(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2018-19944
(P2018-19944A)
(43)公開日　平成30年2月8日(2018.2.8)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61L 27/00	(2006.01)	A61L 27/00	F	4C081

審査請求 未請求　請求項の数 15　ＯＬ　（全 14 頁）

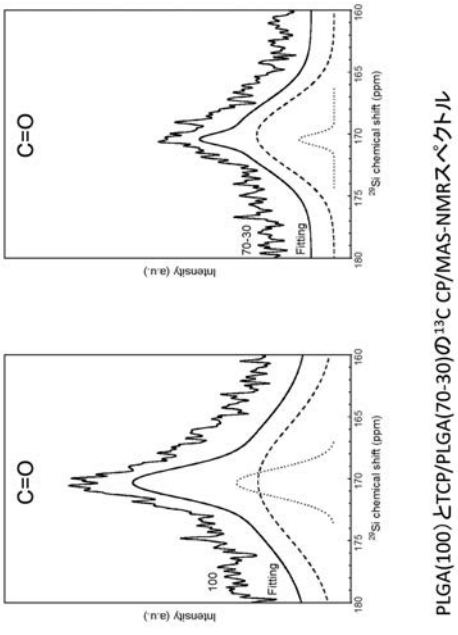
(21)出願番号　特願2016-153415 (P2016-153415)
(22)出願日　平成28年8月4日 (2016.8.4)

(71)出願人　304021277
国立大学法人　名古屋工業大学
愛知県名古屋市昭和区御器所町字木市２９番
(71)出願人　511267996
ＯＲＴＨＯＲＥＢＩＲＴＨ株式会社
神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東三丁目１７番４３号
(74)代理人　100126826
弁理士　二宮　克之
(74)代理人　100107272
弁理士　田村　敬二郎
(74)代理人　100109140
弁理士　小林　研一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生分解性繊維からなる骨再生用材料、及び骨再生用材料を製造するための方法

(57)【要約】
【課題】　PLGAにβ相リン酸三カルシウム粒子を含有する生分解性繊維からなる安全性の高い骨再生用材料、および製造方法が求められている。
【解決手段】
生分解性繊維からなる骨再生用材料であって、前記生分解性繊維は実質的にポリ乳酸-グリコール酸共重合体とβ相リン酸三カルシウム微粒子のみからなり、前記β相リン酸三カルシウム微粒子は、前駆体である非晶質リン酸カルシウムを、リン酸三カルシウムのβ相がα相に転移する実質的に直前の温度で焼成することによって、非晶質部分が実質的に存在していない高純度のβ相リン酸三カルシウムとして調製されており、前記β相リン酸三カルシウム微粒子は、カルシウムイオンと前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の官能基とが配位していない状態で、前記生分解性繊維中に分散している、前記生分解性繊維からなる骨再生用材料。
【選択図】図3(2)



PLGA(100)とTCP/PLGA(70-30)の13C CP/MAS-NMRスペクトル

【特許請求の範囲】
【請求項１】
生分解性繊維からなる骨再生用材料であって、

前記生分解性繊維は実質的にポリ乳酸-グリコール酸共重合体とβ相リン酸三カルシウム微粒子のみからなり、

前記β相リン酸三カルシウム微粒子は、前駆体である非晶質リン酸カルシウムを、リン酸三カルシウムのβ相がα相に転移する実質的に直前の温度で焼成することによって、非晶質部分が実質的に存在していない高純度のβ相リン酸三カルシウムとして調製されており、

前記β相リン酸三カルシウム微粒子は、カルシウムイオンとポリ乳酸-グリコール酸共重合体の官能基とが配位していない状態で、前記生分解性繊維中に分散している、

前記生分解性繊維からなる骨再生用材料。
【請求項２】
前記生分解性繊維はエレクトロスピニング法によって製造されたものである、請求項１に記載の骨再生用材料。
【請求項３】
前記生分解性繊維は、実質的にポリ乳酸-グリコール酸共重合体約３０～６０重量％と、β相リン酸三カルシウム微粒子約７０～４０重量％のみからなり、前記β相リン酸三カルシウム微粒子は、前記生分解性繊維中で凝集せずにほぼ均一に分散している、請求項１又は２に記載の骨再生用材料。
【請求項４】
前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体は、L体のみを含む乳酸とグリコール酸との共重合体である、請求項１～３のいずれか一項に記載の骨再生用材料。
【請求項５】
前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体は、L体とD体が混在した乳酸とグリコール酸との共重合体である、請求項１～４のいずれか一項に記載の骨再生用材料。
【請求項６】
前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の乳酸とグリコール酸の比率は略８５～５０：１５～５０である、請求項１～５のいずれか一項に記載の骨再生用材料。
【請求項７】
前記β相リン酸三カルシウム粒子の外径は０．５～４μｍである、請求項１～６のいずれか一項に記載の骨再生用材料。
【請求項８】
前記生分解性繊維の外径は１０～１５０μｍである、請求項１～７のいずれか一項に記載の骨再生用材料。
【請求項９】
生分解性繊維からなる骨再生用材料の製造方法であって、

前駆体である非晶質リン酸カルシウムを、リン酸三カルシウムのβ相がα相に転移する実質的に直前の温度で焼成することによって調製し、

ポリ乳酸-グリコール酸共重合体をガラス転移点以上の温度でニーダーで加熱して軟化させた後、前記ニーダーに非晶質部分が実質的に存在していない高純度のβ相リン酸三カルシウムの微粒子を投入して熱的かつ機械的エネルギーをかけて混練しその後冷却固化することによって前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体中に前記β相リン酸三カルシウム微粒子が凝集せずに略均一に分散した複合体を作製し、

前記複合体を溶媒で溶かすことによって紡糸溶液を作製し、

前記紡糸溶液をエレクトロスピニング法で紡糸することによって、前記β相リン酸三カルシウムのカルシウムイオンと前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の官能基とが配位していない状態で、前記β相リン酸三カルシウム微粒子が分散している生分解性繊維を作製する、

生分解性繊維からなる骨再生用材料の製造方法。

【請求項１０】

前記ニーダーに前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体約３０～６０重量%、前記β相リン酸三カルシウム微粒子約７０～４０重量%となる量投入して混練する、請求項９に記載の骨再生用材料の製造方法。

【請求項１１】

前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体は、L体のみを含む乳酸とグリコール酸との共重合体である請求項９又は１０に記載の骨再生用材料の製造方法。

【請求項１２】

前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体は、L体とD体が混在した乳酸とグリコール酸との共重合体である請求項９～１１のいずれか一項に記載の骨再生用材料の製造方法。

【請求項１３】

前記ポリ乳酸-グリコール酸共重合体の乳酸とグリコール酸の比率は略８５～５０：１５～５０である請求項９～１２のいずれか一項に記載の骨再生用材料の製造方法。

【請求項１４】

前記β相リン酸三カルシウム粒子の外径は０．５～４μｍである請求項９～１３のいずれか一項に記載の骨再生用材料の製造方法。

【請求項１５】

前記生分解性繊維の外径は１０～１５０μｍである請求項９～１４のいずれか一項に記載の骨再生用材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、生分解性繊維からなる骨再生用材料、及び骨再生用材料を製造するための方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

骨再生医療の分野では、 ポリ乳酸（以下PLAと称する）、ポリ乳酸―グリコール酸共重合体（以下PLGAと称する）等の生分解性樹脂に骨形成因子を含有させて作製した生分解性繊維からなる骨再生材料を骨欠損部に埋め込む方法が実施されている。骨再生材料が体内に埋め込まれた後、体液に接して分解されて、含有された骨形成因子が徐放されると共に、時間の経過とともに体内に吸収されて消失するため、効果的な骨形成が得られると共に、患者の負担が少なくて済む。

【０００３】

骨再生用材料が人の体内に埋め込まれて骨形成活性を発揮するためには、マトリクス樹脂は足場材(scaffold)として骨形成因子を徐放可能に担持できることが求められる。骨形成因子としてはリン三酸カルシウム、特にβ相リン酸三カルシウム（以下β-TCPと称する）が優れた骨形成活性を有するので好適に用いられている。β-TCPによる骨吸収・置換をスムーズに発揮させるためには、マトリクス樹脂は体液と接触してできるだけ早期に加水分解してリン酸三カルシウムの徐放を開始して、その後速やかに分解吸収されて消滅することが望ましい。ＰＬＧＡは人体にインプラントされた後吸収分解される速度が速いので、β-TCPの早期の吸収と骨置換を促す上で優れている。

【０００４】
β-TCPは、一般に前駆体である非晶質リン酸カルシウムを焼結して結晶化させて製造される。焼結温度を８００℃～１１００℃とすると、β相のTCPが得られ、それよりも高温にして１２００℃近辺とするとTCPの結晶はα相に転移する。α－TCPは体内での吸収速度が速いので、TCPは早期に消失してしまい、骨に置換されないことが多いので、整形外科用の骨欠損部充填材料としては不適である。β-TCPは、α－TCPより体内での吸収速度が遅いので、十分な骨置換が得られるので、整形外科用の骨欠損部充填材料として好適に用いられている。
【０００５】
β-TCPの多孔体は優れた骨形成活性を有するので骨補填材として用いられているが、製造するにあたってリン酸カルシウムを焼結して結晶相がβからαに転移してしまうことを避けるために焼成温度を１１００℃近辺以上に上げられない。その結果、β-TCPの多孔体の骨格部分が十分に焼結せず他のリン酸カルシウム多孔体に比べて機械的強度が弱いという問題がある。しかし、β-TCPを単独で用いるのでなく、生分解性樹脂にβ-TCPを含有させた生分解性繊維からなる骨再生材料として用いるのであれば、β-TCP多孔体の機械的強度の不足が問題となることはない。そこで、近時、β-TCP粒子を含有させた生分解性繊維が有力な骨再生用材料として開発が進められている。
【０００６】
β-TCPを生分解性樹脂に含有させることは、しかし、骨再生用材料の安全性に関して別の課題を提起する。整形外科用の骨再生用材料は人の体内に埋め込まれて用いられるので、材料を構成している化合物の人体に対する安全性を確保することが極めて重要である。生分解性繊維からなる骨再生材料においては、骨形成因子である無機粒子と生分解性樹脂がそれぞれ薬事法上の安全性承認を得ている安全な材料であっても、両者が化学的に結合して化合物を形成している場合には、その化合物を形成した状態の材料の安全性がさらに確認証明されなければならない。
【０００７】
β-TCPと生分解性樹脂の複合体を製造する過程で、リン酸カルシウムのカルシウムがイオン化して、生分解性樹脂の官能基と化学的結合を生じる可能性が指摘されている。「βリン酸カルシウム／ポリ乳酸共重合体複合体中の化学的相互作用 菊池正紀他 Journal of the Ceramic Society of Japan 108[7] 642-645 (2000)」は、β-TCPとCPLAをニーダーを用いて混練して複合体を作製すると、CPLAのカルボニル基がTCPのカルシウムイオンと反応して弱い結合を生じることを開示している。同文献では、$Ca(OH)_2$とH_3PO_4をstarting materialとして湿式合成法を用いてリン酸カルシウムを合成して、それを1073K (=800℃)、1373K (=1100℃)で焼結してβ-TCP_{1073}, β-TCP_{1373}を調製している。しかし、同文献がIR spectrumでＴＣＰのCa^{2+}と$C{=}O^{\sigma-}$との間にchemical bondingが存在することを測定しているのは、β-TCP_{1073}についてのみである。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】βリン酸カルシウム／ポリ乳酸共重合体複合体中の化学的相互作用 菊池正紀他 Journal of the Ceramic Society of Japan 108[7] 642-645 (2000)
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
生分解性樹脂にβ-TCPを含有した生分解性繊維を骨再生材料として用いる場合、β-TCPと生分解性樹脂との間に何らかの化学的結合が生じていると、その結合を有する状態での人体に対する安全性が確認証明されなければならなくなるので、骨再生材料としての安全性の確保の観点からは化学的結合の存在は望ましくない。しかし、生分解性樹脂はカルボキシル基、カルボニル基等の官能基を有しており、これらの官能基はカルシウムイオンとの結合を生じやすい。特に、生分解性樹脂とβ-TCPの複合体をエレクトロスピニング等の方

法を用いて生分解性繊維とする場合には、混練、樹脂溶液との撹拌等の工程を踏む過程で、生分解性樹脂の官能基とβ-TCPのカルシウムイオンとの結合を生じやすいので、実際上重要な問題である。

【００１０】

以上のような状況下で、β-TCPと生分解性樹脂を含む生分解性繊維からなる骨再生用材料を商業的に実用可能にするために人体に対する安全性の問題をクリアできる、新たな骨再生用材料、およびその製造方法が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【００１１】

上記の問題を解決するために、本発明の発明者等は実験を重ねて鋭意検討した結果、β-TCPが非晶質相を実質的に含まないように高純度に結晶化していると、生分解性樹脂の官能基とβ-TCPのカルシウムイオンとの間に化学的結合が存在していないことを発見した。その発見に基づいて発明者等は、リン酸カルシウムを高純度にβ相に結晶化したβ-TCPを生分解性樹脂に含有させて生分解性繊維とすることによって、生分解性樹脂の官能基とβ-TCPのカルシウムイオンとが化学的に結合していない生分解性繊維からなる骨再生材料を製造できることに想到した。

【００１２】

本発明の一つの実施態様は、生分解性繊維からなる骨再生用材料であって、前記生分解性繊維は、実質的にPLGA樹脂と、β-TCP微粒子のみからなり、前記β-TCP微粒子は、前駆体である非晶質リン酸カルシウムを、TCPのβ相がα相に転移する実質的に直前の温度で焼成することによって、非晶質部分が実質的に存在していない高純度のβ-TCPとして調製されており、前記β-TCP微粒子は、カルシウムイオンとPLGA樹脂の官能基とが配位していない状態で、前記生分解性繊維中に分散している、生分解性繊維からなる骨再生用材料である。

【００１３】

好ましくは、前記生分解性繊維は、実質的にPLGA約３０～６０重量％と、β-TCP微粒子約７０～４０重量％のみからなり、前記β-TCP微粒子は、前記生分解性繊維中で凝集せずにほぼ均一に分散している。

【００１４】

本発明の一つの実施態様は、生分解性繊維からなる骨再生用材料の製造方法であって、
前駆体である非晶質リン酸カルシウムを、TCPのβ相がα相に転移する実質的に直前の温度で焼成することによって非晶質部分が実質的に存在していない高純度のβ-TCPの微粒子を調製し、
PLGA樹脂をガラス転移点以上の温度でニーダーで加熱して軟化させた後、前記ニーダーに前記β-TCPの微粒子を投入して混合して熱的かつ機械的エネルギーをかけて混練しその後冷却固化することによって前記PLGA樹脂中に前記β-TCP微粒子が分散した複合体を作製し、
前記複合体を溶媒で溶かすことによって紡糸溶液を作製し、
前記紡糸溶液を紡糸することによって、前記β-TCPのカルシウムイオンと前記PLGA樹脂の官能基とが配位していない状態で、前記β-TCP微粒子が分散している生分解性繊維を作製する、
生分解性繊維からなる骨再生用材料の製造方法である。

【００１５】

好ましくは、前記ニーダーに前記PLGAが約３０～６０重量％、前記β-TCP微粒子が約７０～４０重量％となる量投入して混練しその後冷却固化することによって前記PLGA中に前記β-TCP微粒子が略均一に分散した複合体を作製し、
前記複合体を溶媒で溶かすことによって紡糸溶液を作製し、
前記紡糸溶液をエレクトロスピニング法で紡糸することによって、前記β-TCPのカルシウムイオンと前記PLGAの官能基とが配位していない状態で、前記β-TCP微粒子が凝集せずにほぼ均一に分散している生分解性繊維を作製する。

【００１６】
紡糸溶液の作製において、加熱して軟化したＰＬＧＡ樹脂をニーダーでβ-TCP微粒子と共に熱的かつ機械的エネルギーをかけて混練する工程を経ることで、PLGA約３０～６０重量％に対してβ-TCP微粒子約７０～４０重量％となる量を粒子を凝集させずにPLGA樹脂中に均一に分散させることが可能になる。混練工程を踏むことは、PLGA樹脂中にβ-TCP微粒子を均一に分散させるためには極めて有効な方法であるが、他面、PLGAの官能基とカルシウムイオンの結合を生じる可能性が高くなる。しかし、TCPがβ相に高純度に結晶化しているため、ＰＬＧＡの官能基にさらされても、カルシウムイオンとの配位は生じない。
【００１７】
好ましくは、前記PLGAは、L体のみを含むPLAとPGAとの共重合体である。
【００１８】
好ましくは、前記PLGAは、L体とD体が混在したPLAとPGAとの共重合体である。
【００１９】
好ましくは、前記PLGAの乳酸とグリコール酸の比率は略８５～５０：１５～５０である。
【００２０】
好ましくは、前記β-TCP粒子の外径は０．５～４μｍである。
【００２１】
好ましくは、前記生分解性繊維の外径は１０～１５０μｍである。
【００２２】
本発明の骨再生用材料は、薬事法上の承認を得た安全な材料であるβ-TCPとPLGAのみからなり、尚且つ、両者の間に化学的結合が生じていないので、安全性が確保された骨再生用材料として商業的に実用することが可能である。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１】本発明の実施例である骨再生用材料の概観写真である。
【図２】本発明の実施例である骨再生用材料の生分解性繊維の概観写真である。
【図３（１）】サンプル（１）と（２）についてNMR測定した結果を示す。
【図３（２）】図３（１）のカルボニル基（C=O;～170 ppm）周辺のフェーズを合わせて拡大し、ピークフィッティングした図を示す。
【図３（３）】サンプル（３）のNMR測定した結果を示す。
【図３（４）】図３（３）のカルボニル基（C=O;～170 ppm）周辺のフェーズを合わせて拡大し、ピークフィッティングした図を示す。
【図４】本発明で用いるβ－TCPのXRD測定の結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２４】
以下、本発明の実施態様を図面を参照しながら詳細に説明する。
【００２５】
＜生分解性樹脂＞
本発明の骨再生用材料の生分解性繊維の樹脂には、ＰＬＡ，PLGAを用いることができるが、PLGAが特に好適に用いられる。本発明でPLGAとは、ポリ乳酸とポリグリコール酸の共重合体を広く含む。
【００２６】
本発明の生分解性樹脂としてPLGAを用いる場合、 PLGAの乳酸とグリコール酸の比率は必要に応じて適宜選択され、85対15、75対25、50対50のものを含む。
【００２７】
ポリ乳酸（PLA）には、異性体であるL体のみを重合させたポリ-L-乳酸（PLLA）とD体のみを重合させたポリ-D-乳酸（PDLA）と、D、L両方の乳酸が混在したPDLAがあるが、本発明のPLGAはこれらのいずれのタイプのポリ乳酸とポリグリコール酸との共重合体であっても良い。本出願ではPLLAとPGAの共重合体をPLLGAと称し、PDLAとPGAの共重合体をPDLGAと称する。

【００２８】
＜β-TCP＞
本発明の骨再生用材料に用いる骨形成因子には、β-TCPの微粒子を好適に用いる。β－リン酸三カルシウム（β-TCP）は、骨芽細胞系の細胞の増殖と分化のためのscaffoldになる物質として好適である。β-TCPの外見はパウダー状である。パウダーを構成する粒子の径は０．５～４μｍのものが好ましい。本発明の骨再生用材料を構成する繊維の外径が１０～１５０μｍであることからすると、粒子径は４μｍ以下程度のものが好適である。
【００２９】
本発明のβ-TCPは非晶質リン酸カルシウムを焼成して高純度にβ相に結晶化させて製造したものを用いることが好ましい。 TCPが結晶性であり非晶質相がほとんどないものであれば、 生分解性樹脂との混練を経ても樹脂の官能基との結合が生じない。発明者等は実験検討を重ねた結果、リン酸カルシウムをβ相がα相に転移する直前の高温度で焼成すると、非晶質相がほとんどない高純度のβ-TCPが得られ、それを生分解性樹脂に含有させて複合体とすると、両者間に化学的結合が生じないことを発見した。
【００３０】
高純度のβ-TCPを用いると生分解性樹脂との間に化学的結合が生じない理由は発明者等の知見によれば、リン酸カルシウムが非晶質相の場合には、原子配列がランダムであり、結晶よりエネルギーの高い状態にあり、カルシウムはイオンとして存在しているので、一部のカルシウムイオンは動きやすくカルボニル基と配位することでエネルギーを下げると考えられる。これに対して、ＴＣＰが結晶相の場合には、原子はきちんと整列して並んでいる状態であるので、原子がその結合を切って生分解性樹脂の官能基と結合を作ることはないことによると考えられる。
【００３１】
＜生分解性繊維の製造＞
本発明の骨再生用材料を形成する生分解性繊維の製造方法は、生分解性樹脂にβ-TCP微粒子を含有した外径が数ミクロン～数十ミクロンの繊維を紡糸できる限り、特に限定されない。エレクトロスピニング法は、細い外径の生分解性繊維を簡単な設備で商業的に製造できるので、本発明の実施例として好適に用いることができる。
【００３２】
１．エレクトロスピニング法
（１）混練による複合体の作製
ペレット状のPLGA樹脂をニーダーに投入し、 PLGAが十分に軟化する温度まで加熱する。次いで、粉末状のβ-TCP微粒子をニーダーに投入してPLGAと混合して一定時間混錬することで、β-TCP微粒子とPLGAの複合体を作製する。
【００３３】
複合体の重量比は、PLGAが約３０～６０重量％、β-TCP微粒子が約７０～４０重量％であることが好ましい。さらに好ましくは、PLGAが約３０～５０重量％、β-TCP微粒子が約７０～５０重量％である。またさらに好ましくは、 PLGA が約３０重量％、β-TCP微粒子にが約７０重量％である。
本発明においてPLGAとβ-TCP微粒子の適当な重量比率を一桁の％レベルまで厳密にコントロールするのは困難であるので、上記の数値範囲から前後 5％は範囲内として考慮されるべきである。
【００３４】
骨再生用材料の骨形成活性を高めるためにはできるだけβ-TCP微粒子の含有量を増やすことが望ましい。しかしエレクトロスピニング法を用いる場合には、β-TCP微粒子の量を70重量％を実質的に超えて、例えば80重量％にすると、複合体から紡糸溶液を調製してエレクトロスピニングで紡糸することが難しくなる。
【００３５】
β-TCP微粒子は軟化したPLGAと混合されると凝集を生じるが、一定の粘度のPLGAと共にニーダーで一定時間熱的かつ機械的エネルギーをかけて混練すると、β-TCP微粒子の凝集が

物理的に解砕されて、粒子間にポリマーが侵入し、PLGA中にリン酸カルシウム微粒子が実質的に均一に分散した状態を得ることができる。ここで、熱的かつ機械的エネルギーをかけるとは、 PLGA樹脂を加熱することによって軟化させて高粘度状態にした状況で力をかけて練ることをいう。高粘度な状態で練られることによって、樹脂に含有されているβ-TCP微粒子の凝集体が物理的に解砕される。

【００３６】

本発明で用いるニーダーとしては、高粘度の混練、または固体の粉砕を伴う混練に適したタイプの混練機が好適である。β-TCP微粒子を高粘度のPLGA中で効率的に解砕するには、例えば、2枚のスクリュー型の羽根が切断不等速運動で羽根と壁面により剪断混合され特に強力な粉砕捏和を行うＰＢＶ型ニーダーが適している。また、カートリッジヒーター等を備えて、短時間で樹脂の融点まで加熱できるものであることが望ましい。

【００３７】

ニーダーでβ-TCP微粒子に熱的・機械的エネルギーをかけるためには、加熱して軟化したPLGAは一定以上の粘度を有することが必要である。適当な粘度とするために必要な加熱する温度は、 PLGAの種類によって異なる。PLLGA（85:15）では、160℃近辺が好ましい。加熱する温度がより低い温度、（例えばPLLGAで140℃）であっても、 PLGAが軟化してニーダーで練ることが出来る限り、含有する微粒子の凝集体を解砕することが可能である。しかしその場合にはPLGAの粘度が高くなるので、ニーダーで練るためには、より強い力が必要になる。

【００３８】

加熱する温度をさらに上げると（例えばPLLGAで160℃近辺からさらに上げて190℃以上にすると）、 PLGAの粘度が下り、その結果混練によって機械的エネルギーがかかりにくくなり、β-TCP微粒子の凝集を解砕しづらくなり、その結果β-TCP微粒子をPLGA中に均一に分散させづらくなる。

【００３９】

本発明ではPLGAを先にニーダーに投入して加熱し、その後TCP微粒子を投入して混練するほか、 PLGAとβ-TCP微粒子を同時にニーダーに投入して混合混練しても良いし、 PLGAとTCP微粒子を混合した混合物をニーダーに投入して混練しても良い。 PLGAの結晶化度が低いものを用いる場合には加熱したときの粘度が低くなるので、PLGAを先に加熱することをせずにTCP粒子と同時にニーダーに投入して混練する方が熱的・機械的エネルギーをかけやすい。

【００４０】

（２）複合体の冷却、固化

上記で調製された複合体をニーダーから取り出して常温冷却して固化させる。

【００４１】

ニーダー中で軟化したPLGAとTCP微粒子を混練して熱的かつ機械的エネルギーをかけてβ-TCP微粒子を分散させると、その過程でPLGAの分子の末端部が増えて多数の核サイトが形成されるので、複合体を冷却する過程でその多数の核サイトを起点としてPLGAの結晶成長が進むと考えられる。しかし、ブロック共重合体であるPLGA、特にPDLGAはもともと非晶質性が高く結晶化の速度が遅いので、混練を経て多数の核サイトが形成されていても、β-TCP微粒子を核とする結晶成長はそれほど進まないと考えられる。

【００４２】

（３）溶媒による複合体の溶解

上記で製造した複合体を溶媒の溶液中に投入して撹拌して複合体を溶解して紡糸溶液を作製する。エレクトロスピニングの紡糸溶液とするためには複合体は溶媒によってほぼ完全に溶解されていることが必要である。そのために複合体を溶解するには、マグネチックスターラー等を用いて、溶媒液中で4時間以上撹拌することが望ましい。

【００４３】

本発明で用いる溶媒としては、PLGAに対する溶解性が良く、尚且つエレクトロスピニングの過程で繊維から溶媒を効率的に蒸発させることができる点で、クロロホルムを好適に用

いることができる。
【００４４】
溶媒で溶かした紡糸溶液の樹脂濃度は必要に応じて適宜選択調整されるが、8重量%～１２重量%であることがエレクトロスピニングでの紡糸にとって好ましい。
【００４５】
溶媒で溶解されるとPLGAの分子鎖がほどけて分子鎖間の拘束力がなくなり分散し、配列していた分子鎖は自由度が与えられる。その後エレクトロスピニングを経て溶媒を除去された生分解性繊維のPLGAの分子は繊維の固化に伴って再配列されると考えられる。
【００４６】
上記で調製された紡糸溶液をエレクトロスピニングの装置のシリンジに充填し、ノズルに電荷をかけて一定の方法／条件下でノズルから紡糸溶液を繊維状に出射することによってエレクトロスピニングで生分解性繊維を紡糸する。
【００４７】
本発明のエレクトロスピニング法としては、乾式-湿式-電界紡糸法（Dry-Jet-Wet-Electrospinning）を好適に用いることができる。乾式-湿式-電界紡糸法は、繊維をノズルから飛ばして、飛行中に溶剤が蒸発して固化した繊維をコレクター槽のエタノール液の液面に入射させて、繊維を液中に沈殿させてコレクター槽内に綿状に堆積させる。生分解性樹脂は、クロロホルムには溶解されてＥＳ紡糸溶液となるが、コレクター槽に満たすエタノールには溶解されないので、繊維が液相中に堆積される。乾式-湿式-電界紡糸法については、Study on the Morphologies and Formational Mechanism of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Ultrafine Fibers by Dry-Jet-Wet-Electrospinning、Shuqi et al. Journal of Nanomaterials Volume 2012 Hindwi Publishing Corporation October 2012、及び特開２０１２－１６１３６３、米国特許番号８８５３２９８等に詳細に開示されている。
【００４８】
本発明の好ましい実施例では、ノズルから出射された繊維はエタノール液を満たしたコレクター容器に沈殿してコレクター容器のプレート上に堆積される。エタノール液中で生分解性繊維の表面からクロロホルムが除去されて、その結果コレクタープレート上に堆積された繊維同士が互いに接着するのを防ぐことができるので、図１に示すような、ふわふわ感のある綿状物を得ることができる。本発明の生分解性繊維からなる綿状の骨再生用材料は、０．００１～０．１ｇ／ｃｍ^{3}程度の嵩密度を有する。好ましくは、０．０１～０．１ｇ／ｃｍ^3、さらに好ましくは、０．０１～０．０４ｇ／ｃｍ^{3}である。図３に本発明の骨再生用材料の使用例を示す。本発明の骨再生用材料は、繊維の外径が、１０～１５０μｍの範囲にあり、かつ綿の嵩密度が上記の範囲にあるので取り扱い性が優れている。
【００４９】
２．生分解性繊維のその他の製造方法
本発明の生分解性繊維の製造方法は、エレクトロスピニング法に限られるわけではなく、それ以外の従来から公知である紡糸方法によっても製造可能である。
【００５０】
＜生分解性繊維＞
図１は、本発明の実施例のエレクトロスピニングを用いて製造された綿状の骨再生用材料の外観を示す。図２は、本発明の実施例のエレクトロスピニングを用いて製造された生分解性繊維の外観写真を示す。繊維の外径はバラつきがあり、大体１０～１５０μｍの範囲にあるが、好ましい平均径は１０～５０μｍである。エレクトロスピニングで紡糸すると繊維は一般に数μｍ以下の外径になりやすいが、それと比較すると本発明の骨再生用材の生分解性繊維は太い。繊維の外径が１０μｍ以上とすることで、本発明の綿状多孔体の内部に細胞が侵入していくために必要な繊維と繊維の間のスペース（ギャップ）を作り出すことが可能になる。
【００５１】
本発明の生分解性繊維で作成した骨再生用材料は加水分解の速度が速く、人の体内にイン

プラントされた後直ちに分解が開始し、その後数ヶ月以内に体内に吸収されて消滅する。
【００５２】
本発明の骨再生用材料の生分解性繊維は繊維表面には超微細な無数の孔が形成されている。エレクトロスピニングによる紡糸では、ノズルから繊維状に射出された紡糸溶液が揮発する過程で、繊維表面に微細孔が形成される。本発明の骨再生用材料では、生分解性繊維に超微細孔が形成されていることで、含有するセラミック粒子（骨形成因子）と体液との接触面積が著しく増加しており、その結果高い骨形成能が得られる。
【００５３】
＜滅菌処理＞
本発明の骨再生用材料は、エレクトロスピニングで綿状に形成した後、ピンセット等を用いて所望のサイズ／重量に取り分けた上で、アルミ包装して滅菌処理を施すことが望ましい。滅菌の方法としては、放射線滅菌（ガンマ線、電子線）、酸化エチレンガス滅菌、高圧蒸気滅菌等がある。本発明ではγ線による放射線滅菌を好適に用いる。
【００５４】
実験
１）実験の内容
PLGAとβ-TCP からなる生分解性繊維のサンプル(1) 70TCP-30PLGA, (2) 100PLGA, (3) 70TCP-30PLGA(混練なし)を作製し、各サンプルのPLGAとβ-TCPの間の化学的結合の有無をＮＭＲ測定で調べた。(1)はPLGA：β-TCPを30：70になるようにニーダーを用いて混練し、エレクトロスピニングで紡糸した繊維であり、(2)はPLGAのみをニーダーで混練し、エレクトロスピニングで紡糸した繊維である。（3）は（1）と同じ組成で、ニーダー工程を行わずに、直接PLGAとβ-ＴＣＰをクロロホルムに溶解し、エレクトロスピニングで作製したサンプルである。
【００５５】
(1)　70TCP-30PLGA
(2)　100PLGA
(3)　70TCP-30PLGA(混練なし)
【００５６】
＜サンプル作製に用いた材料＞
・β-TCP（Ca3(PO4)2）：太平化学産業株式会社のβ-ＴＣＰ-１００を用いた。粒径１．７ｍｍ以下のものを４μｍ程度に粉砕したもの（β-ＴＣＰ粉砕品）を用いた。
実験で用いたβ-TCPについてXRD測定した結果を図４に示す。明確なピークの存在が本発明で用いるβ-TCPが結晶性の純度が高く、アモルファス部分がほとんど存在していない事を示している。
・PLGA： Evonik社製 RESOMER LG855Sを使用した。
【００５７】
＜サンプルの作製条件＞
・ニーダー条件
ニーダー：　卓上ニーダー　PBV-0.1（株式会社入江商会提供）。
温度： 160℃
時間：サンプル（1）については、PLGAだけで3分半、その後β-ＴＣＰを入れて11分、合計で14分半混練した。
サンプル（2）については、PLGAのみで14分半混練した。
サンプル（3）については、ニーダー工程は行わず、PLGAとβ-ＴＣＰを直接クロロホルムに入れ、紡糸溶液を作製した。
【００５８】
・ES条件
ES装置： NANON （株式会社MECC提供）
　溶媒：クロロホルム
　溶媒中の樹脂濃度：8wt%

電圧　サンプル（1），(2)：28ｋV
　　サンプル（3）：25ｋV
押し出し速度：15ml/h
針の太さ：18G
ノズルからコレクターまでの飛距離は２５ｃｍとした。コレクター容器にはエタノール液を満たして、エレクトロスピニングされた糸を受けて、堆積させた。その後、堆積した生分解性繊維をコレクターから回収し、洗浄後乾燥させることでサンプル(1)，(2)，(3)を得た。

【００５９】

＜NMR測定＞

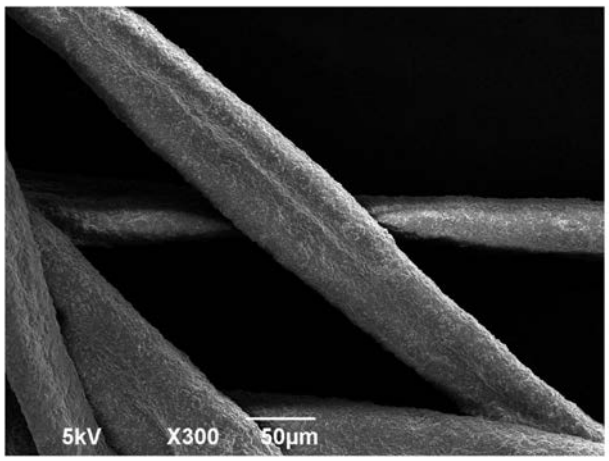
サンプル(1)，(2)，(3)において、PLGAとTCPのカルシウムイオンとの間に配位を生じているか否かをNMRで調べた。
サンプル(1)と(2)の13C CP/MAS-NMRスペクトルを測定した結果を図３（１）に示す。図３（２）は、図３（１）のカルボニル基（C=O;～170 ppm）周辺のフェーズを合わせて拡大し、ピークフィッティングしたものである。
また、サンプル(3)の13C CP/MAS-NMRスペクトルを測定した結果を図３（３）に示す。図３（４）は、図３（３）のカルボニル基（C=O;～170 ppm）周辺のフェーズを合わせて拡大し、ピークフィッティングしたものである。

サンプル(1)，(2)，(3)とも、太破線で示した幅広のピークと細破線で示した170.4 ppmをトップとするピークに分離（ガウシアン）できた。太破線の分離ピークは、フェーズ合わせに影響するバックグラウンドと考えられること、及び、定かではないが、高いアモルファス性による揺らぎに起因する可能性がある。したがって、カルボニル基のピークとしては細破線の分離ピークで議論できる。いずれも低磁場シフトしたピークは見られず、したがって、カルボニル基（COO-エステル結合部分）にCa2+イオンが配位していることはないと言える。
尚、Ca2+イオンなどの２価イオンが配位した場合には、このピークに加えて低磁場側にシフトしたピークが現れることが報告されている（Asada M, Asada N, Toyoda A, Ando I, Kurosu H. Side-chain structure of poly(methacrylic acid) and its zinc salts in the solid state as studied by high-resolution solid-state 13C NMR spectroscopy. J Mol Struct 1991;244:237-48.）。

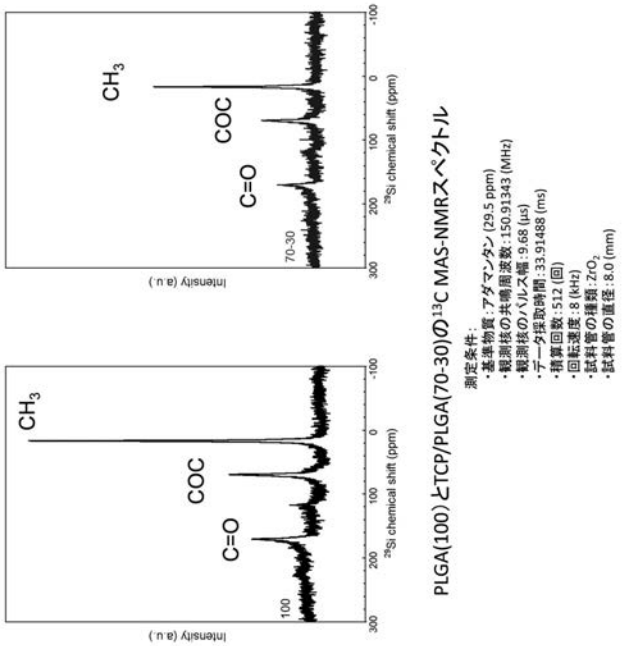
【図１】



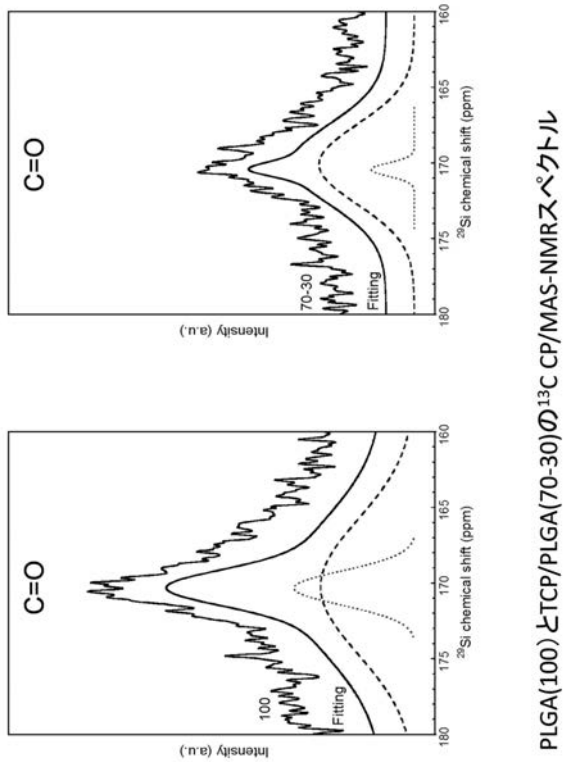
【図２】


5kV
X300
50μm

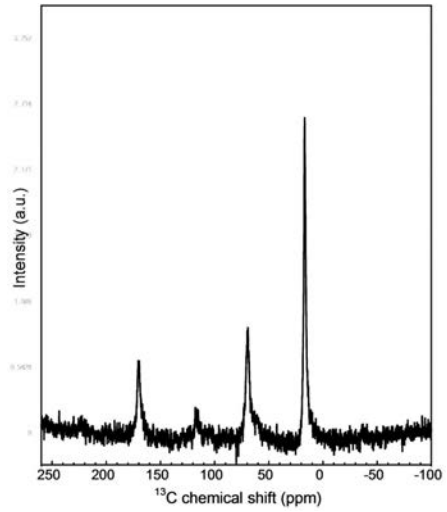
【図３（１）】


CH3
COC
C=O
70-30
100
Intensity (a.u.)
29Si chemical shift (ppm)
PLGA(100)とTCP/PLGA(70-30)の13C MAS-NMRスペクトル
測定条件：
・基準物質：アダマンタン (29.5 ppm)
・観測核の共鳴周波数：150.91343 (MHz)
・観測核のパルス幅：9.68 (μs)
・データ採取時間：33.91488 (ms)
・積算回数：512 (回)
・回転速度：8 (kHz)
・試料管の種類：ZrO2
・試料管の直径：8.0 (mm)

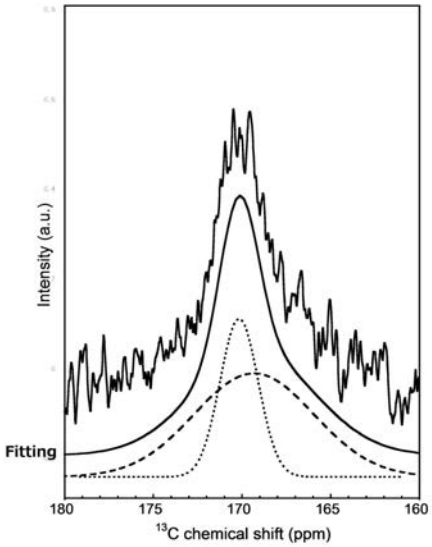
【図３（２）】


C=O
70-30
100
Fitting
Intensity (a.u.)
29Si chemical shift (ppm)
PLGA(100)とTCP/PLGA(70-30)の13C CP/MAS-NMRスペクトル

【図３（３）】

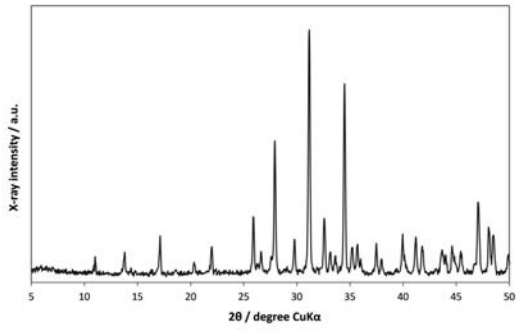


【図３（４）】



【図４】

β-TCP（原材料）



フロントページの続き

(72)発明者　春日　敏宏
愛知県名古屋市昭和区御器所町字木市２９番　国立大学法人名古屋工業大学内
(72)発明者　西川　靖俊
神奈川県横浜市都筑区茅ヶ崎東三丁目１７番４３号　ＯＲＴＨＯＲＥＢＩＲＴＨ株式会社内

Ｆターム(参考) 4C081 AB02　BA16　CA171 CF021 DA04　DC13　EA02　EA06　EA12