

第6号

# 纖維研究所研究報告

2002

財団法人 衣笠会 発行

# 目次

## 報 文

ノックインによるカイコの糖鎖エンジニアリング

森 肇・山本真史・林 幸之 1

カイコTIA-1 相同性蛋白質による細胞死誘導

小谷英治・大庭忠司・古澤壽治・杉村順夫・林 幸之 9

重金属が無菌蚕に及ぼす影響

—当代投与の重金属類の次代への移行残留濃度— 増井博之 17

ドレープ図を用いた簡易風合測定法と風合より

布の物理量を推測するニューラルネットワークに関する研究

岡本次郎・弓削 治・西村太良 23

絹およびさく蚕ニードルパンチ不織布の繊維集合構造および基本力学特性

米田守宏・北村育美・山崎 隆 37

Silk and Silk-Related Products as Materials for Care Morihiro YONEDA 45

カイコの絹糸腺における炭水化物代謝に関する研究

特に前部絹糸腺におけるトレハラーゼについて

定金恵子・古澤壽治・林 幸之 55

多孔性シルクの形成と特性

日本野蚕学会会長 赤井 弘 65

## 技術資料

冬虫夏草のはなし

今村利勝 89

財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

93



# ノックインによるカイコの糖鎖エンジニアリング

森 肇\* · 山本真史 · 林 幸之\*\*

## Engineering of glycosylation pathway in the silkworm

Hajime Mori\*, Masafumi Yamamoto and Yoshiyuki Hayashi\*\*

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

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

### Abstract

AcNPV is an attenuated virus against silkworm and can be used as a vector for foreign gene transfer. In this study, we report a new method for silkworm transgenesis. This new method consisted of DNA injection by AcNPV infection and transposition by *piggyBac* transposase. Transgene ( $\beta$  1,4-galactosyltransferase gene) was inserted between inverted terminal repeat sequences of *piggyBac*. This gene cassette was introduced in AcNPV genome and a recombinant virus AcpigGalT was constructed. Another recombinant virus AcpigTrans contained *piggyBac* transposase gene which was expressed under the control of *Drosophila* HSP promoter and it was used as a helper virus for transposition of the transgene. Silkworm larvae were inoculated with two recombinant baculoviruses and the transgenesis of the silkworm was investigated. The N-linked oligosaccharides of glycoproteins of the transgenic silkworm were suggested to be structurally identical to those produced by higher eucaryotes.

形質転換生物の作出については、すでに植物においてはTiプラスミドなどを例にかなりの成果が得られ、動物においては哺乳動物のマウスをはじめとして、ウシ、ヒツジなどで成果が出つつある。しかし昆虫ではショウジョウバエを除くと長い間、トランスジェニック個体を作ることはできなかった。地球上に生息する昆虫は同定されているものだけで100万種以上で、実際は200万種を超えていると言われており、種類としては最も多く、無脊椎動物では最も進化した生物であるといえる。昆虫と人との関係は、昆虫による病原体の媒介、農作物に対する害虫として扱われることが多いが、養蚕業や、養蜂業など昆虫を利用することも多い。種の多さと環境に対する適応性から、無尽蔵の遺伝子源でもある。しかし、昆虫にはこのような膨大な種があるにもかかわらず、トランスジェニック個体の作出に関する研究では遅れていた。

昆虫における形質転換体の作製にはトランスポ

ゾンが利用されることが多い。トランスポゾンは、染色体上を動き回る（転位）因子であり、遺伝子の発現に様々な影響を与え、多くの突然変異の原因として考えられている。現在、昆虫において機能するトランスポゾンの代表例としてキイロショウジョウバエの形質転換に用いられているPエレメントが知られている。1982年にこのトランスポゾンPエレメント[1]の性質を利用してキイロショウジョウバエでの形質転換が行われて以来、この手法はショウジョウバエの遺伝学の研究にとって必要不可欠なものとなった。しかし、このPエレメントはキイロショウジョウバエ以外の昆虫ではその転位活性を示さないことがわかった[2]。

1989年にPエレメントに次ぐトランスポゾン *hobo* がショウジョウバエ *D. melanogaster* から見つけられたが[3]、これもショウジョウバエ以外の昆虫で機能することはなかった。1995年によくチチュウカイミバエ *Ccratititis capitata* をシヨ

\*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: hmori@ipc.kit.ac.jp,  
TEL & FAX 075-724-7776

\*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

ウジョウバエの一種 *Drosophila hydei* より見つけられたトランスポゾン *Minos* を用いて形質転換する事に成功した[4]。さらに1998年にはイエバエ *Musca domestica* 由来のトランスポゾン *Hermes* と、ショウジョウバエの一種 *Drosophila mauritiana* 由来のトランスポゾン *mariner* をもちいてヤブカ *Aedes aegypti* の形質転換に成功した[5,6]。こうして、トランスポゾンを利用した形質転換昆虫の研究が盛んに行われるようになった。一方、鱗翅目昆虫 *Trichoplusia ni* 由来の培養細胞 TN-368 培養細胞株より新たなトランスポゾン *piggyBac* が発見された[7]。このトランスポゾンは O' Brochta と Atkinson の検定法[8]により様々な鱗翅目昆虫、双翅目昆虫においてそれぞれ同程度の割合で機能することがわかった。そして現在カイコをはじめとしてチチュウカイミバエ、キイロショウジョウバエ、Caribbean fruit fly *Anastrepha suspensa*、pink bollworm *Pectinophora gossypiella*、ハマダラガ *Anopheles gambiae*、イエバエ等の非常に多くの昆虫で *piggyBac* が機能することが確認されており[9-16]、形質転換体の作製に非常に期待されているエレメントである。

ところで、鱗翅目昆虫では形質転換とは異なり、一過性であるが、その培養細胞あるいは昆虫を使ってタンパク質を生産する系が開発された。1983年 Smithらによって夜盗蛾科のバキュロウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AcNPV) の多角体遺伝子のプロモーターを利用したバキュロウイルス発現系が[17]、さらに1985年に前田ら[18]によって、カイコ核多角体病ウイルス (*Bombyx mori* NPV, BmNPV) をベクターに用いた発現系が開発された。これによって、培養細胞やカイコ個体で多くの外来遺伝子の発現が行われている。このバキュロウイルス発現系による外来遺伝子の発現は、ウイルス感染後ウイルスが宿主内で増殖する間に限られる。何故ならば、NPVは宿主昆虫や宿主昆虫細胞に対して病原性が強すぎて致死してしまうからである。このためにバキュロウイルスを用いた形質転換は不可能かと思えた。しかし、バキュロウイルス AcNPVはカイコには感染するが、その増殖速度は極めて遅く、カイコを致死させることはなく、吐糸、営繭、蛹

への変態にも影響しないことがわかった[19]。AcNPVがコードする Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT) 遺伝子のために、カイコのエクダイソンを不活化させ[20]、羽化は阻害されるが、これも蛹期に人工的にエクジステロイドを投与した場合発育を再開することが分かり[21]、このウイルスをカイコの細胞核内で増幅させ、ウイルス遺伝子とカイコの遺伝子の組み換えを起すことによる形質転換体の作製が行われた。AcNPVの遺伝子の一部をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えたリコンビナントウイルスをカイコ5齢幼虫に接種したところ、F<sub>3</sub>世代までのルシフェラーゼ遺伝子の伝達とF<sub>3</sub>世代までのルシフェラーゼ遺伝子の発現が確認され[22]、さらに、外来遺伝子の次世代以降への伝達様式について解析を行ったところ、カイコのゲノムに組み込まれた状態で伝達されていることがわかりAcNPVを用いてカイコのゲノム内に外来遺伝子を導入し、カイコを形質転換させることが可能となった[19]。さらにこのAcNPVをベクターに用いる方法で、カイコのフィブロイン遺伝子と相同組換えを起させ、カイコのフィブロインL鎖遺伝子にGFP遺伝子を含む融合タンパク質を発現させることにも成功した[19]。

カイコを宿主として外来遺伝子を導入するには、先に述べたトランスポゾンを使う系と、バキュロウイルスをベクターに用いる系であるが、前者はトランスポゾン *piggyBac* を持つプラスミドを受精直後の卵にマイクロインジェクションする方法である[15]。しかしこの方法は卵にプラスミドを直接注射するには極めて高度な技術を要する。そこで、本研究ではトランスポゾン *piggyBac* と AcNPVを併用した形質転換法の開発に着手した。

これら形質転換技術によってカイコを無限に改良し有用物質を生産するカイコの昆虫工場としての利用が期待され、新規生物利用産業創出へ応用できる可能性を持つと同時に低迷する蚕糸業界の活性化はもとより、医薬業界や繊維業界への新しい分野の創造が期待できる。しかし昆虫において有用タンパク質を大量に発現させるにあたっての問題となるのが、ヒトを含めた哺乳動物との生理機能の違いである。タンパク質のN型糖鎖プロセッ

シングの過程は、昆虫型も哺乳類型も最初の過程は同じであり、AsnへのGlc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>の付加に始まり、これがMan<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>を経て、GlcNAcMan<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>に変換される。しかし、昆虫と哺乳動物では糖鎖のプロセッシングの途中で違いが見られる、このポイントとなる分岐点での酵素活性の有無によるものである。高等真核生物においては、この後さらにGalactosyltransferaseやSialyltransferaseによってN-アセチルグルコサミンの先にガラクトース、シアル酸の付加が行われ複合型糖鎖へと変換される。昆虫にもN-アセチルグルコサミンの転移酵素を持っていることは明らかにされている。しかしながら、N-アセチルグルコサミンのエキソグルコシダーゼの活性が強いために分解されてしまう。このため昆虫細胞内で作られる糖タンパクは哺乳動物のような複合型糖タンパクではない(図1)[23]。さらにはガラクトースやシアル酸の付加を行う糖転移酵素を持たない、もしくは活性が弱いということもある。また、哺乳動物の複合型糖鎖付加においてガラクトースの付加に関わる酵素β1,4-galactosyltransferaseを、鱗翅目昆虫細胞に導入すると普段昆虫細胞で見られる3マンノース型への転移を行うN-acetylglucosaminidaseと競争的に反応を行うことが報告されており[24]、昆虫細胞での複合型糖鎖付加を行うにはβ1,4-galactosyltransferase活性を上げることが重要といえる。

哺乳類のβ1,4-galactosyltransferase遺伝子をクローニングしたウイルスベクターを作製し、昆虫細胞に接種したところ、同酵素の高い活性が得られた[24]。さらにこの発現系の利点は細胞との遺伝子の形質転換も行えるということであり、β1,4-galactosyltransferase遺伝子を持ち、永続的に発現する培養細胞を構築した。そしてこの細胞由来の糖鎖の末端構造は、N-アセチルグルコサミンの先にガラクトースが付加されており、昆虫での複合型糖鎖の作製においてβ1,4-galactosyltransferaseの重要性が証明された。

従来からのバキュロウイルスベクターを用いた昆虫発現では、ヒトの疾患を治療するための糖タンパク質を得るために、その遺伝子を発現させても、糖鎖構造の違いから利用できなかった。そこで本研究ではカイコ体内で糖タンパク質にヒトと

同様な複合型糖鎖を付加できるようにするために、哺乳動物において複合型糖鎖の付加に関与する酵素であるβ1,4-galactosyltransferaseの遺伝子を導入する。今まで、昆虫を用いてヒトワクチンや治療薬生産の障壁となっていた糖鎖構造に関する問題が解決できるものと期待でき、新しい機能を持つカイコの作出とそれを用いた生物生産系の確立を最終的な目標とする。

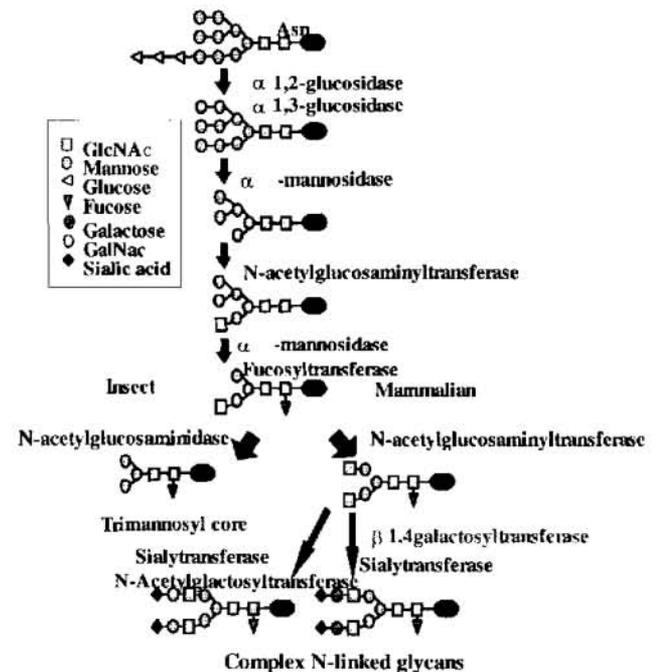


図1 昆虫と哺乳動物における糖タンパク質の糖鎖付加経路

## 材料と方法

### トランスファーベクターpAcpigGalTの構築

ワイオミング大学Donald L. Jarvis 博士より分与いただいたプラスミド pIE1HRGalT [24]にはNPVの初期遺伝子プロモーターであるIE1プロモーター (Immediately early gene promoter) と哺乳類偶蹄目反芻類であるウシ*Bos Taurus*のβ1,4-galactosyltransferase遺伝子のcDNA、そしてバキュロウイルスのhr5エンハンサーが挿入されている。pIE1HRGalTを制限酵素Drd IとSnaB Iで処理し、これを0.7%低融点アガロースゲル (SEA KEM GTG Agarose : FMC社製) で電気泳動した。泳動後、IE1プロモーターからhr5エンハンサー、β1,4-galactosyltransferase遺伝子までの約4 kbの

DNA断片を含むゲルを切り出し、平滑処理後、TE bufferに溶解した。一方、トランスファーベクターpAcpiggyBacを制限酵素Pst IとBgl IIで処理し、同様に平滑処理後、DNAを回収した。IE1HRGalTをトランスファーベクターpAcpiggyBacに挿入し、トランスファーベクターpAcpigGalTを作製した。

### リコンビナントウイルスAcpigGalTの作製

培養細胞は、ヨトウガの一種である*Spodoptera frugiperda*由来のIPLB-SF21AE (Sf21細胞)を用いた。Sf細胞の培養は10% (V/V) のFetal bovine serum (GIBCO BRL社製) と0.26% [W/V] のBacto-tryptose (Difco社製) を含むTC-100培地 (GIBCO BRL社製) を用いた。細胞の培養は27℃で行った。

線状化されたAcNPV由来Baculogold™ Baculovirus DNA (PharMingen社製) を用いた。ファルコンチューブにトランスファーベクターpAcpigGalT 5 μgとBACULO GOLD 2.5 μlに加え、トランスフェクション用滅菌水で26 μlにした。ここに、Lipofectin Reagent (GIBCO BRL社製) 14 μlに加え、室温で15分間静置した。これをトランスフェクション溶液にした。

Sf21細胞を35 mmシャーレに 5×10<sup>6</sup> cells/dishになるように播き、吸着させた。その後、培養液を取り除き無血清TC-100培地で2回細胞を洗浄し、新たに2 mlの無血清TC-100培地を加え、ここにトランスフェクション溶液を接種し、Sf細胞に取り込ませた。27℃で24時間培養し、無血清TC-100培地を取り除き、血清入りのTC-100培地を2 mlに加え再び27℃で培養した。その5日後、リコンビナントウイルスが細胞から放出されてきたので培養液を回収し、室温で160×g、5分間の遠心で細胞を沈殿させ、この上清をプラーク純化の際の試料とした。

次に、35mmシャーレにSf細胞を1×10<sup>6</sup> cells/dishになるように播き、吸着させた。そして、培養液を取り除き、トランスフェクションした後回収したウイルスを適度に希釈したものを200 μl接種し27℃で1時間ウイルスを細胞に感染させた。1時間後、接種液を取り除き、42℃で保温した寒

天培地を2 ml加えた。この寒天培地は、蒸留水で3%に溶かし、滅菌した低融点アガロース (SeaPlaque GTG Agarose : FMC社製) を培養液で1%にしたものを用いた。重層した寒天が固まった後、さらに1 mlの培養液を重層し、27℃で4、5日培養した。4、5日後光学顕微鏡で組換えを起したウイルスが形成したプラークを探し、パスツールピペットで寒天ごと回収し、1 mlの培養液中に浮遊させた。これを接種液として新しくSf細胞に接種し、27℃で4、5日培養した後培養上清を回収し、室温で160×g、5分間の遠心で細胞を沈殿させ、リコンビナントウイルスAcpigGalTを得た (図2)。

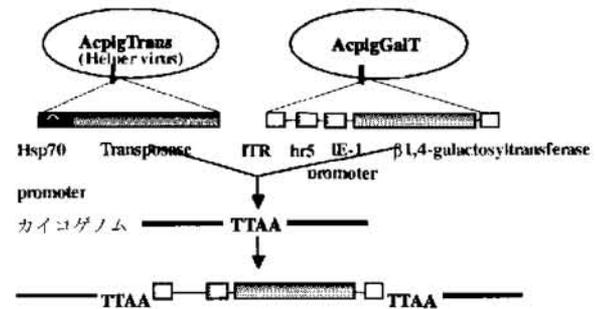


図2 ヘルパーウイルスとβ1,4-galactosyltransferase遺伝子を持つ組み換えウイルスと同遺伝子の転位

### トランスファーベクターpBBHisC/Hspの構築

AcNPVのポリヘドリン遺伝子領域にpiggyBacの転位酵素遺伝子を組み込んで作成したリコンビナントウイルスAcHISPTransはHSPプロモーターの下流にpiggyBacの転位酵素 (トランスポゼース) をコードする遺伝子領域を含んでおり、自身は酵素を発現するものの転位を行うことはない。

まず、piggyBacの前配列を含むプラスミドp3E1.2をHind IIIをつなげた以下のプライマーを用いて増幅させた。

PBTrans-1 :

5'-AAAAAAGCTTATGGGATGTTCTTTAGACGA-3'

PBTrans-2 :

5'-AAAAAAGCTTATACTAATAATAAATTCAAC-3'

PCR反応にはLA Taq polymerase (TaKaRa社製) を用いて、プロトコールに従い反応を行った。PCRによる増幅産物を制限酵素Hind IIIで消化し

た。消化後、エタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、TE bufferに溶解した。

次に、ショウジョウバエ熱ショックタンパク質プロモーターを含むプラスミドpUC/Hspを制限酵素BamH I、Hind IIIで消化した。pBlueBacHisC (Invitrogen社製) を制限酵素BamH I、Hind IIIで消化し、DNA断片を回収した。回収したDNAはTE緩衝液に溶解した。制限酵素処理したpBlueBacHisCとpUC/Hspをそれぞれ0.8%低融点アガロースゲルで電気泳動後、約10kbのベクターDNA断片を回収した。

Hspプロモーター持つインサートとpBBHisCをライゲーションをし、トランスファーベクターpBBHisC/Hspを得た。このpBBHisC/HspをHind IIIで消化し、piggyBac転位酵素遺伝子領域配列とトランスファーベクターpBBHisC/Hspをライゲーションし、トランスファーベクターpBBHspTransを得た。

#### リコンビナントウイルスAcpigTransの作製

作製したpBBHspTransを同様の方法で、線状化されたAcNPV由来のBACULOGOLD™ Baculovirus DNA (Pharming社製) とSf細胞にトランスフェクションすることでヘルパーウイルスAcpigTransを作製した(図2)。

#### 5 齢カイコへのリコンビナントウイルス Acpig-GatT及びAcpigTransの接種

氷で麻酔した5齢起蚕幼虫にAcpigGalTとAcpigTransを混合したウイルス液(それぞれ $5 \times 10^7$  PFU)  $50 \mu\text{l}$ を滅菌された注射器を用いて体節間から経皮接種した。接種後、室温で幼虫が麻酔状態より回復してから再び飼料の上に戻し、25℃で飼育を続けた。

#### インバース PCR

PCRによって $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子の増幅が確認された系統は、実際にpiggyBacがカイコゲノムに転位していることを確認するために、インバースPCRを行い、piggyBacの周辺領域の増幅を行った。

このPCRには以下のプライマーを用いた。

#### 上流領域用

Inv-1 : 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3'

Inv-2 : 5'-TGACGAGCTTGTGGTGAGGATTCT-3'

#### 下流領域用

Inv-G1 : 5'-AAACCTCGATATACAGACCG-3'

Inv-G2 : 5'-TGTCATCTGATGTACCAGGC-3'

反応には、AmpliTaq Gold (Applied Biosystems社製) および付属の10×PCR buffer II (100 mM Tris-HCl[pH 8.3], 500 mM KCl)、dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 濃度 各2.0 mM) を用い、反応液量 $50 \mu\text{l}$ でPCRを行った。反応は95℃10分間加熱してAmpli Taq Goldの活性を上げた後、94℃1分間 (Denatured)、55℃1分間 (Annealing)、72℃2分間 (Extension) の温度周期を60回行った。その後さらに72℃で7分間インキュベートした後、4℃に下げ反応を終了させた。

#### インバースPCR産物の解析

インバースPCRにより増幅されたpiggyBacの周辺領域の配列をDNAシーケンスにより解析するために、インバースPCRの増幅産物をpCR™ベクター (Invitrogen社製) にクローニングを行い、DNAシーケンス解析を行った。

#### レクチンプロット

卵20粒に $40 \mu\text{l}$ のリン酸緩衝液を加えて磨砕した。遠心操作を行い、その上清をリン酸緩衝液で10倍に希釈後、SDS-PAGEを行った。ニトロセルロース膜に泳動したタンパク質を転写し、ConAおよびRCA120の2種類のレクチンで糖タンパク質の糖鎖を解析した。

## 結果および考察

#### 形質転換カイコの選抜

図2の2種類の組み換えウイルスをカイコ5齢幼虫に接種した後、PCR法によって $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子を持つ個体の選抜を行った。

これまでに12回の実験を行い、994頭 (♂:421, ♀:573) のカイコ5齢幼虫にウイルスを接種した。

得られたF<sub>1</sub>卵は194卵塊、つまり194頭分（♂:77, ♀:117）であった。この194卵塊から個別にゲノムを抽出しPCRによるスクリーニングを行ったところ、9卵塊（♂:5, ♀:4）より、 $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子の増幅が確認された。

さらに、 $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子の増幅が確認されたF<sub>1</sub>卵塊9個のうち7卵塊を個別に飼育し、5齢幼虫からゲノム抽出を行いPCRによるスクリーニングを行ったところ、5卵塊より $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子の増幅が確認された。このうち、第9回目のウイルス接種区より、ようやく $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子が挿入されたカイコが選抜された。

	<b>AcpiG<sub>1</sub>GalT(vector)</b>
---piggyBac-GalT sequence---	TTAAATAATAGTTTCTAAATTTTTTATATATCA
	<b>Transformed silkworm</b>
---piggyBac-GalT sequence---	TTAAAGAACTTACTTCAATGCTTTCTCCACTAG
	TTAAAGAACTTACTTCAATGCTTTCTCCACTAG

図3 ウイルスとトランスポゾンによって、挿入された $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子のカイコゲノム上での挿入位置の解析

### $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子の転位部位の解析

この形質転換カイコをインバースPCRで解析した結果、図3に示す通り、 $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子がカイコ染色体に転位していることがわかった。しかも、この転位部位はフィブロインH鎖遺伝子の中であることが判明した。

### $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子形質転換カイコの糖タンパク質の解析

卵20粒を磨砕し、得られたタンパク質をSDS-PAGE後、レクチンプロットを行い、糖タンパク質の糖鎖構造の解析を行った（図4）。ただし、図4に示す通り、目的とする $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子は形質転換カイコでも相同染色体上の片側のフィブロインH鎖にしか組み込まれていない。また、さらにこの形質転換カイコ（♂）と

普通のカイコ（♀）とを交配し、得られた卵の全タンパク質を調べているため、染色体当たりの $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子のコピー数は1/4である。

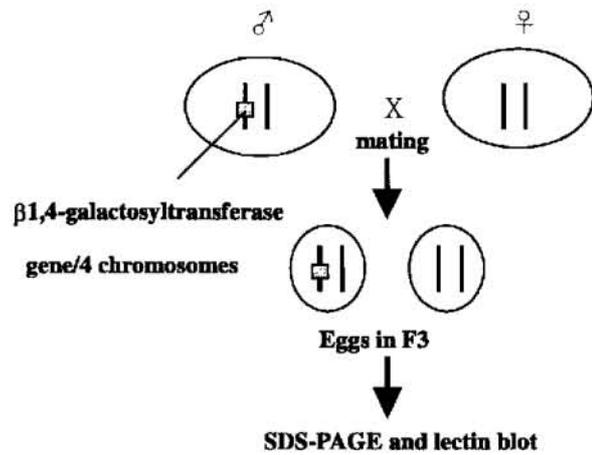


図4  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子を相同染色体当たり1コピー持つ形質転換カイコ（♂）と対照のカイコ（♀）を交配し、得られた卵から全タンパク質を抽出し、SDS-PAGEとレクチンプロットを行う。

実験に用いたレクチンの中で、ConAは昆虫の一般的な糖タンパク質の糖鎖構造に見られるハイマンノース型を認識し、これに結合する。一方、RCA120は哺乳動物の糖タンパク質の糖鎖に見られる複合型糖鎖の $\beta$ 1,4-galactoseを認識し、これに結合する。そこで、形質転換したカイコより得られた卵と対照の卵の糖タンパク質の糖鎖構造の比較を行った。その結果、マンノース型糖鎖を認識するConAの結合は両者の糖タンパク質では全く差が見られないのに対して、形質転換したカイコより得られた卵の糖タンパク質はRCA120に対して強く結合することがわかった（図5）。

ConAでは差が見られないのは、糖鎖構造の骨格は昆虫と哺乳動物ではともにマンノースであるためと考えられる。一方、RCAは哺乳動物の糖タンパク質である複合型糖鎖の $\beta$ 1,4-galactoseを特異的に認識し、これに結合する。このことより、形質転換されたカイコ由来の卵の糖タンパク質の糖鎖は哺乳動物由来の複合型糖鎖により近いものであると考えられた。

このことから、形質転換したカイコを宿主とし

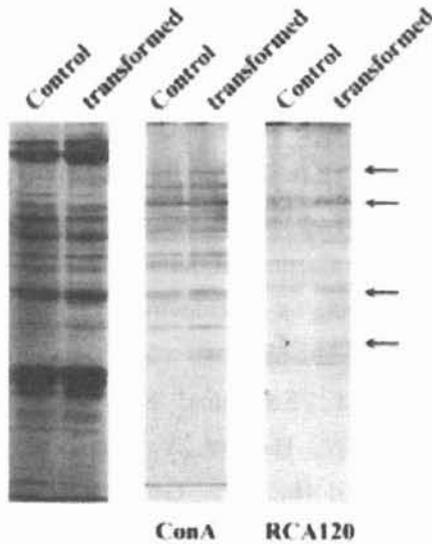


図5 卵から抽出したタンパク質のレクチンブロッキング（左は電気泳動したタンパク質の染色像、真ん中はマンノースに結合するタンパク質、右はガラクトースに結合するタンパク質を示す。矢印は形質転換個体由来のタンパク質で対照のものと比較して、新規なバンドあるいは差が見られたバンド）

てバキュロウイルスバクター系で膜タンパク質などの糖タンパク質を合成した場合、哺乳動物のものと類似した糖タンパク質を合成できるものと期待できる。例えば、インフルエンザワクチンの場合、エンベロープタンパク質HAが抗原となるが、このタンパク質はまさしく糖タンパク質である。この研究は、 $\beta$ 1,4-galactosyltransferase遺伝子形質転換カイコはインフルエンザワクチンを生産するための宿主として今後活用できる可能性を開いたものと言えるが、さらに糖鎖の末端にシアル酸を付加させるための転位酵素遺伝子を導入した形質転換カイコの作製など、解決すべき問題は残されている。

## 引用文献

1. Rubin, G.M., Spradling, A.C., 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
2. Handler, A.M., Gomez, S.P., 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. Blackman, R.K., Gelbart, W. M., 1989. The transposable element *hobo* of *Drosophila melanogaster*. In: Berg, D.E., Howe, M.M. (Eds.) *Mobil DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 523-525.
4. Loukeris, T.G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S., Savakis, C., 1995. Gene transfer into the Medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* 270, 2002-2005.
5. Jasinskiene, N., Coates, C.J., Benedict, M.Q., Cornel, A.J., Rafferty, C.S., James, A.A., Collins, F.H., 1998. Stable transposon mediated transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, using the *Hermes* element from housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3743-3747.
6. Coates, C.J., Jasinskiene, N., Miyashiro, L., James, A.A., 1998. *Mariner* transposition and transformation of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, using the *Hermes* element from housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3742-3751.
7. Fraser, M.J., Smith, G.E., Summers, M.D., 1983. Acquisition of hostcell DNA-sequences by baculoviruses --- relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa-californica* and *Galleria-mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virol.* 47, 287-300.
8. O'brochta, D.A., Atkinson, P.W., 1996. Transposable elements and gene transformation in non-drosophids. *Insect Biochem. Molec.Biol.* 26, 739-753.
9. Handler, A.M., McCombs, S.D., Fraser, M.J., Soul, S.H., 1998. The lepidopteran transposon vector,

- piggyBac*, mediate germ-line transformation in the mediterranean fruit fly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 7520-7525.
10. Handler, A.M., Harrell, R.A., 1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. Insect Mol. Biol. 8, 449-458.
  11. Handler, A.M., 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.
  12. Peloquin, J. J., Thibault, S. T., Staten, R., Miller, T. A., 2000. Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: gelechiidae) mediated by the *piggyBac* transposable element. Insect Mol Biol, 3, 323-333.
  13. Hediger, M., Niessen, M., Wimmer, E.A., Dubendorfer, A., 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. R., Fraser, M.J., Benedict, M.Q., 2000. The *piggyBac* element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito, *Anopheles gambiae*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 909-914.
  15. 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. Nature Biotechnology. 18, 81-84
  16. Eglitis, M.A., and Anderson, W.F., 1988. Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells. Biotechniques 6, 608-615.
  17. Smith, G. E., Summers, M. D., and Frazer, M. J. 1983. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol. 3, 2156-2165.
  18. Macda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., Saeki, Y., Sato, Y., and Furusawa, M. 1985. Production of human  $\alpha$ -interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature, London 315, 592-594.
  19. 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.
  20. O, Reilly, D. R. 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. Insect Biochem. Molec. Biol. 25, 541-550.
  21. Marz, L., Altmann, F., Staudacher, E. and Kubelka, V. 1995. Protein glycosylation in insects. In Montreuil, J., Vliegenthart, J. F. G. and Schachter, H. (Eds.), Glycoproteins, Vol. 29a, Elsevier, Amsterdam, pp. 543-563.
  22. Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glossl, J., and Marz, L., 1995. Insect cells contain an unusual, membrane-bound  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. J. Biol. Chem., 270, 17344-17349.
  23. Hollister, J. R., Shaper, J. H., and Jarvis, D. L., 1998. Stable expression of mammalian  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase extends the N-glycosylation pathway in insect cells. Glycobiology, 8, 473-480.
  24. Jarvis, D. L., and Finn, E. E., 1996. Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. Nature Biotechnology. 14, 1288-1292.

# カイコTIA-1相同性蛋白質による細胞死誘導

小谷英治\*・大庭忠司\*・古澤寿治\*・杉村順夫\*・林 幸之\*\*

## Induction of the cell death process by the artificial introduction of TIA-1 homologous protein into *Bombyx mori* cultured cells

Eiji KOTANI\*, Tadashi OHBA\*, Toshiharu FURUSAWA\*,  
Yukio SUGIMURA\*, 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 Kitano  
Shimo-Hakubai-cho, Kita-ku, Kyoto 606-8326, Japan

A developmentally-regulated RNA-binding protein, named TIAH, which is highly homologous with mammalian TIA-1/R known as an apoptotic regulator, was found to be expressed specifically during metamorphosing stage. In order to elucidate the cellular function of TIAH, induction of the cell death process was investigated by transfection with the recombinant RNA recognition domain of TIAH and with the recombinant plasmid expressing the same region of TIAH into *Bombyx mori* cells. The recombinant TIAH protein was confirmed to have strong polyA- and polyU-binding activities as mammalian TIA-1/R family has similar binding properties. Approximately 20% of cells introduced with 40  $\mu$ g recombinant TIAH showed the DNA fragmentation detected by TUNEL-staining 2h after the transfection. Also, DNA fragmentation in approximately 20% of cells transfected with 16  $\mu$ g recombinant TIAH-encoded plasmids was induced 9h after treatment. From these results, it was demonstrated that TIAH in *Bombyx mori* cells is involved in induction of the cell death process which may be related to the tissue decomposition during metamorphosis stage.

### 1. はじめに

カイコの大型組織である中腸および絹糸腺において、ステロイドホルモンの関与による幼虫一蛹変態期には、極めて短期間にもかかわらず劇的な組織崩壊および組織解離の現象が観察される。前蛹期において特に中腸皮膜細胞では顕著な崩壊が認められている。この崩壊時の細胞内には正常なDNA以外に低分子化された数種のDNA断片が検出されている[1]。同様に絹糸腺においても変態期においてDNAの低分子化が観察されている[2]。この低分子化されたDNAはその性状からも、ヌクレオソーム単位の逐次的な染色体分解の結果であると推察され、幼虫一蛹変態期の組織崩壊には細胞死の過程が関与していると考えられる。生命の発生・発育において与えられた必然性を包含す

る変態現象の中にプログラムされた細胞死が存在することは不可避の条件であると推定され、この細胞死のメカニズムについてカイコを用いて追及することは重要な研究課題であるといえよう。

細胞死の初期因子として機能することは知られていても、その他の諸因子との機能的関連が不明なものの中にアポトーシス誘導性RNA結合タンパク質が挙げられる。たとえばヒトTIA-1蛋白質は、免疫担当細胞の細胞障害性顆粒内成分であるが、ウイルス感染等により障害を受けた細胞の顆粒成分授受後に引き起こされる何らかのアポトーシス誘導過程に関与すると考えられている[3]。ヒトTIA-1とTIARタンパク質は、N末端に3つのRNA認識ドメイン(RRM)を持ち、C末端に働きの不明な独自のドメインを持つ。両者は二番目のRRM(RRM2)においてRNAに対する結合活

\*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

性を有することから、この部分が重要な機能ドメインであると考えられている[4-6]。実際、TIA-1およびTIARを取り込ませた培養細胞においてDNAの断片化が観察されている[6]。またショウジョウバエで見つかったRox8はヒトのTIA-1/Rの相同物であると考えられており、卵形成期の蛹卵巣においてRox8 mRNAが多量に発現することから、この蛋白質は卵形成に関連した細胞死に対して機能すると予想されてきた[7]。TIA-1ファミリーに属するpoly(A)RNA結合蛋白質は、細胞にアポトーシスを誘導する刺激となり得るものとして位置付けることができよう。しかしその刺激伝達およびアポトーシス誘導の詳細な仕組みについて未解決部分も多い。

カイコ中腸組織からもTIA-1/Rと高い相同性を有するホモログ (TIA-1 homologous protein; TIAH) をコードする約2011bpのcDNA遺伝子が単離された[8]。すなわち絹糸腺の初期培養期に脱皮ホルモンを添加した際に、TIA-1様タンパク質遺伝子が発現することが見出された。このcDNA配列にコードされる388残基からなる推定アミノ酸配列をTIA-1 (386残基) およびTIAR (375残基) のアミノ酸配列と比較した結果、N末端から285残基の配列間でそれぞれ同一のアミノ酸が56.5%および58.0%存在した。TIAHはN末端側にRRM1 (2 - 84aa)、RRM2 (97 - 175aa) およびRRM3 (209 - 284 aa) に相当する3つの繰り返し配列を有し、このドメイン構成においてTIA-1、TIARおよびRox8と類似していた。すなわちその一つを取り上げるならば、TIAHのRRM2アミノ酸配列には、TIA-1、TIARおよびRox8のRRM2との間で62.0%、67.1%、そして88.6%の同一のアミノ酸が見られる。また、TIAHのRRM2に存在するRNP2 (Ile<sup>98</sup> - Phe - Val - Gly - Asp - Leu<sup>103</sup>) およびRNP1 (Lys<sup>137</sup> - Gly - Tyr - Ala - Phe - Val - Ser - Phe<sup>141</sup>) に相当する部分は、Rox8のRRM2に存在するRNP2およびRNP1とは完全に一致し、TIA-1およびTIARに存在するものに対して、それぞれ一つのアミノ酸が性質のよく似たアミノ酸に置換されている (RNP1に関してはGlyがAla<sup>116</sup>、RNP2に関してはValがIle<sup>98</sup>にそれぞれ置換) もの、これ以外の配列は一致した。また、ヒトのPABP

と比較した場合TIAHのRRM2アミノ酸配列はPABPのRRM1 (最もN末側に存在) との間で最も高い同一性を示すが、その同一性は41.6%程度に留まった。したがってTIAHは、存在する多数のpoly(A)RNA結合蛋白質の中で、特にTIA-1、TIARおよびRox8と一次構造的に相同な蛋白質であり、またRNAとの相互作用においても類似した性質を示すことも考えられる。しかしTIAHの細胞死との関連性については明らかにされていない。

そこで本論文では、TIAHのRNA結合領域タンパク質を大腸菌内で発現させ、得られる組み換えタンパク質のRNA結合性と細胞への細胞死誘導について明らかにすると共に、このRNA結合タンパク質の昆虫変態機構における重要性について考察した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 組換えTIAHの大腸菌発現

5'末端側に制限酵素NdeIの認識配列を付加したTIAHアミノ末端25merのセンスプライマーと3'末端側に6 His残基と制限酵素BamHIの認識配列とを付加した833-855塩基部分のアンチセンスプライマーを用いて中腸一本鎖cDNAを鋳型とするPCR反応を行った。得られたDNA断片は精製後、NdeI・BamHI消化したpET-11aプラスミドベクターに挿入した。この組み換えプラスミドにより形質転換した大腸菌を2.5リットルのLB培地中で増殖させ、培養液のOD<sub>600</sub>=0.6となったところで1mMのisopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG) により組み換えTIAH蛋白質の発現を誘導した。2.5時間培養後の大腸菌を8M Ureaを含む250mlのBinding buffer (5mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.9) に溶解させた。

ニッケル結合後8M Ureaを含むBinding bufferで平衡化した100ml相当のニッケルキレートカラム (Novagen社製) に大腸菌溶菌液を流入し、8M Ureaを含む1リットルのBinding bufferおよび8M Ureaを含む600mlのWash buffer (60mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.9) でカラムを洗浄し、樹脂に吸着しなかった蛋白質を除去した。次に8M Ureaを含むElution

buffer (1M imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.9) を流入し、溶出される蛋白質溶液を5mlずつ20本の試験管に分取した。組換えTIAHが最も多く含まれていた90mlから120mlまでの溶出画分を、活性化済みの透析膜に入れ、4℃一晩の透析中に尿素を段階的に除去することで、蛋白質の立体構造を再構築させた。この組換えTIAHをウサギに免疫して得られる抗血清から、プロテインA-Sepharoseを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりIgGを精製した。

## 2. 2 組換えTIAHのRNAへの結合活性測定

Hybond N<sup>+</sup> (Amersham社製) のナイロンメンブランに1 $\mu$ g/ $\mu$ lのpoly(A)、poly(U)、poly(G)、poly(C)をそれぞれ5 $\mu$ lずつ滴下した。このメンブランを0.05N NaOHを含ませた濾紙2枚の上に置き20分間放置することによりRNAを固定した。2 $\times$ SSC中で1分間振盪しながら洗浄した後、メンブランを80℃で2時間乾燥させた。5%ゼラチンを含むリン酸緩衝液 (80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, 0.1% Tween20, pH7.5) 中で1時間、室温で軽く振盪しながらメンブランをブロッキングした。さらにブロッキング液を除き、メンブランをリン酸緩衝液で2回、トリス緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 10mM EDTA, 1mM DTT) で2回洗浄した。10 $\mu$ lの組換えTIAH試料 (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) を含むリン酸緩衝液にメンブランを浸し25℃で1時間インキュベートした。同緩衝液で2回洗浄後、メンブランを3%ゼラチンおよびTIAH精製抗体1 $\mu$ lを含むリン酸緩衝液10ml中に浸して25℃一晩インキュベートした。リン酸緩衝液で2回洗浄後、3%ゼラチンおよび1 $\mu$ lの二次抗体 (西洋ワサビペルオキシダーゼを付加したヤギ-抗ウサギIgG抗体, Amersham社製) を混合した溶液にメンブランを浸して25℃で1時間インキュベートした。リン酸緩衝液で2回洗浄後、メンブラン上の二次抗体をECLを用いた化学発光により検出した。発光の強さはエックス線フィルム上で検出し、これをもとにNIHimageソフトウェアを用いたコンピューター解析により発光の強さを相対的に比較した。

## 2. 3 組換えTIAHの細胞への導入

*Bombyx mori* 由来BmN4細胞は、最終濃度14% (v/v) のウシ胎児血清 (BRL社製) を添加したESF-921培地で培養・継代した。8 $\mu$ lのLipofectinと92 $\mu$ lの無血清培地 (ESF-921培地) をエッペンドルフチューブ内で混合し、室温で45分間放置した。この混合液20または40 $\mu$ gの組換えTIAHを含む無血清培地100 $\mu$ lをエッペンドルフチューブ内で混合し15分間室温で放置した。TIAH・リポフェクチン混合液を1 $\times$ 10<sup>6</sup>プレート単層細胞を張り付かせたシャーレ内に注入し、室温にて45分間反応させることにより組換えTIAHをBmN4細胞に取り込ませた[9]。反応終了後、最終濃度14% (v/v) のウシ胎児血清を添加したESF-921培地で細胞を2回洗浄し、同培地にて25℃で培養を行った。

## 2. 4 組換えプラスミドを用いたTIAHの細胞内での一過的発現

一過的発現ベクターとしてCuSO<sub>4</sub>により人為的発現誘導が可能なメタロチオネインプロモーターとTIAH cDNAを挿入したプラスミドを構築した[10]。ショウジョウバエで見つかったメタロチオネインの構造遺伝子上流-370から+1サイトまでをTIAH cDNAの上流に連結した。エッペンドルフチューブ内で16 $\mu$ gの組換えプラスミドベクターに対して14 $\mu$ lのリポフェクチンを混合し、全量が40 $\mu$ lとなるように滅菌水を加えた。室温で15分間放置した混合液をプレート内に注入し、25℃で20時間インキュベートを行った。インキュベート後、培地を再度14% (v/v) ウシ胎児血清を含むESF-921培地に置換し、これに最終濃度が0.1mMとなるように滅菌済みのCuSO<sub>4</sub>を加え、引き続き25℃で培養を行った。なお、ここに記した量は一検体当たりを使用する量を示した。また、TIAH cDNAのみをコードし、メタロチオネインプロモーターをその上流域に含まないプラスミドを取り込ませCuSO<sub>4</sub>処理した細胞を対照区とした。

## 2. 5 TUNEL法によるDNA断片化の検定

### 1) DNA断片化細胞の検出

細胞死の検定にはTACS In Situ Apoptosis

Detection Kit (TREVIGEN社製) を使用した。組換えTIAHを取り込ませるか、もしくは組換えプラスミドを用いてTIAHを一過的に発現させた細胞を培養している培地を固定液 (10mM リン酸緩衝液, pH7.0, 3.7%ホルマリン) に置換し、一晚以上4℃で放置した。この細胞を10mM リン酸緩衝液, pH7.0を使用してプレート上で2回洗浄し、次に細胞膜の透過性を高めるためキット添付のCytoPore 10  $\mu$ lを加え、室温で1時間反応させた。このように処理した細胞を滅菌水で2回洗浄し、10  $\mu$ lの2%過酸化水素水を加えて室温で5分間放置した。細胞から2%過酸化水素水を素早く除去した後10  $\mu$ lの1×TdT Labeling Bufferを加えて5分間放置した。さらに溶液を10  $\mu$ lのLabeling Reaction Mix (TdT dNTP Mix 2  $\mu$ l, 50×Cation Stock 2  $\mu$ l, TdT Enzyme 2  $\mu$ l, 1×TdT Labeling Buffer 100  $\mu$ l) に置換し37℃で1時間インキュベートを行った。上述した同じリン酸緩衝液 (pH7.0) で2回洗浄した細胞にStrep-HRP溶液を10  $\mu$ l加え、室温で10分間反応させた。再び滅菌水で2回洗浄した後、5  $\mu$ lのTACS Blue Labelを加え室温にて10分間反応させた後、細胞を観察した。

## 2) 細胞から抽出したDNAの断片化検定

細胞から抽出・精製したDNA (0.9  $\mu$ g/ $\mu$ l) と5  $\mu$ lのキット添付Labeling reaction mix (TdT dNTP Mix 2  $\mu$ l, 50×Cation Stock 2  $\mu$ l, TdT Enzyme 2  $\mu$ l, 1×TdT Labeling Buffer 100  $\mu$ l) をエツペンドルフチューブ内で混合し、37℃で1時間インキュベートした。反応後の溶液の全量をペーパーパンチでくり貫いたHybond N<sup>+</sup> ナイロンメンブラン (Amersham社製) に滴下し、このメンブランを室温で完全に乾燥させた。さらにメンブランを80℃で2時間インキュベートさせた後、滅菌水中で振盪させながら10分間ずつの2回の洗浄を行った。ストレプトアビジン-HRP結合体溶液を加えて室温で10分間反応させたメンブランを、再び滅菌水で同様の洗浄を行い、ECLを用いた化学発光によりスポットの検出を行った。

## 3. 結 果

すでに遺伝子発現解析から、カイコの変態過程の中腸および絹糸腺で起こる幼虫形質細胞の崩壊

にTIAHが重要な役割を持つことが示唆されている[8]。こうした幼虫型細胞の崩壊過程で観察される核の凝縮、クロマチンの断片化、細胞の小体化は細胞死に関連した形態的特徴と類似したものと考えられる[11]。哺乳類でアポトーシスを誘導するとされるTIA-1およびTIARとの間で一次構造的類似性が認められたことから、変態期のカイコ幼虫細胞の崩壊過程においてTIAHが細胞死誘導に関与することが予想される。そこでTIAHの機能とカイコにおける細胞死誘導機構との関連を明らかにするため、TIAHを導入したカイコ培養細胞における生理的变化を、細胞死を指標として調べた。

RRM2領域に重要な機能領域があるため、この領域を含むTIAHの1-855残基部分をコードするcDNAをpET-11aベクターに挿入し、発現誘導を行った。発現蛋白質のC末端には人為的にポリヒスチジン6残基を付加しているため、培養菌体からニッケルキレートカラムクロマトグラフィーにより、アミノ酸配列に相当する分子量31.6K蛋白質を精製した。穏やかな可溶化剤除去により立体構造を再構成させた後、この組換えTIAHとpoly (A)、poly (U)、poly (G) およびpoly (C) との反応について調べた。ナイロンメンブラン上に固定したpoly (A)、poly (U)、poly (G) およびpoly (C) を、トリス緩衝液 (pH8.0) 中で組換えTIAH蛋白質標品と反応させ、RNAに結合したこの蛋白質を、抗TIAH精製抗体を用いて検出した。メンブラン上の組換え蛋白質検出スポットの強さを、相対比較した。その結果 (表1)、poly (A) と結合した組換えTIAHの量がもっとも多く検出された。また、poly (A) へ結合したものに比べ16.6%相当の組換えTIAHがpoly (U) に結合した。一方、poly (G) およびpoly (C) に結合した組換えTIAHはほとんど検出されなかった。それぞれのRNAに結合する蛋白質量比から判断すると、組換えTIAHは、poly (A) およびpoly (U) に特異的に結合しやすく、poly (G)、poly (C) には結合しないことが示された。したがって、組換えTIAHのRNAとの結合には配列認識を伴うことが明らかとなった。この事実は哺乳類のTIA-1およびTIARも同様にpoly (A) およびpoly (U) に強く結合する性質を持つ

表 1 組換えTIAHのRNAへの結合性

	供 試 R N A			
	poly(A)	poly(U)	poly(C)	poly(G)
相対的RNA結合 活性 (最大100)	100	16.6* (±2.11)	0.21 (±0.08)	0.51 (±0.11)

\*: 材料および方法の手順に従い、3回の測定結果の平均と標準偏差。最大値を100とした相対比較。

とされている[5]。したがって本確認実験は、原核生物の系を用いた発現ではあったが、その一次構造から推定される性質および活性を有する組換えTIAH蛋白質が調製できたことを意味している。したがって、これを用いた細胞死誘導効果の調査を行うことは有意義であると判断された。

約 $1 \times 10^6$ の単層BmN4細胞に、 $40 \mu\text{g}$ の組換えTIAHをトランスフェクションにより取り込ませ、 $25^\circ\text{C}$ のインキュベートを続けた。なお、組換えTIAHのかわりに同量のBSAを細胞に取り込ませたものを対照区とし、処理直後に細胞を回収し、 $25^\circ\text{C}$ のインキュベートを行わなかったものを0時間区とした。まず組換えTIAH処理細胞から抽出したDNAに対するTUNEL染色を行い、実験区の染色体の断片化を検証した。組換えTIAHを $40 \mu\text{g}$ および同量のBSAをトランスフェクションにより取り込ませ、1時間後、4時間経過後のDNAには、図1に示すようにTdT処理あるいはStrept-HRP処理を行わない場合に比べ、強いTUNEL反応が認められ、また細胞の培養時間に伴いその反応は強くなった。BSAを用いた場合に比べ、組換えTIAHを取り込ませた細胞のDNAにおいてより強いTUNEL反応が得られた。したがって、組換えTIAH処理後の細胞から抽出したDNAにはTUNEL法で染色される断片化部分が生じていたことが明らかとなった。

顕微鏡の視野に存在する全細胞に対し、TUNEL染色される細胞の占める割合は、図2に示すように、組換えTIAHによる処理後2時間でおおよそ20%となったが、その後の割合の増加は認められなかった。一方、 $20 \mu\text{g}$ の組換えTIAHによる処理を行い、DNA断片化を起こした細胞数を $40 \mu\text{g}$ の処理区のものと比較した。この結果、 $20 \mu\text{g}$

の組換えTIAH処理区では、2時間以上経過してもDNA断片化細胞の割合は3%程度にとどまり、 $40 \mu\text{g}$ 組換えTIAH処理区に比べ低いものとなった。 $40 \mu\text{g}$ の組換えTIAH処理の結果、反応0時間区にも10%程度の割合のDNA断片化細胞が見られた。培養細胞への組換え蛋白質のトランスフェクションには、室温で45分間放置するステップがある。この45分間の放置を終える前にDNA断片化を起こすのに十分な量の組換えTIAHが細胞に取り込まれ、DNA断片化までの細胞内反応が、予想以上に早く進んだことが原因となって、反応0時間区にもDNA断片化細胞が検出されたものと考えられる。

さらに、組換えTIAHを細胞内で一過的に発現させた。単層のBmN4細胞にTIAH発現用の組換えプラスミドをトランスフェクションにより取り込ませ、この細胞を20時間培養した。このプラスミドにはメタロチオネインプロモーターとTIAH(アミノ酸残基番号1-855)とを連結した配列が含まれており、これを取り込んだ細胞は、培地に $0.1\text{mM}$   $\text{CuSO}_4$ 添加により、細胞内でTIAHを一過的に発現する。対照として、メタロチオネインプロモーターを含まず、TIAHの配列のみを持つプラスミドを取り込ませ、同様に $\text{CuSO}_4$ 処理を行った細胞も用意した。図3に示すように、メタロチオネインプロモーター配列を含まない組換えプラスミドを使用した対照区の場合、 $\text{CuSO}_4$ 処理後にDNA断片化細胞はほとんど検出されなかった。これに対し、同じプロモーターによりTIAHを一過的に発現する細胞では、DNA断片化細胞が検出された。また、 $\text{CuSO}_4$ 処理後の時間経過に伴いこの細胞数が増加した(図3)。 $16 \mu\text{g}$ のプラスミドにより一過的にTIAHを発現させた細胞で

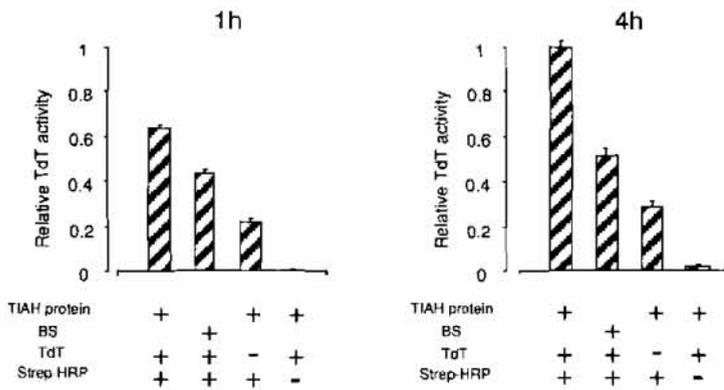


図1 組換えTIAHを取り込んだBmN4細胞のDNA断片化

BmN4細胞に40 $\mu$ gの組換えTIAHを取り込ませ、1 (パネル左) および4時間後 (パネル右) の細胞からDNAを抽出した。このDNAの末端部分を材料および方法に示したTUNEL法により標識、染色した。断片化部分はECL発光として検出され、各区の発光の強さを最大値を1として相対比較した。対照としてTdT処理およびStrep-HRPの処理したものを (+) 処理しなかったものを (-) で示した。

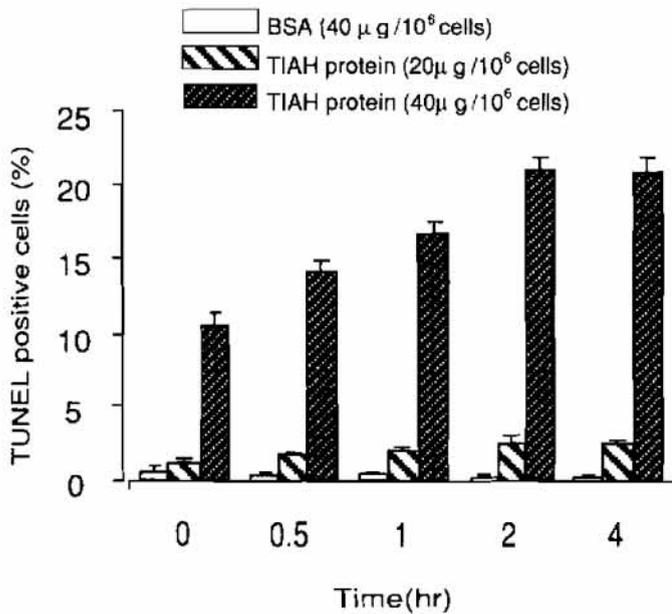


図2 組換えTIAHを取り込んだBmN4細胞における細胞死

BmN4細胞に20および40 $\mu$ gの組換えTIAHを取り込ませ、0、0.5、1、2時間後の細胞におけるTUNEL法陽性細胞割合。横軸には時間経過を、縦軸には3顕微鏡視野の陽性細胞の平均割合と標準偏差を示した。40 $\mu$ gのBSAを取り込ませた細胞の染色結果を対照区とした。

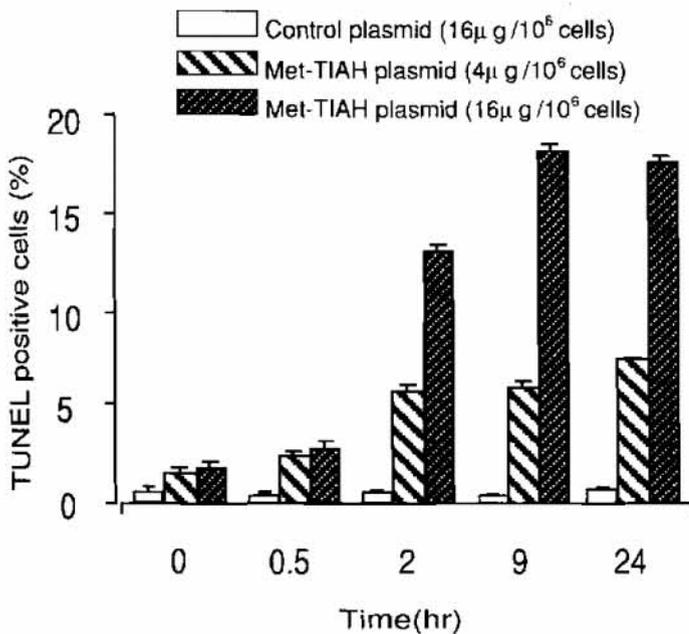


図3 プラスミドによりTIAHを発現する細胞の細胞死

BmN4細胞に図示した量のプラスミドを取り込ませ、0、0.5、1、2、9、24時間後の細胞におけるTUNEL法陽性細胞割合。横軸には時間経過を、縦軸には3顕微鏡視野の陽性細胞の平均割合と標準偏差を示した。

は、CuSO<sub>4</sub>処理後9時間で全細胞のうち20%がDNA断片化を起こしており、このDNA断片化細胞はその後増加しなかった。一方、4 $\mu$ gのプラスミドにより一過的にTIAHを発現させた細胞では、処理後24時間が経過するまでに全体の7%の細胞がDNA断片化を起こしていた。また組換えTIAH 40 $\mu$ gを細胞外より取り込ませた細胞の場合と比較すると、16 $\mu$ gのプラスミドによりTIAHを一過的に発現させた細胞では、DNA断片化細胞の割合が高くなるまでに長時間を要した。

#### 4. 考 察

TIAHを導入した細胞ではその全てに細胞死が起こるわけではなく、検出される死細胞は最大でも約20%程度であった。カイコ胚由来とされるBmN4細胞は多方面で活用されているが、長期にわたる試験管内培養の繰り返しから、染色体の不規則な欠落も見られている[12]。また、培地の中で細胞数を減少させすぎると分裂が止まるという原因不明の性質があるため、細胞の選別、純化が難しいとされてきた。したがって全体の約4/5がTIAH導入による細胞死を起こさない理由として、同一性のある細胞群として見なしているものの、その中にTIAHに対する感受性の異なる複数種の細胞が存在する可能性が挙げられる。この可能性については、BmN4とは異なる培養細胞へのTIAH導入による影響を調べることにより検証されるであろう。

組換えTIAHの取り込みおよびプラスミドによるTIAHの一過的発現が及ぼすBmN4細胞への影響を調べたところ、処理区の細胞にTUNEL法により染色される細胞が観察された。染色される細胞は、DNA断片化が起きたものと判断されるが、形態的には核膜が消失して全体が縮小していく様子が観察された。細胞死過程は、形態および成分変化の特徴から、アポトーシスおよびアポトーシス以外の二つに大別される。カイコと同じ鱗翅目に属するタバコスズメガの羽化直前に観察されるintersegmental muscleの細胞死では、アポトーシスとは異なりポリユビキチンの働きにより活性化した非特異的エステラーゼにより細胞内成分が崩壊するが、DNA断片化、細胞の縮小と小体化を

伴わないことが知られている[13,14]。一方、ショウジョウバエでは胚子器官形成期における頭部陥入過程で、細胞死が起こるとされ、この際にDNA断片化、細胞膜の陥入、blebbing（細胞膜のくびれ）、小体化が観察されている[15,16]。したがって、細胞種および個体によって様々な異なる細胞死機構が存在するものと考えられる。BmN4細胞で検出されたTIAH処理後の変化は、DNA断片化および核膜消失と細胞縮小を伴うことから細胞死ととらえることができ、さらにアポトーシスの機構を有するものであると考えられる。しかし、blebbingと判断できる形態変化は、TIAH導入後の細胞では明確に示すことはできていない。もしblebbingを伴わないものであるならBmN4細胞で見られた細胞死はアポトーシス様の機構を一部持ちながら、細胞膜の変化についてはアポトーシスと全く同じ機構を伴わないものであると推察される。

こうしたTIAH導入により、死に至る細胞数は全体の20%程度であるが、その細胞死に至るまでには長時間を要さないことが示された(図2)。TIAH導入により細胞死に至るまでの最短時間は定かではないが、少なくともトランスフェクション装作に要する45分以内の短い時間であると考えられる。このことは、組換えTIAHが細胞内に取り込まれてからすぐに細胞死を誘導していることを示唆するものである。また、組換えプラスミドを細胞内に取り込ませ、CuSO<sub>4</sub>処理によりTIAHを一過的に発現させた場合においても、TIAH蛋白質の発現が誘導され始める処理後2時間で死に至る細胞数の増加が認められた。したがって両方法の実施後にTIAHの作用が引き起こす速やかな細胞死反応を誘導する細胞内機構が存在すると考えられる。

TIAHの標的については、TIAHの性質をもとに類推し得る。poly(A)RNA結合活性の測定および結合するRNAへの配列認識に関する検討から、組換えTIAHがpoly(A)RNAとpoly(U)RNAに特異的に結合することが判明した(表1)。また、poly(A)に対してpoly(U)の約6倍強くTIAHが結合することも示された(表1)。このようなpoly(A)およびpoly(U)に対して特異結合する性質は、

TIA-1やTIARも有していることが報告されている[4,5]。この性質からTIAHが標的とする物質について以下のことが考えられる。すなわちmRNAのpoly (A) テールを標的とする可能性およびアデニン・ウリジン塩基に富んだmRNAの5', 3'非翻訳領域に結合する可能性が推定される。いずれにしてもTIAHはmRNAを標的とし、mRNAの働きを制御する領域に結合することが推察された。

mRNAに対する相互作用と細胞死誘導との関連については現在全く不明である。最近哺乳類TIA-1には、mRNAの転写後から翻訳にかけての調節に関わるという報告もある[17]。もしTIAHにmRNA配列に特異的な翻訳の調節機能があるとするれば、細胞死に関わる細胞内因子遺伝子に対する翻訳調節が細胞死を引き起こす引き金になることもありうる。昆虫変態期の細胞死には様々な機構が関連すると考えられるが、TIAHの翻訳調節作用を介した細胞死誘導系も一連の複雑な変態プロセスの一経路を担い、重要な役割を果たすものと考えられる。

## 引用文献

- [1] Kobayashi, M., Nakagaki, M., Kawase, S. *J.Scrip.Sci.Japan*, 47, 440 (1978)
- [2] Kobayashi, M., Kawase, S. *Insect Biochem.*, 6, 355 (1976)
- [3] Tian, Q., Streuli, M., Saito, H., Schlossman, S. F., Anderson, P. *Cell*, 67, 629 (1991)
- [4] Kawakami, A., Tian, Q., Duan, X., Streuli, M., Schlossman, S. F., Anderson, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, 8681 (1992)
- [5] Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q., Anderson, P. *J. Biol. Chem.*, 271, 2783 (1996)
- [6] Taupin, J. L., Tian, Q., Kedersha, N., Robertson, M., Anderson, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92, 1629 (1995)
- [7] Brand, S. Bourbon, H. M. *Nucleic Acid Res.*, 21, 3699 (1993)
- [8] Tsuzuki, S., Iwami, M., Sakurai, S. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31, 321, (2001)
- [9] Sells, M., Li, J., Chernoff, J. *Bio.Technique*, 19, 72 (1995)
- [10] Bunch, T. A., Grinblat, Y., Goldstein, L. S. B. *Nucleic Acid Res.*, 16, 1043 (1988)
- [11] 三羽 信比古. 細胞死の生物学—細胞に内臓された自殺プログラム—, 207, 東京書籍(1933)
- [12] 三橋 淳 昆虫の細胞を育てる. サイエンスハウス (1994)
- [13] Schwartz, L. M., Myer, A., Kosz, L., Engelstein, M., Maier, C. *Neuron*, 5, 411, (1990)
- [14] Haas, A. L., Baboshina, O., Williams, B., Schwartz, L. J. *J. Biol. Chem.*, 270, 9407 (1992)
- [15] 木村 賢 . ショウジョウバエのプログラム細胞死, 実験医学, 11, 16 (1993)
- [16] Zakeri, Z. F., Quaglino, D., Latham, T., lockshin, R. A. *FEBSB. J.*, 7, 470 (1993)
- [17] Kedersha, N.L., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., Anderson, P. *J. Cell Biol.*, 151, 1257 (2000)

# 重金属が無菌蚕に及ぼす影響 — 当代投与の重金属類の次代への移行残留濃度 —

増井博之\*

## Influence of Heavy Metals on Germ-free Silkworm Larvae Concentrations of heavy metals carried over from the previous to the next generation

MASUI Hiroyuki\*

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

### Abstract

Germ-free silkworm larvae were reared on an artificial feed to which no heavy metals had been added during a period from the day of hatching through the 4th instar. From the beginning of the 5th instar, the larvae were administered Cd, Zn, or Pb alone, or a combination of Cd and Zn or a combination of Cd and Pb and they were investigated for concentration of excretion of the heavy metals during the larval stage, concentrations of the heavy metals carried over to the pupa and adult after metamorphosis and concentrations of the heavy metals excreted as non-fecal materials. Then the eggs obtained from pairs of these polluted moths were allowed to hatch in aseptic condition, and each individual was reared, mated and allowed to lay eggs in aseptic condition. Concentrations of the heavy metals carried over from the previous generation was determined in each instar. The results follow.

1) Each heavy metal administered during larval stage was found to be excreted in high concentration in feces. In addition to feces, the heavy metals were also excreted as exuvium of the larva, cocoon, exuvium of the pupa, meconium and egg shell. It was also found that high concentration of the administered heavy metals was carried over to the pupa and adult after metamorphosis.

2) When the eggs obtained from these heavy metal-polluted moths were allowed to hatch in aseptic condition, the hatching rate of the eggs was high, and the subsequent growth was also good. These results indicates that concentrations of the heavy metals carried over from the first generation to the next generation was not so large as to give harmful effect on the hatching of the eggs and growth of the larvae of the second generation.

### まえがき

著者は重金属を生体に対する働きの上で、汚染金属群(Cd, Pb, Hg, As, Be, Sn), 必須金属群(Zn, Co, Mo, Fe, Cu, Mn, Cr) および随伴金属群(Ni, Al, V, Sr, Ti) の3群に大別し、このうちCd, Zn, Pb, CoおよびNiの5種類を取り上げ、無菌蚕に投与した場合の許容限界量, LD50および100%致死量。また、重金属の生体内各組織・器官別の分布量と毒性の関係について明らかにした(松原ら, 1975, 1978, 1982, 増井・松原, 1983, 1984a, 1984b)。

本研究は幼虫期にCd, ZnおよびPbを単独にあるいは混合投与した場合、これら重金属の糞および糞以外からの排泄量、変態後の蛹、成虫への移行残留濃度、さらに前代より次代蚕への移行残留濃度について明らかにした。

### 供試材料および実験方法

供試蚕品種として郡光×万里を用いた。供試薬品としてはCdCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>およびPbCl<sub>2</sub>を使用し

\*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

Table 1. Concentrations of Cd excreted and carried over to the pupa and adult<sup>1)</sup>

	Feces	Exuvium of larvae	Cocoon	Pupa	Exuvium of pupa	Adult	Meconium <sup>2)</sup>	Egg shell
control	0.0	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cd	36.6	141.3	0.22	135.0	0.0	216.6	1.9	4.7
Cd·Zn	52.3	115.9	0.20	121.2	7.6	165.8	0.5	1.2
Cd·Pb	43.2	172.1	0.22	124.0	34.6	178.5	0.0	3.1

1) The values ( $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight) were obtained only for single determinations of the pooled materials.

2)  $\mu\text{g} / \text{ml}$

The larvae were reared aseptically on an artificial diet ( without addition of Cd ,Cd·Zn and Cd·Pb ) from hatching to the 4th instar. The controls were continuously fed on the same diet, while the metal-administered larvae were fed with metal-containing diet from the 5th instar only for 5 days.

Table 2. Concentrations of Zn excreted and carried over to the pupa and adult<sup>1)</sup>

	Feces	Exuvium of larvae	Cocoon	Pupa	Exuvium of pupa	Adult	Meconium <sup>2)</sup>	Egg shell
control	135.3	45.0	0.00	391.8	104.2	574.1	12.5	27.4
Zn	318.6	447.1	1.33	688.0	258.8	315.8	51.0	42.2
Cd·Zn	319.8	548.1	0.00	667.6	144.6	759.9	79.0	15.5

1) The values ( $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight) were obtained as shown in Table 1.

2)  $\mu\text{g} / \text{ml}$

The larvae were reared as shown in table 1.

対照の無投与区では排糞中のZn量は135.3  $\mu\text{g}$ , 蛹 391.2  $\mu\text{g}$ , 成虫は574.1  $\mu\text{g}$ 認められた。Zn単独およびCd·Zn 混合投与区の排糞中のZn量は対照と比べて多く, それぞれ318.6 および319.8  $\mu\text{g}$ 認められ, 排出量は両者で殆ど差異を認めなかった。また蛹では667 ~ 688  $\mu\text{g}$ とほぼ等量検出されたが, 成虫ではZn単独投与で315.8  $\mu\text{g}$ , Cd·Zn混合投与区で759.9  $\mu\text{g}$ と混合投与区が多かった。糞以外からの排出については幼虫の脱皮殻でZn単独投与で447.1  $\mu\text{g}$ , Cd·Zn 混合投与区で548.1  $\mu\text{g}$ と対照区の10倍以上の排出が認められた。その他蛹の脱皮殻で1.4 ~ 2.5 倍, 蛾尿で4.0 ~ 6.3 倍と増加したが, 卵殻ではCd·Pb 混合投与区で減少した。

Pbを単独およびCd·Pb を混合して, 5 齢期に投与した場合の幼虫期の排泄量, 蛹・成虫への移行残留濃度および糞以外からの排泄量については Table 3 に示した。

無投与区の糞中のPb量は47.8  $\mu\text{g}$ であるのに対し, Pb単独およびCd·Pb 混合投与区ではPbの排出量は多く, 両者ではほぼ等量の約542 ~ 550  $\mu\text{g}$ 認められた。蛹, 成虫におけるPb量については対照でそれぞれ18.5  $\mu\text{g}$ および14.3  $\mu\text{g}$ 認められた。Pb単独投与では蛹で19.0  $\mu\text{g}$ , 成虫で15.5  $\mu\text{g}$  検出され, Cd·Pb 混合投与では蛹で19.6  $\mu\text{g}$ で, 成虫ではやや多く18.0  $\mu\text{g}$ であった。蛹および成虫へ

Table 3. Concentrations of Pb excreted and carried over to the pupa and adult<sup>1)</sup>

	Feces	Exuvium of larvae	Cocoon	Pupa	Exuvium of pupa	Adult	Meconium <sup>2)</sup>	Egg shell
control	47.8	4.0	0.00	18.5	27.6	14.3	4.2	22.5
Zn	551.5	69.4	0.55	19.0	20.3	15.5	4.1	43.2
Cd·Zn	542.2	58.5	0.08	19.6	20.8	18.0	7.1	341.6

1) The values ( $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight) were obtained as shown in Table 1.

2)  $\mu\text{g} / \text{ml}$

The larvae were reared as shown in table 1.

の移行残留濃度はCd,Znと比較して少なかった。糞以外からの排泄については、幼虫の脱皮殻でPb単独投与で69.4  $\mu\text{g}$ , Cd・Pb混合投与で58.5  $\mu\text{g}$ と多かったが、蛹の脱皮殻では両区とも逆に減少した。その他繭、蛾尿および卵殻中のPb量は単独および混合投与のいずれにおいても対照区と比べて僅かに増加したが、Cd・Pb混合投与区の卵殻中のPb量は多かった。

昆虫の重金属の排泄に関しては、ハバチでCu, Fe, NiおよびCdについて食物、糞、雌の成虫および繭中の分布量が調べられ、糞以外からも僅かに排泄されていることが報告されている(Heliövaara et al, 1990a)。

無菌蚕においても幼虫期に投与された重金属は糞より多量に排出され、更に幼虫から成虫にいたる変態の過程で脱皮殻、幼虫あるいは成虫の排尿中、繭および産卵後の卵殻など糞以外からも僅かに排出された。幼虫から変態後の蛹や成虫への移行残留については、Cd, Znでは多量に認められたが、Pbでは殆ど認めなかった。

## ②幼虫期に投与した重金属の次代蚕への移行残留濃度

5齢期に投与したCd,Zn,Pbは単独および混合投与のいずれの場合も蛹や成虫へ大量に移行残留した。そしてCd・Zn混合投与区では異常蛹や成虫は殆ど認められないが、Cd単独およびCd・Pb混合投与区では異常蛹や成虫が多発した。生殖能力や産卵数は重金属によって影響されることがハバチで報告(Heliövaara et al, 1990b)されているが、

無菌カイコにおいても同様のことが観察された。そこで各区とも生き残ったこれら成虫を交配し、産下卵を無作為に10蛾分を採種し混合後、1蛾分の卵を使用し、無菌孵化させ、各区別に重金属無添加の人工飼料で全齢無菌飼育した場合の蚕の発育およびCd,Zn,Pbの前代よりの移行残留濃度を各齢別で調べた。

先ずCdの前代よりの移行残留濃度については、Cd単独、Cd・ZnおよびCd・Pb混合投与区において卵殻には僅かにCdは認められたが、蟻蚕から5齢までの各齢の起蚕のCd濃度についてはいずれも測定限界値以下であったので表に示さなかった。

ZnについてはTable 4に示したように、蟻蚕体内で多く認められたが、さらに2齢、3齢と発育に伴ってZn濃度は減少したが、対照区と投与区では差異は認めなかった。5齢幼虫では対照区で投与区より多く検出されたが理由は不明である。

Akao(1939)は桑葉育の場合の蟻蚕から5齢までの発育に伴う蚕体無機元素の消長を調べているが、Zn量は齢が進むに従って、相対的に減少することを報告している。人工飼料中にも蚕の成育に不可欠とされるZn(堀江ら, 1967)は多量含まれている(松原ら, 1986, 増井ら1986)が、桑葉育の場合と同じ結果を示した。

PbについてはTable 5に示したように、蟻蚕において対照区とPb単独投与区との間には有意差がなかったのに対し、Cd・Pb混合投与区においては明らかに差が認められた。その後、3齢、4齢および5齢と齢が進むにつれ対照区と差異が認め

られなくなった。なお発育経過は各区とも良好で、  
対照区と変わらず死蚕および異常蚕を全く認めなかつたので表には示さなかつた。

Table 4. Concentrations of the transported Zn to the next generation  
of the Zn-administered silkworm<sup>1)</sup>

	1st instar	2nd instar	3rd instar	4th instar	5th instar
control	573±100	266±64	243±40	155±8.2	118±11.9*
Zn	540±59	214±56	210±21	158±7.0	105±8.5
Cd·Zn	519±95	214±47	208±17	142±8.7	111±19.8

1) The values ( $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight) were expressed as means±SD of three determinations for pooled dry larvae.

\* : Significant difference at 5 % level.

The larvae were reared aseptically on an artificial diet ( without addition of metal) from hatching to the 5th instar.

Table 5. Concentrations of the transported Pb to the next generation  
of the Pb-administered silkworm<sup>1)</sup>

	1st instar	2nd instar	3rd instar	4th instar	5th instar
control	104±23.0	43.0±7.39	26.8±12.76	17.4±4.11	11.7±2.88
Pb	115±24.7	37.3±7.79	21.9±7.86	14.6±2.32	8.5±2.15
Cd·Zn	682±134**	55.7±8.90	28.3±6.47	14.8±2.13	8.3±1.34

1) The values ( $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight) were expressed as shown in Table 4.

\*\* : Significant difference at 1 % level.

The larvae were reared as shown in table 4.

当代投与の薬剤が次代蚕の孵化に及ぼす影響については山野井 (1981) が有機リン殺虫剤 M P P, E P N 投与の孵化への影響は幼虫期では 5 齢後期, 5 齢中期および 5 齢前期の順であること, また孵化阻害 50% を引き起こす薬量は 5 齢後期に投与した場合, 1 頭あたり M P P は致死量の約 1/16, E P N は約 1/3 であることを報告している。本実験での各区の孵化率は 93% 以上で対照区と同じ傾向であり, 重金属の場合, 5 齢期間に投与した Cd (80ppm), Zn, Pb (250ppm) 単独および Cd·Zn, Cd·Pb (80·250ppm) 混合の濃度では孵化に影響を及ぼさないようである。

また蚕に対する薬剤の累代投与が後代の各形質に及ぼす影響について蒲生・広部 (1977) は M E P, 酢酸フェニール水銀, 山野井 (1984) は M P P, M A F A, D P T H およびヒ酸鉛で調べているが,

対照区と投与区間に有意な差は認めていない。本実験ではこれら薬剤とは作用機構の異なる重金属を用い, 次代蚕への移行残留量および発育に及ぼす影響を調べたが, 各齢とも対照区と投与区間に顕著な差異が認められなかつた。

以上のように 5 齢期に重金属を単独および混合投与した場合, 変態後の蛹・成虫には大量に移行残留したが, 無菌継代した次代蚕への重金属の移行残留濃度は孵化や発育に害作用を及ぼす量にいたらなかつた。

## 引用文献

1. Akao, A., "Beitrage zum Wachstumsphanomen des Seidenspinners. Die verschiedenen aufbauenden und katalytischen Element und deren bio-

- logische Bedeutung während des Wachstums", J. Biochem., 30,303 - 349, 1939.
2. 蒲生卓磨・広部達道, 「カイコの遺伝形質に及ぼす農薬の累代投与の影響」応動昆, 21, 47-49, 1977.
  3. 堀江保宏・渡辺喜二郎・伊藤智夫, 「家蚕の栄養に関する研究 X III カリウム, 燐, マグネシウムおよび亜鉛の量的要求について」蚕試報, 22(2), 181-193, 1967.
  4. Kari Heliövaara and Rauno Vaisanen: Concentrations of Heavy Metals in the Food, Faeces, Adults, and Cocoons of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera, Diprionidae), Bull. Environ. Contam. Toxicol, 45, 13-18, 1990a.
  5. Kari Heliövaara, Rauno Vaisanen and Martti Varama: Fecundity and viability in relation to female body size in *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera Diprionidae), Holarctic Eco-logy, 13, 166-172, Copenhagen 1990b.
  6. 増井博之・松原藤好, 「コバルトおよびニッケルが無菌蚕に及ぼす影響」日蚕雑, 52(5), 425-431, 1983.
  7. 増井博之・松原藤好, 「無菌蚕に添食したコバルトの体内分布と消長」日蚕雑, 53(3), 222-225, 1984a.
  8. 増井博之・松原藤好, 「ニッケルの蚕体内各組織・器官別分布量, 排泄量および蛹中の量」日蚕雑, 53(4), 331-334, 1984b.
  9. 増井博之・鈴木和夫・松原藤好, 「無菌蚕に EDTA を投与した場合の蚕体内各組織・器官別無機元素の分布量」日蚕雑, 55(1)23-27, 1986.
  10. 松原藤好・加藤勝・林屋慶三・児玉礼次郎・浜村保次, 「人工飼料による家蚕の無菌飼育」日蚕雑, 36, 39-44, 1967.
  11. 松原藤好, 「無菌飼育法」浜村保次(編), カイコの人工飼料への道, みすず書房, 135-165, 1975.
  12. 松原藤好・増井博之・桑原秀樹, 「重金属が無菌蚕に及ぼす影響(II) カドミウム毒性に及ぼす亜鉛, 鉛の影響」京工繊大, 繊維学術報, 8, 25-32, 1975.
  13. 松原藤好・増井博之・吉田一夫, 「重金属が無菌蚕に及ぼす影響(III) 無菌カイコへのカドミウム取り込みに及ぼす亜鉛, 鉛の影響」京工繊大, 繊維学術報, 8, 46-53, 1978.
  14. 松原藤好・中山康弘・増井博之, 「重金属が無菌蚕に及ぼす影響(IV) Cd および EDTA の毒性」生物環境調節, 19(4), 115-120, 1981.
  15. 松原藤好・増井博之・鈴木和夫, 「人工飼料による無菌飼育蚕の生体内各組織・器官別無機元素の分布量」日蚕雑, 55(1), 5-9, 1986.
  16. 山野井文夫, 「カイコに対する殺虫剤の投与が後代に及ぼす影響 III 産下卵の孵化に影響を及ぼす有機リン殺虫剤の投与時期並びに薬量」日蚕雑, 50(4), 282-287, 1981.
  17. 山野井文夫, 「カイコに対する農薬投与が投与世代並びに後代の実用形質に及ぼす影響」日蚕雑, 53(4), 292-298, 1984.

# ドレープ図を用いた簡易風合測定法と風合より 布の物理量を推測するニューラルネットワーク に関する研究

岡本次郎\*・弓削 治\*\*・西村太良†

## A Study of a Simple Measurement System of HE-values of Fabrics Using Drapage Figures and a Neural Network to Estimate Physical Values of Fabrics from HE-values

OKAMOTO Jiro\*, YUGE Osamu\*\*, NISIMURA Taro†

\* Professor, Faculty of Engineering, Osaka City University

\*\* Emeritus Professor, Faculty of Human Life Science, Osaka City University,  
Sugimoto 3-3-138, Sumiyoshi-ku Osaka Japan

† Professor, Cooperative Research Center, Kyoto Institute of Technology,  
Matsugasaki Sakyo-ku Kyoto Japan

### Abstract

The Hand Evaluation (HE) values of fabrics are usually evaluated by the KES system, which needs the measurements of as many as 16 kinds of physical values of fabrics and then they must be substituted to the linear equations to obtain HE values. In comparison with this, this report describes a new easy method to obtain HE values without using KES system. At first a drapage image of a circular cut fabric is measured by video camera, and then automatically the image is processed to obtain the principal components of its outline and finally the components are added into a neural network to get the HE values.

On the contrary we mention about the method to obtain the physical values, the fabric of which has the desired characteristics, and furthermore prove its possibility experimentally. The proposed method might be useful for fabricating fabrics in the near future.

Key Words : Hand Evaluation, Fabrics, Neural Network, Drapage, KES system

## 1 まえがき

現在、布の特性を表すのに“風合あるいはHE (Hand Evaluation)”という言葉を用いており、これは布の特性を表すのに非常に有用であり、かつ重要な評価量になっている。風合に関する研究は1972年の当時京都大学助教授であった川端季雄博士が委員長となり、“風合い計量と規格化研究委員会”の発足を始めとする [1, 2]。当委員会において初めて風合いの規格化が行われた。表1は当委員会において採択された風合の定義である。それまでは布の評価はエキスパートの間でも共通の概念や明確な定義もない状態であったとこの報

告書は述べている。

1975年と1980年に当委員会はそれまでに得られた研究成果を“風合い評価の標準化と解析”という研究報告書にまとめて、標準試料集 [1, 2] として発刊している。ここで決められた風合の概念は現在一般的に用いられている風合の定義となり、そこに書かれている物理量より風合を求める方法は、KESシステムとして繊維産業方面で一般的に定着した風合測定法となり、その資料集は業界や学界において風合に関するバイブル的存在となっている。

KESシステムは風合を精度良く表すことができるが、6ブロックからなる16もの物理量 (表2参

\*\* 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

照)を専用の測定器を用いて求め、それを数式に当てはめていちいち風合値を求める必要があり、大変面倒な方法である。

筆者らはこれに代わる簡易な風合測定法として、布のドレープの形状に注目した新しい風合測定法の開発を試みた。布の多くの性質は、摩擦係数などの測定に直接布の接触を必要とする物理量を除き、ほとんどの性質が布のドレープの形状に表れるものと考えられる。例えば、硬い布の場合、ドレープ形状は直接的で凹凸が少なく、一方、やわ

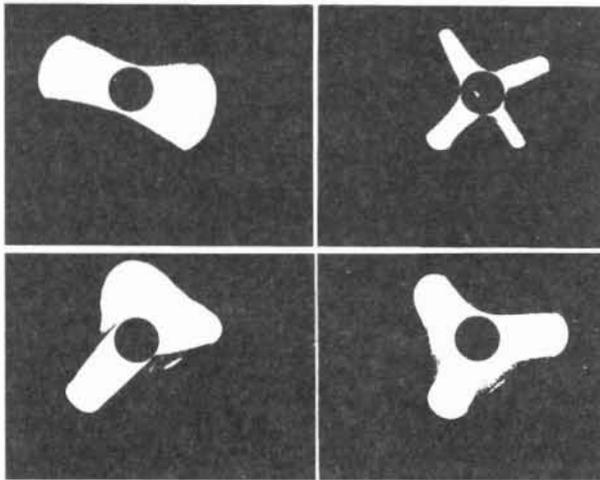


図1 Examples of drape figures

らかい布の場合、曲線的で凹凸が多くなる(図1参照)。従って、ドレープの形状を分析することによって、簡易に布の風合値が求められるものと考えられる。

布のドレープの形状は色々考えられるが、我々は最もオーソドックスな方法として円形に切り抜かれた布をその半径より幾分小さ目の円盤の上に自然に置き、そこに出来るドレープ形状を風合を推定する対象図形として採用することにした。図

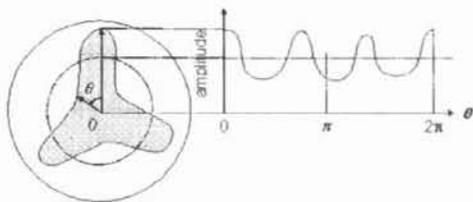


図2 A drape and its drape function

1がその例である。一般的にこれはドレープ図と呼ばれ、布の特性を表すドレープ係数を求めるのに用いられている。その際、円形布の直径は25.4 cm、支持台直径は12.7cmと一応規格化されているが、本実験においては布の直径を20cm、支持台直径を5 cmとした。

円形布の直径と風合との関連性を見る場合には布の種類を見て直径を決めるのがよい、といわれている[3]。本実験を始めるに際し、本実験で用いた布の直径と、ドレープ係数を求める際の布の直径や支持台の大きさを規格値と同一にするということは考慮に入れていなかったが、文献[4]によると布の半径はほとんどドレープ係数に影響を与えないようであるから、この半径の違いは、たとえドレープ係数との比較の問題が起きたとしても、ほとんど問題にならないであろう。

ドレープに関するその他の研究としては文献[5, 6, 7, 8, 9, 25]や[10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17]などが挙げられる。

ドレープ形状を上方(または下方)より測定した際の周辺の輪郭を連ねた形を本研究においては新たにドレープ図と名づける。また、ドレープ図の中心より輪郭までの長さを高さとして、高さの最も高い位置を原点に取り、中心より半径方向に直線を引き、直線の原点より回転角を $\theta$ とし、 $\theta$ を横軸に取って、直角座標に高さをプロットすると、図2のような波形を得る。これは $\theta$ の関数であり、以後、図の右側に示す関数をドレープ関数と呼ぶことにする。

ドレープ関数は $2\pi$ を周期とする周期関数であり、実際上は $\Delta\theta$ 毎にサンプリングされた一周期の値で表わす。多数の布試料に対してサンプリングされた値の集合を考えると、以下の章で述べるように、サンプル化されたドレープ関数のフーリエ変換スペクトルはサンプル集合の主成分になっている[5]。従って、布のドレープ波形に対する主成分はドレープ関数のスペクトルによって表されることになる。スペクトルは主成分であり、各成分は数学的に完全に独立した成分になっている。これはスペクトルの直交性に依存する。従って、この独立した主成分を用いて布の風合いを求めるのが効率的である。

表 1: Definitions of HE

no.	Japanese	English	HE Definition
1	KOSHI	Stiffness	A feeling related with bending stiffness. Springy property promotes this feeling. The fabric having compact weaving density and woven by springy and elastic yarn makes this feeling strong.
2	HARI	Anti-drape stiffness	Anti-drape stiffness, no matter whether the fabric is springy or not.
3	FUKURAMI	Fullness and softness	A feeling comes from bulky, rich and well formed feeling. Springy property in compression and thickness accompanied with warm feeling are closely related with this feeling.
4	SHARI	Crispness	A feeling comes from crisp and round surface of fabric. This feeling is brought by hard and strongly twisted yarn. This feeling brings us a cool feeling.
5	KISHIMI	Scrooping feeling	Scrooping feeling. A kind of silk fabric possesses this feeling strongly.

表 2: The physical values used for KES system

Block	Mechanical property	<i>i</i>	<i>Symbols</i>
1	Tensile property	1	<i>LT</i> (Linearity)
		2	$\log WT$ (Tensile energy)
		3	<i>RT</i> (Resilience)
2	Bending property	4	$\log B$ (Bending rigidity)
		5	$\log 2HB$ (Hysteresis)
3	Shearing property	6	$\log G$ (Shear Stiffness)
		7	$\log 2HG$ (Hysteresis)
		8	$\log 2HG5$ (Hysteresis)
4	Compressional property	9	<i>LC</i> (Linearity)
		10	$\log WC$ (Compressional energy)
		11	<i>RC</i> (Resilience)
5	Surface property	12	<i>MIU</i> (Coefficient of friction)
		13	$\log MMD$ (Mean deviation of MIU)
		14	$\log SMD$ (Geometrical roughness)
6	Weight and thickness	15	$\log T$ (Thickness at $0.5gf/cm^2$ )
		16	$\log W$ (Weight per unit area)

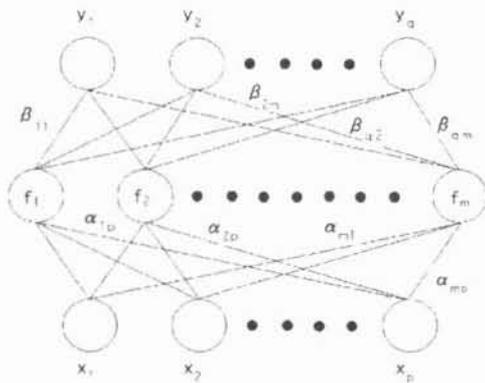


図3 An example of 3layer Neural Network

人工知能の研究において有名な脳のモデルとしてパーセプトロンが挙げられる。現在、パーセプトロンは別名ニューラルネットワーク (NN) とも呼ばれ、学習機能を持った並列情報処理回路網として注目され研究されている。並列情報処理回路網と言うのは時間的に逐次的に情報を処理する現在普及している、いわゆるノイマン型のコンピュータに対して用いられる言葉であり、並列的に情報を高速に処理できることにより、未来型のコンピュータ方式として注目されている方式である。このネットワークは  $N$  個の入力と  $M$  個の出力を持つ多層の並列処理回路網であり、一例として 3 層の場合を図 3 に示した。図において、下端が入力層であり、上端が出力層である。入力層と出力層との間の層を中間層と言ひ中間層の中の加算素子をユニットと呼ぶ。中間層や加算ユニット数が多ければ多くなるほど、この回路網に多様な機能を持たせることができる [18]。

コルモゴロフと舟橋は  $N$  入力よりなる 3 層のニューラルネットワークで任意の  $N$  変数関数を実現できることを証明した [19, 20]。しかし、両者共その具体的な実現方法については述べておらず、その方法は未だ確立されていないが、ラメルハートらにより発表されたバックプロパゲーション法 (BP法) という、いわゆる最急降下法により、回路網の係数を学習的に任意関数に収束させることができることが実験的に証明されている [18]。しかし、この方法もローカルミニマムという局所最小点にトラップされ、任意の関数を実現できない場合があるという欠点を持っている。しかし、この一つの解決策として中間ユニット数を増やす

とか、乱数を係数に加えるとかにより、実質的にはこの欠点を克服することができる [18, 19]。

布の特性を表すドレープ波形が布の 16 種類の物理量を表すことが仮定できるなら、物理量をいちいち測定することなく、ドレープ関数のスペクトルである主成分を入力として、5 つの風合値を出力とするニューラルネットワークを実現することが可能であると考えられる。なぜなら、風合値は 16 種の物理量の関数であるからである。

以上の仮定の下に、物理量と風合値との関係を NN に BP 法で学習させた結果、非常に近似度の高い風合値を得ることができた。将来、摩擦係数などドレープ波形に現れ難いデータを別に計測し、NN の補助入力として加えることにより、さらに近似度の高い風合値を得ることが可能になるであろう。

上述の物理量より風合値を求めることは逆に、風合値より物理量を求めることも重要である。なぜなら、希望する風合値を持った布を製造するには、布にどのような物理的特性を持たせれば良いかを知る必要がある。この風合値より布の物理量を求める方式を更に拡張して、布の物理量より、それを構成する糸や繊維の物理量を推測することも、ニューラルネットワークを用いて可能であると考えられる。すなわち、希望する風合を持った布を織るために必要な繊維の特性まで推測することができよう。このことは繊維産業にとって大いに役立つことと思われる。

風合値より物理量を求めることは、 $N$  元一次連立方程式を解くことと等価である。したがって、その方法として一般逆行列 (疑似逆行列) を用いることが考えられるが、一般逆行列は連立方程式の一般解の中で、ノルム最小のものを選択することになる。しかし、ノルム最小の解が物理的な意味を持った解を与えるわけではなく、風合値と物理量とが非常に強い相関のある本研究のような場合に対しては、返って悪い結果をもたらす。すなわち、ノルム最小の解は与えられた風合値に対する解として物理的に、何ら意味を持たない解を与えるのである。このことは、工学的に連立方程式の解と一般逆行列の解の意味を考える上で貴重な示唆を与えるであろう。

一般的に統計的に強い相関関係のある2つのベクトル集合間の相互関係を、学習機能のあるニューラルネットワークに、入力ベクトルに対する出力ベクトルの関係として学習的に覚えさせることは簡単である。本研究の場合、ベクトルとしては16種の物理量および5種の風合値が相当する。本実験は風合値と物理量とが強い相関関係があるので、ニューラルネットワークを用いて物理量より風合値、あるいは逆に風合値より物理量を求める試みをしていることになる。本研究は始まったばかりであり、今後の研究成果を待たねばならないが、一応の初期的成果を得ており、風合値と物理量とを相互に関連付ける簡易推測システムとして、将来有望と考えている。

## 2 ドレープ関数と風合値

布が自重によって垂れ下がるときにできる自然な3次元形状を一般にドレープと言っているが、本研究においてはもっと狭い意味で用いている。即ち、円形に切られた布をそれより小さい直径の円盤に載せて垂れ下がらせ、それを真上（回り込みのある場合真下）から観測して得られる2次元状の布の波状の輪郭をドレープと言っている。ドレープのひだのし易さを問題にするときには、しばしばドレープ性という言葉が用いられる。このドレープ性は布の物理的特性を表すものとして、これまでに多くの研究がなされて来ている（前節参照）。

最も基本的なドレープ性を表すものとしてHamburgerのドレープ係数 $F_H$ がある[3]。 $F_H$ は布を地面に水平投影した図形(図4)より、次式によって求められる値である。

$$F_H(\%) = \frac{A_s - A_d}{A_0 - A_d} \times 100 \quad (1)$$

ここに、 $A_0$ は資料の面積、 $A_d$ は支持台の面積、 $A_s$ は投影されたドレープ図の面積である。このドレープ係数は一般には値が小さいほどドレープ性に優れていると言われている。簡単に言えば、ひだが多いほど $A_s$ が小さくなり、それに伴いドレープ係数が小さくなる理屈である。

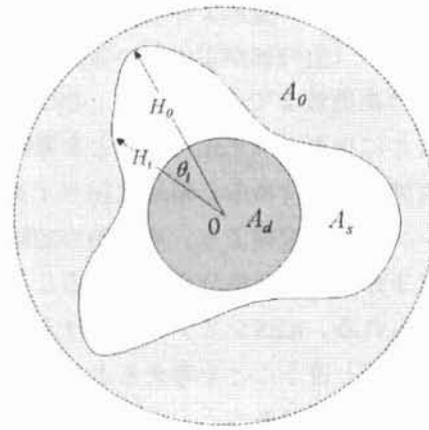


図4 A figure for drape outline and drape coefficient

ドレープは布の風合にかかわるほとんど全ての特性、例えば、“こし”、“はり”、“ふくらみ”、“しゃり”そして“きしみ”に関係しているものと考えられる。この代表的な5つの風合に対する定義は既に表1に示しておいた。

我々はドレープの形状を解析することにより、風合に関する物理量を推測できるものと考えた。そして、雲形状のドレープ形状の解析をし易くするために、図2に示すように、ドレープ形状を直角座標に変換し、それをサンプリングしたデータより主成分を求め、それをニューラルネットワークの入力として物理量を求める。

図2のドレープ波形を解析するにあたり、波高の最も高い点を原点に選んだ。図4において、 $H_0$ が原点に当たり、 $H_1$ が角 $\theta_1$ における振幅に相当する。ドレープ波形は $\theta$ をラジアンで表すと $2\pi$ を周期とする周期波形となるが、本研究においてはその1周期分を解析の対象とした。

この波形をサンプリングするに際し、サンプリング点は何点必要となるかが問題となる。サンプリング定理によると、この波形をフーリエ変換したときの帯域幅の倍の頻度でサンプリングすれば完全に元の波形が再現できると述べているから、有効な帯域幅の2倍のサンプル点数で十二分であると云える。ドレープ波形の山の数が3から4サイクルであることを考えると、基本周期は高々4サイクルと考えればよく、その4倍の高調波までを取り込めば全電力スペクトルのほぼ100%を含ませることが出来ることになる(図1参照)。

例えば、ドレープ波形よりも高調波成分を多く含む三角波の（山の形が尖っている）場合でさえも、4倍の高調波までを含めると、99.7%の電力を含むことになる。以上述べたことを考慮して、4倍の高調波まで含めると帯域は16サイクルとなり、サンプリング定理より、その倍の32個のサンプル数で十分に必要な成分を含ませることができると考えられる。KESシステムにおける必要な物質が16種類と言うことを考えると、32のサンプル数は十二分な数であろう。

また、この32と言う数は都合の良いことに、2の5乗であり高速フーリエ変換（FFT）が可能な2のべき乗という条件を満足している。従って、我々はドレープ波形を32点のサンプリングをしたデータを用いて風合いの解析を進めることにした。

### 2.1 主成分分析

ドレープ波形のサンプル点を  $x_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$  : 本実験の場合、 $n = 32$ ) とする。この値は測定時の誤差や測定条件の違いを考慮に入れると確率変数と見なすことができる。この変数には布の種類の違いなどによる物理量の影響が混在している。そこで  $x_i$  より互に無相関なサンプル数  $n$  より少ない  $m$  個の変量  $y_i$  ( $i = 1, 2, \dots, m, m \leq n$ ) (主成分) を抽出し、それを風合を求めるニューラルネットワークの入力に使う。この数をしぼった理由は入力を少ない数の無相関な値に絞ることによって冗長な入力を除去し、効率よく風合を求めようという考えに基づく。

まず、 $X = (x_1, x_2, \dots, x_n)^t$  を  $n$  変量分布とする。ここに、 $t$  は行列の転置を意味する。 $\Sigma$  を  $X$  の共分散行列  $E\{XX^t\}$  とする ( $E\{*\}$  は  $*$  の平均値を表わす)。 $\lambda_i$  を  $\Sigma$  の固有値 ( $n$  個) とする。このとき、共分散行列が対称行列になることより、固有値は否負実数となり、大きいものから小さいものへ順に、 $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_n \geq 0$  のように並べることができる。 $\gamma_i$  を  $\lambda_i$  に対する固有ベクトルとし、 $\|\gamma_i\| = 1$  と正規化しておく。この正規化は固有値が任意の倍数値を取り得ることにより、常に可能である。ここに、ノルムはユークリッドノルムとする [21]。

次に、主成分分析について、簡単に説明する。

第1主成分とは、変量  $y_i$  の内でその自乗平均値を最大にするものを指す。第  $i$  主成分も同様に、 $i$  番目に大きい変量を指す。 $x_i$  より成る、 $n$  変量分布より取り出した新しい変量である第1主成分を  $y_1$  とし、それを  $n$  個の  $x_i$  の線形な和として表す。即ち、

$$y_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n = \alpha_1^t X \quad (2)$$

$$\alpha_1 = (a_{11}, a_{12}, \dots, a_{1n})^t \quad (3)$$

と置き、 $E\{y_1^2\}$  を最大にする  $\alpha_1$  を求める。

$\|\alpha_1\|^2 = a_1^t \alpha_1 = a_1$  ( $a_1$  は任意の実定数) という条件の元に解くため、ラグランジュの未定係数法を用いる。

$$\Phi(\alpha_1) = E\{y_1^2\} - \lambda(\|\alpha_1\|^2 - a_1) \quad (4)$$

$$= \alpha_1^t \Sigma \alpha_1 - \lambda(\alpha_1^t \alpha_1 - a_1) \quad (5)$$

$$\partial \Phi / \partial \alpha_1 = 2 \Sigma \alpha_1 - 2 \lambda \alpha_1 = 0 \quad (6)$$

$$\alpha_1 \neq 0 \quad (7)$$

より、

$$\Sigma \alpha_1 = \lambda \alpha_1 \quad (8)$$

を得る。従って、上式より  $E\{y_1^2\}$  を最大にする  $\alpha_1$  は  $\Sigma$  の固有ベクトルであり、 $\lambda$  はそれに対する固有値  $\lambda_1$  となる。

最大固有値  $\lambda_1$  に対する固有ベクトルは  $\gamma_1$  となるから、 $\alpha_1 = \gamma_1$  のときが第1主成分となり、 $E\{y_1^2\}$  の値は

$$E\{y_1^2\} = \alpha_1^t \Sigma \alpha_1 \quad (9)$$

$$= \gamma_1^t \lambda_1 \gamma_1 \quad (10)$$

$$= \lambda_1 \|\gamma_1\|^2 \quad (11)$$

$$= \lambda_1 \quad (12)$$

となり、最大値となる。同様に、一般に、

$$E\{y_i^2\} = E\{(\alpha_i^t X)^2\} \quad (13)$$

$$= E\{\alpha_i^t X X^t \alpha_i\} \quad (14)$$

$$= \alpha_i^t \Sigma \alpha_i \quad (15)$$

$$= \lambda_i \|\alpha_i\|^2 = \lambda_i \quad (16)$$

( $\alpha_i = \gamma_i$  とする) となり、第  $i$  主成分は  $\alpha_i = \gamma_i$  のときであり、 $\gamma_i$  のに対する固有ベクトルは

$\gamma_i$ となる。固有ベクトルが直行することにより、 $y_i$ は互いに無相関であり、 $\lambda_i$ は第  $i$  番目の固有値となる。すなわち、第  $i$  主成分は、

$$y_i = \gamma_i^t X \quad (17)$$

となる。

## 2.2 主成分とフーリエスペクトル

サンプル値  $X = \{x_i\} = (x_1, x_2, \dots, x_n)^t$  の共分散行列  $\Sigma$  の要素を  $E\{x_i x_j\} = \gamma_{ij}$  と置き、 $E\{x_i x_j\} = E\{x_j x_i\} = \gamma_{i-j}$  なる軸対称性を考慮すると、

$$\Sigma = \begin{pmatrix} r_0 & r_1 & \dots & r_{n-1} \\ r_1 & r_0 & \dots & r_{n-2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{n-1} & r_{n-2} & \dots & r_0 \end{pmatrix} \quad (18)$$

となる。これは巡回行列（1行の要素を全体的に1つ行（左）にずらすと、次の行の要素となる行列）であるから、共分散行列  $\Sigma$  の固有値を  $\lambda_k$ 、それに対する固有ベクトルを  $\gamma_k$  と置くと、文献 [21] より、それぞれ、

$$\lambda_k = r_0 W^{k \times 0} + r_1 W^{k \times 1} + \dots + r_{n-1} W^{k \times (n-1)} \quad (19)$$

$$= (r_0, r_1, \dots, r_{n-1}) \gamma_k \quad (20)$$

where

$$W = \exp(-2\pi j/n) \quad (21)$$

$$j = \sqrt{-1}$$

and

$$\gamma_k^t = (W^{k \times 0}, W^{k \times 1}, W^{k \times 2}, \dots, W^{k \times (n-1)}) \quad (22)$$

$$k = 0, 1, 2, \dots, n-1$$

となる。すなわち、 $\Sigma$  の固有ベクトルはFFTの核になっているのである。ここに現われた  $k$  は単にスペクトルの高調波の順番を示すもので、先に述べた主成分の順番  $i$  とは異なるものであるから、混同せぬよう注意する。

ここで

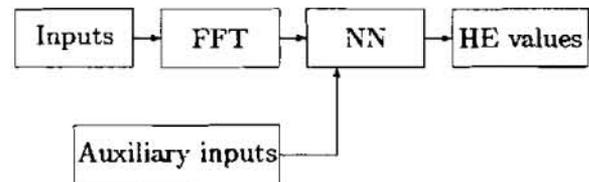
$$y_k = \gamma_k^t X \quad (23)$$

と置くと、 $y_k$  はデータ  $X$  の離散的高速フーリエ変換 (FFT) スペクトルの第  $k$  高調波成分になっ

ていると同時に、式 (17) より  $X$  の主成分になっていることが分かる。

すなわち、スペクトルの高調波とデータの主成分とが一致し、高調波を大きいものから小さいものへ順番に並べたとき、第  $k$  番目の高調波が第  $k$  番目の主成分になる。

この互いに無相関な主成分より、簡易に風合値を求めるニューラルネットワークのシステム構成を以下に示す。図において、入力はドレープ波形をサンプリングし、それよりFFTスペクトルを求め、その大きいものから順に適切な個数、例えば  $m \leq n$  個を選ぶことになる。測定精度を上げるためには、摩擦係数などのドレープとはほとんど関係のない物理量を別に測定して補助入力として加えればよいであろう。図には補助入力も書き込まれている。



Configuration of the HE measuring system

本実験においては直流成分を含む17個のスペクトルをNNの入力として採用した。

## 2.3 ニューラルネットワーク

NNの学習はBP法により行われる。BP法は、多くの入力を次々に与え、同時にそれらに対する教師信号（正解）を与え、その誤差を計算し、その誤差を減少させるようにパラメータを調整することによって、NN内部に最適な入出力関数関係を構築するのである。一旦入出力関係が構築されると、未知の入力に対して正しい出力を出すようになる。本節の場合においては、スペクトルを与えると、それに対する風合値が出力されるようになる。

## 2.4 スペクトルより風合値を求める実験結果

実験に使用した14種の布の資料を表3に示す。全て婦人用薄手平織布である。表中の風合値は予めKESシステムによって測定して得られた値であ

る。まず、12種の資料についてドレープ波形を求め、それぞれ32点のサンプリングを行い、FFTによりスペクトルを求め、スペクトルの大きいものから順に17個を選んで入力とした。それを入力層—中間層—出力層の構成が17—25—25—5からなるニューラルネットワークに加え、KESシステムで得られた風合値が出力値するよう学習を行った。出力の平均2乗誤差が $4 \times 10^{-5}$ となるか、あるいは、 $5 \times 10^4$ 回の学習に達したら学習を終了させた。

表4は12種の資料についての学習結果の平均誤差を示したものである。非常に高い精度で学習が行われたことを示す。この結果が一般性があるかどうかを調べるために、未学習の2つの資料（キュブラ13、ポリノジック14）について、精度を調べた。その結果未学習資料に対しても、表5に示すように、かなりの精度で風合値が得られた。ニューラルネットワークによるスペクトルから風合を求める学習がほぼ有効であることが検証されたものと言えよう [5]。

### 2.5 補助入力を加えた場合の実験結果

学習精度を上げるために、スペクトルと相関の少ないと考えられるLT、log2HB、log2HG、SMDからなる4つの物理量をNNの補助入力として加えてみたが、結果は残念ながら表6に示すように、改善よりもむしろ改悪の結果を示した。実験数が少なく、確定的なことは言えないが、本方式の改善については今後十分検討する必要がある。改善法としては、例えば、スペクトルの振幅成分のみでなく位相成分も入力に加える工夫などが考えられる。

## 3 風合値より物理量の推測

スペクトル（物理量）より風合値を求めた前節の試行とは逆に、風合値より物理量を求める試みをした。風合値より布の物理量が推測できれば、所定の特性を持った布を製造する上で有効であろう。

まず、その方法として、一般逆行列を用いる方法について述べ、その方法がうまくいかない理由

について述べ、それを改善する方法として、NNによる方法について述べ、その実験結果を示す。

### 3.1 一般逆行列（疑似逆行列）

ムーア・ペンローズによって提案された一般逆行列とは次の条件を満たす行列 $A^+$ のことである [22]。

1.  $A^+AA^+ = A^+$
2.  $AA^+A = A$
3.  $A^+A = (A^+A)^t$
4.  $AA^+ = (AA^+)^t$

ここに $A'$ はマトリックス $A$ の転置行列を示す。

もしもマトリックス $A$ が正則であるなら、 $A'$ は $A$ の逆行列 $A^{-1}$ と一致する。一般逆行列は方程式 $AX=B$ の最適解が $X=A'B$ になるという性質を持っている。ここで、 $A$ と $B$ は既知の行列あるいはベクトルであり、 $X$ は未知の行列あるいはベクトルである。 $A$ と $B$ は正方行列あるいは正則な行列である必要はない。最適解の意味は $A^+$ が $\|AX-B\|$ を最小にする $X$ の解になるという意味である。ここに $\|A\|$ は $A$ のユークリッドノルムを意味する。一般逆行列は行列 $A$ が正方行列あるいは正則行列でない場合の逆行列としてしばしば用いられる [21, 22, 24]。

次にこの逆行列を用いて物理量より風合値を求める方法について説明する。

### 3.2 一般逆行列より物理量を求める方法

$Y$ を風合値とすると、風合値の物理量とは次式に示す線形な関係式によって表される [1, 2]。

$$Y = C_0 + C(X - \bar{X}) \quad (24)$$

ここに風合値を表すベクトル $Y$ と係数ベクトル $C_0$ は $5 \times 1$ 、物理量を表すベクトル $X$ とその平均値を表すベクトル $\bar{X}$ は $16 \times 1$ 、物理量と風合値との関係を表す行列 $C$ は $5 \times 16$ の行列である ( $C_0$ 、 $C$ および $\bar{X}$ の値はAppendixに載せておいた)。従って、もしも、 $Y' = Y - C_0$ かつ $X' = X - \bar{X}$ と置くと、

表 3: HE values for experimental fabrics obtained by KES system

no.	samples	KOSHI	HARI	FUKURAMI	SHARI	KISHIMI
1	hemp	8.970	11.129	1.926	5.891	4.552
2	silk	6.042	5.782	2.573	4.101	4.808
3	wool	7.212	7.671	2.186	5.596	4.067
4	vinylon	7.488	10.986	1.798	4.248	2.283
5	acryl	6.542	9.825	2.130	2.921	1.963
6	rayon	8.171	11.314	-0.199	6.233	2.769
7	acetate	7.901	11.548	0.790	2.901	2.087
6	nylon	7.199	10.534	1.052	1.628	1.980
9	polychlorinatevinyl	10.104	13.063	0.229	6.215	3.940
10	polypropylene	7.105	11.028	1.653	3.927	1.569
11	polyurethan	6.049	8.372	3.353	1.802	2.664
12	cotton	5.945	8.506	3.296	1.696	2.374
13	cuprene	6.927	9.272	1.943	3.957	2.853
14	polynozic	7.895	11.274	1.914	4.076	2.669

表 4: Average errors of HE values after learning(  $\times 10^{-4}$ )

	KOSHI	HARI	FUKURAMI	SHARI	KISHIMI	avrage
Average	0.43	0.74	0.33	0.23	0.27	0.40

表 5: Errors of HE values when only FFT spectrum is used

Sample no.	KOSHI	HARI	FUKURAMI	SHARI	KISHIMI	avrage
13	0.546	1.034	1.080	1.113	0.728	0.900
14	0.871	2.001	1.298	1.475	0.853	1.303

表 6: Errors of HE values when auxiliary inputs are used

Sample no.	KOSHI	HARI	FUKURAMI	SHARI	KISHIMI	avrage
13	0.670	2.310	1.343	1.534	1.407	1.453
14	3.332	4.123	1.510	3.048	1.458	2.694

表 7: An example of physical values calculated by the psseudo-inverse method

no.	1	2	3	4	5	6	7	8
KES	0.459	0.928	39.790	-0.656	-1.057	-0.359	-0.896	-0.3032
P-inv	0	0	0	-0.181	-0.727	-1.561	1.793	0
no.	9	10	11	12	13	14	15	16
KES	0.184	-1.200	38.100	0.132	-1.790	0.797	-0.459	1.101
P-inv	0	0	0	0	0	-2.355	0	0

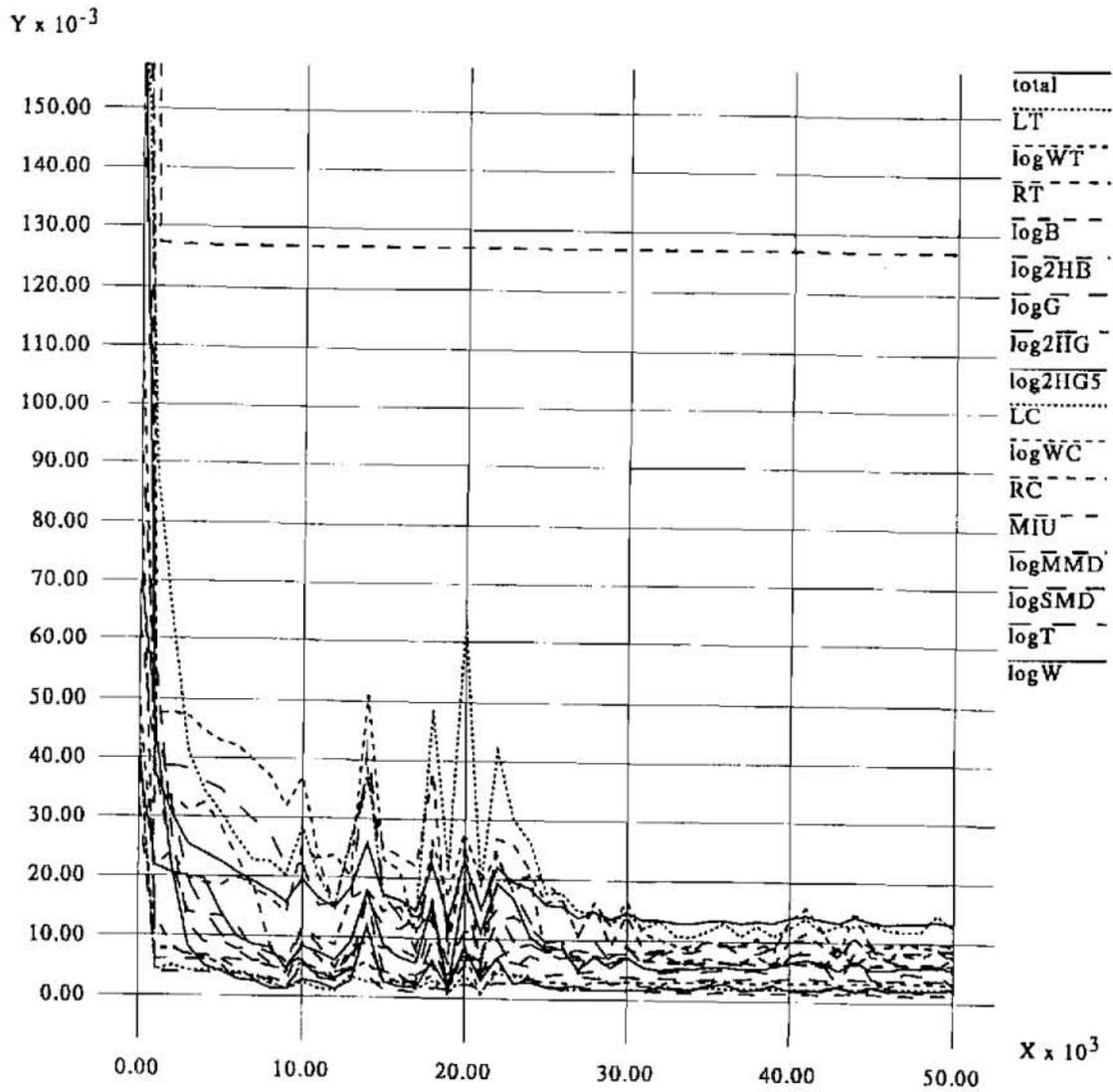


图 5 The learning curves when the physical vales are estimated by IIE values using a Neural Network

$$Y' = CX'. \quad (25)$$

となり、一般逆行列を用いて、 $X'$ が次式のように求められる。

$$X' = C^+ Y'. \quad (26)$$

この解は $X'$ の最適解である。即ち、この $X'$ は $\|Y' - CX'\|$ を最小にするベクトルであり、我々の必要とする解は $X = X' + \bar{X}$ である。

### 3.3 一般逆行列を用いて風合値より物理量を求めた実験結果

一般逆行列を用いて風合値より物理量を求めた実験結果を表7に示す。計算にはMATLABを用いた[23]。上段のno.には物理量の種類を、KESにはKESシステムにより求めた物理量を、P-invには式(26)に基づく一般逆行列により求めた結果を示す。一目して分かるように二つの値は全く一致していない。その原因は最適解が数学的な解としての意味しか持たず、現実の物理現象を表す最適解にはなっていないからである。布の風合値とその布がもつ物理量との間には強い相関関係があり、その統計学的な最尤値を求める必要があることを示している。この相関関係を取り入れて、風合値を物理量と関連付ける最も有望な方法はNNを用いることであり、次節で述べる。この例は、一般逆行列が、変数間に強い相関のある場合には、解を求めるのに役立たない、ということを示す面白い例である。

### 3.4 ニューラルネットワークを用いた物理量の推定

風合値より物理量を求める場合、布の性質として、その物理量は複雑で偶然的な要素を多く含んでおり、物理量の確率的な揺らぎを考慮する必要がある。幸い、NNは学習能力があり、この複雑な入出力関係を求めるのに適している。

我々は、NNの構成として、5-6-6-16というユニットの組み合わせを選んだ。ここに最初の5は5種類の風合値に対応する入力ユニット数

であり、次の6-6はそれぞれ2層の中間ユニット数を示し、最後の16は16種類の物理量を出力するユニット数を示している。これらの中間ユニット数は、予備の実験において得られた最適なユニット数の組み合わせである[25]。図5はNNを用いて風合値より物理量を求めた際の誤差の減少過程を示す。横軸には学習回数を、縦軸には誤差を、それぞれ16種類の物理量に対してプロットしている。図より、摩擦係数(MIU;長い点線)を除いて、物理量が学習的に小さい誤差で推測されて行く様子がわかるであろう。

## 4 結論

まず最初に、KESシステムに代わる簡易な風合測定法として、ドレープ波形を用いる方法について述べた。そこではドレープ波形の主成分(スペクトル)を抽出し、NNの入力として用いることにより、風合値が有効に求められることを実験的に示した。次いで、物理量より風合値を求めるのとは逆に、風合値を与えて、それに対する布の物理量を求める2つの方法について述べた。その一つの方法は一般逆行列を用いる方法であり、その方法はうまく行かないことを示した。次いでそれに代わる方法として、NNによる方法について述べ、その方法により所期の成果が得られることを示した。

得られた成果をまとめると次のようになる。

- 1) ドレープ図より主成分を求め、それをNNの入力として簡易に風合値を求めることができる。
- 2) 風合値より布の物理量を求めるには、一般逆行列は不適當であり、NNを用いて求めるのが良い。

今後の課題として考えられることは、風合値を求める際の精度を上げる工夫をすることと、風合値より糸や繊維の物理量を求めるNNを検討することである。このことが可能になれば所望の風合値を持った布を製造するための糸の物理的特性を知ることができ、布の製造にとって有益であろう。

## References

- [1] 川端季雄;"風合い評価の標準化と解析

- (第2版)」、日本繊維機械学会(1980).
- [2] S. Kawabata; "The Standardization and Analysis of Hand Evaluation", *The Textile Machinery Society of Japan* (1980).
- [3] 須田紀子、大平路通泰;"ドレープ性とその評価"、織学誌、29, 7, pp221-227 (1973).
- [4] 北田総雄、山名信子、青木澄子;"織物のドレープ性の評価について"、織消誌、15, 170, pp23-27 (1962).
- [5] J. Okamoto, S. Nakajima and S. Hosokawa; "Measurement of Fabric Hand Evaluation Values by Neural Network Based on PCA of Drape Images", *Memoirs of the Faculty of Engineering Osaka City university*, 37, pp89-99, Dec. (1996).
- [6] J. Okamoto, M. Zhou and H. Hosokawa; "A proposal of a Simple Predicting method of the fabric Feeling"FUAI"by Neural Network", *Memoirs of the Faculty of Engineering Osaka City university*, 33, pp199-205, Dec. (1992).
- [7] 吉永、岡田、山下、和知、弓削、岡本;"ドレープ波形を用いたニューラルネットワークによる風合値推定の試み"、生理人類学会(1993).
- [8] 岡本、佐田、細川;"ドレープ波形の主成分を入力とするニューラルネットワークによる布の風合測定"、平成5年電気関係学会関西支部連大、G8-34 (1993).
- [9] 岡本、佐田、細川;"風合値より布の力学量を求めるニューラルネットワーク"、平成5年電気関係学会関西支部連大、G8-33 (1993).
- [10] 内山生、秋山隆一、長谷川孝;"布のドレープ性に関する一考察"、織機誌、37, 5, pp207-212 (1984).
- [11] 小林繁雄;"布の衣服のドレープ性"、織学誌、47, 11, pp640-644 (1991).
- [12] 平松光男、川端季雄;"繊維の動的ドレープ解析"、織機誌、39, 12, pp175-182 (1986).
- [13] 丹羽雅子、瀬戸房子;"布の力学的性質とドレープ性との関係"、織機誌、39, 11, pp161-168 (1986).
- [14] 岩崎錦、田中道一;"布の三次元的ドレープにおけるノード形状について"、26, 10, pp739-744 (1973).
- [15] 内山生、浅井高子、重野寿子;"ドレープの美しさに関する定量的考察"、織消誌、15, 5, pp170-174 (1974).
- [16] 須田紀子、小林茂雄、大平通泰;"布のドレープ性について"、織消誌、11, 6, pp312-317 (1970).
- [17] 北田総雄、山名信子、青木澄子;"織物のドレープ性の評価について"、織消誌、3, pp144-147 (1962).
- [18] D. E. Rumelhart, etc.; "Parallel Distributed Processing; Explorations in the Microstructure of Cognition", MIT Press (1989). 日本語訳;"PDPモデル"、産業図書(1989).
- [19] Richard P. Lippmann; "An Introduction to Computing with Neural Nets", *IEEE ASSP Magazine*, April, pp4-22 (1987).
- [20] 船橋賢一;"ニューラルネットワークのCan-abilityについて"、電子情報通信学会技法、MBE88-52, pp127-134 (1988).
- [21] R. Zurmühl; "Matrizen", Springer-verlag (1964)、瀬川、高市訳;"マトリクスの理論と応用"、ブレイン図書出版(1972).
- [22] S. L. Campbell and C. D. Meyer, Jr.; "Generalized Inverses of Linear Transformations", Dover Publications, Inc., New York (1991).
- [23] The math works Inc.; "MATLAB" (1993).
- [24] T. コホネン;"連想記憶"、サイエンス社(1979).
- [25] J. Okamoto and O. Yuge;"Neural Network to Obtain Physical Parameters of Fabrics from Hand Evaluation Values"Fuai"", *Memoirs of the Faculty of Engineering Osaka City university*, 42, pp113-120, Dec.(2001).

## Appendix

 $C_{ij}$  for woman's thin dress

$i$	$C_{ij}$				
	KOSHI	HARI	FUKURAMI	SHARI	KISHIMI
0	5.1991	5.0816	4.7891	4.6833	4.0158
1	0.0003	0.1272	0.0399	0.0189	0.0205
2	-0.3688	-0.2409	0.1015	-0.1181	-0.4831
3	0.0242	0.1212	0.1264	-0.0982	-0.0557
4	1.2622	1.8527	0.0474	0.0770	-0.0218
5	-0.3961	0.0462	0.0199	-0.0602	0.1018
6	-0.0247	0.2238	-0.0018	-1.1854	-0.1765
7	-0.4317	-0.1366	0.0134	-0.0112	-0.8711
8	0.1781	0.1281	0.0104	0.0012	0.1120
9	0.0561	0.1163	-0.2820	0.0674	-0.0504
10	0.1096	-0.0361	0.4589	0.0469	0.1902
11	0.0285	0.0164	-0.1401	0.2745	0.0314
12	-0.0596	-0.0119	0.5535	-0.1014	0.0834
13	0.1760	0.0999	-0.6889	1.0850	-0.1089
14	-0.0537	-0.1379	-0.1246	0.3082	-0.4783
15	-0.2405	-0.0990	-0.1367	-0.0748	0.0044
16	0.0281	0.0332	0.3154	0.1958	-0.0041

 $\bar{X}_i$  and  $\sigma_i$  for woman's thin dress

Block	$i$	$X_i$	$\bar{X}_i$	$\sigma_i$
1	1	$LT$	0.5906	0.0939
	2	$\log WT$	1.0551	0.2728
	3	$RT$	43.0828	12.0448
2	4	$\log B$	-1.7749	0.3592
	5	$\log 2HB$	-2.0351	0.5126
3	6	$\log G$	-0.3731	0.3044
	7	$\log 2HG$	-0.2733	0.5586
	8	$\log 2HG5$	0.0295	0.4506
4	9	$LC$	0.4483	0.1109
	10	$\log WC$	-0.9951	0.3174
	11	$RC$	49.4168	11.6778
5	12	$MMU$	0.2258	0.0452
	13	$\log MMD$	-1.6832	0.2191
	14	$\log SMD$	0.4892	0.3999
6	15	$\log T$	-0.4253	0.2209
	16	$\log W$	0.9623	0.1768

# 絹およびさく蚕ニードルパンチ不織布の 繊維集合構造および基本力学特性

米田守宏\*・北村育美\*・山崎隆\*\*<sup>1</sup>

## Fiber Assembly Structure and Basic Mechanical Properties of Silk and Tussah Silk Nonwovens Made by Needle-punch Method

Morihiko YONEDA\*, Ikumi KITAMURA\* and Takashi YAMAZAKI\*\*

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

\*\*Kinugasakai Textile Research Institute, 29 Kitano Shimo-Hakubaicho, Kita-ku,  
Kyoto, 603-8326 JAPAN

### Abstract

Fiber assembly structure and basic mechanical properties of silk and tussah silk nonwovens made by needle-punch method were measured in order to investigate their use. The basic mechanical properties are measured using KES-FB system. Fiber assembly structure was observed using scanning electron microscope and was analyzed using image analysis method. The results obtained are as follows;

- (1) Recovery from tensile deformation was not good and non-recovery component was observed in tensile/recovery process.
- (2) Linearity of shear force-deformation curve was observed over wide range of shear angle. Shear stiffness  $G$  and shear hysteresis  $2HG$  and  $2HG5$  were large compared to ordinary woven fabrics.
- (3) Bending rigidity  $B$  and bending hysteresis  $2HB$  were large compared to ordinary woven fabrics.
- (4) As for compression properties, the samples were easy to compress and recovery from compression was good.
- (5) As for surface properties, average friction coefficient  $MIU$  was large and geometrical surface roughness  $SMD$  was very small.
- (6) The effect of punching density on fiber assembly structure was evaluated using image analysis. Average spacing between fibers and standard deviation of spacing were decreased with increasing punching density.

## 1. 緒言

絹はそのすぐれた感触、光沢の美しさ、保湿性など衣料用材料としての数多くのすぐれた特性をもった繊維である。また、絹は天然由来のタンパク質からなる繊維であり、本質的にすぐれた生体適合性を持ち、医療効果の面からも注目されている。しかし、近年、とくに日本において絹の生産量は減少する傾向にあり、各方面から憂慮されている[1]。そこで、われわれは、絹の新しい用途

を開発することにより、絹の生産量/使用量を拡大するための刺激を得る目的で、絹および絹関連加工製品に関する研究を行っている[2]。

筆者らは、絹およびさく蚕を素材としてニードルパンチ法により不織布を試作した。できあがった不織布の性質を調べ、その用途や使用法について検討するため、繊維集合構造および基本力学特性に関する測定を行ったので、結果について報告する。なお、絹を素材としてニードルパンチ不織布が作られたことはこれまで例がない。

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

\*\*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

## 2. 測定方法

力学特性の測定にはKES-FB力学特性測定システムを用いた[3]。測定項目は、引張り、剪断、曲げ、圧縮、表面摩擦、表面粗さである。測定にあたってはニードルパンチ不織布の繊維集合構造および力学特性の特徴を考慮して、次のような点に注意を払って行った。引張り、剪断、曲げにおいては、試料のチャック取り付け部分を紙テープで固定して測定した。繊維集合構造を考慮すると、引張りよわいことが予想されるため、引張りの測定は高感度条件( $F_{max}=50gf/cm$ )で行った。

繊維集合構造の観察は、走査型電子顕微鏡(日本電子 JSM-T300)を用いて行った。写真画像はスキャナを用いてパソコンに取り込み、画像処理ソフト(WinROOF)を用いて、繊維直径の測定および繊維集合構造の定量化を行った。

## 3. 試料

表1に試料の詳細を示す。絹を素材とする不織布3種(NA,NB,NC)、さく蚕を素材とする不織布2種(NS1,NS2)および比較対照用としてポリエステル

不織布1種(P)の計6種の不織布を用いた。絹およびさく蚕特有の柔らかさを損ねないように、不織布の製造法としてはニードルパンチ法を採用した。絹不織布3種は、絹の精練工程においてセリシン除去が行われた後のフィブロインを原材料として、パンチ密度を3段階に変えて作製されたものである。なお、前処理としてフィブロイン繊維に対して熱水処理を施しクリンプを付与している。さく蚕不織布2種は、中国産のさく蚕繊維を原材料として、パンチ密度を2段階に変えて作製されたものである。繊維直径は絹、ポリエステルが $20\mu m$ 程度であるのに対し、さく蚕は $35\sim 40\mu m$ 程度と太い繊維である。厚さは $2.3\sim 4.5mm$ の範囲、空隙率は $0.94\sim 0.98$ の範囲であり、本研究で取り扱う試料は全体的に厚くかさ高いという特徴を備えている。

図1に絹、さく蚕およびポリエステル不織布の走査型電子顕微鏡による写真を示す。絹不織布NA, NB, NCの場合、繊維が多少のクリンプをもちながら、互いに絡み合っているようすがわかる。これに対し、さく蚕不織布は、繊維が絹に比べて太く、直線的でクリンプの程度が小さいことがわかる。

Table 1 Details of nonwoven samples

Sample	Fiber	Thickness (mm)	Weight ( $mg/cm^2$ )	Density ( $mg/cm^3$ )	Porosity	Fiber diameter ( $\mu m$ )	Punching density
NA	silk	2.373	11.96	44.71	0.966	19.19	small
NB	silk	2.875	11.23	32.09	0.976	18.84	large
NC	silk	2.213	12.2	50.31	0.962	20.83	large
NS1	tussahsilk	4.525	11.31	24.99	0.981	34.71	small
NS2	tussahsilk	2.863	16.03	55.99	0.958	39.38	large
P	polyester	2.675	20.13	75.28	0.946	22.6	large

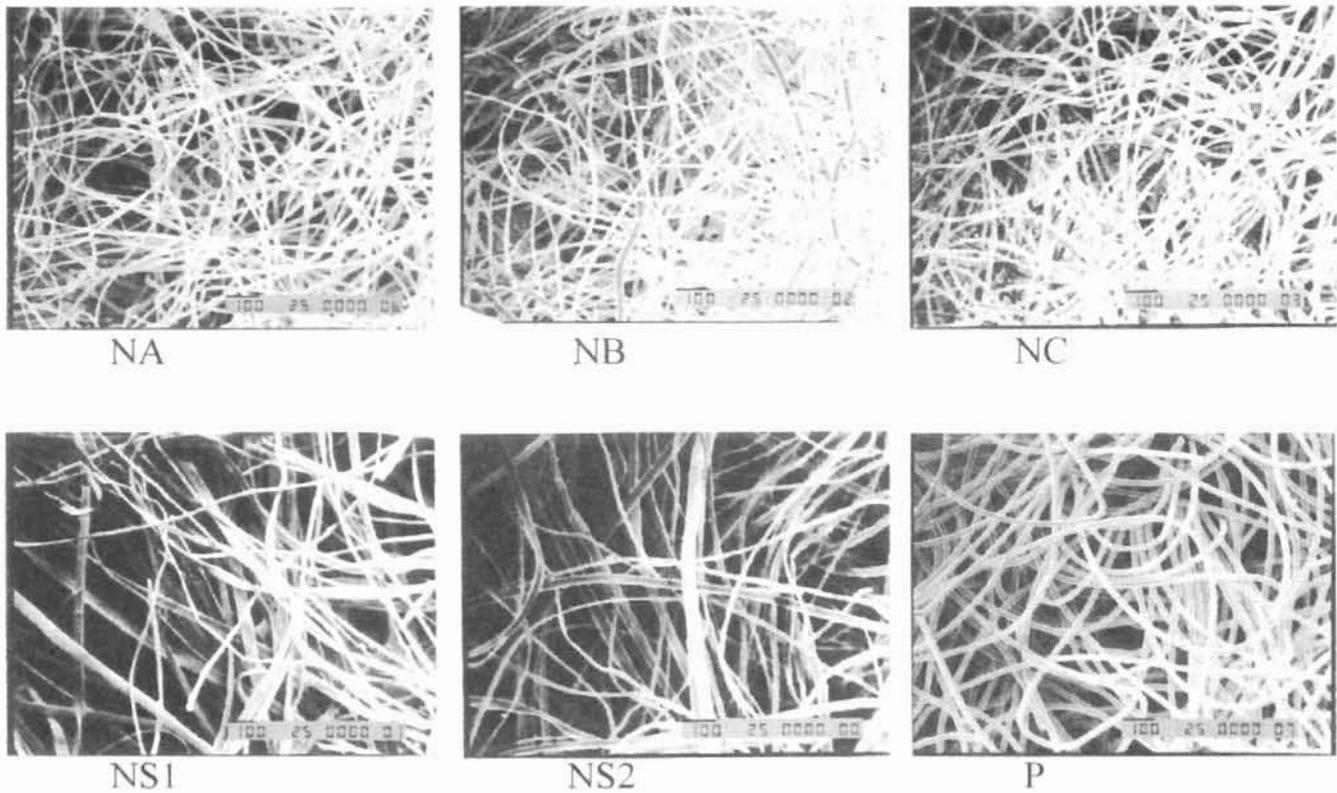


Table 2 Mechanical properties of Silk and Tussah Silk nonwoven fabrics

Block	Tensile				Shear		
Sample	<i>LT</i> (n.d.)	<i>WT</i> (gf.cm/cm <sup>2</sup> )	<i>RT</i> (%)	<i>EMT</i> (%)	<i>G</i> (gf/cm.deg)	<i>2HG</i> (gf/cm)	<i>2HG5</i> (gf/cm)
NA	0.825	50	20.2	2.43	1.89	7.33	7.59
NB	0.92	36.1	47.2	1.73	3.47	5.45	7.2
NC	0.8	133.8	25	6.0	1.72	5.58	6.68
NS1	-	-	-	-	0.344	5.5	5.25
NS2	0.862	56.9	20.5	2.55	1.73	5.93	6.8
P	0.929	156.9	26.0	5.88	1.68	8.23	8.05

Block	Bending		Compression			Surface		
Sample	<i>B</i> (gf.cm <sup>2</sup> /cm)	<i>2HB</i> (gf.cm/cm)	<i>LC</i> (n.d.)	<i>WC</i> (gf.cm/cm <sup>2</sup> )	<i>RC</i> (%)	<i>MIU</i> (n.d.)	<i>MMD</i> (n.d.)	<i>SMD</i> ( $\mu$ m)
NA	0.498	0.463	0.147	1.53	55.4	0.25	0.0096	2.35
NB	0.36	0.285	0.223	2.29	53	0.235	0.0102	2.55
NC	0.516	0.433	0.37	1.21	42.9	0.249	0.0099	2.21
NS1	0.315	0.265	0.228	4.10	46.2	0.281	0.0098	2.18
NS2	1.054	1.378	0.704	1.51	42	0.277	0.012	2.28
P	0.82	1.333	0.585	1.371	54.1	0.24	0.0124	3.22

## 4. 結果と考察

### 4.1 基本力学特性

表2に不織布試料6種の力学特性の測定結果を力学特性のブロック別に示す。さらに、絹不織布試料の力学特性の特徴を示すため、図2に試料NAの各種力学特性の測定曲線の例を示す。以下に、引張り、剪断、曲げ、圧縮および表面（表面摩擦、表面粗さ）の各特性について、順次特徴を記す。

引張り特性曲線の特徴は、図2(a)に示すように、高感度条件でFmaxが小さいにもかかわらず、

伸長/回復のプロセスで非回復の部分が生じることである。このことは、ここで測定したすべての不織布試料において生じており、これら試料の範囲内で不織布としての形成性に関して問題があることを示している。表2の引張り特性パラメータをみると、どの試料に関しても、ヒステリシス幅が大きい（引張りレジリエンスRTが小さい）ことが特徴的であり、このことはすべての試料について伸長回復性がよくないことを示している。最大伸長率EMTについては、NA,NB,NS2では小さく、NC,Pでは大きいことがわかる。ただし、NS1は引張りによって、繊維のすり抜けのみが生

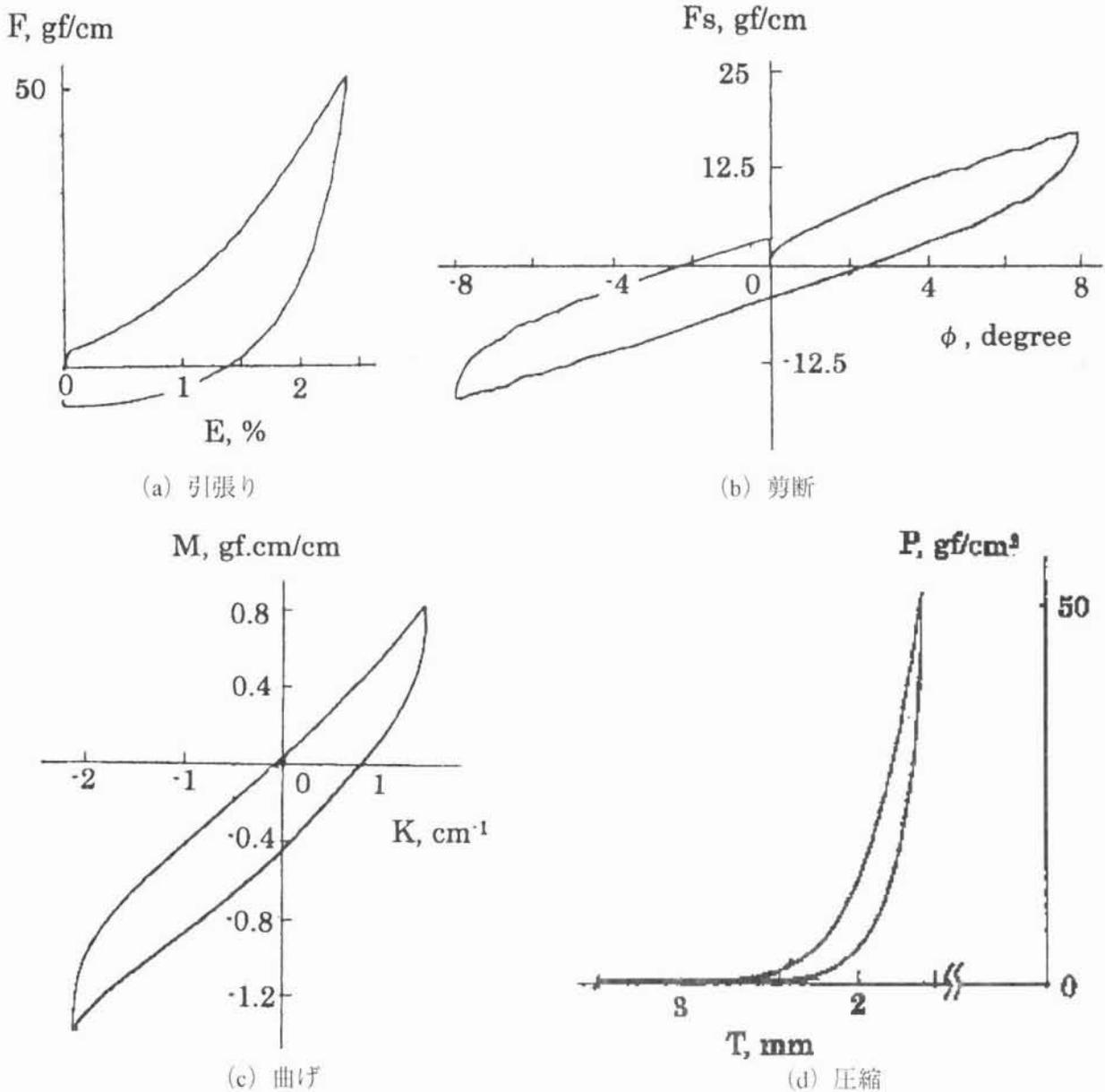


Fig.2 Measurement curve of basic mechanical properties of nonwovens (Sample: NA)  
 (a) Tensile (b) Shear (c) Bending (d) Compression

じたため、伸長特性が測定不能であった。これは、さく蚕の繊維直径が大きく曲げ剛性が大きいこと、および、クリンプが小さいことにより繊維の絡み合いが十分ではないことによるものと考えられる。このようなさく蚕における不織布の形成性については、NS2ではパンチ密度を大きくすることにより、引張り特性が測定可能な程度に多少改善されている。しかし、ここで測定した不織布試料全般において引張り変形に対する回復性がよくないことは、および、絹／さく蚕不織布の用途に制限があることを示している。つまり、引張り変形を受けるような用途には使えないものと考えられる。

剪断特性においては、ニードルパンチ不織布の特徴が明瞭に現れている。剪断特性では、図2 (b) にみられるように、すべての試料について、剪断角の広い範囲にわたって線形性が認められた。これは、剪断角によらず剪断変形のメカニズムが同じであることによる（つまり繊維交差角の変化のみによる）ものと推測される。これは、繊維間の拘束がゆるやかなニードルパンチ不織布の繊維集合構造の特徴を反映しているものと考えられる。剪断剛性Gおよび剪断ヒステリシス2HG, 2HG5は通常の織布と比較すると大きな値を示している。

曲げ特性の測定曲線の例を図2 (c) に示す。これより曲げかたく曲げヒステリシスが大きいことがわかる。表2の曲げ特性のパラメータをみてもわかるように、すべての試料について、曲げ剛性

B, 曲げヒステリシス2HBとも通常の織布と比べて大きな値を示した（とくにNS2,P）。これは、ここで測定した不織布試料の厚さが大きく曲げに関わる繊維本数が多いこと、および厚さ方向の繊維接触点密度が大きいことによるものと考えられる。

圧縮特性の測定曲線の例を図2 (d) に示す。表2の圧縮特性パラメータをみると、圧縮の線形性LCは試料により0.15から0.7程度とさまざまな値をとっており、とくに傾向が認められない。また、圧縮仕事量WCは、通常の織布と比べると一般に大きな値をもっている。圧縮特性のなかで不織布試料の特徴が現れているのは最大圧縮率EMCおよび圧縮レジリエンスRCである。全体的に最大圧縮率EMCは50%程度と大きい。しかし、圧縮ヒステリシスを見てみると、NS1を除いてどの試料も小さいこと（RCが大きい）がわかる。これから、絹およびさく蚕不織布の圧縮特性の特徴として、圧縮されやすく、しかも圧縮回復性がすぐれていることがいえる。前述した引張り特性における特徴もあわせて考慮すると、ここで取り扱った絹およびさく蚕不織布試料は引張り変形を受けるような用途には向いていないが、圧縮変形を受けるような用途には適しているものと考えられる。

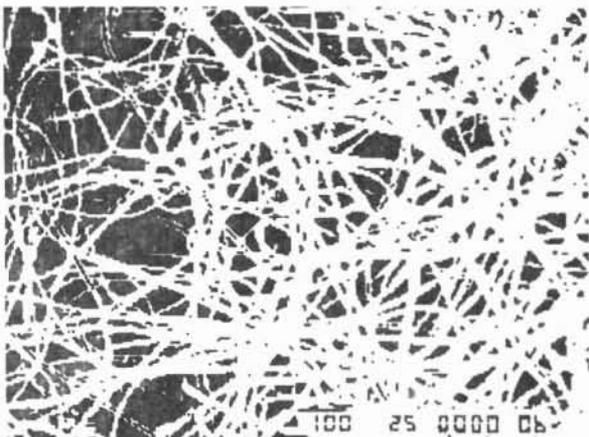


Fig.3 An example of binary image of nonwovens (Sample: NA)

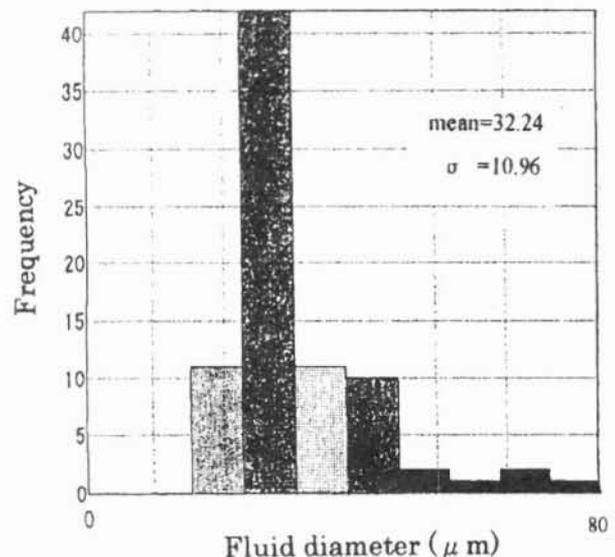


Fig.4 Histogram of fluid diameter distribution (Sample: NA)

Table 3 Parameters of fiber assembly structure

Sample	Number of domain	Fluid diameter ( $\mu\text{m}$ )	
		Average	Standard deviation
NA	80	32.24	10.96
NB	50	30.24	6.4
NC	51	30.03	6.04
NS1	38	34.76	17.58
NS2	51	31.56	8.32
P	29	29.58	5.36

表2の表面特性パラメータの結果からわかることは次の通りである。どの試料も、平均摩擦係数MIUは0.23~0.28と比較的大きい。表面粗さSMDは、絹およびさく蚕不織布では2.2~2.5 $\mu\text{m}$ と小さく、ポリエステル不織布は3.22 $\mu\text{m}$ と大きい。官能試験により絹およびさく蚕不織布特有の触感のよさが認められているが、MIUが大きくSMDが小さいことがその理由の一つとして考えられる。

#### 4.2 不織布の繊維集合構造の解析

図1に示したSEM写真をもとにして、不織布試料の繊維集合構造の定量化を行った。その考え方として、通常行われるように繊維に着目してその配向を評価するのではなく、繊維間空隙に着目して粒子と見なし、これに対して粒子計測の手法を適用することにより、繊維集合構造を間接的に推定するという方法をとった。

画像処理の手順は以下の通りである。

- (1) SEM写真のスキャナによるパソコンへの取り込み
- (2) 前処理(グレースケール化, 二値化, 孤立点(ノイズ)の除去)
- (3) 画像解析

画像解析の手法として、WinROOFに備わっている粒子計測機能を用いる[4]。図3に二値化画像の例を示す。白い部分が繊維、黒い部分が空隙部である。図よりわかるように空隙部は多数個の閉領域からなっており、これを多数個の粒子とみなすことにより粒子計測の手法を適用することができる。本ソフトに備わっている粒子計測機能では、粒子の個数のカウント、番号付け、寸法ならびに形状特徴の計測等を自動的に行い、結果を集計し統計処理を行う。本解析では、空隙部(粒子)

の代表寸法として流体直径を採用する。図4に流体直径の分布を表すヒストグラムの例を示す(試料はNA)。結果を表3にまとめる。平均流体直径は平均の繊維間隔の大きさ、その標準偏差は繊維間隔平均値まわりのばらつきの大小を表している。NB,NCとNAを比較すると、平均流体直径はNB,NCで小さくなり、標準偏差も小さくなっている。これはパンチ密度を大きくしたことにより、繊維の充填度が大きく密になっていること、および、繊維間隔のばらつきが小さい、つまり繊維集合構造が均質化していることを反映しているものと考えられる。NS1とNS2の場合も同様であり、パンチ密度を大きくすることにより、繊維の充填度がやや大きく密になり、繊維間隔のばらつきが小さくなっていることがわかる。とくに絹、さく蚕不織布いずれの場合も、パンチ密度を大きくすることによる効果は繊維間隔のばらつきが小さくなっている点に現れているが、これは、繊維と繊維の絡み合いの程度が大きくなり、繊維間隔が小さくなり、繊維集合構造の均質化が進んでいることを示している。以上より、絹およびさく蚕不織布をニードルパンチ法により作製する場合、不織布としての形態保持性を確保するための方法の一つとして、パンチ密度を十分大きくするというやりかたが有効であるといえる。また形態保持性を改善するもう一つの方法として、前処理工程において十分なクリンプを付与し、繊維の絡み合いを促進することも有効な手段であると推察される。

## 5. まとめ

試作した絹およびさく蚕からなるニードルパンチ不織布の基本力学特性の測定および繊維集合構

造の評価を行った。得られた結果は以下の通りである。

- (1) 引張り特性においては、伸長回復性が悪く、伸長/回復の過程で非回復部分が生じる。
- (2) 剪断特性においては、広い剪断角の範囲にわたって線形性が認められる。通常の織布と比べると、剪断剛性Gおよび剪断ヒステリシス2HG、2HG5とも大きな値を示す。
- (3) 曲げ特性においては、曲げ剛性Bおよび曲げヒステリシス2HBとも、通常の織布と比べて大きな値を示す。
- (4) 圧縮特性においては、圧縮されやすく、圧縮回復性にすぐれている。
- (5) 表面特性においては、平均摩擦係数MIUが大きく、表面粗さSMDが小さい。
- (6) 画像処理による繊維集合構造の解析より、不織布の製造工程パラメータにおけるパンチ密度の効果が捉えられた。つまり、パンチ密度が大きいほど平均の繊維間隔は小さく、繊維間隔のばらつきが小さくなる。

今後の課題として、以上のように得られた絹およびさく蚕不織布の力学特性の特徴をもとにして、

絹の備えている各種の高度な機能を生かせるような適切な用途を探索していく必要がある。また、引張り特性の測定より、絹およびさく蚕不織布は不織布としての形成性および形態保持性がよくないことが認められたが、これを改善するため、製造工程パラメータのひとつであるパンチ密度を大きくすることが有効であることを述べた。ほかに、繊維の絡み合いを促進するための手段として、前処理において十分大きなクリンプを付与するという方法が考えられ、この点についても検討の余地がある。

#### 参考文献

- [1] 山崎隆：“おりもの”，Vol.44, No.3, pp.2-11, 京都染色試験場（2000）
- [2] 米田守宏，前芝三恵子，山崎隆：衣笠会繊維研究所研究報告，第5号，pp.4-11（2001）
- [3] 川端季雄：“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（1980）
- [4] “WinROOFリファレンスマニュアル”，三谷商事（株）（2000）

made from silkworm fed with artificial diet  
 In this paper, the researches on silk/cotton mixed weave fabrics [1] will be reported and application of these materials for care use will also be discussed.

### 3. Structure, Mechanical Properties and Hand of Silk/Cotton Mixed Weave Fabrics

#### 3.1 Method and Sample

In order to observe fabric structure of Silk/Cotton mixed weave fabrics (S/C fabrics), the right

side, the reverse side and the section of S/C fabrics were photographed using microscope. The basic mechanical properties were measured using KES-FB measurement system [2]. The items of the measurement are tensile, shear, bending, compression and surface properties of fabrics. The basic Hand Value (HV) is calculated using KN-201LDY equation for women's dress use [2]. Silk twill fabric (SA fabrics) was used as reference sample to compare with S/C fabrics and the measurement was carried out the same way. Table 1 shows the details of yarn property (a) and fabric construction (b) of S/C and SA fabrics.

Table 1 Details of fabrics and yarn of S/C and SA fabrics  
 (a) Details of yarn of S/C and fabrics

sample	warp		weft	
	material	count	material	count
S/C	silk	28d/3 (84d)	cotton	80tex/2 (133d)
SA	silk	80d	silk	80d

(b) Fabric construction of S/C and SA fabrics

sample	weave density (1/cm)		thickness (mm)	weight (mg/cm <sup>2</sup> )	weave
	warp	weft			
S/C	74	31	0.435	11.5	SA
SA	90	40	0.290	25.6	twill 1/2

\*at pressure 0.5gf/cm<sup>2</sup>

#### 3.2 Structure of Silk/Cotton Mixed Weave Fabrics

Silk/Cotton mixed weave fabrics (S/C fabrics) are made by using mixed weave technique and satin construction and has two-layered structure of which right side is composed of almost 100% silk and back side almost 100% cotton. Figure 1 shows a schematic diagram of weave construction and section of S/C fabrics and Figure 2 shows the microscopy of the right side, the back side and the section of S/C fabrics. White part in Figure 1

shows silk and dark part shows cotton. As far as we can see the diagram, it is supposed that the right side of S/C fabrics is composed of 80 % silk, and the reverse side of fabric is composed of 80 % cotton. However, the actual surface of the right side and the reverse side of S/C fabrics is composed of almost 100 % silk and almost 100 % cotton, respectively, as shown in Figure 2. Picture of the section along warp direction in Figure 2 clearly shows that silk yarn is running through long distance at the right side of fabrics and S/C fabrics

has two-layered structure approximately.

### 3.3 Mechanical Properties and Hand of Silk/Cotton Mixed Weave Fabrics

Mechanical properties of S/C and SA fabrics measured by KES-FB system are shown in Table 2. It is recognized that there are large differences in tensile and shear properties between S/C and SA fabrics. In tensile properties, S/C fabric is easy to stretch (large EMT) and has large hysteresis (small RT) compared to SA fabric. It is supposed that this effect may arise from mixing of cotton yarn (spun yarn) into silk yarn (filament yarn) in S/C fabrics. In shear properties, G, shear stiffness and 2HG, 2HG5, shear hysteresis of S/C fabric are smaller than that of SA fabric. This effect may be influenced by the fact that construction

of S/C fabrics is satin weave. In satin weave, number of interlacing point between warp and weft yarns is smaller compared with plain weave or twill weave, and this small number of interlacing point may help easy movement of interlacing angle between warp and weft yarns and to decrease G, 2HG and 2HG5. There are not so large differences in bending and compression properties.

Results of the measurement of friction and surface roughness of S/C and SA fabrics (warp direction) are shown in Figure 3. The surface properties of the right side of S/C fabrics are almost the same as those of SA fabrics (silk 100%) judging from the shape of the measured curves and the values of mechanical parameters, MIU: mean friction coefficient, MMD: standard deviation of friction coefficient, SMD: surface roughness

Table 2 Basic mechanical properties of S/C and SA fabrics

Block	Parameter	SA	S/C	Unit
Tensile	LT	0.739	0.607	
	WT	4.75	6.50	gf.cm/cm <sup>2</sup>
	RT	72.1	43.8	%
	EMT	2.63	4.30	%
Bending	B	0.055	0.057	gf.cm <sup>2</sup> /cm
	2HB	0.041	0.039	gf.cm/cm
Shear	G	1.230	0.376	g.cm/deg
	2HG	1.05	0.77	g/cm
	2HG5	4.00	1.79	g/cm
Compression	LC	0.292	0.215	
	WC	0.084	0.121	gf.cm/cm <sup>2</sup>
	RC	71.0	62.8	%
Thickness	T	0.290	0.435	mm
Weight	W	25.6	11.5	mg/cm <sup>2</sup>

Table 3 Hand value of S/C and SA fabrics

HV	SA	S/C	C/S
KOSHI	6.947	6.763	6.843
HARI	9.018	7.878	7.899
SHINAYAKASA	2.638	2.650	2.532
FUKURAMI	6.639	5.392	4.863
SHARI	0.965	4.783	5.221
KISHIMI	4.865	4.756	4.616

( $\mu\text{m}$ ). (S/C: S is the right side, C/S: C is the right side.)

Hand Values was calculated using measured values of mechanical properties of fabrics. Results are shown in Table 3 and Figure 4. Calculation was carried out using KN-201LDY equation for women's dress use [5]. Hand value of the right side and the reverse side of S/C fabric was calculated individually because, in S/C fabric, surface properties are different between the right and the reverse sides. Hand Values, "KOSHI", "HARI", "FUKURAMI" and "KISHIMI" of S/C fabrics are almost the same as that of SA fabrics of silk 100%. Hand Value of "SHINAYAKASA" both in S/C and SA fabrics are small and equivalent value. Only "SHARI" value of S/C fabric increases compared to SA fabrics and this fact is because cotton yarn (spun yarn) is mixed with silk yarn (filament yarn) in S/C fabrics. As a result, surface properties and Hand Value of S/C fabrics except "SHARI" has equivalent with those of SA fabric of silk 100 % and this fact may suggest that tactile sensation of S/C and SA fabrics is almost the same.

#### 4. Change in Mechanical Properties and Hand of Silk/Cotton Mixed Weave Fabrics by Repeated Cycle of Washing

##### 4.1 Method and Sample

Change in mechanical properties and hand of S/C fabrics by repeated cycle of washing was investigated in order to confirm the possibility that S/C

fabrics may use for daily use [3,4]. Details of samples are shown in Table 4. In this measurement, plain weave fabrics made of silk (S), cotton (C) and polyester (P) fabrics are also used as reference sample to S/C fabrics.

Repeated cycle of washing was carried out under following conditions. Detergent used is commercially available one including enzyme to simulate machine washing in ordinary home. Washing machine used is two wash-tub type. Temperature of water is 15-17 °C under room temperature. Time of one cycle of washing is 7 minutes. Concentration of detergent is 1 g/l and liquor ratio is 1:100. Rinse is carried out by overflow method the laundry is dried in the shade. Under these conditions, 20 cycles of washing was carried out and change of properties and performance of each fabric were measured.

Items of the measurement were basic mechanical properties, basic hand, shrinkage and surface photography. The basic mechanical properties were measured using KES-FB measurement system [2]. The basic Hand Value (HV) is calculated using KN-201LDY equation for women's dress use [2]. Air resistance is measured using KES-F-8AP air permeability measurement apparatus [5]. Shrinkage is evaluated according to JIS-L-1042. Surface of fabrics is photographed with microscope.

Measurement of the mechanical properties and hand was carried out before washing and after 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 and 20 times washing. Air resistance was measured after every washing times and the picture of fabric surface was photographed before

Table 4 Details sample for washing durability

Sample	Count warp	(tex) weft	Weave den- sity warp	(1/cm) weft	Thickness (mm)*	Weight (mg/cm <sup>2</sup> )
Silk	8.5	8.5	50	41	0.34	7.94
Cotton	16	16	55	28	0.51	12.7
Polyester	5.5	8	32	29	0.09	5.21

\*at pressure 0.5gf/cm<sup>2</sup>

washing and after 3, 5, 10, 15 and 20 times washing.

#### 4.2 Change in Mechanical Properties and Hand before and after Washing

Figure 5 shows the change in mechanical properties and hand before and after washing plotted in chart for women's dress use. Left and right side chart is S/C fabrics and S fabrics, respectively and ○ and △ denotes before washing and after 20 times washing, respectively. Change in mechanical properties and hand of S/C fabrics is little except in compression and surface properties. This fact shows that the performance of S/C fabrics is stable in terms of hand. In contrast, change in mechanical properties of S fabrics is recognized in increasing of bending and shear properties. This fact supports that, in S fabrics, stiffness increases by washing as a whole. Change in Hand values of SA fabrics is recognized because of changes in corresponding mechanical properties. "KOSHI" and "HARI" values increase and "SHARI", "FUKURAMI", "SHINAYAKASA" and "KISHIMI" values decrease.

In order to investigate the time change of hand by washing in detail, change of hand values plotted against washing times is shown in Figure 6 for S/C and S fabrics. In S/C fabrics, change in hand values by washing is small. In S fabrics, hand values are changed largely in the initial stage and change become slowly after increasing times of washing. This behavior shows that, in silk fabrics, hand of silk fabrics at the initial state was damaged with washing. In particular, decreasing in "SHINAYAKASA" and increasing in "HARI" are remarkable. Summarizing these results, it is clear that change in hand values by washing is small in S/C fabrics and fabric performance is stable in terms of hand. It is supposed that small change in hand values of S/C fabrics may be caused by mixing of cotton yarn with S/C fabrics.

#### 4.3 Change in Shrinkage and Air Resistance

Shrinkage of fabrics was measured to investigate dimensional stability which is important in practical use. The standard length for reference is 15 cm. The results are shown in Figure 7, of which the upper graph is for S/C and S fabrics and the lower graph is for C and P fabrics. Vertical axis is shrinkage and horizontal axis is washing times. Suffix 1 denotes warp direction and 2 denotes weft direction.

As for shrinkage of S/C fabrics, shrinkage along warp and weft direction except 1 to 3 times in warp is constant. In the case of S fabrics, large stretch and shrink is recognized with increasing washing times, and in particular stretch along warp direction is remarkable. In contrast, results of C and P fabrics show that these fabrics have good dimensional stability. As a result, S/C fabrics has good dimensional stability the same as C and P fabrics.

Change of air resistance of fabrics with increasing washing times was measured to investigate structure change of fiber assembly by washing. The results of air resistance plotted against washing times are shown in Figure 8. In the case of S fabrics, change of air resistance is large with increasing washing times, and air resistance is tending upward for over 10 times. This fact indicates that silk fabrics tend to be "stiff" by washing as mentioned in 4.2. In contrast, air resistance of the other fabrics including S/C fabrics does not change with increasing washing times. This fact suggests that structure of fiber assembly of these fabrics including S/C fabrics is stable against washing. Summarizing these results, structure change of fiber assembly of S/C fabrics is small and stable by washing though satin weave does not have strong in structure stability compared to plain weave. This fact may explain the stability of hand and dimensional stability of S/C fabrics by washing as mentioned above.

## 5. Summary

The mechanical properties, hand and washing durability of S/C fabrics were investigated and following results were obtained.

- (1) S/C fabrics has equivalent hand of silk.
- (2) Degradation of hand of S/C fabrics by washing is small.
- (3) S/C fabrics has good dimensional stability by repeated cycle of washing.

We can develop the two-layered fabrics which has equivalent touch of silk and good dimensional stability by using the combination of satin weave and mixed weave technique of silk and cotton. Good washing durability of S/C fabrics supports that the fabrics can be used for daily life including repeated washing which could not be expected for traditional silk products. S/C fabrics is already applied for bedding goods such as futon cover, cover of pillow case and pajama etc. One of the expected applications of S/C fabrics will be material for care use

by making use of its good tactile sensation and washing durability that will be needed in actual care activity. The technique of making two-layered fabrics using the combination of satin weave and mixed weave technique can also be applicable for another combination of fiber material such as silk and polyester, wool and cotton etc.

## Acknowledgement

This paper was presented at the Third Joint Seminar between Faculty of Human Life and Environment of Nara Women's University and College of Human Ecology of Seoul National University on "Living Environment for an Aging Society" on September 27, 2002 at Samusung Convention Center, Seoul National University, Seoul City, KOREA.

This study was carried out in collaboration with Dr Takashi Yamazaki, senior researcher of Kinugasakai Institute of Fiber and Textile.

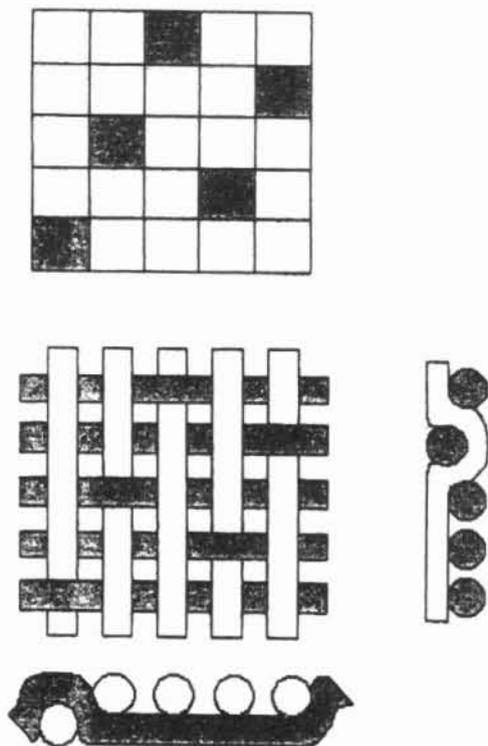


Fig.1 Schematic diagram of fabric construction and section of S/C fabrics

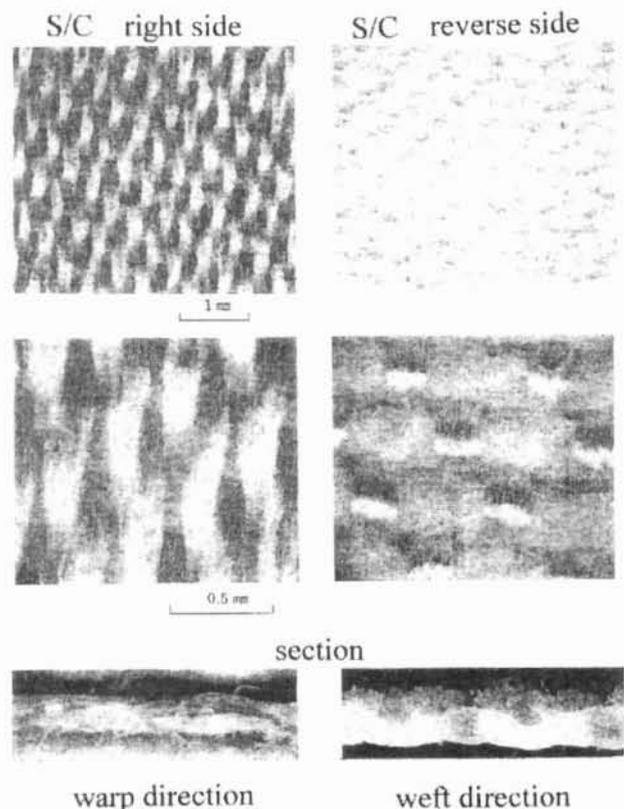


Fig.2 Picture of surface and section of S/C fabrics

**REFERENCES**

- [1] M. Yoneda, M. Maeshiba, T. Yamazaki : Proceedings of Kinugasa Textile Research Institute, No.5, pp.4-11 (2001)
- [2] S. Kawabata : "Standardization and Analysis of Hand Evaluation (2nd ed.)", The Textile Machinery Soc. of Japan (1980)
- [3] M. Niwa, M. Kawamoto : Journal of Society of Home Economics (Nara Women's Univ.), Vol.37, No.1, pp.30-37 (1990)
- [4] M. Niwa, M. Kawamoto : Journal of Society of Home Economics (Nara Women's Univ.), Vol.39, No.1, pp.7-14 (1992)
- [5] S. Kawabata : Journal of the Textile Machinery Soc. of Japan, Vol.40, No.6, pp.59-67 (1987)

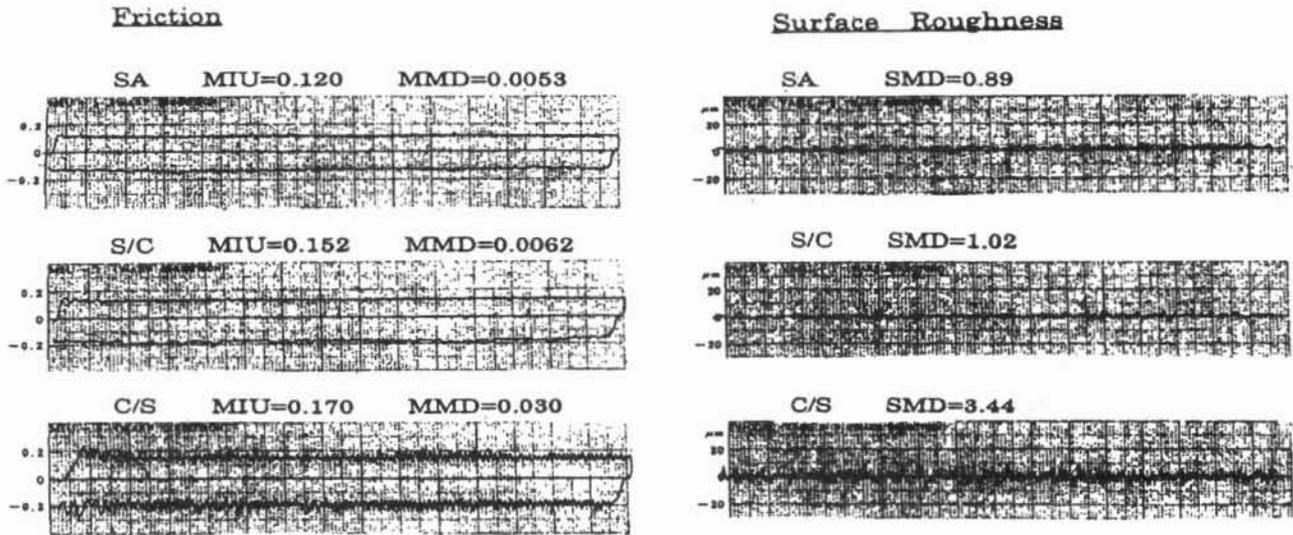


Fig.3 Results of the measurement of surface properties of S/C and SA fabrics. MIU: friction coefficient, MMD: standard deviation of friction coefficient, SMD: surface roughness

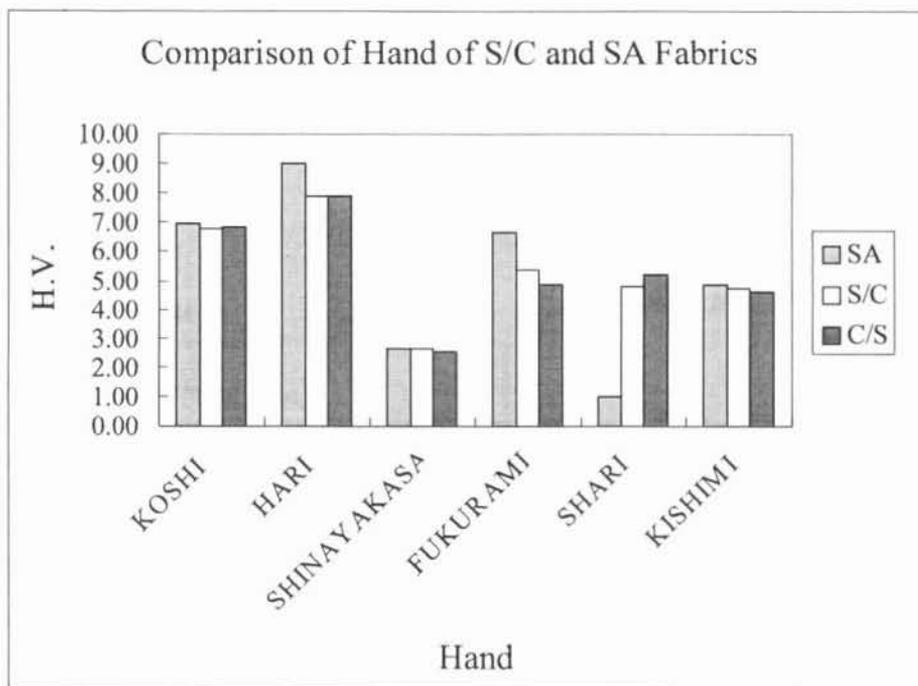


Fig. 4 Comparison of hand value of S/C and SA fabrics

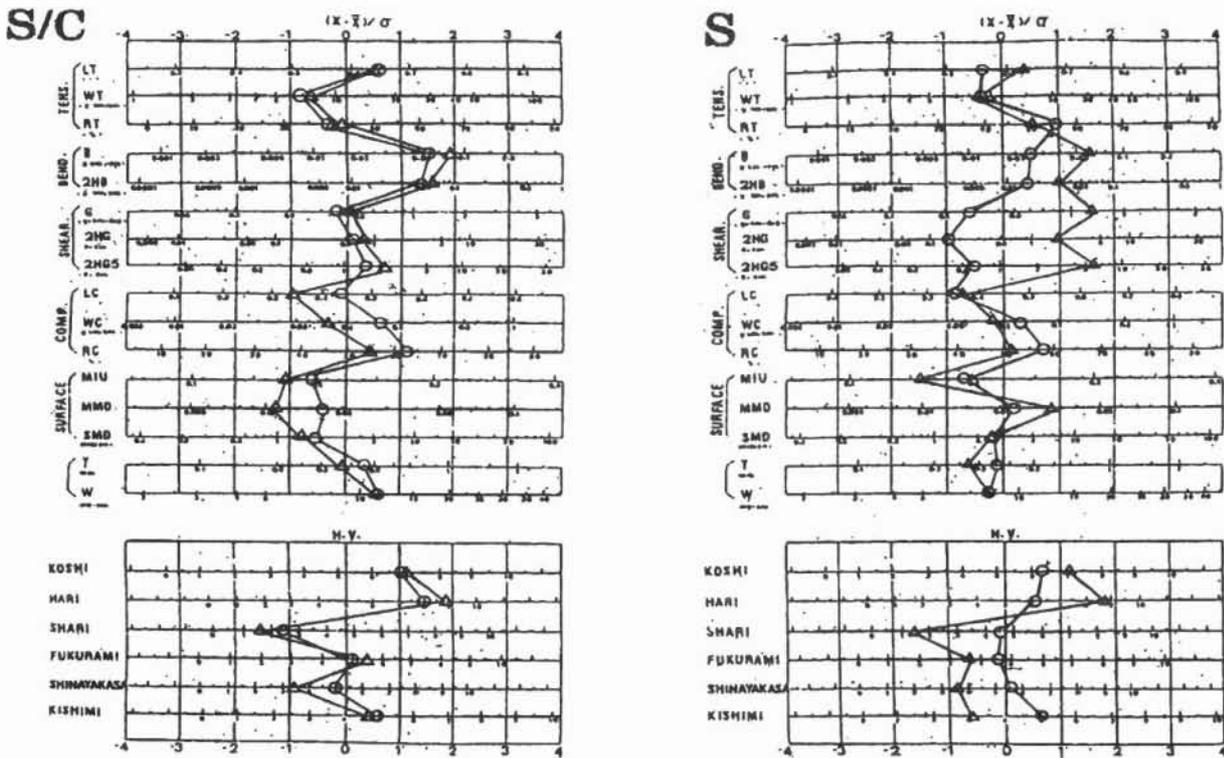


Fig.5 Comparison of mechanical properties and hand between before and after washing.  
 ○: before washing, △: after washing (20 times)

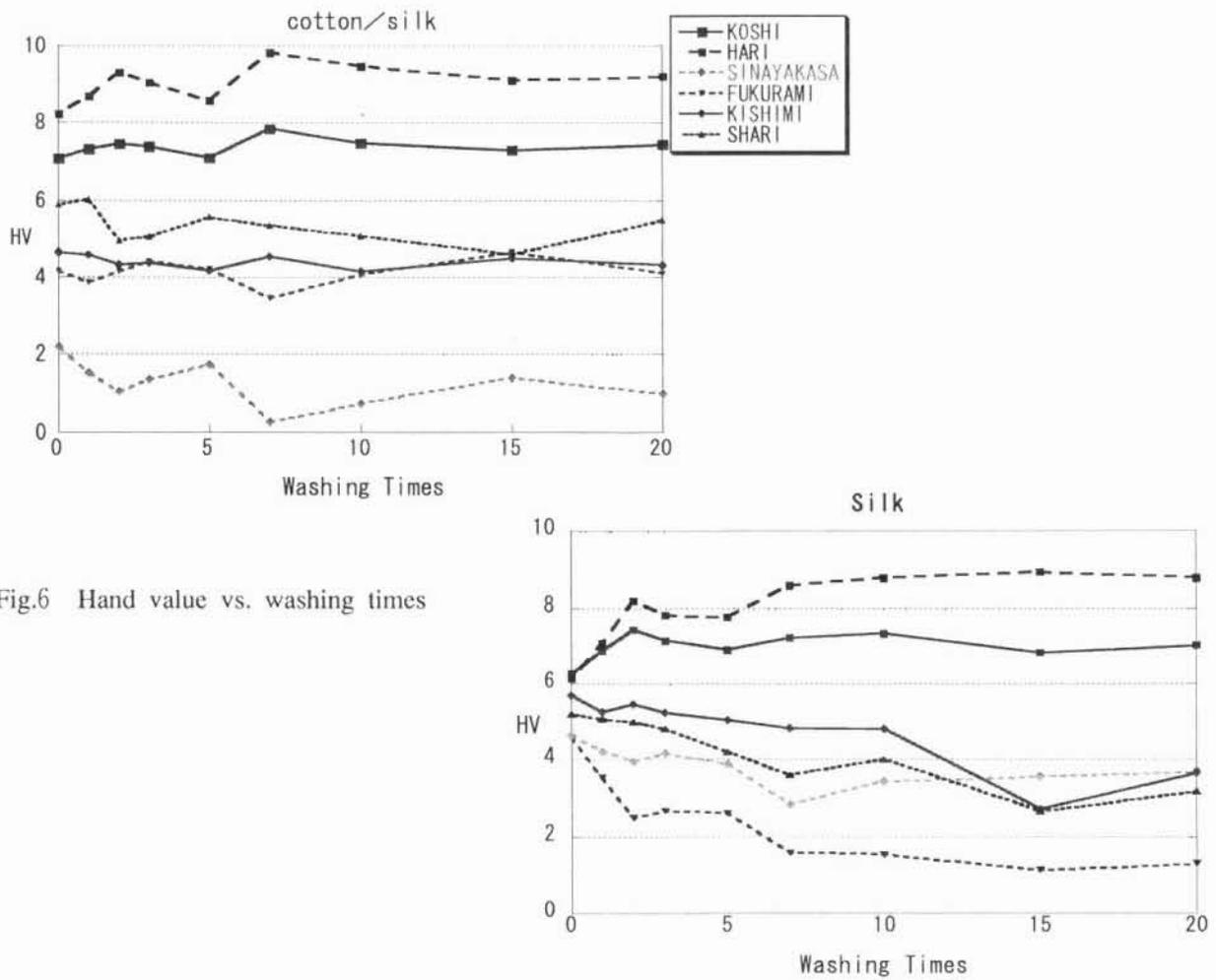


Fig.6 Hand value vs. washing times

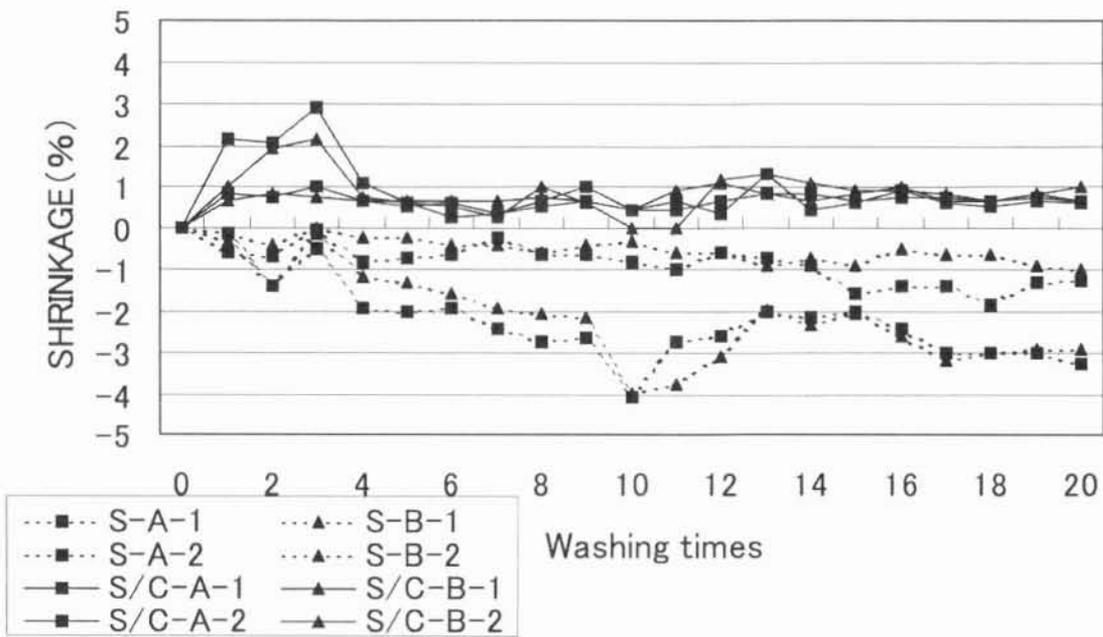


Fig.7 Shrinkage vs. washing times (Sample: S/C, S)

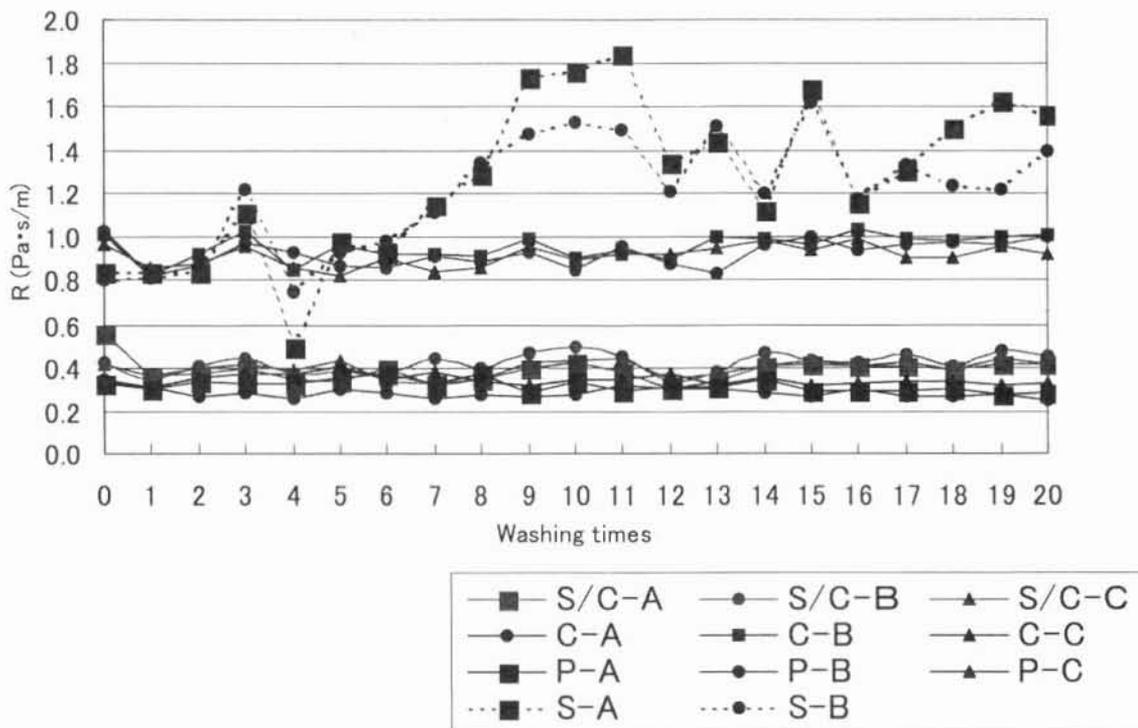


Fig.8 Air resistance vs.washing times (Sample: S/C, S, C, P)

# カイコの絹糸腺における炭水化物代謝に関する研究 特に前部絹糸腺におけるトレハラーゼについて

定金恵子\*・古澤壽治\*・林 幸之\*\*

## Carbohydrate Metabolism in the Silk glands of the Silkworm, *Bombyx Mori* - Trehalase in the Anterior Silk glands

SADAKANE Keiko\*, FURUSAWA Toshiharu\* and HAYASHI Yoshiyuki\*\*

\*Bioresource Field Science Center, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology,  
Ipponki-chou, Ukyou-ku, Kyoto

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

### Abstract

Changes of trehalase activity in the anterior, middle and posterior silk glands of the silkworm *Bombyx mori* were examined from the first day of the fifth instar through the end of the spinning. The trehalase activity appeared in posterior and middle silk glands from the 2<sup>nd</sup> day of the 5<sup>th</sup> instar. The former one reached at a maximum level on day 6, and then decreased thereafter. The latter one increased steeply until day 8 when the mature larvae begun to spin cocoon filaments. Concomitantly with the decrease of the activity in the middle glands from day 8, trehalase activity increased in the anterior silk gland from the beginning of cocoon making. Therefore, in order to clarify the function of trehalase in the anterior parts, a competitive inhibitor of trehalase, Validoxyamine A (VAA), was injected into the larvae 3 days before spinning and into the wandering larvae on beginning of the spinning. VAA inhibited trehalase activity in short time (about one day), resulting in the decreasing in the amount of liquid protein which was flowed from the middle glands to the anterior glands.

Key Words: Validoxyamine, Trehalase, Silk glands, Liquid silk, *Bombyx mori*

## 1. まえがき

カイコの絹糸腺では5齢期になると絹糸腺が急激に発育肥大する。この肥大成長は、細胞分裂によるもではなく、核のみが分裂するとともに、絹糸腺細胞では旺盛な絹蛋白質の合成に起因している。すなわち、後部絹糸腺で合成されたフィブロインは、中部絹糸腺に送られ、セリシン蛋白質に取り囲まれる。そして、フィブロイン蛋白質を中軸とする液状絹蛋白質は前部絹糸腺に送られ脱水された後、繭糸として吐き出される。

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 (Wyatt, 1967) ことから、絹糸腺の発育と炭水化物代謝との関連を調べた結果によると、脱皮後の絹糸腺の成長とともにトレハロースが吐糸開始まで蓄積し、吐糸開始からトレハラーゼ活性が急激に上昇するため、トレハロースは消費される (Shimada, 1980; Furusawa *et al.*, 1993)。すなわち、タンパク質合成が旺盛な時期にトレハラーゼ活性は上昇しない。5齢初期から二種の蛋白質が合成される時期には、体液中のソルビトール-6-リン酸がエネルギー源として利用されるという (Asakura *et al.*, 1990)。

一方、吐糸開始とともに蚕は足場を作り、適当な

\*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, FAX 075-463-6679

二次元空間があれば、楕円形、俵型や円形の繭をつくる。そして、この足場づくりのための繭糸にはトレハラーゼやシュクララーゼ活性が検出される。このことは、吐糸開始から中部絹糸腺のトレハラーゼは液状絹と一緒に吐糸されることを示している (Shimada and Hayashiya, 1975)。

そこで、本論文ではまず絹糸腺の発育に伴う前部、中部、後部絹糸腺でのトレハラーゼ活性を追跡したところ、前部絹糸腺でトレハラーゼ活性が高いことを確認したので、このトレハラーゼの前部絹糸腺における働きを明らかにすることを目的とした。そして、トレハラーゼの活性阻害剤であるバリドキシルアミンA (VAA) (Kono et al., 1993)、を5齢幼虫に投与することによってトレハラーゼ活性阻害と吐糸との関連について検討した。

## 2. 材料および方法

### 1) 供試材料

室温26℃で桑葉飼育した交雑種 (錦秀×鐘和) の5齢幼虫を用いた。

### 2) バリドキシアミン (VAA) の注射

VAA注射は時期を変えて2度行い、吐糸開始の3日前に注射する実験区と、吐糸と同時に注射する実験区との2つの実験区を設けた。VAAは、 $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように滅菌済みの0.8%生理食塩水に溶解し、前者の実験区では10倍、100倍、後者の実験区では2倍、10倍、20倍の希釈液を調製した。それぞれ5齢幼虫1頭当たり $20 \mu\text{l}$ の糸皮投与を行い、対照区として滅菌済み0.8%生理食塩水を投与した。なお、VAA投与量に換算すると、これらの注射液は前者の実験区では $0 \mu\text{g}$ 、 $0.1 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ /頭の4区、後者の実験区では $0 \mu\text{g}$ 、 $0.5 \mu\text{g}$ 、 $1 \mu\text{g}$ 、 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ /頭の5区に、各区10頭ずつ投与したことになる。

### 3) トレハラーゼ活性の測定法

#### (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、吐糸3日前に注射した実験区では前部絹糸腺および中腸を、吐糸と同時に注射した実験区では前部絹糸腺のみを摘出した。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、実験に使用するまで-80℃で凍結保存した。組織の採取は、吐糸開始3日前に注射した区では、注射当日(0日目)から6日目まで、吐糸と同時に注射した区では注射1日目から4日目まで、各区10頭ずつ毎日行った。

#### (2) 粗酵素液の調製

前部絹糸腺および中腸に、0.1M NaClを含む5倍量の20mMリン酸緩衝液(pH7.0)を加え、氷上にてホモジナイザーを用いて十分に磨砕した。前部絹糸腺の磨砕液を15,000rpm、4℃で10分間遠心し、その上清を回収して粗酵素液とした。また中腸の磨砕液は30,000rpm、4℃で1時間遠心し、上清と沈殿とに分けた。上清は可溶性画分として回収し、沈殿を0.5%のTriton Xを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した後、15,000rpm、4℃で10分間遠心してその上清を、先の遠心上清と合わせ細胞画分とした。

粗酵素液中の蛋白質量は、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad社製)を用い、波長595nmの吸光度から予め作成した検量線から求めた。

#### (3) 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。試験管またはエッペンドルフチューブ内で粗酵素液、基質、緩衝液を1:5:4の割合で混合させて反応液とし、ウォーターバスにて30℃で30分間反応させた後、沸騰水中で反応を停止させた。生成されたグルコース量はソモギ・ネルソン法を用い、波長540nmで吸光度を測定した後、予め作成した検量線から生成グルコース量を求めた。単位時間当たりに生成されたグルコース量をもってトレハラーゼ活性とし、 $1\text{U}=1 \mu\text{molcs}/30\text{minutes}$ と定義した。

#### 4) in vitroでのVAAによるトレハラーゼ活性阻害反応

VAAを、 $0.5 \mu\text{g}/80 \mu\text{l}$ となるように0.1M酢酸緩衝液(pH5.6)に溶解し、2倍、5倍、10倍の希釈系列を調製した。これらの溶液を酵素反応用の緩衝液として用い、また酵素液としては吐糸1日目の蚕の前部絹糸腺から調製した粗酵素液を用いた。

#### 5) 吐糸量の測定

吐糸開始3日前に注射した実験区では注射4日

日(吐糸1日目)から注射11日目(吐糸8日目)まで、吐糸と同時に注射した実験区では注射1日目(吐糸1日目)から注射4日目(吐糸4日目)までの菌について行った。測定値から各区ごとに平均値と標準偏差を求めた。

### 3. 実験結果

#### 1) 絹糸腺の部位別におけるトレハラーゼ活性変動

交雑種の5齢起蚕から吐糸終了(吐糸開始4日目)までの前部、中部および後部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性の変動について検討した(図1)。

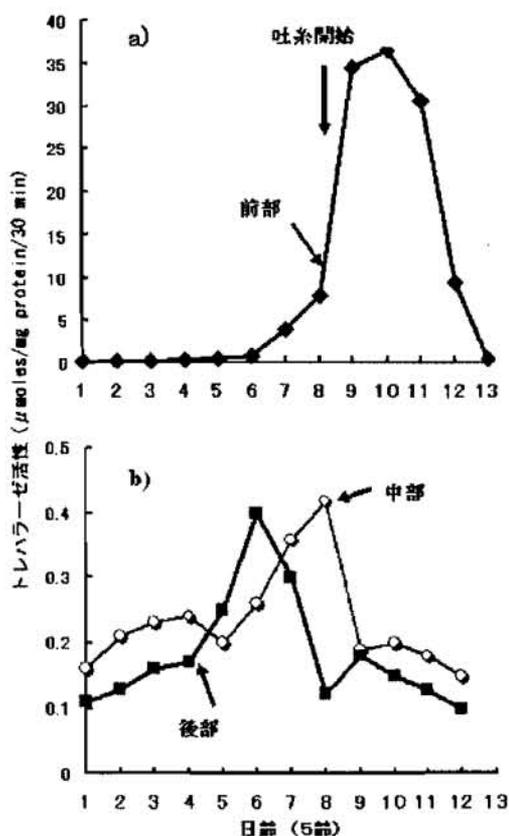


図1. 5齢期の絹糸腺の発育成長に伴うトレハラーゼ活性(比活性)の変動

- ◆—; 前部絹糸腺、
- ; 中部絹糸腺、
- ; 後部絹糸腺

前部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性をみると(図1a)、5齢起蚕から5日目までは約0.4U/mg proteinと低い活性を維持していたが、吐糸開始2日前(起蚕6日目)から上昇し始め、吐糸開始2日

目(起蚕10日目)には、5齢前半期の約90倍(37.6U/mg protein)に達した。その後、徐々に減少し、吐糸終了時には最大値の約1/5(7.9U/mg protein)に減少した。

一方、中部絹糸腺と後部絹糸腺のトレハラーゼ活性の変動をみると(図1b)、起蚕5日目から吐糸直前にかけて緩やかに上昇し、吐糸開始時(起蚕8日目)には最大値(0.42U/mg protein)に達した。そして、それ以降は徐々に減少していった。また、後部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性は、5齢起蚕から徐々に上昇し、起蚕6日目に最大値(0.33U/mg protein)を示し、それ以降は減少した。以上のことから、中部および後部絹糸腺における活性は、一見同様の変動を示しているが、最大活性に達する時期が中部絹糸腺において後部絹糸腺よりも2日遅れて現れることが明らかになった。そして、図1aに示した前部絹糸腺でのトレハラーゼ活性が最大値に達する時期はさらに遅れていた。以上の結果より、トレハラーゼ活性は5齢起蚕からの発育成長にともない後部から中部、さらに前部絹糸腺へと順次現れるものと推定できる。このことをより明確にするため、トレハラーゼ活性を蚕1頭(匹)当たりで表した(図2)。

その結果、中部および後部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性は5齢2日目より現れ、この内、後部絹糸腺は6日目に最大値に達し、その後低下した。しかし、中部絹糸腺ではさらに上昇を続け、8日目に達した後、減少した。この中部絹糸腺での活性低下と時期を同じくして、前部絹糸腺でのトレハラーゼ活性が上昇し始め、9日目から10日目に最大値に達した後、減少した。

#### 2) バリドキシルアミンA投与蚕における前部絹糸腺および中腸トレハラーゼ活性の変動

後部絹糸腺ではフィブリン蛋白質、中部絹糸腺ではセリシン蛋白質が合成されることは既知のことであるが、前部絹糸腺の働きについては未だ明らかにはなっていない。前項の通り、前部絹糸腺においてもトレハラーゼ活性が上昇することから、何らかの機能を果たしていると推察した。そこで、トレハラーゼ拮抗阻害剤であるバリドキシルアミンA(VAA)を5齢幼虫に投与すること

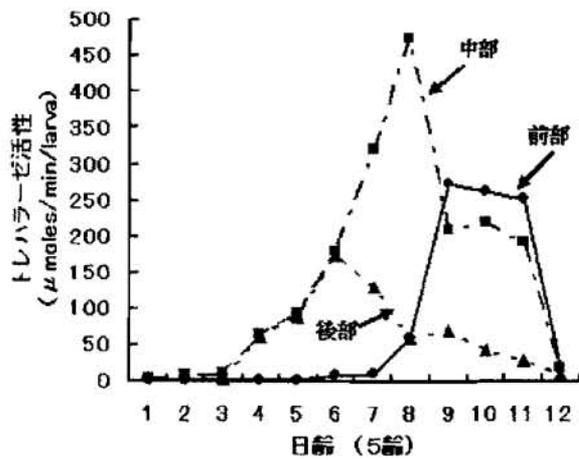


図2. 5齢期における絹糸腺の発育成長に伴うトレハラーゼ活性の変動 (1頭当たりの全活性)

—●—; 前部絹糸腺、  
- - ■ - -; 中部絹糸腺、  
...▲...; 後部絹糸腺

によって、前部絹糸腺トレハラーゼ活性と吐糸量との関係について検討した。なお、絹糸腺以外の組織についてもVAAによってトレハラーゼが阻害されているか否かについて、トレハラーゼ活性が高い中腸組織を用いて検討した。

(1) *in vitro*でのVAAのトレハラーゼ活性阻害

前部絹糸腺のトレハラーゼ活性に対するVAAの阻害を、*in vitro*での実験で検討した。200 μlの反応液中に、VAAが0 μg、0.05 μg、0.1 μg、0.25 μg、0.5 μgとなるように調製して粗酵素液と反応させ、そのトレハラーゼ活性を測定した(図3)。その結果、対照区(0 μg)のトレハラーゼ活性は約0.04Uであったが、0.05 μgでは急激に阻害されおり、その阻害率は79%であった。さらにVAA濃度を高めると(0.1 μg以上)、85%以上のトレハラーゼ活性阻害がみられた。この結果から、VAAは*in vitro*においてトレハラーゼ活性を阻害することが明らかになった。

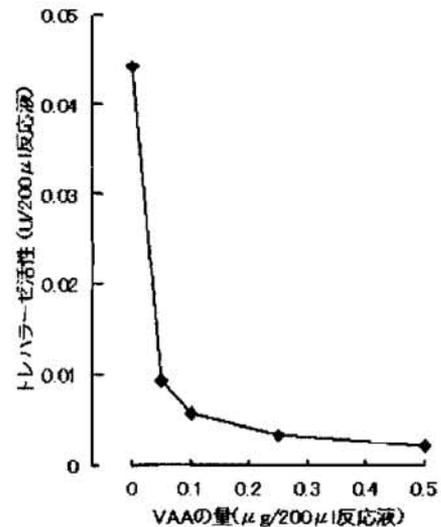


図3. パリドキシアミンA (VAA) による *in vitro*でのトレハラーゼ活性阻害  
粗酵素液20 μl と0.1 M トレハロース溶液100 μl、VAA (0-0.5 μl)を含む0.1M 酢酸緩衝液80 μl と反応させ、その反応液のトレハラーゼ活性を測定した。

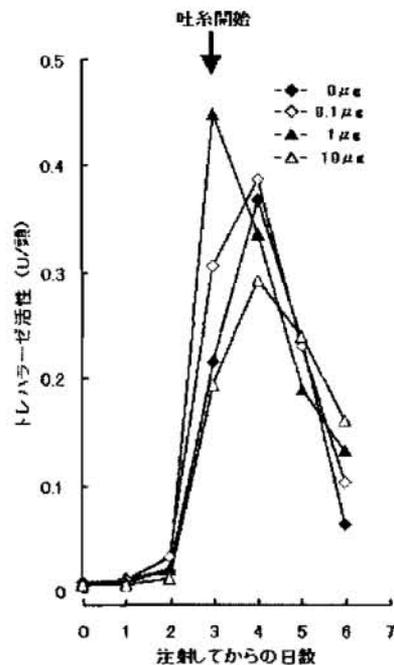


図4. 吐糸3日前にVAAを経皮投与した場合の前部絹糸腺におけるトレハラーゼ活性の変動。吐糸開始3日前にVAAを1頭当たり0 μg、0.1 μg、1 μg、10 μgを投与した。その後、注射当日(0日目)から6日目まで前部絹糸腺を毎日採取し、トレハラーゼ活性を測定した。

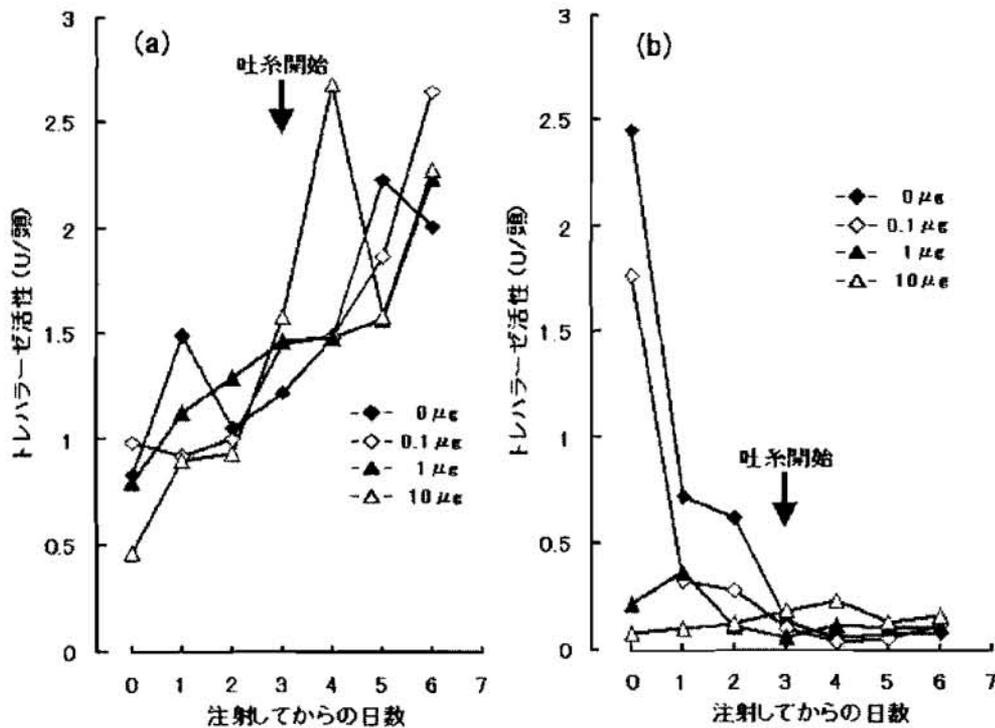


図5. 吐糸3日前にVAAを投与した場合の中腸トレハラーゼ活性の変動

吐糸開始3日前に1頭当たりVAAを $0\mu\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}$ を経皮投与した。その後、注射当日(0日目)から6日目まで毎日中腸を採取し、磨砕液を遠心して上清画分(a)と沈殿画分(b)とに分け、トレハラーゼ活性を測定した。

(2) *in vivo*でのVAAのトレハラーゼ活性に及ぼす影響

#### ①吐糸開始3日前に投与した場合

*in vivo*における前部絹糸腺および中腸トレハラーゼ活性に対するVAAの影響について検討した。まず吐糸開始3日前に、VAAを $0\mu\text{g}$ 、 $0.1\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{頭}$ のVAAを経皮投与した。その後注射当日(0日目)から6日目まで毎日前部絹糸腺の採取を行い、トレハラーゼ活性を測定した(図4)。

吐糸開始3日前(図中では0日目)にVAAを経皮投与したところ、投与2日後まで濃度によるトレハラーゼ活性に差はみられなかった。しかし、投与3日後には対照区( $0\mu\text{g}$ )に比べ $0.1\mu\text{g}$ および $1\mu\text{g}$ の投与区ではトレハラーゼ活性は高かったが、 $10\mu\text{g}$ 投与区では対照区と差がなかった。さらに投与4日後以降では、対照区とVAA投与区との間にあまり差はみられなかった。このように前部絹糸腺でのトレハラーゼ活性はVAAによって阻害されなかったことから、他の組織のトレハラー

ゼ活性が阻害されているか否かについて検討した。

そこで、中腸も同様に注射当日(0日目)から6日目まで採取し、可溶性画分・細胞画分に分けてそれぞれについてトレハラーゼ活性測定を行った(図5)。

対照区でのトレハラーゼ活性は、可溶性画分では吐糸前後で上昇し、細胞画分では逆に減少していた。一方VAA投与区では、可溶性画分のトレハラーゼ活性は対照区と同じように上昇したが、細胞画分のトレハラーゼ活性は注射した時点では投与量の増加に伴って低くなっており、 $0.1\mu\text{g}$ 投与区ではその後対照区と同様に減少したが、 $1\mu\text{g}$ および $10\mu\text{g}$ 投与区での活性はほとんど変化しなかった。以上の結果から、VAAは中腸の膜結合型トレハラーゼの活性は阻害することが分かった。

#### ②吐糸開始と同時に投与した場合

次に、前部絹糸腺トレハラーゼ活性の上昇が開始される吐糸開始と同時にVAAを $0\mu\text{g}$ 、 $0.5\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ 、 $5\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{頭}$ のVAAを経皮投与した。その後注射1日目から4日目まで毎日前部絹糸腺の

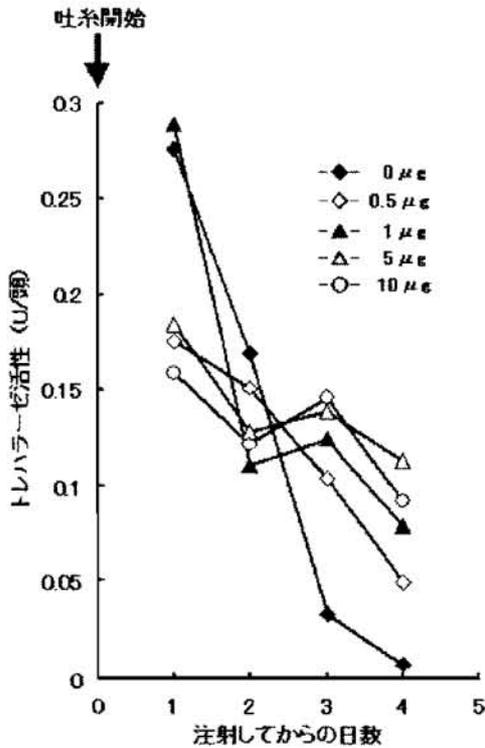


図6. 吐糸と同時にVAAを投与した場合の前部絹糸腺トレハラーゼの活性変動

吐糸開始と同時にVAAを1頭当たり0 μg、0.1 μg、1 μg、5 μg、10 μgを経皮投与した。その後、注射1日目から4日目まで前部絹糸腺を毎日採取し、トレハラーゼ活性を測定した。

採取を行い、トレハラーゼ活性を測定した(図6)。

対照区(0 μg)でのトレハラーゼ活性は、吐糸開始1日目から4日目まで減少し続けており、0.5 μg投与区でも同じように減少がみられた。それに対し、1 μg、5 μg、10 μg投与区では、いずれも投与2日目までは減少し、3日目に再び上昇するという結果となった。また4日目のトレハラーゼ活性は、投与区のいずれにおいても対照区より高くなっていた。

### 3) VAA投与による中部絹糸腺での液状タンパクの貯留と吐糸量の変化

吐糸3日前にVAAを投与した幼虫について、吐糸終了時の投与蚕を0.8%生理食塩水中で解剖し、中部絹糸腺を観察した。その結果、対照区では、絹糸腺から液状絹がほとんど吐糸されており、小さく縮んでいた。これに対しVAA投与区では、中部絹糸腺に液状絹が大量に貯蓄しており、中部

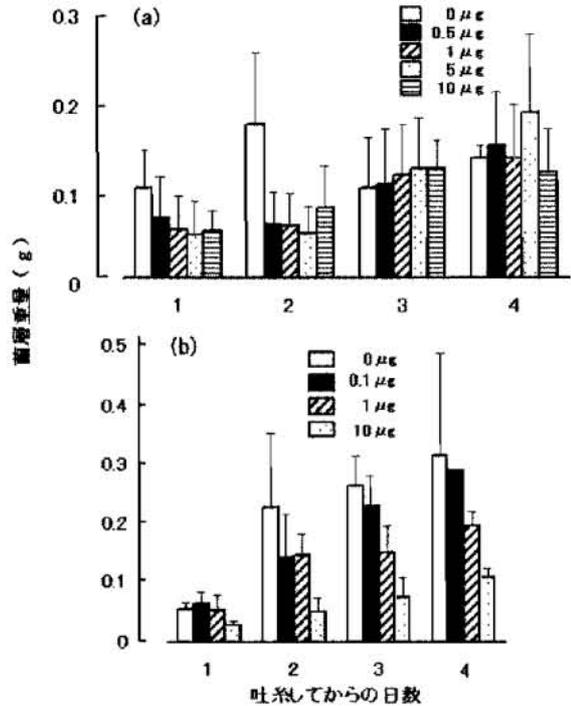


図7. VAAを投与した蚕の日毎の吐糸量

吐糸と同時にVAAを投与した区(a)と吐糸開始3日前にVAAを投与した区(b)から吐糸後、営繭させ1日毎の繭層重量を量ることによって吐糸量として表示した。VAAは凡例に記した量を1頭当たり経皮投与した。

絹糸腺の重量は対照区の約10倍近くにもなっていた。ピンセットで突き刺すと中部絹糸腺は容易に破裂し、内部の液状絹が生理食塩水中に漏れ出した。

また、VAA投与の有無にかかわらず、いずれの実験区においても蛹に変態していた。これらの蛹を解剖すると対照区(VAA無投与区)の絹糸腺はすでに退化していたが、投与区では退化していなかった。すなわち、VAA投与は幼虫から蛹への変態には影響を及ぼさないが、絹糸腺の退化に影響を及ぼすこと、さらにその絹糸腺内に液状絹を貯留させることが判明した。

これらの結果から、絹糸腺での貯留は繭糸として吐き出されていないことを示すことから、VAA投与蚕の日別吐糸量を測定した(図7)。

吐糸と同時にVAAを投与した実験区についてみると、吐糸2日目までは対照区に比べてVAA投与区は低い値をとっていたが、3日目以降は

VAAを注射した区の方が吐糸量は大きくなっていった(図7a)。

一方、吐糸3日前にVAAを投与すると、VAA投与量の増加に伴って繭は薄く柔らかくなり、吐糸量はVAA投与量の増加に伴って減少していた(図7b)。

#### 4. 考 察

カイコの絹糸腺では、その成長発育とともにトレハロースが増大し、吐糸開始からトレハラーゼ活性が増大することは既に明らかにされている(Shimada, 1980; Furusawa *et al.*, 1993)。これらの報告では、絹糸腺が機能の異なる三つの部位、前部、中部、後部絹糸腺として分けられないままトレハロース量やトレハラーゼ活性が測定されている。そこで、本実験では、まず絹糸腺を前部、中部ならびに後部絹糸腺に分けてトレハラーゼ活性を5齢起蚕から吐糸終了まで経時的に測定した。その結果、トレハラーゼ活性を比活性で測定すると、中部や後部絹糸腺に比べ、前部絹糸腺で最も高かった(図1)。そして、中部絹糸腺や後部絹糸腺では活性は低いものの、5齢初期から活性が現れ、前部絹糸腺では吐糸開始直前から活性が現れた。すなわち、絹糸腺の発育成長とともに、トレハラーゼ活性はまず後部絹糸腺に現れ、ついで中部絹糸腺、そして前部絹糸腺に移行して行くことがうかがえた。このことをより明確にするため、絹糸腺1対当たりの酵素活性の変動をみたところ、やはり後部、中部、前部絹糸腺に活性のピークが移行していった(図2)。

一方、営繭初期の毛羽にはトレハラーゼ(Shimada, 1975)やシュクラーゼ活性が検出され(Shimada and Hayashiya, 1975; Shimada *et al.*, 1980)、特にシュクラーゼは液状絹中にも検出され、前部絹糸腺に移行したシュクラーゼは吐糸開始から絹蛋白質とともに吐き出される。しかし、トレハラーゼについては液状絹にその活性が検出できないことから、吐糸過程で付加されるものと推察されている(Shimada, 1980)。これらのことから、図1あるいは図2に示したトレハラーゼ活性の後部、中部から前部絹糸腺の活性ピークの経

時的移行は、単にトレハラーゼが後部から中部、前部へと移行するという考え方では解決できない。すなわち、前部絹糸腺におけるトレハラーゼmRNAの発現は吐糸開始直前から始まり(Kamimura *et al.*, 1999)、図2に示した前部絹糸腺でのトレハラーゼ活性上昇の時期と一致した。このような事実から、さらに後部、中部、前部絹糸腺でのトレハラーゼmRNAの経時的発現についてさらに検討する必要がある。

ところで、前部絹糸腺の機能は吐糸時に液状絹を送り出すための導管としての理解しかされていなかったが、Azuma and Ohta (1998)によってV-ATPaseが見出され、吐糸を契機に前部絹糸腺の生理機能が変化することが示唆された。前述したように吐糸開始前からトレハラーゼmRNAが発現し、さらにその活性が上昇する(図1と2)ことから、前部絹糸腺のトレハラーゼはエネルギー供給としての機能を果たしていることが予想できる。本研究では、トレハラーゼ阻害剤であるバリドキシルアミンA(VAA)を用いてトレハラーゼ活性を阻害し(Kono *et al.*, 1993)、正常な吐糸行動が起こるか否かについて検討することにより、前部絹糸腺トレハラーゼの生理学的役割を明らかにすることを試みた。

まずVAAの*in vitro*でのトレハラーゼ阻害をみたところ、0.05  $\mu$ g/200  $\mu$ l(反応液)によって、80%近くトレハラーゼ活性が阻害された(図3)。VAAの阻害活性はトレハラーゼに特異的であり(Kono *et al.*, 1993)、VAAと同様にバリダマイシン骨格を形成するトレハラーゼ阻害剤が他にもいくつか存在するが、その中でも際立って強い阻害活性を持つということが認められている(Asano *et al.*, 1990)。またVAAを繭に注射することによって卵巣トレハラーゼ活性を阻害し、それによって非休眠卵や不膠着卵を誘導する研究も行われている(Takeda *et al.*, 1988, 竹田ら, 1990)。このためVAAを蚕幼虫の体内に投与し、*in vivo*での実験を行えば、前部絹糸腺トレハラーゼも活性阻害を受けると予測した。しかし、吐糸3日前にVAAを投与したところ、前部絹糸腺トレハラーゼに対する顕著な活性阻害はみられなかった(図4)。

このため、トレハラーゼ活性が存在する絹糸腺以外の組織、例えば中腸皮膜のトレハラーゼに対するVAAの影響について検討した。吐糸3日前に注射した実験区の中腸を採取し、可溶性トレハラーゼと膜結合型トレハラーゼとに分けてその活性変動を検討したところ、対照区(0 $\mu$ gVAA)のトレハラーゼ活性は、吐糸を境に膜結合型から可溶性への移行がみられ(図5)、これはYamashitaら(1974)およびSumida *et al.*(1983)の結果と一致していた。VAAを投与した蚕の中腸についても、可溶性トレハラーゼ活性は吐糸後に上昇したが、膜結合型トレハラーゼ活性は吐糸前から低い値をとっており、吐糸の前後で活性の変動はみられなかった。このことから、VAAが中腸においては膜結合型トレハラーゼの活性のみを阻害するのではないかということが考えられる。今回の前部絹糸腺からの粗酵素液は、遠心後の上清を用いたため、可溶性トレハラーゼのみになっていると思われる。絹糸腺トレハラーゼについても、中腸のそれと類似して、幼虫-蛹変態を境に膜結合型から可溶性へと移行することが分かっている(Shimada, 1981)。今回吐糸3日前に注射した区で前部絹糸腺トレハラーゼ活性の阻害がみられなかったのは、VAAが可溶性トレハラーゼではなく膜結合型トレハラーゼに作用したためではないかと考えられる。

このように、VAAは中腸皮膜トレハラーゼを阻害したにもかかわらず、前部絹糸腺で阻害しなかったことについて、VAAは *in vivo* では短期間の阻害効果しか持たないこと、また前部絹糸腺ではVAA投与時(吐糸3日前)では未だトレハラーゼ活性が出現しないことによるものと考えられる。

そこで、トレハラーゼ活性が出現する吐糸日にVAAを投与したところ、前部絹糸腺トレハラーゼ活性は、注射2日目までは阻害を受けていたが、3日日以降においては対照区と比較して活性の減少は緩やかで、むしろVAAを投与しなかった対照区よりも活性は高かった(図6)。吐糸3日前に投与を行った区についてもこの傾向はみられるようである。このことは、以下の観察結果から、トレハラーゼは液状絹とともに前部絹糸腺へ送られ

るが、VAA投与区では前部絹糸腺への液状絹の流動が対照区に比べ遅いことに起因すると推察した。

すなわち、トレハラーゼは前・中部絹糸腺の *tunica intima* (内層) および *tunica propria* (固有膜)、いわゆる絹糸腺の内腔と体液側の絹糸腺皮膜に局在している(Shimada, 1975)。そして本研究の結果では、対照区の蚕の中部絹糸腺が、吐糸を終えて小さく縮んでしまったのに対し、VAAを投与した蚕の中部絹糸腺は吐糸終了後も液状絹を溜め込み大きく膨らんでいた。蛹変態後も、本来なら強力な染色を施さないとその存在を確認できないはずの中部絹糸腺(Ito, 1915)が、VAA投与区では残っていた。Shimada(1980)の結果から、絹糸腺トレハラーゼは、液状絹と共に吐糸されることが分かっている。すなわち、VAAの影響によって液状絹が正常に吐糸されず、それと共に前部絹糸腺トレハラーゼも吐糸口を通過して体外へ出ていくことができなかつたためではないかと推測した。さらに、吐糸が正常に行われなかつたのは、VAAが体液中および吐糸口付近の筋肉など、前部絹糸腺以外の部位に存在するトレハラーゼ活性を阻害したためであろうと考えている。

VAAを投与した蚕の吐糸した繭は、VAA投与量の増加に従って薄く軽くなり、その糸の断面は扁平な形をしていた。一般に、絹繊維は太さや断面の形状が均一ではないが、繭の外層部(吐き始めの部分)から内層部(吐き終わりの部分)へと移るに従って細くなっていく傾向があり、断面の形状も、大きく丸みのある三角形から扁平な形へと移行していく。図示しなかつたが、走査型電子顕微鏡で観察した繭糸は、どれも繭の外層部から採取したものであるが、VAA投与蚕の繭糸は扁平な形をしていた。それに加え、中部絹糸腺に液状絹が蓄積していたことから、VAAが、液状絹の中部絹糸腺から前部絹糸腺への移行、または繭糸の吐糸口の経路を困難にしているのではないかと考えられる。

以上の結果を総合的に考え、VAAは前部絹糸腺のトレハラーゼ活性を阻害するのみならず、中腸組織のトレハラーゼ活性も阻害したという結果から推察して、他の組織・器官のトレハラーゼを

も阻害するであろうとすると、本研究での吐糸量の減少、絹糸腺での液状絹の貯留といった結果は、単に前部絹糸腺のトレハラーゼ活性の阻害によるものと結論づけることはできないであろう。しかし、本実験においてトレハラーゼは中部絹糸腺から前部絹糸腺への液状絹の移行に大きく関わっていること、また吐糸行動に関与する筋肉などでのトレハラーゼ阻害が吐糸行動に影響するものと推察した。

## 5. 謝 辞

本実験を遂行するにあたり、バリドキシルアミンを快く分譲戴いた筑波大学教授 河野義明博士ならびに北陸大学教授 亀田幸彦博士に心より感謝の意を表します。

## 6. 引用文献

- Asakura, T., Yamada, H., Demura, M. and Osanai, M. (1989) :  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  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
- Asano, N., Takeuchi, M., Kameda, Y., Matsui, K. and Kono, Y. (1990) : Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J. Antibiotics* 43, 722-726
- Azuma, M. and Ohta, Y. (1998) : Changes in  $\text{H}^+$ -translocation vacuolar-type ATPase in the anterior silk gland cell of *Bombyx mori* during metamorphosis. *J. Expl. Biol.* 204, 479-486.
- Ito, H. (1915) : On the metamorphosis of the silk glands of *Bombyx mori*. *Bull. Imperial. Tokyo Sericult. Coll.* 1, 19-42
- Furusawa, T., Wakisaka, 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.* 28, 169-176.
- Kamimura, M., Takahashi, M., Tomita, S., Fujiwara, H. and Kiuchi, M. (1999) Expression of ecdyson receptor isoform and trehalase in the anterior silk gland of *Bombyx mori* during an extra larval molt and precocious pupation induced by 20-hydroxyecdysosn administration. *Archives Insect Biochem. Physiol.* 41, 79-88.
- Kono, Y., Takeda, S., Kameda, Y., Takahashi, M., Matsushita, K., Nishina, M. and Hori, E. (1993) : Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamine A, and its influence on the blood sugar level in *Bombyx mori* (Lepidoptera:Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28(3), 379-386
- Shimada, S. (1975) : Trehalase activity in the silk glands of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera:Bombycidae). *Can. Ent.* 107, 1311-1314
- Shimada, S. (1981) : Soluble and particle-bound trehalase in the silk glands during larval-pupal development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 89, 341-343.
- Shimada, S. and Hayashiya, K. (1975) : Hydrosis of sucrose by the cocoon of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 5, 653-657.
- Shimada, S., Kamada, A. and Asano, S. (1980) : The cocoon trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10, 49-52
- Sumida, M. and Yamashita, O. (1983) : Purification and some properties of soluble trehalase from midgut of pharate adult of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 13(3), 257-265
- Takeda, S., Kono, Y. and Kameda, Y. (1988) : Induction of non-diapause eggs in *Bombyx mori* by a trehalase inhibitor. *Entomol.*

Exp. Appl. 46,291-294

竹田 敏・河野 義明・亀田 幸彦 (1990) : ト  
レハラーゼ阻害剤、バリドキシルアミン  
Aによるカイコ不膠着卵の誘導, 日蚕雑  
59(5),360-365

Wyatt, G. R. (1967): The biochemistry of sugars  
and polysaccharide in insects. *Adv. Insect  
Physiol.* 4, 287-360

Yamashita, O., Sumida, M. and Hasegawa, K. (1974)  
:Developmental changes in midgut trehalase  
activity and its localization in the silk-  
worm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 20,  
1079-1085

# 多孔性シルクの形成と特性

日本野蚕学会会長 赤井 弘

## Formation of porous silk and their characteristics

Hiromu AKAI

### 要 約

シルク、または衣といえ、通常、桑の葉で飼育されるカイコ（家蚕）の繭や生糸、さらに絹織物を想起させる。最近では人工飼育が改良され、カイコばかりでなく多種の野生絹糸昆虫も容易に飼育が可能になった。

昆虫の産生する野生のシルクは、家蚕糸のように繭糸の内部が無構造のものばかりでなく、多孔性繭糸も多量に存在する。ヤマユガ科に属するヤマユガ、サクサン、タサールサンなど、この科のほとんどのシルクは多孔性構造を示す。なぜ、多孔性繭糸が生成されるかについても明らかにした。すなわち、ヤマユガ科の絹糸昆虫の後部糸腺の内膜の退行が他科のそれに較べて進行し、腺細胞から排出されるライソソームも容易に腺腔内の液状絹中に混入される。これが液胞となり、吐糸される繭糸中にも微細な管状構造を形成する。一方、カイコなどでは、内膜が膜状構造として残存し、腺細胞から排出されるライソソームは内膜の内側で自己消化され、腺腔内液状絹中に混入されることはない。

多孔性絹糸は、加工により糸の光沢、織物の風合いに優れ、今後の新製品の開発に大きく期待できる。

野生の絹糸昆虫の作る繭や繭糸は多種多様で、カイコの繭のようによく揃った美しいものは少なく、繭の大小、繭色、構造などの点で異なっている。インドのタサールサンの中にはカイコの数倍の大きさの繭を作り、アフリカのマナフエは集団で巨大な繭巣を作る。

日本のヤマユガやウスタビガは緑色の美しい繭を作り、インドのムガサンは、“ゴールドンシルク”と呼ばれる美しい生糸を、インドネシアのクルキュラは、“黄金繭”を作る。

このように、地球上には数万種に及ぶ特性をもつシルク素材が存在している。

カイコの繭糸は、平均3デニールほどの太さで、光沢があり、染料に対して美しく染まるが、生地にした場合には冷たい感触をもたらす繊維である。一方、インドのタサールサンは、織度が12デニール以上あり、染色性は劣るが柔らかい風合いのあるシルクとして親しまれている。

最近の繭糸の微細構造の研究から、ヤマユガ、サクサン、タサールサンなどの繭糸は、カイコのような緻密性構造とは異なり、繭糸の内部に多数の小管状構造を内在する多孔性繭糸であることが

明らかにされている。なぜ、絹糸昆虫の繭糸構造にこのような違いが見られるのであろうか。この差異は絹糸腺の内部構造に起因するものか、あるいはその他の要因によるのかも問題点の一つであり、この種の論議はこれまでにほとんど行われていなかった。

本文では、ヤマユガ科の絹糸昆虫が産生する多孔性繭糸の生成と特性について考察する。

### 1. 多孔性繭糸の発見

筆者は長年にわたってカイコの絹糸腺について光学顕微鏡（光顕）観察を行ってきたが、絹糸腺の腺腔内に貯留されている液状絹や吐糸された繭糸中に空胞や多孔性構造を見ることはなかった（赤井、1965）。その後も引き続き液状絹や絹糸に関わる電子顕微鏡（電顕）観察を進めてきたが、カイコに限りフィブロイン中に多孔性構造を観察することはなかった。（図1）（赤井、1976；Akai, 1984）

1988年に日本産のヤマユガと中国産のサクサンの繭糸を超薄切片とし、透過電顕で観察したと

表2 絹糸昆虫の繭糸の微細構造

科名	種名	微細構造
カイコガ	カイコ	緻密性繭糸
	クワコ	〃
ヤマユガ	テンサン	多孔性繭糸
	サクサン	〃
	タサールサン	〃
	パフィア	〃
	ムガサン	〃
	エリサン	〃
	ロスチャイルドヤマユガ	〃
	ヨナクニサン	〃
	クリキュラ	〃
カレハガ	ゴノメタ	緻密性繭糸
	ボロセラ	〃
ギョウレツケムシガ	アナフェ	〃
ミノガ	オオミノガ	〃

糸では、テンサンやタサールサンに較べて織度も細く、小孔も小さいため蒸着を厚くすると多孔性が消失し緻密性繭糸と見誤る場合がある。

したがって、走査電顕観察を行う時には同時に切片の観察を併用することが望まれる。

パラフィン切片は通常切片の厚さが $5\mu\text{m}$ 以上になるので繭糸の多孔性構造を観察するには不十分であり、厚さ $0.8\mu\text{m}$ 以下の樹脂切片の観察が不可欠である。さらに微細な情報を必要とする場合には、超薄切片透過電顕観察が必要であろう (Akai, 2000; Akai and Ngashima, 2002)。

以上の諸問題を考慮して観察した結果は、表2に示したとおりである。結論としては、ヤマユガ科の絹糸昆虫の吐糸した糸は多孔性であるが、その他のカイコガ科、カレハガ科、ギョウレツケムシガ科、ならびにミノガ科の繭糸はすべて緻密性繭糸である。

では、なぜヤマユガ科の繭糸のみが多孔性なのであろうか。

### 3. ヤマユガ科の繭糸は多孔性

繭糸は昆虫体内の絹糸腺の細胞で作られる。大きい繭を作るタサールサン (図7)、小さい繭を作るクワコ、ほとんど糸を吐かないモンシロチョウ、

などの間で、絹糸腺の形や大きさと繭糸構造との間に関係がある。

図8には、数種絹糸昆虫の絹糸腺の形態が図示されている (赤井, 1976)。

この中で大型の繭を作るヤマユガ科に属するタサールサン、テンサン、サクサンなどは、中部および後部糸腺がジグザグ状を呈し、シルクの分泌量が最も大量である (図8のd)。これに比較してカイコガ科、カレハガ科、ミノガ科、などの絹糸腺は、中部糸腺がS字形で後部糸腺がジグザグ状をなし、全体の中では中程度の繭糸を作る。繭を作らないモンシロチョウなどの絹糸腺は、小形であり、中部糸腺はS字形、後部糸腺は短小な棍棒状である。

結論として、絹糸腺の形態から見ると、中部および後部糸腺が共にジグザグ状を呈するヤマユガ科に属する絹糸昆虫が多孔性繭糸を産出し、シルクの量も多く、絹糸腺は最も進化しているといえよう。

### 4. 多孔性繭糸の形成

緻密性繭糸を産出するカイコの絹糸腺におけるシルクの分泌と繭糸形成については、すでに詳細に報告した (Akai, 1984; 1998; 2000)。以下にその

要点を述べる。

カイコの後部糸腺細胞のフィブロインの生成を経時的にみると、経口的に投与された<sup>3</sup>Hグリシンは投与後約10分後には細胞質中の発達した粗面小胞体上のリボソームで合成されフィブロイン中に取り込まれる。小胞体の管腔を通り、投与後15分頃にはゴルジ装置に移行し、ここで濃縮されフィブロイン小球となる。フィブロイン小球はゴルジ装置から遊離し、投与後45~60分頃には腺細胞の内縁部に移動し、繊維状のフィブロインはエキソサイトーシスによって細胞外に放出される。

腺細胞の表面には薄いクチクラ性の内膜（電顕で確認できる）が存在し（図9,10）、この内膜にはフィブロインが通過できる小孔が存在する。腺細胞の内表面から内膜の表面までの厚さは厚い時で約10 $\mu$ m、内部にフィブロインが充満し顕微鏡で観察するとブルーの一層をなし“絹質層”と呼ばれてきた。

絹質層内のフィブロイン繊維は小集団をなし、内膜の小孔を通過し、腺腔内の貯留フィブロイン柱の表面に堆積されていく。経口的に投与された<sup>3</sup>Hグリシンがフィブロイン柱に到達するのに約2時間を要する（図9）。

一方、典型的な多孔性繭糸を産生するヤマユガ科のタサールサンの後部糸腺の超微形態を観察すると、カイコとタサールサンの内膜との間にはその微細構造に大差が見られる。

タサールサンの内膜は、カイコの内膜（図10）に比べて著しく退化し、その痕跡が残存するにすぎない（図11）。したがって、腺細胞からエキソサイトーシスによって放出されたフィブロイン繊維の集団は、時間をかけて内膜を通過する必要がなく直接腺腔内フィブロイン柱の表面に堆積される。

吐糸営繭期には、絹糸腺細胞は退行を始め多数のライソソームの形成と放出が始まる。

繭糸中および絹糸腺内の液状絹中に見られる空胞または液胞の起源は、腺細胞から放出されるライソソームによるものと考えられる（図12）。カイコの後部糸腺細胞の表面には上記の内膜が存在し、ライソソームは腺腔内へ移行することはできず、内膜の内側で自己消化により溶解される。

方、タサールサンでは内膜がほとんど存在しないため、ライソソームは容易に腺腔内フィブロイン柱の表面に付着し、その後分泌され堆積されるフィブロイン小塊によりフィブロイン柱に埋没し、自己消化により液胞となる。したがって、カイコの腺腔内液状絹は液胞を含まない状態で吐糸され、緻密性繭糸となるが、タサールサンでは液状絹に多数の液胞を含み、多孔性繭糸となる（図13）。

## 5. 多孔性繭糸は進化の証

さきに述べたように、ヤマユガ科の繭と絹糸腺は他科のそれらに比べて大きく、特に営繭時にはジグザグ状の中部および後部糸腺が著しく肥大し、大量のシルクを分泌する。絹糸昆虫の進化の歴史の中で、ヤマユガ科のグループのみが大量の絹タンパク質の生成と分泌に最も適した絹糸腺への進化に成功したものと考えられる。

その証の一つとして、タサールサン、サクサン、テンサンなどの絹糸腺では、後部糸腺の内表面を覆う内膜が退化している。このことは、フィブロインやライソソーム（細胞からの排出物）が腺細胞から短時間で腺腔内へ分泌できる結果をもたらし、ライソソームは腺腔内フィブロインの中で解離し、液胞形成の原因となり、さらに繭糸中に多孔性の管状空間を形成する原因となっている（Akai et al., 1993; Akai, 1998）。

一方、カイコ（家蚕）については、繭も比較的大きく、糸量も多いが、繭糸は緻密性構造である。その理由として考えられることは、カイコは野生のクワコやウスバクワコらと同じカイコガ科に属し、仲間のすべての種は繭も小さく絹糸腺も内膜を残し（図10）、腺細胞の進化の点ではヤマユガ科に遅れているものといえよう（Akai, 1984; 1998）。

カイコガ科の中でカイコだけが7000~8000年前と推定される頃から馴化され、最良の環境下で飼育され、さらに品種改良が加えられたため、体躯と絹糸腺、さらに繭も肥大したが、体内構造、例えば内膜を変えるまでには至らなかったことを示している。換言すると多孔性繭糸を生み出すための必要条件である後部糸腺の内膜の退化は、

7,000年程度の人類の管理下における飼育や品種改良では変化が起こらなかったといえよう。

## 6.多孔性絹糸による風合いと調節機能

家蚕糸で織った普通の生地は肌に接着すると、その瞬間ひやりと冷たさを感じるが、サクサンやタサールサンの織物では温かさを感じる。この違いが、繭糸構造からくる風合いの差、緻密性と多孔性の差異といえよう。

最近では、合成繊維においても繊維の外形や内部構造を変えて天然繊維に近い風合いや感触を得るための努力がなされている(図14)。しかし、多孔性繭糸の超薄切片を観察すると、天然の造形の精巧さが分かり、これらの素材を十分に活かすことの必要性を感じさせる(図15)。

繭糸織度の最も太いといわれるタサールサンの中の“ダバ”や“スキнда”と呼ばれる品種では、1本の繭糸が15デニールを越すものも少なくない。これを精練し外層部のセリシンを落とすと、内部の多孔性構造が表面に露出し、保温、保湿、通気性、などの衣料内微気象の調節効果が生じ、衣類では快適性を感知できることになる。

また、多孔性繭糸では、外部のセリシンを完全に除くと、その内部構造から見てフィブリルが分離しやすく、織物では毛羽立ちやすくなることは容易に理解できる。事実、タサールサンやサクサン製品では、その毛羽立ちをユーザーが問題にすることは少なくない。

精練の度合い、すなわちセリシンを何パーセント残せば毛羽立ちに効果があるのか、さらに風合いにどの程度の影響が出るのかなどの詳細な研究が現場で求められている。

一方、家蚕糸のような緻密性絹糸では、時に高高度性も要求される。しかし、家蚕糸には織度や緻密性構造に限界があり、風合いや高高度性に係わる要求を満たすためには家蚕糸以外の多孔性絹糸との合糸や交織が必要となろう。

## 7.多孔性絹糸の利用

明治以降、日本の蚕糸、絹産業は、シルクの大

量生産、絹質と製品の均一化、薄利多売をモットーに産業の拡大を進めてきた。しかし、現時点ではこの方針は崩れ、大量から適量へ、多様な製品化、付加価値の高い限定販売などのキーワードがシルクの今後の道と成りつつある。多孔性絹糸、あるいは野生絹糸の出番でもある。

現在、世界で利用されているシルクは、家蚕糸が大部分を占め、残りがテンサン、サクサン、エリサン、タサールサン、ムガサン、などである。サクサンは野蚕糸の中では最も大量であるが、その他は僅少で、利用の仕方によっては高い付加価値に繋がる可能性を持つ。

ムガサンの“ゴールデン・シルク”は、希少性と糸の特性から長年にわたって高い付加価値を保持している。

最近話題になったクリキュラの黄金繭の紬糸、黄金繭シートなどは、珍しさと希少性から高い価格が保たれている。

絹糸昆虫は、長い進化の歴史の中で、虫自身の安全のために獲得してきた多様な機能性をもつが、繭はそれら機能性の代弁者でもある。外界の厳しい環境下に生息する野蚕の機能性は家畜化された家蚕のそれらより明らかに高いことが証明されている(Akai,1997;1999;Akai et al.,1999)。よく知られている機能性としては、抗菌性、UVカット効果、コレステロール制御機能、その他が報告されている。特に、UVカット効果は繭糸の多孔性構造に関係があるものと考えられている。

多孔性絹糸については、今後多方面にわたって詳細な研究を必要とするが、利用面については多孔性をよく理解し付加価値のある製品化に利用できよう。すなわち、(1)多孔性による優れた風合いや感触のある衣料、(2)通気性、温湿度調節に優れた快適衣料、(3)抗菌、UVカットなどの機能性衣料、さらに、珍しさや生産量による希少性製品、などである。

最終製品を作る川下の分野においても、繭糸の諸物性、特に多孔性と緻密性を十分に理解し、それぞれの目的の製品の付加価値を高めるために野生のシルクが有効に利用されることを期待する。

文 献

- 赤井 弘 (1965) カイコの絹糸腺の微細形態に関する研究 (IV)。蚕試報告 19: 375-484
- 赤井 弘 (1976) 昆虫超微形態学、299頁、東大出版、東京
- 赤井 弘 (1976) 昆虫の表面構造、139頁、東大出版、東京
- Akai, H. (1984) Ultrastructure of the cuticular intima of the posterior silk gland in *Bombyx mori*. J. Seric. Sci. Jpn., 53, 72-76.
- Akai, H. (1984) The ultrastructure and functions of the silk gland cells of *Bombyx mori*. In Insect Ultrastructure 2 (eds. R.C. King and H. akai), 323-364. Plenum, New York.
- 赤井 弘 (1990) 絹糸腺と繭糸形成。天蚕、Science & Technology (赤井、栗林編)、70-83。
- 赤井 弘 (1994) シルクの誕生—繭ができるまで—、シルクの科学 (シルクサイエンス研究会編) 10-30, 朝倉書店、東京。
- Akai, H. (1997) Anti-bacterial function of natural silk materials. Int. J. Wild Silkmoth & silk 3, 79-81.
- Akai, H. (1998) Silk glands. Microscopic Anatomy of Invertebrates. vol.11A : Insects, 219 - 253.
- 赤井 弘 (1999) 絹素材の新しい機能性食品と開発34 (7)、45-47
- Akai, H. (2000) Cocoon filament characters and post cocoon technology. Int. J. Wild silkmoth & silk 5, 71-84.
- 赤井 弘 (2002) 野蚕糸の知識ABC (1)、シルクを吐く虫たち (家蚕と野蚕)。染織α252, 32-35。
- 赤井 弘 (2002) 野蚕糸の知識ABC (2)、巨大な珍しい野蚕たち、インド：タサールサン、アフリカ：アナフェ。染織α 254, 64-67。
- 赤井 弘 (2002) 野蚕糸の知識ABC (3)、色繭を作る絹糸虫たち、カイコ、ムガサン、ウスタビガ、クリキュラ、サクサン、エリサン、アゲマ。染織α 256, 64-67。
- 赤井 弘 (2002) 野蚕糸の知識ABC (4)、個性ある繭糸と繭、タサールサン、ゴノメタ、ボロセラ、天蚕、クリキュラ、ロスチルディア、エリサン、オオミズアオ、アゲマ、染織α 260, 46-49。
- 赤井 弘 (2003) 野蚕糸の知識ABC (5)、野蚕と家蚕、シルクは健康素材、染織α 262, 64-67。
- Akai, H., M. Kiuchi, and Tamura (1988) Ultrastructures of silk glands and cocoon filaments of wild silkmoths, *Antheraea yamamai* and *Antheraea pernyi*. Wild-silkmoths ' 88 (eds. H. Akai & z. s. Wu), 9-23. International Society for WildSilkmoths Tsukuba.
- Akai, H. and T. Nagashima (1997) Cocoon filament formation in silk glands and physical characteristics of raw silk of Muga silkworm, *Antheraea assamia*. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 3, 23-30.
- Akai, H. and T. Nagashima (1999) Fine-structural characteristics of Anaphe-cocoon filament. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 4, 13-16.
- Akai, H. and T. Nagashima (2002) Structural characteristics of cocoon filament of the African silkmoth, *Argema mimosae*. Int. J. Wild Silk 7, 47-52.
- Akai, H. and T. Nagashima and S. Aoyagi (1993) Ultrastructure of posterior silk gland cells and liquid silk in Indian tasar silkworm, *Antherasa mylitta* Drury (Lepidoptera : *Satur niidae*). Int. J. Insect Morphol. & Entomol. 22, 497-506.
- Akai, H. and T. Nagashima, S. Aoyagi, and S. Terauchi (1994) Structural and ultrastructural changes of liquid silk in silk

- gland of the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. Int. J. Wild Silk 1, 15-21
- Akai, H. and T. Nagashima, K. Imada, N. Aoki, and N. Mii (1999) Absorbance and transmissivity of ultraviolet by wild silk, *Antherasa pernyi*. Int. J. wild Silkmoth & Silk 4, 97-99.
- Akai, H. and T. Nagashima, and G. Mugenyi (1999) Anaphe in Africa: are they social insect?. Int. J. wild Silkmoth & Silk 4, 7-12.
- Narumi, T., M. Kobayashi, and Mori (1992) Fine structure of cocoon filaments of silkworms. Wild Silkmoths '91 (eds. II. Akai, Y. Kato, M. Kiuchi, and J. Kobayashi), 179-185.
- Narumi, T., M. Kobayashi, and M. Kobayashi (1994) The fine structure of cocoon filaments in wild silkmoth, *Loepa katinka sakaci* Inoue. Int. J. Wild Silkmoth & Silk 1, 22-25.
- 布日 順郎 (1979) 養蚕の起源と古代絹。484頁、雄山閣、東京。

## 図版説明

図1 カイコ (家蚕) の繭糸断面の写真。

A: 顕微鏡写真 f, フィブロイン, pt, 2本のブランよりなる繭糸, s, セリシン。

B: 走査電顕写真 f, フィブロイン, s, セリシン

図2 テンサン繭糸断面の透過電顕写真による模式図。典型的な多孔性繭糸構造を示す。

f, フィブロイン; is, 内層セリシン; os, 外層セリシン; v, 液胞。

図3 タサールサンとクリキュラの繭糸断面の走査電顕写真。両者の繭糸の太さは異なるが共に典型的な多孔性繭糸である。

図4 サクサン終令期の絹糸腺。後部糸腺が急速に肥大してくる。a, 前部糸腺; h, 頭部; m, 中部糸腺; p, 後部糸腺

図5 カイコとサクサンの絹糸腺の形態の比較。

A: カイコ, B: サクサン

1. 吐糸管, 2. 前部糸腺, 3. 中部糸腺, 4. 後部糸腺

図6 タサールサンの絹糸腺の断面写真。

A: 中部糸腺; B: 前部糸腺。cy, 細胞質; i, 内膜; l, 腺腔; s, セリシン, 矢印はフィブロイン中の液胞。

図7 タサールサンの幼虫と繭。

A: 幼虫, B: 繭。幼虫体重は60~80gの巨大幼虫で、繭糸は典型的な多孔性である。

図8 各種絹糸昆虫の絹糸腺の形態。

(a) モンシロチョウ, (b) ヨトウガ, (c) カイコガ, (d) ヤママユガ, (e) オビヒトリ, (f) ドクガ。(d) 型が最も進化した絹糸腺であり、多孔性絹糸を産生する。

図9 絹糸腺細胞内におけるフィブロインの生成を示す模式図。<sup>3</sup>Hグリシンを経口的に投与し、フィブロインの合成と細胞内移動経路をオートラジオグラフィーで追跡し、同時に移動時間を明示した。すなわち、グリシン投与後10分でリボソームに、15分後にゴルジ装置、45~60分後に細胞質から絹質層に分泌され、90分後に内膜を通過し、120分後に腺腔内フィブロインの表面部に到達する。CF、腺腔内フィブロイン; CM、内膜; ER、粗面小胞体; FG、フィブロイン小球; G、ゴルジ装置; MF、フィブロイン小塊; R、リボソーム; SL、絹質層。

図10 カイコの後部糸腺の内膜。bm、マイクロフィラメントの集団を含む細胞質突起 cs、内膜性の支柱; mf、フィブロイン繊維の集団; ocm、内膜の最表層。

図11 タサールサン後部糸腺細胞のフィブロインの分泌。内膜は殆ど見られずフィロインとライソソームが腺細胞から分泌され、腺腔内液状フィブロイン (cf) 中に流入する。細胞質表面には、ミクロフィラメントの集団 (bm) がらせん状に走り、矢印は分泌される大小の塊状フィブロインを示す。cy、細胞質；ly、ライソソーム；v、ライソソーム由来の液胞。

図12 絹糸腺細胞におけるライソソーム形成の過程を示す模式図。不用になった細胞内小器官、例えば粗面小胞体は層状に変化し (a~c)、膜に包まれ (d)、内部で消化が始まり、(e~f)、液胞となる (g)。

図13 カイコの緻密性繭糸系 (上図) とヤマユガの多孔性繭糸 (下図) の繭糸形式の模式図。カイコの後部糸腺 (P) の腺細胞から分泌されたフィブロイン繊維の集団 (mf) は、中部糸腺

(M)、前部糸腺 (A) へと進む、引き延ばされ相互に密着し、吐糸管 (SP) から吐糸される時には緻密性繭糸 (CF) となる。その断面 (SE) には多孔性構造は生じない。一方、ヤマユガでは、塊状フィブロイン繊維のほかにライソソーム由来の液胞が混入し、両者が共に中部糸腺 (M) から前部糸腺 (A) で引き延ばされ、多孔性繭糸となる。繭糸断面には多数の小孔が形成される。

図14 合成繊維の断面の走査電顕写真。1本の繊維に4個の小孔 (上図) や1個の太い孔 (下図) を含むフィラメントが作られている。

図15 ヤマユガ科のアゲマの繭の断面に見られる繭糸断面の光顕写真。繭断面内の小孔は切断角度により円形から楕円形、さらに管状に変わる (矢印)。繭糸間には大量のセリシン (s) が見られる。cf、繭糸；v、空間。

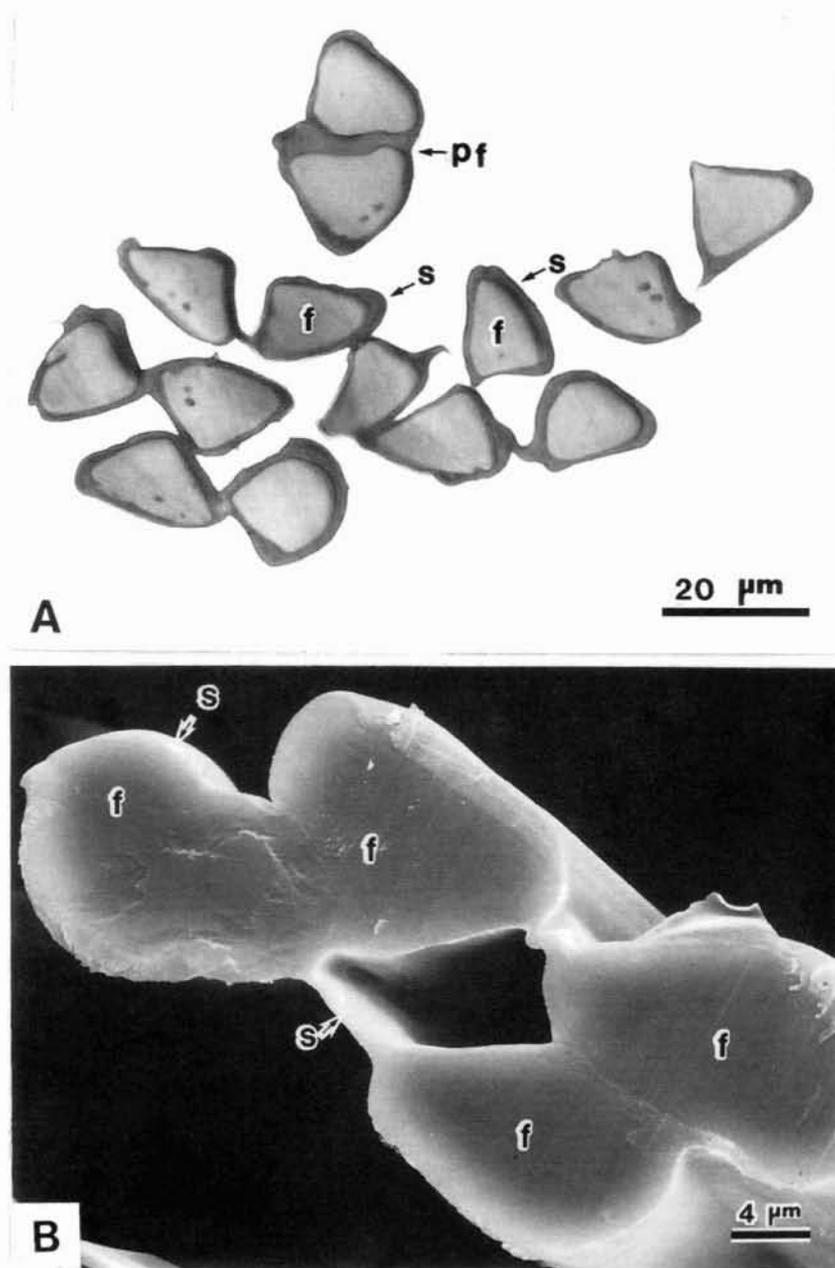


図 1

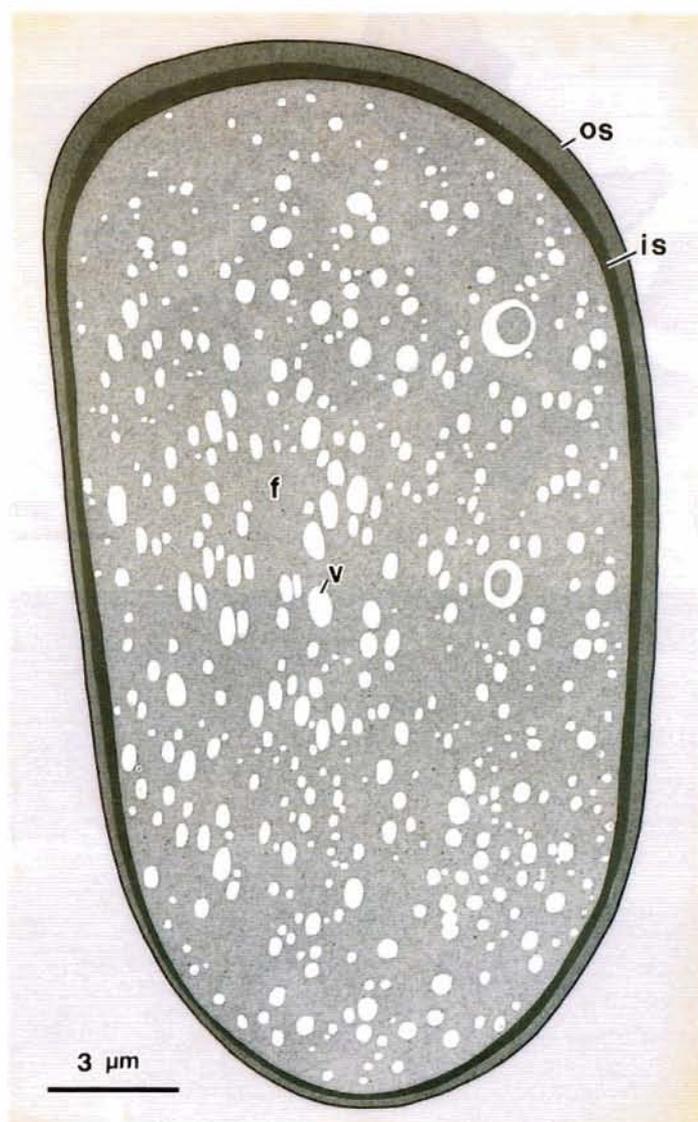
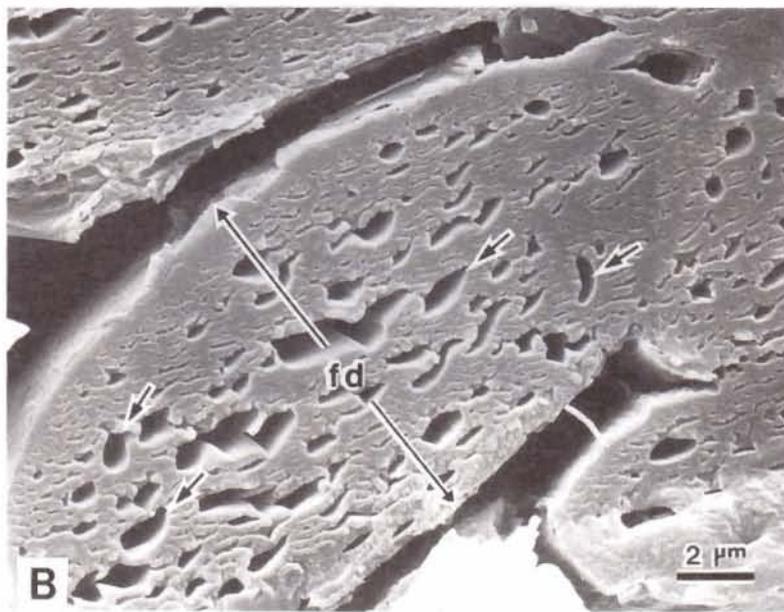
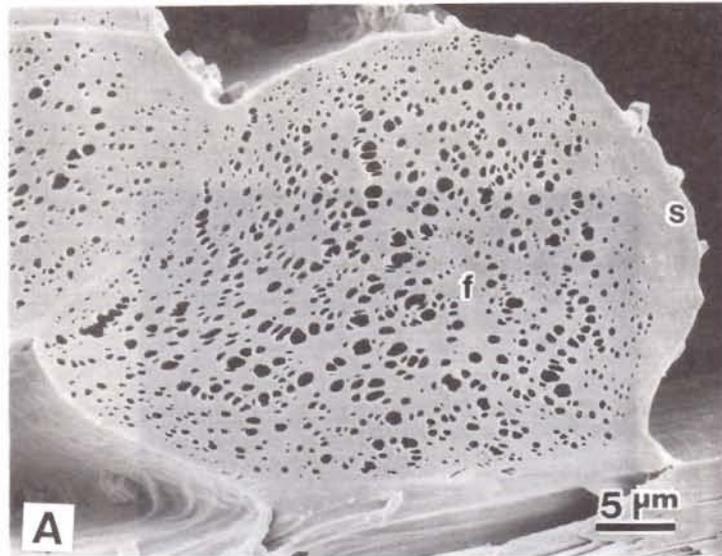


図 2



☒ 3

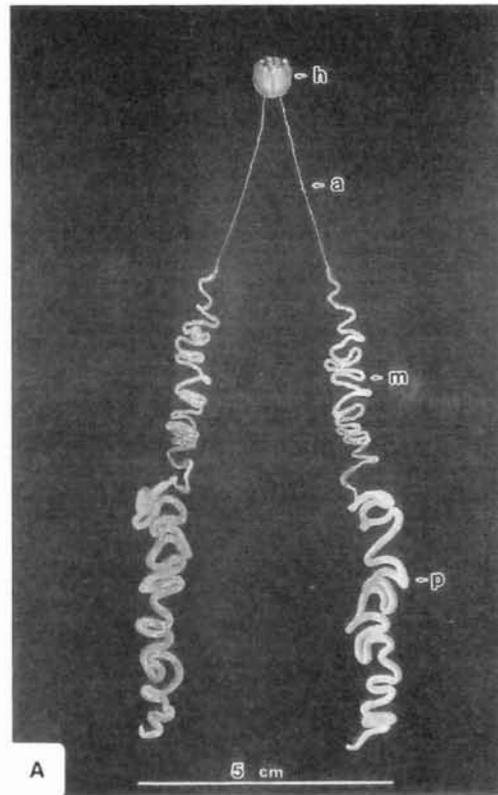


図 4

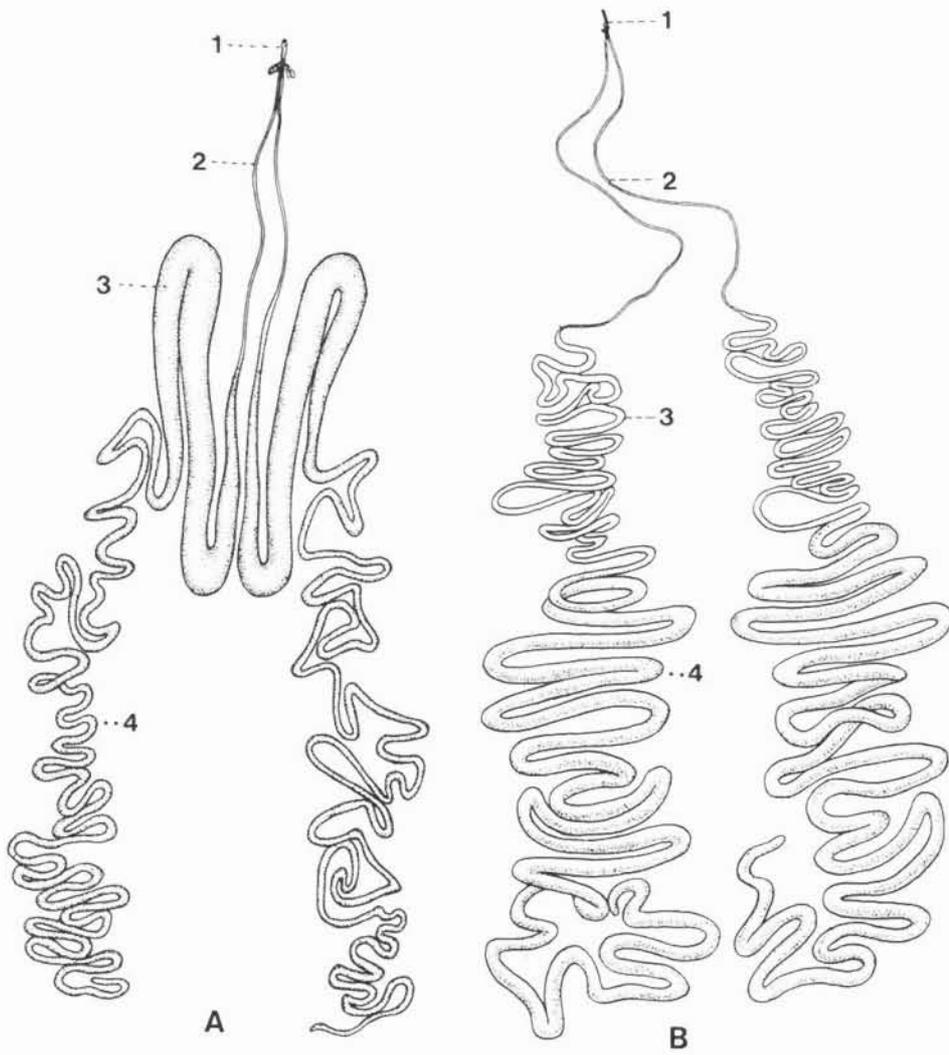


图 5

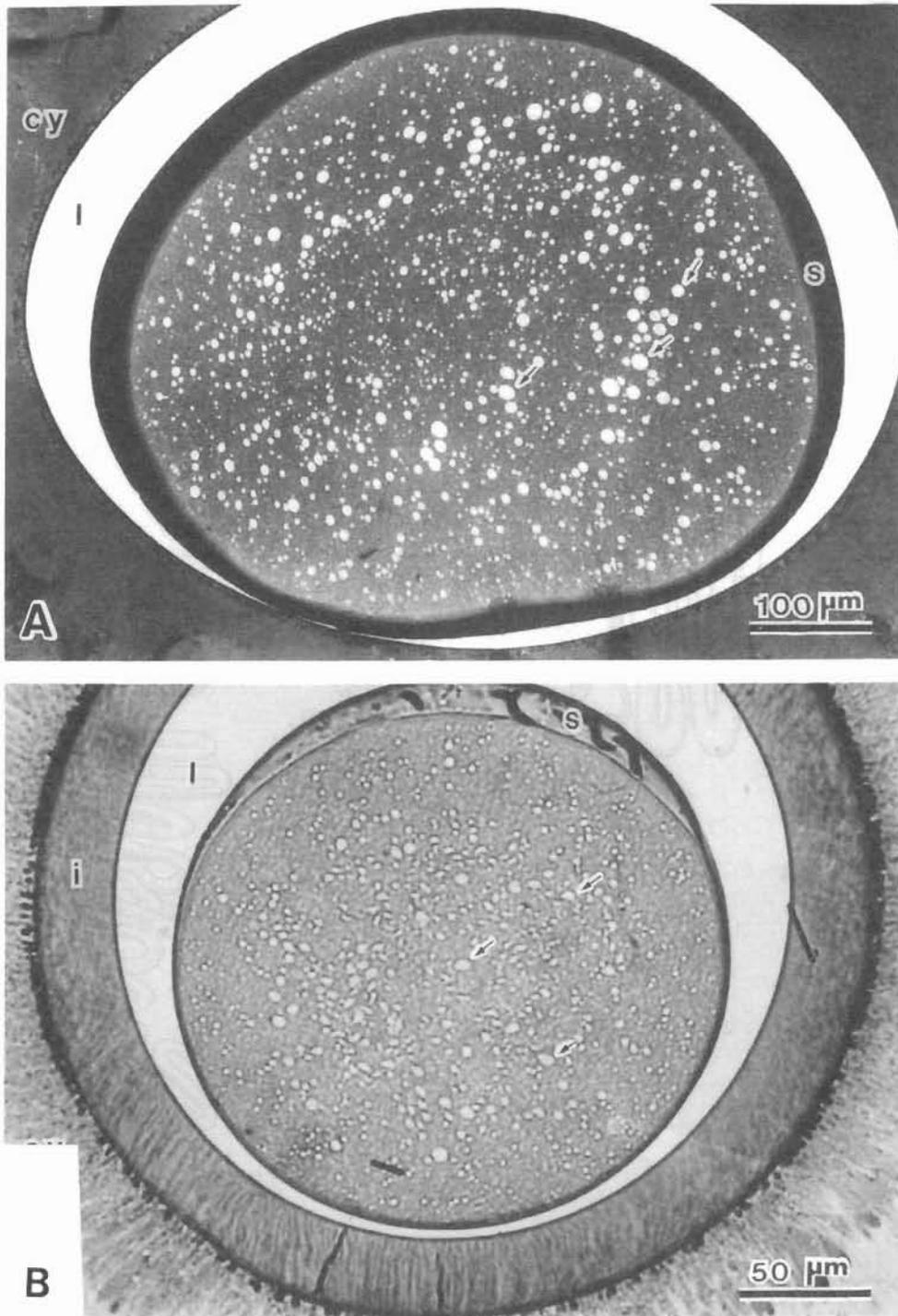


図 6

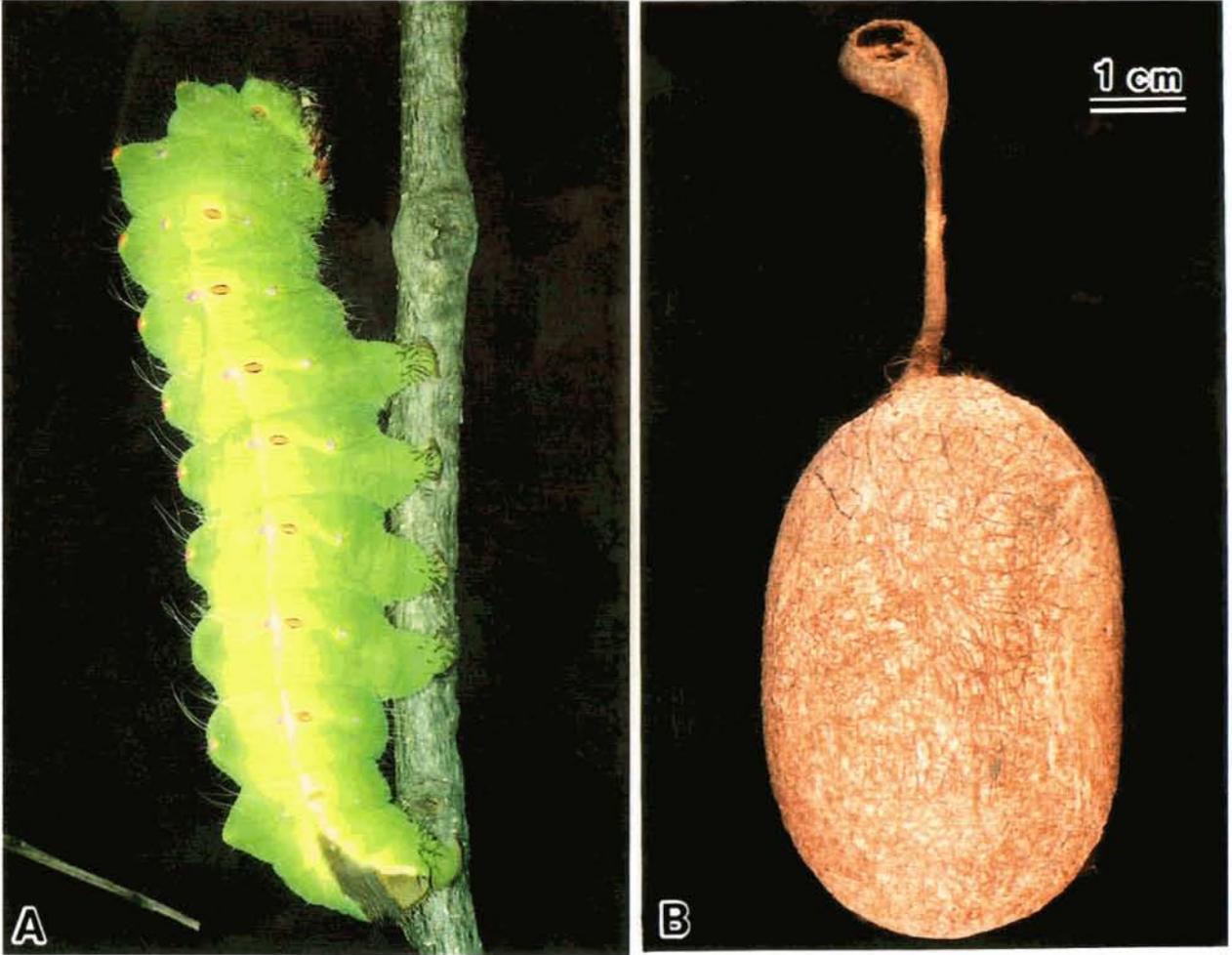


图 7

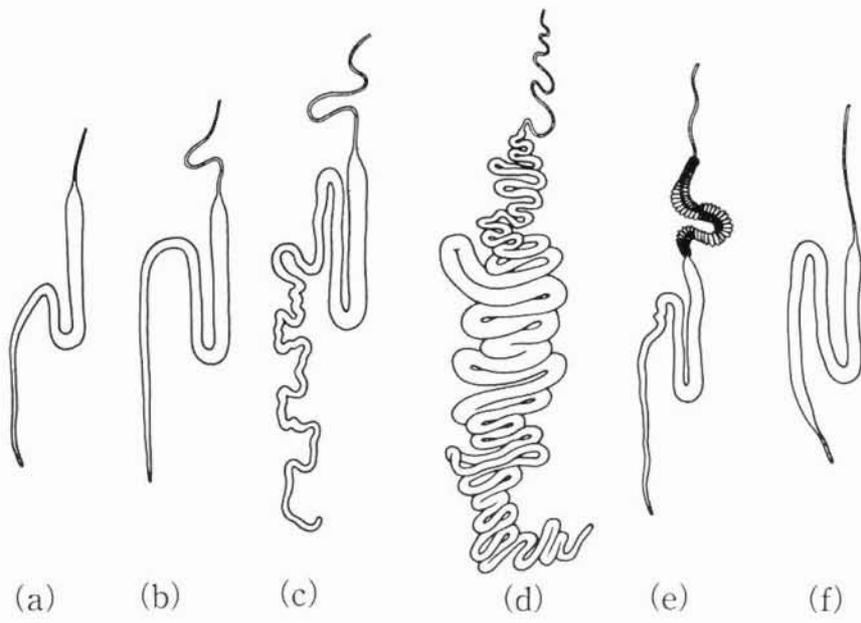


図 8

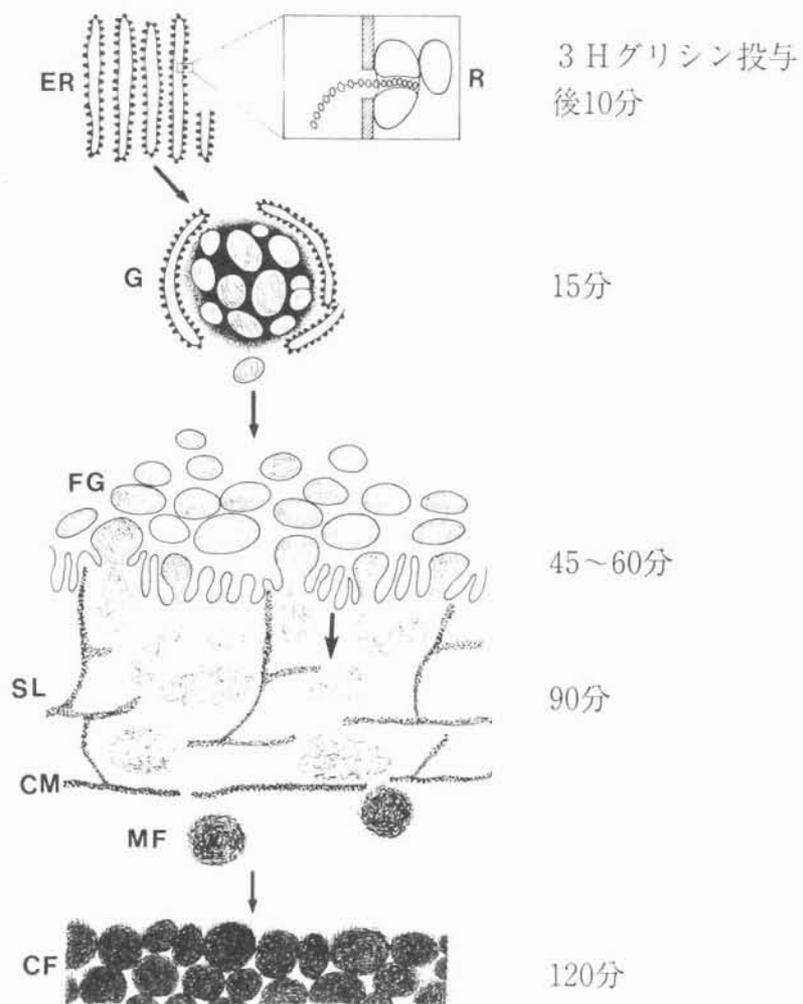


図 9

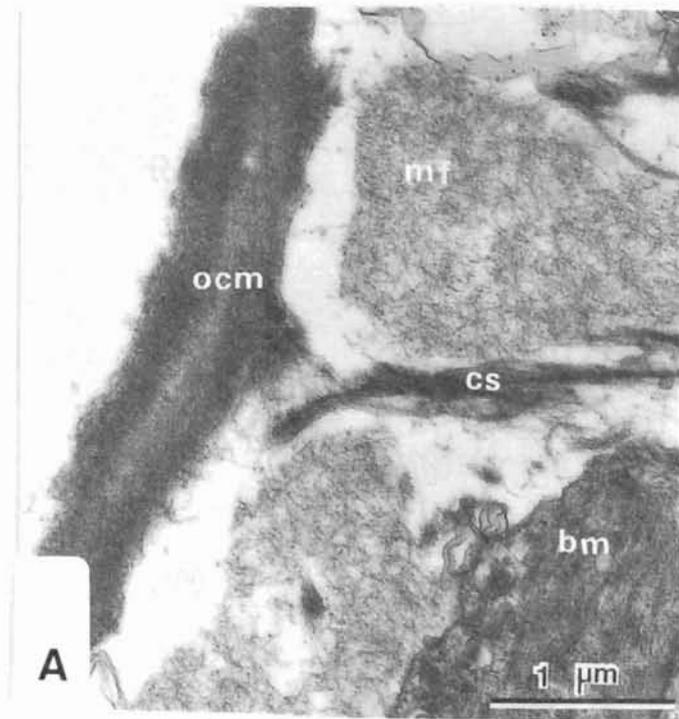


図10

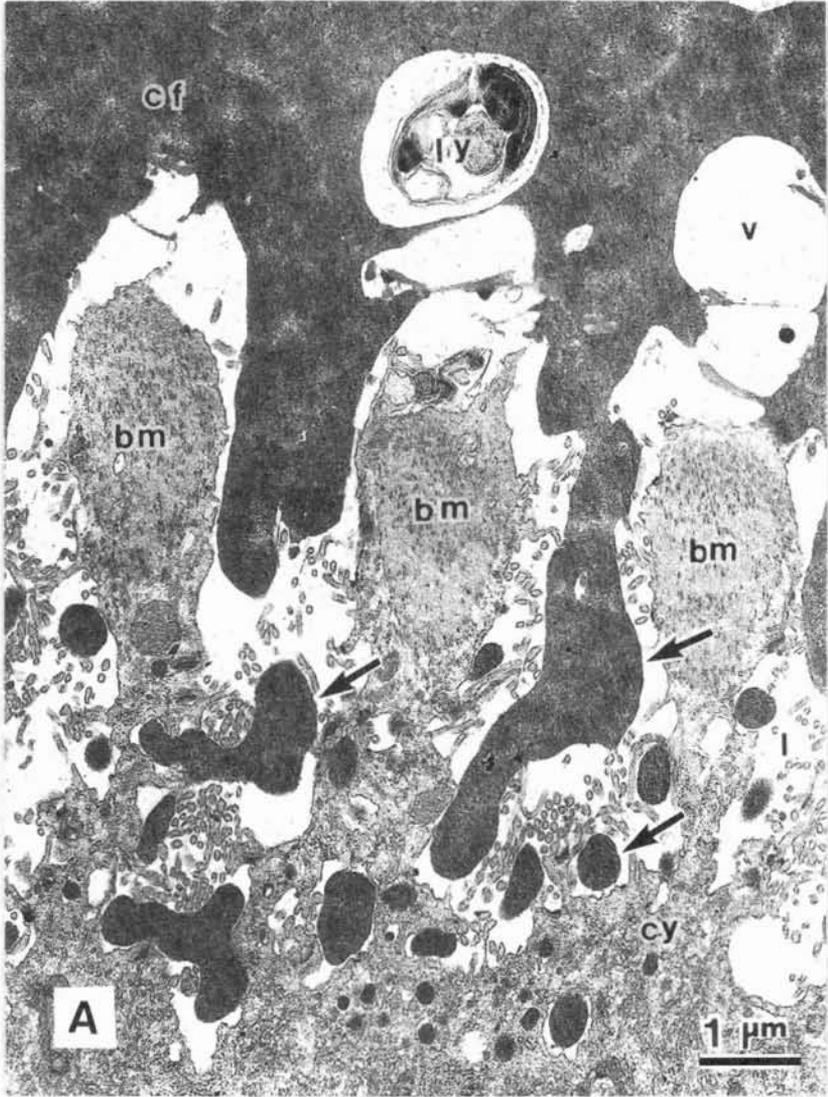


图11

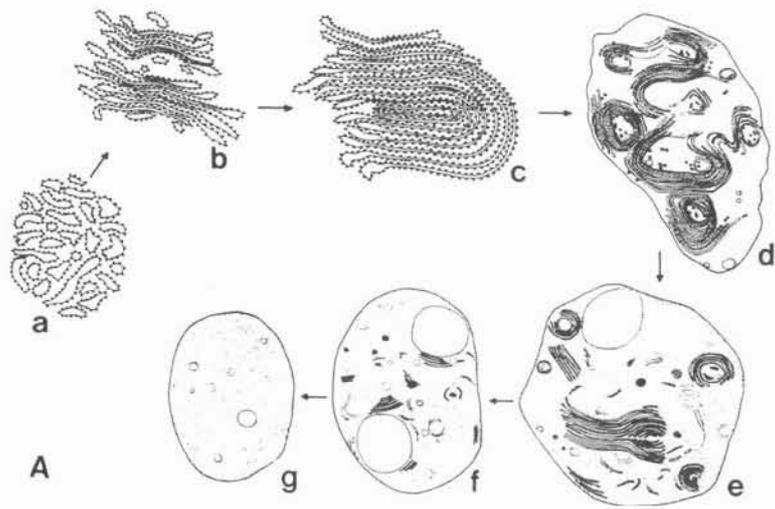


図12

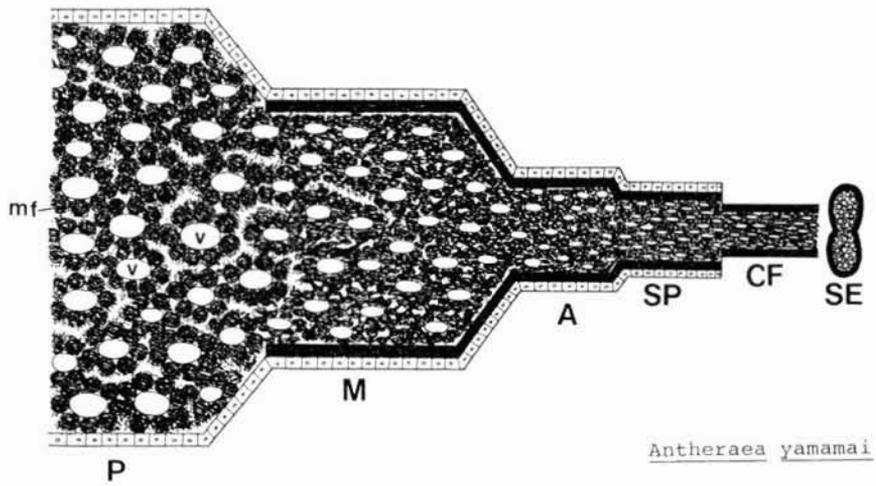
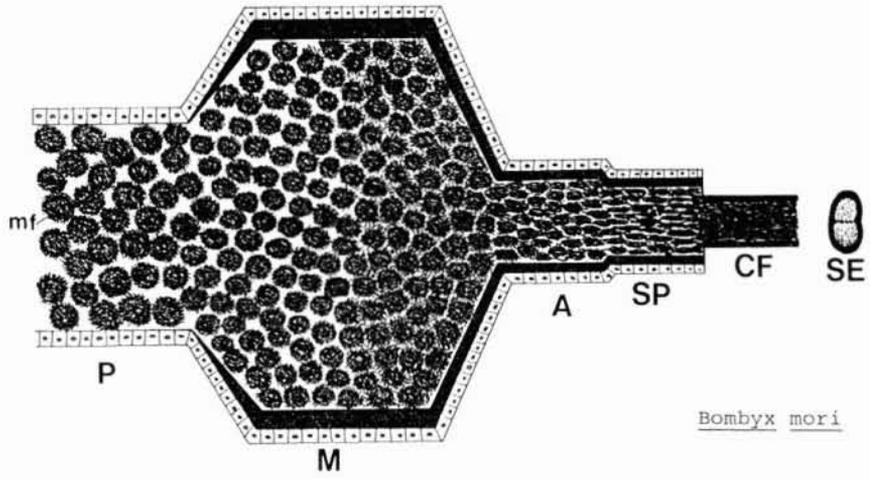


図13

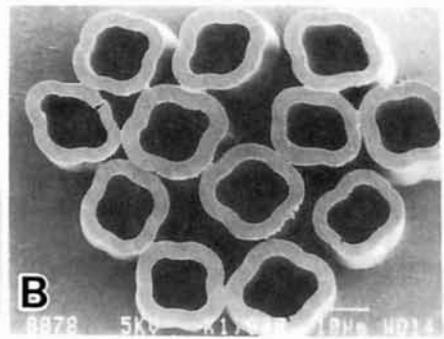
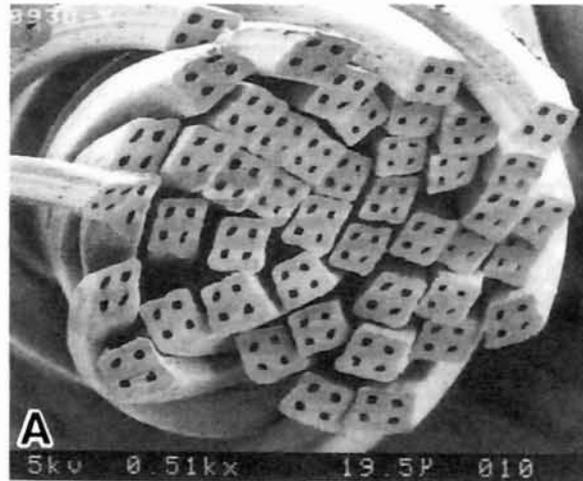


図14

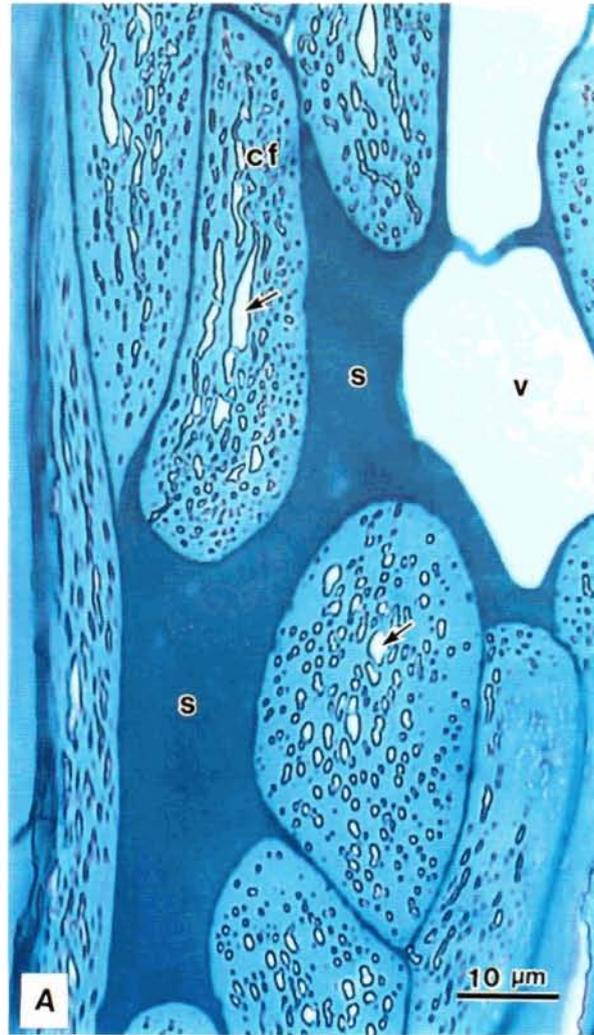


図15

# 冬虫夏草のはなし

今村利勝

## The topic of Vegetable Wasps and Plant Worms

Toshikatsu Imamura

### 1. 冬虫夏草とは

冬虫夏草は虫でも草でもありません。昆虫に寄生したキノコがその本体です。生きた昆虫に寄生し、タンパク質、脂肪や体液を栄養として、菌糸体を成長させキノコ特有の子実体を伸ばします。

冬には虫の姿をしていたものが夏になると植物のような姿をあらわすことから「冬虫夏草」の名がつけました。

この不思議な生物の「冬虫夏草」は現在350種ほど発見されています。



### 2. 冬虫夏草の主な効果

古来、冬虫夏草は中国では、不老不死、強精強壯の秘薬とされ、さらに結核、黄疸、アヘンの解毒に効くとされていました。

中国の「本草従新」には、冬虫夏草、性味が甘平であり、肺、腎を補う。肺を保ち、腎を益し、血を止め、痰を化し、労働を已むと記載されています。

中国伝承医学での肺や腎臓は解剖学的な臓器というよりかなり概念的なものでありその働きも広

範囲に及んでいます。

肺は、呼吸の中樞であると同時に、全身のエネルギーの運行をなめらかにし、体内の水分の運行に関わり、心臓を助け、細菌感染や寒さに対する抵抗力の源でもあります。心肺機能を高め呼吸器の病気を克服し、免疫を強化し、血液をきれいにして、体のエネルギーの流れを整え、清澄な気分にするという意味が「保肺」にあります。

腎臓は精を宿すところで、精力と気力、人体をつくる生命力の源であるといえます。視床下部、脳下垂体、副腎皮質、性腺の各種ホルモンの働きを活発にし、生体調整全般をつかさどります。



天然の冬虫夏草  
京都府北部の丹後半島山中で



「益腎」とは、この腎の働きを高めることであります。

さらに、「本草綱目拾遺」では、“効用は薬用人参と同じ”で上薬であると記載されています。中国医学の薬の分け方のひとつに、上薬、中薬、下薬があります。

上薬とは、命を養う薬で毒性が無く、久しく服用してもまったく害が無い。

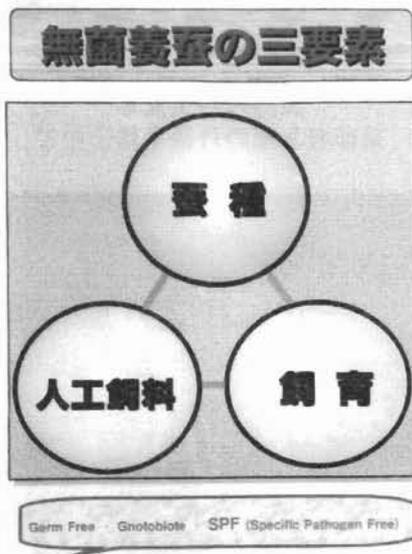
中薬とは、体調を整える働きが主で慢性病を治し、無毒も有毒もある。

下薬とは、急性病を治すのに必要だが、毒性を持つものも多く、短期間のみ服用すべきもの。

病気を治す医療と同時に、病気を未然に防ぎ、“より健やかな体をつくる”  
即ち、滋養強壯薬と呼ばれ、中国では補薬といいますが、これは上薬です。  
代表的なものが薬用人参で、「冬虫夏草」もこれに匹敵するものとみなされています。

### 3. 冬虫夏草の人工培養

冬虫夏草は、中国では昔より不老不死、滋養強壯の秘薬として重宝されていましたが、自然界で採取できる数も少ないため研究材料としての量の



無菌養蚕の三要素

確保も難しい状態でした。

また、滋養強壯剤として、広く多くの人にいきわたるだけの量の確保も難しいものでした。近年は都市化の波が、いたるところに押し寄せ、自然の破壊も急速に進んでいる状態で、自然の冬虫夏草の数は、年々減少していると言われています。

そこで、我々が培養している「冬虫夏草」は、京都府北部の丹後地方の山中より採取してきた自然界の冬虫夏草の菌を純粋培養して、無菌養蚕システムで無菌飼育したカイコに接種して、冬虫夏草（ハナサナギタケ：Isaria japonica IM2001株）の人工培養に成功したものです。

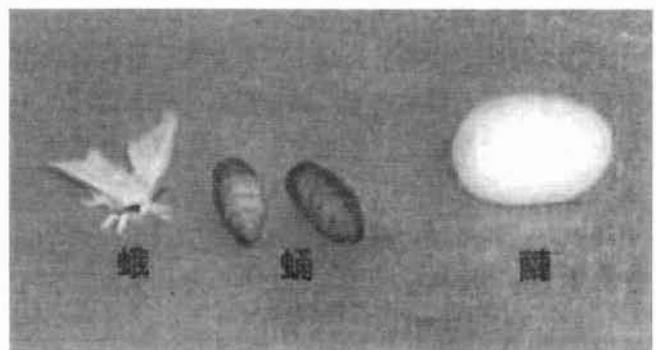
### 4. 冬虫夏草人工培養の特徴

☆無菌養蚕システムのもとクリーンな環境で、カイコの周年飼育をしているので新しい生きた蛹がいつでも手に入れることができる。

☆自然（場所、季節、温度など）の条件に左右さ



無菌養蚕システムで飼育したカイコと繭



れずに生産できる。

☆常に安定した品質のものが生産できる。

☆ニーズに合わせたものが大量生産できる。

## 5. 『冬虫夏草』(培養)の科学的研究

「冬虫夏草」(培養)の科学的研究は、長足の勢いで進んでいます。含有成分は、100g中(日本食品分析センター調べ)

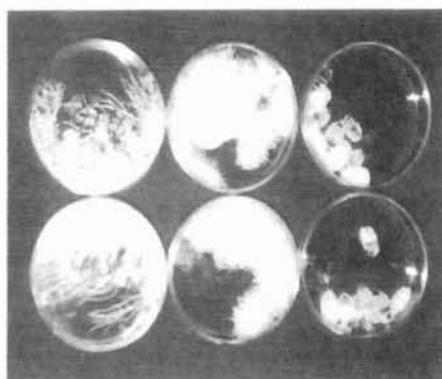
水分	2.6 g
たんぱく質	76.6 g
脂質	6.0 g
食物繊維	15.0 g
β-グルカン	5.4 g
エルゴステロール	406 mg
マンニトール	1.01 g
スーパーオキシド消去活性	
	$7.0 \times 10^3$ 単位/g
カリウム	1.85 g
マグネシウム	376 mg
銅	1.33 mg
マンガン	1.75 mg
亜鉛	17.2 mg
セレン	160 $\mu$ g
ビタミンB <sub>1</sub>	1.22 mg
ビタミンB <sub>2</sub>	1.36 mg
ビタミンB <sub>6</sub>	0.57 mg
ビタミンE	0.20 mg

同じく「冬虫夏草」(培養)のハナサナギタケより、生体リズムを整えるといわれているホルモンのメラトニンが多量検出されています。

活性酸素を消去する働きや、フリーラジカルを消去する働きがあることも研究で明らかになり、ヒトの体の健康維持、病気にかかりにくく、またかかっても免疫力が増強されて、これまで治りにくかった病気も治るようになった事例が多く出てきています。



無菌の蛹に接種



無菌培養した冬虫夏草



ガンの免疫療法に効果があるとされているキノコ[シイタケ、マイタケ、ヒメマツタケ(アガリクス)]からの抽出物(多糖類)と比較した研究では、抗腫瘍性の指標としてマクロファージからのサイトカインである腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )の量を測定した結果、格段に強い効果があることが判明している。

#### 呼吸器系：

冬虫夏草のアルコール抽出物は、結核菌の増殖を抑える働きがある。この抗菌性に関しては、水虫の真菌、日本脳炎、枯草桿菌などで確かめられている。

喘息時に気管支の収縮を緩めるアセチルコリンを増加させるという気管支拡張作用があり、咳を鎮め、タンを取る作用も実験で確認されている。タンが出て、それを取除くのは細菌の感染（侵入）と戦い、死滅させる働きがあるからです。タンを体外にすみやかに排出することで呼吸が楽になります。

#### 循環器系：

心臓に栄養を与え、血液を送り込むのが冠状動脈です。この冠状動脈を拡張させて、血液の心臓への運搬量を増やす物質D-マンニトールが冬虫夏草に含まれていることが分かりました。血圧降下作用、狭心症、心筋梗塞の予防に使われます。同時に、増血作用、血管内での血液の固まり（血栓）を作る血小板の凝集を防ぐ作用も報告されており、過酸化脂質を消去する働きがあることなどを総合すると、冬虫夏草には、心肺機能を増強する物質が、多く含まれていることが分かります。

#### 免疫賦活：

ガンなどの免疫療法に使用されるものにキノコなどからとられる多糖体があります。冬虫夏草もキノコ的一种であるため、免疫力を強化する多糖体（ $\beta$ -グルカンなど）を多く含みます。

これらの多糖体が肺で、肝臓で、腎臓や脾臓で働くことで疾病などへの抵抗力を強め、全身状態を改善することで、健康な体を保つことができる、という免疫賦活作用があげられます。

## 6. まとめ；冬虫夏草の主な効能と効用

1. 抗酸化作用
2. 免疫増強作用
3. 抗腫瘍作用
4. 抗ストレス作用
5. 滋養強壯作用
6. 老化防止効果
7. 成人病予防効果
8. 鎮静・鎮痛効果

以上のような効能効果が期待できます。

## 財団法人 衣笠会繊維研究所活動状況

### 1. 平成14年度各種学会口答発表（下線部は財団理事及び評議員）

- 1) 松本哲・赤井智幸・村上豊・松下正樹・矢井田修：海洋処理場不織布保護マットの保護効果の評価。平成14年度繊維学会年次大会，大田区産業プラザ
- 2) 矢井田修・熊田亜矢子：複合化による不織布のバギング性の改善。日本繊維機械学会第55回年次大会，大阪科学技術センター
- 3) 矢井田修・林幸男・澤村淳二・近藤麻矢：絹複合不織布の基本力学特性と物理的性能。日本繊維機械学会第55回年次大会，大阪科学技術センター
- 4) 赤井智幸・松本哲・村上豊・松下正樹・矢井田修：海洋処理場保護マットに用いる不織布の貫入抵抗と保護機能。日本繊維機械学会第55回年次大会，大阪科学技術センター
- 5) Osamu Yaida: Properties of Silk Nonwoven Composite. International Conference for Inauguration of SOTSEA, Daegu, Korea
- 6) M.Kamon, T.Akai, A.Matsumoto, K.Iwata, T.Nomura and O.Yaida: New development of triple linersystem with polyurethane elastomer between double geomembrance sheets. Seventh International Conference on Geosynthetics, Nice, French
- 7) O.Yaida: Technical Development and Application of Nonwovens. Korea-Japan Technical Seminar of Technical Textiles, Seoul, Korea
- 8) O.Yaida: The Structure and Physical Properties of Silk Composite Nonwovens. 2<sup>nd</sup> International Conference on Advanced Fiber / Textile Materials, Ueda, Japan
- 9) 米田守宏・小松かおり・山崎 隆：セリシン加工合繊編布の基本力学特性および風合。日本繊維機械学会第55回年次大会，大阪科学技術センター
- 10) 小村谷貴子・松原藤好：無菌蚕の25世代にわたる継代。第35回日本無菌生物ノートバイオロジー学会，アピカルイン京都
- 11) 陳 瑞英・松原藤好：人工飼料無菌飼育蚕を用いた冬虫夏草の培養。第35回日本無菌生物ノートバイオロジー学会，アピカルイン京都
- 12) 松原藤好・陳 瑞英・合田恵子・安永大三郎・近藤盛之進・角田素行：大阪市内における無菌周年養蚕施設。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 13) 松原藤好・合田恵子・小村谷貴子・角田素行：無菌周年養蚕用低コスト人工飼料の開発ー桑葉粉末の検討。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 14) 松原藤好・陳 瑞英・合田恵子・角田素行：無菌周年養蚕用低コスト人工飼料の開発ーオカラ粉末の検討。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 15) 坂野大介・小谷英治・杉村順夫・古澤壽治：カイコ胚発育期におけるpyruvate kinase の活性調節について。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 16) 有松裕治・小谷英治・杉村順夫・古澤壽治：カイコ消化液アルカリ性 RNaseの大腸菌での発現について。本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 17) 黄 俊逸・杉村順夫・古澤壽治：カイコ卵トレハラーゼの精製（続報）。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 18) Panida Atiwetin・北島佐紀人・古澤壽治・杉村順夫：Physiological response in water-deficient state of mulberry (*Morus alba*)。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町

- 19) 片山寿人・木田綾子・宮田清司・古澤壽治・杉村順夫・高野 良・亀井加恵子・原 三郎：桑葉に含まれる粘性多糖類の分析と組織局在性。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 20) 坂野大介・杉村順夫・小谷英治・古澤壽治：カイコ卵におけるpyruvate kinase の発現量解析。日本蚕糸学会第72回学術講演会，筑波
- 21) 有松裕治・古野哲生・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天然核酸基質に対する親和性。日本蚕糸学会第72回学術講演会，筑波
- 22) FURUSAWA, T., SAKANO, D., KONISHI, A. and SUGIMURA, Y.: Carbohydrate metabolism during long-term preservation of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. XIXth Congress of the international Sericultural Commission Proceedings p.352
- 23) 山本真史・山尾真史・森 肇・Donald L.Jarvis:バキュロウイルスとトランスポゾンを用いた形質転換法によるカイコへの遺伝子導入。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 24) 森 肇・池田敬子・林 幸之：昆虫ウイルスが作る多角体を利用したタンパク質のカプセル化。第18回農薬デザイン研究会，大津プリンスホテル
- 25) 森 肇・池田敬子：昆虫ウイルス多角体を用いたプロテオーム解析。第25回日本分子生物学会，
- 26) 山本真史・山尾真史・森 肇・Donald L.Jarvis:バキュロウイルスとトランスポゾンを用いた形質転換カイコの作製。第25回日本分子生物学会，
- 27) Masafumi Yamao, Masafumi Yamamoto, Shinya Sugihara, Ai Shimooka, Hajime Mori: A new method for silkworm transgenesis. 第12回 国際ウイルス学会，Paris France
- 28) Masatoshi Ichida, Noriyuki Harada, Athuko Ichida, Masao Kinoshita, Keiko Yukimathu, Kaeko Kamei, Toshiharu Furusawa and Saburou Hara : Non-steamed artificial diet for the silkworm, *Bombyx mori*. XIXth Congress of the International Commission Proceeding. 242
- 29) 一田昌利・原田准行・則本裕子・一田敦子・工藤謙一・行松啓子・亀井加恵子・原 三郎・古澤壽治：無蒸煮人工飼料の開発。日本蚕糸学会関西支部・九州支部合同研究発表会，京都府網野町
- 30) 一田昌利・平岡晃一・原田准行・三田村敏正：エリサン蛹の低温保護時期と保護期間の関係。日本野蚕学会第8回講演要旨集，6，筑波

## 2. 平成14年度各種学会誌投稿論文（下線部は財団理事及び評議員）

- 1) 三好 明：コンピュータによるファッションデザイン。大阪城南女子短期大学研究紀要，Vol.3 6
- 2) 菅井実夫・徳丸一丸・上甲恭平・近藤千夏・廣田貴巳・矢井田修：試作ニードル加工機によるポリ乳酸不織布の力学特性変化。日本繊維機械学会誌，Vol. 5 5, T1-6
- 3) 矢井田修・大目木幸子・安永知代・熊田垂矢子：絹スパンレースの不織布の細孔構造と基本力学特性，生活造形。Vol. 4 7, 4 5-5 0
- 4) T. Nakashima・M. Matsuo・O.Yaida・Y. Sakagami: Effects of Laundering and Light-Exposure on the Antimicrobial Activity of Cotton Fabrics Finished with Metal Salts. Biocontrol Science, Vol. 7, No. 2, 83-90
- 5) Kotani, E., Furusawa, T., Nagaoka, S., Nojima, K., Fyji, H., Sugimura, Y., Ichida, M., Suzuki, E., Nagamatsu, A., Toda, T. and Ikenaga, M.: Somatic Mutation in Larvae of the Silkworm, *Bombyx mori*, induced by Heavy Ion Irradiation to Diapause Eggs., Journal of Radiation Research (印刷中)
- 6) Sakano, D., Furusawa, T., Sugimura, Y., Storey, J. M. and Storey, K. B.: Metabolic shifts in Carbohydrate

metabolism during embryonic development of non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Biotechnology and Sericology (印刷中)

- 8) T. FURUSAWA, E. KOTANI, S. NAGAOKA, Y. SUGIMURA, M. ICHIDA, M. ITO, A. NAGAMATSU, K. KOJIMA, H. FUJII and T. TOHDO : Somatic mutation in epidermal cells of the larvae from diapausing eggs of the silkworms, *Bombyx mori*, irradiated with heavy ion beam. The 2<sup>nd</sup> International Workshop on the space Radiation Research (IWSSRR-2) Program & Abstracts p.118
- 9) Mori, H.: Expressing GFP-silk fibroin light chain fusion protein transgenic silkworms. Methods in Molecular Biology 183, 235-243
- 10) 森 肇・池田敬子：昆虫ウイルスの多角体を用いたプロテインチップの開発. バイオインダストリー-205-11
- 11) Ruiying Chen and Masatoshi Ichida : Infection of the Silkworm, *Bombyx mori*, with Cordyceps. Journal of Insect Biotechnology and Sericology 71,61-63
- 12) 松原藤好：無菌周年養蚕による伝統産業の活性化と新産業の創出. 無菌生物学会誌, 32, 10-13
- 13) 小村谷貴子・松原藤好：無菌蚕の25代にわたる継代. 無菌生物学会誌, 32, 75-77
- 14) 陳瑞英・松原藤好：人工飼料無菌蚕を用いた冬虫夏草の培養. 無菌生物学会誌, 32, 78-79

### 3. 平成14年度著書・特許等（下線部は財団理事及び評議員）

- 1) 本宮達也他編（矢井田分担執筆）：繊維の百科事典，総論8．3不織布を作る，p170～176，丸善株式会社
- 2) 原啓志・尾鍋史彦・矢井田修他（分担執筆）：紙・不織布・フィルム加工ガイド2003. 日本の技術力活かすチャンスとなる中国の成長・拡大，p18～23，テックタイムス
- 3) 矢井田修（分担執筆）：革新への挑戦－新時代を拓く繊維と加工－新しい不織布の製造と用途展開，p42～54，繊維社
- 4) 特許提出 山崎 隆 他2名
  - 【発明の名称】 セリシン抽出方法，その抽出液及び繊維または布帛の改質加工
  - 【整理番号】 BS200110
  - 【特許願】 2001-363542

## 平成14年度講演活動報告

### 【演 題】 無菌周年養蚕による伝統産業の活性化と新産業の創出

農学博士 松原 藤好(会長講演)

日時・場所 平成14年1月30日 アピカルイン京都  
対象者 第35回日本無菌生物ノートバイオロジー学会員及び一般  
講演要旨 我々は人工飼料の開発と無菌蚕の作出によって世界で初めて一年を通した、いわゆる無菌周年養蚕法を明らかにし、そのシステム化を計った。  
年間を通して生産される蚕(幼虫、蛹、蛾)や繭及び生糸は伝統産業の活性化に利用貢献すると同時に食品、化粧品及び医薬品など広い新分野に利用され、新産業の創出に貢献する。

### 【演 題】 無菌周年養蚕による伝統産業の復活と新産業の創出

農学博士 松原 藤好(特別講演)

日時・場所 平成14年11月14日 名古屋大学 豊田講堂  
対象者 日本蚕糸学会東海支部・中部支部会員  
講演要旨 日本の養蚕業は生桑業に変わる低コスト無菌人工飼料の開発と無菌飼育法の確立によって季節に支配されない無菌養蚕のシステム化によって牛や鶏や豚のような家畜と同じように一年中養蚕が出来る。この新システムの養蚕はエコロジーもエコノミーも包括したもので、生糸の生産は勿論、インターフェロンやコンタクトレンズや医療器材など新しい分野の産業の創出を願って大阪市内に研究所を設置して業界に貢献している。

---

### 【演 題】 カイコの話

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成14年3月13日 織道楽 塩野屋  
対象者 西陣の職人仲間  
講演要旨 西陣織の職人と呼ばれる方々に対して、カイコ及び絹の清算に関する基礎的な内容を講演した。

【演 題】 新商品開発と絹—高齢化とシルク

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成14年3月25日 橿原市商工会議所  
 対象者 奈良県繊維工業組合連合会会員  
 講演要旨 高齢化社会に向けた新商品開発のため、シルクの特性とこれからの利用用途の方向について、最近の知見に基づいて解説するとともに、シルクの供給に関する世界及び日本の状況について講演を行った。

【演 題】 クワとカイコー未来への贈り物

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成14年5月13日 京都工芸繊維大学 地域共同研究センター  
 対象者 産業クラスター KITネオバイテク会員  
 講演要旨 産業クラスター KITネオバイテク発会式における記念講演として、標記講演を行った。内容は今注目を集めているクワの効用に関して過去から今日までの知見の解説と今後の見通し、カイコ及びシルクの新しい利用法について。

【演 題】 カイコから絹まで

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成14年8月9日 京都工芸繊維大学繊維学部附属農場  
 対象者 小林きもの学院組紐教授講座受講生  
 講演要旨 カイコの基礎知識、カイコから絹が生産される機構、絹の特性、カイコの歴史、野蚕などに関する基礎的な内容の解説を行うとともに、繭からの糸操りや染色特性を講演した。

【演 題】 食の安全を考える

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成14年12月13日 京都工芸繊維大学繊維学部附属農場  
 対象者 京都市立広沢小学校PTA  
 講演要旨 様々な食の安全に関する問題が提起された2002年を振り返って、意外と知られていない農薬の危険性、食糧危機のこれまでと今後、いかに食の安全を確保するか等について5年間の無農薬・有機栽培に関する公開講座開催の経験から事例を示しながら解説した。

【演 題】 もの作りに利用できるブランド繭

農学博士 一田 昌利

日時・場所 平成15年2月24日 大宮町社会福祉センター  
対象者 丹後塾会員  
講演要旨 これまでのブランド繭に関する状況を詳しく解説するとともに、最近注目を集めている新しいシルクの開発状況と今後考えていかなければならないブランド化について問題提起を行った。

---

【演 題】 日本繊維産業の構造変化と不織布の発展

工学博士 矢井田 修

日時・場所 平成14年5月17日 大阪産業創造館  
対象者 TES会会員  
講演要旨 世界の繊維産業の構造変化の概略と、それに伴う日本不織布業界の現状と課題について述べた。また、過去数年の日本不織布業界の発展とその背景について解説した。

【演 題】 不織布の技術開発動向と用途展開

工学博士 矢井田 修

日時・場所 平成14年9月3日 大阪市立工業研究所  
対象者 繊維加工研究会会員  
講演要旨 日本における不織布の技術開発動向と用途展開について概説した。不織布の技術開発については複合化技術の重要性を指摘し、用途展開においては各種産業用途への更なる進展が望まれ、それには不織布の高機能化が必要であり、その方策について述べた。

【演 題】 産業資材製品の最新動向

工学博士 矢井田 修

日時・場所 平成14年11月19日 滋賀県東北部工業技術センター高島支所  
対象者 滋賀県高島郡工業組合員  
講演要旨 日本における産業用繊維資材の開発動向と技術上の問題点について解説した。特に中小企業が産業用繊維資材分野へ参入する場合の注意点や技術開発の方法について述べ、さらに将来的に発展が見込まれる分野における技術開発課題についても言及した。

【演 題】 新しい紡績法

工学博士 矢井田 修

日時・場所 平成14年12月6日 大阪科学技術センター  
 対象者 日本繊維機械学会会員  
 講演要旨 リング精紡に代表される従来の精紡方式とは異なる革新紡績法について、その糸形成原理や糸の特徴などについて解説した。また将来の発展予測についても、現状の各方式使用実績を基にして解説した。

【演 題】 天然繊維の分類と毛、綿、麻を中心とした採取と性質  
 化学繊維の分類と製法、化学繊維の物理化学的性能

工学博士 山崎 隆

日時・場所 平成14年7月4日、16日 京都染織試験場  
 対象者 平成14年度京都市中小企業技術者研修  
 講演要旨 講義

【演 題】 アルカリイオン水は何故必要か

工学博士 山崎 隆

日時・場所 平成14年11月26日 香川県高松市  
 対象者 水と酵素の勉強会  
 講演要旨 環境悪化、特に酸性雨による水の酸性化を人の健康への影響を説明し、アルカリイオン水の家庭での簡単な作り方を述べた。また市販のボトル入りの水と水道水のpHと塩素イオンの存在を実験をまじえて確認した。

【演 題】 日本の繊維産業の現状と今後の課題

工学博士 山崎 隆

日時・場所 平成15年2月18日 大和高田市幸町2-33 奈良広域地場産業振興センター  
 対象者 平成14年度第3回「ニット塾」奈良県ニット協同組合員  
 講演要旨 「ミラ・ティン®」の開発を記念して、1985年プラザ合意後の日本繊維産業の推移と今後の解決について解説し、特に地場産業を活性化するためには高付加価値商品を作る必要性のあることについて述べた。

【演 題】 細胞よもやま話

農学博士 林 幸之

日時・場所 平成14年7月6日 京都東急ホテル  
対象者 衣笠同窓会 経友会会員  
講演要旨 生命の単位としての細胞について、その起源、構造、機能等の多様性について説明すると共に、全ての生物の遺伝子情報伝達機作の共通性に関する解説。さらに生物工学的手法について報告した。

---

【演 題】 蚕卵の休眠性とその利用による宇宙生物実験への展開

農学博士 古澤 壽治

日時・場所 平成14年10月29日 マハサラカム大学・Silk Innovation Center  
対象者 Silk Innovation Center 教職員  
講演要旨 蚕卵の低温適応能に関する炭水化物代謝変換とこれに関わる律速酵素の性状について述べるとともに、熱帯性品種(多化性)の長期保存法に関する応用技術、さらに蚕卵が休眠することを利用し、宇宙放射線の生物学的影響を調べるのに最適の生物材料であることを強調した。

---

【演 題】 昆虫ウィルスを利用したタンパク質の構造と機能解析

農学博士 森 肇

日時・場所 平成14年11月12日 キャンパスプラザ京都  
対象者 ー昆虫発ベンチャーー2002昆虫産業創出ワークショップin京都、出席者

【演 題】 昆虫ウィルス多角体を用いたプロテオーム解析

農学博士 森 肇

日時・場所 平成14年11月6日 島津製作所中央研究所  
対象者 研究所員

日時・場所 平成14年11月21日 サントリー基礎研究所  
対象者 研究所員

日時・場所 平成14年12月16日 武田薬品工業筑波地区研究部門  
対象者 研究所員

## 講演要旨

上記講演の要旨を下記に記す

カイコ細胞質多角体病ウイルス (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, Bm CPV) は、ウイルス封入体である多角体を細胞質に形成し、この多角体には多数のウイルス粒子が包埋され、これによって紫外線などからウイルスが保護され、さらにその中に包埋されたウイルスの感染力が長期間保存される。この多角体にウイルス粒子が包埋される現象はBmCPVの外殻タンパク質の一つであり、4番目のセグメントによってコードされているviral capsid protein 3 (VP3) と10番目のセグメントによってコードされている多角体タンパク質 (polyhedrin) の相互作用によるものであることが分かっている。

このVP3の一部をシグナルとして機能性タンパク質に導入し、polyhedrinとともに発現すれば、そのタンパク質は発現と同時に多角体の中にカプセル化される。現在、我々はヒト完全長cDNAからタンパク質を順次発現させ、これをBmCPVの多角体にカプセル化する研究を進めている。これによって、カプセル化されたタンパク質の安定性を飛躍的に向上させることができる。また、多角体にカプセル化された状態で、タンパク質の構造と機能解析を進めている。具体的には、プロテインチップの開発、プロテインバンク (ライブラリー) の構築や多角体にカプセル化された状態でのタンパク質の立体構造解析を進めている。

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://wwwsoc.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