

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5437236号
(P5437236)

(45) 発行日 平成26年3月12日(2014. 3. 12)

(24) 登録日 平成25年12月20日(2013. 12. 20)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 38/48 (2006. 01)

A 6 1 K 37/547

A 6 1 K 9/70 (2006. 01)

A 6 1 K 9/70 4 O 1

A 6 1 K 47/10 (2006. 01)

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/26 (2006. 01)

A 6 1 K 47/26

A 6 1 K 47/18 (2006. 01)

A 6 1 K 47/18

請求項の数 4 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-508228 (P2010-508228)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月15日(2009. 4. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2009/057584
 (87) 国際公開番号 W02009/128474
 (87) 国際公開日 平成21年10月22日(2009. 10. 22)
 審査請求日 平成24年1月23日(2012. 1. 23)
 (31) 優先権主張番号 特願2008-106682 (P2008-106682)
 (32) 優先日 平成20年4月16日(2008. 4. 16)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000173555
 一般財団法人化学及血清療法研究所
 熊本県熊本市北区大窪一丁目6番1号
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鮫島 睦
 (74) 代理人 100126778
 弁理士 品川 永敏
 (74) 代理人 100150500
 弁理士 森本 靖
 (74) 代理人 100156111
 弁理士 山中 伸一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記(1)から(3)の工程からなるトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造方法。

(1) 界面活性剤、トレハロース、ヒスチジン、グリセロール及びトロンビンを含む充填液を調製する工程

(2) 前記(1)の充填液を生体吸収性シートに滴下又は前記(1)の充填液を生体吸収性シートを浸漬する工程、及び

(3) 前記(2)の生体吸収性シートを乾燥する工程

【請求項 2】

トロンビンが1000～2000単位/mL、トレハロースが30～40mg/mL、ヒスチジンが2.4～180mM、界面活性剤が0.01～1%及びグリセロールが1～2%であることを特徴とする、請求項1に記載の製造方法。

【請求項 3】

界面活性剤、トレハロース、ヒスチジン及びトロンビンを含むことを特徴とする、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤。

【請求項 4】

トロンビンが1000～2000単位/mL、トレハロースが30～40mg/mL、界面活性剤が0.01～1%及びヒスチジンが2.4～180mMであることを特徴とする、請求項3に記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロンピンを固定化した生体吸収性シート製剤の製造方法に関する。詳細には、有効成分としてトロンピン、添加剤として多価アルコール、界面活性剤、アミノ酸及び少糖を含有する溶液に、生体吸収性のシート状支持体を浸漬し、乾燥させることによる、トロンピン固定化生体吸収性シート製剤の製造方法、及び当該製造方法によって得られるトロンピン固定化生体吸収性シート製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

トロンピンは、止血血栓の形成や創傷治癒などの生命の維持進展に不可欠な作用を有する血液凝固に關与する酵素である。トロンピンは、通常血中では不活性なプロトロンピンとして存在するが、例えば血小板や組織細胞の損傷を起因とする凝固系の活性化により、可溶性形態のフィブリノゲンを止血及び創傷治癒に有用な不溶性のフィブリンに変換する。本原理を利用した止血剤は、幅広い臨床の現場で応用されている。

10

【0003】

トロンピンは、古くから止血剤の有効成分として使用されているが、従来の液状型の止血剤では噴出性・湧出性の出血部位に対する圧迫止血・圧迫閉鎖が不可能であるため、出血を止めることはできない。

【0004】

このような噴出性・湧出性の出血に対する止血を目的として、トロンピン、フィブリノゲン及び／又は血液凝固因子をコラーゲンスポンジ、アルギン酸、ポリグリコール酸からなる不織布、ゼラチン又はハイドロゲルからなる他の生体吸収性支持体に固定化したシート型止血剤の開発が試みられている（例えば、特許文献1, 2, 3, 4, 5, 6, 7参照）。

20

【0005】

しかしながら、そのほとんどが肉厚であり、また乾燥状態で臓器閉鎖部位に適用する場合には支持体自身の固さが影響するため柔軟性に欠き、創傷面に密着させることが難しく、その為に十分な接着効果が得られないなどの問題があり実用化に至っていない。

【0006】

唯一、ウマ由来コラーゲンからなる支持体にフィブリノゲンとウシ由来トロンピンが固定されたシート型フィブリン糊製剤（製品名：タココンブ／CSLベーリング社）が製品化されているが（例えば、特許文献8参照）、シートの厚さ（約3mm）や動物由来成分を含有するなど操作性や危険因子の排除において改善の余地がある。

30

【0007】

一方で、トロンピンの安定化剤に関する種々の報告がある。例えば、液剤に関しては、有機カルボン酸塩（例えば、特許文献9参照）やグリセロール（例えば、特許文献10、11及び12参照）を含有させることにより、またバイアル内やアルミニウムパウチ包装された乾燥製剤に関しては、糖、塩基性アミノ酸及び有機酸液剤（例えば、特許文献13参照）、ゼラチン、グリシン及び糖（例えば、特許文献14参照）、脂肪族多塩基カルボン酸及びアルブミン（例えば、特許文献15参照）又はヒト血清アルブミン及びアミノ酸（例えば、特許文献16参照）を含有させることにより、トロンピンを安定的に維持させる方法が報告されている。しかし、シート型製剤においては、単にトロンピンを安定化させるだけでは目的は達せられない。

40

【0008】

シート製剤を使用する際には、これを創傷部位に密着させるために丸めたり、折り曲げたりすることがあるので、このような力に対してシートの破損やトロンピン成分の脱落が起こらないようにシートの柔軟性やトロンピン保持力を上げる必要がある。

【0009】

例えば、前述の糖、塩基性アミノ酸及び有機酸液剤を含有させたトロンピン製剤では、これをシートに固定した場合は柔軟性が失われるためにシート型の製剤には適さない。ま

50

た、トロンビン溶液に不織布を浸し単純に凍結乾燥した場合にはトロンビンが不織布に固定化されない。斯かる課題を解決するためにキチン不織布を支持体とし、これをコンドロイチン硫酸、アルギン酸又はヒアルロン酸などの酸性高分子溶液、キトサンなどの塩基性高分子溶液及びトロンビン溶液の三種溶液に交互に浸漬してトロンビンを固定化し、真空あるいは送風乾燥させてシート状止血剤やシート状創傷治療剤として用いる技術が報告されている（例えば、特許文献１７参照）。しかしながら、このような交互吸着させる方法は、シートの柔軟性は確保できても、トロンビンの活性低下は免れず、また、製造過程においても操作が煩雑であるなど、より効果的な製剤化方法の開発が望まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【００１０】

【特許文献１】特公昭61-59737号公報

【特許文献２】特開平05-163157号公報

【特許文献３】特表2002-515300号公報

【特許文献４】米国特許第4453939号公報

【特許文献５】特表平9-510357号公報

【特許文献６】特表2000-510357号公報

【特許文献７】特表2001-513368号公報

【特許文献８】欧州特許第0059265号公報

【特許文献９】特開昭56-39782号公報

20

【特許文献１０】特開昭62-106028号公報

【特許文献１１】特公平7-64747号公報

【特許文献１２】特開昭63-192723号公報

【特許文献１３】特開平2-53732号公報

【特許文献１４】特開平7-165604号公報

【特許文献１５】特開2002-193832号公報

【特許文献１６】特開2006-117678号公報

【特許文献１７】特開2006-306759号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【００１１】

前述したように、トロンビンを有効成分として含有するシート型の製剤は既に開発されているものの、シート製剤の柔軟性、トロンビンの安定性や保持力、並びに煩雑な製造過程及び未知の危険因子の排除においてなお改善の余地が残されている。

【００１２】

したがって、本発明の目的は、上記の問題を解決し、利便性の高いトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造方法及び当該製造方法によって得られるトロンビン固定化生体吸収性シート製剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

40

本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、トロンビン溶液にグリセロールを含有させることにより、凍結乾燥粉体の過剰形成を抑制できること及びシート製剤としたときの柔軟性を維持できること、その結果として、乾燥後の粉体飛散によるトロンビン成分の脱落や不織布上での破損が回避できることを発見した。更に、ツイン80を添加することによりトロンビンの不織布への浸透性が増大すること及びトレハロースと少量のヒスチジンを添加することにより、これを乾燥製剤としたときにトロンビンの安定性がそれぞれを単独で添加したときよりも格段に上昇することを見出し、本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、以下の通りである。

【００１４】

〔１〕下記〔１〕から〔３〕の工程からなる、生体吸収性シート製剤の製造方法。

50

(1) 有効成分を、柔軟化剤及び浸透化剤を含有する充填液に混合する工程、
(2) 前記 (1) の充填液を生体吸収性シートに滴下又は前記 (1) の充填液を生体吸収性シートを浸漬する工程、及び

(3) 前記 (2) の生体吸収性シートを乾燥する工程

〔 2 〕 有効成分が、トロンビン又はフィブリノゲンであることを特徴とする、〔 1 〕 記載の製造方法。

〔 3 〕 トロンビンの濃度が1000～2000単位/mLである、〔 2 〕 記載の製造方法。

〔 4 〕 柔軟化剤が多価アルコール又はグリコサミノグリカン、浸透化剤が界面活性剤である、〔 1 〕 ないし〔 3 〕 の何れか一項記載の製造方法。

〔 5 〕 多価アルコールがグリセロール、プロピレングリコール、ブチレングリコール及びソルビットからなる群より選択され、グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸及びヘパラン硫酸からなる群より選択され、並びに界面活性剤がツイン80 (Tween 80) 、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35) 、プルロニックF-68 (Pluronic F-68) 、スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate) 、コール酸ナトリウム (Sodium Cholate) 、ツイン20 (Tween 20) 、トリトンX-100 (Triton X-100) 、ノニデットP-40 (Nonidet P40) 、硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS) 、n-オクチルグルコシド (n-Octylglucoside) 、n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside) 及びジギトニン (Digitonin) からなる群より選択されることを特徴とする、〔 4 〕 記載の製造方法。

〔 6 〕 充填液が、更にアミノ酸及び少糖を含有することを特徴とする、〔 1 〕 ないし〔 5 〕 の何れか一項記載の製造方法。

〔 7 〕 アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸からなる群より選択され、並びに少糖が、マニトール、スクロース、トレハロース、ソルビトール及びエリスリトールからなる群より選択されることを特徴とする、〔 6 〕 記載の製造方法。

〔 8 〕 充填液が、添加剤としてグリセロール、ツイン80、ヒスチジン及びトレハロースを含有することを特徴とする、〔 1 〕 ないし〔 3 〕 の何れか一項記載の製造方法。

〔 9 〕 柔軟化剤の濃度が1～2%及び浸透化剤の濃度が0.01～1%であることを特徴とする、〔 1 〕 ないし〔 8 〕 の何れか一項記載の製造方法。

〔 10 〕 アミノ酸の濃度が2.4～180mM、少糖の濃度が5～40mg/mLであることを特徴とする、〔 6 〕 ないし〔 9 〕 の何れか一項記載の製造方法。

〔 11 〕 生体吸収性シートが、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン及びハイドロゲルからなる群より選択される基材により合成されたものであることを特徴とする、〔 1 〕 ないし〔 10 〕 の何れか一項記載の製造方法。

【 0015 】

〔 12 〕 有効成分としてトロンビン並びに添加剤として柔軟化剤、浸透化剤、アミノ酸及び少糖を含有するトロンビン固定化生体吸収性シート製剤。

〔 13 〕 トロンビンの濃度が、1000～2000単位/mLである、〔 12 〕 記載の製剤。

〔 14 〕 柔軟化剤が多価アルコール又はグリコサミノグリカン、浸透化剤が界面活性剤であることを特徴とする、〔 12 〕 又は〔 13 〕 記載の製剤。

〔 15 〕 多価アルコールがグリセロール、プロピレングリコール、ブチレングリコール及びソルビットからなる群より選択され、グリコサミノグリカンがヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸及びヘパラン硫酸からなる群より選択され、並びに界面活性剤がツイン80 (Tween 80) 、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35) 、プルロニックF-68 (Pluronic F-68) 、スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate) 、コール酸ナトリウム (Sodium Cholate) 、ツイン20 (Tween 20) 、トリトンX-100 (Triton X-100) 、ノニデットP-40 (Nonidet P40) 、硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル) ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS) 、n-オクチルグルコシド (n-Octylglucoside) 、n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside) 及びジギトニン (Digitonin) からなる群より

10

20

30

40

50

選択されることを特徴とする、〔 1 4 〕記載の製剤。

〔 1 6 〕アミノ酸がアルギニン、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸からなる群より選択され、並びに少糖がマンニトール、スクロース、トレハロース、ソルビトール及びエリスリトールからなる群より選択されることを特徴とする、〔 1 2 〕ないし〔 1 5 〕の何れか一項記載の製剤。

〔 1 7 〕添加剤としてグリセロール、ツイン80、ヒスチジン及びトレハロースを含有することを特徴とする、〔 1 2 〕又は〔 1 3 〕記載の製剤。

〔 1 8 〕柔軟化剤の濃度が1~2%、浸透化の濃度剤が0.01~1%、アミノ酸の濃度が2.4~180mM及び少糖の濃度が5~40mg/mLであることを特徴とする、〔 1 2 〕ないし〔 1 7 〕の何れか一項記載の製剤。

10

〔 1 9 〕生体吸収性シートが、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン及びハイドロゲルからなる群より選択される基材により合成されたものであることを特徴とする、〔 1 2 〕ないし〔 1 8 〕の何れか一項記載の製剤。

【 0 0 1 6 】

〔 2 0 〕生体吸収性シート製剤の柔軟化剤としての多価アルコールの使用。

〔 2 1 〕多価アルコールが、グリセロール、プロピレングリコール、ブチレングリコール及びソルビットからなる群より選択されることを特徴とする、〔 2 0 〕記載の使用。

〔 2 2 〕多価アルコールの濃度が1~2%であることを特徴とする、〔 2 0 〕又は〔 2 1 〕記載の使用。

20

〔 2 3 〕生体吸収性シートが、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン及びハイドロゲルからなる群より選択される基材により合成されたものであることを特徴とする、〔 2 0 〕ないし〔 2 2 〕の何れか一項記載の使用。

〔 2 4 〕生体吸収性シート製剤が、トロンビン又はフィブリノゲンを生体吸収性シートに固定化したものであることを特徴とする、〔 2 0 〕ないし〔 2 3 〕の何れか一項記載の使用。

【 0 0 1 7 】

〔 2 5 〕生体吸収性シート製剤における有効成分の浸透化剤としての界面活性剤の使用。

〔 2 6 〕界面活性剤が、ツイン80 (Tween 80)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35)、プルロニック F-68 (Pluronic F-68)、スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate)、コール酸ナトリウム (Sodium Cholate)、ツイン20 (Tween 20)、トリトン X-100 (Triton X-100)、ノニデットP-40 (Nonidet P40)、硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS)、n-オクチルグルコシド (n-Octylglucoside)、n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside) 及びジギトニン (Digitonin) からなる群より選択されることを特徴とする、〔 2 5 〕記載の使用。

30

〔 2 7 〕界面活性剤の濃度が0.01~1%であることを特徴とする、〔 2 5 〕又は〔 2 6 〕記載の使用。

〔 2 8 〕生体吸収性シートが、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン及びハイドロゲルからなる群より選択される基材により合成されたものであることを特徴とする、〔 2 5 〕ないし〔 2 7 〕の何れか一項記載の使用。

40

〔 2 9 〕生体吸収性シート製剤が、トロンビン又はフィブリノゲンを生体吸収性シートに固定化したものであることを特徴とする、〔 2 5 〕ないし〔 2 8 〕の何れか一項記載の使用。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 8 】

本発明に従えば、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤及びその製造方法が提供される。本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、例えば、グリセロール、ツイン80、トレハロース及び少量のヒスチジンを含有するトロンビン溶液に、ポリグリコール酸

50

からなる生体吸収性シートを浸漬させ、凍結乾燥させることにより製造される。グリセロールを含有させることにより、トロンビン成分が生体吸収性シートから脱落するのを阻止し、且つトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性を付与することができる。また、ツイン80を含有させることにより、トロンビンの生体吸収性シートへの浸透性を上げることができ、トロンビンの固定化が容易になる。更に、トレハロースと少量のヒスチジンを含有させることにより、乾燥製剤としたときにトロンビンの活性を十分に維持することができる。したがって、本発明は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造を容易にする。また、本発明の製造方法により製剤化されたトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、トロンビンの安定性と生体吸収性シート製剤として必要な柔軟性を有する。

【0019】

10

また、本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、トロンビンが極めて迅速に液中に溶出するので、トロンビン固定化シートが液状のフィブリノゲンや血液と接触すると直ちにトロンビンの酵素活性を発現することができる。すなわち、接着閉鎖面や活動性出血部位において迅速にトロンビンが溶出してフィブリノゲンを基質に酵素活性を発揮し、速やかにフィブリン転換をもたらして効果的な組織接着閉鎖効果、止血効果をもたらすことが期待される。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、グリセロール添加・未添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の形状を示した図面である。

20

【図2】図2は、グリセロール添加・未添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性値を示した図面である。

【図3】図3は、ヒト血清アルブミン添加・未添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性率を示した図面である。

【図4】図4は、種々の少糖添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性率を示した図面である。

【図5】図5は、各濃度のマニトール又はトレハロース添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性率を示した図面である。

30

【図6】図6は、各種アミノ酸添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性率を示した図面である。

【図7】図7は、各濃度のヒスチジン及びトレハロース添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤における、一定期間保存後のトロンビンの残存活性率を示した図面である。No.1：ヒスチジン未添加、No.2：ヒスチジン2.4mM、No.3：ヒスチジン4.8mM、No.4：ヒスチジン9.6mM、No.5：ヒスチジン22.5mM、No.6：ヒスチジン45mM、No.7：ヒスチジン90mM、No.8：ヒスチジン180mM

【図8】図8は、各種界面活性剤添加・未添加トロンビン充填液に浸漬した生体吸収性シートが一定時間に吸収した液重量を示した図面である。No.1：界面活性剤未添加、No.2：ツイン80 (Tween 80)、No.3：ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35)、No.4：プルロニックF-68 (Pluronic F-68)、No.5：スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate)、No.6：コール酸ナトリウム (Sodium Cholate)、No.7：ツイン20 (Tween 20)、No.8：トリトンX-100 (Triton X-100)、No.9：ノニデットP-40 (Nonidet P40)、No.10：硫酸-3- γ -(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS)、No.11：n-オクチルグルコシド (n-Octylglucoside)、No.12：n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside)、No.13：ジギトニン (Digitonin)

40

【図9】図9は、各濃度のツイン80添加・未添加トロンビン充填液に浸漬した生体吸収性シートが、一定時間に吸収した液重量を示した図面である。

50

【図10】図10は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性比較試験方法を示した図面である。

【図11】図11は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性比較試験結果を示した図面である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、トロンビンを固定化した生体吸収性シート製剤の柔軟化剤としての効果を有する多価アルコール、トロンビンの生体吸収性シートへの浸透性を高める界面活性剤、トロンビン成分の安定性を維持させる特定のアミノ酸及び少糖を含有する充填液を用いることによる、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造方法、及び当該方法により取得されたトロンビン固定化生体吸収性シート製剤により特徴付けられる。

10

【0022】

本発明に使用されるトロンビン成分は、一般に試薬として市販されているトロンビン（例えば、Thrombin from human Plasma（Sigma-Aldrich社製 品番T6884など））、低温エタノール分画やクロマトグラフィー操作等により動物の血液から調製される生体由来のトロンビン又は遺伝子組み換え技術により得られる組換えトロンビンの何れを使用しても良い。好ましくは、未知の感染因子や危険因子の混入を排除するために、組換えトロンビンが使用される。遺伝子組換え技術を利用する場合は、止血を行う対象動物から取得したトロンビン遺伝子を使用するのが好ましい。

20

【0023】

トロンビンは、生体ではその前駆体であるプロトロンビンとしてビタミンK依存的に肝細胞で生合成され、細胞膜リン脂質上でFXa-FVa複合体により限定分解（切断は、プロトロンビンのArg320-Ile321及びArg271-Thr272間の2箇所）を受けてトロンビンとなる。トロンビンを遺伝子組換え技術により取得する場合は、一旦プロトロンビンの形で発現させて、これを精製後にエカリン処理しトロンビンに変換することができる。

【0024】

例えば、ヒトプロトロンビン遺伝子は、ヒト肝臓から抽出された全RNA、mRNA又はゲノムDNAを出発材料として、Sambrookらが述べている一般的な遺伝子組換え技術（Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989）に従って調製することができる。今日では、種々のキットが市販されているので、これを使用すれば良い。例えば、RNAの抽出には、TRIzol試薬（インビトロジェン社）、ISOGEN（ニッポンジーン社）、StrataPrep Total RNA Purification Kit（東洋紡）などの試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit（アマシャムバイオサイエンス社）、Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit（東洋紡）、mRNA Separator Kit（クロンテック社）などのキット、cDNAへの変換には、T-Primed First Strand Kit（アマシャムファルマシア社製）、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning（インビトロジェン社）、cDNA Synthesis Kit（宝酒造）、SMART PCR cDNA Synthesis & Library Construction Kits（クロンテック社）、Directionary cDNA Library Construction systems（ノバジェン社）、GeneAmp PCR Gold（アプライドバイオシステムズ社）などが使用される。

30

40

【0025】

こうして得られたヒトトロンビン遺伝子は適当な発現ベクターに挿入され、該発現ベクターで宿主、例えば、動物細胞の形質転換が行なわれる。発現ベクターには特段の制約はないが、外来遺伝子に適当なプロモーター等の発現調節領域、終止コドン、ポリA付加シグナル配列、kozack配列、分泌シグナルなどが付加される。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリβアクチンなど、最終的に外来遺伝子が発現するものであれば如何なるものでも良い。好ましくは、ニワトリβ-アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGG（特開平3-168087）が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカー遺伝子として、neo遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシ

50

ン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカー遺伝子が利用できる。

【0026】

本発明で用いる宿主としては、各種ほ乳類由来の培養細胞を広く利用することができ、好適にはチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、ヒト由来293細胞又はトリ由来細胞等が例示される。動物細胞への遺伝子導入方法にも特段の制約はなく、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい(Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))。培養に用いる培地として、その形状から寒天培地、液体培地、その種類からYMM-01、DMEM、RPMI、 α MEMなどが使用されるが、細胞や培養目的、或は培養段階に応じて適宜選択すれば良い。それぞれの培地のプロトコールに従って、血清、アミノ酸、ビタミン、糖、抗生物質、pH調整用緩衝液などを添加したものが使用される。培地のpHは6~8、培養温度は30 ~ 39 の範囲が設定される。培地の量、添加物及び培養時間は、培養スケールに合わせて適宜調節される。

10

【0027】

ヒトプロトロンビン産生細胞は、抗トロンビン抗体を用いた特異反応を利用した検出方法、例えば、ドットプロット、ウェスタンプロット、サンドイッチELISAなどの方法により、クローン化された薬剤耐性細胞の培養液中のヒトプロトロンビンを検出することにより取得することができる。こうして得られたヒトプロトロンビン産生細胞は、無血清培地に順応化させた後、工業生産レベルの大量培養が行なわれる。大量培養の方法としては、フェドバッチ培養、バッチ培養などが一般に用いられるが、何れの方法で行っても良い。

20

【0028】

斯かるプロトロンビン産生細胞からヒトプロトロンビンを精製する際には、一般的に、蛋白質化学において使用される精製方法、例えば、塩析法、限外ろ過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマト法、ゲルろ過クロマト法、アフィニティークロマト法、疎水クロマト法、ハイドロキシアパタイトクロマト法などの方法が用いられる。実際には、細胞由来の多種類の夾雑物が混在するため、上記方法の組み合わせにより行われることもある。

【0029】

ヒトプロトロンビンのヒトトロンビンへの変換には、組換えエカリンを用いるのが好ましい。組換えエカリンは、特許公報(WO2003/004641)に記載の方法に従って調製することができる。簡単には、Nishidaらの方法に従って、蛇毒エカリンcDNAを調製し(S. Nishida et. Al., Biochemistry, 34, 1771-1778, 1995)、これを本発明で使用したニワトリ β -アクチンプロモーター系発現プラスミドpCAGGに組み込む。得られた発現ベクターを動物細胞、例えば、CHO細胞に導入し、組換えエカリン産生細胞を得る。組換えエカリンは、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過を行うことにより精製することができる。こうして精製された組換えエカリンをヒトプロトロンビンに作用させ、ヒトトロンビンへの変換が行なわれる。反応条件は、通常の酵素反応と同じ条件が使用される。例えば、ヒトプロトロンビン1000 μ g/mLに終濃度2-8Unit/mLのエカリンを添加し、36-38 で1-4時間反応させることによりヒトプロトロンビンのヒトトロンビンへの変換は完了する。

30

40

【0030】

エカリン処理液からヒトトロンビンを精製するときは、上記の蛋白精製方法に供することにより行われる。好ましくは、ベンズアミジックロマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィーの組み合わせによる精製方法が用いられる。ベンズアミジックロマトグラフィーでは、ヒトトロンビンを、pH7-9、0.3-0.7M NaCl含有緩衝液で平衡化したカラムに吸着させ、同緩衝液で洗浄後、0.1Mのベンズアミジン塩酸塩含有同緩衝液により溶出する。

【0031】

次に、前記のヒトトロンビン溶出液は陽イオン交換クロマトグラフィーに供される。陽

50

イオン交換体としてスルホプロピル基型、カルボキシメチル基型の交換基を有する支持体が開発されているが、適宜選択して使用すれば良い。本発明では、SPトヨパール550C（東ソー）が使用される。ヒトトロンピンは、pH6-7、0.2M NaCl含有10mMクエン酸緩衝液で平衡化したカラムに吸着させ、同緩衝液で洗浄後、0.6M NaCl含有同緩衝液で溶出される。こうして高純度のヒトトロンピンを取得できる。

【0032】

得られたヒトトロンピンの活性単位は、凝固活性、合成基質（S-2238）切断活性で表示される。凝固活性値は、フィブリノゲンが凝固する時間を標準品の検量線と比較して求められる相対値を表したもので、斯かる標準品として、日本薬局方標準品及びWHO国際標準品（NIBSC社）のトロンピンが用いられる。また、S-2338切断活性は、トロンピンとその特異的な基質との反応を利用したもので、合成基質S-2238をトロンピンが切断することで遊離してくるp-ニトロアニリン量をOD405/650の吸光度変化で測定することにより行なわれる。

10

【0033】

こうして得られた組換えヒトトロンピン（以下、単に「トロンピン」と称することもある）は、生体吸収性シートに固定される。当該生体吸収性シートの形体としては、生体吸収性の合成繊維をシート状に加工した織物、織布又は不織布等、ある程度の柔軟性、伸縮性を有するものであれば何れを使用してもよい。生体吸収性の合成繊維は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、カルボキシメチルセルロース、キチン、キトサン、アルギン酸、コラーゲン、ゼラチン及びハイドロゲルからなる群より選択されるが、ポリグリコール酸を基材として編・織成された編・織地をニードルパンチし、不織布化することにより製造されるポリグリコール酸系不織布を用いることが望ましい。

20

【0034】

トロンピンを生体吸収性シートに固定するときの溶液（以下、「トロンピン充填液」と称することもある）には、止血剤の有効成分であるトロンピンの他に、トロンピン自身の活性を維持するための安定化剤、生体吸収性シートに固定化されたトロンピン成分の脱落や飛散を阻止するための柔軟化剤、及びトロンピンの生体吸収性シートへの浸透性を高めるための浸透化剤が添加される。トロンピン充填液中に含まれるトロンピンの量は、一般に止血作用を発揮する濃度範囲、例えば終濃度100～5000単位/mLで使用される。好ましくは、1000～2000単位/mLである。

30

【0035】

トロンピンの活性消失又は低下は、トロンピンを保存する間にこれが凝集してくることに起因する。したがって、トロンピンの安定化剤としては、トロンピンの凝集体形成を抑制することができる物質が使用される。斯かる物質として蛋白、例えば、アルブミン、特定のアミノ酸及び少糖が挙げられる。

【0036】

アミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸、グリシン及びアスパラギン酸が挙げられる。グルタミン酸及びヒスチジンは、安定剤として特に高い効果が見込まれるが、多量に使用するとグルタミン酸は神経毒性が懸念されるため、安全性の点からヒスチジンを使用するのが好ましい。アミノ酸の終濃度としては、2.4～180mMが使用可能である。

40

【0037】

少糖としては、保存期間中においてトロンピンの活性維持に効果を有するものが使用される。斯かる少糖として、スクロース、トレハロース、ソルビトール、エリスリトール及びマニトールが挙げられる。トレハロースは、外科手術時に臓器表面に補うことで、組織の変性を抑制し乾燥性癒着を妨げるとの報告（<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/vmc/achievement/treharose.html>、あるいは<http://www.next21.info/press/images/20050624Treharose.pdf>）があり、安定化剤としての効果だけでなく閉鎖処置面と他臓器の癒着を軽減する効果も期待される。それゆえ、トレハロースを使用するのが好ましい。少糖の終濃度としては、5～40mg/mLが使用可能である。

50

【0038】

アミノ酸と少糖を一緒に使用することにより、それぞれ単独で使用したときに比べて、トロンビンの安定性において相乗効果が得られる。したがって、本発明のトロンビン充填液は、アミノ酸と少糖の両方を含有するものであり、これらの混合比は、上記の使用範囲で適宜調整される。好ましくは、アミノ酸22.5～180mM、少糖30～40mg/mLの濃度が使用される。最も好ましい態様は、ヒスチジン180mM、トレハロース40mg/mLである。

【0039】

柔軟化剤及び浸透化剤としては、トロンビンの活性に影響を与えず、生体吸収性シート製剤の柔軟性を維持できるものであるならば何れも使用できる。

10

【0040】

斯かる柔軟化剤として、多価アルコールやヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸及びヘパラン硫酸などのグリコサミノグリカンが挙げられる。好ましくは、多価アルコールである。多価アルコールとしては、グリセロール、プロピレングリコール、ブチレングリコール及びソルビットが挙げられるが、種々の治療薬やワクチンの安定化剤として実績のあるグリセロールを使用するのが好ましい。柔軟化剤の終濃度は、1～2%の範囲で使用できる。

【0041】

浸透化剤としては、ツイン80 (Tween 80)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35)、プルロニックF-68 (Pluronic F-68)、スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate)、コール酸ナトリウム (Sodium Cholate)、ツイン20 (Tween 20)、トリトンX-100 (Triton X-100)、ノニデットP-40 (Nonidet P40)、硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS)、n-オクチルグルコシド (n-Octyl glucoside)、n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside) 及びジギトニン (Digitonin) などの界面活性剤が使用される。好ましくは、ツイン80である。浸透化剤の濃度は、0.01～1%の範囲で使用できるが、好ましくは、0.01～0.1%である。本発明の柔軟化剤や浸透化剤は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤に限らず、他の止血成分蛋白、例えば、フィブリノゲンを固定化した生体吸収性シート製剤を製造する際にも有効に使用できる。

20

【0042】

トロンビン充填液の調製に使用される緩衝液としては、磷酸緩衝液、Tris緩衝液、クエン酸緩衝液などが使用され、そのpH範囲は6.0～8.0である。必要に応じて適当量の他の添加剤、例えば、塩化カルシウム、塩化ナトリウムなどの塩やスクロースやマニトールなどの賦形剤を添加しても良い。

30

【0043】

本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、例えば、適当な容器に装填したポリグリコール酸からなる生体吸収性シートにトロンビン充填液を滴下するか又はトロンビン充填液を注いだ容器に当該生体吸収性シートを浸漬し、-80℃で凍結後、乾燥させることにより取得できる。あるいは、トロンビン充填液が充填された生体吸収性シートを自然乾燥させても良い。トロンビン充填液に浸透化剤を包含させることで、トロンビンの当該生体吸収性シートへの浸透性を高めることができる。また、乾燥により水分が除去される過程でトロンビンは安定化剤及び柔軟化剤に包含された状態で生体吸収性シートの繊維上に安定に固定される。得られたトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、ポリエチレン-アルミニウム2層フィルム袋に乾燥剤と共に入れて密封包装することにより、室温(22～25℃)で保存される。

40

【0044】

こうして得られたトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の評価は、生体吸収性シート上に固定化されたトロンビンの保持率、成型後のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性及びトロンビンの安定性等を調べることにより行われる。

【0045】

トロンビンの生体吸収性シート上の保持率は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤

50

を生理食塩水や適当な緩衝液に浸漬して振盪することにより溶出されたトロンビンの活性と充填時の活性とを比較することにより算出される。トロンビン活性の測定には、前述の凝固活性や合成基質切断活性が用いられる。本発明に従えば、80%以上の保持率を有するトロンビン固定化生体吸収性シート製剤を取得できる。

【0046】

本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性は、以下のようにして評価される。すなわち、トロンビン固定化生体吸収性シートを適当な大きさにカットし、一辺を台座に固定した後、台座から水平方向に突出した部分に、約55mg/mLに調製したフィブリノゲン液を滴下する。フィブリノゲン液は生体吸収性シート上に固定されたトロンビンの作用により直ちにフィブリンに転換され、シートはその重力によって垂直方向に垂れ下がる。突出部分の先端が水平水準線からどの程度垂れ下がったかを計測することにより、柔軟性が評価される。

10

【0047】

トロンビンの安定性は、長期保存後のトロンビンの残存酵素活性やトロンビン分子の凝集や分解の程度を見ることにより評価される。残存酵素活性は、上記のトロンビンの保持率と同じ要領で酵素活性を測定することにより行われる。また、トロンビン分子の凝集や分解の程度を調べるときは、シートから溶出したトロンビン分子の一部をSDS-PAGEやサイズ排除高速液体クロマトグラフィーにかけることにより行われる。

【0048】

本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、創傷部位や止血部位に貼ることにより組織の接着剤として使用され得るものであり、出血の程度に応じて、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤を単独に適用する方法と、フィブリン糊製剤の一成分であるフィブリノゲンと同時に適用する方法を取り得る。

20

【0049】

消化器外科領域において、肝臓や脾臓の部分切離や部分破裂等の損傷時に発生する湧出性出血については、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤を患部面に単独で適用し3~5分間圧迫することで止血することができる。一方、フィブリン糊製剤の一成分であるフィブリノゲンと同時に適用すると、閉鎖効果や止血効果が増強される。例えば、呼吸器外科領域においては、肺の膨張・収縮圧が発生する肺胸膜剥離面、肺葉実質切離面、あるいは気管支断端部からの気漏部分も効果的に閉鎖することができる。また、子宮や胎盤周辺の湧出性出血においては、血管が多く張り巡らされており切開や切除にともなう出血のリスクが高いため、出血点が不明瞭となり止血処理が極めて困難となるが、本発明では一回の処置で一定面積を同時に閉鎖することを可能とする。

30

【0050】

最も効果が発揮されるのは、高い血圧がかかる動脈の損傷部位や人工血管との縫合処置からの噴出性出血に適用する場合であり、十分量のフィブリノゲンを適用部分に保持させつつ、迅速かつ強固なフィブリンを形成することで止血を可能とする。

以上のように、空気圧や血圧にも耐え得る接着・閉鎖効果は、本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤が柔軟性に富み、組織の凹凸に追従することで密着性が高まること、速やかにトロンビンが溶出しフィブリノゲンをフィブリンへ転換されることにより得られる。

40

【0051】

以下、実施例に従い、本発明を更に詳細に説明するが、下記の実施例に何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0052】

<実施例1：グリセロール添加による凍結乾燥粉体の過剰形成の抑制>

終濃度1%又は1.5%又は2%グリセロール、1875単位/mLトロンビン、10mg/mLヒト血清アルブミン、40mM塩化カルシウム、5mg/mLマニトール及び0.1%ツイン80を含むトロンビン充填液(pH6.0)を、生体吸収性シート(ポリグリコール酸系生体吸収性合成不織布、製品

50

名：ネオパール/グンゼ（株））を敷いた容器に厚さ1mmとなるように注ぎ、-80℃で2時間凍結後、真空乾燥させ、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤を調製した。これを、グリセロールを含まない上記トロンビン充填液で同様に調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤と比較した。

【0053】

図1に示すように、グリセロールの添加により、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤において凍結乾燥粉体の過剰形成が抑制された。

【0054】

<実施例2：グリセロール添加によるトロンビンの安定性への影響>

実施例1で得た1%グリセロール添加及び未添加トロンビン固定化生体吸収性シート製剤を、それぞれ容器のままポリエチレン・アルミニウム2層フィルム袋に乾燥剤と共に入れて密封包装し、室温（22～25℃）にて保存した。保存1、2、3、8週目に検体を開封し、容器からトロンビン固定化シート製剤を剥離して2cm×2cm（4cm²）にカットして生理食塩水1.0mLに浸漬後、十分に混和してトロンビンを溶出し、そのトロンビン溶出液について日本薬局方「トロンビン定量法」に従って凝固活性を調べた。以下、「トロンビン定量法」について簡単に説明する。

【0055】

まず、フィブリノゲン溶液とトロンビン溶液を混合して得られるフィブリンを含有する溶液の吸光度（450nm）が0.3に到達するまでの時間を凝固時間とした。トロンビン自家標準物質を用いて作製した標準溶液（4種の単位）と一定濃度のフィブリノゲン溶液を混合させ、凝固時間を測定した。トロンビンの活性単位を横軸、凝固時間を縦軸に設定して、活性単位と凝固時間の関係を示す標準直線を作成した。上記トロンビン溶出液に対して、同様に凝固時間を測定し、この標準直線を用いてトロンビン活性単位を求め、シート面積当たりの残存トロンビン活性単位（U/cm²）を求めた。図2の通り、グリセロール添加・未添加検体において、保存期間を横軸、保存前に対する保存後のトロンビン溶出液の凝固活性値（U/cm²）を縦軸に設定し、残存トロンビン活性値を示した。

【0056】

グリセロール添加検体と未添加検体を比較した結果、グリセロールの添加によりトロンビン活性を低下させることはなかった。

【0057】

<実施例3：ヒト血清アルブミン添加によるトロンビンの安定性への影響>

実施例1で得た1%グリセロール添加トロンビン充填液及び該トロンビン充填液からアルブミンを除いた2種類のトロンビン充填液を用いて、実施例1及び実施例2の記載に従ってトロンビン固定化生体吸収性シート製剤を作製・密封包装して37℃にて保存した。

【0058】

保存1、2週目に検体を開封して、トロンビン溶出液を取得し、保存前の溶出液に対して維持されている残存トロンビン活性を測定し、グラフ化して図3に示した。その結果、ヒト血清アルブミン添加検体は、保存2週間後に保存前の80%の活性を維持していたが、未添加の検体は20%まで活性が低下した。

【0059】

<実施例4：少糖添加によるトロンビンの安定性への影響>

表1の組成からなるトロンビン充填液を用いて、実施例1及び実施例2の記載に従って、トロンビン固定化生体吸収性シート検体を調製・密封包装し、65℃にて保存した。表1の少糖としてスクロース、トレハロース、ソルビトール、エリスリトール、ラクトース及び対照として従来組成として報告のあるマニトールを用いた。保存8日後に検体を開封して、トロンビン溶出液を取得し、保存前の溶出液に対して維持されている残存トロンビン活性を測定し、グラフ化して図4に示した。

【0060】

その結果、スクロース、トレハロース、ソルビトールが、マニトールと同等のトロンビンの安定化効果を示すことが確認された。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

	トロンビン充填液
トロンビン	1000単位/mL
少糖	10mg/mL
グリセロール	1%
ヒト血清アルブミン	10mg/mL
ツイン80	0.1%
クエン酸緩衝液	50mM, pH6.0

10

【 0 0 6 2 】

< 実施例 5：トロンビンの安定性に与える少糖濃度の影響 >

5、8、10、15若しくは30mg/mLのいずれかの濃度で少糖を含有する表 2 の組成からなるトロンビン充填液を用いて、実施例 1 及び実施例 2 の記載に従ってトロンビン固定化生体吸収性シート製剤を調製・密封包装し、65℃にて保存した。保存3日後に開封してトロンビン溶出液を回収し、残存トロンビン活性を測定した。表 2 の少糖としては、マニトール及びトレハロースを用いた。図 5 のグラフに示す通り、8 mg/mL以上の高濃度添加条件では、マニトールに比べてトレハロースの方が活性維持効果に優れることを確認した。

【 0 0 6 3 】

【表 2】

	トロンビン充填液
トロンビン	1875単位/mL
少糖	5、8、10、15、30mg/mL
グリセロール	1%
ヒト血清アルブミン	10mg/mL
ツイン80	0.1%
クエン酸緩衝液	50mM, pH6.0

20

【 0 0 6 4 】

< 実施例 6：アミノ酸添加によるトロンビンの安定性への影響 >

表 3 の組成からなるトロンビン充填液を用いて、実施例 1 及び実施例 2 の記載に従って、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤を調製・密封包装し、65℃にて保存した。表 3 のアミノ酸として、単純アミノ酸であるグリシン、酸性アミノ酸であるグルタミン酸、アスパラギン酸、塩基性アミノ酸であるアルギニン、ヒスチジン、リジンを用いた。対照として、アミノ酸未添加トロンビン充填液及びアミノ酸の代わりにヒト血清アルブミンを含有するトロンビン充填液を使用した。

【 0 0 6 5 】

保存8日後に開封してトロンビン溶出液を回収してトロンビン活性測定を行い、保存前の溶出液の活性値に対する残存活性を測定した。

40

【 0 0 6 6 】

図 6 のグラフに示す通り、アミノ酸未添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤に比べ、アミノ酸添加群においては、いずれもトロンビン活性維持効果が確認された。グルタミン酸、ヒスチジン又はリジンを添加した群は、ヒト血清アルブミン添加トロンビン充填液で調製したトロンビン固定化生体吸収性シート製剤よりも高い安定化効果を示した。

【 0 0 6 7 】

【表 3】

	アミノ酸添加群	対照 1 (アミノ酸未添加)	対照 2 (アルブミン含有)
トロンビン	1000単位/mL	1000単位/mL	1000単位/mL
アミノ酸	100mM	—	—
少糖 (トレハロース)	30mg/mL	30mg/mL	10mg/mL
グリセロール	1%	1%	1%
ヒト血清アルブミン	—	—	10mg/mL
塩化カルシウム	20mM	20mM	—
ツイン80	0.1%	0.1%	0.1%
クエン酸緩衝液	50mM, pH6.0	50mM, pH6.0	50mM, pH6.0

10

【0068】

<実施例 7：ヒスチジン及びトレハロースの至適配合比の検討>

表 3 のアミノ酸添加群組成からなるトロンビン充填液において、アミノ酸としてヒスチジン、少糖としてトレハロースを表 4 に記載の濃度で含有するトロンビン充填液を用いて、実施例 1 及び実施例 2 の記載に従って、トロンビン固定化生体吸収性シート検体を調製し、密封包装して 65℃ に保存した。トロンビン充填液のうち、ヒスチジン添加充填液については、クエン酸緩衝液を添加しなかった。保存 8 日後に開封してトロンビン溶出液を回収してトロンビン活性測定を行い、保存後の残存活性を測定した。

20

【0069】

その結果、図 7 に示すように、トレハロースを 5～40mg/mL、あるいはヒスチジンを 2.4～90mM でそれぞれ単独に添加した場合には残存活性は 0.8～2.4% にとどまったが、トレハロースとヒスチジンを同時に添加した場合には、配合濃度によってそれぞれ単独添加した時と比べてトロンビン残存活性が向上した。

【0070】

例えば、トレハロースが 5mg/mL の場合、ヒスチジンを 90～180mM で配合することで残存活性は 5.6%～23.1% へ向上し、トレハロースが 15mg/mL の場合、ヒスチジンを 22.5～180mM で配合することで 6.6%～36.4% へ向上した。同様にトレハロースが 30mg/mL、40mg/mL の場合、ヒスチジンを 2.4～180mM で配合することで残存活性は 21.4%～62.0% へ向上した。

30

【0071】

ヒスチジンの添加効果はトレハロースが高濃度の場合に顕著で、トレハロースが 30～40mg/mL の場合、ヒスチジンを 2.4mM と少量の濃度で添加しても相乗効果が認められ、特にヒスチジン 22.5～180mM の配合比で添加した場合に相乗効果が高く、トロンビン残存活性は 35% 以上に向上した。

【0072】

【表 4】

トロンビン 活性残存率 (%)		トレハロースの配合濃度				
		0mg/mL	5mg/mL	15mg/mL	30mg/mL	40mg/mL
ヒスチジンの配合濃度	0mM	1.0	0.8	1.2	1.2	1.6
	2.4mM	—	—	—	21.4	25.3
	4.8mM	—	—	—	22.7	32.3
	9.6mM	—	—	—	25.6	34.9
	22.5mM	1.3	1.6	6.6	42.7	43.6
	45mM	1.0	1.7	11.8	36.5	38.5
	90mM	2.4	5.6	20.2	46.4	48.3
	180mM	19.7	23.1	36.4	55.2	62.0

10

【0073】

<実施例 8：界面活性剤添加によるトロンビン充填液のシートへの浸透効果>

表 5 の組成からなるトロンビン充填液に、実施例 1 の生体吸収性シートを 15 秒間浸漬し、浸漬する前後で増えたシートの重さを測定した。表 5 の界面活性剤には、ツイン 80 (Tween 80)、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35)、プルロニック F-68 (Pluronic F-68)、スクロースモノラウレート (Sucrose monolaurate)、コール酸ナトリウム (Sodium Cholate)、ツイン 20 (Tween 20)、トリトン X-100 (Triton X-100)、ノニデット P-40 (Nonidet P40)、硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン (CHAPS)、n-オクチルグルコシド (n-Octylglucoside)、n-ドデシルマルトシド (n-Dodecylmaltoside)、ジギトニン (Digitonin) を用いた。

20

【0074】

図 8 に示すように、各種界面活性剤の添加により、生体吸収性シートに対するトロンビン充填液の浸透性が向上した。

【0075】

【表 5】

	トロンビン充填液	対照
トロンビン	1000単位/mL	1000単位/mL
アミノ酸 (ヒスチジン)	180mM	180mM
少糖 (トレハロース)	30mg/mL	30mg/mL
グリセロール	1%	1%
塩化カルシウム	20mM	20mM
界面活性剤	0.1%	未添加

30

【0076】

<実施例 9：ツイン 80 の至適濃度の検討>

40

表 5 の組成からなり、界面活性剤として種々の濃度のツイン 80 を含有するトロンビン充填液に、実施例 1 に記載の生体吸収性シートを 15 秒間浸漬させ、浸漬する前後で増えたシートの重さを測定した。ツイン 80 の濃度は、終濃度 0.0001、0.001、0.01、0.1 及び 1% を使用した。対照として表 5 に記載の界面活性剤未添加トロンビン充填液を使用した。

【0077】

図 9 に示すように、0.01～1% ツイン 80 の添加により、本シートにおけるトロンビン充填液の浸透性が格段に向上することが確認された。

【0078】

<実施例 10：トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性評価試験>

表 6 の組成からなるトロンビン充填液を用いて、実施例 1 に記載の方法で調製したトロン

50

ンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性を評価した。図 10 に示すように、本発明のシート (2cm×3cm) の一部 (2cm×1cm) を台座に固定し、台座から水平方向に突出させた残りのシート部分 (2cm×2cm) に、フィブリノゲン溶液 55mg/mL を滴下し、突出部分の先端が水平水準線から垂れ下がった距離及び角度を測定することで、柔軟性を評価した。対照として、フィブリン接着剤の成分が固定化されたコラーゲンシート (製品名: タココンブ/CSLベーリング (株)) を用いた。対照のコラーゲンシート製剤は、フィブリノゲンが予め乾燥固定化されているため、滴下する液体は生理食塩水を用い、接着面を上にした状態で試験した。測定は、溶液を滴下してから 5 分間静置後に行い、3 回実施したところでそれぞれの平均値を標準偏差とともにグラフ化し、図 11 に示した。

【0079】

10

その結果、比較対照であるコラーゲンシート製剤の垂下り距離は、生理食塩水 0.1mL を滴下した時点で 5mm に満たなかったが、本発明のシートでは、フィブリノゲン液を滴下する以前から自らの重みで垂れ下がるほどに柔軟であり、フィブリノゲン液 0.1mL を滴下すると約 20mm の距離を示した。また、フィブリノゲン液 0.3mL を滴下すると、大きく垂れ下がり測定できなかった。

【0080】

【表 6】

	トロンビン充填液
トロンビン	1875単位/mL
アミノ酸 (ヒスチジン)	180mM
少糖 (トレハロース)	30mg/mL
グリセロール	1%
塩化カルシウム	20mM
界面活性剤 (ツイン 80)	0.1%
クエン酸緩衝液	50mM, pH6.0

20

【産業上の利用可能性】

【0081】

本発明に従えば、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤及びその製造方法が提供される。本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、例えば、グリセロール、ツイン 80、トレハロース及び少量のヒスチジンを含有するトロンビン溶液に、ポリグリコール酸からなる生体吸収性シートを浸漬させ、凍結乾燥させることにより製造される。グリセロールを含有させることにより、トロンビン成分が生体吸収性シートから脱落するのを阻止し、且つトロンビン固定化生体吸収性シート製剤の柔軟性を付与することができる。また、ツイン 80 を含有させることにより、トロンビンの生体吸収性シートへの浸透性を上げることができ、トロンビンの固定化が容易になる。更に、トレハロースと少量のヒスチジンを含有させることにより、乾燥製剤としたときにトロンビンの活性を十分に維持することができる。したがって、本発明は、トロンビン固定化生体吸収性シート製剤の製造を容易にする。また、本発明の製造方法により製剤化されたトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、トロンビンの安定性と生体吸収性シート製剤として必要な柔軟性を有する。

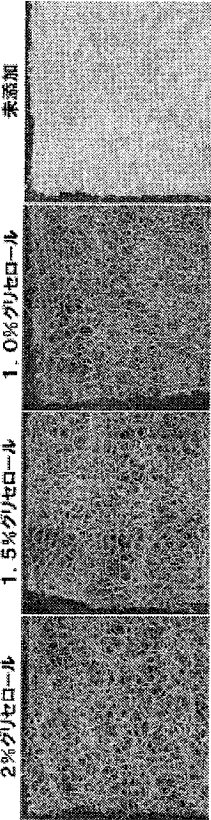
30

40

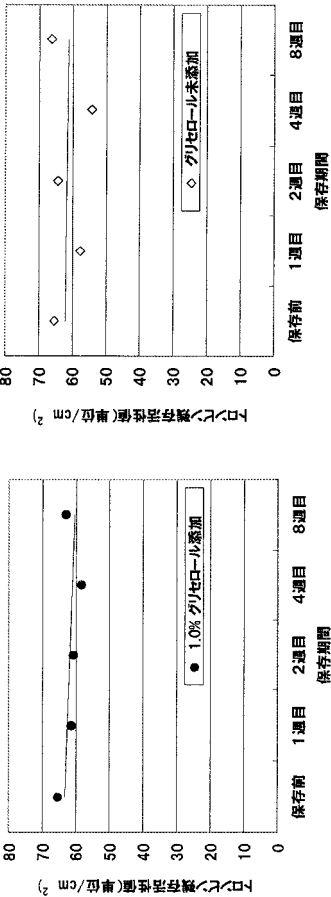
【0082】

また、本発明のトロンビン固定化生体吸収性シート製剤は、トロンビンが極めて迅速に液中に溶出するので、トロンビン固定化シートが液状のフィブリノゲンや血液と接触すると直ちにトロンビンの酵素活性を発現することができる。すなわち、接着閉鎖面や活動性出血部位において迅速にトロンビンが溶出してフィブリノゲンを基質に酵素活性を発揮し、速やかにフィブリン転換をもたらして効果的な組織接着閉鎖効果、止血効果をもたらすことが期待される。

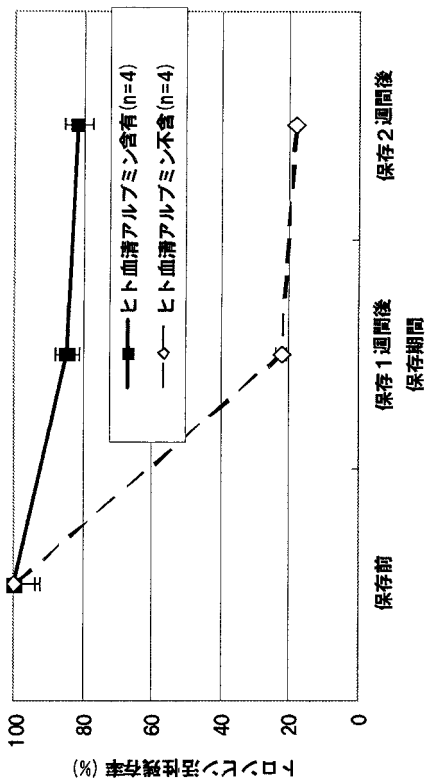
【図 1】



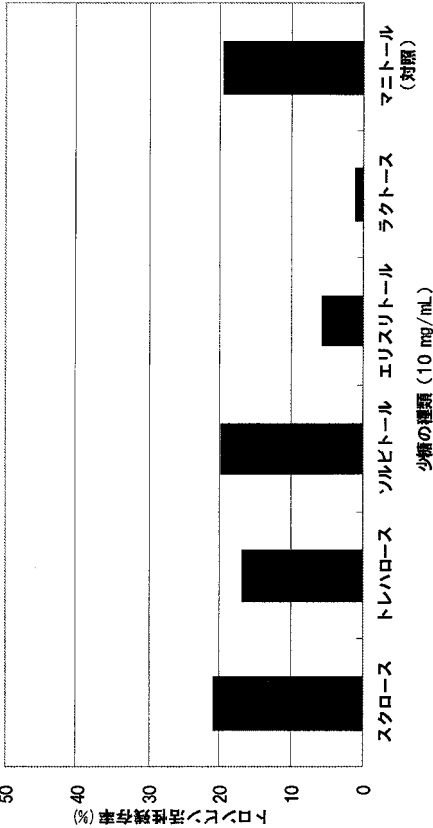
【図 2】



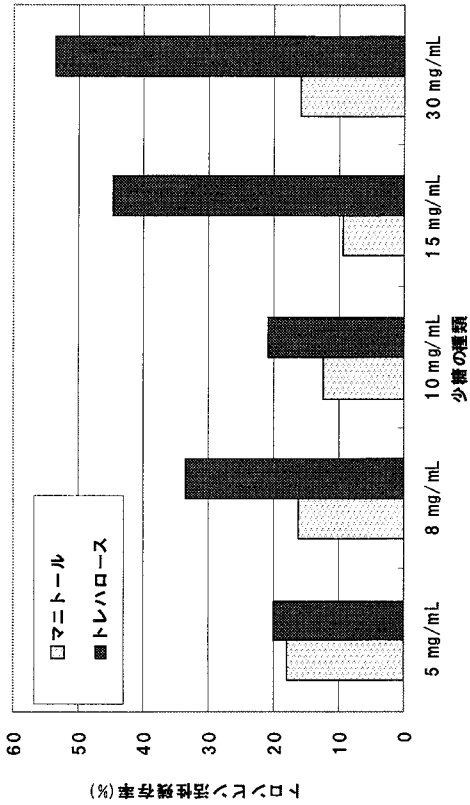
【図 3】



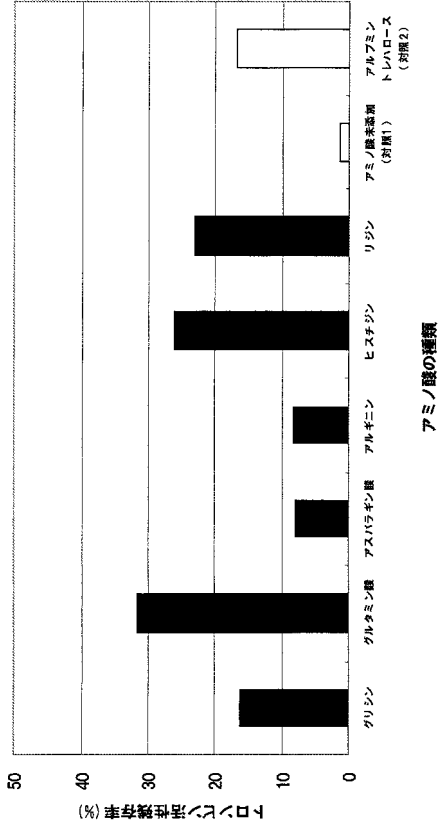
【図 4】



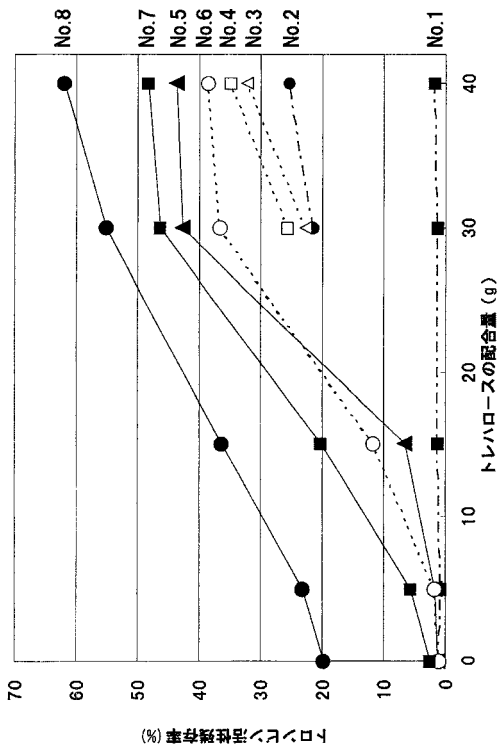
【図 5】



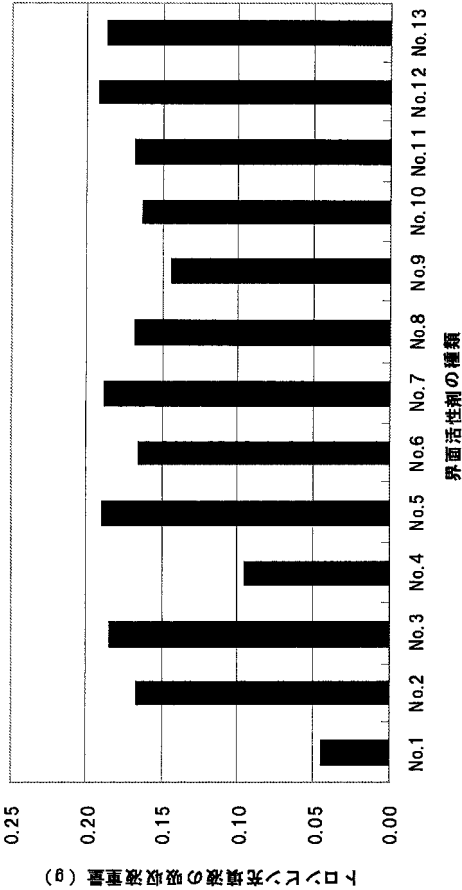
【図 6】



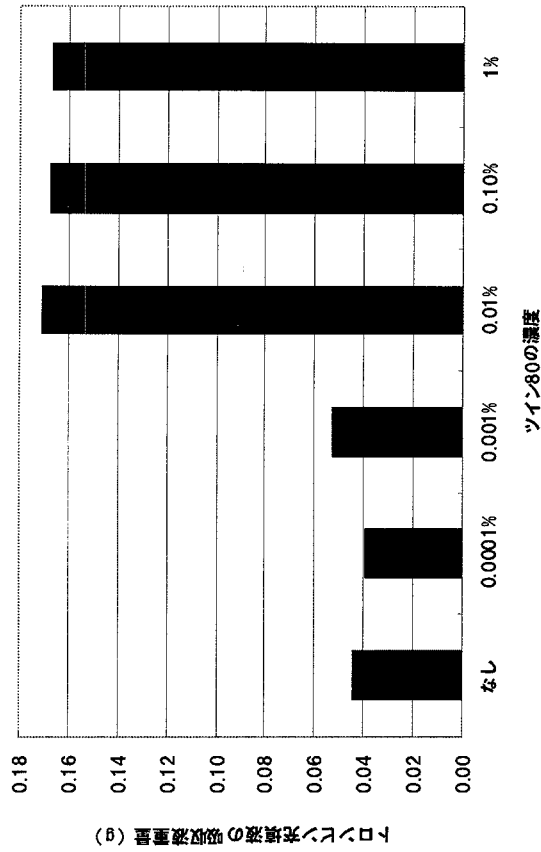
【図 7】



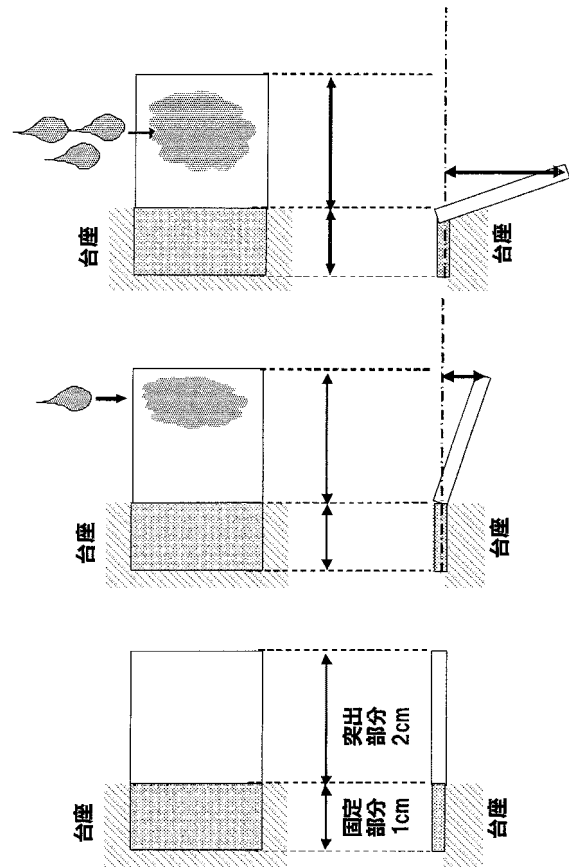
【図 8】



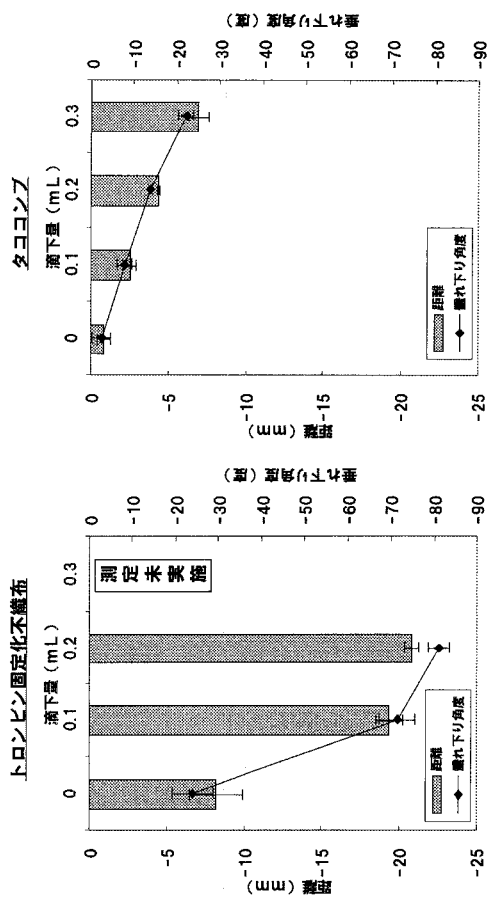
【図 9】



【図 10】



【図 11】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 7/04 (2006.01) A 6 1 P 7/04
A 6 1 P 17/02 (2006.01) A 6 1 P 17/02

(72)発明者 川村 亮一
熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
(72)発明者 今村 隆幸
熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内
(72)発明者 尾脇 瞳
熊本県菊池市旭志川辺 1 3 1 4 番地 1 一般財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所内

審査官 澤田 浩平

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 3 4 3 3 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 4 / 0 4 3 5 0 3 (W O , A 1)
特開 2 0 0 7 - 2 4 6 4 1 9 (J P , A)
特表平 0 1 - 5 0 1 6 2 1 (J P , A)
特表 2 0 0 4 - 5 1 2 3 1 4 (J P , A)
特開平 0 2 - 0 5 3 7 3 2 (J P , A)
特開平 0 7 - 1 6 5 6 0 4 (J P , A)
特表 2 0 0 8 - 5 0 3 2 4 0 (J P , A)
特表 2 0 0 5 - 5 3 2 0 7 3 (J P , A)
特表 2 0 0 3 - 5 1 5 5 5 6 (J P , A)
特表 2 0 0 8 - 5 3 6 9 3 7 (J P , A)
特表平 1 1 - 5 1 3 9 8 3 (J P , A)
特開昭 6 2 - 1 0 6 0 2 8 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2 ,
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8 ,
A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8 ,
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

J S T P l u s (J D r e a m 3) ,
J M E D P l u s (J D r e a m 3) ,
J S T 7 5 8 0 (J D r e a m 3)