

セリシンフィルムに関する研究(第2報)

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を向上させるためにクエン酸を添加してその効果を調べたところ、フィルムの強度が上がる事が確認された。酵素分解性に関しては、グリセリンを添加したものとほとんど差がみられなかった。

1 はじめに

絹精練の際に廃棄されていた絹タンパク質であ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あるということで創傷薬(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であるコラーゲンなどと比較して低いと思われる。このため、今後ますます生体材料としての利用に向けての研究に期待がかかる。

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、成型が困難であり、ドラッグ・デリバリー・システム(DDS)⁽²⁾の素材として利用したり、人工皮膚などとして利用するのも難しい。そこで、小林らはエチレングリコールジグリシジルエーテルを添加したフィルムを作製し、その物性について報告しているが⁽⁴⁾、DDS素材などで生体に利用することを考慮し、著者らはより安全性の高いと思われるグリセリンをセリシン水溶液に添加することにより柔軟なフィルムが作製できることを前報で報告した⁽⁵⁾。今回はその続報として、クエン酸を添加したフィルムの物性について主に報告する。浜岡らは有機酸を用いると、綿に対してセリシンが効率的に付着することを見出した⁽⁶⁾。これは有機酸がバインダー的役割をしてセリシンと何らかの相互作用をしているためであると推測される。この相互作用がフィルムの強化をもたらすのではないかと考え、以下の検討を行った。

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な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 試料

生糸(栃木県産、平均繊度 27 デニール)

2.2 試薬

グリセリン、クエン酸、KCl、HCl、 Na_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 (和光純薬特級)、ペプシン、パパイニン(和光試薬)

2.3 機器

高圧蒸気処理装置(RCS-60/10R、日阪製作所)、高速液体クロマトグラフ(HPLC)(LC-10A、島津製作所)、オートクレーブ(SP200F、ヤマト科学)、紫外分光光度計(UV-2200、島津製作所)、振とう式恒温槽(BW201、ヤマト科学)、フーリエ変換型赤外分光光度計(FT-IR8200PC[ATR-8000]、島津製作所)、チーズ染色機(HUHD-250/350、日阪製作所)、真空乾燥機(16-31、三田村理研工業)

3 方法

3.1 セリシン粉末の作製

チーズに巻いた生糸をチーズ染色機を用いて 120℃、30 分間精練した。その後精練液から凍結解凍法でセリシンを分離し、40℃で真空乾燥することによりセリシン粉末を得た。得られたセリシン粉末を 5 分間煮沸溶解し、重量平均分子

* 織物課 技師 ** 織物課 主査 *** 織物課 主任研究員

量を GPC 測定により算出した結果 170 ± 10 kDa であった。

3.2 フィルムの作製

3.1 により作製したセリシン粉末を 120°C 、15 分間オートクレープ処理することで 2 % の水溶液とし、各添加物を加えてよく混合した後、直径 100 mm のテフロンシャーレに 70 ml 流し込み 40°C で乾燥させた。オートクレープ処理後のセリシン溶液の重量平均分子量は、100 kDa であった。

3.3 水分率測定

5 cm 角のフィルムを 20°C 、65 %R.H. 下に 24 時間以上放置後の重量及び真空乾燥機で 110°C 、2 h 乾燥後の重量を測定し式(1)より 20°C 、65 %R.H. 下の水分率を算出した。その後、再度 20°C 、65 %R.H. 下に 24 時間以上放置後の重量を測定し、再吸湿率を式(2)により算出した。

$$\text{水分率 (\%)} = \frac{Ms - Md}{Md} \times 100 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$\text{再吸湿率 (\%)} = \frac{Mr - Md}{Md} \times 100 \quad \dots \text{式(2)}$$

Ms : 20°C 、65 %R.H. 下に 24 h 以上放置後の重量 (g)

Md : 真空乾燥機で 110°C 、2 h 乾燥後の重量 (g)

Mr : 再度 20°C 、65 %R.H. 下に 24 h 以上放置後の重量 (g)

3.4 酵素分解性の測定

タンパク質分解酵素のペプシン及びパパインを緩衝液に溶解し、濃度を 0.5 % とした。セリシンフィルム $1\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ と酵素溶液 25 ml を共栓付三角フラスコに入れ、 37°C に調節した振とう恒温槽内にて反応させた (100 rpm で振とう)。各時間毎に溶液の 275 nm における吸光度を測定して溶解したセリシンの指標とした。ペプシン及びパパイン溶液の緩衝液は、それぞれ 0.2 M KCl/HCl 緩衝液 (pH 2.0) 及び 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 緩衝液 (pH 7.0) を用いた。また、Blank 試験として緩衝液のみの場合も同時に測定した。

3.5 引張試験

JIS K 7227 及び JIS Z 1702 に基づきセリシンフィルムの引張試験を行った。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 7 cm、標線間距離 3 cm)

・測定環境: 20°C 、65 %R.H.

・試験機: オートグラフ (AG-500B、島津製作所)。引張荷重精度 ± 1.0 % 以内。速度精度 ± 0.1 % 以内。

・試験速度: 30 mm/min

3.6 赤外吸収測定

フーリエ変換型赤外分光光度計 (FTIR) を使い、フィルムをそのまま全反射 (ATR) 法で測定した。

4 結果と考察

4.1 添加物の効果

これまでの研究の中で、フィルムを強化する添加物として数種類のものを使用してみた。その結果をまとめて表1に示す。この中で効果が高いと思われるグリセリン、クエン酸を使って作製したフィルムについて以下の実験を進めた。

表1 添加物の効果

添加物	フィルムの状態
グリセリン	柔軟なフィルム
尿素	不透明なフィルム
ポリビニルアルコール	強靱なフィルム → 以前より文献あり ⁽⁷⁾⁽⁸⁾
クエン酸	柔軟で透明なフィルム
ポリエチレングリコール (200, 400, 600)	フィルム形成なし

4.2 水分率

各セリシンフィルムの水分率を測定した結果を図1に示す。セリシン-グリセリンフィルムは添加したグリセリンの量が多くなると水分率も高くなることが分かった。セリシン-クエン酸フィルムは、クエン酸の割合によって水分率はほとんど変化せず、またその値もセリシン-グリセリンフィルムに比べて低いものであった。ただ、セリシン-グリセリンフィルムの真空乾燥した際の重量減少は、真空乾燥機の内側に水でなく粘度の高いグリセリンが付着していたことを考えると、単純に

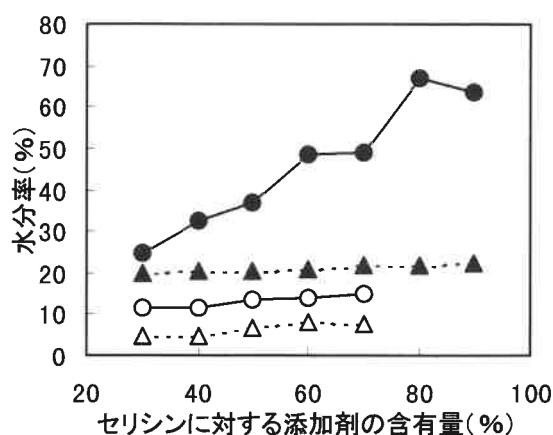


図1 セリシンフィルムの水分率

—●—水分率 (グリセリン) --▲--再吸収率 (グリセリン)

—○—水分率 (クエン酸) --△--再吸収率 (クエン酸)

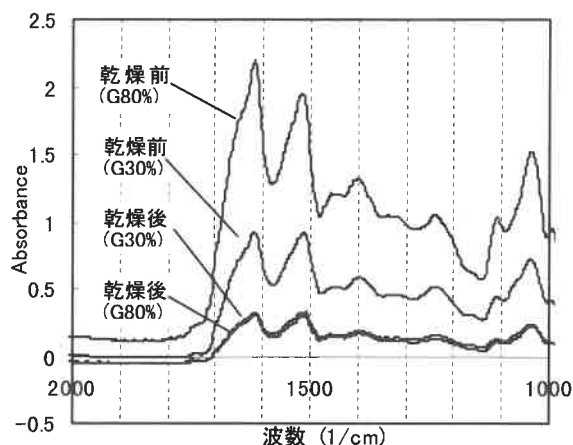


図2 セリシン-グリセリン(G)フィルムの真空乾燥前後の赤外吸収スペクトル

表2 アミド I、II の吸収バンドの移動

	アミド I (1/cm)	アミド II (1/cm)
グリセリン/セリシン=30% 乾燥前	1616.2	1515.9
グリセリン/セリシン=80% 乾燥前	1616.2	1515.9
グリセリン/セリシン=30% 乾燥後	1618.2	1508.2
グリセリン/セリシン=80% 乾燥後	1618.2	1508.2

水分だけではなく、フィルムの内部に入り切れずに表面に存在したグリセリンも真空状態で蒸散した可能性が高い。又、セリシン-グリセリンフィルムを真空乾燥後に再度同環境においたとき、減少した重量は元には戻らず、グリセリンの含有量に関わらず一定の値を示したことから真空乾燥により余分なグリセリンが蒸発したと考えられる。

この真空乾燥は 110℃で行ったが、セリシン-グリセリンフィルムはこの際に黄変が観察された。これは何らかの構造変化が起こっていると予想される。真空乾燥前後のセリシン-グリセリンフィルムの赤外吸収特性を調べた結果は図2のとおりで、110℃の真空乾燥処理によりアミド結合の特徴的なバンド、アミド I が長波数側へ、アミド II が短波数側へ移動し、アミド結合の状態の変化が示された。110℃処理でセリシンの構造が変化を起こしていることが確認された。これはタンパク質変性の際に α 構造が壊れてランダムコイル構造になるときの変化と似ており、セリシンフィルム内でもその変化が起きていると思われる。

これまでフィルム作製は、すべて 40℃と低温で行ってきた。このため、セリシンと添加物が化学的な反応をしている可能性は低く、水素結合などでセリシン分子間に水分を保

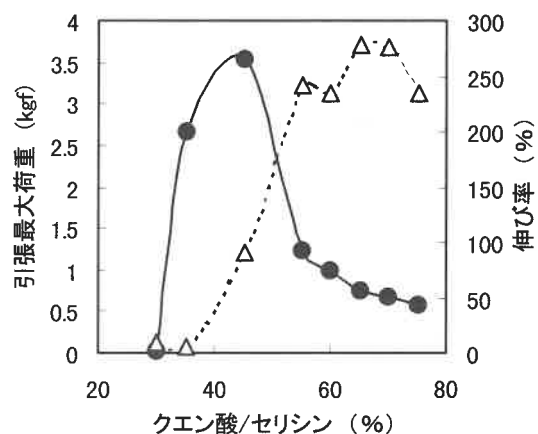
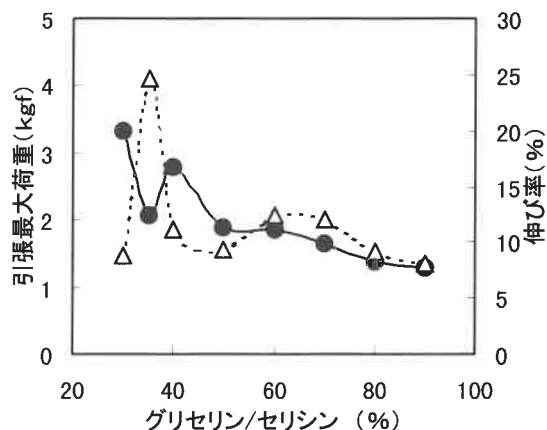


図3 引張試験

●—引張最大荷重 --△--切断時の伸び率

持して、柔軟なフィルムを形成できると考えられる。しかし、この真空乾燥がセリシンの分子構造に影響を与えることが分かり、今後この構造変化がフィルムの性質に与える影響を調べる必要がある。

4.3 引張試験

各濃度のグリセリンまたはクエン酸を加えたフィルムの引張試験により、最大荷重及び切断時の伸び率を求めた結果は図3のようになった。クエン酸を添加した方が最大荷重で約 2 倍強いフィルムができることが分かり、さらに切断時の伸びも非常に大きくなることも分かった。特に、クエン酸濃度が 50%以上になると、切断時伸び率は 300%近くになる。しかしこれと同時に接着性が増し、他のものとくっつきやすくなる傾向があり、問題点として残った。また、フィルム作成の際にホコリや気泡などの異物が混入したり、乾燥が均等にいかなかったりした試料もあったためか、データにばらつきが見られた。

また、グリセリン、クエン酸ともに添加量が 30%より少ないときにはシャーレからうまくはがれない、脆いフィルムになった。したがって、クエン酸の場合もグリセリンの場合と同様に、

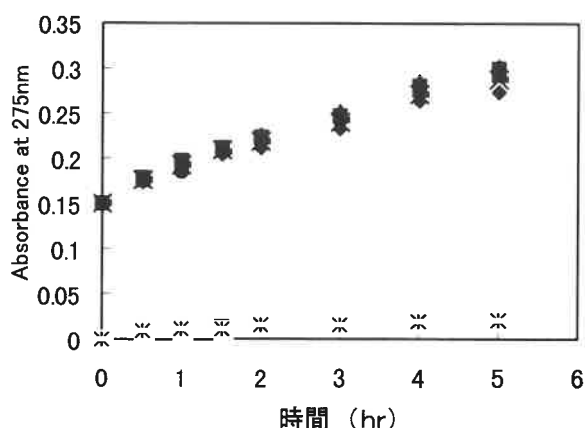


図5-1 セリシン-グリセリンフィルムのパパイン分解性
● 30%; ▲ 40%; ■ 50%; ◆ 60%; × 70%; — 80%;
○, △, □, ◇, ☆, はそれぞれの Blank 試験

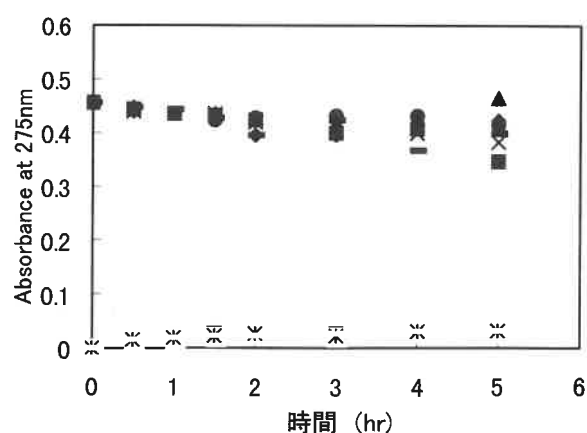


図4-1 セリシン-グリセリンフィルムのペプシン分解性
● 30%; ▲ 40%; ■ 50%; ◆ 60%; × 70%; — 80%;
○, △, □, ◇, ☆, はそれぞれの Blank 試験

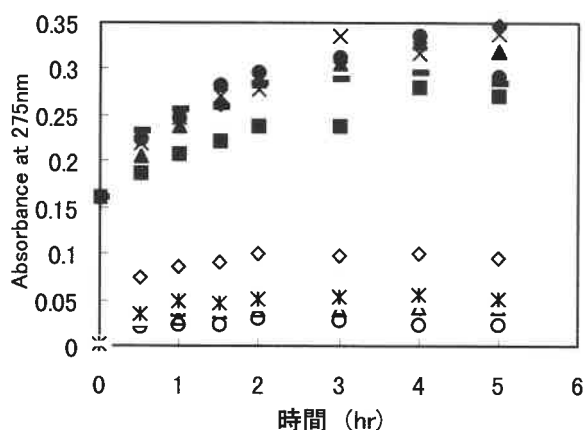


図5-2 セリシン-クエン酸フィルムのパパイン分解性
● 30%; ▲ 40%; ■ 50%; ◆ 60%; × 70%; — 80%;
○, △, □, ◇, ☆, はそれぞれの Blank 試験

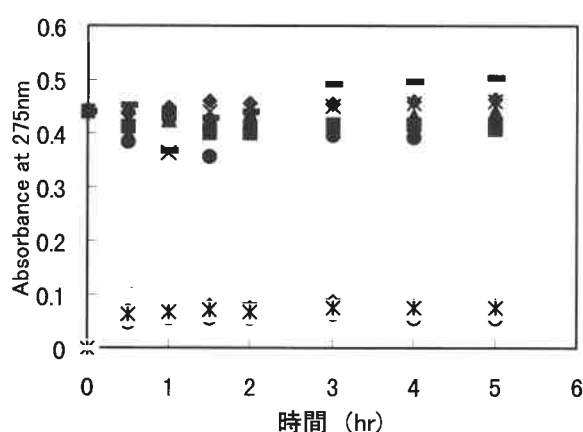


図4-2 セリシン-クエン酸フィルムのペプシン分解性
● 30%; ▲ 40%; ■ 50%; ◆ 60%; × 70%; — 80%;
○, △, □, ◇, ☆, はそれぞれの Blank 試験

実用に耐えるフィルムにするにはセリシン量の 30%以上を、添加することが必要であると思われる。さらに、フィルムなどの架橋には、反応させるために熱処理が必要なものが多いが、セリシン-クエン酸の場合もセリシン-グリセリンの場合も、引張試験の結果、熱処理しなくても強度のあるフィルムになることが分かった。

4.4 酵素分解性

各フィルムのタンパク質分解酵素のパパイン、ペプシンによる分解性を調べたところ、図4、5のようになった。どちらのフィルムもペプシンではほとんど分解されないことが分かった(図4)。ペプシンは動物の胃液に含まれるプロテアーゼの主成分であり、ペプシン分解を受けにくいということは胃で消化されず腸まで到達できる可能性も示された。DDS 素材としての利用可能性も十分に考えられる。

ペプシンは分解されるペプチド結合のカルボキシル側に

酸性アミノ酸で遊離カルボキシル基の存在、アミノ側に芳香族アミノ酸で遊離カルボキシル基の存在が必須であるという基質特異性を示すという⁹⁾。セリシンには酸性アミノ酸は比較的多いし、Tyr、Pheなどの芳香族アミノ酸も多く含まれる。それでもペプシンが作用しないというのは、フィルム化にこの遊離カルボキシル基が寄与しているのではないかと想像される。

パパイン分解性は添加物の濃度によりほとんど影響されないが、クエン酸含有率が 50%のフィルムが最も分解を受けにくいことが分かった。パパインは絹の酵素精練にも利用される酵素であり、セリシン-グリセリンフィルムもセリシン-クエン酸フィルムもペプシンよりよく分解した。

5 今後の課題

実用化に耐えうる強度のフィルムを作製することができた

ので、今後はその用途の開発が必要になってくると思われる。DDS 素材としての用途を当初の目的としてこれまでトリプシン、ペプシン、パパインによる分解性を、試験管内の実験により調べてきた。今後はもっと体内環境を意識した分解挙動の解析が必要になってくる。また、他にも様々な利用可能性があると思われるため、その点でも具体的な検討を進めていきたいと思っている。

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(2001)『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-』, *京都府織物・機械金属振興センター研究報告*, 35, 1-5
- (6) 浜岡容子ら (2001)『綿のセリシン加工に関する研究』, *京都府織物・機械金属振興センター研究報告*, 35, 12-16
- (7) 石川博ら (1987)『セリシンとポリビニルアルコールのブレンドフィルムの構造と物性』, *繊維学会誌*, 43, 283-287
- (8) 王蘇ら (1998)『ポリビニルアルコール／セリシン系ブレンド含水ゲル膜の構造と物性』, *日蚕雑*, 67, 295-302
- (9) 化学大辞典, 共立出版