

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年12月7日(07.12.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/209136 A1

(51) 国際特許分類:

C04B 35/447 (2006.01) B28B 1/30 (2006.01)
A61L 27/12 (2006.01) B29C 67/00 (2017.01)
A61L 27/22 (2006.01) C07K 14/78 (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/020130

(22) 国際出願日: 2017年5月30日(30.05.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2016-107615 2016年5月30日(30.05.2016) JP
特願 2016-239826 2016年12月9日(09.12.2016) JP

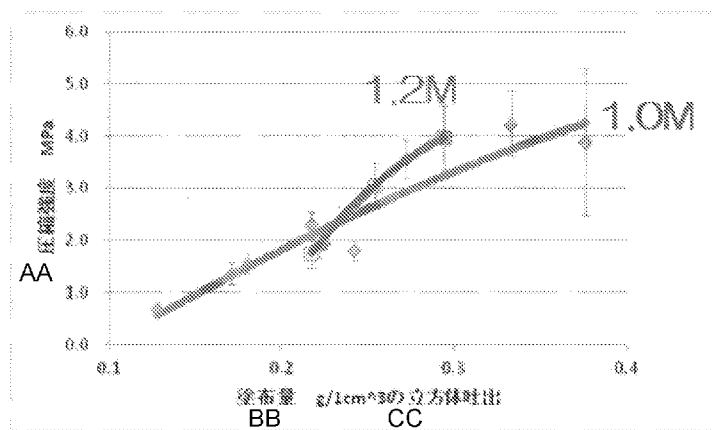
(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目26番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 太田 浩史 (OTA Hiroshi); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 勝村 学 (KATSUMURA Manabu); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 川崎 和也 (KAWASAKI Kazuya); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 石井 善雄 (ISHII Yoshio); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 伏見 英生 (FUSHIMI Hideo);

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CALCIUM PHOSPHATE MOLDED ARTICLE, CALCIUM PHOSPHATE MOLDED ARTICLE, AND MATERIAL FOR TRANSPLANTATION

(54) 発明の名称: リン酸カルシウム成形体の製造方法、リン酸カルシウム成形体及び移植用材料

[図27]



AA Compressive strength

BB Amount of coating

CC Cubic discharge of g/1cm³

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for quickly producing a high-strength calcium phosphate molded article with high shaping accuracy, a calcium phosphate molded article produced by the method, and a material for transplantation. The present invention provides a method for producing a calcium phosphate molded article, the method comprising step a for forming, on a substrate, a layer containing a calcium phosphate powder having an atomicity ratio of Ca/P of 1.4-1.8; and step b for discharging an organic acid solution in which the solubility of a calcium salt of an organic acid is 1 g/100 mL or less in water, and which has a pH of 3.5 or lower, in the form of droplets, from



〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 平塚 崇浩(HIRATSUKA Takahiro); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 岡村 愛(OKAMURA Ai); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 西谷 守(NISHITANI Mamoru); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 江角 将之(EZUMI Masayuki); 〒2588577 神奈川県足柄上郡開成町牛島 5 7 7 番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(74) 代理人：特許業務法人特許事務所サイクス(SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)： AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)： ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

a nozzle part, and thereby dropping the organic acid solution onto the layer that contains the calcium phosphate powder and is formed in step a, to produce the calcium phosphate molded article.

(57) 要約：本発明の課題は、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度で製造する方法、上記方法で製造されるリン酸カルシウム成形体、及び移植用材料を提供することである。本発明によれば、Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程a；及び有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記有機酸溶液を上記工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程b；を含む、リン酸カルシウム成形体の製造方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：

リン酸カルシウム成形体の製造方法、リン酸カルシウム成形体及び移植用材料

技術分野

[0001] 本発明は、有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、リン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることにより、リン酸カルシウム成形体を製造する方法に関する。本発明はさらに、リン酸カルシウム成形体に関する。本発明はさらに移植用材料に関する。

背景技術

[0002] 機能障害又は機能不全に陥った生体組織又は臓器の再生を図る再生医療の実用化が進められている。再生医療は、生体が持っている自然治癒能力だけでは回復できなくなった生体組織において、細胞、足場及び成長因子の一種以上を使って元の組織と同じような形態及び機能を再生する医療技術である。再生医療においては、リン酸カルシウム成形体を使用する場合がある。

[0003] 特許文献1には、医科用、歯科用に用いられるリン酸カルシウムセメント及びリン酸カルシウム粉体が記載されている。特許文献1には、具体的には、リン酸カルシウムの粉体と、硬化用の液剤とを練和してなるリン酸カルシウムセメントであって、粉体と液剤との粉液比を1.5～3.5の範囲で変えたとき、JIS T6602で規定される稠度が2～100mmであるリン酸カルシウムセメントが記載されている。特許文献2には、a) 燐酸カルシウム等の無機成分とその他の骨成分からなる粉末骨材を平面状の粉末層に形成する粉末層形成ステップと、b) 粉末層の一部に生体適合性を有する水溶液を噴射し、噴射部分を硬化させる部分硬化ステップと、c) a) と b) のステップを繰り返して積層し、硬化部分が連結した所望の3次元構造の人工骨を成形する人工骨成形ステップとを有する粉末積層法による人工骨成形方法が記載されている。特許文献3には、カルシウム溶液とリン酸溶液とを含む混合液

を調製し、その際混合液中にリン酸カルシウムからなる母材が存在するようにし、もって母材にリン酸カルシウムを析出させ、得られた複合体を熱処理するリン酸カルシウム系骨補填材の製造方法が記載されている。

[0004] 特許文献4には、サイトカインとリン酸カルシウムとを含有する生分解性樹脂膜を含む組織再生用部材であって、サイトカインとリン酸カルシウムとの比率が厚み方向で連続的に増加又は減少する傾斜構造を有する、組織再生用部材を、インクジェット方法により形成することが記載されている。また、特許文献5には、リン酸カルシウム粉末を含有してなる積層造形用粉末材料であって、リン酸カルシウム粉末表面にリン酸基もしくはカルボキシル基を有する有機化合物が所定の量で付与され、リン酸基もしくはカルボキシル基を有する有機化合物からなる粉末を所定の量で含み、かつ積層造形用粉末材料を硬化させてなる硬化物のハイドロキシアパタイト（H A p）転移率が1%以下である積層造形用粉末材料が記載されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2001-95913号公報
特許文献2：国際公開WO2005/011536号公報
特許文献3：特開2006-25915号公報
特許文献4：特開2013-106721号公報
特許文献5：特開2015-187058号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 上記の通り、リン酸カルシウムを含む材料を骨補填材又は組織再生用部材として使用することは知られているが、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度で製造する方法の開発が望まれていた。
- [0007] 本発明は、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度で製造する方法、リン酸カルシウム成形体、及び移植用材料を提供す

ることを解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、Ca/P（カルシウム／リン）の原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成した後に、有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記のリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによって、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度で製造できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0009] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

<1> Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程a；及び
有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記有機酸溶液を上記工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程b；

を含む、リン酸カルシウム成形体の製造方法。

<2> 上記工程bで使用する有機酸が、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも1種である、<1>に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<3> 上記工程bの後に、

Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を、上記工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層の上に形成する工程c；及び

有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて

、上記有機酸溶液を上記工程 c で形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程 d ;

をさらに含む、＜1＞又は＜2＞に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

＜4＞ 上記工程 d で使用する有機酸が、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも 1 種である、＜3＞に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[0010] ＜5＞ 上記リン酸カルシウム粉末は、第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含み、第一のリン酸カルシウム粉末の上記有機酸に対する溶解性が、第二のリン酸カルシウム粉末の上記有機酸に対する溶解性よりも高く、

第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含む上記リン酸カルシウム粉末は、粒子径 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ の粒子と、粒子径 $25 \sim 100 \mu\text{m}$ の粒子とを少なくとも含み、粒子径 $25 \mu\text{m}$ 以上の粒子を体積基準で 20% 以上含む、＜1＞から＜4＞の何れか一に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

＜6＞ 第一のリン酸カルシウム粉末のフローファンクションが 4.00 未満であり、

第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含む上記リン酸カルシウム粉末のフローファンクションが 4.00 以上である、＜5＞に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法：但し、フローファンクションは、破壊強度を f_c 、最大主応力を σ_1 とした時、 σ_1 / f_c で表される。

＜7＞ 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の濃度が 1.1 mol/L 以上 1.4 mol/L 以下である、＜1＞から＜6＞の何れか一に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

＜8＞ 工程 b および／又は工程 d における有機酸が、クエン酸である、＜7＞に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<9> 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の塗布量が、 $0.20 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以上 $0.30 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以下である、<7>又は<8>に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<10> 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の pH が、2.5 以上 3.5 以下である、<1>から<9>の何れかに記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[0011] <11> 成形体の形成に使用されなかった、リン酸カルシウム粉末を除去する工程 e をさらに含む、<1>から<10>のいずれかに記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<12> 上記工程 e の後、成形体を水溶液に浸漬することにより成形体を硬化させる工程 f、及び／又は成形体を加熱することにより成形体を硬化させる工程 g を含む、<11>に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<13> 成形体に生体親和性高分子を被覆する工程 h をさらに含む、<1>から<12>のいずれかに記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<14> 上記生体親和性高分子が、リコンビナントゼラチンである、<13>に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<15> 上記工程 h の後に、上記生体親和性高分子に細胞を播種する工程 i をさらに含む、<13>又は<14>に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

<16> リン酸カルシウム成形体が、再生医療用足場材又は組織修復材である、<1>から<15>のいずれかに記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[0012] <17> <1>から<16>のいずれかに記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法により製造されるリン酸カルシウム成形体。

<18> 再生医療用足場材又は組織修復材である、<17>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<19> 外部空間と連通している孔を有している、<17>又は<18>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<20> 外部空間と連通している孔が、成形体の内部を貫通し、孔の両端において外部空間と連通している、<19>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<21> 外部空間と連通している孔の平均径が $200\mu\text{m}$ ～ $2000\mu\text{m}$ である、<19>又は<20>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<22> Ca/P の原子数の比が $1.4\sim 1.8$ であるリン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であって、外部空間と連通している第一の孔及び当該第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔を有する、リン酸カルシウム成形体。

<23> 外部空間と連通している第一の孔の平均径が $200\mu\text{m}$ ～ $2000\mu\text{m}$ である、<22>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<24> 外部空間と連通している第一の孔の数が、第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔の数よりも多い、<22>又は<23>に記載のリン酸カルシウム成形体。

[0013] <25> 表面の一部又は全部がリコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体を含む、移植用材料。

<26> 上記リン酸カルシウムの Ca/P の原子数の比が $1.4\sim 1.8$ である、<25>に記載の移植用材料。

<27> リコンビナントペプチドが、熱架橋又は化学架橋されている、<25>又は<26>に記載の移植用材料。

<28> リコンビナントペプチドでコートされているリン酸カルシウム成形体の表面が、移植用材料の表面および内部に存在する、<25>から<27>の何れかーに記載の移植用材料。

<29> リン酸カルシウム成形体が、ブロック状である、<25>から<28>の何れかーに記載の移植用材料。

<30> リン酸カルシウム成形体が、顆粒状である、<25>から<28>の何れかーに記載の移植用材料。

[0014] <31> リン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であっ

て、

外部空間と連通している孔を有し、

比重が 0.7 g/mL 以上であるか、および／又は水銀注入法による気孔率が 75% 以下であり、

吸水浸透速度が、 0.05 mm/秒 以上である、

リン酸カルシウム成形体；

但し、吸水浸透速度とは、以下の条件で測定したものである。直径 8 mm 高さ 20 mm のリン酸カルシウム成形体に、内径 2 mm のプラスチック筒の一端を連結し、上記プラスチック筒の他端を長さ 100 mm のチューブの一端に連結し、上記チューブの他端を 10 mL のシリンジに連結した実験系を構築する。リン酸カルシウム成形体とプラスチック筒の接する高さ、シリンジ内のインキの水位の高さが吸水浸透の開始から終了まで同じになるように調整した条件下において、シリンジ内のインキをリン酸カルシウム成形体に吸水浸透させる。インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に 15 mm となったときは、 15 mm を浸透に要した時間で割った値を吸水浸透速度とし、インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に 15 mm とならない場合は、5分の時点においてインキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さを、浸透に要した時間である5分で割った値を、吸水浸透速度とする。

<32> 上記リン酸カルシウムの Ca/P の原子数の比が $1.4 \sim 1.8$ である、<31>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<33> ナノフォーカスX線CT又はマイクロフォーカスX線CTによる測定により判別される相対的に密な層と相対的に疎な層とが交互に積層された構造を有している、<31>又は<32>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<34> 少なくとも5層以上の相対的に密な層と、少なくとも5層以上の相対的に疎な層とが交互に積層されている、<33>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<35> 第一の相対的に密な層と、上記第一の相対的に密な層の隣の第二の相対的に密な層とのピッチが50～300 μm である、<33>又は<34>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<36> リン酸カルシウム成形体のナノフォーカスX線CT画像に基づいて、成形体の一方向の距離を横軸に、相対CT強度を縦軸に表示した波形図において、山のピークと谷のピークとを交互に有する、<31>又は<32>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<37> 少なくとも5つ以上の山のピークを有する、<36>に記載のリン酸カルシウム成形体。

<38> 第一の山のピークと、上記第一の山のピークの隣の第二の山のピークとのピッチが50～300 μm である、<36>又は<37>に記載のリン酸カルシウム成形体。

発明の効果

[0015] 本発明によるリン酸カルシウム成形体の製造方法によれば、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度で製造することができる。本発明のリン酸カルシウム成形体は、高い強度を有する。本発明の移植材料は、細胞接着性に優れ、骨形成能が高い。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、第一の孔のX連通孔、Y連通孔及びZ連通孔を有する成形体を示す。

[図2]図2は、構造強化領域を有する成形体を示す。

[図3]図3は、3Dプリンターによる成形体の作製の設計図を示す。

[図4]図4は、作製した成形体を示す。

[図5]図5は、 β -TCP粒子へのリコンビナントゼラチン修飾効果（細胞接着性）を確認した結果を示す。

[図6]図6は、 β -TCP粒子へのリコンビナントゼラチン修飾効果（骨形成）を確認した結果を示す。

[図7]図7は、吸水浸透速度の測定に用いた実験系を示す。

[図8]図8は、疎密積層構造の解析に用いた対象物の構造を示す。

[図9]図9は、ナノフォーカスX線CT解析において、密層（相対的に密な層）と疎層（相対的に疎な層）が視認できるように見え方を調整した結果を示す。

[図10]図10は、ナノフォーカスX線CT解析において、Z軸方向に3.14 mm、X軸方向に3.14 mmの領域を選択した様子を示す。

[図11]図11は、図10において選択した領域を白黒の程度に合わせて、波形化したものを示す。

[図12]図12は、ナノフォーカスX線CT解析において、Z軸方向に3.12 mm、Y軸方向に3.12 mmの領域を選択した様子を示す。

[図13]図13は、図12において選択した領域を白黒の程度に合わせて、波形化したものを示す。

[図14]図14は、混合粉体の粒度分布の測定結果を示す。

[図15]図15は、TTCP粉体の粒度分布の測定結果を示す。

[図16]図16は、DCPD粉体の粒度分布の測定結果を示す。

[図17]図17は、ラット試験に用いたリン酸カルシウム成形体の模式図を示す。

[図18]図18は、試験A（コントロール：欠損のみ）について、マイクロフォーカスCT解析の結果を示す。

[図19]図19は、成形体Bのラット移植後8週間のマイクロCT解析の結果を示す。

[図20]図20は、移植した成形体Bの0週から2週間ごとのマイクロCT解析の結果を示す。

[図21]図21は、移植した成形体Bの8週間後のマイクロCT解析の結果を示す。

[図22]図22は、移植した成形体Bの8週間後の病理標本、H&E染色の結果を示す。

[図23]図23は、移植した成形体Bについてラット（2匹目）の8週間後の

病理標本、H & E 染色の結果を示す。

[図24]図24は、移植した成形体Bについてラット（2匹目）の8週間後の病理標本、H & E 染色の結果を示す。

[図25]図25は、移植した成形体Bについてラット（3匹目）の8週間後の病理標本、von Kossa染色の結果を示す。

[図26]図26は、底面の反りの評価におけるクラス1から5の見本を示す。

[図27]図27は、リン酸カルシウム成形体について塗布量と圧縮強度の関係を示す。

[図28]図28は、リン酸カルシウム成形体について塗布量と底面の反りの関係を示す。

[図29]図29は、リン酸カルシウム成形体について圧縮強度と底面の反りの関係を示す。

[図30]図30は、3段階の連通孔を有するリン酸カルシウム成形体の模式図を示す。

[図31]図31は、3段階の連通孔を有するリン酸カルシウム成形体の走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope ; SEM）像を示す。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明について詳細に説明する。

以下に記載する構成要件の説明は、本発明の代表的な実施態様に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施態様に限定されるものではない。

なお、本明細書において、「～」を用いて表される数値範囲は、「～」の前後に記載される数値を下限値および上限値として含む範囲を意味する。

[0018] [1] リン酸カルシウム成形体の製造方法

本発明によるリン酸カルシウム成形体の製造方法は、
Ca / Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程a；及び

有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が $1\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下であり、かつ $\text{pH } 3.5$ 以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記有機酸溶液を上記工程 a で形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程 b ;

を含む。

[0019] 本発明においては、 Ca / P の原子数の比が $1.4 \sim 1.8$ であるリン酸カルシウム粉末を使用すること、並びに有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が $1\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下であり、かつ $\text{pH } 3.5$ 以下である有機酸溶液を使用することにより、高い強度を有するリン酸カルシウム成形体を、迅速かつ高い造形精度（液滴のにじみ防止性が高い）で製造することができる。本発明の効果が得られるメカニズムとしては以下のメカニズムが想定されるが、以下のメカニズムによって本発明の範囲は何ら限定されるものではない。

[0020] リン酸カルシウムは $\text{pH } 4$ 以下では Ca / P の原子数の比が 1 であるリン酸水素カルシウム (CaHPO_4 : DCPA とも言う) として析出する。本発明では、 $\text{pH } 3.5$ 以下である有機酸溶液を使用するが、これは、吐出後の pH 変化、具体的には、 Ca / P の原子数の比が 1 である DCPA として析出するので Ca が余り、 pH はアルカリ側へシフトするためである。この際、余分となる Ca が溶解度の小さい塩として固化し、「高い硬化速度」、「成形体の高い強度」、並びに「液滴のにじみ防止による成形体の精度向上」という効果が達成されることが想定される。

本明細書で言う「高い強度を有するリン酸カルシウム成形体」とは、リン酸カルシウム成形体が、成形後の取り扱い（例えば、成形体を装置から取り出す操作など）に耐えうる程度の強度を有していることを意味する。

[0021] <1>リン酸カルシウム粉末

本発明で使用するリン酸カルシウム粉末におけるリン酸カルシウムにおいては、 Ca / P の原子数の比が $1.4 \sim 1.8$ である。 Ca / P の原子数の

比は、好ましくは1.45～1.79であり、より好ましくは1.50～1.70である。

Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末の製造方法は特に限定されないが、例えば、Ca/Pの原子数の比が既知である2種類以上のリン酸カルシウム粉末を原料として使用し、Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8となるように、上記2種類以上のリン酸カルシウム粉末を所定の比率で混合することにより、Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を製造することができる。一例としては、リン酸カルシウム粉末の原料として、 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ （リン酸四カルシウム：TTCPとも言う：Ca/Pの原子数の比は2.0）と、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （リン酸水素カルシウム二水和物：DCPDとも言う：Ca/Pの原子数の比は1.0）とを用いて、TTCPとDCPDとの混合比率を変化させることにより、Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を製造することができる。

[0022] 粉末の粒径は、反応性の点では小さい方が優れるが、粉末層を形成しやすくする点では、粒径は、好ましくは $1\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ であり、より好ましくは $5\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ であり、さらに好ましくは $10\mu\text{m} \sim 30\mu\text{m}$ である。なお、粒径は、レーザ回折散乱式粒度分布測定法で測定することができ、具体的には、レーザ回折散乱式粒度分布測定装置／堀場製作所製／LA-920や株式会社セイシン企業製のLMS-2000eにより測定することができる。

[0023] 好ましくは、リン酸カルシウム粉末は、第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含み、第一のリン酸カルシウム粉末の有機酸（後記する）に対する溶解性が、第二のリン酸カルシウム粉末の有機酸（後記する）に対する溶解性よりも高い。

好ましくは、第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含む上記のリン酸カルシウム粉末は、粒子径 $5 \sim 15\mu\text{m}$ の粒子と、粒子径 $25 \sim 100\mu\text{m}$ の粒子とを少なくとも含み、粒子径 $5 \sim 15\mu\text{m}$ の粒

子を体積基準で5.0%以上（より好ましくは10%以上、さらに好ましくは15%以上含む）、粒子径 $25\mu\text{m}$ 以上の粒子を体積基準で20%以上（より好ましくは25%以上、さらに好ましくは30%以上）含む。

[0024] 好ましくは、第一のリン酸カルシウム粉末のフローファンクションが4.00未満であり、第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含むリン酸カルシウム粉末のフローファンクションが4.00以上である。ここで、フローファンクションは、破壊強度を f_c 、最大主応力を σ_1 とした時、 σ_1 / f_c で表される。フローファンクションは、ブルックフィールド製の「パウダーフローテスター、PFT」などの測定装置を用いて後記する実施例の記載に準じて測定することができる。

[0025] <2>リン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程a

本発明における工程aは、リン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程である。

基板の材質、形状、及び大きさは、特に限定されず、目的に応じて適切な基板を使用することができる。基板としては、所定の面積の平面を有する基板が好ましい。基板の表面積は特に限定されないが、好ましくは $5\sim 200\text{cm}^2$ であり、より好ましくは $20\sim 100\text{cm}^2$ である。

[0026] 基板の材質としては、アクリル、メタクリル（ポリメタクリル酸メチル樹脂など）、ポリスチレン、及びポリプロピレン等のプラスチック素材、ガラス等の無機素材、並びに銅、アルミニウム及びステンレス鋼などの金属素材等が挙げられる。

[0027] リン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程は、任意の方法で行うことができ、その方法は特に限定されないが、例えば、3Dプリンタ（三次元プリンター）を用いて行うことができる。3Dプリンタの一例としては、Z-Printer 310 Plus（3D Systems Corporation（旧 Z Corporation））等を使用できるが、特に限定されない。

[0028] <3>有機酸溶液

本発明においては、有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が $1\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下であり、かつ pH 3.5 以下である有機酸溶液を使用する。有機酸のカルシウム塩の溶解度は、温度 25°C における溶解度を意味する。

有機酸溶液について、有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が $1\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下であればよいが、好ましくは $0.5\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下であり、より好ましくは $0.1\text{ g} / 100\text{ mL}$ 以下である。

上記の溶解度を満たす有機酸としては、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましく、クエン酸、シュウ酸又は酒石酸がより好ましく、クエン酸がさらに好ましい。

[0029] 有機酸溶液の pH は5以下であり、好ましくは1.0～3.5であり、より好ましくは2.5以上3.5以下であり、さらに好ましくは3.0以上3.5以下である。

pH 3.5 以下である有機酸溶液は、有機酸及び有機酸の塩（有機酸のナトリウム塩など）の混合比を調整することにより、製造することができる。

有機酸溶液における有機酸の濃度は、特に限定されないが、一般的には $0.1\text{ mol} / \text{L}$ 以上 $5.0\text{ mol} / \text{L}$ 以下であり、好ましくは $0.5\text{ mol} / \text{L}$ 以上 $3.0\text{ mol} / \text{L}$ 以下であり、より好ましくは $1.0\text{ mol} / \text{L}$ 以上 $2.0\text{ mol} / \text{L}$ 以下であり、さらに好ましくは $1.1\text{ mol} / \text{L}$ 以上 $1.4\text{ mol} / \text{L}$ 以下である。

[0030] <4>有機酸溶液の吐出を含むリン酸カルシウム成形体を製造する工程 b

本発明においては、有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記有機酸溶液を工程 a で形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることにより、リン酸カルシウム成形体を製造する。

[0031] 本発明においては、有機酸溶液を液滴状態で吐出させる。液滴状態とは、ノズル部から吐出した有機酸溶液が、ノズル部と基板上のリン酸カルシウム粉末を含有する層のいずれにも接触せずに、空間中を移動する状態である。

[0032] 本発明においては、有機酸溶液を液滴状態で吐出させる際の温度は特に限

定されないが、一般的には 15℃以上50℃以下であり、好ましくは 20℃以上40℃以下であり、例えば、室温である。

[0033] 有機酸溶液の吐出は、ノズル部を有するインクジェットヘッドを用いて行うことができる。インク液滴をピエゾ素子のアクチュエータ等によりノズル部から吐出し、媒体に着弾させて媒体上に画像を形成するインクジェット記録装置が知られている。インクジェット記録装置では、ノズル部の配列ピッチが高密度化されるとともに、数ピコリットル～100ピコリットルの微小なインク液滴を吐出することが可能である。特開2012-4555号公報には、インクジェット方式による機能材料の製造方法及び装置が記載されているが、有機酸溶液の吐出は、特開2012-4555号公報に記載されているようなインクジェットヘッドを用いて行うことができる。特開2012-4555号公報に記載の内容は全て本明細書に引用されるものとする。

[0034] インクジェットヘッドは水平方向について自在に移動可能に構成されることが好ましい。固定された基板に対してインクジェットヘッドを移動させてもよいし、インクジェットヘッド及び基板の両方を移動させてもよい。インクジェットヘッドは、インクタンクから供給されるインク（即ち、有機酸溶液）を基板上の粉末を含有する層の所望の位置に対して吐出するものである。

[0035] インクジェットの方式としては、コンティニュアス型、オンデマンド型のいずれでもよいが、数10cm四方以上の大面積に吐出する場合には、ノズルが複数あるオンデマンド型が好ましい。オンデマンド型の吐出方式を特徴付けるアクチュエータは、ピエゾ方式、サーマル方式、ソリッド方式、静電吸引方式等の種々の方式を用いることができる。ピエゾ方式は、水系以外に、有機溶剤系を吐出することも可能である。ノズルの並びについても、単列に配置、複数列に配置、千鳥格子状に配置のいずれでも構わない。

[0036] 上記の有機酸溶液の吐出を含むリン酸カルシウム成形体を製造する工程bは、例えば、インクジェットヘッドを備えた3Dプリンタ（三次元プリンター）を用いて行うことができる。3Dプリンタの一例としては、Z-P r i

nter 310 Plus (3D Systems Corporation (旧 Z Corporation) 等を使用できるが、特に限定されない。

[0037] 本発明の方法で製造されるリン酸カルシウム成形体の大きさは特に限定されないが、リン酸カルシウム成形体を直方体に近似した場合で、直方体の縦、横及び高さはそれぞれ、好ましくは0.1mm～200mmであり、より好ましくは1mm～100mmである。

[0038] <5>積層

本発明によるリン酸カルシウム成形体の製造方法は、上記の工程bの後に、

Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を、工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層の上に形成する工程c；及び有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、上記の有機酸溶液を工程cで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程d；

をさらに含んでもよい。

[0039] 上記の工程cは、工程aと同様に行うことができる。工程cで使用する材料の種類は、工程aと同一でもよいし、異なってもよいが、好ましくは同一である。

上記の工程dは、工程bと同様に行うことができる。工程dで使用する材料の種類は、工程bと同一でもよいし、異なってもよいが、好ましくは同一である。

工程dで使用する有機酸は、工程bの場合と同様に、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましく、クエン酸、シュウ酸又は酒石酸がより好ましく、クエン酸がさらに好ましい。

[0040] 工程 c 及び工程 d を行う場合、その回数は特に限定されず、1 回以上の任意の回数で行うことができ、例えば、1 回～1 0 0 0 回行うことができる。

工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の塗布量は、一般的には $0.10 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以上 $0.40 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以下であり、好ましくは、 $0.20 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以上 $0.30 \text{ g} / \text{cm}^3$ 以下である。

[0041] <6>リン酸カルシウム粉末を除去する工程

本発明においては、成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去する工程 e をさらに設けることができる。リン酸カルシウム粉末を除去するとは、リン酸カルシウム粉末を、成形体の表面から除去することである。

成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去することによって、所望の形状に成形された成形体を回収することができる。なお、本発明においては、形成された成形体が所定の強度を有していることにより、成形体を破損することなく、成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去することができる。

[0042] 成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去する方法は特に限定されず、例えば、圧縮空気を用いて行ってもよい。

[0043] <7>成形体を硬化させる工程

本発明においては、成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去する工程 e の後に、成形体を水溶液に浸漬することにより成形体を硬化させる工程 f、及び／又は成形体を加熱することにより成形体を硬化させる工程 g をさらに設けることができる。但し、工程 f 及び工程 g はそれぞれ設けてもよいし、設けなくてもよい。

上記の工程 f 及び／又は工程 g を行うことにより、添加した有機酸を除去することができ、成形体の強度を更に高めることができる。

[0044] また、上記の工程 c 及び工程 d を行う場合（即ち、リン酸カルシウム粉末を含有する層を積層する場合）には、工程 f により成形体を硬化させることによって、成形体の強度をより高めることができる。リン酸カルシウム粉末

を含有する層の間の強度の向上に起因して、成形体の強度がより高められるものと推定される。即ち、本発明の好ましい態様においては、工程 a 及び工程 b を行った後に、工程 c 及び工程 d を行い、その後、成形体の形成に使用されなかったリン酸カルシウム粉末を除去する工程 e を行い、さらに工程 e の後に、成形体を水溶液に浸漬することにより成形体を硬化させる工程 f を行うことができる。

[0045] 成形体を水溶液に浸漬することにより成形体を硬化させる工程 f において使用する水溶液の種類は、成形体を硬化できる限り特に限定されず、例えば、リン酸水溶液などが挙げられ、より具体的には、 $0.1 \text{ mol/L} \sim 1.0 \text{ mol/L}$ のリン酸二水素ナトリウム溶液などを使用することができる。上記水溶液の pH は特に限定されないが、一般的には pH 3～11 であり、好ましくは pH 3～10 であり、より好ましくは pH 4～9 である。

成形体を水溶液に浸漬する時間は、特に限定されないが、一般的には 1 時間から 48 時間であり、好ましくは 2 時間から 24 時間であり、より好ましくは 4 時間から 24 時間である。

[0046] 成形体を加熱することにより成形体を硬化させる工程 g は、成形体を、一般的には $100^{\circ}\text{C} \sim 2000^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $200^{\circ}\text{C} \sim 1500^{\circ}\text{C}$ であり、より好ましくは $500^{\circ}\text{C} \sim 1500^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは $1000^{\circ}\text{C} \sim 1300^{\circ}\text{C}$ 、特に好ましくは $1100^{\circ}\text{C} \sim 1200^{\circ}\text{C}$ の温度で加熱することにより行うことができる。但し、 $T [\text{ケルビン} : \text{K}] = t [\text{セルシウス度} : ^{\circ}\text{C}] + 273.15$ である。

[0047] 加熱時間は、特に限定されないが、一般的には 1 時間から 48 時間であり、好ましくは 1 時間から 24 時間であり、より好ましくは 2 時間から 12 時間であり、さらに好ましくは 2 時間から 6 時間である。

加熱は、マッフル炉などを用いて常法により行うことができる。

[0048] 上記した成形体を硬化させる工程 f 及び／又は工程 g を行うことにより、成形体の圧縮強度を高めることができる。工程 f 及び／又は工程 g を行った成形体の圧縮強度は特に限定されないが、好ましくは 2.5 MPa 以上であ

り、より好ましくは3.0 MPa以上であり、さらに好ましくは3.5 MPa以上であり、圧縮強度の上限は特に限定されないが、一般的には10 MPa以下である。

[0049] <8>生体親和性高分子を被覆する工程

本発明においては、成形体に生体親和性高分子を被覆する工程hをさらに設けることができる。但し、工程hは設けてもよいし、設けなくてもよい。成形体を生体親和性高分子で被覆することにより、細胞を吸着させ易くすることができる。好ましくは、本明細書で上記したような成形体を硬化させる工程f及び／又は工程gを行うことにより酸を成形体から除去した後に、成形体に生体親和性高分子（好ましくは、後記するリコンビナントゼラチン）を被覆することにより、生体親和性高分子と酸との反応を防止することができる。即ち、本発明の好ましい態様においては、成形体を硬化させる工程f及び／又は工程gを行った後に、成形体に生体親和性高分子を被覆する工程hを行うことができる。

[0050] (8-1) 生体親和性高分子

生体親和性とは、生体に接触した際に、長期的かつ慢性的な炎症反応などのような顕著な有害反応を惹起しないことを意味する。生体親和性高分子は、生体に親和性を有するものであれば、生体内で分解されるか否かは特に限定されないが、生分解性高分子であることが好ましい。非生分解性材料として具体的には、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリウレタン、ポリプロピレン、ポリエステル、塩化ビニル、ポリカーボネート、アクリル、ステンレス、チタン、シリコン、及びMPC（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）などが挙げられる。生分解性材料としては、具体的には、天然由来のペプチド、リコンビナントペプチド（RCP）又は化学合成ペプチドなどのポリペプチド（例えば、以下に説明するゼラチン等）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、乳酸・グリコール酸コポリマー（PLGA）、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、コンドロイチン、セルロース、アガロース、カルボキシメチルセルロース、キチン、及び

キトサンなどが挙げられる。上記の中でも、リコンビナントペプチドが特に好ましい。これら生体親和性高分子には細胞接着性を高める工夫がなされていてもよい。具体的には、「基材表面に対する細胞接着基質（フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン）や細胞接着配列（アミノ酸一文字表記で現わされる、RGD配列、LDV配列、REDV配列、YIGSR配列、PDSGR配列、RYVVLP R配列、LGTIPG配列、RNIAEIIKD I配列、IKVAV配列、LRE配列、DGEA配列、及びHAV配列）ペプチドによるコーティング」、「基材表面のアミノ化、カチオン化」、又は「基材表面のプラズマ処理、コロナ放電による親水性処理」といった方法を使用できる。

[0051] リコンビナントペプチド又は化学合成ペプチドを含むポリペプチドの種類は、生体親和性を有するものであれば特に限定されないが、例えば、ゼラチン、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、プロネクチン、ラミニン、テネイシン、フィブリン、フィブロイン、エンタクチン、トロンボスポンジン、レトロネクチンが好ましく、最も好ましくはゼラチン、コラーゲン、アテロコラーゲンである。

[0052] 本発明で用いるゼラチンとしては、好ましくは、天然ゼラチン、リコンビナントゼラチン又は化学合成ゼラチンであり、さらに好ましくはリコンビナントゼラチンである。天然ゼラチンとは天然由来のコラーゲンより作られたゼラチンを意味する。ゼラチンが由来する生物は特に限定されず、例えば、動物（哺乳類、魚類など）由来のゼラチンを使用することができる。

[0053] 化学合成ペプチド又は化学合成ゼラチンとは、人工的に合成したペプチド又はゼラチンを意味する。ゼラチン等のペプチドの合成は、固相合成でも液相合成でもよいが、好ましくは固相合成である。ペプチドの固相合成は当業者に公知であり、例えば、アミノ基の保護としてFmoc基（Fluorenyl-Methoxy-Carbonyl基）を使用するFmoc基合成法、並びにアミノ基の保護としてBoc基（tert-Butyl Oxy Carbonyl基）を使用するBoc基合成法などが挙げられる。なお、化学合成ゼラチンの好ましい態様は、本明細書中後記の

リコンビナントゼラチンに記載した内容を当てはめることができる。

リコンビナントゼラチンについては、本明細書中後記する。

[0054] 生体親和性高分子の親水性値「 $1 / \text{IOB}$ 」値は、0から1. 0が好ましい。より好ましくは、0から0. 6であり、さらに好ましくは0から0. 4である。IOBとは、藤田穆により提案された有機化合物の極性/非極性を表す有機概念図に基づく、親疎水性の指標であり、その詳細は、例えば、“Pharmaceutical Bulletin”, vol.2, 2, pp.163-173 (1954)、「化学の領域」vol. 11, 10, pp.719-725 (1957)、「フレグランスジャーナル」, vol.50, pp.79-82 (1981) 等で説明されている。簡潔に言えば、全ての有機化合物の根源をメタン (CH_4) とし、他の化合物はすべてメタンの誘導体とみなして、その炭素数、置換基、変態部、環等にそれぞれ一定の数値を設定し、そのスコアを加算して有機性値 (OV)、無機性値 (IV) を求め、この値を、有機性値をX軸、無機性値をY軸にとった図上にプロットしていくものである。有機概念図におけるIOBとは、有機概念図における有機性値 (OV) に対する無機性値 (IV) の比、すなわち「無機性値 (IV) / 有機性値 (OV)」をいう。有機概念図の詳細については、「新版有機概念図－基礎と応用－」(甲田善生等著、三共出版、2008)を参照されたい。本明細書中では、IOBの逆数をとった「 $1 / \text{IOB}$ 」値で親疎水性を表している。「 $1 / \text{IOB}$ 」値が小さい(0に近づく)程、親水性であることを表す表記である。

[0055] 本発明で用いる生体親和性高分子がポリペプチドである場合は、Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値で表される親疎水性指標において、0. 3以下、マイナス9. 0以上であることが好ましく、0. 0以下、マイナス7. 0以上であることがさらに好ましい。Grand average of hydropathicity (GRAVY) 値は、『Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607』及び『Gasteig

er E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A.; E xPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis.; Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003).』の方法により得ることができる。

[0056] (8-2) 架橋

生体親和性高分子は、架橋されているものでもよいし、架橋されていないものでもよい。一般的な架橋方法としては、熱架橋、アルデヒド類（例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなど）による架橋、縮合剤（カルボジイミド、シアナミドなど）による架橋、酵素架橋、光架橋、紫外線架橋、疎水性相互作用、水素結合、イオン性相互作用などが知られており、本発明においても上記の架橋方法を使用することができる。本発明で使用する架橋方法としては、さらに好ましくは熱架橋、紫外線架橋、又は酵素架橋であり、特に好ましくは熱架橋である。

[0057] 酵素による架橋を行う場合、酵素としては、高分子材料間の架橋作用を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはトランスグルタミナーゼ及びラッカーゼ、最も好ましくはトランスグルタミナーゼを用いて架橋を行うことができる。トランスグルタミナーゼで酵素架橋するタンパク質の具体例としては、リジン残基及びグルタミン残基を有するタンパク質であれば特に制限されない。トランスグルタミナーゼは、哺乳類由来のものであっても、微生物由来のものであってもよく、具体的には、味の素（株）製アクティバシリーズ、試薬として販売されている哺乳類由来のトランスグルタミナーゼ、例えば、オリエンタル酵母工業（株）製、Upstate USA Inc.製、Bioscience International製などのモルモット肝臓由来トランスグルタミナーゼ、ヤギ由来トランスグルタミナーゼ、ウサギ由来トランスグルタミナーゼなど、ヒト由来の血液凝固因子（Factor XIIIa、Haematologic Technologies, Inc. 社）などが挙げられる。

[0058] 架橋（例えば、熱架橋）を行う際の反応温度は、架橋ができる限り特に限定されないが、好ましくは、 -100°C ～ 500°C であり、より好ましくは

0℃～300℃であり、更に好ましくは50℃～300℃であり、更に好ましくは100℃～250℃であり、更に好ましくは120℃～200℃である。

[0059] (8-3) リコンビナントゼラチン

本発明で用いるゼラチンとしては、リコンビナントゼラチンが好ましい。

リコンビナントゼラチンとは、遺伝子組み換え技術により作られたゼラチン類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくは蛋白様物質を意味する。本発明で用いることができるリコンビナントゼラチンは、コラーゲンに特徴的なG I y - X - Yで示される配列（X及びYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す）の繰り返しを有するものが好ましい。ここで、複数個のG I y - X - Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。好ましくは、細胞接着シグナルが一分子中に2配列以上含まれている。本発明で用いるリコンビナントゼラチンとしては、コラーゲンの部分アミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を有するリコンビナントゼラチンを用いることができる。例えばEP 1014176、米国特許6992172号、国際公開WO2004/85473、国際公開WO2008/103041等に記載のものを用いることができるが、これらに限定されるものではない。本発明で用いるリコンビナントゼラチンとして好ましいものは、以下の態様のリコンビナントゼラチンである。

[0060] リコンビナントゼラチンは、天然のゼラチン本来の性能から、生体親和性に優れ、且つ天然由来ではないことで牛海綿状脳症（BSE）などの懸念がなく、非感染性に優れている。また、リコンビナントゼラチンは天然ゼラチンと比べて均一であり、配列が決定されているので、強度及び分解性においても架橋等によってブレを少なく精密に設計することが可能である。

[0061] リコンビナントゼラチンの分子量は、特に限定されないが、好ましくは2000以上100000以下（2kDa（キロダルトン）以上100kDa以下）であり、より好ましくは2500以上95000以下（2.5kDa以上95kDa以下）であり、さらに好ましくは5000以上90000以

下（５ｋＤａ以上９０ｋＤａ以下）であり、最も好ましくは１００００以上９００００以下（１０ｋＤａ以上９０ｋＤａ以下）である。

[0062] リコンビナントゼラチンは、コラーゲンに特徴的なＧＩＹ－Ｘ－Ｙで示される配列の繰り返しを有することが好ましい。ここで、複数のＧＩＹ－Ｘ－Ｙはそれぞれ同一でも異なってもよい。ＧＩＹ－Ｘ－Ｙにおいて、ＧＩＹはグリシンを表し、Ｘ及びＹは、

任意のアミノ酸（好ましくは、グリシン以外の任意のアミノ酸）を表す。コラーゲンに特徴的なＧＩＹ－Ｘ－Ｙで示される配列とは、ゼラチン及びコラーゲンのアミノ酸組成及び配列における、他のタンパク質と比較して非常に特異的な部分構造である。この部分においてはグリシンが全体の約３分の１を占め、アミノ酸配列では３個に１個の繰り返しとなっている。グリシンは最も簡単なアミノ酸であり、分子鎖の配置への束縛も少なく、ゲル化に際してのヘリックス構造の再生に大きく寄与している。Ｘ及びＹで表されるアミノ酸はイミノ酸（プロリン、オキシプロリン）が多く含まれ、全体の１０％～４５％を占めることが好ましい。好ましくは、リコンビナントゼラチンの配列の８０％以上、更に好ましくは９５％以上、最も好ましくは９９％以上のアミノ酸が、ＧＩＹ－Ｘ－Ｙの繰り返し構造である。

[0063] 一般的なゼラチンは、極性アミノ酸のうち電荷を持つものと無電荷のものが１：１で存在する。ここで、極性アミノ酸とは具体的にシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン及びアルギニンを指し、このうち極性無電荷アミノ酸とはシステイン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン及びチロシンを指す。本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいては、構成する全アミノ酸のうち、極性アミノ酸の割合が１０～４０％であり、好ましくは２０～３０％である。上記極性アミノ酸中の無電荷アミノ酸の割合が好ましくは５％以上２０％未満であり、より好ましくは５％以上１０％未満である。さらに、セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシン及びシステインのうちいずれか１アミノ酸を配列上に含まないことが好ましく、

セリン、スレオニン、アスパラギン、チロシン及びシステインのうち2以上のアミノ酸を配列上に含まないことがより好ましい。

[0064] 一般にポリペプチドにおいて、細胞接着シグナルとして働く最小アミノ酸配列が知られている（例えば、株式会社永井出版発行「病態生理」Vol. 9、No. 7（1990年）527頁）。本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、これらの細胞接着シグナルを一分子中に2以上有することが好ましい。具体的な配列としては、接着する細胞の種類が多いという点で、アミノ酸一文字表記で現わされる、RGD配列、LDV配列、REDV配列、YIGSR配列、PDSGR配列、RYVVLP R配列、LG T I P G配列、RN I A E I I K D I配列、I K V A V配列、L R E配列、D G E A配列、及びH A V配列の配列が好ましい。さらに好ましくはRGD配列、Y I G S R配列、P D S G R配列、L G T I P G配列、I K V A V配列及びH A V配列、特に好ましくはRGD配列である。RGD配列のうち、好ましくはE R G D配列である。細胞接着シグナルを有するリコンビナントゼラチンを用いることにより、細胞の基質産生量を向上させることができる。

[0065] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおけるRGD配列の配置としては、RGD間のアミノ酸数が0～100の間で均一でないことが好ましく、RGD間のアミノ酸数が25～60の間で均一でないことがより好ましい。

この最小アミノ酸配列の含有量は、細胞接着及び増殖性の観点から、タンパク質1分子中3～50個が好ましく、さらに好ましくは4～30個、特に好ましくは5～20個である。最も好ましくは12個である。

[0066] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンにおいて、アミノ酸総数に対するRGDモチーフの割合は少なくとも0.4%であることが好ましい。リコンビナントゼラチンが350以上のアミノ酸を含む場合、350のアミノ酸の各ストレッチが少なくとも1つのRGDモチーフを含むことが好ましい。アミノ酸総数に対するRGDモチーフの割合は、より好ましくは少なくとも0.6%であり、更に好ましくは少なくとも0.8%であり、更に一層好ましくは少なくとも1.0%であり、特に好ましくは少なくとも1.2%であり

、最も好ましくは少なくとも1、5%である。リコンビナントペプチド内のRGDモチーフの数は、250のアミノ酸あたり、好ましくは少なくとも4、より好ましくは6、更に好ましくは8、特に好ましくは12以上16以下である。RGDモチーフの0.4%という割合は、250のアミノ酸あたり、少なくとも1つのRGD配列に対応する。RGDモチーフの数は整数であるので、0.4%の特徴を満たすには、251のアミノ酸からなるゼラチンは、少なくとも2つのRGD配列を含まなければならない。好ましくは、本発明のリコンビナントゼラチンは、250のアミノ酸あたり、少なくとも2つのRGD配列を含み、より好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも3つのRGD配列を含み、さらに好ましくは250のアミノ酸あたり、少なくとも4つのRGD配列を含む。本発明のリコンビナントゼラチンのさらなる態様としては、少なくとも4つのRGDモチーフ、好ましくは6つ、より好ましくは8つ、さらに好ましくは12以上16以下のRGDモチーフを含む。

[0067] リコンビナントゼラチンは部分的に加水分解されていてもよい。

[0068] 好ましくは、本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、 $A - [(Gly - X - Y)_n]_m - B$ で示されるものである。n個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、n個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。mは好ましくは2～10の整数を示し、より好ましくは3～5の整数を示す。nは3～100の整数が好ましく、15～70の整数がさらに好ましく、50～65の整数が最も好ましい。Aは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示し、Bは任意のアミノ酸又はアミノ酸配列を示す。なお、n個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。

[0069] より好ましくは、本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、 $Gly - Ala - Pro - [(Gly - X - Y)_{63}]_3 - Gly$ （式中、63個のXはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示し、63個のYはそれぞれ独立にアミノ酸の何れかを示す。なお、63個のGly-X-Yはそれぞれ同一でも異なってもよい。）で示されるものである。

[0070] 繰り返し単位には天然に存在するコラーゲンの配列単位を複数結合することが好ましい。ここで言う天然に存在するコラーゲンとは天然に存在するものであればいずれでも構わないが、好ましくはI型、II型、III型、IV型、又はV型コラーゲンである。より好ましくは、I型、II型、又はIII型コラーゲンである。別の形態によると、上記コラーゲンの由来は好ましくは、ヒト、ウシ、ブタ、マウス又はラットであり、より好ましくはヒトである。

[0071] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンの等電点は、好ましくは5～10であり、より好ましくは6～10であり、さらに好ましくは7～9.5である。リコンビナントゼラチンの等電点の測定は、等電点電気泳動法 (Maxey, C. R. (1976; Phitogr. Gelatin 2, Editor Cox, P. J. Academic, London, Engl. 参照) に記載されたように、1質量%ゼラチン溶液をカチオン及びアニオン交換樹脂の混晶カラムに通したあとのpHを測定することで実施することができる。

[0072] 好ましくは、リコンビナントゼラチンは脱アミン化されていない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンはテロペプチドを有さない。

好ましくは、リコンビナントゼラチンは、アミノ酸配列をコードする核酸により調製された実質的に純粋なポリペプチドである。

[0073] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンとして特に好ましくは、

(1) 配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド；

(2) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するペプチド；又は

(3) 配列番号1に記載のアミノ酸配列と80%以上（さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上）の配列同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ生体親和性を有するペプチド；の何れかである。

[0074] 本発明における配列同一性は、以下の式で計算される値を指す。

％配列同一性＝〔（同一残基数）／（アラインメント長）〕×１００

２つのアミノ酸配列における配列同一性は当業者に公知の任意の方法で決定することができ、ＢＬＡＳＴ（(Basic Local Alignment Search Tool)）プログラム（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０，１９９０）等を使用して決定することができる。

[0075] 「１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」における「１若しくは数個」とは、好ましくは１～２０個、より好ましくは１～１０個、さらに好ましくは１～５個、特に好ましくは１～３個を意味する。

[0076] 本発明で用いるリコンビナントゼラチンは、当業者に公知の遺伝子組み換え技術によって製造することができ、例えばＥＰ１０１４１７６Ａ２号公報、米国特許第６９９２１７２号公報、国際公開ＷＯ２００４／８５４７３号、国際公開ＷＯ２００８／１０３０４１号等に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、所定のリコンビナントゼラチンのアミノ酸配列をコードする遺伝子を取得し、これを発現ベクターに組み込んで、組み換え発現ベクターを作製し、これを適当な宿主に導入して形質転換体を作製する。得られた形質転換体を適当な培地で培養することにより、リコンビナントゼラチンが産生されるので、培養物から産生されたリコンビナントゼラチンを回収することにより、本発明で用いるリコンビナントゼラチンを調製することができる。

[0077] （８－４）生体親和性高分子による被覆

成形体に生体親和性高分子を被覆する方法は、特に限定されないが、生体親和性高分子溶液を使用することができる。生体親和性高分子溶液に使用する溶媒は、生体親和性高分子を溶解できる溶媒であれば、特に限定されないが、一般的には、水、有機溶媒、又は水と有機溶媒の混合物であり、好ましくは水、又は水と有機溶媒の混合物などの水性媒体である。有機溶媒としては、例えば、アセトン、エタノール等があげられる。ゼラチン溶液の場合には、好ましくは、ゼラチン水溶液を使用することができる。

[0078] 生体親和性高分子溶液における生体親和性高分子の濃度は特に限定されないが、一般的には1質量%～50質量%であり、好ましくは2～40質量%であり、より好ましくは3～30質量%である。

[0079] 上記の生体親和性高分子溶液で成形体を処理することによって、成形体に生体親和性高分子を被覆することができる。具体的には、成形体を生体親和性高分子溶液に浸し、乾燥することにより、成形体に生体親和性高分子を被覆することができる。

[0080] <9>生体親和性高分子に細胞を播種する工程

本発明においては、上記した成形体に生体親和性高分子を被覆する工程hの後に、生体親和性高分子に細胞を播種する工程iをさらに設けることができる。

本発明における成形体の用途は、後記の通り、再生医療用足場材又は組織修復材などが意図されるが、成形体に細胞を播種して使用する場合と、成形体に細胞を播種せずに使用する場合とが想定される。

[0081] 播種する細胞の種類は特に限定されず、使用目的に応じて適宜選択することができる。

使用する細胞として、好ましくは、動物細胞であり、より好ましくは脊椎動物由来細胞、特に好ましくはヒト由来細胞である。脊椎動物由来細胞（特に、ヒト由来細胞）の種類は、万能細胞、体性幹細胞、前駆細胞、又は成熟細胞の何れでもよい。万能細胞としては、例えば、胚性幹（ES）細胞、生殖幹（GS）細胞、又は人工多能性幹（iPS）細胞を使用することができる。体性幹細胞としては、例えば、間葉系幹細胞（MSC）、造血幹細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、心筋幹細胞、脂肪由来幹細胞、又は神経幹細胞を使用することができる。前駆細胞及び成熟細胞としては、例えば、皮膚、真皮、表皮、筋肉、心筋、神経、骨、軟骨、内皮、脳、上皮、心臓、腎臓、肝臓、膵臓、脾臓、口腔内、角膜、骨髓、臍帯血、羊膜、又は毛に由来する細胞を使用することができる。ヒト由来細胞としては、例えば、ES細胞、iPS細胞、MSC、軟骨細胞、骨芽細胞、骨芽前駆細胞、間充

繊維細胞、筋芽細胞、心筋細胞、心筋芽細胞、神経細胞、肝細胞、ベータ細胞、線維芽細胞、角膜内皮細胞、血管内皮細胞、角膜上皮細胞、羊膜細胞、臍帯血細胞、骨髓由来細胞、又は造血幹細胞を使用することができる。また、細胞の由来は、自家細胞又は他家細胞の何れでも構わない。

[0082] < 10 > 本発明の方法で製造されるリン酸カルシウム成形体の用途

本発明によるリン酸カルシウム成形体の製造方法で製造されるリン酸カルシウム成形体の用途は特に限定されないが、好ましくは再生医療用足場材又は組織修復材である。リン酸カルシウム成形体の用途については本明細書中において後記する。

[0083] [2] リン酸カルシウム成形体

本発明はさらに、上記 [1] に記載した本発明によるリン酸カルシウム成形体の製造方法により製造されるリン酸カルシウム成形体を提供する。

本発明のリン酸カルシウム成形体は、高い強度を有し、かつ迅速かつ高い造形精度で製造することができる。

[0084] 本発明はさらに、リン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であって、外部空間と連通している孔を有し、比重が 0.7 g/mL 以上であるか、および／又は水銀注入法による気孔率が 75% 以下であり、吸水浸透速度が、 0.05 mm/秒 以上である、リン酸カルシウム成形体を提供する。

[0085] リン酸カルシウム成形体の比重は 0.7 g/mL 以上であり、好ましくは 0.75 g/mL 以上であり、より好ましくは 0.85 g/mL 以上である。

[0086] リン酸カルシウム成形体の水銀注入法による気孔率は 75% 以下であり、より好ましくは 70% 以下であり、さらに好ましくは 67% 以下であり、特に好ましくは 65% 以下である。

水銀圧入法とは、水銀の表面張力が大きいことを利用して粉体の細孔に水銀を浸入させるために圧力を加え、圧力と圧入された水銀量から比表面積や細孔分布を求める方法であり、気孔率は POREMASTER 60GT (Quantachrome 社製) 等の装置を使用して測定することができる。

。

[0087] リン酸カルシウム成形体の吸水浸透速度は、0.05 mm/秒以上であり、好ましくは0.10 mm/秒以上であり、より好ましくは0.30 mm/秒以上であり、より一層好ましくは0.50 mm/秒以上であり、さらに好ましくは0.70 mm/秒以上であり、更に一層好ましくは0.80 mm/秒以上であり、特に好ましくは0.90 mm/秒以上である。

リン酸カルシウム成形体の吸水浸透速度は、X方向（描画方向）、Y方向（リコート走査方向）及びZ方向（積層方向）のうちの少なくとも一つの方向において、上記の吸水浸透速度を満たしていればよいが、好ましくは上記のうちの何れか二つの方向において上記の吸水浸透速度を満たし、より好ましくは上記の全方向（三方向）において上記の吸水浸透速度を満たしている。

[0088] 本発明における吸水浸透速度とは、以下の条件で測定したものである。測定中の実験室の温度を20～25℃、湿度を25～40%に保ち、直径8 mm高さ20 mmのリン酸カルシウム成形体に、内径2 mmのプラスチック筒の一端を連結し、上記プラスチック筒の他端を長さ100 mmのチューブの一端に連結し、上記チューブの他端を10 mLのシリンジに連結した実験系を構築する。リン酸カルシウム成形体とプラスチック筒の接する高さ、シリンジ内のインキの水位の高さとが吸水浸透の開始から終了まで同じになるように調整した条件下において、シリンジ内のインキをリン酸カルシウム成形体に吸水浸透させる。インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとなったときは、15mmを、浸透に要した時間で割った値を、吸水浸透速度とする。インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとならない場合は、5分の時点においてインキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さを定規で測定し、浸透に要した時間で割った値を、吸水浸透速度とする。

[0089] 上記のリン酸カルシウム成形体におけるリン酸カルシウムにおいては、Ca/Pの原子数の比が、好ましくは1.4～1.8であり、より好ましくは

1. 45～1. 79であり、さらに好ましくは1. 50～1. 70である。

[0090] 本発明のリン酸カルシウム成形体は、好ましくは、相対的に密な層と相対的に疎な層と交互に積層された構造を有している。相対的に密な層及び相対的に疎な層とは、ナノフォーカスX線CT又はマイクロフォーカスX線CTによる測定により、相対的に密な層および相対的に疎な層であると判別できる層を意味する。相対的に密な層とは、相対的に疎な層よりも密であることを意味し、相対的に疎な層とは、相対的に密な層よりも、疎であることを意味する。

[0091] 後記する実施例に記載のように、リン酸カルシウム成形体のCT測定を行った後に、ソフトウェアを用いることにより、リン酸カルシウム成形体の内部構造の様態が見えるよう、さらに、相対的に密な層と相対的に疎な層が視認できるように、白、グレー、黒の見え方を調整する。白と黒のストライプ様態が見えるように、リン酸Caの向きを調整し、白と黒のストライプ様態に対し、直交する方向をZ軸とし、Z軸と直交する方向を、XY平面とする（X軸とY軸も直交する方向とする）。Z軸を含む、ZX平面もしくはYZ平面にて、Z軸方向に0. 5mmから5. 0mmの範囲、X軸方向に0. 5mmから5. 0mmの範囲の領域を選択する。ソフトウェアをもちいて、選択領域のZ軸方向の距離を横軸に、選択領域を白黒の程度を縦軸として、波形化することができる。得られた波形から、層の数、及び相対的に密な層と相対的に疎な層のピッチを分析することができる。

[0092] 本発明においては、好ましくは少なくとも5層以上（より好ましくは少なくとも7層以上、さらに好ましくは少なくとも10層以上）の相対的に密な層と、少なくとも5層以上（より好ましくは少なくとも7層以上、さらに好ましくは少なくとも10層以上）の相対的に疎な層とが交互に積層されている。

第一の相対的に密な層と、上記第一の相対的に密な層の隣の第二の相対的に密な層とのピッチは、好ましくは50～300 μ mであり、より好ましくは60～200 μ mであり、さらに好ましくは70～150 μ mである。

[0093] 相対的に密な層が存在することにより、外形と内部構造を形成することができる、細胞に吸収されつつ置換されるので全体形状を保つことができる。相対的に疎な層が存在することにより、細胞が、より早く、より広範囲に、かつより多く浸潤することができる。従って、相対的に密な層と相対的に疎な層と交互に積層された構造を有することにより、相対的に密な層と相対的に疎な層と交互に積層された構造を有さないリン酸カルシウム成形体よりも、細胞浸潤が容易になる、組織再生が早いという利点がある。

[0094] 本発明のリン酸カルシウム成形体の内部構造には、約800 μ mの連通孔（大：第一連通孔とも言う）と、約20～約80 μ mの連通孔（中：第二連通孔とも言う）と、約1～10 μ mの連通孔（小：第三連通孔とも言う）が存在することが好ましい。上記した3段階の連通孔を有するリン酸カルシウム成形体の模式図を図30に、SEM像を図31に示す。第一連通孔は、3Dプリンターの設計により形成され、第二連通孔は、粉体の凝集を残しつつ流動性を高めたことによるものであり、第三連通孔は粉体の隙間によるものである。第二連通孔は相対的に密な層と相対的に疎な層と関係している。

[0095] 本発明のリン酸カルシウム成形体は、好ましくは、リン酸カルシウム成形体のナノフォーカスX線CT画像に基づいて、成形体の一方向の距離を横軸に、相対CT強度を縦軸に表示した波形図において、山のピークと谷のピークとを交互に有する。

好ましくは、少なくとも5つ以上（より好ましくは少なくとも7個以上、さらに好ましくは少なくとも10個以上）の山のピークを有する。

第一の山のピークと、上記第一の山のピークの隣の第二の山のピークとのピッチは、好ましくは50～300 μ mであり、より好ましくは60～200 μ mであり、さらに好ましくは70～150 μ mである。

[0096] 本発明のリン酸カルシウム成形体の用途は、特に限定されないが、例えば、再生医療用足場材、再生医療等製品（体外で組織培養するもの）、又は組織修復材として使用することができ、好ましくは、再生医療用足場材、又は組織修復材として使用することができる。

[0097] 本発明における組織修復材とは、生体内に埋植されることにより、この埋植された部位における組織の形成に寄与する材料のことであり、細胞を含んでいても含んでいなくてもよい。また、本発明のリン酸カルシウム成形体は、増殖因子や薬剤のような生体の反応を促す成分を含んでいても含んでいなくてもよい。さらに、本発明のリン酸カルシウム成形体は、ハイドロキシアパタイト等の無機材料と混合して使用してもよいし、上記無機材料とのコンポジットとして使用してもよい。本発明における組織修復材とは、埋植部位に通常存在する正常組織の形成に寄与するものだけではなく、瘢痕組織等を含む非正常組織の形成を促進する材料も包含するものである。

[0098] 組織修復材の具体例としては、特に限定されないが、軟骨、半月板、皮膚又は骨の修復材を挙げることができる。即ち、本発明のリン酸カルシウム成形体は、軟骨、半月板、皮膚又は骨の再生のための治療剤として使用することができる。上記した再生が必要である限り、疾患は限定されるものではないが、一例として、軟骨欠損を伴う疾患としては、変形性関節症、骨軟骨欠損、離断性骨軟骨炎、外傷性軟骨損傷、骨関節炎、再発性多発軟骨炎、軟骨無形成症、椎間板損傷、椎間板ヘルニア等を挙げることができる。

[0099] 本発明のリン酸カルシウム成形体は、移植細胞や骨誘導薬剤と併用することによっても骨再生治療剤として用いることもできる。骨誘導薬剤としては、例えばBMP（骨形成因子）やbFGF（塩基性線維芽細胞増殖因子）が挙げられるが、特に限定はされない。

[0100] 本発明のリン酸カルシウム成形体は、組織修復材として使用できることから、組織の修復方法や、組織の損傷を伴う疾患等の治療方法も本発明に包含される。本発明における組織の修復方法は、対象組織が欠損又は損傷した部位に、リン酸カルシウム成形体である組織修復材を適用することを含み、必要に応じて他の工程を含んでいてもよい。他の工程としては、例えば、移植細胞及び／又は骨誘導剤を、組織修復材の適用の前後、又は同時に、組織修復材を適用する部位へ適用することが挙げられる。

対象組織が欠損又は損傷した部位に、リン酸カルシウム成形体を適用する

方法としては、切開、注射、関節鏡、内視鏡などが使用可能である。

[0101] 本発明のリン酸カルシウム成形体は、外部空間と連通している孔（第一の孔）を有していることが好ましい。上記孔を有するリン酸カルシウム成形体を生体に移植した場合、細胞がリン酸カルシウム成形体の内部に入り易くなる。外部空間と連通している孔は、成形体の内部を貫通し、孔の両端において外部空間と連通していることがより好ましい。外部空間と連通している孔の平均径は、特に限定されないが、好ましくは $200\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ である。

[0102] 外部空間と連通している孔（第一の孔）とは、孔が、成形体の一か所の表面から成形体の内部の空間に形成されていることを示す。即ち、孔の内部の空間が、外部空間と連通することになる。

「外部空間と連通している孔が、成形体の内部を貫通し、孔の両端において外部空間と連通している」とは、孔が、成形体のある箇所の表面から成形体の内部の空間に形成され、さらに成形体の別の箇所の表面を通じて外部空間と連通していることを示す。

[0103] 成形体は、例えば、移植前に細胞を注入するための孔として、第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔を有することが好ましい。

第二の孔より、注入された細胞等は、第一の孔を通り成形体全体に浸潤する。

第一の孔及び第二の孔の形状は、円形、正方形、長方形、六角形、八角形、十字型、楕円のいずれでも良い。

成形体が立方体又は長方体である場合、第一の孔は、図1のように各方向に応じて、それぞれX連通孔、Y連通孔、Z連通孔を設けることができる。各連通孔は、互いに交わっても、交わらなくても良い。各連通孔の平均径は $200\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ の範囲が好ましく、細胞の浸潤のし易さから $200\mu\text{m}\sim 1200\mu\text{m}$ がより好ましい。平均径は、例えば、キーエンス社製VHX-D510で測定することができる。径とは、孔が貫通し成形体の外表面上にあるときの孔の外周上においてある二点をとったときに、二点間の

距離が最も大きくなる二点間の距離のことであり、孔の形状が円形であれば直径を意味し、四角形であれば、対角線の内の長い方を意味する。またその平均径とは、孔の数が1～4個のときには、それぞれの径の和を孔の数で割ったものを指し、5個以上のときには、4個の径の和を4で割ったものを指すものとする。

外部空間と連通している第一の孔の数は、第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔の数よりも多いことが好ましい。

[0104] 成形体は、成形されていれば、立方体又は長方体、円柱、三角柱、円錐などの形状でも良い。

また、成形体は、例えば、移植後に体内での変形応力に耐えられるように、孔を有さない構造体の外縁部の厚さを1.3 mm以上にすることが好ましい（図2の構造強化領域）。様々な外観形状や第一の孔と第二の孔を有する複雑な成形体の形状は、コンピューター上の各種3次元CADソフト上で構築され、固有のオーダーメイド品として作成しても良いし、形と形状が定まった定型品として作成しても良い。

[0105] [3] 移植用材料

本発明は、表面の一部又は全部がリコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体を含む、移植用材料を提供する。

リン酸カルシウム成形体は特に限定されないが、好ましくは、本明細書中に上記した形態のリン酸カルシウム成形体を使用することができる。移植用材料に用いるリン酸カルシウムのCa/Pの原子数の比は、好ましくは1.4～1.8であり、より好ましくは1.45～1.79であり、さらに好ましくは1.50～1.70である。

リコンビナントゼラチンの詳細は本明細書中上記した通りである。リコンビナントゼラチンは、好ましくは熱架橋又は化学架橋されている。

[0106] リコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体の表面は、好ましくは、移植用材料の表面および内部に存在する。

リコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体の表

面が、移植用材料の表面に存在するとは、移植用材料の表面が、リコンビナントゼラチンでコートされていることを意味する。

リコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体の表面が、移植用材料の内部に存在するとは、移植用材料、即ち、リン酸カルシウム成形体が、多孔質であり、リン酸カルシウム成形体の内部に存在する孔を形成する表面が、リコンビナントゼラチンでコートされていることを意味する。

[0107] リン酸カルシウム成形体は、好ましくは、ブロック状又は顆粒状である。

ブロック状とは、平面のみで構成された立体形状に限らず、曲面を有する曲面立体を含む。ブロック状の一例としては、縦2.0～100.0mm、横2.0～100.0mm、及び高さ 2.0～100.0mmを有する直方体形状を挙げることができる。

顆粒状とは、粒径が約0.5～2.0mm程度の粒子の集まりを言う。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0108] 実施例 1 :

(1) リン酸カルシウム粉末の作製方法

リン酸カルシウム粉末の原料として、 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ (リン酸四カルシウム : TTCP) と、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (リン酸水素カルシウム二水和物 : DCPD) とを用いた。TTCPのCa/Pの原子数の比は2.0であり、DCPDのCa/Pの原子数の比は1.0である。TTCPとDCPDとの混合比率を変化させることにより、全体のCa/Pの原子数の比が異なる混合粉末を作製した。TTCPとDCPDの混合比率(モル比)とその際の混合粉末のCa/Pの原子数の比を表1に示す。

[0109]

[表1]

T T C P	D C P D	C a / P の原子数の比
1. 0	0. 0	2. 0 0
0. 9	0. 1	1. 9 5
0. 8	0. 2	1. 8 9
0. 7	0. 3	1. 8 2
0. 6 5	0. 3 5	1. 7 9
0. 5	0. 5	1. 6 7
0. 3 3	0. 6 7	1. 5 0
0. 2 5	0. 7 5	1. 4 0
0. 2	0. 8	1. 3 3
0. 1	0. 9	1. 1 8
0. 0	1. 0	1. 0 0

[0110] (2) 有機酸溶液の作製方法

有機酸及び有機酸のナトリウム塩の混合比を調整することにより、含まれる有機酸イオンの量を一定にしながらpHの異なる溶液を作製した。具体的には、例えばクエン酸の場合、1 mol/Lのクエン酸溶液と1 mol/Lのクエン酸三ナトリウム溶液を混合することにより、所望のpHの溶液を作製した。

[0111] (3) 評価方法

上記(1)で作製したリン酸カルシウム粉末に対して、上記(2)で作製した有機酸溶液を吐出により滴下させた。粉末および有機酸溶液を、Z-Printer 310 Plus (3D Systems Corporation (旧 Z Corporation)) に導入し、20×20×5 mmの直方体に、2×2 mmの穴が薄手方向に5カ所あいたサンプルを作製した。粉末単位体積に供給される有機酸溶液体積の比率は42%とし、リン酸カルシウム粉末の積層ピッチは100 μmとした。Z-Printer 310 Plusによる成形体の作製においては、リン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程と、有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、リン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによ

リン酸カルシウム成形体を製造する工程とを反復することにより、上記の成形体が作製される。

[0112] リン酸カルシウム粉末と有機酸溶液の種類については表2及び表3に示す通りである。有機酸溶液を滴下したリン酸カルシウム粉末を約40℃で保温しながら30分間放置した後、圧縮空気により、不要部分のリン酸カルシウム粉末（有機酸溶液による成形がなされていないリン酸カルシウム粉末）の除去を行った。不要部分のリン酸カルシウム粉末の除去について以下の基準で評価し、リン酸カルシウム粉末の強度を評価した。評価Aは、リン酸カルシウム成形体が十分な強度を有していることを示す。

[0113] 評価A：不要部分を問題なく除去することができた場合

評価B：有機酸溶液を滴下したリン酸カルシウム粉末について一部破損があった場合

評価C：有機酸溶液を滴下したリン酸カルシウム粉末が崩壊した場合

[0114] (4) 評価の結果

Ca/Pの原子数の比を変化させたリン酸カルシウム粉末に、pHが異なるクエン酸溶液を滴下させた場合の評価の結果を表2に示す。

[0115] [表2]

粉末のCa/P の原子数の比	クエン酸溶液のpH			
	1.0	2.4	3.5	4.2
2.0	B	B	C	C
1.89	B	B	C	C
1.79	A	A	A	C
1.67	A	A	A	C
1.40	A	A	A	C
1.33	C	C	C	C
1.18	C	C	C	C

[0116] Ca/Pの原子数の比が1.67であるリン酸カルシウム粉末に対して、各種有機酸のpH3溶液を滴下させた場合の評価の結果を表3に示す。リンゴ酸（カルシウム塩の水に対する溶解度が0.92g/100g）より溶解度が小さい酸（クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸）については評価が

Aであったのに対し、コハク酸（溶解度 1.27）では評価がBであり、より溶解度が大きい乳酸、酢酸及びグルコン酸では評価がCであった。

[0117] [表3]

評価	有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度 (g/100g)				
	0.1以下	0.1より大きく0.5以下	0.5より大きく1.0以下	1.0より大きく1.5以下	1.5より大きい
A	クエン酸 シュウ酸 酒石酸	マロン酸	リンゴ酸		
B				コハク酸	
C					乳酸 酢酸 グルコン酸

[0118] [精度と硬化速度に関する評価]

2mm角の穴を有する3D（三次元）造形物データを実際に造形して、造形物の穴の大きさを測定した。実測値は常に設計値より小さく、有機酸溶液がにじむことにより、設計時に想定していない部分まで硬化してしまうと考えられる。またにじみは硬化速度が速いほど小さくなると考えられる。そこで、(実測値)/(設計値)×100を指標とし、75%以上をA、50%以上75%未満をB、25%以上50%未満をC、測定不能な場合をDとする評価を行った。この指標は100%に近いほど、設計値を再現できることを意味する。

[0119] その結果、カルシウム塩の水に対する溶解度(g/100mL)が1.0以下である酸、グルコン酸はサンプル崩壊のため測定できずD判定となった。

[0120] 上記の結果から、Ca/Pの原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末に対して、有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1g/100mL以下であり、かつpH3.5以下である有機酸溶液を吐出させて滴下させることにより、良好な評価結果が達成できることが示された。

[0121] <リン酸カルシウム成形体の製造方法>

インクとして、クエン酸 1.0mol/L：クエン酸三ナトリウム二水和物

1. $0\text{ mol} / \text{L} = 3 : 1$ 、の体積比で混合し、 $\text{pH} 3.15$ に調整したクエン酸ナトリウム水溶液を調製した。この調製したクエン酸ナトリウム水溶液をクエン酸Naインクと称する。

[0122] 粉体として、微細側から累積10%のときの粒径(μm)を d_{10} 、微細側から累積25%のときの粒径(μm)を d_{25} 、微細側から累積50%のときの粒径(μm)を d_{50} 、微細側から累積75%のときの粒径(μm)を d_{75} 、微細側から累積90%のときの粒径(μm)を d_{90} と表したとき、TTCPはメジアン径にあたる $d_{50} = 7.4\ \mu\text{m}$ 、DCPDは $d_{50} = 19.5\ \mu\text{m}$ となる。最終的にCa/Pの原子数の比が1.5になるように混合した、より具体的には、モル比でTTCP : DCPD = 1 : 2、TTCP : DCPD = 219.8 g : 206.5 gで混合した、この混合物をリン酸Ca粉体とする。

混合したリン酸カルシウム粉体は、 $d_{50} = 17.0\ \mu\text{m}$ であり、粒子径 $5 \sim 15\ \mu\text{m}$ の粒子を体積基準で約35%含み、粒子径 $25 \sim 100\ \mu\text{m}$ の粒子を32%含む。レーザー回折式粒度分布測定装置として、株式会社セイシン企業製のLMS-2000eにて、分散媒はエタノールで測定した。

[0123] 3Dプリンター(Zprinter 310 plus)を用い、インクと粉体をクエン酸Naインク、リン酸Ca粉体に置き換え、積層厚みを $100\ \mu\text{m}$ とし、図3のように設計した。このときのサイズは、 $X = 21.5\text{ mm}$ 、 $Y = 17\text{ mm}$ 、 $Z = 21\text{ mm}$ とした。また、直径 2 mm の円形の片側貫通の第二の孔を4個設け、非貫通末端を外表面から 9 mm の所とした。第一の孔は、正方形の平均径 $900\ \mu\text{m}$ の孔をX、Y、Z方向に直交するように設計し、それぞれ第一の孔のX連通孔、Y連通孔、Z連通孔とし、X連通孔を64個、Y連通孔を51個、Z連通孔を51個設けた。また、成形体を縫合固定するために、縫合孔を設計した。3Dプリンターで成形した後、 35°C の3Dプリンター内で1時間、乾燥させ、余剰な粉体を圧空(エアガンから 0.15 MPa に調整した圧縮空気をだすエアブロー流)で除去した。この成形体をマッフル炉にて、1時間につき 100°C ずつ昇温させた後、11

00℃で2時間焼結し、焼結の為の加熱をoffにし、マッフル炉の蓋は開けない状態で、8時間静置する。マッフル炉が100℃以下の温度になった後、焼結の済んだ成形体を取り出し、成形体（図4）を得た。

[0124] <評価>

成形体全域への浸透性を評価する為、PBS+（本件では、SIGMA-ALDRICH社製、D8662を使用した。PBSとは、リン酸緩衝生理食塩水のことであり、生化学等の実験で使用される緩衝液である。生体内に普遍的にあるイオンで構成されていて、組成としてはpH7.4で、NaCl、KCl、Na₂HPO₄、KH₂PO₄などが入っている。PBS+は、PBSにカルシウムとマグネシウムも入ったものである）に1.0質量%染料インク（パイロットコーポレーション製、万年筆用のBlue__Black、INK-30-BB）を加えた混合液10mLを用いて、孔のない成形体、第二の孔だけをもった成形体、第一の孔と第二の孔をもった成形体の浸透性を調べた。

[0125] 以下のように浸透性を測定した。直径55mmのプラスチック容器に、染料入りPBS+溶液を10mL入れ、約3mm深さとする。そこに成形体を浸漬し、浸漬直後から何秒で、成形体の全域が着色されたかを測定した。その結果、成形体全域に浸透するのに要した時間は、孔のない成形体では1時間以上たっても、上面の半分以上が直色されることはない。第二の孔だけをもった成形体では10分、第一の孔と第二の孔をもった成形体では5秒以内で成形体全域に着色が見られた。この結果から、成形体の浸透性は、第一の孔と第二の孔をもった成形体で顕著に高いことが示された。

[0126] 実施例2：浸漬による成形体を硬化する工程

実施例1の（1）で作製したCa/Pの原子数の比が1.67であるリン酸カルシウム粉末を、Z-Printer 310 Plus（3D Systems Corporation（旧 Z Corporation））に導入し、pH3のクエン酸溶液を用いて、5×5×12mmの成形体を作製した。粉末単位体積に供給される有機酸溶液体積の比率は42%とし、リ

ン酸カルシウム粉末の積層ピッチは $100\mu\text{m}$ とした。Z-Printer 310 Plusによる成形体の作製においては、リン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程と、クエン酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、リン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程とを反復することにより、 $5\times 5\times 12\text{mm}$ の成形体を作製される。

[0127] 上記で作製した成形体を、以下の溶液A、溶液B又は溶液Cの何れかに12時間浸漬し、浸漬前後における圧縮強度を測定した。

溶液A：0.5mol/Lリン酸二水素ナトリウム溶液（pH4.3）

溶液B：0.5mol/Lリン酸水素二ナトリウム溶液（pH9）

溶液C：溶液Aと溶液Bの1：1混合溶液（pH6.6）

[0128] 圧縮強度の測定は、TAインスツルメント社のElectroforce 5500を用いて行った。 $5\times 5\times 12\text{mm}$ サンプルの長手方向に、 0.17mm/秒 の速度で荷重をかけ、サンプル破壊時の最大荷重（N）を断面積で割ることにより圧縮強度（MPa）を求めた。

[0129] 浸漬前は2.2MPaであった圧縮強度が、溶液Aに浸漬した場合には4.2MPa、溶液Bに浸漬した場合には3.5MPa、溶液Cに浸漬した場合には3.9MPaとなった。成形体を溶液に浸漬することにより成形体の硬化が進行し、強度が大きくなることが確認された。

[0130] 実施例3：加熱による成形体硬化工程

実施例2と同様にして作製したリン酸カルシウム成形体を、マッフル炉を用いて 1100°C 又は 1200°C で4時間加熱した。加熱前後における圧縮強度を実施例2と同様に測定した。加熱前は2.2MPaであった圧縮強度が、 1100°C での加熱の場合には3.5MPa、 1200°C での加熱の場合には6.1MPaとなった。成形体の加熱により、強度が大きくなることが確認された。また、造形に用いた有機酸も熱分解により除去することができる。

[0131] 実施例4：細胞接着性におけるRCP修飾の効果確認

(操作1) β -TCP粒子として骨補填材オスフェリオン(オリンパステルモバイオマテリアル株式会社製)を37℃にて、7.5%(配列番号1のアミノ酸配列からなるRCP)溶液に3時間、振とうしながら浸漬させた。その後、50℃にて12時間、乾燥させた。更に160℃にて20時間の熱架橋処理を施して製剤を得た。

(操作2) 作製した製剤を10mg/wellとなるように24well超低接着プレート(コーニング社製)に入れ、細胞(NIH-3T3)を50000cells/wellとなるように播種した。

(操作3) 播種後、24時間で、カルセイン染色後、蛍光観察及び走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope; SEM)で観察を行った。

[0132] 比較例4：

実施例4において、操作1を施さない以外は、実施例4と同様の操作を施した例を比較例4とした。

[0133] 実施例4と比較例4の結果を図5に示す。比較例4に対して実施例4では、細胞接着性の向上が認められた(図5)。

[0134] 実施例5：ラット頭頂骨欠損部における骨再生誘導試験によるRCP修飾の効果確認

実験動物として、SDラット(雄、10-12週齢、0.3-0.5kg)を用い、ラットの頭頂骨を露出し、直径5mmの円形の骨欠損部を作製した。実施例4の製剤、約10mgを作製した骨欠損部へ充填した後、皮膚を縫合した。

埋植後8週目に放血致死させて頭部を摘出した。埋入部を含む頭頂骨をHE染色にて組織学的観察をおこなった。

[0135] 比較例5：

実施例5において、実施例4の製剤の代わりに比較例4の製剤を用いる以外は、同様の操作を施した例を比較例5とした。

[0136] 実施例5及び比較例5の結果を図6に示す。比較例5に対して実施例5では、骨形成の向上が認められた(図6)。

[0137] 実施例6：リン酸カルシウム成形体の気孔率、比重および吸水浸透速度

リン酸カルシウム成形体を以下の通り作製した。

＜リン酸カルシウム成形体の製造方法＞

インクとして、クエン酸 1.2 mol/L : クエン酸三ナトリウム二水和物 1.2 mol/L = 3 : 1、の体積比で混合し、pH 3.15 に調整したクエン酸ナトリウム水溶液を調製した。この調製したクエン酸ナトリウム水溶液をクエン酸 Na インクと称する。

[0138] 粉体として、微細側から累積 10% のときの粒径 (μm) を d_{10} 、微細側から累積 25% のときの粒径 (μm) を d_{25} 、微細側から累積 50% のときの粒径 (μm) を d_{50} 、微細側から累積 75% のときの粒径 (μm) を d_{75} 、微細側から累積 90% のときの粒径 (μm) を d_{90} と表したとき、メジアン径にあたる $d_{50} = 7.4 \mu\text{m}$ の TTCP、 $d_{50} = 19.5 \mu\text{m}$ の DCPD 粉体を用意し、最終的に Ca/P の原子数の比が 1.5 になるように混合した。より具体的には、モル比で TTCP : DCPD = 1 : 2、TTCP : DCPD = 219.8 g : 206.5 g で混合した。この混合物をリン酸 Ca 粉体とする。

混合したリン酸 Ca 粉体は、粒子径 5 ~ 15 μm の粒子を体積基準で約 35% 含み、粒子径 25 ~ 100 μm の粒子を 32% 含む。レーザー回折式粒度分布測定装置として、株式会社セイシン企業製の LMS-2000e にて、分散媒はエタノールで測定した。

[0139] 3D プリンター (Z printer 310 plus) を用い、インクと粉体をクエン酸 Na インク、リン酸 Ca 粉体に置き換え、積層厚みを 100 μm とした。

・構造物は円柱状であり、焼結すると 10% 縮むことを考えて、直径 $\Phi 8.8\text{mm}$ 、高さ 22mm で造形した。

[0140] 3D プリンターで成形した後、35℃ の 3D プリンター内で 1 時間、乾燥させ、余剰な粉体を圧空 (エアガンから 0.15 MPa に調整した圧縮空気をだすエアブロー流) で除去した。この成形体をマッフル炉にて、1 時間

につき100℃ずつ昇温させた後、1100℃で2時間焼結し、焼結の為の加熱をoffにし、マッフル炉の蓋は開けない状態で、8時間以上静置する。マッフル炉が100℃以下の温度になった後、焼結の済んだ成形体を取り出し、直径Φ8mm、高さ20mmの円柱状の成形体を得た。

[0141] 上記で作製したリン酸カルシウム成形体、並びに市販品（下記3種）について、以下の方法で気孔率、比重、及び吸水浸透速度を測定した。

スーパーポア（ペンタックス社製）品番KB-6-1、径8×長さ20mm

スーパーポア（ペンタックス社製）品番HB-50-0820、径8×長さ20mm

スーパーポアEX（ペンタックス社製）品番XC-0820、径8×L20mm

上記3種のスーパーポアは、β型リン酸三カルシウムからなる白色多孔体である。

[0142] <気孔率の測定法>

気孔率は、水銀圧入法で測定した。水銀圧入法とは、水銀の表面張力が大きいことを利用して粉体の細孔に水銀を浸入させるために圧力を加え、圧力と圧入された水銀量から比表面積や細孔分布を求める方法である。P O R E M A S T E R 6 0 G T（Q u a n t a c h r o m e社製）を使用して測定した。以下の標準的な条件で測定した。

H g S u r f a c e T e n s i o n 4 8 0 . 0 0 e r g / c m ²

H g C o n t a c t A n g l e (I) 1 4 1 . 3 0 ° , (E) 1 4 1 . 3 0 °

温度20.00 [℃]

サンプルサイズは、径0.462mm、高さ0.959mmの円柱状である。

[0143] <比重の測定>

上記で作製したリン酸カルシウム成形体の重量を1/1000gまで測定可能な電子天秤で測定し、直径と高さを1/100mmまで測定可能なノギスで

、測定して体積を求めた。次に、重量を体積で割って、比重を求めた。

[0144] <吸水浸透速度の測定法>

吸水浸透速度を求める実験系を構築した。

実験室の温度を23℃、湿度を30%とし実験測定した。万年筆インクとして、パイロットコーポレーション製のINK-30-BBを使用した。

内径2mmのプラスチック筒とチューブとシリンジにより、図7に示す実験系を構築した。構造物の底面にメニスカス面を作ってそこから浸透させた。メニスカス高さは、目視、手動で調整した。リン酸カルシウム成形体21は、径8mm×20mm高さとした。プラスチック筒22の内径は2mmである。チューブ23の長さは100mmである。水位24については、プラスチック筒22とリン酸カルシウム成形体21の接する高さに、吸水浸透の開始から終了まで調整した。シリンジ25は、10mLのシリンジを使用した。リン酸カルシウム成形体21より内径を大きくした。

[0145] 図7に示す実験系において、上記の通り、リン酸カルシウム成形体とプラスチック筒の接する高さ、シリンジ内のインキの水位の高さが吸水浸透の開始から終了まで同じになるように調整した条件下において、シリンジ内のインキをリン酸カルシウム成形体に吸水浸透させた。インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとなったときは、15mmを浸透に要した時間で割った値を、吸水浸透速度とし、インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとならない場合は、5分の時点においてインキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さを定規で測定し、浸透に要した時間である5分で割った値を、吸水浸透速度とする。

[0146] 気孔率、比重、及び吸水浸透速度の測定結果を下記表に示す。

[表4]

	気孔率 (%)	比重 (g/ml)	吸水浸透速度 (mm/秒)
リン酸カルシウム成形体 (X方向：描画方向)	64.6	0.922	1.002
リン酸カルシウム成形体 (Y方向：リコート走査方向)	64.6	0.922	0.986
リン酸カルシウム成形体 (Z方向：積層方向)	64.6	0.922	0.576
スーパーポア 品番KB-6-1	75	0.757	0.010
スーパーポア 品番HB-50-0820	67	1.022	0.003
スーパーポアEX 品番XC-0820	57	1.269	0.015

[0147] 実施例7：リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造

＜リン酸カルシウム成形体の製造方法＞

インクとして、クエン酸1.2mol/L：クエン酸三ナトリウム二水和物1.2mol/L=3：1、の体積比で混合し、pH3.15に調整したクエン酸ナトリウム水溶液を調製した。この調製したクエン酸ナトリウム水溶液をクエン酸Naインクと称する。

粉体として、メジアン径（以下d50と表記）7.4μmのTTCP、d50=19.5μmのDCPD粉体を用意し、最終的にCa/Pの原子数の比が1.5になるように混合した。

より具体的には、モル比でTTCP：DCPD=1：2、TTCP：DCPD=219.8g：206.5gで混合した。この混合物をリン酸Ca粉体とする。混合したリン酸Ca粉体は、粒子径5～15μmの粒子を体積基準で約35%含み、粒子径25～100μmの粒子を32%含む。

3Dプリンター（Zprinter310plus）を用い、インクと粉体をクエン酸Naインク、リン酸Ca粉体に置き換え、積層厚みを100μmとした。

構造物は円盤を3個重ねた構造であり、一番大きな円盤は直径14.4mmで、全高7.8mmの円盤状である。

3Dプリンターで成形した後、35℃の3Dプリンター内で1時間、乾燥

させ、余剰な粉体を圧空（エアーガンから0.15 MPaに調整した圧縮空気をだすエアブロー流）で除去した。この成形体をマッフル炉にて、1時間につき100℃ずつ昇温させた後、1100℃で2時間焼結し、焼結の為に加熱をoffにし、マッフル炉の蓋は開けない状態で、8時間以上静置する。マッフル炉が100℃以下の温度になった後、焼結の済んだ成形体を取り出し、成形体を得た。

[0148] <ナノフォーカスX線CT解析>

疎密積層構造の解析に用いた対象物の構造を図8に示す。

ゼネラルエレクトロニクス社製の *phoenix nanotom m* により以下の測定条件において観察及び解析を行った。

管電圧： 120 kV

管電流： 90 μ A

X線源から検出器までの距離（FDD）： 600 mm

X線源から対象サンプルの回転中心までの距離（FOD）： 400 mm

解像度： X軸、Y軸、Z軸ともに6.66 μ m

[0149] 上記のような条件で測定したのち、装置と連携しているCT画像を解析できるソフトウェア、*VGS tudio Max 3.0.3 64bit*により、リン酸カルシウム成形体の内部構造の様様が見えるよう、さらに、密層（相対的に密な層）と疎層（相対的に疎な層）が視認できるように、白、グレー、黒の見え方を調整した（図9）。

[0150] 白、グレー、黒の見え方を調整するのは、図9の右下のレンダリング機能の画面である。白く表示されるほど相対的に物質の密度が高くなり、黒くなるほどが相対的に物質の密度が低くなることを示し、本件では白いほど、リン酸カルシウムが多くなり、黒いほどリン酸カルシウムが少なくなり空隙に近づくことになる。

[0151] 幾何学的に互いに直交するXY平面、YZ平面、ZX平面を、図9のXY平面の図、YZ平面の図、ZX平面の図として、*VGS tudio Max 3.0.3 64bit*画面内の領域に表示する。

[0152] 画面内のYZ平面の図と、XZ平面の図にて、白と黒のストライプ模様が見えるようにレンダリング機能の画面にて調整する。

[0153] さらに、YZ平面の図とXZ平面の図の白と黒のストライプ模様が同一の方向に向くように、さらに、白の筋と白の筋の間隔が、出来るだけ一致するように、V G S t u d i o M a x 3.0.3 64bitでのリン酸カルシウム成形体の向きを調整する。この操作により、リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造の疎層と密層は、XY平面と平行になる。

図9のように、リン酸カルシウム成形体の向きを調整し、白と黒のストライプ模様に対し、直交する方向をリン酸カルシウム成形体のZ軸とする。

[0154] Z軸を含む、ZX平面の図をT I F F形式でコンピューター上で保存しを、生物学のイメージング分野ではデファクトスタンダードな画像解析、Image J 1.50i (ImageJとは、アメリカ国立衛生研究所 (NIH) で開発されたオープンソースでパブリックドメインの画像処理ソフトウェアである) にてT I F F画像データを開く。

[0155] ImageJ 1.50i にて、Z軸方向に3.14mm、X軸方向に3.14mmの領域を選択する(図10)。ZX平面の画像は、Z方向に密層と疎層を横断するように交互になっていて、X方向は密層がほぼ直線的に延び、疎層もほぼ直線的に延びている。

[0156] Z軸方向の領域を選択する際は、Z軸方向に、0.5mmから5.0mmの距離範囲が好ましく、2.0mmから4.0mmの距離がより好ましい。

2.0mm以上のより広い領域を選択するのが、リン酸カルシウム成形体の局所性に影響されずに済むので好ましいが、リン酸カルシウム成形体が小さい場合は実施できないので適宜調整する。大きすぎると後の作業が大変になるので、5.0mmを上限とし、4.0mmまでがより好ましい。

[0157] ImageJ 1.50iのプロットプロファイル機能により、選択領域のZ軸方向の距離を横軸に、選択領域を白黒の程度をG r a y V a l u e値として縦軸に、波形として表示することができる(図11)。

[0158] 表示されているG r a y V a l u e値は、Z軸の距離に応じて、X軸の

3. 14mm内にある各ピクセルのGray Value値を平均した値となっている。本件では、3.14mmの間に153ピクセルとなっている。

[0159] X軸方向の領域を選択する際は、X軸方向に、0.5mmから5.0mmの距離範囲が好ましく、2.0mmから4.0mmの距離がより好ましい。2.0mm以上のより広い領域を選択するのがリン酸カルシウム成形体の局所性からの影響とピクセルの分解能に影響されずに済むので好ましいが、リン酸カルシウム成形体が小さい場合は実施できないので適宜調整する。大きすぎると、リン酸カルシウム成形体の疎層と密層の向きとVGStudio Max 3.0.3 64bit内で構築するX軸、Y軸、Z軸向きの一貫性の影響があるので、5.0mmを上限とし、4.0mmまでとするのがより好ましい。

[0160] 得られた波形から、層の数、及び相対的に密層と相対的に疎層のピッチを分析する。

密層の頂点の数を数える。密層の頂点とは、相対的にその周辺より物質密度が高くなる、波形の傾きの係数がプラスからマイナスに転じるところである。疎層の頂点とは、相対的にその周辺より物質密度が小さくなる場所であり、波形の傾きの係数がマイナスからプラスに転じる場所である。

[0161] 本ケースでは、Z軸の選択距離は3.14mmで、プロットプロファイル機能にて形成した波形グラフ内の3.0mmの間に密層の頂点は34個存在した。

(密層の頂点の数/Z軸の距離) = リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のZX平面のピッチとする。本件は3.0mm/34個で88.2μmがピッチとなる(図11)。

[0162] YZ平面の図からも(図12)、XZ平面の図と同様の処理にて、リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のYZ平面のピッチ(図12)を導き出した。

(密層の頂点の数/Z軸の距離) = リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のYZ平面のピッチとする。本件は3.0mm/32個で93.8μmがピッチとなる(図13)

[0163] リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のZ X平面のピッチとリン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のY Z平面のピッチの平均を、リン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のピッチとする。本件で $h(88.2\mu\text{m} + 93.8\mu\text{m}) / 2 = 90.3\mu\text{m}$ がリン酸カルシウム成形体の疎密積層構造のピッチとなる。

[0164] リン酸カルシウム成形体の吸水浸透速度が速いことと、疎密積層構造との間には関係があると考えられる。X方向とY方向の吸水浸透速度をはかるとき、リン酸カルシウム成形体の外観を目視やルーペで観察しても、XY平面と平行にある疎層を通じて浸透する様子が確認できる。また、Z方向の吸水浸透速度をはかるときでも、Z方向と直交する疎層と密層にて、疎層ではやく、密層で遅くなりつつ、1層ごとにZ方向に浸透する様子が分かる。

[0165] 疎層の空隙が数mmから数10mmに渡って、折れ曲がった3次元的な連結でなく、シンプルでストレートな平面的な連結をしていて、さらにリン酸カルシウム成形体の一方の表面から他の対向する別の表面まで両側に抜けていることにより、浸透したインクが空気の抵抗を受けることなく浸透するためと考えられる。

[0166] 実施例8：リン酸カルシウム粉末のレーザー回折式粒度分布測定

リン酸カルシウム粉末として、 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ （リン酸四カルシウム：TTCP）、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （リン酸水素カルシウム二水和物：DCPD）、及びTTCPとDCPDとの混合粉体（Ca/Pの原子数の比は1.5）を用いて、以下の方法及び条件で粒度分布を測定した。

[0167] 装置： 株式会社セイシン企業製のLMS-2000e

測定原理： 水やエタノールなどの分散媒に分散された粒子にレーザー光照射し、粒子からの散乱光強度の角度依存性を測定することにより、サンプルに含まれる粒子の粒子径分布を求める。

測定範囲： $0.02 \sim 2000\mu\text{m}$

レーザー光源：ヘリウムネオンレーザー

分散媒： エタノール

測定方法： 分散媒のみでブランク測定を行ったのち、1分間の超音波分散により試料を分散させ、超音波分散した試料を分散槽に入れ循環式にて粒度分布測定を行う。

粒度分布： 体積基準で表示。

[0168] 混合粉体の測定結果を図14に示し、TTCP粉体の測定結果を図15に示し、DCPD粉体の測定結果を図16に示す。

粉体として、微細側から累積10%のときの粒径(μm)をd10、微細側から累積25%のときの粒径(μm)をd25、微細側から累積50%のときの粒径(μm)をd50、微細側から累積75%のときの粒径(μm)をd75、微細側から累積90%のときの粒径(μm)をd90と表したとき、TTCPはメジアン径にあたるd50=7.4 μm 、DCPDはd50=19.5 μm となる。最終的にCa/Pの原子数の比が1.5になるように混合した、より具体的には、モル比でTTCP:DCPD=1:2、TTCP:DCPD=219.8g:206.5gで混合した、この混合物をリン酸Ca粉体とする。

混合したリン酸カルシウム粉体は、d50=17.0 μm であり、粒子径5~15 μm の粒子を体積基準で約35%含み、粒子径25~100 μm の粒子を32%含む。

[0169] [表5]

	d10 μm	d25 μm	d50 μm	d75 μm	d90 μm
混合粉体	4.7	8.8	17.0	29.5	43.3

	d10 μm	d25 μm	d50 μm	d75 μm	d90 μm
TTCP粉体	1.5	4.5	7.4	11.3	16.0

	d10 μm	d25 μm	d50 μm	d75 μm	d90 μm
DCPD粉体	5.3	10.3	19.5	32.6	47.1

[0170] 実施例9：リン酸カルシウム粉体の流動性試験

粉体として、平均粒子径7 μm のTTCP、平均粒子径60 μm のDCPD

D、並びにTTCPとDCPDの混合物（Ca／Pの原子数の比が1．5になるように混合したもの）を用意した。TTCPとDCPDの混合物としては、より具体的には、モル比でTTCP：DCPD＝1：2、TTCP：DCPD＝219．8g：206．5gで混合した。

上記の粉体の流動性（フローファンクション）を以下の方法で測定した。測定装置としては、ブルックフィールド製の「パウダーフローテスター、PFT」を用いて、スタンダードフローファンクションを選択して測定した、フローファンクションは、破壊強度を f_c 、最大主応力を σ_1 とした時、 σ_1 / f_c で表される値である。フローファンクション値は、以下の基準で評価した。

[0171] [表6]

フローファンクション値	流動性の目安	評価ランク
10以上	極めて流動しやすい	5
4～10未満	流動しやすい	4
2～4未満	付着性があり、やや流動しにくい	3
1～2未満	付着性が高く、流動しにくい	2
0～1未満	流動しない	1

[0172] フローファンクション値と評価結果を下記表に示す。混合したTTCPとDCPDは重量と体積とも大きく変わらないにも関わらず、TTCPの影響は大きく受けていないようで、TTCPとDCPDの中間的な値とならず、DCPDに近い値であった。

[0173] [表7]

	フローファンクション値	評価ランク
TTCP	3．34	3
DCPD	5．13	4
混合粉体	4．87	4

[0174] TTCPはフローファンクションの値が示すように、流動性が悪く、TTCPのみで粉体をリコートすると、ローラーにTTCPが付着したり、本来、平らになるはずのTTCP粉体の表層面に目で見える数mm以上の凹凸がでたりする。DCPDを混合するとローラーに混合粉体が付着することな

く、混合粉体の表層面が凹凸になることなくリコートできる。

[0175] T T C P 粉体は、有機酸溶液に対する反応性は高く、反応性の観点からは 3 D 粉体積層プリンター造形に適しているが、流動性はフローファンクションで 4. 0 未満でリコート不良が発生する。

一般的に、流動性は粒子径と関係あって、粒子径が小さいと流動性が悪くなる。粒子径が小さいほど、比表面積が大きくなり、質量と比例する体積よりも、表面の影響がでて、ある粉体粒子の表面と隣り合う粉体粒子の表面に働く、ファンデルワールス力、静電気力など、粒子を引き合わせる引力の影響が大きくなる。

[0176] T T C P は粒子径の代表サイズといえる d_{50} において $\Phi 7.4 \mu\text{m}$ で、D C P D の $d_{50} = \Phi 19.5 \mu\text{m}$ より小さく、粒子径分布の大きい側である d_{90} でも $16.0 \mu\text{m}$ と D C P D の $d_{90} = 47.1 \mu\text{m}$ より小さく、大粒子も混合していない。

T T C P と D C P D を所定のモル比で混合すると $d_{50} = 17.0 \mu\text{m}$ となり、粒子径 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ の粒子を体積基準で約 35% 含んでいても、粒子径 $25 \sim 100 \mu\text{m}$ の粒子を 32% 含む影響がでて、流動性が T T C P のみでは 3.34 というフローファンクション値であったのが、混合粉体では 4.87 と、D C P D のみでの 5.13 という値に近くづく。これによりリコート不良も発生せず、3D 粉体積層プリントすることが可能になる。

[0177] 実施例 10：ラット試験

C B E 3（配列番号 1 のアミノ酸配列からなるリコンビナントゼラチン）を被覆したリン酸カルシウム成形体を用いて骨再生の評価試験を行った。

[0178] リン酸カルシウム成形体を以下の通り作製した。

＜リン酸カルシウム成形体の製造方法＞

インクとして、クエン酸 1.2 mol/L ：クエン酸三ナトリウム二水和物 $1.2 \text{ mol/L} = 3:1$ 、の体積比で混合し、 $\text{pH } 3.15$ に調整したクエン酸ナトリウム水溶液を調製した。この調製したクエン酸ナトリウム水溶液をクエン酸 N a インクと称する。

[0179] 粉体として、微細側から累積10%のときの粒径(μm)を d_{10} 、微細側から累積25%のときの粒径(μm)を d_{25} 、微細側から累積50%のときの粒径(μm)を d_{50} 、微細側から累積75%のときの粒径(μm)を d_{75} 、微細側から累積90%のときの粒径(μm)を d_{90} と表したとき、メジアン径にあたる $d_{50}=7.4\mu\text{m}$ のTTCP、 $d_{50}=19.5\mu\text{m}$ のDCPD粉体を用意し、最終的にCa/Pの原子数の比が1.5になるように混合した。より具体的には、モル比でTTCP:DCPD=1:2、TTCP:DCPD=219.8g:206.5gで混合した。この混合物をリン酸Ca粉体とする。

混合したリン酸Ca粉体は、粒子径5~15 μm の粒子を体積基準で約35%含み、粒子径25~100 μm の粒子を32%含む。

[0180] 3Dプリンター(Zprinter310plus)を用い、インクと粉体をクエン酸Naインク、リン酸Ca粉体に置き換え、積層厚みを100 μm 設定とした。

[0181] 3Dプリンターで成形した後、35℃の3Dプリンター内で1時間、乾燥させ、余剰な粉体を圧空(エアガンから0.15MPaに調整した圧縮空気をだすエアブロー流)で除去した。この成形体をマッフル炉にて、1時間につき100℃ずつ昇温させた後、1100℃で2時間焼結し、焼結のための加熱をoffにし、マッフル炉の蓋は開けない状態で、8時間以上静置する。マッフル炉が100℃以下の温度になった後、焼結の済んだ成形体を取り出し、成形体を得た。リン酸カルシウム成形体の模式図を図17に示す。

- ・ 構造物は直径 $\Phi 5\text{mm}$ 、高さ1.9mmの円盤状である。
- ・ 円盤の底面と平行に、円盤の中間くらいの高さに、X方向とY方向に、 $0.7\times 1.0\text{mm}$ の連通孔が十字形状に形成されている。
- ・ 十字形状の中心を貫くようにZ軸方向に $\Phi 1.1\text{mm}$ の連通孔が形成されている。
- ・ 円盤の上面側にも、連通孔と上側に、X方向とY方向に、幅1.8mmで

高さ0.4 mmの凸部が形成されている。

[0182] 成形体にCBE3を被覆する。CBE3水溶液の作成方法、リン酸CaのCBE3の被覆は以下の通りである。

光製薬株式会社製の注射水溶液に7質量%のCBE3を溶解させ、45℃のオーブンで30分加熱し、溶解して、CBE3水溶液を作製した。

CBE3水溶液に、リン酸カルシウム成形体を浸漬し、デシケーター内で、大気圧から-0.09 MPaまで真空脱気処理し、水溶液に溶解している空気やリン酸Ca成形体の内部にある空隙から空気を取り除きつつ、10分間放置する。大気状態に戻したあと2回同様の操作を行ったあと、取り出して、リン酸Ca成形体に付着している余剰なCBE3水溶液を取り除き、50℃のオーブンにて3時間乾燥する。

CBE3の熱架橋は以下の通り行った。真空引きと窒素置換が可能なオーブンにて、2 hPa程度まで真空引きと窒素置換を数度繰り返したのち、1013 hPaの窒素雰囲気下で約150℃の4時間程度に加熱する。

[0183] ラットの頭頂骨に、骨膜を剥離後直径5mmの欠損を設け試験材料を設置後、剥離した骨膜を貼付したのち皮膚を縫合した。

[0184] (病理標本の作製)

試験期間終了後、放血死させたラットより頭部を回収し、眼球、脳等の軟組織を除去したのち。得られた標本より埋植部をトリミングし、樹脂包埋した。同包埋標本からミクロトームにより5 μm厚の切片を切出し、ヘマトキシリン&エオジン染色(H&E)とvon Kossa染色を行った。

[0185] (マイクロCT解析)

試験A(コントロール:欠損のみ)について、マイクロフォーカスCT解析を行った。マイクロフォーカスCTは株式会社リガク製のR-mCTであり、管電圧は90kV、管電流は100 μA、X線焦点-検出器の距離(FDD)は292 mm、X線焦点-回転中心の距離(FOD)は73 mmである。マイクロフォーカスCTの解析結果を図18に示す。マイクロフォーカスCT解析において、コントロール(欠損のみ)は、既存骨の外周部からの骨再生は見られるが、ラット頭部の欠損

を補填するような再生はみられない。

- [0186] 試験B（CBE3を被覆したリン酸Ca成形体（成形体B））のラット移植後8週間のマイクロCT解析の結果を図19に示す。成形体Bとラット自骨が接触しているところで、十分な骨癒合が確認できる。成形体Bの外観形状、3Dプリンターにより形成した内部構造ともに形状維持されている。
- [0187] 移植した成形体Bの0週から2週間ごとのマイクロCT解析の結果を図20に示す。4週間後に、設計して作成した約 0.7×1.0 mmの十字形状の連通孔に骨が新生し、6週間後に成長している様子が確認できる。
- [0188] 移植した成形体Bの8週間後のマイクロCT解析の結果を図21に示す。解析条件は上記の試験Aと同様である。設計して作成した約 0.7×1.0 mmの連通孔に骨が新生し、長いところで 3.5 mmまで成長している。また、病理標本、von Kossa染色により、連通孔の内部できたものが、間違いなく骨であることも確認できる。
- [0189] 移植した成形体Bの8週間後の病理標本、H&E染色の結果を図22に示す。図22の病理標本は、図21の病理標本の近くである。3Dプリント設計により作成した、 0.7×1.0 mmの十字形状の連通孔内部で、骨が新生している近くでも、細胞が浸潤し、軟組織となっていることが分かる。3Dプリント粉体積層時に、自律形成された疎密積層構造の疎層にも（ $20 \sim 80$ μ m程度）にも、細胞が浸潤し、軟組織となっている。
- [0190] 移植した成形体Bについて、上記とは異なるラット（2匹目）の8週間後の病理標本、H&E染色の結果を図23と図24に示す。3Dプリント設計により作成した、 0.7×1.0 mmの連通孔内部にて血管の新生を確認した。3D粉体積層プリント時に自律形成された疎密積層構造の疎層にも（ $20 \sim 80$ μ m程度）にも、血管の新生を確認した。
- [0191] 移植した成形体Bについて、上記とは違うラット（3匹目）の8週間後の病理標本、von Kossa染色の結果を図25に示す。リン酸カルシウムが吸収置換され、骨に置き換わっている様子が確認できる。
- [0192] 実施例11：有機酸溶液の濃度の影響

<リン酸カルシウム成形体の製造方法>

クエン酸 1.0 mol/L : クエン酸三ナトリウム二水和物 1.0 mol/L = 3 : 1、の体積比で混合し、pH 3.15 に調整した 1.0 mol/L のクエン酸ナトリウム水溶液を調製した。

クエン酸 1.2 mol/L : クエン酸三ナトリウム二水和物 1.2 mol/L = 3 : 1、の体積比で混合し、pH 3.15 に調整した 1.2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を調製した。

[0193] 粉体として、微細側から累積 10% のときの粒径 (μm) を d_{10} 、微細側から累積 25% のときの粒径 (μm) を d_{25} 、微細側から累積 50% のときの粒径 (μm) を d_{50} 、微細側から累積 75% のときの粒径 (μm) を d_{75} 、微細側から累積 90% のときの粒径 (μm) を d_{90} と表したとき、メジアン径にあたる $d_{50} = 7.4 \mu\text{m}$ の TTCP、 $d_{50} = 19.5 \mu\text{m}$ の DCPD 粉体を用意し、最終的に Ca/P の原子数の比が 1.5 になるように混合した。より具体的には、モル比で TTCP : DCPD = 1 : 2、TTCP : DCPD = 219.8 g : 206.5 g で混合した。この混合物をリン酸 Ca 粉体とする。

混合したリン酸 Ca 粉体は、粒子径 5 ~ 15 μm の粒子を体積基準で約 35% 含み、粒子径 25 ~ 100 μm の粒子を 32% 含む。レーザー回折式粒度分布測定装置として、株式会社セイシン企業製の LMS-2000e にて、分散媒はエタノールで測定した。

[0194] 上記のリン酸 Ca 粉体に対して、1.0 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液又は 1.2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を吐出により滴下させた。

有機酸溶液の塗布量は、3D プリンターからリン酸カルシウム粉体を除き、重量を測定したおいたプラスチック容器を、本来、リン酸カルシウム成形体が形成される場所において、プラスチック容器に対し、1 cm^3 設計の立体物を造形するよる有機酸溶液を吐出し、有機酸溶液がのった状態でプラスチック容器の重量を測定し、吐出された有機酸溶液の重量を測定する。1 cm^3 設

計の立体物を造形するのに要した有機酸溶液の重量を有機酸溶液の塗布量として、 $\text{g}/1\text{cm}^3$ という単位であらわす。

[0195] 1. $0\text{mol}/\text{L}$ クエン酸ナトリウム水溶液は $0.12\text{g}/1\text{cm}^3$ から $0.38\text{g}/1\text{cm}^3$ の範囲で試験し、1. $0\text{mol}/\text{L}$ クエン酸ナトリウム水溶液は $0.215\text{g}/1\text{cm}^3$ から $0.29\text{g}/1\text{cm}^3$ の範囲で試験した。

[0196] 粉末およびクエン酸ナトリウム水溶液を、Z-Printer 310 Plus (3D Systems Corporation (旧 Z Corporation)) に導入し、 $20\times 20\times 8\text{mm}$ の直方体を作成した。

[0197] 3Dプリンター (Z printer 310 plus) を用い、インクと粉体をクエン酸Naインク、リン酸Ca粉体に置き換え、積層厚みを $100\mu\text{m}$ 設定とした。

[0198] 3Dプリンターで成形した後、 35°C の3Dプリンター内で1時間、乾燥させ、余剰な粉体を圧空 (エアガンから 0.15MPa に調整した圧縮空気をだすエアブロー流) で除去した。この成形体をマッフル炉にて、1時間につき 100°C ずつ昇温させた後、 1100°C で2時間焼結し、焼結のための加熱をoffにし、マッフル炉の蓋は開けない状態で、8時間以上静置する。マッフル炉が 100°C 以下の温度になった後、焼結の済んだ成形体を取り出し、成形体を得た。成形体は焼結後に各方向に約1割縮むので約 $18\times 18\times 7.2\text{mm}$ となった。

[0199] 作製したリン酸カルシウム成形体について、圧縮強度の測定及び底面の反りの評価を行った。

圧縮強度の測定は、株式会社イマダ製の縦型電動計測スタンドMX2と同じく株式会社イマダ製のデジタルフォースゲージZTA-1000Nを用いて行った。約 $18\times 18\times 7.2\text{mm}$ サンプルの長手方向に、 $0.17\text{mm}/\text{秒}$ の速度で荷重をかけ、サンプルの形状は正確にノギスにより測定し、サンプル破壊時の最大荷重 (N) を断面積で割ることにより圧縮強度 (MPa) を求めた。

底面の反りの評価は、以下の基準で行った。クラス1から5の見本を図2

6に示す。

[0200] [表8]

	注釈
クラス 5	やや凹になっているように見える。
クラス 4	反りがほぼなし。
クラス 3	反りがわずかにある。
クラス 2	反りが大きい。
クラス 1	反りが非常に大きい。ヒビが発生する場合もある。

[0201] 1. 0 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液又は 1. 2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を用いて作製したリン酸カルシウム成形体について、塗布量と圧縮強度の関係を図 27 に示し、塗布量と底面の反りの関係を図 28 に示し、圧縮強度と底面の反りの関係を図 29 に示す。

[0202] 図 27 から、設計事項として塗布量を増やすと、圧縮強度も大きくなり造形物としての強度が高まることが分かる。図 28 から、設計事項として塗布量が増やすと反りが大きくなって形状精度が失われることが分かる。図 29 は、図 27 の塗布量と圧縮強度の関係と、図 28 の塗布量と底面の反りの関係を統合した、圧縮強度と底面の反りの関係であり、圧縮強度と底面の反りがトレードオフの関係になっていることが明瞭に分かる。

[0203] 1. 0 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液の結果からは、圧縮強度 2.0 MPa 以上で、底面の反りのクラスが 4 以上となる領域はない。しかし、1. 2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を用いて作成したリン酸カルシウム成形体について、圧縮強度 2.0 MPa 以上で、底面の反りのクラスが 4 以上となる領域が見つかる。

[0204] pH3.15 と同じであっても、1. 2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を用いた方が、圧縮強度及び底面の反りのトレードオフは解消され、より良好な結果が得られる。即ち、1. 2 mol/L クエン酸ナトリウム水溶液を用いることにより、高い圧縮強度と、底面の反りの抑制とを両立することができる。

符号の説明

- [0205] 1 1 第一の孔のX連通孔
1 2 第一の孔のY連通孔
1 3 第一の孔のZ連通孔
1 4 第一の孔のX Y Z連通孔
1 5, 0 6 縫合孔
1 6, 0 2 第二の孔
1 7 構造強化領域
0 4 第一の孔
2 1 リン酸カルシウム成形体
2 2 プラスチック筒
2 3 チューブ
2 4 水位
2 5 シリンジ

請求の範囲

- [請求項1] Ca / P の原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程a；及び有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1 g / 100 mL以下であり、かつpH 3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、前記有機酸溶液を前記工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程b；を含む、リン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項2] 前記工程bで使用する有機酸が、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項3] 前記工程bの後に、 Ca / P の原子数の比が1.4～1.8であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を、前記工程aで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層の上に形成する工程c；及び有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が1 g / 100 mL以下であり、かつpH 3.5以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、前記有機酸溶液を前記工程cで形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程d；をさらに含む、請求項1又は2に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項4] 前記工程dで使用する有機酸が、クエン酸、シュウ酸、酒石酸、マロン酸及びリンゴ酸からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項3に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項5] 前記リン酸カルシウム粉末は、第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含み、第一のリン酸カルシウム粉末の前記

有機酸に対する溶解性が、第二のリン酸カルシウム粉末の前記有機酸に対する溶解性よりも高く、

第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含む前記リン酸カルシウム粉末は、粒子径 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ の粒子と、粒子径 $25 \sim 100 \mu\text{m}$ の粒子とを少なくとも含み、粒子径 $25 \mu\text{m}$ 以上の粒子を体積基準で 20% 以上含む、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[請求項6] 第一のリン酸カルシウム粉末のフローファンクションが 4.00 未満であり、

第一のリン酸カルシウム粉末と第二のリン酸カルシウム粉末とを含む前記リン酸カルシウム粉末のフローファンクションが 4.00 以上である、請求項 5 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法：但し、フローファンクションは、破壊強度を f_c 、最大主応力を σ_1 とした時、 σ_1 / f_c で表される。

[請求項7] 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の濃度が 1.1 mol/L 以上 1.4 mol/L 以下である、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[請求項8] 工程 b および／又は工程 d における有機酸が、クエン酸である、請求項 7 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[請求項9] 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の塗布量が、 0.20 g/cm^3 以上 0.30 g/cm^3 以下である、請求項 7 又は 8 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[請求項10] 工程 b および／又は工程 d における有機酸溶液の pH が、 2.5 以上 3.5 以下である、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

[請求項11] 成形体の形成に使用されなかった、リン酸カルシウム粉末を除去する工程 e をさらに含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。

- [請求項12] 前記工程 e の後、成形体を水溶液に浸漬することにより成形体を硬化させる工程 f、及び／又は成形体を加熱することにより成形体を硬化させる工程 g を含む、請求項 11 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項13] 成形体に生体親和性高分子を被覆する工程 h をさらに含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項14] 前記生体親和性高分子が、リコンビナントゼラチンである、請求項 13 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項15] 前記工程 h の後に、前記生体親和性高分子に細胞を播種する工程 i をさらに含む、請求項 13 又は 14 に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項16] リン酸カルシウム成形体が、再生医療用足場材又は組織修復材である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法。
- [請求項17] 請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のリン酸カルシウム成形体の製造方法により製造されるリン酸カルシウム成形体。
- [請求項18] 再生医療用足場材又は組織修復材である、請求項 17 に記載のリン酸カルシウム成形体。
- [請求項19] 外部空間と連通している孔を有している、請求項 17 又は 18 に記載のリン酸カルシウム成形体。
- [請求項20] 外部空間と連通している孔が、成形体の内部を貫通し、孔の両端において外部空間と連通している、請求項 19 に記載のリン酸カルシウム成形体。
- [請求項21] 外部空間と連通している孔の平均径が $200\ \mu\text{m}$ ～ $2000\ \mu\text{m}$ である、請求項 19 又は 20 に記載のリン酸カルシウム成形体。
- [請求項22] Ca / P の原子数の比が 1.4 ～ 1.8 であるリン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であって、

外部空間と連通している第一の孔及び当該第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔を有する、リン酸カルシウム成形体。

[請求項23] 外部空間と連通している第一の孔の平均径が $200\mu\text{m}\sim 2000\mu\text{m}$ である、請求項22に記載のリン酸カルシウム成形体。

[請求項24] 外部空間と連通している第一の孔の数が、第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔の数よりも多い、請求項22又は23に記載のリン酸カルシウム成形体。

[請求項25] 表面の一部又は全部がリコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体を含む、移植用材料。

[請求項26] 前記リン酸カルシウムの Ca/P の原子数の比が $1.4\sim 1.8$ である、請求項25に記載の移植用材料。

[請求項27] リコンビナントペプチドが、熱架橋又は化学架橋されている、請求項25又は26に記載の移植用材料。

[請求項28] リコンビナントペプチドでコートされているリン酸カルシウム成形体の表面が、移植用材料の表面および内部に存在する、請求項25から27の何れか一項に記載の移植用材料。

[請求項29] リン酸カルシウム成形体が、ブロック状である、請求項25から28の何れか一項に記載の移植用材料。

[請求項30] リン酸カルシウム成形体が、顆粒状である、請求項25から28の何れか一項に記載の移植用材料。

[請求項31] リン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であって、外部空間と連通している孔を有し、比重が $0.7\text{g}/\text{mL}$ 以上であるか、および／又は水銀注入法による気孔率が75%以下であり、吸水浸透速度が、 $0.05\text{mm}/\text{秒}$ 以上である、リン酸カルシウム成形体；

但し、吸水浸透速度とは、以下の条件で測定したものである。直径8mm高さ20mmのリン酸カルシウム成形体に、内径2mmのプラス

チック筒の一端を連結し、前記プラスチック筒の他端を長さ100mmのチューブの一端に連結し、前記チューブの他端を10mLのシリンジに連結した実験系を構築する。リン酸カルシウム成形体とプラスチック筒の接する高さ、シリンジ内のインキの水位の高さとが吸水浸透の開始から終了まで同じになるように調整した条件下において、シリンジ内のインキをリン酸カルシウム成形体に吸水浸透させる。インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとなったときは、15mmを浸透に要した時間で割った値を吸水浸透速度とし、インキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さが5分以内に15mmとならない場合は、5分の時点においてインキが浸透したリン酸カルシウム成形体の領域の高さを、浸透に要した時間である5分で割った値を、吸水浸透速度とする。

[請求項32] 前記リン酸カルシウムのCa/Pの原子数の比が1.4～1.8である、請求項31に記載のリン酸カルシウム成形体。

[請求項33] ナノフォーカスX線CT又はマイクロフォーカスX線CTによる測定により判別される相対的に密な層と相対的に疎な層とが交互に積層された構造を有している、請求項31又は32に記載のリン酸カルシウム成形体。

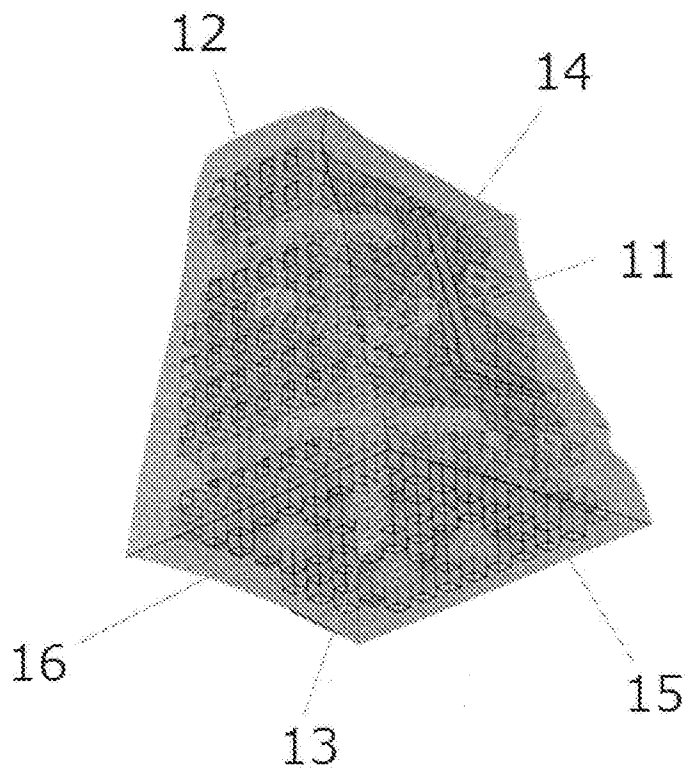
[請求項34] 少なくとも5層以上の相対的に密な層と、少なくとも5層以上の相対的に疎な層とが交互に積層されている、請求項33に記載のリン酸カルシウム成形体。

[請求項35] 第一の相対的に密な層と、前記第一の相対的に密な層の隣の第二の相対的に密な層とのピッチが50～300μmである、請求項33又は34に記載のリン酸カルシウム成形体。

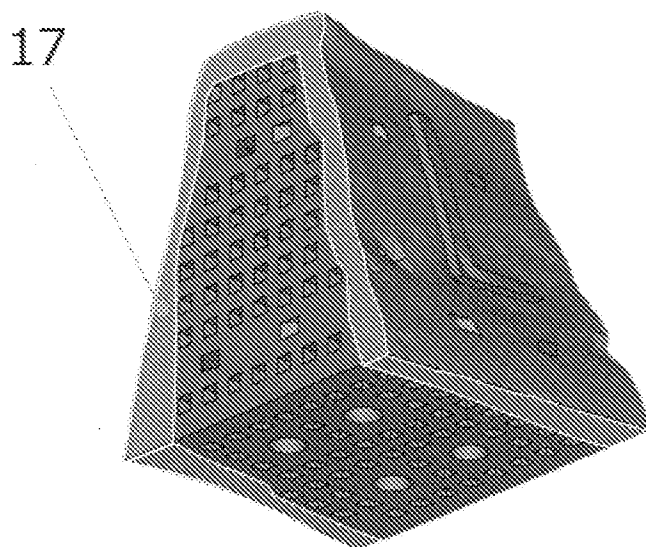
[請求項36] リン酸カルシウム成形体のナノフォーカスX線CT画像に基づいて、成形体の一方向の距離を横軸に、相対CT強度を縦軸に表示した波形図において、山のピークと谷のピークとを交互に有する、請求項31又は32に記載のリン酸カルシウム成形体。

- [請求項37] 少なくとも5つ以上の山のピークを有する、請求項36に記載のリン酸カルシウム成形体。
- [請求項38] 第一の山のピークと、前記第一の山のピークの隣の第二の山のピークとのピッチが50～300 μm である、請求項36又は37に記載のリン酸カルシウム成形体。

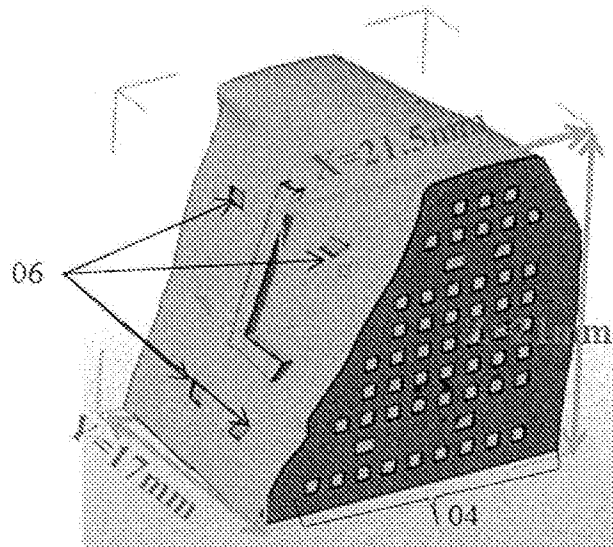
[図1]



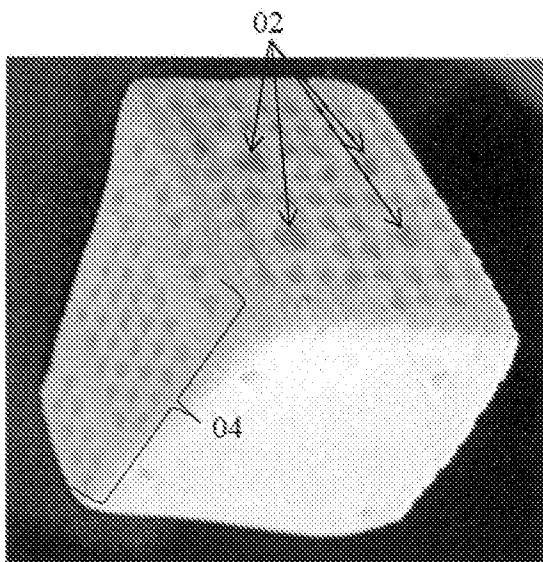
[図2]



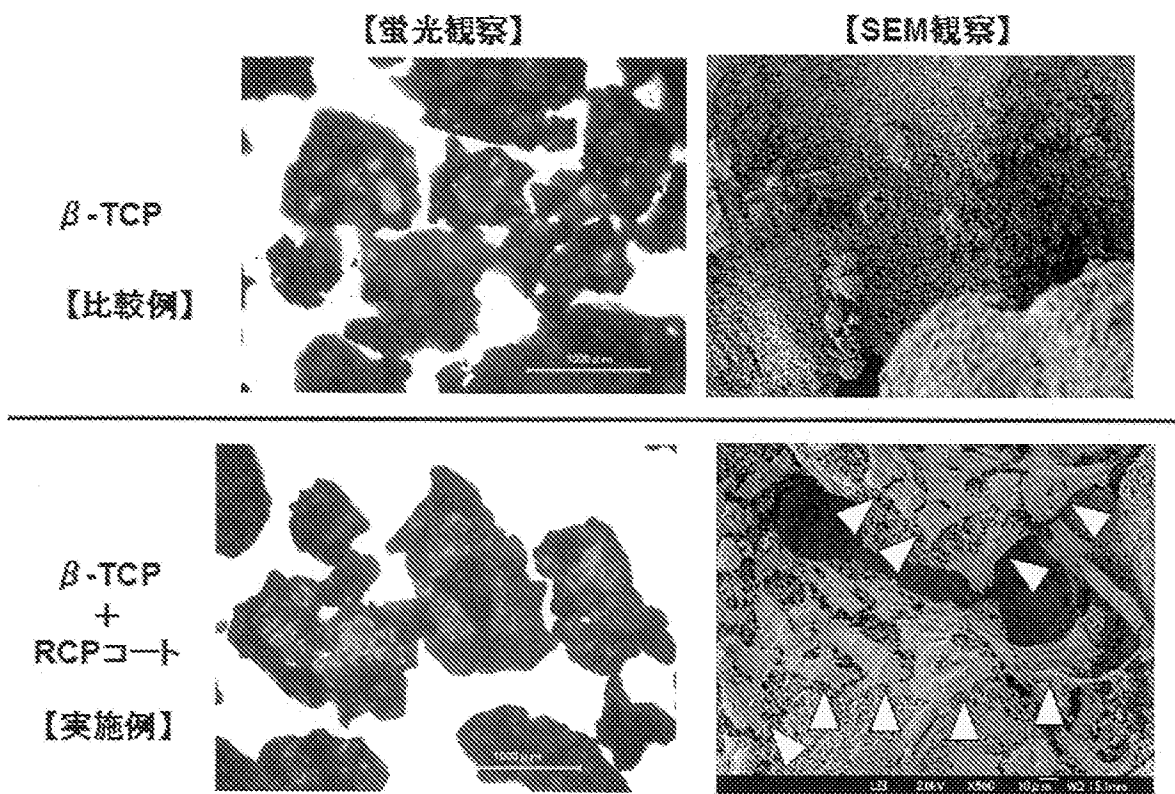
[図3]



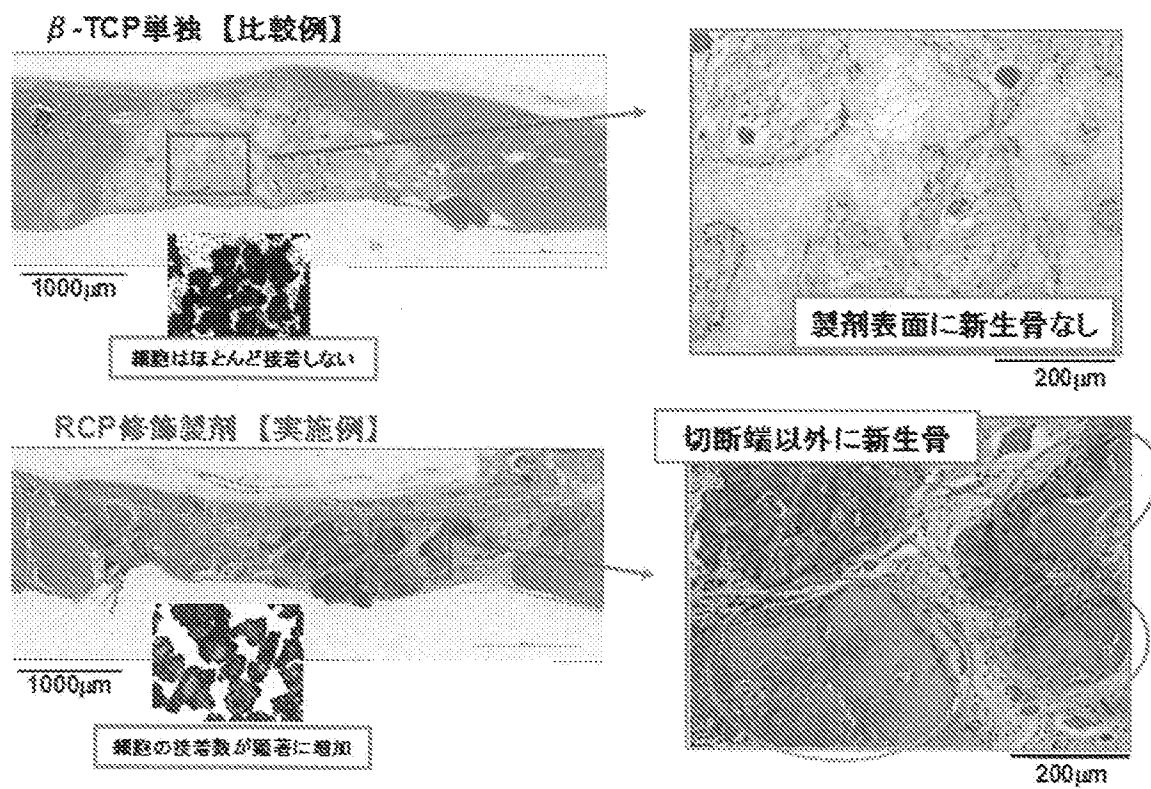
[図4]



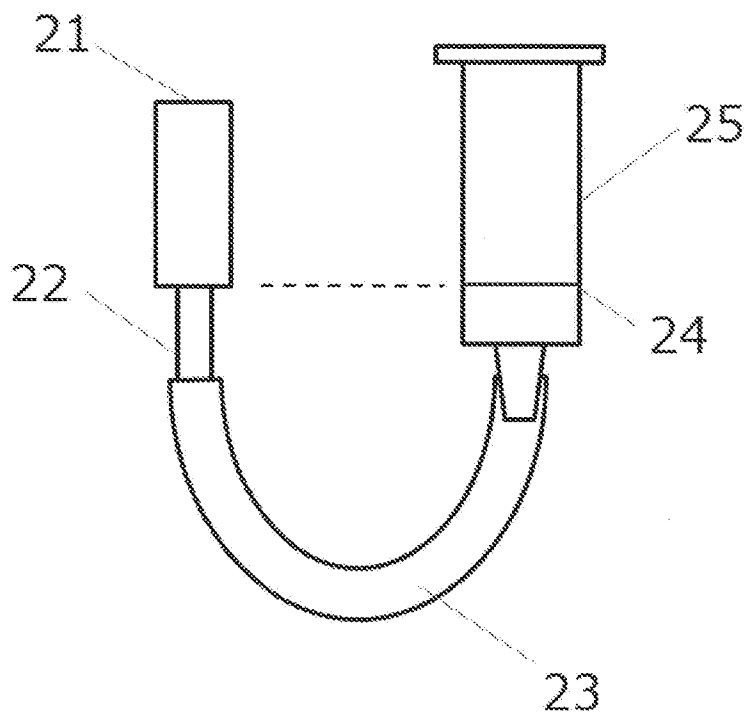
[図5]



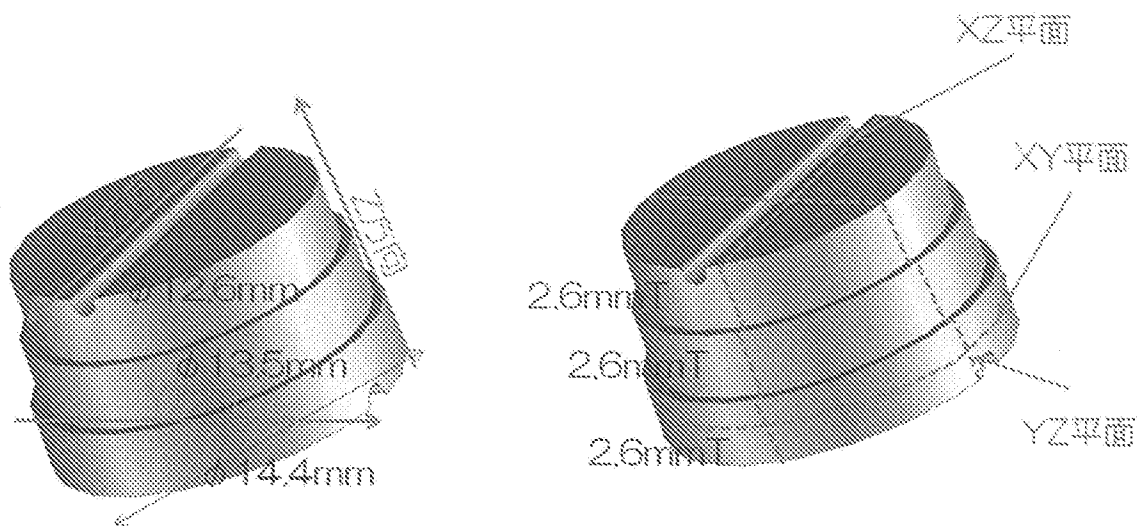
[図6]



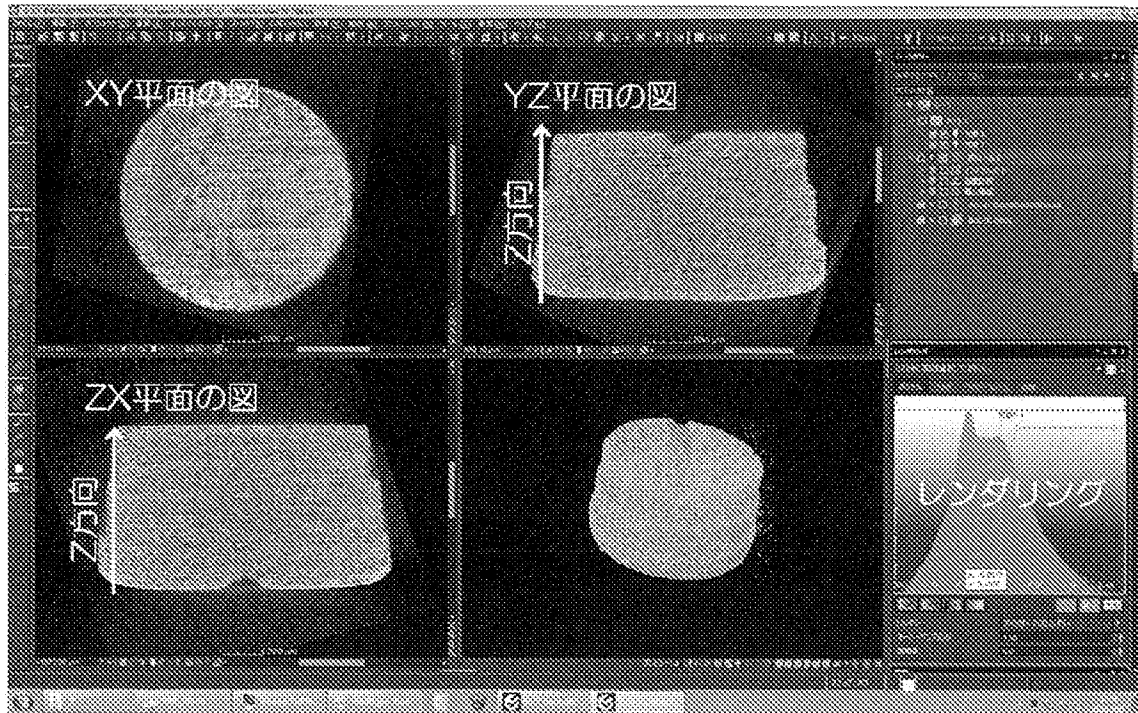
[図7]



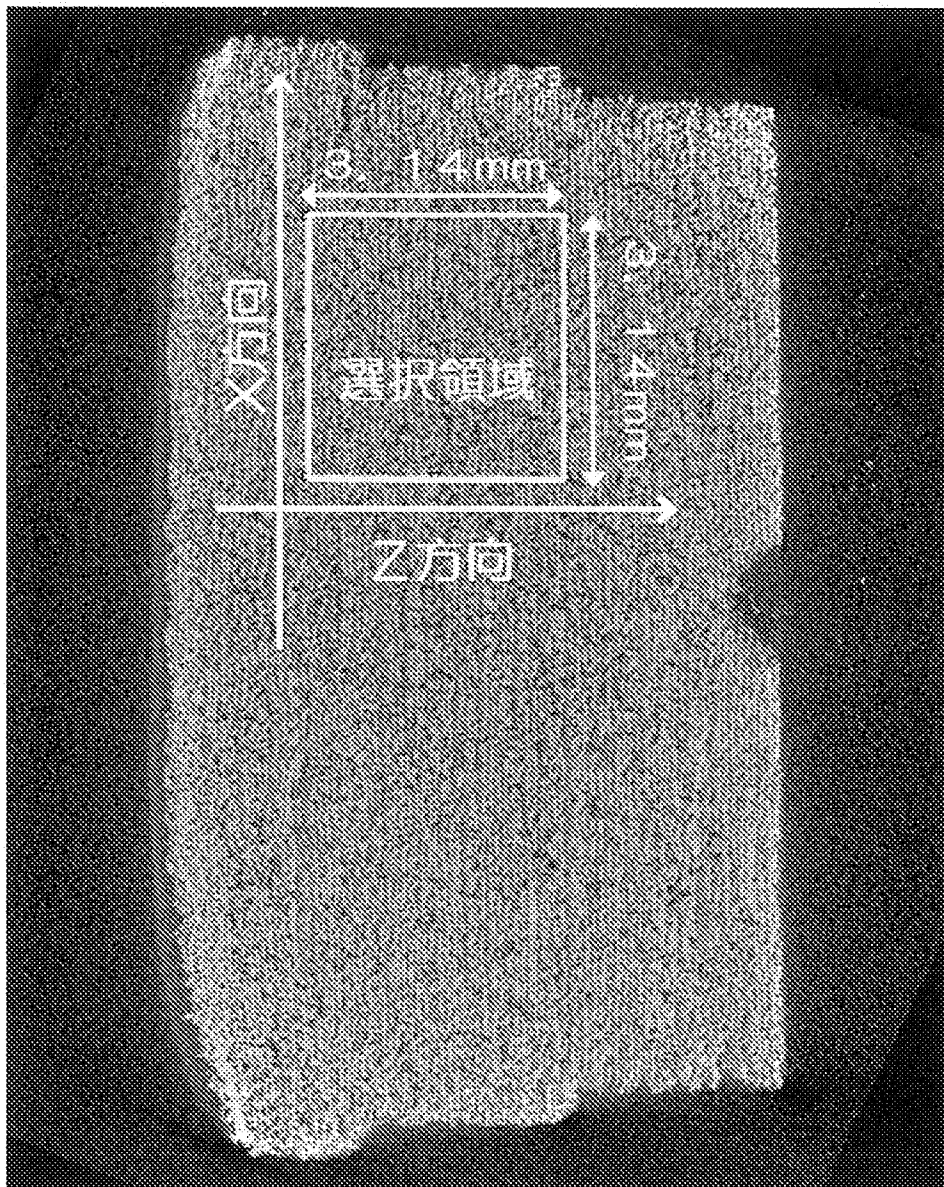
[図8]



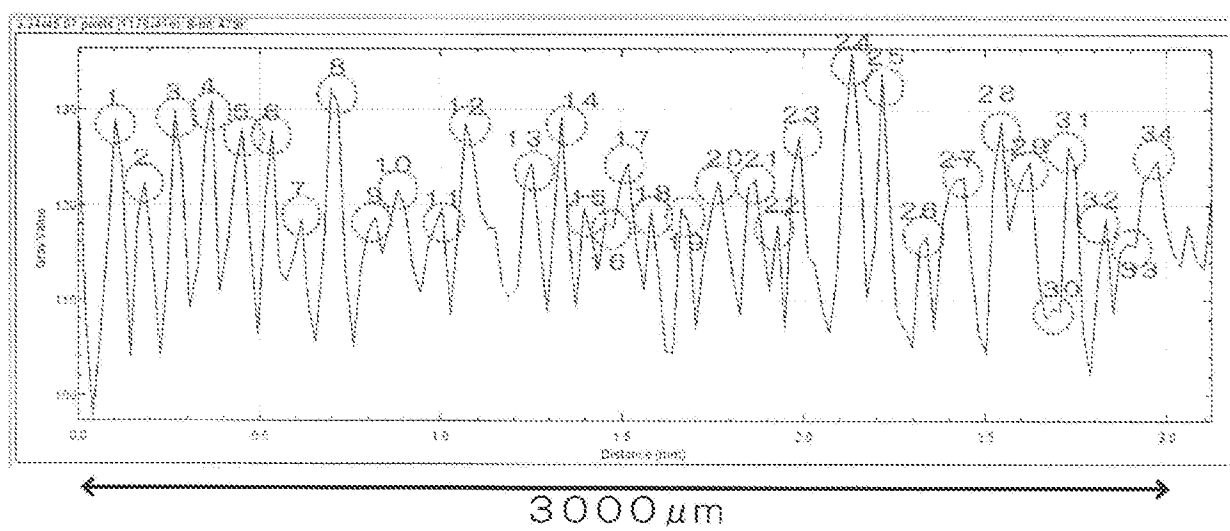
[図9]



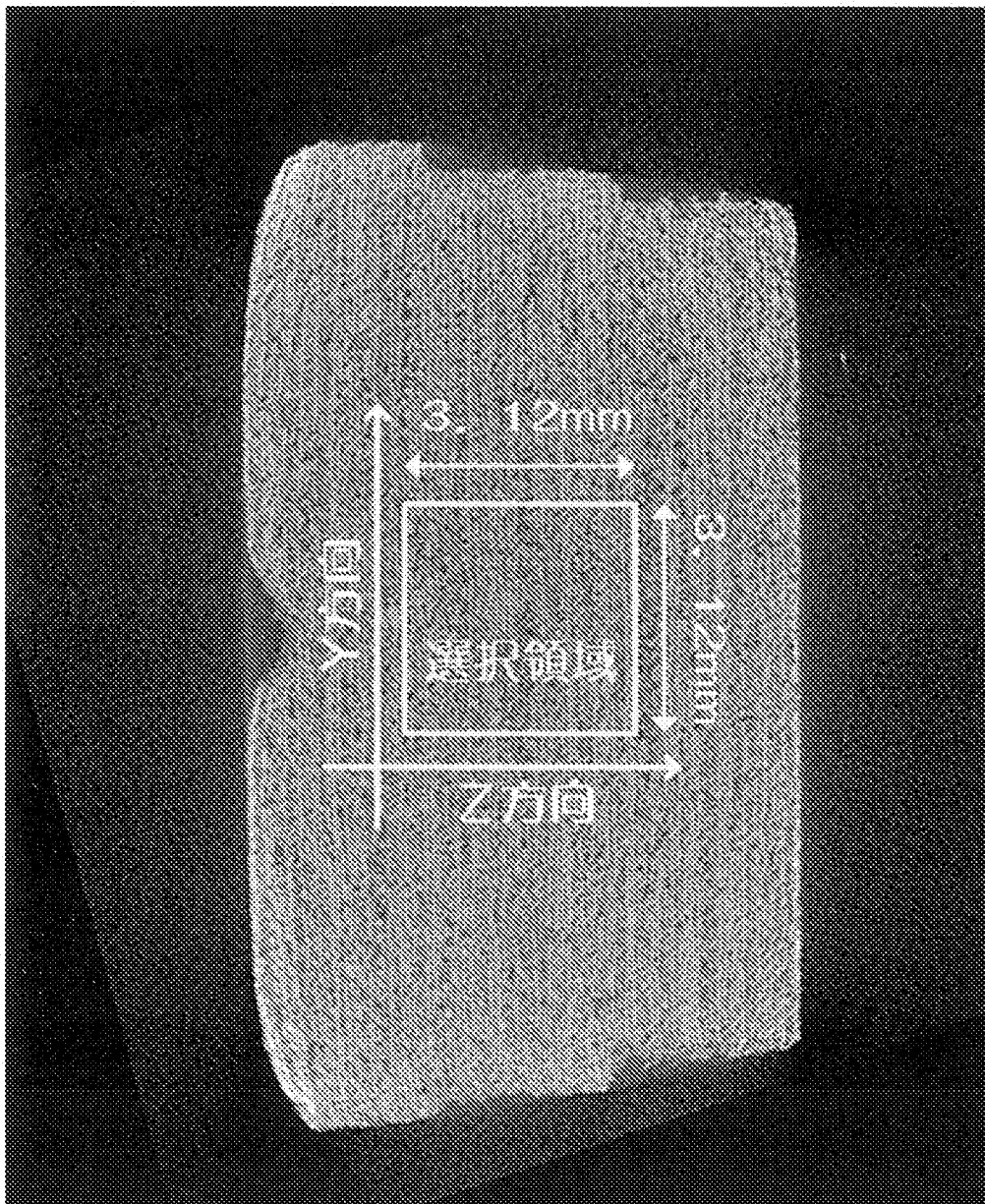
[図10]



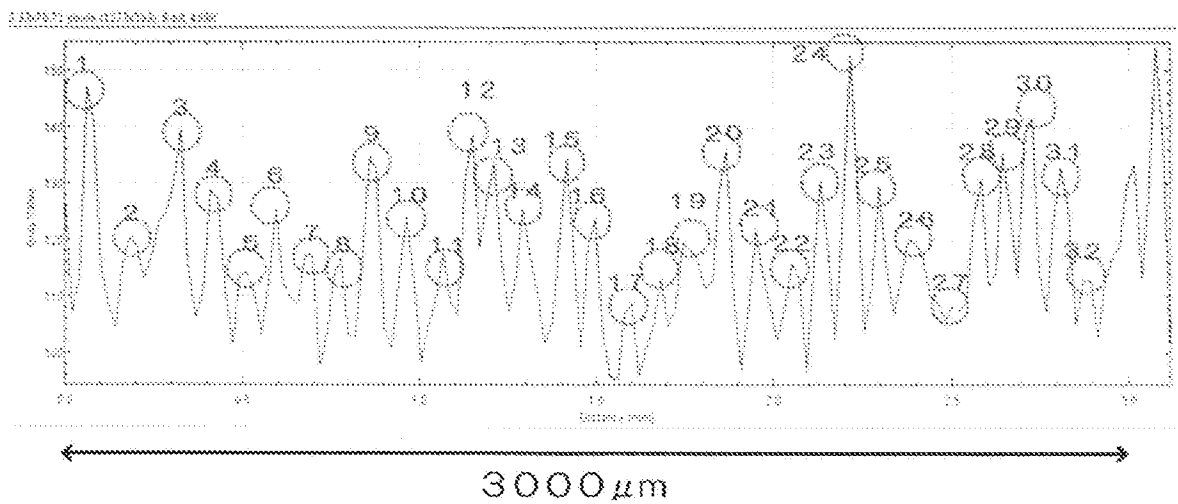
[図11]



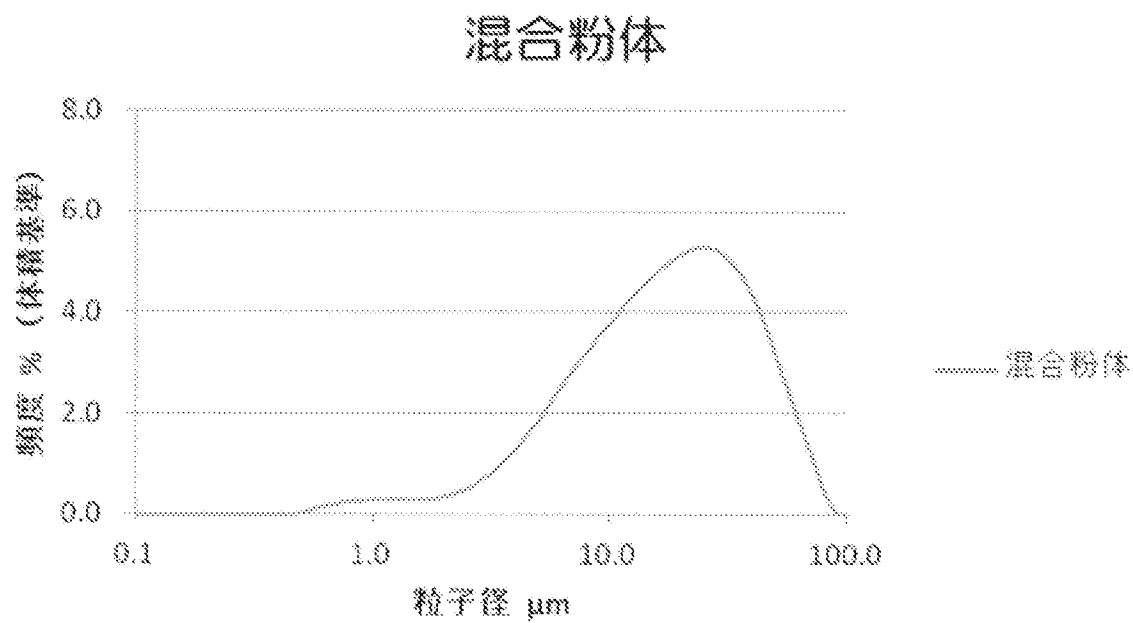
[図12]



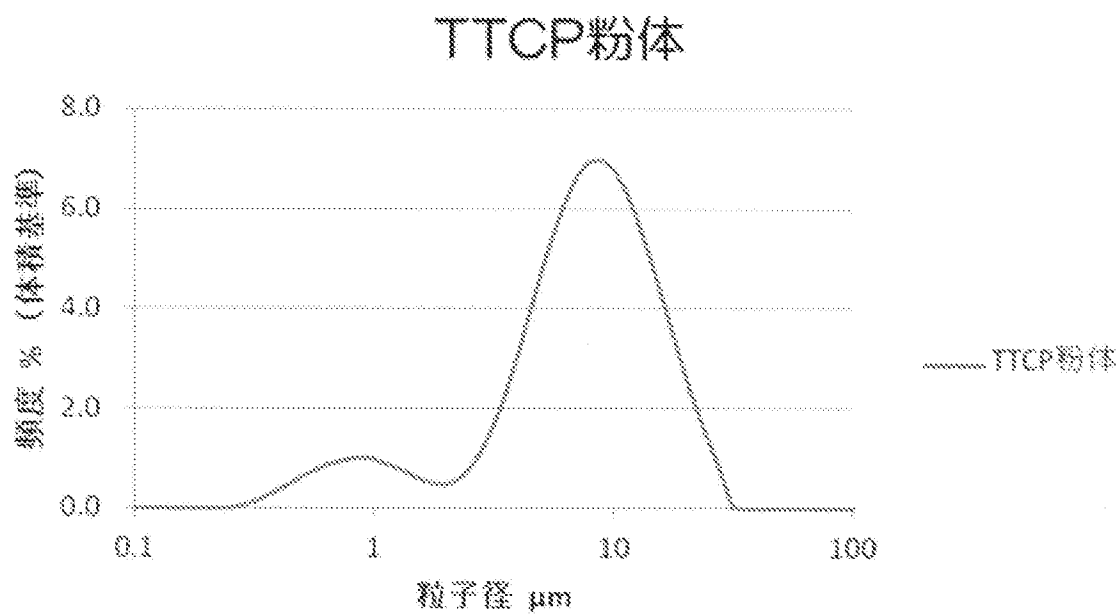
[図13]



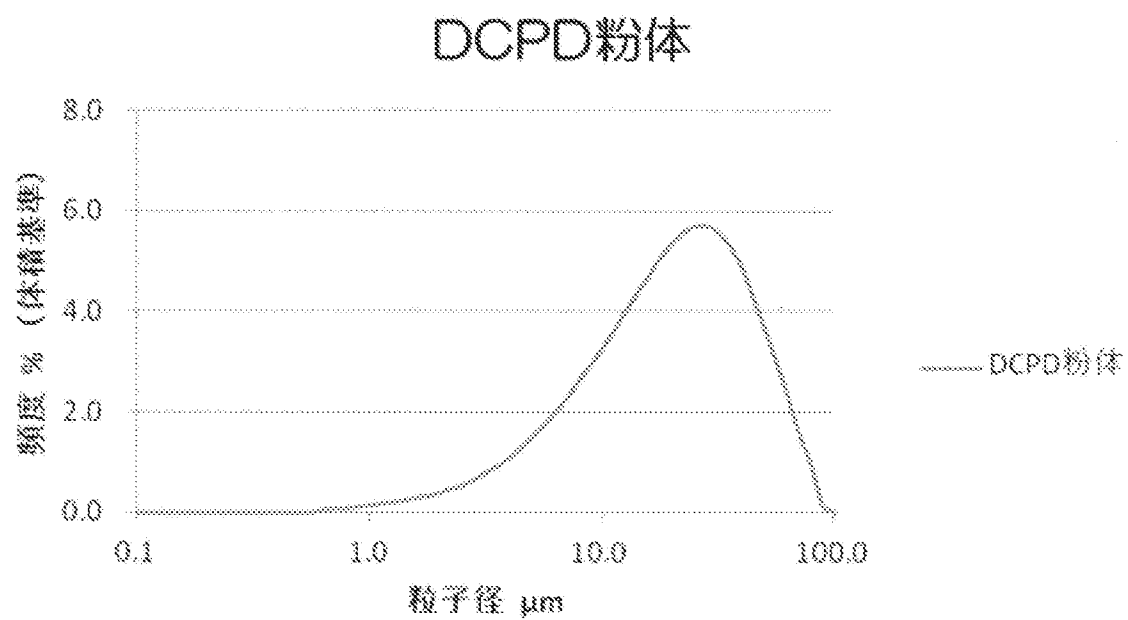
[図14]



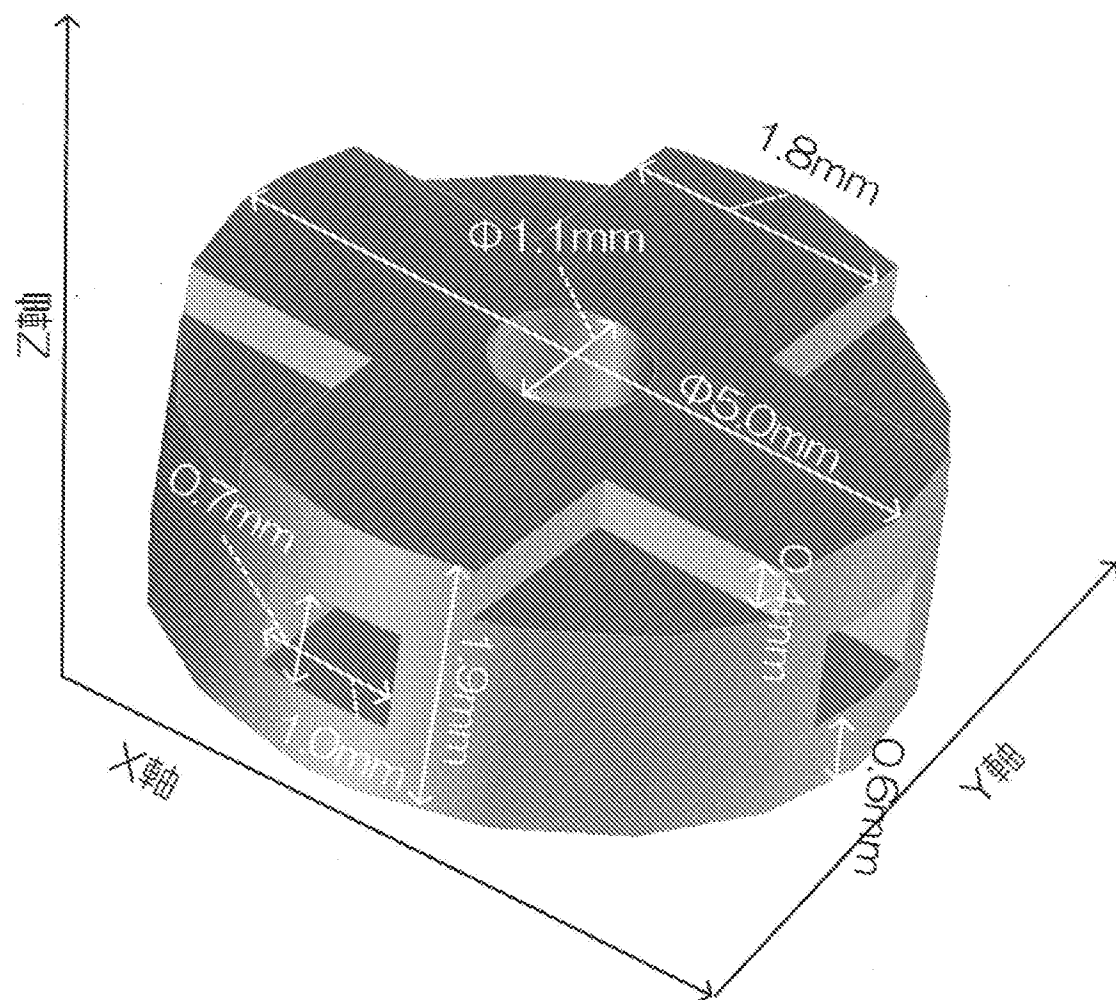
[図15]



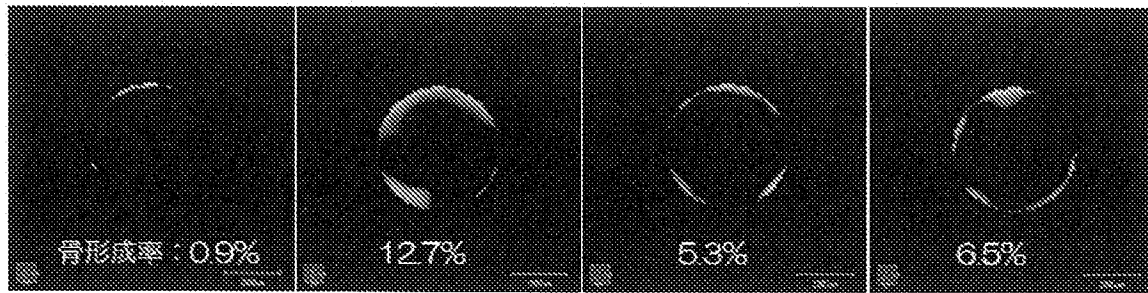
[図16]



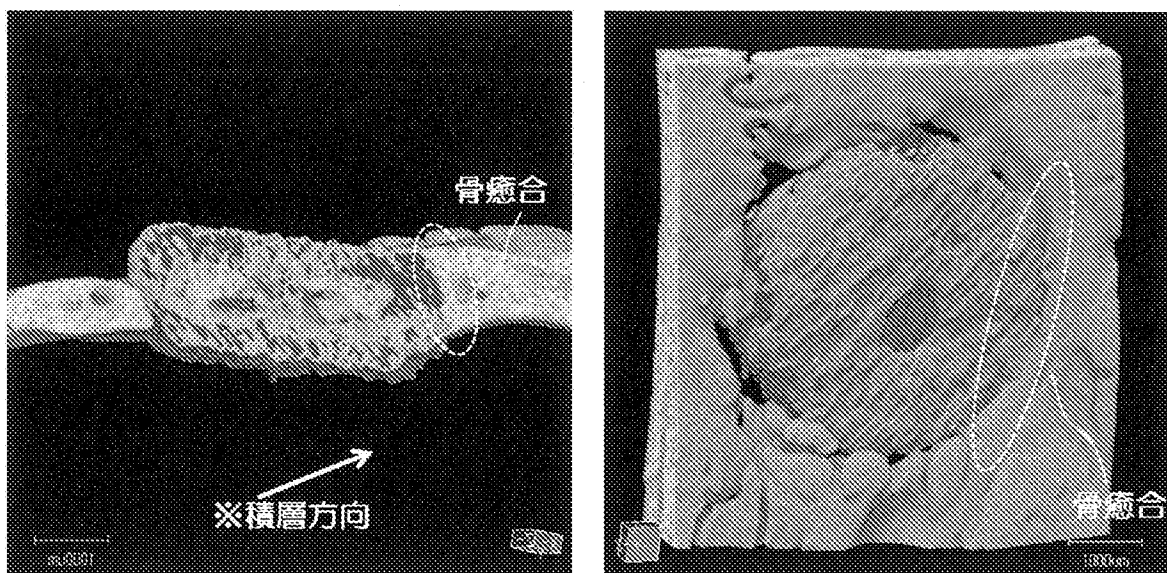
[図17]



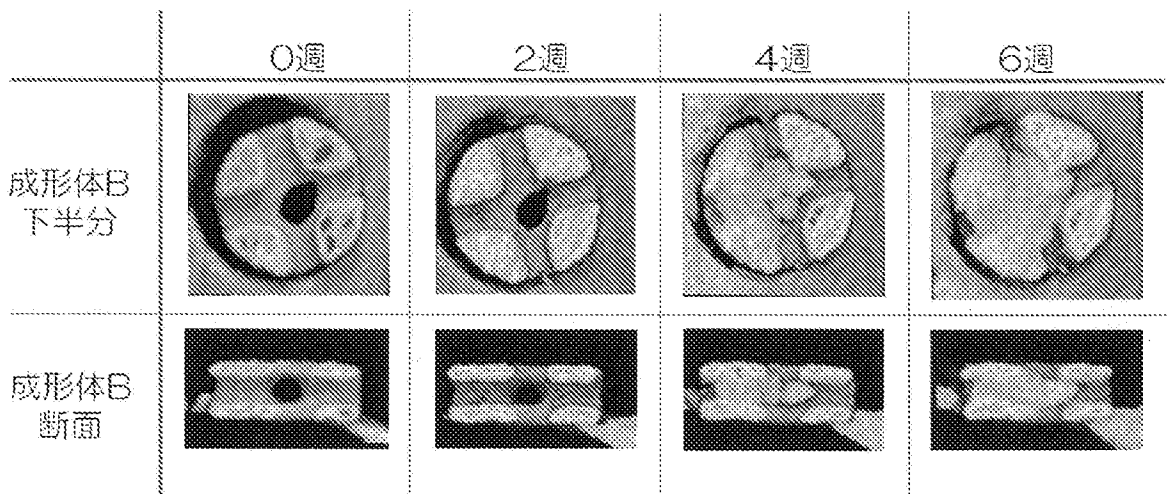
[図18]



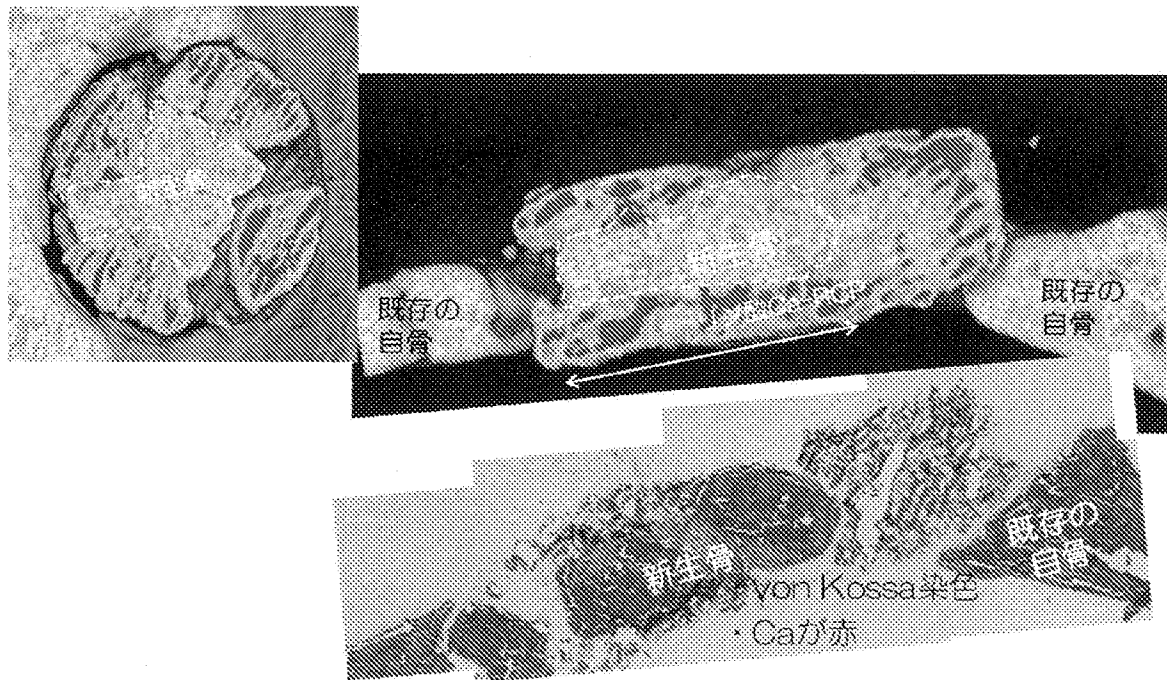
[図19]



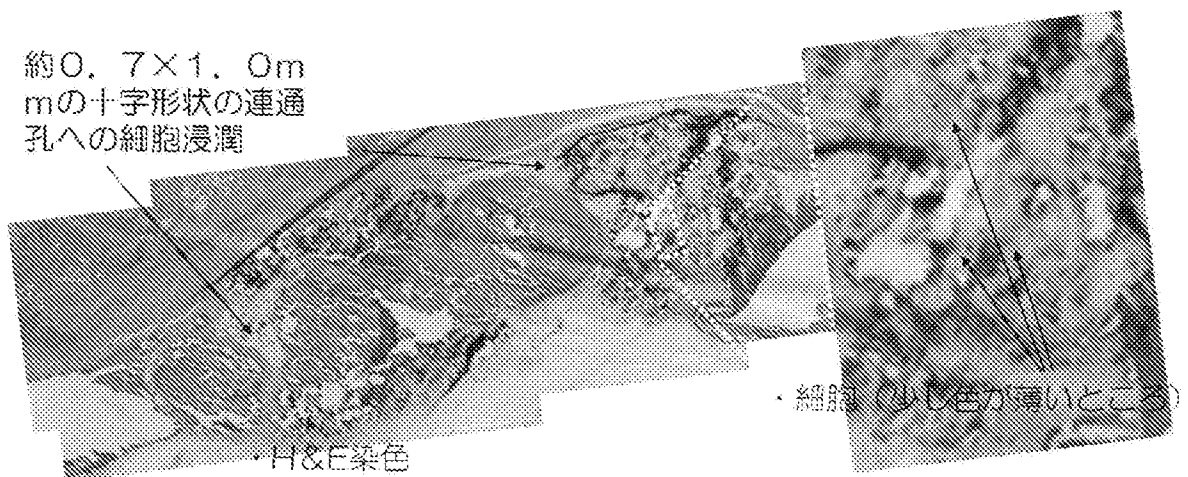
[図20]



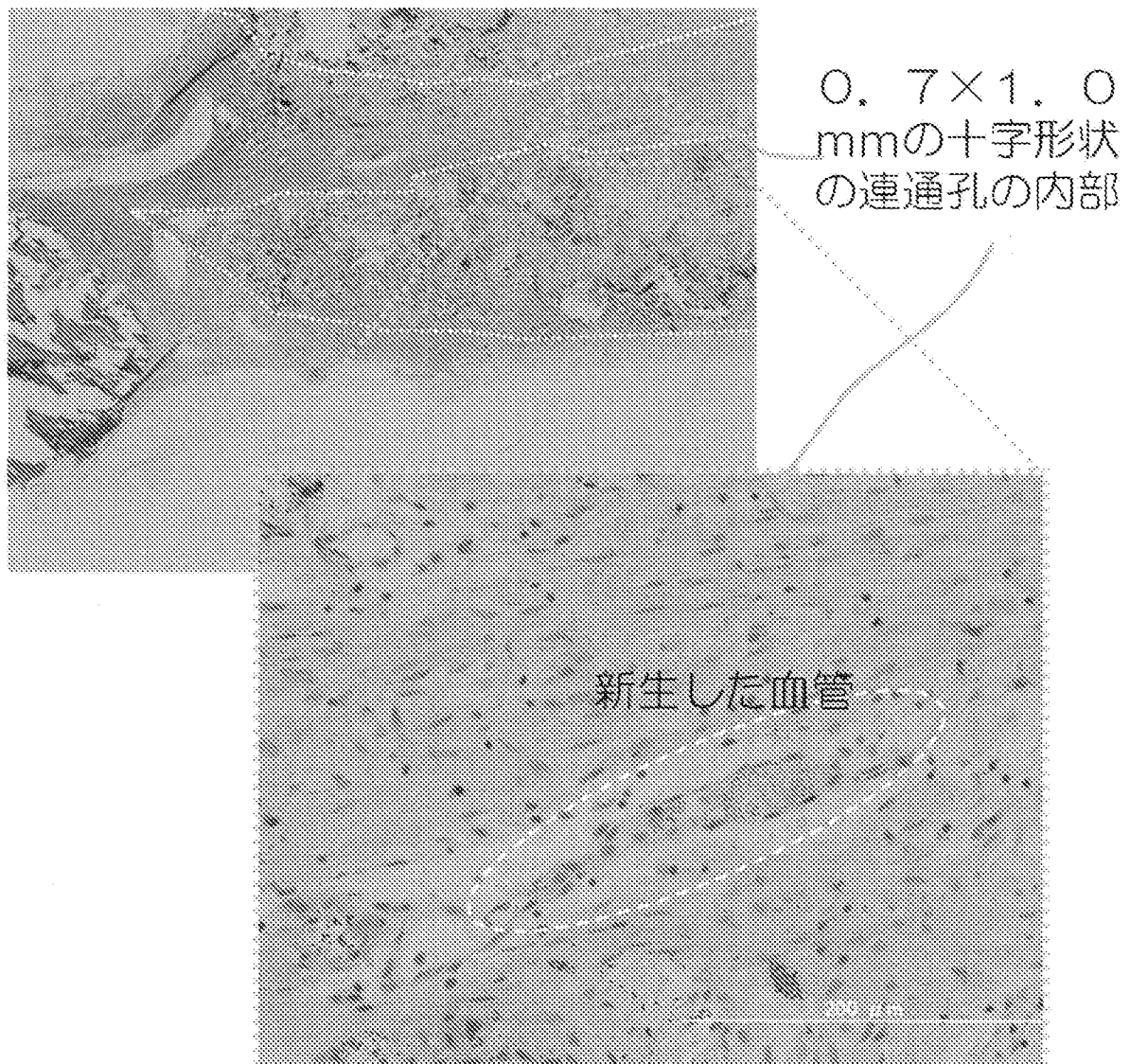
[図21]



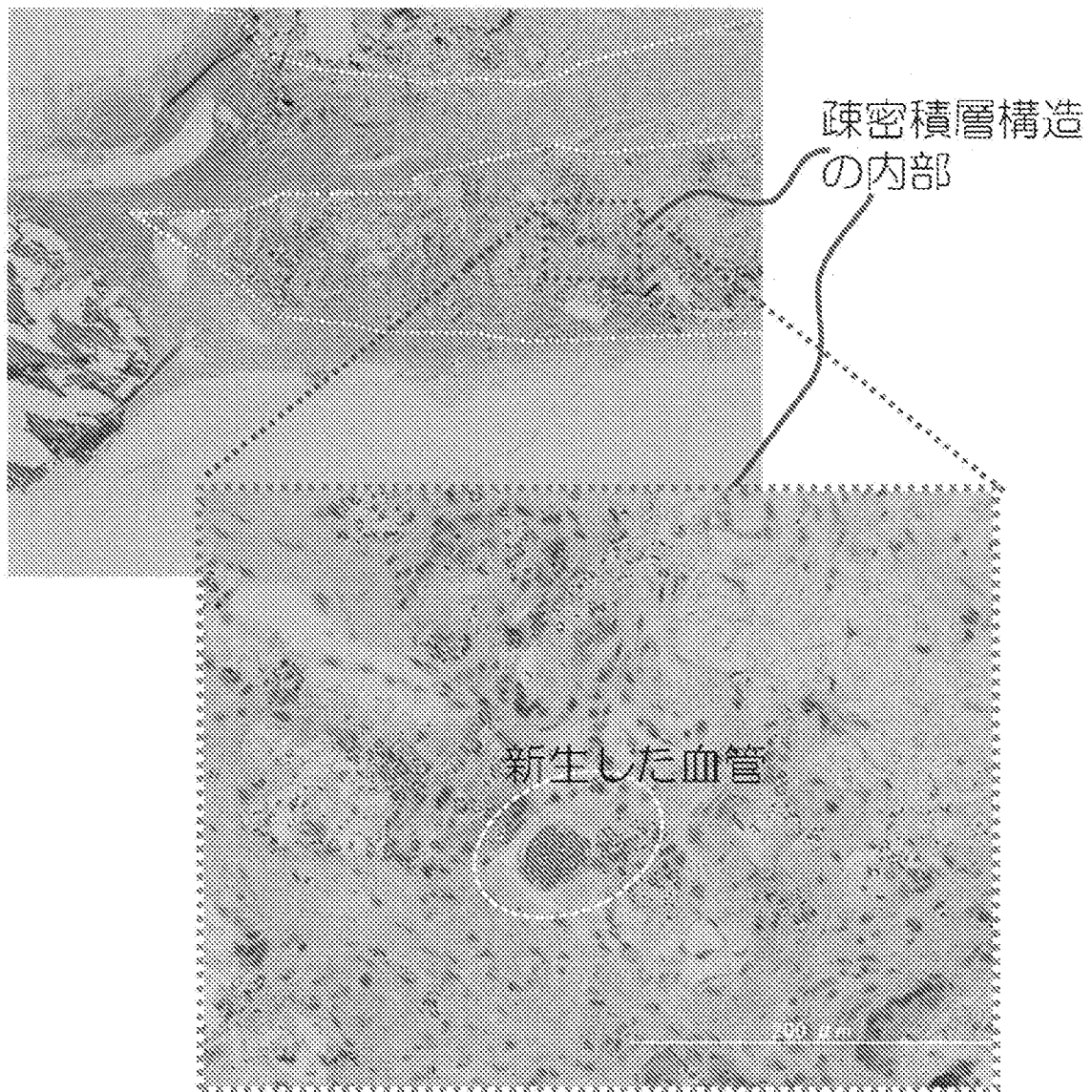
[図22]



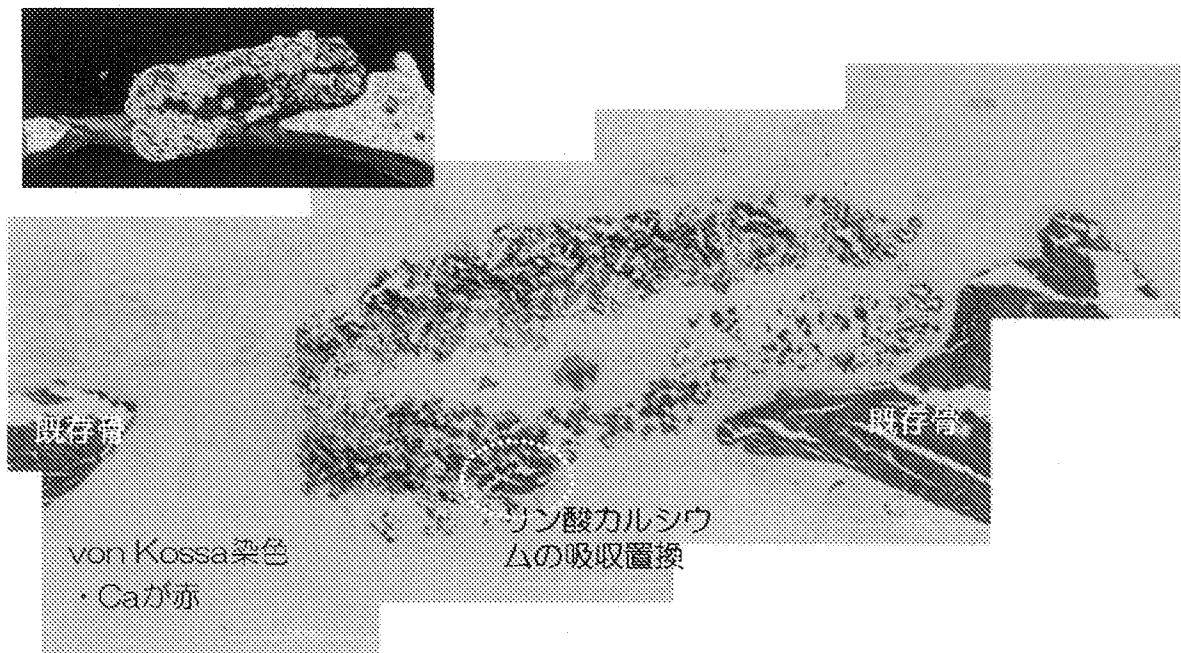
[図23]



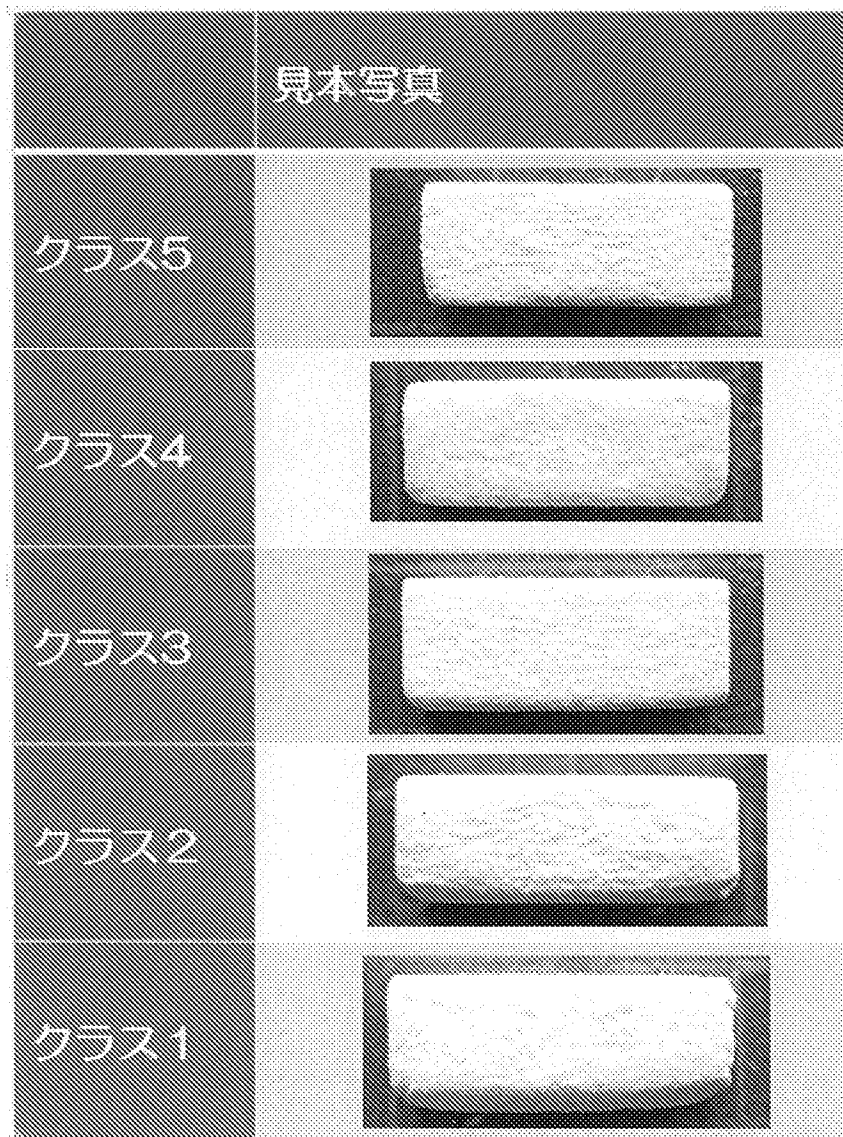
[図24]



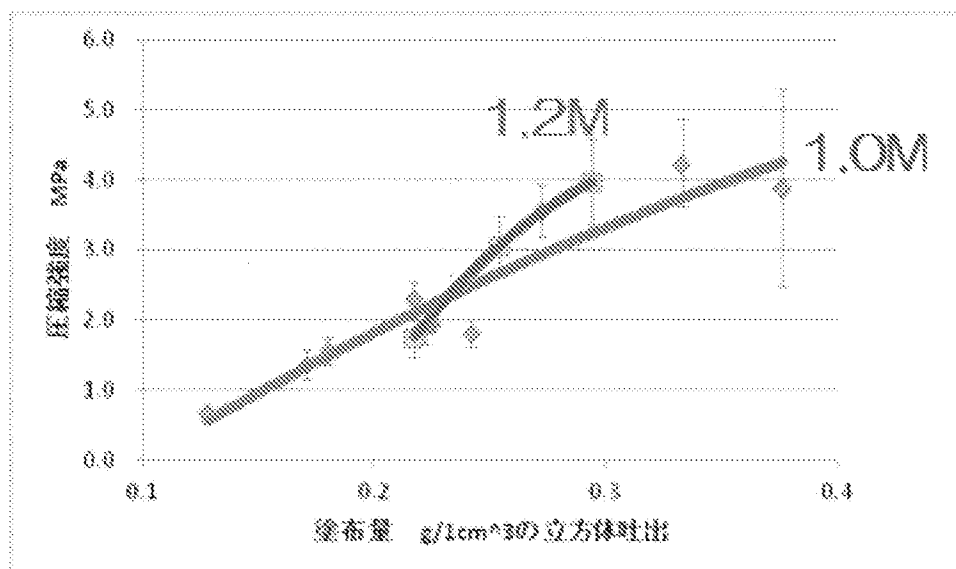
[図25]



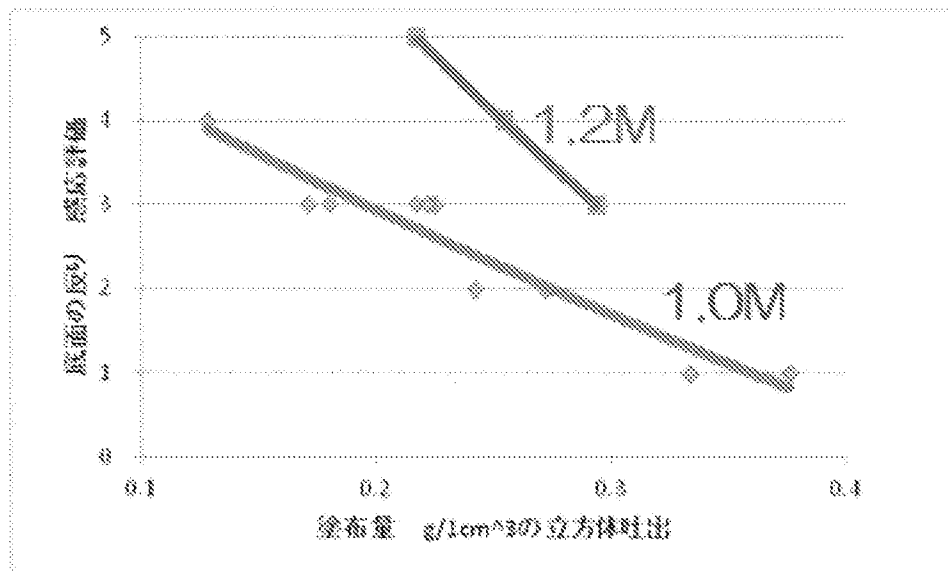
[図26]



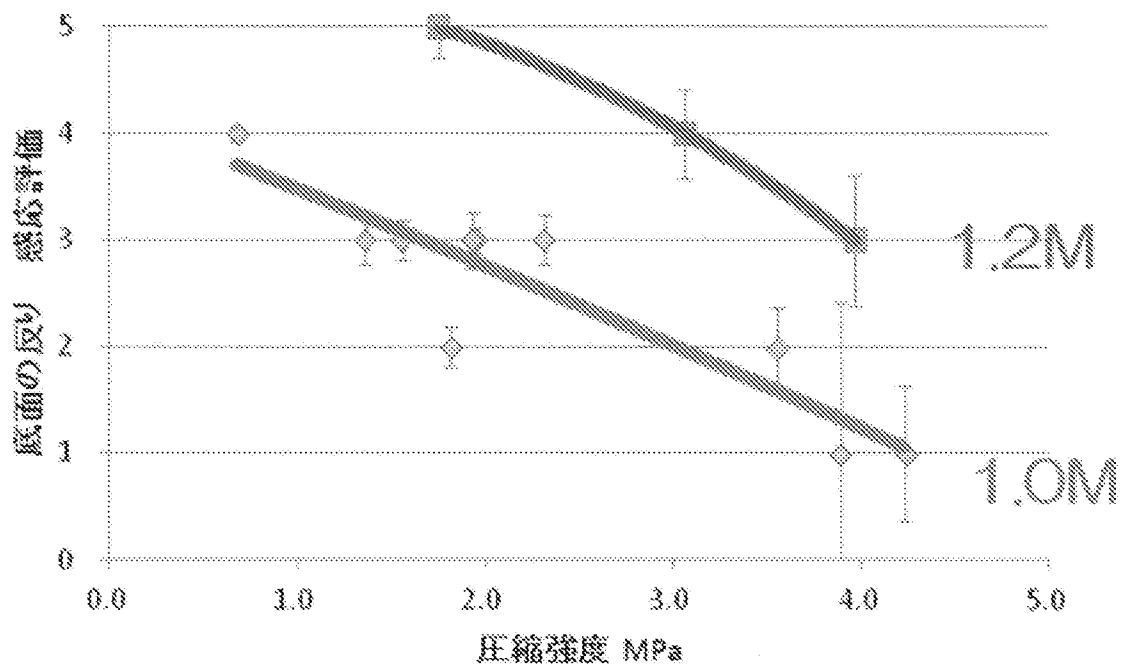
[図27]



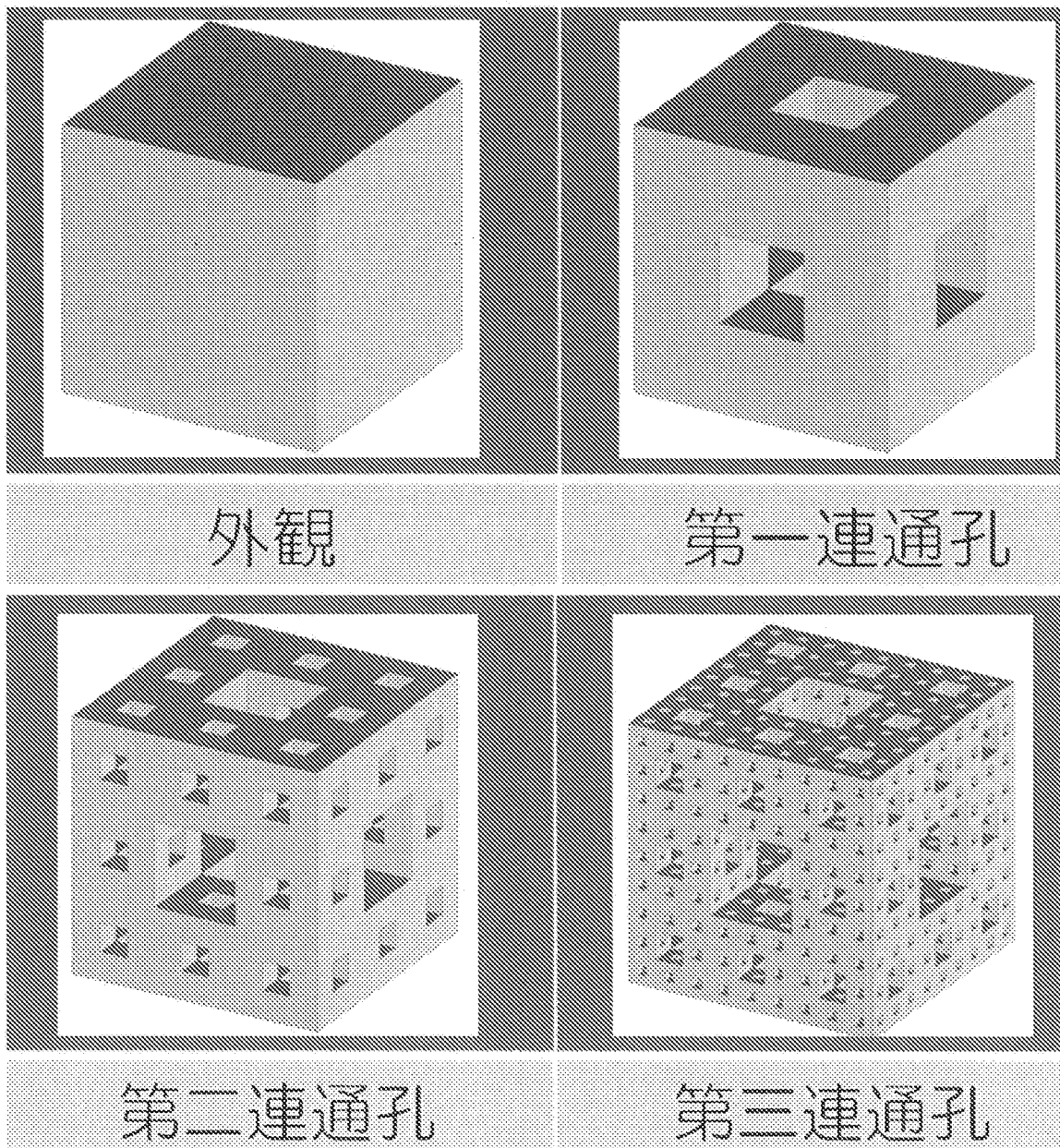
[図28]



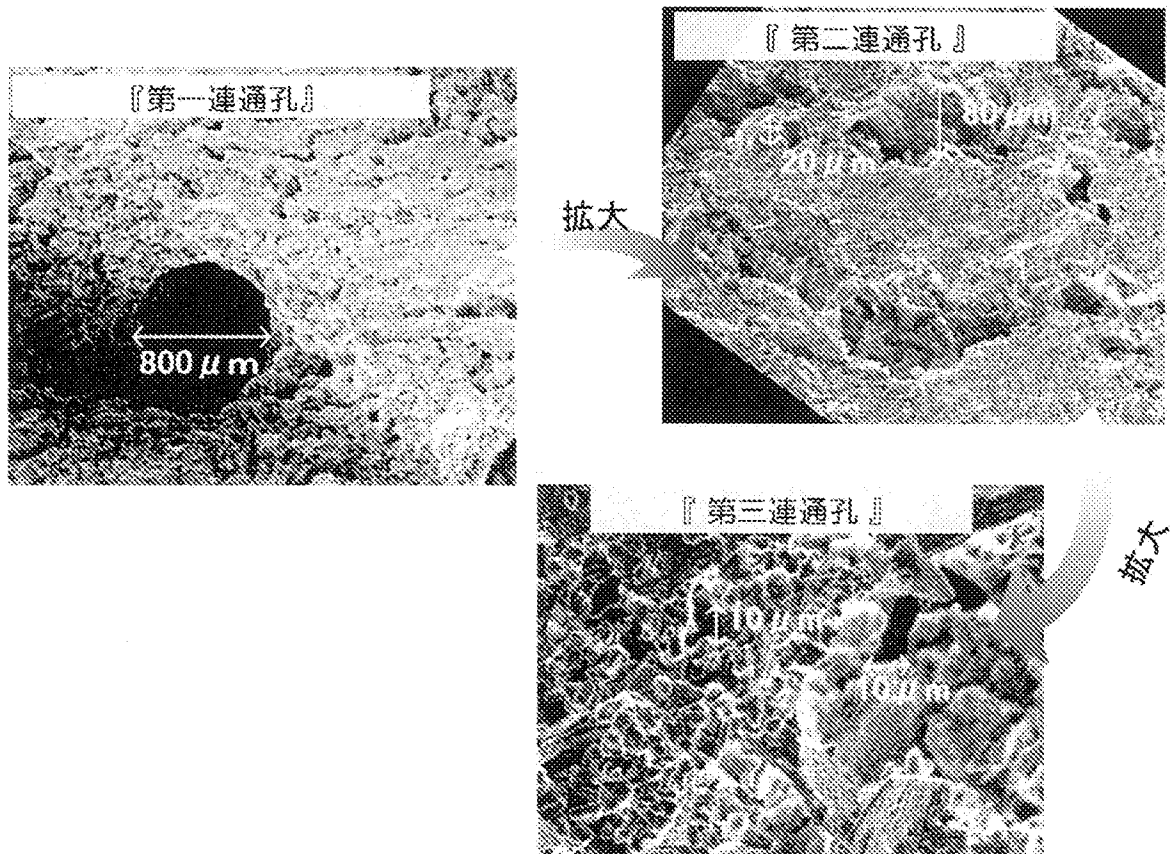
[図29]



[図30]



[図31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C04B35/447(2006.01)i, A61L27/12(2006.01)i, A61L27/22(2006.01)i, A61L27/40(2006.01)i, B28B1/30(2006.01)i, B29C67/00(2017.01)i, C07K14/78(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C04B35/447, A61L27/12, A61L27/22, A61L27/40, B28B1/30, B29C67/00, C07K14/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2015-174792 A (Ricoh Co., Ltd.), 05 October 2015 (05.10.2015), claims; example 1; paragraphs [0019], [0023], [0056], [0062] & US 2015/0259247 A1 claims; example A1-1; paragraphs [0066], [0091], [0148], [0156] & CN 104906631 A	1-21 31-38
Y A	Masayoshi NAKAHARA, Dictionary of Inorganic Compounds & Complexes, Kodansha Ltd., 10 June 1997 (10.06.1997), page 163	1-21 31-38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 July 2017 (27.07.17)

Date of mailing of the international search report
15 August 2017 (15.08.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2015/194678 A1 (Fujimi Inc.), 23 December 2015 (23.12.2015), claims; paragraphs [0026], [0063] & EP 3159141 A1 claims; paragraphs [0031], [0078] & CN 106457668 A	6 31-38
Y A	JP 2004-202126 A (Next Co., Ltd.), 22 July 2004 (22.07.2004), claims; paragraphs [0007], [0015], [0021] to [0023] (Family: none)	13-16, 25-30 31-38
Y A	JP 2013-202213 A (Fujifilm Corp.), 07 October 2013 (07.10.2013), claims; paragraphs [0006], [0027], [0046], [0054] (Family: none)	14-16, 18, 25-30 31-38
X A	WO 2005/105164 A1 (Sunstar Suisse S.A.), 10 November 2005 (10.11.2005), claims; paragraphs [0033], [0038]; fig. 2 & US 2007/0231364 A1 claims; paragraphs [0050], [0055]; fig. 2 & EP 1757315 A1 & CA 2570623 A	22-24 31-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020130

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Document 1: JP 2015-174792 A (Ricoh Co., Ltd.) 05 October 2015 (05.10.2015), claims; example 1; paragraphs [0019], [0023], [0056], [0062] & US 2015/0259247 A1 claims; example A1-1; paragraphs [0066], [0091], [0148], [0156] & CN 104906631 A

Claims are classified into the following four inventions.

(Invention 1) claims 1-21

(Continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020130

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims 1-16 have a special technical feature wherein the process "comprises: step a in which a layer comprising a calcium phosphate powder in which the Ca/P ratio in terms of the number of atoms is 1.4-1.8 is formed on a base; and step b in which an organic-acid solution in which the calcium salt of the organic acid has a solubility in water of 1 g/100 mL or less and which has a pH of 3.5 or lower is ejected in a droplet state from a nozzle and dropped onto the layer comprising a calcium phosphate powder formed in the step a, thereby producing a shaped calcium phosphate object". Claims 1-16 are hence classified as Invention 1.

Further, claims 17-21 are classified into Invention 1, since these claims have a relationship such that said claims are substantially same as or equivalent to claim 1.

(Invention 2) claims 22-24

Claims 22-24 share a common technical feature which is "a shaped calcium phosphate object wherein the Ca/P ratio in terms of the number of atoms is 1.4-1.8" with claim 1, which is classified as Invention 1.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 (particularly, see example 1).

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between claims 22-24 and claim 1.

In addition, claims 22-24 are not dependent on claim 1.

Further, claims 22-24 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claims 22-24 cannot be classified into Invention 1.

Claims 22-24 have a special technical feature which is "a shaped calcium phosphate object that is formed from calcium phosphate having a Ca/P ratio in terms of the number of atoms of 1.4-1.8 and that has first pores, which communicate with the surrounding space, and second pores, which communicate with the surrounding space and have a larger average diameter than the first pores", and are hence classified as Invention 2.

(Invention 3) claims 25-30

Claims 25-30 share a common technical feature which is "a shaped calcium phosphate object" with claim 1, which is classified as Invention 1, and claim 22, which is classified as Invention 2.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 (particularly, see example 1).

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between claims 25-30 and claims 1, 22.

In addition, claims 25-30 are not dependent on either claim 1 or 22.

Further, claims 25-30 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1 or 2.

Consequently, claims 25-30 cannot be classified into either Invention 1 or 2.

Claims 25-30 have a special technical feature which is "A material for transplantation that includes a shaped calcium phosphate object in which some or all of the surface has been coated with a recombinant gelatin", and are hence classified as Invention 3.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/020130

(Invention 4) claims 31-38

Claims 31-38 share a common technical feature which is "a shaped calcium phosphate object" with claim 1, which is classified as Invention 1, with claim 22, which is classified as Invention 2, and with claim 25, which is classified as Invention 3.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the document 1 (particularly, see example 1).

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between claims 31-38 and claims 1, 22, and 25.

In addition, claims 31-38 are not dependent on any one of claims 1, 22, and 25.

Further, claims 31-38 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-3.

Consequently, claims 31-38 cannot be classified into any one of Inventions 1-3.

Claims 31-38 have a special technical feature which is "a shaped calcium phosphate object which has pores communicating with the surrounding space, and which has a specific gravity of 0.7 g/mL or higher and/or a porosity, as measured by a mercury intrusion method, of 75% or less, and which has a water penetration rate of 0.05 mm/sec or higher", and are hence classified as Invention 4.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C04B35/447(2006.01)i, A61L27/12(2006.01)i, A61L27/22(2006.01)i, A61L27/40(2006.01)i, B28B1/30(2006.01)i, B29C67/00(2017.01)i, C07K14/78(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C04B35/447, A61L27/12, A61L27/22, A61L27/40, B28B1/30, B29C67/00, C07K14/78

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2015-174792 A (株式会社リコー) 2015.10.05, 特許請求の範囲, 実施例1, [0019], [0023], [0056], [0062] & US 2015/0259247 A1, 特許請求の範囲, 実施例A1-1, [0066], [0091], [0148], [0156] & CN 104906631 A	1-21 31-38
Y A	中原勝儼, 無機化合物・錯体辞典, 株式会社講談社, 1997.06.10, P. 163	1-21 31-38

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.07.2017

国際調査報告の発送日

15.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小川 武

4 T

9270

電話番号 03-3581-1101 内線 3465

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2015/194678 A1 (株式会社フジミインコーポレーテッド) 2015. 12. 23, 特許請求の範囲, [0026], [0063] & EP 3159141 A1 , 特許請求の範囲, [0031], [0078] & CN 106457668 A	6 31-38
Y A	JP 2004-202126 A (株式会社ネクスト) 2004. 07. 22, 特許請求の範 囲, [0007], [0015], [0021] - [0023] (ファミ リーなし)	13-16, 25-30 31-38
Y A	JP 2013-202213 A (富士フイルム株式会社) 2013. 10. 07, 特許請求 の範囲, [0006], [0027], [0046], [0054] (ファ ミリーなし)	14-16, 18, 25- 30 31-38
X A	WO 2005/105164 A1 (サンスター スイス エスエー) 2005. 11. 10, 特許請求の範囲, [0033], [0038], 図2 & US 2007/0231364 A1 , 特許請求の範囲, [0050], [0055], 図2 & EP 1757315 A1 & CA 2570623 A	22-24 31-38

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

文献1：JP 2015-174792 A（株式会社リコー）2015.10.05，特許請求の範囲，実施例1，[0019]，[0023]，[0056]，[0062] & US 2015/0259247 A1，特許請求の範囲，実施例A1-1，[0066]，[0091]，[0148]，[0156] & CN 104906631 A
請求の範囲は、以下の4つの発明に区分される。

（発明1）請求項1-21
（特別頁に続く）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項 1-16 は、「C a / P の原子数の比が 1.4 ~ 1.8 であるリン酸カルシウム粉末を含有する層を基板上に形成する工程 a ; 及び有機酸のカルシウム塩の水に対する溶解度が 1 g / 100 mL 以下であり、かつ pH 3.5 以下である有機酸溶液をノズル部から液滴状態で吐出させて、前記有機酸溶液を前記工程 a で形成したリン酸カルシウム粉末を含有する層に対して滴下させることによりリン酸カルシウム成形体を製造する工程 b ; を含む」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 1 に区分する。
さらに、請求項 17-21 は請求項 1 と実質同一又はそれに準ずる関係にあるので、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 22-24

請求項 22-24 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「C a / P の原子数の比が 1.4 ~ 1.8 であるリン酸カルシウム成形体」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容（特に実施例 1 参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、請求項 22-24 と請求項 1 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 22-24 は請求項 1 の従属請求項ではない。また、請求項 22-24 は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 22-24 は発明 1 に区分できない。

そして、請求項 22-24 は、「C a / P の原子数の比が 1.4 ~ 1.8 であるリン酸カルシウムから形成されるリン酸カルシウム成形体であって、外部空間と連通している第一の孔及び当該第一の孔よりも平均径が大きい第二の孔を有する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

(発明 3) 請求項 25-30

請求項 25-30 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 22 と、「リン酸カルシウム成形体」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容（特に実施例 1 参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

また、請求項 25-30 と請求項 1, 22 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 25-30 は請求項 1, 22 のいずれの従属請求項でもない。また、請求項 25-30 は、発明 1 又は 2 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 25-30 は発明 1 及び 2 のいずれにも区分できない。

そして、請求項 25-30 は、「表面の一部又は全部がリコンビナントゼラチンでコートされているリン酸カルシウム成形体を含む、移植用材料。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 3 に区分する。

(特別頁に続く)

(発明 4) 請求項 31-38

請求項 31-38 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 22 及び発明 3 に区分された請求項 25 と、「リン酸カルシウム成形体」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献 1 の開示内容（特に実施例 1 参照）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 31-38 と請求項 1, 22, 25 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 31-38 は請求項 1, 22, 25 のいずれの従属請求項でもない。また、請求項 31-38 は、発明 1~3 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項 31-38 は発明 1~3 のいずれにもに区分できない。

そして、請求項 31-38 は、「外部空間と連通している孔を有し、比重が 0.7 g/mL 以上であるか、および／又は水銀注入法による気孔率が 75% 以下であり、吸水浸透速度が、 0.05 mm/秒 以上である、リン酸カルシウム成形体」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 4 に区分する。