

真の意味での人工皮膚はいまだに開発されていない。従って、真皮を完全になくした皮膚の欠損を治療するには自家移植しかない。もちろん自家皮膚は供給に限りがある。これを補う最短のものとして培養皮膚がある。技術的な進歩は確実に行われているものの生着率は高いものではなく安定した培養法の確立にはいまだ時間がかかる、かつ限りがある。

そのため、より優れた人工皮膚を要望する声が医療機関からあがっている。真皮を再生させるためには、やはり単一の材料からではそれを期待するのは難しい。特に医学及び材料科学の進歩により、人工皮膚として生体環境との接触時間を長くするような材料が望まれている。すなわち生体環境下での材料の運命についても重大な関心が向けられ、材料機能の持続性をコントロールすることの重要性が認識されるようになった。一般に、生体材料と言え化学的側面が中心であるとの認識が強く、材料力学的な性質に関しては単に十分な強度を持ち、壊れなければよいとの考えが支配的であった。しかし、生体材料は長期にわたり劣化しないで十分適切な機械的性質を発揮し生体活動を維持しなければならない^{4, 17}。従って、機械的問題も化学的問題に劣らず重要であり、生体材料の設計に於ては、十分に注意する必要がある⁴。従って、今後の人工皮膚の研究としては、生体環境下において長期間にわたり劣化しない生体材料の開発が主流となっていくものと思われる。また、人工皮膚でも、創面にあてて、血液、リンパ液などの体液、筋肉、血管などの生体組織と常に接触し、できれば創面上で生分解し共に再生が促進されて真皮及び表皮が生成する人工皮膚の開発が望まれる。一方、このような高度な人工皮膚だけでなく真皮の残った創の良好な修復は重要な課題でもある。この効果は材料によってかなり異なる。即ち、材料が与える真皮への活性化が鍵となる。このため、皮膚の細胞にとって、生体適合性の高い材料の開発が、第一のキーポイントとなる。

3 絹タンパク質の特性

私達に馴染みの深い生体高分子の中で絹タンパク質をバイオ素材として用いる長所を考えてみたい。コラーゲン、キチンなどの生体高分子あるいは他の有機材料と比べ絹タンパク質の最大の特徴は次のようにまとめられる。

第一に絹タンパク質が優れた生体適合性を有していることである。生体適合性とは、材料が生体組織と接触したとき、生体側はもちろん、材料側にも不都合な副反応を引き起こさず、目的とする機能を果たす性質である。つまり生体適合性は代表的な生体反応である(1)血液反応、(2)免疫反応及び(3)組織反応と、材料側の反応である(4)物理的及び化学的の反応に関する¹⁸。従って、フィブロインをバイオ素材として生体に適合するに当たり、材料と生体組織界面の諸現象がまず問題となる。

(1) 免疫反応性 生体に触れるバイオ素材と生体間の反応としては、刺激反応と免疫反応がある^{19,20}。刺激反応はフィブロインとその界面との物理的反應で一過性のものである。これに対し免疫反応は長期にわたり生体に触れるためアレルギー反応を起こす可能性がある。平林ら²¹は、まずフィブロインの生体適合性実験の手始めに免疫性試験を行った。フィブロインの免疫性試験としては即時型反応の受身皮膚アナフィラキシー反応(PCA)及び遅延型過敏性の遅延型アレルギー反応(DTH)がある。PCA反応実験ではフィブロインは抗原刺激に対して良い免疫機能を示した。また、遅延型アレルギー反応実験に於ては、コラーゲン溶液を使うと、アレルギー反応を起したが、 β 化フィブロイン溶液を使うと、アレルギー反応は起こらず抗原性を弱める結果を示した。

(2) 血液反応性 坂部ら²²はメタノール及び蟻酸処理により β 化した絹フィブロインの抗血栓性を成犬を用いた*in vivo*の動物実験により検討したところ、静脈内留置2週間後の結果より、抗血栓性を有することを明らかにした。

(3) 組織反応性 特に絹タンパク質を人工皮膚として用いるとき、材料と生体との間の組織反応性が問題となる。その中の細胞の粘着・増殖について箕浦²³及び塚田ら²⁴は異なる側面から検討した。マウス由来の繊維芽細胞L929を用い、試料膜の表面上に10%の子ウシ血清を含んだ細胞浮遊液(約10万/ml)を加え、所定時間(50時間)培養してフィブロイン膜上での細胞の付着・増殖が良好な状態になることを示した。細胞の付着性が良好であると言われているコラーゲンに匹敵する優れた細胞付着・増殖能力を持つことが明らかとなった。絹表面での細胞付着及び増殖性が良いため、火傷などの患部の治癒を促進する働きが期待される。

(4) 材料の抗劣化性 平林ら²⁵も絹糸を生体に埋め込み絹タンパク質の劣

化について検討した。その結果、犬及びラット体内に埋め込んだエタノール処理絹糸は、最初、機械的性質の低下を示したが、4ヶ月位からほぼ一定値を保持するようになった。また、熱分析結果も化学的劣化（主鎖分解、側鎖分解など）を起こしていないことを示した。

第二に人工皮膚に望まれる主な機能性として水蒸気透過性がある。絹繊維の吸湿率は他の材料と比べて高いため水蒸気の透過性も良好なものと期待できる。箕浦ら²⁶はメタノール処理による不溶化時間3分、60分の試料膜の水分透過量は、それぞれ7.9 mg/cm²/時、4.9 mg/cm²/時であるとした。これはコラーゲンの2~3 mg/cm²/時に比べ優れている²。

第三に分子側鎖部分には化学反応性に富む官能基が多いため化学修飾加工が可能である。絹タンパク質は微細構造的にみると、分子の引き揃え状態が良く疎水性の結晶領域と親水性を示す乱れた分子鎖からなる非結晶領域とから構成されている。絹タンパク質の結晶形態には α 型及び β 型が存在すると言われている⁴⁶。 α 型は α -helixと混同し易いので、Kratky⁴⁷の命名したSilk Iと、 β 型はSilk IIと呼ばれている。しかし、Silk I、Silk IIという言い方は馴染みにくいため、本論文では α 型と α -hilexとを区別して、 α 型（Silk I）及び β 型（Silk II）を使うことにする。また、非結晶領域には分子側鎖が長くて化学反応に富むリジン、アルギニン、ヒスチシン、グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸残基が多く含まれる。こうした部位の化学反応性を活用し、生化学的な機能を持つ第2物質を共有結合させることにより分子レベルで材料のデザインが可能となる。

第四に結晶性、溶解性、分子形態及び分子凝集性などの微細構造が溶媒処理、延伸、熱処理などの操作で自由に変えることができる。かつて味沢²⁷は再生フィブロインの分子形態は溶媒であるCaCl₂の濃度により異なることを報告している。また、フィブロインを加水分解するとき、その分子量及び分子形態は溶媒濃度と処理時間により左右される。また、絹フィブロインの乾燥条件によりその分子形態は異なる。すなわち、フィブロイン溶液を-20℃以下或は-2~50℃の範囲で乾燥させると α 型が得られるが²⁸⁻³⁰、50℃以上或は-20~-2℃の間で乾燥すると、 β 型となる。また、極性溶媒で処理しても β 型に転移する³¹。Happyら³²は β 型の増加はrandomからの転移によるものとしている。

これに反し α 型構造は不安定なため、 α 型を示す試料は延伸により、容易に β 型に転移するとの報告もある³³。

4 本研究の目的

本論文で扱う絹フィブロインも天然タンパク質の一つであり、生体側の血液反応、組織反応、免疫反応及び材料側の物理・化学的実験から、他の生体高分子と比べ優れた生体適合性を備えている。そして、絹フィブロインは種々の膜、再生繊維、粉末及び固形物に成型しやすい。これらの事実からバイオ素材としての絹フィブロインの応用には将来性がある。つまり、絹タンパク質の持つ特性から見れば絹タンパク質が持つ新たな機能性が見いだされ衣料素材としての利用はもとより、工業素材、医療素材として絹を利用する技術がさらに展開するものと期待される。これらのうちで、絹タンパク質の特性を生かして高度な人工皮膚が開発される可能性は十分に有り得る。そのためには、絹タンパク質の化学反応性を詳細に追求し、構造と物性とに関わる研究を更に深化させつつ実用性のある素材へのアプローチを進めることが不可欠であろう。

ところで、いままで非衣料分野における絹タンパク質に関する研究には、フィブロインの酵素固定化担体膜³⁴としての応用、絹の食品化^{35,36}、化粧品³⁷、固形化などがある。これまでは、絹タンパク質の構造に関する研究の一助として、その製膜法、キャスト条件、物理化学的処理による分子形態への影響等が主体であった^{28-33,38-40}。しかし、従来絹フィブロインが縫合糸として以外、優れた生体適合性を有しながら、フィブロイン膜が実用化されなかったのは、その力学的性質の欠如にある。そこで、本研究では、まず人工皮膚の目的及び要件から考えて、人工皮膚として絹を使うときどのような性質が要求されるか考えてみる。

第一は β 化である。これは β 化しないと、上述の生体適合性が得られないからである。つまり、絹フィブロインの β 化によりその組織適合性、非抗原性、非炎症起因性及び治癒促進効果などの生化学的機能が向上する。

第二として物理的には、次のような生体皮膚に近い物性値^{17,2}が要求される。

- (1) 強度 24 kg/mm^2 及び伸度 60% (乾燥時)
- (2) 強度 4 kg/mm^2 及び伸度 110% (湿潤時)

(3) 20~40 mg/cm²/時 (透湿性)

(4) 適当な柔軟性

本研究は、いかにこれらの要求にアプローチするのかについて検討を進める。一般的に絹フィブロインのβ化が進めば結晶性が良くなるため、膜の強伸度も向上するという認識が強い。これはフィブロイン分子の配向度と結晶化度をあげれば、優れた機械的性質を持つ繊維が得られることから類推される。またフィブロイン分子鎖の柔軟性はアミノ酸組成の影響を受ける。従って、絹フィブロインの物理化学的性質はそれの持つα、β及びアモーフラスという分子形態の割合により大きく影響を受けるため、期待される性質をもつフィブロイン膜を作るためには、分子レベルの特性からの影響の把握がキーポイントとなる。次に絹フィブロインの分子レベルの特性を制御する因子を挙げてみる。

(1) フィブロインを溶かす条件 (溶媒組成、溶解時間及び温度)

(2) 乾燥条件 (温度、湿度、速度)

(3) 物理的及び化学的な処理 (有機溶媒浸漬、延伸、加熱など)

(4) 機能性高分子の導入など

そこで、本研究は人工皮膚のような膜状の生体素材としての応用を考え、生体適合性に優れた絹フィブロイン膜を作製するため、まず絹フィブロイン膜の物理的性質に及ぼす分子レベルの要因を解明することにした。そのためフィブロイン分子形態の定量的評価法を確立したうえで、絹フィブロインキャスト膜の性質に及ぼすフィブロイン繊維の溶媒温度及び乾燥条件に的を絞り実験を行った。フィブロイン繊維を溶かす温度が低くなるに連れフィブロインのβ化率は増加するので膜の強度は向上する。しかしこのβ化率が30%以下の膜は水に溶けるため、なおβ化率を進める必要がある。従って、乾燥速度を下げ、β化を促進し、β化率が30%以上の膜を作製した。ところが、膜の強伸度は逆に低下した。

そのため、次にキャストフィブロイン膜を作製し、エタノール処理による急速β化の効果について研究を進めた。エタノール処理によりフィブロイン分子鎖は収縮し、クロスβとなり凝集するため膜の物性は低下した。さらにキャスト膜の延伸について検討した。延伸ではアンチパラレルβ構造が形成されるため膜の生体適合性及び強度の向上が見られた。しかし、物性の目標値にはいまだ及ばない。キャスト膜の延伸は不均一であるため、分子鎖の切断を伴うからである。し

かも、いずれの方法でも膜の吸水性、柔軟性は低下した。

そこで、物性から考え、高度な人工皮膚を開発するためには、単一の材料からでは相当難しいことが分かった。水溶性ポリマーの改質にブレンド法が適用できれば、その取扱上の簡便さから、工業的にも非常に有利である。1957年 Smithら⁴¹はポリアクリル酸とポリエチレンオキシドとのブレンド物について検討し、耐熱性が向上することを見いだした。一方、ポリビニルアルコール（PVA）については、大豆タンパクやカゼイン⁴²、コラーゲンやゼラチン⁴³とのブレンドに依り、染色性の向上が計られた。また、PVAとカルボキシメチルセルロースやメチルセルロース等他の水溶性高分子との相溶性及びブレンド物の皮膚の性質について検討され、両成分相溶性がブレンド物の皮膚の性質を大きく支配することが明らかにされた⁴⁴。しかしながら、フィブロインのブレンド物の物性と微細構造との関係を分子レベルでの検討した例は、奈倉ら⁴⁵の報告に過ぎず、新しい観点からの研究が期待される。そこでわれわれは天然タンパク質である絹フィブロインの分子形態も適当な機能性ポリマーの導入により期待される方向へもって行くことができるのではないかと考えた。言い替えば、フィブロインは他の生体適合性ポリマーの添加により、その優れた生体適合性を弱めずに高度の人工皮膚の開発が期待できる。従って、他の生体適合性に優れた生体材料（アルギン酸ナトリウム、キトサン）との複合化により、両成分の相溶性およびその複合膜の物性について検討を行った。中でもキトサンを混合したとき、相溶性が良く網目構造及び β 構造の形成が促進されたため、従来の人工皮膚より優れた物理的性質を有する複合膜を作製することができた。

文 献

1. 江藤 譲：「皮膚移植への道」、共立出版株式会社、p17(1986)。
2. 桜井 靖久：化学総説、No.21、pp233-249(1978)。
3. 木船 紘爾：織学誌、Vol.47、146(1991)。
4. 高久田 和夫：織学誌、47、143(1991)。
5. 高久田 和夫他：日本機械学会バイオエンジニアリングシンポジウム前刷集、173(1990)。
6. KT-80、研究会、7、142(1981)。
7. 岸本三郎ら、基礎と臨床、17、3804(1983)。
8. M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti: Nature, 30, 309(1990)。
9. 戸辺 成四郎、小林 一清、赤池 敏宏：織学誌、47、133(1991)。
10. I. Y. Yannas, J. Biomed. Mater. Res., 14, 65(1980)。
11. I. Y. Yannas, J. Biomed. Mater. Res., 14, 107(1980)。
12. J. F. Burke: Ann. Surg., 194, 413(1981)。
13. 木船 紘爾：機能誌研究会誌、27、43(1988)。
14. 大浦 武彦：西日本皮膚科、50、712(1988)。
15. 大島 良夫：西日本皮膚科、48、1119(1986)。
16. 中島 正治：最新医学、40、1958(1985)。
17. J. Black: "Biological Performance of Materials", Marcel Dekker, New York, (1981)。
18. 赤池 敏宏：高分子、33巻、2月号、110(1984)。
19. 石坂 公成：免疫学 4、山村 雄一 監修、中山書店、p.113(1982)。
20. 石坂 公成、林 秀雄、石坂 照子、吉永 秀、宮本 昭正：免疫科学 8 アレルギーと炎症、岩波書店、p.141、(1985)。
21. 平林 潔、岩田 光夫、梁 傳信：蚕学誌、投稿中。
22. H. Sakabe, H. Ito, T. Miyamoto, Y. Noishiki, Wanshik Ha: Sen-i Gakkaishi, 45, 487(1989)。
23. 箕浦 憲彦、相羽誠一、富士原行彦、田中和宏、塚田 益裕：繊維学会シンポジウム予稿集、A-29(1988)。

24. 塚田 益裕: 蚕糸技術, 140, 39(1991).
25. 平林 潔、武居 正和、梁 傳信、野一色 泰晴: 蚕学誌、投稿中.
26. N. Minoura: M. Tsukada, M. Nagura: Biomaterials, 11, 430(1990).
27. 味沢 昭義: 日蚕雑, 39, 139(1970).
28. 小西 孝、黒川 昌孝: 繊維学会誌, 23, 64(1967).
29. 馬越 淳、笠井 民、角戸 正夫: 高化, 30, 649(1973).
30. J. Magoshi, Y. Magoshi, S. Nakamura, N. Kasai, M. Kakudo: J. Polm. Sci., Polm. Phym. Enn., 15, 18(1977).
31. 塚田 益裕: 繊維学会誌, 41, 265(1985).
32. F. Happy, A. J. Hyde: Nature, 165, 196(1950).
33. 馬越 淳: 高論, 31, 765(1974).
34. M. Demura, T. Asakura: Biotech. and Bioengi., 33, 598(1989).
35. K. Hirabayashi, M. Watanabe, M. Suzuki: Soc. Fiber Sci. Tech., 45, 236(1989).
36. K. Hirabayashi: Bio-Industry, 6, 749(1989).
37. 中山 大樹 (和光堂 KK)、特公昭、45-28903(1970).
38. 平林 潔、石川 博: 繊維学会誌, 24, 449(1968).
39. B. Lotz, H. D. Keith: J. Mol. Biol., 61, 201(1971).
40. 馬越 淳、上山澄江、馬越芳子、高橋和夫、杉山かおる、中村茂夫: 高分子学会予稿集, 31(8), 1897(1982).
41. K. L. Smith, A. E. Wishow, and D. E. Petersen: Indust. Eng. Chem. 51, 1361(1959)
42. 増尾 富士雄、山岡憲一、川上 博、溝口 英雄、特公昭: 33-210(1958)
43. 宇津 尾明: “繊維の形成と構造の発見 III”、化学増刊、50, 化学同人、京都、p131(1971)
44. 長野 浩一、山根 三郎、豊島 賢太郎: “ポパール”、改訂新版、高分子刊行会、京都、p184(1971)
45. 奈倉正宣、土屋善裕、山崎昭徳、石川博: 高分子論文集、41, 301 (1984)
46. 清水 正徳: 蚕糸試報、10, 475(1941)
47. O. Kratky, E. Schauenstein, A. Sekora: Nature, 165, 319(1950)