

(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
2014年7月3日(03.07.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/103688 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/083008
- (22) 国際出願日: 2013年12月9日(09.12.2013)
- (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 2012-283944 2012年12月27日(27.12.2012) JP
- (71) 出願人: 学校法人愛知学院(AICHI GAKUIN)
[JP/JP]; 〒4648650 愛知県名古屋市千種区楠元町
1丁目100番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 河合 達志(KAWAI, Tatsushi); 〒4648650
愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地
学校法人愛知学院内 Aichi (JP). 野口 俊英
(NOGUCHI, Toshihide); 〒4648650 愛知県名古屋市
千種区楠元町1丁目100番地 学校法人愛知
学院内 Aichi (JP). 林 達秀(HAYASHI, Tatsuhide);
〒4648650 愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目
100番地 学校法人愛知学院内 Aichi (JP). 小林
周一郎(KOBAYASHI, Shuichiro); 〒4648650 愛
知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地
学校法人愛知学院内 Aichi (JP). 朝倉 正紀
(ASAKURA, masaki); 〒4648650 愛知県名古屋市千
種区楠元町1丁目100番地 学校法人愛知学
院内 Aichi (JP). 濱島 聡一郎(HAMAJIMA,
Souichiro); 〒4648650 愛知県名古屋市千種区楠元
町1丁目100番地 学校法人愛知学院内 Ai-
chi (JP).
- (74) 代理人: 青山陽(AOYAMA, Yo); 〒4600012 愛知県
名古屋市中区千代田五丁目14番27号 Aichi
(JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: MATERIAL FOR CELL GROWTH, TISSUE REGENERATING MEMBRANE AND TISSUE REGENERATION METHOD

(54) 発明の名称: 細胞増殖用材料、組織再生膜及び組織再生方法

(57) Abstract: [Problem] To provide a material for cell growth, said material being flexible and assuring a high cell growth rate. [Solution] A scaffold material for cell growth, characterized in that the surface of a scaffold base material, which is formed of polyvinylidene chloride, has been plasma-treated by exposing to a plasmatized inert gas (for example, argon gas) atmosphere. The plasmatization can be conducted by using a magnetron sputtering device. In this case, it is preferred to employ as a target electrode a material which generates no sputtering particles in ion sputtering, for example, titanium or stainless.

(57) 要約: 【課題】柔軟性があり、且つ細胞増殖速度の速い細胞増殖用材料を提供する。【解決手段】本発明の細胞増殖用の足場材料は、ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材の表面が、プラズマ化した不活性ガス(例えばアルゴンガス)雰囲気下に曝されるプラズマ処理が施されていることを特徴とする。プラズマ処理は、マグネトロンスパッタリング装置を用いて行うことができるが、この場合において、ターゲット電極にはイオンスパッタによるスパッタ粒子の発生しない材料(例えばチタンやステンレス)を用いることが好ましい。



WO 2014/103688 A1

明 細 書

発明の名称：細胞増殖用材料、組織再生膜及び組織再生方法

技術分野

[0001] 本発明は再生医療等に好適に用いることのできる細胞増殖用材料、組織再生膜及び組織再生方法に関する。

背景技術

[0002] 医療や生化学等の分野において、細胞増殖に適した足場となる材料（以下「細胞増殖用材料」という）の開発は、重要なキーテクノロジーとなる。

例えば、口腔顎顔面領域における外傷、炎症、先天性疾患、腫瘍摘出等による骨欠損部の再建や、インプラント治療のため、GTR (Guided Tissue Regeneration: 組織再生誘導法) やGBR (Guided Bone Regeneration: 骨再生誘導法) が临床上広く普及している。歯周組織治療におけるGTRは、上皮ならびに歯肉結合組織が歯根面に達成するのを遮蔽しつつ歯根膜由来細胞を歯根面に誘導し、新付着を獲得することが目的とされる。一方、GBRは、骨量の不十分な顎堤にインプラントを埋入する際の骨形成、顎顔面損傷に対する治療等に臨床応用され、各種骨補填材や自家骨移植と併用される。その他、骨髓に含まれる細胞を分離し、培養して得られた間葉系幹細胞を、骨欠損部に移植する術式が考案されている。

これらの再建術には、細胞増殖や細胞再生するための足場が必要となるため、細胞増殖に適した細胞増殖用材料が希求されている。

[0003] 従来の細胞増殖用材料としてはポリスチレンが用いられており、培養皿等に利用されている。しかし、ポリスチレンはガラス転移点が高く剛性の強い材料であるため、これを歯周再生療法およびインプラント埋入のための骨再生や皮膚移植のための細胞増殖用材料として利用しようとした場合、患部に沿って張り付けることが困難であったり、柔軟な皮膚粘膜を突き破ったりするため、利用は困難であった。

[0004] この問題を解決するため、本発明者らは、ガラス転移点が低くて柔軟な素

材であるポリ塩化ビニリデンに着目し、これを骨新生分野に応用する研究を行い、ポリ塩化ビニリデンフィルムが細胞増殖用材料として優れていることを見出している（非特許文献1）。すなわち、ポリ塩化ビニリデンフィルム上でラット大腿骨の骨髄より採取した間葉系幹細胞を培養し、ラット頭蓋骨におけるクリティカルサイズの骨欠損に対して、塩化ビニリデンフィルムを欠損部に覆うように移植すれば、骨新生が促進されることを見出した。

[0005] 骨再生の分野に限らず、各種幹細胞の増殖、各種骨補填材や自家骨移植との併用、歯周組織再生療法の遮蔽膜および細胞移植用材料、湿潤療法と呼ばれる褥創の治療等、さまざまな医療分野や生化学分野において細胞増殖用材料は便利なツールとなるため、細胞増殖を迅速に促すことのできる優れた細胞増殖用材料の開発が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hamajima et.al. Dent Materials Journal2011;30(5) 707-716

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかし、上記従来のポリ塩化ビニリデンフィルムを用いた細胞増殖用材料では、ポリスチレンからなる培養皿による細胞増殖に比べ細胞増殖が遅く、増殖に時間がかかるという欠点があった。このため、細胞増殖速度の速い足場材料が求められていた。

[0008] 本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、柔軟性があり、且つ細胞増殖速度の速い細胞増殖用材料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] 本発明者らは、ポリ塩化ビニリデンフィルムを用いた上記従来の細胞増殖用材料において細胞増殖の速度が遅いのは、その表面の疎水性に原因があるのではないかと考えた。このため、ポリ塩化ビニリデンフィルムの表面を処理して親水性にすることを考えた。そして、このための手段として、プラズ

マ化した不活性ガス雰囲気下に曝すといういわゆるプラズマ処理を適用したところ、細胞増殖速度が極めて速くなり、しかも細胞が堅固に固着したフィルムとなることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は細胞増殖用の足場材料であって、ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材の表面が、プラズマ化した不活性ガス雰囲気下に曝されるプラズマ処理が施されていることを特徴とする細胞増殖用材料である。

[0011] 不活性ガスとしては、アルゴンガス、ヘリウムガス、ネオンガス、キセノンガス等を用いることができる。これらのガスの任意の混合ガスを用いてもよい。本発明者らはアルゴンガスを用いることによって、ポリ塩化ビニリデンの表面が確実に親水性となり、細胞増殖速度が極めて速くなり、しかも細胞が堅固に固着することを確認している。

[0012] プラズマ処理に用いる装置としては、スパッタリング装置（例えば直流グロー放電や高周波によって発生させたプラズマを利用する2極式のスパッタリング装置や熱陰極を付加する3極式のスパッタリング装置等）を応用して行うことができる。さらに、ターゲット表面近傍に磁界を印加し、2次電子をローレンツ力で捉えてサイクロイドあるいはトロコイド運動させることにより、不活性ガスと加速電子との衝突の頻度を高めたマグネトロンスパッタリング装置を用いることも好ましい。

[0013] ただし、本発明においては、スパッタ粒子によるコーティングが目的ではなく、プラズマ化した不活性ガスによるポリ塩化ビニリデンからなる基材自身の表面改質が目的であるため、ターゲット電極の材料はスパッタ粒子が発生し難い材料（例えばチタンやステンレス等）からなる電極を用いることが好ましい。また、ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材が耐え得る温度となるように処理を行うことが必要となる。このため、高温プラズマよりも低温プラズマの方が好ましく、大気圧プラズマよりも減圧下でのプラズマである方が好ましい。

[0014] 本発明の細胞増殖用材料を膜状に成形すれば、その膜を患者の組織欠損部へ装着させることによって組織再生膜として利用することができる。例えば

、骨再成膜として利用した場合、本発明の細胞増殖用材料は骨芽細胞との接着性が良好であるため、剥離し難い骨芽細胞組織を形成させることができる。しかも、再成膜の構成材料であるポリ塩化ビニリデンは、ガラス転移点が低くて柔軟性があるため、患者の骨欠損部へ骨誘導再成膜を装着する場合、移植部位に沿って適した形状を付与させることができる。また、装着付近の組織を傷つけることもない。従って、好適に骨誘導再成を行うことができる。

[0015] 本発明の組織再生膜は、骨誘導再成膜以外にも、各種幹細胞の増殖、各種骨補填材や自家骨移植との併用、歯周組織再生療法の遮蔽膜および細胞移植用材料、湿潤療法と呼ばれる褥創の治療、心筋再生治療等、さまざまな医療分野や生化学分野において用いることができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 2極式のマグネトロンスパッタ装置の模式断面図である。

[図2] 繊維芽細胞様細胞 L 929 を用いた細胞接着試験の試験結果を示すグラフである。

[図3] 繊維芽細胞様細胞 L 929 を培養した後の細胞形態の SEM 写真である。

[図4] 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた細胞接着試験結果を示すグラフである。

。

[図5] L929 の細胞増殖試験の結果を示すグラフである。

[図6] MC3T3-E1 の細胞増殖試験の結果を示すグラフである。

[図7] プラズマ処理 PVDC フィルム及び未処理 PVDC フィルムについて、ラットを用いた骨欠損部位への移植試験を行った場合の 3 週間後の μ -X 線 CT 写真である。

[図8] プラズマ処理 PVDC フィルム及び未処理 PVDC フィルムについて、ラットを用いた骨欠損部位への移植試験を行った場合の 3 週間後の新生骨体積を示すグラフである。

[図9] 接触角と時間の経過の関係を示すグラフである。

[図10] プラズマ処理前及びプラズマ処理後の PVDC フィルムの表面についての

FT-IRチャートである。

発明を実施するための形態

[0017] (原料)

本発明の細胞増殖用材料は、ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材を用いる。ポリ塩化ビニリデンの重合度については特に規定はなく、柔軟性、耐熱性等使用目的に応じて適切な重合度のものを適宜選択すればよい。また、本発明の課題達成を阻害しない範囲で、必要に応じて副次的な添加物を加えて様々な改質を行うことが可能である。副次的な添加物の例としては、可塑剤、酸化防止剤、難燃剤、紫外線吸収剤、着色剤、顔料、抗菌剤、安定剤、静電剤、核形成材、各種フィラー等その他の類似のものが挙げられる。

[0018] (プラズマ処理)

ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材をプラズマ化した不活性ガス雰囲気下に曝すことにより、本発明の細胞増殖用材料となる。プラズマ処理は減圧下で行うことが好ましい。大気圧プラズマではポリ塩化ビニリデンからなる足場基材の耐熱温度を超えるおそれがあるからである。低圧プラズマ発生のための装置として、例えばスパッタリング装置（例えば直流グロー放電や高周波によって発生させたプラズマを利用する2極式のスパッタリング装置や熱陰極を付加する3極式のスパッタリング装置等）を用いることができる。さらに、ターゲット表面近傍に磁界を印加し、2次電子をローレンツ力で捉えてサイクロイドあるいはトロコイド運動させることにより、不活性ガスと加速電子との衝突の頻度を高めたマグネトロンスパッタリング装置を用いることも好ましい。

[0019] 例として、グロー放電を用いた2極式のマグネトロンスパッタ装置を用いて説明する（図1参照）。このスパッタ装置はガラス製の円筒型チャンバー1内の上端近くに円板型のターゲット電極2が配置されており、ターゲット電極2中央に電磁石3が設けられている。一方、円筒型チャンバー1の下端近くには対極4が設けられている。ターゲット電極2及び対極4は交流電源5に、それぞれ接続されている。また、円筒型チャンバー1は図示しない排

気制御装置に接続されており、内部の気圧及びガス雰囲気を制御可能としている。

[0020] 次に、細胞増殖用材料の製造方法について述べる。

まず、円筒型チャンバー1を取り外し、対極4上にポリ塩化ビニリデンからなる足場基材を載せる。そして、再び円筒型チャンバー1を設置し、排気制御装置によって排気を行う。円筒型チャンバー1内部が真空に近くなったら、不活性ガスを導入し、大気圧に戻す。以上の操作を繰り返した後、プラズマ処理を行うための不活性ガス圧に調整する。具体的なガス圧は、ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材6の耐熱性や処理を行った後の親水性の程度などを勘案して適宜決定すればよいが、通常0.1~100Pa、好ましくは1~10Paである。

そして、電磁石3に電流を流しつつターゲット電極2及び対極4間に直流電流を流す。電流値は足場基材6の様子（あまり電流が高いと温度上昇の為変形する）やプラズマ発光の様子を観察しながら、適宜調整すればよい。こうして、プラズマ処理を行った後、電流を止め、チャンバー1内に空気を導入し、大気圧に戻した後、チャンバー1を外してプラズマ処理が終了した足場基材6（すなわち細胞増殖用材料）を取り出し、作業を終了する。

[0021] 以上のようにして製造された細胞増殖用材料は、プラズマ処理前に比べて水ぬれ性が極めて良好となる。また、細胞接着試験を行った場合、プラズマ処理前に比べて優れた細胞接着性を有する。さらには、ポリ塩化ビニリデンのフィルムを原料として細胞増殖用材料を調製し、これを例えば骨欠損部に蔽うように移植すれば、骨新生が促進される。

[0022] 本発明の細胞増殖用材料の用途としては、例えば骨欠損部の骨造成、歯周組織再生療法への細胞移植、火傷等の褥瘡部の被覆等が考えられる。

実施例

[0023] <細胞増殖用材料の製造>

・実施例1

（足場基材）

原料となる足場基材として、厚さ20 μ mのポリ塩化ビニリデン（以下PVDCという）フィルム（旭化成株式会社製、商品名：サランラップ（登録商標）、柔軟剤として脂肪酸誘導体、安定剤としてエポキシ化植物油が添加されている）を用いた。

[0024] （プラズマ処理）

上記PVDCフィルムに対して、マグネトロンスパッタリング装置（日本電子社製、JUC-5000）によってアルゴンプラズマ処理を行った。

まず、マグネトロンスパッタリング装置のチャンバーを開け、陽極上に上記PVDCフィルムを貼り付けたガラス板を載せ、再びチャンバーを載せ、チャンバー内をロータリーポンプで真空にした。その後、チャンバー内にアルゴンガスを6Paとなるように導入した。そして、電流が10mAとなるように制御しながら放電を行うことによってチャンバー内にアルゴンプラズマを発生させ、この状態で3分間の処理を行った。その後、空気を導入して大気圧に戻し、チャンバーを開けてプラズマ処理された実施例1のPVDCフィルムを取り出した。このプラズマ処理されたPVDCフィルムが細胞増殖用材料である。

[0025] <評価>

以上のようにして調製した実施例1のプラズマ処理PVDCフィルムの各種特性を調べた。その評価方法と結果を以下に示す。

[0026] （繊維芽細胞様細胞L929を用いた細胞増殖試験）

細胞には、マウス線維芽細胞由来L929(NCTCclone929、大日本住友製薬株式会社)を用いた。培養液はMinimumEssentialMedium(GIBCO)に5wt%ウシ胎仔血清(EQUITECH-BIO)、100U/mlPenicillin(GIBCO)、および100FLg/ml Streptomycin (GIBCO)を添加しろ過滅菌したものを使用した。試料作製のため、前述の方法で作成したPVDCフィルムを ϕ 15mmの円形に成型し、ガラス板にはり付けた状態でオートクレーブにて加熱滅菌した後でプラズマ処理を行なった。また、比較のためにプラズマ処理をしていない未処理のPVDCフィルムも同様に滅菌した。加熱滅菌後、PVDCフィルムを得られた各試料を24ウェルマイクロプレート(Falcon)のウェル底面に気泡が混入しないようにはり付け、滅菌綿

棒を用いて圧接した。細胞懸濁液はL929を 1.0×10^5 cells/mlとなるように調整し、24ウェルマイクロプレートの各ウェルに400 μ Lずつ播種した。37°C、CO₂濃度5%の条件下で培養し、細胞増殖の測定は培養開始3,6および24時間後に行なった。測定にはCellCountingKit-8(同仁化学研究所)を用いた。即ち、測定する各ウェルの培養液を新しい培養液に交換した後、CellCountingKit-8試薬を40 μ Lずつ培養液に添加し攪拌した。マイクロプレートをインキュベーター内に2時間静置後、反応液を96ウェルマイクロプレートに100 μ Lずつ移し、microplatereader(東ソー、MPR-A4i)を用いて450nmにおける吸光度を測定した。測定回数nは5回とした。

[0027] 3時間,6時間及び,24時間後に細胞数を計測した結果を図2に示す。このグラフから、どの時間においても、プラズマ処理PVDCフィルムの方が未処理のPVDCフィルムよりも接着細胞数の方が多いことが分かる。

[0028] また、繊維芽細胞様細胞L929を培養した後の細胞形態をSEM(日本電子(株)製JSM-5510LV)を用いて観察した。培養24時間後の結果を図3に示す。左上の写真はアルゴンプラズマ処理したPVDCフィルム上で24時間培養した繊維芽細胞様細胞L929であり、四角で囲んだ部分の拡大写真が左下の写真である。この図から細胞が扁平に伸展していることが分かり、細胞が糸状仮足を出し、フィルム表面に強固に接着しているのが分かる。一方、右上の写真が未処理のPVDCフィルム上で24時間培養した繊維芽細胞様細胞L929であり、四角で囲んだ部分の拡大写真が左下の写真である。この図から細胞がさほど伸展していないことが分かり、細胞からの糸状仮足がほとんど出ておらず、フィルム表面に単に載っているだけの弱い接着状態となっていることが分かる。

[0029] (骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いた細胞増殖試験)

繊維芽細胞様細胞L929を培養した方法と同様の方法により、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いた細胞増殖試験を行った。培養液は α -MinimumEssentialMedium(GIBCO)に5wt%ウシ胎仔血清(EQUITECH-BIO)、100U/mlPenicillin(GIBCO)、および100FLg/ml Streptomycin (GIBCO)を添加しろ過滅菌したものを使用

した。CellCountingKit-8試薬を添加した後、24ウェルマイクロプレートを一時間インキュベーター内に静置後、吸光度を測定した。

[0030] 3,6及び、24時間後に細胞数を計測した結果を図4に示す。このグラフから、どの時間においても、プラズマ処理PVDCフィルムの方が未処理のPVDCフィルムよりも接着細胞数の方が多いたことが分かる。

[0031] (線維芽細胞様細胞L929および骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いた細胞増殖試験)

上記と同様の方法で細胞を播種及び培養し、培養液の交換は毎日行なった。線維芽細胞様細胞L929の培養期間は5日間とし、細胞増殖の測定は毎日行なった。骨芽細胞様細胞MC3T3-E1の培養期間は12日とし、細胞増殖の測定は2日に一回行なった。

[0032] <結果>

L929の細胞増殖試験の結果を図5に示す。プラズマ処理PVDCフィルムでは5日目にコンフルエントに達したが、未処理のPVDCフィルムの5日目における吸光度は、有意に低かった。MC3T3-E1の細胞増殖試験の結果を図6に示す。プラズマ処理PVDCフィルムは10日目にコンフルエントに達したのに対し、未処理のPVDCフィルムは吸光度の有意な減少を認めた。

[0033] (骨欠損部位への移植試験)

プラズマ処理PVDCフィルム及び未処理PVDCフィルムについて、ラットを用いた骨欠損部位への移植試験を行った。移植には5週齢sprague-Dawleyラット雄(体重130-150g)をソムノペンチル(共立製薬製)腹腔内投与により麻酔し、無痛下にて処置した。頭部手術部位を消毒、剃毛した後にメスを用いて10mm程度の皮膚切開を加え、鈍的に剥離し骨膜を切開した。開創器にて切開部を保持し、頭蓋骨正中に外径5mmのトレフィンバーを用い、注水下、低速回転にて直径5.0mm、深さ0.5mmの骨欠損を形成した。創部をエアブローした後、φ7mmのプラズマ処理PVDCフィルム(あるいは及び未処理PVDCフィルム)をはり付けた。その上に、PVDCフィルムの形状付与と固定の目的で、歯科用ボンディング材G-BOND+(GC)を塗布したφ10mmのPVDCフィルムを貼り付け光照射に

て固定した。そして、3週間後に μ -X線CT写真撮影を行った。

その結果、図7に示すように、プラズマ処理PVDCフィルムを張り付けた方は、未処理のPVDCフィルムを張り付けたものより、広い面積にわたって欠損部が新生骨に覆われていた。

[0034] これらの μ -X線CT写真について、3D画像計測ソフトを用いて新生骨体積を計算した（n数は3）。その結果、図8に示すように、プラズマ処理PVDCフィルムを張り付けた場合には、未処理のPVDCフィルムを張り付けた場合よりも大きな新生骨の増加が認められた。

[0035] （水ぬれ性試験）

実施例1のプラズマ処理PVDCフィルムの表面の水ぬれ性試験を行った。まず、PVDCフィルムをオートクレーブに入れ、120°C、20分間処理したものについて、上記のようにして調整したプラズマ処理を行なった。そして、そのフィルム上に水滴を載せ、水滴とプラズマ処理PVDCフィルムとが接触している部分を横からデジタルカメラで撮影し、その画像を基に市販の画像処理ソフトウェア（Adobe社製Photoshop）を使用して水の接触角を測定した。水は脱イオン水を用い、フィルム表面に載せる水滴の体積は10 μ Lとした。測定は、プラズマ処理後30分、1、3、6及び12時間経過後について行い、径時変化を調べた。また、比較の為、プラズマ処理を行う前のPVDCフィルムについても測定を行った。接触角の算出は、親水性の評価において一般的によく用いられている $\theta/2$ メソッドを用いてフィルム上に置かれた水滴の接触角を求めた（下記式1参照）。ここで、 r は水滴の半径、 h は水滴の高さを意味する。

[0036] [数1]

$$\theta = 2 \arctan \frac{h}{r}$$

[0037] 結果を図9に示す。この図において、横軸が0時間のときの値は、プラズマ処理前のPVDCフィルムと水との接触角を示している。その後急激に低下し最低値となっているポイントは、プラズマ処理直後のPVDCフィルムと水との

接触角の値を示している。

この図から、プラズマ処理前のPVDCフィルムは接触角が 67° と大きく、親水性に劣っているのに対し、プラズマ処理直後のPVDCフィルムは接触角が 10° と小さくなり、優れた親水性の表面となっていることが分かる。そして、その接触角は時間と共に少しずつ大きくなるものの、12時間経過後においても 22° であり、優れた親水性を維持していた。親水性は細胞の接着が行われやすくなると考えられており、プラズマ処理後のPVDCフィルムは、細胞増殖速度が極めて速くなり、しかも細胞が堅固に固着することとなる。

[0038] ・実施例2及び比較例1～3のフィルムの調製

さまざまな材料からなるフィルムについて、実施例1のプラズマ処理方法及びそれに続くオートクレーブ処理を行い、処理前と処理後30分間経過後の接触角を測定した(N数=3)。使用した材料は、実施例2ではPVDC(株式会社クレハ製 商品名:クレラップ(登録商標))、比較例1ではポリオレフィン(日本製紙株式会社製 商品名:ワンラップ(登録商標))、比較例2ではポリ塩化ビニル(日立化成株式会社製 商品名:日立ラップ)、比較例3ではポリエチレン(宇部フィルム株式会社製 商品名:ポリラップ(登録商標))を用いた。なお、ポリエチレンは耐熱温度がオートクレーブの温度よりも低いため、オートクレーブ処理は行わなかった。プラズマ処理の方法は実施例1と同様である。また、接触角の測定方法は前述の水ぬれ試験と同様である。

[0039] 結果を表1に示す。この表から、素材としてPVDCを用いた実施例1及び2では、プラズマ処理前には接触角が 80 度以上であるのに対し、プラズマ処理後は 20 度以下となり、プラズマ処理による親水性の向上効果が顕著に優れていることが分かった。これに対して、ポリオレフィンやポリ塩化ビニルを用いた比較例1～3では、プラズマ処理を行っても 26 度以下となることはなく、プラズマ処理による親水性の向上効果が、PVDCよりも劣っていることが分かった。

[表1]

	素 材	プラズマ処理	接触角 (degree)
実施例1	ポリ塩化ビニリデン (サランラップ (登録商標))	無し	81.6±4.3
		有り	16.8±1.8
実施例2	ポリ塩化ビニリデン (クレラップ (登録商標))	無し	89.0±0.4
		有り	19.8±1.3
比較例1	ポリオレフィン	無し	92.8±1.1
		有り	39.6±3.1
比較例2	ポリ塩化ビニル	無し	78.8±3.2
		有り	35.0±1.5
比較例3	ポリエチレン	無し	96.0±2.0
		有り	26.7±2.7

[0040] 以上のように、PVDCは、ポリオレフィンやポリ塩化ビニルに比べてプラズマ処理による親水性の向上効果が極めて顕著である。親水性が良好である場合、細胞の接着が行われやすくなる。プラズマ処理を行った実施例1のPVDCフィルムが細胞増殖試験において優れた増殖促進効果を示したり、骨欠損部位への移植試験において優れた組織再生能力を示したりするのは、親水性の顕著な向上効果が寄与しているものと推定される。しかも、PVDCフィルムは極めて柔軟性に富むため、これを歯周再生療法およびインプラント埋入のための骨再生や皮膚移植のための細胞増殖用材料として利用しようとした場合、患部に沿って張り付けることが容易であり、柔軟な皮膚粘膜を突き破ったりするおそれもない。

[0041] (赤外分光分析)

実施例1におけるプラズマ処理前及びプラズマ処理後のPVDCフィルムの表面について、FT-IR(日本電子株式会社製 商品名Diamond-20)による測定を行った。その結果、図10に示すように、プラズマ処理前には明確には認められなかった3200~3600cm⁻¹付近の水酸基のO-H伸縮に起因すると思われる吸収ピークがプラズマ処理後に表れる一方、プラズマ処理前に存在した2800~2900cm⁻¹付近のメチル基のC-H伸縮運動に起因すると思われる吸収ピ

ークがプラズマ処理後には不明確になっていた。以上のことから、アルゴンのプラズマ処理によってPVDCフィルムの表面のメチル基が少なくなり、水酸基が生成したことが分かった。前述した水ぬれ性試験において、プラズマ処理したPVDCフィルムの水ぬれ性が良好であったのは、PVDCフィルムの表面に水酸基が生成したことによるものと合理的に理解することが出来る。

なお、本実施例のプラズマ処理PVDCフィルムはアルゴンプラズマ中で処理を行っており、PVDCには酸素は含まれていないことから、水酸基の酸素の供給源について疑問が残るが、恐らくプラズマ処理前のPVDCフィルムに吸着していた酸素、あるいはチャンバー内にわずかに存在していた酸素等が供給源となったのではないかと考えられる。このため、チャンバー内に不活性ガス以外のガスとして酸素ガスを共存させることも可能である。

[0042] この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

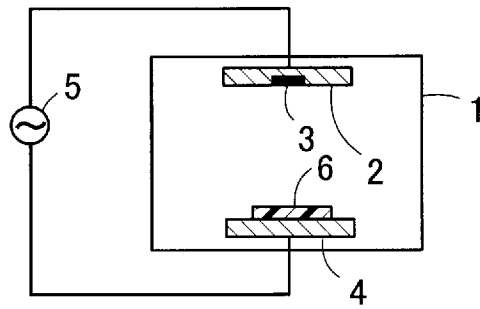
符号の説明

[0043] 1…円筒型チャンバー、2…ターゲット電極、3…電磁石、4…対極イオン、5…交流電源、6…足場基材

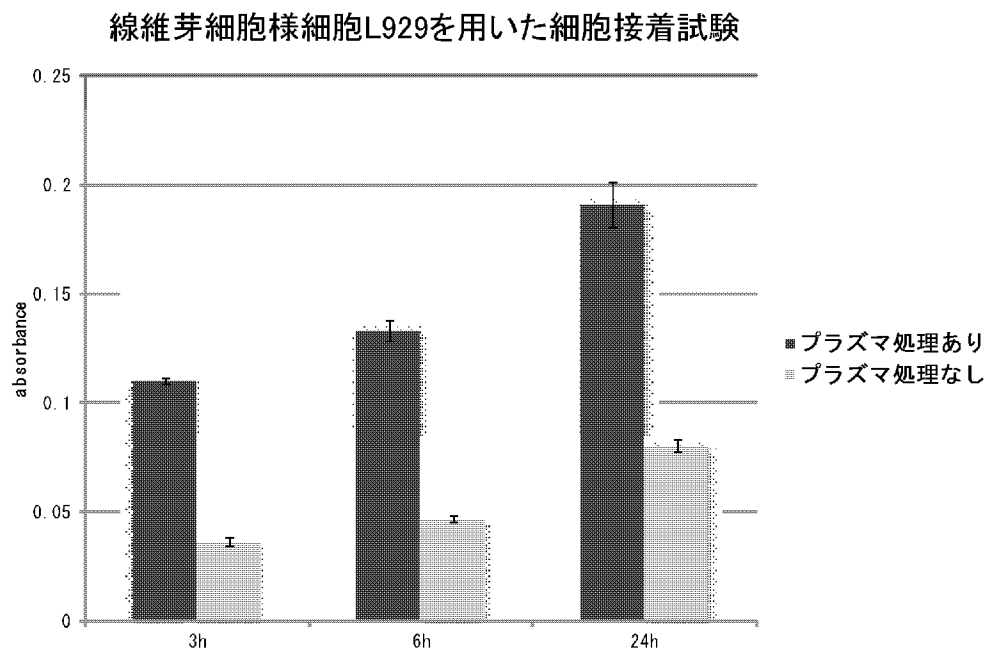
請求の範囲

- [請求項1] 細胞増殖用の足場材料であって、
ポリ塩化ビニリデンからなる足場基材の表面がプラズマ化した不活性ガス雰囲気下に曝されるプラズマ処理が施されていることを特徴とする細胞増殖用材料。
- [請求項2] 前記不活性ガスはアルゴンガスである請求項1に記載の細胞増殖用材料。
- [請求項3] 前記プラズマ処理はマグネトロンスパッタリング装置によって行われ、ターゲット電極にはイオンスパッタによるスパッタ粒子の発生しない材料が用いられている請求項1又は2に記載の細胞増殖用材料。
- [請求項4] 請求項1乃至3のいずれかの細胞増殖用材料を膜状にしたことを特徴とする組織再生膜。
- [請求項5] 患者の組織欠損部へ請求項4の組織再生膜を装着するステップを含む組織再生方法。

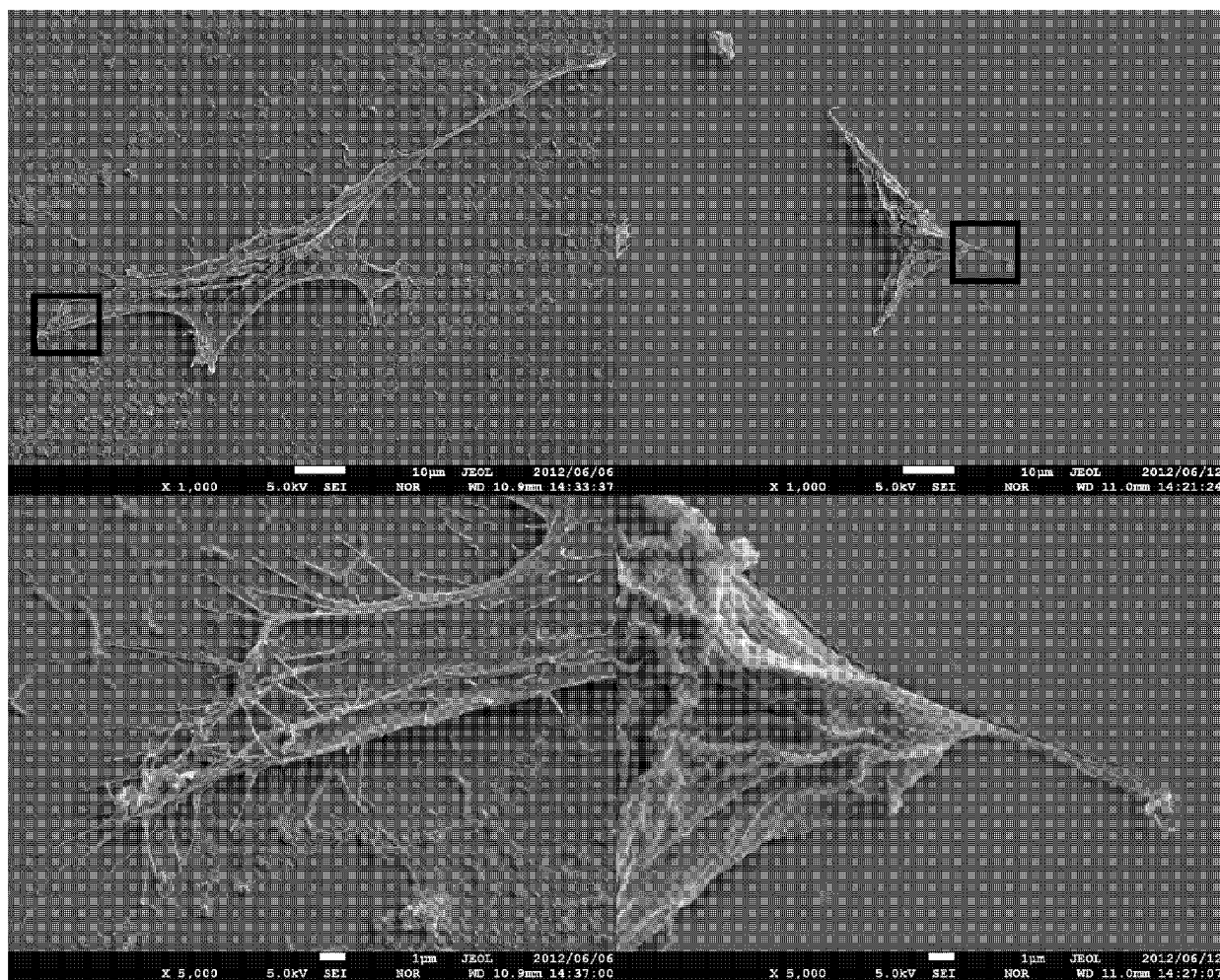
[図1]



[図2]



[図3]

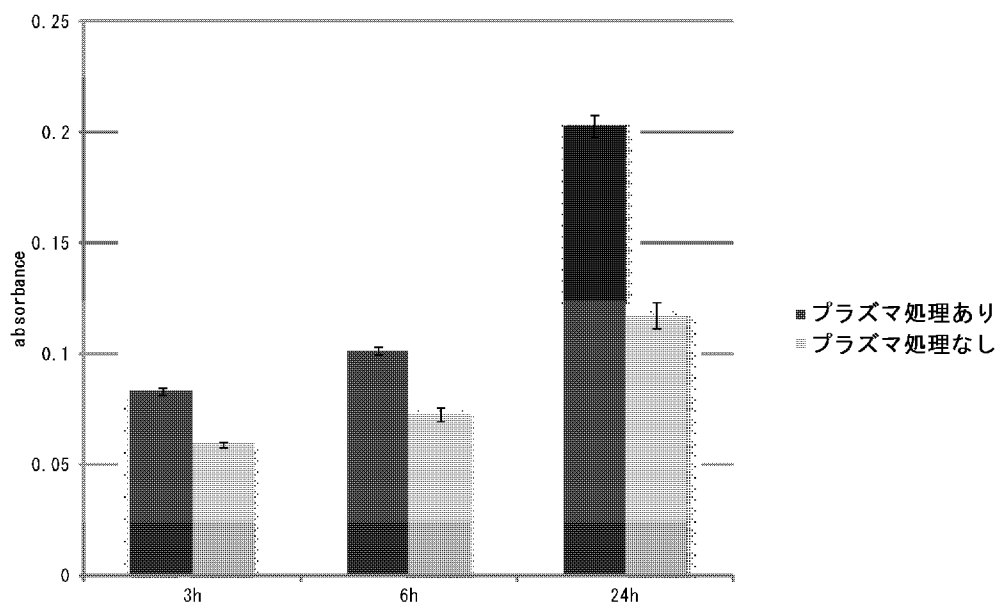


Arプラズマ処理PVDCフィルム

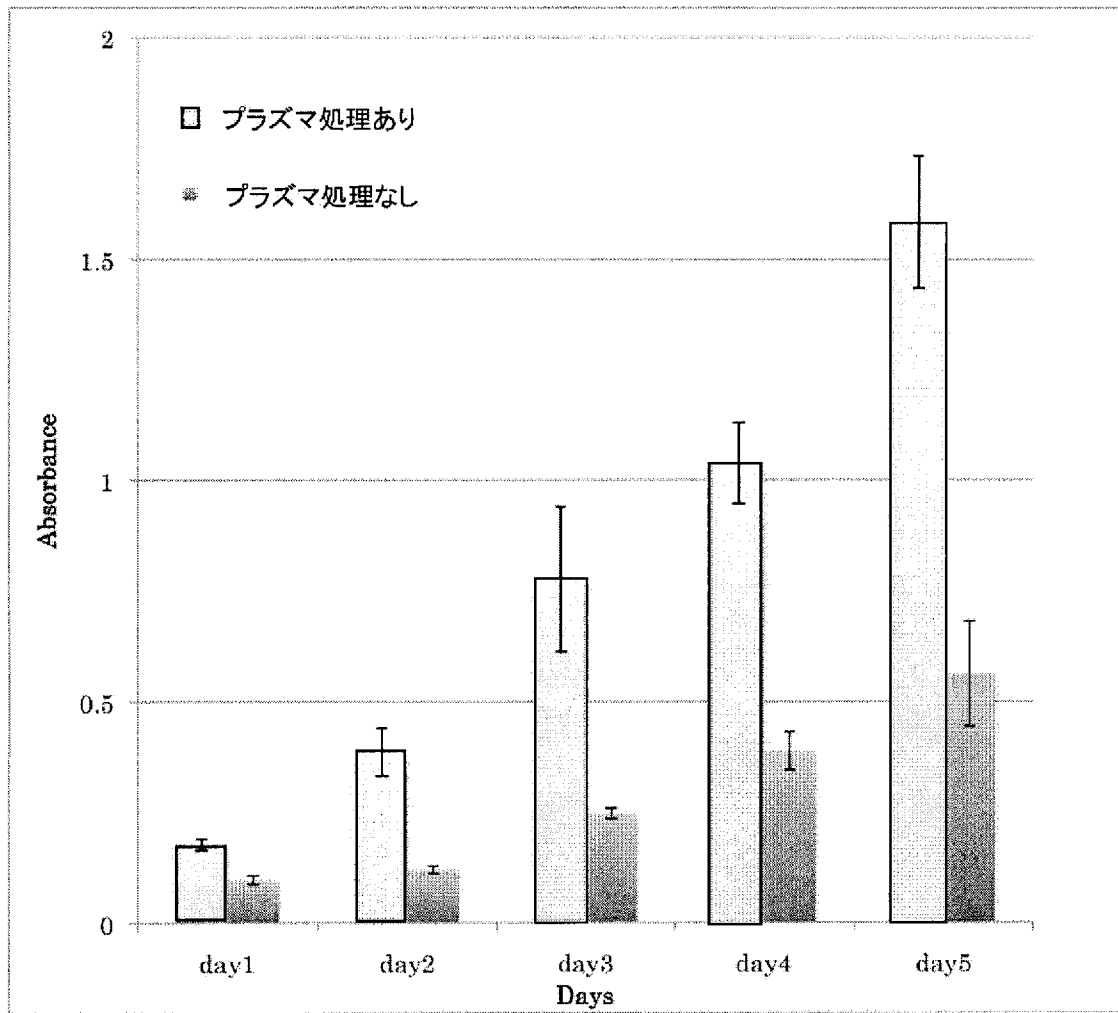
未処理PVDCフィルム

[図4]

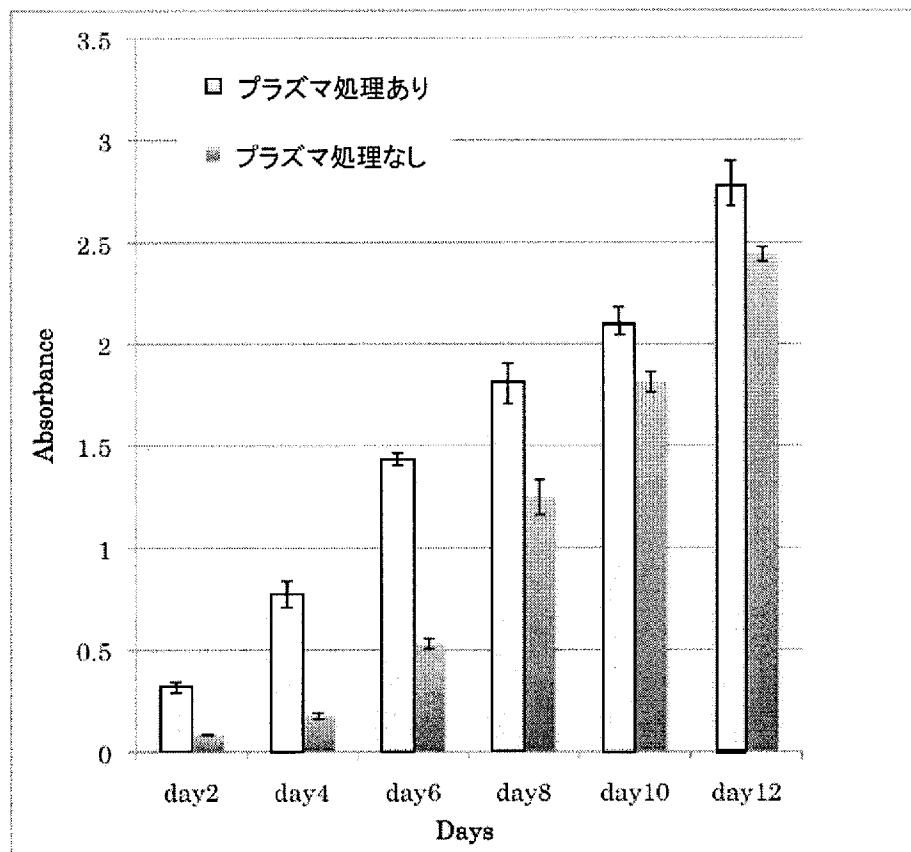
骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いた細胞接着試験



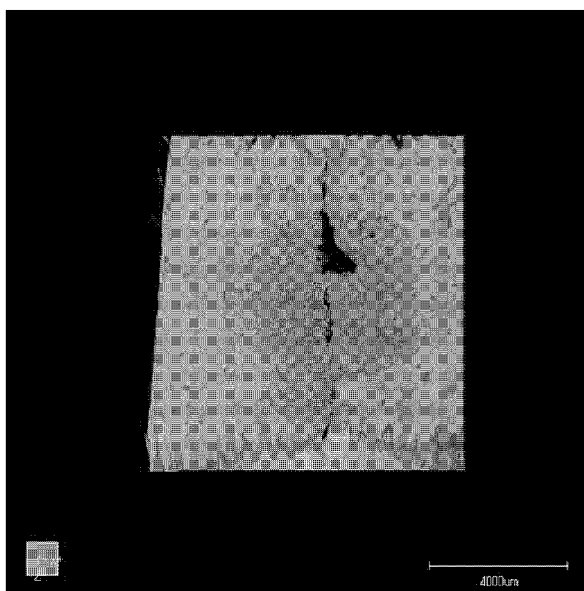
[図5]



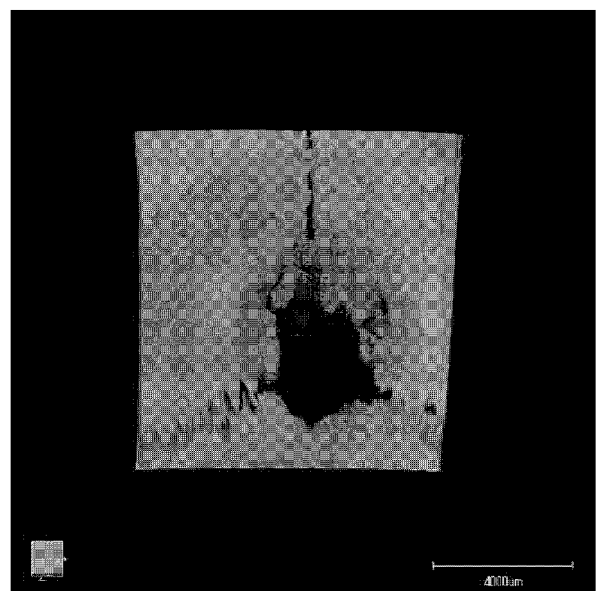
[図6]



[図7]

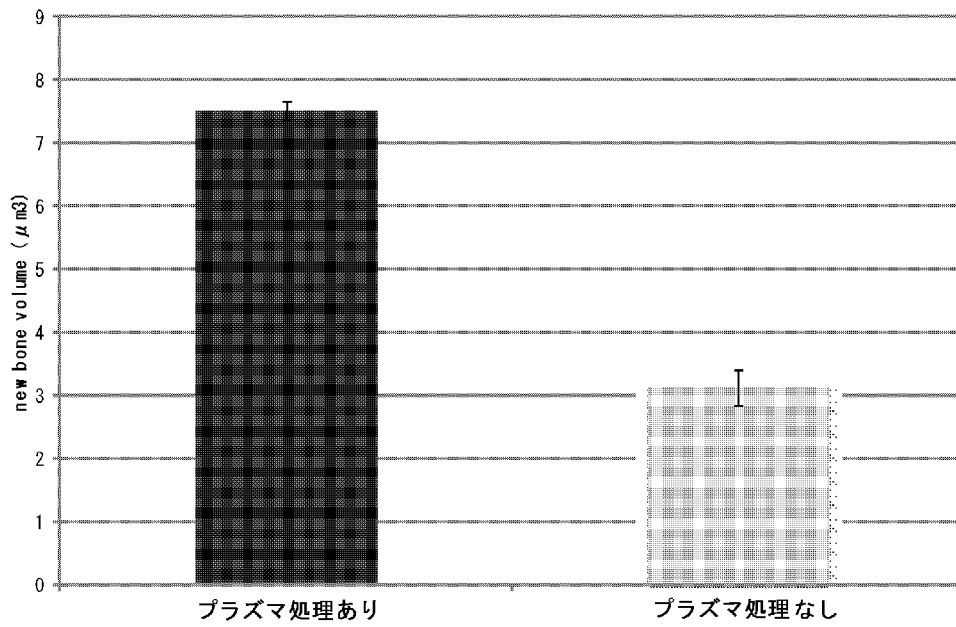


Arプラズマ処理PVDCフィルム

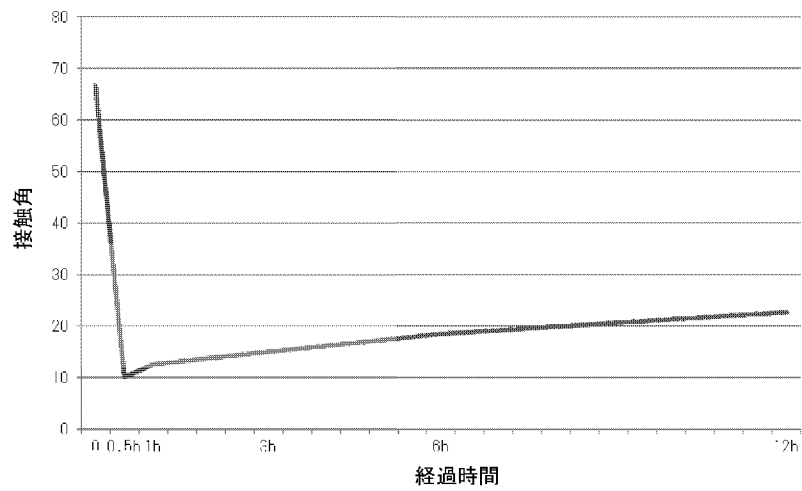


未処理PVDCフィルム

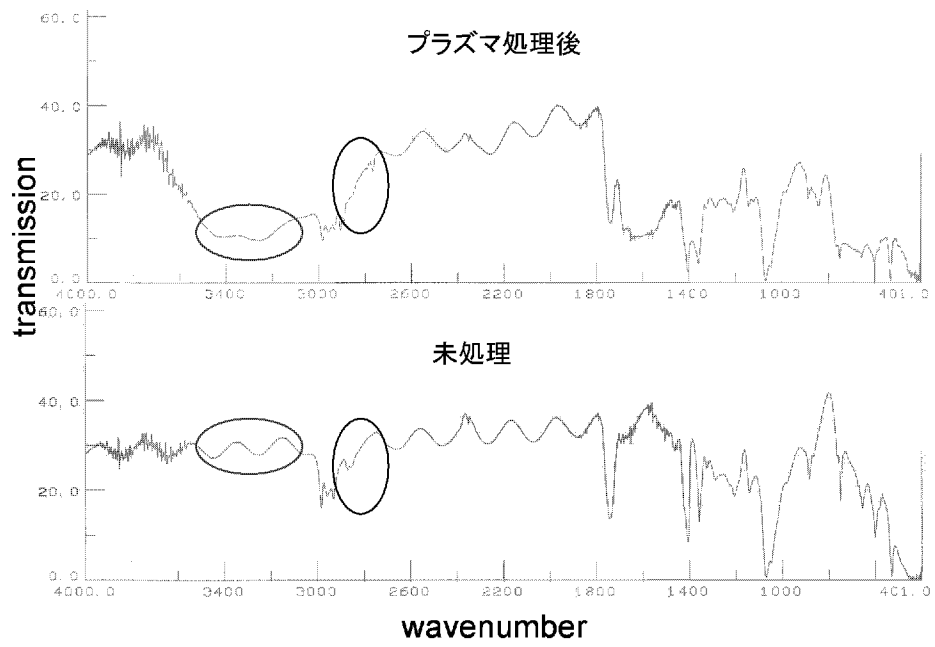
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/083008

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2008-054566 A (Hitachi, Ltd.), 13 March 2008 (13.03.2008), & US 2008/0057578 A1	1, 2, 4/1-4
X/Y	JP 2008-248181 A (Fujifilm Corp.), 16 October 2008 (16.10.2008), (Family: none)	1-4/1-4
Y	HAMAJIMA Soichiro, et al, Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. Dent Mater J., 2011, Vol.30 No.5, p.707-716	1-4

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
26 December, 2013 (26.12.13)

Date of mailing of the international search report
14 January, 2014 (14.01.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/083008

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Soichiro HAMAJIMA et al., "PVDC Film o Ashiba to shita Baiyo Kotsuzui Saibo Ishoku ni yoru Kotsu Saisei" Dai 32 Kai Nippon Material Gakkai Taikai Yokoshu, 2010, page 241 [P1-29]	1-4
Y	LIM Hye Ryeon, et al, Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films by microwave-induced argon plasma Surf Coat Technol., 2008, Vol.202 No.22-23, p.5768-5772	1-4
Y	ZHU Xiao, et al, Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro J Biomed Mater Res Pt A., 2005, Vol.73A No.3, p.264-274	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/083008

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of claim 5 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy or to a diagnostic method therefor and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
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/Y	JP 2008-054566 A (株式会社日立製作所) 2008.03.13 & US 2008/0057578 A1	1, 2, 4 / 1-4
X/Y	JP 2008-248181 A (富士フイルム株式会社) 2008.10.16 (ファミリーなし)	1-4 / 1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 26.12.2013	国際調査報告の発送日 14.01.2014	
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) 渡邊 倫子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 3764

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	HAMAJIMA Soichiro, et al, Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. Dent Mater J., 2011, Vol.30 No.5, p.707-716	1-4
Y	濱島聡一郎 他、 PVDC フィルムを足場とした培養骨髄細胞移植による骨再生 第 32 回日本マテリアル学会大会予稿集, 2010, p.241[P1-29]	1-4
Y	LIM Hye Ryeon, et al, Surface modification for enhancing behaviors of vascular endothelial cells onto polyurethane films by microwave-induced argon plasma Surf Coat Technol., 2008, Vol.202 No.22-23, p.5768-5772	1-4
Y	ZHU Xiao, et al, Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro J Biomed Mater Res Pt A., 2005, Vol.73A No.3, p.264-274	1-4

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項5に係る発明は、人の身体の手術若しくは治療による処置又は診断方法に係るものであり、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。