

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6576933号  
(P6576933)

(45) 発行日 令和1年9月18日 (2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日 (2019.8.30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 L 15/28 (2006.01)

A 6 1 L 15/28 1 0 0

A 6 1 L 15/42 (2006.01)

A 6 1 L 15/42 1 0 0

C 1 2 M 3/00 (2006.01)

C 1 2 M 3/00 A

C O 8 B 16/00 (2006.01)

C O 8 B 16/00

請求項の数 25 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2016-543668 (P2016-543668)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月30日 (2014.12.30)  
 (65) 公表番号 特表2017-506924 (P2017-506924A)  
 (43) 公表日 平成29年3月16日 (2017.3.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2014/051061  
 (87) 国際公開番号 W02015/101711  
 (87) 国際公開日 平成27年7月9日 (2015.7.9)  
 審査請求日 平成29年12月28日 (2017.12.28)  
 (31) 優先権主張番号 20136336  
 (32) 優先日 平成25年12月30日 (2013.12.30)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 フィンランド (FI)

(73) 特許権者 514158855  
 ユー ビー エム キュンメネ コーポレ  
 ーション  
 フィンランド国、エフアイー・〇〇・〇〇  
 ヘルシンキ、アルヴァー アアロン カト  
 ウ 1  
 (74) 代理人 100080791  
 弁理士 高島 一  
 (74) 代理人 100125070  
 弁理士 土井 京子  
 (74) 代理人 100136629  
 弁理士 鎌田 光宣  
 (74) 代理人 100121212  
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パターニングされたメンブレン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンであって、  
 当該メンブレンは、該メンブレンの少なくとも一面に、マイクロスケール凹部および  
 /または突出部を含む少なくとも一つのパターニングされた領域を含み、  
 前記ナノフィブリル多糖類は、植物由来のナノフィブリルセルロースを含み、  
 前記パターニングされた領域は、単位の繰返しパターンを含み、一つの単位の少なくと  
 も一つの寸法は、当該メンブレンの平面に沿って  $1\ \mu\text{m} \sim 500\ \mu\text{m}$  であり、  
 当該メンブレンは、傷の治療の用途のためのものである、  
 前記メンブレン。

【請求項 2】

当該メンブレンの少なくとも一面はマイクロスケール凹部および / または突出部を連続  
 的相互接続単位として有するパターニングされた領域を含む、請求項 1 に記載のメンブレ  
 ン。

【請求項 3】

前記パターニングされた領域の数平均厚さは、 $100\ \text{nm} \sim 100\ \mu\text{m}$  である、請求項  
 1 ~ 請求項 2 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 4】

前記パターニングされた領域は、 $10\ \text{nm} \sim 10\ \mu\text{m}$  の幅を有する共通壁と相互接続さ  
 れた単位の繰返しパターンを含む、請求項 1 ~ 請求項 3 のいずれか一項に記載のメンブレ

ン。

【請求項 5】

当該メンブレンは、 $1\text{ }\mu\text{m} \sim 300\text{ }\mu\text{m}$ の厚さを有する、請求項 1～請求項 4 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 6】

当該メンブレンは、ナノフィブリル多糖類の乾燥重量  $90 \sim 100\%$  を含む、請求項 1～請求項 5 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 7】

前記ナノフィブリル多糖類は、ヘミセルロース、キチン、キトサン、アルジネート、ペクチン、アラビノキシラン、またはこれらの誘導体をさらに含む、請求項 1～請求項 6 のいずれか一項に記載のメンブレン。

10

【請求項 8】

前記ナノフィブリル多糖類は植物由来のセルロースの誘導体を含む、請求項 1～請求項 7 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 9】

前記ナノフィブリル多糖類は機械的に崩壊された、請求項 1～請求項 8 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 10】

前記ナノフィブリル多糖類は、 $1 \sim 500\text{ nm}$ の数平均直径を有する多糖類ナノフィブリルおよび/またはナノフィブリル束を含む、請求項 1～請求項 9 のいずれか一項に記載のメンブレン。

20

【請求項 11】

当該メンブレンが、両面上に、前記のパターニングされた領域を含む、請求項 1～請求項 10 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 12】

請求項 1～請求項 11 のいずれか一項に記載されたメンブレンを製造する方法であって、

ナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階を有し、かつ、

a. マイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターニングされた領域を含むキャストリング支持部上に前記ナノフィブリル多糖類分散剤をキャストリングして乾燥させ、前記キャストリング支持部の前記マイクロスケール凹部および/または突出部に比べて逆の構成となっているマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターニングされた領域を含む形成されたメンブレンを除去する段階であって、該キャストリング支持部が、単位の繰返しパターンを含み、一つの単位の少なくとも一つの寸法が前記メンブレンの平面に沿って $1\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ である、該段階と、

30

b. 前記ナノフィブリル多糖類分散剤をメンブレンとなるように形成し、前記メンブレンの少なくとも一つの領域をエッチングしてマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターニングされた領域を提供する段階であって、前記パターニングされた領域が、単位の繰返しパターンを含み、一つの単位の少なくとも一つの寸法が前記メンブレンの平面に沿って $1\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ である、該段階と

40

からなる群から選択される 1つの段階を有する、前記方法。

【請求項 13】

請求項 1～請求項 11 のいずれか一項に記載されたメンブレンを製造する方法であって、

a. マイクロスケール凹部および/または突出部を含むパターニングされたフィルター上に、ナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階であって、前記パターニングされたフィルターが、単位の繰返しパターンを含み、一つの単位の少なくとも一つの寸法が前記メンブレンの平面に沿って $1\text{ }\mu\text{m} \sim 500\text{ }\mu\text{m}$ である、該段階、

50

b. 前記ナノフィブリル多糖類のフィブリルに対しては本質的に不透過性であるが液体に対しては透過性である前記パターンニングされたフィルターを通じて変更された圧力の効果によって前記ナノフィブリル多糖類分散剤から前記液体を排出して前記パターンニングされたフィルター上にメンブレンを形成する段階、

c. 前記ナノフィブリル多糖類分散剤から前記液体を除去し続けながら前記メンブレンを選択的に乾燥させる段階、および

d. 前記パターンニングされたフィルターから前記メンブレンを選択的に除去する段階を含み、

これによって、前記マイクロスケール凹部および/または突出部を有するパターンニングされたフィルターに比べて逆の構成でマイクロスケール凹部および/または突出部を有する、ナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを取得する、  
前記方法。

【請求項 1 4】

前記ナノフィブリル多糖類分散剤は、多糖類の崩壊によって取得され、選択的に多糖類の機械的崩壊によって取得される、請求項 1 2 または請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 d の段階は、前記パターンニングされたフィルターを前記パターンニングされたフィルターとナノフィブリル多糖類メンブレンを含むメンブレン産物の構成の部分として維持する段階を代替的に含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

メンブレンシートは、前記 c の段階で前記ナノフィブリル多糖類メンブレンを非接着層で選択的にコートされた加熱した表面と接触させることによって前記メンブレンに熱を印加して乾燥される、請求項 1 3 ~ 請求項 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記加熱した表面は、前記メンブレンシートに圧力を提供して前記パターンニングされたフィルターに対して圧力差を少なくとも部分的に引き起こすように前記メンブレンに対して加圧される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記加熱した表面および/または非接着層には前記のパターンニングがなされ、前記加熱した表面が前記メンブレンに対して加圧される時、前記加熱した表面および/または非接着層と対面するメンブレンの面に逆パターンが転写される、請求項 1 6 または請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ナノフィブリル多糖類メンブレンがラミネートされるパターンニングされたフィルターまたは構造層などの、前記加熱した表面と前記ナノフィブリル多糖類メンブレンの間に内在した層を通じて、前記加熱した表面から前記ナノフィブリル多糖類メンブレンに熱を印加する、請求項 1 6 ~ 請求項 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ナノフィブリル多糖類分散剤は移動するパターンニングされたフィルター上に連続ウェブとして提供され、連続的パターンニングされたメンブレンは互いに異なる処理段階を通じて前記移動するパターンニングされたフィルター上に前記連続ウェブを転写することによって製造され、前記パターンニングされたメンブレンは前記パターンニングされたフィルターから分離される、請求項 1 4 ~ 請求項 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

ナノフィブリル多糖類は、0.5 wt % 濃度の水分散剤で 1 ~ 50 Pa の貯蔵弾性率を有する、請求項 1 2 ~ 請求項 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

療法に使うための、請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか一項に記載のメンブレン。

【請求項 2 3】

傷の治療に使うための、請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか一項に記載のメンブレン。

10

20

30

40

50

## 【請求項 2 4】

傷の治療に使うためのキットであって、当該キットは、請求項 1 ~ 請求項 1 1 のいずれか一項に記載されたメンブレンを有し、選択的に水性培地および説明書を有する、前記キット。

## 【請求項 2 5】

前記メンブレンは、滅菌および無菌パッケージングされ、選択的な前記水性培地は滅菌されてメンブレンに吸収されて提供されるか別途のガラス瓶に提供され、前記説明書は傷治癒時療法的に有用な細胞とともに使うためのものである、請求項 2 4 に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

10

## 【0001】

本発明はナノセルロース技術およびバイオ医薬品分野に関するものである。具体的には、本発明は、ナノフィブリル多糖類を含む新規のパターニングされたメンブレン、その製造方法、および傷治療などの多様な応用分野における使用に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

皮膚の傷、特に、深刻な傷と火傷を治療することは時々難しい。皮膚の傷治癒には、損傷した組織を復旧し、皮膚の障壁機能を再確立する一連の細胞型および分子型過程が含まれる。損傷後、初期反応は血液損失と感染を防止するフィブリン塊の形成である。解除されたフィブリンと化学活動性は、感染を防止し、新しい血管を形成し、細胞のマトリックスを合成するようにそれぞれ機能する好中球 (neutrophils)、マクロファージ (macrophages)、内皮細胞および繊維芽細胞を誘惑する。以後、塊障壁は、傷表面を復旧して新しい機能上皮を再構成する移動 (migrating) 角質細胞で代替される。

20

## 【0003】

治癒過程は、損傷後、約 2 4 時間に始まって傷が回復する時まで続く。ひとまず新しい上皮が確立されると、血管密度が傷領域で減少し、真皮のリモデリングが数ヶ月の間続く。深刻な火傷または低体温 (hypothermal) 損傷などの深刻な損傷がある場合、皮膚が損傷して傷を復旧することができず、時には患者が生存できない場合もある。他の一部の場合に、正常な傷治癒過程が失敗することもあり、炎症状態を持続的に続くことになる。このような問題点は、患者が糖尿病などの正常な治癒過程を損傷させる慢性病をすでに有していると時々発生する。

30

## 【0004】

成長した (adult) 哺乳動物の治癒過程の主な構成要素は細胞外マトリックスを生成するための繊維芽細胞の刺激である。細胞外マトリックスは傷領域を復旧するように発達する結合組織の主な成分を構成する。しかし、復旧過程は完璧ではなく、結合組織は、時々繊維型であり、結合組織の傷跡 (繊維症) がよく形成される。傷跡は、フィブロネクチンとコラーゲン類型 1 および 3 のマトリックスが支配的な結合組織として構成される。傷跡は、(皮膚の傷跡からわかるように) 異常な構造のコラーゲン繊維からなることもあり得、または (中枢神経系の傷跡からわかるように) 結合組織が異常に蓄積されたものであり得る。多くの傷跡は異常に構成されたコラーゲンと過多コラーゲンからなる。

40

## 【0005】

傷治癒に関連されたさらに他の難しさは、一般的に傷治癒の自然的で本質的な要素と見なされる収縮である。しかし、多くの場合に、治癒過程の間制御されない過度な傷収縮が観察され、収縮誘導繊維症が発生する可能性があり、したがって、例えば関節や手足の奇形および本来の機能ができない (impaired) 移動性を引き起こし得る。

## 【0006】

業界では皮膚の傷治癒を改善し、炎症、繊維症および傷跡の発生を防止するように多様な薬剤、傷ドレッシング、および組成物が提案されてきた。傷ドレッシングと軟膏ガーゼは浅い真皮火傷などの真皮の上層に至る皮膚欠陥に対する療法として一般的に使われる。

50

深い真皮火傷、少なくとも2度の真皮火傷または褥瘡などの皮膚欠陥が真皮の下層に達すると、表皮細胞の増殖による皮膚組織の自己再建化が問題となる。このような欠陥は、通常的に、瘡蓋または非正常的肉芽組織を壊死組織除去 (debride) し、欠陥を同種異形皮膚、異種発生性皮膚、人工シリコン皮膚、皮膚代替物、傷ドレッシングでカバーすることによって正常的な肉芽組織を再建し、引き続き、自家 (autologous) 部分層皮膚移植 (split-thickness skin graft; STSG) または全体皮膚移植によって皮膚を再建することによって治療される。

#### 【0007】

前記の考慮事項は人の傷治療および炎症に主に適用されるが、同じ問題点が動物、特に、獣医学的動物または家畜 (例えば、馬、牛、犬、猫など) でも発生する可能性があることを理解できるはずである。

10

#### 【0008】

WO01/03750は、間質細胞が付着され得るフレームワークおよび人間細胞のマトリックスを含む物質を開示している。

#### 【0009】

EP06742940は、脂肪組織誘導基質幹細胞で瘻孔 (fistulae) などの傷の治療を開示している。分離された細胞は注射器によって治療部位に伝達される。ナノフィブリルセルロース上にマイクロスケールテクスチャーを生成する方法は、なめらかなメンブレンに規則的に配列されたポア (pores) を有する平たいセルロースメンブレンを製造するように電子スピン (electrospun) セルローススキャフォールドとレーザー切除を使用してきた (Rodriguez K. et al., Electrospun nanofibrous cellulose scaffolds with controlled microarchitecture, Carbohydrate Polymers, 2013)。

20

#### 【0010】

Jones、CurrieおよびMartinは、これらの報告書で傷治療のための多様なシステムを扱っており (A guide to biological skin substitutes, British Journal of Plastic Surgery (2002), 55, 185-193)、そのうちの一つは、レーザー-ドリリングされたポアを満たすように (populate) 角質細胞が体外で (in vitro) シーディング (seed) されるエステル化されたヒアルロン酸のレーザー-穿孔された誘導体から生成されるレーザースキン、アップサイド-ダウンメンブレン伝達システムである。引き続き、細胞群体がメンブレンの上下で成長する。このシステムは白斑症を治療し、インテグラ (Integra) を再表面化するのに使われてきた。

30

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0011】

業界での一部前進にもかかわらず、傷治療と組織復旧の間、傷治療を向上させて炎症を防止するように、傷部位に治療細胞 (therapeutic cells) を制御しながら簡単に伝達する必要が依然として残っている。

40

#### 【0012】

本発明の目的は、医療応用分野のためにナノフィブリル多糖類を含む新規のパターニングされたメンブレンを提供することである。

#### 【0013】

本発明の他の目的は、皮膚の傷治療の間炎症を防止したり少なくとも部分的に緩和させる新規の組成物、装置、および方法を提供することである。

#### 【0014】

本発明のさらに他の目的は皮膚の傷を治療するための装置を開発することである。好ましくは、装置は生体医学的装置である。

#### 【0015】

50

本発明者らは、驚くべきことに、マイクロスケルトポグラフィーを有する連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含み、メンブレンの少なくとも一面上に凹部および／または突出部を含むパターンニングされたメンブレンを製造する新規の方法を開発した。

【0016】

本発明のメンブレンは、驚くべきことに、本発明のメンブレンと幹細胞を含む装置の構成要素として有用であった。前記装置は、傷治癒と組織復旧の間傷治癒を非常に向上させて炎症を防止する効果を表した。

【0017】

マイクロパターンは、傷治療のための装置の製造に特に有用であることを発見した。本発明のパターンニングされたメンブレンを使うことによって、治療細胞が、メンブレンのパターンニングされた構造上に均一に拡散することができ、細胞がメンブレンから生存可能な状態で分離される傷部位に移送され得る。装置は、傷治療部位に付着した場合、傷治癒が非常に向上された。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明の連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むパターンニングされたメンブレンは、

a. 凹部および／または突出部を含むマイクロスケルトポグラフィーを有するパターンニングされたフィルター（以下、「フィルター」を「フィルタ」と記載する場合もある）上に、ナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階、

b. ナノフィブリル多糖類のフィブリルに対しては本質的に不透過性であるが液体に対しては透過性であるパターンニングされたフィルターを通じて変更された圧力の効果によって、ナノフィブリル多糖類分散剤から前記液体を排出して多糖類分散剤の乾物（dry matter）含量を増加させてパターンニングされたフィルター上にメンブレンシートを形成する段階、

c. ナノフィブリル多糖類分散剤から液体を除去し続けながら前記メンブレンを選択的に乾燥させる段階、および

d. パターンニングされたフィルターから前記メンブレンを選択的に除去する段階

を含む方法によって製造することができ、

これによって、マイクロスケール凹部および／または突出部を有するパターンニングされたフィルターに比べて逆の構成（inverse arrangement）でマイクロスケール凹部および／または突出部を有する、ナノフィブリル多糖類を含むパターンニングされたメンブレンを取得する。

【0019】

その上、本発明の連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含み、メンブレンの少なくとも一面上にマイクロスケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を有するメンブレンは、ナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階、および

a. マイクロスケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含むキャストリング支持部上にナノフィブリル多糖類分散剤をキャストリングして乾燥させ、マイクロスケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含んで形成されたメンブレンをキャストリング支持部に比べて逆の構成で除去する段階と、 b. ナノフィブリル多糖類分散剤をメンブレンとなるように形成し、メンブレンの少なくとも一つの領域をエッチングしてマイクロスケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を提供する段階からなる群から選択される段階を含む方法によって製造され得る。

【0020】

本発明のナノフィブリル多糖類を含むパターンニングされたメンブレンは生体医学的装置などの装置の構成要素として使用され得る。装置は、細胞および連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを含み、メンブレンの少なくとも一面はマイクロス

10

20

30

40

50

ケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含む。具体的には、装置は療法に有用な細胞を含み、パターンニングされたメンブレンはナノフィブリル多糖類、および水性培地を含む。

【 0 0 2 1 】

本発明のメンブレンは、療法に使用時に、傷、好ましくは、皮膚の傷または皮膚火傷の治療に使用時に、真皮組織損傷からの回復の間、炎症、免疫拒否または傷跡形成防止のために使用する時に有用である。

【 0 0 2 2 】

装置は、細胞、好ましくは、療法的に有用な細胞を提供し、ナノフィブリル多糖類を含み、凹部および／または突出部を含むマイクロスケルトポグラフィーを有するパターンニングされたメンブレンを水性培地によって吸収し、メンブレン上に細胞を転写し、およびメンブレン上の細胞の付着が可能であり、維持または未分化なまたは分化した成長が可能な状態で細胞を培養することによって製造される。生体医学的装置が製造される場合、療法的に有用な細胞は、その細胞が凹部および／または突出部を含むパターンニングされた表面上にまたはひいてはメンブレン上の凹部内に定着できるように、パターンニングされたメンブレン上に拡散される。

【 0 0 2 3 】

前記装置は、細胞、好ましくは、療法的に有用な細胞を提供し、連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを水性培地で吸収し、このとき、メンブレンの少なくとも一面はマイクロスケール凹部および／または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含み、メンブレン上に細胞を転写し、メンブレン上の細胞の付着が可能であり、細胞の維持または未分化なまたは分化した成長が可能な状態で細胞を培養することによって製造される。

【 0 0 2 4 】

原核細胞の通常の大きさは約  $1 \sim 5 \mu\text{m}$  で、真核細胞の通常の大きさは約  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  である。連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類およびマイクロスケール凹部および／または突出部を含むパターンニングされた領域を含むメンブレンは、細胞を収容し、細胞の接着 (a d h e s i o n)、増殖、および整列を容易にさせるのに特に適切である。ナノフィブリル多糖類およびマイクロスケール凹部および／または突出部を含むメンブレンは、例えば、療法的に有用な細胞をメンブレンに最も適した形で付着できるようにし、その細胞を過度に堅固に結合することなく細胞が治療部位に実際に伝達されることを容易にさせることができ、これによって、細胞と治療部位間の完全な接触を容易にさせることができ、必要に応じて細胞を部位から分離することもできる。ナノスケールまたはマクロスケールパターンは、単独で使用時、すなわち、マイクロスケール凹部および／または突出部がない場合、必要なマイクロ環境を提供しない。ナノフィブリル多糖類は、また、全体細胞というよりは細胞受容体と同じ大きさスケールのナノスケルトポグラフィーを提供することができる。ナノフィブリル多糖類は、また、メンブレンのための優れた吸水性を提供し、これによって伝達される細胞または治療される部位のために水性培養培地と任意の追加薬剤の統合を容易にさせる。マイクロスケルトポグラフィーはメンブレンの表面湿性 (m o i s t) を維持することを容易にさせる。凹部がメンブレンの全体厚さにわたって延長されないメンブレンは、装置で使用時、細胞が実質的に表面上に留まり、これによって、より多くの細胞が治療部位と接触して治療部位に転写され得る追加効果を有する。スルーホール (T h r o u g h - h o l e s) もメンブレンの引裂 (t e a r) 強度などの機械的特性を減少させることができる。

【 0 0 2 5 】

本発明の一実施形態に係るメンブレンは、療法、傷治療、皮膚の傷または皮膚火傷の治療に使用し、または真皮組織損傷から回復の間、炎症、免疫拒否および／または傷跡形成の防止に使うための装置に有用である。

【 0 0 2 6 】

本発明の他の実施形態は、また、生体組織工学、マイクロ流体工学、およびマイクロ電

10

20

30

40

50

子工学での本発明のパターニングされたメンブレンおよび／または本発明の装置の使用に関するものである。

【 0 0 2 7 】

本発明のさらに他の実施形態は、また、生体組織工学、マイクロ流体工学、マイクロ電子工学で使用するよう、本発明のパターニングされたメンブレン、選択的に水性培地、および説明書を含むキットに関するものである。

【 0 0 2 8 】

さらに他の一実施形態において、本発明は、本発明の治療細胞があるパターニングされたメンブレンを皮膚の傷がある患者の傷部位などの傷治療部位上に付着することによって傷を治療する方法に関するものである。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 9 】

【図 1】一実施形態によりパターニングされたメンブレンを製造する方法を図示する図面。

【図 2】他の一実施形態によりパターニングされたメンブレンを製造する方法を図示する図面。

【図 3】パターニングされたメンブレンを製造する方法の第 2 実施形態に係る加圧段階を図示する図面。

【図 4】パターニングされたメンブレンを製造する方法の第 3 実施形態に係る乾燥段階を図示する図面。

【図 5】 $1\text{ }\mu\text{m}$  フィルタークロス (cloth) で製造されたマイクロパターニングされた NFC メンブレンの SEM 画像を図示する図面であって、倍率:  $\times 100$ 、A;  $\times 400$  B、および  $\times 1200$  C. フィルタークロスは生産に使用される ( $\times 400$ 、D)。

【図 6】 $10\text{ }\mu\text{m}$  フィルタークロスで製造されたマイクロパターニングされた NFC メンブレンの SEM 画像を図示する図面であって、倍率:  $\times 100$ 、A;  $\times 400$  B、および  $\times 1200$  C. フィルタークロスは生産に使用される ( $\times 400$ 、D)。

【図 7】 $10\text{ }\mu\text{m}$  フィルタークロスの SEM 画像 (A) および対応する NFC メンブレンの部分的に重畳された反転 SEM 画像 (B) を図示する図面。

【図 8】傾斜角が互いに異なる  $1\text{ }\mu\text{m}$  フィルタークロスで製造された NFC メンブレンの SEM 画像を図示する図面。傾斜角  $0^\circ$ 、 $\times 100$  A; 傾斜角  $0^\circ$ 、 $\times 300$  B; 傾斜角  $45^\circ$ 、 $\times 100$  C; 傾斜角  $45^\circ$ 、 $\times 200$  D.

【図 9】細胞が治療のために傷に伝達される前に細胞の分離および製造のための一般的な技法を図示する図面。

【図 10】表面パターニングと hASC 細胞に対する差を表す走査電子顕微鏡を図示する図面。 $700\times$  倍率。(A) 表面上に付着されようとする hASC を図示するメンブレンのなめらかな側。スフェロイド (spheroid) を形成する細胞の形態学参照。(B) 粗パターニングされたメンブレン側。ナノセルロースメンブレンの上の hASC 成長の断層の詳細図。

【図 11】プラスチック (A - C) およびナノセルロースメンブレン (D - F) 上に互いに異なるコート状態で培養される hASC 細胞の透過電子顕微鏡を図示する図面。A - C. プラスチック上に培養される細胞は hASC の通常の繊維芽細胞型形態学を図示する。細胞核は、コンパクト化され、細胞質内で偏心される脂肪滴を認識することができる。これは、培養 1 週間後に細胞中の一部が分化し始めたことを表す。NFC メンブレンの真上にシーディングされた細胞は、プラスチックの上で成長した細胞と類似の特徴を表す。細胞核はさらに楕円形であり、ミトコンドリアは正常なクレスタ (crest) を表す。E. 細胞は細長型核および明確なミトコンドリアを表す。F. 細胞コーティングの開始時に、細胞はいかなる核変形も提示しない。細胞質レベルで、培養の脂肪滴の増加する量を観察することができる。

【図 12】未分化間充織マーカーのための QRT-PCR からの結果を図示する、アガロ

10

20

30

40

50

ースゲル電気泳動を表す。互いに異なる状態でNFCメンブレンの上に1．3日と7日培養された後で、hASC細胞は、プラスチックの上で培養されるこれらの写本(cou n t e r p a r t s)と同じレベルで間充織末分化マーカーを発現し続ける。

【図13】ナノセルロースメンブレン対プラスチックの上に互いに異なるコーティングで培養されるhASC細胞間のサイトカイン発現の差を図示するX線露出された膜を表す。

【図14】ナノセルロースメンブレンおよび細胞治療5日での対照および治療動物の病理学研究を図示する図面。(A)．損傷未治療。この損傷は外傷領域を表す。境界にあるピンクラインはフィブリンのラインである。このフィブリン合成は損傷後傷治癒応答の第1信号のトーン(tone)である。多くの炎症細胞が表皮から検出される。これは、損傷が傷治癒回復の初期段階にあることを表す。さらに深い部分(下の表皮および初期真皮)では、多くの繊維芽細胞が埋没された細胞外マトリックスが検出され、これは傷が回復の未熟段階(初期段階)にあることを意味する。(B)．表皮がかなり回復して成熟した。真皮は、さらに成熟されており、浮腫および炎症細胞のトレースを有する。傷治癒は、治療された細胞でさらに早く、特に、表面にあって適切な細胞と接触する層でさらに早い。過程の間、真皮は進化し続ける必要がある。毛穴は十分に発達して構成されている。真皮は再構築中であり、筋肉はまだきちんと構成されていない。

【発明を実施するための形態】

【0030】

特に断らない限り、詳細な説明と請求範囲で用いられる用語は細胞培養またはナノセルロース技術分野で共通して用いられる意味を有する。具体的に、次に従う用語は後述する意味を有する。

【0031】

本願において、「多糖類」という用語は、グリコシド結合によって共に連結された繰返されるモノマー単位の長い線形または分岐型(branch ed)炭水化物分子、およびグリコシド結合によって共に連結された単糖類のチェーンで構成された複合炭水化物を含むものを意味する。本発明の実施形態に係る多糖類の非制限的な例としては、セルロース、ヘミセルロース、キチン、キトサン、アルジネート、ペクチン、アラビノキシラン、ナノフィブリルセルロース、またはこれらの誘導体がある。「ナノフィブリル」という用語は、多糖類原料から分離された既存の副構造(substance)を示す。ここで、ナノフィブリルは、多糖類原料の副構造を破壊することによって、例えば、副構造を溶解した後、電子スピン多糖類などの新しい構造を生成することによって取得される構造を示さない。したがって、「ナノフィブリル多糖類」という用語は、多糖類ナノフィブリルまたはナノフィブリル束の集合を示す。「ナノフィブリル多糖類」という用語の非制限的例としては、すべてのマイクロフィブリル化されたセルロース(MFC)およびナノセルロースを示す「ナノフィブリルセルロース」すなわち「NFC」がある。また、NFCに対する他のいくつかの広く使われる同義語、例えば、フィブリルセルロース、セルロースナノ繊維、ナノフィブリル化されたセルロース(CNF)、ナノスケールフィブリル化されたセルロース、マイクロフィブリルセルロース、またはセルロースマイクロフィブリルがある。

【0032】

ナノフィブリルセルロースは、セルロース原料から誘導された分離されたセルロースマイクロフィブリルまたはマイクロフィブリル束を含む。ナノフィブリルセルロースは、事実上豊富で特に植物と一部のバクテリアで豊富な天然多糖類ポリマーに基づく。

【0033】

ナノフィブリルセルロースの生産技術はパルプ繊維の水性分散剤の研削(grinding)または均質化による機械的治療に基づく。分散剤内のナノフィブリルセルロースの濃度は通常非常に低く、一般的に約1～5wt%である。研削または均質化工程後に、取得されたナノフィブリルセルロース物質は希釈粘弾性ハイドロゲルである。

【0034】

強い水保有力(water retention)は、水がフィブリルに多くの水素結

10

20

30

40

50

合を通じて結合されるので、ナノフィブリルセルロースに対して通常的である。つまり、メンブレンで通常の乾物含量に到達するには、長い乾燥時間と効率的な水除去が必要である。真空濾過などの従来の方法では、建造物を取得するのに数時間がかかり得る。繊維型多糖類分散剤の低い一貫性は、メンブレンの表面上での秤量の小さい変化がある薄いメンブレンの形成を有利にさせる。反面、これは乾燥の間除去されるべき水の量を増加させる。

#### 【 0 0 3 5 】

陰イオン基を含むナノフィブリルセルロース（陰イオン性帯電されたナノフィブリルセルロース）などの一部ナノフィブリルセルロース等級では、粘性が高いほど脱水時間が長くなる問題点がさらに存在する。このような陰イオン性帯電されたナノフィブリルセルロースは、例えば、改質の結果でカルボキシル基を含有する化学的に改質されたセルロースであり得る。N - オキシル媒介（m e d i a t e d）触媒酸化を通じて（例えば、2、2、6、6 - テトラメチル - 1 - ピペリジン N - 酸化物を通じて）取得されたセルロースまたはカルボキシメチル化されたセルロースが、陰イオン電荷が解離されたカルボキシル酸モイエティ（m o i e t y）のために陰イオン性帯電されたナノフィブリルセルロースの例である。

#### 【 0 0 3 6 】

「連続構成」という用語は、ナノフィブリル多糖類がメンブレンで連続構造として存在する構造または配列を示す。言い換えれば、ナノフィブリル多糖類が全体面ブレンに沿って配列される。

#### 【 0 0 3 7 】

「水性培地」という用語は、水、滅菌水、精製水、生理的食塩水、生理的緩衝剤、培養培地、栄養剤、および／または生理活性剤、およびこれらの組合せからなる群から選択される任意の水性培地を示す。水性培地は、細胞または組織の維持、移送、分離、培養、電波、パッシング（p a s s a g i n g）または分化に適切な水、脱イオン水、緩衝液、または栄養培地などの任意の水性培地であり得る。

#### 【 0 0 3 8 】

「相互接続された」または「相互接続」という用語は、連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンがマイクロスケール凹部および／または突出部連続相互接続された単位として有するパターンニングされた領域を含むことができる構成を示す。言い換えれば、マイクロスケール凹部および／または突出部は互いに接触する。接触は凹部および／または突出部間の直接的接触であり得、または凹部および／または突出部が緩く接続され得る。本発明の一実施形態において、パターンニングされた領域は共通壁によって相互接続される単位の繰返しパターンを含むことができる。

#### 【 0 0 3 9 】

「マイクロスケール凹部および／または突出部」という用語は、凹部および／または突出部を有するトポグラフィーを示し、ここで、凹部はメンブレンの全体厚さにわたって延長されない。マイクロスケール凹部および／または突出部は通常の細胞の大きさのスケールでトポグラフィーを提供し、これによって、細胞の接着、増殖、整列を容易にさせる。マイクロスケールトポグラフィーはメンブレンの表面湿性を維持することを容易にさせる。マイクロスケール凹部および／または突出部は、単独で使用されると、すなわち、マイクロスケール凹部および／または突出部がないナノスケールまたはマクロスケールパターンによっては提供されない必要なマイクロ環境を提供する。

#### 【 0 0 4 0 】

ナノフィブリルセルロースを取得するためには、精製機、研削機、均質化機、コライダー（c o l l i d e r）、摩擦研削機、超音波ソニケーター、マイクロフリュイダイザ（f l u i d i z e r）、マクロフリュイダイザまたはフリュイダイザ型均質化機などのフリュイダイザなどの適切な装備によってセルロースパルプまたは酸化されたセルロース原料の機械的崩壊（d i s i n t e g r a t i o n）を実行する。好ましくは、ナノフィブリルセルロースは機械的崩壊を利用して取得される。

## 【0041】

多様な生産技術を利用してナノフィブリルセルロースのいくつかの互いに異なる等級を開発してきた。各等級は製造方法、フィブリル化の程度、および化学的組成により互いに異なる特性を有する。等級の化学組成物も可変される。原料ソースにより、例えば、HW v s SWパルプにより、互いに異なる多糖類組成物が最終セルロースナノフィブリル産物に存在する。通常的に、非イオン性または天然等級は広いフィブリル直径を有する一方、化学的に改質された等級は格段に厚く、連続網を有する。セルロースナノフィブリルの数平均フィブリル直径は、適切に1~200nmで、好ましくは、天然等級の数平均フィブリル直径は1~100nm、化学的に改質された等級の場合には1~20nmである。大きさ分布も改質された等級ではさらに狭い。天然イオン-交換されたセルロースナノフィブリルは、部分的に非均質性がある不連続的構造を示す。本発明の実施形態で、ナノフィブリルセルロースは好ましく非毒性および滅菌性を有する。

10

## 【0042】

ナノフィブリルセルロースの誘導体は、本発明で、例えば、細胞培養と傷治療に使用するのに適切な、化学的にまたは物理的に改質された任意のセルロース誘導体であり得る。化学的改質は、例えば、セルロース分子のカルボキシルメチル化、酸化、エステル化、またはエーテル化反応に基づき得る。改質は、また、セルロース表面上での、陰イオン性、陽イオン性、または非イオン性物質またはこれらの任意の組合せの物理的吸収によって具現され得る。説明した改質は、ナノフィブリルセルロースの製造の前、後、または間に実行され得る。一部改質では、身体で分解され得る物質を引き起こし得る。

20

## 【0043】

本発明の実施形態に係るナノフィブリルセルロースとセルロースメンブレンは、傷治癒を向上させ、傷跡の発生を防止し、または傷領域の血管の新生を改善する薬剤と合成されるかこのような薬剤で補充され得る。

## 【0044】

化学的誘導化過程での代替(substitution)程度は広く変えられ得る。例えば、TEMPOまたはN-オキシル媒介酸化は、通常的に、300~1500micromol/g、好ましくは600~1200micromol/g、最も好ましくは、700~1100micromol/gの値を帯電するように行われる。酸化されたNFCは、また、通常的に0~250micromol/gであるアルデヒド作用基を含有することができる。カルボキシルメチル化を通じた誘導化は、通常的に、フィブリル化の前に0.05~0.3、好ましくは0.08~0.25、最も好ましくは、0.10~0.2人dsレベルでのセルロースパルプのために行われる。誘導化が陽イオン化によって行われると、dsレベルは通常的に0.05~0.4、好ましくは0.15~0.3である。

30

## 【0045】

## メンブレンの出発物質

パターンニングされたメンブレンが製造される出発物質として用いられるナノフィブリル多糖類は、任意の適切な多糖類、好ましく植物-由来ナノフィブリルセルロースを含む。好ましくは、ナノフィブリルセルロースは、ナノフィブリルセルロース、ヘミセルロース、キチン、キトサン、アルジネート、ペクチン、アラビノキシラン、ナノフィブリルセルロース、またはこれらの誘導体から少なくとも部分的に構成され、最も好ましくは、ナノフィブリルセルロースは植物-由来ナノフィブリルセルロースである。

40

## 【0046】

一実施形態において、ナノフィブリル多糖類は、サブマイクロメートル範囲のフィブリル直径を有するナノフィブリルセルロースを含む。このようなフィブリル直径を有するナノフィブリルセルロースは低濃度においても自己組立されたハイドロゲル網を形成する。このようなゲルは大きいずり流動化(shear thinning)と揺変性(thixotropic)を有する。

## 【0047】

一実施形態において、ナノフィブリル多糖類は、類型1結晶構造を有する天然または未

50

酸化されたセルロースまたは類型 1 結晶構造を少なくとも部分的に有するカルボキシメチル化されたセルロースである。

【0048】

他の一実施形態において、ナノフィブリル多糖類はグラウンドマイクロフィブリルバクテリアセルロースを含む。

【0049】

ナノフィブリル多糖類は植物起源のセルロース原料から製造され得る。原料はセルロースを含有する任意の植物物質に基づき得る。植物物質は木材であり得る。木材は、蝦夷松、松、モミ、朝鮮唐松、米松 (d o u g l a s - f i r) または樺などの軟木に基づくか、白樺、ヤマナラシ、ポピュラー、榛の木、ユーカリまたはアカシアなどの硬木に基づくか、軟木と硬木の混合物に基づく。非木 (N o n - w o o d) 物質は、綿、とうもろこし、小麦、燕麦、ライ麦、麦、米、亞麻 (f l a x)、麻 (h e m p)、マニラ麻 (h e m p)、シザル麻 (s i s a l h e m p)、黄麻 (j u t e)、ラミー (r a m i e)、ケナフ (k e n a f)、パガス (b a g a s s e)、竹または葦からの、わら、葉、木の皮 (b a r k)、種 (s e e d s)、外皮 (h u l l s)、花、野菜または産物などの農作業残留物、草、またはその他の植物物質に基づき得る。セルロース原料は、また、セルロース生成微生物から誘導され得る。

【0050】

「ナノフィブリル多糖類」と「フィブリルセルロース」という用語は、例えば、セルロース原料から誘導された、分離されたマイクロフィブリルまたはマイクロフィブリル束の集合を示す。マイクロフィブリルは通常的に高縦横比を有し、その長さは1マイクロメートルを超過できる一方、数平均直径は通常的に200nm未満である。マイクロフィブリル束の直径も大きい概略1μm未満であり得る。最小マイクロフィブリルは、通常的に直径が2~12nmである、いわゆる基本フィブリルに類似する。フィブリルまたはフィブリル束の寸法は原料と崩壊法に依存する。ナノフィブリルセルロースは、また、一部ヘミセルロースを含有することができるし、その量は植物ソースに依存する。セルロース原料、セルロースパルプ、または精製されたパルプからのナノフィブリルセルロースの機械的崩壊は、精製機、研削機、均質化機、コライダー、摩擦研削機、超音波ソニケーター、マイクロフリュイダイズ、マクロフリュイダイズまたはフリュイダイズ型均質化機などのフリュイダイズなどの適切な装備によって実行される。

【0051】

ナノフィブリル多糖類またはナノフィブリルセルロースは好ましく植物物質で製造される。一つの代案は、二次細胞壁からフィブリルが取得される非実質 (p a r e n c h y m a l) 植物物質からフィブリルを取得することである。セルロースフィブリルの一つの豊富なソースは木材繊維である。ナノフィブリル化されたセルロースは、化学的パルプであり得る木材 - 誘導繊維型原料を均質化することによって製造される。前述した装備中の一部での崩壊は、直径がせいぜい所定のナノメートルであるフィブリルを生産し、その直径は最大50nmであり、水の中にフィブリルの分散剤を提供する。フィブリルは、フィブリルのほとんどの直径範囲が約2~20nmである大きさに減少され得る。二次細胞壁で発生するフィブリルは、結晶化度が少なくとも55%である本質的に結晶性を有する。

【0052】

本発明の実施形態でパターンニングされたメンブレン製造のための出発物質は、一般的に、前述した繊維型原料のうち一部の崩壊から直接取得されて崩壊状態のために水に均質に分散された比較的低濃度で存在するナノフィブリルセルロースである。出発物質は0.05~5w%濃度の水性ゲルであり得る。したがって、このようなタイプのゲルは、メンブレンの本体を形成し、メンブレンの構造的無欠性と強度特性を引き起こすセルロースフィブリルの網が残されるように除去されるべき大量の水を含有する。このような網は水性ゲル内に初期に分散された他の固体も含有することができるが、セルロースフィブリルがメンブレンの主な構成要素である。

【0053】

ナノフィブリル多糖類は、前記ナノフィブリルから形成された分離されたナノフィブリルおよび/または束を含むことができる。最小ナノフィブリルは、直径が通常的に2～12 nmである、いわゆる基本フィブリルに類似する。ナノフィブリルまたはナノフィブリル束の寸法は原料および崩壊法に依存する。

#### 【0054】

ナノフィブリル多糖類またはナノフィブリル多糖類束の数平均直径の範囲は、適切な実施形態によれば、1～500 nm、適切な他の一実施形態によれば、2～200 nm、適切なさらに他の一実施形態によれば2～100 nm、適切なさらに他の一実施形態によれば、2～20 nmである。

#### 【0055】

天然または非誘導(non-derivatized)ナノフィブリルセルロースの数平均直径は、2～500 nm、好ましく7～100 nm、最も好ましくは、7～50 nmに可変される。また、Cryo-TEM画像から束構造を見ることができ、天然等級は時々7 nm基本フィブリルと20～50 nmフィブリル束の混合物である。誘導されたNFCは通常的にさらに薄く、数平均直径は2～200 nm、好ましく2～20 nm、最も好ましくは、2～6 nmに可変される。

#### 【0056】

ナノフィブリルセルロースの長さを正確に測定することは多少困難であるが(challenging)、天然等級の長さに対する概略的推定値は、1～100 μm、好ましく1～50 μm、最も好ましくは、5～20 μmである。誘導されたNFCは、多少短く、その長さが0.3～50 μm、好ましく0.3～20 μm、最も好ましくは、0.5～10 μmに可変される。このような値はCRYO-TEM、SEMまたはAFM画像から推定される。最も正確な推定はCryo-TEM画像に基づく。

#### 【0057】

部分的にのみフィブリル化されたより多くのエンティティが評価される繊維分析からフィブリル化の程度を評価することができる。例えば、誘導体化されたナノフィブリルセルロースの場合、乾燥サンプルのmg当たりのそのような粒子の個数は0～10000、好ましく0～5000、最も好ましくは、0～1000に可変される。しかし、非誘導体化された(non-derivatized)NFCで、mg当たりの非フィブリル化された粒子の個数は通常的に多少多く、0～20000、好ましく0～10000、最も好ましくは、0～5000に可変される。繊維分析は、後述するようにファイバーラボ(FiberLab)方法を利用して適切に実行され得る。

#### 【0058】

繊維分析 - ファイバーラボ方法説明

商業用繊維分析器を用いることができ、適切な装置は、例えば、繊維分析器Kajani FiberLabまたはFS-300である。乾物含量決定のためにサンプル質量マイナス8 gを計量して一定の重量に達するまで加熱を行うことによって乾物含量(DMC)が決定される点を除いては、通常の繊維粗度(coarseness)測定のために指示される通りにサンプル製造および測定を行う。

#### 【0059】

サンプル希釈を次のとおりに実行する：5リットル水容器内に希釈されるサンプルの量：

DCMが約2%である場合、8 grams

DCMが約1%である場合、16 grams.

すべての可視的フィブリック束が消えるまでバルブミキサーを適用する。

ブロック除去機能は非活性化する。

測定のために5リットル容器から50 mlサンプルを取る。下の測定に基づいて「ミリグラム当たり繊維」を算出する。

$FPM = ADF / (Mw * DMC / 100 * Vp / Vv)$ 、ここで、

FPM = ミリグラム当たり繊維 [ pcs / mg ]

A D F = 検出された繊維の量 [ p c s ]

\* これは検出された粒子の個数である。

M w = 5 リットル水容器内に希釈されるサンプルの量 [ m g ]

D M C = 未希釈されたサンプルの乾物含量 [ % ]

V p = 分析器のためにピペットで取った体積 [ m l ]

V v = 希釈容器の体積 [ m l ] .

#### 【 0 0 6 0 】

ナノフィブリル多糖類ハイドロゲルの剛性度 ( s t i f f n e s s ) はゲルの粘弾性測定によって評価され得る。通常的に、p H 7、2 5 で純水内のナノフィブリルセルロースハイドロゲル 0 . 5 % ( 重量 ) に対する貯蔵弾性率は 1 ~ 5 0 P a、好ましく 3 ~ 2 0 P a である。誘導体化された N F C は時々さらに剛性のハイドロゲルを増進させるが、このようなフィブリル化等級を延長すると、貯蔵弾性率がさらに低くなり得る。

10

#### 【 0 0 6 1 】

また、粘度をせん断応力またはせん断率の関数として監視することによってナノフィブリル多糖類ハイドロゲルのレオロジー ( R h e o l o g i c a l ) 特性を評価することができる。ナノフィブリル多糖類ハイドロゲルはプラスチック挙動を表し、これは、物質が容易に流れ始める前に所定のせん断応力 ( 力 ) が必要であることを意味する。このような臨界せん断応力をよく降伏応力という。降伏応力は、応力制御流量計によって測定されるステディステート ( s t e a d y s t a t e ) 流れ曲線から決定され得る。粘度が印加されるせん断応力の関数としてプロット ( p l o t ) すると、臨界せん断応力を超過した後で粘度の急激な減少を見せる。ゼロ - せん断粘度値は、通常的に、0 . 5 w t % 濃度の水で 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 0 P a ⋅ s、好ましく 5 0 0 0 ~ 5 0 0 0 0 P a ⋅ s に可変される。非誘導体化された N F C に対し、好ましい範囲は 1 0 0 0 ~ 1 0 0 0 0 P a ⋅ s である。降伏応力は、通常的に、0 . 5 w t % 濃度の水で 1 ~ 5 0 P a ⋅ s、好ましく 2 ~ 1 5 P a ⋅ s に可変される。ナノフィブリルキチンとキトサンハイドロゲルの粘弾性は、セルロースナノ繊維ハイドロゲルを利用する状況を模倣する。

20

#### 【 0 0 6 2 】

N F C ハイドロゲルのレオロジー測定は、4 - ブレード羽根状 ( f o u r - b l a d e d v a n e g e o m e t r y ) の応力制御型回転流量計 ( A R - G 2、T A i n s t r u m e n t s、U K ) により p H 7 および室温で適切に実行される。円筒形サンプルカップと羽根の直径はそれぞれ 3 0 m m と 2 8 m m である。羽根の長さは 4 2 m m である。ハイドロゲルの粘弾性は、0 . 1 w t % のひずみ ( s t r a i n ) で流量計の動的発進モードでの周波数スイープと時間スイープによって決定される。測定前にすべてのサンプルをワーリングブレンダーにより適切に混合する ( 3 × 1 0 秒 ) 。

30

#### 【 0 0 6 3 】

本発明の一実施形態に係るナノフィブリル多糖類メンブレンの微生物純度 ( m i c r o b i a l p u r i t y ) は細胞培養と医療応用分野で必須である。したがって、上記パターンニングされたメンブレンは細胞培養または医療使用前に滅菌されなければならない。これに加えて、フィブリル化前とフィブリル化の間、産物の微生物汚染を最小化することが重要である。フィブリル化の前に、パルプが依然として滅菌状態である時、漂白段階直後にパルプミル ( m i l l ) からセルロースパルプを無菌性収集した方が有利である。微生物成長を防止するように本発明に係るナノフィブリル多糖類に抗菌剤を提供することができる。

40

#### 【 0 0 6 4 】

液体除去およびパターン形成

本発明のナノフィブリル多糖類を含むパターンニングされたメンブレンは、分散剤から液体を除去し、同時にパターンニングされた表面を形成する方法によって製造され得、この方法は、

a . 凹部および/または突出部を含むマイクロスケルトポグラフィを有するパターンニングされたフィルタ上にナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階、

50

b. ナノフィブリル多糖類のフィブリルに対しては不透過性であるが液体に対しては透過性であるパターンニングされたフィルターを通じて減少した圧力の効果によってナノフィブリル多糖類分散剤から液体を排出してパターンニングされたフィルタ上にメンブレンウェブを形成する段階、

c. パターンニングされたフィルタ上への圧力差によってパターンニングされたフィルターを通じて液体を排出し続けながらメンブレンウェブの反対面に選択的に熱を印加する段階、および

d. パターンニングされたフィルターからメンブレンウェブを独立的 (free standing) ナノフィブリル多糖類メンブレンとして選択的に除去するか、あるいは、メンブレンのフィルタ層をフィルタ層とナノフィブリル多糖類メンブレンを含むメンブレン産物の構成層として維持する段階を含み、

10

これによって、マイクロスケルトポグラフィーを有するパターンニングされたフィルターの逆の構成で凹部および/または凸部を含むマイクロスケルトポグラフィーを有する、ナノフィブリル多糖類を含むメンブレンが取得される。メンブレンがほとんど乾燥するまで分散剤から水を除去することによって、上の方法においてパターン形成を達成し、これによって水-フィブリル結合が、乾燥されたパターンニングされたメンブレンを湿潤化する場合にも変化のない状態を本質的に維持するほどに強力に凝集した構造を生成するフィブリル-フィブリル結合に代替される。凝集効果は天然ナノフィブリルセルロースに対して特に目立つ。大きい凝集物へのフィブリルの非可逆的凝集、すなわち、角質化 (hornification) が好ましい。角質化は、マイクロフィブリル多糖類の水性懸濁液の乾燥の間発生する可能性がある。これは、隣接するナノフィブリルのヒドロキシル基間の大量の水素結合の形成で説明され得る。

20

#### 【0065】

選択的加熱段階 c は、分散剤からの水除去の向上に用いることができるが、パターンニングには不要である。熱は分散剤からの水除去の向上に用いることができるが、パターンニングには不要である。熱は、段階 c で、加熱面との直接的な接触 (伝導) によるまたはメンブレンシートの表面の照射 (放射熱) によるまたはこれらの組合せによる排出を通じて形成されるメンブレンシートの反対面上で印加され得る。熱が印加されるとともに、水が、パターンニングされたフィルターの反対面上に存在する圧力差を通じて排出される。これは、減少した圧力、増加した圧力によって、または加熱面を有するメンブレンシートを機械的に加圧することによって達成され得る。

30

#### 【0066】

本発明の一実施形態において、熱は、ナノフィブリル多糖類メンブレンを選択的に非接着層でコートされた加熱面と接触させることによって印加される。

#### 【0067】

熱は、液体状態の液体除去を促進するためにメンブレンシートの温度を液体の沸点未満の範囲に増加させるように形成されるメンブレンシートに印加され得る。

#### 【0068】

加熱面を有するメンブレンシートをパターンニングされたフィルターに対して加圧することによって圧力差が達成される場合、メンブレンからの液体の最終排出は、排出される液体を吸収するように吸収シートをパターンニングされたフィルターの自由面に対して配置することによって向上することができる。適切な吸収剤の例としては、吸水性パルプシート、ブロッティング (blotting) 紙、乾燥フェルト (felt) がある。このような吸収シートは、パターンニングされたフィルターの自由面に抵抗するように層に配置され得る。このような吸収シートまたは複数の吸収シートは、形成されるナノフィブリルセルロースを含むパターンニングされたメンブレンからの吸収によって液体を除去する。

40

#### 【0069】

本発明の一実施形態において、加熱面および/または非接着層はパターンニングされ、パターンの逆画像は、加熱面がメンブレンに対して直接的に接触して加圧される場合、加熱面と対面するメンブレンの面に転写される。

50

## 【0070】

一実施形態において、熱は、ナノフィブリル多糖類メンブレンがラミネート (laminated) されるパターンニングされたフィルタまたは構造層などの、加熱面とナノフィブリル多糖類メンブレンの間に介在する選択的にパターンニングされた層を通じて加熱面からナノフィブリル多糖類メンブレンに印加される。

## 【0071】

一実施形態では、ナノフィブリル多糖類分散剤が移動するパターンニングされたフィルタ上に連続層として提供され、連続パターンニングされたメンブレンは、互いに異なる処理段階を通じて移動するパターンニングされたフィルタ上の連続層を転写することによって製造され、パターンニングされたメンブレンはパターンニングされたフィルターから分離される。

10

## 【0072】

所定等級のナノフィブリル多糖類は乾燥させることが特に難しいが、その理由は水保有容量のためであり、乾燥は正常な「天然」等級よりかなり時間が長くなり得る。陰イオン基を含有するナノフィブリルセルロースは、乾燥させることが特に難しいナノフィブリル多糖類分散剤の一例である。N - オキシメチル触媒酸化を通じて (例えば、2、2、6、6 - テトラメチル - 1 - ピペリジン N - 酸化を通じて) 取得されるセルロースまたはカルボキシメチル化されたセルロースは、陰イオン電荷が解離されたカルボキシ酸モイエティのためである陰イオン性ナノフィブリルセルロースの特定例である。このような陰イオン性ナノフィブリルセルロース等級はメンブレンを製造するための潜在的な出発物質であり、その理由は高品質のナノフィブリル多糖類分散剤を化学的に改質されたパルプから容易に製造することができるためである。ナノフィブリル陰イオン性セルロースを含むメンブレンの乾燥を向上させるように、前記セルロースは、分散剤の pH を低くすることによって前処理 (pretreat) され得る。一実施形態において、pH は適切な酸を添加することによって低くすることができる。このような前処理は、陰イオン性セルロースの水保有容量を減少させる。一実施形態では、ナノフィブリル多糖類分散剤の pH を 3 pH 単位未満に下げることによって、前述した方法を利用する乾燥時間を減少させることができる。医療使用のためにパターンニングされたメンブレンを製造する場合、療法的に互換性ある酸が適切に用いられる。

20

## 【0073】

長さの高縦横比は、フィルタファブリック上でナノフィブリルを維持することを容易にさせる。しかし、多糖類ナノフィブリルの大きさが非常に小さいと、多糖類ナノフィブリルは、最小で可能なポアの大きさのフィルタファブリックが使用されてもフィルタファブリックを通じて除去される液体とともに流れることができる。本発明の一実施形態によれば、フィルタークロスを通した多糖類ナノフィブリルの流れは、フィルタファブリック上に第 1 繊維型多糖類分散剤層を提供し、第 1 繊維型多糖類分散剤のフィブリルに対して不透過性を有するフィルタファブリックを通じて液体を排出してフィブリル網を形成することによって防止される。このようなフィブリル網は、後続で塗布される第 2 ナノフィブリル多糖類分散剤のための追加フィルターとして機能し、第 2 セルロース分散剤のフィブリルの大きさは第 1 繊維型多糖類分散剤のフィブリルの大きさより小さい。第 2 ナノフィブリル多糖類分散剤を塗布した後、排出は前述した一つの段階で塗布される繊維型多糖類分散剤とともに進行される。

30

40

## 【0074】

第 2 繊維型多糖類分散剤のフィブリルの大きさは、フィルタファブリックのポアの大きさに比べて、分散剤から排出される液体 (濾過物) とともにファブリックを通過するように選択される。第 2 ナノフィブリル多糖類分散剤の量は第 1 ナノフィブリル多糖類分散剤の量より多いこともあり、これによって、乾燥されたメンブレンの重量の最大の部 (part) を構成することができる。

## 【0075】

フィルタークロスを通したナノフィブリル多糖類の実質的な転写を許容せず、ナノフィブリル多糖類からの透過物の効率的なフィルタリングを確実にするようにフィブリルの大

50

きさに対して十分に小さいポアの大きさを有するパターンニングされたフィルタファブリックが適切に使われる。適切に、フィルタファブリックのポアの大きさはマイクロメートル範囲にある。通常的に、メッシュの開口/多孔は、0.1 ~ 50 マイクロメートル、好ましく1 ~ 10 マイクロメートルである。フィルタクロスワイヤーの直径は1 ~ 200 マイクロメートル、好ましく10 ~ 100 マイクロメートルである。フィルタファブリックは、好ましくフィルタリングされたナノフィブリル多糖類メンブレンシートに対して付着しない物質、例えば、プラスチック、およびPET、ポリアミド、フルオロポリマーなどのその他の合成ポリマーで製造され得る。適切なファブリックの制限がない他の一例は、ナノフィブリルセルロースの選択される粒子の大きさにより選択できる多様なポアの大きさで利用可能なこまかく織り込まれた(woven)ポリアミド-6、6ファブリックである。

10

#### 【0076】

フィルタファブリックの表面は、メンブレンの製造過程の間ナノフィブリル多糖類メンブレンの表面上に選択されたパターンを製造するように改質できる。

#### 【0077】

熱をナノフィブリル多糖類に提供するための加熱面は、フィルタリングされたナノフィブリル多糖類メンブレンシートに対して非接着性を適切に有する。PTFEなどの反発性がある耐熱コーティング剤でコートされた金属板を用いることができる。一実施形態において、加熱面は、ナノフィブリル多糖類メンブレンの面上に生成したいパターンの逆パターンでパターンニングされ得る。加熱面をメンブレンに対して加圧すればパターンが形成される。

20

#### 【0078】

前述した本発明の方法は、フィルタファブリック上にナノフィブリル多糖類分散剤を塗布して所定の順序により連続作業ステージを遂行することによってシートモールドで個別的な別途のメンブレンを連続的に一つずつ製造することに用いることができる。あるいは、前述した本発明の方法は、連続作業ステージを通じて形成されるメンブレンシートを返送する移動するフィルタファブリック上にナノフィブリル多糖類分散剤を塗布することによって連続工程で連続メンブレンを製造することに用いることができる。

#### 【0079】

フィルタファブリック上に塗布されるナノフィブリル多糖類分散剤の出発濃度は、一般的に、5w%より低く、例えば、0.5 ~ 5.0w%範囲にある。これは、一般的に繊維型原料を崩壊することによって製造される製造工程の出口でのナノフィブリル多糖類の初期濃度である。しかし、ナノフィブリル多糖類分散剤をフィルタファブリック上に等しく分布させてメンブレン構造の変動を避けるのを確実にするように初期濃度(製造工程からの産物の濃度)から適切な出発濃度でナノフィブリル多糖類分散剤を液体で希釈させることができる。ナノフィブリル多糖類等級の特徴的粘度により、出発濃度は低いまたは高く、0.1 ~ 10w%で変えられ得る。本発明の実施形態に係るナノフィブリル多糖類分散剤のための適切な出発濃度の例は、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10w%である。低粘度等級に対してさらに高い濃度を使うことができ、これは高濃度にもかかわらずフィルタファブリック上に均一に拡散され得る。

30

40

#### 【0080】

排出される液体が水である場合、好ましくは、ナノフィブリル多糖類の温度を少なくとも70℃でしかし100℃未満で、例えば、70 ~ 95℃の範囲で上昇させる強度で熱をフィルタファブリック上に提供されたナノフィブリル多糖類に印加する。予想とは対照的に、温度を100℃超に上昇させることは乾燥結果を改善できないが、その理由はメンブレンシートが大量の水を含有し、乾燥の初期ステージでの圧力差を通じて水が除去される限り、水を沸騰させることができないためであり、これはメンブレンに悪影響を及ぼすためである。メンブレンシートが十分に乾燥し、圧力差によってシートからそれ以上の水を抽出することができない場合、シートの最終形成されたフィブリル網に依然として結合さ

50

れている残留水は蒸発によって除去できる。この場合にも、100 を超過する温度を利用することができる。

【0081】

しかし、フィルタファブリックと同じ目的で、液体が通過できるようにしつつセルロースフィブリルを保持するが、メンブレンシートに付着した状態を維持してメンブレン産物の一部を形成する濾過層を使うことができる。この場合、濾過層は、メンブレンシートのセルロースフィブリルに付着する物質で製造され得、例えば、セルロース繊維で製造され得る。

【0082】

製造工程を向上させまたはメンブレンの特性を改善または調節するための補助剤がナノフィブリル多糖類分散剤に含まれ得る。このような補助剤は、分散剤または固体の液体上で溶解可能である。補助剤は、ナノフィブリル多糖類分散剤の製造の間原料にあらかじめ添加することができ、または繊維型多糖類分散剤をフィルタファブリック上に塗布する前に繊維型多糖類分散剤に添加することができる。細胞療法応用分野のために、補助剤は細胞成長、接着を支持する薬剤を含むことができる。

【0083】

フィブリルが網で配列される固体独立的パターンニングされたメンブレンを形成するように、液体を分散剤から除去しなければならない。液体は、一つ以上の段階を含む例示的な方法によって、ナノフィブリル多糖類から除去され得る。第1段階で、液体は、ナノフィブリル多糖類分散剤/メンブレンの二つの面間の圧力勾配によって排出される。

【0084】

一実施形態では、ナノフィブリル多糖類分散剤のフィルタ側に負圧 (negative pressure) が生成される。

【0085】

他の一実施形態では、フィルタクロスの反対側であるナノフィブリル多糖類分散剤側に増加した圧力を、前述した通りナノフィブリル多糖類分散剤のフィルタ側に対する選択的負圧とともに利用する。

【0086】

2 - 段階方法を使う場合、第2段階では、フィルタファブリックに対して圧力差を維持しつつメンブレンに熱を印加し、メンブレンシートからの追加排出を引き起こす。

【0087】

図1と図2は、改質された研究所シートモールド1が使われる本発明に係るパターンニングされたメンブレンを製造する実施形態を図示する。本発明の方法を例示する図1および図2～図4では、多様な要素が一定の比率となっていない。水性ナノフィブリル多糖類分散剤4は、マイクロメーター範囲の孔を有しメンブレン上に形成されるパターンに比べて逆の構成で配列された凹部および/または突出部を含むマイクロスケルトポグラフィを有するパターンニングされたフィルタファブリック3上に塗布される。パターンニングされたフィルタファブリック3はシートモールド1のワイヤー2により適切に支持される。図1に図示した第1段階で、パターンニングされたフィルタファブリック3とワイヤー2を通した多糖類分散剤4からの脱水は、パターンニングされたフィルタファブリック3の自由面 (ナノフィブリル多糖類分散剤4によりカバーされていない面) に対して有効な減少された圧力  $p_1$  (真空) により引き起こされる。したがって、水はパターンニングされたフィルタファブリックとワイヤーを通じて流れ、多糖類分散剤4の乾物含量は水除去と同時に徐々に増加する。

【0088】

ぬれたメンブレンシート4がパターンニングされたフィルタファブリック上に脱水を通じて形成されてパターンニングされたフィルタファブリック3を通した脱水が中断された後、図2に図示した第2段階が開始され得る。加熱した本体5の表面はメンブレンシート4上に配置され、メンブレンシートは本体5と接触するメンブレンシートの全体面にかけてパターンニングされたフィルタファブリック3に対して加圧され、減少された圧力  $p_1$  (真空

10

20

30

40

50

）が維持される。加熱した本体 5 により引き起こされる圧力は  $p_2$ （矢印）で表示する。脱水は圧力  $p_2$  と減少された圧力  $p_1$  の結合効果を通じて続けられ、これはフィルタファブリックにかけた圧力差およびフィルタファブリックを通したメンブレンシートからのより多くの水の除去を引き起こす。脱水が続けられるとともに、ナノフィブリル多糖類メンブレンはパターニングされたフィルターのマイクロ構造に対して固く定着され、繊維はパターニングされたフィルターのマイクロスケール凹部を満たす一方、本体 5 に対向するメンブレン 4 の面はなめらかな状態を維持する。

【 0 0 8 9 】

本体 5 の表面はメンブレンシート 4 に熱を伝達し、これはメンブレンシート 4 の温度上昇、特にメンブレンシートに含まれた水の温度上昇のために、脱水を向上させる。本体 5 の温度は例えば 90 であり得る。本体 5 は金属からなるものであり得る。金属本体の接触面は、メンブレンシート 4 の付着を防止する薄いコーティング剤で、例えば、メンブレンシート 4 の加熱時に使われる温度に抵抗する P T F E で選択的にコーティングされ得る。選択的に、本体 5 および / またはコーティング剤は、本体 5 に対向するメンブレンシート 4 の表面が本体 5 および / またはコーティング剤上のパターンの逆パターンでパターニングされるように、パターニングされる。これは両面にパターンを有するメンブレンを製造することができるようにする。図 2 で、本体 5 はパターニングされていない金属板である。

【 0 0 9 0 】

本体 5 は、好ましくは、本体がメンブレンシート 4 に対して配置された直後メンブレンシート 4 の温度が上昇し始めるように予熱される。本体 5 は、温度が一定のレベルで維持されるように加圧の間外部的に加熱される。

【 0 0 9 1 】

脱水が適切な乾物含量まで進行された後、形成されたセルロースフィブリル網のためにメンブレンを自己支持するメンブレンシート 4 は、フィルタファブリック 3 から分離され、モールド 2 から除去される。以後、次のメンブレンの製造のためにモールド 2 を使うことができる。

【 0 0 9 2 】

図 1 と図 2 の実施形態で、すべての段階は同じシートモールド 2 で実行される。図 3 は、パターニングされたフィルタファブリック 3 とワイヤー 2 を通した分散剤 4 からの脱水が図 1 と符合する減少された圧力  $p_1$  によって初期に引き起こされる一実施形態を図示する。図 3 は、パターニングされたフィルタファブリック 3 とともにぬれたメンブレンシート 4 がシートモールド 1 から除去され、パターニングされたフィルタファブリック 3 の自由面が吸収シート 6 の面と接触するように一つの吸収シートまたはいくつかの吸収シート 6 上にフィルタファブリックとともに配置されるプレス ( p r e s s ; 7 ) に伝達されるさらなる段階を図示する。吸収シート 6 は、繊維型物質で製造され得、自身の体積内に水を収容できる。シート 6 は吸水性パルプシート、プロットティング紙または乾燥フェルトの一部であり得る。図 3 に図示した通り、シート 6 は水収容体積を増加させるように積層され得る。

【 0 0 9 3 】

図 2 と類似の構造および機能を有することができる加熱した本体 5 は、ぬれたメンブレンシート 4 の自由面上に配置される。機械的圧力  $p_2$  は本体 5 によりメンブレンシート 4 に印加される。脱水は機械的圧力  $p_2$  によってのみ発揮される圧力差によって引き起こされ、メンブレンシート 2 から絞られて出た水は、フィルタファブリック 3 を通じて吸収シート 6 の体積によって保持される吸収シート 6 または吸収シート内に流れる。熱は、図 1 と図 2 の実施形態でのように本体 5 からメンブレンシート 4 に伝達される。吸収シート 6 の下には、ぬれたメンブレンシート 4 と吸収シート 6 を通じて温度勾配が生成されて高温から低温に向かって水を催促するように比較的低温で維持される冷たい金属面があり得る。金属面の温度は、例えば、25 未満、好ましくは 20 未満に調節され得る。本体 5 の接触面上の非付着性コーティング剤は 5 a と表示される。脱水が適切な乾物含量まで進行

された後、メンブレンシート4とフィルタファブリック3をプレス7から分離し、形成されたセルロースフィブリル網のためにメンブレンを自己支持するメンブレンシート4をプレスフィルタファブリック3から分離する。フィルタファブリック3は、新しいメンブレンシート4を形成するようにシートモールド1で次回使用できる。吸収シートまたは吸収シート6はプレス7から分離され、乾燥され、プレス7で再使用され得る。

【0094】

一実施形態において、本体5および/または非付着性コーティング剤5aは、マイクロスケール凹部および/または突出部を含むパターンを有するものとして提供される。前記パターンは、圧力が印加されてメンブレンが形成される場合、メンブレンの他のなめらかな面上に逆パターンを生成することに用いることができる。

10

【0095】

連続ウェブ工程のパターンカレンダーリング(calendarling)によるまたは非連続工程の静的エンボシングプレスによるパターン転写によって、バルク層の面(すなわち、パターンニングされた面の反対面)も改質され得る。

【0096】

図3の実施形態で、第1段階(真空による脱水)は、メンブレンのターゲット秤量が平方メートル当たり20gramである場合、60秒未満がかかる。第2段階(加圧+加熱)は5分未満がかかる。ナノフィブリル多糖類分散剤から始めて乾燥メンブレンで終了する総製造時間は10分未満である反面、従来の方法では製造時間が数時間であり得る。

【0097】

20

図4は、減少された圧力p1(真空)により図1のように第1段階を遂行した一実施形態を図示する。形成されるメンブレンシート4の反対面上に印加される熱は、図2と図3のように加熱面5との接触(伝導)によってではなく、メンブレンシート4から離れて配置されたIR加熱装置8によるメンブレンシートの自由面の照射(放射熱)により達成される。機械的圧力は印加されないが、減少された圧力p1によってのみ引き起こされる圧力差の効果によってフィルタファブリック3を通じてメンブレンシート4から水が排出される。マイクロスケールパターンは、フィルタファブリック3と接触するメンブレンの面上に形成される。

【0098】

パターンニングされた面を生成するように、フィルタメンブレンは、ナノフィブリル多糖類メンブレン上に形成される面を有するように選択されるか改質され、選択されたパターンニングされた面は、乾燥の間ナノフィブリル多糖類メンブレンに対して加圧される場合、凹部および/または突出部を含む。フィルタクロス上のパターンは、フィルタメンブレン上のパターンに比べて逆となっているものである。通常の技術者には明白なように、本発明の実施形態に係る方法を利用することによってナノフィブリル多糖類メンブレン上に任意のパターンを生成することができる。例えば、ナノフィブリル多糖類メンブレン上に通常のフィルタクロスのパターンの逆パターンを生成することができる。あるいは、当業界に知られている方法を利用してフィルタクロス上に所望のパターンの逆パターンを形成することができる。

30

【0099】

40

多糖類が天然セルロースであるナノフィブリル多糖類分散剤の脱水に比べて、多糖類が陰イオン性セルロースであるナノフィブリル多糖類分散剤の脱水はさらに時間消耗的であるが、その理由は水がセルロースに非常に強力に結合されているためである。陰イオン基を含有するナノフィブリルセルロースは、例えば、改質の結果でカルボキシル基を含有する化学的に改質されたセルロースであり得る。N-オキシル媒介触媒酸化を通じて(例えば、略語で「TEMPO」で知られている、2,2,6,6-テトラメチル-1-ピペリジンN-オキシド)取得されたセルロースはまたはカルボキシメチル化されたセルロースは、陰イオン性帯電が解離されたカルボキシル酸モイエティのためである陰イオン性ナノフィブリルセルロースの例である。総乾燥時間は、主に大きい水保有容量および陰イオン性ナノフィブリルセルロースの高粘度のため、セルロースが改質されていないナノフィ

50

ブリルセルロースの総乾燥時間の数倍と予想される。例えば、ターゲットが平方メートル当たり 20 g r a m メンブレンである場合、第 1 段階で改質されていないナノフィブリルセルロースの脱水は 60 秒（メンブレンシート上に可視的に水が見えなくなるまで真空で始まる時間）未満がかかる反面、類似の条件で同じターゲット秤量を有するメンブレンに対する陰イオン性ナノフィブリルセルロースの脱水にはさらに 60 分～120 分がかかることがある。

#### 【0100】

このような陰イオン性ナノフィブリルセルロース等級の脱水特性は、酸によってナノフィブリル多糖類分散剤を前処理することによってかなり改善され得る。ナノフィブリルセルロースが、酸化されたセルロースおよびカルボキシメチル化されたセルロースの場合のように塩基（解離された形態の酸モイエティ）として機能する陰イオン基を含有する場合、pH を酸で下げることは、このような基を非解離（undissociated）形態に変換し、フィブリルの間の静電気斥力はそれ以上有効でなく、水-フィブリル相互作用は分散剤の脱水を助ける形に変わる（分散剤の水保有容量が減少する）。陰イオン性ナノフィブリルセルロース分散剤の pH は、脱水特性を改善するように 4 未満、好ましく 3 未満である。

#### 【0101】

「TEMPO」酸化されたパルプから取得された陰イオン性ナノフィブリルセルロース分散剤は、メンブレンのターゲット秤量が平方メートル当たり 20 g r a m である場合、初期（調節されていない）pH で約 100 分である真空下の脱水時間を必要とした。脱水前に分散剤の pH を HCl によって 2 に下げた場合、同じ条件での脱水時間は約 30 秒であり、すなわち、時間が初期の 0.5 % に減少した。pH を低くすると、分散剤は可視的に凝集し（フィブリル塊が形成され）、これがさらに早い脱水の一つの理由であると尾もわれ、その理由は水が凝集物の間でさらに容易に流れるためである。低くされた pH によって分散剤を脱水することによって第 1 段階で形成されるメンブレンシートは、第 2 段階で最終乾燥状態となるように乾燥され得る。おそらく低 pH で分散剤の初期に凝集された構造のためである乾燥の最終ステージの間メンブレンが引裂される傾向は、乾燥干渉することによって除去され得る。引き続き、メンブレンシートは、自由に置くことができ、応力を解除するように（フィルタファブリックなどの）任意の支持構造から分離され得る。以後、乾燥が継続され得る。乾燥の最終ステージは、残っている湿気を除去するように 100 を超過する温度で、例えば、105 で二つの吸収シート（例えば、ブロッティング紙）間に実行され得る。

#### 【0102】

酸化されたパルプから製造されたナノフィブリルセルロースの場合でよく見られるように、陰イオン性ナノフィブリルセルロースのフィブリルの大きさがフィルタファブリックの濾過容量に関して過度に小さいと（カットオフの大きさ）、前処理されたナノフィブリル多糖類分散剤が添加される前に、前述した原理と同じ原理で補助フィルタ層が大きいフィブリルの大きさを有する繊維型多糖類分散剤で先に形成され得る。補助フィルタ層は、例えば、フィブリルの大きさがさらに大きいセルロースなどの化学的に改質されていない（天然）繊維型多糖類分散剤で製造され得る。

#### 【0103】

ナノフィブリル多糖類分散剤がフィルタファブリックに塗布される場合、これらは、注入（pouring）により、または厚さが最小限で変動する分散剤の均一な層を初期に製造するための他の一部の塗布方法によって塗布され得る。分散剤は、例えば、フィルタファブリック上に噴射され得る。必要であれば、分散剤は、粘度を減少させるように分散剤の均一な拡散を改善するように水で希釈され得る。

#### 【0104】

その結果、パターンニングされたナノフィブリル多糖類メンブレンは、メンブレンの所望の特徴により多様な厚さで製造され得る。秤量分布が均一な（メンブレンの領域に対して小さい秤量変動）薄いメンブレンを製造することができる。選択されたパターンニングは形

成されるメンブレンの機械的特性に対して影響を及ぼし、一般的に、同じ厚さのパターニングされていないメンブレンに比べて、メンブレンがパターニングされる場合にさらに剛性の構造を取得する。メンブレンの総厚さは好ましく150  $\mu\text{m}$ 以下である。独立的メンブレンが製造されると、厚さ範囲は、十分な強度を付与するように、好ましくは10~100  $\mu\text{m}$ 、さらに好ましく30~70  $\mu\text{m}$ である反面、(フィルタ層に付着したまたは支持部に別途ラミネートされた)メンブレン産物でのメンブレン層を形成する場合、その厚さ範囲は小さいこともあり、例えば、5~40  $\mu\text{m}$ であり得る。しかし、数値を制限的なものと見なしてはならない。本発明の実施形態に係るメンブレン厚さの非制限的な例は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、115、120、125、130、135、140、145、および150  $\mu\text{m}$ である。(メンブレンの平面に垂直である)パターニングされたメンブレンの断面について、連続構造で二つの構造層、すなわち、バルク層とパターニングされた層を命名することができる。バルク層はパターニングされたメンブレンの主な体積を本質的に含み、パターニングされた層はマイクロスケルトポグラフィを含むパターニングされたメンブレンの一部に対応する。例えば、図7でわかるように、パターニングされた層の厚さは、フィルタの特性によって、すなわち、ナノフィブリル多糖類がフィルタ内にいかほど深く浸透できるかによって少なくとも部分的に決定される。

#### 【0105】

好ましくは、パターニングされたナノフィブリル多糖類メンブレンは、乾燥し、残余湿気含量が<10 wt %である。好ましくは、残余湿気含量は約9、8、7、6、5、4、3、2、または1 wt %である。このような乾燥性で可視的に乾燥されたメンブレンは半透明で頑丈なシート型メンブレンである。パターニングされていない加熱面を使ってメンブレンを製造する場合、加熱面に対面するメンブレンの表面は非常になめらかで、このとき、表面粗さは最小である。最下位の部分はフィルタファブリックの形態学から発生する別個の表面構造を有し、図5~図8を参照する。

#### 【0106】

本願で、液体除去は、ナノフィブリル多糖類分散剤から除去されるべき水が分散培地である場合に対して説明している。その動作は、水でない液体が分散培地である場合、類推的に実行され得る。

#### 【0107】

パターニングされたメンブレンの構造

パターニングされたメンブレンは、ナノフィブリルセルロースなどのナノフィブリル多糖類を連続的に含む構造である。本発明の一実施形態では、二つの層であるバルク層とパターニングされた層をパターニングされたメンブレンで見ることができる。バルク層とパターニングされた層を言及するのは、前記層がそのような物理的に個別的な層であることを意味しようとするものではなく、前記用語は本発明を容易に説明するためのものであるだけであり、つまり、パターニングされたメンブレンの構造的に互いに異なる部分、すなわち、パターニングされた連続メンブレンの部分、およびパターニングされていない部分を意味するという点を理解されたい。

#### 【0108】

装置

本発明の実施形態は、幹細胞などの療法的に有用な細胞を傷部位に直接付着して皮膚の傷治癒、縫合を改善しておよび/または傷部位の炎症を減少させるように、マイクロスケールパターニングされたナノフィブリル多糖類メンブレンをシーディングスキャフォールドまたは本発明のメンブレンを含む装置として開発することに関するものである。本発明は、細胞によって分泌される細胞外マトリックスおよびパターニングされたナノフィブリル多糖類メンブレンを含む運搬体を使って治療細胞を投薬することによって、治療細胞を治療部位に伝達することを制御することができる。

#### 【0109】

一実施形態において、装置が具備するメンブレンの少なくとも一面は、メンブレンに対する細胞接着を向上させる薬剤でコーティングされるかそのような薬剤と化学的に結合される。このような薬剤は、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、類型Ⅰコラーゲン、類型Ⅱコラーゲン、および類型Ⅴコラーゲンおよび/またはこれらの組合せやフラクション (fractions) または複合混合物などのすべての種類の細胞外マトリックス蛋白質のすべての種類を含む。他の一実施形態において、メンブレンが両面上にパターンニングされた場合、メンブレンの互いに他の面は同じ薬剤または互いに異なる薬剤でコーティングされるかこのような薬剤と化学的に結合され得る。適切に、薬剤は、蛋白質、ペプチド、炭水化物、脂質、核酸およびこれらの破片、抗ウイルス化合物、抗炎症化合物、抗真菌化合物と抗バクテリア化合物などの抗生化合物、細胞分化剤、鎮痛剤、医療診断撮像のための造影剤、酵素、サイトカイン、麻酔剤、抗ヒスタミン剤、免疫系に作用する薬剤、免疫刺激剤、止血剤、ホルモン、血管形成剤または抗血管形成剤、神経伝達物質、治療用オリゴ核酸塩、ウイルス粒子、ベクター、成長因子、レチノイド、細胞接着因子、骨形成因子、抗体、抗原、ペプチド、細胞、および無細胞マトリックスを含むこれらの誘導体からなる群から選択される。

#### 【0110】

一実施形態において、装置は、装置の中心領域や周辺領域などの、装置の少なくとも一部の上で延びる一つ以上の層をさらに含むことができ、一つ以上の層は、支持層、バックリング (backing) 層、保湿層、吸湿層、吸気障壁層、気体障壁層、臭い吸収層、薬物含有層、接着層および/または粘膜粘着層 (mucoadhesive) の中から選択される。

#### 【0111】

一実施形態において、装置は、水、滅菌水、精製水、生理的食塩水、生理的緩衝剤、培養培地、栄養剤、および/または生理活性剤、またはこれらの組合せを含む。

#### 【0112】

一実施形態において、療法的に有用な細胞は、自家細胞、同種異形細胞、幹細胞、電球細胞、前駆体 (precursor) 細胞、結合組織細胞、上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞性細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、角質細胞、なめらかな筋肉細胞、間質細胞、間充細胞、臍帯血細胞、胚幹細胞、誘導多能性細胞、胎盤細胞、骨髄誘導細胞、免疫系細胞、造血細胞、樹突状細胞、毛穴細胞、軟骨細胞、ハイブリッドマ細胞、および/またはこれらの組合せを含む。

#### 【0113】

一実施形態において、装置は、傷治療に有用な細胞、好ましくは、間充細胞、脂肪誘導細胞、または骨髄誘導細胞を含む。

#### 【0114】

##### 傷治療

本発明の実施形態は、傷治療装置での本発明の実施形態に係るメンブレンの使用に関するものである。ナノフィブリル多糖類メンブレンが装置で使われる場合、これは好ましく植物などの非動物 (non-animal) 物質から取得される。生体医学的応用分野のためには、植物由来物質が好ましい。一実施形態において、装置で使われる細胞の根源は人間であり得る。他の一実施形態において、細胞の根源は人間でないこともあり得る。細胞は自家型 (autologous) または異種型 (heterologous) であり得る。

#### 【0115】

一実施形態において、hASCは、(自家細胞が分離され得る場合) 治療される被験者からまたはドナー (donor) から治療前に脂肪吸引 (lipoaspiration) により取得される (Escobedo-Lucea et al. A Xenogenic-Free Protocol for Isolation and Expansion of Human Adipose Stem Cells for Clinical Uses, Plos One, July 9, 2013)。本実施形態に

よれば、分離された h A S C は、所望の細胞密度に到達するまで N F C 培養マトリックス上で培養される。

【 0 1 1 6 】

本明細書で用いられるように、「傷」という用語は、互いに異なるように開示され、特性も多様な、皮膚、表皮、真皮、および皮下組織のすべての層に位置する損傷を広く指し示すように用いられる。

【 0 1 1 7 】

「キット」という用語は、本発明の実施形態に係る組成物の方法、分析 ( a s s a y )、または操作を容易にさせる物品やコンテナの組合せを示す。キットは、キットをどのように使用するかを説明する説明書 (例えば、本発明の方法を説明する説明書)、カートリッジ、混合ステーション、化学反応剤、およびその他の構成要素を選択的に含むことができる。キット構成要素は、船積み、保管、または使用のために一つのコンテナ (例えば、ボックス、ラッピング ( w r a p p i n g ) など) に一緒にパッケージングされ得、または二個以上のコンテナにパッケージングされ得る

【 0 1 1 8 】

パターンニングされたナノフィブリル多糖類メンブレン上にいかなる細胞でも培養され得るが、傷治療に適切な細胞は自家または非自家哺乳類脂肪誘導幹細胞である。

【 0 1 1 9 】

本発明の多糖類メンブレンマトリックスを使って培養される細胞は移送の間または移送前に細胞を冷凍する必要なく移送され得る。一実施形態において、培養細胞は、その細胞を追加の段階なく + 3 7 ° C で培養した後で治療部位に直接移送され得る。培養幹細胞ラインは、また、培養系内に成長因子、免疫調節蛋白質、または傷治癒を改善する他の薬剤などの選択された蛋白質を生産するように遺伝子操作され得る。

【 0 1 2 0 】

さらに他の一実施形態において、ナノフィブリル多糖類メンブレンの少なくとも一面はメンブレンに対する細胞接着を向上させるようにラミニンでコートされる。

【 0 1 2 1 】

様態 1 で、本発明は連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを提供し、メンブレンは、メンブレンの少なくとも一つの一面上にマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含む。

【 0 1 2 2 】

様態 2 は様態 1 に係るメンブレンを提供し、ナノフィブリル多糖類は植物 - 由来ナノフィブリルセルロースを含む。

【 0 1 2 3 】

様態 3 は様態 1 と様態 2 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、パターンニングされた領域は単位の繰返しパターンを含み、一つの単位の少なくとも一つの寸法はメンブレンの平面に沿って 1 μ m ~ 5 0 0 μ m である。

【 0 1 2 4 】

様態 4 は様態 1 ~ 様態 3 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、メンブレンの少なくとも一面はマイクロスケール凹部および/または突出部を連続的相互接続単位として有するパターンニングされた領域を含む。

【 0 1 2 5 】

様態 5 は様態 1 ~ 様態 4 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、パターンニングされた領域の数平均厚さは 1 0 0 n m ~ 1 0 0 μ m、好ましく 2 0 0 n m ~ 1 0 μ m、最も好ましくは、1 μ m ~ 1 0 μ m である。

【 0 1 2 6 】

様態 6 は様態 1 ~ 様態 5 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、パターンニングされた領域は、1 0 n m ~ 1 0 μ m、好ましく 1 0 0 n m ~ 1 μ m、最も好ましくは、2 0 0 n m ~ 1 μ m の幅を有する共通壁と相互接続された単位の繰返しパターンを含む。

【 0 1 2 7 】

様態 7 は様態 1 ~ 様態 6 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、メンブレンは  $1\ \mu\text{m} \sim 300\ \mu\text{m}$ 、好ましく  $10\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ 、最も好ましくは、 $20\ \mu\text{m} \sim 60\ \mu\text{m}$  の厚さを有する。

【0128】

様態 8 は様態 1 ~ 様態 7 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、メンブレンは、ナノフィブリル多糖類の乾燥重量  $90 \sim 100\%$ 、好ましくナノフィブリル多糖類の乾燥重量  $95 \sim 100\%$ 、さらに好ましくナノフィブリル多糖類の乾燥重量  $99 \sim 100\%$  を含む。

【0129】

様態 9 は様態 1 ~ 様態 8 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、ナノフィブリル多糖類は、セルロース、ヘミセルロース、キチン、キトサン、アルジネート、ペクチン、アラビノキシラン、ナノフィブリルセルロース、またはこれらの誘導体から少なくとも部分的に構成され、ナノフィブリル多糖類は植物 - 由来ナノフィブリルセルロースを含み、ナノフィブリル多糖類は、ヘミセルロース、キチン、キトサン、アルジネート、ペクチン、アラビノキシラン、またはこれらの誘導体をさらに含む。

【0130】

様態 10 は様態 1 ~ 様態 9 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、ナノフィブリル多糖類は植物 - 由来ナノフィブリルセルロースの誘導体を含む。

【0131】

様態 11 は様態 1 ~ 様態 10 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、前記ナノフィブリル多糖類は機械的に崩壊されている。

【0132】

様態 12 は様態 1 ~ 様態 11 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、ナノフィブリル多糖類は、 $1 \sim 500\ \text{nm}$ 、好ましく  $2 \sim 200\ \text{nm}$  の数平均直径を有する多糖類ナノフィブリルおよび/またはナノフィブリル束を含む。

【0133】

様態 13 は様態 1 ~ 様態 12 中のいずれか一つに係るメンブレンを提供し、メンブレンの両面がパターンニングされている。

【0134】

様態 14 は、連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを製造する方法を提供し、メンブレンの少なくとも一面がマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含み、前記方法は、

ナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階、および

a. マイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含むキャストリング支持部上にナノフィブリル多糖類分散剤をキャストリングして乾燥させ、マイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含む形成されたメンブレンをキャストリング支持部に比べて逆の構成で除去する段階と、b. ナノフィブリル多糖類分散剤をメンブレンとなるように形成し、メンブレンの少なくとも一つの領域をエッチングしてマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を提供する段階からなる群から選択される段階を含む。

【0135】

様態 15 は、連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを製造する方法を提供し、メンブレンの少なくとも一面がマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含み、前記方法は、

a. マイクロスケール凹部および/または突出部を含むパターンニングされたフィルタ上に、好ましくは、パターンニングされたフィルタファブリック上にナノフィブリル多糖類分散剤を提供する段階、

b. ナノフィブリル多糖類のフィブリルに対しては本質的に不透過性であるが液体に対しては透過性であるパターンニングされたフィルターを通じて変更された圧力の効果によっ

10

20

30

40

50

て、ナノフィブリル多糖類分散剤から液体を排出してパターンニングされたフィルタ上にメンブレンを形成する段階、

c. ナノフィブリル多糖類分散剤から液体を除去し続けながらメンブレンを選択的に乾燥させる段階、および

d. パターンニングされたフィルターからメンブレンを選択的に除去する段階を含み、

これによって、マイクロスケール凹部および/または突出部を有するパターンニングされたフィルターに比べて逆の構成でマイクロスケール凹部および/または突出部を有する、ナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを取得することになる。

【0136】

状態16は状態14または状態15に係る方法を提供し、ナノフィブリル多糖類分散剤は、多糖類の崩壊によって取得され、選択的に多糖類の機械的崩壊によって取得される。

【0137】

状態17は状態15に係る方法を提供し、d段階は、パターンニングされたフィルターを、パターンニングされたフィルターとナノフィブリル多糖類メンブレンを含むメンブレン産物の構成の部分として維持する段階を代案として含む。

【0138】

状態18は状態15～状態17中のいずれか一つに係る方法を提供し、メンブレンシートは、c段階でナノフィブリル多糖類メンブレンを非接着層で選択的にコートされた加熱した表面と接触させることによってメンブレンに熱を印加して乾燥される。

【0139】

状態19は状態18に係る方法を提供し、加熱した表面は、メンブレンシートに圧力を提供してパターンニングされたフィルターに対して圧力差を少なくとも部分的に引き起こすようにメンブレンに対して加圧される。

【0140】

状態20は状態16～状態19中のいずれか一つに係る方法を提供し、加熱した表面および/または非接着層はパターンニングされ、加熱した表面がメンブレンに対して加圧される時加熱した表面および/または非接着層と対面するメンブレンの面に逆パターンが転写される。

【0141】

状態21は状態16～状態20中のいずれか一つに係る方法を提供し、ナノフィブリル多糖類メンブレンがラミネイティンデールパターンニングされたフィルタまたは構造層などの、加熱した表面とナノフィブリル多糖類メンブレンの間に内在した層を通じて、加熱した表面からナノフィブリル多糖類メンブレンに熱を印加する。

【0142】

状態22は状態16～状態21中のいずれか一つに係る方法を提供し、ナノフィブリル多糖類分散剤は移動するパターンニングされたフィルタ上に連続ウェブとして提供され、連続的パターンニングされたメンブレンは互いに異なる処理段階を通じて移動するパターンニングされたフィルタ上に連続ウェブを転写することによって製造され、パターンニングされたメンブレンはパターンニングされたフィルターから分離される。

【0143】

状態23は状態14～状態22中のいずれか一つに係る方法を提供し、ナノフィブリル多糖類は、0.5wt%濃度の水分散剤で1～50Pa、好ましく3～20Paの貯蔵弾性率を有する。

【0144】

状態24は状態14～状態22中のいずれか一つの方法によって取得可能なメンブレンを提供する。

【0145】

本発明に係るメンブレンは、装置で用いることができ、状態25～状態43にともなうこのような装置の製造時用いることができる。

【0146】

10

20

30

40

50

様態 25 は、細胞、および連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを含む装置を提供し、メンブレンの少なくとも一面はマイクロスケール凹部および/または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含む。

【0147】

様態 26 は様態 25 に係る装置を提供し、メンブレンは様態 1 ~ 様態 13 中のいずれか一つに係るメンブレンである。

【0148】

様態 27 は様態 25 または様態 26 に係る装置を提供し、細胞は冷凍乾燥される (lyophilize)。

【0149】

様態 28 は様態 24 ~ 様態 26 中のいずれか一つに係る装置を提供し、装置は乾燥形態になっている。

【0150】

様態 29 は様態 25 ~ 様態 28 中のいずれか一つに係る装置を提供し、マイクロスケール凹部および/または突出部は、細胞がメンブレンの凹部を収容できるようにする、および/または細胞がメンブレンの突出部上に本質的に付着できるようにする寸法を有する。

【0151】

様態 30 は様態 25 ~ 様態 29 中のいずれか一つに係る装置を提供し、この装置はメンブレン内に吸収された水性培地を含み、水性培地は、水、滅菌水、精製水、生理的食塩水、生理的緩衝剤、培養培地、栄養剤、および/または生理活性剤、またはこれらの組合せを含む。

【0152】

様態 31 は様態 30 中のいずれか一つに係る装置を提供し、前記生理活性剤は、蛋白質、ペプチド、炭水化物、脂質、核酸およびこれらの破片、抗ウイルス化合物、抗炎症化合物、抗真菌化合物と抗バクテリア化合物などの抗生物質、細胞分化剤、鎮痛剤、医療診断撮像のための造影剤、酵素、サイトカイン、抗ヒスタミン剤、免疫系に作用する薬剤、免疫刺激剤、止血剤、ホルモン、血管形成剤または抗血管形成剤、神経伝達物質、治療用オリゴ核酸塩、ウイルス粒子、ベクター、成長因子、レチノイド、細胞接着因子、骨形成因子、抗体、抗原、ペプチド、細胞、および無細胞マトリックスを含むこれらの誘導体からなる群から選択される。

【0153】

様態 32 は様態 25 ~ 様態 31 中のいずれか一つに係る装置を提供し、メンブレンの少なくとも一面の少なくとも一部は、ラミニン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、類型 I コラーゲン、類型 II コラーゲン、および類型 IV コラーゲンおよび/またはこれらの組合せやフラクションまたは複合混合物などのすべての種類の細胞外マトリックス蛋白質からなる群から選択される細胞接着を向上させるための薬剤でコーティングされるかこのような薬剤と化学的に結合される。

【0154】

様態 33 は様態 25 ~ 様態 32 中のいずれか一つに係る装置を提供し、この装置は、装置の中心領域または周辺領域などの装置の少なくとも一部の上で延びる一つ以上の層をさらに含み、一つ以上の層は、支持層、バックリング (backing) 層、保湿層、吸湿層、吸気障壁層、気体障壁層、臭い吸収層、薬物含有層、接着層および/または粘膜粘着層中で選択される。

【0155】

様態 34 は様態 25 ~ 様態 33 中のいずれか一つに係る装置を提供し、細胞は、自家細胞、同種異形細胞、幹細胞、電球細胞、前駆体細胞、結合組織細胞、上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞性細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、角質細胞、なめらかな筋肉細胞、間質細胞、間充細胞、臍帯血細胞、胚幹細胞、誘導多能性細胞、胎盤細胞、骨髄誘導細胞、免疫系細胞、造血細胞、樹突状細胞、毛穴細胞、軟骨細胞、ハイブリッドマ細胞、および/またはこれらの組合せを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 6 】

様態 3 5 は様態 2 5 ~ 様態 3 4 中のいずれか一つに係る装置を提供し、細胞は傷治癒のための治療に有用な細胞、好ましくは、間充織幹細胞、脂肪 - 誘導幹細胞、または骨髄誘導幹細胞を含む。

## 【 0 1 5 7 】

様態 3 6 は、連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含む装置を製造する方法を提供し、メンブレンの少なくとも一面はマイクロスケール凹部および / または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含み、方法は、

a . 細胞を提供する段階、

b . 連続構成で配列されたナノフィブリル多糖類を含むメンブレンを吸収する段階であって、メンブレンの少なくとも一面は水性培地とともにマイクロスケール凹部および / または突出部を含む少なくとも一つのパターンニングされた領域を含む、段階、

c . メンブレン上に細胞を転写する段階、および

d . メンブレン上に細胞が付着され得、細胞の未分化な成長または分化した成長や維持が可能な状態で細胞を培養する段階を含む。

## 【 0 1 5 8 】

様態 3 7 は様態 3 6 に係る方法を提供し、細胞は、自家細胞、同種異形細胞、幹細胞、電球細胞、前駆体細胞、結合組織細胞、上皮細胞、筋肉細胞、神経細胞性細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、角質細胞、なめらかな筋肉細胞、間質細胞、間充織細胞、臍帯血細胞、胚胎幹細胞、誘導多能性細胞、胎盤細胞、骨髄誘導細胞、免疫系細胞、造血細胞、樹突状細胞、毛穴細胞、軟骨細胞、ハイブリッドマ細胞、および / またはこれらの組合せを含む。

## 【 0 1 5 9 】

様態 3 8 は様態 3 6 または様態 3 7 に係る方法を提供し、細胞は冷凍乾燥される。

## 【 0 1 6 0 】

様態 3 9 は様態 3 6 ~ 様態 3 8 中のいずれか一つに係る方法を提供し、b 段階と c 段階は同時に実行される。

## 【 0 1 6 1 】

様態 4 0 は様態 3 6 ~ 様態 3 9 中のいずれか一つに係る方法を提供し、メンブレンは様態 1 ~ 様態 1 3 中のいずれか一つに係るメンブレンである。

## 【 0 1 6 2 】

様態 4 1 は、療法に使うように様態 1 ~ 様態 1 3 中のいずれか一つに係るメンブレンまたは様態 2 5 ~ 様態 3 5 中のいずれか一つに係る装置を提供する。

## 【 0 1 6 3 】

様態 4 2 は、傷、好ましく皮膚傷や皮膚火傷の治療に使うように様態 1 ~ 様態 1 3 中のいずれか一つに係るメンブレンまたは様態 2 5 ~ 様態 3 5 中のいずれか一つに係る装置を提供する。

## 【 0 1 6 4 】

様態 4 3 は、真皮組織損傷からの回復の間、炎症、免疫拒否、または傷跡形成を防止することに使うように脂肪誘導幹細胞または骨髄誘導幹細胞を含む、様態 2 5 ~ 様態 3 5 中のいずれか一つに係る装置を提供する。

## 【 0 1 6 5 】

様態 4 4 は、生体組織工学、マイクロ流体工学、またはマイクロ電子工学で様態 1 ~ 様態 1 3 中のいずれか一つに係るメンブレンの使用を提供する。

## 【 0 1 6 6 】

様態 4 5 は、生体組織工学、マイクロ流体工学、またはマイクロ電子工学で使用するように様態 1 ~ 様態 1 3 中のいずれか一つに係るメンブレン、選択的に水性培地、および説明書を含むキットを提供する。

## 【 0 1 6 7 】

様態 4 6 は様態 4 5 に係るキットを提供し、メンブレンは滅菌および無菌パッケージングされ、選択的な水性培地は滅菌されてメンブレンに吸収されて提供されるか別途のガラ

10

20

30

40

50

ス瓶に提供され、説明書は傷治癒時療法的に有用な細胞とともに使うためである。

#### 【0168】

様態は、様態1～様態13中のいずれか一つに係るメンブレンまたは様態25～様態35中のいずれか一つに係る装置を皮膚の傷がある患者の傷部位に付着する段階を含む傷治療方法を提供する。

#### 【0169】

下記の実施例は、本発明の多様な実施形態を例示するためのものであるだけで、本発明を限定しようとするものではない。

#### 【0170】

実施例

物質

ナノフィブリルセルロース

研削ストーンによる9パス(passes)を利用するMasuko SangyoのSupermasscolloiderを使って、漂白された白樺パルプからナノ繊維を分離した。最終産物は下記の特徴を有した。

- 濃度2.0重量%
- 半透明または不透明、混濁度150AU
- 若干陰イオン性表面帯電、-2mV
- 繊維直径7nmナノ繊維+20～50nmフィブリル束、長さ数マイクロメートル
- 多数の未フィブリル化された粒子200(粒子/mg)、FiberLab
- 炭水化物組成物：72.8%グルコース、25.6%キシロース、1.4%マンノ

ス

- 0.5wt%サンプル8000Pa・sのゼロずり粘度および降伏応力5Pa
- 1.0wt%サンプル30000Pa・sのゼロずり粘度および降伏応力20Pa
- 0.5wt%サンプルの貯蔵弾性率 $G' = 10\text{ Pa}$

#### 【0171】

第1実施例

ナノフィブリル多糖類メンブレン製造

NFCメンブレンを製造するための2-ステージ方法を利用した。第1ステージで、改質された研究所シートモールドを使って、ぬれたNFCメンブレンを形成した。1マイクロメートルまたは10マイクロメートル多孔性のフィルタクロスを利用した。フィルタファブリックはSefar Petex 07-10/2およびSefar Petex 07-1/2であり、これらのワイヤー直径はそれぞれ47マイクロメートルおよび34マイクロメートルであった。まず、フィルタクロスをシートモールドワイヤー上に置いてNFC分散剤をその上に注いだ。NFC分散剤の濃度は2g/lであったが、NFCの性質と状況によってその濃度を変更することもできる。シートモールド真空を利用してNFC分散剤から水を除去した。

#### 【0172】

形成されるNFC-メンブレンから水がそれ以上除去されない時、メンブレンが金属板とポリアミドファブリックの間にあるようにテフロン(teflon)コートされた金属板をNFC-メンブレン上に置いた。セルロースプロッターをポリアミドファブリックの下に置いた。

#### 【0173】

第2ステージで、プロッター/ポリアミド/NFC-メンブレン/金属板パッケージをシートモールドから除去して水圧プレスへ向かうようにした。プレスの上測板を90で加熱し、テフロンコートされた金属板をその上側板においた。プレッシングを開始して数分の間持続した。この期間の間、メンブレンから第1ステージの間除去されなかった水がプロッターに伝達され、ポリアミドファブリックからNFCメンブレンが容易に除去されるようにNFCメンブレン内に強力な内部結合を形成した。同時に、フィルタファブリックの表面形態の陰画像を形成されたNFCメンブレンに転写する。

10

20

30

40

50

## 【0174】

## NFCメンブレン特性

この研究では、厚さが概略60マイクロメートルである60 g/m<sup>2</sup> NFCメンブレンを製造した。メンブレンの乾燥密度は1.4~1.5 g/cm<sup>3</sup>であった。製造後、メンブレンは乾燥しており(1~5 wt% 残留湿気)、半透明で、剛性のシート型物質であった。メンブレンの表面は表面粗度が最小限であり、非常になめらかであった。最下部はフィルタファブリックの形態から発生する別個の表面構造を有しており、図5~図8を参照する。

## 【0175】

図5には、1マイクロメートルフィルタクロスを利用して製造されたNFCメンブレンの表面構造が提示されている。連続突出パターンが形成されており、その構造は、対角線の長さが300マイクロメートルに近い長い閉鎖ダイヤモンド状のウェル(well)構造で形成されている。長い形状の間には、短い長方形ウェル形状も見られる。対応するフィルタクロス(S E M画像)は、表面構造が直接的にコピーされておらず、ウェル形状がダイヤモンド状にストレッチングされていることを表す。ストレッチングは、乾燥ステージ2の間、ぬれたNFCメンブレンの乾燥時の収縮によって引き起こされる。このような挙動は、例えば、紙製造において公知されている。制御される乾燥収縮を利用して乾燥完了後に形状の寸法を調節することができる。ダイヤモンドタイプの形状は、物質の一部がファブリックフィラメントと固く接触し、後者がフィラメント表面とより少なく接触する時形成される。したがって、乾燥収縮および乾燥率において局部的差が発生し、非長方形の形状を引き起こすことになる。この現象は、ファブリック ウェーピング(waving)パターン、構造、およびフィラメントタイプによって制御され得る。図8に示されたように、ストレッチングされた形状は、メンブレンを湿潤化することによって弛緩することができ、細胞培養実験に関するS E M画像から弛緩した長方形の形状を見ることができる。図8に示されたように、突出する壁構造の高さをS E M画像から概略推定することができる。1マイクロメートルフィルターとともに製造されるメンブレンにおいて、突出部分の高さ分布は広く、最低の部分はせいぜい数マイクロメートルである一方、最高の部分は平面から20~40マイクロメートル突出される。

## 【0176】

図6には、10 μmフィルタクロスとともに製造されたNFCメンブレンの表面構造が提示されており、フィルターの対応するS E M画像も提示されている。糸(yarn)直径(20マイクロメートル)が1マイクロメートルフィルターの大きさに近いが、対応するNFCメンブレンは図5に比べてかなり異なるように見える。図7に示されたように、10マイクロメートルフィルタクロスで、織り込まれたテクスチャーは乾燥ステージの間収縮を防止し、NFCメンブレンの表面構造はフィルターの陰画像に非常に類似していると見られる。閉鎖されたウェル構造はほぼ長方形(20×180マイクロメートル)である。突出する壁構造の高さは、S E M画像から正確に推定することは難しいが、約5~10マイクロメートルであり得る。

## 【0177】

## 第2実施例

## 傷治癒治療

傷治癒法が図9に図示されている。脂肪間充織幹細胞(hASC)を、ナノフィブリルセルロースメンブレンの上にシーディングし、傷領域に伝達する前に1週間の間体外培養する。メンブレンに対する細胞シーディング前に細胞の分離および培養状態は、(Escobedo-Lucea et al, Plos One 2013)により確立されたプロトコルにより展開する。

## 【0178】

ナノフィブリルセルロースメンブレンは、二つの互いに異なる特性である、なめらかな特性と粗い特性がある二つの互いに異なる面を有する。hASC細胞は、機械的接着が明確に良好であるという事実のため、メンブレンの粗い面上にシーディングされる(図10

10

20

30

40

50

参照)。このとき、化学的接着は不要である。これに加えて、ナノフィブリルセルロースメンブレンを、表面に対するhASCの接着を改善できる任意のECM誘導体でコーティングすることができるが、全くコーティング剤を使わずに使うこともできる。

#### 【0179】

細胞に対するナノフィブリルセルロースメンブレンの安定性を互いに異なる分析を通じて(すべての場合において)確認した。7日間の培養後、透過電子顕微鏡(TEM)分析を通じて形態学的超微細構造の変形は細胞で検出されなかった(図11)。間充織幹細胞マーカーは、QRT-PCRによる分析時自身の特徴的レベル維持し続ける(図12)。

#### 【0180】

いずれの場合でもメンブレンの上のhASCの培養後に死滅細胞が増加しない。

10

#### 【0181】

hASCサイトカインアレイの体外免疫調節特性に関し、コートされたまたはコートされていないナノセルロースメンブレンの上にまたは通常的方式でプラスチックの上に培養された間充織幹細胞間の任意の変形や差を確認するように研究した。サイトカイン発現と解除は、ナノセルロースメンブレンの上の培養後に妥協しないものと見える(図13と表1)。サイトカイン発現は、全てのものが正しく機能しており、進行している拒否がないということを保障することである。

#### 【0182】

表1. プラスチックおよび互いに異なるコーティング剤を有するメンブレンの上に培養された細胞から解除されるサイトカインの識別。表では、5%より大きい相対的ピクセル密度を有して発現されたサイトカインを示している。

20

	板	メンブレン
人の血清のない培地	Serpine1	Serpine1
細胞によって分泌される	MIF Serpine1	Il-1ra MIF
蛋白質(HSない培地)		Serpine1
LM+細胞によって分泌される	Gro $\alpha$ il-1ra MI	Il-1ra MIF
蛋白質(HSない培地)	F	Serpine1
	Serpine1	
CS+細胞によって分泌される	Gro $\alpha$ il-1ra IL	MIF
蛋白質(HSない培地)	-8 MIF	Serpine1
	Serpine1	

30

#### 【0183】

生体外傷復旧分析に関し、細胞を有するメンブレンによる治療後傷領域の回復は、2007年Geerなどによって説明される検証された傷治療ヌードマウス(mice)モデルを利用して実行された。

#### 【0184】

40

細胞メンブレン治療の5日と10日後に、動物たちを犠牲にさせて解剖病理学(anatomopathology)研究を遂行した。動物たちは細胞を有するナノフィブリルメンブレンで治療し、図14に立証された通り、さらに良好な治癒予後およびさらに早い回復を示した。

#### 【0185】

##### 物質と方法

##### メンブレンの上のhASC細胞の分離と培養

コートされたメンブレンの場合に若干の改質とともに2013年Escobedo-Luceaなどによってあらかじめ確立されたプロトコルを利用して脂肪間充織幹細胞を分離および培養した。コーティングのために、傷をカバーするための所望の領域を有するよ

50

うにメンブレンを培養フード内で無菌および滅菌状態で切断した。メンブレンを5および10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の人間ラミニンおよびCS (cell start) でそれぞれ1時間の間コーティングした。洗浄後、細胞を培養培地でシーディングし、治療または生体外分析の時まで37、95%の湿度、および5%のCO<sub>2</sub>でインキュベーターにて1週間の間培養した。一日おきに培養培地を変更した。

#### 【0186】

##### 走査電子顕微鏡

培養物を2.5%グルタルアルデヒドに1時間の間浸水 - 固定した。引き続き、培養物を1時間の間1%オスミウムにポストフィックス (post fix) し、脱水化し、臨界点乾燥し、スパッタ - コーティングし、走査電子顕微鏡 (S-4100、Hitachi、Japan) で分析した。

10

#### 【0187】

##### 透過電子顕微鏡

微細超微細構造分析のために、細胞をチャンバースライドで培養した後、透過電子顕微鏡 (TEM) のための固定前に0.1M燐酸塩緩衝 (PB; pH 7.4) 溶液で連続的に洗浄した。37で30分の間PBの3%グルタルアルデヒド溶液で固定を遂行してPBの2%OsO<sub>4</sub>でポストフィックスした。エタノール溶液の等級シリーズおよびプロピレン酸化物による最終洗浄 (Lab Baker、Deventry、Holland) により脱水化を達成した。最後に、板をアラルダイト (Durkupan、Fluka) に一晚埋没した。ポリマー化に引き続き、埋没したサンプルをチャンバースライドから分離し、アラルダイトブロックに付着した。多少薄い (1.5  $\mu\text{m}$ ) 連続的セクションを、Ultracut UC-6 (Leica、Heidelberg、Germany) により切断し、スライド上に装着し、最後に1%トルイジンブルーで染色した。初箔 (0.07  $\mu\text{m}$ ) セクションをUltracutによって製造してクエン酸鉛で染色した。デジタルカメラ (Morada、Soft Imaging System、Olympus) を使って下記の透過電子顕微鏡 (FEI Tecnai Spirit G2) のマイクロ写真を取得した。

20

#### 【0188】

##### RNA製造およびQRT-PCR

RNeasyミニキット (Qiagen、Gilden; no. 74104) を使って細胞から総RNAを製造した。ゲノムDNA汚染を除去するように、初期RNAベレットをデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) I (2 to 4 U/ $\mu\text{L}$ ; Qiagen、Carlsbad; no. 79254) で15分の間室温でメーカーによって供給される緩衝剤s u内で培養した。RT-PCRおよびプライマー シークエンスはEsco bedo-Lucea et al 2013、Plos Oneに開示された通りであった。これらは、Primer 3ソフトウェアを使って設計され、Sigma-Aldrichによって合成された。各実験ごとに、cDNA反応混合物から逆転写酵素が省略されてPCR混合物からDNAが省略された対照を遂行した。定量的リアルタイムPCR (QRT-PCR) のために、5  $\mu\text{g}$  RNAをcDNAに変換し、Lightcycler 480 (Roche Diagnostics、Mannheim) 機構のLight Cycler 480 SYBR Green I Master (Kit no. 04707516001) で40 - サイクルPCRに対して一連の希釈されたサンプルを使った。反応 (合計20  $\mu\text{L}$ ) は、1  $\mu\text{L}$  cDNA、10  $\mu\text{M}$  の各プライム、および4  $\mu\text{M}$  プローブを含み、デフォルトLightcycler 480プログラム下で実行された。互いに異なるサンプルのmRNAレベルの比較のための標準曲線を生成するように、少なくとも三桁の数にかけた対照cDNAサンプルの多数の希釈液を製造した。臨界サイクルCt対ログ濃度のプロットを表す等式を使って実験サンプルのmRNAの相対量を決めた。最適化された条件と臨界値を使って、サンプルの間に変わらないと予想される内部対照区および関心プローブによって個別的なサンプルを3回分析した。互いに異なる三個の内部対照区である、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (Gapdh

30

40

50

)、 - 2 マイクログロブリン、および - アクチンを使った。Ct 値から、相対転写濃度を算出して内部対照区の相対転写濃度で正規化した。最大発現データポイントを 100 に調節した。データは Gapdh で正規化されたサンプルに対して表しているが、結果は、 - 2 マイクログロブリンだけを使ったり 3 個の対照区すべての組合せを使って分析を遂行した場合、比較するだけの有意義なものであった。

#### 【0189】

##### サイトカインアレイ

ストレプトアビジン - HRP によってメンブレンを 30 分の間培養した。1 分の間 Chemi Reagent Mix を添加することによってアレイを明らかにした。過度な反応剤を除去および密封した。メンブレンを、該当識別とともにオートラジオグラフィ膜カセット内に置いて 1 分 ~ 10 分の間 X 線膜に露出した。対照区、基準および候補サイトカインの位置と識別は説明書で提供者によって列挙されている。

10

#### 【0190】

各条件間の比較のために、透過モードスキャナおよび画像分析ソフトウェア (Image J) を使って、現像された X 線膜上の画素密度を収集して分析した。テンプレートを生成してアレイの各スポットの画素密度を分析した。バックグラウンドとしての陰対照スポットまたはきれいな領域からの信号をそれぞれ考慮する重複スポットのペアを利用して平均信号 (画素密度) を決めた。各スポットからの平均化されたバックグラウンド信号を減算した。

#### 【0191】

##### 動物手術

Charles River (France) からスイス nu/nu ヌードマウスを購入し、倫理許容番号 (ethical permission number) が 12 - 02 - 38 である、スペインバレンシアにある Centro de Investigacion Principe Felipe によって維持される施設に収容した。このようなヌードマウスをヘルシンキとバレンシア間の協約による共同作業に利用した。すべての実験に対して、雄は 7 ~ 8 週となったものを使った。実験は CIPF Institutional Animal Care Committee から承認を受けた。すべての施術は無菌技術を利用して遂行し、すべての物質は滅菌状態であった。生物学的安全キャビネット内で外科施術を遂行した、ラミナ流れケージ分離器 (laminar flow cage isolator) のフィルタが上部に設置されたケージ内に動物たちを収容した。実験のために、マウスが所望レベルの麻酔に到達するまでマウスをイソフルラン (IsoFlo; Abbott Laboratories, North Chicago, IL) で満たされたガスチャンバー内に置いた。ピンチテストを使用し、呼吸率を監視して適切なレベルの麻酔を決めた。引き続き、マウスをチャンバーから除去して全体施術にかけてイソフルランガスでマスキングした。マウスの背中をエタノールで洗浄した後、マウスの肩から  $1\text{ cm}^2$  上に (皮下筋肉層を含む) 二つの全 (full) 厚さ傷を生成した。二つの傷の中の一つを対照区として使い、残りの一つを治療にを使った。次に、傷治療剤を傷上に置いて、各コーナーでスティッチ (stitch) によって 6 - 0 Vicryl (Ethicon/Johnson & Johnson, Somerville, NJ) により固定した。ポリウレタン閉塞ドレッシング (Tegaderm; 3M, St. Paul, MN) の一側をドレッシングの上に塗布した。トリミングされた 3M スポーツバンドをドレッシングの上に置いて 6 - 0 Vicryl スティッチで固定されるように縫い合わせた。引き続き、防水接着テープ (Johnson & Johnson, Skillman, NJ) を使ってグラフト (graft) を固く囲んでドレッシングを固定した。Geer など (2007) により説明される勧告を利用して傷領域を脱水した。

30

40

#### 【0192】

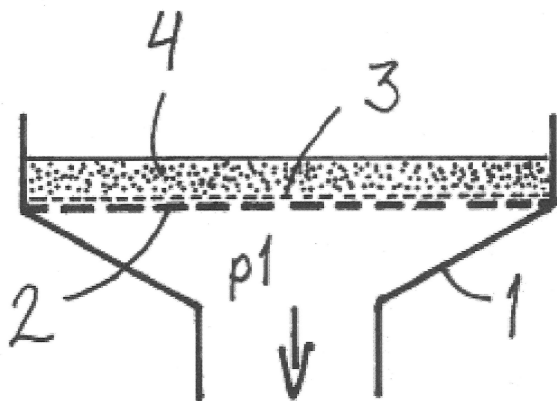
##### ヒストロジー

パラフィンを埋没した組織セクションの標準ヘマトキシリンおよびエオシン染色および

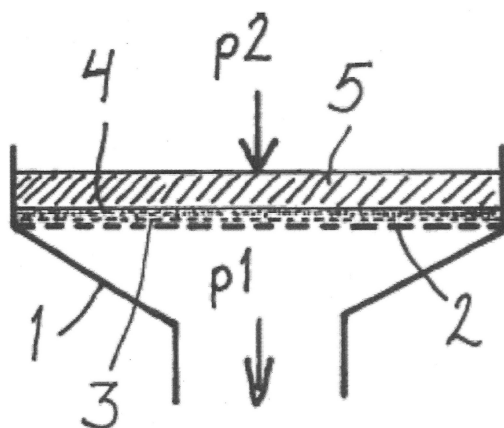
50

M a s s o n の 3 色 染 色 に よ っ て 組 織 形 態 学 を 分 析 し た 。 パ ラ フ ィ ン に 対 し て 、 切 断 さ れ た 皮 膚 等 価 物 を 1 0 % 緩 衝 ホ ル マ リ ン ( F i s h e r S c i e n t i f i c ) に 2 時 間 の 間 室 温 で 固 定 し た 後 、 エ タ ノ ール - キ シ レ ン 洗 浄 に よ っ て 脱 水 し た 。 6 0 ° で 一 晩 の 間 浸 潤 後 に 組 織 を パ ラ フ ィ ン に 埋 没 し た 。

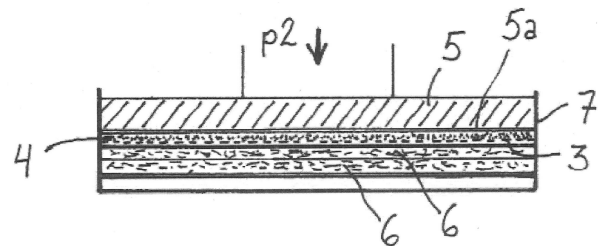
【 図 1 】



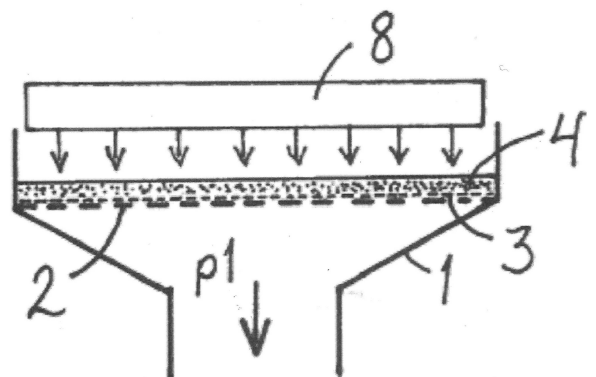
【 図 2 】



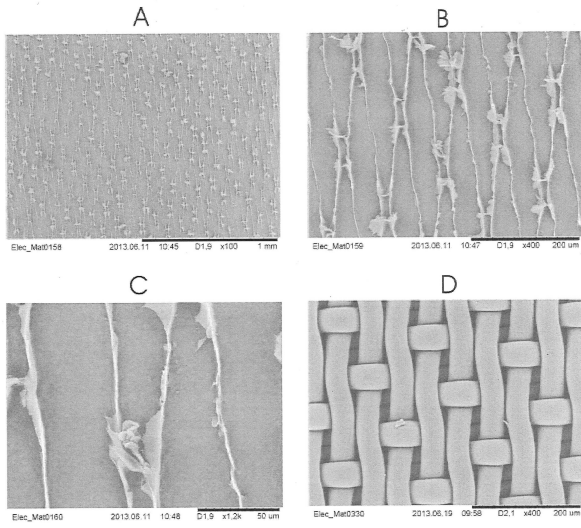
【 図 3 】



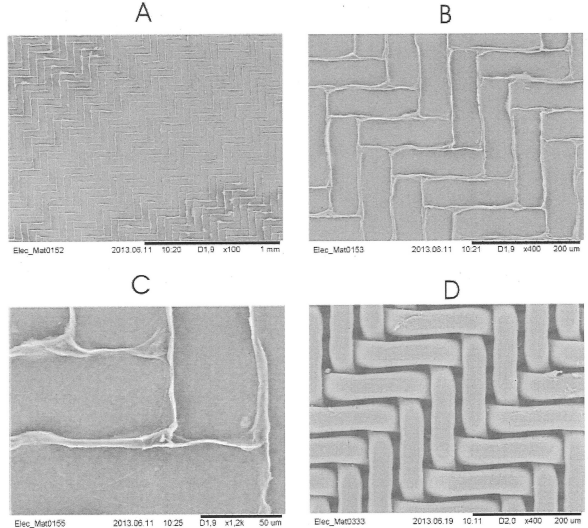
【 図 4 】



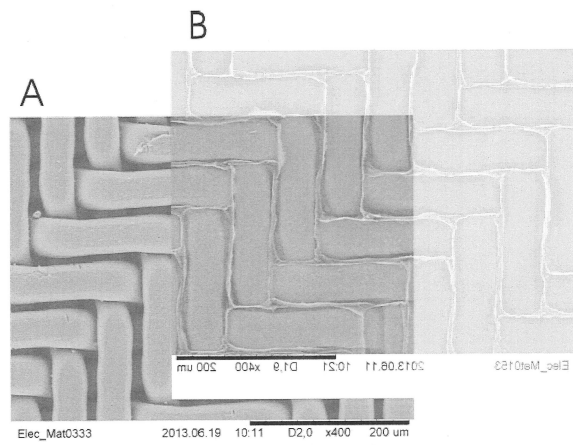
【図 5】



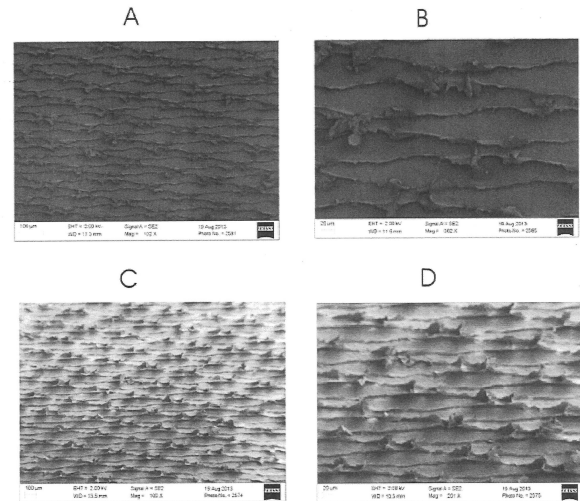
【図 6】



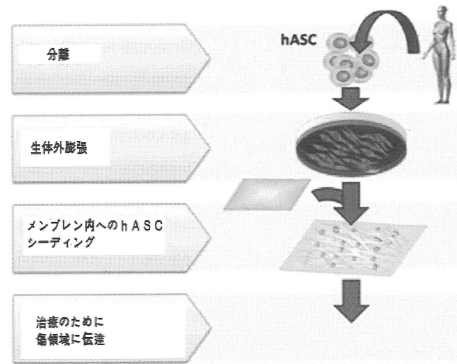
【図 7】



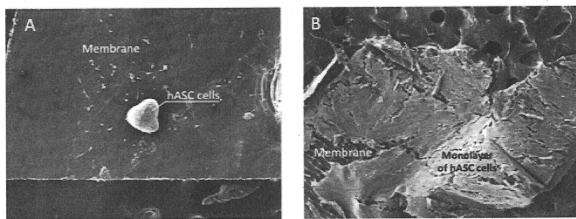
【図 8】



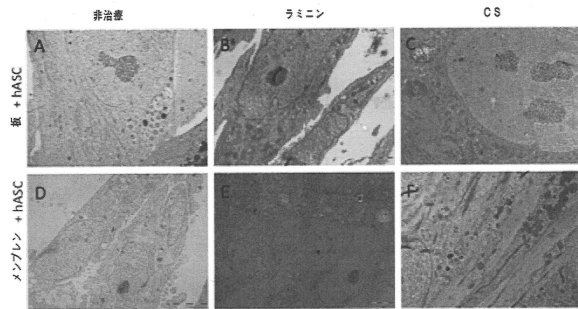
【図 9】



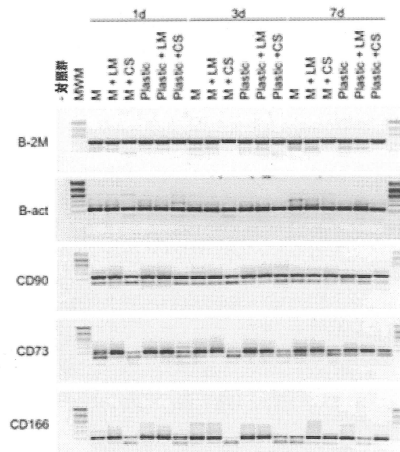
【図 10】



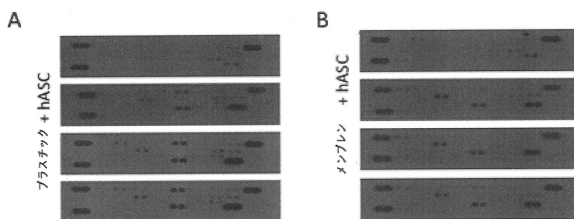
【図 11】



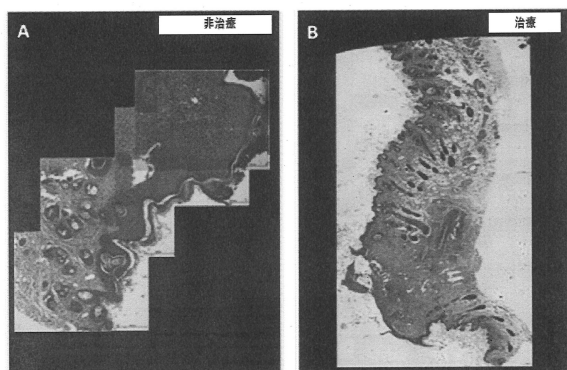
【図 12】



【図 13】



【図 14】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100163658  
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文
- (74)代理人 100137729  
弁理士 赤井 厚子
- (74)代理人 100151301  
弁理士 戸崎 富哉
- (72)発明者 ラウカネン、アンティ  
フィンランド国、エフアイ - 0 0 2 5 0 ヘルシンキ、マンネルヘイミンティエ 3 5 エー 5
- (72)発明者 イリパーチュラ、マージョ  
フィンランド国、エフアイ - 0 2 3 3 0 エスボー、カティラブオレンクジャ 2
- (72)発明者 ガンディア - ベントゥラ、カロリナ  
スペイン国、イー - 4 6 9 6 0 パレンシア、アルダヤ、テオドロ ロレンテ通り 8 ピーティ  
ーエー 4
- (72)発明者 エスコベド - ルシア、カルメン  
フィンランド国、エフアイ - 0 0 7 9 0 ヘルシンキ、ヴィキンカアリ 8 ディー
- (72)発明者 パルタカリ、ヨウニ  
フィンランド国、エフアイ - 0 2 2 0 0 エスボー、ツーリンマーンティエ 1 4
- (72)発明者 ベッソノフ、マルコ  
フィンランド国、エフアイ - 0 2 1 0 0 エスボー、ミエリキンヴィータ 8 シー 4 6

審査官 長谷川 茜

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 7 1 3 7 3 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 1 3 - 5 4 1 9 5 6 ( J P , A )  
Materials Science and Engineering C , 2 0 1 1 年 , 31 , p.1201-1208

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8  
A 6 1 F 2 / 0 0 - 4 / 0 0  
A 6 1 F 1 3 / 0 0 - 1 3 / 8 4  
A 6 1 F 1 5 / 0 0 - 1 7 / 0 0  
A 6 1 B 1 3 / 0 0 - 1 8 / 2 8  
A 6 1 M 2 5 / 0 0 - 9 9 / 0 0  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )