

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02005/037292

発行日 平成18年12月28日 (2006.12.28)

(43) 国際公開日 平成17年4月28日 (2005.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/722 (2006.01)	A 6 1 K 31/722	4 C 0 6 0
A 6 1 P 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 41/00	4 C 0 8 6
A 6 1 B 17/00 (2006.01)	A 6 1 B 17/00 3 2 0	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号	特願2005-514855 (P2005-514855)	(71) 出願人	596021735
(21) 国際出願番号	PCT/JP2004/015588		株式会社ネーテック
(22) 国際出願日	平成16年10月21日 (2004.10.21)		神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 K
(31) 優先権主張番号	特願2003-360198 (P2003-360198)		S P 西 3 0 0 - H
(32) 優先日	平成15年10月21日 (2003.10.21)	(71) 出願人	390033145
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		焼津水産化学工業株式会社
			静岡県焼津市小川新町5-8-13
		(74) 代理人	100137512
			弁理士 奥原 康司
		(72) 発明者	林 琢也
			東京都品川区東五反田2丁目4番6号-2
			05号
		(72) 発明者	石原 雅之
			東京都立川市一番町6丁目24番地18号
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 糖鎖含有キトサン誘導体を含む内視鏡手術用粘膜下膨隆液組成物

(57) 【要約】

本発明は、糖鎖含有キトサン誘導体を含むことを特徴とする内視鏡手術用粘膜膨隆液を提供する。本発明の組成物を内視鏡手術用における粘膜下膨隆液として用いた場合、長期間にわたる粘膜隆起を確保でき、穿孔を防止して内視鏡手術用の信頼性を向上させることができる。さらに本発明の組成物は、手術部位からの出血を防止/抑制する効果も有する。また、前記糖鎖含有キトサン誘導体に光反応性基を導入することにより、光架橋によって容易にハイドロゲルを形成し、膨隆維持能及び止血能が更に向上する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖鎖含有キトサン誘導体を含んでなることを特徴とする内視鏡手術用粘膜下膨隆液組成物。

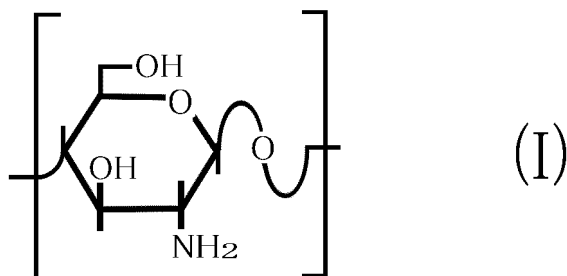
【請求項 2】

糖鎖含有キトサン誘導体を 0.5 ~ 8.0 重量% 含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

糖鎖含有キトサン誘導体が、下記式 (I) :

【化 1】



10

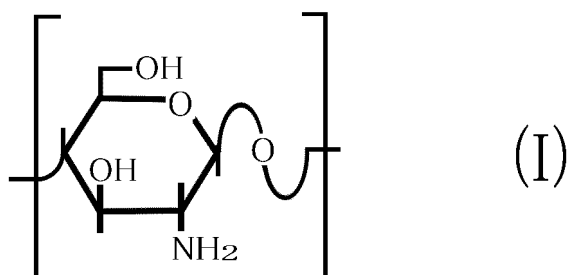
で表される単位を含んでなるキチン・キトサン類のグルコサミン単位の 2 位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入してなる高分子であることを特徴とする、

20

【請求項 4】

糖鎖含有キトサン誘導体が、下記式 (I) :

【化 2】



30

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

【請求項 5】

糖鎖が、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、ヘブツロース、ヘキシロースを含むペンタオース又はヘキサオース；グルコサミン、N - アセチルグルコサミン、ガラクサミンを含むアミノ糖類；ウロン酸類及びデオキシ糖類を含む糖誘導体；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、マルトトリオースを含む二糖類又は三糖類及びオリゴ糖類から選択されることを特徴とする、請求項 3 または 4 に記載の組成物。

40

【請求項 6】

光反応性基が、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、及びホルミルスチリル基から選択されることを特徴とする、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

糖鎖含有キトサン誘導体が、さらに両親媒性基を有することを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

50

オートクレーブ滅菌したものであ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。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の組成物を標的部位に局注する手段を具備することを特徴とする内視鏡システム。

【請求項 10】

局注された組成物に光照射する手段を更に具備することを特徴とする請求項 8 に記載の内視鏡システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、糖鎖含有キトサン誘導体を含む組成物に関する。特に、EMRにおいて粘膜下に局注して病変部を含む粘膜を膨隆させるのに最適な組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

昨今の内視鏡技術の発達により、病変部の内視鏡的切除術は、食道、胃又は腸を含む消化管のポリープや早期癌（リンパ節転移が無いと考えられている表層癌）等への適応が確立されてきている。内視鏡的粘膜切除術（EMR = Endoscopic Mucosal Resection）は、低侵襲の手術法として、外科的開腹手術が困難な高齢者や重篤な合併症を有する患者等に主に適応されてきたが、QOLの面から一般患者への適応としても第一の選択肢となっている。

20

【0003】

EMRは一般に、病変部及びその辺縁部に適当なマーキングを付し、マーキングした病変部を含む粘膜下層に高張食塩水等を注入して病変部を隆起させ、切除すべき部分を把持しながらスネアリングし、高周波電流によって病変部を含む組織を切開し、切開した組織を回収して組織検査に供するという手技を含んでいる（非特許文献1）。

【0004】

EMRにおいて粘膜切開を安全に行うためには病変部と固有筋層とを引き離すことが必要である。そのために、粘膜下層に高張食塩水等の液体（以下、本明細書において「粘膜下膨隆液（又は局注液）」と称する）が局注される。病変部を含む粘膜の隆起が十分でない

30

と、目的とする部位でスネアリング等による切開をすることが困難になり、病変部を確実に切除できなかつたり、粘膜下に存在する固有筋層まで切開して穿孔を生じることもある。よって、望まれる粘膜隆起レベルが切除完了まで維持されるような粘膜下膨隆液が必要とされている。

【0005】

さらに、穿孔とともにEMRにおいて発生しがちな他の合併症は出血である。そこで、高張食塩水等に血管収縮作用を有するエピネフリンを添加することによって出血量を抑制することが行われていた（非特許文献2）。しかしながら、エピネフリンの添加によって出血量を抑制しても煩雑な止血操作を回避するするには至らない。加えて、粘膜下膨隆液として食塩水等の低粘度液体を使用したのでは、局注針の進入部や切開の一刀目で生じた

40

間隙等から粘膜下膨隆液が漏れ出し、注入時の膨隆レベルが維持できないという問題があった。

【0006】

近年、上記の問題を解決するため、粘膜下膨隆液にグルコースやヒアルロン酸ナトリウム等を添加して膨隆を維持する試みが行われ、ヒアルロン酸を使用した場合に、ブタ食道で行った動物実験において、膨隆継続時間を平均約23分程度まで延長できたことが報告されている（非特許文献3）。ところが、実際にはEMRが完了するまでに1時間以上、ときには数時間を要する場合もあり、よって、膨隆継続時間をさらに延長することのできる粘膜下膨隆液が要望されている。また、近年、スネア法に代わって主流になりつつあるITナイフ等による切開剥離法（ESD：endoscopic submucosal dissection）では、第

50

一刀目での膨隆液の流出が避けられない。さらに、ヒアルロン酸の添加によって膨隆継続時間を或る程度延長できたとしても、出血予防のためにはエピネフリン等の止血剤をさらに添加する必要があった。

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】林琢也等、「臨床と研究」、第 72 巻、第 5 号、第 52-55 頁、1995 年

【非特許文献 2】「Endoscopic Surgery 切開・剥離 E M R」、小山恒男著、日本メディカルセンター発行、第 30-31 頁、2003 年

【非特許文献 3】Massimo Conio 等, Gastrointestinal Endoscopy, Vol. 56, p513-516 (2002)

【発明の開示】

10

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

よって本発明における課題は、従来より更に長時間にわたる粘膜隆起を確保することができ、穿孔を防止して E M R の信頼性を向上させることのできる粘膜下膨隆液（局注液）を提供することにある。さらに本発明は、施術中や施術後の出血を有効に抑制できる粘膜下膨隆液を提供することにもある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、糖鎖含有キトサン誘導体を含む組成物を内視鏡手術における粘膜下膨隆液として用いた場合、粘膜の膨隆を極めて長期にわたって維持できるとともに、出血の防止及び抑制効果も得られることを見出した。

20

即ち本発明は、糖鎖含有キトサン誘導体を含むことを特徴とする内視鏡手術用粘膜膨隆液（局注液）組成物を提供する。

【発明の効果】

【 0 0 1 0 】

本発明の粘膜下膨隆液組成物によれば、糖鎖含有キトサン誘導体に基づく粘性により、粘膜を長時間（24 時間以上）に渡って隆起させておくことが可能になる。しかも、残ったキトサン誘導体が出血巣を取り囲むため、出血量を格段に少なくすることができる。その結果、穿孔及び出血という E M R 治療における主要な 2 つの問題を同時に解決することが

30

ことができる。このような特長に鑑みて、本発明の組成物は、例えば、大腸ポリテクトミー（内視鏡的大腸ポリープ切除術）、腹腔鏡下の胃切除術、食道動脈瘤の処置などの、内視鏡や腹腔鏡と組み合わせて行われる遠隔手術において、胃粘膜以外の部位を含む消化管全体に適用可能である。従って、本明細書における内視鏡手術という用語は、E M R 及び E S D を含む胃粘膜切除術に限られず、内視鏡や腹腔鏡と組み合わせて行われる遠隔手術をすべて包含するものと解する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】粘膜下膨隆液を局注した粘膜周辺組織の断面を示す模式図である。

40

【図 2】糖鎖含有キトサン誘導体水溶液（a）及び食塩水（b）を粘膜下組織に局注した 30 分後の粘膜周辺組織の断面を示す顕微鏡写真である。

【図 3】糖鎖含有キトサン誘導体及び食塩水を粘膜下層に局注し、粘膜を切開した後の累積出血量（血液損失）の時間変化を示すグラフである。

【図 4】食塩水（a）及びヒアルロン酸水溶液（b）の局注 30 分後、及び糖鎖含有キトサン誘導体水溶液（c）の局注及び光照射後 24 時間における粘膜周辺組織の断面を示す顕微鏡写真である。

【図 5】食塩水（a）、ヒアルロン酸水溶液（b）、糖鎖含有キトサン誘導体水溶液（光架橋無し）（c）、及び糖鎖含有キトサン誘導体水溶液（光架橋有り）（d）を局注後、粘膜を切開してからの出血量の変化を示すグラフである。

50

【符号の説明】

【0012】

1：粘膜、2：病変部、3：粘膜下膨隆液、4：固有筋層

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の粘膜下膨隆液に配合される糖鎖含有キトサン誘導体は、キトサン骨格にラクトース等の糖鎖を導入することにより、特に中性pHでの水溶性を向上させたキトサン誘導体である。例えば、本発明で好ましく使用される糖鎖含有キトサン誘導体として、国際特許公開W000/27889号パンフレットに記載されたものが挙げられる。具体的には、それらの誘導体は、一般にキチン・キトサン類と呼ばれている高分子骨格に糖鎖と任意に光反応性基を導入した構造を有しており、中でも、少なくとも一部が脱アセチル化されたキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の2位アミノ基の少なくとも一部に還元性末端を有する糖鎖を導入し、好ましくは他の少なくとも一部に光反応性基を導入してなるものである。

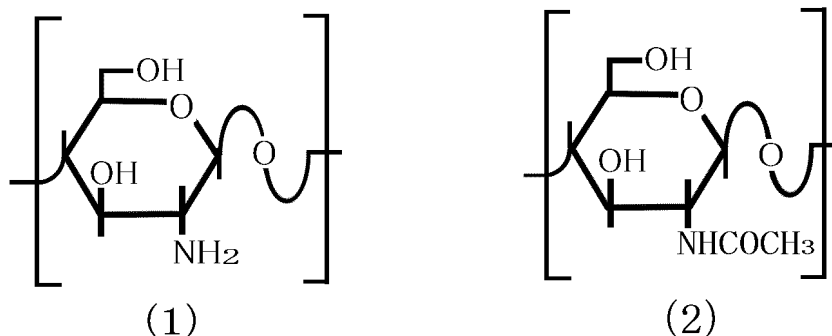
10

【0014】

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

【化1】

20



30

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

【0015】

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

40

【0016】

本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体は、このキトサン骨格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。

【0017】

また、該キトサンの分子量には特に制限はなく、最終的なキトサン誘導体の使用目的に

50

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。

【0018】

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

10

【0019】

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

キトサンの前記式(1)のグルコサミン単位における2位アミノ基への糖鎖の導入は、それ自体既知の方法を用いて行うことができる。例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、グルコサミン単位の2位アミノ基にアミド結合を介して結合させる方法(例えば、特開平10-120705号公報参照)や、糖類の還元性末端をアルデヒド化またはカルボニル化した後、それをグルコサミン単位の2位アミノ基に、シッフ塩基を経由する還元アルキル化法により結合させる方法(例えば、キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」53-56頁、1990年2月20日、技法堂出版発行参照)などが含まれる。

20

【0020】

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

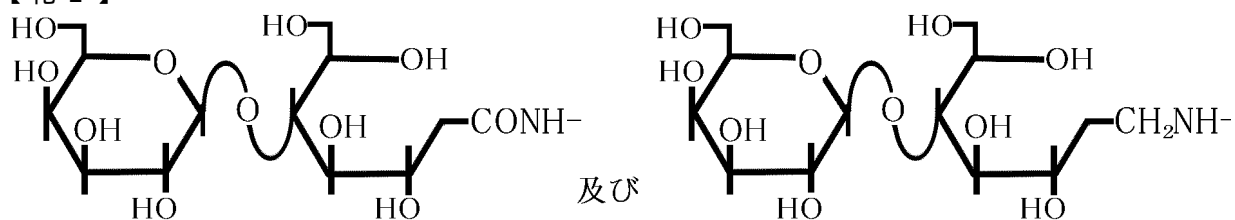
本発明の糖鎖含有キトサン誘導体を構成する糖側鎖の具体例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限られるわけではない。

【0021】

(i) ラクトースから誘導される糖鎖：

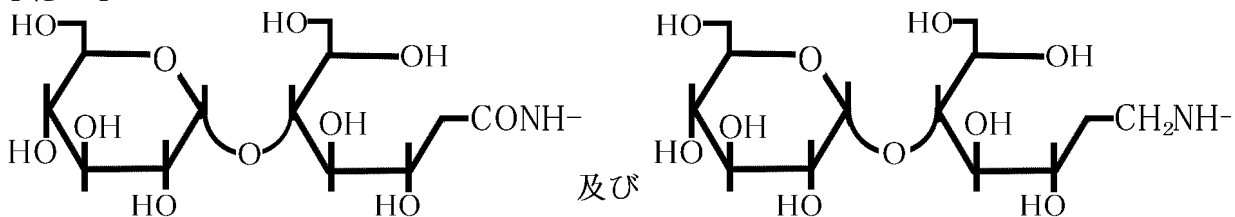
30

【化2】



(ii) マルトースから誘導される糖鎖：

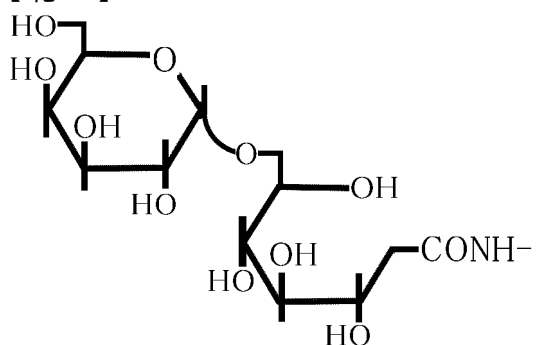
【化3】



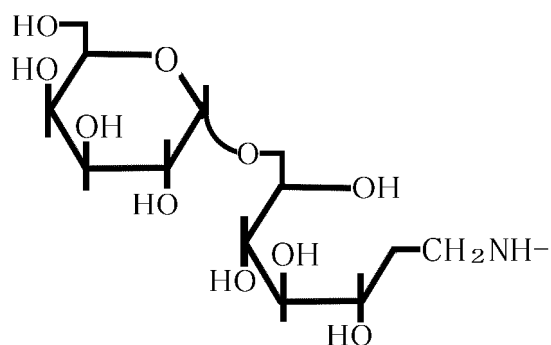
40

(iii) メリピオースから誘導される糖鎖：

【化 4】



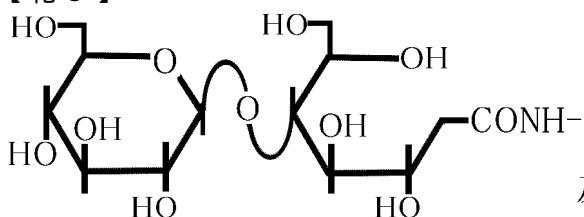
及び



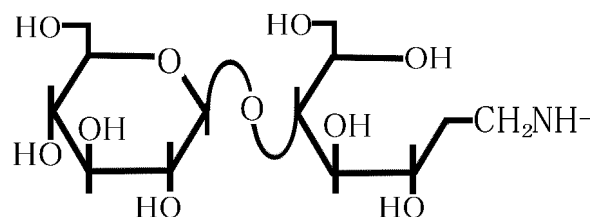
10

(iv) セロビオースから誘導される糖鎖：

【化 5】



及び

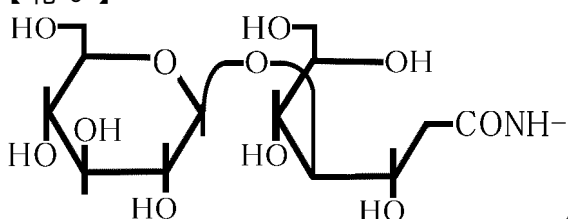


20

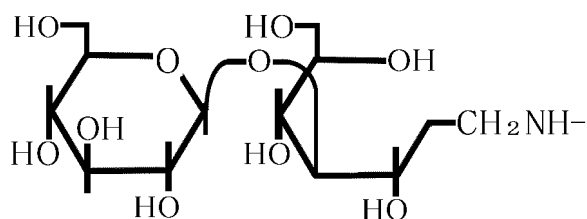
【 0 0 2 2 】

(v) ラミナリビオースから誘導される糖鎖：

【化 6】



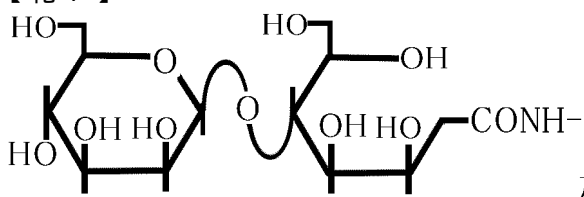
及び



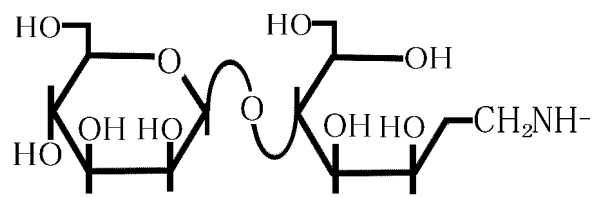
30

(vi) マンノピオースから誘導される糖鎖：

【化 7】

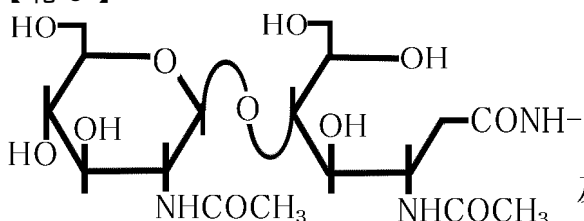


及び

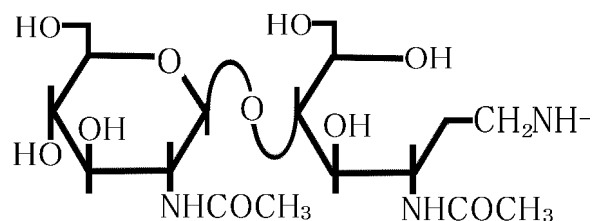


(vii) N-アセチルキトピオースから誘導される糖鎖：

【化 8】



及び



40

【 0 0 2 3 】

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

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

50

【 0 0 2 4 】

キトサンのグルコサミン単位における 2 位アミノ基の糖側鎖による置換度は、最終的なキトサン誘導体に望まれる物性などに応じて変えることができるが、置換度は、一般的には 0 . 1 ~ 8 0 %、特に 0 . 5 ~ 6 0 %、さらに特に 1 ~ 4 0 % 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 位のアミノ基のうち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される。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 4 9 0 n m の吸光度で検知する「フェノール - 硫酸法」によって測定される (J . E . Hodge, B . T . Hofreiter, "Methods in Carbohydrate Chemistry", ed. by R . L . Whistler, M . L . Wolfrom, vol.1, p388, Academic Press, New York(1962)参照)。

【 0 0 2 5 】

本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体としては、キトサンを構成する前記式 (1) のグルコサミン単位の 2 位アミノ基の他の少なくとも一部に光反応性基を導入したものが好ましく、それにより、光照射による自己架橋性が付与される。即ち、粘膜下層に注入した後に紫外線等の光を照射することにより不溶性のハイドロゲルを形成し、形状保持性 (粘膜膨隆維持能) がさらに向上する。

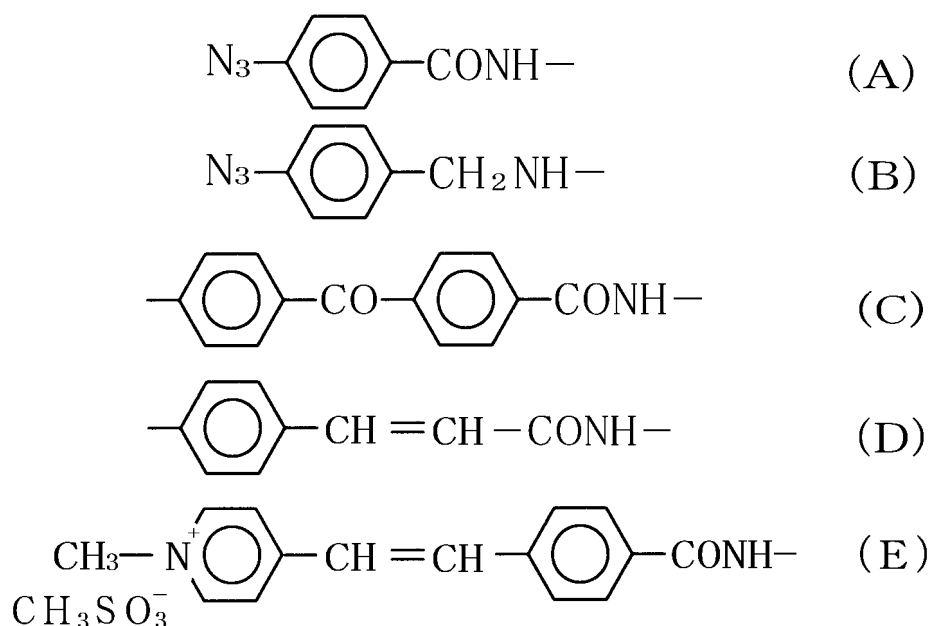
【 0 0 2 6 】

キトサン骨格の化学修飾に使用される光反応性基は、紫外線、特に約 2 0 0 ~ 3 8 0 n m の近紫外領域を含む紫外線の照射によって該光反応性基同志で及び / 又はキトサン中に存在するアミノ基あるいは水酸基等と反応して架橋結合を形成するような基を含む。例えば、ベンゾフェノン類、ケイ皮酸類、アジド類、ジオレフィン類、ビスアントラセンのような環状不飽和化合物等から誘導されるものが挙げられ、中でも、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基を有するものが好適である。

【 0 0 2 7 】

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

【 化 9 】



10

20

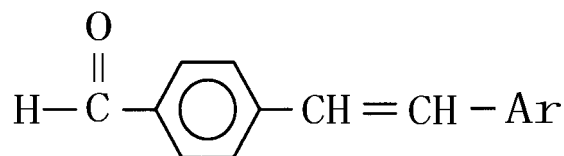
40

30

【 0 0 2 8 】

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

【 化 1 0 】



10

(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。)

【 0 0 2 9 】

かかる光反応性基の導入は、それ自体既知の方法により行うことができ、例えば、カルボキシル基を有するアジド化合物を縮合剤の存在下に該 2 位のアミノ基に結合させる方法(特開平 10 - 120705 号公報参照); 酸クロリド基、アルデヒド基、N - ヒドロキシコハク酸イミドエステル基又はエポキシ基を介してアジド化合物を該 2 位のアミノ基と反応させる方法(キチン・キトサン研究会編「キチン、キトサンの応用」第 45 ~ 65 頁、1990 年 2 月 20 日、技報堂出版発行、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。

20

【 0 0 3 0 】

これらの光反応性基の導入の程度は、最終的なキトサン誘導体に望まれる架橋反応に基づくゲル化(不溶化)の程度等に応じて変えることができるが、光反応性基の置換度を 0.1 % ~ 80 %、特に 0.5 ~ 50 %、さらに特に 1 ~ 30 % の範囲内にすることが望ましい。ここで、光反応性基の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の 2 位のアミノ基が光反応性感応基で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の 2 位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する置換アミノ基の割合である。本明細書では、光反応性基、例えばアジド基の置換度は、4 - アジド安息香酸の 270 nm における特性吸収から得られる検量線に基づいて決定した。

30

【 0 0 3 1 】

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

【 0 0 3 2 】

また、本発明で使用される糖鎖含有キトサン誘導体では、キトサン骨格を構成する前記式(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、さらに両親媒性基を導入してもよく、それにより架橋後のハイドロゲル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。

40

【 0 0 3 3 】

50

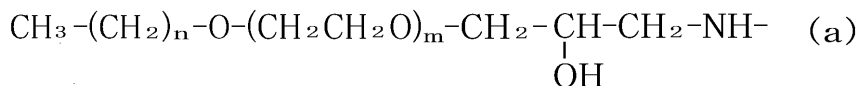
かかる両親媒性基のキトサンへの導入は、例えば、両親媒性基の親水ブロック又は疎水ブロックのいずれか一方の末端に、アミノ基と反応して共有結合を形成しうる基、例えば、アルデヒド基やエポキシ基などを持つ化合物を導入した後、キトサンのグルコサミンの2位アミノ基と反応させる方法や、カルボキシル基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンとを縮合剤の存在下で反応させる方法、あるいは酸クロリド基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体をキトサンの水酸基やアミノ基と反応させる方法などを用いて行うことができる。

【0034】

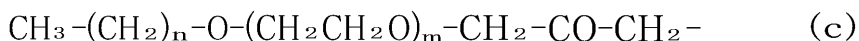
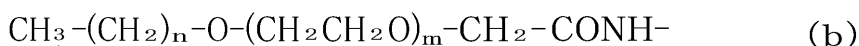
例えば、末端にエポキシ基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基あるいは末端にアルデヒド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンのアミノ基に導入した場合、キトサン骨格に結合した側鎖は下記式(a)あるいは(b)で表される。また、末端に酸クロリド基を誘導したポリオキシアルキレンアルキルエーテル基をキトサンの3位または6位の水酸基に結合させた場合、キトサン骨格に結合した側鎖は、下記式(c)で表される。ただし、下記式(a)～(c)におけるn及びmは1以上の繰返し単位数である。

10

【化11】



20



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。

【0035】

本発明に係る膨隆液組成物は、上記のような糖鎖含有キトサン誘導体を水又は水-アルコール混合溶媒等の生理的に許容され得る媒体に溶解させることにより液体製剤として調製することができる。

30

粘膜膨隆液は、通常、23G程度のステンレス針を通して粘膜下層に局注される。従って、容易に針を通して注入可能でなければならない。また、注入された膨隆液は、血流等による流散に抗するのに十分な程度の粘性を有しているのが好ましい。さらに、EMRやESDにより粘膜を切除した後に粘膜下層に保持されるのが好ましい。

これらの条件に鑑みて、本発明の組成物は、糖鎖含有キトサン誘導体(およそ1,000,000程度の分子量)を0.5～8.0重量%、好ましくは1.0～5.0重量%、より好ましくは2.0～3.0重量%、最も好ましくは約2.5重量%含有するものとした。このような割合で調製された膨隆液は、例えば、市販されている回転粘度計(例えば、B型粘度計、TOKIMEC INC. (Tokyo Japan))で測定した場合に約300cps(mPa・s)未満、さらには約200cps未満、さらには約100cps未満の低粘度でなる。

40

【0036】

本発明で好ましく使用される糖鎖含有キトサン誘導体においては、糖類を導入することにより中性領域での水溶性に優れており、生理的緩衝液などで製剤化することができ、例えばタンパク質等の酸やアルカリで変性する可能性のある薬物の活性を失うことなく添加することも可能になる。

例えば、本発明の組成物はそれ自体に十分な止血作用があるが、エピネフリン等の止血作用を持つ他の薬剤を配合して出血防止能を更に向上させてもよし、抗ガン剤を添加して治癒促進(あるいは再発防止)効果を付与してもよい。

50

【 0 0 3 7 】

また、光反応性基を導入した糖鎖含有キトサン誘導体を用いる場合には、製造した膨隆液を粘膜下層に注入した後に光照射することによって即時に不溶性ゲルを形成し、粘膜隆起維持を従来からは予測できないほど格段に長期化することができる。また、光架橋により形成されたハイドロゲルは、配合した薬剤等を徐放するマトリクスの役割も果たす。

【 0 0 3 8 】

光による架橋条件は、使用する光架橋性キトサン誘導体に導入した光反応性基の種類や置換度、組成物に溶解されるキトサン誘導体の量、注入される組成物の量、及び望ましい硬度等に応じて変化しうる。通常は、約 2.5 mg/ml 程度の光架橋性キトサン誘導体を含む組成物を $30 \mu\text{l}$ 程度使用する場合、約 2 cm 程度離間した光源からの光を、約 $0.01 \sim 100$ 秒、好ましくは約 $0.02 \sim 60$ 秒、さらに好ましくは $0.1 \sim 30$ 秒、もっとも好ましくは数秒程度照射するのが好ましく、これにより十分な硬度を持ったゲルが形成される。架橋反応度は特に限られないが、一般に、架橋反応度が高いほど形成されるハイドロゲルが硬くなる傾向がある。

10

【 0 0 3 9 】

光照射は、本発明の膨隆液組成物を注入した後、病変部を切開する前に実施してもよいし、病変部を切開した後に露出された組成物に照射してゲル化させてもよい。前者の場合、膨隆液を注入する針と一体化した又は別個の光ファイバーを通して光照射して組成物をゲル化させる。後者の場合、例えば、内視鏡のチャンネルを介して挿入した光ファイバーを通して露出した組成物に光照射する。

20

このように、局注される膨隆液に物理化学的引き金によって不溶化（固体化）しうる性質（例えば光架橋性）を付与し、注入後に不溶化（固体化）させて組織内での留置性を高めるという概念は、これまでに提案されておらず、本発明によって初めて達成されたものである。

【 0 0 4 0 】

なお、本発明の組成物にあつては、光照射しない状態でも出血を抑制する効果が確認された。これは、組成物の粘性及びキトサンの特性に基づくものと考えられる。さらに、光照射によって形成されたハイドロゲルは格段に優れた止血効果を示した。例えば、ヘパリン化によって通常は止血が困難な状況下でも 10 分以内に出血が停止した。即ち、本発明の組成物は、エピネフリン等の止血剤を使用しなくても E M R における出血を抑制、防止する効果に優れている。

30

【 0 0 4 1 】

さらに、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル等の両親媒性基を導入した場合には、光架橋したハイドロゲルの吸水性が格段に向上する（自重の 100 倍程度となる）ため、傷口から流出した血液を吸収して止血及び治癒を早めることもできる。

【 0 0 4 2 】

本発明の膨隆液組成物は、オートクレーブ滅菌された溶液の形態で提供するのが好ましい。オートクレーブ滅菌は高圧蒸気滅菌とも言い、所定温度と圧力の飽和水蒸気を作って加熱することによる滅菌方法である。例えば、日本薬局方では、 115 で 30 分、 121 で 20 分、 126 で 15 分という滅菌条件が挙げられている。

40

【 0 0 4 3 】

本発明の組成物は、容器に充填された溶液の状態オートクレーブ滅菌を実施すると、その性能は劣下せずに溶液の粘度が低下し、内視鏡手術用の膨隆液としての使用性が向上する。例えば、光反応性基を有するキトサン誘導体を含む場合であっても、オートクレーブ滅菌による光反応性基の変性は認められず、光照射することにより良好にゲル化する。従って、本発明の粘膜下膨隆液は、即座に使用可能な滅菌された溶液の状態で供給することができる。

【 0 0 4 4 】

以下、本発明を具体例によりさら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。

50

【実施例】

【0045】

(実施例1)

光架橋性糖鎖含有キトサン誘導体の調製

光架橋性糖鎖含有キトサン誘導体(「Az-CH-LA」とする)は、WO00/27889に記載したようにして調製した。具体的には、およそ300~600kDaの分子量、80%の脱アセチル化度を有するキトサン(焼津水産化学工業(株)製)を原料として使用した。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、アミノ基との縮合反応を介して上記キトサン分子に導入した。得られたキトサン誘導体のアミノ基の2.5%及び2%が各々p-アジド安息香酸及びラクトビオン酸で置換された。ラクトースの導入により得られた誘導体は中性pHで水溶性であった。

10

【0046】

得られたAz-CH-LAの水溶液(20~30mg/ml)を調製し、2cm離間したランプで約10秒UV照射(UV-照射システム:ガイドファイバーユニット(SF-101BQ)及び250Wランプ(240-380nm)を具備するSpot Cure ML-251C/A;ウシオ電機製)することにより、光架橋反応を介して不溶性のハイドロゲルが形成された。

【0047】

(実施例2)

粘膜下層の厚みの測定

実験には、Sprague-Dawleyラット(15-16週齢、全て雄であり、平均体重 325 ± 15 g; SLC Japan)を使用した。終夜絶食させた後、ラットをベントバルビタール(25mg/kg)で麻酔し、開腹術後に前壁胃造瘻術により腺胃粘膜を露出させた。2.5%のAz-CH-LA水溶液(0.3ml)又は食塩水(0.3ml)を、後壁粘膜下層に、25Gのステンレススチール針を通して注入した。注入後、粘膜表面を30分間観察し、各群から5匹ずつのラットを麻酔薬の過剰投与によって犠牲にした。他のラットでは、処理の30分後、皮下に10mlの生理食塩水を注入して乾燥を防ぎ、胃及び腹部を閉じた。これらのラットは6時間後(各群についてn=5)及び24時間後(各群についてn=5)に犠牲にした。次いで、組織を取り出し、10%ホルマリンで2日間固定した。次に、粘膜下層の厚みを、固定した試料の断面の顕微鏡観察により測定した。また、試料をパラフィンに包埋し、切り出してヘマトキシリン-エオシン(HE)試薬で染色した。

30

【0048】

Az-CH-LA溶液及び食塩水を注入した直後、粘膜表面は同程度に隆起された。しかし、30分後には、隆起された領域は、Az-CH-LA注入群では注入直後と同様の急勾配な起伏が見られたが、食塩水注入群では30分以内に起伏が顕著に収縮した(図2)。所定時間経過後における粘膜下層の厚みを下記の表1に示す。表1における結果は、平均値 $\pm$ S.E.で示し、データは、有意性レベルを $P < 0.05$ としたMann-Whitney U-testを用いて分析した。

【0049】

【表1】

	30分後	6時間後	24時間後
Az-CH-LA 注入群	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1
食塩水注入群	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.3

40

数値は平均 $\pm$ S.E.(mm)である(各群についてn=5)

【0050】

24時間以内の如何なる時点でも、Az-CH-LA注入した粘膜下層は食塩水注入したものより有意に厚みが大きかった。食塩水注入群では30分後以降の厚みが変化していないことから、30分以内に全ての食塩水が流出してしまったことが示唆される。組織学的試験により、エオシンで均一に染色されたAz-CH-LAが粘膜下組織に保持されていることが明らかになった。

50

【 0 0 5 1 】

(実施例 3)

出血量の測定

実施例 2 と同じ方法を用いて 2.5% の Az-CH-LA 水溶液又は食塩水を注入する前に、ヘパリン (300 単位) を静脈注射した。粘膜の隆起された領域の頂点周辺の粘膜 (直径 5-6mm) を外科用メスを用いて切開した。Az-CH-LA 群では、切開した傷に上記の UV - 照射システムを用いて 30 秒間 UV 光を即座に照射した (各群について n=10)。出血量測定は 5 分ごとに 4 回 (20 分間) 行い、次いで動物を麻酔薬の過剰投与により犠牲にした。組織学的試験のために胃を切除した。取り出した組織は、10%ホルマリンで 2 日間固定し、パラフィンに包埋し、切り出し、ヘマトキシリン - エオシン (HE) 試薬で染色した。

10

【 0 0 5 2 】

Az-CH-LA 注入群では、切開した粘膜辺縁部又は粘膜辺縁部と Az-CH-LA との間隙から出血が見られた (照射前)。しかし、UV 照射の 5 ~ 10 分後に出血は完全に停止し、形成されたゲルが開口部を閉塞する糊として作用した。食塩水注入群では、切開後 20 分間経過しても出血が続いていた。

【 0 0 5 3 】

粘膜切開後の最初の 5 分間における血液損失は、Az-CH-LA 注入群では 63.1 ± 14.2 mg であったのに対し、食塩水注入群では $92.2.9 \pm 143.6$ mg であった ($p < 0.001$) (図 3)。累積容量は、Az-CH-LA 注入群では 10 分間で 93.2 ± 10.5 mg、15 分間で 106.4 ± 15.2 mg、20 分間で 113.0 ± 15.5 mg であった。食塩水注入群では各々 1268.0 ± 105.5 mg、 1537.2 ± 125.4 mg、 1682.3 ± 95.2 mg であった。これらの値 (血液損失) を時間に対して図 3 にプロットした。、Az-CH-LA 群での血液損失は、食塩水处理群より有意に少なかった。試料の組織学的観察により、Az-CH-LA 注入群では、出血巣がキトサンハイドロゲルにより完全に囲まれていることが明らかになった。

20

【 0 0 5 4 】

(実施例 4)

ヒアルロン酸ナトリウムを配合した膨隆液を用いて、実施例 2 及び 3 と同様の測定を行った。結果を、実施例 2 及び 3 の結果と合わせて図 4 及び 5 に示す。図 4 に示すように、ヒアルロン酸含有膨隆液を用いた場合 (b) でも、注入 30 分後で既に粘膜隆起の縮小が見られるが、本発明の膨隆液を使用した場合 (c) には、24 時間後であっても顕著な隆起形状が保たれていた。さらに、本発明の膨隆液を使用した場合には、格段に優れた出血抑制効果が得られた (図 5)。

30

【 0 0 5 5 】

(実施例 5)

オートクレーブ滅菌による組成物の粘度変化

市販の Az-CH-LA (GPC 測定による分子量約 10,000) の水溶液を調製した (濃度 : 0.5 重量 % 及び 1.0 重量 % の 2 種類)。それらの水溶液を、15ml コニカルチューブ (ファルコン社製) に充填し、以下の条件でオートクレーブ滅菌した。

(1) 121 × 20 分間

(2) 118 × 30 分間

40

【 0 0 5 6 】

滅菌後の各水溶液を未処理の水溶液と比較したところ、いずれの水溶液にも沈殿形成は観察されず、若干の着色 (薄黄色) が見られた程度であった。

未処理及び滅菌後の水溶液の粘度を単一円筒型回転粘度計にて測定した結果を下記の表 2 に示す。

【 0 0 5 7 】

【表 2】

処理条件	粘度 (mPa・s)	
	Az-CH-LA 濃度 : 0.5 重量%	Az-CH-LA 濃度 : 1.0 重量%
未処理	32.8	264.0
121℃×20 分間	12.6	46.0
118℃×30 分間	14.0	51.0

上記の結果から明らかなように、オートクレーブ滅菌処理により、水溶液の粘度が格段に低下し、更に局注に適したものになった。

10

【0058】

また、未処理及び滅菌後のサンプルについて、UVスペクトル測定、FT-IR測定によりアジド基の量を算出した。その結果、滅菌による光反応性基（アジド基）の分解は見られず、未処理のサンプルと同等のアジド基が残存していることが確認された。

さらに、各サンプルに光照射して硬化させたところ、いずれも良好にゲル化することが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0059】

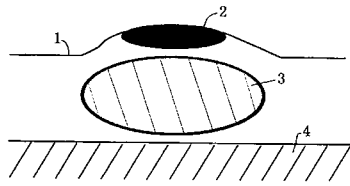
本発明の粘膜下層膨隆液組成物に使用される糖鎖含有キトサン誘導体、及びそれを光架橋させて得られるハイドロゲルは、ヒト皮膚繊維芽細胞、ヒト上皮細胞、及びヒト平滑筋細胞の培養実験において、いかなる細胞毒性も示さないことが確認された。さらに、突然変異誘発及び細胞毒性を含む生物に対する毒性試験においても、誘導体及びハイドロゲルの安全性が示された。よって、本発明の組成物は、特にEMRやESD等の内視鏡手術で使用される粘膜下層膨隆液（局注液）として使用するのに最適である。

20

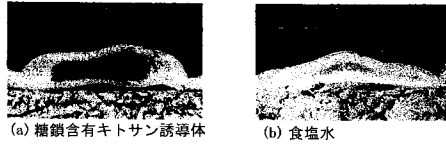
さらに、オートクレーブ滅菌を用いることにより、手術現場でそのまま使用できる態様の製品として提供することができる。

なお、本発明の膨隆液は、内視鏡手術に限らず、組織表層の癌細胞を切除したり止血するなどの一般の外科的処理においても使用可能であることはいうまでもない。

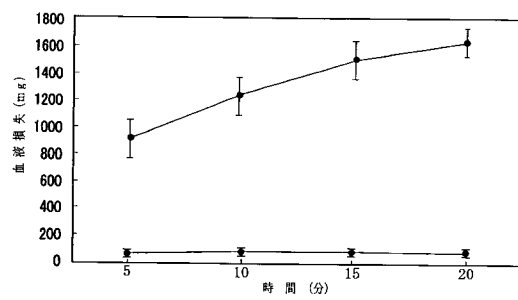
【図 1】



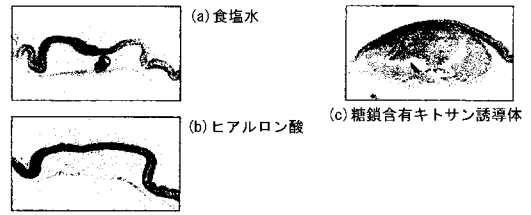
【図 2】



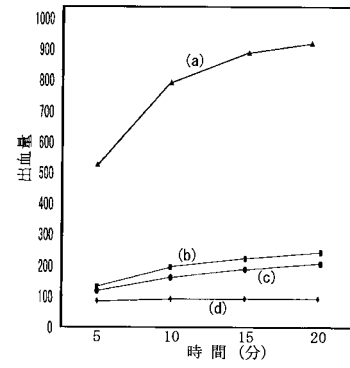
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K31/70, 49/00, 9/08		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K31/70, 49/00, 9/08		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CAS (STN), MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-62057 A (NEXT Co., Ltd.), 04 March, 2003 (04.03.03), (Family: none)	1-10
Y	JP 2000-503318 A (Hansson, Hans-Arne), 21 March, 2000 (21.03.00), & WO 97/25994 A1 & EP 874634 A & US 6174855 B1	1-10
Y	JP 7-2679 A (Gyokuho Kabushiki Kaisha), 06 January, 1995 (06.01.95), (Family: none)	1-10
A	Takuya HAYASHI et al., "Soki Igan no Naishikyoteki Chiryō", Rinsho to Kenkyu, Vol.72, No.5, 1995 Nen, pages 52 to 55	1-10
☐ 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 17 January, 2005 (17.01.05)		Date of mailing of the international search report 08 February, 2005 (08.02.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/015588	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/70, 49/00, 9/08			
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 ⁷ A61K31/70, 49/00, 9/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) WPI (DIALOG)、BIOSIS (DIALOG)、CAS (STN)、MEDLINE			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	JP 2003-62057 A (株式会社ネクスト) 2003.03.04 (ファミリーなし)	1-10	
Y	JP 2000-503318 A (ハンソン、ハンスーアルネ) 2000.03.21 & WO 97/25994 A1 & EP 874634 A & US 6174855 B1	1-10	
Y	JP 7-2679 A (玉宝株式会社) 1995.01.06 (ファミリーなし)	1-10	
☒ 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、一般的な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 17.01.2005		国際調査報告の発送日 08.02.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 裕 4C 9050 電話番号 03-3581-1101 内線 3450	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2004/015688
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
A	林琢也等、“早期胃がんの内視鏡的治療”、臨床と研究、第72巻、第5号、1995年、p. 52-55	1-10

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 由良 洋文

神奈川県川崎市高津区久本3丁目12番20号 - 702号

Fターム(参考) 4C060 MM26

4C086 AA01 AA02 EA23 MA01 MA04 MA17 MA65 NA14 ZC54 ZC71

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于内窥镜手术的粘膜下鼓胀液体组合物，其含有含糖链的壳聚糖衍生物		
公开(公告)号	JPWO2005037292A1	公开(公告)日	2006-12-28
申请号	JP2005514855	申请日	2004-10-21
申请(专利权)人(译)	株式会社ネーテック 烧津Suisankagaku实业有限公司		
[标]发明人	林琢也 石原雅之 由良洋文		
发明人	林 琢也 石原 雅之 由良 洋文		
IPC分类号	A61K31/722 A61P41/00 A61B17/00 A61K31/70 A61K41/00 A61K49/00		
CPC分类号	A61K31/70 A61K41/0042 A61K49/00 A61P41/00		
FI分类号	A61K31/722 A61P41/00 A61B17/00.320		
F-TERM分类号	4C060/MM26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA23 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA65 4C086/NA14 4C086/ZC54 4C086/ZC71		
优先权	2003360198 2003-10-21 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种在内窥镜手术期间使粘膜隆起的液体组合物，其特征在于其包含含有碳水化合物链的壳聚糖衍生物。本发明的组合物作为内窥镜手术中使粘膜膨出的液体，长期维持粘膜膨出，防止穿孔的用途，可以提高内窥镜手术的可靠性。本发明的组合物还证明了预防和抑制切开部分的出血。在具有碳水化合物链的上述壳聚糖衍生物中引入光反应性基团使得可以通过光交联容易地形成水凝胶，从而导致凸起保持性的进一步改善和防止出血。

が、下記式（Ⅰ）：

