

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：34426

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15H02950

研究課題名(和文)原料由来の膠の性質と用途に関する研究

研究課題名(英文)The chemical and material properties of nikawas produced from several animals

研究代表者

山内 章(Yamauchi, Akira)

桃山学院大学・国際教養学部・客員教授

研究者番号：90174573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：文化財修復に使用する膠は、市販膠製品の不十分な情報開示や誤認により、修復で使用されてきた膠に対する信頼性が著しく低下している。本研究はこれらの問題を解消すべく、現在使用されている膠の動物種の同定法の探索と、化学分析に基づく膠の物性に影響する要因を研究し、次の成果を上げた。DNAを利用した同定及び安定同位体分析による膠原料の同定方法を提示した。安定同位体分析等によりアラビアゴムを同定し、膠を含む有機素材の安定同位体分析による原料同定方法を提示した。アミノ酸分析や融点分析等により、膠の物性に影響する要因の一端を明らかにし、化学分析に基づく物性評価の重要性を提起した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はDNAを利用した同定及び安定同位体分析による膠原料の同定方法を提示し、また、アミノ酸分析や融点分析等の化学分析により、膠の物性に影響する要因の一端を明らかにした。具体的には、文化財修復で使用する膠は原料動物種の同定が必要であることを提起するとともに、化学分析に基づく物性評価の重要性を示し、今後の膠研究の方向性を示唆した。これらの研究成果が本研究の学術的意義及び社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to inform the origin of nikawa (= animal skin glue) for use of repairing cultural assets. However, inaccurate information about commercial nikawas has given rise to prevent them useful. In this study, scientific analysis was carried out in order to obtain useful information of nikawa. The trace DNA remained and the isotopic analysis revealed the original animal species of nikawa. Some chemical analyses discovered Non-nikawa medium, gum Arabic, firstly from the asset of Edo period in this scientific research in this study. The amino acid composition and the malting point was related to material properties essential for the restoration.

研究分野：文化財科学

キーワード：膠 物性 用途 化学分析 DNA 安定同位体分析 アミノ酸分析 融点分析

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

本研究開始当初（2015年頃）市販の膠製品は、洋膠と和膠の流れを汲む膠製品と主に欧州から輸入される膠に分類される。洋膠の原料はシェービング革屑である。洋膠に含まれる物質を分析するとCr・Ca・Sが検出されたが、これらはシェービング皮屑に含まれるCrと、クロムを除去する工程で使用された石灰と硫酸に由来すると考えられる。和膠の流れを汲む商品名「三千本膠」と「京上膠」は、製膠所の清恵商店が2010年冬に製造を停止、廃業されて、和膠製造は消滅した。膠の製造研究は三千本膠製造停止以前から複数行われていた。2011年、三千本膠を復元した膠と、薬品類を使用しない古典的製法を現代技術で再興した膠が製造、販売された。輸入膠は主に欧州製造のウサギ膠である。ウサギ膠と明記された市販膠に、色は黄色く半透明で匂いは動物臭が抑えられ微かに薬品臭がする製品があった。本研究で試作したウサギ皮膠は鼈甲色で匂いは鶏ガラスープに似たような香りがし、明らかに違っていた。この市販ウサギ膠はDNAを利用した同定によりウシ由来であることが分かった。以上が市販膠製品の概要である。文化財修復で使用される膠の問題点は、原料や添加剤・調製方法等の情報不足から市販の膠製品から用途に適した物性を発揮する膠製品を選び出すことが困難になっていることであった。

2. 研究の目的

文化財修復で使用される膠は膠製品の不十分な情報開示や誤認により信頼性が低下していた。本研究はこれらの問題を解消すべく、現在使用されている膠の動物種の同定法の探索と、化学分析を基に膠の抽出方法や動物種に基づく物性を明らかにすることを目的として実施した。

3. 研究方法

3-1. 古典的膠及び市販膠のDNAを利用した原料推定と安定同位体分析

3-1-1. 古典的膠と市販膠

古典的膠は、各種薬品類を添加せず、動物原料と水のみで製造された膠である。本研究では、ウシ皮・シカ皮（本州と北海道）・ウサギ皮・ニホンイノシシ皮等を原料に調製した膠を分析の標準試料に用いた。市販膠についても分析を試みた。

3-1-2. PCRによる残存DNAを利用した同定

膠の動物原料を特定する目的で、これまで質量分析などいくつかの方法が検討されてきた。本研究においても微量の多糖類や脂質、あるいは非コラーゲンタンパク質の分析を行ってきたが、検出の難しさや分子的な多様性の低さが同定を困難にすることが分かってきた。そこで増幅が可能であることや、種特異性が高く、現在生態学等にも大きな威力を発揮しているDNA分析に着目した。特に今後の作業の効率を考え、リアルタイムPCRによる融解曲線を利用した同定方法の確立を目指すこととした。

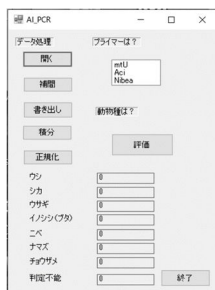
まず、膠に残存するDNAによって同定が可能であることを示すため、標準試料について抽出作業後にPCR増幅を行い、増幅断片の配列解析を行った。抽出作業はQIAGEN社製のキットQIAampを用いて行った。増幅用酵素はTAKARA社製のPrimeSTAR® GXL DNA Polymeraseを使用し、アガロースゲル電気泳動によって目的DNA断片の増幅を確認した。増幅断片については、GEヘルスケア社製illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kitで増幅断片を精製し、マクロジェン・ジャパン社に配列決定を依頼した。結果は次ページの表のとおりで、灰色の試料は実際に本研究で製作したものである。

この結果から、少量の膠試料からも特異的なDNAを増幅することが可能であると判明した。従って、原料推定にDNAを分析することが有効な手法であることが分かった。一方、同定不可のうちブタとされる試料についてはSEM-EDXの元素分析から塩蔵等の可能性が考えられ、またシカ（本州）については同位体分析やタンパク質の質量分析等から硬化中での反応が示唆され、いずれもDNAの検出に適さないのではないかと考えられた。また、チョウザメ由来とされた膠のうち、ヨーロッパオオナマズに由来するものが混入していることが判明した。

以上の結果を踏まえて市販の膠について同様のDNA配列解析を行った。3種類の膠のうち、1つについては試料量が0.2mgで解析できたが、他の2つについては2mg必要であった。また、表示の動物種と異なる結果を示すものがあった。

DNA分析を利用したより迅速・簡便な原料同定法を確立するため、上記の確認された標準試料についてリアルタイムPCRを行い、融解曲線によって同定がその場で可能になるよう検討することとした。使用した機器はAgilent Technologies社製のMx3000Pで、PCR反応には同社のBrilliant HRM Ultra-Fast Loci Master Mixを使用した。PCR条件は配列解析の際のものを参考にすること

ができ、十分に区別できる融解曲線を得ることができた。これらのデータを学習データとして、ディープ・ラーニングの手法を取り入れてリアルタイム PCR のみで同定作業が完結可能になるようプログラム (Microsoft 社製 Visual Studio 2008 を使用) を作成した (下図)。

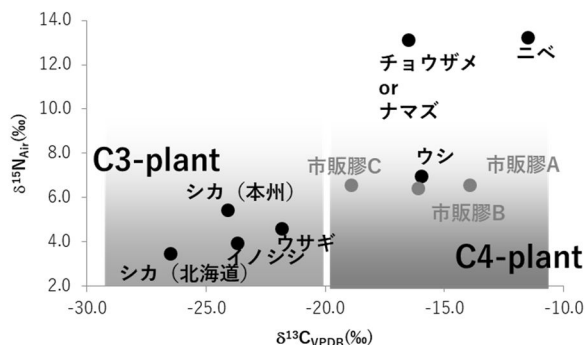


試料	DNA から判明した学名	検出プライマー	試料量 (mg)	産地
ウシ (1)	<i>Bos taurus</i>	mt-UF/R ¹⁾	0.2	日本
ウシ (2)	<i>Bos taurus</i>	FWM/BT ²⁾	2	日本
ウシ (3)	未同定			日本
シカ (北海道)	<i>Cervus nippon</i>	mt-UF/R ¹⁾	0.2	日本
シカ (本州)	同定不可			日本
イノシシ	<i>Sus scrofa</i>	mt-UF/R ¹⁾	0.2	日本
ブタ	同定不可			中国
ウサギ	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	mt-UF/R ¹⁾	0.2	実験用
ニベ	<i>Atrobuca nibe</i>	NibeF/R	0.2	韓国
オオナマズ	<i>Silurus glanis</i>	NibeF/R	0.2	ロシア
チョウザメ (1)	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	AciF/R	0.2	ロシア
チョウザメ (2)	<i>Huso huso</i>	AciF/R	2	ロシア
チョウザメ (3)	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	AciF/R	2	ロシア

1) Nakamura et al. (2009) Forensic Species Identification based on Size Variation of Mitochondrial DNA Hypervariable Regions. *Int. J. Legal Med.* **123**, 177-184.
 2) Rodriguez et al. (2004) PCR Identification of Beef, Sheep, Goat, and Pork in Raw and Heat-Treated Meat Mixtures. *J. Food Protection* **67**, 172-177.

3-1-3. 膠の安定同位体分析

DNA を用いる方法は、原料動物の遺伝的な背景に影響を受けやすい。従って、近縁種同士は分離しにくい可能性があることから、保存の良いでない試料などでは判定にエラーが生じると思われる。このことから、遺伝的な背景とは比較的独立し、食性や生活環境を反映すると考えられている、安定同位体分析を試みた。必要とされる試料も測定ごとに 100 μ g 程度とされ、統計的手法なども組み合わせながら生態的地位などを復元する研究も行われている。今回は 10mg 程度の膠試料を 70 で予備乾燥し、昭光サイエンス株式会社に ¹³C、¹⁵N、¹⁸O、D の同位体比測定を依頼した。¹³C、¹⁵N については ThermoFisher Scientific 製の Flash EA1112-DELTA V ADVANTAGE ConFloIV System を使用、¹⁸O、D については ThermoFisher Scientific 製の TC/EA-DELTA V PLUS ConFloIII System を使用した。一回測定とし、脱脂は特に行わなかった。



¹³C、¹⁵N の結果から、同じ反芻動物のシカとウシを分離することができた。また、市販膠についても、DNA 分析 (ウシ) と整合的で、トモロコシ等の C4 植物を含む飼料を与えられていたことが読み取れた。従って、系統とは直接に関わらない方法として安定同位体測定が原料同定に有効であることが判明した。

3-2. アラビアゴムの発見

3-2-1. 分析試料

本研究グループは、過去の絵具メディウムの調査研究を進める過程で、葛飾北斎の弟子平松葛齋（寛政4年～明治元年（1792～1868））所用絵具箱に収められた茶色の小塊を見つけた。当初、茶色の小塊を膠と思い科学分析を行ったが、膠ではなかった。多糖類を疑い、各種産業用多糖類および試薬多糖類との比較を試みた。Holbein社から販売されている画材用のアラビアゴムや、樹脂由来画材としての桃膠も用いた。

3-2-2. 安定同位体分析

10mg程度の試料を70℃で予備乾燥し、3-1-3と同様に昭光サイエンス株式会社に¹³C、¹⁵N、¹⁸O、Dの同位体比測定を依頼した。一回測定とし、脱脂は特に行わなかった。その結果、窒素の含有量が測定には少なすぎることから、¹⁵Nについて測定できなかった。従ってタンパク性の膠ではなく、炭素、酸素、水素からなる多糖ではないかと推測した。そこで文化財保存修復学会第40回大会で報告した膠の安定同位体分析と比較したところ、膠とは同じクラスターを形成せず、樹脂由来の多糖類に類似した値を示した。

3-2-3. 赤外吸収スペクトルの比較

粉末とした試料及び各種多糖試料についてShimadzu製のFTIR-8300及びSensIR Technologies社のThe Dura Scope™を用いてATR法で赤外吸収スペクトルを測定した。その結果、アラビアゴムとよく一致した。しかしながら、ゲランガムともやや線形が類似していたため、より詳しく他の機器分析を行った。

3-2-4. 核磁気共鳴（NMR）による分析

試料及びアラビアゴム試薬を10mg/800μLとなるよう、ゲランガムについては2mg/800μL程度となるよう重水に溶解し、日本電子製の600MHzNMRを使用しプロトンNMRを測定した。その結果、試料と試薬アラビアゴムでケミカルシフト及びそのシグナル強度のパターンがほぼ一致し、ゲランガムとは異なっていた。二次元分光法であるH-H COSYについては当該試料と試薬アラビアゴムでパターンが一致した。一方、¹³Cについては固体のまま20kHzでのCP-MASを測定した。高分子であることから鋭いシグナルとはならなかったが、試料がアラビアゴムと同様のスペクトルを示し、ケミカルシフト等がゲランガムとは異なっていた。

3-2-5. イオンクロマトグラフィー（HPAEC-PAD）による構成糖の分析

構成糖を比較するため、試料及びアラビアゴム、ゲランガム、桃膠の水溶液を塩酸で加水分解し、電気化学検出器を備えたイオンクロマトグラフ装置HPAEC-PAD（Dionex社製）で構成糖を分析した。中性糖の分析の結果、試料については試薬のアラビアゴムと同様にラムノース、アラビノース、ガラクトースと保持時間の一致する糖を含有していた。しかしながら、アラビノースとガラクトースのピーク強度は逆転していた。なお、桃膠でも同様の物質が含まれる結果となっているが、その構成比は試料と大きく異なっていた。一方、ゲランガムがラムノースとグルコースを含有していた。酸性糖の分析では、試料及び試薬アラビアゴムはグルクロン酸を主とし、L-グルクロン酸様のシグナルのみが検出された。一方、桃膠にはガラクトン酸を含むより多数の酸性糖が認められ、ゲランガムには同定できなかった酸性糖が含まれていた。これらのことから、当該試料の糖組成がアラビアゴムに酷似していることが判明した。

3-2-6. 考察

上記の結果および旋光度の測定から総合的に検討した結果、試料がアラビアゴムであると考えられた。なお、試薬や画材のアラビアゴムとは微少な差を示し、原木の品種などに違いがある可能性も考えられる。DNAの分析も試みたが、試料からのDNAの増幅はできなかった。

3-3. 膠の物性に影響する要因の検討

3-3-1. 分析試料

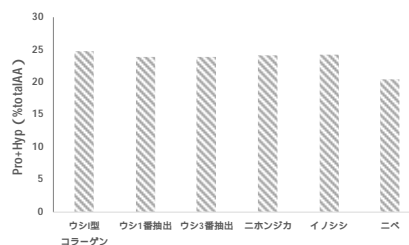
古典的膠は、各種薬品類を添加せず、動物原料と水のみで製造された膠である。本研究では、ウシ皮・ニホンジカ皮・ニホンイノシシ皮・ニベ浮袋を原料に調製した古典的膠を用いた。

3-3-2. アミノ酸分析

膠の動物種によるアミノ酸含量についてヒドロキシプロリンを含めアミノ酸分析を行った。（一財）日本食品分析センターに依頼し、約50gの膠について加水分解後、アミノ酸分析装置及び高速液体クロマトグラフィーによって各アミノ酸の分別定量を行った。定量結果に対する比較対照として、NCBIのデータベースより検索したウシI型コラーゲンのアミノ酸配列からアミノ酸含量を算出した。結果として、膠のアミノ酸組成がウシI型コラーゲンとほぼ一致した。また、抽出条件によって不純物量が異なることやイノシシから作った膠ではタンパク質以外の成分が多いことが

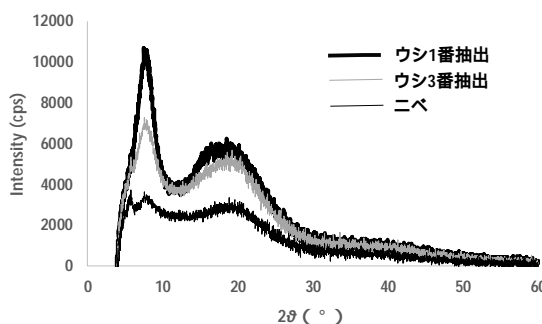
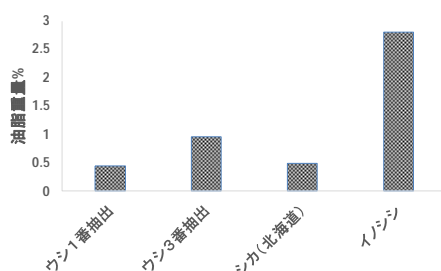
分かった（下表）。また、ニベの浮袋を原料とする膠では、他の四足動物由来のものに比べてイミノ酸（プロリン Pro+ ヒドロキシプロリン Hyp）量が少ないことが示された（下図）。

	ウシ1型コラーゲン	ウシ1番抽出	ウシ3番抽出	ニホンジカ	イノシシ	ニベ
アミノ酸総量/ 試料 (%)	112	96.4	93.8	93.5	91.8	101



3-3-3. 油脂の分析

膠を 20% となるよう脱イオン水に溶解し、半量の塩酸にて加水分解後、酸性下で油分をヘキサン抽出した。抽出溶媒を蒸発乾固後、膠単位重量当たりの油脂重量を定量した。なお、油脂分について DART/MS によっても組成を調べたが、違いははっきりしなかった。薄層クロマトグラフィーの結果では、グリセリドなどの相対的な組成については特に試料間での大きな相違が認められなかった。油脂率から見ると、イノシシについて油脂分の総量が非常に多いことが確認された。また、ウシ膠では抽出の番手によって油脂分に違いがあることが判明した（下図左）。



3-3-4. 硬化した膠の X 線回折

5% 膠水溶液 1mL をスライドガラスの上に広げ室温で硬化・風乾した。薄膜用の X 線回折装置（全自動多目的 X 線回折装置 SmartLab）を用いて、ウシ 1 番抽出・3 番抽出およびニベ膠について 2θ を 2° から 60° まで測定した。対照としてスライドガラスのみの測定を行い、データ整理の際に膠試料から差し引いた（上図右）。その結果、ウシ膠では、1 番抽出の方が 3 番抽出よりもコラーゲンの反射ピークが鋭く、抽出段階を経るにしたがって結晶性が下がることが認められた。また直接の比較は難しいが、ニベ膠についても、ピークが鋭さに欠けることからウシ膠に比べて結晶性が低いことが示唆された。

3-3-5. 膠の融点分析

膠液（10%）を落球法によりウシ 1 番抽出と 3 番抽出について融点を測定した。その結果、ウシ 1 番抽出膠の融点は 26.5、ウシ 3 番抽出膠は 23.5 であった。

3-3-6. 考察

アミノ酸分析の結果、ウシ皮膠についてはタンパク成分が I 型コラーゲンと考えられるが、1 番抽出より 3 番抽出の方が、タンパク質含量が少なかった。さらに 3 番抽出は 1 番抽出よりも油脂分が多く、融点は下がっていた。硬化した状態でも 3 番抽出したものは結晶性が低いことが X 線回折から分かった。

一方、魚類であるニベの浮袋の膠はイミノ酸のヒドロキシプロリンとプロリンの含有量が低く、X 線回折でも結晶性が低かった。これまでに、魚由来のゼラチンは哺乳類由来に比べて融点が低いことが報告されており（元村まみ・市川寿一 ゲル強度に優れた魚由来ゼラチンの調製と特徴・日本バイオレオロジー学会誌（電子版）第 27 巻 第 3 号（2013））、魚のコラーゲンはイミノ酸が少ないことから強度や融点が低くなることが提唱されていたが、今回ニベ膠でも確認できた。以上のことから、膠液の融点や硬化後の結晶性がアミノ酸組成、およびタンパク質含量に左右されることが判明した。

4. 研究成果

本研究は、膠原料の同定において、PCR による残存 DNA を利用した同定方法を作成し安定同位体測定の有効性を示した。そして、文化財修復で使用する膠は動物種の同定が必要であることを提起した。また、化学分析に基づく膠の物性評価の重要性を示し、膠研究の方向性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内章・木曾太郎・山内朝夫・田中重光
2. 発表標題 膠の物性に影響する要因の検討
3. 学会等名 文化財保存修復学会第42回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山内章
2. 発表標題 文化財修復の枠を超えて - 次世代社会に向けた膠の革新と継承 -
3. 学会等名 日本接着学会中部支部設立40周年記念講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内章・木曾太郎・山内朝夫・田中重光
2. 発表標題 江戸時代末期の平松葛斎所用絵具箱から発見されたアラビアゴムについて
3. 学会等名 文化財保存修復学会第41回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内章・木曾太郎・山内朝夫・田中重光
2. 発表標題 古典的膠及び市販膠のD A Nを利用した原料推定と安定同位体分析
3. 学会等名 文化財保存修復学会第40回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山内章、山内朝夫、田中重光、木曾太郎、木下雅代
2. 発表標題 桐油と竹酢液を含む膠接着剤の保存安定性
3. 学会等名 文化財保存修復学会第38回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山内章、山内朝夫、田中重光、木曾太郎、木下雅代
2. 発表標題 桐油と竹酢液を用いた膠油接着剤の開発-抗菌効果と接着力-
3. 学会等名 文化財保存修復学会第37回大会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公開研究会「膠ほか動物由来接着剤と文化財修復 伝統材料を繋ぐ」 案内・開催 http://goo.gl/f9dpS0
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 重光 (Tanaka Sigemitsu) (20509822)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究員 (84431)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山内 朝夫 (Yamauchi Asao) (80416304)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究主任 (84431)	
研究分担者	木曾 太郎 (Kiso Taro) (90416313)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・研究主任 (84431)	