

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-157629

(P2012-157629A)

(43) 公開日 平成24年8月23日(2012.8.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00	4 C 0 8 1
	A 6 1 L 27/00	J

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2011-20856 (P2011-20856)</p> <p>(22) 出願日 平成23年2月2日(2011.2.2)</p>	<p>(71) 出願人 899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号</p> <p>(74) 代理人 110000084 特許業務法人アルガ特許事務所</p> <p>(74) 代理人 100068700 弁理士 有賀 三幸</p> <p>(74) 代理人 100077562 弁理士 高野 登志雄</p> <p>(74) 代理人 100096736 弁理士 中嶋 俊夫</p> <p>(74) 代理人 100117156 弁理士 村田 正樹</p> <p>(74) 代理人 100111028 弁理士 山本 博人</p>
---	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多孔質立体構造体及びその利用

(57) 【要約】

【課題】細胞培養条件である水分存在下でもその立体構造を保持し、かつ生体適合性のある、三次元細胞培養用足場材として有用な立体構造体を提供する。

【解決手段】コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、 - トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる2種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含有する組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトをコーティングしてなる多孔質立体構造体。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、 - トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる 2 種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトをコーティングしてなる多孔質立体構造体。

【請求項 2】

前記コラーゲン繊維で形成された立体構造体が、ハニカム構造を有するコラーゲンスポンジである請求項 1 記載の多孔質立体構造体。

10

【請求項 3】

前記水溶性セルロース誘導体が、ヒドロキシアルキルセルロースである請求項 1 又は 2 記載の多孔質立体構造体。

【請求項 4】

前記ヒドロキシアパタイトのコーティングが、前記コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、 - トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる 2 種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む粉体状組成物を塗布した後、水蒸気処理して当該表面上でヒドロキシアパタイトを形成させる手段である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の多孔質立体構造体。

20

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の多孔質立体構造体を有する三次元細胞培養用足場材。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の多孔質立体構造体を有する骨再生材料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、表面がヒドロキシアパタイトでコーティングされた多孔質立体構造体、これを有する三次元細胞培養用足場材及び骨再生材料に関する。

30

【背景技術】

【0002】

外科手術のうち骨切除を伴う手術において、あるいは歯根再生術においては、欠損部に補填材、充填材と称される構造体が必要になる。これらの充填材としては、 - トリカルシウムジホスフェート (- TCP)、 - リン酸 3 カルシウム (- TCP)、ヒドロキシアパタイトなどの骨組織親和性充填材が用いられている (非特許文献 1 ~ 3)。

【0003】

また、骨の再生医療においては、生体外で充填材や足場材に骨髄細胞や前駆細胞を付着させ、培養することにより三次元細胞培養した構造体を得、これを移植する手術も研究されている。このような三次元細胞培養における足場材としては、チタン、チタン合金、セラミックス等 (特許文献 1、2) の他、コラーゲン繊維が広く用いられている。このうち、コラーゲン繊維は、生体適合性の点で特に優れており、最も広く用いられている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】国際公開 WO 2006/090777 号公報

【特許文献 2】特開 2006 - 263459 号公報

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】深瀬康公 (1990) リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究 - 硬化

50

反応及び硬化物の圧縮強さと焼結処理 - . 日大歯学, 64, 190-203

【非特許文献2】Fukase Y, Eanes E D, Takagi S, Chow L C, Brown W E (1990) Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. J Dent Res, 69, 1852-1856

【非特許文献3】Fukase Y, Wada S, Uehara H, Terakado M, Sato H, Nishiyama M. (1998) Basic studies on hydroxy apatite cement I. setting reaction. J Nihon Univ Sch Dent, 40, 71-76

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、三次元細胞培養の足場材として広く用いられているコラーゲン繊維立体構造体は、水溶液に接触するとその立体構造が保持できず、結果として十分満足できる立体構造を保持した三次元細胞培養が可能でないという欠点がある。かかる欠点を克服するため、PET繊維補強コラーゲンスポンジ等が開発されているが、PETは生体適合性の点で問題があり、再生医療材料としては採用できない。

従って、本発明の課題は、細胞培養条件である水分存在下でもその立体構造を保持し、かつ生体適合性のある、三次元細胞培養用足場材として有用な立体構造体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

そこで本発明者は、生体適合性を有する材料を用いて、コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の強度を向上させるべく種々検討したところ、コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、-トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる2種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトをコーティングすれば、得られる多孔質立体構造体は水分存在下及び細胞培養条件下においてもその構造を保持し、細胞の増殖や分化が良好であり、かつコーティング材料が基本的にヒドロキシアパタイトであるため、生体適合性も良好であり、三次元細胞培養足場材、骨再生材料として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、-トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる2種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトをコーティングしてなる多孔質立体構造体を提供するものである。

また、本発明は、上記多孔質立体構造体を有する三次元細胞培養用足場材及び骨再生材料を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明の多孔質立体構造体は、細胞培養条件及び生体の水分条件においてもその立体構造を保持するため、細胞が多孔質立体構造体に緻密に付着し、細胞増殖、細胞分化効率も良好となる。また、その表面がヒドロキシアパタイトでコーティングされているため、骨再生用充填材として十分な強度を有するとともに、生体適合性も良好である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】水を含んだコラーゲンスポンジの状態を示す写真である。(多孔性の形状及び円柱状の構造は失われ、水の表面張力によって形状が萎縮している)

【図2】水を含んだヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジの状態を示す写真である。(多孔性の形状と全体の円柱状の構造をともに維持している)

10

20

30

40

50

【図3】本発明多孔質立体構造体表面に骨芽細胞が生成している状態を示すSEM像である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の多孔質立体構造体は、(A)コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体の表面に、(B) -トリカルシウムジホスフェート、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート及びテトラカルシウムジホスフェートから選ばれる2種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトがコーティングしてなるものである。

【0012】

(A)コラーゲン繊維で形成された多孔質立体構造体としては、コラーゲン繊維により空隙率20~97%の多孔質立体構造体が形成されているものが挙げられ、より好ましくは、比表面積500~10,000cm²/g、単位体積当りの重量5~80mg/mLであり、ポアサイズ10~800μmの立体構造体である。さらに好ましくは、スポンジ状でポア(孔)が蜂の巣状に一定方向に密に並んだ構造(ハニカム構造)を有するもの(コラーゲンスポンジ)が挙げられる。

【0013】

本発明多孔質立体構造体には、その表面に、前記特定組成物を水和反応させて得られるヒドロキシアパタイトがコーティングされている。通常のヒドロキシアパタイトは、水酸化リン酸カルシウムであり、固体状であるから、前記コラーゲン立体構造体の表面に均一にコーティングすることはできない。そこで、本発明者は、特定の2種以上のリン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物(以下、コーティング用組成物ともいう)が、水和反応により容易に硬化し、ヒドロキシアパタイトを生成することを見出し、これをコラーゲン立体構造体表面のコーティングに応用することに成功した。

【0014】

本発明におけるコーティング用組成物においては、 -トリカルシウムジホスフェート(-TDP)、カルシウムモノヒドロゲンホスフェート(DCPA)及びテトラカルシウムジホスフェート(TTCP)から選ばれる2種以上のリン酸カルシウム化合物を使用する必要がある。これらのうちの1種だけを用いても水和反応により容易に硬化させることはできない。より好ましい組み合わせは、 -TCPとDCPA、 -TCPとTTCP、又は -TCPとDCPAとTTCPであり、 -TCPとDCPAとTTCPの3種の組み合わせ(-DTC)が最も好ましい。これらの2種又は3種のリン酸カルシウム化合物の使用モル比は、 -TCP 1モルに対し、DCPAが0.5~2モル、TTCPが0.5~2モルであるのが好ましい。

【0015】

コーティング用組成物に用いられる水溶性セルロース誘導体は、前記リン酸カルシウム化合物と水の混合物に対して適度な粘性を与え、リン酸カルシウム化合物の流出を防止し、所望の形状にし、また多孔質立体構造体表面への付着性を付与するうえで重要である。水溶性セルロース誘導体としては、水溶性であり、かつ増粘性を有するセルロース誘導体であればよく、例えばセルロースエーテルが挙げられる。セルロースエーテルの例としては、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等のヒドロキシアシルセルロース；ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース等のヒドロキシアシルアルキルセルロース等が挙げられる。このうち、ヒドロキシアシルセルロースが好ましく、特にヒドロキシプロピルセルロースが好ましい。水溶性セルロース誘導体の使用量は、前記リン酸カルシウム化合物1質量部に対し、0.001~0.50質量部、さらに0.005~0.50質量部が好ましい。

【0016】

前記リン酸カルシウム化合物と水溶性セルロース誘導体を含む組成物の水和反応(ヒドロキシアパタイト形成反応)は、例えばリン酸カルシウム化合物1質量部に対して、

10

20

30

40

50

0.001～1質量部の水（又は、生体内においては体液も可）を加えて、養生すればよい。ここで養生条件は、所望の硬化時間により相違し、生体内で用いることを前提とした場合、例えば30～40、24時間程度が好ましい。

【0017】

本発明においては、前記コーティング組成物を、コラーゲン多孔質立体構造体の表面に均一にかつ薄くコーティングするため、コラーゲン多孔質立体構造体の表面に、前記粉体状のコーティング組成物を塗布した後、水蒸気処理することによって、当該表面上でヒドロキシアパタイトを形成させる手段により、コーティングするのが好ましい。ここで粉体状のコーティング組成物は、コラーゲン多孔質立体構造体1質量部に対し、0.1～1質量部使用するのが好ましい。水蒸気処理は、例えばコラーゲン多孔質立体構造体の表面全体に水蒸気が接触する条件で行えばよく、水分量としてコラーゲン多孔質立体構造体1質量部あたり、0.01～0.1質量部で、条件は例えば、30～40、10分程度、さらに水溶液として浸漬する場合0.1～10質量部で、条件は例えば、30～40、10分程度行えばよい。また、塗布及び水蒸気処理は、振動条件下行うのが好ましい。振動条件としては、50～60KHz、1～5分が好ましい。その後の養生条件として、30～40、24時間程度の環境が望ましい。

10

【0018】

得られる本発明の多孔質立体構造体中の前記コーティング組成物の含有量は、0.01～0.1質量%、さらに0.1～10質量%であるのが、強度保持、細胞の増殖効率、空隙率の確保の点で好ましい。

20

【0019】

本発明の多孔質立体構造は、コラーゲン多孔質立体構造体の表面、すなわち多孔質立体構造体の孔の中の表面も含めた表面全体に、前記コーティング組成物が略均一にコーティングしており、細胞培養条件や被移植組織等の水分が存在する条件下でも、その立体構造を保持し、かつ取り扱い性も良好である。また、本発明の多孔質立体構造体に含まれる成分は、すべて天然由来成分であることから生体適合性も高く、安全である。従って、本発明の多孔質立体構造体は、三次元細胞培養用足場材、骨再生材料として有用である。

【0020】

本発明の多孔質立体構造体を用いて三次元細胞培養を行うには、本発明の足場材を用いて、骨芽細胞、骨細胞、幹細胞、繊維芽細胞等を常法により培養すればよい。このとき、必要に応じて、増殖因子、分化因子等を添加して培養することができる。培養条件は、30～40で行うことができる。

30

【0021】

また、本発明の多孔質立体構造体は、その表面にヒドロキシアパタイトを有するので、そのまま骨再生材料として使用することもできる。さらに、前記のように三次元細胞培養を行った構造体を骨再生材料を含む、再生医療材料として使用することもできる。骨再生材料として使用する場合には、手術時の骨欠損部に充填する充填材として使用するのが好ましい。

【実施例】

【0022】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

40

【0023】

実施例1

(1) コラーゲンスポンジに対して十分量の -DTC (-TCP と DCPA と TTC P の等モル混合) 粉末 (コラーゲンスポンジ1質量部に対して -DTC 10質量部以上) を10mL試験管中に入れ、この中に八ニカム構造コラーゲンスポンジを入れる。この試験管を歯科用パイプレーターにて振動を約1分間かける。次に、この中から八ニカム構造コラーゲンスポンジを取り出し、何も入っていない10mL試験管中に入れ、さらに1分間振動を加える。その後、再び最初の -DTC の試験管に戻し、同様に1分間振動を

50

加えた後、空の試験管に入れ、1分間振動を加える操作を5回程度繰り返し、最初のハニカム構造スポンジ1質量部に対してコーティング後の質量が1.1~2になるように操作を繰り返す。

養生は、100%相対湿度、38℃の試験管中で24時間行い、-DTCをハニカム構造コラーゲンスポンジ表面に硬化させた。

【0024】

(2) -DTCコーティングされたコラーゲンスポンジを瑪瑙製乳鉢にて微粉末化し、これを粉末X線回折装置によってX線回折による同定を行った。ヒドロキシアパタイトが生成されている場合、例えばターゲットCuK α ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$)を使用して粉末X線回折を行うと、反応前の-DTCに対して反応(養生)後-DTCの $2\theta = 25.9^\circ$ のピークが極めて顕著に認められることによって確認が取れる(非特許文献1、2、3)。

10

【0025】

実施例2

(ヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジと、通常のコラーゲンスポンジの水の存在下での形状維持の比較)

未処理のハニカム構造コラーゲンスポンジは、水の滴下によってその多孔性の構造を失い萎縮してしまう(図1)のに対して、ヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジは、ハニカム構造の多孔性を保ち、しかも開孔方向に対して自重の1~100倍程度の垂直加重に耐えるだけの強度を有している(図2)。

20

【0026】

実施例3

(得られた構造体における細胞培養)

本ヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジを線維芽細胞の播種された培養液中に浸漬した。24時間経過後、ヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジを取り出し、アルコール置換法によって細胞を乾燥・固定し、SEMにて観察を行った。この結果、コラーゲンスポンジ壁に進展した骨芽細胞が認められた。すなわち、培養液中の線維芽細胞がヒドロキシアパタイトコーティングされたコラーゲンスポンジ中に侵入し、スポンジ壁面に活着して伸展したと考えられ、組織親和性が良好であることが確認された(図3)。

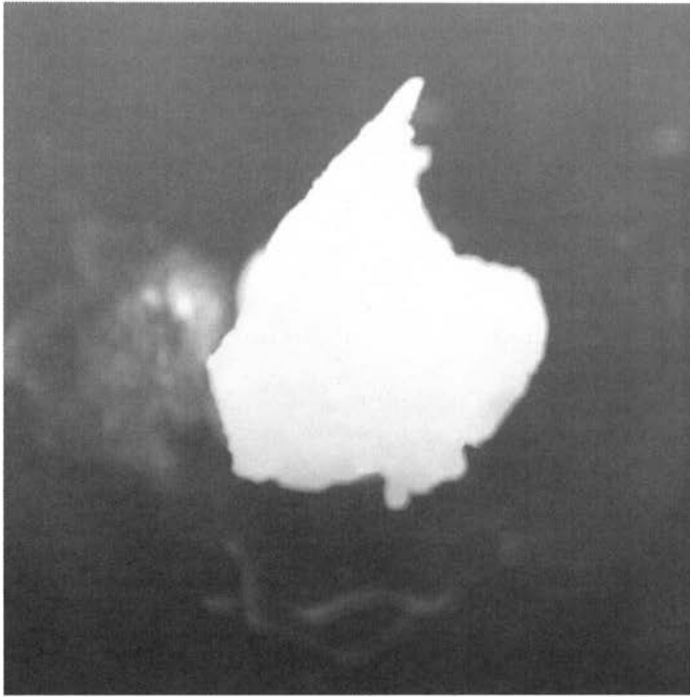
30

【産業上の利用可能性】

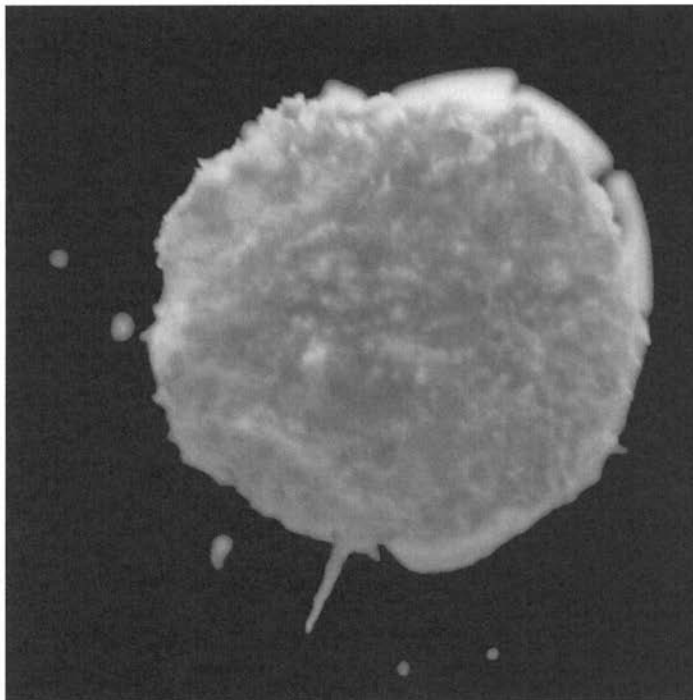
【0027】

本発明の多孔質構造体は、細胞培養足場材及び骨再生材料として有用である。例えば骨欠損部分の容積の補填及び骨増殖の促進、抜歯窩への填入による骨梁の回復、歯周骨吸収部分への補填、歯周外科的処置との併用による硬組織及び軟組織の容積の回復処置等にも臨床応用できる。

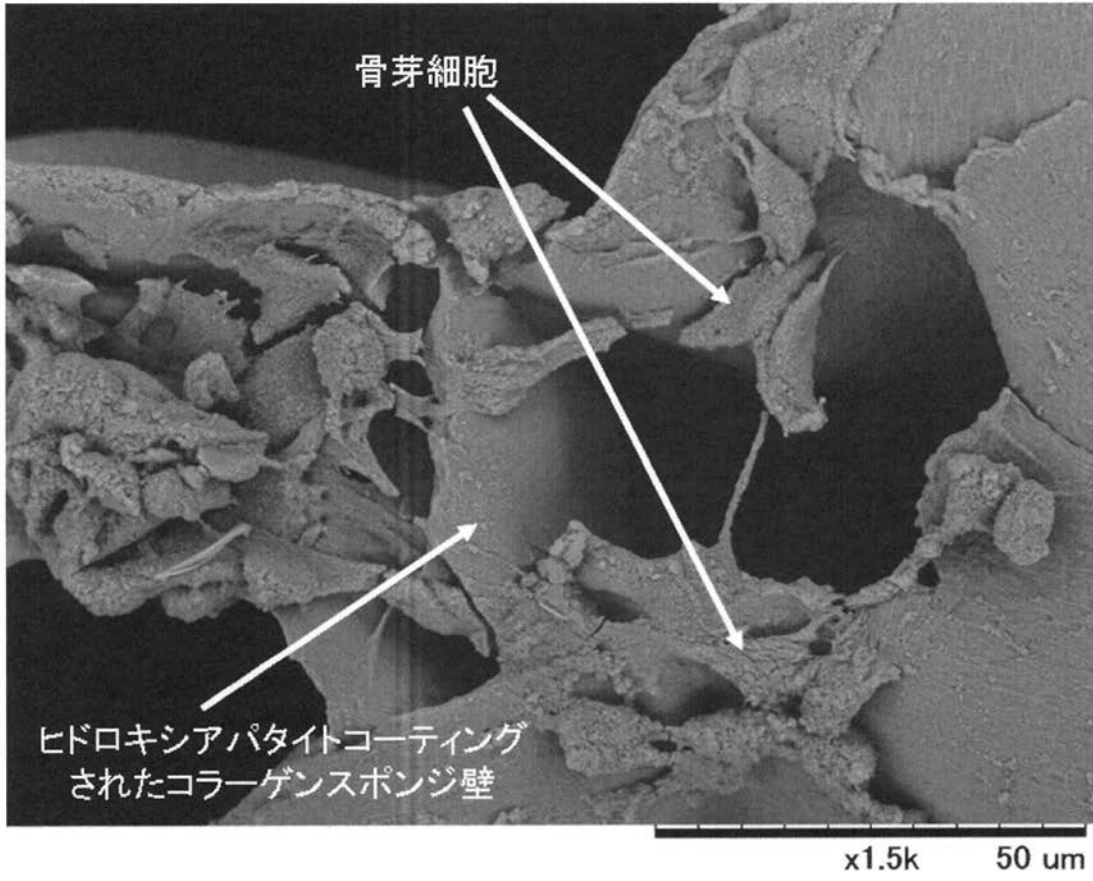
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(72)発明者 深瀬 康公

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4C081 AB01 AB04 BA12 BA13 CD021 CD121 CF032 DA01 DB03 EA02
EA03 EA05 EA06