

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/203738

発行日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)

(43) 国際公開日 平成26年12月24日 (2014. 12. 24)

(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 K	4 C 0 7 6
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	4 C 0 8 1
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 33/08 (2006.01)	A 6 1 K 33/08	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

出願番号 特願2015-522740 (P2015-522740)	(71) 出願人 504139662 国立大学法人名古屋大学 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/064920	
(22) 国際出願日 平成26年6月5日 (2014. 6. 5)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-128021 (P2013-128021)	(74) 代理人 100167689 弁理士 松本 征二
(32) 優先日 平成25年6月18日 (2013. 6. 18)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 西田 佳弘 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
	(72) 発明者 生田 国大 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内
	(72) 発明者 本多 裕之 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大 学法人名古屋大学内

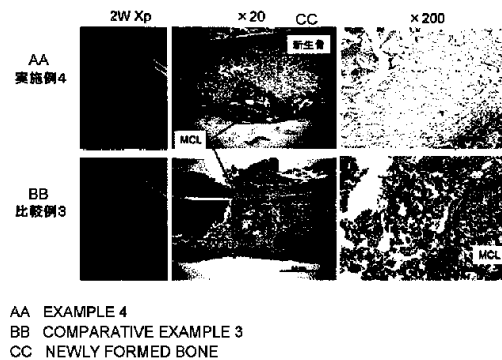
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨新生用組成物及び骨新生システム

(57) 【要約】

骨治療箇所に充填しても、骨髄液等の流れにより充填箇所から流出することなく、且つ骨治療箇所において骨の新生を促進することができる、骨新生用組成物及び骨新生システムを提供する。

外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子及び該微粒子のキャリアを含む骨新生用組成物を用いることで、骨治療箇所において骨の新生を促進することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子及び該微粒子のキャリアを含むことを特徴とする骨新生用組成物。

【請求項 2】

前記キャリアが、ゲル、人工骨、骨セメントから選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 1 に記載の骨新生用組成物。

【請求項 3】

前記材料が、マグネタイト、マグヘマイトから選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の骨新生用組成物。

【請求項 4】

前記微粒子が、リポソームで被覆されていることを特徴とする請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の骨新生用組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の骨新生用組成物及び該骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させるための外部信号を発生する外部信号発生装置を含むことを特徴とする骨新生システム。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、骨折・骨折後の遷延治癒・骨欠損・骨転移等、治療が必要な箇所の骨（以下、「骨治療箇所」と記載することがある。）の新生に好適な骨新生用組成物及び骨新生用組成物を用いた骨新生システムに関するものである。

【背景技術】**【0002】**

骨は元来、柔軟性・弾力性・可塑性を持ち、健康な骨は骨折しにくいのが、限界を超える強い外力や反復した外力が加わると骨折する。また、骨に腫瘍などの病変が存在する場合は、病変部分の強度が軽減するため、軽微な外力でも骨折に至る場合がある。特に、高齢化社会に伴い、近年、骨粗鬆症および骨脆弱性骨折が増加している。

【0003】

骨折箇所の治療方法としては、外科的手術により、金属製のプレートを骨折部位にあて、螺子でプレートを骨に固定するロッキングプレート法、又は骨の中心部にある髓腔に骨端から金属製の長いロッド（棒）を打ち込み、ロッドを螺子で固定する髓内釘固定法が一般的に用いられている。

【0004】

その他の外科的手術としては、骨折で損傷、骨折の遷延治癒部、又は腫瘍等の病変を除去した後の骨欠損部に相当する骨をボーン・バンクから選択して移植する他家骨移植、自身の損傷した骨を体外に一度取り出し、放射線・熱処理等で処理した後、体内に戻す自家処理骨移植、自身の別の部位から骨を移植する自家骨移植、ハイドロキシアパタイト等による人工骨移植が知られている。

【0005】

また、上記の外科的手術以外には、フィブリンシート、コラーゲンシート、又はポリ乳酸、ポリグリコール酸の単独重合体若しくは共重合体から選択された 1 種からなる生体吸収性材料で骨セメントを包囲して充填することで、骨セメントが充填箇所から骨外に漏洩して血管内に流入することを防止しながら骨折箇所を強化する方法が知られている（特許文献 1 参照）。

【0006】

骨の新生には、「骨誘導能」、「骨伝導能」及び「細胞」が必要である。しかしながら、上記の金属プレート、他家骨又は骨芽細胞までも死滅処理してしまう自家骨を移植する方法は、骨折箇所を力学的に支えているに過ぎず、骨の新生を積極的に促進するものでは

10

20

30

40

50

ないという問題がある。また、骨セメントを生体吸収性材料で包囲して充填する方法も、骨セメントが充填箇所から骨外に漏洩することを防止することが目的で、積極的に骨を新生するものではない。更に、ハイドロキシアパタイト等の人工骨移植についても、人工骨は上記の骨伝導能を有すると考えられているが、骨芽細胞などに働きかけて積極的に骨を誘導するものではない。

【0007】

一方、骨治療箇所において、骨の新生を積極的に促進する方法としては、培養した骨芽細胞を移植する方法、骨形成タンパク質（BMP）を含む骨新生材料を移植する方法（特許文献2参照）等が知られている。しかしながら、上記の方法は、骨新生用の細胞やタンパク質等の生体材料を準備する必要があり、時間とコストがかかるという問題がある。

10

【0008】

また、上記の骨芽細胞や骨新生材料を移植する方法以外に、超音波振動を与えることで新しい骨組織の形成を促進するようにした超音波治療器（特許文献3参照）が知られている。しかしながら、上記の超音波振動を与える方法は、体外の超音波治療装置から超音波を照射するもので、骨治療箇所のみ超音波を照射することは困難で、他の生体組織に悪影響を与える恐れがあるという問題がある。

【0009】

骨治療箇所における骨の新生に関しては、（1）骨治療箇所の温度上昇が新生骨の形成に密接に関連すること（非特許文献1参照）、（2）骨髄幹細胞を加温すると、通常よりも早期に有意なアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の上昇及び石灰沈着が増強すること（非特許文献2参照）、（3）骨芽細胞形成や活性の制御に特に重要で、骨の増加や維持を調整する中心的な経路であるWnt/catenin signalは、43.7～47.5の温度で活性化すること（非特許文献3参照）、が知られている。しかしながら、上記非特許文献はin vitroの実験による結果である。したがって、骨治療箇所における骨の新生に関しては、生体の正常細胞に影響を与えることなく、骨治療箇所のみを温熱する必要があるが、当該方法は知られていない。

20

【0010】

ところで、生体内の正常な細胞には影響を与えず特定の腫瘍領域のみを温熱する方法として、抗体を結合した磁性微粒子を含むリポソームを特定の腫瘍領域に結合させ、交番電場（AMF）で発熱させる方法が知られている（特許文献4参照）。しかしながら、当該方法は、腫瘍細胞に特異的に結合する抗体を準備するための煩雑な手順が必要であり、且つ、抗体を結合した磁性微粒子を含むリポソームを骨治療箇所に充填しても、骨内の骨髄液及び/又は血液等の流れにより、抗体を結合した磁性微粒子を含むリポソームを骨治療箇所に留めておくことが困難である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2000-262609号公報

【特許文献2】特開2012-16517号公報

【特許文献3】特開2008-295548号公報

【特許文献4】特開2006-273740号公報

40

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Doyle JR et al., "Stimulation of bone growth by short-wave diathermy", J Bone Joint Surg - Am 1963, Vol. 45, No. 1, p15, p15-24

【非特許文献2】Jing Chen et al., "Enhanced Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells by Periodic Heat Shock in Self-Assembling

50

g Peptide Hydrogel”, Tissue Engineering Part A, 2013, Vol. 19, No. 5 and 6, p716 - 728

【非特許文献3】Olkku et al., “Ultrasound-induced activation of Wnt signaling in human MG-63 osteoblastic cells”, Bone, 2010, Vol. 47, No. 2, p320 - 330

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明は、上記従来の問題を解決するためになされた発明であり、鋭意研究を行ったところ、外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子（以下、「外部信号により発熱することができる材料」を「発熱材料」と記載し、「外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子」を「微粒子」と記載することもある。）をキャリアと共に骨治療箇所に充填することで、骨髓液等の流れにより微粒子が充填箇所から流出することを減少することができ、そして、前記微粒子に外部信号を付与することで発生する温熱効果により、骨治療箇所において骨の新生を促進できることを新たに見出し、本発明を完成した。

10

【0014】

すなわち、本発明の目的は、骨新生用組成物及び骨新生システムを提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、以下に示す、骨新生用組成物及び骨新生システムに関する。

【0016】

(1) 外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子及び該微粒子のキャリアを含むことを特徴とする骨新生用組成物。

(2) 前記キャリアが、ゲル、人工骨、骨セメントから選択される少なくとも1種であることを特徴とする上記(1)に記載の骨新生用組成物。

(3) 前記材料が、マグネタイト、マグヘマイトから選択される少なくとも1種であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載の骨新生用組成物。

30

(4) 前記微粒子が、リポソームで被覆されていることを特徴とする上記(1)～(3)の何れか一に記載の骨新生用組成物。

(5) 上記(1)～(4)の何れか一に記載の骨新生用組成物及び該骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させるための外部信号を発生する外部信号発生装置を含むことを特徴とする骨新生システム。

【発明の効果】

【0017】

微粒子をキャリアと共に骨治療箇所に充填することで、微粒子が骨髓液等の流れにより骨治療箇所から流出することを減少することができる。したがって、微粒子を充填した骨治療箇所のみで温熱効果を与えることができるので、他の生体組織に負荷を与えることなく、骨の新生を促進することができる。

40

また、微粒子をキャリアと共に充填するため、微粒子に抗体等を吸着させる必要が無く、簡易な方法により微粒子を作製することができる。

更に、キャリアとして人工骨を用いると、微粒子の温熱効果による新生骨の発生促進に加え、人工骨による骨の新生を促進することもできる。

本発明の発熱材料は外部信号により発熱することから、発熱材料を調整及び/又は外部信号を調整することで、微粒子の温度、発熱時間等を調整することができる。したがって、症状に応じて温熱効果の程度を調整することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

50

【図 1】図 1 は、本発明の骨新生用組成物をラットの脛骨近位内側に充填する手順を示している。

【図 2】図 2 は、図面代用写真で、本発明の骨新生用組成物を骨孔に充填後、加温した場合と加温しない場合の 0、2、4、6 週間後の骨のレントゲン写真である。

【図 3】図 3 は、図面代用写真で、画像評価による骨硬化度を測定するためのレントゲン写真である。

【図 4】図 4 は、実施例 3 及び比較例 2 で撮影したレントゲン写真の画像評価による骨硬化度測定の結果を示すグラフである。

【図 5】図 5 は、図面代用写真で、実施例 4 及び比較例 3 において、骨新生用組成物を充填した部分のラットの骨の組織断面写真である。

【図 6】図 6 は、図面代用写真で、図 6 (1) はリジェノスの断面の拡大写真、図 6 (2) は、実施例 5 で作製した骨新生用組成物の写真である。

【図 7】図 7 は、図面代用写真で、実施例 6 ~ 8 及び比較例 5 のレントゲン写真を示す。

【図 8】図 8 は、実施例 9 及び比較例 6 で撮影したレントゲン写真の画像評価による骨硬化度測定の結果を示すグラフである。

【図 9】図 9 は、図面代用写真で、実施例 10 ~ 12 及び比較例 7 で撮影した骨の断面を 20 倍に拡大した写真である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下に、本発明の骨新生用組成物及び骨新生システムについて詳しく説明する。

【0020】

先ず、本発明の骨新生用組成物は、外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子及び該微粒子のキャリアを含んでいる。本発明における「外部信号」とは、材料に当該外部信号を付与することで材料を発熱することができるものを意味し、例えば、磁場、電場、超音波、光等が挙げられる。

【0021】

また、本発明における「外部信号により発熱することができる材料」とは、前記「外部信号」を付与することで、自身が発熱することができる材料を意味する。発熱材料は、外部信号により発熱できるものであれば特に制限は無いが、昇温速度が早く、かつ発熱においても安定であり、生体内への影響がない、あるいは実質的に影響が少ない材料であることが好ましい。その観点からは、金、銀、白金、パラジウム、イリジウム、アルミニウム、銅、ニッケル、鉄、マグネシウム、チタン、ジルコニウム、または、これら金属を 2 種あるいはそれ以上含有する合金、さらにはこれらの誘導体などを挙げることができる。なお、かかる誘導体には金属化合物も含まれる。前記発熱材料を含む微粒子の例としては、上記の金属、合金及びこれらの誘導体の少なくとも 1 種を含む微粒子が例示できる。

【0022】

更に、微粒子としては、例えば、金属分が 70 重量%以上であり、この金属分の 80 重量%以上が Fe である鉄を主体とした磁性微粒子が挙げられる。かかる磁性微粒子の具体例としては、例えば Fe - Co、Fe - Ni、Fe - Al、Fe - Ni - Al、Fe - Co - Ni、Fe - Ni - Al - Zn、Fe - Al - Si などの合金または金属化合物からなる磁性微粒子を挙げることができる。また、 FeO_x ($4/3 < x < 3/2$) で表わされる酸化鉄系の強磁性微粒子； FeO_x に Cr、Mn、Co、Ni などの二価の金属が添加された酸化鉄微粒子、 FeO_x に Co 被着させた Co 被着 FeO_x 微粒子；二酸化クロムまたは二酸化クロムに、Na、K、Fe、Mn などの金属、あるいはこれら金属の酸化物が添加された酸化物微粒子も挙げられる。また、微粒子の形状は、本発明の効果を達成しえるものであれば如何なるものであってもよく、球形、ロッド型、針状、中空素子、異なる金属の層状構造（コア・シェル構造）、チューブ型等を挙げることができ、凹凸、突起を有していてもよい。

【0023】

前記微粒子の大きさは、後述するキャリアと共に骨治療箇所に充填することができれば

10

20

30

40

50

特に制限は無い。例えば、前記微粒子を含む骨新生用組成物をシリンジにより骨治療箇所に充填する場合は、微粒子の大きさをシリンジの内径より小さくすればよく、後述する固体状のキャリアに前記微粒子を吸着して骨治療箇所へ充填する場合は、固体状キャリアに吸着できる大きさであればよく、充填方法等により、適宜調整すればよい。上記の微粒子は、公知の製造方法により製造してもよいし、市販品を用いてもよい。

【0024】

前記微粒子は後述するキャリアと共に骨治療箇所に充填し外部信号により加熱して温熱効果を発揮すればよいことから、発熱材料のみから作製した微粒子でも本願発明の効果を奏することはできる。しかしながら、上記のとおり、骨治療箇所は骨髄液流等の流体力が発生しており、前記微粒子がキャリアから脱落する可能性がある。その場合であっても、前記微粒子が骨治療箇所の周りに留まれるように、例えば、前記微粒子を、骨組織に吸着し易い材料で被覆してもよい。前記骨組織に吸着しやすい材料としては、リボソーム、ピスフォスフォネート等が挙げられ、これらを、単独又は組み合わせて被覆してもよい。また、骨細胞に特異的に吸着する抗体を微粒子又は微粒子を被覆している材料に結合してもよい。一方、キャリアと親和性の高い材料で微粒子を被覆することもでき、例えば、後述するキャリアとなるハイドロキシアパタイトとの高い吸着性を示すアミノ酸・タンパク質・脂質・糖等で被覆してもよい。

10

【0025】

骨組織に吸着しやすい材料で微粒子を被覆する方法は、微粒子の種類及び骨組織に吸着しやすい材料の種類に応じて適宜選択すればよい。例えば、磁性微粒子にリボソームを被覆する場合は、次の手順で行うことができる。磁性微粒子を脱イオン水で十分に洗浄することで余分なイオン成分を取り除き、超音波処理を行うことにより、水に分散する磁性微粒子溶液を作製する。次に、ホスファチジルコリン/ホスファチジルエタノールアミン及びN-(6-マレイミドカプロイルオキシ)-ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミンからなる脂質混合物からナス型フラスコ内壁にリン脂質膜を作製する。このリン脂質膜に上記の方法で作製した磁性微粒子溶液を加え、ボルテックス攪拌しながら膜を膨潤する。膨潤した膜と磁性微粒子に15分間の超音波処理を施し、その後、生理食塩水(PBS)を加え、生理食塩水中に分散している状態にする。さらに超音波処理を行うことで、マグネタイトリボソームを得ることができる。

20

【0026】

本発明の骨新生用組成物に含まれる「キャリア」とは、微粒子を骨治療箇所に充填し、該充填箇所に微粒子を留めることができる物質を意味し、例えば、ゲル、人工骨、骨セメント等が挙げられる。

30

【0027】

ゲルとしては、例えば医療用ゲルを用いることができ、アルジネイトゲル、ヒアルロン酸ゲル、ホスファチジルエタノールアミン結合多糖類誘導体、マンナンゲル、及びカラギーナン、ローカストビーンガム、グルコマンナン、デンプン、カードラン、グアーガム、寒天、カシアガム、デキストラン、アミロース、ゼラチン、ペクチン、キサンタンガム、タラガム、ジェランガムから選択される2種以上の天然有機高分子の組み合わせからなるゲル、等が挙げられる。

40

【0028】

人工骨としては、生体適合性がある、リン酸カルシウム系材料が挙げられる。また、リン酸カルシウム系材料は、硬化処理を実施するまでは固体形状(典型的には粉末形状)のまま貯蔵することができるため、本発明の骨新生用組成物を用事調整型として使用することができる。

【0029】

リン酸カルシウム系材料としては、種々の化学組成比のリン酸カルシウムが含まれ得る。好適にはハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)或いは加水分解によりハイドロキシアパタイトを生成し得る化合物が挙げられる。例えば、型リン酸三カルシウム($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)を主成分とし副成分として他のリン酸カルシウム系化合

50

物が混合されたものが挙げられる。例えば、型リン酸三カルシウムにハイドロキシアパタイト、型リン酸三カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、リン酸四カルシウム ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)、リン酸水素カルシウム ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 等を添加したものが挙げられる。なお、これら例示したものの以外のリン酸カルシウム系化合物を使用してもよく、使用する化合物の組み合わせはハイドロキシアパタイトその他のリン酸カルシウム系基材 (硬化体) を形成し得る組み合わせであれば特に制限はない。

【0030】

また、リン酸カルシウム系基材 (硬化体) が得られる限り、主成分たるリン酸カルシウム系化合物以外の化合物が含まれていてもよい。例えば、リン酸カルシウム系化合物における Ca の一部が他の元素 (例えば Sr 、 Ba 、 Mg 、 Fe 、 Al 、 Na 、 K 、 H) と置換した化合物を含んでいてもよい。或いは PO_4 の一部が他の酸成分 (例えば CO_3 、 BO_3 、 SO_4 、 SiO_4) と置換した化合物を含んでいてもよい。なお、人工骨をキャリアとして使用する際の形態は、ペースト状であっても多孔質の固体状であってもよく、微粒子を骨治療箇所に留めることができるものであれば、形態等に特に制限は無い。例えば、人工骨が固体状の多孔質の場合、微粒子を分散した溶液に前記多孔質を染み込ませて微粒子を多孔質に吸着、又は多孔質の製造工程の途中で多孔質の材料の中に微粒子を練り込み、作製された多孔質中に微粒子が分散されるようにしてもよい。

10

【0031】

骨セメントとしては、ポリメチルメタクリレートを主成分とする骨セメント材料 (例えばポリメチルメタクリレートの他に、バリウム粉末、メチルメタクリレート (モノマー) 等を含むセメント材料) を使用することができる。

20

【0032】

本発明で用いられるキャリアは、上記の材料を適宜調整して作製してもよいし、市販されているものを使用してもよい。例えば、医療用ゲルとしては、アテロコラーゲンインプラント (高研)、Zyplast (コラーゲン社)、Puredent (ヒアルロン酸ゲル、プレスジャパン社) 等が市販されている。また、メチルメタクリレートを主成分とする骨セメントは、サージカルシンプレックス (ストライカー社製)、オストロンII (ジーシー社製) 等の商品名で市販されており、人工骨は、バイオベックス-R (アドバンスフルセット) (HOYA社製)、セラペースト (日本特殊陶業社製、販売: 小林メディカル)、プリマフィックス (日本エム・デイ・エム社製)、オスフェリオン (オリンパス株式会社)、リジェノス (株式会社クラレ) 等の商品名で市販されている。上記のゲル、人工骨、骨セメントは、それぞれ単独で用いてもよいし、例えば、ゲル及び人工骨、ゲル及び骨セメント、人工骨及び骨セメント等、組み合わせで用いてもよい。

30

【0033】

また、本発明においては、骨治療箇所に骨新生用組成物を充填する際に微粒子とキャリアが含まれていればよい。つまり、キャリアとしてゲルを用いた場合は、(1) 予めゲルに微粒子を分散させておいたものを骨治療箇所に充填、(2) 骨治療箇所への充填時に、ゲルに微粒子を分散してから充填、(3) 未架橋のゲル化用材料を治療時に加水等によりゲル化し、次いで微粒子を分散し骨治療箇所に充填等、何れの使用形態であってもよい。また、骨セメント又は人工骨の場合も、上記と同様、(1) 予め骨セメント又は人工骨のペースト又は固体に微粒子を分散又は吸着させておいたものを骨治療箇所に充填、(2) 骨治療箇所への充填時に、骨セメント又は人工骨のペースト又は固体に微粒子を分散又は吸着してから充填、(3) 骨治療箇所への充填時に、骨セメント又は人工骨用材料をペースト化し、次いで微粒子を分散して骨治療箇所に充填等、何れの使用形態であってもよい。したがって、本発明における「キャリア」には、充填時における使用形態に限定されるものではなく、その形態になり得る材料も含まれる。

40

【0034】

本発明の外部信号は、被投与側への影響がないか、あるいは影響が少ないものであることが好ましい。そのような観点から、磁場 (磁界の変化) 又は光を用いることが好ましい。磁場としては、例えば、交番磁場を用いることができ、磁場の強度及び時間は、用いる

50

発熱材料の種類に応じて、所望の温度となるように適宜調整すればよい。例えば、人体にほとんど害が無いと考えられるマグネタイト (Fe_3O_4) 又はマグヘマイト ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) の $10\text{nm} \sim 100\text{nm}$ 程度の微粒子又は該微粒子をリポソーム等で被覆した場合、 $50\text{kHz} \sim 10\text{MHz}$ の磁場を付与すればよい。 50kHz より小さい磁場では加温効率が悪くなり、 10MHz より大きな磁場では、水や血液も加温され好ましくない。

【0035】

光の場合、波長などの選択は、用いる発熱材料の種類に応じて、所望の温度となるように適宜調整すればよい。例えば、発熱材料として金を用いた微粒子の場合は、動物体内の組織及び細胞に殆ど害を及ぼさない 800nm 乃至 1200nm の光を用いることが好ましい。また、発熱材料が金の場合は、短波からマイクロウェーブ領域の 10MHz 乃至 2GHz の高周波を与えることもでき、照射時間は照射に使用する周波数に応じて適宜定めればよい。

10

【0036】

本発明の骨新生システムに含まれ、上記の外部信号を付与するための外部信号発生装置としては、公知の交番磁場発生装置、サーモトロン RF-8、ランプ又は YAG レーザー、マイクロウェーブ発生装置を用いればよい。

【0037】

また、微粒子の温度は、Wnt / catenin signal を活性化できる温度が好ましく、 $42.5 \sim 47$ に加温することが好ましく、 $44 \sim 46$ に加温することがより好ましい。 42.5 より低い温度では、Wnt / catenin signal が活性化せず、 47 より高い温度では、充填箇所に隣接する生体の正常細胞を死滅させる恐れがあり好ましくない。

20

【0038】

本発明の骨新生用組成物が適用できる骨治療箇所としては、物理的圧力により骨折した部分、骨折の治癒が遷延している部分、腫瘍の切除等により欠損した部分、骨転移病変など骨が脆弱化した部分等、骨の新生が必要な部分であれば、特に制限は無い。

【0039】

本発明の骨新生用組成物を使用する際には、外科的手術で生体を切開し骨治療箇所に骨新生用組成物を充填する、又はシリンジ等を用いて生体外から骨新生用組成物を骨治療箇所に充填後、外部信号発生装置により外部信号を前記微粒子に付与し、発熱による温熱効果を施せばよい。

30

【0040】

以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、この実施例は単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらの例示は本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。

【実施例】

【0041】

< 実施例 1 >

〔リポソーム被覆微粒子の作製〕

磁性微粒子 (10nm マグネタイト：戸田工業株式会社製) を脱イオン水で十分に洗浄を行って余分なイオン成分を取り除き、超音波処理を行うことにより、水に分散するマグネタイト溶液を作製した。ホスファチジルコリン / ホスファチジルエタノールアミン (比、 $2:1$) および N - (6 - マレイミドカプロイルオキシ) - ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンからなる脂質混合物からナス型フラスコ内壁にリン脂質膜を作製した。このリン脂質膜に上記の方法で作製したマグネタイト溶液を加え、ボルテックス攪拌しながら膜を膨潤させた。膨潤させた膜と磁性微粒子に 15 分間の超音波処理を施し (28W)、その後 10 倍濃度の生理食塩水 (PBS) $200\mu\text{l}$ を加え、生理食塩水中に分散している状態にした。さらに超音波処理を 15 分間行い (28W)、マグネタイトリポソーム (MCL) が分散した溶液を得た。

40

50

【0042】

〔骨新生用組成物の作製〕

上記MCLが分散した溶液(36mg/ml)と1.2%アルジネイト溶液(FMC Bio Polymer社製、KELTONE LVC R)を1:1の割合で混合して、骨新生用組成物(ゲル)を作製した。

【0043】

〔ラットへの移植、骨新生確認〕

<実施例2>

生後8週のラット(Sprague-Dawley rat)を用い、インフルレン吸引(5%濃度)及びペントバピタル腹腔内投与(10mg/1匹、共立製薬)により麻酔した。次いで、図1(1)に示すように、ラットの右足の脛骨近位内側に、ドリルで直径約2mm、深さ3mmの骨孔を作製した。出血が落ち着いた2日後に、図1(2)に示すように、上記実施例1で作製した骨新生用組成物を作製後すぐに、100 μ lをピンセットにより、上記骨孔に充填した。骨新生用組成物充填時にカーボン温度センサーを直上に設置した。図1(3)は、ラットに温度センサーをセットした写真である。骨新生用組成物を充填した直後に、高周波磁場発生装置(第一高周波工業社製)を用い、外部信号として100KHzの交番磁場を付与することで微粒子を発熱させた。骨新生用組成物は45で15分間継続して温度を維持した。加温は1回だけ実施した。骨の新生は、加温直後、2週間後、4週間後、6週間後にレントゲン撮影を行うことで評価を行った。

10

【0044】

<比較例1>

交番磁場を付与しなかった以外は、実施例2と同様の手順で実験を行った。

20

【0045】

図2は、実施例2及び比較例1のレントゲン写真の結果である。写真から明らかなように、実施例2では2週間後に骨孔周囲の骨の硬化が確認されたが、比較例1の場合は、2週間後の骨硬化所見は乏しかった。以上の結果より、骨治療箇所を加温することで、新生骨の生成が促進されることが確認できた。

【0046】

〔画像評価による骨硬化度の測定〕

<実施例3>

画像解析ソフトを用いて、骨孔周囲の一定面積における平均密度を測定することで、骨硬化度の経時的变化の観察を行った。先ず、実施例2と同様の手順でラットの右足(患側)に骨新生用組成物を充填・加温し、図3(1)に示すように加温直後、及び図3(2)に示すように2週間後に、右足(患側)及び健常状態の左足(健側)が含まれるようにレントゲン写真撮影した。撮影したレントゲン画像をコンピューターに取り込み、加温直後のレントゲン写真の右足(患側)の骨孔周囲を画像解析ソフトImage J(NIH)で設定(図中の白線で囲われている部分)し、左足(健側)の脛骨近位内側についても右足(患側)と同じ面積となるようImage J(NIH)でマウスを用いて設定(図中の白線で囲われている部分)した。2週間後のレントゲン写真についても同様に、Image J(NIH)でマウスを用いて設定した。次に、左足(健側)の骨形成はほとんど変化がない、つまりレントゲン画像はほとんど変化がないと考えられるので、右足(患側)の骨形成像がどれだけ変化したかを比較するための解析を行った。0週における右足(患側)/左足(健側)の値を1とし、2週後の右足(患側)/左足(健側)の値とともにグラフ化した。骨新生用組成物を充填・加温したラットは14匹準備し、平均値を用いた。

30

40

【0047】

<比較例2>

加温しなかった以外は、実施例3と同様の手順で解析・グラフ化した。コントロール用のラットは7匹準備し、平均値を用いた。

【0048】

50

図4は、実施例3及び比較例2の結果を示すグラフである。実施例3では、左足（健側）と比較して、右足（患側）の骨形成（密度）が明らかに上昇した。一方、比較例2では、左足（健側）と比較して、右足（患側）の骨形成（密度）がむしろ減少していた。これは骨新生用組成物を充填した直後は微粒子自体がレントゲンを吸収するため白く写るが、2週間後はこの微粒子が流れて消失していくため、レントゲンで黒く写ったためと考えられる。以上の結果より、本発明の骨新生用組成物を含む骨新生システムにより、骨治療箇所で骨が新生することが確認された。

【0049】

〔組織学的評価〕

<実施例4>

加熱温度を46℃とした以外は、実施例2と同様の手順で、骨新生用組成物を充填・加温した。2週間後に骨新生用組成物を充填した足を取り出し、パラホルムアルデヒド固定後に5μmの厚さにスライスし、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。次いで、骨新生用組成物を充填・加温した箇所の染色されたスライスを、光学顕微鏡を用いて撮影した。マグネタイト周囲の新生骨像を顕微鏡下に評価した。

【0050】

<比較例3>

加温をしなかった以外は、実施例4と同様の手順で骨新生用組成物を充填した箇所の骨の断面を撮影した。

【0051】

図5は、実施例4及び比較例3の足を取り出す前のレントゲン写真、及び骨の断面を拡大した写真である。写真から明らかなように、実施例4では骨孔周囲に多くの新生骨が認められたが、比較例3では、微粒子を縁取るように新生骨を認めるのみであった。

【0052】

〔MCLのみの充填〕

<比較例4>

実施例1で作製したMCLのみを、実施例2と同様の手順で骨孔に充填した。交番磁場を付与しながらカーボン温度センサーによる温度観察をしたところ、MCLが骨内で拡散してしまうことが確認された。

【0053】

<実施例5>

〔骨新生用組成物の作製〕

実施例1の〔リポソーム被覆微粒子の作製〕で作製したマグネタイトリポソーム（MCL）が分散した溶液に、人工骨であるリジェノス（株式会社クラレ）を330mg加えたシャーレを、陰圧発生器（TAITEX社製GCD-051XA）内に載置した。次いで、0.067Paの陰圧下で60分間処理することで、リジェノスの気孔内にマグネタイトリポソームが吸着した骨新生用組成物（多孔質の固体）を作製した。図6（1）はリジェノスの断面の拡大写真、図6（2）は、実施例5で作製した骨新生用組成物の写真である。

【0054】

〔ラットへの移植、骨新生確認〕

<実施例6>

実施例2と同様の手順で骨孔を作製し、出血が落ち着いた2日後のラットに、実施例5で作製した骨新生用組成物1個をピンセットにより、上記骨孔に充填した。次いで、実施例2と同様の手順で加温し、加温直後及び2週間後にレントゲン撮影を行うことで評価を行った。評価は2匹のラットを用いて行った。

【0055】

<実施例7>

加熱温度を44℃とした以外は、実施例6と同様に手順で評価を行った。

【0056】

10

20

30

40

50

< 実施例 8 >

加温温度を 43 とした以外は、実施例 6 と同様に手順で評価を行った。

【 0 0 5 7 】

< 比較例 5 >

加温しなかった以外は、実施例 6 と同様の手順で評価を行った。

【 0 0 5 8 】

図 7 は、実施例 6 ~ 8 及び比較例 5 のレントゲン写真を示す。写真から明らかなように、実施例 6 ~ 8 では 2 週間後に骨孔周囲の骨の硬化が確認されたが（図中の ）、比較例 5 の場合は、2 週間後の骨硬化所見は乏しかった。以上の結果より、キャリアとして人工骨を用いた場合も、骨治療箇所を加温することで、新生骨の生成が促進されることが確認できた。

10

【 0 0 5 9 】

〔画像評価による骨硬化度の測定〕

< 実施例 9 >

実施例 5 で作製した骨新生用組成物を用いた以外は、実施例 3 と同様の手順で解析・グラフ化した。なお、ラットは 12 匹準備し、平均値を用いた。

【 0 0 6 0 】

< 比較例 6 >

加温しなかった以外は、実施例 9 と同様の手順で解析・グラフ化した。コントロール用のラットは 3 匹準備し、平均値を用いた。

20

【 0 0 6 1 】

図 8 は、実施例 9 及び比較例 6 で撮影したレントゲン写真の画像評価による骨硬化度測定の結果を示すグラフである。実施例 9 では、左足（健側）と比較して、右足（患側）の骨形成（密度）が明らかに上昇した。一方、比較例 6 では、左足（健側）と比較して、右足（患側）の骨形成（密度）がむしろ減少していた。これは骨新生用組成物を充填した直後は微粒子自体がレントゲンを吸収するため白く写るためと考えられる。なお、比較例 2 と比べて比較例 6 の骨形成（密度）の減少が少ないのは、キャリアとしてゲルを用いる場合より、流れて消失する微粒子が少ないためと考えられる。以上の結果より、本発明の骨新生用組成物を含む骨新生システムにより、骨治療箇所が骨が新生することが確認された。

30

【 0 0 6 2 】

〔組織学的評価〕

< 実施例 10 >

実施例 6 でレントゲン撮影した後のラット 1 匹を用いて、実施例 4 と同様の手順で骨新生用組成物を充填した箇所の骨の断面を撮影・評価した。

【 0 0 6 3 】

< 実施例 11 >

実施例 7 のラットを用いた以外は、実施例 10 と同様の手順で骨新生用組成物を充填した箇所の骨の断面を撮影した。

【 0 0 6 4 】

< 実施例 12 >

実施例 8 のラットを用いた以外は、実施例 10 と同様の手順で骨新生用組成物を充填した箇所の骨の断面を撮影した。

40

【 0 0 6 5 】

< 比較例 7 >

比較例 5 のラットを用いた以外は、実施例 10 と同様の手順で骨新生用組成物を充填した箇所の骨の断面を撮影した。

【 0 0 6 6 】

図 9 は、実施例 10 ~ 12 及び比較例 7 で撮影した骨の断面を 20 倍に拡大した写真である。写真から明らかなように、実施例 10 ~ 12 では骨孔周囲に多くの新生骨が認めら

50

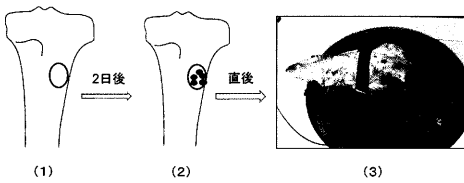
れたが、比較例7では、微粒子を縁取るように新生骨を認めるのみであった。

【産業上の利用可能性】

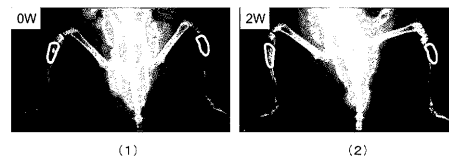
【0067】

本発明に係る骨新生用組成物を用いることで、骨折等の治療の際に、新生骨の生成を促進することができる。また、抗体等を使用する必要がなく、従来から骨折の治療に用いられている骨セメント又は人工骨、並びに医療用ゲル等と共に用いることができるので、病院や救急センターなどの医療機関や大学医学部などの研究機関、一般病院等において、骨折箇所の治療材料として利用が可能である。

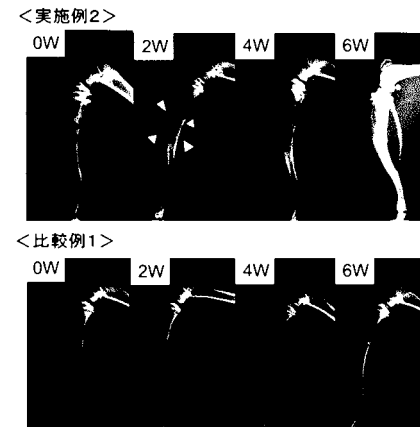
【図1】



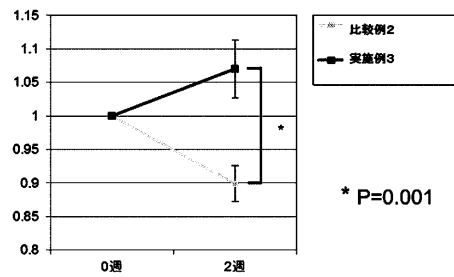
【図3】



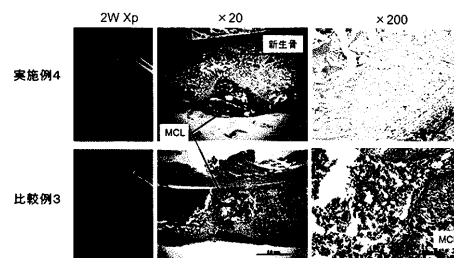
【図2】



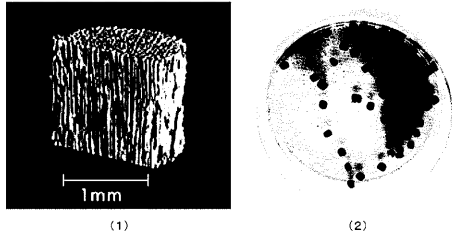
【図4】



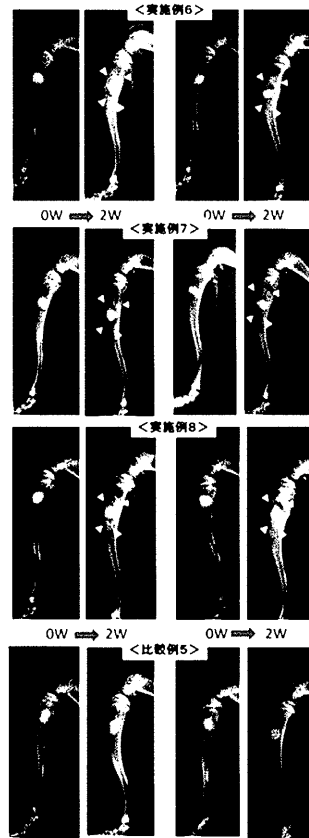
【図5】



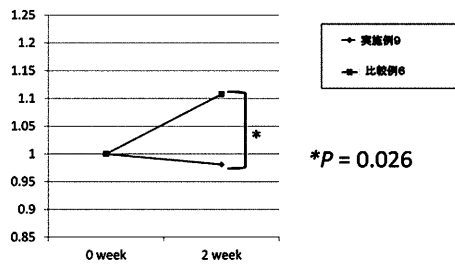
【 図 6 】



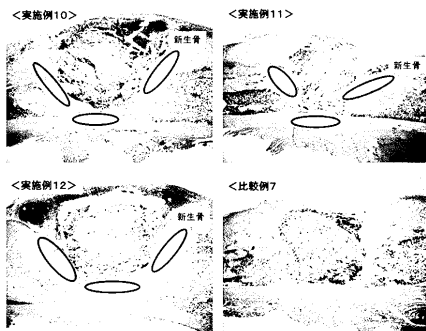
【 図 7 】



【 图 8 】



【 图 9 】



【手続補正書】

【提出日】平成26年11月27日(2014.11.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

外部信号により発熱することができる材料を含む微粒子及び該微粒子のキャリア（但し、アルブミン及び/又はコラーゲンを除く。）を含み、骨治療箇所に充填後に加熱することで骨の新生を促進するための骨新生用組成物。

【請求項2】

前記骨治療箇所が、物理的圧力により骨折した部分、骨折の治癒が遷延している部分、腫瘍の切除等により欠損した部分、骨転移病変など骨が脆弱化した部分から選択されることを特徴とする請求項1に記載の骨新生用組成物。

【請求項3】

前記キャリアが、ゲル、人工骨、骨セメントから選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2に記載の骨新生用組成物。

【請求項4】

前記材料が、マグネタイト、マグヘマイトから選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項1～3の何れか一項に記載の骨新生用組成物。

【請求項5】

前記微粒子が、リポソームで被覆されていることを特徴とする請求項1～4の何れか一項に記載の骨新生用組成物。

【請求項6】

請求項1～4の何れか一項に記載の骨新生用組成物及び該骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させるための外部信号を発生する外部信号発生装置を含むことを特徴とする骨新生システム。

【請求項7】

請求項5に記載の骨新生用組成物及び該骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させるための外部信号を発生する外部信号発生装置を含むことを特徴とする骨新生システム。

【請求項8】

請求項1～4の何れか一項に記載の骨新生用組成物を骨治療箇所（但し、人体を除く）に充填する工程、

外部信号により前記骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させる工程、を含むことを特徴とする骨治療箇所（但し、人体を除く）の骨の新生を促進する方法。

【請求項9】

請求項5に記載の骨新生用組成物を骨治療箇所（但し、人体を除く）に充填する工程、外部信号により前記骨新生用組成物に含まれる微粒子を発熱させる工程、を含むことを特徴とする骨治療箇所（但し、人体を除く）の骨の新生を促進する方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/064920
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/00(2006.01)i, A61F2/28(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K33/08(2006.01)i, A61K41/00(2006.01)i, A61P19/08(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) A61L27/00, A61F2/28, A61K9/127, A61K33/08, A61K41/00, A61P19/08 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-522667 A (DFINE, Inc.), 03 July 2008 (03.07.2008), claims; paragraphs [0061] to [0074]; fig. 6 to 8 & US 2006/0122622 A1 & EP 1824424 A & WO 2006/062939 A2	1-3, 5
X	JP 2008-545665 A (Universite de Geneve), 18 December 2008 (18.12.2008), claims; paragraphs [0044] to [0106], [0129] to [0133]; examples 9, 11 & US 2009/0081122 A1 & EP 1883425 A & WO 2006/125452 A1	1-3, 5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 "T" 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 01 August, 2014 (01.08.14)		Date of mailing of the international search report 12 August, 2014 (12.08.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/064920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2013-510186 A (Creaspine), 21 March 2013 (21.03.2013), claims; paragraphs [0011] to [0096] & US 2012/0220991 A1 & EP 2498805 A & WO 2011/055047 A1 & FR 2952306 A	1, 2, 5
X	JP 2005-510291 A (NuVasive, Inc.), 21 April 2005 (21.04.2005), claims; paragraphs [0009] to [0031] & US 2004/0228898 A1 & EP 1453435 A & WO 2003/045274 A2	1, 2, 5
X	SHIMIZU Kazunori et al, Mag-Seeding of Rat Bone Marrow Stromal Cells into Porous Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, J Biosci Bioeng, 2007, Vol.104, No.3, Page.171-177	1-4

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 4 9 2 0									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61F2/28(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K33/08(2006.01)i, A61K41/00(2006.01)i, A61P19/08(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. A61L27/00, A61F2/28, A61K9/127, A61K33/08, A61K41/00, A61P19/08											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014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) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
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									
X	JP 2008-522667 A (ディーエフアイエヌイー・インコーポレーテッド) 2008.07.03, 【特許請求の範囲】 , 【0061】 - 【0074】 , 【図6】 - 【図8】 & US 2006/0122622 A1 & EP 1824424 A & WO 2006/062939 A2	1-3, 5									
X	JP 2008-545665 A (ユニベルシテ ドゥ ジュネーブ) 2008.12.18, 【特許請求の範囲】 , 【0044】 - 【0106】 , 【0129】 - 【0133】 , 実施例 9, 11 & US 2009/0081122 A1 & EP 1883425 A & WO 2006/125452 A1	1-3, 5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 01.08.2014		国際調査報告の発送日 12.08.2014									
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) 石井 裕美子	4C 3402								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 4 9 2 0
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
X	JP 2013-510186 A (クルアスパンヌ) 2013. 03. 21, 【特許請求の範囲】, 【0011】 - 【0096】 & US 2012/0220991 A1 & EP 2498805 A & WO 2011/055047 A1 & FR 2952306 A	1, 2, 5
X	JP 2005-510291 A (ヌバシブ, インコーポレイテッド) 2005. 04. 21, 【特許 請求の範囲】, 【0009】 - 【0031】 & US 2004/0228898 A1 & EP 1453435 A & WO 2003/045274 A2	1, 2, 5
X	SHIMIZU Kazunori et al, Mag-Seeding of Rat Bone Marrow Stromal Cells into Porous Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, J Biosci Bioeng, 2007, Vol.104, No. 3, Page.171-177	1-4

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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

(72)発明者 加藤 竜司

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

(72)発明者 小林 猛

愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内

Fターム(参考) 4C076 AA19 BB32 CC09 FF70

4C081 AB03 AB04 CF24 DA12 DC03 EA14

4C084 AA11 MA28 MA67 NA14 ZA96 ZC75

4C086 AA01 AA02 HA04 MA01 MA04 MA24 MA67 NA14 ZA96 ZC75

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。