

第7号

纖維研究所研究報告

2003

財団法人 衣笠会

京都市北区北野下白梅町29 〒603-8326

目次

報文

- セリシン処理によるポリエステル編布の基本力学特性および風合いの変化
米田守宏・槻木みどり・小松かおり・山崎 隆 1

- ハナサナギタケ (*Isaria japonica*) の水溶性多糖による
マウスマクロファージにおけるTNF- α 及びNO産生の促進
川上佐知子・湊 健一郎・今村利勝・相菌泰生・水野雅史 11

- カイコ絹糸腺における炭水化物代謝に関する研究
前部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性変動とmRNAの発現
定金恵子・古澤壽治・黄俊逸・林 幸之 19

- Silkworm Transformation using *Autographa californica*
Nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* Transposable Elements
Masafumi YAMAMOTO・Masafumi YAMAO・Hiroshi NISHIYAMA
Sumiharu NAGAOKA・Yoshiyuki HAYASHI and Hajime MORI 29

- カイコRNA結合タンパク質BmTRN-1の機能解析
小谷英治・古澤壽治・林 幸之 35

- 大阪市内における人工飼料無菌周年蚕糸生産
松原藤好・合田恵子・陳 瑞英・角田素行 43

短報

- Trial on Aseptic Rearing of the Mulberry Wild Silkworm (*Bombyx mandarina*)
Masatoshi ICHIDA・Syuji DOI・Yoshihiko MIURA
Takashi NAKAMURA and Yutaka BANNO 51

技術資料

- インドのマニプール州における養蚕技術指導 大槻良樹 55

総説

- 絹セリシンの利用技術・商品開発の動向 三好 明・山崎 隆 63

- 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況 71

セリン処理によるポリエステル編布の 基本力学特性および風合いの変化

米田守宏*, 槻木みどり*, 小松かおり*, 山崎隆**¹

Changes in Mechanical Properties and Hand of Polyester Knitted Fabrics by Processing with Sericin

Morihiro YONEDA*, Midori TSUKIKI*, Kaori KOMATSU*
and Takashi YAMAZAKI**

*Faculty of Human Life and Environment, Nara Women's University,
Kitauoya-Nishimachi, Nara 630-8506, JAPAN

**Kinugasakai Textile Research Institute, 29 Shimohakubai-cho, Kitano, Kita-ku,
Kyoto 603-8326, JAPAN

Abstract

In order to investigate the effect of processing with sericin on fabric performance, basic mechanical properties and hand of polyester knitted fabrics with and without sericin processing were measured using KES-FB system. Sericin processing was carried out using super electrolyte solution method and the traditional method.

The results obtained are as follows.

(1) Changes in mechanical properties of fabrics by processing with sericin were observed in bending rigidity B , linearity of compression LC and mean friction coefficient MIU . B , LC and MIU increased by processing.

(2) It is conjectured that changes in mechanical properties of fabrics by processing with sericin may be caused by changes in mechanical properties of single fibers because of adhesion of sericin layer on fiber surface.

(3) Comparison between hand of the processed and the original fabrics showed that hand of original fabrics does not change so much by processing with sericin.

(4) A sensory test of touch of the processed and the original fabrics was carried out, and the results showed that touch of the original fabrics does not change so much by processing with sericin.

The results showed that sericin processing by super electrolyte solution method is a good processing method by which can attach the properties of sericin to fibers without change in hand of the original fabrics.

1. 緒言

蚕が吐出する繭糸は、繊維状タンパク質フィブロインおよび水溶性タンパク質セリンからなっている。このうちセリンは、絹製品を製造するさいに精練工程において溶解され、不純物として廃棄されてきた。しかし廃液中に溶解しているセ

リンは保湿性や生体適合性など数々のすぐれた性質を持っている。そのためセリンは、繊維加工剤、食品、化粧品など、様々な分野への応用が試みられており、生物由来のすぐれた有機素材として、有効利用が期待され、最近注目を集めている。

セリンの加工法としては、これまで加水分解

*連絡先：奈良女子大学生生活環境学部、630-8506 奈良市北魚屋西町、E-mail: yoneda@cc.nara-wu.ac.jp
TEL & FAX 0742-20-3463

**連絡先：(財)衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、E-mail: zai-kinugasakai@nifty.com
TEL 075-461-5949, FAX 075-463-6679

にもとづく方法が用いられてきたが、この方法には、加水分解によりセリシンが低分子量化すること、付着性/耐久性がよくないなどいくつかの問題点が指摘されてきた。最近、著者らの一人により、強電解水法にもとづくセリシンの抽出法/加工法[1]が開発されているが、加工法として従来法にはない、いくつかの利点を備えている。また、セリシン処理は本来吸湿性を持たないポリエステル繊維に対して吸湿性を付与する方法として有望であると考えられる。しかし、セリシン処理により、布の力学特性や風合いがどのように変化するかという問題は、加工布の実用性能の評価において重要である。そこで本研究では、インナー用途のポリエステル編布を原布として、強電解水法および従来法によりセリシン加工を施して得られた加工布の基本力学特性および風合いを測定することにより、セリシン加工によるこれら性質、性能の変化について検討を行う。

2. 試料

2.1 セリシンの加工方法

本研究では、セリシンによる繊維および布の加工法として強電解水法[1]を用いている。本方法は強電解水溶液 (pH=12) を用いてセリシン成分を抽出したあと、同水溶液に加工の対象物である繊維あるいは布を浸漬し、セリシン成分を繊維

表面に付着させるという方法である。本方法によれば、高分子量のセリシンが得られ (Mw=67,000)、繊維に対する付着性、耐久性が優れていることが確認されている*。また、常温で加工が可能であり、とくに加熱する必要がないため、製造工程におけるエネルギーコストの面で有利である。本方法は天然繊維、再生繊維および合成繊維など各種繊維に応用が可能であり、これらの繊維に対してセリシンのもつ特性を付与することが可能である。加水分解にもとづく従来のセリシン加工法では、加水分解によりセリシンが低分子量化すること、高温処理 (90~95℃) を必要とするためエネルギーコストがかかること、付着性、耐久性がよくないこと等の問題点が指摘されていたが、本研究で用いる強電解水法では従来法のもつ以上のような問題点が解決されている。(注*: セリシン加工により繊維表面にセリシン層が付着していること、および付着性・耐久性がよいことはニンヒドリンスプレー法により定性的に確認されている。)

2.2 試料

Table 1 に本研究で用いた試料の詳細を示す。セリシン加工による布の力学特性および風合いの変化を比較検討するため、未加工原布に対して従来法による加工および強電解水法による加工を行った試料を用いている。未加工原布はポリエステル編布4種 (A, B, C, D) であり、用途は婦人

Table 1 Details of Samples

Sample No.	Processing*	Fiber	Knit Structure	Gauge
A-1	BLANK	Polyester	56T x 30F Smooth	40
A-2	DP	Polyester	56T x 31F Smooth	40
A-3	SP	Polyester	56T x 32F Smooth	40
B-1	BLANK	Polyester	56T x 33F Smooth	32
B-2	DP	Polyester	56T x 34F Smooth	32
B-3	SP	Polyester	56T x 35F Smooth	32
C-1	BLANK	Polyester	33T x 18F Tricot	40
C-2	DP	Polyester	33T x 19F Tricot	40
C-3	SP	Polyester	33T x 20F Tricot	40
C-1	BLANK	Polyester	Smooth	32
C-2	DP	Polyester	Smooth	32
C-3	SP	Polyester	Smooth	32

*BLANK : No processing

DP : Hydrolysis Method

SP : Super Electrolyte Solution Method

インナー用で製品として市販されているものを含んでいる。組織に関する詳細を述べると、試料A, B, C, Dはスムーズ組織で緯編タイプに属しており、試料Cはトリコット組織で経編タイプに属している。後で示すように、原布は一般に構造的には非常に薄く、力学的には非常に曲げ柔らかいという特徴を持った布である。コード番号における添字として原布を1、従来法(DP法)による加工布を2、強電解水法(SP法)による加工布を3で示すことにする。以上、未加工および加工による違いを含めて12種の試料布を用いて基本力学特性の測定を行った。測定に用いた試料の寸法は、ウェール方向、コース方向それぞれに20cm×20cmに切り出したものである。

3. 方法

基本力学特性の測定にはKES-FB力学特性測定システムを用い、引張り、剪断、曲げ、圧縮、表面の各特性を測定し、16項目の力学特性パラメー

タを求めた[2]。Table 2に力学特性のブロック、力学特性パラメータ、測定条件の詳細を示す。本研究において試料として用いた編布は、構造的には非常に薄く、力学特性としては非常に曲げ柔らかいという特徴を備えているため、測定条件の選択および試料の取り扱いには注意を払っている。以下に測定上、配慮した諸点について記す。引張り、圧縮では高感度条件を用いて測定した。引張りでは $F_{max}=50\text{gf/cm}$ 、圧縮では $P_{max}=10\text{gf/cm}^2$ である。曲げでは、重力の影響を取り除くため、試料を水平に設置するタイプのKES-FB2-AUTO-Aを用いて測定した。表面特性の測定においては、摩擦用接触子として広幅タイプのものを用いた(長さ5mm、幅30mm)[3]。

布の力学特性パラメータを用いて風合い値の算出を行った。計算に用いた風合い予測式は婦人薄手布地用途用のKN-202LDY式である[4]。この式は高感度条件下での測定パラメータを用いるもので、基本風合いとして、“こし”、“はり”、“しなやかさ”、“ふくらみ”、“しゃり”、“きしみ”

Table 2 Parameters and conditions of measurement on mechanical properties of fabrics

Properties	Symbols	Characteristic Value	Unit	Measuring Condition
Tensile*	LT	Linearity of tension	n.d.	Maximum load ; 50gf/cm
	WT	Tensile energy	gf·cm/cm ²	Tensile strain rate ; 0.2%/sec.
	RT	Tensile resilience	%	Speed ; 0.1mm/sec
Bending	B	Bending rigidity	gf·cm ² /cm	Maximum curvature ; $K_{max} = \pm 2.5\text{cm}^{-1}$
	2HB	Hysteresis of bending moment	gf·cm/cm	Bending rate ; 0.5^{-1}cm/sec .
Shear	G	Shear stiffness	gf/cm·deg	Shear deformation under constant tension ;
	2HG	Hysteresis of shear force at 0.5 degree of shear angle	gf/cm	W=5gf/cm
	2HG5	at 5 degree of shear angle	gf/cm	
Compression*	LC	Linearity of compression	n.d.	Maximum pressure ; 10gf/cm^2
	WC	Compressional energy	gf·cm/cm ²	Rate of compression ; $6.6\mu\text{m/sec}$.
	RC	Compressional resilience	%	
Surface	MIU	Coefficient of friction	n.d.	Contact for friction measurement ;
	MMD	Mean deviation of MIU	n.d.	30mm length simulating finger skin geometry**
	SMD	Geometrical roughness	μm	Contact force ; 50gf
Construction	T	Fabric thickness	mm	$P=0.5\text{gf/cm}^2$
	W	Fabric weight	mg/cm ²	

*Measured at High Sensitivity conditions

**Wide type contactor for friction measurement

の6項目を算出する。

セリシン処理布および未処理布を用いて、手触りに関する官能試験を実施した。被験者は20代の健康な女子学生16名であり、測定環境は20℃、65%RHのもとで行った。評価項目は9項目で、7段階評価のSD法を用いて行った。結果は単純集計を行い、各項目に対する被験者全体の評定平均値を求めた。t検定を用いて試料間の評価に関する有意差検定を行った。

4. 結果と考察

4. 1. 未加工布の基本力学特性および風合い

未加工原布の力学特性の特徴を把握するため、図1に各基本力学特性の測定曲線の例を示す。試料はA-1のウェール方向である。今回測定した編布の特徴は、圧縮、曲げおよび表面特性に現れ

ている。曲げ特性では、曲げ剛性 B が非常に小さく極度に曲げ柔らかく、ヒステリシス幅 $2HB$ が非常に小さいことが特徴である。圧縮特性では、最大圧縮率 EMC が小さく、圧縮ヒステリシスが小さい(圧縮レジリエンス RC は大きい)。また、表面粗さ SMD は $1\mu\text{m}$ 前後と小さく、非常に表面が滑らかであった。ほかに、引張り特性では、一般に引張りの線形性 LT が大きく、小さな力で伸びやすい。剪断特性では剪断力-剪断角の関係が広い剪断角の範囲において直線的であり、剪断ヒステリシス $2HG$ は小さい。

未加工布4種の力学特性の試料間の特徴を比較するため、婦人薄手布地用チャート紙に力学特性パラメータをプロットした(図2上側)。本チャート紙は婦人薄手布地の風合い予測式の作成に用いられた試料布の母集団($N=120$)の各力学特性の平均値および標準偏差を基準として作成されたも

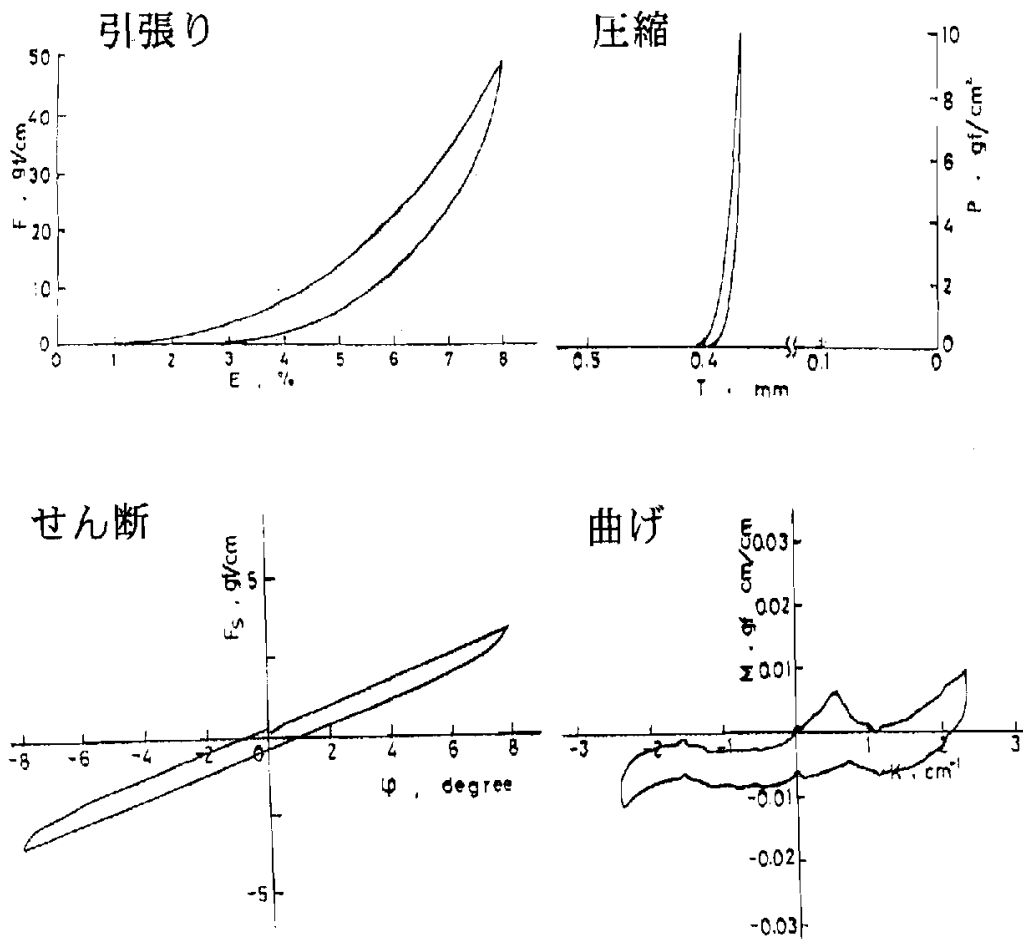


Fig.1 Examples of the measurement curve of mechanical properties of the original polyester knitted fabrics (Sample: A-1 Wale)

のである。中心軸は母集団の平均値、 ± 1 は標準偏差 $\pm \sigma$ 、 ± 2 、 ± 3 はそれぞれ $\pm 2\sigma$ 、 $\pm 3\sigma$ を表している。このチャート紙に力学特性をプロットすることにより、本研究で用いた試料布が標準的な婦人薄手布地試料と比較してどのような特徴を備えているかを把握できる。多くの力学特性パラメータは ± 1 の範囲に入っており、これら多くの特性については本試料布が通常の布地と似通った性質をもっているといえる。しかし、引張り仕事量WT、曲げ剛性B、圧縮レジリエンスRCおよび圧縮の線形性LCは ± 1 の範囲から逸脱しており、これらの特性において本試料布が通常の薄手布地と異なった特徴を持っていることを示してい

る。とくにBが非常に小さく、極度に曲げ柔らかいというのが、本試料布の最大の特徴である。またWT、LC、RCが大きいということは、本試料布の繊維集合構造がかなり密であることを示唆している。経編布Cと緯編布A、B、Dを比較してみると、試料布Cはとくに剪断特性においてG、2HG、2HG5とも試料布A、B、Dに比べて全般にやや大きめの値を持っていることが特徴的である。この事実は、経編布が織物構造に類似した構造を持っていることを考慮すると理解できる。

基本力学特性パラメータを用いて、KN-202LDY式により婦人薄手布地用途における基本風合い値6項目を算出し、チャート紙にプロットした

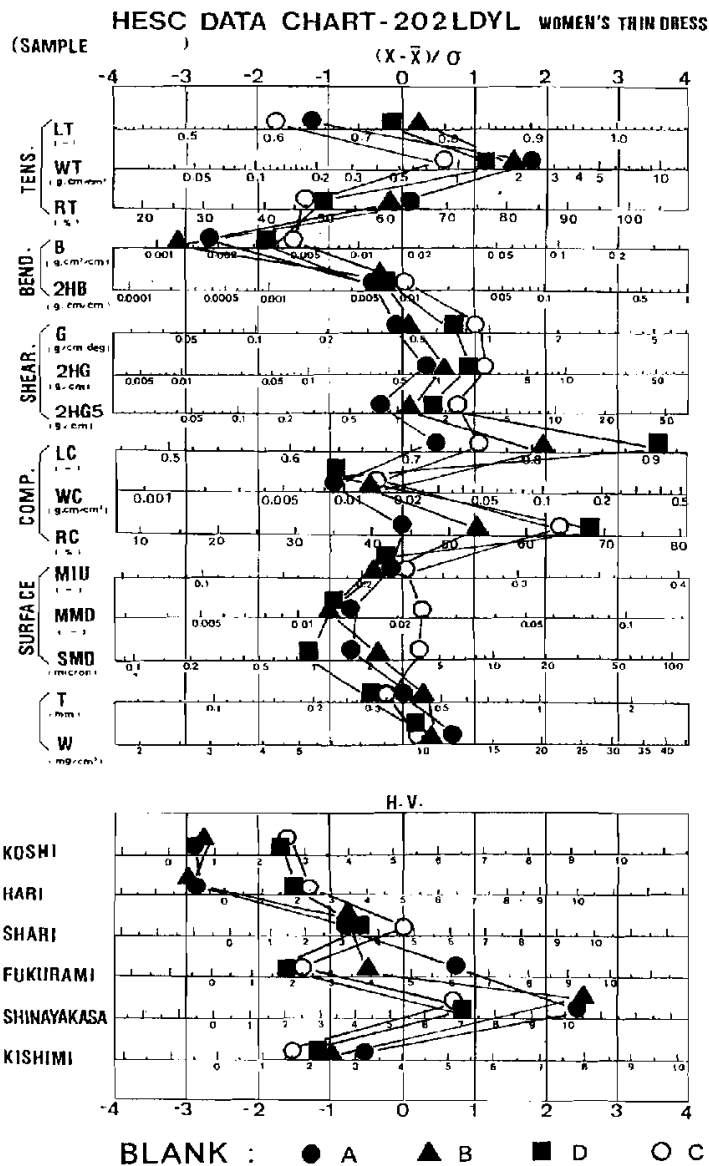


Fig.2 Mechanical properties and hand of the original knitted fabrics (Sample : A, B, C, D)

(Fig 2 下側)。基本風合いの場合も、力学特性の場合と同様に、本チャート紙にプロットすることにより、本試料布が通常の薄手布地と比較したときの風合いにおける特徴を把握できる。“しゃり”、“ふくらみ”、“きしみ”の値は、おおむね±1の範囲に入っており、通常の薄手布地と同様の傾向をみせているといえる。“こし”、“はり”値は-1をかなり下回っており、“しなやかさ”値が+1を上回っているのが本試料布の特徴である。このことは、本試料布が、全体的に柔らかく、しなやかな特徴を備えていることを示している。

4. 2. セリシン加工布と未加工布の
基本力学特性の比較

セリシン加工布と未加工布の基本力学特性を比較することにより、未加工原布の特性がセリシン加工によりどのように変化したかについて検討する。またDP加工およびSP加工を比較すること

により、加工法の違いによる効果についても検討する。

Fig 3 に、婦人薄手布地用チャート紙に試料布Aの未加工布と加工布（DP加工およびSP加工）の力学特性パラメータをプロットしたものを示す。加工によりとくに大きく変化した特性は、曲げ剛性B、圧縮の線形性LCおよび平均摩擦係数MIUである。曲げ剛性Bについては、DP加工ではわずかに増加しているのみであるのに対し、SP加工では大きく増加している。圧縮の線形性LCでは、DP加工、SP加工とも大きく増加しているが、SPのほうがDPにくらべて二倍程度大きくなっている。平均摩擦係数MIUでは、DP加工、SP加工とも少し増加しているが、SPのほうがDPよりもやや大きくなっている。次にセリシン加工によるこれら力学特性の変化について考察する。曲げ剛性Bがセリシン加工により大きくなって

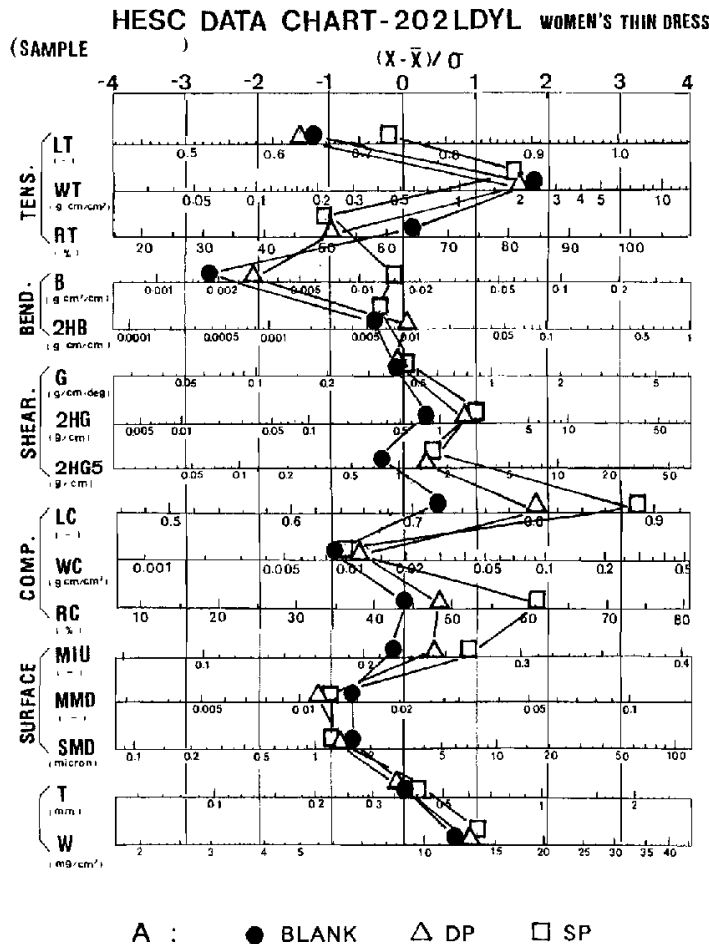


Fig.3 Comparison of mechanical properties of the original and the processed fabrics
(Sample A, DP: Hydrolysis method, SP: Super Electrolyte Solution method)

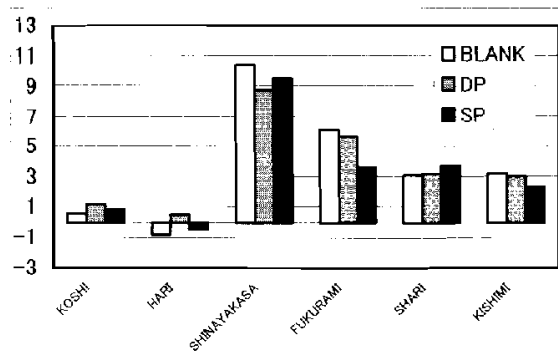
いることは、加工により繊維表面に付着したセリシン層により、布を構成する個々の単繊維の曲げ剛性が大きくなり、結果として繊維集合体である布の曲げ剛性が増加しているものと考えられる。さらに、SP加工のほうが曲げ剛性Bが大きいことは、SPにおけるセリシンの分子量がDPに比べて大きいことによるものと推測される。圧縮の線形性LCがセリシン加工により大きくなっていることも、曲げ剛性Bの場合と同様に考えることができる。圧縮変形の場合、厚さ方向の圧縮により布を構成する個々の単繊維において曲げ変形が生じていることが推測される。したがって、加工によって繊維表面に付着したセリシン層により、個々の単繊維の曲げ剛性が大きくなることにより、圧縮に対して布全体の抵抗力が大きくなり、力学的挙動がより弾性的になっている（LCの増加）ものと考えられる。SP加工のほうが圧縮の線形性LCが大きいことも、曲げ剛性Bの場合と同様に、

SPにおけるセリシンの分子量がDPに比べて大きいことによるものと推測される。

平均摩擦係数MIUの場合は、生じている現象としては金属製の接触子と布表面間の摩擦現象であり、BやLCの場合と多少事情が異なっている。しかし、この場合も金属製接触子と繊維側面間の摩擦力の増加が、加工により繊維表面に付着したセリシン層によるものと考えれば理解できる。B、LCの場合と同じく、SP加工のMIUがDP加工よりも大きくなっている。

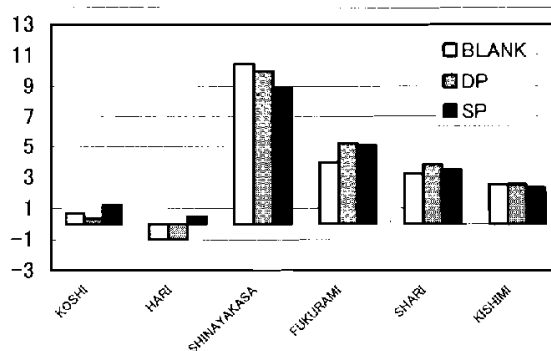
以上、試料布Aについてセリシン加工がポリエステル編布の基本力学特性に及ぼす効果について検討した。曲げ剛性B、圧縮の線形性LCおよび平均摩擦係数MIUにおいて、とくに加工による大きな変化が見出されたが、これらはいずれも加工により繊維表面に付着したセリシン層による効果であると考えられる。また、SP加工のほうがDP加工より特性値の変化量が大きいことは、DP加

H.V.

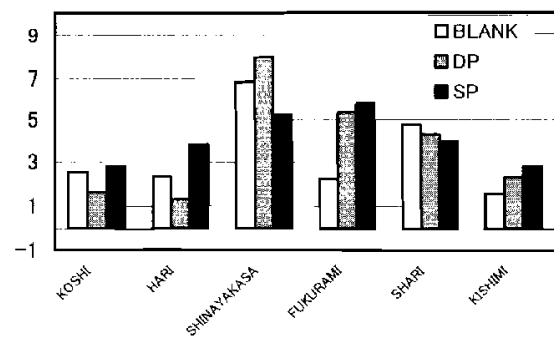


Sample : A

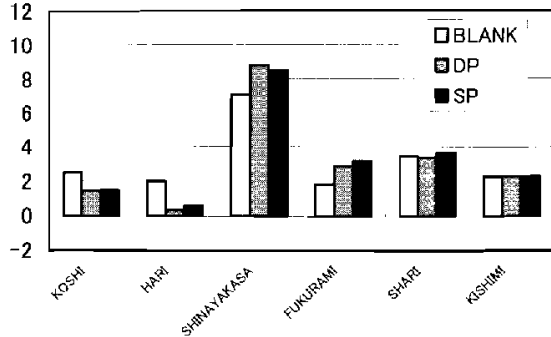
H.V.



Sample : B



Sample : C



Sample : D

Fig.4 Comparison of hand between the original and the processed fabrics (Sample : A, B, C, D)

工において得られるセリシンの分子量が大きいことによるものであると推測される。他の試料布B, C, Dについても同様の比較を行っているが、それぞれの試料において変化する特性値の種類や変化の程度は多少異なるが、いずれもセリシンの付着効果によるものであると推測される。

4. 3. セリシン加工布と未加工布の風合い値の比較

セリシン加工布と未加工布の風合い値を比較することにより、未加工原布の風合いがセリシン加工によりどのように変化したかについて、また加工法による違いについて検討する。

Fig 4 に試料布A, B, C, Dにおいて、風合いの項目ごとに未加工布、加工布(DP法およびSP法)を比較したグラフを示す。風合いの絶対値の比較的大きい“しなやかさ”、“ふくらみ”、について加工による効果を検討する。“しなやかさ”について見ると、試料布A, Bでは加工により風合い値は少し減少している。試料布Cでは、DP加工により“しなやかさ”値は増加している

が、SP加工により減少している。試料布Dでは、DP加工、SP加工とも、“しなやかさ”値は増加している。“ふくらみ”について見ると、試料布Aでは加工により風合い値は少し減少している。試料布B, Dでは、加工により“ふくらみ”値は少し増加しており、試料布Cでは、加工により“ふくらみ”値は大きく増加している。以上を要約すると、加工による変化、および、加工の種類(DPかSPか)による変化は試料、および、風合いの項目により影響のしかたが様々であることがわかる。さらに、加工による風合い値の変化の程度は、ごくわずかの例外(試料布Cの“ふくらみ”の変化)を除いて一般にごくわずかである。風合いの絶対値が中程度である“しゃり”、“きしみ”、および、風合いの絶対値が小さい“こし”、“はり”の場合、加工による風合い値の変化の程度は非常に小さいか、あるいはほとんどないといえる。

以上を通じて、ここで試料として用いたポリエステル編布の場合、全体的にセリシン加工による

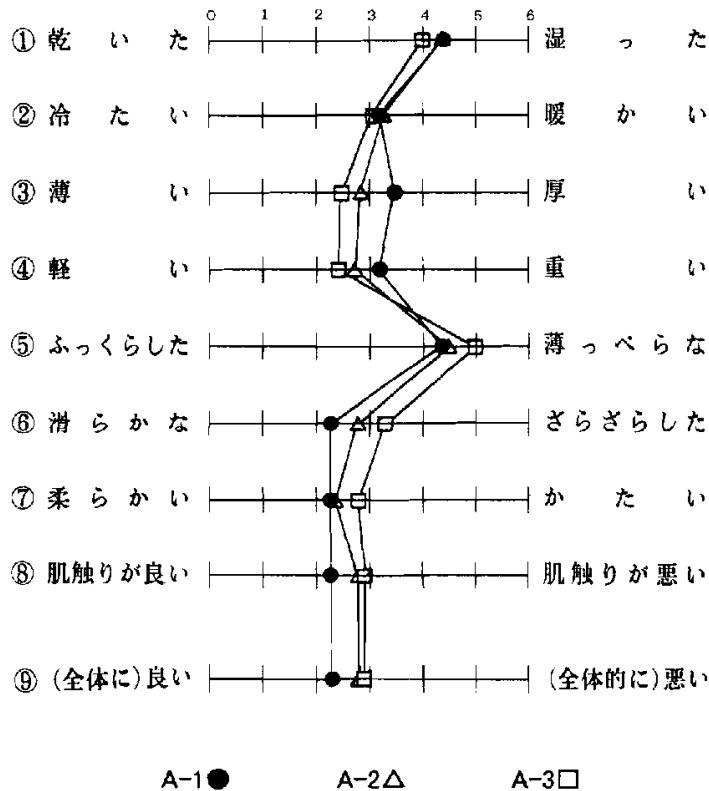


Fig.5 Sensory test of fabric touch of the original and the processed fabrics (Sample: A)

風合いの変化はごくわずかであるといえる。これは、加工による力学特性の違いが、風合い値の計算において多項式の一構成要素として組み込まれることにより、結果として算出される風合い値にほとんど影響を与えないためであると考えられる。また、セリシン加工により風合いが原布とほとんど変わらないということは、原布の風合いをほとんど損なわずにセリシンの特性を繊維、布に与えることができるということを示している。このことは、セリシン処理が加工技術としての有利さを持っていることをも意味している。

4. 4. 手触りに関する官能試験

セリシン加工布および未加工布を試料として、手触りによる官能試験を行った。被験者はインナー素材にユーザーとしてなじみ深いと考えられる健康な20代の女子学生16名である。官能試験の一例をFig 5に示す。試料はAで、未加工布(A-1)、DP加工(A-2)およびSP加工(A-3)の場合の評定平均値をプロットしている。t検定法により有意差検定を行い、5%水準で有意差が認められた質問項目は、試料Aの場合、「薄い」「滑らかな」の2項目であった。他のほとんどの項目においては、有意な差は認められなかった。試料布Aの場合、薄さ感、ざらざら感において多少、処理による影響が現れているものと考えられる。これは、試料布Aにおいて加工による変化が認められた力学特性である圧縮の線形性LCおよび平均摩擦係数MIUが多少影響していることが推測される。他の試料について有意差(有意水準5%)が認められた項目を述べると、試料布Bでは「薄い」、試料布Cでは「薄い」「軽い」であり、試料布Dでは有意差の認められた項目はなかった。

以上より、手触りによる官能試験の結果、全体的に手触りに関してセリシン加工による有意な差はほとんど認められなかったが、加工によりわずかに「軽く」「薄い」方向に向けて、触感の変化が認められた。

5. 結論

セリシン加工を施したポリエステル編布の基本力学特性および風合いを測定し、未加工布と比較

を行うことにより、加工による力学特性および風合いの変化について検討を行った。セリシン処理法として、超電解水法および加水分解法を採用し、加工法による違いについても検討した。未加工原布はインナー用途のポリエステル編布で、構造的には薄く、力学的には非常に曲げ柔らかいという特徴を持った布である。得られた結果は以下の通りである。

- (1) セリシン処理による力学特性の変化は、曲げ剛性B、圧縮の線形性LCおよび平均摩擦係数MIUにおいて認められた。セリシン処理により、曲げ剛性B、圧縮の線形性LCおよび平均摩擦係数MIUは大きくなった。
- (2) セリシン処理により力学特性が変化する原因は、処理により繊維表面に付着したセリシン層であることが推測された。
- (3) 加工布と未加工布の風合い値を比較した結果、加工により原布の風合いはほとんど変化しないことがわかった。
- (4) 加工布と未加工布に対して手触りによる官能試験を行った結果、加工による手触りの変化はほとんど認められなかった。

以上より、超電解水法によるセリシン加工により原布の風合いをほとんど変えることなく、セリシンの持つ特性である保湿性、生体適合性等を付与できることが認められた。本方法は、たとえば、吸湿性を持たないポリエステル繊維に対して吸湿性を付与できる処理法として有効であると考えられる。

文献

- [1] 特願 2001-363542
- [2] 川端季雄 (1980) : 『風合いの標準化と解析 (第2版)』, 風合い計量と規格化委員会, 日本繊維機械学会
- [3] Kawabata, S., Yamashita, Y., Umeda, T., and Nakano, K. (1998) : The 28th Textile Research Symposium at Mt.Fuji, proceedings, p.75
- [4] 川端季雄, 丹羽雅子 (1984) : 繊維機械学会誌, Vol.37, T113

ハナサナギタケ (*Isaria japonica*) の水溶性多糖によるマウスマクロファージにおけるTNF- α 及びNO産生の促進

川上佐知子^{1,2} 湊 健一郎³ 今村利勝^{4,*} 相菌泰生⁵ 水野雅史^{1,**}

Stimulation of TNF- α and NO Productions by Murine Macrophage with Water-Soluble Polysaccharides from *Isaria japonica*

Sachiko KAWAKAMI^{1,2}, Kenichiro MINATO³, Toshikatsu IMAMURA⁴,
Yasuo AIZONO⁵ and Masashi MIZUNO¹.

¹Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

²The Tottori Mycological Institute, Tottori 689-1125, Japan

³Miyagi Agricultural College, Sendai 982-0215, Japan

⁴Aseptic Sericulture System Laboratory, Kyoto 601-8203, Japan

⁵Faculty of Agriculture, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

Abstract

Polysaccharides extracted from *Isaria japonica* with hot-water was purified chromatographically with an index of TNF- α and NO productions by murine peritoneal macrophages. Molecular weight of the purified polysaccharide was 8,200 by high performance size exclusion chromatography. TNF- α and NO productions with purified polysaccharide (500 μ g/ml) were significantly enhanced to 365.9 pg/ml and 37.3 μ M in comparison with the values of 2.2 pg/ml and 13.8 μ M without the polysaccharide, respectively.

The purified polysaccharide did not cross-react with anti- β -1,3- and anti- β -1,6-glucan antibodies, suggesting that it might have a different structure with functional polysaccharides such as letinan, gliforan and schizophyllan.

Key Words : Water-soluble polysaccharides, *Isaria Japonoca*, TNF- α , NO, Macrophage

1. まえがき

キノコ由来の多糖類が、抗腫瘍活性を示すことは良く知られている事実である[1-8]。この活性は、腫瘍細胞にたいして直接細胞毒性を示すのではなく[9-12]、免疫応答系細胞の賦活化によるものである。最近、抗腫瘍性多糖類によるマクロファージの腫瘍壊死因子(TNF- α : tumor necrosis factor- α)の分泌促進が報告されている[13]。腫瘍選択毒性を示す内因性因子であるTNF- α は、腫瘍

細胞に対する重要な防御分子として認められている。レンチナンは、NK細胞を活性化し[14]、また、TNF- α の分泌を含め幾つかのマクロファージの機能を促進する[15]。

フリーラジカルガスである一酸化窒素(NO)は、NO合成酵素(NOS)により生成され[16]、情報伝達、免疫応答、炎症、血小板凝集抑制など、多様な機能に関わっている[17]。さらに、TNF- α により刺激されたマウスマクロファージは、誘導型NOS遺伝子を介してNOを産生し、活性酸素

*連絡先: 無菌養蚕システム研究所、601-8203 京都市南区久世築山町250、
e-mail: tvimamu@m15.alpha-net.ne.jp、TEL & FAX 075-934-9487

**連絡先: 神戸大学大学院自然科学研究科、657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1、
e-mail: mizuno@ans.kobe-u.ac.jp、TEL & FAX 078-803-5835

中間体が腫瘍壊死や微生物殺菌において重要な役割をはたしていることが最近の研究で明らかにされている[17,18]。この様に、TNF- α とNOは、抗腫瘍細胞活性や、免疫系において多様な生理活性を示す因子として作用すると考えられている。

*Isaria japonica*は、Clavicipitaceae科に属し、古来伝統的に、その薬理的機能が研究されていて、韓国では子実体が癌治療に使用されている。Takano et al. は、*Isaria japonica*の培養物をマウスに経口投与すると、抗ヒツジ赤血球ブランク形成細胞の産生が有意に高まることを報告している[19]。最近、*Isaria japonica*のメタノール抽出液からアポトーシス誘導化合物である4-acetyl-12,13-epoxyl-9-trichotecene-3,15-diol が分離され、10nM濃度で、HL-60における核の形態変化、核内DNA断片化のラダーパターン変化やカスパーゼ-3の活性化などが認められている[20]。

しかし、*Isaria japonica*の抗腫瘍性ポリサッカライドに関する知見は見当たらない。従って、この研究において、マウス腹腔マクロファージによるTNF- α とNOの産生を指標として、免疫機能調節ポリサッカライドを検索した。

2. 実験材料と方法

2. 1 材料

ハナサナギタケ (*Isaria japonica*) の子実体は、無菌養蚕システム研究所 (京都) において蚕蛹で培養されたものを用いた。マウス rTNF- α とリポポリサッカライドは、それぞれ、和光純薬株式会社 (大阪) とディフコ研究所 (デトロイト) より購入して使用した。その他の薬品は、特級試薬を購入して使用した。

2. 2 熱水可溶性画分の調製

新鮮なハナサナギタケ子実体を、液体窒素中でWaring Blenderを用いて磨砕した後、凍結乾燥した。乾燥標品 (60g) を200mlの85%エタノール水溶液で、80℃、3時間の条件下、3回抽出し得られた抽出液を濾過した。次いで、濾液を減圧濃縮し、1.5倍容量のクロロホルムで12時間脱脂した。水層を凍結乾燥しMI画分とした。上記のエ

タノール水溶液処理の残渣を、600mlの熱水で6時間抽出し濾過した。この濾液に2,400mlのエタノールを加え、8,000gで30分間遠心分離した。沈澱を水に溶解し、セルロースチューブを用いて純水に対して透析した。透析内液を減圧濃縮後、凍結乾燥しMII画分を得た。他方、遠心分離上清を減圧濃縮後、凍結乾燥してMIII画分とした。

2. 3 熱水可溶性画分からの活性ポリサッカライドの分離

MII画分につき、1/15M phosphate buffer, pH7.2で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6B カラム (2.6×30cm) を用いたクロマトグラフィーによる分画を行った。平衡化に用いた緩衝液でMII-1, MII-2画分を溶出させた後、吸着物質を0.2M, 0.6MのNaClを含む同緩衝液で段階的に溶出した。0.2M NaClを含む緩衝液では、MII-3, MII-4画分が、さらに、0.6M NaClを含む緩衝液では、MII-5画分が溶出された。

次いで、活性画分MII-5 (15mg) を、1/9M phosphate buffer, pH7.2で平衡化したToyopearl HW-55S カラム (1.6×94cm) を用いたゲル濾過に供し、メインピーク画分 (MII-5a) を純水にたいして透析した後、凍結乾燥した。

さらに、この活性画分MII-5a (20mg) を、Mono Q HR5/5カラム (0.5×5cm) を装着したFPLCシステムを用いたクロマトグラフィーに供した。吸着物質を、1/15M phosphate buffer, pH7.2中でNaCl濃度を0~1Mに変化させる直線の濃度勾配法によって分画した。非吸着物質としてMII-5a-1画分が溶出した後、NaCl濃度0.7MでMII-5a-2画分 (マイナーピーク) が、さらに、NaCl濃度0.75MでMII-5a-3画分 (メインピーク) が溶出された。

2. 4 マウス腹腔マクロファージの調製と試料による刺激

マウス (BALB/c) の腹腔内に、2mlの4.05% (W/V) チオグリコレート溶液を投与し、3日後に10mlの無血清RPMI 1640培地を用いて腹腔からマクロファージを採取した。採取細胞をRPMI 1640培地で洗浄した後、平底24ウェルマイクロカルチャープレートを用い、1ウェル当たりの細胞

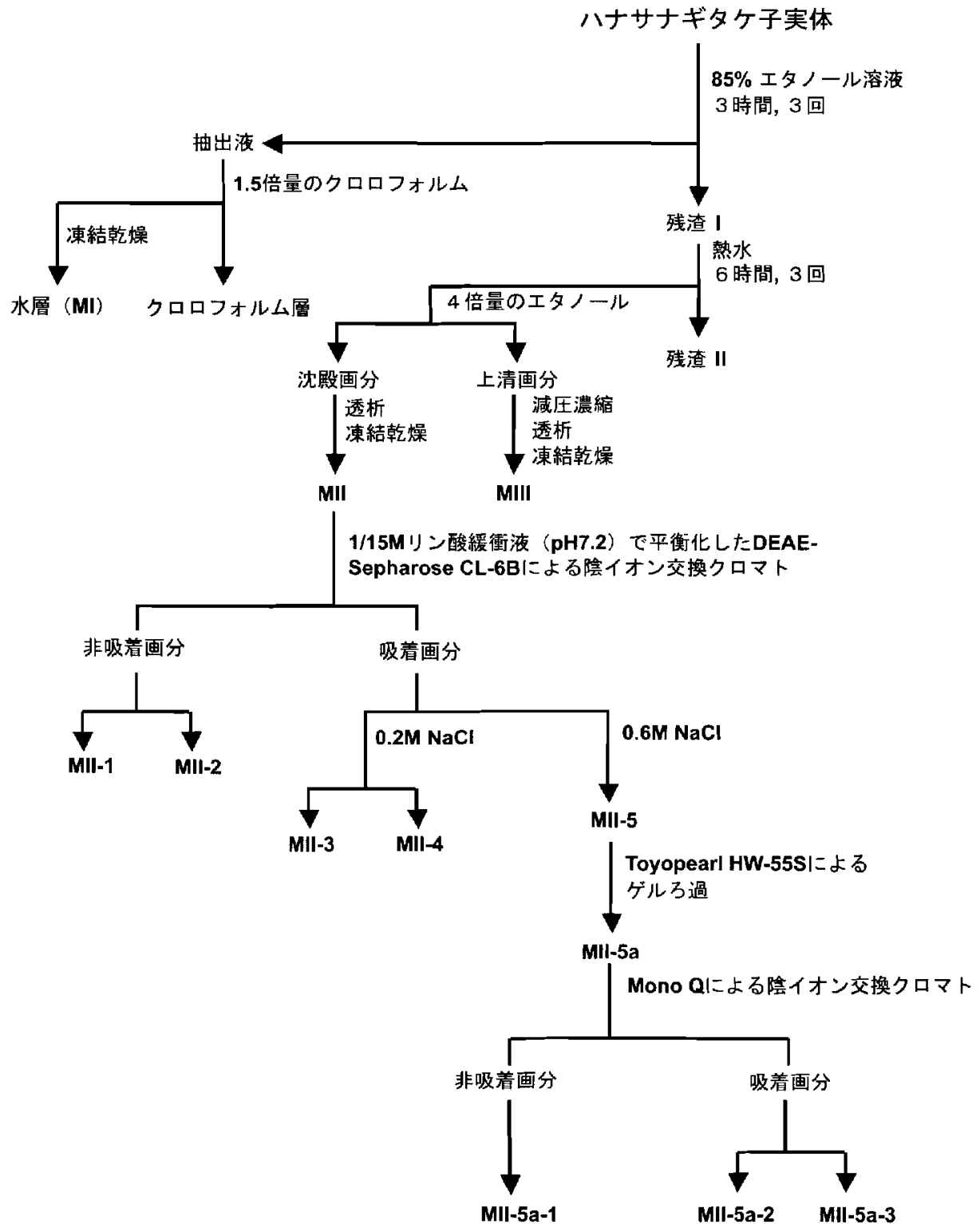


図1. ハナサナギタケ子実体からの多糖類の抽出と熱水可溶性成分の分画

密度を 0.5×10^6 として、5%仔牛胎児血清を含む同培地で、5%CO₂、37℃、2時間培養した。カルチャープレートに接着しない細胞を除去した後、同じ培養条件下で、モノレイヤーのマクロファージを試料で24時間刺激した。ついで、培養上清を採取して300g、5分間遠心分離した。

2. 5 TNF- α の活性測定

TNF- α の活性は、Kerckgyártó et al. の方法[15]に準拠して測定した。培養上清に含まれるTNF- α について、アクチノマイシンD処理マウス繊維芽細胞L-929を用いた生物検定を行った。標準物質としては、リコンビナントマウスTNA- α （和光純薬）を用いた。アクチノマイシンD含有完全培地にL-929細胞を懸濁した溶液（ 2×10^4 cells/ml）を、96穴平底培養プレートに播種した後、腹腔マクロファージ培養上清を添加した。37℃、20時間培養後、残存生細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色した。ついで、570nmの吸光度を測定した。

2. 6 NOの測定

前述の方法で調製したマクロファージを、1ウェル当たりの細胞数を 1×10^6 となるように、24ウェル培養プレートに播種した。24時間後の合成NOは、酸素分子による安定な反応産物である培養上清のNO₂をStuehr and Nathanの方法[21]でアッセイすることにより測定した。

2. 7 分子量の測定

活性画分の分子量評価は、SB-805 HQ（6×50mm）とSB-803 HQ（8×300mm）の両カラム（Showa Denko）を連結した分画システムを用いた高速分子篩クロマトグラフィー（HP-SEC）で行った。試料（40 μ l, 2mg/ml）は、1/15M phosphate buffer, pH7.2を用いて40℃、流速0.8ml/minで、45分間溶出させた。標準物質としては、プルラン・キット（Shodex STANDARD P-82）を用いた。なお、データは、HP-SECソフト（Mellempium 32-J, Waters）により分析した。

3. 実験結果と考察

3. 1 ハナサナギタケ子実体からのポリサッカライドの分離

ハナサナギタケ子実体からのポリサッカライド分画の概要を図1に示す。MI画分は、85%エタノール抽出物から、また、MII画分とMIII画分は、熱水抽出物から分画した。各画分の溶液（100 μ g/ml）につき、マクロファージによるTNF- α とNOの産生促進活性を測定し、表1に示す結果を得た。

さらに、最も高い活性を示した熱水抽出画分、MIIを、DEAE-Sephadex CL-6B カラムクロマトグラフィーに供し、5画分に分離した。それらMII-1, -2, -3, -4, -5の画分で個別に刺激したマクロファージによるTNF- α とNOの産生量を表2に

表1. 画分MI, MII, MIIIのマウス（BALB/c）腹腔マクロファージによるTNF- α とNOの産生にたいする促進活性

	Nitrite (μ M)	TNF- α (pg/ml)
Control	6.2 \pm 0.4	50.4 \pm 5.7
LPS (10 μ g/ml)	35.7 \pm 2.0	1630.1 \pm 84.7
MI (100 μ g/ml)	4.5 \pm 0.9	52.6 \pm 3.4
II (100 μ g/ml)	20.5 \pm 2.8	1460.0 \pm 320.7
MIII (100 μ g/ml)	14.6 \pm 1.7	1348.3 \pm 742.9

測定値：平均値 \pm 標準誤差（n=3）

表2. 画分MII, MII-1, MII-2, MII-3, MII-4, MII-5のマウス（BALB/c）腹腔マクロファージによるTNF- α とNOの産生にたいする促進活性

	Nitrite (μ M)	TNF- α (pg/ml)
Control	1.3 \pm 0.5	28.2 \pm 3.4
LPS (10 μ g/ml)	17.6 \pm 0.2	731.4 \pm 12.6
II (10 μ g/ml)	2.8 \pm 0.2	266.5 \pm 4.7
II-1 (10 μ g/ml)	7.7 \pm 1.0	301.7 \pm 8.6
II-2 (10 μ g/ml)	17.8 \pm 0.2	391.0 \pm 6.6
II-3 (10 μ g/ml)	14.7 \pm 0.7	360.0 \pm 5.4
II-4 (10 μ g/ml)	16.6 \pm 1.6	603.8 \pm 11.6
II-5 (10 μ g/ml)	18.1 \pm 0.1	597.8 \pm 5.0

測定値：平均値 \pm 標準誤差（n=3）

示す。MII-4とMII-5が、両活性において高い比活性を示した。しかし、MII-5の方がMII-4より収量が多かったため、MII-5をToyopearl HW-55Sカラム (1.6×94cm) を用いたゲル濾過に供し、活性画分MII-5aを得た。

さらに、MII-5a画分をMono Qカラムを用いたクロマトグラフィーに供し、3画分に分離した。この3画分MII-5a-1、MII-5a-2、MII-5a-3により刺激されたマクロファージによるTNF- α の産生量と、NOの産生量を表3に示す。このように、MII-5a-2、MII-5a-3が、マウスマクロファージによるTNF- α とNOの産生促進で高い活性を示したが、収量では、MII-5a-3の方が、MII-5a-2を上回ったため、MII-5a-3画分を機器分析に供した。

表3. 画分 MII-5a-1, MII-5a-2, MII-5a-3のマウス (BALB/c) 腹腔マクロファージによる TNF- α と NOの産生にたいする促進活性

	Nitrite (μ M)	TNF- α (pg/ml)
Control	13.5 \pm 0.7	1.9 \pm 0.1
LPS (10 μ g/ml)	75.9 \pm 5.1	199.4 \pm 23.7
MII-5a-1 (500 μ g/ml)	22.3 \pm 0.5	349.0 \pm 38.4
MII-5a-2 (500 μ g/ml)	37.3 \pm 5.9	400.0 \pm 53.4
MII-5a-3 (500 μ g/ml)	30.5 \pm 2.7	388.3 \pm 15.1

測定値：平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

3. 2 MII-5a-3画分の特性

HP-SECによって評価された分子量は、約8,000であった。これまでに報告されている抗腫瘍性多糖類の分子量は、小さくても400,000とされている[22]ので、MII-5a-3画分の構成成分は、新規の抗腫瘍性多糖と推定される。精製されたMII-5a-3画分のTNF- α 産生促進活性は、10~500 μ g/mlの濃度範囲で、投与量に比例して増大した(表4)。MII-5a-3画分の500 μ g/ml濃度では、TNF- α 産生量が、400pg/mlに達し、この量は、10 μ g/mlのリポポリサッカライド(LPS)濃度でのTNF- α 産生量より多かった。また、100 μ g/mlのMII-5a-3濃度でのTNF- α 産生量は、10 μ g/mlのリポポリサッカライドによるTNF- α 産生量と殆ど等しいことが認められた。

表4. 画分MII-5a-3のマウス (BALB/c) 腹腔マクロファージによるTNF- α とNOの産生にたいする促進活性の濃度依存性

	TNF- α (pg/ml)
Control	1.9 \pm 0.1
LPS (10 μ g/ml)	57.2 \pm 12.7
MII-5a-3 (10 μ g/ml)	2.3 \pm 0.2
MII-5a-3 (100 μ g/ml)	43.9 \pm 13.5
MII-5a-3 (500 μ g/ml)	396.0 \pm 34.4

測定値：平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

この物質の構造に関する情報をえるため、MII-5a-3画分についてトリメチルシリル化糖分析を行ったところ、アラビノースとキシロースが2:1のモル比で検出された。しかし、他の糖類は検出されなかった。この結果は、MII-5a-3がアラビナンを主鎖とする構造を有していることを示唆するものである。また、抗腫瘍多糖類は、おもに、 β -1,3-グルカンあるいは β -1,6-グルカンから構成されているが、MII-5a-3は、 β -1,6-グルコース側鎖を有する β -1,3-グルカンに特異的な抗体及び β -1,3-グルコース側鎖を有する β -1,6-グルカンに特異的な抗体と交差反応を示さなかったことから、レンチナン[20]、シゾフィラン[2]、グリフォラン[23]のような抗腫瘍多糖類と異なった多糖構造をとっていることが推測された。この物質の構造決定は、今後の重要課題である。

References

- [1] Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., and Fukuoka, F. (1969) : Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk). *Nature*, 222, 687-688
- [2] Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G., and Sakai, S. (1969) : Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, 60, 137-144
- [3] Nanba, H., and Kuroda, H. (1987) : Antitumor mechanisms of orally administered shiitake

- fruit bodies. Chem. Pharm. Bull., 35, 2459-2464
- [4] Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., and Asakura, A. (1990) : Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "himematsutake", the fruiting body of *Agaricus blazei* murill. Agric. Biol. Chem., 54, 2897-2905
- [5] Mizuno, M., Shiomi, Y., Minato, K., Kawakami, S., Ashida, H., and Tsuchida, H. (2000) : Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits the release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. Immunopharmacology, 46, 113-121
- [6] Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K., and Tsuchida, H. (1998) : Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. Biosci. Biotech. Biochem., 62, 434-437
- [7] Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H., and Tsuchida, H. (1999) : Antitumor polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Mill. Biochem. Mol. Biol. Int., 47, 707-714
- [8] Kawagishi, H., Nomura, A., Mizuno, T., Kimura, A., and Chiba, S. (1990) : Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. Biochim. Biophys. Acta, 1034, 247-252
- [9] Maeda, T.Y., and Chihara, G., (1973) : The effects of neonatal thymectomy on the anti-tumour activity of lentinan, carboxymethyl-pachyman and zymosan, and their effects on various immune responses. In. J. Cancer, 11, 153-161
- [10] Kobayashi, H., Matsunaga, K., and Fujii, M. (1993) : PSK as a chemopreventive agent. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2, 271-276
- [11] Ladanyi, A., Timar, J., and Lapis, K. (1993) : Effect of lentinan on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. Cancer Immunol. Immunother., 36, 123-126
- [12] Mizutani, Y., and Yoshida, O. (1991) : Activation by the protein-bound polysaccharide PSK (krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. J. Urol., 145, 1082-1087
- [13] Okazaki, M., Adachi, Y., Ohno, N., and Yadomae, T. (1995) : Structure-activity relationship of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, in vitro. Biol. Pharm. Bull., 18, 1320-1327
- [14] Nanba, H., and Kuroda, H. (1987) : Antitumor mechanisms of orally administered shiitake fruit bodies. Chem. Pharm. Bull., 35, 2459-2464
- [15] Kerékgyártó, C., Virág, L., Tankó, L., Chihara, G., and Facht, J. (1996) : Strain differences in the cytotoxic activity and TNF production of murine macrophages stimulated by lentinan. Int. J. Immunopharmacol., 18, 347-53
- [16] Xie, O.-W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. (1992) : Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. Science, 256, 225-228
- [17] Lowenstein, C.J., and Snyder, S.H. (1992) : Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell, 70, 705-707
- [18] Lorsbach, R.B., Murphy, W.J., Lowenstein, C.J., Snyder, S.H., and Russell, S.W. (1993) : Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. J. Biol. Chem., 268, 1908-1913
- [19] Takano, F., Kikuchi, Y., Fushiya, S., Hojo, H., Nozoe, S., Yahagi, N., Yahagi, R., and Kondo, Y. (1996) : The culture fluid of

- Isaria japonica* Yasuda augments anti-sheep red blood cell antibody response in mice. Biol. Pharm. Bull., 19, 641-643
- [20] Oh, G.S., Hong, K.H., Oh, H., Pae, H.O., Kim, I.K., Kim, N.Y., Kwon, T.O., Shin M.K., and Chung, H.T. (2001) 4-Acetyl-12,13-epoxy-9-trichothecene-3,15-diol isolated from the fruiting bodies of *Isaria japonica* Yasuda induces apoptosis of human leukemia cells (HL-60). Biol. Pharm. Bull., 24, 785-789
- [21] Stuehr, D.J., and Nathan, C.F. (1989) : Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J. Exp. Med. 169, 1543-1555
- [22] Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. (1970) : Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing (an edible mushroom). Cancer Res., 30, 2776-2781
- [23] Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Sato, K., Oikawa, S., and Yadomae, T. (1989) : Physicochemical properties and antitumor activities of chemically modified derivatives of antitumor glucan "grifolan LE" from *Grifola frondosa*. Chem. Pharm. Bull., 37, 1838-1843

カイコ絹糸腺における炭水化物代謝に関する研究 前部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性変動とmRNAの発現

定金恵子*・古澤壽治*・黄俊逸*・林 幸之**

Carbohydrate Metabolism in the Silk glands of the Silkworm, *Bombyx mori*. Changes of Trehalase Activity and mRNA Content in the Anterior Silk glands

Keiko SADAKANE*, Toshiharu FURUSAWA*,
Junyi HUANG* and Yoshiyuki HAYASHI**

*Center for Bioresource Field Science, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Ippongi-cho, Ukyou-ku, Kyoto 616-8354, Japan

**Kinugasa Research Institute, The Kinugasakai Foundation, 29 Shimohakubai-cho, Kitano,
Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

In order to clarify carbohydrate metabolism in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori*, the changes of trehalase activity was examined about the anterior, middle and posterior silk glands from the day of 4th ecdysis (day 0). Trehalase activity was at a trace level in the posterior silk glands throughout the 5th instar. In the middle silk glands, trehalase activity was appeared from day 2, and then reached at a maximum level (0.19U/larva) on day 8. In contrast, trehalase activity in the anterior silk gland appeared from the 6th day, and then reached at a maximum level (0.55U/larva) on day 9. The maximum level in the anterior silk glands was three times higher than that of the middle silk glands. Thereafter, both activities decreased to a trace level through pupation. In the anterior silk gland, northern and western blotting analysis revealed that trehalase mRNA was expressed from 6th day, and one day later trehalase was synthesized. The immunohistochemical analysis showed that trehalase localized at the basement membrane of the anterior silk gland. These results suggest that blood sugar, trehalose, would be used as an energy source in the anterior silk gland cell during spinning stage.

1. はじめに

蚕の絹糸腺では、5齢起蚕4日目頃から絹蛋白質の合成が始まる。まず後部絹糸腺ではフィブロイン蛋白質が合成され、中部絹糸腺に送られる。そこで合成されたセリシン蛋白質は内腔に分泌され、フィブロイン蛋白質を取り囲む。前部絹糸腺はこれら絹蛋白質（液状絹）を吐糸口へ運ぶための導管の役割を果たし、蛋白質の合成・分泌は行わない[1]。しかし前部絹糸腺では液状絹の脱水

が起こる。徐々に水分率が低下した液状絹は、吐糸管の圧糸部で更に急激に脱水されて繊維化が起こる。

このような、絹蛋白質の合成に関わるエネルギー消費については、体液中のトレハロース及びソルビトール-6-リン酸（S-6-P）の代謝の面から様々な研究がなされている[2]。一般に、昆虫の運動や飛翔へのエネルギー供給源はトレハロースである[3]。5齢蚕の絹糸腺において、トレハロース量は絹糸腺の発育成長とともに増加し、吐糸開始

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部附属生物資源フィールド科学教育研究センター、
616-8354 京都市右京区嵯峨一本木町1、E-mail: toshif@ipc.kit.ac.jp、TEL 075-861-0714

**財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、E-mail: zai-kinugasakai@nifty.com、
TEL 075-461-5949

と同時に減少する[4]。また絹糸腺トレハラーゼ活性は、吐糸開始から急激に上昇する[5]。すなわち絹蛋白質の合成が行われる時期にはトレハラーゼの活性は低いことから、絹蛋白質の合成にトレハロースが利用されているとは考え難い。

一方、体液中にはトレハロースの約2倍量のS-6-Pが存在する[6]。特に後部絹糸腺においてはS-6-P脱水素酵素の活性が高く、絹糸腺の成長に伴ってその活性が変動することから、後部絹糸腺でのフィブロイン蛋白質合成には体液中のS-6-Pがエネルギー源として利用されているようである[2]。

吐糸期に高い活性をみせる絹糸腺トレハラーゼが、絹蛋白質合成へのエネルギー供給に関与していないとすると、その存在意義は何なのか。本論文では、絹糸腺トレハラーゼの生理的機能を明らかにすることを目的とし、前部、中部および後部絹糸腺各部位におけるトレハラーゼ活性の変動、また絹糸腺トレハラーゼmRNAの発現変動や、トレハラーゼ蛋白質の絹糸腺細胞内における局在の面から解析を行った。

2. 材料および方法

2. 1 供試材料

室温26℃で桑葉飼育した交雑種（錦秀×鐘和）の家蚕5齢幼虫を用いた。

2. 2 酵素活性の測定

1) 組織の採取

5齢幼虫を氷上にて低温麻酔した後、0.8%生理食塩水中で解剖を行い、絹糸腺を前部・中部・後部に分けて摘出した。摘出した組織は0.8%生理食塩水に移してよく洗い、余分な水分を除いた後、実験に供試するまで-80℃で凍結保存した。絹糸腺の採取は、5齢起蚕当日（0日目）から吐糸終了（12日目）まで、毎日10頭ずつ行った。

2) 粗酵素液の調製

絹糸腺組織を、0.1M NaClを含む5倍量の20mMリン酸緩衝液（pH7.0）を少量ずつ加え、氷で冷やしながらかき混ぜるホモジナイザーを用いて十分に磨碎した。中部絹糸腺についてはあらかじめ乳鉢ですりつぶした後ホモジナイザーで磨碎した。磨碎

液はその後、15,000×g、4℃で10分間遠心して、その上清を回収して粗酵素液とし、トレハラーゼ活性測定に用いた。

粗酵素液中の蛋白質は、Bio-Rad Protein Assay kit（Bio-Rad社製）を用いて定量した。粗酵素液20μlに染色液200μl、蒸留水800μlを加え、室温で5分間以上放置した後波長595nmで吸光度を測定した。そして予め作成した検量線から、粗酵素液中の蛋白質量を求めた。

3) トレハラーゼ活性測定

トレハラーゼの活性測定には、基質として0.1Mトレハロース溶液、緩衝液として0.1M酢酸緩衝液（pH5.6）を用いた。エッペンドルフチューブ内で、粗酵素液、基質、緩衝液を、前部絹糸腺では1：5：4、中部・後部絹糸腺では1：1：1の割合で混合させ、これを反応液とし、ウォーターバスにて30℃で30分間反応させた。その後、沸騰水中で5分間煮沸することによって反応を停止させた。

酵素反応によって生成されたグルコース量はソモギ・ネルソン法[7]により測定した。すなわち、反応を停止させた反応液100μlにソモギ液を200μl加えてよく攪拌し、沸騰水中で10分間反応させた。その後、冷水で冷却し、ネルソン液を200μl加えてよく攪拌し、蒸留水2mlを加えた後、波長540nmで吸光度を測定した。そして予め作成した検量線から生成グルコース量を求めた。30分間当たりに生成されたグルコース量（1μmoles）をもってトレハラーゼ活性とし、1Uと定義した。

2. 3 ノーザンブロッティングによる分析

1) プロブの作製

(1) トレハラーゼmRNAのプロブ

トレハラーゼmRNAのプロブは、産卵9日目の蚕卵からのトレハラーゼmRNAをRT反応して得られたcDNAをテンプレートとし、Gene Images random prime labeling module（Amersham社製）によって作製した。テンプレートの増幅は、以下の試薬を、最終濃度が記載の通りになるよう調製し、これらを混合して110μlとした。なおプライマーは蚕蛹卵巣から読まれた塩基配列[8]を基に作成した。

- ・ テンプレート (10ngRNAからRT反応によって得られたcDNA)
- ・ 1×PCR buffer
- ・ 1.5mM MgCl₂
- ・ 0.2mM dNTP
- ・ 0.2μMプライマー 1
(5'-TTAGCCAGGCGCGTTAAGCC-3')
- ・ 0.2μMプライマー 2
(5'-ACGCCGTTTCGACCATCCGAATCC-3')
- ・ 滅菌水
- ・ 1U Taq polymerase

混合液は10本のマイクロチューブに分注し、PCRを行った。まず94℃で2分30秒間インキュベートした後、94℃30秒間、64℃1分間、72℃1分30秒間で40サイクル増幅反応を行った。PCR終了後、10本のマイクロチューブのうち1本は増幅の確認の電気泳動に用い、残りの9本は1本のエッペンドルフチューブにまとめ、cDNAを濃縮した。すなわち、PCR産物に等量のPCI (フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1)を加えて攪拌した後、15,000rpm、4℃で5分間遠心して上清を回収した。回収した上清に0.1倍量の3M酢酸ナトリウム溶液 (pH5.2) および2.5倍量の100%エタノールを加えて混合し、室温で30分間静置した。その後15,000rpm、4℃で20分間遠心を行い、ペレットを1mlの70%エタノールで2回洗って15,000rpm、4℃で5分間遠心し、最終的に得られたペレットは20μlの滅菌水で溶解した。濃縮したDNA断片を5μlとり、29μlの滅菌水と混合した後、5分間沸騰水中にて変性した。その後のラベリング反応は、kit中の試薬を以下の量で混合して行った。

- ・ Nucleotide mix 10μl
- ・ Primer solution 5μl
- ・ Exonuclease free Klenow 1.3μl
- ・ 変性DNA 34μl

反応は25℃で約16時間行い、EDTA溶液 (pH8.0)を最終濃度20mMになるよう加えて反応を停止した。作製したプローブは-30℃で遮光保存して用いた。

(2) rRNAのプローブ

rRNAのプローブは、(1)に記載したトレハラー

ゼmRNAのプローブと同じkitを用いた。用いたプライマーの配列は以下の通りである。

プライマー 1 :

5'-GCACGTCCTACTCGTTACGG-3'

プライマー 2 :

5'-AACTCCGGCTTACTCGAACG-3'

またPCRは、94℃で2分30秒間インキュベートした後、94℃30秒間、61℃1分間、72℃25秒間で40サイクル行った。PCR後のcDNAの濃縮、ラベリング反応は(1)に記載したトレハラーゼmRNAのプローブと同様の方法で行った。

2) RNAの抽出

5齢起蚕0日目から12日目までの前部・中部・後部絹糸腺を湿重量100mgになるように乳鉢に取り、液体窒素で凍らせた。ISOGEN (ニッポンジーン社製) 1mlを加えて十分に磨砕し、ISOGEN kitのプロトコールに従ってRNAを抽出した。すなわち、磨砕した組織は室温で10分間放置し、0.2mlクロロホルムを加えて15秒間振盪した後、室温で5分間放置した。その後12,000×g、4℃で15分間遠心し、上層を回収して0.5mlイソプロパノールを加えて穏やかに振盪した。再び室温で10分間放置した後、12,000×g、4℃で10分間遠心し、生じたペレットを1mlの70%エタノールで2回洗って7,500×g、4℃で5分間遠心した。得られたRNAペレットは、前部絹糸腺では30μl、中部・後部絹糸腺では50μlのTE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に溶解した。抽出したRNAは、滅菌水を用いて100~1600倍に希釈して波長260nmでの吸光度から定量した。

3) 電気泳動

各部位の絹糸腺から抽出した0日目から12日目までのtotal RNA量30μgを、滅菌水を用いて全量5.5μlにし、MOPS buffer (20mM MOPS, 5mM酢酸ナトリウム, 1mM EDTA (pH7.0)) 1.0μl、ホルムアルデヒド3.5μl、ホルムアミド10μlと混合した。この混合液を65℃で15分間インキュベートして変性させた後、クラッシュアイス中で急冷した。次いで、1%アガロース、18%ホルムアルデヒド、1×MOPS bufferで調製した5.9cm×10.7cmの変性ゲルを1×MOPS bufferに浸し、変性させたRNAサンプルをアプライして、40Vの定電圧

で5時間泳動した。3枚のゲルにそれぞれ前部・中部・後部絹糸腺のRNAサンプルをアプライして電気泳動を行ったが、中部・後部絹糸腺においては、ポジティブコントロールとして前部絹糸腺9日目のサンプルも同時に泳動した。

4) プロットティング

電気泳動終了後のゲルを、50mM NaOH中で25分間アルカリ変性させ、その後中和液（200mM 酢酸ナトリウム (pH4.0)）中で20分間の振盪を2度行うことによって中和した。中和したゲルを20×SSPE（3 M NaCl、173mM NaH₂PO₄・2H₂O、25mM EDTA）に浸らせた濾紙3枚の上に置き、その上にゲルと同じ大きさに切ったメンブラン、20×SSPEをしみ込ませた濾紙3枚を乗せ、さらに厚みが約5cmになるようにキッチンペーパーを重ねた。上に重しを乗せ、約16時間プロットティングを行った。

5) ハイブリダイゼーション

プロットティング終了後のメンブランを、50mM NaOHを含む濾紙の上に5分間置き、その後2×SSPE中で1分間振盪した。80℃で30分間～1時間乾燥させ、42℃でハイブリダイゼーションバッファ（5×SSPE、50%ホルムアミド、5×Denhalt' solution、0.5%SDS）25ml中で振盪させてプレハイブリダイゼーションを1時間以上行った。プローブはTE bufferで4倍希釈し、沸騰水中で5分間変性させた後、クラッシュアイス中で急冷した。プレハイブリダイゼーション後のメンブランをハイブリバックに入れ、ハイブリダイゼーションバッファ3mlとプローブ20μlを加えて、42℃で約16時間ハイブリダイゼーションを行った。

6) シグナル検出

ハイブリダイゼーション後のメンブランを、一次洗浄液（2×SSPE、0.1%SDS）中で10分2回、二次洗浄液（1×SSPE、0.1%SDS）中で20分2回、三次洗浄液（0.1×SSPE、0.1%SDS）中で20分1回洗浄した。一次洗浄については室温で、二次および三次洗浄については65℃で行った。その後、Buffer A（100mM Tris-HCl、300mM NaCl (pH9.5)）で10倍希釈したGenc Images（Amersham社製）のブロッキング試薬中で1時間ブロッキング、0.5%BSAを含むBuffer Aに1/2000の割合で混

合したアルカリフォスファターゼ抗体と1時間インキュベーション、0.3%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート（Tween-20）を含むBuffer A中で10分間3回洗浄した。これらの操作はすべて室温で行った。洗浄したメンブランはBuffer Aで軽くリンスした後、kit中の検出試薬を用いて検出を行った。

2. 4 ウエスタンプロットティングによる分析

1) SDS-PAGE

5齢起蚕0日目から12日目までの前部絹糸腺粗酵素液を、蛋白質量30μgにそろえ、SDS-PAGEで電気泳動した。ゲルは、6cm×8cmのもので、濃度は10%のものを用いた。分子量マーカーには第一化学薬品社製のタンパク質分子量マーカー「第一」・Ⅲ（フォスフォリラーゼb：97,400、ウシ血清アルブミン：66,267、アルドラーゼ：42,400、カルボニックアンヒドラーゼ：30,000、トリプシンインヒビター：20,100、リゾチーム：14,400）を用いた。泳動は90分間25mAの定電流で行った。

2) ニトロセルロース膜への転写

6cm×8cmに切った濾紙6枚を、0.3M Trisを含む20%メタノール（A液）、25mM Trisを含む20%メタノール（B液）、25mM Tris、ホウ酸を含む25%メタノール（C液）にそれぞれ2枚ずつ浸し、また同じ大きさに切ったニトロセルロース膜（Amersham社製）をC液に浸した。転写装置に、A液に浸した濾紙2枚、B液に浸した濾紙2枚、ニトロセルロース膜、泳動後のゲル、C液に浸した濾紙2枚の順に重ね、上部電極板を設置して1mA×1cm定電流で90分間通電して転写を行った。

3) ウエスタンプロットティング

転写後のニトロセルロース膜を、5%スキムミルクを含むPBS-T（80mMリン酸水素ナトリウム、20mMリン酸二水素ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、0.1% Tween-20）10mlに浸して1時間振盪し、ブロッキングを行った。その後1%スキムミルクを含むPBS-T 10mlで10分間の洗浄を2回繰り返し、1%スキムミルクを含むPBS-T 5mlに抗トレハラーゼ抗体0.5μlを混合した溶液中で

約16時間振盪して一次抗体反応を行った。次に1%スキムミルクを含むPBS-T 10mlで10分間の洗浄を2回繰り返し、1%スキムミルクを含むPBS-T 5mlに二次抗体（HRP標識抗ヤギ-抗ウサギIgG抗体）1 μ lを混合した溶液中で1時間振盪して二次抗体反応を行った。その後1%スキムミルクを含むPBS-T 10mlで10分間の洗浄を2回、PBS-T 20mlで10分間の洗浄を1回を行い、ECL PLUS kit（Amersham社製）を用いて発色反応を行った。kitのA液500 μ lとB液12.5 μ lをよく混合し、これに洗浄後のニトロセルロース膜を浸すことによって発色させた後、暗黒下にてフィルムと密着させてシグナルを検出した。

2. 5 免疫組織染色

1) 組織の固定

免疫組織化学による分析には、前部絹糸腺の最も太くなった、中部絹糸腺との境界の部分を用いた。摘出した組織は、約50倍量のBouin液（ピクリン酸飽和水溶液：ホルマリン：酢酸=15：5：1）に2時間浸した。その後、約10倍量の90%エタノール中で3回、95%エタノール中で1回、99.5%エタノール中で2回、それぞれ1時間ずつ振盪することによって脱水を行った。

2) パラフィン包埋

脱水後の組織を、キシレンに1時間ずつ2回浸した後、燃焼ポットに満たした融解パラフィン中に沈ませた。65℃で30分間静置した後、水中で冷却し、パラフィンに包埋した。

3) 切片の作製

組織を包埋したパラフィンを燃焼ポットからはずし、部分的に熱をかけて台木に密着させた。冷却後、台木ごとミクロトームにセットし、約8 μ mの厚みの横断面切片を作製した。そして、1%ゼラチンおよび0.1%クロム明礬でゼラチンコートしたスライドガラス上に、パスツールピペットで水を置き、その上にスライスした切片を乗せた。スライドガラスを40℃ホットプレート上に置くことにより水を蒸発させ、スライドガラスに組織をマウントさせた。

4) 抗体反応

乾燥したスライドガラスは、染色バットに満たしたキシレンに5分間ずつ2回浸した後、99.5%エタノールに2回、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールに1回ずつ、それぞれ2分間ずつ浸し、脱パラフィンを行った。その後約5分間蒸留水中に浸し、PBS（10mMリン酸緩衝液、0.9%NaCl）で5分間の洗浄を3回繰り返し、1%スキムミルクを含むPBS中でブロッキングを1時間行った。再び5分間の洗浄を3回を行い、水を含ませたキムワイプを入れたモイストチャンバー内で、1/100濃度の抗トレハラーゼ抗体を含むPBSをサンプル上に乗せ、4℃で約16時間一次抗体反応を行った。その後PBS洗浄3回を5分間ずつ行い、1/200濃度のビオチン標識抗ウサギIgG抗体を含むPBSをサンプルの上に乗せ、モイストチャンバー中、室温で1時間二次抗体反応を行った。

5) 発色

発色反応にはABC kitを用いた。kit中のA液、B液およびPBSを、1：1：100の割合で混合し、同じようにモイストチャンバー中でABC（Avidin-Biotin Complex）反応を1時間行った。その後PBS洗浄3回を5分間ずつ行い、発色液中で発色反応を行った。発色液は、0.05M Tris-HCl（pH 7.6）に溶かした10mgDABおよび7.5 μ l H₂O₂を150ml PBSに加えて調製した。反応はDABの発色が十分にみられるまで、5分から10分間行い、直ちに光学顕微鏡で観察した。観察後、PBS洗浄3回を5分間ずつ行い、70%エタノール→80%→90%→100%（2回）→キシレン（2回）（各2分間）の系列で脱水し、エンテランで封入し保存した。

3. 結果

3. 1 トレハラーゼ活性変動

5齢幼虫は、起蚕8口目に吐糸を始めた。その幼虫を、起蚕当日（0日目）から吐糸後4口目（12口目）まで毎日10頭ずつ解剖して、前部・中部・後部絹糸腺に分けて採取し、それぞれのトレハラーゼ活性を測定した（図1）。

後部絹糸腺では、トレハラーゼ活性は5齢期を通して常に0.02U以下という低い値に留まってお

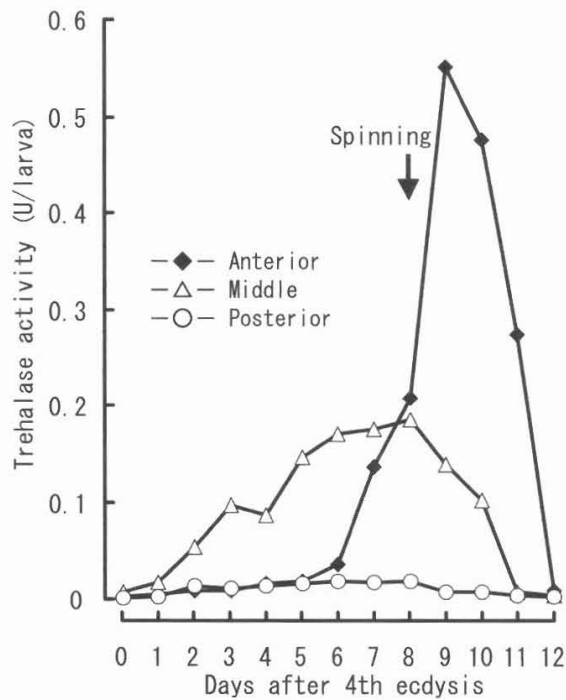


図1. 5 齢期における前部、中部および後部絹糸腺トレハラーゼの活性変動

5 齢幼虫を起蚕当日 (0 日目) から吐糸後 4 日目 (12 日目) まで毎日 10 頭ずつ解剖して、前部・中部・後部絹糸腺に分けて採取して磨碎し、そのトレハラーゼ活性を測定した。—◆—: 前部絹糸腺、—△—: 中部絹糸腺、—○—: 後部絹糸腺

り、大きな変動はみられなかった。

中部絹糸腺でのトレハラーゼ活性は、5 齢起蚕時では約 0.08U であったが、その後緩やかに上昇し、起蚕 8 日目 (吐糸 0 日目) に最大値 (約 0.19U) に達した。その後は急激に減少し、最終的に 0.04U となった。

それに反し、前部絹糸腺においては、トレハラーゼ活性は 5 日目頃まで 1 頭あたり約 0.02U 以下という低い値に留まっていたが、6 日目頃から急激な上昇を始め、中部絹糸腺より 1 日遅い 9 日目 (吐糸 1 日目) に最大値 (約 0.55U) に達した。その値は中部の約 3 倍であった。その後、吐糸終了に向けて急激に減少し、化蛹直前の 12 日目 (吐糸 4 日目) には約 0.09U までに低下した。

3. 2 絹糸腺におけるトレハラーゼ mRNA の変動

前記のトレハラーゼ活性の変動が *de novo* によるトレハラーゼ蛋白質の合成に依存しているか否

かについて検討するため、トレハラーゼ mRNA 量の変動について検討した。前部、中部および後部絹糸腺を、5 齢起蚕当日 (0 日目) から吐糸後 3 日目 (11 日目) までの幼虫 10 頭ずつから採取し、ISOGEN で RNA を抽出した。total RNA 30 μg をアプライし、トレハラーゼ mRNA のプローブとハイブリダイゼーションしてノーザンブロッティングを行った。またコントロールとして rRNA のプローブを用いて rRNA の発現もみた (図 2)。

前部絹糸腺では、rRNA が 5 齢期を通じて常に発現しているのに対し、トレハラーゼ mRNA は 6 日目頃から発現がみられ、9 日目に最大となった後、減少した。この変動パターンは、トレハラーゼ活性変動の結果と一致している。

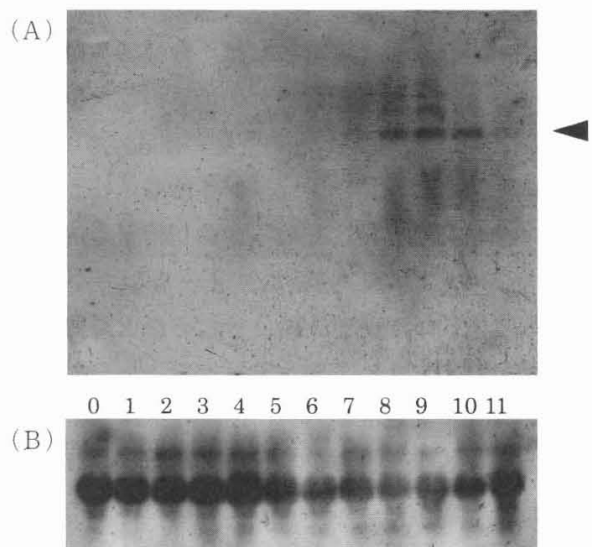


図 2. 前部絹糸腺におけるトレハラーゼ mRNA の発現

5 齢幼虫を起蚕当日 (0 日目) から吐糸後 3 日目まで毎日 10 頭ずつ解剖して、前部絹糸腺を採取し、ISOGEN で RNA を抽出した。その後トレハラーゼ mRNA のプローブとハイブリダイゼーションし、ノーザンブロッティングを行った (A)。またコントロールとして rRNA のプローブを用いて rRNA の発現をみた (B)。矢印: トレハラーゼ mRNA、数字: 5 齢起蚕からの日数

中部・後部絹糸腺においては、本論文中に結果は示していないが、rRNA は 5 齢期を通じて常に発現していた。しかし、前部絹糸腺 9 日目の mRNA を用いたポジティブコントロールは検出されているのに対し、中部および後部絹糸腺トレハ

ラーゼmRNAの発現はまったくみられなかった。

3. 3 絹糸腺におけるトレハラーゼ蛋白質の変動

5 齢起蚕当日（0 日目）から吐糸後4 日目（12 日目）までの前部絹糸腺粗酵素液を、SDS-PAGEで電気泳動しウエスタンブロッティングを行った（図3）。その結果、0 日目から6 日目ごろまではバンドはみられず、7 日目頃から検出され始めた。9 日目に最も濃いバンドが確認され、その後は減少していった。これはトレハラーゼ活性変動の結果と一致しており、バンドの検出はmRNAの検出に比べ1 日遅れていた。

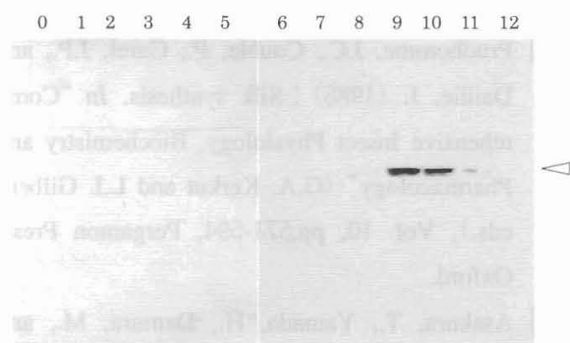


図3. 前部絹糸腺におけるトレハラーゼ蛋白質の検出

5 齢幼虫を起蚕当日（0 日目）から吐糸後4 日目（12 日目）から得られた前部絹糸腺粗酵素液を、10 %ゲルを用いてSDS-PAGEで電気泳動し、ニトロセルロース膜へ転写した。矢印：トレハラーゼ蛋白質（約68kDa）、数字：5 齢起蚕からの日数

3. 4 免疫組織化学的分析

前部絹糸腺の、中部絹糸腺との境界部分を抽出し、パラフィン包埋してマイクロトームで横断面の切片を作製した。それをトレハラーゼ抗体と反応させ、ABC kitを用いて発色させて顕微鏡で観察した（図4）。その結果、絹糸腺細胞の中でも特に体液に接する基底部分で強く染色されていたが、内腔側では染色程度は基底部分のそれに比べて弱かった。さらに、絹糸腺組織の内部にある液状絹にはトレハラーゼはほとんどみられなかった。

4. 考察

蚕の絹糸腺の、5 齢起蚕から吐糸期にかけての肥大に伴い、絹糸腺トレハラーゼ活性が吐糸期に急激に上昇する[5]。今回、絹糸腺トレハラーゼの活性を、前部、中部および後部絹糸腺に分けて測定しその5 齢期における変動をみたところ、中部および前部でのみ大きな活性の変動が確認された（図1）。すなわち、5 齢起蚕から吐糸開始にかけて中部絹糸腺トレハラーゼ活性がゆるやかに上昇し、吐糸直前からは前部絹糸腺トレハラーゼ活性が急激な上昇をみせた。後部絹糸腺においては、トレハラーゼ活性はほとんど検出されなかった。このことから、5 齢起蚕から吐糸終了にかけて変動する絹糸腺トレハラーゼ活性は、5 齢起蚕から吐糸開始までは中部絹糸腺トレハラーゼに起因し、その後は前部絹糸腺トレハラーゼに因るものであるということが分かった。

そしてノーザンブロッティングによる解析で、活性変動と同様に吐糸直前から吐糸後にかけて、前部絹糸腺においてトレハラーゼmRNAの発現がみとめられた（図2）。この結果は、Kamimura[9]のものとは一致するものであった。すなわち、トレハラーゼ蛋白質は、前部絹糸腺において*de novo*に合成されるものであることが明らかになった。

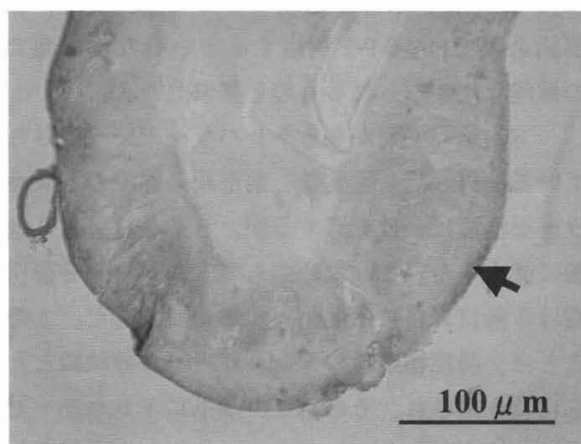


図4. 免疫組織染色によるトレハラーゼの検出

前部絹糸腺の中部絹糸腺との境界部分を、5 齢起蚕9 日目の蚕から摘出し、パラフィン包埋してマイクロトームで横断切片を作製した。それをトレハラーゼ抗体と反応させて発色させ、光学顕微鏡で観察した。矢印：基底部分

中部絹糸腺においてmRNAの発現が確認されなかったのは、中部における発現が前部に比べて低いものであり、ノーザンブロッティングで検出する範囲に達していなかったという可能性も考えられる。今後RT-PCRによる分析を行う必要があるであろう。とりわけ、吐糸期に前部絹糸腺において新しくトレハラーゼ蛋白質が合成されるということは、液状絹が通過する際に前部絹糸腺が独自にエネルギーを必要するというを意味している。今まで液状絹の通過する導管としての認識しかなかった前部絹糸腺が、吐糸に際して重要な役割を担っているということが示唆された。

さらに、免疫組織化学的分析によりトレハラーゼ蛋白質の前部絹糸腺内での局在をみた。その結果、トレハラーゼは主に前部絹糸腺細胞の基底部分、つまり体液に接する部位に局在していることが示唆された(図4)。これらの結果から、体液中のトレハロースは前部絹糸腺基底部分のトレハラーゼによってグルコースに分解されエネルギー源として利用されるものと推察できる。前部絹糸腺では酸性化に寄与するためのイオンポンプが作動している[10]ので、この作動のためのエネルギーが必要である。前部絹糸腺のトレハラーゼはこれに寄与しているのかも知れない。また、前部絹糸腺に対し、後部絹糸腺では体液中のS-6-P[6]をエネルギー源としてフィブリン蛋白質合成するという[2]。従って、前部絹糸腺ではトレハロース、後部絹糸腺ではS-6-Pを利用するといった代謝面での機能分化がみられるものと推察した。

一方、繭の毛羽からもトレハラーゼが検出されている[11]。吐糸開始後、前部絹糸腺でのトレハラーゼ活性は一旦上昇するが、5齢9日目より急激に減少する。これに呼応してトレハラーゼ蛋白質は5齢11日目には痕跡程度まで減少した。このことは、前部絹糸腺のトレハラーゼが液状絹とともに吐き出され、その結果、繭糸にトレハラーゼ活性が検出されるものと考えられる。しかも繭層と比べて、蚕が繭を作る足場として吐糸初期に吐き出す毛羽部分の方がトレハラーゼ活性は高い。したがってトレハラーゼは、前部絹糸腺において最もその活性が高くなる時期より以前に液状絹に大量に付加されるということが示唆され、また液状

絹とは離れた基底部分に今回トレハラーゼ蛋白質が確認されたことから、繭糸中に検出されるトレハラーゼ活性と今回確認されたトレハラーゼ蛋白質とを直接関連づけることは現在のところ困難であると考えている。

謝辞

本実験を遂行するに当たり、免疫組織染色のご指導を賜った応用生物学科遠藤泰久教授、また供試材料として用いた交雑種の家蚕5齢幼虫を提供して頂いた鳥袋順二技官に感謝の意を表します。

References

- [1] Prudhomme, J.C., Couble, P., Garel, J.P., and Daillie, J. (1985): Silk synthesis. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds.), Vol. 10, pp.571-594, Pergamon Press, Oxford.
- [2] Asakura, T., Yamada, H., Demura, M., and Osanai, M. (1990): ^{13}C and ^{31}P NMR Analyses of the Cultured Posterior Silk Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*: Silk Fibroin Production and the Effect of Sorbitol-6-Phosphate. Insect Biochem. 20, 261-266
- [3] Wyatt, G. R. (1967): The Biochemistry of Sugars and Polysaccharide in insects. Adv. Insect Physiol. 4, 287-360
- [4] Furusawa, T., Wakizaka, T., and Ishihara, Y. (1993): Effect of an Imidazole Compound, KK-42, on Changes in Trehalose Content and Trehalase Activity in the Silk glands of the Silkworm, *Bombyx mori* Lepidoptera: Bombycidae). Appl.Entomol,Zool. 26, 169-176
- [5] Shimada, S. (1975): Trehalase activity in the Silk Glands of the Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Can.Ent. 107, 1311-1314
- [6] Sakamoto, E., and Horie, Y. (1979): Quantitative Change of Phosphorus Compounds in

- Hemolymph during Development of the Silkworm, *Bombyx mori* L. J. Sericult. Sci. Japan. 48, 319-326
- [7] Somogyi, M. (1952) : Notes on Sugar Determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23
- [8] Su, Z.-H., Ikeda, M., Sato, H., Imai, K., Isobe, M., and Yamashita, O. (1994) : Molecular Characterization of Ovary Trehalase of the Silkworm, *Bombyx mori* and its Transcriptional Activation by Diapause Hormone. Biochemica et Biophysica Acta. 1218, 366-374
- [9] Kamimura, M., Takahashi, M., Tomita, S., Fujiwara, H., and Kiuchi, M. (1999) : Expression of Ecdysone Receptor Isoforms and Trehalase in the Anterior Silk Gland of *Bombyx Trehalase* in the Anterior Silk Gland of *Bombyx mori* During an Extra Larval Molt and Precocious Pupation Induced by 20-Hydroxyecdysone Administration. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, 79-88
- [10] Azuma, M., and Ohta Y. (1998) : Changes in H^+ -Translocation Vacuolar-type ATPase in the Anterior Silk Gland Cell of *Bombyx mori* During Metamorphosis. J. Exp. Biol. 201, 479-486
- [11] Shimada, S., Kamada, A., and Asano, S. (1980) : The Cocoon Trehalase of the Silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 10, 49-52

Silkworm Transformation using *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus and *piggyBac* Transposable Elements

¹Masafumi YAMAMOTO, ¹Masafumi YAMAOKA, ¹Hiroshi NISHIYAMA,
¹Sumiharu NAGAOKA, ²Yoshiyuki HAYASHI and ¹Hajime MORI

¹Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan,

²Kinugasa-kai Foundation, Textile Research Institute, 29 Shimohakubai-cho, Kitano,
Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan

Abstract

We have developed a new method for the transgenesis of the silkworm, *Bombyx mori*. This method couples the use of recombinant baculoviruses with the use of the *piggyBac* transposable element. One recombinant *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV), designated the helper virus, is designed to express the *piggyBac* transposase under the control of *Drosophila* hsp70 promoter. Another recombinant AcNPV encoded the gene to be incorporated into the silkworm genome, in this case a green fluorescent protein (GFP) gene, under the control of *Bombyx mori* actin A3 promoter and flanked by the *piggyBac* inverted terminal repeats. Preblastoderm eggs were injected with a mixture of these two recombinant baculoviruses. Most of the injected larvae hatched and a high proportion of the newly hatched G0 larvae expressed the GFP marker. Transgenesis was confirmed by Southern blot analysis of G1 insects and the marker segregated in Mendelian fashion, as evidenced by the appearance of green fluorescence in G2 insects.

Introduction

More than 1 million species of insects have been identified, but most studies of insect transgenesis have been restricted to the fruit fly *Drosophila melanogaster* owing to the ability to manipulate fly genes by P-element transposition^{1,2}. There also are a few examples of transgenesis of the silkworm, *Bombyx mori*, by two different methods. One involves using an attenuated recombinant baculovirus vector³ and the other involves using a *piggyBac* transposon-derived vector⁴⁻⁷. However, the former transgenesis method relies upon extremely low frequency homologous recombination events and therefore, requires labor-intensive screening to identify transformants. The *piggyBac* method is also problematic because silkworm eggs, which are coated by a very hard chorion, are extremely difficult to inject with the *piggyBac* vector. These are some of the reasons why silkworm transgenesis is

not established as a routine technique and successful silkworm transgenesis has only been accomplished by a few laboratories. In this report, we describe a new and highly efficient method for silkworm transgenesis that will be widely useful in silkworm biotechnology.

Methods

Construction of the recombinant baculoviruses

Most of the transposase gene sequence was excised by digestion of the plasmid p3E1.2, which contains the full-length *piggyBac* sequence, with *SacI* and *PstI*. The DNA fragment was blunted using a commercial DNA blunt-ending kit (TAKARA). The multiple cloning site (MCS) sequences *XbaI-BamHI-SmaI-KpnI-EcoRI-SacI-XhoI* was introduced in the blunted site. The ITRs from both ends and the MCS were then excised with *SaII* and *EcoRV* and inserted into the *EcoRV-XhoI* sites of

pBacPAC9 (Clontech), resulting in the creation of pAcpigMCS. The *B. mori* cytoplasmic actin A3 promoter and the EGFP gene cassette were excised from pPIGA3GFP¹ with *Sma*I and *Nae*I. The A3-EGFP cassette was then inserted into the *Sma*I site of pAcpigMCS, resulting in pAcpigA3EGFP. The *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF21AE cells were transfected with 5 μ g of the recombinant transfer vector pAcpigA3EGFP and 0.5 μ g of linearized AcNPV DNA (Baculogold ; Pharmigen). Homologous recombination rescued the parental viral DNA and yielded a recombinant baculovirus designated AcpigA3EGFP, which was isolated by plaque purification³ and used as the “transformation” virus. Construction of the helper virus, designated AcpigTrans, which encoded the *piggyBac* transposase gene under the control of *Drosophila* hsp70 promoter was performed as follow. The *Drosophila* hsp70 promoter sequence was excised by digesting phspCAT with *Bam*HI and *Hind*III, then inserted into the *Bam*HI-*Hind*III sites of the baculovirus transfer vector, pBlueBacHisC (Invitrogen), resulting in pHSP70. Two primers were synthesized for PCR amplification of the *piggyBac* transposase sequence. The forward primer was 5'-AAAAAAGC TTATGGGATGTTCTTTAGACGA-3' and the reverse primer was 5'-AAAAAAGCTTATACTAATAATAATTCAAC-3'. The *piggyBac* transposase gene was amplified by using the plasmid p3E1.2 as a template and *pyrobest* DNA polymerase (TAKARA). PCR was carried out with 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 0.5 min at 94°C, 0.5 min at 60°C, 2 min at 72°C, and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were digested with *Hind*III and inserted into the *Hind*III site of pHSP70. The recombinant transfer vector, pHSPpigTrans, was used to isolate the recombinant baculovirus AcpigTrans as described above³ and this virus was used as the “helper virus” .

Embryo injection and screening of transgenic silkworms

Preblastoderm silkworm eggs were collected between 1- 2 h after oviposition and inoculated under a microscope with a thin needle that had been dipped into a mixture of the transformation and helper viruses (Fig.1A). At first a fine needle was dipped into insect cell culture medium containing these two recombinant viruses (each with a titer of 1×10^8 plaque forming units/ml) and then used to inject preblastoderm *B. mori* eggs (Fig. 1B). The inoculated embryos were held at 25°C in moist petri dishes until hatching.

After hatching from G0 inoculated eggs, newly hatched larvae were screened for EGFP expression under a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan). EGFP positive G0 silkworms were reared on an artificial diet under aseptic conditions at 25°C. The genomic DNAs were extracted from 100 embryos of G1 eggs derived from the EGFP positive G0 insects by using a commercial DNA Extraction Kit (Stratagene) and then used as a template for PCR screening. PCR was performed with 10 min at 95°C followed by 60 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, 2 min at 72°C, and a final extension at 72°C for 7 min by using Ampli TaqGold with GeneAmp (Applied Biosystems). The forward PCR primers used to amplify the EGFP gene was (5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG GAG-3') and the reverse primer was (5'-TTACTT GTACAGCTCGTCCATGC-3'). The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining and EGFP gene positive G1 broods were reared on artificial diet under aseptic conditions at 25°C. G1 larvae were screened for GFP expression under a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Southern blot analysis

The EGFP gene was excised from the pEGFP cDNA vector (Clontech) with *Bam*HI and *Eco*RI and then used as a probe for Southern blot analysis. Genomic DNA was extracted from G1 adults by using a commercial DNA Extraction Kit

(Stratagene) and then digested with *EcoRI* and *BamHI* or *EcoRI* and *PstI*. Ten μ g of the digested genomic DNA was electrophoresed on a 1.0 % agarose gel and transferred onto a Hybond-N membrane (Amersham). Labelling of the probe, hybridization, and signal detection were carried out using the Gene Images Random Prime Labelling and Detection System (Amersham) according to the supplier's protocol.

Results and discussion

This new method couples the use of recombinant baculoviruses, specifically AcNPV with the *piggyBac* transposable elements. One recombinant AcNPV was designed to express the *piggyBac* transposase under the control of *Drosophila* heat shock protein 70 (*hsp70*) promoter and to function as a helper virus for the transgenesis. A second recombinant AcNPV, the transformation virus, was designed to carry the actual transgene under the control of the *Bombyx mori* actin A3 promoter and flanked by the *piggyBac* inverted terminal repeats (ITR; Fig. 1A).

A fine needle was dipped into insect cell culture medium containing these two recombinant viruses (each with a titer of 1×10^8 plaque forming units/ml) and used to inject preblastoderm *B. mori* eggs (Fig. 1B). The majority of the injected eggs remained viable, as evidenced by hatching of G0 larvae (Table 1).

Furthermore, several of the newly hatched larvae exhibited green fluorescent (Fig. 1C). In our first experiment, 311 preblastoderm eggs were injected with these two recombinant baculoviruses, 227 hatched, and the green fluorescence was observed in five of the G0 insects. PCR analysis of the genomic DNA of 100 embryos produced from G1 eggs of the five fluorescent G0 insects showed that two of the G1 broods were positive for the EGFP transgene and each line was established as lines 1-a and 1-b. About 10-15% of the larvae hatched from

these PCR-positive G1 broods exhibited green fluorescence, respectively (Table 1 and Fig. 2A). The presence of the EGFP gene in the genomes of the transformed insects was shown by Southern blot analysis of genomic DNA extracted from G1 adults derived from lines 1-a and 1-b, respectively (Fig. 2B and C). DNA isolated from lines 1-a and 1-b G1 adults and digested with *EcoRI* and *BamHI* contained the predicted 1.3 kbp fragment. After the genomic DNA was digested with *EcoRI* and *PstI*, which does not cut the vector (Fig. 2B and C), lines 1-a and 1-b had a different hybridization pattern indicating that the transgenic silkworms carried a single GFP gene insertion. When male or female G1 insects were crossed with normal insects, one-half of the offspring exhibited green fluorescence in Mendelian fashion, indicating that the GFP gene was entirely localized to a single chromosome in the G1 insects.

Microinjection may actually impede the ability to effectively introduce DNA into silkworm embryos, because it is difficult to penetrate the DNA-filled micropipet through the hard chorions of lepidopteran insect eggs without mechanical damage⁸. The conventional method is dependent on the high-level techniques and complex equipments for plasmid DNA microinjection⁸. More creative approaches to DNA delivery must be developed. We have developed the new microinjection method, resulting in minimal damage to the embryo and eggshell. After the silkworm eggs were pierced with the needle dipped into the culture medium containing recombinant viruses, a higher hatchability (about 70%) was observed in comparison with the conventional microinjection methods (Table 1). Moreover G1 broods containing the transgenic insects were selected with a higher efficiency (33.3% to 42.9%) (Table 1). A female adult normally lays about 500 eggs and in the conventional microinjection method^{4,6} a very large number of G1 insects (about 50,000 to 100,000) must be bred and screened (Table 1). In contrast, the transgenic insects were selected

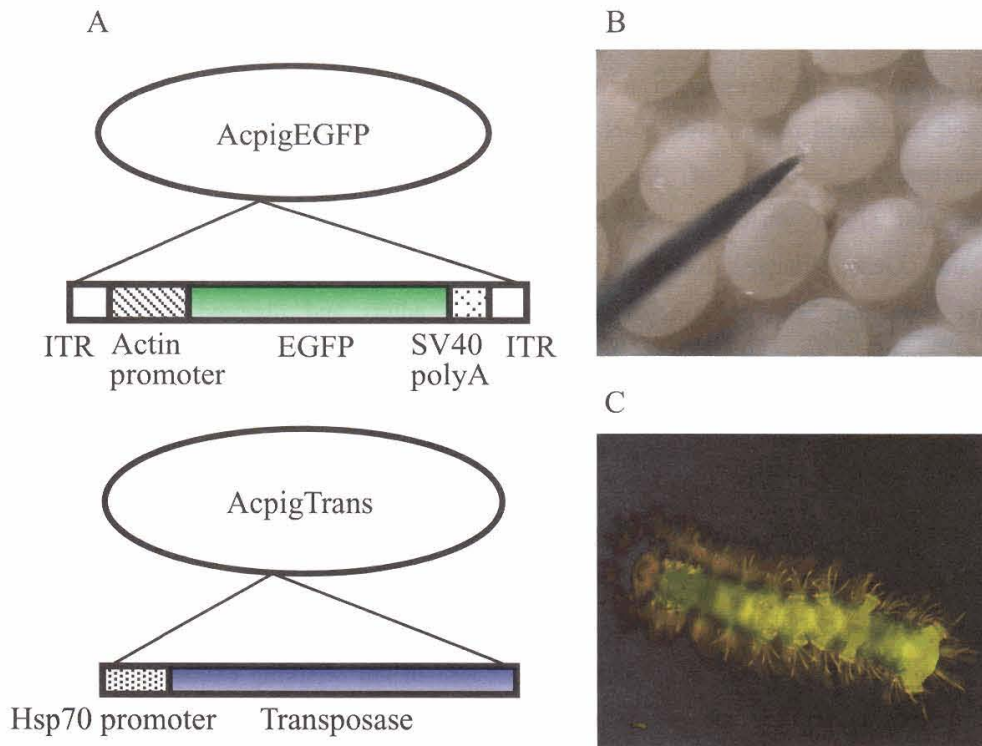


Fig. 1 Inoculation of silkworm eggs with transformation and helper viruses. (A) The diagrams show the genetic features of the transformation virus (top) encoding the EGFP gene under the control of the *Bombyx mori* actin A3 promoter and flanked by the *piggybac* ITRs and the helper virus (bottom) encoding the *piggyBac* transposase under the control of the *Drosophila* hsp70 promoter. (B) Preblastoderm eggs were injected with a fine needle dipped into insect cell culture medium containing equal proportions of the transformation and helper viruses. (C) Most of the infected eggs hatched and some newly-hatched larvae exhibited green fluorescence.

from a very small number of G1 insects by the new microinjection method (Table 1).

The viral plaque phenotype resulting from insertion of the host *piggyBac* element into the AcNPV genome during passage of this virus through *Trichoplusia ni* cell lines is known as the “few polyhedra” phenotype and the transpositional mutation of viruses may provide a means for horizontal transmission of transposons between insect species⁹. The *piggyBac* was considered to be recently introduced into the *Trichoplusia ni* genome⁹. The *piggyBac* element consists of a 2472 kbp DNA with 13 bp perfect ITRs and 19 bp subterminal repeats located 31 bp from the 5' ITR and 3 bp from the 3' ITR. A transcriptional unit of 2.1 kbp with a single open reading frame of 1.8 kbp is located between the subterminal repeats and it encodes a transposase with a predicted molecular mass of 64 kDa. This

piggyBac element has been used to transform a variety of insect species spanning three orders, dipterans¹⁰⁻¹⁴, lepidopterans^{4,7,15}, and coleopterans¹⁶. In this study, we successfully transformed silkworm by exploiting the ability of *piggyBac* to move restlessly like a piggy between the host and virus genome. Our new method was simple and provided a high level of transformation efficiency. This method can be utilized to further develop transgenic silkworms as bioreactors for the production of large quantities of foreign proteins, to improve silk fibers, and to study important processes such as metamorphosis or the acquisition of insecticide resistance.

References

[1] Rubin, G.M., and Spradling, A.C. (1982) :

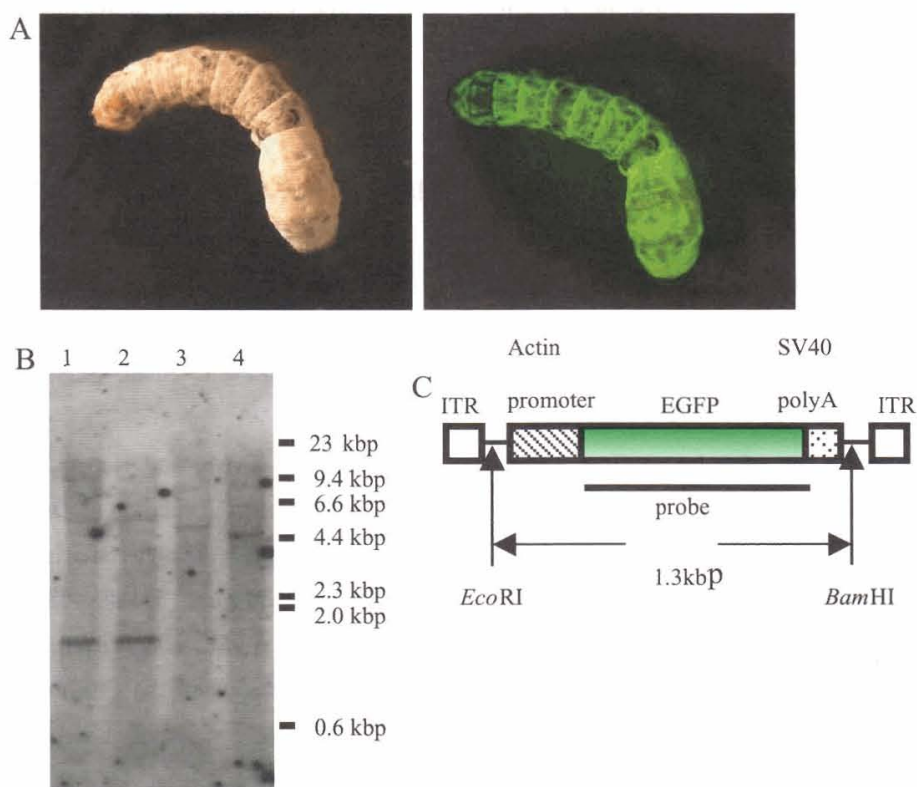


Fig. 2 Green fluorescence and Southern blot analysis of transgenic G1 insects. (A) Third instar G1 larva was photographed under the white light (left) and EGFP-excitation-wavelength light (right). (B) Genomic DNA was extracted from G1 adults derived from lines 1-a and 1-b digested with *EcoRI* and *BamHI* or *EcoRI* and *PstI*, and used for hybridization with an EGFP probes. (C) Organization of the *B. mori* cytoplasmic actin A3 promoter and EGFP gene cassette and location of the *EcoRI* and *BamHI* sites in the transformation virus.

Table 1 Transformation efficiency

Experiments	No. of injected eggs	No. of hatched larvae	No. of fluorescent G0 larvae	No. of EGFP positive G1 broods	Transgenic line	No. of fluorescent G1 larvae
1	311	227 (73.0%)	5 (2.2%)	2/5 (40%)	Line 1-a	30/284 (10.6%)
					Line 1-b	22/141 (15.6%)
2	223	157 (70.4%)	3 (1.9%)	1/3 (33.3%)	Line 2-a	33/249 (13.3%)
					Line 3-a	48/261 (18.4%)
3	239	172 (72.0%)	7 (4.1%)	3/7 (42.9%)	Line 3-b	19/128 (14.8%)
					Line 3-c	33/307 (10.7%)

Table 2 Segregation of the green fluorescence to G2 insects

Mating	No. of insects	No. of fluorescent insects
EGFP ♂(G1) X ♀	279	130 (46.6%)
♂ X EGFP ♀(G1)	185	89 (48.1%)

- Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353
- [2] Handler, A.M., Gomez, S.P., and O'brochta, D.A. (1993) : A functional analysis of the P-element gene-transfer vector in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 22, 373-384
- [3] Yamao, M., Katayama, N., Nakazawa, H., Yamakawa, N., Hayashi, Y., Hara, S., Kamei, K., and Mori, H. (1999) : Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.* 13, 511-516
- [4] Tamura, T., Chantal, T., Corinne, R., Kanda, T., Eappen, A., Kanba, M., Komoto, N., Jean-Luc, T., Bernard, M., Gerard, C., Paul, S., Malcolm, F., Jean-Claude, P., and Pierre, C. (2000) : Germline transformation of the silkworm *Bombix mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18, 81-84
- [5] Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., Hayashi, M., Shimizu, K., Nakamura, N., Tamura, T., and Yoshizato K. (2003) : Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21, 52-56
- [6] Uhlirova, M., Asahina, M., Riddiford, L. M., and Jindra, M. (2002) : Heat-inducible transgenic expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.* 212, 145-151
- [7] Thomas, J.L., Rocha, M. Da., Besse, A., Mauchamp, B., and Chavancy, G. (2002) : 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 247-253
- [8] Atkinson, P. W., Pinkerton, A. C., and O'Brochta, D.A. (2001) : Genetic transformation systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 46, 317-346
- [9] Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H., Rosen, E., and Fraser, M. J. (1989) : Transposon mutagenesis of baculoviruses : analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-169
- [10] Handler, A. M., McCombs, S. D., Fraser, M. J., and Soul, S. H. (1998) : The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediate germline transformation in the mediterranean fruit fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7520-7525
- [11] Handler, A. M. and Harrell, R. A. (1999) : Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol. Biol.* 8, 449-458
- [12] Handler, A. M. and Harrell, R. A. (2001) : Transformation of the Caribbean fruit fly with a *piggyBac* transposon vector marked with polyubiquitin-regulated GFP. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 201-207
- [13] Hediger, M., Niessen, M., Wimmer, E.A., Dubendorfer, A., and Bopp, D. (2001) : Genetic transformation of housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon *piggyBac*. *Insect Mol. Biol.* 10, 113-119
- [14] Grossman, G. L., Rafferty, C. S., Clayton, J. R., Stevens, T. K., Mukabayire, O., and Benedict, M. Q. (2001) : Germline transformation of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, with the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol Biol.* 10, 597-604
- [15] Peloquin, J. J., Thibault, S. T., Staten, R., and Miller, T. A. (2000) : Germline transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the *piggyBac* transposable element. *Insect Mol Biol.* 3, 323-333
- [16] Lorenzen, M. D., Berghammer, A. J., Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M., and Beeman, R. W. (2003) : *piggybac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol.* 12, 433-440

カイコRNA結合タンパク質BmTRN-1の機能解析

小谷英治*・古澤壽治*・林 幸之**

RNA-binding Protein, BmTRN-1 from the Midgut Cells of the Silkworm, *Bombyx mori*

Eiji KOTANI*, Toshiharu FURUSAWA* and Yoshiyuki HAYASHI**

*Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku,
Kyoto 606-0962, Japan

**Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29
Shimohakubai-cho, Kitano, Kita-ku, Kyoto 606-8326, Japan

Abstract

A TIA-1-type RNA-binding protein (BmTRN-1) identified from midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, has significant homology with human TIA-1 and TIAR known as apoptotic regulators and recently reported to function as important factors for either splicing or translation. RT-PCR analysis showed that the BmTRN-1 gene was vigorously transcribed in the midgut at the gut purge stage, indicating a possible relation to the tissue-decomposing process in larval-pupal metamorphosis. We also show that inhibition of the expression of BmTRN-1 by a transfected oligonucleotide encoding the antisense sequence caused a remarkable rise in protein expression from artificially constructed cDNAs encoded by plasmid vectors in *Bombyx* cells, depending on the constructed ORF sequences of the introduced cDNAs. Furthermore, it was shown that the truncated transcripts from the *Bombyx* highly basic protease cDNA introduced into the cells increased under the antisense-inhibition of BmTRN-1 when its protein level also rose, demonstrating that BmTRN-1 could act as a regulator especially of the mechanism eliminating transcripts with possible targets for BmTRN-1 recognition in the authentic post-transcription process.

1. まえがき

RNA認識配列 (RNA-recognition motif, 以後 RRMと略す) を持つRNA結合タンパク質群は、さまざまな生体内過程、特に細胞活動や発生における転写後の諸過程に関わると考えられている。こうしたRRM型RNA結合タンパク質は、アミノ末端側にRRMドメインの繰り返し構造とカルボキシル末端側に別のタンパク質因子と相互作用するドメインから構成されるという共通性が一般的に見られる[1,2]。

RRM含有RNA結合タンパク質群の中で、哺乳類のTIA-1、およびTIARは1990年代初頭にT細胞内の細胞核崩壊機能を持つ顆粒内成分として同定

された[3,4]。すなわち両タンパク質を含む顆粒を受容した細胞の中で核DNAの断片化を伴う細胞死 (アポトーシス) が誘導されることが報告されていた。しかし2000年代に入ってからは一変して、TIA-1およびTIARには薬物ストレスを与えた細胞の翻訳機能性オルガネラからメッセンジャーRNA (mRNA) を隔離する働きがあることや、ある種の初期転写産物エキソン配列が関与したmRNAスプライシングに重要な働きを持つことも判明してきた[5-8]。さらにTIA-1の不完全部分配列を細胞内で発現させることによるtrans-dominant repression (不完全TIA-1タンパク質を細胞内であえて発現させることによる完全体TIA-1の発現阻害) が引き起こす外来タンパク質発現量の増大も

*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部、606-0962 京都市左京区松ヶ崎御所海道町、
E-mail: kotani@ipc.kit.ac.jp、TEL 075-724-7774、FAX 075-724-7760

示されている[5]。これらを統括してTIA-1およびTIARタンパク質は、細胞内で転写後の過程、特にスプライシングの促進や翻訳の阻害に関わると解釈され、関連過程の一部がアポトーシス現象に対しても影響を及ぼすと推察されている[5-7]。

昆虫種では、ショウジョウバエからTIA-1同属群の相同性遺伝子(Rox8)が単離されており、蛹期の卵形成に関わる可能性が示唆されている[9]。カイコでもTIA-1相同性遺伝子の単離が行われてきた(カイコTIA-1-related nucleolysin, BmTRN-1)[10,11]。その遺伝子解析の結果から、BmTRN-1は388個のアミノ酸配列からなり、N末端側にはRox8およびTIA-1と同様のRRM領域の繰り返しと、C末端には他のTIA-1ファミリータンパク質とは有意な相同性を示さないタンパク質相互作用領域にあたる配列が認められた[10]。加えて、すでに金沢大のグループが培養中の絹糸腺に脱皮ホルモンを作用させた際に微弱に誘導される物質として同定したカイコTIA-1-like proteinとBmTRN-1とは一部を除いて同じ塩基配列を持つ遺伝子であったが、C末端側タンパク質相互作用領域のアミノ酸コードに重大な違いがあった[10,12]。また大腸菌を用いて調製した組み換えタンパク質による解析から、BmTRN-1の1および2番目のRRM領域にpoly(A)およびpoly(U)RNAに対する結合活性が認められ、このRRM領域組み換えタンパク質をトランスフェクション法で取り込ませたカイコ培養細胞内においてDNA断片化が観察された[10, 11]。

発育過程の昆虫生体内におけるBmTRN-1の役割および培養細胞内の具体的な機能を明らかにすることによって、生物界のRRM含有RNA結合タンパク質がいかに生体機構維持に関わっているかの統括的理解に到達するものと考えられる。そこで本研究では、カイコ幼虫-蛹変態期におけるBmTRN-1 mRNAの発現変動解析と、培養細胞内における恒常的なBmTRN-1発現に対する人為的抑制が及ぼすタンパク質産生系への影響を調べた。

2. 材料および方法

2. 1. 生物試料および培養細胞

人工飼料無菌飼育した青熟種のカイコを用いてTRN-1遺伝子発現解析を行った。また細胞内TRN-1抑制実験には、カイコ胚由来BmN4細胞を用いた。細胞は、市販ESF921昆虫細胞培養液(エクस्पレーションシステム製)に最終濃度14%の子牛血清を添加した混合培地を用いて25℃で培養・継代した[13]。

2. 2. RNA解析

(a) RT-PCR

5齢幼虫期から蛹化までの発育過程に抽出した中腸の全RNA(0.25 μg)に対して、オリゴd(T)プライマーとリバーストランスクリプターゼにより相補的一本鎖DNAを合成した。5'-AATATGGG-CGACGAAAGCCACCCG-3'と5'-CGATTTTGGAG-ACAGATCGCCC-3'のプライマーを用いて、熱変性94℃30秒、アニーリング63℃1分、伸張72℃30秒間の反応を26回繰り返すPCR法により塩基番号(-3)-(300)の部分を増幅した(BmTRN-1 sequence accession number: AB092510)[10]。また、用いた試料RNAの各サンプル間での量的な均一性を明確に示すため、5'-GATTGATGACGGTGCC-AAG-3'と5'-GCACGTCCTACTCGTTACGG-3'をプライマーとして用い、熱変性94℃30秒間、アニーリング61℃1分間、伸張72℃25秒間の反応を14回繰り返すPCR反応により、28sリボソームRNAの部分配列(塩基番号1-288、文献[14])を増幅した。それぞれの増幅DNAバンドを1.2%アガロースゲル電気泳動にて分離した後、Hybond-N+ナイロンフィルター(アマシャム製)上にアルカリ条件下で転写した。

(b) ハイブリダイゼーション

RT-PCR産物のサザンプロットは、ChurchとGilbert(1984)の方法で調製した7% SDSを含むリン酸緩衝液(pH7.4)中で65℃条件で行った[15]。プローブのフルオレッセイン修飾およびハイブリダイゼーションバンドの検出はジーンイメージキット(アマシャムファルマシア製)を用いて行った。エックス線フィルム上に検出されるハイブリダイゼーションのシグナル強度を、NIH-Imageソフトウェアを用いたコンピューター解析により求め、各サンプル間の28sリボソーム

RNA量比に基づき修正した。

2. 3. アンチセンスヌクレオチドを用いた培養細胞内におけるBmTRN-1発現の抑制

(a) 発現ベクターの構築

インビトロジェン製pIZ/His-V5/CATベクターに含まれるバキュロウイルスIE-2プロモーター下流のクローニングサイトに以下の遺伝子cDNAを組み込んだ。すなわちカイコ高塩基性プロテアーゼ(BmHBP、文献[16])の翻訳開始メチオニンから133残基までの不活性部分配列とパラミクソウイルスSV5抗原および6Hisの融合タンパク質コード配列を挿入した他、カエルLi16タンパク質(文献[17])のN末端から115残基までの完全配列とSV5および6Hisの融合タンパク質、緑色蛍光タンパク質(GFP、文献[18])のN末端から終止コドン部分までをBmN4細胞内で発現するようにベクター内に構築した。またpIZ/His-V5/CATをそのまま用いて、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)とSV5抗原および6Hisとの融合タンパク質も発現させた。CAT、BmHBPとLi16配列は、カルボキシル末端のSV5抗原に対する特異抗体(インビトロジェン製)を用いたウエスタンブロッティング法で検出した。GFPについてはこのタンパク質の特異抗体を用いて同法により検出した。

(b) オリゴヌクレオチド

BmTRN-1の299-322部分塩基配列(5'-CGATTT-CTGGAGACAGATCGCCC-3')に対する相補的配列の5'末端にphosphothioate修飾したオリゴDNAをアンチセンスヌクレオチドとして使用した。同様に5'末端を修飾したセンスヌクレオチド(塩基番号690-711)を対照実験に用いた。

(c) 化学的トランスフェクション法

1.5ml混合培地中の 0.7×10^6 単層細胞を35mmプラスチックプレートに播いた。100 μ lのESF921に1 μ gの発現プラスミドベクター、0.5 μ gのオリゴヌクレオチド、および4 μ lのロッシュ製FuGene6試薬を混合し、室温で15分インキュベートした。この混合液を細胞プレートに滴下し、室温で5時間のインキュベート中に細胞内にDNAを取込ませた。その後培地を1.5mlの新しい混合

培地と交換し、室温での培養を続けた。

(d) ウエスタンブロッティング法

細胞をSDS-PAGE用サンプル処理液200 μ lに溶解させたものを電気泳動用サンプルとした。3 μ gタンパク質を含む10 μ lサンプル液を12%SDS-PAGEの各レーンに注入した。電気泳動終了後、分離したタンパク質を電気泳動的にPVDF膜に転写した。このPVDF膜を5%スキムミルクを含む抗体反作用リン酸緩衝液(pH7.4)内でブロッキングした後、5 $^{\circ}$ Cで一晩抗体(1:5000)と反応させた。同抗体反作用リン酸緩衝液で洗浄後、二次抗体(1:5000)とPVDF膜を室温3時間反応させ、洗浄後発色させた。発色にはウエスタンブラスキット(アマシャム・ファルマシア製)を用いた。

2. 4. アンチセンス抑制中の細胞におけるmRNAの解析

BmHBP発現用プラスミドのトランスフェクション処理後36時間まで培養したアンチセンス抑制細胞の全RNA標品(10 μ g)を、RNA用1.2%変性ゲル電気泳動で分離し、HybondN+ナイロン膜(アマシャム・ファルマシア製)に転写した。BmHBP配列(10-558塩基)をコードするプローブを用いて2.2Mホルムアルデヒドを含む溶液中でハイブリダイゼーションを行い、ジーンイメージキット(アマシャム・ファルマシア製)によりBmHBPのmRNAバンドを検出した。またハウスキープング遺伝子の一つである α -チューブリンの発現量、28sリボソームRNAの存在量についても、それぞれ α -チューブリンmRNAの71-555塩基部分および28sリボソームRNAの1-288塩基部分をフルオレッセイン修飾したプローブを用い、ノーザンブロッティング法により解析した[14,19]。

3. 結果

3. 1. 幼虫-蛹変態期におけるBmTRN-1遺伝子の発現解析

BmTRN-1遺伝子の発育に伴う発現変動を調べるため、幼虫-蛹変態期にかけての各日齢の中腸全RNAにおけるBmTRN-1 mRNA量をRT-PCR法

により解析した。その結果図1に示されるように、吐糸を行う5齢8-10日の間、BmTRN-1 mRNA量が急激に増加し、その後減少することが明らかになった。この時期には急激な脱皮ホルモンの増加とそれに伴う幼虫期旧組織の崩壊、蛹組織の新生が始まり、幼虫期に多量に作られていたプロテアーゼやヌクレアーゼなど消化酵素の活性およびそれらのmRNAや酵素タンパク質が急激に消失する。BmTRN-1遺伝子の変態期における急激な発現上昇と脱皮ホルモン作用による中腸細胞内生理変化との関連性がうかがえる。

3. 2. BmTRN-1のカイコ細胞内における役割

BmTRN-1の細胞内機能を明らかにする目的で、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてBmTRN-1の発現抑制処理を施したBmN4細胞における外来遺伝子由来のタンパク質発現を調べた。特異抗体により検出される分子質量42.5kDaおよび44.1kDaのBmTRN-1タンパク質バンドは、センスDNAを使用した対照区に比べ、アンチセンス抑制24時間および48時間までに明らかに細胞内における存在量が減少した。BmTRN-1のアンチセンス抑制処理を施した細胞内で、C末端活性基を除去したカイコ高塩基性プロテアーゼ (BmHBP、文献[16]) を発現させたところ、対照区である無

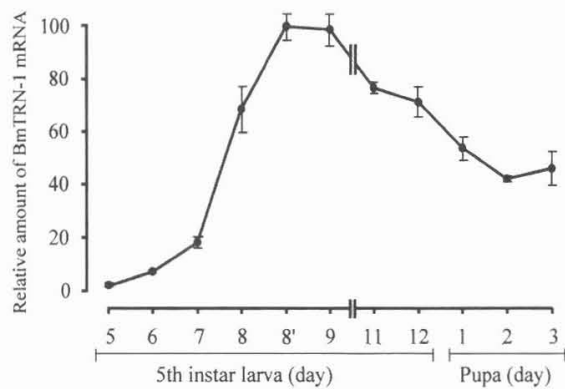


図1. BmTRN-1遺伝子の発現変動解析。

図示したステージの全RNAを用いてRT-PCRにより解析した。ステージ8はガットパージ以前の8日目、ステージ8'はガットパージ以後の8日目を示す。得られる数値は最大値を100として相対比較し、3回実施した結果の平均と標準偏差をあらわした。

処理細胞およびセンス鎖DNAを取込ませた細胞に比べて著しく発現タンパク質の増加が認められた。図2・上図に示されるように、 0.7×10^6 単層細胞あたり $0.75 \mu\text{g}$ を上限にアンチセンスDNA量に依存して、BmHBPの発現量は増加した。理由は今のところ明確ではないが、 0.7×10^6 単層細胞あたり $1.5 \mu\text{g}$ のアンチセンスDNAを用いた場合BmHBPの発現量が減少したのは、おそらく使用したDNA量がトランスフェクション試薬の添加DNA最適量を大きく逸脱したことによるものと予想される。また図2・下図に示されるように、BmTRN-1アンチセンス抑制下において検出可能なBmHBPタンパク質は、48時間までの培養時間の長さによって増加した。対照区としてセンス鎖DNAを用いた場合は、48時間の培養後もBmHBPバンドが検出できなかった。したがってこのことは、少なくとも48時間程度まではBmTRN-1アンチセンス抑制の効果が細胞内で持続することを示している。さらに図3に示されるように、外来

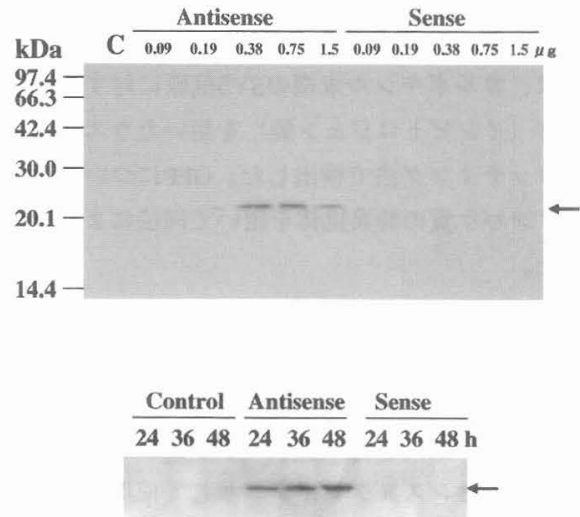


図2. (上図) BmTRN-1アンチセンス抑制細胞で発現したカイコ高塩基性プロテアーゼ (BmHBP) 不活性断片 (推定22.0kDaタンパク質) のウエスタンブロットティング。BmN4細胞内に0.09-1.50 μg のBmTRN-1アンチセンスDNAおよびセンスDNAが存在する状態で、BmHBPのC末端にSV5抗原を付加した融合タンパク質を発現させた。処理後24時間培養した後の細胞タンパク質をSV5特異抗体によるウエスタンブロットティングで解析した。レーンCでは無処理区の細胞検体を解析した。矢印のタンパク質バンドは実測値22.0kDaを示す。(下図) BmTRN-1抑制細胞内における不活性BmHBPの経時的解析。

遺伝子としてCAT (インビトロジェン社製のpIZ/His-V5/CATベクター由来)、カエルLi16[17]、およびGFP[18]の発現量について解析を同様に行った結果、センスDNAを用いた場合に比べ、BmTRN-1アンチセンスDNAを取込ませた細胞では、培養48時間目にGFPとLi16の過剰な発現が確認された。一方CAT遺伝子では24時間まではBmTRN-1アンチセンスDNAの発現量増大効果が見られたが、処理48時間後では対照区と実験区で有意な差が認められなくなった。

BmTRN-1アンチセンス抑制細胞および対照区細胞におけるBmHBP転写産物RNAの存在量を、処理後36時間目に調べた。また本来カイコ細胞内で恒常的に発現する α -チューブリンmRNA[19]、28sリボソームRNA[14]についても同様の解析を行った(図4)。28sリボソームRNAの解析は試料RNA量の均一性を測る内部標準であるが、BmTRN-1センス・アンチセンスDNA処理区は、

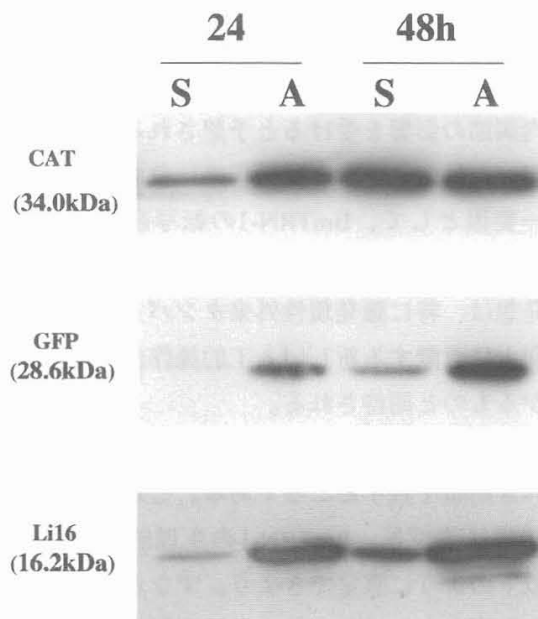


図3. BmTRN-1アンチセンス抑制細胞における外来遺伝子発現。 0.7×10^6 細胞あたり $0.5 \mu\text{g}$ のセンス鎖DNA (レーンS) およびアンチセンス鎖DNA (レーンA) と発現プラスミドとのトランスフェクション処理から24および48時間培養後の、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ-SV5融合タンパク (CAT)、緑色蛍光タンパク (GFP)、そしてカエル*Rana Sylvatica* Li16-SV5融合タンパク (Li16)をウェスタンブロットティングにより検出した。

無処理のものとは比べ差異が認められなかった。また α -チューブリンmRNAもセンス・アンチセンスDNAの取り込み処理に影響されず、無処理区の結果との間で差異が認められなかった。これらに対し、BmHBPの転写産物RNAは無処理区およびセンスDNA取り込み区とは異なり、アンチセンスDNA取り込み区では多量のBmHBP転写産物が検出された。BmTRN-1アンチセンス抑制細胞におけるBmHBPタンパク質および転写産物の対照区に対する増加割合はほぼ一致すると考えられる。こうした結果から、本論文で用いた外来遺伝子の転写産物は、BmTRN-1の本来の働きが関与して引き起こされる細胞内機能により崩壊すること、そしてこのBmTRN-1の働きを阻害したことにより、外来遺伝子の転写産物は崩壊を免れ、多量のタンパク質が産生することが立証された。

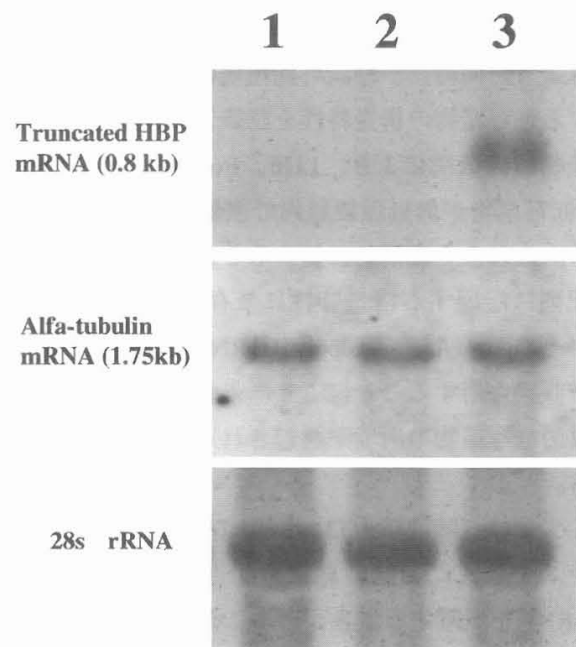


図4. BmTRN-1アンチセンス抑制細胞におけるBmHBP転写産物量のノーザンブロットティング解析。 0.7×10^6 細胞あたり $0.5 \mu\text{g}$ のセンス鎖DNA (レーン2) およびアンチセンス鎖DNA (レーン3) と、BmHBP発現プラスミドとのトランスフェクション処理後36時間経過した細胞から抽出した全RNAを1.2%変性ゲルで分離した後、ナイロンフィルターに転写した。このフィルターをBmHBPのプロープ断片と反応させた。また同じフィルター上のRNA試料を、 α チューブリンプロープおよび28sリボソームRNAプロープを用いたノーザンブロットティングにより解析した。

4. 考察

BmTRN-1遺伝子のアンチセンス抑制下におけるさまざまな人為的外来遺伝子発現は、対照区に比べいずれも上昇する結果を得たが、その発現量上昇効果は用いる外来遺伝子によって様ではなかった(図2および図3)。特にCAT遺伝子を発現させた場合、他の外来遺伝子の場合に比べ、培養48時間後にはアンチセンスDNAによる発現量増大効果が弱いものとなった(図3)。CAT遺伝子はカイコ細胞において、本来BmTRN-1抑制処理を行わずとも他の外来遺伝子とは異なり高発現性である(図3)。一方、Li16、BmHBP、およびGFPは、CATの場合と同じプロモーターの働きで転写され、翻訳可能領域を除いて同じ転写産物配列を持つにも関わらず、無処理細胞において産生タンパク質量が低減した。したがって、用いたCAT遺伝子の翻訳可能領域の配列は本来、カイコ細胞が有する制御機構に非感受性であると解釈できよう。同時に、翻訳可能領域の特異配列に起因する転写産物の構造特性を認識して作用する転写産物制御機構により、Li16、BmHBP、およびGFP転写産物が無処理細胞内で崩壊したと考えられる。これらを総括的に捉えると、翻訳可能領域の配列に起因する構造特性に依存して、BmTRN-1がそのpoly(A)およびpoly(U)RNA結合活性をもって直接作用することにより、未知の機構による特異的転写産物の崩壊が誘起されるものと示唆される。

すでに、哺乳類のTIA-1およびTIARには、ストレスを与えた細胞の翻訳機能性オルガネラからmRNAを隔離する働きがあることや、特定のエキソンを介したmRNAのスプライシングに重要な役割を持つことも報告されている[5-8]。さらにTIA-1およびTIARの一部を細胞内で発現させた際のtrans-dominant repressionによる外来タンパク質発現量の増大が示されており、したがってTIA-1/Rタンパク質は細胞内で転写後の諸過程、特にスプライシング促進や翻訳の阻害に関わると考えられている[5]。カイコBmTRN-1の生理的な機能は未だスプライシング制御か翻訳阻害にしばられたわけではないが、図4のノーザンブロットイングに

おける α -チューブリンmRNA解析結果による推察から、もしBmTRN-1が外来転写産物を特異的なターゲットとし、本来細胞内に存在する転写産物を認識しにくいものであると仮定すると、以下の想定が成り立つ。すなわち外来の遺伝子や相補的DNAから作られる人工的な転写産物には、スプライシングによる成熟mRNA生成の過程、効率的翻訳に必要なRNA結合タンパク質-mRNA複合体の形成、さらに翻訳後の複合体の寿命に関わる調節などにおいて重大な異常が伴っていると考えられ、こうした転写後に不適切な過程を経た転写産物を認識して排除する機構にBmTRN-1は関わるのではなかろうか。

このような想定が明らかになれば、本研究で用いたBmTRN-1発現の人為的制御の技術は、昆虫細胞内でのウイルスベクターを用いた外来タンパク質生産系の改良にも以下の点で利用できると考えられる。バキュロウイルスベクターが有する強力な転写プロモーターを用いた外来タンパク質発現の場合であっても、配列によっては特定できない理由で期待通りの発現量が得られない実験例があり、タンパク質の発現量が転写後にさまざまな細胞内調節の影響を受けると予想される。昆虫細胞を用いた外来タンパク質発現系に負の影響を及ぼす一要因として、BmTRN-1の転写産物制御機能が考えられるため、BmTRN-1発現の人為的阻害の発想は、特に難発現性外来タンパク質の発現効率向上に貢献する新しい人工的操作法の確立につながるものと期待される。

BmTRN-1の生理的機能については現在も解決すべき問題を残すところである。しかしこれまでの結果に基づき、BmTRN-1の生理的意義について以下のように想定できよう。すなわち図1の結果から明らかな通り、幼虫-蛹変態期の中腸におけるmRNA発現の急激な上昇が、変態過程での旧組織排除とBmTRN-1の生理的役割との密接な関連を示すものである。摂食期には多量の消化酵素タンパク質の遺伝子発現が幼虫の消化管では活発に見られるが、ガットパージ以降の変態過程では急激に消化管組織mRNAの消失が観察される[20]。これ以降は消化管細胞の脱落や崩壊と新組織の更新が急速に進む。すでに我々はBmTRN-1

RRM領域の組み換えタンパク質をBmN4細胞に外部から取り込ませた際に、核のDNA断片化を引き起こすことを示しているが[11]、この事実に基づきBmTRN-1の転写産物制御機能と細胞死現象との関連については次のように推察した。すなわち細胞死抑制を担う細胞内因子、例えば細胞死誘導性プロテアーゼのインヒビターなどが十分機能することにより平常細胞ではその恒常性が維持されているのに対し、変態のプロセスではこうした細胞死抑制因子の発現低下が敏速な消化管細胞の脱落・崩壊と新組織更新を進行させる上で有効であると考えられる。BmTRN-1がもし特異転写産物と相互作用するものであると仮定すると、細胞死抑制因子転写産物のBmTRN-1による特異制御がカイコの変態に伴う細胞死を誘導する一つの経路の引き金となることも推察される。BmTRN-1の標的となる特異的RNAを見出すことができ、その配列の中にBmTRN-1の標的配列を特定することができれば、さらに昆虫の細胞予死死についての理解を深めることにもつながるであろう。

引用文献

- [1] Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994) : Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.
- [2] Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991) : RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 16, 214-220.
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1991) : A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67, 629-639.
- [4] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S.F., and Anderson, P. (1992) : Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8681-8685.
- [5] Kedersha, N., Cho, M.R., Li, W., Yacono, P.W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D.E., and Anderson, P. (2001) : Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 151, 1257-1268.
- [6] Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, J., and Anderson, P. (2000) : RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431-1442.
- [7] Gatto-Konczak, F.D., Bourgeois, C., Guiner, C.L., Kister, L., Gesnel, M.-C., Stevenin, J., and Breathnach, R. (2000) : The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* 20, 6287-6299.
- [8] Guiner, C.L., Lejeunc, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., and Gatto-Konczak, F.D. (2001) : TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 40638-40646.
- [9] Brand, S., and Bourbon, H. - M. (1993) : The developmentally - regulated *Drosophila* gene *rox8* encodes an RRM-type RNA binding protein structurally related to human TIA-1-type nucleolysins. *Nucleic acids Res.* 21, 3699-3704.
- [10] Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K. B., Storey, J. S., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y., and Furusawa, T. (2003) : De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of BmTRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79.
- [11] Ohba, T., Saito, H., Sugimura, Y., Furusawa, T., and Kotani, E. (2004) : Induction of genomic DNA fragmentation by introduction of

- the BmTRN-1 RNA binding domain into cultured cells of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Biotech. Sericol. 71, in press.
- [12] Tsuzuki, S., Iwami, M., and Sakurai, S. (2001) : Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 321-331.
- [13] Brown, M., and Faulkner, P. (1997) : A plaque assay for nuclear polyhedrosis viruses using a solid overlay. J. Gen. Virol. 36, 361-364.
- [14] Fujiwara, H., and Ishikawa, H. (1986) : Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. Nucleic Acids Res. 14, 6393-6401.
- [15] Church, G.M., and Gilbert, W. (1984) : Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 1991-1995.
- [16] Kotani, E., Niwa, T., Tokizane, M., Suga, K., Sugimura, Y., Oda, K., Mori, H., and Furusawa, T. (1999) : Cloning and sequence of a cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Mol. Biol. 8, 299-304.
- [17] McNally, J.D., Wu, S., Sturgeon, C.M., and Storey, K.B. (2002) : Identification and characterization of a novel freezing inducible gene, li16, in the wood frog *Rana sylvatica*. FASEB J. 8, 902-904.
- [18] Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P. (1996) : Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat. Biotechnol. 14, 315-319.
- [19] Hachouf-Gheras, S., Bassen, M.T., and Bosquet, G. (1998) : Identification and developmental expression of a *Bombyx mori* alpha-tubulin gene. Gene 208, 89-94.
- [20] Waku, Y., and Sumimoto, K. (1974) : Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. II. Electron microscopy. Tissue cell 6, 127-136.

大阪市内における人工飼料無菌周年蚕糸生産

松原藤好, 合田恵子, 陳 瑞英, 角田素行*

All the Year-round, Germfree Sericulture in Osaka city using Artificial Diet

Fujiyoshi MATSUBARA, Keiko GOHDA, Ruiying CHEN
and Motoyuki SUMIDA*

*Matsubara Research Institute of Germfree All the Year-round Sericulture, Hirano-Nishi, 4-1-2,
Hirano-ku, Osaka, 547-0033, Japan*

**Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki Sakyo-ku Kyoto,
606-8585, Japan*

Abstract

We are producing germfree cocoons, all the year-round in Osaka city using all the year-round, germfree sericulture system we developed and artificial diet for silkworm larvae, the composition of which we developed. The system produces 30,000 cocoons in a single rearing and 60,000 cocoons are produced per month. Diet changes are done three times during the entire larval period of 25 days and no other procedures are required. A year and a half passed since the start of production here and no disease of silkworm occurred. *Cordyceps militaris* is successfully cultured on germfree silkworm pupae we produced and it is a source for making health food. Germfree, fine quality of fibroin powder and sericin powder are produced from the germfree cocoons and these are used for making silk cosmetics and food additives which are used for improving food quality.

Key Words : All the year-round, germfree sericulture ; artificial diet ; silkworm ; Osaka city

1. はじめに

養蚕は世界では約50ヶ国が行っており、我国は世界の追従を許さない蚕糸生産技術をもっている。しかし近年では和装需要の減退と生糸、絹製品の輸入増大による需給の失調、価格の低迷による農家の生産意欲の低下、従事者の高齢化や農産物の自由化の波や規制緩和等も加わり、かつて221万戸あった養蚕農家も2002年では2,730戸に激減し、養蚕業は絶滅の危機に直面している。こうした状況からの脱皮を念頭に省資源、機械力よりも蚕の機能を活かした超省力、低コスト、安定多収、しかも高品質の繭ができる無菌周年養蚕システムを考えてきた。

1960年人工飼料が開発され、1964年蚕の無菌飼

育法を確立して以来 [1]、本法を病理学や生産学へ応用を広げ [2] 季節に制約されない世界で初めての無菌周年養蚕のシステム化を計り [3]、京都工芸繊維大学附属農場を初めに京都市工業団地や中山間地（日原町、加悦町）および山間地（白峰村）での実用化を試みてきたが飼料や施設、飼育法が従来と全く異なった考え方と方法であるため理解されることなく国内外ともに全く普及しなかった。

我国の蚕糸業は平成10年4月蚕糸業法の廃止を契機に養蚕は全く新しい局面となり、誰でも自由に蚕糸生産ができると同時に、蚕や繭も生糸以外の新しい分野の商品開発が自由に出来る時代になった。そこで、今度は工業的な無菌周年養蚕によって再び蚕糸業の活性化を願って大阪市内に松原方

連絡先：松原無菌周年養蚕研究所、547-0033 大阪市平野区平野西4-1-2、TEL 06-4302-0085
*連絡先：京都工芸繊維大学繊維学部、606-8585 京都市左京区松ヶ崎、E-mail：sumida@ipc.kit.ac.jp、
TEL 075-724-7765

式の無菌周年養蚕研究所を設置し、生産活動を行っている。その概要を報告する。

なお本研究所設立には(株)栄光堂セレモニ・ユニオンの近藤盛之進会長と(株)ウイズラブの安永大一郎社長のご支援によるもので厚く御礼申し上げます。

2. 無菌周年養蚕工場の施設、設備

はじめにも述べたように、従来の考え方と全く異なるので、本工場の施設設備の配置の詳細は図1、図2、図3に示した。図1に示したように部屋を無菌にする必要のない飼料製造部門と蚕を一年を通して連続で飼育できる無菌部門からなり、無菌施設は無菌度10,000の閉鎖環境を作り、その中に更にコンテナの無菌室(クリーン度10,000)を3室設け、その中間にクリーン度1,000のクリーンブースを設けている(図1と図2、3)。従来の施設と全く異なるのは無菌施設と飼料製造が同一場所で行われ、閉鎖された無菌施設と外部とは飼料の滅菌室の内外の扉を利用して閉鎖し、また、人の出入口をエアーカーテンの付いた扉によって閉鎖することによって、無菌施設の無菌は維持されている。さらに無菌の小部屋は引き戸にし、ここは先にも述べたようにクリーン度10,000のフィルター付空調機で陽圧とし、掃立と2回の飼料交換時に飼育トレイの出し入れをする以外はのぞき窓を設け温湿度の調査を行っている。装置設備は表1と図2に示した通りで材料と方法の項で詳細に説明する。

3. 材料と方法

3.1 無菌施設の洗浄と消毒

無菌施設では本格的な洗浄消毒は6ヶ月に1回行うようにしている。つまり連続で月2回飼育しているので消毒できないためである。

本研究所では掃立10日前に2%ホルマリン水で3.3㎡当り3ℓを噴霧し、更に掃立5日前にはクライト200倍液で第2回の消毒を行って無菌室とした。なお飼育用器具類は飼料滅菌庫に入れて使用する前に必ず100℃90分の蒸気滅菌処理を行って

表1 設備備品類一覧表

1. 無菌カイコ作出関係
1) クリーンベンチ, 2) 滅菌シャーレ, 3) 滅菌濾紙, 4) ガーゼ, 5) 消毒用ビン(500ml) 3個, 6) 薬剤, アルコール, ホルマリン水, 高度晒粉
2. 人工飼料製造関係
1) 桑葉乾燥粉末製造
(1) 桑葉粉末粗粉碎機(P-3型) ダルトン
(2) 桑葉粉末微粉碎機(アルマイザーAIIW)
(3) 振動ふるい機
2) 人工飼料調製
(1) 電子天秤(微量用と大量用エコノミ秤)
(2) 粉体混合機 本工場では粉体混合、練合兼用
(3) 粉体練合機
(4) 飼料袋(粉体保存用), ppフィルム
3) 人工飼料製造
(1) シート圧延成型機(ヤナギヤ製)
(2) リフター
(3) 蒸煮台2台, 台車は27段
(4) 蒸煮滅菌庫
(5) ボイラー(SZ-200A)
(6) 乾熱および高圧蒸気滅菌機, 冷蔵庫
(7) 大形冷蔵および冷凍庫(飼料素材の保存)
3. 無菌飼育関係
(1) 無菌室3室
(1-3 令用), (4 令用), (5 令用)
(2) 上簇室
((1)(2)はコンテナを改装して用いた)
(3) 除菌装置のついた空調機, 加湿機
(4) クリーンブース(クリーン度1,000)
(5) クリーンベンチ(MCV-710ATS)
(6) インキュベーター3台
(7) 蚕具消毒槽
(8) トレイ台車10台
(9) 飼育トレイ セイロウ2型(1210×600×52) 300枚
(10) 不織布飼育シート, 飼育網
(11) 上簇まぶし
(12) その他小物 温湿度計, 滅菌濾紙, ガーゼ, 白金耳, ピンセット, 滅菌シャーレ, ピーカー, 無菌服, 長靴, モップ類, アルコール, ホルマリン, クライトなど消毒薬品

使用している。なお飼育終了後の飼育トレイ、網、シートなど蚕具類は水洗の後2%ホルマリン水槽か、高度晒粉の場合は500倍液の水槽中に浸漬消毒後天日乾燥を行っている。

3.2 蚕卵の催青と卵消毒

催青直後又は孵化前日の卵1箱(20,000粒)を

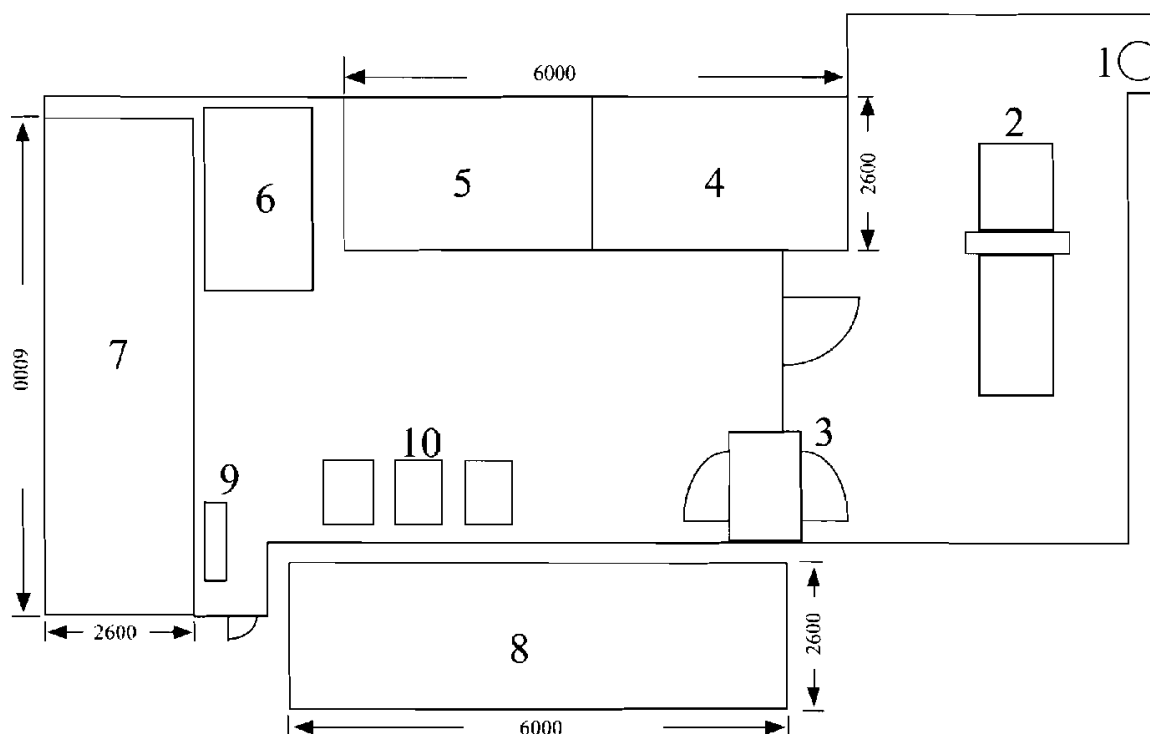


図1 大阪市内に設置された松原無菌周年養蚕研究所の人工飼料無菌周年蚕糸生産プラントの配置図。

1、粉体混合/練合機；2、シート圧延成型機；3、煮沸滅菌庫；4、無菌室 No. 1（1-3令用）；5、無菌室 No. 2（4令用）；5、クリーンパス；7、無菌室 No. 3（5令用）；8、上簇室；9、クリーンベンチ；10、インキュベーター3台。

表2 人工飼料無菌周年養蚕における飼育標準表（作業内容、飼育トレイ、網など 対20,000頭）

蚕令	日順	作業項目	トレイ数	1トレイ当り頭数	1トレイ当り乾物飼料	2万頭当り乾物飼料
	-10	催青	6個（シャーレ）	3,300粒		
	-7	卵消毒（常法）				
	-5	飼育空蚕具等滅菌				
	-1	無菌飼料製造	6枚			
1令	1	掃立	6枚（網18枚）	3,300頭	0.8kg	4.8kg
2令						
3令	11	無菌飼料製造	18枚			
4令	12	4令第1回飼料交換	18枚（網54枚）	1,100頭	0.8kg	14.4kg
	18	無菌飼料製造	54枚			
5令	19	5令第2回飼料交換	54枚（網162枚）	367頭	1.5kg	81.0kg
	24	初熟				
	25	80%				
	26	10%	120枚	165頭		
	29	営繭（化蛹）				
		毛羽取り				
	31	化蛹直後送繭				
合計			78枚	20,000頭		100.2kg
蚕種1箱（20,000頭）当り取繭量		35~40kg				
全繭重	繭層重	繭層歩合				
♀3.09g	♀0.61g	♀19.7%				
♂2.29	♂0.46	♂20.1				

ガーゼで包み、70%エタノールに10秒浸漬し直ちに高度晒粉（クライト）300倍液に15分浸漬消毒し、75%、99%エタノールに20~30秒浸漬した後滅菌濾紙上に移し出来るだけ早く、卵面の水分を除去し、3,300粒ずつ秤量した後、滅菌シャーレ6個に移し、25℃で暗催青を続けて、僅かに孵化した朝8時頃、光を当て孵化させている。ここでは1.5箱（30,000粒）の蚕種を9個のシャーレに移した。消毒法の常法はMatsubara [1, 6]に詳報している。

3. 3 人工飼料組成、飼料の調製、製造、滅菌

1) 人工飼料の組成

本工場で市販している飼料で1-4令用と5令用（オカラ30~50%を含む）を用いた [3, 6].

2) 飼料の調製

人工飼料の素材は少量のものから秤量し、先に示した飼料混合機に移し、全体で20kg~40kg単位で混合調製した。これを袋づめした後冷蔵コンテナに入れ5℃で保存している。

3) 練合、圧延、成型および滅菌

この作業は表2に示したように第1回が掃立前に、第2回目が掃立後11日目4令起蚕の前日、第3回目が掃立後18日目5令起蚕の飼料交換前日である。掃立用飼料は2万頭当り、乾物4.8kgの飼料を混合、2.2倍の水を加えて練合した後圧延成型して蚕種1箱当たり6枚のトレイ（55×116×4cm）に分け（1枚当り乾物0.8kg）蒸煮滅菌機に移して扉を閉め滅菌して用いている。4令用飼料は、乾物14.4kgの混合飼料に2.2倍量の水を加え練合した後18枚のトレイに分けた。1トレイ当りの乾物飼料は0.8kgである。つぎに5令用飼料は乾物81kgに約2倍の水を加え前述のように練合し、圧延成型の後54枚の飼料を作り（トレイ1枚当り乾物1.5kg）、蒸煮滅菌機に移し扉を閉め100℃90分の滅菌を行った。滅菌後は滅菌庫内で自然冷却を行っている。

3. 4 無菌周年飼育

表2に示した飼育標準表に従って無菌周年養蚕を実施している。

1) 掃立

滅菌庫で冷却した飼料の入ったトレイ6枚（蚕種1.5箱では9枚）をクリーンブース中へ搬送し、台車に積み重ねppフィルムに包んだ上部のフィルムをめくって取り除き、飼料上に3枚の飼育用網を重ねないように張り、真中の網上に、シャーレ中の無菌蟻蚕3,300頭を払い落とし更にシャーレを逆にしてシャーレの底をたたくと蟻蚕は全部落下する。これが掃立で図3のGに示した。落下した蟻蚕はしばらくすると均等に散らばり飼料を食べ、数日すると網上の乾燥した所に昇り眠に入り脱皮する。脱皮した蚕は2令となり網から飼料上に降りて自然に摂食をつづける。2眠前にまた網上に昇り脱皮して3令となり10日か11日目に3眠に入り12日目には4令になる。従来は各令に数回の給餌をし、眠に入ると飼料を乾燥させ停食し、脱皮したら新しい飼料を与えるというように各令での給餌、停食、除沙、払座、分箔等人為的な作業が必要であったが、無菌飼育の場合は前述のような作業は蚕自身が行うので掃立から11日目まで飼育作業は必要でない。

2) 4令起蚕時、飼料の交換を兼ねた分箔

掃立後12日目になると1トレイの飼料上3,300頭が3枚の網の上にいる（図3のH）。したがって1枚の網には約1,100頭いるのでこれを新しく製造したトレイ中の飼料の真中に移した（図3のI）。後は新しい滅菌した網を飼育トレイの左と右に置くだけで真中の蚕は左右に均等に自然に移動しながらトレイ中の飼料を食べ終わり網上で4令の眠に入る。掃立後19日目に5令になる。このように掃立時6枚のトレイ中にいた20,000頭の蚕は18枚のトレイに増加し、1枚の飼育トレイ中には1,100頭となる。

3) 5令起蚕時、飼料の交換を兼ねた分箔

掃立より19日目に18枚のトレイ中の2万頭の蚕は5令起蚕になりトレイ中の飼料は殆どなくなるので1トレイ1,100頭の蚕を新しい飼料を作って3分の1つまり3枚（1枚当り370頭）に分箔する必要があるので2万頭を18枚のトレイから54枚にする（図3のJ）。その方法は4令起蚕掃立後12日目と全く同じ方法でよい。5令の無菌飼育室中の54枚の蚕の発育状況は図3のK、Lに示した。

4) 上簇 営繭

掃立から25日目に熟蚕が僅かに現れ翌日殆どが熟蚕になり初熟から3日目に終熟になる(図5のL)。これらは過熱にならないように払い上げ万年簇に150~200頭ずつ入れて営繭させた。営繭後は4日目頃から蛹になるので、これを切開して冬虫夏草の生産用とし切開繭は化粧品類と食品添加用に粉末にして利用している。

4. 結果と考察

人工飼料の調製および製造にあたって本研究所ではタイ国の桑葉天日乾燥したものをを用いた。乾燥桑葉は直ちに今回入手した粉碎機を用いて桑葉粉末を作ることができた。粉末の良否は従来の日本産と別段差異はなかったように思われる。飼料の混合と練合は同時にできるパワフルミキサーの利用によって、約50kgでも20~30秒の混合と数分の練合でねり合わせの飼料ができるようになったので本工程での時間の短縮と操作を簡単に行うことができた。しかしねり合わせ飼料の取出しについては工夫する必要がある。人工飼料の圧延成型機はヤナギヤ製の装置を改良したもので従来のものより安価で使い易くなった。しかし、平板上の飼料成型では全く問題はないが5令期用または全令1回育用の波型の飼料の成型には更なる工夫の必要がある。蚕の発育成長揃いの上から、飼料組成、飼料製造、蒸煮滅菌機と滅菌条件は標準表の通りに実施したが、全く問題はなかった。無菌周年養蚕においては本研究所では無菌の小部屋を安く、何時でも誰でも利用できるコンテナを改装して無菌室としたが気密性が高く、温湿度の変化も少なく、洗浄、消毒、滅菌が容易で無菌の維持の面から、大きな建物があれば、これらのコンテナを利用して多くの無菌の小部屋を造り、全令3回給餌を採用する場合、3つの小部屋を1つの単位とすれば月2回又は3回の連続飼育が可能であることが明らかとなった。したがって蚕種、10箱、100箱での、無菌養蚕も容易になったと考えている。なお、本所に設置している人工飼料製造機の

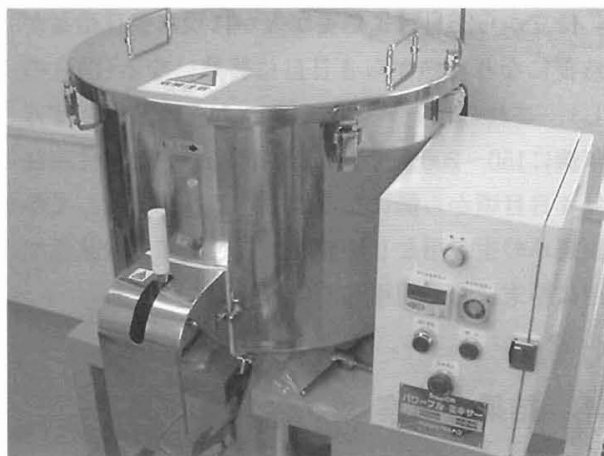
能力は現在でも蚕種100~200箱の養蚕が可能な機械の能力があるものを設置している。蚕の飼育前の蚕種は日本では高価すぎる(1箱10,000円)のでタイ国のものを用いたが、2ヶ月以上冷蔵保存した蚕種の孵化率は悪いので出来るだけ保存期間の短いものが望ましい。消毒後孵化率のよいものはその後の蚕の発育成長もよく、飼育標準表通り、掃立、4令および5令の飼料交換作業だけで成績は良好で表2に示したように繭重の重いものは♀3.09g, ♂2.29g, 繭層重は♀0.61g, ♂0.45gとなり繭層歩合は♀♂ともに約20%であった。飼育中蚕病は毎回全く認められなかった。上簇後4日目の化蛹直後、繭は切開して冬虫夏草生産の原料に供しているが、冬虫夏草の生産成績も良好である。切開繭は織度が細く、従来のものと同じように白度が高く美しいので[7]粉末にして米飯などの食料品や化粧品類の添加物に供している。現在の設備は繭まで作らせるには1回蚕種1.5~3箱飼育が可能であるが、5令の途中で利用する場合1回10箱程度の飼育が可能である。なお本所のすべての作業は女性2人その内1人はアルバイトで運営されている。

References

- [1] Matsubara, F. (1965): Bull. Fac. Text. Sci, Kyoto Univ. Indus. Arts Text. Fib., 4, 291
- [2] Matsubara, F. (1965): Kinugasakai, p. 150
- [3] Matsubara, F. (1995): "Sericultural Facilities", p. 484, Youkendo
- [4] Matsubara, F. (1999): Kinki-Kagaku-Kogyo-kai-shi, 558, 1
- [5] Matsubara, F. (1975): "Silkworm Rearing on Artificial Diet", p. 135. Misuzu Shobo, Tokyo
- [6] Matsubara, F. (1997): J. Text. Machin. Soc. Jpn, 252
- [7] Matsubara, F., and Yamazaki T. (1998): J. Text. Machin. Soc. Jpn, 242



A 無菌工場



B 混合練合機



C 飼料圧延機



D 飼料減菌機

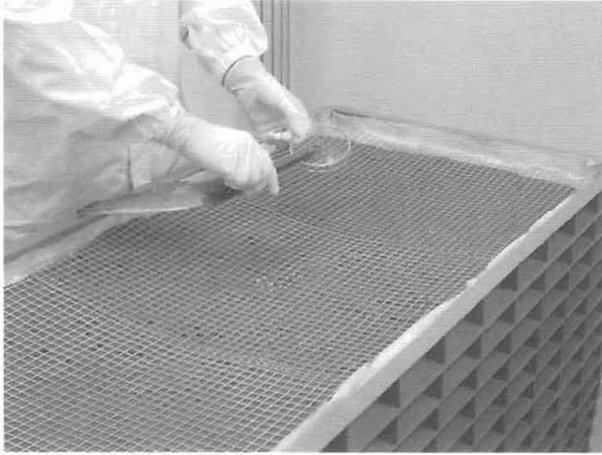


E 無菌室

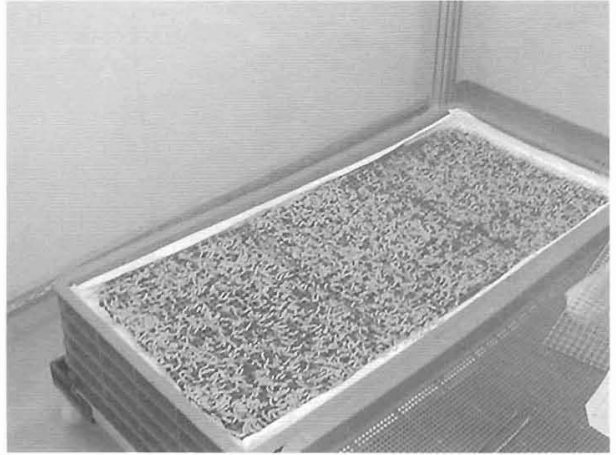


F クリーンブース

図2 無菌工場、飼料製造、無菌室、およびクリーンブース



G 掃立



H 掃立後12日目の4齢蚕



I 掃立後12日目 飼料交換と分箔 (4齢蚕)



J 掃立後19日目の5齢蚕



K 掃立後19日目 飼料交換と分箔 (5齢蚕)



L 5齢盛食期

図3 クリーンプース内での飼育作業と無菌蚕

Trial on Aseptic Rearing of the Mulberry Wild Silkworm (*Bombyx mandarina*)

Masatoshi ICHIDA*, Syuji DOI*, Yoshihiko MIURA*,

Takashi NAKAMURA** and Yutaka BANNO**

* Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Saga-ippongicho
Ukyou-ku Kyoto-city Kyoto, 616-8354, Japan.

** Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki Higashi-ku Fukuoka-city
Fukuoka, 81-8518, Japan.

1. Introduction

Some of the rearing trials of the mulberry wild silkworm (*Bombyx mandarina*) have been reported^{1,2,3}, but the rearings under aseptic condition are by no means complete. The development of the rearing procedure has been studied with fresh mulberry leaves and artificial diet at laboratory level^{1,2,3}. In fact, no report have been published about the aseptic rearing of the *Bombyx mandarina*. Obviously, such information would be of much practical use in studying the physiology of the wild silkworm and other factor affecting there growth under aseptic condition.

We present here an evidence, based on the use of artificial diet on the rearing for the wild silkworm under aseptic condition.

2. Materials and Methods

Material chosen was *Bombyx mandarina*, the eggs of which were field collected in Nagano prefecture, from population in which germ free was suspected. After disinfection, the eggs were held at 25°C in moist petri dishes until hatching. The compositions of artificial diet used in this experiment are given in Table 1. KIT2516 was the diet designed for hybrid strains of the domestic Silkworm, and KIT4016 and KIT404110 were for the parent strains.

The just hatched larvae are collected from the petri dish and twenty larvae were transferred into styrene cases having the sterilized diet, and the larvae were kept at 30°C. After 13 days from the first feeding, the diet was replaced and the rearing was continued.

Table 1 Composition of diets (%)

	KIT2516	KIT4016	KIT404110
Mulberry leaf powder	25.0	40.0	40.0
Soy-protein	40.0	35.0	41.0
Tofu-cake powder	16.0	16.0	—
Corn starch	10.0	—	10.0
Citric acid	2.0	2.0	2.0
Sterol	0.4	0.4	0.4
Ascorbic acid	1.5	1.5	1.5
Vitamin mixture	1.5	1.5	1.5
Mineralmixture	3.0	3.0	3.0
Other	0.6	0.6	0.6

3. Results and Discussion

When larvae in diets of KIT2516 and KIT4016 were kept under aseptic condition, none of feeding larvae were found, suggesting that the compositions used could contain inhibitory substance. On the other hand, the growth of the wild silkworm from the KIT404110 is seen in Fig.1. It is evident from the result obtained that out of 20 young larvae in the beginning 11 larvae (60%) were found to spin cocoon in 16-27 days (Fig.2 & 3). The pupal

period continued lasted for 14-20 days, resulting in 31-46 days elapsed from hatching to emergence.

Characteristics of cocoon produced from the rearing are shown in Table 2. The total cocoon weight was 0.565g and cocoon shell weight was 4.16cg. The cocoon shell ratio counted as 7.62%. Furthermore, there were marked difference in these characteristics between female and male.

Total length of the larval period was longer by 3-5 days and its variance was greater than these reported by Taniguchi and Ninagi (1983) who fed silkworms on fresh mulberry leaves, but it was shorter than that reported by Ninagi and Takeda (1982) who fed all the instars on an artificial diet. According to Taniguchi and Ninagi (1983), the pupal stage lasted for 11 to 53 days with two peaks. In the present study the pupal stage lasted for 14-20 days with unimodal distribution. The cocooning ratio in the present study (55%) was lower than in the case of feeding on mulberry leaves, but higher than that 29.0% reported by Ninagi and Takeda (1982) who fed on an artificial diet.

Table 2 Characteristics of cocoons produced by the larvae reared on the artificial diet KIT404110

SEX	Cocoon weight (g)	Cocoon shell weight (cg)	% of Cocoon shell weight
♀	0.678±0.134*	4.704±0.657*	6.98±0.65*
♂	0.413±0.075*	3.613±0.580*	8.78±0.43*

* : significant

The results in this paper describe the first attempt to the rearing under aseptic condition using the wild silkworm. The successful use of artificial diet for this purpose is encouraging. Thus, the present study showed that aseptic rearing by the plate-feeding method was useful for rearing the wild silkworm.

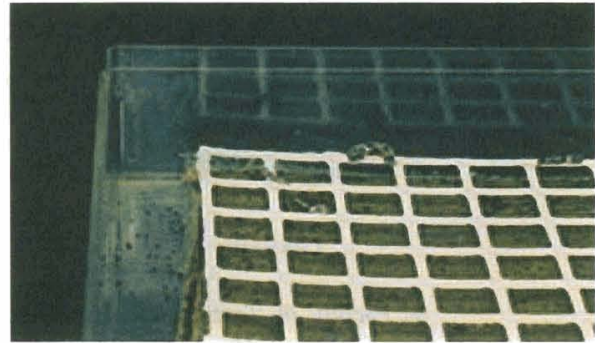


Fig.1 Second and third instar larvae of the wild silkworms on artificial diet by means of a plate feeding method.

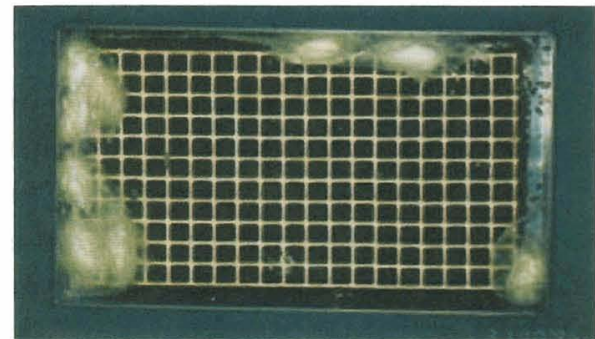


Fig.2 Appearance of cocoons in the styrene case.



Fig.3 Comparison of the wild silkworm Cocoon
Right side : Artificial diet rearing
Left side : Mulberry leaves rearing

4 . References

- [1] Taniguchi, Y., and Ninagi O. (1983) : Laboratory rearing of mulberry wild silkworms. *Acta Sericologica*, 126, 18-24.
- [2] Ninagi O., and Takeda S. (1982) : Rearing of mulberry wild silkworms, *Bombyx mandarina*

on artificial diet. J. Seric. Sci. Jpn. 51, 237-238.

- [3] Takeda S., and Ninagi O. (1983) ; Feeding response of mulberry wild silkworms, *Bombyx mandarina* on the artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn. 52, 306-311.

インドのマニプール州における養蚕技術指導

大槻良樹

Guidance on Sericulture Technology in Manipur State of INDIA

Yoshiki OHTSUKI

*Kinugasa-kai Foundation, Textile Research Institute, 29 Shimohakubai-cho, Kitano,
Kita-ku, Kyoto 603-8326, Japan*

まえがき

インド政府は1996年東部のマニプール州と中央部のマディヤプラディッシュ州(図1:マディヤプラディッシュ州は1991年11月に東西に分割され、東部がチャティスガル州となってこの養蚕事業を引き継いだ)での養蚕事業(Sericulture Project)に対する円借款を日本に求めた。この要請を受けて海外経済協力基金(OECF)は同年末から、“インド国養蚕事業に係わる案件形成促進調査(SAPROF)”を実施し、1997年両州の養蚕局に対し、インド政府を通して、OECFの円借款を供与した。この事業は、二つの州政府がそれぞれ別個に日本からの円借款を利用して、家蚕および野蚕(マニプール州はエリ蚕、マディヤプラディッシュ州はタサール蚕)を対象に、繭と生糸の生産性と品質を向上する技術を普及、定着させ、農村部の貧困層の所得向上に寄与するのを目的とした。実施期間は3年間のPhase 1と、これに続く7年間のPhase 2の合計10年間である。

円借款はOECFによって1999年9月30日运行われ、1999年10月1日以後は、海外経済協力基金と日本輸出入銀行が合併して新しく発足した、国際協力銀行(JBIC)が行っている。

事業開始に当り、両州養蚕局は日本の技術の導入を目的として、(株)日本工営をコンサルタントとして契約し、家蚕については国際協力事業団(JICA:現在・国際協力機構)の協力により、中

央蚕糸局(Central Silk Board:CSB)が実施した「二化性養蚕技術開発計画」で、新しく開発された蚕品種と技術の導入を求めている。

筆者はこの事業に(株)日本工営の協力会社、(株)M&Yコンサルタントの専門家として1998年7月から参加し、マニプール州とマディヤプラディッシュ州で、家蚕の二化性交雑種を対象に、桑の栽培・収穫、蚕種の製造・保護、蚕の飼育等の技術指導を行った。ここでは、マニプール州の事業について、家蚕繭の生産計画、筆者が担当した技術指導及び農民グループによる壮蚕条桑育の成果等の概要を紹介する。

本稿の取り纏めにご協力を頂いた独立行政法人農業生物資源研究所の今西重雄博士にお礼を申し上げます。

1. 繭の生産計画と関連施設の 整備計画

マニプール州では灌漑をしなくても桑の栽培が出来るので、家蚕の飼育は古くから行われている。飼育は年間に数回行われ、蚕品種は多化性原種あるいは多化性×二化性が年間を通して用いられ、また、インド在来の二化性交雑種も一部の蚕期に飼育されている。しかし、飼育規模が小さいことに加えて、何れの蚕品種も生産性は極めて低い。その結果、繭生産量は州内の生糸需要を賄うことが出来ないため、織物業者は州外から生糸を購入

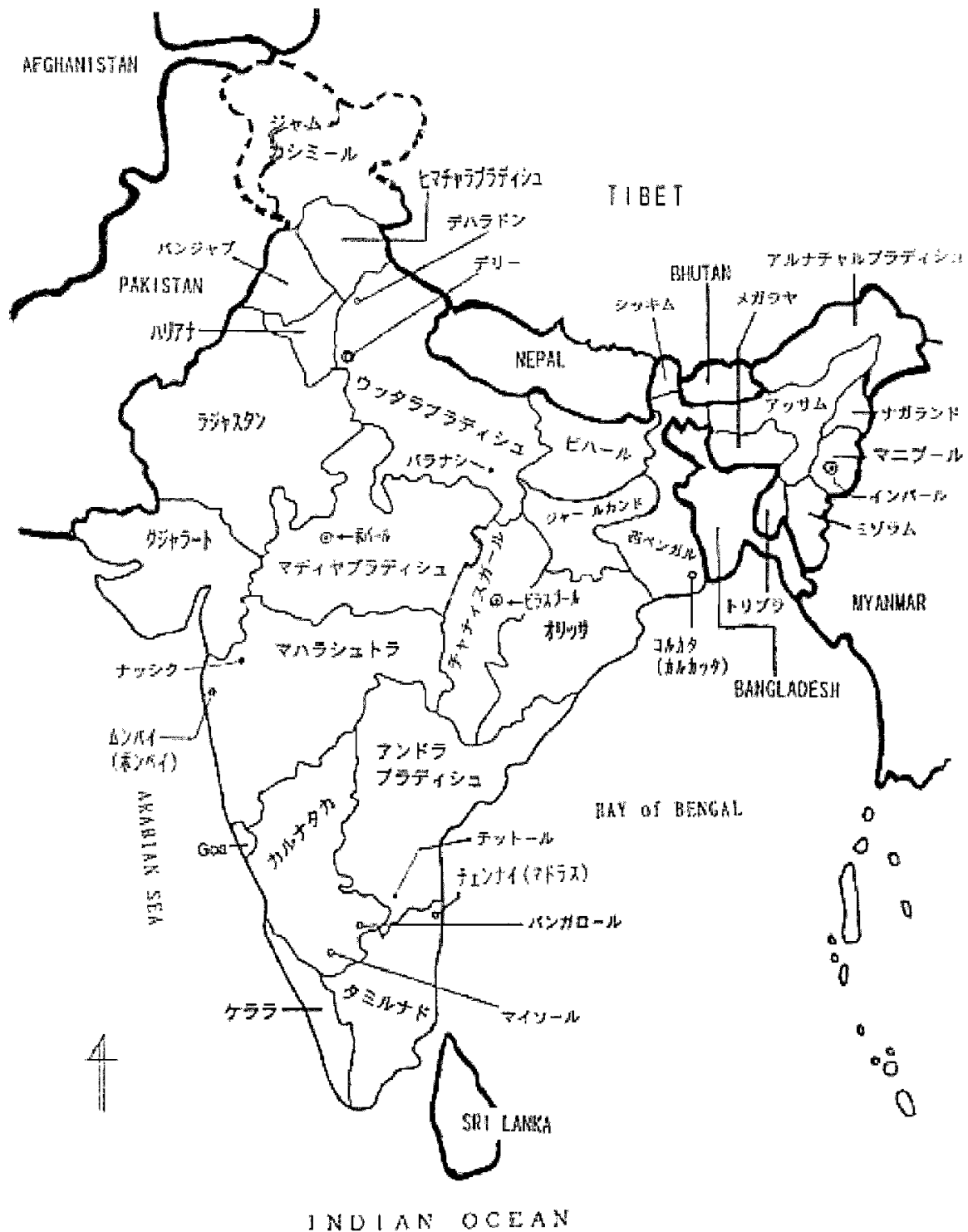


図1 インド地図

している。そのため、織物業者は生糸の生産量の増加と品質向上を強く求めている。また、冒頭に述べたように、マニプール州の農村では、農地を持たない（あるいは所有農地が少ない）ために日雇いの農作業等に従事している人達（以下農民）が多いので、この農民を養蚕事業に参加させ、繭生産によって彼らの自立を支援することも事業の重要な目的の一つである。マニプール州の事業の家蚕繭生産分野では、これらの目的を達成するために、下記の計画が策定された。

1) 農民5人が1組のグループを作り、このグループに州政府は公用地約1.7haを事業地として無償で提供する。農民グループは共同でこの土地に桑園を造成し、その後の肥培管理をする。

2) 事業費でこの事業地の一角に床面積が約250㎡の壮蚕飼育棟を建てこれを農民グループに供与する。この壮蚕飼育棟は農民1グループが共同で管理し、1回に二化性交雑種10箱の3齢起蚕以後の飼育と上簇に使用する。4齢以後は条桑育し、上簇には回転簇を使用する。1年間に4～5回飼育し、年間の上繭1,000kg以上の生産を目標とする。壮蚕飼育棟は桑園と同様に、農民グループが管理する。このような5人1組の農民グループが使用する事業地を州全域に配置し、Phase 1終了迄に600箇所、Phase 2終了時に1,600箇所を造成する。

3) 稚蚕専用桑園を備えた稚蚕共同飼育所を建て、1箇所の稚蚕共同飼育所は、3齢起蚕を20箇所の壮蚕飼育棟に年間4～5回配蚕する。稚蚕は州の技術者が責任者となり、農民を指導して飼育する。

4) 二化性交雑種はインド南部のカルナタカ州で、筆者らが1991～1997年に実施したJICAプロジェクト「インド二化性交雑種技術開発計画」で育成し、指定蚕品種となった多糸量系蚕品種CSR系統を使用する。

5) 州政府はCSBから研究所が育成した生産性の高い桑の新品種、S36、V1等の穂木を譲り受けて農民グループに配布する。農民はそれぞれの事業地で挿木法を使って新品種の桑苗を生産し、桑園の生産性を高める。

6) 年間4～5回の飼育に対応するために、蚕種の製造・保護・催青施設を建設し、飼育時期に合

せて孵化させる蚕卵保護技術を確立する。

7) CSBから分譲を受けた原・原・原種(P3)と原・原種(P2)の形質を維持するP3・P2保存センターと、種繭養蚕農家に配布する原種(P1)を増殖する飼育所を建設する。

8) 生産した繭を繰糸する州政府の製糸工場と、一部の繭を民間の製糸業者に販売するための繭市場をインパール市郊外に建設する。さらに、製糸工場を通年稼動するために、繭乾燥施設と貯繭倉庫を建設する。

9) 養蚕技術と製糸技術に関する研究所と宿泊施設を備えた農民のための技術研修所を建設する。

2. 技術指導

1) 桑栽培

桑苗生産：現地の桑苗生産は全て挿木法で行われている。しかし、落葉後に伐採した桑条をすぐに挿穂に調整して挿木するので、挿木の時期が乾期の始まる頃になり、挿木後の灌漑が十分に行われない場合が多い。また、気温が低くなるので、挿穂からの発芽、発根、その後の成長も悪く、枯死する挿穂が多い。そこで、雨量が多く、気温が高い時期に挿木する方法を検討した。

先ず、1999年7月に州の飼育施設の圃場を使い、壮蚕に給桑した条桑を除沙した後に集め、これを挿穂に使って92本を挿木した。挿木40日後に調査すると、91本は発芽・開葉し、その内の55本は新しい条が31cm以上に成長していた。

この結果を参考にして、2000年4月にSangaitheh事業地の圃場を使って、2回目の試験を行った。4齢期にS36の条桑を給桑した後、除沙した条を集めて葉柄を除去し、長さ15～20cmの挿穂を調整した(図2:3)。予め用意した挿床に挿木し、その上を枯れ草等で被覆した後、如露で撒水した。この時期は気温が高く、雨の日も多いが、晴天の続く場合には2日に1度、挿床に如露で撒水した。挿木した1週間後に殆どの挿穂から発芽し、2週間後に3～4開葉になった(図2:4)。その後の管理は農民と州の技術者に任せしたが、挿穂の90%以上が苗木として2001年3月に圃場に植え付けられた。この結果から、この方法[Young Shoot

Cutting] は穂木採取岡場の桑葉を有効利用出来るので、今後、桑苗生産技術として活用する。なお、この方法による挿木の適期は、インパール周辺では4月下旬から6月下旬迄である。

桑の植え付け：事業地の候補として調査している用地には、平坦地と緩やかな傾斜地がある。最初に造成されたSangaitel事業地は緩やかな傾斜地なので、畝が等高線と平行になるテラス式にし、畝間、株間共に122cm (4feet) で植え付けた (図2：5)。

桑の仕立て・収穫スケジュール：壮蚕飼育棟を使って年間5回飼育する場合の飼育開始を、3月10日、4月20日、6月1日、8月15日、9月25日と想定し、各蚕期に収穫するための桑の仕立て・収穫スケジュールを検討した。基本的には、桑園をA、Bの2ブロックに分け、各ブロックについて基部伐採、中間伐採、先端伐採を組み合わせた仕立て・収穫スケジュールを策定した。しかし、滞在日程の都合で桑の生育を年間通して観察することが出来なかったため、このスケジュールは、桑の発育状態を調査した後、改めて検討する必要がある。

条桑収穫：現地の桑収穫は年間を通して摘葉収穫を行っているため、条桑収穫の指導は農民だけでなく州の技術員にも苦勞した。しかし、基部伐採あるいは中間伐採後に新しい芽が出て立派な条に発育するのを確認すると、農民も抵抗なく剪定鋏を使って収穫するようになり、貯桑法 (図2：6) も習得した。

2) 蚕種の製造、保護、催青

州政府の蚕種の製造・保護施設は規模が小さいだけでなく、停電、発電機の故障、保護庫の電気系統の故障等が頻発するので、安心して使用出来る状態ではなかった。そのため、越年蚕種等の長期保護法は、インパール市内にあるCSBタサール蚕研究所の設備を借用して指導し、蚕種、雄蛾、蛹等を一時的に保護・発育抑制する技術等は、大型の電気冷蔵庫と発電機を購入して指導した。催青技術は州の飼育施設の一室を発電機、電熱器、加湿器を備えた催青室に改造し、催青中の温度・湿度の管理と孵化を齊一にする光線管理等の技術を指導した。

3) 蚕室・蚕具等の消毒

マニプール州ではホルマリンの使用規制がなく、蚕室、蚕具の消毒に使うことに問題はない。しかし、現地の方法はホルマリンが高価なために撒布量が少ないこと、消毒用噴霧器の性能が悪いことに加えて、ホルマリンを撒布する人が消毒マスクを着用しない場合が多く、有効な消毒が出来ない状況であった。そのため、日本製の消毒用マスクを持ち込み、ホルマリンを十分に撒布するよう繰り返し指導した。また、眠期の蚕座・蚕体消毒 (図3：3)、入室前の手足の消毒、蚕室入り口での履物の履替え等、日本では基本的なことを実行するよう指導した。その結果、以前には膿病等が多発していた州の飼育施設でも、州の技術者を対象にした条桑育研修に使った時には、病蚕は殆ど出なくなった。最近、インドでは新しい消毒剤や消毒用マスクが市販されているので、今後、これらを積極的に導入する必要がある。

4) 壮蚕条桑飼育技術の研修

州の技術者に既存の飼育施設4ヶ所で、日本の二化性交雑種を使って条桑育技術を指導した。蚕品種は、朝日×東海、芙蓉×つくばね、錦秋×鐘和、春嶺×鐘月を用いた。条桑育用に蚕座が3段 (1段の蚕座面積：100cm×225cm)、高さ200cm、蚕座の間隔73cmの木製飼育台を作った (図3：2)。上段と中段の蚕座の下は、上蔭後の回転蔭を吊り下げるのに利用出来るように設計した (図3：5)。1～2齢を剉桑育した後、3齢起蚕を飼育台に移して全葉育し、4～5齢を条桑育した (図3：1～4)。5齢中期までの飼育は下段と中段を使い、その後、一部を上段に移して拮座した。4～5齢期の除沙はロープを使い、上段の蚕座での作業には踏み台を使った。4～5齢は1日3回給桑で飼育したが、最初は発育が不揃いになることが多かった。しかし、研修を数回繰り返す間に、参加者達は給桑の合間に補助給桑をしたり、眠起の取り扱いに注意する等の要領を習得したので、発育が良く揃い、一斉上蔭が出来るようになった。

5) 回転蔭による上蔭

インド各地では日本の回転蔭がコピーされ、一部の現場で使われている。しかし、マニプール州の飼育施設、農家等では専らインド独特の小さい

(100cm×80cm) チャンドリケを使っている。この事業では繭質の向上を図るために回転蒨を導入することにし、現地の材料を使って作り方を指導した。木枠の部分は連続して使えるものを作ることが出来たが、厚紙製の管蒨枠は良質の材料が入手出来ないために、連続使用に耐えるものを作ることが出来なかった。今迄にインド各地で作られた回転蒨でも、管蒨枠の材料には苦勞しているもので、優れた材料が見つかるまでは、更新用の準備が必要であろう。熟蚕は人手で蒨に振込み、熟蚕が登蒨した蒨の一部は飼育台の上段と中段に吊り下げた(図3：5)。これによって飼育室内に作業スペースを確保することが出来た。

3. Sangaithel事業地における 農民グループによる壮蚕条桑育

1998年7月にインパール市郊外のSangaithel地区に事業地の1箇所が選定されていたので、5人の農民グループ(図2：2)による桑園造成に着手した。1999年8月には桑園から条桑収穫が出来ようになり、また、事業地に壮蚕飼育棟第1号(図2：1)が完成した。そこで、日本の二化性

交雑種を用いて、農民5人による壮蚕飼育棟での飼育を始めた。農民の指導は研修を受けた州の技術員が協力した。

最初の飼育には春嶺×鐘月5箱を用い、1999年9月14日に州の飼育施設で掃き立て、1～3齢を飼育した。9月26日に4齢起蚕を壮蚕飼育棟に運び、州の技術者に研修した手法で条桑育した(図3：1～4)。条桑の収穫と給桑、ロープ除沙、回転蒨による上蒨等は、全て彼女達には初めての作業であったが、4齢起蚕の配蚕で飼育量が少なく、州の技術者が泊まり込みで熱心に指導したので上繭収量は33.17kg/箱であった。

2000年4月になると桑の収量が多くなったので、飼育規模を春嶺×鐘月10箱に増やし、2回目の飼育を行った。4月7日に掃き立て、4月16日に3齢起蚕を配蚕した。前回同様に飼育し、5月2～3日に上蒨、5月9～10日に収繭、5月11日に出荷した(図3：6)。飼育結果を表1に示した。

さらに、2000年5月に春嶺×鐘月5箱を用いて3回目の飼育を行った。この飼育は、壮蚕飼育棟の連続飼育を検証するためのもので、前回飼育の出荷が終わった2日後の5月13日に州の飼育施設で掃き立て、3齢起蚕を壮蚕飼育棟の消毒・飼育

表1. マニプール州における二化性交雑種の壮蚕条桑育成績

蚕品種：春嶺×鐘月，掃立量：10箱

掃立日：2000年4月7日

1) 収繭量 (kg/箱)		2) 繭層歩合 (%)	
上繭	30.37	♀	21.50
同功繭	0.45	♂	24.50
選除繭	1.28	平均	23.00
計	32.10		

表2. チャティスガール州における二化性交雑種の壮蚕条桑育成績

蚕品種：CSR2×CSR4，掃立量：2箱

掃立日：2001年2月19日

1) 収繭量 (kg/箱)		2) 繭層歩合 (%)	
上繭	29.00	♀	21.55
同功繭	0.60	♂	26.58
選除繭	0.40	平均	24.06
計	30.00		

準備が完了した5月21日に配蚕した。しかし、配蚕した翌日に治安が悪化したので、筆者は5月23日にインパール市を出発して急遽帰国した。そのため、配蚕以後の飼育経過と結果を現地で確認することは出来なかったが、帰国後、現地から上繭収量は1箱当たり31kgとの報告が届いた。今後、このような連続飼育を繰り返すことで、年間4～5回飼育の手順を習熟出来ると期待している。

なお、筆者は、1991年11月にマディアプラディシュ州から分離して養蚕事業の実施母体となったチャティスガル州（図1）でも、日本の二化性交雑種とCSR系交雑種を併用して条桑養育を指導していたので、参考までにCSR系統の成績を付記した（表2）。

4. 今後の取り組み

マニプール州では事業が始まってから3年経過したときに、治安の悪化によって外国人の滞在が出来なくなり、筆者は帰国した。その後は、現地採用の技術者によって壮蚕飼育棟での二化性交雑種の10箱規模の飼育が続けられている。最近の現地からの情報では、1箱の収繭量は25～30kgを維持していると伝えている。従って、これまでの飼育結果から、年間4～5回の飼育に必要な条桑収穫が出来るとなれば、当初の事業計画で想定した1事業地での年間収繭量1,000kg以上を実現することが可能と思われる。

しかし、このレベルの繭生産を続けるためには、桑の新品種導入並びに肥培管理によって桑園の生産性の維持・向上、年間4～5回飼育に必要な桑の栽培・仕立て・収穫法の確立、壮蚕飼育棟の清浄環境の維持、飼育技術の向上等の努力が必要で

ある。

また、用いる蚕種は、当面、CSBからCSR系交雑種を購入するにしても、将来は州政府がCSBから原種（P3）の分譲を受け、それを飼育して交雑種の蚕種を製造・配布する技術確立が必要がある。そのためには、CSBから分譲を受けた原種の形質を、少なくとも数年間はマニプール州で維持する技術を、早急に確立する必要がある。

3年間で終了予定のPhase 1の計画は遅れているが、最近、治安が回復し、日本人技術者による現地での技術指導を再開する準備が進められている。今後、事業の展開が加速すると、養蚕・製糸技術の向上と並行して関連施設の整備も進むので、日本の養蚕技術がマニプール州に定着し普及すると思われる。筆者は二化性生糸の生産が拡大し、日本の養蚕技術が一人でも多くの農民の生活向上に役立つことを期待している。

あとがき

マニプール州は、この事業が始まる以前から治安の関係で、一般旅行者の立ち入りが出来ない状態が続いている。しかし、筆者はこの事業に参加することによって、インパール市に長期間滞在し、現地調査の途中で第二次世界大戦末期が偲ばれる現場を見たり、当時の様子を知る古老の話を聞いたりすることが出来た。また、現地の人達は風貌が日本人と非常に良く似ているばかりでなく、日本人に対して親しみを持っていることを実感することも出来た。筆者はこのような機会を与えて頂いた（株）日本工営と、（株）M&Yコンサルタント並びに関係各位にお礼を申し上げる。



1. 事業地に完成した壮蚕飼育棟第1号



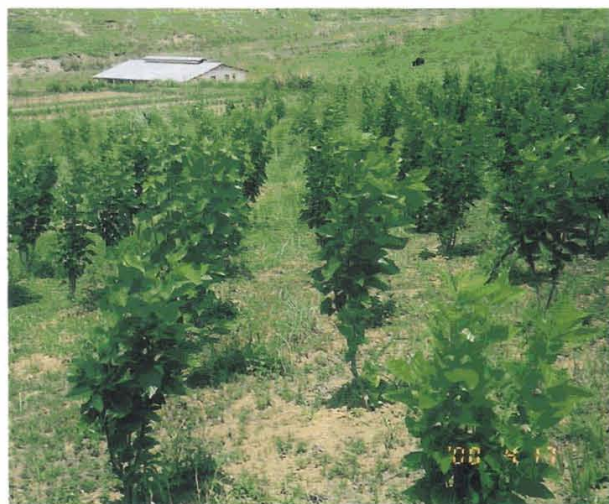
2. 5人の農民グループ



3. Young Shoot Cutting : 挿穂の準備



4. Young Shoot Cutting : 挿木4週間後の開葉



5. 植え付け3年目の桑園



6. 条桑の貯桑

図2 Sangaitel事業地の条桑育(1)



1. 4 齡期の給桑



2. 木製飼育台



3. 5 齡起蚕の蚕座・蚕体消毒



4. 5 齡末期



5. マニプール製回転族による上簇



6. 繭の出荷

図3 Sangaitel事業地の条桑育(2)

絹セリシンの利用技術・商品開発の動向

三好 明・山崎 隆

Present Situation and Future Prospects in Product Development of Silk Sericin

Akira MIYOSHI and Takasi YAMAZAKI

*Kinugasa Textile Research Institute, The Kinugasa-kai Foundation, 29
Shimohakubai-cho, Kitano, Kita-ku, Kyoto, 603-8326, Japan*

Abstract

The sericin is one of the main constituents of cocoon and contributes 25 to 30% of the total cocoon shell weight. When raw silk is used for woven fabrics, the fibroin is available, but sericin enveloped fibroin is practically discarded by degumming. The sericin has skin moisturizing due to the composition involved and shielding property of ultraviolet ray. Furthermore, antioxidant and inhibitor of tyrosinase in sericin were recently discovered. These characteristics of sericin are available to develop new products, such as fabric, cosmetic, medical product and food additive as resources of biomaterial. The silk like fibers derived from polyester are developed by alkali treatment technology similar to removing sericin from cocoon shell. In this paper, the authors will review the present situation in products development for the sericin and discuss about the future prospects from view point of the water pollution under circumstances.

Key Ward : Sericin ; Antioxidant ; Tyrosinase inhibitor ; Silk like fibers ; Water pollution

1. はじめに

日本から蚕が減っていつている。しかし、最近、家蚕、野蚕シルクの特徴ある品種を差別化商品として取り上げる試み〔1〕〔2〕や遺伝子組み換え技術を用いて全く新規な高性能、高機能新素材を開発する試み〔3〕がある。蚕の周辺が再びあわただしくなってきた。

われわれは、天然資源の有効活用と環境保護の観点から、過去廃棄されていた天然蛋白、絹セリシンに着目して、セリシンの回収技術と回収セリシンからの新商品開発を進めている。

本報では、従来検討されてきた(1)絹セリシンの回収技術、(2)絹織物精練技術コンセプトを適用したシルクライク合織の開発、事業化(3)絹セリシン利用布帛の開発、(4)化粧品、医療品、食品の開発について概説する。また、関連する技術開発、商品開発の問題点と方向について考

える。

2. 絹セリシンの生合成、組成と活用可能量

絹繊維は、蚕によって吐出されるアミノ酸の連鎖からなる天然蛋白繊維である。蚕は一對の絹糸腺をもち、中部糸腺でセリン、スレオニン、アスパラギン酸、グリシンを主とするアミノ酸からDNA情報に基づいてセリシン分子を合成、分泌する。家蚕切開繭から抽出したセリシンを主とするアミノ酸組成分析結果〔4〕を表1に示す。後部糸腺ではグリシン、アラニン、セリンを主とするアミノ酸を結合してフィブロイン分子を合成、分泌する。蛋白質を構成するアミノ酸残基の側鎖の種類、数等は、蛋白質の水溶性に著しく関与すると考えられ、セリシンは、フィブロンと比較して水易溶性である。液状シルクは、一對の前部糸腺

* * 連絡先：財団法人衣笠会繊維研究所、603-8326 京都市北区北野下白梅町29、
E-mail : zai-kinugasakai@nifty.com、TEL 075-461-5949、FAX 075-463-6679

を通り、吐糸管で合流、吐出される。したがって1本の繭糸は2本のフィブロン繊維からなり、それをセリシンが包む二重構造になっている。

表1 切開繭セリシンのアミノ酸組成

アミノ酸		Mol%
非極性アミノ酸	グリシン	9.72
	アラニン	3.57
	バリン	3.14
	ロイシン	1.28
	イソロイシン	0.83
	プロリン	0.67
	フェニルアラニン	0.57
酸性アミノ酸	アスパラギン酸	18.00
	グルタミン酸	5.61
塩基性アミノ酸	アルギニン	4.70
	ヒスチジン	1.62
	リシン	3.42
オキシアミノ酸	セリン	29.40
	スレオニン	8.42
	チロシン	4.80
含硫アミノ酸	メチオニン	0.11
	シスチン	0.47

繭を解紬して生糸を採り、それを織って織物にするが、絹織物には生糸を織って製織後精練するものと精練した絹糸を用いて製織するものとがある。いずれにしても、セリシンは除去、廃棄されることになる。繭糸を構成する2種の蛋白質、セリシンとフィブロインの割合は、蚕の種類や繭の外層、内層で相違するが、セリシンが25~30%、フィブロインが70~75%といわれている。統計によると1999年度の世界の繭生産量の合計は約64万トンである。その内セリシンの量は、20%として換算すると計算上は約13万トンとなる(表2)。

3. 絹セリシンの回収技術

生糸、絹織物の精練は、一般にはアルカリによる煮沸精練が行われ、セリシンを溶解してフィブロインを残す。セリシンを含有する精練廃液は、活性汚泥法で廃水処理しなければならない。この精練廃液からセリシンを回収する場合、アルカリ

表2 主要生産国の繭生産量 (1000トン)

国	1996	1997	1998	1999
中国	471	423	476	447
インド	116	128	127	125
ウズベキスタン	22	21	20	19
タイ	13	12	13	14
ブラジル	15	15	15	10
ベトナム	11	6	7	6
日本	3	3	2	2
北朝鮮	8	2	2	2
世界合計	671	621	672	636

等が関与するので回収、精製は著しく煩雑となる。溶媒は水とすることが望ましく、溶媒を水単独とした場合、高温、高圧にすることによってセリシンを溶解することができる〔5〕。セリシン抽出液を凍結乾燥あるいはスプレードライすれば、水易溶粉末が形成される。

京都織物指導所(現京都府織物・機械金属振興センター)は、無薬剤精練と精練廃液の凍結乾燥とからなる回収プラントを製作した〔6〕。この回収プラントを運転した結果、セリシンの回収率、油脂分残留を問題点としている。生繭から白生地までの熱履歴は図1に示すようであり、撚糸廃液と織物精練廃液中のセリシンの分子量が加熱によって低下することを指摘している〔7〕。

セーレン(株)は、化学精練による絹精練廃液を限外濾過に付し、セリシン溶液を得、粘度コントロールしてスプレードライ法により乾燥、セリシン微粉体の製造法を開発した〔8〕。その他、100℃以上の尿素水溶液によりセリシンを抽出する方法〔9〕、イオン水生成装置で得られた90℃のイオン水を抽出液とする方法〔10〕などが提案されている。

(株)ベスト工房と山崎らは、結晶性粘土鉱物を溶解させながら電気分解することで生成した強電解水に繭糸を浸漬、セリシンを抽出する方法を開発した〔11〕。本電解水が、一般の電解水と大きく異なるところは、経過時間、攪拌、材料の溶解等に対してpHが安定していることである。また、溶解能が高いので低温で溶解することができ、本法によれば、平均分子量67000のセリシンが抽出

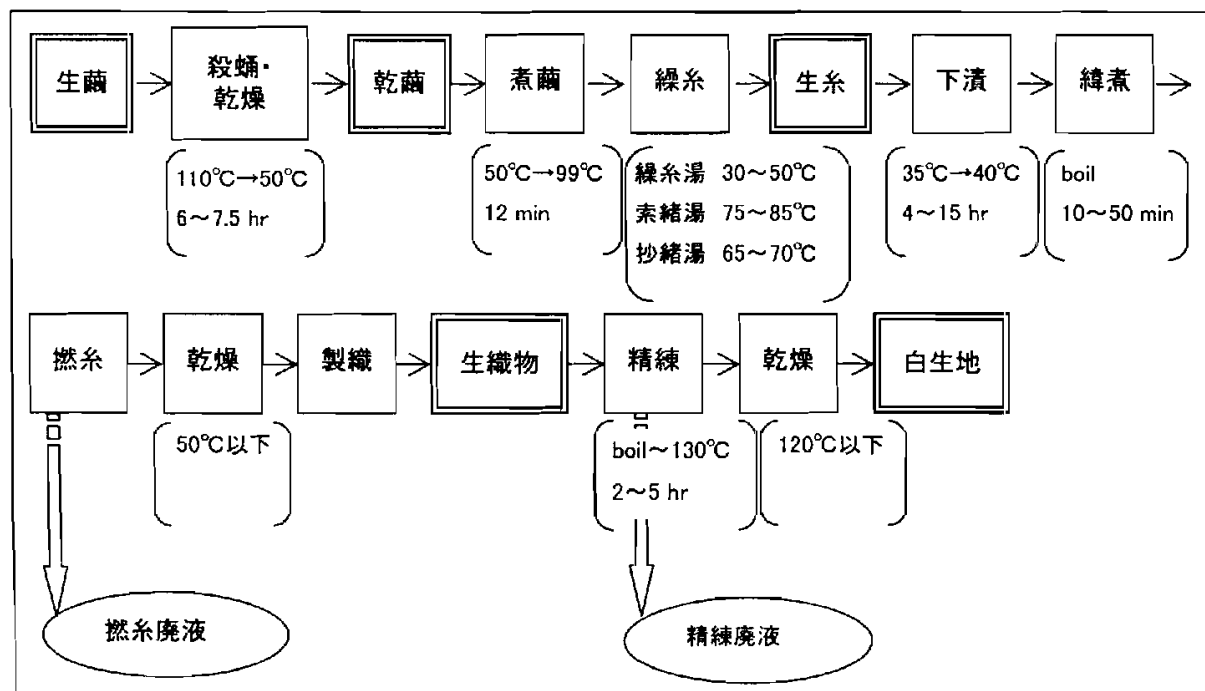


図1 生繭から白生地までの熱履歴

される。

用途により適正な純度と分子量を持ったセリシンを準備することが必要である。純度に関しては、医薬品や食品等高純度を要する場合には、周年無菌生産システム [12] による繭を原料とすることが考えられる。高分子量のセリシンを得る必要がある場合は、結晶性粘土鉱物を溶解させながら電気分解することで生成する強電解水で抽出する方法が最適と思われる。

セリシンの回収は、生織物を水系で精練し、限外濾過、スプレードライ法で乾燥する工程が最も合理的である。本法によると、環境負荷は大幅に減少し、有用な副産物、セリシンが得られる。回収設備投資額は小さく、ランニングコストも低い。地球にやさしい精練技術を伴ったセリシン回収技術といえる。

4. 絹織物精練技術コンセプトの利用 技術—シルクライク合織の開発[13]

繭糸を織物とした後、セリシンを除去すると繊維間、織物組織間に空隙ができるが、この空隙は絹織物の風合いに重要な意味を持っている (表3)。

絹織物精練技術コンセプトは、合成繊維に移植され、シルクライク合織が開発され、実用化されるに至った。

合成繊維のシルクライク化は、1960年頃から始まる。繊維のやわらかさやアミド結合を持つことなどから最も絹に近いと思われるナイロンについて、横断面を三角形にし、繊維に光沢を持たせることが試みられた。ナイロンのヤング率はシルクに比べて低いことから、織物の風合いはシルクライクにならず、不成功におわっている。ついで新規ポリマーによるシルキー素材の開発が進められ、1965年にキアナ、栄輝、続いてシノンが発表され、和装、洋装分野で一時代を築いた。しかし新規ポリマーによるシルクライク繊維は原料価格面から主流の座をひいた。

ポリエステルによるシルクライク繊維の出現は、1965年頃から始まる。ここでは家蚕、ついで野蚕をターゲットにシルクライク合織の開発を進めたユニチカの商品シリーズを例に述べる。ポリエステルは織物のこし、はりに関与するヤング率が1000kg/m²と高いことと、絹における精練と類似の減量加工が可能なが、ポリエステルがシルクライク繊維の王座につくこと理由である。

表3 シルク織物の特性と織物構造、シルク繊維の特性

区分	織物の特徴	織物の構造	繊維の特性
風合特性	腰がある	糸～糸間の接圧小 糸の屈曲大 単繊維間の空隙大	ヤング率が高い
	やわらかい		繊度が細い
	しなやか		セリシンの除去
	ドレープ性がある		わずかな捲縮がある
	ふくらみがある (温もりがある)		
	ドライタッチである		
	きしみ感がある		
外観特性	光沢が美しい		透明
	色鮮やかで、深みがある		三角横断面
	自然な感じがする		易染性、低屈折率 太さ、断面斑大
その他	適度な吸湿性		公定水分率 11%
	絹鳴り		スティック・スリップ現象

第1世代のシルクライク繊維は、絹様光沢の表現がコンセプトで、三角異形断面形成技術が基本技術である。光沢は模倣できたがペーパーライクでシルクの風合いは得られていない。第2世代のシルクライク繊維は、1970年から市場に出、異収縮混織技術と絹織物のセリシン除去に相当するアルカリ減量技術の確立により漸く達成された。新合織時代の基礎技術が形成された重要な世代である。ポリエステルアルカリ減量加工技術は、正に絹の脱セリシン技術を模倣したものに他ならない。アルカリによりエステル繊維の表面が加水分解され、繊維の太さが減少する。アルカリ減量は10～30%であり、織物組織間、糸を構成する繊維間に空隙が生じ、織物はやわらかさとふくらみを持つようになる。ポリエステルのアルカリ減量処理とシルクの脱セリシン処理による織物の変化を比較して図2に示した。

第2世代の典型的な素材例としては、シルミー5を挙げることができる。シルミー5の原糸は、三角異形断面、マルチフィラメントの異収縮混織糸である。製織し染色加工プロセスで収縮差を発現させ、さらにアルカリ減量によりふくらみを付与した。シルミー5織物の風合いはシルク織物の、

こし、はり、ふくらみ、しゃり、きしみ、しなやかさの風合いの表現項目によく一致する(表4)。第1世代から第3世代までは、家蚕をモデルとしたシルクライク合織の世代である。家蚕をモデルにしたシルクライク繊維はファッショントレンドとしてはフェミニン調のものであった。

1981年、ファッションはフェミニン調からカジュアル調に変わってゆく。シルクライク合織は野蚕をモデルとしたナチュラル感のあるシルキー化の技術が進む。野蚕タイプのポリエステル繊維、ミキシイが商品化された。ミキシイの特徴は、1本、1本のフィラメントの横断面形状、繊度、伸度、熱収縮などの物性に斑を持たせたところにある。ミキシイの単繊維繊度は10倍差の0.5～5dが混在し、単繊維伸度は25～80%が混在する。ミキシイの繊維断面と布綿断面を野蚕と比較して図3に示した。図4はミキシイの織物の形態をシルミー5と比較したものである。それぞれ野蚕、家蚕糸の織物と極めて類似していることがわかる。ナチュラルへの挑戦はフィラメント1本、1本に仕掛けを施し、1本、1本の繊維に異なる繊度、形状と物性を与える技術により達成された。

シルクライク合織は、糸条形成技術だけでなく、

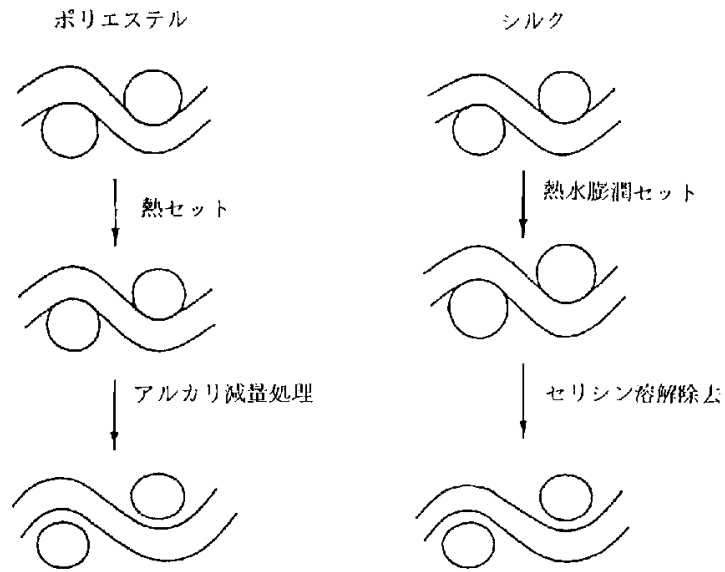


図2 ポリエステル織物のアルカリ減量処理とシルク織物のセリシン溶解除去

表4 シルミー5とシルクの風合い特性比較

項目		試料	
		シルミー5 パルスクレープ	シルク織物 パルスクレープ (デシン調)
風合い表現項目	こはふくらみ	4.56	4.49
	しりみ	3.38	3.24
	しゃり	5.91	4.83
	しきしみ	5.07	5.39
	しなやかさ	4.84	4.65
		7.29	7.31

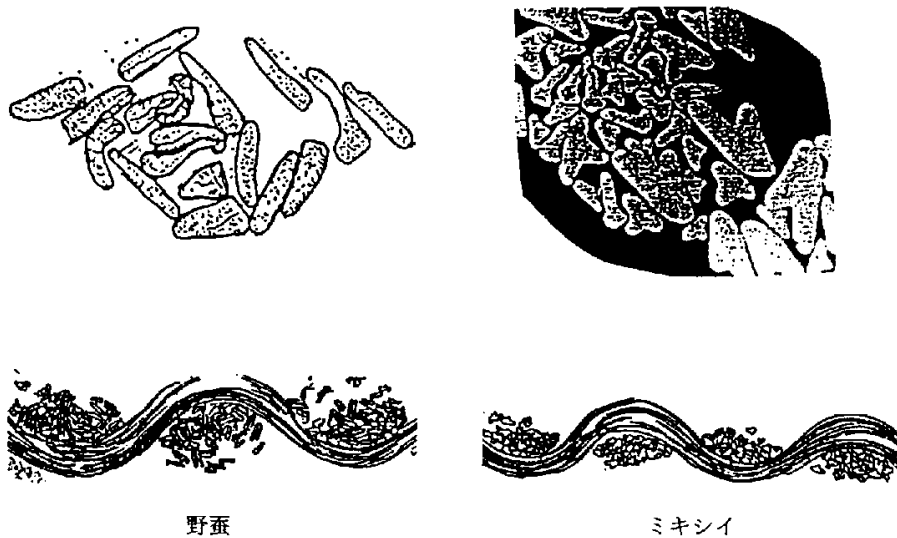


図3 ミキシイと野蚕の繊維断面と布帛断面

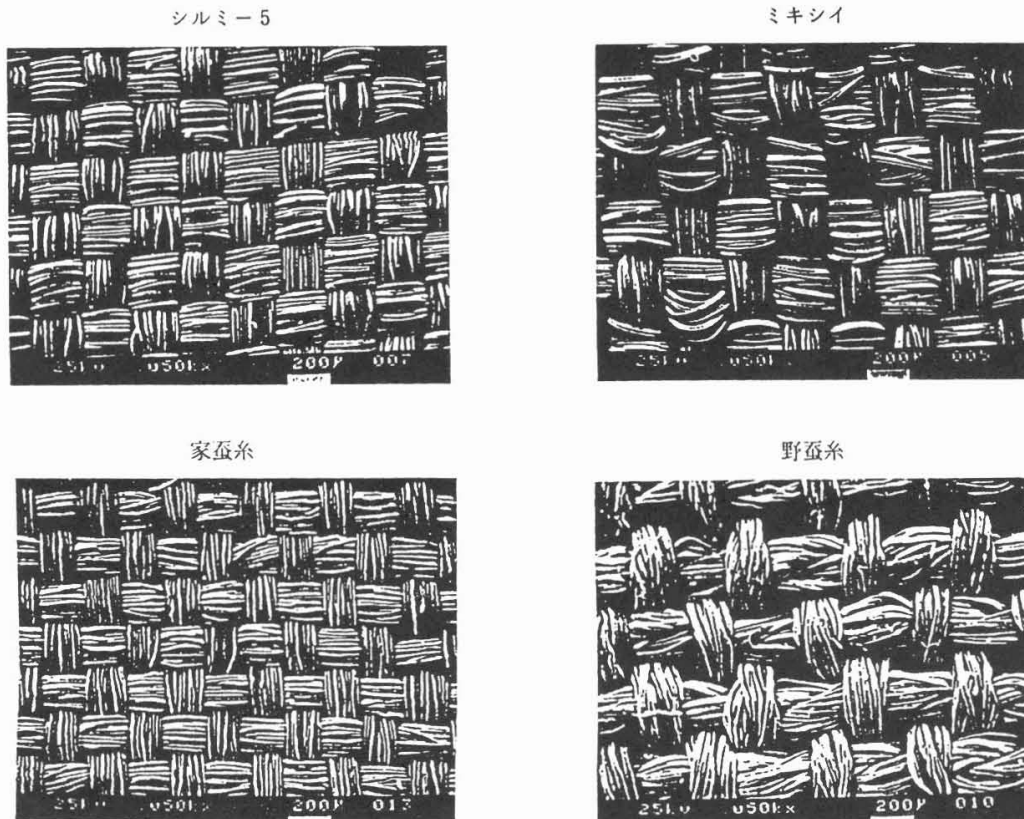


図4 シルミー5 ミキシイ 家蚕 野蚕の布帛の表面形態

製織、染色仕上技術とのドッキングによって完成された。糸条の“不均一性”、織物の“不均一性”を織物全体の風合いに“均質”に反映させるには、極めて高度な品質管理技術がベースとなる。

5. セリシン加工布の開発—吸湿性、帯電防止性、紫外線吸収性、生体適合性の付与

セリシンは各種のアミノ酸からなるが、セリンが約30%、スレオニン、チロシンを合わせると40%がオキシアミノ酸である。また非極性アミノ酸が少なく、セリシンは親水性が高い蛋白質であるといえる。したがって、帯電防止性も高い。含有するフェニルアラニンは紫外線吸収性、UVケア性を有する。また、セリシンは生体適合性がよく、長時間肌に触れていてもかぶれ、湿疹、アレルギーなどの外因性皮膚障害を起こしにくい。セリシンは、繊維加工剤として快適性の高い衣料素材の開発に適性がある。

京都府織物指導所は、疎水性であるポリエステ

ル織物にセリシンの吸湿性を付与した〔14〕。ポリエステル織物表面にアクリル酸樹脂をグラクト重合し、次に樹脂とセリシンを反応させ、ポリエステル織物表面にセリシンを固着した。吸湿性は2%レベルまで増加している。綿については、セリシン水溶液処理で直接セリシンを固着することができる〔15〕。

セーレン(株)は、ポリエステル織物にセリシンを定着加工し、“フレッシュ”を開発、大幅に吸湿性を向上させた〔16〕。“フレッシュ”は高湿度下と低湿度下での吸湿率の差が大きい(図5)。体から出た汗や湿気を、外気に逃がす吸放湿性に優れていることがわかる。またアトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎の患者に“フレッシュ”のブラジャーの着用試験を行い、良好な結果を得ている。皮膚癌抑制効果も認めている。

(株)ベスト工房と山崎らは、結晶性の粘度土鉱物を溶解させながら電気分解することで生成した強電解水でセリシンを抽出し、この抽出液を布帛に噴霧し、乾燥した〔17〕。この方法で加工した布帛は他社製品に比べて黄変性に優れる特徴がある。

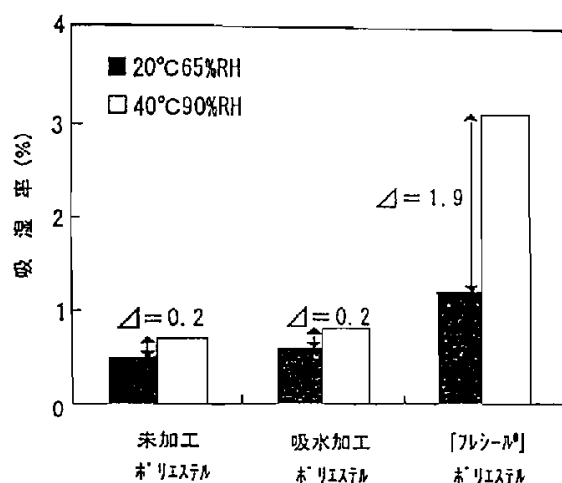


図5 フレッシュルの吸放湿性

本法では他の樹脂の介在がないことによるものと考えている。また、強電解水法によりポリエステル布、およびポリエステル/綿混紡布を処理した場合、風合いを大きく変えることなく加工を行えることが確認されている [18]。

布帛に吸湿性や紫外線吸収性を付与する方法には、各種の手法があり、セリシンに依存する必要があるかどうかは詳細な対比のもとで判断する必要がある。アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎に留意しなければならない人は、乳児から高齢者まで相当数になると思われ、マーケットサイズは大きい。セリシン加工布帛は、この分野での展開を重点指向する必要があることが示唆される。

6. 化粧品、医療品、食品の開発—抗酸化性、チロシナーゼ活性低下作用、UVカット性、保湿性の利用

加藤、山田らはセリシンには抗酸化作用があることを見出している [19]。セリシンを添加すると自然酸化する脂質の量が減少することを認めた。またセリシンの添加によりメラニン色素の生成にかかわるチロシナーゼ活性の低下があり、セリシンの美白効果を確認した。

セリシンは皮膚への浸透性と親和性が高く、素肌に対しては理想的な保湿成分といえる。セリシンが含むセリンは角質層の保湿因子を構成する成分そのものである。化粧品の保湿剤として用いら

れているものにコラーゲン、フィブロインがあるが、セリシンの保湿性はこれに勝る。

セリシンはトリプトファン、チロシン、フェニルアラニン等、3種類の芳香族アミノ酸を含有するが、これらは紫外線を受けて変性する。つまりUVカット特性がある。

以上のようなセリシンの諸特性は、化粧品や医療品、食品などの分野への展開を可能にする。

セーレン(株)、丹後織物工業組合、(株)ベスト工房をはじめ、幾つかの企業がセリシンを原材料とした基礎化粧品、入浴液、石鹸などを本格販売、あるいは試販している。

セリシンの抗酸化作用やチロシナーゼ阻害作用から医用素材への適用が考えられる。皮膚炎の患者用のアンダーウェアについては先に述べた。皮膚再生機能を促進する作用があるので創傷貼り薬 [20] が開発されている。薬物投与の最適化システムであるいわゆるドラッグデリバリーシステムについては、既に立ち上がった研究がなされている。セリシンのみではフィルムは脆く壊れやすいので、グリセリン等の添加が必要である。図6はセリシンフィルムの酵素分解性の分子量依存性を示したものである [21]。

食品では、豊富な必須アミノ酸を含むセリシンの米飯への添加 [4] など各種の試みが進められている。

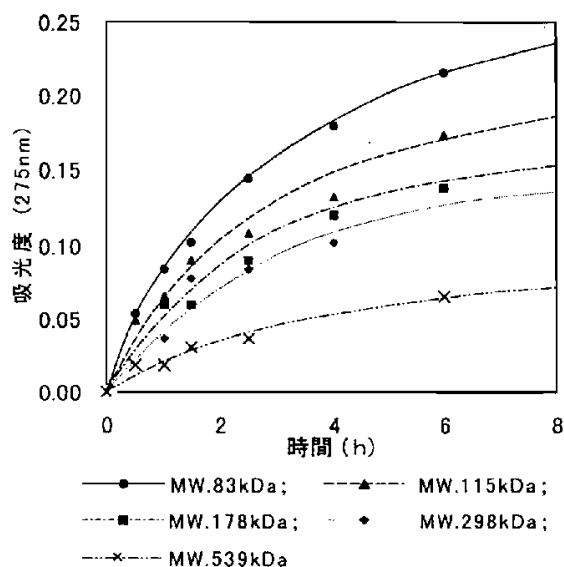


図6 分子量の違いによるセリシンフィルムの酵素分解性の変化

7. おわりに

繭からシルクを生産するシステムの中で、片側のセリシンは廃棄され、その量は膨大であり、廃水の負荷は大きい。廃棄されるセリシンは生体適合性をはじめ抗酸化性、チロシナーゼ活性低下作用、UVカット性、保湿性等の特性、機能を持つものであり、蛋白資源としても有用である。

今後は、繭からフィブロインを生産する現在のシステムを、繭からフィブロインとセリシンを生産するシステムに考え方を変えることを原点に、プラントや用途開発を考えることが必要だろう。回収方式もおのずと決まり、セリシンのコストも低いものとなる。

人工飼料や無菌飼育法のKIT方式に、セリシンとフィブロインを生産する方式をドッキングすれば、世界に発信できる革新技术になるだろう。

引用文献

- [1] 一田昌利 (2004) : 繊維機械学会第10回春季セミナー講演集 75
- [2] 赤井弘 (2004) : 繊維機械学会第10回春季セミナー講演集 81
- [3] 森肇 (2004) : 繊維機械学会第10回春季セミナー講演集 89
- [4] 松原藤好、山崎隆、三好明 (2000) : 「繭の新規用途開発に関する研究」平成11年度貞明皇后蚕糸記念科学技術研究助成成果報告書
- [5] 加藤弘 (1987) : 「絹繊維の加工技術とその応用」繊維研究社 29
- [6] 田中裕美、片山哲郎、山崎正夫 (2000) : 京都府織物指導所研究報 34、1
- [7] 田中裕美、浜岡容子、片山哲郎、山崎正夫 (2002) : 京都府織物指導所研究報 36、1
- [8] 特開昭63-92671
- [9] 特開平11-92564
- [10] 特開平10-29909
- [11] 特願2001-363542
- [12] 松原藤好、山崎隆 (1998) : 衣笠会繊維研究報 3、1
- [13] 三好明 (1998) : 繊維機械学会誌 51、211
- [14] 浅田聡、小林哲 (1999) : 京都府織物指導所研究報 33、1
- [15] 浜岡容子、田中裕美、井沢一郎、片山哲郎、山崎哲郎 (2001) : 京都府織物・機械金属振興センター 研究報 35、12
- [16] 塩見秀数、山田秀幸 (2001) : 繊維と工業 57、234
- [17] 特願2001-363542
- [18] 米田守宏、太田絵理子、西村真弥、山崎隆 (2003) : 繊維機械学会講演集 50
- [19] Kato, N., Sato, S., Yamada, A., Yamada, H., and Fuwa, N. (1998) : Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 145
- [20] 特願平9333560
- [21] 田中裕美、浜岡容子、片山哲郎、山崎正夫 (2001) : 京都府織物・機械金属振興センター 研究報 35、2

財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

1. 平成15年度各種学会口答発表 (下線部は財団理事及び評議員)

- 1) 有松祐治・小谷英治・杉村順夫・古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 2) 定金恵子・島田秀弥・黄俊逸・有松祐治・古澤壽治：蚕の絹糸腺におけるトレハラーゼ活性の変動とmRNAの発現。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 3) 黄俊逸・小谷英治・古澤壽治：トレハララーゼ活性上昇と遺伝子の発現。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 4) 行松恵子・Wanchai De-Eknamkul (MSU)・岡崎正樹 (JICA)・原 三郎・古澤壽治：タイ産・黄蘭種 (Nang-Lai)の生糸特性。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 5) 行松恵子・Wanchai De-Eknamkul (MSU)・岡崎正樹 (JICA)・原 三郎・古澤壽治：東北タイ・イサン地方における生糸作りとその特性。第51回日本シルク学会研究発表会，東京
- 6) 定金恵子・島田秀弥・黄俊逸・古澤壽治・河野義明・亀田幸彦：家蚕の前部絹糸腺トレハラーゼに及ぼすバリドキシアミンAの影響。日本蚕糸学会第73回学術講演会，東京
- 7) 坂野大介・小西 綾・小谷英治・杉村順夫・古澤壽治：カイコの胚発育期における炭水化物代謝変換とその調節機構。日本蚕糸学会第73回学術講演会，東京
- 8) 片山寿人・木田綾子・新田郁郎・宮田清司・古澤壽治・杉村順夫・高野 良・亀井加恵子・原 三郎：クワ葉に含まれる粘性多糖類の構造と組織局財性。日本蚕糸学会第73回学術講演会，東京
- 9) 黄俊逸・定金恵子・有松祐治・遠藤泰久・古澤壽治：家蚕卵でのトレハラーゼ活性上昇と遺伝子の発現。日本蚕糸学会第74回学術講演会，盛岡
- 10) 有松祐治・小谷英治・杉村順夫・宮田清司・古澤壽治：カイコ消化液ヌクレアーゼのプロセッシングについて。日本蚕糸学会第74回学術講演会，盛岡
- 11) 定金恵子・黄俊逸・遠藤泰久・古澤壽治：カイコ絹糸腺におけるトレハラーゼ活性変動とmRNAの発現。日本蚕糸学会第74回学術講演会，盛岡
- 12) 小谷英治・武藤清佳・斉藤 準：カイコRNA結合蛋白質人為抑制による細胞内転写産物量変化。日本蚕糸学会第74回学術講演会，盛岡
- 13) 河本愛美・一田昌利：無蒸煮人工飼料育に関する研究。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 14) 藤井信乃・渡辺昌秀・宮田清司・一田昌利・斉藤 準・角田素之：柞蚕の5齢幼虫8日と4齢幼虫眠期の絹糸腺におけるフィブロイナーゼの免疫学的組織局在性。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 15) 藤井信乃・一田昌利・斉藤 準・角田素之：柞蚕とエリ蚕の5齢幼虫期の絹糸腺のカテプシン活性。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 16) 一田昌利・河本愛美：光線照射と黄色繭の繭色変化。日本蚕糸学会第74回学術講演会，盛岡
- 17) 横井佐代子・小村谷貴子・松原藤好：無菌処理した蚕卵の電子スピン共鳴測定，日本無菌生物ノートバイオロジー学会，ナビオス横浜
- 18) 加占 武・山崎 隆：Cochinealの先媒染によるキトサン処理柞蚕絹織物の染色性。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都工芸繊維大学繊維学部
- 19) 米田守宏・太田絵理子・西村真弥・山崎 隆：セリシン処理ポリエステル織布の基礎力学特性、風

合緒よび過渡的透湿性. 日本繊維機械学会第56回年次大会, 大阪科学センター

- 20) Hajime Mori, Keiko Ikeda, Hiroshi Nakazawa, Yoichiroh Hosokawa and Hiroshi Masuhara : PROTEIN NANO-CHIP : IMMOBILIZATION OF DIVERSE FOREIGN PROTEINS IN VIRAL POLYHEDRA. TENTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPOSITES/NANO ENGINEERING, WYNDHAM Canal Place Hotel, New Orleans
- 21) Hajime Mori, Hiroshi Nakazawa, Keiko Ikeda and Donald L. Jarvis : Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. The Sixth International Workshop on MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS OF THE LEPIDOPTERA, Orthodox Academy of Crete, Kolympari, Crete, Greece
- 22) 山本真史・山尾真史・西山啓史・森 肇・田中博光・山川 稔 : バキュロウイルスAcNPVとトランスポゾンpiggyBacを用いた高効率形質転換法及びRNAi. 日本蚕糸学会第74回大会, 岩手大学
- 23) 森 肇・中澤 裕・池田敬子 : 昆虫ウイルスベクターを用いたプロテインチップの開発. 日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会, 京都工芸繊維大学繊維学部
- 24) 山本真史・山尾真史・森 肇・富田正浩・吉里勝利 : バキュロウイルスとトランスポゾンを利用した形質転換法の改善. 日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会, 京都工芸繊維大学繊維学部
- 25) 長岡純治・山尾真史・宮崎正教・中島咲子・森 肇 : 幼虫脂肪体由来の初代培養細胞におけるRNAiによる遺伝子発現抑制実験系の確率. 日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会, 京都工芸繊維大学繊維学部
- 26) 長岡純治・山尾真史・宮崎正教・中島咲子・森 肇 : 初代培養細胞-RNAiによる遺伝子機能阻害実験系の確率. 日本蚕糸学会第74回学術講演会, 盛岡
- 27) 池田敬子・中澤 裕・森 肇 : 昆虫ウイルスの多角体を利用したプロテインビーズ(†)の開発とその応用. 第26回日本分子生物学会年会, 神戸
- 28) 門 純子・西村太良 : 糸の強力むらを考慮した織物の力学的性質についての一考察. 日本繊維機械学会年次大会, 大阪科学技術センター
- 29) 高田昌輝・西村太良 : 繊維集合体内における吸液. 日本繊維機械学会年次大会, 大阪科学技術センター
- 30) 西村太良・中西貴輝 : 地域産業活性化のための取り組み. 産学連携学会会員第一回年次大会, 北海道大学
- 31) 赤井智幸・松本 哲・村上 豊・近藤誠二・松下正樹・石山正利・矢井田 修 : 海面処分用保護マットに用いる不織布の貫入抵抗と保護性能. 日本繊維機械学会第56回年次大会, 大阪
- 32) 矢井田 修・中村亜衣・吉田恵子 : スパンボンド/スパンレース複合不織布の力学的性質に及ぼすWater Jet二次圧の影響. 日本繊維機械学会第56回年次大会, 大阪
- 33) 矢井田 修・武村有子・堀田知香 : 複合不織布の耐洗濯性. 日本繊維機械学会第56回年次大会, 大阪
- 34) O.Yaida : Present Situation of Japanese Nonwovens Industry. Korea-Japan Technical Seminar of Technical Textiles, Daegu, Korea

2. 平成15年度各種学会誌投稿論文

- 1) 三好 明・神野友香子 : 被服コンピュータ演習の開設ーファッション教育におけるコンピュータの

活用一. 大阪城南女子短期大学研究紀要, Vol.37,49-58.

- 2) Kotani, E., Ohba, T., Niwa, T., Storey, K. B., Storey, J. B., Hara, S., Saito, H., Sugimura, Y., and Furusawa, T.: De novo gene expression and antisense inhibition in cultured cells of Bm TRN-1, cloned from the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, which is homologous with mammalian TIA-1/R. *Gene* 320, 67-79.
- 3) 古澤壽治: 宇宙開発の夢-400Km上空での蚕の行動. 繊維学会予講集, Vol.58(2), 37-40.
- 4) Sakano, D., Furusawa, T., Sugimura, Y., Storey, T. M., and Storey, K. B.: Metabolic shifts in carbohydrate metabolism during embryonic development of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.*(in press)
- 5) 矢井田 修: タオルの吸水性と拭き心地. 京都女子大学宗教文化研究所紀要, Vol.16, 15-36.
- 6) 森澤 純・林 幸男・澤村淳二・田村愛理・矢井田 修: スパンレース不織布の基礎研究(第9報) スパンボンド/スパンレース複合不織布の基本力学特性. 高知県立紙産業技術センター報告, Vol. 8, 25-34.

3. 平成15年度著書・特許等

- 1) 古澤壽治: 宮崎 緑の夢・実現! ライフサイエンス, 蚕で宇宙線調査, C S テレビ, 科学技術振興財団製作
- 2) 古澤壽治: 松ヶ崎産 宇宙に飛び立ったカイコ, *Kansai Walkers* Vol. 10, 235
- 3) 矢井田 修: 紙・不織布フィルム加工ガイド2004(分担執筆)-質的向上と独自性の追求で再び成長品種に-, テックタイムス, 26-31.
- 4) 矢井田 修: 絹不織布による高感性複合布に関する研究. 平成13年度~14年度科学研究費補助金(基盤研究)(C)(1)研究成果報告書.
- 5) 矢井田 修: |解説|「不織布Q&A基礎編(1)~(10)」加工技術, 繊維社, 平成15年3~12月
- 6) 矢井田 修: 不織布産業の構造変化とそれに伴う技術開発および用途展開. 科学と工業, 大阪工研協会 Vol. 28, 13-22.

平成15年度講演活動報告

【演 題】 京都ブランドの染織

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 川口 浩

日時・場所 平成15年10月24日 京都工芸繊維大学大学院会議室
対 象 者 日本蚕糸学会関西支部・九州支部会員および一般市民
講演要旨 京都の染織は、その製品が和洋の分野で多岐にわたっていて、品種、品質ともに他の追従を許さず、その代表格は「おり」では西陣織、「そめ」では京染が挙げられる。これらの素材の大半は絹であり、製品と絹とは必要不可分の関係がある。京都ブランドという名の染織と絹素材の関係について、品種、品質が抱える共通の課題を指摘し、提案した。

【演 題】 各種繊維素材について

(財)衣笠会繊維研究所 理事 山崎 隆

日時・場所 平成15年7月4、8、15日 京都市産業技術研究所繊維技術センター
対 象 者 西陣の技術者
講演要旨 天然繊維、絹繊維、化学繊維の性質と用途についての講義

【演 題】 宇宙開発の夢—400 Km上空での蚕の行動

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 古澤壽治

日時・場所 平成15年6月13日 京都リサーチパーク
対 象 者 繊維学会会員
講演要旨 1997年スペースシャトル・アトランティスに蚕卵を搭載し、宇宙放射線と微小重力の影響について検討した結果を含め、現在建設中の国際宇宙ステーションを利用した「蚕を用いた宇宙生物実験の目的と計画」を紹介した。さらに、これに伴う地上予備実験（放射線医学総合研究所と共同研究）のHIMAC によるネオン、炭素、鉄などの重粒子線の蚕の胚発育に及ぼす影響、体細胞突然変異に関する実験結果を発表し、宇宙生物実験の有用性について理解を深めてもらった。

【演 題】 宇宙開発に貢献する生物学

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 古澤壽治

日時・場所 平成15年12月12日 東舞鶴高等学校
対 象 者 高校生
講 演 要 旨 高等学校で学習する生物、特に発生学や遺伝子学が宇宙生物学の発展や、強いては宇宙開発に結びついていることを、これまでの演者の実験を通して紹介した。また、現在進行中の地上予備実験における結果も併せて紹介し、蚕の吐糸行動が微小重力の下ではどのような行動をとるかについて、模擬微小重力装置を用いた際の蚕の吐糸行動から解説した。

【演 題】 タイ蚕糸科学の現状と将来展望

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 古澤壽治

日時・場所 平成15年12月9日 京都リサーチパーク
対 象 者 KIT ネオバイテク研究会会員
講 演 要 旨 京都工芸繊維大学とタイ王立・マハサラカム大学との蚕糸科学に関する国際学術交流協定に基づくこれまでの実績、ならびに外山亀太郎博士や大村清之介博士がかかってタイ王国の養蚕業発展に貢献されたことを含めて紹介した。また、現地調査からみた現在の養蚕現場の問題点を指摘した。さらに、生物資源フィールド科学教育研究センターが調査したタイシルクの特長について本学修士課程修了生・行松啓子が紹介した。

【演 題】 インテリジェントウェア・新機能繊維の展望

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 弓削 治

日時・場所 平成15年9月30日 大阪産業創造館
対 象 者 ファッション関連・応用システム研究開発者、繊維研究開発者、ウェアラブルコンピュータシステム研究者
講 演 要 旨 昨今のコンピュータ技術の小型化によって、日々進歩しているウェアラブルコンピュータ技術は「衣」の部分にも深く関わるようになってきた。すでに携帯端末 (PDA) が仕込まれた背広が発売され、またメガネ型ディスプレイと小型パソコンを組み合わせた着用型システムも出現する。このような現状から、新しい価値をもった知的衣服を創造するための将来展望について講演。

〔演 題〕 無菌周年養蚕のシステム化と伝統産業の活性化

(財)衣笠会繊維研究所 理事 松原藤好

日時・場所 平成15年12月18日 中国農業科学院蚕桑研究所
対 象 者 研究者、大学院生
講 演 要 旨 1964年無菌飼育法を確立以来生産学や病理学の応用研究を進め、世界で初めて無菌周年養蚕のシステム化を計り、安定した蚕糸生産が可能になった。現在伝統産業の活性化と同時に新産業（食品、化粧品、医薬品など）の開発を進めている。

〔演 題〕 無菌周年養蚕法と繭の安定生産

(財)衣笠会繊維研究所 理事 松原藤好

日時・場所 平成15年12月18日 午後 浙江省蚕桑試験場
対 象 者 研究員、技術員
講 演 要 旨 全齢3回給飼法（掃立、4齢および5齢）による養蚕法では1年を通して、蚕病皆無で安定した繭生産ができる。本法を桑育の稚蚕期に応用した繭生産法は中国蚕糸業に役立つ大きな生産技術と思われる。

〔演 題〕 周年蚕糸生産技術と日本蚕糸業

(財)衣笠会繊維研究所 理事 松原藤好

日時・場所 平成15年12月19日 午前 浙江大学
対 象 者 教官および学生
講 演 要 旨 平成10年4月1日、日本国の蚕糸業法律が全廃になった。これからどこでも、誰でも、何時でも自由に養蚕ができるので、無菌周年養蚕が発展するであろう。日本では、我々は一年を通じた蚕や繭や蛹はシルク生産よりも、食品や化粧品や医薬品などの生産が中心となっている。

〔演 題〕 無菌周年蚕糸生産技術とその応用

(財)衣笠会繊維研究所 理事 松原藤好

日時・場所 平成15年12月19日 午後 蘇州大学
対 象 者 教官および学生
講 演 要 旨 季節的、重労働、複雑、きたないしかも不安定な蚕糸業から、周年、軽労働簡単、きれいな（無菌）な新しい生産技術を確立して日本蚕糸業の活性化と新しい産業の開発を進め

ている。また、都市で周年養蚕も進めている。

『演 題』 松原無菌周年養蚕システムによる蚕の用途開発

(財)衣笠会繊維研究所 理事 松原藤好

日時・場所 平成16年3月8日 大阪市都市開発センター大阪産業創造館
対象者 健康食品関係業界(研究者含む)
講演要旨 大阪市内に設立した無菌周年養蚕の施設設備と生産技術を述べ、1年を通した蚕、蛹、蛾、繭などを用いた食品、化粧品、医薬品、医療技術への利用研究と生蛹による冬虫夏草の生産、切繭の食品や化粧品類生産と販売の現状について述べ、今後、我国での蚕糸生産の重要性を述べた。

『演 題』 繊維材料、不織布への用途展開

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成15年7月25日 京都市健康保険組合保養所「保養所きよみず」
対象者 日本繊維機械学会リサイクル技術研究会会員
講演要旨 繊維製品のリサイクル、リユース、リデュースの考え方について述べ、次にリサイクルの一つの方法である「廃棄繊維製品の不織布化」における技術的問題点について言及した。

『演 題』 不織布料の技術開発動向と用途展開

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成15年9月26日 大阪産業創造館
対象者 日本繊維技術士会総会参加者
講演要旨 日本の不織布産業の技術開発動向と用途開発動向について述べた。特に不織布の複合化技術について、その方法及び複合不織布の性能について詳細に論じた。

『演 題』 産業資材製品の最新動向

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成15年11月17日 滋賀県東北部工業技術センター高島支所

対 象 者 滋賀県東北部工業技術センター産業用繊維委員会会員
講 演 要 旨 日本における産業用繊維製品の技術開発動向について講演した。十木、自動車、農業、工業、医療、衛生用途における繊維製品の高機能化、高性能化についての情報を伝えた。

『演 題』 Present Situation of Japanese Nonwoven Industry

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成15年11月26日 忠南大学(韓国、太山市)
対 象 者 韓国繊維産業連合会所属の研究者
講 演 要 旨 日本における不織布産業の最近の統計資料技術、開発動向、用途開発動向について概説した。

『演 題』 不織布に関する研究事例と技術動向

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成15年12月11日 大阪科学技術センタービル
対 象 者 日本繊維機械学会会員
講 演 要 旨 過去数年間における不織布に関する研究論文、口頭発表について分類してまとめ解説した。また、これら研究論文、発表と不織布製造技術の進展との関係について意見を述べた。

『演 題』 不織布国際見本市(ANEX2003)における不織布開発動向

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 矢井田 修

日時・場所 平成16年3月11日 高知県立紙産業技術センター
対 象 者 四国紙パルプ研究協議会の会員
講 演 要 旨 2003年の中国上海で開催された国際的不織布見本市における展示品の技術的特徴について述べると共に、世界の不織布メーカーの技術動向について解説した。

『演 題』 布帛の通気性、透湿性、保温性等の機能と構造について

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成15年8月15日 和歌山県工業技術センター

対 象 者 和歌山県工業技術センター多孔質体研究会会員
講 演 要 旨 多孔質体研究会

『演 題』 地域繊維産業における大学発シーズ・スキルの活用<大学が身近に>

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成15年10月28日 和歌山県工業技術センター
対 象 者 繊維技術研究会会員
講 演 要 旨 繊維技術研究会

『演 題』 日本における蚕業について

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成15年11月15日 中国安徽省農業科学技術研究院
対 象 者
講 演 要 旨 中国安徽省農業科学技術研究院での研究会

『演 題』 京都工芸繊維大学における産官学連携の取り組み

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成15年12月19日 舞鶴市商工観光センター舞鶴商工会議所ホール
対 象 者 京都北部地域産官学連携関係者
講 演 要 旨 舞鶴商工会議所主催：近畿北部・まいづる地域産学連携セミナー

『演 題』 産官学連携10年間の戦いを顧みて

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成16年1月30日 徳島大学地域共同研究センター
対 象 者 産官学連携関係者
講 演 要 旨 地域連携討論会「産学連携学会支部設置に向けて・戦いの日々を思い浮かべて」

『演 題』 京都工芸繊維大学地域共同研究センターの取り組み

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成16年2月20日 ドーンセンター
対 象 者 産官学連携関係者
講 演 要 旨 産学連携学会主催シンポジウム「人社デ技術よってたかって産学連携京都ネットワーク型産学連携を目指して～」

『演 題』 地域産業のブランド化：北山ブランドにおける産官学連携

(財)衣笠会繊維研究所 理 事 西村太良

日時・場所 平成16年3月16日 和歌山大学地域共同研究センター
対 象 者 産官学連携関係者
講 演 要 旨 和歌山大学地域共同研究センターフォーラム「地域産業のデザイン戦略と産官学連携」

『演 題』 カイコの遺伝子の改造ーバキュロウイルスベクターによる
外来遺伝子導入と絹糸腺の改良

(財)衣笠会繊維研究所 評議員 森 肇

日時・場所 平成16年3月4日 キャンパスプラザ京都
対 象 者 日本繊維機械学会第10回春期セミナー
講 演 要 旨 新たなカイコの形質転換方法を開発した。これによって、今後カイコの持つ形質、例えば糸の性質等を遺伝子組み換え技術によって改変して行くことが可能となる。

発行所

財団法人 衣笠会 纖維研究所

〒603-8326

京都市北区北野下白梅町29

TEL 075-461-5949

TEL/FAX 075-463-6679

E-mail zai-kinugasakai@nifty.com

<http://www.soc.nii.ac.jp/kinugasa/>

会長

林 幸之

印刷所

為国印刷株式会社

〒604-8457

京都府京都市中京区西ノ京馬代町6-16

TEL 075-462-7889

FAX 075-464-3923