

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5706691号
(P5706691)

(45) 発行日 平成27年4月22日(2015.4.22)

(24) 登録日 平成27年3月6日(2015.3.6)

(51) Int.Cl. F I
CO8G 65/333 (2006.01) CO8G 65/333
CO8G 81/00 (2006.01) CO8G 81/00
CO8J 3/075 (2006.01) CO8J 3/075

請求項の数 10 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2010-542805 (P2010-542805)	(73) 特許権者	301032160
(86) (22) 出願日	平成21年6月19日 (2009.6.19)		株式会社ネクスト21
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/002789		東京都文京区本郷3-38-1本郷イシワ
(87) 国際公開番号	W02010/070775		タビル8階
(87) 国際公開日	平成22年6月24日 (2010.6.24)	(74) 代理人	100116850
審査請求日	平成24年6月15日 (2012.6.15)		弁理士 廣瀬 隆行
(31) 優先権主張番号	特願2008-324313 (P2008-324313)	(74) 代理人	100165847
(32) 優先日	平成20年12月19日 (2008.12.19)		弁理士 関 大祐
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100161322
			弁理士 白坂 一
特許法第30条第1項適用	American Chemical Society, Macromolecules, vol. 41, pp5379-pp5384, 2008年6月21日	(74) 代理人	100120570
			弁理士 中 敦士
		(72) 発明者	鄭 雄一
			東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

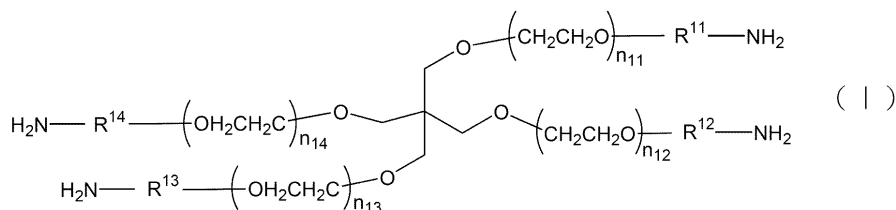
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイドロゲルの製造方法、及びハイドロゲル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ハイドロゲルの製造方法であって、
 第1の四分岐化合物と第1の緩衝液を含む第1の溶液と、第2の四分岐化合物と第2の緩衝液を含む第2の溶液とを混合する混合工程とを含み、
 前記第1の四分岐化合物は、
 下記式(I)で表わされ、
 【化14】



10

前記式(I)中、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、25~250の整数を示すものであり、

前記式(I)中、 $\text{R}^{11} \sim \text{R}^{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、

$\text{C}_1 - \text{C}_7$ アルキレン基、 $\text{C}_2 - \text{C}_7$ アルケニレン基、 $-\text{NH}-\text{R}^{15}-$ 、 $-\text{CO}-\text{R}^{16}$

20

$^5 - , - R^{16} - O - R^{17} - , - R^{16} - NH - R^{17} - , - R^{16} - CO_2 - R^{17} - , - R^{16} - CO_2 - NH - R^{17} - , - R^{16} - CO - R^{17} - ,$ 又は $- R^{16} - CO - NH - R^{17} -$ を示し,

ここで, R^{15} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示し,

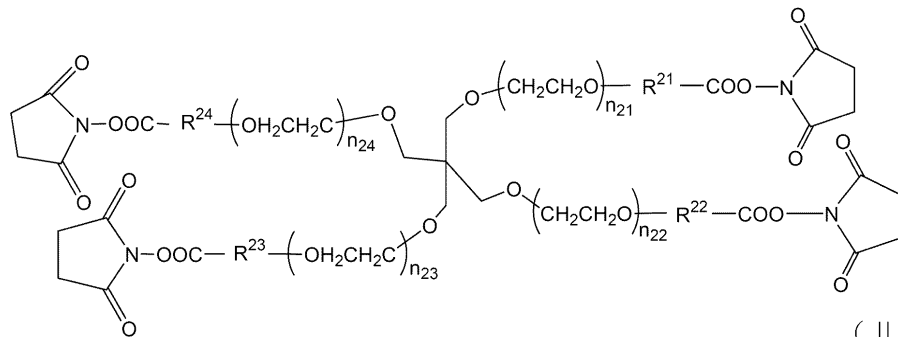
R^{16} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示し,

R^{17} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示し,

前記第2の四分岐化合物は,

下記式(II)で表わされ,

【化15】



前記式(II)中, $n_{21} \sim n_{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, 20 ~ 250の整数を示すものであり,

前記式(II)中, $R^{21} \sim R^{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, $C_1 - C_7$ アルキレン基, $C_2 - C_7$ アルケニレン基, $-NH - R^{25} - , -CO - R^{25} - , -R^{26} - O - R^{27} - , -R^{26} - NH - R^{27} - , -R^{26} - CO_2 - R^{27} - , -R^{26} - CO_2 - NH - R^{27} - , -R^{26} - CO - R^{27} - ,$ 又は $-R^{26} - CO - NH - R^{27} -$ を示し,

ここで, R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示し,

R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示し,

R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示し,

前記第1の緩衝液は, pHが6 ~ 8, 及び濃度が20 ~ 200 mMであり,

前記第2の緩衝液は, pHが5 ~ 7.5, 及び濃度が20 ~ 200 mMである,

ハイドロゲルの製造方法。

【請求項2】

前記 $R^{11} \sim R^{14}$ は, $C_1 - C_7$ アルキレン基であり,

前記 $R^{21} \sim R^{24}$ は, $-CO - R^{25} -$ (R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す) である,

請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】

前記 $R^{11} \sim R^{14}$ は, $C_2 - C_4$ アルキレン基であり,

前記 $R^{21} \sim R^{24}$ は, $-CO - R^{25} -$ (R^{25} は $C_2 - C_4$ アルキレン基を示す) である,

請求項1に記載の製造方法。

【請求項4】

前記第1の緩衝液は,

リン酸緩衝液, 又はリン酸緩衝生理食塩水のいずれか1つ又は2つを含み,

前記第2の緩衝液は,

リン酸緩衝液, クエン酸・リン酸緩衝液, リン酸緩衝生理食塩水, 又はクエン酸・リン酸緩衝生理食塩水のいずれか1つ又は2つ以上を含む,

請求項1に記載の製造方法。

【請求項5】

10

20

30

40

50

前記混合工程後の混合溶液は、
塩濃度が $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^2$ mM である、
請求項 1 に記載の製造方法。

【請求項 6】

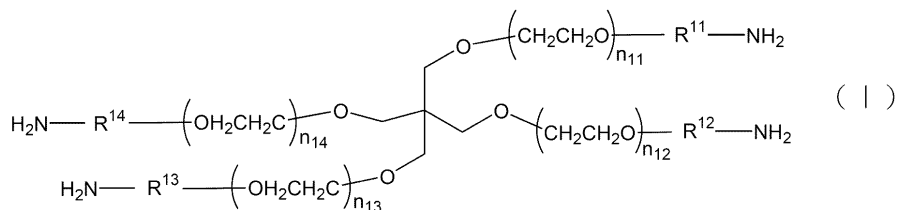
前記第 1 の緩衝液は、
前記 pH が 6 ~ 8 である 20 mM ~ 100 mM のリン酸緩衝液であり、
前記第 2 の緩衝液は、
前記 pH が 5 ~ 7.5 である 20 mM ~ 100 mM のリン酸緩衝液、又は前記 pH が 5 ~ 7.5 である 20 ~ 100 mM のクエン酸・リン酸緩衝液のいずれかである、
請求項 1 に記載の製造方法。

10

【請求項 7】

第 1 の四分岐化合物と第 1 の緩衝液を含む第 1 の溶液と、第 2 の四分岐化合物と第 2 の緩衝液とを含む第 2 の溶液とを混合する混合工程を含み、
前記第 1 の四分岐化合物は、
下記式 (I) で表わされ、

【化 16】



20

前記式 (I) 中、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、25 ~ 250 の整数を示すものであり、

前記式 (I) 中、 $\text{R}^{11} \sim \text{R}^{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、

$\text{C}_1 - \text{C}_7$ アルキレン基、 $\text{C}_2 - \text{C}_7$ アルケニレン基、 $-\text{NH}-\text{R}^{15}-$ 、 $-\text{CO}-\text{R}^{15}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{O}-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{R}^{17}-$ 、又は $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ を示し、

30

ここで、 R^{15} は $\text{C}_1 - \text{C}_7$ アルキレン基を示し、

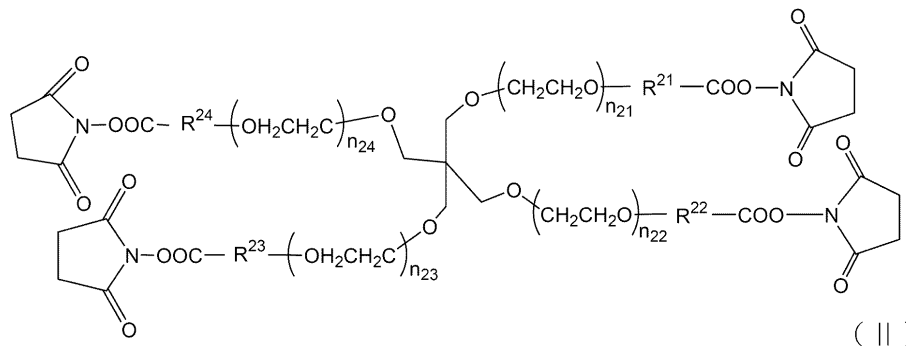
R^{16} は $\text{C}_1 - \text{C}_3$ アルキレン基を示し、

R^{17} は $\text{C}_1 - \text{C}_5$ アルキレン基を示し、

前記第 2 の四分岐化合物は、

下記式 (II) で表わされ、

【化 17】



40

前記式 (II) 中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、20 ~ 250 の整数を示すものであり、

前記式 (II) 中、 $\text{R}^{21} \sim \text{R}^{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $\text{C}_1 - \text{C}_7$ アルキレン基

50

, C₂ - C₇ アルケニレン基, -NH-R²⁵ -, -CO-R²⁵ -, -R²⁶-O-R²⁷ -, -R²⁶-NH-R²⁷ -, -R²⁶-CO₂-R²⁷ -, -R²⁶-CO₂-NH-R¹⁷ -, -R²⁶-CO-R²⁷ -, 又は -R²⁶-CO-NH-R²⁷ - を示し,

ここで, R²⁵ は C₁ - C₇ アルキレン基を示し,

R²⁶ は C₁ - C₃ アルキレン基を示し,

R²⁷ は C₁ - C₅ アルキレン基を示し,

前記第 1 の緩衝液は,

pH が 6 ~ 8 , 及び濃度が 20 ~ 200 mM であり,

前記第 2 の緩衝液は,

pH が 5 ~ 7.5 , 及び濃度が 20 ~ 200 mM である,

ハイドロゲルの製造方法により製造されたハイドロゲル。

【請求項 8】

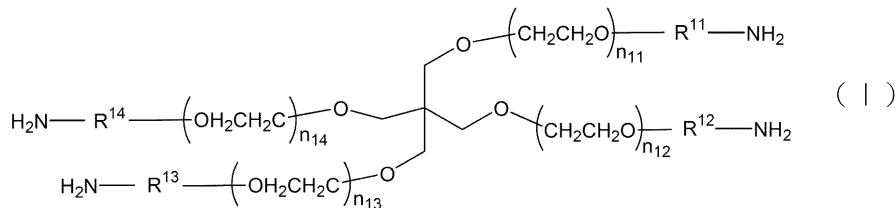
第 1 の四分岐化合物と第 2 の四分岐化合物とを, モル比 0.8 : 1 ~ 1.2 : 1 で含む

ハイドロゲルであって,

前記第 1 の四分岐構造化合物は,

下記式 (I) で表わされ,

【化 18】



前記式 (I) 中, n₁₁ ~ n₁₄ は, それぞれ同一又は異なり, 25 ~ 250 の整数を示すものであり,

前記式 (I) 中, R¹¹ ~ R¹⁴ は, それぞれ同一又は異なり,

C₁ - C₇ アルキレン基, C₂ - C₇ アルケニレン基, -NH-R¹⁵ -, -CO-R¹⁵ -,

-R¹⁶-O-R¹⁷ -, -R¹⁶-NH-R¹⁷ -, -R¹⁶-CO₂-R¹⁷ -, -R¹⁶-CO₂-NH-R¹⁷ -, -R¹⁶-CO-R¹⁷ -, 又は -R¹⁶-CO-NH-R¹⁷ - を示し,

ここで, R¹⁵ は C₁ - C₇ アルキレン基を示し,

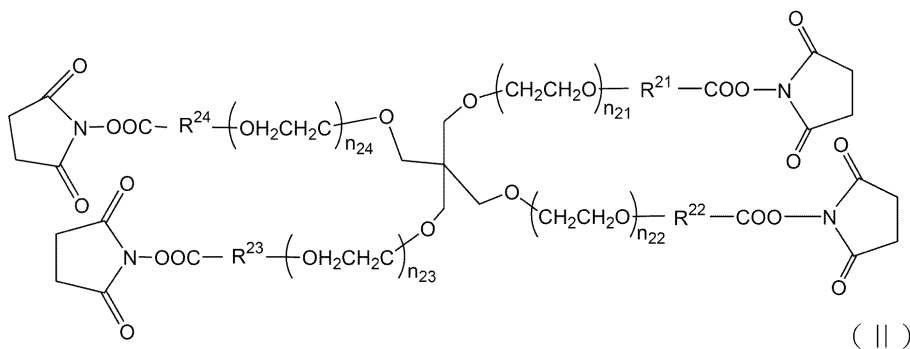
R¹⁶ は C₁ - C₃ アルキレン基を示し,

R¹⁷ は C₁ - C₅ アルキレン基を示し,

前記第 2 の四分岐構造化合物は,

前記式 (II) で表わされ,

【化 19】



10

20

30

40

50

前記式(II)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、20～250の整数を示すものであり、

前記式(II)中、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $C_1 - C_7$ アルキレン基、 $C_2 - C_7$ アルケニレン基、 $-NH-R^{25}-$ 、 $-CO-R^{25}-$ 、 $-R^{26}-O-R^{27}-$ 、 $-R^{26}-NH-R^{27}-$ 、 $-R^{26}-CO_2-R^{27}-$ 、 $-R^{26}-CO_2-NH-R^{27}-$ 、 $-R^{26}-CO-R^{27}-$ 、又は $-R^{26}-CO-NH-R^{27}-$ を示し、

ここで、 R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示し、

R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示し、

R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示し、

前記ハイドロゲルの中性子散乱の散乱曲線が、オルンシュタイン-ゼルニケ関数でフィッティングされる、

ハイドロゲル。

【請求項9】

圧縮破断強度が10～120MPaである、

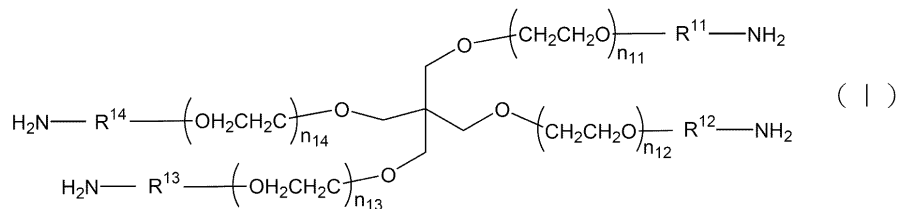
請求項8に記載のハイドロゲル。

【請求項10】

第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物と第3の四分岐化合物とを、モル比0.3～0.7：0.1～0.65：0.1～0.65で含むハイドロゲルであって、

前記第1の四分岐化合物は、下記式(I)で表わされ、

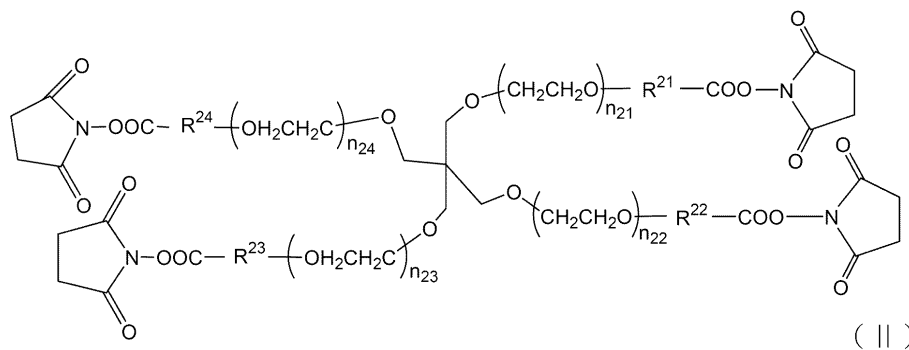
【化20】



式(I)中、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、50～60の整数を示すものであり、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、同一又は異なる $C_1 \sim C_7$ アルキレン基であり、

前記第2の四分岐化合物は、下記式(II)で表わされ、

【化21】



式(II)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、45～55を示すものであり、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、同一又は異なる $-CO-R^{25}-$ (R^{25} は $C_1 \sim C_7$ アルキレン基を示す)である、

前記第3の四分岐化合物は、前記式(II)で表わされ、

式(II)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、45～55の整数を示すものであり、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、同一又は異なる $C_1 - C_7$ アルキレン基である、

ハイドロゲル。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、3次元網目構造のハイドロゲル、およびその製造方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、シーリングや癒着防止などの医療目的でポリマーを用いたゲルが使用されてきた。特表2000-502380号公報には、多分岐ポリマーを混合して作製するゲルが開示されている。しかし、同公報で得られるゲルは、強度が弱く、膝軟骨、椎体、又は椎間板など生体内荷重部位へ適用することができない。

10

【0003】

国際公開WO2006/013612号パンフレットには、2種類のモノマーを混合するハイドロゲルの製造方法が開示されている。同パンフレットでは、2種類のモノマーを混合して多重網目構造を形成させることによりハイドロゲルを製造する。しかし、同パンフレットに開示されたハイドロゲルは、生体内荷重部位へ適用できるほど十分な強度ではない。

【0004】

このように、現在、膝軟骨や椎間板（髄核）の手術に用いられているゲルは、強度が十分とはいえず、生体内に長期間導入して用いるとゲルの変性が起こる。そのため、荷重負荷がかかる部位へ使用すると定期的な手術が必要になるという問題があった。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2000-502380号公報

【特許文献2】国際公開WO2006/013612号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、高強度なハイドロゲル及びその製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

本発明は、分解速度の異なるハイドロゲルの製造方法を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、溶液のpH、溶液中のイオン強度、溶液中の緩衝液濃度を調整することで、高強度なハイドロゲルを製造することができるという知見に基づくものである。また本発明は、2種類の四分岐化合物を均一に分散させた後に、2種類の四分岐化合物を重合させることで、均一な高分子網目構造を有する高強度なハイドロゲルを製造することができるという知見に基づくものである。

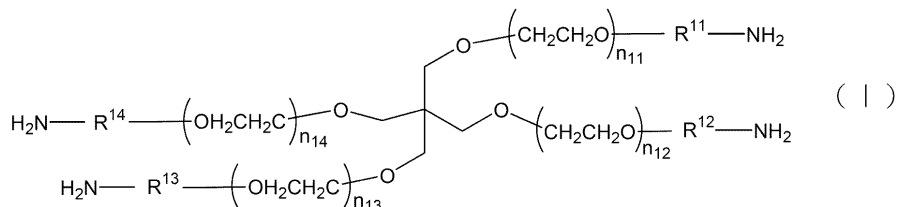
【0009】

本発明の第1の側面は、ハイドロゲルの製造方法に関する。本発明のハイドロゲルの製造方法は、第1の四分岐化合物と第1の緩衝液を含む第1の溶液と、第2の四分岐化合物と第2の緩衝液を含む第2の溶液とを混合する混合工程を含む。前記第1の四分岐化合物は、下記式(I)で表わされる。

40

【0010】

【化1】



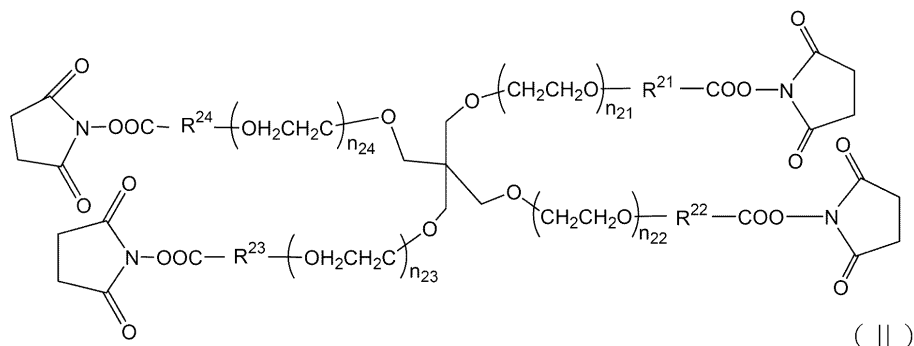
前記式 (I) 中, $n_{11} \sim n_{14}$ は, それぞれ同一又は異なり, 25 ~ 250 の整数を示すものである。式 (I) 中, $R^{11} \sim R^{14}$ は, それぞれ同一又は異なり, $C_1 - C_7$ アルキレン基, $C_2 - C_7$ アルケニレン基, $-\text{NH}-R^{15}-$, $-\text{CO}-R^{15}-$, $-\text{R}^{16}-\text{O}-R^{17}-$, $-\text{R}^{16}-\text{NH}-R^{17}-$, $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-R^{17}-$, $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{NH}-R^{17}-$, $-\text{R}^{16}-\text{CO}-R^{17}-$, 又は $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{NH}-R^{17}-$ を示す。ここで, R^{15} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{16} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{17} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

10

【0011】

前記第2の四分岐化合物は, 下記式 (II) で表わされる。

【化2】



20

前記式 (II) 中, $n_{21} \sim n_{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, 20 ~ 250 の整数を示すものである。式 (II) 中, $R^{21} \sim R^{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, $C_1 - C_7$ アルキレン基, $C_2 - C_7$ アルケニレン基, $-\text{NH}-R^{25}-$, $-\text{CO}-R^{25}-$, $-\text{R}^{26}-\text{O}-R^{27}-$, $-\text{R}^{26}-\text{NH}-R^{27}-$, $-\text{R}^{26}-\text{CO}_2-R^{27}-$, $-\text{R}^{26}-\text{CO}_2-\text{NH}-R^{27}-$, $-\text{R}^{26}-\text{CO}-R^{27}-$, 又は $-\text{R}^{26}-\text{CO}-\text{NH}-R^{27}-$ を示す。ここで, R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

30

【0012】

そして, 第1の緩衝液の pH が 6 ~ 8, 及び前記第1の緩衝液の濃度が 20 ~ 200 mM であり, 前記第2の緩衝液の pH が 5 ~ 7.5, 及び前記第2の緩衝液の濃度が 20 ~ 200 mM である。また第1の溶液の pH は, 前記第2の溶液 pH よりも高いことが好ましい。このような2種類の四分岐化合物を用いることで, 図1及び図2に示す反応が起こり, 均一な網目構造を有するハイドロゲルを製造することができる。

40

【0013】

上記のとおり, 本発明の第1の四分岐化合物は, アミノ基を有する。酸性溶液中では, 第1の四分岐化合物のアミノ基がカチオンの状態となりやすく, 互いに反発しやすくなる (図2, 図3A)。そして, カチオン状態のアミノ基は, 第2の四分岐化合物の官能基 (N -ヒドロキシ-スクシンイミジル (NHS)) と反応性が低下する (図2)。一方, 第1の溶液の pH が高くなる (アルカリ性側に傾く) と, 第1の四分岐化合物のアミノ基が $-\text{NH}_3^+$ から $-\text{NH}_2$ へと移りやすくなるので, 第2の四分岐化合物との反応性が高くなる (図2)。しかし, 第2の四分岐化合物は, 溶液の pH が7以上になると, エステル結

50

合が分解されやすくなり、第1の四分岐化合物との反応性が低下してくる。そのため、ゲル強度が弱くなってしまふ。そのため、第1及び第2の緩衝液のpHを調節することで、第1及び第2の溶液のpHを調節でき、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の反応速度を調節し、高強度なハイドロゲルを製造することができる。

【0014】

また、後述する実施例で示されたとおり、緩衝液濃度が低すぎると、溶液中のpH緩衝能が低下し、高強度のハイドロゲルを製造することができない。そして、緩衝液濃度が高すぎても、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の混合を阻害するために、高強度のハイドロゲルを製造することができない。よって、後述する実施例で示されたとおり、緩衝液の濃度を20mM~200mMとすることで、均一構造を有する高強度なハイドロゲルを製造することができる。

10

【0015】

よって、第1及び第2の緩衝液のpH、溶液中の緩衝液濃度を上記のように調整することで、ハイドロゲルのゲル化までの時間(反応速度)を調整することができ、さらに均一構造を有する高強度なハイドロゲルを製造することができる。

【0016】

本発明の第1の側面の好ましい態様は、前記第1の緩衝液は、リン酸緩衝液、またはリン酸緩衝生理食塩水のいずれか1つ又は2つ以上を含む。前記第2の緩衝液は、リン酸緩衝液、クエン酸・リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、またはクエン酸・リン酸緩衝生理食塩水のいずれか1つ又は2つ以上を含む。後述する実施例に示されたとおり、このような緩衝液を用いることで、均一構造を有する高強度なハイドロゲルを製造することができる。

20

【0017】

本発明の第1の側面の好ましい態様は、前記混合工程後の混合溶液は、塩濃度が $0 \sim 1 \times 10^2$ mMがあげられ、 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^2$ mMであってもよい。混合溶液中の塩濃度が高いと、塩のアニオンが第1の四分岐化合物のカチオンと相互作用し、カチオン同士の反発が低減する。カチオン同士の反発が低減すると、2種類の四分岐化合物を均一に混合しにくくなる(図3A, 図3B)。2種類の四分岐化合物が均一に混合されていないと、均一な3次元構造を有するハイドロゲルが作製されず、ハイドロゲルの強度が弱くなる。後述する実施例でも示されたとおり、混合溶液中の塩濃度が高くなるとゲルの強度が弱くなる。よって、後述する実施例で示されたとおり、混合溶液中の塩濃度を上記濃度とすることで、塩のアニオンによる影響を受けず、2種類の四分岐化合物が均一に混合され、高強度のハイドロゲルを製造することができる。

30

【0018】

本発明の第1の側面の好ましい態様は、前記第1の溶液は、前記pHが6~8で、前記第1の緩衝液が20mM~100mMのリン酸緩衝液である。前記第2の溶液は、前記pHが5~7.5で、前記第2の緩衝液が20mM~100mMのリン酸緩衝液、又は20~100mMのクエン酸・リン酸緩衝液のいずれかである。上記のとおり、第1の溶液のpHが高いと、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物が均一に混合しにくい。また、第2の溶液のpHが高すぎると、第2の四分岐化合物のエステルが分解されてしまふ。第2の四分岐化合物のエステルが分解されると、四分岐化合物の末端の官能基が外れる。これにより、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物は結合することができなくなる。よって、作製されるハイドロゲルの強度が低下する。そのため、本発明のように、第1の溶液のpHを6~8、第2の溶液のpHを5~7.5とすることで、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物を効率よく均一に混合することができ、均一な3次元構造を有するハイドロゲルを製造することができる。また、後述する実施例に示されたとおり、緩衝液濃度が低すぎると、混合溶液中のpH緩衝能が低い。一方、濃度が高すぎるとハイドロゲルの強度が低下する。そのため、第1及び第2の緩衝液濃度を、20~100mMとすることで、より高強度なハイドロゲルを効果的に製造することができる。

40

【0019】

50

本発明の第1の側面の好ましい態様は、前記混合工程後の混合溶液は、混合直後から30秒後までの平均pHは、6～8である。上記のとおり、本発明の第1の四分岐化合物は、アミノ基を有する。アミノ基は、pHが8以下の溶液中では95%以上がカチオンの状態で存在し、互いに反発し合う(図3A)。そして、カチオン性のアミノ基は、第2の四分岐化合物の官能基(N-ヒドロキシ-スクシンイミジル(NHS)基)と反応しない(図2)。そのため、混合開始時から混合30秒後の混合溶液のpHを6～8としておくことで、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とが局所的に結合することを防ぎ、溶液中に両化合物を均一に分散させることができる(図3A)。その後、5%程度存在する非カチオン性のアミノ基(-NH₂)がNHSと反応するに伴って、第1の四分岐化合物のアミノ基の平衡状態が-NH₃⁺から-NH₂へと移り、第2の四分岐化合物との反応が進行する(図2)。このように混合後の溶液のpHを調整することで、NHSと反応しうる非カチオン性のアミノ基の分率を5%程度に保つことにより、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物が不均一に混合すること効果的に防ぐことができ、最終的な反応率を上昇させ、均一な高強度なハイドロゲルを製造することができる。

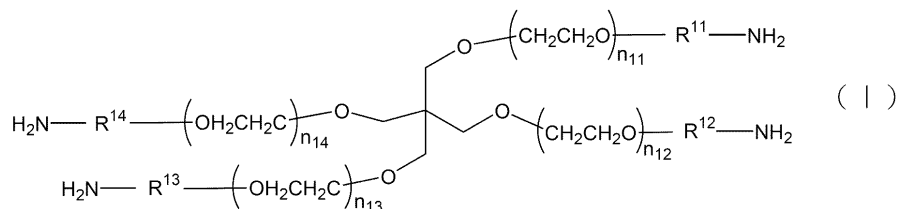
10

【0020】

本発明の第2の側面は、第1の四分岐化合物と第1の緩衝液とを含む第1の溶液と、第2の四分岐化合物と第2の緩衝液とを含む第2の溶液とを混合する混合工程を含む、製造方法で製造されたハイドロゲルに関する。前記第1の四分岐化合物は、下記式(I)で表わされる。

【化3】

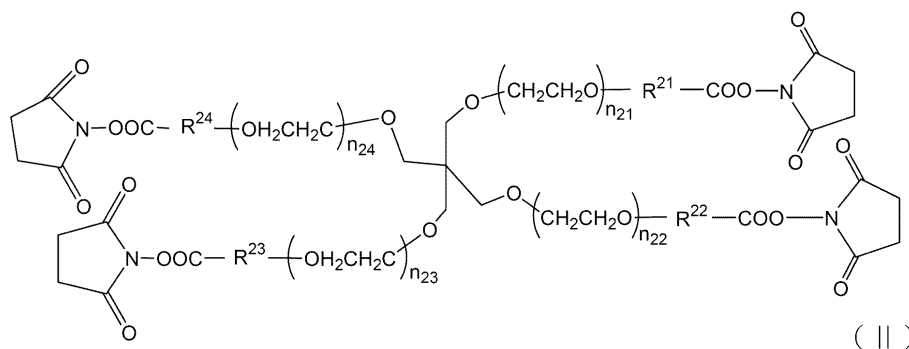
20



前記式(I)中、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、25～250の整数を示すものである。式(I)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $C_1 - C_7$ アルキレン基、 $C_2 - C_7$ アルケニレン基、 $-\text{NH}-R^{15}-$ 、 $-\text{CO}-R^{15}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{O}-R^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{NH}-R^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-R^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{NH}-R^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}-R^{17}-$ 、又は $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{NH}-R^{17}-$ を示す。ここで、 R^{15} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{16} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{17} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。前記第2の四分岐化合物は、前記一般式(II)で表わされる。

30

【化4】



40

前記式(II)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、20～250の整数を示すものである。式(II)中、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $C_1 - C_7$ アルキレン基、 $C_2 - C_7$ アルケニレン基、 $-\text{NH}-R^{25}-$ 、 $-\text{CO}-R^{25}-$ 、 $-\text{R}^{26}-$

50

$^6 - O - R^{27} - , - R^{26} - NH - R^{27} - , - R^{26} - CO_2 - R^{27} - , - R^{26} - CO_2 - NH - R^{27} - , - R^{26} - CO - R^{27} - ,$ 又は $- R^{26} - CO - NH - R^{27} -$ を示す。ここで、 R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

【0021】

前記第1の緩衝液のpHが6 ~ 8 , 及び前記第1の緩衝液の濃度が20 ~ 200 mMであり, 前記第2の緩衝液のpHが5 ~ 7.5 , 及び前記第2の緩衝液の濃度が20 ~ 200 mMである。前記第1の溶液のpHは, 前記第2の溶液pHよりも高いほうが好ましい。

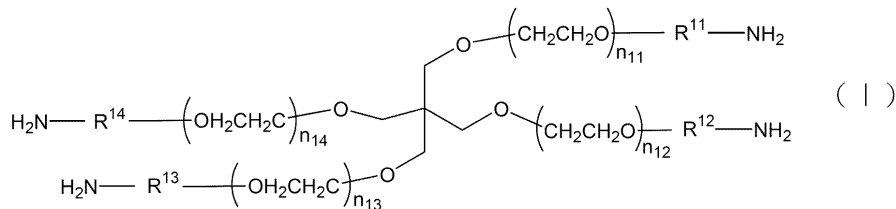
【0022】

後述する実施例で示されたとおり, 本発明の製造方法を用いて製造したハイドロゲルは, 生体軟骨をしのぐ強度を有する。また, 後述する実施例で示されたとおり, 本発明のハイドロゲルは細胞毒性を示さない。よって, 本発明のハイドロゲルによれば, 骨, 軟骨, 若しくは椎間板の欠損部, 又は骨, 軟骨, 若しくは椎間板の変性部の治療に効果的に用いることができる。

【0023】

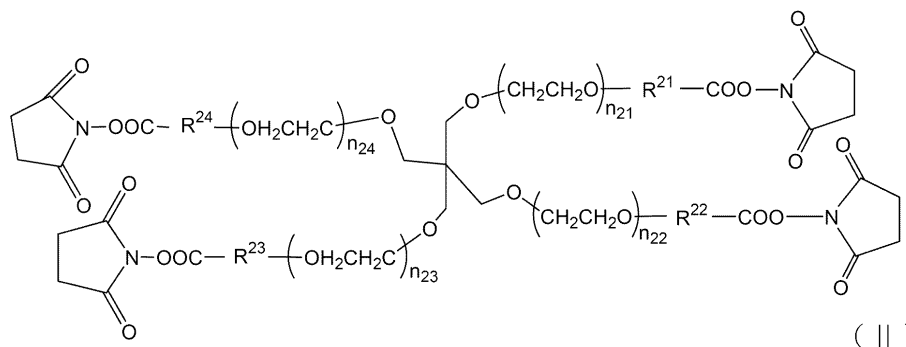
本発明の第3の側面は, 第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とを, モル比0.8 : 1 ~ 1.2 : 1 で含むハイドロゲルに関する。前記第1の四分岐構造化合物は, 下記一般式(I)で表わされる。

【化5】



前記式(I)中, $n_{11} \sim n_{14}$ は, それぞれ同一又は異なり, 25 ~ 250の整数を示すものである。式(I)中, $R^{11} \sim R^{14}$ は, それぞれ同一又は異なり, $C_1 - C_7$ アルキレン基, $C_2 - C_7$ アルケニレン基, $- NH - R^{15} - , - CO - R^{15} - , - R^{16} - O - R^{17} - , - R^{16} - NH - R^{17} - , - R^{16} - CO_2 - R^{17} - , - R^{16} - CO_2 - NH - R^{17} - , - R^{16} - CO - R^{17} - ,$ 又は $- R^{16} - CO - NH - R^{17} -$ を示す。ここで, R^{15} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{16} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{17} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。前記第2の四分岐構造化合物は, 前記一般式(II)で表わされる。

【化6】



前記式(II)中, $n_{21} \sim n_{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, 20 ~ 250の整数を示すものである。式(II)中, $R^{21} \sim R^{24}$ は, それぞれ同一又は異なり, $C_1 - C_7$ アルキレン基, $C_2 - C_7$ アルケニレン基, $- NH - R^{25} - , - CO - R^{25} - , - R^{26} - O - R^{27} - , - R^{26} - NH - R^{27} - , - R^{26} - CO_2 - R^{27} - , - R^{26} - CO_2 - NH - R^{27} - , - R^{26} - CO - R^{27} - ,$ 又は $- R^{26} - CO - NH - R^{27} -$ を示す。ここで, R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

-CO₂-NH-R¹⁷-, -R²⁶-CO-R²⁷-, 又は -R²⁶-CO-NH-R²⁷-を示す。ここで、R²⁵はC₁-C₇アルキレン基を示す。R²⁶はC₁-C₃アルキレン基を示す。R²⁷はC₁-C₅アルキレン基を示す。

【0024】

前記ハイドロゲルの中性子散乱の散乱曲線は、オルンシュタイン-ゼルニケ(OZ)関数でフィッティングされる。後述する実施例で示されたとおり、本発明のハイドロゲルの中性子散乱測定値群から得られる散乱曲線は、OZ関数で表わされる曲線にフィッティングする。すなわち、本発明のハイドロゲルは、均一なゲル構造を有する。このような均一なゲル構造を有することで、ハイドロゲルは高強度になり、膝軟骨や椎体や椎間板など荷重負荷がかかる生体部位において好適に使用することができる。

10

【0025】

本発明の第3の側面の好ましい態様は、圧縮破断強度が10~120MPaである上記に記載のハイドロゲルである。後述する実施例で示されたとおり、本発明のハイドロゲルは、生体軟骨強度(10MPa)を超える強度を有する。よって、膝軟骨や椎体など荷重負荷がかかる生体部位において好適に使用することができる。

【0026】

本発明の第4の側面は、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物と第3の四分岐化合物とを、モル比0.3~0.7:0~0.65:0~0.65で含むハイドロゲルに関する。本発明のハイドロゲルの第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物と第3の四分岐化合物のモル比は、モル比0.3~0.7:0.1~0.65:0.1~0.65であってもよい。前記第1の四分岐化合物は、前記式(I)で表わされる。前記式(I)中、n₁₁~n₁₄は、それぞれ同一又は異なり、50~60の整数を示すものである。前記式(I)中、R¹¹~R¹⁴は、同一又は異なるC₁~C₇アルキレン基である。前記第2の四分岐化合物は、前記式(II)で表わされる。前記式(II)中、n₂₁~n₂₄は、それぞれ同一又は異なり、45~55の整数を示すものであり、前記式(II)中、R²¹~R²⁴は同一又は異なる-CO-R²⁵-(R²⁵はC₁~C₇アルキレン基を示す)である。前記第3の四分岐化合物は、前記式(II)で表わされ、前記式(II)中、n₂₁~n₂₄は、それぞれ同一又は異なり、45~55整数を示すものであり、R²¹~R²⁴は同一又は異なるC₁~C₇アルキレン基である。後述する実施例で示されたとおり、このようなモル比のハイドロゲルとすることで、高強度でありながら、分解速度を調整することができる。よって、本発明のハイドロゲルは、分解速度を調節することにより、ハイドロゲルを導入した部位での再生速度に合わせてハイドロゲルを分解させることができる。よって、骨、軟骨、若しくは椎間板の欠損部、骨、軟骨、若しくは椎間板の変性部に好適に使用することができる。

20

30

【発明の効果】

【0027】

本発明によれば、高強度なハイドロゲル及びその製造方法を提供できる。

【0028】

本発明は、分解速度の異なるハイドロゲルを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0029】

【図1】図1は、ハイドロゲルの構造を示す図面である。

【図2】図2は、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の反応状態を示す図面である。

。

【図3】図3は、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の溶液中での分布を概略的に示した図面である。図3Aは、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物が溶液中で均一に混合している状態を示す図面である。図3Bは、塩アニオンによって、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の溶液中の分布が不均一になることを示す図面である。

【図4】図4は、TAPEGとTNPEGのモル比率(r)を0.33~3.0の範囲で混合したゲルの圧縮弾性率(kPa)を示す図面に替わるグラフである。

50

【図5】図5は、T A P E GとT N P E Gのモル比率0.6～1.4の範囲で混合したゲルの破断歪み(%)及び破断強度(M P a)を示す図面に替わるグラフである。

【図6】図6は、ハイドロゲルの圧縮破断強度測定の結果を示す図面に替わるグラフである。

【図7】図7は、ハイドロゲルの中性子散乱測定結果を示す図面に替わるグラフである。

【図8】図8は、ハイドロゲルを埋植したマウス背部の図面に替わる写真である。

【図9】図9は、ハイドロゲルを埋植したイヌ膝軟骨の図面に替わる写真である。図9 A～図9 Cは、手術後2か月後の埋植部を示す図面に替わる写真である。図9 D～図9 Fは、手術後4か月後の埋植部を示す図面に替わる写真である。

【図10】図10は、ハイドロゲルを埋植したブタ椎間板の図面に替わる写真である。図10 Aは、ハイドロゲルを埋植中の図面に替わる写真である。図10 Bは、ハイドロゲルを埋植後の椎間板を示す図面に替わる写真である。

【図11】図11は、ゲルの分解速度を示す図面に替わるグラフである。

【図12】図12は、ハイドロゲル存在下でのN I H 3 T 3, M C 3 T 3 - E 1, A T D C 5の各細胞における細胞増殖活性を示す図面に替わるグラフである。図12中、縦軸は、細胞の増殖活性(吸光度値)を示す。図12 Aは、N I H 3 T 3細胞の増殖活性結果を示す。図12 Bは、M C 3 T 3 - E 1細胞の増殖活性結果を示す。図12 Cは、A T D C 5細胞の増殖活性結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明の第1の側面は、ハイドロゲルの製造方法に関する。本発明のハイドロゲルの製造方法は、第1の四分岐化合物と第1の緩衝液を含む第1の溶液と、第2の四分岐化合物と第2の緩衝液を含む第2の溶液とを混合する混合工程を含む。

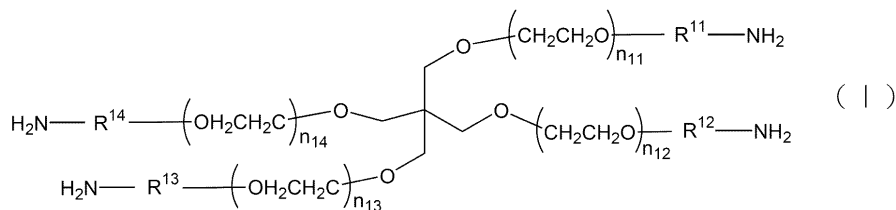
【0031】

ハイドロゲルとは、多量の水を含んだ親水性の高分子を含むゲル状の物質である。本発明のハイドロゲルは、2種類以上の四分岐化合物から製造される。

【0032】

本発明の第1の四分岐化合物として、下記式(I)で表わされる化合物があげられる。

【化7】



【0033】

式(I)中、 $\text{R}^{11} \sim \text{R}^{14}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$ アルキレン基、 $\text{C}_2 \sim \text{C}_7$ アルケニレン基、 $-\text{NH}-\text{R}^{15}-$ 、 $-\text{CO}-\text{R}^{15}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{O}-\text{R}^{17}$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}_2-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ 、 $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{R}^{17}-$ 、又は $-\text{R}^{16}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}^{17}-$ を示す。ここで、 R^{15} は $\text{C}_1 \sim \text{C}_7$ アルキレン基を示す。 R^{16} は $\text{C}_1 \sim \text{C}_3$ アルキレン基を示す。 R^{17} は $\text{C}_1 \sim \text{C}_5$ アルキレン基を示す。

【0034】

$n_{11} \sim n_{14}$ は、それぞれ同一でも又は異なってもよい。 $n_{11} \sim n_{14}$ の値が近いほど、ハイドロゲルは均一な立体構造をとることができ、高強度となる。このため、高強度のハイドロゲルを得るためには、同一であることが好ましい。 $n_{11} \sim n_{14}$ の値が高すぎるとハイドロゲルの強度が弱くなり、 $n_{11} \sim n_{14}$ の値が低すぎると化合物の立体障害によりハイドロゲルが形成されにくい。そのため、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、25～250の

整数値があげられ、35～180が好ましく、50～115がさらに好ましく、50～60が特に好ましい。そして、本発明の第1の四分岐化合物の分子量としては、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ Daがあげられ、 $7.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ Daが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ Daがより好ましい。

【0035】

上記式(I)中、 $R^{11} \sim R^{14}$ は、官能基と第1の四分岐化合物のコア部分をつなぐリンカー部位である。 $R^{11} \sim R^{14}$ は、それぞれ同一でも異なってもよいが、均一な立体構造を有する高強度なハイドロゲルを製造するためには同一であることが好ましい。 $R^{11} \sim R^{14}$ は、 $C_1 - C_7$ アルキレン基、 $C_2 - C_7$ アルケニレン基、 $-NH-R^{15}-$ 、 $-CO-R^{15}-$ 、 $-R^{16}-O-R^{17}-$ 、 $-R^{16}-NH-R^{17}-$ 、 $-R^{16}-CO_2-R^{17}-$ 、 $-R^{16}-CO_2-NH-R^{17}-$ 、 $-R^{16}-CO-R^{17}-$ 、又は $-R^{16}-CO-NH-R^{17}-$ を示す。ここで、 R^{15} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{16} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{17} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

10

【0036】

ここで、 $C_1 - C_7$ アルキレン基とは、分岐を有してもよい炭素数が1以上7以下のアルキレン基を意味し、直鎖 $C_1 - C_7$ アルキレン基又は1つ又は2つ以上の分岐を有する $C_2 - C_7$ アルキレン基(分岐を含めた炭素数が2以上7以下)を意味する。 $C_1 - C_7$ アルキレン基の例は、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基である。 $C_1 - C_7$ アルキレン基の例は、 $-CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH(CH_3))_2-$ 、 $-(CH_2)_2-CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_3-CH(CH_3)-$ 、 $-(CH_2)_2-CH(C_2H_5)-$ 、 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_2-C(C_2H_5)_2-$ 、及び $-(CH_2)_3C(CH_3)_2CH_2-$ などが挙げられる。

20

【0037】

「 $C_2 - C_7$ アルケニレン基」とは、鎖中に1個若しくは2個以上の二重結合を有する状又は分枝鎖状の炭素原子数2～7個のアルケニレン基であり、例えば、前記アルキレン基から隣り合った炭素原子の水素原子の2～5個を除いてできる二重結合を有する2価基が挙げられる。

【0038】

なお、リンカー部と第1の四分岐化合物のコア部分との結合がエステル結合となるとき、第1の四分岐化合物は生体内において分解されやすくなる。それに対して、リンカー部位と第1の四分岐化合物のコア部分との結合がエーテル結合となるとき、第1の四分岐化合物は生体内において分解されにくくなる。すなわち、 $R^{11} \sim R^{14}$ によって、第1の四分岐化合物の分解性が変化する。よって、このような第1の四分岐化合物を用いることで、製造されるハイドロゲルの分解速度を制御することも可能になる。分解速度を制御したハイドロゲルを製造する場合、上記式(I)で表わされる2種以上の化合物を用いてもよい。エーテル結合となる $R^{11} \sim R^{14}$ として、 $C_1 - C_7$ アルキレン基が好ましく、エチレン基、プロピレン基、及びブチレン基が好ましい。

30

【0039】

なお、上記式(I)で示したように、本発明の第1の四分岐化合物の官能基はアミノ基である。本発明のハイドロゲルは、求電子性を有する第1の四分岐化合物の官能基と、求核性を有する第2の四分岐化合物の官能基とが化学反応により結合して高強度な立体構造になる。

40

【0040】

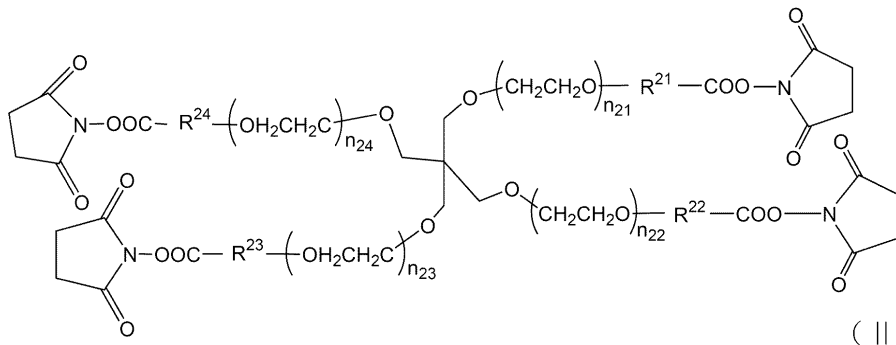
上記式(I)で表わされる第1の四分岐化合物の第1の溶液中濃度は、 $10 \text{ mg/mL} \sim 500 \text{ mg/mL}$ があげられる。四分岐化合物濃度が、低すぎるとゲルの強度が弱くなり、四分岐化合物濃度が高すぎるとハイドロゲルの構造が不均一になりゲルの強度が弱くなる。そのため、 $20 \sim 400 \text{ mg/mL}$ が好ましく、 $50 \text{ mg/mL} \sim 300 \text{ mg/mL}$ がより好ましく、 $100 \sim 200 \text{ mg/mL}$ がさらに好ましい。

【0041】

50

本発明の第2の四分岐化合物としては、下記式(II)で表わされる化合物があげられる。

【化8】



10

前記式(II)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、それぞれ同一でも又は異なってもよい。 $n_{21} \sim n_{24}$ の値は近いほど、ハイドロゲルは均一な立体構造をとることができ、高強度となるので好ましく、同一である方が好ましい。 $n_{21} \sim n_{24}$ の値が高すぎるとハイドロゲルの強度が弱くなり、 $n_{21} \sim n_{24}$ の値が低すぎると化合物の立体障害によりハイドロゲルが形成されにくい。そのため、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、5～300の整数値があげられ、20～250が好ましく、30～180がより好ましく、45～115がさらに好ましく、45～55であればさらに好ましい。本発明の第2の四分岐化合物の分子量としては、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ Daがあげられ、 $7.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ Daが好ましく、 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ Daがより好ましい。

20

【0042】

上記式(II)中、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、官能基と第2の四分岐化合物のコア部分をつなぐリンカー部位である。 $R^{21} \sim R^{24}$ は、それぞれ同一でも異なってもよいが、均一な立体構造を有する高強度なハイドロゲルを製造するためには同一であることが好ましい。式(II)中、 $R^{21} \sim R^{24}$ は、それぞれ同一又は異なり、 $C_1 - C_7$ アルキレン基、 $C_2 - C_7$ アルケニレン基、 $-NH - R^{25} -$ 、 $-CO - R^{25} -$ 、 $-R^{26} - O - R^{27} -$ 、 $-R^{26} - NH - R^{27} -$ 、 $-R^{26} - CO_2 - R^{27} -$ 、 $-R^{26} - CO_2 - NH - R^{27} -$ 、 $-R^{26} - CO - R^{27} -$ 、又は $-R^{26} - CO - NH - R^{27} -$ を示す。ここで、 R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す。 R^{26} は $C_1 - C_3$ アルキレン基を示す。 R^{27} は $C_1 - C_5$ アルキレン基を示す。

30

【0043】

なお、リンカー部位と第2の四分岐化合物のコア部分との結合がエステル結合となるとき、第2の四分岐化合物は生体内において分解されやすくなる。それに対して、リンカー部位と第2の四分岐化合物のコア部分との結合がエーテル結合となるとき、第2の四分岐化合物は生体内において分解されにくくなる。すなわち、 $R^{21} \sim R^{24}$ によって、第2の四分岐化合物の分解性が変化する。よって、このような第2の四分岐化合物を用いることで、作製されるハイドロゲルの分解速度を制御することも可能になる。エーテル結合となる $R^{21} \sim R^{24}$ として、好ましくは $C_1 - C_7$ アルキレン基であり、 $C_2 - C_6$ アルキレン基が好ましく、 $C_3 - C_5$ アルキレン基がより好ましい。エステル結合となる $R^{21} \sim R^{24}$ としては、 $-CO - R^{25}$ (R^{25} は $C_1 - C_7$ アルキレン基を示す)又は $-CO - NH - R^{25} -$ であり、より好ましくは $-CO - R^{25}$ (R^{25} は $C_3 - C_5$ アルキレン基を示す)である。

40

【0044】

なお、上記式(II)で示したように、本発明の第2の四分岐化合物の官能基はN-ヒドロキシ-スクシンイミジル(NHS)基である。上記のとおり、本発明のハイドロゲルは、求電子性を有する第1の四分岐化合物の官能基と、求核性を有する第2の四分岐化合物の官能基とが化学反応により結合して高強度な立体構造になる。第2の四分岐化合物の官能基が同一であることによって、第1の四分岐化合物の官能基との反応性が均一になり、均一な立体構造を有する高強度のハイドロゲルを得やすくなる。

50

【0045】

本発明の第2の溶液中に含まれる第2の四分岐化合物濃度は、 $10\text{ mg/mL} \sim 500\text{ mg/mL}$ があげられる。四分岐化合物濃度が、低すぎるとゲルの強度が弱くなり、四分岐化合物濃度が高すぎるとハイドロゲルの構造が不均一になりゲルの強度が弱くなる。そのため、 $20 \sim 400\text{ mg/mL}$ が好ましく、 $50\text{ mg/mL} \sim 300\text{ mg/mL}$ がより好ましく、 $100 \sim 200\text{ mg/mL}$ がさらに好ましい。

【0046】

本発明のハイドロゲルの製造方法において第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物は、モル比 $0.8 : 1 \sim 1.2 : 1$ で混合することができる。本発明の第1の四分岐化合物は、求電子性官能基（アミノ基）を有する。一方、本発明の第2の四分岐化合物は、求核性官能基（N-ヒドロキシ-スクシンイミジル（NHS）基）を有する。本発明の第1又は第2の四分岐化合物の官能基はそれぞれ $1 : 1$ で反応しうる。よって、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の混合モル比は $1 : 1$ に近いほど好ましい。後述する実施例で示されたとおり、本発明のハイドロゲルの第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物との混合モル比は、 $0.9 \sim 1 : 1.1 \sim 1$ が好ましい。後述する実施例で示されたとおり、本発明の製造方法では、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物との混合モル比が $0.8 : 1 \sim 1.2 : 1$ であれば、軟骨（ 10 MPa ）を超える強度のゲルを製造することができる。

【0047】

本発明において、分解速度を制御するためのハイドロゲルの製造方法では、2又は3種以上の四分岐化合物を用いる。上記したとおり、本発明は、各末端に求核性官能基を有する四分岐化合物と各末端に求電子性官能基を有する四分岐化合物が $0.8 \sim 1.2$ の混合モル比で結合することで高強度なハイドロゲルを作ることができる。また、上記したとおり、四分岐化合物のコア部分とリンカー部位の結合がエステル結合であるとき、四分岐化合物の分解が進む。そして、四分岐化合物のコア部分リンカー部位の結合がエーテル結合であるとき、四分岐化合物は分解されず安定状態のままである。よって、各末端に求核性官能基を有する四分岐化合物と各末端に求電子性官能基を有する四分岐化合物が $0.8 \sim 1.2$ のモル比で混合すれば、求核性官能基を有する四分岐化合物又は求電子性官能基を有する四分岐化合物は、それぞれエステル結合又はエーテル結合を含むことができる。この場合、求核性官能基を有する四分岐化合物、又は求電子性官能基を有する四分岐化合物は、それぞれ2種類以上の四分岐化合物であってもよい。当業者であれば、適宜エステル結合又はエーテル結合を含む割合、求核官能基を有する四分岐化合物と求電子性官能基を有する四分岐化合物のどちらにどの結合を用いるかなど適宜調整することができる。

【0048】

本発明の好ましい態様は、第1の溶液、又は第2の溶液に緩衝液を含み、それぞれの溶液のpHを調整する。本発明において緩衝液とは、溶液中のpHが大幅に変化することを妨げる能力（pH緩衝能）を有する液をいう。本発明の緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、クエン酸・リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酒石酸緩衝液、トリス緩衝液、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、又はクエン酸・リン酸緩衝生理食塩水があげられる。本発明の製造方法において、第1の緩衝液と第2の緩衝液は、同じでも異なってもよい。また、第1の緩衝液及び第2の緩衝液は、それぞれ2種類以上の緩衝液を混合して用いてもよい。本発明の緩衝液の濃度はそれぞれ $20\text{ mM} \sim 200\text{ mM}$ である。後述する実施例に示したとおり、緩衝液濃度が低い場合には、緩衝液のpH緩衝能が低く、pHの制御が適切に行われない。一方、緩衝液濃度が高すぎる場合には、緩衝液成分が、ハイドロゲル形成を妨げる。そのため、本発明の緩衝液の濃度としては、 $20\text{ mM} \sim 100\text{ mM}$ が好ましい。本発明の緩衝液のpHは、酸性度及びアルカリ度が強すぎると、均一構造を有するハイドロゲルが形成されない。そのため、本発明の緩衝液のpHは、第1の緩衝液のpHが $6 \sim 8$ 、第2の緩衝液のpHが $5 \sim 7.5$ である。

【0049】

本発明の第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物は、混合工程で混合される。本発明の

10

20

30

40

50

混合工程としては、第1の溶液に第2の溶液を添加して混合する工程、第2の溶液に第1の溶液を添加して混合する工程、第1の溶液と第2の溶液とを等モルずつ混合する工程があげられる。本発明の製造方法において、第1の溶液又は第2の溶液の添加速度、混合速度は特に限定されず、当業者であれば適宜調整することができる。

【0050】

本発明の混合工程は、たとえば国際公開WO2007/083522号パンフレットに開示されたような二液混合シリンジを用いて行うことができる。混合時の二液の温度は、特に限定されず、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物がそれぞれ溶解され、それぞれの液が流動性を有する状態の温度であればよい。温度が低すぎると化合物が溶解されにくく、または溶液の流動性が低くなり、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物が均一に混ざりにくい。一方、温度が高すぎると第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物の反応性を制御しにくくなる。そのため、本発明の製造工程において、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物を混合するときの溶液の温度としては、 $1 \sim 100$ が挙げられ、 $5 \sim 50$ が好ましく、 $10 \sim 30$ がより好ましい。本発明の混合工程において、二液の温度は異なってもよいが、温度が同じである方が、二液が混合されやすいので好ましい。

10

【0051】

本発明の製造方法において、混合工程によって得られる混合溶液は、塩濃度が $0 \sim 1 \times 10^2$ mMであることが好ましく、 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^2$ であってもよい。後述する実施例で示されたとおり、混合溶液中の塩濃度が高くなると、混合溶液中のイオン強度が上昇する。イオン強度が上昇すると、正に帯電したアミノ基同士の静電反発が遮断されるため、四分岐化合物が均一に混合しなくなる(図3B)。そのため、混合溶液中の塩濃度が低い方が好ましい。そのため、混合溶液の塩濃度は、 100 mM以下であることが好ましく、 50 mM以下であることがさらに好ましい。

20

【0052】

また、本発明の製造方法において、第2の四分岐化合物は加水分解しないよう安定に存在することが好ましい。このためには、混合前の第2の四分岐化合物の溶液のpHは $5 \sim 6.5$ であることが好ましい。また、混合後の溶液においては、不均一な混合を防ぐために、第1の四分岐化合物の $95 \sim 99\%$ は第2の四分岐化合物との結合能を有するカチオン性のアミノ基の状態で存在することが好ましい。このような工程を経るためには、混合直後の溶液のpHは $6 \sim 8$ であることが望ましい。このため、本発明の製造方法において、第1の溶液のpHは、第2の溶液のpHよりも高い方が好ましい。溶液のpHは、市販のpHメーターを用いるなど公知の方法で測定することができる。このように、混合後のpHを $6 \sim 8$ に保ち、NH₂と反応可能な非カチオン性のアミノ基を 5% 以下に保つことにより、均一で強固なハイドロゲルを製造することが可能になる。なお、本明細書において混合開始とは、第1の溶液と第2の溶液とが接したときからをいう。

30

【0053】

このように混合後にpHを高くする方法としては、pHが 7.5 以上で 8.0 以下の第1の緩衝液を含む第1の溶液と、pH 5.0 以上で 6.5 以下の第2の緩衝液を含む第2の溶液とを混合する方法があげられる。本発明の第1及び第2の溶液は、緩衝液を含むので、異なるpHの溶液によって急激にpHが変化することがない。当業者であれば、第1及び第2の溶液のそれぞれのpHは、第1及び第2の溶液に含まれる第1の緩衝液及び第2の緩衝液の種類、濃度等を適宜調整して、混合後のpHを変化させることができる。

40

【0054】

本発明の第2の側面は、上記方法で製造されたハイドロゲルに関する。上記のとおり本発明の製造方法で製造されたハイドロゲルは、高強度であり、溶液のpHを調整することによって、ゲル化の時間を調整することができる。このように本発明のハイドロゲルは、ゲル化までの時間を調節することができるので、導入部に適合した形状を作りやすい。そのため、後述するように、本発明のハイドロゲルは、膝軟骨手術や椎間板手術など、生体において荷重負荷がかかる骨、軟骨、又は椎間板の整形外科的手術において、骨、軟骨、若

50

しくは椎間板の欠損部補填物質，又は骨，軟骨，若しくは椎間板の変性部補填物質として好適に用いることができる。整形外科手術において，本発明のハイドロゲルは，上記した二液混合シリンジを用いて，患部に直接投与してもよいし，あらかじめ導入する部位の型に合わせてハイドロゲルを形成して形成後のハイドロゲルを患部に導入してもよい。

【0055】

本発明の第3の側面は，第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とをモル比0.8：1～1.2：1で含む，ハイドロゲルに関する。上述したとおり，第1の四分岐化合物の求電子性官能基と第2の四分岐化合物の求核性官能基は1：1で反応しうる。よって，第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物のモル比は1：1に近いほど好ましい。後述する実施例で示されたとおり，本発明の第3の側面のハイドロゲルの第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とのモル比は，0.8：1～1.2：1であり，0.9～1：1.1～1が好ましい。後述する実施例で示されたとおり，本発明の製造方法では，第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物との混合モル比が0.8：1～1.2：1であれば，軟骨（10MPa）を超える強度のゲルを製造することができる。このような製造方法で製造されるハイドロゲルは，ハイドロゲルの中性子散乱の散乱曲線が，オルシュタイン-ゼルニケ（OZ）関数でフィッティングすることができる。これにより，ハイドロゲルの構造が均一であることを評価することができる。

【0056】

“ハイドロゲルの中性子散乱の散乱曲線が，オルシュタイン-ゼルニケ（OZ）関数でフィッティングされる”とは，ハイドロゲルの中性子散乱測定値群から表わされる近似曲線が，「ガウス（Gauss）関数で表わされる理論曲線と，OZ関数で表わされる理論曲線とを組み合わせた曲線」ではなく，「OZ関数で表わされる理論曲線」に相関することをいう。ハイドロゲルの中性子散乱測定値群から表わされる近似曲線が，OZ関数で表わされる理論曲線と相関することは，曲線フィッティングで評価することができる。具体的には，中性子散乱測定で得られた測定値群で表わされる近似曲線に，OZ関数で表わされる理論曲線を，重なりが最も大きくなるように重ね合わせた時，重なりの程度（フィッティングの程度）が，80%以上であればよく，より好ましくは90%以上である。このように2本の線を重ね合わせて，フィッティングの程度を算出する方法は，公知であり，当業者であれば適宜行うことができる。

【0057】

本発明の第3の側面の好ましい態様は，圧縮破断強度が10MPa以上のハイドロゲルである。本発明のハイドロゲルの圧縮破断強度は，公知の測定機器を用いて，公知の方法で調べることができる。圧縮破断強度測定機器としては，たとえば，Instron社製の圧縮試験機（Instron 3365）があげられる。圧縮破断強度とは，ゲル試料に圧縮荷重を加えた時に，ゲル試料が破断する最大応力のことをさす。圧縮破断強度は，円柱状のゲル試料に対して，1軸荷重をかけた時の圧縮力をその軸に垂直な断面積で割った値で表わすことができる。本発明のハイドロゲルは，生体軟骨の圧縮破断強度を超える10MPa以上であることが好ましい。このような圧縮破断強度を有するハイドロゲルを用いることで，高負荷がかかる骨欠損部や骨変形部に好適に用いることができる。

【0058】

本発明のハイドロゲルは，高強度であり，ゲル化までの時間を調整できるので，生体内荷重部位である膝軟骨や椎間板などに，骨，軟骨，若しくは椎間板の欠損部，又は骨，軟骨，若しくは椎間板の変形部に好適に使用することができる。また，本発明のゲルは，溶液のpHを調整することで，ゲル化までの時間を調整することが可能である。また，国際公開WO2007/083522号パンフレットに開示されたような二液混合シリンジを用いれば，オンサイト（onsite）でのゲル注入が可能になる。よって，ゲルを本発明のハイドロゲルは，整形外科手術などにおいて新しい治療方法を提供することができる。現在の膝軟骨や椎間板を補強する手術では，皮膚を切開し，患部を開口してゲルを導入している。それに対して，本発明のハイドロゲルは，椎間板造影方法を用いたゲルの投与が可能になる。椎間板造影方法とは，後側方向より椎間板用針を用いてゲルを注入する方

10

20

30

40

50

法である。このように、皮膚切開を行わず、椎間板髄核へゲルを注入することができるので、患者の体への負担を少ない低侵襲手術を行うことができる。このように本発明のハイドロゲルは、短期間的には椎間板の力学的特性を有し、長期的には椎間変性に対する予防効果が期待される有用な新規物質である。

【0059】

また、本発明のハイドロゲルは、椎間板切除術（LOVE法）又は内視鏡的髄核摘出術後にオンサイトでゲルを注入してもよい。本発明のハイドロゲルは、オンサイトで注入し、ゲル化までの時間を調整することができる。そのため、患部の形状に適合した状態でゲル化させるように、人為的に調整することができる。よって、術後の早期回復が期待でき、さらに術後の椎間板変性を予防することができる。

10

【0060】

さらに、本発明のハイドロゲルは、ヘルニアモデルとしても使用することができる。ヘルニアモデルとしては、腰椎前側方アプローチで後腹膜の後方より侵入し椎体前面を展開し、18G（ゲージ）又は20G（ゲージ）針と10mLシリンジを用いて髄核を吸引後、ゲルを注入し経過を観察することができる。

【0061】

すなわち、本発明は、第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とをモル比0.8:1~1.2:1で含むハイドロゲルを用いる骨、軟骨、又は椎間板の欠損部治療方法；第1の四分岐化合物と第2の四分岐化合物とをモル比0.8:1~1.2:1で含むハイドロゲルを用いる骨、軟骨、又は椎間板の変形部治療方法をも提供する。本発明のハイドロゲルは、短期間的には椎間板の力学的特性を有し、長期的には椎間変性に対する予防効果が期待される。

20

【実施例】

【0062】

[実施例1]

四分岐化合物の作製

2つの四分岐化合物TAPEG（テトラアミン-ポリエチレングリコール）とTNPEG（N-ヒドロキシ-スクシンイミジル-ポリエチレングリコール（NHS-PEG））は、末端にヒドロキシル基を有するTHPEG（テトラヒドロキシル-ポリエチレングリコール）をそれぞれアミノ化、スクシンイミジル化することによって得た。

30

【0063】

THPEGの作製

開始剤のペンタエリスリトール（0.4572mmol, 62.3mg）をDMSO/THF（v/v=3:2）50mLの混合溶媒に溶解させ、メタル化剤にカリウムナフレン（0.4157mmol, 1.24mg）を用い、エチレンオキシド（200mmol, 10.0mL）を加え、約2日間、Ar存在下、60℃で加熱攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテルに再沈殿させ、濾過により沈殿物を取り出した。さらに、ジエチルエーテルで3回洗浄し、得られた白色固体を減圧乾燥することにより、20kのTHPEGを得た。

【0064】

TAPEGの作製

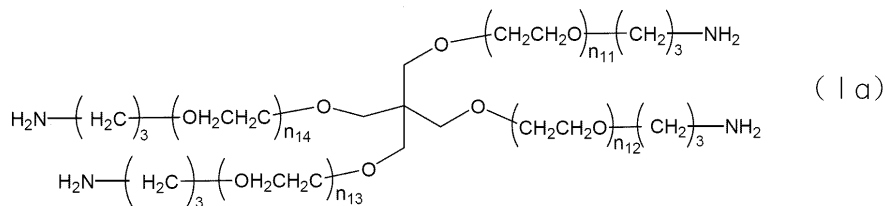
THPEG（0.1935mmol, 3.87g, 1.0equiv）をベンゼンに溶解させ、凍結乾燥した後、THF62mLに溶解させ、トリエチルアミン（TEA）（0.1935mmol, 3.87g, 1.0equiv）を加えた。別のナスフラスコにTHF31mLとメタンスルホニルクロライド（MsCl）（0.1935mmol, 3.87g, 1.0equiv）を加え、氷浴につけた。THPEG, TEAのTHF溶液にMsClのTHF溶液を約1分間かけて滴下し、30分間氷浴中で攪拌した後、室温で1時間半攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテルに再沈殿させ、濾過により沈殿物を取り出した。さらに、ジエチルエーテルで3回洗浄し、得られた白色固体をナスフラスコに移し、25%アンモニア水250mLを加え、4日間攪拌した。反応終了後、エバポレーター

40

50

により溶媒を減圧留去し、水を外液に2, 3回透析を行い、凍結乾燥することにより、白色固体のT A P E Gを得た。作製したT A P E Gの化学式は式(I a)に示した。式(I a)中、 $n_{11} \sim n_{14}$ は、T A P E Gの分子量が約10,000(10kDa)のとき50~60であり、分子量が約20,000(20kDa)のとき100~115であった。

【化9】



10

【0065】

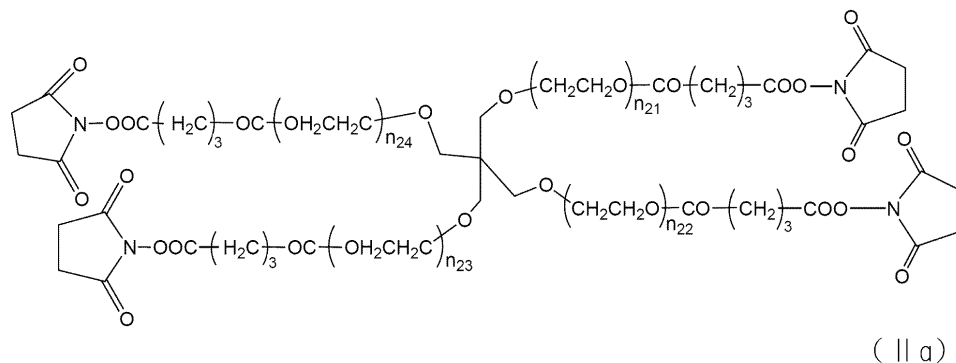
T N P E Gの作製

T H P E G (0 . 2 3 9 5 m m o l , 4 . 7 9 g , 1 . 0 e q u i v) を T H F に溶解させ、0.7mol/lグルタル酸/T H F 溶液 (4 . 7 9 0 m m o l , 6 . 8 5 m L , 2 0 e q u i v) を加え、A r 存在下、6時間攪拌した。反応終了後、2-プロパノールに滴下し、遠心分離機に3回かけた。得られた白色固体は300mLナスフラスコに移し、エバポレーターにより溶媒を減圧留去した。残渣をベンゼンに溶解させ、不溶物を濾過によって取り除いた。得られた濾液を凍結乾燥により溶媒を除去することで、末端がカルボキシル基で修飾された白色固体のT e t r a - P E G - C O O H を得た。このT e t r a - P E G - C O O H (0 . 2 1 6 5 m m o l , 4 . 3 3 g , 1 . 0 e q u i v) を T H F に溶解させ、N - ハイドロスクシンイミド (2 . 5 8 9 m m o l , 0 . 2 9 9 g , 1 2 e q u i v) , N , N ' - ジイソプロピルスクシンイミド (1 . 7 3 2 m m o l , 0 . 2 6 9 m L , 8 . 0 e q u i v) を加え、3時間、40 で加熱攪拌した。反応終了後、エバポレーターにより溶媒を減圧留去した。クロロホルムに溶解させ、飽和食塩水で3回抽出し、クロロホルム層を取り出した。さらに、硫酸マグネシウムで脱水、濾過を行った後、エバポレーターにより溶媒を減圧留去した。得られた残渣のベンゼン凍結乾燥を行い、白色固体のT N P E G を得た。作製したT N P E G の化学式は式(II a)に示した。式(II a)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は、T N P E G の分子量が約10,000(10k)のとき45~55であり、分子量が約20,000(20k)のとき90~115であった。

20

30

【化10】



40

【0066】

[実施例 2]

ゲルの強度に与える溶媒種の効果

T A P E G (I a) (1 0 k) , T N P E G (II a) (1 0 k) をそれぞれ100mg/mLの濃度で純水、リン酸緩衝液(pH7.4)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、生

50

理食塩水に溶解させた。調整後，得られた溶液を速やかに二液混合し，37 でゲル化させ，ゲル化後のゲル強度を測定した。強度としては，直径15 mm，高さ7.5 mmの円筒状サンプルに直径2 mmの進入棒を進入させ，98%まで進入させた際の圧力を用いた。

【0067】

結果，すべてのゲルは100%の変形においても破断せず，高い変形に対しても破断しないでゲルであるといえる。ゲル化速度に関しては，純水中が最も早く数十秒でゲル化した。その後，リン酸緩衝液，PBSと続き，生理食塩水は最も遅く5分程度であった。ゲル強度の結果を表1に示した。

【表1】

溶媒種	ゲル強度(kPa)	破断の有無
20mMリン酸緩衝液 pH 7.4	16.6	破断せず
PBS pH 7.4	12.2	破断せず
純水	6.7	破断せず
生理食塩水	4.5	破断せず

【0068】

本発明において反応速度は極めて重要である。反応が早すぎると，四分岐化合物同士が均一に混合される前に溶液の粘度が高くなってしまい均一な網目構造を得ることができない。一方，遅すぎると分解性の活性エステル部位が加水分解してしまうために，最終的な反応率が低くなる。よって，純水中で作製したものは，混合前にゲルが形成されてしまうために，網目構造が不均一になり，強度が減少していると考えられる。すなわち，純水中で作製したものは，混合前にゲルが形成されてしまうために，網目構造が不均一になり，強度が減少していると考えられる。一方で，生理食塩水中で作製したものは，反応中に活性エステル部位が加水分解したために，反応率が低下し，強度が減少していると考えられる。そのために，中間的な反応速度を有するリン酸緩衝液，PBSにおいては反応率が高く，力学強度も上昇したと考えられる。

【0069】

[実施例3，比較例1]

ゲル化強度及びゲル化時間に与える溶媒pHの効果
TAPEG (Ia) (10k)，TNPEG (IIa) (10k)をそれぞれ100 mg / mLの濃度でリン酸緩衝液 (pH 6.0，7.4 (以上，実施例3)，9.0 (比較例1))，クエン酸緩衝液 (pH 6.0，7.4 (以上，実施例3)，9.0 (比較例1))に溶解させた。調整後，得られた溶液を速やかに二液混合し，37 でゲル化させ，ゲル化後のゲル強度を測定した。強度としては，直径15 mm，高さ7.5 mmの円筒状サンプルに直径2 mmの進入棒を侵入させ，98%まで侵入させた際の圧力を用いた。

【0070】

結果，すべてのゲルは，100%の変形においても破断しなかった。ゲル化速度はpHが高いほど早く，pH 9.0では1分以内，pH 6.0では5分程度でゲル化した。その結果を表2に示した。

【表2】

溶媒種	ゲル強度(kPa)	破断の有無
リン酸緩衝液 pH 6.0	9.52	破断せず
リン酸緩衝液 pH 7.4	19.3	破断せず
リン酸緩衝液 pH 9.0	14.2	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 6.0	8.6	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 7.4	12.9	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 9.0	10.2	破断せず

【0071】

この結果，中間的な反応速度を示すpHの溶媒を使用したときに，高い強度を持つハイド

10

20

30

40

50

ロゲルが得られた。pH 7.4 付近が最適値であると考えられる。また、クエン酸緩衝液はリン酸緩衝液と比べて、pH 7 付近での緩衝能力が低く、pH 制御がうまくいかなかったために、このような結果になったと考えられる。よって、pH 7 付近で高い緩衝能力を有するリン酸緩衝液が最も適していると考えられる。

【 0 0 7 2 】

[実施例 4]

ゲル強度及びゲル化時間に与える緩衝液濃度の効果

T A P E G (1 0 k) , T N P E G (1 0 k) をそれぞれ 1 0 0 m g / m L の濃度でリン酸緩衝液 (p H 7 . 4 , 2 m M , 2 0 m M , 1 0 0 m M , 2 0 0 m M) , クエン酸緩衝液 (p H 7 . 4 , 2 m M , 2 0 m M , 1 0 0 m M , 2 0 0 m M) に溶解させた。調整後、得られた溶液を速やかに二液混合し、37 でゲル化させ、ゲル化後のゲル強度を測定した。強度としては、15 mm、高さ7.5 mmの円筒状サンプルに直径2 mmの侵入棒を侵入させ、98%まで侵入させた際の圧力を用いた。

10

【 0 0 7 3 】

結果、すべてのゲルは100%の変形においても破断しなかった。ゲル化速度は緩衝液濃度が高いほど低かったが、すべてのゲルは1~2分程度でゲル化した。その結果を表3に示した。

【 表 3 】

溶媒種	ゲル強度(kPa)	破断の有無
リン酸緩衝液 pH 7.4 2mM	6.7	破断せず
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	19.3	破断せず
リン酸緩衝液 pH 7.4 100mM	15.7	破断せず
リン酸緩衝液 pH 7.4 200mM	13.0	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 7.4 2mM	6.3	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	12.9	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 7.4 100mM	8.8	破断せず
クエン酸緩衝液 pH 7.4 200mM	8.5	破断せず

20

【 0 0 7 4 】

その結果、反応速度はあまり変化しなかったことにより、緩衝液濃度は反応速度には大きく影響しないと考えられる。しかしながら、ゲル強度は緩衝液濃度が20 mMから100 mMのあたりで高い値を示した。緩衝液濃度が低い場合は、緩衝液の緩衝限界が低くpHの制御ができなかったために、ゲル化速度が速くなり、それにより均一な構造が得られなかったと考えられる。すなわち、四分岐化合物が100 mg / mLの場合、緩衝液の濃度を20 mM以上にすれば、溶液を適切なpHに保つことができる。それに対して、高濃度側で強度が低下した理由は、四分岐化合物が均一に混合されなかったためであると考えられる。pH 7 付近においては、アミノ基はプロトン化し正電荷を帯びているために、アミノ基同士は反発する。この反発によって、T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) の混合が促進されると考えられる。緩衝液濃度が高い場合には、イオン強度が高いため、アミノ基同士の反発が遮断され、混合状態が均一にならなかったために、均一な構造になったと考えられる。

30

40

【 0 0 7 5 】

[実施例 5]

ゲル強度及びゲル化時間に与える塩濃度の効果

T A P E G (I a) (1 0 k) , T N P E G (I I a) (1 0 k) をそれぞれ 1 0 0 m g / m L の濃度で塩化ナトリウム濃度、0 mM、50 mM、100 mM、200 mM溶解させた水溶液及びリン酸緩衝液 (p H 7 . 4 , 2 0 m M) に溶解させた。調整後、得られた溶液を速やかに二液混合し、37 でゲル化させ、ゲル化後のゲル強度を測定した。強度としては、直径15 mm、高さ7.5 mmの円筒状サンプルに直径2 mmの侵入棒を侵入させ、98%まで侵入させた際の圧力を用いた。

【 0 0 7 6 】

50

結果，すべてのゲルは100%の変形においても破断しなかった。ゲル化速度はイオン強度が高いほど低かった。また，純水のものは反応速度が高く1分以内でゲル化した。それに対して，リン酸緩衝液を用いたものは，1～2分程度でゲル化した。その結果を表4に示した。

【表4】

溶媒種	NaCl濃度(mM)	ゲル強度(kPa)
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	0	19.3
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	50	13.4
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	100	13.8
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	200	11.2
純水	0	6.2
純水	50	7.1
純水	100	5.6
純水	200	5.7

10

【0077】

純水を用いた場合，リン酸緩衝液を用いた場合，共に，塩濃度が高い場合にはゲルの強度が減少した。これは，イオン強度の上昇により，アミノ基同士の静電反発が遮断され四分岐化合物同士の混合状態が不均一になったためであると考えられる。

【0078】

[実施例6]

ゲル作製溶媒の最適化実験

TAPGE (Ia) (10k)，TNPEG (IIa) (10k)の両方をリン酸緩衝液 (pH 7.4, 50mM)，及びTAPEG (Ia)のみをリン酸緩衝液 (pH 7.4, 50mM)，TNPEG (IIa)のみをクエン酸・リン酸緩衝液 (pH 5.8, 5.0mM)にそれぞれ100mg/mLの濃度で溶解させた。調整後，得られた溶液を速やかに二液混合し，37 でゲル化した。ゲル形状は直径15mm，高さ7.5mmの円筒形に成形し，ゲルの圧縮弾性率を測定した。

20

【0079】

結果，TAPEG (Ia)をリン酸緩衝液 (pH 7.4, 50mM)，TNPEG (IIa)をクエン酸・リン酸緩衝液 (pH 5.8, 50mM)に溶解させて作製した方が，ゲルの弾性率は高かった。その結果を表5に示した。

30

【表5】

TAPEGの溶媒種	TNPEGの溶媒種	圧縮弾性率(kPa)
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	90.3
リン酸緩衝液 pH 7.4 20mM	クエン酸・リン酸緩衝液 pH 5.8 20mM	98.7

【0080】

pHが高い状態では，TNPEG (IIa)の活性エステル部位は加水分解し，反応に寄与しなくなる。TNPEG溶液のpHのみを下げたことにより，加水分解を抑制することが可能となり最終的な反応率が向上したと考えられる。

40

【0081】

[実施例7]

TAPEGとPNPEGの混合比率検討

TAPEG (Ia) (分子量約10k)とTNPEG (IIa) (分子量約10k) (前駆物質の全量 = 600mg)をそれぞれpH 7.2およびpH 7.4の100mMリン酸緩衝液 (10mL)に一定全量溶解した。TAPEG (Ia)とTNPEG (IIa)のモル比率を0.33～3.0の範囲になるように，等量の各化合物溶液を室温下で混合し，ゲル化は2時間，直径15mm，高さ7.5mmの円筒形上に成形した。圧縮試験は機械的試験装置 (Instron Corporation製 (INSTRON 3365))を用いて，速度0.75mm/minで行った。結果を図4及び図5に示した。

50

【 0 0 8 2 】

図 4 は、T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) のモル比率 (r) を 0 . 3 3 ~ 3 . 0 の範囲で混合したゲルの圧縮弾性率 ($k P a$) を示す図面に替わるグラフである。図 5 は、T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) のモル比率 0 . 6 ~ 1 . 4 の範囲で混合したゲルの破断歪み (%) 及び破断強度 ($M P a$) を示す図面に替わるグラフである。図 4 及び図 5 の結果より、圧縮弾性率および破断強度の最大値は、 $r = 1 . 0$ のときであり、等モルの四分岐化合物が互いに反応していることを示された。そして 1 成分が過剰又は不足するとゲルが弱くなることが示された。さらに圧縮弾性率の値は、成分が過剰又は不足であっても、 r が逆数同士ではほぼ同一であり、圧縮弾性率は同様に減少した。このことは、網目構造が類似していることを示唆している。このような化学量論性および対称性が高いゲル化プロセスは前例がなく、ハイドロゲルの均一な網目構造を形成していると考えられる。四分岐化合物の最適用量および最適比が、均一な網目構造を形成するのに必要であることが示された。

10

【 0 0 8 3 】

図 4 及び図 5 より、T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) のモル比率が 0 . 6 ~ 1 . 4 の間では、破断強度 0 . 8 $M P a$ 以上のゲルが得られることが示された (図 5) 。そして、モル比 0 . 8 ~ 1 . 2 では圧縮弾性率が約 4 0 $k P a$ (図 4) となり、破断強度が約 1 $M P a$ (図 5) と高強度になり、生体材料としても好適に使用されることが示された。よって、本発明のハイドロゲルは、T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) とをモル比 0 . 6 : 1 ~ 1 . 4 : 1、好ましくは 0 . 8 : 1 ~ 1 . 2 : 1 の範囲で有することにより、均一な網目構造を有するハイドロゲルが形成されることが示された。

20

【 0 0 8 4 】

[実施例 8]

圧縮破断強度の測定

分子量 2 0 , 0 0 0 の T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) を 1 6 0 $m g / m L$ の濃度で 1 0 0 $m M$ のリン酸緩衝溶液、クエン酸・リン酸緩衝溶液に溶解させ、二液を混合した結果、1 分程度で無色・透明なハイドロゲルが形成された。直径 7 $m m$ 、高さ 3 . 5 $m m$ の円筒状のサンプルを作製し、圧縮試験機 ($I n s t r o n$) を用いて圧縮強度試験を行った。その結果を図 6 に示した。図 6 の縦軸は応力 [$M P a$] をしめし、横軸はハイドロゲルの歪み [%] を示す。この結果、このハイドロゲルは、9 0 % 以上の歪みを与えても破断することなく、また、1 0 0 $M P a$ を超える応力にも耐えることができた。この値は、従来のハイドロゲルの強度はおろか、生体軟骨の破断応力である 1 0 $M P a$ をはるかに凌駕する値であり、関節軟骨を始め、高負荷のかかる椎間板などへの応用も可能であると考えられる。

30

【 0 0 8 5 】

[実施例 9]

中性子散乱測定による網目構造の均一性解析

分子量 1 0 , 0 0 0 の T A P E G (I a) と T N P E G (I I a) を様々な濃度で 5 0 $m M$ のリン酸緩衝溶液 ($p H 7 . 4$)、クエン酸・リン酸緩衝溶液 ($p H 5 . 8$) に溶解させ、二液を混合することでハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルに対して、構造における不均一性を解析するために、中性子散乱測定を行った。その結果を図 7 に示した。

40

【 0 0 8 6 】

図 7 中、「ガウス + $O Z$ 」は、通常のハイドロゲル (例 : P T H F (U 1 0 2)) の散乱曲線を示し、ポリマーの熱揺らぎに起因するオルンシュタイン - ゼルニケ ($O Z$) 関数と系内に存在する不均一性からの過剰散乱を表すガウス ($G a u s s$) 関数の足し合わせで書くことができる。図 7 中「ガウス」は、ゲルが不均一のとときの過剰散乱を表すガウス関数曲線を示す。図 7 中「 $O Z$ 」は、ゲルが均一なときの中性子散乱を表す $O Z$ 関数曲線を表す。図 7 中「ハイドロゲル」は、本発明のハイドロゲルを示す。図 7 に示したように、通常のハイドロゲルにおいて、ガウス関数の寄与は小角領域における曲線の立ち上がりに

50

見られる。それに対して本発明のハイドロゲルから得られた錯乱関数はガウス関数の寄与は一切存在せず，OZ関数のみで記述することが可能であった。このような実験結果は，これまでに得られたいかなるハイドロゲルにおいても観察されておらず，当ハイドロゲルがこれまでにない非常に均一な構造を有していることを強く支持するものである。この著しい均一性は，ハイドロゲルの有する高い機械的強度に強く寄与していると考えられる。

【0087】

[実施例10]

マウス背部への皮下埋植試験

分子量20,000のTAPEG(Ia)とTNPEG(IIa)を160mg/mLの濃度で100mMのリン酸緩衝溶液(pH7.4)，クエン酸・リン酸緩衝溶液(pH5.8)に溶解させた。得られた溶液を二液混合シリンジにロードし，C57BL/6マウスの背部へ注入した。その後，マウス皮下において，ゲル化が起こったことを触診により確認した。埋食後1ヶ月でマウスを解剖し，埋植部の組織観察を行った。埋植部の写真を図8に示した。結果，一切の炎症反応や毒性反応は見られなかった。

10

【0088】

[実施例11]

イヌ膝軟骨への埋植試験

関節軟骨疾患への適用の試験をするために，イヌ膝軟骨に直径3mmの欠損を作製し，二液混合シリンジを用いてオンサイトでゲルを作製した。手術後2ヶ月・4ヶ月で解剖し，埋植部を観察した。その結果を図9に示した。図9A～図9Cは，手術後2か月後の埋植部を示し，図9D～図9Fは，手術後4か月後の埋植部を示す。結果，患部にハイドロゲルは残っており，炎症反応や毒性反応は見られなかった。

20

【0089】

[実施例12]

ブタ椎間板への埋植試験

椎間板用充填剤としての適用の試験をするために，ブタの椎体より髓核を抽出し，その空隙に二液混合シリンジを用いてハイドロゲルを作製した。椎体内の髓核を除いた空隙部においてハイドロゲルの作製は可能であった。その結果を図10に示した。図10Aは，埋植中の写真を示し，図10Bは，埋植後の椎間板の写真を示す。

30

【0090】

[実施例13]

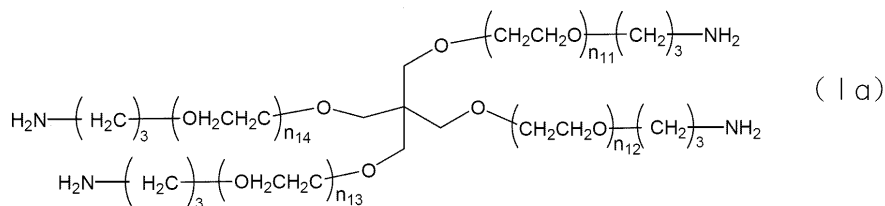
ゲルの分解速度の検討

ゲルの分解速度を検討するために，TAPEG(Ia)(下記式(Ia))，TNPEG(IIa)(下記式(IIa))，及びTNPEG(IIb)(下記式(IIb))の3種類の四分岐化合物を用いた。

【0091】

式(Ia)中， $n_{11} \sim n_{14}$ は50～60であり，分子量は約10,000(10k)であった。

【化11】



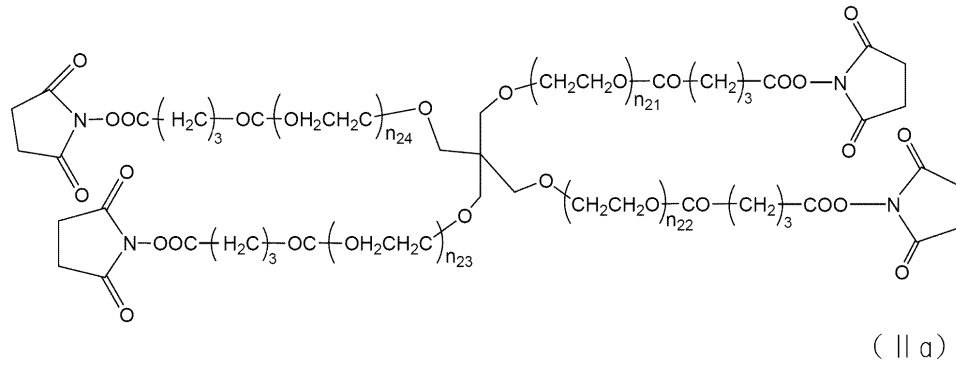
40

【0092】

式(IIa)中， $n_{21} \sim n_{24}$ は45～55であり，分子量は約10,000(10k)であった。

50

【化12】

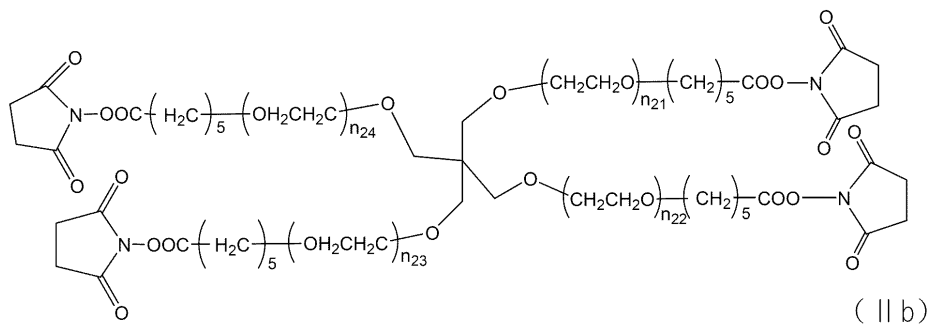


10

【0093】

式(IIb)中、 $n_{21} \sim n_{24}$ は45~55であり、分子量は約10,000(10k)であった。

【化13】



20

【0094】

上記3種類の化合物をリン酸緩衝液(pH7.4, 20mM)に溶解して60mg/mLとした。それぞれの組み合わせと混合の比率を表6に示した。下記表6の比率にしたがって、それぞれを混合し、ゲルを作製した。

【表6】

	TAPEG(Ia)	TNPEG(IIa)	TNPEG(IIb)
パターン1	1	1	—
パターン2	1	—	1
パターン3	2	1	1

30

【0095】

作製した3種類のゲルの力学的強度の比較結果を表7に示した。

【表7】

サンプル	破断歪み(%)	破断強度(MPa)	圧縮弾性率(KPa)
パターン1	88.6	2.12	92.7
パターン2	84.6	1.78	85.2
パターン3	88.7	1.92	91.7

40

【0096】

表5の結果からわかるように、3種類のハイドロゲルは、破断歪み、破断強度、圧縮弾性率はほぼ同じであった。これらのゲルを用いて、ゲルの分解速度の検討を行った。作製した3種類のゲルを、37の疑似体液中に静置し、ゲルの膨潤率を測定した。その結果を図11に示した。縦軸は膨潤率、横軸は静置した日数を示す。膨潤率が高ければ高いほど、ゲルが分解されたことを示す。図11に示されたとおり、パターン2はある程度膨潤後、膨潤率は一定であった。すなわちほとんど分解されないことが示された。パターン1は

50

日数の経過とともに膨潤率が上昇し、ゲルが分解されることが示され、図 1 1 には示していないが 2 か月後には完全に分解された。パターン 3 はパターン 1 とパターン 2 の中間的な挙動を示した。このことから、TNPEG (IIa) TNPEG (IIb) の混合比を変えることで、ゲルの分解速度をコントロールできることが示された。

【0097】

[実施例 14]

ハイドロゲル存在下での細胞増殖活性の検討

マウス繊維芽細胞株 NIH3T3, マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5, マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 をそれぞれ 12well プレートに 40,000 個 / 2mL / well で播種し、24 時間培養した。なお、培養培地は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma 社製) に、10% FBS (Gibco 社製) および 1% ペニシリン / ストレプトマイシンを含む培地を用いた。各種細胞を 24 時間培養後、培養培地を新鮮な培地に交換した。その後、培養液の 0.25% vol/vol, 0.5% vol/vol, 1.0% vol/vol に相当するハイドロゲルをトランスウェルを使用して培養液中に浸漬し、24 時間培養した。なお、ハイドロゲルは、表 6 中、パターン 2 の組み合わせのものを用いた。各細胞に関して、Cell counting kit-8 (Wako 社製) を使用して、細胞増殖活性を測定した。細胞増殖活性は、各 well の吸光度 (OD450nm) を測定することで調べた。その結果を図 1 2 に示した。

10

【0098】

図 1 2 は、ハイドロゲル存在下での NIH3T3, MC3T3-E1, ATDC5 の各細胞における細胞増殖活性 (n = 6) を示す図面に替わるグラフである。図 1 2 中縦軸は、細胞の増殖活性 (吸光度測定値) を示す。図 1 2 A は、NIH3T3 の結果を示す。図 1 2 B は、MC3T3-E1 の結果を示す。図 1 2 C は、ATDC5 の結果を示す。その結果、ゲル非存在下とゲル存在下を比較しても、各細胞の何れにおいても細胞増殖活性には大きな変化はなかった。また、ゲルの量を増加させても細胞増殖活性には、大きな変化はなかった。従って、ハイドロゲルは様々な細胞に対して細胞毒性を示さないことが明らかとなった。よって、本発明のハイドロゲルは生体材料として好適に使用することができることが示された。

20

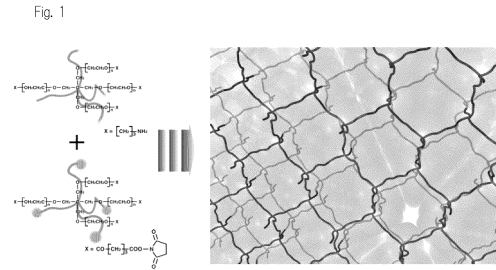
【産業上の利用可能性】

【0099】

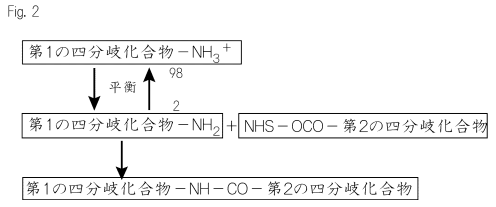
本発明は、医療産業において広く利用されうる。

30

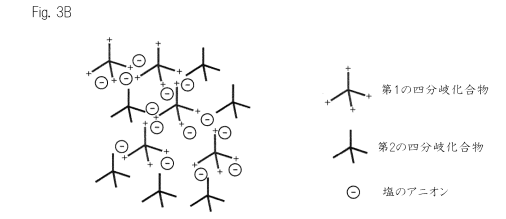
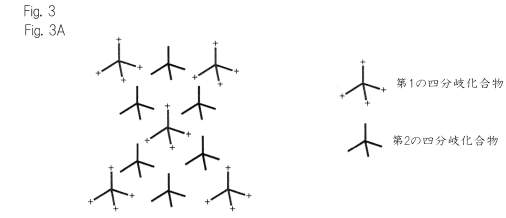
【 図 1 】



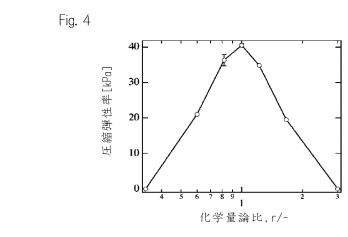
【 図 2 】



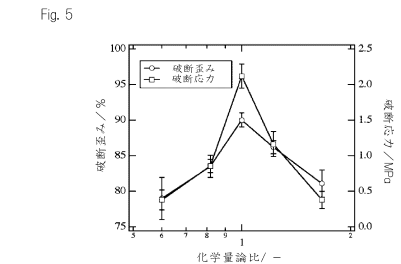
【 図 3 】



【 図 4 】



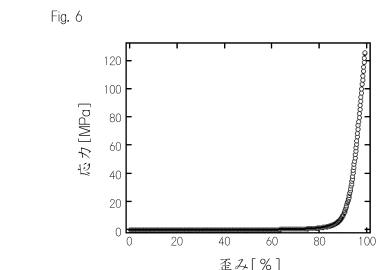
【 図 5 】



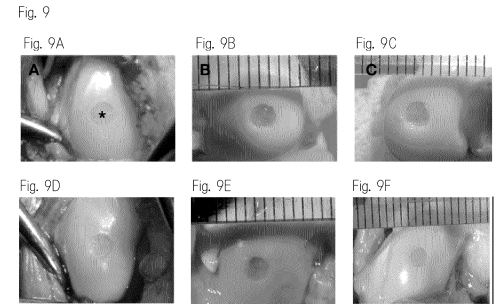
【 図 8 】



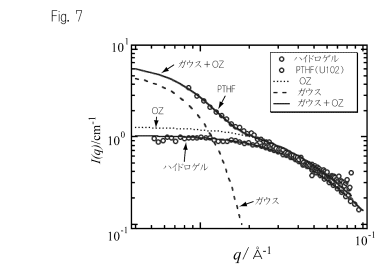
【 図 6 】



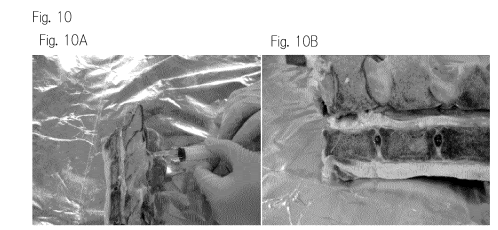
【 図 9 】



【 図 7 】

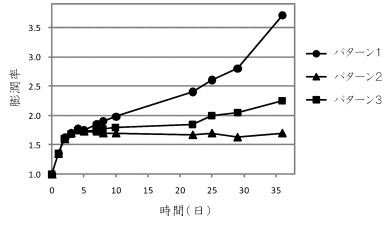


【 図 10 】



【 11 】

Fig. 11



【 12 】

Fig. 12

Fig. 12A

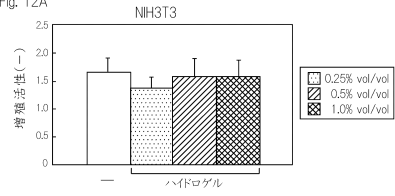


Fig. 12B

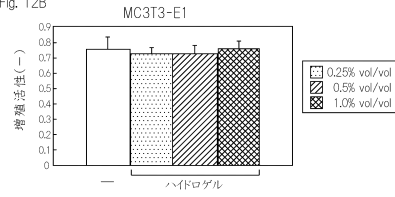
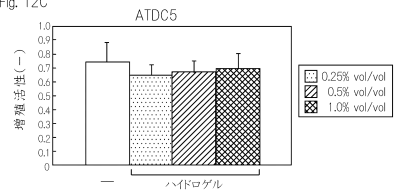


Fig. 12C



フロントページの続き

- (72)発明者 酒井 崇匡
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 佐々木 伸雄
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 柴山 充弘
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 鈴木 茂樹
東京都文京区本郷3-38-1本郷イシワタビル8階

審査官 井津 健太郎

- (56)参考文献 特開2008-029855(JP,A)
特開2007-217699(JP,A)
特表平08-502082(JP,A)
特表2003-508564(JP,A)
特表2006-516548(JP,A)
特表2003-503367(JP,A)
特表2000-502380(JP,A)
国際公開第2006/013612(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08G 65/00 - 65/48
C08G 81/00
C08J 3/03 - 3/075
A61L 15/00 - 33/00
CA(STN)
REGISTRY(STN)