一般報文

(平成元年 9 月 5 日受理)

絹フィブロインキャスト膜の物性に及ぼす溶媒組成の影響

東京農工大学工学部 梁 傳 信・平 林 潔

EFFECT OF SOLVENT COMPONENT ON MECHANICAL PROPERTIES
OF SILK FIBROIN MEMBRANE

By Chuan Xin Liang and Kiyoshi Hirabayashi

Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology,
Nakamachi, 2-Chome, Koganei, Tokyo, 184, Japan

ABSTRACT: The silk fibroin membrane was obtained by the solvent casting method. The effect of the concentration of calcium chloride in solvent on the molecular structure and the mechanical properties such as strength, elongation and Young's modulus of fibroin membrane was investigated. The content of calcium chloride absorbed by fibroin increased with increasing the concentration of calcium chloride in solvent and approached to the absorption equilibrium at concentration above 3 M. The coordinated absorption of calcium chloride on fibroin residues may be restrained at the high concentration of calcium chloride. As calcium chloride molecules penetrated into the non-crystalline and crystalline regions of silk fibroin and expanded the intermolecular space, the cleavage of fibroin by hydrolysis and the hydrogen bond breaking occurred. The fibroin membrane cast from 2 M of calcium chloride solution showed the highest value of elongation, because the hydrogen-bond breaking and the cleavage of fibroin slightly occurred at this concentration.

(Received September 5, 1989)

1. 緒 言

近年、絹フィブロインの非繊維分野への応用が種々検討されている。そのうち最も注目されているのはバイオ素材としての応用である。例えば、絹フィブロインをゲル化して食品、粉末化して化粧品などへの応用の研究が進められており、後者は既に実用化されている¹⁾。また、フィブロイン溶液からキャストした膜、或は他のバイオ素材の補強材としての応用研究が報告されている。これは、絹フィブロインが生体適合性を有するからで、そのバイオ素材への応用はかなり将来性がある課題と言える。本研究は、絹フィブロインのバイオ素材、例えば人工皮膚及び人工血管への応用を目的とし、フィブロイン膜の製造法及びその物理化学的な性質を検討しようとするものである。

周知のように、フィブロインを塩化カルシウム、水、エタノール 3 成分系溶媒に溶かす際に、フィブロイン分子の構造変化は主に塩化カルシウム対水の比率に左右さ

れると考えられる²⁾。そこで、この分子構造の変化が膜の性質に及ぼす影響を及ぼすかを検討するため、10種類の溶媒を用いて試料を作製した。本報では、まず絹フィブロイン溶液の組成が最終的に得られるフィブロイン膜の物性に及ぼす影響について検討した結果を報告する。

2. 実験方法及び材料

2.1 フィブロイン溶液の調製

2.1.1 溶液の調製及びフィブロインの溶解

10種類の溶媒は次式により調製した。

x, y の比率は表 1 に示した。これらの溶媒を沸騰させてから、それぞれ 50:1 の浴比で 3 グラムのフィブロインを溶かした。

2.1.2 フィブロイン溶液の透析

まずフィブロイン溶液を遠心分離機で (3500rpm で 30 分間) 不溶解物を分離除去してから、さらにろ紙で二回

Table 1 The Ratio of Calcium Chloride to Water

Sample No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4
H ₂ O	10	9	8	10	9	8	10	9	8	10

ろ過した。この溶液を透析膜に入れて流速が0.002m³/minである純水で96時間透析した。これを室温で送風しながら濃縮して、再生フィブロイン溶液を得た。

2.2 塩化カルシウムの

フィブロインへの吸着量の測定

5グラムの再生フィブロイン溶液とその4倍以上のAgNO₃とを反応させて、生成したAgCl沈でん物を分離した。そのAgCl沈でん物を105°Cで無水状態までに乾燥し、重量を測り、対応する塩化カルシウムの量を算出し、これと溶媒に投入した塩化カルシウム量との差をフィブロインに吸着された塩化カルシウム量とした。

また、96時間透析した溶液について前述の方法で調べたが、いずれの試料にも塩化カルシウムは存在していなかった。

2.3 フィブロイン膜の作製

2.1で得た再生フィブロイン溶液を再び遠心分離機にかけ、沈でん物を除去し、ろ紙でろ過してアクリル板にキャストし、相対湿度85%温度5°Cに保った恒温恒湿中で製膜した。さらに乾燥したフィブロイン膜を室温で75%のエタノール水溶液中に1時間浸漬しβ化させた後再び室温で乾燥した。

2.4 標準含水量の測定

室温で6日間放置した膜を5グラム取り、105°Cで6日間乾燥させた。その後これを秤量瓶に入れて温度20°C、相対湿度60%の恒温室で55日間放置し、吸湿平衡状態にせしめ膜の標準含水量を求めた。

また、フィブロイン膜の荷重-伸長曲線を測るため、4時間乾燥した試料の重量W'を完全乾燥した試料の重量W₂(=W'×98%)に求め直し、各試料の含水量Wを式1により求めた。これは4時間乾燥で膜の含水量が2%に下がるからである。

$$W = \left(\frac{W_1}{W_2} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

ただし、W₁は乾燥前の重量である。

2.5 荷重-伸長曲線の測定

含水量の異なるフィブロイン膜の荷重-伸長曲線を求めるため、得られたフィブロイン膜を1時間水中に浸漬した湿潤状態にしたのち、試料毎に3mm×25mmの試料を作製した。これを室温で送風しながら乾燥し、10分毎

に恒温恒湿中で島津製L2型直示天びんでその重量W₁を測り、東洋ボールドウィン製テンシロンUTM-II型により引っ張り試験を行なった。測定条件は最大荷重を5kg、引っ張り速度4mm/min、チャート速度50mm/min、両端間距離を10mmとし、20°C、相対湿度65%の恒温恒湿中にて行なった。測定後直ちに秤量瓶に入れ恒温乾燥機で105°Cで4時間乾燥させ、再度同一条件でその試料の重量W'を測り(1)式により含水量Wを計算した。

3. 結果と考察

3.1 フィブロイン膜の荷重-伸長曲線

No. 3号試料(塩化カルシウム:水=1:8)について得た荷重-伸長曲線を図1に示した。含水量が11.5%及び10.8%の絹フィブロイン膜の結果はそれぞれ曲線1、曲線2である。これらの曲線では、降伏点が明瞭ではなく、0.8kg~1.2kgという低荷重を示したが、伸度は100%以上あった。曲線の末端がやや下がることから、破断は弱い部分から始まり、徐々に全体に及ぶと予想される。含水量が9.7%(曲線3)である試料の荷重-伸長曲線は、降伏点と対応する荷重がほぼ1.6kgであり、破断強力も曲線1、2に比較しほぼ2倍近い値になったが、破断伸度は3/4程度に低下した。含水量が8.5%及び6.5%の荷重-伸長曲線をそれぞれ4と5に示す。降伏点荷重はそれぞれ2.9kgと3.4kgとなり、比較的高い強力を示した。その後、降伏点を過ぎると、一旦荷重が下がるが、前者(曲線4)では2.8kg、後者(曲線5)では3.2kgの荷重で伸長変形-つまりクリープ現象を続け、まもなく破断した。これは金属材料の荷重-伸長変形と類似する。従って、含水量の増加はフィブロイン分子相互の結合を緩めるため強力が減少し、著しい伸度の増加

Fig. 1 Effect of water content on stress-strain curves of fibroin membranes obtained from 1 M calcium chloride solution. Water content of sample was 11.5 (1), 10.8 (2), 9.7 (3), 8.5 (4) and 6.5 (5) %.

Fig. 2 Relation between the calcium chloride absorbed on fibroin and the ratio of calcium chloride to water.

を来すと推測できる。

他の試料の荷重-伸長曲線に付いても検討したところ、No. 3号の試料と同様な結果が得られた。

3.2 塩化カルシウムのフィブロインへの吸着量

図2から明らかなように、塩化カルシウムのフィブロインへの吸着量は、塩化カルシウム濃度の増加に伴い、増していく。塩化カルシウム:水 = 1:10のとき、吸着量は0.315g/gであり、2:10になると、吸着量はもっと増加し、さらに3:10になると、吸着量も0.358g/gに増加するが、その後平衡状態に達する。このことは、塩化カルシウムが錯塩として水和された状態でフィブロインの非結晶領域にあるチロシン及びセリン残基に配位するが、塩化カルシウムの濃度が増加すると対応するチロシン及びセリン残基の数が相対的に減少するため、塩化カルシウムの配位が抑制され、平衡状態になったと推測できる³⁾。

3.3 塩化カルシウム対水量の比と

フィブロイン分子量との関係

沸騰した濃度の異なる塩化カルシウム溶液でフィブロインを処理したとき、フィブロインの分子量がどのような影響を受けるかを調べるため、次のようにフィブロイン膜を溶かした溶液の粘度を測定した。各試料について、それぞれ0.2g, 0.1g, 0.05gの乾燥した膜を25mlのジクロル酢酸に溶かし、オストワルト粘度計を用いて、23°Cで溶液の粘度を測った。その結果を図3に示した。塩化カルシウム濃度の増加にともない、粘度は減少した。これは、分子量の低下を意味する。すなわち、沸騰状態ではフィブロイン分子鎖の運動が激しく、それに塩化カルシウムの濃度が増加すると、溶媒である水分子及び Ca^{2+} , Cl^- は徐々にフィブロインの非結晶領域、中間領域及び結晶領域へと侵入し水素結合を切断する。この状態が続けば加水分解⁴⁾によりフィブロインの側鎖ばかり

Fig. 3 Relation between the viscosity of fibroin membrane and the ratio of calcium chloride to water.

Fig. 4 Relation between the elongation of fibroin membrane containing 10% water and the ratio of calcium chloride to water.

でなく、主鎖の切断も起こり、分子量が小さくなると考えられる。これよりフィブロイン膜の力学的性質の優劣はフィブロインの溶媒である塩化カルシウム濃度に依存すると推測される。また、フィブロイン溶液を透析する前に遠心分離機により不溶解物を除去したが、新たに透析で塩化カルシウム濃度と比例して、異なる量の沈澱物が生じた。これは、いかなる原因によるのか、今のところ明らかでない。

3.4 塩化カルシウム対水量の比と膜の物性との関係

3.4.1 破断伸長率

図4は含水量が10%のフィブロイン膜の破断伸長率と塩化カルシウム濃度との関係である。塩化カルシウムの量が1:10の時には、破断伸長率は約100%であるが、2:10のとき、約140%の最大の破断伸長率を示した。塩

Fig. 5 Relation between the stress of fibroin membrane containing 6% water and the ratio of calcium chloride to water.

化カルシウムの濃度が増加すると破断伸長率は低くなり、4:10では約80%の破断伸長率となった。初期にフィブロイン膜の伸度が増すのは、フィブロインを沸騰した溶媒に溶かす際、非結晶領域は溶媒である水分子及び Ca^{2+} 、 Cl^- の侵入(その一部がチロシン及びセリン残基に配位する)により膨潤される分子の間隙が広げられ、比較的弱い分子鎖の水素結合が切断され、分子間の結合が緩められたためである。塩化カルシウムの濃度が高くなり、かつ熱エネルギーの供給を増せばフィブロイン分子鎖の運動も激しくなり、さらに溶媒はフィブロインの結晶領域にも侵入し、水素結合を切り、続いて分子鎖の切断も起こす。この状態では隣接分子同士の絡み合いが弱くなるので、弱い牽引力でも分子間に滑りが生じ伸びやすくなる。しかし、沸騰状態で塩化カルシウムの濃度が3Mに増すと、フィブロイン分子運動が激しくなったため、溶媒はますます侵入しフィブロイン分子鎖の切断が進み、強度も低くなる。

3.4.2 破断応力

フィブロイン膜(含水量6%)の強度は用いた塩化カルシウム溶液の濃度に依存する(図5)。塩化カルシウム:水=1:10の時は 10.8kg/mm^2 の破断応力を示すが、塩化カルシウムの増加にしたがい、破断応力は低下した。特にその比が4:10においては破断応力が 2.5kg/mm^2 となり、1:10のときと比べれば約1/4に低下した。1:10において高い破断応力を示すのは、フィブロインを溶かす際、塩化カルシウム濃度が低いいため、フィブロインのチロシン及びセリン残基へ配位してくる塩化カルシウムの水和物が少なく、フィブロインの分子鎖間の水素結合の切断も少ないためであると推測できる。これに反して、

Fig. 6 Relation between the Young's modulus of fibroin membrane containing 8% water and the ratio of calcium chloride to water.

4:10の時に弱い破断応力を示すのは、分子鎖の切断が進むためとして説明される。

3.4.3 ヤング率

ヤング率は膜の弾性に関係する。図6に示すのは含水量が8%のとき得た結果である。ヤング率は塩化カルシウム対水の比が減少するに従い高くなる。その比が1:8以下では急激に増加する。一方塩化カルシウムの増加によりヤング率は低くなる。これは、塩化カルシウム濃度の増加にしたがい水分子及び Ca^{2+} 、 Cl^- はフィブロインの非結晶性領域から中間領域、そして結晶領域へと侵入し、水素結合を切断しミセル内膨潤をおこし、分子鎖を切断するため、強度と弾性は低下すると推測できる。

3.5 フィブロイン膜の含水量とその物性との関係

フィブロイン膜の物理化学的性質はその含水量に大きく左右されるので、各試料について標準含水量を測った。フィブロイン膜の標準含水量は溶媒である塩化カルシウムの濃度により異なり、7.66(No. 3号試料)~9.42%(No. 4号試料)の間にある。いずれも値は絹糸における値11.5%と比べるとかなり低い。これはフィブロインを溶媒に溶かす際、水素結合が切断され、フィブロインの立体構造が緻密な構造に変化するためである。実際、乾燥状態のフィブロイン膜は剛硬で脆い。しかし、水に浸漬すれば、柔軟になり、力学的性質も向上する。従って、フィブロイン膜の力学的性質を向上させるためには、フィブロイン膜の力学的性質と含水量との間にと

のような依存性があるかを検討する必要がある。

4. 結 語

以上主にフィブロインの溶媒である塩化カルシウムの濃度とフィブロインの構造変化及びフィブロイン膜の強度、伸長などの物理的性質の相関について検討を行い、次のような結果を得た。

1. 塩化カルシウムのフィブロインへの吸着量は塩の濃度の増加により増加することが明らかになった。塩化カルシウム濃度が3Mになると、吸着平衡状態になる。これは塩の濃度の増加にともない塩化カルシウムのフィブロイン残基への配位が抑制されるからである。
2. 溶媒である塩化カルシウムがフィブロインの非結晶領域、続いて結晶領域へと侵入するため、分子の間隙を広げる結果、水素結合の切断が起こり、さらに加水分解によりフィブロイン分子鎖の切断は進む。
3. フィブロイン膜の破断伸長率は塩化カルシウム濃度

が2Mのときに最大であり、逆に1M及び3M以上の場合は、低い値を示した。前者はフィブロインの水素結合の切断が原因であり、後者は、分子鎖の切断のため分子間の絡み合いが弱くなるからである。

4. フィブロイン膜の破断応力及びヤング率は低い塩化カルシウム濃度の時に大きく、塩化カルシウム濃度が2M以下であれば強度のあるフィブロイン膜が得られる。これはフィブロインの分子鎖間の水素結合の切断が少ないためである。従って、伸長率及び強度のよい膜を得るには塩化カルシウム濃度を2M以下にすればよい。

文 献

- 1) 平林 潔, 蚕糸科学と技術, **27**, 24, (1988)
- 2) 味沢昭義, 日蚕雑, **39**, 139, (1970)
- 3) 味沢昭義, 日蚕雑, **38**, 365, (1969)
- 4) 荻原応至, 宮坂啓象, 石川欣造, 織学誌, **34**, T-99, (1978)