

明 細 書

発明の名称：骨欠損部充填材料、及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は生分解性繊維で綿状に形成された骨欠損部充填材料、及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近時、骨の自己再生能力を活かして欠損部の骨を再建するタイプの骨欠損部充填材料が開発されている。このタイプの骨欠損部充填材料は、生分解性樹脂に骨形成因子となるセラミックを含有させた多孔質繊維材料を欠損部に埋入し、骨形成因子を供給することによって、骨細胞による骨形成を促すものである。

[0003] 上記タイプの骨欠損部充填材料は、ポリL乳酸（PLL A）、ポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体（PLGA）等の生分解性樹脂の溶液とセラミック粒子を混合して作製した紡糸溶液をエレクトロスピニング等の方法で繊維化して製造されている。生分解性繊維のマトリックス樹脂は材料が体内に埋入された後、欠損部において材料の3次元骨格を維持する足場材料となると共に、樹脂が生体液と接触して徐々に吸収分解されるに伴いリン酸カルシウム等の骨形成因子を露出又は溶出して骨形成の生体活性を発揮させ、その後骨形成が終わった後は生分解性樹脂は生体内で完全に分解吸収されて消失するように設計されている。

[0004] 骨形成因子となるセラミックとしては、 β -リン酸三カルシウム（ β -TCP）等の生体吸収性リン酸カルシウムが生体親和性と骨伝達性を併せもつ材料として用いられている。生体吸収性リン酸カルシウムの生体活性のメカニズムは必ずしも明らかでないが、骨欠損部においてリン酸カルシウムの表面に骨形成細胞がよく接着し、増殖分化することによって骨形成するための足場（scaffold又はsubstrate）となると考えられている（非特許文献1）。炭酸カルシウムも同様に骨細胞の接着及び増殖の機能を示すことが知られている（

非特許文献2、非特許文献3)

[0005] 骨は破骨細胞と骨芽細胞のカップリングによるリモデリングによって形成されることが知られているが、その過程でカルシウムと共に微量のケイ素を供給すると骨芽細胞の増殖が刺激されて、増殖分化を促進させることが実験的に確認、報告されている(非特許文献4)。その知見に基づいて新しい骨欠損部充填材料として生分解性ポリマーにケイ素溶出型バテライト相炭酸カルシウム(S i V)粒子を含んだ骨欠損部充填材料が提案されている(特許文献1)。骨欠損部に充填されて体液に接触して炭酸カルシウムが溶解されるに伴い微量のケイ素が徐々に溶出されて骨芽細胞を刺激して増殖・分化を促進する。さらに、炭酸カルシウムが分解されて溶出されたカルシウムイオンが細胞周辺に供給されることによって細胞の活動が活発化して高い活性が得られる。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特許第5179124号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Walsh et al. β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 29 (2008) 266-271)

非特許文献2：Obata et al. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1248-1257.

非特許文献3：Fujiwara et al. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. *Biomaterials* 26 (2005) 4139-4147)。

非特許文献4：Hench LL. Polak JM: Third-generation biomedical materials. *Science* 2002, 295: 1014-1017)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 欠損した骨を骨の自己再生能力を活かして再建するのは永続的な骨修復が得られる優れた方法であるが、骨の自己再生には材料の埋入後少なくとも3～6ヶ月の長期間を要する。従って、その方法に用いる骨欠損部充填材料は、埋入された後骨再建作用をできるだけ早く開始させ、さらにその後欠損部を再建するのに十分な骨の形成が得られるまで欠損部に残って骨形成活動を促進する作用を継続することが求められる。しかし、これまでの骨欠損部充填材料はいずれもこれらの互いに背反する要求を十分に満たすものは未だ得られていない。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の骨欠損部充填材料は、エレクトロスピンングで製造された生分解性繊維を含む綿状の骨欠損部充填材料であり、前記生分解性繊維は、リン酸カルシウム粒子を40～60重量%、好ましくは40重量%、ケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子を10重量%以上、好ましくは30重量%、かつポリL乳酸樹脂を30重量%以上を含み、好ましくは30重量%、又は残部すべてである。また、前記ポリL乳酸樹脂の非晶質相量は75～98%、好ましくは、該非晶質相量は85～95%、さらに好ましくは88～92%である。

[0010] 本発明の骨欠損部充填材料に用いる生分解性繊維は、PLL含有量をエレクトロスピンングによる紡糸が可能な範囲でできるだけ抑えられているので、繊維表面においてリン酸カルシウムと炭酸カルシウム粒子の露出量が大きく、体液と直接接する部分が大きい。その結果、リン酸カルシウムと炭酸カルシウム粒子から高い生体活性が得られる。

[0011] 本発明の骨欠損部充填材料が含有するケイ素溶出型炭酸カルシウム、好ましくはバテライト相のケイ素溶出型炭酸カルシウムである。該ケイ素溶出型炭酸カルシウムは溶解速度が速いため、埋入後カルシウムイオンを早期に溶出してカルシウムリッチの環境を作り出す。他方、炭酸カルシウムにドーブされているケイ素種が徐々に溶出されて骨芽細胞の増殖を刺激して、骨形成を促進する。

- [0012] 本発明の骨欠損部充填材料は、埋入後バテライト相炭酸カルシウムから豊富な量のカルシウムイオンが溶出されて繊維表面に骨似アパタイトの生成を誘起する。マトリックス樹脂であるポリ乳酸はカルボキシル基を多く有しており、生体液に接触してポリ乳酸が加水分解されると骨似アパタイトの核生成を誘引するカルボキシル基を形成する。
- [0013] 本発明の骨欠損部充填材料の炭酸カルシウムはバテライト相のものをを用いるのが好ましい。一般に炭酸カルシウムは結晶構造の違いからカルサイト相、アラゴナイト相、バテライト相の3つに分けられるが、バテライト相炭酸カルシウムが人体液中の溶解性が最も高い。従って、バテライト相炭酸カルシウムを含むPLL Aは高い骨似アパタイト形成能力を有する。
- [0014] 本発明の骨欠損部充填材料に用いる生体吸収性リン酸カルシウムは、欠損部に埋入された後ゆっくりと時間をかけて生体吸収されて骨に置換される。本発明の骨欠損部充填材料は生体吸収性リン酸カルシウムを40%以上含有するので、吸収置換による骨形成が有効に行われる。
- [0015] 本発明の骨欠損部充填材に用いるPLL Aはリン酸カルシウムが吸収されて骨に置換される間は欠損部において骨格を維持して残留し、骨が形成される間は骨細胞がそこで活動するための足場となる。PLL Aは加水分解されにくいので、埋入後、体液に接触して直ちに分解吸収して消失してしまう恐れが少ない。
- [0016] 本発明の骨欠損部充填材の生分解性繊維の外径は10～50 μm が好ましい。より好ましくは30～50 μm の外径である。
- [0017] 本発明の骨欠損部充填材料の製造方法は、溶融したポリL乳酸溶液中にリン酸カルシウム粒子とSiV粒子を3者の重量比率リン酸カルシウム40～60重量%、ケイ素溶出型炭酸カルシウム10重量%以上、残部にポリL乳酸30重量%以上となるように投入して、その状態で混練し、前記混練した溶液をその後常温冷却して固化させてポリL乳酸の分子量が20万～25万、非晶質相量が75%以上好ましくは85%以上であるコンポジットを作製し、前記コンポジットを溶剤で溶かして、紡糸溶液を作製し、前記紡糸溶液

をエレクトロスピニング法を用いて紡糸して、生分解性繊維を製造し、前記生分解性繊維をエタノール溶液を満たしたコレクターに受けて堆積させることによって、綿状の骨欠損部充填材料を製造する工程を含む、前記骨欠損部充填材料の製造方法である。

[0018] 本発明の骨欠損部充填材料の製造方法は、ケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子とリン酸カルシウム粒子と熔融ポリ乳酸をそれぞれ一定量含んだ溶液を一定時間と温度でニーダーを用いて混練して、その過程でケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子に含まれるシロキサンのアミノ基部分とポリ乳酸構造の末端のカルボキシ基との結合（アミド結合）を生じさせる工程を含む。かかる製造方法により、紡糸溶液に含まれるポリ乳酸の秩序性の乱れを生じ、ポリ乳酸の非晶質相の割合が上がって溶解性が高まるため、その紡糸溶液を用いてエレクトロスピニングで製造された骨欠損部充填材料は、生体内においてより高い吸収性を有する。本発明の骨欠損部充填材料のポリL乳酸の好ましい非晶質相量は75～98%であり、さらに好ましくは85～95%、さらに好ましくは88～98%である。

[0019] 本発明の骨欠損部充填材料では、エレクトロスピニングで形成された直径約10～50 μ mのコンポジット繊維において、略球形状のTCP粒子（好ましい平均粒子径約3-4 μ m前後）と略球形状SiV粒子（好ましい平均粒子径約1 μ m前後）がPLLAマトリックス樹脂中にほぼ均一に分散している。好ましくは、TCP粒子、SiV粒子は共にマトリックス樹脂中の特定の箇所に偏在せずにほぼ均一に分散している。その結果、微小なTCP粒子とSiV粒子が繊維表面付近と繊維の中心付近にわたって広く均一に散在するので、骨欠損部に材料が充填された後、PLLAの分解生体吸収に伴い、TCP粒子の骨吸収、SiVからのケイ素溶出とが、比較的長期間にわたって骨欠損部内において均一に生じる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料の概観写真である。

[図2]図2は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料の繊維の表面を示すS

EM写真である。

[図3]図3は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料繊維の断面を示すSEM写真である。

[図4]図4は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料の綿を構成する繊維が互いに絡みあった状態を示すSEM写真である。

[図5]図5は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料の綿を人体の脊椎固定用のインプラントの周囲に埋めて使用方法を示す。

[図6]図6は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料の綿で自家骨を包んで使用方法を示す。

[図7]図7は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料に用いる β -TCPの粒子のSEM写真である。

[図8]図8は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料に用いるケイ素溶出型炭酸カルシウム(SiV)の粒子のSEM写真である。

[図9]図9は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料に用いるケイ素溶出型炭酸カルシウム(SiV)の粒子の構造予想図である。

[図10]図10は、ケイ素溶出型炭酸カルシウムをトリス緩衝溶液に浸漬したときのケイ素とカルシウムの溶出特性を示すグラフである。

[図11]図11(A)は、ウサギの脊椎に本発明の実施例である骨欠損部充填材料の綿を埋植直後の状態を示すX線画像である。脊椎の右側が単独で埋植した状態を示し、脊椎左側が自家骨混合で埋植した状態を示す。図11(B)は図11(A)の12週間経過のCT画像である。脊椎の左側が単独で埋植した状態を示し、脊椎右側が自家骨混合で埋植した状態を示す。

[図12]図12(A)及び(B)はウサギの大腿骨に本発明の実施例である骨欠損部充填材料を骨髓穿刺液(Bone Marrow Aspirate)と共に埋植して12週間経過後の状態を示す染色切片画像である。

[図13]図13(A)～(C)はウサギの脊椎に本発明の実施例である骨欠損部充填材料を骨髓穿刺液(Bone Marrow Aspirate)と自家骨と共に埋植して12週間経過後の状態を示す染色切片画像である。

[図14]図14(1)～(5)は、サンプル〔1〕～〔5〕を水酸化ナトリウム溶液に浸漬して1～14日を経過することによる見た目の変化を示す写真である。

[図15]図15は、サンプル〔1〕～〔4〕を水酸化ナトリウム溶液に浸漬して1～14日を経過することによるPLLAの分子量の変化を示すグラフである。ポリ乳酸の含有量とSiVの含有量によって、浸漬前の分子量に差が生じていた。浸漬開始後すぐに、分子量が大きく減少し、その後徐々に減少していく結果となった。

[図16]図16は、サンプル〔1〕～〔5〕を水酸化ナトリウム溶液に浸漬して1～14日を経過することによる綿材料の乾燥重量の変化を示すグラフである。浸漬後のサンプルは、傾向としては、PLLAの分子量の低いもののほうが、重量の減少も大きかった。

[図17]図17(1)及び(2)はサンプル〔1〕～〔5〕の結晶化度を測定したDSC測定の結果を示す。

[図18]図18(1)及び(2)は、図17のサンプルと同じ方法で作製した別のサンプル〔2〕' (70SiV-30PLLA)、〔3〕' (30SiV-40TCP-30PLLA)、〔4〕' (10SiV-60TCP-30PLLA)についてDSC測定の結果を示す。

[図19]図19は、本発明の実施例である骨欠損部充填材料に35kGyのγ線照射をして滅菌処理した場合のPLLAの分子量の減少を示す。

発明の詳細な説明

[0021] 以下、本発明の実施態様を図面を参照しながら詳細に説明する。

<生分解性樹脂>

本発明の骨欠損部充填材料の生分解性樹脂としてはポリL乳酸（以下ポリL乳酸又はPLLAと称する）を用いるのが好ましい。PLLAは生体吸収性ではあるが、PLGAに比べて加水分解を生じにくい。そのため、PLLAをマトリックス樹脂とする生分解性繊維は、欠損部で体液に接触して容易に分解せず、長期間消失せずに残留し、材料の骨格を維持することができる

。

[0022] 他面、マトリックス樹脂に含まれるリン酸カルシウム又は炭酸カルシウム等の骨成長因子が生体活性を発揮するには、これらの微粒子が体液に接触する必要があるが、マトリックス樹脂が人体液に容易に溶解しないものであると、骨形成因子がマトリックス樹脂の存在に妨げられて十分な骨形成作用を発揮できない。

[0023] PLGAは生体液と接触して容易に分解吸収されるので、それに含有される骨形成因子が生体液と直接接触する妨げになることは少ない。しかし、PLGAの分解吸収速度は速すぎるので、材料の骨格を長期間維持できず、骨形成を生じさせるための足場となるのが難しいという問題がある。PLLAは生体液に接触して分解される速度はかなり遅いので、埋入後長期間体内に残留し、十分な骨形成が完了する前に消失してしまうという問題は少ない。逆に分解吸収されない結果、含有する骨形成因子の生体液への露出又は溶出を妨げる可能性がある。また、骨形成が終わった後もPLLAが消失せずにさらに長期間体内に残留するのは人体の健康に与える影響上望ましくない。

[0024] 溶融したPLLAをケイ素溶出型炭酸カルシウム（SiV）と混合した溶液をニーダーを用いて混練すると、PLLAの分子量が減少する。その熱混練過程で一部反応してシロキサンのアミノ基部分とポリ乳酸構造の末端のカルボキシ基との結合（アミド結合）が生じる（Wakita他、Dental Materials Journal 2011; 30(2): 232-238）。このため、ポリ乳酸の秩序性が乱れ、結果としてポリ乳酸の非晶質相の割合が上がるので、溶解性が高まる結果、生体内で速い吸収性を示す。しかし、骨形成のためには、少なくとも3～6ヶ月は材料そのものが吸収されて消失せずに細胞の活動場所を確保することが望ましい。 β -TCPにはSiVのようなアミノ基の付いたケイ酸部分は有しないので、熱をかけて混練してもPLLAに変化が生じにくいので、PLLAの吸収性が急激に高くなることはない。本発明の発明者等は、アミノ基の付いたケイ酸部分を有しないリン酸カルシウムの相当量をSiVとPLLAのコンポジットに混合することで、得られたコンポジット材の生体吸収性はS

！VとPLLAのコンポジット材より遅くなり、骨が生成してくる前に材料がなくなってしまうようなことが起こらないように制御することが可能であることを見出した。

[0025] 本発明の骨欠損部充填材料のポリL乳酸の非晶質相の割合は、混練にあつてのケイ素溶出型炭酸カルシウムとリン酸カルシウムの配合比の他、繊維

中に含まれるポリL乳酸の量によっても大きく影響を受けると考えられる。図17に示す例では、ケイ素溶出型炭酸カルシウム30重量%に対しポリL乳酸を70重量%含むサンプル〔1〕ではポリL乳酸の結晶化度は21.8%であるのに対し、ケイ素溶出型炭酸カルシウム70重量%に対しポリL乳酸を30重量%含むサンプル〔1〕ではポリL乳酸の結晶化度は7.5%と大きく下がっている。

[0026] <リン酸カルシウム>

本発明の骨欠損部充填材に用いるリン酸カルシウムとしては、リン酸水素カルシウム、リン酸八カルシウム、リン酸四カルシウム、リン酸三カルシウム、炭酸含有アパタイト等の生体吸収性リン酸カルシウムなどがある。β-リン酸三カルシウムは、骨芽細胞系の細胞の増殖と分化のためのscaffoldとなる物質として特に好適である。外見はパウダー状である。パウダーを構成する粒子の径は1～6μmのものが好ましい。本発明の充填材料を構成する繊維の外径が10～50μmであることからすると、粒子径は6μm以下程度のものが好適である。混練にあつて混合するケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子と均一分散させるためには、粒子の外径がそれと同等の1～2μm程度のものとするのが好ましい。

[0027] <ケイ素溶出型炭酸カルシウム（S！V）>

本発明の骨欠損部充填材に用いるS！Vは、シロキサンと炭酸カルシウム（バチライト相）とのコンポジットであり、外見はパウダー状で、パウダーを構成する粒子の径は1μm程度のものが好適である。S！Vの構造予想図を図9に示す。走査型電子顕微鏡（SEM）写真を図8に示す。S！Vの製造方法は特開平2008-100878（ケイ素溶出炭酸カルシウム、およびその製造方法

）に詳細に開示されている。S i V中のケイ素含有量は2～4重量%、好ましくは2～3重量%である。ケイ素含有量が4重量%を超えるとS i Vが球状とならなくなり、不定形になってしまうので、P L L Aとの混合分散が不均一になってしまう可能性があるので、好ましくない。

[0028] S i Vは、欠損部に埋入されて体液と接触するとバテライト相炭酸カルシウムが加水分解されて短時間でカルシウムイオンが溶出する。ケイ素は徐々に溶出される。本発明の発明者等は、本出願に先立つ特願2011-021790において、ケイ素溶出型炭酸カルシウムのカルシウムイオンとケイ素種の溶出特性を開示した。P L L A 42gと2S i V（S iを2重量%含むバテライト相炭酸カルシウム）18gを加熱ニーダーで200℃、45分間混練して2S i Vを30wt%含有する複合体を調製した。該複合体1gに対してCHCl₃ 9.3gを混合した紡糸溶液を準備した。この紡糸溶液を用いて、エレクトロスピンング法により綿状物を作製した。得られた綿状物をトリス緩衝溶液に浸漬して37℃に保持された恒温器に静置し、所定時間浸漬した後、固液分離して液中のS iとC aの濃度を誘導プラズマ結合発光分析（ICP）にて測定した。図10は、特願2011-021790の図6であり、S iとC aのトリス緩衝溶液に浸漬したときの溶出特性を示す。同図は、トリス緩衝溶液に浸漬後、カルシウムは1日以内になんかの量が溶出し、ケイ素は、その後徐々に微量が時間の経過と共に溶出されていくことを示している。

[0029] <骨欠損部充填材料の製造>

高温で溶融して作製したP L L A溶液中にリン酸カルシウム粒子とS i V粒子を所定の重量比率となるように投入して、その状態で混練し、その後常温冷却して固化させることで、ケイ素溶出型炭酸カルシウム／リン酸カルシウム／P L L Aのコンポジットを作製する。好ましくは、3者の重量比はP L L A 30重量%以上／リン酸カルシウム40～60重量%／ケイ素溶出型炭酸カルシウム10重量%以上である。さらに好ましくは、P L L A 30重量%／リン酸カルシウム40重量%／ケイ素溶出型炭酸カルシウム30重量%である。

[0030] 次いで、前記コンポジットをクロロホルムで溶解して紡糸溶液を作製し、それを一定の方法／条件下でエレクトロスピニングで紡糸して、生分解性繊維からなる綿状物を作製する。

コレクター容器にはエタノール液を満たして、エレクトロスピニングされた糸を受けて、堆積させる。コレクターに満たしたエタノール溶液が繊維表面に残ったクロロホルムを除去し、その結果コレクタープレート上に堆積される繊維同士が互いに接着するのを防ぐことができるので、ふわふわ感のある嵩密度が低い綿状物が形成される。

[0031] 骨形成の促進の目的のためには、コンポジットに含まれる無機粒子（S i V, β -T C P）の含有量が多い方が生体活性が上がるので望ましい。しかし、無機粒子を一定限度以上多くするとP L L Aと共に混練することが難しくなる。本発明の発明者らの実験では、無機粒子全体の量が80重量%かつP L L A 20重量%では混練ができなかった。本発明の骨欠損部充填材料において、P L L Aの含有量は30重量%以上40重量%以下であり、残りが骨形成無機セラミック粒子（S i V、リン酸カルシウム）から構成されることが好ましい。

[0032] エレクトロスピニングの紡糸溶液は高温で溶融したP L L Aに無機粒子を投入して混合して作製した溶液をニーダーで一定温度と時間混練した上で冷却固化してコンポジットを作製し、次いでそのコンポジットをクロロホルムで溶かして紡糸溶液を作製するという2ステップを踏んで作製する。

[0033] P L L Aは本来分子配列秩序性が高く、樹脂が体液に接触しても加水分解し難い。紡糸溶液を作るのにP L L Aの溶融溶液をニーダーで混練すると、その混合過程（熱をかけて練る）でS i V粒子が一部反応して、S i V中に含まれるシロキサンのアミノ基とポリ乳酸の末端のカルボキシ基との結合（アミド結合）が生じる（Wakita他、Dental Materials Journal 2011; 30(2): 232-238）。このため、ポリ乳酸の秩序性が乱れ、結果としてポリ乳酸の非晶質相の割合が上がるので、溶解性が高まる。これに対し、P L L Aに加える無機物がポリ乳酸とのアミド結合を作らないものであれば、P L L Aの非

晶質の割合を上げることはないので、溶解性が急激に高くなることはない。

[0034] 本発明の骨欠損部充填材では、リン酸カルシウム40－50重量％／ケイ素溶出型炭酸カルシウムが10重量％以上／残部をPLLA30重量％以上という配合比率で混練するので、生分解性繊維の非晶質の割合は適度に制御される。その結果、PLLAマトリックス樹脂の体液に対する溶解性が適度にコントロールされる。

図17に示す例では、SiV70重量％にPLLA30重量％を加えたサンプル〔2〕の結晶化度は8％以下であるのに対し、SiVを減らしてその分TCPを一定量加えたサンプル〔3〕（30SiV-40TCP-30PLLA）及び〔4〕（10SiV-60TCP-30PLLA）はPLLAの結晶化度が8％以上15％以下と高くなっている。

[0035] エレクトロスピンングを用いて製造される本発明の骨欠損部充填材の生分解性繊維の外径は10～50 μ mが好ましく、さらに好ましいのは30～50 μ mである。エレクトロスピンングで紡糸すると繊維は一般に数 μ m以下の外径になりやすいが、それと比較すると本発明の骨欠損部充填材の生分解性繊維は太い。繊維の外径が10 μ m以上とすることで、本発明の綿状多孔体の内部に細胞が侵入していくために必要な繊維と繊維の間のスペース（ギャップ）を作り出すことが可能になる。エレクトロスピンングを用いて紡糸する繊維の径を50 μ m以上にすることは難しい。

[0036] 図3に示すように、本発明の骨欠損部充填材の生分解性繊維は繊維表面に超微細な無数の孔が形成されている。エレクトロスピンングによる紡糸では、ノズルから繊維状に射出された紡糸溶液が揮発する過程で、繊維表面に微細孔が形成される。本発明の骨欠損部充填材では、生分解性繊維に超微細孔が形成されていることで、含有するセラミック粒子（骨形成因子）と体液との接触面積が著しく増加していると考えられる。

[0037] <滅菌処理>

本発明の骨欠損部充填材料は、エレクトロスピンングで綿状に形成した後、ピンセット等を用いて所望のサイズ／重量（例2g）に取り分けた上で、

アルミ包装して滅菌処理を施す。滅菌の方法としては、放射線滅菌（ガンマ線、電子線）、酸化エチレンガス滅菌、高圧蒸気滅菌等がある。本発明では γ 線による放射線滅菌を好適に用いる。PLL Aの分子量20万～25万のサンプルに25 kGy～35 kGyの γ 線による放射線滅菌を施すと、分子量は7万～12万に減少する。図19は、本発明の実施例である40TCP（SiV30重量%/TCP40重量%/PLL A30重量%の組成の骨欠損部充填材料に35 kGyの線量の γ 線照射をした場合のPLL Aの分子量が減少した結果データを示す。

実施例

[0038] 本発明の実施例のサンプルは以下に示す材料を使用して作製した。

・ケイ素溶出型炭酸カルシウム（SiV）：水酸化カルシウム（試薬特級 純度96%以上 和光純薬工業株式会社）、メタノール（試薬特級 純度99.8%以上 和光純薬工業株式会社）、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン（SILQUEST A-1100 純度98.5%以上 モメンティブ・パフォーマンス・マテリアルズ・ジャパン合同会社）、炭酸ガス（高純度液化炭酸ガス 純度99.9% 大洋化学工業株式会社）を用いて調製されたSi含量2.9重量%のバテライト相炭酸カルシウム。その製造方法の詳細は、特開平2008-100878（ケイ素溶出炭酸カルシウム、およびその製造方法）に開示されている。

図9にSiVの構造予想図を、図8にSiV粒子のSEM 写真を示した。

・ β -リン酸三カルシウム（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）：太平化学産業（株） β -TCP-100を用いた。粒径1.7 mm以下のものを4 μm 程度に粉砕したもの（ β -TCP粉砕品）を用いた。

・PLL A：PURAC biochem社製PURASORB PL24 Poly(L-lactide) 分子量20-30万を使用した。

[0039] 1. コンポジットの作製

PLL Aをニーダー中で180℃で溶融して作製した樹脂溶液中に、SiV粒子と β -TCP粒子を投入してその状態で12分間混練し、その後常温冷

却して固化させることで、30SiV/40 β -TCP/30PLLAコンポジットを作製した。

[0040] 2. 綿状物の作製

前記コンポジットをクロロホルムで溶解して紡糸溶液を作製し、該紡糸溶液をエレクトロスピンングで紡糸して、生分解性繊維からなる綿状物を作製した。

1) エレクトロスピンングの方法

コンポジットをクロロホルムで溶解して10%濃度のエレクトロスピンング用紡糸溶液を作製した。

針の太さは18G、電圧は25kV、紡糸溶液のノズルからの吐出量：15ml/時間とした。ノズルからコレクターまでの飛距離は25cmとした。コレクター容器にはエタノール液を満たして、エレクトロスピンングされた糸を受けて、堆積させた。コレクターにエタノール溶液を満たしてある結果、堆積される繊維同士が互いに接着するのを防ぐことができるので、嵩密度の低い綿状物を形成することが可能になる。

2) エレクトロスピンングで紡糸された繊維の構成を図2に示した。紡糸された生分解性繊維の直径は約50 μ mであった。

図3に、繊維径50 μ mの中に、 β -TCP粒子（平均粒子径3-4 μ m）とSiV粒子（平均粒子径約1 μ m）がPLLAマトリックス樹脂中にほぼ均一に分散した状態を示した。

[0041] 3. 綿状物の性状

図4に本発明の骨欠損部充填材料の実施例の綿状物を示すSEM写真を示した。該繊維が3次元方向に絡み合って綿状を形成している。該繊維は長手方向に互いに接着されておらず、ふわふわの3次元立体綿構造を形成している。綿を構成する各繊維間の距離は、約50-200 μ mで平均50 μ m前後である。

[0042] 実施例の綿状物のサンプルの嵩密度、圧縮率、圧縮回復率を、JIS規格L 1927に準拠して測定したところ、嵩密度：0.01489g/cm³、圧縮率：52.

61%、圧縮回復率：31.10%であった。

[0043] 4. 綿状物の繊維に含まれるポリL乳酸の溶解性

本発明の骨欠損部充填材料が体内に埋入されると該繊維を構成するポリL乳酸樹脂が溶解し生体吸収されるが、その速度は繊維中に含まれるポリL乳酸の含有量、非晶質相量等の相違によって異なる。そこで本発明の実施例のサンプルを複数用意して、その結晶化度をDSC測定するとともに、それらを水酸化ナトリウム溶液に浸漬し、見た目の変化、分子量、乾燥重量の減少を観察し、評価分析した。

[0044] 1) 実験の実施方法

実験サンプルとして、組成重量比の異なる〔1〕30SiV-70PLLA〔2〕70SiV-30PLLA〔3〕30SiV-40TCP-30PLLA、〔4〕10SiV-60TCP-30PLLA、〔5〕50SiV-50PLLAを作製した。作製方法は[0038]～[0040]に記載した方法に従った。作製した実験サンプル〔1〕～〔5〕の結晶化度をDSC測定した。測定結果を図17（1）及び（2）に示す。上記実験サンプル〔1〕～〔5〕を5mmol/L水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、室温放置し、朝晩に容器をひっくり返して攪拌して1日、3日、7日、14日経過後の水酸化ナトリウム水溶液中のサンプル〔1〕～〔5〕の見た目の変化と分子量（SEM観察）の変化を観察した。結果を図14（1）～（5）と図15に示す。上記実験サンプル〔1〕～〔4〕を5mmol/L水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、浸漬時、1日経過時、3日経過時、7日経過時、14日経過時に綿材料を水酸化ナトリウム水溶液から取り出して各サンプルの分子量と乾燥重量の変化を観察した。結果を図16に示す。

[0045] 2) 実験結果

[結晶化度]

図17のDSC測定結果では、原料PLLAは当初結晶化度が74.7%であるのに対し、熱混練を経てエレクトロスピンングで紡糸した繊維中のPLLAの結晶化度は21.8%以下と大きく減少している。紡糸された繊維のPLLAの結晶化度は、PLLA含有量が多いサンプル（〔1〕及び〔5〕）の方がP

LLAの含有量が少ないサンプル（〔2〕、〔3〕、及び〔4〕）よりも高いことが観察された。紡糸された繊維に含まれるPLLAの量が30重量%である3つのサンプル（〔3〕、〔4〕、及び〔5〕）を比較すると、SiVにTCPを含有させたサンプルの方が、TCPを含有していないサンプルよりも結晶化度が高いことが観察された。図18は、サンプル〔2〕、〔3〕、及び〔4〕と同じ組成・方法で作製した別のサンプル〔2〕'〔3〕'〔4〕'についてDSC測定した結果を示す。図17の結晶化度のデータとは実験測定誤差が認められる。サンプルの結晶化度のDSC測定値には、±5～10%の実験測定誤差があると見込まれることを考慮すると、サンプル〔2〕、〔3〕、〔4〕の結晶化度は約75～98%、さらに正確には約85～95%の範囲内であると考えられる。

[0046] [分子量の変化]

図15の分子量測定で示す通り、SiVを30重量%PLLA70重量%含んだサンプル〔1〕では浸漬開始後14日を経過しても、若干の減少傾向はあるものの大きな変化は認められなかった。これに対し、SiV70重量%/PLLA30重量%含んだサンプル〔2〕、及びSiV30重量%/TCP40重量%/PLLA30重量%含んだサンプル〔3〕では浸漬開始後1日経過して分子量の大きな減少が認められた。SiV10重量%/TCP60重量%/PLLA30重量%含んだサンプル〔4〕では、浸漬開始後14日を経過して分子量の緩やかな減少傾向が認められた。

[0047] [乾燥重量の変化]

実験サンプル〔1〕～〔4〕を水酸化ナトリウム溶液に浸漬後時間の経過による生分解性繊維の乾燥重量の変化（減少）を図16に示す。サンプル〔1〕～〔5〕の乾燥重量は浸漬開始後短期間（1日程度）で大きく減少し、その後は緩やかに減少していくことが観察された。

[0048] [見た目の変化]

サンプル〔1〕（30SiV-70PLLA）を水酸化ナトリウム水溶液に、浸漬期間：0, 1, 3, 7, 14日の経過で外観の変化を観察した結果を図14

(1) に示す。浸漬開始後14日を経過しても綿の3次元骨格は大きく変わらずに維持されたままであった。

サンプル〔2〕(70SiV-30PLLA)を水酸化ナトリウム水溶液に、浸漬期間：0, 1, 3, 7, 14日で経過を観察した結果を図14(2)に示す。浸漬開始後3日を経過して綿の3次元骨格は失われ、14日経過した時点では短繊維としては残っているものの綿としては存在していなかった。

サンプル〔5〕(50SiV-50PLLA)を水酸化ナトリウム水溶液に、浸漬期間：0, 1, 3, 7, 14日で経過を観察した結果を図14(3)に示す。浸漬開始後14日を経過しても綿の3次元骨格は大きく変わらずに維持されたままであった。

サンプル〔3〕(30SiV-40TCP-30PLLA)を水酸化ナトリウム水溶液に浸漬期間：0, 1, 3, 7, 14日で経過を観察した結果を図14(4)に示す。浸漬開始後3日を経過して綿の3次元骨格は失われ、14日経過した時点では短繊維としては残っているものの綿としては存在していなかった。

サンプル〔4〕(10SiV-60TCP-30PLLA)を水酸化ナトリウム水溶液に浸漬期間：0, 1, 3, 7, 14日で経過を観察した結果を図14(5)に示す。浸漬開始後14日を経過して綿の3次元骨格は失われつつあるがろうじて形状を維持しており、短繊維としては残っており、水酸化ナトリウム水溶液中に浮遊している。

[0049] 見た目の変化の観察からは、PLLAの含有量が多いサンプル(サンプル〔1〕)は水酸化ナトリウム水溶液に浸漬した後、14日経過しても大きな変化はなかった。逆にPLLAの含有量が少なくかつSiVの含有量が多いサンプル(サンプル〔2〕及び〔3〕)は水酸化ナトリウム水溶液に浸漬した後、14日経過して大きな形状の変化が観察された。この結果は、水酸化ナトリウム水溶液に浸漬した後、14日経過して起こる分子量の変化とほぼ一致する。

[0050] 3. 実験結果の分析、評価

1) S i V 30 重量% / P L L A 70 重量%の組成のサンプル (サンプル [1]) は、見た目観察の結果、水酸化ナトリウム溶液中で分解しづらいことが観察された。この結果は、サンプル [1] は、P L L A の分子量が高く (27万程度)、結晶化度が高い (図 17 に示す D S C 測定では 21.8%) ことによると考えられる。

サンプル [1] に T C P を 40 重量% を混ぜた組成である 30 S i V / 40 T C P / 30 P L L A (サンプル [3]) は、水酸化ナトリウム溶液に浸して 1 日で急激な分子量の減少が認められた。サンプル [3] は分子量 23 万、結晶化度が低い (図 17 に示す D S C 測定では 9.1%)。この違いの主な原因はサンプルの繊維に含まれる P L L A の含有量がサンプル [1] は 70 重量% であるのに対し、サンプル [3] は 30 重量% と少ないことが大きいと考えられる。

2) 70 S i V / 30 P L L A の組成のサンプル [2] は見た目観察の結果、水酸化ナトリウム溶液中で急速に分解されることが観察された。この結果は、サンプル [2] は、P L L A の分子量が 20 万程度と低く、結晶化度が低い (図 17 に示す D S C 測定では 7.5%) ことによると考えられる。

サンプル [2] に T C P を 40 重量% 混ぜた組成である 30 P L L A / 40 T C P / 30 S i V (サンプル [3]) は、P L L A の分子量は 23 万程度で結晶化度は図 17 に示す D S C 測定では 9.1% であった。S i V のシロキサンと P L L A のカルボキシル基との反応による P L L A の分子配列秩序の乱れの発生が抑制された結果、結晶化度が上がって、分子量の減少及びそれに伴う綿材料の 3 次元骨格の崩壊の時期を遅らせたと考えられる。

[0051] <動物実験>

上記実施例で作成された綿状の骨欠損部充填材料のサンプルを γ 線照射による滅菌処理を施した上で、ウサギの大腿骨 (サンプル単独)、脊椎 (サンプルに骨髓穿刺液を混合)、脊椎 (サンプルに骨髓穿刺液と自家骨を混合) に埋植して、骨形成を評価した。

[0052] 脊椎への埋植直後の X 線視認性の評価は、単純 X 線画像の撮影により実施

した。骨形成能の評価はCT画像と染色切片により実施した。大腿骨の染色切片の作製方法は、骨孔に対してヨコ方向で作製し、脊椎の染色切片は矢状面で作製した。染色はヘマトキシリン・エオジンを実施した。

[0053] 図11に脊椎への埋植直後(A)と、埋植後12週間経過後(B)の放射線学的データ、図12に大腿骨への埋植後12週間経過後の組織学的データと組織形態計測学的データ、図13に脊椎への埋植後12週間経過後の組織学的データ及び組織形態計測学的データをそれぞれ示す。

[0054] 図11のCT画像から、試料1を脊椎に骨髓穿刺液を混合して埋植後12週間を経過した後に埋植した部位に骨が形成されたことがわかる。

[0055] 図12の組織学的データ及び組織形態計測学的データから、試料1を大腿骨への埋植後12週間経過後、実験のためにウサギの大腿骨に円状に形成した骨孔の27.1%を占める部分に新生骨が形成されていることが確認できた。

[0056] 図13の組織学的データ及び組織形態計測学的データから、試料1を脊椎に骨髓穿刺液を混合して自家骨と共に埋植後12週間を経過した後、埋植した部位の39%の面積に新生骨が形成されたことが確認できた。

[0057] 本発明の骨欠損部充填材料は、単独で使用する他、自家骨を綿材に包んだ状態で骨欠損部に充填するという方法で使用する事が可能である。自家骨との親和性が高いため、欠損部に自家骨が充填されて、その状態で骨が形成されるのを助ける。図6は、自家骨を本発明の骨欠損部充填材料で包んで使用する状態を示す。S：Vから溶出したケイ素が自家骨と欠損部の骨の骨芽細胞を刺激し、当該部位における骨形成が促進される。

[0058] 本発明の骨欠損部充填材料のコポジット繊維は、PLLAマトリックス樹脂中において、TCP粒子とS：V粒子と共に互いに近接して保持された状態で体液と接触する。この状態で、TCPの吸収置換による骨形成と微量のケイ素による骨芽細胞刺激による骨形成促進とが並行して有効に行われると考えられる。

[0059] 本発明のポリ乳酸／リン酸カルシウム／ケイ素溶出型炭酸カルシウムコ

ンポジットからなる生分解性繊維で形成された綿状骨欠損部充填材料は、人体の骨欠損部に充填されたときにX線によって充填位置を確認できる。

[0060] 本出願の発明ではリン酸カルシウムとして β -TCP等の生体吸収性のもを用いるが、生体吸収性ではないリン酸カルシウム（例：ハイドロキシアパタイト）もアミノ基のついたケイ酸部分を有しない点では β -TCPと同じである。そこで、 β -TCPに変えてハイドロキシアパタイト（HAp）を相当量加えてSiVとPLLAとHApのコンポジットとしても、同様にアミド結合の発生による分子秩序の乱れに起因する非晶質相量の増加が抑制されて、それで得られたコンポジットの生体吸収性はSiVとPLLAのコンポジットよりも遅らせることが可能である。従って、本件出願で述べたことはその限度でHApを用いたコンポジットについても基本的に適用可能であると考えられる。具体的には、本発明の骨欠損部充填材料と同様の構成を、 β -TCPに代えてHApを用いて構成することが可能である。例えば、SiV30重量%/HAp40重量%/PLLA30重量%の比率で構成することが可能である。

請求の範囲

- [請求項1] エレクトロスピンングで製造された生分解性繊維を含む綿状の骨欠損部充填材料であって、
- 前記生分解性繊維は、リン酸カルシウム粒子を40～60重量%、ケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子を10重量%以上、残部にポリL乳酸樹脂を30重量%以上含んでおり、かつ
- 前記ポリL乳酸樹脂の非晶質相量が75～98%である、前記骨欠損部充填材料。
- [請求項2] 前記ポリL乳酸樹脂の非晶質相量が85%以上95%以下である、請求項1に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項3] 前記リン酸カルシウムは β -TCPである、請求項1又は2に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項4] 前記生分解性繊維は、ポリL乳酸溶液とケイ素溶出型炭酸カルシウム粒子とリン酸カルシウム粒子の混合溶液をニーダーを用いて熱混練して得たコンポジットを溶剤で溶解して製造した紡糸溶液を、エレクトロスピンングして製造されたものである、請求項1～3のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項5] 前記ケイ素溶出型炭酸カルシウムはシロキサンを2～4重量%含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項6] 前記ポリL乳酸樹脂の分子量が20万～25万である、請求項1～5のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項7] 前記骨欠損部充填材料は、25kGy～35kGyの γ 線照射による滅菌処理を施すことによってポリL乳酸の分子量が7万～12万に減少したものである、請求項1～6のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項8] 前記生分解性繊維の外径は10～50 μ mである、請求項1～7のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。
- [請求項9] 前記ポリ乳酸樹脂中に前記リン酸カルシウム粒子とケイ素溶出型炭

酸カルシウム粒子がほぼ均一に分散されている、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料。

[請求項10] 溶融したポリ L 乳酸溶液中にリン酸カルシウム粒子と S i V 粒子を 3 者の重量比率をリン酸カルシウム 4 0 ～ 6 0 重量%、ケイ素溶出型炭酸カルシウム 1 0 重量%以上、残部にポリ L 乳酸 3 0 重量%以上の配合で投入して、その状態でニーダーを用いて混錬し、
前記混錬した溶液をその後常温冷却して固化させてポリ L 乳酸の分子量が 2 0 万～2 5 万、非晶質相量が 7 5 ～ 9 8 %であるコンポジットを作製し、
前記コンポジットを溶剤で溶かして、紡糸溶液を作製し、
前記紡糸溶液をエレクトロスピング法を用いて紡糸して、生分解性繊維を製造し、
前記生分解性繊維をエタノール溶液を満たしたコレクターに受けて堆積させることによって、綿状の骨欠損部充填材料を製造する工程を含む、
前記骨欠損部充填材料の製造方法。

[請求項11] 前記ポリ L 乳酸樹脂の非晶質相量が 8 5 %以上 9 5 %以下である、請求項 1 に記載の骨欠損部充填材料の製造方法。

[請求項12] 前記リン酸カルシウムは β -T C P である、請求項 1 又は 2 に記載の骨欠損部充填材料の製造方法。

[請求項13] 前記骨欠損部充填材料に、2 5 k G y ～ 3 5 k G y の γ 線照射による滅菌処理を施すことによってポリ L 乳酸の分子量を 7 万～1 2 万に減少させる工程を含む、請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の骨欠損部充填材料の製造方法。