

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5924693号

(P5924693)

(45) 発行日 平成28年5月25日 (2016. 5. 25)

(24) 登録日 平成28年4月28日 (2016. 4. 28)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 Q
A 6 1 F 2/28 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 J
	A 6 1 F 2/28

請求項の数 3 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2012-545681 (P2012-545681)	(73) 特許権者	000001085
(86) (22) 出願日	平成23年11月10日 (2011. 11. 10)		株式会社クラレ
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/075973		岡山県倉敷市酒津 1 6 2 1 番地
(87) 国際公開番号	W02012/070400	(73) 特許権者	504171134
(87) 国際公開日	平成24年5月31日 (2012. 5. 31)		国立大学法人 筑波大学
審査請求日	平成26年11月6日 (2014. 11. 6)		茨城県つくば市天王台一丁目 1 番 1
(31) 優先権主張番号	特願2010-262538 (P2010-262538)	(74) 代理人	100080791
(32) 優先日	平成22年11月25日 (2010. 11. 25)		弁理士 高島 一
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宜
		(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】 インプラント材料の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

工程 (A) : 実質的に一方向に配列した気孔を有する多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置へ設置する工程、

工程 (B) : 該容器に骨髓血および／または末梢血を少なくとも含む細胞含有液体を充填する工程、および

工程 (C) : 該容器に該容器の軸線に沿う方向の遠心力を作用させて、該細胞含有液体を遠心分離してバフィーコート層を形成させる工程を含み、

工程 (A) において、該多孔質セラミックス材料を、その実質的に一方向に配列した気孔の長軸が該容器の軸線に沿うように、かつ、該多孔質セラミックス材料の少なくとも一部が、工程 (C) で生成するバフィーコート層と接する位置となるように設置する、インプラント材料の製造方法。

【請求項 2】

工程 (C) において、遠心力を $100 \times g \sim 2000 \times g$ に制御する、請求項 1 記載のインプラント材料の製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のインプラント材料の製造方法に使用するインプラント材料製造用器具であって、

骨髓血および／または末梢血を少なくとも含む細胞含有液体、並びに、多孔質セラミックス材料を収容し得る容器と、

該細胞含有液体中の細胞が通過し得る貫孔を有し、該容器の内部の任意の深さ位置に該多孔質セラミックス材料を設置するための、多孔質セラミックス材料位置決め手段とを含む、インプラント材料製造用器具。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インプラント材料の製造方法、当該方法に用いる器具および当該方法によって製造されるインプラント材料に関する。

【背景技術】

【0002】

10

セラミックス材料のうちリン酸カルシウム系セラミックス材料は、骨や歯の主成分であり、優れた生体親和性を有しており、且つ安全性にも優れていることから、人工骨、人工歯根などの医科用あるいは歯科用などの生体内に埋植するインプラント材料、再生医療などに用いられる細胞培養用の足場、ドラッグデリバリーシステム（DDS）用の薬剤担持材料などの生体材料として幅広く利用、研究されている。

【0003】

しかしながら、セラミックス材料単体では、骨欠損が大きい場合、単体での骨の修復は困難である。また骨よりも修復機能の低い軟骨部の修復は困難である。

【0004】

このような背景から、骨髓由来間葉系幹細胞などの組織修復能を有する細胞を多孔質セラミックス材料に播種したインプラント材料の開発が行われている。

20

【0005】

かかるインプラント材料において、多孔質セラミックス材料に骨髓由来の組織修復能を有する細胞を播種する場合、骨髓血から組織再生に必要な赤血球を除去し、幹細胞などの有用細胞のみを濃縮した状態で播種することが望ましい。

【0006】

細胞が播種されたインプラント材料の製造方法としては、（１）培養細胞を含む液体を滴下する方法、（２）細胞を含む液体中に多孔質体を浸す方法、（３）細胞を含む液体と多孔質体の入った密閉容器にピストン等で圧力を負荷する方法、および（４）培養細胞を含む液体と多孔質体の入った容器に遠心力を負荷する方法などが知られている。

30

【0007】

例えば、特許文献１～４には、遠心力を用いて播種する方法が記載されているが、１と４については患者から採取して培養した培養細胞を播種し、また２と３については細胞すべてを材料に播種しており、液体中の細胞の分布状態をコントロールすることはできない。

【0008】

また、特許文献５には、容器内に多孔質体と液体を共存させ、ピストンを容器内面にしゅう動させることで予め多孔質体内に液体を浸透させた後、培養細胞を播種する方法が開示されている。しかし、この方法でも、細胞の分布状態をコントロールすることはできない。このため、従来公知の方法では、液体中の細胞を選択的に濃縮した状態で播種することは困難であった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献１】特開２００２－２８２２８５号公報

【特許文献２】特開２００３－３１９９５３号公報

【特許文献３】特開２００５－１３７４７８号公報

【特許文献４】特開２００５－４００６０号公報

【特許文献５】特開２００６－２５６３５号公報

【発明の概要】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、その解決しようとする課題は、多孔質セラミックス材料内に組織（特に骨組織や軟骨組織）を速やかに誘導するために、予め有用な細胞を採取して培養することなく、骨髓血や末梢血等の細胞含有液体中の有用な細胞の分布状態をコントロールしながら（特に細胞含有液体中の有用な細胞を濃縮した状態にして）多孔質セラミックス材料に細胞を播種するインプラント材料の製造方法、並びに、該方法を実施するためのインプラント材料製造用器具およびインプラント材料製造用キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

10

【0011】

上記の課題を解決するために、本発明は以下の構成を採る。

〔1〕工程（A）：実質的に一方向に配列した気孔を有する多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置へ設置する工程、

工程（B）：該容器に骨髓血および／または末梢血を少なくとも含む細胞含有液体を充填する工程、および

工程（C）：該容器に該容器の軸線に沿う方向の遠心力を作用させる工程を含むインプラント材料の製造方法。

〔2〕工程（A）において、多孔質セラミックス材料をその実質的に一方向に配列した気孔の長軸が容器の軸線に沿うように設置する、上記〔1〕記載のインプラント材料の製造方法。

20

〔3〕工程（C）において、遠心力を $100 \times g \sim 2000 \times g$ に制御する、上記〔1〕または〔2〕記載のインプラント材料の製造方法。

〔4〕工程（C）において、細胞含有液体を遠心分離してバフィーコート層を形成させる、上記〔1〕または〔2〕記載のインプラント材料の製造方法。

〔5〕工程（A）において、多孔質セラミックス材料の少なくとも一部が工程（C）で生成するバフィーコート層と接する位置となるように多孔質セラミックス材料を設置する、上記〔4〕記載のインプラント材料の製造方法。

〔6〕上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の製造方法から得られるインプラント材料。

〔7〕骨髓血および／または末梢血を少なくとも含む細胞含有液体、並びに、多孔質セラミックス材料を収容し得る容器と、

30

前記細胞含有液体中の細胞が通過し得る貫孔を有し、前記容器の内部の任意の深さ位置に前記多孔質セラミックス材料を設置するための、多孔質セラミックス材料位置決め手段とを含む、インプラント材料製造用器具。

〔8〕多孔質セラミックス材料と、

骨髓血および／または末梢血を少なくとも含む細胞含有液体、並びに、前記多孔質セラミックス材料を収容し得る容器と、

前記細胞含有液体中の細胞が通過し得る貫孔を有し、前記容器内部の任意の深さ位置に前記多孔質セラミックス材料を設置するための、多孔質セラミックス材料位置決め手段とを含む、インプラント材料製造用キット。

40

〔9〕多孔質セラミックス材料が、実質的に一方向に配列した気孔を有する多孔質セラミックス材料である、上記〔8〕記載のインプラント材料製造用キット。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、多孔質セラミックス材料の内部に、骨組織形成や軟骨組織形成に有用な細胞を濃縮して播種することができるため、特に骨軟骨補填材などに適したインプラント材料を簡便にかつ効率よく作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明のインプラント材料の製造方法で使用する、多孔質セラミックス材料を容

50

器内部の任意の深さ位置へ設置するための多孔質セラミックス材料位置決め手段の一例の模式図である。

【図2】図1の位置決め手段を用いて多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置に設置した状態の模式図である。

【図3】本発明のインプラント材料の製造方法において、容器内部に多孔質セラミックス材料をその下端がバフイーコート層に接する位置となるように設置し、骨髓血および／または末梢血を充填し、遠心してバフイーコート層を形成させた状態の模式図である。

【図4】図3の要部拡大図である。

【図5】実施例で作製した材料の断面のSEM観察像である。

【図6】比較例1で作製した材料の断面のSEM観察像である。

【図7】比較例2で作製した材料の断面のSEM観察像である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明をその実施形態に即して説明する。

【0015】

本発明に用いる多孔質セラミックス材料は、好ましくはリン酸カルシウム系多孔質セラミックス材料である。

【0016】

リン酸カルシウム系セラミックスとしては、たとえば、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、塩素アパタイト、リン酸三カルシウム、メタリン酸カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸水素カルシウム、リン酸水素カルシウム2水和物などが例示され、また、これらから選ばれる任意の2種以上の混合物であっても良い。また、リン酸カルシウムにおけるCa成分の一部が、Sr、Ba、Mg、Fe、Al、Y、La、Li、Na、K、Ag、Pd、Zn、Pb、Cd、H、および、このほかの希土類元素から選ばれる一種以上で置換されてもよい。また(PO₄)成分の一部が、VO₄、BO₃、SO₄、CO₃、SiO₄などから選ばれる一種以上で置換されてもよい。さらに、(OH)成分の一部が、F、Cl、O、CO₃、I、Brから選ばれる一種以上で置換されてもよい。

【0017】

骨形成の観点から、リン酸カルシウムは、ハイドロキシアパタイト、フッ素アパタイト、塩素アパタイトおよびリン酸三カルシウムから選ばれるものが好ましく、ハイドロキシアパタイトおよび／またはリン酸三カルシウムがより好ましい。

【0018】

本発明に用いる多孔質セラミックス材料の気孔率は好ましくは40～90%であり、より好ましくは50～90%であり、さらに好ましくは60～90%である。気孔率が40%以上であれば、多くの細胞が材料内に浸透・接着するため、十分な組織、例えば骨組織の形成が見込まれる。一方、気孔率90%以下であれば、通常のハンドリングに十分であり、なおかつ遠心操作の際に崩れることもない。

【0019】

気孔率はJIS R 1634に準拠して算出される。具体的には評価対象の多孔質セラミックス材料から直径6mm×高さ8mmの円柱状の試験片を切り出す。その試験片の重量および体積を測定して、以下の式より、気孔率を算出する。

嵩密度＝(試験片の重さ)／(試験片の体積)

気孔率＝(1－嵩密度／理論密度)×100

【0020】

本発明に用いる多孔質セラミックス材料は、実質的に一方向に配列した気孔を有している。「気孔が実質的に一方向に配列する」とは、一軸方向に伸びた気孔が複数存在してそのような気孔のうちの例えば半数以上、好ましくは80%以上の気孔の長軸方向が角度30°以内の範囲で揃っていることをいう。ここでいう「角度」とは、任意平面への気孔の長軸の正写影の交差角度のことである。当該多孔質セラミックス材料は、実質的に一方向に配列した気孔を有することから、血液や骨髓液等の細胞含有液体が気孔を通過して材料

内を通り抜ける細胞含有液透過性を有する。なお、ここでいう「細胞含有液体が気孔を通過する」とは細胞含有液体の液成分（組織液）および細胞が通過することを意味する。

【0021】

セラミックス材料中の各々の気孔の断面積（すなわち、気孔の長軸と直交する断面の面積）は、好ましくは $0.05 \times 10^{-3} \sim 100 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ であり、より好ましくは $0.05 \times 10^{-3} \sim 50 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ である。上記範囲内であれば、血液や骨髓液が通過するのに十分な大きさであり、且つ、毛細管現象により血液や骨髓液などの組織液が通過し易くなる。ただし、本発明の課題解決のために、材料内の全ての気孔が上記断面積をもつことは必ずしも要さない。

【0022】

本発明に用いる多孔質セラミックス材料は、公知の方法により製造することができる。具体的には、セラミックススラリー内に発泡剤により気孔を形成させる方法や、焼成時に炭化する物質を混合しておき、焼結過程において CO_2 などのガスとして消失させることで気孔を形成する方法、スラリーを凝固させた際に生じた氷の昇華痕を気孔とする方法などが挙げられる。また本発明の多孔質セラミックス材料として好ましい、実質的に一方向に配列した気孔を有する多孔質セラミックス材料は、セラミックススラリーを一方向に凍結させることで、一方向に成長した霜柱状の氷を形成させ、これを昇華、焼成することで得ることができる。

【0023】

図1は多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置に設置する多孔質セラミックス材料位置決め手段（以下、単に「位置決め手段」とも略称する。）の一例の模式断面図であり、図2は図1の位置決め手段を用いて多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置に設置した状態の模式図である。

【0024】

多孔質セラミックス材料位置決め手段10は、ストッパー11とアダプター12とからなり、ストッパー11がアダプター12に対してキャップ様に取り付けられる構造になっている。ストッパー11はその軸縁方向の一方の側部に天板を有する筒体であり、アダプター12はストッパー11と連結してストッパー11の天板1の高さ位置を調節するための部材である。ストッパー11の天板1の表面が多孔質セラミックス材料22の載置面となる。

【0025】

ストッパー11の天板1には細胞が通過できる貫孔2が複数形成され、細胞はこの貫孔2を通過して下部（すなわち、アダプター12側）へ自由に移動することができる。この貫孔2の断面（すなわち、貫孔の長軸と直交する断面）の大きさは細胞が通過する大きさであればよく、また、貫孔の断面の形状も特に限定はされないが、例えば、貫孔の断面が円形の貫孔の場合、その孔径（直径）は細胞の透過性の観点から0.5mm以上が好ましく、1.5mm以上がより好ましい。また、天板にかかる遠心力を分散させて支える観点から、6mm以下が好ましく、4mm以下がより好ましい。また全ての貫孔の大きさが均一である必要はなく、天板の断面（すなわち、天板の厚み方向と直交する断面）における貫孔の占める割合（面積率）を上げる目的で、大きいサイズの貫孔の隙間に小さいサイズの貫孔を配置しても良い。貫孔の断面が円形以外の形状の貫孔の場合、貫孔の断面の大きさは上記直径の範囲の円形の面積に相当する大きさとするのが好ましい。

【0026】

ストッパー11の天板1の断面における貫孔2の占める割合（面積率）が多すぎると天板の強度が弱くなる傾向となり、少なすぎると細胞の通過を妨げる傾向になるため、該面積率（〔天板の断面に存在する貫孔の断面の総面積／天板の断面の面積〕×100）は50～95%程度が好ましく、より好ましくは60～90%程度である。また、天板の厚みは、特に限定はされないが、薄すぎると天板の強度が弱くなる傾向となり、厚すぎると位置決めのための可動範囲が小さくなるという観点から1～7mm程度が好ましい。

【0027】

アダプター１２はストッパー１１の天板１を容器２１の深さ方向の中間部に配置させ、かつ、天板１１を容器２１の深さ方向で移動可能に支持するために使用される。

【００２８】

ストッパー１１とアダプター１２とは、ストッパー１１の天板１のアダプター１２に対する高さ（すなわち、天板１のアダプター１２の上端からの離間距離）を変化させることができるように連結されている。

【００２９】

ストッパー１１の天板１のアダプター１２に対する高さを変化させるための手段は、特に限定されず、種々の手段を用いることができるが、操作のし易さ、構造の簡易さ（加工の容易さ）等の観点からネジ機構が好適である。図１の位置決め手段１０は、かかるネジ機構にて連結されるストッパー１１とアダプター１２で構成されており、ストッパー１１の側壁内面と、アダプター１２の側壁外面とが螺合している。

10

【００３０】

本発明における多孔質セラミックス材料位置決め手段１０（ストッパー１１およびアダプター１２）は耐滅菌性を有し、かつ遠心力に耐える強度を有することが重要であり、たとえば、ステンレス鋼などの金属やＰＥＥＫ（ポリエーテルエーテルケトン）などの樹脂で形成されていることが好ましい。

【００３１】

本発明では、インプラント材料を製造するに当たり、先ず、多孔質セラミックス材料を容器内部の任意の深さ位置へ設置する（工程Ａ）。すなわち、該工程（Ａ）では、容器２１の内部に多孔質セラミックス材料位置決め手段１０（ストッパー１１およびアダプター１２）を挿入し、ストッパー１１の天板１に多孔質セラミックス材料２２を載置する。ストッパー１１の天板１のアダプター１２に対する高さを予め所望の高さに設定しておくことで、多孔質セラミックス材料２２は容器２１内部の任意の深さ位置に設置される（図２）。

20

【００３２】

容器２１には、後述の通り、骨髓血、末梢血等の細胞含有液体が充填されるものであり、細胞含有液体中の細胞の分布状態が目視で分かるように透明な素材であることが重要であり、たとえば、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂などの樹脂やガラスなどで形成されていることが好ましい。

30

【００３３】

また、容器２１の形状は、特に限定されるものではないが、後述の通り、容器２１には遠心機にて遠心力を作用させる。このため、遠心機への取り付けが容易なように、円筒状の容器が好ましく使用される。また、上述のとおり、容器２１の内部には、ストッパー１１の天板１のアダプター１２に対する高さが変化する多孔質セラミックス材料位置決め手段１０が挿入されるので、容器２１の少なくともストッパー１１の可動範囲に対応する部分は横断面の形状および大きさが変わらないことが好ましい。

【００３４】

本発明に用いる細胞含有液体は、基本的には、骨髓血および／または末梢血が使用される。また、骨髓血および末梢血は、ヒトまたは動物（特に哺乳動物）由来の骨髓血や末梢血が使用される。

40

【００３５】

また、細胞含有液体は、末梢血および／または骨髓血に、新たに別の細胞や別の細胞含有液体を混合したものでもよい。新たに加える細胞ソースとしては、臍帯血；骨髓血、末梢血、脂肪、臍帯血、胚、海綿骨および骨膜等から採取した幹細胞；並びに該幹細胞を分化させたもの等が挙げられる。また、細胞含有液体にはフィブリンの凝固を防ぐためにヘパリン、クエン酸などの抗凝固剤を添加することもできる。

【００３６】

なお、前述のとおり、本発明で使用する多孔質セラミックス材料２２は実質的に一方向に配列した気孔を有している。そして、図２に示されるように、多孔質セラミックス材料

50

22をその実質的に一方向に配列した気孔22aの長軸が容器21の軸線Lに沿うように設置する。これにより、後述の工程(C)における容器21内に細胞含有液体が充填された状態での遠心力の作用によって細胞含有液体中の細胞が気孔を通過する。なお、「実質的に一方向に配列した気孔22aの長軸が容器の軸線Lに沿う」とは、実質的に一方向に配列した気孔中の半数以上（好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上）の気孔の長軸と容器の軸線との交差角度（気孔の長軸と容器の軸線の任意平面への正写影の交差角度）が30°以内にあることであり、当該交差角度は小さければ小さい程よい。

【0037】

工程(B)では、工程(A)で得られた、その内部の任意の深さ位置に多孔質セラミックス材料22が設置された容器21に細胞含有液体を充填する。容器21の挿入口（入り口）には、例えば、ポリエチレン等からなる着脱可能なキャップ4が取り付けられており、工程(A)から工程(B)へ移行する間、および／または工程(B)から以下に記載の工程(C)へ移行する間等において、容器内に埃等の異物が浸入しないようにキャップ4にて容器21を密閉する。

10

【0038】

工程(C)では、工程(B)で得られた、細胞含有液体が充填され、キャップ4にて密閉された容器21に遠心力を付与する。遠心力は一般的な遠心分離器（遠心力付与手段）を使用して付与すればよく、遠心分離器の回転部を回転させて、容器21にその深さ方向へ向かう遠心力（すなわち、容器21の軸線Lに沿う方向の遠心力（図3中の矢印F））を作用させる。このときの遠心力は、好ましくは100×g～2000×gであり、より好ましくは100×g～1500×gである。

20

【0039】

骨髓血や末梢血等の細胞含有液体を、上記範囲内の遠心力で遠心することで、細胞含有液体は遠心分離されてバフィーコート層を生成する。バフィーコート層には骨や軟骨に分化する能力を有する幹細胞を始めとした有核細胞や、血小板、組織修復に有用なサイトカイン等が濃縮して含まれることが知られている。一方、赤血球は骨や軟骨の組織修復にはほとんど関与しない。

【0040】

図3は容器21に末梢血、骨髓等の細胞含有液体を充填して、上記範囲内の遠心力にて遠心した後の容器21の内部の好ましい状態を模式的に示している。細胞含有液体は遠心分離されて、容器21の底部から上部にかけて赤血球層31、バフィーコート層32および血清層33が形成されている。なお、血清層33はバフィーコート層32の程度には有核細胞およびサイトカインを高濃度に含有していないが、細胞の接着・増殖・分化に有用なタンパク質やサイトカインなどが含まれる。

30

【0041】

遠心時間は容器21の大きさ、使用する細胞含有液体等によっても異なるが、一般的には1～20分であり、好ましくは5～15分である。遠心時間が1分より短いと、細胞と組織液とが十分に分離されない傾向となり、20分より長いと細胞に与えるダメージが大きくなる傾向となる。また、遠心時の容器内の細胞含有液体の温度は好ましくは3～6℃である。

40

【0042】

なお、容器21内の多孔質セラミックス材料22および位置決め手段10（ストッパー11の天板1）は、いずれも細胞含有液体中の細胞が通過し得る孔（気孔22a、貫孔2）を有しているため、容器21内に細胞含有液体を充填して容器に21遠心力を付与すると、多孔質セラミックス材料22および位置決め手段10が容器内に存在しない状態（細胞含有液体のみが容器21内に充填された状態）で遠心力を付与したときと同様に細胞含有液体は遠心分離がなされ、バフィーコート層を生成する。

【0043】

図4は図3の要部の拡大図である。工程(A)での、多孔質セラミックス材料22の容器21内での深さ位置（容器の深さ方向の位置）を、多孔質セラミックス材料22の少な

50

くとも一部が、当該工程（Ｃ）で生成するバフィーコート層３２と接する（重なる）位置となるように設定しておくことで、図４に示されるように、バフィーコート層３２は多孔質セラミックス材料２２の気孔２２ａに浸入して内包され、バフィーコート成分が多孔質セラミックス材料２２の気孔２２ａ内表面に付着する。バフィーコート成分は濃縮された有核細胞、サイトカイン等が含まれており、濃縮された有核細胞、サイトカイン等が骨組織や軟骨組織の再生に極めて効果的に働く。ここで、バフィーコート成分は多孔質セラミックス材料２２の気孔２２ａ内表面に付着しているため、生体内に埋植するまでにインプラント材料から脱落しにくい。図４は多孔質セラミックス材料２２の容器内での設置位置の好ましい態様を示しており、多孔質セラミックス材料２２の下端部がバフィーコート層３２と接し（重なり）、多孔質セラミックス材料２２の残りの部分は血清層と接しており（重なっており）、骨組織や軟骨組織の再生に作用する血清層の成分も多孔質セラミックス材料２２内に付着させている。多孔質セラミックス材料２２としてその厚みがバフィーコート層３２の厚みと同等のものを使用すれば、バフィーコート成分由来の濃縮された有核細胞、サイトカイン等のみはその内部に付着した多孔質セラミックス材料を得ることも可能である。なお、上記の多孔質セラミックス材料２２の下端部とは多孔質セラミックス材料２２における位置決め手段１０に接触する側の端部のことである。

10

【００４４】

工程（Ｃ）でのバフィーコート層３２の生成位置は骨髓血、末梢血等の細胞含有液体を採取する個体によっても異なるが、予め、多孔質セラミックス材料２２のみを除いた状態（すなわち、容器内２１内に位置決め手段１０を挿入し、細胞含有液体を充填した状態）で遠心力を付与することで明らかにすることができる。

20

【００４５】

以上の工程を経ることで、多孔質セラミックス材料２２に細胞含有液体中の有用な細胞が濃縮して播種されたインプラント材料が作製される。

【００４６】

このようにして得られた、本発明のインプラント材料は、骨補填材、骨軟骨補填材、再生医療材料などとして有用である。

【００４７】

さらに、より効率的に骨組織や軟骨組織を再生することを目的として、本発明のインプラント材料は播種された細胞を培養する操作に付してから使用してもよい。また形質転換増殖因子（ＴＧＦ- β ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）などの、組織、たとえば骨組織や軟骨組織に対して成長を促す作用のある物質を、本発明のインプラント材料に含浸、吸着、固定化してもよい。

30

【００４８】

上述の、細胞含有液体および多孔質セラミックス材料を収容し得る容器２１と、多孔質セラミックス材料位置決め手段１０とは、本発明のインプラント材料製造用器具を構成する。また、かかるインプラント材料製造用器具とともに、上述の多孔質セラミックス材料２２を備えることで、本発明のインプラント材料製造用キットが構成される。

【実施例】

【００４９】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に記載の実施例によって限定されるものではない。

40

【００５０】

[バフィーコート位置の確認]

内径が直径１４ｍｍの容量１５ｍＬのグライナー社（ドイツ）製のポリプロピレン製遠心チューブ（円筒型）の容器２１の中に、筒部の外径が直径１３ｍｍのＰＥＥＫ製のストッパー（天板の厚み：５ｍｍ、貫孔：直径２ｍｍの円形貫孔、貫孔の面積率：６０％）１１および該ストッパーとネジ機構で接続される内径が直径７ｍｍの円筒状のアダプター１２を設置した。容器の８ｍＬ目盛りまでウサギ心臓血を充填して、４℃で１５００×ｇで１０分間遠心した。遠心後に容器を取り出し、目視でバフィーコート層の位置を確認した

50

ところ、容器の5.0 mL～5.1 mL目盛りの位置であった。

【0051】

[実施例1]

上記バフイーコート位置の確認実験で使用した容器21、ストッパー11およびアダプター12と同じものを使用し、ストッパー11の天板の上面の位置が容器21の5 mL目盛り位置に設置されるよう、ストッパー11とアダプター12の間のネジ機構により調整した。次に、ストッパー11の天板上に、ハイドロキシアパタイトからなる気孔率75%、気孔の断面積の平均値 $18.6 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ の多孔質セラミックス材料（直径：1.1 mm、高さ10 mmの円柱状）であって、気孔が一方（当該材料の高さ方向）に配列した多孔質セラミックス材料を気孔の配列方向が天板と垂直になるように載置し、さらにその容器21の中にウサギ心臓血を容器21の目盛り8 mLの位置まで充填した。このとき毛細管現象により速やかに血液が多孔質セラミックス材料の内部まで浸透した。その後、4℃で $1500 \times g$ で10分間遠心した。

10

【0052】

[比較例1]

実施例1で使用した容器21と同じものを使用し、ストッパー11およびアダプター12を使用せず、実施例1で使用した多孔質セラミックス材料と同じ多孔質セラミックス材料を使用し、容器21内部の底部に多孔質セラミックス材料を設置し、その容器21の中にウサギ心臓血を容器21の目盛り8 mLの位置まで充填して、10分間静置することにより多孔質セラミックス材料の中にウサギ心臓血を浸透させた。

20

【0053】

[比較例2]

実施例1で使用した容器21、ストッパー11およびアダプター12と同じものを使用し、ストッパー11の天板の上面の位置が容器21の5 mL目盛り位置に設置されるよう、ストッパー11とアダプター12の間のネジ機構により調整した。次に、ストッパー11の天板上に、ハイドロキシアパタイトからなる気孔率55%、気孔の断面積の平均値 $43.2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ の多孔質セラミックス材料（直径：1.1 mm、高さ10 mmの円柱状）であって、3次元網目状気孔構造（気孔が連通していない）を有する多孔質セラミックス材料を載置し、さらにその容器21の中にウサギ心臓血を容器21の目盛り8 mLの位置まで充填した。このとき毛細管現象による多孔質セラミックス材料の内部への血液の浸透は認められなかった。その後、4℃で $1500 \times g$ で10分間遠心した。

30

【0054】

図5は実施例1で調製した材料の断面のSEM観察像である。図5（A）は上面部分の観察像であり、図5（B）は下面部分の観察像である。上部である図5（A）ではほとんど細胞が見られないのに対して、下部である図5（B）では、有核細胞の存在が確認できる。一方、図5（A）においても図5（B）においても、組織再生に必要な赤血球は少ない。

【0055】

図6は比較例1で調製した材料の断面のSEM観察像である。図6（A）は上面部分の観察像であり、図6（B）は下面部分の観察像である。上部である図6（A）においても、下部である図6（B）においても、多数の細胞が確認できるが、そのほとんどは組織再生に必要な赤血球である。

40

【0056】

実施例1と比較例1の対比から、本発明方法によれば、赤血球を排除して、組織修復に有用な細胞を濃縮して多孔質セラミックスに付着できることが分かる。

【0057】

図7は比較例2で調製した材料の断面のSEM観察像である。図7（A）は上面部分の観察像であり、図7（B）は下面部分の観察像である。上部においても下部においても、遠心操作によって内部に侵入した組織再生に必要な赤血球が主に存在するが、下部である図8（B）よりも上部である図8（A）において数が多い。

50

【産業上の利用可能性】

【0058】

本発明は、特に整形外科分野における骨や軟骨欠損の再建において、薬剤などの添加物を用いずに、骨組織や軟骨組織の高い修復効果と調製の簡便性を両立したインプラント材料の製造方法を提供するものである。

【0059】

本出願は日本で出願された特願2010-262538を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含される。

【符号の説明】

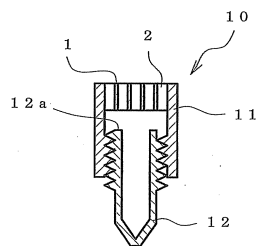
【0060】

- 1 天板
- 2 貫孔
- 10 多孔質セラミックス材料位置決め手段
- 11 ストッパー
- 12 アダプター
- 12a アダプターの上端
- 21 容器
- 22 多孔質セラミックス材料
- 22a 気孔
- 31 赤血球層
- 32 バフィーコート層
- 33 血清層

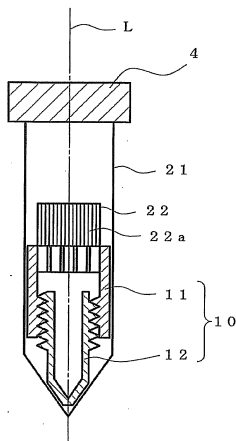
10

20

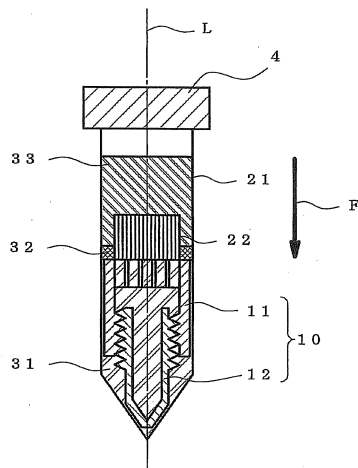
【図1】



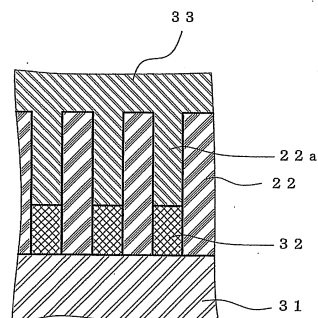
【図2】



【図3】

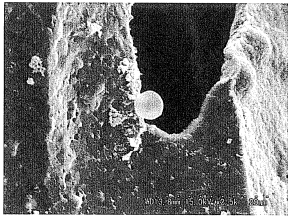


【図4】

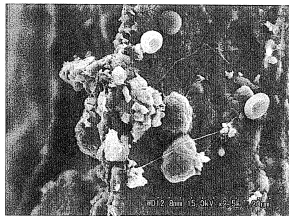


【図 5】

(A)

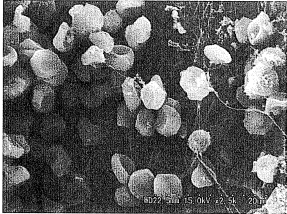


(B)

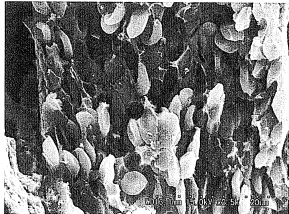


【図 6】

(A)

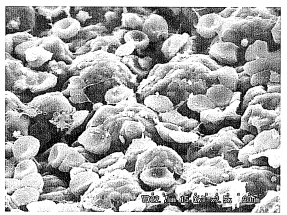


(B)

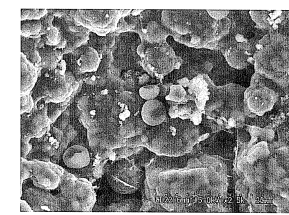


【図 7】

(A)



(B)



フロントページの続き

- (74)代理人 100122688
弁理士 山本 健二
- (74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 堀田 裕司
岡山県倉敷市酒津2045番地の1 株式会社クラレ内
- (72)発明者 坂根 正孝
茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内

審査官 牧野 晃久

- (56)参考文献 特表2002-515288 (JP, A)
特開2002-282285 (JP, A)
特開2005-040060 (JP, A)
国際公開第2008/111432 (WO, A1)
特開2010-018459 (JP, A)
特表2003-517259 (JP, A)
特表2007-527221 (JP, A)
国際公開第2007/148788 (WO, A1)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61L 15/00- 33/00
A61F 2/00- 2/97
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)