

(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
2024年9月26日(26.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/195261 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 31/14 (2006.01) A61L 31/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2024/000678
- (22) 国際出願日: 2024年1月12日(12.01.2024)
- (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 2023-043384 2023年3月17日(17.03.2023) JP
- (71) 出願人: 株式会社チャーリーラボ(CHARLIE LAB INC.) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番地1 熊本大学インキュベーションラボラトリー308 Kumamoto (JP). 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP];

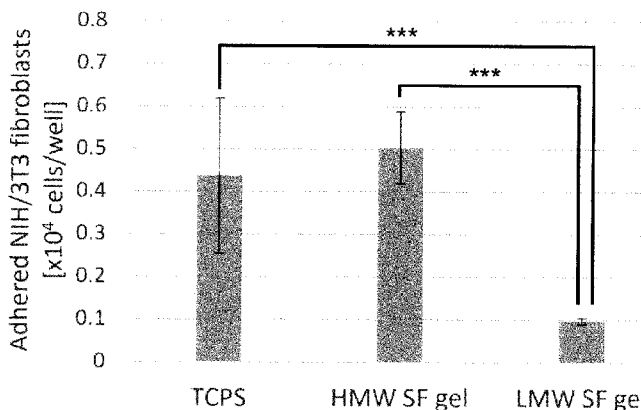
〒3058517 茨城県つくば市観音台三丁目1番地1 Ibaraki (JP). 学校法人藤田学園(FUJITA ACADEMY) [JP/JP]; 〒4701192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 Aichi (JP). 株式会社あつまるホールディングス(ATSUMARU HOLDINGS INC.) [JP/JP]; 〒8600012 熊本県熊本市中央区紺屋今町14番地 求人案内本社ビル Kumamoto (JP).

- (72) 発明者: 神戸 裕介(KAMBE, Yusuke); 〒3058634 茨城県つくば市大わし1番2 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門内 Ibaraki (JP). 河野 友祐(KAWANO, Yusuke); 〒4701192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 学校法人藤田学園 藤田医科大学内 Aichi (JP). 佐々木 誠(SASAKI, Makoto); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番地1 熊本大学インキュベシ

(54) Title: SILK FIBROIN GEL FOR ADHESION PREVENTION MATERIAL, METHOD FOR PRODUCING SAME, ADHESION PREVENTION MATERIAL, AND ADHESION PREVENTION METHOD

(54) 発明の名称: 癒着防止材用のシルクフィブロインゲルおよびその製造方法、癒着防止材、ならびに癒着防止方法

[図2]



(57) Abstract: Provided is a silk fibroin gel for an adhesion prevention material having the properties of low adhesion and proliferation promotion of fibroblasts, and low adsorption of serum proteins. The silk fibroin gel is for an adhesion prevention material and contains silk fibroin with a weight average molecular weight of 150 kDa or less. For example, the molecular weight distribution (PDI) of the silk fibroin in the silk fibroin gel may be 1-10. In addition, the water retention (mg) per unit weight (mg) of the silk fibroin may be 10 mg or more.

[続葉有]

ヨシノラボラトリー 308 株式会社チャーリー
ラボ 研究開発部内 Kumamoto (JP). 瀧上 博貴
(**FUCHIGAMI, Hiroki**); 〒8610602 熊本県山鹿
市鹿北町芋生 4041 株式会社あつまるホール
ディングス NSP 山鹿工場内 Kumamoto (JP).
亀田 恒徳(**KAMEDA, Tsunenori**); 〒3058634 茨
城県つくば市大わし 1 番 2 国立研究開発
法人農業・食品産業技術総合研究機構 生
物機能利用研究部門内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人イノベントリア
(**INNOVENTIER IP ATTORNEYS**); 〒5300001
大阪府大阪市北区梅田 2-4-9 ブリ
ーゼタワー 12 階 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG,
KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS,
MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS,
IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約: 線維芽細胞の接着性および増殖促進性が低く、かつ、血清タンパク質の吸着性が低い性質を有している、癒着防止材用のシルクフィブロインゲルを提供する。前記シルクフィブロインゲルは、癒着防止材用のシルクフィブロインゲルであって、重量平均分子量が150kDa以下のシルクフィブロインを含有する。例えば、前記シルクフィブロインゲルは、前記シルクフィブロインの分子量分布(PDI)が1~10であってもよい。また、前記シルクフィブロインの単位重量(mg)当たりの保水量(mg)が10mg以上であってもよい。

明 細 書

発明の名称：

癒着防止材用のシルクフィブロインゲルおよびその製造方法、癒着防止材、ならびに癒着防止方法

関連出願

[0001] 本願は、日本国で2023年3月17日に出願した特願2023-043384の優先権を主張するものであり、その全体を参照により本出願の一部をなすものとして引用する。

技術分野

[0002] 本発明は、比較的低分子量のシルクフィブロインを含んで構成され、体内に適用する癒着防止材として用いることのできるシルクフィブロインゲルに関する。

背景技術

[0003] 整形外科（腱等）手術、腹部手術、心臓外科手術など、近年の外科手術は目覚ましく進歩してきている。また、昨今の長期生存化により、患者が再手術、再々手術を受けるケースが増加している。しかしながら、以前に行われた手術に起因して、術後の臓器表面と周囲組織の表面との間に癒着等が生じている場合、癒着剥離のために多大な時間や労力を要したり、また剥離時に新たな傷が発生して思わぬ合併症を招いたりする懸念がある。この点を解消するため、人体や動物の体に対して安全に用いることのできる癒着防止材が求められている。

[0004] 一方で、近年、シルクフィブロインは生体親和性に優れているため、生体材料として注目を集めている。例えば、非特許文献1には、シルクフィブロインのアルカリ加水分解時間を10～180分の範囲内で調整することにより、数平均分子量が低分子量化したシルクフィブロインを得ることができる旨が記載されており、その低分子量化したシルクフィブロインを含有するハイドロゲル上で、ヒト間葉系幹細胞を培養した場合には、細胞接着性が低か

ったことが記載されている。

[0005] また、特許文献1には、ポリエチレングリコール（PEG）で表面官能化されたシルクフィブロインマトリックスが開示されており、それによりシルクフィブロインマトリックスの表面でのタンパク質吸着や細胞接着や増殖を改変することが開示されている。

また、特許文献1には、癒着を防止するためには、患部への間葉系幹細胞の接着や増殖を抑制することが重要であることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許第9427499号明細書

非特許文献

[0007] 非特許文献1：H. H. Kim et al., “Polymer”, 2016, vol. 90, pp. 26-33

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 非特許文献1で得ている低分子量化したシルクフィブロインについて、これを含むハイドロゲル上へのヒト間葉系幹細胞の接着性は低いことが記載されているが、癒着防止材を構成する素材については、細胞群分化に関係しているヒト間葉系幹細胞の接着性は重要視されていない。一般に、癒着防止材には、線維芽細胞の接着性が低く、線維芽細胞の増殖促進性が低く、かつ、フィブリノゲンなどの血清タンパク質の吸着性が低い、という特性を有することが求められる。細胞やタンパク質の種類に応じて接着性や増殖促進性がそれぞれ異なることは技術常識であるので、非特許文献1の前記低分子量化したシルクフィブロインハイドロゲルに対して線維芽細胞の接着性・増殖促進性が低いとは限らず、またフィブリノゲンなどの血清タンパク質の吸着性が低いとも限らない。

[0009] さらに、非特許文献1では、シルクフィブロインの数平均分子量を低減することが示されているものの、PDIから算出されるシルクフィブロインの

重量平均分子量は、300前後であり、非特許文献1には重量平均分子量を低減するという技術思想は存在していない。また、非特許文献1で示す程度の低分子量化は、後に示す比較例から明らかなように、線維芽細胞の接着性・増殖促進性の低減、および血清タンパク質の吸着性の低減の観点からは不十分であった。

[0010] また、特許文献1には、シルクフィブロインマトリックスの表面をPEGで改質することによって、間葉系幹細胞および線維芽細胞のそれぞれについて、接着性および増殖促進性を抑制することが記載されているが、接着性や増殖促進性の抑制に寄与しているのはPEGであり、シルクフィibroイン自体の構造による効果を見出しているものではない。

[0011] したがって、本発明の目的は、線維芽細胞の接着性および増殖促進性が低く、かつ、血清タンパク質の吸着性が低い性質を有しており、癒着防止材としての用途に適したシルクフィibroイン材料を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明の発明者らは、上記目的を達成するために鋭意検討した結果、驚くべきことに、物の性質に寄与する重量平均分子量を低減したシルクフィibroインをゲル化させることにより、線維芽細胞の接着性・増殖促進性が低く、しかも、血清タンパク質の吸着性が低く、体内に適用するのに好適な医療用材料を作製できることを見出した。さらに、発明者らは、このようなシルクフィibroインゲルが癒着を低減できることを見出し、本発明を完成した。

[0013] すなわち、本発明は、以下の態様で構成され得る。

〔態様1〕

癒着防止材用のシルクフィibroインゲルであって、重量平均分子量が150kDa以下（好ましくは120kDa以下、より好ましくは100kDa以下、より一層好ましくは80kDa以下）のシルクフィibroインを含有する、シルクフィibroインゲル。

〔態様2〕

態様1に記載のシルクフィibroインゲルであって、前記シルクフィibroイ

ンの分子量分布（PDI）が1～10（好ましくは1.5～8、より好ましくは2～6、より一層好ましくは3～5）である、シルクフィブロインゲル。

〔態様3〕

態様1または2に記載のシルクフィブロインゲルであって、前記シルクフィブロインの単位重量（mg）当たりの保水量（mg）が10mg以上（好ましくは20mg以上、より好ましくは30mg以上、より一層好ましくは40mg以上）である、シルクフィブロインゲル。

〔態様4〕

態様1から3のいずれか一態様に記載のシルクフィブロインゲルを含有する癒着防止材。

〔態様5〕

態様4に記載の癒着防止材であって、外傷による臓器または組織の損傷部位、術後の臓器または組織の離断面、および術後の臓器の周囲組織表面の少なくともいずれかに適用される、癒着防止材。

〔態様6〕

癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、

重量平均分子量が150kDa以下（好ましくは120kDa以下、より好ましくは100kDa以下、より一層好ましくは80kDa以下）のシルクフィブロインをゲル化させる工程を含む、製造方法。

〔態様7〕

態様6に記載の癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、

前記シルクフィブロインを得るために、精練されたシルクフィブロインをアルカリ処理する工程を含み、前記アルカリ処理は、40℃以下（好ましくは0℃～40℃、好ましくは5℃～40℃、より好ましくは10℃～35℃）で、180分を超える時間（好ましくは4時間以上、より好ましくは10時間以上、より一層好ましくは15時間以上）行われる、製造方法。

〔態様 8〕

態様 6 または 7 に記載の癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、

前記アルカリ処理工程の後にアルカリ処理物からアルカリ成分を除去し、脱アルカリ化シルクフィブロインを得る工程と、

前記脱アルカリ化シルクフィブロインをオートクレーブ滅菌する工程と、を含む製造方法。

〔態様 9〕

態様 4 または 5 に記載の癒着防止材を用いた癒着防止方法であって、

前記癒着防止材を、外傷による臓器または組織の損傷部位、術後の臓器または組織の離断面、および術後の臓器の周囲組織表面の少なくともいずれかに適用する工程を含む、癒着防止方法。

なお、本明細書において、「ゲル」とは、半固体状の物質であり、外力や熱が加わることによって可塑性（流動性）が出現するものや、外力が加わらなくても可塑性（流動性）を有するゲル状物を含んでいる。また、「ゲル化」とは、上記ゲルを形成することを意味している。

[0014] 本明細書で使用される場合、単数形、「a」、「an」及び「the」は、内容が明確にそうでないことを示さない限り、「at least one」を含む複数形を含むことを意図している。本明細書で使用される場合、用語「および／または」、「少なくとも 1」、「および「1以上」は、関連する列挙された項目の任意の及び全ての組合せを含む。

[0015] なお、請求の範囲および／または明細書および／または図面に開示された少なくとも 2 つの構成要素のどのような組み合わせも、本発明に含まれる。特に、請求の範囲に記載された請求項の 2 つ以上のどのような組み合わせも本発明に含まれる。

発明の効果

[0016] 本発明に係る癒着防止材用のシルクフィブロインゲルによれば、線維芽細胞の接着性および増殖促進性が低く、血清タンパク質の吸着性が低く、特に i

n vivoでの評価系において癒着を低減できる医療用材料を提供することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0017] この発明は、添付の図面を参考にした以下の好適な実施形態の説明からより明瞭に理解されるであろう。しかしながら、実施形態および図面は単なる図示および説明のためのものであり、この発明の範囲を定めるために利用されるべきでない。この発明の範囲は添付のクレームによって定まる。添付図面において、複数の図面における同一の部品番号は、同一部分を示す。

[0018] [図1]実施例1 (LMW SF gel) 及び比較例1 (HMW SF gel) のシルクフィブロインゲル試料における血清タンパク質 (アルブミン、フィブリノゲン) の吸着性を示すグラフである。

[図2]実施例1 (LMW SF gel) 及び比較例1 (HMW SF gel) のシルクフィブロインゲル試料、並びに比較対象としての組織培養ポリスチレン (TCPS) に、それぞれ線維芽細胞を播種した後、3時間後における、線維芽細胞の接着性を示すグラフである。

[図3]実施例4 (6% LMW SF gel) 及び比較例2 (6% HMW SF gel) のシルクフィブロインゲル試料に、それぞれ線維芽細胞を播種した後、7日目までにおける、線維芽細胞の細胞数の経時変化を示すグラフである。

[図4]ラットのアキレス腱の切断箇所に実施例1のシルクフィブロインゲル試料 (LMW SF gel) およびヒアルロン酸 (Hyaluronic acid) をそれぞれ適用した場合ならびに適用しなかった場合 (Control) において、足関節背屈角度 (Dorsiflexion angle) を示すグラフである。ラットの手術を施さなかった左後肢 (Healthy) と、手術を施してアキレス腱を切った右後肢 (Affected) との間で比較した。

[図5]ラットのアキレス腱を切断する手術の様子を示す写真である。

[図6]ラットの足関節背屈角度 ($90^\circ - \theta$) を得るために角度 θ を測定する

様子を示す写真である。

[図7A]擦過傷を形成したラット回腸に、実施例1のシルクフィブロインゲル試料(LMW SF gel)および生理食塩水(Saline)をそれぞれ適用した場合において、癒着が生じた部分の回腸の長さを示すグラフである。

[図7B]擦過傷を形成したラット回腸に、実施例1のシルクフィブロインゲル試料(LMW SF gel)および生理食塩水(Saline)をそれぞれ適用した場合において、その移植時と評価時(移植後2週間が経った時)でのラットの体重変化を示すグラフである。

[図8A]擦過傷を形成したラット回腸を示す写真である。

[図8B]擦過傷を形成した後に創傷部に癒着防止材を適用したラットの回腸を示す写真である。

[図9A]擦過傷を形成すると共に創傷部に生理食塩水(Saline)を適用した後、2週間が経過した時のラットの回腸を示す写真である。

[図9B]擦過傷を形成すると共に創傷部に実施例1のシルクフィブロインゲル試料(LMW SF gel)を適用した後、2週間が経過した時のラットの回腸を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0019] (シルクフィブロインゲル)

シルクフィブロインゲルは、重量平均分子量(Mw)が150kDa以下のシルクフィブロインを含有している。重量平均分子量がこの特定の範囲内にある場合、線維芽細胞の接着性・増殖促進性および血清タンパク質の吸着性を低減できる。また、シルクフィブロインゲルに含有されるシルクフィブロインの重量平均分子量は、好ましくは120kDa以下であってもよく、より好ましくは100kDa以下であってもよく、より一層好ましくは80kDa以下であってもよい。下限値は特に限定されないが、例えば10kDa以上であってもよい。このシルクフィブロインゲルは、癒着防止材に用いられる。

[0020] シルクフィブロインゲルは、シルクフィブロイン分子鎖間での水素結合等により形成される網目状の構造内に水を保持するハイドロゲルである。本明細書で各種「分子量」は、水素結合等を形成していない状態におけるシルクフィブロイン分子に関する分子量を示す。なお、シルクフィブロインの重量平均分子量は、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0021] シルクフィブロインは、分子が規則正しく並び、主にグリシン、アラニン、セリンを含む結晶性部分と、チロシンなどを含む非晶性部分とで構成され、通常、繊維状タンパク質の一種として知られているものである。シルクフィブロインは、このような構成を有していればその原料は特に限定されず、例えば、後述の絹原料からシルクフィブロインを得ることができる。また、シルクフィブロインは、本発明の効果を阻害しない範囲で、化学的に修飾されていてもよい。本明細書において、単に「シルクフィブロイン」と記載する場合には、その定義には化学修飾されたシルクフィブロインも包含される。ただし、フィルム表面に存在するシルクフィブロインがポリエチレングリコール（PEG）により修飾されていないシルクフィブロインであってもよい。

[0022] 癒着防止材としてシルクフィブロインの特性を発揮する観点から、未修飾シルクフィブロインを含むことが好ましい。本明細書において、未修飾シルクフィブロインとは、シルクフィブロインに官能基や架橋結合等を導入する反応やグラフト化反応が行われておらず、シルクフィブロインを構成するアミノ酸残基の側鎖が化学修飾されていないシルクフィブロインを意味する。

[0023] また、シルクフィブロインは、その数平均分子量（ M_n ）が80 kDa以下であってもよく、好ましくは50 kDa以下であってもよく、より好ましくは30 kDa以下であってもよく、より一層好ましくは20 kDa以下であってもよい。下限値は特に限定されないが、例えば8 kDa以上であってもよい。なお、シルクフィブロインの数平均分子量は、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0024] シルクフィブロインの分子量分布は、1以上10以下であってもよく、好

ましくは1.5以上8以下であってもよく、より好ましくは2以上6以下であってもよく、より一層好ましくは3以上5以下であってもよい。なお、分子量分布は、重量平均分子量（ M_w ）の値を数平均分子量（ M_n ）の値で除することで求められる、多分散度（ PDI ）を示す。

[0025] さらに、シルクフィブロインは、そのピークトップ分子量（ M_p ）が250 kDa以下であってもよく、好ましくは150 kDa以下であってもよく、より好ましくは50 kDa以下であってもよい。下限値は特に限定されないが、例えば20 kDa以上であってもよい。なお、ピークトップ分子量とは、クロマトグラムで検出されたピークトップの位置に相当する分子量を指し、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0026] シルクフィブロインゲルは、熱分解温度が250℃～300℃であってもよく、好ましくは260℃～290℃であってもよく、より好ましくは270℃～280℃であってもよい。シルクフィブロインゲルの熱分解温度が上記範囲内にあると、結晶性がある程度低いため、水を保持できる非晶領域が多く、ゲルの保水量を多くすることができる。熱分解温度は、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0027] シルクフィブロインゲルは、圧縮弾性率が1～200 kPaであってもよく、好ましくは3～160 kPaであってもよく、より好ましくは5～140 kPaであってもよい。圧縮弾性率が上記の範囲内にあると、ゲルの形状を維持し易く、癒着防止材として扱いやすい。シルクフィブロインの圧縮弾性率は、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0028] シルクフィブロインゲルは、乾燥時のシルクフィブロインの単位重量（1 mg）当たりの保水量が10 mg以上であってもよく、好ましくは20 mg以上であってもよく、より好ましくは30 mg以上であってもよく、より一層好ましくは40 mg以上であってもよい。また、上限値は特に限定されないが、例えば、100 mg以下であってもよい。保水量が多過ぎる場合、流動化し過ぎてゲルの形態を保てなくなる虞がある。一方、保水量が少な過ぎる場合、ゲルの硬度が高過ぎて、術後の臓器の離断面や、術後の臓器の周囲

組織表面に沿わせて密着状態で適用することが困難となる虞がある。シルクフィブロインゲルの保水量は、後述の実施例に記載の方法によって測定される値である。

[0029] シルクフィブロインゲルは、シルクフィブロインおよび水以外の成分（例えば着色剤などの添加物）を含有していてもよいが、シルクフィブロインゲルの乾燥重量に対するシルクフィブロインの含有率が90%以上であってもよく、好ましくは95%以上であってもよく、より好ましくは98%以上であってもよく、より一層好ましくは99.9%以上であってもよい。

[0030] 例えば、シルクフィブロインゲルに着色料が含まれる場合、医療従事者が、臓器表面などにおける癒着防止材を適用した領域を目視で確認することが容易になり、有利な場合がある。

[0031] （癒着防止材）

本発明は癒着防止材を包含し、前記癒着防止材はシルクフィブロインゲルを含有している。本明細書において「癒着防止材」とは、手術後の炎症などによって、本来は接合するべきではない臓器表面や組織表面同士が貼り付いてしまう現象である「癒着」を抑制することを目的として、癒着が生じる虞のある、外傷による臓器または組織の損傷部位、術後の臓器または組織の離断面および術後の臓器の周囲組織表面等に適用する生体材料をいう。

[0032] また、本明細書において「癒着防止材」は、整形外科（腱等）手術、腹部手術、心臓外科手術などの様々な手術において、癒着が生じ得るあらゆる臓器や組織の癒着防止のために用いることができる。また、ヒトの手術だけではなく、ペットなどの非ヒト動物の手術においても利用することができる。例えば、非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物が挙げられ、非ヒト哺乳動物としては、例えば類人猿、その他霊長類、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ等が挙げられる。例えば、切断されたアキレス腱、靱帯などの組織の再建途中における周囲組織との癒着防止に用いることもできるし、表面が傷ついた腸や腹膜の癒着防止に用いることもできる。

[0033] 本明細書において「癒着防止」は、癒着の発生を完全に防ぐことだけではなく、癒着の発生を抑制する、換言すれば癒着の程度を少なく抑えることも含む。

[0034] 本明細書において「外傷」とは、外力(機械的、物理的、化学的)により生じた臓器または組織の損傷をいう。

[0035] 本明細書において「臓器」とは、独自の構造をもち、それぞれが特定の機能を有する解剖学的単位である体内器官を意味し、例えば、脳、心臓、食道、胃、膀胱、小腸、大腸、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、子宮などが挙げられる。

[0036] 本明細書において「組織」とは、互いに関連する細胞や細胞の産生物質が合体して一定の機能を成す単位をいい、皮膚、筋肉、腱、骨、関節、靱帯、血管、膵島、角膜などが挙げられる。

[0037] 本明細書において「離断面」とは、外科手術等により臓器や組織の一部を切除又は剥離することによって体内に晒されることとなった表面をいう。

[0038] 一態様において、「癒着防止材」は、ゲルの形状維持に必要な支持体を含んでいてもよい。また、別の一態様において、「癒着防止材」は、実質的にゲルのみからなるものであってもよい。

[0039] また、本明細書において「癒着防止材」は、好ましくは、開腹手術などの外科手術の仕上げ工程で、術後の臓器または組織の離断面および術後の臓器の周囲組織表面等に筆、ブラシ、スプレー、刷毛等によって塗布されるものであってもよく、あるいはシリンジやカテーテルなどの手段によって上記離断面や上記周囲組織表面に投与されるものであってもよい。

あるいは、縫合糸や医療用ステープラを用いて係止するなどの手段によって、術後の臓器または組織の離断面および術後の臓器の周囲組織表面等に、シート状に形成された上記癒着防止材が固定されるものとしてもよい。

[0040] (シルクフィブロインゲルの製造方法)

シルクフィブロインゲルの製造方法には、重量平均分子量が150kDa以下のシルクフィブロインをゲル化させる工程を含む。ゲル化に供するシル

クフィブロインとしては、上述のシルクフィブロインを使用することができる。

[0041] また、このシルクフィブロインゲルの製造方法には、精練されたシルクフィブロインをアルカリ処理する工程が含まれてもよく、当該アルカリ処理は40℃以下で180分を超えて行われてもよい。

シルクフィブロイン原料としては、昆虫（家蚕、野蚕、天蚕等の鱗翅目昆虫、スズメバチやミツバチ等の膜翅目昆虫等の絹糸昆虫）やクモ類が作る繭や生糸等の、フィブロインおよびセリシンを含む絹原料を使用することができる。絹原料を精練することにより、精練された（精練済みの）シルクフィブロインが得られる。また、絹糸腺からシルクフィブロインを得ることもできる。なお、精練は公知の方法で行うことができ、例えば、炭酸ナトリウムや珪酸ナトリウム、燐酸ナトリウム等のアルカリ精練剤を用いてセリシンを膨潤させて取り除く方法や、セリシン分解酵素を用いてセリシンを分解させる方法、セリシンを腐化させて除去する方法など、種々の方法が挙げられる。

[0042] 次に、精練されたシルクフィブロインを、アルカリ処理に供することによって低分子量化することができる。アルカリ処理は、例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物やアンモニア等をアルカリ処理剤として用いることによって行うことができる。アルカリ処理は、シルクフィブロインを溶媒に溶解させた状態で行うことが好ましい。例えば、シルクフィブロインは、臭化リチウムや塩化カルシウム等の中性塩を含む中性塩溶液に溶解させてもよい。アルカリ処理剤を加えるタイミングは、例えば、中性塩溶液と共に混合水溶液を用いてシルクフィブロインを溶解させると共にアルカリ処理剤を加えてアルカリ処理を行ってもよいし、あるいは、中性塩溶液にシルクフィブロインを溶解させた後にアルカリ処理剤を加えてアルカリ処理を行ってもよい。

[0043] アルカリ処理を比較的マイルドな条件で行うことにより、重量平均分子量を効果的に低下させることができる。この時のアルカリ処理の温度は、40

℃以下であってもよく、好ましくは0℃～40℃であってもよく、好ましくは5℃～40℃であってもよく、より好ましくは10℃～35℃であってもよい。また、アルカリ処理を施す時間は、180分を超える時間であり、好ましくは4時間以上であってもよく、より好ましくは10時間以上であってもよく、より一層好ましくは15時間以上であってもよい。アルカリ処理を施す時間の上限は特に限定されないが、例えば、48時間以下であってもよい。アルカリ処理は、攪拌下で行われるのが好ましい。

[0044] アルカリ処理の後には、例えば透析や限外濾過などの公知の方法で、中性塩の除去（脱塩処理）やアルカリ処理剤の除去（脱アルカリ化）を行ってもよい。

また、アルカリ処理および脱アルカリ化の後には、生体材料として使用する観点から、ゲル化させる前に、脱アルカリ化シルクフィブロインを精製（不純物を除去）したり、滅菌処理したりすることが好ましい。滅菌処理に関しては、フィルタ滅菌やオートクレーブ滅菌などの公知の方法を採用することができるが、確実に滅菌できるという点ではオートクレーブ滅菌を行うことが好ましい。

[0045] シルクフィブロイン水溶液、特に好ましくは精製及び／又は滅菌処理後のシルクフィブロイン水溶液に対してゲル化処理を行うことによってシルクフィブロインゲルを得ることができる。ゲル化処理を施すシルクフィブロイン水溶液は、所望のゲルの形態や物性等に応じて濃度を調整してもよく、例えば、シルクフィブロイン水溶液の濃度は、1～10%（w/v）であってもよく、好ましくは2～8%（w/v）であってもよく、より好ましくは3～6（w/v）%であってもよい。

[0046] ゲル化処理としては、公知の種々の方法を用いて行うことができるが、例えば、クエン酸などを添加することによってpHを低く保つことによりゲル化したり、37℃～40℃の温度条件で長時間静置することによりゲル化したり、エタノール等の有機溶媒などを添加することによりゲル化したり、ボルテックス処理を施すことによりゲル化したり、超音波照射処理を施すこと

によりゲル化したり、炭酸ガスを噴射することによりゲル化することができる。これらのゲル化処理は、単独でまたは二種以上組み合わせて行ってもよい。また、これらのゲル化処理後に、さらに室温（例えば、15～30℃）で、所定の時間（例えば、30分～6時間）静置することにより、ゲル化処理を完了させてもよい。

[0047] また、シルクフィブロイン水溶液は、所望の癒着防止材の形態に応じてゲル化させてもよい。例えば、ゲル化前のシルクフィブロイン水溶液をシリンジ内やカテーテル内やスプレー内等に収容して、その後ゲル化させることにより、ヒトや動物の体内の目的の箇所に、シルクフィブロインゲルにより構成される癒着防止材を投与し易くすることができる。あるいは特定形状の平坦な容器（例えば、シャーレ）にシルクフィブロイン水溶液を均一に広げた後にゲル化させることにより、ヒトや動物の体内の目的の領域に固定するためのシート状の癒着防止材（ゲルシート）を得ることができる。ここで、ゲルシートとは、半固体状の物質のシート状物である点で、固体状のフィルムとは区別することができる。

実施例

[0048] 以下、実施例および比較例を示すことで本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例や比較例によっては何ら限定されるものではない。なお、以下の実施例及び比較例においては、下記の方法により各種物性を測定した。

[0049] [シルクフィブロインの分子量]

シルクフィブロイン水溶液の濃度を0.5%（w/v）に調整したものを試料とした。この試料を用いて、以下の測定装置および条件でゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）により測定を行った。シルクフィブロインの重量平均分子量（M_w）、数平均分子量（M_n）、分子量分布（PDI）、およびピークトップ分子量（M_p）は、低分子用（Low Molecular Weight; LMW）Gel Filtration Calibration Kitsと、高分子用（High Molecular Wei

ght ; HMW) Gel Filtration Calibration Kits (いずれもCytiva社製) とに含まれる分子量マーカーを、標準物質として用いて算出した。

- ・装置 : Cytiva社製GFC装置「AKTA prime plus」
- ・分離カラム : Cytiva社製「HiLoad 16/600 Superdex 200 pg」
- ・移動相 : 500 mM塩化ナトリウム含有20 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)
- ・流速 : 1 ml/min
- ・温度 : 室温

[0050] [シルクフィブロインゲルの熱分解温度 (°C)]

熱重量示差熱分析装置 (TG-DTA ; リガク株式会社製「Thermoplus TG8120」) を用いて、シルクフィブロインゲルの熱分解温度 (°C) を測定した。具体的には、シルクフィブロインゲル試料41~48 mgをアルミニウム製パンに封入し、窒素を200 ml/minの流量で流し、30°Cから10°C/minの速度で昇温した時のDTA曲線の吸熱ピーク温度を測定した。これと同様にして個別に調製した3つの試料のそれぞれについて測定し、これらの平均値を熱分解温度として算出した。

[0051] [シルクフィブロインゲルの保水量]

予め重さ (この時の重量を「チューブ重量」とする) を量った1.5 mL容量のチューブ内に100 μ Lのシルクフィブロインゲルを入れ、そこに超純水を1 mL加えて室温で3時間インキュベートした。シルクフィブロインゲルに保持されていない超純水を除去するとともに、新たに超純水を1 mL加え、インキュベートを行う処理を、もう2回繰り返した後、最終的にシルクフィブロインゲルに保持されていない超純水を除去し、チューブとシルクフィブロインゲルとを合わせた重さを量った (この時の重量を「チューブ+湿潤ゲル重量」とする)。その後、60°Cに設定した定温乾燥機 (アズワン

社製、「KM-600V」)内にチューブを静置して一晩インキュベートすることで、シルクフィブロインゲルに保持された水分を蒸発させ、チューブと乾燥したシルクフィブロインゲルとを合わせた重さを量った(この時の重量を「チューブ+乾燥ゲル重量」とする)。そして、下式に従って保水量を測定した。これと同様にして個別に調製した3つの試料のそれぞれについて測定し、これらの平均値をシルクフィブロインゲルの保水量として算出した。

$$\text{保水量 (mg/mg)} = \left[\{ \text{チューブ+湿潤ゲル重量 (mg)} - \text{チューブ重量 (mg)} \} - \{ \text{チューブ+乾燥ゲル重量 (mg)} - \text{チューブ重量 (mg)} \} \right] / \{ \text{チューブ+乾燥ゲル重量 (mg)} - \text{チューブ重量 (mg)} \}$$

[0052] [シルクフィブロインゲルの圧縮弾性率]

直径10mm、高さ5mmのシルクフィブロインゲルを作製し、試料とした。この試料を用いて、以下の測定装置および条件で一軸圧縮試験により圧縮弾性率の測定を行った。これと同様にして、個別に調製した4つの試料のそれぞれについて測定し、これらの平均値をシルクフィブロインゲルの圧縮弾性率として算出した。

- ・装置 : 島津製作所社製小型卓上試験機「EZ Test」
- ・押し子直径 : 8mm
- ・圧縮速さ : 1%ひずみ/min
- ・温度 : 室温
- ・弾性率計算のためのひずみ範囲 : 0~5%

[0053] [実施例1]

[シルクフィブロインゲルの作製]

以下のようにして、実施例に係るシルクフィブロインゲルを作製した。

[0054] まず、0.02M炭酸ナトリウム水溶液を用いて精練したシルクフィブロイン3gを、9M臭化リチウムと0.1M水酸化ナトリウム(NaOH)とを含有する混合水溶液(50mL)に浸し、室温で1~6時間放置した。

[0055] 次に、この混合水溶液を室温で17時間攪拌することで、シルクフィブロ

インを上記混合水溶液に溶解させるとともにアルカリ処理を行い、比較的低分子量となったシルクフィブロインを含むシルクフィブロイン水溶液を得た。

[0056] 続いて、得られたシルクフィブロイン水溶液を、透析膜（分画分子量：6－8 k）を用いて脱イオン水中で透析（透析比：160倍）した。1回の透析を、室温で6～12時間かけて行うこととし、これを6回繰り返した。これにより、シルクフィブロイン水溶液に含まれていた臭化リチウムおよび水酸化ナトリウムを除去した。

[0057] 続いて、臭化リチウムおよび水酸化ナトリウムを除去した後のシルクフィブロイン水溶液を透析膜（分画分子量：6－8 k）に入れたまま風乾することで、室温下で濃縮した。風乾による濃縮を、シルクフィブロイン水溶液の体積が1／5～1／3になるまで続けた。

[0058] 次いで、得られたシルクフィブロイン水溶液を、オートクレーブ装置（トミー精工社製、「LBS－245」）を用いてオートクレーブ滅菌処理に供した。このオートクレーブ滅菌処理は、同じ条件（いずれも121℃、20分）で2度行った。なお、以降の処理はいずれも滅菌状態で行った。

[0059] 続いて、オートクレーブ滅菌後のシルクフィブロイン水溶液を、遠心処理装置（ベックマン・コールター社製「Avanti201」）を用いて遠心処理（40000×g、20℃、30分）し、沈殿した不溶物を除去した。

[0060] そして、不溶物を除去した後のシルクフィブロイン水溶液を濃度が3%（w／v）となるように、適宜希釈や濃縮を行うことにより調整し、1.5 mL容量のチューブに1 mL採取した。

[0061] 続いて、超音波ホモジナイザー（SONICS & MATERIALS社製「VCX－750」）を用いて、3%（w／v）シルクフィブロイン水溶液に対して超音波照射処理（Amplitude：21%、30秒）を行った。

[0062] 次いで、超音波照射処理後のシルクフィブロイン水溶液を入れたチューブをスピンドウンし、水溶液部分をチューブから回収した。

[0063] 回収したシルクフィブロイン水溶液をシリンジに充填した後、室温下で4

時間以上インキュベートしてゲル化を完了させた。このようにして実施例 1 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0064] [実施例 2]

超音波照射を施すシルクフィブロイン水溶液の濃度が 4.5 % (w/v) となるように調整した以外は、実施例 1 と同様にして、実施例 2 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0065] [実施例 3]

超音波照射を施すシルクフィブロイン水溶液の濃度が 5 % (w/v) となるように調整した以外は、実施例 1 と同様にして、実施例 3 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0066] [実施例 4]

超音波照射を施すシルクフィブロイン溶液の濃度が 6 % (w/v) となるように調整した以外は、実施例 1 と同様にして、実施例 4 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0067] [比較例 1]

精練済みのシルクフィブロイン 3 g を、NaOH を含有しない 9 M 臭化リチウム水溶液 (50 mL) に浸したこと、および超音波照射処理を施す時間を 10 秒としたこと以外は、実施例 1 と同様にして、比較例 1 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0068] [比較例 2]

精練済みのシルクフィブロイン 3 g を、NaOH を含有しない 9 M 臭化リチウム水溶液 (50 mL) に浸したこと、超音波照射処理を施す時間を 10 秒としたこと、および超音波照射を施すシルクフィブロイン水溶液の濃度が 6 % (w/v) となるように調整したこと以外は、実施例 1 と同様にして、比較例 2 に係るシルクフィブロインゲルを得た。

[0069] 各実施例および比較例について、各種測定を行った結果を表 1 に示す。

[0070]

[表1]

	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	比較例 1	比較例 2
アルカリ処理	有り	有り	有り	有り	無し	無し
重量平均分子量(Mw) [kDa]	76.1	76.1	76.1	76.1	337.6	337.6
数平均分子量(Mn) [kDa]	17.4	17.4	17.4	17.4	44.4	44.4
分子量分布(PDI)	4.38	4.38	4.38	4.38	7.60	7.60
ピークトップ分子量(Mp) [kDa]	40	40	40	40	418	418
熱分解温度 [°C]	277	280	279	279	285	289
圧縮弾性率 [kPa]	11	48	79	121	27	417
シルクフィブロイン濃度 [%]	3	4.5	5	6	3	6
保水量 [mg/mg]	51	37	28	21	36	18

[0071] 表 1 に示すように、特定の条件でアルカリ処理を行った実施例 1 ～ 4 では、比較例 1 ～ 2 と比較して分子量を低下できており、シルクフィブロインの重量平均分子量がいずれも 1 5 0 k D a 以下である。

また、実施例 1 ～ 4 では、分子量を低下させることにより熱分解温度を低減することができていることから、シルクフィブロインの結晶性が低減できていると考えられる。実施例 1 および 4 ではそれぞれ、結晶性を低減し、水を保持できる非晶領域が多く存在しているためか、同濃度で対応するサンプルとして作製された比較例 1 および 2 と比較して、保水量を向上させることができている。また、実施例 1 ～ 4 で示すように、シルクフィブロインの濃度を調整することによって保水量を調整することができている。

[0072] [血清タンパク質の吸着性]

9 6 ウェルプレート（A G C テクノグラス社製「組織培養用マイクロプレート（付着性細胞用）」）の 1 つのウェル（直径 7 m m）につきシルクフィブロインゲル試料がウェル内部で水平な表面を形成するように、1 0 0 μ L のシルクフィブロインゲル試料として、超音波処理後のシルクフィブロイン水溶液を各ウェルに分注し、静置してゲル化させた。具体的には、実施例 1 のシルクフィブロインゲル試料（L M W S F g e l）と、比較例 1 のシルクフィブロインゲル試料（H M W S F g e l）との、2 種類を各 6 ウェル

エルずつ作製した。

その後、各ウェル内のシルクフィブロインゲル表面に、リン酸緩衝生理食塩水（Gibco社製）（PBS）で希釈して0.45mg/mLの濃度としたAlexa488標識アルブミン（Invitrogen社製、A13100）またはPBSで希釈して0.3mg/mLの濃度としたAlexa488標識フィブリノゲン（Invitrogen社製、F13191）のいずれかの血清タンパク質溶液を、100μLずつ添加した。

[0073] 遮光下、37℃で1時間静置した後、各ウェル内の血清タンパク質溶液を除去し、オートクレーブ装置（トミー精工社製、「LBS-245」）を用いてオートクレーブ滅菌処理に供した。その後PBSを各ウェルに200μL加えて除去する洗浄操作を3回繰り返した。その後、10mg/mLのドデシル硫酸ナトリウム（和光純薬工業社製）（SDS）水溶液を各ウェルに100μLずつ加え、遮光下、25℃で1時間静置することで、各ウェル内のシルクフィブロインゲルに吸着した血清タンパク質をSDS水溶液に個別に溶出させた。血清タンパク質が溶出したSDS水溶液（50μL）を別の96ウェルプレートの各ウェルと1対1対応となるように移し、以下の測定装置および条件で各血清タンパク質のシルクフィブロインゲル表面に対する吸着性を測定した。なお、複数の血清タンパク質の中から選択した標準物質として、上述したAlexa488標識アルブミン、およびAlexa488標識フィブリノゲンを用いた。

・装置	: Thermo Fisher Scientific社製マイクロプレートリーダー「Varioskan LUX」
・励起波長	: 490nm
・蛍光波長	: 525nm
・バンド幅	: 12nm
・露光時間	: 100msec

[0074] これにより得られた結果を、図1のグラフに示す。図1は、実施例1（LMW SF gel）及び比較例1（HMW SF gel）のシルクフィ

ブロインゲル試料のそれぞれにおける血清タンパク質の吸着性を示すグラフである。2種類の血清タンパク質のそれぞれにつき、6ウェルで得られた吸着性の測定結果を平均し、その平均値を図1に示す吸着性の値として採用した ($n=6$)。また、各6個のデータにつき、標準偏差も求めた。なお、図1の各棒グラフに示した細い縦線は、平均値±標準偏差を表している。また、各図に示したグラフ中のアスタリスクの数は、有意差検定の結果を示している (* : $p<0.05$ 、** : $p<0.01$ 、*** : $p<0.001$)。

[0075] 図1に示すように、血清タンパク質としてアルブミンを用いた場合にも、フィブリノゲンを用いた場合にも、実施例1 (LMW SF gel) の方が、比較例1 (HMW SF gel) よりも、血清タンパク質の吸着性が低かった。

[0076] [線維芽細胞の接着性]

マウス胎児線維芽細胞 (NIH/3T3) (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより分譲) を細胞試料として、シルクフィブロインゲルに対する線維芽細胞の接着性を調べた。

[0077] -80°C のフリーザ中で凍結保存された細胞試料を 37°C で解凍し、10%牛胎児血清 (HyClone社より購入) と1%ペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco社製) を含有したダルベッコ改変イーグル培地 (Gibco社製) (以下では、単に「培地」とも記載する。) 中に懸濁した後、組織培養用培養皿 (AGCテクノグラス社製) 上に播種し、 CO_2 インキュベータ (アステック社製、「ACI-165」) 内で、 37°C 、5% CO_2 、湿度100%の条件下で3日間培養した。培養中、2日が経過した時点で一度、培地交換を行った。培地を除去し、PBSで洗浄した後、0.25%トリプシン・EDTA液 (Gibco社製) を添加して、組織培養用培養皿から細胞を剥離した。

[0078] この剥離された細胞を含む溶液をチューブに入れて、それに培地を加えることで、トリプシン・EDTAをクエンチした後、遠心処理 ($300\times g$ 、

室温、3分)して細胞を沈殿させ、上清を除去した。チューブ内で、沈殿した細胞をPBS (Gibco社製)で洗浄した後、それに培地を加えて細胞を懸濁させた。この細胞懸濁液の一部を採取し、0.4%トリパンブルー (Gibco社製)を加えて死細胞を染色した後、血球計算盤 (NanoEntek社製)を用いて生細胞をカウントすることで、細胞懸濁液中の生細胞濃度を求めた。その後、培地を足すことで細胞懸濁液を希釈し、生細胞濃度が $1 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ となるように調整した。

[0079] 組織培養ポリスチレン (TCPS) 製の96ウェルプレート (AGCテクノグラス社製、組織培養用マイクロプレート (付着性細胞用)) の1つのウェル (直径7mm) につきシルクフィブロインゲル試料がウェル内部で水平な表面を形成するように、 $100 \mu\text{L}$ のシルクフィブロインゲル試料として、超音波処理後のシルクフィブロイン水溶液を各ウェルに分注し、静置してゲル化させた。シルクフィブロインゲル試料としては、実施例1 (LMW SF gel) と、比較例1 (HMW SF gel) との、2種類を各6ウェルずつ作製した。また、比較対象として、シルクフィブロインゲル試料を分注していない空のウェルを6個用意した (TCPS)。

[0080] 室温の下でウェルプレートを静置した。その後、各ウェル内部に形成されたゲル表面に対して、上記の細胞試料 (NIH/3T3) を $100 \mu\text{L}$ ($1 \times 10^4 \text{ cells}$) 播種した。その後、CO₂インキュベータ内で、37℃、5%CO₂、湿度100%の条件下で3時間ウェルプレートを静置した。各ウェル内の細胞懸濁液を除去した後、PBSを各ウェルに $200 \mu\text{L}$ 加え、その後PBSを除去するという洗浄操作を2回繰り返した。その後、PBSを足して希釈することで濃度を0.5%としたTriton X-100 (シグマアルドリッチ社製) 溶液を各ウェルに $100 \mu\text{L}$ ずつ加え、これらウェルを含むウェルプレートを4℃で一晩静置することで、細胞試料の細胞膜を溶解させた。本溶解液 $10 \mu\text{L}$ を試料とし、細胞毒性検出キット^{PLUS} (LDH) (Roche社製)を用いて線維芽細胞の接着性を測定した。

[0081] これにより得られた結果を、図2のグラフに示す。図2は、実施例1 (L

MW SF gel) 及び比較例 1 (HMW SF gel) のシルクフィブロインゲル試料、並びに比較対象としての組織培養ポリスチレン (TCPS) ウェルのそれぞれに、線維芽細胞を播種した後、3 時間が経過した時における、線維芽細胞の接着性を示すグラフである。6 ウェルで得られた (吸着性の) 測定結果を平均し、その平均値を図 2 に示す接着性の値として採用した ($n = 6$)。また、図 2 の各 6 個のデータにつき、標準偏差も求めた。なお、各棒グラフに示した細い縦線は、平均値 ± 標準偏差を表している。

[0082] 図 2 に示すように、実施例 1 (LMW SF gel) の方が、比較例 1 (HMW SF gel) よりも、線維芽細胞の接着性が低かった。

[0083] [線維芽細胞の増殖促進性]

マウス胎児線維芽細胞 (NIH/3T3) (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲) を細胞試料として、シルクフィブロインゲルに対する線維芽細胞の増殖促進性を調べた。希釈することにより生細胞濃度が $4 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ となるように調整した以外は、上述した [線維芽細胞の接着性] と略同様の方法で、細胞懸濁液を得た。

[0084] 96 ウェルプレート (AGC テクノグラス社製「組織培養用マイクロプレート (付着性細胞用)」) の 1 つのウェル (直径 7 mm) につきシルクフィブロインゲル試料がウェル内部で水平な表面を形成するように、シルクフィブロインゲル試料として、超音波処理後のシルクフィブロイン水溶液を $100 \mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、静置してゲル化させた。具体的には、実施例 4 のシルクフィブロインゲル試料 (6% LMW SF gel) と、比較例 2 のシルクフィブロインゲル試料 (6% HMW SF gel) との、2 種類を各 4 ウェルずつ作製した。

[0085] 室温の下でウェルプレートを静置した。その後、各ウェル内部に形成されたゲル表面に対して、上記の細胞試料 (NIH/3T3) を $100 \mu\text{L}$ ($4 \times 10^3 \text{ cells}$) 播種した。その後、 CO_2 インキュベータ内で、 37°C 、5% CO_2 、湿度 100% の条件下で 7 日間細胞を培養した。培養中、1 日

もしくは2日が経過した時点で、一度、培地交換を行った。培養開始後1、3、5、および7日目に各ウェル内の細胞懸濁液中にWST-1試薬（Roche社製、「細胞増殖試薬WST-1」）を10 μ L添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、湿度100%の条件下で1時間30分静置した。

[0086] その後、ウェル内の細胞懸濁液（100 μ L）を別の96ウェルプレートに1対1対応となるように移し、マイクロプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific社製、「Varioskan LUX」）を用いて、波長450nmおよび650nmにおける吸光度をそれぞれ測定した。650nmにおける吸光度を参照用吸光度（コントロール）とし、450nmにおける吸光度と650nmにおける吸光度との差分を細胞数の指標として算出し、その推移からシルクフィブロインゲル上での線維芽細胞の増殖性を測定した。

[0087] これにより得られた結果を、図3のグラフに示す。図3は、実施例4（6%LMW SF gel）及び比較例2（6%HMW SF gel）のシルクフィブロインゲル試料に、それぞれ線維芽細胞を播種した後、7日目までにおける、両試料で特定波長に設定して測定された吸光度の差、すなわち線維芽細胞の細胞数の経時変化を示すグラフである。4ウェルで得られた各日における線維芽細胞の細胞数の測定結果を各日について平均し、その平均値を図3に示すドットの値として採用した（n=4）。また、各4個のデータにつき、標準偏差も求めた。なお、図3の折れ線グラフの各ドットに示した細い縦線は、平均値 $\pm$ 標準偏差を表している。

[0088] 図3に示すように、比較例2（6%HMW SF gel）は、時間経過とともに繊維が細胞の細胞数が増加しているのに対して実施例4（6%LMW SF gel）は比較例2よりも線維芽細胞の細胞数の増加率が小さく、細胞増殖性を抑制できていた。

[0089] [ラットのアキレス腱の切断箇所における癒着の評価]

ラット（Wistar、6週齢オス、日本SLC社）を9匹用意し、図5に示すように、それぞれについて、全身麻酔下で、ラットの右後肢に切り込

みを形成してアキレス腱を露出させ、アキレス腱を中途部で切断した。その後、アキレス腱の切断面同士を、5-0号ナイロン縫合糸を用いてケスラー変法によって縫合した。アキレス腱の上記縫合部に、何も適用しなかった（Control：コントロール）ラットと、ヒアルロン酸（Hyaluronic Acid）を1mLシリンジから注入したラットと、実施例1のシルクフィブロインゲル試料（LMW SF gel）を1mLシリンジから注入したラットとを、3匹ずつ作製し、それぞれのラットの右後肢の切り込みを閉創し、自律的に再建できる状態にした。そして、ラットに上記手術を施した4週間後に、各ラットの左後肢（健常側：Healthy）と、右後肢（処置側：Affected）との、図6に示す角度 θ を計測し、足首の屈曲可能な足関節背屈角度を $90^\circ - \theta$ として算出した。

[0090] ここで、この足関節背屈角度が大きいほど、足首がよく曲がることを意味する。1匹のラットにおける左後肢と右後肢とを比較したときの足関節背屈角度の差が大きいほど、右後肢で癒着が発生したことで足首を曲げにくくなっていることを意味する。

[0091] これにより得られた結果を、図4のグラフに示す。図4は、ラットのアキレス腱の切断箇所に実施例1のシルクフィブロインゲル試料（LMW SF gel）およびヒアルロン酸（Hyaluronic acid）をそれぞれ適用した場合ならびに適用しなかった場合（Control）において、手術を施さなかった左後肢の足関節背屈角度（Healthy）と、手術を施してアキレス腱を切った右後肢の足関節背屈角度（Affected）を、それぞれ示すグラフである。足関節背屈角度については、同じ条件で作製したラット3匹において得られた角度の値（3つの値）の平均をとり、この平均値を図4で採用する足関節背屈角度とした（ $n=3$ ）。また、各3個のデータにつき、標準偏差も求めた。なお、各棒グラフに示した細い縦線は、平均値±標準偏差を表している。

[0092] 癒着防止材をラットのアキレス腱の切断箇所に適用した場合における癒着の評価結果を検討すると、図4に示すように、何も適用しなかった（Con

t r o l : コントロール) ラットでは、手術を施した右後肢の足関節背屈角度 ($27.0 \pm 3.6^\circ$) は、手術を施していない左後肢の足関節背屈角度 ($32.0 \pm 3.6^\circ$) よりも小さくなっており、術後のアキレス腱やその周囲組織の間に癒着が生じていることが分かる。また、ヒアルロン酸 (H y a l u r o n i c A c i d) を適用したラットでは、手術を施した右後肢の足関節背屈角度 ($25.7 \pm 3.5^\circ$) は、手術を施していない左後肢の足関節背屈角度 ($31.3 \pm 4.0^\circ$) よりも小さくなっており、一般に関節の動きをスムーズにする効果が知られているヒアルロン酸を適用しても癒着防止の効果は殆ど確認できないことが伺える。

[0093] 一方、実施例1のシルクフィブロインゲル試料 (L M W S F g e l) を含んでなる癒着防止材を適用したラットでは、手術を施した右後肢の足関節背屈角度 ($34.7 \pm 2.5^\circ$) と、左後肢の足関節背屈角度 ($36.3 \pm 2.3^\circ$) との間には、大きな差異が見られず、癒着防止の効果が大きいことが伺える。

[0094] [擦過傷を形成したラットの回腸における癒着の評価]

ラット (S p r a g u e - D a w l e y、7週齢オス、日本S L C社) を7匹用意し、それぞれについて、全身麻酔下で、開腹してラットの回腸を露出させ、当該回腸のうちの回盲部よりも上流側の10cmをガーゼでこすることで擦過傷を形成した。そして、回腸の創傷部分に生理食塩水 (S a l i n e) を塗布し閉腹したラットを4匹と、実施例1のシルクフィブロインゲル試料 (L M W S F g e l) をシリンジから注入し閉腹したラットを3匹とを、それぞれ作製した。そして、ラットに上記手術を施した2週間後に、これら7匹のラットを再び全身麻酔下で開腹して回腸を取り出し、癒着が生じている部分の長さを測定した。

[0095] 擦過傷を形成したラット回腸に、実施例1のシルクフィブロインゲル試料 (L M W S F g e l) および生理食塩水 (S a l i n e) をそれぞれ適用した場合において、図7Aは癒着が生じた回腸の長さを示すグラフである。回腸の癒着が生じている箇所の長さについては、創傷部分に生理食塩水を

塗布した場合（４匹）と、創傷部分にシルクフィブロインゲル試料を適用した場合（３匹）とを、それぞれ１つの群として、Studentのt検定を行った。その結果、これらの２つの群の間には、有意差（*： $p < 0.05$ ）が認められた。なお、各棒グラフに示した細い縦線は、平均値±標準偏差を表している。

[0096] 図７Ｂは、擦過傷を形成したラット回腸の移植時と評価時（移植後２週間が経った時）におけるラットの体重変化を示すグラフである。

[0097] 擦過傷を形成したラット回腸に癒着防止材を適用した場合における癒着の評価結果を検討すると、図７Ａに示すように、創傷部分（擦過傷形成部分）に実施例１のシルクフィブロインゲル試料を適用したラットの回腸の癒着部分の長さは、生理食塩水を塗布したラットの回腸の癒着部分の長さと比較して短かった。ここで、図７Ｂに示すように、創傷部分にシルクフィブロインゲルを適用した場合と、生理食塩水を塗布した場合とでは、ラットの体重変化に殆ど差は見られず、相違は回腸で生じた癒着の程度の有無だけであったと認められる。このことより、実施例１の方が生理食塩水よりも癒着の発生を抑制できていたことが分かる。

[0098] 以上より、*in vivo*試験においても、実施例１により得られたシルクフィブロインゲル試料が、顕著な癒着防止効果を奏していたことが分かる。

産業上の利用可能性

[0099] 本発明の癒着防止材用のシルクフィブロインゲルおよびその製造方法、ならびに癒着防止方法は、整形外科（腱等）手術、腹部手術、心臓外科手術などの種々の外科手術に利用することができ、しかも体内で安全に用いることができる。

[0100] 以上のとおり、本発明の好適な実施例を説明したが、当業者であれば、本件明細書を見て、自明な範囲内で種々の変更および修正を容易に想定するであろう。

したがって、そのような変更および修正は、請求の範囲から定まる発明の

範囲内のものと解釈される。

請求の範囲

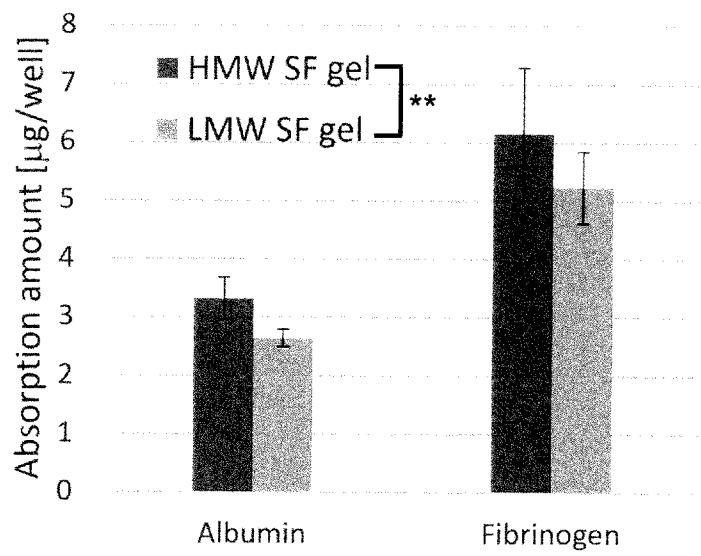
- [請求項1] 癒着防止材用のシルクフィブロインゲルであって、重量平均分子量が150kDa以下のシルクフィブロインを含有する、シルクフィブロインゲル。
- [請求項2] 請求項1に記載のシルクフィブロインゲルであって、前記シルクフィブロインの分子量分布（PDI）が1～10である、シルクフィブロインゲル。
- [請求項3] 請求項1または2に記載のシルクフィブロインゲルであって、前記シルクフィブロインの単位重量（mg）当たりの保水量（mg）が10mg以上である、シルクフィブロインゲル。
- [請求項4] 請求項1から3のいずれか一項に記載のシルクフィブロインゲルを含有する癒着防止材。
- [請求項5] 請求項4に記載の癒着防止材であって、外傷による臓器または組織の損傷部位、術後の臓器または組織の離断面、および術後の臓器の周囲組織表面の少なくともいずれかに適用される、癒着防止材。
- [請求項6] 癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、
重量平均分子量が150kDa以下のシルクフィブロインをゲル化させる工程を含む、製造方法。
- [請求項7] 請求項6に記載の癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、
前記シルクフィブロインを得るために、精練されたシルクフィブロインをアルカリ処理する工程を含み、前記アルカリ処理は、40℃以下で、180分を超える時間行われる、製造方法。
- [請求項8] 請求項6または7に記載の癒着防止材用のシルクフィブロインゲルの製造方法であって、
前記アルカリ処理工程の後にアルカリ処理物からアルカリ成分を除去し、脱アルカリ化シルクフィブロインを得る工程と、
前記脱アルカリ化シルクフィブロインをオートクレーブ滅菌する工

程と、を含む製造方法。

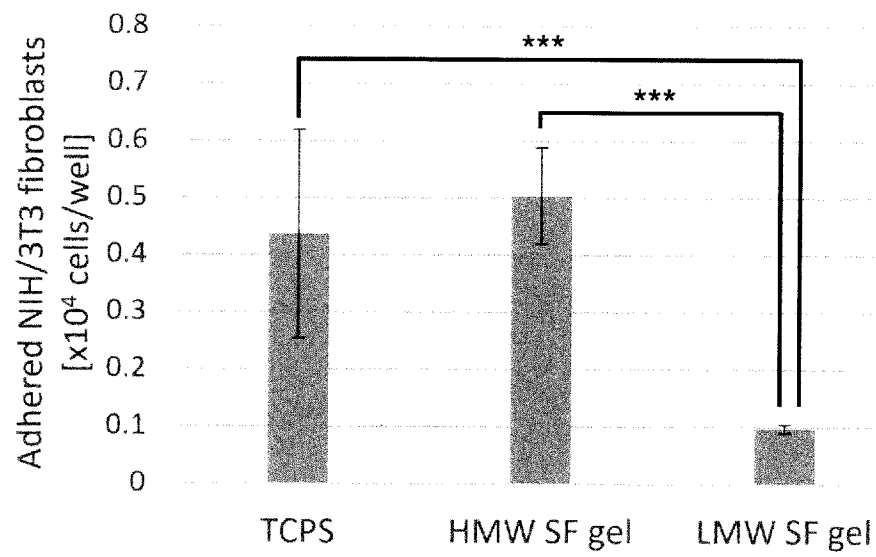
[請求項9] 請求項4または5に記載の癒着防止材を用いた癒着防止方法であって、

前記癒着防止材を、外傷による臓器または組織の損傷部位、術後の臓器または組織の離断面、および術後の臓器の周囲組織表面の少なくともいずれかに適用する工程を含む、癒着防止方法。

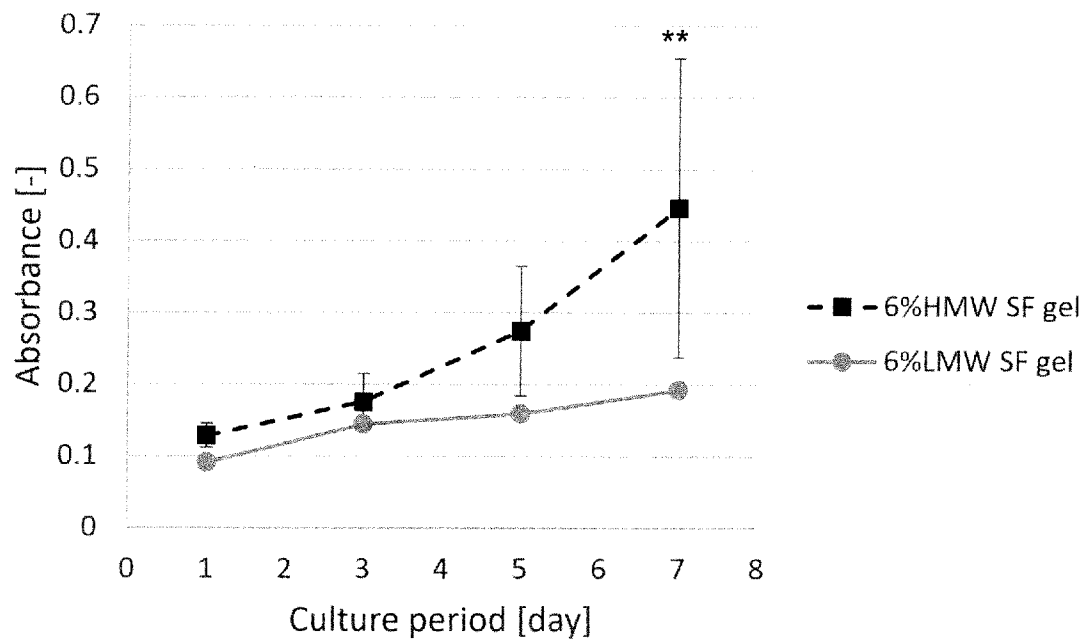
[図1]



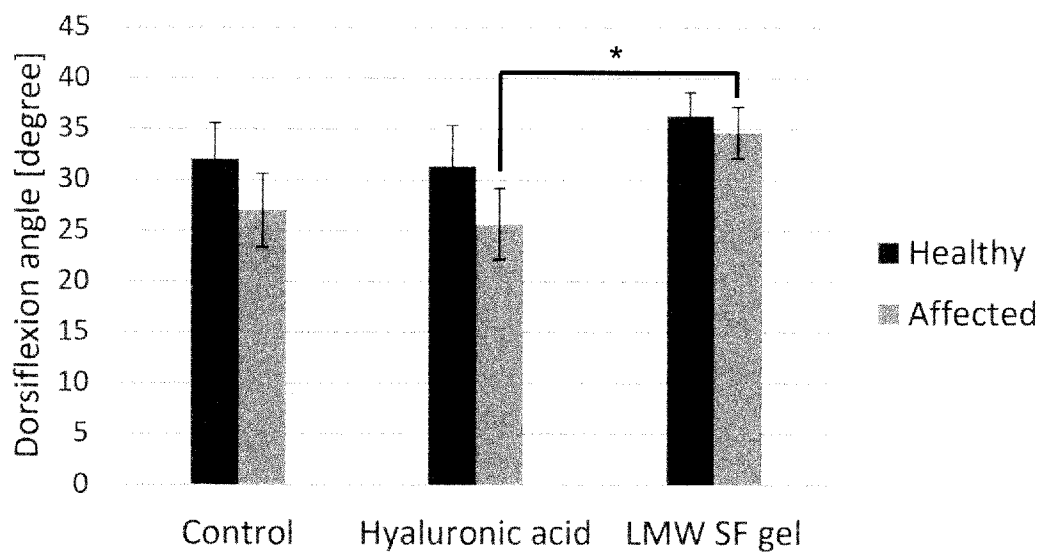
[図2]



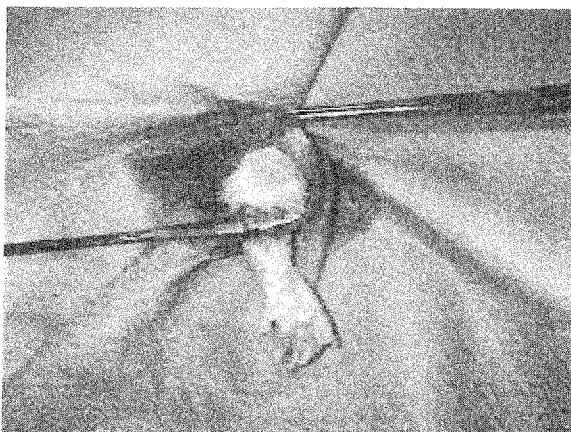
[図3]



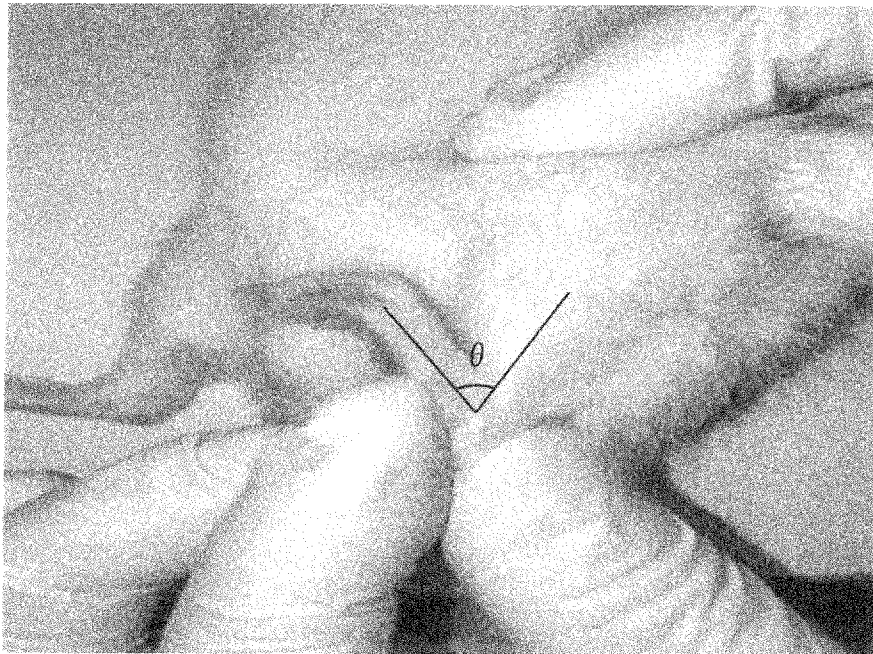
[図4]



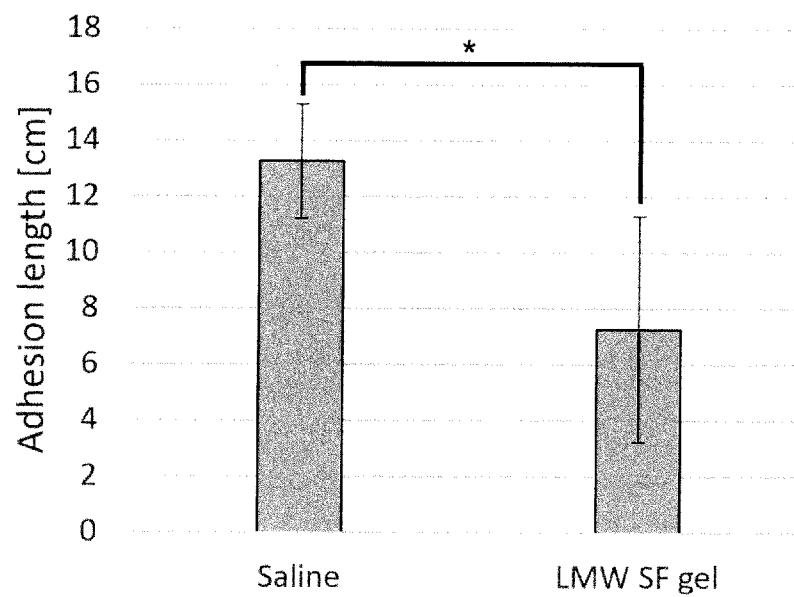
[図5]



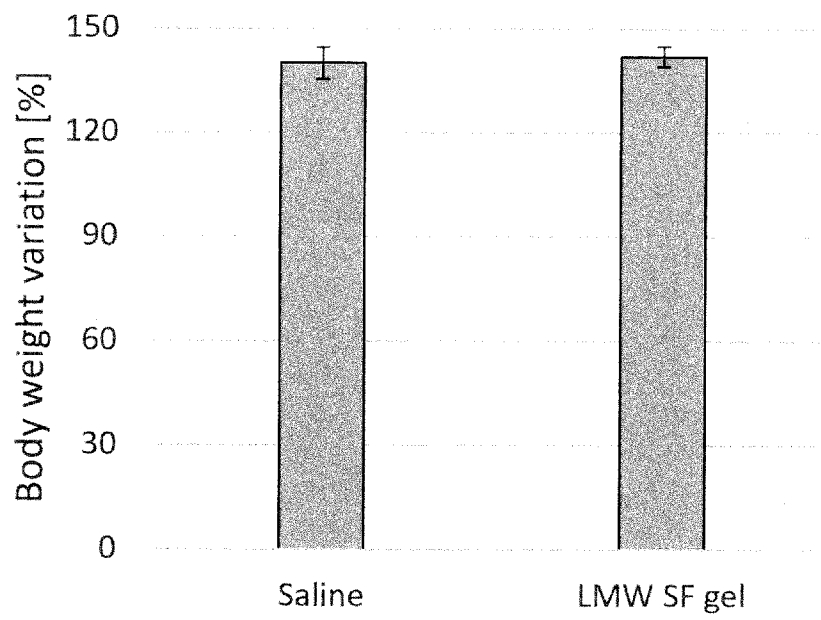
[図6]



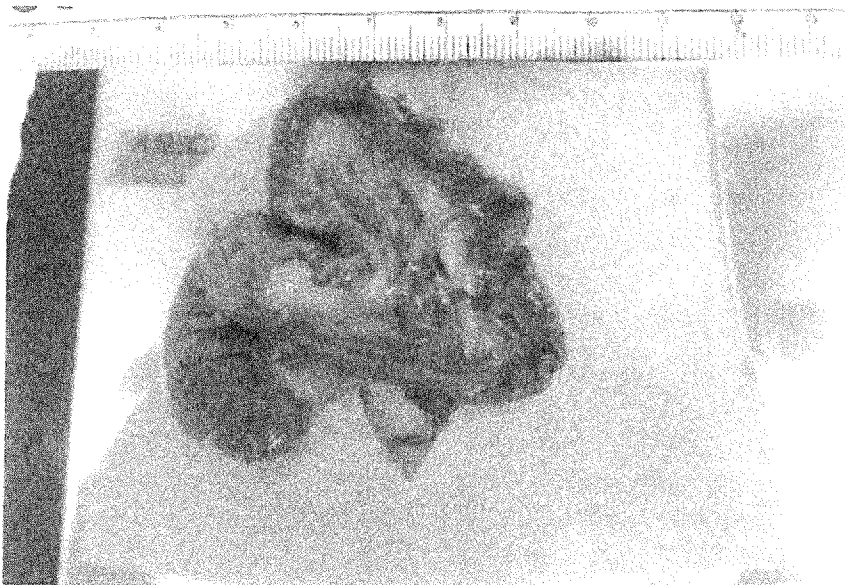
[図7A]



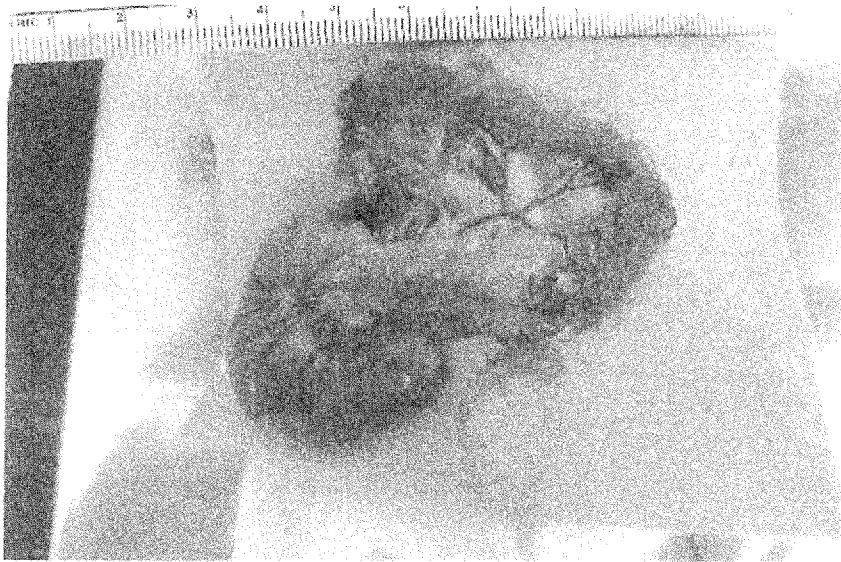
[図7B]



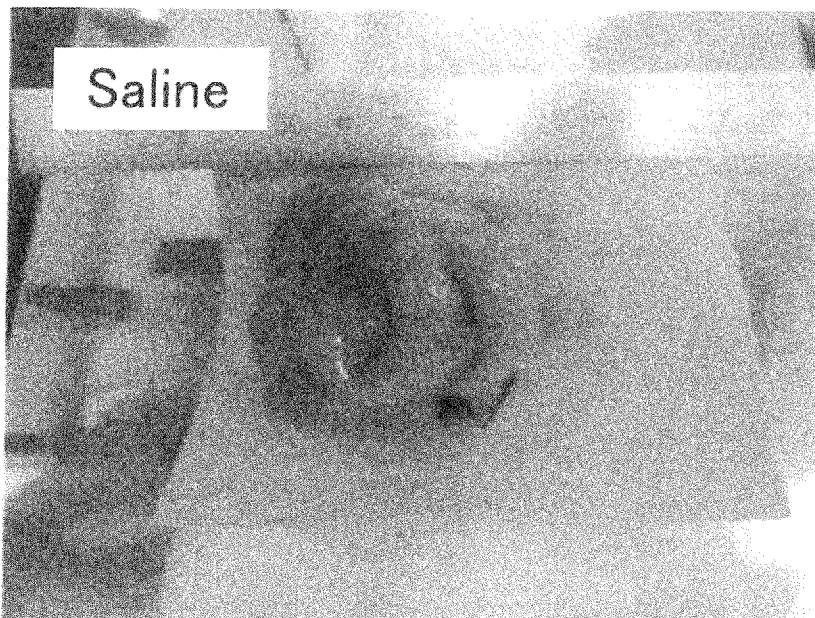
[図8A]



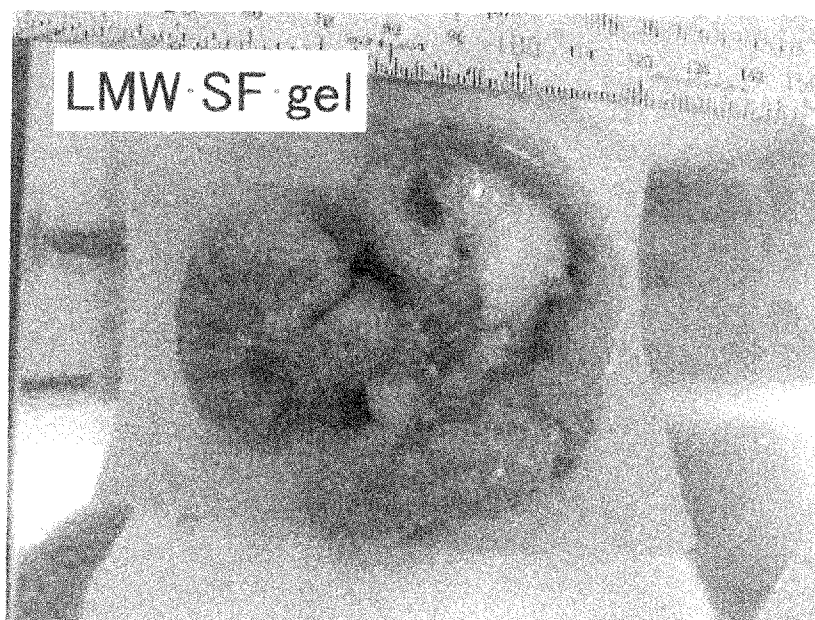
[図8B]



[図9A]



[図9B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/000678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61L 31/14 (2006.01)i; A61L 31/04 (2006.01)i FI: A61L31/14 300; A61L31/04 120 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) A61L31/14; A61L31/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1927419 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 10 December 2018 (2018-12-10) examples 2-7	1-5, 9
X	JP 2003-226614 A (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) 12 August 2003 (2003-08-12) example 4, paragraph [0044]	6, 8
Y		7
X	JP 2016-531943 A (SILK THERAPEUTICS, INC.) 13 October 2016 (2016-10-13) claim 39, examples 2, 4	6
Y		7
X	KIM, H.H. et al.. Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel. Polymer. 2016, vol. 90, pp. 26-33 abstract, fig. 1-2	6
Y		7
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent 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 01 April 2024		Date of mailing of the international search report 09 April 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2011-521020 A (ORTHOX LIMITED) 21 July 2011 (2011-07-21) examples 1-2, claims 14-15	7
A	JP 2012-80917 A (HITACHI CHEM. CO., LTD.) 26 April 2012 (2012-04-26) entire text	1-9
A	WO 2010/057142 A2 (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE) 20 May 2010 (2010-05-20) whole document	1-9
A	山本 遥香 ほか, 柔軟性を付与したシルクフィブロインフィルム の作製と癒着防止剤への応用, 繊維学会予稿集 2021, 02 June 2021, vol. 76(1), column "1PA234", (YAMAMOTO, Haruka et al. Fabrication and Evaluation of Adhesion Preventive Film based on a Silk Fibroin with High Flexibility.), non-official translation (Sen-i Gakkai preprints 2021) entire text	1-5
P, A	河野 友祐 ほか, シルクフィブロインゲルを用いた新規癒着防止材の開発, 第42回 整形外科バイオマテリアル研究会 プログラム・抄録集, November 2023, p. 33, (KAWANO, Yusuke et al.), non-official translation (Development of new anti-adhesion material using silk fibroin gel. Programs and Abstracts of the 42nd Annual Meeting of the Research Society for Orthopaedic Biomaterials.) entire text	1-5, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/000678

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-1927419	B1	10 December 2018	(Family: none)	
JP	2003-226614	A	12 August 2003	US 2004/0265260 A1 example 4, paragraphs [0146]- [0148]	
				EP 1459728 A1	
JP	2016-531943	A	13 October 2016	US 2015/0093340 A1 claim 1, examples 2, 4	
				EP 3052203 A1	
				KR 10-2016-0062152 A	
				CN 106029176 A	
JP	2011-521020	A	21 July 2011	US 2011/0177151 A1 examples 1-2, claims 42-43	
				EP 2276514 A1	
				CN 102083477 A	
JP	2012-80917	A	26 April 2012	(Family: none)	
WO	2010/057142	A2	20 May 2010	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61L 31/14(2006.01)i; A61L 31/04(2006.01)i

FI: A61L31/14 300; A61L31/04 120

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））

A61L31/14; A61L31/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報

1922 - 1996年

日本国公開実用新案公報

1971 - 2024年

日本国実用新案登録公報

1996 - 2024年

日本国登録実用新案公報

1994 - 2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	KR 10-1927419 B1 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 10.12.2018 (2018 - 12 - 10) 実施例 2 ～ 7	1-5, 9
X	JP 2003-226614 A (独立行政法人農業生物資源研究所) 12.08.2003 (2003 - 08 - 12) 実施例 4、段落 0 0 4 4	6, 8
Y		7
X	JP 2016-531943 A (シルク セラピューティクス, インコーポレイテッド) 13.10.2016 (2016 - 10 - 13) 請求項 3 9、実施例 2、4	6
Y		7
X	KIM, H.H. et al., Effect of silk fibroin molecular weight on physical property of silk hydrogel, Polymer, 2016, Vol.90, pp.26-33 Abstract、図 1 ～ 2	6
Y		7

☒ 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、一般的技术水準を示すもの

“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献

“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

“I” 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抵触するものではなく、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

01.04.2024

国際調査報告の発送日

09.04.2024

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

〒100-8915

日本国

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

権限のある職員（特許庁審査官）

参鍋 祐子 4C 6112

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

様式 PCT/ISA/210（第 2 ページ）（2 0 2 2 年 7 月）

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 請求項の番号
Y	JP 2011-521020 A (オルソックスリミテッド) 21.07.2011 (2011 - 07 - 21) 実施例 1 ～ 2、請求項 1 4 ～ 1 5	7
A	JP 2012-80917 A (日立化成工業株式会社) 26.04.2012 (2012 - 04 - 26) 全文	1-9
A	WO 2010/057142 A2 (TRUSTEES OF TUFTS COLLEGE) 20.05.2010 (2010 - 05 - 20) Whole document	1-9
A	山本 遥香 ほか, 柔軟性を付与したシルクフィブロインフィルムの作製と癒着防止 剤への応用, 繊維学会予稿集 2 0 2 1, 2021.06.02, Vol.76(1), 「1PA234」欄 全文	1-5
P, A	河野 友祐 ほか, シルクフィブロインゲルを用いた新規癒着防止材の開発, 第 4 2 回 整形外科バイオマテリアル研究会 プログラム・抄録集, 2023.11, p.33 全文	1-5, 9

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2024/000678

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
KR	10-1927419	B1	10.12.2018	(ファミリーなし)	
JP	2003-226614	A	12.08.2003	US 2004/0265260 A1	
				Example 4, [0146]-[0148]	
				EP 1459728 A1	
JP	2016-531943	A	13.10.2016	US 2015/0093340 A1	
				Claim 1, Examples 2, 4	
				EP 3052203 A1	
				KR 10-2016-0062152 A	
				CN 106029176 A	
JP	2011-521020	A	21.07.2011	US 2011/0177151 A1	
				Examples 1-2, Claims 42-43	
				EP 2276514 A1	
				CN 102083477 A	
JP	2012-80917	A	26.04.2012	(ファミリーなし)	
WO	2010/057142	A2	20.05.2010	(ファミリーなし)	