

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-136795

(P2012-136795A)

(43) 公開日 平成24年7月19日(2012.7.19)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>DO1F 4/00 (2006.01)</b>	DO1F 4/00 Z	4G066
<b>DO1F 4/02 (2006.01)</b>	DO1F 4/02	4H045
<b>DO1D 5/04 (2006.01)</b>	DO1D 5/04	4L035
<b>DO4H 1/72 (2012.01)</b>	DO4H 1/72 C	4L045
<b>CO7K 14/435 (2006.01)</b>	CO7K 14/435	4L047
審査請求 未請求 請求項の数 18 O L (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-288973 (P2010-288973)  
 (22) 出願日 平成22年12月24日 (2010.12.24)

(71) 出願人 504180239  
 国立大学法人信州大学  
 長野県松本市旭三丁目1番1号  
 (74) 代理人 100101236  
 弁理士 栗原 浩之  
 (74) 代理人 100128532  
 弁理士 村中 克年  
 (72) 発明者 塚田 益裕  
 長野県上田市常田三丁目15番1号 国立  
 大学法人信州大学繊維学部内  
 (72) 発明者 森川 英明  
 長野県上田市常田三丁目15番1号 国立  
 大学法人信州大学繊維学部内

最終頁に続く

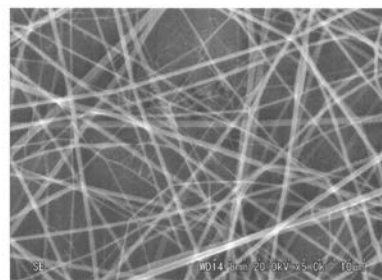
(54) 【発明の名称】 セリシンナノファイバーおよびその製造方法、金属イオン吸着材、染色機能増強材、耐薬品増強材、ならびにセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 エレクトロスピニングにより有用な水不溶化可能なセリシンナノファイバー、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバー、およびそれらの製造方法を提供すると共に、これらのナノファイバーの水不溶化技術、ならびに水不溶化ナノファイバーからなる染色増強材、金属イオン吸着材および耐薬品性増強材を提供すること。

【解決手段】 シルクセリシンからなるセリシンナノファイバーであって、シルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンである。得られた水溶性ナノファイバーを水不溶化処理および化学加工処理し、この水不溶化ナノファイバーからなる染色増強材、金属イオン吸着材および耐薬品性増強材。シルクセリシンとシルクフィブロインとからなる複合ナノファイバー。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

シルクセリシンからなるセリシンナノファイバーであって、該シルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とするセリシンナノファイバー。

**【請求項 2】**

前記シルクセリシンが、セリシン分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなるセリシンか、二塩基酸無水物による処理で二塩基酸無水物がセリシンの塩基性アミノ酸側鎖と結合し、カルボキシル基が導入されてなるセリシンか、またはアルデヒド化合物による処理でセリシン分子間が架橋されてなるセリシンであることを特徴とする請求項 1 に記載のセリシンナノファイバー。

10

**【請求項 3】**

シルクセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングしてなることを特徴とするセリシンナノファイバーの製造方法。

**【請求項 4】**

前記シルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする請求項 3 に記載のセリシンナノファイバーの製造方法。

20

**【請求項 5】**

前記エレクトロスピンニングした後、得られたセリシンナノファイバーを水不溶化処理してなることを特徴とする請求項 3 または 4 に記載のセリシンナノファイバーの製造方法。

**【請求項 6】**

前記水不溶化処理が、アルコールと間接的に接触させるかまたはアルデヒド化合物を作用させる第 1 工程と、エポキシ化合物または二塩基酸無水物を作用させる第 2 工程とからなることを特徴とする請求項 5 に記載のセリシンナノファイバーの製造方法。

**【請求項 7】**

シルクセリシンの分子内に二塩基酸無水物による処理でカルボキシル基が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする金属イオン吸着材。

30

**【請求項 8】**

前記セリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする請求項 7 に記載の金属イオン吸着材。

**【請求項 9】**

シルクセリシンの分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなるかまたは二塩基酸無水物による処理でカルボキシル基が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする染色機能増強材。

40

**【請求項 10】**

前記水不溶性のセリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする請求項 9 に記載の染色機能増強材。

**【請求項 11】**

シルクセリシンの分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする耐薬品性増強材。

**【請求項 12】**

50

前記水不溶性のセリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d ）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s ）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする請求項 1 1 に記載の耐薬品性増強材。

【請求項 1 3】

シルクセリシンとシルクフィブロインとの複合体からなることを特徴とするセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー。

【請求項 1 4】

前記シルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d ）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s ）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする請求項 1 3 に記載のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー。

10

【請求項 1 5】

シルクセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液と、シルクフィブロインを有機溶媒で溶解してなるフィブロインスポンジとからなる複合溶液を用い、エレクトロスピンングしてなることを特徴とするセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法。

【請求項 1 6】

前記複合溶液が、裸蛹（遺伝子記号 N d ）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s ）もしくはセリシンホープの繭層、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液と、シルクフィブロインを有機溶媒で溶解してなるフィブロインスポンジとからなる複合溶液であることを特徴とする請求項 1 5 に記載のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法。

20

【請求項 1 7】

前記エレクトロスピンングした後、得られたセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを水不溶化処理してなることを特徴とする請求項 1 5 または 1 6 に記載のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法。

【請求項 1 8】

前記水不溶化処理が、アルコールと間接的に接触させるまたはアルデヒド化合物を作用させる第 1 工程と、エポキシ化合物または二塩基酸無水物を作用させる第 2 工程とからなることを特徴とする請求項 1 7 に記載のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、セリシンナノファイバーおよびその製造方法、金属イオン吸着材、染色機能増強材、耐薬品増強材、ならびにセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびその製造方法に関し、特にセリシンを多量に吐糸するセリシン蚕品種由来のセリシンを用いるセリシンナノファイバーおよびこれを水不溶化したセリシンナノファイバーならびにそれらの製造方法に関すると共に、水不溶化したセリシンナノファイバーからなる金属イオン吸着材、耐薬品性増強材および染色性増強材に関する。本発明はまた、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびその製造方法にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

生糸の本体は絹フィブロイン繊維（以下、シルクフィブロインまたは単にフィブロインともいう）であり、絹フィブロイン繊維は膠着物質のシルクセリシン（以下、シルクセリシンまたは単にセリシンという）で被覆されている。絹フィブロイン繊維である絹糸は衣料材料として古くから使用されてきたのに対し、膠着物質のセリシンは、生糸から絹糸を製造する過程、製糸工程、あるいは生糸の仕上げ過程において重要な役割を果たすもので

50

ある。セリシンは、その殆どが、生糸が絹製品になるまでの最終段階では除去されてしまい、最終製品では絹フィブロイン繊維の絹糸が利用されているに過ぎない。このため、セリシンは、研究対象になり難く、副産物としてセリシンを多目的に利用する技術開発が重要であるにもかかわらず、その応用や利用の技術の開発は極めて遅れている。

#### 【0003】

セリシンは、膠質絹タンパク質であり、繭糸の表面を覆い、グリシン、アラニンの他、セリン、スレオニン、アスパラギン酸等の化学反応性に富む嵩高いアミノ酸から構成されている。繭糸から生糸、生糸から絹織物を製造する諸過程で、セリシンは絹糸の溶解性を制御し、高品質な絹糸を製造する上で重要な意味を持つ。また、接着機能タンパク質として極めて重要な役割を果たす。絹繊維を衣料素材として利用する場合、繭糸を覆うシルクセリシンの殆どは除去・廃棄されてしまうため、セリシンは貴重な未利用資源である。我が国の繭生産量は683トン、世界の主要な養蚕国の中国繭生産量は64万トン（平成16年度統計）であり、我が国だけでも134トン、中国では何と13万トンのセリシンが全く利用されないまま廃棄されている計算となる。こうした未利用資源を新たな素材（例えば、エレクトロスピンング技術を利用して製造するナノファイバー形状の素材等）として広範な産業分野で利活用することが強く望まれてきた。しかし、いまだにその有効な利活用法は開発されていない。

10

#### 【0004】

繭糸や生糸を熱水あるいはアルカリ水溶液で加熱処理すると、水溶解性のシルクセリシンは溶出し、その溶出液がシルクセリシン水溶液となる。これをポリエチレン膜の上に拡げて蒸発乾燥固化すると、乾燥固化条件によっても異なるが、粉末状態または脆い膜状のシルクセリシンが得られる。しかし、セリシンは水に対する溶解度が高いため、その使用用途が限定されるので、広い用途を目的とするためには、水不溶性のセリシンを開発することが必要である。

20

#### 【0005】

従来、フィブロイン繊維、フィブロイン膜、またはフィブロイン粉末を溶解して、エレクトロスピンングする際の溶媒としては、ヘキサフルオロアセトン1.5水和物（Hexafluoroacetone (HFAC) 1.5 hydrate、例えば、和光純薬工業（株）製）、ヘキサフルオロイソプロパノール（1, 1, 1, 3, 3, 3 Hexafluoro-2-propanol (HFIP)、例えば、和光純薬工業（株）製）等

30

#### 【0006】

しかし、セリシン蚕の繭層の溶液を作製する場合、従来のエレクトロスピンングで使用されている上記溶媒（HFAC、HFIP）では、セリシン蚕の繭層の溶解量が十分でなく、また、溶解時にセリシン蚕の繭層の分子量を大幅に低下させるという問題があるため、これらの溶媒を使用することができない。しかし、セリシンの分子量を低下させることなくセリシン蚕の繭層を溶解させ、エレクトロスピンングに利用できるセリシン溶液とするための溶媒について、また、セリシン溶液を用い、所望の諸物性を備えたナノスケールのセリシンナノファイバーを製造することは、いまだ提案されておらず、そのようなセリシンナノファイバーを製造する技術の開発が強く望まれてきた。

40

#### 【0007】

上記した「セリシン蚕の繭層」という用語は、セリシン繭幼虫が作った繭層を意味するが、以下では、単に「セリシン繭層」とも称す。また、上記した「セリシン繭層の分子量の低下」とは、正確には、セリシン繭層を構成するセリシン分子の分子量が低下することを言うが、以下、単に「セリシン繭層の分子量の低下」または「セリシンの分子量の低下」とも称す。

#### 【0008】

本発明者らは、家蚕または野蚕由来の絹タンパク質水溶液を透析して絹タンパク質ドー

50

ブを調製した後、この絹タンパク質ドープを用いてエレクトロスピンニングにより絹タンパク質ナノファイバーを製造する方法および得られた絹タンパク質ナノファイバーを提案した（例えば、特許文献2参照）。この場合、絹タンパク質ドープ（水溶液）として絹セリシンドープ（水溶液）を用い、エレクトロスピンニングして絹セリシンナノファイバーを製造し、所望によりルコールのみにて水不溶化を行ったことを提案した。

#### 【0009】

セリシンを有機溶媒に溶かした溶液を用い、エレクトロスピンニングして製造できるセリシンナノファイバーは、そのままでは水に極めて溶解し易いため、応用範囲は限られてしまうという問題があるので、新しい応用を拓くには、水溶解性セリシンナノファイバーを水不溶性に変える必要があるが、こうした目的に合致した効率的な水不溶化処理方法はいまだ知られていない。また、セリシンの分子量を低下させることなく、効率よく溶解できれば、セリシンにカイコ由来のフィブロインを複合した新素材が製造できるはずであるが、そのような溶媒および新素材についてもいまだ知られていない。

10

#### 【0010】

また、本発明者らは、商品化したセリシンパウダーを85の加熱水溶液に溶解してなるセリシン水溶液をエレクトロスピンニングすることでセリシンナノファイバーを製造することを提案した（特開2010-270426号）。セリシンパウダーを使用するには、加熱した水溶液にセリシンパウダーを溶解する。セリシン濃度を40wt%~60wt%の濃度範囲に設定してエレクトロスピンニングすると、平均繊維径とその標準偏差が微少なセリシンナノファイバーが製造できることが知られている。しかし、セリシン繭層を溶解させる溶媒、溶解条件、セリシン濃度、エレクトロスピンニング条件によっては、製造されるセリシンナノファイバー中にビーズ状の形態が存在する場合がある。

20

#### 【0011】

セリシン繭層として、セリシンを大量に生産する新蚕品種「セリシンホープ」が知られており（例えば、特許文献3参照）、このセリシンホープのセリシン繭層を用いてハイドロゲル、セリシン多孔質体を製造する技術が知られている（例えば、特許文献4参照）。これによるとセリシンホープのセリシン繭層を臭化リチウム水溶液で溶解させてなる溶液に1MのTris-HCl緩衝液（pH9）を加えた後、弱アルカリ性に調整する。透析チューブに入れて純水で透析を繰り返し、濾過を行い、セリシン水溶液を調製する。このセリシン水溶液にエタノールを添加して超音波処理することでセリシンハイドロゲルができる。また、このセリシン水溶液を-25で凍結させて水分を除去することでセリシン多孔質体が製造できる。しかしながら、セリシンホープ繭層を用いて新素材を製造する技術はこの技術以外には知られていない。

30

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

#### 【0012】

【特許文献1】特表2006-504450号公報

【特許文献2】特開2010-150712号公報

【特許文献3】特開2001-245550号公報

【特許文献4】特開2006-111667号公報

40

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0013】

本発明の課題は、上述の従来技術の問題点を解決することであり、カイコ由来のセリシンを、十分な量で溶解する有機溶媒であって、かつその際にセリシンの分子量低下のない所望の有機溶媒に溶解して得た溶液を用いて、エレクトロスピンニングにより得られる所望の特性を有するセリシンナノファイバーおよびその製造方法を提供すると共に、このセリシンナノファイバーを効率的に水不溶化し、次いで化学加工処理したセリシンナノファイバーにより染色性を増強し（染色増強材）、金属イオンを効果的に吸着し（金属イオン吸着材）、または優れた耐薬品性を付与する（耐薬品性増強材）ことができるセリシンナノ

50

ファイバーおよびそれを製造するための技術を提供することにある。

【0014】

本発明の課題はまた、上記従来技術の問題点を解決し、カイコ由来のセリシンを素材にしたセリシン溶液を用いてエレクトロスピンニングし、平均繊維径と繊維径分布の制御を可能とするセリシンナノファイバーの効率的、経済的な製造技術を提供することにある。

【0015】

本発明の課題はさらに、シルクセリシンとシルクフィブロインとからなるセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびその製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、遺伝的に多くのセリシンを含むセリシン繭層を有機溶媒に溶解し、この溶液を用いてエレクトロスピンニングすることで、微細なセリシンナノファイバーを製造すると共に、セリシンナノファイバーを水不溶化し、次いで化学加工処理した水不溶化セリシンナノファイバーの染色性を調べると共に、この水不溶化セリシンナノファイバーの各種用途（例えば、金属イオン吸着材、薬品抵抗性素材、抗菌活性素材、耐熱安定性素材等）を研究することで、多様な機能を持ち、産業資材として多面的に利用できる素材開発を進めてきた。

【0017】

シルクセリシンをどのような有機溶媒に溶かすのか、その溶解温度と溶解時間について、そしてエレクトロスピンニング条件について検証した。また、この特定の有機溶媒に溶解して得られたセリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングして製造できるセリシンナノファイバーは、高い水溶解性を示す。この水溶解性セリシンナノファイバーを染色したり、金属吸着実験を行ったり、酸やアルカリの水溶液による溶解性実験等を行うために、これらの実験に先立って、セリシンナノファイバーをセリシンの貧溶媒で処理することで水不溶化処理を行う水不溶化したセリシンナノファイバーを製造するための方法を確立した。すなわち、第1工程でアルコールまたはアルデヒド化合物を水溶解性セリシンナノファイバーに作用させ、第2工程でエポキシ化合物、二塩基酸無水物またはEDTA二塩基酸無水物を作用させて化学加工処理した水不溶化セリシンナノファイバーを製造し、このセリシンナノファイバーがアルカリ・酸の水溶液に対して溶解しないこと、金属イオン吸着性および抗菌活性を有すること、ならびに染色増強性を有すること等を見出し、本発明を完成させるに至った。なお、第1工程でアルコールなどを作用させて水不溶化するのは、第2工程において水を用いた系で処理する場合に、セリシンがその化学加工処理中に溶解してしまわないようにするためである。また、本発明で「水不溶化」といった場合、文意により、第1工程（アルコール処理など）による場合および第2工程（化学加工処理）による場合の一方または両方を含む場合がある。

【0018】

また、裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（Nd-s）または新蚕品種・セリシンホープに由来する蚕品種のセリシン繭層を有機溶媒で溶解し、この溶液を用いてエレクトロスピンニングすることにより、所望の平均繊維径の小さい、しかも繊維径分布が少ないセリシンナノファイバーを効率的に製造することが可能となり、従来技術の問題を解決することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0019】

本発明に使用できる蚕の絹糸腺、繭層または繭は、下記の4種類の蚕品種に由来するものであれば使用が可能である。例えば、セリシンN、セリシンNd蚕、Nd-s蚕およびセリシンホープ等の蚕品種（注：カイコの幼虫を意味する）に由来する繭層を構成するセリシン、またはこれらカイコ幼虫の体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンを例示でき、セリシンホープを特に好ましく用いることができる。

【0020】

(1) 形質名 裸蛹、遺伝子記号Ndで表されるカイコ(Naked pura中部及び

10

20

30

40

50

後部糸腺の退化により吐糸が不能で裸蛹となる)。

【0021】

(2) 形質名 橋本裸蛹、遺伝子記号NdHで表されるカイコ(Naked pupa of Hashimoto: Ndと性状は同じ)。

【0022】

(3) 形質名 セリシン繭、遺伝子記号Nd-s (sericin cocoon 後部糸腺の退化によりフィブロイン合成が負で、セリシンだけからなる繭をつくる)。

上記(1)~(3)における3種類のカイコの特性は、蚕糸学用語辞典、Page 244、日本蚕糸学会、1979に基づく。

【0023】

(4) セリシンホープと呼ばれるカイコ。

蚕品種セリシンホープは、中国品種「CS83」系統に品種「Nd系統」を交配し、さらに戻し交配等を行い、作製した品種である(特許文献3:特開2001-245550)。蚕品種セリシンホープは、フィブロイン合成能が退化しており、セリシンを多量に生産する((4)の文言は特許文献4:特開2006-111667号公報より引用)。セリシンホープは、独立行政法人農業生物資源研究所が開発し、蚕品種として特許されており、この蚕の特徴は、セリシンを合成する絹糸腺が大部分で、フィブロインを合成する部分がほとんど発達していない。そのため、セリシンホープが作る繭は通常の品種より繭層が薄く小さい(高原社HPより)。

【0024】

本発明のセリシンナノファイバーは、シルクセリシンからなり、該シルクセリシンが、裸蛹(遺伝子記号Nd)、セリシン蚕(遺伝子記号Nd-s)もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

【0025】

前記シルクセリシンが、セリシン分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなるセリシンか、二塩基酸無水物による処理で二塩基酸無水物がセリシンの塩基性アミノ酸側鎖と結合し、その結果、カルボキシル基が導入されてなるセリシンか、またはアルデヒド化合物による処理でセリシン分子間が架橋されてなるセリシンであることを特徴とする。

【0026】

本発明のセリシンナノファイバーの製造方法は、シルクセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングしてなることを特徴とする。

【0027】

前記セリシンナノファイバーの製造方法において、シルクセリシンが、裸蛹(遺伝子記号Nd)、セリシン蚕(遺伝子記号Nd-s)もしくはセリシンホープの繭層、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

【0028】

前記セリシンナノファイバーの製造方法において、エレクトロスピンニングした後、得られたセリシンナノファイバーを水不溶化処理してなることを特徴とする。

【0029】

前記セリシンナノファイバーの製造方法において、水不溶化処理が、アルコールと間接的に接触させるかまたはアルデヒド化合物を作用させる第1工程と、エポキシ化合物または二塩基酸無水物を作用させる第2工程とからなることを特徴とする。

【0030】

本発明の金属イオン吸着材は、シルクセリシンの分子内に二塩基酸無水物による処理でカルボキシル基が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする。

【0031】

10

20

30

40

50

前記金属イオン吸着材において、セリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

【0032】

本発明の染色機能増強材は、シルクセリシンの分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなるか、または二塩基酸無水物による処理でカルボキシル基が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする。

【0033】

前記染色機能増強材において、水不溶性のセリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

10

【0034】

本発明の耐薬品性増強材は、シルクセリシンの分子内にエポキシ化合物による処理でエポキシ化合物が導入されてなる水不溶性のセリシンナノファイバーからなることを特徴とする。

【0035】

前記耐薬品性増強材において、水不溶性のセリシンナノファイバーを構成するシルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

20

【0036】

本発明のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーは、シルクセリシンとシルクフィブロインとの複合体からなることを特徴とする。

【0037】

前記セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーにおいて、シルクセリシンが、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層由来のセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンであることを特徴とする。

30

【0038】

本発明のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法は、シルクセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液と、シルクフィブロインを有機溶媒で溶解してなるフィブロインスポンジとからなる複合溶液を用い、エレクトロスピンニングしてなることを特徴とする。

【0039】

前記セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法において、複合溶液が、裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 N d - s）もしくはセリシンホープの繭層、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンを有機溶媒で溶解してなるセリシン溶液と、シルクフィブロインを有機溶媒で溶解してなるフィブロインスポンジとからなる複合溶液であることを特徴とする。

40

【0040】

前記セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法において、エレクトロスピンニングした後、得られたセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを水不溶化処理してなることを特徴とする。

【0041】

前記セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの製造方法において、水不溶化処理が

50



、アルコールと間接的に接触させるかまたはアルデヒド化合物を作用させる第1工程と、エポキシ化合物または二塩基酸無水物を作用させる第2工程とからなることを特徴とする。

【発明の効果】

【0042】

本発明によれば、カイコ由来のセリシン（例えば、裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）もしくは新蚕品種・セリシンホープからの繭層由来のセリシン）をTFA等の有機溶媒に溶解してなるセリシン溶液を用いてエレクトロスピンニングし、平均繊維径と繊維径分布との制御を可能とする所望のセリシンナノファイバーを効率的、経済的に製造する技術を提供できるという効果を奏する。

10

【0043】

また、本発明によれば、エレクトロスピンニングして得られた水溶解性のセリシンナノファイバーを水不溶性にすることができるので、金属イオン吸着材、染色機能増強材、抗菌活性素材、耐薬品性素材等として利用できるという効果を奏する。

【0044】

さらに、本発明によれば、上記セリシン溶液と絹タンパク質であるフィブロインの溶液とを用いてエレクトロスピンニングし、平均繊維径と繊維径分布との制御を可能とする所望のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを効率的、経済的に製造する技術を提供できるという効果を奏する。

【0045】

なお、本発明によれば、上記水溶解性のセリシンナノファイバーは、極細であることに加え、生体適合性素材であり、かつ生分解性であるため、体内に移植しても体内酵素で分解するという生化学特性を有する。

20

【0046】

上記したように、本発明の水溶解性セリシンナノファイバーは、生体適合性のよいシルクのセリシンに由来するので、有用な細胞を培養・増殖させるための再生医療材料として利用でき、その表面積は極めて大きいため、様々な生体細胞（骨細胞、肝細胞、平滑筋細胞、神経細胞、繊維芽細胞等）との親和性の良さから短時間での細胞増殖が可能のため、医用材料として利用でき、再生医療工学、創傷材料等のヘルスケア分野、バイオテクノロジー分野、エネルギー分野における新素材として有望である。

30

【0047】

本発明の水溶解性セリシンナノファイバーは、絹タンパク質の持つ生体適合性に加えて、保水性、保湿性、生分解性に優れ、紫外線のエネルギーを吸収する性質を持ち、かつ有効表面積が広いという諸特性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】実施例4において製造された水溶解性のセリシンナノファイバーの形態を示すSEM画像。

【図2】比較例1において製造された水溶解性のセリシンナノファイバーの形態を示すSEM画像。

40

【発明を実施するための形態】

【0049】

本発明に係るセリシンナノファイバーの実施の形態によれば、セリシンナノファイバーは、裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）もしくはセリシンホープの繭層由来のシルクセリシン、またはこれらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンもしくはこの液状セリシンを凝固させたセリシンからなり、エレクトロスピンニングにより得られる。

【0050】

上記したシルクセリシンは、遺伝的にセリシンからなる繭層を作るセリシンを多量に製造する裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）あるいは新蚕品種・

50

セリシンホープ幼虫に由来するセリシンホープの繭層由来のものである。従来技術には、例えば、セリシンホープ繭層を溶解するための最適な溶媒について、また、セリシンホープ繭層をその溶媒に溶解して得たセリシンホープ繭層溶液を用いてエレクトロスピンニングする技術については、全く開示も示唆もされていない。セリシンホープ繭層を効率的に、かつセリシンの分子量を急激に低下させずに溶解できる溶媒で溶解して得たセリシンホープ繭層の溶液を用いてエレクトロスピンニングすることで、各種産業資材として利用できるセリシンナノファイバーが製造できれば新たな用途に利用できる素材となり得るであろう。従来はこうした技術の提案がないために素材開発が遅れていた。

#### 【0051】

本発明によれば、セリシンを溶媒に溶かした溶液を用い、エレクトロスピンニングして製造できるセリシンナノファイバーは、水に極めて溶解し易く、用途に限界がある。そのため、新しい応用を拓くには、水溶解性セリシンナノファイバーを水不溶性に変える必要があったが、従来技術には、こうした目的に合致した効率的な水不溶化処理方法は開示も示唆もされていない。セリシンの分子量を低下させることなく効率よく溶解できれば、セリシンにカイコ由来のフィブロインを複合した新素材の製造もできるはずである。

#### 【0052】

本発明でエレクトロスピンニングする原料であるセリシンを得るためには次のような方法がある。絹糸本体の成分であるフィブロインを生合成する組織である後部絹糸腺が遺伝的に退化した突然変異系統である裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）、または先端技術で育成して得られ、最近特許になった第3374177号（発明の名称：セリシンを大量に生産する蚕品種）に記載された「セリシンホープ」のセリシンホープ繭層が好ましく利用できる。あるいはまた、これらカイコの幼虫体内から取り出した絹糸腺内の液状セリシンやこの液状セリシンを凝固させたセリシンも用いることができる。

#### 【0053】

遺伝子記号NdおよびはNd-s、ならびにセリシンホープ幼虫におけるセリシンの吐糸量、幼虫の大きさ、強健度、営繭性などは全く異なる。

#### 【0054】

これらの突然変異種の蚕品種について詳細に説明する。こうした突然変異種としては次の2種がある。

(1) フィブロインをほとんど合成せず、セリシンのみ（含量99%以上）を合成する裸蛹系統（「Nd系統」）。

(2) フィブロイン約30%、セリシン約70%の組成から成るタンパク質を生産するセリシン蚕系統「Nd-s系統」（特許文献3：特開2001-245550参照）。

#### 【0055】

しかし、上記突然変異種であるカイコは、絹タンパク質の生産量が1頭当たり30mg内外と非常に少なく、セリシン1gを生産するには、Nd系統で約55頭、Nd-S系統で約80頭を飼育する必要があり、両系統ともセリシンの生産量が著しく低い（特開2001-245550参照）。これに対して、本発明で最も効率的に利用できるセリシンホープ繭層は、1頭当たりの吐糸量が約95mg、セリシン量の割合が99%で、交雑種に比べてセリシン生産量が1.2~1.3倍であるセリシンN（セリシンホープ蚕品種）（注：セリシンの含量、1頭当たりの吐糸量、フィブロイン含量についての記述は、特開2001-245550参照）である。

#### 【0056】

本発明によれば、セリシンを多量に製造するセリシン繭層を用いることが好ましく、こうしたセリシンを用い、エレクトロスピンニングしてなるセリシンナノファイバー、およびその製造方法が提供される。本発明によればまた、エレクトロスピンニングにより得られたセリシンナノファイバーを水不溶化処理することにより、金属イオン吸着性セリシンナノファイバー、酸やアルカリに対する耐薬品性が増強したセリシンナノファイバー、および染色性が向上したセリシンナノファイバーを提供できる。

## 【0057】

本発明では、上記したように、セリシンを多量に吐糸するセリシンホープのセリシン繭層、Ndカイクのセリシン繭層がセリシンナノファイバーを製造するのに好ましく利用できる。但し、これらカイクの繭層には、上記のとおり重量比で数%のフィブロインが含まれるが、残りのタンパク質はセリシンであるため、これらカイク繭層は実質的にはセリシンから構成されていると考えてよい。

## 【0058】

これらのセリシン繭層は、本発明者らが出願した先願で用いたセリシンパウダーとは異なり溶媒に対する溶解性も大きく相違する。セリシン繭層はカイクが吐糸して製造されたものであり、繊維構造を持つが、セリシンパウダーは家蚕繭糸のセリシンを粉末化したものであるため繊維構造を持たず、熱水には溶解し易い。セリシン繭層の熱水に対する溶解性は低く、本発明で用いるセリシンを多量に吐糸するセリシン繭層は、85の加熱温水で処理しても溶解率は低く5%程度を示す程度に過ぎない。本発明に従ってセリシンナノファイバーを製造するために用いる素材は、セリシンホープのセリシン繭層、Ndカイクのセリシン繭層等であり、セリシンパウダーでないため、どんな溶媒で溶解するとよいか、セリシンの最適濃度はどの位か等の情報は全く不明であった。

10

## 【0059】

こうしたセリシンホープのセリシン繭層、セリシンカイクのセリシン繭層、Ndカイクのセリシン繭層を原料として用い、エレクトロスピンニングしてセリシンナノファイバーを製造するに際して、セリシンナノファイバーの平均繊維径や繊維径分布をいかに微少にするかの技術的な開示はこれまで無い。そこで、これらの問題解決を可能とする、経済的かつ効率的なセリシンナノファイバーの製造技術の出現が強く望まれてきた。

20

## 【0060】

本発明のセリシンホープのセリシン繭層、セリシンカイクのセリシン繭層、Ndカイクのセリシン繭層を溶解する際に、フィブロインを溶解するための従来公知の上記溶媒で溶解するかどうかは一切不明であった。

## 【0061】

本発明では、上記セリシン繭層の分子量を低下させずにエレクトロスピンニング用の溶液を製造する最善の方法を試行錯誤的に工夫しながら検討し、最適溶媒と最適エレクトロスピンニング条件を解明し本発明を完成させた。

30

## 【0062】

エレクトロスピンニング法でセリシン溶液を用いてセリシンナノファイバーを製造する際に、セリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングして平均繊維径と繊維径分布を制御したセリシンナノファイバーを効率的にしかも経済的に製造することが製造上の重要な要件であった。

## 【0063】

本発明では、セリシン繭層を溶解する溶媒を試行錯誤的に検索した結果、トリフルオロ酢酸(TFA)が特に優れた溶解性を示し、かつセリシン繭層の分子量を急激に低下することがなく、その結果、セリシン繭層のTFA溶液を用いてエレクトロスピンニングすることで、所望のセリシンナノファイバーを効率的に経済的に製造することが可能となった。こうした方法でセリシン繭層の溶液を用いてエレクトロスピンニングすると、セリシンからなり、表面積が極めて大きいセリシンナノファイバーが製造でき、その結果、有用細胞を効率的に増殖させるための再生医療材料としての利用価値は高く、様々な生体細胞との親和性が良く、短時間に細胞増殖が可能となるため再生医用材料として広範に利用できる。

40

## 【0064】

セリシンナノファイバーは、例えば染色工程では高温水溶液系に接触するため、素材が水溶解性であると染色することはできない。エレクトロスピンニングしてなるセリシンナノファイバーは、水溶解性であり、極めて吸湿性が高いので、染色素材以外に、金属イオン吸着材、耐薬品性素材として使用するには、予め水不溶性にしておくことが必要であり、本発明によれば、より満足すべき特性を有する水不溶化したセリシンナノファイバーの製

50

造が可能となった。

【0065】

上記したように、本発明における素材は、シルクセリシンを特異的に生合成する蚕（遺伝子記号がNd-s、Ndで表されるセリシン幼虫）由来のセリシン繭層、特に好ましくはセリシンホープ幼虫のセリシン繭層である。

【0066】

セリシンホープ幼虫を例にとり、以下説明する。セリシンホープ幼虫体内からセリシンを取り出すには次のようにするとよい。成熟したセリシンホープ幼虫体内から絹糸腺を取り出し、水洗いして絹糸腺細胞をピンセットで除去すると、液状のセリシンが得られるので、これを、蒸留水を入れたシャーレに浸漬し、5で4時間放置すると、均一なセリシン水溶液が製造できる。このセリシン水溶液をセルロース製透析膜で蒸留水により十分に置換した後、無菌環境下、扇風機で送風乾燥してセリシンの濃度を高めると高分子量の所定濃度のセリシン水溶液が製造できる。本発明によれば、この絹糸腺から取り出して調製したセリシン水溶液を用いてエレクトロスピンングしても良いが、このセリシン水溶液を蒸発・乾燥・固化して粉末状のセリシンを得た後、この粉末状のセリシンを所定の有機溶媒に溶解して所定濃度を有するセリシン溶液を調製し、この溶液を用いてエレクトロスピンングすることにより、所望のセリシンナノファイバーを製造することが好ましい。

【0067】

セリシンを構成する主要なアミノ酸はセリンである。シルクセリシンには、その他に、側鎖が長くて嵩高いアルギニン、ヒスチジン、リジン等の化学反応性に富むアミノ酸が多く含まれる。繭糸をアルカリ抽出して得られるセリシンは水溶解性であるため、高温の水に長時間晒されるとセリシンは膨潤し、ついには溶解してしまう。そのため、グラフト加工処理や化学加工処理、あるいは染色処理の工程の対象には、水に溶解しない水不溶性のセリシンを用いることが必要である。また、従来の方法でセリシンを染色するには、高温で長時間、水溶液系の染色浴で処理するため、水不溶化したセリシンを用い、水溶液系によらない染色浴での染色をする必要がある。

【0068】

本発明において、セリシンまたはセリシン繭層を溶解し、セリシンナノファイバーを製造するために使用できる溶媒としては、例えばトリフルオロ酢酸（TFA）、蟻酸（FA）、ヘキサフルオロアセトン（HFAc）1.5水和物、ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）等を利用できる。しかし、分子量を低下させることなく、溶解性に優れた溶媒としてはTFAまたはFAが好ましく利用でき、TFAが特に好ましく利用できる。

【0069】

本発明によれば、セリシン溶液を製造するためのセリシン原料は、上記したように、裸蛹（遺伝子記号Nd）の繭層、セリシン蚕（Nd-s）の繭層、または新蚕品種・セリシンホープに由来するセリシンホープの繭層である。これらの試料をTFAまたはFA等の有機酸で溶解したセリシンの溶液を使用してエレクトロスピンングすることが好ましい。

【0070】

裸蛹、シルクセリシン繭、シルクセリシンホープのカイコ幼虫は成熟すると繊維状のセリシンを吐糸する。この未処理未加工の繊維状セリシンは熱水には一部溶解するが、試料の全量を溶解することは無い。こうしたセリシンをTFA等の有機溶媒に溶解した溶液を用い、エレクトロスピンングして製造できるセリシンナノファイバーは、高い水溶解性を示すため、セリシンナノファイバーを用いて、染色したり、金属吸着実験を行ったり、酸やアルカリ水溶液による溶解性実験を行うには、これらの実験に先立ってセリシンナノファイバーを水に対して不溶化処理し、かつまた染色にあたっては染色効率をよくするため、水溶液系ではなく溶媒系の染色浴で、かつできる限り低温で染色することが可能な染色技術の開発が望まれてきた。

【0071】

ところで、従来法で極細のセリシンナノファイバーを製造するには、ドープ濃度、印加電圧、陽極・陰極間距離（紡糸距離ともいう）、溶液送り出し速度等の紡糸条件を変えな

10

20

30

40

50

がらナノファイバーの最適製造条件を試行錯誤的に検討する必要があった。本発明でも、セリシン溶液を使用し、エレクトロスピンニングして製造されるセリシンナノファイバーの平均繊維径(サイズ)を極細にするには、セリシンを溶解する溶媒の種類、セリシン溶液の濃度、エレクトロスピンニングの紡糸条件(印加電圧、紡糸距離、紡糸速度)を試行錯誤的に変えながら所望する条件に合う最適条件を探すことで、所望するセリシンナノファイバーを製造する必要がある。本発明では、以下の実施例に記載するように、エレクトロスピンニング条件、セリシン溶液の濃度、紡糸距離、印加電圧を変える実験を主に行った。

【0072】

本発明におけるシルクセリシンはまた、蚕が作った繭糸から取り出すことも可能であるし、蚕の絹糸腺内のセリシンを利用することも可能である。

10

【0073】

セリシンホープ繭層をTFAに溶解して得られるセリシンTFA溶液の濃度は、1wt%~15wt%が好ましく、2wt%~15wt%が特に好ましい。セリシン溶液の濃度が1wt%未満と低すぎると、エレクトロスピンニング効率が良くなり、セリシン溶液の濃度が15wt%を超えると、エレクトロスピンニングの際、紡糸口でセリシンが凝固したり、安定した紡糸ができなかったり、紡糸口から良好なセリシンジェットが噴出し、表面が平滑な極細のセリシンナノファイバーが製造できないという問題がある。

【0074】

セリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングして製造されるセリシンナノファイバーの形態上の評価は次のようにして行う。すなわち、セリシンナノファイバーの平均繊維径がどれほどか、そのパラッキの指標である平均繊維径の標準偏差はどれほどか、あるいは陰極板上に集積するナノファイバーに粒状の「ビーズ」の付着が見られるかを観察することにより行われる。

20

【0075】

これらのセリシンナノファイバーの紡糸状態に及ぼすエレクトロスピンニング紡糸条件で特に重要なものは、セリシン溶液濃度、印加電圧、紡糸口から陰極金属板までの紡糸距離である。

【0076】

従って、セリシンナノファイバーをエレクトロスピンニングにより製造する決め手としては、セリシン溶液濃度、印加電圧、紡糸距離が重要な要因となる。エレクトロスピンニングの紡糸条件が一定であれば、セリシン溶液濃度が希薄なほどナノファイバーの平均繊維径は細くなる傾向にある。セリシン溶液濃度が1wt%未満だと、紡糸口からシルクドープを微細に放出しても、陰極板上ではナノファイバーの形態とならず、極微細な粒子(ビーズ)状となってしまうし、セリシン溶液濃度が15wt%を超えると、電圧を印加してもセリシンジェットが紡糸口から噴出し、という問題が生ずる。

30

【0077】

本発明で用いることができるエレクトロスピンニング装置は、特別の仕様の装置でなくてもよく、従来の既知の装置で良い。

【0078】

本発明で用いるエレクトロスピンニング装置は、高圧電源、ポリマー溶液の貯蔵タンク、陽極に接続する紡糸口、およびアースされ陰極に接続する陰極板(コレクター)から構成される。

40

【0079】

セリシン溶液を試料貯蔵容器(タンク)に入れ、既知の操作に従ってエレクトロスピンニングすれば良く、例えば、紡糸口と陰極板間に10~30kVの電圧を印加すると、セリシン溶液表面の過剰電荷が表面張力を越える時、セリシン溶液の表面積が最大となるようにセリシン溶液のジェットが噴射し、超微細なセリシンナノファイバーとなって陰極板(コレクター)に向かって噴射し、金属製の陰極板上にセリシンナノファイバーが積層する。

【0080】

50

上記したように、セリシンナノファイバーを効率よく製造するためには、セリシン溶液を製造するためにセリシンをどのような溶媒で溶解するか、セリシン溶液の最適濃度は何wt%とするか、印加電圧をどのように設定するかが重要な要因である。

【0081】

また、セリシンホープ繭層を溶解するための従来の溶媒はHFIP、HFAcであるが、分子量を低下することなく効率的に溶解するにはTFAやFAが好ましく用いられ、特にTFAが好ましく用いられる。

【0082】

本発明者らは、上記したように、セリシンをTFA等の有機溶媒に溶解し、この溶液を用いてエレクトロスピンニングし、セリシンナノファイバーを製造しているが、製造されたセリシンナノファイバーは高い水溶解性を示すため、セリシンナノファイバーを用いて、染色したり、金属吸着実験を行ったり、酸やアルカリ水溶液による溶解性実験を行うには、これらの実験に先立ってセリシンナノファイバーを水に対する不溶化処理をさせることで素材が広範に利用できることを見出し、本発明を完成するに至ったが、以下、水不溶化したセリシンナノファイバーの製造方法、本発明の優れた金属イオン吸着性、染色性、耐薬品性を有するセリシンナノファイバーおよびその製造方法、および染色方法等についてその好ましい実施の形態を詳細に説明する。

【0083】

セリシンとしては、上記したように、セリシン蚕由来の液状セリシンあるいはセリシン蚕幼虫が吐き出すセリシン繭であっても同様に利用できる。セリシン蚕であれば、遺伝子記号がNd、Nd-sで表されるカイコ由来のシルクセリシンが利用できる。

【0084】

以下、金属イオン吸着性、耐薬品性および染色性に関して説明する。

【0085】

金属イオン吸着性：

セリシン溶液を用い、エレクトロスピンニングして製造できるセリシンナノファイバーは水に溶解してしまうが、水不溶化処理した後に二塩基酸無水物等で化学加工処理してカルボキシル基を導入した水不溶化セリシンナノファイバーは金属イオンを吸着するための基材やその他の基材として利用できる。これは、セリシンを構成するグルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸側鎖が金属イオンを配位する拠点となるためである。

【0086】

耐薬品性：

セリシンナノファイバーの耐薬品性を向上させるためには、まずセリシンナノファイバーを水不溶化処理した後、エポキシ化合物で化学加工処理するとよい。エポキシ化合物でセリシンナノファイバーを化学加工処理する方法は次の通りである。

【0087】

例えば、グリセロールポリグリシジルエーテル（ナガセ化成工業株式会社製、商品名：デナコールEX-313およびEX-314）等のように3官能性エポキシ化合物や、エチレングリコールジグリシジルエーテル（ナガセ化成工業株式会社製、商品名：デナコールEX-810）等のような2官能性エポキシ化合物を用いて化学加工処理すれば良い。

【0088】

セリシンナノファイバーの化学加工処理において、エポキシ化合物を溶解するための有機溶媒としては、従来公知の有機溶媒を利用できる。このようなものとしては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド（DMFと略記することもある）、ジメチルスルホキシド（DMSOと略記することもある）、ジメチルアセトアミド（DMAと略記することもある）、テトラヒドロフラン、ピリジン等が挙げられる。本発明においては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の使用が特に好ましい。

【0089】

上記した化学加工処理は、例えば、エポキシ化合物を、試料重量に対して20倍（浴比

10

20

30

40

50

1 : 20 と略記することもある) のジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し、この溶液を逆流冷却器を付けた 100 mL のナス型フラスコに入れ、試料が DMF 中に完全に浸漬するように留意しながら、ウォーターバス中で、75 ~ 80 の間で時間を変えて反応させることにより実施できる。なお、エポキシ化合物は、例えば、100 mL の DMF に 20 g 含まれるようにする。反応終了後、試料を取り出し、DMF で洗浄し、続いて 55 のアセトンで洗浄することで未反応試薬を除去する。最終的に水で洗浄し、乾燥後重量を測定し、公知の方法で化学加工の有無を確認する。

#### 【0090】

セリシンナノファイバーへのエポキシ化合物による化学加工処理は、化学反応時の反応温度 60 ~ 90 で実施される。反応温度が 60 より低すぎると反応効率が良くなり、反応温度が 90 を超えると反応が短時間に進んでしまい、反応量を制御できなくなる等の問題がある。有機溶媒中におけるエポキシ化合物の濃度は、5 ~ 30 wt % であればよい。濃度が 5 wt % 未満となると反応効率が低下するという問題があり、また、30 wt % を超えると、有機溶媒に無駄に溶解する酸無水物量が増えるため、経済的ではないし、かつ反応温度を上げると短時間に反応効率が上がりすぎてしまい、加工効率を制御することが困難となるという問題がある。

10

#### 【0091】

なお、開放容器中で、75 以上の温度で化学加工処理すると、反応時間が長時間に及ぶので溶媒が蒸発し、これに伴い加工試薬濃度が変化し、セリシンナノファイバーの化学加工処理の程度を制御することが困難となる。そのため、化学加工処理は逆流冷却器を付けたナス型フラスコ、三角フラスコ等内で行うことが望ましい。

20

#### 【0092】

染色性：

セリシンナノファイバーの染色性を増強するための化学加工処理は次のようにする。まず、セリシンナノファイバーを、アルコールで水不溶化処理した後またはアルデヒド化合物で水不溶化処理した後、この水不溶化した試料にエポキシ化合物もしくは二塩基酸無水物で化学加工処理することで染料が吸着する拠点となるカルボキシル基やエポキシ基を予め導入しておく。この場合、水不溶化した試料に対して、エポキシ化合物で処理した後にさらに二塩基酸無水物で化学加工処理しても、染色性増強効果は得られる。

30

#### 【0093】

上記二塩基酸無水物としては、無水コハク酸 (SA)、無水グルタル酸 (GA)、無水イタコン酸 (IA)、無水フタル酸 (PA) または無水 *o*-スルホベンゾイル無水物 (OSBA) が例示できる。こうした二塩基酸無水物を有機溶媒に溶解し、その中にセリシンナノファイバー等の試料を入れ、予め一定時間加熱加工しておくことで、染料を吸着するカルボキシル基が確実に導入でき、その結果、塩基性染料で良く染まるようになる。

#### 【0094】

二塩基酸無水物で予め化学加工処理したセリシンナノファイバーを染色するには、エタノール溶媒染色するとよく、染料を含む所定のエタノール濃度の水溶液中での溶媒染色が最適である。塩基性染料を溶解したエタノール水溶液による溶媒染色で処理したセリシンナノファイバーは、未加工未処理に較べて多くの染料を吸着することができる。染色には加熱した染色浴を使用することはなく、室温付近の染色加工でよく、時間は 30 分以上、好ましくは 1 時間程度がよい。

40

#### 【0095】

アルデヒド化合物としては、例えばパラホルムアルデヒドのようなホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒド等を挙げることができ、エポキシ化合物は上記した通りである。

#### 【0096】

例えば、二塩基酸無水物濃度は 100 mL の DMF に 5 ~ 20 g 含まれるようにし、試料に対して 20 倍 (浴比 1 : 20 と略記することもある) のジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し、この溶液を、逆流冷却器を付けた 10 mL のナス型フラスコに入れ、試料が DMF 中に完全に浸漬するように留意しながら、75 ~ 80 のウォーターバス中で、

50

随時、時間を変えて反応させることにより実施できる。

【0097】

反応終了後、試料を取り出し、DMFで洗浄し、続いて55のアセトンで洗浄することで未反応試薬を除去する。最終的に水で洗浄し、化学加工処理前後の試料量の変化から加工率を求める。

【0098】

染料は水によく溶けた状態で水不溶性のセリシンナノファイバー内に入り込み、吸着する。試料への染料の吸着度合いは、染料を含むエタノール水溶液濃度に依存し、染色浴のエタノール濃度は低くもなく、高くもない値、例えば40~70v/v%の濃度範囲が好ましい。染色浴中のエタノール濃度が70v/v%を超えると、染料はセリシンナノファイバー内に入り難くなり、染着状態が悪化する。また、エタノール濃度が40v/v%未満であると、染着量は減少するが、セリシンナノファイバーが膨潤し溶解する恐れがある。

10

【0099】

セリシンナノファイバーを溶媒染色で染める詳細な染色方法は次の通りである。

【0100】

エタノールで水不溶化したセリシンナノファイバーはエタノール溶媒染色法で染色できる。染色浴はエタノールと水との混合で組成比はエタノール濃度40~70%であればよい。浴比が1:200となるようにして、エタノール染色浴にサンプルを入れ、室温で1時間静置すると染色が可能となる。染料濃度は0.1~0.5%でよい。未加工セリシンにはOrange 2などの酸性染色で染めるとよいし、グルタル酸無水物(GA)で予め試料にカルボキシル基を導入したセリシンナノファイバーは塩基性染料で染色するとよい。

20

【0101】

次に、水不溶化処理について、纏めて記載する。水溶解性のセリシンナノファイバーを水不溶性にするには次のようにするとよい。

【0102】

例えば、70v/v%のメタノール水溶液または70v/v%のエタノール水溶液をポリスチレン容器の底部分に入れ、これらの水溶液が直接セリシンナノファイバーに触れないように上げ底付きの台にセリシンナノファイバーを置く。ポリスチレン容器に蓋をして室温で2日間静置すると、ポリスチレン容器内部はアルコールにより蒸気圧が高まり、アルコールはセリシンナノファイバーに吸着される。ポリスチレン容器から試料を取りだし、室温で乾燥すると水不溶性のセリシンナノファイバーが製造できる。これが第1工程である。この場合、温度を高くすれば、吸着時間は短くなる。

30

【0103】

溶解性のセリシンナノファイバーを完全に水不溶化するには、上記したようにアルコールで水不溶化する第1工程か、または以下の(a)のパラホルムアルデヒドで水不溶化する第1工程を経れば良く、次いで染色性の向上などのために、水不溶性セリシンナノファイバーに対して、以下の化学加工処理(b)の第2工程を行う。

【0104】

(a) 和光純薬工業(株)製の商品: 4%パラホルムアルデヒド試薬0.1mol/Lリン酸緩衝液pH7.4にセリシンナノファイバーを室温で2時間浸漬処理した後、試料を取り出し十分に水洗いを行い標準状態で乾燥させる。こうして製造したセリシンナノファイバーは、水不溶性である。

40

【0105】

(b) 3官能性エポキシ化合物であるグリセロールポリグリシジルエーテル(ナガセ化成工業(株)製、商品名: デナコールEX-313およびEX-314)または2官能性エポキシ化合物であるエチレングリコールジグリシジルエーテル(ナガセ化成工業(株)製、商品名: デナコールEX-810)をジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し、この溶液を逆流冷却器を付けた100mLのナス型フラスコに入れ、セリシンナノファイバー

50



がDMF中に完全に浸漬するように留意しながら、ウォーターバス中で、75～80で2時間化学反応を行った。反応終了後、試料を取り出し、DMFで洗浄し、続いて55のアセトンで洗浄することで未反応試薬を除去する。最終的に水で洗浄して室温で乾燥させる。このように第2工程の化学加工処理を行うことにより染色性などの向上した水不溶化ナノファイバーが得られる。

#### 【0106】

上記第1工程のアルコール処理を更に詳細に説明する。エレクトロスピンングで製造したセリシナノファイバーに水・アルコールの混合溶液を作用させる際、ポリスチレン容器の底部分に水・アルコールを入れ、セリシナノファイバーが水・アルコールに触れないようにして水・アルコール蒸気に一定時間晒すことが効率的である。しかるのち、プラスチック容器からセリシナノファイバーを取り出した後、室温の標準状態で軽く乾燥させるとよい。不溶化には公知のアルコールを用いることができ、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどが例示できる。水・アルコール混合溶液において、まず水がセリシンに浸透し、構造を弱め、しかるのち、アルコールが弱まった構造部分に入り込み、脱水効果を与えセリシンが結晶化するのであろう。そのため、アルコール溶液に水を所望により適量入ることが必要であり、セリシン層を結晶化させるためのアルコール濃度は、通常、30～90v/v%、好ましくは40～80v/v%である。30v/v%未満ではアルコールによる脱水作用が少なくなり結晶化効果が薄れる傾向があり、90v/v%を超えると水による拡散が不十分となり、結晶化度を向上させることは困難となる傾向がある。

10

20

#### 【0107】

メタノール、エタノールを用いるときは所望により水を加えアルコール濃度60～80v/v%のアルコール水溶液を用い、セリシン層を室温で5分以上浸漬した後に取り出し、室温で乾燥するとよい。浸漬用アルコールが60v/v%未満であると結晶化速度が遅くなり、十分に結晶化しない傾向があり、また80v/v%を超えるとサンプル中に水が拡散しなくなり、逆に結晶化が進まなくなる傾向がある。

#### 【0108】

上記第2工程としての(b)の化学加工処理を更に詳細に説明する。

#### 【0109】

セリシナノファイバーの染色性を向上させるためには、水不溶性のセリシナノファイバーをエポキシ化合物で化学加工処理するとよい。例えば、グリセロールポリグリシジルエーテル(ナガセ化成工業(株)製、商品名:デナコールEX-313およびEX-314)のように3官能性エポキシ化合物や、エチレングリコールジグリシジルエーテル(ナガセ化成工業(株)製、商品名:デナコールEX-810)のような2官能性エポキシ化合物を用いて化学加工処理することができる。

30

#### 【0110】

シルクセリシンへの化学加工処理において、エポキシ化合物、二塩基酸無水物に対する有機溶媒としては、従来公知の有機溶媒を利用できる。このようなものとしては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMFと略記することもある)、ジメチルスルホキシド(DMSOと略記することもある)、ジメチルアセトアミド(DMAと略記することもある)、テトラヒドロフラン、ピリジン等が挙げられる。本発明においては、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)等の使用が特に好ましい。

40

#### 【0111】

本発明によれば、上記したセリシン溶液を用いてエレクトロスピンングするに際して、セリシナノファイバーに第二物質としてカイコ由来の絹フィブロイン(単に、フィブロインということもある)を複合してセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを提供することができる。この絹フィブロインの原料としては、絹糸を溶解して製造できるフィブロインスポンジを原料として用いることができる。このフィブロインスポンジは、次のようにして製造できる。

50

## 【0112】

例えば、絹フィブロイン繊維を臭化リチウム、塩化カルシウム、硝酸カルシウム、硝酸アンモニウム等の加熱した中性塩水溶液（例えば、60 の7Mの臭化リチウム水溶液）で溶解し、セルロース製透析膜で水と置換する透析法を採用する。その結果得られる、絹フィブロイン以外の夾雑物が除去された絹フィブロイン水溶液にメタノールやエタノール等のアルコールを添加して凝固させた後、凍結乾燥することでフィブロインスポンジ（シルクスポンジともいう）が製造できる。このシルクスポンジを、時間をかけながらTFA、HFAC、HFIP、FA等（TFA、FAが好ましく、ナノファイバー製造の効率的、経済的な視点からすると、TFAが特に好ましい）に溶解してシルクのフィブロイン溶液（フィブロインドープ）を調製することができる。このフィブロイン溶液を用いてエレクトロスピニングする。

10

## 【0113】

例えば、セリシンホープ菌層をTFAに溶解してなるセリシンTFA溶液に、シルクスポンジをFAまたはTFAに溶解したフィブロイン溶液を複合して製造できるセリシン・フィブロイン複合溶液を用いてエレクトロスピニングすることで、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを製造できる。

## 【0114】

このセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合、セリシンナノファイバーについて上記したセリシン溶液、エレクトロスピニング技術、アルコールやパラホルムアルデヒドによる水不溶化処理、化学加工処理、ならびに金属イオン吸着性、耐薬品性および染色性に関する記載は、全て適用され得るので、その詳細については説明しない。

20

## 【実施例】

## 【0115】

以下、本発明を実施例および比較例により更に詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

## 【0116】

実施例で使用する試料特性の測定方法は次の通りである。本発明で調製したセリシンナノファイバーやセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの理化学的特性を明らかにするため次の項目の試験を行った。

## (1) 酸溶解度 (Acid) およびアルカリ溶解度 (Alkali) :

30

65 の4M塩酸水溶液および0.1M水酸化ナトリウム水溶液のそれぞれにサンプルを1時間浸漬処理し、処理前後の重量変化から酸溶解度とアルカリ溶解度とを評価した。

## 【0117】

酸溶解度またはアルカリ溶解度 =  $\{ (M_b - M_a) / M_b \} \times 100$

上式において、 $M_b$ は、薬品処理前のサンプル重量（105 で1時間30分乾燥）であり、 $M_a$ は、薬品処理後のサンプル重量（105 で1時間30分乾燥）である。

## 【0118】

## (2) 金属吸着量の定量 :

アルコール処理により水不溶化したセリシンナノファイバーを、更にEDTA二塩基酸無水物を含み加熱した有機溶媒で処理することで金属イオンの配位基となるEDTAをセリシンナノファイバーに導入して金属イオン吸着用の試料を製造した。これを0.5mMの硝酸銀水溶液あるいは0.5mMの硝酸銅水溶液に浸漬することで、銀イオンあるいは銅イオンを吸着させた。セリシンに吸着した金属イオン量はパーキンエルマー社製のプラズマ原子吸光スペクトロメーター (Inductive Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometer (ICP - AES)) を用いて定量した。5 ~ 10mgの試料を、マイクロウェーブ加水分解炉 (MDS - 81DCCEM) を用いて2mLの65%硝酸で完全に加水分解し、実験時にさらに10mLの水を加え、ICP - AES分析を行った。金属イオンの吸着量は、試料重量 (g) あたりの金属イオン量をmmolで表示した。

40

## 【0119】

50

## (3) 抗菌性評価：

加熱溶解後55℃に保持した半合成脳本培地またはキングB培地25mLと、トマトかきよう病細菌(濃度 $10^9$ /mL)2mLとを混合し、この混合物をシャーレに流し込んで平板状に固めた。この菌液混合平板培地上に約1cm四方の試料膜(水不溶化セリシナノファイバー)を置き、試料全体を培地に密着させた。これを20~25℃に保ち、所定の経過時間毎に検定試料付近の培地での菌増殖阻害程度を、試料の周囲に現れる阻止円の大きさをmm単位で実測し、阻止円のサイズ変化から抗菌活性の有無、優劣を評価した。

## 【0120】

## (4) 染色方法：

水不溶化セリシナノファイバーの染色には、エタノール・水の混合水溶液系を染色浴にした「溶媒染色法」によることが最適である。溶媒染色法によると、未加工・未処理のセリシナノファイバーは、酸性染料で効率的に染まるが、化学加工処理によりカルボキシル基等を導入した水不溶化セリシナノファイバーは、塩基性染料で特異的に染色できるようになる。

## 【0121】

エタノールと水との混合溶液からなる染色浴を用い、0.2%の塩基性染料Methylene Blue(日本化薬株式会社製)を含む有機溶媒系で染色するとよい。浴比を1:100に設定し、染色は、室温で1時間処理することが好都合である。

## 【0122】

溶媒染色法では次の染料を用いることができる。

Ethyl Violet(東京化成工業株式会社製、MW=560、C.I.N.: C.I. Basic Violet 4 C.I.=42600)。

Methylene Blue(純正化学株式会社製、MW=320、C.I.N.: C.I. Basic Blue 9 C.I.=52015)。

Acid Red 18(日本化薬株製、商品名: Acid Scarlet 3B)

但し、MWは分子量、C.I.はColor Index組成番号、C.I.N.はColor Index Generic名を意味する。

## 【0123】

## (5) 染着率：

染着率(%)は、水不溶化セリシナノファイバーの染着前および染着後における染色浴中の染料濃度変化から求めた。染着前、染着後における染色浴に対して、最大吸収波長662nmあるいは染料に特有な296nmにおける吸光度を島津自記分光光度計(MPC-3100/UV-3100S)を用いて求め、予め作成した既知濃度-吸光度関係の検量線にあてはめて染色浴濃度を求めた。染着率は下記の式から計算した。

染着率(%) = [(染着前の染色浴濃度 - 染着後の染色浴濃度) / (染色前の染色浴濃度)] × 100

## 【0124】

実施例および比較例で使用する試料は下記の通りである。

## (1) セリシパウダー(粉末状態を呈するもの)：

本発明で比較のために使用するセリシパウダーは、和光純薬工業株製の商品名：セリシパウダー(167-22681、Lot CDR4258、1g)である。本発明では、セリシパウダーとはこの商品を意味するが、明細書の一部の個所では、セリシパウダー以外の粉末状セリシをいう場合もある。

## 【0125】

## (2) セリシホープのセリシ菌層(セリシホープ菌層ともいう)：

セリシ菌層は、高原社市販の商品であり、商品名はセリシホープ・コクーン、企画番号は、SHC-1-150であり、250g単位で購入できる。この試料には無機物、脂質(0.16%)、尿酸(0.006%)が含まれる(高原社HP: <http://www.kouge>)

10

20

30

40

50

nsha.com/hanbai/sericin.html 参照)

【0126】

セリシンホープ・コクーンを本発明の実験で使用するには、試料に含まれる脂質を除去することが必要である。そのため、予めアルコール（例えば、メタノール、エタノールなど）水溶液に浸漬し脂質を除いた後、アルコールから取り出し室温で軽く乾燥させるとよい。

【0127】

(3) シルクスポンジ（フィブロインスポンジともいう）：

家蚕から得られた生糸を、濃度 0.07% 炭酸ナトリウム溶液を用いて 1 時間煮沸してシルクセリシンを除去した後の精練絹（絹フィブロイン繊維）6.5 g を温度 75、9.5 モルの臭化リチウム水溶液に溶解し、5 の蒸留水で 4 日間透析し、Li イオンと Br イオンを除去して、濃度 1.8% の絹フィブロイン水溶液を得た。この濃度 1.8% の絹フィブロイン水溶液 300 mL に 99% メタノール 20 mL を加え、室温で静置するとフィブロイン水溶液がゲル化して沈殿を生じた。これを凍結乾燥装置に入れて減圧下で乾燥することによりシルクスポンジを製造した。

10

【0128】

(4) エレクトロスピンニングによるナノファイバー製造方法：

セリシン溶液を用い、カトーテック株式会社（カトーテック）製のエレクトロスピンニング装置によりセリシンナノファイバー（またはセリシンとフィブロインとからなるセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー）を製造した。所定濃度のセリシン溶液（またはセリシン溶液とフィブロイン溶液との複合溶液）をポリマー溶液貯蔵タンクに充填した。ポリマー溶液貯蔵タンクに陽極電極を付けた紡糸口から陰極板間に印加電圧を加えた。陽極・陰極間の距離は自由に变化させることが可能である。

20

【0129】

この場合、テルモ株式会社製、テルモノンベベル針（22 G X 11/2"（0.70 x 38 mm））を紡糸口のノズルとして用いた。株式会社トップ製・ロックタイプ・螺旋式の 5 mL トッププラスチックシリンジをポリマー貯蔵タンクとして使用した。

【0130】

両極に印加電圧を加えると、陽極に接続する紡糸口から静電力により陰極板に向かって極めて微細なセリシン溶液が噴射され、陰極板上にセリシンナノファイバー（またはセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー）が積層した。陰極板に付着したセリシンナノファイバー（またはセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー）に金イオンのコーティングを施し、走査型電子顕微鏡でナノファイバーの形態を観察し、ナノファイバーの太さ（サイズ）を評価した。

30

【0131】

以下の実施例では、エレクトロスピンニングの条件を詳細に記述するようにしたが、紡糸条件の記載の無い場合は、印加電圧 20 kV、紡糸距離 15 cm であることを意味する。

【0132】

なお、本発明では、セリシン溶液（またはセリシン・フィブロイン複合溶液）の濃度はすべて wt % で表示した。

40

【0133】

(5) ナノファイバーの平均繊維径と標準偏差：

エレクトロスピンニングで製造したセリシンナノファイバー（またはセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー）にイオンコーターで厚さ 300 の金のコーティングを施した。走査型電子顕微鏡（SEM）により異なる視野 10 箇所（箇所）のナノファイバー画像を撮影し、画像をプリンターで印刷した。画像に記載されたスケールを基に各視野につき 10 箇所の繊維径を計測した。このようにして合計 100 箇所（箇所）の繊維径から、平均繊維径と標準偏差（SD）を計測した。

【0134】

(6) 耐薬品安定セリシン：

50

酸性水溶液またはアルカリ性水溶液の作用を受けるとエレクトロスピンングにより製造されたセリシンナノファイバーは溶解する。このセリシンナノファイバーの耐薬品性を向上させるには、エポキシ化合物で予めセリシンを化学修飾するとよい。エポキシ化合物の中で化学反応性が高く、安定して化学加工処理ができるのはエチレングリコールジグリシジルエーテル（EGDGE）であり、エポキシ化合物の中で最も使いやすい。EGDGEは2官能性エポキシ化合物であるため、セリシン分子間を架橋結合し、セリシンの塩基性アミノ酸であるTy r、Serなどのフェニル基のOHと化学結合し、その結果、アルカリや酸の水溶液に対する耐薬品性が向上する。セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も同様である。

#### 【0135】

アルコール等で水不溶化したセリシンナノファイバーに対してグラフト加工処理も化学加工処理をもすることもできるし、グルタル酸無水物で化学修飾してカルボキシル基を導入した水不溶化セリシンナノファイバーは塩基性染料でよく染まるようになる。また、エポキシ化合物で化学加工処理した水不溶化セリシンナノファイバーは酸やアルカリなどの薬品に溶解し難くなる。さらに、無水フタル酸を含むDM SOでセリシンナノファイバーを化学修飾すると、強くて堅いゴム状セリシンナノファイバーとなる。セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も同様である。

#### 【0136】

(7) 金属イオンの吸着および定量方法：

被測定試料を、硝酸カリウムを含む0.5mMの硝酸銀水溶液および硝酸銅水溶液（アンモニア水を加えてpHを11.4に調整）のそれぞれに室温で30時間浸漬することで金属イオンを吸着させた。

#### 【0137】

被測定試料に吸着した金属イオンを、パーキンエルマー社製のプラズマ原子吸光スペクトルメーター（ICP-AES）を用いて分析した。5～10mgの試料を、マイクロウェーブ加水分解炉（MDS-81DCCEM）を用いて2mLの65%硝酸で完全に加水分解し、実験時さらに10mLの水を加え、ICP-AES分析を行った。金属イオンの吸着量は、試料重量あたりの金属イオン量をmmolで表した。

#### 【0138】

エレクトロスピンングにより製造した状態の従来のセリシンナノファイバーは本来水に溶解し易いが、本発明で使用する裸蛹（遺伝子記号Nd）、セリシン蚕（遺伝子記号Nd-s）または新蚕品種・セリシンホープに由来する蚕品種のセリシン繭層は、水中にいれても全量が溶解することは無い。エレクトロスピンングを行うための溶媒としては、(1)ヘキサフルオロアセトン（HFAc）1.5水和物（和光純薬工業（株）製）（特開2004-68161）、(2)ヘキサフルオロイソプロパノール（HFIP）（和光純薬工業（株）製）（特表2006-504450）、または(3)ヘキサフルオロ酢酸（TFA）を利用できる。しかし、セリシンホープ繭層の分子量を低下させることなく、エレクトロスピンングのために好ましく利用できる溶媒はTFAである。セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も同様である。

#### 【0139】

セリシンホープ繭層をTFAで溶解してなる溶液を従来既知のエレクトロスピンング装置で紡糸して製造できるセリシンナノファイバーは水溶解性であるため、エレクトロスピンング紡糸直後のセリシンナノファイバーは応用範囲に限られる。産業資材として利用する場合には、水不溶化処理や化学加工処理を施すことが必要不可欠である。セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も同様である。

#### 【実施例1】

#### 【0140】

本実施例では、セリシンホープ繭層溶解のための溶媒探索を行った。

#### 【0141】

0.04gのセリシンホープ繭層を25 および50 に調整した1.160gの溶媒

10

20

30

40

50

(TFA、HFIP、FA、DMF、DMSO)に2時間浸漬し、セリシンホープ繭層の溶解状態を調べた。得られた結果を表1および2に示す。TFAはトリフルオロ酢酸、HFIPはヘキサフルオロイソプロパノール、FAは蟻酸、DMSOはジメチルスルホキシド、DMFはN,N-ジメチルホルムアミドである。

【0142】

【表1】

25℃での溶解実験

溶媒	TFA	HFIP	FA	DMF	DMSO
溶解状態	◎	×	△	×	×

10

【0143】

【表2】

50℃での溶解実験

溶媒	TFA	HFIP	FA	DMF	DMSO
溶解状態	◎	×	△	×	×

20

【0144】

上記表1および2において、溶解状態は、次のカテゴリで判定した。

◎：完全に溶解した。

△：試料の一部が溶解しゲル状態になったが、膜としては使用可能である。

×：試料は全く溶解しなかった。

【0145】

上記表から次のことが分かる。セリシンホープ繭層を効率的に溶解する溶媒は、TFAである。セリシンホープ繭層を上記温度のTFAに溶解し、この溶液をポリスチレン膜からなる基材の表面に塗布し、溶媒を蒸発させて乾燥固化して得られたセリシン膜は、透明で、かつしなやかな膜であった。このことから、セリシンホープ繭層をTFAで溶解すればセリシンホープ繭層の分子量は大幅に低下しないことが分かる。分子量の低下が顕著であると、得られるセリシン膜は脆弱となり、ポロポロの粉末状態になるからである。また、上記5種類の溶媒中、TFA以外にFAも使用は可能であると考えられる。

30

【実施例2】

【0146】

本実施例では、セリシンホープ繭層のTFA溶液から製造したセリシン膜の形状を観測し、所見を述べる。

40

【0147】

セリシンホープ繭層(SC)およびセリシンパウダー(SP)のそれぞれを25のTFAに24時間かけて完全に溶解させて、一定濃度(3wt%、6wt%)のセリシン溶液をポリスチレン(St)基材表面に拡げて室温のドラフト中で送風乾燥させてTFAを蒸発させ、乾燥固化させてセリシン膜を調製した。得られたセリシン膜の形状と機械的特性を調べた。得られた観察結果を表3に示す。

【0148】

【表 3】

セリシン溶液 濃度 (wt%)	3%SC	3%SP
形状	◎	○
所見	△ : draft で 30 分の間乾燥し、ソ フトな膜試料。	▲ : ネバネバ膜; St 底面に付着- 剥離困難。

10

## 【0149】

表 3 中で、3%SC とは、セリシンホープ繭層を 25 の TFA に溶解して調製した濃度 3wt% セリシンの TFA 溶液、3%SP とは、セリシンパウダーを TFA に溶解して調製した濃度 3wt% のセリシン溶液を意味する。

## 【0150】

表 3 において、形状および所見は次のカテゴリで判定した。

形状 :

: 良好な透明膜状態。

: 透明膜状態。

20

## 【0151】

所見 :

: 送風乾燥後のセリシン膜はポリスチレン基材から容易に剥離できる。

い。

: 送風乾燥後のセリシン膜はポリスチレン基材に強固に付着し、剥離は容易ではない。

## 【0152】

上記表 3 から次のことが分かる。セリシンホープ繭層を TFA に溶解してなる 3wt% のセリシンホープ TFA 溶液をポリスチレン基材表面に塗布し、蒸発乾燥固化して得られたセリシン膜は透明でしなやかであった。

30

## 【0153】

一方、セリシンパウダーを TFA に溶解してなる溶液をポリスチレン基材表面に塗布し、乾燥固化して得られたセリシン膜は、ポリスチレン基材表面でネバネバした状態であり、ポリスチレン基材表面を強固に被覆してしまい剥離できなかった。

## 【0154】

以上のことは、セリシンホープ繭層を TFA に溶解しても分子量は大幅に低下していないが、セリシンパウダーを TFA に溶解すると分子量低下が起こる可能性があることを示唆する。本発明の目的を達成するためには、セリシンパウダーよりもセリシン繭層が好ましい。

## 【実施例 3】

40

## 【0155】

本実施例では、各種濃度のセリシン TFA 溶液を用いて得られたセリシン膜の形状を観測し、所見を述べる。

## 【0156】

セリシンホープ繭層を 40 の TFA に 3 日間浸漬して完全に溶解させてなる各種濃度のセリシン TFA 溶液をポリスチレン基材表面に拡げ、室温、ドラフト中で送風乾燥し、TFA を蒸発させ、乾燥固化させてセリシン膜を調製した。得られたセリシン膜の形状と所見の観察結果を表 4 に示す。

## 【0157】

【表 4】

セリシン溶液濃度 (wt%)	2%SC	4%SC	6%SC	8%SC	10%SC	12%SC
形状	◎	◎	◎	○	×	×
所見	△	△	△	△	△	△

## 【0158】

表 4 において、2%SC とは、セリシンホープ繭層を 40 の TFA に溶解して調製したセリシンホープ繭層の濃度 2 wt% TFA 溶液を意味する。4%SC、6%SC、8%SC、10%SC、および 12%SC もこれに準ずる。

10

## 【0159】

表 4 において、形状および所見は次のカテゴリで判定した。

形状：

◎：良好な透明膜状態。

×：暗茶褐色。

所見：

△：送風乾燥後のセリシン膜はポリスチレン基材から容易に剥離できる。

## 【0160】

表 4 から明らかなように、セリシンホープ繭層を 40 の TFA で溶解して得られた 2 wt% ~ 8 wt% のセリシン溶液を原料にして、ポリスチレン基材表面に塗布し、乾燥固化させると透明で強靱なセリシン膜が製造できる。

20

## 【実施例 4】

## 【0161】

本実施例では、各種濃度のセリシンホープ繭層の TFA 溶液を用いてエレクトロスピンニングし、セリシンナノファイバーを製造した。

## 【0162】

セリシンホープ繭層を 25 の TFA に浸漬し、浸漬時間（溶解時間）を変えて溶解させ、濃度 2 wt% ~ 12 wt% のセリシン TFA 溶液を作製した。得られた濃度 2 wt% ~ 12 wt% のセリシン TFA 溶液を用い、室温でエレクトロスピンニングしてセリシンナノファイバーを製造した。

30

## 【0163】

エレクトロスピンニングの条件：紡糸距離は 15 cm、印加電圧は 25 kV、紡糸速度は 0.06 cm/min とした。

## 【0164】

得られたセリシンナノファイバーの形態を SEM 観察し、セリシンナノファイバーの平均繊維径、標準偏差、ナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびナノファイバーの形状を表 5 に集約する。

## 【0165】

40



【表 5】

セリシン溶液 濃度 (wt%)	2%-0.5d	4%-2.5d	6%-4d	8%-4d	10%-7d	12%-4d
繊維径 (nm)	228	114	172	231	173	219
標準偏差	131	40	75	101	55	90
最大径 (nm)	726.7	268.3	410.4	563.6	373.4	494.1
最小径 (nm)	36.1	50.0	40.0	60.9	70.0	40.0
形状	◎	○	◎	◎	◎	○

10

## 【0166】

表 5 において、2% - 0.5d とは、25 の TFA に 0.5 日 (12 時間) かけてセリシン繭層を完全に溶解し、セリシン繭層の TFA 濃度が 2wt% である試料溶液を意味する。4% - 2.5d、6% - 4d、8% - 4d、10% - 7d、12% - 4d もこれに準じる。繊維径とは、製造したセリシンのナノファイバーの平均繊維径 (nm) であり、最大径および最小径とは、製造したセリシンのナノファイバーを SEM 観察した際、観察できるセリシンナノファイバーの最大の繊維径 (nm) と最小の繊維径 (nm) である。

20

## 【0167】

セリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずかに存在する。

## 【0168】

表 5 におけるセリシン TFA 溶液のうち、その代表例として、6wt% - 4d セリシン TFA 溶液を用いてエレクトロスピニングして製造したセリシンナノファイバーの形態を走査型電子顕微鏡で観察し、この SEM 画像を図 1 に示す。図 1 から明らかなように、ビーズ形状の存在は全く認められず表面が平滑なセリシンナノファイバーであった。ビーズ形状の存在が少ないため優れたセリシンナノファイバーである。

30

## 【0169】

表 5 から明らかのように、2wt% ~ 12wt% 濃度で、25 の浸漬温度 (溶解温度)、0.5 日 ~ 7 日の浸漬時間 (溶解時間) で得られたセリシンホープ繭層の TFA 溶液を用いてエレクトロスピニングしたところ、種々の平均繊維径を有するセリシンナノファイバーを製造できた。従って、用途に目的に合わせて各種繊維径のセリシンナノファイバーを提供できることが分かる。セリシン TFA 溶液の濃度が 2wt% ~ 8wt%、好ましくは 2wt% ~ 6wt% である場合に、平均繊維径が極細となり、繊維径分布が狭く、利用価値の高いセリシンナノファイバーを提供できる。なお、ビーズ形状の存在が少なければ、ビーズ形状が混じったセリシンナノファイバーでも、それに合った用途で利用可能である。このエレクトロスピニングの結果と実施例 3 における成膜の結果とは若干異なり、必ずしも直接的な関係はないことが分かった。

40

## 【実施例 5】

## 【0170】

セリシンホープ幼虫のセリシンホープ繭層の代わりに、突然変異系統である裸蛹 (遺伝子記号 Nd) あるいはセリシン蚕 (Nd-s) 幼虫のセリシン繭層を用い、実施例 4 と同様の方法で試料を TFA に浸漬し、25 で 4 日溶解して 6wt% のセリシン溶液をエレクトロスピニングしても図 1 と同様に良好なセリシンナノファイバーが製造できた。また、2wt% ~ 12wt% 濃度で、25 の浸漬温度 (溶解温度)、0.5 日 ~ 7 日の浸漬時間 (溶解時間) で得られた上記セリシン繭層の TFA 溶液を用いてエレクトロスピニングしたところ、実施例 4 の場合とほぼ類似した傾向が確認された。

50

## 【実施例 6】

## 【0171】

セリシンホープ幼虫のセリシンホープ繭層の代わりに、突然変異系統である裸蛹（遺伝子記号 N d）、セリシン蚕（遺伝子記号 P n d、N d - 2 3、N d 強、N d - s および N d H）の幼虫の各種セリシン繭層を用い、実施例 4 と同様の方法で試料を F A（蟻酸）、T F A（トリフルオロ酢酸）、H F I P（1, 1, 1, 3, 3, 3 - ヘキサフルオロ 2 プロパノール）に浸漬し、2 5 または 4 0 で溶解時間を変えて各種セリシン繭層の溶解状態を評価した。溶解条件は次の通りである。0 . 0 0 5 g セリシン繭層を 0 . 0 0 2 g の有機溶媒に溶解した。得られた結果のうち、N d、N d - s、セリシンホープ、N d H についての結果を表 6 および 7 に示す。

10

## 【0172】

## 【表 6】

セリシン繭層を室温（2 5℃）の有機溶媒に浸漬して溶解状態を評価した結果：

溶解条件	N d	N d - s	セリシン ホープ	N d H
FA 15	-	-	-	-
FA 39	-	-	-	-
FA 65	-	-	-	-
FA 20 D	-	-	-	-
TFA 39	-	-	-	-
TFA 65	±	±	±	±
TFA 20D	+	+	+	+
HFIP 65	-	-	-	-
HFIP 20D	-	-	-	-

20

30

## 【0173】

表 6 中の溶解条件の略符合は次のことを意味する。

F A 1 5、F A 3 9、F A 6 5：セリシン繭層を F A 中、室温で、それぞれ、1 5、3 9、6 5 時間浸漬した。

F A 2 0 D：セリシン繭層を F A 中、室温で 2 0 日間浸漬した。

T F A および H F I P の場合は、F A に準ずる。

## 【0174】

表 6 中の溶解状態は次の 3 種類で評価した。

-：溶解しない。

±：試料は部分的に溶解する。

+：溶解する。

40

## 【0175】

表 6 から次のことがわかる。各種セリシン繭層を室温の F A、T F A、H F I P の溶媒で溶解しようとする、使用できる溶媒は T F A であり、溶解時間は 2 0 日であった。ただし、溶解時間が長いと試料の分子量が低下してしまい良好なエレクトロスピンングができ難いという問題がある。

## 【0176】

【表 7】

セリシン繭層を40℃の有機溶媒に浸漬して溶解状態を評価した結果：

溶解条件	Nd	Nd-s	NdH	セリシン ホープ
FA 39	-	-	-	-
FA 65	-	-	-	-
FA 20D	-	-	-	-
TFA 15	±	±	-	±
TFA 39	±	±	±	+
TFA 50	±	±	+	+
TFA 65	+	+	+	+
TFA 20D	+	+	+	+
HFIP 65	-	-	-	-
HFIP 20D	-	-	-	-

10

20

## 【0177】

表7中の溶解条件の略符合は、表6の場合と同様である。

## 【0178】

表7から次のことがわかる。各種セリシン繭層を40℃のFA、TFA、HFIPの溶媒で溶解しようとする、使用できる溶媒はTFAであり、溶解時間は39時間もくしは50時間であった。

30

## 【0179】

各種セリシン繭層を各種温度の溶媒に溶かし、あるいは各種の溶解時間をかけることで、溶媒中に溶解したセリシン分子量の低下が起こる可能性がある。エレクトロスピニングで製造できるセリシンナノファイバーの利用用途を考えると、セリシン分子量が高いことが望まれる。そのため、試料調製条件として穏やかな条件下でのセリシン溶液を製造することが望ましい。セリシン溶解条件が極端に厳しいと、例えば溶媒温度が高く、溶解時間が長くと、セリシン分子量が著しく低下し、その結果、エレクトロスピニングできない場合がある。セリシン分子量が一定以上あることが、エレクトロスピニング状態を良くし、その結果、製造できるセリシンナノファイバーの用途を広範なものにするための条件である。

40

## 【実施例7】

## 【0180】

本実施例では、セリシンホープ繭層を40℃のTFAに浸漬し、溶解時間を変えて溶解させ、濃度2wt%～12wt%のセリシンTFA溶液を用い、室温でエレクトロスピニングしてセリシンナノファイバーを製造した。

## 【0181】

エレクトロスピニング紡糸条件：紡糸距離は15cm、印加電圧は25kV、紡糸速度は0.06cm/minとした。

## 【0182】

セリシンナノファイバーの繊維径（これは平均繊維径であり、以下、単に繊維径ということもある）、その標準偏差、ナノファイバー繊維径の最大値と最小値およびナノファイ

50

バーの形状を表 8 に集約する。

【 0 1 8 3 】

【 表 8 】

セリシン溶液濃度 (wt%)	2%-0.5d	4%-0.5d	6%-1d	8%-1d	10%-1d	12%-1d
繊維径 (nm)	111	135	125	225	302	371
標準偏差	63	54	50	150	164	206
最大径 (nm)	382.8	386.3	300	780	1528.7	1334.2
最小径 (nm)	36.1	50.0	44.7	53.9	53.9	92.2
形状	○	○	○	◎	◎	◎

10

【 0 1 8 4 】

表 8 において、2% - 0.5d とは、40 の TFA に 0.5 日 (12 時間) かけてセリシン繭層を完全に溶解し、セリシン繭層の TFA 濃度が 2 wt% である試料溶液を意味する。4% - 0.5d、6% - 1d、8% - 1d、10% - 1d、および 12% - 1d もこれに準じる。

【 0 1 8 5 】

また、セリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずかに存在する。

20

【 0 1 8 6 】

表 8 から明らかのように、2 wt% ~ 12 wt% 濃度で、40 の浸漬温度 (溶解温度)、0.5 日 ~ 1 日の浸漬時間 (溶解時間) で得られたセリシンホープ繭層の TFA 溶液を用いてエレクトロスピンニングしたところ、種々の平均繊維径を有するセリシンナノファイバーを製造できた。従って、用途に目的に合わせて各種繊維径のセリシンナノファイバーを提供できることが分かる。セリシン TFA 溶液の濃度が 2 wt% ~ 6 wt% である場合に、平均繊維径が極細となり、繊維径分布が狭く、利用価値の高いセリシンナノファイバーを提供できる。なお、ビーズ形状の存在が少なければ、ビーズ形状が混じったセリシンナノファイバーでも、それに合った用途で利用可能である。

30

【 0 1 8 7 】

表 8 からはまた、セリシンホープ繭層を TFA に溶解してなる溶液濃度が 6 wt% 以下であり、溶解時間が 1 日程度と短い程、エレクトロスピンニングしてなるセリシンナノファイバーの平均繊維径は減少し、繊維径のパラッキは小さくなるが、ビーズ形状が若干存在することが分かる。

【 実施例 8 】

【 0 1 8 8 】

本実施例では、セリシン濃度とセリシン溶解時間との関係を検討した。

40

【 0 1 8 9 】

セリシンホープ繭層を 25 の TFA に溶解時間を変えて溶解させ、濃度 10% のセリシン TFA 溶液を作製した。これとは別に、セリシンホープ繭層を 40 の TFA に溶解時間を変えて溶解させ、濃度 6 wt% のセリシン TFA 溶液を作製した。これらのセリシン TFA 溶液を用い、室温でエレクトロスピンニングしてセリシンナノファイバーを製造した。

【 0 1 9 0 】

エレクトロスピンニング紡糸条件：紡糸距離は 15 cm、印加電圧は 25 kV、紡糸速度は 0.06 cm/min とした。

【 0 1 9 1 】

50

得られたセリシナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシナノファイバーの繊維径（平均繊維径）、その標準偏差、セリシナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびセリシナノファイバーの形状を表9に集約する。

【0192】

【表9】

セリシン溶液 濃度 (wt%)	25-10%-4d	25-10%-7d	25-10%-11d	40-6%-0.5d	40-6%-1d	40-6%-4d
繊維径 (nm)	448	173		270	125	
標準偏差	371	55		172	50	
最大径 (nm)	2277	373.4		1252.5	300	
最小径 (nm)	63.2	70.0		56.6	44.7	
形状	○	○	●	◎	◎	●

10

【0193】

表9において、25-10%-4dとは、25のTFAに4日かけてセリシン繭層を完全に溶解し、セリシン繭層のTFA濃度が10wt%である試料溶液を意味する。25-10%-7d、25-10%-11d、40-6%-0.5d、40-6%-1d、および40-6%-4dもこれに準じる。

20

【0194】

セリシナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずかに存在する。

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が少し多めに存在する。

【0195】

表9から明らかのように、セリシンホープ繭層をTFAに溶解してなるセリシンTFA溶液の濃度が同じであれば、溶解温度が25でも40でも、セリシンホープ繭層を溶解する時間が長くなるとセリシナノファイバーの平均繊維径は減少して極細になり、繊維径のパラッキは小さくなるのが分かる。恐らく、セリシン分子量の低下の幅が一定値以内の許容範囲であるので、セリシンTFA溶液の表面張力が低下し、セリシンTFA溶液を用いてエレクトロスピンングする際の溶液ジェットが良好となるからであると思われる。しかし、溶解時間が長くなる程、セリシン分子量が低下する可能性があるためか、ビーズ状の形態が多くなる。

30

【実施例9】

【0196】

本実施例では、セリシン濃度を一定とし、セリシン溶解時間とセリシン濃度との関係を検討した。

40

【0197】

セリシンホープ繭層を、25あるいは40の溶解温度で、溶解時間を変えてTFAに溶解させ、濃度2wt%のセリシンTFA溶液を作製した。これらのセリシンTFA溶液を用い、室温でエレクトロスピンングしてセリシナノファイバーを製造した。

【0198】

エレクトロスピンング紡糸条件：紡糸距離は15cm、印加電圧は25kV、紡糸速度は0.06cm/minとした。

【0199】

得られたセリシナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシナノファイバーの繊維径（平均繊維径）、その標準偏差、セリシナノファイバー繊維径の最大値と最小値、

50

およびセリシンナノファイバーの形状を表 10 に集約する。

【 0 2 0 0 】

【表 10】

セリシン溶液 濃度 (wt%)	25-2%-0.5d	25-2%-1d	25-2%-4d	40-2%-0.5d	40-2%-1d	40-2%-4d
繊維径 (nm)	228	138		111		
標準偏差	131	44		63		
最大径 (nm)	726.7	277.8		382.8		
最小径 (nm)	36.1	53.9		36.1		
形状	○	○	●	◎	●	●

10

【 0 2 0 1 】

セリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずかに存在する。

：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が少し多めに存在する。

20

【 0 2 0 2 】

上記条件下で、セリシンホープ繭層の T F A 溶液を用い、エレクトロスピンニングして得た結果を示す表 10 から次のことが分かる。

【 0 2 0 3 】

セリシン T F A 溶液の濃度が同一であれば、セリシン繭層を T F A に溶解する温度が高温となると、エレクトロスピンニングで得られるセリシンナノファイバーの平均繊維径と標準偏差は減少する傾向が見られる。また、溶解する温度が 25 度であれば、溶解時間が長いとセリシンナノファイバーの平均繊維径と標準偏差は減少する傾向が見られる。これは、セリシン分子量の低下割合が顕著ではないためであると推測される。しかし、溶解温度が 25 度で溶解時間が 4 日で調製したセリシン T F A 溶液では、超微細セリシンナノファイバーを製造することができず、不定形のビーズの出現率が顕著となる。溶解温度が 25 度から 40 度になり、溶解時間が 1 日もしくはそれ以上となると不定形のビーズの出現率が增加する。これは、セリシン分子量の低下割合が顕著となるためであると推測される。

30

【 0 2 0 4 】

広い用途に利用できるセリシンナノファイバーは、ビーズ形態の出現率が少なく、繊維径が細くて平滑であり、かつ繊維径分布が狭い、すなわち標準偏差が小さいセリシンナノファイバーである。こうした特性を持つセリシンナノファイバーを製造するには、25 度でセリシンホープ繭層を T F A に溶解する際、溶解時間が 1 日以下に、また 40 度でセリシンホープ繭層を T F A に溶解するには、溶解時間が半日以下にすることが必要である。

40

【実施例 10】

【 0 2 0 5 】

本実施例では、セリシンナノファイバーの平均繊維径に及ぼす紡糸距離の影響について検討した。

【 0 2 0 6 】

セリシンホープ繭層を 40 度の T F A に 15 時間かけて溶解し、濃度 4 % のセリシン T F A 溶液を作製した。このセリシン T F A 溶液を用い、室温でエレクトロスピンニングしてセリシンナノファイバーを製造した。

【 0 2 0 7 】

エレクトロスピンニング紡糸条件：印加電圧は 25 k V、紡糸速度は 0 . 0 6 c m / m i n、紡糸距離は 6、9、12、15 c m に設定してセリシンナノファイバーを製造した。

50

## 【0208】

得られたセリシナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシナノファイバーの繊維径（平均繊維径）、その標準偏差、ナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびナノファイバーの形状を表11に集約する。

## 【0209】

## 【表11】

紡糸距離 (cm)	6cm	9cm	12cm	15cm
繊維径 (nm)	200	292	348	230
標準偏差	113	141	147	99
最大径 (nm)	832.3	894.4	924.8	581.4
最小径 (nm)	60.0	116.6	145.6	72.1
形状	◎	◎	◎	◎

10

## 【0210】

セリシナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

## 【0211】

表11から明らかなように、採用したエレクトロスピンニング条件下、セリシンTFA溶液の濃度が同一であれば、エレクトロスピンニング紡糸で得られるセリシナノファイバーの平均繊維径は、紡糸距離（6、9、12、15cm）が増加すると、紡糸距離15cmの場合を除いて、次第に増加する傾向があるが、標準偏差には大きな違いは見られない。上記紡糸距離の範囲内であれば、良好なセリシナノファイバーを製造できる。なお、紡糸距離は、セリシン溶液が紡糸口のノズルから噴射され、溶媒が十分に蒸発した状態でセリシナノファイバーが陰極板上に堆積するように、エレクトロスピンニング条件に応じて選択すればよい。それにより、所望の平均繊維径、繊維径分布のセリシナノファイバーを製造できる。

20

## 【実施例11】

30

## 【0212】

本実施例では、セリシナノファイバーの繊維径に及ぼす印加電圧の影響について検討した。

## 【0213】

セリシンホープ蘭層を40のTFAに15時間かけて溶解させ、4wt%のセリシンTFA溶液を作製し、この溶液を用い、室温でエレクトロスピンニングしてセリシナノファイバーを製造した。

## 【0214】

エレクトロスピンニング紡糸条件：紡糸距離は15cm、紡糸速度は0.06cm/minとした。

40

## 【0215】

印加電圧を7、11、18、25、32、および36kVに設定してセリシナノファイバーを製造した。得られたセリシナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシナノファイバーの繊維径（平均繊維径）、その標準偏差、ナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびナノファイバーの形状を表12に集約する。

## 【0216】

【表 1 2】

印加電圧 (kV)	7kV	11kV	18kV	25kV	32kV	36kV
繊維径 (nm)	292	299	235	230	250	278
標準偏差	96	134	88	99	80	136
最大径 (nm)	721.4	930	644	581.4	583.1	684.1
最小径 (nm)	89.4	107.7	89.4	72.1	100	80
形状	◎	◎	◎	◎	◎	◎

10

## 【0 2 1 7】

セリシナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

## 【0 2 1 8】

表 1 2 から明らかなように、採用したエレクトロスピンニング条件下、印加電圧（7、11、18、25、32、および36 kV）を増加させてエレクトロスピンニングを行っても、得られるセリシナノファイバーの平均繊維径とその標準偏差、最大径、最小径には大きな違いは見られず、また、得られるセリシナノファイバーは全て超極細である。

20

## 【実施例 1 2】

## 【0 2 1 9】

本実施例では、セリシナノファイバーの繊維径に及ぼす紡糸速度の影響について検討した。

## 【0 2 2 0】

セリシンホープ繭層を40のTF Aに15時間かけて溶解し、濃度4wt%のセリシンTF A溶液を作製した。このセリシンTF A溶液を用い、室温でエレクトロスピンニングしてセリシナノファイバーを製造した。

## 【0 2 2 1】

エレクトロスピンニング紡糸条件：紡糸距離は15cm、印加電圧は25kVとし、紡糸速度を0.020、0.060、0.080、0.150、および0.250cm/minに設定して、セリシナノファイバーを製造した。得られたセリシナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシナノファイバーの繊維径（平均繊維径）、その標準偏差、ナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびナノファイバーの形状を表13に集約する。

30

## 【0 2 2 2】

【表 1 3】

紡糸速度 (cm/min)	0.020	0.060	0.080	0.150	0.250
繊維径 (nm)	194	230	269	301	430
標準偏差	66	99	102	131	189
最大径 (nm)	442.7	581.4	666	655.1	1297.7
最小径 (nm)	72.1	72.1	100	100	102
形状	◎	◎	◎	◎	◎

40

## 【0 2 2 3】

セリシナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

：超微細なナノファイバー

50



## 【0224】

表13から明らかなように、採用したエレクトロスピニング条件下、セリシンTFA溶液の濃度が同一であれば、紡糸速度(0.020、0.060、0.080、0.150、および0.250 cm/min)が増加すると、エレクトロスピニングで得られるセリシンナノファイバーの平均繊維径とその標準偏差は、次第に増加する。従って、遅い紡糸速度でエレクトロスピニングすることで、所望する小さい繊維径で、繊維径のバラツキがない極細のセリシンナノファイバーが製造できる。

## 【0225】

(比較例1)

本比較例では、セリシンパウダーを用い、セリシンTFA溶液濃度を変えて、セリシンナノファイバーを製造した。

10

## 【0226】

市販品のセリシンパウダーを25のTFAに入れ、浸透機を用いて攪拌しながら10時間かけて完全に溶解し、濃度1.3、2.6、3.8、6.2、8.5、9.6、11.7、14.2、16.5、20.9および22.9 wt%のセリシンTFA溶液を作製した。このセリシンTFA溶液を用い、室温でエレクトロスピニングしてセリシンナノファイバーを製造した。

## 【0227】

エレクトロスピニング紡糸条件：紡糸距離は15 cm、印加電圧は25 kV、紡糸速度は0.060 cm/minとして、セリシンナノファイバーを製造した。得られたセリシン集積物とセリシンナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシンナノファイバーの繊維径(平均繊維径)、その標準偏差、セリシンナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびセリシンナノファイバーの形状を表14に集約する。

20

## 【0228】

【表14-1】

セリシン溶液濃度 (wt%)	1.3	2.6	3.8	6.2	8.5	9.6
繊維径 (nm)	230	265	311	254	230	217
標準偏差	275	280	335	168	155	158
最大径 (nm)	1740	1540	1961	1161	836	900
最小径 (nm)	21	64	63	36	28	45
形状	▼	▼	▼	▼	▼	▽

30

## 【0229】

【表14-2】

セリシン溶液濃度 (wt%)	11.7	14.2	16.5	20.9	22.9
繊維径 (nm)	100	94	398	163	313
標準偏差	44	35	255	71	102
最大径 (nm)	244	228	1351	588	546
最小径 (nm)	30	49	60	83	83
形状	△	▲	▲	△	△

40

## 【0230】

セリシン集積物あるいはセリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した

50

- ：超微細なナノファイバー
- ：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずか存在する。
- ：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が少し多めに存在する。
- ：集積物の殆どがビーズ状の形態である。

## 【0231】

表14中の6.2wt%セリシンTFA溶液用い、エレクトロスピンングして製造した(水溶解性の)セリシンナノファイバーの形態を走査型電子顕微鏡で観察した。得られたSEM画像を図2に示す。図2から明らかなように、セリシンナノファイバーの他に、ビーズ形態の存在量が多く、エレクトロスピンングで得られる集積物の殆どがビーズ状の形態であった。その他の濃度の場合も、同様な結果が得られた。

10

## 【0232】

本比較例において製造したセリシンパウダーを使用してなるセリシンナノファイバーには、実施例4の6wt%-4dセリシンホープ繭層のTFA溶液をエレクトロスピンングして製造した(水溶解性の)セリシンナノファイバー(図1)に比べて、多くのビーズの存在が確認された。セリシン繭層を使用することで、ビーズ形状の存在は全く認められず、表面が平滑なセリシンナノファイバーであって、平均繊維径が小さく、繊維径のバラツキが小さい極細のセリシンナノファイバーが製造できることが分かった。

## 【0233】

(比較例2)

本比較例では、セリシンパウダーを用い、セリシンTFA溶液の濃度を変えて、セリシンナノファイバーを製造した。

20

## 【0234】

市販品のセリシンパウダーを25のTFAに入れ、浸透機を用いて攪拌しながら4日間かけて完全に溶解し、濃度1.3、2.6、3.8、6.2、8.5、9.6、11.7、14.2、16.5、20.9および22.9wt%のセリシンTFA溶液を作製した。このセリシンTFA溶解を用い、室温でエレクトロスピンングしてセリシンナノファイバーを製造した。

## 【0235】

エレクトロスピンング紡糸条件：紡糸距離は15cm、印加電圧は25kV、紡糸速度0.060cm/minとして、セリシンナノファイバーを製造した。得られたセリシンナノファイバーの形態をSEM観察し、セリシンナノファイバーの繊維径(平均繊維径)、その標準偏差、セリシンナノファイバー繊維径の最大値と最小値、およびセリシンナノファイバーの形状を表15に集約する。

30

## 【0236】

## 【表15-1】

セリシン溶液濃度(wt%)	1.3	2.6	3.8	6.2	8.5	9.6
繊維径(nm)	251	326	279	331	380	351
標準偏差	330	588	274	247	272	257
最大径(nm)	2580	5300	2020	1860	2086	1358
最小径(nm)	67	78	80	47	67	50
形状	▽	▽	▽	▽	▽	▽

40

## 【0237】

【表 15 - 2】

セリシン溶液濃度 (wt%)	11.7	14.2	16.5	20.9	22.9
繊維径 (nm)	350	456	779	145	184
標準偏差	210	403	725	37	33
最大径 (nm)	1266	2267	5293	241	311
最小径 (nm)	30	50	128	61	111
形状	△	▽	▽	△	△

10

## 【0238】

セリシン集積物あるいはセリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

○ : 超微細なナノファイバー

△ : 超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が少し多めに存在する。

## 【0239】

表 15 に示したエレクトロスピニングして製造した全ての（水溶解性の）セリシンナノファイバーの形態を走査型電子顕微鏡で観察したところ、図 2 の場合と同様に、セリシンナノファイバーの他に、ビーズ形態の存在量が多く、エレクトロスピニングで得られる集積物の殆どがビーズ状の形態であった。

20

## 【実施例 13】

## 【0240】

本実施例では、セリシンホープ繭層とフィブロイン（シルク）スポンジとからなるセリシン・フィブロイン複合溶液を用いてセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを製造し、このナノファイバーの平均繊維径、その標準偏差、その形状を検討した。

## 【0241】

セリシンホープ繭層とフィブロインスポンジとからなるセリシン・フィブロイン複合溶液は、次のようにして作製した。

30

## 【0242】

まず、フィブロインスポンジ（SFP）を次のようにして製造した。絹フィブロイン繊維を 60、9 M の臭化リチウム水溶液に溶解し完全に溶解し、この溶液をセルロース製透析膜に入れ、5 日間水と置換して 2、3 % の絹フィブロイン水溶液を調製した。1 L 絹フィブロイン水溶液に 7 mL のメチルアルコールを添加し、2 時間静置した後、凍結乾燥することでフィブロインスポンジを製造した。セリシンホープ繭層（SC）とフィブロインスポンジ（SFT）との重量組成比が 100 / 0、75 / 25、50 / 50、25 / 75、0 / 100 となるように秤量してガラス瓶に入れた。7.2 wt % 濃度となるように、各試料に所定量の TFA を加えて 40 で 24 時間加熱して試料を完全に溶解した。かくして得られたセリシンホープ繭層溶液、セリシン・フィブロイン複合溶液およびフィブロイン溶液のそれぞれの溶液を用い、室温でエレクトロスピニングした。得られたセリシンナノファイバー、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーおよびフィブロインナノファイバーを SEM 測定して、それぞれの平均繊維径とその標準偏差を求めると共に、その形状を観測した。得られた結果を表 16 に集約する。

40

## 【0243】

エレクトロスピニング紡糸条件：紡糸距離は 15 cm、印加電圧は 25 kV、紡糸速度は 0.060 cm/min とした。

## 【0244】

【表 16】

SC/SFT	100/0	75/25	50/50	25/75	0/100
繊維径 (nm)	200	160	165	150	120
SD	41	33	30	29	25
形状	△	▽	▽	△	▲

## 【0245】

10

表 16 中、100/0、75/25、50/50、25/75、および 0/100 は、それぞれ、セリシンホープ蘭層とフィブロインスポンジとの重量比が 100/0、75/25、50/50、25/75、および 0/100 であることを意味する。

## 【0246】

セリシンナノファイバーの形状は、次のカテゴリーで表示した。

- ：超微細なナノファイバー。
- ：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が極わずかに存在する。
- ：超微細なナノファイバーにビーズ状の形態が少し多めに存在する。

## 【0247】

20

上記表 16 から明らかなように、セリシンホープ蘭層 TFA にフィブロインスポンジ TFA を混ぜた溶液を用いてエレクトロスピニングすると、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーが製造できる。

## 【0248】

フィブロイン含量が増すとセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの平均繊維径は減少する傾向にあり、ビーズ形状物は次第に減少する。

## 【実施例 14】

## 【0249】

本実施例では、セリシンホープ蘭層 TFA 溶液から得られたセリシン膜に対する水不溶化処理について検討した。

## 【0250】

30

セリシンホープ蘭層を 25 の TFA に 4 日間浸漬し、完全に溶解させて製造した 8 wt% セリシンホープ蘭層 TFA 溶液をポリスチレン膜上に広げ、1 時間送風乾燥させることで透明なセリシン膜を製造した。100 mg のセリシン膜を 15 mL の 25 の蒸留水に浸漬したところ 3 時間でセリシン膜は完全に溶解し、水溶解性セリシン膜であることが分かった。

## 【0251】

次に、水溶解性セリシン膜に対して下記のような 2 工程の処理で水不溶化処理を行った。

## 【0252】

40

第 1 工程：70 v/v% のメタノールあるいは 70 v/v% のエタノール水溶液に水溶解性セリシン膜を室温で 10 分間浸漬処理した後、このアルコール溶液から試料を引き上げ、室温で乾燥させて第 1 工程の水不溶化処理を行った。

## 【0253】

第 2 工程：上記アルコール処理による第 1 工程または下記の (a) 工程により完全に水不溶化した試料をさらに化学加工処理する (下記 (b)) ことで、化学加工された水不溶化膜を製造できた。

## 【0254】

(a) 上記アルコール処理による第 1 工程の代わりに、水溶解性セリシン膜を、和光純薬工業株式会社の商品：4% パラホルムアルデヒド試薬 0.1 mol/L、リン酸緩衝液 (pH 7.4) に、室温で 2 時間浸漬処理した後、試料膜を取り出し十分に水洗いを行い

50

、標準状態で乾燥させた。かくして製造したセリシン膜は水に浸漬しても溶解しなかった。

【0255】

(b) 3官能性エポキシ化合物であるグリセロールポリグリシジルエーテル(ナガセ化成工業株式会社製、商品名:デナコールEX-313およびEX-314)あるいは2官能性エポキシ化合物であるエチレングリコールジグリシジルエーテル(ナガセ化成工業株式会社製、商品名:デナコールEX-810)をジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し、この溶液を逆流冷却器を付けた100mLのナス型フラスコに入れ、試料がDMF中に完全に浸漬するように留意しながら、ウォーターバス中で、75~80℃で2時間化学反応を行った。反応終了後、試料を取り出し、DMFで洗浄し、続いて55℃のアセトンで洗浄することで未反応試薬を除去した。最終的に水で洗浄した。乾燥後、重量測定によると、エポキシ化合物で処理したセリシン膜の加工率は8.7%であった。これを水に浸漬しても試料膜は溶解しなかった。

10

【0256】

上記では、セリシン膜について述べたが、セリシンナノファイバーの場合も、以下の(c)のようにパラホルムアルデヒド処理により水不溶化し、または上記したアルコール処理により水不溶化し、次いで化学加工処理(b)することにより、化学加工された水不溶化ナノファイバーを製造できる。

【0257】

(c) 和光純薬工業株式会社の商品・4%パラホルムアルデヒド試薬0.1mol/Lおよびリン酸緩衝液(pH7.4)を用い、水溶解性セリシンナノファイバーを4%パラホルムアルデヒド固定液で浸漬し、概ね2時間~10時間静置することで水不溶化したセリシンナノファイバーが製造できた。

20

【0258】

上記工程でセリシンナノファイバーを水不溶化できたので、用途に応じて水溶性および水不溶性のセリシンナノファイバーを適宜選択して利用できるというメリットがある。

【実施例15】

【0259】

本実施例では、セリシンホープ層TFA溶液を用い、エレクトロスピンニングして得られたセリシンナノファイバーに対する水不溶化処理について検討した。

30

【0260】

実施例4における6wt%-4dセリシンTFA溶液用い、実施例4記載の方法でエレクトロスピンニングして製造した水溶解性のセリシンナノファイバーを上記実施例14と同様に、アルコール処理または上記パラホルムアルデヒド処理(c)により完全に水不溶性にし、その後で、(b)の化学加工処理工程で処理することで染色性などの向上した水不溶性のセリシンナノファイバーを製造した。

【0261】

ただし、水溶解性のセリシンナノファイバーは、実施例14における水溶解性セリシン膜とは異なり、アルコール処理による前処理では、実施例14とは少し異なる工夫を要する。水溶解性のセリシンナノファイバーは実施例14のセリシン膜とは異なり、アルコール水溶液に直接浸漬することはできないので、蓋付きのポリスチレン容器を用い、容器の底部分に70v/v%のエタノール水溶液を入れ、アルコール水溶液がセリシンナノファイバーに触れないように配置した試料台上に試料を置いた。ポリスチレン容器に蓋をして室温で2日間静置すると、ポリスチレン容器内部はアルコールの蒸気圧が高まりセリシンナノファイバーに吸着された。ポリスチレン容器から試料を取りだし、室温で乾燥することで水不溶性のセリシンナノファイバーを製造できた。続いて、実施例14記載の第2工程(b)処理により染色性が向上した水不溶性のセリシンナノファイバーを製造することができた。

40

【0262】

第1工程(c)の後に第2工程(b)処理を行うことにより染色性が向上した不溶性の

50

セリシンナノファイバーを製造することができた。

【実施例 16】

【0263】

本実施例では、セリシンホープ繭層とフィブロインスポンジとからなるセリシン・フィブロイン複合溶液を用いてセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを製造し、このナノファイバーの平均繊維径、その標準偏差、その最大径と最小径を検討した。

【0264】

セリシンホープ繭層 (SC) とフィブロインスポンジ (SFP) とからなるセリシン・フィブロイン複合溶液を、実施例 13 記載の方法に準じて次のようにして製造した。

【0265】

セリシンホープ繭層とフィブロインスポンジとの重量組成比が 100/0、75/25、50/50、25/75、および 0/100 となるように、セリシンホープ繭層の重量とフィブロインスポンジの重量とを秤量してガラス瓶に入れた。すなわち、セリシンホープ繭層の TFA 溶液、フィブロインスポンジの TFA 溶液およびセリシン・フィブロイン複合物の TFA 溶液の濃度がすべて 7.2 wt% となるようにセリシンホープ繭層とフィブロインスポンジとに TFA を所定量加え、40℃ で 24 時間加熱して試料を完全に溶解した。かくして得られた試料 TFA 溶液を用いて室温でエレクトロスピニングした。得られた試料ナノファイバーを SEM 測定して、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの繊維径 (平均繊維径)、標準偏差、複合ナノファイバーの繊維径の最大値 (最大径) と最小値 (最小径) とを求めた。得られた結果を表 17 に集約する。

【0266】

エレクトロスピニング紡糸条件：紡糸距離は 15 cm、印加電圧は 25 kV、紡糸速度は 0.060 cm/min とした。

【0267】

【表 17】

セリシン溶液濃度 (wt%)	7.2-SC	25-SC-75-SFP	50-SC-50-SFP	75-SC-25-SFP	7.2-SFP
繊維径 (nm)	218	112	153	142	148
標準偏差	37	25	28	32	38
最大径 (nm)	84	45	45	80	60
最小径 (nm)	583	184	352	273	440

【0268】

表 17 において、7.2-SC とは、セリシンホープ繭層を 40℃ で 24 時間加熱して試料を完全に TFA に溶解した 7.2 wt% のセリシン TFA 溶液、25-SC-75-SFP とは、セリシンホープ繭層を 40℃ で 24 時間加熱して試料を完全に TFA に溶解した 7.2 wt% のセリシン TFA 溶液とフィブロインスポンジを 40℃ で 24 時間加熱してなる 7.2 wt% のフィブロイン TFA 溶液との 25:75 混合溶液、50-SC-50-SFP とは、セリシンホープ繭層を 40℃ で 24 時間加熱して試料を完全に TFA に溶解した 7.2 wt% のセリシン TFA 溶液とフィブロインスポンジを 40℃ で 24 時間加熱してなる 7.2 wt% のフィブロイン TFA 溶液との 50:50 混合溶液、75-SC-25-SFP とは、セリシンホープ繭層を 40℃ で 24 時間加熱して試料を完全に TFA に溶解した 7.2 wt% のセリシン TFA 溶液とフィブロインスポンジを 40℃ で 24 時間加熱してなる 7.2 wt% のフィブロイン TFA 溶液との 75:25 混合溶液、7.2-SFP とは、フィブロインスポンジを 40℃ で 24 時間加熱してなる 7.2 wt

%のフィブロイン T F A 溶液を意味する。

【 0 2 6 9 】

表 1 7 から明らかなように、セリシンホープ繭層の T F A 溶液を用い、室温でエレクトロスピンングして製造できるセリシンナノファイバーの平均繊維径とその標準偏差は最も大きかったが、セリシン溶液にフィブロイン溶液を加えることで、平均繊維径とその標準偏差は低下した。

【 実施例 1 7 】

【 0 2 7 0 】

本実施例では、実施例 1 6 記載の方法に従って得られたセリシン・フィブロイン複合ナノファイバー ( 2 5 - S C - 7 5 - S F P、5 0 - S C - 5 0 - S F P および 7 5 - S C - 2 5 - S F P ) に対して、実施例 1 5 記載の方法に従って水不溶化処理を行った。

【 0 2 7 1 】

すなわち、この複合ナノファイバーに対して、第 1 工程としてアルコール ( メタノール ) 処理または上記 ( a ) のアルデヒド処理をして完全に水不溶化し、次いで第 2 工程として上記 ( b ) の化学加工処理を行った。その結果、化学加工された完全に水不溶性のセリシン・フィブロイン複合ナノファイバーを製造することができた。

【 実施例 1 8 】

【 0 2 7 2 】

本実施例では、化学加工処理して得られた水不溶化セリシンナノファイバーへの金属イオン吸着について検討した。

【 0 2 7 3 】

実施例 1 5 の方法で第 1 工程のアルコール処理を実施して水不溶化処理した後、第 2 工程 ( b ) の処理に準じて E D T A 二塩基酸無水物による化学加工処理を行った。すなわち、E D T A 二塩基酸無水物 1 0 w t % を含む D M S O 中にアルコールにより水不溶化処理したセリシンナノファイバーを浸漬し、7 5 で 2 時間処理し、加工率 5 . 2 % の水不溶性のセリシンナノファイバーを製造した。未加工の家蚕絹糸および上記方法で化学加工処理して製造した水不溶性のセリシンナノファイバーを、抗菌性の金属である銀および銅イオンを含む水溶液に浸漬して金属イオンを吸着させた。また、銀イオンを吸着させたセリシンナノファイバーに対するトマトかいよう病細菌の増殖抑止効果に関する抗菌活性の評価も行った。なお、ほぼ同一の上記加工率を持つ家蚕絹糸への金属イオンの吸着、銀イオンの抗菌活性も行った。かくして得られた銀イオンおよび銅イオンの吸着量 ( m m o l / g ) と、抗菌活性の評価結果を表 1 8 に示す。

【 0 2 7 4 】

【 表 1 8 】

試 料	銀イオン (mmol/g)	銅イオン (mmol/g)	抗菌活性 (mm)
家蚕絹糸	0.1	0.23	2
化学加工処理したセリシンナノファイバー	0.3	0.45	3.2

【 0 2 7 5 】

表 1 8 から明らかなように、家蚕絹糸を金属イオン水溶液に浸漬した場合、極微量の銀イオン、銅イオンは吸着するが、予め E D T A 二塩基酸無水物により化学加工処理した水不溶性のセリシンナノファイバーには多量の金属イオン量が吸着し、これに伴い抗菌活性も向上する。化学加工処理したセリシンナノファイバーへの金属イオン吸着量は、家蚕絹糸への金属イオン吸着量の 2 ~ 3 倍であった。また、化学加工処理したセリシンナノファイバーの抗菌活性は、家蚕絹糸の抗菌活性の 1 . 5 倍以上の高い値を示した。なお、セリ

シン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。

【0276】

しかし、未加工のセリシンナノファイバーの場合、水溶性であるため、測定できなかった。

【実施例19】

【0277】

本実施例では、化学加工処理して製造した水不溶化セリシンナノファイバーへの耐薬品抵抗性について検討した。

【0278】

実施例15記載の方法に従って第1工程のアルコール処理を行った後、第2工程の(b)処理を行った。すなわち、化学加工処理して得られた水不溶化セリシンナノファイバーの酸およびアルカリによる耐薬品抵抗性を調べた。

【0279】

上記(b)処理の詳細は次の通りであった。エチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDGE)5%を含むトリクロロエチレン中に第1工程で処理した水不溶性のセリシンナノファイバーを浸漬し、70℃で2時間化学加工処理を行い、加工率が5.2%のエポキシ加工した水不溶性のセリシンナノファイバーを調製した。かくして得られた水不溶性のセリシンナノファイバーを65℃の4M塩酸水溶液および0.1M水酸化ナトリウム水溶液中で1時間加水分解処理を行い、試料の重量変化から酸およびアルカリに対する溶解度を評価した。得られた結果を表19に集約する。

【0280】

【表19】

	加工率 (%)	酸溶解度 (%)	アルカリ溶解度 (%)
未処理試料	—	100	100
化学加工処理した水不溶化セリシンナノファイバー	5.2	61.3	71

【0281】

表19において未処理試料とは、実施例4に記載したように、6wt%のセリシンTFA溶液(6wt%-4d)を用い、エレクトロスピンニングして製造した水溶解性のセリシンナノファイバーを意味する。表19において、酸溶解度、アルカリ溶解度の値が大きいほど、試料が酸あるいはアルカリ溶液で溶解してしまい易いことを意味し、数値が小さいほど酸あるいはアルカリ溶液に晒しても溶解しないこと、すなわち耐薬品性が高いことを意味する。

【0282】

表19から明らかのように、未加工試料は酸あるいはアルカリ水溶液による浸漬処理で試料は完全に溶解してしまうが、エポキシ加工された水不溶化セリシンナノファイバーは溶解し難くなり耐薬品性が向上したことが分かる。なお、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。

【0283】

(参考例1)

本参考例では、セリシンホープ蘭層(以下の表20では「セリシン蘭層」と略記する。)を用いて、染色性について検討した。

セリシンホープ蘭層を次の方法で染色した。塩基性染料であるEthyl Violetを濃度の異なるエタノール水溶液に溶解した系でセリシンホープ蘭層を染色することによりセリシンホープ蘭層の染色挙動を調べた。すなわち、塩基性染料のEthyl Violet(C.I. Basic Violet 4)(C.I. Constitutio

10

20

30

40

50



n No. 42600, C.I.: Colour Index)あるいは酸性染料 Azophloxine (C.I. Acid Red 1)を、その濃度が0.2 g/Lとなるように0~100%エタノールに完全に溶解したものを染色浴とした。0.5 gのセリシン繭層を染料濃度が0.2 g/Lの0~100%エタノール水溶液20 mLに浸漬し、室温で1時間静置することで染色を行った。得られた結果を表20に示す。

【0284】

【表20】

試料	エタノール濃度 (%)					
	0	20	40	60	80	100
セリシン繭層	±	+	+	+	±	-
家蚕絹糸	±	+	+	+	±	-
柞蚕絹糸	±	+	+	+	±	-

10

【0285】

表20における染色程度の評価基準は以下の通りである。

+ : シルクセリシンが濃い紫色に染まり、染まり方が良好である。

- : シルクセリシンは淡い紫色しか染まらず、染色状態は良くない。

± : 染色状態は、良いとも悪いとも言えない。

20

【0286】

溶媒法においてセリシンを染色するには、溶媒染色浴に水が所定量含まれ、20~80%エタノール濃度となると良い。

【実施例20】

【0287】

本実施例では、化学加工処理した水不溶化セリシンナノファイバーへの染色について検討した。

【0288】

実施例4に記載した6 wt%のセリシンTFA溶液(6 wt% - 4 d)を用い、エレクトロスピンニングして製造した水溶解性のセリシンナノファイバーを実施例14の方法で第1工程のメタノールで前処理を実施し、または上記したパラホルムアルデヒド試薬で前処理(c)を実施して水不溶性のセリシンナノファイバーを作製し、次いで以下のような化学加工処理をして得られたセリシンナノファイバーへの染色を行った。

30

【0289】

まず、水不溶性のセリシンナノファイバーを5%のグルタル酸無水物(GA)を含むDMF中に浸漬し、75℃で1時間および6時間処理することにより、それぞれ、GAによる加工率20%、15%のセリシンナノファイバーを製造した。このGA加工したセリシンナノファイバーを、水とエタノールとが等量ずつ混合された混合溶媒にメチレンブルーを溶解させて調製した塩基性染料であるメチレンブルー(Methylene Blue)により溶媒染色法で染色した。具体的な染色方法は次の通りである。

40

【0290】

水とエタノールからなる混合溶媒に、0.2%となるようにメチレンブルーを溶解し、25℃で1時間静置して得た塩基性染料を用いてセリシンナノファイバーを染色した。染色後、遠心分離で染色浴に分散したセリシン粉末を沈殿分離して除去した。染色残液の吸光度測定を行い、セリシンナノファイバーへの染料の吸着率を評価した。

【0291】

染色後の残液自体の濃度は濃いため、染色残液5 mLを25 mLの蒸留水で薄め、Methylene Blueの吸収が最大となる662 nmもしくは296 nmにおける吸光度(Absorbance)値を、島津製作所製自記分光光度計(UV-3100S)

50

で求めた。染色残液の吸光度からセリシンナノファイバーの染色挙動を調べた。得られた値を表 2 1 に示す。

【0292】

【表 2 1】

加工率 (%)	染着率 (%)
20	31
15	25
0	14

10

【0293】

表 2 1 から明らかなように、グルタル酸無水物で化学加工処理したセリシンナノファイバーにはカルボキシル基が導入されるので、溶媒染色法で用いた塩基性染料によく染まるようになる。加工率 20 % のセリシンナノファイバーは未加工セリシンナノファイバーのほぼ 2 . 2 倍の値となった。なお、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。

【0294】

上記では、水とエタノールとが等量ずつ混合された混合溶媒にメチレンブルーを溶解させて調製した塩基性染料を使用した。15 % エタノールおよび 75 % エタノールを用いた場合も同様な染着率が得られた。従って、溶媒染色法でセリシン層を染色するには 15 ~ 75 % のエタノール水溶液を用いることで高い先着率が得られる。

20

【0295】

無水グルタル酸の代わりに、無水コハク酸、無水フタル酸あるいは無水 *o* - スルホ安息香酸 (OSBA) で化学加工処理しても上記実施例と同様に、良好な染色ができた。なお、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。

【実施例 2 1】

【0296】

本実施例では、不溶化セリシンナノファイバーへの染色について検討した。

30

実施例 4 に記載したように、6 wt % のセリシン TFA 溶液 (6 wt % - 4 d) を用い、エレクトロスピンニングして製造した水溶解性のセリシンナノファイバーを実施例 1 4 の方法で第 1 工程のメタノールで前処理を実施し、または上記したパラホルムアルデヒド試薬で前処理 (c) を実施して水不溶性のセリシンナノファイバーを作製し、得られたセリシンナノファイバーへの染色を行った。

【0297】

塩基性染料の Ethyl Violet (C. I. Basic Violet 4) (C. I. Constitution No. 42600、C. I. Colour Index) または酸性染料の Azophloxine (C. I. Acid Red 1) を用い、濃度が 0 . 2 g / L となるように 100 % エタノールに完全に溶解したものを染色浴とした。0 . 5 g の不溶化セリシンナノファイバーをこの染色浴 20 mL に浸漬し、室温で 1 時間静置することで染色を行った。

40

【0298】

不溶化セリシンナノファイバーへの染色前後の染色浴の吸光度変化から染着量を求めた。塩基性染料または酸性染料を溶解した 100 % エタノールの染色浴で室温 1 時間染色したときの染着率を表 2 2 に示す。また、エタノール 0 % すなわち蒸留水中に酸性染料 (Acid Red 18 (Scarlet 3R)) を溶解した染色浴を用い室温で染色したときの染着率を求め、表 2 2 に合わせて示す。

【0299】

【表 2 2】

染料種類	染色浴	染料名	染着率 (%)
塩基性染料	アルコール 100%	Ethyl Violet	12
酸性染料	アルコール 100%	Azophloxine	13
酸性染料	アルコール 0%	Acid Red 18	22

## 【0300】

10

表 2 2 から明らかなように、100%エタノールに塩基性染料や酸性染料を溶解した染色浴でセリシンホープ繭層から得られた不溶化セリシンナノファイバーを染色しても良好には染まらない(染着率は低い)。セリシンナノファイバーの染色を効率よく進める上では、染色浴に水を所定量(例えば、アルコール濃度が15~75%となるように)加えることが必要である。これは、染色浴中の水がセリシンナノファイバーを膨潤させるので、染料が拡散し易くなるためである。なお、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。

## 【0301】

本実施例では、実施例 2 0 のように化学加工処理をしていないが、染色は可能であった。しかし、実施例 2 0 の場合の方が染色性は増加した。

20

## 【実施例 2 2】

## 【0302】

本実施例では、セリシンナノファイバーへの染色性増強処理について検討した。

## 【0303】

実施例 4 に記載したように、6wt%のセリシンTFA溶液(6wt%-4d)を用い、エレクトロスピンングして製造した水溶性のセリシンナノファイバーを実施例 1 4 記載の方法に従ってメタノールで前処理し、続いて二塩基酸無水物である無水グルタル酸(GA)あるいは無水フタル酸(PA)で化学加工処理し、加工率が異なるセリシンナノファイバーを製造し、以下記載するように、エタノール溶媒染色法で染色した。

## 【0304】

30

なお、エタノール濃度を50%とし、染料としてC.I. Basic Orange 14を用い、染料濃度を0.2%とし、染色温度と時間を、それぞれ、25、1時間とした。染着程度は目視により次の3段階で評価した。また、C.I. Basic Orange 14の代わりにMethylene Blueを用いた場合についても染色実験を行った。

## 【0305】

C.I. Basic Orange 14およびMethylene blueを用いた染色実験で染着度合いを次の評価基準で求めたものを、それぞれ、O染着程度、M染着程度と略記する。得られた結果を表 2 3 に示す。

## 【0306】

40

【表 2 3】

試料	加工率 (%)	加工時間 (h)	O 染着程度	M 染着程度
Cont	0	0	+	+
GA	38.1	1	++	+++
GA	50.0	2.5	++	+++
PA	39.2	1	+++	++
PA	41.7	2.5	+++	++

10

## 【0307】

表 2 3 中、Cont は、メタノールで水不溶化したセリシンナノファイバーであり、GA および PA は、それぞれ、無水グルタル酸および無水フタル酸で化学加工処理した水不溶性のセリシンナノファイバーを意味する。

## 【0308】

表 2 3 中、染着程度の評価基準は次の通りである。

- + : 染料による染着程度がやや薄い。
- ++ : 染料による染着程度が普通。
- +++ : 染料による染着が著しく濃い。

20

## 【0309】

表 2 3 の結果から、化学加工処理で不溶化セリシンナノファイバーにカルボキシル基を導入することにより、また、用いた化学修飾試薬が疎水性の高いものであると、塩基性染料による染着率が著しく向上することが確かめられた。

## 【0310】

なお、セリシン・フィブロイン複合ナノファイバーの場合も上記と同様であった。また、二塩基酸無水物である無水コハク酸 (SA) および無水 *o*-スルホ安息香酸 (OSBA) で化学加工処理した場合も、上記と同様な結果が得られた。

## 【産業上の利用可能性】

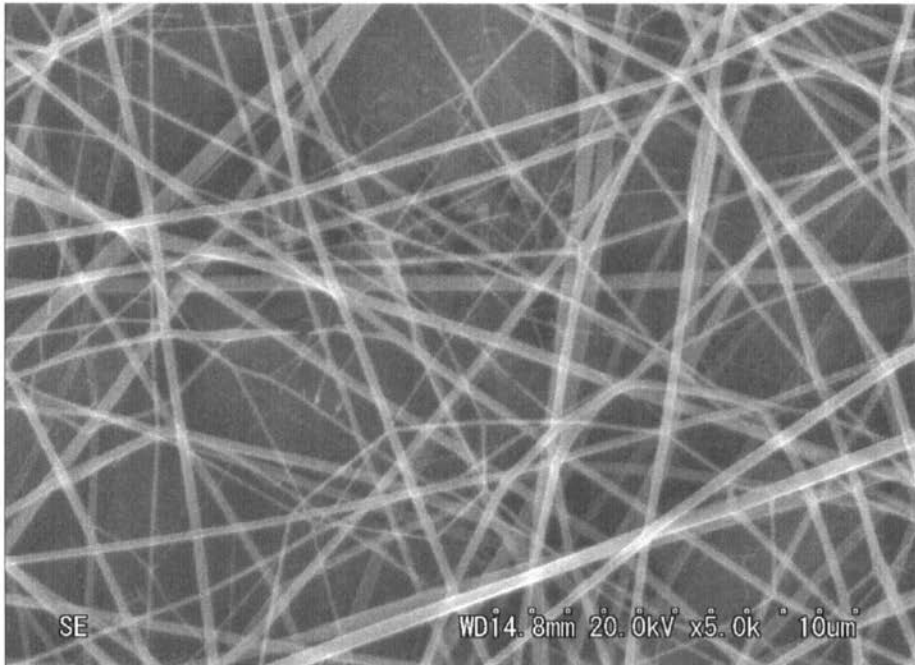
## 【0311】

本発明によれば、カイコ由来のセリシンを十分な量溶解する溶媒であって、かつその際のセリシンの分子量低下のない所望の溶媒に溶解して得た溶液を用いて、エレクトロスピンニングにより、平均繊維径と繊維径分布の制御を可能とするセリシンナノファイバーの効率的、経済的な製造技術を提供することができると共に、このセリシンナノファイバーを効率的に水不溶化することができ、この不溶化したセリシンナノファイバーを染色したり (染色性増強材)、金属イオンを効果的に吸着する金属イオン吸着材としたり、あるいは耐薬品性に優れた耐薬品性増強材としたりすることができるセリシンナノファイバーを製造するための技術を提供することができる。また、このエレクトロスピンニングにより得られたセリシンナノファイバーは水溶解性であり、有用細胞を効率的に増殖させるための再生医療材料としての利用価値は高く、様々な生体細胞との親和性が良く、短時間に細胞増殖が可能となるため再生医用材料として広範に利用できる。従って、本発明は、各種の産業分野で利用可能である。

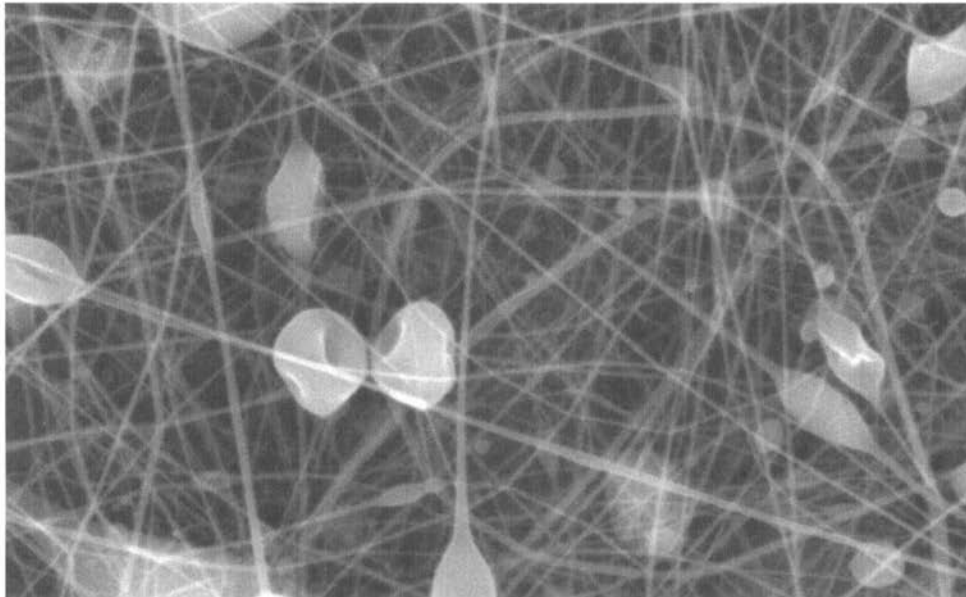
30

40

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
B 0 1 J 20/24 (2006.01) B 0 1 J 20/24 B

(72)発明者 ジャン シアンファ

長野県上田市常田三丁目15番1号 国立大学法人信州大学繊維学部内

Fターム(参考) 4G066 AC03B AC35B AC37B AD15B BA16 CA46 DA07 FA05  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA51 EA60  
4L035 AA04 AA07 BB02 BB06 BB59 DD13 FF01 FF05 GG06  
4L045 AA01 AA08 BA34 BA54 BA60 DA60  
4L047 AA10 AB08 BA09 CC16