

明 細 書

発明の名称：癒着防止材

技術分野

[0001] 本発明は、癒着防止効果（特に、腱の癒着防止効果）に優れた癒着防止材に関する。

背景技術

[0002] 癒着とは、本来互いに近接して存在するが、遊離している臓器間若しくは組織間に連続性が生ずる状態を言う。手術後の縫合部癒着は人工的に生じさせた炎症性癒着の一種であり、程度の差はあるにせよ手術により高い確率で引き起こされる合併症である。特に、腱損傷、腱断裂、骨折等の治療後に腱の癒着が生じると、関節が動かなくなったり、関節の可動域が低下したりすることも知られており、癒着防止材によって手術後の腱の癒着防止を講じることは、損傷組織の正常な回復のために重要である。

[0003] 癒着防止材には、癒着防止が求められる部位に投与され、当該部位に一定期間留まって物理的バリアとして機能することが求められる。特に、腱の癒着を防止する場合には、腱の周辺組織が微細で複雑であるため、投与時には対象部位全体に行き渡るように拡散性に優れた特性を有していることが要求され、また投与後には対象部位に一定期間留まって物理的バリアとして機能することが求められる。

[0004] 従来、癒着防止材について種々検討されている。例えば、特許文献1には、ゲル化剤、有機酸及び／又は無機酸と2価の金属との塩、並びにポリエチレングリコールを含有する固体状癒着防止材であって、用時に水と混合することにより、投与時には液状を呈し、投与後にはゲル状に変化する癒着防止材が提案されている（特許文献1 参照）。このように投与時には液状で投与後にはゲル状を呈する癒着防止材は、微細で複雑な組織に適用しても、適用組織に拡散でき、物理的バリア機能を発揮できるため、腱の癒着防止に有効であると考えられている。

[0005] また、コラーゲン様ペプチドやゼラチンを利用した癒着防止材についても提案されている。例えば、特許文献2には、 $-(\text{Pro}-\text{Y}-\text{Gly})_n-$ [YはPro又はHyp、nは1以上の整数] からなるコラーゲン様ペプチドオリゴマーと多糖類とを縮合させた重合体を癒着防止材として利用できることが開示されている。また、特許文献3には、ゼラチンをスクシンイミド化ポリ-L-グルタミン酸により架橋してなる医用材料を癒着防止材として使用できることが開示されている。

[0006] しかしながら、癒着防止材に対する機能性や使用簡便性等の向上に対する要求は高まっており、新たな癒着防止材の開発が求められている。特に、対象部位への拡散性と一定期間の物理的バリア機能を高度に両立でき、腱に対して好適に適用される癒着防止材の新たな開発が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2013/77414号

特許文献2：特開2013-112653号公報

特許文献3：特開平9-103479号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、優れた癒着防止効果を奏する癒着防止材を提供することである。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者等は、前記課題を解決すべく鋭意検討を行ったところ、(A) $(\text{A}-1)-(\text{X}-\text{Pro}-\text{Y})_n-$ [Xは任意のアミノ酸、Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、nは1～10の整数である。] のアミノ酸配列を含むペプチド、及び／又は(A-2) $-(\text{Pro}-\text{Y})_m-$ [Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、mは1～10の整数である。] のアミノ酸配列を含むペプチドと、(B) ゼラチンゲルを併

用した癒着防止材は、これらの成分を単独で使用的場合に比して癒着防止効果が飛躍的に向上し、特に腱の癒着に対して格段に優れた防止効果を奏することを見出した。本発明は、かかる知見に基づいて更に検討を重ねることにより完成したものである。

[0010] 即ち、本発明は、下記に掲げる態様の発明を提供する。

項1. (A) (A-1)－(X－Pro－Y)_n－[Xは任意のアミノ酸、Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、nは1～10の整数である。]のアミノ酸配列を含むペプチド、及び／又は(A-2)－(Pro－Y)_m－[Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、mは1～10の整数である。]のアミノ酸配列を含むペプチド、並びに

(B) ゼラチンゲル

を含有する、癒着防止材。

項2. 前記(A-1)のアミノ酸配列において、Xが疎水性アミノ酸、親水性塩基性アミノ酸、又は親水性中性アミノ酸である、項1に記載の癒着防止材。

項3. 前記(A-1)のアミノ酸配列において、Xがグリシン、イソロイシン、アスパラギン、アルギニン、チロシン、アラニン、バリン、又はロイシンである、項1又は2に記載の癒着防止材。

項4. 前記(A-1)のアミノ酸配列において、Yがヒドロキシプロリンである項1～3のいずれかに記載の癒着防止材。

項5. 前記(A-1)アミノ酸配列において、Xがグリシン、イソロイシン、アスパラギン、アルギニン、又はチロシンであり、且つYがヒドロキシプロリンである、項1～4のいずれかに記載の癒着防止材。

項6. 前記(A-1)のアミノ酸配列において、nが1～5の整数である、項1～5のいずれかに記載の癒着防止材。

項7. 前記(A-2)のアミノ酸配列において、mが1～5の整数である、項1に記載の癒着防止材。

項8. 前記ゼラチンゲルが架橋ゼラチンゲルである、項1～7のいずれかに記載の癒着防止材。

項 9. 前記ゼラチンゲルが、ゼラチンスポンジゲルである、項 1～8 のいずれかに記載の癒着防止材。

項 10. 前記ゼラチンゲルが、粉末状のエアロゲル、又は粒状のヒドロゲルである、項 1～9 のいずれかに記載の癒着防止材。

項 11. 更に水性溶媒を含み、前記ペプチド及び前記ゼラチンゲルを含むヒドロゲル状である、項 1～10 のいずれかに記載の癒着防止材。

項 12. 水性溶媒を含まず、前記ペプチド及び前記ゼラチンゲルを含む固体製剤からなる 1 剤タイプである、項 1～10 のいずれかに記載の癒着防止材。

項 13. 前記ペプチドを含む第 I 剤と、前記ゼラチンゲルを含む第 II 剤とを含む 2 剤タイプである、項 1～10 のいずれかに記載の癒着防止材。

項 14. 前記第 I 剤が水性溶媒を含む液状であり、且つ前記第 II 剤が水性溶媒を含むヒドロゲル状である、項 13 に記載の癒着防止材。

項 15. 前記第 I 剤が水性溶媒を含む液状であり、且つ前記第 II 剤がエアロゲル状である、項 13 に記載の癒着防止材。

項 16. 前記第 I 剤が粉末状であり、且つ前記第 II 剤が水性溶媒を含むヒドロゲル状である、項 13 に記載の癒着防止材。

項 17. 前記第 I 剤が粉末状であり、且つ前記第 II 剤がエアロゲル状である、項 13 に記載の癒着防止材。

項 18. 癒着防止材の製造のための、(A) (A-1)－(X－Pro－Y)_n－
[Xは任意のアミノ酸、Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、nは1～10の整数である。] のアミノ酸配列を含むペプチド、及び／又は(A-2)－(Pro－Y)_m－[Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、mは1～10の整数である。] のアミノ酸配列を含むペプチド、並びに(B)ゼラチンゲルを含有する製剤の使用。

項 19. 項 1～17 のいずれかに記載の癒着防止材の癒着防止に有効な量を、生体組織の癒着の防止が求められる部位に投与する、癒着防止方法。

発明の効果

[0011] 本発明癒着防止材によれば、特定のアミノ酸配列を含むペプチドとゼラチンゲルの相互作用によって、格段に優れた癒着防止効果を奏することができる。また、本発明の癒着防止材の一態様によれば、対象部位への拡散性と物理的バリア機能を高度に両立できるので、周辺組織が微細で複雑な腱に対しても、優れた癒着防止効果を奏することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]試験例 1 及び 2 において、癒着の程度を評価したアキレス部位を示す図である。

[図2]試験例 1 において、アキレス腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図3]試験例 2 において、アキレス腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図4]試験例 3 において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図5]試験例 4 において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図6]試験例 5 において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図7]試験例 6 において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図8]試験例 7 において、関節可動域を測定した結果を示す図である。

[図9]試験例 7 において、P I P 関節及び D I P 関節の関節可動域を測定した結果を示す図である。

[図10]試験例 7 において、癒着スコアを測定した結果を示す図である。

[図11]試験例 7 において、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を示す図である。

[図12]試験例 7 において、関節可動域と癒着スコアの相関を分析した結果を示す図である。

[図13]試験例8において、関節可動域を測定した結果を示す図である。

[図14]試験例8において、P I P関節及びD I P関節の関節可動域を測定した結果を示す図である。

[図15]試験例8において、癒着スコアを測定した結果を示す図である。

[図16]試験例8において、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を示す図である。

[図17]試験例8において、関節可動域と癒着スコアの相関を分析した結果を示す図である。

[図18]試験例9において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図19]試験例9において、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を示す図である。

[図20]試験例10において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図21]試験例10において、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を示す図である。

[図22]試験例11において、屈筋腱における癒着防止効果を評価した結果を示す図である。

[図23]試験例11において、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の癒着防止材は、特定のアミノ酸配列を含むペプチドとゼラチンゲルを含むことを特徴とする、以下、本発明の癒着防止材について詳述する。

[0014] [定義]

本明細書において、アミノ酸は下記三文字表記の略号を使用する。

A l a : アラニン

A r g : アルギニン

A s n : アスパラギン

A s p : アスパラギン酸

C y s : システイン

G l n : グルタミン

G l u : グルタミン酸

G l y : グリシン

H i s : ヒスチジン

H y p : ヒドロキシプロリン

I l e : イソロイシン

L e u : ロイシン

L y s : リシン

M e t : メチオニン

P h e : フェニルアラニン

P r o : プロリン

S e r : セリン

T h r : トレオニン

T r p : トリプトファン

T y r : チロシン

V a l : バリン

[0015] 本発明において、ジペプチド及びトリペプチドの表記は、左端がN末端、右端がC末端に位置していることを示す。例えば、トリペプチドの表記「X－P r o－Y」は、左側のアミノ酸残基（X）がN末端、右側のアミノ酸残基（Y）がC末端に配されていることを指す。

[0016] [ペプチド]

本発明の癒着防止材には、下記(A-1)のアミノ酸配列を含むペプチド、及び／又は下記(A-2)のアミノ酸配列を含むペプチドが含まれる。

(A-1) － (X－P r o－Y) _n－ [Xは任意のアミノ酸、P r oはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、nは1～10の整数である。

]

(A-2) — (Pro-Y)_m — [Proはプロリン、Yはヒドロキシプロリン又はプロリンを示し、mは1～10の整数である。]

[0017] 前記(A-1)のアミノ酸配列において、Xは任意のアミノ酸である。前記(A-1)のアミノ酸配列におけるXとしては、例えば、疎水性アミノ酸、親水性塩基性アミノ酸、親水性中性アミノ酸等が挙げられる。前記疎水性アミノ酸としては、具体的には、Gly、Ala、Val、Leu、Tyr、Ile、Met、Pro、Phe、Trp、Cysが挙げられる。前記親水性塩基性アミノ酸としては、具体的には、Arg、Lys、Hisが挙げられる。前記親水性中性アミノ酸としては、具体的には、Asn、Gln、Ser、Thrが挙げられる。Xを構成するアミノ酸の中でも、癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、好ましくはGly、Ile、Asn、Arg、Tyr、Ala、Val、Leu、Met、Pro、Phe；より好ましくはGly、Ile、Asn、Arg、Tyr、Ala、Val、Leu、Phe；更に好ましくは、Gly、Ile、Asn、Arg、Tyr、Ala、Val、Leu；特に好ましくはGly、Ile、Asn、Arg、Tyr；最も好ましくはGly、Ile、Asn、Argが挙げられる。

[0018] また、前記(A-1)のアミノ酸配列において、YはHyp又はProである。癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、Yを構成するアミノ酸として、好ましくはHypが挙げられる。

[0019] 前記(A-1)のアミノ酸配列においてトリペプチドユニット「X-Pro-Y」の具体例としては、Gly-Pro-Hyp、Ile-Pro-Hyp、Asn-Pro-Hyp、Arg-Pro-Hyp、Tyr-Pro-Hyp、Ara-Pro-Hyp、Leu-Pro-Hyp、Val-Pro-Hyp、Phe-Pro-Hyp、Gly-Pro-Pro、Ile-Pro-Pro、Asn-Pro-Pro、Arg-Pro-Pro、Tyr-Pro-Pro、Ara-Pro-Pro、Leu-Pro-Pro、Val-Pro-Pro、Phe-Pro-Pro等が挙げられる。これらの中でも、癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、好ましくは、G

I l y - P r o - H y p、I l e - P r o - H y p、A s n - P r o - H y p、
A r g - P r o - H y p、T y r - P r o - H y p、G l y - P r o - P r o、
I l e - P r o - P r o、A s n - P r o - P r o、A r g - P r o - P r o、
T y r - P r o - P r o；更に好ましくは、G l y - P r o - H y p、
I l e - P r o - H y p、A s n - P r o - H y p、A r g - P r o - H y p、
T y r - P r o - H y p；特に好ましくは、G l y - P r o - H y p、
I l e - P r o - H y p、A s n - P r o - H y p、A r g - P r o - H y pが挙げられる。

[0020] また、前記(A-1)のアミノ酸配列において、 n は、トリペプチドユニット「 $X-Pro-Y$ 」の数であり、 $1 \sim 10$ の整数である。即ち、 n が2である場合には、前記(A-1)のアミノ酸配列は、「 $X-Pro-Y-X-Pro-Y$ 」を有することになる。癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、 n として、好ましくは $1 \sim 7$ 、より好ましくは $1 \sim 5$ 、更に好ましくは $1 \sim 3$ 、或は1又は2、特に好ましくは1である。

[0021] また、前記(A-1)のアミノ酸配列を有するペプチドは、所望の癒着防止効果を奏することを限度として、 $-(X-Pro-Y)_n-$ に示すアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に1以上のアミノ酸が付加されていてもよい。N末端に付加可能なアミノ酸の数として、例えば $1 \sim 40$ 個、好ましくは $1 \sim 20$ が挙げられる。また、C末端に付加可能なアミノ酸の数として、例えば $1 \sim 40$ 個、好ましくは $1 \sim 20$ が挙げられる。

[0022] 前記(A-2)のアミノ酸配列において、 Y はHyp又はProである。癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、 Y を構成するアミノ酸として、好ましくはHypが挙げられる。

[0023] また、前記(A-2)のアミノ酸配列において、 m は、ジペプチドユニット「 $Pro-Y$ 」の数であり、 $1 \sim 10$ の整数である。即ち、 m が2である場合には、前記(A-2)のアミノ酸配列は、「 $Pro-Y-Pro-Y$ 」を有することになる。癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、 m として、好ましくは $1 \sim 7$ 、より好ましくは $1 \sim 5$ 、更に好ましくは $1 \sim 3$ 、或は1又

は2、特に好ましくは1である。

[0024] また、前記(A-2)のアミノ酸配列を有するペプチドは、所望の癒着防止効果を奏することを限度として、 $-(\text{Pro}-Y)_n-$ に示すアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に1以上のアミノ酸が付加されていてもよい。N末端に付加可能なアミノ酸の数として、例えば1～40個、好ましくは1～20が挙げられる。また、C末端に付加可能なアミノ酸の数として、例えば1～40個、好ましくは1～20が挙げられる。

[0025] 本発明の癒着防止材において、前記(A-1)のアミノ酸配列を有するペプチド、及び前記(A-2)のアミノ酸配列を有するペプチドの中から、1種のペプチドを単独で使用してもよく、また2種以上のペプチドを組み合わせ使用してもよい。

[0026] また、本発明の癒着防止材では、前記アミノ酸配列を有するペプチドと共に、他のアミノ酸配列のペプチドも含まれていてもよい。例えば、コラーゲンのアミノ酸配列には、トリペプチドユニット「Gly-Pro-Hyp」及びジペプチドユニット「Pro-Hyp」が含まれており、コラーゲンを加水分解することにより得られるトリペプチド混合物にはGly-Pro-Hypが含まれており、コラーゲンを加水分解することにより得られるジペプチド混合物にはPro-Hypが含まれているので、本発明の癒着防止材では、このようなトリペプチド混合物やジペプチド混合物を使用することもできる。

[0027] 本発明で使用されるトリペプチド及びジペプチドは、天然由来のポリペプチド又は生物工学的手法を用いて得られたポリペプチドを加水分解することによって得ることができ、また、化学的に合成することによって得ることができる。例えば、トリペプチド「Gly-Pro-Hyp」及びジペプチド「Pro-Hyp」は、化学的な合成手法の他、コラーゲン等を加水分解することによって得ることができる。具体的には、ウシ、ブタ等の哺乳動物や、サメ、ティラピア、サケ、パンガシウス等魚類のコラーゲンは、トリペプチドユニット「Gly-Pro-Hyp」のアミノ酸配列、及びジペプチド

ユニット「P r o - H y p」のアミノ酸配列を含んでおり、これらのコラーゲンから、前記トリペプチド及びジペプチドを得ることができる。

[0028] [ゼラチンゲル]

本発明の癒着防止材にはゼラチンゲルが含まれる。

[0029] ゼラチンは、ウシ、ブタ等の哺乳動物や、サメ、ティラピア、サケ、パンガシウス等魚類のコラーゲンを、熱、酸、アルカリ、酵素等により変性させることにより得られる水溶性タンパク質であり、生体内で徐々に加水分解して消失するため生体適合性の高い素材である。

[0030] 本発明で使用されるゼラチンゲルは、未架橋ゼラチンゲル又は架橋ゼラチンゲルのいずれであってもよいが、癒着防止効果をより一層向上させるという観点から、好ましくは架橋ゼラチンゲルが挙げられる。架橋ゼラチンゲルを使用することによって、ゼラチンの生体内における分解が抑えられ、癒着防止に必要な期間、本件発明の癒着防止材が投与部に残存することが可能になる。

[0031] 架橋ゼラチンゲルとは、ゼラチンを架橋させたゲルである。ゼラチンを架橋させる方法としては、特に制限されず、例えば、加熱によって架橋させる熱架橋；紫外線や遠赤外線等の電子線照射によって架橋させる電子線架橋；グルタルアルデヒド、タンニン、明バン、硫酸アルミニウム、スクシンイミド化ポリ－L－グルタミン酸等で処理する化学架橋；グルタミナーゼ等の酵素で処理する酵素架橋等のいずれであってもよい。本発明で使用される架橋ゼラチンとして、生体適合性、癒着防止効果等の観点からは、好ましくは、熱架橋によって得られた架橋ゼラチンゲルが挙げられる。

[0032] また、本発明で使用されるゼラチンゲルは、多孔質体であることが好ましい。多孔質体のゼラチンゲルを使用することによって、癒着防止効果をより一層向上させることができる。多孔質体のゼラチンゲルの好適な例として、ゼラチンスポンジ（スポンジ様のゼラチンゲル）が挙げられる。多孔質体のゼラチンゲルは、公知の製造方法に従って得ることができる。また、ゼラチンスポンジとしては、例えば、スポンゼル（S p o n g e l）、ゲルフォー

ム（Gel foam）等として市販されており、本発明では、このような市販品を使用することもできる。

[0033] また、本発明で使用されるゼラチンゲルとしては、ヒアルロン酸、トレハロース、ペクチン、シクロデキストリン、キトサン等を含有するものを使用することもできる。このようなゼラチンゲルは、公知の方法で製造することができる。

[0034] 本発明で使用されるゼラチンゲルの形態は、エアロゲル又はハイドロゲルのいずれであってもよい。本発明において、エアロゲルとは、分散媒体としての空気を含有するゲル（即ち、乾燥ゲル）を指し、超臨界乾燥法を用いて得られた乾燥ゲル（狭義のエアロゲル）、大気圧下での乾燥により得られた乾燥ゲル（キセロゲル）、凍結乾燥により得られた乾燥ゲル（クライオゲル）を包含する。また、本発明において、ハイドロゲルとは、分散媒体としての水性溶媒を含有するゲル（即ち、含水ゲル）を指す。本発明の癒着防止材において、ゼラチンゲルとしてエアロゲル又はハイドロゲルのいずれを使用するかについては、後述する製剤形態に応じて適宜設定される。

[0035] 本発明で使用されるゼラチンゲルの形状については、特に制限されず、適用対象部位の形状に適合するように成型されていればよいが、エアロゲルの場合には粉末状であり、ハイドロゲルの場合に粒状（粉末状のハイドロゲルを含水させた形状）であることが好ましい。このように粉末状のエアロゲル又は粒状ハイドロゲルを使用することによって、本発明の癒着防止材が、患部で流動性があるゲル状を呈するので、投与後に適用対象部位での拡散性が良好になり、腱に投与しても微細で複雑な組織にまで拡散して癒着防止材患部に行き渡らせることが可能になって、しかも適用対象部位で一定期間留まって物理的バリア機能を発揮することができる。特に、ゼラチンスポンジを粉末状にしたエアロゲル、及び当該エアロゲルを含水させたハイドロゲルは、格段に優れた癒着防止効果を奏し得るので、好適に使用される。なお、ゼラチンゲルは、必要に応じて、シート状又はフィルム状の形状に成形されたものであってもよい。

[0036] 本発明の癒着防止材において、ゼラチンゲルとして、粉末状のエアロゲルを使用する場合、その粒径については、特に制限されないが、例えば、粉末状のエアロゲル（吸水していない状態）の粒径が、 $200 \sim 750 \mu\text{m}$ 、好ましくは $250 \sim 750 \mu\text{m}$ 、更に好ましくは $250 \sim 500 \mu\text{m}$ の範囲内にあることが挙げられる。このような粒径への調整は、篩を用いて所望の粒径のものを分級することにより行うことができる。

[0037] [ペプチドとゼラチンゲルの比率]

本発明の癒着防止材において、前記ペプチドとゼラチンゲルの比率については、所望の癒着防止効果が奏されることを限度として特に制限されないが、例えば、ゼラチンゲルの乾燥重量換算（ゼラチン自体の重量に換算） 100 重量部当たり、前記ペプチドが $2 \sim 500$ 重量部、好ましくは $50 \sim 400$ 重量部、更に好ましくは $100 \sim 300$ 重量部が挙げられる。

[0038] [癒着防止用ハイドロゲル]

本発明の癒着防止材による癒着防止効果は、前記ペプチド、ゼラチンゲル、及び水性溶媒を含むハイドロゲル（以下、「癒着防止用ハイドロゲル」と表記する）を、癒着防止が求められる対象部位に適用することによって奏される。

[0039] 前記癒着防止用ハイドロゲルに使用される水性溶媒としては、例えば、水、生理食塩液等が挙げられる。

[0040] 前記癒着防止用ハイドロゲルでは、前記ペプチドとゼラチンゲルが前述する比率を充足しつつ、ハイドロゲル状になる適量の水性溶媒が含まれていればよいが、前記癒着防止用ハイドロゲルにおける各成分の配合割合として、以下の範囲が例示される。

前記ペプチドの配合割合：例えば、 $1 \sim 50$ 重量%、好ましくは $3 \sim 40$ 重量%、更に好ましくは $10 \sim 30$ 重量%。

ゼラチンゲルの配合割合：例えば、乾燥重量換算（ゼラチン自体の重量に換算）で $5 \sim 50$ 重量%、好ましくは $10 \sim 40$ 重量%、更に好ましくは $15 \sim 30$ 重量%。

水性溶媒の配合割合：例えば、１０～９０重量％、好ましくは３０～８０重量％、更に好ましくは４０～５５重量％。

[0041] 本発明の癒着防止材において、前記アミノ酸配列を有するペプチドと共に、他のアミノ酸配列のペプチドを含むペプチド混合物を使用する場合、前記アミノ酸配列を有するペプチドが前記配合割合となるようにすることが好ましい。

[0042] 〔製剤形態及び使用方法〕

本発明の癒着防止材は、前記癒着防止用ハイドロゲルそのものを含むものであってもよい。

[0043] また、前記癒着防止用ハイドロゲルを投与前に調製又は適用対象部位にて形成できるものであってもよい。以下、前記癒着防止用ハイドロゲルを投与前に調製又は適用対象部位にて形成できる態様の製剤を「用時調製用の癒着防止材」と表記する。

[0044] 用時調製用の癒着防止材として、具体的には、前記ペプチド及びゼラチンゲルを同一組成物中に含む製剤（以下、１剤タイプ）、及び前記ペプチドとゼラチンゲルとを別々の組成物として含む製剤（以下、２剤タイプ）が挙げられる。以下、本発明の癒着防止材について、１剤タイプの用時調製用の癒着防止材と２剤タイプの用時調製用の癒着防止材に分けて説明する。

[0045] ・ １剤タイプの用時調製用の癒着防止材

１剤タイプの用時調製用の癒着防止材では、同一組成物中で、前記トリペプチド及びエアロゲル状のゼラチンゲルが水非存在下で含まれている固形製剤であり、用時に水性溶媒を添加することによって使用される。

[0046] １剤タイプの用時調製用の癒着防止材では、例えば、ゼラチンゲルが粉末状のエアロゲルであれば、当該エアロゲルと前記ペプチドが混合されたもの、又は当該エアロゲルに前記トリペプチドが担持されたものであればよい。また、ゼラチンゲルがシート状又はフィルム状に成型されているエアロゲルであれば、当該エアロゲルに前記ペプチドが担持させていけばよい。

[0047] １剤タイプの用時調製用の癒着防止材では、前記ペプチドとゼラチンゲル

が前述する比率を充足するように含まれていればよいが、1剤タイプの用時調製用の癒着防止材における各成分の含有量として、以下の範囲が例示される。

前記ペプチドの含有量：例えば、10～90重量%、好ましくは40～80重量%、更に好ましくは50～70重量%。

ゼラチンゲルの含有量：例えば、乾燥重量換算（ゼラチン自体の重量に換算）で10～90重量%、好ましくは20～60重量%、更に好ましくは30～50重量%。

[0048] 当該態様の癒着防止材の使用方法としては、例えば、投与する前に水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製した後に適用対象部位に投与する方法；又はそのまま適用対象部位に投与した後に水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成させる方法等が挙げられる。

[0049] 当該態様の癒着防止材において、投与時に使用される水性溶媒の量については、最終的に前記癒着防止用ハイドロゲルを形成できるように適宜設定すればよいが、具体的には、エアロゲル状のゼラチンゲル100重量部当たり、使用される水性溶媒が10～90重量部、好ましくは30～80重量部、更に好ましくは40～55重量部が挙げられる。

[0050] ・2剤タイプの用時調製用の癒着防止材

2剤タイプの用時調製用の癒着防止材では、前記トリペプチドを含む第Ⅰ剤と、ゼラチンゲルを含む第Ⅱ剤が、それぞれ分離した状態で含まれる。当該態様の癒着防止材では、第Ⅰ剤、第Ⅱ剤、及び必要に応じて水性溶媒を、用時に混合又は含浸させることによって使用される。

[0051] 前記第Ⅰ剤は、水性溶媒を含む液状であってもよく、また、水性溶媒を含まない粉末状であってもよい。また、前記第Ⅱ剤は、水性溶媒を含むハイドロゲル状であってもよく、また、水性溶媒を含まないエアロゲル状であってもよい。即ち、2剤タイプの用時調製用の癒着防止材における第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の組み合わせ態様として、(1)液状の第Ⅰ剤とハイドロゲル状の第Ⅱ剤

剤の組み合わせ、(2)液状の第Ⅰ剤とエアロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせ、(3)粉末状の第Ⅰ剤とハイドロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせ、及び(4)粉末状の第Ⅰ剤とエアロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせが挙げられる。以下、これらの組み合わせ態様毎に説明する。

[0052] (液状の第Ⅰ剤とハイドロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせ)

液状の第Ⅰ剤は、前記トリペプチド及び水性溶媒を含有する。

[0053] また、ハイドロゲル状の第Ⅱ剤は、ゼラチンゲル及び水溶溶媒を含有する。ゼラチンゲルとして、粉末状のエアロゲルに含水させた粒状のハイドロゲルを使用する場合には、第Ⅱ剤は流動性があるゲル状を呈する。また、ゼラチンゲルとしてシート状又はフィルム状に成型されているものを使用する場合、第Ⅱ剤はシート状又はフィルム状になる。

[0054] 液状の第Ⅰ剤における前記ペプチド及び水性溶媒の配合割合、並びにハイドロゲル状の第Ⅱ剤におけるゼラチンゲル及び水性溶媒の配合割合については、用時に第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合した際に、前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜設定すればよいが、具体的には、以下の範囲が例示される。

第Ⅰ剤中の前記ペプチドの配合割合：例えば、1～80重量%、好ましくは3～50重量%。

第Ⅰ剤中の水性溶媒の配合割合：例えば、20～99重量%、好ましくは50～97。

第Ⅱ剤中のゼラチンゲルの配合割合：例えば、乾燥重量換算（ゼラチン自体の重量に換算）で1～80重量%、好ましくは10～50重量%。

第Ⅱ剤中の水性溶媒の配合割合：例えば、20～99重量%、好ましくは50～90重量%。

[0055] 投与される第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の比率については、第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の混合後に前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜調整すればよいが、例えば、第Ⅰ剤100重量部当たり、第Ⅱ剤が75～125重量部、好ましくは90～120重量部、更に好ましくは95～105重量部が挙げら

れる。

[0056] 当該態様の癒着防止材の使用方法としては、例えば、投与する前に第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法；適用対象部位に第Ⅰ剤を投与した後に第Ⅱ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法；又は適用対象部位に第Ⅱ剤を投与した後に第Ⅰ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法等が挙げられる。投与する前に第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法が、投与の簡便性の観点から好ましい。

[0057] (液状の第Ⅰ剤とエアロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせ)

液状の第Ⅰ剤は、前記ペプチド及び水性溶媒を含有する。

[0058] また、エアロゲル状の第Ⅱ剤は、エアロゲル状のゼラチンゲルを含有する。ゼラチンゲルとして粉末状のエアロゲルを使用する場合、第Ⅱ剤は粉末状になる。また、ゼラチンゲルとしてシート状又はフィルム状に成型されているものを使用する場合、第Ⅱ剤はシート状又はフィルム状になる。

[0059] 液状の第Ⅰ剤における前記トリペプチド及び水性溶媒の配合割合については、用時に第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合した際に、前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜設定すればよいが、具体的には、以下の範囲が例示される。

第Ⅰ剤中の前記トリペプチドの配合割合：例えば、1～80重量%、好ましくは3～50重量%。

第Ⅰ剤中の水性溶媒の配合割合：例えば、20～99重量%、好ましくは50～97。

[0060] 投与される第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の比率については、第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の混合後に前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜調整すればよいが、例えば、第Ⅰ剤100重量部当たり、第Ⅱ剤が75～125重量部、好

ましくは90～110重量部、更に好ましくは95～105重量部が挙げられる。

[0061] 当該態様の癒着防止材の使用方法としては、例えば、第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法；適用対象部位に第Ⅰ剤を投与した後に第Ⅱ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法；又は適用対象部位に第Ⅱ剤を投与した後に第Ⅰ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法等が挙げられる。第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法が、投与の簡便性の観点から好ましい。

[0062] (粉末状の第Ⅰ剤とハイドロゲル状の第Ⅱ剤の組み合わせ)

粉末状の第Ⅰ剤は、前記トリペプチドを含有する。

[0063] また、ハイドロゲル状の第Ⅱ剤は、ゼラチンゲル及び水性溶媒を含有する。ゼラチンゲルとして、粉末状のエアロゲルに含水させた粒状のハイドロゲルを使用する場合には、第Ⅱ剤は流動性があるゲル状を呈する。また、ゼラチンゲルとしてシート状又はフィルム状に成型されているものを使用する場合、第Ⅱ剤はシート状又はフィルム状になる。

[0064] ハイドロゲル状の第Ⅱ剤におけるゼラチンゲル及び水性溶媒の配合割合については、用時に第Ⅰ剤と第Ⅱ剤を混合した際に、前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜設定すればよいが、具体的には、以下の範囲が例示される。

第Ⅱ剤中のゼラチンゲルの配合割合：例えば、1～50重量%、好ましくは10～30重量%。

第Ⅱ剤中の水性溶媒の配合割合：例えば、50～99重量%、好ましくは70～90%。

[0065] 投与される第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の比率については、第Ⅰ剤と第Ⅱ剤の混合

後に前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜調整すればよいが、例えば、第ⅠⅠ剤１００重量部当たり、第Ⅰ剤が７５～１２５重量部、好ましくは９０～１１０重量部、更に好ましくは９５～１０５重量部が挙げられる。

[0066] 当該態様の癒着防止材の使用方法としては、例えば、投与する前に第Ⅰ剤と第ⅠⅠ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法；適用対象部位に第Ⅰ剤を投与した後に第ⅠⅠ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法；又は適用対象部位に第ⅠⅠ剤を投与した後に第Ⅰ剤を投与し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法等が挙げられる。投与する前に第Ⅰ剤と第ⅠⅠ剤を混合し、更に必要に応じて水性溶媒を添加して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法が、投与の簡便性の観点から好ましい。

[0067] （粉末状の第Ⅰ剤とエアロゲル状の第ⅠⅠ剤の組み合わせ）

粉末状の第Ⅰ剤は、前記トリペプチドを含有する。

[0068] また、エアロゲル状の第ⅠⅠ剤は、エアロゲル状のゼラチンゲルを含有する。ゼラチンゲルとして粉末状のエアロゲルを使用する場合、第ⅠⅠ剤は粉末状になる。また、ゼラチンゲルとしてシート状又はフィルム状に成型されているものを使用する場合、第ⅠⅠ剤はシート状又はフィルム状になる。

[0069] 投与される第Ⅰ剤と第ⅠⅠ剤の比率については、投与される第Ⅰ剤、第ⅠⅠ剤、及び水性溶媒の混合後に前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜調整すればよいが、例えば、第Ⅰ剤１００重量部当たり、第ⅠⅠ剤が７５～１２５重量部、好ましくは９０～１１０重量部、更に好ましくは９５～１２５重量部が挙げられる。

[0070] 当該態様の癒着防止材の使用方法としては、例えば、投与する前に第Ⅰ剤、第ⅠⅠ剤、及び水性溶媒を混合して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法；投与する前に第Ⅰ剤及び第ⅠⅠ剤を

混合し、得られた混合物を適用対象部位に投与し、更に当該混合物に水性溶媒を添加して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法；第ⅠⅠ剤を適用対象部位に投与し、次いで水性溶媒を加えた第Ⅰ剤を投与して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法；又は第Ⅰ剤を適用対象部位に投与し、次いで第ⅠⅠ剤に水性溶媒を加えてハイドロゲル状にして適用対象部位に投与して、適用対象部位上で前記癒着防止用ハイドロゲルを形成する方法等が挙げられる。投与する前に第Ⅰ剤、第ⅠⅠ剤、及び水性溶媒を混合して前記癒着防止用ハイドロゲルを調製にした後に適用対象部位に投与する方法が、投与の簡便性の観点から好ましい。

[0071] また、当該態様の癒着防止材は、水性溶媒を用いず使用することができる。具体的には、このような使用方法としては、例えば、投与する前に第Ⅰ剤及び第ⅠⅠ剤を混合した後に適用対象部位に投与する方法；適用対象部位に第Ⅰ剤を投与した後に第ⅠⅠ剤を投与する方法；又は適用対象部位に第ⅠⅠ剤を投与した後に第Ⅰ剤を投与する方法等が挙げられる。投与する前に第Ⅰ剤及び第ⅠⅠ剤を混合した後に適用対象部位に投与する方法が投与の簡便性の観点から好ましい。これらの使用方法の場合、適用対象部位に存在する血液等が、癒着防止用ハイドロゲルを作成するための水性溶媒として使用される。

[0072] 当該態様の癒着防止材において、投与時に水性溶媒を使用する場合、その使用量については、用時に第Ⅰ剤、第ⅠⅠ剤、及び水性溶媒を混合した際に、前記癒着防止用ハイドロゲルの組成になるように適宜設定すればよいが、具体的には、第Ⅰ剤及び第ⅠⅠ剤の合計量１００重量部当たり、使用される水性溶媒が１０～９００重量部、好ましくは２０～２５０重量部、更に好ましくは８０～１５０重量部が挙げられる。

[0073] [その他の成分]

本発明の癒着防止材は、前記成分の他に、必要に応じて、治療効果の促進や細菌感染の防止等を目的として、抗菌剤、抗生剤、抗炎症剤、血行改善剤、ステロイド剤、酵素阻害剤、増殖因子、各種ビタミン等の薬理成分を含ん

でいてもよい。本発明の癒着防止材は、適用対象部位で一定期間留まることから、上記薬理成分を含有することによって、薬理成分の徐放を目的とするドラッグデリバリーシステム的一种として利用することもできる。

[0074] 更に、本発明の癒着防止材には、必要に応じて、賦形剤、結合剤、滑沢剤、pH調整剤、緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、防湿剤等の添加剤を含んでいてもよい。

[0075] 本発明の癒着防止材が2剤タイプの用時調製用の癒着防止材である場合、これらの薬理成分及び添加剤は、前記第Ⅰ剤及び第Ⅱ剤のいずれか一方に含まれていてもよく、またこれらの双方に含まれていてもよい。

[0076] [用途]

本発明の癒着防止材は、腹腔内臓器等の外科分野や、腱、神経、関節への整形外科分野において、切開や内視鏡処理等の手術を行った際の生体組織の癒着を防止するために使用される。特に、癒着防止が求められる部位の中でも、腱は、周辺組織が微細で複雑なため、癒着防止材には、腱の周辺組織全体に行き渡るように優れた拡散性を有していることが求められるが、本発明の癒着防止材は、エアロゲル状のゼラチンゲル粉末又はこれを含水させた粒状のハイドロゲルを使用する場合には、腱の癒着防止材としての要求特性を十分に満足させることができる。このような本発明の効果を鑑みれば、癒着防止の適用対象として、好ましくは腱が挙げられる。

[0077] 本発明の癒着防止材がハイドロゲル状で投与される場合には、投与後の拡散性に優れているので、対象部位周辺に投与すれば、対象部位全体に行き巡らせることができる。また、本発明の癒着防止材が粉末状で投与される場合には、対象部位全体に投与すればよい。

[0078] 本発明の癒着防止材の投与量は、適用対象部位の状態に応じて癒着防止に有効な量を適宜設定すればよいが、例えば、本発明の癒着防止材を、癒着防止が求められる適用対象部位1cm²当たり、ゼラチンゲルの乾燥重量換算（ゼラチン自体の重量に換算）で20～120mg程度に相当する量に設定すればよい。

実施例

[0079] 以下に、実施例等に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

[0080] 1. 試験材料の作製・準備

1-1. ゼラチンスポンジゲル粉末の作製

以下の試験例に使用した架橋ゼラチンスポンジゲル粉末は、以下の手順で作製した。

[0081] 1-1-1. 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)の作製

架橋ゼラチンスポンジゲル（商品名「スポンゼル」、アステラス製薬株式会社）を、超遠心ミルを用いて $500\mu\text{m}$ 以下の粒子径に粉碎し、ふるいを用いて粒子径 $250\sim 500\mu\text{m}$ の粉体のみを回収し、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)を得た。

[0082] 1-1-2. 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)の作製

ゼラチン（商品名「RM-100」、ゼライス株式会社）2.5重量%を蒸留水に溶解してゼラチン溶液を調製した。これを予備凍結（ -40°C 、12時間）した後に凍結乾燥（約 -45°C 、40時間）してゼラチンスポンジを得た。得られたゼラチンスポンジを定温乾燥機を用いて熱架橋（ 140°C 、48時間）した後、超遠心ミルを用いて $500\mu\text{m}$ 以下の粒子径に粉碎し、ふるいを用いて粒子径 $250\sim 500\mu\text{m}$ の粉体のみを回収し、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)を得た。

[0083] 1-1-3. 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(C)の作製

ゼラチン溶液におけるゼラチン濃度を10重量%としたこと以外は、前記架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)と同条件で製造を行い、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(C)を得た。

[0084] 1-1-4. 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(D)の作製

ゼラチンとして、商品名「BeMatrix ゼラチンLS-H」（新田ゼラチン株式会社）を使用したこと以外は、前記架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)と同条件で製造を行い、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(D)を得た。

[0085] 1-2. ペプチドの準備

下記の各種ペプチドを準備した。

・トリペプチド混合物 1

豚皮由来のコラーゲンを加水分解したペプチド混合物（商品名「T p - 1 0 0」、ゼライス株式会社）。

当該ペプチド混合物にはトリペプチドが90重量%含まれている。

含まれるトリペプチドの総量100重量部当たり、G l y - P r o - H y p が33.3重量部、G l y - A l a - H y p が3.7重量部、G l y - P r o - A l a が14.8重量部、その他のトリペプチドが48.1重量部含まれている。

[0086] ・トリペプチド2

G l y - A l a - H y p からなる合成したトリペプチド（B a c h e m A G、H-3260）。

[0087] ・トリペプチド3

G l y - P r o - A l a からなる合成したトリペプチド（B a c h e m A G、H-3615）。

[0088] ・トリペプチド4

G l y - P r o - H y p からなる合成したトリペプチド（B a c h e m A G、H-3630）。

[0089] ・トリペプチド5

I l e - P r o - H y p からなる合成したトリペプチド（株式会社ペプチド研究所による委託合成）。

[0090] ・トリペプチド6

A s n - P r o - H y p からなる合成したトリペプチド（株式会社ペプチド研究所による委託合成）。

[0091] ・トリペプチド7

A r g - P r o - H y p からなる合成したトリペプチド（株式会社ペプチド研究所による委託合成）。

[0092] ・トリペプチド8

T y r - P r o - H y p からなる合成したトリペプチド（株式会社ペプチド研究所による委託合成）。

[0093] ・オリゴペプチド1

(G l y - P r o - H y p)₅ からなる合成したオリゴペプチド（アミノ酸残基数15）（株式会社ペプチド研究所、4032）。

[0094] ・ポリペプチド1

(G l y - P r o - H y p)₁₀ からなる合成したポリペプチド（アミノ酸残基数30）（株式会社ペプチド研究所、4033）。

[0095] ・ジペプチド1

P r o - H y p からなる合成したジペプチド（B a c h e m A G、G - 3025）。

[0096] ・ジペプチド2

G l y - P r o からなる合成したジペプチド（株式会社ペプチド研究所、3052）。

[0097] 2. 試験例12-1. 検体の準備

表1に示す組成の検体を調製した。

[表1]

検体	組成
比較例1-1	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
比較例1-2	トリペプチド混合物1（3重量%）を含む生理食塩液
比較例1-3	架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)（20重量%）及び生理食塩液（80重量%）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例1	トリペプチド混合物1（3重量%）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)（20重量%）及び生理食塩液（77重量%）を混合したハイドロゲル組成物。

[0098] 2-2. 癒着防止効果の評価

供給動物として13週齢のウサギ（Kbl:JW、雄）を用いた。麻酔薬として

、ケタミン（商品名「ケタラール筋注用500mg」、第一三共プロファーマ株式会社）とキシラジン（商品名「セラクター2%注射液」、）をケタミン100液量あたりキシラジン20液量の割合で混合し、ウサギに混合液1.45ml/kg体重を筋肉内注射した。次いで、鎮痛薬としてブプレノルフィン（商品名「レペタン注0.2mg」、大塚製薬株式会社）20μg/kg体重を筋肉内注射し、抗菌薬としてエンロフロキサシン（バイトリル2.5%注射液、バイエル薬品株式会社）4mg/kg体重を皮下注射した。

[0099] 麻酔下の動物の左後肢を除毛した。次いで、固定器（商品名「北島式固定器」、株式会社夏目製作所）にウサギを固定し、術部周辺を消毒した。左後肢のアキレス腱の上部の皮膚を縦切開し、アキレス腱を露出させた。露出したアキレス腱の中央をメスで鋭的に切断した。その後、アキレス腱の切断部位を、縫合糸（商品名「5-0 Mersilene」、Ethicon株式会社）を用いてmodified kessler法で縫合し、止血及び生理食塩液を用いた洗浄を行った後に、露出したアキレス腱とその周囲に検体0.5mLを投与した。その後、切開部を縫合糸（商品名「医療用糸付き縫合糸3-0号」、松田医科工業株式会社）で縫合し、ウサギの左後肢をギブス（商品名「スコッチキャストTMプラス-Jキャストینگ・テープ」、3M株式会社）を用いて固定して不動化した。

[0100] 検体投与から2週間後に、術部を再度切開し、アキレス腱の5カ所（図1に示すA～E）の癒着の程度を、下記に示す判定基準に従ってスコア化した。

<癒着スコア>

0：癒着なし

1：鈍的剥離により周囲組織から容易に剥離可能

2：鈍的剥離により周囲組織から剥離可能

3：周囲組織からの剥離には、わずかな鋭的剥離が必要

4：周囲組織からの剥離には、完全な鋭的剥離が必要

[0101] 比較例1-1及び1-2では各6匹のウサギ、比較例1-3及び実施例1では各5匹のウサギで試験を行い、5カ所のスコアの合計を個体の癒着スコアとし、各

群の当該癒着スコアの平均値を算出した。また、検体投与から2週間後のアキレス腱において検体の残存の有無を目視にて確認した。

[0102] 得られた結果を図2に示す。この結果、G l y - P r o - H y pを含むコラーゲン由来トリペプチド混合物1（比較例1-2）又は架橋ゼラチンスポンジゲル(A)を含むハイドロゲル（比較例1-3）の単独投与では、癒着防止効果は限定的であった。G l y - P r o - H y pを含むコラーゲン由来トリペプチド混合物1と架橋ゼラチンスポンジゲルを含むハイドロゲル(A)（実施例1）では、これらを単独で使用した場合に比して、飛躍的に癒着防止効果が向上していた。

[0103] 3. 試験例2

3-1. 検体の準備

表2に示す組成の検体を調製した。

[表2]

検体	組成
比較例2	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例2	トリペプチド混合物1（30重量%）を含む生理食塩液からなる第I剤、及び 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)からなる第II剤

[0104] 3-2. 癒着防止効果の評価

13週齢のウサギ（Kbl:JW、雄）を用いて、前記試験例1と同様の方法で、アキレス腱の切断及び縫合を行い、止血及び生理食塩水を用いた洗浄を行った後に、露出したアキレス腱とその周囲に検体を投与した。検体の投与は、比較例2では0.5 mLを投与し、実施例2では、第I剤0.1 gの投与後に、第II剤の上に第I剤0.4 mLを投与した。

[0105] 検体の投与後、切開部を縫合し、ウサギをギブス固定して不動化した。検体投与から4週間後に、前記試験例1と同様の方法でアキレス腱の癒着の程度を評価した。なお、比較例2では5匹のウサギ、実施例2では6匹のウサギで試験を行った。

[0106] 得られた結果を図3に示す。この結果、G l y - P r o - H y pを含むコ

ラーゲン由来トリペプチド混合物 1 と架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)を投与することによって、術後4週間後でも、癒着防止効果が認められることが明らかとなった。

[0107] 4. 試験例 3

4-1. 検体の準備

表3に示す組成の検体を調製した。

[表3]

検体	組成
比較例 3	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例 3-1	トリペプチド混合物 1（3 重量％）を含む生理食塩液からなる第 I 剤、及び 架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)からなる第 II 剤
実施例 3-2	トリペプチド混合物 1（3 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(A)（20 重量％）及び生理食塩液（77 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0108] 4-2. 癒着防止効果の評価

供給動物として、13週齢のウサギ（Kb1:JW、雄）を用いた。前記試験例 1と同様の方法で、麻酔、除毛、固定及び消毒を実施した。次いで、麻酔下で、左後肢の中足指の上部の皮膚を縦切開し、屈筋腱を露出させた。露出した屈筋腱の内、深指屈筋腱をメスで鋭的に切断した。その後、深指屈筋腱の切断部位を、縫合糸（商品名「6-0 prolene」、Ethicon株式会社）を用いてmodified kessler法で縫合し、止血及び生理食塩液を用いた洗浄を行った後に、露出した深指屈筋腱とその周囲に検体を投与した。検体の投与は、比較例 3では0.1 mLを投与し、実施例3-1では第 II 剤0.02 gの投与後に、第 II 剤の上に第 I 剤0.08 mLを投与し、実施例3-2では0.1 mLを投与した。その後、切開部を縫合糸（商品名「医療用糸付き縫合糸 5-0 号」、松田医科工業株式会社）で縫合した、自傷行為の予防のために、首の周りにカラーを巻いて飼育した。

[0109] 検体投与から2週間後に、ウサギをソムノペンチル（商品名「ペントバル

ビタールナトリウム」、共立製薬株式会社)の耳介静脈からの過剰投与により安楽死した。術部を再度切開し、深指屈筋腱と滑走床、深指屈筋腱と浅指屈筋腱、深指屈筋腱とその他周囲組織の3箇所について、下記の評価基準に従い癒着の程度を評価した。3箇所のスコアの合計を個体値とした。

<評価基準>

0:癒着なし

1:鈍的剥離により周囲組織から容易に剥離可能

2:鈍的剥離により周囲組織から剥離可能

3:周囲組織からの剥離には、わずかな鋭的剥離が必要

4:周囲組織からの剥離には、完全な鋭的剥離が必要

[0110] また、関節可動域の測定は以下の手順で行った。検体投与から2週後のウサギの左後肢を距骨と頸骨間で切断した。切断した左後肢を測定台に設置した。次に、MP関節近位の深指屈筋腱に糸を結びつけ、フックを介して糸と引っ張り試験機を結びつけた。なお、引っ張り試験機は荷重測定器(商品名「デジタルフォースゲージ ZP-500N」、イマダ株式会社)と計測スタンド(商品名「横型電動計測スタンドMH2-500N」、イマダ株式会社)から構成した。そして、腱に負荷(0.5、1.0、2.0、及び3.0N)をかけ、負荷前及び負荷後の写真を撮影した。下記計算式により、関節可動域を算出した。

[数1]

$$\text{関節可動域} (^{\circ}) = \text{負荷前} (\text{PIP関節の屈曲角度} + \text{DIP関節の屈曲角度}) - \text{負荷後} (\text{PIP関節の屈曲角度} + \text{DIP関節の屈曲角度})$$

[0111] 得られた結果を図4に示す。また、図4には、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した写真も示す。この結果、Gly-Por-Hypを含むコラーゲン由来トリペプチド混合物1と架橋ゼラチンスポンジゲルを投与することによって、癒着を防止でき、関節可動域が広がることが確認された。

[0112] 5. 試験例4

5-1. 検体の準備

表 4 に示す組成の検体を調製した。

[表4]

検体	組成
比較例 4	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例 4-1	トリペプチド混合物 1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 4-2	トリペプチド混合物 1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（C）（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0113] 5－2．癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体の投与量は 0.2 mL に設定した。また、比較例 4 では 12 匹のウサギ、実施例 4-1 では 8 匹のウサギ、実施例 4-2 では 9 匹のウサギで試験を行った。

[0114] 得られた結果を図 5 に示す。この結果、G l y－P r o－H y p を含むトリペプチド混合物 1 と架橋ゼラチンスポンジゲルを投与することによって、癒着を防止でき、関節可動域が広がることが確認された。また、架橋ゼラチンスポンジゲル(B)又は(C)を使用した場合（実施例 4-1 及び 4-2）には、架橋ゼラチンスポンジゲル(A)を使用した場合（前記試験例 3 の実施例 3-1 及び 3-2）に比べて、投与 2 週間後において検体が患部に屈筋腱に残存している割合が高くなっており、癒着防止効果が向上していることが確認された。

[0115] 6．試験例 5

6－1．検体の準備

表 5 に示す組成の検体を調製した。

[表5]

検体	組成
比較例 5-1	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例 5-1	トリペプチド混合物 1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
比較例 5-2	トリペプチド 2（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
比較例 5-3	トリペプチド 3（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 5-2	トリペプチド 4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
比較例 5-4	架橋ゼラチンスポンジゲル粉末（B）（20 重量％）、及び生理食塩水（80 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0116] 6-2. 癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果进行评估した。なお、検体の投与量は 0.15 mL に設定した。また、比較例 5-1、実施例 5-1 及び 5-2 では 6 匹のウサギ、比較例 5-2、5-3 及び 5-4 では 7 匹のウサギで試験を行った。

[0117] 得られた結果を図 6 に示す。この結果、トリペプチド 4（G l y - P r o - H y p）と架橋ゼラチンスポンジゲルの投与は、ペプチド混合物 1 と架橋ゼラチンスポンジゲルの投与の場合と同等の癒着防止効果が認められた。一方、トリペプチド 2（G l y - A l a - H y p）及びトリペプチド 3（G l y - P r o - A l a）を使用した場合には、癒着防止効果はペプチド混合物 1 を使用した場合に比べて劣っていた。

[0118] 7. 試験例 67-1. 検体の準備

表 6 に示す組成の検体を調製した。

[表6]

検体	組成
比較例 6-1	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例 6-1	トリペプチド4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
比較例 6-2	ジペプチド2（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 6-2	ジペプチド1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0119] 7-2. 癒着防止効果の評価

前記試験例3と同様の方法で癒着防止効果进行评估した。なお、検体の投与量は0.15 mLに設定した。また、比較例6-1、及び実施例6-1及び6-2では9匹のウサギ、比較例6-2では5匹のウサギで試験を行った。

[0120] 得られた結果を図7に示す。この結果、ジペプチド2（Gly-Pro）は、トリペプチド4（Gly-Pro-Hyp）及びジペプチド1（Pro-Hyp）を使用した場合に比して癒着防止効果が低下していた。即ち、本結果から、Gly-Pro-Hypのアミノ酸配列及びPro-Hypのアミノ酸配列が、癒着防止効果に寄与していることが明らかとなった。

[0121] 8. 試験例78-1. 検体の準備

表7に示す組成の検体を調製した。

[表7]

検体	組成
比較例 7	生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）
実施例 7-1	トリペプチド 4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 7-2	オリゴペプチド 1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 7-3	ポリペプチド 1（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）、及び生理食塩液（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0122] 8-2. 癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体の投与量は 0.15 mL に設定した。また、試験では、PIP 関節及び DIP 関節の可動域についても、下記算出式に従って算出した。なお、比較例 7 では 1 匹のウサギ、実施例 7-1 及び 7-2 では 7 匹のウサギ、実施例 7-3 では 8 匹のウサギで試験を行った。

[数2]

PIP 関節の可動域 (°) = 負荷前の PIP 関節の屈曲角度 - 負荷後の PIP 関節の屈曲角度)

DIP 関節の可動域 (°) = 負荷前の DIP 関節の屈曲角度 - 負荷後の DIP 関節の屈曲角度)

[0123] 関節可動域の測定結果を図 8、PIP 関節及び DIP 関節の可動域の測定結果を図 9、癒着スコアの結果を図 10、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を図 11、関節可動域と癒着スコアの相関を分析した結果を図 12 に示す。

[0124] この結果、ユニット[Gly-Pro-Hyp]を有するトリペプチド 4、オリゴペプチド 1 及びポリペプチド 1 を使用した場合でも、癒着防止効果が認められた。但し、ポリペプチド 1 は、トリペプチド 4 及びオリゴペプチド

1 に比べて、その効果が低下していた。これらの結果から、ユニット [G I y - P r o - H y p] を 5 ユニット以下含むペプチドを使用することによって、格段に優れた癒着防止効果が奏されることが明らかとなった。

[0125] また、図 1 2 から明らかなように、関節可動域と癒着スコアの間には相関関係が認められた。なお、縫合した深指屈筋腱の破断強度は、比較例 7 及び実施例 7-1~7-3 の間で有意な差は認められなかった。

[0126] 9. 試験例 8

9-1. 検体の準備

表 8 に示す組成の検体を調製した。

[表 8]

検体	組成
比較例 8	生理食塩液 (株式会社大塚製薬工場)
実施例 8-1	トリペプチド 4 (45mg)、及び架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B) (30mg) からなる粉末組成物。
実施例 8-2	トリペプチド 4 からなる第 I 剤 (粉末状)、及び架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B) (20 重量%) 及び生理食塩液を含む第 II 剤 (ハイドロゲル状)
実施例 8-3	トリペプチド 4 (30 重量%) 及び生理食塩液を含む第 I 剤 (液状)、及び架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B) (20 重量%) 及び生理食塩液を含む第 II 剤 (ハイドロゲル状)

[0127] 9-2. 癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体は、比較例 8 では 0.15 mL 投与、実施例 8-1 では 75 mg 投与、実施例 8-2 では第 I 剤 45 mg を投与後に第 II 剤 0.15 mL を投与、実施例 8-2 では第 I 剤 0.075 mL と第 II 剤 0.075 mL とを混合した後に投与した。また、試験では、PIP 関節及び DIP 関節の可動域についても、前記試験例 7 と同様の方法で求めた。

[0128] 関節可動域の測定結果を図 1 3、PIP 関節及び DIP 関節の可動域の測定結果を図 1 4、癒着スコアの結果を図 1 5、試験終了時に屈筋腱の状態を

観察した結果を図 16、関節可動域と癒着スコアの相関を分析した結果を図 17 に示す。

- [0129] この結果、G l y－P r o－H y p からなるトリペプチド 4 と架橋ゼラチンスポンジゲルは、混合粉末状で同時に投与（実施例 8-1）、粉末状の第 I 剤とハイドロゲル状の第 II 剤を別々に投与（実施例 8-2）、ハイドロゲル状態で同時に投与（実施例 8-3）の何れであっても、癒着防止効果が認められた。但し、混合粉末状で投与した実施例 8-1 は、実施例 8-2 及び 8-3 に比して、D I P 可動域が小さくなっていた。

[0130] 10. 試験例 9

10-1. 検体の準備

表 9 に示す組成の検体を調製した。

[表 9]

検体	組成
比較例 9	生理食塩水（株式会社大塚製薬工場）
実施例 9-1	トリペプチド 4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B)（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 9-2	トリペプチド 5（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B)（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 9-3	トリペプチド 6（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B)（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 9-4	トリペプチド 7（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B)（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。
実施例 9-5	トリペプチド 8（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末 (B)（20 重量％）、及び生理食塩水（50 重量％）を混合したハイドロゲル組成物。

[0131] 10-2. 癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体の投与量は 0.15 mL に設定した。なお、比較例 9 及び実施例 9-3 では 9 匹のウサギ、実施例 9-1 では 6 匹のウサギ、実施例 9-2、9-4、及び 9-5 では 8 匹のウサギで試験を行った。

- [0132] 関節可動域及び癒着スコアの測定結果を図 18、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を図 19 に示す。

- [0133] この結果、トリペプチド 4（G l y－P r o－H y p）だけでなく、トリペプチド 5（l e－P r o－H y p）、6（A s n－P r o－H y p）、7

(A r g - P r o - H y p)、及び8 (T y r - P r o - H y p) を使用した場合でも、癒着防止効果が認められた。即ち、本結果から、「X - P r o - H y p」(Xは任意のアミノ酸)のトリペプチドは、ゼラチンゲルとの併用によって、優れた癒着防止効果を奏することが確認された。

[0134] 1 1. 試験例 1 0

1 1 - 1. 検体の準備

表 1 0 に示す組成の検体を調製した。

[表10]

検体	組成
比較例 10-1	生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場)
実施例 1 0	トリペプチド 4 (30 重量%)、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B) (20 重量%)、及び生理食塩水 (50 重量%) を混合したハイドロゲル組成物。
比較例 10-2	グリシン (10 重量%)、プロリン (10 重量%)、ヒドロキシプロリン (10 重量%)、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B) (20 重量%)、及び生理食塩水 (50 重量%) を混合したハイドロゲル組成物。

[0135] 1 1 - 2. 癒着防止効果の評価

前記試験例 3 と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体の投与量は 0. 1 5 m L に設定した。なお、比較例 10-1 では 9 匹のウサギ、実施例 1 0 では 7 匹のウサギ、比較例 10-2 では 6 匹のウサギで試験を行った。

[0136] 関節可動域及び癒着スコアの測定結果を図 2 0、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を図 2 1 に示す。

[0137] この結果、トリペプチド 4 (G l y - P r o - H y p) の構成アミノ酸であるグリシン、プロリン及びヒドロキシプロリンを遊離アミノ酸の状態でゼラチンゲルと併用すると、癒着防止効果は認められなかった。即ち、本結果から、癒着防止効果を奏する上では、特定の配列のペプチドの状態でゼラチンゲルと併用することが必要になることが明らかとなった。

[0138] 1 2. 試験例 1 1

1 2 - 1. 検体の準備

表 1 1 に示す組成の検体を調製した。

[表11]

検体	組成
比較例 1 1	生理食塩水（株式会社大塚製薬工場）
実施例 11-1	トリペプチド4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)（20 重量％）及び生理食塩液（50 重量部）を混合したハイドロゲル組成物
実施例 11-2	トリペプチド4（30 重量％）、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(D)（20 重量％）及び生理食塩液（50 重量部）を混合したハイドロゲル組成物

[0139] 1 2 - 2. 癒着防止効果の評価

前記試験例3と同様の方法で癒着防止効果を評価した。なお、検体の投与量は0.15 mLに設定した。また、比較例11では10匹のウサギ、実施例11-1では9匹のウサギ、実施例11-2では6匹のウサギで試験を行った。

[0140] 関節可動域及び癒着スコアの測定結果を図22、試験終了時に屈筋腱の状態を観察した結果を図23に示す。この結果、架橋ゼラチンスポンジゲル粉末(B)と(D)のいずれを用いても、トリペプチド4（G l y - P r o - H y p）との併用投与によって、優れた癒着防止効果が奏されることが確認された。