

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/005778

発行日 平成27年2月23日 (2015. 2. 23)

(43) 国際公開日 平成25年1月10日 (2013. 1. 10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 G	4 C 0 8 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

出願番号	特願2013-523039 (P2013-523039)	(71) 出願人	304021417 国立大学法人東京工業大学 東京都目黒区大岡山2丁目12番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2012/067113	(74) 代理人	100090251 弁理士 森田 憲一
(22) 国際出願日	平成24年7月4日 (2012. 7. 4)	(74) 代理人	100139594 弁理士 山口 健次郎
(31) 優先権主張番号	特願2011-148123 (P2011-148123)	(72) 発明者	田中 順三 東京都目黒区大岡山2-12-1 国立大 学法人東京工業大学内
(32) 優先日	平成23年7月4日 (2011. 7. 4)	(72) 発明者	生駒 俊之 東京都目黒区大岡山2-12-1 国立大 学法人東京工業大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体吸収性の傾斜した多孔質複合体及びそれを用いた人工骨、並びにそれらの製造方法

(57) 【要約】

本発明の目的は、早期の骨リモデリングにより骨置換を誘導することができ、且つ荷重のかかる部位に使用することのできる優れた機械的性質を有するリン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体を提供することである。

前記課題は、リン酸カルシウム結晶とコラーゲン線維とを、80 : 20 ~ 20 : 80の重量比で含む多孔質複合体であって、(1) 生体吸収性が傾斜していること、及び(2) 重量法による密度が300 ~ 1500 mg / cm³であること、を特徴とする多孔質複合体によって解決することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リン酸カルシウム結晶とコラーゲン線維とを、80：20～20：80の重量比で含む多孔質複合体であって、

(1) 生体吸収性が傾斜していること、及び

(2) 重量法による密度が300～1500 mg/cm³であること、を特徴とする多孔質複合体。

【請求項 2】

前記生体吸収性の傾斜が、多孔質複合体の2つの点における、2mmの円柱状プローブを用いた押し込み試験による強度比であり、歪率30%における2点の強度比が1.5倍以上である、請求項1に記載の多孔質複合体。

10

【請求項 3】

前記生体吸収性の傾斜が、

多孔質複合体の生体吸収性が連続又は不連続に変化し、生体吸収性の速い第1の断片及び生体吸収性の遅い第2の断片を多孔質複合体から切り出すことができ、そして第1の断片の生体吸収性と第2の断片の生体吸収性の比が1.5以上である、請求項1に記載の多孔質複合体。

【請求項 4】

前記生体吸収性がコラゲナーゼによる生分解率であって、

生分解率は、関係式(I)：

$$\text{生分解率} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \quad (\text{I})$$

〔式中、 W_0 及び W_t は、多孔質複合体の断片を2unit/mLのコラゲナーゼ溶液により6時間浸漬した場合、又は多孔質複合体の断片を200unit/mLのコラゲナーゼ溶液により0.5時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_0)及び浸漬後の乾燥重量(W_t)である〕で表され、

前記第1の断片が、多孔質複合体の生分解率の速い30重量%の領域から切り出され、第2の断片が多孔質複合体の生分解率の遅い30重量%の領域から切り出され、第1の断片の生分解率に対する第2の断片の生分解率の比が1.5以上である、請求項3に記載の多孔質複合体。

20

【請求項 5】

前記生体吸収性が膨潤率であって、

膨潤率は、関係式(II)：

$$\text{膨潤率} = (W_w - W_d) / W_d \times 100 \quad (\text{II})$$

〔式中、 W_d 及び W_w は、それぞれ、多孔質複合体の断片を、リン酸緩衝溶液により24時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_d)及び浸漬後の湿潤重量(W_w)である〕で表され、

前記第1の断片が、多孔質複合体の膨潤率の高い30重量%の領域から切り出され、第2の断片が多孔質複合体の膨潤率の低い30重量%の領域から切り出され、第2の断片の膨潤率に対する第1の断片の膨潤率の比が1.5以上である、請求項3に記載の多孔質複合体。

30

40

【請求項 6】

リン酸カルシウムが、水酸アパタイト、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸八カルシウム、及びリン酸三カルシウムからなる群から選択される少なくとも1種のリン酸カルシウムである、請求項1～5のいずれか一項に記載の多孔質複合体。

【請求項 7】

請求項1～6のいずれか一項に記載の多孔質複合体を含む人工骨。

【請求項 8】

(A) リン酸カルシウム及びコラーゲンを含む多孔体を形成する工程、及び

(B) 前記多孔体に架橋密度を変化させた架橋処理を行うことによって、生体吸収性が1

50

． 5 倍以上異なる多孔質複合体を得る傾斜架橋工程、
を含む、多孔質複合体の製造方法。

【請求項 9】

前記多孔体形成工程（A）が、

（1）リン酸カルシウム、又は表面修飾されたリン酸カルシウムの結晶懸濁液を得る結晶合成工程、

（2）可溶化コラーゲン溶液中のコラーゲンを線維化し、コラーゲン線維懸濁液を得る、コラーゲン線維化工程、

（3）前記コラーゲン線維懸濁液とリン酸カルシウム結晶懸濁液とを混合し、リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を得る、混合工程、及び

（4）前記リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を多孔体に成形する工程、である、請求項 8 に記載の多孔質複合体の製造方法。

【請求項 10】

前記多孔体形成工程（A）が、

リン酸カルシウム/コラーゲン複合繊維と緩衝液との混合によりゲル化させ、多孔体に成形する工程である、請求項 8 に記載の多孔質複合体の製造方法。

【請求項 11】

前記傾斜架橋工程（B）における架橋がグルタルアルデヒド気相蒸着法による架橋であって、多孔体へのグルタルアルデヒドガスの拡散量を変化させることにより、生体吸収性が 1.5 倍以上異なる多孔質複合体を作製する、請求項 8～10 のいずれか一項に記載の多孔質複合体の製造方法。

【請求項 12】

前記傾斜架橋工程（B）における架橋が、放射線照射架橋であって、湿潤環境下において多孔体への放射線照射量を変化させることにより、生体吸収性が 1.5 倍以上異なる多孔質複合体を作製する、

請求項 8～10 のいずれか一項に記載の多孔質複合体の製造方法。

【請求項 13】

前記リン酸カルシウム結晶が、ビニル基が導入されたものである、請求項 12 に記載の多孔質複合体の製造方法。

【請求項 14】

前記リン酸カルシウムが、水酸アパタイト、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸八カルシウム、及びリン酸三カルシウムからなる群から選択される少なくとも 1 種のリン酸カルシウムである、請求項 8～13 のいずれか一項に記載の多孔質複合体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体吸収性の傾斜した多孔質複合体及びそれを用いた人工骨、並びにそれらの製造方法に関する。本発明によれば、生体内で強度を損なわずに骨組織再生を促進する人工骨を提供することができる。

【背景技術】

【0002】

骨組織はコラーゲン及び水酸アパタイトがナノレベルで相互作用し、コラーゲン線維に沿って水酸アパタイトが整列し、更にその集合体が階層構造を形成している。この階層構造とコラーゲン同士の相互作用により、極めて優れた力学特性を示すものである。

【0003】

骨組織が欠損した場合の治療法としては、患者自身の腸骨や脾骨等を使用する自家骨移植が主流である。しかし、自家骨移植は二次手術が必要なため、患者への負担が大きく、更に、摘出部位における感染が生じる場合がある。また、自家骨の採取量も限られるため、自家骨の代わりに人工骨を用いる方法や、自家骨の不足する部分を人工骨による補填材

10

20

30

40

50

により補充する方法が試みられている。

【0004】

従来、人工骨としては、骨伝導能を有するリン酸カルシウムからなるセラミックス系人工骨が使用されていたが、セラミックス特有の脆性による術後の破損やハンドリングの悪さが臨床現場で指摘されていた。更に、人工骨は、生体適合性及び骨伝導性などの生理学的性質が必要である。すなわち、自家骨は吸収と再生という代謝を繰り返すのに対し、アパタイトからなる人工骨は生体内でほとんど溶解しないため、生体内に半永久的に残存する。骨再生に用いられる人工骨には、骨親和性に加えて、骨組織と融合し、骨再生を積極的に促す効果も必要である。従って、生体適用後徐々に吸収され、骨再生サイクルに取り込まれて自身の骨に置換していくための、骨伝導性や生体活性が求められる。

10

【0005】

この観点から、リン酸カルシウムにコラーゲンを加えたリン酸カルシウム/コラーゲン複合体が、骨再生用の人工骨として期待されている。リン酸カルシウム/コラーゲン複合体は骨伝導能をもち、これまでのセラミックスにはない柔軟性を示すことから、骨再生の足場材料としての実用化研究が検討されている。しかしながら従来のアパタイトからなる材料と比較すると、柔らかすぎるため、わずかの荷重により容易に変形するために、骨再生のテンプレートとして荷重部位には適用しにくいという問題があった。

【0006】

このようなリン酸カルシウム/コラーゲン複合体の開発には、骨再生の足場として骨伝導性を重視する方向性と、骨再生のテンプレートとして機械的強度を重視する2つの方向性がある。例えば、前者のリン酸カルシウム/コラーゲン複合体として、乾燥させたアパタイト/コラーゲン複合体線維に 線 を照射して、強度の半減期を短く調整した多孔体が開示されている(特許文献1)。一方、コラーゲン線維の濃度を上昇させ、密度を $130 \sim 600 \text{ mg/cm}^3$ と高めることにより、生体骨に近い強い強度や弾性などの機械的性質が優れたリン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体が開示されている(特許文献2)。

20

しかしながら、骨再生の足場として、骨リモデリングにより早期に骨置換を起こすことが可能で、且つ荷重のかかる部位に使用することのできる優れた機械的性質を有するリン酸カルシウム/コラーゲン複合体は開発されていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0007】

【特許文献1】特開2009-132601号公報

【特許文献2】特開2010-273847号公報

【特許文献3】特開2001-286494号公報

【特許文献4】特開2008-18163号公報

【特許文献5】特開2007-98118号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明者は、生体吸収性が1.5倍以上異なる第1の断片と第2の断片を切り出すことのできる多孔質複合体により、骨組織の再生において、早期の骨リモデリングにより骨置換を誘導することができ、且つ荷重のかかる部位に使用することのできる優れた機械的性質を有するリン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体が得られることを見出した。

40

従来のリン酸カルシウム/コラーゲン複合体は、前記のように骨再生の足場として骨伝導性を重視するもの、又は骨再生のテンプレートとして機械的強度を重視するものであった。すなわち、骨置換の誘導と、機械的強度とを満足する人工骨用のリン酸カルシウム/コラーゲン複合体は存在しなかった。

コラーゲンをを用いないアパタイト又はリン酸カルシウム系の人工骨においては、気孔率の異なる部分を組み合わせた人工骨(特許文献3)、又は気孔率が傾斜化している人工骨(特許文献4)が開示されている。しかしながら、これらの人工骨は、骨置換を誘導する

50

ための生体吸収性を考慮したものではなかった。

本発明の目的は、早期の骨リモデリングにより骨置換を誘導することができ、且つ荷重のかかる部位に使用することのできる優れた機械的性質を有するリン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、骨組織の再生において、早期の骨リモデリングにより骨置換を誘導することができ、且つ荷重のかかる部位に使用することのできる優れた機械的性質を有するリン酸カルシウム/コラーゲン複合体について鋭意、研究を進めた結果、多孔質複合体における生体吸収性を連続又は不連続に変化させることにより、前記課題を解決できることを見出した。すなわち、生体吸収性が傾斜している多孔質複合体が、人工骨に有用であることを見出した。更に、本発明者は、生体吸収性の傾斜が架橋によって制御することが可能であることを見出した。例えば、グルタルアルデヒドが揮発及び拡散することを利用したグルタルアルデヒド気相蒸着法を用いることにより、架橋密度の傾斜を制御できることを見出した。また、放射線照射は物質透過性に優れているため、物質内部まで均質な反応が可能であるが、テーパした部材を用いて線の透過量を制御することで架橋密度の傾斜制御ができることを見出した。そしてこれらの架橋法により、生体吸収性が傾斜している多孔質複合体を製造することができることを見出した。

10

本発明は、こうした知見に基づくものである。

【0010】

20

すなわち、本発明は、

[1] リン酸カルシウム結晶とコラーゲン線維とを、80:20~20:80の重量比で含む多孔質複合体であって、

(1) 生体吸収性が傾斜していること、及び

(2) 重量法による密度が300~1500 mg/cm³であること、

を特徴とする多孔質複合体、

[2] 前記生体吸収性の傾斜が、多孔質複合体の2つの点における、2mmの円柱状プローブを用いた押し込み試験による強度比であり、歪率30%における2点の強度比が1.5倍以上である、[1]に記載の多孔質複合体、

[3] 前記生体吸収性の傾斜が、多孔質複合体の生体吸収性が連続又は不連続に変化し、生体吸収性の速い第1の断片及び生体吸収性の遅い第2の断片を多孔質複合体から切り出すことができ、そして第1の断片の生体吸収性と第2の断片の生体吸収性の比が1.5以上である、[1]に記載の多孔質複合体、

30

[4] 前記生体吸収性がコラゲナーゼによる生分解率であって、生分解率は、関係式(I)：

$$\text{生分解率} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \quad (I)$$

〔式中、 W_0 及び W_t は、多孔質複合体の断片を2unit/mLのコラゲナーゼ溶液により6時間浸漬した場合、又は多孔質複合体の断片を200unit/mLのコラゲナーゼ溶液により0.5時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_0)及び浸漬後の乾燥重量(W_t)である〕で表され、前記第1の断片が、多孔質複合体の生分解率の速い30重量%の領域から切り出され、第2の断片が多孔質複合体の生分解率の遅い30重量%の領域から切り出され、第1の断片の生分解率に対する第2の断片の生分解率の比が1.5以上である、[3]に記載の多孔質複合体、

40

[5] 前記生体吸収性が膨潤率であって、膨潤率は、関係式(II)：

$$\text{膨潤率} = (W_w - W_d) / W_d \times 100 \quad (II)$$

〔式中、 W_d 及び W_w は、それぞれ、多孔質複合体の断片を、リン酸緩衝溶液により24時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_d)及び浸漬後の湿潤重量(W_w)である〕で表され、前記第1の断片が、多孔質複合体の膨潤率の高い30重量%の領域から切り出され、第2の断片が多孔質複合体の膨潤率の低い30重量%の領域から切り出され、第2の断片の膨潤率に対する第1の断片の膨潤率の比が1.5以上である、[3]に記載の多

50

孔質複合体、

[6] リン酸カルシウムが、水酸アパタイト、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸八カルシウム、リン酸三カルシウム、及びリン酸四カルシウムからなる群から選択される少なくとも1種のリン酸カルシウムである、[1] ~ [5] のいずれかに記載の多孔質複合体

[7] [1] ~ [6] のいずれかに記載の多孔質複合体を含む人工骨、

[8] (A) リン酸カルシウム及びコラーゲンを含む多孔質複合体を形成する工程、及び (B) 前記多孔質複合体に架橋密度を変化させた架橋処理を行うことによって、生体吸収性が1.5倍以上異なる多孔質複合体を得る傾斜架橋工程、

を含む、多孔質複合体の製造方法、

[9] 前記多孔質複合体形成工程 (A) が、(1) リン酸カルシウム、又は表面修飾されたリン酸カルシウムの結晶懸濁液を得る結晶合成工程、(2) 可溶性コラーゲン溶液中のコラーゲンを線維化し、コラーゲン線維懸濁液を得る、コラーゲン線維化工程、(3) 前記コラーゲン線維懸濁液とリン酸カルシウム結晶懸濁液とを混合し、リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を得る、混合工程、(4) 前記リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を多孔体に成形する工程である、[8] に記載の多孔質複合体の製造方法、

[10] 前記多孔体形成工程 (A) が、

リン酸カルシウム/コラーゲン複合繊維と緩衝液との混合によりゲル化させ、多孔体に成形する工程である、[8] に記載の多孔質複合体の製造方法、

[11] 前記傾斜架橋工程 (B) における架橋がグルタルアルデヒド気相蒸着法による架橋であって、多孔体へのグルタルアルデヒドガスの拡散量を変化させることにより、生体吸収性が1.5倍以上異なる多孔質複合体を作製する、[8] ~ [10] のいずれかに記載の多孔質複合体の製造方法、

[12] 前記傾斜架橋工程 (B) における架橋が、放射線照射架橋であって、湿潤環境下において多孔体への放射線照射量を変化させることにより、生体吸収性が1.5倍以上異なる多孔質複合体を作製する、[8] ~ [10] のいずれかに記載の多孔質複合体の製造方法、

[13] 前記リン酸カルシウム結晶が、ビニル基が導入されたものである、[12] に記載の多孔質複合体の製造方法、

[14] 前記リン酸カルシウムが、水酸アパタイト、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸八カルシウム、リン酸三カルシウム、及びリン酸四カルシウムからなる群から選択される少なくとも1種のリン酸カルシウムである、[8] ~ [13] のいずれかに記載の多孔質複合体の製造方法、

に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明の多孔質複合体によれば、骨組織の再生において、早期の骨リモデリングにより骨置換を誘導することができ、且つ優れた機械的特性により荷重のかかる部位に使用することができる。すなわち、生体硬組織と類似した組成及び物性を有するため、生体内に移植すると骨リモデリングに伴い早期に骨置換が生じる空間と長期にわたり生体内に残り周囲に骨組織を再生させる空間を制御することで、生体内で強度を損なわず骨組織再生を促進する傾斜機能を実現する材料である。本発明の多孔質複合体は、骨補填材料又は再生医療用足場材料などの生体材料として用いることができる。また、多孔質複合体を用いた本発明の人工骨によれば、骨欠損部位において、骨組織や骨髄組織を再生させることが可能である。

また本発明の多孔質複合体の製造方法によれば、リン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体の架橋を制御することによって、骨置換の誘導と、機械的強度とを満足する人工骨用

10

20

30

40

50

のリン酸カルシウム/コラーゲン線維複合体を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】グルタルアルデヒド気相蒸着法による、多孔体への傾斜架橋の導入を模式的に表した図である。

【図2】放射線照射法による、多孔体への傾斜架橋の導入を模式的に表した図である。

【図3】トリメトキシビニルシランにより水酸アパタイトに導入されたトリメトキシ基を、赤外線スペクトル分析で調べたグラフである。

【図4】水酸アパタイトの表面におけるトリメトキシ基の導入を模式的に表した図である。

【図5】湿潤環境下での線照射により、多孔質複合体の圧縮強度が上昇することを示した図である。

【図6】湿潤環境下での線照射の量を増加させることにより、40%歪率、50%歪率、及び60%歪率における圧縮強度が顕著に向上することを示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

[1] 多孔質複合体

本発明の多孔質複合体は、リン酸カルシウム結晶とコラーゲン線維とを、80:20~20:80の重量比で、含む多孔質複合体であって、(1)生体吸収性が傾斜していること、(2)重量法による密度が300~1500mg/cm³であること、を特徴とし、好ましくは、前記生体吸収性の傾斜は、多孔質複合体の生体吸収性が連続又は不連続に変化し、生体吸収性の速い第1の断片及び生体吸収性の遅い第2の断片を多孔質複合体から切り出すことができ、そして第1の断片の生体吸収性と第2の断片の生体吸収性の比が1.5以上であることである。

生体吸収性の傾斜は、多孔質複合体の特定の2つの点における生体吸収性の比で表すことができるが、好ましくは2倍以上であり、より好ましくは3倍以上であり、より好ましくは5倍以上であり、最も好ましくは10倍以上である。また、上限は特に限定されるものではないが、1000倍以下が好ましい。

【0014】

(リン酸カルシウム結晶)

リン酸カルシウム結晶に用いることのできるリン酸カルシウムとしては、Ca(H₂PO₄)₂、Ca(H₂PO₄)₂・H₂O、CaHPO₄、CaHPO₄・2H₂O、Ca₃(PO₄)₂、Ca₃(PO₄)₂・2H₂O、Ca₈H₂(PO₄)₆・5H₂O、Ca₃(PO₄)₂、Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂、Ca₄O(PO₄)₂、CaP₄O₁₁、Ca(PO₃)₂、Ca₂P₂O₇、等の1群の化合物を挙げることができるが、特に、水酸アパタイト、リン酸二水素カルシウム、リン酸二水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸一水素カルシウム水和物、リン酸八カルシウム、又はリン酸三カルシウムが好ましく、水酸アパタイトが最も好ましい。水酸アパタイトは、生体骨の成分の60~80%を占めるリン酸カルシウムの1種であり、Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂の組成式で示される化合物を基本成分とする。水酸アパタイトのCa成分の一部は、Sr、Ba、Mg、Fe、Al、Y、La、Na、K、H等から選ばれる1種以上で置換されてもよく、また(PO₄)成分の一部が、VO₄、BO₃、SO₄、CO₃、SiO₄等から選ばれる1種以上で置換されてもよく、更に、(OH)成分の一部が、F、Cl、O、CO₃等から選ばれる1種以上で置換されてもよい。また、これらの各成分の一部が欠損していてもよい。

上記のリン酸カルシウム結晶として、水酸アパタイトとリン酸三カルシウムや、水酸アパタイトとリン酸一水素カルシウムや、水酸アパタイトとリン酸八カルシウムなどの1種以上のリン酸カルシウム結晶を含有していてもよい。

【0015】

(コラーゲン)

コラーゲンは、28種類程度の分子種の異なるものが、哺乳動物、及び魚類を含む広範な動物の生体組織中に存在することが知られている。本発明の多孔質複合体に用いることのできるコラーゲンは、その出発原料とする動物の種、組織部位、年齢等は特に限定されないが、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ネズミ等）若しくは鳥類（例えば、ニワトリ等）の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器等から得られるコラーゲン、又は魚類（例えば、タラ、ヒラメ、カレイ、サケ、マス、マグロ、サバ、タイ、イワシ、サメ、ティラピア等）の皮、骨、軟骨、ひれ、鱗、臓器等から得られるコラーゲタンパク質を用いることができる。更には、前記の動物組織からの抽出ではなく、遺伝子組み替え技術によって人工的に得られたコラーゲンをを用いてもよい。特に、生体内に移植する人工骨として使用することを考えた場合、人畜共通ウイルスなどの病原体の存在しない魚類由来のコラーゲンをを用いることが好ましい。また、放射線による架橋では、コラーゲン同士、又はコラーゲン アパタイト界面の立体的距離が重要であるため、コラーゲンを高密度に濃縮できるウロココラーゲンが好ましい。

10

20

30

40

50

【0016】

コラーゲンには、I型コラーゲンからVIII型の分子種が知られており、I、II、III、及びV型コラーゲンが線維型コラーゲンである。コラーゲンのアミノ酸配列は、グリシンが3残基ごとに繰り返す一次構造を有しており、この繰り返し配列は、コラーゲン様配列と呼ばれ、コラーゲタンパク質の特徴である。本発明で用いることのできるコラーゲンは、前記の線維型コラーゲンに限定されるが、コラーゲン中のアミノ酸残基を、アセチル化、コハク化、マレイル化、フタル化、ベンゾイル化、エステル化、アミド化、グアニジノ

【0017】

(重量比)

本発明の多孔質複合体に含まれるリン酸カルシウム結晶とコラーゲンとの重量比は、好ましくは80:20~20:80であり、より好ましくは、80:20~50:50であり、最も好ましくは、80:20~70:30である。コラーゲンが20重量%未満である（リン酸カルシウム結晶が80重量%を超える）と多孔質複合体は、脆性が顕著になり、コラーゲンが80重量%を超える（リン酸カルシウム結晶が20重量%未満である）と、多孔質複合体は弱くなり、機械的強度が不足する。換言すると、リン酸カルシウム結晶とコラーゲンとの重量比が、80:20~20:80であることにより、人工骨として曲げ破断歪み、及び曲げ弾性率などの機械的強度に優れ、且つ生体吸収性の優れた多孔質複合体を得ることができる。

リン酸カルシウム結晶とコラーゲンとの重量比は、多孔質複合体中のリン酸カルシウム結晶とコラーゲンの重量比を分析することによって測定可能であるが、多孔質複合体の製造工程におけるリン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液に含まれるリン酸カルシウムとコラーゲンの重量比によっても、規定することができる。

【0018】

(生体吸収性)

本発明の多孔質複合体は、リン酸カルシウム結晶及びコラーゲン線維が複合化されたものであるが、生体吸収性が連続又は不連続に変化することに特徴を有している。生体吸収性が変化することによって、1つの複合体の中に、早期に骨置換が生じる部分と、機械的特性に優れ、長期にわたり生体内に残り周囲に骨組織を再生する部分が存在することができる。すなわち、生体吸収性が連続又は不連続に変化することによって、骨置換の誘導と、機械的強度とを満足する人工骨用のリン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維複合体を得ることができる。特に生体吸収性の優れている部分は、一般的に骨置換の誘導が優れており、生体吸収性に耐性のある部分は、機械的強度が優れている。

【0019】

生体吸収性を示す指標は、特に限定されるものではなく、例えば強度（例えば、押し込み試験による強度、曲げ破断歪み、及び曲げ弾性率）、密度、架橋密度、膨潤度、気孔率、気孔径、連通孔径又はコラーゲナーゼによる生分解率などの指標で表わすことが可能であ

るが、特に、押し込み試験による強度、膨潤度、又はコラゲナーゼによる生分解率が好ましい。

リン酸カルシウム結晶及びコラーゲン線維が、均一に、そして同じ条件で複合化された場合、一般的に1つの多孔質複合体の中で生体吸収性は変化しない。生体吸収性の変化は、多孔質複合体の製造条件によって誘導されるが、特に後述の架橋条件によって達成することができる。この架橋条件を、押し込み試験による強度、膨潤度、又はコラゲナーゼによる生分解率が反映しており、従って生体吸収性を示す指標として、この3つの指標が好ましい。

【0020】

「生体吸収性が連続に変化する」多孔質複合体は、多孔質複合体の製造条件を連続的に変化させることによって、得ることができる。例えば、後述のように多孔質複合体の架橋密度を連続的に変化させることによって、得ることができる。

「生体吸収性が不連続に変化する」多孔質複合体は、例えば製造条件を変えて得られた生体吸収性の異なる多孔質複合体を、積層させることによって得ることができる。また、後述のように多孔質複合体の架橋密度を不連続に変化させることによって得ることができる。

【0021】

本発明の多孔質複合体から、生体吸収性が1.5倍以上異なる少なくとも2つの断片、すなわち生体吸収性の速い第1の断片及び生体吸収性の遅い第2の断片を切り出すことができる。この第1の断片及び第2の断片は、生体吸収性が1.5倍以上異なる限り、多孔質複合体の任意の領域から切り出すことができる。例えば、生体吸収性の異なる多孔質複合体を積層させることによって得られた多孔質複合体の場合、積層させたそれぞれの多孔質複合体から、それぞれ第1の断片及び第2の断片を得ることができる。また、「生体吸収性が連続に変化する」多孔質複合体においても、製造者は、例えばグルタルアルデヒド気相蒸着法による架橋、又は放射線照射による架橋の条件を制御できるため、多孔質複合体から生体吸収性が1.5倍以上異なる第1の断片及び第2の断片を、的確に切り出すことが可能である。

更に、多孔質複合体の製造者でない場合であっても、後述のように多孔質複合体の生体吸収性の速い第1の断片が含まれる領域、及び生体吸収性の遅い第2の断片が含まれる領域を同定することは容易である。従って、同定されたそれらの領域から第1の断片及び第2の断片を切り出すことができる。

【0022】

一方、押し込み試験による強度比を用いる場合は、2つの断片を多孔質複合体から切り出すことなしに、押し込み試験を行うことができる。すなわち、2つの断片の切り出しをせずに、生体吸収性の傾斜を測定することが可能である。

【0023】

(押し込み試験による強度比)

生体吸収性を示す指標の1つである押し込み試験における強度比は、以下のように測定することができる。得られた多孔質複合体のいくつかの部位の機械強度を、押し込み試験機により測定する。それぞれの部位の強度のうち、2点の強度を比較することにより、強度比を得ることができる。

押し込み試験の方法は、通常の方法を用いることができ、限定されるものではないが、以下の方法によって行うことができる。

多孔質複合体を、ダルベッコスリン酸緩衝溶液に浸し、テクスチャーアナライザー(TA-XTP1us)を用い、押し込み試験を行う。シリンダーとして、P/2の2mmの円柱状プローブを用い、多孔質複合体の任意の数点(例えば、5点)において、測定を行う。得られた機械強度を用いて、例えば歪量30%における強度比が1.5倍以上が観測された。

【0024】

多孔質複合体における機械強度は、限定されるものではないが、好ましくは1N~1

10

20

30

40

50

600Nであり、より好ましくは100N～1000Nであり、更に好ましくは300N～500Nである。

多孔質複合体の2点の強度比は、1.5倍以上であれば限定されるものではないが、好ましくは2.0倍以上であり、更に好ましくは5.0倍以上である。上限は限定されるものではないが、10倍以下が好ましい。

【0025】

(コラゲナーゼによる生分解率)

生体吸収性を示す指標の1つであるコラゲナーゼによる生分解率は、以下の関係式(I)によって、計算することができる。

関係式(I)：

$$\text{生分解率} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \text{ (I)}$$

[式中、 W_0 及び W_t は、多孔質複合体の断片を2unit/mLのコラゲナーゼ溶液により6時間浸漬した場合、又は多孔質複合体の断片を200unit/mLのコラゲナーゼ溶液により0.5時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_0)及び浸漬後の乾燥重量(W_t)である]

前記関係式(I)により、多孔質複合体から切り出された第1の断片及び第2の断片の生分解率を求めることによって、生体吸収性が1.5倍以上異なるか否かを判断することができる。

【0026】

具体的なコラゲナーゼによる処理は、例えば以下のように行うことができる。

多孔質複合体から、約10mgの試料片(断片; 0.1×0.1×1.0cm)を、生検トレパンにより採取する。コラゲナーゼ2.0units(0.01mg)/mL、又は200units(1mg)/mLを含むダルベッコスリン酸緩衝溶液(pH7.2)を作製し、マルチウェルプレート内に静置した試料片(断片)に対して3mLずつ加える。37のバイオシェーカー内にマルチウェルプレートを入れ、50rpmで振盪しながら6時間(2.0units)又は0.5時間(200units)反応させる。反応後、試料片を取り出し、純水で1時間洗浄する。洗浄した試料片をディープフリーザー内で、-20で凍結した後、凍結乾燥する。得られた試料の乾燥重量を測定し、前記関係式(I)によって、生分解率を求める。基本的に、2.0unit/mLのコラゲナーゼ溶液により6時間浸漬した場合の生分解率により、生体吸収性の判断を行う。しかしながら、第1の断片及び第2の断片の生分解率がいずれも5%以下で、ほとんど分解されない場合は、200unit/mLのコラゲナーゼ溶液により0.5時間浸漬した場合の生分解率により生体吸収性の判断を行う。

更に、前記のいずれかの条件においても、第1の断片及び第2の断片の生分解率がいずれも5%以下、又は95%以上で、生分解率の差がない場合は、2.0unit/mL又は200unit/mLのコラゲナーゼ溶液の条件で、浸漬時間を0.5～24時間の任意の時間に調整し、生分解率の差を求めることもできる。

【0027】

コラゲナーゼによる生分解率の測定において、多孔質複合体の生体吸収性の速い第1の断片が含まれる領域、及び生体吸収性の遅い第2の断片が含まれる領域は、事前に多孔質複合体の全体の生分解性を測定することによって、同定することができる。例えば、多孔質複合体の全体の生分解性を測定し、多孔質複合体の生分解率の速い10～30重量%の領域(A)を第1の断片を切り出す領域とし、そして多孔質複合体の生分解率の遅い10～30重量%の領域(B)を第2の断片を切り出す領域と決定することができる。ここで、領域(A)及び領域(B)以外の領域は、生分解率の中程度の領域(C)である。

【0028】

また、領域(A)は、多孔質複合体における生分解率の速い10～30重量%の領域であることができるが、生分解率の速い20重量%の領域が好ましく、生分解率の速い30重量%の領域がより好ましい。

本明細書において、領域(A)から切り出された1つの第1の断片と、領域(B)から

10

20

30

40

50

切り出された1つの第2の断片との少なくとも1つの組み合わせで、生分解率が1.5倍以上異なれば、本発明の効果を得ることができる。すなわち、1つの多孔質複合体において、最大で生分解率が1.5倍以上異なる第1の断片と第2の断片とを切り出すことが可能であれば、本発明の効果を得ることができる。しかしながら、領域(A)から切り出された任意の第1の断片と、領域(B)から切り出された任意の第2の断片の組み合わせで生分解率が1.5倍以上異なることが最も好ましい。

【0029】

具体的な、領域(A)及び領域(B)の決定は、以下のように行うことができる。

コラゲナーゼ2.0 units (0.01 mg) / mL、又は200 units (1, 0 mg) / mLを含むpH7.2のダルベッコスリン酸緩衝溶液を作製し、多孔質複合体の試料の体積に応じて、適量の溶液を添加する。例えば、試料の体積に対して、約50倍量の溶液を添加する。試料及び溶液を、37のバイオシェーカー内に入れ、50 rpmで振盪しながら1、3、12、18、24時間反応させる。反応後、試料を取り出し、純水で1時間洗浄する。試料を-20のディープフリーザー内で凍結し、凍結乾燥を行う。得られた試料の乾燥重量を測定し、一般式(I)から生分解率を求める。

生分解率 = $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100$ (I)

1~24時間の生分解率から、生分解率の速い10~30重量%の領域(A)及び生分解率の遅い10~30重量%の領域(B)を決定することができる。

【0030】

多孔質複合体の第1の断片及び第2の断片の重量は、生分解率を測定できる重量であれば、特に限定されることはないが、5~30 mgが好ましく、5~20 mgがより好ましく、約10 mgが最も好ましい。また、第1の断片及び第2の断片の重量は、異なる重量でも生分解率を測定することが可能であるが、およそ同じ重量が好ましい。異なる重量の場合は、重量の差は、5 mg以下が好ましく、2 mg以下がより好ましい。

【0031】

また、多孔質複合体の第1の断片及び第2の断片の形状も、生分解率を測定できる形状であれば、特に限定されることはないが、立方体(正六面体)、直方体、角柱(例えば、直角柱)、又は円柱などの形状の断片を用いることができる。例えば、実施例で使用している生検トレパンを用いた場合は、円柱状の形状の断片を得ることができる。また、図1において、生体吸収性に耐性のある部分(架橋の進んだ部分(21))と生体吸収性の優れた部分(架橋の進んでない部分(22))の断片を切り出し、コラゲナーゼによる生分解率の測定を行うことができる。

【0032】

生分解率の測定に用いるコラゲナーゼは、特に限定されるものではないが、クロストリジウム属由来のコラゲナーゼを用いることができる。

【0033】

早期に骨置換が生じる部分、すなわち生体吸収性の良い部分の生分解率は、特に限定されるものではないが、2.0 unit / mLのコラゲナーゼ溶液で6時間処理した場合の条件で、好ましくは40%以上であり、より好ましくは50%以上であり、最も好ましくは60%以上である。コラーゲンのよる生分解率が40%以上であると、生体吸収性がよく、骨再生時における骨置換が早期に生じ、骨再生が進みやすいからである。

一方、機械的強度を有する部分の生分解率は、特に限定されるものではないが、好ましくは30%以下であり、より好ましくは15%以下であり、最も好ましくは5%以下である。コラーゲンの生分解率が30%以下であることにより、生体親和性を有し、骨置換を可能にしながら、一定の機械的強度を有しており、長期にわたり生体内に残り周囲に骨組織を再生させる領域を提供することができる。

【0034】

更に生体吸収性の良い部分の生分解率と、機械的強度を有する部分の生分解率との差は、1.5倍以上であれば特に限定されるものではないが、好ましくは2倍以上であり、より好ましくは5倍以上であり、最も好ましくは10倍以上である。また、上限は特に限定

10

20

30

40

50

されるものではないが、1000倍以下が好ましい。生体吸収性の良い部分の生分解率と、機械的強度を有する部分の生分解率との差が1.5倍以上であることによって、骨置換の誘導と、機械的強度とをバランスよく満足する人工骨を得ることができる。

【0035】

(膨潤度)

生体吸収性を示す指標の1つであるコラゲナーゼによる生分解率は、以下の関係式(I I)によって、計算することができる。

関係式(I I)

$$\text{膨潤率} = (W_w - W_d) / W_d \times 100 \quad (\text{I I})$$

〔式中、 W_d 及び W_w は、それぞれ、多孔質複合体の断片を、リン酸緩衝溶液により24時間浸漬した場合の、浸漬前の乾燥重量(W_d)及び浸漬後の湿潤重量(W_w)である〕

前記関係式(I I)により、多孔質複合体から切り出された第1の断片及び第2の断片の膨潤率を求めることによって、生体吸収性が1.5倍以上異なるか否かを判断することができる。

【0036】

具体的な膨潤度は、特に限定されるものではないが、以下の方法によって測定することができる。

多孔質複合体から約10mgの試料片(断片)を採取する。試料片(断片)をダルベッコス社製のリン酸緩衝溶液10mLに含浸させる。含浸後、37℃で24時間静置する。その後、試料を速やかに取り出し、キムワイブ上で2分間静置後、重量を計測する。得られた試料の重量から、前記関係式(I I)に従い、膨潤率を求める。

【0037】

膨潤率の測定において、多孔質複合体の生体吸収性の速い第1の断片が含まれる領域、及び生体吸収性の遅い第2の断片が含まれる領域は、事前に多孔質複合体の全体の膨潤率を測定することによって、同定することができる。例えば、多孔質複合体の全体の膨潤率を測定し、多孔質複合体の膨潤率の高い10~30重量%の領域(A)を第1の断片を切り出す領域とし、そして多孔質複合体の膨潤率の低い10~30重量%の領域(B)を第2の断片を切り出す領域と決定することができる。ここで、領域(A)及び領域(B)以外の領域は、膨潤率の中程度の領域(C)である。

【0038】

また、領域(A)は、多孔質複合体における膨潤率の高い10~30重量%の領域であることができるが、膨潤率の高い20重量%の領域が好ましく、膨潤率の高い30重量%の領域がより好ましい。

本明細書において、領域(A)から切り出された1つの第1の断片と、領域(B)から切り出された1つの第2の断片との少なくとも1つの組み合わせで、膨潤率が1.5倍以上異なれば、本発明の効果を得ることができる。すなわち、1つの多孔質複合体において、最大で膨潤率が1.5倍以上異なる第1の断片と第2の断片とを切り出すことが可能であれば、本発明の効果を得ることができる。しかしながら、領域(A)から切り出された任意の第1の断片と、領域(B)から切り出された任意の第2の断片の組み合わせで膨潤率が1.5倍以上異なることが最も好ましい。

【0039】

具体的な、領域(A)及び領域(B)の決定は、以下のように行うことができる。

ダルベッコス社製のリン酸緩衝溶液に多孔質複合体を、例えば4つの部分に分割して含浸させる。多孔質複合体の試料の体積に応じて、適量のリン酸緩衝溶液の量を調整する。例えば、それぞれの試料の体積に対して、約50倍量の溶液を添加する。試料及び溶液を、37℃で24時間静置する。得られた試料と、含浸を行っていない試料を比較し、膨潤率の高い10~30重量%の領域(A)及び膨潤率の低い10~30重量%の領域(B)を決定することができる。

【0040】

多孔質複合体の第1の断片及び第2の断片の重量は、膨潤率を測定できる重量であれば

、特に限定されることはないが、5～30mgが好ましく、5～20mgがより好ましく、約10mgが最も好ましい。また、第1の断片及び第2の断片の重量は、異なる重量でも膨潤率を測定することが可能であるが、およそ同じ重量が好ましい。異なる重量の場合は、重量の差は、5mg以下が好ましく、2mg以下がより好ましい。

【0041】

また、多孔質複合体の第1の断片及び第2の断片の形状も、膨潤率を測定できる形状であれば、特に限定されることはないが、立方体（正六面体）、直方体、角柱（例えば、直角柱）、又は円柱などの形状の断片を用いることができる。例えば、実施例で使用している生検トレパンを用いた場合は、円柱状の形状の断片を得ることができる。また、図2において、生体吸収性に耐性のある部分（架橋の進んだ部分（21））と生体吸収性の優れた部分（架橋の進んでない部分（22））の断片を切り出し、膨潤率の測定を行うことができる。

10

【0042】

早期に骨置換が生じる部分、すなわち生体吸収性の良い部分の膨潤率は、特に限定されるものではないが、好ましくは80%以上であり、より好ましくは100%以上であり、最も好ましくは120%以上である。膨潤率が80%以上であると、生体吸収性がよく、骨再生時における骨置換が早期に生じ、骨再生が進みやすいからである。

一方、機械的強度を有する部分の膨潤率は、特に限定されるものではないが、好ましくは70%以下であり、より好ましくは60%以下であり、最も好ましくは50%以下である。膨潤率が70%以下であることにより、生体親和性を有し、骨置換を可能にしながら、一定の機械的強度を有しており、長期にわたり生体内に残り周囲に骨組織を再生させる領域を提供することができる。

20

【0043】

更に生体吸収性の良い部分の膨潤率と、機械的強度を有する部分の膨潤率との差は、1.5倍以上であれば特に限定されるものではないが、好ましくは1.5倍以上であり、より好ましくは2.0倍以上であり、最も好ましくは3倍以上である。また、上限は特に限定されるものではないが、1000倍以下が好ましい。生体吸収性の良い部分の膨潤率と、機械的強度を有する部分の膨潤率との差が1.5倍以上であることによって、骨置換の誘導と、機械的強度とをバランスよく満足する人工骨を得ることができる。

【0044】

本発明の多孔質複合体は、重量法による密度が、好ましくは300～1500mg/cm³であり、より好ましくは500～1400mg/cm³であり、最も好ましくは750～1200mg/cm³である。密度が300mg/cm³未満であると機械的強度が不足し、1500mg/cm³を超えると骨組織の侵入性が悪化する。

30

重量法による密度は、円柱状もしくは板状の多孔質複合体を成型し、その重量をノギスで測定して求めた体積で割ることによって計算することができる。

【0045】

本発明の多孔質複合体は、その他の成分を含むことができる。リン酸カルシウム結晶及びコラーゲンと、その他の成分との重量比は、前記密度の範囲であれば、特に限定されないが、リン酸カルシウム結晶及びコラーゲンが、多孔質複合体の総重量に対し70重量%以上が好ましく、75重量%以上がより好ましく、80重量%以上が最も好ましい。また、リン酸カルシウム結晶及びコラーゲンからなる多孔質複合体も、本発明の範囲に含まれる。本発明の多孔質複合体は、リン酸カルシウム結晶の含量及びコラーゲン線維間の架橋により強度を得るため、リン酸カルシウム結晶及びコラーゲンが総重量の70重量%未満となると強度が低下する可能性があり、好ましくない。

40

【0046】

多孔質複合体を含むことのできるその他の物質としては、例えば、コラーゲン及びリン酸カルシウム結晶と親和性のある「つなぎ材」、又は骨治療に使用する薬剤を挙げることができる。

【0047】

50

つなぎ材としては、例えば、ゼラチン、グリコサミノグリカン、アルギン酸を挙げることができ、その他に、ポリ乳酸などの生体吸収性ポリエステル、1-3グルカン、キチン、あるいはキトサンなどの機能性多糖類を挙げることができる。

【0048】

グリコサミノグリカン（以下、GAGと称することがある）は、ヘキスロン酸又はガラクトースとヘキソサミンの二糖単位の繰り返し構造からなる基本骨格を有する多糖であり、ヒアルロン酸及びコンドロイチンを除くGAGは、構成糖のヒドロキシル基が部分的に硫酸エステル化され、アミノ基がアセチル化又は硫酸化されている。前記ヘキスロン酸としては、例えばグルクロン酸及びイズロン酸を挙げることができ、ヘキソサミンとしては、例えばグルコサミン及びガラクトサミンを挙げることができる。本発明の多孔質複合体に使用することができるGAGとしては、例えばヒアルロン酸（HA）、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸（CS）、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、ケラタンポリ硫酸等を挙げることができるが、その中でも骨再生において血管の誘導を促進することが知られているヒアルロン酸又は硬組織に広く存在するコンドロイチン硫酸が好ましい。

10

【0049】

（多孔質複合体の生体分解性の傾斜の態様）

本発明の多孔質複合体は、生体分解性が傾斜していることにより、生体内に移植すると骨リモデリングに伴い早期に骨置換が生じる空間と長期にわたり生体内に残り周囲に骨組織を再生させる空間を制御することが可能であり、それによって生体内で強度を損なわず骨組織再生を促進することができる。

20

生体分解性の傾斜は、連続的であってもよく、不連続であってもよい。また、多孔質複合体の一方から他方に向かって、連続又は不連続に傾斜してもよい。更に、1つの多孔質複合体において、連続又は不連続の傾斜が交互に存在してもよい。すなわち、生体分解性の高い部分と低い部分がただらに存在することもできる。

【0050】

[2]人工骨

本発明の人工骨は、前記多孔質複合体を含むか、前記多孔質複合体からなるものである。すなわち骨置換の誘導と、機械的強度とを満足する骨欠損時の骨再生用人工骨として用いることができる。

本発明の人工骨の形状は、特に限定されるものではなく、欠損した患部の形状に合わせて成形することができる。

30

【0051】

本発明の人工骨の対象疾患は特に限定されるものではないが、骨腫瘍（軟骨腫、側弯症）、人工関節置換術・再置換術、骨折、頸椎後方固定術、変形性股関節症、偽関節、大腿骨頭壊死、及び骨髄炎を挙げることができる。

【0052】

[3]多孔質複合体の製造方法

本発明の多孔質複合体の製造方法は、

（A）リン酸カルシウム及びコラーゲンを含む多孔体を形成する工程、及び（B）前記多孔体に架橋密度を変化させた架橋処理を行うことによって、生体吸収性が1.5倍以上の多孔質複合体を得る傾斜架橋工程、を含む。

40

【0053】

《リン酸カルシウム結晶及びコラーゲン線維による製造方法》

本発明の1つの実施態様においては、前記多孔体形成工程（A）が、

（1）リン酸カルシウムまたは表面修飾されたリン酸カルシウムの結晶懸濁液を得る結晶合成工程、（2）可溶化コラーゲン溶液中のコラーゲンを線維化し、コラーゲン線維懸濁液を得る、コラーゲン線維化工程、（3）前記コラーゲン線維懸濁液とリン酸カルシウム結晶懸濁液とを混合し、リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を得る、混合工程、（4）前記リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を多孔体に成形する

50

工程である。限定されるものではないが、本発明の多孔質複合体の製造方法によって、項目 [1] に記載の多孔質複合体を製造することができる。

【 0 0 5 4 】

(1) 結晶合成工程

前記結晶合成工程 (1) において、前記 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 CaHPO_4 、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 等のリン酸カルシウムを用いて、リン酸カルシウム結晶を調整することが可能であるが、特に水酸アパタイト結晶が好ましい。リン酸カルシウム結晶の調整法は、湿式法、乾式法、水熱法、アルコシキド法、フラックス法などの常法に従って行うことができるが、例えば水酸アパタイト結晶は、以下の湿式法によって調整することができる。

例えば、水酸アパタイトの場合、水酸化カルシウム (又は炭酸カルシウム) とリン酸とを溶液中で室温 ~ 80 程度の温度下で反応させ、得られた水酸アパタイトの微結晶粉末を 100 以下で乾燥させることによって得ることができる。より具体的には、水酸化カルシウム水溶液 (又は炭酸カルシウム) 及びリン酸水溶液を混合することによって、水に不溶な白い懸濁液 (いわゆる、スラリー) を得ることができる。水酸化カルシウム水溶液としては、水酸化カルシウムが完全に溶解していない水酸化カルシウム懸濁液を用いることもできる。反応液の pH は 7 ~ 11 の範囲で、かつ変化の幅を 1 以内となるようにリン酸水溶液を滴下することが望ましく、pH 7 ~ 9 の範囲で、かつ変化の幅を 0.5 以内とすることがより好ましい。また、得られた懸濁液を 50 ~ 1200 で焼成することによってリン酸カルシウム結晶懸濁液を得ることができる。

より具体手的には、0.5 mol / L の水酸化カルシウム懸濁液 (例えば、4 リットル) に 0.6 mol / L のリン酸水溶液 (例えば 2 リットル) を、ゆっくりと pH 7.5 になるまで滴下する。得られた懸濁液は、120 で乾燥後、1200 で 30 分間焼成する。合成した水酸アパタイトは、粉末 X 線回折測定により単一相であるか否かを確認することができる。

【 0 0 5 5 】

後述のコラーゲン線維架橋工程 (4) で放射線照射による架橋を行う場合は、結晶調整工程 (1) において、リン酸カルシウム結晶に放射線によって架橋が生じるビニル基を導入した、表面修飾されたリン酸カルシウム結晶を用いることも可能である。ビニル基の導入は常法に従って行うことができるが、例えば、トリメトキシビニルシランを用いて、以下のように行うことができる。

前記水酸アパタイト結晶懸濁液から遠心分離により液相を分離し、エタノールに溶媒を置換する。この操作を三回繰り返し、エタノールに懸濁した水酸アパタイト結晶懸濁液 (6.0 mg / mL) を作製する。一方、精製水にトリメトキシビニルシランを加え、トリメトキシビニルシラン溶液 (20 重量 %) を調整した。水酸アパタイト結晶懸濁液に、トリメトキシビニルシラン溶液を、重量比 9 : 1 になるように加え、水酸アパタイトの濃度が 6 重量 % になるように調整する。混合液を 18 時間転倒攪拌後、遠心分離により、上澄みを除去し、100 で 2 時間、大気中で乾燥させた。

ビニル基の導入は、赤外線スペクトル分析によって行うことができる。図 3 に示すように、トリメトキシビニルシランの処理前と処理後のサンプルとを比較すると、処理後のサンプルで、 3570 cm^{-1} の OH のピークが減少し、 1273 cm^{-1} 及び 1600 cm^{-1} に $\text{C}=\text{C}$ のピークが、 1087 cm^{-1} に $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ のピークが観察されるようになる。従って、図 4 に示すように、水酸アパタイト結晶の表面の水酸基と、トリメトキシビニルシランとの反応により、トリメトキシ基が結合しているものと考えられる。

また、熱分析により、210 と 320 に発熱挙動を観察することにより、320 では重量減少が観測される。320 での重量減少は、ビニルシランが水酸アパタイト表面に修飾されていることを示している。

【 0 0 5 6 】

(2) コラーゲン線維化工程

コラーゲン線維化工程(2)においては、哺乳動物又は魚類由来の可溶化コラーゲンを水などの水性の溶媒に溶解する。酸可溶化コラーゲン溶液に中性の緩衝液を混合してコラーゲン線維を析出させ、コラーゲン線維懸濁液を得ることができる。酸可溶化コラーゲン溶液のpHは、2.0~6.0の間であることが好ましい。コラーゲンの線維化に適するpHは、コラーゲンの種類によって変化するが、pH5~9の範囲、すなわち中性の範囲である場合が多く、中性の緩衝液が用いられる。コラーゲンを線維化させる中性の緩衝液の条件としては、適度なイオン強度及びpHが中性であることが重要である。このような条件を満たすものであれば、緩衝液は、特に限定されるものではないが、生体に用いる人工骨などの最終的な用途を考慮すれば、細胞毒性が無いかあるいは低い、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩、Tris等の緩衝能を有する塩水溶液を用いることが好ましい。特に、中性の緩衝液であり、安価、生体に毒性を示さない、そしてコラーゲンの線維化を他の中性の緩衝液よりも活発に起こす点において、リン酸緩衝液(特に、リン酸ナトリウム水溶液)が好ましい。

10

【0057】

コラーゲン線維化工程において、コラーゲン線維懸濁液中のコラーゲン線維を遠心分離、又は加圧脱水などにより濃縮し、高濃度コラーゲン線維懸濁液としてもよい。

遠心分離は、コラーゲン線維懸濁液を、遠心機による遠心分離とホモジェナイズを1~10回程度繰り返し行うことができる。より詳細には、遠心分離は、水分をコラーゲン線維から分離できる条件であれば、特に限定されるものではないが、2000g~20000gで行うことが好ましく、例えば、遠心機GRX-220(トミー精工社製)を用い、10000rpmで行うことができる。遠心機による遠心分離を行い、コラーゲン線維と水分を分離させた後、水分を除去し、ペースト状になったコラーゲン線維を得る。次に、ペースト状のコラーゲン線維を、ホモジェナイザーを用いてホモジェナイズすることによって、コラーゲン線維間に保持されている水分を分離しやすくする。ホモジェナイズ後、更に遠心機を用い遠心分離を繰り返し、分離した水分を除去する。ホモジェナイザーは、一般に用いられているものを利用することができるが、例えば、セルマスター(アズワン社製)を用い、5000rpmで行うことができる。この遠心分離の回数は、限定されるものではないが、1回~10回程度行うことができ、効率の観点から、好ましくは1~8回、より好ましくは、1~5回、最も好ましくは1~3回程度行う。

20

30

加圧脱水で濃縮を行う場合は、一回で濃縮を行ってもよいが、加圧脱水とホモジェナイズを繰り返し、1~10回程度行うことができる。遠心分離、又は加圧脱水を行う前のコラーゲン線維懸濁液中のコラーゲン線維の濃度は、0.4~0.5重量%程度であるが、遠心分離又は加圧脱水により、10重量%以上の濃度のコラーゲン線維懸濁液を得ることができる。

【0058】

(3) 混合工程

混合工程(2)においては、前記コラーゲン線維懸濁液(高濃度コラーゲン線維懸濁液を含む)とリン酸カルシウム結晶懸濁液とを混合し、リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を得ることができる。コラーゲン線維懸濁液に混合するリン酸カルシウム結晶懸濁液は、特に限定されるものではないが、水酸アパタイト結晶懸濁液が好ましい。

40

また、得られた混合液は、十分に攪拌を行った後に、例えばスイング式遠心機などを用いて、脱泡を行うことが好ましい。これは、凍結乾燥を行う際に、気泡の混入を防ぐためである。

【0059】

(4) 多孔体形成工程

多孔体形成工程(4)は、リン酸カルシウム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を多孔体に成形する工程であり、多孔体の成形方法としては、従来公知の方法を用いることが可能であり、具体的には、凍結乾燥法などを挙げることができる。多孔体の成形方法として、凍結乾燥法を用いる場合は、所望の大きさ及び形態の成形容器を用意し、リン酸カルシウ

50

ム結晶/コラーゲン線維混合懸濁液を流し込む。成形容器の材料は、冷凍機による凍結、及び凍結乾燥機における減圧に耐えることができる限り、限定されるものではないが、例えば、シリコンゴムなどを用いることができ、任意の大きさ及び形態の成形容器を作製することが可能である。成形容器中のリン酸カルシウム/高濃度コラーゲン線維混合懸濁液は、冷凍機により、例えば - 80 ~ - 0 で凍結される。凍結されたリン酸カルシウム/高濃度コラーゲン線維混合懸濁液は、凍結乾燥機に入れ、例えば棚温度 - 30 ~ 40 で、水分がなくなるまで、凍結乾燥を行う。

【0060】

多孔体形成工程において、一定以上の機械的強度を得るために、多孔体中のコラーゲン線維を熱脱水により架橋してもよい。すなわち、減圧雰囲気下で、130 24時間程度の処理を行うことにより、熱脱水架橋を行うことができる。

10

【0061】

《リン酸カルシウム/コラーゲン複合線維を用いた製造方法》

本発明の別の実施態様においては、前記多孔体形成工程(A)が、リン酸カルシウム/コラーゲン複合線維と緩衝液との混合によりゲル化させ、多孔体に成形する工程である。本工程は、特開2007-98118に記載の多孔質体を製造する方法である。本態様においては、リン酸カルシウムは、特に限定されるものではないが、好ましくは水酸アパタイトである。

具体的には、水酸アパタイト/コラーゲン複合線維と緩衝液との混合後、凍結乾燥してもよいが、凍結乾燥は、後述の傾斜架橋工程(B)の後に行うことができる。また、水酸アパタイト/コラーゲン複合線維と緩衝液との混合後に、さらにインキュベーションしてもよい。水酸アパタイト/コラーゲン複合線維は、水酸アパタイトのc軸が線維軸方向に配向されていることが好ましい。

20

水酸アパタイト/コラーゲン複合線維は緩衝液との混合により、水酸アパタイトのc軸が線維軸方向に配向されることにより、スポンジ状の弾力性を有し、従来の強度の問題や、使用時の操作性の問題を解消することができる。

【0062】

本願発明に用いられる緩衝液は、イオン種やイオン強度を制御した溶媒であり、例えば、イオン種が、無機イオンであるリン酸緩衝液等、あるいは、有機イオンであるトリス緩衝液や酢酸緩衝液等、各種の緩衝液を使用することができる。また、イオン強度は、ペースト状にした水酸アパタイト/コラーゲン複合物中の値として、0.01~0.5mol/Lの範囲、特に0.02~0.2mol/Lの範囲であることが好ましい。

30

【0063】

例えば、多孔体は、以下のとおり調製することができる。

(1) 水酸アパタイト/コラーゲン複合線維体(HAp/Col:混合比率は、80/20)1gと、リン酸緩衝液(0.1mol/L, pH6.8)8mLとを、均一になるまで混合し、インキュベーションしてゲル状とした。

(2) ゲル状の混合物を、型(細胞培養用53mmのポリスチレンディッシュや細胞培養用24穴プレート等、適宜に選択することができる)に注入した。

得られた多孔体を以下の傾斜架橋工程に用いることが可能である。

40

【0064】

(B) 傾斜架橋工程

傾斜架橋工程における架橋方法は、1.5倍以上異なる第1の断片及び第2の断片を切り出すことのできる多孔質複合体を作製することができる架橋方法であれば、特に限定されるものではなく、アルデヒド系・イソシアネート系・カルボジイミド系架橋剤・タンニンを用いた湿式架橋法、金属イオン(クロム、鉄など)を用いた架橋法、紫外線照射法、熱架橋、グルタルアルデヒド気相蒸着法、又は放射線照射法を挙げることができるが、グルタルアルデヒド気相蒸着法、又は放射線照射法が好ましい。本工程においては、これらの架橋法によって、架橋密度の変化した架橋処理を行う。

【0065】

50

(グルタルアルデヒド気相蒸着法)

傾斜架橋法において、グルタルアルデヒド気相蒸着法を用いる場合、多孔体へのグルタルアルデヒドガスの揮発・拡散を調整することにより、多孔体の架橋の程度を調整し、生体吸収性が異なる部分を作製することができる。

グルタルアルデヒド気相蒸着法は、通常の方法で行うことができる。すなわち、グルタルアルデヒド〔 $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ 〕を精製水で希釈し、1～25%程度のグルタルアルデヒド溶液を調製する。グルタルアルデヒド蒸気を用いた化学架橋では、グルタルアルデヒドの濃度が拡散に影響する。濃度が高いほうが、拡散速度が速く、濃度が低いと拡散速度が遅くなる。従って、グルタルアルデヒド溶液の濃度を調整することにより、拡散速度を制御することができる。

10

このグルタルアルデヒド溶液を上方の開放された容器（例えば、ガラス瓶、又はシャーレなど）に入れる、デシケータなどに、グルタルアルデヒド溶液と、架橋を行うサンプルを入れて、37℃程度で、1～24時間程度反応させる。

グルタルアルデヒド気相蒸着法による架橋の場合、グルタルアルデヒドは、サンプルの表面から拡散し、アミノ基同士、又はアミノ基及びSH基の架橋を起こす。従って、傾斜架橋法を行う場合、弱い架橋を導入したい面からのグルタルアルデヒドの拡散を防ぐことによって、傾斜架橋を行うことができる。具体的には、グルタルアルデヒドの拡散を抑えたい面を、膜などで覆うことにより、架橋の傾斜を導入することが可能である。

【0066】

前記膜としては、グルタルアルデヒドの透過しない膜、又は透過を抑制することのできる膜であれば、特に限定されるものではないが、例えばシリコン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリメタクリル酸メチル、ポリテトラフルオロエチレン、又はポリスチレン膜などを挙げることができ、特にポリスチレン膜が好ましい。

20

【0067】

(放射線照射法)

傾斜架橋法において、放射線照射を用いる場合、湿潤環境下における多孔質複合体のコラーゲン濃度の違いによって架橋の傾斜を導入することができる。湿潤環境下において放射線を照射するとコラーゲン同士の架橋が生じるためである。

【0068】

コラーゲン濃度の異なる多孔体で生体吸収性が異なる部分を作製する場合には、例えば以下のように多孔体を製造することができる。

30

コラーゲンとアパタイトの混合比を変えた多孔体を作製し、それらの多孔体を積層することによって、コラーゲン濃度の異なる部分を有する多孔体を得ることができる。この多孔体に放射線照射を行うことによって、生体吸収性が1.5倍以上異なる2つの部分を有する多孔質複合体を得ることができる。

【0069】

傾斜架橋法において、放射線照射法を用いる場合、放射線に感受性の官能基（例えば、ビニル基）の、リン酸カルシウムへの導入の多寡によって傾斜を導入することができる。また、リン酸カルシウムの官能基の量が同じであっても、放射線の照射量を調整することによっても傾斜を導入することができる。放射線に感受性の官能基、具体的にはビニル基のリン酸カルシウムへの導入は、前記「(1)結晶合成工程」において、記載した方法によって行うことができる。

40

【0070】

ビニル基の導入を調整することにより、得られる多孔体で生体吸収性が異なる部分を作製する場合は、例えば以下のように多孔体を製造することができる。

ビニル基の導入量の異なるリン酸カルシウム結晶懸濁液を、複数調製する。それらのリン酸カルシウム結晶懸濁液をコラーゲン懸濁液と混合し、ビニル基の導入量の異なる複数の多孔体を調整する。それらの多孔体を積層することによって、ビニル基の導入量の異なる部分を有する多孔体を得ることができる。この多孔体に放射線照射を行うことによって、生体吸収性が1.5倍以上異なる2つの部分を有する多孔質複合体を得ることができる。

50

。

【0071】

放射線の照射量を調整することによっても傾斜を導入することができる。例えば以下のように行うことができる。

多孔体への放射線の照射量を調整する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、テーパをもった鉛板を用いることによっても行うことができる。例えば、図2に示すように、三角錐の「テーパ」を用い、放射線を三角錐の上方から照射する。このような照射を行うことにより、三角錐の中心部はテーパが厚く、照射が少なくなり放射線架橋が起こりにくい。従って、生体吸収性や膨潤性に優れ、機械的強度が弱い部分となる。一方、三角錐の周辺部はテーパが薄いため、照射が多くなり、放射線架橋が起こりやすい。従って、生体吸収性に耐性があり、機械的強度が高い部分となる。

10

【0072】

放射線照射に用いる線源は特に限定されるものではないが、 γ 線、電子線、又は α 線を用いることができるが、 γ 線が好ましい。

また、放射線による湿潤環境下における架橋では、コラーゲン同士、又はコラーゲンアパタイト界面において、架橋がおきるため、それらの立体的距離が重要である。すなわち、密度が高いほうが強固な架橋ができる。更に、放射線架橋の特徴は、物質透過性に優れ、分子内において均一な分布で架橋が起こること、架橋の密度を容易に調整できること、及び形状に係わらず架橋できること、を挙げることができる。

20

【0073】

多孔質複合体に対する放射線による架橋は、湿潤状態又は乾燥状態で行うことができるが、湿潤状態で行うのが好ましい。湿潤状態で行うことにより、コラーゲン分子のペプチド結合の切断による分解が起きず、コラーゲン同士を効率よく架橋させることが可能だからである。水分の含有量は、特に限定されるものではないが、多孔体の体積と同じか、1～10倍が好ましい。雰囲気窒素・アルゴンなどの不活性ガスに置換して行うことも可能である。

【実施例】

【0074】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

30

【0075】

《実施例1》

本実施例ではグルタルアルデヒド気相蒸着法により、多孔質複合体を製造した。

(i) 水酸アパタイト結晶の懸濁液の調製

水酸アパタイト結晶は、湿式法により合成した。0.5 mol/Lの水酸化カルシウム懸濁液(4リットル)に、0.6 mol/Lのリン酸水溶液(2リットル)をゆっくりとpH7.5になるまで滴下した。得られた懸濁液を、120℃で乾燥後、更に電気炉を用いて1200℃で30分間焼成した。粉末X線回折測定により合成した水酸アパタイトが単一相であることを確認した。

40

【0076】

(ii) コラーゲン線維懸濁液の調製

テラピアウロコ由来コラーゲンを、pH3.0の塩酸溶液に1重量%になるように溶解させた。0.1 mol/Lのリン酸水素ナトリウムとリン酸二水素ナトリウムの溶液とを混合し、pH8.2になるように緩衝溶液(PB)を作製した。コラーゲン溶液とPBを等量混合して、27℃で3日間静置して、コラーゲン線維ゲルを作製した。遠心分離を行い、上澄みを除去することで濃縮を行った。130℃で乾燥させ、コラーゲンの濃度を測定した結果、コラーゲン濃度は17.3%であった。

【0077】

(iii) 乾燥複合体の調製

前記工程(ii)で得られたコラーゲン線維ゲルをコラーゲン濃度10%に調整し、水酸

50

アパタイト結晶を重量比4：6になるように混合した。混合には、Cellmasterを用い、十分に混合攪拌を行った。得られた複合ゲル（水酸アパタイト結晶/コラーゲン線維混合懸濁液）を、25 mLの遠沈管にいれ、スイング式遠心機（1000 G）を用いて、脱泡（5分間）した。得られた複合体を、10 mm × 10 mm × 10 mmの容器に入れ、-20 で一日凍結させ、更に48時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気下、130 で24時間処理して、熱脱水架橋を導入した。得られた複合体を試料Aと称する。

【0078】

(iv) グルタルアルデヒド気相蒸着による傾斜架橋

グルタルアルデヒド（GA）ガス架橋は、以下のように行った。GA溶液（25%）を精製水で希釈して10%の溶液を調整した。GA溶液をシャーレに20 mL加え、作製した試料（10 mm × 10 mm × 10 mm；試料A）とともにデシケータ内に静置した。デシケータを減圧し、37 の恒温乾燥機に入れ、3、6、12、24時間反応させた。試料Aの五面はポリスチレン膜で覆い、一面のみからGAガスが拡散し、反応するようにした（図1A）。得られた多孔質複合体を、試料A-GAと称する。

GAによる架橋の傾斜は、目視でも確認することが可能である。すなわち、3時間GA処理した試料の中央部をメスにて切断し観察した。GAガスが拡散した面から、順番に黄色から白色に色が変化しており、拡散面の方が、架橋が進んでいると考えられた。また、6時間GA処理した試料では、その濃淡が更にはっきりと確認することができた。

【0079】

《実施例2》

本実施例では、放射線照射により、膨潤した多孔質複合体を製造した。

(i) 水酸アパタイト結晶の懸濁液の調製及びビニル基の導入

水酸アパタイト結晶は、湿式法により合成した。0.5 mol/Lの水酸化カルシウム懸濁液（4リットル）に、0.6 mol/Lのリン酸水溶液（2リットル）をゆっくりとpH7.5になるまで滴下した。得られた懸濁液を、120 で乾燥後、更に電気炉内を用いて1200 で30分間焼成した。粉末X線回折測定により合成した水酸アパタイトが単一相であることを確認した。

【0080】

ビニル基の導入は以下のように行った。

水酸アパタイト懸濁液を、遠心分離により、固液分離を行い、エタノールに溶媒を置換した。この操作を三回繰り返し、水酸アパタイト懸濁液（60 mg/mL）を作製した。一方、精製水にトリメトキシビニルシランを加え、メトキシビニルシラン溶液（20重量%）を調整した。水酸アパタイト懸濁液に、重量比9：1になるようにメトキシビニルシラン溶液を加えた。この際、水酸アパタイトの濃度は6重量%になるように調整した。18時間転倒攪拌後、遠心分離により、固液分離を行い、上澄みを除去し、100 で2時間、大気中で乾燥させた。赤外線スペクトル分析により、Si-Oの振動とビニル基に由来する振動が確認された。また、熱分析の結果から、210 と320 に発熱挙動を観察し、320 では重量減少が観測された。このことから、本方法によりシラン剤が水酸アパタイト表面に修飾できていることが分かった。

【0081】

(ii) コラーゲン線維懸濁液の調製

前記実施例(ii)の操作を繰り返し、コラーゲン線維懸濁液を得た。

(iii) 膨潤多孔質複合体の調製

作製したコラーゲン線維懸濁液に、水酸アパタイト結晶の懸濁液を重量比4：6になるように混合した。混合には、Cellmasterを用い、十分に混合攪拌を行った。作製した複合ゲル（水酸アパタイト結晶/コラーゲン線維混合懸濁液）を、25 mLの遠沈管にいれ、スイング式遠心機（1000 g）を用いて、脱泡（5分間）を行った。得られた湿潤状態の複合体を試料Cと称する。

(iv) 放射線による傾斜架橋

放射線による架橋を傾斜化させるため、鉛で作製した三角錐（高さ10 cm × 直径1 cm）

10

20

30

40

50

をテーパーとして用いた放射線照射を行った。図 1 に示すように、遠心管にいれた試料 C の先端部位に鉛三角錐を取り付け、コバルト 60 の線源を用いて線 (5.3 kGy/h) を照射した (図 2 A)。照射時間は約 10 時間とした。照射後、-20 で一日凍結させ、48 時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130 で 24 時間処理して更に熱脱水架橋を導入した。得られた多孔質複合体を、試料 C-g と称する。

【0082】

《実施例 3》

(i) 水酸アパタイト/コラーゲン複合線維の調整

2.0 g のテラピアウロコ由来コラーゲンを 0.15 mol/L のリン酸 (200 mL) に溶解させた水溶液と、0.25 mol/L の水酸化カルシウム懸濁液 (200 mL) を調整した。また、200 mL の精製水を加えた 1000 mL ビーカーを準備した。調整した二液を、25 の精製水に、pH 8.0 ± 0.5 の一定になるように、滴下速度 4 mL/min で同時に加えた。滴下終了後、吸引濾過により上澄み液を除き、得られた水酸アパタイト/コラーゲン複合線維を -20 で凍結後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥した複合線維の熱分析 (TG-DTA) の結果、水酸アパタイトとコラーゲンの重量比は、8 : 2 であった。

10

【0083】

(ii) 水酸アパタイト/コラーゲン複合線維ゲルの調整と成形

0.1 mol/L のリン酸緩衝溶液 (4 mL; pH 8.0、リン酸二水素ナトリウムとリン酸一水素ナトリウムの混合緩衝液) を、2 g の作製した水酸アパタイト/コラーゲン複合線維に加え、混練を十分に行い、均一な水酸アパタイト/コラーゲン複合線維ゲルをえた。これを直径 35 mm × 10 mm の細胞培養用ディッシュ (イージーグリップディッシュ、Falcon) に高さが 3 mm になるようにつめた。

20

【0084】

(iii) 放射線による傾斜架橋

放射線による架橋を傾斜化させるため、鉛で作製した円筒 (高さ 4 cm × 直径 35 mm) を用いた放射線照射を行った。コバルト 60 の線源の上に複合線維ゲルを置き、照射を行った。照射後、-20 で凍結させ、48 時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130 度で 12 時間処理して更に熱脱水架橋を導入した。

30

【0085】

(iv) 押し込み試験による機械強度の傾斜化

作製した水酸アパタイト/コラーゲン複合線維多孔体を、ダルベッコスリン酸緩衝溶液に浸し、テクスチャーアナライザー (TA-XTP1us) で押し込み試験を行った。シリンダーには、P/2 の 2 mm の円柱状プローブを用いた。試料片の端から、中心部にむかい 5 点の測定を行った。この結果、照射量の多い端と中心部では、歪量 30% において約 2 倍の強度の違いが観測された。

【0086】

《比較例 1》

実施例 2 の工程 (i) で、ビニル基の導入を行わなかったことを除いては、実施例 2 の操作を繰り返し、工程 (iii) で複合体である試料 D を、工程 (iv) で多孔質複合体である試料 D-g を得た。

40

【0087】

《参考例 1》

本参考例 1 では、架橋を傾斜化させずに、放射線架橋を行い、膨潤した多孔質複合体を製造した。実施例 2 の、(i)、(ii)、及び (iii) の操作を繰り返して、試料 C を得た。

(iv) 放射線架橋

遠沈管にいれた試料 C は、コバルト 60 の線源を用いて線 (50 KGy) を照射した。照射後、-20 で一日凍結させ、48 時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130 で 24 時間処理して更に熱脱水架橋を導入した。得られた多孔質複合体を、試料 C- と

50

称する。

【0088】

《比較例2》

本参考例1では、ビニル基を導入していない試料Dに、架橋を傾斜化させずに、放射線架橋を行い、膨潤した多孔質複合体を製造した。比較例1の(i)、(ii)、及び(iii)の操作を繰り返して、試料Dを得た。

(iv)放射線架橋

遠沈管にいれた試料Dは、コバルト60の線源を用いて線(50KGy)を照射した。照射後、-20で一日凍結させ、48時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130で24時間処理して更に熱脱水架橋を導入した。得られた多孔質複合体を、試料D-と称する。

10

【0089】

《参考例2》

本参考例2では、架橋を傾斜化させずに、放射線架橋を行い、乾燥した多孔質複合体を製造した。実施例2の、(i)、及び(ii)の操作を繰り返して、水酸アパタイト結晶懸濁液、及びコラーゲン線維懸濁液を得た。

(iii)乾燥多孔質複合体の調製

コラーゲン線維懸濁液に水酸アパタイト結晶懸濁液を重量比4:6になるように混合した。混合には、Cell masterを用い、十分に混合攪拌を行った。作製した複合ゲル(水酸アパタイト結晶/コラーゲン線維混合懸濁液)は、更に25mLの遠沈管にいれ、スイング式遠心機(1000g)を用いて、脱泡(5分間)を行った。作製した複合体は、-20で一日凍結させ、更に48時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130で24時間処理して、熱脱水架橋を導入した。得られた乾燥複合体を試料Aと称する。

20

(iv)放射線架橋

作製した乾燥複合体Aは、滅菌シートにいれ、脱酸素剤により酸素を吸着させた後、コバルト60の線源を用いて、50KGyの線量の線を照射した。得られた多孔質複合体を、試料A-と称する。

【0090】

《比較例3》

本比較例3では、ビニル基を導入していない試料に、架橋を傾斜化させずに、放射線架橋を行い、乾燥した多孔質複合体を製造した。比較例1の、(i)、及び(ii)の操作を繰り返して、水酸アパタイト結晶懸濁液、及びコラーゲン線維懸濁液を得た。

30

(iii)乾燥多孔質複合体の調製

コラーゲン線維懸濁液に水酸アパタイト結晶懸濁液を重量比4:6になるように混合した。混合には、Cell masterを用い、十分に混合攪拌を行った。作製した複合ゲル(水酸アパタイト結晶/コラーゲン線維混合懸濁液)は、更に25mLの遠沈管にいれ、スイング式遠心機(1000G)を用いて、脱泡(5分間)を行った。作製した複合体は、-20で一日凍結させ、更に48時間凍結乾燥を行った。減圧雰囲気、130で24時間処理して、熱脱水架橋を導入した。得られた乾燥複合体を試料Bと称する。

40

(iv)放射線架橋

作製した乾燥複合体Bは、滅菌シートにいれ、脱酸素剤により酸素を吸着させた後、コバルト60の線源を用いて、50KGyの線量の線を照射した。得られた多孔質複合体を、試料B-と称する。

【0091】

《コラゲナーゼによる生分解率による領域(A)及び領域(B)の決定》

多孔質複合体の生体吸収性の速い第1の断片が含まれる領域、及び生体吸収性の遅い第2の断片が含まれる領域の決定をコラゲナーゼによる生分解性試験により行った。

コラゲナーゼ2.0units(0.01mg)/mL、又は200units(1.0mg)/mLを含むpH7.2のダルベッコスリン酸緩衝溶液を作製し、実施例1で得られた試料A-GAの0.3gの多孔質複合体に対して、30mLのダルベッコスリン酸

50

緩衝溶液を添加した。試料及び溶液を、37 のバイオシェーカー内に入れ、50 rpm で振盪しながら1、3、12、18、24時間反応させた。反応後、試料を取り出し、純水で1時間洗浄した。試料を-20 のディープフリーザー内で凍結し、凍結乾燥を行った。得られた試料の乾燥重量を測定し、一般式(I)から生分解率を求めた。

生分解率 = $(W_0 - W_t) / W_0 \times 100$ (I)

【0092】

12、18、24時間GAガス反応させた試料は全体にGAガスが拡散し、コラゲナーゼによる分解が1mg/mLの溶液中ですら生じなかった。3時間GAガスに反応させた試料をコラゲナーゼ分解試験(0.01mg/mL)した結果、GAガス拡散が起きた面と逆面から順番に分解が生じていた。一般式(I)の生分解率から求めた、時系列による重量変化は、1時間後に約30%の生分解率が、24時間後に約70%の生分解率が、24時間後には、ほぼ100%の生分解率となった。このように時系列変化により、大きく3段階に分けることができる分解性を示した。6時間GAガスに反応させた試料をコラゲナーゼ分解試験(0.01mg/mL)した結果、GAガス拡散が起きた面と逆面から順番に分解が生じていた。上式の生分解率から求めた、時系列による重量変化は、1時間後に約20%の生分解率が、12時間後に約40%の生分解率が、24時間後でも60%の生分解率となった。このように時系列変化により、大きく3段階に分けることができる分解性を示した。

すなわち、3時間GAガスに反応させた試料から、生分解率の速い30重量%の領域及び生分解率の遅い30重量%の領域を決定することができた。

【0093】

《コラゲナーゼによる生分解性試験》

6時間反応させた試料A-GAの架橋の進んだ生分解率の遅い30重量%の領域の断片10mg、及び架橋の進んでない生分解率の速い30重量%の領域の断片10mgを生検トレパンにより切り出した(図1B)。各試料A-GAを2.0unit/mLのコラゲナーゼ溶液又は200unit/mLを含むダルベッコスリン酸緩衝溶液に浸漬させた。容器にはマルチウェルプレートを用い、コラゲナーゼ溶液3mLを加え、50rpmで振とうしながら、所定時間反応させた。反応後、各試料を取り出し、精製水で1時間洗浄し、(iii)の多孔質複合体の調製と同条件で凍結乾燥を行い、生分解率(関係式(I))を求めた。

6時間のコラゲナーゼ処理では、架橋の進んだ部分の断片の生分解率は約10%で、架橋の進んでいない部分の断片の生分解率は90%であった。従って、第1の断片の生分解率に対する第2の断片の生分解率の比は、9.0であった。

【0094】

《膨潤率による領域(A)及び領域(B)の決定》

多孔質複合体の生体吸収性の速い第1の断片が含まれる領域、及び生体吸収性の遅い第2の断片が含まれる領域の決定を膨潤率の測定により行った。

実施例2で得られた多孔質複合体である試料C-gを4つの断片に分割した。分割した0.3gの多孔質複合体の断片に対して、300mLのダルベッコスリン酸緩衝溶液を添加し、含浸させた。試料及び溶液を、37 で24時間静置した。得られた試料と、含浸を行っていない同様に分割した試料を比較し、膨潤率の高い10~30重量%の領域(A)及び膨潤率の低い10~30重量%の領域(B)を決定した。

【0095】

《膨潤率》

実施例2で得られた試料C-gの膨潤率の高い30重量%の領域(A)の断片10mgと、膨潤率の低い30重量%の領域(B)の断片10mgを図1(B)と同様な方法で切り出した。5mLの精製水を入れた容器に24時間、常温で静置した。余分な水分を除去するため、ろ紙に1分間静置した。その後、湿潤下重量を測定し、関係式(III)から膨潤率を求めた。

線照射量を多くした断片の膨潤率は20%程度であったが、線照射量を少なくした

10

20

30

40

50

断片の膨潤率は、40%であった。従って、第1の断片の膨潤率に対する第2の断片の膨潤率の比は、2.0であった。

【0096】

《参考試験例1》

本試験例では、放射線架橋により、多孔質複合体の圧縮強度が上昇することを確認した。

参考例2で得られた試料A及び試料A-、並びに比較例3で得られた試料B及び試料B-の4種類の試料(10mm×10mm)の圧縮試験を行い、その力学特性を明らかにした。放射線架橋の効果を明確にするため、ダルベッコスリン酸緩衝溶液中に3時間浸漬させた後、50kgのロードセルを用いて、ロードヘッド速度0.1mm/minで測定を行った。水酸アパタイト/コラーゲンは、線照射によりコラーゲン分子又は線維が分断され、ダルベッコスリン酸緩衝溶液の浸漬によりコラーゲンが骨格構造を維持できなくなった。これに対して、ビニルシランを表面修飾した水酸アパタイト結晶を用いた試料A-では、線照射により、著しく圧縮強度が向上した。そのため、線照射により、コラーゲンと水酸アパタイト結晶の界面において架橋結合が形成され、ダルベッコスリン酸緩衝溶液中に含浸させても骨格を形成するコラーゲン分子の分断が低減されたと考えられる。

10

【0097】

【表1】

γ線照射	試料	20%歪応力 (kPa)
なし	B (HAp/Col)	13.5
	A (s-HAp/Col)	14.56
あり	B-γ (HAp/Col)	4.46
	A-γ (s-HAp/Col)	26.84

20

【0098】

《参考試験例2》

実施例2で得られた試料C及び試料C-g、並びに比較例1で得られた試料D及び試料D-gを前記参考試験例1と同じ方法により、圧縮試験を行った。

30

その結果、傾斜化させた試料は、明らかにその強度が傾斜化させない試料(CとD)と比較して弱かった。また、乾燥させた試料と比較すると2倍以上の強度を示した。更に、目視でダルベッコスリン酸緩衝溶液浸漬3時間後の膨潤度を確認したところ、中央部分での膨潤が確認できた。以上のことから、鉛円錐を用いて線照射することで材料内部までその膨潤度の異なる部位ができることを明らかとした。

【0099】

《参考例3》

本参考例では、湿潤状態で線照射を行うことにより、架橋を傾斜化できることを確認した。

40

(i) 水酸アパタイトナノ結晶のビニルシラン修飾

90%エタノール溶液(100mL)に、水酸アパタイトナノ結晶が1wt%になるように懸濁し、ビニルシランカップリング剤を100mgになるように混合し、良く分散・転倒攪拌(18時間)後、遠心分離による固液分離を行った。さらに90%エタノール及び遠心分離による固液分離により洗浄を行った。その後、固相を100で2時間乾燥させ、ビニルシラン修飾水酸アパタイトを作製した。

【0100】

(ii) 線照射による圧縮強度の向上

得られたビニルシラン修飾水酸アパタイト及び濃縮コラーゲン(10wt%)を混合重量比が60/40になるように均一に分散させ、湿潤環境下で線を25kGy及び50

50

k Gy の線量で照射した。その後、 -20°C で凍結及び凍結乾燥を行い、ダルベッコスリン酸緩衝溶液に室温で4時間湿潤させて圧縮試験を行った。比較対象として線量を照射せずに凍結及び凍結乾燥した試料を用いた。その結果を図6に示す。横軸には歪量を、縦軸には応力をプロット（S-S曲線）した。図5からも明らかなように線照射しない材料と比較して圧縮強度が2倍以上高くなった。また、25 k Gy と50 k Gy の照射では、圧縮強度が同程度であり、25 k Gy で必要最大照射量があると考えられた。

【0101】

ビニルシラン修飾水酸アパタイト及び濃縮コラーゲン（8重量%）を混合重量比が60/40になるように均一に分散させ、湿潤環境下で線量を3.125 k Gy、6.25 k Gy、12.5 k Gy 及び25 k Gy の線量で照射した。その後、 -20°C で凍結及び凍結乾燥を行い、ダルベッコスリン酸緩衝溶液に室温で4時間湿潤させて圧縮試験を行った。その結果を図6に示す。横軸には照射した線量を縦軸には一定の歪量（40%、50%、又は60%）における応力を示す。線照射量により、応力は指数関数的な相関であることが分かった。非線形最小二乗によるフィッティングの結果から、「（線照射処理をしない材料の応力） $\times \text{EXP}(0.12 \times \text{照射線量})$ 」の関係が得られた。

10

【産業上の利用可能性】

【0102】

本発明の多孔質複合体は、骨補填材料又は再生医療用足場材料などの生体材料、又は人工骨として用いることができる。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

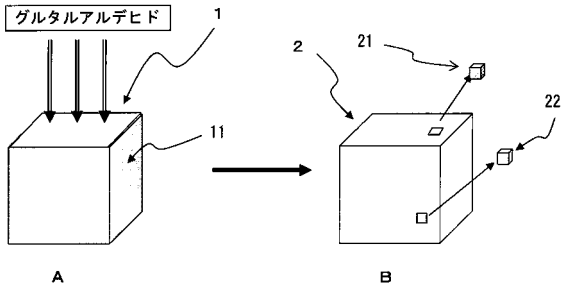
20

【符号の説明】

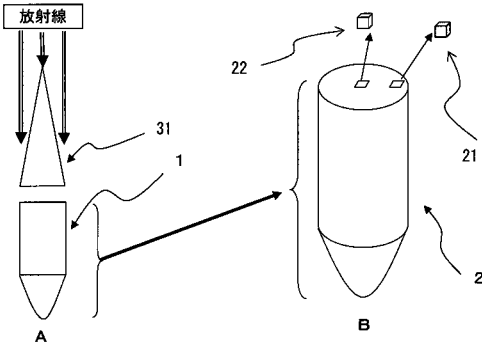
【0103】

- 1・・・多孔体；
- 11・・・ポリスチレン膜；
- 2・・・多孔質複合体；
- 21・・・生体吸収性に耐性のある部分（架橋の進んだ部分）；
- 22・・・生体吸収性の優れた部分（架橋の進んでない部分）；
- 31・・・テーパー（三角錐）。

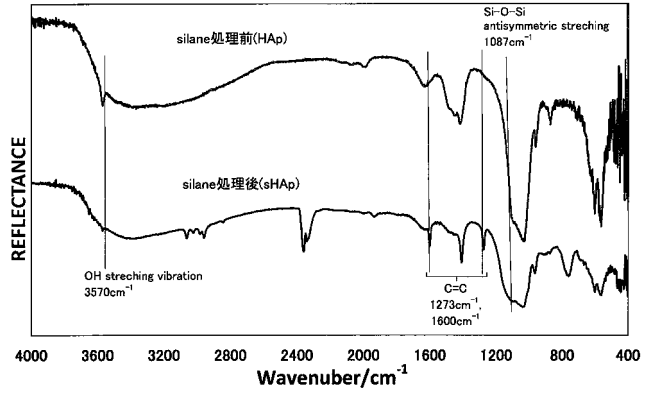
【 図 1 】



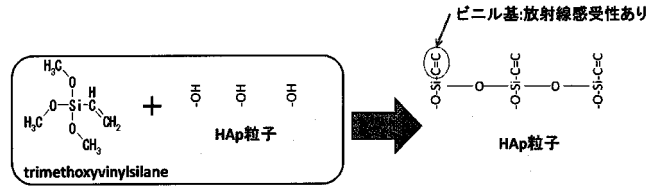
【 図 2 】



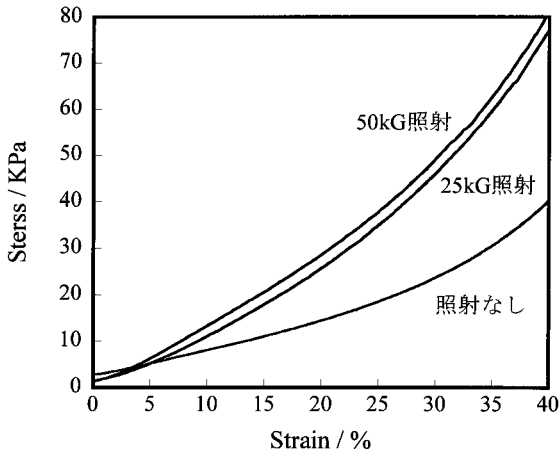
【 図 3 】



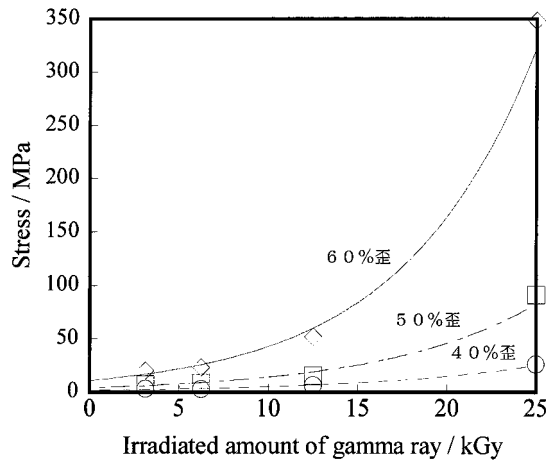
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/067113
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 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YUNOKI S, et al., Effects of increased collagen-matrix density on the mechanical properties and in vivo absorbability of hydroxyapatite-collagen composites as artificial bone materials., Biomed. Mater., 2011.02, Vol.6, No.1, p.015012	1-14
A	JP 2008-513159 A (Massachusetts Institute of Technology), 01 May 2008 (01.05.2008), & US 2006/0121609 A1 & GB 2432845 A & EP 1804716 A & WO 2006/034365 A2 & CA 2581328 A & CN 101060821 A & AU 2005286755 A	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 20 July, 2012 (20.07.12)		Date of mailing of the international search report 31 July, 2012 (31.07.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/067113

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-273847 A (Tokyo Institute of Technology), 09 December 2010 (09.12.2010), (Family: none)	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 6 7 1 1 3													
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2012年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2012年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2012年	日本国実用新案登録公報	1996-2012年	日本国登録実用新案公報	1994-2012年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2012年														
日本国実用新案登録公報	1996-2012年														
日本国登録実用新案公報	1994-2012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 (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)															
C. 関連すると認められる文献															
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号													
A	YUNOKI S, et al., Effects of increased collagen-matrix density on the mechanical properties and in vivo absorbability of hydroxyapatite-collagen composites as artificial bone materials., Biomed. Mater., 2011.02, Vol.6, No.1, p.015012	1-14													
<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。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「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	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 20.07.2012		国際調査報告の発送日 31.07.2012													
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) 山村 祥子	4U 9217												
		電話番号 03-3581-1101	内線 3439												

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/067113
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
A	JP 2008-513159 A (マサチューセッツ・インスティテュート・オブ・テクノロジー) 2008.05.01, & US 2006/0121609 A1 & GB 2432845 A & EP 1804716 A & WO 2006/034365 A2 & CA 2581328 A & CN 101060821 A & AU 2005286755 A	1-14
A	JP 2010-273847 A (国立大学法人東京工業大学) 2010.12.09, (ファミリーなし)	1-14

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 吉岡 朋彦

東京都目黒区大岡山 2 - 1 2 - 1 国立大学法人東京工業大学内

(72)発明者 吉田 嵩

東京都目黒区大岡山 2 - 1 2 - 1 国立大学法人東京工業大学内

Fターム(参考) 4C081 AB02 AB03 AB05 BA16 BB06 BB08 CA17 CD01 CD04 CD09
CD12 CD15 CE02 CE11 CF01 CF02 CF03 DA01 DB03 DC15
EA02

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。