

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007年4月12日 (12.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/039973 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/314096
- (22) 国際出願日: 2006年7月14日 (14.07.2006)
- (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2005-294058 2005年10月6日 (06.10.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリジナル
株式会社 (OLYMPUS CORPORATION) [JP/JP]; 〒
1510072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 Tokyo
(JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 土屋 利江 (TSUCHIYA, Toshie) [JP/JP]; 〒
1580094 東京都世田谷区玉川3-29-21 Tokyo
(JP). 玉井 将人 (TAMAI, Masato) [JP/JP]; 〒2270044
神奈川県横浜市青葉区もえぎ野18-36-105
Kanagawa (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 袴塚 康治 (HAKA-
MATSUKA, Yasuharu) [JP/JP]; 〒1960033 東京都昭島
市東町3-2-13-603 Tokyo (JP). 田村 知明
(TAMURA, Tomoaki) [JP/JP]; 〒1910032 東京都日野
市三沢1502-8-306 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 上田 邦生, 外 (UEDA, Kunio et al.); 〒
2200012 神奈川県横浜市西区みなとみらい3-3-
1 三菱重工横浜ビル24F Kanagawa (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
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, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REINFORCING AGENT FOR BIOLOGICAL TISSUE, METHOD OF PRODUCING THE SAME, UTILIZATION OF THE SAME AND METHOD OF CULTURING CELLS

(54) 発明の名称: 生体組織補填材、その製造方法および使用、ならびに細胞培養方法

(57) Abstract: A method of producing a reinforcing agent for a biological tissue, which is applicable to a site to be reinforced and can improve the working properties in transplantation, involving the step S1 of coprecipitating ammonium hydrogen phosphate together with calcium nitrate in the presence of sulfuric acid.

(57) 要約: 強度を必要とする部位に適用でき、移植を行う際の作業性を向上することができる生体組織補填材の製造方法は、燐酸水素アンモニウムと硝酸カルシウムとを硫酸存在下において共沈させる工程S1を含む。

WO 2007/039973 A1

明 細 書

生体組織補填材、その製造方法および使用、ならびに細胞培養方法
技術分野

[0001] この発明は、生体組織補填材、その製造方法および使用、ならびに細胞培養方法に関するものである。

背景技術

[0002] 従来、生体組織補填材の一種である人工骨補填材としてはハイドロキシアパタイト(HAP)、 β 燐酸三カルシウム(β TCP)が知られている(例えば、非特許文献1参照)。また、近年、硫酸カルシウムを骨補填材として使用する報告がなされている(例えば、非特許文献2参照)。

非特許文献1:植村他、「生分解性 β TCP多孔材料を用いた骨におけるティッシュエンジニアリングー生体内で強度を増す新しい材料オスフェリオン」メディカル朝日、朝日新聞社、2001. 10. 1, 30(10)p. 46-49

非特許文献2:Raffy Mirzayan et al, "The use of calcium sulfate in the treatment of benign bone lesions", The Journal of bone and joint surgery, vol. 83-A, No. 3, March 2001, p.355-358

発明の開示

[0003] しかしながら、硫酸カルシウムは粉末であり、燐酸カルシウムのような焼結体に構成することができないので、強度を必要とする部位に適用することができないという不都合がある。また、硫酸カルシウムは粉末であるために移植を行うのに作業性が悪いという問題がある。

[0004] 本発明は上述した事情に鑑みてなされたものであって、強度を必要とする部位に適用でき、移植を行う際の作業性を向上することができる生体組織補填材、その製造方法および使用、ならびに細胞培養方法を提供することを目的としている。

[0005] 上記目的を達成するために、本発明は、以下の手段を提供する。

本発明は、硫酸基を含有する燐酸カルシウムからなる生体組織補填材を提供する。
。

上記発明においては、硫黄(S)と燐(P)との比率が、 $1/2 \leq P/(S+P) \leq 5/6$ となるように調製されていることが好ましい。

前記生体補填材は、さらに生体由来物質を有していてもよい。

また、本発明は、燐酸水素アンモニウムと硝酸カルシウムとを硫酸存在下において共沈させる工程を含む生体組織補填材の製造方法を提供する。

[0006] また、本発明は、前記生体組織補填材と生体由来物質とを組み合わせる工程を有する細胞培養方法を提供する。

また、本発明は、生体由来物質と組み合わせる、細胞培養基材としての前記生体組織補填材の使用を提供する。

[0007] 本発明において、前記生体由来物質が成長因子およびサイトカインの少なくとも一方を有していてもよい。

また、本発明において、前記生体由来物質が組織由来細胞を有していてもよい。

また、本発明において、前記生体由来物質が幹細胞を含む細胞集団を有していてもよい。

[0008] 本発明の生体組織補填材および細胞培養方法は、強度を必要とする部位に適用でき、移植を行う際の作業性を向上することができるという効果を奏する。また、本発明に係る製造方法によれば、燐と硫黄とを均一に混合することができ、かつ、定められた混合比に容易に調製することができるという効果を奏する。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]本発明の一実施形態に係る生体組織補填材の製造方法を示すフローチャートである。

[図2]図1の製造方法により製造された本実施形態に係る生体組織補填材のX線解析結果を示す図である。

[図3]図1の製造方法により製造された本実施形態に係る生体組織補填材のペレットに播種して培養した骨芽細胞の増殖能を示すグラフである。

[図4]図1の製造方法により製造された本実施形態に係る生体組織補填材のペレットに播種して培養した骨芽細胞の分化能を示すグラフである。

[図5]図1の製造方法により製造された本実施形態に係る生体組織補填材を含有す

る培地を用いて培養した骨芽細胞の増殖能を示すグラフである。

[図6]図1の製造方法により製造された本実施形態に係る生体組織補填材を含有する培地を用いて培養した骨芽細胞の分化能を示すグラフである。

[図7]実験例3-1において、hMSCを抽出液中で培養した際の増殖能をDNA量により評価した結果を示すグラフである。

[図8]実験例3-1において、hMSCをペレット上で培養した際の増殖能をDNA量により評価した結果を示すグラフである。

[図9]実験例3-2において、hMSCを抽出液中で培養した際の分化能をアルカリフォスファターゼの産生量により評価した結果を示すグラフである。

[図10]実験例3-2において、hMSCをペレット上で培養した際の分化能をアルカリフォスファターゼの産生量により評価した結果を示すグラフである。

[図11]実験例3-2において、hMSCを抽出液中で培養した際の分化能をオステオカルシンの産生量により評価した結果を示すグラフである。

[図12]実験例3-2において、hMSCをペレット上で培養した際の分化能をオステオカルシンの産生量により評価した結果を示すグラフである。

[図13]実験例4において、hMSCを抽出液中で培養した際の石灰化度をカルシウムの沈着量により評価した結果を示すグラフである。

[図14]実験例5において、bFGFの吸着量を評価した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明の一実施形態に係る生体組織補填材とその製造方法について、図1～図6を参照して以下に説明する。

本実施形態に係る生体組織補填材は、硫酸基を含有する磷酸カルシウムにより構成されている。

[0011] この生体組織補填材は、図1に示されるように、以下の製造方法を用いて製造することができる。

まず、0.5Mの硫酸 H_2SO_4 、0.5Mの磷酸水素アンモニウム $(NH_4)_2HPO_4$ 水溶液および0.5Mの硝酸カルシウム $Ca(NO_3)_2$ 水溶液を作成する。次いで、作成された0.5Mの硫酸と0.5Mの磷酸水素アンモニウム水溶液とを混合し、1.0Nの水酸

化ナトリウムを用いて得られた混合液のpHが10となるように調製する。

[0012] このようにして調製された混合液中に、0.5Mの硝酸カルシウム水溶液を徐々に滴下する(ステップS1)。このとき、混合液のpHをモニタリングしてpHが10となるように1.0Nの水酸化ナトリウムを加える。滴下終了後、1昼夜(24時間)攪拌し(ステップS2)、析出物を遠心分離により分離して蒸留水で洗浄する(ステップS3)。洗浄された析出物を濾過し(ステップS4)、乾燥し(ステップS5)、大気中において、800°Cで2時間保持することにより焼結する(ステップS6)。これにより、本実施形態に係る生体組織補填材が製造される。

[0013] このように本実施形態に係る生体組織補填材の製造方法によれば、リン酸水素アンモニウムと硝酸カルシウムとを硫酸存在下において共沈させる工程S1を含むので、定められた混合比でリンと硫黄とを均一に含有する生体組織補填材を簡易に製造することができる。そして、このようにして製造された本実施形態に係る生体組織補填材によれば、均一に含有される硫酸基の作用により、従来のHAPよりも骨芽細胞に対する増殖能および分化能に優れ、かつ従来のHAPの特徴を保持することができる。

[0014] 特に、硫黄SとリンPとの比率が $1/2 \leq P/(S+P) \leq 5/6$ であることが好ましい。このようにすることで、特に、従来のHAPと同等の物性を有することができる。

また、本実施形態に係る生体組織補填材とその製造方法によれば、特殊な原料を必要とせず、従来のHAPの製造コストとほぼ同程度のコストで製造することができるという利点を有する。

[0015] なお、本実施形態に係る生体組織補填材は、従来の骨補填材としてはもちろんのこと、高い骨芽細胞活性化作用から、以下の用途に適用することができる。

1. 骨芽細胞の培養基材

骨芽細胞を高い活性状態で培養することができる。

2. 培養骨の基材

骨芽細胞の活性が高い培養骨もしくは細胞外基質が豊富な培養骨を提供できる。

3. 骨補填材

骨芽細胞を活性化させる骨補填材を提供することができる。

4. 骨粗鬆症治療薬

骨芽細胞の活性化、細胞外基質による再石灰化効果による治療効果が期待できる。

5. 歯周骨再生用治療薬

骨芽細胞の活性化、細胞外基質による再石灰化効果による治療効果が期待できる。

[0016] (実施例)

次に、上記実施形態に係る生体組織補填材とその製造方法の実施例について説明する。

本実施例においては、図1に示されるフローチャートに従って、硫酸HAPからなる生体組織補填材を製造した。

[0017] 0.5Mの硫酸と、0.5Mの燐酸水素アンモニウム水溶液とを混合する際には、硫酸イオン SO_4^{2-} および燐酸イオン PO_4^{3-} の比 $X = \text{PO}_4^{3-} / (\text{SO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}) = \text{P} / (\text{S} + \text{P})$ が、 $X = 0, 1/6, 2/6, 3/6, 4/6, 5/6, 6/6$ となるように混合し、1.0Nの水酸化ナトリウムを用いて得られた混合液のpHが10となるように調製した。

[0018] このようにして得られた硫黄と燐との比 $X = 1/6 \sim 5/6$ の本実施形態に係る生体組織補填材、 $X = 6/6$ の従来のHAPおよび $X = 0$ の硫酸カルシウムについてのX線解析結果を図2に示す。この図2によれば、本実施形態に係る生体組織補填材は、 $X = 3/6 \sim 5/6$ の場合に、従来のHAP($X = 6/6$)とほぼ同じ構造であることが確認された。

[0019] 次に、本実施形態に係る生体組織補填材からなるペレットを製造した。ペレットは、図1の乾燥ステップS5により得られた硫酸HAPの粉末を、例えば、ステンレス製の金型に入れて30MPaでプレス成形したものを焼結ステップS6において大気中において、800°Cで2時間焼結することにより製造した。

[0020] (実験例1)

このようにして製造された本実施形態に係る生体組織補填材のペレットにヒト正常骨芽細胞を 4×10^4 個/well/mLになるように播種し、1週間培養した結果の骨芽細胞の増殖能を図3に、分化能を図4に、それぞれコントロールとの比率において示す。コントロールは、それぞれ、播種する前の細胞をそのまま培養皿上で培養した細胞であ

る。

増殖能は、Tetra Color One (450nm) により測定し、分化能は、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性をPNPの呈色反応 (405nm) によって測定した。

[0021] これによれば、本実施形態に係る生体組織補填材のペレットは、従来のHAP (X=6/6) および硫酸カルシウム (X=0/6) と比較して、骨芽細胞の増殖能および分化能が、優位に高いことが確認された。

[0022] (実験例2)

次に、焼結ステップS6により熱処理された硫酸HAPの粉末を培地に投入し (100 mg/mL)、シェーカーで72時間攪拌 (150rpm) した。その後、得られた液体を遠心分離機にかけ、3000rpmで10分間遠心分離を行った。これにより得られた上清に骨芽細胞を投入し (4×10^4 個/well/mL)、培養した結果の増殖能を図5に、分化能を図6に、それぞれコントロールとの比率において示す。コントロールは、それぞれ、播種する前の細胞をそのまま培養皿上で培養した細胞である。

[0023] これによれば、本実施形態に係る生体組織補填材を骨芽細胞の培地中に添加しただけでも、増殖能および分化能を向上させることができることがわかった。

[0024] (実験例3)

上記実施形態と同様の製造方法により製造された、硫黄と磷との比X=4/6の生体組織補填材 (以下の記載及び図面において、「 $\text{SO}_4\text{-HAp}$ 」として表す) からなるペレット (12mm ϕ \times 1mm) を試料として用いた。また、比較用の試料として従来のハイドロキシアパタイト (X=6/6; 以下の記載及び図面において、「HAp」と略記する) のペレット (12mm ϕ \times 1mm) を用いた。

[0025] $\text{SO}_4\text{-HAp}$ の再生医療における足場材料 (培養基材) としての利用を検討するために、分化誘導因子 (デキサメタゾン、アスコルビン酸、 β -グリセリン酸) を含む骨分化誘導培地中において、前記試料を足場材料 (培養基材) として用いて、 2×10^4 cells/ml/well のヒト間葉系幹細胞 (以下、「hMSC」と略記する) を24ウェルプレートに播種して培養 (7日間、14日間、21日間) を行い、hMSCの増殖および分化を調べた。

[0026] また、 $\text{SO}_4\text{-HAp}$ の流出成分の影響を検討するために、抽出処理 (100mg/ml、

37°C、3日間)を行い、得られた抽出液中でhMSCの培養(7日間、14日間、21日間)を行った。

[0027] 実験例3-1: hMSC増殖能の評価

hMSCの増殖については、細胞の破碎液を作製し、該破碎液中のDNA量を測定することで定量した。

細胞の破碎液の作製は、次のように行った。まず、培養終了後に培地を捨て、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で2回洗浄した後、トリプシンを加えて(200 μ l/well、37°C、1分)、細胞を剥がした。各ウェルに800 μ lのPBSを加え、細胞液を回収し、遠心分離を行い(4°C、1000rpm、2分)、上清を捨てて、細胞を回収した。回収した細胞中に、非イオン性界面活性剤ノニデット(登録商標)P-40を2%含有する液を600 μ l加えた後、氷冷して超音波を10秒間当て、細胞を破碎した。

[0028] DNAの定量には、Molecular Probes社製、PicoGreen(登録商標)dsDNA定量キット(励起波長(Ex):485nm;検出波長(Em):530nm)を使用した。

SO₄-HApおよびHApについて、抽出液中で培養した結果における増殖能を図7に、ペレット上で培養した結果における増殖能を図8に示す。

[0029] 実験例3-2: hMSC分化能の評価

分化能は、アルカリフォスファターゼとオステオカルシンの産生量で評価した。

アルカリフォスファターゼの産生量は、次のように測定した。培養終了後、各ウェルの培地を捨て、PBSで洗浄した後、4mMのp-ニトロリン酸、10mMのMgCl₂、0.1mMのZnCl₂を含む0.1Mのグリシン-NaCl-NaOH緩衝液を500 μ lずつ各ウェルに加え、室温で5分間放置し、この緩衝液の吸光度(波長405nmにおける光学密度OD)を測定した。

[0030] オステオカルシンの産生量は、細胞破碎液100 μ lを抗体プレートに入れ、市販のELISAキット(Gla-OC EIA Kit(タカラバイオ株式会社製))を用いてオステオカルシン濃度を測定することにより定量した。

[0031] SO₄-HApおよびHApについて、抽出液中で培養した結果におけるアルカリフォスファターゼ産生量を図9に、ペレット上で培養した結果におけるアルカリフォスファターゼ産生量を図10に、抽出液中で培養した結果におけるオステオカルシン産生量

を図11に、ペレット上で培養した結果におけるオステオカルシン産生量を図12に示す。

[0032] hMSCは骨芽細胞などの成熟した細胞に比べ未熟な細胞といわれ、成熟した細胞よりも増殖能に優れていることから、再生医療などに用いる細胞ソースとして非常に注目されている。実験例3の結果は、本願発明の生体組織補填材にhMSCまたは幹細胞を組み合わせれば、その組み合わせた細胞の能力が最大限に引き出され、その作用により、治療効果の向上が期待されることを示している。

[0033] (実験例4)

実験例3の抽出液中での培養を終了し、細胞を回収した後、各ウェルに0.1Nの塩酸を500 μ l加え、沈着したカルシウムを溶解させた。その後、この溶液のカルシウム濃度をカルシウムC-テストワコー(和光純薬工業)を用いて定量することで石灰化度の測定値とした。測定結果を図13に示す。

[0034] (実験例5)

実験例3と同様の SO_4 -HAp(硫黄と燐との比 $X=4/6$)からなるペレットおよびHAp(硫黄と燐との比 $X=6/6$)からなるペレットのそれぞれを、500pg/mlの塩基性繊維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor;以下、「bFGF」という;Pepro Tech EC Ltd. (London, UK) 製)を含む無血清培地中に入れ、37°Cで7日間温置することによって、bFGFの吸着について検討した。ペレット上に吸着したbFGF量を市販のELISAキット(Quantikine(登録商標) Human FGF Basic Immunoassay, R&D Systems Inc., ミネアポリス、ミネソタ州)に含まれている試薬を用いて測定した。

[0035] はじめに、温置終了後のペレットを上記ELISAキットに含まれている洗浄液で洗浄し、800 μ lのbFGFコンジュゲートを添加した。2時間後、ELISAキットのプロトコールに従い、基質溶液、停止液を加えた。呈色した溶液を新しいウェルに移し、その溶液の450nmの吸光度を測定した。このとき、ペレットを入れていないウェル上に吸着しているbFGF量をコントロール値とした。測定結果を図14に示す。

[0036] 測定結果より、 SO_4 -HApはHApよりbFGFの吸着能が高いことが分かった。成長因子もしくはサイトカインは関連する細胞を刺激し活性化する作用があり、例えば骨のリモデリングや、幹細胞または免疫細胞を必要な部位に呼び集める働きに関連す

るといわれている。本実験例の結果は、SO₄-HApに成長因子類を組み合わせれば、その組み合わせた成長因子の効果を長時間持続できる作用(成長因子を長時間にわたって徐放する作用)により、治療効果の向上が期待されることを示している。

請求の範囲

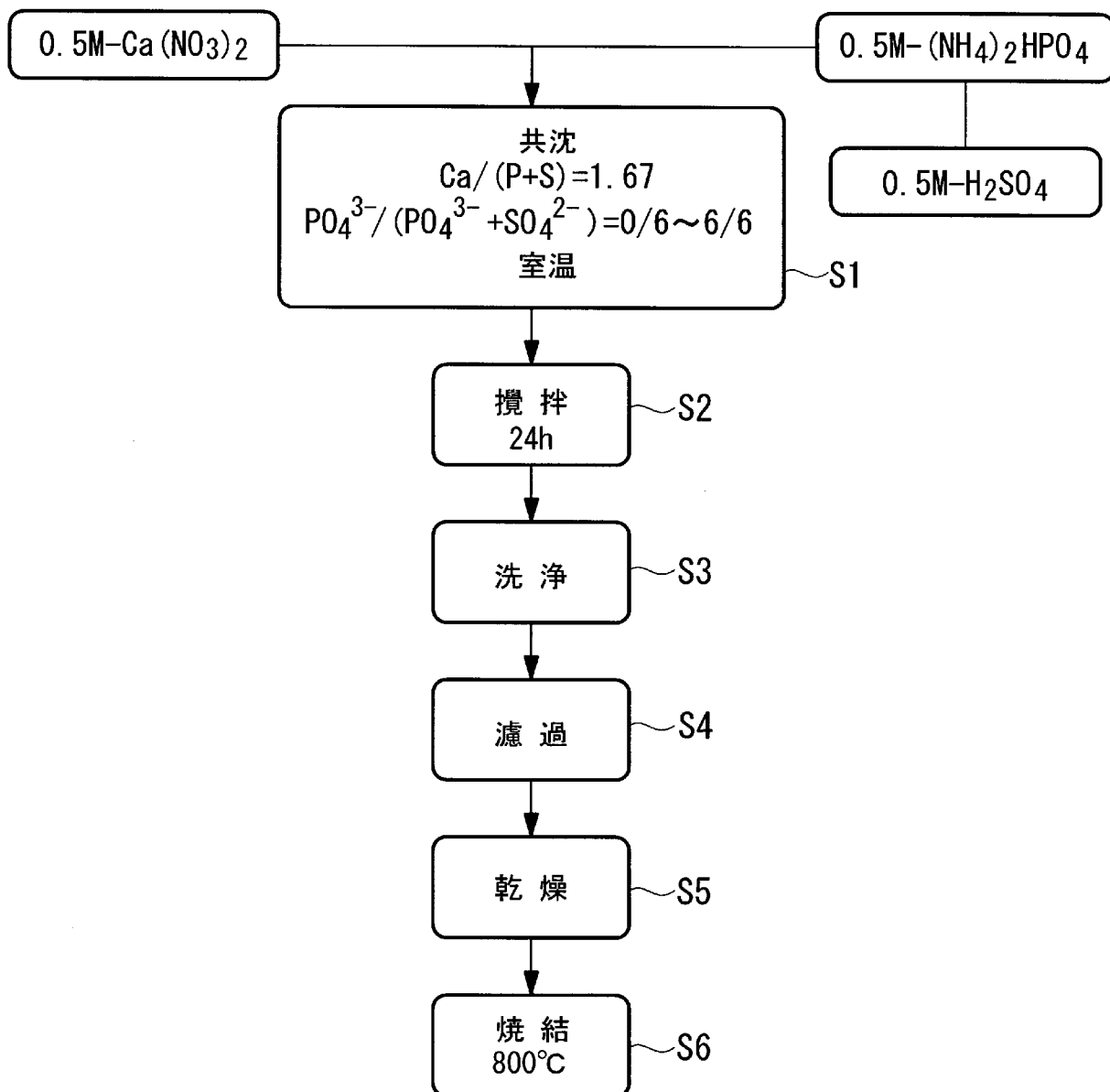
- [1] 硫酸基を含有する磷酸カルシウムからなる生体組織補填材。
- [2] 硫黄(S)と燐(P)との比率が、
 $1/2 \leq P / (S + P) \leq 5/6$
となるように調製されている請求項1に記載の生体組織補填材。
- [3] 磷酸水素アンモニウムと硝酸カルシウムとを硫酸存在下において共沈させる工程を含む生体組織補填材の製造方法。
- [4] 硫酸基を含有する磷酸カルシウムからなる基材と生体由来物質とを有する生体組織補填材。
- [5] 硫黄(S)と燐(P)との比率が、
 $1/2 \leq P / (S + P) \leq 5/6$
となるように調製されている請求項4に記載の生体組織補填材。
- [6] 前記生体由来物質が成長因子およびサイトカインの少なくとも一方を有する請求項4または請求項5に記載の生体組織補填材。
- [7] 前記生体由来物質が組織由来細胞を有する請求項4または請求項5に記載の生体組織補填材。
- [8] 前記生体由来物質が幹細胞を含む細胞集団を有する請求項4または請求項5に記載の生体組織補填材。
- [9] 請求項1または請求項2に記載の生体組織補填材と生体由来物質とを組み合わせる工程を有する細胞培養方法。
- [10] 前記生体由来物質が成長因子およびサイトカインの少なくとも一方を有する請求項9に記載の細胞培養方法。
- [11] 前記生体由来物質が組織由来細胞を有する請求項9に記載の細胞培養方法。
- [12] 前記生体由来物質が幹細胞を含む細胞集団を有する請求項9に記載の細胞培養方法。
- [13] 生体由来物質と組み合わせる、細胞培養基材としての請求項1または請求項2に記載の生体組織補填材の使用。
- [14] 前記生体由来物質が成長因子およびサイトカインの少なくとも一方を有する請求項

13に記載の生体組織補填材の使用。

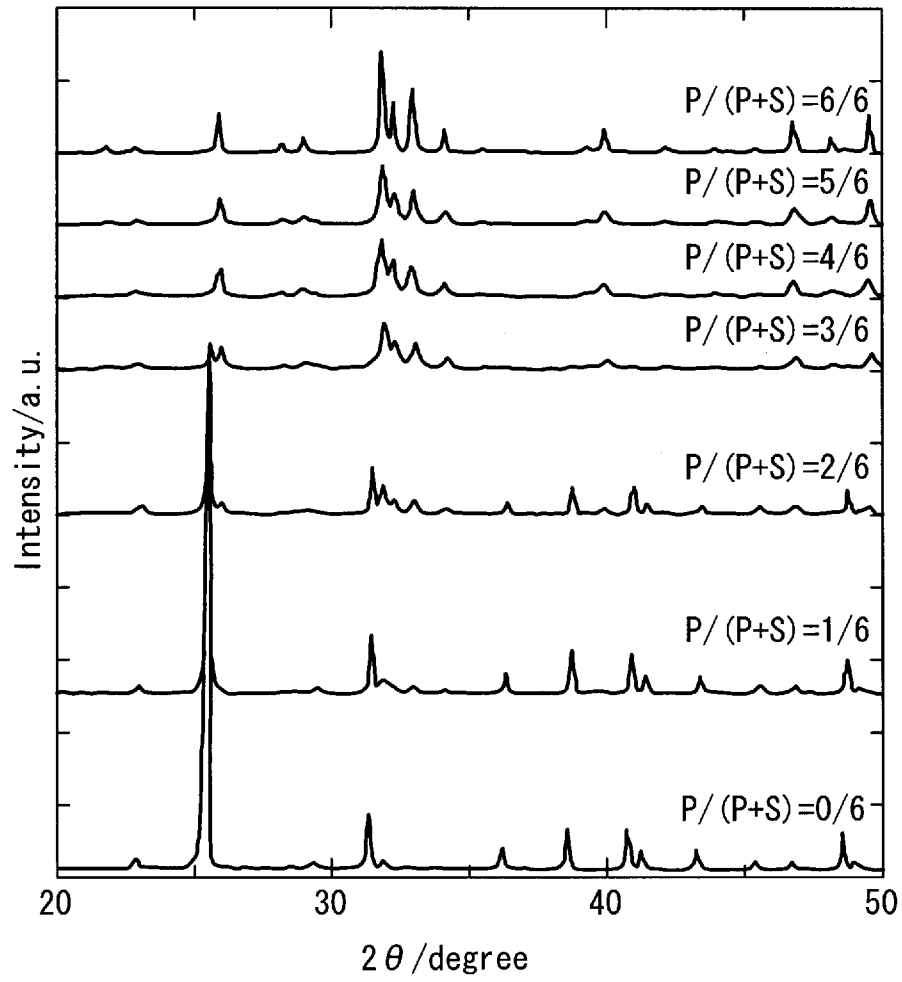
[15] 前記生体由来物質が組織由来細胞を有する請求項13に記載の生体組織補填材の使用。

[16] 前記生体由来物質が幹細胞を含む細胞集団を有する請求項13に記載の生体組織補填材の使用。

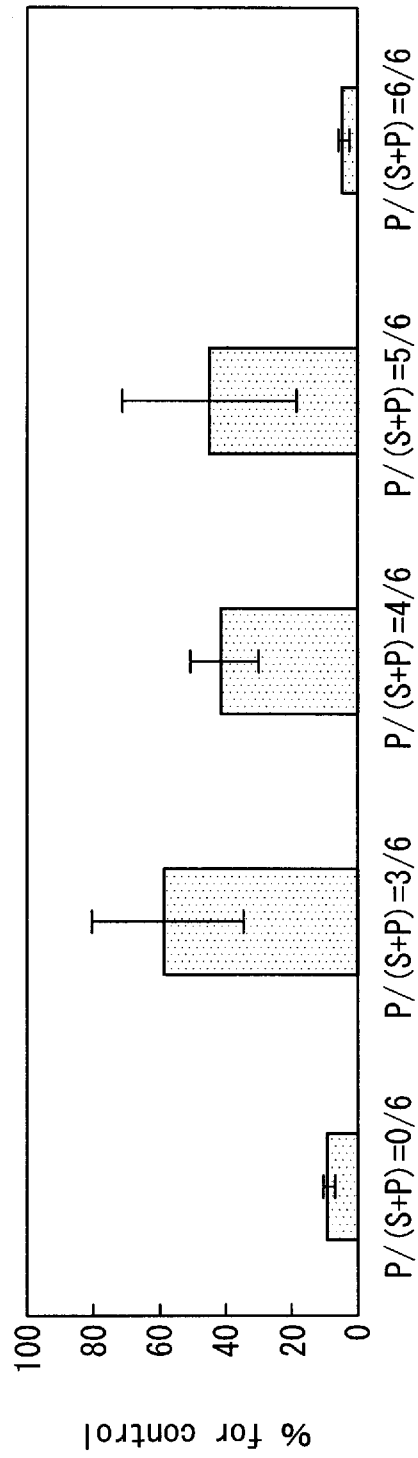
[図1]



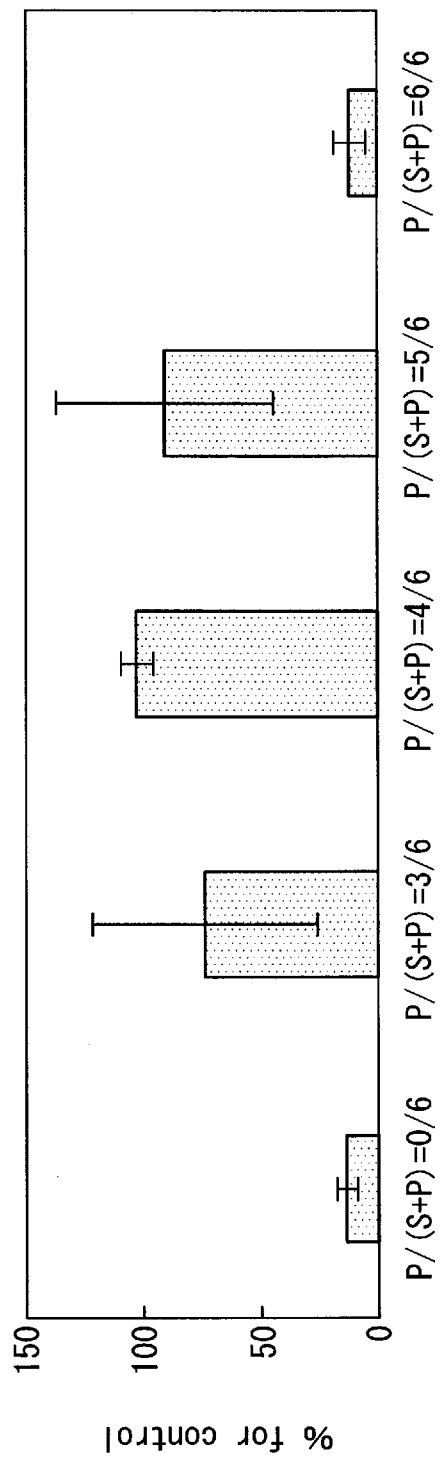
[図2]



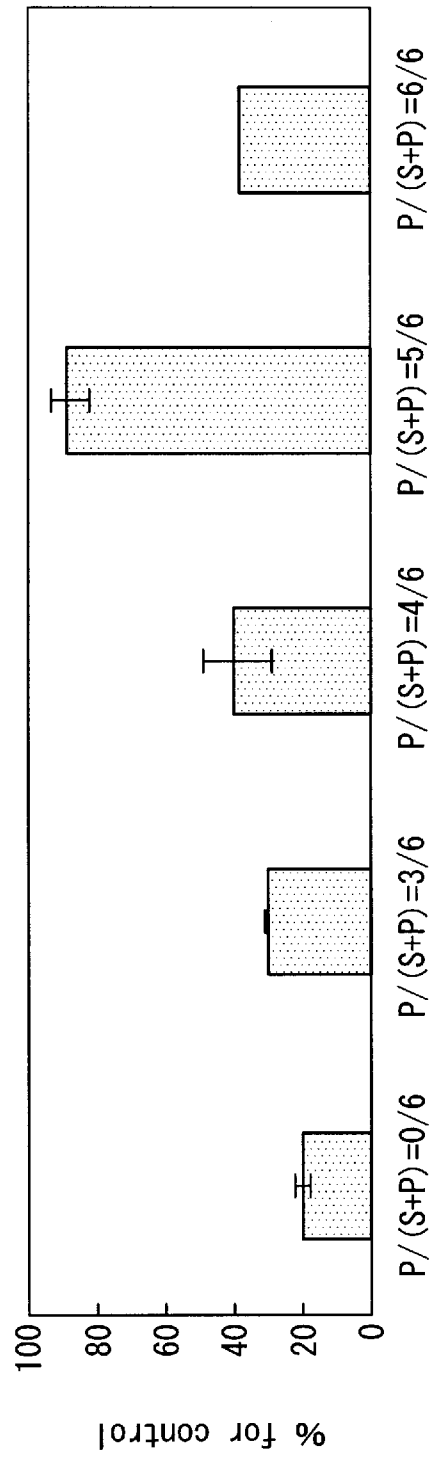
[図3]



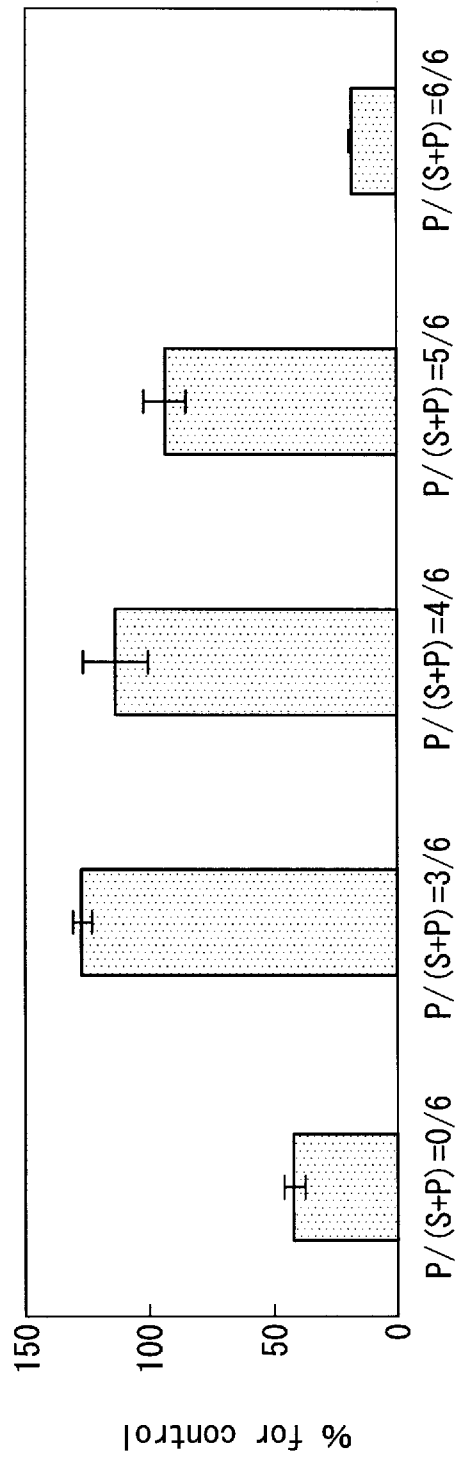
[図4]



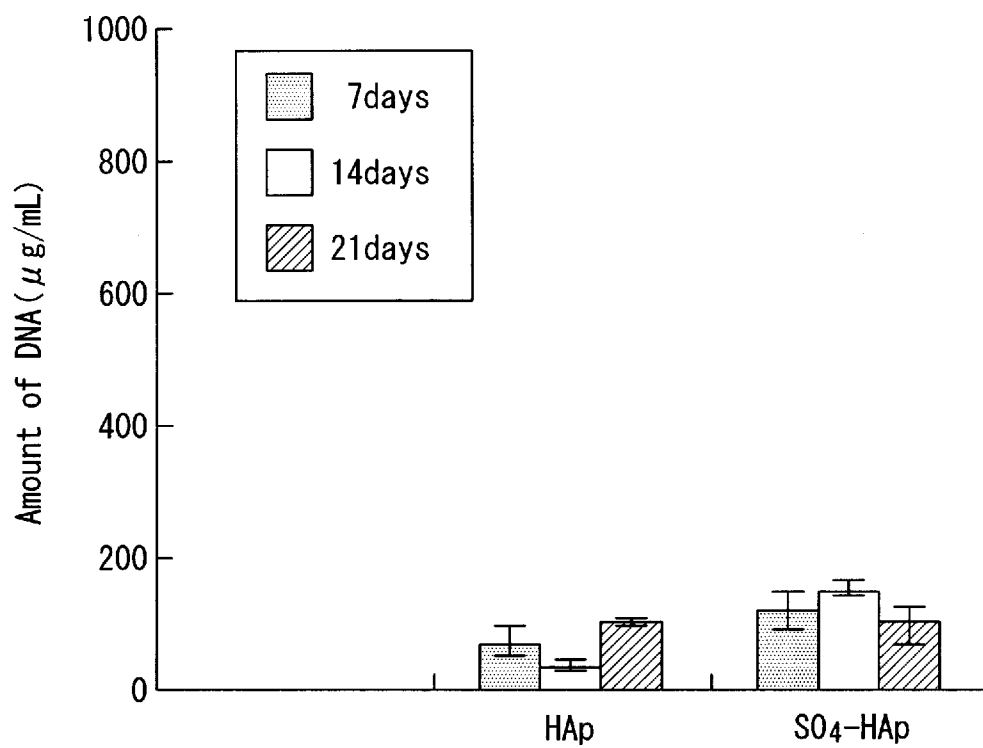
[図5]



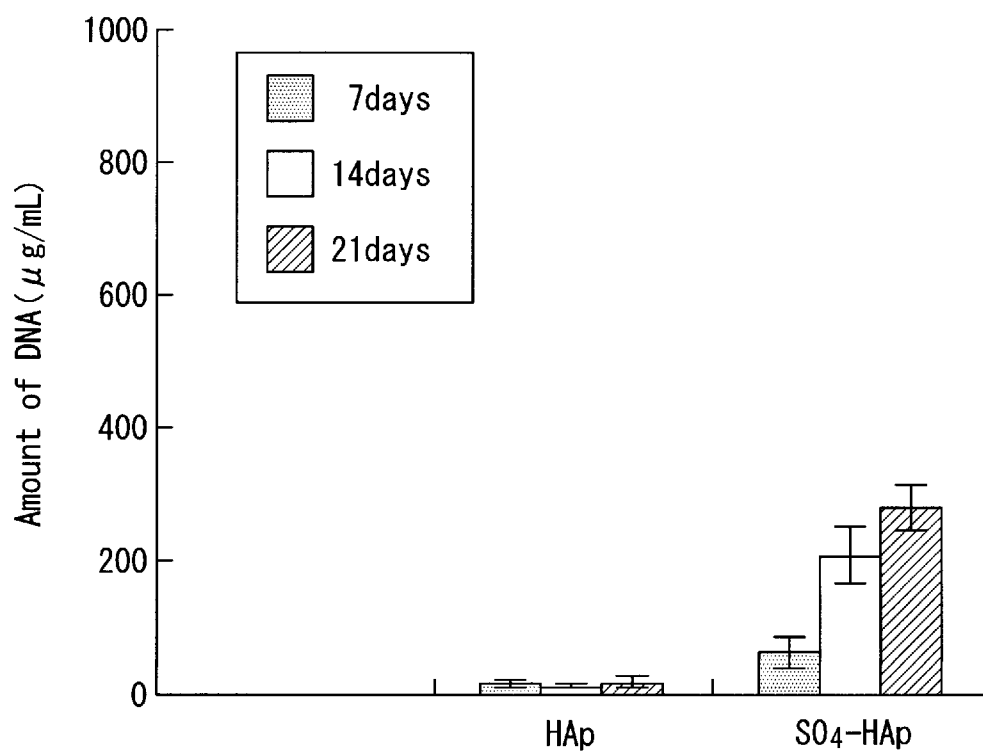
[図6]



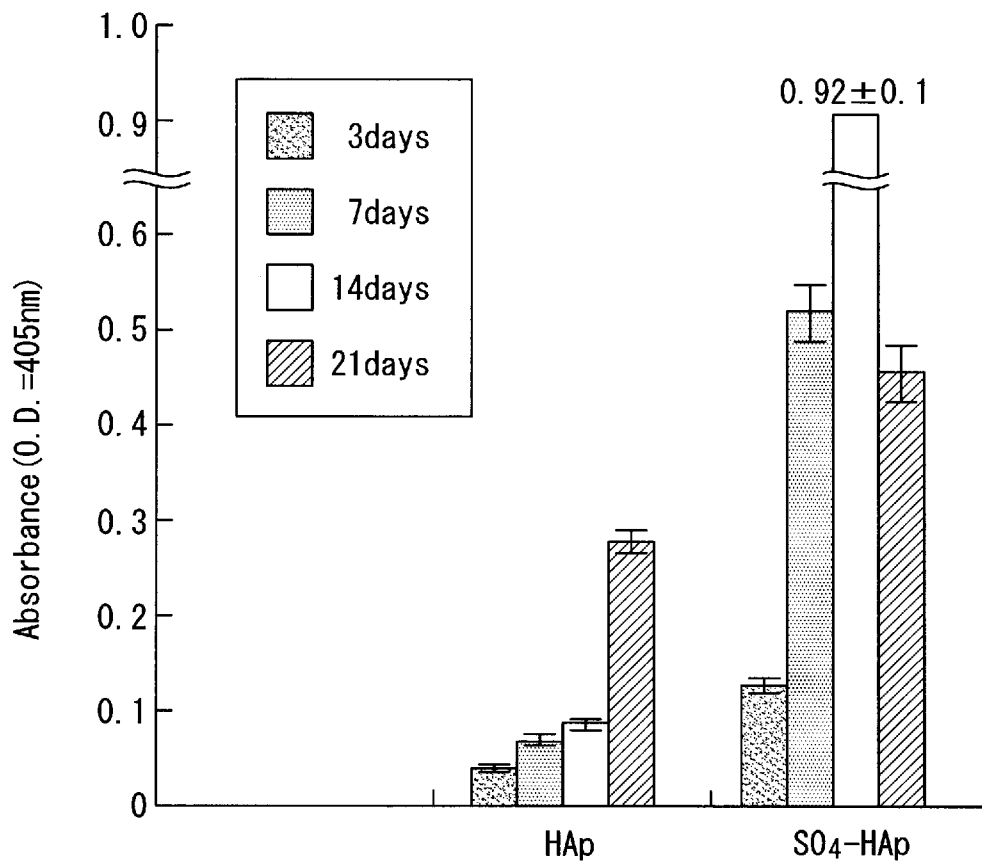
[図7]



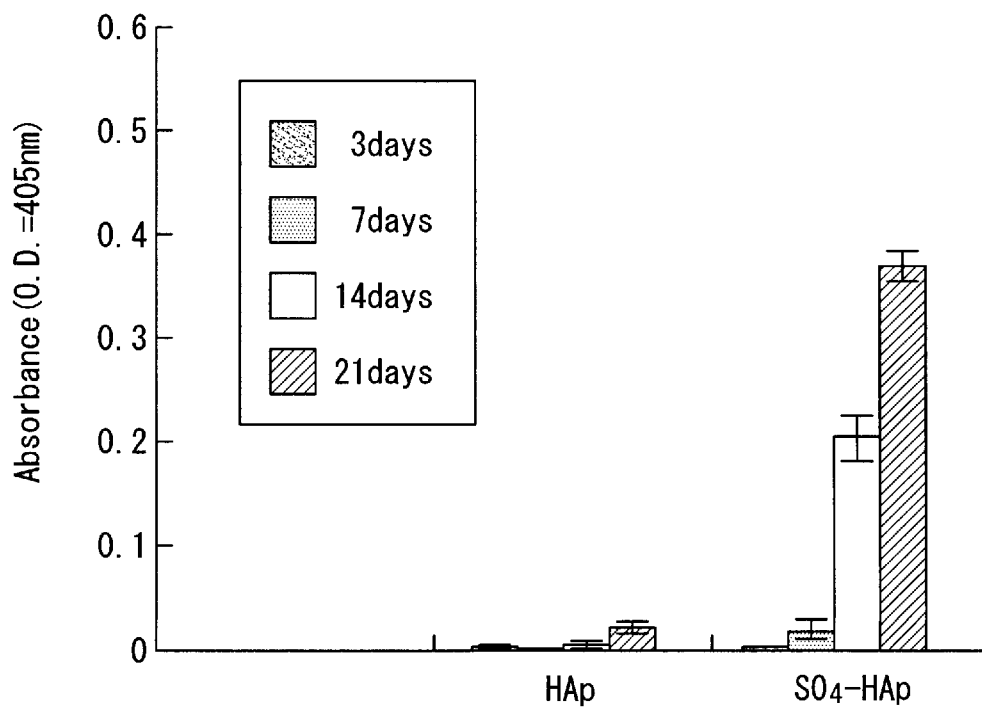
[図8]



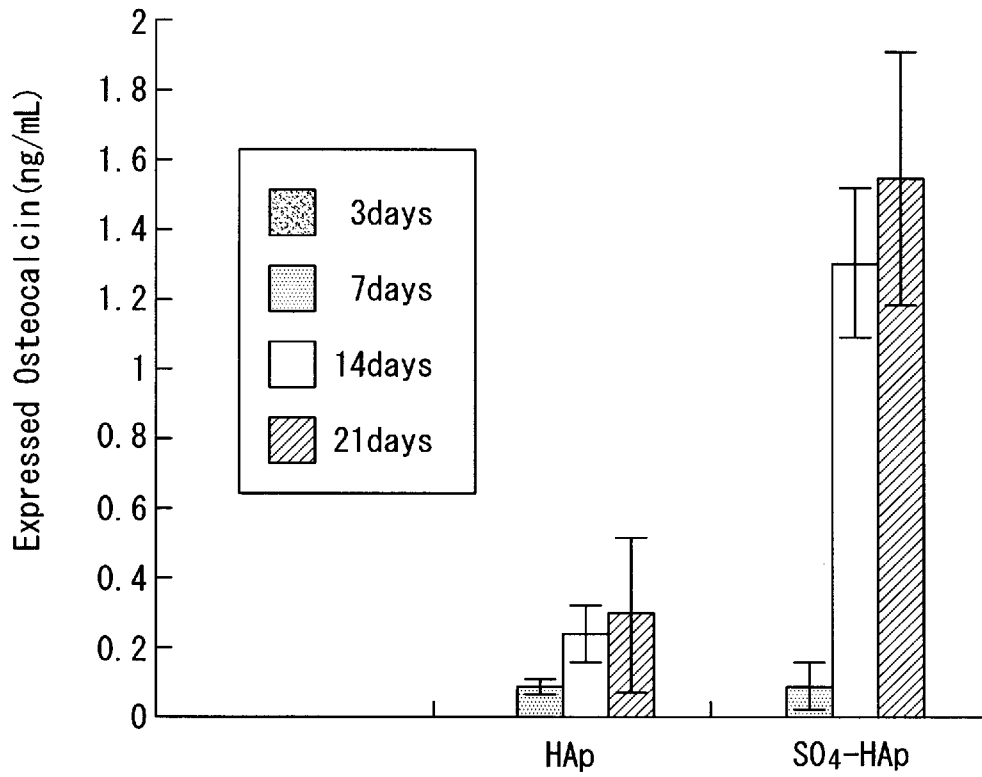
[図9]



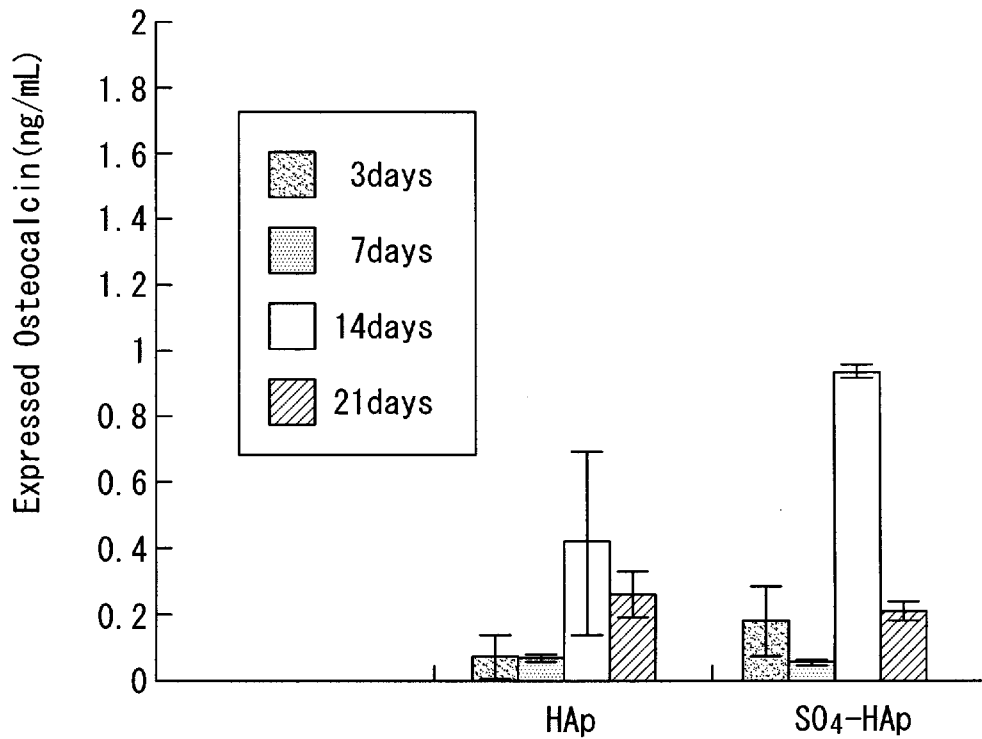
[図10]



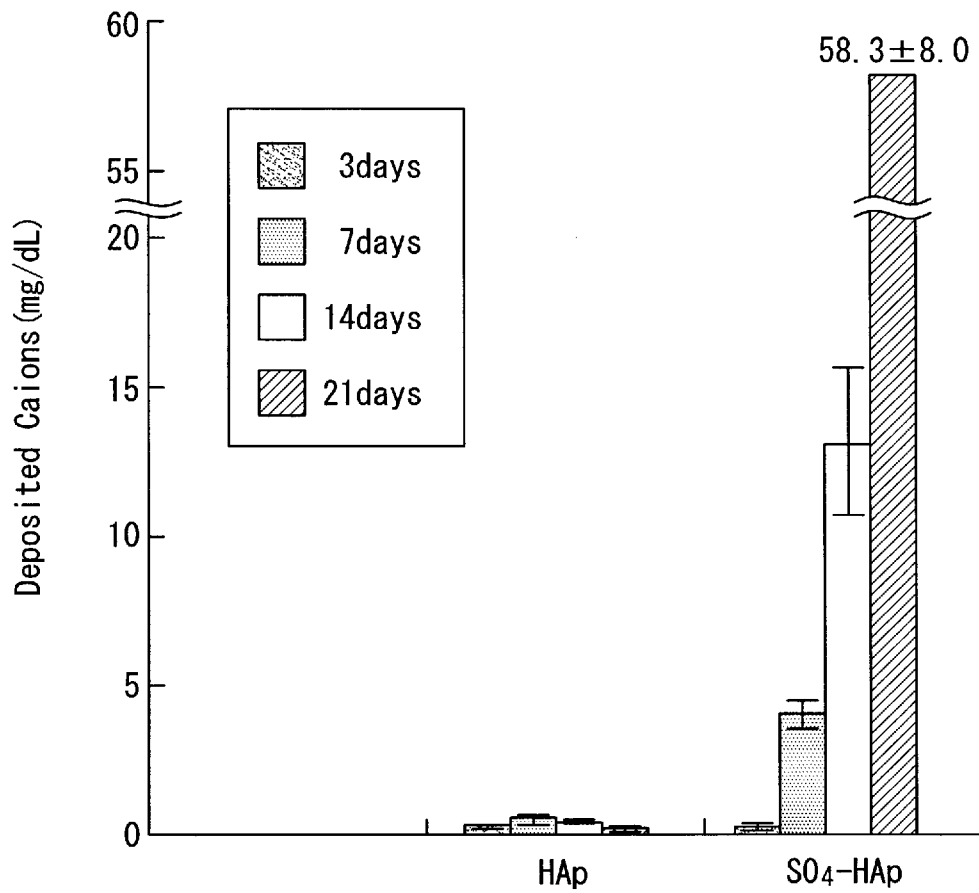
[図11]



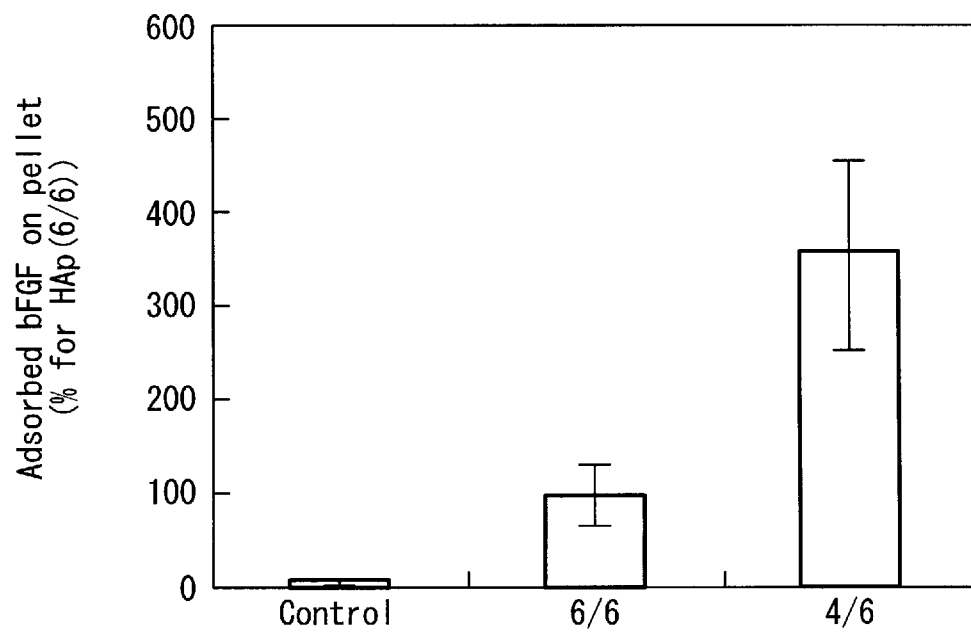
[図12]



[図13]



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314096

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01) i, C12N5/06(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, C12N5/06

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIANG, Chong et al., Synthesis of calcium phosphate/calcium sulfate powder, Materials Chemistry and Physics, 2004, 88(2-3), 285-289	1-16
A	JP 2000-508911 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC), 18 July, 2000 (18.07.00), Full text & WO 97/40137 A1 & EP 906415 A1 & US 2003/031695 A1	4-16
A	JP 2002-282285 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 02 October, 2002 (02.10.02), Full text & WO 2002/76522 A1 & EP 1378256 A1 & US 2004/057939 A1	4-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 22 September, 2006 (22.09.06)	Date of mailing of the international search report 03 October, 2006 (03.10.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/314096

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LESHKIVICH, K. S. et al., Synthetic silicate sulfate apatite: Mechanical properties and biocompatibility testing, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993, 4(1), 86-94 (abstract) CAPLUS [online]; AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS) [retrieved on 1 September 2006] Retrieved from STN, CAPLUS Accession no.1993:656485	1-16

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, C12N5/06(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, C12N5/06		
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 1971-2006年 日本国実用新案登録公報 1996-2006年 日本国登録実用新案公報 1994-2006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) MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN)		
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 請求の範囲の番号
X	LIANG, Chong et al., Synthesis of calcium phosphate/calcium sulfate powder, Materials Chemistry and Physics, 2004, 88(2-3), 285-289	1-16
A	JP 2000-508911 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC) 2000.07.18, 全文 & WO 97/40137 A1 & EP 906415 A1 & US 2003/031695 A1	4-16
A	JP 2002-282285 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002.10.02, 全文 & WO 2002/76522 A1 & EP 1378256 A1 & US 2004/057939 A1	4-16
<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 22.09.2006	国際調査報告の発送日 03.10.2006	
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) 川口 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4C 9829

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 請求の範囲の番号
A	LESHKIVICH, K. S. et al., Synthetic silicate sulfate apatite: Mechanical properties and biocompatibility testing, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993, 4(1), 86-94 (abstract) CAPLUS [online]; AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS) [retrieved on 1 September 2006] Retrieved from STN, CAPLUS Accession no.1993:656485	1-16