

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4391815号
(P4391815)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月16日(2009.10.16)

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

請求項の数 12 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2003-501511 (P2003-501511)	(73) 特許権者	504136166 イエンセン バイオテック カンパニー リミテッド 中国、ジャンス 214431、ジャング イン、ピンジャン インダストリアル パ ーク、ディンジャン ロード 10
(86) (22) 出願日	平成14年6月4日(2002.6.4)	(74) 代理人	100064562 弁理士 清水 徹男
(65) 公表番号	特表2005-506114 (P2005-506114A)	(74) 代理人	100093207 弁理士 醍醐 邦弘
(43) 公表日	平成17年3月3日(2005.3.3)	(72) 発明者	チョウ ライシェン アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O 2469、ブルックライン、ボナード ロ ード 177
(86) 国際出願番号	PCT/CN2002/000389		
(87) 国際公開番号	W02002/098474		
(87) 国際公開日	平成14年12月12日(2002.12.12)		
審査請求日	平成17年6月2日(2005.6.2)		
(31) 優先権主張番号	01113076.8		
(32) 優先日	平成13年6月5日(2001.6.5)		
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト骨組織工学のための足場、その調製方法およびそれらの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨形成誘導物質としてケイ素を60%乃至100%含有する無機元素微粒子を含むヒト骨組織工学のための足場であり、ナトリウムを含有していないヒト骨組織工学のための足場。

【請求項 2】

前記無機元素微粒子がさらに、前記ケイ素含有無機元素微粒子の骨形成誘導効果を相乗的に増強することのできる、カルシウム及び/又はリンを含んでなる補助骨形成誘導物質を含んでいる、請求項1記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項 3】

前記無機元素微粒子がケイ素微粒子とカルシウム微粒子の混合物、又はケイ素微粒子とリン微粒子の混合物、又はケイ素微粒子とカルシウム微粒子とリン微粒子の混合物である、請求項2記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項 4】

前記無機元素微粒子の直径が10ミクロン或いはそれより小さい、請求項3記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項 5】

前記無機元素微粒子の直径が1000nm未満である、請求項4記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項 6】

10

20

前記無機元素微粒子の直径が100nm未満である、請求項5記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項7】

前記無機元素微粒子の直径が5乃至80nmである、請求項6記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項8】

前記無機元素微粒子が、ケイ素を60-100%、カルシウムを0-30%、およびリンを0-20%含有している、請求項3記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項9】

前記無機元素微粒子が、ケイ素を60-90%、カルシウムを0-25%、およびリンを0-15%含有している、請求項3記載のヒト骨組織工学のための足場。

10

【請求項10】

前記無機元素微粒子が、ケイ素を60-70%、カルシウムを20-25%、およびリンを10-15%含有している、請求項3記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項11】

前記足場が、球形状、柱形状、或いは四辺形状を有するプレハブ足場である、請求項1記載のヒト骨組織工学のための足場。

【請求項12】

前記足場の形状が、処置されるヒト骨の解剖学的形態に適合した形状を有するテイラーメイド型足場である、請求項1記載のヒト骨組織工学のための足場。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト骨組織工学のための複合材料製の足場、特に、ヒト骨組織の再生を誘導する能力を有する新規医用微粒子複合材料製の足場、その調製方法およびヒト骨組織工学へのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ヒト骨組織工学は、吸収性生物学的材料を自己骨組織の再生を誘導するための足場として用いるプロセスに関する。前記足場の生理化学的特性および三次元構造は骨組織の再生に直接影響を及ぼす鍵である。生物学的材料の分子適合性の基準に基づいて、ヒト身体用の移植装置または組織工学用の足場は安全でなければならず、細胞および分子レベルで関連ヒト組織の再生および関連生理学的機能の回復を誘導するための生理活性を有する(Chou, et al, J. Cell Sci., 1995, 108:1563-1573; Chou, et al, J. Biomed. Mater. Res., 1996, 31:209-217; Chou, et al, J. Biomed. Mater. Res., 1998, 33:437-445)。

30

【0003】

従来技術においては、足場用の材料の組合せは、主として、天然コラーゲン、リン酸カルシウム、または有機ポリマーから選択される。天然コラーゲンは、よりコストが高く、より物理的特性に乏しく、疾患を伝播し易く、かつヒト身体において過敏性を誘導する潜在的な不都合を有する(Pachence and Kohn, Biodegradable polymers for tissue engineering in

40

Principles in Tissue engineering, 1997, p273-293)。リン酸カルシウム(Kukubo, et al, J.

Mater. Science, 1985, 20:2001-2004; Feinberg, et al, Shanghai Journal of Stomatology, 2000, 9:34-38 および 88-93)は伸縮性に劣る不都合を有し、かつヒト骨組織の再生を誘導する生理活性を示す(Chou,

et al, Biomaterials, 1999, 20:977-985)。有機ポリマー、例えば、ポリ(乳酸)(PLA

50

)、ポリ(グリコール酸)(PGA)、またはPLAおよびPGAの複合体(PLGA)も幾つかの不都合を有する:前記ポリマーの分解から放出される酸性分解生成物はヒト身体内の組織において炎症反応および異質反応を誘導することがある。さらに、これらのポリマーは、ヒト骨組織の再生を誘導する生理活性を持たない(Hubel, Bio/Technology, 1995, 13(6):565-576; Thomson, et al, Polymer scaffolds processing in principles in Tissue Engineering, 1997, p273-293; Cao, et al, Plast Reconstr. Surg. 1997, 100:297-304; Minuth, et al, Cell Tissue Research, 1998, 291(1): 1-11; Wong Yulai, et al, Shanghai Journal of Stomatology, June 2000, 9(2):94-96)。従来技術においては、幾つかの生理活性タンパク質、例えば、細胞結合性タンパク質または骨誘導性タンパク質を非活性ポリマー足場上に移植する試みがなされている(Barrea, et al, Macromolecules 1995, 28:425-432; Ugo and Reddi, Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the periodontal tissue by bone morphogenetic proteins, 1997)。しかしながら、これらの方法は、より高いコスト、移植タンパク質の不安定性および不均一性、並びに足場の滅菌の困難性のため、臨床的に実施することはほとんど不可能である。米国特許第5977204号は、有機ポリマーおよびバイオガラス(バイオセラミックス)を含む複合材料製の足場を開示する。前記バイオガラスは米国特許第4103002号において最初に開示された。そこでは、前記材料とヒト骨組織との生体適合性を改善するのにケイ素、カルシウムおよびリンの組合せが用いられたが、骨組織の再生を誘導するためではなかった。実際、米国特許第5977204号および米国特許第4103002号の両者は、骨組織の再生を誘導するケイ素の活性を明確に記述することもカルシウムおよびリンの相乗誘導効果に言及することもない。さらに、両特許に開示される材料はナトリウムを含む。しかしながら、ナトリウムには骨組織の再生に対する誘導活性はない。したがって、生体材料の分子適合性の原理によると、米国特許第5977204号において請求されるような足場には骨組織の再生を誘導する有意の生理活性はない。加えて、前記特許において開示されるようなプロセスは前記複合材料足場の調製において有機溶媒を用い、これはヒト身体に対する潜在的な細胞毒性を生じる可能性がある。米国特許第6051247号は、米国特許第4103002号のバイオガラスおよび骨の欠陥の修復において有用な多糖(例えば、デキストラン)を含む複合材料を開示する。しかしながら、前記複合材料は単にペーストまたはパテを形成するのに用いられ、組織工学のための微細三次元構造および特定の圧力耐性を有する足場の調製には不適切である。さらに、前記複合材料のバイオガラスの組合せは骨組織の再生の誘導に対して不活性である。米国特許第5977204号、第4103002号および第6051247号において用いられるバイオガラスは70ミクロンを上回る平均粒子径(直径)を有する。複合材料の物理的特性はそのような大粒子によって明らかに冒され、そのような無機元素が足場の複合材料の分解間に均一に放出されることはあり得ない。米国特許第4192021号および第5017627号は有機ポリマーおよびリン酸カルシウムを含む複合材料を開示し、これは骨の欠陥を修復するための足場の調製に用いることができる。しかしながら、この複合材料は骨組織の再生の誘導に対しては不活性であり、前記足場について設計された微小空隙率および細孔径は移植および骨細胞の再生には適切ではない。米国特許第5552454号は、有機ポリマー粒子の表面上にリン酸カルシウムがコートされている複合材料を開示する。この設計には骨組織の再生に対する誘導効果がなく、組織工学用の足場の微細三次元構造を達成するのに用いることもできない。

【0004】

ヒト骨組織工学用の足場の三次元構造は新しい骨における骨組織および血管の両者の再生に重要である。従来技術において、米国特許第5977204号、第4192021号、第5017627号および第5552454号は全て足場を均一な多孔性もしくは非多孔性形態として設計し、多孔性足場における細孔形状、細孔径および細孔分布は一様である。しかしながら、そのような類似の均一に分布した細孔を有する足場は骨組織再生には適切ではない。従来技術において開示されるそのような足場の使用の例において、足場の

10

20

30

40

50

細孔の直径は150ないし400ミクロンの範囲をとる。これは、ヒト細胞が足場の中心部分に侵入することを保証するのに十分な大きさではない。したがって、骨組織の再生は、単に、それらの足場を取り巻く2ないし3mmで生じる。他の側面において、比較的大きな細孔径(400ミクロン超)は骨組織の再生に適切ではない(Cartner and Mhiatt, Textbook of Histology, 1997; Tsuruga et al, J.

Biochem., 1997, 121:317-324; Gauthier et al, J Biomed. Mat. Res., 1998, 40:48-56)。生体適合材料の分子適合性によると、足場の中心部分における血管の再生がそれらの足場における新しい骨の成長の鍵であり、血管は、一般に、400ミクロンを上回る直径を有するチャンネルにおいてのみ形成される。したがって、従来技術における均一な細孔を有する足場が骨再生および血管再生の異なる要求を同時に満たすことはあり得ず、それ故、そのような足場の骨組織工学への実際の適用は限定される。

10

【0005】

したがって、ヒト骨芽細胞の増殖および分化の誘導、新しい骨の形成および石灰化の促進、並びに細胞および分子レベルでの関連生理学的機能の回復に対して生理活性を有する、ヒト組織工学において有用な足場に対する多大な要求が従来技術において存在する。

【0006】

【特許文献1】米国特許第5977204

【特許文献2】米国特許第4103002

【特許文献3】米国特許第6051247

【特許文献4】米国特許第4192021

【特許文献5】米国特許第5017627

【特許文献6】米国特許第5552454

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の目的

本発明の目的は、有機溶媒とは無縁であり、かつ三次元構造および外部解剖学的構造を有する足場であって、生体適合材料の分子適合性における原理に基づいて有機溶媒を用いることなく加熱型成型法によって調製され、ケイ素、カルシウム、およびリンの微粒子の組合せで作製される複合粒子状材料を、ヒト骨芽細胞の増殖及び分化を活発に誘導し、かつ新しい骨の形成および石灰化を促進し得る足場の生理活性物質として、担体としての特定の割合の有機ポリマーと組み合わせて用い、前記複合材料が骨組織の再生の誘導に対する生理活性および所望の物理的特性を有する足場を提供することである。得られる足場は、ヒト骨組織工学において、安全に、経済的に、かつ効率的に、腫瘍、炎症もしくは外傷によって生じる骨組織の欠損の修復またはヒト骨の整形外科手術に用いることができる。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の要約

上記目的を達成するため、本発明の一側面は、微細孔および連結チャンネルの両者を備える三次元構造を有し、骨組織の再生の主要誘導性物質としての無機ケイ素微粒子、相乗誘導性物質としてのカルシウムおよび/またはリン微粒子、並びに担体としての有機ポリマーを含む、ヒト骨組織工学のための複合足場を提供することである。本発明の別の側面は、ヒト骨組織工学のための複合材料足場を調製するための方法であって、有機溶媒を用いることのない加熱型成型法を含む方法を提供することである。本発明のさらなる側面は、腫瘍、炎症もしくは外傷によって生じる骨組織の欠損の回復並びにヒト骨の整形外科手術における、細胞のインサイツ移植またはヒト身体においてイン・ビトロで予め増殖させた骨芽細胞の移植による、ヒト骨組織工学のための複合材料足場の使用を提供することである。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

50

発明の詳細な説明

本発明は、ヒト骨組織工学用の足場を調製するための化学的成分として有用な微粒子状要素を求める本発明者の長期的かつ熱心な研究に基づき、前記微粒子状要素はヒト骨組織の再生の誘導に対して生理活性を有し、自己分解性であり、かつイン・ピボで足場周囲の酸性またはアルカリ性物質を中和することが可能である。本発明者らは、ケイ素微粒子がヒト骨芽細胞の増殖および分化、骨の形成および石灰化を誘導する主要活性成分として用いられ；カルシウム微粒子が骨芽細胞の増殖および分化を相乗的に誘導する活性成分として用いられ；並びにカルシウムおよびリン微粒子が再生した骨の石灰化を相乗的に誘導する活性成分として用いられる、ヒト骨組織工学用の足場を自発的に開発した。これらの元素の組合せは生体毒性がなく、骨組織の再生の誘導に対して活性であり、かつイン・ピボで分解して新しい骨と置き換えることができる。したがって、組織工学におけるタンパク質製品の使用が回避され、生成コストが低下し、臨床実務における足場の安全性および有効性が増大する。本発明の足場の生理活性性組合せは米国特許第5977204号に開示される足場のバイオガラスとは異なり、本発明の生理活性性組合せはケイ素のみ、または主要成分としてのケイ素および特定の割合のカルシウムおよび/またはリンを含むが、ナトリウムとは無縁である。加えて、本発明におけるこれらの元素の粒子直径は従来技術のものとは異なる。したがって、本発明は、骨組織の再生のための新規化学物質およびそれらの組合せの割合の選択に関する。本発明は有機ポリマー、例えば、PLA、PGAまたはPLGAを前記ケイ素、カルシウム、リン微粒子の担体として用い、これは成形のために前記ケイ素、カルシウムおよびリン微粒子を連結させ、前記足場に圧力耐性を付与する。複合材料中のケイ素、カルシウム、およびリン微粒子は前記足場の生理活性成分として用いられ、したがって、前記足場は前記生理活性成分の貯蔵所として機能する。前記生理活性成分は、前記有機ポリマーがイン・ピボで分解するときに徐々に、連続的に、かつ均一に足場から放出されて骨の形成を誘導し、かつ前記有機ポリマーの酸性分解生成物を中和し、骨組織の再生に適する環境を提供する。したがって、本発明は、骨組織工学用の足場が生物学的誘導を欠き、かつ骨の大容量欠損の修復に用いることができないという、従来技術に横たわる問題に取り組む。

【0010】

本発明においては、全ての無機元素は微粒子であり、これらは50ミクロンを上回る直径を有する粒子の形態にある元素に関連する米国特許第5977704号とは異なる。他に述べられない限り、本発明の「微粒子」は10ミクロン以下の直径を有する粒子、好ましくは1000nm未満、より好ましくは100nm未満、最も好ましくは5ないし80nmの直径を有するナノ粒子と定義される。本発明の範囲においては、100nm超または10ミクロン未満の直径を有するケイ素、カルシウムおよびリン微粒子も、それらも生物学的誘導効果を有するため、本発明の目的の達成に用いることができる。そのような粒子に存在する唯一の相違は、それが有する誘導効果はより弱いことであり、これはそれらがよりゆっくりと分解および拡散するためである。本発明において用いられる微粒子の直径は従来技術における骨組織工学用の足場の材料に用いられるものよりも明らかに小さい。さらに、本発明において用いられる微粒子の直径は、足場中の化学元素の均一な分布、それらの化学元素の足場からの均一な放出を助成し、足場の圧力耐性を改善することができる。

【0011】

本発明においては、他に述べられない限り、「生理活性誘導性物質」は、特定の生理学的機能が達成されるように正常細胞を活発に刺激して特異的に増殖および分化させることができる物質と定義される。本発明のケイ素、カルシウムおよびリン元素は、正常ヒト骨芽細胞を活発に誘導して増殖させ、かつ骨芽細胞の一連の特定の生理学的機能（例えば、アルカリホスファターゼの生理活性、オステオカルシンの合成および分泌、並びに骨の石灰化）を刺激することができる生理活性誘導性物質である。従来技術における足場中の全ての無機元素の組合せには、本発明の組合せが有するものと同様の生物学的誘導活性はない。

10

20

30

40

50

【0012】

本発明においては、他に述べられない限り、「ヒト組織工学のための足場」は、安全かつ生理活性であり、特定の期間内にイン・ビボで吸収され得る生体材料で作製されている、特定の三次元構造およびヒト骨における欠損領域の解剖学的形態と一致する形状を有する足場と定義される。そのような足場がイン・ビボで移植されるとき、それらは増殖および分化するのに好ましい環境条件を骨芽細胞に提供し、並びに足場における新しい骨の漸進的形成を促進し、一方で前記足場の枠材料はイン・ビボで徐々に吸収されて最終的に消失し、かつ前記足場の位置が新しい骨で置き換えられる。従来技術における全ての足場は本発明の足場のものに類似する特定の三次元構造を欠く。

【0013】

本発明者らは、無機元素「ケイ素」を、ヒト骨組織工学において生理活性誘導効果を有する足場における主要活性成分として最初に立証し、かつ用いる。図1に示される正常ヒト骨芽細胞の実験データ(下記参照)は、細胞培養培地に添加されたケイ素イオンが新しい骨の形成における鍵生物学的指数、例えば、骨芽細胞の増殖、アルカリホスファターゼの生理活性、オステオカルシンの合成および分泌、並びに骨の石灰化等に対する有意の誘導および促進効果(2-4倍)を有することを立証する。図3に示される動物モデルに対するデータ(下記参照)は、さらに、無機元素ケイ素粒子がイン・ビボで移植された後に、無機ケイ素粒子が周囲の軟組織に拡散し、新しい骨の形成の早期段階(2週間)を特徴付けるイオウイオン濃度を高め、並びに成熟かつ緻密な骨の形成の後期段階(8週間)を特徴付けるカルシウムおよびリンイオン濃度の増加も誘導することを立証する。これらの証拠に基づき、本発明は最初に現状打破を達成し、すなわち、無機元素ケイ素の特定の生物学的誘導効果が確認され、元素ケイ素を骨組織工学のための足場において用いることができる。加えて、図1のデータは、ケイ素の濃度がそれらの生物学的誘導効果に直接比例し、かつケイ素の最大誘導効果がケイ素の飽和濃度(100ppm)で出現することを示す。

加えて、図1に示される実験のデータは、無機元素ケイ素および無機元素カルシウムおよびリンの組合せが、明らかに、正常ヒト骨芽細胞の増殖、オステオカルシンの合成および分泌、並びに骨の石灰化を促進する相乗効果を有することを立証する。したがって、本発明は無機元素カルシウムおよびリンを相乗性物質として用いてケイ素イオンの生理活性を補助する。

【0014】

本発明においては、他に述べられない限り、全ての元素の組合せは、新しい骨組織の形成が積極かつ効率的に誘導されるように、ケイ素イオンを唯一の、または主要な生物学的誘導物質として用い、かつカルシウムおよび/またはリンを相乗的に活性の物質として用いる。好ましくは、「生物学的誘導物質として用いられる元素の組合せ」における原子含有物のパーセンテージは60-100%ケイ素、0-30%カルシウム、および0-20%リンであり;より好ましくは、60-90%ケイ素、0-5%カルシウム、および0-15%リンであり;並びに、最も好ましくは、60-70%ケイ素、20-25%カルシウム、および10-15%リンである。

【0015】

前記生理活性複合材料におけるケイ素/カルシウム/リン微粒子は単一元素微粒子の全種類の混合物の形態にあるか、または全ての種類の元素を混合し、通常物理的もしくは化学的方法によって乾燥粉碎することにより得られる。図1によると、微粒子混合物中または複合元素の微粒子中の原子の相対量は本発明の目的を達成するのに重要な要素ではなく、これは、異なる原子または重量比が単に異なるレベルの誘導活性を生じるためである。したがって、ケイ素が主要生理活性誘導物質として用いられ、かつカルシウムおよびリンが相乗的生理活性誘導物質として用いられる、これら3種類の元素の任意の原子または重量比を有する全ての組合せを本発明の足場のための生理活性物質として用いることができる。

【0016】

無機元素ケイ素、カルシウムおよびリンはヒト骨組織の増殖、骨芽細胞の分化、並びに骨の石灰化を誘導し得る生理活性元素として定義される。これも生体材料分野における躍進である。従来技術においては、合成または抽出された外来性オステオゲニン、オーキシンまたはコネキシン等を生物学的誘導効果を有するものと考えているが、これらの生物学的生成物は安全性に乏しく、生理活性の安定性に劣り、かつコストが高く、したがって、生体工学において用いることはほとんど不可能である。上記に加えて、本発明の無機元素の組合せの誘導活性は、図3の動物モデルにおいて示されるような移植された材料と組織との界面での骨再生と放出されたケイ素イオンの分布との密接な関係、図2において示されるようなヒト正常骨芽細胞のモデルに対するものに加えて図7において示されるような動物モデルに対するケイ素/カルシウム/リン微粒子およびPLGAを含む複合材料の骨再生誘導効果によってさらに立証される。上述の理由で、無機元素ケイ素、カルシウムおよびリンを生理活性タンパク質の置換、および有意の生物学的誘導効果の達成に用いることができることが初めに立証される。さらに、これらの無機元素は、より低いコスト並びにより高い安全性および安定性で容易に調製することができる安全かつ安定な足場を得、並びにそれらの足場の実務的適用可能性が高まるように、ヒト骨組織工学のための足場において生体活性材料として用いることができる。

10

【0017】

従来技術においては、有機ポリマー（PLA、PGAおよびPLGA）が一般に単一の足場材料として用いられる。ここでもまたこれらの有機ポリマーには生物学的誘導活性がなく、ヒト体内のそれらの酸性分解生成物がイン・ビボでの骨組織の再生を妨害する。本発明においては、有機ポリマーは、単に、ケイ素、カルシウムおよびリン微粒子の特定の組合せの担体として用いられる。異なる割合の担体を有する足場での試験結果によると、無機元素の組合せの含有率が80%を上回る場合にはそれらの足場の圧力耐性は比較的弱くなり、したがって、動物体内において特定の立体構造を維持することができず、無機元素の組合せの含有率が20%未満である場合には生物学的誘導活性が8週間以内での新しい骨の完全な形成を促進するには不十分となる。足場の圧力耐性と生体活性との妥協点を得るため、本発明は、図2、図4および図6に関連する例の生物学的試験に従い、ケイ素/カルシウム/リンの組合せの有機ポリマーに対する容積比を80:20ないし20:80、好ましくは70:30ないし30:70の範囲内に定義する。この範囲内で、足場複合体の溶解度を調整することができる。ケイ素/カルシウム/リンの組合せの含有率が増加するに従い、骨組織再生の誘導に対する生理活性が増加する。これら2種類の材料の量は、ヒト骨組織の修復に関する異なる要求が満たされるように、この範囲内で調整することができる。本発明は、生理活性物質の組合せおよび有機ポリマーを用い、そのような生理活性物質の貯蔵所として機能し得る足場を形成する。イン・ビボでの有機ポリマー（PLA、PGA、PLGA）の溶解（1ないし8週間）に伴い、ケイ素/カルシウム/リン微粒子が連続的かつ安定に放出されて骨芽細胞の増殖および分化並びに骨再生の全プロセスの間の骨の形成および石灰化を誘導する。加えて、放出されたケイ素/カルシウム/リンナノ粒子は有機ポリマーの酸性分解生成物を中和することができ、それが足場を取り巻く、骨組織の再生に有利な局所環境を生じる。

20

30

【0018】

従来技術においては、骨の欠損を修復するための全てのリン酸カルシウムまたはバイオガラスは50ミクロンを上回る直径を有する大粒子である。そのような大粒子を複合材料において用いると、その複合材料の物理的特性が冒される。さらに、足場の有機ポリマーに埋め込まれた大粒子の放出は均一ではない。したがって、本発明は、10ミクロン以下、好ましくは1000nm未満、より好ましくは100nm未満、最も好ましくは5-80nmの範囲の直径を有するケイ素/カルシウム/リン微粒子を用い、それによりそれらの微粒子は有機ポリマー中に均一に埋め込まれ、その有機ポリマーが分解する間に徐々に、かつ均一に放出される。これらの微粒子は、3種類の元素の各々の微粒子を本発明において定義される原子含有率に従って混合することによって調製される。

40

【0019】

50

従来技術においては、様々な足場の三次元構造は均一な細孔径および均一な分布を有する微細孔性である。これらの足場の不都合は、比較的小さい(300ミクロン未満の直径を有する)微細孔が骨芽細胞および血管の侵入に不利であり、比較的大きい(400ミクロンを上回る直径を有する)微細孔が骨組織の再生に不利であるという点にある。そのため、骨生体工学におけるこれらの足場の実際の適用は明らかに制限される。本発明は、図6に示される微細孔および連結チャンネルの両者を含む三次元構造を有する足場を用いる(下記参照)。他の直径についての試験結果によると、100ミクロン未満の直径を有する細孔は細胞の侵入に適さず、300ミクロンを上回る直径を有する細孔は新しい骨の形成に適さない。そのため、図4ないし図7に示される調製および生物学的試験の実施例において用いられる全ての足場(下記参照)は100ないし300ミクロンの範囲の直径を伴う微細孔を有する。本発明において定義される直径を有する微細孔は骨芽細胞の増殖および新しい骨の再生に適する。本発明の微細孔の占有率は50%ないし90%である。例えば、図4、図6および図7に示される実施例において用いられる足場の微細孔の占有率は、それぞれ、80%、50%および50%である。微細孔の他の占有率についての試験結果によると、90%を上回る微細孔占有率を有する足場の物理的圧力耐性は明らかに弱く、かつ周囲の組織からの圧力に抗するには不十分であり、それに対して、微細孔の占有率が50%未満である場合には骨芽細胞が足場に侵入して新しい骨を形成することはほとんど不可能である。連結チャンネルの異なる直径に関する試験結果によると、直径が500ミクロンを上回る場合、足場の圧力耐性は明らかに弱く、かつ大容積骨組織の新生が妨害され、それに対して、直径が350ミクロン未満であるときには細胞の侵入および骨組織の形成が妨害される。したがって、本発明の連結チャンネルの直径は、足場の深部領域への細胞の侵入を保証し、かつそれらの連結チャンネルに沿って足場内部に成長する血管を介して新しい骨に栄養分および酸素が供給されるように、350ないし500ミクロンの範囲にある。連結チャンネルの間隔に関する試験結果によると、足場の圧力耐性は間隔が3mm未満であるときにより弱く、それに対して新しい骨を形成するための足場の全ての微細孔への細胞の侵入は間隔が6mmを上回るときに妨害され、したがって、新しい骨の形成には不適切である。したがって、本発明の連結チャンネルの間隔は、好ましくは、全ての微細孔への連結チャンネルを介する細胞の侵入が保証されるように、3ないし6mmの範囲にある。本発明は連結チャンネルおよび同心的に配置された微細孔の両者を含む三次元構造を備えた組合せ単位を用い、これは(建築ブロックのように)反復集合して大きな骨の欠損を修復するためのより大容積の様々な足場を形成することができる。この新規三次元構造は骨の再生に有益である微細孔並びに細胞の均一な分布、ヒト組織への栄養分の輸送、および新しい骨における血管の再生に有益である連結チャンネルを含み、したがって、従来技術においては修復することができなかった大容積の骨の欠損の修復に用いることができる。5mm未満のサイズを有する小サイズの足場または患者の硬化性残滓を有する様々な骨の欠陥については、微細孔のみを有し、かつ様々な形状、例えば、図4および図6に示されるような球形状、柱形状または四辺形状を有する足場を本発明に従って用いることができる。

【0020】

ヒト骨組織工学のための本発明の足場の解剖学的形状は、骨の欠損の位置およびサイズに応じて、2つのグループ、すなわち、プレハブ型およびテーラーメイド型に分けることができる。プレハブ足場は様々な形状、例えば、球形形状、柱形状、または四辺形状等であり得る。プレハブ足場の直径が5mm未満である場合、足場中には微細孔のみが存在し、連結チャンネルは存在しない。これらの小サイズの足場は0.5mmないし5mmの範囲の様々な直径のものであり得る。5mmを上回るサイズを有するプレハブ足場は、骨の欠損の空間が最大程度まで充填されるように、異なるサイズおよび形状を有する微細孔および連結チャンネルの両者を含む組合せ単位の集合体として設計される。これらのプレハブ足場は、異なるサイズおよび形状を有し、かつヒト体内の異なる位置の骨の欠損領域を骨組織の再生のために充填するのに用いられる。テーラーメイド足場は、ヒト骨の解剖学的形態に合致する足場の形状を設計するのにヒト骨の走査画像をテンプレートとして

10

20

30

40

50

用い、それらの足場は微細孔および連結チャンネルの両者を含む組合せ構造を有し、これらは大きな骨の欠損の修復、ヒト骨の整形外科手術、およびその形状を維持する残留骨壁がない場合の治療に用いることができる。

【0021】

加えて、従来技術においては生体工学用の有機ポリマー足場を調製するのに有機溶媒が通常用いられる。有機溶媒を足場から完全に除去することはほとんど不可能であるため、これはヒト骨組織の再生に有害である。従来技術に公知のヒト骨組織工学用の足場の調製方法とは異なり、本発明の方法は生体工学用のプレハブまたはテーラーメイド足場の調製に通常の加熱型成型法を用い、有機溶媒の使用が回避される。本発明の方法は、従来技術における足場中の残留有機溶媒によって生じる細胞毒性を回避することができ、かつ足場のバッチ生産のコストを低下させることができる。

10

【0022】

ヒト骨組織工学用の本発明の足場の臨床使用には、イン・ビボでの細胞のイン・サイト移植またはイン・ビトロ増殖細胞の移植が含まれる。イン・ビボでの細胞のイン・サイト移植は、手術の間のヒト骨欠損の空洞への小サイズプレハブ足場の直接移植、手術の間に骨欠損の空洞に捕捉された血液および組織浸出液中に豊富な未分化間質細胞の足場の細孔間の空間へ浸透するための直接使用、並びに足場の材料による骨の再生の誘導を含む。したがって、そのような方法は、応力がかからない位置での骨の残留外壁を伴う骨の欠損の修復に用いることができる。移植されたプレハブ足場は、0.5 mmを上回るサイズを有する足場の組合せである。例えば、図4および図6に示される球形および柱状足場を上記方法において用いることができる。イン・ビトロ増殖細胞の移植は、応力のかかる位置または骨の残留外壁を伴わない位置での骨の欠損の修復に用いられる。正常ヒト自己骨芽細胞（これは、それを足場に移植することによって大容積骨欠損を修復するのに大量に必要である）の源は医療分野において常に深刻な問題である。本発明において用いられる正常ヒト由来のイン・ビトロ増殖自己骨芽細胞はこの問題を解決することができる。本発明は、患者から誘導される自己表層骨格断片を骨芽細胞の源として用いる。図7に示されるように、0.2 cm³の表層骨格断片をイン・ビトロで増殖させ、600 - 1000万個の正常骨形成活性を有する自己骨芽細胞を産生させることができる。さらに、これは傷跡を残さず、最終部位に対する機能的影響も身体的影響もない。2 cm³正常自己骨を再生するための足場を供給するには5500万個の増殖骨芽細胞で十分である。臨床実務においては、テーラーメイド足場を、その足場に増殖骨芽細胞をイン・ビトロで移植した後に骨欠損領域に埋め込み、その骨を通常の骨手術によって合金支持副木で固定する。足場中の新しい骨の再生に伴い、これらの副木の支持力が徐々に低下し、新しい骨の負荷が徐々に増加し、かつ最終的には、再生した骨の生理学的機能が回復する（下記「組織工学によるヒト側頭下顎関節の関節突起再建の動物モデル」を参照）。

20

30

【0023】

従来技術と比較すると、本発明の利点は：ヒト骨再生に関する誘導活性を有するケイ素/カルシウム/リン微粒子の生理活性材料としての使用が本発明の足場の生物学的有効性を生物学的誘導活性のない従来技術に公知の足場より優れたものとし；微細孔および連結チャンネルの両者を含む組合せ単位の足場における使用がそれらの足場におけるヒト細胞の均一な分布および血管の再生を促進し、従来技術において再生された骨が足場を取り巻く局所領域のみに限定されるという問題を解決することにある。さらに、三次元的に合致する構造を有する足場の組合せ単位を反復して集合させて十分な容積を形成することにより、従来技術においては達成することができなかった大きなヒト骨欠損の修復および再生を本発明においては達成することができる。

40

以下の非限定的な実施例を図面と組み合わせ用いて本発明をさらに説明する。

【実施例1】

【0024】

実施例1. ケイ素、カルシウム、リン微粒子は正常ヒト体内で骨芽細胞の増殖、アルカリホスファターゼの生理活性、オステオカルシンの合成および分泌、並びに骨石灰化を有意

50

に生物学的に誘導する

【 0 0 2 5 】

この試験において用いられるヒト骨芽細胞は年齢 20 ないし 25 歳の健常ドナーから得る。各々の細胞群は 1 人のドナーの 0.2cm³ 表層骨格断片から得る。この試験において用いられる細胞には合計で 5 群が存在する。5 群の試験データの平均値および標準偏差を図 1 に示す。実験室内でドナーの 0.2cm³ 表層骨格断片を増殖させて 600 - 1000 万個の骨形成活性を有する自己骨芽細胞を産生できることがわかる。この試験において用いられる細胞培養培地には 10 ミクロン未満の直径を有するケイ素、カルシウム、リン粒子が図 1 の表の下に示される特定の濃度または割合で予め添加されており、ケイ素の飽和濃度は 100 ppm である。培養の間、特定の濃度の粒子を含有する培養培地を同じ濃度の粒子を含有する新鮮な培地と 3 日毎に置き換える。第 12 日および第 20 日に、以下の試験を実施する：1) 骨芽細胞の増殖試験：異なる濃度または割合の化学添加物を含有する培養培地中で成長する細胞の総数を通常の細胞フローカウンティング装置によってカウントし、図 1 に示される骨芽細胞の増殖倍数を最初の 24 時間に培養皿上に付着した細胞の数を基準にして算出して、無機元素ケイ素が骨該細胞の増殖に対する明白な誘導効果を有し、かつその誘導効果がケイ素の濃度に直接比例することを示す。さらに、無機元素カルシウムおよびリンはシリコンの生物学的誘導効果を相乗的に増強する；2) アルカリホスファターゼの生理活性の決定。正常骨芽細胞の重要な特徴は正常機能を有するアルカリホスファターゼの分泌である。図 1 の表の下に示される条件下で 12 日ないし 20 日培養された細胞を試験する；これらの細胞をプラスマーズによって脱着させ、通常の超音波発生器で破壊し、得られる細胞スラリーを通常のクロマトグラフィーで解析する；次に、時間あたり 1000 万個の細胞によって産生されるアルカリホスファターゼによって分解される基質のミクロ当量数を算出する。これらの結果は、無機元素ケイ素がアルカリホスファターゼの生理活性および誘導効果をケイ素の濃度に比例して増強し得ることを立証した；3) オステオカルシンの合成および分泌の決定。オステオカルシンの合成および分泌は正常ヒト骨芽細胞の活性の特異的かつ重要な指数である。培養培地に分泌されたオステオカルシンの含有率を、ヒトオステオカルシンに対するモノクローナル抗体を用いる通常の免疫組織化学的方法によって決定する。結果は第 12 日および第 20 日に 1000 万個の細胞によって分泌されるオステオカルシンのフェムトグラム値として表す。これらの結果は、無機元素ケイ素が正常ヒト骨芽細胞によるオステオカルシンの分泌の増加を特異的に誘導し得たことを示した。そのような誘導効果はケイ素の濃度に直接比例する。さらに、無機元素カルシウムおよびリンは相乗的に機能してケイ素の生物学的誘導効果を補助する。並びに 4) 骨石灰化の試験。骨芽細胞の隙間におけるカルシウムの沈着は新しい骨の形成の最終段階の間の重要な指数の 1 つである。各々の群の細胞を第 12 日および第 20 日に通常の方法によってカルシウム染色し、染色密度を通常のクロマトグラフィー機器によって決定した。これらの結果は、高濃度のケイ素、カルシウムおよびリンが有意かつ相乗的に機能し、正常ヒト骨芽細胞の石灰化を誘導および増加させたことを立証した。

【 実施例 2 】

【 0 0 2 6 】

実施例 2 . ケイ素、カルシウム、リン微粒子および有機ポリマー (P L G A) を含む複合材料は正常ヒト骨芽細胞の増殖およびアルカリホスファターゼの生理活性の誘導において単一 P L G A 材料よりも有利である

【 0 0 2 7 】

この生物学的アッセイは、細胞培養物中でのイン・ビトロでの本発明のナノメートル複合材料の 1 群の誘導効果を説明し、単一有機ポリマー P L G A および通常のポリスチレン細胞培養皿に対して比較する。複合材料の元素組合せにおける無機元素の原子含有率は 67 % ケイ素、22 % カルシウム、および 11 % リンであり、無機元素の組合せの P L G A に対する容積比は 50 : 50 である。この複合材料および単一有機ポリマー P L G A を別々に処理し、直径 2 cm および厚み 1.5 mm を有するディスクを、型を用いる 200 で 8 時間の加熱型成型法によって形成する (詳細な工程については実施例 4 も参照) 。 得

られたディスクを直径 2 c m の通常のポリスチレン細胞培養皿に別々に置き、細胞を異なる成形ディスク上に、または成形ディスクのない通常のポリスチレン細胞培養皿上に直接接種した後、培養細胞に対する異なる材料の効果を決定する。3 群の試験細胞を 3 人の健康ドナーから得る。これらの細部を 7 日間培養した後、図 1 に述べられる方法によって細胞の増殖およびアルカリホスファターゼの生理活性を決定する。図 2 に示されるデータは 3 群の細胞の平均値および平均偏差である。これらの結果は、本発明の複合材料で作製されたディスクが単一 P L G A ディスクおよび通常のポリスチレン細胞培養皿より優れた生物学的誘導効果を有することを立証する。

【実施例 3】

【 0 0 2 8 】

10

実施例 3 . ケイ素ナノメートル材料を動物モデルに移植した後のケイ素イオンの拡散および分布、並びに新しい骨組織の再生を誘導するためのイオン分布

【 0 0 2 9 】

成体白ウサギをこの生物学的試験における動物モデルとして用いる。小錐により直径 0 . 5 c m の骨空洞を動物モデルの腓骨に作製した後、5 0 - 8 0 n m の直径を有するケイ素 / カルシウム / リン複合材料粒子 (S i : C A : P = 6 7 : 2 2 : 1 1 の原子比) をその空洞に充填し、最後に創傷領域を縫合する。試験動物に 2 または 8 週間給餌した後、複合材料で充填した部分および周囲組織を第 2 手術によって取り出し、それを 1 0 % ホルムアルデヒドで固定し、樹脂で埋め込み、長軸方向断面に沿って 1 m m スライスとして切片化して、最後に複合材料で充填した領域と周囲動物組織との界面の 2 つの側でのイオン濃度分布を放射イオンアナライザによって決定する。表 1 に示されるデータは 5 群の動物の原子パーセンテージでの平均値である。

20

【 0 0 3 0 】

【表 1】

生体組織と移植材料との界面でのケイ素、カルシウム、リン、イオウおよび塩素の濃度分布

2週間	+1mm ←	材料側	材料と動物身体との界面	動物身体側 →	+1mm	→ 2mm
ケイ素	14.78	4.12		8.79	13.82	2.09
カルシウム	28.37	8.70		9.01	14.47	9.47
リン	7.31	7.88		8.47	11.64	18.51
イオウ	7.81	24.26		11.88	15.47	31.90
塩素	24.99	0		0	0	0
8週間	←	材料側	動物身体側 →			
ケイ素	12.72	21.22	0.41	0.58	0.29	
カルシウム	56.64	37.96	64.63	59.93	59.44	
リン	17.76	34.45	32.40	35.95	37.96	
イオウ	0	0	0	0	0	
塩素	0	0	0	0	0	

30

40

【 0 0 3 1 】

これらの結果は、複合材料を動物体内に 2 週間移植した後にケイ素イオンがケイ素ナノ粒子から放出され、かつ動物体内に拡散し、ケイ素イオン濃度の有意の局所的増加に加えて早期段階での新しい骨の活発な再生を示すイオウイオン濃度の増加を生じることを示す

50

。8週間後、ケイ素イオンは動物体内において消失し、成熟した骨の形成を示すカルシウムおよびリン濃度は有意に増加する。この生物学的試験モデルは組織学的にも試験され、それらの結果は、界面の2つの側の組織画像が前述のイオン分布の変化によって特徴付けられる新しい骨の形成のダイナミックな変化に適合することを立証する。この生物学的試験の結果は、ケイ素イオンが新しい骨の形成の誘導に対する主要生理活性効果を有することを立証する。

【実施例4】

【0032】

実施例4．ケイ素、カルシウム、リンナノ粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で加熱型成型法によって作製された球形足場

10

【0033】

これは複合材料で作製された球形足場の調製例である。出発物質はシリカ（ SiO_2 ）、カルシア（ CaO ）、および三リン酸カルシウム（ $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ ）であって原子含有率はそれぞれ67%ケイ素、22%カルシウム、および11%リンであり、出発物質の重量割合はそれに対応して40%シリカ、6%カルシア、および54%三リン酸カルシウムである。この調製法は、前記ケイ素 -、カルシウム - およびリン - 含有無機出発物質を前記重量割合に従って混合し、微粒子の直径が5ないし80nmの範囲に到達するまでRetrachトラック・オート・ローリング・ミラーによって3日間粉碎することを含む。微粒子の直径は電子走査顕微鏡によって確認する。有機ポリマーPLGAをステンレス電気粉碎ミラーによって粉碎し、細かいふるいでふるい掛けして25ないし50ミクロンの範囲の直径を有するPLGA微粒子を得る。図3に示される球形足場を70：30の比の無機元素の組合せおよびPLGAで調製する。型をポリテトラフルオロエチレンから作製した後、ケイ素 -、カルシウム -、リン - 含有無機出発物質微粒子および有機ポリマー微粒子を前述の比で型に充填する。充填後、型をセラミック釜において200で8時間焼成して徐々に冷却し（毎分10）、最後に型からはずして図3に示される球形足場を得る（微細孔の占有率は80%；および微細孔の直径は100ないし300ミクロン）。

20

【実施例5】

【0034】

実施例5．電子走査顕微鏡の画像は、ケイ素、カルシウム、リンナノ粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された足場中に微細孔を示す

30

【0035】

得られた、ケイ素、カルシウム、リンナノ粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された足場をその長軸方向断面に沿って切断し、その内部微細孔を通常の電子走査顕微鏡によって検査する。図4に示されるその結果は、加熱型成型法によって調製された足場が連続する微細孔を備える構造を有することを立証する（それらの微細孔の直径は100ないし300ミクロンの範囲をとる）。

【実施例6】

【0036】

実施例6．ケイ素、カルシウム、リンナノ粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で加熱型成型法によって作製された柱状足場は微細孔およびそれらの微細孔を連結する連結チャンネルを含む三次元構造を有する

40

これは複合材料で作製された柱状足場の調製の例である。出発物質はシリカ（ SiO_2 ）、カルシア（ CaO ）、および三リン酸カルシウム（ $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ ）であって原子含有率はそれぞれ67%ケイ素、22%カルシウム、および11%リンであり、出発物質の重量割合はそれに対応して40%シリカ、6%カルシア、および54%三リン酸カルシウムである。この調製法は、前記重量割合の前記ケイ素 -、カルシウム - およびリン - 含有無機出発物質を混合し、微粒子の直径が5ないし80nmに到達するまでRetrachトラック・オート・ローリング・ミラーによって3日間粉碎することを含む。微粒子の直径は電子走査顕微鏡によって確認する。有機ポリマーPLGAをステンレス電気粉碎ミラーによって粉碎し、細かいふるいでふるい掛けして25ないし50ミクロンの範囲の直

50

径を有する P L G A 微粒子を得る。図 6 に示されるプレハブ柱状足場を 5 0 : 5 0 の比の無機元素の組合せおよび P L G A から以下のように調製する。型をポリテトラフルオロエチレンから作製した後、3 5 0 ないし 5 0 0 ミクロンの直径を有する数本のステンレス鋼ワイヤを 4 m m の間隔でその型内に指定された方向に設置する。前記出発物質を型に充填し、セラミック釜において 2 0 0 で 8 時間焼成し、徐々に冷却（毎分 1 0 ）した後、型からはずす。柱状足場を取り出した後、ステンレス鋼ワイヤを引き抜くことで図 5 に示される柱状足場が生じる（微細孔の占有率は 5 0 % ; 微細孔の直径は 1 0 0 ないし 3 0 0 ミクロン ; および連結チャンネルの直径は 5 0 0 ミクロン）。

【実施例 7】

【0037】

10

実施例 7 . 組織工学による側頭下顎関節の関節突起再建のための動物モデル

【0038】

図 6 に示されるように、ヒト側頭下顎関節の関節突起の解剖学的形状に従ってポリテトラフルオロエチレン型を調製し、図 5 に示される足場の調製方法に従ってテイラーメイド足場を調製する。図 6 b に示されるように、表層骨格断片を以下の工程によって患者の表層部分から収集する：局所麻酔下で体表面の隠された位置で軟組織を切開し、約 0 . 2 c m ³ の表層骨格断片を掻き落とし、細胞培養培地中で培養する。切開は縫合する。それは 3 ないし 5 日後に治癒し、患者の機能または形状に対する影響はない。得られた骨格断片を細胞培養チャンパー内の通常のポリスチレン培養皿に置き、3 7 で培養する。2 週間後、図 6 b に示される正常骨形成活性を有する 6 0 0 ないし 1 0 0 0 万個の自己骨芽細胞が 0 . 2 c m ³ の表層骨格断片から増殖する。図 6 b は通常の「V a n c u s a」法によるカルシウム沈着試験の陽性の結果を示し、ここで、ピンクに染色された骨細胞の堆積領域における褐色粒子が骨石灰化の証拠である。上記の理由で、これらの増殖細胞を医療実務のための足場において用いることができる。医療実務によると、2 c m ³ の正常自己骨を再生および形成する足場には 5 0 0 万個の細胞で十分である。関連工程はプラスマーズによる培養皿からの増殖細胞の脱着、細胞溶液への足場の浸漬を含み、それにより足場の連結チャンネルおよび連結した微細孔を介して細胞が足場の部分に侵入する。内部に細胞を有する足場を、試験（図 6 c 参照）のため、通常の手術によって動物モデルの胎内に移植する。臨床実務においては、体内に移植された足場を通常の手術によって合金副木で固定する。足場における新しい骨の再生に伴い、固定副木の支持力が徐々に低下し、新しい骨の負荷が徐々に増加し、最後に再生した骨の生理学的機能が回復する。図 6 d に示されるように、新しい骨組織は細胞および足場を体内に 6 週間移植した後に形成される。例えば、この動物モデルの新しい骨を、移植した足場を手術によって取り出し、1 0 % ホルムアルデヒド溶液で 2 4 時間固定し、パラフィンワックスに埋め込み、かつその組織を通常の方法によって切片化および染色することによって試験する。新たに形成された正常ヒト骨は普通の光学顕微鏡の下で観察することができ、H a r v a r d 細管の出現が高密度骨の形成を立証する。話は変わって、新たに再生された血管が足場中の元の連結チャンネルの位置で見出される。これらの組織学的証拠は、正常骨組織の新生が満足のいくものであることを立証する。

20

30

【0039】

40

参考文献：

1. Barrera

DA, Zylstra E, Lansbury PT, Langer R. (1995), Copolymerization and degradation of poly(lactic acid-co-lysine), *Macromolecules*, 28:425-432.

2. Cao Y,

Vacanti JP, Paige KT, Upto J, Vacanti CA. (1997), Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear, *Plast. Reconstr. Surg.* 100:297-304.

3. Cartner

50

- LP, Hiatt JL. (1997), *Textbook of Histology*, V.B. Saunders Company, Philadelphia.
4. Chou L,
Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1995), Substratum surface topography alters cell shape and regulates fibronectin, mRNA level, mRNA stability, secretion and assembly in human fibroblasts, *J. Cell Sci.* 108:1563-1573.
 5. Chou L,
Firth JD, Nathanson D, Uitto V-J, Brunette DM, (1996) Effects of titanium on transcriptional and post-transcriptional regulation of fibronectin in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 31:209-217. 10
 6. Chou L,
Firth JD, Uitto V-J, Brunette DM. (1998a), Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 39:437-445.
 7. Chou L,
Marek B, Wagner WR. (1999) Effects of hydroxyapatite coating crystallinity on biosolubility, cell attachment efficiency, and proliferation in vitro. *Biomaterials*, 20:977-985.
 8.
Feinberg SE, Hollister SJ, Halloran JW, Chu TMG, Krebsbach PH. (2000) A tissue engineering approach to site-specific reconstruction of skeletal structures of the maxillofacial regions. *Shanghai Journal of Stomatology.* 9:34-38; 88-93. 20
 9.
Gauthier AJ, Ducheyne P. Bettiger D. (1999) Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J. Biomed. Mat. Res.* 40:48-56.
 10. Hubbell
JA. (1995) *Biomaterials in tissue engineering.* Bio/Technology. 13(6):565-576.
 11. KuKubo
T. ITO S, Shigematsu M, Sakka S, Yamamuro T. (1985) Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass ceramics for prosthetic application. *J. Mater. Science*, 20:2001-2004. 30
 12. Minuth
WW, Sittinger M, Kloth S. (1998) Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Research.* 291(1):1-11.
 13. Pachence
JM, Kohn J. (1997) Biodegradable polymers for tissue engineering, in *Principles in Tissue Engineering.* By Lanz RP, Langer R, Chick WL. Academic Press, London. P273-293. 40
 14. Thomson
RC, Yaszemski MJ, Mikos AG. (1997) Polymer scaffolds processing. In *Principles in Tissue Engineering.* By Lanz RP, Langer R, Chick WL. Academic Press, London. P263-272.
 15. Tsuruga
E, Hiroko T, Hideaki I, Yuichi W, Yoshinori K. (1997) Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem.* 121:317-324.
 16. Ugo R,
Reddi AH. (1997) Tissue engineering, morphogenesis, and regeneration of the 50

periodontal tissue by bone morphogenetic proteins. 8:154-163.

17. Wong

Yulai, Cao Yilin, Vacanti, (2000) Experimental studies on condyle of human temporomandibular joint by tissue engineering, Shanghai Journal of Stomatology. Vol.9(2):94-96.

18. U.S.

Patent 4103002, July 1978

19. U.S.

Patent 4192021, March 1980

20. U.S.

Patent 5017627, May 1991

21. U.S.

Patent 5552454, September 1996

22. U.S.

Patent 5977204, November 1999

23. U.S.

Patent 6051247, April 2000

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 0 】

【図 1】骨芽細胞の増殖、アルカリホスファターゼの生理活性、オステオカルシンの合成および分泌、並びに正常なヒト身体における骨石灰化に対するケイ素、カルシウム、およびリンの効果。 20

【図 2】ケイ素、カルシウム、およびリン微粒子並びに有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された足場と単一の PLGA で作製された足場の、正常なヒト身体における骨芽細胞の増殖およびアルカリホスファターゼの生理活性の誘導における性能の比較。

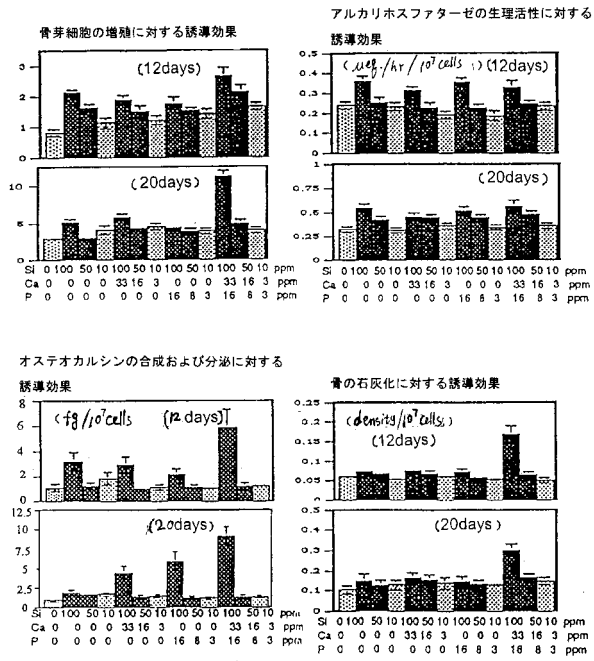
【図 3】ケイ素、カルシウム、リンのナノ微粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された球形足場。

【図 4】ケイ素、カルシウム、リンのナノ微粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された足場の微細孔の SEM 写真。

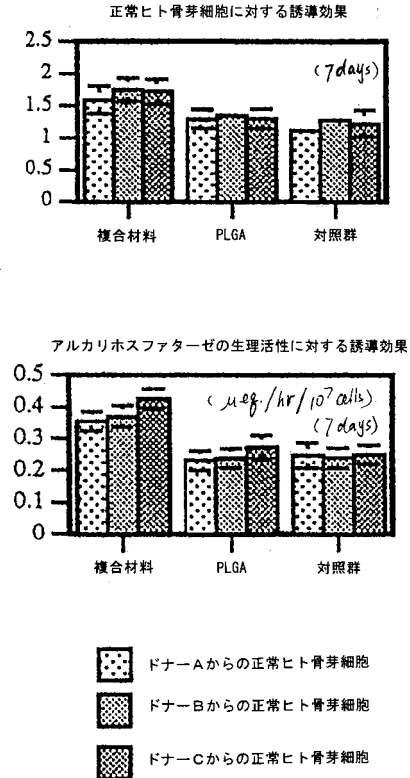
【図 5】加熱型成型法によりケイ素、カルシウム、リンのナノ微粒子および有機ポリマー（PLGA）を含む複合材料で作製された、微細孔および連結チャンネルからなる三次元構造を有する柱状足場の写真。 30

【図 6】組織工学によるヒト顎関節の関節突起再建の動物モデル。

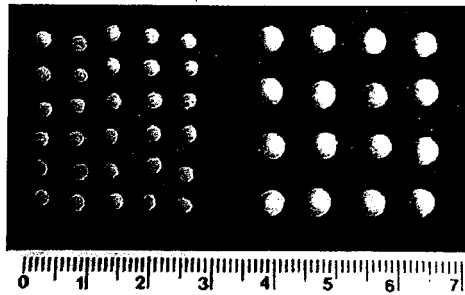
【 図 1 】



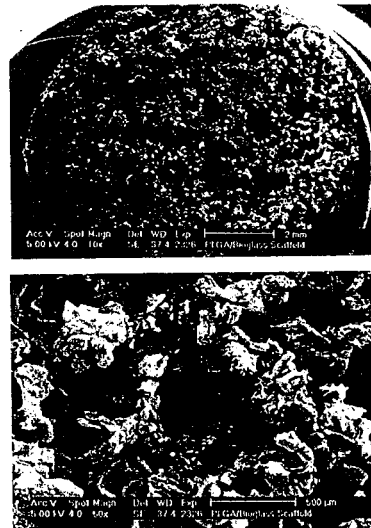
【 図 2 】



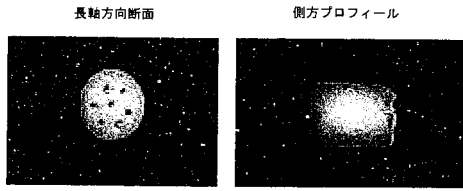
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

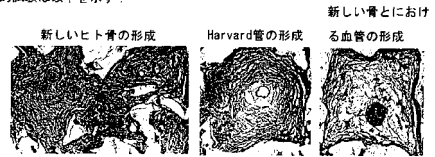
- a) ヒト側頭下顎関節の関節突起のための、 b) 骨形成特性を示すイン・ビトロ増殖正常
 ナノメートル複合材料で作成された足場 ヒト骨芽細胞



- c) ヒト側頭下顎関節の関節突起のための、正常ヒト骨芽細胞を有するナノメートル複合材料で作成された足場の動物モデルへの移植



- d) 足場を動物に6週間移植した後にヒト側頭下顎関節の関節突起が形成される。組織学的試験は以下を示す：



フロントページの続き

審査官 原田 隆興

- (56)参考文献 国際公開第99/007777(WO, A1)
国際公開第98/046164(WO, A1)
国際公開第01/034060(WO, A1)
国際公開第98/052498(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61L 27/00

A61F 2/28