(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2003 年11 月6 日 (06.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/090765 A1

(51) 国際特許分類[7]: A61K 31/722, 31/727, 38/22, 45/00, 9/06, A61L 15/16, 27/20, 27/44, A61P 17/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/05070

(22) 国際出願日: 2003 年4 月21 日 (21.04.2003)

(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2002-120995 2002 年4 月23 日 (23.04.2002) JP

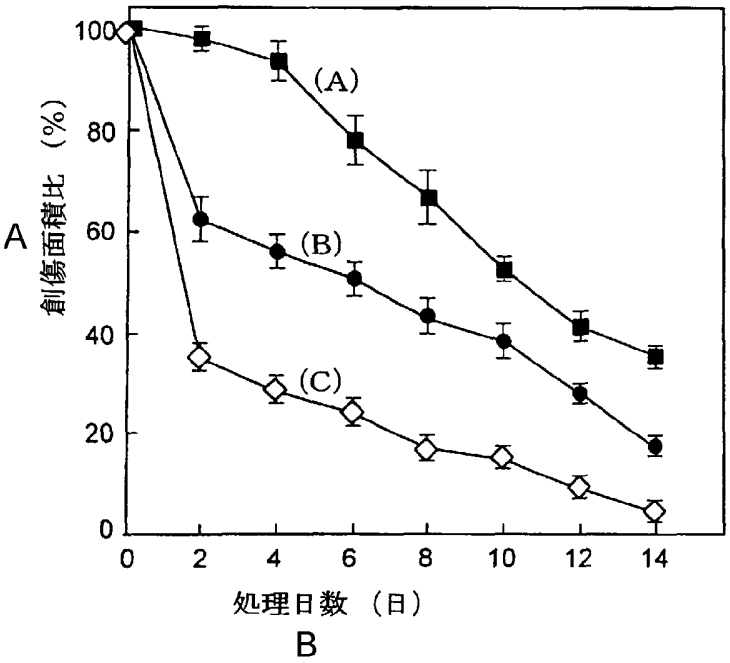
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ネーテック (NETECH INC.) [JP/JP]; 〒213-0012 神奈川県 川崎市高津区 坂戸３丁目２番１号 ＫＳＰ 東 - ５０２ Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石原 雅之 (ISHIHARA,Masayuki) [JP/JP]; 〒190-0033 東京都 立川市一番町６丁目２４番地１８号 Tokyo (JP). 由良 洋文 (YURA,Hirofumi) [JP/JP]; 〒213-0011 神奈川県 川崎市高津区 久本３丁目１２番２０号- ７０２ Kanagawa (JP). 斎藤 芳夫 (SAITO,Yoshio) [JP/JP]; 〒236-0011 神奈川県 横浜市金沢区 長浜２丁目６番１９号 Kanagawa (JP). 小原 聖勇 (OBARA,Kiyohaya) [JP/JP]; 〒359-1145

[続葉有]

(54) Title: MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING PHTOCROSSLINKABLE CHITOSAN DERIVATIVE

(54) 発明の名称: 光架橋性キトサン誘導体を含有する医療用組成物



A...WOUND AREA RATIO (%)
B...TREATING TIME (DAYS)

(57) Abstract: It is intended to provide medicinal compositions which are advantageous as sealants for wound, etc. and have an effect of strongly promoting the healing of intractable wounds or operative wounds without any risk of side effects such as canceration accompanying the promotion of tissue generation. Namely, medicinal compositions characterized by containing a photocrosslinkable chitosan derivative and a wound healing promoter. It is preferable that the photocrosslinkable chitosan derivative has a saccharide having a reducing end which has been introduced into at least a part of the amino groups in the chitosan skeleton and a photoreactive group which has been introduced into at least another part thereof. It is preferable that the wound healing promoter is a cell proliferative factor.

(57) 要約: 傷口等のシーラントとして有利であると同時に難治性創傷や手術切開創の治癒を積極的に推進する機能を有し、組織再生を促進するが癌化などの副作用を生じる危険のない医療用組成物を提供する。本発明は、光架橋性キトサン誘導体及び創傷治癒促進薬を含有することを特徴とする医療用組成物に係る。この光架橋性キトサン誘導体は、キトサン骨格のアミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖類を導入し、他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなるものが好ましい。創傷治癒

[続葉有]

WO 03/090765 A1

埼玉県 所沢市 大字山口１１３８の１ Saitama (JP). 藤田 真敬 (FUJITA,Masanori) [JP/JP]; 〒359-0045 埼玉県 所沢市 美原町２丁目２９２９番地の１６ Saitama (JP).

(74) 代理人: 園田 吉隆, 外(SONODA,Yoshitaka et al.); 〒163-0243 東京都 新宿区 西新宿２丁目６番１号 新宿住友ビル４３階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (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。

明細書

光架橋性キトサン誘導体を含有する医療用組成物

技術分野

本発明は、光架橋性キトサン誘導体と創傷治癒促進剤とで構成される医療用組成物、特に、糖尿病性皮膚潰瘍や褥創といった難治性皮膚疾患又は創傷に密着し、創傷治癒促進剤を適切に徐放して治癒することのできる、接着作用と創傷治癒促進作用とを兼ね備えた組成物、並びに、光架橋性キトサン誘導体を主剤とする当該組成物の製造方法及び当該組成物の用途に関する。

背景技術

皮膚等の創傷は、主として、正常皮膚・粘膜組織が離開した解放性創傷、熱や放射線による熱傷、潰瘍（限局性（circumscribed）の組織欠損）、あるいはそれらの複合創傷などに分類される。特に、面積が広く深度が深い重度の創傷では、感染による外来性の炎症を防いで肉芽組織の誘導を促進する治療が必須となる。

このような創傷の治療には、ガーゼ等の創傷被覆材を用いることが古くから行われているが、被覆材自体に治癒効果は無いため、抗生剤などの薬剤を併用して治癒効果を上げる工夫がなされている。近年、材料化学の進歩によって、ガス透過性を持ちながら水分の浸入を防ぐような透明粘着フィルムやゼリー状のハイドロゲル、さらには動物の生体膜などを利用した人工皮膚的被覆材も用いられるようになってきた。しかし、創傷の保護や感染防御などのプロテクション機能と治癒を促進するヒーリング機能とを同時に具備するものは未だ提供されるに至っていない。

特に、褥創や糖尿病に由来する皮膚潰瘍といった難治性の創傷では欠損組織の血液循環が阻害されるために欠損組織の再生が著しく遅延する。現状では、治癒を促進するために有効な治療薬や被覆剤などが提供されていないので、治癒に要する長期間の間に外来性の重篤な感染症を合併する危険があり、感染症を合併した場合には、それらを治療するために壊死した組織を根こそぎ切除するといった患者負担の大きな外科的処置を施さざるを得ない。

このような難治性の創傷治療のために、組織細胞を体外で培養した再生組織を用いることが検討されているが、簡便性、コスト、時間、安全性などの問題を残している。最近では、組織再生を誘導するための血管新生を促す遺伝子を用いた治療法に関する研究も進められているが、遺伝子を導入するための方法論や導入遺伝子によって産生されるタンパク質が臨床効果を有するかなどの多くの課題が未解決である。

また、上記以外の創傷として、胃や肺などの臓器治療における外科的切除創があるが、これらの創傷に対して、組織の吻合部の空気や体液の漏れを防ぐシーラントとして接着性の高い被覆剤が使用されている。例えば、生体由来のタンパク質やシアノアクリレート系の合成接着剤、さらには、血液凝固因子などのヒト由来血漿製剤などが用いられているが、現状では、接着性、安全性、生分解性などの点で十分ではない。特に、切開創の組織再生を誘導して積極的な治癒促進効果を持たせることは、患者の予後に大きく貢献するために重要であるが、そのような機能を有する実用的なシーラントは未だ提供されるには至っていない。

一方、細胞増殖因子（ＧＦ）は、細胞の増殖や分化を制御し、組織再生に寄与することが知られている。特に、繊維芽細胞増殖因子であるＦＧＦ－１とＦＧＦ－２の研究が進んでおり、これらが細胞の増殖、移動、分化、寿命などを制御し、胎児の発生、血管新生、骨形成、神経形成や創傷修復に寄与することが明らかとなった。しかしながらＧＦは、その活性の維持や保存が困難であり、通常、細胞外基質を構成するプロテオグリカン中のヘパリン分子と相互作用して、酸化に対する劣化のプロテクションや機能調節がなされている。また、一時期に高濃度のＧＦが作用した場合、癌的な要素を惹起する危険もあるので、その使用法には注意が必要である。即ち、ＧＦの組織再生機能を創傷治療に利用することが期待されていながら、ＧＦ自身の高い拡散性や機能劣化の早さという問題が実際の臨床応用を妨げていた。

本発明者らは、多糖類であるキトサンを応用した創傷治療剤の開発を進めてきた（ＷＯ００／２７８８９参照）。キトサンは創傷治癒効果と抗菌性を兼ね備えた素材として知られていたが、水溶性とゲル化の制御が困難であったため、従来は汎用的で機能的な接着剤や被覆材として製品化することが困難であった。我々は、酸性領域でしか可溶化しないキトサンの物性を、化学修飾によって、中性からアルカリ性においても易溶性に改良すると同時に、分子間架橋を機能的に行う光反応性基を導入した。

このようにして得られた光架橋性キトサン誘導体は、生理的ｐＨにおいて粘稠な水溶液を形成し、当該水溶液は光照射によって密着型の不溶性ゲルとなる。よって、開発された光架橋性キトサン誘導体の水溶液は、あらゆる患部に塗布でき、当該部位での光反応により即座に接着性のゲルとなるため、創傷部位の接着剤として有効に使用できることが明らかになった。

発明の開示

本発明は、我々が開発した光架橋性キトサン誘導体が有する(1)強くて早い接着性、(2)治癒性、(3)安全性、及び(4)適度な生分解性といった傷口のシーラントとしての有利な機能に加えて、当該キトサン誘導体を含む組成物に難治性創傷や手術切開創の治癒を積極的に促進する機能を付加することにより、組織再生を促進すると同時に癌化などの副作用を生じる危険のない医療用組成物を提供することを目的とする。

よって本発明は、光架橋性キトサン誘導体及び創傷治癒促進剤を含有することを特徴とする医療用組成物を提供する。

この組成物は、上記(1)～(4)に挙げたような創傷部位のシーラント(医療用接着剤)としての有利な特性を具備するとともに、生理的ｐＨで調製されるので、ＧＦといった生理的活性を有する創傷治癒促進薬を変性させることなく良好に混和させることができる。得られた組成物は、あらゆる創傷部位に適用可能であり、当該部位で光照射するだけで閉塞性の不溶性ゲルマトリクスとなる。当該光架橋性キトサン誘導体から得られる架橋ゲルマトリクスは、単に増殖因子等の創傷治療促進薬を強固に担持するだけでなく、担持されたＧＦ等を適度な速度で徐放することができる。この適度な徐放性により、増殖因子の大量投与による組織の癌化を起こすことなく血管新生誘導効果を長期間に渡って発揮することができ、その結果、難治性の創傷や切開創の治癒を促進できる。

また、本発明では、ＧＦの機能制御にとって重要なヘパリン等のグリコサミノグリカン類を同時に担持させた組成物も提供する。本発明で用いる光架橋性キトサン誘導体は、酸性ヘパリン類とのポリイオンコンプレックス形成の制御が困難であった従来の塩基性キトサンとは異なり、ヘパリン類を容易に担持でき、患部におけるＧＦ機能をヘパリンとの相互作用で増強させることも可能となった。

よって本発明は、光架橋性キトサン誘導体及び創傷治癒促進薬、そして任意にグリコサミノグリカン類を含有する組成物に光照射することにより製造される架橋キトサンマトリクスも提供する。このマトリクスは、内部に担持した増殖因子等の創傷治癒促進薬やヘパリン類等を最適な速度で徐放する薬物徐放体として使用できる。特に、増殖因子を担持したマトリクスは、徐放される増殖因子の作用により、組織再生用の細胞培養基材としても使用できる。

図面の簡単な説明

図１は、合成例１及び２で調製したラクトース導入キトサン誘導体（ＣＨ-ＬＡ）、可視光反応性化合物（ＦＰＰ）及び可視光架橋型キトサン誘導体（ＶＬ-ＲＣ）の各水溶液の光吸収スペクトルを示すグラフである。

図２は、インビトロにおける、本発明の架橋キトサンマトリクスからＰＢＳへの低分子色素（トリパンブルー及びトルイジンブルー）の放出を示すグラフである。

図３は、インビトロにおける、本発明の架橋キトサンマトリクスからＰＢＳへの高分子物質（糖類、タンパク質）の放出を示すグラフである。

図４は、インビトロにおける、本発明の架橋キトサンマトリクスからＰＢＳへの高分子物質（ＦＧＦ-２）の放出を示すグラフである。

図５は、インビトロにおける、本発明の架橋キトサンマトリクスの分子密度（キトサン誘導体濃度）と内部に担持された物質の残存率との関係を示すグラフである。

図６は、本発明の架橋キトサンマトリクス上でのＨＵＶＥＣ細胞増殖性とマトリクスからのＦＧＦ-２放出との関係を示すグラフである。

図７は、インビボにおける、本発明の架橋キトサンマトリクスからの低分子色素（トリパンブルー）の放出を示すグラフである。

図８は、本発明の架橋キトサンマトリクスからの増殖因子（ＦＧＦ）の徐放による血管新生効果を示すグラフである。担持させるＦＧＦ濃度とヘモグロビン量との関係を示す。○はＦＧＦ担持キトサンマトリクスを示し、●は更にヘパリンを添加したものを示す。

図９は、本発明の架橋キトサンマトリクスからの増殖因子（ＦＧＦ）の徐放による血管新生効果を示すグラフである。ヘモグロビン量の時間変化を示す。○はＦＧ

Ｆ担持キトサンマトリクスを示し、●は更にヘパリンを添加したものを示す。◆はヘパリンのみを担持させた比較例、△はＦＧＦを添加したＵＶ-ＲＣ水溶液を示す。

図１０は、db/db マウスの創傷モデルにおける本発明の架橋キトサンマトリクスの治癒効果を示す写真である。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

図１１は、db/db マウスの創傷モデルにおける本発明の架橋キトサンマトリクスの治癒効果を示すグラフである。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

図１２は、db/+マウスの創傷モデルにおける本発明の架橋キトサンマトリクスの治癒効果を示す写真である。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

図１３は、db/+マウスの創傷モデルにおける本発明の架橋キトサンマトリクスの治癒効果を示すグラフである。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

図１４は、db/db マウスの創傷モデルにおける創傷断面の時間変化を示す写真である。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

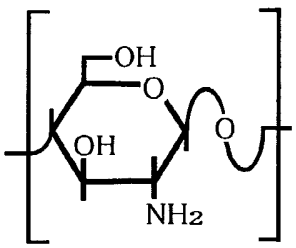
図１５は、db/db マウスの創傷モデルにおける４日目の創傷断面をＨＥ染色したサンプルの顕微鏡写真である。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含まない架橋キトサンマトリクス被覆創傷、（Ｃ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

図１６は、db/db マウスの創傷モデルにおける４日目の創傷断面をＣＤ３４により免疫染色したサンプルの顕微鏡写真である。（Ａ）は未処理のコントロール、（Ｂ）はＦＧＦを含む本発明の架橋キトサンマトリクス被覆創傷である。

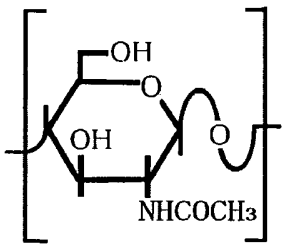
好ましい実施態様の説明

本発明の医療用組成物で使用される光架橋性キトサン誘導体は、一般にキチン・キトサン類と呼ばれている高分子骨格に光反応性基と糖鎖とを導入した構造を有しており、中でも、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の２位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなるものであるのが好ましい。

通常、キチン・キトサン類は、カニ殻由来のキチン質（ポリ－Ｎ－アセチルグルコサミン）をアルカリ処理することによって得られる脱アセチル化した酸可溶性画分であって、一般に下記式（１）、（２）で示される構成単位を有するものである。



(1)



(2)

これらキチン・キトサン類のうち脱アセチル化度の低いもの（通常４０％未満のもの）を「キチン」、そして脱アセチル化度の高いもの（通常４０％以上のもの）を「キトサン」と呼ぶこともあるが、以下、本明細書では、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を総称して「キトサン」という。なお、本発明におけるキトサンは天然由来のものに限らず、化学的または遺伝子工学的に合成された類似構造を有する化学修飾糖鎖であってもよい。

ここで、「脱アセチル化度」とは、キトサン（あるいは、ポリ－Ｎ－アセチルグルコサミン）を構成する糖単位の２位のアセチルアミノ基が脱アセチル化によって遊離アミノ基に変換されている割合である。本明細書では、脱アセチル化度は、「健康食品規格規準集（その４）」財団法人日本健康・栄養食品協会（1996 年）第 55 頁に記載の「コロイド滴定法」によって定量した。

本発明のキトサン誘導体は、このキトサンをさらに化学的に修飾することによ

り機能化したものであり、原料として使用されるキトサンとしては、脱アセチル化度が少なくとも４０％、特に６０～１００％、さらに特に６５～９５％の範囲にあるものが好適である。なお、脱アセチル化度が１００％のキトサンは、上記式（１）の構成単位のみからなり、式（２）の構成単位は含まない。

また、該キトサンの分子量には特に制限はなく、最終的なキトサン誘導体の使用目的に応じて広い範囲で変えることができるが、一般には、数平均分子量が５，０００～２，０００，０００、好ましくは１０，０００～から１，８００，０００、より好ましくは４０，０００～１，５００，０００の範囲のものが適している。

本発明で好ましいキトサン誘導体は、上記キトサンを構成する式（１）のグルコサミン単位における２位のアミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、他の一部に光反応性基を導入したものである。このようなキトサン誘導体の詳細については、国際出願ＷＯ００／２７８８９号パンフレットを参照されたい。

キトサン誘導体に導入される還元性末端を有する糖鎖としては、アルドース類、ケトース類に由来するものが包含され、中でも、構成糖単位の数が２０個以下、特に１～７個のものが好適に使用される。具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、フコース、マンノース、アラビノース、キシロース、エリトロース、ヘプツロース、ヘキシロース等のペンタオースやヘキサオース；グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン、ガラクサミン等のアミノ糖類；ウロン酸類やデオキシ糖類等の糖誘導体；これらの単糖類を組み合わせた糖鎖からなる、マルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオース、マルトトリオース等の二もしくは三糖類；及び各種オリゴ糖類等が挙げられるが、中でもマルトース、ラクトース、メリビオースなどの中性二糖類が好適である。

上記糖鎖に換えて、ポリエーテル、多価アルコールなどの有機化合物をキトサンに誘導することもできるが、生体適合性などの面で天然の糖鎖を利用するのが好ましい。

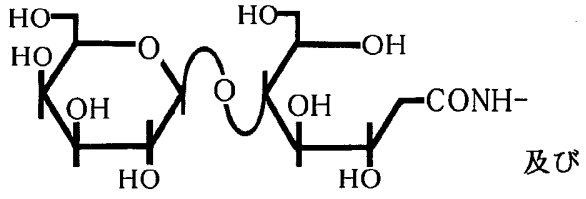
キトサンの前記式（１）のグルコサミン単位における２位アミノ基への糖鎖の導入は、それ自体既知の方法を用いて行うことができる。例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、グルコサミン単位の２位アミノ基にアミド結合を

介して結合させる方法（例えば、特開平１０－１２０７０５号公報参照）や、糖類の還元性末端をアルデヒド化またはカルボニル化した後、それをグルコサミン単位の２位アミノ基に、シッフ塩基を経由する還元アルキル化法により結合させる方法（例えば、キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」53-56頁、1990年2月20日、技法堂出版㈱発行参照）などが含まれる。

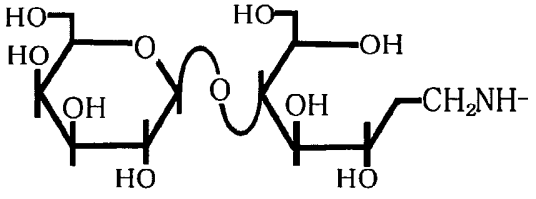
本発明でキトサンに導入される糖類は１種のみに限定されるものではなく、２種以上を組み合わせて使用することもできる。

本発明のキトサン誘導体を構成する糖側鎖の具体例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

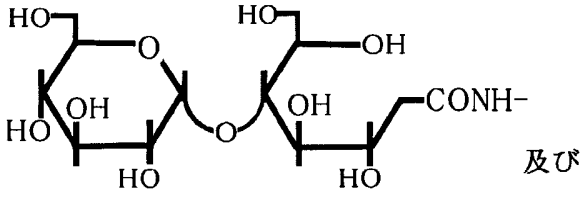
(i)　ラクトースから誘導される糖鎖：



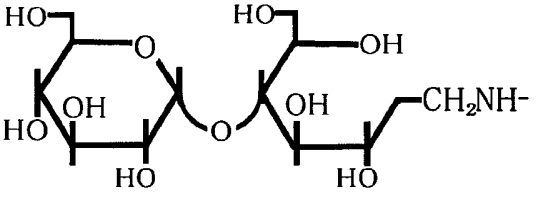
及び



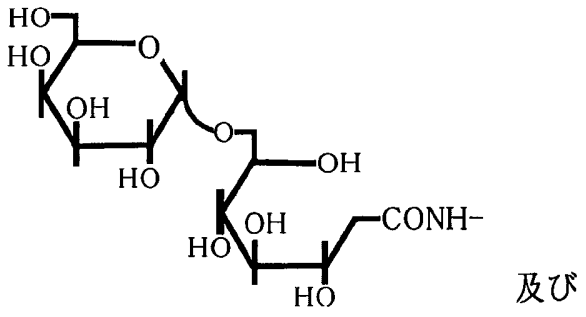
(ii)　マルトースから誘導される糖鎖：



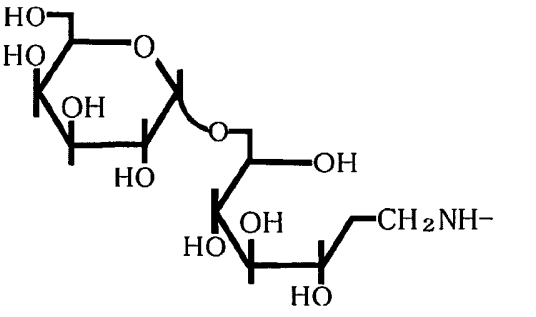
及び



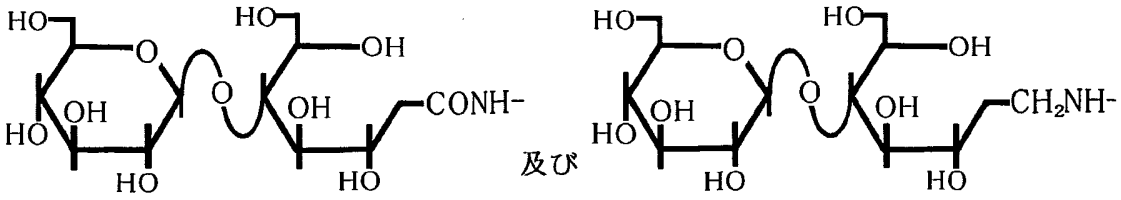
(iii)　メリビオースから誘導される糖鎖：



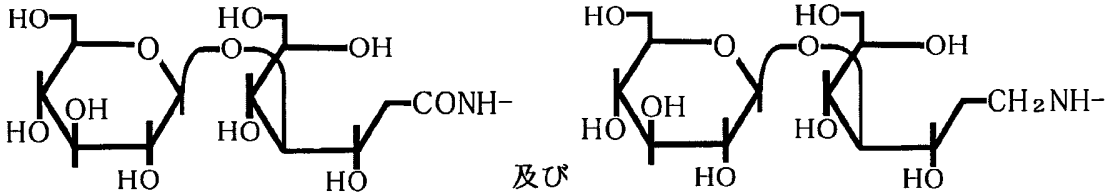
及び



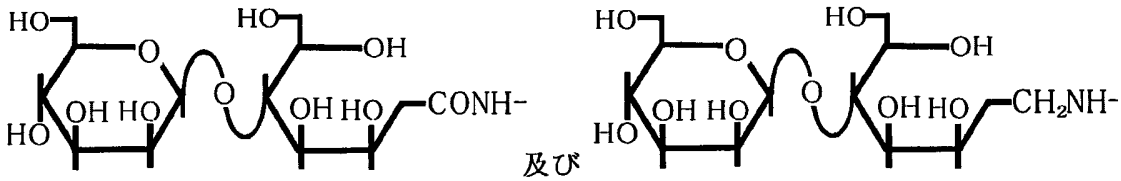
(iv)　セロビオースから誘導される糖鎖：



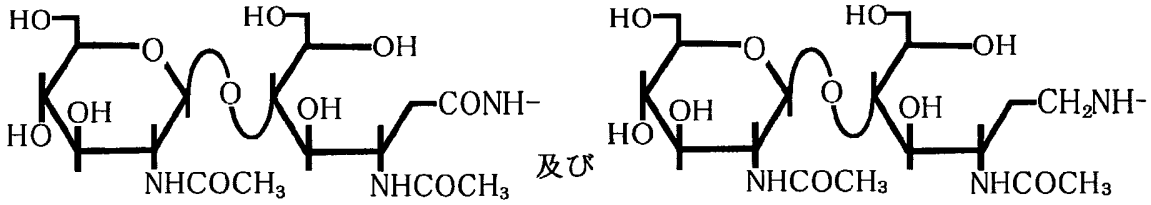
(v) ラミナリビオースから誘導される糖鎖：



(vi) マンノビオースから誘導される糖鎖：



(vii) N-アセチルキトビオースから誘導される糖鎖：



上記(i)～(vii)の糖側鎖のうち、左側に記載したものは糖のカルボキシル基とキトサンの２位アミノ基との縮合によって導入される残基を表し、右側に記載したものはシッフ塩基を介して結合させた残基を表す。

このようにして、キトサンのグルコサミン単位の２位アミノ基を糖類で置換することにより、キトサンの酸依存的溶解性が緩和され、中性領域での可溶化が達成される。

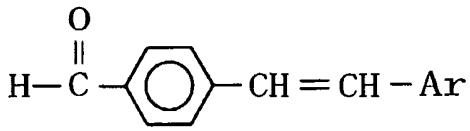
キトサンのグルコサミン単位における２位アミノ基の糖側鎖による置換度は、

最終的なキトサン誘導体に望まれる物性などに応じて変えることができるが、置換度が、一般的には０．１～８０％、特に０．５～６０％、さらに特に１～４０％の範囲内にあるのが好適である。ここで、糖側鎖の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の２位のアミノ基が糖側鎖で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の２位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合として示す。本明細書では、糖側鎖の置換度は、硫酸中で糖鎖がフェノールと反応することに基づく特徴的な発色を４９０ｎｍの吸光度で検知する「フェノール－硫酸法」によって測定される（J.E.Hodge, B.T.Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. by R.L.Whistler, M.L.Wolfrom, vol.1, p388, Academic Press, New York(1962)参照)。

本発明のキトサン誘導体は、キトサンを構成する前記式（１）のグルコサミン単位の２位アミノ基の少なくとも一部に光反応性基を導入することにより、光照射による自己架橋性が付与されている。

本発明に従ってキトサンの化学修飾に使用される光反応性基は、紫外線、特に約２００～３８０ｎｍの近紫外領域を含む紫外線の照射によって該光反応性基同志で及び/又はキトサン中に存在するアミノ基あるいは水酸基等と反応して架橋結合を形成するような基を含む。例えば、ベンゾフェノン類、ケイ皮酸類、アジド類、ジオレフィン類、ビスアントラセンのような環状不飽和化合物等から誘導されるものが挙げられ、中でも、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基を有するものが好適である。

また、本発明における光反応性基は、約４００～５００ｎｍ程度の可視光の照射で反応する置換基であってもよい。このような可視光反応性基としては、例えば、下記式で表されるような、Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, Vol.20, 1419-1432 (1982)に記載されたホルミルスチリル化合物等が挙げられる。



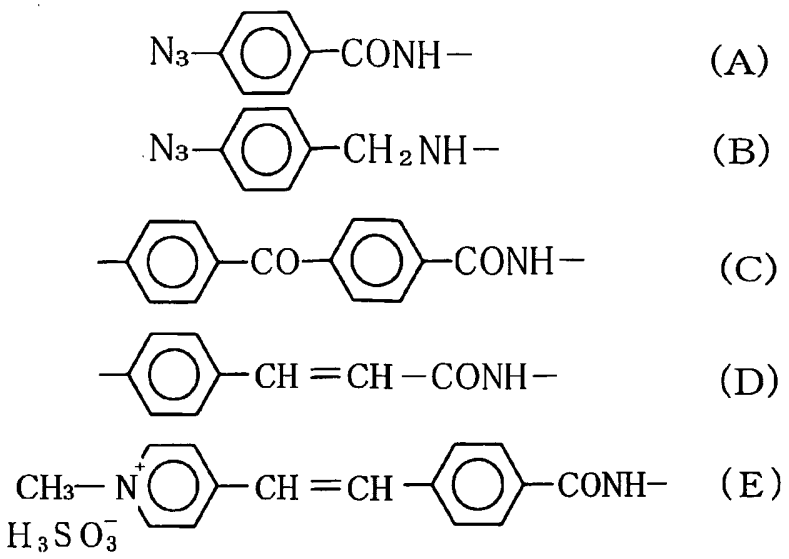
（上記式中、Ａｒは、ピリジン、アルキルピリジニウム塩、キノリン、

アルキルキノリニウム塩等の複素環を表す。)

キトサンのグルコサミン単位における２位アミノ基へのかかる光反応性基の導入は、それ自体既知の方法により行うことができ、例えば、カルボキシル基を有するアジド化合物を縮合剤の存在下に該２位のアミノ基に結合させる方法（特開平１０－１２０７０５号公報参照）；酸クロリド基、アルデヒド基、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミドエステル基又はエポキシ基を介してアジド化合物を該２位のアミノ基と反応させる方法（キチン・キトサン研究会編「キチン、キトサンの応用」第45～65頁、1990年2月20日、技報堂出版（株）発行、参照）等の方法により行うことができきる。上記のホルミルスチリル化合物のホルミル基をキトサンのアミノ基とカップリングさせることによっても好適に導入できる。

なお、従来、アジド基の架橋反応において、ビスアジド以上の多官能性化合物が有効であるとされているが（特開平９－１０３４８１号公報参照)、本発明ではその必要はなく、モノアジド化合物の導入によっても、十分に自己架橋性を有するキトサン誘導体が得られる。

しかして、本発明のキトサン誘導体を構成する光反応性基の具体例としては、例えば、紫外線の場合は、下記式（Ａ）から（Ｄ）で表されるものが挙げられる。式（Ａ）の基は、ｐ－アジド安息香酸から誘導されるものであり、式（Ｂ）の基は、ｐ－アジドベンズアルデヒドから誘導されるものであり、式（Ｃ）の基は、ｐ－ベンゾイル安息香酸から誘導されるものであり、式（Ｄ）の基は、ケイ皮酸から誘導されるものであり、そして式（Ｅ）は、１-メチル-４-[２-(ホルミルフェニル)エテニル]ピリジニウムから誘導されるものである。



(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

これらの光反応性基の導入の程度は、最終のキトサン誘導体に望まれる架橋反応に基づくゲル化（不溶化）の程度等に応じて変えることができるが、光反応性基の置換度が０．１％～８０％、特に０．５～５０％、さらに特に１～３０％の範囲内にすることが望ましい。ここで、光反応性基の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の２位のアミノ基が光反応性感応基で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の２位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合である。本明細書では、光反応性基、例えばアジド基の置換度は、４－アジド安息香酸の２７０ｎｍにおける特性吸収から得られる検量線に基づいて決定することができる。

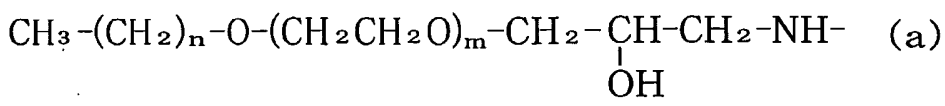
本発明のキトサン誘導体における糖側鎖と光反応性基の合計の置換度は、特に制限されるものではなく、広い範囲に渡って変えることができるが、一般には０．２～８０％、好ましくは１．５～６５％、さらに好ましくは３～５０％の範囲内とすることができる。

また、本発明のキトサン誘導体では、キトサンを構成する前記式（１）の糖単位の２位のアミノ基や、式（１）又は（２）の糖単位の３位あるいは６位の水酸基の少なくとも一部に、両親媒性基を導入してもよく、それにより架橋後のマトリクスに飛躍的に向上した含水性を付加することができる。この両親媒性基は、疎水性基を具備する疎水ブロックと親水基を具備する親水ブロックとを有する基であり、一般に界面活性剤機能を有する場合が多い。中でも、疎水ブロック（Ｘ）

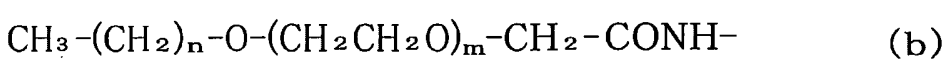
と親水ブロック（Y）の分子量の割合が、X：Y=1：5～5：1のものが好適に用いられ、解離性のイオン基を持たない非イオン性の基がより好適に使用できる。特に、疎水性のアルキルブロックと親水性のポリオキシアルキレンブロックから構成される分子量が少なくとも９０以上、より好ましくは５００～１０，０００のポリオキシアルキレンアルキルエーテルが好ましい。疎水ブロックを持たないポリエーテル類も使用できるが、疎水ブロックと親水ブロックの両方を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテルが含水性向上の点から好ましい。

かかる両親媒性基のキトサンへの導入は、例えば、両親媒性基の親水ブロック又は疎水ブロックのいずれか一方の末端に、アミノ基と反応して共有結合を形成しうる基、例えば、アルデヒド基やエポキシ基などを持つ化合物を導入した後、キトサンのグルコサミンの２位アミノ基と反応させる方法や、カルボキシル基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンを縮合剤の存在下で反応させる方法、さらには酸クロリド基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンの水酸基やアミノ基と反応させる方法などを用いて行うことができる。

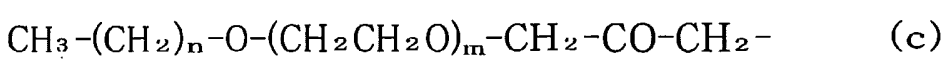
例えば、末端にエポキシ基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基あるいは末端にアルデヒド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンのアミノ基に導入した場合、キトサン骨格に結合した側鎖は下記式（ａ）あるいは（ｂ）で表される。また、末端に酸クロリド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンの３位または６位の水酸基に結合させた場合、キトサン骨格に結合した側鎖は、下記式（ｃ）で表される。ただし、下記式（ａ）～（ｃ）におけるｎ及びｍは１以上の繰返し単位数である。



(a)



(b)



(c)

本発明のキトサン誘導体における両親媒性基の導入の程度は、特に制限される

ものではないが、導入後のキトサン誘導体の重量変化に基づいて、通常５～７０％、好ましくは１５～５５％の範囲内とすることができる。

以上詳細に述べたように、本発明の医療用組成物に使用される光架橋性キトサン誘導体にあっては、キトサン骨格に還元性末端を有する糖類及び光反応性基が導入され、任意に両親媒性基が導入されていてもよい。糖類を導入することにより、キトサン誘導体は中性領域での可溶性に優れており、生理的緩衝液や培地などで溶液化することができ、タンパク質等の酸やアルカリで変性する可能性のある薬物の活性を失うことなく混合できる。さらに、光反応性基を導入することにより、任意の部位に適用した後に光照射することによって即時に不溶性ゲル体を形成して組織と密着するとともに、内部に創傷治癒促進薬を封入して、後に徐放することができる。

なお、本発明の光架橋性キトサン誘導体の骨格をなす高分子として、キトサンに代えてヒアルロン酸等の多糖類やコラーゲン等のタンパク質、その他の合成高分子などいかなるものを使用してもよいが、創傷や組織を密閉することができて薬物保持性や適度な生分解性を有し、速すぎない速度で薬物のコントロールドリリースができる糖類が好適であり、中でも、それ自体が創傷治癒特性や抗菌性を有するキトサンあるいはヒアルロン酸等の糖類、特に原材料の供給やコストなどの点からキトサンが好ましい。

また、光反応性基に代えて化学的架橋性を有する基を導入してもよいが、速やかな分子内架橋が可能でそのスイッチングが容易なものであるのが好ましく、スイッチングが容易で反応性も高く未反応の活性部位が残ることも少ないことから、光反応性基が好適に使用されうる。また、２位にアミノ基を有するキトサンは、光反応性基の導入反応にとっても有利であるため、この点からも好適に使用されうる。

本発明の医療用組成物は、上述した光架橋性キトサン誘導体に加えて、少なくとも１つの創傷治癒促進薬を含有する。本発明における創傷治癒促進薬は、あらゆる意味で当該組成物が適用された部位の創傷の治癒効果を促進する物質であればよい。これには、「医薬品要覧第５版」（大阪府病院薬剤師会著、薬業時報社、1992年）及びその追補版（1992年）に記載された創傷治癒効果を有する薬物などが含まれ、例えば、創傷部位の感染や炎症を防ぐことにより治癒を促進する抗菌剤、抗生物質、あるいは創

傷による痛みを緩和する鎮痛剤や麻酔薬なども含まれるものとする。特に、褥創や糖尿病性皮膚潰瘍といった血液循環が阻害された難治性皮膚創傷に適用する場合には、血管新生を誘導する物質、例えば増殖因子、血管新生因子などが好ましい。ここで使用される増殖因子は、血管新生を誘導し、肉芽形成を促進する機能を有する細胞増殖因子であれば特に限定されるものではなく、例えば、ＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ＨＢ－ＥＧＦ、ＨＧＦ及び$VEGF_{165}$及びＨＧＦ等を挙げることができる。また、本発明の薬物徐放体は組織密着性が極めて高いので、上記増殖因子を発現する遺伝子を組み込んだプラスミドを包含させて創傷部位での自発的な増殖因子供給を行うこともできる。

さらに本発明の医療用組成物は、上記の光架橋性キトサン誘導体及び創傷治癒促進薬に加えて、任意にヘパリン又はヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカン類を更に含有していてもよい。例えば増殖因子は、創傷組織近傍に存在する細胞外基質を構成するプロテオグリカン中のヘパリン分子と相互作用して機能調節がなされるとされている。よって、ヘパリン等のグリコサミノグリカン類を含有せしめることにより、本発明の組成物にグリコサミノグリカン類の供給源としての機能も付与することができる。このグリコサミノグリカン類は、単に組成物に混合するだけでもよいが、例えばＷＯ００／２７８８９に記載されているようにキトサン骨格に共有結合させてもよい。

さらに、本発明の組成物は、医療用として許容される他の添加剤を任意に含有していてもよい。例としては、インターロイキン、白血病抑制因子、インターフェロン、ＴＧＦ-β、エリスロポエチン及びトロンボポエチン等が含まれる。また、哺乳動物においてアポトーシスを誘発することが知られている他の薬剤もまた使用することができ、それら薬剤には、ＴＮＦ-α、ＴＮＦ-β、ＣＤ３０リガンド及び４-１ＢＢリガンドが含まれる。また、癌の治療に有用な化学治療薬を使用してもよく、その例には、アルキル化剤、葉酸アンタゴニスト、核酸代謝の代謝産物、抗生物質、ピリミジン類似物、５-フルオロウラシル、シスプラチン、プリンヌクレオシド、アミン類、アミノ酸、トリアゾールヌクレオシド、又はコルチコステロイド類、あるいはタモキシフェン及びオナプリストン等の腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように機能するホルモン薬も含まれる。

本発明の医療用組成物は、光架橋性キトサン誘導体及び創傷治癒促進薬並びに他の任意成分を、溶媒、好ましくは水性媒体に、好ましくは中性のｐＨで溶解せしめることにより調製することができる。

このようにして調製される組成物は、創傷部位に塗布されることを考慮すると、適度な粘性を有しているのが好ましい。例えば、一般に市販されている回転粘度計（例えば、Ｂ型粘度計、TOKIMEC INC.（Tokyo Japan））によれば、約１００～１０，０００cps（センチポアズ（mPa・s））、好ましくは約１５０～８，０００、より好ましくは約２００～６，５００cps の粘度とすると垂直な創傷や組織面への塗布が容易になり、さらに約２５０～５，０００cps、好ましくは約３００～２，０００cps とすると、あらゆる創傷や組織面での垂れ落ちがなくなって塗布しやすく保持時間も適度な長さとなり、続く光照射などの作業にゆとりができる。但し、水平な創傷面への塗布又は凹部への充填等では、約３００cps 未満、さらには約２００cps 未満、さらには約１００cps 未満の低粘度の組成物も使用できる。また、例えば純水と同程度の低粘度の組成物は、スプレー装置などを用いて水平な創傷面以外にも適用でき、カテーテル等を介した内視鏡治療においては、管内での流動性や内視鏡手術による切除創での保持性などを考慮して適当な粘度を採用しうる。

即ち本発明の医療用組成物における光架橋性キトサン誘導体の含有量は、適用部位での保持性を確保し、架橋後のマトリクスによる内包薬物を確実に担持するためには、少なくとも３ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは少なくとも５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも７．５ｍｇ／ｍｌ、より好ましくは少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、更に好ましくは少なくとも１５ｍｇ／ｍｌ程度とする。

創傷治癒促進薬の含有量は、適用部位において必要とされる量が徐放されるように適宜決定される。例えば、皮膚創傷部位に適用される場合の増殖因子は、約１～１０００μｇ／ｍｌ、より好ましくは約５～５００μｇ／ｍｌ、更に好ましくは約１０～２００μｇ／ｍｌの含有量とする。

ヘパリン等のグリコサミノグリカン類は、同時に包含される増殖因子の量にもよるが、好ましくは約１０～５０００μｇ／ｍｌ、より好ましくは約５０～１０００μｇ／ｍｌ、更に好ましくは約１００～５００μｇ／ｍｌの含有量とする。その他の任意成分の含有量は、医療の分野で通常使用されている程度の含有量とし、最適な量は

当業者が容易に決定することができる。

本発明の医療用組成物は、光架橋性キトサン誘導体を含有しているため、所定強度の光（紫外線及び可視光など）を所定時間照射することにより、短時間で架橋して不溶性のマトリクスを形成する。形成された架橋キトサンマトリクスは、内部に創傷治癒促進薬などの添加成分を担持し、それらを適当な速度で徐放することができる。

光による架橋条件は、使用する光架橋性キトサン誘導体に導入した光反応性基の種類や置換度、組成物に含有されるキトサン誘導体の量や担持すべき薬物の量、使用する組成物の量及び望ましい徐放速度等に応じて変化しうる。通常は、少なくとも７．５ｍｇ／ｍｌ程度の光架橋性キトサン誘導体を含有する組成物を１００μｌ程度使用する場合、約２ｃｍ程度離間した光源からの光を、約０．０１～３００秒、好ましくは約０．０５～１２０秒、さらに好ましくは０．１～６０秒程度照射するのが好ましく、これにより光反応性基が約１００％の架橋度となる。

光照射することにより、光架橋性キトサン誘導体が架橋して不溶性のマトリクスが形成される。形成された架橋キトサンマトリクスは、増殖因子等の創傷治癒促進薬及びヘパリン等の他の添加剤を内包している。これらの薬物は薬物自身の拡散性により或る程度初期放出される場合もあるが、その大部分は架橋キトサンマトリクス内に強固に担持される。その後、架橋キトサンマトリクスが生分解されると、担持されていた薬物が適度な速度で徐放される。

キトサンマトリクスの光反応性基の架橋反応度は特に限られないが、一般に、架橋反応度が高いと薬物の初期放出が少なく、薬物放出体として好適に機能する傾向があるように思われる。よって、本発明の架橋キトサンマトリクスは、少なくとも３０％、好ましくは４０～１００％、より好ましくは５０～１００％、より好ましくは６０～１００％、さらに好ましくは７０～１００％の架橋反応度を有する。ここで、本発明でいう「架橋反応度（又は架橋度）」は、光架橋性キトサン誘導体に存在する光反応性基の中で他の基等と結合したものの割合を指すものとする。

より具体的な使用形態としては、本発明の医療用組成物は、例えば皮膚潰瘍を有する組織に適用されて光照射される。当該組成物は適度な粘性を有しているので、損傷部位から流れ落ちることなく保持され、光照射による分子間架橋によって速や

かな接着性の不溶性ゲル体（マトリクス）となり、損傷組織を密閉すると同時に内包する薬剤を徐放して、創傷の保護と治癒を促進する。また、胃壁や癌組織などではそれらを治療する薬剤を包含させることによって胃潰瘍や腫瘍組織被覆剤として治療効果を誘導することもできる。

よって、本発明の医療用組成物に光照射して形成される架橋キトサンマトリクスは、特に創傷治癒に適した極めて優れた薬物徐放体を構成する。

なお、従来は塩基性のキトサン骨格には担持されないと考えられてきた塩基性の増殖因子（ＦＧＦ—２）が、本発明の光架橋性キトサン誘導体から形成されたマトリクス内には酸性の増殖因子（ＦＧＦ－１）と同等以上に担持され徐放されたことは驚くべきことである。

また、光架橋性キトサン誘導体にポリオキシアルキレンアルキルエーテル等の両親媒性基を更に導入した場合は、光照射後の架橋キトサンマトリクスは、例えば自重の１００倍に近い水分を迅速に吸収できる程度の高含水性となり、創傷部位や外科処置部位から出血を吸収して止血を促進することもできる。

さらに本発明の架橋キトサンマトリクスは、内部に細胞増殖因子を包含し、それを徐々に放出するという特性を有するため、組織再生用細胞培養基材として使用することもできる。例えば、細胞培養プレート等の表面に本発明の医療用組成物を塗布し、光照射して膜状の架橋キトサンマトリクスを形成する。当該細胞培養プレートの被覆部分に目的とする細胞培地を配置してインキュベートすると、当該細胞の増殖が刺激される。よって本発明は、上記の架橋キトサンマトリクス、中でも増殖因子を内包するマトリクスは組織再生用細胞培養基材として有効に使用できる。

本発明の組成物は、一般的には上述したように粘性を持つ水溶液として提供されるが、例えば、当該水溶液を凍結乾燥させた固体（例えば粉体）として提供してもよい。固体状の組成物は、水性媒体で溶解又は膨潤させることにより即座に使用に供することができる。

実施例

以下、本発明を具体例を用いて更に詳細に説明するが、これらの具体例は本発明の範囲を限定するものではない。

（合成例１）

光（紫外線）架橋性キトサン誘導体（ＵＶ-ＲＣ）の合成

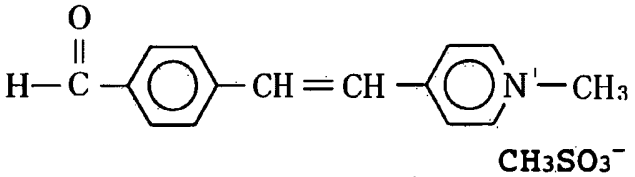
キトサン骨格に紫外線反応性基及び糖鎖を導入したＵＶ-ＲＣを、ＷＯ００／２７８８９に記載された方法に準じて合成した。具体的には、カニ由来の 800～1000ｋＤａの分子量及び 80%の脱アセチル化度を持つキトサン（焼津水産工業（株）製）のアミノ基に、アジド(ｐ-アジド安息香酸)及びラクトース（ラクトビオン酸）を縮合反応により導入した。ラクトースの導入により中性ｐＨで可溶性であり、ｐ-アジド安息香酸及びラクトビオン酸の置換度が、各々約 2.5%及び 2.0%であることが確認された。

また、エビ殻及びイカ軟骨由来のキトサン素材を使用した場合にも、同様の誘導体が合成できた。

（合成例２）

光（可視光）架橋性キトサン誘導体（ＶＬ-ＲＣ）の合成

下記式で表されるメチル-４-［２-(４-ホルミルフェニル)エテニル］ピリジンメトスルホネート（ＦＰＰ）を、Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition, Vol.20, 1419-1432 (1982)記載の方法に準じて合成した。



具体的には、γ-ピコリン(3.07g, 33mmol)のメタノール(8.3ml)溶液を氷冷下、硫酸ジメチル(4.16g, 33mmol)に加えた。溶液を室温で１時間放置した後、テレフタルアルデヒド(13.4g, 100mmol)を加え、加熱して溶解させた。続いてピペリジン(0.47ml)を加え、５時間還流した。析出物を熱時ロ過により除いた。温濾液はエタノール(50ml)とアセトン(16.7ml)の混合溶媒と合わせ、室温で一晩放置した。黄色析出物をろ過により分取し、エタノール及びアセトンで洗浄後、減圧乾燥をしてＦＰＰを得た。収量 4.81g(46%)、融点 210～213℃であった。

上記合成例１記載のキトサンにラクトースを導入した誘導体（ＣＨ-ＬＡ）(1g)を

蒸留水(100ml)に溶解し、上記で得たＦＰＰ(368mg, 1.15mmol)を加えて 30 分間撹拌した。1N NaOH にてｐＨを 4.75 に調製し、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(112mg,1.73mmol)の注射用水(8ml)溶液を加えた。室温、遮光状態で24時間撹拌した。アセトン(360ml)に注いで沈殿させた。沈殿物を十分にメタノール及びアセトンで洗浄して減圧乾燥をし、ＶＬ-ＲＣを得た。収量728mg、置換度1.55%であった。

合成例２で得たＣＨ-ＬＡ、ＦＰＰ及びＶＬ-ＲＣを各々0.01wt%、0.001wt%及び0.01wt%含有する水溶液を調製し、各水溶液について蛍光分光光度計で吸収特性を測定した。それらの結果の一部を比較して図１に示す。

図１に示したスペクトルに示されるように、ＶＬ-ＲＣはＦＰＰと同様に340～350nm付近に極大吸収が見られ、可視光反応性のＦＰＰが導入されていることが確認された。また、エビ殻及びイカ軟骨由来のキトサン素材を使用した場合も、同様に可視領域に吸収を示す誘導体が合成できた。

（実施例１）

上記合成例１及び２で得たＵＶ-ＲＣ及びＶＬ-ＲＣの 2%水溶液を調製し、各溶液にウシオ電機製の照射装置で各種波長の光を照射し、ＷＯ００／２７８８９の実施例４に記載の要領で架橋キトサンマトリクスによる接着の強度試験を行った。

具体的には、2×3cmに裁断した厚さ２㎜の食用ハム２枚を2×6㎝になるように並べ、２枚のハムの境目を中心に2×2㎝、厚さ２㎜になるように、前記各溶液を塗布した。

この後直ちに、塗布した溶液に 30 秒間光照射して２枚のハムを接着させた。接着した２枚のハムの一方をクリップでスタンドに固定し、もう片方のハムの末端に漸次加重をかけ、断裂する加重量を測定した。ハムを接着している架橋キトサンゲルが断裂したときの、ゲルの断面積当たりにかかった重量（10^2kg/㎡）で評価し、各誘導体についての結果を、ＵＶ-ＲＣ（カニ）の断裂時の 3×10^2 Kg/m^2 を基準にして相対的に表示した（表１）。

表１

素材	照射光の波長(nm)		
	245	365	400～500
UV-RC（カニ）	++	+++	-
UV-RC（エビ）	++	+++	-
UV-RC（イカ）	+++	+++	-
VL-RC（カニ）	+	+	+++
VL-RC（エビ）	+	+	+++
VL-RC（イカ）	+	++	+++

(-) 不溶化せず

（実施例２）高分子物質の担持性

調製されたカニ由来のＵＶ-ＲＣを用いて高分子物質（タンパク質）の担持特性を調べた。水溶性及び高分子物質の担持特性を変化させる目的で、ラクトースの導入率を0、2、5、10、及び20%としたＵＶ-ＲＣを調製し、各ＵＶ-ＲＣの1wt%溶液と10wt%ウシ血清アルブミン溶液とを4:1の割合で混合してｐＨを6.0又は7.0に調整した。その際に混合液中に発生した不溶化物の量及び混合液の粘度を比較した。混合液の粘度は、ガラス管内での混合溶液の移動速度から見積もった。その結果を下記の表２に示す。

表２

UV-RCのラクトース導入率(%)	pH	不溶物質の発生程度(-：なし)		アルブミン添加による粘度増加(+：あり)
		アルブミンなし	アルブミン混合	
0	6	+	+	+
	7	++++	+++++	+
2	6	-	-	+
	7	++++	+++++	+
5	6	-	-	-
	7	++	+++	+
10	6	-	-	-
	7	+	++	-
20	6	-	-	-
	7	-	±	-

上記に示されるように、ラクトースを導入しない場合には何れのｐＨでも不溶物質が発生したのに対し、ラクトースの導入によって生理的条件（pH6 及び／又は 7）で可溶化できた。さらに、タンパク質（アルブミン）のような高分子物質を取り込む場合には、ラクトースの導入率を上げた方が不溶性の沈殿物が発生し難く、薬物などを担持させる光架橋性キトサン誘導体として有利であることも解った。また、生理的条件又はその近傍（pH６又は７）において、ラクトース導入率を約 5%以上、好ましくは約 10%以上とすれば、大量のタンパク質などの高分子物質を好適に担持させることができることが示された。

（実施例３）

架橋キトサンマトリクスからの薬物放出（１）

リン酸塩緩衝液（ＰＢＳ）に溶解させた 1 mg/ml のトリパンブルー（酸性低分子モデル）あるいはトルイジンブルー（塩基性低分子モデル）をカニ由来キトサンから合成されたＵＶ-ＲＣの 2 wt%水溶液と 1:3 の割合で混合した。調製された混合溶液 50μl をポリスチレン製 24 穴組織培養用マルチウエルに添加し、ＵＶ照射してウェル底面に低分子色素を含有した架橋キトサンマトリクス層を形成した。このマトリクスをＰＢＳで洗浄し、1 ml のＰＢＳを加えてロータリシェーカーで室温において穏やかに揺動しながらインキュベートした。ＰＢＳは毎日交換した。

所定時間間隔でＰＢＳを回収し、ＰＢＳ中に溶出した色素の量を吸光度（OD_{640}）から見積もった。架橋キトサンマトリクスに残留した色素量の時間変化を図２に示す。

図２に示されるように、塩基性のアミノ基を有する架橋キトサンマトリクス（ＵＶ-ＲＣ）に担持させた低分子色素は、酸性のトリパンブルーの場合はイオン的相互作用により長期間に渡って完全にゲル内に保持されたが、塩基性であるトルイジンブルーは１日で殆ど全てがＰＢＳ中に溶出した。

（実施例４）

架橋キトサンマトリクスからの薬物放出（２）

低分子色素を多糖類であるヘパリン、タンパク質であるアルブミン及びプロタミン

に換えた以外は実施例３と同様の条件で試験し、高分子物質の溶出性を比較した。溶出したヘパリン量はカルバゾールアッセイ（Guo, Y., Conrad 及び H.E., Anal. Biochem., 176, 96-104 (1989))、タンパク質量はプロテイン・アッセイ・キットを用いて測定した。その結果を図３に示す。

図３に示されるように、高分子物質であるヘパリン等は架橋キトサンマトリクス内に効率よく捕捉され、長期間に渡って溶出が抑制された。保持性は、酸性多糖類であるヘパリンが最も高く、塩基性タンパク質であるプロタミンは最初の１日で30%程度溶出した後に溶出が抑制された。中性タンパク質のアルブミンは両者の中間に相当する挙動を示した。いずれにしても、２日目からは担持された高分子物質の有意な溶出は無く、架橋キトサンマトリクスは酸性、中性、塩基性等の性質によらず、多糖類やタンパク質といった高分子物質を長期間にわたり強固に担持することがわかった。

（実施例５）

架橋キトサンマトリクスからの薬物放出（３）

担持される物質を増殖因子であるＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ヘパリン結合性ＥＧＦ（ＨＢ－ＥＧＦ）、及び$VEGF_{165}$に換えた以外は、実施例３及び４と同様にして溶出試験を行った。各増殖因子の溶出量は、市販のヘパリン化ビーズを用いたELISA法(Sigma Aldrich)で見積もった。

その結果、全ての増殖因子について実施例４のアルブミンとほぼ一致した溶出プロフィールが観察された。各増殖因子の間では、１日目の初期溶出に若干の違いが認められ、その溶出量は、ＦＧＦ－１が最も少なく、次いでＦＧＦ－２、ＨＢ－ＥＧＦ、$VEGF_{165}$の順に増加したが有意な差異は見られなかった。何れの増殖因子においても、１日目の初期溶出量が２０％を超えることは無かった。代表例として、ＦＧＦ－２を嘆じさせた場合の結果を図４に示す。

（実施例６）

架橋キトサンマトリクスからの薬物放出（４）

担持させる薬物としてアルブミンを使用し、ＵＶ－ＲＣの濃度を0.5～1.5 wt%の範囲で変化させて実施例４と同様の試験を行った。第１日目の経過時に架橋キトサンマ

トリクスに保持されていたアルブミン量をＵＶ-ＲＣ濃度に対してプロットした結果が図５である。薬物、特に高分子物質の初期溶出性は、図５に示されるように、ＵＶ-ＲＣの含有量、即ちキトサン分子密度に依存することは明らかである。

実施例３～６の結果から、糖類、タンパク質又は増殖因子といった高分子物質は本発明の架橋キトサンマトリクスに効率よく担持され、特に２日目以降の溶出がほぼ完全に抑制されて安定に保持されることが実証された。また、これらの高分子物質は、低分子物質とは異なり、酸性、中性、塩基性といった分子の性質によらず良好に保持されるが、中でも酸性基を多く有する薬物は保持安定性が高いことが示された。また、溶出抑制効果は上記タンパク質や細胞増殖因子で７日以上に渡って維持された。一方、７日目にキトサンハイドロゲルを分解するキチナーゼ／キトサナーゼ混合酵素を添加したＰＢＳに置換したところ、徐々に高分子物質の溶出が開始された。このようなキトサンマトリクスの生分解による徐放性は少なくとも１週間以上継続した。

（実施例７）

架橋キトサンマトリクス上でのＨＵＶＥＣの培養

実施例４で調製した増殖因子（ＦＧＦ-１、ＦＧＦ-２、ＨＢ-ＥＧＦ及び$VEGF_{165}$）を担持させた架橋キトサンマトリクスを細胞培養デイッシュ上で形成し、当該マトリクスを１、３、７日間ＰＢＳで洗浄した。その後ＨＵＶＥＣを播種して３日間培養した後、各増殖因子を担持したマトリクス上での増殖性を評価した。また、７日間洗浄したマトリクスを含むディッシュにキチナーゼ／キトサナーゼ酵素を添加した培地でも同様に評価した。結果を表３に示す。表中の数値は、ＵＶ-ＲＣのみ（増殖因子無し）のマトリクス上で培養した場合の増殖性を 100 とした相対値である。

表３

	UV-RCの洗浄日数（日）				
	0	1	3	7	7+酵素
FGF-1	132±14	126±19	104±18	100±19	129±14
FGF-2	173±27	142±11	104±12	97±17	178±27
$VEGF_{165}$	159±14	151±17	115±20	107±13	173±21
HB-EGF	109±12	104±14	108±17	104±21	112±17

洗浄日数０日とは、架橋キトサンマトリクスを洗浄することなくＨＵＶＥＣを播

種したことを意味する。表３から明らかなように、マトリクスからの増殖因子の初期放出がある未洗浄の場合に最も高い細胞増殖性が認められ、１日以上洗浄して増殖因子の放出がほぼ完全に抑制された場合には増殖因子を含まないマトリクス（数値 100）と同等の増殖性しか示さない場合も見られた。しかしながら、酵素を添加した場合、架橋キトサンマトリクスの分解に伴う各増殖因子の再放出により、未洗浄マトリクスに匹敵する増殖性を回復した。代表例として、ＦＧＦ－２を担持させた場合の結果を図６に示す。図６のグラフ縦軸は増殖性（増殖率）の相対値であり、増殖細胞数と相関している。また、図６中の点線は、数値 100 のベースラインである。

（実施例８）

架橋キトサンマトリクスからのトリパンブルーのインビボでの放出

実施例３に従って、トリパンブルーを担持させた架橋キトサンマトリクスを調製し、それをマウスの背中の尾の付け根 2cm の位置に 100μｌ埋入した。所定期間経過後に、マトリクスを取り出して洗浄し、100mM の硝酸ナトリウムでキトサンを分解して残存しているトリパンブルーの量を測定した。その結果を図７に示す。

実施例３の結果では、トリパンブルーは架橋キトサンマトリクスからＰＢＳ中に殆ど放出されなかったのに対し（図２）、インビボでは、図７に示されるように、生体内に存在する酵素によってキトサンマトリクスが分解され、約２週間に渡ってトリパンブルーが徐々に放出され、マトリクスに残存する色素量が減少した。

（実施例９）

架橋キトサンマトリクスからの増殖因子のインビボでの放出

実施例５に従って、ＦＧＦ－１あるいはＦＧＦ－２を含む組成物を調製し、各 100μｌにＵＶ照射して架橋キトサンマトリクスとした。さらに、増殖因子を安定化させる目的で最終濃度 20μg/ml のヘパリンを共存させたものも調製した。これらを、実施例８と同様にマウスの背中に埋入して４日間放置した。その後、埋入したマトリクス周辺の皮膚 1×1cm を剥離し、皮膚組織を細かく裁断し、溶血剤（Sigma Aldrich）で組織中の赤血球ヘモグロビンを抽出した。ヘモグロビンアッセイキット(Sigma Aldrich)で検出したヘモグロビン量から、当該部位における毛細血管誘導性を見積もった。結

果を図８に示す。なお、組成物への増殖因子の添加量は１、４、１５μｇ／１００μｇで変化させた。

図８に示されるように、架橋キトサンマトリクスに４μｇ以上のＦＧＦを保持させることによって、ゲル埋入部位付近での血管形成に伴う著しいヘモグロビン(Ｈｂ)増加が認められた。このような効果は、ＦＧＦの機能を増強させてイオン的相互作用で増殖因子を滞留させる効果が期待できるヘパリンの添加によって更に強化された。

対照として、増殖因子は含むが光架橋させていないキトサン誘導体の埋入も同時に行ったが、ヘモグロビンの増加は認められなかった。これは、増殖因子が短時間で拡散放出されてしまい、徐放効果が得られなかったためと考えられる。また、架橋キトサンマトリクスにヘパリンのみを保持させた場合にはＦＧＦを添加しない場合と同じ程度のＨｂ量であった。

さらに、ＦＧＦ濃度を４μｇに固定し、同様の試験を 15 日間継続したが、ヘモグロビンの増加傾向は維持された。図９（Ｂ）に示すように、特にＦＧＦ-２を使用した場合にＨｂ増加傾向の維持効果が顕著であり、１５日後においても１ｍｇ以上のレベルであった。なお、埋入部位付近での癌化の徴候は全く観察されなかった。

（実施例１０）

創傷モデルにおける治癒促進効果

（１）マウスにおける皮膚創傷モデルの形成

この実験においては、雌の糖尿病変異体マウスである C57BL/ksj db/db 及びその正常な同腹子（db/+）（CREA Japan 社）を使用した。全てのマウスは、標準的な実験室食餌及び水を与え、１０週齢を越えたときに実験に供した。実験に先立って、マウスの尿をグルコース及びタンパク質について試験片(Uro-Labstrix : Bayer Medical 社)を用いてチェックした。その結果、db/db マウスは重篤な糖尿病であり、db/+マウスは正常である診断された。

各マウスをジエチルエーテルで麻酔し、背面の毛を完全に剃り落とした後、鋭利な鋏及びメスを用いて各マウスの背面上部に皮膚全厚に渡る円形創傷（約 100mm^2）を形成した。

（２）創傷治癒促進効果

20mg/mlのＵＶ-ＲＣ水溶液にヒト組換えＦＧＦ-２(Pepro Tech EC社)添加した組成物あるいはＦＧＦ-２を添加しない組成物を、各マウスの創傷に100μl塗布し、2cmの距離から紫外光を20秒間照射して架橋キトサンマトリクスとした。同様の創傷（約100mm^2）を形成し、何も処理しないマウスをコントロールとした。各マウスの創傷面積の変化を２日毎にカリパスを用いて測定した。目視観察によると、架橋キトサンマトリクスは、治癒プロセスを通して水和したハイドロゲルを形成していた。

db/dbマウスについて、創傷形成から２、４、８、及び１４日目における創傷の写真を図１０に示す。さらに、創傷閉塞速度を、非閉塞面積の創傷形成時の面積に対する割合（％）を時間の関数として評価し、その結果を図１１にプロットした。

図１０及び１１から明らかなように、コントロール創傷（Ａ）では、１４日目においても、創傷面積の約５０％しか閉塞されておらず、約８０％の創傷閉塞が達成されたのは２０日以後であった。これに対し、ＦＧＦ-２を担持した架橋キトサンマトリクスで被覆した創傷（Ｃ）の面積は極めて迅速に縮小し、およそ６～１０日目に創傷の約８０％が閉塞され、１４日目には殆ど完全に治癒した。また、（ＦＧＦ-２を含まない）架橋キトサンマトリクスのみで被覆した創傷（Ｂ）は両者の中間に相当する結果を示した。本発明の光架橋性キトサン誘導体を含む組成物による治癒効果は、特に初期２日間に顕著に発揮され、その効果が治癒の達成まで継続することが確認された。

一方、db/+マウスについて、創傷形成から２、４、及び１０日目における創傷の写真を図１２に示し、創傷治癒速度のグラフを図１３に示す。

正常なdb/+マウスの場合は、全ての条件において、治癒障害を持つdb/dbマウスより創傷治癒が速いが、本発明の架橋キトサンマトリクスで被覆した場合は、未処理のコントロールに比較して治癒が有意に促進された。より詳細に言えば、コントロール（Ａ）では１０日目に約７０％の創傷閉塞が見られたのに対し、架橋キトサンマトリクスで被覆した場合（（Ｂ）及び（Ｃ））では、８日以内に約８０％の創傷閉塞が達成された。また、ＦＧＦ-２を添加することによる治癒促進効果は、治癒プロセスの初期（約６日以内）に顕著であり、その後はＦＧＦ-２添加の有無による有意な相違は見られなかった。これは、正常なdb/+マウスにおいては、治癒に必要とされる増殖因子等が生体内からも供給されるためと考えられる。即ち、ＦＧＦ-２等の増殖因子を適切かつ長期に渡って徐放できる本発明の架橋キトサンマトリクスは、糖尿病性皮

膚潰瘍等の難治性外傷の治療に特に適している。

なお、ヘパリン（ブタ小腸由来、Scientific Protein Laboratories 社）を更に添加した場合にも、上記と同等以上の治癒促進効果が認められた。

（実施例１１）

db/db マウスにおける創傷モデルの組織学的観察

実施例１０における各測定日に創傷組織を含む皮膚の一部を採取し、それを 10%ホルムアルデヒド溶液中で固定し、パラフィンに包埋し、創傷表面に垂直な断面で 4μm の厚さにスライスした（Yamato Kohki 社）。スライスした断片をガラススライドに置き、ヘマトキシリン-エオシン（HE）試薬で染色した。

図１４は、２、４、８及び１６日目における各断片を示す写真である。図中に付した矢印は上皮化組織の端部を示している。未処理のコントロール（A）では、１６日目においても上皮化が進んでいないが、ＦＧＦ-２担持キトサンマトリクスで被覆した創傷（C）では上皮化が急速に進み、１６日目には殆ど完全に上皮化されている。ＦＧＦ-２を含まないキトサンマトリクスの場合（B）は両者の中間に相当する上皮化が観察された。

創傷形成から４日目の断片の顕微鏡写真を図１５に示す。図中に付した▼印は形成された肉芽組織の端部、白矢印は血管形成部位、そして黒矢印は残っているキトサンマトリクスを表す。ＦＧＦ-２担持キトサンマトリクスで被覆した創傷（C）においては、血管形成及び肉芽組織形成が進んでいる。ＦＧＦ-２を含まないキトサンマトリクス被覆した場合（B）においても、若干の血管形成が観察される。しかしながら、未処理のコントロール（A）では血管形成及び肉芽組織形成のいずれも観察されない。

例えば、ＦＧＦ-２の水溶液を１日に１回、db/db マウスの創傷開口部に添加した場合、再上皮化の促進に対しては僅かな効果しか示さなかったとの報告がある（Tsuboi, R. and Rifkin, D.B., J. Exp. Med., 1990: 172, 245-251）。本発明者等は、ＦＧＦ-２溶液を使用した場合には、創傷開口部に大きな瘡蓋が形成され、それがケラチノサイトの遊走に悪影響を与えたのであろうと推察する。本発明によれば、キトサンマトリクス（ハイドロゲル）が創傷開口部を被覆しているので、大きな瘡蓋が形成されず、マトリクス中のＦＧＦ-２が再上皮化を促進したものと考えられる。

また、図１６は、創傷形成から４日目の断片にＣＤ３４による免疫染色を施したサンプルの顕微鏡写真である。未処理のサンプル（Ａ）に比較してＦＧＦ-２担持キトサンマトリクスで被覆したサンプルでは血管新生が有意に増加していることが観察された。顕微鏡の１視野当たりに存在する平均血管数を数えた結果を下記の表４に示す。

表４

日数	4日目	16日目
コントロール	18．2	33．4
キトサンマトリクス	15．1	31．5
FGF-2/キトサンマトリクス	37．4	41．6

（実施例１２）

ラットを開腹して胃壁面にレーザーメスによる潰瘍モデルを形成した。上記と同様の治癒促進効果が病理組織観察によって確認された。具体的には、治癒速度が架橋キトサンマトリクス（ＧＦ無し)、架橋キトサンマトリクス＋ＧＦの順で向上した。このことは、胃酸による非生理的環境(pH2 程度)でも、キトサンゲルがＧＦなどの薬物を或る程度保護し、治癒に寄与したことを示唆するものである。結局、数例の動物実験では、被覆しない場合に比較すると、最大約 1/2 の期間で治癒が確認された。但し、実用的には、胃酸により低ｐＨ環境となっている胃壁で使用する場合には、緩衝剤やＨ２ブロッカー等の胃酸の作用や分泌を抑制する物質の共存下で使用するのが好ましい。しかしながら、十二指腸以降の消化器では、そのような物質を共存させなくても良好にＧＦ等が保護され、優れた創傷治癒促進効果が発揮される。

なお、上記の効果は、紫外線架橋型（ＵＶ-ＲＣ）のみならず、可視光架橋型のＶＬ-ＲＣを使用した場合でも同様に認められた。

産業上の利用可能性

本発明で使用する架橋性キトサン誘導体は、ラクトース部分と光反応性基の両方を有しておいるため、中性付近の生理的ｐＨで水に可溶であり、その水溶液を光（ＵＶ

又は可視光）照射することにより、通常は１０秒以内に、軟質ゴムに匹敵する強度の不溶性ハイドロゲルとなる。形成された架橋キトサンマトリクスは、創傷を良好に閉塞し、適切な加湿治癒環境において創傷を保護し、収縮させる。

また、本発明の架橋キトサンマトリクスは、糖類やタンパク質、増殖因子等の高分子物質を特に良好に担持することができ、インビボにおけるマトリクスの生分解に伴い、担持された物質を徐放する能力を有する。特に、ＦＧＦ等の拡散性の高い増殖因子を含む創傷治療剤を担持させた架橋キトサンマトリクスで創傷を被覆した場合、増殖因子等を適切に徐放することによって創傷治癒を促進し、癌化を誘発することもない。よって、本発明の組成物は、糖尿病性皮膚潰瘍等の組織が壊死した難治性創傷の治癒を促進させるのに特に有用である。

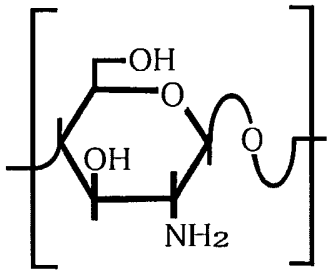
本発明の架橋キトサンマトリクスは、ＦＧＦ以外の創傷治癒に関連する増殖因子、例えば血小板由来成長因子（PDGF）、トランスフォーミング成長因子-β（TGF-β）、血管内皮細胞成長因子（VFGF）又は上皮成長因子(EGF)などを担持し、徐放するキャリアとして使用することもできる。

さらに、本発明の架橋キトサンマトリクスは、細胞培養又は組織再生のための培養基材としても使用できる。

請求の範囲

1． 光架橋性キトサン誘導体と創傷治癒促進薬とを含有することを特徴とする医療用組成物。

2． 光架橋性キトサン誘導体が、下記式（Ｉ）：



(I)

で表される単位を含んでなるキチン・キトサン類のグルコサミン単位（1）の２位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなる高分子であることを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

3． 光架橋性キトサン誘導体を、少なくとも３ｍｇ／ｍｌ含有することを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

4． 創傷治癒促進薬が増殖因子であることを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

5． 増殖因子がＦＧＦ－１、ＦＧＦ－２、ＨＢ－ＥＧＦ、$VEGF_{165}$又はＨＧＦであることを特徴とする、請求項４に記載の組成物。

6． グリコサミノグリカン類を更に含有することを特徴とする、請求項１に記載の組成物。

7． グリコサミノグリカン類がヘパリン又はヘパラン硫酸であることを特徴とする、請求項６に記載の組成物。

８．　請求項１から７のいずれか一項に記載の組成物に光を照射することによって得られる、創傷治癒促進薬及び任意にグリコサミノグリカン類を担持した架橋キトサン誘導体マトリクス。

９．　光反応性基による架橋度が３０～１００％であることを特徴とする、請求項８に記載の架橋キトサン誘導体マトリクス。

１０．　創傷治癒促進薬が増殖因子であることを特徴とする、請求項８又は９に記載の架橋キトサン誘導体マトリクス。

１１．　請求項８から１０のいずれか一項に記載の架橋キトサン誘導体マトリクスからなることを特徴とする薬物徐放体。

１２．　請求項１０に記載の架橋キトサン誘導体マトリクスを含んでなることを特徴とする組織再生用又は細胞培養用基材。

１３．請求項１から７のいずれか一項に記載の組成物を含んでなる、難治性皮膚創傷治療用の創傷被覆材。

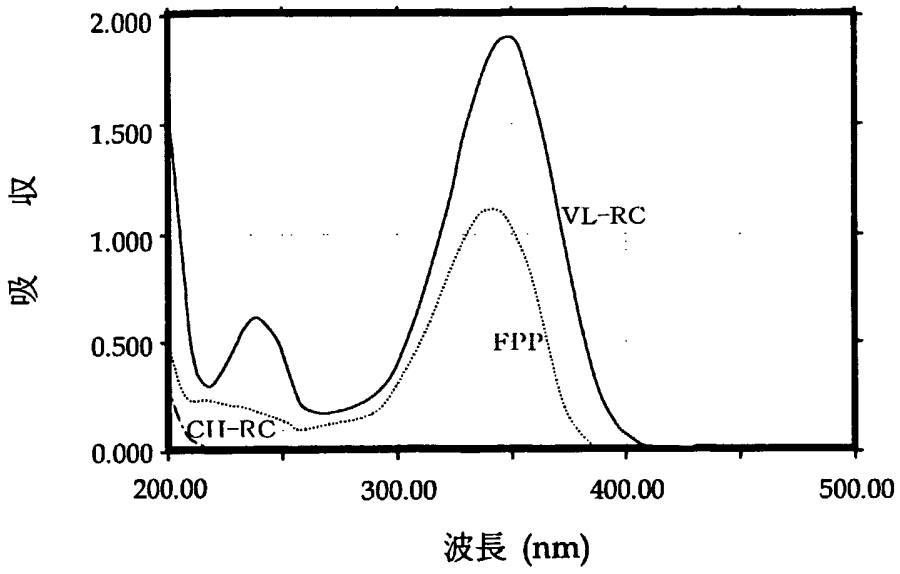

2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
吸収
VL-RC
FPP
CII-RC
200.00
300.00
400.00
500.00
波長 (nm)

図１

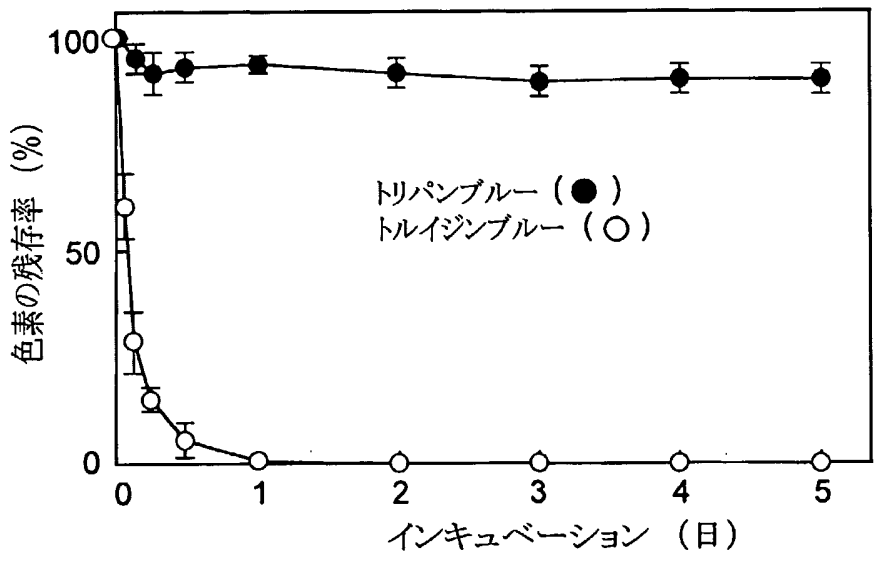

100
50
0
色素の残存率（%）
トリパンブルー（●）
トルイジンブルー（○）
0
1
2
3
4
5
インキュベーション （日）

図２

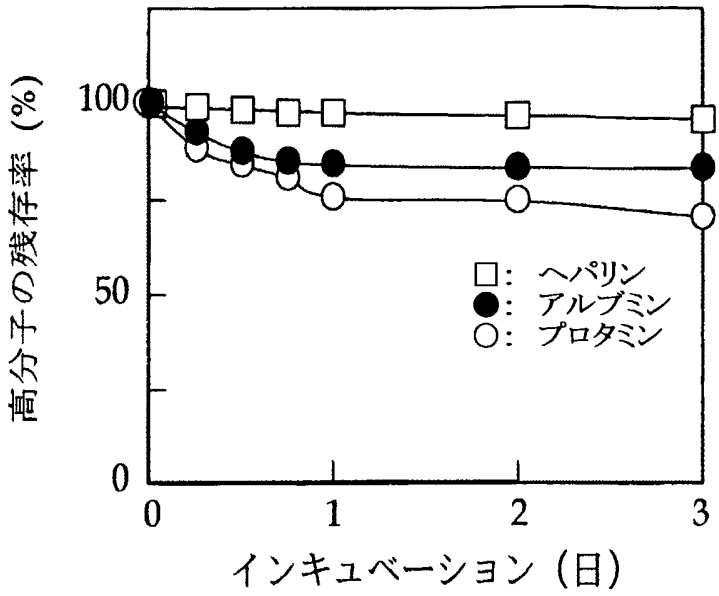

高分子の残存率（%）
100
50
0
0
1
2
3
インキュベーション（日）
□：ヘパリン
●：アルブミン
○：プロタミン

図３

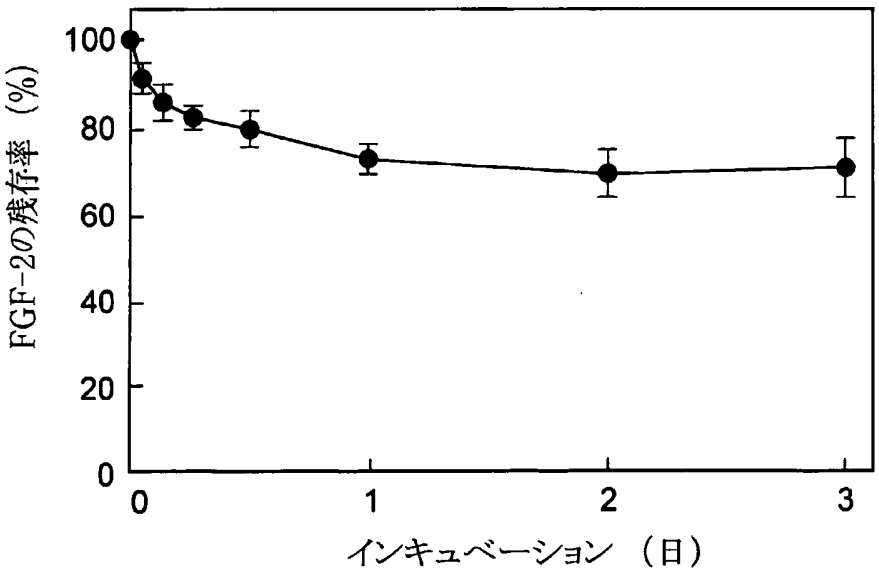

FGF-2の残存率（%）
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
インキュベーション（日）

図４

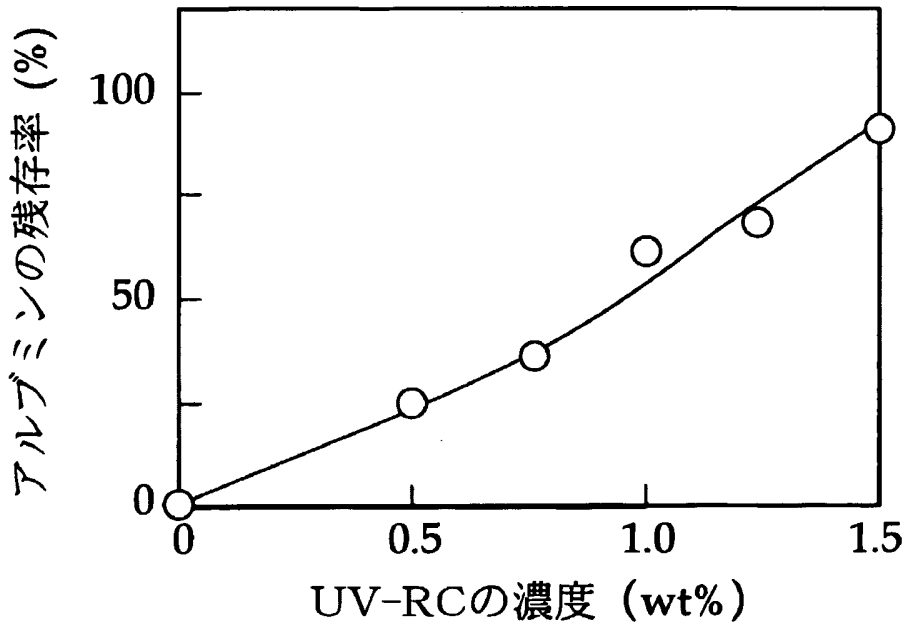

アルブミンの残存率（%）
100
50
0
0
0.5
1.0
1.5
UV-RCの濃度（wt%）

図５

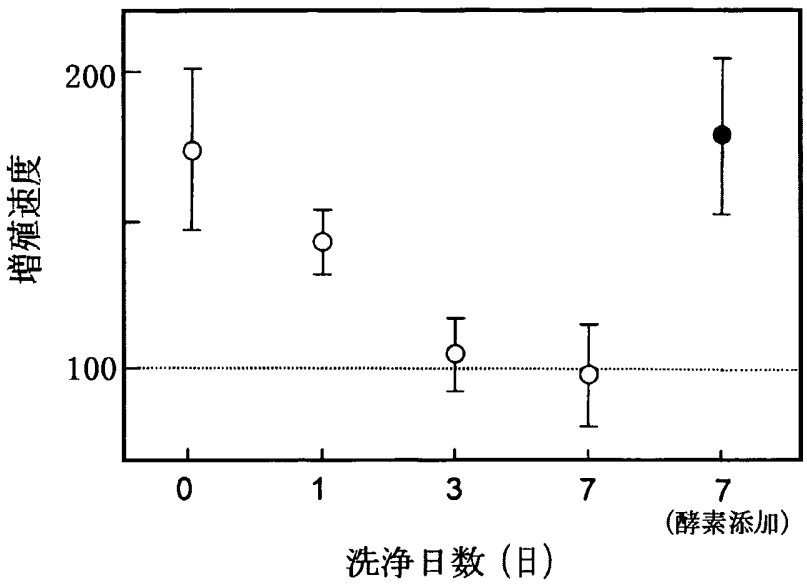

増殖速度
200
100
0
1
3
7
7
（酵素添加）
洗浄日数（日）

図６

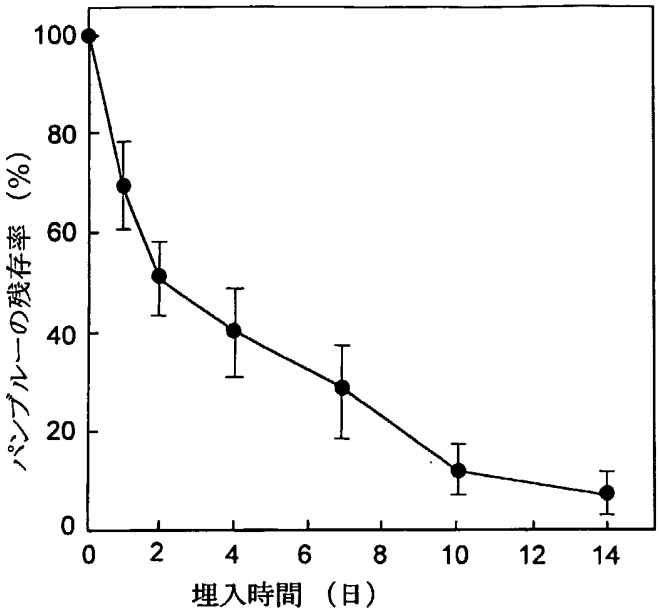

パンプルーの残存率（%）
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
埋入時間（日）

図7

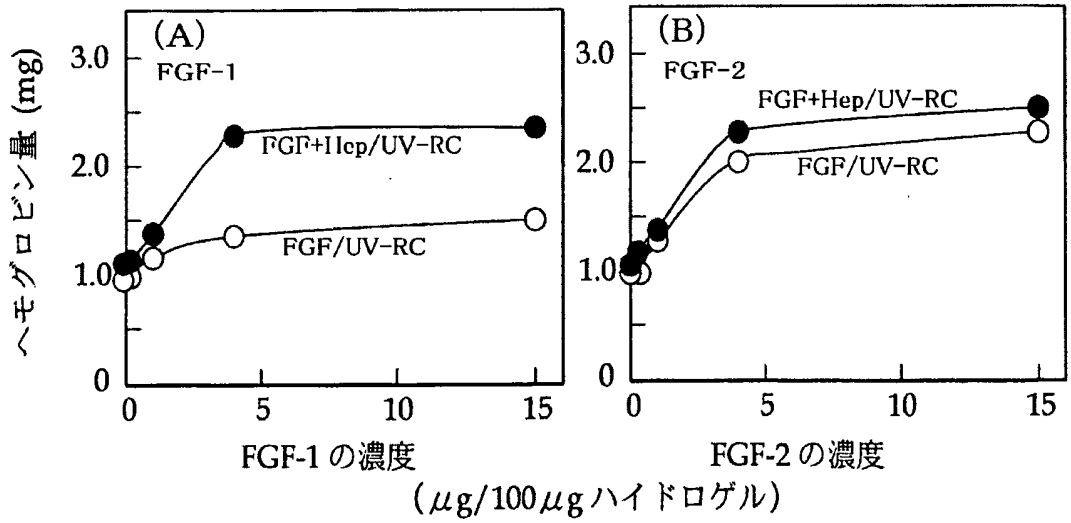

ヘモグロビン量 (mg)
(A)
FGF-1
FGF+Hep/UV-RC
FGF/UV-RC
3.0
2.0
1.0
0
0
5
10
15
FGF-1の濃度
(B)
FGF-2
FGF+Hep/UV-RC
FGF/UV-RC
3.0
2.0
1.0
0
0
5
10
15
FGF-2の濃度
(μg/100μgハイドロゲル)

図8

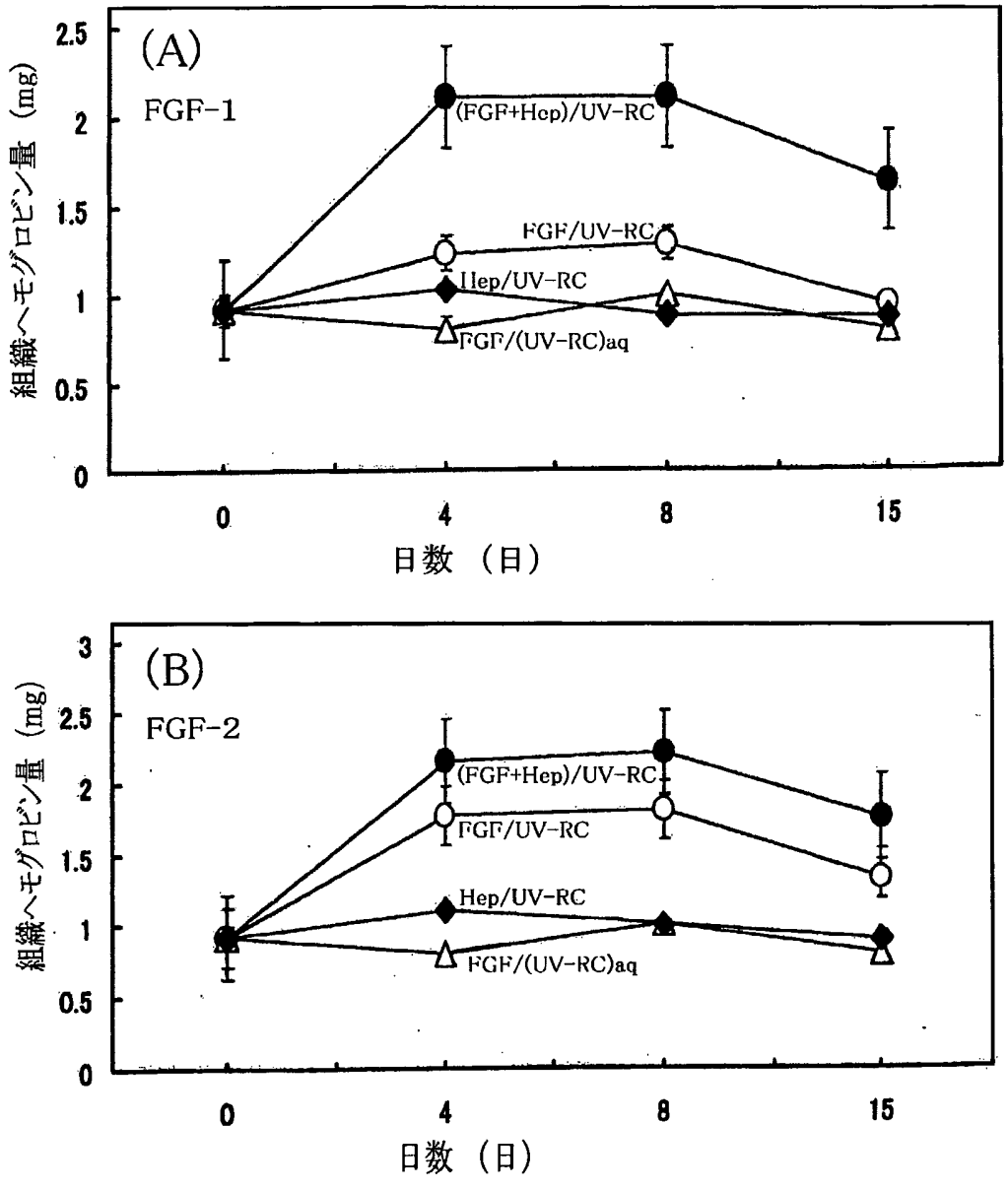

(A)
FGF-1
(FGF+Hep)/UV-RC
FGF/UV-RC
Hep/UV-RC
FGF/(UV-RC)aq
組織ヘモグロビン量（mg）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
15
日数（日）
(B)
FGF-2
(FGF+Hep)/UV-RC
FGF/UV-RC
Hep/UV-RC
FGF/(UV-RC)aq
組織ヘモグロビン量（mg）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
4
8
15
日数（日）

図 9

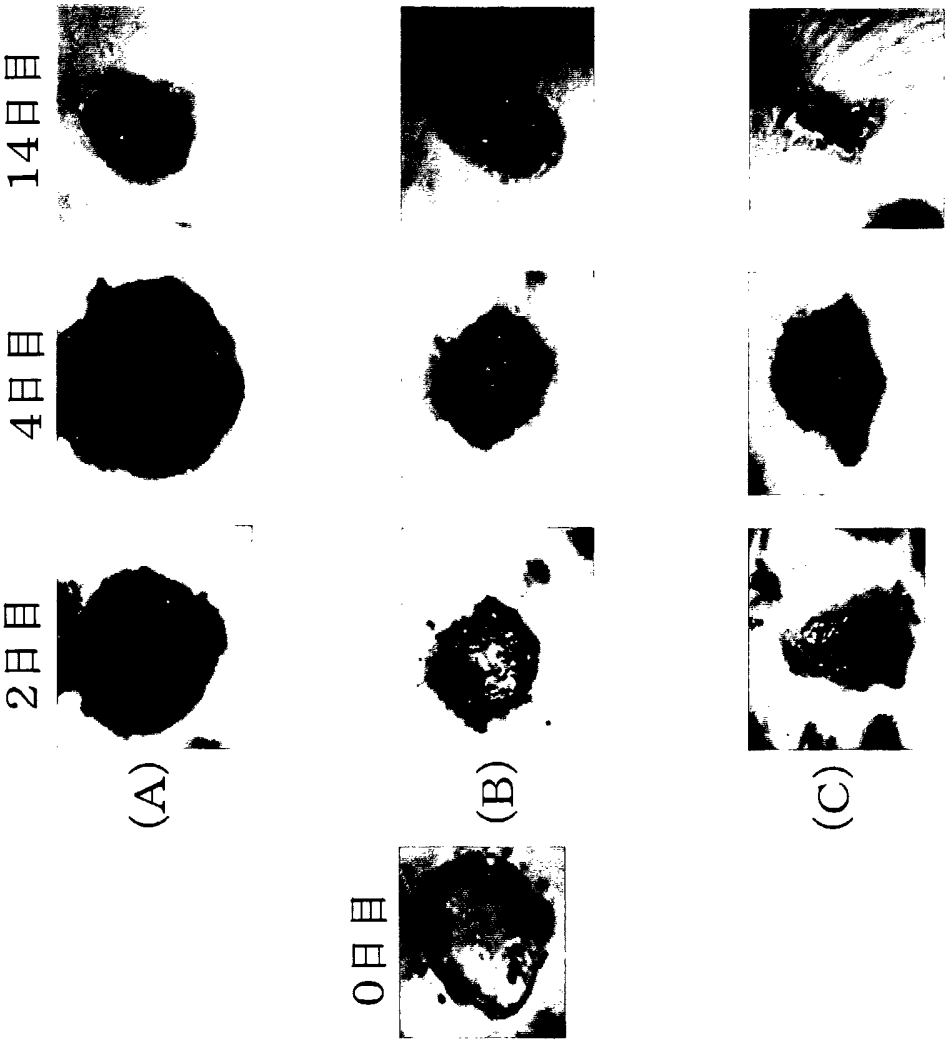


図 10

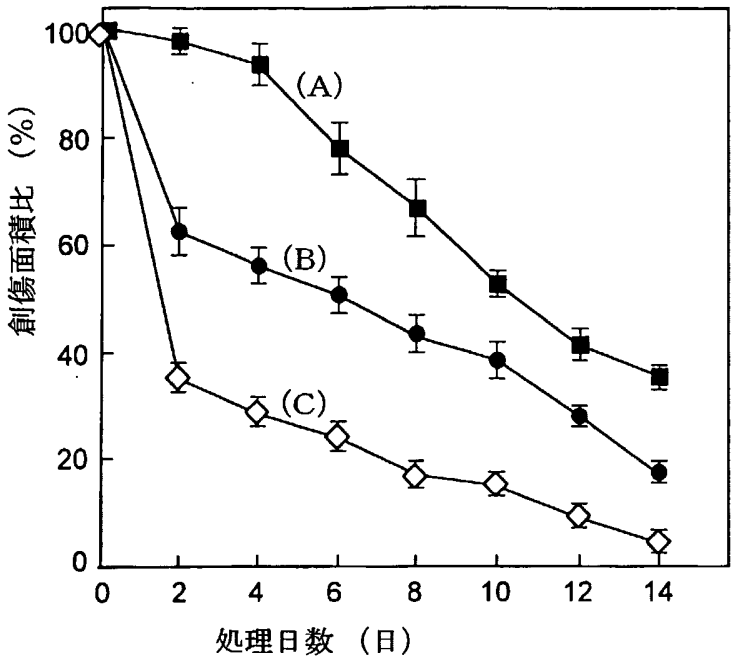

100
80
60
40
20
0
創傷面積比（%）
(A)
(B)
(C)
0
2
4
6
8
10
12
14
処理日数（日）

図１１

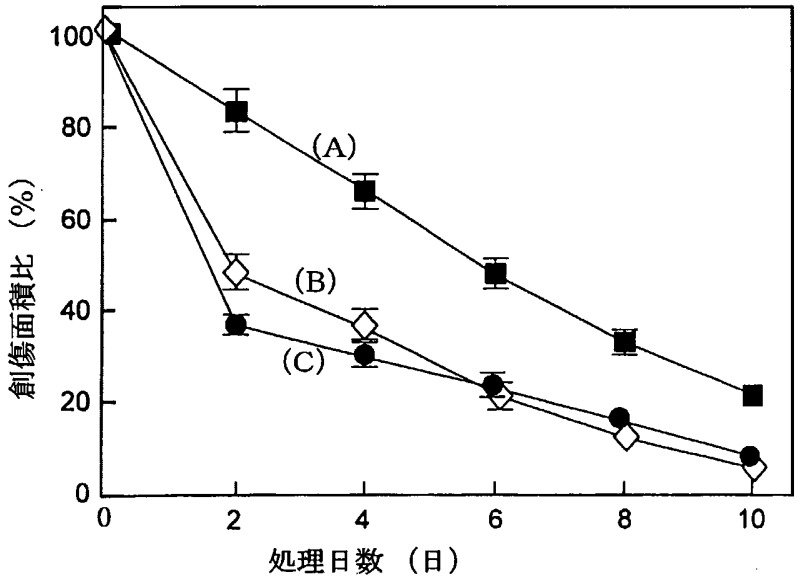

100
80
60
40
20
0
創傷面積比（%）
(A)
(B)
(C)
0
2
4
6
8
10
処理日数（日）

図１３

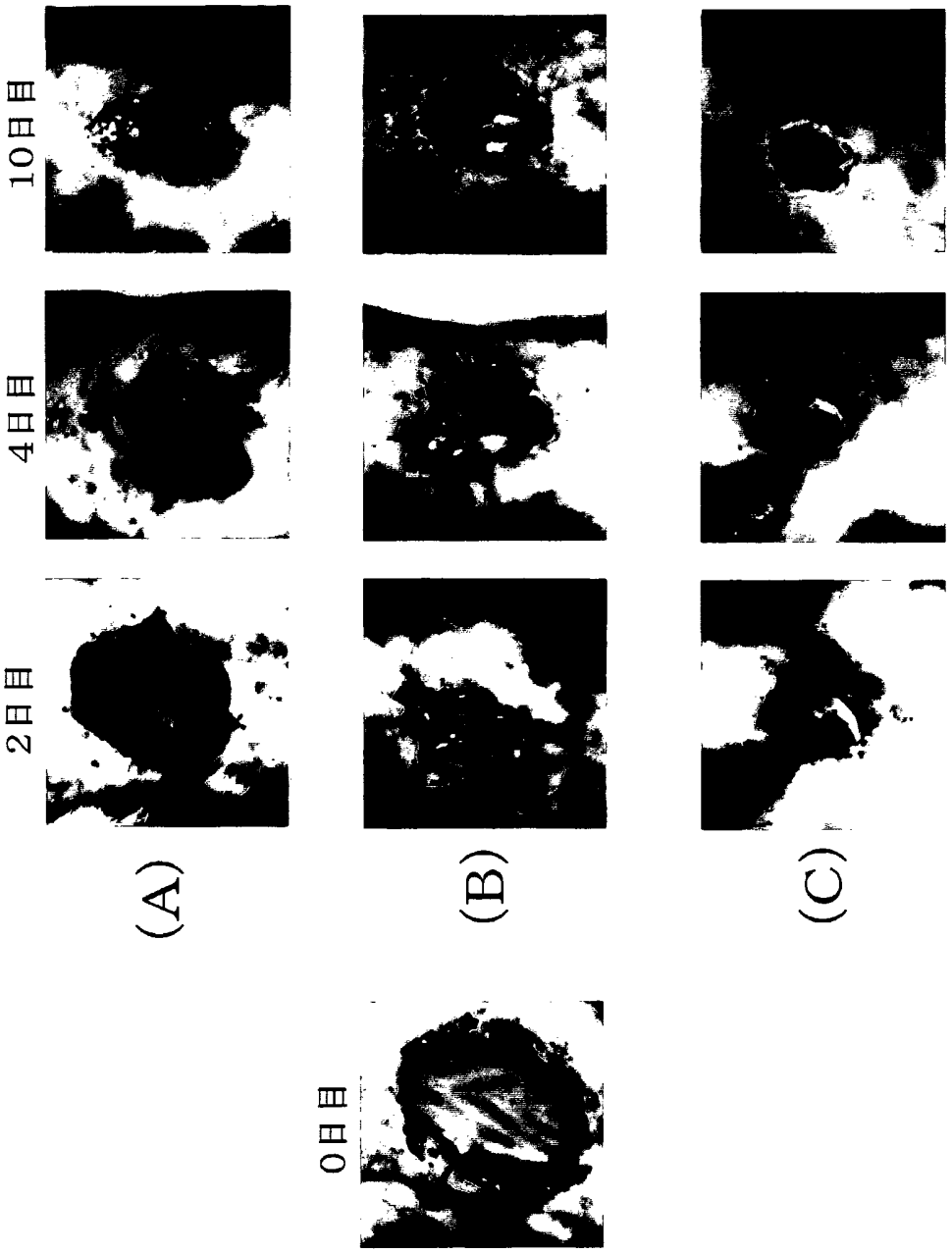


図 12

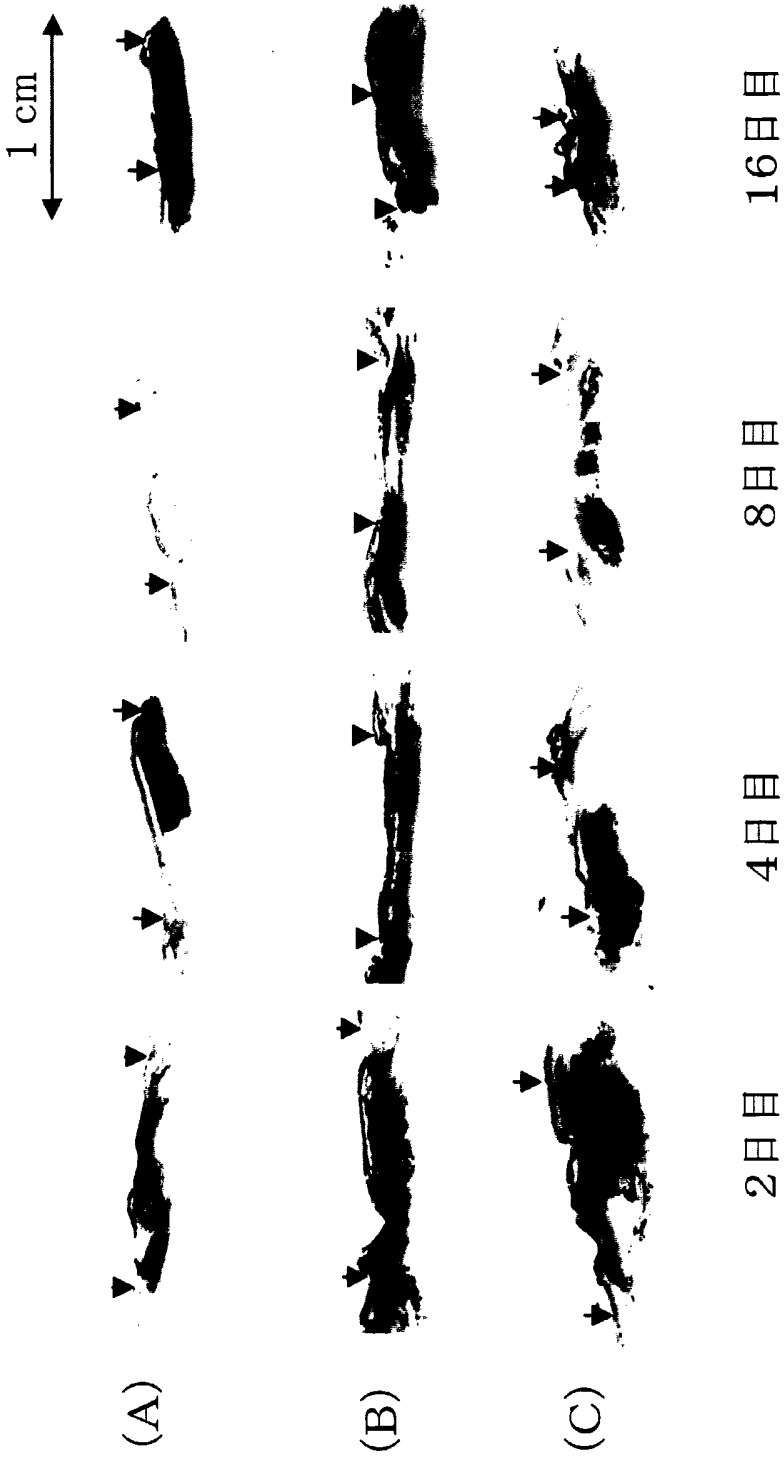


図 14

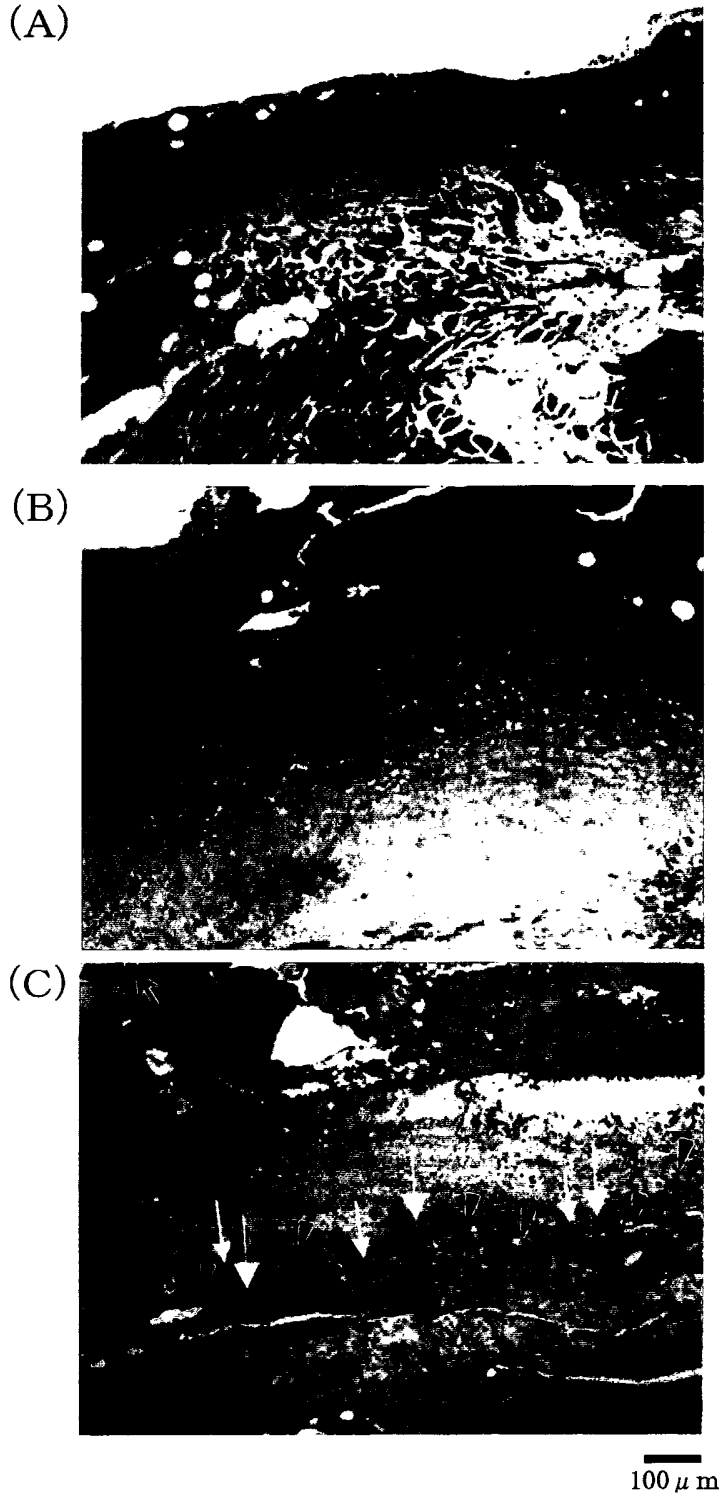
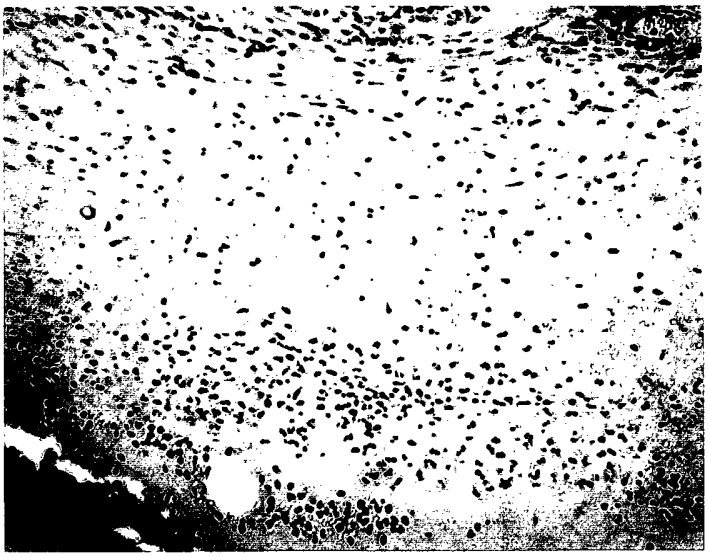


図１５

(A)



(B)

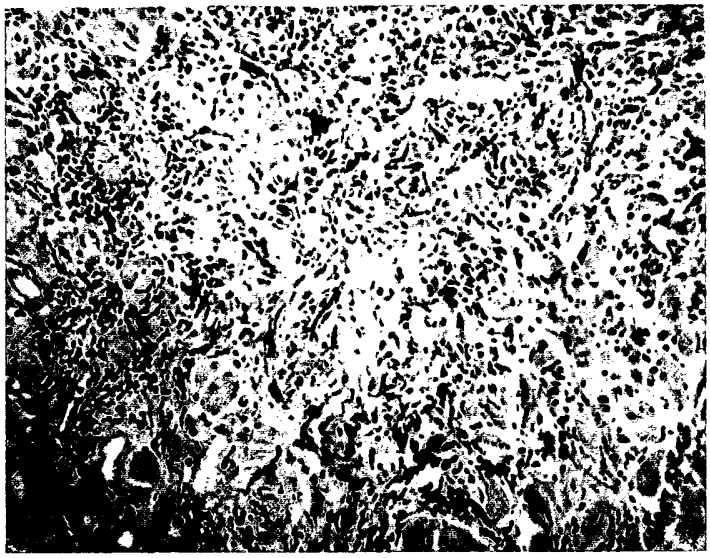


図１６

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/05070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K31/722, 31/727, 38/22, 45/00, 9/06, A61L15/16, 27/20, 27/44, A61P17/02

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)
Int.Cl[7] A61K31/722, 31/727, 38/22, 45/00, 9/06, A61L15/16, 27/20, 27/44, A61P17/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/27889 A1 (Netech Inc.), 18 May, 2000 (18.05.00), Claims; 'Disclosure of the invention', Pamphlet, page 11, line 6 to page 13, line 12; page 17, line 4 to 4th line from the bottom; page 18, lines 9 to 16 & AU 1078600 A & EP 1152013 A1	1-14
Y	WO 00/33893 A1 (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL LTD.), 15 June, 2000 (15.06.00), Claims & GB 2344519 A & CA 2319327 A & JP 2002-531532 A & EP 1053029 A & AU 1577000 A & BR 9907679 A & SI 20306 A	1-14

[×] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] 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 document 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	Date of mailing of the international search report
19 May, 2003 (19.05.03)	03 June, 2003 (03.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/05070

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 656215 A1 (COLLAGEN CORP.), 07 June, 1995 (07.06.95), Claims & JP 7-278203 A & US 5470911 A & US 5476666 A & CA 2134745 A	1-14
Y	EP 200574 A2 (KATAKURA CHIKKARIN CO., LTD.), 05 November, 1986 (05.11.86), Claims & DE 3688805 A & JP 61-253065 A & ES 554614 A & US 5116824 A	1-14
A	JP 2000-109502 A (Maruho Kabushiki Kaisha), 18 April, 2000 (18.04.00), Claims (Family: none)	1-14

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０３／０５０７０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ３１／７２２，３１／７２７，３８／２２，４５／００，９／０６，Ａ６１Ｌ１５／１６，２７／２０，２７／４４，Ａ６１Ｐ１７／０２

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．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ３１／７２２，３１／７２７，３８／２２，４５／００，９／０６，Ａ６１Ｌ１５／１６，２７／２０，２７／４４，Ａ６１Ｐ１７／０２

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

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）

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
Ｙ	WO 00/27889 A1 （株式会社ネーテック）2000.05.18 請求の範囲、「発明の開示」の項、パンフレット第１１頁第６行～第１３頁第１２行、同第１７頁第４行～下から第４行、同第１８頁第９行～第１６行 & AU 1078600 A & EP 1152013 A1	１－１３
Ｙ	WO 00/33893 A1 (JOHNSON & JOHNSON MEDICAL LIMITED) 2000.06.15 Claims & GB 2344519 A & CA 2319327 A & JP 2002-531532 A	１－１３

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ 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	国際調査報告の発送日
19.05.03	03.06.03

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｃ	８５１９
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	守安　智　印		
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第2ページ）（１９９８年７月）

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
	& EP 1053029 A & AU 1577000 A & BR 9907679 A & SI 20306 A	
Y	EP 656215 A1 (COLLAGEN CORPORATION) 1995.06.07 Claims & JP 7-278203 A & US 5470911 A & US 5476666 A & CA 2134745 A	１－１３
Y	EP 200574 A2 (KATAKURA CHIKKARIN CO.,LTD.) 1986.11.05 Claims & DE 3688805 A & JP 61-253065 A & ES 554614 A & US 5116824 A	１－１３
A	JP 2000-109502 A （マルホ株式会社） 2000.04.18 特許請求の範囲　（ファミリーなし）	１－１３