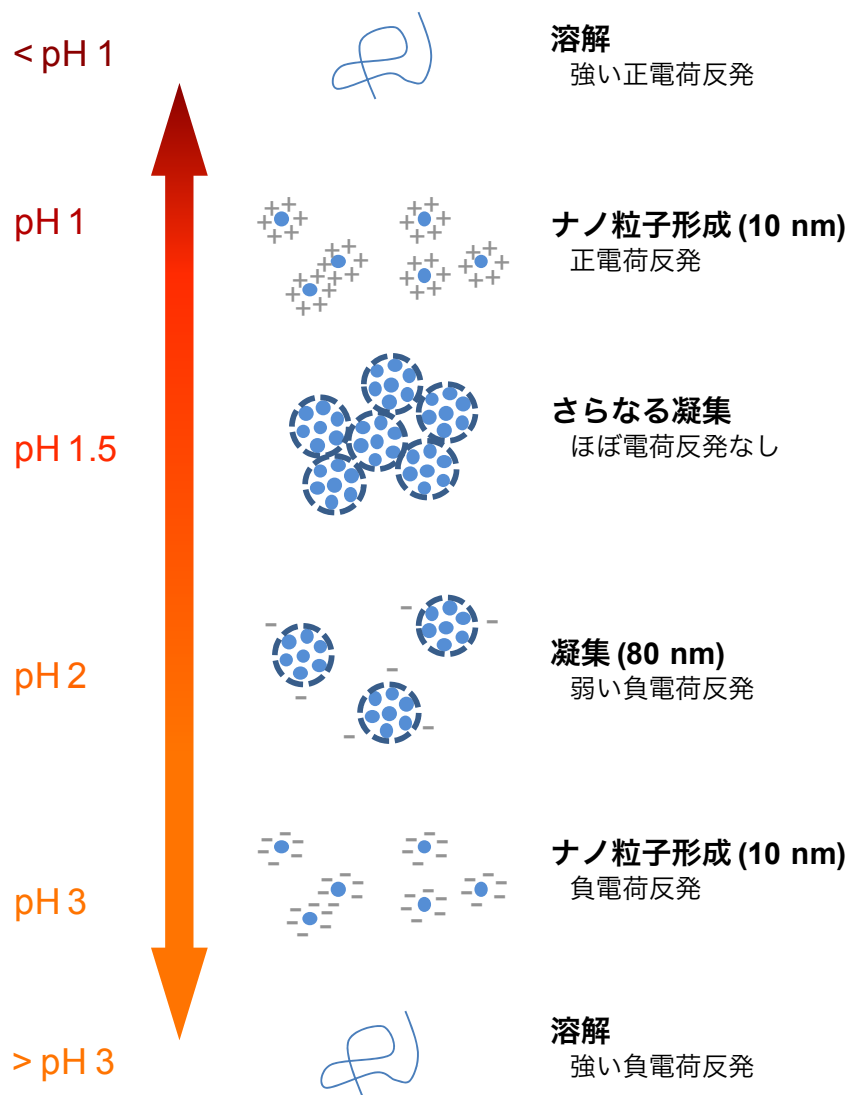


図 3-3-3-15 *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子形成のモデル。具体例に置換度 1.38 とした。

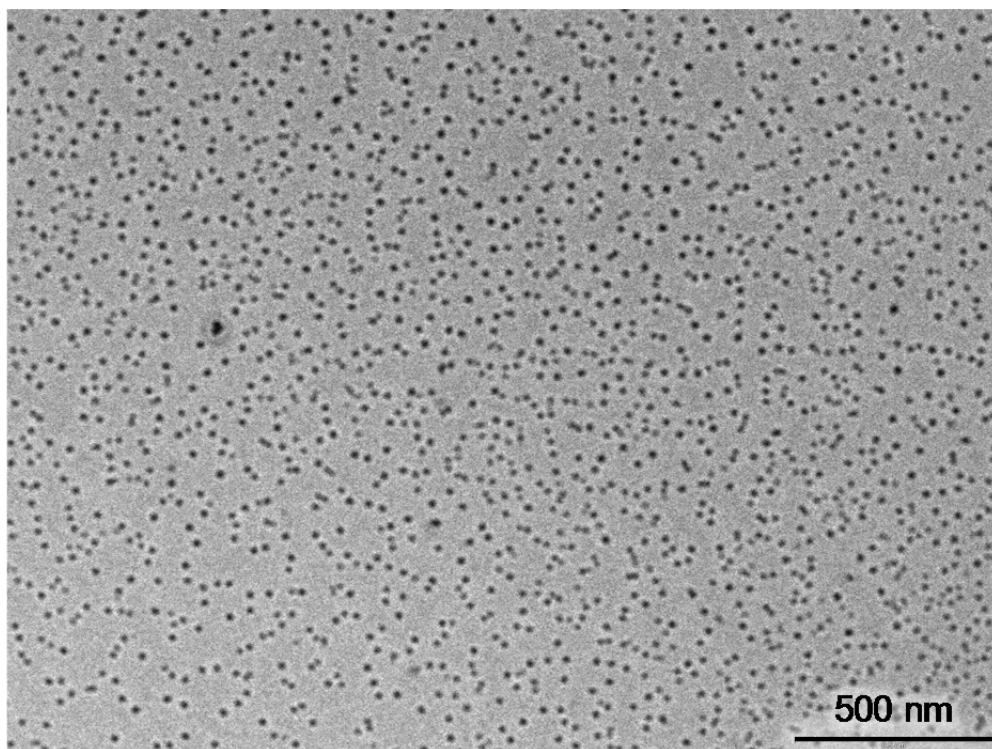


図 3-3-3-16 置換度 1.62 の *N*-カルボキシメチルキトサンの pH1.0 におけるナノ粒子の TEM 観察像

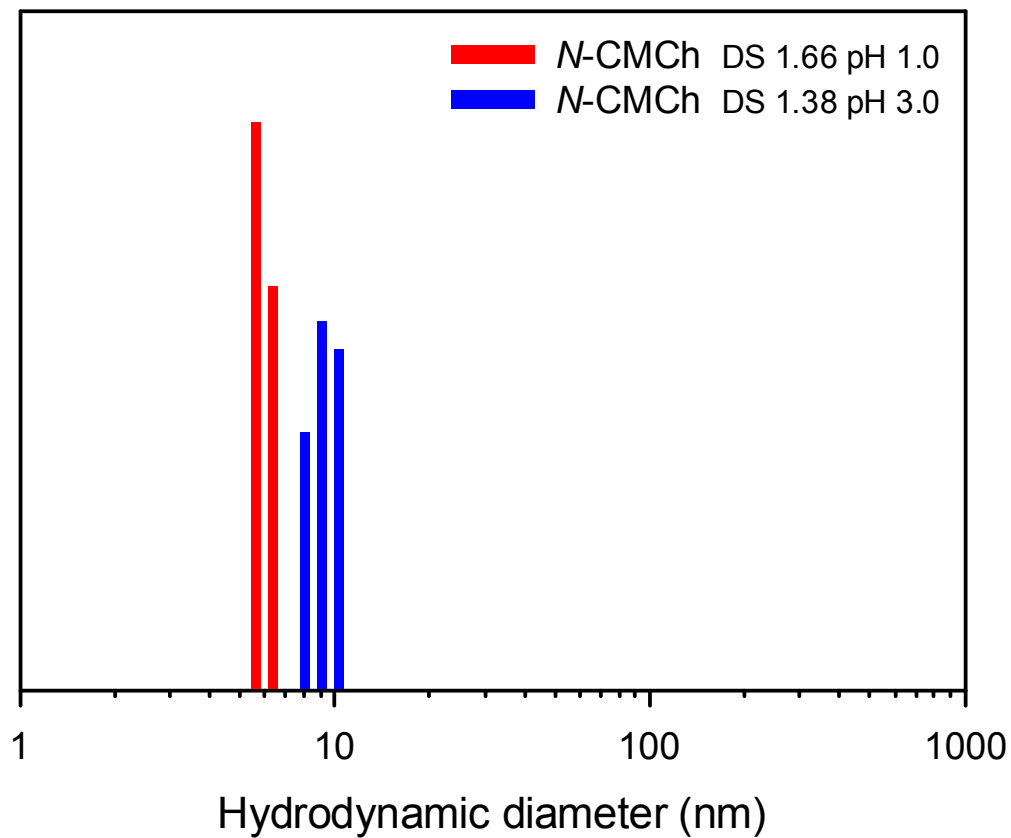


図 3-3-3-17 置換度 1.62 と 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子の粒度分布

負にある程度帯電しているためわずかに溶媒和していると考えられる。そのため、図 3-2-2-12 では液中の形のまま乾燥するのに対し、他の条件では乾燥過程で表面積を最小化するため球状なる。

この一次粒子が何個の *N*-CMCh 分子からなるのかは、証明していないが、現状では分子一つ分だと考えている。図 3-3-3-16 は、置換度 1.62 の *N*-CMCh のナノ粒子を pH 1.0 において調製したものである。図 3-3-3-10 などと比較すると、置換度 1.62 のナノ粒子は置換度 1.38 のナノ粒子より明らかに小さい。DLS の結果からも同様の結果が確認できる(図 3-3-3-17)。2つの *N*-CMCh の差は置換度だけではなく、試薬添加量の差による低分子化の度合いの違いにより、置換度 1.62 の *N*-CMCh の方が低い重合度をもつ(表 3-3-3-2)。分子1つのナノ粒子ならば、分子量がそのままナノ粒子の大きさとして現れるはずである。また、各生成物の重合度から分子鎖が折り畳まれた際の大きさを、キトサンの含水結晶のモデル[37]を参考に試算した。その結果、置換度 1.38 および 1.62 のとき、それぞれ四分子と二分子集まったモデルを考えたとき、ナノ粒子の流体力学的直径を超える。しかし、このモデルはキトサンの含水結晶をモデルとしたものであり、*N*-CMCh の理論より得られたものではない。したがって、*N*-CMCh ナノ粒子が一分子で形成しうるかについては、さらなる検討が必要である。

表 3-3-3-2 置換度 1.62 と 1.38 の *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子の流体力学的直径、重量平均重合度、重合度から換算した分子鎖折りたたみ時の大きさ

試料	DS	pH	流体力学的直径 (nm)	重量平均重合度	重合度換算サイズ (nm)
N-CMCh	1.38	3.0	9.26	669	6.31 (一分子)
					9.10 (三分子)
					10.01 (四分子)
	1.62	1.0	5.94	397	5.30 (一分子)
					6.68 (二分子)

N-カルボキシメチルキトサンのドラッグ・デリバリー・システムへの応用

N-CMCh は pH 応答性ナノ粒子を形成した。pH 応答性ナノ粒子の応用として、経口による DDS が精力的に検討されている。消化器官の pH は、胃で酸性 (pH3 以下)、腸で中性と大きく変化するためである。したがって、モデル・ドラッグを用いて *N*-CMCh ナノ粒子の DDS に関する性質について検討を行う。

まず、薬剤担持性について評価を行った。蛍光物質であるアクリジンオレンジをモデル・ドラッグに採用し、蛍光を観察することで *N*-CMCh の薬剤担持機能について評価した。*N*-CMCh とアクリジンオレンジの混合水溶液の pH を *N*-CMCh の等電点まで下げ、よく洗浄したナノ粒子凝集物の共焦点蛍光レーザー顕微鏡による観察結果を示す (図 3-3-3-17)。ナ

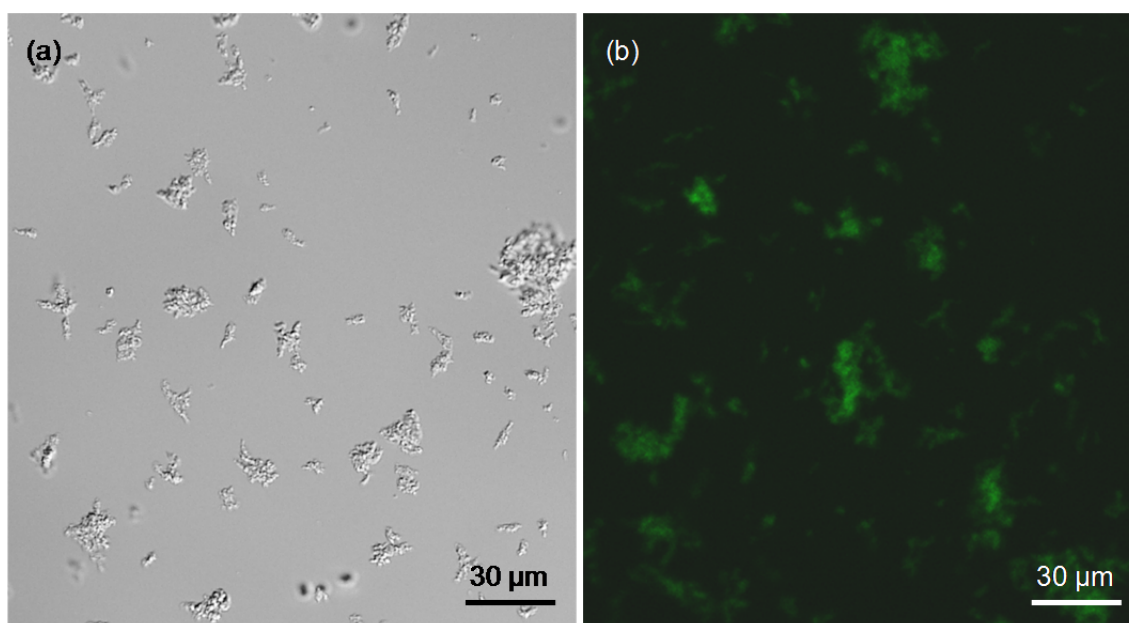


図 3-3-3-17 アクリジンオレンジ担持 *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子の観察像。(a) 明視野像、(b) FITC 設定での蛍光像。

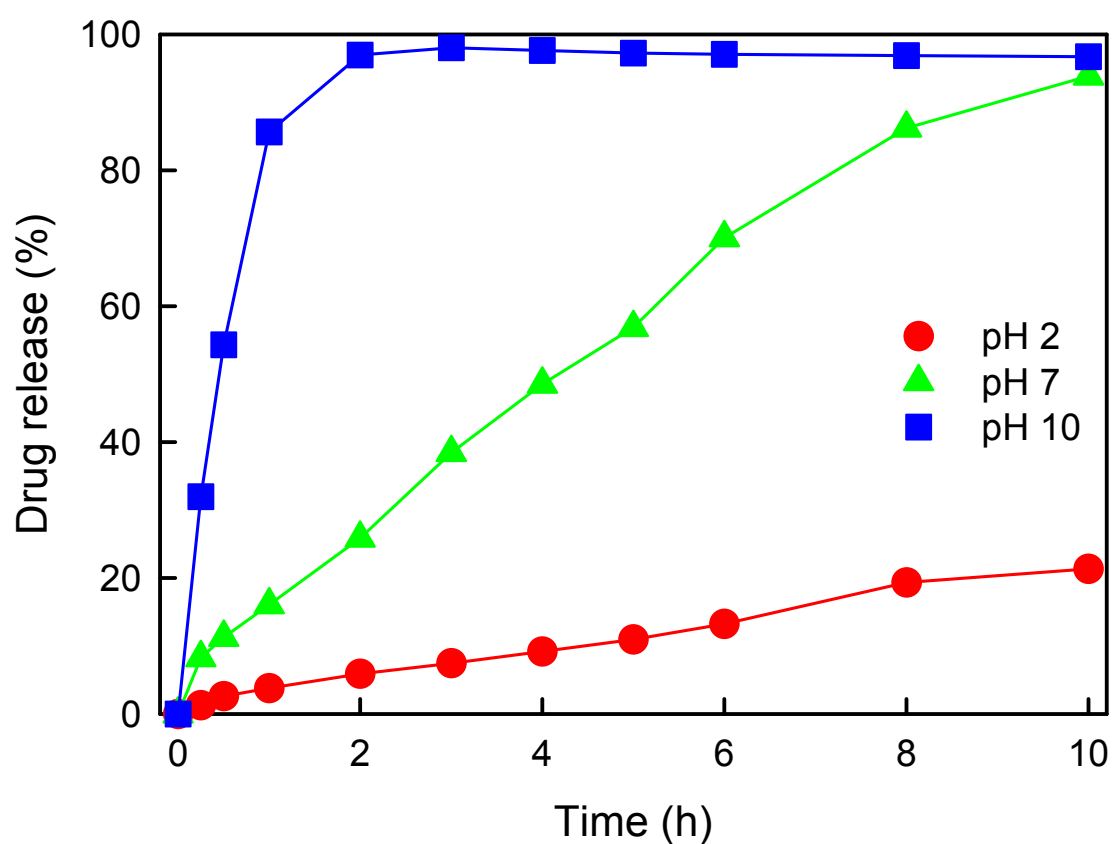


図 3-3-3-18 マイトマイシン C 担持 *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子の、様々な pH のリン酸緩衝液中でのマイトマイシン C 放出挙動。リン酸緩衝液の濃度は 0.1 M。マイトマイシン C は *N*-CMCh に対して 1.6 重量%が担持された。

ノ粒子が、アクリジンオレンジの蛍光である緑色光を発したため、*N*-CMCh ナノ粒子内にアクリジンオレンジが担持されていることがわかった。しかしこれが表面吸着なのか内部に包摂されているのかについては不明である。

続いて、薬剤の放出挙動について検討を行った。この評価では、モデル・ドラッグとして強力な抗癌剤であり、副作用も認められるマイトマイシン C を用いた。マイトマイシン C 担持 *N*-CMCh ナノ粒子を pH2、7、10 のリン酸緩衝液に浸漬し、それぞれの pH でのマイトマイシン C の溶出量を調べた。図 3-3-3-18 に示すように、各 pH に依存し、異なる放出挙動を示した。マイトマイシン C の放出速度は pH2 が最も遅く、10 時間で 20% しか放出されなかった。一方、pH10 ではマイトマイシン C は直ちに放出され、2 時間以内にほとんどのマイトマイシン C が放出されている。また pH2 および 7 では徐放性が認められ、ゆっくりと長時間かけて薬剤が放出された。pH2 で放出が起こることから、表面吸着されている

N-CMCh の DDS への応用に関するポテンシャルは本研究によって示されたが、*N*-CMCh に対して 1.6% が担持されるにとどまった。これは、他の DDS について研究されている直鎖ポリマーに比較しても小さい値である。ナノ粒子形成および洗浄時に多くのマイトマイシン C が溶出するため、マイトマイシン C の高い水溶性が担持性能の低さの原因だと考えられる。したがって、別のモデル・ドラッグについても DDS の試験を行い、更に *N*-CMCh に担持できる量の高い薬剤を見つける必要がある。おそらく、疎水性の薬剤や酸性条件下でイオン化しづらい酸性の薬剤を用いることで向上できると期待している。

3-3-4 結論

カルボキシメチルキトサンは、pH に応答し可逆性のナノ粒子を形成した。立体構造の違いから *N*-カルボキシメチルキトサンは *N,O*-カルボキシメチルキトサンより pH に対して鋭敏に応答し、小さく均一なナノ粒子を形成した。また *N*-カルボキシメチルキトサンナノ粒子の大きさは、置換度、pH によって制御することができ、置換度 1.62、pH1.0 の条件において 5.94 nm の均一なナノ粒子を得た。これは電離したアミノ基と電離したカルボキシル基の量が等しくなる等電点付近でナノ粒子が形成するためである。また、*N*-カルボキシメチルキトサンはアクリジンオレンジとマイトマイシン C を粒子内に担持することができた。マイトマイシン C 担持ナノ粒子は、pH2 では最も放出速度が遅く、pH10 では素早くほとんどのマイトマイシン C が放出された。また pH2 および 7 では、マイトマイシン C の徐放性が確認された。しかし、マイトマイシン C の担持量は *N*-CMCh の重量に対し 1.6% と、直鎖型のポリマーを用いた他の研究報告と比較しても低い値であったため、マイトマイシン C 以外の物質を用いた検討も今後必要である。

3-4 キチンの NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化

3-4-1 緒言

天然のキチンは繊維状の結晶性マイクロフィブリルから構成されている[38]。マイクロフィブリルの大きさや形態は生物種により様々であると言われている。例えば、エビやカニの甲殻中では、このマイクロフィブリルの周りには酸性タンパク質がペプチド結合しており、キチン原繊維を形成している。この原繊維が集まった平板が、旋回しながら積層し、さらに炭酸カルシウムと複合化することで、甲殻は高い強度としなやかさを発現している。マイクロフィブリルについて詳細な研究を行うことで、キチンの生合成機構など様々な知見を得ることができるが、マイクロフィブリル同士は強い相互作用で高いに凝集しているため、これまで1本を単離することはできなかった。

しかし、Fan らはタンパク質の除去によりキチン表面に生成すると考えられているアミノ基に注目し、キチンを pH3~4 の酸性水溶液中で機械処理をおこない、 α -キチンおよび β -キチンをマイクロフィブリル一本一本に分散させた[39,40]。キチンのマイクロフィブリル化物は、他に多糖に広く適用されている TEMPO 触媒酸化[41,42]からも得られる。類似物質であるセルロースも同様に、酸加水分解[43,44]、TEMPO 酸化[45,46]、機械処理[43,47] を用いてマイクロフィブリル化できる。このようなナノ繊維状材料は、他の材料と複合化して強度を出す FRP のような繊維補強材としての利用が有望視されている[43,44,48,49]。複合材料にナノファイバーやナノウィスカーを用いた場合、その高い表面積から直径が $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上の繊維状材料を用いた複合材料よりも少量で高い機械強度を発現できる。一般にセルロース加水分解ナノウィスカーの場合、ナノ複合材料の強度発現機構はナノウィスカーのネットワークによると考えられており、ナノ複合材料中のナノウィスカーの割合が高くなるほど強度が増す[44]。

キチンナノファイバーおよびナノウィスカーも、同様であると考えられる。したがって、これらキチンナノ繊維材料を複合材料に用いる場合、樹脂や無機物と混和させるため、様々な溶媒中にキチンナノ繊維材料を分散させることが求められるが、酸性水溶液中で機械処理により得られるキチンナノ繊維材料は酸性水溶液でしか分散が確認されていない。

したがって、本実験ではキチンナノ繊維材料の表面化学修飾により、酸性水溶液以外の分散媒でのキチンナノ繊維の分散を目指す。キチンナノ繊維の表面にはアミノ基が分布しているため、*N*-選択的誘導体化により表面化学修飾が可能であると考えた。今回は、前実験で最も高い置換度が得られた NaHCO_3 による *N*-カルボキシメチル化を適応し、中性条件での水分散とキチンナノ繊維の表面化学修飾に関する基礎的知見を得ることを目指した。

3-4-2 実験

試料

結晶型の異なる二種類のキチンを出発物質として用いた。 α -キチンには (Chitin, Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan; エビ由来) を、 β -キチンにはスルメイカ (*Todarodes pacificus*) の軟甲をそれぞれ用いた。 α -キチンは 50 w/v% の NaOH 水溶液中で 1~4 時間部分的に脱アセチル化した試料も用いた (図 3-4-2)。 β -キチンは 1 M の HCl 水溶液で一晩脱灰し、続いて 1 M NaOH 水溶液で一晩脱タンパクして精製した。

ハロゲン化アルキル(モノブromo酢酸)、 NaHCO_3 およびその他の試薬や溶液 (Wako Pure Chemicals, Co., Ltd., Japan) は試薬グレードのものを、特別な前処理なく物質を用いた。

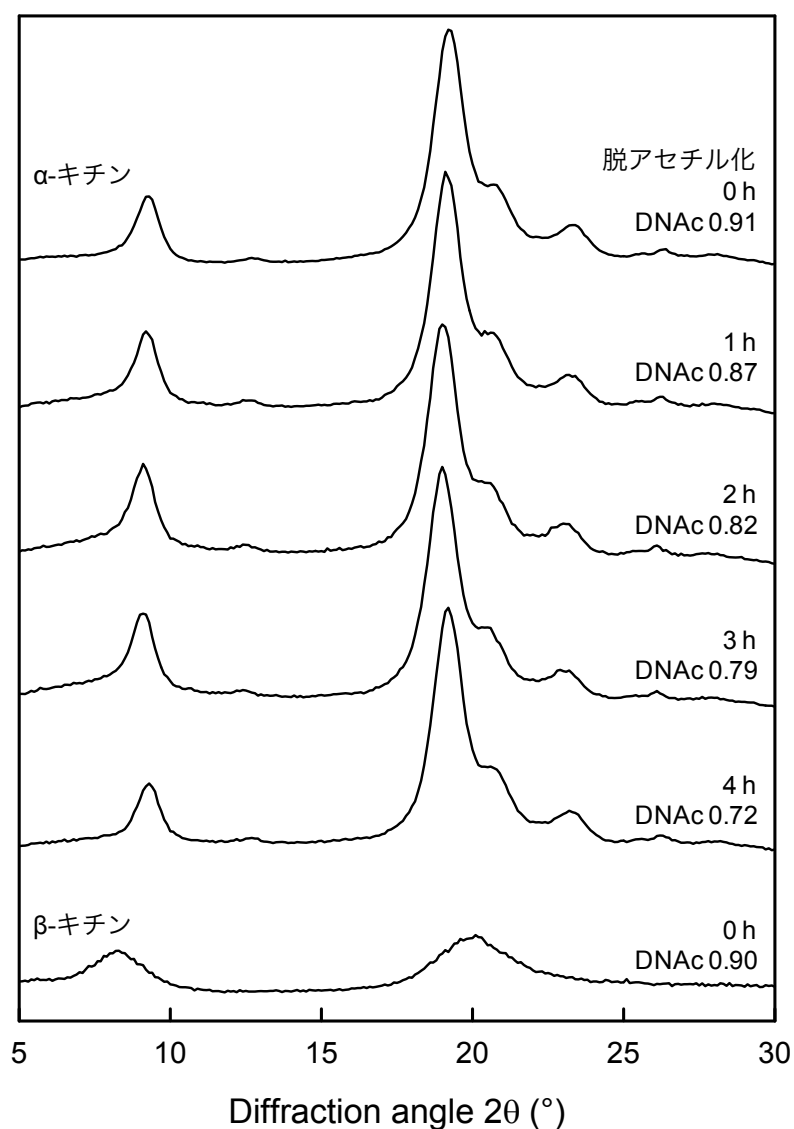


図 3-4-2 出発物質に用いた α -キチンの X 線回折。試料間で結晶性はほぼ変化ない。

キチンの水系 *N*-カルボキシメチル化

キチンを出発物質とし、水系 *N*-アルキル化により *N*-カルボキシメチルキチン (*N*-CM キチン) を調製した。キチン 1.0 g とモノブロモ酢酸 (キチンのアミノ基料に対して 4 モル等量) を脱イオン水 50 mL に加えた。攪拌しながら NaHCO₃ (ハロゲン化酢酸の倍の物質質量) を加え、80°C で 6 時間反応させた。生成物は濾過で十分に洗浄し精製、回収した。

超音波処理

N-カルボキシメチルキチンを中性の水中で分散させるため、超音波処理を行った。蒸留水 20 mL 中に 20 mg の *N*-CM キチンを加え、19.5 kHz の超音波を 300 W の出力で照射した (プローブチップは径 7 mm の US-300T ; Nippon Seiki Co. Ltd., Japan)。超音波処理中の温度上昇は 5°C 以下であった。超音波処理のあと、遠心分離により得られた上澄みをキチンナノ繊維分散液とした。また、遠心分離で得られた沈殿と超音波処理前の試料の重量比から、水中に分散したナノファイバー割合であるナノファイバー化収率を求められる。

化学構造解析

置換度や *N*-アセチル化度などを測定するため、元素分析器 Flash EA1112 (Thermo Fisher Scientific Inc., Germany) の C/N 比を用いた。

X 線回折

キチンおよび *N*-カルボキシメチルキチンの結晶構造を X 線回折装置 Rint 2000 (Rigaku Corporation, Japan) によって反射法で測定した。測定には Ni フィルターを通した CuK α 線 (λ 0.1548 nm) を 40 kV、40 mA で用いた。凍結乾燥した試料 0.1 g を 750 MPa で 1 分間加圧することで直径 1 cm に錠剤整形して用いた。

透過型電子顕微鏡観察

N-CM キチンの観察に、透過型電子顕微鏡 JEM 2000-EXII (JEOL Ltd., Japan) を用いた。加速電圧は 200 kV に設定し、回折コントラスト法の明視野観察を行った。また、画像の撮影には CCD カメラ Keen View (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) と iTEM ソフトウェア (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) を用いた。

3-4-3 結果および考察

N-カルボキシメチル基導入量の変化

表 3-4-3-1 に、キチン試料ごとの *N*-アセチル化度 (DNAc)、カルボキシメチル基の置換

度 (DS) および収率を示す。すべての試料について、カルボキシメチル基の導入が確認され、*N*-カルボキシメチル化キチン (*N*-CM キチン) の生成が確認された。収率はすべての試料において 90%以上と高かった。キトサンの場合ではアミノ基 1 つにつき平均で 2 つのカルボキシメチル基導入できる条件であったが、カルボキシメチル基：アミノ基量が 1：1 までしか導入できなかった。詳しい原因については不明であるが、おそらくカルボキシル基とアミノ基が 1：1 のときに静電的相互作用により凝集の度合いが進み、反応抵抗性のある構造を取るようになったと考えられる。

表 3-4-3-1 *N*-カルボキシメチルキチンの *N*-アセチル化度、置換度、収率

試料	NaOH 処理 (h)	DNAc	DS	カルボキシメチル基/アミノ基 DS/(1-DNAc)	収率 (%)
α -キチン	0	0.91	0.07	0.80	95.2
	1	0.87	0.13	0.97	97.5
	2	0.82	0.20	1.11	96.4
	3	0.79	0.21	0.98	92.9
	4	0.71	0.28	0.96	95.1
β -キチン	0	0.90	0.12	1.10	94.9

N-カルボキシメチルキトサンの構造と性質変化

反応前後の X 線回折による結晶構造の変化を評価した (図 3-4-3-1)。*N*-CM α -キチンと *N*-CM β -キチンの結晶構造は出発物質のキチンから変化なく、反応により結晶内部への影響はないことがわかった。これにより、ミクロフィブリル表面への反応の進行が示された。

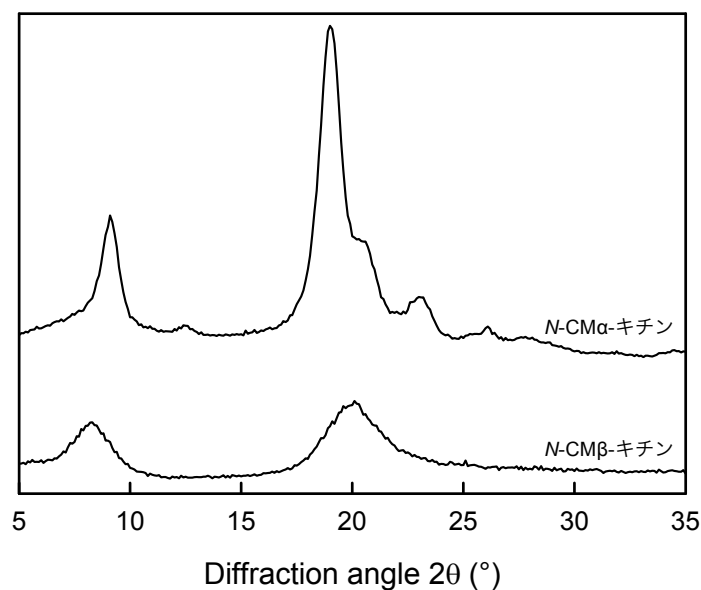


図 3-4-3-1 *N*-CM α -キチンおよび *N*-CM β -キチンの X 線回折。出発物質は図 3-4-2 参照。

各 N -CM α -キチンを水に浸漬すると、その膨潤性に違いがみられた。図 3-4-3-2 において、右のサンプルほど DNAc が低くカルボキシル基導入量が多くなり、それにもなって膨潤していた。

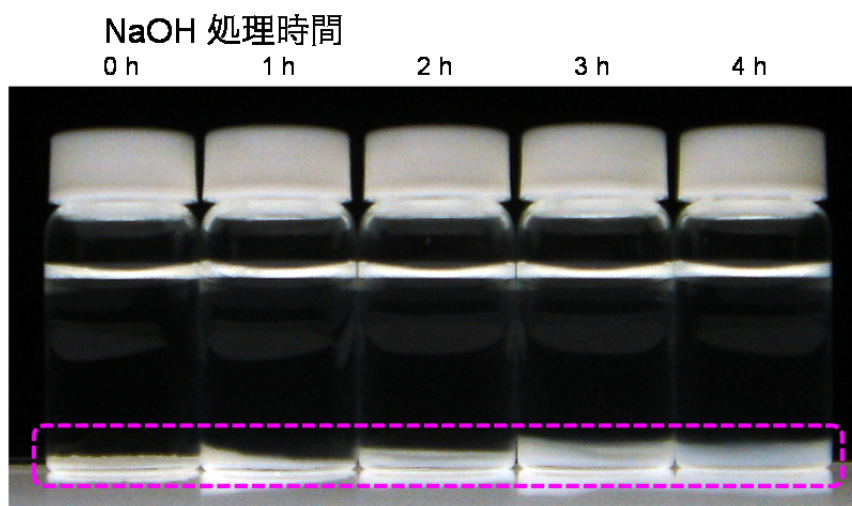


図 3-4-3-2 N -CM α -キチンの水に対する膨潤性

これらのサンプルを超音波処理後に TEM 観察すると、 N -CM α -キチンからはナノウィスカー、 N -CM β -キチンからはナノファイバーが得られていることがわかった（図 3-4-3-3～3-4-3-8）。図 3-4-3-7 に示す N -CM α -キチンは、幅約 7 nm 長さ数百 nm と Fan らの報告にある α -キチンナノウィスカーと同様の形態であった[40]。また、図 3-4-3-3 では幅約 100 nm のナノファイバーが目立ち、幅約 7 nm のナノウィスカーは少量みられるのみであった。図 3-4-3-5、図 3-4-3-6 と DNAc および DS の上昇するにともない、約 100 nm のナノウィスカーが解繊し、約 7 nm のナノウィスカーになっていた。キチンマイクロフィブリルは互いに結合しあって約 100 nm の大きな繊維を構成し、その繊維が配向した層が旋回しながら積層するのがカニやエビの甲殻中のキチンの高次構造である[38]。この TEM 観察は、約 100 nm の繊維とマイクロフィブリルの構造の関係をよく説明しているといえる。しかし、図 3-4-3-7 においても独立した状態で得られるナノウィスカーは少なく、多くが互いに繋がりあった状態であった。これはアミノ基量とカルボキシル基量が 1 : 1 であるため、中性付近の pH では静電相互作用により凝集しやすいと考えられる。図 3-4-3-8 の N -CM β -キチンナノウィスカーも同様に、完全に独立しているものの量は少なかった。

N -CM キチンナノファイバーおよびナノウィスカーの水分散液の複屈折性を確認した。図 3-4-3-9 は、偏光面が互いに垂直な偏光板の間においた水分散液の写真である。Fan らのキチンナノウィスカーおよびナノファイバー[39,40]、さらに TEMPO 酸化セルロースナノファイバー[46]と同様の複屈折性を示した。これは、水に分散したナノファイバーが互いの排除体積効果により、ある程度配向しているために見られる現象だといわれている。写真に用いたのは NaOH 処理を 4 時間行った N -CM α -キチンを用いたが、1～3 時間の試料および

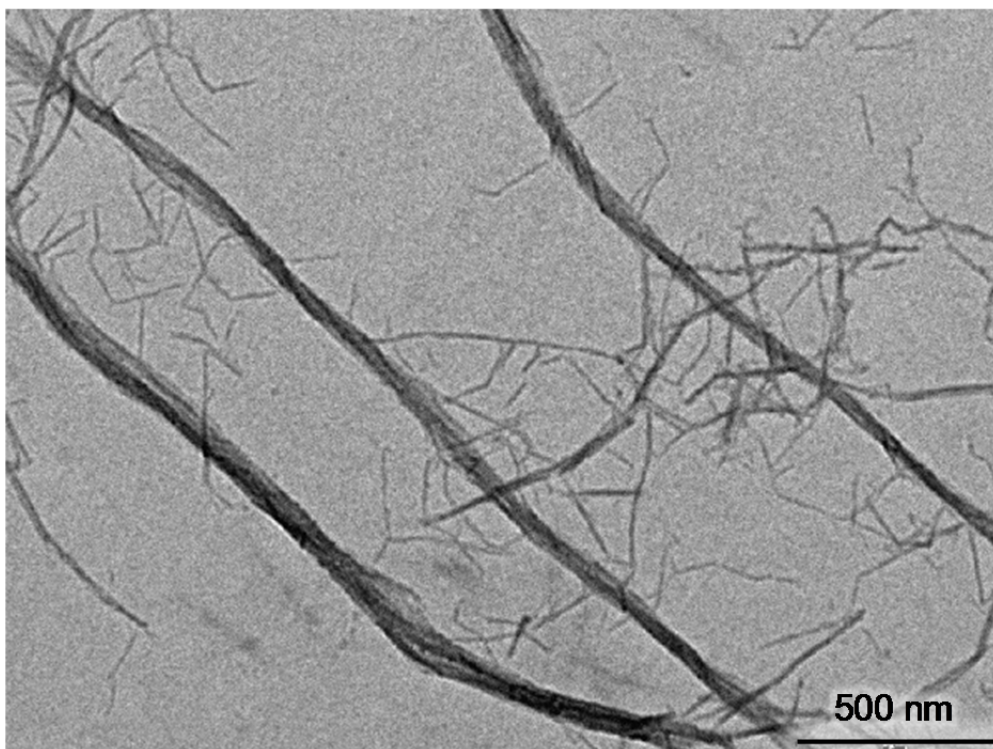


図 3-4-3-3 NaOH 処理 1 時間の *N*-CM α -キチンの TEM 観察像

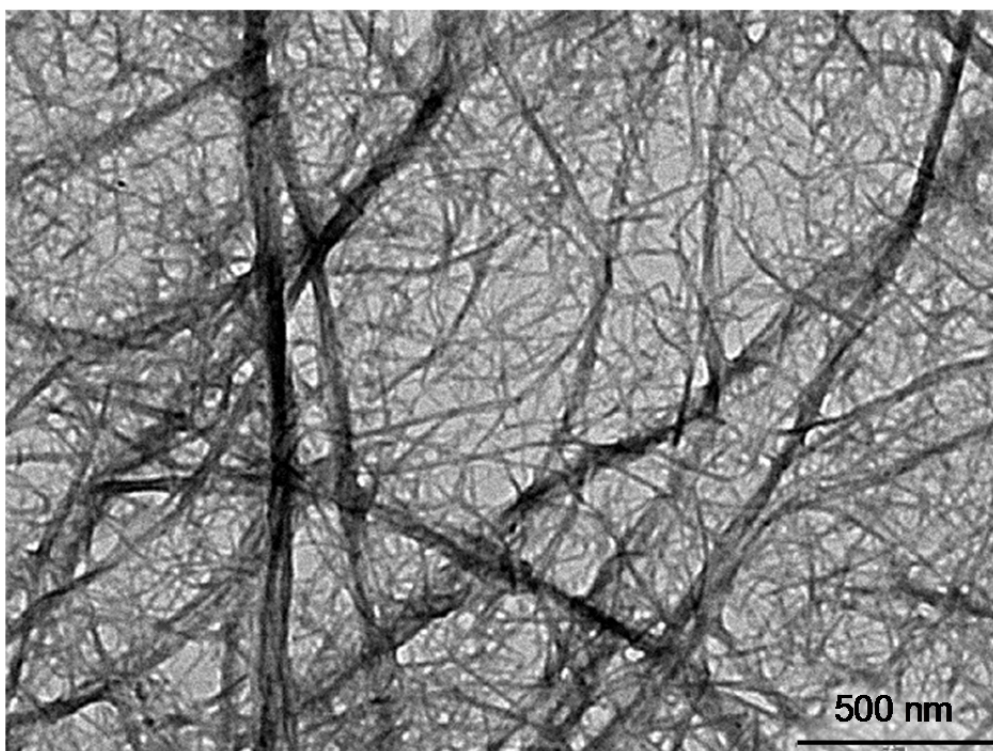


図 3-4-3-4 NaOH 処理 2 時間の *N*-CM α -キチンの TEM 観察像

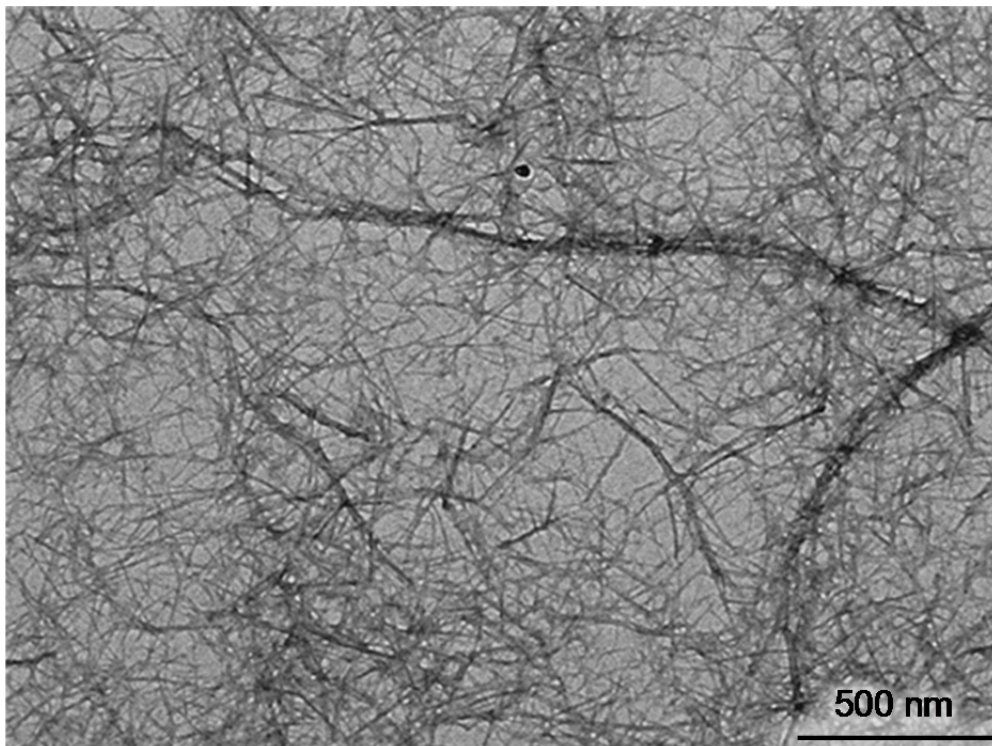


図 3-4-3-5 NaOH 処理 3 時間の *N*-CM α -キチンの TEM 観察像

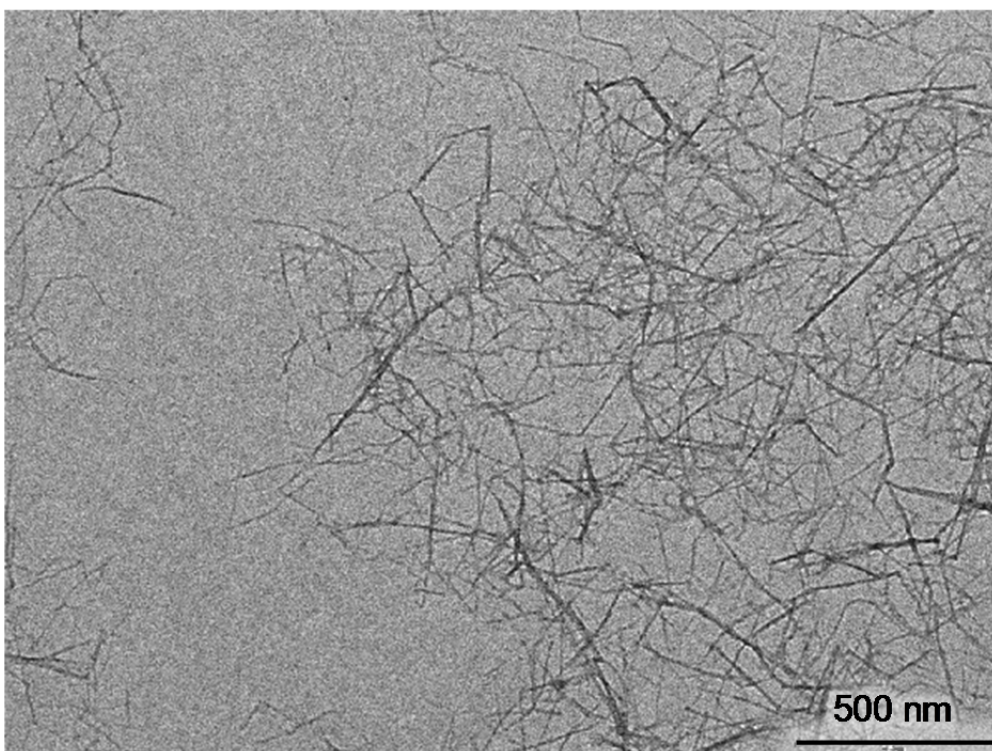


図 3-4-3-7 NaOH 処理 4 時間の *N*-CM α -キチンの TEM 観察像

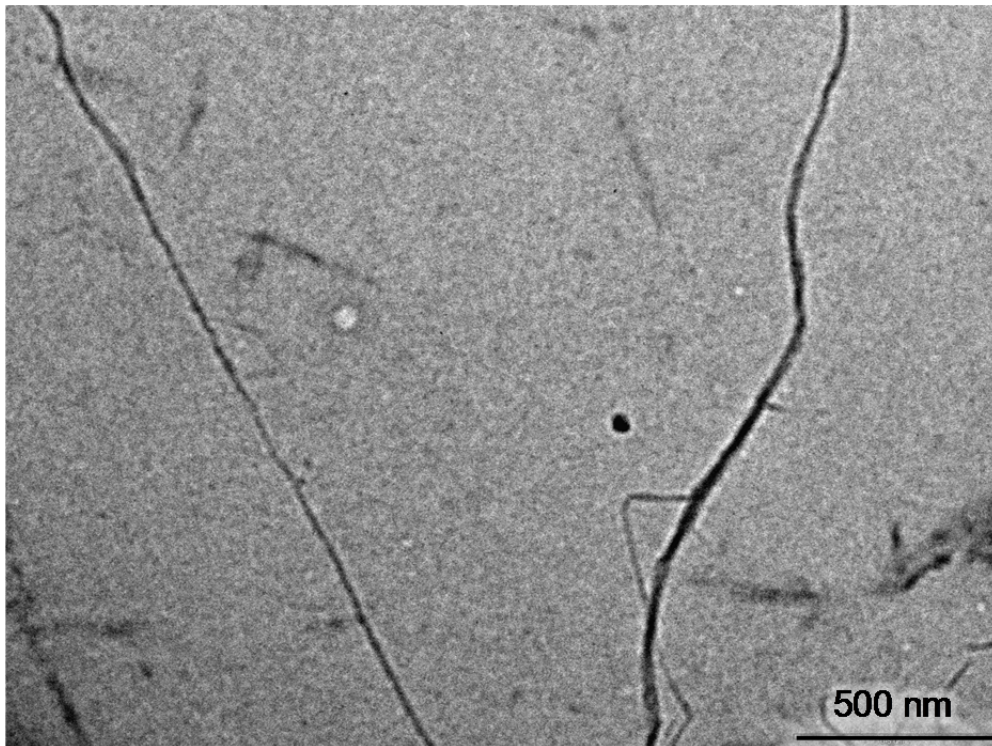


図 3-4-3-8 N -CM β -キチンの TEM 観察像

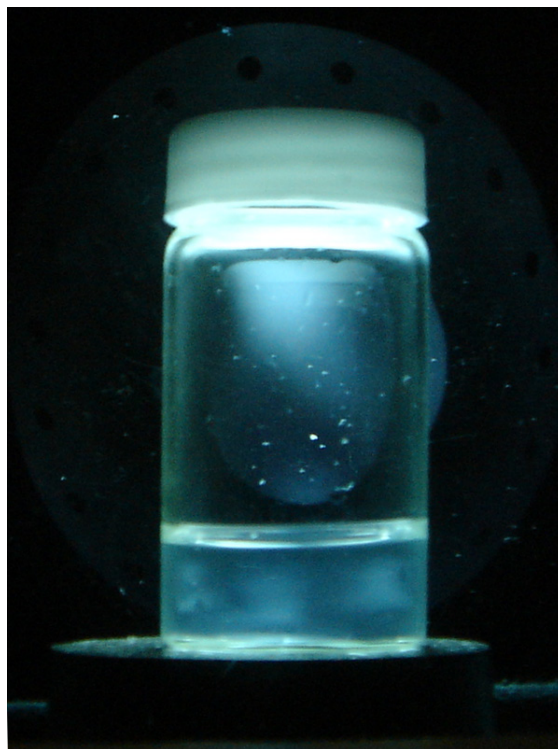


図 3-4-3-9 N -CM α -キチン水分散液の複屈折像

N-CM β -キチンについても同様であった。

表 3-4-3-2 は各 *N*-CM キチンのナノファイバー化収率である。*N*-CM α -キチンは DNAc が低くなるにつれ、ナノファイバー化収率が向上した。しかし、収率は全体的に少なかった。これは導入されたカルボキシメチル基とアミノ基の量比が 1 : 1 であるため、静電相互作用により収率が低いものだと考えられる。

表 3-4-3-2 *N*-CM キチンのナノファイバー化収率

試料	NaOH 処理 (h)	DNAc	DS	ナノファイバー化収率 (%)
α -キチン	0	0.91	0.07	0
	1	0.87	0.13	0.05
	2	0.82	0.20	0.09
	3	0.79	0.21	0.12
	4	0.71	0.28	0.15
β -キチン	0	0.90	0.12	0.08

3-4-4 結論

NaHCO₃ による *N*-アルキル化をキチンに適用したところ、キチンの結晶構造を変化させることなくカルボキシメチル基を導入することができた。*N*-カルボキシメチル β -キチンを超音波処理したところ、幅 4 nm 程度のナノファイバー水分散液を得ることができた。部分的に脱アセチル化した α -キチンからも、同様に幅 7 nm 長さ数百 nm 程度のナノウィスカー水分散液を得ることに成功した。しかし、*N*-カルボキシメチル基をアミノ基量に対して 1 : 1 以上導入量することが難しく、そのためナノファイバー化収率が低いという問題があった。しかしながら、*N*-アルキル化がキチン結晶の表面化学改質として有効であることは示すことができ、キチンフィルムやキチン繊維の表面改質手法により、キチン表面物性の改質には有効である。これについては、*N*-カルボキシル基以外の官能基、例えばベンジル基などについても検討を行い、さらに知見を得る余地がある。

参考文献

- [1] K. Kurita, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1921-1971
- [2] K. Kurita, *Mar. Biotechnol.* 8 (2006) 203-226
- [3] R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanualli, S. Mariotti, *Carbohydr. Res.* 10 (1982) 199-214
- [4] Y. Kurita, A. Isogai, *Int. J. Biol. Macromol.* 47 (2010) 184-189
- [5] S. Hirano, Y. Ohe, H. Ono, *Carbohydr. Res.* 47 (1976) 315-320
- [6] K. Kurita, M. Uno, Y. Saito, Y. Nishiyama, *Chitin Chitosan Res.* 6 (2000) 43-50
- [7] S. Ifuku, T. Miwa, M. Morimoto, H. Saimoto, *Green Chem.* 13 (2011) 1499-1502
- [8] H. Sashiwa, N. Yamamori, Y. Ichinose, J. Sunamoto, S. I. Aiba, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1250-1254
- [9] P. L. Dung, D. T. Thien, N. T. Dong, T. T. Y. Nhi, N. T. An, M. Rinaudo, M. Milas, *AJSTD* 22 (2005) 261-270.
- [10] N. T. An, P. L. Dung, D. T. Thien, N. T. Dong, T. T. Y. Nhi, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 261-264
- [11] T. J. Krause, N. K. Goldsmith, S. Ebner, G. A. Zazanis, R. D. McKinnon, *J. Invest. Surg.* 11 (1998) 105-113
- [12] X. G. Chen, H. J. Park, *Carbohydrate Polymers* 53 (2003) 355-395
- [13] P. L. Dung, M. Milas, M. Rinaudo, J. Desbrières, *Carbohydr. Polym.* 24 (1994) 209-214
- [14] C. B. Singh, V. Kavala, A. K. Samal, B. K. Patel, *Eur. J. Org. Chem.* (2007) 1369-1377
- [15] Y. Yoshida, M. Yanagisawa, A. Isogai, N. Suguri, N. Sumikawa, *Polym.* 46 (2005) 2548-2557
- [16] M. Yanagisawa, Y. Kato, Y. Yoshida, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 192-198
- [17] T. Isogai, M. Yanagisawa, A. Isogai, *Cellul.* 15 (2008) 815-823
- [18] A. Isogai, A. Ishizu, J. Nakano, *J. Appl. Polym. Sci.* 29 (1984) 2097-2109
- [19] M. Rinaudo, J. Desbrieres, P. Le Dung, P. Thuy Binh,
- [20] W. Sajomsang, S. Tantayanon, V. Tangpasuthadol, M. Thatte, W. H. Daly, *Int. J. Biol. Macromol.* 43 (2008) 79-87
- [21] D. E. Discher, A. Eisenberg, *Science* 297 (2002) 967-973
- [22] G. Riess, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 1107-1170
- [23] H. Dong, J. Huang, R. R. Koepsel, P. Ye, A. J. Russell, K. Matyjaszewski, *Biomacromolecules* 12 (2011) 1305-1311
- [24] S. C. Boca, M. Potara, A. M. Gabudean, A. Juhem, P. L. Baldeck, S. Astilean, *Cancer Lett.* 311 (2011) 131-140
- [25] A. S. Lee, A. P. Gast, V. Bütün, S. P. Armes, *Macromolecules* 32 (1999) 4302-4310
- [26] Y. Qiu, K. Park, *Adv. Drug Del. Rev.* 53 (2001) 321-339

- [27] Q. Yan, J. Yuan, F. Zhang, X. Sui, X. Xie, Y. Yin, S. Wang, Y. Wei, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2033-2042
- [28] M. Hamidi, A. Azadi, Pedram Rafiei, *Adv. Drug Del. Rev.* 60 (2008) 1638-1649
- [29] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi, *J. Control. Release* 100 (2004) 5-28
- [30] Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida, *Biomaterials* 25 (2004) 907-915
- [31] Z. Aiping, C. Tian, Y. Lanhua, W. Hao, L. Ping, *Carbohydr. Polym.* 66 (2006) 274-279
- [32] M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3030-3036
- [33] R. Jayakumar, M. Prabakaran, S. V. Nair, S. Tokura, H. Tamura, N. Selvamurugan, *Prog. Mater. Sci.* 55 (2010) 675-709
- [34] B. Sayin, S. Somavarapu, X. W. Li, M. Thanou, D. Sesardic, H. O. Alpar, S. Şenel, *Int. J. Pharm.* 363 (2008) 139-148
- [35] Y. Song, H. Onishi, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 2822-2825
- [36] X. Shi, Y. Du, J. Yang, B. Zhang, L. Sun, *J. Appl. Polym. Sci.* 100 (2006) 4689-4696
- [37] K. Okuyama, K. Noguchi, T. Miyazawa, T. Yui, K. Ogawa, 30 *Macromolecules* (1997) 5849-5855
- [38] D. Raabe, C. Sachs, P. Romano, *Acta Mat.* 53 (2005) 4281-4292
- [39] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules* 9 (2008) 1919-1923
- [40] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 1046-1051
- [41] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Biomacromolecules* 9 (2008) 192-198
- [42] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 832-83
- [43] S. J. Eichhorn, A. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, A. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, A. S. Benight, A. Bismarck, L. A. Berglund, T. Peijs, *J. Mater. Sci.* 45 (2010) 1-33
- [44] M. A. S. A. Samir, F. Alloin, A. Dufresne, *Biomacromolecules* 6 (2005) 612-626
- [45] T. Saito, S. Kimura, Y. Nishiyama, A. Isogai, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2485-2491
- [46] A. Isogai, T. Saito, H. Fukuzumi, *Nanoscale* 3 (2011) 71-85
- [47] S. Iwamoto, A. N. Nakagaito, H. Yano, M. Nogi, *Appl. Phys. A* 81 (2005) 1109-1112
- [48] J. N. Coleman, U. Khan, Y. K. Gun'ko, *Adv. Mater.* 18 (2006) 689-706
- [49] M. T. Byrne, Y. K. Gun'ko, *Adv. Mater.* 21 (2009) 1-17

第四章

総括

総括

本研究では還元的 *N*-アルキル化と NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化という 2 つの方法をキトサンに用い、様々な *N*-アルキルキトサンを調製した。還元的 *N*-アルキル化により、様々なアルキル基を選択的にアミノ基に対して導入することで、キトサンにおける反応の最適条件を見出し、反応中に分子量の変化がないことが明らかになった。また、還元的 *N*-TEMPO 化によりキトサンに分子に安定ラジカル種である TEMPO を導入することに成功し、誘導体が酸化と還元を繰り返し行うことを確認した。一方、 NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化は *N*-カルボキシメチル化や *N*-ベンジル化に対して特に有効な *N*-誘導体化法であり、1 つのアミノ基に対し 2 つの官能基を導入することができた。得られた *N*-カルボキシメチルキトサンは水中で pH 応答性ナノ粒子を形成し、置換度を調節することで pH 応答性を容易に調節できる従来ないタイプのナノ粒子であった。薬剤をナノ粒子に担持させることで経口ドラッグ・デリバリー・システムへの応用が期待される。また、キチンに *N*-カルボキシメチル化を施し、機械処理を加えることで、*N*-カルボキシメチルキチンナノウィスカーおよびナノファイバーを得ることに成功した。これにより、*N*-アルキル化がキチン表面化学修飾に対して有効であることが示され、様々な材料との複合化や機能性ナノ材料の開発が期待される。

キトサンの還元的 *N*-アルキル化の反応条件と生成物の性質に関する検討

キトサンの還元的 *N*-アルキル化の最適化のため、様々な条件において *N*-アルキルキトサンを調製した。反応を pH4.5～5.0 から開始したとき、各種 *N*-アルキルキトサンの置換度が最大のものを得た。*N*-イソプロピルキトサンと *N*-カルボキシブチルキトサンを比較すると、同じ反応条件において *N*-イソプロピルキトサンの置換度が常に高かった。試薬添加量の増加により、高い置換度の *N*-アルキルキトサンが得られ、すべてのアミノ基にイソプロピル基が導入された反応率 100% の均一な *N*-イソプロピルキトサンを得ることに成功した。*N*-イソプロピルキトサンの SEC-MALLS による分子量測定の結果、反応中に低分子化はほぼ起きておらず、反応の前後で重合度はほぼ変化なかった。すなわち、還元的 *N*-アルキル化は幅広い種類の官能基を、水系の温和な条件で導入できる誘導体化であることが示された。

以上により得られた知見をもとに、還元的 *N*-アルキル化によりキトサンに安定ラジカル種である TEMPO を導入した *N*-TEMPO キトサンの調製に成功した。*N*-TEMPO キトサンのサイクリック・ボルタモグラムから、この誘導体が酸化と還元を繰り返すことが明らかになった。これは、導入された TEMPO 構造に由来するものであり、このような特徴を持つポリマーは近年開発された新しい方式の二次電池である有機ラジカル電池への応用が期待されている。しかし、*N*-TEMPO キトサンは酸化中に自己分解しており、何百回と繰り返し充放電される二次電池にこのまま使用することは難しかった。これはアミノ基を持つ、キチ

ン・キトサンを出発物質として用いる限り防ぎ難い問題であったが、持続可能な資源であるバイオマスから有機ラジカル電池への応用の可能性が示された。そのため、セルロースなど他のアミノ基を持たないバイオマスに TEMPO を導入することで、新しい生物由来の持続可能な有機ラジカルポリマーが期待される。

キチン・キトサンの NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化と生成物の性質に関する検討

NaHCO_3 を反応のプロモーターとして用いて、水中でキトサンの C2 位のアミノ基を選択的に *N*-カルボキシメチル化、*N*-ベンジル化、*N*-ヒドロキエチル化、*N*-カルボキシブチル化することに成功し、これまでの研究で行われた *N*-カルボキシメチル化以外にも様々な官能基を水系の比較的温和な条件で導入できる簡便な方法であることが示された。特に *N*-カルボキシメチルキトサンおよび *N*-ベンジルキトサンは、高置換度のものが高い収率で調製できた。これらの誘導体については、1つのアミノ基につき2つのカルボキシメチル基を導入することが可能であり、脱アセチル化したキトサンを適切な反応条件で反応させれば、置換度 2.0 の *N,N*-ジカルボキシメチルキトサンを得ることができた。同様に *N*-ベンジル化によって *N,N*-ジベンジルキトサンが得られたが、ベンジル基の導入量は最大でもアミノ基の約 1.6 倍であった。還元的 *N*-アルキル化では、これほどの高い置換度 *N*-カルボキシメチルキトサンおよび *N*-ベンジルキトサンが得られた例はなく、本誘導体化法によって初めて調製に成功した。また、これまで NaHCO_3 による水系 *N*-アルキル化では、 $\text{S}_{\text{N}}2$ 反応によるカルボキシメチル化しか行われていなかったが、 $\text{S}_{\text{N}}1$ 反応で進行する *N*-ベンジル化についても反応の進行と *N*-選択性が確認できた。

N-カルボキシメチルキトサンの重合度を SEC-MALL を用いて詳細に検討したところ、反応中の分子量低下が確認された。低分子化は反応の初期に起こっており、少なくとも反応開始 3 時間以降は反応時間の変化による重合度の差はなかった。分子量は試薬の添加量の増加に伴いともない小さくなっていたため、低分子化を抑えるにはなるべく少ない試薬量で反応時間をとって充分反応させることが有効であると考えられる。

N-カルボキシメチルキトサンと *N,O*-カルボキシメチルキトサンは、pH に応答し可逆性のナノ粒子を形成した。ナノ粒子の形成する pH 域はカルボキシメチル基の置換度に依存し、高い置換度のカルボキシメチルキトサンほど低い pH でナノ粒子を形成した。ナノ粒子の形成とゼータ電位には相関があり、ゼータ電位が 0 mV になる条件を境にしてナノ粒子が形成した。このことから、ナノ粒子はカルボキシメチルキトサンの等電点付近で形成されていると考えられる。すなわち、カルボキシメチルキトサンナノ粒子は置換度を制御することで、簡単に形成する pH 域を設定できる、両性高分子のみを用いた新しいタイプのナノ粒子であった。*N*-カルボキシメチルキトサンと *N,O*-カルボキシメチルキトサンを比較すると、*N*-カルボキシメチルキトサンは pH に対してより鋭敏に応答し、より小さく均一なナノ粒子を形成することができた。*N,O*-カルボキシメチルキトサンからは小さくても約 150 nm のナノ粒子しか得られないのに対し、置換度 1.62 の *N*-カルボキシメチルキトサンからは pH1.0

において 5.94 nm の均一なナノ粒子を得た。*N,O*-カルボキシメチルキトサンは溶解状態でも常に数分子が凝集した状態であり、立体構造の違いにより *N*-カルボキシメチルキトサンは分子間の静電的反発力が十分に作用するため、このような差が生じると考えられる。

N-カルボキシメチルキトサンナノ粒子は、アクリジンオレンジとマイトマイシン C を内部に担持することができた。マイトマイシン C 担持ナノ粒子は、pH2 では最も放出速度が遅く、pH10 では短時間でほとんど全てのマイトマイシン C が放出された。また pH2 および 7 では、マイトマイシン C の徐放性が確認された。しかし、マイトマイシン C は *N*-CMCh の重量に対し 1.6%の担持量と、直鎖型のポリマーを用いた他の研究報告と比較しても低い値であったため、マイトマイシン C 以外の物質を用いた検討も今後必要である。また、このナノ粒子は応答する pH 帯を置換度により容易に制御することができるため、今回のとはまた異なる薬剤放出挙動のナノ粒子も調製できると考えられる。

キチンの *N*-カルボキシメチル化を行ったところ、キチンの結晶構造を変化させることなくカルボキシメチル基を導入することができた。*N*-カルボキシメチル β -キチンを超音波処理したところ、幅 4 nm 程度のナノファイバー水分散液を得ることができた。部分的に脱アセチル化した α -キチンからも、同様に幅 7 nm 長さ数百 nm 程度のナノウィスカー水分散液を得ることに成功した。しかし、*N*-カルボキシメチル基をアミノ基量に対して 1:1 以上導入することが難しく、そのためナノファイバー化収率は低いという問題があった。これについては、他の *N*-ベンジル化などもキチンに適応し、より詳細に検討する必要がある。

投稿論文

1. Y. Kurita, A. Isogai, Reductive N-alkylation of chitosan with acetone and levulinic acid in aqueous media. International Journal of Biological Macromolecules 42 (2010) 184-189
2. Y. Kurita, A. Isogai, N-alkylations of chitosan promoted with sodium hydrogen carbonate under aqueous conditions. International Journal of Biological Macromolecules (submitted)

研究発表

1. 国際学会での発表（口頭発表）

- ・ Y. Kurita, T. Saito, A. Isogai, Preparation of pH-responsible *N*-carboxymethyl chitosan nanoparticles and their application to drug delivery. 2nd EPNOE Polysaccharide Conference, Wageningen, Netherlands, 2011 Oct.

2. 国際学会での発表（ポスター発表）

- ・ Y. Kurita, T. Yasuda, T. Kato, A. Isogai, Reductive *N*-alkylation of chitosan and its application to organic radical battery. The 237th ACS National Meeting, Salt Lake City, USA, 2009 Mar.

3. 国内学会での発表（口頭発表）

- ・ 栗田侑典、磯貝明、水系での還元的アミノ化によるキトサンの化学修飾、繊維学会平成 19 年度年次大会、東京、2007 年 6 月
- ・ 栗田侑典、磯貝明、炭酸水素ナトリウムを触媒としたキトサンの水系 *N*-アルキル化、繊維学会平成 20 年度年次大会、東京、2008 年 6 月
- ・ 栗田侑典、齋藤継之、磯貝明、*N*-カルボキシメチルキトサンのナノ粒子形成とドラッグデリバリーシステムへの応用、第 24 回キチン・キトサンシンポジウム、東京、2010 年 7 月

4. 国内学会での発表（ポスター発表）

- ・ 栗田侑典、磯貝明、キトサンの還元的アミノ化による誘導体化、第 21 回キチン・キトサンシンポジウム、神戸、2007 年 7 月
- ・ 栗田侑典、磯貝明、水系におけるキトサン由来のラジカルポリマーの調製と物性評価、セルロース学会第 15 回年次大会、京都、2008 年 7 月
- ・ 栗田侑典、齋藤継之、磯貝明、*N*-カルボキシメチルキトサンの調製とドラッグ・デリバリーシステムへの応用、第 40 回繊維学会夏期セミナー、福井、2009 年 8 月
- ・ 栗田侑典、齋藤継之、磯貝明、*N*-カルボキシメチル化キトサンの pH 応答性ナノ粒子形成とその性質、第 59 回高分子討論会、北海道、2010 年 9 月
- ・ 栗田侑典、齋藤継之、磯貝明、*N*-カルボキシメチル化キトサンの pH 応答性ナノ粒子とドラッグ・デリバリーシステムへの応用、平成 23 年度繊維学会年次大会、2011 年 6 月

謝辞

本論文は、私が東京大学農学部製紙科学研究室において学んだ 2006 年から 2012 年までの研究成果をまとめたものです。本研究を進めるにあたり、多くの方々から、ご指導、ご鞭撻、ご協力を賜りました。ここに感謝の意を表し、御礼申し上げます。

研究に関する多くのご指導、ご鞭撻をいただき、本論文の審査では主査を務めていただきました磯貝明教授には心より感謝申し上げます。磯貝先生には研究の内容に関しての的確なご指導だけでなく、研究に対する姿勢、教育に対する姿勢など多くを学ばせていただきました。また、数々の場面において常に前向きなお言葉を賜り、激励いただきましたことを御礼申し上げます。論文の審査をしていただき、多くのご助言、ご意見をいただきました浦上忠教授、岩田忠久教授、和田昌久准教授、江前敏晴准教授に感謝いたしますとともに御礼申し上げます。特に江前先生には、製紙科学研究室で過ごした 6 年間にわたり本研究に対しての助言など、数々のご教授いただきましたこと、心より感謝の意を申し上げます。本研究に対して多くのご指導、ご助言をいただきました木村実特任教授、齋藤継之助教に感謝いたします。

また研究室生活において、研究面だけでなく研究生活を盛り上げていただきました柳澤正弘博士、石井大輔助教、吉田穰博士、金野尚武博士、森陽太博士、古賀大尚博士、磯貝拓也博士、沖田祐介博士をはじめとした諸先輩方、廣田真之氏、藤澤秀次氏、篠田隆史氏、蔵前亮太氏、堂込一智氏、東嶋健太氏など後輩の皆様、そして共に同期として同じ時間を歩んだ植松武彦氏、田村直之氏、福住早花氏には感謝いたしますとともに、今後の皆様のご活躍をお祈り申し上げます。

最後に、研究生活を応援してくれた両親に心より感謝いたします。

栗田侑典

