

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-151438

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I
B 0 1 J 20/24		B 0 1 J 20/24 Z
A 6 1 K 9/00		A 6 1 K 9/00 A
	47/42	47/42 C
B 0 1 J 20/26		B 0 1 J 20/26 Z
C 0 8 F 289/00		C 0 8 F 289/00

審査請求 有 請求項の数 9 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-319905	(71) 出願人	391030284 農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長 茨城県つくば市大わし1-2
(22) 出願日	平成9年(1997)11月20日	(72) 発明者	塚田 益裕 茨城県つくば市大わし1-2 農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所内
		(72) 発明者	白田 昭 茨城県つくば市大わし1-2 農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所内
		(72) 発明者	塚本 貴敬 茨城県つくば市大わし1-2 農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所内
		(74) 代理人	弁理士 北村 欣一 (外3名)

(54) 【発明の名称】 生体高分子からなる吸着体/徐放体、その製造方法、および吸着方法

(57) 【要約】

【課題】 有効成分を効率よく吸着させ、また、有効成分の徐放速度を制御することのできる吸着体および徐放体を提供すること。

【解決手段】 有効成分を吸着する吸着機能を有し、また、一旦吸着させた有効成分を徐放する徐放機能を有する生体高分子として、絹蛋白質または動物由来のケラチン、コラーゲンもしくはゼラチンを用いること。

**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 有効成分を吸着する吸着機能を有し、一旦吸着させた有効成分を徐放する徐放機能を有する生体高分子からなり、該生体高分子が絹蛋白質または動物由来のケラチン、コラーゲンもしくはゼラチンであることを特徴とする有効成分の吸着体または徐放体。

【請求項 2】 前記生体高分子が絹フィブロインまたは羊毛ケラチンからなり、該絹フィブロインおよび羊毛ケラチンの結晶化度が X 線回折強度分析結果に基づき 7% 以上である請求項 1 に記載の吸着体または徐放体。

【請求項 3】 前記生体高分子が S-H 基を有する還元ケラチンまたは S-（置換）アルキルケラチンである請求項 1 または 2 に記載の吸着体または徐放体。

【請求項 4】 前記生体高分子が水不溶化されたものである請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の吸着体または徐放体。

【請求項 5】 前記生体高分子がビニル基含有モノマーによりグラフト共重合されたものである請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の吸着体または徐放体。

【請求項 6】 前記ビニル基含有モノマーが、メタクリルアミド、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル、メタクリル酸メチル、スチレン、またはメタクリル酸ベンジルである請求項 5 に記載の吸着体または徐放体。

【請求項 7】 吸着機能を有し、また徐放機能を有する生体高分子からなる吸着体または徐放体の製造方法であって、該生体高分子として絹蛋白質または動物由来のケラチン、コラーゲン、もしくはゼラチンを用い、該生体高分子自体の形状を、粉末状、ゲル状、膜状、ブロック体状、多孔質体状、もしくは繊維状として、これを有効成分を含む水溶液中に浸漬し、次いで取り出して乾燥せしめること、または、有機高分子支持体を有効成分を含む該生体高分子水溶液中に浸漬し、次いで取り出して乾燥し、該支持体の表面を該生体高分子で被覆せしめること、または、有効成分を含む該生体高分子水溶液を該支持体上に広げ、乾燥して生体高分子膜を形成せしめることを特徴とする有効成分の吸着された吸着体または徐放体の製造方法。

【請求項 8】 前記得られた吸着体または徐放体を、さらに不溶化剤で処理して水不溶性にする請求項 7 に記載の吸着体または徐放体の製造方法。

【請求項 9】 吸着機能を有する絹蛋白質、または動物由来のケラチン、コラーゲンもしくはゼラチンからなる生体高分子に有効成分を吸着させるに際し、該生体高分子を該有効成分を含む水溶液中に浸漬し、または、有機高分子支持体を該有効成分を含む生体高分子水溶液中に浸漬し、次いで該生体高分子または支持体を取り出して乾燥し、該生体高分子の表面、その内部、もしくはその表面と内部とに該有効成分を吸着させ、または、該支持体表面に該有効成分含有膜を被覆せしめることを特徴とする有効成分の吸着方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、以下記載する有効成分を吸着する機能、吸着した有効成分を徐放する機能を有する生体高分子からなる吸着体 / 徐放体、およびそれらの製造方法、ならびに吸着方法に関する。吸着体とは、上記有効成分（すなわち、生理活性物質、酵素、毒素、生体細胞、抗生物質、医薬品、ワクチン、ホルモン、フェロモン、農薬、肥料、香料等）を効率的に吸着させる機能を持つ素材である。また、徐放体とは、これらの吸着された有効成分の放出を長期間維持できる機能を持つ素材である。

**【0002】**

【従来技術・発明が解決しようとする課題】従来、吸着体としては、植物素材または有機素材、例えば、セルロースやリグニンの加水分解物、木粉、デンプン、塩素化ポリエチレン、塩素化ポリプロピレン、ポリ酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル等が用いられていた。また、徐放体用の素材としては、例えば、尿素、ホルムアルデヒド樹脂、ポリウレタン等が用いられていた。しかし、これらの吸着体や徐放体の製造は化学合成手法が複雑であり、また、粉末、ゲル状、膜状、塊状物等のようにさまざまな形状の材料を成形することは困難であることから、これらの点が技術的な問題となっていた。

【0003】例えば、医薬品の血中濃度を長期間にわたって有効なレベルに維持させるために、徐放体が用いられている。この徐放体として従来用いられているシリコンゴムやエチレン / 酢酸ビニル共重合体の場合、有効成分の徐放速度を有効に制御することは困難であり、また、緩効性や持続性を備えたものを得ることも困難であった。通常、徐放体に有機高分子材料を用いるときには、この材料に有効成分を含有させ、固定化した後に架橋剤で有機高分子材料を処理して不溶化させる必要があった。徐放体からの有効成分の徐放量は、含有させるべき有効成分の量を変えたり、徐放体である高分子材料の架橋度等を変えることによって制御されていたが、従来の有機高分子を徐放体に用いた場合には、徐放体の分子間に架橋を形成させる等の複雑な工程が必要であった。そのため、より簡便で経済性に優れ、効率的な新たな徐放体の出現が望まれていた。

【0004】また、農学分野では、農薬等の有効成分が長時間にわたって徐放できる素材が望まれている。従来は、農薬等の有効成分の徐放速度を制御するため、農薬等をカプセル化する技術が利用されている。例えば、毒性の強いメチルパラチオンを、架橋ポリアミド / ポリ尿素膜でカプセル化する方法が採用されている。このような従来法により農薬をカプセル化して徐放体を合成する場合、徐放体素材を合成するための化学反応を制御しながら有効成分を含んだカプセルを調製するために、特別な化学反応装置が必要である。かくして、特殊な技術を

習熟する必要があり、従来法は経済的で効率的な製造方法ではないという欠点があり、こうした欠点を補う技術開発が求められていた。

【0005】さらに、医薬品による化学療法においては、徐放性医薬品の投薬法が広く用いられている。薬効は確かであるものの副作用の強い抗ガン剤のような医薬品では、徐放効果を持たせた投薬法が望まれている。血液中での薬剤濃度を長期間にわたり一定に維持するような徐放性製剤が好ましいが、医薬品の徐放体としては、従来から用いられてきたシリコンゴムやエチレン/酢酸ビニル共重合体などの有機高分子材料が主流を占め、こうした好ましい徐放体を調製するには困難が伴っていた。

【0006】このように、上記従来法では、有効成分との相互作用の強くない鉱物性素材、植物性素材、あるいは有機高分子素材が用いられてきた経過がある。しかし、これら従来の素材を徐放体とした場合には、十分な徐放効果を発現させることが困難であった。また、従来の有機高分子材料の形態を所望の形態、例えば、粉末、膜、塊状物等に調製するには、特別な装置が必要であったり、化学反応、溶解処理、製膜処理などの複雑なプロセスを必要とする等の問題があった。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、カイコ由来の絹蛋白質および羊毛のケラチンについて、調製方法、溶解方法、製膜条件、蛋白質膜の分子形態、高次構造の解析を行いつつ、新しい利用技術の開発を進めてきた。絹蛋白質または羊毛ケラチン等の生体高分子と有効成分との間には親和性、すなわち分子レベルでの相互作用が生ずることから、かかる生体高分子が有効成分の吸着体または吸着された有効成分の徐放体に利用できることを確かめ、本発明を完成させるに至った。すなわち、有効成分と本発明に用いた生体高分子との間には強い分子相互作用が生じ、生体高分子が有効成分を吸着させたり、徐放させたりする素材として利用できることを見出したのである。

【0008】本発明の目的は、有効成分を効率良く吸着する吸着体、また、吸着された有効成分の徐放速度を制御することのできる徐放体、それらの製造方法、ならびに吸着方法を提供することにある。

【0009】本発明の目的は、有効成分を吸着する吸着機能を有し、一旦吸着させた有効成分を徐放する徐放機能を有する生体高分子からなり、該生体高分子が絹蛋白質または動物由来のケラチン、コラーゲンもしくはゼラチンである有効成分の吸着体または徐放体によって達成される。このコラーゲンは骨、軟骨、腱などにある結合組織の主要な蛋白質成分であり、ゼラチンはコラーゲンを水と煮沸して加熱変性することで水溶性に変えた誘導蛋白質である。

【0010】また、該絹蛋白質絹フィブロインおよび羊

毛ケラチンの場合、結晶化度がX線回折強度分析結果に基づき7%以上であることが望ましい。7%以上で水不溶性となるからである。また、生体高分子はSH基を有する還元ケラチンまたはS-(置換)アルキルケラチンであることが望ましい。また、生体高分子は不溶化剤により水不溶化されたものであることが望ましい。さらに、該生体高分子は、ビニル基含有モノマー(例えば、メタクリルアミド(MAA)、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル(HEMA)、メタクリル酸メチル(MMA)、スチレン(St)、メタクリル酸ベンジル(BzMA))等によりグラフト共重合されたものであってもよい。また、該生体高分子の形状は、粉末状、ゲル状、膜状、ブロック体状、多孔質体状、または繊維状等であることが望ましい。該有効成分としては、例えば、生理活性物質、酵素、毒素、生体細胞、抗生物質、医薬品、ワクチン、ホルモン、フェロモン、農薬、肥料、香料等から選ばれる。

【0011】また、本発明による有効成分の吸着された吸着体または徐放体の製造方法は、吸着機能を有し、また徐放機能を有する生体高分子からなる吸着体または徐放体の製造方法であって、該生体高分子として絹蛋白質または動物由来のケラチン、コラーゲン、もしくはゼラチンを用い、該生体高分子自体の形状を、粉末状、ゲル状、膜状、ブロック体状、多孔質体状、もしくは繊維状として、これを有効成分を含む水溶液中に浸漬し、次いで取り出して乾燥せしめること、または、有機高分子支持体を有効成分を含む該生体高分子水溶液中に浸漬し、次いで取り出して乾燥し、該支持体の表面を該生体高分子で被覆せしめること、または、有効成分を含む該生体高分子水溶液を該支持体上に広げ、乾燥して生体高分子膜を形成せしめることによって行われる。かくして得られた吸着体または徐放体を、さらに不溶化剤で処理して水不溶性にすることができる。

【0012】さらに、本発明の吸着方法では、吸着機能を有する絹蛋白質、または動物由来のケラチン、コラーゲンもしくはゼラチンからなる生体高分子に有効成分を吸着させるに際し、該生体高分子を該有効成分を含む水溶液中に浸漬し、または、有機高分子支持体を該有効成分を含む生体高分子水溶液中に浸漬し、次いで該生体高分子または支持体を取り出して乾燥し、該生体高分子の表面、その内部、もしくはその表面と内部とに該有効成分を吸着させ、または、該支持体表面に該有効成分含有膜を被覆せしめることによって有効成分を吸着できる。

【0013】絹蛋白質または羊毛ケラチン等の蛋白質を有効成分の吸着体とするために最も簡便な方法としては、例えば、次の2つがある。

【0014】(1)昆虫が作る絹蛋白質繊維または動物由来の羊毛繊維等の蛋白質繊維に有効成分を吸着させる方法である。すなわち、有効成分を含む水溶液に蛋白質繊維等を浸漬して取り出した後、これを自然乾燥させ

る。この操作を数回繰り返すだけで、蛋白質繊維等の表面に有効成分を吸着することができる。

【0015】(2)有機高分子からなるメンブレンフィルター、不織布等の支持体を吸着体とする方法である。すなわち、有効成分を含む絹蛋白質または羊毛ケラチン等の蛋白質の水溶液にこれらの支持体を浸漬し、攪拌等の特別な他の手段を用いることなく試料水溶液中で2～3分以上放置してから取り出した後、これを乾燥させることにより、有機高分子支持体の表面が蛋白質薄膜で被覆される。

【0016】かくして得られた吸着体において、所望の溶解度に適合するように絹蛋白質等を不溶化処理薬剤で不溶化することにより、有効成分のための徐放体が製造できる。あるいはまた、蛋白質水溶液に有効成分を溶解させた混合水溶液をポリエチレン膜等の成型用支持体の上に広げ、水分を蒸発させることにより、有効成分を徐放する支持体となる蛋白質膜が製造できる。有効成分を吸着、徐放させ得る生体高分子の形状は、繊維状、膜状、多孔質体状、ブロック状、粉末状、ゲル状等のようにさまざまなものであってよい。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明で利用できる生体高分子としては、特に制約はなく、家蚕、野蚕由来の絹蛋白質（例えば、絹フィブロイン、絹セリシン）または動物由来のケラチン（羊毛ケラチン）、コラーゲン、ゼラチンであってもよい。例えば、家蚕もしくはクワコ由来の絹蛋白質、または野蚕であるテンサン、サクサン、エリサン、シンジュサン由来の絹蛋白質が用いられる。家蚕、野蚕由来の絹繊維、絹繊維製品もしくはその繊維集合体、または動物繊維のケラチン繊維、ケラチン繊維製品であってもよい。

【0018】上記生体高分子の蛋白質繊維、またはその蛋白質繊維製品は、有効成分の吸着体、徐放体として利用することができる他、それらの蛋白質の水溶液に有効成分を溶解した後、水分を蒸発することにより調製できる粉末状試料、ゲル状試料、膜状試料、多孔質体試料等の形状が異なる生体高分子も同様に吸着材/徐放体として利用することができる。

【0019】吸着体としての蛋白質繊維または蛋白質繊維製品に有効成分を吸着させるには、有効成分を溶解した水溶液または分散した水分散溶液に当該繊維や当該繊維製品の試料を浸漬し、試料が十分吸水するまで放置した後、試料を取り出し、標準状態で軽く乾燥することによって行われる。また、吸着体に有効成分を効果的に吸着させるには、有効成分を含有する蛋白質水溶液に当該繊維、当該繊維製品等の試料を浸漬し、軽く乾燥させる工程を複数回繰り返すとよい。さらに効果的に有効成分を吸着させるには、常温常圧での浸漬処理よりも、有効成分の水溶液の入ったガラス製密閉容器内に当該繊維試料を入れ、流水アスピレーターで減圧させた後、急激に減

圧を解除する操作を3～4回繰り返すとよい。この操作により、試料の繊維表面・繊維間隙ならびに微細な繊維組織内にも有効成分が確実に入り込む。こうした方法で、有効成分を繊維表面のみならず微細繊維組織内にも吸着させることができる。有効成分が十分に吸着することから、本発明の吸着体は徐放体としても有効に利用できる。

【0020】浸漬処理のための水溶液の温度は、有効成分の活性が低下しない範囲の温度であれば、制約が無い。浸漬時間は通常3分以上、好ましくは5分以上が望ましい。

【0021】蛋白質繊維等を吸着体として利用するには、前記のように有効成分の水溶液に蛋白質繊維を浸漬し、これを取り出して自然乾燥させることにより、蛋白質繊維表面に有効成分を吸着させるとよい。また、蛋白質繊維または有機高分子材料を徐放体として利用するには、有効成分を含む蛋白質水溶液に、該蛋白質繊維または有機高分子材料を浸漬し、これを取り出して軽く自然乾燥するとよい。有効成分の徐放速度は、バインダーとしての機能を持つ蛋白質の水不溶性の度合いを変えることで制御できる。通常、蛋白質を不溶化させるには、エポキシ化合物、アルデヒド化合物等の分子間架橋剤が有効であるが、絹蛋白質の場合には、アルコール水溶液に軽く浸漬処理するだけでも分子間凝集構造が密になり不溶化する。

【0022】有機高分子材料の表面に有効成分を吸着させるには、有効成分を含む生体高分子水溶液に支持体としての有機高分子材料を浸漬するとよい。この処理で、表面が水溶性の有効成分含有生体高分子膜で被覆された有機高分子材料を調製できる。有機高分子材料表面に被覆された生体高分子膜（例えば、絹蛋白質膜）は水中では吸水して溶解してしまうので、効率的な徐放体にはなり難い。しかし、例えばランダムリッチな絹蛋白質の分子形態を型に転移させることで水不溶化させることができる。同様の分子形態の転移は、有効成分を含む絹蛋白質膜を延伸、熱処理、吸水処理することによっても達成できる。メタノール水溶液に有効成分を含む絹蛋白質膜（以下、絹膜とも称す）を軽く浸漬するだけで、この試料はゲル化し、結晶化し、これにより目的とする水不溶性の吸着体または徐放体が得られる。結晶化した絹膜は、水中に浸漬されて、吸水しても溶解することはなくゲル状物質になるので、分子間凝集性が低下し、包括してある有効成分の徐放効果が向上する。支持体分子と有効成分とは、化学結合ではなく、水素結合、疎水結合等の物理化学的結合で包括的に結合されているからである。

【0023】絹蛋白質繊維の代わりに、カイコを解剖し、体内から取り出した絹糸腺内の液体状の絹蛋白質を用いることもできる。年間を通じて随時、多量に試料が得られる点において、カイコ体内の液体状試料を用いる

よりは、カイコが吐糸した繊維状試料を用いる方が効率的である。

【0024】羊毛はケラチンと呼ぶ蛋白質からできており、本発明で利用できるのは、羊毛ケラチン繊維をはじめ、次のようにして調製できるケラチン水溶液またはS-カルボキシメチルケラチン水溶液である。これらの水溶液は既存の技術で調製できる。すなわち、羊毛繊維を溶解するために、まず、分子間のCys結合を窒素中でメルカプトエタノールまたはチオグリコール酸等の還元剤を用いて切断し、ケラチン分子を還元して可溶化する。メルカプトエタノールを用いる場合には、尿素溶液中で還元処理を行うとよい。尿素の濃度は一般に7.5~8.8M、好ましくは7.8~8Mである。また、チオグリコール酸を用いる場合には、1~4%のNaClを添加するとよい。例えば、還元剤として作用するメルカプトエタノールを用いる場合、羊毛繊維を上記濃度の尿素水溶液に浸漬し、脱気後、窒素雰囲気下、45以下、望ましくは20~25の温度で、メルカプトエタノールを10gの羊毛繊維に対し3~5mL加え、さらに約3時間攪拌する。こうしてケラチン分子が還元され、SH基を有するケラチンが得られる。純水を用いて透析し、尿素、過剰のメルカプトエタノールを除去するとケラチン水溶液が得られる。これは、本発明における水溶性生体高分子として利用できる。

【0025】また、上記のようにして得られたSH基を有するケラチンをさらにアルキル化剤、例えば(置換)アルキルハライド等の既知アルキル化剤と反応させて、S-(置換)アルキルケラチンとすれば、この水溶液もまた本発明において利用することができる。このアルキル化は公知の方法に従って行えばよい。一例として、アルキル化剤としてヨード酢酸を用いた場合について説明する。上記の還元ケラチンに、窒素中、20~25の温度で、攪拌しながら、10gの羊毛繊維に対して10~17gのヨード酢酸(分子量185.95)を加えて反応させる。1~2時間後、pHをほぼ8.5に調整し、純水を用いて透析することによって過剰のヨード酢酸を除いて、S-カルボキシメチルケラチン水溶液を得る。

【0026】このS-カルボキシメチルケラチン水溶液は、上記したように、本発明における水溶性生体高分子として利用できる。S-カルボキシメチルケラチン水溶液に有効成分を混合して均一に攪拌し、この混合水溶液をポリエチレンテレフレート、ポリアミド、ポリエチレン、ポリスチレンもしくはポリフルオロエチレン等の有機高分子材料の表面またはガラス等の無機材料の表面等のような支持体表面上に広げ、水分を蒸発させ、乾燥固化させることで、有効成分を含んだケラチン膜を調製できる。かかる支持体としては、乾燥後の膜が容易に剥がれるものであれば、特に制限はない。

【0027】有効成分の吸着体としては、上記したよう

に、生体高分子繊維が利用できる。吸着体としては、例えば、絹蛋白質繊維または羊毛ケラチン繊維でもよいし、これら繊維の集合体である編地、不織布などの繊維製品であってもよい。あるいはまた、これら天然繊維を溶解して製造した蛋白質水溶液を第二物質の表面に被覆したものでよい。セルロースアセテートとニトロセルロースとの混合物からなる材料、グラスファイバー製の材料、その他の有機高分子材料を吸着用の支持体として利用できる。繊維の集合体である織地、編地、不織布なども吸着用の支持体として利用できるが、微細繊維からなる繊維製品や不織布が吸着体として好ましい。

【0028】有機高分子材料に、例えば絹蛋白質被膜を付着させるには、有効成分を含む0.1~10重量%の絹蛋白質水溶液に有機高分子材料を軽く浸漬処理するとよい。絹蛋白質水溶液濃度が高いと有機高分子材料に付着する絹蛋白質膜の結晶構造はSilk I型になり、試料濃度が概ね3%以下だとランダム分子形態となることが知られている。ランダム分子形態の絹蛋白質膜をアルコール処理、あるいは熱処理するとSilk II型の結晶形態に転移する。本発明で利用できる絹蛋白質の結晶形態はSilk IあるいはSilk IIでもよく、分子形態がランダム状分子のもので同様に利用できる。吸着体または徐放体調製用として利用できる絹蛋白質水溶液の最適濃度は、乾燥重量法で0.2~5重量%である。絹蛋白質の薄膜を被覆した吸着体は、絹蛋白質の薄膜を被覆しない対照区の吸着体に比べて、植物病原細菌を10~100倍以上も吸着する。

【0029】繊維状生体高分子に有効成分を吸着させるには、この生体高分子試料を有効成分を溶解した水溶液に入れ、長時間浸漬処理するだけでよい。効率的に吸着させるには、この浸漬処理を濾過ビンなどの減圧に耐える容器中で行って、減圧、減圧解除操作を繰り返せば、繊維間隙または繊維組織内に被吸着物質が十分に吸着される。簡便な操作としては、室温で1~20分、好ましくは3~7分の浸漬処理が最も好ましい。こうした簡単な処理で絹蛋白質の薄膜が吸着支持体表面に形成されるが、浸漬処理により調製できる絹蛋白質薄膜は水溶性であるため、目的に応じて不溶化処理するのが好ましい。絹膜は、30~70重量%エタノール、メタノールなどのアルコールで浸漬処理すると、分子間の凝集密度が向上し、その結果、結晶性が増加して水不溶性になる。絹蛋白質膜はアルコールの他、エポキシ化合物あるいはアルデヒド化合物による処理でも水不溶性となる。エポキシ化合物は、エチレングリコールジグリシジルエーテルなどの二官能性エポキシ化合物、その他三官能性および多官能性エポキシ化合物であってもよい。アルデヒド化合物としては、通常用いられるグルタルアルデヒドまたはアセトアルデヒドが簡便に用いられる。

【0030】生体高分子に有効成分を効率的に吸着させるには、微細の繊維構造の繊維状物質よりも表面積が大

きくかつ構造が疎な粉末、または多孔質体の方が優れている。しかも、一旦吸着した有効成分を長時間にわたって徐放するという機能を発現することが本発明の吸着体または徐放体の特徴であるが、徐放体からの有効成分の徐放効果は、微細の繊維構造の繊維状物質の方が優れている。従って、吸着効果を優先するか、徐放効果を優先するかによって、また、所望する用途によって生体高分子の形態を選ぶとよい。

【0031】本発明の徐放体は次のようにして製造できる。すなわち、セルロースアセートとニトロセルロースとの混合物または有機高分子材料等の支持体を、水溶性の有効成分を含む蛋白質水溶液に浸漬し、攪拌等の特別な他の手段を用いることなく試料水溶液中で2～3分以上放置してから取り出した後、これを自然状態で乾燥させれば製造できる。吸着体の場合と同じように、アルコール、エポキシ化合物、アルデヒド化合物等で不溶化させることにより徐放効率は著しく向上する。不溶化の程度をかえることで有効成分の徐放速度を制御することができる。

【0032】生体高分子のうち、徐放体として効果的な素材は、絹フィブロインのような絹蛋白質または羊毛ケラチンである。その理由は、有効成分の吸着能が高く、これらの蛋白質の変性特性を利用することによって、徐放速度のコントロールが可能となるからである。これらの蛋白質を徐放制御製剤として利用するには、カプセル、ラミネート、コーティング等の形態が好ましい。

【0033】有効成分を含む生体高分子膜を調製するには、生体高分子水溶液に有効成分を溶解させ、この溶液を静かに攪拌しながら、ポリエチレン、ポリスチレン等の成型用支持体の膜上に拡げて水分を蒸発する方法が簡便である。

【0034】生体組織と絹蛋白質との抗原抗体反応の起こり方は軽微であるため、絹糸は従来より外科用縫合糸として生体組織に埋め込んで利用されている。そのため、有効成分を含む絹膜を所定の体内部位に埋め込むことにより、必要な部位に必要な量の医薬品を供給することができる。

【0035】特に絹フィブロイン膜は、透明であり、酸素透過性が良好であり、生体組織との適合性がよい。こうした生化学的特性に加えて、さらに成形性にも優れており、また有効成分を包括した絹フィブロイン膜は、優れた徐放効果を持つので、視力補正用のコンタクトレンズ素材として最適である。緑内障治療に有効な医薬品を包括した絹フィブロイン膜を有するコンタクトレンズは、メタノール浸漬処理により該膜の不溶化する程度をかえるだけで、医薬品の放出速度を大幅に制御できるなどの効果がある。

【0036】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

い。

【0037】以下の実施例において細菌活性を評価するための抗菌性評価は、次の方法に基づいて行われた。実施例で用いた植物病原細菌については、植物病原細菌の中でも比較的数の少ないグラム陽性菌であり、生理活性物質に対して感受性が比較的強いトマトかいよう病細菌(*Corynebacterium*属細菌の*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*)を選んだ。

【0038】(1)細菌に対する抗菌活性検定評価：加熱溶解後55℃に保持したキングB培地25mLと、検定菌(濃度 $10^9$ - $10^{10}$ 個/mL)2mLとを混合してシャーレに流し込んで平板状に固めた。この菌液混合平板培地上に繊維状試料または約5mm四方の膜状試料を置き、ピンセットで注意深く試料を培地に密着させるようにした。2日間、20～25℃に保った後、試料周辺に現れる菌増殖阻害阻止帯の大きさから、検定試料の菌増殖阻害程度を下記の判定基準により4段階で評価した。

【0039】++++：極めて強い(幅33mm以上の菌増殖阻害阻止帯を形成)。

【0040】+++：かなり強い(幅21mmから33mm未満までの菌増殖阻害阻止帯を形成)。

【0041】++：強い(明瞭で幅10mmから21mm未満までの菌増殖阻害阻止帯を形成)。

【0042】+：弱い(不明瞭な阻止帯を形成、幅15mmから19mm未満までの菌増殖阻害阻止帯を形成)。

【0043】±：軽微(幅8mmから15mm未満までの菌増殖阻害阻止帯を形成)。

【0044】-：抗菌活性は認められない。

【0045】実施例1：絹フィブロイン多孔質体からの無機イオンの徐放

次の方法で再生絹フィブロインを調製した。家蚕の絹フィブロイン繊維5gを55℃の8M臭化リチウム水溶液40mLに溶解させた。これをセルロース製透析膜に入れ、5℃で1週間純水に置換し、濃度1.3%の絹フィブロイン水溶液を作製した(以下これを再生絹フィブロイン水溶液と略記する)。

【0046】2Nの硝酸カルシウム( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )水溶液15mLと2Nの硝酸アンモニウム( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )水溶液15mLとを等量宛混合した合計30mLの混合水溶液に、上記1.3%再生絹フィブロイン水溶液180mLを加えた。攪拌用のホモジナイザーを用いて混合水溶液を1500rpmで15分攪拌すると、ホモジナイザーによる機械的な剪断応力が絹フィブロイン分子に加わることとなり、分子間の分子凝集が高まり、硝酸カルシウムと硝酸アンモニウムとを含む絹フィブロインが溶液内で沈殿した。次いで、デカンテーション法で上澄を除去し、沈殿物を濾紙で濾過することにより、硝酸カルシウムと硝酸アンモニウムとを含む絹フィブロイン沈殿物が得られた。この沈殿物を60℃で1.5時間乾燥すると、堅くて、軽石状の多孔質状固

形物が得られた。

【0047】この固形物をメノウ製の乳ばちで微粉末化した。この粉末3.13gに5gの石英砂(Quartz sand, 和光純薬工業株製、172-00015)を加え、組成的に均一となるように十分混合して混合粉末を得た。直径18mm、長さ11cmのガラス製のカラム管を用い、その底面にガラスウールを敷き、続いてこの混合粉末の全量を入れ、その上に再度ガラスウールを敷いて、混合粉末がサンドイッチ状になるように充填した。カラム管に約25mLの蒸留水を入れ、所定の溶出経過時間毎にカラム管より25mLの水溶液を取り出し、その内の2m

Lを無機イオン測定用に用いた。その後、カラム管には、25mLの蒸留水を補給した。Merckoquantのカルシウムイオンテスト(10083-1M; range 0-100mg/L)およびMerckoquantの硝酸イオンテスト(10050-1M; range 10-500mg/L)に基づく簡易テストキットによる呈色評価法で、浸出液中のCa<sup>2+</sup>とNO<sub>3</sub><sup>-</sup>とを測定した。NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の測定にはMERCK社製の硝酸塩試験用試験紙を用いて、紫色に着色する度合いごとに7段階に区別して評価した。Ca<sup>2+</sup>の定量実験により得られた結果を表-1に示す。

【0048】

表-1

溶出経過時間	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)
15分	1266	—
40分	457	—
170分	313	600以上
5.5時間	180	550
23時間	158	500
2日	115	250
3日	52	100
4日	21	—
5日	21	—

表-1から明らかのように、絹蛋白質からなる吸着体/徐放体は、無機イオンを長時間にわたり徐放するので、徐放素材として利用できる。

【0049】実施例2：家蚕絹フィブロイン膜からの抗生物質および酵素の徐放

(1)カナマイシン含有家蚕絹フィブロイン膜

実施例1で用いた1.3%再生絹フィブロイン水溶液を扇風機により室温で送風乾燥させて、濃度6%の再生絹フィブロイン水溶液を調製した。

【0050】0.65mLの10,000ppmカナマイシン水溶液に6%再生絹フィブロイン水溶液1.13mLを加え、ガラス棒で静かに攪拌した後、この混合水溶液をポリエチレン膜の上に広げて、25℃で乾燥固化させ、カナマイシンを固定化した水溶性の透明絹フィブロイン膜を調製した。この絹膜を以下No.1と略記する。この絹膜を50重量%のメタノール水溶液に15分間浸漬することで、抗生物質を固定化した水不溶性の絹フィブロイン膜が得られた。これを以下No.2と略記する。

【0051】(2)アルカリフォスファターゼ含有家蚕絹フィブロイン膜

上記6%再生絹フィブロイン水溶液0.99mLにアルカリフォスファターゼ12.7mgを加え、静かに攪拌した後、ポリエチレン膜上に広げて乾燥固化させ、アルカリフォスファターゼを含有する水溶性の絹フィブロイン膜を調製した。以下、この絹膜をNo.3と略記する。アルカリフォスファターゼを固定化した水溶性の絹フィブロイン膜を50重量%のメタノール水溶液に15分間浸漬することで、水不溶性の絹フィブロイン膜を調製した。この絹膜を以下、No.4と略記する。

【0052】No.1およびNo.2について、トマトかきよう病細菌の増殖阻害に及ぼす影響を次のようにして評価した。成形直後のNo.1およびNo.2を何も処理しなかったもの(成形直後試料)、2mLの蒸留水中に入れ、振盪することなく2日間静置したもの(水中静置区)、または6時間流水で水洗いしたもの(水洗区)を、トマトかきよう病細菌を含んだKB培地に置床セットし、2日後に細菌の増殖状態をチェックした。得られた阻止円の数値(mm)を表-2に表示すると共に抗菌性を評価した。

【0053】

表-2

試料 No.	成形直後試料	水中静置区	水洗区
No. 1	33-35	34	15
No. 2	29-30	30	25

表-2から明らかなように、カナマイシンを含んだ絹フィブロイン膜は、トマトかいよう病細菌の増殖を強く阻害する。また、水洗区のデータから明らかなように、水不溶化処理をすることで徐放効果が一層持続するようになる。

【0054】加熱溶解後55に保ったKB培地25mLとトマトかいよう病細菌(濃度 $10^{8-9}$ 個/mL)2mLとを混合してシャーレに流し込んで平板状に固めたものを用い、No.1-No.4について、トマトかいよう病細菌の増殖阻害に及ぼす抗菌性評価実験を下記の2つ

の方法(法、法)で行った。法は、被検定試料をそのまま培地に良く接するように置床した成形直後試料の結果であり、法(溶出処理試料)は、被検定試料を、20mLの蒸留水に2日間浸漬し、試料から可溶成分を溶出させた後、この被検定試料を培地表面に置床し2日目の抗菌性を評価した結果である。得られた結果を表-3に示す。表中の括弧内の数値は阻止円の大きさをmmで表示したものである。

【0055】

表-3

試料 No.	方 法	
	$\alpha$ 法：成型直後試料	$\beta$ 法：溶出処理試料
No. 1	+++ (35-45)	+++ (25-32)
No. 2	+++ (33-48)	+++ (26-32)
No. 3	++ (10-17)	±
No. 4	++ (10)	±

絹膜を水中に2日間浸漬し続けても、抗生物質や酵素は持続的に溶出し続ける。これらの結果は、絹膜が徐放担体として有望であることを示している。

【0056】実施例3：徐放体素材の種類の違いによる抗生物質の徐放効果

テトラサイクリン2mgを2mLのメタノールに溶解させた後、4mLの蒸留水を加えた。この水溶液にペーパーディスク(AVANTEC, Thin 8mm Lot No.040495)を10分間浸漬処理した後、取り出して105で30分間乾

燥させた。こうして調製した抗生物質付着ディスクを6%再生絹フィブロイン水溶液に浸漬し、取り出して25で自然乾燥させた。これをディスクAと略記する。一方、上記のようにしてディスクを6%再生絹フィブロイン水溶液に浸漬した後、取り出して105で1時間乾燥したものをディスクBと略記する。トマトかいよう病細菌の増殖阻害効果を実施例2に準じて評価した。得られた結果を表-4に示す。

【0057】

表-4

試料	成形直後試料	浸漬処理4時間	48時間後	72時間処理
ディスクA	++ (19)	± (11)	± (11)	
ディスクB	++ (20)	± (14)	± (9)	± (8-12)

表-4から明らかなように、ペーパーディスクに水不溶性の絹フィブロインが支持体となって付着し、テトラサイクリンを包括したもの(ディスクB)は、浸漬時間72時間後においても抗生物質の徐放が見られる。水溶性の絹フィブロインが付着したディスクAからの抗生物質の徐放は48時間で終了している。

【0058】実施例4：家蚕絹フィブロイン膜からの抗

生物質の徐放

リファンピシン10.1mgに1.83mLの6%再生絹フィブロイン水溶液を加え、更にエタノール0.55mLを添加した混合水溶液をポリエスチレン容器に広げ、送風乾燥して膜状試料を作製した。この試料を以下No.5と略記する。

【0059】テトラサイクリン-塩酸塩11.4mgに



1.83 mLの6%再生絹フィブロイン水溶液を加え、更にエタノール0.55 g加えた混合水溶液をポリエチレン容器に拡げ、送風乾燥して膜状試料を作製した。この試料を以下No.6と略記する。

【0060】カナマイシン10,000 ppmの水溶液0.65 mLに1.83 mLの6%再生絹フィブロイン

水溶液を入れ、更にエタノールを0.55 g加えた混合水溶液をポリエチレン容器に拡げ、送風乾燥して膜状試料を作製した。この試料を以下No.7と略記する。得られた結果を表-5に示す。

【0061】

表-5

サンプルNo.	成形直後試料	48時間水に浸漬
No. 5	+++ (45)	+++ (43)
No. 6	+++ (32)	+++ (22)
No. 7	+++ (31)	+++ (31)

表-5から明らかなように、抗生物質の徐放性が観測される。

【0062】実施例5：抗生物質の付着した家蚕生糸、家蚕絹糸からの抗生物質の徐放

繊維が250d(デニール)の家蚕生糸、およびアルカリで精練した家蚕絹フィブロイン繊維(家蚕絹糸)表面に、それぞれ、次のようにして抗生物質(テトラサイクリン)を付着させた。約0.2gの家蚕生糸、家蚕絹フィブロイン繊維を20mgのテトラサイクリンを含む2mLの水溶液中に40分間浸漬した。浸漬処理後、各試料を取り出し、表面に付着する抗生物質水溶液を濾紙で軽く拭き取り、20、65%RHで40分間風乾させた後、再び、該抗生物質水溶液に40分間浸漬させ、取り出して繊維表面の水分を濾紙で再度拭き取り乾燥させた。こうして調製した家蚕生糸、絹フィブロイン繊維の表面または内部にテトラサイクリンが付着した処理試料を、100mLの水が入った200mLの三角フラスコの中に入れ、タイテック社製の振盪機(Double shaker NR-30)で、1時間、1日、3日、5日、7日の間連続的に振盪した。振盪速度は120rpmであり、試料を

取り出す毎に、三角フラスコ中の100mLの水は全量取り換えた。振盪処理開始前、振盪時間が1時間、1日、3日、5日、7日に対応する処理試料を室温で乾燥させた。トマトかいよう病細菌に対するこれらの繊維試料の増殖阻害の程度(mm)を評価した。なお、培地には、KBと半合成培地とを等量宛混合した培地を用いた。得られた結果を表-6に示す。また、家蚕生糸、家蚕絹フィブロイン繊維は、それぞれ、試料No.8、No.9として表-6に示した。

【0063】実施例6：抗生物質の付着した柞蚕生糸、柞蚕絹糸からの抗生物質の徐放

実施例5と同様の方法で、振盪時間を変えて、柞蚕生糸、柞蚕絹フィブロイン繊維(柞蚕絹糸)について、テトラサイクリン浸漬処理を行った。繊維試料のトマトかいよう病細菌の増殖阻害の程度(mm)を評価した。得られた結果を表-6に併せて示す。柞蚕生糸、柞蚕絹フィブロイン繊維をそれぞれ、No.10、No.11と略記した。

【0064】

表-6

試料 No.	成形直後試料	振盪時間				
		1時間	1日	3日	5日	7日
No. 8	19	13	12	10	6	3
No. 9	19	13	12	11	8	3
No.10	19	12	11	5	5	4
No.11	19	12	11	9	7	6

表-6から明らかなように、表面に抗生物質(テトラサイクリン)を付着・吸着せしめた家蚕生糸、家蚕絹糸、柞蚕生糸、および柞蚕絹糸は、振盪初期の段階で抗菌活性が低下するが、1日~7日にかけて徐放効果が認められた。特に絹セリシンを除去した柞蚕絹フィブロイン繊維(No.11)では長期にわたり抗菌活性が持続す

る。これは、一旦絹フィブロイン繊維内部に入り込んだ抗生物質が長時間徐放し続けるためである。

【0065】実施例7：抗生物質の付着した各種繊維からの抗生物質の徐放

合成繊維および天然繊維をテトラサイクリンの水溶液に浸漬する簡単な方法を用いて、それぞれの繊維表面を抗

生物質で薄く覆った。用いた各種の繊維試料は、合成繊維としては、ポリプロピレン（以下、PPと略記）、ポリエチレン（以下、PEと略記）、ジアセテート（以下、DAと略記）、ポリエステル（以下、PETと略記）、ナイロン（以下、NYと略記）、天然繊維としては、木綿（以下、COTと略記）、羊毛（以下、WOと略記）、絹糸（以下、SIと略記）であった。各繊維試料を、20mgのテトラサイクリンを含む2mLの水溶液に20で40分間浸漬した。その後、取り出して室温で40分間風乾させた。再びテトラサイクリン水溶液に各試料を40分間浸漬させ、各試料を取り出して室温で十分に風乾させた。このようにして調製した各処理繊維を、それぞれNo.12、13、14、15、16、17、18、19と略記する。実施例6と同様に水100mLを入れた三角ビーカーに各処理繊維を入れ、所定時間振盪処理し、得られた試料の抗菌性を実施例6と同様にして評価した。なお、試料を取り出す毎に蒸留水は全量を交換した。得られた各試料の阻止円をmm単位で表示したものを表-7に示す。

【0066】なお、用いた合成繊維の組成上の特徴は次のとおりであった。

【0067】PP No.12 長繊維（丸断面）  
200デニール/40フィラメント  
PE No.13 長繊維 85デニール/20フィラメント  
DA No.14 長繊維 75デニール/21フィラメント  
PET No.15 長繊維 50デニール/36フィラメント（三角断面）  
NY No.16 長繊維 80デニール/30フィラメント  
COT No.17 木綿繊維、20/3 絹100%スタクロバー家庭糸（Y-KT2525）  
WO No.18 メリノ種由来の羊毛繊維（64'S）  
SI No.19 家蚕絹繊維250dを2本合糸したもの

表-7

試料 No.	振盪時間						
	0	1時間	4時間	1日	3日	6日	8日
No.12(PP) (比較例)	25	0	0	0	0	0	0
No.13(PE) (比較例)	25	1	0	0	0	0	0
No.14(DA) (比較例)	28	20	15	0	0	0	0
No.15(PET) (比較例)	27	15	13	0	0	0	0
No.16(NY) (比較例)	30	19	8	0	0	0	0
No.17(COT) (比較例)	30	17	15	0	0	0	0
No.18(WO) (本発明)	28	16	10	5	0	0	0
No.19(SI) (本発明)	30	28	25	25	15	10	8

表-7の結果から明らかなように、合成繊維および木綿の表面に付着した抗生物質は振盪時間1~4時間を過ぎると殆どが溶出してしまうため、いずれの繊維の抗菌性も1日以内に失われる。一方、羊毛、絹などの天然繊維の場合は、通常1時間振盪処理しても大部分の抗生物質が残留し、振盪処理8日間でも一部の抗菌活性の残留することが確かめられた。

【0068】実施例8：酵素被覆した各種繊維からの徐放

次の方法で各種繊維表面にアルカリフォスファターゼを吸着・被覆させた。すなわち、100mLの蒸留水に33mgのアルカリフォスファターゼ（シグマ社(Sigma Chemical Company)製、No.P-3877）を溶解させて、これを原液とした。各繊維試料（実施例7で用いたPP、PE、DA、PET、NY、COT、WO、SI）約30mgをそれぞれ15mL容量のガラス瓶に入れ、この中

にアルカリフォスファターゼの原液13mLを加えた。繊維試料にアルカリフォスファターゼが良く浸透するように、ガラス瓶をガラス製密閉容器に入れ、流水アスピレーターで密閉容器内を減圧にさせた後、圧力を解除した。この操作を3回繰り返した後、圧力を解除し、密閉容器内より試料を取り出し、5で12時間放置し、水分を徐々に蒸発させた後、最後に凍結乾燥器に入れて減圧環境下で試料含有水分を完全に除去した。こうして乾燥した約30mgの繊維状試料を木綿製の日本薬局方ガーゼ（タイプI、蕨衛材（株）製）に包んだ。ガラス製の200mL三角フラスコに100mLの蒸留水を入れ、これにガーゼに包んだ試料を入れて、タイテック社製の振盪機（Double shaker NR-30）を用いて振盪させ、試料に付着、吸着したアルカリフォスファターゼを溶出させた。振盪時間は0、1、4、24時間とし、振盪速度は140rpmに設定した。所定時間振盪した各

試料は、一旦4℃冷蔵庫で保存した後、試料から溶出したアルカリフォスファターゼの量を次の方法で定量した。ガーゼより取り出した繊維試料の全量(約30mg)を10mLのガラス瓶に入れ、これに後述の方法で調製した基質溶液を添加し、酵素反応により生ずる基質溶液の発色程度を、東ソ株式会社製の吸光度測定装置(Micro Plate Reader MPR A4i)を用いて、波長405nmにおける吸光度(O.D.)として求めて評価した。

【0069】なお、基質溶液の作製方法は次のとおりで

表-8

(単位: O. D.)

振盪時間	DA	SI	PET	COT	WO	AC	PP
0 時間	0.032	0.439	0.025	0.079	0.646	0.076	0.002
1 時間	0.001	0.198	0.012	0.047	0.045	0.055	0.004
4 時間	0.013	0.134	0.006	0.021	0.030	0.015	0.000
24 時間	0.001	0.109	0.005	0.011	0.028	0.006	0.001

注): アンダーラインを引いた繊維状試料は比較例である。

【0071】表-8の結果から、天然生体高分子の絹蛋白質(絹フィブロイン)繊維、羊毛ケラチン繊維は、合成繊維や木綿繊維に比べて、アルカリフォスファターゼの表面吸着量が多く、また、その徐放性があることが明らかとなった。振盪時間24時間後においても十分な徐放性が観察された。一方、PP、PETに見られるような合成繊維および木綿繊維の表面では、酵素が物理的に吸着しているだけで、徐放効果は認められなかった。

【0072】実施例9: 酵素付着絹不織布からの酵素の徐放

実施例8によると、絹フィブロイン繊維は、合成繊維および木綿繊維に比べてアルカリフォスファターゼの吸着・徐放効果が良好であることが確かめられたので、これが絹フィブロイン繊維によるものかまたは絹フィブロイン被膜によるものかを次に検討した。絹フィブロイン繊維から成り水流交絡法で調製した絹フィブロイン不織布に、次の方法でアルカリフォスファターゼを付着させた。

【0073】すなわち、1997年6月クヌギの生葉で飼育した柞蚕の熟蚕(吐糸1日前)体内より取り出した絹糸腺内の液状絹フィブロインを蒸留水に分散させ、また必要に応じて送風乾燥させて、絶乾重量で2.2重量%の柞蚕絹フィブロイン水溶液(以下、単に絹フィブロイン水溶液と略記する場合もある)として調製した。

【0074】1.93mLの絹フィブロイン水溶液に実施例8で用いたアルカリフォスファターゼ28mgを十分に溶解した。こうして作製した酵素入り絹フィブロイ

ある。和光純薬工業製試薬のジエタノールアミン(Cat. No.093-03115)を蒸留水で希釈し、1Mの溶液を作り、10NHClでpH3.8に調整した。この溶液に1mg/mLの濃度になるようにジソジウム p-ニトロフェニルホスフェート六水和物(和光純薬工業製、Cat No.147-02343)を添加したものを基質溶液とした。4mLの基質溶液に上述の繊維試料を入れ、25℃で30分間反応させた。得られた結果を表-8に示す。

【0070】

ン水溶液に、約38mgの該不織布3枚を25℃で5分間浸漬させた後、取り出してポリエチレン膜の上に並べて2時間乾燥させた。このアルカリフォスファターゼ担持絹フィブロイン試料を次の方法で不溶化処理した。

【0075】A: 50重量%のメタノール水溶液に30秒間浸漬した。

【0076】B: 2重量%グルタルアルデヒドに30秒間浸漬処理した。

【0077】なお、絹フィブロインの酵素担持効果を明らかにする対象区として下記の2区を用いた。

【0078】C: 不織布を酵素入り絹フィブロイン水溶液に浸漬した後、不溶化処理は全く行わなかったもの。

【0079】D: 酵素入り絹フィブロイン水溶液の代わりに酵素を溶解した蒸留水を使用して不織布を浸漬処理したが、不溶化処理は全く行わなかったもの。

【0080】A、B、C、Dについての徐放効果を実施例8と同様にして調べた。ただし、振盪時間は、0時間、1時間、4時間、24時間、3日、6日、10日に、また基質反応時間は、30分に設定した。試料から徐放する酵素液は振盪時間が0~24時間までは、所定の振盪時間毎に三角フラスコ中の水溶液100mLの全量を交換し、振盪時間3日~10日までは1日毎に水溶液全量を交換した。所定の振盪時間毎に得られた徐放酵素溶液中のアルカリフォスファターゼについて実施例8と同様の方法で定量実験を行った。得られた結果を表-9に示す。

【0081】

表-9 (単位: O. D.)

振盪時間	A	B	C	D
0 時間	1.512	0.496	0.869	0.263
1 時間	1.895	0.484	0.775	0.186
4 時間	1.672	0.209	0.371	0.144
24 時間	0.953	0.253	0.464	0.060
3 日	0.411	0.054	0.024	0.022
6 日	0.176	0.051	0.023	0.036
10 日	0.122	0.024	0.019	0.020

表-9から明らかのように、絹不織布を酵素入り絹フィブロイン水溶液に浸漬した後、不溶化処理を行わなかったもの(C)、および酵素入り絹フィブロイン水溶液のかわりに酵素を溶解した蒸留水を使用して不織布を浸漬処理し、不溶化処理を行わなかったもの(D)は、両者に差が見られず、半価時間は4時間であった。一方、不溶化処理を施したものの場合(AおよびB)、半価時間は著しく延長し、メタノール処理では40時間(A)、グルタルアルデヒド処理では28時間(B)となった。ここで、半価時間とは、振盪時間0時間におけるアルカリフォスファターゼの定量値が1/2に低下するまでに要した時間を意味する。

【0082】実施例10：グラフト加工絹糸表面へのアルカリフォスファターゼの吸着  
家蚕絹糸へのグラフト加工を次のようにして行った。すなわち、非イオン/アニオン混合界面活性剤のニューカルゲン1515-2H(竹本油脂(株)製)を6重量%含む加工液に希薄蟻酸を加えて、加工溶液のpHを3.0に調整した後、メタクリルアミド(以下MAAと略記)(65owf%)を添加し、シェーカーにより十分攪拌した。更に、重合開始剤としての過硫酸アンモニウムを、絹糸重量とモノマー重量との合計重量に対して1.8owf%添加した。なお、浴比は1:15に設定した。グラフト加工溶液の温度を、25から45分かけて85まで昇温せしめ、次いで80の一定温度で60分間加熱処理してグラフト加工を進め、グラフト加工絹糸を調製した。この絹糸試料表面に付着した未反応薬品を除去するため、1g/LのノイゲンHC(商品名、第一工業製薬製)水溶液で80、30分間処理した。流水で十分に洗浄した試料を標準状態(20、65%R

H)に1時間放置し、軽く乾燥してから105恒温装置にて2時間乾燥させた。このようにしてMAAでグラフト加工した家蚕絹糸であって、グラフト率が48%のものを製造した。調製した試料を以下、試料Eと略記する。

【0083】次いで、グラフト加工した家蚕絹糸の他に、グラフト加工していない家蚕絹糸の対照試料および野蚕絹糸についても酵素付着の実験を行った。これらの後者の2つの試料を以下、それぞれ試料F、Gと略記する。

【0084】すなわち、グラフト加工した家蚕絹糸、対照家蚕絹糸および野蚕絹糸をそれぞれ、アルカリフォスファターゼ水溶液に浸漬し、取り出して室温で自然乾燥し、絹糸表面にアルカリフォスファターゼを付着させた。具体的には、50mgのアルカリフォスファターゼを10mLの蒸留水に溶解し、この溶液2mLに7mgの各試料を別々に入れ、これをガラス製密閉容器に入れ、流水アスピレーターで30分減圧と減圧解除とを3回繰り返し、繊維内部にアルカリフォスファターゼを含浸させた。含浸試料を自然乾燥させた後、この試料を基質溶液に入れ、室温静置し、10分間反応せしめた。10分後に、基質溶液について、波長405nmで吸光度を求め、各試料からの酵素の徐放量を測定した。得られた結果を表-10に示す。用いた試料をまとめれば、下記のとおりである。

【0085】

E：MAAグラフト加工家蚕絹糸(グラフト加工率48%)

F：家蚕絹糸対照区(未グラフト加工)

G：野蚕絹糸(未グラフト加工)

表-10

反応時間	吸光度		
	E	F	G
10分	1.689	1.239	1.669

表-10から明らかのように、家蚕絹糸では、グラフト

加工することにより対照区より酵素が多く吸着し、ま

た、野蚕絹糸では、未加工絹糸であっても酵素を多く吸着する。各繊維試料に付着したアルカリフォスファターゼが基質溶液に溶出・徐放する量は増量値で判断できる。1日毎に溶出水溶液の全量を取り換えながら振盪5日目における溶出水溶液のO.D.値を測定した。MAAでグラフト加工することで付着酵素の徐放効果は向上し、対照区の家蚕絹糸に比べて約40%増加する。また、野蚕絹糸はグラフト加工しなくても家蚕絹糸に比べてアルカリフォスファターゼの徐放効果を持つ。

【0086】また、上記MAAの代わりに、メタクリル酸2-ヒドロキシエチル(HEMA)、メタクリル酸メチル(MMA)、スチレン(St)、メタクリル酸ベンジル(BzMA)等のビニル基含有モノマーを使用しても同じような結果が得られる。実施例11

熟蚕の柞蚕体内より取り出した絹糸腺から未変性の液状絹フィブロインを取り出した。絶乾重量法で測定した柞蚕絹フィブロイン水溶液の濃度は、2.2%であった。この柞蚕絹フィブロイン水溶液4.4mLにアルカリフォスファターゼ11.8mgを溶解し、静かにガラス棒で攪拌し、ポリスチレン膜の上に広げ、25℃で、1昼夜放置し、緩やかに試料水分を蒸発させて、アルカリフォスファターゼ含有の柞蚕絹フィブロイン膜を調製し、その後2%グルタルアルデヒドで不溶化処理した。

【0087】上記不溶化処理の結果、得られた絹フィブロイン膜は不溶化されていることが確認された。

【0088】実施例12

水溶性高分子として、羊毛を溶解したケラチン水溶液を次のようにして調製した。メリノ種羊毛(64'S)に含まれる色素、脂肪分を、ベンゼン/エタノール(50/50容積%)の混合溶媒を用いて、ソックスレー抽出器で2.5時間処理することにより除去した。

【0089】三つ口フラスコを用意し、その一つの口には三方コックを介して乾燥窒素ボンベからのゴム管を接続し、反応系のpH調節のためのpH電極を別の口に常時挿入し、残りの口は必要な薬剤投与用として利用する。繊維長が約1cmとなるように細断した8.18gのメリノ種羊毛繊維を三つ口フラスコに投入し、これに450mLの8M尿素溶液を加えた。窒素ガスでパージし、アスピレーターで15分間三つ口フラスコ内を45mmHg程度に減圧し、次いで急激に大気圧に戻す操作を3~4回繰り返した。このようにすると、三つ口フラスコ内の羊毛繊維間に含まれる空気が完全に除去でき、尿素水溶液とケラチン分子との反応が効率的となる。窒素置換が完了した後、三つ口フラスコ内に、還元剤として、4.8mLのメルカプトエタノールを加えて、8M尿素水溶液中で2~3時間放置した。更に、約100mLの5N KOH溶液を微量づつ加えて、三つ口フラスコの混合溶液のpHを10.5に調節した。室温で3時間かけて羊毛繊維が完全に溶解するのを待った。繊維状の羊毛繊維が溶解したものがケラチン水溶液である。

セルロース透析膜を用い、ケラチン水溶液を純水で2日間透析した。送風乾燥させたり、あるいは必要により純水を加えることにより、所定濃度のケラチン水溶液を調製した。

【0090】こうして調製した0.01%のケラチン水溶液450mLに室温で9.5gのヨード酢酸を加えて、ケラチンのS-カルボキシメチル化反応を1時間行った。5N KOH水溶液でケラチン水溶液のpHを8.5に調製することによりS-カルボキシメチルケラチン水溶液を得た。セルロース製の透析膜を用いてこの水溶液を純水で2日間透析した。次いで、実施例8で用いたのと同じ各種繊維を用い、アルカリフォスファターゼを含むS-カルボキシメチルケラチン水溶液にこれらの繊維をそれぞれ浸漬し、各繊維表面での酵素の徐放量を評価した。実施例8の各繊維の場合について得られた表-8のデータと同様の結果が得られた。すなわち、天然生体高分子の絹蛋白質(絹フィブロイン)繊維、羊毛ケラチン繊維は、合成繊維や木綿繊維に比べて、アルカリフォスファターゼの表面吸着量が多く、また、その徐放性があることが確認され、また、振盪時間24時間後においても十分な徐放性が観察された。一方、PP、PETに見られるような合成繊維および木綿繊維の表面では、酵素が物理的に吸着しているだけで、徐放効果は認められなかった。

【0091】また、コラーゲン及びゼラチンについても、上記ケラチンの場合と同様に、吸着されたアルカリフォスターゼの徐放性が認められた。

【0092】実施例13：絹蛋白質で被覆したプレフィルターの細菌の吸着

グラスファイバーからなる日本ミリポアー株式会社製のプレフィルター(AP25035K00、アクリル樹脂接着メンブレン用プレフィルター)を2.2%の再生絹フィブロイン水溶液に1分間浸漬した後、ピンセットで取り出し、濾紙の上で自然乾燥させ、更に65℃の乾燥機で乾燥させた。その後、50%メタノールで不溶化処理し、再び65℃で乾燥させた。このようにして作製した絹フィブロイン付着のプレフィルター、および絹フィブロインを付着させなかったプレフィルターを濃度 $10^7$ 個/mLに希釈したトマトかいよう病細菌の水溶液に2分間浸漬した直後、(1)流水で2分間洗浄(流水区)、または(2)100mLの蒸留水で2分間激しく揉み洗い(揉み洗い区)した。以下の方法で、プレフィルターに吸着したトマトかいよう病細菌の菌数を計測した。すなわち、流水区、揉み洗い区のプレフィルター試料を半合成培地上に別々に置き、各試料表面に付着した細菌を広げ、2日目の細菌コロニーの出現を調べた。その結果、絹フィブロインが付着したプレフィルター試料では、両区とも絹フィブロインを付着させなかったプレフィルター試料の場合と比べ、10~100倍の細菌付着率の増加が認められた。

【0093】このことから、絹フィブロインでプレフィルターの表面を被覆した試料では、細菌を効率良く吸着することが明らかとなった。

【0094】実施例14：絹フィブロインで被覆したメンブレンフィルターへの酵素吸着

日本ミリポアー株式会社製のメンブレンフィルター（HA WPO2500、孔径0.45 μm、直径25mm、セルロースアセテートとニトロセルロースとからなる混合物製）を2.2%の絹フィブロイン水溶液に1分間浸漬した後、ピンセットで取り出し、濾紙の上で、室温で乾燥させた。室温で乾燥したこのメンブレンフィルターを2.2%の絹フィブロイン水溶液に1分間再度浸漬した後、ピンセットで取り出し、濾紙の上で乾燥させた。これを65の乾燥機で3時間乾燥させた。このフィルターを50%メタノールに5分間浸漬処理して、フィルターに付着した絹フィブロインを不溶化処理し、再び65で乾燥させた。こうして作製した絹フィブロイン付着メンブ

レンフィルターを日本ミリポアー株式会社のマイクロシリンジフィルターホルダー（XX300250、ステンレス製、直径32mm）に入れ、アルカリフォスファターゼ溶液を通過させながら吸着実験を行った。

【0095】すなわち、300mLの蒸留水に1mgのアルカリフォスファターゼを溶解した溶液2mLをマイクロシリンジで取り、上述のメンブレンフィルターをセットしたフィルターホルダーに注入した。フィルターが溶液中のアルカリフォスファターゼを均一に吸着できるようにゆっくりと（200 μm/min.）酵素溶液をフィルターホルダーに注入してメンブレンフィルターを通過させた。この操作を10回繰り返して、10回メンブレンフィルターを通過させた後の溶液中のアルカリフォスファターゼの定量を希釈倍率を変えることにより測定した。なお、反応時間は30分である。得られた結果を表-11に示す。

【0096】（単位：O. D.）

表-11

	希 釈 倍 率							
	原液	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
対照区	1.258	0.669	0.319	0.163	0.081	0.040	0.019	0.007
絹加工区	1.227	0.600	0.293	0.143	0.068	0.034	0.015	0.006

表-11から明らかなように、メンブレンフィルター表面に水不溶性の絹フィブロインを付着させると、絹フィブロインを付着させなかったメンブレンフィルターの場合（対照区）と比べ、アルカリフォスファターゼを10%程度多く吸着することができる。

【0097】実施例15

メタノール処理前後の家蚕絹フィブロイン膜の結晶化度をX線回折に基づいて次のようにして求めた。電学電機（株）製X線回折測定装置（RU-200）を用い、管電圧40KV、管電流50mA、Niで濾光したCuK線（ $\lambda = 1.542$ ）を用いた。回折角は5~35°、回折スピードは1°/min.、タイムコンスタントは1sであった。結晶化度はハーマンス（Hermans）らの方法（J. Appl. Phys., 19, (1948)）によった。メタノール処理前後の家蚕絹フィブロイン膜の結晶化度は、それぞれ5.1%及び9.0%であった。なお、メタノール浸漬処理は、家蚕絹フィブロイン膜をメタノール50重量%の水溶液に室温で15分浸漬した後取り出し、自然乾燥することによって行われた。メタノール処理前の家蚕絹フィブロイン膜は、蒸留水に浸漬すると3~4分以内に溶解してしまうが、メタノール処理後の該膜は、水により膨潤するものの溶解はしなくなった。このことから、絹フィブロイン膜の溶解挙動と結晶化度とは密接に関連しており、結晶化度が7%前後で溶解挙動が変わることが分かった。

【0098】また、ケラチン膜についても、上記絹フィブロイン膜の場合と同様に、結晶化度が7%前後で溶解挙動が変わり、結晶化度が低いと水溶性であり、高いと水不溶性であることが分かった。

【0099】

【発明の効果】生体高分子の蛋白質からなる本発明の吸着体/徐放体は、有効成分を効率的に吸着できると共に、これらの有効成分の包括力に優れているため、これらの有効成分を効率的に徐放することができるものである。

【0100】本発明における生体高分子は、吸水すると分子間凝集性が低下し、良好な徐放効果を示すようになる。徐放体としては、繊維状の生体高分子そのものを利用できるし、または絹蛋白質水溶液等に有効成分を溶解させてから水分を蒸発させることで調製できる有効成分包括絹蛋白質等の膜として、もしくは有効成分が溶解した絹蛋白質等の混合水溶液に徐放支持体を浸漬することによって調製できる絹蛋白質等の膜で被覆された素材としても利用できる。こうして調製できる絹蛋白質等の膜または徐放支持体表面の絹蛋白質等の膜は水溶性であるので、所望により不溶化処理する。例えば、人体に無害なアルコール水溶液で軽く浸漬処理すれば、分子間凝集状態が高まるため、他の従来の有機高分子素材とは違って有害な架橋剤を用いなくてもよい。そのため、本発明の徐放性基材は、放出制御型製剤、または、薬物の新し

い投与システムのドラッグデリバリーシステム（D D S）用の製剤に利用できる。

【0101】本発明の生体高分子からなる吸着体／徐放体は、有効成分を吸着したり、包括できるので、徐放支持体としても利用できる。薬物の有効成分や肥料成分は徐放支持体中を拡散しながら溶出するので、有効成分の持続性を高めることができる。固定化した有効成分または肥料成分の全量を溶出した後、本発明の吸着体／徐放体は、土壌中の微生物、バクテリアの作用により加水分解的に劣化し、土壌中に還元されてしまうので環境の汚染源とならないという特徴がある。

【0102】本発明の生体高分子は、抗生物質、医薬品、生理活性物質等の有効成分との分子相互作用が強いので、各種産業資材として利用できる。農学分野において被吸着物質、被徐放物質として利用できるものには、例えば、（１）殺虫剤、フェロモン、ホルモン、殺ダニなどの害虫防除剤、（２）殺菌剤、（３）除草剤、（４）植物生長調節剤、（５）殺鼠剤等がある。また、農薬の徐放をさせる例としては、農薬成分の消失に見合った速度で農薬剤を放出する放出制御製剤担体に利用できる。放出速度は、担持する農薬量、固定化後の不溶化処理の程度を変えることで制御できる。また、担持する農薬の水に対する溶解性によっても変化させることができる。一般的に、多くの肥料成分は、水溶性であり速効性があるため、持続性が無く、降雨で流出し無駄になってしまう。本発明の徐放性基材を用いると、肥料成分に持続性を付与することが可能となり、作物が必要とする時期に必要な量を持続的に施肥することができ、肥料の利用効率を上げることができる。農薬成分の放出制御製剤に対応する緩効性肥料の徐放体として利用できる。

【0103】本発明の吸着体および徐放体は、低分子物質に対する吸着性、物質徐放速度を、常温常圧において、しかも健康に害を与える恐れのない薬剤処理により制御できるので、例えば、アフィニティークロマトグラフィ用担体、医薬品、生理活性物質、ホルモン及びワクチン等のマイクロカプセル化基材としても優れた特性を発揮する。農薬または肥料成分を物質吸着体および物質徐放体に封入してカプセル化したものは、土壌改良剤

として利用できる。

【0104】本発明の生体高分子からなる吸着体／徐放体は、動物性蛋白質であるので、バクテリア、微生物の作用を受けると、低分子化して、最終的にはアミノ酸にまで分解してしまう。そのため、医薬品、生理活性物質等の有効成分を本発明の吸着体／徐放体に包括させても、人間、生体組織に対して安全であるので、バイオ材料として付加価値の高い利用が可能となる。また、殺虫剤、フェロモン、ホルモン、殺ダニ剤などを固定化した生体高分子は農薬活性がある。

【0105】本発明の吸着体／徐放体は、害虫防除剤の徐放支持体として利用できる。このようにバイオ分野または農学分野において、本発明の吸着体／徐放体は効果面、安全性のいずれの面でも優れた素材である。

【0106】本発明によれば、生体に有毒な分子間架橋薬剤を用いることなく、常温常圧で容易に使用可能なアルコールを用いて、この水溶液中に該生体高分子を浸漬するだけで容易に水不溶性の生体高分子に変化せしめることができる。絹蛋白質等は、環境に有害な薬品を用いることなく、メタノールなどのアルコール水溶液で短時間浸漬処理をするだけで水不溶化してしまう。こうした簡単な処理により生体高分子の分子凝集状態は密になるので、こうした性質を利用することにより、反応薬剤との浸漬時間を変えるだけで、生体高分子に固定・包括した酵素、医薬品、生理活性物質等の有効成分の徐放速度を簡単な方法で制御できる。従来は、固定化担体の架橋度、壁厚、ポリマー組織を変えなくてはならなかったが、本発明によれば、生体高分子の膜厚を変えたり、粉末試料では粒径を変えたり、不溶化程度を変えるだけで徐放体からの有効成分の放出速度制御が可能である。

【0107】本発明の徐放体は医薬品の徐放素材として有効であり、医薬品の投与部位が皮膚であれば、軟骨剤、プラスター剤、ハップ剤、ローション剤に本発明の絹フィブリン等の水溶液、ゲル、粉末状態のものを入れることで徐放性効果を上げることができ、また、本発明の徐放体を治療システム用に適用すればD D S製剤を適用でき、皮膚のみでなく、眼、口腔、鼻、子宮等の粘膜への医薬成分の徐放が可能である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 08 H 1/00

識別記号

F I

C 08 H 1/00