

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年3月30日(30.03.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/051926 A1

- (51) 国際特許分類:  
*D01F 4/02* (2006.01) *D04H 1/4266* (2012.01)  
*D01F 1/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/078308
- (22) 国際出願日: 2016年9月26日(26.09.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-187180 2015年9月24日(24.09.2015) JP
- (71) 出願人: 日立化成株式会社(HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 角 直祐(SUMI, Naosuke); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 小林 一稔(KOBAYASHI, Kazutoshi); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 塚原 隆文(TSUKAHARA, Takafumi); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 大谷 保, 外(OHTANI, Tamotsu et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門三丁目2番2号

虎ノ門E Sビル7階 特許業務法人大谷特許事務所 Tokyo (JP).

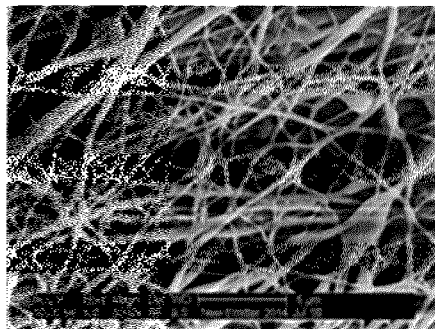
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: FIBER, SKIN CARE SHEET, WOUND-COVERING MATERIAL, REGENERATIVE MEDICAL MATERIAL, AND NON-WOVEN FABRIC

(54) 発明の名称: ファイバー、スキンケアシート、創傷被覆材、再生医療用材料及び不織布



(57) Abstract: The present invention provides a fibroin fiber, especially a fibroin nanofiber, which is insoluble in water without being subjected to an insolubilization process. The present invention furthermore provides a skin care sheet, a wound-covering material, a cell culture carrier, and a non-woven fabric formed by including the fibroin (nano)fiber. More specifically, the present invention provides a (nano)fiber formed by including fibroin and C2-8 polyhydric alcohol, as well as a skin care sheet, a wound-covering material, a regenerative medical material, and a non-woven fabric formed by including the (nano)fiber.

(57) 要約: 不溶化処理を行わずとも水に不溶であるフィブロインファイバー、特にフィブロインナノファイバーを提供する。さらに、該フィブロイン(ナノ)ファイバーを含有してなる、スキンケアシート、創傷被覆材、細胞培養担体及び不織布を提供する。より具体的には、フィブロイン及び炭素数2~8の多価アルコールを含有してなる(ナノ)ファイバー、並びに該(ナノ)ファイバーを含有してなる、スキンケアシート、創傷被覆材、再生医療用材料及び不織布を提供する。



WO 2017/051926 A1

## 明 細 書

発明の名称：

ファイバー、スキンケアシート、創傷被覆材、再生医療用材料及び不織布  
技術分野

[0001] 本発明は、ファイバー、スキンケアシート、創傷被覆材、再生医療用材料及び不織布に関する。

### 背景技術

[0002] ファイバー（繊維）のうち、繊維径がナノメートルオーダーの極細の繊維であるナノファイバーは、医療用途、バッテリー用セパレーターをはじめとする電池用途、フィルター用途、分離膜用途等、幅広い分野の産業への利用が期待される材料である。

ナノファイバーを得る手法としては、セルフアッセンブリー法、フェイズセパレーション法、エレクトロスピニング法等が知られている。

これらのうち、エレクトロスピニング法は、高分子等の溶液（ドープと称することがある）を高電圧印加しながらノズル等から吐出することで、静電反発を利用してドープからナノファイバーを製造する方法である。

エレクトロスピニング法に利用可能な素材としては、ポリビニルアルコール、ポリ乳酸等の合成高分子、コラーゲン、フィブロイン等のたんぱく質などが挙げられる。

たんぱく質から形成されるナノファイバーは、表面積が大きく、生体親和性に優れるため、医療用途への応用が期待されている。

[0003] エレクトロスピニング法でフィブロインを原料とするナノファイバー（以下、「フィブロインナノファイバー」ともいう）を製造する方法に関してはいくつか報告がある。

具体的には、フィブロインをヘキサフルオロイソプロパノール（以下、「HFIP」ともいう）、ヘキサフルオロアセトン（以下「HFA」ともいう）等に溶解した溶液（ドープ）を用いてエレクトロスピニングする方法（特

許文献1)、フィブロインを臭化リチウム(LiBr)、塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)等の中性塩溶液に溶解した後、脱塩して得たフィブロイン水溶液の凍結乾燥物を蟻酸に溶解した溶液(ドープ)を用いてエレクトロスピニングする方法(特許文献2)、フィブロインをLiBr、CaCl<sub>2</sub>等の中性塩溶液に溶解した後、脱塩して得たフィブロイン水溶液に非イオン性界面活性剤及び水溶性高分子を加えた溶液(ドープ)を用いてエレクトロスピニングする方法(特許文献3)などが挙げられる。

また、フィブロインに加え、ポリエチレンオキサイド等の生体適合性高分子を添加した溶液(ドープ)を用いてエレクトロスピニングすることにより、生体親和性に優れるシルク複合ナノファイバーが得られることが報告されている(特許文献3)。

[0004] しかしながら、これらの方法で得られるナノファイバーは、水、湿気等で容易に溶解してしまうため、多くの用途で、その利用に制約が生じていた。そこで、フィブロインナノファイバーを水に対して不溶化する検討がなされている。

水に不溶なフィブロインナノファイバーを得る方法としては、上記の方法で製造したナノファイバーを、メタノール、エタノール、プロパノール、メチルエーテル、エチルエーテル及びプロピルエーテルからなる群から選ばれる低級アルコール又は低級エーテルに浸漬する方法(特許文献3及び非特許文献1)、及びエタノール雰囲気下で紡糸する方法(非特許文献2)などが知られている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2004-68161号公報

特許文献2：特開2011-208286号公報

特許文献3：特開2010-150712号公報

### 非特許文献

[0006] 非特許文献1：繊維と工業，Vol. 71，No.3 (2015)，P. 117-122

非特許文献2：日本シルク学会誌，Vol. 16（2007），P. 150-151

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、特許文献1に記載の方法は、使用する溶媒（HFIP、HFA等）が人体に有害な上に、非常に高価であることが問題であった。

また、特許文献2に記載の方法は、溶解、脱塩、凍結乾燥、再溶解等の工程が煩雑であること、高コストの凍結乾燥工程が必須であること、皮膚腐食性の蟻酸を溶媒に用いるため、作業環境及び得られるナノファイバーの安全性に問題があることなどが問題であった。

特許文献3に記載の方法は、工程が簡便であり、作業環境及び得られるナノファイバーの安全性にも問題はないが、前述したとおり特許文献1及び2に記載の方法と同様、得られるナノファイバーが水に溶解してしまうことが問題であった。

[0008] また、非特許文献1に記載の方法は、不溶化処理後に、使用した溶媒の乾燥が必要である上、特に製造したナノファイバーを医療用途に用いる場合には、溶媒が残留すると、安全上に問題があった。また、ナノファイバーの形状を保ったまま不溶化するためには、高純度の低級アルコールをさらに十分に脱水して純度を高めてから用いる必要があるため、工業的には低級アルコールをこの純度に常時保つことは困難であった。

非特許文献2に記載の方法は、エタノールが充満した環境で高電圧を印加する必要があるため、発火、爆発等の危険があり、安全性に問題があった。また、前述の通り、ナノファイバーの形状を保ったまま不溶化するためには、水分を厳密に除去した環境下でエタノールに暴露する必要があるため、紡糸チャンバー内のエタノールの濃度及び湿度を厳密に制御する必要があり、工業的な応用は困難であった。

[0009] そこで、本発明の課題は、不溶化処理を行わずとも水に不溶であるフィブロインファイバー、並びに該フィブロインファイバーを含有してなる、スキンケアシート、創傷被覆材、再生医療用材料及び不織布を提供することにあ

る。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは鋭意検討を行った結果、フィブロイン及び炭素数2～8の多価アルコールを含有してなるファイバーであれば、不溶化処理を行わずとも水に不溶であることを見出した。

本発明は、以下の[1]～[11]に関する。

[1] フィブロイン及び炭素数2～8の多価アルコールを含有してなるファイバー。

[2] さらに、水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有してなる、上記[1]に記載のファイバー。

[3] 前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキサイド、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコール及びゼラチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記[2]に記載のファイバー。

[4] 前記水溶性高分子がポリエチレンオキサイドである、上記[2]又は[3]に記載のファイバー。

[5] 前記ポリエチレンオキサイドの数平均分子量が100,000～700,000である、上記[4]に記載のファイバー。

[6] 前記無機塩が、アルカリ金属塩及びアルカリ土類金属塩からなる群から選ばれる少なくとも1種である、上記[2]～[5]のいずれかに記載のファイバー。

[7] 平均繊維径が10～900nmである、上記[1]～[6]のいずれかに記載のファイバー。

[8] 上記[1]～[7]のいずれかに記載のファイバーを含有してなるスキンケアシート。

[9] 上記[1]～[7]のいずれかに記載のファイバーを含有してなる創傷被覆材。

[10] 上記[1]～[7]のいずれかに記載のファイバーを含有してなる再生医療用材料。

[11] 上記[1]～[7]のいずれかに記載のファイバーを含有してなる不織布。

## 発明の効果

[0011] 本発明のフィブロインファイバー、特にフィブロインナノファイバーは、不溶化処理を行わずとも水に不溶である。

## 図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例9で製造したナノファイバーの走査型電子顕微鏡像である。

[図2]実施例9で製造したナノファイバーを水に浸漬後、凍結乾燥して得たナノファイバーの走査型電子顕微鏡像である。

## 発明を実施するための形態

[0013] [ファイバー]

本発明のファイバーは、フィブロイン及び炭素数2～8の多価アルコールを含有してなるファイバーである。特に、本発明は、フィブロイン及び炭素数2～8の多価アルコールを含有してなるナノファイバーをも提供する。本明細書において、「ファイバー」と表記した場合、ナノファイバーも含む。

本発明のファイバーは、低級アルコール等に浸漬する不溶化処理を行わずとも水に不溶である。ここで、本発明において、「水に不溶」な（ナノ）ファイバーとは、実施例に記載の方法に従ってエレクトロスピニング法によって紡糸した4cm角に切削したファイバーの堆積物を超純水中に1時間浸漬した後、目視観察によって溶解した様子が確認できない（ナノ）ファイバーのことをいう。

また、本発明のファイバーに含まれる炭素数2～8の多価アルコールは、沸点が180℃以上、引火点が90℃以上と高いため、作業工程上で引火、爆発等の危険が、上記したエタノール雰囲気下で紡糸する方法よりも格段に低く、安全性に優れている。

また、本発明のファイバーは、炭素数2～8の多価アルコールを含むこと

で、保湿性及び質感が良好となる傾向があり、例えば、スキンケアシート、創傷被覆材、不織布等に好適である。そこで、本発明は、本発明のファイバーを含有してなるスキンケアシート、本発明のファイバーを含有してなる創傷被覆材、及び本発明のファイバーを含有してなる不織布をも提供する。

さらに、後述するように、本発明のファイバーの製造方法に用いる溶液（ドープと称することもある）に配合される物質は、安全性の高いものを用いることができるため、安全性の高いファイバーを得ることができる。具体的には、必須成分であるフィブロインは、外科手術において縫合糸としても使用される安全性の高い素材であり、炭素数2～8の多価アルコールも食品、医薬品、化粧品等に使用される安全性の高い素材を選択することができる。ゆえに、本発明のファイバーは、再生医療用材料等に好適である。そこで、本発明は、本発明のファイバーを含有してなる再生医療用材料をも提供する。

[0014] 本発明のファイバーは、フィブロイン、炭素数2～8の多価アルコール及び水を含有するドープを用いて製造することができる。

以下、該ドープが含有する各成分について説明する。

[0015] （フィブロイン）

フィブロインとしては、例えば、家蚕、野蚕、天蚕等の天然蚕、トランスジェニック蚕等から産生されるシルクフィブロインなどが挙げられ、その製造方法に特に制限はない。これらの中でも、大量調達が可能であることから、家蚕の繭から産生されたものが好ましい。

フィブロインは、前述の繭を精練し、セリシンを除去することで得られる。

[0016] フィブロインとしては、フィブロイン水溶液の形態で用いることが好ましい。

フィブロイン水溶液を得る方法としては、公知のいかなる方法を用いてもよい。例えば、フィブロインを、臭化リチウム水溶液、硝酸カルシウム水溶液、塩化カルシウムのエタノール／水混合溶液等の中性塩溶液に溶解した溶

液を透析膜に入れ、水中で透析により脱塩することでフィブロイン水溶液を得る方法、及び蚕の絹糸腺に蓄積されたフィブロイン水溶液をそのまま使用する方法等が挙げられる。これらの中でも、前者の方法、つまりフィブロインを中性塩溶液に溶解した溶液を透析膜に入れ、水中で透析により脱塩する方法が、大量のフィブロイン水溶液を製造可能であるため好ましい。また、フィブロインを中性塩溶液に溶解する方法としては、例えば、塩化カルシウムの水／エタノール混合溶液を用いて50～95℃（好ましくは60～90℃、より好ましくは70～90℃）の温度で加熱溶解する方法が、中性塩残留時の安全性の観点からより好ましい。

[0017] フィブロインの分子量は、ドープが良好なジェットとなり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば特に制限はない。例えば、タンパク質換算分子量が、100,000～1,000,000、好ましくは200,000～700,000、より好ましくは300,000～500,000のフィブロインを含むドープを用いることにより、良好な紡糸性が得られる。

本明細書において、タンパク質換算分子量とは、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いて得られる評価試料のクロマトグラムにおけるピークトップを、分子量マーカーとしてグルタミン酸脱水素酵素（分子量：290,000）、豚心筋乳酸脱水素酵素（分子量：142,000）、酵母エノラーゼ（分子量：67,000）を使用して作成した校正曲線を用いて、タンパク質の分子量に換算した分子量を意味し、実施例に記載の方法により測定することができる。

[0018] ドープ中におけるフィブロインの濃度  $\left[ \left\{ \text{ドープ中のフィブロインの質量 (mass)} / \text{ドープの体積 (volume)} \right\} \times 100 \right]$  により算出されるパーセント濃度を意味し、単位を「% (m/v)」と表す] は、3～30% (m/v) であることが好ましく、5～20% (m/v) であることがより好ましく、7～15% (m/v) であることがさらに好ましい。ドープ中におけるフィブロインの濃度をこの範囲に設定することで、ドープが短時間でゲル化することを抑制できる。また、ドープ中におけるフィブロインの濃度

がこの範囲であると、ドープの粘度及び表面張力がエレクトロスピニング法により一層適した値となり、エレクトロスピニング法によってナノファイバーを得ることが容易となる。

特に、ドープが水溶性高分子を含有する場合は、ドープ中におけるフィブロインの濃度は、3～20% (m/v) が好ましく、4～20% (m/v) がより好ましく、5～15% (m/v) がさらに好ましい。ドープが水溶性高分子を含有する場合に、ドープ中のフィブロインの濃度をこの範囲に設定することで、ドープが短時間でゲル化することを抑制でき、後述する水溶性高分子の効果を十分に発現させながら、生産性（単位時間あたりに製造可能なファイバーの量）も一定量確保できる。また、水溶性高分子を含有するドープ中におけるフィブロインの濃度がこの範囲であると、ドープの粘度及び表面張力がエレクトロスピニング法により一層適した値となり、エレクトロスピニング法によってナノファイバーを得ることが容易となる。ドープ中におけるフィブロインの濃度調整が必要な場合には、風乾により濃縮してもよく、水を加えて希釈してもよい。

[0019]（炭素数2～8の多価アルコール）

前述のとおり、ドープは、炭素数2～8の多価アルコール（以下、単に「多価アルコール」ともいう）を含有する。

多価アルコールの炭素数は、経済性、生産性、安全性及び得られるファイバーの質感の観点から、2～8であり、2～5が好ましく、2～4がより好ましく、3がさらに好ましい。

炭素数2～8の多価アルコールとしては、例えば、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ブチレングリコール、1, 4-ブタンジオール、1, 5-ペンタンジオール、1, 6-ヘキサンジオール、1, 8-オクタンジオール、3-メチル-1, 5-ペンタンジオール、シクロヘキサンジオール等のジオール；グリセリン、ペンタエリスリトール、トリメチロールエタン、トリメチロールプロパン、ソルビトール、

マンニトール等の3価以上の多価アルコールなどが挙げられる。3価以上の多価アルコールとしては、特に、3価のアルコールが好ましい。

これらの中でも、多価アルコールとしては3価のアルコールが好ましく、食品、医薬品、化粧品等に使用される安全性の高い素材であり、得られるファイバーの質感が優れる観点から、グリセリンがより好ましい。

グリセリンの種類に特に制限はなく、例えば、植物性のグリセリン、動物性のグリセリン等が使用可能である。

[0020] 多価アルコールの沸点に特に制限はないが、経済性、生産性及び安全性の観点から、150℃以上であることが好ましく、200℃以上であることがより好ましく、250℃以上であることがさらに好ましい。多価アルコールの沸点の上限に特に制限はないが、入手容易性の観点からは、400℃以下であることが好ましく、350℃以下であることがより好ましく、300℃以下であることがさらに好ましい。

また、多価アルコールの引火点に特に制限はないが、経済性、生産性及び安全性の観点から、100℃以上であることが好ましく、130℃以上であることがより好ましく、150℃以上であることがさらに好ましい。多価アルコールの引火点の上限は、高いほど好ましいが、入手容易性の観点からは、250℃以下であることが好ましく、220℃以下であることがより好ましく、200℃以下であることがさらに好ましい。

[0021] 多価アルコールの含有量は、ドープ中のフィブロインの質量(g)を1とした場合における多価アルコールの体積(mL) (多価アルコール(mL) / フィブロイン(g)) が、0.25~1.0となる量であることが好ましく、0.3~0.8となる量であることがより好ましく、0.3~0.6となる量であることがさらに好ましい。多価アルコールの含有量を、この範囲に調節することで、水に対して十分に不溶化することができる。

特に、多価アルコール(mL) / フィブロイン(g) が0.25以上であることにより、水に対して十分に不溶化されたファイバーが得られる傾向にある。また、多価アルコール(mL) / フィブロイン(g) が1.0以下で

あることにより、エレクトロスピニング法において良好なジェットが得られ易く、ファイバーを形成し易い傾向にある。

[0022] ドープは、さらに水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有してもよい。換言すると、ファイバーは、さらに水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有してなるものであってもよい。水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を加えることで、ドープの導電性、表面張力及び粘度等を調整し易くなるため、ファイバーの生産性が向上すると共に、ファイバーの形状及び繊維径の調節を容易にすることができる。

また、同様の観点から、ドープは、水溶性高分子及び無機塩からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有していることが好ましい。換言すると、ファイバーは、さらに水溶性高分子及び無機塩からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有してなるものであることが好ましい。

[0023] (水溶性高分子)

水溶性高分子としては、特に限定されないが、例えば、医薬品にも使用される、ポリエチレンオキサイド（以下、「PEO」ともいう）、ポリビニルアルコール（以下、「PVA」ともいう）、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコール及びゼラチンからなる群から選ばれる少なくとも1種が好ましく挙げられる。これらの中でも、ポリエチレンオキサイド及びポリビニルアルコールからなる群から選ばれる1種以上であることがより好ましく、ポリエチレンオキサイドであることがさらに好ましい。これらの水溶性高分子を用いることにより、ファイバーの安全性を損なうことなく生産性を向上させることができる共に、ファイバーの形状及び繊維径を容易に調節することができる。

ここで、水溶性高分子とは、25℃において、高分子0.5gを100gの水に溶解した際に、不溶分が0.5質量%未満の高分子をいう。

[0024] ドープ中の水溶性高分子の分子量及び含有量は、ドープが良好なジェット

となり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば特に制限はなく、エレクトロスピニングの方式（ノズル式、シリンダー式、ワイヤー式等）、電極の形状、印加電圧、目的とするファイバーの形状及び繊維径等によって好ましいドープの特性（粘度、導電性など）が異なるため、目的に応じて適宜選択すればよい。

[0025] 水溶性高分子の分子量は、上記のとおり目的に応じて適宜選択すればよいが、ファイバーの生産性を向上する観点、並びにファイバーの形状及び繊維径を容易に調節する観点からは、数平均分子量が、10,000～800,000であることが好ましく、20,000～800,000であることがより好ましく、30,000～800,000であることがさらに好ましく、50,000～600,000であることが特に好ましい。

特に、水溶性高分子としてポリエチレンオキサイドを用いる場合、ポリエチレンオキサイドの分子量は、例えば、ポリエチレンオキサイドの含有量を最小化する観点からは、数平均分子量が、100,000～700,000であることが好ましく、200,000～600,000であることがより好ましく、300,000～600,000であることがさらに好ましい。この範囲の分子量のポリエチレンオキサイドを使用することで、より少ない含有量でファイバーの生産性を高めることができる。

水溶性高分子としてポリビニルアルコールを用いる場合、ポリビニルアルコールの分子量は、ファイバーの生産性を向上する観点、並びにファイバーの形状及び繊維径を容易に調節する観点から、数平均分子量が、10,000～500,000であることが好ましく、30,000～100,000であることがより好ましい。

なお、数平均分子量は、水系移動層を用いたゲルろ過クロマトグラフィー（GFC）を用いて標準ポリエチレンオキサイドの検量線を使用して換算することによって求めることができる。

[0026] ドープが水溶性高分子を含有する場合、水溶性高分子の含有量は、上記のとおり目的に応じて適宜選択すればよいが、ファイバーの生産性を向上する

観点、並びにファイバーの形状及び繊維径を容易に調節する観点からは、ドープ中の水溶性高分子とフィブロインとの質量比（水溶性高分子／フィブロイン）が、0.05～1であることが好ましく、0.06～0.5であることがより好ましく、0.07～0.3であることがさらに好ましい。ドープ中の水溶性高分子とフィブロインとの質量比（水溶性高分子／フィブロイン）が前記範囲内であると、フィブロインの有する安全性、細胞培養時の分化の誘導等の特徴を最大限発揮する必要のある用途に好適なファイバーを得ることができる。

[0027] 水溶性高分子は、ドープに直接添加してもよく、水溶液としてから添加してもよい。ここで、固形の水溶性高分子を水に溶解する際、ドープを激しく攪拌する必要がある。その際にフィブロインが析出することを抑制する観点から、水溶性高分子は、水溶液としてからドープに添加することが好ましい。

[0028] （無機塩）

無機塩の種類としては、特に制限はないが、安全性及び価格の観点から、アルカリ金属塩及びアルカリ土類金属塩からなる群から選ばれる少なくとも1種が好ましく、ナトリウム塩及びカルシウム塩からなる群から選ばれる少なくとも1種であることがより好ましく、塩化ナトリウム及び塩化カルシウムからなる群から選ばれる少なくとも1種であることがさらに好ましく、食品及び医薬品としても使用される塩化ナトリウムであることが特に好ましい。

これらの無機塩を用いることにより、ファイバーの安全性を損なうことなく、ファイバーの生産性が向上すると共に、ファイバーの形状及び繊維径を容易に調節することができる。

[0029] ドープが無機塩を含有する場合、無機塩の含有量は、ドープが良好なジェットとなり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば、特に制限はない。前述のとおり、好ましいドープの特性は、エレクトロスピニングの条件、目的とするファイバーの形状及び繊維径等によって異なるため、目的に応

じて適宜選択すればよい。

例えば、ドープが良好なジェットとなり、水に不溶なファイバーが得られやすい観点からは、ドープ中の無機塩とフィブロインとの質量比（無機塩／フィブロイン）が、0.001～0.05であることが好ましく、0.002～0.03であることがより好ましく、0.003～0.01であることがさらに好ましい。

[0030] （非イオン性界面活性剤）

非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルアリールエーテル類、ポリオキシエチレンアルキルエーテル類、ポリオキシエチレンアルケニルエーテル類、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル類等が挙げられる。

非イオン性界面活性剤としては、具体的には、例えば、ポリオキシエチレン（50）オレイルエーテル、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノイソステアレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレン（7.5）ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（120）ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（15）ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（18）ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（20）ノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（8）オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル等が挙げられる。ここで、括弧内の数値は、エチレンオキサイドの繰り返し単位数を表す。

[0031] ＜エレクトロスピニング法による紡糸方法＞

本発明のファイバーは、前記ドープを用いてエレクトロスピニング法により紡糸することで簡便に得ることができる。

エレクトロスピニング法は、電気の力を利用した繊維化方法として公知の方法であり、ドープに高電圧を印加することにより、ドープを電極に向かって噴出させ、噴出によって溶媒が蒸発し、簡便に極細のファイバー（特にナ

ノファイバー)を得ることができる方法である。エレクトロスピニング法は、多種多様な材料が適用でき、繊維の形状及び繊維径のコントロールも容易である。

ファイバーの製造に使用し得るエレクトロスピニング装置に特に制限はなく、公知の装置を利用することができる。例えば、エレクトロスピニング装置の方式としては、電極等の構造が異なる、ノズル式、ワイヤー式、シリンダー式等があるが、いずれの方式を用いても、前記ドーブを用いることにより、水に不溶なファイバーが得られる。但し、ドーブが水溶性高分子及び非イオン性界面活性剤を含有しない場合は、紡糸可能な条件の幅を広くする観点から、ノズル式のエレクトロスピニング装置を用いることが好ましい。

ノズル式のエレクトロスピニング装置は、シリンジに充填したドーブを一定速度で吐出させると同時に、シリンジに充填したドーブとアースされた陰極板(コレクター)との間に高電圧を印加することで、シリンジのノズル先端からドーブ溶液がジェットとなり噴射され、陰極板上にファイバー、特にナノファイバーを堆積させる装置である。

[0032] ドーブの組成は、前記各方式に適した、粘度、濃度、導電性、表面張力等になるように適宜調整すればよい。

ドーブの粘度としては、特に制限はなく、目的とするファイバーの繊維径等に応じて適宜調整すればよいが、例えば、 $10 \sim 1,000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ が好ましい。ドーブの粘度が $10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上であると、ドーブの流量制御が容易となり、 $1,000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下であると、ファイバーの生産性に優れると共に、細い繊維が得られやすくなる。

ドーブの表面張力としては、特に制限はなく、目的とするファイバーの繊維径等に応じて適宜調整すればよい。

[0033] ファイバーの製造において、ドーブの組成以外にも得られるファイバーの形状及び繊維径、並びに紡糸の可否に影響するファクターとしては、エレクトロスピニング装置の電極間距離、装置内湿度、印加電圧等がある。

エレクトロスピニング装置の電極間距離は、吐出したドーブが良好なジェ

ットとなり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば特に制限はないが、例えば、10～25 cmである。

エレクトロスピニング装置の装置内湿度は、吐出したドープが良好なジェットとなり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば特に制限はないが、例えば、40%以下であることが好ましく、35%以下であることがより好ましく、30%以下であることがさらに好ましい。装置内湿度を、前記範囲内に調節することにより、ドープがコレクターに到達するまでの間に乾燥が十分に進み、コレクター上の堆積物がフィルム状になったり、液状になったりすることを抑制することができる。

エレクトロスピニング装置の印加電圧は、吐出したドープが良好なジェットとなり、水に不溶なファイバーが得られる条件であれば特に制限はなく、装置、電極形状等に応じて適宜選択すればよいが、例えば、10～30 kVの範囲で選択することができる。

[0034] 前述のとおり、形成されたファイバーは、エレクトロスピニング装置のコレクターに集積されるが、コレクターにファイバーが付着し、剥がれ難くなる場合がある。この場合、必要に応じてコレクター上又はコレクターよりも陽極よりに、基材シート等を設置して、該基材シート上にファイバーを堆積させてもよい。

基材シートの素材及び形状に特に制限はないが、例えば、あまりにも導電性に乏しく、分厚い基材シートを用いると、ジェットが歪む等の不都合が生じ得るため、ある程度の導電性を有するものを使用することが好ましい。また、基材シートからファイバーを剥離して用いる場合には、剥離のしやすさから、平滑な構造の基材シートを用いることが好ましい。例えば、アルミホイルを、基材シートとして好適に使用することができる。

[0035] 前記エレクトロスピニング法によって得られるファイバーは、エレクトロスピニング法で用いたドープが含有する物質を含有してなるものである。

すなわち、フィブロインと多価アルコールとを含有するドープを用いる場合には、フィブロインと多価アルコールとを含有してなるファイバーが得ら

れる。

同様に、フィブロインと多価アルコールと、さらに水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも１種とを含有するドープを用いる場合には、フィブロインと多価アルコールと、さらに水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも１種とを含有してなるファイバーが得られる。

[0036] また、本発明のファイバー中に含まれる、多価アルコール、水溶性高分子、無機塩、非イオン性界面活性剤等の除去が必要な場合には、ファイバーを水洗することで適宜除去することができる。

[0037] 本発明のファイバーの平均繊維径は、特に制限はなく、ファイバーの用途に応じて適宜調整すればよいが、例えば、１０～９００ｎｍであってもよく、５０～７００ｎｍであってもよく、２００～６００ｎｍであってもよい。このように、ナノオーダーの平均繊維径を有するファイバーを、通常、ナノファイバーと称する。

ファイバーの平均繊維径は、電子顕微鏡（５，０００倍）を用いて、任意の箇所に存在するファイバー２０本の繊維の幅（直径）を測定し、得られた各測定結果の値を平均することで測定することができる。

[0038] 以上、本明細書に記載された事項は、いずれをも任意に組み合わせることができる。

## 実施例

[0039] 以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例によってなんら限定されるものではない。

[0040] [評価方法及び分析方法]

### （１）紡糸可否

実施例及び比較例で得られたナノファイバーについて、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）による観察を行い、下記の基準で判定した。

A：繊維径１，０００ｎｍ以下の繊維が観察された。

C：繊維は見られなかった。

## [0041] (2) 不溶化可否

4 c m角に切削したナノファイバーの堆積物を超純水中に1時間浸漬した後、目視観察し、下記の基準で判定を行った。

A：溶解は見られなかった。

C：完全に溶解した。

## [0042] (3) ナノファイバーの定性分析

実施例及び比較例で得られたナノファイバーについて、以下の方法により定性分析を行った。

## &lt;フィブロインの分析&gt;

ナノファイバーをクロロホルムで抽出し、抽出液と抽出残渣を得た。次に、得られた抽出残渣をフーリエ変換型赤外分光光度計「3100FT-IR」（バリアン・テクノロジーズ・ジャパン・リミテッド製）を用いてATR法で分析した。抽出残渣のIRスペクトルが高圧精練済み切繭（ながすな繭株式会社製）のIRスペクトルと同様のパターンを示した場合をフィブロインが含まれていると判定し、そうでない場合をフィブロインが含まれないと判定した。

## [0043] &lt;グリセリン及びPEOの分析&gt;

ナノファイバーをクロロホルムで抽出し、抽出液と抽出残渣を得た。次に、得られた抽出液を用いて下記構成及び条件でダブルショット熱分解ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS分析）を行った。280℃の熱抽出ガスクロマトグラムからグリセリンのピークが確認された場合に「グリセリンが含まれている」と判定し、そうでない場合に「グリセリンが含まれていない」と判定した。また、590℃の熱分解GC/MSのクロマトグラムからPEOのピークが確認された場合に「PEOが含まれている」と判定し、そうでない場合に「PEOが含まれていない」と判定した。グリセリン及びPEOのピーク位置は、それぞれドープに添加したグリセリン及びPEOのクロロホルム溶液を用いて行った。

・熱分解装置：EGA/PY-3030D（フロンティア・ラボ株式会社製）

)

・熱抽出条件：280℃

・熱分解条件：590℃

・分析装置：GC/MS 5973N MSD

(Agilent Technologies社製)

・カラム：HP-5ms 5%Phenyl-95%Methylpolysiloxane (内径0.25mm×長さ30m、膜厚0.25μm)

・オープン温度：40℃で5min保持した後、15℃/minで320℃に昇温

・イオン化法：EI法

・質量範囲：m/z = 29～800

・カラム流量：He 1.0mL/min

## [0044] &lt;塩化ナトリウムの分析&gt;

ナノファイバーをエネルギー分散型X線装置「INCA Energy 350」（オックスフォード・インスツルメンツ株式会社製）を用いて分析した。ナトリウムイオン、塩化物イオンが検出され、他のカウンターイオンが検出されなかった場合に塩化ナトリウムが含まれていると判定した。反対に、ナトリウムイオン及び塩化物イオンが未検出だった場合に塩化ナトリウムが含まれないと判定した。

[0045] なお、製造例及び実施例で使用した試薬等は、表1に記載の通りである。

## [0046] [表1]

表1

| 呼称                | 物質名         | 仕様           | メーカー       | 等級   |
|-------------------|-------------|--------------|------------|------|
| PEO-500k          | ポリエチレンオキサイド | 数平均分子量:約50万  | 和光純薬工業株式会社 | 和光1級 |
| PVA               | ポリビニルアルコール  | 平均重合度:約1,500 | 和光純薬工業株式会社 | —    |
| NaCl              | 塩化ナトリウム     | —            | 和光純薬工業株式会社 | 試薬特級 |
| CaCl <sub>2</sub> | 無水塩化カルシウム   | —            | 和光純薬工業株式会社 | 和光1級 |
| EtOH              | エタノール       | 純度99.5%      | 和光純薬工業株式会社 | 試薬特級 |

## [0047] [フィブロイン水溶液の調製]

## 製造例 1

フィブロイン水溶液を調製するために、まず、高圧精練済み切繭（ながすな繭株式会社製）60 gを塩化カルシウムの水／エタノール混合溶液（塩化カルシウム：水：エタノール＝1：8：2（モル比））400 mLに投入し、80℃で加熱しながら1時間攪拌して溶解した。次いで、遠心分離（回転速度：12,000 min<sup>-1</sup>、5分間）して、デカンテーションで沈殿物を除去した後、透析チューブ（Spectra/Por（登録商標）1 Dialysis Membrane、MWCO 6,000–8,000、Spectrum Laboratories, Inc. 社製）に注入し、超純水製造装置（PRO-0500及びFPC-0500（型番）、オルガノ株式会社製）から採水した超純水5 Lに対して12時間の透析を5回繰り返し、フィブロイン水溶液を得た。

得られたフィブロイン水溶液2 mLをポリスチレン製容器に分取し、秤量した後、庫内温度をあらかじめ−20℃程度に調整しておいたノンフロン冷蔵冷凍庫（「R-Y370（型番）」、株式会社日立製作所製）の冷凍室で12時間かけて凍結し、凍結乾燥機（「FDU-1200（型番）」、東京理化工業株式会社製）中で7時間凍結乾燥した。得られた乾燥物を凍結乾燥機から取り出して30秒以内に秤量し、質量減少からフィブロイン水溶液中のフィブロイン濃度（%（m/v））を定量した。また、以下の方法で調製した移動層を用いてHPLCでフィブロイン水溶液中のフィブロインのタンパク質換算分子量を測定した。

[0048]（移動相の調製）

ガラスビーカーに超純水を700 mL入れ、そこに硫酸ナトリウム（無水物、和光純薬工業株式会社製、試薬特級）14.2 gと尿素（和光純薬工業株式会社製、試薬特級）120.1 gを加えて得た溶液をビーカーごと超音波洗浄機に漬けて超音波処理し、実質的に完全に溶解させた。この溶液に、さらにリン酸緩衝剤粉末（1.15 mol/L、pH 7.0、和光純薬工業株式会社製、生化学用）20 gを加え、再度超音波処理をして溶解した。次いで、溶解後の溶液をメスフラスコに移し、1 Lにメスアップした後に攪拌

して均一な溶液とした。この溶液を分子量測定に使用する移動相とした。

[0049] (フィブロインのタンパク質換算分子量の測定)

フィブロイン水溶液にフィブロイン濃度が10 g/Lになるよう超純水を加えて混合し、続いてそこに移動相を加えて5倍に希釈し、得られた溶液を0.45  $\mu$ mのフィルター（東洋濾紙株式会社製、商品名：25HP045AN）に通してろ過し、クロマトグラフ評価試料とした。

測定には高速液体クロマトグラフ（HPLC）本体（株式会社日立ハイテクノロジーズ製、商品名：Chromaster（登録商標）、とそのオプションであるUV検出器（株式会社日立ハイテクノロジーズ製、型番：5410）、ポンプ（株式会社日立ハイテクノロジーズ製、型番：5110）、オートサンプラ（株式会社日立ハイテクノロジーズ製、型番：5210）、カラムオーブン（株式会社日立ハイテクノロジーズ製、型番：5310）に加え、カラム（昭和電工株式会社製、商品名：SHODEX（登録商標）PROTEIN KW-804を組み合わせたHPLC装置を使用した。測定条件は移動相流量0.5 mL/sec、カラム温度30℃、検出波長UV 220 nmとした。

得られたクロマトグラムをタンパク質分子量に換算するための校正曲線の作成には、分子量マーカーとしてHPLC用分子量マーカータンパク質である酵母由来グルタミン酸脱水素酵素（分子量：290,000、Oriental Yeast Co., Ltd. 製、商品名：MW-Marker（HPLC））、豚心筋由来乳酸脱水素酵素（分子量：142,000、Oriental Yeast Co., Ltd. 製、商品名：MW-Marker（HPLC））、酵母由来エノラーゼ（分子量：67,000、Oriental Yeast Co., Ltd. 製、商品名：MW-Marker（HPLC））を使用した。

HPLC装置に移動相を1時間流し、ベースラインが安定するのを待った。ベースラインの安定後に、各分子量マーカーが水溶液中でそれぞれ0.05質量%となるように溶解した分子量マーカー水溶液を22  $\mu$ L注入し、得

られるクロマトグラムのピークトップと分子量マーカの分子量から校正曲線を作成した。次いで、クロマトグラフ評価試料を  $22\ \mu\text{L}$  注入して得られるクロマトグラムのピークトップの位置から校正曲線を使用してフィブロインのタンパク質換算分子量を測定した。

その結果、フィブロイン水溶液のタンパク質換算分子量は  $386,000$  であった。

#### [0050] [水溶性高分子水溶液の調製]

##### 製造例 2

表 2 に示す水溶性高分子  $100\text{ g}$  を、超純水  $1\text{ L}$  に激しく攪拌しながら加え、実質的に完全に溶解させて、各水溶性高分子水溶液を調製した。

#### [0051] [ファイバー（ナノファイバー）の製造]

##### 実施例 1

###### (i) ドープの調製

製造例 1 で得たフィブロイン水溶液に、水及びグリセリンを加え、 $22^\circ\text{C}$  で 3 分間、マグネチックスターラーにより攪拌し、ドープの調製を行った。ここで、ドープ中のフィブロイン濃度は  $10\%$  ( $\text{m}/\text{v}$ )、グリセリン濃度は  $4\%$  ( $\text{v}/\text{v}$ ) [グリセリン ( $\text{mL}$ ) / フィブロイン ( $\text{g}$ ) 比 =  $0.4$ ] とした。

###### (ii) エレクトロスピンニング法による紡糸

上記で得たドープをプラスチックシリンジに充填し、プラスチックシリンジの先端にノズルを取り付けた。次に、ノズルを取り付けたシリンジをエレクトロスピンニング装置にセットし、陰極板（アースされた金属板）には基材シートであるアルミホイルを貼付し、以下に示す条件でエレクトロスピンニング法により紡糸を行い、ナノファイバーを製造した。エレクトロスピンニング装置及びその使用条件は以下のとおりである。

・エレクトロスピンニング装置：MECC Co., Ltd. 製「NANON-3」

・ノズル：テルモ株式会社製、ノンベベル針  $18\text{ G}$

- ・ ドープ吐出速度：1 mL/h
- ・ 電極間距離：18 cm
- ・ 印加電圧：20 kV

なお、実施例1で使用したエレクトロスピンニング装置は、装置がシリンジのプランジャー部を押してドープを一定速度で吐出させると同時にノズル内のドープとアースされた陰極板の間に高電圧を印加することで、ドープがジェットとして噴射され、陰極板上にナノファイバーが堆積するという仕組みを有するものである。

上記で得られたナノファイバーをアルミホイルから剥離し、ナノファイバーの紡糸可否と不溶化可否を前述の方法で評価した。結果を表2に示す。

#### [0052] 実施例2～15

実施例1において、ドープの組成及びエレクトロスピンニングの条件を表2に記載のものとした以外は実施例1と同様にしてナノファイバーの製造を行った。得られたナノファイバーの評価結果を表2に示す。

なお、実施例15では、ワイヤー式のエレクトロスピンニング装置として、ELMARCO s. r. o. 社製「ナノスパイダープロダクションライン NS 1WS500U」を使用した。

ワイヤー式のエレクトロスピンニング装置は、ドープを充填したタンクを装着したキャリッジと呼ばれる稼動部が、紡糸チャンバー下部に設置された陽極ワイヤーにドープを塗りつけると同時に、高電圧を印加することで、紡糸チャンバー下部に設置された陽極ワイヤーから紡糸チャンバー上部に設置された陰極ワイヤーに向けてドープのジェットが噴出されるという仕組みである。基材シートであるアルミホイルを陰極ワイヤーの下部に設置することで、アルミホイル上にナノファイバーを堆積させることができる。

#### [0053] 比較例1～3

実施例1において、ドープの組成及びエレクトロスピンニングの条件を表2に記載のものとした以外は、実施例1と同様にしてナノファイバーの製造を行った。得られたナノファイバーの評価結果を表2に示す。

[0054] [表2]

表2

|               |                          | 実施例    |        |        |        |        |        |        |        |        |        |                   |                   |        |        |        | 比較例    |        |        |
|---------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|               |                          | 1      | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      | 8      | 9      | 10     | 11                | 12                | 13     | 14     | 15     | 1      | 2      | 3      |
| ドープの組成        | フィブリン濃度 [% (m/v)]        | 10     | 20     | 5      | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     | 10                | 10                | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     | 10     |
|               | フィブリンのタンパク質換算分子量         | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000            | 386000            | 134000 | 891000 | 386000 | 386000 | 386000 | 386000 |
|               | グリセリン (mL) / フィブリン (g) 比 | 0.4    | 0.4    | 0.4    | 0.3    | 0.6    | 0.4    | 0.4    | 0.4    | 0.4    | 0.4    | 0.4               | 0.4               | 0.4    | 0.4    | 0.4    | 0      | 0      | 0      |
|               | 水溶性高分子の種類 <sup>*1</sup>  | -      | -      | -      | -      | -      | PEO    | PEO    | PVA    | PEO    | -      | PEO               | -                 | PEO    | PEO    | PEO    | -      | PEO    | PEO    |
|               | 水溶性高分子/フィブリン [質量比]       | -      | -      | -      | -      | -      | 0.1    | 0.5    | 0.1    | 0.1    | -      | -                 | -                 | 0.1    | 0.1    | 0.1    | -      | 0.3    | 0.3    |
|               | 塩類種類                     | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | NaCl   | NaCl   | CaCl <sub>2</sub> | CaCl <sub>2</sub> | NaCl   | NaCl   | NaCl   | -      | -      | NaCl   |
| エレクトロスピニングの条件 | 塩類/フィブリン [質量比]           | -      | -      | -      | -      | -      | -      | -      | 0.005  | 0.005  | 0.005  | 0.005             | 0.005             | 0.005  | 0.005  | 0.005  | -      | -      | 0.005  |
|               | 印加電圧 (kV)                | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20                | 20                | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     | 20     |
|               | 電極間距離 (cm)               | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18                | 18                | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     | 18     |
|               | 装置内湿度 (%)                | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30                | 30                | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     |
| 評価結果          | エレクトロスピンニング方式            | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式             | スプレー式             | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  | スプレー式  |
|               | (1) 紡糸可否                 | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A                 | A                 | A      | A      | A      | A      | A      | A      |
|               | (2) 不溶化可否                | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A      | A                 | A                 | A      | A      | A      | C      | C      | C      |

\*1: PEO=PEO-500k

[0055] 実施例 1 ～ 15 より、ドープがグリセリン等の炭素数 2 ～ 8 の多価アルコールを含有することで、いずれのドープ組成においても、安全かつ簡易にナノファイバーが得られ、得られたナノファイバーは水に不溶であることが分かった。

一方、比較例 1 ～ 3 から、グリセリン等の炭素数 2 ～ 8 の多価アルコールを添加しない場合にはナノファイバーが不溶化しないことが分かった。

[0056] [ナノファイバーの観察]

実施例 9 で製造したナノファイバーを走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。走査型電子顕微鏡は、「Neo Scope JCM-5000」(日本電子株式会社製)を使用し、高真空 Pt 蒸着モード、加速電圧 10 kV の条件で観察した。結果を図 1 に示す。

図 1 から、実施例 9 では繊維径 150 ～ 800 nm (平均繊維径: 294 nm) のナノファイバーが得られることが分かった。

次いで、実施例 9 で製造したナノファイバーを 24℃ の超純水中に 1 時間浸漬した後に、凍結乾燥したナノファイバーについて、上記と同様の条件で SEM による観察を行った。結果を図 2 に示す。

図 2 から、実施例 9 で製造したナノファイバーは水に浸漬後も図 1 と同様の構造を保っており、水に不溶であることが分かった。

図 1 及び図 2 の結果から、フィブロインと、グリセリン等の炭素数 2 ～ 8 の多価アルコールとを含む本発明のナノファイバーは、ナノオーダーの繊維径を有する繊維であり、かつ水に不溶であることが分かった。

[0057] [ナノファイバーの定性分析]

次に、実施例 1、6、9 及び 10 で製造したナノファイバーについて、前述の方法により、定性分析を行った。結果を表 3 に示す。

なお、表 3 において、各実施例で用いたドープ中に含まれる成分及び各実施例で得られたナノファイバー中に含まれる成分を A、含まれない成分を C として記入した。但し、ドープに添加しなかった成分については、定性分析

を行わず、ナノファイバーにも含まれない（つまり、C）という表記をした。  
。

[0058] [表3]

表3

| (3)定性分析 | 実施例 |         |     |         |     |         |     |         |
|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
|         | 1   |         | 6   |         | 9   |         | 10  |         |
|         | ドープ | ナノファイバー | ドープ | ナノファイバー | ドープ | ナノファイバー | ドープ | ナノファイバー |
| フィブリン   | A   | A       | A   | A       | A   | A       | A   | A       |
| グリセリン   | A   | A       | A   | A       | A   | A       | A   | A       |
| PEO     | C   | C       | A   | A       | A   | A       | C   | C       |
| NaCl    | C   | C       | C   | C       | A   | A       | A   | A       |

[0059] 表3の結果から、本発明の（ナノ）ファイバーは、エレクトロスピンングで用いたドープに添加した物質を含むことが分かった。

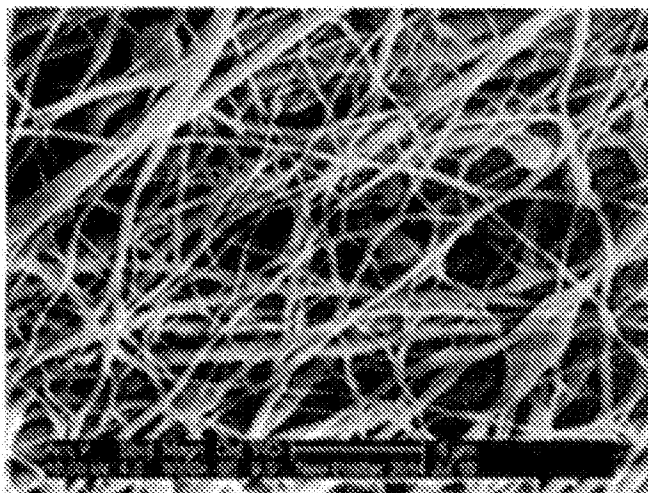
### 産業上の利用可能性

[0060] 本発明のファイバーは、水に不溶であり、生体親和性に優れ、微細な構造で表面積が大きいなどの特徴を活かし、創傷被覆材、不織布、再生医療用材料（細胞培養担体）等として好適に使用することができる。特にナノファイバーについては、ナノファイバーの表面積の大きさとフィブリンの特異な吸着能を活かした吸着材、ナノファイバーのファイバー間の微細な空孔を活かしたフィルター及び分離膜、質感の良さを活かしたスキンケアシート等への応用も期待される。

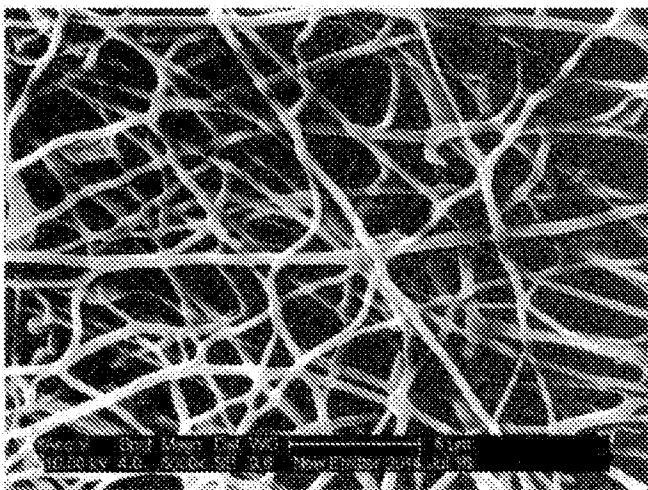
### 請求の範囲

- [請求項1]        フィブロイン及び炭素数2～8の多価アルコールを含有してなるファイバー。
- [請求項2]        さらに、水溶性高分子、無機塩及び非イオン性界面活性剤からなる群から選ばれる少なくとも1種を含有してなる、請求項1に記載のファイバー。
- [請求項3]        前記水溶性高分子が、ポリエチレンオキサイド、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリエチレングリコール及びゼラチンからなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項2に記載のファイバー。
- [請求項4]        前記水溶性高分子がポリエチレンオキサイドである、請求項2又は3に記載のファイバー。
- [請求項5]        前記ポリエチレンオキサイドの数平均分子量が100,000～700,000である、請求項4に記載のファイバー。
- [請求項6]        前記無機塩が、アルカリ金属塩及びアルカリ土類金属塩からなる群から選ばれる少なくとも1種である、請求項2～5のいずれか1項に記載のファイバー。
- [請求項7]        平均繊維径が10～900nmである、請求項1～6のいずれか1項に記載のファイバー。
- [請求項8]        請求項1～7のいずれか1項に記載のファイバーを含有してなるスキンケアシート。
- [請求項9]        請求項1～7のいずれか1項に記載のファイバーを含有してなる創傷被覆材。
- [請求項10]       請求項1～7のいずれか1項に記載のファイバーを含有してなる再生医療用材料。
- [請求項11]       請求項1～7のいずれか1項に記載のファイバーを含有してなる不織布。

[図1]



[図2]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/078308

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

D01F4/02(2006.01)i, D01F1/10(2006.01)i, D04H1/4266(2012.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

D01F1/00-4/06, D04H1/00-18/04, A61L15/00-15/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2016 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2016 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2016 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JST7580/JSTChina(JDreamIII), Japio-GPG/FX

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                            | Relevant to claim No.          |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| X<br>Y<br>A | JP 2013-119676 A (Shinwa Co., Ltd.),<br>17 June 2013 (17.06.2013),<br>0007, 0009; example 7<br>(Family: none) | 1, 7, 8, 11<br>2-5<br>6, 9, 10 |
| Y           | JP 2010-150712 A (Shinshu University),<br>08 July 2010 (08.07.2010),<br>0077, 0084<br>(Family: none)          | 2-5                            |
| A           | CN 1818163 A (Soochow University),<br>16 August 2006 (16.08.2006),<br>(Family: none)                          | 1-11                           |
| A           | JP 2006-504450 A (Tufts University),<br>09 February 2006 (09.02.2006),<br>& WO 2004/000915 A2                 | 1-11                           |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 December 2016 (08.12.16)

Date of mailing of the international search report  
20 December 2016 (20.12.16)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/078308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                           | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | JP 2015-93857 A (Shinshu University),<br>18 May 2015 (18.05.2015),<br>(Family: none)                                                                         | 1-11                  |
| A         | JP 2011-173963 A (Kitakyushu Foundation for<br>the Advancement of Industry, Science and<br>Technology),<br>08 September 2011 (08.09.2011),<br>(Family: none) | 1-11                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. D01F4/02(2006.01)i, D01F1/10(2006.01)i, D04H1/4266(2012.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. D01F1/00-4/06, D04H1/00-18/04, A61L15/00-15/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2016年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2016年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2016年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JST7580/JSTChina (JDreamIII)  
Japio-GPG/FX

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                     | 関連する<br>請求項の番号                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| X<br>Y<br>A     | JP 2013-119676 A (シンワ株式会社), 2013.06.17,<br>0007, 0009, 実施例7 (ファミリーなし) | 1, 7, 8, 11<br>2-5<br>6, 9, 10 |
| Y               | JP 2010-150712 A (国立大学法人信州大学), 2010.07.08<br>0077, 0084 (ファミリーなし)     | 2-5                            |
| A               | CN 1818163 A (苏州大学), 2006.08.16 (ファミリーなし)                             | 1-11                           |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.12.2016

国際調査報告の発送日

20.12.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平井 裕彰

4 S

9633

電話番号 03-3581-1101 内線 3474

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                      |                |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                    | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | JP 2006-504450 A (タフツ ユニバーシティー), 2006. 02. 09<br>& WO 2004/000915 A2 | 1-11           |
| A                     | JP 2015-93857 A (国立大学法人信州大学), 2015. 05. 18<br>(ファミリーなし)              | 1-11           |
| A                     | JP 2011-173963 A (財団法人北九州産業学術推進機構), 2011. 09. 08<br>(ファミリーなし)        | 1-11           |