



IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

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。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

皮膚再生を促進する医療用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、光架橋性キトサン誘導體とグルコース等の糖類及び/又はグリシン等のアミノ酸を含有する、皮膚再生を促進することのできる医療用組成物に関する。

背景技術

[0002] 皮膚には元来自己修復機能が備わっており、単純外傷等の軽度の創傷であれば自己修復機能によって皮膚が再生されるが、重度熱傷、放射線被曝複合創傷、褥創等の難治性創傷においては完全な修復は困難である(非特許文献1)。

創傷治癒の機序は、(1)炎症性細胞、次いで結合組織の細胞、表皮細胞による損傷部の認識、(2)創傷部の収縮、そして(3)肉芽形成及び上皮化という順序で進行するとされており、各段階において関与する細胞、各種因子、サイトカイン、分泌物などが解明されてきている。

[0003] 皮膚の修復を人工的に行う皮膚創傷治癒の研究も、創面の一時的保護を目的とする創傷被覆剤の材料改質に始まり、創傷治癒に係わるサイトカインや増殖因子などの薬剤利用による積極的な治癒を誘導する試みにまで及んだ。しかし、単純創傷から難治性創傷に至る様々な程度の皮膚創傷に有効な被覆剤や単一成分の薬剤は未だ存在せず、特に重度熱傷や広範囲外傷にとって重要な上皮形成までを促進・誘導できる技術は皆無である。

[0004] このような状況にあつて、全層皮膚欠損した患者の治療に皮膚代替物が用いられるようになった。表皮細胞を組み込んだ皮膚代替物は培養表皮、真皮の線維芽細胞を組み込んだ皮膚代替物は培養真皮、それらの両方を組み込んだ物は培養皮膚と呼ばれている。

例えば、深達性II度熱傷の治療には凍結培養表皮が利用されており、同種培養表皮から自己細胞に置き換わっていく。しかし、小さな全層欠損である場合、全層皮膚腿潰瘍やIII度熱傷においても肉芽形成の促進から上皮化することもあるが、広範囲全層欠損では培養表皮の生着が悪く、最終的には自家皮膚移植に頼らざるを得な

い。

[0005] 現在、培養真皮としては、線維芽細胞が組み込まれるマトリックス素材が異なるTransCyteやDermagraft等の製品がSmith & Nephew社から販売されている。しかし、培養真皮も培養表皮と同様に広範囲の創傷で上皮化を誘導する能力はなく、機能的創傷被覆剤の範疇から逸脱しないものと言える。

一方、表皮細胞と線維芽細胞が組み込まれた培養皮膚として、Apligraf(NOVARTIS社)やVivoDerm(Convatec社)等が市販されている。しかし、現実には、培養上皮層と真皮層との親和性の問題や感染創での臨床効果が得られないといった問題があり、自家皮膚に置換可能な皮膚代替物の完成までにはほど遠いものがある。

[0006] また、従来の皮膚代替物は動物性コラーゲンやヒト血漿成分の利用依存度が高く、その安全性も懸念されている。

さらに、重症熱傷に対し人工真皮も使用されるようになってきているが、最終的に上皮化させるためには、再度の自家皮膚移植が必要となる。また、培養皮膚単独の重度熱傷への移植は有効性に乏しく、無細胞性の真皮と合わせたハイブリッド型の培養皮膚を研究している施設もあるが、その臨床評価は未だ定まっていない。

[0007] 即ち、最も機能的な皮膚再生・治療技術を必要とするのは、広範囲重度熱傷などに代表される皮膚付属器の残っていない全層皮膚欠損で、その治癒の鍵は、速やかな真皮形成と上皮形成が握っている。しかしながら、従来の皮膚代替物では、上皮形成に至らしめる程の能力を有するものは得られていない。よって、唯一、上皮化誘導が期待できるのは自家皮膚移植のみということになる。しかし、広範囲に熱傷を受けた場合、自家皮膚移植のために採取できる皮膚の範囲が限られ、創面全体の上皮化に必要な量を確保することは困難である。さらに、移植組織を皮下組織に強固に固着するための縫合あるいはステイプラー等による処置は時間を要するのみならず、術後包帯交換処置の疼痛や再障害の危険を伴い、患者及び医師への負担が大きいものとなっている。

非特許文献1:高柳健二、熊谷憲夫、「蛋白質 核酸 酵素」第45巻、第13号、2283-2287頁、2000年

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0008] よって本発明における課題は、重度熱傷などの広範囲全層皮膚欠損における唯一の上皮再生法である自家皮膚移植において、自家皮膚移植片を簡便に固定化することができ、上皮化の効率を上げて皮膚再生を促すことのできる医療用組成物を提供することにある。特に、重症熱傷の治療においては、早期に肉芽の形成を促進させることが自家皮膚移植片の定着に大きく関与することが知られており、肉芽形成を促す単純高分子皮膚製剤の開発は、これまで多くの熱傷専門医に期待されてきた。

課題を解決するための手段

- [0009] かかる課題を解決するため、本発明は、基材と、糖類及び／又はアミノ酸とを含有することを特徴とする医療用組成物を提供する。前記基材としては、創傷などに使用され、傷の修復や組織治癒・再生をサポートする、いわゆる被覆材料が好ましく用いられる。例えば、各種ハイドロゲル、ハイドロコロイド、コラーゲン、ゼラチン製剤などを挙げることができる。特に、後述する光架橋性キトサン誘導体から形成されるハイドロゲルを用いるのが好ましい。

発明の効果

- [0010] 本発明で使用される光架橋性キトサン誘導体 (PRC:Photo-Crosslinkable Chitosan) は、例えば、WO00/27889パンフレットに記載されているものから選択され、400nm付近の安全な紫外線で接着性のハイドロゲルになる機能性ポリマーであり、医療用接着剤として好適に用いられるものである。従って、当該PRCを含有する本発明の組成物は、簡便な操作によって自家移植片等の移植組織を固定・密閉しながら患部の感染を予防し、生体が有する活発な肉芽形成能を保全するというPRCが有する基本的特徴に加え、なおかつ早期分解することにより交換時の再障害の心配がないという熱傷治療を含む本願発明の用途に特に適した特性を有している。

- [0011] さらに、驚くべき事に、PRCを溶解させる媒体に、アミノ酸及び／又は糖類を共存させることにより、好中球を中心とする多核球が速やかにキトサン層に浸潤し、多核球によるVEGF発現亢進、それに伴う新生血管形成、肉芽形成及び上皮形成の促進が、組織の傷害部位のみならずサポート素材としてのキトサンゲル内でも (PRCの分

解を伴って)観察された。

PRCに細胞増殖因子等の創傷治癒促進剤を含有せしめることにより、その創傷治癒活性を高めることができるが(WO03/090765パンフレット参照)、本発明の組成物は、増殖因子等を含有しなくても、自家皮膚移植片や他の皮膚代替物を創傷部位に生着させることができ、重度熱傷等の皮膚創傷において皮膚移植片をサポートする素材として使用できるばかりではなく、皮膚移植片や皮膚代替物が存在しなくても上皮化を促し治癒を促進させる効果があり、皮膚創傷治療薬として使用することもできる。

また、本発明の組成物は、従来の接着剤であるフィブリン糊やコラーゲン製剤等のようにヒト組織由来の製剤でないことから感染の危険が無いという利点も有している。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]実施例における自家皮膚移植実験の手法の概略を示す説明図である。

[図2]実施例2において本発明の組成物(A)を用いたときの創傷部位の組織変化を示す顕微鏡写真である。

[図3]実施例2においてアミノ酸及び糖類を含まない組成物(B)を用いたときの創傷部位の組織変化を示す顕微鏡写真である。

[図4]実施例3において本発明の組成物(A)を用いたときに、創傷部位組織の抗-V EGF染色した断面を示す顕微鏡写真である。

[図5]実施例3において本発明の組成物(A)を用いたときに、創傷部位組織の抗-V EGF染色した断面を示す顕微鏡写真である。

[図6]実施例6において、人為的熱傷の形成及び処置方法を示す写真である。

[図7]実施例6において、熱傷部位の肉芽組織の厚み変化を示すグラフである。

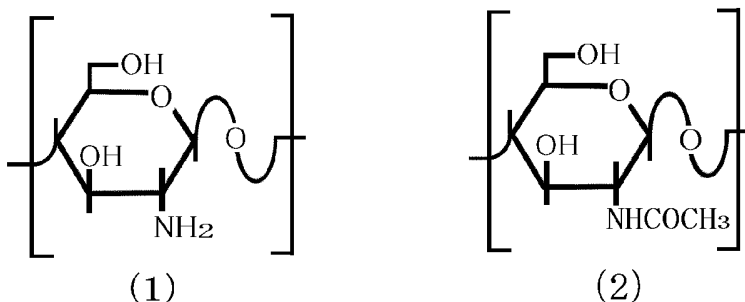
[図8]実施例6において、熱傷部位の毛細血管数の変化を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0013] 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(PRC)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置換基と糖鎖構造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

する糖類を導入し、他の少なくとも一部に光反応性官能基を導入してなるものであるのが好ましい。

- [0014] 通常、キチン・キトサン類は、エビ殻やカニ殻などの甲殻類由来のキチン質(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。その他、イカ軟骨、昆虫や植物由来の原料であつても何ら問題はない。



- [0015] これらのキチン・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、酵素的、または発酵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つてもよい。

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うち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」によって定量される。

- [0016] 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、最終の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。

[0017] 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の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類を導入し、他の一部に光反応性官能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、WO00/27889号パンフレットを参照されたい。

[0018] キトサン誘導体に導入される還元性末端を有する糖類としては、アルドース類、ケトース類が包含され、中でも、構成糖単位の数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、ヘキシロースなど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、ガラクサミンなどのアミノ糖類；uron酸類やデオキシ糖類などの糖誘導体；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、マルトトリオースなどの二もしくは三糖類；各種オリゴ糖類などが挙げられるが、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。特にグルコースが好ましい。

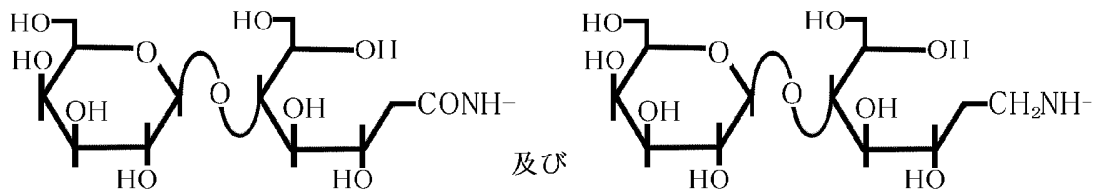
上記糖類に換えて、ポリエーテル、多価アルコールなどの有機化合物をキトサンに誘導することもできるが、生体適合性などの面で天然の糖鎖を利用するのが好ましい。

[0019] キトサンの前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基への上記の糖類の導入は、それ自体既知の方法を用いて行うことができ、例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、該2位アミノ基にアミド結合により結合させる方法(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、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(株)発行参照)などが含まれる。

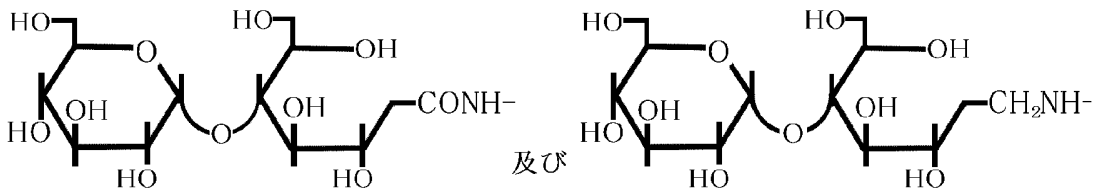
本発明でキトサンに導入される糖類は1種のみ限定されるものではなく、2種以上を組み合わせて使用することもできる。

[0020] 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。

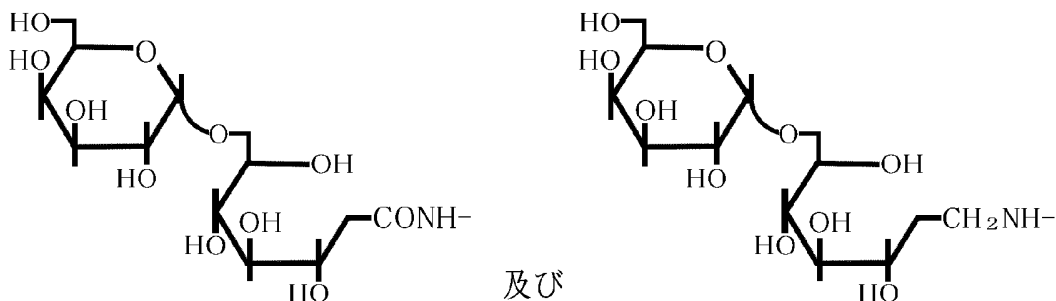
(i) ラクトースから誘導される糖鎖:



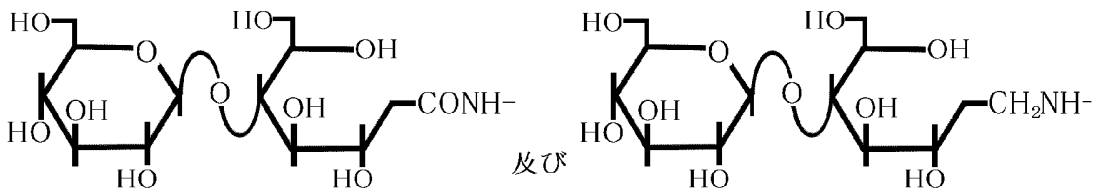
(ii) マルトースから誘導される糖鎖:



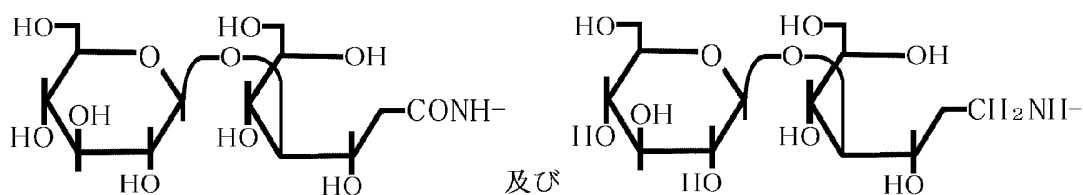
(iii) メリビオースから誘導される糖鎖:



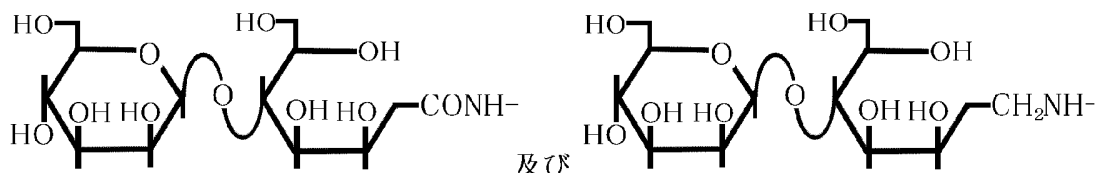
(iv) セロビオースから誘導される糖鎖:



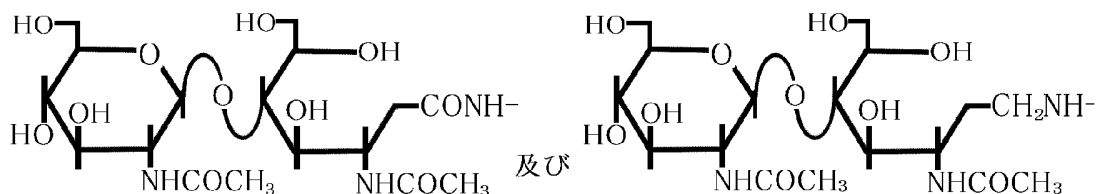
(v) ラミナリビオースから誘導される糖鎖:



(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:



[0021] 上記(i)~(vii)の糖側鎖のうち、左側に記載したものが、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が、シッフ塩基を介して結合させた残基を表す。

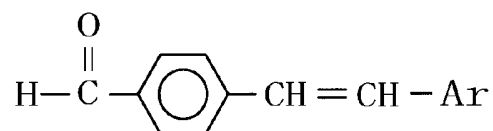
このようにして、キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基を糖類で置換することにより、キトサンの酸依存的溶解性が緩和され、中性領域での可溶化が達成される。

キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基の糖側鎖による置換度は、最終の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「フェノールー硫酸法」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)。

[0022] また、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官能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官能基は、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官能基同士で及び/又はキトサン中に存在するアミノ基あるいは水酸基などと反応して架橋結合を形成するような基を含み、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などから誘導されるものが包含され、特に、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、光反応性官能基は、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。このような官能基としては、例えば、下記式であらわされるような、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。



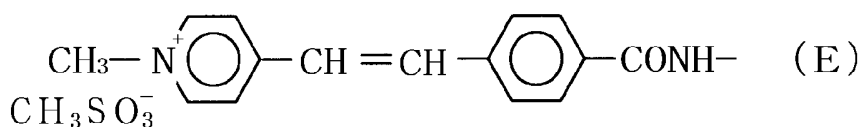
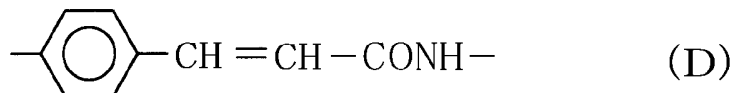
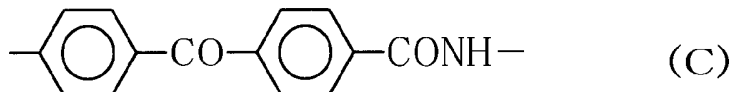
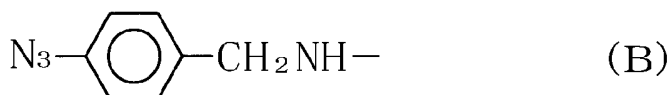
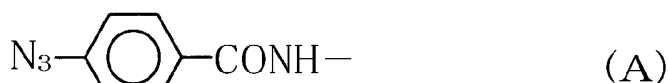
(上記式中、Arは、ピリジン、アルキルピリジニウム塩、キノリン、アルキルキノリニウム塩等の複素環を表す。)

[0023] キトサンのグルコサミン単位の2位のアミノ基へのかかる光反応性官能基の導入は、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。

[0024] しかして、本発明のキトサン誘導体(PRC)を構成する光反応性官能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。



[0025] これらの光反応性官能基の導入の程度は、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、光反応性官能基の置換度が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、光反応性官能基の「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、光反応性官能基、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。

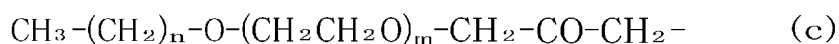
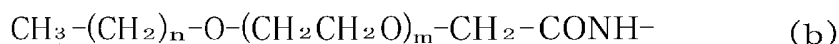
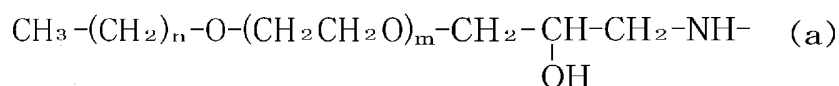
本発明のキトサン誘導体における糖側鎖と光反応性官能基の合計の置換度は、特に制限されるものではなく、広い範囲にわたり変えることができるが、一般には0.2～80%、好ましくは1.5～65%、さらに好ましくは3～50%の範囲内とすることができる。

[0026] 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。

[0027] 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。



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。

[0028] 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つては、キトサン骨格に還元性末端を有する糖類及び光反応性官能基が導入され、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、蛋白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、光反応性官能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するので、皮膚代替物等の移植片を組織に固着させるとともに、上皮化を促進して皮膚を再生させることができる。

[0029] 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リリースができる糖類が好適であり、中でも、それ自体が生体の高い創傷治癒活性を保全しながら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、光反応性官能基に代えて化学的架橋性を有する官能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、光反応性官能基が好適に使用される。また、2位にアミノ基を有するキトサンは、光反応性官能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る。

[0030] 本発明の組成物は、前記の光架橋性キトサン誘導体(PCR)に加えて、糖類及び/又はアミノ酸を含有することを特徴としている。

本発明で用いられる糖類は、特にグルコース、ガラクトース、マンノース又はフコース等の中性の単糖類、二糖類、オリゴ糖類などの比較的分子量の糖類が好ましい。特にグルコースが好ましい。アニオン性の糖類を使用した場合、キトサン誘導体との間でポリオンコンプレックスを形成して光照射しなくてもゲル化してしまうことがある。

[0031] 一方、本発明で用いられるアミノ酸は、グルタミン、アラニン、セリン等の一般に知られたアミノ酸であってよく、特に限定されないが、特に必須アミノ酸(フェニルアラニン、ロイシン、バリン、ヒスチジン、メチオニン、イソロイシン、リジン、スレオニン、トリプトファン、アルギニン、グリシン)を用いるのが好ましい。

[0032] 本発明の医療用組成物は、光架橋性キトサン誘導体(PCR)及びアミノ酸及び/又は糖類、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。例えば、PCRの蒸留水又はリン酸緩衝液(PBS)溶液に、アミノ酸又は糖類を添加してもよいし、PCR溶液をアミノ酸及び/又は糖類を含有する細胞培養液と混合して調製してもよい。本発明において特に好ましく用いられる細胞培養液は、ダルベッコの変性イーグル培地(D-MEM)とハムのF12培地との混合培地(DMEM/F12)であるが、機能性ペプチド研究所や日水製薬で市販されているものや理研セルバンクなどで用いられているヒト細胞株の培養用培地などであっても、所望の分解特性(多核球浸潤特性)を得ることができる。その他の培地としては、例えば<http://func-p.co.jp/hitoseihin.html>及びhttp://www.brc.riken.jp/lab/cell/distribution/med_table.shtmlを参照されたい。

[0033] 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(PCR)の含有量は、皮膚移植片周辺部への注入性を確保し、架橋後のゲルによる皮膚移植片の担持を確

実にするために、一般的には0.01~100mg/ml、より好ましくは少なくとも1~50mg/ml、更に好ましくは5~30mg/ml、特に20mg/ml程度とされる。

一方、アミノ酸及び/又は糖類の含有量は特に限られないが、アミノ酸としては約0.01~50mg/ml、より好ましくは約0.1~25mg/ml、更に好ましくは約0.2~200mg/mlで所望の分解性が得られ、また、糖類としては約0.1~250mg/mlで、より好ましくは約1.0~200mg/ml、更に好ましくは約1.5~150mg/mlで所望の分解性が得られる。これらのアミノ酸類や糖類の添加効果は、PRC溶液として光照射前に不溶化しない限り、単独添加でも混合添加でも同様に得られる。

[0034] このようにして調製された本発明の医療用組成物は、光架橋性キトサン誘導体(PRC)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ゲルを形成し、皮膚移植片を固定化することができる。

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官能基の種類や置換度、組成物に含有されるキトサン誘導体の量や、使用する組成物の量に応じて変化しうるが、400nm以下の波長の紫外線による所定の積算光量が得られれば架橋反応が速やかに達成され、実用的なキトサンハイドロゲル体を得られる。

例えば、365nm検出タイプの市販の照度計(UIT-150、ウシオ電機)による光量測定において、50~300mj/cm²の積算光量で当該組成物は良好な架橋ハイドロゲル形成を達成する。当該組成物は400nm以下の波長のUV-LED、エキシマレーザー、水銀ランプなどによる紫外線で架橋反応し、照射時間は照射強度を高くすれば必要な積算光量を得るまでの時間を短縮でき、1秒以下の照射時間で所望のハイドロゲル体を得ることも可能である。

[0035] 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、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官能基の中で他の官能基等と結合したものの割合を指すものとする。

[0036] 本発明の医療用組成物を用いた場合、キトサンゲル層にグルコースやアミノ酸が添加されていることにより、光架橋反応後のキトサン分子の分子間距離が広がって、細胞の浸潤が容易になっているものと考えられる。

また、アミノ酸の添加によって細胞の浸潤が促進されたのは、アミノ酸のコーティング効果であると推察される。すなわち、シアル酸で覆われた酸性粒子である細胞の進入を妨げていたキトサンのアミノ基を、アミノ酸類が中和したことによって、細胞のモビリティが容易になったものと考えられる。このような、キトサンゲル内への細胞浸潤を容易にする添加物効果は、糖類やアミノ酸類を単独で使用しても複合して使用しても有効であり、その効果を減ずることはない。

[0037] グルコースとグルタミン酸は白血球細胞の増殖を刺激することが知られている。本願発明者等は、本発明で観察された効果の主要な原因が、糖類又はアミノ酸による細胞のエネルギー効果であると考えている。即ち、下記の実施例においては、基材として光架橋性キトサンゲルを使用しているが、当該キトサンゲルを他のハイドロゲルやコラーゲン、あるいはゼラチン製剤等の基材に置換しても、グルコース等の糖類又はアミノ酸とを併用することにより本発明の効果が得られ、そのような基材と糖類及び/又はアミノ酸とを含有する医療用組成物も本発明の範囲内にある。

実施例

[0038] 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)

光架橋性キトサン誘導体(PRC)の合成

キトサン骨格に紫外線反応性官能基及び糖鎖を導入したPRCを、WO00/27889に記載された方法に準じて合成した。具体的には、エビ由来の800~1000kDaの分子量及び85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領域の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5.0%であることが確認された。

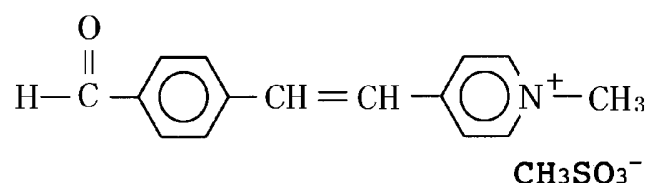
また、カニ殻及びイカ軟骨由来のキトサン素材を使用した場合も、同様の誘導体が

合成できた。

[0039] (合成例2)

光(可視光)硬化性キトサン誘導体(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iniumメスルホネート(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。析出物を熱時ろ過により除いた。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°Cであった。

[0040] (実施例1)

ラットの背に3cm×3cmの大きさの皮膚全層欠損を人為的に作成した。その際、切除した皮膚を自家皮膚移植片とし、当該移植片に直径5mmの孔を12個形成した。

次いで、前記皮膚全層欠損部位に孔を形成した移植片を静置し、(A)そのまま放置した場合、(B)移植片を縫合した場合、(C)孔に従来の医療用接着剤(シアノアクリルアミド系、商品名:ダーマボンド(J&J社製))を充填した場合、及び(D)孔に本発明の組成物を充填し、紫外線を照射した場合(波長330nm×15秒間)について、以下の項目について評価した。結果を表1に示す。

[0041] [表1]

	(A)	(B)	(C)	(D)
(1) 処置に要した時間 (分)	0.8	10.8	5.5	7.9
(2) 移植片の生着率 (%) ^(a)	69.4	97.2	100.0	91.7
(3) 移植片周囲での肉芽形成 ^(b)	(+)	(+)	(-)	(+)

(a) 生着率: 移植後5日目のマクロ所見で生着が観察された移植片数/移植片総数 (N=12)。

(b) 肉芽形成:

(+): 移植後7日目における組織所見で移植片周囲の肉芽組織の形成を認めた。

(-): 移植後7日目における組織所見で移植片周囲の肉芽組織の形成を認めなかった。

[0042] 表1から明らかなように、未処理の移植片(A)では生着率が格段に低く、移植片を縫合した場合(B)には生着率は向上するものの、処理に10分以上の時間を要する。一方、シアノアクリルアミド系接着剤を用いた場合(C)には、処理時間及び生着率の点で優れているが、移植片周囲における肉芽形成が見られなかった。しかしながら、本発明の組成物を用いた場合(D)には、処理時間、生着率、及び肉芽形成の全ての点で優れていた。

[0043] (実施例2)

PRCの4%水溶液(蒸留水)を調製し、等量の培地(DMEM/F12、Invitrogen社製)と混合して本実施例の組成物(A)とした。また、前記培地の代わりに等量のPBSと混合して比較組成物(B)を調製した。組成物(A)で使用した培地(DMEM/F12)は、各種アミノ酸、グルコース、及びその他の成分を含有する無血清組織培養培地である。

実施例1と同様に、マウスの皮膚全層欠損部位に自家皮膚移植片を静置し、前記組成物(A)及び(B)を充填して紫外線照射した。その後、移植部位の断面組織を観察した結果を図2及び3に示す。

[0044] 図2に示されるように、本発明に係る組成物(A)を用いた場合には、キトサン層に好中球が高密度に浸潤し(2日目)、引き続きキトサン層が消失するとともに血管新生、肉芽形成が見られ(4日目)、さらに上皮化が観察された(8日目)。それに対して、図3に示すアミノ酸やグルコースを含まない組成物(B)を用いた場合は、キトサン層への細胞の浸潤が見られず、8日目になってキトサン層の収縮が認められるが、キトサン層直下の組織における浸潤は著しく(2日目)、線維芽細胞などによる肉芽の形成は活発であった。

[0045] (実施例3)

実施例2と同様の実験を行い、所定時間(4日)の後、PRCゲル層を含む組織を取

り出し、抗-VEGF抗体で免疫染色した。アミノ酸、グルコース等を含む培地を用いた実施例(A)及びPBSを用いた比較例(B)で得られた結果を各々図4及び5に示す。

図4に示すように、本発明の組成物を用いた実施例(A)では、PRCゲル層内部に強い染色が認められた(図4(A))。特に、ゲル層の上層部に多くの好中球を含む線維化した層が存在し、強いVEGF染色が観察された(図4(B))。

一方、PBSに溶解した比較例(B)では、PRCゲル層の分解は見られず、PRCゲル層が皮下組織と接する最下層に強い染色が認められた(図5(A))。当該界面領域ではPRCゲルが線維状に変性し、VEGFの強い染色が観察された。

[0046] (実施例4)

PRCをPBSに溶解した組成物(A)、(A)に50mg/mlのD-グルコースを添加した組成物(B)、及び(A)に5mg/mlのグルタミンを添加した組成物(C)を調製した。また、組成物BおよびCと同じ濃度のグルコースとアミノ酸を添加した組成物(D)を調製した。

実施例2及び3と同様にマウスの背部に皮膚全層欠損部位を作製し、当該部位に自家皮膚移植片を静置して、前記組成物(A)、(B)、(C)又は(D)を充填して紫外線照射により硬化させた。処理後5日目に組織を採取し、顕微鏡観察によってキトサンゲル層への顆粒球の浸潤程度を比較した。結果を表2に示す。

[0047] [表2]

キトサン層への顆粒球の浸潤程度	
(A)	-
(B)	++
(C)	++
(D)	+++

備考：

+++：顆粒球がゲル層全体に高密度で浸潤

++：顆粒球がゲル層全体に浸潤

＋：顆粒球がゲル層と肉芽との界面付近にのみ浸潤

-：顆粒球のゲル層への浸潤は認められない

実施例2および3で認められた培地による添加物効果は、グルコースやアミノ酸単独でも観察されることが明らかである。また、添加するアミノ酸を必須アミノ酸混合物としても、同様に有効な顆粒球浸潤が観察できた(データは示さない)。

[0048] (実施例5)

マウス背部に2cmの皮膚全層欠損を形成し、本発明の組成物又は市販の人工真皮であるコラーゲン膜(テルダーミス;テルモ社製)で処理した(自家皮膚移植はしていない)。

処理後6日目には、本発明の組成物で処理した創傷(A)では、キトサンゲルが既に消失し、肉芽形成が早く周辺組織からの上皮化が進行していた。一方、コラーゲン膜で処理した創傷(B)では、創傷周辺組織からの上皮化は観察されるものの、コラーゲン膜が残存していた。また、(A)では、紫外線硬化させたキトサンゲルをガーゼ等の被覆材で覆う必要はないが、(B)ではコラーゲン膜の固定に縫合が必要であり、抜糸を行う際に再度創傷が生じるという問題が伴った。

[0049] (実施例6)

ラットの背部に人為的にIII度熱傷を形成させ、壊死組織を切除した(図6A)。次いで、当該部位をサポート材としての本発明の組成物(図6A)又はコラーゲンスポンジ(テルダーミス;テルモ社製)(図6C)で処理した。即ち、本発明の組成物(DMEM/F12含有PRC水溶液)を創傷部分に充填して光硬化させた例と、コラーゲンスポンジを用いて処理した例とを比較した。

[0050] 本発明の組成物で処理した場合には、移植後6日目頃から新生血管の発現が認められた。それに対して、コラーゲンスポンジを用いた場合には、6日目では血流量が少なく、新生血管の発現は移植後12日以降にピークに達した。創傷部位における肉芽組織の厚み及び顕微鏡観察したときの毛細血管数の変化を図7及び8に示す。本発明の組成物により、肉芽形成及び血管新生が著しく促進されたことがわかる。

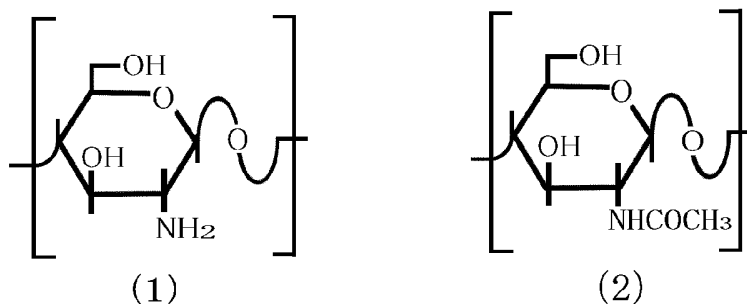
[0051] 移植後32日における上皮の厚さは、本発明の組成物で処理した例では平均67.1 μm に達したのに対し、コラーゲンスポンジで処理した例では55.8 μm であった。

即ち、本実施例の結果から、本発明の医療用組成物を用いることにより、自家皮膚移植片を使用しなくても、キトサンゲル層への顆粒球の浸潤に続いて新生血管の増加、さらには上皮形成が誘導されるという驚くべき結果が得られた。

請求の範囲

- [1] 基材と、アミノ酸及び／又は糖類とを含有することを特徴とする医療用組成物。
- [2] 基材が、ハイドロゲル、ハイドロコロイド、コラーゲン、ゼラチン製剤から選択されることを特徴とする請求項1に記載の組成物。
- [3] 基材が、光架橋性キトサン誘導体から形成されたものであることを特徴とする請求項1に記載の組成物。
- [4] 前記糖類が、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコースから選択される中性糖であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。
- [5] 前記アミノ酸が必須アミノ酸であることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。
- [6] 前記光架橋性キトサン誘導体が、下記式(1)及び(2)：

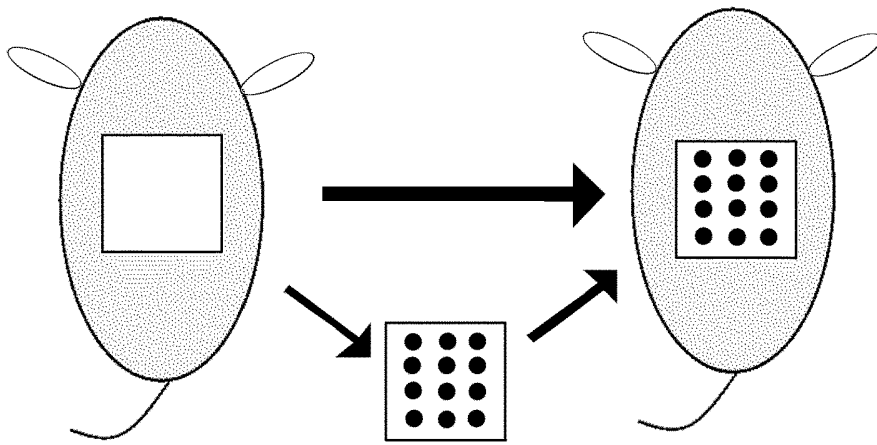
[化1]



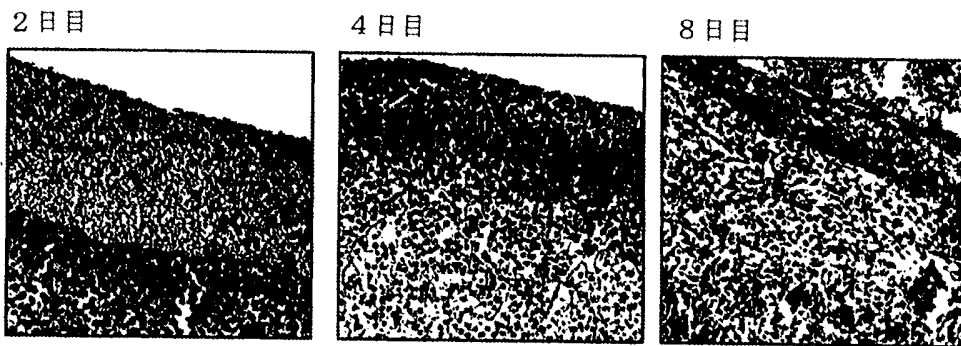
で表される構成単位を含んでなるキチン・キトサン類のグルコサミン単位(1)の2位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなる高分子であることを特徴とする、請求項3に記載の組成物。

- [7] 光架橋性キトサン誘導体を、少なくとも1mg/ml含有することを特徴とする、請求項3に記載の組成物。
- [8] 創傷治癒促進薬をさらに含有することを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載の組成物。

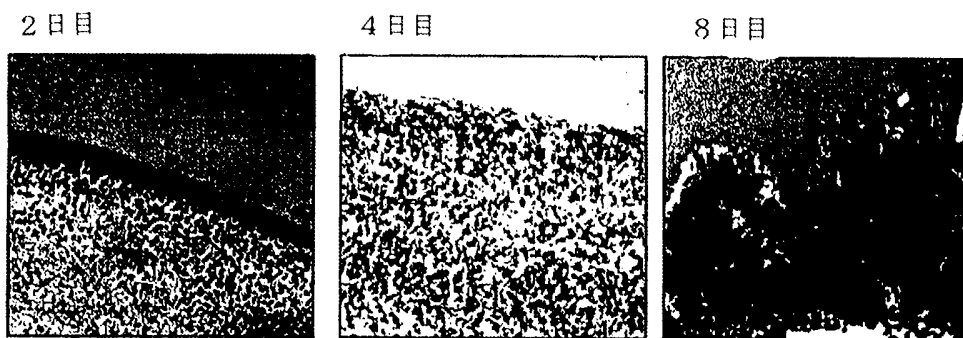
[図1]



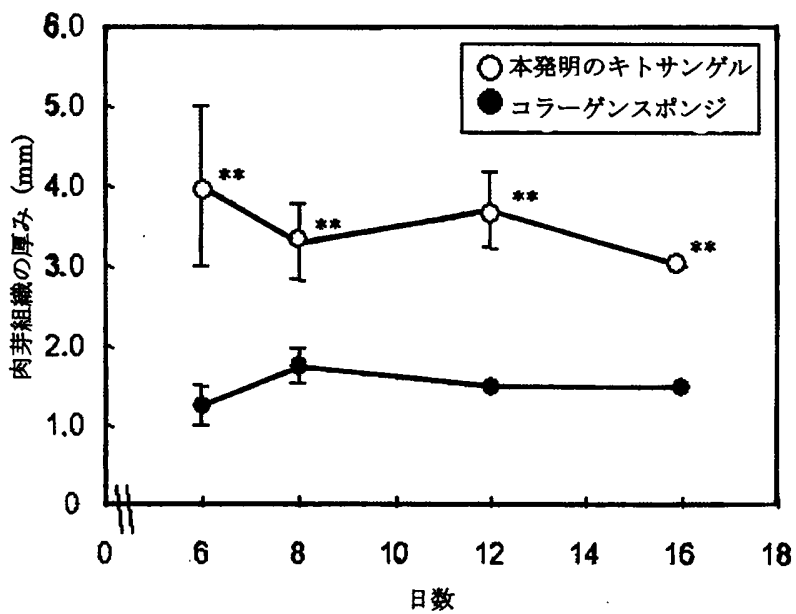
[図2]



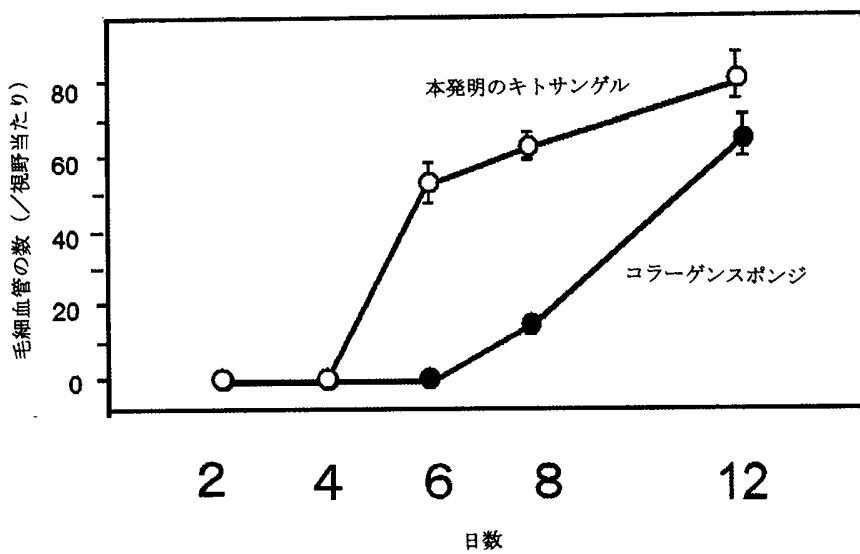
[図3]



[図7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L24/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K31/198(2006.01)i, A61K31/405(2006.01)i, A61K31/4172(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L24/00, A61K9/06, A61K31/198, A61K31/405, A61K31/4172, A61K31/7004, A61K47/36, A61P17/02

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

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

WPI, Caplus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/072155 A1 (ENCELLE, INC.), 04 September, 2003 (04.09.03), Full text & JP 2005-528933 A & JP 2005-524425 A & US 2003/0232198 A1 & US 2003/0232746 A1 & EP 1476202 A1 & EP 1476204 A1	1, 2, 5, 8
X	JP 2004-523521 A (LMD), 05 August, 2004 (05.08.04), Full text & US 2005/0191354 A1 & EP 1351694 A1 & WO 2002/056894 A1	1, 4

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 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 August, 2006 (01.08.06)

Date of mailing of the international search report
08 August, 2006 (08.08.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/309562

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-122790 A (Mikasa Seiyaku Kabushiki Kaisha), 08 May, 2001 (08.05.01), Full text & WO 2001/028571 A1 & EP 1224937 A1	1, 2, 8
X Y	JP 10-175857 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 30 June, 1998 (30.06.98), Full text (Family: none)	1, 5, 8 1-3, 5-8
X Y	JP 62-161729 A (Anthony N. Silvetti, Sr.), 17 July, 1987 (17.07.87), Full text & EP 221728 A2	1, 2, 4, 8 1-4, 6-8
Y	JP 2004-107265 A (President of Nagasaki University), 08 April, 2004 (08.04.04), Claims (Family: none)	1-3, 6-8
Y	WO 2003/090765 A1 (Netech Inc.), 06 November, 2003 (06.11.03), Full text & US 2005/0238702 A1 & EP 1498128 A1	1-8
Y	JP 2004-161684 A (Nitto Denko Corp.), 10 June, 2004 (10.06.04), Full text (Family: none)	1, 2, 4, 5, 8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L24/00(2006.01)i, A61K9/06(2006.01)i, A61K31/198(2006.01)i, A61K31/405(2006.01)i, A61K31/4172(2006.01)i, A61K31/7004(2006.01)i, A61K47/36(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61L24/00, A61K9/06, A61K31/198, A61K31/405, A61K31/4172, A61K31/7004, A61K47/36, 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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

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

WPI
CAplus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2003/072155 A1(ENCELLE, INC.)2003.09.04, 全文 & JP 2005-528933 A & JP 2005-524425 A & US 2003/0232198 A1 & US 2003/0232746 A1 & EP 1476202 A1 & EP 1476204 A1	1, 2, 5, 8
X	JP 2004-523521 A(エル エム デー)2004.08.05, 全文 & US 2005/0191354 A1 & EP 1351694 A1 & WO 2002/056894 A1	1, 4
X	JP 2001-122790 A(三笠製薬株式会社)2001.05.08, 全文 & WO 2001/028571 A1 & EP 1224937 A1	1, 2, 8

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	の日の後に公表された文献
「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	「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
「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	「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
「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)	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
01.08.2006

国際調査報告の発送日
08.08.2006

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
關 政立
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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
X Y	JP 10-175857 A(積水化学工業株式会社)1998. 06. 30, 全文 (ファミリーなし)	1, 5, 8 1-3, 5-8
X Y	JP 62-161729 A(アンソニー エヌ シルバツティ シニア)1987. 07. 17, 全文 & EP 221728 A2	1, 2, 4, 8 1-4, 6-8
Y	JP 2004-107265 A(長崎大学長)2004. 04. 08, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-3, 6-8
Y	WO 2003/090765 A1(株式会社ネーテック)2003. 11. 06, 全文 & US 2005/0238702 A1 & EP 1498128 A1	1-8
Y	JP 2004-161684 A(日東電工株式会社)2004. 06. 10, 全文 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5, 8