

セリシンフィルムに関する研究

—セリシンの分子量・添加物による性質の変化—

田 中 裕 美*
浜 岡 容 子**
片 山 哲 郎***
山 崎 正 夫***

セリシンフィルムの物性(脆さ)を改良するため、尿素又はグリセリンを添加してその効果を検討したところ、セリシンのみで作製したフィルムより、柔軟で扱いやすいフィルムを作製することができた。また、セリシンの分子量の違いによりフィルムの酵素分解性が異なることが分かった。

1 はじめに

最近、絹精練の際に廃棄されているセリシンが非常に有効なタンパク質として注目され、その優れた生体適合性や保湿性⁽¹⁾から、化粧品をはじめ繊維加工など各方面への利用が進められている。

絹本体のフィブロインは、医療用素材への応用例が多数報告され、⁽²⁾。フィルム状にしたものには皮膚再生機能を促進する作用が見出され、創傷薬(貼り薬)として用いられている⁽³⁾。一方セリシンについても同様に、様々な効能が期待されている。特に、フィブロインもセリシンも昆虫由来のタンパク質であり、人間がこれらに対してアレルギー反応を起こす可能性は哺乳類由来のタンパク質のコラーゲンなどと比較して低いと思われ、今後ますます生体材料としての開発が盛んになると思われる。

セリシンフィルムの溶解性・酵素分解性については前報⁽⁴⁾で報告した。しかし、セリシンのみで作製したフィルムは脆くて壊れやすいため、架橋剤としてエチレングリコールジグリシジルエーテル(EDGE)を用いて強化しているが、生体材料としては安全性に問題が残る。そこで、安全かつ扱いやすいフィルムの作製を目指し、プラスチックの可塑剤としてよく使用される尿素、グリセリンをセリシン水溶液に添加してフィルムを作製し、強度の測定をするとともに、ドラッグ・デリバリー・システム⁽⁵⁾用の素材や生体吸収性医療用材料に応用する際に問題となる酵素分解性を調べた。

また、それ自身強靱なフィルムを形成するポリビニルアルコール(PVA)をセリシンに添加したフィルムについても、同様の試験を行った。

注)ドラッグ・デリバリー・システム

ドラッグ・デリバリー・システムとは生体に対する薬物投与の最適化、すなわち投与形態を工夫することにより標的部位に必要時間にわたって必要量の主薬を送り届けることを究極の目的とする剤形の総称である。

2 材料

2.1 試薬

グリセリン、尿素、リン酸三ナトリウム、ホウ酸、クエン酸(和光純薬特級)、ポリビニルアルコール(PVA)(和光純薬試薬)、ポリエチレングリコール 400(PEG-400)(日本油脂)、トリプシン(和光純薬一級)

2.2 機器

高压蒸気処理装置(RCS-60/10R、日阪製作所)、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(島津製作所、LC-10A)、恒温恒湿器(IG-46M、ヤマト科学)、圧縮試験機(KES-FB3、カトーテック)、紫外線分光光度計(UV-2200、島津製作所)、オートグラフ(AG-500B、島津製作所)、振とう式恒温槽(BT-25、ヤマト科学)

*織物課 技師 **織物課 主査 ***織物課 主任研究員

3 方法

3.1 セリシン粉末の作製

生糸を 120℃で高温高圧精練してセリシンを抽出した。得られたセリシン水溶液を凍結させた後に解凍し、濾過・乾燥してセリシン粉末とした。このとき、精練時間を変化させることによって分子量の異なるセリシン粉末を得ることができた。しかし、重量平均分子量 10 万以下のものは、凍結解凍法では効率よく回収することが困難である⁽⁵⁾ので、凍結乾燥法により回収した。また、分子量の測定は得られた粉末を水に煮沸溶解させ、HPLC で GPC カラム (Asahipak・GS-520HG) を使い、カラム温度 40℃、流速 0.6 ml/min、移動相は 50mM リン酸緩衝液 + 0.3M NaCl (pH 7.0)、検出器; 紫外分光光度計 SPD-10Ai (測定波長 210nm) の条件で行った。分子量計算は、CLASS-LC10A 用 GPC オプションソフトウェアにより行った⁽⁶⁾。

3.2 セリシンフィルムの作製

セリシン粉末を煮沸溶解し、2%のセリシン水溶液を作製した。この溶液 70ml を直径 100mm のテフロンシャーレに流し込み、20℃、50% R.H. の恒温恒湿器中で水平に静置し乾燥させた⁽⁴⁾。

また、グリセリン、尿素、PVA 含有フィルムは、上記のセリシン水溶液にこれらを所定量添加して攪拌した後、同様に乾燥させて作製した。なお、添加物を加えたフィルムの作製には、重量平均分子量が 150 kDa のセリシン粉末を用いた。

3.3 フィルムの厚さ測定

JIS K 7130 に基づき、KES-FB3 圧縮試験機を用いて測定した。測定面は 2 cm² の円形で、測定時の力は 50gf/cm²。1 つの測定片につき 10 点を測定し、平均値及び標準偏差を求めた。

3.4 酵素分解性の測定

タンパク質分解酵素のトリプシンを緩衝液 [0.2M ホウ酸-0.05M クエン酸-0.1M リン酸三ナトリウム、pH 7.0 (20℃)] に溶解し濃度を 1.0% とした。セリシンフィルムと酵素溶液 50ml を三角フラスコに入れ、37℃に調節した振とう恒温槽にて反応させた。水溶液中のセリシン濃度は 275nm における吸光度と比例することが分かっているため、275nm の吸光度を測定して溶解したセリシン量の指標とした。

3.5 引張り試験

JIS K 7127 に基づきオートグラフを用いて行った。条件は以下のとおりである。

- ・試験片の形: 特殊短冊形 (幅 2cm × 長さ 7cm、
標線間距離 3cm)
- ・試験片の数: 5 個
- ・測定環境: 20℃、65% R.H. (測定前、同条件下に 1 晩以上放置)
- ・試験機の精度: 引張荷重精度 ±1.0% 以内。
速度精度 ±0.1% 以内。
- ・試験速度: 500mm/min。

4 結果

4.1 セリシンの分子量の影響

4.1.1 酵素分解性

分子量の異なるセリシンフィルムについてトリプシン分解性を調べた結果は図 1 で、分子量が小さくなると分解しやすくなることが分かる。したがって、分子量を変化させることにより分解性を調節できるといえる。

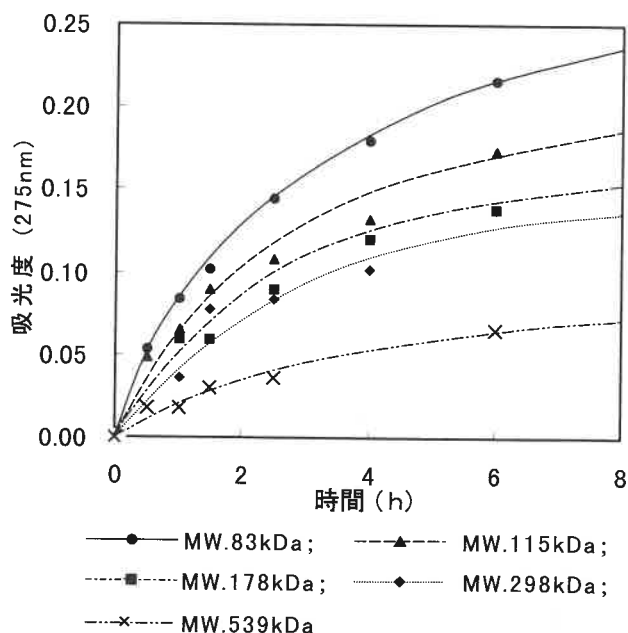


図 1 分子量の違いによるセリシンフィルムの酵素分解性の変化

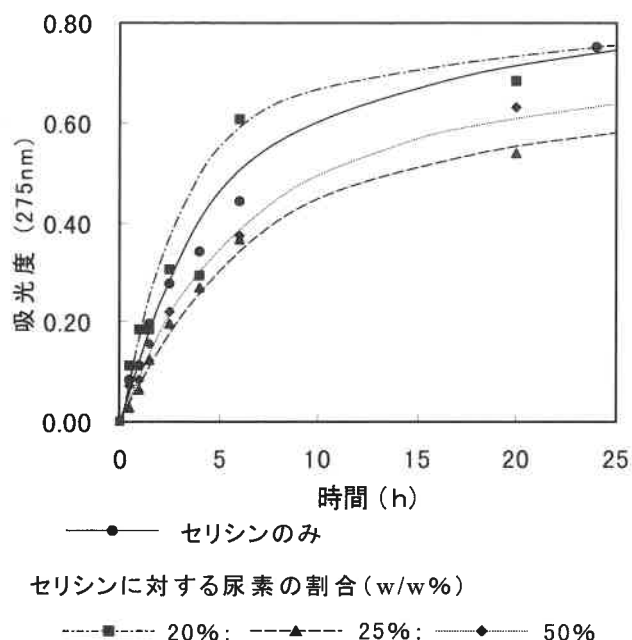


図 2-A セリシン・尿素フィルムの酵素分解性

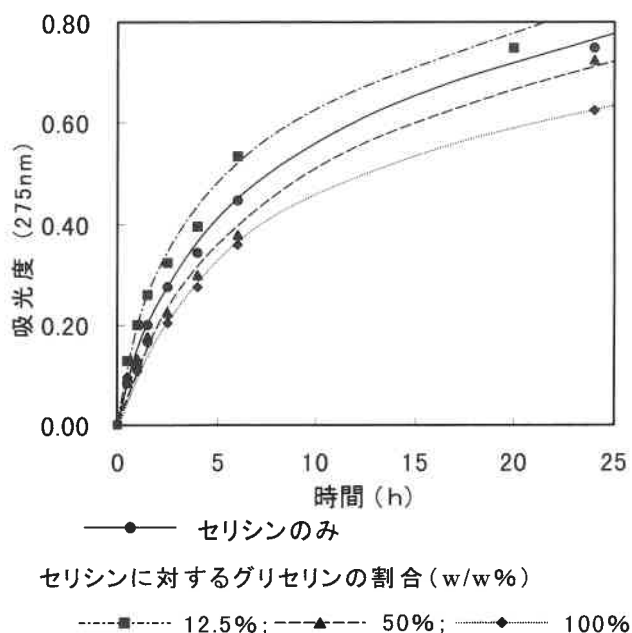


図 2-B セリシン・グリセリンフィルムの酵素分解性

表 1 セリシンフィルムの厚さ

添加物の種類	セリシンに対する添加物の割合 (w/w%)	厚さ (mm)
グリセリン	12.5	0.207±0.0236
	25	0.210±0.0150
	50	0.220±0.0137
	100	0.310±0.0134
	150	0.431±0.0123
尿素	20	0.169±0.0099
	25	0.185±0.0187
	35	0.215±0.0298
	50	0.244±0.0290
PVA	5	0.161±0.0061
	25	0.215±0.0111
	50	0.266±0.0406
	100	0.291±0.0075

4. 2 添加物の効果

4. 2. 1 フィルムの厚さ

添加物を加えて作製したセリシンフィルムの厚さは表 1 のとおりである。添加物を加えると、フィルムの厚さは増加した。また、グリセリンを加えたときは、弾力のあるフィルムができた。

尿素含量が 20%未満では、脆すぎてシャーレからはがすときに破損してしまい、物性の測定ができなかった。また、PVA 含有フィルムは硬く、ハサミでの切断時にヒビが入った。尿素、グリセリン含有フィルムは、柔軟性があり、ハサミでも容易に切断できた。

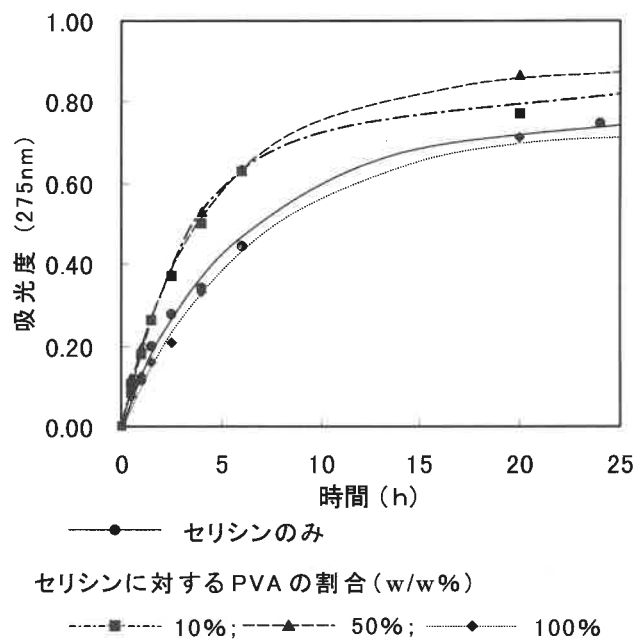


図 2-C セリシン・PVA フィルムの酵素分解性

4. 2. 2 酵素分解性

各添加物を加えたフィルムの酵素分解性を図 2-A～C に示す。

尿素を用いた場合、酵素分解性は尿素的セリシンに対する割合が 20w/w%で最大で、それより尿素量が多くなると逆に分解性が低下した。尿素的割合が、

50%を超えると、フィルム上に尿素の結晶が析出するため、これ以上濃度を上げることは困難であった。また、この時フィルムは白濁し、透明度が下がった。グリセリンを用いた場合、最も柔軟なフィルムができた。セリシンに対するグリセリンの割合が 12.5 w/w%のものは、セリシンのみのフィルムに比べて、酵素分解性は高くなったが、50%、100%になると、逆に分解性が低下した。これは、尿素の場合と同じ傾向である。

PVA を用いた場合は、比較的弾力のない、硬質プラスチックの板に近い、硬いフィルムができた。またこの場合は、セリシンに対する PVA の割合が大きくなると酵素分解性は上がった。

4. 2. 3 引張試験

引張試験は、試験片の形状に成形できるもののみ行った。セリシンのみで作ったフィルムは、脆くて成形できなかった。グリセリン及び尿素を添加したフィルムの引張強度と伸び率を図 3-A、B に示す。尿素、グリセリンともセリシンに対する割合が約 20%のときに、最も強度が高いフィルムができた。同様な方法で作製した PVA のみのフィルムは、厚さ 0.16mm のもので、引張強度 2.15kgf/mm²、伸び率 189%であった。セリシンで作ったフィルムは、これよりは小さいが、取り扱い上十分な強度であると考えられる。

セリシンに PVA を加えて作製したフィルムは、表 2 のような結果になった。PVA の割合が変わってもほとんど変わらず、脆いフィルムであることが分かった。

5 考察

セリシンの分子量及び加える添加物がフィルムの物性に大きく影響を与えることが明らかになった。したがって、目的に応じて分子量・添加物を選択し、フィルムを作製する必要がある。

この試験は、セリシンに添加物を加えることによりフィルムの強化を図る方法の検討であるが、セリシンに対して約 20%のグリセリン、又は尿素を加えるだけで、かなりの強度で柔軟性もあるフィルムができた。特に、グリセリンを 25%加えたものは、透明度もよく、強度も最も高くなった。グリセリンは医薬品にも使用されており、生体材料とする場合の安全性にも問題ないと考えられる。

PVA は、生分解性樹脂の原料として使われ、キトサンとのブレンドによっても強度の高いフィルムが作製できるという報告があるが⁽⁷⁾、この場合は、架橋剤にメ

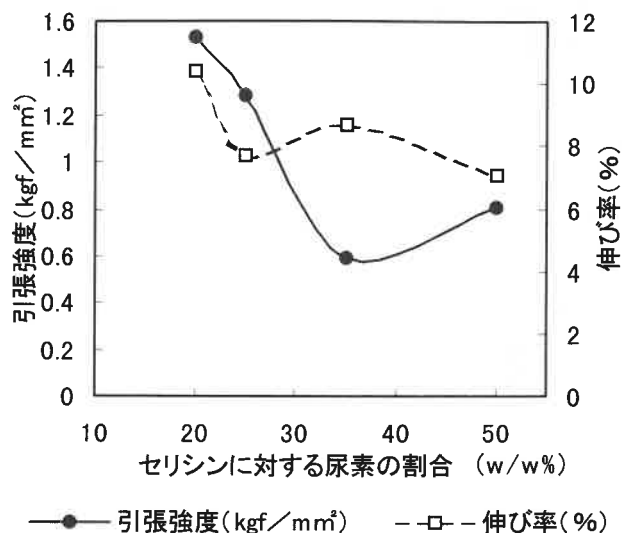


図 3-A セリシン・尿素フィルム引張強度と伸び率

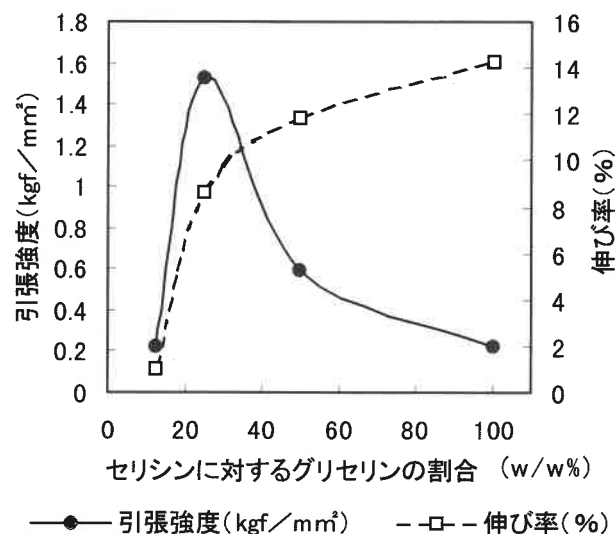


図 3-B セリシン・グリセリン引張強度と伸び率

表 2 PVA 含有フィルムの引張強度と伸び率

セリシンに対する PVA の割合 (w/w%)	引張強度 (kgf/mm ²)	伸び率 (%)
50	0.416 ± 0.0731	1.21 ± 0.083
100	0.384 ± 0.1017	1.21 ± 0.064

ラミン樹脂を用いており、PVA のみを添加するだけでは強度のあるフィルムの形成は難しいと考えられる。

今回の試験で添加剤として用いたグリセリンと尿素は、セロファンや PVA フィルムの可塑剤として数%~20%程度用いられているものである⁽⁸⁾。この可塑剤

の種類と量によりこれらのフィルムの性質は大きく変化する。セリシンフィルムに関しても、同じことがいえる。グリセリンと尿素は、セリシン分子と反応することなく、フィルム化したときの分子構造を変化させて、柔軟な性質を作りだしているのではないかと考えられる。すなわち、セリシンに対して 20w/w%のグリセリン及び尿素は分子同士の相互作用を強めるため、酵素分解性が低下し、強度が高くなるのではないかと考えられる。

これに対して、PVA はそれ自身だけで分子同士が相互作用して強靱なフィルムを形成する。このPVA とセリシンを混合すると、セリシンはPVA分子間に入りこみ、分子間の相互作用を阻害してしまうのではないかと考えられる。このことにより酵素分解性は上がり、脆いフィルムになってしまうのではないかと考えられる。

今回作製し、ある程度の強度が得られたフィルムについて気体やイオンなどの透過試験を行い、更にその基本的性質を明らかにしていくことで、実用化の可能性を探るのが今後の課題である。

6 参考文献

- (1) Rainer Voegeli ら(1998),『セリシンの皮膚保湿・抗シワ効果』, *FRAGRANCE JOURNAL*, 70-74
- (2) 箕浦憲彦(1995),『絹タンパク質フィルムー生体材料としての可能性ー』, *生体材料*, 13, 4, 184-190
- (3) 坪内鉦三ら, 特願平 9-333560
- (4) 小林哲ら(1999),『セリシンフィルムの物性に関する研究ーその溶解性・分解性についてー』, *京都府織物指導所研究報告*, 33, 7-11
- (5) 田中裕美ら(2000)『絹セリシンの回収・有効利用技術開発-回収の実用化-』*京都府織物指導所研究報告*, 34, 1-8
- (6) 浜岡容子ら(1997), 平成 8 年度技術開発研究補助事業成果普及講習会用テキスト, III
- (7) 吉村治ら(2000),『キトサン系生分解性樹脂の開発』, *石川県工業試験場研究報告*, 49, 55-60
- (8) 高橋儀作著,『プラスチックフィルム』, 日刊工業新聞社