

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-173312

(P2008-173312A)

(43) 公開日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 15/16 (2006.01)	A 6 1 L 15/01	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 V	4 C 0 8 7
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 41/00	
C O 7 K 14/435 (2006.01)	C O 7 K 14/435	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-9946 (P2007-9946)  
 (22) 出願日 平成19年1月19日 (2007.1.19)

(出願人による申告) 平成18年度農林水産技術会議事務局「21世紀最大の未利用資源活用のための「昆虫・テクノロジー」研究」委託事業、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 501167644  
 独立行政法人農業生物資源研究所  
 茨城県つくば市観音台2丁目1-2

(74) 代理人 100103805  
 弁理士 白崎 真二

(74) 代理人 100126516  
 弁理士 阿部 紳勝

(74) 代理人 100132104  
 弁理士 勝木 俊晴

(72) 発明者 亀田 恒徳  
 茨城県つくば市大わし1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

(72) 発明者 玉田 靖  
 茨城県つくば市大わし1-2 独立行政法人農業生物資源研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質フィルムの製造方法及びそれにより得られるタンパク質フィルム

(57) 【要約】

【課題】本発明は、使用用途に応じて厚みや密度等を調整することができるタンパク質フィルムの製造方法、及び、それにより得られ、水分を含んでも殆ど変形しないタンパク質フィルムを提供すること。

【解決手段】本発明は、節足動物が産出するタンパク質、水及び溶解促進剤を混合してタンパク質水溶液とする溶解工程と、タンパク質水溶液中の溶解促進剤を除去してタンパク質液を得る除去工程と、タンパク質液中のタンパク質をゲル化させるゲル化工程と、ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入し、該弾性容器の両側面から挟圧することにより、タンパク質液中の水を強制的に排出させると共に、ゲル化したタンパク質をフィルム状に成形するフィルム成形工程と、を備えるタンパク質フィルムの製造方法である。

【選択図】図2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

節足動物が産出するタンパク質、水及び溶解促進剤を混合してタンパク質水溶液とする溶解工程と、

前記タンパク質水溶液中の前記溶解促進剤を除去してタンパク質液を得る除去工程と、  
前記タンパク質液中のタンパク質をゲル化させるゲル化工程と、

前記ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入し、前記弾性容器の両側面から挟圧することにより、前記タンパク質液中の水を強制的に排出させると共に、前記ゲル化したタンパク質をフィルム状に成形するフィルム成形工程と、  
を備えることを特徴とするタンパク質フィルムの製造方法。

10

**【請求項 2】**

前記挟圧の圧力が 100 Pa 以上であることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質フィルムの製造方法。

**【請求項 3】**

前記挟圧の圧力を段階的に上昇させることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質フィルムの製造方法。

**【請求項 4】**

前記ゲル化工程において、前記タンパク質液にゲル化促進剤を加えて、前記タンパク質を強制的にゲル化させることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の製造方法。

**【請求項 5】**

前記除去工程において、前記溶解促進剤の除去が透析により行われることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質の製造方法。

20

**【請求項 6】**

前記透析が、前記タンパク質水溶液を透析チューブに投入して行われ、

前記透析チューブと、前記弾性容器とが同一のものであることを特徴とする請求項 5 記載のタンパク質フィルムの製造方法。

**【請求項 7】**

前記節足動物が、蜂又は蚕の幼虫であることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質フィルムの製造方法。

**【請求項 8】**

前記溶解促進剤が、臭化リチウム、塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウム又は尿素であることを特徴とする請求項 1 記載のタンパク質フィルムの製造方法。

30

**【請求項 9】**

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の製造方法により得られることを特徴とするタンパク質フィルム。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、タンパク質フィルムの製造方法及びそれにより得られるタンパク質フィルムに関する。

40

**【背景技術】****【0002】**

生体適合性を備え且つ成形の容易な医療用天然素材としてタンパク質フィルムが注目されている。

このようなタンパク質フィルムの製造方法としては、タンパク質の水溶液をシャーレ上に流延して乾燥するいわゆるキャスト法が知られている。

**【0003】**

このキャスト法としては、例えば、カイコ絹を八口ゲン化酢酸で溶かし、溶液を溶媒が揮発できる状態に展ばし、固化した成形物を水で洗浄するカイコ絹可溶化成形方法（例え

50

ば、特許文献 1 参照) や、絹フィブロイン水溶液を、水蒸気透過性材料からなる形成容器に入れ、該形成容器中の水溶液の蒸発速度を制御しながら、水分を蒸発除去して乾燥固化する絹フィブロインの塊状物の形成方法(例えば、特許文献 2 参照)が開示されている。

【0004】

一方、本発明者等は、繊維状タンパク質を溶解させた中性塩水溶液から透析して得た水溶液、又はハロゲン化有機溶媒を平板上で風乾してフィルム状の繊維状タンパク質を得るハチの巣に含まれる繊維状タンパク質の薄膜化方法を開示している(特許文献 3 参照)。

【0005】

なお、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基およびチオール基から選択された少なくとも 1 つの基を有するポリマ - からなる成形物であって、アルデヒド化合物およびポリアミン化合物で架橋処理されてなる成形物が開示されている(例えば、特許文献 4 参照)。

この成形物によれば、耐薬品性が向上したポリエステル成形物、およびセルロース、絹、ウール、綿等からなる成形物が得られる。

【特許文献 1】特開平 06 - 166850 号公報

【特許文献 2】特開平 07 - 314569 号公報

【特許文献 3】特開 2006 - 45076 号公報

【特許文献 4】特開平 10 - 298277 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上記特許文献 1 ~ 3 に記載のキャスト法を始めとする従来のタンパク質フィルムの製造方法では、溶媒を揮発させる必要があるため、得られるフィルムのフィルム厚を使用用途に応じて調製することができない。

また、上記キャスト法は濃縮固化するので、フィルムの密度の調製も困難である。

さらに、上記キャスト法により得られるフィルムは、ポリペプチド鎖の構造化が不十分であったり、膜厚が薄すぎたりという原因から、水分を含むと、容易に変形してしまう傾向にある。

【0007】

上記特許文献 4 に記載の従来のタンパク質フィルムの製造方法では、化学処理を施すので、天然のシルクの性質が失われる欠点がある。

【0008】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、使用用途に応じて厚みや密度等を調整することができるタンパク質フィルムの製造方法、及び、それにより得られ、水分を含んでも殆ど変形しないタンパク質フィルムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討したところ、タンパク質フィルムを成形する際に、ゲル化したタンパク質を所定の圧力条件下で挟圧し、水分を強制的に排出させると同時に、タンパク質フィルムを成形することにより、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、(1)節足動物が産出するタンパク質、水及び溶解促進剤を混合してタンパク質水溶液とする溶解工程と、タンパク質水溶液中の溶解促進剤を除去してタンパク質液を得る除去工程と、タンパク質液中のタンパク質をゲル化させるゲル化工程と、ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入し、弾性容器の両側面から挟圧することにより、タンパク質液中の水を強制的に排出させると共に、ゲル化したタンパク質をフィルム状に成形するフィルム成形工程と、を備えるタンパク質フィルムの製造方法に存する。

【0011】

10

20

30

40

50

本発明は、(2) 挟圧の圧力が100 Pa以上である上記(1)記載のタンパク質フィルムの製造方法に存する。

【0012】

本発明は、(3) 挟圧の圧力を段階的に上昇させる上記(1)記載のタンパク質の製造方法に存する。

【0013】

本発明は、(4) ゲル化工程において、タンパク質液にゲル化促進剤を加えて、タンパク質を強制的にゲル化させる上記(1)記載のタンパク質フィルムの製造方法に存する。

【0014】

本発明は、(5) 除去工程において、前記溶解促進剤の除去が透析により行われる上記(1)記載のタンパク質の製造方法に存する。

10

【0015】

本発明は、(6) 透析が、タンパク質水溶液を透析チューブに投入して行われ、透析チューブと、弾性容器とが同一のものである上記(5)記載のタンパク質フィルムの製造方法に存する。

【0016】

本発明は、(7) 節足動物が、蜂又は蚕の幼虫である上記(1)記載のタンパク質フィルムの製造方法に存する。

【0017】

本発明は、(8) 溶解促進剤が、臭化リチウム、塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウム又は尿素である上記(1)記載のタンパク質フィルムの製造方法に存する。

20

【0018】

なお、本発明の目的に添ったものであれば、上記(1)～(8)を適宜組み合わせた構成も採用可能である。

【0019】

また、本発明は、(9) 上述した(1)～(8)のいずれか一つに記載の製造方法により得られるタンパク質フィルムに存する。

【発明の効果】

【0020】

本発明のタンパク質フィルムの製造方法においては、ゲル化したタンパク質を挟圧することにより、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークが十分に形成されたタンパク質フィルムが成形される。

30

このため、タンパク質フィルムの濃度や圧力を調整することにより、得られるタンパク質フィルムの厚みや密度等を調整できる。

【0021】

上記タンパク質フィルム製造方法においては、タンパク質フィルムを短時間で大量生産することが可能であり、得られるタンパク質フィルムの品質のバラつきも極めて少なくすることができる。

【0022】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、タンパク質液中の水を強制的に排出しながらタンパク質フィルムが形成されるので、水分を含んでも殆ど変形しないタンパク質フィルムが得られる。

40

【0023】

よって、本発明のタンパク質フィルムの製造方法によれば、使用用途に応じて厚みや密度等を調整することができる。

また、得られるタンパク質フィルムは、水分を含んでも殆ど変形しないものとなる。

【0024】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、挟圧の圧力が100 Pa以上であると、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークがより十分に形成される。

50

また、挟圧の圧力を段階的に上昇させると、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークが更に十分に形成される。

したがって、これらの方法によって得られるタンパク質フィルムは、より十分な密度と柔軟性を有し、機械強度にも優れるものとなる。

【0025】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、ゲル化工程において、タンパク質液にゲル化促進剤を加えて、タンパク質を強制的にゲル化させると、密度が高いタンパク質フィルムが製造できる。

【0026】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、除去工程において、溶解促進剤の除去が透析により行われると、比較的容易に溶解促進剤を除去できる。

【0027】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、透析が、タンパク質水溶液を透析チューブに投入して行われ、透析チューブと、弾性容器とが同一のものであると、工程を簡略化できるため、生産性が向上する。

【0028】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、節足動物が、蜂又は蚕の幼虫であると、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークが確実に形成されるので、より一層十分な密度と柔軟性を有するものとなる。

【0029】

上記タンパク質フィルムの製造方法においては、溶解促進剤が、臭化リチウム、塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウム又は尿素であると、タンパク質フィルムを効率よく水に溶解させることができる。

【0030】

本発明のタンパク質フィルムは、上述したタンパク質フィルムの製造方法により得られるため、十分な密度と柔軟性を有し、水分を含んでも殆ど変形しないものとなる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

以下、必要に応じて図面を参照しつつ、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

なお、図面中、同一要素には同一符号を付すこととし、重複する説明は省略する。

また、上下左右等の位置関係は、特に断らない限り、図面に示す位置関係に基づくものとする。

更に、図面の寸法比率は図示の比率に限られるものではない。

【0032】

本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法は、節足動物が産出するタンパク質、水及び溶解促進剤を混合してタンパク質水溶液とする溶解工程と、タンパク質水溶液中の溶解促進剤を除去してタンパク質液を得る除去工程と、タンパク質液中のタンパク質をゲル化させるゲル化工程と、ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入し、該弾性容器の両側面から挟圧することにより、タンパク質液中の水を強制的に排出させると共に、ゲル化したタンパク質をフィルム状に成形するフィルム成形工程とを備える。

【0033】

以下、溶解工程、除去工程、ゲル化工程、及びフィルム成形工程について更に詳細に説明する。

【0034】

(溶解工程)

溶解工程は、節足動物が産出するタンパク質、水及び溶解促進剤を混合してタンパク質水溶液とする工程である。

10

20

30

40

50

## 【0035】

上記節足動物としては、蜂、蚕等の昆虫、クモ類等が挙げられる。

よって、上記節足動物が産出するタンパク質としては、蜂又は蚕の幼虫が産出するタンパク質、クモ類が吐糸するタンパク質等が挙げられる。

## 【0036】

これらの中でも、節足動物が蜂又は蚕の幼虫であることが好ましい。

すなわち、節足動物が産出するタンパク質が、蜂の幼虫が産出するタンパク質（ホーネットシルク）、蚕の幼虫が産出するタンパク質（絹フィブロイン、セリシン）であることが好ましい。

この場合、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークが確実に形成されるので、十分な密度と柔軟性を有するものとなる。

10

## 【0037】

なお、タンパク質フィルムの機械強度、成形性の観点から、節足動物が産出するタンパク質が、蜂の幼虫が産出するタンパク質（ホーネットシルク）であることがより好ましい。

また、かかる節足動物が産出するタンパク質の採取時期は、上記幼虫が体外へ分泌する前でも後でも良い。

すなわち、体内のタンパク質分泌器官から採取することも可能である。

これらの中でも、回収の容易さ等の観点から分泌後であることが好ましい。

## 【0038】

20

タンパク質の形状は、特に限定されないが、繊維状であることが好ましい。

この場合、後述する溶解促進剤及び水の混合液に溶解させ易くなる。

## 【0039】

上記溶解促進剤としては、特に限定されないが、臭化リチウム、塩化カルシウム、銅エチレンジアミン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸リチウム、硝酸マグネシウム、硝酸カルシウム又は尿素等が挙げられる。

なお、尿素を用いる場合は、8 M程度の濃度で用いるのがよい。

これらの中でも、溶解促進剤が無機塩であることが好ましく、臭化リチウムであることがより好ましい。

臭化リチウムは、安価で入手が容易であり、タンパク質を分解させることなく水に溶解させることができる。

30

## 【0040】

上記水としては、水道水、工業用水、純水等が用いられる。

これらの中でも、タンパク質フィルムに残存する不純物を減らす観点から、純水であることが好ましい。

## 【0041】

このようなタンパク質、水及び溶解促進剤を含むタンパク質水溶液において、タンパク質水溶液全量に対するタンパク質の含有割合が0.5～30質量%であることが好ましい。

タンパク質の含有割合が0.5質量%未満であると、含有割合が上記範囲内にある場合と比較して、十分な密度を有するタンパク質フィルムが得られない傾向にあり、タンパク質の含有割合が30質量%を超えると、タンパク質が水に溶けにくくなり、透析にも時間がかかる傾向にある。

40

## 【0042】

また、溶解促進剤が臭化リチウムである場合、溶解促進剤の濃度は、上記水に対して、5.0～9.3（飽和濃度）mol/lであることが好ましい。

溶解促進剤の濃度が5.0 mol/l未満であると、含有割合が上記範囲内にある場合と比較して、タンパク質を十分に溶解できない傾向にあり、溶解促進剤の濃度が9.3 mol/lを超えると、成形されるタンパク質フィルムに溶解促進剤が残存する傾向にある。

50

## 【 0 0 4 3 】

なお、タンパク質水溶液は、上述したタンパク質、水及び溶解促進剤以外にも、アルコール等の添加剤を含んでいてもよい。

## 【 0 0 4 4 】

上記溶解工程においては、一定の温度を保ちながら、タンパク質、水及び溶解促進剤を混合することが好ましい。

上記温度は、タンパク質の変性凝集（ゲル化とは違う、分子ネットワークがない）や分解が生じない範囲とすることが好ましく、具体的には4～50の範囲とすることがより好ましい。

## 【 0 0 4 5 】

（除去工程）

除去工程は、溶解工程で得られたタンパク質水溶液中の溶解促進剤を除去してタンパク質液を得る工程である。

## 【 0 0 4 6 】

溶解促進剤を除去する方法としては、拡散透析法や電気透析法等の透析や限外ろ過法、ゲルろ過法等のろ過が挙げられる。

これらの中でも、溶解促進剤の除去が透析により行われると、比較的容易に溶解促進剤を除去できるため好ましい。

## 【 0 0 4 7 】

例えば、拡散透析法を行う場合、まず、タンパク質水溶液を透析チューブに投入し、該透析チューブの外側を水に浸す。

そうすると、溶解促進剤が透析チューブの外側の水に移行するため、タンパク質水溶液中の溶解促進剤が除去される。

こうして、タンパク質水溶液から溶解促進剤が除かれたタンパク質液が得られる。

## 【 0 0 4 8 】

上記透析チューブの材質としては、セルロース膜、多孔性のポリテトラフルオロエチレン膜、セルロースアセテート膜、セルロースナイトレート膜等が挙げられる。

なお、透析チューブを備える透析装置は、特に限定されず、公知の装置が用いられる。

## 【 0 0 4 9 】

また、電気透析法を行う場合、電気透析によって透析槽内に形成したゲルを、その場で挟圧乾燥してフィルム化すればよい。

なお、上記ろ過は公知の方法で行えばよい。

## 【 0 0 5 0 】

上記除去工程においては、一定の温度を保ちながら、タンパク質水溶液中の溶解促進剤を除去することが好ましい。

上記温度は、タンパク質の変性凝集（ゲル化とは違う、分子ネットワークがない）や分解が生じない範囲とすることが好ましく、具体的には4～50の範囲とすることがより好ましい。

## 【 0 0 5 1 】

（ゲル化工程）

ゲル化工程は、除去工程で得られたタンパク質液中のタンパク質をゲル化させる工程である。

## 【 0 0 5 2 】

本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法においては、タンパク質液にゲル化促進剤を加えることにより、タンパク質液中のタンパク質をゲル化させる。

なお、かかるゲル化工程は、タンパク質液が透析チューブに投入されたままの状態で行ってもよく、別の容器に移し替えて行ってもよい。

また、透析チューブを投入している容器の水にゲル化促進剤を加えることにより、タンパク質液中のタンパク質をゲル化させてもよい。

## 【 0 0 5 3 】

10

20

30

40

50

かかるゲル化促進剤としては、酢酸、蟻酸、硫酸、塩酸等の酸性溶媒やアルコール等の水溶性有機溶媒が挙げられる。

これらの中でも、酸性溶媒であることが好ましく、酢酸又は蟻酸であることがより好ましい。

これらは揮発性であるため、後の工程において、ゲル化促進剤を容易に除去できる。

また、安全性の観点から、ゲル化促進剤は酢酸であることがより好ましい。

#### 【0054】

この場合の酸濃度はpHが7以下であることが好ましく、pH2～3程度であることがより好ましい。

酸濃度が高すぎると、酸の除去が困難になる傾向にある。

また、タンパク質が分解を起こす虞もある。

なお、ゲル化促進剤を加える代わりに、加熱したり、凍結融解してもよい。

#### 【0055】

本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法においては、ゲル化工程におけるゲル化したタンパク質の構造を、ゲル化の濃度、温度、速度、ゲル化促進剤の種類等によってゲル構造を様々に変えることができる。

そして、このゲルの持つ特徴を利用すれば、ゲルの構造を反映したタンパク質フィルムを成形することで、多種多様な用途に対応できる構造と物性を有するタンパク質フィルムの作製が可能となる。

#### 【0056】

(フィルム成形工程)

フィルム成形工程は、ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入し、該弾性容器の両側面からろ紙等の吸水性材に挟んで挟圧することにより、タンパク質液中の水を強制的に排出させると共に、ゲル化したタンパク質をフィルム状に成形する工程である。

#### 【0057】

すなわち、フィルム成形工程は、第1に、ゲル化したタンパク質を含むタンパク質液を透水性の弾性容器に投入する。

本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法においては、かかる透水性の弾性容器として、除去工程において用いた透析チューブを用いる。

換言すると、本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法においては、透水性の弾性容器と、透析チューブとが同一のものである。

この場合、タンパク質液を透析チューブから別の透水性の弾性容器に移し替えるという手間が省けるので、生産性が向上する。

#### 【0058】

第2に、透水性の弾性容器(透析チューブ)の両側面から挟圧する。

かかる挟圧は、プレス装置を用いて行われる。

具体的には、一对のプレス間にタンパク質液を配置し、両側面からプレスする。

なお、かかる両側面は上下、左右等、いずれであってもよい。

#### 【0059】

また、狭圧は、図1に示すように、吸引力で行ってもよい。

この場合、減圧するとゴムシート11が多孔質板12に吸い付けられ、平板13が透析チューブ14を下方向に押す(加圧される)ことになる。

そうすると、ゲルが平板状に成形される。

#### 【0060】

これらの狭圧により、タンパク質液中の水が透水性の弾性容器(透析チューブ)内から外に強制的に排出されると共に、透水性の弾性容器(透析チューブ)内ではゲル化したタンパク質がフィルム状となる。

このため、上記タンパク質フィルムの製造方法においては、水分を含んでも殆ど変形しないタンパク質フィルムが得られる。

10

20

30

40

50



なお、上述したゲル化促進剤はかかる工程にて除去される。

【0061】

ここで、上記挟圧の圧力は、タンパク質の濃度に基づいて、適宜設定することができる。

その中でも、かかる圧力は、100 Pa以上であることが好ましく、1 GPa以下であることがより好ましく、3.5 ~ 41.3 kPaであることが更に好ましい。

圧力が100 Pa未満であると、圧力が上記範囲内にある場合と比較して、タンパク質フィルムの機械強度が不十分となる傾向にあり、圧力が1 GPaを超えると、圧力が上記範囲内にある場合と比較して、柔軟性が低下する傾向にある。

【0062】

また、上記挟圧の圧力は、段階的に上昇させることが好ましい。

換言すると、挟圧を、低圧の状態から初め、その後、圧力を徐々に上昇させ、最終的に所望の圧力とすることが好ましい。

この場合、弾性容器（透析チューブ）の破損が抑制されると共に、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークが十分に形成されたタンパク質フィルムが成形される。

【0063】

具体的には、弾性容器（透析チューブ）に変形が与えられ、且つ、弾性容器の破損が抑制される2 ~ 5 kPa程度の圧力で12時間挟圧し、その後、圧力を35 ~ 40 kPaに上昇させて、24時間以上放置する方法が挙げられる。

低圧のまま放置すると、フィルム化に時間がかかるだけでなく、ゲルの収縮が起こり、フィルムの平滑化が妨げられる等、良質のフィルムが得られなくなるという問題が生じる。

【0064】

さらに、所望の圧力とした後は、圧力状態を1 ~ 7日間維持することが好ましい。

この場合、タンパク質の系全体に広がる分子鎖ネットワークを更に成長させることができる。

【0065】

上記フィルム成形工程においては、40 ~ 80 の熱をかけることが好ましい。

これにより、より効率的に水を排出させることができる。

また、これらの水の排出は、得られるタンパク質フィルムの水含有割合が全量の10質量%未満となるまで行われることが好ましい。

【0066】

上記フィルム成形工程においては、透水性の弾性容器（透析チューブ）を挟圧するので、ゲル化したタンパク質内部からの水分の発散速度が抑制され、挟圧によるタンパク質分子鎖同士の密着性が向上する。

また、上記フィルム成形工程によれば、透水性の弾性容器（透析チューブ）が加圧によるゲルの広がりを抑制するので、厚さの厚いフィルムの作製を可能にする等、フィルム厚のコントロールがより容易となる。

【0067】

なお、透水性の弾性容器は、透析チューブに限らず、こうした水分の透過速度が制御できるフィルターとしての性能を有するものであればよい。

例えば、弾性容器の材質としては、再生セルロース、酢酸セルロースのようなセルロース由来の透水性材料、ポリメチルメタクリレート、エチレンビニルアルコール共重合体、ポリアクリロニトリル、ポリスルホンなどの合成高分子からなる透水性材料等が挙げられる。

【0068】

以上の工程を経ることにより、タンパク質フィルムが得られる。

本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法によれば、使用用途に応じて厚みや密度等を調整することができる。

【0069】

10

20

30

40

50

すなわち、上述した本実施形態に係るタンパク質フィルムの製造方法において、タンパク質の濃度やフィルム成形工程における圧力を調整することにより、得られるタンパク質フィルムの厚みや密度等を調整できる。

【0070】

また、上述したように、ゲル化工程における加工条件によっても、得られるタンパク質の構造と物性を調整できる。

例えば、上記タンパク質フィルムは、適度な分子鎖ネットワークを形成することにより、乾燥後に再び水中に浸漬しても形状が崩れないものとなる。

すなわち、かかるタンパク質フィルムは、吸湿しても形状が乱れることはなく、乾燥することで元の透明なタンパク質フィルムに戻る。

このことから、上記タンパク質フィルムは、オートクレーブ滅菌によっても物性の低下がほとんど起こらない。

【0071】

また、上記タンパク質フィルムは、柔軟性があり、吸湿することで透明性が失われるが、柔軟性が著しく向上する。

これによって、吸湿状態では容易にフィルムを切断することができ、任意の形に変形させることも可能となる。

具体的には、上記の方法によって得られた厚さ50 $\mu$ mのタンパク質フィルムは、室温の水中にて数分浸漬することで十分に柔軟になり、ハサミやカッターナイフで任意の形状に切断することが可能である。

【0072】

さらに、挟圧するプレス装置のプレスの形状を変えることにより、所望の形状のタンパク質フィルムとすることも可能である。

【0073】

上記タンパク質フィルム製造方法においては、タンパク質フィルムを短期間で大量生産することが可能であり、得られるタンパク質フィルムの品質のバラつきも極めて少なくすることができる。

【0074】

図2は本発明のタンパク質フィルムを示す断面図である。

図2に示す本発明のタンパク質フィルム100は、十分な密度と柔軟性を有し、水分を含んでも殆ど変形しないものである。

【0075】

上記タンパク質フィルム100は、水に浸漬させた場合の引っ張り弾性率が30MPa~300MPaであることが好ましい。

引っ張り弾性率が30MPa未満であると、引っ張り弾性率が上記範囲内にある場合と比較して、フィルムが軟弱となり、ハサミで切るなどの操作が困難になる傾向にあり、引っ張り弾性が300MPaを超えると、引っ張り弾性率が上記範囲内にある場合と比較して、剛直となるため、柔軟性が必要とされる生体医療材料等の使用が困難になる傾向にある。

【0076】

上記タンパク質フィルム100は、医療分野における癒着防止膜、創傷被覆材料(創傷保護材料)、再生医療分野における生体材料、化粧品等の生体材料等の用途に好適に用いられる。

【0077】

以上、本発明の好適な実施形態について説明したが、本発明は上述した実施形態に限定されるものではない。

【0078】

例えば、本実施形態に係るタンパク質の製造方法においては、除去工程の後に、ゲル化工程を行い、タンパク質をゲル化させているが、除去工程時にタンパク質の一部がゲル化していてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0079】

本実施形態に係るタンパク質の製造方法のゲル化工程において、タンパク質液にゲル化促進剤を加えているが、除去工程時にタンパク質の一部がゲル化している場合は、必ずしもゲル化促進剤を加える必要がない。

すなわち、この場合、除去工程がゲル化工程を兼ねることになる。

なお、この場合、タンパク質液を所定期間放置し、タンパク質のゲルを成長させることが好ましい。

## 【0080】

本実施形態に係るタンパク質の製造方法においては、プレス装置を用いて挟圧しているが、透水性の弾性容器を引っ張ることで、内部のゲルを圧縮し脱水する方法であってもよい。

10

## 【0081】

本実施形態に係るタンパク質の製造方法においては、得られるタンパク質フィルムを吸湿状態にすることにより、柔軟性を向上させ、これにプレス機による延伸等の二次加工を施すことによって、さらに構造と物性を制御することも可能である。

## 【実施例】

## 【0082】

以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

## 【0083】

20

(実施例1) ホーネットシルクフィルムの作製

## [溶解工程]

7 mol/l の臭化リチウム水溶液 (溶解促進剤) 20 ml にキイロスズメバチの巣から取り出した繭 (ホーネットシルク) 400 mg を加え、35 で15分間攪拌し、木くずとワックス成分を濾別することにより、ホーネットシルク (タンパク質) が完全に溶解したタンパク質水溶液を得た。

## 【0084】

## [除去工程]

次いで、得られたタンパク質水溶液をセルロースチューブ (透析チューブ) (商品名: シームレスセルロースチューブ、和光純薬社製) に入れ、2日間蒸留水で透析することにより、臭化リチウムが除去されたタンパク質液を得た。

30

また、このとき、タンパク質液中に、ホーネットシルクのゲルが生成していた (ゲル化工程)。

得られたホーネットシルクのゲルの状態の写真を図3に示す。

## 【0085】

## [フィルム成形工程]

次いで、ホーネットシルクのゲルが内在するセルロースチューブを吸水紙で挟み、セルロースチューブの両側面から挟圧した。

まず、3.5 kPa、温度25 で12時間放置した後、40 kPaで2日間更に放置した。

40

そして、この挟圧した状態を維持したまま、3日間放置した。

そうすると、白濁していたホーネットシルクのゲルはしだいに透明になり、厚みが50 μmの透明なフィルムを得た。

なお、挟圧乾燥時のホーネットシルクの写真を図4に示す。

## 【0086】

(実施例2) 絹フィブロインフィルムの作製

## [溶解工程]

9 mol/l の臭化リチウム水溶液 (溶解促進剤) 20 ml に精練済み絹フィブロイン 400 mg を加え、45 で半日間攪拌することにより、絹フィブロインが完全に溶解したタンパク質水溶液を得た。

50

【 0 0 8 7 】

[ 除去工程 ]

次いで、得られたタンパク質水溶液を、透析装置のセルロースチューブに入れ、4日間蒸留水で透析することにより、臭化リチウムが除去されたタンパク質液を得た。

【 0 0 8 8 】

[ ゲル化工程 ]

次いで、得られたタンパク質液をセルロースチューブに入れたまま、7日間放置すると、絹フィブロインの一部がゲル化した。

そして、セルロースチューブごと、酢酸水溶液（水で10倍希釈したもの）に浸漬させ、半日間放置し、絹フィブロインのゲルを成長させた。

10

【 0 0 8 9 】

そして、セルロースチューブごと、蒸留水中に浸漬させ、酢酸臭がなくなるまで、1日放置した。

【 0 0 9 0 】

[ フィルム成形工程 ]

次いで、絹フィブロインのゲルが内在するセルロースチューブを吸水紙で挟み、プレス装置に配置し、セルロースチューブの両側面から挟圧した。

まず、3.5 kPa、温度25 で12時間放置した後、次いで40 kPaで2日間放置した。

そして、この挟圧した状態を維持したまま、3日間放置した。

20

そうすると、白濁していた絹フィブロインのゲルはしだいに透明になり、厚みが50 μmのフィルムを得た。

【 0 0 9 1 】

( 実施例 3 ) セリシンフィルムの作製

[ 溶解工程 ]

まず、蚕の繭からセリシンを取り出す方法として、80 の8M尿素水溶液を用いて、セリシンを繭から溶出させ、溶液の3倍量のエタノールを加えて溶出セリシンを沈殿させ、セリシンを回収した。

次いで、9 mol/lの臭化リチウム水溶液（溶解促進剤）20 mlにセリシン400 mgを加え、40 で12時間攪拌することにより、セリシンが完全に溶解したタンパク質水溶液を得た。

30

【 0 0 9 2 】

[ 除去工程 ]

次いで、得られたタンパク質水溶液を、透析装置のセルロースチューブに入れ、4日間蒸留水で透析することにより、臭化リチウムが除去されたタンパク質液を得た。

また、このとき、タンパク質液中に、セリシンのゲルが生成していた（ゲル化工程）。

【 0 0 9 3 】

[ フィルム成形工程 ]

次いで、セリシンのゲルが内在するセルロースチューブを吸水紙で挟み、プレス装置に配置し、セルロースチューブの両側面から挟圧した。

40

まず、3.5 kPa、温度25 で12時間放置した後、次いで40 kPaで2日間放置した。

そして、この挟圧した状態を維持したまま、3日間放置した。

そうすると、白濁していたセリシンのゲルはしだいに透明になり、厚みが50 μmの透明なフィルムを得た。

得られたセリシンフィルムを図5に示し、セリシンフィルムの乾燥状態の写真を図6の(a)に、湿潤状態の写真を図6の(b)にそれぞれ示す。

【 0 0 9 4 】

( 比較例 1 ) ホーネットシルクキャストフィルムの作製

実施例1の除去工程を経たタンパク質溶液を、凍結乾燥して得た粉末を、1, 1, 1,

50

3, 3, 3 - ヘキサフルオロ - 2 - プロパノール (HFIP) (東京化成製) に溶解した (ホーネットシルク 200 mg に対して HFIP 20 ml)。

この溶液をプラスチックシャーレ (商品名: Bio BIK、オプティカ社製) に流延した。

そして、室温にて 2 日間静置し、HFIP 溶媒を蒸発させることにより、透明なフィルムを得た。

【0095】

(比較例 2) 絹フィブロインキャストフィルムの作製

実施例 2 の除去工程を経たタンパク質溶液 (ゲル化する前の状態) を、比較例 1 と同様にして、プラスチックシャーレに流延した。

10

そして、室温にて 2 日間静置し、溶媒を蒸発させることにより、透明なフィルムを得た。

【0096】

(比較例 3) セリシンキャストフィルムの作製

セリシン蚕の繭を 9 M 臭化リチウム水溶液に溶解し、透析によって臭化リチウムを除去したセリシン水溶液をプラスチックシャーレに流延した。

そして、室温にて 2 日間静置し、水分を蒸発させることにより、透明なフィルムを得た。

【0097】

(評価方法)

20

[形状安定性]

1. 寸法変化

実施例 1 ~ 3 及び比較例 1 ~ 3 で得られたフィルムを水中に 30 分間浸漬させた。このときの実施例 1 で得られたホーネットシルクフィルムの浸漬後の写真を図 7 に示す。

また、湿潤時のフィルムの体積変化を測定した。

得られた結果を表 1 に示す。

表 1 中、「シルク濃度」は、9 mol/l の臭化リチウム水溶液 100 mg (V) 中に溶解したシルクの重量 (W) から求められ、「長さ変化率」は、

湿潤時のフィルムの長手方向の長さ  $\times 100$  / 乾燥時のフィルムの長手方向の長さから求められ、「厚さ変化率」は、

30

湿潤時のフィルムの厚さ  $\times 100$  / 乾燥時のフィルムの厚さから求められる。

なお、比較例 1 ~ 3 のキャスト法においては、浸漬させるとフィルムの形態を維持できなかったため、測定できなかった。

【0098】

[表 1]

	シルク濃度 (W/V%)	長さ変化率 (%)	厚さ変化率 (%)
実施例 1	2.0	110.0	169.5
実施例 2	2.0	102.8	124.7
実施例 3	2.0	101.4	600.7
比較例 1	—	測定不能	測定不能
比較例 2	—	測定不能	測定不能
比較例 3	—	測定不能	測定不能

40

【0099】

50

## 2. 赤外吸収スペクトル

実施例 1 及び比較例 1 で得られたフィルムの湿潤時と乾燥時の赤外吸収スペクトルを、フーリエ変換赤外分光装置 (FT-IR) (日本分光社製) を用いて測定した。

得られた結果を図 8 に示す。

図 8 の (a) は比較例 1 で得られたフィルムの赤外吸収スペクトルを示し、(b) は実施例 1 で得られたフィルムの赤外吸収スペクトルを示す。

また、図 8 の (a) 及び (b) 中、X は乾燥時の赤外吸収スペクトルを示し、Y は湿潤時の赤外吸収スペクトルを示す。

【0100】

## 3. $^{13}\text{C}$ -NMR

実施例 1 で得られたフィルムの湿潤時と乾燥時の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを、Infinity 300 NMR 装置 (Varian-Chemagetics 社製) を用いて測定した。

得られた結果を図 9 に示す。

図 9 の (a) は、乾燥時の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示し、Y は湿潤時の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを示す。

【0101】

## 4. 水蒸気滅菌に対する安定性

実施例 1 で得られたフィルムにオートクレーブにより 120、20 分間の水蒸気滅菌処理を施した。

水蒸気滅菌処理前後のタンパク質のバンドを図 10 に示す。

図 10 の (a) は、滅菌処理後のタンパク質のバンドを示し、(b) は、滅菌処理前のタンパク質のバンドを示す。

【0102】

以上より、実施例 1 ~ 3 のフィルムは、湿潤時であっても、十分に形態を維持できることがわかった。

一方、比較例 1 ~ 3 のフィルムは、湿潤させると溶解してしまい、十分に形態を維持できなかった。

また、赤外吸収スペクトルにおいて、 $1650\text{ cm}^{-1}$  はヘリックスもしくはランダム構造に由来し、 $1610\text{ cm}^{-1}$  はシート構造に由来する吸収であるところ、実施例 1 ~ 3 のフィルムは、二次構造の変化が殆ど起こらない。

一方、比較例 1 ~ 3 のフィルムは、二次構造が大きく変化した。

実施例 1 ~ 3 のフィルムにおいて、吸湿による二次構造変化を示さなかったことが、水中にフィルムを浸漬しても形状が乱れなかったことに起因すると考えられる。

さらに、 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおいて、水を吸収するとピークがシャープになり、分子の運動性が向上したことを示唆している。

水を吸収することによるフィルムの柔軟化は、分子の運動性が向上することに起因していると考えられる。

さらにまた、水蒸気滅菌処理を施しても、タンパク質は分解されず、十分な安定性を有することが確認された。

【0103】

これらのことにより、本発明のタンパク質フィルムの製造方法により得られるタンパク質フィルムは、水分を含んでも殆ど変形せず、形態安定性に優れることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図 1】図 1 は、吸引力を利用した狭圧方法の一例を示す模式図である。

【図 2】図 2 は、本発明のタンパク質フィルムを示す断面図である。

【図 3】図 3 は、実施例 1 の除去工程で得られたホーネットシルクのゲルの状態を示す写真である。

【図 4】図 4 は、実施例 1 における挟圧乾燥時のホーネットシルクを示す写真である。

10

20

30

40

50

【図 5】図 5 は、実施例 3 で得られたセリシンフィルムを示す写真である。

【図 6】図 6 の ( a ) は、実施例 3 で得られたセリシンフィルムの乾燥状態を示す写真であり、図 6 の ( b ) は、実施例 3 で得られたセリシンフィルムの湿潤状態を示す写真である。

【図 7】図 7 は、実施例 1 で得られたホーネットシルクフィルムの浸漬後を示す写真である。

【図 8】図 8 は、実施例 1 及び比較例 1 で得られたフィルムの赤外吸収スペクトルを示す図である。

【図 9】図 9 は、実施例 1 で得られたフィルムの固体  $^{13}\text{C}$  - NMR スペクトルを示す図である。

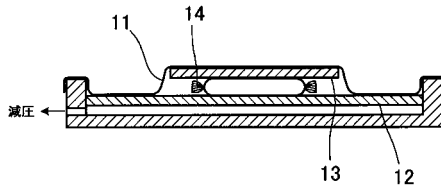
【図 10】図 10 は、実施例 1 で得られたフィルムの水蒸気滅菌処理前後のタンパク質の電気泳動 ( SDS - PAGE ) のバンドを示す図である。

【符号の説明】

【 0 1 0 5 】

- 1 1 ... ゴムシート
- 1 2 ... 多孔質板
- 1 3 ... 平板
- 1 4 ... 透析チューブ
- 1 0 0 ... タンパク質フィルム

【図 1】



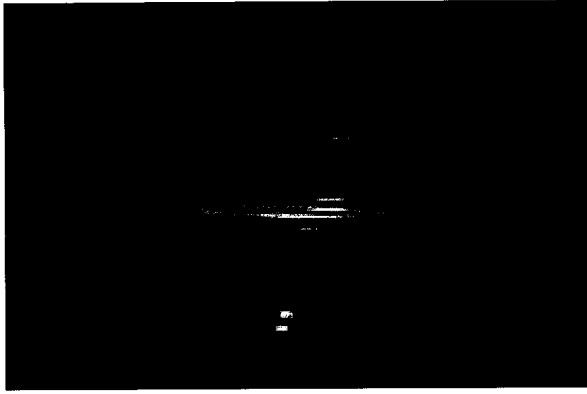
【図 3】



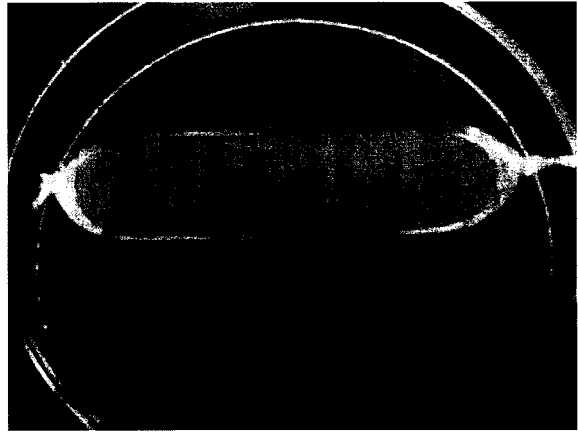
【図 2】



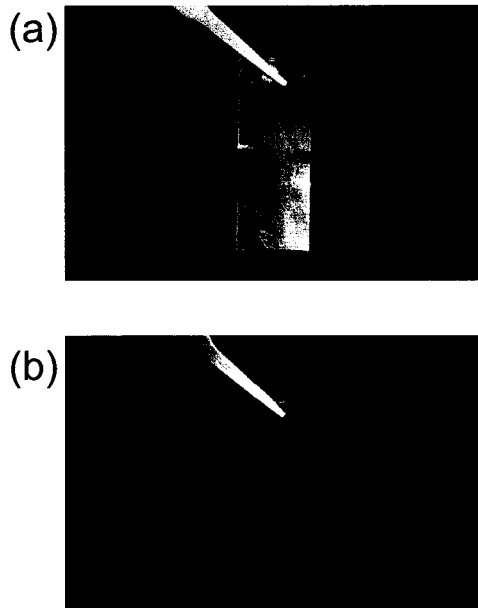
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

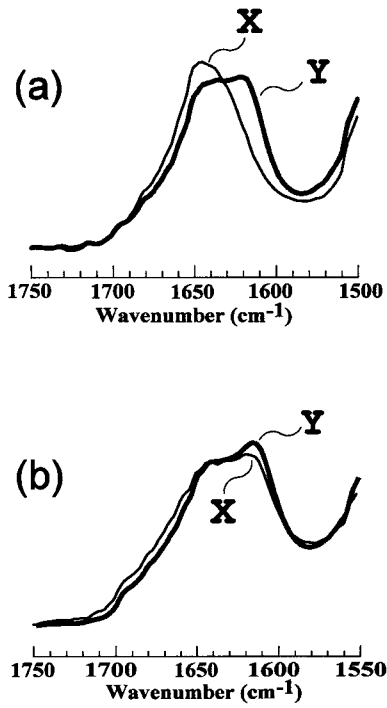


【 図 7 】

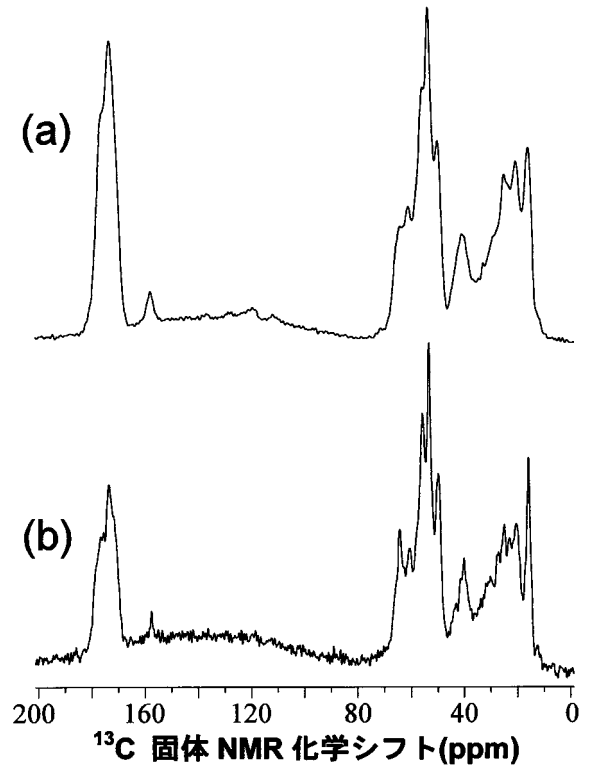




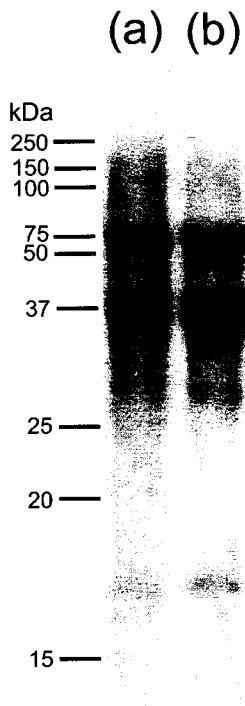
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
A 6 1 K 35/64 (2006.01) A 6 1 K 35/64

(72)発明者 寺本 英敏  
茨城県つくば市大わし 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内

(72)発明者 高須 陽子  
茨城県つくば市大わし 1 - 2 独立行政法人農業生物資源研究所内

Fターム(参考) 4C081 AA02 AA12 AA14 AB11 BA16 BB01 BB04 BC01 CD111 CD33  
DA02 EA02 EA03  
4C087 AA01 BB22 CA16 MA32 MA63 MA67 NA10 ZA89 ZC51  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA05 CA51 EA34 FA65 GA01 GA05