

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6396803号
(P6396803)

(45) 発行日 平成30年9月26日(2018.9.26)

(24) 登録日 平成30年9月7日(2018.9.7)

(51) Int.Cl.

F I

C O 1 B 25/32 (2006.01)

C O 1 B 25/32

P

C O 1 B 25/32

M

請求項の数 14 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2014-548182 (P2014-548182)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月17日 (2012.12.17)
 (65) 公表番号 特表2015-502327 (P2015-502327A)
 (43) 公表日 平成27年1月22日 (2015.1.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/053160
 (87) 国際公開番号 W02013/093439
 (87) 国際公開日 平成25年6月27日 (2013.6.27)
 審査請求日 平成27年12月8日 (2015.12.8)
 (31) 優先権主張番号 1122405.2
 (32) 優先日 平成23年12月23日 (2011.12.23)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 514157995
 シラコス リミテッド
 イギリス国 スコットランド イーエイチ
 2 4エーディー エディンバラ プリン
 セス ストリート 125 レベル 5
 (74) 代理人 100106002
 弁理士 正林 真之
 (74) 代理人 100120891
 弁理士 林 一好
 (72) 発明者 ギブソン イアイン ロナルド
 イギリス国 アバディーンシャー エイビ
 ー24 3アールワイ アバディーン ユ
 ニバーシティ オフィス リサーチ アン
 ド イノベーション ユニバーシティ オ
 ブ アバディーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸カルシウム材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

それぞれ少なくとも1つのリン酸カルシウム結晶を含有する個別の多孔質顆粒を含む、
 多孔質粒状リン酸カルシウム材料であって、ここで、

(i) 前記多孔質顆粒の結晶の少なくとも90%が10~100nmの範囲の結晶サイズ
 であり、ここで、前記結晶サイズは、断面SEMにおいて見られる結晶の最長の寸法で
 あり、前記多孔質顆粒の結晶の少なくとも90%が、断面SEMにおいて観察したときに、
 50nm以下の少なくとも1つの寸法を有し、前記多孔質顆粒の結晶が非焼結状態にあり
 、かつ各結晶の最長の寸法の、各結晶の最短の寸法に対する比の平均が、1~10の範囲
 であり、

(ii) 前記多孔質顆粒の細孔の少なくとも90%が10~500nmの範囲の細孔径を
 有し、ここで、前記細孔径は、断面SEMにおいて見られる細孔の最長の寸法であり、

(iii) 前記多孔質顆粒において10~500nmの範囲の細孔径を有する細孔の平均
 細孔径が水銀圧入ポロシメトリーで測定して30~90nmの範囲であり、

(iv) アルキメデスの原理を用いて測定した前記多孔質顆粒の全体積多孔性が少なくと
 も60%であり、および

(v) BET法で測定した前記多孔質顆粒の表面積が10~70m²/gの範囲である、
 多孔質粒状リン酸カルシウム材料。

【請求項2】

前記結晶の少なくとも90%が、断面SEMにおいて観察したときに、20~40nm

の範囲の少なくとも 1 つの寸法を有する、請求項 1 に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 3】

各結晶の最長の寸法の、各結晶の最短の寸法に対する比の平均が、1.5 ~ 3 の範囲である、請求項 1 に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 4】

前記多孔質顆粒中の少なくとも 50 % の細孔が 10 ~ 100 nm の範囲の細孔径を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 5】

前記多孔質顆粒において 10 ~ 500 nm の範囲の細孔径を有する前記細孔の平均細孔径が 30 ~ 70 nm の範囲である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

10

【請求項 6】

前記多孔質顆粒の全体積空隙率が 70 ~ 90 % の範囲である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 7】

前記多孔質顆粒の表面積が $20 \sim 40 \text{ m}^2 / \text{g}$ の範囲である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 8】

前記多孔質顆粒リン酸カルシウムまたは各リン酸カルシウムが、
化学量論のヒドロキシアパタイト、
カルシウム欠損ヒドロキシアパタイト、
1 以上のイオンが部分的にまたは完全に置換されている、化学量論のヒドロキシアパタイトまたはカルシウム欠損ヒドロキシアパタイト、
リン酸三カルシウム、および
ヒドロキシアパタイトおよびリン酸三カルシウム相からなる二相性リン酸カルシウム、
から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

20

【請求項 9】

哺乳動物の非骨部に移植されるときに骨誘導性を有する、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 10】

骨補填材、骨置換材または骨代用材としての請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料の使用。

30

【請求項 11】

骨誘導により骨修復において使用するための請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料を前記骨成長が起こる部分に配置することを含む、骨成長による非ヒト哺乳動物の治療方法。

【請求項 13】

(a) 液相中、リン酸カルシウム結晶の分散材を調製する工程、
(b) 部分的に前記液相を除去し、前記リン酸カルシウム結晶を含む濡れたコンパクトな塊を得る工程、
(c) 段階 (d) で加熱処理する前に、前記液相を除去し、前記リン酸カルシウム結晶を含む乾燥したコンパクトな塊であって、前記乾燥したコンパクトな塊が、アルキメデスの方法により測定したとき、60 % 以上の全空隙率を有する形態で乾燥材料を得るため段階 (b) において得られる前記濡れたコンパクトな塊を乾燥する工程、
(d) 段階 (c) で得られた前記乾燥した材料を 200 ~ 1000 の範囲の温度で加熱処理し、前記結晶の焼結を避ける工程、および
(e) 段階 (d) の前または後に、前記乾燥したコンパクトな塊を顆粒に分離する工程、

40

50

の段階を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のリン酸カルシウム材料の作製方法。

【請求項 1 4】

段階 (d) は、段階 (c) で得られた前記乾燥した材料を 700 ~ 900 の範囲の温度で加熱処理し、前記結晶の焼結を避ける工程を含む、請求項 1 3 に記載のリン酸カルシウム材料の作製方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多孔質粒状リン酸カルシウム材料、特に、体組織修復、特に、骨修復および骨置換において有用な材料に関し、ならびに、そのような材料の使用法および作製方法

10

【背景技術】

【0002】

外科医は、疾患または外傷に起因して骨組織の置換を必要とする。外科医は、骨移植 (自家移植もしくは同種移植) または合成材料を用い、外科手術中に骨を置換し得る。骨を置換するために用いられる合成材料の種類の中で、外科医は、プレートを固定するために、金属 (例えば、ステンレス鋼の腰インプラントまたは膝インプラント)、ポリマー (例えば、骨臼カップのポリエチレン)、セラミックス (例えば、マクロ多孔性骨移植片としてのヒドロキシアパタイト) または無機有機複合体 (例えば、ヒドロキシアパタイト - ポリ乳酸複合材) を用いる。

20

【0003】

骨移植片材料として用いられるリン酸カルシウムセラミック (ヒドロキシアパタイトまたはリン酸三カルシウムなど) は、典型的には、海綿骨の多孔質構造に似た多孔質構造を形成することにより製造される。そのような骨移植片は、マクロ孔 (0.1 ~ 1 mm の大きさ) および、当該マクロ孔と相互に連結されたマイクロ孔 (0.5 ~ 10 μ m) の混合物として存在する孔を全孔隙率 (60 ~ 90 %) の大きな値で有する。これらの骨移植片は、多孔質海綿の構造を形成するリン酸カルシウムを密集状態とする製造プロセスの一部として、通常高い焼結温度、典型的には、1100 ~ 1300 を必要とする。典型的には、粒形において用いられるマクロ多孔性骨移植片のようなものは、骨格として作用し、骨を、そのマクロ多孔性骨移植片に沿って成長させることを可能とすることを意味する骨

伝導性の骨移植片として分類される。自家移植と異なり、ほとんどの合成リン酸カルシウム骨移植片は、骨誘導性の骨移植片ではない。骨誘導性は、未分化の間葉系幹細胞を管理することにより、骨を分離かつ形成する新しい骨形成をもたらす能力である。最近、いくつかのグループは、骨誘導性であるリン酸カルシウムに基づく合成骨移植の開発を報告している。骨誘導性に許容される試験は、骨補填材を好適な動物モデルにおいて非骨性 (骨のない) 部位 (皮下または筋肉内に) に埋め込み、この部位に骨が形成されるかどうかの組織学的検査および組織形態計測を用いることである。唯一骨誘導性である骨補填材は、この部位に骨を形成しないが、骨誘導性材料は骨を形成する。骨誘導性の骨がヒトの骨欠陥に移植されたとき、骨誘導性の骨移植の利点は、骨がインプラントとホスト骨とのインターフェースで骨伝導性の応答により、かつインプラント全体にわたり骨誘導性の応答により形成し得るので、骨修復の加速された速度を有する。全体にわたって新しい骨を形成するため、骨伝導性の骨移植はインプラント後より長い時間を必要とする。新しい骨は、全体にわたって形成するため、インプラントおよびホスト骨の界面から骨移植の全体にわたって移行するので、骨伝導性の骨移植は移植後に長時間を必要とする。

30

40

【0004】

骨誘導性リン酸カルシウムセラミックは特許文献 1 に開示されており、0.1 ~ 1.5 mm の大きさのマクロ孔および 0.05 ~ 20 μ m の大きさのマイクロ孔、20 ~ 90 % の全孔隙率、および 50 nm ~ 20 μ m の大きさの結晶の混合物であるリン酸カルシウムセラミックを記載している。これらの骨誘導性セラミックは、1000 ~ 1275、好ましくは 1150 ~ 1250 の高温を用いて形成された。セラミック材料は塊として移

50

植される。

【0005】

実質的にマイクロ孔のみを有する微小粒子からなる骨誘導性リン酸カルシウムは特許文献2に記載されており、 $0.1 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の大きさ、顆粒の全表面の $10 \sim 40\%$ の表面積のマイクロ孔(%)および $0.1 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の粒(結晶)径を有する。これらの骨誘導性セラミックは $1050 \sim 1150$ の高温を用いて形成された。当該特許文献において、骨誘導性リン酸カルシウムが、最少のマイクロ孔および粒(結晶)径を有する犬の筋肉に移植されたとき、骨誘導性応答を示した顆粒の例は、 1050 で焼結され、マイクロ孔を 24.2% の表面積を有する $0.58 \mu\text{m}$ 細孔径および $0.76 \mu\text{m}$ 粒径として報告されている。

10

【0006】

一緒に焼結されるよりむしろ一緒に緩やかに拘束される微結晶を有する無機の再吸収可能な骨置換材料は特許文献3に記載されている。この材料は、ナノメートルの範囲に、数ミクロンの範囲に、および $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ の範囲に、細孔を有する3つの異なる大きさからなる多孔性を有する。さらなる開示である特許文献4は特許文献5に記載されている材料を述べ、リン酸カルシウムをシリカキセロゲルと混合して、キセロゲルを含まない材料より強固であった無機の再吸収可能な骨置換材料を形成する。シリカキセロゲルは $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ の顆粒サイズを有し、リン酸カルシウムは $10 \sim 2000 \text{nm}$ の結晶サイズを有する。当該シリカキセロゲルは、 $0.5 \sim 20 \text{nm}$ の範囲の細孔を有し、 $10 \sim 60\%$ の多孔性を示す。

20

【0007】

特許文献6は、新しい骨の形成を刺激するため、溶液中に浸した高濃度のケイ素を放出する機能を有する。無機ケイ素置換リン酸カルシウムヒドロキシアパタイトについて開示する。 CaP のモル比は $2.05 \sim 2.55$ の範囲にあり、 $\text{Ca}/(\text{P} + \text{Si})$ のモル比は 1.66 未満である。当該ヒドロキシアパタイトは焼結されず、粉末またはコンパクトな粉末として用いられる。当該ヒドロキシアパタイトの懸濁液を濾過し、ウェット濾過ケーキを乾燥し、ドライケーキをすりつぶして微粒子にし、 900 でその微粒子を加熱して生成される。骨誘導性は試験されない。

【0008】

特許文献7(Tuanら)は、ヒドロキシルアパタイト粉末の調製方法に関する。ヒドロキシルアパタイト粉末は、魚の鱗を 600 、 700 、または 900 を包含する温度に加熱して、有機成分を除去し、無機粉末を凝集して得られた。当該開示は、さらに、ヒドロキシルアパタイト粉末を焼結して得られるヒドロキシルアパタイト多孔質体に関する。骨誘導性は試験されなかった。

30

【0009】

非特許文献1は、従来にない極低温($T < 300$)でナノ結晶アパタイトを凝固してナノ結晶上に存在する表面の水和層を保存とするために使われる、放電プラズマ焼結法に関する。

【0010】

特許文献8(Wahligら)は、再吸収可能な骨のインプラント材料およびその製造方法に関する。インプラント材料の粉末成分は、実質的にヒドロキシアパタイト粉末および硫酸カルシウム粉末の混合物からなり、ヒドロキシアパタイト粉末は、合成的に調製され、 $10 \sim 20 \text{nm}$ 幅および $50 \sim 60 \text{nm}$ 長さの結晶サイズを有すると報告されている結晶性ナノ粒子が沈殿することからなる。ナノ結晶の特定の吸収BET表面積は、報告によれば、好ましくは $100 \sim 150 \text{m}^2/\text{g}$ である。

40

【0011】

特許文献9(Yingら)は、ナノ結晶質アパタイトの合成方法に関する。本開示は、回収製品の特性をあつらえるように意図的に調整されうる一連の具体的な反応パラメータを報告する。 150nm 未満の平均結晶サイズを有する微粒子アパタイト組成物は、報告により提供される。製品は少なくとも $40 \text{m}^2/\text{g}$ の表面積を有し得ると述べられている

50

。組成物の所定の用途は、歯科用インプラントおよび歯科用インプラント用コーティングである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第6,511,510号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2010/0034865号明細書（米国特許第7,942,934号明細書）

【特許文献3】独国特許発明第10060036号明細書

【特許文献4】米国特許出願公開第2007/0059379号明細書（米国再発行特許発明第2008/0152723号明細書） 10

【特許文献5】独特特許発明第10060036号明細書

【特許文献6】国際公開第2010/079316号明細書

【特許文献7】米国特許出願公開第2005/0191226(A1)号明細書

【特許文献8】米国特許第6,689,375(B1)号明細書

【特許文献9】米国特許第6,013,591号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Grossinら、“Biomimetic apatite sintered at very low temperature by spark plasma sintering: Physico-chemistry and microstructure aspects”、Acta Biomaterialia、2010年、第6巻（第2号）、p577-585 20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の目的は、骨誘導性を示し容易に製造されるリン酸カルシウム材料を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0015】

30

本発明は、新しい組織形成、特に骨修復を刺激する定義されたナノスケール構造を有す粒状材料の知見に基づく。当該材料は、骨伝導性、骨刺激性および骨誘導性である。特に、材料は非骨性の（すなわち、骨のない）部位（筋肉内にまたは皮下など）に移植されたときに骨誘導性であり、新しい組織を形成すること、特に新しい骨形成を誘導する。本発明の組成物の骨誘導性特性は、非骨性部位に移植されたとき、より迅速に新しい骨形成／修復をもたらし、新しい骨は、（骨伝導性骨移植として知られているように）既存の骨と接触している骨移植塊の端でよりむしろ骨移植塊の全体にわたって形成するだろう。

【0016】

本願明細書に記載されている材料を含む骨誘導のプロセスは、新しい骨形成の前および間に細胞による高レベルのBMP-2発現と関連付けられてよい。特に、本願明細書に記載されている材料を伴って、血管周皮細胞による高レベルのBMP-2発現は骨の形成前に観測されてよい。本願明細書に記載されている材料を用いた骨形成の間、顆粒の周りの骨芽細胞、骨細胞および線維芽細胞による高レベルのBMP-2発現は観測されてよい。BMP-7の比較的低い発現は、新しい骨形成の前および／または間に顆粒の周りの細胞により観測されてよい。

40

【0017】

1つの態様において、本発明は、それぞれ少なくとも1つのリン酸カルシウム結晶（微結晶、結晶粒）を含有する個別の多孔質顆粒を含む、多孔質粒状リン酸カルシウム材料を提供し、ここで、

（i）顆粒の結晶の少なくとも90％は10～100nmの範囲の結晶サイズであり、

50

ここで、結晶サイズは、断面SEMにおいて見られる結晶の最長の寸法であり、

(ii) 顆粒における細孔の少なくとも90%は、10～500nmの範囲の細孔径を有し、ここで、細孔径は、断面SEMにおいて見られる細孔の最長の寸法であり、

(iii) 顆粒において10～500nmの範囲の細孔径を有する細孔の平均細孔径は、水銀圧入ポロシメトリーで測定して30～90nmの範囲であり、

(iv) アルキメデスの原理を用いて測定した顆粒の全体積多孔性が少なくとも50%であり、および

(v) BET法で測定した顆粒の表面積は10～70m²/gの範囲である、多孔質粒状リン酸カルシウム材料。

【0018】

10

好ましくは、少なくとも90%の結晶は断面SEMにおいて見られるような最大50nmの少なくとも1つの寸法を有する。好ましくは、少なくとも90%は、断面SEMにおいて観察したときに、20～40nmの範囲の少なくとも1つの寸法を有する。

【0019】

好ましくは、各結晶の最長の寸法の、各結晶の最短の寸法に対する平均比は1～10、好ましくは1.5～3の範囲である。

【0020】

好ましくは、顆粒中の少なくとも50%の細孔は10～100nmの範囲の当該細孔径を有する。好ましくは、顆粒において10～500nmの範囲の細孔径を有する細孔の上記平均細孔径は30～70nmの範囲にある。

20

【0021】

好ましくは、顆粒の全体積孔隙率は、少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%、より好ましくは70～90%の範囲にある。

【0022】

好ましくは、顆粒の表面積は、10～60m²/g、または20～40m²/gの範囲にある。

【0023】

好ましくは、上記顆粒の結晶は、実質的に非焼結状態にある。

【0024】

別の態様において、本発明は、骨補填材、骨置換材または骨代用材として上記の本発明のリン酸カルシウム材料の使用に存する。

30

【0025】

さらに、本発明は、骨誘導により骨修復において使用するための上記の本発明のリン酸カルシウム材料であり、骨成長が起こる部分に上記の本発明のリン酸カルシウム材料を配置することを含む、骨成長による哺乳動物の治療方法でもある。

【0026】

本発明は、

(a) 液相中、リン酸カルシウム結晶の分散材を調製する工程、

(b) 部分的に液相を除去して、リン酸カルシウム結晶を含む濡れたコンパクトな塊を得る工程、

40

(c) 段階(d)で加熱処理する前に、液相を除去し、リン酸カルシウム結晶を含む乾燥したコンパクトな塊であって、乾燥したコンパクトな塊が、アルキメデスの方法により測定したとき、50%以上の全孔隙率を有する形態で乾燥材料を得るため段階(b)において得られる上記濡れたコンパクトな塊を乾燥する工程、

(d) 段階(c)で得られた上記乾燥した材料を200～1000、好ましくは700～900の範囲の温度で加熱処理し、実質的に、結晶の焼結を避ける工程、および

(e) 段階(d)の前または後に、乾燥したコンパクトな塊を顆粒に分離する工程、の段階を含む、上記のとおりリン酸カルシウム材料の作製方法もて提供する。

【0027】

好ましくは、段階(c)において、乾燥したコンパクトな塊の上記全孔隙率が60%以

50

上、より好ましくは70%以上である。

【0028】

したがって、本発明の材料は、各粒子の具体的な構造を有するリン酸カルシウム顆粒を含む。特に、顆粒を作る結晶のサイズ(CS)、顆粒全体にわたる細孔のサイズ(PS)、顆粒の全孔隙率(TP)および顆粒の表面積(SA)は、顆粒の製造中加工パラメータの制御により制御され、これらの4つのパラメータ(CS、PS、TPおよびSA)は値の範囲を定義した。顆粒サイズは好適に制御されてもよい。これは、付与されたリン酸カルシウム材料のため、顆粒の製造中の加工パラメータは最適化され、適切な値を有する顆粒を製造し得る。

【0029】

本発明の材料は、ヒトが介入して人工的に合成された、または言い換えれば、生物学的起源の材料(例えば、うろこ)ことを意味する合成品であるだろう。これは、本願明細書で定義されている結晶、細孔および顆粒のパラメータのより精密な制御を可能とする。

【0030】

本発明の材料のため、所望の特性に重要であるパラメータは、顆粒を作る結晶のサイズ(CS)、顆粒全体にわたる細孔のサイズ(PS)、顆粒の全孔隙率(TP)および顆粒の表面積(SA)である。顆粒のサイズ(GS)は、例えば、規定されたサイズのふるいを通して材料をふるいにかけることにより、顆粒のサイズ(GS)範囲を選抜する構築された方法によって決定されてよい。

【0031】

本発明において、結晶の形態学は、好ましくは、結晶の1つの寸法が他の寸法より長い、幾分か針状の形態である。顆粒を形成する結晶のサイズ(最長寸法)(CS)は、10~100nm、または任意に10~80、または10~90nmのサイズ範囲にあり、好ましくは、50nm未満のサイズの結晶の少なくとも1つの寸法を有する。好ましくは、結晶の少なくとも1つの寸法は20~40nmの範囲のサイズを有する。最短の寸法に対する最長の寸法の割合(最短の寸法は、最長の寸法に垂直な方向にある)は、1~10、好ましくは1.5~3の範囲であるだろう。結晶サイズおよび形態学は、走査電子顕微鏡法を用いて、特にSEMの断面において決定され得る(ここで、結晶は、2つの寸法において見られる)。上で述べたように、上記結晶の好ましくは少なくとも90%、または少なくとも95%がこのサイズ範囲を有する。

【0032】

本発明において、顆粒全体にわたって最高の典型的なサイズ(最大寸法)(PS)は10~500nmのサイズ範囲である。無作為に選んだ少なくとも90%の細孔はこのサイズ範囲にある。好ましくは、その大多数(無作為に選んだ少なくとも50%)は10~100nmのサイズ範囲にある。

【0033】

平均細孔径は、30~90nm、好ましくは30~70nmの範囲にある。細孔の大多数は30~90nmのこのサイズ範囲内にあり、典型的には、細孔の60~100%、好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上はこのサイズ範囲にある。一方、本発明の材料は、この範囲内に95%以上の細孔を有し、実際いくつかより大きな細孔であってよい。平均細孔径および細孔径分布は水銀圧入ポロシメトリーを用いて測定される。

【0034】

顆粒の中に、500nmより大きいサイズ、例えば、1μm以上のサイズの細孔または空隙があるかもしれない。そのような大きな細孔または空隙は、平均細孔径の算出から排除される。

【0035】

本発明において、顆粒の全孔隙率(TP)は、体積に関して、顆粒のより大きな体積は材料より多孔性であるようである。顆粒の全孔隙率は典型的には60%より大きく、好ましくは全孔隙率の70~90%の範囲にある。明確にするため、上記の例は、与えられた顆粒のため、70%の顆粒は、平均30~70nmの細孔径を有する細孔を有し、10~

10

20

30

40

50

100 nm、または任意に10~80もしくは10~90 nmの範囲の直径を有する結晶からなる顆粒の材料成分(この例において、残り30%の体積)を有し、20~40 nmの範囲の大きさを有する結晶の少なくとも1つの寸法を有する多孔性である。この全孔隙率(TP)は、ASTM C373に記載されるようにアルキメデスの原理を用いて測定される。

【0036】

本発明において上記のとおりCS、PSおよびTPの値は高い比表面積(m^2/g で表現される)を有する材料となることに起因して、顆粒の表面積(SA)は、公知のリン酸カルシウム骨移植片材料より大きい。本発明の、CS、PSおよびTPの値を上記のとおり有するリン酸カルシウム材料は、 $10\sim70\text{m}^2/\text{g}$ 、好ましくは $10\sim60\text{m}^2/\text{g}$ 、より好ましくは $20\sim40\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する。比表面積(SA)は、材料の表面への N_2 の吸着を利用するBET方法を用いて測定される。

【0037】

本発明において、上記の他の4つのパラメータ(CS、PS、TPおよびSA)を伴う材料の顆粒のサイズ(GS)は典型的には $50\mu\text{m}\sim10\text{mm}$ の範囲にある。この範囲内において、より狭い粒径範囲は用途に応じて選択されてよく、例えば、骨移植系としての材料の臨床用途に応じて、 $100\sim500\mu\text{m}$ 、 $500\sim1000\mu\text{m}$ 、 $1\sim2\text{mm}$ 、 $2\sim5\text{mm}$ 、 $5\sim10\text{mm}$ のより狭い範囲であってよい。一方で、顆粒サイズ範囲は典型的にはこれらの範囲にあり、本発明の材料はより狭い範囲、例えば $200\sim300\mu\text{m}$ を有していてもよく、または本発明の材料と一緒に封入される方法に影響を及ぼすサイズスケールの粒径を有していてもよい。例えば、二峰性の分布は特定の利用、例えば、 $200\sim300\mu\text{m}$ および $1\sim2\text{mm}$ の範囲のサイズを有する顆粒などであってよく、これらの相対的割合は封入を最適化するために設定されてよい。

【0038】

顆粒の物理パラメータの本願明細書に含有される上限および下限、顆粒中のリン酸カルシウムの具体的な結晶サイズ、顆粒の多孔性特徴部および顆粒の表面積は、顆粒材料は、骨に形成を誘導するタンパク質を吸収する効果を有するために選択される。当該結果は、多孔性の顆粒の全体にわたって新しい骨が形成することである。結晶サイズは、ナノスケールの多孔性特徴部を得るために重要である。顆粒の大きな表面積は、顆粒の体積の全体にわたって骨の成長のための部位の可能性を増加させる。顆粒サイズは、本願明細書に記載されるように、意図された使用に応じて選択され得る。選択されたサイズを有する顆粒またはサイズは、骨成長が欲される部位にこの顆粒(微粒子)型において送達するため、互いに結合されず、別々である。

【0039】

用語「リン酸カルシウム」は、本願明細書、特許請求の範囲において用いられ、本技術分野において通常であるリン酸カルシウムに基づく多くの材料を含む。具体的な材料は以下で議論されているが、用語「リン酸カルシウム」は、本願明細書において以下の非限定的なリストの材料を包含する。

- および - リン酸カルシウム

アパタイト

リン酸二水素カルシウムおよびその水和物

リン酸水素カルシウム、無水物および水和物

ヒドロキシアパタイト(カルシウム欠乏性のヒドロキシアパタイトを包含している)

炭酸アパタイト

第二リン酸カルシウム、無水物および脱水物

フルオロアパタイト

リン酸一カルシウム、無水物および一水和物のリン酸オクタカルシウム

【0040】

2以上のリン酸カルシウムは、本発明の材料の顆粒もしくは異なる顆粒または各顆粒の混合物において用いられてよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 1 】

特に好ましい再吸収可能なリン酸カルシウム材料は、限定されず、1.667のCa/Pモル比を有する化学量論のヒドロキシアパタイト、1.50~1.667のCa/Pモル比を有するカルシウム欠損アパタイト、1以上のイオンが別のイオンまたは複数のイオンで部分的にまたは完全に置換された化学的に修飾されたヒドロキシアパタイト、および1以上のイオンが別のイオンまたは複数のイオンで部分的にまたは完全に置換された化学的に修飾されたカルシウム欠損アパタイトを包含する。これらの1つの例は、カーボネートイオンがリン酸イオンおよび/またはヒドロキシルイオンを置換するカーボネート置換されたヒドロキシアパタイトである。さらなる例は、ケイ酸イオンがリン酸イオンを置換するケイ酸置換されたヒドロキシアパタイトである。ある場合には、これらのイオン置換は、結果的に、荷電平衡を保持するためヒドロキシルまたはカルシウムイオンの喪失のようなヒドロキシアパタイトの組成物中の同時変化になる。別の例は、ケイ酸イオンがリン酸イオンを置換し、Ca/(P+Si)モル比は1.667未満であるシリカ置換カルシウム欠損アパタイトである。多くの他のイオン置換は、ヒドロキシアパタイト中で生成され、またはカルシウム欠乏性のヒドロキシアパタイト材料は最新の発明の材料中で生成され得る。これらは、限定されないが、ストロンチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウム、リチウム、亜鉛、銀、チタン、コバルト、銅、ニッケル、鉄、硝酸塩、硫酸塩、フッ化物および塩化物を包含する。上記のイオンは単独または組み合わせて置換してよい。いくつかのイオンは様々な価数状態に置換してよく、これは、例えば、 SiO_4^{4-} 、 $\text{Si}_2\text{O}_7^{6-}$ 、 SiO_3^{2-} 、などのケイ酸イオンの置換を、単独または組み合わせて包含してよい。

【 0 0 4 2 】

本発明において用いられる他の好ましいリン酸カルシウムは、限定されないが、ヒドロキシアパタイトおよびリン酸三カルシウムの相の混合物からなる - または - 多形、または二相性のリン酸カルシウム (BCP) のいずれかに存在し得るリン酸三カルシウム (TCP) を包含する。リン酸三カルシウムの場合に、製造プロセスは、TCPの - 多形の形状を好む上記の4つのパラメータ (CS、PS、TPおよびSA) の値を有する材料になると本願明細書に記載される。しかしながら、 - 多形は、ある場合には、他のイオンの添加により通常の高温より低い温度で得られるかもしれない (Nurse, J. Chem. Soc. 1959の相図に記載されている。)。リン酸三カルシウム相は変性されてよく、それにより1以上のイオンは、上記のとおり置換されたヒドロキシアパタイトおよびイオン置換カルシウム - 不足ヒドロキシアパタイトのイオンの場合に別のイオンまたは複数のイオンに部分的にまたは完全に置換される。BCPの場合において、ヒドロキシアパタイト (HA) およびリン酸三カルシウム相の相対的割合は実質的に0%のHA~100%のHAに変動し得る。BCPにおけるHAおよび/またはリン酸三カルシウム相は変更されてよく、それによって1以上のイオンは、イオン置換ヒドロキシアパタイトおよびイオン置換されたカルシウム欠損ヒドロキシアパタイトのため、上記のとおり、別のイオンまたは複数のイオンによって部分的にまたは完全に置換される。

【 0 0 4 3 】

他のリン酸カルシウムは最新の発明において用いられうる。例えば、オクタリン酸カルシウム、非晶リン酸カルシウム、ブルシャイト、モネタイトおよびテトラリン酸カルシウムは単独で用いられ得、または上位において追加の層として用いられうる。リン酸カルシウムは非結晶性であり、本願明細書における結晶サイズの参考は材料のナノ粒子の大きさへの言及である。

【 0 0 4 4 】

他の相は、顆粒中の上記のリン酸カルシウムに添加されてよい。そのような他の相は、これらに限定されないが、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、ケイ酸カルシウムガラス、ケイ酸カルシウムベースガラス、リン酸カルシウムガラス、リン酸カルシウムベースガラス、ケイ酸カルシウムベースガラスセラミック、リン酸カルシウムベースガラスセラミック、生理活性ガラス、生理活性ガラスセラミック、生体適合性ガラス

、生体適合性ガラスセラミック、アルミナおよびジルコニアを包含する。このリストにおいてリン酸カルシウムベース材料は骨成長において活性ではなく、好ましくは存在しない。そのような他の相の量は、好ましくは50重量%未満、より好ましくは3重量%未満である。しかしながら、本発明において、顆粒はリン酸カルシウムの全体的にまたは実質的に全体的に含む（例えば、>99重量%）。

【0045】

本発明の材料を製造する方法において、リン酸カルシウムは好ましくは液相中に分散されるべきである。この分散は、水溶液沈殿などのリン酸カルシウム材料の合成の結果であり得、またはリン酸カルシウム粉末は好適な溶媒、典型的には水または水ベース溶媒に分散され得る。分散系中のリン酸カルシウムは、100nm未満の、または任意に80または90nm未満の小さな一次結晶サイズを有し、上記のとおり4つのパラメータ（CS、PS、TPおよびSA）の値を有する材料を形成する。リン酸カルシウムは、一次結晶としておよび/または一次結晶の塊として分散系に存在してよい。

【0046】

もし、1以上の他の相は、顆粒中に追加の非リン酸カルシウム材料を取り込むのが望ましい場合、分散系に包含されてよい。

【0047】

液相中に分散されるリン酸カルシウムは加工され、上記のとおり4つのパラメータ（CS、PS、TPおよびSA）の値を有する材料を形成する。液相に分散されたリン酸カルシウムは懸濁液として記載され得る。液相（リットル、L）に分散される固相（リン酸カルシウム）の量（グラム、g）は、1500g/L~0.1g/L、好ましくは150g/L~10g/Lで変動し得る。

【0048】

第一加工段階は、典型的には大多数の液相を除去し、濡れたコンパクトな塊の固相を残すように加工される分散系を含む。この段階に好適な方法は、減圧濾過であり、例えば、ブフナー漏斗、ろ紙および真空ポンプ（コンパクトな塊の固相の濾過にかけられる質量/力を有しまたは有さず）、フィルタープレス（懸濁液に圧密圧力をかけ、コンパクトな塊の固相から水を効果的に絞りだすことを有するまたは有しない）または遠心分離を用いる。この段階において、液相の除去および固相の塊の圧縮は、続く乾燥段階の後に適切な全孔隙率（TP）を保持するように制御される。コンパクトな塊は過度にコンパクトにされる場合、全孔隙率は60%未満または50%未満のレベル、好ましい範囲の70~90%の全孔隙率に落ちついてよく、液相を除去するプロセスは制御されなければならない。これは、減圧濾過の間に真空力の間に真空力を高くかけすぎないこと（または、真空濾過の間にかけられる質量/力を制御すること）、フィルタープレスの間にかけられる圧縮力を制御すること、または遠心分離の間に遠心力および継続期間を制御することを意味する。これらのパラメータは用いられる装置、分散系中のリン酸カルシウムの量、用いられる液相の種類および用いられるリン酸カルシウムの種類に応じてかなり変動し得、第一段階で用いられている加工条件の好適な設定は、乾燥後の固相のコンパクトな塊の全孔隙率は、例えば、これらに限定されないが、50~150の間で、ASTM C373を用いで測定した後、50%超、好ましくは60%超、より好ましくは70~90%超の全孔隙率であるということである。

【0049】

典型的には、これらに限定されないが、50~150での乾燥段階は、固相の濡れたコンパクトな塊からさらに水を除去して、さらなる加工工程の固相の乾燥したコンパクトな塊を製造するまでさらに水を除去する工程である。

【0050】

懸濁液内に、液相中の分散したリン酸カルシウム結晶の相互作用は、固相のコンパクトな塊内の結晶の包装を変化するように変更され得る。そのような変更は、液相のpH、または界面活性剤の添加を変更することによりなされ得、結晶の表面電荷およびそれゆえ結晶の間の静電的な電荷を変更するかもしれない。これは、本願明細書に記載される骨移植

10

20

30

40

50

系の全孔隙率（ＴＰ）および表面積（ＳＡ）を変更および／または制御する別の方法である。

【００５１】

次の加工段階は、好適な温度で乾燥したコンパクトな塊の固相を加熱することを含み、任意の揮発性の成分を除去し、乾燥したコンパクトな塊の固相における結晶サイズ（ＣＳ）および細孔径（ＰＳ）を制御して、上記の範囲の値とする。この第二段階は、第一加工段階、または乾燥したコンパクトな塊の固相がさらなる小片に破壊され得、または上記のとおり希望の顆粒サイズ（ＧＳ）の範囲の大きさにされた後に得られる乾燥したコンパクトな塊の固相上で直接行われ得る。サンプルを加熱するために用いられる温度は、結晶成長および焼結のプロセスのいずれも回避されまたはちょうど始まるのみであるように制御される。これは、乾燥したコンパクトな塊の固相の結晶サイズ（ＣＳ）、細孔径（ＰＳ）および表面積（ＳＡ）は上記の範囲内の値を維持することを保証する。典型的には、この熱処理に用いられる温度は２００～１０００、好ましくは、７００～９００である。この温度での熱処理の継続期間は、典型的には１～４時間であるが、結晶成長および焼結のプロセスがいずれも回避されまたはちょうど始まるのみである場合に、より短い時間または長い時間は適切である。加熱するための雰囲気は空気であり得、または適切な水蒸気を包含している気体の豊富な雰囲気であってよい。２００～１０００、好ましくは７００～９００での熱処理を行うことにより、固相のコンパクトな塊の中の結晶は焼結せず、そのため最終生成物はセラミックと分類されないことを成し遂げることができる。セラミックは、高温の熱処理の間に高密度化した無機材料と関連し、密度および結晶サイズにおける増加ならびに全孔隙率および細孔径における減少に関連する。セラミックは、隣接する粒または結晶の間の「ネック（n e c k s）」の形成とも関係し、これらの隣接する粒または結晶は共に融合しており、これはＳＥＭ分析を用いて観測され得る。これは他の先行技術（米国特許第６，５１１，５１０号および米国特許第７，９４２，９３４号）への異なるアプローチであり、高温、つまり、それぞれ１０００～１２７５（好ましくは１１５０～１２５０）および１０５０～１１５０を用いてセラミックを形成する。

【００５２】

本願明細書に記載される本発明の粒状リン酸カルシウム材料は、エチレンオキシドなどまたはエチレンオキシドの標準的な工業方法を用いて滅菌され得る。イオン化滅菌方法、照射、電子線およびＸ線滅菌も用いられる。

【００５３】

本願明細書に記載される本発明の粒状リン酸カルシウム材料は、骨欠陥、骨の外傷および骨の癒着の範囲を治療するために使用することができる。例えば、骨移植系の顆粒は、骨欠陥に包装されまたは新しい骨を必要とする部分に置換されて、後側部の脊椎固定術または椎体間固定固定術においてなど形成する。これらの顆粒は、直接移植され得、または移植の前に水、生理食塩水、血液または骨髓穿刺液、または別の適切な媒体と混合され得る。顆粒はペーストとしても運ばれてよく、または適切な溶解性担体（限定されないが、吸収性ポリマー（カルボキシメチルセルロースまたはエチレンオキシド／プロピレンオキシドブロック共重合体など）、または天然ポリマー（コラーゲンまたはフィブリンなど）と混合することによるペーストであってもよい。

【００５４】

加えて、本願明細書に記載される本発明の粒状リン酸カルシウム材料は、成長因子タンパク質（骨形成タンパク質など）、抗生物質（ゲンタマイシンなど）または他の調合薬、サイトカインまたは抗体などの活性な生体分子と混合されてよい。

【００５５】

加えて、本願明細書に記載される本発明の粒状リン酸カルシウム材料は、細胞と混合されてよい。これは手術室においてなされてよく、移植の直前にまたは細胞が移植の前の顆粒における時間の間培養されてよい。そのような細胞は、限定されないが、自生間充織幹細胞、同種異系間充織幹細胞、骨芽細胞前駆細胞、骨芽細胞細胞、内皮細胞、およびこれ

らの組み合わせを包含する。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】本発明の実施例2の骨移植系を、後述するようにヒツジの筋肉に移植した後の組織学的な部分の光学顕微鏡画像である。

【図2】実施例2の骨移植系の移植された顆粒の表面における新しい骨形成の領域における細胞のアルカリホスファターゼ発現を示す光学顕微鏡画像である。

【図3】コントロールとして用いられる先行技術の系の移植された顆粒の近くにアルカリホスファターゼ発現のないことを示す光学顕微鏡画像である。

【図4】実施例2の骨移植系における顆粒の表面を示す走査電子顕微鏡画像（SEM）である。

10

【図5】比較のヒドロキシアパタイト焼結セラミック材料の顆粒の表面のSEM画像である。

【実施例】

【0057】

本発明の実施形態および実験データ

本発明は、以下の限定を意図しない実施形態および添付図面を参照して説明される。

【0058】

実施例1～4は、本発明の粒状材料の製造を記載している。これらの材料のそれぞれの平均細孔径は、水銀ポロシメトリーによって30～70nmの範囲で測定される。細孔は、顆粒のSEM断面に見られるように、10～100nmの大きさで、少なくとも50%の細孔を有する10～500nmの範囲のサイズである。

20

【0059】

実施例1

骨移植系1（ヒドロキシアパタイト，HA）の製造

500mlのアルカリ水溶液（添加された10mlのアンモニア溶液を含む水溶液）中に、およそ50gのHA結晶を分散させてなるヒドロキシアパタイト（HA）懸濁液を、従来の水溶液沈殿反応により調製する。この実施例の目的のため、これは、水酸化カルシウム懸濁液ヘリン酸溶液を、Ca/Pモル比が1.667となるように添加し、pHを10～11で維持したことを含み、しかし、他の合成方法は適切である。固相の濡れたコンパクトな塊（ヒドロキシアパタイト）を、真空ポンプに接続されたサイドアームを有する三角フラスコに設置されているプフナー濾過ポートでろ紙にヒドロキシアパタイト懸濁液を通すことにより、水溶液を除去し、固相を集めて得る。この段階の臨界制御は、液相の除去および固相の塊の圧縮を制御して、高レベルの全孔隙率（TP）を保持することである。真空ポンプを、フラスコ中に真空を創造するために用い、その真空を、水の約80～90質量%を除去する期間想像し、これにより、水相の除去の間に固相を凝縮する必要はない。進行中の実施例において、真空を30分間のみ創造した。濡れたコンパクトな固相をその後80℃でさらに乾燥した。

30

【0060】

固相を乾燥したコンパクトな塊（ヒドロキシアパタイト）を、乳鉢および乳棒を用いてより小さいサイズに破碎し、1～2mmの大きさの顆粒を一連のふるいを用いて選抜した。この方法において調製したいくつかのサンプルにおける顆粒の全孔隙率を、ASTM C373に記載されている方法を用いて測定し、値は74～84%の範囲だった。顆粒を加熱炉中、700℃で1時間加熱した。加熱された顆粒の全孔隙率は、66～76%の範囲であり、71%の平均値だった。

40

【0061】

顆粒の表面積（SA）は、BET方法によって測定して、 $27\text{ m}^2/\text{g}$ だった。顆粒の表面をSEMを用いて観測し、結晶の寸法（CS）は、最長の寸法で50～90nmの範囲であるが、結晶の最短の寸法（幅）は20～40nmであった。

【0062】

50

実施例 2

骨移植系 2 (ケイ素置換ヒドロキシアパタイト、 Si-HA) の製造

500 ml のアルカリ水溶液 (添加された 10 ml のアンモニア溶液を含む水溶液) 中に、およそ 50 g の Si-HA 結晶を分散させてなるヒドロキシアパタイト (HA) 懸濁液を、従来の水溶液沈殿反応により調製する。この実施例の目的のため、これは、オルトケイ酸テトラエチル (TEOS) を含有する水酸化カルシウム懸濁液へリン酸溶液を、 Ca/P モル比が 2.45 および Ca/(P+Si) モル比 1.64 となるように添加し、 pH を 10 ~ 11 で維持したことを含み、しかし、他の合成方法は適切である。実施例 1 に関しては、固相 (ケイ素置換ヒドロキシアパタイト) の濡れたコンパクトな塊は、真空ポンプに接続されたサイドアームを有する三角フラスコに設置されているブフナー濾過ポートでろ紙にケイ素置換ヒドロキシアパタイト懸濁液を通すことにより、水溶液を除去し、固相を集めて得る。真空ポンプを、フラスコ中に真空を創造するために用い、その真空を、水の約 80 ~ 90 質量 % を除去する期間創造し、これにより、水相の除去の間に固相を凝縮する必要はない。進行中の実施例において、真空を 30 分間のみ創造した。濡れたコンパクトな固相をその後、オーブン中 80 ° でさらに乾燥した。

【 0063 】

固相を乾燥したコンパクトな塊 (ケイ素置換ヒドロキシアパタイト) を、乳鉢および乳棒を用いてより小さいサイズに破碎し、1 ~ 2 mm の大きさの顆粒を一連のふるいを用いて選抜した。顆粒の全孔隙率を ASTM C 373 に記載されている方法を用いて測定し、値は 73 ~ 82 % の範囲だった。顆粒を加熱炉中、900 ° で 1 時間加熱した。加熱された顆粒の全孔隙率は、71 ~ 78 % の範囲であり、75 % ($n = 5$) の平均値だった。

【 0064 】

顆粒の表面積 (SA) は、BET 方法によって測定して、 $28 \text{ m}^2 / \text{g}$ だった。顆粒の表面を SEM を用いて観測し、結晶 (CS) の最長の寸法は 50 ~ 80 nm の範囲であり、結晶の最短の寸法 (幅) は 20 ~ 40 nm の範囲であった。

【 0065 】

実施例 3

骨移植系 3 (α -リン酸三カルシウム、 α -TCP) の製造

実施例 1 および 2 に記載されている方法を用い、500 ml のアルカリ水溶液 (添加された 10 ml のアンモニア溶液を含む水溶液) 中に、1.58 の Ca/P モル比を有するおよそ 50 g のアパタイト結晶を分散させてなるカルシウム欠損アパタイト懸濁液を、従来の水溶液沈殿反応により調製する。この実施例の目的のため、これは、水酸化カルシウム懸濁液へ、リン酸溶液を、 Ca/P のモル比 1.50 となるように滴下添加し、 pH を 7 ~ 8 の間で維持することを含み、しかし、他の合成方法は適切である。固相の濡れたコンパクトな塊 (カルシウム欠損アパタイト) が得られ、乾燥したコンパクトな塊、次いで、実施例 1 および 2 に記載されているような同じプロセスにより顆粒へ変形される。65 % 超の全孔隙率を有する顆粒を、750 ° で 1 時間加熱する。X 線回析分析により、当該相組成物は α -多形のリン酸三カルシウムであることがわかった。加熱した顆粒の全孔隙率は 65 ~ 77 % ($n = 5$) の範囲であった。

【 0066 】

顆粒の表面積 (SA) は、BET 方法によって測定して、 $25 \text{ m}^2 / \text{g}$ であった。顆粒の表面を SEM を用いて観測し、結晶 (CS) の最長の寸法は 50 ~ 90 nm の範囲であり、結晶の最短の寸法 (幅) は 20 ~ 50 nm の範囲であった。

【 0067 】

実施例 4

骨移植系 4 (二相性リン酸カルシウム、BCP) の製造

実施例 1、2 および 3 に記載されている方法を用いるは、500 ml のアルカリ水溶液 (添加された 10 ml のアンモニア溶液を含む水溶液) 中に、1.58 の Ca/P モル比を有するおよそ 50 g のアパタイト結晶を分散させてなるカルシウム欠損アパタイト懸濁液を、従来の水溶液沈殿反応により調製する。この実施例の目的のため、これは、水酸化

カルシウム懸濁液へ、リン酸溶液を、Ca/Pのモル比1.58となるように滴下添加し、pHを8~10の間で維持することを含みし、しかし、他の合成方法は適切である。固相の濡れたコンパクトな塊（カルシウム欠損アパタイト）が得られ、乾燥したコンパクトな塊、次いで、実施例1および2に記載されているような同じプロセスにより顆粒へ変形される。65%超の全孔隙率を有する顆粒を、800℃で1時間加熱する。X線回析分析により、当該相組成物は、多形のリン酸三カルシウムとヒドロキシアパタイトとの（およそ50%：50%の割合にある）2相性の混合物であることがわかった。加熱した顆粒の全孔隙率は、68~79%（ $n=5$ ）の範囲であり、73%（ $n=5$ ）の平均値だった。

【0068】

顆粒の表面積（SA）は、BET方法によって測して、 $22\text{ m}^2/\text{g}$ であった。顆粒の表面をSEMを用いて観測し、結晶（CS）の最長の寸法は50~80nmの範囲であり、結晶の最短の寸法（幅）は20~40nmの範囲であった。

【0069】

実施例5

骨移植系の1~4に対するタンパク質の付着

結晶および細孔径の効果、および実施例1~4の骨移植系の表面積の高い値を試験するため、24時間浸した後0.5gの顆粒に付着する1%ウシ胎児血清の3ml溶液からの血清蛋白質の量の測定を行った。比較として、実施例1~4の顆粒と同様の全孔隙率であるが結晶サイズはおよそ1 μm で、細孔径は1 μm より大きく、 $1.5\text{ m}^2/\text{g}$ の表面積を有する多孔質ヒドロキシアパタイト顆粒（コントロール顆粒と称される）を試験した。初期の1%のウシ胎児血清溶液中および顆粒を浸した後の溶液中に存在するタンパク質の量を測定するためのピシンコニン酸（BCA）アッセイを用い、顆粒に吸収した血清タンパク質の量をこれらの2つの値の差として計算し得る。実施例1~4により製造される顆粒に吸収した血清タンパク質の量は、オリジナルの1%ウシ胎児血清溶液中の全タンパク質の39%+5%であり、一方で、コントロール顆粒は、タンパク質から9%±3%を吸収した。

【0070】

実施例6

骨移植系の骨誘導性の実施

実施例2に記載されている骨移植系を、18月齢のヒツジの背中の筋肉における小さい欠陥に移植した。6週間後、外植された見本/部分は、組織学的検査のために滑降され、新しい骨形成を同定するために染色（テトラクローム）する。イメージは、顆粒の周りに形成されている新しい骨（青く染色される）と全体にわたってある欠陥を示した（図1）。比較用の非骨誘導性の合成骨移植（ProOsteon 200Rとして購入可能）は、この移植時間の後の新しい骨がなく、顆粒の周りの緻密線維組織の存在のみを示した。

【0071】

図1は、実施例2に記載されている骨移植系のテトラクローム染色された組織学的検査は、骨移植系の脱灰された顆粒（G）を示す6週間のヒツジにおける筋肉内への移植を示し、インプラント部位内の顆粒の周りに形成される宿主筋肉（M）と新しい骨（NB）を示す。

【0072】

脱灰する組織学スライドは免疫組織化学を用いて染色され、アルカリホスファターゼ（AP）の正の発現、骨芽細胞の細胞分化およびそれゆえ骨形成の具体的なマーカー、APのため正に染色された細胞はブラウンを表す。そのような染色された区分は図2に示され、APの正に染色された細胞（骨芽細胞）は、実施例6における実験において顆粒（G）の表面で、新しい骨形成（NB）の配置で現れる。これは、新しい骨は筋肉内移植部位への宿主間葉系幹細胞の補充により形成され、骨芽細胞へ分化することを示し、ここで、それらは新しい骨を製造する。これらの区分において軟骨細胞/軟骨組織の重要な領域の存在の証拠はなく、そのため新しい骨は、軟骨内骨形成に観察されるように軟骨中間体相を

10

20

30

40

50

介するより、直行ルートから形成することを表す。

【 0 0 7 3 】

対照的に、非骨誘導性の合成骨移植 (ProOsteon 200R) は、この移植期間の後AP用の正に染色された骨芽細胞の細胞を示さず、顆粒の周りの緻密線維組織 (線維芽細胞) の存在のみを示した (図3)。

【 0 0 7 4 】

図2は、実施例2に記載されている、6週間ヒツジの筋肉内に移植されるナノスケールの骨移植系の顆粒 (G) の表面で、新しい骨形成 (NB) の領域で細胞 (ブラウンに染色された) によるアルカリホスファターゼ (AP) 発現を示す顕微鏡イメージ (×20) である。

10

【 0 0 7 5 】

図3は、6週間ヒツジの筋肉内に移植される骨伝導性のコントロールとして用いられるProOsteon 200Rの顆粒 (G) の近くの細胞 (ブラウンに染色を不足) によりアルカリホスファターゼ (AP) 発現を示さない顕微鏡イメージ (×20) である。

【 0 0 7 6 】

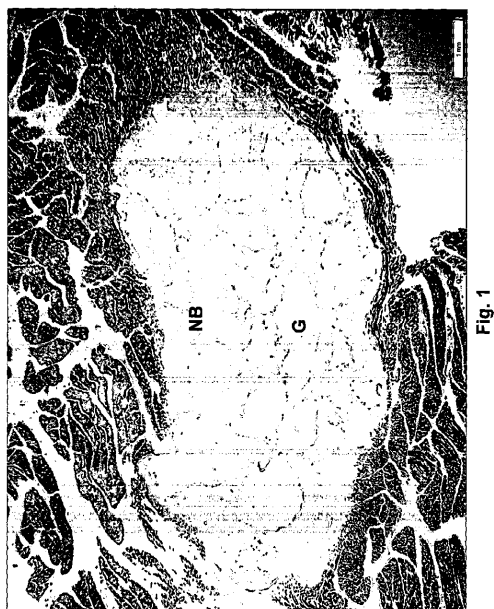
図4は、顆粒を作製する結晶のナノスケール構造 (サイズおよび形状を包含する) を示す、実施例2に記載されているナノスケールの骨移植系の顆粒の表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) イメージを示す。

【 0 0 7 7 】

図5は、顆粒を作製する共に焼結する大きな結合したグレインの存在およびナノスケールの細孔構造の欠乏を示す比較的多孔質ヒドロキシアパタイトセラミック材料の粒子の表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) イメージを示す。

20

【 図 1 】



【 図 2 】

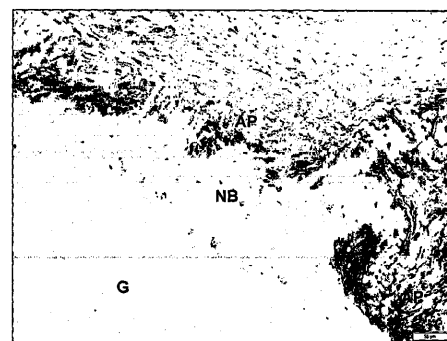


Fig. 2

【 図 3 】

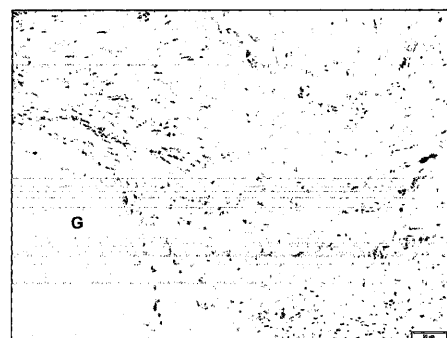


Fig. 3

【 図 4 】

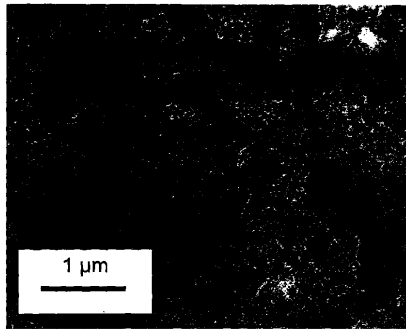


Fig. 4

【 図 5 】

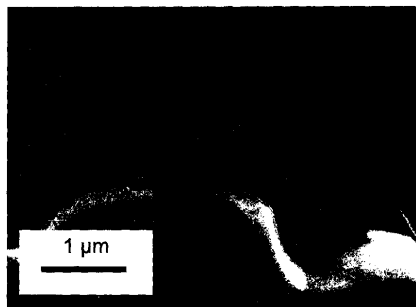


Fig. 5

フロントページの続き

- (72)発明者 スカクル ジャネット マベル スコット
イギリス国 アバディーンシャー エイビー 24 3 アールワイ アバディーン ユニバーシティ
オフィス リサーチ アンド イノベーション ユニバーシティ オブ アバディーン
- (72)発明者 コンウェイ ジョーダン クリストファー
イギリス国 スコットランド イーエイチ 2 4 エーディー エディンバラ プリンセス ストリ
ート 125 レベル 5 シラコス リミテッド

審査官 若土 雅之

- (56)参考文献 米国特許第 06013591 (US, A)
国際公開第 2011/053719 (WO, A1)
SPONER, Pavel et al., In vivo behaviour of low-temperature calcium-deficient hydroxyap
atite: comparison with deproteinised bovine bone, International Orthopaedics, 2010
年 8月19日, Vol. 35, pp. 1553-1560

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C01B 25/00 - 25/46
A61L 27/00 - 27/60
JSTPlus (JDreamIII)
JST7580 (JDreamIII)
JSTChina (JDreamIII)