(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
2021年3月11日(11.03.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/045167 A1

(51) 国際特許分類:
D04H 1/4266 (2012.01) *C12M 1/00* (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01) *C12M 3/00* (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01) *D01F 4/02* (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) *D04H 1/728* (2012.01)
A61L 27/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/033488

(22) 国際出願日： 2020年9月3日(03.09.2020)

(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 2019-163170 2019年9月6日(06.09.2019) JP
特願 2019-163172 2019年9月6日(06.09.2019) JP
特願 2019-185461 2019年10月8日(08.10.2019) JP
特願 2019-185462 2019年10月8日(08.10.2019) JP

(71) 出願人: セントラル硝子株式会社(**CENTRAL GLASS CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒7550001 山口県宇部市大字沖宇部５２５３番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 関矢 雄貴(**SEKIYA Yuki**); 〒3501159 埼玉県川越市中台２丁目１７番地５ セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP). 河合 亘(**KAWAI Wataru**); 〒3501159 埼玉県川越市中台２丁目１７番地５ セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP). 萩原 祐樹(**HAGIWARA Yuki**); 〒3501159 埼玉県川越市中台２丁目１７番地５ セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP). 松永 佳(**MATSUNAGA Kei**); 〒3501159 埼玉県川越市中台２丁目１７番地５ セントラル硝子株式会社化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人航栄特許事務所(**KOH-EI PATENT FIRM, P.C.**); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目７番１３号 虎ノ門イーストビルディング９階 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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,

(54) **Title:** SILK FIBER-CONTAINING NONWOVEN FABRIC, WOUND DRESSING, IPS CELL SCAFFOLD MATERIAL, NONWOVEN FABRIC FOR BLOOD COMPATIBLE MATERIAL, BLOOD COMPATIBLE MATERIAL, METHOD FOR PRODUCING SILK FIBER-CONTAINING NONWOVEN FABRIC, METHOD FOR PRODUCING WOUND DRESSING, METHOD FOR PRODUCING IPS CELL SCAFFOLD MATERIAL, METHOD FOR PRODUCING NONWOVEN FABRIC FOR BLOOD COMPATIBLE MATERIAL, AND METHOD FOR PRODUCING BLOOD COMPATIBLE MATERIAL

(54) 発明の名称： シルクファイバーを含む不織布、創傷被覆材、ｉＰＳ細胞足場材、血液適合材料用不織布、血液適合材料、シルクファイバーを含む不織布の製造方法、創傷被覆材の製造方法、ｉＰＳ細胞足場材の製造方法、血液適合材料用不織布の製造方法、及び血液適合材料の製造方法

(57) **Abstract:** An embodiment of the present invention provides: a silk fiber-containing nonwoven fabric for which the abs intensity ratio [abs((1650))/abs((1620))], which is the ratio between the intensity [abs((1650))] of the peak located in the vicinity of 1650 cm^{-1} in the infrared absorption spectrum and the intensity [abs((1620))] of the peak located in the vicinity of 1620 cm^{-1}, is greater than 0.65 and less than or equal to 1.90; and a method for producing the silk fiber-containing nonwoven fabric.

(57) 要約：本発明の実施形態の一つは、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（（１６５０））］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（（１６２０））］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（（１６５０））／ａｂｓ（（１６２０））］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布、およびその製造方法を提供する。

WO 2021/045167 A1

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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

シルクファイバーを含む不織布、創傷被覆材、ｉＰＳ細胞足場材、血液適合材料用不織布、血液適合材料、シルクファイバーを含む不織布の製造方法、創傷被覆材の製造方法、ｉＰＳ細胞足場材の製造方法、血液適合材料用不織布の製造方法、及び血液適合材料の製造方法

技術分野

[0001] 本発明の実施形態の一つは、シルクファイバーを含む不織布、創傷被覆材、ｉＰＳ細胞足場材、血液適合材料用不織布、血液適合材料、シルクファイバーを含む不織布の製造方法、創傷被覆材の製造方法、ｉＰＳ細胞足場材の製造方法、血液適合材料用不織布の製造方法、及び血液適合材料の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 特許文献１には、生繭、乾繭もしくは煮繭した繭の繭層もしくは繭糸を、あるいは生糸、絹織物又はそれらの残糸を精練に付して得られる未分解絹フィブロインを提供することが開示されている。

そして、特許文献２には、特許文献１に示す方法により得られた絹フィブロインから製造されるフィブロイン成形体は、高い水溶性を示し、水との接触によって溶解もしくは強度の脆弱化を示す不都合が存在することが記載されている。

さらに、特許文献２には、この不都合を克服するために、不溶化を目的とした処理(例えば、アルコールによる結晶化の誘起、あるいは熱処理による結晶化の誘起)が知られていることが記載されている。

[0003] 特許文献３には、絹フィブロイン溶解液からエレクトロスピニング法により管状構造物を形成し、さらにその管状構造物を絹フィブロインスポンジにてコーティングして、血液適合性が要求される人工血管に用いることが開示されている。

[0004] 特許文献４には、直径が１０ｎｍ～１００μｍの繊維糸で交絡してなり、多孔質構造を有し、嵩高が２００～２０００ｃｍ^3／ｇであり、柔軟度が５０～５００ｍＮであることを特徴とする組織修復用繊維膜が開示されている。

特許文献５には、シルクとポリオキシ酸との任意の組成比からなり、繊維径が１００ｎｍから１０００ｎｍであるシルク複合ナノファイバーからなる骨芽細胞等の細胞足場材が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：日本国特開２００１－１６３８９９号公報

特許文献2：日本国特開２０１７－１４９６７４号公報

特許文献3：日本国特開２０１０－１３７０４１号公報

特許文献4：日本国特許第６１４０２９５号公報

特許文献5：日本国特開２０１４－０１５７０２号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献２に記載されているようなアルコールによる不溶化処理を施した場合には、靭性の低下（脆さの誘因）を招く場合があり、耐水性及び靭性の観点でさらなる改善の余地があった。

[0007] 特許文献３に記載の絹フィブロイン溶解液からエレクトロスピニング法により管状構造物を形成し、さらにその管状構造物を絹フィブロインスポンジにてコーティングして人工血管に用いる場合に限らず、人工血管には耐水性及び靭性の観点でさらなる改善が求められている。

人工血管のような血液適合材料において、血液の漏出の抑制、及び血液の付着を抑えることも求められている。

[0008] 特許文献４に記載の組織修復用繊維膜は、治癒効果に改善の余地がある。

皮膚における傷口を覆う素材として創傷被覆材が知られているが、皮膚の傷口の血液や体液との接触を前提とする用途のために、創傷被覆材は、耐水

性を備えることが必要であり、また損傷部位への貼付後の追従性、および皮膚の曲げ伸ばしなどの変形への耐久性を鑑みて、靭性が高いことが必要とされている。

[0009] 特許文献５に記載の骨芽細胞等に限らず、特に近年研究が盛んなｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能な足場材が求められている。

また、ｉＰＳ細胞を培養する培養液は、一般的には水であることを鑑みて、ｉＰＳ細胞足場材は、耐水性を備えることが必要であり、また、足場材の加工、使用を鑑みて、取り扱い性が良好、言い換えれば、靭性が高いことが必要とされている。

[0010] 本発明の実施形態の一つは、上記を鑑みてなされたものであり、耐水性が高く、靭性が高い、シルクファイバーを含む不織布およびその製造方法を提供することを目的の一つとする。

あるいは、本発明の実施形態の一つは、上記を鑑みてなされたものであり、耐水性が高く、靭性が高く、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑える血液適合材料用不織布、血液適合材料、血液適合材料用不織布の製造方法、および血液適合材料の製造方法を提供することを目的の一つとする。

あるいは、本発明の実施形態の一つは、上記を鑑みてなされたものであり、耐水性が高く、靭性が高く、かつ治癒効果に優れた創傷被覆材およびその製造方法を提供することを目的の一つとする。

あるいは、本発明の実施形態の一つは、上記を鑑みてなされたものであり、耐水性が高く、靭性が高く、かつｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能なｉＰＳ細胞足場材およびその製造方法を提供することを目的の一つとする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らが鋭意検討したところ、シルクファイバーを含む不織布において、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（

１６２０)］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布は、耐水性が高く、靭性が高いことを見出した。

本発明者らは、上記不織布により、耐水性が高く、靭性が高く、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑える血液適合材料用不織布が得られることを見出した。

また、本発明者らは、上記不織布を用いることで、耐水性が高く、靭性が高く、かつ治癒効果の優れた創傷被覆材が得られることを見出した。

更に、本発明者らは、上記不織布を用いることで、耐水性が高く、靭性が高く、かつｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能なｉＰＳ細胞足場材が得られることを見出した。

[0012] 本発明は、以下の態様を含むものである。

［１］

赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６５０)］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６２０)］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布。

［２］

前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．７０以上、１．００以下である、［１］に記載のシルクファイバーを含む不織布。

［３］

前記不織布が、血液適合材料用不織布である、［１］又は［２］に記載のシルクファイバーを含む不織布。

［４］

［３］に記載のシルクファイバーを含む不織布を含む血液適合材料。

［５］

前記血液適合材料が人工血管、カテーテル、血液フィルタ、癒着防止材、

ステント、細胞足場材料、人工臓器、血液保存容器、または、輸血用具である、［４］に記載の血液適合材料。

［６］

前記不織布が、創傷被覆材である、［１］又は［２］に記載のシルクファイバーを含む不織布。

［７］

前記不織布が、ｉＰＳ細胞足場材である、［１］又は［２］に記載のシルクファイバーを含む不織布。

［８］

シルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解してシルクフィブロイン溶液を得て、上記溶液を用いて電界紡糸する、シルクファイバーを含む不織布の製造方法であって、

前記シルクファイバーにおいて、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５より大きく、１．９０以下である、シルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［９］

前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒である、［８］に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１０］

前記シルクフィブロイン溶液が、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒に、５８．６℃以上、１８０℃以下の溶解温度で、シルクフィブロインを溶解させることにより得られる、［８］又は［９］に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１１］

前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２

－プロパノールである、［８］～［１０］のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１２］

電界紡糸によって得られたシルクファイバーを含む前記不織布を、さらにアルコールに接触させる工程を含む、［８］～［１１］のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１３］

前記アルコールが、エタノールまたはその水溶液である、［１２］に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１４］

前記不織布が、創傷被覆材である、［８］～［１３］のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１５］

前記不織布が、ｉＰＳ細胞足場材である、［８］～［１３］のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１６］

前記不織布が、血液適合材料用不織布である、［８］～［１３］のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

［１７］

［１６］に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法を含む、血液適合材料の製造方法。

発明の効果

[0013] 本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高い、シルクファイバーを含む不織布およびその製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑える血液適合材料用不織布、血液適合材料、血液適合材料用不織布の製造方法、および血液適合材料の製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、かつ治癒効果に優れた創傷被覆材およびその製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、かつｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能なｉＰＳ細胞足場材およびその製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]ｉＰＳ細胞の培養試験において、継代１回目、２回目、３回目のそれぞれの培養後の顕微鏡観察を行って、実施例におけるｉＰＳ細胞増殖時の様子を示す当該顕微鏡観察写真である。

[図2]ｉＰＳ細胞の培養試験において、継代１回目、２回目、３回目のそれぞれの培養後の顕微鏡観察を行って、比較例におけるｉＰＳ細胞増殖時の様子を示す当該顕微鏡観察写真である。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布は、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布である。

上記ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］は、シルクファイバーのαヘリックス構造に由来するものであり、上記ピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］は、シルクファイバーのβシート構造に由来するものである。

なお、本明細書において、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近とは、１６５０ｃｍ$^{-1}$を中心として、±１０ｃｍ$^{-1}$の範囲を意味するものであり、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークとは、１６５０ｃｍ$^{-1}$を中心として、±１０ｃｍ$^{-1}$の範囲内における最大のピークを意味する。

本明細書において、赤外吸収スペクトルの１６２０ｃｍ$^{-1}$付近とは、１６２０ｃｍ$^{-1}$を中心として、±１０ｃｍ$^{-1}$の範囲を意味するものであり、赤外

吸収スペクトルの１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークとは、１６２０ｃｍ$^{-1}$を中心として、±１０ｃｍ$^{-1}$の範囲内における最大のピークを意味する。

[0016] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布は、不織布が含むシルクファイバーのａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であることにより、耐水性が高く、靭性が高いことを達成することができる。

本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布は、血液適合材料用不織布が含むシルクファイバーのａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であることにより、耐水性が高く、靭性が高く、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑えることを達成することができる。

[0017] また、本発明の一実施形態の創傷被覆材は、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布を用いることにより、耐水性が高く、靭性が高く、かつ優れた治癒効果を達成することができる。

更に、本発明の一実施形態のｉＰＳ細胞足場材は、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布を用いることにより、耐水性が高く、靭性が高く、かつｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能となる。

[0018] 詳細は明らかではないが、以下の通りと推測される。

ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］を０．６５より大きくすることで、不織布の脆さを改善できると考えられる。ピークの強度［ａｂｓ(１６２０)］が大きいことによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ(１６５０)］が低くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因して、靭性が高くなると考えられる。

[0019] また、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］を１．９０以下とすることで、高い耐水性が得られると考えられる。ピークの強度［ａ

ｂｓ（１６２０）］が存在することによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］が高くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因する水への溶解を抑えることができ、水に対して形状保持がしやすくなり、耐水性が担保されているものと考えられる。

[0020] さらに、シルクフィブロインは従来から生体親和性に優れている事が知られており、シルクファイバーを含む不織布である血液適合材料用不織布を用いることで、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑えることが考えられる。

本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布におけるシルクファイバーは、通常、シルクフィブロインより得られ、その大部分の２次構造がαヘリックスの螺旋構造ではなく、βシートの平面構造をとっているため、水に対して不溶性かつ強靭な素材となっており、血液適合材料として物理的な外的刺激から血液の漏出を保護しつつ、さらに、血液の付着を抑えたものと推測される。

[0021] 上述の通り、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を０．６５より大きくすることで、不織布の脆さを改善できると考えられる。ピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］が大きいことによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］が低くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因する創傷被覆材としての水への馴染み性も担保することができ、靭性が高くなる、言い換えると不織布の形状維持が可能となると考えられる。

[0022] また、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を１．９０以下とすることで、高い耐水性が得られると考えられる。ピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］が存在することによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］が高くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因する創傷被覆材としての水への溶解を抑えることができ、水に対して形状保持がしやすくなり、耐水性が担保されているものと考えられる。

[0023] さらに、創傷材として、シルクファイバーを含む不織布を用いることで、優れた治癒効果が得られることが考えられる。

カイコ由来のシルクフィブロインは生体親和性に優れた素材といわれており、例えば外科手術用縫合糸（マニー株式会社製、商品名マニーシルク）にも使用されてきた。

本発明の一実施形態の創傷被覆材におけるシルクファイバーは、通常、シルクフィブロインより得られ、本発明の一実施形態の不織布におけるシルクファイバーは、その大部分の２次構造がαヘリックスの螺旋構造ではなく、βシートの平面構造をとっているため、水に対して不溶性かつ強靭な素材となっており、創傷被覆材として物理的な外的刺激から傷口を保護しつつ、その治癒効果を高めたものと推測される。

一般的に創傷治癒の過程は、止血期、炎症期、細胞増殖期、成熟期の各段階を経て、最終的に皮膚の上皮組織が再生されるが、創傷材として、シルクファイバーを含む不織布を用いることで、これらの治癒過程において、組織の再生（特に上皮層の再生）に寄与しているものと考えられる。

[0024] ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を０．６５より大きくすることで、不織布の脆さを改善でき、ｉＰＳ細胞足場材として使用できると考えられる。これは確かな理由は不明であるが、ピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］が大きいことによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］が低くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因するｉＰＳ細胞足場材としての水への馴染み性も担保することができ、靭性が高くなる、言い換えると不織布の形状維持が可能となると考えられる。

また、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を１．９０以下とすることで、高い耐水性が得られると考えられる。これは確かな理由は不明であるが、ピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］が存在することによりβシート構造に基づく強靭性を担保しつつ、ピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］が高くなりすぎないために、αヘリックス構造に起因するｉＰＳ細胞足場

材としての水への溶解を抑えることができ、水に対して形状保持がしやすくなり、耐水性が担保されているものと考えられる。

[0025] さらに、ｉＰＳ細胞足場材として、シルクファイバーを含む不織布を用いることで、ｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能となるものと考えられる。

カイコ由来のシルクフィブロインは本質的に生体親和性に優れた素材といわれており、例えば外科手術用縫合糸（販売名マニーシルク、マニー株式会社）にも使用されてきた。

本発明におけるシルクファイバーは、通常、シルクフィブロインより得られ、本発明の一実施形態の不織布におけるシルクファイバーは、その大部分の２次構造がαヘリックスの螺旋構造ではなく、βシートの平面構造をとっているため、水に対して不溶性かつ強靭な素材となっており、確かな理由は不明であるが、細胞培養時の培地に不溶な足場材として機能する事が可能となるものと推測される。

ｉＰＳ細胞足場材として、シルクファイバーを含む不織布を用いることで、ｉＰＳ細胞に対して適度な生体親和性であるため、詳細は不明であるが、その細胞増殖の挙動が足場材に対して平面状ではなく、立体状（３次元）に進行したものと推測される。

[0026] ａｂｓ強度比は、０．６５より大きく、１．９０以下であり、０．７０以上、１．００以下が好ましく、０．７０以上、０．８０以下がさらに好ましい。

ａｂｓ強度比は、０．６５以下であると、靭性を担保することができない。一方で、ａｂｓ強度比は、１．９０より大きいと耐水性を担保することができない。

[0027] ａｂｓ強度比を０．６５より大きく、１．９０以下に調整する方法は特に限定されないが、例えば、原料となるシルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解して、シルクフィブロイン溶液を得て、電界紡糸することにより、シルクファイバーを含む不織布を得ることが挙げられる。

[0028] 上記シルクファイバーを含む不織布（単に、「不織布」ともいう）は、血液適合材料用不織布であることが好ましい。

上記不織布は、創傷被覆材であることが好ましい。

上記不織布は、ｉＰＳ細胞足場材であることが好ましい。

[0029] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布、及びその製造方法、本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布及びその製造方法、本発明の一実施形態の創傷被覆材及びその製造方法、並びに、本発明の一実施形態のｉＰＳ細胞足場材及びその製造方法において、原料として用いるシルクフィブロインは、蚕の繭玉、または生糸から夾雑物等を除いて、得ることができる。蚕の幼虫が吐き出す繭糸は、フィブロインのフィラメントとその周りを被覆している膠質のセリシンからなり、繭玉は、フィブロインのフィラメントをセリシンで接着し創製される。

繭玉中のフィブロインの含有率は７０質量％以上、８０質量％以下で、セリシンの含有率が２０質量％以上、３０質量％以下、その他少量の脂肪分等の夾雑物が含まれる。なお、生糸は、繭玉を熱水に漬け解した後、繭から取り出した糸であり夾雑物を含む。

[0030] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布、及びその製造方法、本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布及びその製造方法、本発明の一実施形態の創傷被覆材及びその製造方法、並びに、本発明の一実施形態のｉＰＳ細胞足場材及びその製造方法に用いるシルクフィブロインを産生する蚕種は特に制限されず、エリ蚕、柞蚕、天蚕等の野蚕、または家蚕を挙げることができる。

[0031] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布、及びその製造方法、本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布及びその製造方法、本発明の一実施形態の創傷被覆材及びその製造方法、並びに、本発明の一実施形態のｉＰＳ細胞足場材及びその製造方法において、例えば、精練を経て得られたシルクフィブロインを用いることができる。精練は繭玉から上記夾雑物を除去する工程であり、例えば、繭玉または生糸を、石鹸液、灰汁またはソーダ

液等のアルカリ性溶液に接触させることで、上記夾雑物を除去することができる。また、絹糸、絹織物、健康食品等として市販されているシルクフィブロインを使用してもよい。また、蚕の幼虫の絹糸腺から直接採取したシルクフィブロインを用いることもできる。

[0032] 本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布、及びその製造方法、本発明の一実施形態の血液適合材料用不織布及びその製造方法、本発明の一実施形態の創傷被覆材及びその製造方法、並びに、本発明の一実施形態のｉＰＳ細胞足場材及びその製造方法に用いる、シルクフィブロインの分子量（Ｍｗ）は特に制限されない。繭玉または生糸の精練で使用されるアルカリ溶液の種類および精練条件にもよるが、通常、シルクフィブロインのＭｗは５０，０００～３７０，０００である。なお、家蚕の絹糸腺から産生されるシルクフィブロインのＭｗの文献値は３７０，０００である（非特許文献 Tashiro Yutaka and Otsuki Eiichi, Journal of Cell Biology, Vol.46, P1(1970)、非特許文献Prog.Polym.Sci.2007；32(8－9):991－1007に記載）。

[0033] 前記フッ素系アルコール（含フッ素アルコールともいう）は、シルクフィブロインを溶解できるものであればよく、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノール（ＨＦＩＰ）等の含フッ素アルコールを挙げることができる。

前記フッ素系アルコールは、好ましくはＨＦＩＰである。また、前記含フッ素アルコールは単独で用いてもよく、混合して用いてもよい。さらに、前記含フッ素アルコールは他の溶剤を１種類または２種類以上混合して用いてもよい。他の溶剤としては、シルクフィブロインの変質および分子量の低下を起こすことなく溶解を妨げない溶剤であればよい。このような溶剤としては、Ｎ－メチルモルホリンＮ－オキシド、２，２，２－トリフルオロエタノール、メタノール、アセトン、テトラヒドロフラン、Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド、トルエンまたはジクロロメタンを例示することができる。これら溶剤は、シルクフィブロイン溶液を得る際に、含フッ素アルコールの質量を１００とする相対比で表して、３０以下（好ましくは１０以下）の範囲内で

用いることができる。

好ましい一態様として、前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒である。

[0034] シルクフィブロイン溶液は、原料となるシルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解して得られるものである。

シルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解させる際に用いる容器は、気密性および耐圧性を有する容器であれば特に制限はない。例えば、ガラス製やステンレス鋼製、またはこれらを樹脂でライニングした密閉耐圧容器を用いることができる。

好ましい一態様として、前記シルクフィブロイン溶液は、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒にシルクフィブロインを溶解させることにより得られる。１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒にシルクフィブロインを溶解させる際の溶解温度は、特に限定されないが、５８．６℃以上、１８０℃以下であることが好ましい。

ＨＦＩＰの大気圧（１０１３．２５ ｈＰａ）での沸点である５８．６℃以上では、シルクフィブロインの溶解速度が遅くならず、不溶分の回収量が増加しないため好ましい。好ましくは、６０℃以上である。１８０℃以下では、シルクフィブロインの加水分解または変質による溶液の着色が生じ難いため好ましい。好ましくは１４０℃以下であり、特に好ましくは１２０℃以下である。

[0035] 好ましい一態様として、シルクフィブロインの１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒への溶解時間は、０．５時間以上、２４時間以内である。溶解時間が０．５時間以上では、シルクフィブロインの溶解が十分となり、不溶分の回収量が増加し難いため好ましい。溶解時間が２４時間以下では、生産性が高く実用的であるため好ましい。また、シルクフィブロインが加水分解し分子量の低下を起こし難く、シルクフィブロインのＨＦＩＰ溶液が着色し難いため好ましい。好まし

くは、１２時間以内であり、特に好ましくは６時間以内である。不要な加熱を避けるため溶解の進行を適宜確認し、溶解が完了した後は速やかに冷却し、溶解作業を終了することが好ましい。この際、溶解時間を短縮する目的で攪拌を行ってもよい。

[0036] 上記シルクフィブロイン溶液におけるシルクフィブロインの濃度は、シルクフィブロイン溶液全体に対して、０．０１質量％以上、５０質量％以下が好ましい。より好ましくは、０．１質量％以上、３０質量％以下であり、更に好ましくは、１質量％以上、１０質量％以下であり、特に好ましくは、１質量％以上、５質量％以下である。

濃度が０．０１質量％以上であれば、得られるシルクファイバーを含む不織布の生産性を担保し易く、５０質量％以下であれば、溶液の粘度が高くなりすぎないため、成形し易い。

濃度が０．０１質量％以上であれば、得られる血液適合材料用不織布の生産性を担保し易く、５０質量％以下であれば、溶液の粘度が高くなりすぎないため、成形し易い。

濃度が０．０１質量％以上であれば、得られる創傷被覆材の生産性を担保し易く、５０質量％以下であれば、溶液の粘度が高くなりすぎないため、成型し易い。

濃度が０．０１質量％以上であれば、得られるｉＰＳ細胞足場材の生産性を担保できるため好ましく、５０質量％以下であれば、シルクフィブロイン溶液の粘度が高くなりすぎず、成形し易いため好ましい。

[0037] 本発明の一実施形態のシルクフィブロイン溶液の製造方法は、窒素もしくはヘリウム等の不活性ガス雰囲気、および空気雰囲気のいずれでも行なうことができるが、不活性ガス雰囲気下で行うことが好ましい。空気雰囲気は、加水分解や溶液の着色を促進する原因となることがある。

[0038] 以下、シルクフィブロイン溶液の濃縮について記載する。

希薄なシルクフィブロイン溶液を調製した後、溶液中のフッ素系アルコールの一部を留去することにより濃縮し、高濃度のシルクフィブロイン溶液を

得ることができる。例えば、濃度１質量％のシルクフィブロインのＨＦＩＰ溶液を調製した後、エバポレータを用いて、濃度１０質量％以上のシルクフィブロインのＨＦＩＰ溶液を得ることができる。ＨＦＩＰの使用量は増えるが、溶解時間が短縮される効果を奏する。

[0039] シルクフィブロイン溶液を用いて、シルクファイバーを含む不織布を得る方法としては、電界紡糸法を挙げることができる。

[0040] 電界紡糸法は、ノズル（ニードル）と電極（コレクタ）の間に、高い電圧を印加した状態で、高分子溶液を噴射し、紡糸する方法である。

[0041] 具体的には、高分子溶液をシリンジに入れ、シリンジ先端のニードルと、コレクタ間に１～１００ｋＶ程度の電圧をかけながら、高分子溶液をニードルからコレクタへ向けて噴射させる。この際、電圧がしきい値を超えると、電荷の反発力が高分子溶液の液滴の表面張力に打ち勝って、電荷を帯びた噴流が発生する。電場内で噴流が伸長しながら溶媒が蒸発し、細いファイバーを形成し、コレクタ上にファイバーが集積されることで不織布が得られる。なお、日本工業規格（ＪＩＳ）では、不織布とは、「繊維が一方向またはランダムに配向しており、交絡、融着、接着によって繊維間が結合されたもの」と定義されている（ＪＩＳ　Ｌ　０２２２：２００１）。

[0042] 電界紡糸を行う際の好適な印加電圧は、１ｋＶ以上、１００ｋＶ以下である。より好ましくは、５ｋＶ以上、５０ｋＶ以下である。特に好ましくは、１０ｋＶ以上、３０ｋＶ以下である。印加電圧が１ｋＶ以上であれば、ニードルからシルクフィブロインのＨＦＩＰ溶液を噴射した際に、電荷を帯びた噴流が発生し易く、液垂れが生じ難い。印加電圧が１００ｋＶ以下であれば、噴流の速度および形状を制御し易い。

[0043] 電界紡糸を行う際のニードルとコレクタ間の好適な距離（紡糸距離ともいう）は、５ｃｍ以上、５０ｃｍ以下である。より好ましくは、７．５ｃｍ以上、４０ｃｍ以下である。特に好ましくは、１０ｃｍ以上、３０ｃｍ以下である。ニードルとコレクタ間の距離が５ｃｍ以上であれば、溶媒が十分に蒸発し易く、液垂れが生じ難い。ニードルとコレクタ間の距離が５０ｃｍ以下

であれば、噴流が発生し易い。

[0044] コレクタの回転速度は特に限定されないが、好ましくは３０ｒｐｍ以上、５００ｒｐｍ以下、さらに好ましくは５０ｒｐｍ以上、１５０ｒｐｍ以下である。

[0045] 電界紡糸法における温度は、特に限定されないが、０℃以上、８０℃以下であることが好ましく、室温（２０～２５℃）近辺である１５℃以上、４０℃以下であることがさらに好ましい。

また、電界紡糸法における湿度は、特に限定されないが、２０％以上、８０％以下であることが好ましく、２０％以上、６０％以下であることが更に好ましく、２０％以上、４０％以下であることが特に好ましい。また、上記のように、温度、湿度を適宜調節すると、前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］の値を、０．６５より大きく、１．９０以下に調整し易い。

電界紡糸時の圧力については、電界紡糸装置内を加圧または減圧しシルクフィブロイン溶液中の溶剤の蒸発速度を調整する必要がない限りは、あえて加圧または減圧する必要性はなく、大気圧（海面上で１０１３．２５ｈＰａ）にて行うことが好ましい。また、電界紡糸装置に加減圧機構を設ける必要もなく、経済的である。

[0046] 本明細書において、電界紡糸を行う装置としては、株式会社メック製の不織布電界紡糸装置ＮＡＮＯＮ－０３を用いた。

[0047] 上記のように電界紡糸法により作製した、シルクファイバーを含む不織布は、アルコールに接触（例えば、浸漬）させて乾燥させることで、不溶化処理を行うことができる。これにより、不織布のおける上記βシート構造の割合を増やすことができ、前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］の値を、０．７以上、１．０以下の範囲に調整し易くなる。

アルコールとしては、特に限定されないが、例えばメタノール、エタノール、ｎ－プロピルアルコール、イソプロパノール等の水溶性アルコールを挙げることができる。好ましくは、入手が容易で取り扱いが容易なエタノール

である。

なお、アルコールは、アルコール水溶液であってもよい。

アルコールへの接触の方法は、不織布をアルコールに浸漬する方法、不織布をアルコールの蒸気に曝す方法、不織布にアルコールをスプレー塗布する方法など既知の接触方法が挙げられる。短時間で均一に不溶化処理する観点から不織布をアルコールに浸漬する方法が好ましい。

アルコールへの接触時間は特に限定されないが、通常１０分以上、５時間以下が好ましく、１０分以上、３時間以下がより好ましく、１０分以上、１時間以下がさらに好ましい。

[0048] アルコールへの接触温度は特に限定されないが、１０℃以上、５０℃以下が好ましく、１５℃以上、４０℃以下がさらに好ましい。また、上記のアルコールへの接触は加圧条件下で行ってもよい。

加圧条件としては、特に限定されないが、大気圧（海面上で１０１３．２５ｈＰａ）以上、大気圧の２倍（２０２６．５ｈＰａ）以下が好ましい。

前記乾燥は、不溶化処理された不織布が乾燥すれば、特に限定されないが、例えば、恒温乾燥、熱風乾燥等を挙げることができる。

[0049] アルコール接触前の不織布の前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が１．９以下であると、アルコール接触後の不織布の前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５以下になり脆くなる。不織布を作製する前の電界紡糸時の湿度を５０％以上、７０％以下にすることで得られる不織布の前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を１．９０以上とすることができ、そのアルコール接触により、アルコール接触後の不織布の前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］を０．７０以上、０．８０以下にすることができる（本明細書の［実施例］参照）。

[0050] 前記不織布は、シルクファイバーを含むものであるが、シルクファイバーのみから構成されている不織布（シルクファイバー不織布）でもよい。

[0051] シルクファイバーを含む不織布は、原料となるシルクフィブロイン溶液の

量および濃度を適宜調整することで、所望の厚みに制御することができる。電界紡糸法から得られるシルクファイバーを含む不織布の場合、厚みの制御が容易なことから、１μｍ以上、２５０μｍ未満であることが好ましい。更に好ましくは、１μｍ以上、２００μｍ以下であり、より好ましくは、５μｍ以上、１５０μｍ以下である。特に好ましくは、１０μｍ以上、１００μｍ以下である。また電界紡糸法から得られるシルクファイバーを含む不織布は、用途に応じて、得られた不織布の片側又は両側に、さらに不織布を保持するための支持体を接合させてもよく、その支持体の素材は特に限定されない。

[0052] 不織布を構成するシルクファイバー（繊維）の好適な繊維径（太さ）（円断面であれば直径）は、１０ｎｍ以上、１０μｍ以下である。より好ましくは、２０ｎｍ以上、５μｍ以下である。繊維径は、特に好ましくは、３０ｎｍ以上、１μｍ以下である。繊維径が１０ｎｍ以上、１０μｍ以下の繊維は、電界紡糸法で得られ易い。

[0053] 上記不織布は、血液適合材料用不織布であることが好ましい。

本発明は、シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布を含む血液適合材料にも関する。

血液適合材料は、血液に接触させて用いる材料である。

前記血液適合材料としては、特に限定されないが、人工血管、カテーテル、血液フィルタ、癒着防止材、ステント、細胞足場材料、人工臓器、血液保存容器、輸血用具などが挙げられる。本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布は、常に血液と接触する人工血管に、特に好適に用いることができる。これらの血液適合材料は、シルクファイバーを少なくとも一部に含み、その他の構成部材を含んでもよい。例えば、これらの血液適合材料は、シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布が基材（例えば、合成高分子や生体高分子を含むポリマー部材、あるいは、金属部材）にコーティングされた複層体であってもよい。

[0054] 上記不織布は、創傷被覆材であることが好ましい。

[0055] 上記不織布は、ｉＰＳ細胞足場材であることが好ましい。

[0056] ｉＰＳ細胞は、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）を表し、多能性幹細胞である。

「幹細胞」とは、自己複製能と分化能を有する細胞をいう。幹細胞のうち、自己複製能を有し、かつ、１つの細胞から、内胚葉、中胚葉、外胚葉の全ての細胞へ分化できるものを「多能性幹細胞」という。

[0057] 上述の通り、本発明の一実施形態のシルクファイバーを含む不織布の製造方法について説明したが、本発明の好ましい実施形態にかかるシルクファイバーを含む不織布の製造方法は、以下の通りである。

シルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解してシルクフィブロイン溶液を得て、前記溶液を用いて電界紡糸する、シルクファイバーを含む不織布の製造方法であって、

前記シルクファイバーにおいて、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６５０）］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ（１６２０）］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５より大きく、１．９０以下である、シルクファイバーを含む不織布の製造方法。

シルクフィブロイン、フッ素系アルコール、シルクフィブロイン溶液、電界紡糸、及びａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］等は、上述の通りである。

前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒であることが好ましい。

前記シルクフィブロイン溶液が、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒に、５８．６℃以上、１８０℃以下の溶解温度で、シルクフィブロインを溶解させることにより得られることが好ましい。

フッ素系アルコール、シルクフィブロイン溶液、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒等は、上述

の通りである。

[0058] 前記フッ素系アルコールは１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールであることが好ましい。

[0059] 電界紡糸によって得られたシルクファイバーを含む前記不織布を、さらにアルコールに接触する工程を含むことが好ましい。アルコールに接触する工程は、上述の通りである。

[0060] 前記アルコールが、エタノールまたはその水溶液であることが好ましい。

[0061] 前記不織布が、創傷被覆材であることが好ましい。

前記不織布が、ｉＰＳ細胞足場材であることが好ましい。

前記不織布が、血液適合材料用不織布（シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布）であることが好ましい。

また、本発明の一実施形態は、前記シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布の製造方法を含む、血液適合材料の製造方法にも関する。

実施例

[0062] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

本発明の一実施形態におけるｉＰＳ細胞の培養方法は、プラスチック製シャーレに培養培地（液体）と足場材を準備した上で、その足場材に対してｉＰＳ細胞を接着させて培養する公知の培養方法を用いた。細胞培養後のｉＰＳ細胞は、フローサイトメトリー法、ならびにＲｅａｌ－ｔｉｍｅ　ＰＣＲにて、それぞれ公知の方法に準じてその未分化能を評価した。本発明の実施例に培養方法の一例を記載する。

[0063] ［シルクファイバーを含む不織布の作製］

[0064] シルクフィブロインＨＦＩＰ溶液の作製

温度計および撹拌子を備えた１００ｍＬのステンレス鋼製耐圧容器内に、２５℃でシルクフィブロインを０．２ｇ、ＨＦＩＰを１９．８ｇ量り入れた。次いで、耐圧容器内部を１１０℃まで昇温後、２時間攪拌してシルクフィブロインを溶解させることにより、シルクフィブロインの濃度が１質量％の

ＨＦＩＰ溶液を得た。得られたシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液から、エバポレータを用いて１０．０ｇのＨＦＩＰを減圧留去することで、濃度２質量％のシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液１０．０ｇを得た。

[0065] ［実施例１］

電界紡糸による紡糸

株式会社メック製の不織布電界紡糸装置ＮＡＮＯＮ－０３を用いて、上記で得られたシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液から紡糸を行った。ノズルの内径は０．４ｍｍ、印可電圧２５ｋＶ、紡糸距離は２０ｃｍに設定した。紡糸装置の温度２３～２４℃、湿度は２０～３０％を維持した。また、コレクタにはドラムロールコレクタを用いて、コレクタ電極上には模造紙を用いた。ドラムコレクタの回転速度は１００ｒｐｍとした。得られた不織布は、厚さ２０～５０μｍ、繊維径１００～７００ｎｍであった。

[0066] ［比較例１］

電界紡糸による紡糸

紡糸装置の温度２６～２７℃、湿度は５０～６０％を維持した以外は実施例１と同様に紡糸を行った。得られた不織布は、厚さ２０～５０μｍ、繊維径１００～７００ｎｍであった。

[0067] ［実施例２］

比較例１と同様の条件にて作製した不織布を２３℃でエタノールに２０分浸漬させて、乾燥させることで不溶化処理された不織布を得た。

[0068] ［実施例３］

比較例１と同様の条件にて作製した不織布を２３℃でエタノールに１時間浸漬させて、乾燥させることで不溶化処理された不織布を得た。

[0069] ［実施例４］

比較例１と同様の条件にて作製した不織布を２３℃でエタノールに３時間浸漬させて、乾燥させることで不溶化処理された不織布を得た。

[0070] ［比較例２］

実施例１と同様の条件にて作製した不織布を２３℃でエタノールと水の混

合液（質量比でエタノール：水＝８０：２０）に１時間浸漬させて、乾燥させることで不溶化処理された不織布を得た。

[0071] ［実施例５］

温度計および撹拌子を備えた１００ｍＬのステンレス鋼製耐圧容器内に、２５℃でシルクフィブロインを０．２ｇ、ＨＦＩＰを１９．８ｇ量り入れた。２時間攪拌してシルクフィブロインを溶解させることにより、シルクフィブロインの濃度が１質量％のＨＦＩＰ溶液を得た。得られたシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液から、エバポレータを用いて１５．０ｇのＨＦＩＰを減圧留去することで、濃度４質量％のシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液５．０ｇを得た。

このシルクフィブロインＨＦＩＰ溶液を用いたこと以外は、実施例１と同様の条件にて紡糸を行った。得られた不織布は、厚さ２０～５０μｍ、繊維径１００～７００ｎｍであった。

[0072] ＜シルクファイバー不織布の膜厚測定＞

シルクファイバー不織布の膜厚の測定には株式会社ミツトヨ製マイクロメータ、製品名：ＭＤＣ－２５ＭＸを用いた。測定は不織布の中心を含む、任意の３点を測定し、その平均値を膜厚とした。

[0073] ＜シルクファイバーの高次構造評価＞

得られたシルクファイバー不織布のＩＲスペクトル測定で、αヘリックスに由来する１６５０ｃｍ$^{-1}$付近のピーク強度（ａｂｓ）およびβシート構造に由来する１６２０ｃｍ$^{-1}$付近のピーク強度（ａｂｓ）より、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］を算出した。

ＩＲスペクトル測定には、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製、製品名：ＮｉｃｏｌｅｔｉＳ５を用いた。

なお、各高次構造に由来するピークの波数については、非特許文献 Taiyo Yoshioka, Tamako Hata, Katsura Kojima, Yasumoto Nakazawa, and Tsunenori Kameda, Biomater. Sci. Eng.,Vol.3, P3207-3214(2017)に記載されている。

[0074] ＜シルクファイバー不織布の耐水性評価＞

上記実施例、比較例にて得られたシルクファイバー不織布を、室温（約２５℃）で水に浸漬させた際の状態を目視観察し、以下の基準で耐水性を評価した。

Ａ：外観に変化なし（溶解しない）

Ｂ：部分的に溶解する

Ｃ：完全に溶解する

[0075] 表１に作製した不織布のａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］の値、および耐水性評価結果を示す。

[0076] [表1]

シルクファイバー不織布	エタノール処理	ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］	耐水性
実施例１	処理なし	１．８１	Ｂ
実施例２	浸漬２０分	０．７５	Ａ
実施例３	浸漬１時間	０．７４	Ａ
実施例４	浸漬３時間	０．７５	Ａ
実施例５	処理なし	１．６９	Ｂ
比較例１	処理なし	２．１５	Ｃ
比較例２	エタノールと水の混合液に浸漬１時間	０．６５	—

[0077] 表１に示すように、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が２．１５である比較例１では、不織布が完全に溶解し、耐水性に劣る結果となった。一方、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が１．８１である実施例１、１．６９である実施例５では溶解は部分的なものにとどまり、水に対して不織布が形状保持しやすい傾向であった。さらに、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が１．００以下である実施例２～４では溶解は確認されず、水に対して不織布が形状保持できる。

また、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５である比較例２では、不織布作製時や取り扱い時に壊れてしまい、耐水性を

評価することができなかった。一方、ａｂｓ強度比［ａｂｓ（１６５０）／ａｂｓ（１６２０）］が０．６５より大きい実施例１～５、比較例１では、不織布に脆さはなく、破損することはなかった。

[0078] 上記実施例１～５、比較例１、２で作製したシルクファイバー不織布をそれぞれ、血液適合材料用不織布として用いた。

シルクファイバー不織布の耐水性の評価は、表１に示す通りである。

[0079] ［シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布の耐圧試験］

上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を血液適合材料用不織布として用いた。

上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を用いて、人工血管等の血液適合材料に要求される当該不織布の耐圧試験を行った。なお耐圧試験においては、ポリエステルファイバー不織布についても同様に試験を行った。ポリエステルファイバー不織布は、ユニチカ株式会社製、ポリエチレンテレフタラート、型番ＮＥＨ－２０７０を原料にして、シルクファイバー不織布と同様にＨＦＩＰを用いて溶解させて溶液にした後、電解紡糸法によって作製した不織布である。

[0080] プラスチック製ディスポーザブルシリンジ（内容積１０ｍｌ）を用意し、シリンジの出口側にプラスチック製フィルターホルダー（フィルター内径１３ｍｍ）を接続した。上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布、およびポリエステルファイバー不織布を、ハサミを用いて直径１３ｍｍの円形のサイズに切り抜いた後、各不織布をシリンジのフィルターホルダーに挟み込んだ。シリンジ内部に血液（牛保存血液、株式会社日本バイオテスト研究所製）を５ｍｌ封入し、シリンジのプランジャーから１００ｍｍＨｇ、２００ｍｍＨｇ、３００ｍｍＨｇ、４００ｍｍＨｇ、または５００ｍｍＨｇの圧力を加えて、不織布からの血液の漏れ具合を評価した。なお本試験において、不織布に何も圧力を加えてない場合の圧力は０ｍｍＨｇとなる。

[0081] それぞれの不織布の耐圧評価の結果を表２に示す。

[0082] ［不織布の耐圧性評価］

Ａ：不織布から血液の漏れは生じなかった。

Ｂ：不織布から血液の漏れが生じた。

[0083] [表2]

不織布の種類	圧力条件					
	0 mmHg	100 mmHg	200 mmHg	300 mmHg	400 mmHg	500 mmHg
シルクファイバー不織布	A	A	A	A	A	A
ポリエステルファイバー不織布	A	A	A	B	B	B

[0084] 表２に示すように、シルクナノファイバー不織布は０ｍｍＨｇから５００ｍｍＨｇの範囲内において、血液の漏れは生じなかった。ポリエステルファイバー不織布は０ｍｍＨｇから２００ｍｍＨｇの範囲内において、血液の漏れは生じなかったが、３００ｍｍＨｇ、４００ｍｍＨｇ、および５００ｍｍＨｇの各圧力では血液の漏れが生じた。シルクナノファイバー不織布は、各圧力での血液の漏れがなく、血液適合材料用不織布として好ましい耐圧特性を有している。

[0085] ［シルクファイバーを含む血液適合材料用不織布の血液付着試験］

上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を用いて、人工血管等の血液適合材料に要求される当該不織布の血液付着性を試験した。シルクファイバー不織布、およびポリエステルファイバー不織布を、ハサミを用いて２ｃｍ×２ｃｍの正方形に切り取った後、各不織布の全面に血液（牛保存血液、株式会社日本バイオテスト研究所製）を接触させた。その後、蒸留水で各不織布の全面をよく洗い流した。各不織布の外観を目視、および光学顕微鏡にて観察して、各不織布に対する血液付着性を評価した。

[0086] それぞれの不織布の血液付着試験の結果を表３に示す。

[0087] ［不織布の血液付着性評価］

Ａ：不織布に血液の付着は認められなかった。

Ｂ：不織布の全面に血液の付着が認められた。

[0088] [表3]

不織布の種類	血液付着性評価
シルクファイバー不織布	A
ポリエステルファイバー不織布	B

[0089] 表３に示すように、シルクナノファイバー不織布には血液の付着が認められなかった。しかしながらポリエステルファイバー不織布には血液の付着が認められた。シルクナノファイバー不織布は、血液適合材料用不織布として血液が付着しづらい性状を有しており、好ましい。

[0090] 上記実施例１～５、比較例１、２で作製したシルクファイバー不織布をそれぞれ、創傷被覆材として用いた。

創傷被覆材の耐水性の評価は、表１に示す通りである。

[0091] ［創傷被覆材の治癒効果評価試験］

上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を創傷被覆材として用いた。

上記創傷被覆材にて、実験動物にラット(Slc:Wistar、オス、供給元：日本エルエスシー)を用いて試験を行った。試験開始時のラットは、体重142～154g、週齢8週のラットを16匹用いた。実験ラットを、創傷被覆材を用いない陰性対照群(CT)、キチン製創傷被覆材（ニプロ株式会社製、商品名ベスキチンW）を用いたキチン群(CH)、ポリエステル製創傷被覆材（ユニチカ株式会社製、ポリエチレンテレフタラート、型番ＮＥＨ－２０７０）を用いたポリエステル群(E)、上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を用いた絹群(Si)の4群に分けて、各郡の実験動物を4匹とした。

[0092] 実験動物にイソフルランにて麻酔をかけ、剃毛した。皮抜きポンチを用いて直径15mmの全層欠損創を作製した。E群およびSi群の創傷被覆材については、生理食塩水で濡らし創傷部位に密着させた。CH群は製品添付文書に従い、被覆材を創傷部位に添付した。被覆材の添付後、被覆材の上からガーゼを添付し、サージカルテープで固定後、ガーゼを覆うようにネット包帯を胴体に装着させた。CT群では生理食塩液で湿らせたガーゼを直接創傷部位に貼付し

、サージカルテープで固定後、ガーゼを覆うようにネット包帯を胴体に装着させた。モデル動物作製後の全ラットについてエリザベスカラーをモデル動物作製日に装着した。モデル動物作製日以降は2～4日に1回の頻度でエリザベスカラーを交換した。

[0093] ４日後および７日後では被覆材、ガーゼおよびネット包帯を交換したが、被覆材やガーゼが創傷部位から剥がれない場合は生理食塩液で濡らしてから剥がした。濡らしても剥がれない場合は無理に剥がさず、上に貼付するガーゼあるいはネット包帯のみ交換した。

[0094] モデル動物作製後の全ラットについて、モデル動物作製日（開始時）、４日後、７日後、及び１４日後に創傷部位の写真撮影、面積測定を実施した。ラットをイソフルランの吸入麻酔にて麻酔した。

麻酔下にて、被覆材、ガーゼおよびネット包帯を剥がし、創傷部位をデジタルカメラで撮影した。

[0095] ラットをイソフルランの吸入麻酔にて麻酔した。麻酔下にて、被覆材、ガーゼおよびネット包帯を剥がし、トレーシングペーパーへ創傷部位の形状を転写した。被覆材やガーゼが創傷部位から剥がれない場合は生理食塩液で濡らしてから剥がした。濡らしても剥がれない場合は無理に剥がさず、被覆材あるいはガーゼ越しに創傷部位の形状を転写した。イメージスキャナーを用いてトレーシングペーパーの情報をコンピューターへ入力した。Image J software (US National Institutes of Health)を用いて面積を測定した。

[0096] 損傷部位面積、および損傷部位面積の割合（％）を表４に示す。

[表4]

Animal#	群	Sex	創傷部位面積 (mm^2)				創傷部位面積(%)			
			開始時	4日後	7日後	14日後	開始時	4日後	7日後	14日後
CT-01	陰性対照群	♂	187.216	110.116	66.535	18.097	100.0	58.8	35.5	9.7
CT-02		♂	187.209	127.895	58.356	7.609	100.0	68.3	31.2	4.1
CT-03		♂	177.772	102.025	98.779	36.368	100.0	57.4	55.6	20.5
CT-04		♂	151.192	135.979	93.258	21.774	100.0	89.9	61.7	14.4
CH-01	キチン群	♂	153.009	108.540	82.276	22.545	100.0	70.9	53.8	14.7
CH-02		♂	155.760	129.563	77.533	35.678	100.0	83.2	49.8	22.9
CH-03		♂	126.918	104.445	82.770	15.379	100.0	82.3	65.2	12.1
CH-04		♂	147.565	108.810	56.047	22.167	100.0	73.7	38.0	15.0
E-01	ポリエステル群	♂	154.381	97.018	68.937	55.686	100.0	62.8	44.7	36.1
E-02		♂	131.133	78.703	65.676	89.845	100.0	60.0	50.1	68.5
E-03		♂	145.806	38.396	25.211	24.180	100.0	26.3	17.3	16.6
E-04		♂	173.822	154.252	132.093	48.476	100.0	88.7	76.0	27.9
Si-01	絹群	♂	186.153	122.732	106.155	18.700	100.0	65.9	57.0	10.0
Si-02		♂	170.080	71.152	75.445	19.870	100.0	41.8	44.4	11.7
Si-03		♂	153.454	76.530	67.637	17.406	100.0	49.9	44.1	11.3
Si-04		♂	215.082	148.147	121.394	44.494	100.0	68.9	56.4	20.7
平均	陰性対照群		175.847	119.004	79.232	20.962	100.0	67.7	45.1	11.9
	キチン群		145.813	112.840	74.657	23.942	100.0	77.4	51.2	16.4
	ポリエステル群		151.286	92.092	72.979	54.547	100.0	60.9	48.2	36.1
	絹群		181.192	104.640	92.658	25.118	100.0	57.8	51.1	13.9

[0097] １４日後に、創傷部組織断面の顕微鏡観察を行って、皮膚上皮組織の回復具合を確認した。

創傷被覆材の創傷部面積評価、創傷部組織断面評価は、以下のように行い、治癒効果を評価した。評価結果を表５に示す。

［創傷部面積評価］

Ａ：創傷部の面積が早期に小さくなり（４日後参照）、１４日後に創傷部の面積が小さくなる。

Ｂ：１４日後に創傷部の面積が小さくなる。

Ｃ：１４日後に創傷部の面積が比較的小さくなる。

Ｄ：１４日後に創傷部の面積が比較的大きい。

[0098] ［創傷部組織断面評価］

Ａ：上皮層が均一に再生されている。

Ｂ：上皮層が部分的に再生されている。

Ｃ：上皮層の再生がほとんど認められない。

[0099]

[表5]

群	試験動物数	治癒効果の評価結果	
		創傷部 面積評価	創傷部組織 断面評価
陰性対照 (CT)群	4	B	B
キチン (CH)群	4	C	B
ポリエステル (E)群	4	D	C
絹 (Si)群	4	A	A

[0100] 表４に記載されるように、４日後までの早期において創傷部位面積（平均）で絹群（Ｓｉ群）は、最も面積が小さくなっていた。

表４、表５に示すように、絹（Ｓｉ）群では、創傷部位面積（平均）が小さくなるとともに、創傷部組織の断面観察において、他の群に比べて、上皮層の再生に優れており、組織が綺麗に再生されていた。

以上により、絹群（Ｓｉ）では、他群と比較して、治癒効果に優れていることが分かる。

[0101] 上記実施例１～５、比較例１、２で作製したシルクファイバー不織布をそれぞれ、ｉＰＳ細胞足場材として用いた。

ｉＰＳ細胞足場材の耐水性の評価は、表１に示す通りである。

[0102] ［ｉＰＳ細胞の培養試験］

以下、iPS細胞の培養試験を詳述するが、本発明はこれに限定されるものではない。

ヒトiPS細胞はタカラバイオ株式会社製、Cellartis human iPS cell line P1 1025（European/North African、男性、33.4歳）を用いた。培養培地にはタカラバイオ株式会社製、Cellartis DEF-CS 100 Culture SystemのDEF-CS 100 Basal Mediumを用いた。培養基質（細胞足場）には、上記実施例３で作製したシルクファイバー不織布を、又はコントロール（比較例）としてDEF-CS COAT-1（タカラバイオ株式会社製、非シルクファイバー）を、それぞれ、ポリスチレンシャーレ（TPP社製、平底細胞培養プレート）に塗布した培養基質（細胞足場）をそれぞれ使用した。また細胞培養と継代に用いた細胞剥離液はC

TSTM TrypLETM Select Enzyme (Thermo Fisher Scientific製, Cat. No. A12 85901)、細胞洗浄液D-PBS (-) (Wako製, Cat. No. 045-29795, Lot. No. APG 7057) 、細胞保存液はSTEM-CELLBANKER (Zenoaq製, Cat. No. CB045) を使用した。

シルクファイバー不織布、およびDEF-CS COAT-1コートのそれぞれ足場に対して、iPS細胞をコンフルエントになるまで培養し、倒立顕微鏡でiPS細胞を観察した（これを継代１回目と記載する）。さらに新たに準備したシルクファイバー不織布、およびDEF-CS COAT-1コートにiPS細胞を継代し、培養を繰り返した。最終的に継代3回目を終えたところで、iPS細胞の未分化を確認するため、フローサイトメトリー法、Real-time PCR法の２種類を実施した。

[0103] １． 細胞培養

[0104] １－１ 細胞の凍結融解

1). DEF-CS COAT-1をD-PBS (+/+) で20倍希釈し、0.1 mL/cm^{2}となるように培養容器に入れる。

2). 37° Cで2時間以上インキュベートする。

3). DEF-CS GF3を1,000倍希釈になるように加えた培養培地を必要量用意する。

4). 15 mLチューブに必要量の培養培地 (GF3+)を入れる。

5). 標的細胞を液体窒素から取り出し、37° Cのウォーターバスで融解させる。

6). 4)で準備したチューブに融解した細胞を移す。凍結チューブに培養培地 1 mLを加えて、チューブに追加する。

7). 室温 (25℃) 、300 × gで、1分間遠心する。

8). 遠心後の細胞から培地を吸引除去した後、培養培地(GF3+) 1 mLを加えてピペッティングする。

9). 2)でコートしたプレートからDEF-CS COAT-1を除去し、必要量の培養培地 (GF3+)を入れる。

10). 9)のプレートに、約3.0 x 10^5 cells/cm^{2}で細胞を播種する。

11). 5% CO_2存在下、37°Cで培養する。

12). 翌日、培養培地で培地交換し、その後は隔日で培地交換する。

[0105] １－２ 継代培養

[0106] ＜コントロール＞（比較例）

1). DEF-CS COAT-1をD-PBS（+/+）で20倍希釈し、0.1 mL/cm^{2}となるように培養容器に入れる。

2). 37°Cで2時間以上インキュベートする。

3). 70-80% コンフルエントの細胞をD-PBS（-）1 mL/wellで洗浄する。

4). D-PBS（-）をアスピレートし、TrypLE™ Selectを20 μL/cm^{2}になるよう76 μL/well入れて37°Cで5分間静置し、細胞間の接着を解離させる。

5). 培養培地(GF3+) 500 μL/wellを加えて、ピペッティングでシングルセル化させる。

6). 室温（25℃）、200 × gで4分間遠心する。

7). 上清をアスピレートし、培養培地(GF3+) 500 μL/wellで細胞ペレットを懸濁する。

8). 細胞数をカウントする。

9). 2)でコーティングした細胞容器からDEF-CS COAT-1をアスピレートし、培養培地(GF3+)を0.17 mL/cm^{2}となるように入れる。

10). 9)のプレートに、約0.6～1.4 x 10^5 cells/cm^{2}となるように、細胞を播種する。

11). 37°CのCO_2インキュベータ中で培養する。

12). 翌日培養培地で培地交換し、それ以降は2日毎に培地交換する。細胞数が増えて培地交換の翌日に培地が黄色くなり始めたら、毎日培地交換する。

[0107] ＜シルクファイバー不織布使用＞（実施例）

1). シルクファイバー不織布をそれぞれ直径約2.1 cmの円形に切り取る。

2). 円形のシルクファイバー不織布を70%エタノール中に浸して滅菌する。

3). シルクファイバー不織布を風乾させた後、D-PBS(-)で数回洗浄する。

4). シルクファイバー不織布を12穴プレートのwellに入れる。

5). 培養培地(GF3+)を加える。

6). 37° Cで2時間以上インキュベートする。

7). 70-80% コンフルエントの細胞をD-PBS (-) 1 mL/wellで洗浄する。

8). D-PBS (-) をアスピレートし、TrypLE™ Selectを20 μL/cm²になるよう76 μL/well入れて37° Cで5分間静置し、細胞間の接着を解離させる。

9). 培養培地(GF3+) 500 μL/wellを加えて、ピペッティングでシングルセル化させる。

10). 室温（25℃）、200 × gで4分間遠心する。

11). 上清をアスピレートし、培養培地(GF3+) 500 μL/wellで細胞ペレットを懸濁する。

12). 細胞数をカウントする。

13). 5)のプレートに、約2.4～8.3 x 10^4 cells/cm²となるように、細胞を播種する。

14). 37° C のCO_2インキュベータ中で培養する。

15). 翌日培養培地で培地交換し、それ以降は2日毎に培地交換する。細胞数が増えて培地交換の翌日に培地が黄色くなり始めたら、毎日培地交換する。

[0108] ［ｉＰＳ細胞の培養試験結果］

継代１回目、２回目、３回目のそれぞれの培養後の顕微鏡観察を行って、実施例と比較例におけるｉＰＳ細胞増殖時の様子を比較した。当該顕微鏡観察写真を図１および図２に示す。

[0109] シルクファイバー不織布を足場材として用いた実施例では、培養後の顕微鏡写真中に黒い斑点のような塊が確認された。これは、ｉＰＳ細胞が塊を作りながら、上方向に（３次元的に）丸まりながら増殖していることを示唆している。

一方、シルクファイバー不織布を用いずに、DEF-CS COAT-1を足場材として

用いた比較例では、上述のような塊が認められず、ｉＰＳ細胞が３次元的ではなく２次元的に平面上に広がりながら増えていることを示唆している。

今回の培養条件において、通常予見されるｉＰＳ細胞の成長過程は足場材に対して平面的な成長であり、３次元的な成長となると技術的な難易度が高いものである。

[0110] また、細胞培養の結果を下表に示す。

[0111] [表6]

(DEF-CS COAT-1コート)

継代数	培養日数(日)	播種数($\times10^5$ cells)	総細胞数($\times10^5$ cells)	生存率(%)(回収時)	増殖率(倍)	倍加時間(hr)
継代１回目	3	0.5	2.25	96.2	4.5	33.2
継代２回目	6	0.21	9.12	100	43.4	26.5
継代３回目	6	0.21	9.62	99.4	45.8	26.1

*倍加時間の算出式：倍加時間(hr) =ln2/ln (増殖率)×培養日数(day)×24(hr)

[0112] [表7]

(シルクファイバー不織布)

継代数	培養日数(日)	播種数($\times10^5$ cells)	総細胞数($\times10^5$ cells)	生存率(%)(回収時)	増殖率(倍)	倍加時間(hr)
継代１回目	3	3	0.86	86.4	0.3	-
継代２回目	6	0.86	5.92	100	6.9	51.6
継代３回目	6	0.86	14.41	98.9	16.8	35.4

[0113] 上記表は、最初にｉＰＳ細胞を播種して、そのｉＰＳ細胞が培養後にどのくらい増殖したかを示す総細胞数、総細胞の中で死細胞を除いた、生きているｉＰＳ細胞の割合を示す生存率等を記載したものである。

上記表より、今回のｉＰＳ細胞は、シルクファイバー不織布足場上でもコントロールのCOAT-1足場と同じように、しっかり細胞総数は増えており、さらに死細胞の割合も高くなかったことがわかる。

[0114] ｉＰＳ細胞培養は、細胞数を増やす点も確認しつつ、かつ未分化能も保持している点も確認する必要がある。

シルクファイバー不織布にて培養したｉＰＳ細胞の未分化を確認するため、フローサイトメトリーにて未分化マーカーであるSSEA-4とTRA-1-60の発現

について、それぞれ試験を行った。

具体的には、ｉＰＳ細胞の未分化能を評価するため、フローサイトメーター（ＢＤバイオサイエンス製、ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ）で解析した。評価結果を以下に示す。

[0115] [表8]

足場材料	細胞総数	ＳＳＥＡ－４陽性細胞	ＴＲＡ－１－６０陽性細胞
シルクファイバー	９８５２	９７９５（９９．４％）	８９６７（９１．０％）
ＤＥＦ－ＣＳ　ＣＯＡＴ－１	９８７２	９８４１（９９．７％）	９５８１（９７．１％）

[0116] その結果、シルクファイバー上で培養したｉＰＳ細胞はｉＰＳ細胞表面の未分化マーカーであるＳＳＥＡ－４とＴＲＡ－１－６０がいずれもコントロール試験と同程度の陽性を示している事が確認され、未分化能を維持している事が分かった。

[0117] また、シルクファイバー不織布にて培養したｉＰＳ細胞の未分化を確認するため、Real -Time-PCRによるOct3/4とNanogの発現について、それぞれ試験を行った。

具体的には、ｉＰＳ細胞の未分化能を評価するため、Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ ＰＣＲ（サーモフィッシャーサイエンティフィック製、ＳｔｅｐＯｎｅＰｌｕｓリアルタイムＰＣＲシステム）を用いて、未分化マーカーであるＯｃｔ３／４とＮＡＮＯＧの発現量を評価した。評価結果を以下に示す。

[0118] [表9]

足場材料	総ＲＮＡ数（μｇ）	ＧＡＰＤＨ（内部標準遺伝子）	Ｏｃｔ３／４	ＮＡＮＯＧ	［Ｏｃｔ３／４］／ＧＡＰＤＨ	ＮＡＮＯＧ／ＧＡＰＤＨ
シルクファイバー不織布	９．４	１８１５７４１	６５２９３６	３３５３８	０．３６	０．０１８
ＤＥＦ－ＣＳ ＣＯＡＴ－１	９．２	１４３６０３８	６４８６３８	２４１３６	０．４５	０．０１７

[0119] その結果、シルクファイバー不織布上で培養したｉＰＳ細胞は、コントロール試験と同程度の発現量を示している事が確認され、未分化能を維持して

いる事が分かった。

具体的には、シルクファイバー不織布とコントロールにて培養したｉＰＳ細胞の総RNA数を、揃えて遺伝子解析した結果、Ｏｃｔ３／４については、コントロールの発現量割合が高く、Ｏｃｔ３／４では同程度であり、未分化を維持していることが分かった。

産業上の利用可能性

[0120] 本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高い、シルクファイバーを含む不織布およびその製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、血液の漏出を抑制でき、かつ血液の付着を抑える血液適合材料用不織布、血液適合材料、血液適合材料用不織布の製造方法、および血液適合材料の製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、かつ治癒効果に優れた創傷被覆材およびその製造方法を提供することができる。

本発明の一実施形態によれば、耐水性が高く、靭性が高く、かつｉＰＳ細胞が、増殖時に３次元組織構造をつくることが可能なｉＰＳ細胞足場材およびその製造方法を提供することができる。

[0121] 本発明を詳細にまた特定の実施態様を参照して説明したが、本発明の精神と範囲を逸脱することなく様々な変更や修正を加えることができることは当業者にとって明らかである。

[0122] なお、本出願は、２０１９年９月６日出願の日本特許出願（特願２０１９－１６３１７０）、２０１９年９月６日出願の日本特許出願（特願２０１９－１６３１７２）、２０１９年１０月８日出願の日本特許出願（特願２０１９－１８５４６１）、及び２０１９年１０月８日出願の日本特許出願（特願２０１９－１８５４６２）に基づくものであり、その内容はここに参照として取り込まれる。

請求の範囲

[請求項1] 赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６５０)］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６２０)］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下であるシルクファイバーを含む不織布。

[請求項2] 前記ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．７０以上、１．００以下である、請求項１に記載のシルクファイバーを含む不織布。

[請求項3] 前記不織布が、血液適合材料用不織布である、請求項１又は２に記載のシルクファイバーを含む不織布。

[請求項4] 請求項３に記載のシルクファイバーを含む不織布を含む血液適合材料。

[請求項5] 前記血液適合材料が人工血管、カテーテル、血液フィルタ、癒着防止材、ステント、細胞足場材料、人工臓器、血液保存容器、または、輸血用具である、請求項４に記載の血液適合材料。

[請求項6] 前記不織布が、創傷被覆材である、請求項１又は２に記載のシルクファイバーを含む不織布。

[請求項7] 前記不織布が、ｉＰＳ細胞足場材である、請求項１又は２に記載のシルクファイバーを含む不織布。

[請求項8] シルクフィブロインをフッ素系アルコールに溶解してシルクフィブロイン溶液を得て、上記溶液を用いて電界紡糸する、シルクファイバーを含む不織布の製造方法であって、

前記シルクファイバーにおいて、赤外吸収スペクトルの１６５０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６５０)］と、１６２０ｃｍ$^{-1}$付近に位置するピークの強度［ａｂｓ(１６２０)］の比である、ａｂｓ強度比［ａｂｓ(１６５０)／ａｂｓ(１６２０)］が０．６５より大きく、１．９０以下である、シルクファイバーを含む不織

布の製造方法。

[請求項9] 前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒である、請求項８に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項10] 前記シルクフィブロイン溶液が、１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールを７０質量％以上含む溶媒に、５８．６℃以上、１８０℃以下の溶解温度で、シルクフィブロインを溶解させることにより得られる、請求項８又は９に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項11] 前記フッ素系アルコールが１，１，１，３，３，３－ヘキサフルオロ－２－プロパノールである、請求項８～１０のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項12] 電界紡糸によって得られたシルクファイバーを含む前記不織布を、さらにアルコールに接触させる工程を含む、請求項８～１１のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項13] 前記アルコールが、エタノールまたはその水溶液である、請求項１２に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項14] 前記不織布が、創傷被覆材である、請求項８～１３のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項15] 前記不織布が、ｉＰＳ細胞足場材である、請求項８～１３のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

[請求項16] 前記不織布が、血液適合材料用不織布である、請求項８～１３のいずれか１項に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法。

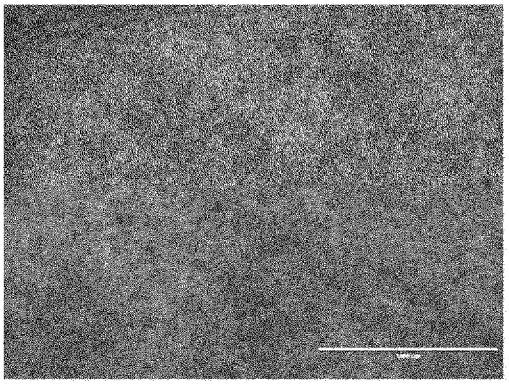
[請求項17] 請求項１６に記載のシルクファイバーを含む不織布の製造方法を含む、血液適合材料の製造方法。

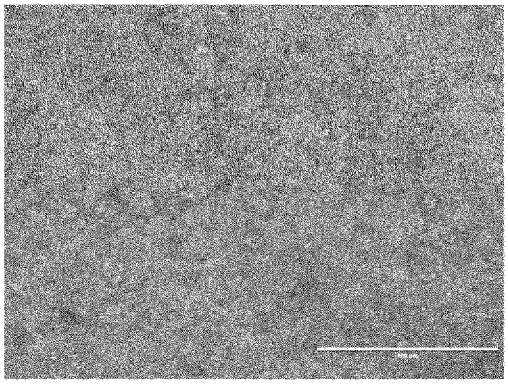
[図1]

細胞観察結果：シルクファイバー不織布（実施例）

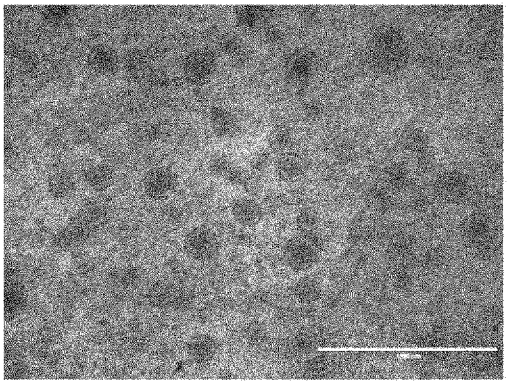
○対物レンズ4倍 ○対物レンズ10倍

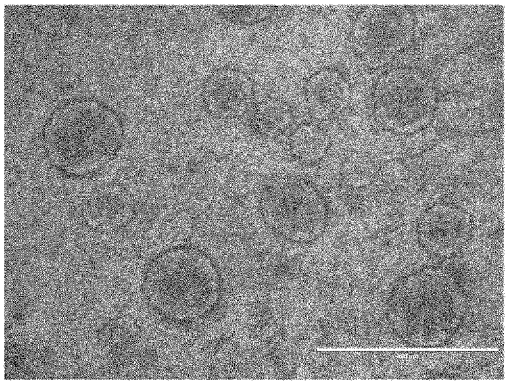
（継代1回目、3日間培養）



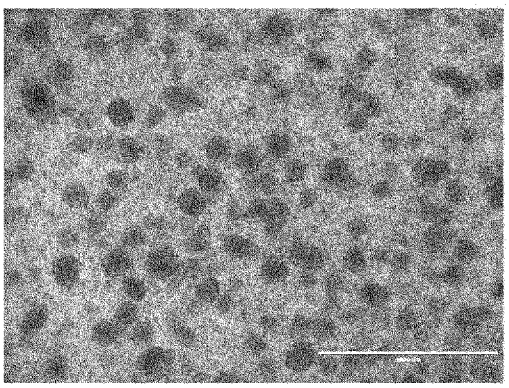


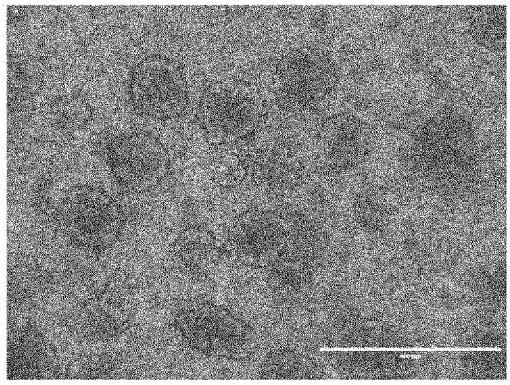
（継代2回目、6日間培養）





（継代3回目、6日間培養）



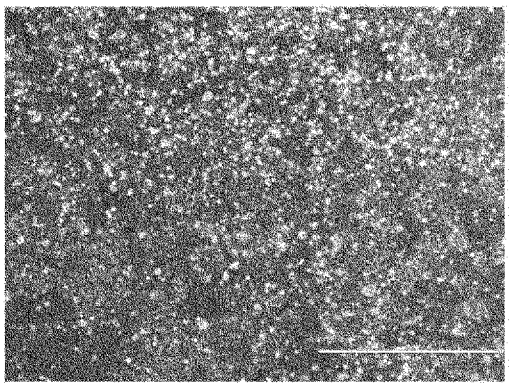
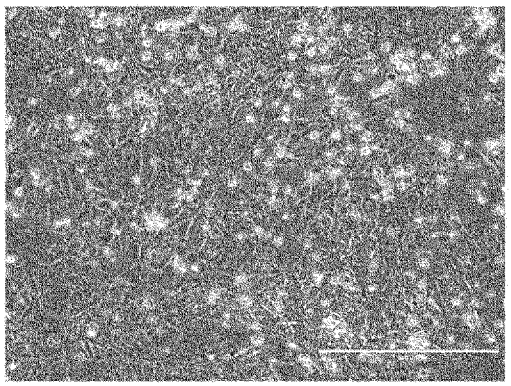


[図2]

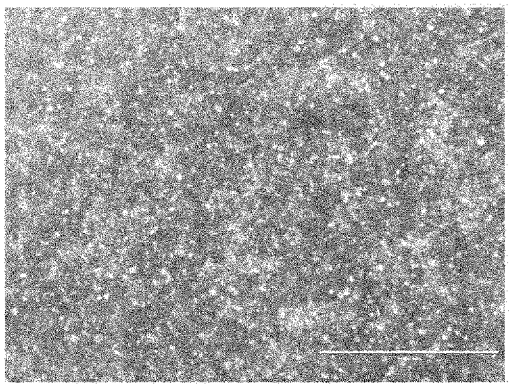
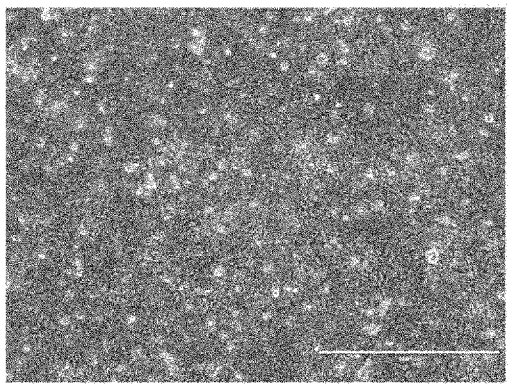
細胞観察結果:DEF-CS COAT-1 コート(比較例)

○対物レンズ4倍 ○対物レンズ10倍

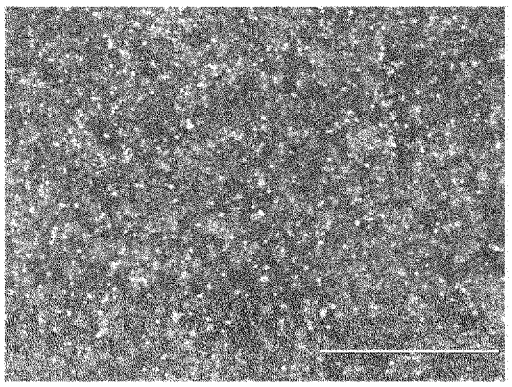
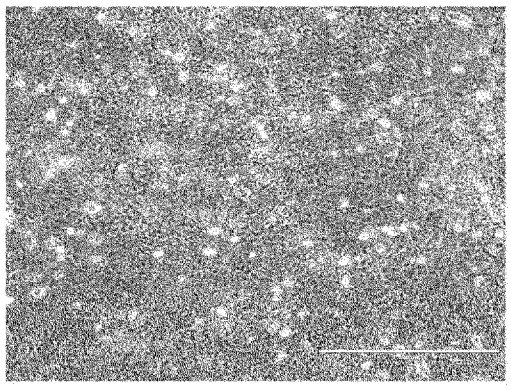
(継代1回目、3日間培養)

(継代2回目、6日間培養)

(継代3回目、6日間培養)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/033488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
D04H 1/4266(2012.01)i; A61F 13/00(2006.01)i; A61L 15/32(2006.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; D01F 4/02(2006.01)i; D04H 1/728(2012.01)i
FI: D04H1/4266; A61F13/00 T; A61F13/00 301C; A61L15/32 100; A61L27/36 100; A61L27/50 300; C12M1/00 A; C12M3/00 A; D01F4/02; D04H1/728
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)
D04H1/00-18/04; D01F1/00-6/96; D01F9/00-9/04; D01D1/00-13/02

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2010-270426 A (SHINSHU UNIVERSITY) 02 December 2010 (2010-12-02) claims, example 25, paragraphs [0003], [0172]	1-17
Y	JP 2010-150712 A (SHINSHU UNIVERSITY) 08 July 2010 (2010-07-08) claims, examples 13, 15	1-17
Y	WO 2005/103158 A1 (NIPPON SHINYAKU CO., LTD.) 03 November 2005 (2005-11-03) claims, paragraph [0004]	1-17
A	KR 10-1460338 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 November 2014 (2014-11-13) claims, examples	1-17

☐ 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	Date of mailing of the international search report
22 October 2020 (22.10.2020)	02 November 2020 (02.11.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/033488

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2010-270426 A	02 Dec. 2010	(Family: none)	
JP 2010-150712 A	08 Jul. 2010	(Family: none)	
WO 2005/103158 A1	03 Nov. 2005	(Family: none)	
KR 10-1460338 B1	13 Nov. 2014	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/033488

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

D04H 1/4266(2012.01)i; A61F 13/00(2006.01)i; A61L 15/32(2006.01)i; A61L 27/36(2006.01)i; A61L 27/50(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 3/00(2006.01)i; D01F 4/02(2006.01)i; D04H 1/728(2012.01)i

FI: D04H1/4266; A61F13/00 T; A61F13/00 301C; A61L15/32 100; A61L27/36 100; A61L27/50 300; C12M1/00 A; C12M3/00 A; D01F4/02; D04H1/728

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））

D04H1/00-18/04; D01F1/00-6/96; D01F9/00-9/04; D01D1/00-13/02

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	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０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）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	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	関連する請求項の番号
Y	JP 2010-270426 A (国立大学法人信州大学) 02.12.2010 (2010-12-02) 特許請求の範囲，実施例２５，【０００３】，【０１７２】	1-17
Y	JP 2010-150712 A (国立大学法人信州大学) 08.07.2010 (2010-07-08) 特許請求の範囲，実施例１３，１５	1-17
Y	WO 2005/103158 A1 (日本新薬株式会社) 03.11.2005 (2005-11-03) 請求の範囲，[0004]	1-17
A	KR 10-1460338 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13.11.2014 (2014-11-13) 請求の範囲，実施例	1-17

☐ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
22.10.2020	02.11.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
斎藤　克也 4S 9344
電話番号 03-3581-1101 内線 3474

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/033488

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2010-270426 A	02.12.2010	（ファミリーなし）	
JP 2010-150712 A	08.07.2010	（ファミリーなし）	
WO 2005/103158 A1	03.11.2005	（ファミリーなし）	
KR 10-1460338 B1	13.11.2014	（ファミリーなし）	