

第4号

# 纖維研究所研究報告

2000

財団法人衣笠会発行  
THE KINUGASA-KAI FOUNDATION

Published  
by  
KINUGASA TEXTILE RESEARCH INSTITUTE  
KYOTO, JAPAN

# 目 次

## I. カイコの Cypovirus ゲノムが DS-Nh マウスの扁平上皮癌の 増殖に及ぼす影響 - - - - 古澤壽治・森 肇・岸本嘉夫・林 幸之

材料および方法 - - - - -	3
実験結果 - - - - -	7
考察 - - - - -	14
引用文献 - - - - -	16

## II. 繭の新規用途開発に関する研究

### 周年生産繭からのセリシンおよび絹フィブロインの粉末化と 炊飯時の添加 - - - - 松原藤好・山崎 隆・三好 明・小村谷貴子

1. 生繭の周年生産 - - - - -	21
2. 切開繭からのセリシンの抽出と水溶性フィブロインの粉末化 および炊飯時におけるセリシンの添加 - - - - -	24
3. 文献 - - - - -	29

カイコの Cypovirus ゲノムが DS-Nh マウスの扁平上皮癌の増殖に及ぼす影響

古澤寿治\*・森 肇\*・岸本嘉夫\*\*・林 幸之\*\*\*

Effect of Silkworm Cypovirus Genome on Behavior of Squamous Cell Carcinoma  
Transplanted in Non-hair Mouse

by

Toshiharu FURUSAWA\*・ Hajime MORI\*\*・ Yoshio KISHIMOTO\*\*  
and Yoshiyuki HAYASHI

---

現在：\*京都工芸繊維大学・繊維学部

京都市左京区松ヶ崎御所海道町

\*\*塩野義製薬株式会社・植物薬品部

\*\*\* (財) 衣笠会 繊維研究所

古澤寿治\*・森 肇\*・岸本嘉夫\*\*・林 幸之\*\*\*

はじめに

一般的に、ウイルス抑制因子と呼ばれているインターフェロン (Interferon, IFN) は、ウイルスが動物細胞に感染後に、次に感染してくるウイルスの増殖阻止という干渉作用を惹起する細胞因子として紹介されてきた<sup>1)</sup>。IFN は細胞がウイルスによって感染を受けると、他の細胞へウイルス抵抗性が賦与されるように働きかける液性因子である。これらウイルスの相互間での干渉には、同種干渉現象、異種干渉現象および欠損干渉粒子が関係する自己干渉現象が広く知られている<sup>2)</sup>。

IFN による抗ウイルス作用の方程式については分子レベルでの詳細な研究がある<sup>2,3,4,5)</sup>。IFN はウイルスの増殖抑制のみならず、実に多面的生物活性を有している<sup>2,6,7,8)</sup>。なかでも、抗腫瘍作用については、細胞増殖抑制作用として見出されたもので、この作用は正常細胞より悪性腫瘍細胞に対してより強い活性を有している<sup>2)</sup>。この現象は腫瘍に関係する遺伝子の活性とその発現を阻害している<sup>2)</sup>。すなわち、IFN は腫瘍細胞に対して、直接の増殖抑制活性を発揮し、該細胞の膜表面の腫瘍特異抗原の発現を強める。さらにこの事実は、腫瘍に対する自己防衛の機構を目覚めさせ、腫瘍の特異抗原に対する免疫応答が発動され、抗体産生、キラーT細胞の誘導、マクロファージの活性化などにより、間接的作用として、腫瘍細胞に対する傷害性の亢進が認められる。もちろん、IFN の産生に係わるナチュラルキラー (NK) 細胞も活性化され、その傷害性を高める<sup>2,10,11,12)</sup>。

細胞がウイルスに感染されると IFN 産生が誘導されるが、この IFN の誘導物質 (インデューサー) として、ほとんどすべてのウイルス<sup>2)</sup> は云うにおよばず、様々なインデューサーが知られている<sup>13)</sup>。RNA ウイルスは DNA ウイルスより、IFN 誘導能は高く<sup>2,13,14)</sup>、特に二本鎖 RNA ゲノム (Double-stranded RNA; dsRNA) 複製型 dsRNA (Replicative intermediate RNA; RI-RNA) 加うるに合成 dsRNA (PolyI:C)<sup>15)</sup> は IFN の最も強力なインデューサーであり、PolyI:C は工業的規模でインデューサーとして使用されていることは、周知の事実である<sup>13,14)</sup>。IFN は抗腫瘍剤と

して広く使用されているが、その種特異性、抗体の出現、副作用等、種々問題が山積している。この IFN に代わり、強力なインデューサーである PolyI:C の利用、また前者との併用も試みられているが、その効果において、トレランス現象および PolyI:C の毒性（安全性）が問題として残されている<sup>13,14)</sup>。

この dsRNA の存在を自然界にむけると、dsRNA をゲノムとするウイルスは動物界に広く分布している。その存在は昆虫においても、実に 200 種に及んでいる<sup>17,18,19)</sup>。なかんずく、カイコ (*Bombyx mori*) においては細胞質多角体病ウイルス (Cytoplasmic polyhedrosis virus; CPV) のゲノムである<sup>20,21)</sup>。本ウイルスは、レオウイルス科 (Reoviridae) の Cypovirus 属に分類されている<sup>22,23)</sup>。事実、レオウイルスから得られた dsRNA には IFN に対する強力な誘発能を有することが知られている。このカイコの CPV は感染細胞中に分子量約 30K のポリヘドリン (Polyhedrin) と呼ばれる蛋白質の結晶状会合による多角体構造 (封入体) が形成され、内部に多数のウイルス粒子を包埋している<sup>17,18)</sup>。この構築物は多角体の名称が与えられているが、ウイルスが多角体の姿で存在する限り半永久的に生存することができる<sup>17,18)</sup>。このウイルス粒子中には 10 本に分節した dsRNA がゲノムとして内臓されている<sup>17,18,19)</sup>。これらの dsRNA の分子量は  $0.2-4 \times 10^6$ K の範囲にあり、10 本に分節 RNA の合計は、 $13-22 \times 10^6$ K である<sup>21)</sup>。この分子量は PolyI:C の IFN 誘発に必要な大きさを満足させている<sup>14)</sup>。また、本 dsRNA は RNase に対して抵抗性であり<sup>24)</sup>、生体内における酵素分解から回避できるものと思われる。さらに、この dsRNA は家畜化されたカイコから容易に、かつ多量に得ることができる<sup>25)</sup>。

これらの見地から、自然界に存在するカイコの CPV-dsRNA が、いかに IFN の誘発に関与し、結果として抗腫瘍活性に帰着するかについて、DS-マウス由来の Non hair mouse (Nh-mouse) に自然発生した、可移植性、高転移性扁平上皮癌を Nh-mouse に移植し、その増殖性および各種臓器への転移像について追及し、その結果について報告する。

## 材料および方法

### I. カイコ CPV-dsRNA の調製<sup>25)</sup>

CPV 感染蚕児の中腸を 30 mM Tris-25mM KCl 緩衝液 (pH 7.5) (以下 TK 緩衝液

と略す) 中で磨碎し、ついで遠心分離 (1,200g、10min、5°C) し、沈殿 (多角体分画) を得た。この多角体分画に5倍容のTK緩衝液を加え、攪拌後、遠心分離 (1,200g、10min) し、再度、多角体分画を得た。この操作を数回繰り返し、多角体の粗精製標品を得た。次いでTK緩衝液で飽和したフェノール20mlを加え、氷冷下で30min攪拌した。この懸濁液を800g、10min遠心分離し、上清 (水層) に再び水飽和フェノール20mlを加え10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 2mlを添加し、攪拌後、遠心分離した。この上清に3倍容の冷エタノールを加え、-20°C下に一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離 (800g、10min) することによって採取し、この沈澱を冷エタノールで2回洗浄した。

次に、本沈澱部分のdsRNAを精製する目的で、沈澱物をSSC (0.15M NaCl + 0.015M sodium citrate) に溶解し、この溶液に等量の4M LiCl (Lithium chloride) を加え、5°C下で一昼夜放置後、遠心分離によって上清を得た。さらにこの上清に冷エタノールを加え-20°Cで一夜放置した。生じた沈澱を遠心分離によって集め、窒素ガス下で乾燥し、再び10mM Tris, 1mM EDTAを含む10mM TK緩衝液 (pH 7.4) に核酸量が1mg/mlになるように溶解した。さらに、dsRNAを精製するため、ポリエチレングリコール (PEG) 処理した。すなわち核酸溶液5容に対し20% PEG-2.5M NaCl 3容を混合し、氷冷中で1時間放置し、次いで遠心分離によって沈澱を集め、70%エタノールで2回洗浄した。窒素気流下で本沈澱を乾燥した後、蒸留水で1mg/mlになるよう溶解し、dsRNA標品とした。

なお、本実験に用いたdsRNAの収量は、CPV感染中腸5gから核酸量として約50mgが得られたことを附記する<sup>25)</sup>。

## II. 実験動物および高転移性腫瘍

1. 本実験に用いたマウスは、1976年、塩野義製薬株式会社、油日ラボラトリーズで育成されたシオノギ「DSマウス」由来の無毛マウス (Non-hair mouse, Nh-mouse) であり、いわゆるヌードマウスとは異なる有胸腺動物である (図1)。

### 2. 高転移性扁平上皮腫瘍株

前述のDS-Nh mouseの皮膚に自然発生した腫瘍の初代継代担癌動物において、移植腫瘍細胞が肝臓および脾臓に転移することを認めた (1980)。その後、本腫

瘍は転移を好発する腫瘍株として樹立した (図2)。



図1 Non-hair mouse(DS-Nh mouse)(上)とヌードマウス (下)

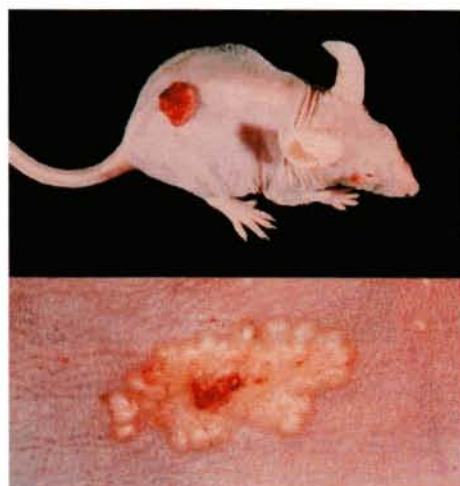


図2 DS-Nh mouse に自然発生した SqC-Nh

本腫瘍は DS-系 mouse に 100%移植可能な可移植性マウス腫瘍であり、移植後の経過日数に相関して出現が認められている。このことは図3に示すように腫瘍移植後 (42日) の経代によって、その増殖性は高められるようである。



図3 可移植性高転移腫瘍 (SqC-Nh) 54 経代像 本実験動物移植後 42 日

この著しい増殖力を示す腫瘍株は、前述したように極めて高転移能を有している。その転移状況 (図4) は肝臓および肺で好発し、腎、心、脾にも転移するが、その頻度は低い。本腫瘍の組織学的研究の結果、癌真珠形成像が観察され、扁平上皮癌 (Squamous Cell Carcinoma; SqC-Nh) であると同定された。



図4 本実験動物、担癌  
42日後の肝(左)、肺(右  
上)、腎(右下)での転  
移像

図4の結果から、これらの臓器の肉眼的所見においても明らかなように顕著な結節病変が観察された。以上の種々な病徴の提示像にしたがって、本実験におけるSqC-Nh mouse<sup>注)</sup>の実験設定の条件を決定した。なお、本動物および扁平上皮癌細胞の詳細な発生状況および高転移性像については塩野義製薬株式会社から近い将来において発表される予定である。

### III. SqC-Nh mouse に対する dsRNA の投与条件の設定

腫瘍移植動物は6週齢および8週齢の雌のNh-mouseを使用した。このマウスへの腫瘍株の移植は常法により、動物の背面部に移植した。

本実験に入るに先立って、dsRNAの投与は、50、100、300、400および500 $\mu$ g/0.1mlの0.1M 磷酸緩衝液(PBS)pH 7.4を皮下および腹腔内投与した。さらにdsRNAの大量単回投与、あるいは低濃度dsRNAの連続投与などの予備実験の結果、以下に示す実験区を設定した。

#### 実験群 I

Nh-mouse(6週齢)へSqC-Nhを移植後、2日目にdsRNA 50 $\mu$ g、100 $\mu$ gのPBSを投与し、以後2日毎に各濃度のdsRNAを腹腔内投与した(投与日程参照)体重および腫瘍の増殖状況さらに死亡率についても毎週調査した。実験開始後38日にSqC-Nh mouseを解剖し、各試験区における臓器重量および腫瘍細胞の転移状況について観察した。

---

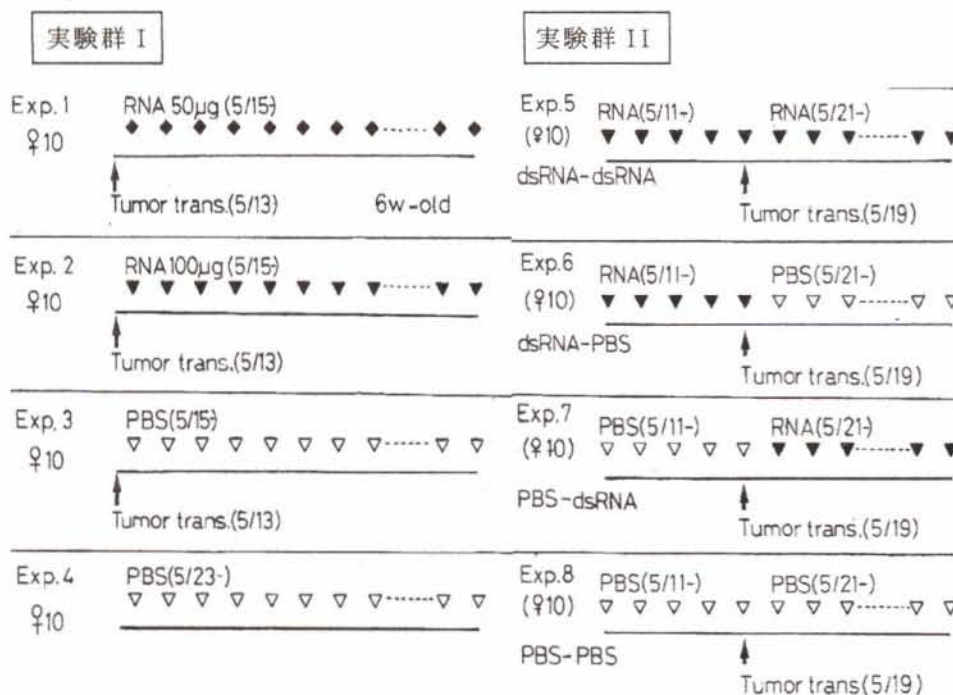
注) SqC-Nhを移植されたNh-mouseをSqC-Nh mouseと略す。



## 実験群 II

前回の試験においては、腫瘍移植後に dsRNA を投与し、腫瘍の変遷像について観察したが、本実験群においては dsRNA の腫瘍移植前投与および移植後の dsRNA の影響について観察した。すなわち dsRNA 100  $\mu$ g/匹を腫瘍移植前 10 日より、2 日毎に Nh-mouse の腹腔内へ投与し、腫瘍細胞移植後も dsRNA を連続投与する区、および移植時以降投与を停止する区、さらに移植 2 日後から dsRNA を投与する区、対照区として PBS のみ連続投与の 4 実験区（投与日程参照）を設けた。調査の対象としては実験群 I に準じた。なお、本実験の期間は 42 日間であった。

### SqC-Nh mouse への dsRNA 投与日程



## 実験結果

### 1. 体重の推移

扁平上皮癌細胞 (SqC-Nh) を移植された Nh-mouse に対する CPV-dsRNA 投与の影響を実験群 I および II について、体重の変化について調査し、その結果を図

5および図6に提示した。対照区（非移植区、PBSのみ投与）の体重の推移は6週齢のマウスでは、ほぼ成獣体重に達しており、試験期間中では殆ど変化は認められなかった（図5）のに対して、SqC-Nh移植個体の体重はいずれの実験区においても腫瘍細胞の増殖に伴って増加し、移植後35日目の各々の区間における有意差は認められなかった。総体重についてみると、dsRNA 50  $\mu$ gでは実に  $45.5 \pm 2.8$ gに比し、対照区（非移植区）では  $27 \pm 1.5$ gであり、その差18.5gは腫瘍重自体の著しい増殖を示すものであった。この成績から、移植腫瘍の増殖に対してdsRNA 50  $\mu$ gおよび100  $\mu$ gの投与の影響は判然とした結果は得られなかった。これらの傾向は実験群II（図6）においても同様であり、腫瘍移植前のdsRNA投与区、および連続投与区、その他いずれの実験区においても本腫瘍の増殖に対するdsRNAによる有意な効果は総体重の推移についてみる限り得ることはできなかった。

## 2. 死亡率について

腫瘍細胞移植後の各実験区についてみると実験群I（図7）で

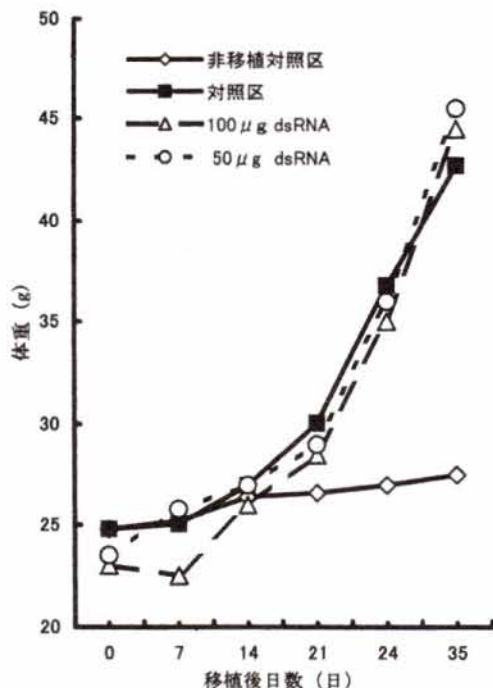


図5 実験群I SqC-Nh移植マウスの体重の推移とdsRNA投与の関係

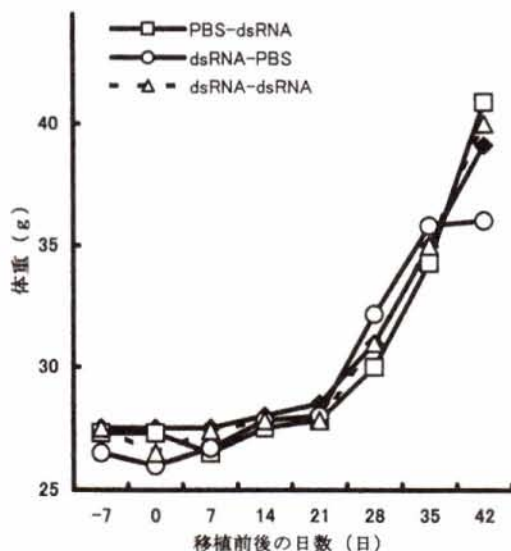


図6 実験群II SqC-Nh移植前後のdsRNA投与と体重の推移

は、いわゆる対照区においては、32 日後において死亡個体が認められ、38 日後に至り、その死亡率は 80%に達した。これに対して dsRNA 投与区では dsRNA 50  $\mu$ g および 100  $\mu$ g 投与の両区において、34 日後に死亡個体が観察され、38 日後で各々 40%および 30%の死亡率を示した。

これらの結果から、dsRNA の投与は明らかに延命的な効果のあることが示された。さらに dsRNA 投与による延命効果は、次に示す実験群 II (図 8) の成績によっても裏付けられた。図 8 に示した死亡率の推移からみると、腫瘍細胞移植前の dsRNA (dsRNA-PBS) 投与については効果がなく、移植後 34 日目から個体の死亡がみられ、42 日後では 80%に達した。一方、対照区 (PBS-PBS) における死亡率は 63%であった。本実験区において顕著な成果は dsRNA 連続投与区 (dsRNA-dsRNA) および移植後の dsRNA 投与区 (PBS-dsRNA) において著しい死亡率の低下をみたことである。すなわち、両区とも死亡個体の発生も遅く、実験終了時の 42 日後では前者の 22%と後者の死亡率 0%であった。

これらの事実、dsRNA 投与に

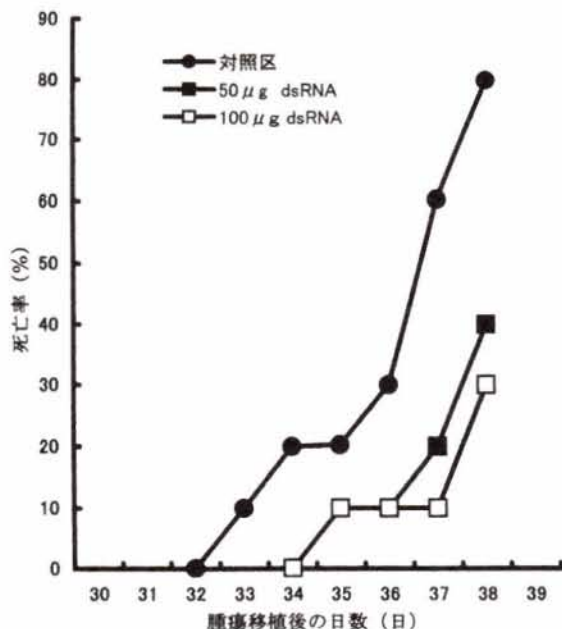


図 7 実験群I SqC-Nh移植マウスの死亡率に対するdsRNAの効果

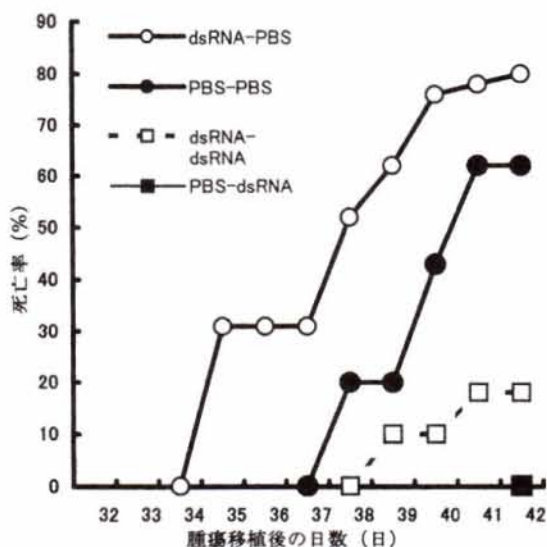


図 8 実験群II SqC-Nh移植マウスの死亡率に対するdsRNAの効果

よる SqC-Nh 増殖に対する効果を招来している証查であろう。さらに、この結果は、移植腫瘍細胞自体の増殖に対して dsRNA 投与の効果はないが、死亡（延命）の鍵であろう各臓器への転移に対して何らかの正の影響が推定されるものであった。

### 3. 各種臓器重量について

SqC-Nh 移植動物の各臓器重量に対する dsRNA 投与の影響について観察した。実験群 I の実験終了時における結果を第 1 表に示した。まず、通常個体の肺重量について、移植個体（対照区）と比較すると前者の 161mg に対して後者は実に 500mg と重量増が認められ、明らかに移植腫瘍細胞の転移像を如実に物語っている。これに対して dsRNA 投与の成績は、50  $\mu$ g 投与の肺重量 326mg および 100  $\mu$ g 投与の 290mg を示し、dsRNA の何等かの効果を推定させる結果が得られた。その他の臓器、肝、腎、副腎等においても移植個体において SqC-Nh の転移を肯定する重量増が認められた。

第 1 表 実験群 I SqC-Nh 移植マウスの臓器重量について、  
特に dsRNA 投与との関係

実験区	体重 (g)	腫瘍重 (g)	肺 (mg)	肝 (g)	腎 (mg)	副腎 (mg)	リンパ節(mg)	
							右	左
SqC-Nh 移植 dsRNA 50 $\mu$ g	43.9 $\pm 3.6^*$	23.2 $\pm 3.3^*$	326 $\pm 119^*$	1.81 $\pm 0.23$	476 $\pm 29$	7.0 $\pm 0.9$	626 $\pm 101$	29 $\pm 19$
SqC-Nh 移植 dsRNA 100 $\mu$ g	44.0 $\pm 3.1^*$	24.6 $\pm 2.4^{**}$	290 $\pm 46^{**}$	1.72 $\pm 0.15$	457 $\pm 33$	6.4 $\pm 0.6^*$	174 $\pm 105^*$	33 $\pm 13^*$
対照区	40.4 $\pm 3.7$	19.7 $\pm 3.1$	500 $\pm 160$	1.70 $\pm 0.39$	460 $\pm 66$	8.7 $\pm 2.9$	429 $\pm 307$	21 $\pm 7$
非移植 対照区	27.4 $\pm 1.3$	—	161 $\pm 10$	1.34 $\pm 0.04$	341 $\pm 23$	7.7 $\pm 0.6$	23 $\pm 5$	22 $\pm 3$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 対照区. 本実験に用いた動物は実験区 10 匹である。リンパ節については上腋+窩腋の数値である。腫瘍移植後 38 日目に解剖摘出し、湿重を測定した。

次に実験群 II から得られた成績を第 2 表に示した。本実験結果からも極めて著しい臓器重量の変化は肺において認められ、対照区（PBS-PBS）の 787mg に比して dsRNA 投与の PBS-dsRNA 区 469mg および dsRNA-dsRNA 連続投与区 628mg と有意の重量減が観察された。他の臓器においても多少の重量の高低が認められたが、特に dsRNA 投与の効果として提示するデータとは云えない。

以上の結果から、SqC-Nh 移植に対する dsRNA 投与の効果については移植細胞自体の増殖に対しては何等の影響はないものと推定されるが、該腫瘍の転移につい

第 2 表 実験群 II SqC-Nh の移植前および後の dsRNA の投与が各臓器重量に及ぼす影響

実験区	体重 (g)	腫瘍重 (g)	肺 (mg)	肝 (g)	腎 (mg)	副腎 (mg)	リンパ節 (mg)	
							右	左
dsRNA	39.2	7.5	628	1.87	476	9.3	5.55	0.33
-dsRNA	±5.0**	±1.8	±258*	±0.26 <sup>ab</sup>	±57*	±6.0	±3.03	±0.40
dsRNA	33.9	7.2	896	1.44	412	8.3	4.50	0.06
-PBS	±2.5	±2.6	±266	±0.33	±39	±1.8	±1.77	±0.08*
PBS	41.2	8.3	469	1.87	460	6.3	5.47	0.21
-dsRNA	±3.9 <sup>ab</sup>	±2.5	±287* <sup>ab</sup>	±0.30*	±44*	±1.3*	±1.43	±0.25
PBS-PBS	34.9	6.2	787	1.58	460	8.9	4.51	0.22
	±5.3	±1.6	±339	±0.48	±68	±3.9	±2.03	±0.13

(\*P<0.05 vs PBS-PBS, \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs dsRNA-dsRNA)

本実験に供試した動物数は dsRNA-dsRNA、dsRNA-PBS は各 9 匹、他の 2 区は各々 8 匹であった。各臓器は腫瘍移植後 42 日に解剖摘出し、湿重を測定した。

では、特に肺への転移に多少の効果のあることが予測され、この転移の強弱が死亡率における減少（延命）に導かれたものと思われる。

#### 4. SqC-Nh 移植と転移について

前述の SqC-Nh 移植による各種臓器重量に及ぼす影響について調査した結果、dsRNA 投与が本腫瘍の肺への転移を少なからず抑制することが判明したので、さらにその体内動態を観察するため各種臓器への SqC-Nh の転移について肉眼的観察で追求した。実験群 I で得られた結果を第 3 および第 4 表に提示した。

Nh-mouse の背面に移植された SqC-Nh は移植部において著しい増殖を遂げると同時に 38 日後の転移は観察した肺、肝、腎、心、脾臓の各臓器および副腎、リンパ節（左右）において、対照区（移植）および dsRNA 投与を問わず、すべての臓器に転移が認められた。この転移は、なかでも肺、肝、脾臓の各臓器、さらにリンパ節（右）において 100% 近い数値が得られた。しかしながら、転移の程度が低いと思われる腎、心臓、加うるに副腎、リンパ節（左）においては対照区（移植）に比して、dsRNA 投与区では 100 μg で転移の程度が抑えられている結果が得られた。この転移の状況について、さらに詳しく肺および肝臓について調査し

第3表 実験群 I SqC-Nh 移植後の Nh-mouse における転移状況 (個体数)

実験区	肺	肝	腎	心	脾	副腎	リンパ節	
							右	左
dsRNA 50 $\mu$ g	10	9	0	0	3	1	10	2
dsRNA100 $\mu$ g	10	10	1	1	3	2	10	1
対照区 (PBS)	10	10	3	4	2	3	10	2

第4表 実験群 I SqC-Nh 移植後の肺および肝における転移状況

実験区	個体数	肺			肝			
		+	++	+++	-	+	++	+++
dsRNA 100 $\mu$ g	10	1(10%)	7(70%)	2(20%)	1(10%)	7(70%)	1(10%)	1(10%)
dsRNA 50 $\mu$ g	10	0	8(80%)	2(20%)	0	8(80%)	2(20%)	0
対照区 (PBS)	10	0	4(40%)	6(60%)	0	4(40%)	2(20%)	4(40%)

SqC-Nh を DS-Nh mouse に移植後 38 日に解剖し、肉眼所見により表示した。

た(第4表)ところ、肺においては対照区(移植)の重度(+++)60%、中度(++)40%に比し、dsRNA投与区、50  $\mu$  g および 100  $\mu$  g で、重度の転移はそれぞれ20%、中度が70%および80%の値が得られた。

一方、肝臓への転移は肺と同傾向であることが判明した。すなわち、対照区(移植)で重度の転移の4個体に対し、dsRNA 50  $\mu$  g 投与区で1個体、中度の転移は対照区で2、50  $\mu$  g 投与区で1、100  $\mu$  g 投与区で2個体であり、軽度の転移は、それぞれ4、7、8個体を数え、肝臓においても dsRNA 投与が SqC-Nh の転移を抑制するであろう結果が得られた。

次に実験群 II についてみると、第5表および第6表に示すように、実験群 I の成績と同傾向の結果が得られた。観察調査したすべての臓器に SqC-Nh の転移が認められ、特に肺、肝、リンパ節で顕著であった。

これらの現象をさらに詳細に調査した結果(第6表)、肺における重度の転移状況のなかで、対照区(PBS-PBS)の6個体に対して、dsRNA-dsRNA 区の4個体、さらに PBS-dsRNA 区の1個体と dsRNA 投与区において SqC-Nh の転移が著しく抑制

第5表 実験群 II 移植前後の dsRNA 投与が移植 SqC-Nh の転移に及ぼす影響  
(個体数)

実験区	肺	肝	腎	心	脾	副腎	リンパ節	
							右	左
dsRNA-dsRNA	9	9	3	0	1	4	9	7
dsRNA-PBS	9	9	0	0	2	7	9	6
PBS-dsRNA	8	8	1	0	0	3	8	8
PBS-PBS	8	8	3	1	0	4	8	6

第6表 実験群 II 移植前後の肺および肝における転移状況

実験区	個体数	肺			肝		
		+	++	+++	+	++	+++
dsRNA-dsRNA	9	1(12%)	4(44%)	4(44%)	3(33%)	3(33%)	3(33%)
dsRNA-PBS	9	0	2(22%)	7(78%)	3(33%)	5(56%)	1(11%)
PBS-dsRNA	8	1(13%)	6(74%)	1(13%)	7(87%)	1(13%)	0
PBS-PBS	8	0	2(25%)	6(75%)	2(25%)	2(25%)	4(50%)

本実験における dsRNA 投与量は 100  $\mu$ g/個体である。42 日後の肉眼検査によつた

されていることが判明した。さらに軽度の転移個体は対照区では 0 個体 (すべて中度以上) dsRNA 投与区で 1 個体宛であり、この結果からも、dsRNA の転移に対しての何等かの抑制作用のあることが推定された。次に肝臓における SqC-Nh の転移の程度は重度に焦点を合わせてみると対照区 (PBS-PBS) の 4 個体 (50%) に対して dsRNA-dsRNA の連続投与で 3 個体 (33%)、PBS-dsRNA 区では 0 個体であり、本試験においても dsRNA が転移抑制に作用している。この抑制作用は、実験群 I および II を通じて dsRNA の投与は SqC-Nh の移植前の投与より、移植後 (2 日目) の投与が効果的であることが判明した。

## 考 察

ヒト腫瘍移植ヌードマウス系を用い IFN の抗腫瘍活性を観察する方法は IFN の *in vivo* 系での直接作用を追及する上で優れた方法である。このモデルを用いて IFN のヒト腫瘍の増殖抑制に関する多くの報告がなされている<sup>10,11)</sup>。一方で IFN の間接作用を証明するために、正常マウス、例えば DBA/2 に腫瘍細胞を移植し IFN を皮下、腹腔内投与し、腫瘍細胞群の増殖抑制または延命効果を確認した報告も多い<sup>10,12,14,26,27)</sup>。これらの研究から、IFN が抗ウイルス剤および抗腫瘍剤として注目を集めていることに対して、当然 IFN のインデューサーも予防薬、さらには治療薬としての期待も高まっている<sup>14)</sup>。それらの中でも、PolyI:C およびその誘導体を用いて、*in vivo* での IFN の産生、NK 細胞の活性化の起こることが観察されている。

著者らはインデューサーのトレランス（耐性）の問題も PolyI:C の誘導体により回避できる可能性のあることに注目し<sup>13)</sup>、天然から得られるカイコの CPV-dsRNA を PolyI:C 誘導体と同じレベルに並べて本実験を遂行した。本実験において顕著な成績は、移植 SqC-Nh-mouse において移植細胞の増殖に対して CPV-dsRNA は何等影響がないものの、その死亡率において dsRNA の効果が著しいことである（図 7 および図 8）。この効果は、腫瘍移植後の dsRNA 投与によって引き出されたものである。いずれにしても、CPV-dsRNA 投与による、極めて有意なマウスに対する延命効果は、現時点では dsRNA がインデューサーとしての引き金を引き、IFN 産生に拍車をかけたものと思われる。

次いで、SqC 移植後の各種臓器重についてみると（第 1 表）、非移植個体との比較において、特に肺の重量増が著しい。その他の臓器においても重量増が認められ、腫瘍細胞の転移が明白であった。この転移像に対する dsRNA 投与の効果は肺において著しく、この結果は実験群 II の成績からも肯定されている（第 6 表）。

従って、先の死亡率で観察した dsRNA 投与による延命効果は、肺への転移がある程度抑制されたことを意味付けるものである。この SqC-Nh 細胞の転移状況をさらに肉眼検査によって観察した（第 3, 4, 5, 6 表）ところ、移植後 38 日では、本腫瘍は移植部において dsRNA 投与に関係なく増殖するとともに肺、肝、腎、心、脾、副腎およびリンパ節のすべてに転移する高転移性腫瘍株であることも再確認された。これらの結果は実験群 II においても確認されたが、dsRNA 投与の効果を



肺および肝において転移の程度を重度 (+++), 中度 (++)、軽度 (+) に分けて観察すると dsRNA 投与区において重度の転移率が対照区に比して低く、CPV-dsRNA 投与が SqC-Nh 細胞の転移を抑制することが認められた。既に多くの報告にもあるように dsRNA (天然、合成を問わず) は最強の IFN のインデューサーであり、本実験の結果についても、おそらく CPV-dsRNA を Nh-mouse の細胞が非自己と認識し、IFN 産生を誘発した結果であり<sup>26, 27)</sup>、あるいは間接作用として各種の細胞傷害性免疫細胞の活性を惹起した結果かもしれない<sup>14, 28, 29)</sup>。

CPV-dsRNA は極めて RNase に対して抵抗性であるので<sup>24)</sup>、PolyI:C で認められたヒトまたはサルの血中での RNase による分解は避けられるものと思われる。また、その分子量においても IFN インデューサーとしての充分条件を満たしている。この実験期間中、dsRNA 投与がマウスの行動に異常を起こすことは全くなく、副作用はないものと思われた。これらの観点に立つと IFN 投与がその効果において種特異性が高く、且つタンパク因子による治療 (注射) のため、投与後の抗体出現、さらには重篤な副作用の問題等から逃避するためにも、問題の比較的少ない IFN のインデューサーを治療薬として開発することも、あながち無駄であると思えない<sup>14)</sup>。

本実験に用いた CPV-dsRNA は宿主生物がカイコであり、材料が容易に入手できること、ならびに CPV-感染組織から多量に dsRNA が得られることを考慮すれば、IFN にとって代わり Cypovirus のゲノムは哺乳動物の抗ウイルス剤および各種の抗腫瘍剤 (特に転移抑制) としての見地からさらなる研究が望まれる命題であると云えよう。なお、本報告において使用した SqC-Nh は必ずしもこの種の研究に合っていなかったことも考えられ、さらに別の腫瘍株について追求する必要がある。

謝辞：本実験を行うに当たり、貴重な動物の提供を戴いた塩野義製薬株式会社・油日ラボラトリーズ、牧野 進 博士に深謝いたします。

## 要 約

カイコの Cypovirus ゲノム (二本鎖 RNA; dsRNA) が DS-Nh mouse に移植された、高転移性扁平上皮癌 (SqC-Nh) の増殖にいかに関与するかについて追求した。

1. dsRNA は移植 SqC-Nh の増殖に対して全く影響しない。
2. dsRNA は上記担癌動物の死亡率を下げる効果が認められ、延命の効果が著しい。
3. dsRNA は移植 SqC-Nh 細胞からの転移を完全に束縛しない。すなわち、対照区および実験区とも肺、肝、心、腎、脾、副腎、リンパ節への転移が認められた。
4. 特に肺への SqC-Nh の転移の程度において dsRNA の効果が認められ、dsRNA の投与によって転移の程度が減じられた。このことから、dsRNA 投与による死亡率の低下は、肺における転移軽減によるものと考えられた。
5. dsRNA の転移の程度軽減への効果は、他の調査した臓器においても観察された。
6. 実験の期間を通じて dsRNA の DS-Nh mouse に対する副作用は認められなかった。

以上の結果から、dsRNA は移植部の SqC-Nh 細胞の増殖を妨げることはできなかったが、明らかに他臓器への転移の程度を軽減すること、および、特に肺への転移程度の軽減が延命効果に繋がるものと考えられた。

## 引用文献

1. Isaacs, S. and Lindenmann, J. (1957): Proc. Roy. Soc. London, Ser. B. 147, 258.
2. 今西二郎 (1997): ウイルス学 (畑中正一編) p. 158, 朝倉書店 (東京)
3. 平野昌彦 (1985): インターフェロンの科学 (小林茂保編) p. 22, 講談社 (東京)
4. Schaffner, A. *et al.* (1982): J. Interferon Res., 2, 285.
5. Ohtsuki, K. and Baron, S. (1979): J. Biochem., 85, 1495.

6. 松本 修 (1985) : インターフェロンの科学 (小林茂保編) p. 69, 講談社 (東京)
7. De Maeyer, E. *et al.* (1981) : The Biology of The Interferon System (eds. De Maeyer, E. *et al.*) p. 141, p. 203, Elsevier/North-Holland.
8. Ho, M. (1982) : Pharmacol. Rev. 34, p. 119.
9. 渡辺伸昌・谷口維紹 (1992) : 蛋白質・核酸・酵素、37、p. 119.
10. 井田直隆 (1985) : インターフェロンの科学 (小林茂保編) p. 44, 講談社 (東京)
11. Stewart II, W.E. (1977) : Interferon and Their Action, CRC press.
12. Grasser, I. (ed) (1981) : Interferon 3, Academic Press.
13. 内海 潤 (1985) : インターフェロンの科学 (小林茂保編) p. 88, 講談社 (東京)
14. 小林茂保 (1982) : インタフェロンの話、サイエンス社 (東京)
15. Field, A.K. *et al.* (1967) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 2102.
16. 佐野恵海子・小林茂保 (1990) : サイトカイン (大沢利昭編) p. 115, 東京化学同人 (東京)
17. 森 肇ら (1998) : ウイルス、48、p. 81.
18. 小林 淳・宮島成壽 (1997) : ウイルス学 (畑中正一編) p. 397, 朝倉書店 (東京)
19. Belloncik, S. and Mori, H. (1998) : The Insect Viruses (ed. Miller, L.K. and Ball, L.A.), p. 337, Plenum Pub. Comp. New York.
20. Hayashi, Y. and Kawase, S. (1964) : Virology, 23, 612.
21. Miura, *et al.* (1968) : J. Virol., 2, 1211.
22. Belloncik, S. (1989) : Adv. Virus Res., 37, 173.
23. Belloncik, S. *et al.* (1996) : J. Invertebr. Pathol., 67, 41.
24. Hayashi, Y. (1979) : J. Invertebr. Pathol., 16, 451.
25. Furusawa, T. *et al.* (1993) : Comp. Biochem. Physiol., 104B, 795.
26. Yokota, Y. *et al.* (1976) : Biken J., 19, 125.
27. Ida, N. *et al.* (1982) : Gann, 73, 952.
28. Belardelli, F. *et al.* (1982a) : Int. J. Cancer, 30, 813.
29. Belardelli, F. *et al.* (1982b) : Int. J. Cancer, 30, 821.

# 繭の新規用途開発に関する研究

周年生産繭からのセリシンおよび  
絹フィブロインの粉末化と炊飯時の添加

松原藤好・山崎 隆\*・三好 明\*\*・小村谷貴子\*\*\*

Studies on The High Quality Cocoon

by

Fujiyoshi MATSUBARA, Takashi YAMAZAKI\*, Akira MIYOSHI\*\*  
and Takako KOMURATANI \*\*\*

---

現在 京都工芸繊維大学名誉教授  
中国西南農業大学教授・浙江大学客座教授  
\* 京都教育大学名誉教授  
\*\* 大阪城南短期大学教授  
\*\*\* 京都工芸繊維大学繊維学部

# 繭の新規用途開発に関する研究

松原藤好・山崎 隆・三好 明・小村谷貴子

## はじめに

1998年4月蚕糸業法の全廃に伴って、桑葉による我が国の蚕糸業の衰退は加速し、この現象は世界各国にも及んでいる。筆者らは1960年代より人工飼料や、無菌飼育法の開発とそれらの病理学や生産学への応用に関して研究を進めてきた（松原 1965, 1967, 1975, 1987, 1997, 1999）。

研究を進めるに当たっては常にエコロジーとエコノミーを両立させるべく配慮し、我が国の伝統であるシルク産業の活性化と、周年無菌養蚕を全く新しい産業へ利用できるように研究開発を進めてきた（図1）。

本研究はその一つの例として、周年生産した白度の高い生繭の食品への利用を目的とした研究について報告する。

まず、産業廃棄物であるオカラ含有の低コスト人工飼料を用いて、全齢3回給餌の周年無菌飼育法で生繭を生産する。この生繭を切開した後蛹は制ガン剤や強壯剤といわれる冬虫夏草の周年生産用に供し、残った切開繭は溶解後純粋なセリシン抽出液とその粉末や、絹フィブロインの粉末化に用いる。そして、これらを古米および不良米の炊飯時に添加することで白度が高く栄養価の高いおいしい米飯作りができることによって、我が国の米消費量の拡大と同時に、繭の大量消費による新しい人工飼料周年無菌養蚕の発展に寄与できるのではないかとと思われる。

なお本研究は、平成11年度貞明皇后蚕糸記念科学技術研究助成金によるもので本研究の機会を与えられた財団法人大日本蚕糸会総裁常陸宮正仁親王殿下、二瓶 博会頭、佐藤 豊氏、嶋崎正典先生、その他関係各位に感謝申し上げます。

## 第1章 生繭の周年生産

### 1) 生繭の周年安定生産の三条件

1年を通して繭を生産する場合は人工飼料を用いなければならない。桑葉と異なって人工飼料は高温多湿の飼育条件下では防腐、防黴剤を用いない限り飼料は腐敗する。生糸を生産する場合は大きな問題を生じないが、食品や医療用として利用する場合、無菌条件下での飼育が望まれる。図2に示したように無菌蚕には無菌人工飼料を用い、無菌蚕室により1年を通した無菌の繭生産が可能である(松原 1975, 1995)。

無菌にはgerm freeと言うようにウイルスを含めた絶対無菌から、Gnotobiotteのように既知の微生物を含んでいるものや、さらにSPFのように指定された病原微生物は含まないが他の微生物は存在してもよいという幅広い定義がある。蚕の場合、ほとんどgerm freeで飼育されている(松原 1995a, 1997a)。その判定は細菌や糸状菌については飼料や糞の検定、ウイルスについては起蚕の5℃24時間の誘発処理により判定を行った。

### 2) 生繭の周年無菌生産システム

無菌条件下での人工飼料養蚕は季節に関係なく養蚕が可能である。本研究においては図3に示したシステム、つまり無菌人工飼料は月3回、掃立から3齢用と4齢用および5齢用を生産した。蚕種は消毒後孵化させて用いた。飼育は小規模および大量飼育用容器を滅菌消毒し、この容器で月1回の飼育を行うシステムで養蚕を実施した。

### 3) 無菌人工飼料の組成と飼料生産

人工飼料組成は表1に示したように稚蚕(1-3齢)用と壮蚕(4-5齢)用を製造した。稚蚕用と壮蚕用飼料の大きな違いは、桑葉粉末が稚蚕用は25%であるのに対して壮蚕用は10%と少なくしたことと、産業廃棄物であるオカラの含量を稚蚕用は15%、壮蚕用は50%と多くしたことである。また、脱脂大豆は稚蚕用40%、壮蚕用では19%と少なくした。両者共に、防腐、防黴剤を全く含まないのが特徴である(松原 1995, 1999)。

示した組成を混合した粉体飼料を秤量した後、2.2-2.5倍量の水を加え練合し、サンシート上に平面に成型した。掃立、4齡起蚕、および5齡起蚕時に3回調製される飼料は全て、117℃40分間高圧蒸気滅菌して用いた。なお、生産規模では混合機、練合機、圧延・成型機および大型滅菌機を用いて飼料を生産した（松原1995）。

#### 4) 周年繭生産用の蚕種生産と無菌孵化

周年で繭生産しようとする場合市販の蚕種を購入すればよいが、現在蚕種は1箱10,000円である。そこで本研究所で小村谷氏が生産している、図4に示した年4回の原蚕の無菌飼育で蚕種を生産する方法（松原1997a, 小村谷1998a）で採種し、これを用いて年間用いる蚕種に供した。対照として市販の蚕種も用いた。無菌孵化のための蚕卵の消毒は、催育卵の孵化前日にアルコール-ホルマリン-アルコール浸漬消毒法（松原1975,1987）を実施した。年12回とも98%以上の孵化率を示した。

本法の採用によって超省力で、微粒子病等の蚕病の心配のない蚕種を生産に用いることができた。

#### 5) 幼虫の周年無菌飼育（全齡3回育）

##### (1) 供試蚕品種および飼料調達

小村谷氏が継代している品種（小村谷ら1998）および市販の交雑種を用いた。月1回1,000頭および切開繭が不足した場合は市販の交雑種1箱あるいは2箱を、1-3齡1回、4齡1回および5齡1回の計3回の給餌の常法（松原1997）で無菌飼育を行った。

毎月1回の飼育には表1の飼料を用い、大量飼育用はオカラ含有の市販飼料を用いた。そして飼育容器であるプラスチックケース（22×16×4cm）1容器当たり飼料粉末50gを、大量飼育の場合はプラスチックトレイ（115×55×4cm）1容器当たり600gを用いた。前者は無菌蚕1-3齡100-120頭分、後者は1-3齡3,300頭分に相当する。飼料粉末に対して2.2-2.5倍量の水を加えてよく練合し、ppフィルムに包んで平面に成型した後、オートクレーブで117℃40分間滅菌処

理した。なお、大量飼育の場合は練合および成型機を利用して調製した後、飼育トレーに入れて大型滅菌機で滅菌した飼料を用いた。

#### (2) 蚕卵の消毒および掃立

蚕卵は25℃で暗催青した。消毒は孵化前日にクリーンベンチ内で常法（松原1975, 1997）に従って行った。消毒卵は表面を乾燥させた後滅菌シャーレに入れ、暗催青を続けた。

掃立作業は、月1回飼育ではクリーンベンチ内で無菌飼料上に100-120頭を、大量飼育の場合はクリーンブース内で3,300頭を打ち落とし法で行った。そして上からプラスチック網を掛け、飼料に密着するように載せて飼育容器のふたをした。大量飼育では飼育トレーを積み重ね、最上部は空のトレーでふたをした。

#### (3) 飼料の交換

全齢3回つまり1-3齢1回、4齢1回、5齢1回とした。1箱当たりの飼育頭数は1-3齢は100-120頭、4齢は40-50頭、5齢は10-11頭になるようにした。飼育トレーの場合は1-3齢は3,300頭、4齢は1,000頭、および5齢は360-370頭とした。この詳細については松原（1997）の方法に準じた。

上簇は一斉上簇で、年月1回飼育では改良簇を用い、その他は回転簇を用いた。

#### (4) 飼育条件

毎月1回飼育においてはインキュベーターを利用したので、飼育温度は1-3齢29℃、4-5齢25℃とした。湿度は密閉飼育のため常に90%以上と思われ、特に制御しなかった。光条件は全暗とした。大量飼育においてもほぼ同様である。ただし、5齢5日目から飼育トレー間にスペーサー（15×20×30mmのアルミ製パイプ）を用い、空気の交換を行って過湿を防止した。

#### 6) 予察

年間繭生産においては、掃立した蚕が上簇前に死亡せずにどのくらい繭を作るのか、前もって知るための試験を実施する必要がある（松原 1995, 1997）。そこで2カ月に1回無菌飼育した一部4齢起蚕および5齢起蚕に5℃24時間の誘発処



理を実施し発病の有無について調査した。第2表に結果の1例を示した。この実験でわかるように、ウイルス病の誘発処理においてもウイルス病を含む伝染性蚕病の発生は全く見られなかった。よって、インキュベーター、飼育容器および無菌室内は病原微生物が存在しないことが明らかである。なお、1-3 齢を無菌飼育し、4 齢起蚕より無菌条件から開放して飼育し、5 齢起蚕に低温誘発処理しても発病は認められなかった（松原 2000）。

#### 7) 周年繭生産成績および切開繭の新規用途利用への準備

インキュベーター内で毎月1,000頭単位で無菌飼育した場合の全繭重量と繭生産量は表3に示したように、T・K（小村谷育成）および市販の交雑種ともに良好で、ほとんど死亡することなく成長し営繭した。1,000頭当たりの生繭量は1,590-1,720gの範囲内で飼育用においてほとんど差異がなく、繭層重も同様であった。

切開して取り出した生蛹は、冬虫夏草菌の接種用に供し、繭層は次の実験に供用した。1年を通して蚕病による弊死蚕は見られず、さらに小さな繭もほとんど見られず生糸用に適している。また、切開しても内部は清潔で、既に報告した（松原 1998, 1999）ように繭は白度が高く、繭の大きさがよく揃っているのが特徴的である。

## 第2章 切開繭からのセリシンの抽出と水溶性フィブロインの粉末化および炊飯時におけるセリシンの添加

第1章で周年生産した生繭を用いて、セリシン溶液とその粉末化および水溶性絹フィブロインの製造と食品、特に米飯への応用について検討した。

### 1) セリシンの抽出および粉末化

#### (1) セリシンの抽出条件の検討

食品への添加を目的としているため、従来のような生糸の精練法に用いられて

いるアルカリや界面活性剤などを用いることはできない。水のみによる精練については加藤によって100℃以上の高温では薬剤を使用しなくても、水のみで精練（脱セリシン）が可能であることが報告されている（加藤弘 1987）。

水道水、水を電気分解した後、特殊隔膜処理によって得られたpH10.5~12.4の“アルカリオン水”および一定の圧力を加えながら長時間循環させることで、水を圧縮、膨張、曝気させ、水の分子同士をつなぐ水素結合を分断させた“単分子水”を用いて切開菌からの脱セリシンを行った。アルカリオン水と単分子水を用いるのはそれぞれの水が水道水と比較して浸透、抽出力に優れており、セリシタンパクの熱変性をできるだけおさえて効率よく抽出することを目的としている。結果は図5と表4に示した。図5と表4からも明らかなように、水道水による抽出と比較してアルカリオン水と単分子水のいずれも60℃、105℃ではセリシン抽出能が大きい。特にアルカリオン水100%、それを25%、50%に希釈しても105℃ではほぼセリシン抽出量に差のないことがわかった。

精練直後のセリシンの平均分子量は約600KDaであるが、水120℃~130℃で抽出されたセリシンは長時間処理するほど低分子化する。また保存温度40℃以下では大きな分子量変化はないが、高温（60℃以上）の保存では時間の経過とともに徐々に低下する傾向があることが報告されている（浜岡容子ら 1997）。今回の研究で用いた、アルカリオン水による100℃以上の温度での抽出セリシンの分子量変化などについては現在検討中である。

## （2）抽出セリシンの粉末化

乾燥粉末化を行うにあたって、抽出セリシン水溶液の室温近辺（15℃~20℃）におけるゲル化を切開菌重量に対する水道水、アルカリオン水の浴比で観測した。水道水の場合は120℃、60分、浴比1:10、1:20、および1:30とした。その時のセリシン水溶液濃度はそれぞれ約3%、1.5%および1%の水溶液となる。いずれの浴比においてもセリシンはほぼ完全に抽出されるが、浴比1:10では室温でゲル化し、ろ過不可能となる。浴比1:20（約1.5%濃度）と1:30（約1%濃度）では室温でのゲル化は認められなかった。以下に述べる凍結乾燥、スプレードライによる粉末化は浴比1:20~30のセリシン水溶液について行った。

## 凍結乾燥

凍結乾燥はタンパク質の変性も少なく、回収率も高い優れた乾燥法であるが、コスト的にも実用化が困難であるため、少量で測定する試料の作成についてのみ行った。

## スプレードライ

スプレードライは凍結乾燥と比較して経済的である。セリシン1.5%溶液を用いて下記条件で乾燥粉末化を行った。装置は大川原化工機株式会社製のMODEL L-8型を用い、溶液噴霧口回転板の回転数30,000rpm、入口温度140℃、出口温度85℃に設定し、8ℓの1.5%溶液から61.69g（約77%）の収率で得られた。これらのセリシンの物理的、化学的および生理学的性質については目下検討中であるが、構成アミノ酸の分析結果を表5のセリシン粉末のアミノ酸組成、図6にアミノ酸の百分率を示した。ここに示したスプレードライによる粉末化条件では、大きなタンパク変性は認められなかった。

アルカリイオン水で抽出したセリシン溶液のスプレードライで注目されたのは、乾燥機内の壁面に粉末セリシンの付着が認められなかったことである。これはアルカリイオン水の静電気発生防止効果によるものであり、今後さらに検討することによって収率にも良好な結果をもたらすものと思われる。イオン水によるセリシタンパクの変性などについては、今後さらに検討を進める予定である。

## 2) 絹フィブロインの溶解と粉末化

線状タンパク質である絹フィブロインは加水化の大きい中性塩、例えば塩化カルシウム、リチウムプロマイドなどの濃厚水溶液あるいは銅-アルカリ溶液、たとえば水酸化銅-アンモニア溶液（シュワイサー試薬）、水酸化銅-アルカリグリセリン溶液（ローエ試薬）などに溶解することはすでによく知られている。

本稿では水溶性絹フィブロイン粉末を得るために50%塩化カルシウム溶液400ml中に脱セリシン後の切繭を20g投入し、温度120℃で4時間加熱した。溶解液をろ過した後、セロハン透析チューブに入れ72時間流水中で塩化カルシウムを除いた。透析終了後、透析チューブに温風を送り濃縮した。濃縮が進むにつれてゲルを生じた。約1/3の水分が蒸発した濃縮ゲル溶液中に、中性で作用する

酵素プロテアーゼP3Gを溶液に対して1%加え、37℃で48時間処理した。絹フィブロインゲルは消失した。凍結乾燥して得られた粉末のタンパク質量定量をLowry法の変法で行ったところ、0.1794mg/mlであった。

SDS-PAGE分析の結果を表6に示した。検出されたバンドは12個であり、分子量は15.9~65.6KDaの範囲にあり、絹糸の350KDaと比較するとかなり分解しており、この範囲の分子量分布になると水溶性絹フィブロインが得られるものと思われる。この溶液をセリシンのスプレードライと同じ条件で粉末化した試料の顕微鏡写真を図7に示した。

他方、中国から輸入されている水溶性フィブロインは食品添加や繊維製品のシルクプロテイン加工などに使用されている。分解方法などについての詳細は不明であるが、同様の方法でタンパク質の定量を行ったところ、Lowry法の変形では検出できなかった。ニンヒドリン法によるアミノ酸の定量を行ったところ0.121mg/mlグリシン当量（77.5%）、0.144mg/mlアラニン当量（92.3%）の値が得られた。この結果から中国産の水溶性フィブロインはほぼアミノ酸にまで分解されており、前述のオリゴマー状態のフィブロインはごく少量しか含まれていないものと思われる。食品添加に用いるにはどの程度までの分解がよいのかはわからないが、分解方法による分子量のコントロールをも含めて分解法の確立が必要であると考えられる。

報告した以外にセリシン抽出に用いたアルカリイオン水と塩化カルシウムの組み合わせによる分解についても検討しているが、今回はデータを示すことができなかった。今後引き続き検討する予定である。

### 3) 炊飯時におけるセリシンの添加について

1) の(1)で述べたセリシン抽出液（水道水で抽出した液）を炊飯時に添加した時の影響ならびに効果については、研究協力者である株式会社両双の吉田政人社長を中心にして行われた。

評価方法として、炊飯後の常温放置（室温20℃）で、炊飯後24時間放置のセリシン未使用の場合との比較を下記の3つの項目について行った。

- ①咀嚼時の弾性（粘性）
- ②炊飯後の炊き上がり歩留まり率

### ③合わせ酢混合の“シャリ玉”

テスト条件は生米6.5kgに対して

テスト1	アクアマックス	6.5g
テスト2	セリシン	162g (2.5%)
テスト3	セリシン	162g (2.5%)
	アクアマックス	3.25g

で行った。

- ①についてはセリシン添加の方が咀嚼時の弾性（粘性）に明確な違いが見られた。  
②については炊飯後の炊き上がり数値においても、歩留まり率の向上がみられた。  
③については合わせ酢混合の“シャリ玉”の場合も常温での確認テストおよび冷凍を解凍しての解凍テスト時においても、総合的に食味に向上が見られた。セリシン添加白飯の分析結果の1例を表7に示した。

次に、添加物としてアクアマックス、シルクパウダー、昆布tをそれぞれ表8に示した炊飯テストを行った。ここでのシルクパウダーは絹フィブロン粉末であり、炊飯時に1%（56g）添加された。

炊き上がり重量には差が認められなかったが、蒸発量の設定が予想より多かったため、テスト1、2、3、4とも焦げが生じ、また蒸発量が多かったため、歩留まりが悪く（2.18～2.22）かなり硬い炊き上がりになった。テスト3のシルクパウダー添加米では釜側面にオブラート状の膜が見られた。ここで添加されたシルクパウダーの分子量分布が不明なため、膜の出現が分子量によるのか、また、もっと分子量が小さくなれば膜を生じないのかなどの点についてさらに追求する必要がある。

結論としてセリシンを生米重量に対して2.5%添加した時は前述のように良好な結果が出ているので、今後の見通しはよくなるものと思われる。

全体としてセリシンの米飯への添加は、炊飯器を使用して現場段階で炊飯試験を研究室でのテーブルテストとドッキングさせて経時変化の追跡試験を行う必要がある。また、現在使用している調味液（pH調整液）との併用についてもテストする必要のあることがわかった。

## おわりに

我々は蚕の人で飼料や無菌飼育法を開発して以来、歴史的な過去の養蚕にとらわれない、全く新しい生産方式の産業を模索し研究を進め、省資源、超省力、低コスト、高品質、安定した周年無菌養蚕のシステムによって蚕糸絹生産を計ってきた。これは従来の農業生産でもなく、工業生産と言われるものでもない、全く新しい生産様式であり、また、エコロジーとエコノミーをも包括したものと考えている。従って、従来の生糸生産だけを目標とせず、飼料から蚕、繭、生糸など生産過程で生ずるものを全て有効に利用することを考えた。

本研究では切開繭や生糸に不適な繭の有効利用の一つとして、切開繭の食品添加について検討した。繭生産については周年無菌生産システムの利用によって白度の高い、汚れのない清潔な生繭を容易に得ることができた。

次に、食品添加を目的としたセリシンの抽出と絹フィブロインの水溶性分解物は溶液としての利用と粉末化してからの利用が考えられるが、貯蔵や輸送の問題を考えると粉末化することが最も重要である。粉末化はタンパク質の変性を考慮するならば抽出、分解のいずれもできるだけ低温で、また乾燥も同様に低温で効率よく行うことが必要である。本研究の中でいくつかの知見が得られたので具体化については現在検討しているところである。

使用する切開繭は桑葉育繭と本研究で用いた周年無菌生産繭とでは色、臭いなどかなりの違いが認められた。詳細については述べなかったが食用、医療用などに用いるには周年無菌生産システムによって得られた繭が最適であると言える。

## 文 献

- 松原藤好（1965）：無菌飼育における蚕病に関する研究(1)低温処理と多角体病誘発との関係，京工織大繊維学部学術報，4，291-297.
- 松原藤好・加藤 勝・林屋慶三・児玉礼次郎・浜村保次（1967）：人工飼料による家蚕の無菌飼育，日蚕雑，38，39-44.

- 松原藤好（1975）：カイコの人工飼料育への道（浜村保次編），みすず書房（東京），pp135-165，pp220-258.
- 加藤 弘（1987）：絹繊維の加工技術とその応用，繊維研究社，pp29-35.
- 松原藤好（1987）：蚕糸生産学実験実習書，（財）衣笠会，pp150-288.
- 松原藤好（1995）：新版生物環境調節ハンドブック，養賢堂，pp484-494.
- 松原藤好ら（1995a）：蚕糸生産の立場から，無菌生物，25，15-17.
- 浜岡容子ら（1997）：京都府織物指導所研究報告，No.31.
- 松原藤好（1997）：絹の50年，繊維機械学会誌，50，252-258.
- 松原藤好（1997a）：人工飼料無菌飼育法をベースにした我が国の新しい周年養蚕，（財）衣笠会繊維研究報，2，1-49.
- 松原藤好・山崎 隆（1998）：人工飼料無菌周年蚕糸生産と高品質シルク，（財）衣笠会繊維研究報，3，1-14.
- 小村谷貴子・松原藤好（1998）：人工飼料無菌飼育法による17代にわたるカイコの継代，（財）衣笠会繊維研究報，3，51-62.
- 松原藤好（1999）：21世紀の周年工場無菌蚕糸生産システムとその利用，近畿化学工業界，（553），1-6.
- 松原藤好・山崎 隆・小村谷貴子・王 章娥（2000）：無菌蚕を自然環境下に移して飼育した場合の発病，無菌生物，30，42-45.

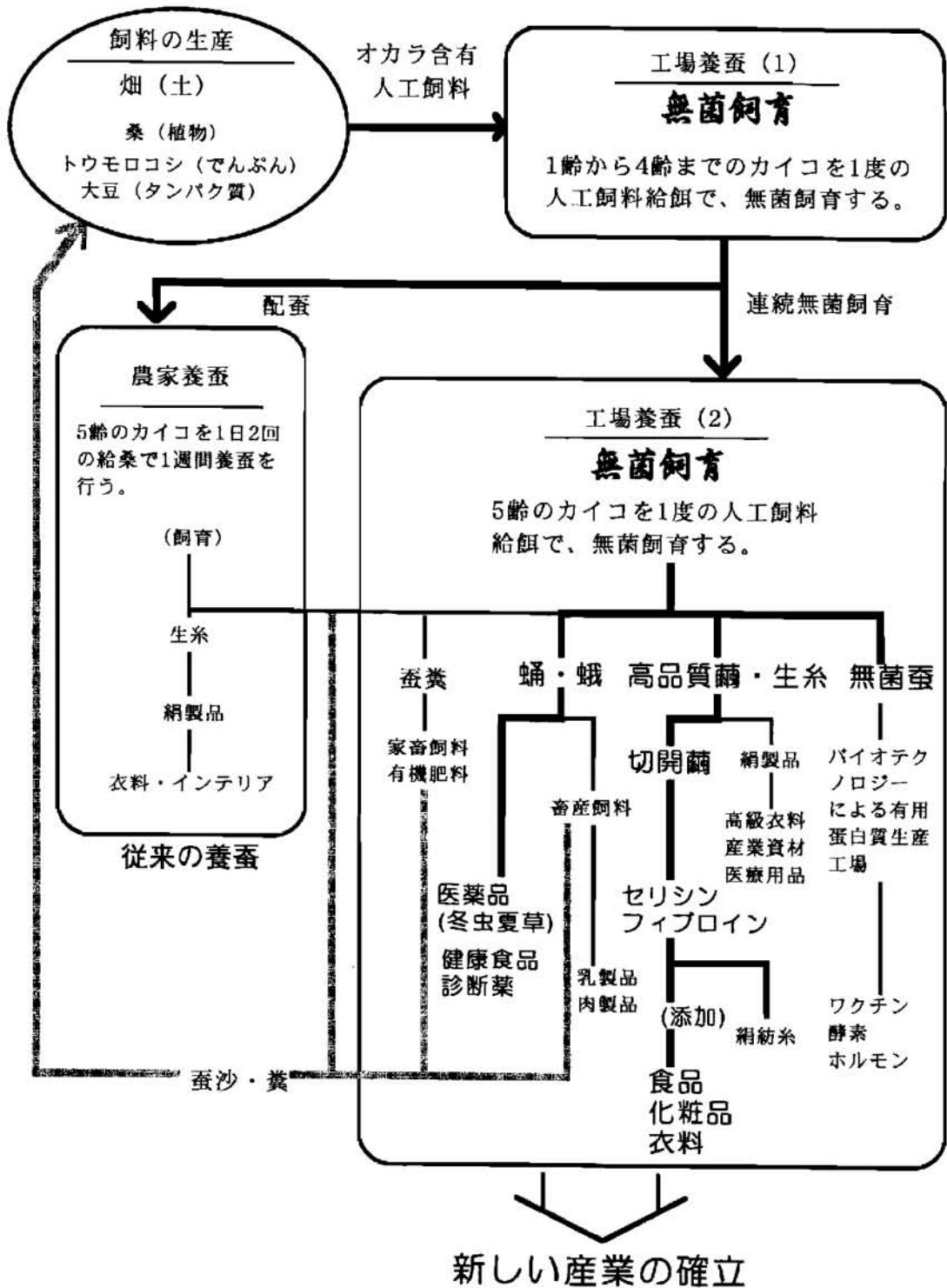


図1 エコロジーとエコノミーを両立させる周年産業



表1 人工飼料組成

飼料素材	1-3齡用	4-5齡用
桑葉粉末	25.0 (%)	10.0 (%)
脱脂大豆粉末	40.0	20.0
オカラ粉末	15.0	50.0
澱粉	11.0	11.0
微量成分混合物	6.0	6.0
無機塩混合物	3.0	3.0
合計	100	100

表2 無菌蚕の4齡起蚕および5齡起蚕を  
低温処理した場合の発病の有無

飼育時期	齡	処理	供試蚕数	発病率		
				N	C	F
7月	4齡起蚕	5℃24h	10頭	0%	0%	0%
	5齡起蚕	"	10	0	0	0
9月	4齡起蚕	"	10	0	0	0
	5齡起蚕	"	10	0	0	0
11月	4齡起蚕	"	10	0	0	0
	5齡起蚕	"	10	0	0	0

なお、12月・2月においても実施したが発病は見られなかった。

N：核多角体病、C：細胞質多角体病、F：軟化病

表3 周年無菌生繭生産成績（掃立1,000頭当たり）

掃立年・月	蚕品種	生繭重	繭層重
1999・4月	T・K	1,691 (g)	342 (g)
” ・5	T・K	1,703	355
” ・6	T・K	1,652	347
” ・7	市販	1,715	349
” ・8	市販	1,592	334
” ・9	T・K	1,685	352
” ・10	T・K	1,623	341
” ・11	T・K	1,716	359
” ・12	市販	1,726	357
2000・1	T・K	1,671	349
” ・2	T・K	1,586	331
” ・3	市販	1,634	342

**T・K**：小村谷氏継代蚕

その他、7月、9月、11月に生産依頼した蚕種2箱分の生繭重は1箱当たり35kg以上であった

表4 各種水のセリシン抽出能 (60℃, 105℃)

温度/時間	水道水	単分子水	アルカリ イオン水	アルカリ イオン水25 水道水75	アルカリ イオン水50 水道水50
60℃					
60分	0.00		18.40		
180分	0.60	4.00	23.10	4.57	9.29
300分	0.90	4.14	28.00	5.71	10.29
420分	3.60		26.10		
105℃					
30分	17.00	17.33	28.20	27.87	28.80
60分	21.70	22.00	30.60	29.13	29.40

\* 単位は切藪より抽出されたセリシン重量%

表5 セリシン粉末のアミノ酸組成

アミノ酸	セリシン 粉末			
	Glycine	9.72	Serine	29.40
	Alanine	3.57	Aspartic acid	18.00
	Valine	3.14	Glycine	9.72
無極性アミノ酸	Leucine	1.28	Threonine	8.42
	Isoleucine	0.83	Glutamine acid	5.61
	Proline	0.67	Tyrosine	4.80
	Phenylalanine	0.57	Arginine	4.70
	Tryptophan	0.49	Alanine	3.57
酸性アミノ酸	Aspartic acid	18.00	Lysine	3.42
	Glutamine acid	5.61	Valine	3.14
	Arginine	4.70	Histidine	1.62
塩基性アミノ酸	Histidine	1.62	Leucine	1.28
	Lysine	3.42	Isoleucine	0.83
	Serine	29.40	Proline	0.67
オキシアミノ酸	Threonine	8.42	Phenylalanine	0.57
	Tyrosine	4.80	Tryptophan	0.49
	Methionine	0.11	Cystine	0.47
含硫アミノ酸	Cystine	0.47	Methionine	0.11
Total	96.82			

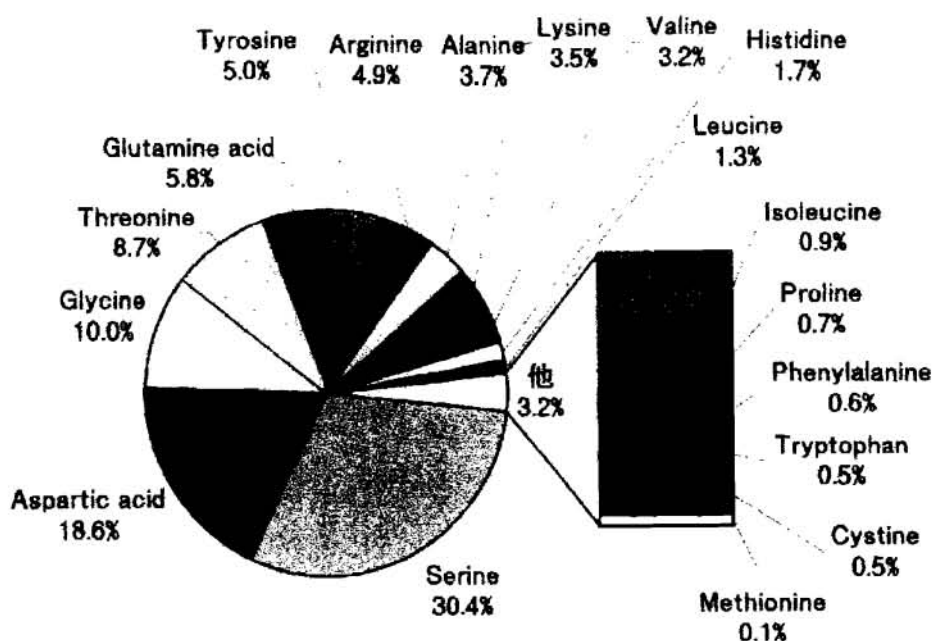


図6 セリシン粉末のアミノ酸の百分率

表6 SDS-PAGE分析結果

Band	Molecular mass (kDa)
1	159
2	65.6
3	63.3
4	55.8
5	52.9
6	48.4
7	43.4
8	37.5
9	34.8
10	31.5
11	27.9
12	15.6

表7 セリシン添加白飯の分析結果

	水分(%)	硬度(g/■)	付着性(g/■)	咀嚼率(%)
白飯 (セリシン添加)	61.95	4.87	1793	67.3

表8 炊飯テスト条件の結果

	テスト1	テスト2	テスト3	テスト4
品名	アクアマックス	アクアマックス	シルクパウダー	昆布t
精白米銘柄	¥280	¥280	¥280	業務用上米
炊飯量	5.6kg	5.6kg	5.6kg	5.6kg
浸漬温度	23.8℃	23.8℃	23.8℃	23.8℃
浸漬時間	120分	120分	120分	120分
浸漬後米重量	7.2kg	7.25kg	7.2kg	7.3kg
一次歩留まり	1.28	1.29	1.28	1.3
二次歩留まり 予測	2.4(13.44kg)	2.4(13.44kg)	2.4(13.44kg)	2.4(13.44kg)
加水量	6.24kg	6.19kg	6.24kg	6.14kg
加水量 (蒸発予測分)	0.8kg	0.8kg	0.8kg	0.8kg
加水量合計	7.04kg	6.99kg	7.04kg	6.94kg
炊飯前重量	14.24kg	14.24kg	14.24kg	14.24kg
添加物				
1 昆布風味				112g
2 アクアマックス	1/1000(5.6 g)	1/500(11.2 g)		0
3 シルクパウダー			1%(56g)	0
4 SRオイルHS				30cc
5 セリシン				0
使用炊飯釜	ライスフレンド20	ライスフレンド20	ライスフレンド20	ライスフレンド20
炊き上がり重量	12.25kg	12.45kg	12.45kg	12.40kg
二次歩留まり	2.18	2.22	2.22	2.21
蒸発量	1.99kg	1.79kg	1.79kg	1.84kg
合わせ酢添加量	5kg(550cc)	5kg(550cc)	5kg(550cc)	5kg(550cc)
ガスバーナー火力	①半開	②全半開	③全開	③全開
蒸らし温度	①156℃	③177℃	③171℃	④186℃
蒸らし時間	20分	⇒	⇒	⇒

発 行 2001年 3月15日

発行所 財団法人 衣笠会

〒603-8326

京都市北区北野下白梅町29

TEL. 075-461-5949

FAX. 075-463-6679

印 刷 爲國印刷株式会社

TEL. 075-462-7889