

明 細 書

発明の名称：

活性エステル基を含む繊維製造用組成物及びその繊維を用いた細胞培養足場材料

技術分野

[0001] 本発明は、活性エステル基とヒドロキシ基を側鎖に有する高分子化合物、架橋剤、酸化合物、及び溶剤を含有する繊維製造用組成物、該組成物を紡糸して（好ましくは、更に加熱して）得られる、有機溶剤耐性に優れた繊維、並びに該繊維を用いた細胞培養足場材料に関する。

背景技術

[0002] 生体内の骨髄や基底膜において、細胞はコラーゲンなどのナノレベルの繊維状構造で構成された細胞外マトリクス中で生育し、増殖している。そのため、細胞医療や再生医療で必要な細胞を提供するためには、生体外において効率よく細胞を培養する細胞培養用の足場材料が求められている。このような細胞培養足場材料は、細胞を取り囲む生体内環境をできるだけ模倣することが好ましい。

[0003] 細胞を生体外にて培養する場合、従来は生体から抽出したコラーゲンなどのマトリクス構成物質をゲルやスポンジ状構造体として加工し、これを培養用の足場とする検討が進められてきた（特許文献1参照）。しかしながら、主にタンパク質からなるこれら生体由来の物質については、オートクレーブや γ 線などの滅菌処理に耐えられないことや、使用するまでの長期保存に対する安定性の問題、および力学的な強度や形状安定性などの問題がある。また、これらコラーゲンなどの生体由来物質は、一般的に牛や豚などの動物から抽出されるため、これら動物から感染性物質が混入する危険性がある。

[0004] そのため、最近では生体から抽出した物質に代わり、合成高分子を材料として使用し、発泡体、ゲル、繊維などの構造体を作製し、これを培養足場とする研究も進められている（特許文献2～特許文献5参照）。特に、N－ヒ

ドロキシスクシンイミド（NHS）アクリレートエステルモノマー、親水性モノマー、および架橋剤を含む合成ポリマーを細胞培養基材表面に適用することが開示されている（特許文献6参照）。

このうち、電界紡糸法（エレクトロスピニング）と呼ばれる高電圧をかけながら繊維を吹き付ける方法によって、ナノレベルの繊維径を持つナノ繊維（ナノファイバー）で構成された構造体が細胞培養足場材料として注目を浴びている。そのナノ繊維上で細胞医療や再生医療に使用する機能細胞や多能性幹細胞の未分化性を保持したまま培養する試みが多数なされている（非特許文献1～非特許文献3参照）。しかしながら、このような合成高分子由来の繊維は細胞接着性や増殖性を付与することが難しく、生体内の環境を模倣しているとは言えない。

[0005] この点を改善するため、RGDを含む細胞接着性ペプチドを固定化したナノ繊維も検討されている（非特許文献4参照）。この場合、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステルのような活性エステル基を含む合成高分子に細胞接着性ペプチドを固定化するが、高分子が水に溶解しないように、親・疎水性を考慮した共重合体を用いて検討されている。これよりNHSの導入量が制限され、固定化できる細胞接着物質の量も制限され、結果的に細胞培養足場材料の細胞接着性も制限されてしまう。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開昭62-502936号公報
特許文献2：特開昭62-122586号公報
特許文献3：特開2003-265593号公報
特許文献4：特開2005-60570号公報
特許文献5：特開2007-325543号公報
特許文献6：米国特許第8362144号明細書

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：B i o m a t e r i a l s 26 p5158（2005）

非特許文献2: Tissue Eng. 11 p1149 (2005)

非特許文献3: Cytotechnology 64 p701 (2012)

非特許文献4: Journal of Biomedical Materials Research A 100A p794 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化でき、さらに有機溶剤耐性、液体培地耐性を保持する繊維製造のための繊維製造用組成物、該組成物を紡糸して得られる繊維、及び該繊維を用いた細胞培養足場材料を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らが鋭意検討した結果、活性エステル基とヒドロキシ基を側鎖に有する高分子化合物、架橋剤、酸化合物、及び溶剤を含有する繊維製造用組成物を紡糸して製造した繊維は、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化でき、また十分な有機溶媒耐性を有し、更には優れた細胞培養足場材料としての機能を有することを見出した。

また本発明者らは、上記繊維製造用組成物の紡糸は、活性エステル基とヒドロキシ基を側鎖に有する高分子化合物を架橋剤及び酸化合物とともに紡糸することから、高分子化合物に含まれるヒドロキシ基同士が架橋剤を介して架橋反応することにより、高分子化合物同士が架橋する結果、有機溶剤耐性、液体培地耐性を有する繊維が得られることを見出した。

また、本発明者らは、本発明の繊維製造用組成物を紡糸して製造した繊維は、加熱処理を施すことにより、より優れた有機溶剤耐性、液体培地耐性を発現することを見出した。

これらの知見に基づき、本発明者らは本発明を完成するに至った。

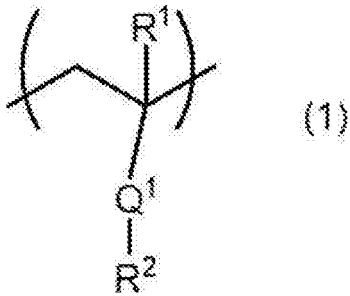
[0010] 即ち、本発明は以下の通りである。

[0011] [1] (A) 一般式(1)で表される単位構造及び一般式(2)で表される単位構造を含む高分子化合物、

- (B) 架橋剤、
- (C) 酸化合物、及び
- (D) 溶剤

を含有する繊維製造用組成物。

[0012] [化1]



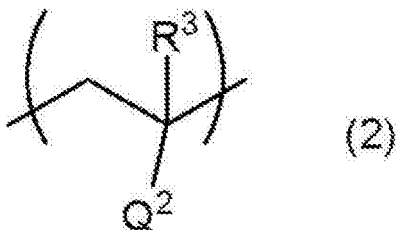
[0013] [式中、

R¹は、水素原子又はメチル基を示し、

Q¹は、エステル結合又はアミド結合を示し、

R²は、少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数1～10のアルキル基又は炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基を示す。]

[0014] [化2]



[0015] [式中、

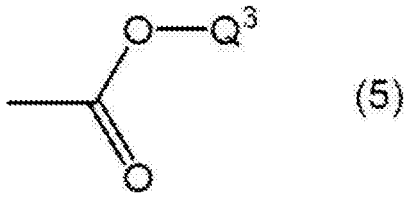
R³は、水素原子又はメチル基を示し、

Q²は、活性エステル基を示す。]

[2] 上記Q²が、一般式(5)で表される、上記[1]に記載の組成物。

[0016]

[化3]



[0017] [式中、 Q^3 は、N-スクシンイミド基、p-ニトロフェニル基又はペンタフルオロフェニル基を示す。]

[3] 上記高分子化合物の重量平均分子量が、1,000～1,000,000である、上記[1]又は[2]に記載の組成物。

[4] 上記溶剤が、極性溶剤である、上記[1]～[3]のいずれか1つに記載の組成物。

[5] 上記[1]～[4]のいずれか1つに記載の組成物を紡糸する工程を含む、繊維の製造方法。

[6] 上記紡糸が、電界紡糸である、上記[5]記載の方法。

[7] 紡糸した繊維を、70～300℃の範囲で加熱する工程を含む、上記[5]又は[6]記載の方法。

[8] さらに細胞接着物質を固定化する工程を含む、上記[5]～[7]のいずれか1つに記載の方法。

[9] 上記[5]～[8]のいずれか1つに記載の方法で製造される繊維。

[10] 上記[9]記載の繊維を含む、細胞培養足場材料。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化でき、さらに有機溶剤耐性、液体培地耐性を保持する繊維製造のための繊維製造用組成物、該組成物を紡糸して得られる繊維、及び該繊維を用いた細胞培養足場材料を提供できる。かかる繊維は、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化することより、細胞培養足場材料としてより優れた機能を発現する。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]実施例1の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で10分間加熱処理した後のSEM写真である。

[図2]実施例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を80℃で24時間加熱処理した後のSEM写真である。

[図3]実施例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で30分間加熱処理した後のSEM写真である。

[図4]実施例1の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で10分間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図5]実施例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を80℃で24時間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図6]実施例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で30分間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図7]実施例5の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を80℃で24時間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図8]比較例2の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を80℃で24時間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図9]比較例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で10分間加熱処理した後、エタノールに10秒間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図10]実施例4の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で30分間加熱処理した後、液体培地に7日間浸漬処理した後のSEM写真である。

[図11]比較例1の繊維製造用組成物から電界紡糸法にて得られた繊維を180℃で10分間加熱処理した後、液体培地に7日間浸漬処理した後のSEM写真である。

発明を実施するための形態

[0020] 1. 繊維製造用組成物

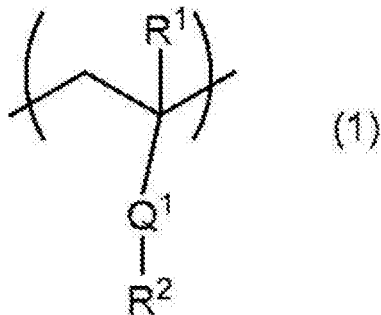
本発明の繊維製造用組成物（以下、「本発明の組成物」とも称する）は、（A）一般式（1）で表される単位構造及び一般式（2）で表される単位構造を含む高分子化合物、（B）架橋剤、（C）酸化合物、及び（D）溶剤を含有することを、主たる特徴とする。

[0021] [成分A]

本発明の組成物は成分Aとして、一般式（1）で表される単位構造及び一般式（2）で表される単位構造を含む高分子化合物（以下、「成分Aの高分子化合物」又は単に「成分A」とも称する）を含有する。成分Aに含まれる一般式（1）で表される単位構造は、側鎖にヒドロキシ基を有するため、成分Aを架橋剤及び酸化合物とともに紡糸することにより、ヒドロキシ基同士が架橋剤を介して架橋反応することにより高分子化合物同士が架橋し、有機溶剤耐性を有する繊維が得られる。また、成分Aに含まれる一般式（2）で表される単位構造は、側鎖に活性エステル基を有するため、任意のアミン（タンパク質、ペプチド、有機アミンなど）との求核付加反応によって、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質（細胞接着物質）を固定化することができる。一般式（2）で表される単位構造の活性エステル基と任意のアミンとの反応は、繊維製造用組成物の調製時に行うことが可能であり、さらに繊維製造用組成物を紡糸後、加熱処理後でも行うことが可能である。

[0022]

[化4]



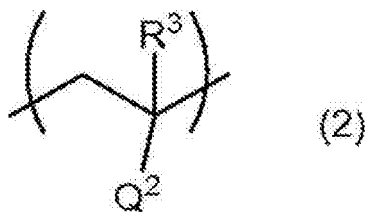
[0023] [式中、

R^1 は、水素原子又はメチル基を示し、

Q^1 は、エステル結合又はアミド結合を示し、

R^2 は、少なくとも1個のヒドロキシ基で置換されている炭素原子数1～10のアルキル基又は炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基を示す。]

[0024] [化5]



[0025] [式中、

R^3 は、水素原子又はメチル基を示し、

Q^2 は、活性エステル基を示す。]

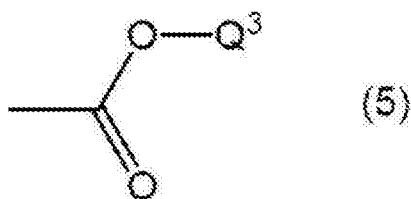
[0026] 一般式(1)及び一般式(2)における各基の定義について、以下に詳述する。

[0027] R^1 は、水素原子又はメチル基を示す。

[0028] Q^1 は、エステル結合又はアミド結合を示し、成分Aの高分子化合物の溶剤に対する溶解性の観点から、好ましくはエステル結合である。

[0029] Q^2 は、活性エステル基を示す。本発明において「活性エステル基」とは、エステル基の片方に電子求引性の置換基を有することによってカルボニル基が活性化された(求核攻撃を受けやすい)エステル基をいい、具体的には、一般式(5)で表されるエステル基である。

[0030] [化6]



[0031] 式中、 Q^3 は活性エステル基を形成する1価の有機基（電子求引性基）を示し、その具体例としては、N-スクシンイミド基、p-ニトロフェニル基及びペンタフルオロフェニル基が挙げられるが、細胞親和性の観点から、好ましくは、N-スクシンイミド基である。

[0032] R^2 は、少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数1～10のアルキル基又は炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基を示す。該炭素原子数1～10のアルキル基は直鎖状又は分岐鎖状のいずれでもよく、その具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、1-エチルプロピル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、1,1-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等が挙げられる。該アルキル基の炭素原子数は、好ましくは1～6であり、より好ましくは1～4である。

また、 R^2 における少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基の「炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基」としては、例えば、フェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基等が挙げられる。

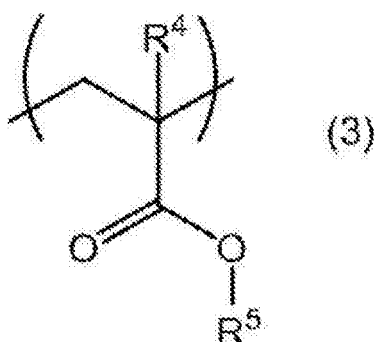
R^2 は、繊維製造時における架橋反応効率や、製造された繊維の細胞親和性の観点から、好ましくは、少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数1～10（より好ましくは1～6、特に好ましくは1～4）のアルキル基又は少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されているフェニル基である。

[0033] R^3 は、水素原子又はメチル基を示す。

[0034] 一般式（１）で表される単位構造は、 R^1 が、水素原子又はメチル基であり、 Q^1 が、エステル結合であり、 R^2 が、少なくとも１個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数１～１０（より好ましくは１～６、特に好ましくは１～４）のアルキル基又は少なくとも１個の水素原子がヒドロキシ基で置換されているフェニル基であることが好ましい。

[0035] 一般式（１）で表される単位構造は、好ましくは、一般式（３）で表される単位構造である。

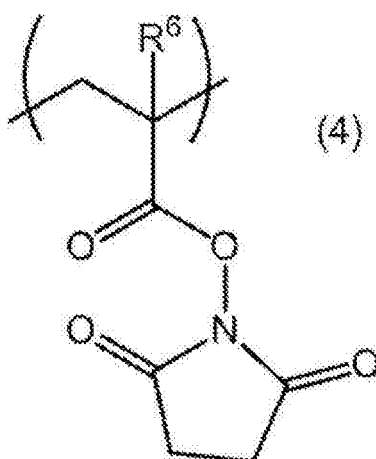
[0036] [化7]



[0037] [式中、 R^4 は上記 R^1 と同義であり、 R^5 は上記 R^2 と同義である。]

[0038] 一般式（２）で表される単位構造は、好ましくは、一般式（４）で表される単位構造である。

[0039] [化8]



[0040] [式中、 R^6 は水素原子又はメチル基である。]

[0041] 成分Aの高分子化合物において、一般式（１）で表される単位構造の組成比と一般式（２）で表される単位構造との組成比は、合成のしやすさ、溶剤

に対する溶解性、繊維形成のしやすさ、任意のアミンを固定化した際の効果の観点から、（一般式（１）で表される単位構造）／（一般式（２）で表される単位構造）＝（３５～９５モル％）／（５～６５モル％）が好ましい。これらの単位構造の組成比は、 ^{13}C -NMRにより測定される。

成分Ａの高分子化合物は、本発明の目的を損なわない限り、一般式（１）で表される単位構造及び一般式（２）で表される単位構造以外の単位構造を含んでもよいが、成分Ａの高分子化合物の重合性の観点から、成分Ａの高分子化合物の全単位構造に対する一般式（１）で表される単位構造の割合（モル％）は、３５～９５モル％が好ましく、一般式（２）で表される単位構造の割合（モル％）は、５～６５モル％が好ましい。また成分Ａの高分子化合物の全単位構造に対する一般式（１）で表される単位構造の割合と一般式（２）で表される単位構造の割合との合計（モル％）は、成分Ａの高分子化合物の重合性の観点から、９０モル％を超えることが好ましく、９５モル％以上がより好ましく、１００モル％が特に好ましい。成分Ａの高分子化合物の全単位構造に対する各単位構造の割合は、 ^{13}C -NMRにより測定される各単位構造の組成比から算出できる。

[0042] 成分Ａの重量平均分子量は、上記組成物を使用した繊維の有機溶媒耐性の観点から、好ましくは１，０００～１，０００，０００の範囲であり、より好ましくは５，０００～５００，０００の範囲であり、特に好ましくは１０，０００～３００，０００の範囲である。本発明において「重量平均分子量」とは、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）にて測定される、ポリスチレン換算の分子量をいう。

[0043] 成分Ａは、自体公知の方法又はそれに準ずる方法によって製造することができる。例えば、一般式（１）で表される単位構造に対応する単量体及び一般式（２）で表される単位構造に対応する単量体を、適当な溶媒（例、アセトニトリル等）中で、適当な重合開始剤（例、２，２'-アゾビス（イソ酪酸）ジメチル等）を使用して重合すること等により製造できるが、これに限定されない。市販品を使用してもよい。

[0044] 一般式(1)で表される単位構造に対応する単量体としては、例えば、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート(例えば、CAS番号: 868-77-9の化合物)、2-ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレート(例えば、CAS番号: 923-26-2の化合物)、4-ヒドロキシブチル(メタ)アクリレート(例えば、CAS番号: 2478-10-6の化合物)、N-ヒドロキシメチル(メタ)アクリルアミド(例えば、CAS番号: 923-02-4の化合物)、N-(2-ヒドロキシエチル)(メタ)アクリルアミド(例えば、CAS番号: 5238-56-2の化合物)、N-(2-ヒドロキシプロピル)(メタ)アクリルアミド(例えば、CAS番号: 26099-09-2の化合物)、p-ヒドロキシ(メタ)アクリルアニリド(例えば、CAS番号: 19243-95-9の化合物)等が挙げられ、2-ヒドロキシエチル(メタ)アクリレート又は2-ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレートが好ましく、2-ヒドロキシプロピル(メタ)アクリレートが最も好ましい。

なお、本発明において「(メタ)アクリレート化合物」とは、アクリレート化合物とメタクリレート化合物の両方をいう。例えば、(メタ)アクリル酸は、アクリル酸とメタクリル酸の両方をいう。

[0045] 一般式(2)で表される単位構造に対応する単量体としては、p-ニトロフェニル(メタ)アクリレート(例えば、CAS番号: 16522-41-1の化合物)、ペンタフルオロフェニル(メタ)アクリレート(例えば、CAS番号: 13642-97-2の化合物)、N-アクリルオキシスクシンイミド(CAS番号: 38862-24-7の化合物)、N-スクシンイミジルメタクリレート(CAS番号: 38862-25-8の化合物)が好ましく、N-スクシンイミジルメタクリレートが最も好ましい。

[0046] 本発明の組成物における成分Aの含有割合は、適度な太さを有する繊維製造の観点から、5~50重量%が好ましく、10~40重量%がより好ましい。

[0047] [成分B]

本発明の組成物は成分Bとして、架橋剤（以下、「成分Bの架橋剤」又は単に「成分B」とも称する）を含有する。成分Bは、後述の成分Cと併用することにより、成分Aのヒドロキシ基同士を、成分B自身を介して架橋させることで、繊維に有機溶剤耐性を付与することができる。

[0048] 成分Bの架橋剤としては、例えば、1, 3, 4, 6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリル、1, 3, 4, 6-テトラキス（ブトキシメチル）グリコールウリル等のアミノプラスト架橋剤；2, 2-ビス（4-ヒドロキシ-3, 5-ジヒドロキシメチルフェニル）プロパン等のフェノプラスト架橋剤；ヘキサメチレンジイソシアネート等のイソシアネート架橋剤；1, 4-ビス（ビニルオキシ）ブタン等のビニルエーテル架橋剤；等が挙げられる。

[0049] 成分Bは、好ましくはアミノプラスト架橋剤であり、好ましくは1, 3, 4, 6-テトラキス（ヒドロキシメチル）グリコールウリル（CAS番号：5395-50-6）、1, 3, 4, 6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリル（CAS番号：17464-88-9）、1, 3, 4, 6-テトラキス（エトキシメチル）グリコールウリル（CAS番号：65952-06-9）、1, 3, 4, 6-テトラキス（1-メチルエトキシ）グリコールウリル（CAS番号：508220-69-7）、1, 3, 4, 6-テトラキス（1, 1-ジメチルエトキシ）グリコールウリル（CAS番号：547744-08-1）又は1, 3, 4, 6-テトラキス（ブトキシメチル）グリコールウリル（CAS番号：15968-37-3）であり、より好ましくは1, 3, 4, 6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリルである。

[0050] 成分Bは単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

[0051] 成分Bの架橋剤は、自体公知の方法又はそれに準ずる方法によって製造することができる。また、市販品を用いてもよい。

[0052] 本発明の組成物における成分Bの含有割合は、成分Aとの反応効率の観点から、0.1～5重量%が好ましく、0.2～3重量%がより好ましい。

[0053] 本発明の組成物に含まれる成分Aと成分Bの重量比（成分Aの重量／成分Bの重量）は、繊維製造時の反応効率の観点から、5～65が好ましく、5～25がより好ましい。

[0054] [成分C]

本発明の組成物は成分Cとして、酸化合物（以下、「成分Cの酸化合物」又は単に「成分C」とも称する）を含有する。当該酸化合物は塩の態様であってもよく、即ち、本発明における「酸化合物」なる用語は、塩をも包含する概念である。成分Cは、成分Bと併用することにより、成分Aのヒドロキシ基同士が成分Bを介して架橋反応する際にその架橋反応を促進させることができる。

[0055] 成分Cの酸化合物としては、例えば、スルホン酸化合物、カルボン酸化合物等の有機酸化合物；塩酸、リン酸、硫酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸化合物等が挙げられる。

[0056] 成分Cは、好ましくは有機酸化合物であり、より好ましくはスルホン酸化合物である。スルホン酸化合物としては、例えば、p-トルエンスルホン酸、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート、トリフルオロメタンスルホン酸等が挙げられ、好ましくはピリジニウム-p-トルエンスルホナートである。

[0057] 成分Cは単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

[0058] 成分Cの酸化合物は、自体公知の方法又はそれに準ずる方法によって製造することができる。また、市販品を用いてもよい。

[0059] 本発明の組成物における成分Cの含有割合は、架橋反応速度、架橋反応効率の観点から、0.01～1.0重量%が好ましく、0.05～0.5重量%がより好ましく、0.07～0.4重量%が特に好ましい。

[0060] 本発明の組成物に含まれる成分Aと成分Cの重量比（成分Aの重量／成分Cの重量）は、架橋反応速度、架橋反応効率の観点から、20～120が好ましく、80～115がより好ましい。

[0061] [成分D]

本発明の組成物は成分Dとして、溶剤（以下、「成分Dの溶剤」又は単に「成分D」とも称する）を含有する。

[0062] 成分Dの溶剤は、少なくとも上記成分A～Cを均一に溶解又は分散し得、且つ、各成分と反応しないものであれば特に制限されないが、成分A～Cの溶解性の観点から、極性溶剤が好ましい。

当該極性溶剤としては、例えば、水、メタノール、エタノール、2-プロパノール、プロピレングリコールモノメチルエーテル、アセトン、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等が挙げられ、組成物の紡糸し易さのため、好ましくはアセトンとジメチルアセトアミドの混合溶媒であり、その好ましい混合比率（重量％）は、アセトン／ジメチルアセトアミド＝（90重量％～60重量％）／（10重量％～40重量％）である。

[0063] 成分Dは単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

[0064] 本発明の組成物は、本発明の目的を著しく損なわない限り、成分A～D以外に、繊維製造用組成物に通常使用される添加剤を必要に応じて含んでもよい。当該添加剤としては、例えば、界面活性剤、レオロジー調整剤、薬剤、微粒子等が挙げられる。

[0065] 本発明の組成物は、上記の成分A～Dを、あるいは、成分A～D及び上記の添加剤を、混合することにより調製できる。混合方法は特に制限されず、自体公知の方法又はそれに準ずる方法によって混合すればよい。

[0066] 本発明の組成物は、繊維製造のために用いられる。本発明の組成物を用いて製造される繊維の種類は特に制限されないが、例えば、生体適合材料（例、細胞培養足場材料等）等に使用する場合は、ナノ繊維、マイクロ繊維等が好ましく、ナノ繊維がより好ましい。本発明において「ナノ繊維」とは、ナノメートルオーダー（例、1～1000nm）の直径を持つ繊維をいい、また「マイクロ繊維」とは、マイクロメートルオーダー（例、1～1000μm）の直径を持つ繊維をいう。

[0067] 本発明の組成物を用いて形成される繊維の直径は、繊維の用途等に応じて

適宜調整すればよいが、本発明の組成物の濃度、及び紡糸のし易さの観点から、 $1 \sim 1000 \text{ nm}$ が好ましく、 $10 \sim 1000 \text{ nm}$ がより好ましい。本発明において、繊維の直径は、走査型電子顕微鏡（SEM）にて測定される。

[0068] 2. 繊維の製造方法、該製造方法で製造される繊維

本発明の繊維の製造方法（以下、「本発明の方法」とも称する）は、本発明の組成物を紡糸する工程を含むことを、主たる特徴とする。

[0069] 本発明の組成物の紡糸方法は繊維を形成できるものであれば特に制限されないが、例えば、メルトブロー法、複合熔融紡糸法、電界紡糸法等が挙げられ、繊維形成能の観点から、電界紡糸法が好ましい。

[0070] 電界紡糸法は、公知の紡糸方法であり、公知の電界紡糸装置を用いて行うことができる。本発明の組成物をノズル（例、ニードル等）の先端から吐出する速度（吐出速度）；印加電圧；本発明の組成物を吐出するノズルの先端から、これを受け取る基板までの距離（吐出距離）等の各種条件は、製造する繊維の直径等に応じて適宜設定できる。吐出速度は、通常 $0.1 \sim 100 \mu\text{l}/\text{min}$ であり、好ましくは $0.5 \sim 50 \mu\text{l}/\text{min}$ であり、より好ましくは $1 \sim 20 \mu\text{l}/\text{min}$ である。印加電圧は、通常 $0.5 \sim 80 \text{ kV}$ であり、好ましくは $1 \sim 60 \text{ kV}$ であり、より好ましくは $3 \sim 40 \text{ kV}$ である。吐出距離は、通常 $1 \sim 60 \text{ cm}$ であり、好ましくは $2 \sim 40 \text{ cm}$ であり、より好ましくは $3 \sim 30 \text{ cm}$ である。

[0071] 本発明の方法は、本発明の組成物を紡糸した後に、該紡糸した繊維を、特定の温度で加熱する工程を更に含むことが好ましい。紡糸した繊維を特定の温度で加熱することにより、より優れた有機溶剤耐性を発現させることができる。

[0072] 紡糸した繊維を加熱する温度は、通常 $70 \sim 300^\circ\text{C}$ の範囲であり、成分Bの架橋剤の反応性、及び成分Aの高分子化合物の耐熱性の観点から、好ましくは $80 \sim 250^\circ\text{C}$ であり、より好ましくは $90 \sim 200^\circ\text{C}$ である。当該温度が 70°C 未満であると、成分A同士の架橋反応が不十分であり、製造し

た繊維の有機溶媒耐性が低くなる傾向があり、300℃を超えると、成分Aの高分子化合物自体が熱による分解又は溶解等を起こし繊維が形成できない。

[0073] 紡糸した繊維の加熱方法は、上記の加熱温度で加熱し得るものであれば特に制限されず、自体公知の方法又はそれに準ずる方法で適宜加熱することができる。該加熱方法の具体例としては、大気下にてホットプレート又はオーブン等を使用する方法等が挙げられる。

[0074] 紡糸した繊維を加熱する時間は、加熱温度等に応じて適宜設定し得るが、架橋反応速度、生産効率の観点から、1分間～48時間が好ましく、5分間～36時間がより好ましく、10分間～24時間が特に好ましい。

[0075] 本発明の方法で製造される繊維（以下、「本発明の繊維」とも称する）の種類は特に制限されないが、例えば、生体適合材料（例、細胞培養足場材料等）等に使用する場合は、ナノ繊維、マイクロ繊維等が好ましく、ナノ繊維がより好ましい。

[0076] 本発明の繊維の直径は、繊維の用途等に応じて適宜調整すればよいが、例えば、細胞培養足場材料として使用する場合は、細胞培養効率の観点から、1～1000nmが好ましく、10～1000nmがより好ましい。

[0077] 本発明の繊維の用途は特に制限されないが、後述の実施例に示されるように、本発明の繊維は優れた有機溶剤耐性を有しており、細胞培養足場として十分な機能を有することから、細胞培養足場材料に適している。

[0078] 細胞の接着・増殖・分化などに有効な担持物質（細胞接着物質）は、本発明の繊維に存在する活性エステル基と、細胞接着物質との反応により、前記繊維に固定化できる。

活性エステル基は、中性の条件で遊離一級アミノ基と反応する。一級アミンの塩基性は、芳香族アミンよりアルキルアミンが強く、アルキルアミンは活性エステルとの反応により適している。蛋白質及びペプチドを、それらのアミノ基を介して共有結合的に繊維に付加させる場合には、水系での反応が必須であり、反応溶液のpHが中性から弱アルカリ性領域にある場合や、反

応温度が氷冷下から37℃程度である場合に、短時間に反応が進む。水溶性の低い一級アミンの場合には、エタノールやジメチルスルホキシド等のような有機溶剤に溶解して反応させることが好ましい。

好ましい反応条件は0℃～37℃で1～48時間、さらに好ましくは0℃～37℃で1～24時間である。

[0079] 本発明の繊維に固定化できる物質（細胞接着物質）としては、例えば、蛋白質、生理活性物質及び化合物等が挙げられる。前記蛋白質としては、例えば、癌胎児性抗原、扁平上皮癌関連抗原、サイトケラチン19フラグメント、シアル化糖鎖抗原 KL-6、ナトリウム利尿ペプチド、トロポニン、ミオグロビン等の疾患マーカー、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-4（IL-4）、インターロイキン-5（IL-5）、インターロイキン-6（IL-6）、インターロイキン-7（IL-7）、インターロイキン-8（IL-8）、インターロイキン-9（IL-9）、インターロイキン-10（IL-10）、インターロイキン-11（IL-11）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-13（IL-13）、インターロイキン-14（IL-14）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-18（IL-18）、インターロイキン-21（IL-21）、インターフェロン- α （IFN- α ）、インターフェロン- β （IFN- β ）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、単球コロニー刺激因子（M-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、幹細胞因子（SCF）、f l k 2 / f l t 3 リガンド（FL）、白血病細胞阻害因子（LIF）、オンコスタチンM（OM）、エリスロポエチン（EPO）、トロポポエチン（TPO）、トランスフォーミング成長因子- α （TGF- α ）、トランスフォーミング成長因子- β （TGF- β ）、マクロファージ炎症蛋白質-1 α （MIP-1 α ）、上皮細胞増殖因子（EGF）、繊維芽細胞増殖因子-1、2、3、4、5、6、7、8、又は9（FGF-1、2

、3、4、5、6、7、8、9）、神経細胞増殖因子（NGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、白血病阻止因子（LIF）、プロテアーゼネキシンI、プロテアーゼネキシンII、血小板由来成長因子（PDGF）、コリン作動性分化因子（CDF）、ケモカイン、Notchリガンド（Delta1など）、Wnt蛋白質、アンジオポエチン様蛋白質2、3、5または7（Angpt2、3、5、7）、インスリン様成長因子（IGF）、インスリン様成長因子結合蛋白質（IGFBP）、プレイオトロフィン（Pleiotrophin）、インシュリン、成長ホルモン等の細胞増殖因子、及びコラーゲンI乃至XIX、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン-1乃至12、ラミニン511、ラミニン521、ニトジェン、テネイシン、トロンプスポンジン、フォンビルブランド（von Willebrand）因子、オステオポンチン、フィブリノーゲン、各種エラスチン、各種プロテオグリカン、各種カドヘリン、デスモコリン、デスモグレイン、各種インテグリン、E-セレクチン、P-セレクチン、L-セレクチン、免疫グロブリンスーパーファミリー、マトリゲル、ポリ-D-リジン、ポリ-L-リジン等の細胞接着因子、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE等の各種抗体等が挙げられる。

前記生理活性物質としては、例えば、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、ノイラミン酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン等の糖類、セロトニン、ノルアドレナリン、アドレナリン、3-（3,4-ジクロロフェニル）-1,1-ジメチルウレア（DCMU）、アトラジン、リニュロン及びシマジン等が挙げられる。

前記化合物としては、例えば、アンジオテンシンI乃至IV、ブラジキニン、フィブリノペプチド、ナトリウム利尿ペプチド、ウロディラチン、グアニリン、エンドセリン1乃至3、サリューシン、ウロテンシン、オキシトシン、ニューロフィジン、バソプレシン、副腎皮質刺激ホルモン、メラニン細胞刺激ホルモン、エンドルフィン、リポトロピン、ウロコルチン1乃至3、黄体形成ホルモン放出ホルモン、成長ホルモン放出ホルモン、ソマトスタチン

、コルチスタチン、プロラクチン放出ペプチド、メタスチン、タキキニン、サブスタンスP、ニューロキニン、エンドキニン、ニューロテンシン、ニューロメジン、ゼニン、グレリン、オベスタチン、メラニン凝集ホルモン、オレキシン、ニューロペプチド、ダイノルフィン、ネオエンドルフィン、エンドモルフィン、ノシセプチン、ピログルタミル化RF アミドペプチド、ガラニン、ガストリン、コレシストキニン、セクレチン、リラキシン、グルカゴン、グリセンチン、アドレノメデュリン、アミリン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン、ディフェンシン、チモシン、Y I G S R ペプチド等のペプチド；アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、シスチン、ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリジン、ジヒドロキシフェニルアラニン、チロキシン、フォスフォセリン、デスモシン、 β -アラニン、サルコシン、オルニチン、クレアチン、 γ -アミノ酪酸、テアニン、カイニン酸、ドウモイ酸、イボテン酸等のアミノ酸；2-ジメチルアミノエチルアミン（CAS番号：108-00-9の化合物）、N-（2-ヒドロキシエチル）エチレンジアミン（CAS番号：111-41-1の化合物）、N-（2-アミノエチル）ピペラジン（CAS番号：140-31-8の化合物）、4-（2-アミノエチル）モルホリン（CAS番号：2038-03-1の化合物）、1-（2-アミノエチル）-2-イミダゾリドン（CAS番号：6281-42-1の化合物）、トリプトアミン（CAS番号：61-54-1の化合物）、ヒスタミン二塩酸塩（CAS番号：56-92-8の化合物）、チラミン（CAS番号：51-67-2の化合物）、ドーパミン（CAS番号：51-61-6の化合物）等の一級アミン；エチレンジアミン二塩酸塩（CAS番号：333-18-6の化合物）、1,6-ジアミノヘキサン（CAS番号：124-09-4の化合物）、N,N'-ビス（アミノプロピル）ピペラジン（CAS番号：7209-38-3の化合物）の一級ジアミン等が挙げられる。

この中で特に好ましい細胞接着物質は、ラミニン 5 1 1、ラミニン 5 2 1 又は Y I G S R ペプチドである。

[0080] 3. 細胞培養足場材料

本発明の細胞培養足場材料は、本発明の繊維を含むことを、主たる特徴とする。本発明において「細胞培養足場材料」とは、細胞に対して悪影響を及ぼさず、細胞培養が可能な材料をいう。

[0081] 本発明の細胞培養足場材料は、例えば、ガラス、金属、及びポリスチレンのようなプラスチック上に本発明の繊維を吹付けた細胞培養基材（例えば、6 穴平底マイクロプレート等）、本発明の繊維を導入した培養バック等が挙げられる。さらに、活性エステル基を介して固定化する物質（細胞接着物質）によって、細胞増殖の促進、細胞の分化誘導等が可能である。

[0082] 本発明の細胞培養足場材料を用いて培養される細胞に関しては特に制限が無く、例えば、線維芽細胞、骨髄細胞、B リンパ球、T リンパ球、好中球、赤血球、血小板、マクロファージ、単球、骨細胞、骨髄細胞、周皮細胞、樹枝状細胞、ケラチノサイト、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経系細胞、グリア細胞、ニューロン、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、星状膠細胞、心臓細胞、食道細胞、筋肉細胞（例えば、平滑筋細胞または骨格筋細胞）、膵臓ベータ細胞、メラニン細胞、造血前駆細胞、単核細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、筋幹細胞、生殖幹細胞、腸幹細胞、癌幹細胞、毛包幹細胞、及び各種細胞株（例えば、HCT 116、Huh 7、HEK 293（ヒト胎児腎細胞）、HeLa（ヒト子宮頸癌細胞株）、Hep G2（ヒト肝癌細胞株）、UT 7/TPO（ヒト白血病細胞株）、CHO（チャイニーズハムスター卵巢細胞株）、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five、Vero）等が挙げられる。

[0083] 本発明の細胞培養足場材料は、本発明の繊維を原材料の一つとして使用し、自体公知の方法又はそれに準ずる方法によって製造することができる。

実施例

[0084] 以下、本発明に係る具体例を説明するが、これによって本発明は何ら限定されるものではない。

[0085] [高分子化合物 1 ～ 6 の重量平均分子量の測定]

下記の高分子化合物 1 ～ 6 の重量平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）により測定した。測定に用いた装置、測定条件は次の通りである。

装置：TOSOH HLC-8320GPC system

カラム：Shodex（登録商標）KF-803L、KF-802及びKF-801

カラム温度：40℃

溶離液：DMF

流量：0.6 ml / 分

検出器：RI

標準試料：ポリスチレン

[0086] [成分 A の高分子化合物の¹³C-NMR測定]

下記成分 A の高分子化合物の単位構造の組成比は、¹³C-NMRにより測定した。測定及び解析に用いた装置、条件は次の通りである。

装置：日本電子株式会社 JNM-ECA500、Delta V5.0

測定核：¹³C ゲートデカップリング

積算回数：18000

測定温度：室温

検出ピーク：69～71 ppm（HPMA由来）、
25～27 ppm（NSuMA由来）

測定溶剤：重水素化ジメチルスルホキシド（DMSO-d₆）、750 μ

L

サンプル量：0.1 g

緩和試薬：クロム（ⅠⅠⅠ）アセチルアセトナート、4 mg

[0087] <合成例（高分子化合物1～6の合成）>

（合成例1：高分子化合物1）

2-ヒドロキシプロピルメタクリレート（HPMA；東京化成工業株式会社製）10.5 g、N-スクシンイミジルメタクリレート（NSuMA；東京化成工業株式会社製）1.5 g、及び2, 2'-アゾビス（イソ酪酸）ジメチル（MAIB；和光純薬工業株式会社製）0.01 gをアセトニトリル28.3 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル20.2 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液にジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物1を7.71 g得た。当該高分子化合物1の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で217,000であった。¹³C-NMRにて測定した組成比は、HPMA/NSuMA=91モル%/9モル%であった。

[0088] （合成例2：高分子化合物2）

2-ヒドロキシプロピルメタクリレート（HPMA；東京化成工業株式会社製）10.6 g、N-スクシンイミジルメタクリレート（NSuMA；東京化成工業株式会社製）1.5 g、及び2, 2'-アゾビス（イソ酪酸）ジメチル（MAIB；和光純薬工業株式会社製）0.72 gをアセトニトリル30.0 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル21.4 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液にジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物2を12.0 g得た。当該高分子化合物2の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で13,000であった。¹³C-NMRにて測定した組成比は、HPMA/NSuMA=92モル%/8モル%であった。

[0089] (合成例3：高分子化合物3)

2-ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA；東京化成工業株式会社製) 33.0 g、N-スクシンイミジルメタクリレート (NSuMA；東京化成工業株式会社製) 18.0 g、及び2, 2'-アゾビス(イソ酪酸)ジメチル (MAIB；和光純薬工業株式会社製) 0.05 gをアセトニトリル 119.2 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル 85.2 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液を100 ml程度の量まで濃縮し、ジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物3を36.0 g得た。当該高分子化合物3の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で182,000であった。¹³C-NMRにて測定した組成比は、HPMA/NSuMA=62モル%/38モル%であった。

[0090] (合成例4：高分子化合物4)

2-ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA；東京化成工業株式会社製) 8.3 g、N-スクシンイミジルメタクリレート (NSuMA；東京化成工業株式会社製) 7.0 g、及び2, 2'-アゾビス(イソ酪酸)ジメチル (MAIB；和光純薬工業株式会社製) 0.01 gをアセトニトリル 35.7 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル 25.5 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液にジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物4を11.0 g得た。当該高分子化合物4の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で265,000であった。¹³C-NMRにて測定した組成比は、HPMA/NSuMA=50モル%/50モル%であった。

[0091] (合成例5：高分子化合物5)

2-ヒドロキシプロピルメタクリレート (HPMA；東京化成工業株式会社製) 5.5 g、N-スクシンイミジルメタクリレート (NSuMA；東京

化成工業株式会社製) 7.0 g、及び2, 2'-アゾビス(イソ酪酸)ジメチル(MAIB; 和光純薬工業株式会社製) 0.01 gをアセトニトリル29.2 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル20.9 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液にジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物5を8.9 g得た。当該高分子化合物5の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で113,000であった。 ^{13}C -NMRにて測定した組成比は、HPMA/NSuMA=37モル%/63モル%であった。

[0092] (合成例6: 高分子化合物6)

メチルメタクリレート(MMA; 東京化成工業株式会社製) 10.0 g、及び2, 2'-アゾビス(イソ酪酸)ジメチル(MAIB; 和光純薬工業株式会社製) 0.01 gをアセトニトリル23.4 gに溶解させ、窒素雰囲気下、加熱還流させたアセトニトリル16.7 g中へ滴下した。滴下終了後、加熱還流を保ちながら、17時間反応させた。その後、この反応混合液にジエチルエーテルを加えてポリマーを析出させた。ポリマーをろ取した後、減圧下で乾燥することで、高分子化合物6を5.3 g得た。当該高分子化合物6の重量平均分子量は、ポリスチレン換算で230,000であった。

[0093] 前記高分子化合物1~5において、重合反応後、均一な高分子溶液となっていた場合を「良好」とし、均一な高分子溶液とならない場合を「不良」として表1にまとめた。

[0094]

[表1]

高分子化合物	各単量体の仕込み比率 (モル%)		全単量体に対する 仕込み比率 (モル%)	各単量体の組成比 (モル%)		重合性 (重量平均分子重)
	HPMA	NSuMA		HPMA	NSuMA	
1	90	10	0.06	91	9	良好 (217,000)
2	90	10	3.8	92	8	良好 (13,000)
3	70	30	0.07	62	38	良好 (182,000)
4	60	40	0.07	60	50	良好 (265,000)
5	50	50	0.07	37	63	良好 (113,000)

[0095] <実施例（繊維製造用組成物（溶液）の調製）>

（実施例1）

高分子化合物1；0.50g、1,3,4,6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリル0.03g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート0.005g、ジメチルアセトアミド0.49g、及びアセトン1.48gを混合した後、ミックスローターVMR-5（アズワン株式会社製）にて溶解するまで100rpmで攪拌し、実施例1の繊維製造用組成物を得た。実施例1の繊維製造用組成物における高分子化合物1の含有割合は、約2

0重量%である。

[0096] (実施例2)

高分子化合物2 ; 0.70 g、1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコールウリル0.04 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート0.007 g、ジメチルアセトアミド0.31 g、及びアセトン0.94 gを混合した後、ミックスローターVMR-5 (アズワン株式会社製)にて溶解するまで100 rpmで攪拌し、実施例1の繊維製造用組成物を得た。実施例2の繊維製造用組成物における高分子化合物2の含有割合は、約35重量%である。

[0097] (実施例3)

高分子化合物3 ; 0.23 g、1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコールウリル0.01 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート0.002 g、ジメチルアセトアミド0.50 g、及びアセトン1.52 gを混合した後、ミックスローターVMR-5 (アズワン株式会社製)にて溶解するまで100 rpmで攪拌し、実施例3の繊維製造用組成物を得た。実施例3の繊維製造用組成物における高分子化合物3の含有割合は、約10重量%である。

[0098] (実施例4)

高分子化合物3 ; 0.60 g、1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコールウリル0.03 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート0.006 g、ジメチルアセトアミド0.59 g、及びアセトン1.77 gを混合した後、ミックスローターVMR-5 (アズワン株式会社製)にて溶解するまで100 rpmで攪拌し、実施例4の繊維製造用組成物を得た。実施例4の繊維製造用組成物における高分子化合物3の含有割合は、約20重量%である。

[0099] (実施例5)

高分子化合物3 ; 0.40 g、1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコールウリル0.06 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナ

ート 0.004 g、ジメチルアセトアミド 0.38 g、及びアセトン 1.15 g を混合した後、ミックスローター VMR-5（アズワン株式会社製）にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、実施例 5 の繊維製造用組成物を得た。実施例 5 の繊維製造用組成物における高分子化合物 3 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0100]（実施例 6）

高分子化合物 4；0.50 g、1, 3, 4, 6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリル 0.03 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート 0.005 g、ジメチルアセトアミド 0.49 g、及びアセトン 1.48 g を混合した後、ミックスローター VMR-5（アズワン株式会社製）にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、実施例 6 の繊維製造用組成物を得た。実施例 6 の繊維製造用組成物における高分子化合物 4 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0101]（実施例 7）

高分子化合物 5；0.50 g、1, 3, 4, 6-テトラキス（メトキシメチル）グリコールウリル 0.03 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート 0.005 g、ジメチルアセトアミド 0.49 g、及びアセトン 1.48 g を混合した後、ミックスローター VMR-5（アズワン株式会社製）にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、実施例 7 の繊維製造用組成物を得た。実施例 7 の繊維製造用組成物における高分子化合物 5 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0102]（比較例 1）

高分子化合物 3；0.70 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート 0.007 g、ジメチルアセトアミド 0.70 g、及びアセトン 2.09 g を混合した後、ミックスローター VMR-5（アズワン株式会社製）にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、比較例 1 の繊維製造用組成物を得た。比較例 1 の繊維製造用組成物における高分子化合物 3 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0103] (比較例 2)

高分子化合物 3 ; 0.70 g、1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコールウリル 0.035 g、ジメチルアセトアミド 0.69 g、及びアセトン 2.07 g を混合した後、ミックスローター VMR-5 (アズワン株式会社製) にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、比較例 2 の繊維製造用組成物を得た。比較例 2 の繊維製造用組成物における高分子化合物 3 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0104] (比較例 3)

高分子化合物 3 ; 0.70 g、ジメチルアセトアミド 0.70 g、及びアセトン 2.10 g を混合した後、ミックスローター VMR-5 (アズワン株式会社製) にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、比較例 3 の繊維製造用組成物を得た。比較例 3 の繊維製造用組成物における高分子化合物 3 の含有割合は、約 20 重量%である。

[0105] (比較例 4)

高分子化合物 6 ; 0.26 g、ピリジニウム-p-トルエンスルホナート 0.003 g、ジメチルアセトアミド 1.70 g、及びアセトン 0.96 g を混合した後、ミックスローター VMR-5 (アズワン株式会社製) にて溶解するまで 100 rpm で攪拌し、比較例 4 の繊維製造用組成物を得た。比較例 4 の繊維製造用組成物における高分子化合物 6 の含有割合は、約 8.9 重量%である。

[0106] 実施例 1 ~ 7、比較例 1 ~ 4 の繊維製造用組成物の構成を表 2-1 及び 2-2 に示す。

[0107]

[表2-1]

	高分子 化合物 (成分A)	成分Aの 重量平均 分子量	成分Aの 含有割合 (重量%)	架橋剤 (成分B)	成分Bの 含有割合 (重量%)	酸化合物 (成分C)	溶剤 (成分D)
実施例 1	1	217000	20.0	PL-LI	1.2	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 2	2	13000	35.1	PL-LI	2.0	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 3	3	182000	10.2	PL-LI	0.44	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 4	3	182000	20.0	PL-LI	1.0	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 5	3	182000	20.1	PL-LI	3.0	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 6	4	265000	20.0	PL-LI	1.2	PyPTS	DMAc/ アセトン
実施例 7	5	113000	20.0	PL-LI	1.2	PyPTS	DMAc/ アセトン

[0108]

[表2-2]

	高分子 化合物	高分子 化合物の 重量平均 分子量	高分子 化合物の 含有割合 (重量%)	架橋剤 (成分B)	成分Bの 含有割合 (重量%)	酸化合物 (成分C)	溶剤 (成分D)
比較例1	3	182000	20.0	—	—	P y P T S	DMAc/ アセトン
比較例2	3	182000	20.0	P L - L I	1.0	—	DMAc/ アセトン
比較例3	3	182000	20.0	—	—	—	DMAc/ アセトン
比較例4	6	230000	8.9	—	—	P y P T S	DMAc/ アセトン

[0109] 註) P L - L I : 1, 3, 4, 6-テトラキス(メトキシメチル)グリコー

ルウリル、PyPTS：ピリジニウム－p－トルエンスルホナート、DMAc：ジメチルアセトアミド

[0110] [電界紡糸法による繊維の製造]

下記の試験例１～４において、電界紡糸法による繊維の製造は、エスプレーヤーES－２０００（株式会社フューエンス製）を用いて実施した。繊維製造用組成物は、１ｍｌのロック式ガラス注射筒（アズワン株式会社製）に注入し、針長１３ｍｍのロック式金属製ニードル２４Ｇ（武蔵エンジニアリング株式会社製）を取り付けた。ニードル先端から繊維を受け取る基板までの距離（吐出距離）は２０ｃｍとした。印加電圧は２５ｋＶとし、吐出速度は１０μｌ／minとした。

[0111] [繊維形状の確認方法]

下記の試験例１～４において、繊維形状の確認は、イオンスパッター（E－１０３０、株式会社日立ハイテクノロジーズ製）にてPt－Pdを繊維に１分間蒸着した後、走査型電子顕微鏡（SEM）（S－４８００、株式会社日立ハイテクノロジーズ製）を使用して、拡大倍率１０，０００倍で観察することにより行った。

繊維形状が維持されている場合は「良好」とし、繊維形状が維持されない場合は「不良」とした。

[0112] [繊維径の測定方法]

下記の試験例１～４において、繊維径（繊維の太さ）の測定は、走査型電子顕微鏡（SEM）（S－４８００、株式会社日立ハイテクノロジーズ製）を使用して、拡大倍率１０，０００倍の画像を撮影及び保存した後、付属の測長ツールにより行った。

[0113] <試験例１：加熱処理及び溶剤耐性試験>

実施例１～７及び比較例１～４の繊維製造用組成物を、調製後すぐに、電界紡糸法によりアルミ箔上に紡糸した後、得られた繊維に、表３に示す条件で加熱処理を施し、加熱処理後の繊維形状を確認した。結果を表３に示す。

実施例１～７及び比較例１～４の繊維製造用組成物を、調製後すぐに、電

界紡糸法によりアルミ箔上に紡糸した後、表４に示す条件で加熱処理を施した繊維をエタノールに１０秒間浸漬した後、再び繊維形状を確認し、繊維径を測定した。結果を表４に示す。

実施例４及び比較例１～３の繊維製造用組成物を、調製後すぐに、電界紡糸法によりアルミ箔上に紡糸した後、表５に示す条件で加熱処理を施した繊維を液体培地であるＩＳＣＯＶＥ’Ｓ ＭＯＤＩＦＩＥＤ ＤＵＬＢＥＣＣＯ’Ｓ ＭＥＤＩＵＭ（シグマ社製）に７日間浸漬した後、水洗及びエタノール洗浄を経て、再び繊維形状を確認し、繊維径を測定した。結果を表５に示す。

[0114] [表3]

(加熱処理後の繊維形状)			
温度	80℃	180℃	
時間	24時間	10分	30分
実施例 1	—	良好	良好
実施例 2	—	良好	—
実施例 3	—	—	良好
実施例 4	良好	良好	良好
実施例 5	良好	—	—
実施例 6	—	良好	—
実施例 7	—	良好	—
比較例 1	良好	良好	—
比較例 2	良好	良好	—
比較例 3	良好	良好	—
比較例 4	—	良好	—

[0115]

[表4]

(加熱処理→エタノール浸漬後の繊維形状及び繊維径)

温度	80℃	180℃	
時間	24時間	10分	30分
実施例1	—	良好 (約400nm)	良好 (約430nm)
実施例2	—	良好 (約220nm)	—
実施例3	—	—	良好 (約70nm)
実施例4	良好 (約460nm)	良好 (約500nm)	良好 (約450nm)
実施例5	良好 (約470nm)	—	—
実施例6	—	良好 (約510nm)	—
実施例7	—	良好 (80～750nm)	—
比較例1	繊維形状保持 ファイバー表面荒れ	良好 (約770nm)	—
比較例2	繊維形状保持 ファイバー表面荒れ	良好 (約400nm)	—
比較例3	ファイバーはく離	繊維形状保持 ファイバー表面荒れ	—
比較例4	—	良好 (約440nm)	—

[0116] [表5]

(加熱処理→液体培地浸漬後の繊維形状及び繊維径)

温度	80℃	180℃	
時間	24時間	10分	30分
実施例4	良好 (約420nm)	—	良好 (約540nm)
比較例1	網目形状	網目形状	—
比較例2	網目形状	ファイバーはく離	—
比較例3	ファイバーはく離	ファイバーはく離	—

(ファイバーはく離；形成した繊維がアルミ箔からはく離し消失。)

[0117] 表3の結果より、実施例1～7及び比較例1～4の繊維製造用組成物を用い、電界紡糸法にて製造した繊維は、加熱処理のみを行った場合、NSuMA／HPMA組成比、高分子化合物の分子量及び高分子化合物の含有量、及び架橋剤の含有量にかかわらず良好な形状であった。

表4の結果より、実施例1～7の繊維製造用組成物を用いて製造した繊維は、加熱処理後、さらにエタノールに10秒間浸漬後においても良好な形状を示した。実施例7においては、良好な繊維形状を示したが、広範囲の繊維

径が観察された。さらに実施例 4 及び実施例 5 の結果より、加熱処理における加熱温度が 80℃であっても、良好な繊維形状を示した。

表 5 の結果より、実施例 4 の繊維製造用組成物を用いて製造した繊維は、細胞培養用液体培地に 7 日間浸漬後であっても、良好な繊維形状を示した。

つまり、本発明の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を製造する場合、良好な繊維形状を示し、且つ有機溶剤耐性及び培地耐性に優れた繊維とするためには、80℃以上で加熱処理することが望ましい。

また、上記条件にて電界紡糸を行なった場合、製造される繊維の繊維径は、成分 A の高分子化合物の重量平均分子量と、繊維製造用組成物における成分 A の高分子化合物の含有割合とに依存することが示唆された。従って、成分 A の高分子化合物の重量平均分子量、及び繊維製造用組成物における成分 A の高分子化合物の含有割合を調整することで、所望の繊維径の繊維を得ることが可能である。

[0118] <試験例 2：細胞培養評価 1>

実施例 1 及び比較例 4 の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸した後、得られた繊維上にて細胞培養評価を行った。なお、以下において、CO₂インキュベーターにおける CO₂ の濃度 (%) は、雰囲気中の CO₂ の体積%で示した。

[0119] [実施例 1 の繊維の製造]

実施例 1 の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸し、ガラス基板上に 20 分間吹付けた後、180℃30 分間加熱処理した。ガラス基板には、マイクロカバーガラス（マツナミガラス株式会社製）（Φ32mm、厚さ約 0.5mm）を使用した。得られた繊維をエタノールで洗浄して風乾した後、繊維形状を走査型電子顕微鏡（SEM）で確認した。実施例 1 の繊維製造用組成物から得られた繊維の繊維径は約 430nm であった。

尚、以下において、実施例 1 の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を形成したガラス基板を、便宜上「実施例 1 の繊維基板」と称する。

[0120] [比較例 4 の繊維の製造]

比較例4の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸し、ガラス基板上に20分間吹付けた後、180℃10分間加熱処理した。ガラス基板には、マイクロカバーガラス（マツナミガラス株式会社製）（Φ32mm、厚さ約0.5mm）を使用した。得られた繊維をエタノールで洗浄して風乾した後、繊維形状を走査型電子顕微鏡（SEM）で確認した。比較例4の繊維製造用組成物から得られた繊維の繊維径は約440nmであった。

尚、以下において、比較例4の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を形成したガラス基板を、便宜上「比較例4の繊維基板」と称する。

[0121] [細胞の調製]

細胞は、ヒト胎児腎細胞株HEK293（DSファーマバイオメディカル株式会社製）を用いた。細胞の培養に用いた培地は、10%（v/v）FBS及び1%（v/v）NEAA（Non-Essential Amino Acids）（GIBCO社製）を含むEMEM（Eagle's Minimum Essential Medium）培地（和光純薬工業株式会社製）を用いた。細胞は、37℃CO₂インキュベーター内にて5%二酸化炭素濃度を保った状態で、直径10cmシャーレ（培地10mL）を用いて2日間以上静置培養した。引き続き、本細胞をPBS10mLで洗浄した後、トリプシン-EDTA（エチレンジアミン四酢酸）溶液（和光純薬工業株式会社製）1mLを添加して細胞を剥がし、上記の培地10mLにて懸濁した。本懸濁液を遠心分離（株式会社トミー精工製、LC-200、1000rpm/3分、室温）後、上清を除き、上記の培地を添加して細胞懸濁液を調製した。なお、PBSはリン酸緩衝生理食塩水（シグマアルドリッチジャパン社製）を意味し、FBSは牛胎児血清（Biological Industries社製）を意味する。

[0122] [基材の滅菌]

6穴平底マイクロプレート（アズワン株式会社製）に、実施例1の繊維基板、比較例4の繊維基板、及び対照として未処理のガラス基板を配置し、70%エタノール2mLを添加し、室温で5分間浸漬した後、風乾した。

[0123] [細胞接着物質の固定化]

6穴平底マイクロプレートに、実施例1の繊維基板を配置し、70%エタノール2 mLを添加し、室温で5分間浸漬した。この溶液を除いて風乾した後、ラミニン521 (BioLamina株式会社製) / PBS溶液 (20 μ g / mL) を1ウェルあたり2 mL添加した。37°Cインキュベーターにて2時間静置しラミニンを固定化した後に溶液を除き、1ウェルあたり2 mLのPBSで2回洗浄した。

[0124] [細胞培養]

6穴平底マイクロプレートに、滅菌した実施例1の繊維基板、比較例4の繊維基板、未処理のガラス基板、及びラミニン521を固定化した実施例1の繊維基板を配置し、培地2 mLで2回洗浄した。その後、 2.0×10^5 cells / well に調製したHEK293 (ヒト胎児腎細胞) の細胞懸濁液を各2 mL加えた後、5%二酸化炭素濃度を保った状態で、37°Cで24時間CO₂インキュベーター内にて静置した。

[0125] [WST-8を用いた細胞数計測]

24時間の細胞培養の後、各繊維基板、及び未処理のガラス基板 (対照) の上清を除き、PBS 2 mLで洗浄した。PBSを除いた後、10% (v / v) FBS及び1% (v / v) NEAA (GIBCO社製) を含むEMEM培地を1 mL添加し、さらに100 μ LのWST-8試薬 (キシダ化学株式会社製) を添加した。37°Cで100分CO₂インキュベーター内にて静置した後、反応溶液100 μ Lを96穴平底マイクロプレートに移し、吸光度計 (モレキュラーデバイス社製、SpectraMax) にて450 nmの吸光度を測定した。

[0126] 各細胞数計測の結果 (n = 2の平均値) を表6に示す。

[0127]

[表6]

	吸光度 (450 nm) (WST-8)
ラミニン521を固定化した 実施例1の繊維基板	0.31
実施例1の繊維基板	0.18
比較例4の繊維基板	0.14
ガラス基板	0.16

[0128] 表6の結果から、180℃で加熱した実施例1の繊維基板上でHEK293細胞が増殖することが分かり、実施例1の繊維製造用組成物を用いて製造した繊維は、生体に対して無害であることが示された。また、ラミニン521を固定化した実施例1の繊維基板上で細胞増殖率が約2倍向上した。これより、本発明の繊維に細胞培養に有効な物質を固定化することで、細胞増殖性が向上することがわかった。

[0129] <試験例3：細胞培養評価2>

実施例5の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸した後、得られた繊維上にて細胞培養評価を行った。なお、細胞培養方法は、試験例2に準じて行った。

[0130] [実施例5の繊維の製造]

実施例5の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸し、Φ30mmポリスチレン（PS）基板上に20分間吹付けた後、80℃24時間加熱処理した。Φ30mmPS基板は、アクリサンデー株式会社製「プラバン」（商品名；厚さ0.2mm）から自作した。得られた繊維をエタノールで洗浄して風乾した後、繊維形状を走査型電子顕微鏡（SEM）で確認した。実施例5の繊維製造用組成物から得られた繊維の繊維径は約470nmであった。

尚、以下において、実施例5の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を形成したPS基板を、便宜上「実施例5の繊維基板」と称する。

[0131] [細胞接着物質の固定化]

6穴平底マイクロプレートに、実施例5の繊維基板を配置し、YIGSRペプチド（株式会社ベックス社製）／PBS溶液（0.05重量％）を1ウ

エルあたり 2 mL 添加した。室温 24 時間静置してペプチドを固定化した後に溶液を除き、1 ウェルあたり 2 mL の PBS で 2 回洗浄した。

[0132] [基材の滅菌]

6 穴平底マイクロプレート（アズワン株式会社製）に、実施例 5 の繊維基板、ペプチドを固定化した実施例 5 の繊維基板、及び対照として未処理の PS 基板を配置し、70%エタノール 2 mL を添加し、室温で 5 分間浸漬した後、風乾した。

[0133] [細胞培養]

6 穴平底マイクロプレートに、滅菌した実施例 5 の繊維基板、ペプチドを固定化した実施例 5 の繊維基板、及び対照として未処理の PS 基板を配置し、培地 2 mL で 2 回洗浄した。その後、 $2.0 \times 10^5 \text{ cells/well}$ に調製した HEK293（ヒト胎児腎細胞）の細胞懸濁液を各 2 mL 加えた後、5%二酸化炭素濃度を保った状態で、37℃で 24 時間 CO₂ インキュベーター内にて静置した。

[0134] [WST-8 を用いた細胞数計測]

24 時間の細胞培養の後、細胞培養を行った実施例 5 の繊維基板、ペプチドを固定化した実施例 5 の繊維基板、及び未処理の PS 基板（対照）の上清を除き、PBS 2 mL で洗浄した。PBS を除いた後、10%（v/v）FBS 及び 1%（v/v）NEAA（GIBCO 社製）を含む MEM 培地を 1 mL 添加し、さらに 100 μ L の WST-8 試薬（キシダ化学株式会社製）を添加した。37℃で 100 分 CO₂ インキュベーター内にて静置した後、反応溶液 100 μ L を 96 穴平底マイクロプレートに移し、吸光度計（モレキュラーデバイス社製、SpectraMax）にて 450 nm の吸光度を測定した。

[0135] 各細胞数計測の結果（n = 2 の平均値）を表 7 に示す。

[0136]

[表7]

	吸光度 (450 nm) (WST-8)
ペプチドを固定化した 実施例5の繊維基板	0.40
実施例5の繊維基板	0.25
P S 基板	0.10

[0137] 表7の結果から、未処理のP S基板上と比較して、実施例5の繊維基板上ではH e k 2 9 3細胞が2.5倍多く増殖した。さらに、ペプチドを固定化した実施例5の繊維基板上では4.0倍多く増殖した。これより、本発明の繊維は細胞増殖性を有すること、及び細胞培養に有効な物質を本発明の繊維に固定化することで、細胞増殖性が向上することが分かった。

[0138] <試験例4：細胞培養評価3>

実施例4及び比較例4の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸した後、得られた繊維上にて細胞培養評価を行った。なお、以下において、C O₂インキュベーターにおけるC O₂の濃度(%)は、雰囲気中のC O₂の体積%で示した。

[0139] [実施例4の繊維の製造]

実施例4の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸し、ガラス基板上に20分間吹付けた後、180℃30分間加熱処理した。ガラス基板には、マイクロカバーガラス(マツナミガラス株式会社製)(Φ32mm、厚さ約0.5mm)を使用した。得られた繊維をエタノールで洗浄して風乾した後、繊維形状を走査型電子顕微鏡(SEM)で確認した。実施例4の繊維製造用組成物から得られた繊維の繊維径は約450nmであった。

尚、以下において、実施例4の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を形成したガラス基板を、便宜上「実施例4の繊維基板」と称する。

[0140] [比較例4の繊維の製造]

比較例4の繊維製造用組成物を電界紡糸法により紡糸し、ガラス基板上に20分間吹付けた後、180℃10分間加熱処理した。ガラス基板には、マ

イクロカバーガラス（マツナミガラス株式会社製）（Φ 32 mm、厚さ約 0.5 mm）を使用した。得られた繊維をエタノールで洗浄して風乾した後、繊維形状を走査型電子顕微鏡（SEM）で確認した。比較例 4 の繊維製造用組成物から得られた繊維の繊維径は約 440 nm であった。

尚、以下において、比較例 4 の繊維製造用組成物を紡糸して繊維を形成したガラス基板を、便宜上「比較例 4 の繊維基板」と称する。

[0141] [細胞の調製]

マウス繊維芽細胞（MEF；日本 SLC 社製 E12.5 ICR マウスから採取・調整）またはマトリゲル ヒト ESC-qualified matrix（Corning 製）上で培養したヒト ES 細胞（H9 株）またはヒト iPS 細胞（253G1 株）を D-PBS（-）（Life technologies 製）にて 2 回洗浄した後、TrypLE Express 1 mL を加えて 37℃ で 5 分間静置した。TrypLE Express を吸引除去した後、最終濃度 10 μM の Y-27632（和光純薬株式会社製）を含む mTeSR1（株式会社ベリタス製）（以下、mTeSR1 / 10 μM Y27632）培地で細胞を回収した。細胞懸濁液をピペティングにてシングルセルにした後、回転数 1000 rpm / 3 分間、室温で遠心分離を行った。上清を除去した後、細胞ペレットを mTeSR1 / 10 μM Y27632 培地に再度懸濁し、NucleoCounter NC-200（以下、NC-200；ChemoMetec AS 製）にて細胞数を計測した。

[0142] [基材の滅菌]

6 穴平底マイクロプレート（BD Bioscience 社製）に、実施例 4 の繊維基板、及び比較例 4 の繊維基板を配置し、100% エタノール 1 mL にて 3 回洗浄した後、風乾した。その後、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12（DMEM / F-12；Sigma Aldrich 製）溶液 1 mL にて 3 回洗浄した。

[0143] [細胞接着物質の固定化]

6穴平底マイクロプレート（BD Bioscience社製）に、実施例4の繊維基板、及び未処理のガラス基板を配置し、100%エタノール1 mLにて3回洗浄し、風乾後、D-PBS（－）またはDMEM/F-12溶液1 mLにて3回洗浄した。実施例4の繊維基板には、D-PBS（－）によって最終濃度100 μ g/10 mLに調製したラミニン511（BioLamina製）溶液を1 mL添加し、37℃2時間または4℃一晩静置後、DMEM/F-12溶液1 mLにて1回洗浄した。ガラス基板には、DMEM/F-12にて75倍で希釈したマトリゲル溶液を1 mL添加し、37℃2時間または4℃一晩静置後、DMEM/F-12溶液1 mLにて1回洗浄した。

[0144] [細胞培養]

6穴平底マイクロプレート（BD Bioscience社製）に、滅菌した実施例4の繊維基板、滅菌した比較例4の繊維基板、ラミニン511を固定化した実施例4の繊維基板、及びマトリゲル（コーニング社製）をコートしたガラス基板を配置した後、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞の懸濁液を1.5～2.0 $\times 10^5$ cells/wellとなるように添加した。37℃24時間後（培養1日目）、mTeSR1/10 μ M Y27632培地1.5 mLにて培地交換を行った。培養2日目から培養4日目は、mTeSR1培地1.5 mLにて培地交換を行った。培養期間中は、5%二酸化炭素濃度を保った状態で、37℃でCO₂インキュベーター内にて静置した。

[0145] [細胞数の計測]

培養4日後、培地を除去し、D-PBS（－）で細胞層を洗浄した。その後、TrypLE Express 0.5 mLを添加し、37℃1分間または3分間静置した。細胞を回収した後、回転数1000 rpm/3分間遠心分離し、上清を除去した。細胞ペレットをDMEM/F-12溶液にて再度懸濁した後、NC-200にて細胞数と生存率を計測した。細胞増殖効率は、培養4日目の細胞数/播種した細胞数より算出した。

[0146] 各細胞の増殖効率の結果（ $n = 2$ の平均値）を表8（ヒトES細胞）及び表9（ヒトiPS細胞）に示す。

[0147] [表8]

	ヒトES細胞増殖効率	ヒトES細胞生存率 (%)
ラミニン511を固定化した 実施例4の繊維基板	6.65	95.3
実施例4の繊維基板	2.87	93.3
比較例4の繊維基板	0.38	90.7
マトリゲルをコートした ガラス基板	7.20	95.1

[0148] [表9]

	ヒト i P S 細胞増殖効率	ヒト i P S 細胞生存率 (%)
ラミニン 511 を固定化した 実施例 4 の繊維基板	3.87	88.0
実施例 4 の繊維基板	0.10	83.3
比較例 4 の繊維基板	検出不可	検出不可
マトリゲルをコートした ガラス基板	4.18	68.8

[0149] 表 8 及び表 9 の結果から、実施例 4 の繊維基板は、比較例 4 の繊維基板より、ヒト E S 細胞及びヒト i P S 細胞の培養に有効であることがわかった。

また、ラミニン 5 1 1 を固定化した実施例 4 の繊維基板における細胞増殖率・BR>へ、マトリゲルをコートしたガラス基板における細胞増殖率と同程度であることがわかり、繊維基板に細胞接着物質を固定化することは、細胞培養に効果的であることがわかった。

さらに、表 9 のヒト i P S 細胞生存率の結果から、ラミニン 5 1 1 を固定化した実施例 4 の繊維基板、及び実施例 4 の繊維基板の細胞生存率は、マトリゲルをコートしたガラス基板より約 2 0 % 高かった。この結果より、細胞培養には本発明の繊維が有効であることがわかった。

産業上の利用可能性

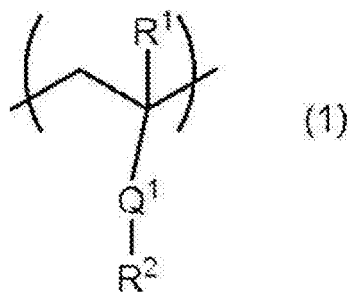
[0150] 本発明によれば、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化するために好適であり、さらに有機溶剤耐性を保持する繊維製造のための繊維製造用組成物、該組成物を紡糸して得られる繊維、及び該繊維を用いた細胞培養足場材料を提供できる。かかる繊維は、細胞の接着・増殖・分化などに有効な物質を固定化することより、細胞培養足場材料としてより優れた機能を発現する。

[0151] 本出願は、日本で出願された特願2014-027044（出願日：2014年2月14日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] (A) 一般式 (1) で表される単位構造及び一般式 (2) で表される単位構造を含む高分子化合物、
- (B) 架橋剤、
- (C) 酸化合物、及び
- (D) 溶剤
- を含有する繊維製造用組成物。

[化1]

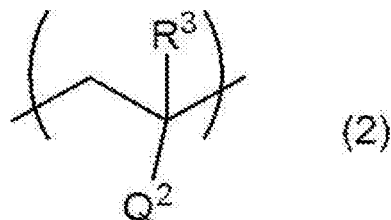


〔式中、

R¹は、水素原子又はメチル基を示し、Q¹は、エステル結合又はアミド結合を示し、

R²は、少なくとも1個の水素原子がヒドロキシ基で置換されている炭素原子数1～10のアルキル基又は炭素原子数6～10の芳香族炭化水素基を示す。〕

[化2]

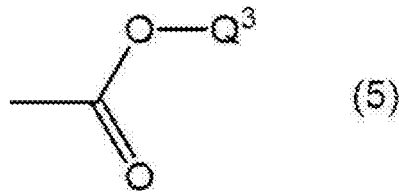


〔式中、

R³は、水素原子又はメチル基を示し、Q²は、活性エステル基を示す。〕

- [請求項2] 上記Q²が、一般式 (5) で表される、請求項1に記載の組成物。

[化3]



〔式中、 Q^3 は、N-スクシンイミド基、p-ニトロフェニル基又はペンタフルオロフェニル基を示す。〕

[請求項3] 上記高分子化合物の重量平均分子量が、1,000～1,000,000である、請求項1又は2に記載の組成物。

[請求項4] 上記溶剤が、極性溶剤である、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

[請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物を紡糸する工程を含む、繊維の製造方法。

[請求項6] 上記紡糸が、電界紡糸である、請求項5記載の方法。

[請求項7] 紡糸した繊維を、70～300℃の範囲で加熱する工程を含む、請求項5又は6記載の方法。

[請求項8] さらに細胞接着物質を固定化する工程を含む、請求項5～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 請求項5～8のいずれか1項に記載の方法で製造される繊維。

[請求項10] 請求項9記載の繊維を含む、細胞培養足場材料。