

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号  
特許第6174684号  
(P6174684)

(45) 発行日 平成29年8月2日 (2017.8.2)

(24) 登録日 平成29年7月14日 (2017.7.14)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 33/06 (2006.01)	A 6 1 K 33/06
A 6 1 K 33/00 (2006.01)	A 6 1 K 33/00
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 33/10 (2006.01)	A 6 1 K 33/10
A 6 1 K 33/42 (2006.01)	A 6 1 K 33/42

請求項の数 19 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-511567 (P2015-511567)	(73) 特許権者	513067808
(86) (22) 出願日	平成25年5月6日 (2013.5.6)		リン, ジン-フェイ, チャン
(65) 公表番号	特表2015-520148 (P2015-520148A)		アメリカ合衆国, 60093 イリノイ,
(43) 公表日	平成27年7月16日 (2015.7.16)		ウィネトカ, タワー ロード 911
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/039661	(73) 特許権者	508230868
(87) 国際公開番号	W02013/169633		ジュ, チェン-ピン
(87) 国際公開日	平成25年11月14日 (2013.11.14)		アメリカ合衆国ミズーリ州64137, カ
審査請求日	平成28年4月18日 (2016.4.18)		ンザス・シティ, モンロー・アヴェニュー
(31) 優先権主張番号	61/643,500		10535
(32) 優先日	平成24年5月7日 (2012.5.7)	(73) 特許権者	514283607
(33) 優先権主張国	米国 (US)		チェン, チャン-ケン
			台湾, タオユエン カウンティ, ダイユエ
			ン タウンシップ, ダグアン ロード, レ
			ーン 600, アリイ 43, ナンバー1
			3-1, 6エフ.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルシウム系抗菌材料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リチウム化合物及びカルシウム化合物を含む固体成分を含み、  
前記固体成分は、リチウム化合物およびカルシウム化合物を含む50～90%の空隙率を有する多孔質なブロック、または前記ブロックから得られる50～90%の空隙率を有する顆粒 ( g r a n u l e s ) もしくは50～90%の空隙率を有する断片 ( p i e c e s ) であり、前記カルシウム化合物は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、ヒドロキシアパタイト ( h y d r o x y a p i t i t e ) 、およびこれらの混合物からなる群より選択される、  
抗菌剤 ( a n t i - b a c t e r i a l p r e p a r a t i o n ) 。

【請求項2】

カルシウム化合物を含むがリチウム化合物は含まない製剤に比べて抗菌能が向上する、請求項1に記載の抗菌剤。

【請求項3】

溶液：抗菌剤 = 10cc / g 割合で抗菌剤を浸漬したハंकス溶液が10以上のpH値を示す、請求項1または2に記載の抗菌剤。

【請求項4】

抗菌剤は、前記固体成分の重量に対して、5～80%の前記リチウム化合物を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗菌剤。

## 【請求項 5】

前記リチウム化合物は、リチウム塩、酸化リチウム、リチウムアミド ( $\text{LiNH}_2$ )、水酸化リチウムまたはハロゲン化リチウムである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤。

## 【請求項 6】

前記リチウム化合物は、炭酸リチウム、硫酸リチウム、リン酸リチウム、酸化リチウム、フッ化リチウム、酢酸リチウム、臭化リチウム、水酸化リチウム、硝酸リチウム、亜硝酸リチウム、ヨウ化リチウム、モリブデン酸リチウム ( $\text{Li}_2\text{MoO}_4$ )、四ホウ酸リチウム ( $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )、クエン酸リチウム四水和物 ( $\text{Li}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、またはステアリン酸リチウム ( $\text{LiC}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2$ ) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤。

10

## 【請求項 7】

リチウム化合物及びカルシウム化合物を含む固体成分を含み、

前記固体成分は、前記リチウム化合物および前記カルシウム化合物を含む粉末成分であり、前記カルシウム化合物は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム (calcium magnesium phosphate)、硝酸カルシウム、クエン酸カルシウム、塩化カルシウムおよびこれらの混合物からなる群より選択される、または

前記固体成分は、リチウム化合物およびカルシウム化合物を含むブロック、または前記ブロックから得られる顆粒 (granules) もしくは断片 (pieces) であり、前記カルシウム化合物は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、ヒドロキシアパタイト (hydroxyapatite)、およびこれらの混合物からなる群より選択される、抗菌剤 (anti-bacterial preparation) を含む、骨インプラント。

20

## 【請求項 8】

前記抗菌剤は、前記固体成分の重量に対して、5 ~ 80 % の前記リチウム化合物を含む、請求項 7 に記載の骨インプラント。

## 【請求項 9】

前記リチウム化合物は、リチウム塩、酸化リチウム、リチウムアミド ( $\text{LiNH}_2$ )、水酸化リチウムまたはハロゲン化リチウムである、請求項 7 または 8 に記載の骨インプラント。

30

## 【請求項 10】

前記リチウム化合物は、炭酸リチウム、硫酸リチウム、リン酸リチウム、酸化リチウム、フッ化リチウム、酢酸リチウム、臭化リチウム、水酸化リチウム、硝酸リチウム、亜硝酸リチウム、ヨウ化リチウム、モリブデン酸リチウム ( $\text{Li}_2\text{MoO}_4$ )、四ホウ酸リチウム ( $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ )、クエン酸リチウム四水和物 ( $\text{Li}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、またはステアリン酸リチウム ( $\text{LiC}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2$ ) である、請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の骨インプラント。

## 【請求項 11】

前記固体成分は、前記リチウム化合物および前記カルシウム化合物を含む粉末成分であり、前記カルシウム化合物は、硫酸カルシウム、リン酸カルシウム、またはこれらの混合物であり、前記リン酸カルシウムは、リン酸テトラカルシウム (TTCP)、リン酸ジカルシウム、リン酸トリカルシウム、リン酸モノカルシウムまたはこれらの混合物であり、前記硫酸カルシウムは、硫酸カルシウム 1 / 2 水和物 (CSH)、脱水硫酸カルシウム (calcium sulfate dehydrate) (CSD)、無水硫酸カルシウム、またはこれらの混合物である、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の骨インプラント。

40

## 【請求項 12】

前記抗菌剤は、0.20 ml / g ~ 0.80 ml / g の粉末に対する液体の割合でセッ

50

ティング液体成分 ( s e t t i n g   l i q u i d   c o m p o n e n t ) をさらに含む、請求項 1 1 に記載の骨インプラント。

【請求項 1 3】

前記固体成分は、50～90%の空隙率を有する多孔質なブロックである、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤。

【請求項 1 4】

前記カルシウム化合物は、リン酸テトラカルシウム、リン酸ジカルシウム、ヒドロキシアパタイト、硫酸カルシウム二水和物、硫酸カルシウム 1 / 2 水和物、およびこれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 3 に記載の抗菌剤。

【請求項 1 5】

前記固体成分は、50～90%の空隙率を有する多孔質な顆粒または断片である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤。

【請求項 1 6】

前記カルシウム化合物は、リン酸テトラカルシウム、リン酸ジカルシウム、ヒドロキシアパタイト、硫酸カルシウム二水和物、硫酸カルシウム 1 / 2 水和物、およびこれらの混合物からなる群より選択される、請求項 1 5 に記載の抗菌剤。

【請求項 1 7】

前記ブロック、前記顆粒または前記断片が 50～90%の空隙率を有する、請求項 7～12 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤の骨インプラント。

【請求項 1 8】

リチウム化合物が抗菌剤から放出されるのを遅延させるリチウム遅延剤 ( l i t h i u m   r e t a r d i n g   a g e n t ) をさらに含む、請求項 1～6 および 1 3～1 6 のいずれか 1 項に記載の抗菌剤。

【請求項 1 9】

前記リチウム遅延剤がポリ ( アクリル酸 ) であり、抗菌剤が、抗菌剤の全重量に対して、0.01～5%の、 $-(CH_2-C(COOH)H)_n-$  (この際、 $n=50\sim5000$ ) の繰り返し単位を有するポリ ( アクリル酸 ) を含む、請求項 1 8 に記載の抗菌剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、骨を処置するための抗菌剤 (antibacterial preparation) に関する。より詳細には、本発明は、リチウムを含むカルシウム系材料である骨を処置するための抗菌剤に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

かなり研究や開発の努力がなされているにもかかわらず、生物医学装置やインプラントに関連する感染の問題が存続している。細菌は、明らかに、カテーテル、股関節や膝関節インプラント、歯科インプラント、及び多くの他のデバイスの作製に使用されるものなどの、合成材料の表面に容易にコロニーを形成する。インプラントデバイスに関連する感染は、重篤な病院での問題であり、非常にしばしば、インプラント障害の主要原因である (Shi et al., Int J Artif Organs. 2008 Sep; 31(9):777-85; Zhao et al., J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Oct; 91(1):470-80; Vasilev et al., Expert Rev Med Devices. 2009 Sep; 6(5):553-67)。生育したコロニーが保護的細胞外細菌ポリサッカライド層 (protective exocellular bacterial polysaccharide layer) で自身をカプセル化するので、生体膜 (biofilm) は循環細菌 (circulating bacteria) に比べて戦うのがかなり難しい (Vasilev et al., Expert Rev Med Devices. 2009 Sep; 6(5): 553-67)。Ratner (UW Today 1999-12-14) によると、細菌が一旦デバイスにくっつくと、取り除くのが非常に困難であり、処置に対して耐性が高く、細菌が存在しない場合に細菌を殺すのに比べて

10

20

30

40

50

、細菌が付着した場合には細菌を殺すのに100倍濃度の抗生物質が必要になりうる。その理由は、細菌が定着した後に細菌が生産する保護的な生体膜である可能性がある。生体膜が生じると、しばしば、デバイスを患者から取り除くしか感染を治療する方法がない。次に、感染を止めるカギは、細菌が定着(attachment)を形成する前にデバイス近くに来る細菌を殺すことにある。

#### 【0003】

多くのストラテジーが、Na、K及びCl化合物の取り込み(Mari'a et al., 2012; Uwe et al., 2005)、酸化窒素(Nablo BJ et al., 2005)、ゲンタマイシン、セファロチン、カルベニシリン、アモキシシリン、セファマンドール、トブラマイシン及びバンコマイシン等の抗生物質(Stallmann HP et al., 2006; Stallmann HP et al., 2006; Bohner M et al., 2000; Zhao L et al., 2009; Zhao L et al., 2009; Akif et al., 2008; Helen et al., 2010; A.Dion et al., 2005)、銀及びキトサンナノ粒子(Huiliang et al., 2010; Volker et al., 2003; Ewald A et al., 2011; Shi Z et al., 2006)、TiO<sub>2</sub> (Lingzhou et al., 2011; Bogdan et al., 2009)、イオンをインプラントした銅及び銀(ion implanted copper and silver)(N. Matsumoto et al., 2009; Jayesh et al., 2008)など、細菌の付着及び成長を阻害するためのインプラントまたはインプラント表面の修飾について開発されてきたし、数多くのレビュー記事が公開された(Vasilev et al., Expert Rev Med Devices. 2009 Sep; 6(5): 553-67; Cao and Liu, Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2010 Nov-Dec; 2(6): 670-84; Chaloupka et al., Trends Biotechnol. 2010 Nov; 28(11):580-8. Epub 2010 Aug 18)。報告された抗菌性インプラントとしては、ポリマー系(Alt et al, Biomaterials Volume 25, Issue 18, August 2004, Pages 4383-4391; Shi et al., Biomaterials Volume 27, Issue 11, April 2006, Pages 2440-2449; Marks et al., The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume 1976, 58(3): 358-64)、金属系(Visai et al., Int J Artif Organs. 2011 Sep; 34(9): 929-46; Heidenau et al., J Mater Sci Mater Med. 2005 Oct; 16(10): 883-8; Fiedler et al., Int J Artif Organs. 2011 Sep; 34(9): 882-8; Cao et al., Biomaterials. 2011 Jan; 32(3):693-705), Kazemzadeh-Narbat M et al., 2010; Yoshinari M et al., 2001; Yoshinari M et al., 2010)、およびセラミック系(Gbureck et al., Biomaterials. 2005 Dec; 26(34):6880-6; Kim et al., 2007, Key Engineering Materials, 330-332, 791; Bohner et al., Journal of Pharmaceutical Sciences Volume 86, Issue 5, pages 565-572, May 1997)などがある。

#### 【発明の概要】

#### 【0004】

##### 発明の要約

本発明の第一の目的は、骨を処置するための抗菌剤を提供することである。

#### 【0005】

さらに、本発明はまた、前記抗菌剤を調製する方法、および骨を処置するのに前記抗菌剤を使用する方法を提供することを目的とする。

#### 【0006】

本発明により提供される抗菌剤は、リチウム化合物およびカルシウム化合物を含む固体成分を含み、カルシウム化合物を含むがリチウム化合物は含まない製剤に比べて抗菌能が向上する。

#### 【0007】

溶液：抗菌剤 = 10 cc / g 割合で本発明の抗菌剤を浸漬したハंकス溶液は、10以上のpH値を示す。

#### 【0008】

好ましくは、前記抗菌剤は、前記固体成分の重量に対して、約5～80%、より好ましくは約10～70%の前記リチウム化合物を含む。

#### 【0009】

好ましくは、前記リチウム化合物は、リチウム塩、酸化リチウム、リチウムアミド(L

10

20

30

40

50

iNH<sub>2</sub>)、水酸化リチウムまたはハロゲン化リチウムであり；より好ましくは、炭酸リチウム、硫酸リチウム、リン酸リチウム、酸化リチウム、フッ化リチウム、酢酸リチウム、臭化リチウム、水酸化リチウム、硝酸リチウム、亜硝酸リチウム、ヨウ化リチウム、モリブデン酸リチウム(Li<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>)、四ホウ酸リチウム(Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)、クエン酸リチウム四水和物(Li<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>・4H<sub>2</sub>O)、またはステアリン酸リチウム(LiC<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub>)であり、最も好ましくは炭酸リチウム、またはリン酸リチウムである。

#### 【0010】

好ましくは、前記固体成分は、前記リチウム化合物及び前記カルシウム化合物を含む粉末成分であり、この際、前記カルシウム化合物は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム(calcium magnesium phosphate)、硝酸カルシウム、クエン酸カルシウム、塩化カルシウムおよびこれらの混合物からなる群より選択され；より好ましくは前記カルシウム化合物は、硫酸カルシウム、リン酸カルシウム源、またはこれらの混合物である。好ましくは、前記リン酸カルシウムは、リン酸テトラカルシウム(TTCP)、リン酸ジカルシウム、リン酸トリカルシウム、リン酸モノカルシウムまたはこれらの混合物である。好ましくは、前記硫酸カルシウムは、硫酸カルシウム1/2水和物(CSH)、脱水硫酸カルシウム(calcium sulfate dehydrate)(CSD)、無水硫酸カルシウム、またはこれらの混合物である。

#### 【0011】

好ましくは、前記抗菌剤は、固体成分は粉末成分である際に、0.20ml/g～0.80ml/gの粉末に対する液体の割合でセッティング液体成分(setting liquid component)をさらに含む。

#### 【0012】

本発明はまた、本発明の抗菌剤の前記粉末成分及び前記セッティング液体成分を混合することにより骨セメントペーストを形成し；さらに前記骨セメントペーストを骨の穴(hole)または空洞(cavity)に充填して、処置を必要とする穴または空洞で硬化させることを有する、患者の処置方法を提供する。

#### 【0013】

好ましくは、前記固体成分は、ブロック、または前記ブロックを粉砕することによって得られる顆粒(granules)もしくは断片(pieces)である。前記ブロックは、リチウム化合物及びカルシウム化合物を含み、この際、前記カルシウム化合物は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、ヒドロキシアパタイト(hydroxyapatite)、またはこれらの混合物からなる群より選択され、好ましくは、リン酸テトラカルシウム、リン酸ジカルシウム、ヒドロキシアパタイト、硫酸カルシウム二水和物、硫酸カルシウム1/2水和物、またはこれらの混合物からなる群より選択される。

#### 【0014】

本発明はまた、本発明の抗菌剤の前記ブロック、前記顆粒または前記断片を処置を必要とする患者にインプラントすることを有する、患者の処置方法を提供する。

#### 【0015】

好ましくは、前記抗菌剤は、リチウム化合物が抗菌剤から放出されるのを遅延させるリチウム遅延剤(lithium retarding agent)をさらに含む。より好ましくは、前記リチウム遅延剤がポリ(アクリル酸)である。好ましくは、前記抗菌剤は、抗菌剤の全重量に対して、0.01～5%の、 $-(CH_2-C(COOH)H)_n-$ (この際、 $n=50\sim50000$ 、好ましくは $n=1000\sim5000$ 、より好ましくは、 $1500\sim2500$ )の繰り返し単位を有するポリ(アクリル酸)を含む。

#### 【0016】

本発明の主要な利点は下記のとおりである：

(a) 本発明の抗菌剤(リチウム化合物)は抗生物質ではないので、すべての種類の抗

10

20

30

40

50

生物質に関連する副作用がない。

【0017】

(b) 本発明の抗菌剤のリチウム化合物は、インプラントされた後徐々にインプラントから溶出できるので、細菌をインプラントに近づかないように維持できる。さらに、抗菌性のリチウム化合物の溶解速度を、濃度が高くなりすぎて周辺組織のネガティブな応答を引き起こさないように、または濃度が低くなりすぎて不十分な抗菌効果を生じないように、調節できる。

【0018】

(c) 有効な抗菌期間が長くなりすぎたりまたは短くなりすぎたりしないように調節できる。金属系の抗菌剤等の永久的な抗菌剤を含むインプラントデバイスとは異なり、本発明の抗菌剤の期間は、所望の抗菌期間終了時（殆どの抗菌剤が放出された際）には、インプラントの生体適合性が正常な許容レベルにまで容易に上昇するように設計できる。

【0019】

(d) 本発明の抗菌性のリチウム化合物が溶解した後は、所望の大きさの孔が形成され、これにより周辺の骨細胞が孔内で生育することによって、インプラントの生体吸収速度が向上する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、本発明により調製されたTTCP/DCPA/CSH/LiサンプルおよびTTCP/DCPA/CSHアルカリ金属塩サンプルの抗菌領域を示す。

【図2】図2は、1日間、ハンクス溶液に浸漬された本発明により調製されたTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックの抗菌領域を示す。

【図3】図3は、2日間、ハンクス溶液に浸漬された本発明により調製されたTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックの抗菌領域を示す。

【図4】図4は、3日間、ハンクス溶液に浸漬された本発明により調製されたTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックの抗菌領域を示す。

【図5】図5は、5日間、ハンクス溶液に浸漬された本発明により調製されたTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックの抗菌領域を示す。

【図6】図6は、浸漬せずに本発明により調製されたCaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Liブロックの抗菌領域を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

本発明の好ましい実施形態を示すが、下記事項に限定されるものではない：

1. カルシウム(Ca)源およびリチウム(Li)源を含む骨部位を治療するための抗菌剤(anti-bacterial formula)。

【0022】

2. カルシウム源及びリチウム源の重量に対して、約5～80%、より好ましくは約10～70%のリチウム源を含む、上記1.の抗菌剤。

【0023】

3. 上記1.におけるリチウム源は、炭酸リチウム、硫酸リチウム、リン酸リチウム、酸化リチウム、フッ化リチウム、酢酸リチウム、臭化リチウム、水酸化リチウム、硝酸リチウム、亜硝酸リチウム、ヨウ化リチウム、モリブデン酸リチウム(Li<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>)、リチウムアミド(LiNH<sub>2</sub>)、四ホウ酸リチウム(Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>)、クエン酸リチウム四水和物(Li<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>・4H<sub>2</sub>O)、ステアリン酸リチウム(LiC<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub>)からなる群より選択される。

【0024】

4. 上記2.におけるリチウム源は、炭酸リチウムおよび/またはリン酸リチウムである。

【0025】

5. 上記1.におけるカルシウム源は、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、水酸化カルシウム、リン酸カルシウムマグネシウム、硝酸カルシウム、クエン酸カルシウム、塩化カルシウム、またはこれらの混合物である。

【0026】

6. 上記5.におけるリン酸カルシウムは、リン酸テトラカルシウム(TTCP)、リン酸ジカルシウム、リン酸トリカルシウム(TCP)、ヒドロキシアパタイト(HA)、またはこれらの混合物である。

【0027】

7. 上記6.におけるリン酸ジカルシウムは、リン酸ジカルシウム無水物(DCPA)である。

10

【0028】

8. 上記5.における硫酸カルシウムは、硫酸カルシウム1/2水和物(CSH)、硫酸カルシウム二水和物(CSD)、無水硫酸カルシウム、またはこれらの混合物である。

【0029】

9. 上記5.におけるカルシウム源は、リン酸カルシウム及び硫酸カルシウムを含む。

【0030】

10. 上記9.におけるリン酸カルシウムは、リン酸テトラカルシウム(TTCP)を含む。

【0031】

11. 上記10.におけるリン酸カルシウムは、リン酸ジカルシウムをさらに含む。

20

【0032】

12. 上記11.におけるリン酸ジカルシウムは、リン酸ジカルシウム無水物(DCPA)である。

【0033】

13. 上記9.におけるリン酸カルシウムは、硫酸カルシウム1/2水和物(CSH)を含む。

【0034】

14. 上記1.における抗菌剤は、前記抗菌剤からのリチウムの放出を遅延させるリチウム遅延剤(lithium retarding agent)をさらに含む。

【0035】

15. 上記14.におけるリチウム遅延剤は、ポリ(アクリル)酸(PAA)である。

30

【0036】

16. 上記15.における抗菌剤は、抗菌剤の全重量に対して、0.01~5%の、 $-(CH_2-C(COOH)H)_n-$ (この際、 $n=50\sim50000$ 、好ましくは $n=1000\sim5000$ 、より好ましくは $1500\sim2500$ )の繰り返し単位を有するポリ(アクリル酸)を含む。

【0037】

17. 上記1.における抗菌剤は、これにより孔が前記孔形成剤の溶解後にインピボで形成する、孔形成剤(pore-forming agent)をさらに含む。

【0038】

40

18. 上記17.における孔形成剤は、LiCl、KCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NaIO<sub>3</sub>、KI、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、アミノ酸-ナトリウム塩、アミノ酸-カリウム塩、グルコース、ポリサッカライド、脂肪酸-ナトリウム塩、脂肪酸-カリウム塩、酒石酸水素カリウム(KHC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)、炭酸カリウム、グルコン酸カリウム(KC<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>)、酒石酸カリウム-ナトリウム(KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O)、硫酸カリウム(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群より選択される。

【0039】

19. 上記18.における孔形成剤は、カルシウム源およびリチウム源の容積に対して、約10~80容積%、好ましくは20~60容積%である。

50

## 【 0 0 4 0 】

20. 上記1.における抗菌製剤は、粉末形態、セメント形態、密なブロック（予め成形された(pre-molded)）形態、密な顆粒形態、多孔質なブロック（予め成形された(pre-molded)）形態、多孔質な顆粒形態、またはこれらの混合物である。

## 【 0 0 4 1 】

21. 上記20.におけるセメント形態の抗菌製剤は、セッティング液剤(setting liquid agent)をさらに含み、これにより、前記カルシウム源、前記リチウム源、および前記セッティング液剤を混合することにより、セメントペーストが形成されうる。

## 【 0 0 4 2 】

22. 上記21.におけるセッティング液剤は、約0.01M～約2M濃度のアンモニウムイオン( $\text{NH}_4^+$ )を含む。

10

## 【 0 0 4 3 】

23. 上記22.におけるセッティング液剤は、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 、またはこれらの混合物の溶液である。

## 【 0 0 4 4 】

24. 上記23.におけるセッティング液剤は、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ の溶液である。

## 【 0 0 4 5 】

25. 上記24.における粉末に対する液体の割合(liquid-to-powder ratio)は、約0.1cc/g～約1.0cc/g、好ましくは約0.2cc/g～約0.8cc/gである。

20

## 【 0 0 4 6 】

26. 上記20.における密なブロック（予め成形された(pre-molded)）形態の抗菌製剤は、セメント粉末および上記21.におけるセッティング液剤を混合することによりセメントペーストを調製し；前記ペーストを金型で成形し；さらに前記金型を取り除いて密なブロックを形成することを有する方法によって調製される。

## 【 0 0 4 7 】

27. 上記26.における方法は、前記ペーストを金型中で加圧した後、前記ペーストを硬化させて液体の一部を前記ペーストから取り除くことにより、前記ペーストの粉末に対する液体の割合を低くすることをさらに有し、この際、金型中のペーストにかかる圧力は、約1MPa～500MPa、好ましくは100MPa～500MPaである。

30

## 【 0 0 4 8 】

28. 上記26.における方法は、所定期間、密なブロックを浸漬溶液に浸漬することにより、浸漬溶液から取り除かれた得られた浸漬ブロックの圧縮強度が、前記浸漬処理を行わないブロックに比して増加することをさらに有する。

## 【 0 0 4 9 】

29. 上記28.における浸漬溶液は、約0.1M～約3Mのリン酸塩濃度を有するリン酸塩含有溶液である。

## 【 0 0 5 0 】

30. 上記20.における密な顆粒形態の抗菌製剤は、セメント粉末および上記21.におけるセッティング液剤を混合することによりセメントペーストを調製し；前記ペーストを金型で成形し；前記金型を取り除いて密なブロックを形成し；さらに前記密なブロックを密な顆粒状に粉砕することを有する方法によって調製される。

40

## 【 0 0 5 1 】

31. 上記30.における方法は、前記ペーストを金型中で加圧した後、前記ペーストを硬化させて液体の一部を前記ペーストから取り除くことにより、前記ペーストの粉末に対する液体の割合を低くすることをさらに有し、この際、金型中のペーストにかかる圧力が約1MPa～500MPa、好ましくは100MPa～500MPaである。

## 【 0 0 5 2 】

32. 上記30.における方法は、所定期間、密な顆粒を浸漬溶液に浸漬することによ

50



り、浸漬溶液から取り除かれた得られた浸漬された密な顆粒の圧縮強度が、前記浸漬処理を行わない顆粒に比して増加することをさらに有する。

【 0 0 5 3 】

33. 上記32.における浸漬溶液は、約0.1M～約3Mのリン酸塩濃度を有するリン酸塩含有溶液である。

【 0 0 5 4 】

34. 上記20.における多孔質のブロック形態の抗菌剤は、セメント粉末および上記(21)におけるセッティング液剤を混合することによりセメントペーストを調製し、この際、孔形成剤をセメントに添加し；前記ペーストを金型で成形し；前記金型を取り除いてブロック体(block article)を形成し；さらに前記ブロック体を浸漬溶液に浸漬して、浸漬溶液中に前記孔形成剤の少なくとも一部を溶解して、孔を中に形成することにより、多孔質なブロックを形成し、この際、好ましくは、前記多孔質なブロックは50～90%の空隙率を有することを有する方法によって調製される。

10

【 0 0 5 5 】

35. 上記34.における方法は、前記ペーストを金型中で加圧した後、前記ペーストを硬化させて液体の一部を前記ペーストから取り除くことにより、前記ペーストの粉末に対する液体の割合を低くすることをさらに有し、この際、金型中のペーストにかかる圧力が約1MPa～500MPa、好ましくは100MPa～500MPaである。

【 0 0 5 6 】

36. 上記34.における方法は、所定期間、多孔質なブロックを浸漬溶液に浸漬することにより、浸漬溶液から取り除かれた得られた浸漬多孔質ブロックの圧縮強度が、前記浸漬処理を行わない多孔質ブロックに比して増加することをさらに有する。

20

【 0 0 5 7 】

37. 上記36.における浸漬溶液は、約0.1M～約3Mのリン酸塩濃度を有するリン酸塩含有溶液である。

【 0 0 5 8 】

38. 上記20.における多孔質な顆粒形態の抗菌剤は、セメント粉末および上記21.におけるセッティング液剤を混合することによりセメントペーストを調製し、この際、孔形成剤をセメントに添加し；前記ペーストを金型で成形し；前記金型を取り除いてブロック体(block article)を形成し；さらに前記ブロック体を浸漬溶液に浸漬して、浸漬溶液中に孔形成剤の少なくとも一部を溶解して、孔を中に形成することにより、多孔質なブロックを形成し、この際、好ましくは、前記多孔質なブロックは50～90%の空隙率を有し；さらに前記多孔質ブロックを多孔質な顆粒状に粉砕することを有する方法によって調製される。

30

【 0 0 5 9 】

39. 上記20.における多孔質な顆粒形態の抗菌剤は、セメント粉末および上記21.におけるセッティング液剤を混合することによりセメントペーストを調製し、この際、孔形成剤をセメントに添加し；前記ペーストを金型で成形し；前記金型を取り除いて密なブロック体(block article)を形成し；前記密なブロック体を密な顆粒状に粉砕し；さらに前記密な顆粒を浸漬溶液に浸漬して、浸漬溶液中に孔形成剤の少なくとも一部を溶解して、孔を中に形成することにより、多孔質な顆粒を形成することを有する方法によって調製され、この際、好ましくは、前記多孔質な顆粒は50～90%の空隙率を有する。

40

【 0 0 6 0 】

40. 上記38.または39.における方法は、前記ペーストを金型中で加圧した後、前記ペーストを硬化させて液体の一部を前記ペーストから取り除くことにより、前記ペーストの粉末に対する液体の割合を低くすることをさらに有し、この際、金型中のペーストにかかる圧力が約1MPa～500MPa、好ましくは100MPa～500MPaである。

【 0 0 6 1 】

41. 上記38.または39.における方法は、所定期間、多孔質なブロックを浸漬溶

50

液に浸漬することにより、浸漬溶液から取り除かれた得られた浸漬多孔質顆粒の圧縮強度が、前記浸漬処理を行わない多孔質顆粒に比して増加することをさらに有する。

【0062】

42. 上記41.における浸漬溶液は、約0.1M～約3Mのリン酸塩濃度を有するリン酸塩含有溶液である。

【0063】

43. 上記34.または38.における孔形成剤は、LiCl、KCl、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NaIO<sub>3</sub>、KI、Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、アミノ酸-ナトリウム塩、アミノ酸-カリウム塩、グルコース、ポリサッカライド、脂肪酸-ナトリウム塩、脂肪酸-カリウム塩、酒石酸水素カリウム(KHC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>)、炭酸カリウム、グルコン酸カリウム(KC<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>)、酒石酸カリウムナトリウム(KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>・4H<sub>2</sub>O)、硫酸カリウム(K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、硫酸ナトリウム、硫酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群より選択される。

10

【0064】

44. 上記1.における抗菌製剤は、成長因子、BMP、生細胞、または薬剤をさらに含む。

【0065】

45. 上記1.における骨部位は、整形外科部位(orthopedic site)または歯科部位(dental site)である。

【0066】

20

46. 上記45.における整形外科部位(orthopedic site)または歯科部位(dental site)は、骨折部位(fractured site)、疾患部位(diseased site)、または感染部位である。

【0067】

47. 上記46.における疾患部位(diseased site)は、歯肉の疾患部位(gum-diseased site)である。

【0068】

48. 少なくとも一部の抗菌製剤が前記部位で溶解するとpH値が少なくとも10にまで上昇する、(1)における骨部位。

【実施例】

【0069】

30

実験方法

略語

TTCp: リン酸テトラカルシウム

DCPA: リン酸ジカルシウム無水物

CSH: 硫酸カルシウム1/2水和物

PAA: ポリ(アクリル酸)

L/P比: 液体/粉末比

【0070】

## 【表 1】

表 1: 本研究のために使用される化学物質

化学物質	式	製造会社	場所
ピロリン酸ニカルシウム	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Alfa	USA
リン酸テトラカルシウム (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Fabricated in-house	Taiwan
リン酸ジカルシウム無水物 (DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	ACROS and Innophos	New jersey, USA
硫酸カルシウム1/2水和物 (CSH)	$\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$	Showa	Tokyo, Japan
リン酸水素ジアンモニウム	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Showa	Tokyo, Japan
炭酸カルシウム	$\text{CaCO}_3$	Katayama	Japan
硫酸リチウム	$\text{Li}_2\text{SO}_4$ (99% 純度)	Nihon Shiyaku Industries	Osaka, Japan
リン酸リチウム	$\text{Li}_3\text{PO}_4$ (99% 純度)	Nihon Shiyaku Industries	Osaka, Japan
炭酸リチウム	$\text{Li}_2\text{CO}_3$ (99% 純度)	Nihon Shiyaku Industries	Osaka, Japan
炭酸リチウム		JT Baker	
酸化リチウム	$\text{Li}_2\text{O}$ (99% 純度)	Alfa	USA
フッ化リチウム	$\text{LiF}$ (98% 純度)	Nihon Shiyaku Industries	Osaka, Japan
ポリ(アクリル酸)(PAA)	$-(\text{CH}_2-\text{C}(\text{COOH})\text{H})_n$	Showa	Tokyo, Japan

## 【0071】

TTCP、TTCP/DCPA、TTCP/CSHおよびTTCP/DCPA/CSH粉末の調製

TTCP粉末は、BrownおよびEpsteinによって提案された方法[Journal of Research of the National Bureau of Standards - A Physics and Chemistry 6 (1965) 69A 12]を用いてピロリン酸ニカルシウム( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) (Alfa, USA)及び炭酸カルシウム( $\text{CaCO}_3$ ) (Katayama Chem. Co., Tokyo, Japan)の反応からインハウスで(in-house)作製された。

## 【0072】

TTCP粉末は、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 粉末を $\text{CaCO}_3$ 粉末と均一に12時間混合することによって調製した。 $\text{CaCO}_3$ 粉末に対する $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 粉末の混合比は、1:1.27(重量比)であり、上記粉末混合物を1400℃まで加熱して、2種の粉末を反応させて、TTCPを形成した。

## 【0073】

適当量のTTCP及びDCPA粉末を、1:1のモル比でボールミル(ball miller)で

均一に混合して、T T C P / D C P A 混合粉末を得た。適当量の T T C P 及び C S H 粉末をボールミル(ball miller)で均一に混合して、T T C P / C S H 混合粉末を得た。適当量の T T C P / D C P A 混合粉末 ( 1 : 1 のモル比 ) および C S H 粉末をボールミル(ball miller)で均一に混合して、T T C P / D C P A / C S H 混合粉末を得た。

#### 【 0 0 7 4 】

T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物および T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物混合粉末の調製

適当量の L i 化合物 ( 例えば、炭酸リチウム、リン酸リチウム、硫酸リチウム、または酸化リチウム ) 及び T T C P、T T C P / D C P A、T T C P / C S H または T T C P / D C P A / C S H をボールミル(ball miller)で均一に混合して、T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物または T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物混合粉末を得た。

10

#### 【 0 0 7 5 】

P A A 含有セッティング溶液(setting solution)の調製

P A A を添加したまたは添加しない ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> 溶液双方をセッティング溶液(setting solution)として使用し、様々な L i 含有サンプルの抗菌挙動への効果を比較した。本研究に使用されるポリ ( アクリル ) 酸 ( P A A と省略する ) は、1 5 0 , 0 0 0 の分子量を有し、2 5 w t % 水溶液 ( 試薬グレード、Showa, Japan ) として得られた。異なる濃度の P A A 含有 ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> セッティング溶液を、異なる容積 % の P A A 水溶液を ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> 溶液に添加することによって、調製した。

20

#### 【 0 0 7 6 】

P A A を添加したおよび添加しない T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物および T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物セメントペーストの調製

P A A を添加したおよび添加しない一連の T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物及び T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物セメントペーストを、それぞれ、適当な L / P 比で P A A を添加しておよび添加せずに、適当量の各混合粉末および ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> セッティング溶液を混合することによって、調製した。

#### 【 0 0 7 7 】

セメントペーストの有効時間(working time) / 硬化時間(setting time)の測定

セメントペーストの有効時間(working time)を、その後セメントペーストが有効でなくなった時間によって測定した。セメントペーストの硬化時間(setting time)を、歯科用リン酸亜鉛セメントに関する I S O 1 5 6 6 に記載される標準的な方法に従って測定した。1 mm 直径の先端を有する V i c a t 針に載せられた 4 0 0 g m 重量がセメントの表面に丸状がはっきり分かる押し込み(perceptible circular indentation)が作れなくなる時に、セメントが硬化したと考える。

30

#### 【 0 0 7 8 】

P A A を添加したおよび添加しない T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物及び T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物ブロックおよび顆粒の調製

40

適当量の T T C P / L i 化合物、T T C P / D C P A / L i 化合物、T T C P / C S H / L i 化合物または T T C P / D C P A / C S H / L i 化合物混合粉末を、所望の L / P 比で P A A を添加しておよび添加せずに、( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> セッティング溶液と混合してセメントペーストを形成した。

#### 【 0 0 7 9 】

十分硬化する前に、ペーストを所望の圧力 ( 例えば、4 5 0 K g f または 1 5 6 M P a ) で金型に仕込み、液体の一部をペーストからしぼり出した(squeeze)。金型から取り出した後、必要であれば、ブロックサンプルをさらに、所望の時間 ( 例えば、1 日 )、所望の温度 ( 例えば、0 ~ 5 0 ) で、浸漬溶液 ( 例えば、1 ~ 3 M ( N H <sub>4</sub> )<sub>2</sub> H P O<sub>4</sub> )

50

または $K_2HPO_4$ )に浸漬して、強度を増加させた後、オープンで(例えば、50℃で1日)乾燥した。必要であれば、ブロックを所望の粒度分布範囲を有する顆粒状に粉碎した。必要であれば、金型をオーダーメイドして(tailor-made)、所望の形状(shape)および配置(geometry)を有するブロックを製造してもよい。

#### 【0080】

浸漬、pHおよび重量損失の測定

様々なLi含有サンプルを、異なる期間(1日、2日、3日、5日、及び7日)、10cc/gの溶液/サンプル比で、ハンクス溶液(Hanks' solution)(pH値が7.4)に浸漬した。溶液中の浸漬による重量損失及びpH変化を測定した。ハンクス溶液は、溶液のイオン濃度を一定に保つために、浸漬試験中、毎日新しいものに交換した(refresh)。

10

#### 【0081】

細胞毒性試験

細胞毒性試験を、ISO 10993-5に従って行った。抽出方法を使用した。NIH/3T3線維芽細胞(播種密度 5000個/ウェル)を、ウシ血清(10%)及びPFSF(1%)を追加したダルベッコの改変最小培地(Dulbecco's modified essential medium)(DMEM)中で24時間予め培養した。0.1(g/ml)の比で培養培地中で硬化したセメントペーストを37℃で24時間浸漬した後、遠心によって液体を集めることによって、抽出物を調製した。この抽出物を、37℃で5%CO<sub>2</sub>加湿雰囲気中でインキュベートした96ウェルマイクロプレートに添加した(100μl/ウェル)。24時間後、抽出物を吸引した後、培養培地(100μl)及びWST-1(10μl)の混合物をウェルに添加して、37℃で1時間インキュベートした。細胞の生存率をWST-1アッセイを用いることによって測定した。これは、450nmでの吸光度が細胞のデヒドロゲナーゼ活性の量に比例するミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性の比色分析である。1時間インキュベート後、培地およびWST-1の混合物を96ウェルマイクロプレートに移して、450nmの吸光度をELISAリーダーで測定した。また、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>粉末をコントロールとしてアッセイした。各サンプルについて、4回試験した(n=4)。

20

#### 【0082】

##### 【表2】

表2:細胞毒性試験に使用される細胞系

細胞名	NIH/3T3
細胞番号	BCRC 60008
タイプ	Mouse NIH/Swiss embryo
成長特性	Adherent, 5% CO <sub>2</sub> , 37°C
形態	線維芽細胞
細胞培養培地	90% ダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's medium)(DMEM)+10% ウシ血清
凍結用培地 (Freeze medium)	93% 培養培地 + 7% DMSO

30

40

#### 【0083】

抗菌試験

トリプシンソイブロス(Tryptic Soy Broth)(TSB)培地の調製

TSB培地を調製するために、6g トリプトン(Neogen, USA)、2g ソイトン(Soytone)(Soytone BD, USA)及び2g NaCl(J.T. Baker, USA)を、400mlの再蒸留水の入ったビーカーに仕込み、撹拌子で混合した。完全に溶解した後、溶液のpHを7.3に調節し、溶液を30分間オートクレーブにかけた(121℃、1.2kg/cm<sup>2</sup>)。

#### 【0084】

トリプシンソイアガー(Tryptic Soy Agar)(TSA)培地の調製

50

T S A 培地を調製するために、6 g トリプトン (Neogen, USA)、2 g ソイトン (Soytone) (Soytone BD, USA) 及び 2 g N a C l (J.T. Baker, USA) を、4 0 0 m l の再蒸留水の入ったビーカーに仕込み、撈拌子で混合した。完全に溶解した後、溶液の p H を 7 . 3 に調節し、溶液を 3 0 分間オートクレーブにかけた ( 1 2 1 、 1 . 2 k g / c m <sup>2</sup> ) 。滅菌した後、この T S A 培地をペトリ皿に注ぎ、硬化させた。次に、この T S A 培地を 3 0 のインキュベーターに入れた。

#### 【 0 0 8 5 】

##### ディスク拡散アッセイ

黄色ブドウ球菌 (staphylococcus aureus) ( S A ) 含有 T S B 培地 1 m l を 1 5 m l の遠心管に写し、1 0 m l のリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) を加えて、緩やかに混合した。この混合物を 3 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心した (KUBOTA 5922, Japan)。上清を除去して、S A ペレットを残した。さらに、1 m l の P B S を添加して、ペレットを懸濁した。2 0 μ l の S A 懸濁液及び 1 8 0 μ l の P B S を 9 6 ウェルプレートの各ウェルに移した。E L I S A リーダー (Sunrise, Tecan, Switzerland) を用いて、6 0 0 n m の吸光度をアッセイして、細菌濃度 ( c f u / m l ) を測定した ( 2 0 0 μ l の P B S をネガティブコントロールに使用した ) 。測定したら、適当量の S A 含有培地を 1 マイクロ遠心管 (1 m i c r o c e n t r i f u g e t u b e) に移し、細菌濃度が 3 . 5 × 1 0 <sup>6</sup> ( c f u / m l ) になるように T S B を添加した。遠心管を 1 5 秒間振盪して、完全に混合した。1 0 0 μ l の S A 含有培地を除去して、寒天プレートに均一に滴下した。ブロスが寒天プレート上に均一に分布してほとんど乾燥したら、試験すべきサンプルを寒天の上において、ペトリ皿にパラフィルムをかぶせた。この皿を 3 7 で 2 4 時間インキュベーター (LM-570R, Yih Der, Taiwan) に置いた。次に、細菌コロニー形成を観察して、コロニーの直径を測定した。

#### 【 0 0 8 6 】

##### ハンクス溶液への浸漬

載せた (loaded) 後、サンプルを 1 時間テーブルにおいて乾燥させた。次に、4 つのサンプルを 2 0 m l のガラス製バイアルに入れ、0 . 1 g / m l の固体 / 液体比となるように 8 m l のハンクス溶液を添加した。このガラス製バイアルを、1、2、3、5、及び 7 日間、3 7 の水浴中に入れた。ハンクス溶液を毎日交換した。所定期間浸漬した後、サンプルを 2 4 時間 5 0 のオープンに入れた後、ジップロックバッグ (zip lock bag) 中で貯蔵した。

#### 【 0 0 8 7 】

##### 実施例 1 : 市販の純粋なリチウム塩での抗菌試験

L i <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、L i <sub>3</sub> P O <sub>4</sub>、L i <sub>2</sub> C O <sub>3</sub>、L i <sub>2</sub> O、及び L i F 等の、一連の市販の純粋なリチウム化合物を用いて、抗菌試験を行った。

#### 【 0 0 8 8 】

サンプルを、セッティング溶液と混合せずに 3 m m 高さ、6 m m 直径のシリンダー状に 4 5 0 k g f の圧力下で乾式成形する (dry-molded) か、または 0 . 2 ~ 0 . 6 の L / P 比 ( L i <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> では、L i <sub>3</sub> P O <sub>4</sub> では 0 . 2 5、L i <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> では 0 . 6 0 ) で 0 . 6 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> セッティング溶液と混合して 3 m m 高さ、6 m m 直径のシリンダー状に 1 . 4 M P a の圧力下で湿式成形する (wet-molded) した。

#### 【 0 0 8 9 】

##### 結果 :

- ( 1 ) 全ての試験リチウム化合物 ( L i <sub>2</sub> S O <sub>4</sub>、L i <sub>3</sub> P O <sub>4</sub>、L i <sub>2</sub> C O <sub>3</sub>、L i <sub>2</sub> O、及び L i F ) は、高い抗菌挙動を示した、
- ( 2 ) L i <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> 以外は、全ての ( セッティング溶液と混合せずに ) 乾式成形したリチウム化合物は、T B S 寒天プレートで多かれ少なかれ崩壊 / 溶解した。

#### 【 0 0 9 0 】

- ( 3 ) 全ての ( 0 . 2 ~ 0 . 6 c c / g の L / P 比で 0 . 6 M ( N H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> と混合して ) 湿式成形した L i 化合物は、T B S 寒天プレートに崩壊しなかった。

#### 【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

(4) 湿式成形した  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  及び  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  サンプルは、2つの最大抗菌領域(それぞれ、22mm及び18mm)を示す。

【0092】

実施例2: TTCP/Li塩およびTTCP/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動および他の試験

浸漬、pH測定、重量損失、細胞毒性および抗菌試験を、TTCP/LiおよびTTCP/Li/PAAブロックサンプルで行った。

【0093】

TTCP/Li/PAAブロックは、適当量のTTCP粉末及び $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末(TTCP: $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 1:1(重量比))を混合してTTCP/ $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 混合粉末を得ることによって、調製した。このTTCP/ $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末を、0.45cc/gのL/P比で3、5、または10vol% PAA溶液を含む0.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ セッティング溶液と混合して、TTCP/Li/PAAセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でTTCP/Li/PAAセメントペーストを加圧成形することによって、TTCP/Li/PAAブロックサンプルを調製した。

【0094】

【表3】

表3:異なる期間(日)ハンクス溶液に浸漬したTTCP/Li/PAAブロックの  
抗菌領域の平均直径(mm)

	1日	2日	3日	5日	7日
3% PAA	11.4	10.3	8.5	6	6
5% PAA	11.5	11.4	11.3	6	6
10% PAA	12.6	12.5	11.7	6.7	6

(注:測定した抗菌領域は6mm直径のサンプルを含む)

【0095】

結果:

(1) PAAの添加によって、TTCP/Li製剤(formula)の抗菌効果が延長する。

【0096】

(2) 3vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に11.4mmの; 2日間で10.3mmの; 3日間で8.5mmの抗菌領域を示す。

【0097】

(3) 5vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に11.5mmの; 2日間で11.4mmの; 3日間で11.2mmの抗菌領域を示す。

【0098】

(4) 10vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に12.6mmの; 2日間で12.5mmの; 3日間で11.7mm; 5日間で6.7mmの抗菌領域を示す。

【0099】

## 【表 4】

表 4: TTCP/Li/PAAブロックを異なる期間(日)浸漬したハanks溶液の平均 pH 値

	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日
3% PAA	11.4	12.2	12.0	11.6	11.2	10.7	10.6	10.5	10.4	10.3
5% PAA	10.7	11.9	12.1	11.8	11.4	11.1	10.7	10.6	10.4	10.3
10% PAA	10.5	11.0	11.5	11.9	11.5	11.1	10.7	10.6	10.4	10.3

## 【0100】

結果：

(1) ハanks溶液の平均 pH 値はすべて 10 より高く、場合によっては 12 より高い。

## 【0101】

## 【表 5】

表 5: 異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/Li/PAAブロックの平均重量損失比(%)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	11.4	14.9	17	23.8	24.4	27.4
5% PAA	12.4	20.9	24.9	28.5	30.1	37.9
10% PAA	15.3	22.5	28.9	38.6	39.6	42.8

## 【0102】

結果：

(1) ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均重量損失は、浸漬時間に比例して増加する。

## 【0103】

(2) 重量損失は PAA 含有量に比例して増加した。

## 【0104】

(3) 10 日後、3% PAA サンプルでは 27.4% の重量が損失し；5% PAA サンプルでは 37.9% の重量が損失し；および 10% PAA サンプルでは 42.8% の重量が損失する。Li 化合物がかなり速く溶解した後に、非常に多孔質な構造がインプラント材料に形成されこれによりインプラントの生体吸収速度を増加できるため、この結果は望ましい。

## 【0105】

## 【表 6】

表 6: 異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/Li/PAAブロックの平均細胞生存率(サンプル/DMEM培地比=0.1g/ml、NIH-3T3)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	39.8	41.2	42.0	43.2	43.4	50.0
5% PAA	38.2	40.9	42.7	44.6	48.6	51.8
10% PAA	40.8	42.9	45.1	44.8	57.4	75.0

## 【0106】

結果：

(1) ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均細胞生存率の値は浸漬時間に比例して増加することから、Li 化合物が徐々に消費されることにより生体適合性レベルが増加し続けることが示される。高い抗菌効果の段階後は、インプラント材料が徐々にその生

10

20

30

40

50



体適合性レベルを回復することが最良の結果であるであろうため、この結果は望ましい。

【0107】

(2) 7日後、10% PAAサンプルの細胞生存率の値は、3% PAA及び5% PAAサンプルの値に比して有意に高い。

【0108】

実施例3：TTCP/DCPA/Li塩およびTTCP/DCPA/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動および他の試験

浸漬、pH測定、重量損失、細胞毒性および抗菌試験を、TTCP/DCPA/LiおよびTTCP/DCPA/Li/PAAブロックサンプルで行った。

【0109】

適当量のTTCP/DCPA粉末(1:1(モル比))及びLi化合物(Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>またはLi<sub>2</sub>O)粉末(Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>またはLi<sub>2</sub>O = 全粉末成分の10wt%または30wt%)を混合して、TTCP/DCPA/Li化合物混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/Liブロックを調製した。このTTCP/DCPA/Li化合物粉末を、0.35のL/P比で0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/Liセメントペーストを得た。1.4MPaの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

【0110】

【表7】

表7: 24時間37℃PBSに浸漬したTTCP/DCPA/LiサンプルのPBS抽出物のpH値

サンプル: PBS (重量比)	TTCP/DCPA : Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> = 90:10 (重量比)	TTCP/DCPA : Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> = 70:30 (重量比)	TTCP/DCPA : Li <sub>2</sub> O = 90:10 (重量比)
1:5	10.5	10.4	12.6
1:10	10.6	10.5	12.7

【0111】

結果:

(1) 90wt% TTCP/DCPA及び10% Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含むサンプルは、22mmの抗菌領域を示す。

【0112】

(2) 70wt% TTCP/DCPA及び30% Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含むサンプルは、24mmの抗菌領域を示す。

【0113】

(3) 抽出物のpH値はすべて10より高く、Li<sub>2</sub>Oサンプルでは12よりも高い。

【0114】

適当量のTTCP/DCPA粉末(1:1(モル比))及びLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末(TTCP/DCPA : Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 1:1(重量比))を混合して、TTCP/DCPA/Li混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/Li/PAAブロックを調製した後、これを0.35cc/gのL/P比で3、5、または10vol% PAA溶液を含む0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/Li/PAAセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、高さ3mm、直径6mmのブロックサンプルを調製した。

【0115】

## 【表 8】

表 8:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/Li/PAAブロックの  
抗菌領域の平均直径(mm)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日
3% PAA	12.5	9.9	9.8	6	6
5% PAA	12.7	10.6	10.9	7.3	6
10% PAA	11.9	11.5	10.6	8.8	6.9

(注:測定した抗菌領域は6mm直径のサンプルを含む)

10

## 【0116】

結果:

(1) PAAの添加によって、TTCP/DCPA/Li製剤(formula)の抗菌効果が延長する。

## 【0117】

(2) 3vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に12.5mmの; 2日間で9.9mmの; 3日間で9.8mmの抗菌領域を示す。

## 【0118】

(3) 5vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に12.7mmの; 2日間で10.6mmの; 3日間で10.9mmの; 5日間で7.3mmの抗菌領域を示す。

20

## 【0119】

(4) 10vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に11.9mmの; 2日間で11.5mmの; 3日間で10.6mm; 5日間で8.8mmの; 7日間で6.9mmの抗菌領域を示す。

## 【0120】

## 【表 9】

表 9:TTCP/DCPA/Li/PAAブロックを異なる期間(日)浸漬したハanks溶液の  
平均pH値

	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日
3% PAA	10.5	10.5	10.8	10.8	10.6	10.5	10.4	-	-	-
5% PAA	10.5	10.7	10.7	10.7	10.8	10.6	10.4	-	-	-
10% PAA	10.5	10.8	10.8	10.8	10.7	10.7	10.7	-	-	-

30

## 【0121】

結果:

(1) ハanks溶液の平均pH値はすべて10より高い。

40

## 【0122】

## 【表 10】

表 10:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/Li/PAAブロックの平均重量損失比(%)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	7.6	14	25.1	27.2	27.4	-
5% PAA	8.5	14.3	26.1	32.1	33.9	-
10% PAA	8.6	20.9	26.6	32.3	41.0	-

10

## 【0123】

結果:

(1)ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均重量損失は、浸漬時間に比例して増加する。

## 【0124】

(2)特に7日後、重量損失はPAA含有量に比例して増加する。Li化合物がかなり速く溶解した後に、非常に多孔質な構造がインプラント材料に形成されこれによりインプラントの生体吸収速度を増加できるため、この結果は望ましい。

## 【0125】

## 【表 11】

表 11:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/Li/PAAブロックの平均細胞生存率(サンプル/DMEM培地比=0.1g/ml、NIH-3T3)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	26.0	43.1	42.9	-	-	48.1
5% PAA	25.7	44.0	43.9	-	-	70.6
10% PAA	27.3	44.9	51.2	-	-	80.3

20

## 【0126】

結果:

(1)ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均細胞生存率の値は浸漬時間に比例して増加することから、Li化合物が徐々に消費されることにより生体適合性レベルが増加し続けることが示される。高い抗菌効果の段階後は、インプラント材料が徐々にその生体適合性レベルを回復することが最良の結果であるであろうため、この結果は望ましい。

30

## 【0127】

(2)3日後、10%PAAサンプルの細胞生存率の値は、3%PAA及び5%PAAサンプルの値に比して有意に高い。10日後、10%PAAサンプルの細胞生存率の値は80.3に到達する。

## 【0128】

実施例4:TTCP/DCPA/Li塩/KClサンプルの抗菌挙動

TTCP/DCPA/Li/KClブロックサンプルについて、抗菌試験を行った。適当量のTTCP/DCPA粉末(1:1(モル比))及びLi<sub>2</sub>O粉末(Li<sub>2</sub>O=全粉末成分の10wt%)とおよびさらに100~200μmKCl粉末(TTCP/DCPA/Li粉末:KCl粉末=60:40(重量比))と混合して、TTCP/DCPA/Li/KCl混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/Li/KClブロックを調製した。この混合粉末を、0.50のL/P比で0.6M(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/Li/KClセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

40

50

## 【0129】

結果：

(1) 上記TTCP/DCPA/Liサンプルは、21mmの平均抗菌領域を示す。

## 【0130】

(2) 上記TTCP/DCPA/Li/KClサンプルは、22mmの平均抗菌領域を示す。

## 【0131】

実施例5：TTCP/CSH/Li塩およびTTCP/CSH/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動および他の試験

浸漬、pH測定、重量損失、細胞毒性および抗菌試験を、TTCP/CSH/LiおよびTTCP/CSH/Li/PAAブロックサンプルで行った。

## 【0132】

適当量のTTCP/CSH粉末(65:35(重量比))及びLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末(TTCP/CSH:Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=1:1(重量比))を混合して、TTCP/CSH/Li混合粉末を得ることによって、TTCP/CSH/Li/PAAブロックを調製した。このTTCP/CSH/Li粉末を、0.35のL/P比で3、5、または10vol% PAA溶液を含む0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTCP/CSH/Li/PAAセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

## 【0133】

## 【表12】

表12:異なる期間(日)ハンクス溶液に浸漬したTTCP/CSH/Li/PAAブロックの抗菌領域の平均直径(mm)

	1日	2日	3日	5日	7日
3% PAA	11.7	8.0	6	6	6
5% PAA	12.7	8.0	6	6	6
10% PAA	13.0	10.0	11.0	6	6

(注:測定した抗菌領域は6mm直径のサンプルを含む)

## 【0134】

結果：

(1) PAAの添加によって、TTCP/CSH/Li製剤(formula)の抗菌効果が延長する。

## 【0135】

(2) 3vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に11.7mmの; 2日間で8.0mmの抗菌領域を示す;

(3) 5vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に12.7mmの; 2日間で8.0mmの抗菌領域を示す;

(4) 10vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハンクス溶液中に浸漬した後に13.0mmの; 2日間で10.0mmの; 3日間で11.0mmの抗菌領域を示す。

## 【0136】

## 【表 1 3】

表 13: TTCP/CSH/Li/PAAブロックを異なる期間(日)浸漬したハanks溶液の平均pH値

	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日
3% PAA	11.9	12.1	11.5	11.0	10.8	10.5	10.5	-	-	-
5% PAA	10.9	12.2	11.8	11.1	10.9	10.6	10.5	-	-	-
10% PAA	10.2	11.5	12.1	11.6	11.1	10.7	10.6	-	-	-

## 【0 1 3 7】

10

結果：

(1) ハanks溶液の平均pH値はすべて10より高く、場合によっては12より高い。

## 【0 1 3 8】

## 【表 1 4】

表 14: 異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/CSH/Li/PAAブロックの平均重量損失比(%)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	20.7	24.6	25.0	31.8	33.8	
5% PAA	18.6	25.9	30.2	33.3	37.4	
10% PAA	19.1	27.4	32.4	33.3	40.0	

20

## 【0 1 3 9】

結果：

(1) ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均重量損失は、浸漬時間に比例して増加する。

## 【0 1 4 0】

(2) 特に7日後、重量損失はPAA含有量に比例して増加する。Li化合物がかなり速く溶解した後に、非常に多孔質な構造がインプラント材料に形成されこれによりインプラントの生体吸収速度を増加できるため、この結果は望ましい。

30

## 【0 1 4 1】

## 【表 1 5】

表 15: 異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/CSH/Li/PAAブロックの平均細胞生存率(サンプル/DMEM培地比=0.1g/ml、NIH-3T3)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	38.1	39.7	40.2	40.7	50.8	51.9
5% PAA	38.5	40.0	42.2	42.9	54.7	60.9
10% PAA	42.2	42.6	43.1	43.7	55.1	76.7

40

## 【0 1 4 2】

結果：

(1) ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均細胞生存率の値は浸漬時間に比例して増加することから、Li化合物が徐々に消費されることにより生体適合性レベルが増加し続けることが示される。高い抗菌効果の段階後は、インプラント材料が徐々にその生体適合性レベルを回復することが最良の結果であるであろうため、この結果は望ましい。

## 【0 1 4 3】

50

(2) 10日後、10% PAAサンプルの細胞生存率の値は、76.7に到達し、3% PAA及び5% PAAサンプルの値に比して有意に高い。

#### 【0144】

実施例6：TTCP/DCPA/CSH/Li塩サンプルの抗菌挙動

様々なTTCP/DCPA/CSH/Liブロックサンプルについて、抗菌試験を行った。適当量のTTCP/DCPA/CSH粉末及び $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末(TTCP/DCPA/CSH： $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 1：1(重量比))と混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li混合粉末を得ることによって、TTTCP/DCPA/CSH/Liブロックを調製した。この際、TTCP/DCPA粉末 = 1：1(モル比)であり、TTTCP/DCPA：CSHの重量比は表16に記載されるとおりである。例えば、65wt% TTCP/DCPA粉末及び35wt% CSH粉末を含む混合粉末は、「TTCP/DCPA/CSHサンプル65/35」または単に「65/35」と；45wt% TTCP/DCPA粉末及び55wt% CSH粉末を含む混合粉末は、「TTCP/DCPA/CSHサンプル45/55」または単に「45/55」と；など、称する。

#### 【0145】

#### 【表16】

表16:TTCP/DCPA/CSHサンプルの名称

TTCP/DCPA/CSH サンプルの名称	TTCP/DCPA:CSH (重量比)	TTCP:DCPA:CSH (重量比)
“90/10”	90:10	2.69:1:0.41
“85/15”	85:15	2.69:1:0.65
“80/20”	80:20	2.69:1:0.92
“75/25”	75:25	2.69:1:1.23
“65/35”	65:35	2.69:1:1.99
“55/45”	55:45	2.69:1:3.02
“45/55”	45:55	2.69:1:4.51
“35/65”	35:65	2.69:1:6.85
“25/75”	25:75	2.69:1:11.07
“10/90”	10:90	2.69:1:33.21

#### 【0146】

TTCP/DCPA/CSH/アルカリ金属塩サンプルの抗菌挙動

一連のアルカリ金属塩( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 、KClまたはNaCl粉末)との「65：35」の混合物について、抗菌試験を行った。この際、「65：35」：アルカリ金属塩 = 1：1(重量比)であった。「65：35」/アルカリ金属塩混合粉末を、0.35g/ccのL/P比で0.6M( $\text{NH}_4$ ) $_2$ HPO $_4$ セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/CSH/アルカリ金属塩セメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

#### 【0147】

図1は、TTCP/DCPA/CSH/LiサンプルおよびTTCP/DCPA/CSH/アルカリ金属塩サンプルに関する抗菌試験の結果を示すものである。

#### 【0148】

図1の結果：

これらの試験した3種のアルカリ金属(Li、Na及びK)塩のうち、Li系のアルカリ金属塩(Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)のみが13mmの抗菌領域という強力な抗菌効果を示す(Nihon ShiyakuおよびJT Baker製品双方について)；

(2) Na塩またはK塩から調製されたサンプルでは、抗菌領域は観察されなかった。

【0149】

TTC P / DCP A / CSH / Liサンプルの抗菌挙動

一連の異なるLi化合物(Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、Li<sub>2</sub>O)との「65:35」の混合物について、抗菌試験を行った。この際、「65:35」:Li化合物=1:1(重量比)であった。「65:35」/Li化合物混合粉末を、0.3~0.5g/cc(Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>では0.3;Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>及びLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>では0.35;Li<sub>2</sub>Oでは0.5)のL/P比で0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTC P / DCP A / CSH / Liセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

【0150】

結果：

(1) TSB寒天プレートでは崩壊したものの、Li<sub>2</sub>Oを含むサンプルが最も強い抗菌効果を示す。

【0151】

(2) Li<sub>2</sub>O及びLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含むサンプルは、Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>またはLi<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を含むものに比べてより強い抗菌効果を示す。

【0152】

TTC P / DCP A / CSH / Li塩サンプルの抗菌挙動

Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末との「55:45」の混合物について、抗菌試験を行った。この際、「55:45」:Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=1:1または7:3(重量比)であった。「55:45」/Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末を、0.35g/ccのL/P比で0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTC P / DCP A / CSH / Li塩セメントペーストを得た。1.4MPaの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

【0153】

結果：

(1) 70wt%「55:45」及び30wt% Li<sub>2</sub>Oを含むサンプルが13mmの抗菌領域を示す；

(2) 50wt%「55:45」及び50wt% Li<sub>2</sub>Oを含むサンプルが17mmの抗菌領域を示す。

【0154】

TTC P / DCP A / CSH / Li塩サンプルの抗菌挙動

Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末との「65:35」の混合物について、抗菌試験を行った。この際、「65:35」:Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=7:3(重量比)であった。「65:35」/Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末を、0.35g/ccのL/P比で0.6M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTC P / DCP A / CSH / Li塩セメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。さらに、このTTC P / DCP A / CSH / Li塩ブロックサンプルを400℃で1時間または2時間加熱した。

【0155】

結果：

(1) 400℃で1時間加熱したTTC P / DCP A / CSH / Li塩ブロックサンプルが15mmの抗菌領域を示す；

(2) 400℃で2時間加熱したTTC P / DCP A / CSH / Li塩ブロックサンプルが16mmの抗菌領域を示す。

## 【0156】

実施例7：TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動および他の試験

浸漬、pH測定、重量損失、細胞毒性および抗菌試験を、様々なTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックサンプルで行った。適当量のTTCP/DCPA/CSH粉末及び $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末を、所定のTTCP/DCPA/CSH： $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 重量比（例えば、1：1（重量比））で混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/CSH/Liブロックを調製した。この際、TTCP：DCPA = 1：1（モル比）であり、TTCP/DCPA：CSHの重量比は表16に記載されるとおりである。例えば、65wt% TTCP/DCPA粉末及び35wt% CSH粉末を含む混合粉末は、「TTCP/DCPA/CSHサンプル65/35」または単に「65/35」と；45wt% TTCP/DCPA粉末及び55wt% CSH粉末を含む混合粉末は、「TTCP/DCPA/CSHサンプル45/55」または単に「45/55」と；など、称する。

10

## 【0157】

TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動

「65：35」粉末（TTCP/DCPA：CSH = 65：35（重量比））を $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末と混合（「65：35」： $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 70：30（重量比））して、TTCP/DCPA/CSH/Li混合粉末を得た。このようにして得られたTTCP/DCPA/CSH/Li粉末を、0.35cc/gのL/P比で3vol% PAA溶液を含む0.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li/PAAセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

20

## 【0158】

結果：

（1）3% PAAサンプルは、15mmの抗菌領域を示す。

## 【0159】

TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAサンプルの抗菌挙動および他の試験

適当量の「65：35」粉末及び $\text{Li}_2\text{CO}_3$ 粉末（「65：35」： $\text{Li}_2\text{CO}_3$  = 1：1（重量比））を混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックを調製した。この際、TTCP：DCPA = 1：1（モル比）であり、TTCP/DCPA：CSH = 65：35（重量比）であった。このようにして得られたTTCP/DCPA/CSH/Li粉末を、0.35のL/P比で3、5、または10vol% PAA溶液を含む0.6M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li/PAAセメントペーストを得た。450kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3mm高さ、6mm直径のブロックサンプルを調製した。

30

## 【0160】

図2～5は、それぞれ、1日、2日、3日及び5日間、ハックス溶液に浸漬した上記のようにして調製されたTTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックを示すものである。

40

## 【0161】



## 【表 17】

表 17:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/CSH/Li/PAA  
ブロックの抗菌領域の平均直径(mm)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日
3% PAA	11.0	8.0	6.3	6	6
5% PAA	10.7	10.0	6.7	6	6
10% PAA	11.0	10.0	10.0	9.0	7.5

(注:測定した抗菌領域は6mm直径のサンプルを含む)

## 【0162】

結果:

(1) PAAの添加によって、TTCP/DCPA/CSH/Li製剤(formula)の抗菌効果が延長する。

## 【0163】

(2) 3vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に11.0mmの; 2日間で8.0mmの; 3日間で6.3mmの抗菌領域を示す。

## 【0164】

(3) 5vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に10.7mmの; 2日間で10.0mmの; 3日間で6.7mmの抗菌領域を示す。

## 【0165】

(4) 10vol% PAAを含むセッティング溶液を用いたサンプルは、1日ハanks溶液中に浸漬した後に11.0mmの; 2日間で10.0mmの; 3日間で10.0mm; 5日間で9.0mmの; 7日間で7.5mmの抗菌領域を示す。

## 【0166】

## 【表 18】

表 18:TTCP/DCPA/CSH/Li/PAAブロックを異なる期間(日)浸漬した  
ハanks溶液の平均pH値

	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	9 日	10 日
3% PAA	10.1	11.1	11.0	10.8	10.6	10.5	10.4	10.3	10.2	10.1
5% PAA	10.1	11.1	11.2	10.8	10.7	10.5	10.5	10.3	10.2	10.1
10% PAA	10.2	10.7	10.6	10.7	10.9	10.7	10.7	10.6	10.3	10.2

## 【0167】

結果:

(1) ハanks溶液の平均pH値はすべて10より高く、場合によっては11より高い。

## 【0168】

10

20

30

40

## 【表 19】

表 19:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/CSH/Li/PAA  
ブロックの平均重量損失比(%)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	19.5	25.8	29.5	35.3	41.2	43.2
5% PAA	17.3	22.8	28.3	31.7	42.9	45.6
10% PAA	15.2	23.3	28.7	40.2	48.3	49.5

10

## 【0169】

結果:

(1)ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均重量損失は、浸漬時間に比例して増加する。7日後、40%超の重量が損失する。

## 【0170】

(2)特に5日後、重量損失はPAA含有量に比例して増加する。Li化合物がかなり速く溶解した後に、非常に多孔質な構造がインプラント材料に形成されこれによりインプラントの生体吸収速度を増加できるため、この結果は望ましい。

## 【0171】

## 【表 20】

表 20:異なる期間(日)ハanks溶液に浸漬したTTCP/DCPA/CSH/Li/PAA  
ブロックの平均細胞生存率(サンプル/DMEM培地比=0.1g/ml、  
NIH-3T3)

	1 日	2 日	3 日	5 日	7 日	10 日
3% PAA	49.9	50.2	50.5	51.0	54.2	54.2
5% PAA	55.6	55.5	55.6	58.6	59.3	60.3
10% PAA	64.6	65.9	64.4	65.1	68.3	86.1

20

30

## 【0172】

結果:

(1)ハanks溶液に浸漬した全てのサンプルの平均細胞生存率の値は、浸漬時間に比例して増加することから、Li化合物が徐々に消費されることにより生体適合性レベルが増加し続けることが示される。高い抗菌効果の段階後は、インプラント材料が徐々にその生体適合性レベルを回復することが最良の結果であるであろうため、この結果は望ましい。

## 【0173】

(2)10%PAAサンプルの平均細胞生存率の値は、3%PAA及び5%PAAサンプルの値に比して有意に高い。10日後、10%PAAサンプルの細胞生存率の値は、86.1に到達する。

40

## 【0174】

TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストの注射性(Injectability)

TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストについて、注射性試験(injectability test)を行った。適当量の「65:35」粉末及びLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末(「65:35」:Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=1:1(重量比))を混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li塩混合粉末を得ることによって、TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストを調製した。この際、TTCP:DCPA=1:1(モル比)であり、TTCP/DCPA:CSH=65:35(重量比)であった。このようにして得ら

50

れたTTCP/DCPA/CSH/Li塩粉末を、0.35 cc/g ~ 0.7 cc/gの範囲のL/P比で10 vol % PAA溶液を含む0.6 M、1 M、2 Mまたは3 M ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、TTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストを得た。このようにして得られたペーストを、外科用縫合針を付けたまたは付けない5 ccシリンジを用いて37 °Cの水中に注入して、セメントペーストの注射性(injectability)を試験した。残りのセメント(正常に手動で注入した(normal hand-injection)後にシリンジに残っているセメント)の量を測定し、これをセメントの注射性の指標として考えた(残ったセメントの量が多いことは、注射性が低いことを示す)。

【0175】

10

【表21】

表21: 針を付けない5ccシリンジを通過したTTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストの手動注入後のシリンジ中に残ったセメント量(wt%)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> conc.	L/P = 0.35 cc/g	L/P = 0.40 cc/g	L/P = 0.45 cc/g
0.6 M	78.6	10.3	0
1 M	100	22.8	0
2 M	100	0	0
3 M	100	0	0

【0176】

20

【表22】

表22: 11cm長、0.6mm内径の「18G」のステンレス製針を付けた5ccシリンジを通過したTTCP/DCPA/CSH/Li塩/PAAセメントペーストの手動注入後のシリンジ中に残ったセメント量(wt%)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> conc.	L/P=0.40	L/P=0.45	L/P=0.50	L/P=0.55	L/P=0.60	L/P=0.65	L/P=0.70
1 M	100	90.1	70.8	20.2	0	0	0
2 M	100	95.2	88.1	80.8	60.2	34.2	0

【0177】

30

結果:

(1) シリンジに残ったセメントの量は、L/P比の増加に比例して減少する。

【0178】

(2) シリンジに残ったセメントの量は、セッティング溶液濃度の増加に比例して増加する。

【0179】

実施例8: CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩サンプルの抗菌挙動

CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩サンプルについて抗菌試験を行った。適当量のCaCO<sub>3</sub>及びCa<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>粉末(CaCO<sub>3</sub>:Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>=1:1.27(重量比))をLi<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>粉末と、CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>=1:1または7:3(重量比)で混合して、CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩混合粉末を得ることによって、CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩サンプルを調製した。このCaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩混合粉末を、0.35 g/ccのL/P比で0.6 M ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>セッティング溶液と混合して、CaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Li塩セメントペーストを得た。450 kgfの圧力下でこのセメントペーストを加圧成形することによって、3 mm高さ、6 mm直径のブロックサンプルを調製した。このブロックサンプルを600 °Cで1時間または3時間加熱した。

40

【0180】

図6は、浸漬せずに本発明に従って調製されたCaCO<sub>3</sub>/Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/Liブロックの抗菌領域を示すものである。

50

## 【0181】

結果：

(1) 70 wt %  $\text{CaCO}_3$  /  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  及び 30 wt %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  を含みかつ 600 で 1 時間加熱したサンプルは、12 mm の抗菌領域を示す。

## 【0182】

(2) 70 wt %  $\text{CaCO}_3$  /  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  及び 30 wt %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  を含みかつ 600 で 3 時間加熱したサンプルは、18 mm の抗菌領域を示す。

## 【0183】

(3) 50 wt %  $\text{CaCO}_3$  /  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  及び 50 wt %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  を含みかつ 600 で 1 時間加熱したサンプルは、19.5 mm の抗菌領域を示す。

10

## 【0184】

(4) 50 wt %  $\text{CaCO}_3$  /  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  及び 50 wt %  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  を含みかつ 600 で 3 時間加熱したサンプルは、22.8 mm の抗菌領域を示す。

## 【0185】

実施例 9：抗菌活性の測定

適当量の試験すべき UV 滅菌したサンプル（顆粒またはセメント）を、12 ウェルプレートに仕込み、 $10^6$  個の生黄色ブドウ球菌 (*S. aureus bacteria*) を含む 1 ml トリプトンソーヤブロス (Tryptone Soya Broth) (TSB) を各ウェルに添加した（濃度： $10^6$  コロニー形成単位 (CFU) / ml）。黄色ブドウ球菌 (*S. aureus bacteria*) を 37 で嫌氣的にサンプルと一緒に培養した。サンプルを含まずに培養したものを各研究群のポジティブコントロールとして考えた。異なるサンプルと一緒にインキュベートした細菌懸濁液の生存率を、トリプトンソーヤ寒天 (Tryptone Soya Agar) (TSA) 固体寒天プレートを用いてアッセイした。24 時間培養後、各ウェルのブロスを順次希釈して、播種した。37 で 24 時間寒天プレート上で培養した後、細菌の成長を評価した。次に、コロニー形成単位 (CFU) をカウントして、下記式を用いて濃度を算出し、

20

## 【0186】

【数 1】

$$\frac{\text{寒天プレート上のコロニー数 (単位=CFU)}}{\text{チューブの全希釈倍率} \times \text{播種容積 (単位=ml)}}$$

## 【0187】

さらに、抗菌活性を下記式によって得る。

30

## 【0188】

【数 2】

抗菌活性＝

$$\{[(\text{コントロール群の濃度}) - (\text{実験の濃度})] / (\text{コントロール群の濃度})\} \times 100\%$$

## 【0189】

適当量の UV 滅菌した  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  または  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  塩を、それぞれ、1 ml TSB と混合して、上記方法を用いて抗菌活性値を試験した。結果を表 23 に示す。

## 【0190】

40

## 【表 2 3】

表 23

Li 塩	Li 塩量 /TSB (g/ml)	抗 菌 活 性(24h)(%)
$\text{Li}_3\text{PO}_4$	0.06	98.9
$\text{Li}_3\text{PO}_4$	0.08	98.9
$\text{Li}_3\text{PO}_4$	0.10	97.4
$\text{Li}_3\text{PO}_4$	0.12	98.8
$\text{Li}_3\text{PO}_4$	0.14	99.8
$\text{Li}_2\text{CO}_3$	0.06	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$	0.08	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$	0.10	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$	0.12	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$	0.14	100

10

20

## 【 0 1 9 1】

結果：

(1) 1 ml TSB中に0.06～0.12 g  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  塩を含む $\text{Li}_3\text{PO}_4$  塩サンプルの24時間抗菌活性値は、約97.4～98.9%の範囲である。1 ml TSB中に0.14 g  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  塩を含むサンプルの24時間抗菌活性値は、約99.8に到達する。

## 【 0 1 9 2】

(2) すべての $\text{Li}_2\text{CO}_3$  塩サンプルは、100%の24時間抗菌活性値を示す。

## 【 0 1 9 3】

適当量の「65：35」粉末を、適当量の $\text{Li}_3\text{PO}_4$  または $\text{Li}_2\text{CO}_3$  塩と混合して、異なるLi塩割合を有するTTCP/DCPA/CSH/Li塩混合粉末を形成した。この混合粉末を0.6 M  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  溶液と混合して、セメントペーストを形成した。十分硬化させる前に、ペーストを、450 kgfの圧力下でステンレス製の金型に仕込み、ペーストから液体の一部をしぼり出した(squeeze)。硬化させ、金型から取り出した後、硬化ブロックを粉砕し、約0.4～1.2 mmの粒度範囲を有する顆粒に分級した。0.2 gのUV滅菌した上記したようにして得られた顆粒状サンプルを1 ml TSBと混合し、上記した方法を用いて抗菌活性を試験した。結果を表24に示す。

30

## 【 0 1 9 4】

## 【表 2 4】

表 24

サンプル	抗 菌 活 性 (24h) (%)
$\text{Li}_3\text{PO}_4$ : 65/35 = 25 : 75 (重量比)	81
$\text{Li}_3\text{PO}_4$ : 65/35 = 50 : 50 (重量比)	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$ : 65/35 = 25 : 75 (重量比)	100
$\text{Li}_2\text{CO}_3$ : 65/35 = 50 : 50 (重量比)	100

40

## 【 0 1 9 5】

結果：

50

(1)  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  を含む顆粒状サンプルでは、24時間抗菌活性値は、 $\text{Li}_3\text{PO}_4$  塩含有量の増加に伴い増加する。50wt%  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  を含むサンプルの24時間抗菌活性値は100%に到達する。

【0196】

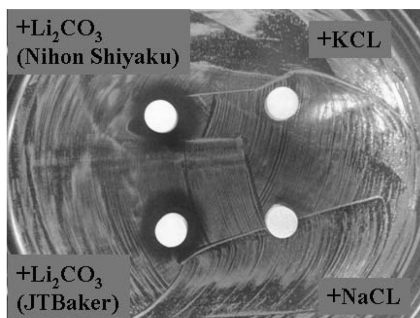
(2) 双方の  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  塩を含むサンプルの24時間抗菌活性値は、100%に到達する。

【0197】

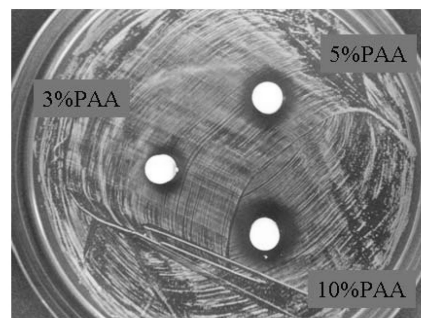
上記説明から、当業者は、本発明の必須の特徴を容易に確認でき、本発明の精神および概念から逸脱せずに、様々な用途及び状態に適合するように本発明の様々な変更及び修飾を行うことができる。ゆえに、他の実施形態もまた、本願特許請求の範囲に含まれる。

10

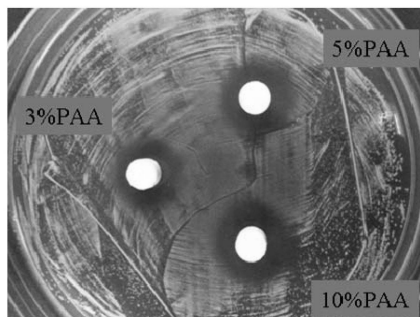
【図1】



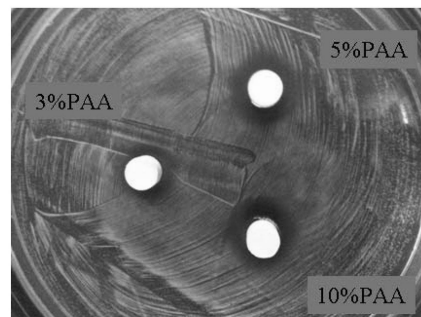
【図3】



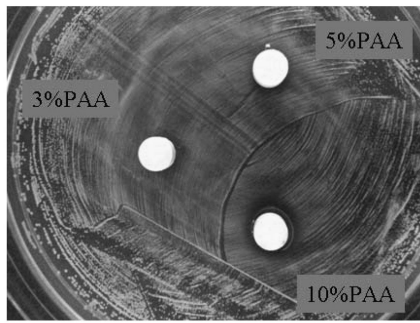
【図2】



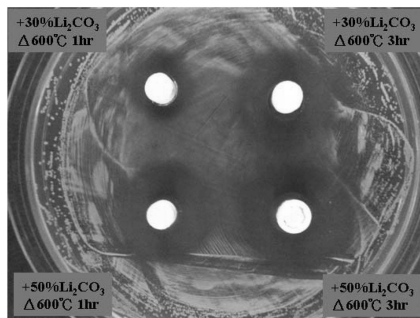
【図4】



【図 5】



【図 6】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
A 6 1 P	19/08	(2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 L	27/04	(2006.01)	A 6 1 L	27/04
A 6 1 L	27/12	(2006.01)	A 6 1 L	27/12
A 6 1 L	27/56	(2006.01)	A 6 1 L	27/56
A 6 1 K	9/16	(2006.01)	A 6 1 K	9/16
A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32
A 6 1 K	33/08	(2006.01)	A 6 1 K	33/08

(73)特許権者 514283618

ヤン, ビン - チェン

台湾, カオシュン シティ, サンミン ディストリクト, チェンシン ロード, ナンバー 9, 20  
エフ. - 2

(74)代理人 110000671

八田国際特許業務法人

(72)発明者 リン, ジン - フェイ, チャン

アメリカ合衆国, 60093 イリノイ州, ウィネトカ, タワー ロード 911

(72)発明者 ジュ, チェン - ピン

アメリカ合衆国, 64137 ミズーリ州, カンザス シティ, モンロー アヴェニュー 105  
35

(72)発明者 チェン, チャン - ケン

台湾, タオユエン カウンティ, ダイユエン タウンシップ, ダグアン ロード, レーン 600  
, アリイ 43, ナンバー 13 - 1, 6エフ.

(72)発明者 ヤン, ビン - チェン

台湾, カオシュン シティ, サンミン ディストリクト, チェンシン ロード, ナンバー 9, 20  
エフ. - 2

審査官 金田 康平

(56)参考文献 特開2000-313817(JP, A)

特開2007-084450(JP, A)

特表2008-500980(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4

A 6 1 L 1 5 / 0 0 - 3 3 / 1 8

A 6 1 K 6 / 0 0 - 6 / 1 0

A 0 1 N 1 / 0 0 - 6 5 / 4 8

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)