

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4813741号
(P4813741)

(45) 発行日 平成23年11月9日(2011.11.9)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 31/7016 (2006.01) A 6 1 K 31/7016
A 6 1 P 19/08 (2006.01) A 6 1 P 19/08
C 0 7 H 5/04 (2006.01) C 0 7 H 5/04

請求項の数 2 (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願2002-141195 (P2002-141195)	(73) 特許権者	591046892 富士産業株式会社 香川県丸亀市田村町1301番地
(22) 出願日	平成14年5月16日(2002.5.16)	(73) 特許権者	502456541 有限会社 シーバイオン 香川県高松市林町2217番地16 FR OM香川 5C
(65) 公開番号	特開2003-335682 (P2003-335682A)	(74) 代理人	100086221 弁理士 矢野 裕也
(43) 公開日	平成15年11月25日(2003.11.25)	(72) 発明者	奥谷 康一 香川県高松市木太町3738番地35
審査請求日	平成17年1月31日(2005.1.31)		
審判番号	不服2009-3537 (P2009-3537/J1)		
審判請求日	平成21年2月18日(2009.2.18)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨細胞プロテオグリカン生成促進用栄養補助剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤。

【請求項2】

コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする軟骨障害の予防又は治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤に関し、詳しくはコンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有する軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤に関する。さらには、当該コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有する軟骨障害の予防又は治療剤に関する。

【0002】

コンドロシンは、(1,3)-D-グルクロノシル-D-ガラクトサミンとも称される既知物質であり、例えばコンドロイチン硫酸を酸で加水分解することによって得られる他、特定の微生物によって生産されるコンドロイチンモチーフ(基本骨格)を含む酸性ムコ多糖を酸で加水分解して得られる二糖である。本発明は、特に後者の方法によって工業的に安定して得られるコンドロシンの新規な用途を開発したものである。

【0003】

【従来の技術】

軟骨は、軟骨細胞とこれを取り囲む軟骨基質からなる結合組織である。軟骨基質の主成分は、プロテオグリカンとコラーゲンであり、これらが他の機能分子と共に複雑な相互作用を介して細胞の接着、増殖、分化等の重要な細胞活動の調節に関与している。

プロテオグリカンの糖鎖の大部分は、コンドロイチン硫酸などの酸性ムコ多糖であり、タンパク質に結合して巨大分子を形成している。様々な原因により、この軟骨組織からのプロテオグリカン遊離が促進され、かつ組織におけるプロテオグリカンの生成能が低下すると、軟骨組織の破壊が進み、変形性関節症等の疾患が起こる。

これまでも、各種軟骨疾患の予防あるいは治療を目的とするプロテオグリカン発現促進物質についての報告があり、例えばベンゾチエピン誘導体（特開2000-72678号）、HGF（特開平8-59502号）、プロテオグリカン生成促進剤（特開2000-281577号）、ヒアルロン酸（特開平11-60609号）等が挙げられる。

しかし、安全性、安定性及び有効性に優れた軟骨細胞プロテオグリカン生成促進のための栄養補助剤又は医薬についてはまだ開発されていない。

【0004】

近年、アミノ糖の生体内における重要性と、その摂取による種々の有用な効果が確かめられている。アミノ糖は、生体中の様々な複合糖質中に構成単位として存在し、その代表的なものがコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などの酸性ムコ多糖を含むプロテオグリカンであり、結合組織や皮膚組織、軟骨、関節液などに多く分布している。

これらは、細胞の機能や形態を維持し、滑剤として変形性関節症の緩和作用や皮膚組織の保湿性、柔軟性を持たせる機能を有していることが報告されている（Fortschr Medicine, 98, 801-806, 1980及びNew Food Industry, 41, 1-4, 1999を参照）。

【0005】

グルクロン酸とN-アセチル-ガラクトサミンを構成糖とするコンドロイチンやコンドロイチン硫酸などの酸性ムコ多糖は、変形性関節症の治療等のヒトにおける結合組織疾病の予防や治療のために用いられ、近年は特にその需要が著しく増大している。

しかし、コンドロイチン及びコンドロイチン硫酸の製造は、ウシ軟骨、サメ軟骨などの動物由来に限られている上に、最近ではウシ軟骨は狂牛病（BSE）の影響で使用が困難な状況にある。また、サメ軟骨は資源保護の立場から、その供給と品質が不安定になっている。

【0006】

しかも、従来より試みられている治療法は、直接的に原因の解決を図ることを目的とするものではなく、抗炎症剤などを投与することによって、その疾患に基づく痛み等の障害を抑制する方法や関節にヒアルロン酸製剤などを注入して関節の動きを潤滑にする方法等の対症療法的なものでしかなかった。その上、使用薬剤によっては消化管障害等の有害作用を生起することも知られている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

このように、軟骨損傷や軟骨障害の根治的治療法は未だ見出されておらず、特に変形性関節症は患者数が多く、その有効な治療法が切望されている。

本発明の目的は、軟骨損傷や軟骨障害の予防、治療に有効であり、しかも安全性の高い栄養補助剤を提供することである。

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ね、前記した特定の微生物により産生されるコンドロシンに着目し、その作用について検討したところ、軟骨細胞のプロテオグリカン生成を促進する作用を有していることを見出し、かかる知見に基づいて本発明を完成するに至った。さらに、コンドロシンは軟骨障害の予防又は治療に対しても有効であり、組織細胞培養に利用できる可能性があると考えられる。

【0008】

【課題を解決するための手段】

請求項1記載の本発明は、コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤である。

請求項2記載の本発明は、コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする軟骨障害の予防又は治療剤である。

【0009】

【発明の実施の形態】

前記したように、本発明に用いるコンドロシンは、微生物により産生される。すなわち、海洋微生物であるシュードモナス属微生物、シュードモナス・エスピーWAK-1株の培養物中に生成、蓄積される酸性ムコ多糖を加水分解することによって得られる（特願2001-64228号明細書）。化学的、酵素的手法等の他の方法により取得されるコンドロシン、例えばコンドロイチン硫酸や当該物質を含む動物組織の磨砕物等を酸で加水分解して得られるコンドロシンも本発明に使用することができる。

また、生理学的に許容される塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩やアンモニウム塩等の無機塩基との間で形成された塩、さらには塩酸塩などを挙げることができ、コンドロシンと併用することもできる。

【0010】

請求項1記載の本発明は、コンドロシン又は生理学的に許容されるその塩を有効成分として含有する軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤である。軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤には、所望により賦形剤（例えばセルロース、デキストリン、乳糖、第三リン酸カルシウム等）、安定剤、着色料、香料、ビタミン類などを適宜加えることができる。

本発明に係る軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤は、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤などの各種形態とすることができる。その他、栄養補助剤を食品に添加して用いることもできる。

本発明に係る軟骨細胞プロテオグリカン生成促進剤の使用量については、特に制限されることはないが、通常は1日当たりコンドロシンとして0.001~10g、好ましくは0.01~1g程度が摂取されるように、1日1回ないし数回に分けて用いると良い。

【0011】

【実施例】

次に、本発明を実施例などにより詳しく説明するが、本発明はこれらにより制限されるものではない。

製造例1

ペプトン0.5%及び酵母エキス0.1%を含む海水を滅菌処理して得た培地（基本培地）10mLにシュードモナス・エスピーWAK-1株（香川大学農学部生命機能科学科岡崎研究室保存菌株で、申請により入手可能）を1白金耳接種し、28℃で72時間振盪培養を行った。

【0012】

このようにして得た前培養液を滅菌した容器（18×26cm）中の基本培地に3%ショ糖と寒天を添加した培地250mLに接種し、28℃で72時間培養した。培養後、菌体を含む粘質物を1%フェノール溶液に懸濁し、遠心分離して菌体を除いた上清に2倍量のエタノールを加えて白色沈殿を得た。

この沈殿物を採取し、水に溶解した後、再度2倍量のエタノールを加えて多糖を沈殿させた。沈殿を水に溶解し、水に対して透析後、凍結乾燥を行って多糖を得た。

【0013】

得られた多糖を0.01Mリン酸塩緩衝液（pH7.0）に溶解し、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化させたDEAE-セルロースカラム（2.3×22.5cm）に充填し、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）中の0.2M塩化ナトリウムで溶出される画分を除いたのち、0.4M塩化ナトリウムで溶出される画分を集めて透析した。次いで、凍結乾燥を行い酸性ムコ多糖を得た。この酸性ムコ多糖について、セルロースアセテート膜電気泳動法を用いて均一性を確認すると共に、糖組成分析、ピルビン酸含量分

10

20

30

40

50

析、核磁気共鳴分析などを行って文献 (M. Matsudaら、Fisheries Science, 62, 983-986, 1997) に記載のものと同じの 酸性ムコ多糖であることを確認した。

【0014】

得られた酸性ムコ多糖を水に溶解して1.0重量%溶液とし、1.0N塩酸濃度にて100で6時間加熱して加水分解処理を行った。反応液を冷却後、水酸化ナトリウムで中和した。

この中和液を用い、ゲル濾過Bio-Gel P2カラム(2.5×100cm)にてコンドロシンを単糖類や無機塩類と分別、採取した。Bio-Gel P2カラムクロマトグラフィーは、溶離液に緩衝液(水:ピリジン:酢酸=500:5:2)を用い、4.0mL/30minの流速で展開し、各4.0mLを分画した。

10

【0015】

次いで、コンドロシンのみが含まれる画分を集めて凍結乾燥した。各フラクションのコンドロシン及びガラクトサミンの検出には、各フラクションから一定量の試料を採取し、(i)N-アセチル化後に還元し、wakopak WBT-130Eカラム(7.8×300mm、和光純薬製)にアプライした。移動相に水を用い、60で0.5mL/minの流速で展開し、示差屈折計で測定した。(ii)誘導体としないで、Mightysil RP-18GPカラム(4.6×250mm、関東化学製)にアプライした。移動相には0.001N-HCl又は2.4mMフタル酸含有2.5mMトリスアミノメタン(pH4.0)を用い、35で0.5mL/minの流速で展開し、示差屈折計で測定した。

【0016】

上記中和液に活性炭を加えて良く攪拌した後、プフナー漏斗上のガラス繊維濾紙(Whatman GFF)を通して濾過し、水で良く洗浄してから、さらに2.5%エタノールで洗浄した。次に、5%エタノールで溶出する画分を集め、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固した後、300mLの水に溶解し、AC-220-550カートリッジを装着した電気透析システム(旭化成(株)製、S3型)を用いてコンドロシンを精製し、凍結乾燥した。

20

【0017】

製造例2

市販のコンドロイチン硫酸(三栄源エフ・エフ・アイ製、サメ軟骨抽出物)を1.0N塩酸に溶解して1.0重量%溶液とし、100で6時間加熱して加水分解処理を行った。反応液を冷却後、水酸化ナトリウムで中和した。

30

この中和液をそのまま又は中和液に活性炭を加えて良く攪拌した後、プフナー漏斗上のガラス繊維濾紙(Whatman GFF)を通して濾過し、水で良く洗浄してから、さらに2.5%エタノールで洗浄した。次に、5%エタノールで溶出する画分を集め、ロータリーエバポレーターで蒸発乾固した後、300mLの水に溶解し、AC-220-550カートリッジを装着した電気透析システム(旭化成(株)製、S3型)を用いてコンドロシンを精製し、凍結乾燥した。

【0018】

実施例1

マウス胚細胞由来の軟骨細胞様に分化するATDC5(RIKEN BANK、RBC0565)培養細胞株を、48ウエルプレートに5×10⁴ cells/wellの密度で播種し、5%FCS(牛胎児血清)を含むイーグルMEM培地を用いて5%CO₂下、37で培養した。

40

2日間培養後、血清を含まないイーグルMEM培地でウエルを2回洗浄したのち、450μLの5%FCSを含むイーグルMEM培地を各ウエルに入れた後、50μLの試験液を入れ、4日間37で培養した。なお、試験液は製造例1又は2で調製したコンドロシンが5mg/mLの濃度となるように血清を含まないイーグルMEM培地に溶解した後、0.45nmのフィルターで除菌したものである。

【0019】

培養終了後、培養液を除去して得た細胞株をPBS-A(リン酸緩衝液)で2回洗浄したのち、0.125mLの0.2%NP-40(1mM MgCl₂を含むPBS-Aに溶解)と共に各ウエルに入れ、37で2時間培養して細胞を溶解した後、10000rp

50

mで5分間遠心し、得られた上清について酸性ムコ多糖測定用キット（ホクドー製）で酸性ムコ多糖を定量した。結果を第1表に示す。なお、表中の数値は、コンドロシン無添加群の吸光度（650nm）を100%とした場合のコンドロシン添加群の吸光度を活性%として算出したものである。濃度は、各ウエル中の反応混液1mL当たりのコンドロシン濃度（ μg ）である。

表から明らかのように、コンドロシンはATDC5の発色を増加させ、軟骨細胞の酸性ムコ多糖を指標とするプロテオグリカン生成に対する促進作用を有していることが分かる。

【0020】

【表1】

第1表 軟骨細胞のプロテオグリカン生成促進効果

10

コンドロシン濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	活性 (%)
0	100
10	180
100	139

【0021】

20

【発明の効果】

本発明により、コンドロシンを有効成分として含有する栄養補助剤が提供される。この栄養補助剤は、軟骨細胞プロテオグリカン生成促進作用を有する。

コンドロシンは、低分子化合物であるため、コンドロイチン硫酸などのムコ多糖よりも消化吸収性に優れている。しかも、プロテオグリカンを構成するコンドロイチン硫酸の基本骨格を有するので、吸収された後、コンドロイチン硫酸やプロテオグリカンへの生合成がグルコサミンやコンドロイチン硫酸よりも速く行われることが期待される。

さらに、コンドロシンは安定的に大量に入手することができる上に、このコンドロシンを含む栄養補助剤は副作用がなく、安全性が高いものである。

コンドロシンは、軟骨障害の予防又は治療に対しても有効であり、組織細胞培養に利用できる可能性がある。

30

フロントページの続き

合議体

審判長 横尾 俊一

審判官 上條 のぶよ

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特開平5 - 262783 (JP, A)

国際公開第98 / 13328 (WO, A1)

特表平9 - 503197 (JP, A)

特開2002 - 3382 (JP, A)

Chem Pharm Bull, 1966, 14(2), p. 1433 - 1434

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC A61K31/70

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)