

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年12月15日(15.12.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/155243 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/056638
- (22) 国際出願日: 2011年3月18日(18.03.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-130299 2010年6月7日(07.06.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人山形大学(YAMAGATA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9908560 山形県山形市小白川町一丁目4-1-2 Yamagata (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鶴沼 英郎 (UNUMA, Hidero) [JP/JP]; 〒9928510 山形県米沢市城南4丁目3-1-6 国立大学法人山形大学大学院理工学研究科内 Yamagata (JP). 川井 貴裕 (KAWAI, Takahiro) [JP/JP]; 〒9928510 山形県米沢市城南4丁目3-1-6 国立大学法人山形大学大学院理工学研究科内 Yamagata (JP). 古澤利武 (FURUSAWA, Toshitake) [JP/JP]; 〒9820001 宮城県仙台市太白区八本松1-7-4-2 古澤歯科医院内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 笹島 富二雄, 外 (SASAJIMA, Fujio et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2-1-3-5 赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))



WO 2011/155243 A1

(54) Title: MEMBRANE FOR INDUCTION OF REGENERATION OF BONE/TISSUE

(54) 発明の名称: 骨・組織再生誘導用メンブレン

(57) Abstract: Disclosed is a membrane for inducing the regeneration of a bone/tissue, which can assist in the formation of a bone and can be removed easily after the formation of the bone. Specifically disclosed are: a membrane for inducing the regeneration of a bone/tissue, which comprises a hydrophilized polyester or polyamide film that serves as a base, a collagen layer that is formed on both surfaces or one surface of the film and comprises a collagen or a thermally modified collagen, and a calcium phosphate layer that is superposed on the collagen layer; and a process for producing the membrane.

(57) 要約: 骨形成を助け、骨形成後の摘出が容易な骨・組織再生誘導用メンブレンを提供する。基材となるポリエステルまたはポリアミドの親水化フィルムと、該フィルムの両面または片面に設けたコラーゲンまたは熱変性コラーゲンからなるコラーゲン層と、該コラーゲン層の上に被せたリン酸カルシウム層とを含んでなる骨・組織再生誘導用メンブレンとその製造方法。

明 細 書

発明の名称：骨・組織再生誘導用メンブレン

技術分野

[0001] 本発明は、歯科あるいは外科分野において用いられる骨・組織再生関連材料に関し、特に、骨・組織再生誘導用メンブレンとその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 形成外科分野における外傷や疾病による骨欠損部の再生、歯科における歯周病により失われた組織の再生、歯科インプラント治療におけるインプラント埋入部位の骨の増量は、それぞれの分野において重要な課題である。一般的に、骨再生を望んでも、骨よりもその周囲の上皮組織または粘膜の方が成長のスピードが速いため、骨を再生または増量しようとする部位が肉組織で覆われてしまい、骨再生が難しい。そこで、遮蔽用のメンブレンを利用して骨再生を促す技術が開発されている。

[0003] 歯科の分野では、中等度以上の歯周病で失われた組織や骨を元通りに戻す歯周組織再生治療がある。歯周病が進行すると、歯の周りの骨と歯根膜という歯根の周りの組織が破壊されるが、この歯根膜組織と骨を再生する治療がある。その方法としては、メンブレンを使用するGTR法(Guided Tissue Regeneration)や、メンブレンを用いて骨再生のスペースを作り、その中に移植骨、骨代替材等の誘導因子などを封入して、骨を再生させるGBR法(Guided Bone Regeneration)がある。GBR法においては、自己由来の海綿骨もしくは皮質骨、異種または同種の骨移植片、ヒドロキシアパタイト又はリン酸三カルシウムの顆粒、サンゴ、コラーゲンのような天然ポリマー、骨形態形成タンパク質のような骨誘導タンパク質などが用いられる。

[0004] このようなメンブレンとしては、非吸収性メンブレンと吸収性メンブレンの2種類が知られている。非吸収性メンブレンとしては、生体とのなじみがよく変形が容易なチタンのメッシュや、延伸加工したポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)が知られている。このタイプのメンブレンは、骨生成が完了

したあと、手術により除去する必要がある。そして、吸収性メンブレンとしては、乳酸とグリコール酸の共重合体やコラーゲンなどが使用される。このタイプのメンブレンは、ある程度の時間がたつと生体内で分解されて吸収されるので、除去手術の必要がない一方、組織再生の状況のコントロールと確認が困難である。最近では、特許文献1にあるような、生体吸収性のコラーゲンメンブレンとハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）との2層あるいは、それにさらに治癒促進用の濃縮血小板ゲルを重ねたものも知られており、非特許文献1にあるようなハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）、コラーゲン、ポリ乳酸などからなる吸収性の三層膜が知られている。

- [0005] 非吸収性メンブレンは、骨再生完了後に周辺組織と不必要な癒着を起こすことなく、患部からスムーズに摘出できることが求められているが、上記のチタンメッシュでは、メッシュのわずかな間隙にも骨が貫入し、骨再生後のチタンメッシュの摘出が困難になる場合がある。特許文献1に記載されているハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）及びコラーゲンからなる2層のメンブレン、又は非特許文献1に記載されているハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）、コラーゲン及びポリ乳酸からなる3層のメンブレンでは、体内での吸収が骨形成よりも速いために、上皮の侵入を許してしまい、歯槽骨が最初のメンブレンの埋入位置まで再生できないという問題がある。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開2007-160011号公報

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：亘理文夫ら、傾斜機能材料論文集 vol. 20 (2006), 35-40「骨組織再生用傾斜機能型GTR膜の試作」

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、骨形成を助け、骨形成後の摘出が容易な骨・組織再生誘導用メ

ンブレンを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明の骨・組織再生誘導用メンブレンは、ポリエステルまたはポリアミドの親水化フィルムの基材と、該フィルムの両面または片面に設けたコラーゲンまたは熱変性コラーゲンからなるコラーゲン層と、該コラーゲン層の上に被せたリン酸カルシウム層とを含んでなる。
- [0010] 本発明の骨・組織再生誘導用メンブレンの製造方法は、ポリエステルまたはポリアミドの親水化フィルムへコラーゲンまたは熱変性コラーゲンを固定してコラーゲン層を生成する第一固定化工程と、コラーゲン層の上にリン酸カルシウム層を置く積層工程とを含んでなる。
- [0011] ポリエステルとは、一般に、多価カルボン酸（ジカルボン酸）とポリアルコール（ジオール）との重縮合体をいう。ポリアルコール（アルコール性の基-OHを複数有する化合物）と、多価カルボン酸（カルボキシル基-COOHを複数有する化合物）を反応（脱水縮合）させて作ることを基本とするものである。ポリエチレンテレフタレート（PET）、ポリエチレンナフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリトリメチレンテレフタレート、ポリブチレンナフタレートなどがあるが、中でも最も多く生産されているものはテレフタル酸とエチレングリコールから製造されるポリエチレンテレフタレートである。ポリエステル以外の材料としては、ナイロンや、アラミドのようなポリアミドを使用することができる。ポリアミドは、モノマー内にアミド基を持つポリマーの総称である。ポリエステルもポリアミドも、下に記す親水化処理を施すことによって、コラーゲンとの固定化に必要なカルボキシル基を提供することができるからである。
- [0012] ここで使用できるコラーゲンまたは熱変性コラーゲン（ゼラチンなど）としては、ウシ、ブタまたは魚類由来のI型、II型またはIII型のアテロコラーゲンといったタイプのものがある。このコラーゲンは、コラーゲンペプチドといったポリペプチドで代替でき、本願においては、コラーゲンという用語は、このようなポリペプチドを包含する広い意味で使用する。このコラーゲン

は、リン酸カルシウム層とポリエステル接着の役割を果たすとともに、骨芽細胞に対しては増殖のための環境形成の助けになることが知られている。

[0013] また、リン酸カルシウムは、カルシウムイオンとリン酸基 (PO_4^{3-}) またはピロリン酸基 ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) からなる物質である。水素やヒドロキシ基を持つこともある。骨の約70%は、リン酸カルシウム系のセラミックスの一種であるヒドロキシアパタイト (水酸アパタイト) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) からできている。リン酸の持つ三個の水素原子(H)とカルシウムがそれぞれ置換されて、次の三種類の異なったリン酸塩となる。水素原子一個がカルシウムと置き換った場合には、第一リン酸カルシウム $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ となり、水素原子二個がカルシウムと置き換った場合には、第二リン酸カルシウム CaHPO_4 、水素原子三個がカルシウムと置き換ると第三リン酸カルシウム $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ となる。

発明の効果

[0014] 本発明の骨・組織再生誘導用メンブレンによれば、順調な骨組織の成長が期待できるとともに、骨形成後の摘出が容易である。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]本発明の一実施形態のメンブレンとそれ以外のメンブレンを用いた場合と、メンブレンを用いなかった場合とを比較したラット頭蓋骨欠損部のマイクロCT写真を示す。

[図2]本発明の一実施形態のメンブレンとそれ以外のメンブレンを用いた場合を比較したメンブレン埋入部分の組織切片画像を示す。

発明を実施するための形態

[0016] 本発明の一つの実施形態を下記に説明する。この実施形態のメンブレンは、(1) 基材となるポリエステルまたはポリアミドのフィルムの表面の親水化と、(2) フィルム表面へのコラーゲンの固定化と、(3) フィルム上に固定されたコラーゲンへのウレアーゼの固定化と、(4) このコラーゲンの表面上へのリン酸カルシウムの析出との4工程により製造することができる。

- [0017] まず、10～300 μm 程度の厚さ、好ましくは20～100 μm の厚さのポリエステルまたはポリアミドのフィルムを0.1～10 mol/L のアルカリ性水溶液（水酸化ナトリウムなど）に浸し、60～100 $^{\circ}\text{C}$ の温度で15分～6時間程度保持する。これにより、ポリエステルフィルムの表面が加水分解し、ヒドロキシ基（ $-\text{OH}$ ）とカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）が表面に現れる。なお、ポリエステルまたはポリアミドのフィルムの厚さは、フィルム自体の剛性、骨欠損部の大きさ、外部組織からの応力を支えるために求められる剛性、取り扱いやすさといった要素を検討して決めるべきものである。あまり薄いと外部組織からの応力を支えきれずに骨形成のための空間を維持することができなくなるし、あまり厚いと摘出の際の切開部を大きくしなければならなくなる。親水化には、電子線処理、酸溶液処理、酸化剤処理、親水性官能基のグラフト処理、シランカップリング処理、陽極酸化処理、粗面化処理など、アルカリ水溶液を用いるほかにもいくつかの方法が知られている。また、すでに親水化処理の済んだフィルム素材も販売されている。
- [0018] 次に、コラーゲンまたは熱変性コラーゲン（ゼラチンなど）を分散した水溶液に、カルボジイミドなどの架橋剤を溶かし、これに親水化フィルムを浸して、20～50 $^{\circ}\text{C}$ の温度で6～72時間保持する。この過程で、ポリエステル表面のカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ 基）とコラーゲンのアミノ基（ $-\text{NH}_2$ ）が脱水縮合し、ペプチド結合（ $-\text{CONH}-$ ）することによって、コラーゲンがポリエステル表面に固定化される。
- [0019] 次に、このコラーゲンが固定されたフィルムを、ウレアーゼとカルボジイミドを溶かした水溶液に入れ、20～50 $^{\circ}\text{C}$ の温度、好ましくは30～40 $^{\circ}\text{C}$ の温度で6～72時間保持する。この過程で、コラーゲンの表面のカルボキシル基またはアミノ基と、ウレアーゼのアミノ基またはカルボキシル基が脱水縮合し、コラーゲン表面にウレアーゼが固定化される。
- [0020] 最後に、このウレアーゼが固定されているコラーゲンの表面に、リン酸カルシウムを析出させる。すなわち、カルシウムイオン1～100 mmol/L

L、リン酸イオン $1\sim 100\text{mmol/L}$ 、尿素 $10\sim 100\text{mmol/L}$ を含む水溶液に。先の工程で準備されたウレアーゼを固定化したフィルムを浸し、 $20\sim 50^\circ\text{C}$ の温度で15分から24時間保持する。この過程で、ウレアーゼの作用により尿素がアンモニアに変わり、アンモニアはリン酸カルシウムをフィルムの表面に選択的に析出させる。その結果、フィルムの基体と、フィルムの上のリン酸カルシウムとの3層構造を有しているメンブレンを得ることができる。

[0021] 上記の過程では、ポリエステルフィルムの両面にコラーゲンとリン酸カルシウムが付着することになるが、片面だけに付着させたい場合には、予めポリエステルフィルムを2枚重ねておくか、1枚のポリエステルフィルムの1面を別のポリマーフィルムで覆っておくなどして、上記の工程が終了後に重なったフィルムを剥がせばよい。

[0022] その結果得られるメンブレンは、コラーゲンの層の厚さが、一般的に、約 $1\sim 100\mu\text{m}$ であり、約 $5\sim 20\mu\text{m}$ であることが好ましい。リン酸カルシウムの層の厚さは、一般的に、約 $1\sim 100\mu\text{m}$ であり、約 $20\sim 70\mu\text{m}$ であるのが好ましい。コラーゲン層の厚さが $1\mu\text{m}$ より薄いと、リン酸カルシウム層の接着性に劣るといった問題があり、 $100\mu\text{m}$ より厚いとコラーゲン層自体が剥がれやすいという問題が生じる。また、リン酸カルシウム層の厚さは、 $1\mu\text{m}$ より薄いと、骨組織の成長を促す効果に乏しくなり好ましくなく、 $100\mu\text{m}$ より厚いとコラーゲン層から剥がれやすくなるので好ましくない。このようなコラーゲン層およびリン酸カルシウム層の厚さには幅があってもよく、からならずしも高い均一性が求められるものではなく、ある程度のムラがあってもかまわない。

[0023] また、ポリエステルに固定したコラーゲン上にリン酸カルシウムを析出させる方法としては、ウレアーゼを用いる方法以外にも、少なくともカルシウムまたはリン酸のイオンを含む溶液で基材を処理し、溶液が付着した基材を水を含む媒体で処理し乾燥させ、水処理後のいずれかのイオンを吸着した基材を少なくともリンまたはカルシウムを含む溶液で処理して、水を含む媒体

で基材を処理し乾燥させる方法(特許文献2)や、その表面が親水性を有する基材表面にリン酸カルシウムからなるアパタイト核形成剤が固定化されてなる基材とリン酸カルシウム過飽和溶液を接触させるアパタイト複合体の製造方法(特許文献3)などを利用することができる。

[0024] 特許文献2：特開2005-112716号公報

特許文献3：特開2005-111255号公報

[0025] この別法においては、親水性を有するコラーゲンの表面にリン酸カルシウムからなるアパタイト核形成剤を固定化する。コラーゲンの表面にアパタイト核形成剤を固定化するには、次の工程を組み合わせる方法が好ましい。すなわち、(イ)コラーゲン層を有するフィルムを、少なくともカルシウムを含む溶液で処理する工程と、(ロ)カルシウム溶液が付着したフィルムを、水を含む媒体で処理し乾燥する工程と、(ハ)水処理後のカルシウムイオン吸着フィルムを、少なくともリンを含む溶液で処理する工程と、(ニ)リン溶液が付着したフィルムを、水を含む媒体で処理し乾燥する工程とからなる方法である。

[0026] (イ)の工程は、まず、コラーゲンの表面にカルシウムイオンを吸着させることを主眼としたものであり、通常、 CaCl_2 水溶液などのカルシウムイオンを含む溶液にフィルムを浸漬することにより行われる。浸漬時間は通常1秒～100分好ましくは10～60秒である。また基材の引き上げ速度は、通常1～100cm/分、好ましくは15～60cm/分である。カルシウムイオンの濃度は特に限定されないが、通常1～1000mM、好ましくは100～500mM、さらに好ましくは200～250mMである。

[0027] (ロ)の工程は、(イ)の工程でコラーゲンの表面に付着したカルシウム溶液を表面から除くことを主眼としたものである。この工程により、水素結合等により吸着したカルシウムイオンが、表面に選択的に残存するようになる。この水処理工程を欠くと、アパタイト核形成剤が厚く形成されてしまうので、その上に設けられるアパタイト層とコラーゲン層との接着強度が弱くなるだけでなく、リン酸カルシウム以外の結晶も多量に析出してしまう。(

ロ) の工程は通常、水を含む媒体中に、カルシウム溶液が付着したフィルムを浸漬することにより行われる。浸漬時間は通常 1～60 秒、好ましくは 1～5 秒である。またフィルムの引き上げ速度は、通常 1～100 cm/分、好ましくは 15～60 cm/分である。乾燥時間は、通常 10 秒～60 分、好ましくは 1～10 分である。

[0028] (ハ) の工程は、前記 (ロ) の工程で得られたコラーゲンの表面に吸着したカルシウムイオンとリン酸イオンを反応させて、リン酸カルシウムからなるアパタイト核形成剤を得ることを主眼としたものである。浸漬時間は通常 1 秒～100 分好ましくは 10～60 秒である。またフィルムの引き上げ速度は、通常 1～100 cm/分、好ましくは 15～60 cm/分である。リン酸イオンの濃度は特に限定されないが、通常 1～1000 mM、好ましくは 100～500 mM、さらに好ましくは 200～250 mM である。

[0029] (ニ) の工程は通常、水を含む媒体中に、リン溶液が付着したフィルムを浸漬することにより行われる。浸漬時間は通常 1～60 秒、好ましくは 1～5 秒である。またフィルムの引き上げ速度は、通常 1～100 cm/分、好ましくは 15～60 cm/分である。乾燥時間は、通常 10 秒～60 分、好ましくは 1～10 分である。この工程により、表面にアパタイト核形成剤が固定化される。

[0030] この場合、カルシウム溶液とリン溶液への浸漬順序は上記のような態様に特に限定されるものではなく、カルシウム溶液とリン溶液への浸漬の順番を下記のごとく変更し、アパタイト核形成剤の固定化手段として、次の工程をとっても良い。すなわち、(イ) 少なくともリンを含む溶液で処理する工程と、(ロ) 水を含む媒体で処理し乾燥する工程と、(ハ) 少なくともカルシウムを含む溶液で処理する工程と、(ニ) 水を含む媒体で処理し乾燥する工程とからなる方法である。

[0031] 通常、前記 (イ) → (ロ) → (ハ) → (ニ) の工程順により行われるが、アパタイト核形成剤の導入量を多くし、また親水性の十分高くない基材表面にも確実に、かつ基材の表面全面にアパタイト核形成剤を固定化するために

は、工程（イ）～（二）の浸漬工程を、（イ）→（ロ）→（ハ）→（ニ）→（イ）→（ロ）・・・の如く所定回数繰り返せばよい。ただし、繰り返す回数を多くすると、基材と、その表面に形成されるアパタイト層の間の接着強度が低くなってしまうので、繰り返す回数は通常1回以上、4回以内とするのが好ましい。

[0032] [実験例]

以下に、本発明のメンブレンを用いて、ラット頭蓋骨の骨誘導再生を行った実験例を記す。ポリエステルフィルム基材にはPETフィルムを用いた。PETフィルムは、東洋紡績株式会社製の厚さ50 μ mの製品を用いた（製品名A4100）。このPETフィルムを25mm \times 50mmの大きさに切り取ったものを3.0m ϕ 1/Lの濃度の水酸化ナトリウム水溶液に浸し、約70 $^{\circ}$ Cの温度で3時間程度保持して親水化を行った。また、コラーゲンは、株式会社高研製のウシ真皮由来アテロコラーゲン溶液I-PC 50（5mg/mL）を用いた。このコラーゲン溶液2mLに純水48mLと再構成用緩衝溶液5mL（炭酸水素ナトリウム50mmol/L、水酸化ナトリウム260mmol/L、HEPES 200mmol/Lを含むもの）を加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間保持してコラーゲンをゲル化（フィブリル化）させた。このゲルをホモジナイザーでせん断して分散させたものを遠心分離で取り出し、pH5.8のリン酸緩衝溶液で2回洗浄した。洗浄後のコラーゲンフィブリルをpH5.8のリン酸緩衝溶液50mLに入れて分散させ、コラーゲンフィブリル濃度10mg/50mLの濃度にした水溶液に、カルボジイミドを0.150g加え、これに親水化ポリエステルを浸して、約37 $^{\circ}$ Cの温度で18時間保持して、コラーゲンをPETフィルムに固定した。さらに、ウレアーゼは、関東化学株式会社の製品（タチナタ豆由来、5000U/g）を用いた。このウレアーゼ0.030gとカルボジイミド0.150gをpH5.8のリン酸緩衝溶液50mLに溶かした水溶液に、コラーゲンを固定化したPETフィルムを入れ、約37 $^{\circ}$ Cの温度で24時間保持した。そして、リン酸カルシウムを析出させるために、硝酸カルシウム四水和物10.0mmol/L、リン酸二水素アンモニウム6.0mmol/L、尿素10.0mmol/Lを含む水溶液に、先の工程で準備されたウレアーゼを固定化したPETフィルムを浸し、約37 $^{\circ}$ Cの温度で1時間保

持した。その結果、コラーゲンの層の厚さは、約 $10\mu\text{m}$ 、ハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）の層の厚さは、約 $30\mu\text{m}$ であった。以下、colはコラーゲン、HAはリン酸カルシウムの一種のハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）を表す。

[0033] 8週齢Wister系ラット雄の頭頂部に、硬膜を傷つけないように直径5mmの骨欠損を形成し、メンブレンなし（第1群）、未処理PETフィルム（PETフィルム単独）（第2群）、PETフィルムをコラーゲンで被覆したもの（第3群、PET-col被覆）、PETフィルムをコラーゲンとハイドロキシアパタイト（水酸アパタイト）で被覆したもの（第4群、PET-col-HA被覆）の各群に3匹ずつ使用した。メンブレンで骨欠損部分を覆い、その上で、開口部を縫合し、メンブレンが完全に頭皮の下にある状態で経過を観察した。メンブレンで覆われた骨欠損部は、血餅で満たされていた。メンブレンを埋入してから1週間後に摘出し、マイクロCTにより骨欠損部を観察し、組織切片の観察を行った。図1にその結果を示す。なお、いずれの例でも、被覆がある場合は、その被覆はPETフィルムの両面に行った。

[0034] 図1には、ラット頭蓋骨欠損部のマイクロCT写真を示す。それぞれ、（A）が第1群、（B）第2群、（C）第3群、（D）第4群である。図中の波線は、天然骨と骨欠損部との境界線である。第1群と第2群（図1（A）、（B））では、境界線が明確であり、骨形成はほとんど進行していないことがわかる。これに対して第3群と第4群（図1（C）、（D））では、欠損部に向かって新生骨が成長している様子が観察される。またメンブレン摘出の際、第3群には骨膜が強固に付着していたが、第4群には骨膜の付着がなく、滑らかに摘出することができた。このメンブレン摘出の容易性は特筆すべきであり、メンブレンの一端あるいは一部をつまんで、小さな開口からメンブレンを容易に引き出すことができる。そのため、メンブレンを摘出する際の切開の大きさを限定することができ、患者の身体への侵襲を最小化することができる。第3群の摘出の容易性は劣っていたが、これは、コラーゲンが骨とも上皮組織などとも親和性が高いことが原因であると考えられる。

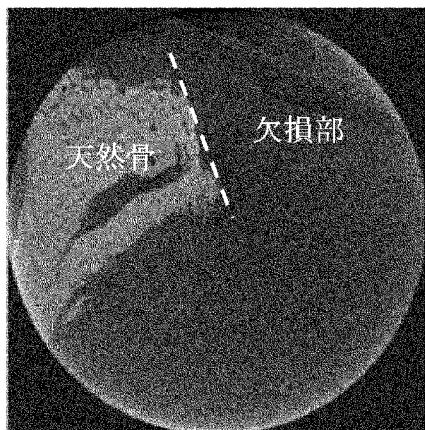
[0035] 本メンブレンが新生骨の形成を促進している様子は、メンブレンを摘出後、脱灰した組織の切片観察からも示された。図2にその結果を示す。図2には、メンブレン埋入部分の組織切片画像を示す。(A)は、第2群、(B)第3群、(C)第4群である。図中のAはメンブレンが埋入されていた領域を示し、Bは欠損部側、Cは骨膜側、Dはこの領域の小さな点は炎症を表す。Eは新生骨であり、Fはメンブレンから溶解したリン酸カルシウムと骨芽細胞、Gは新生血管である。

[0036] 未処理のPETメンブレンを使用した第2群(図2(A))では、新生骨の生成が見られず、骨膜中にはDのように炎症の痕跡が観察される。PET-colメンブレンを使用した第3群(図2(B))では、Eの部分に新生骨の形成が観察されるが、Dの付近に炎症が見られる。PET-col-HAメンブレンを使用した第4群(図2(C))では、Eの領域に厚く新生骨形成が認められ、炎症の痕跡がない。Fの領域は、メンブレンから溶解したリン酸カルシウムによって、骨芽細胞が旺盛に増殖していることを示している。さらにG付近には新生血管の形成が認められる。つまり、本発明のメンブレンは、生体内において、基材と骨表面に挟まれている部分においては、リン酸カルシウムの層が溶けず、メンブレン摘出の際のメンブレンの剥離性を高める一方、骨欠損部に接している部分では、リン酸カルシウムの層は溶解して、コラーゲンの作用と相まって、骨芽細胞の活性を高めることができる。以上の結果より、本発明のメンブレンの有効性が示されている。

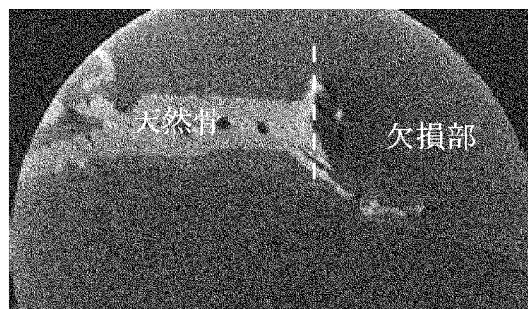
請求の範囲

- [請求項1] 基材となるポリエステルまたはポリアミドの親水化フィルムと、該フィルムの両面または片面に設けたコラーゲンまたは熱変性コラーゲンからなるコラーゲン層と、該コラーゲン層の上に被せたリン酸カルシウム層とを含んでなる骨・組織再生誘導用メンブレン。
- [請求項2] ポリエステルまたはポリアミドの親水化フィルムへコラーゲンまたは熱変性コラーゲンを固定してコラーゲン層を生成する第一固定化工程と、コラーゲン層の上にリン酸カルシウム層を置く積層工程とを含んでなる骨・組織再生誘導用メンブレンの製造方法。
- [請求項3] 前記積層工程が、該コラーゲン層へウレアーゼを固定する第2固定化工程と、ウレアーゼを固定化したコラーゲン層の上にリン酸カルシウムを析出させる析出工程とを含んでなる、請求項2に記載の骨・組織再生誘導用メンブレンの製造方法。
- [請求項4] 前記積層工程が、該コラーゲン層の表面にリン酸カルシウムからなるアパタイト核形成剤が固定化されてなる該コラーゲン層とリン酸カルシウム過飽和溶液を接触させることを含む、請求項2に記載の骨・組織再生誘導用メンブレンの製造方法。

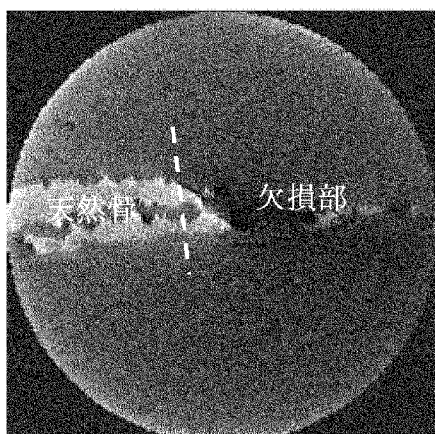
[图1]



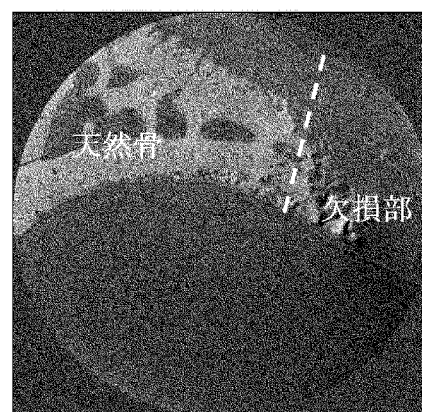
(A)



(B)

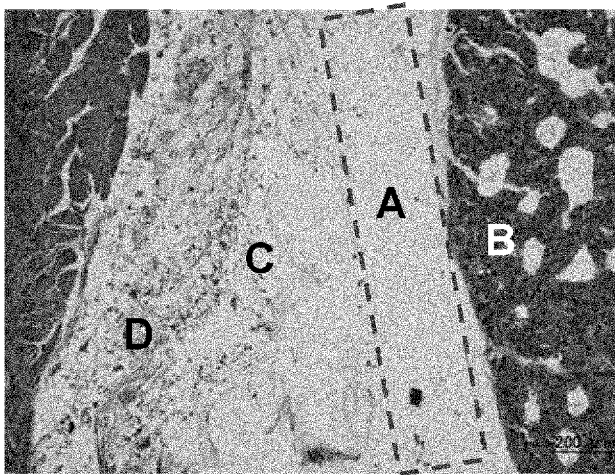


(C)

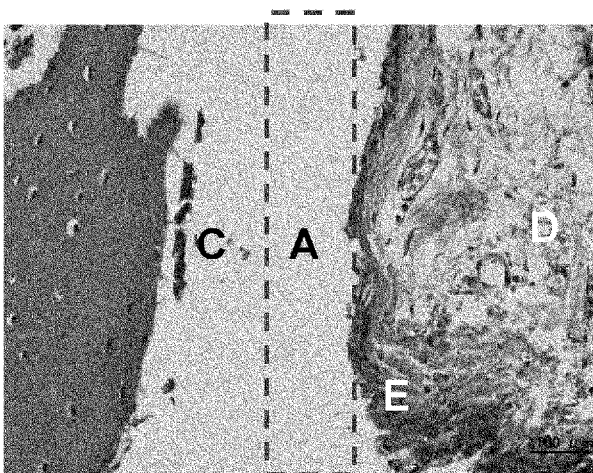


(D)

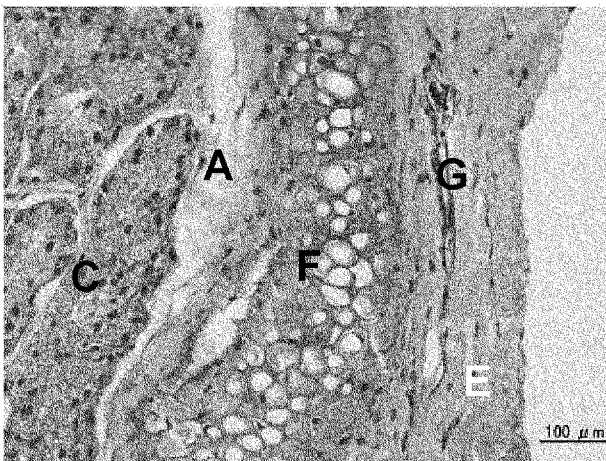
[圖2]



(A)



(B)



(C)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/056638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L27/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Noriko TANAKA et al., "PET/Collagen/	1-3
Y	Hydroxyapatite Membrane no Sakusei to Kotsuyudo Saiseiho eno Tekiyo", The Ceramic Society of Japan Nenkai Koen Yokoshu, 2010.03, vol.2010, page 288, column of '3E22'	4
Y	JP 2005-111255 A (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 28 April 2005 (28.04.2005), claims; paragraphs [0014], [0031]; example 3 (Family: none)	1-4
Y	Akihiro UMEZAWA, "Hone Saisei Keijo System no Kochiku", Igaku no Ayumi, 2004, vol.209, no.12, pages 964 to 967, page 965, column of 'Hone Keisei ni Okeru Ashiba', fig. 2	1, 2, 4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 May, 2011 (24.05.11)

Date of mailing of the international search report
07 June, 2011 (07.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/056638

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kyoko YOSHIDA et al., "Urease o Shokubai to shite Mochiita Titanium/Collagen/Apatite Fukugotai no Sakusei", The Ceramic Society of Japan Nenkai Koen Yokoshu, 2009, vol.2009, page 291, column of '3G12'	1-4
A	LIAO, S. et al., The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro, Dental Materials, 2007, Vol.23, pp.1120-1128	1-4
A	SUGANUMA, J. et al., In vivo evaluation of collagen-coated Dacron fiber in bone, Clinial Materials, 1994, Vol.15, pp.43-50	1-4
A	JP 2007-160011 A (Hidesato HARA), 28 June 2007 (28.06.2007), & US 2009/0004627 A1 & WO 2007/069785 A1 & DE 112006000064 T & KR 10-2007-0088477 A	1-4
A	JP 2000-327314 A (NOF Corp.), 28 November 2000 (28.11.2000), & US 2002/0127262 A1	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011年

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	田仲徳子 他, PET/コラーゲン/水酸アパタイトメンブレンの作製と骨誘導再生法への適用, 日本セラミックス協会年会講演予稿集,	1-3
Y	2010.03, Vol.2010, Page.288 「3E22」欄	4
Y	JP 2005-111255 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005.04.28, 特許請求の範囲, [0014], [0031], 実施例3 (ファミリーなし)	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

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

国際調査を完了した日

24.05.2011

国際調査報告の発送日

07.06.2011

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

安居 拓哉

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3437

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	梅澤明弘, 骨再生・形状システムの構築, 医学のあゆみ, 2004, Vol.209, No. 12, pp.964-967 第965頁「骨形成における足場」欄、図2	1, 2, 4
Y	吉田京子 他, ウレア-ゼを触媒として用いたチタン/コラーゲン/ア パタイト複合体の作製, 日本セラミックス協会年会講演予稿集, 2009, Vol.2009, Page.291 「3G12」欄	1-4
A	LIAO, S. et al., The degradation of the three layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane in vitro, Dental Materials, 2007, Vol.23, pp.1120-1128	1-4
A	SUGANUMA, J. et al., In vivo evaluation of collagen-coated Dacron fiber in bone, Clinial Materials, 1994, Vol.15, pp.43-50	1-4
A	JP 2007-160011 A (原英達) 2007.06.28, & US 2009/0004627 A1 & WO 2007/069785 A1 & DE 112006000064 T & KR 10-2007-0088477 A	1-4
A	JP 2000-327314 A (日本油脂株式会社) 2000.11.28, & US 2002/0127262 A1	1-4