

# 装着感のない皮膚貼付型ナノ透明薄膜の創製と芳香・消臭能の精密制御

東海大学工学部応用化学科／マイクロ・ナノ研究開発センター

岡村 陽介

Fragrant products have been paid much attention to improvement of quality of life. However, their effect is often insufficient due to flowing by sweats and short-term evaporation of odor molecules. We have proposed polymer ultra-thin films (often called nanosheet) with a film thickness of nanoscale. These nanosheets have shown an excellent adhesiveness on various interfaces via a physical adsorption. In this study, we proposed freestanding polysaccharide nanosheets and nanofibers and evaluate their control of fragrant and deodorant ability. For fragrant materials, free-standing crosslinked chitosan nanosheets carrying cyclodextrin (CD) were successfully fabricated by a spin-coating process. When linalool as a model was dropped on the CD nanosheets, volatilization of linalool was prolonged compared to the control. This prolonged effect of  $\beta$ -CD-nanosheet was higher than that of  $\gamma$ -CD-nanosheet. This result indicates the volatilization of linalool was controlled by  $\beta$ -CD on CS nanosheets. For deodorant materials, free-standing crosslinked nanofiber-sheets composed of chitosan were successfully fabricated by electrospinning, crosslinking, and sacrificial layer process. The obtained nanofiber-sheet were still transparent, and easily adhered onto skin. Based on detection of the amine groups using fluorescamine, *trans*-2-nonenal, which is a causative compound of the aged body odor, could be covalently bound via amino groups of chitosan-nanofiber-sheets.

## 1. 緒 言

「におい」はヒトの生活と密接に関与している。におい分子は揮発性の低分子有機化合物であり、世の中には数十万種存在するといわれている<sup>1)</sup>。嗅覚受容体が発見<sup>2)</sup>されて以来、これまで数多くの受容体が同定されており<sup>3)</sup>、におい分子の濃度がpM-nM レベルであっても嗅覚受容体を介して高感度に検知される<sup>4)</sup>。従って、においがそのヒトの第一印象を決定するといつても過言ではなく、においが注目される要因である。

近年、体臭(加齢臭・汗臭等)等の不快な臭いを消し、好みの香りをつけて個性を演出する等、肌に塗布・噴霧する消臭・芳香剤が市場を賑わしている。消臭剤は、加齢臭(*trans*-2-ノネナール、皮脂酸化物)や汗臭(アンモニア等)を標的とし、物理吸着法、化学吸着法、生物学的手法にて消臭する。芳香剤は香料を配合した香水が代表例であり、不快な臭いを香りでごまかす感覚的消臭法に分類され、しばしば前者と組合せて使用する。しかし、いずれも液状・粉末状であり肌に塗布あるいは噴霧する用法のため、有効成分は汗等で流れてしまうほか、におい分子は揮発性のため芳香・消臭能の持続性が不足しているという課題が残されている。

我々は、厚みをナノ寸法に制御した生体適合性高分子からなる2次元ナノ材料「ナノ薄膜」を提案してきた<sup>5-9)</sup>。興味深いことに、100 nm以下の膜厚にすると、ナノ厚特有の柔軟性と平滑面ゆえに、貼りたい界面の凹凸に追従しながら面接触吸着でき、極めて高い接着性が発現するユニークな現象を見出した。このため、接着剤を使用せず物理吸着のみで肌に貼付できる。また、透明なため貼っても目視できず装着感がないことも特筆すべき点である。さらに、極細径由来の高い比表面積を有するナノファイバーからなる自己支持性薄膜の調製にも成功している。

本研究では、におい分子の吸着・徐放を制御した「皮膚貼付型ナノ薄膜・ナノファイバー薄膜」を創製し、その芳香・消臭能評価を行うことを目的とした。ここでは、芳香あるいは悪臭におい分子モデルとして、それぞれリナロール(ラベンダー由来)、*trans*-2-nonenal(加齢臭の原因成分、不飽和アルデヒド)を選定した。芳香制御として、生体適合性を有するキトサンからなるナノ薄膜に、有効成分となるにおい分子包接体(シクロデキストリン、CD)を搭載し、におい分子の包接・徐放能を持続させる仕組みを提案する。消臭制御として、比表面積の向上を期待したキトサンナノファイバー薄膜を創製し、シップ塩基を形成して*trans*-2-nonenalを捕集、消臭する仕組みを提案する。

## 2. 方 法

### 2. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と芳香制御能評価

#### 2. 1. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製法

$\text{SiO}_2$ 基板( $20 \times 20 \text{ mm}^2$ )上にセルロースアセテートのジオキサン溶液(40 mg/mL)をスピンドルコート(4,000 rpm, 20 s)



Fabrication of Adhesive and Transparent Nanosheets and Their Control of Fragrant and Deodorant Abilities

Yosuke Okamura

Department of Applied Chemistry,  
School of Engineering, Tokai University  
Micro/Nano Technology Center, Tokai University

し犠牲膜とした。続いて、キトサン水溶液(10 mg/mL)をスピンドルコート(6,000 rpm, 60 s)し、キトサンナノ薄膜を調製した。キトサン間の架橋並びにナノ薄膜にCDを担持するためにはジフェニルメタンジイソシアネート(MDI)を用いた。MDI、 $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD、トリメチルアミンを混合したDMF溶液(0.5 mL)にキトサンナノ薄膜を基板ごと浸漬後、加熱(70°C, 1 h)した。DMFで洗浄後、アセトン中で犠牲膜を溶解させ、 $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜を得た。なお、比較対照として、CDを担持させないキトサンナノ薄膜を調製した。ナノ薄膜の表面観察並びに膜厚測定は、走査型電子顕微鏡(FE-SEM S-4800、日立ハイテク社製)、触針式表面形状測定器(DektakXT、ブルカー社製)を用いた。

## 2. 1. 2. におい分子包接能評価

リナロール(0.2 mL)を充満させた密閉瓶(容量 350 mL)中に、 $\text{SiO}_2$ 基板上の $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜( $30 \times 30 \text{ mm}^2$ )を静置した(r. t., 15 h)。その後、ナノ薄膜に包接したリナロールをアセトン(1 mL)で抽出した。抽出液をガスクロマトグラフィー分析(GC-8A、島津製作所製)に供し、ナノ薄膜の単位面積当たりのリナロール包接量を定量した。

## 2. 1. 3. におい分子揮発制御能評価

$\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜をポリエチレン基板( $10 \text{ mm}\phi$ )上に貼付した。その上にリナロール溶液(30% (v/v), 10  $\mu\text{L}$ )を滴下し、恒温恒湿下(25°C, 湿度 40%)、開放系の状態で静置した。所定の時間(10 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h)経過後、ナノ薄膜貼付PE基板をサンプル瓶に入れ、セプタムラバーで密閉した。5分間静置後、NeedlEx(信和化工社製)を取り付けた気体捕集ポンプを用いてサンプル瓶内の気体を採取し、ガスクロマトグラフィー分析に供して気相中のリナロールの揮発量を定量した。

## 2. 1. 4. ジボロン酸誘導体を架橋剤とした $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜の調製

$\text{SiO}_2$ 基板( $20 \times 20 \text{ mm}^2$ )上にセルロースアセテートのジオキサン溶液(40 mg/mL)をスピンドルコート(4000 rpm, 20 s)し、犠牲膜とした。次いで、キトサン(10 mg/mL)／ポリビニルアルコール(1 mg/mL)混合水溶液をスピンドルコート(4000 rpm, 60 s)しキトサンナノ薄膜を調製した。得られた基板を1,4-フェニレンジボロン酸(PBA)のDMF溶液に浸漬した(r. t., 1 h)。DMFで洗浄後、 $\beta$ -CD溶液にナノ薄膜を浸漬し(70°C, 24 h)、DMFで洗浄後に加熱乾燥した(60°C, 1 h)。最後に、アセトン中で犠牲膜を溶解させ、 $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜を得た。ナノ薄膜の膜厚は、触針式表面形状測定器(DektakXT)を用いて測定した。

## 2. 2. キトサンナノファイバー薄膜の調製と消臭制御能評価

### 2. 2. 1. キトサンナノファイバー薄膜の調製法

$\text{SiO}_2$ 基板( $30 \times 30 \text{ mm}^2$ )上にポリスチレンスルホン酸ナトリウム水溶液(PSS: 200 mg/mL)をスピンドルコート(4000 rpm, 60 s)し、犠牲層とした。次いで、電界紡糸法(NANON-03、メック社製)を用いて、キトサン溶液(5.6 wt% in TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ =4/1 (v/v))溶液をシリジンジ(ノズル径 27G)に注入し、PSSを成膜した $\text{SiO}_2$ 基板上をターゲットとして紡糸した(印加電圧: 30 kV, 送り速度: 1.0 mL/h, ノズル-ターゲット距離: 200 mm)。その後、1,4-フェニレンジボロン酸(PBA)溶液(30–250 mM)を用いて架橋を施し(r. t., 2 h)、エタノールにて洗浄した。その後、 $\text{SiO}_2$ 基板ごと蒸留水に浸漬して犠牲層を溶解させ、キトサンナノファイバー薄膜を得た。

### 2. 2. 2. キトサンナノファイバー薄膜のFT-IR分析

キトサンナノファイバー薄膜のPBA架橋濃度を決定するため、アルミホイル上をターゲットとし、2. 2. 1. と同条件で電界紡糸した。ピンセットでファイバー薄膜を回収後、(PBA)溶液(30–250 mM)を用いて架橋を施した(r. t., 2 h)。その後、ホモジナイザー(NS-57、マイクロテック・ニチオン社製)を用いてキトサンナノファイバー薄膜をエタノール中にて裁断し、t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。得られた粉末を臭化カリウムと混合してペレットを作成し、FT-IR分析(FTIR-8400S、島津製作所社製)に供した。この時、吸光度に変換し、キトサンがもつN-アセチル基由来のC=O伸縮振動に対するPBAのベンゼン環由来のC-H伸縮振動の比を算出し、PBA架橋の進行具合を判定した。

### 2. 2. 3. trans-2-nonenalを吸着させた際のキトサンナノファイバー薄膜のアミノ基定量

上述した条件でキトサンナノファイバー薄膜を紡糸した $\text{SiO}_2$ 基板を密閉容器(100 mL)内に置き、trans-2-nonenalのエタノール溶液(0.575 mM–57.5 mM)と接触させないように静置した(r. t., 20 h)。 $\text{SiO}_2$ 基板を回収し、蒸留水(2 mL, 10 min)でキトサンナノファイバー薄膜を溶解させた。得られた溶液にフルオレスカミン(0.075 mg/mL, 670  $\mu\text{L}$ )を加え蛍光発色させた後(r. t., 1 h)、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

## 3. 結果と考察

### 3. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と芳香制御能評価

#### 3. 1. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と物性

キトサン及びCDの水酸基、キトサンのアミノ基を標的とし、架橋剤(MDI)のイソシアネート基を介した共有結合(ウレタン結合・ウレア結合)にて、 $\beta$ -CDあるいは

$\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜を調製した。 $\text{SiO}_2$ 基板ごとアセトン中に浸漬させたところ、犠牲膜であるセルロースアセテートが溶解し、基板の形状を維持した状態で透明性の高い自己支持性ナノ薄膜が得られた(Fig. 1a)。ナノ薄膜を水中に展開しても不溶であったことから、MDIによってナノ薄膜を構成するキトサンの架橋も進行したと考えられる。得られたナノ薄膜を走査電顕観察したところ、ナノ薄膜表面は破断なく平滑であった(Fig. 1b)。また、得られたナノ薄膜は肌に貼付することも可能であり、目立たず装着感がないことも特筆すべき点であった。今回調製した $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜の膜厚は、それぞれ  $106 \pm 9$  nm、 $110 \pm 9$  nm と算出された。この時、キトサン水溶液をスピンドル界面の回転数によって膜厚を制御可能であることも確認した。

### 3. 1. 2. $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜において分子包接能

2. 1. 2. に記載の方法に従い、リナロールを充満させた密閉瓶中に各種ナノ薄膜を静置した際の包接されたリナロールを測定した。その結果、CD未担持キトサンナノ薄膜でも非特異的にリナロールが包接され、単位面積当たりのリナロール包接量は  $0.30 \pm 0.27$  nmol/cm<sup>2</sup> であった(Fig. 2)。そこで、CD担持キトサンナノ薄膜で同様の試験を行ったところ、CD未担持体と比較してリナロール包接量

は4倍以上となった( $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜:  $1.30 \pm 0.52$  nmol/cm<sup>2</sup>、 $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜:  $1.41 \pm 0.65$  nmol/cm<sup>2</sup>)。以上より、キトサンナノ薄膜に表面修飾されたCDによってリナロールが有意に包接されたことを支持しており、密閉系では $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CDのリナロール包接能は同等であると判断した。

### 3. 1. 3. $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜における分子揮発制御能

2.1.3. に記載の方法に従い、ポリエチレン基板に貼付した各種ナノ薄膜上にリナロール溶液を滴下し、開放系の状態で静置した。経時に密閉したサンプル瓶内に基板を5分間静置し、気相中のリナロールの揮発量を定量した。まず、比較対照としてナノ薄膜を貼付しない基板に直接リナロールを滴下した場合、気相中のリナロール濃度は時間経過とともに顕著に減少した(Fig. 3、黒カラム)。これと比較して、CDを担持していないナノ薄膜を貼付した場合、静置4時間以降、気相中のリナロール濃度が増大していた。これは、リナロールがナノ薄膜に非特異的に吸着して揮発が抑制され、緩やかに徐放されたためと考えられる(Fig. 3、白カラム)。そこで、 $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜を貼付した場合、他群と比較して静置1時間以降から気相中のリナロール濃度が有意に増大した(Fig. 3、赤カラム)。これは、リナロールがナノ薄膜表面の $\beta$ -CDに一旦包接されて揮発が抑制され、時間経過とともに徐放する効果が発現したためと考えられる。しかし、 $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜を貼付した場合、その効果は見られず、CDを担持していないナノ薄膜と同程度であった(Fig. 3、灰色カラム)。これは $\gamma$ -CDの内径がリナロールに対して大きく、包接はするものの徐放効果が見られなかったためと考えられる。以上より、 $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜はリナロールの揮発を制御し、長時間徐放できることを明らかにした。

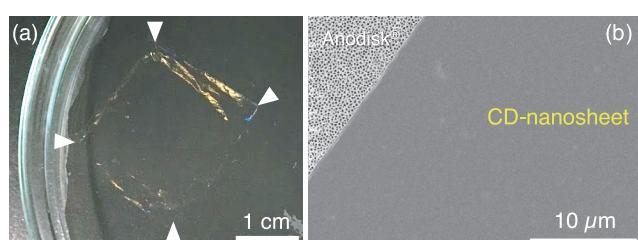


Fig. 1 (a) Macroscopic image of  $\beta$ CD-nanosheet composed of chitosan suspended in acetone. (b) SEM image of  $\beta$ CD-nanosheet attached on alumina porous filter (Anodisc<sup>®</sup>).

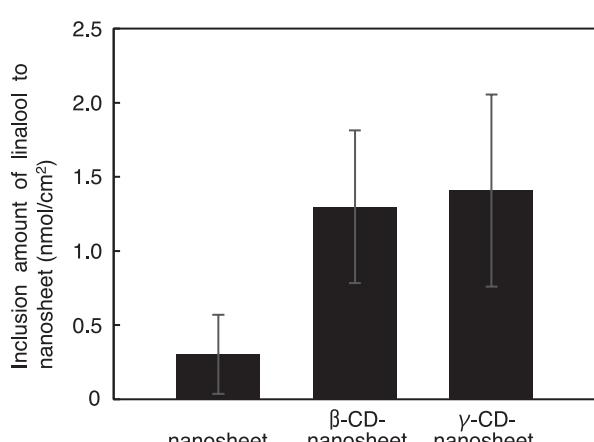


Fig. 2 Inclusion amount of linalool on  $\beta$ CD- or  $\gamma$ CD nanosheet under a closed condition (N=3, Mean  $\pm$  S.D.).

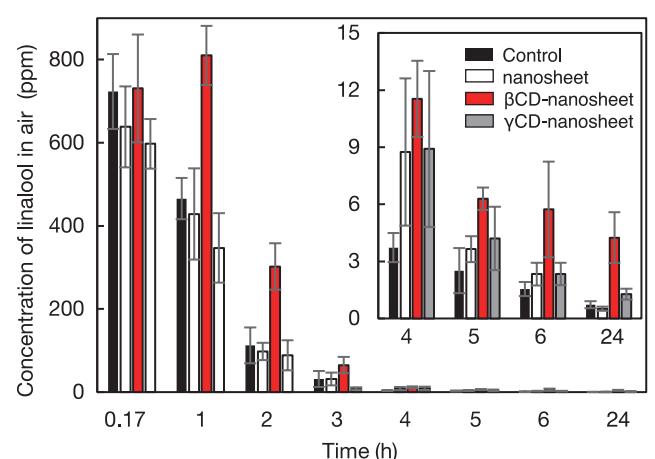


Fig. 3 Concentration of linalool released in air using  $\beta$ CD- or  $\gamma$ CD nanosheet (N=7, Mean  $\pm$  S.E.).

### 3. 1. 4. ジボロン酸誘導体を架橋剤とした $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜の調製

上述までは、架橋剤(MDI)のイソシアネート基を介した共有結合にてCD担持キトサンナノ薄膜を調製してきた。しかし、イソシアネート基は水で失活しやすい他、共有結合でCDと結合するため、ナノ薄膜表面のCD担持量を直接定量するのは難しい。そこで、ジオール骨格と反応し、弱酸性条件下ではその結合が解離することが知られているジボロン酸誘導体を架橋剤として着目した。表面に結合したCD担持量を定量化することを期待している。2. 1. 4. に記載の方法に従い、PBAを架橋剤とした $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜の調製法を新たに検討した。 $\text{SiO}_2$ 基板ごとアセトン中に浸漬させたところ、犠牲層であるセルロースアセテートが溶解し、基板の形状を維持した状態で透明性の高いナノ薄膜が得られた。得られたナノ薄膜を水中に展開しても不溶であったことから、PBAによってナノ薄膜を構成するキトサン・ポリビニルアルコールの水酸基を介して架橋されたことを支持した(Fig. 4)。今回調製した $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜の膜厚は  $161 \pm 11 \text{ nm}$  であり、未架橋体 ( $148 \pm 9 \text{ nm}$ ) と比較して約 10 nm 程度上昇した。今後は、酸性条件下で $\beta$ -CDを脱離させ、表面結合量を定量する計画である。

## 3. 2. キトサンナノファイバー薄膜の調製と消臭制御能評価

### 3. 2. 1. キトサンナノファイバー薄膜の調製と物性

キトサンナノファイバーの不溶化に向け、キトサンの水酸基に反応するジボロン酸誘導体(PBA)を架橋剤に選定し、キトサンのアミノ基を潰さない戦略とした。実際、125 mM の PBA にて架橋後、キトサンナノファイバーを  $\text{SiO}_2$  基板ごと蒸留水に浸漬させたところ、犠牲層である PSS が溶解し、基板の形状を維持した状態で透明なキトサンナノファイバー薄膜が得られ、架橋が十分進行して水に不溶化したと判断した(Fig. 5a)。実際、キトサンナノファイバー薄膜の表面を電顕観察したところ、繊維構造を維持していた(Fig. 5b)。この時、未架橋体の繊維径 ( $221 \pm 51 \text{ nm}$ ) と比較して、架橋体 ( $350 \pm 95 \text{ nm}$ ) では 1.6 倍増

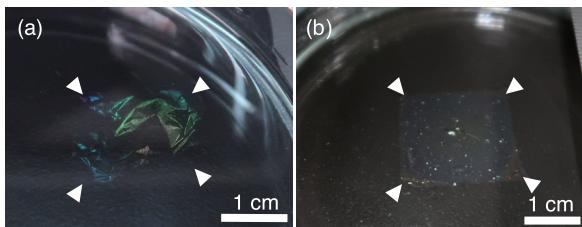


Fig. 4 Macroscopic image of (a)  $\beta$ CD-nanosheet without crosslinking with PBA suspended in acetone, and (b)  $\beta$ CD-nanosheet crosslinked with PBA suspended in water.

大したことからも架橋は十分進行したと考えられる。そこで、FT-IR分析から、最適なPBA架橋濃度を判定した。具体的には、得られたスペクトルを吸光度に変換し、キトサンがもつN-アセチル基由來のC=O伸縮振動に対するPBAのベンゼン環由來のC-H伸縮振動の吸光度比を算出した。その結果、少なくともPBAを125 mM以上仕込めば、吸光度比が増大しそれ以上は変化しなかったことから、PBAの架橋濃度を125 mMと決定した。

### 3. 2. 2. *trans*-2-nonenalを吸着させた際のキトサンナノファイバー薄膜のアミノ基定量

キトサンナノファイバー薄膜(未架橋)を蒸留水に溶解し、アミノ基定量試薬であるフルオレスカミンと反応させたところ蛍光発色したことから、アミノ基が確実に残存していることを確認した(Fig. 6)。そこで、濃度の異なる*trans*-2-nonenalで充満させた密閉容器内にキトサンナノファイバー薄膜を静置して蒸留水で溶解させた後、同測定をしたところ、*trans*-2-nonenalの濃度の増大と共に蛍光強度は減少していた(Fig. 6)。これは、キトサンナノファイバー薄膜のアミノ基を介して、*trans*-2-nonenal(不飽和アルデヒド)とシップ塩基を形成し、アミノ基が減少したためと考えられる。以上より、キトサンナノファイバー薄膜は

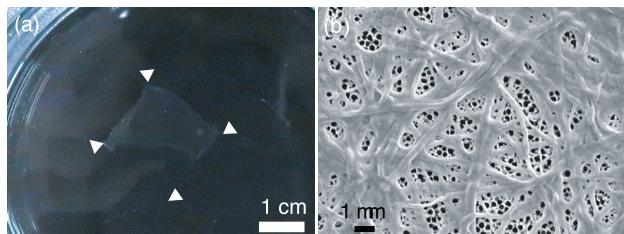


Fig. 5 (a) Macroscopic image of chitosan nanofiber-sheet crosslinked with PBA suspended in water. (b) SEM image of chitosan nanofiber-sheet attached on alumina porous filter (Anodisc<sup>®</sup>).

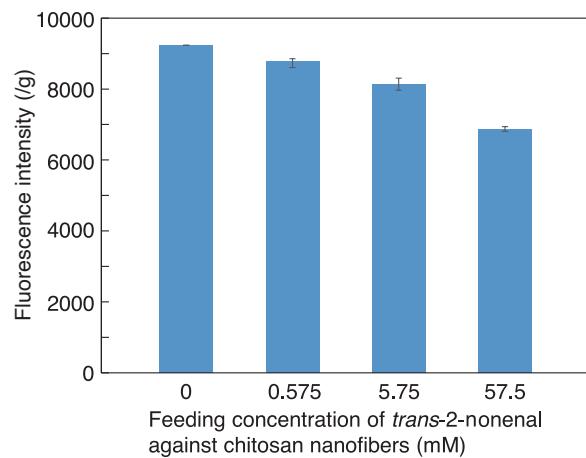


Fig. 6 Fluorescence intensities of chitosan nanofiber-sheet before after reaction with *trans*-2-nonenal by a fluorescamine assay.

*trans*-2-nonenalを化学吸着可能であることを間接的に実証した。

#### 4. 総 括

本研究では、におい分子の吸着・徐放を制御した「皮膚貼付型ナノ薄膜・ナノファイバー薄膜」を創製した。芳香制御として、 $\beta$ -CDあるいは $\gamma$ -CD担持キトサンナノ薄膜の調製法を確立した。得られたナノ薄膜は肌に貼付することも可能であり、目立たず装着感すらないことも特筆すべき点であった。この時、 $\beta$ -CD担持キトサンナノ薄膜はリナロールの揮発を制御し、長時間徐放できることを明らかにした。消臭制御として、比表面積の向上を狙いキトサンナノファイバー薄膜の創製法を確立した。得られたキトサンナノファイバー薄膜は*trans*-2-nonenalを化学吸着可能であることを実証した。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂きました公益財団法人コーワセコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻 土屋笙子氏、岩松宏徳氏、藤田峻平氏に記して謝意を表する。

#### (引用文献)

- 1) 東原和成. 進展する化学感覚の科学. 現代化学 **9**, 23-25 (2014).
- 2) L. Buck, R. Axel. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition *Cell* **65**, 175-187 (1991).

- 3) S. Ihara, K. Yoshikawa, K. Touhara. Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. *Neuroscience* **254**, 45-60 (2013).
- 4) U.B. Kaupp. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188-200 (2010).
- 5) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, D. Saitoh, S. Takeoka. Free-standing biodegradable poly (lactic acid) nanosheet for sealing operations in surgery. *Adv. Mater.* **21**, 4388-4392 (2009).
- 6) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, H. Miyazaki, A. Saito, T. Fujie, T. Ohtsubo, D. Saitoh, S. Takeoka. Fragmentation of poly (lactic acid) nanosheets and patchwork treatment for burn wounds. *Adv. Mater.* **25**, 545-551 (2013).
- 7) T. Komachi, H. Sumiyoshi, Y. Inagaki, S. Takeoka, Y. Nagase, Y. Okamura. Adhesive and robust multi-layered poly (lactic acid) nanosheets for hemostatic dressing in liver injury model. *J. Biomed. Mater. Res. B* **105**, 1747-1757 (2017).
- 8) H. Zhang, A. Masuda, R. Kawakami, K. Yarinome, R. Saito, Y. Nagase, T. Nemoto, Y. Okamura. Fluoropolymer nanosheet as a wrapping mount for high quality tissue imaging. *Adv. Mater.* **29**, 1703139 (2017).
- 9) H. Zhang, T. Aoki, K. Hatano, K. Kabayama, M. Nakagawa, K. Fukase, Y. Okamura. Porous nanosheet wrapping for live imaging of suspension cells. *J. Mater. Chem. B* **6**, 6622-6628 (2018).