

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5024780号
(P5024780)

(45) 発行日 平成24年9月12日(2012.9.12)

(24) 登録日 平成24年6月29日(2012.6.29)

(51) Int.Cl. F 1
A 6 1 L 27/00 (2006.01) A 6 1 L 27/00 F

請求項の数 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2006-225545 (P2006-225545)	(73) 特許権者	301023238
(22) 出願日	平成18年8月22日(2006.8.22)		独立行政法人物質・材料研究機構
(65) 公開番号	特開2007-98117 (P2007-98117A)		茨城県つくば市千現一丁目2番地1
(43) 公開日	平成19年4月19日(2007.4.19)	(72) 発明者	生駒 俊之
審査請求日	平成21年8月11日(2009.8.11)		茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内
(31) 優先権主張番号	特願2005-263103 (P2005-263103)	(72) 発明者	柚木 俊二
(32) 優先日	平成17年9月9日(2005.9.9)		茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	菊池 正紀
			茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内
		(72) 発明者	田中 順三
			茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立行政法人物質・材料研究機構内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一方向性多孔質複合体の製造方法および一方向性多孔質複合体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維と緩衝液とを混合して混合物を形成する工程と、前記混合物に冷却板又は冷却棒を接触させ、前記冷却板又は冷却棒を接触させた面から混合物全体を冷却して、混合物内の氷結晶の成長サイズおよび成長方向を制御して前記混合物を凍結処理する工程と、前記混合物を凍結乾燥する工程と、を有することを特徴とする一方向性多孔質複合体の製造方法。

【請求項2】

水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維は、水酸アパタイトのc軸が繊維軸方向に配向されているものであることを特徴とする請求項1の製造方法。

【請求項3】

前記凍結処理において、前記混合物の底面又は側面に冷却板又は冷却棒を接触させ、前記底面又は側面から混合物全体を冷却して、前記混合物全体を凍結することを特徴とする請求項1または2の製造方法。

【請求項4】

前記凍結処理において、前記混合物の内部に冷却板又は冷却棒を挿入して、混合物の内部で冷却板又は冷却棒を接触させた面から混合物全体を冷却して、前記混合物全体を凍結することを特徴とする請求項1または2の製造方法。

【請求項5】

前記凍結乾燥後に、さらに真空下で加熱処理することを特徴とする請求項1から4いず

れかの製造方法。

【請求項 6】

前記凍結乾燥後に、化学架橋剤で処理することを特徴とする請求項 1 から 4 いずれかの製造方法。

【請求項 7】

水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維の凝集体であって、一方向に連通した気孔からなる多孔質を有し、気孔率 80% 以上であり、気孔横断面の短軸長さが 5 ~ 60 μm であることを特徴とする一方向性多孔質複合体。

【請求項 8】

水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維は、水酸アパタイトの c 軸が繊維軸方向に配向されているものであることを特徴とする請求項 7 の一方向性多孔質複合体。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は、一方向性多孔質複合体の製造方法および一方向に連通した気孔と弾性とを有する一方向性多孔質複合体に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、再生医療の分野では、損傷を受けた組織や器官に代わる種々の人工生体材料の研究開発が盛んに進められている。また、骨欠損部の治療においては、人工骨材や人工骨充填材等のインプラントが用いられる。このようなインプラントには生体骨に類似の機械的特性はもちろん、生体適合性や骨誘導性が求められる。この骨誘導性とは、生体適用後に徐々に吸収されて、骨再生サイクルに取り込まれ、自身の骨に置換していく性質のことをいう。

20

【0003】

脊椎動物の骨は、リン酸カルシウム的一种である水酸アパタイト（水酸アパタイト）と、タンパク質であるコラーゲンとからなる複合体である。これらは、生体骨中で水酸アパタイトが、その c 軸方向にコラーゲン繊維に沿って配向した特有の構造を形成し、この構造が骨に特有の機械的性質を与えていることが知られている。

30

【0004】

そこで、硬いが脆くインプラント後に崩壊をきたすという強度の問題や、使用時の操作性が悪い等の問題を有していた、既存のリン酸カルシウムを使用した多孔体人工骨に代わって、上記のような生体骨に類似の構造組成を有する、水酸アパタイトとコラーゲンからなる二元複合生体材料が提案され（たとえば、特許文献 1）、また、水酸アパタイト、コラーゲンおよびアルギン酸塩からなる三元複合生体材料も提案されている（たとえば、特許文献 2）。これら複合生体材料は、上記のとおり、水酸アパタイトとコラーゲン、あるいは、さらにアルギン酸塩を含んでおり、水酸アパタイトの c 軸がコラーゲン繊維に沿うように配向した微小多孔質構造を有するように製造することができるとしている。このような構成を有するため、この複合生体材料は、スポンジ状の弾力性を有し、従来の強度の問題や、使用時の操作性の問題を解消することはもちろん、生体適合性および骨誘導性にも優れた複合生体材料であるとされている。

40

【特許文献 1】WO 2003/035128 号公報

【特許文献 2】特開 2003-190271 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかしながら、従来の上記特許文献 1 および特許文献 2 のような複合生体材料は、球状の気孔が無秩序に存在しているため、強度が等方的であり、部位によっては周囲組織につぶされて変形するという強度の問題が依然として解消できないでいた。また、気孔の連通

50

性が少ないため、細胞や組織の侵入性が不十分な場合があった。さらに、このような問題を解決しようとする、たとえば、つなぎ材としてのコラーゲンを別途添加する工程や、ゲル化剤として、たとえば水酸化ナトリウムを添加する工程等が必要になる等、製造工程がさらに煩雑となり、手間とコストがかかるという問題があった。

【0006】

そこで、本願発明は、以上のとおりの背景から、従来の問題点を解決すべく、優れた強度や使用時の操作性、生体適合性および骨誘導性を備えているとともに、強度が異方的で変形の抑制効果を向上させ、細胞や組織の侵入性を向上させた一方向に連通した気孔と弾性を有する新しい一方向性多孔質複合体と、この一方向性多孔質複合体を簡単な工程で、しかも手間とコストを抑えて製造できる、新しい一方向性多孔質複合体の製造方法を提供することを課題としている。

10

【課題を解決するための手段】

【0007】

本願発明は、前記の課題を解決するものとして、第1には、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維と緩衝液とを混合して混合物を形成する工程と、前記混合物に冷却板又は冷却棒を接触させ、前記冷却板又は冷却棒を接触させた面から混合物全体を冷却して、混合物内の氷結晶の成長サイズおよび成長方向を制御して前記混合物を凍結処理する工程と、前記混合物を凍結乾燥する工程と、を有することを特徴とする。

【0008】

20

また、本願発明は、第2には、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維は、水酸アパタイトのc軸が繊維軸方向に配向されているものであることを特徴とし、第3には、前記混合物の底面又は側面に冷却板又は冷却棒を接触させ、前記底面又は側面から混合物全体を冷却して、前記混合物全体を凍結することを特徴とし、第4には、前記混合物の内部に冷却板又は冷却棒を挿入して、混合物の内部で冷却板又は冷却棒を接触させた面から混合物全体を冷却して、前記混合物全体を凍結することを特徴とし、第5には、前記凍結乾燥後に、さらに真空中で加熱処理することを特徴とし、第6には、前記凍結乾燥後に、化学架橋剤で処理することを特徴とする。

【0009】

30

さらに、第7には、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維の凝集体であって、一方向に連通した気孔からなる多孔質を有し、気孔率80%以上であり、気孔横断面の短軸長さが5~60 μ mであることを特徴とし、第8には、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維は、水酸アパタイトのc軸が繊維軸方向に配向されているものであることを特徴とする。

【発明の効果】

【0010】

本願第1から第6の発明によれば、優れた強度や使用時の操作性、生体適合性および骨誘導性を備えているとともに、強度が異方的で変形の抑制効果を向上させ、細胞や組織の侵入性を向上させた一方向性多孔質複合体を、簡単な工程で、しかも手間とコストを抑えて製造できる。

40

【0011】

第7、第8の発明によれば、優れた強度や使用時の操作性、生体適合性および骨誘導性を備えているとともに、強度が異方的で変形の抑制効果を向上させ、細胞や組織の侵入性を向上させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本願発明は、上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

50

【0013】

本願発明の一方方向性多孔質複合体の製造方法は、水酸アパタイトとコラーゲンを必須成分として含有している複合繊維である、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維（以下、HAp/Colとすることがある）と緩衝液とを混合し、均一になるまで十分に混練し、ペースト状にして、水酸アパタイト/コラーゲン複合物（以下、混合物とすることがある）とする。次に、このペースト状の前記混合物を、凍結処理するために凍結装置等の型に注入し、冷却を開始して完全に凍結させる。

【0014】

この凍結処理は、凍結することで前記混合物の構成成分を結晶化させ（すなわち氷結晶）この氷結晶の成長サイズ、および、成長方向を制御して行い、その後凍結乾燥することによって、一方方向に連通した気孔からなる多孔質を有するHAp/Colの凝集体である一方方向性多孔質複合体を製造する。

10

【0015】

前記凍結処理においては、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維と緩衝液との混合によって得られる混合物の任意の特定箇所（実際的には、この混合物が注入された容器の特定箇所）を冷却して、前記混合物全体を凍結することで、冷却した特定箇所（冷却面）から氷結晶が一方方向に成長して、凍結乾燥後に一方方向の連通性が高い気孔を有する多孔質複合体を、さらに効率よく得ることができる。この特定箇所は、底面や側面等、特に限定されない。さらには、前記混合物内（もしくは、混合物が注入された容器内）に冷却板や冷却棒を挿入し、これを冷却して前記混合物を凍結してもよい。

20

【0016】

「氷結晶の成長サイズ、および、成長方向を制御」について説明すると、具体的には、まず、「サイズ」については、冷却面の温度によって制御できる。たとえば、 -100 では気孔横断面の短軸長さが $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 、 -30 では気孔横断面の短軸長さが $30 \sim 60 \mu\text{m}$ とすることができ、次に、「方向」については、冷却面の設定によって制御できる。たとえば、前記混合物の底面（実際的には、混合物が注入されている容器の底面）のみを冷却すると、鉛直方向の一方方向性連通気孔が形成され、また、前記混合物の側面（実際的には、混合物が注入されている円筒容器の側面）の場合は、側面から中心に向かって収束する一方方向性連通気孔が形成される。

【0017】

このように一方方向性連通気孔を形成させることで、本願発明の一方方向性多孔質複合体の強度は、一方方向性連通気孔に対して平行な方向への圧縮強度が高いため、筋肉圧等によって潰れやすい方向に対して優先的に強度を付与することができる。また、組織再生については、従来の多孔質複合体が有する無秩序の球状気孔に比べ、一方方向に連通した気孔は骨組織や血管の積極的な再生を気孔方向に沿って速やかに生じさせることができ、また、再生速度は気孔のサイズを大きくすることで高めることができる。そして、気孔サイズが大きすぎると強度が悪化し、小さいと強度が高くなるが、組織誘導の効果が低くなることを考慮して、上記の氷結晶の成長サイズ、および、成長方向を制御して凍結処理を行うことで、気孔サイズを制御して、気孔サイズを適宜組み合わせることにより、骨欠損部の状態に応じて部位最適化された、本願発明の多孔質複合体からなる人工骨材等を作製することができる。

30

40

【0018】

なお、HAp/Colの混合比率について説明すると、吸着水の重量を除いた重量比で、 $90/10 \sim 60/40$ 、特に $85/15 \sim 70/30$ の範囲で設定することが好ましい。この「吸着水の重量を除いた重量比」とは、大気下の熱重量測定によって、昇温速度 20 /分において、室温（通常 25 ） ~ 200 の範囲の重量減少分を「吸着水」、 $200 \sim 600$ の範囲の重量減少を「コラーゲン」、残り分を「水酸アパタイト」として算出することを示す。

【0019】

このとき、HAp/Colは、たとえば、水酸アパタイトのc軸がコラーゲン繊維軸に

50

沿うように配向されている、生体骨に類似の微小多孔質構造を有する複合繊維体（たとえば、特開平11-199209号公報参照）であることが望ましく、これをさらに凍結乾燥して、粉末状にしたものを使用することが、緩衝液の混合が容易となり、さらに望ましい。このような複合繊維体は、たとえば、水酸化カルシウム溶液とコラーゲンを含むリン酸塩水溶液を反応容器中に同時滴下し、生じた沈澱物を乾燥することにより得ることができる。ここで、用いられるコラーゲンは、特に限定されないが、分子量が大きいとH A p / C o l 繊維合成時のコラーゲンの分散が悪くなるため、単分子なコラーゲンをを用いることが好ましい。特に、ペプシン処理したアテロコラーゲンはモノメリックであることに加え、抗原性が低いため、好ましい。

【0020】

水酸アパタイトは、一般組成を $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 、とする化合物であり、その反応の非化学量論性によって、 CaHPO_4 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、 $\text{CaP}_4\text{O}_{11}$ 、 $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 等、リン酸カルシウムと称される1群の化合物を含んでいる。また、水酸アパタイトは、 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ 、または $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の組成式で示される化合物を基本成分とするもので、Ca成分の一部分は、Sr、Ba、MG、Fe、Al、Y、La、Na、K、H等から選ばれる1種以上で置換されてもよい。また、 (PO_4) 成分の一部分が、 VO_4 、 BO_3 、 SO_4 、 CO_3 、 SiO_4 等から選ばれる1種以上で置換されてもよいし、さらに、 (OH) 成分の一部分が、F、Cl、O、 CO_3 等から選ばれる1種以上で置換されてもよい。また、これらの各成分の一部が欠失していてもよい。

【0021】

なお、水酸アパタイトは、通常の微結晶や非晶質、結晶体の他に、同型固溶体、置換型固溶体、侵入型固溶体であってもよく、非量子論的欠陥を含むものであってもよい。

【0022】

コラーゲンは、現在では20種類程度の分子種の異なるものが、哺乳動物に限らず、魚類を含む広範な動物の生体組織中に存在することが知られている。本願発明で用いられるコラーゲンは、その出発原料とする動物の種、組織部位、年齢等は特に限定されず、任意のものを用いることができるが、一般的には、哺乳動物（たとえば、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ネズミ等）や鳥類（たとえば、ニワトリ等）の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器等から得られるコラーゲンが用いられる。また、魚類（たとえば、タラ、ヒラメ、カレイ、サケ、マス、マグロ、サバ、タイ、イワシ、サメ等）の皮、骨、軟骨、ひれ、うろこ、臓器等から得られるコラーゲン様蛋白を出発原料として用いてもよい。さらには、上記のような動物組織からの抽出ではなく、遺伝子組換え技術によって人工的に得られたコラーゲンを

【0023】

本願発明で用いられるコラーゲンは特に限定されないが、たとえば、I型コラーゲン、コラーゲンタンパク質のアミノ酸残基を、アセチル化、コハク化、マレイル化、フタル化、ベンゾイル化、エステル化、アミド化、グアニジノ化等といった化学修飾したものを

【0024】

本願発明に用いられる緩衝液は、イオン種やイオン強度を制御した溶媒であり、たとえば、イオン種が、無機イオンであるリン酸緩衝液等、あるいは、有機イオンであるトリス緩衝液や酢酸緩衝液等、各種の緩衝液を使用することができる。また、イオン強度は、上記のとおりペースト状にした水酸アパタイト/コラーゲン複合物中の値として、0.01~0.5の範囲、特に0.02~0.2の範囲であることが好ましい。

【0025】

また、本願発明は、凍結乾燥における凍結温度を制御することで、多孔質複合体の気孔形状および気孔サイズを制御することができ、たとえば、気孔率を80%以上にする

【0026】

ことができる。この制御条件については、基本的には、上記の氷結晶の成長サイズ、および、成長方向を制御する条件に準じている。

さらに、この凍結乾燥後に、真空炉を使って減圧下で行う熱処理（真空熱処理）することで、脱水縮合を生じさせ、効率よく架橋を生成することができ、より弾性に富み、安定した多孔質複合体を製造することができる。真空熱処理の実施条件としては、コラーゲンにおける効率のよい架橋生成を考慮すると、温度は90～170の範囲、より好ましくは100～150の範囲であり、圧力（真空度）は気圧20Pa以下の減圧状態が好ましい。そして、処理時間は、温度によって変化する。具体的には、たとえば、処理温度が90～110の範囲の場合、処理時間は72～168時間が好ましく、処理温度が110～130の範囲の場合、処理時間は24～120時間が好ましく、また、処理温度が130～150の範囲の場合、処理時間は8～48時間以上が好ましく、さらに、処理温度が150～170の範囲の場合、処理時間は3～24時間が好ましい。そして、コ

10

【0027】

さらにまた、化学架橋剤を使用することによっても、上記の真空熱処理と同様に効率よくコラーゲンに架橋を導入させることができる。本願発明における化学架橋剤は、タンパク質を架橋でき、水溶性を有するものであれば特に限定されるものではない。このタンパク質の架橋剤については、たとえば、Biomaterials 18, p95～105 (1997)記載のものが使用でき、中でも、アルデヒド系、カルボジイミド系、エポキシド系およびイミダゾール系架橋剤が、経済性、安全性および操作性の観点から好ましい。さらに具体的には、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミド・スルホン酸塩等の水溶性カルボジイミドが、さらに好ましい。

20

【0028】

このような製造方法によって、水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維の凝集体であって、一方向に連通した気孔からなる多孔質を有することで、スポンジ様の弾性（粘弾性）を発揮することを特徴とした、優れた強度や使用時の操作性、生体適合性および骨誘導性を備えているとともに、変形の抑制効果を向上させ、細胞や組織の侵入性を向上させることができる多孔質複合体を、簡単な工程で、しかも手間とコストを抑えて製造することができる。さらに、このとき水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維は、水酸アパタイトのc軸が繊維軸方向に配向されているものであること、さらにまた、気孔率が80%以上とする

30

【0029】

そして、このような製造方法で製造された一方向性多孔質複合体は、生体骨類似体として、たとえば、骨欠損部の治療における人工骨材や人工骨充填材等のインプラントに活用することができる。

【0030】

以下に、実施例を例示しながら、さらに詳しく本願発明の一方向性多孔質複合体の製造方法および一方向に連通する気孔と弾性とを有する一方向性多孔質複合体について説明する。もちろん、以下の例によって本願発明が限定されることはない。

【実施例】

40

【0031】

実施例1：本願発明の一方向性多孔質複合体の試験例と、その比較例

1. 一方向性多孔質複合体の作製

(1) 水酸アパタイト/コラーゲン複合繊維体（HAp/Col：混合比率は、80/20）7gと、リン酸緩衝液（100mM, pH6.8）56mLとを混合し、均一になるまで十分に混練してペースト状とした。

(2) このペースト状の混合物を、凍結装置のペースト成形容器の型に注入し、容器底面から凍結冷却を開始して、前記ペーストを完全に凍結した。図1にこの凍結装置の構成例を例示した。この凍結装置1は、凍結乾燥機（AD2.0-EL-SC、バーチス社製）付属の冷却台2、冷却台2の温度を伝導する真鍮台3、HAp/Colからなるペースト

50

状混合物 4 を注入するシリコンからなる成形容器 5 (内径 60 mm × 高さ 20 mm) とから構成されている。そして、前記真鍮台 3 から冷却台 2 の温度が、真鍮台 3 上に設置されている成形容器 5 内のペースト状混合物 4 に伝導し、凍結させる。

(3) 凍結完了後、凍結乾燥を行った。

(4) そして、140℃、12時間の条件で、真空下で加熱処理(真空熱処理)を行い、脱水縮合を生じさせて、本願発明の一方向性多孔質複合体、すなわち、多孔質の H A p / C o l 複合体を作製した。

2. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

作製した一方向性多孔質複合体をカッターで、図 2 (A) における、矢印 A - A および矢印 B - B に示したように切断(カッティング)し、その切断面を白金コーティングした。そして、この切断面から気孔構造に確認を SEM で行った。

【0032】

結果は、図 3 (A) (B) に示したとおりであった。横断面図である A - A 断面図および縦断面図である B - B 断面図ともに、気孔が確認できた。特に、縦断面図である B - B 断面図に示したように、多孔質複合体における気孔は、図 2 (A) 中の矢印 C で示した冷却面からの冷却方向に沿って、一方向に気孔が連通していることが確認できた。

3. 圧縮強度試験

図 2 (B) に例示したように、作製した一方向性多孔質複合体から内径 10 mm、高さ 10 mm の円柱(または、内径 8 mm、高さ 8 mm)を、白矢印で示した気孔軸が高さ方向と平行および垂直になるように切り出した。この円柱を、リン酸緩衝液に浸漬し、減圧脱気した後、37℃で静置してインキュベーションした。

【0033】

24時間のインキュベーション後、テクスチャーアナライザーを用いてリン酸緩衝液に浸漬した状態で多孔質複合体の圧縮試験を行った。押し込み速度 0.1 mm/s で押し込み、圧縮歪み 2 ~ 8% の範囲の応力 - 歪み曲線の傾きから圧縮弾性率を求め、圧縮歪み 20% 時の応力を圧縮強度とした。

【0034】

結果を表 1 に示した。値は、4 サンプルの平均値 ± 標準偏差で表記した。多孔質複合体は高い圧縮弾性率と強度を示し、それらは気孔方向による異方性も示した。多孔質複合体中の連通気孔軸と同方向に対する弾性率と強度は、垂直方向に対するよりもそれぞれ 7 倍および 4 倍高かった。

【0035】

【表 1】

	圧縮強度 (kPa)		圧縮弾性率 (kPa)	
	平行	垂直	平行	垂直
実施例 1	33.2 ± 4.9	8.28 ± 0.76	279 ± 69	37.7 ± 4.6
実施例 2	44.5 ± 4.9	-	284 ± 37	-
実施例 3	85.3 ± 6.5	-	545 ± 105	-

実施例 2 : 化学架橋剤を使用した一方向性多孔質複合体の検証 I

上記実施例 1 で作製した一方向性多孔質複合体を、エタノールに浸漬後、減圧して脱泡し、室温で減圧乾燥した。内径 8 mm、高さ 8 mm の円柱を、気孔軸が高さ方向と平行になるように切り出した。実施例 1 と同様に P B S 中での圧縮試験を行った。

【0036】

結果は、上記表 1 に示したとおりであった。

実施例 3 : 化学架橋剤を使用した一方向性多孔質複合体の検証 I I

実施例 1 で作製した一方向性多孔質複合体を、50 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド・塩酸塩 (EDC) を含むエタノールに浸漬した。速やかに減圧して脱泡し、室温にて外液をマグネティックスターラーで 12 時間攪拌した。エタノールで繰り返し洗浄し、未反応 EDC および副生成物を除去した後、減圧乾燥した。実施例 2 と同様にサンプルを切り出し、PBS 中での圧縮試験を行った。

【0037】

結果は、上記の表 1 に示したとおりであった。

【0038】

すなわち、化学架橋剤 EDC をさらに用いたことで、本願発明の一方向性多孔質複合体の機械的強度を大幅に向上させることができることを確認できた。

10

実施例 4 : 動物実験用の一方向性多孔質複合体の作製

4-1. 動物実験用の一方向性多孔質複合体の作製

実施例 1 で作製した一方向性多孔質複合体を試料片 10 × 10 × 3 mm の大きさに切り出した。一方向性気孔は短辺方向に対して垂直になるよう成型した。25 kGy の線量にて線滅菌を行い動物実験用の一方向性多孔質複合体とした。

4-2. 動物実験用の比較用多孔質複合体の作製

比較用多孔質複合体として、従来作製されている凍結乾燥処理による無秩序な気孔構造を持った多孔質複合体 (無秩序多孔質複合体) を作製した。実施例 1 の (1) で作製したペーストを同様な型に流し込み、20 で全方位から凍結し、同じ条件で凍結乾燥と真空熱処理を行った。試料片は上記 4-1 と同様に 10 × 10 × 3 mm の大きさに切り出して、線滅菌処理を行った。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察により、気孔構造は従来報告されている無秩序な多孔構造を持っていることを確認した。

20

実施例 5 : 一方向性多孔質複合体の生体内における組織観察

ウイスターラット (10 週齢 ; 体重 280 - 320) の背部皮下の筋肉と皮膚との間に、上記 4-1 及び 4-2 において作製した一方向性多孔質複合体及び無秩序多孔質複合体を、それぞれ別個のウイスターラットに移植した。その際に気孔構造に関しては十分に配慮を行った。そして、移植して 2 週間後に真皮組織ごと摘出した。10%ホルムアルデヒドで固定し、アルコールにて脱水した後、キシレンで洗浄を行い、パラフィンワックスに埋め込んだ。これを厚さ 5 μm の薄片にして HE 染色を行い、光学顕微鏡で組織観察を行った。

30

【0039】

図 4 に、光学顕微鏡写真 (無秩序多孔質複合体 (a) (c)、一方向性多孔質複合体 (b) (d)) を示す。図 4 中の黒三角 () は侵入組織を示すものである。一方向性多孔質複合体 (a) 及び無秩序多孔質複合体 (b) はどちらも、明確な分解は生じていなかった。ここで、一方向性多孔質複合体 (a) では、制御した気孔に周囲組織からの線維芽細胞様細胞などの浸潤が認められ、材料内部までほぼ均一に組織が侵入していた。一方、無秩序多孔質複合体 (b) では、組織侵入は外側だけに観察され、材料内部の気孔内への組織侵入は観察されなかった。このことより、組織侵入において、一方向に連通させた気孔構造の方が無秩序な気孔構造の材料よりも優れており、本願発明の一方向性多孔質複合体は細胞・組織親友性が優れていることが示された。

40

実施例 6 : 一方向性多孔質複合体の生体内での血管新生に関する評価

上記 4-1 において作製した一方向性多孔質複合体に、200 μl の血管由来の各成長因子 (塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 0.25 μg/ml と 2.5 μg/ml、血管内皮増殖因子 (VEGF) 2.5 μg/ml) を別個に滴下した後、それぞれを実施例 5 と同様に別個のラット背部皮下に移植した。そして、移植 2 週間後に摘出を行い、実施例 5 と同様な処理を行い、光学顕微鏡で観察して、生体内での血管新生に関する評価を行った。ここで、血管新生量を定量化するため、抗 SMA 染色を用いて面積を計算した。また、比較例として、上記 4-2 において作製した無秩序多孔質複合体と、成長因子の代わりにリン酸緩衝液 (PBS) を添加した一方向性多孔質複合体を用いた。

50

【0040】

図5に、光学顕微鏡写真（無秩序多孔質複合体（a）、PBS添加（b）、FGF0.25 μg/ml添加（c）、FGF2.5 μg/ml添加（d）、VEGF2.5 μg/ml添加（e））を示す。無秩序多孔質複合体（a）では、血管新生が殆ど観察されなかった。また、PBS添加した一方向性多孔質複合体（b）では、無秩序多孔質複合体（a）と比較して血管新生が観測されたが、成長因子を用いた一方向性多孔質複合体（c）-（e）ほど多くは無かった。そして、FGF0.25 μg/ml添加（c）とFGF2.5 μg/ml添加（d）とVEGF2.5 μg/ml添加（e）を比較すると、FGF濃度を増加させると血管新生が多くなり（（c）<（d））、同じ濃度であればFGFよりもVEGFの方が血管新生を促進している（（d）<（e））ことが図5より明らかであるが、新生血管の面積計算からも統計学的に優位差があった。このことより、これら成長因子と一方向性多孔質構造の組み合わせることにより、一方向性多孔質複合体材料内部に血管新生を加速できることが示された。

10

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】本願発明の一方向性多孔質複合体を作製する際に使用した、凍結装置の一例を例示した模式図であり、（A）は側面図、（B）は平面図である。

【図2】本願発明の一方向性多孔質複合体の気孔構造を確認するため、試料の調製の様子を例示した模式図であり、（A）は多孔質複合体のカッティングの様子、（B）は気孔軸の方向を例示している。

20

【図3】本願発明の一方向性多孔質複合体の気孔構造を例示した図であり、（A）は図2のA-A断面図を本願発明の一方向性多孔質複合体の横断面図として、（B）図2のB-B断面図を本願発明の一方向性多孔質複合体の縦断面図として例示している。

【図4】ラットの背部皮下の筋肉と皮膚との間に、本願発明の一方向性多孔質複合体を移植して、2週間後に摘出して、HE染色した試料（（b）、（d））の光学顕微鏡写真である。比較として、従来の無秩序多孔質複合体を用いて、同様に移植、摘出、染色した試料（（a）、（c））の光学顕微鏡写真も示す。

【図5】ラットの背部皮下の筋肉と皮膚との間に、本願発明の一方向性多孔質複合体に血管由来の成長因子を添加した後に移植して、2週間後に摘出して、抗SMA染色した試料（FGF0.25 μg/ml添加（c）、FGF2.5 μg/ml添加（d）、VEGF2.5 μg/ml添加（e））の光学顕微鏡写真である。比較として、無秩序多孔質複合体（a）及びPBS添加した一方向性多孔質複合体（b）を用いて、同様に移植、摘出、染色した試料の光学顕微鏡写真も示す。

30

【符号の説明】

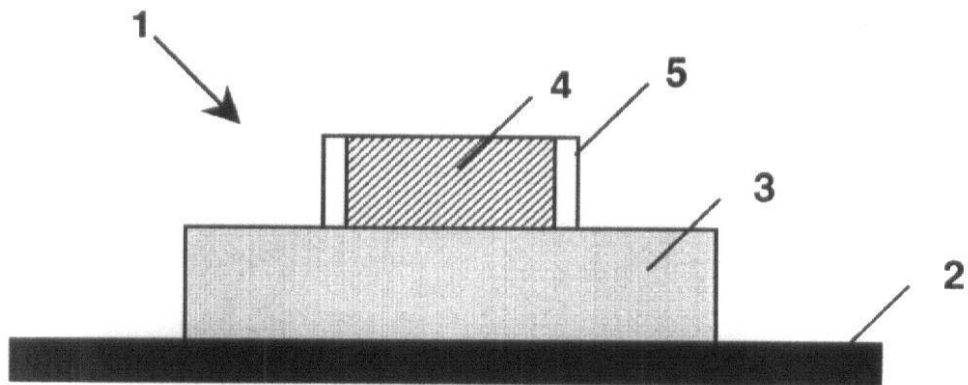
【0042】

- 1 凍結装置
- 2 冷却台
- 3 真鍮台
- 4 ペースト状混合物
- 5 成形容器

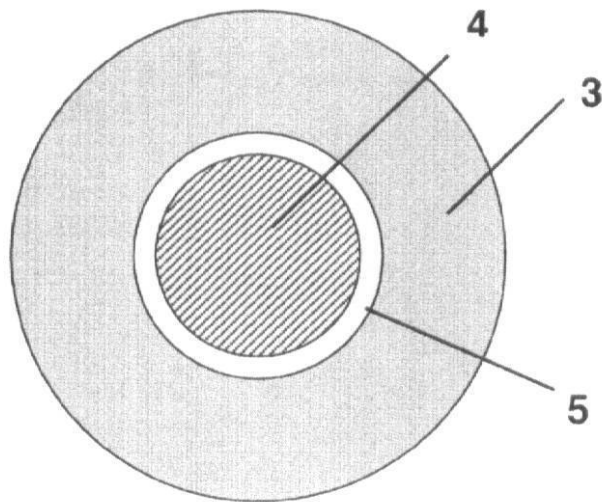
40

【図1】

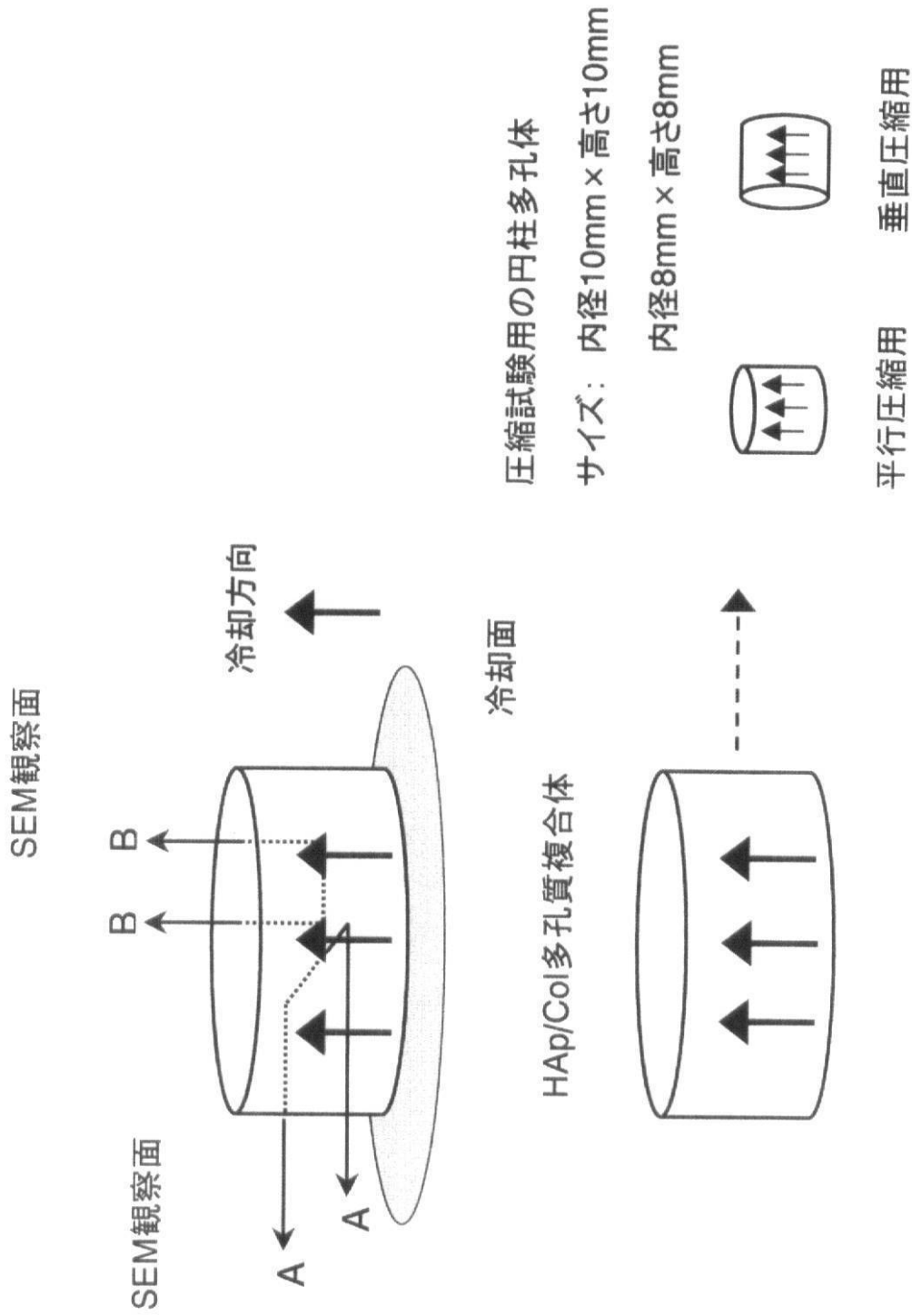
(A)



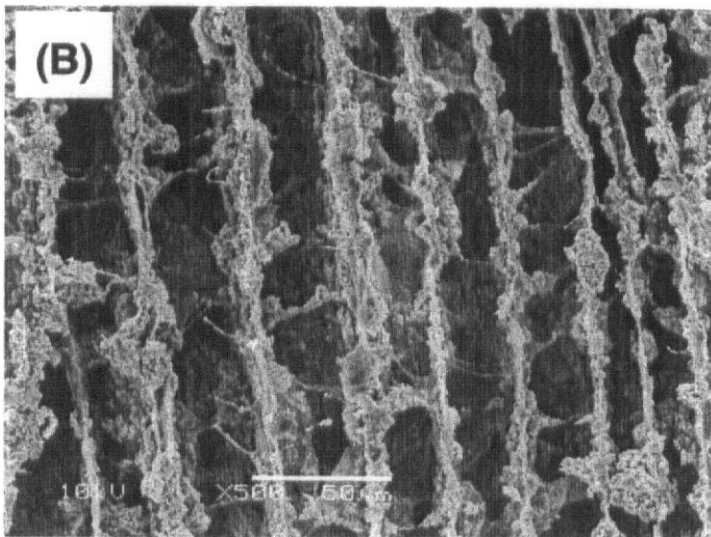
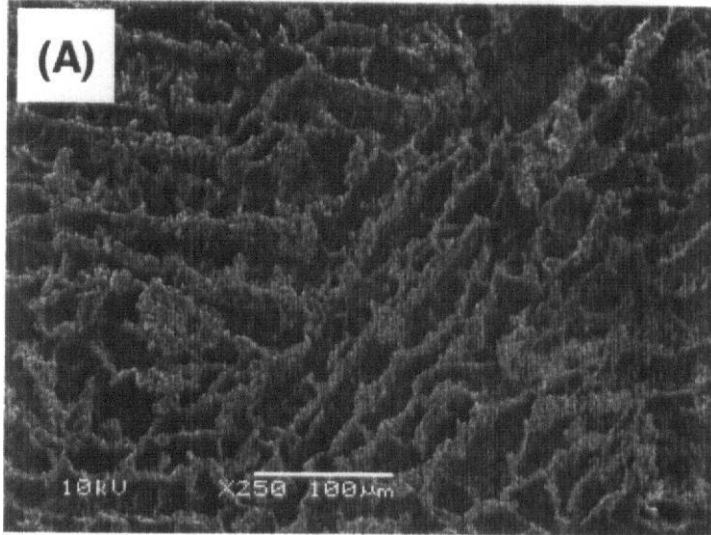
(B)



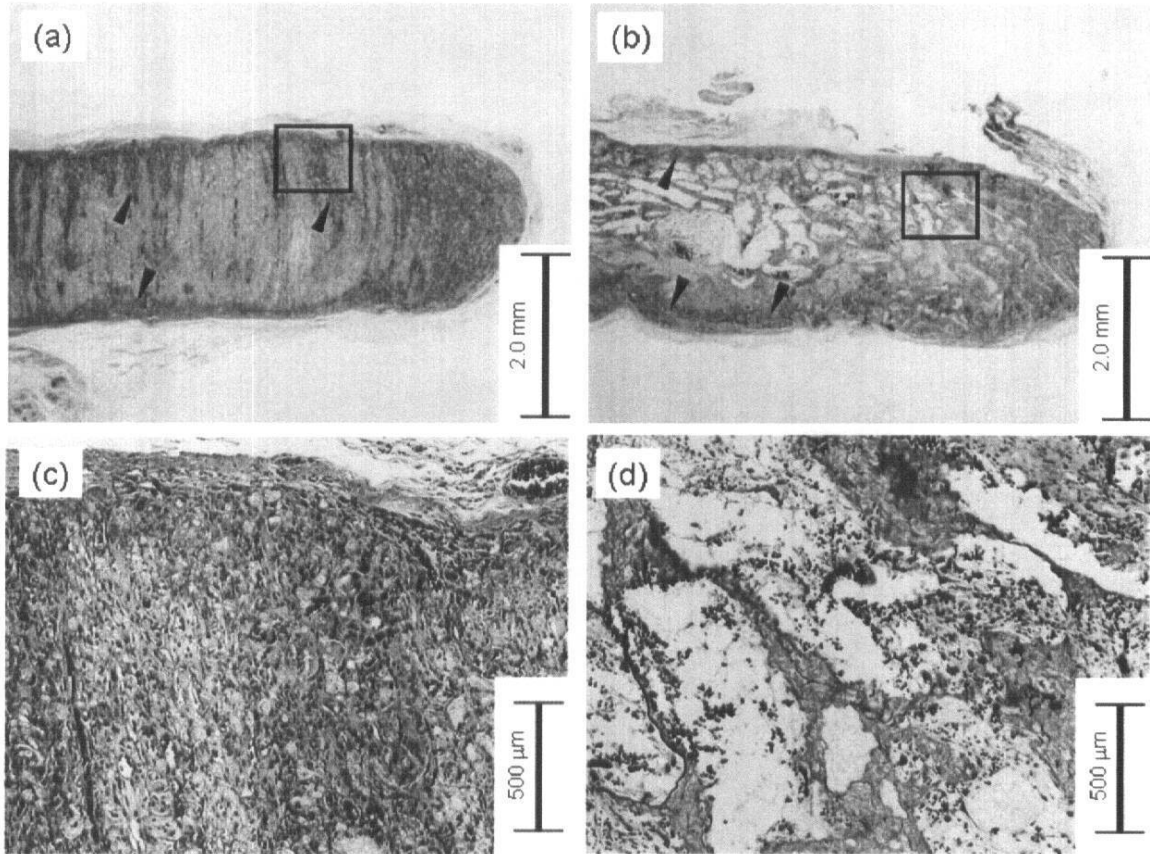
【 図 2 】



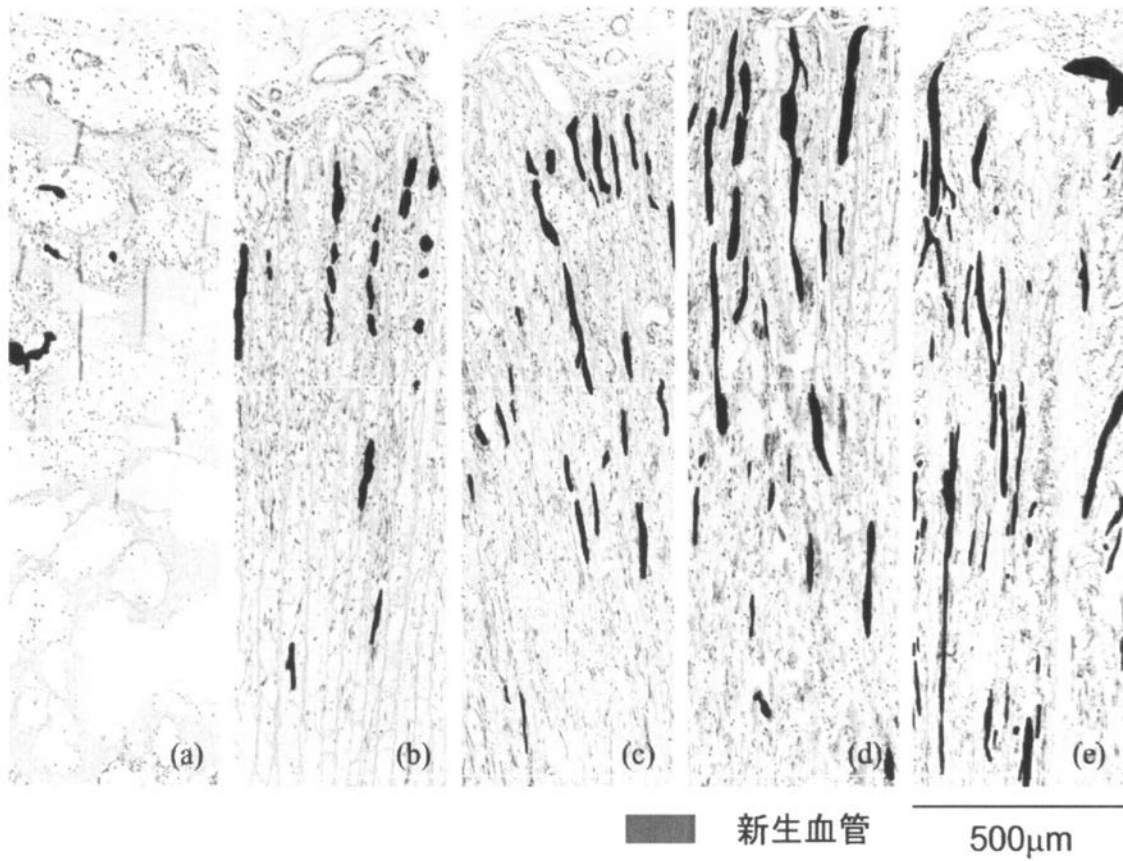
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開2002-248119(JP,A)
国際公開第03/092759(WO,A1)
国際公開第03/035128(WO,A1)
特開2003-169845(JP,A)
特開平07-088174(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61L 15/00-33/18