

シルクフィブロインタンパク質への ヘルスケア製品及び医療材料技術開発

担 当 機 関 名	研 究 期 間
カネボウ株式会社	平成14年度～16年度

I. 3カ年の研究成果の要約

1. 技術開発課題の目的

シルクフィブロインタンパク質からなる硫酸化物およびスポンジ構造物の工業的に最適化された生産プロセスの構築と、それらを利用したヘルスケア製品及び医療材料の開発を通じ、低迷する絹需要の新規な応用分野を開拓し事業化につなげることを目的とした。

2. 担当者

カネボウ株式会社 シルク技術開発センター

センター長	広瀬 文雄
前センター長	草木 一男
シルクケミカル製造課長	宇根 俊夫
シルクケミカル開発係主任	豊平 聡美

独立行政法人 農業生物資源研究所

生体機能模倣研究チーム長	玉田 靖
--------------	------

3. 研究の実施場所

カネボウ株式会社 シルク技術開発センター

滋賀県長浜市鐘紡町1番11号

独立行政法人 農業生物資源研究所 昆虫・動物生命科学研究部門

茨城県つくば市大わし1-2

聖マリアンナ医科大学 微生物学教室

神奈川県川崎市宮前区菅生2丁目16-1

国立大学法人 京都大学 国際融合創造センター

京都府京都市左京区吉田本町

4. 要約

シルクフィブロインタンパク質の硫酸化物である硫酸化フィブロインについては、当該物質の持つ抗 AIDS 活性を軸として、機能発現の解明や細菌や他ウイルスへの作用評価等を進め、ウイルス感染阻害剤として利用可能であることが明らかとなった。工業化については、反応工程の合理化、環境負荷やコストの削減を実現すると共に、従来のラボスケールを工業生産レベルまで精度良くスケールアップ出来ることを確認した。商品化についてはヒトに用いることが可能な潤滑剤として製剤化を行い、in vitro とヒトパッチテストによる有効性ならびに安全性について評価・確認した。

スポンジ構造物は、シルクフィブロインからなる多数の間隙を有する構造体を指し、当該構造体を形成するにいたる各種パラメーターの解析を実施し、孔径や圧縮弾性率の制御が可能となった。得られた該構造体を軟骨細胞培養床とフェイスケアシートへ商品化すべく、機能化技術の開発と工業化・商品化へ向けた取り組みを実施した。軟骨細胞培養床では、移植細胞が培養日数に伴い正常軟骨に近づく傾向が確認されたが、事業化になお相当な時間を要すると判断されたことから、開発を中断した。フェイスケアシートは工業的に最適な製造方法を確立し、プロトタイプとなるシート材を用いて、実際の使用形態に即した形でのヒトパッチテストによる安全性、有効性を評価し、確認した。

事業化の見通しとして、硫酸化フィブロイン製剤は今後、新規化学物質としての安全性データと疫学調査の必要性について検討し、更なるコストダウンに向けてブラッシュアップが必要である。スポンジ構造物の内、軟骨細胞培養床については引き続き機能化技術の研究が必要とされる。フェイスケアシートについては、最終商品への商品設計を進め、時機を見た商品企画で事業化を目指す。

なお、本事業で得られた知見に基づき、硫酸化フィブロイン、スポンジ構造物について、各々特許出願を予定している。

Ⅱ． 3 年間の研究成果の本文

1． 技術開発課題の目的

シルクフィブロインタンパク質からなる硫酸化物およびスポンジ構造物の工業的に最適化された生産プロセスの構築と、それらを利用したヘルスケア製品及び医療材料の開発を通じ、低迷する絹需要の新規な応用分野を開拓し事業化につなげることを目的とした。

2． 技術開発課題の内容

(1) 技術開発の実施に必要な事業

ア． 基礎となる試験研究の概要及び技術開発の目的

独立行政法人農業生物資源研究所では、シルクフィブロインを利用した次のような技術シーズを有していた。①シルクフィブロインを硫酸化することで得られる硫酸化フィブロインが、抗血液凝固機能や抗 AIDS 機能を有すること、②シルクフィブロインをスポンジ構造体に成形することで得られるシルクフィブロインスポンジが、従来メディカル用途に用いられているコラーゲンスポンジに比較して強度が大きくハンドリングに優れた軟骨細胞培養床として利用可能であること、の 2 点である。シルクフィブロインは、医療分野では経験的に「天然物で安全である」というイメージを持つ素材であり、先のシーズにある新たな機能性の付与により、将来的に新たな製品群として広く展開できる可能性を秘めている。しかしながら、これら機能性フィブロインの製造は実験室スケールであり、製品としての実用化に向けたプロセスには収率の向上や最適な製造フローの確立、大量安定生産を見据えた製造ラインの組み立て等、多くの課題が未着手の状態であった。さらに得られた機能性フィブロインの具体的な最終製品形態、販売ルート等のいわゆる「出口条件」の確立も課題となっていた。係る課題を解決するため本事業では、上述の 2 種類の機能性フィブロインについて、各々工業的生産技術の確立と最終商品へ向けた具体的な商品化開発を目的とした。

ア－1． 硫酸化フィブロインに関する技術開発の目的

硫酸化フィブロインの抗血液凝固能や抗 AIDS 能といった機能面についてはすでに独立行政法人農業生物資源研究所で明らかにされていることから、本事業では生産技術の確立と商品化開発に主眼をおいた。併せて機能と構造との関連や新機能の探索といった基礎研究も商品化に際し重要であることから、これらについては独立行政法人農業生物資源研究所ならびに聖マリアンナ医科大学との間で委託研究契約を締結し実施した。

アー 2. シルクフィブロインスポンジに関する技術開発の目的

シルクフィブロインからなるスポンジ構造体が軟骨細胞培養床として有望であるという知見に基づき、当該シルクフィブロインスポンジのヘルスケア製品及び医療材料としての実用化を主たる目的とし、本事業では工業的生産方法の確立と商品化開発に主眼をおいた。具体的には、スポンジ化制御プロセスの構築に必要な諸条件の探索と最終商品化に際して求められる付属工程の条件確立を目指した。併せてシルクフィブロインスポンジの製品カテゴリーの拡充を目的に、機能的物質の付与やその評価、軟骨細胞再生素材としての最適化条件の探索、スポンジ形成過程の解明といった基礎的研究も重要であることから、これらについては独立行政法人農業生物資源研究所ならびに国立大学法人京都大学との間で委託研究契約を締結し実施した。

イ. 技術開発の内容

イー 1. 硫酸化フィブロインに関する技術開発の内容

イー 1-1. 機能発現機構解明に関する研究

機能発現機構解明に関する研究については、以下の 3 点を実施した。

- ①構造と抗血液凝固活性の相関
- ②各種硫酸化タンパク質における抗 AIDS 効果
- ③抗菌作用ならびに HIV 以外のウイルスへの作用評価

先ず①について具体的には、構造の異なる硫酸化フィブロインを得るために、構造の異なるシルクフィブロインを原料に用い硫酸化処理を施した。構造の異なるシルクフィブロインには、絹繊維を直接微粉化し微視的に繊維形状を保持した水不溶性シルクパウダー、絹繊維を一旦水系溶媒に溶解し次いで結晶・微粉化し微視的に球形状を呈した水不溶性シルクパウダーおよび絹繊維を水系溶媒に溶解した物を加水分解し中和・乾燥した水溶性シルクパウダーの三点を使用した。水不溶性シルクパウダーは結晶部と非晶部が混在し、水溶性シルクパウダーは非晶部分が多く割合を占める。また水溶性シルクパウダーは加水分解の程度によって分子量を調節し、平均分子量でおよそ 7 万、1 万 5 千、1 万、5 千および 2 千の五種類を準備した。さらに比較検討のためフィブロインとは異なる、絹繊維を構成するもう一つのタンパク質であるセリシンを取り上げ、市販のセリシンパウダーと自家精製セリシンを供試した。

上述の原料を基にした硫酸化物を用い、APTT 活性を測定することで構造による機能的発現の差異を確認した。加えて自家精製セリシンの硫酸化物について、ゲル濾過を用いて三分画に取り分け、評価した。APTT 活性は抗血液凝固活性を計るもので、抗 AIDS 効果と直接的には何ら関与しないが、これまでの農業生物資源研究所の知見から APTT 活性値と抗 AIDS 効果が相関関係を示すことが判っており、抗 AIDS 効果を測定するより簡便であるため、本法を採用した。APTT 活性測定は、新鮮クエン酸加血漿 0.1ml と APTT 試薬 (APTT リキッド[RD]ロッシュ ダイアノグスティック) 0.1ml に所定の濃度 (0.01~10mg/ml) の試料を 10 μ l ずつ添加したものを、37℃3 分間加温し次いで予め乾燥しておいた 25mmol 濃度の塩化カルシウム液を 0.1ml 加え、恒温槽で 20 秒間

静置した後フィブリノーゲンが析出するまでの時間を測定するというフローで実施した。

②については、フィブロインの他にセリシン、フィブロインのキモトリプシンフラクション、アルブミンそしてゼラチンを用い、各々を硫酸化したのち抗 AIDS 活性を測定した。抗 AIDS 活性測定は、所定の濃度の試験物質と共に HIV 感染 MT-4 細胞を感染直後に加え、炭酸ガスインキュベーターで 37℃5 日間培養後、MTT 法で生存細胞数を測定するというフローで実施した。抗 AIDS 活性は HIV 感染による細胞傷害を 50% プロテクションする濃度 EC_{50} で判定した。

③については、*E. coli*、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌および単純ヘルペスウイルスを対象に作用評価を実施した。

抗菌試験は、液体培地に一定量の菌を接種した菌液に試験物質を加えて試験液とし、所定時間ごとに試験液を寒天培地に接種し 24 時間培養後のコロニー数をカウントする方法と、菌を接種した寒天培地上に硫酸化フィブロインを滴下して培養し、発育阻止円の有無を確認する方法を採った。

抗単純ヘルペス試験は、単層培養した Vero 細胞に HSV-1 あるいは HSV-2 を感染させ、培養液中に所定の濃度の試験物質を加え 96 時間培養後、MTT 法で生存細胞数を測定するというフローで実施した。並行して非感染区も同様に培養し MTT 法で生存細胞数を測定することで、細胞毒性の程度も観察した。抗ヘルペス活性は HSV 感染による細胞傷害を 50% プロテクションする濃度を EC_{50} 、細胞毒性は試験物質による 50% 細胞傷害濃度を CC_{50} で表し、試験物質の作用評価の指標とした。

イー 1-2. 工業化研究

硫酸化フィブロインの収率の向上を目指し、工業的生産技術の精度向上を行った。具体的には反応プロセスの簡略化、製造工程の簡素化を検討し、農業生物資源研究所法に対して、工程の省略と使用薬品量の削減に注力した。

イー 1-3. 商品化研究

最終商品を見据えた硫酸化フィブロイン製剤の処方組み立てとその有効性・安全性について取り組んだ。

具体的な商品群としてヒト用途潤滑剤に絞り込み、処方の確立を実施した。

細胞レベルでの有効性については、目標とする最終商品に準じた処方を組んだ抗 AIDS 製剤を試作し、抗 AIDS 活性を測定した。測定は上記イー 1-1 ②に準じて行い、加えて当該製剤の安全性についても確認する必要があるため、並行して細胞毒性の測定も実施した。方法は上記イー 1-1 ②に記載の培養・測定に並行して、ウイルス非感染細胞を同様の条件で培養する手法を採った。細胞毒性は上記イー 1-1 ③に準じ当該製剤による 50% 細胞傷害濃度 CC_{50} で表し、 CC_{50}/EC_{50} 値をもって当該製剤の有効性の指標とした。

ヒトへの安全性については、第一段階として最も簡便なパッチテストを実施した。

イー２．シルクフィブロインスポンジに関する技術開発の内容

イー２－１．構造制御技術開発

シルクフィブロイン、スポンジ化剤そして水からなる三相系の微小領域の相互作用を解析すべく、スポンジ構造形成条件の把握とバルク構造の確認、それらから推察されるスポンジ構造形成機構の仮説を立てた。

具体的には、スポンジ構造形成のパラメーターと考えられるスポンジ化剤の種類と濃度、フィブロインの濃度、処理温度そして処理時間について実験と考察を実施した。

加えて、その構造を解析するためにX線解析を実施した。

イー２－２．機能化技術開発

家兎軟骨細胞を用いて培養を試みた。得られた再生軟骨組織を基に観察・考察を実施し、正常軟骨との物性の比較を行った。加えて、得られた知見から硫酸化フィブロインとの併用を想定し、硫酸化フィブロイン含有シルクフィブロインスポンジの物性を測定した。

また、機能性付与を目的とし、界面活性剤を添加有効成分のモデルとして、スポンジ構造形成等に及ぼす影響を観察した。

イー２－３．工業化開発

求められるスポンジ構造の発現条件と再現性についての探索を実施した。上記イー２－１に記載のパラメーターに加え、処理速度や工業化へスケールアップする際に発生すると思われる問題点等について、検討を行った。

イー２－４．商品化計画

事業化へ向けてマーケットの模索と調査を実施した。

イー２－５．商品化開発

具体的な商品群としてフェイスケアシートを選択し、その安全性と効果の確認を実施した。

ウ．技術開発の実施結果

ウー１．硫酸化フィブロインに関する技術開発の内容

ウー１－１．機能発現機構解明に関する研究

①構造と抗血液凝固活性の相関

構造の異なるシルクフィブロイン 2g と硫酸化剤 23.9g を用いて硫酸化を実施した。得られた硫酸化フィブロインの収率は、表１の通りであった。次いでこれら硫酸化フィブロインの APTT 活性を測定したところ、図１の様な結果となった。

これらの事柄より、構造の違いによって活性に違いが出るものの、いずれの硫酸化フィブロインにも抗血液凝固活性が認められることが明らかとなった。傾向としては、

絹繊維を直接微粉化した水不溶性シルクパウダーを原料として用いた群の方が、その他の群に比較して活性が高いことが判った。原料となるフィブロインの構造は、天然に近い形の構造を有したもの、すなわち分子量が大きいものの方が、硫酸化に際し望ましいと考えられた。このことからフィブロインの結晶部分に導入された硫酸基が、抗血液凝固活性に寄与していると推察された。

試作 No.	フィブロイン原料の内容	収量 [mg]	収率 [%]
K A	絹繊維直接粉砕品	700	35
K 2	絹溶解後、再結晶品	470	24
K 4	加水分解品 低分子量	860	43
K 5	加水分解品 高分子量	800	40
K 6	市販セリシンパウダー	260	13

表 1 原料構造の違いと硫酸化フィブロインの収率

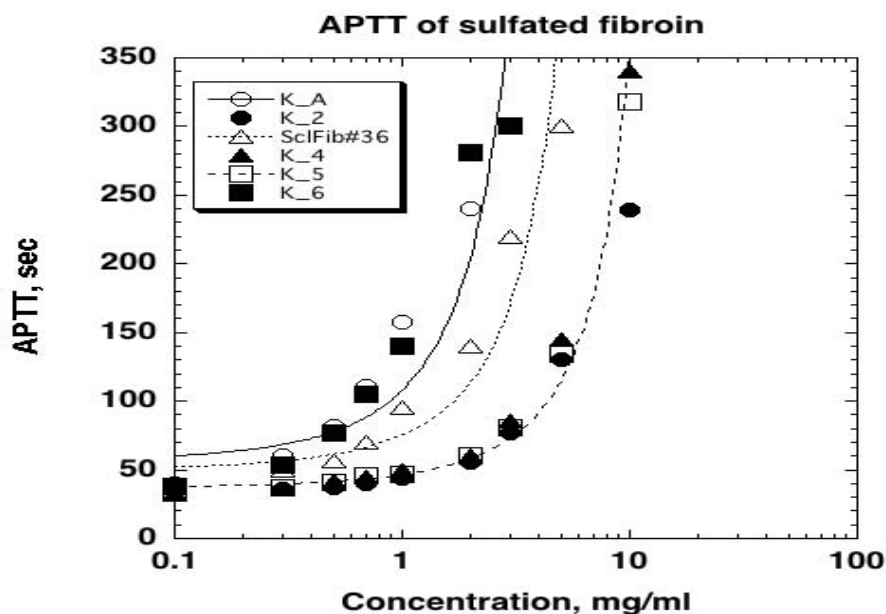


図 1 原料構造の異なる硫酸化フィブロインの APTT 活性

図中の記号は表 1 の試作No.を表す

ScIFib#36 は農業生物資源研究所で試作されたラボスケール品

図 1 より硫酸化セリシンについても抗血液凝固活性が認められたので、自家精製セリシンを用いて硫酸化を施し、分子量画分による APTT 活性の違いを測定した。その結

果は図2の通りであるが、図よりゲル濾過によって大きく三分画された硫酸化セリシンは、画分毎のアミノ酸組成や硫酸基導入量に顕著な差が無いにもかかわらず、APTT活性に大きな差異が確認された。最も大きい画分に高い活性を示し、分子量の低下と共に活性の減少が確認された。

以上の結果から、硫酸化フィブロインも同セリシンも抗血液凝固活性は分子量に依存することが明らかとなった。

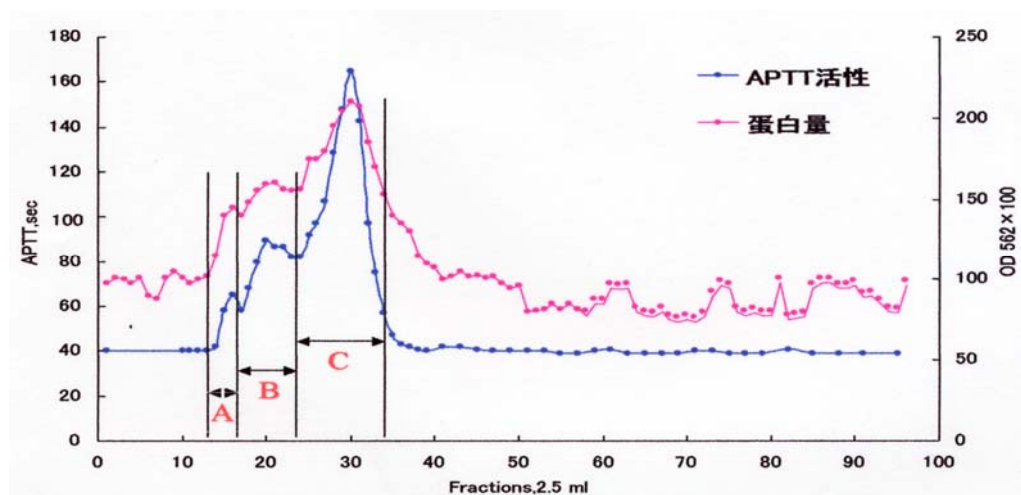


図2 硫酸化セリシンの分子量と APTT 活性の相関

②各種硫酸化タンパク質における抗 AIDS 効果

各種硫酸化タンパク質の、抗 AIDS 活性についての測定結果を表2に示した。

S Fはフィブロイン、S Sはセリシン、S F c pはフィブロインキモトリプシンフラクション、S AはアルブミンそしてS Gはゼラチンをそれぞれ硫酸化したものである。

試作 No.	硫酸化率 [mmol/g]	E C ₅₀ [μg/ml]	細胞毒性
S F	1.281	16.529	—
S S	1.906	87.121	—
S F c p	1.750	70.431	+
S A	1.031	8.074	+
S G	0.969	> 10 ³	+

表2 硫酸化タンパク質の硫酸化率と抗 AIDS 活性

硫酸化ゼラチン以外は抗 AIDS 活性が認められたが、硫酸化フィブロインと硫酸化セリシン以外は細胞毒性も観察された。このことより実際の製品化に当たっては、抗 AIDS 活性評価だけでなく、細胞毒性も加味した「有効性の指標」を新たに設定する必要があることが明らかとなった。

③抗菌作用ならびに HIV 以外のウイルスへの作用評価

代表的な細菌として *E. coli* とメシチリン耐性黄色ブドウ球菌を用いて、硫酸化フィブロインの抗菌作用についてテストしたところ、いずれの結果も抗菌活性は全く認められなかった。

次に、Vero 細胞を用いて、硫酸化フィブロインの抗単純ヘルペス作用についてテストしたところ、図 3 の様な結果が得られた。

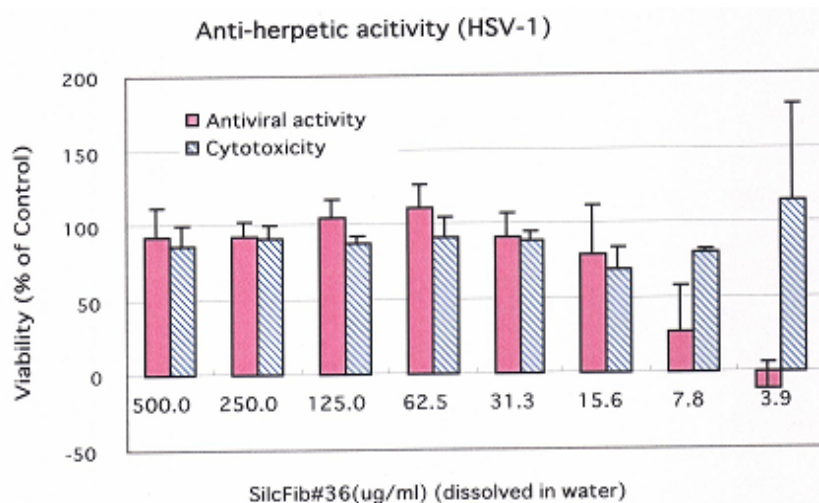


図 3 硫酸化フィブロインの抗ヘルペス作用

Antiviral activity : 抗ウイルス活性 Cytotoxicity : 細胞傷害性

図 3 に示すように、15.6 μ g/ml の濃度でウイルス感染による細胞傷害をほぼ完全に阻止していることが判った。聖マリアンナ医科大学の従来知見から硫酸化フィブロインは HIV に対して、そのウイルス粒子が感染標的細胞に吸着する時点を阻止することで抗 AIDS 活性を示すことが判っており、HSV に対しても同様の作用機序で抗ヘルペス活性をしめすと推察された。

ウー 1－2．工業化研究

従来の農業生物資源研究所法では、およそ次に記載のフローで硫酸化フィブロインが合成されていた。

- ①クロロスルホン酸－ピリジン錯体の合成
- ②硫酸化反応

- ③硫酸化反応停止のための中和
- ④未反応不溶物の濾別
- ⑤硫酸化フィブロインのエタノールによる析出分離
- ⑥超遠心分離・デカンテーションによる硫酸化フィブロインの回収
- ⑦回収硫酸化フィブロインの水への再溶解
- ⑧脱塩のための透析
- ⑨濃縮
- ⑩乾燥

この内、①については糖類等の硫酸化に関する文献調査により、クロロスルホン酸から生じた三酸化硫黄が親電子反応として作用することが判明した。この知見からフィブロインに対しても三酸化硫黄ピリジン錯体を硫酸化剤として直接作用させることが可能であるとの推察から実証し、当該工程を省略することが可能となった。

次いで、⑤～⑦までの精製工程を簡素化する目的で種々精製工程の検討を進めた結果、除去すべき不要物であるピリジンや生成中和塩は、分子量 7,000 前後の膜を用いることで、硫酸化フィブロインと十分に分離出来ることが解明された。これにより、⑧の透析工程の膜条件を操作することで⑤～⑦工程を⑧工程に包含出来るようになった。

⑨の濃縮工程は、包含された新⑧工程（透析）への負荷を軽減し、ピリジンの回収・再利用目的で新⑧工程の前段に工程組み替えし、さらに精製度を高め品質を向上させる目的で精密濾過工程を新設した。

その結果、合成フローは次の通りとなった。

- ①硫酸化反応
- ②硫酸化反応停止のための中和
- ③未反応不溶物の濾別
- ④濃縮（ピリジン回収）
- ⑤精密濾過
- ⑥脱塩のための透析
- ⑦乾燥

最終的に、錯体合成設備（冷浴設備）や超遠心分離器といった設備面での合理化、反応溶媒の回収による環境負荷軽減そして工程短縮によるコスト削減が達成された。

上述した工程簡素化法で得られた硫酸化フィブロインについて、APTT 活性でその効力を測定した結果、図 1 に記載の試作 No.C および D に示すように、従来法と何ら遜色のないものが得られた。

ウー 1－3．商品化研究

最終商品としてヒト用途潤滑剤にターゲットを絞り、抗 AIDS 製剤として処方し、これの有効性・安全性を確認した。

ヒト用途潤滑剤とは、粘膜感染の恐れのある状況下で、感染危惧部位に硫酸化フィブロイン製剤を塗布し、感染のリスクを低減させる目的で使用するもので、実際の使

用想定場面としては、性交時や尿道カテーテル等の医療器具使用時を考えている。

処方、従来からあるポリアクリル酸ナトリウムを主体とするジェル状物に硫酸化フィブロインを配合するという方法を採用した。性状や使用感は従来品と見分けがつかないレベルのもので、製造工程においても特に問題となる点は確認されなかった。

当該製剤の有効性を判断すべく、抗 AIDS 活性を測定した結果を表 3、図 3 および表 4 に示した。

組成物	試料 A	試料 B	試料 C	試料 D	試料 E
精製水	99.2	99.9	99.1	99.1	99.0
ポリアクリル酸ナトリウム	0.8	—	0.8	0.8	0.8
硫酸化フィブロイン	—	—	—	0.1	0.1
メチルパラベン	—	0.1	0.1	—	0.1

表 3 ヒト用途潤滑剤試料の組成

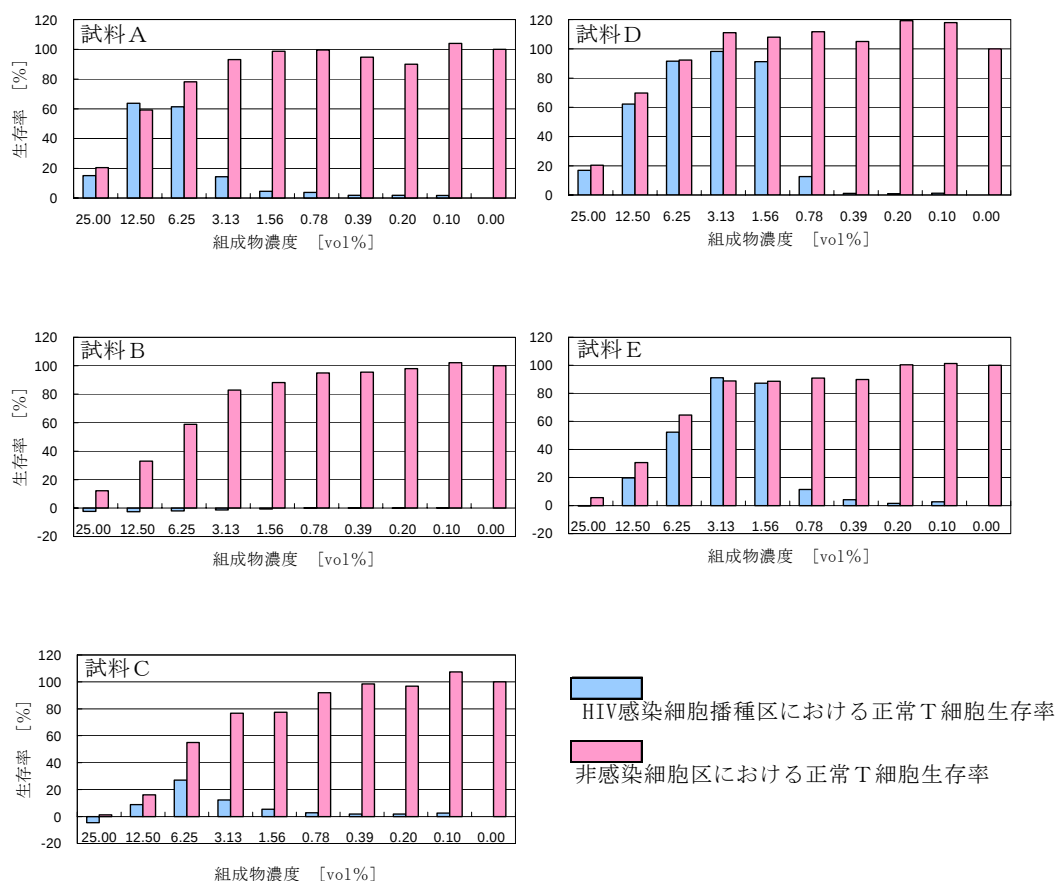


図 3 ヒト用途潤滑剤の抗 AIDS 活性

表 3 のメチルパラベンは、製剤の防腐目的で処方されている。

図 3 から硫酸化フィブロインが処方された試料 D および E は、添加量の増加と共に HIV 感染細胞播種区における正常 T 細胞の生存率が高くなり、すなわち感染細胞を播種しても他の正常細胞への伝播が抑えられていることから、抗 AIDS 活性があることが確認できた。高濃度域で HIV 感染細胞播種区も非感染細胞区も生存率が低下する傾向が観察されたが、これは処方のポリアクリル酸ナトリウムの粘度やパラベンが評価系に影響を及ぼしている為と考えられた。

試験物質	C C ₅₀	E C ₅₀	S I
試料 A	14.74	5.29	3
試料 B	7.91	> 12.5	< 1
試料 C	6.82	> 12.5	< 1
試料 D	16.51	1.09	1.5
試料 E	8.42	1.11	8

表 4 ヒト用途潤滑剤の抗 AIDS 活性

表 4 は図 3 を数値化したものであるが、硫酸化フィブロインを処方した試料 D および E は、S I 値からその有効性が評価できることがわかる。S I 値は、C C₅₀ を E C₅₀ で除したもので、当該製剤の有効性の指標とした。これは、HIV に効果を発現するのに並行して正常細胞にも傷害が生じては、製剤としては不適格であるとの考え方から設定された指標である。

当該製剤の安全性については、硫酸化フィブロイン 100ppm 配合製剤をもって、48 時間の閉鎖系パッチテストを 18 歳以上の男女計 50 名に実施した。結果、全例陰性の判定が得られ、当面の安全性については担保出来ることが明らかとなった。

ウー 2. シルクフィブロインスポンジに関する技術開発の内容

ウー 2-1. 構造制御技術開発

スポンジ構造形成のためパラメーターを操作して以下の点が明らかとなった。

- ①溶媒添加量はジメチルスルホキシド (DMSO) の場合、0.1~2%が適値である。
- ②フィブロイン濃度は、1%以上が必要とされる。
- ③フィブロインの分子量は、数万程度まで分解されてもスポンジ形成能を有する。
- ④-20℃で 8 時間以上の凍結工程が必須である。

これらの具体的な数値は、溶媒の種類によって変化する可能性があるものの、少なくともシルクフィブロイン、スポンジ化剤そして水からなる三相系の存在と、-20℃で 8 時間以上という物理的な因子が、液相中での三者の相分離を進め、最終的にスポンジ構造を形成するものと考えられた。

図 4 左はスポンジ化剤として DMSO を用いた時の保持温度と DMSO 濃度によるスポン

ジ構造形成の関係を表し、図 4 右は -20°C 下での保持時間とフィブロイン濃度によるスポンジ構造形成の様子を表している。

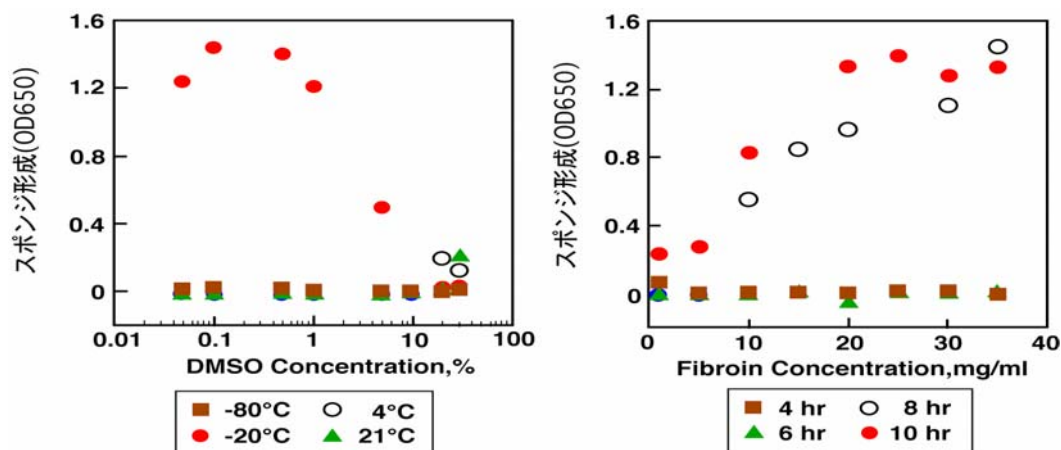


図 4 スポンジ構造形成における各種パラメーターの影響

一方、フィブロイン濃度を極端に上げた場合、スポンジ構造体の構造が大きく変化し、スポンジ化剤の種類を操作することで圧縮弾性率を制御できることも明らかとなった。

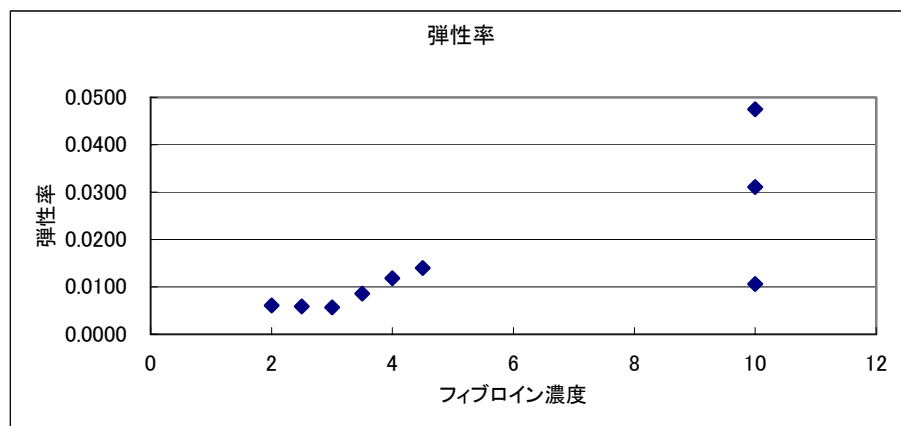


図 5 フィブロイン濃度と圧縮弾性率の関係

図 5 で表した座標のうち、フィブロイン濃度が 2～5%までの群はスポンジ化剤に 1,3 ブチレングリコール (1,3BG) を用いた例であるが、その際の構造は図 6 の様に空隙率の高いブロック状を呈し、圧縮弾性率もフィブロイン濃度に比例することが判った。

同じくフィブロイン濃度が 10%の群は、圧縮弾性率の大きい順にスポンジ化剤を「エタノール」、「エタノール、1,3BG 混」、「1,3BG」に替えたもので、その構造は

図 7 の様に稠密なスポンジ状を呈し、薄いシート状に成形出来ることが判明した。

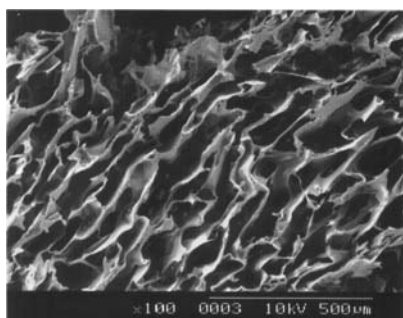


図 6 低濃度スポンジ SEM 像

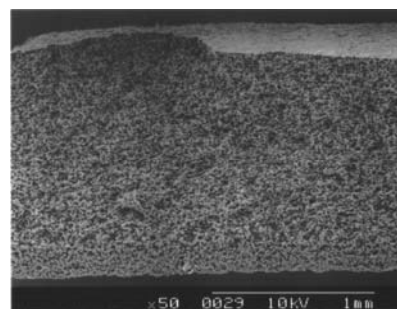


図 7 高濃度スポンジ SEM 像

これらシルクフィブロインスポンジの構造を解析するため、X線解析を実施したところ、通常の絹糸に比較して低いものの、いずれも結晶構造を持つことが判った。上述したスポンジ構造形成のパラメーターを変えたシルクフィブロインスポンジ数点全てにおいて、その結晶性に著しい違いが無かったことから、スポンジ構造形成過程においては、フィブロイン分子の結晶化が介在していることが判った。

ウー 2ー 2. 機能化技術開発

家兎の骨・軟骨細胞を用いて *in vitro*、*in vivo* 双方で培養を試み、再生した骨・軟骨再生組織の力学的成熟過程を経時的に測定し、その細胞増殖能と形質の維持能、力学的性質などを測定した。その結果、培養日数に伴う細胞外基質の産生の増加および細胞の増殖がみられ、得られた再生組織ではサフラニンO染色にて異染性が確認できた。さらに産生されたコンドロイチン硫酸量は培養日数に伴って増加し、組織学的に見られた細胞外基質の産生の増加を裏付ける結果となった。

図 8 は硫酸化フィブロインを含有させたシルクフィブロインスポンジを用いて、軟骨細胞を培養した様子を時系列に示したものである。

フィブロインスポンジ内に移植された軟骨細胞は分化能力を失うことなく増殖が可能で、強度的には正常な関節軟骨には劣るものの、培養日数に伴い正常軟骨に近づく傾向が見られた。ただ、得られた硝子軟骨様組織は部分的であったため、初期細胞接着を向上させる目的でフィブロインスポンジに硫酸化フィブロインを含有させた硫酸化フィブロインスポンジも検討したが、再生組織のフィブロインスポンジ全体への広がり確認できず、今後の課題となった。

この他、硫酸化シルクフィブロインスポンジにおける硫酸化フィブロインの含有割合と、接触角の関係、圧縮弾性率の関係、細胞付着性についても測定したが、軟骨細胞培養能を改善させるに明らかな方向性は見いだせなかった。

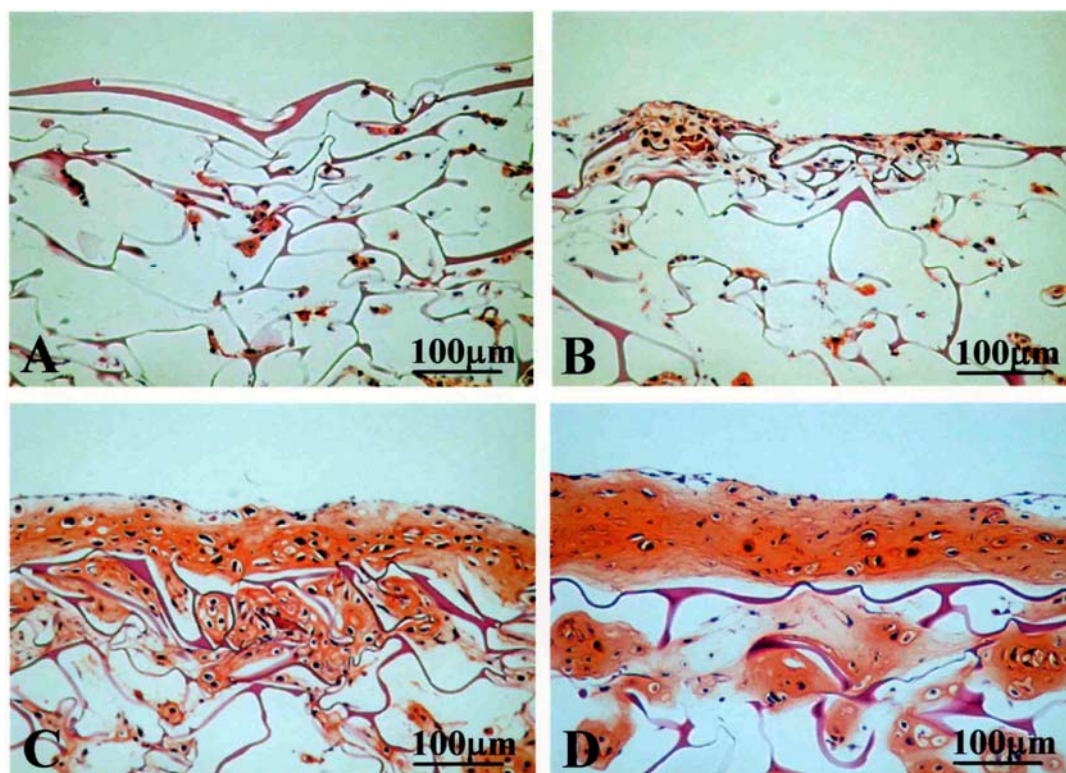


図8 硫酸化フィブロイン含有シルクフィブロインスポンジ内での軟骨細胞培養
A：培養1日目、B：同3日目、C：同14日目、D：同28日目

また前述した機能化技術とは別の方向性として、機能性成分の付与が重要であり、その添加有効成分のモデルとして界面活性剤を取り上げ、これを併用してスポンジ構造体形成に及ぼす影響を観察した。結果、スポンジ構造が変化する現象が確認されたが、そのメカニズムを解明するには至らなかった。

ウー2-3. 工業化開発

ヘルスケア製品及び医療材料への商品展開を考えた場合、用いることの出来るスポンジ化剤は安全性や過去の処方実績から、自ずと絞り込まれてくる。シルクフィブロインの濃度を変えて各種スポンジ化剤を検討し、ヘルスケア製品については1,3BGとエタノールを、医療材料についてはDMSOが好適であることを見出した。これを受け、工業化に向けてフィブロイン濃度を2～5%に設定し、開発を継続した。

凍結工程は、グループ内の冷菓の研究所および市中の冷蔵冷凍倉庫を借り受け、フィブロイン溶液内で温度下降斑が生じることでスポンジ構造が変化することや、フィブロイン溶液と空気面の界面においてスポンジ構造が異なりスポンジに「うら・おもて」が生じることなど、スケールアップで明らかになった問題点に対し、技術的ノウハウを蓄積することができた。

しかしながら、フィブロイン濃度2～5%群は、ハンドリングの問題からヘルスケア

一製品としての実用化は困難であることが判り、医療材料としては機能化技術開発が継続的に必要で直ちに実用化には結びつかないことが明らかとなってきた。その為、フィブロイン濃度 10%群で得られる稠密なシルクフィブロインスポンジへ開発方向をシフトし、工業化開発を推し進めた。

結果、次に示すような製造工程を確立し、商品化に向けてのプロモートへつなげることが出来た。

- ①シルクフィブロイン水溶液の調製
- ②濃縮
- ③スポンジ化剤添加
- ④凍結
- ⑤解凍／必要に応じ乾燥

ウー 2－4．商品化計画

商品化に際し、軟骨細胞培養床用途では事業化にまだなお多くの時間を要することから、先述のウー 2－3 で得られた稠密なシルクフィブロインスポンジをシーズに検討を進めた。その結果、エステティーク業界で頻用されるシートパックやフェイシャルマスク施術に用いられる基材としての事業化が適しているとの結論に達し、当該方面への商品化を進めることとした。

同市場は、ドラッグストアなどで販売されるセルフ市場向け商材とエステサロンなどで施術を含んだ形で提供される業務用市場向け商材に大別される。本事業で得られる稠密なシルクスポンジは、その製造コストを考慮すると業務用市場を対象とした方が有利であるが、化粧品メーカー処方担当者へのシルクスポンジの認知や新規基材としての易採択性を考慮し、敢えてセルフ市場から商品化に着手することとした。

ウー 2－5．商品化開発

フィブロイン濃度 10%群で得られたシルクフィブロインスポンジは、稠密な構造であるため構造体としての強度に優れ、シート状に成形してもハンドリングに難がない。この特徴を活かして、得られたフィブロインシートをフェイシャルケアで使用されるシートパックの基材として展開すべく、試験を実施した。

安全性については、日本産業皮膚衛生協会の皮膚貼付試験で判定した。健常成人 20 名を対象に行った 24 時間貼付の開放法貼付試験結果は、肉眼判定では全く問題なく、顕微鏡判定で皮溝の陥凹が認められる事例がわずかにあるとする所見結果であり、商品化の第一段階は充分クリアできたと考えている。

効果については、乾燥肌の女性 10 名を対象に、4 週間の連用による皮膚保水性の試験を実施した。保水性は、Novameter を用い、皮膚の水分量と連動しているとされる電気伝導度の測定値で判定した。

その結果を表 5 に示した。

測定時期	開始時	2週間後	4週間後	開始時	2週間後	4週間後
試験対象	フィブロインシート			対照		
平均値	93	119	125	93	92	92
標準偏差	1.2	2.4	6.6	1.3	1.0	1.2
保水効果	—	29%	36%			
試験対象	コットンパフ			対照		
平均値	93	130	202	93	92	92
標準偏差	0.6	15.5	29.4	1.1	0.7	0.7
保水効果	—	41%	120%			

表 5 保水性試験結果

試験方法は、シートパック用化粧水に求められる①ノンアルコール、②施術中にシートが顔からずり落ちない程度の粘性の付与、③安全性・防腐性の担保、の三点を有した化粧水を使用し、化粧水含浸フィブロインシートと無施術区の比較試験とし、都度被験部分の電気伝導度を測定する手法を採った。保水効果は同一ステージの試験区値を対照区値で除して表した。結果、フィブロインシート施術区は、無施術区に対して約 40%の肌水分量の上昇が確認され、効果のバラツキも少なく非常に良好なものであった。対照として実施した化粧水含浸コットンパフと無施術区の比較試験では同様に 120%の上昇が認められた。これはコットンパフがフィブロインシートに比較して化粧水を保持しやすい、換言すればフィブロインシートの化粧水蒸散能力がコットンパフに比較して大きいことにあると考えられる。このような特徴は、今後の研究でよりコットンパフに近づけることや、当該性質を利用しメリットとして訴求できるような商品づくりをすることで、対応できると考えている。

エ．考察

エー 1．硫酸化フィブロインについて

硫酸化フィブロインが抗 AIDS 活性を持ち、製剤化してなおその効力を保持していることが明らかとなったことで、当該製剤の商品化が可能となった。

加えて、製造に際し工程簡素化などの目処がついたため、工業生産への道筋も整った。

エー 2．シルクフィブロインスポンジについて

工業的にフィブロインシートを製造する手法を確立し、ヒトを用いた安全性の確認と保水効果が確認出来たことで、当該製品の商品化が可能となった。

医療材料用途への展開は、機能化技術開発の進展と数多くのデータ採取が必須であ

るが、硫酸化フィブロインとの併用も含め、その将来性は多分にあると考えられた。

オ．まとめ

オー１．硫酸化フィブロインについて

硫酸化フィブロインを利用したウイルス感染阻害剤については、その作用評価、工業化そして商品化について概ね作業を終えることが出来た。商品化についてはプロトタイプも出来上がり、一応の安全性、効果についても評価が完了している。従来からヒト用途潤滑剤を製造・販売しているメーカーとの共同研究契約も新たに締結し、「出口条件」の整備も進んでいる。

今後の課題としては、事業化に際し当該製剤をどういったカテゴリーで販売していくかという点にある。

薬効を謳わずにあくまでも補助成分のひとつとして処方し展開するか、薬事法の範疇で臨床試験を実施し必要なエビデンスをとりつけて展開するのか、の判断が求められる。企業としての費用対効果を考えた時、その決断は非常に難しい点である。医療材料への展開には、この硫酸化フィブロインのみならず、本事業で中断したシルクフィブロインスポンジを用いた軟骨細胞培養床についても慎重を期した対応が必要である。皮膚や粘膜への使用や、体内への埋設といった施術を念頭に置いた場合、臨床試験は不可欠であると考えられる。具体的な手法等については、現在全く調査に着手しておらず、本事業完了後、継続して関係方面と連携の上、さらに推し進めていく必要がある。

硫酸化フィブロインの抗 AIDS 能についてみれば、エイズ予防といった世界規模の問題に対し、当該製剤の疫学調査や販売網の確立など一企業への負荷としては、非常に大きいものといわざるを得ず、今後はこのような点について、関係機関への働き掛けも重要であろう。

一方、抗 AIDS 効果のみに囚われず、上述した商品展開とは異なる商品群を見出し、量産化によるコスト低減を求める必要性も痛感している。

オー２．シルクフィブロインスポンジについて

オー２－１．ヘルスケア製品として

基材としての開発は概ね完了し、安全性と効果についても立証されたことから、実際の最終製品への作り込みが事業化の成否を握っている。現在、グループ内の化粧品企画・開発・処方の各部門と鋭意、商品化に向けた作業を進めており、さらなるブラッシュアップを目指している。また、流行に左右され易いカテゴリーである当該製品は、上市にむけて的確な時期を見極めて展開することが肝要である。その為にも市場動向を常にリサーチし、時機を逸しない販売戦略を構築する必要がある。

オー２－２．医療材料として

当初目論んだ軟骨細胞培養床への展開は、事業化の観点から一時中断することとな

った。しかしながら本事業を通して構造制御技術や機能化技術について多くのノウハウを得ることが出来、必ずや近い将来、事業化出来るものと確信している。

カ．特許出願、学会発表等

(ア) 工業所有権

「機能性潤滑剤」出願準備中

「シルクフィブロインからなる多孔質体とその製法」(仮称)出願準備中

(イ) 学会発表

玉田ら(2002)シルクフィブロインスポンジの作製と再生軟骨素材としての検討 高分子討論会(九州工業大学戸畑キャンパス、平成14年10月2日～4日)

玉田ら(2002) Characterization of Silk Fibroin Sponge for a New Cartilage Regeneration Scaffold 5th International Meeting of Tissue Engineering(神戸国際会議場、平成14年12月8日～10日)

Tamada, Y. (2003) Sulfation of silk fibroin by sulfuric acid and anticoagulant activity J. Appl. Polym. Sci., 87, 2377-2382

玉田 靖、園部正人、富田直秀、青木秀之、原田恭治(2003) 新しい細胞培養担体としての絹フィブロインスポンジの検討ー作製条件による細胞増殖挙動の変化ー 第25回日本バイオマテリアル学会予稿集、259

Y. Tamada, M. Sano (2003) Influence of sulfated silk proteins on blood coagulation factors and blood cells Joint Meeting of Japanese and Korean Societies of Sericultural Science, 71

玉田 靖、佐野将也、丹羽和紀、今井利夫(2003) 硫酸化絹タンパク質の抗血液凝固機序 高分子学会予稿集、52、4117

草木(2003)シルクの可能性 鶴岡シルクサミット2003(鶴岡タウンキャンパス)

草木(2003)シルクの商品開発 2003 Silk Summer Seminar in OKAYA 第56回製糸夏期大学(ホテル岡谷)

中島(2004)硫酸化フィブロインの抗ウイルス活性および実用化の可能性 平成15年度製糸・昆虫機能研究全国連絡会(農業生物資源研究所大わし地区)

Yasushi Tamada, et al., (2004) Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity. Biomaterials, 25: 377-83.

Yasushi Tamada, et al., (2004) Sulfation of silk sericin and anticoagulant activity of sulfated sericin. J Biomater. Sci. Polymer Edn, 15: 971-80.

Yasushi Tamada, Naohide Tomita (2004) "Preparation and Characterization of Silk Fibroin Sponges as Cell Support", 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia.

玉田 靖、園部正人、原田恭治、富田直秀(2004) 硫酸化フィブロインによるシルクスポンジの改質と軟骨細胞培養 蚕糸学会第74回学術講演会講演要旨集、95

- 玉田 靖（2004）繊維材料のバイオテクノロジー 繊維学会夏季セミナー講演要旨集
- 玉田 靖（2004）絹の結晶を利用する、絹の化粧品、生体材料への利用 応用物理学会結晶工学分科会年末講演会予稿集、27-31
- 玉田（2005）軟骨再生軟骨素材開発を目指したフィブロイン改変技術の開発 平成16年度蚕糸・昆虫機能研究全国連絡会（農業生物資源研究所大わし地区）