



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0007288
(43) 공개일자 2009년01월16일

(51) Int. Cl.

A61L 15/16 (2006.01) C01B 25/32 (2006.01)
C23C 14/08 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2008-7022611
- (22) 출원일자 2008년09월16일
심사청구일자 2008년09월16일
번역문제출일자 2008년09월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2007/055028
국제출원일자 2007년03월14일
- (87) 국제공개번호 WO 2007/108373
국제공개일자 2007년09월27일
- (30) 우선권주장
JP-P-2006-00074254 2006년03월17일 일본(JP)

(71) 출원인

갓코 호진 긴키 다이가쿠

일본국 오사카, 히가시 오사카시, 코와카에,
3-4-1

도꾸리쯔교세이호징 가가꾸 기쥬쯔 신포 기꼬

일본 사이타마켄 가와구찌시 혼쵸 4쵸메 1방 8고

(72) 발명자

혼쯔, 시게끼

일본 5730016 오사카후 히라가마시 무라노 홈마찌
12-25

니시카와, 히로아끼

일본 6496213 와카야마켄 이와테시 니시 고히부
134-1-908

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박보현, 장수길, 김성완

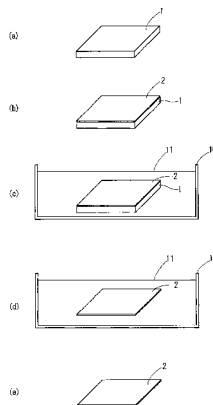
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 생체 친화성 투명 시트, 그의 제조 방법 및 세포 시트

(57) 요약

생체 친화성이나 생체 관련 물질의 흡착성이 높아서, 신규한 생체 재료로서 사용할 수 있고, 살아있는 세포의 증식·분화 등을 실시간으로 관찰할 수 있음과 동시에 가요성 및 유연성을 구비한 생체 친화성 투명 시트를 제공한다. 본 발명의 생체 친화성 투명 시트는 생체 친화성 세라믹을 용해시키지 않는 용매 (11)에 용해되는 기재 (1)에, 레이저 증착법 등에 의해 생체 친화성 세라믹 막 (2)을 성막한 후, 막 (2)가 성막된 기재 (1)을 용매 (11)에 침지시켜 기재 (1)을 용해시키고, 단리된 막 (2)를 건조시킴으로써 제조한다. 이 생체 친화성 투명 시트 (2)는 가요성 및 유연성을 구비하고, 그 표면에 세포를 파종·증식시킴으로써 환부에 직접 이식할 수 있는 세포 시트의 제조에 이용할 수 있다.

도면도 - 도1



(72) 발명자

구수노끼, 마사노부

일본 6496203 와카야마켄 이와테시 사쿠라 다이
679

하타나카, 료우파

일본 5960045 오사카후 기시와다시 벳쇼 조우 1 쯔
메 3-23

특허청구의 범위

청구항 1

생체 친화성 세라믹을 용해시키지 않는 용매에 가용인 부분을 포함하는 기재에, 생체 친화성 세라믹 막을 성막한 후, 생체 친화성 세라믹 막이 성막된 기재를 상기 용매에 침지하여 기재를 용해시킴으로써 얻어지는, 생체 친화성 세라믹 막만으로 이루어지고 가요성 및 유연성을 구비한 생체 친화성 투명 시트.

청구항 2

제1항에 있어서, 두께가 1 내지 100 μm 인 생체 친화성 투명 시트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상면과 하면 사이를 관통하는 관통 구멍을 갖는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 기재가 용매에 가용인 부분과 용매에 불용인 부분으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 레이저 증착법, 스퍼터링법, 이온 빔 증착법, 전자 빔 증착법, 진공 증착법, 분자선 에피택시법, 화학적 기상 성장법 중에서 선택된 방법에 의해 성막하여 이루어지는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 기재를 용해시킨 후, 단리한 생체 친화성 세라믹 막을 건조시켜 이루어지는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막을 성막 또는 건조시킨 후에, 고온의 수증기 함유 가스 및 탄산 함유 가스 중 하나 이상을 포함하는 분위기 중에서 열 처리하여 이루어지는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막이 수산화인회석(hydroxyapatite)으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막이 종류가 다른 복수개의 생체 친화성 세라믹으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트.

청구항 10

생체 친화성 세라믹을 용해시키지 않는 용매에 가용인 부분을 포함하는 기재에, 생체 친화성 세라믹 막을 성막하는 성막 공정, 및

생체 친화성 세라믹 막이 성막된 기재를 상기 용매에 침지하여 기재를 용해시키는 용해 공정을 포함하는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 기재가 용매에 가용인 부분과 용매에 불용인 부분으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 레이저 증착법, 스퍼터링법, 이온 빔 증착법, 전자 빔 증착법, 진공 증착법, 분자선 에피택시법, 화학적 기상 성장법 중에서 선택된 방법에 의해 생체 친화성 세라믹 막을 성막하는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 기재를 용해시킨 후, 단리한 세라믹 막을 건조시키는 건조 공정을 포함하는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막을 성막 또는 건조시킨 후에, 고온의 수증기 함유 가스 및 탄산 함유 가스 중 하나 이상을 포함하는 분위기 중에서 열 처리하는 공정을 포함하는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막이 수산화인회석으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 16

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 생체 친화성 세라믹 막이 종류가 다른 복수개의 인회석으로 구성되어 있는 생체 친화성 투명 시트의 제조 방법.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 기재된 생체 친화성 투명 시트의 표면에 세포를 파종·증식시킴으로써 얻어지는, 가요성 및 유연성을 구비함과 동시에 생체에 직접 이식 가능한 세포 시트.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 생체 친화성 및 생체 관련 물질의 흡착성이 높고, 신규한 생체 재료로 사용할 수 있으며, 또한 살아있는 세포의 증식·분화 등을 실시간으로 관찰할 수 있는 생체 친화성 투명 시트, 그의 제조 방법 및 생체 친화성 투명 시트의 표면에 세포를 파종·증식시킨 세포 시트에 관한 것이다.

배경기술

<2> 수산화인회석(hydroxyapatite) 등의 생체 친화성 세라믹은 생체 친화성이 높아서, 이것을 박막으로서 코팅한 금속이나 세라믹은 생체 재료로서 우수하며, 이들 기관 상에 세포를 배양함으로써 세포의 증식이나 분화가 빨라지는 것이 확인되었다(특히 문헌 1 참조). 또한, 생체 친화성 세라믹을 코팅한 시트는 생체 관련 물질의 흡착성이 높기 때문에, 핵산이나 단백질 등의 분리 분석 시트 등으로의 이용이 검토되었다(특히 문헌 2 및 3 참조). 또한, 세포를 살아있는 채로 직접 관찰하기 위해서, 고온에서 소결시킨 생체 친화성 세라믹의 벌크를 연마하여 이루어지는 투명체도 존재한다.

<3> 이에 더하여, 생분해성 중합체와 양친매성 중합체를 포함하는 소수성 유기 용매 용액을 원료로 하는 다공성 필름(특히 문헌 4 참조), 피브린 겔 등 위에 증착된 고생착성 배양 세포 시트 및 그것을 이용한 중층화 시트(특히 문헌 5 참조)도 존재한다.

<4> 그러나, 생체 친화성 세라믹을 코팅한 기관은 유연성이 부족하기 때문에 사용 범위가 한정되었고, 박막 상에서 배양한 세포는 목적하는 기능이 발휘되는 조직 상태로 회수할 수도 없으며, 이식 후에 생체 내에 흡수되는 세포 시트를 제조할 수도 없었다. 또한, 금속이나 세라믹 기관은 불투명하기 때문에, 살아있는 세포의 접촉이나 분화 등의 거동을 실시간으로 관찰할 수도 없었다.

<5> 또한, 생체 친화성 세라믹을 코팅한 시트는 생체 관련 물질을 흡착·분리할 수는 있어도, 시트가 불투명하기 때

문에 생체 관련 물질 사이의 상호 작용 등을 실시간으로 관찰할 수는 없었다.

- <6> 또한, 생체 친화성 세라믹의 벌크를 연마에 의해 얇게 하는 것에는 한계가 있고, 가요성 및 유연성을 구비하는 투명체는 얻지 못하였다. 그 때문에, 이 투명체를 연조직 등의 유연성이 필요한 조직의 피복재로서 이용할 수는 없었다.
- <7> 또한, 다공질 필름은 합성 중합체 수지인 양친매성 중합체를 포함하기 때문에 생체 독성이 생길 가능성이 있고, 고생착성 배양 세포 시트는 생체 관련 물질인 피브린 겔을 포함하기 때문에 바이러스 등의 감염이 생길 가능성이 있었다.
- <8> 특허 문헌 1: 일본 특허 공개 제2005-278609 공보
- <9> 특허 문헌 2: 일본 특허 공개 (평)07-88819호 공보
- <10> 특허 문헌 3: 일본 특허 공개 (평)10-156814호 공보
- <11> 특허 문헌 4: 일본 특허 공개 제2001-157574호 공보
- <12> 특허 문헌 5: 일본 특허 공개 제2005-608호 공보

발명의 상세한 설명

- <13> <발명의 개시>
- <14> 따라서, 본 발명은 생체 친화성이나 생체 관련 물질의 흡착성이 높고, 신규한 생체 재료로서 사용할 수 있으며, 살아있는 세포의 증식·분화 등을 실시간으로 관찰할 수 있음과 동시에 가요성, 유연성 및 안전성을 구비하는 생체 친화성 투명 시트를 제공하는 것을 과제로 한다.
- <15> 본 발명은 생체 친화성 세라믹을 용해시키지 않는 용매에 가용인 기재 위에 투명 생체 친화성 세라믹 막을 성막한 후, 상기 용매에 의해 기재를 용해시킴으로써 생체 친화성 투명 시트를 제조하는 것을 최대의 특징으로 한다.
- <16> 본 발명의 생체 친화성 투명 시트는 높은 생체 친화성, 생체 흡수성 및 안전성을 구비하기 때문에, 신규한 생체 재료로서 또한 단백질·DNA 분리 흡착 시트나 세포 배양용 판으로서 이용할 수 있고, 배양한 세포는 박리 등의 조작을 필요로 하지 않으며 직접 이식할 수도 있다. 또한, 투명하기 때문에 세포의 증식이나 분화, 생체 분자끼리의 상호 작용을 실시간으로 감시할 수도 있다. 또한, 기재의 형상을 변화시키면 시트 형상을 다양하게 변화시킬 수 있고, 또한 가요성 및 유연성을 구비하기 때문에, 지금까지 생체 친화성 세라믹 막을 코팅할 수 없었던 부분에 대한 피복재로서의 응용도 기대할 수 있다. 또한, 표면에 세포를 과중함으로써 세포가 접촉·증식하기 때문에, 세포 배양 판으로서 이용하면 세포와 일체인 상태로 직접 환부에 이식 가능한 세포 시트를 얻을 수 있다.

실시예

- <71> 이하에 본 발명을 실시예에 따라서 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명의 특허 청구의 범위가 어떠한 의미에서도 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <72> 실시예 1
- <73> (1) 생체 친화성 투명 시트의 제조
- <74> 우선, 염화나트륨 결정에 레이저 증착법에 의해 수산화인회석막을 성막하였다. 구체적으로는 10 mm×10 mm×2.5 mm의 염화나트륨 결정을 레이저 증착 장치(긴끼 다이가꾸 세이부쓰 리꼬가꾸부 혼썌 갱규시쓰 셋게쓰, 세이난 고교 가부시끼가이샤 제조)의 시료 고정 장치에 고정시키고, ArF 엑시머 레이저($\lambda=193$ nm, 펄스 폭=20 n초)를 사용하는 레이저 증착법을 18 시간 행하여 두께 약 12 μ m의 수산화인회석막을 피복하였다. 한편, 기재 온도는 300 °C, 사용된 분위기 가스는 산소-수증기 혼합 가스, 혼합 가스의 가스 압력은 0.8 mTorr였다.
- <75> 이어서, 수산화인회석막을 성막한 염화나트륨 결정을 순수에 침지하여 염화나트륨을 용출시키고, 투명 수산화인회석막만을 단리하였다. 또한, 단리된 투명 수산화인회석막을 순수로 세정하여 자연 건조시킨 후, 400 °C, 10 시간, 산소-수증기 분위기하에서 후-어닐링 처리(열 처리)함으로써 투명 수산화인회석막을 결정화하여 생체 친화성 투명 시트를 얻었다.

<76> (2) 제조한 생체 친화성 투명 시트의 평가

<77> 이와 같이 하여 제조한 생체 친화성 투명 시트를 도 4에 나타낸다. 또한, 침 접촉식 막 두께계에 의해서 그 두께를 측정한 결과, 두께는 약 12 μm 였다. 또한, 이 생체 친화성 투명 시트의 X선 회절 패턴을 $2\theta-\theta$ 법에 의한 X선 회절에 의해서 관찰하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5의 X선 회절 패턴으로부터, 본 발명의 제조 방법에 의해 생체 친화성 투명 시트가 결정화된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 생체 친화성 투명 시트에 힘을 가한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 생체 친화성 투명 시트가 흰 상태를 나타내었다. 이로부터, 생체 친화성 투명 시트가 가요성 및 유연성을 구비하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이 생체 친화성 투명 시트를 배양 살레 중의 15 % FBS 함유 돌베코 변법 이글 배지(D-MEM 배지)에 침지시켜, 인간 유래 골아 세포 2×10^5 세포/ml를 2 ml 파종하고, 인큐베이터 (37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 농도 5 %) 안에서 24 시간 배양함으로써 세포 시트를 제조하였다. 세포 시트를 위상차 현미경으로 관찰한 결과를 도 7에 나타낸다. 또한, 12 일간 배양하면, 이 세포 시트는 도 8에 나타낸 바와 같이 핀셋으로 취급할 수 있게 되었다.

<78> 실시예 2

<79> (1) 생체 친화성 투명 시트의 제조

<80> 실시예 1과 동일하게 하여 두께 2 mm의 유리판 표면에 레이저 증착법을 4 시간 행하여 두께 5 μm 의 비정질 산화 마그네슘으로 피복된 유리판을 제조하였다. 이어서, 이 유리판 위에 직경 50 μm 의 구멍을 중횡 100 μm 간격으로 뚫은 두께 0.1 mm의 메탈 마스크를 배치하고, 레이저 증착법을 8 시간 행하여 높이 20 μm 의 비정질 산화마그네슘 원주를 형성하고 표면에 미소한 요철이 있는 기재를 제조하였다.

<81> 이 표면에 미소한 요철이 있는 기재를 실시예 1과 동일하게 레이저 증착 장치의 시료 고정 장치에 고정시키고, ArF 엑시머 레이저($\lambda=193 \text{ nm}$, 펄스 폭=20 n초)를 사용하는 레이저 증착법을 18 시간 행하여 두께 약 12 μm 의 수산화인회석막을 피복하였다. 한편, 기재 온도는 실온, 사용된 분위기 가스는 산소-수증기 혼합 가스, 혼합 가스의 가스 압력은 0.8 mTorr였다.

<82> 이어서, 수산화인회석막을 성막한 기재를 순수에 침지시켜 비정질 산화마그네슘으로 이루어지는 부분을 용해시키고, 유리판과 투명 수산화인회석막을 분리하였다. 또한, 단리된 투명 수산화인회석막을 순수로 세정하여 자연 건조시킴으로써 직경 50 μm 의 관통 구멍이 중횡 100 μm 간격으로 개방된 생체 친화성 투명 시트를 얻었다. 이 생체 친화성 투명 시트의 현미경 사진을 도 9에 나타낸다.

<83> (2) 제조한 생체 친화성 투명 시트의 평가

<84> 제조한 생체 친화성 투명 시트의 두께를 침 접촉식 막 두께계에 의해서 측정한 결과, 두께는 약 12 μm 였다.

도면의 간단한 설명

<17> 도 1은 생체 친화성 투명 시트의 제조 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다.

<18> 도 2는 생체 친화성 투명 시트의 제조에 이용되는 레이저 증착(laser ablation) 장치의 개략도이다.

<19> 도 3은 다른 생체 친화성 투명 시트의 제조 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다.

<20> 도 4는 생체 친화성 투명 시트의 한 실시예의 외관 사진이다.

<21> 도 5는 생체 친화성 투명 시트의 X선 회절 패턴을 나타낸 도면이다.

<22> 도 6은 생체 친화성 투명 시트에 힘을 가하여 휘게 한 상태를 나타낸 도면이다.

<23> 도 7은 세포 시트의 한 실시예의 위상차 현미경 사진이다.

<24> 도 8은 세포 시트를 핀셋으로 취급할 수 있는 것을 나타내는 사진이다.

<25> 도 9는 생체 친화성 투명 시트의 다른 실시예의 확대 사진이다.

<26> <발명을 실시하기 위한 최선의 형태>

<27> 1. 생체 친화성 투명 시트

<28> 본 발명에 따른 생체 친화성 투명 시트는 아무런 지지체를 갖지 않는 생체 친화성 세라믹 막만으로 구성된 것이고, 예를 들면 도 1에 모식적으로 나타내는 (a) 내지 (e)의 각 과정을 거쳐 제조한다. 한편, 생체 친화성 투명

시트의 제조는 기본적으로는 성막 공정, 용해 공정으로 구성되고, 건조 공정 및 결정화를 위한 열 처리 공정을 포함할 수도 있다. 한편, 이들에 대해서는 이하에 상세하게 설명한다.

<29> (1) 성막 공정

<30> 성막 공정은 도 1(a)에 나타난 바와 같이 기재 (1)에 레이저 증착법 등에 의해 생체 친화성 세라믹 막 (2)를 성막하는 공정이다. 한편, 도 1(b)는 성막이 완성된 상태를 나타낸다.

<31> (i) 기재

<32> 기재 (1)은 생체 친화성 세라믹을 용해시키지 않는 용매에 용해되는 소재로 구성되어 있는 것이면, 염화나트륨, 염화칼륨 등의 할로겐화 알칼리 금속이나 비정질 산화마그네슘 등의 수용성 무기염이나 글리신을 비롯한 아미노산 결정 등의 수용성 유기물 등, 특별히 제한없이 사용할 수 있다. 이들 중에서도 결정을 제조하기 쉬우며 저렴하기 때문에 염화나트륨이 바람직하다.

<33> 한편, 도 1(a)에 기재된 기재 (1)의 형상은 판형이지만, 기재 (1)의 형상은 이것으로 한정되는 것은 아니고, 예를 들면 반구형이나 통형 등, 제조하는 생체 친화성 투명 시트의 형상에 따른 임의의 형상일 수 있다.

<34> (ii) 생체 친화성 세라믹

<35> 생체 친화성 세라믹은 인회석, 그의 원재료 및 그것을 포함하는 혼합물이다. 여기서, 인회석이란 $M_{10}(ZO_n)_6X_2$ 의 조성을 갖는 광물군이고, 식 중의 M은 예를 들면 Ca, Na, Mg, Ba, K, Zn, Al이고, ZO_n 은 예를 들면 PO_4 , SO_4 , CO_3 이고, X는 예를 들면 OH, F, O, CO_3 이다. 수산화인회석이나 탄산인회석이 일반적이지만, 특히 생체 친화성이 높기 때문에 수산화인회석이 바람직하다. 또한, 인회석의 원재료로는 인산삼칼슘(TCP)을 예시할 수 있고, 인회석을 포함하는 혼합물로는 소 등의 뼈로부터 채취한 생체 인회석을 예시할 수 있다.

<36> (iii) 레이저 증착법

<37> 레이저 증착법에 대해서는, 레이저 증착 장치 (5)의 개략도인 도 2에 기초하고, 이 도면을 사용하여 이하에 설명한다.

<38> 우선, 기재 (1)을 도 2에 나타난 바와 같이 진공 성막 챔버 (51) 내의 시료 고정 장치(도시하지 않음)에 회전이 자유롭게 고정시키고, 생체 친화성 세라믹 분말을 금형으로 가압 성형하여 얻은 타겟 (52)를 기재 (1)에 대향하는 위치에 배치한다.

<39> 이어서, 이 상태에서 진공 챔버 (51) 내의 공기를 배기계 (53)에 의해서 소정의 진공도까지 배기시킨다. 배기 완료 후, 기재 (1)을 히터 (54)에 의해 소정의 온도로 승온시킴과 동시에 시료 고정 장치에 의해 회전시킨다.

<40> 또한, 가스 도입 노즐 (55)로부터 수증기 함유 가스 또는 탄산 함유 가스를 상기 진공 챔버 (51) 내에 도입하고, ArF 엑시머 레이저 발생 장치 등의 레이저 발생 장치 (56a), 미러 (56b), 렌즈 (56c) 등으로 이루어지는 레이저 광원 (56)으로부터 발생한 레이저 광선 (L)을 타겟 (52)에 조사한다. 이에 의해서, 타겟 (52)를 구성하는 생체 친화성 세라믹이 분해되어 원자, 이온, 클러스터 등이 방출되고, 기재 (1)의 타겟 (52)측을 생체 친화성 세라믹 막에 의해서 피복한다. 한편, 수증기 함유 가스로는 수증기, 산소-수증기 혼합 가스, 아르곤-수증기 혼합 가스, 헬륨-수증기 혼합 가스, 질소-수증기 혼합 가스, 공기-수증기 혼합 가스 등을, 탄산 함유 가스로는 탄산 가스, 산소-수증기·탄산 혼합 가스, 아르곤-수증기·탄산 혼합 가스, 헬륨-수증기·탄산 혼합 가스, 질소-수증기·탄산 혼합 가스, 공기-수증기·탄산 혼합 가스 등을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

<41> 한편, 생체 친화성 투명 시트가 가요성 및 유연성을 가지며 일정한 강도를 유지하기 위해서, 생체 친화성 투명 시트의 두께는 1 내지 100 μm , 바람직하게는 4 내지 50 μm 이다. 그 때문에, 레이저 증착법에 의해 생체 친화성 세라믹 막을 성막할 때의 각종 조건, 예를 들면 기재 온도나 분위기 가스의 가스압 등은, 레이저 증착 장치의 구성이나 특성을 고려하여 상기 생체 친화성 투명 시트 두께의 범위에 들어가도록 제조할 필요가 있다.

<42> (2) 용해 공정

<43> 용해 공정은 생체 친화성 세라믹 막이 성막된 기재 (1)을 용매에 침지하여 기재를 용해시키는 공정이다. 한편, 도 1(c)는 생체 친화성 세라믹 막 (2)를 성막한 기재 (1)을 용기 (10) 내의 용매 (11)에 침지한 상태를 나타내고, 도 1(d)는 기재 (1)이 용해된 후의 상태를 나타낸다.

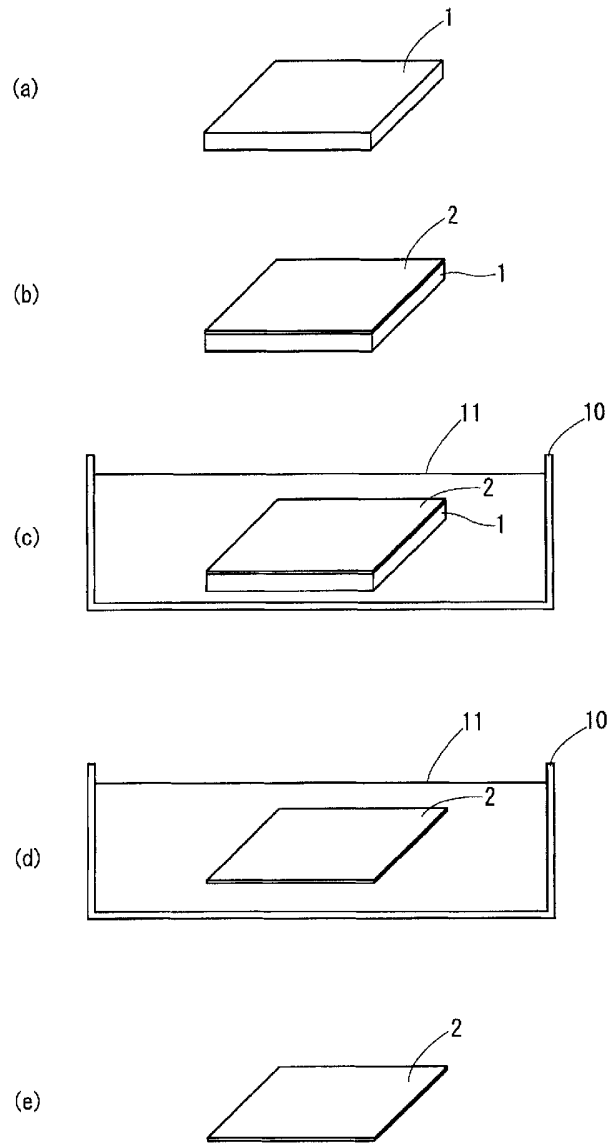
<44> (i) 용매

- <45> 용매로는 생체 친화성 세라믹 막 (2)를 용해시키지 않는 액체인, 극성 용매, 비극성 용매 등 특별히 한정하지 않고 사용할 수 있지만, 가격이 저렴하고, 독성이 없기 때문에 수계 용매가 바람직하고, 그 중에서도 순수, 세포 배양용 완충액, 세포 배양용 액체 배지 등이 바람직하다.
- <46> (3) 건조 공정
- <47> 건조 공정은 기재 (1)이 용해됨으로써 기재 (1)로부터 단리된 생체 친화성 세라믹 막 (2)를, 핀셋 등에 의해 용매 (11)에서 꺼내어 자연 건조 또는 장치 건조시키는 공정이다. 한편, 건조가 완료된 생체 친화성 세라믹 막 (2)를 도 1(e)에 나타낸다.
- <48> 이와 같이 성막, 용매에의 침지, 막 건조라는 이미 확립된 방법을 조합함으로써, 생체 친화성이 높고 신규한 생체 재료로서 사용할 수 있으며 살아있는 세포의 증식·분화 등을 실시간으로 관찰할 수 있는 생체 친화성 투명 시트를 제조할 수 있다.
- <49> 한편, 본 발명은 상기 실시 형태로 한정되지 않고, 특허 청구의 범위에 기재된 발명의 범위 내에서 다양한 변경을 부가할 수 있다.
- <50> 예를 들면, 도 3(a)에 나타낸 바와 같이, 상기 기재 (1)과 동일하게 용매 (11)에 용해되는 재료로 이루어지는 부분 (7a)와, 용매 (11)에 용해되지 않는 재료, 예를 들면 유리판이나 강판 등으로 이루어지는 부분 (7b)를 구비한 기재 (7)을 사용할 수도 있다. 또한, 도 3(b)에 나타낸 바와 같이, 이 (7a)의 상면에 용매 (11)에 용해되는 재료로 이루어지는 돌기물 (7c)에 의해 일정 패턴을 형성할 수도 있다.
- <51> 이러한 기재 (7)을 사용하면, 생체 친화성 투명 세라믹 시트를 제조할 때마다 기재를 전부 다시 만들 필요가 없기 때문에, 생체 친화성 투명 세라믹 시트를 보다 저가에 제작할 수 있다. 또한, 도 3(b)에 나타낸 바와 같은 돌기물 (7c)에 의한 패턴을 형성한 기재 (7)을 사용하여, 상기 실시 형태와 동일하게 생체 친화성 세라믹 막 (8)의 성막(성막 공정, 성막 후의 상태를 도 3(c)에 나타냄), 기재 (7)의 용해(용해 공정), 생체 친화성 세라믹 막 (8)의 건조(건조 공정)를 행함으로써 도 3(d)에 나타낸 바와 같은 관통 구멍 (8a)가 개방된 생체 친화성 투명 세라믹 시트 (8)을 제조할 수 있다.
- <52> 한편, 상기와 같은 기재 (7)은, 용매 (11)에 용해되지 않는 유리판이나 강판 등 위에, 레이저 증착법, 스퍼터링법, 이온 빔 증착법, 전자 빔 증착법, 진공 증착법, 분자선 에피택시법, 화학적 기상 성장법 등을 이용하여 용매 (11)에 용해되는 재료의 피복을 정제하는 것, 용매 (11)에 용해되는 재료를 녹인 액체를 분무 등에 의해서 분무한 후 건조시키는 것 등에 의해서 제조할 수 있다.
- <53> 이 생체 친화성 투명 시트 (8)은 돌기물 (7c)의 크기와 간격에 의해서 관통 구멍 (8a)의 직경과 간격을 조절할 수 있기 때문에, 이에 의해서 세포 증식 속도 등을 제어할 수 있다. 또한, 관통 구멍 (8a)를 통해 물질을 교환하는 상태로 세포 증식시킬 수 있기 때문에, 생체 친화성 투명 시트 (8)의 양면에 종류가 다른 세포를 증식시킬 수 있고, 이 양면에 다른 세포가 증식된 생체 친화성 투명 세라믹 시트 (8)을 복수개 적층함으로써 다른 종류의 세포를 포함하여 복잡한 구조를 갖는 중층화 시트를 용이하게 제조할 수 있다.
- <54> 또한, 성막 공정에서 레이저 증착법 이외의 방법, 예를 들면 스퍼터링법, 이온 빔 증착법, 전자 빔 증착법, 진공 증착법, 분자선 에피택시법, 화학적 기상 성장법 등을 사용할 수도 있다. 또한, 성막이 완료된 후, 또는 막의 건조 후에, 300 내지 1200 ℃의 고온의 수증기 함유 가스 또는 탄산 함유 가스 중에서 열 처리하는 열 처리 공정을 추가하여 생체 친화성 세라믹 막을 더욱 결정화하여, 생체 친화성 투명 시트를 보다 치밀하게 할 수도 있다.
- <55> 또한, 종류가 다른 복수개의 생체 친화성 세라믹을 조합하여 사용할 수도 있다. 구체적으로는, 예를 들면 생체 인회석과 화학양론 조성 인회석을 조합하여 사용할 수도 있다. 여기서, 생체 인회석은 생체 내 흡수성이 있기 때문에 조직 유도성이 우수하고, 반대로 화학양론 조성 인회석은 생체 내에 잔류하기 때문에 조직 안정성이 우수하다. 그 때문에, 이들을 조합함으로써 조기의 조직 유도성과 조직 안정성을 겸비한 시트를 제조할 수 있다. 한편, 이 시트는 투명하기도 하기 때문에, 생체 인회석이 갖는 우수한 조직 유도성 효과를 현미경에 의해서 산채로 관찰할 수도 있다.
- <56> 2. 세포 시트
- <57> 본 발명의 세포 시트는 생체 친화성 투명 시트의 표면에 세포를 증식시킨 것이고, 직접 환부에 이식할 수 있다.
- <58> (1) 세포

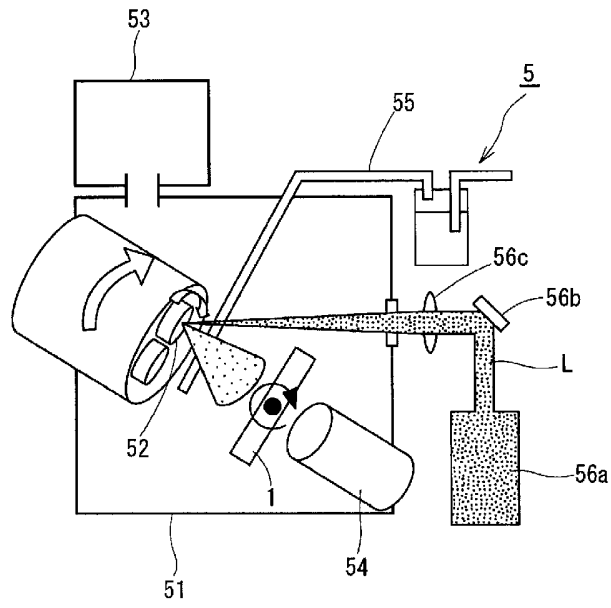
- <59> 상기 세포로는 각막 상피 세포, 표피 각화 세포, 구강 점막 세포, 결막 상피 세포, 골아 세포, 신경 세포, 심근 세포, 섬유 아세포, 혈관 내피 세포, 간실질 세포, 지방 세포 및 이들의 간세포 등을 예시할 수 있지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다. 또한, 이들 세포는 단독으로 사용할 수도 있지만, 복수의 세포를 조합하여 사용할 수도 있다. 또한, 그 세포의 유래는 특별히 한정할 필요는 없지만, 인간, 개, 고양이, 토끼, 래트, 돼지, 양 등을 예시할 수 있다. 단, 이 세포 시트를 인간의 치료에 이용하는 경우에는 인간 유래의 세포를 사용하는 것이 바람직하다.
- <60> (2) 배양 방법
- <61> 세포 배양은 구체적으로는 다음과 같이 하여 행한다. 우선, 생체 친화성 투명 시트를 샬레 등의 배양 용기의 내부에 배치하고, 샬레 등의 내에 적당한 세포 배양액을 첨가한 뒤 배지를 버려 생체 친화성 투명 시트에 스며들게 한다. 이후, 복수회 배지 교환을 반복하고, 적당한 시간 방치함으로써 세포 배양액을 생체 친화성 투명 시트에 배지를 친화시킨다. 이어서, 세포를 생체 친화성 투명 시트 상에 접종하고, 샬레 내에 세포 배양액을 첨가하여 통상적인 배양 조건하에서 적당한 기간 배양한다. 또한, 필요에 따라서 배양액을 교환한다.
- <62> 한편, 상기와 같이 생체 친화성 투명 시트의 한면에서만 세포 증식을 행하는 것이 아니라, 그의 양면에서 세포 증식을 행할 수도 있다. 예를 들면, 관통 구멍을 갖는 생체 친화성 투명 시트를 사용하여, 그의 양면에서 다른 종류의 세포를 증식시키면, 세포를 통과시키지 않고, 세포가 생산하여 배양액 중으로 방출하는 액성 인자만을 통과시킬 수 있다. 이에 따라, 예를 들면 한면에 상피계 세포(예를 들면 표피 각화 세포)가 증식하고, 다른 면에 지지 세포(feeder cell)가 증식한 세포 시트가 얻어진다.
- <63> 여기서, 사용되는 지지 세포로는, 예를 들면 섬유 아세포, 조직 줄기 세포, 배성 줄기 세포 등을 예시할 수 있지만, 용도에 따라서 자유롭게 변경할 수 있고, 특별히 한정되는 것은 아니다. 또한, 상피계 세포와 지지 세포가 동일종의 동물에서 유래할 필요는 없지만, 얻어진 세포 시트를 이식에 사용하는 경우에는, 상피계 세포와 지지 세포가 동일종의 동물에서 유래하는 것이 바람직하다. 또한, 이 세포 시트를 인간의 치료에 사용하는 경우에는, 상피계 세포와 지지 세포에 인간 유래의 세포를 사용하는 것이 바람직하다.
- <64> (3) 배양 배지
- <65> 세포 배양을 위한 배지는 배양하는 세포에 대하여 일반적으로 사용되고 있는 것이면 특별히 한정없이 사용할 수 있다. 구체적으로는, D-MEM 배지, MEM 배지, HamF12 배지, HamF10 배지를 예시할 수 있고, 이들 배지에는 소테아 혈청(FSC) 등의 혈청을 첨가한 배지일 수도 있고, 첨가하지 않은 무혈청 배지일 수도 있다. 단, 세포 시트를 인간의 치료에 사용하는 경우에는, 배지 성분은 유래가 명확한 것, 또는 의약품으로서 사용하는 것이 확인된 것이 바람직하다.
- <66> (4) 이식 방법
- <67> 표면에 세포를 증식시킨 세포 시트는 단독으로 또는 복수매 중첩하여 직접 환부에 이식한다. 이와 같이 복수매 중첩시킴으로써 삼차원 구조를 갖는 세포 조직을 이식할 수 있다. 한편, 배양액으로부터 세포 시트의 회수, 세포 시트의 중첩, 환부에의 이식은, 예를 들면 핀셋 등을 사용하는 수기(手技)에 의해서 행한다.
- <68> 또한, 이식 후에 세포 시트와 생체 조직을 고정시키는 방법은, 공지된 방법이면 특별히 한정할 필요없이 사용할 수 있다. 예를 들면, 세포 시트와 생체 조직을 봉합할 수도 있고, 세포 시트와 생체 조직과의 생착 용이성을 이용하여, 환부에 배양 세포 시트를 부착시켜 봉대 등으로 덮기만 하여도 된다.
- <69> (5) 적용 질환
- <70> 이 세포 시트는 이식 가능하기만 하면, 적용 질환은 전혀 제약되지 않는다. 구체적인 적용 질환으로는, 예를 들면 연골 세포를 증식시킨 세포 시트는 변형성 관절증의 치료에, 심근 세포를 증식시킨 심근 시트는 허혈성 심 질환에, 표피 세포와 진피 세포를 각각 증식시킨 세포 시트를 중첩한 세포 시트는 화상, 켈로이드, 명 등에 사용할 수 있다.

도면

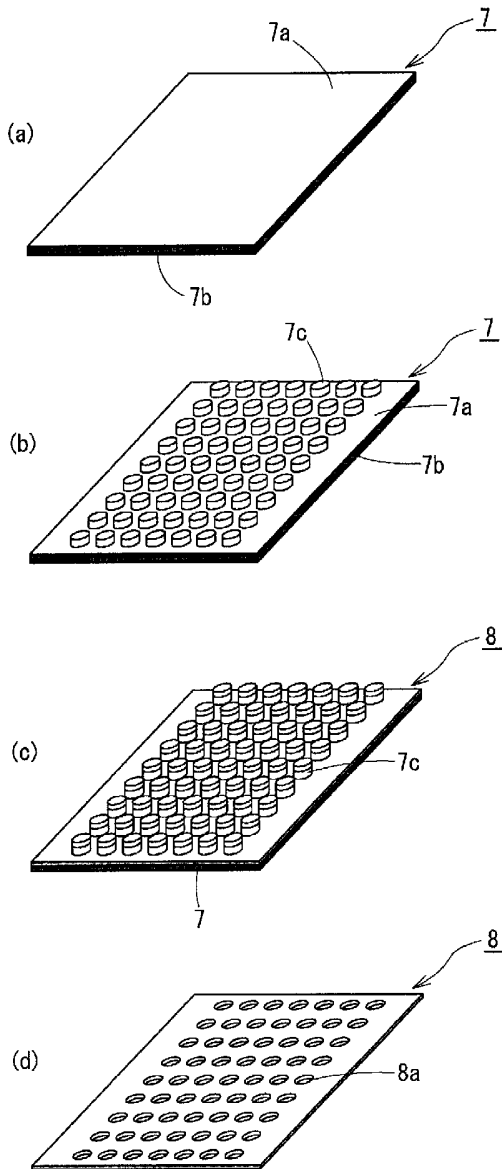
도면



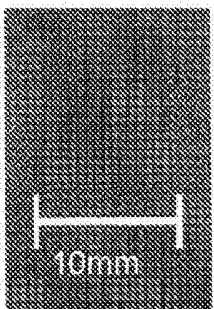
도면2



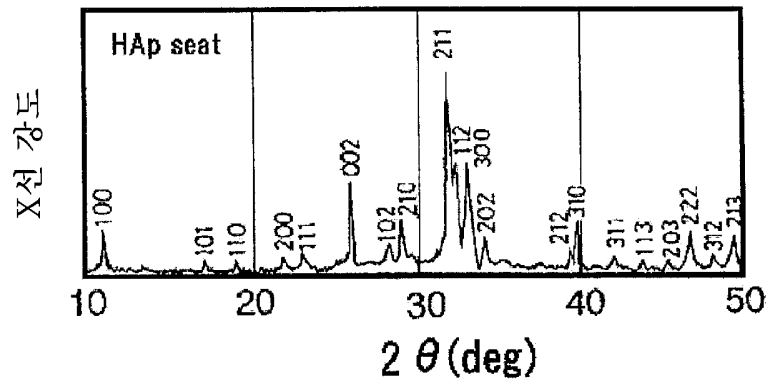
도 3



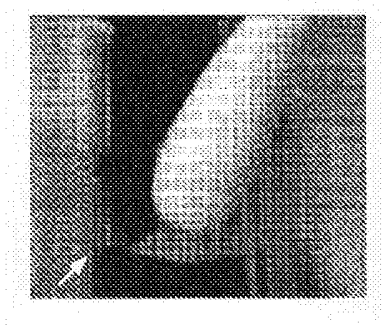
도 4



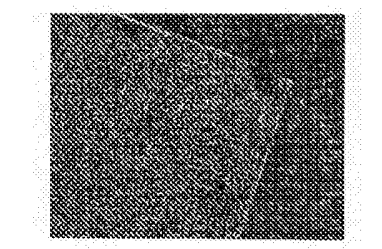
도면5



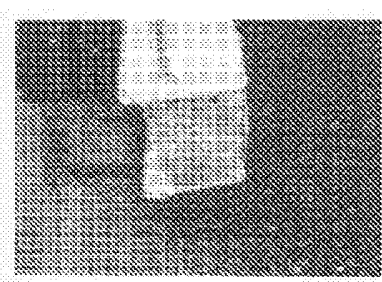
도면6



도면7



도면8



도면9

