

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3739715号
(P3739715)

(45) 発行日 平成18年1月25日(2006.1.25)

(24) 登録日 平成17年11月11日(2005.11.11)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)
 A 6 1 L 27/00 J
 A 6 1 L 27/00 G

請求項の数 5 (全 8 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-77170 (P2002-77170) (22) 出願日 平成14年3月19日 (2002.3.19) (65) 公開番号 特開2003-265592 (P2003-265592A) (43) 公開日 平成15年9月24日 (2003.9.24) 審査請求日 平成15年11月5日 (2003.11.5)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 000000376 オリンパス株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号</p> <p>(74) 代理人 100058479 弁理士 鈴江 武彦</p> <p>(74) 代理人 100091351 弁理士 河野 哲</p> <p>(74) 代理人 100088683 弁理士 中村 誠</p> <p>(74) 代理人 100108855 弁理士 蔵田 昌俊</p> <p>(74) 代理人 100075672 弁理士 峰 隆司</p> <p>(74) 代理人 100109830 弁理士 福原 淑弘</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 人工骨および組織工学用担体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リン酸カルシウム系セラミックス多孔体からなり、気孔径が0.1 μm ~ 1000 μm に分布する、多孔体全域に3次的に連通する球状またはアメーバ状の気孔を有し、それらの気孔が100 μm以上の径を有する気孔連通部と、5 μm以下の径を有する気孔連通部とを有し、それらの気孔のうち、気孔連通部の径が外部まで100 μm以上である連通気孔の全容量Aが、多孔体の体積の10%以上であり、かつ前記Aが、多孔体中の気孔径10 μm以上の気孔の全容積の30%以上である多孔構造を有することを特徴とする人工骨。

【請求項2】

前記リン酸カルシウム系セラミックス多孔体に、BMP、FGF、TGF-β、PDGF、VEGF、IGF、HGF、PTH、およびエストロゲンからなる群から選ばれた少なくとも1種を複合したことを特徴とする請求項1に記載の人工骨。

【請求項3】

組織工学的に細胞を複合する担体であって、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体からなり、気孔径が0.1 μm ~ 1000 μm に分布する、多孔体全域に3次的に連通する球状またはアメーバ状の気孔を有し、それらの気孔が100 μm以上の径を有する気孔連通部と、5 μm以下の径を有する気孔連通部とを有し、それらの気孔のうち、気孔連通部の径が外部まで100 μm以上である連通気孔の全容量Aが、多孔体の体積の10%以上であり、かつ前記Aが、多孔体中の気孔径10 μm以上の気孔の全容積の30%以上で

ある多孔構造を有することを特徴とする組織工学用担体。

【請求項4】

請求項3に記載の組織工学用担体に、幹細胞、骨髄未分化細胞、骨芽細胞、骨芽細胞の前駆細胞、破骨細胞、および破骨細胞の前駆細胞からなる群から選ばれた少なくとも1種を複合したことを特徴とする人工骨。

【請求項5】

前記リン酸カルシウム系セラミックスは、リン酸カルシウム、水酸化アパタイト、これらの複合物からなるセラミックス、および結晶化ガラスからなる群から選ばれた1種であることを特徴とする請求項1、2または4に記載の人工骨。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、人工骨および組織工学用担体に関する。

【0002】

【従来の技術】

整形外科等の分野において、骨欠損を修復する方法として、自家骨移植がオーソドックスな方法である。自家骨移植は、その使用実績からも信頼性は高いが、採骨量に限界があること、採骨により健常部に侵襲を加えてしまうこと、手術時間が長くなること、などの問題点があった。

【0003】

そのため、近年、リン酸カルシウムを主成分とする多孔体を人工骨として応用する方法が開発され、上述の自家骨移植の問題を解決する手段として、多く用いられるようになっていく。

【0004】

骨は、無機成分としてリン酸カルシウムを主成分として含んでおり、一般にリン酸カルシウム化合物は、細胞がこれを足場にして骨を形成する性質である骨伝導能を有している。従って、人工骨は、リン酸カルシウム化合物を主成分とし、材料内部まで骨形成が得られるように、多孔質にデザインされるのが一般的である。

【0005】

人工骨を構成する多孔質の性状は、補填部全域、特に材料内部までの速やかな骨形成を得るために非常に重要な点である。例えば、特開2000-302567号公報には、連通する気孔を有し、その連通部分の平均的な直径が50 μ m以上であり、かつ気孔径が150 μ m以上である性状のリン酸カルシウム多孔体が開示されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、この公報に記載されている多孔体は、気孔の連通部分の平均的な直径を50 μ m以上としているが、気孔の中で最小の径である連通部の径は、細胞の侵入にとって最も重要であり、平均的な連通部の径を規定するだけでは、気孔の連通状態が十分にコントロールされていない。そのため、材料の内部から外部に至るまで十分な径を有する気孔連通部が確実に存在するとは限らない。

【0007】

また、気孔径が150 μ m以上としただけでは、細胞との親和性の確保やリン酸カルシウムの化学的な作用、例えば周囲の化学的な状況を刺激する微妙な溶解などをもたらす得ない。

【0008】

本発明は、このような事情の下になされ、細胞との親和性に優れ、細胞をスムーズに材料内部に侵入させることを可能とする人工骨および組織工学用担体を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

上記目的を達成するため、本発明は、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体からなり、気孔径が $0.1\ \mu\text{m} \sim 1000\ \mu\text{m}$ に分布する、多孔体全域に3次的に連通する球状またはアメーバ状の気孔を有し、それらの気孔が $100\ \mu\text{m}$ 以上の径を有する気孔連通部と、 $5\ \mu\text{m}$ 以下の径を有する気孔連通部とを有し、それらの気孔のうち、気孔連通部の径が外部まで $100\ \mu\text{m}$ 以上である連通気孔の全容量Aが、多孔体の体積の10%以上であり、かつ前記Aが、多孔体中の気孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上の気孔の全容積の30%以上である多孔構造を有することを特徴とする人工骨を提供する。また、この人工骨は、組織工学用担体として用いることが可能である。

【0011】

上記人工骨は、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体に、BMP、FGF、TGF - 10
、PDGF、VEGF、IGF、HGF、PTH、およびエストロゲンからなる群から選ばれた少なくとも1種を複合したものとすることが出来る。

【0012】

また、本発明は、組織工学的に細胞を複合する担体であって、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体からなり、気孔径が $0.1\ \mu\text{m} \sim 1000\ \mu\text{m}$ に分布する、多孔体全域に3次的に連通する球状またはアメーバ状の気孔を有し、それらの気孔が $100\ \mu\text{m}$ 以上の径を有する気孔連通部と、 $5\ \mu\text{m}$ 以下の径を有する気孔連通部とを有し、それらの気孔のうち、気孔連通部の径が外部まで $100\ \mu\text{m}$ 以上である連通気孔の全容量Aが、多孔体の体積の10%以上であり、かつ前記Aが、多孔体中の気孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上の気孔の全容積の30%以上である多孔構造を有することを特徴とする組織工学用担体を提供する。 20

【0013】

更にまた、本発明は、上記組織工学用担体に、幹細胞、骨髄未分化細胞、骨芽細胞、骨芽細胞の前駆細胞、破骨細胞、および破骨細胞の前駆細胞からなる群から選ばれた少なくとも1種を複合したことを特徴とする人工骨を提供する。

【0014】

以上説明した人工骨において、リン酸カルシウム系セラミックスは、 β -リン酸カルシウム、水酸化アパタイト、これらの複合物からなるセラミックス、および結晶化ガラスからなる群から選ばれた1種とすることが出来る。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

【0016】

本発明に係る人工骨は、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体により構成される。既に知られているように、リン酸カルシウム化合物は骨伝導能を有しているため、従来より人工骨の成分として用いられている。リン酸カルシウム化合物の中でも、水酸化アパタイト(HAP)および β -リン酸カルシウム(β -TCP)は、より骨伝導能に優れており、人工骨成分として好ましい。

【0017】

これらの中でも、特に β -TCPは、骨伝導能に優れているだけでなく、骨組織内で吸収される性質も併せて有している。即ち、 β -TCPを骨組織に補填すると、骨芽細胞が材料を足場にして骨を形成し、それと同時に破骨細胞が材料を吸収し、補填部が経時的に自家骨に置換されるという特徴がある。従って、 β -TCPは、本発明に係る人工骨の成分として最適な材料である。 40

【0018】

リン酸カルシウム化合物の骨伝導能や生体吸収性は、その製造プロセスによっても大きく左右される。人工骨用の β -TCPは、原材料粉末として、湿式磨砕するメカノケミカル法により合成された β -TCP粉末を用いて得たものであることが望ましい。

【0019】

得られた β -TCP粉末は、次いで、水、解膠剤、界面活性剤とともにスラリー化され、乾燥および焼成され、セラミックス多孔体とされる。 50

次に、以上説明したリン酸カルシウム系セラミックス多孔体の気孔性状について説明する。

【0020】

本発明に係る人工骨および組織工学用担体を構成するリン酸カルシウム系セラミックス多孔体は、気孔径 $0.1\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ に分布する球状またはアメーバ状の気孔が、多孔体全域に3次的に連通する構造である必要がある。球状気孔とは、多数の球状気孔が繋がった気孔であり、アメーバ状気孔とは、アメーバ状に延びた気孔である。

【0021】

このような多孔体において、気孔径の大きなマクロ側の気孔は、細胞の侵入、移植後の血管の新生などに必要であり、気孔径の小さなミクロ側の気孔は、細胞との親和性、周囲への化学的刺激（イオンの微量溶出など）のために必要である。

10

【0022】

なお、本発明に係るセラミックス多孔体は、気孔径 $0.1\mu\text{m} \sim 1000\mu\text{m}$ に分布する連通気孔を有するが、従来、人工骨用に用いられているセラミックス多孔体が、気孔径 $150\mu\text{m}$ 以上の気孔を有するのに対し、それよりはるかに小さい側にも分布を有する点で、基本的に相違する。

【0023】

また、人工骨における骨形成と材料の吸収、組織工学用担体における培養細胞との複合が効果的に行われるためには、材料の外部から内部まで、十分な径の連通部を介して連通する気孔を十分に確保した構造とすることが必要である。

20

【0024】

すなわち、このような多孔体において、気孔の連通部の径は、 $100\mu\text{m}$ 以上を確保し、かつ外部に至るまで確実に連通する気孔を有することが重要である。気孔の連通部とは、気孔とそれに隣接する気孔の間の部分であって、気孔径よりも小さい径を有している。従って、細胞の侵入等のためには、気孔の連通部の径を大きく確保することが重要である。

【0025】

従って、本発明に用いるセラミック多孔体は、気孔連通部の径が外部まで $100\mu\text{m}$ 以上である連通気孔の全容量Aが、多孔体の体積の10%以上であること、およびAが、多孔体中の気孔径 $10\mu\text{m}$ 以上の気孔の全容積の30%以上である構造を有する。Aが、多孔体の体積の10%未満では、細胞が浸入し得る気孔が少なく、十分な骨形成が得にくくなり、好ましくない。

30

【0026】

また、Aが、多孔体中の気孔径 $10\mu\text{m}$ 以上の気孔の全容積の30%未満では、同様に細胞が浸入し得る気孔が少なく、十分な骨形成が得にくくなり、好ましくない。

【0027】

或いは、本発明に用いるセラミック多孔体は、多孔体中の気孔連通部の径が $5\mu\text{m}$ 以上ある気孔において、気孔連通部の径が外部まで $B\mu\text{m}$ 以上である連通気孔の全容積をCとした場合、微分 dC/dB の最大値が $B > 100\mu\text{m}$ で得られる構造を有する。

【0028】

微分 dC/dB は、気孔連通部の径の変化に対する連通気孔の全容積の変化を示し、その曲線が $100\mu\text{m}$ を越えるBの値においてピークを有することを意味する。

40

【0029】

微分 dC/dB の最大値が $100\mu\text{m}$ 以下のBで得られるような多孔構造では、連通部の径の分布において $100\mu\text{m}$ 以上を確保する気孔が少なくなり、好ましくない。

【0030】

以上説明した、リン酸カルシウム系セラミックス多孔体を用いることにより、細胞をスムーズに多孔体内部に侵入させ、かつ細胞との親和性を最適なものとし、多孔体内部まで速やかな骨形成が得られる人工骨を得ることが可能である。

【0031】

更に速やかな骨形成を得るために、上述した構造のリン酸カルシウム系セラミック多孔体

50

に、骨形成を促進する成長因子、細胞増殖因子、ホルモンなどを複合することができる。骨形成を促進する因子であれば、特に限定されないが、例えばBMP、FGF、TGF、PDGF、VEGF、IGF、HGF、PTH、エストロゲンなどを複合することが出来る。

【0032】

また、上述したリン酸カルシウム系セラミック多孔体は、組織工学用担体としても、培養細胞の内部までの速やかな侵入という点で優れている。特に、骨形成、骨のリモデリング、骨代謝に寄与する細胞と複合することにより、優れた人工骨を得ることが出来る。複合する細胞は、骨形成、骨のリモデリング、骨代謝に寄与する細胞であれば、特に限定されないが、幹細胞、骨髄未分化細胞、骨芽細胞、骨芽細胞の前駆細胞、破骨細胞、破骨細胞の前駆細胞などを用いることができる。幹細胞は骨髄由来のものをはじめ、様々なものを複合することが出来る。

10

【0033】

以下、本発明の種々の実施例を示し、本発明の効果をより具体的に説明する。

【0034】

<実施例1>

本実施例は、リン酸カルシウム系セラミックスとして -TCPを用いて得た多孔体の製造例について示す。

【0035】

-TCPの合成は、メカノケミカル法により以下のようにして行った。即ち、炭酸カルシウム粉末とリン酸水素カルシウム2水和物粉末をモル比で1:2の割合で秤量し、純水とともにボールミルポットに入れ、約1日ボールミルにて混合粉碎した。得られたスラリーを約80℃で乾燥し、その後750℃で焼成した。得られた粉末は、焼結性に優れた高純度の -TCPであった。

20

【0036】

このようにして得た -TCP粉末に純水とアクリル酸アンモニウム系の解膠剤とポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル系の界面活性剤を添加し、混合攪拌して発泡スラリーを調製した。この発泡スラリーを乾燥させ、その後1050℃で焼成して -TCP多孔体を得た。

【0037】

この多孔体について、その気孔性状を評価した。まず重量および体積を測定し、それらの値を用いて気孔率を算出すると、75%であった。また、SEM観察により、マクロな気孔として、100~400μmの径の気孔が多く存在することを確認した。

30

【0038】

材料外部からの気孔連通性は、水銀圧入法により測定した。水銀圧入法は、測定精度上、連通部の径で100μmが評価の上限であり、その範囲において、連通部径と、その値以上の連通部径を満たして外部まで連通している全気孔の容積との関係を測定することができる。100μmを越える連通部径の全気孔容積は、気孔率と水銀圧入量の差引によって求められる。

【0039】

水銀圧入法による多孔体の気孔連通性の測定は、前処理として試料を110℃で5時間真空乾燥したのち乾燥炉より取り出し、約30分自然放冷させた後、オートポアIIIS420(商品名: Micromeritics社製)を用いて行った。その結果、多孔体単位体積(1ml)当たりの連通部径と気孔容積の関係は、下記表1に示す通りとなった。

40

【0040】

【表1】

表 1

連通部径 (μm)	気孔容積 (ml)
> 100	0.24
100~50	0.21
50~25	0.04
25~10	0.02
10~5	0
5>	0.24

10

【0041】

上記表 1 に示す結果から、多孔体の単位体積中、連通部径が $100\ \mu\text{m}$ 以上である気孔で、外部までこの連通部の径 $100\ \mu\text{m}$ 以上を満たす気孔により連通している気孔の全容量 A は $0.24\ \text{ml}$ であり、これは多孔体の体積 ($1\ \text{ml}$) に対して 24% であることがわかる。また、A の多孔体中の気孔径 $10\ \mu\text{m}$ 以上の気孔の全容積に対する割合は、 30% 以上であることは明らかである。

20

【0042】

更に、多孔体中の気孔連動部の径が $5\ \mu\text{m}$ 以上ある気孔において、外部まで連通部の径 B μm 以上を満たす気孔により連通する全気孔の容積を C とした場合、 dC/dB 値の最大値は $B > 100\ \mu\text{m}$ で得られることも明らかである。

【0043】

<実施例 2>

実施例 1 において作製した - TCP 多孔体 (試料 a とする) を、兎の大腿骨に補填して評価した。対照として、実施例 1 と同様にしてメカノケミカル法により作製した - TCP 粉末に、グリセリン系界面活性剤を添加物として用い、同様な湿式発泡法により作製した多孔体 (試料 b とする) を、同様に兎の大腿骨に補填して評価した。

30

【0044】

なお、この試料 b は、気孔率が試料 a と同様に 75% であり、SEM 観察により $100 \sim 300\ \mu\text{m}$ の気孔が確認されたが、気孔連通性を水銀圧入法により評価すると、実施例 1 で示した A 値は極く僅か (多孔体体積の 10% 未満) であり、 dC/dB の最大値は $5\ \mu\text{m}$ の時に得られ、連通性が悪いものであった。

【0045】

$3\ \text{kg}$ の雌の兎の大腿骨顆部に $5 \times 8\ \text{mm}$ の骨欠損を作製し、これに同サイズの試料を補填した。コントロールは何も補填しないものとした。2 週、4 週、6 週経過後に補填部を摘出し、非脱灰標本作製して評価した。また、標本上の新生骨の面積率と材料の面積率を計測した。

40

【0046】

その結果、試料 a については、2 週の早期に、周辺部から中心部に向かうように骨形成が進行しており、4 週では骨形成は中心部まで達していた。これに対し、試料 b では、4 週までは材料周辺部での骨形成しか得られなかった。

【0047】

新生骨の面積率、材料の面積率を下記表 2 に示す。

【0048】

【表 2】

表 2

経過週	新生骨面積率 (%)			材料面積率 (%)	
	試料 a	試料 b	コントロール	試料 a	試料 b
2W	12	1.5	0	45	48
4W	23	6.7	0	18	33
6W	30	20	6.3	15	17

10

【 0 0 4 9 】

以上の結果より、試料 a においては、速やかな骨の形成と材料の吸収の進行を確認することができた。これは、試料 a が良好な気孔連通性を有するためと考えられる。

【 0 0 5 0 】

< 実施例 3 >

実施例 1 において作製した - T C P 多孔体 (試料 a) に、細胞増殖因子を複合した。細胞増殖因子としては r h B M P - 2 を用い、これを緩衝液に溶解したものを、多孔体 1 cm^3 あたり $10 \sim 1000 \mu\text{g}$ 含有するように多孔体に染み込ませ、減圧乾燥し、または凍結乾燥を行い、人工骨を得た。

20

【 0 0 5 1 】

この人工骨は、細胞との親和性に優れ、細胞をスムーズに材料内部に侵入させることが可能であるとともに、細胞の増殖を促進させる優れた人工骨であった。

【 0 0 5 2 】

< 実施例 4 >

実施例 1 において作製した - T C P 多孔体 (試料 a) に培養細胞を複合し、評価した。対照として実施例 2 に示す試料 b についても同様に培養細胞を複合し、評価した。

【 0 0 5 3 】

まず、フィッシャーラット大腿骨より骨髓細胞を採取し、F B S を 15% 加えた M E M 培地で 8 日間初期培養を行い、トリプシン処理により細胞を剥がして 10^6 個 / m l の濃度とした細胞浮遊液を、試料 a、b の - T C P 多孔体に浸透させた。次いで、- T C P 多孔体に Dexamethasone 10mM、 \cdot Glycerophosphate 10mM、Ascorbic acid 50 $\mu\text{g/ml}$ を新たに加えて 2 週培養した後、フィッシャーラット背部の皮下に移植して評価した。

30

【 0 0 5 4 】

皮下移植前の試料を S E M 観察したところ、試料 a には培養細胞が材料内部まで侵入していることが確認できたが、試料 b では細胞は観察されなかった。また、皮下移植後 4 週で、試料 a について材料内部での異所性骨形成を確認することが出来たが、試料 b では骨形成は認められなかった。

【 0 0 5 5 】

これらの結果より、試料 a は良好な気孔連通性を有しており、in vitro においても良好な細胞の侵入が行われることが確認された。

40

【 0 0 5 6 】

【 発明の効果 】

以上、詳細に説明したように、本発明によれば、所定の気孔性状のセラミック多孔体を用いることにより、特に細胞との親和性に優れ、細胞をスムーズに材料内部に侵入させることが可能な人工骨および組織工学用担体を提供することができる。

フロントページの続き

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72)発明者 入江 洋之

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス光学工業株式会社内

(72)発明者 井上 晃

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス光学工業株式会社内

審査官 川口 裕美子

(56)参考文献 特開昭63-040782(JP,A)

特開2002-017846(JP,A)

特開平07-194688(JP,A)

特開2000-302567(JP,A)

大蔵常利ら, '骨補填剤「セラタイトR大気孔多孔体」の開発について', Fine Ceram Rep, 19

98年 7月, 16(7), 156-157

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00