

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5819189号

(P5819189)

(45) 発行日 平成27年11月18日 (2015.11.18)

(24) 登録日 平成27年10月9日 (2015.10.9)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/726 (2006.01)

A 6 1 K 31/726

A 6 1 P 19/04 (2006.01)

A 6 1 P 19/04

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 19/02 (2006.01)

A 6 1 P 19/02

C O 8 B 37/00 (2006.01)

C O 8 B 37/00 Q

請求項の数 1 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2011-505815 (P2011-505815)

(86) (22) 出願日 平成21年12月25日 (2009.12.25)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2009/071613

(87) 国際公開番号 W02010/109736

(87) 国際公開日 平成22年9月30日 (2010.9.30)

審査請求日 平成24年12月18日 (2012.12.18)

(31) 優先権主張番号 特願2009-73856 (P2009-73856)

(32) 優先日 平成21年3月25日 (2009.3.25)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 504150461

国立大学法人鳥取大学

鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地

(73) 特許権者 390016953

株式会社海産物のきむらや

鳥取県境港市渡町3307番地

(74) 代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74) 代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74) 代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72) 発明者 南 三郎

鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地

国立大学法人鳥取大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 軟骨生成促進剤および軟骨損傷由来疾病の予防治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フコイダンを有効成分として含有し、経口投与される グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤であって、該フコイダンの分子量は146000である剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

この出願は、平成21年3月25日に日本国特許庁に出願された出願番号2009-73856号の優先権の利益を主張する。優先権基礎出願はその全体について、出典明示により本明細書の一部とする。

【0002】

本発明は、フコイダンを有効成分として含有する、軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤に関する。

【背景技術】

【0003】

軟骨は軟骨基質と、その中に点在する軟骨細胞からなる組織である。軟骨基質は水、コラーゲン、プロテオグリカンなどから構成される。プロテオグリカンは、グルコサミノグ

10

20

リカンとよばれる多糖類および蛋白質より構成される複合体である。軟骨はその弾性により、生体内で様々な機能を果たしている。

【0004】

軟骨損傷に由来する疾病は変形関節症、関節炎、リウマチ等多岐にわたる。これらの疾病の治療剤として、グルコサミン（非特許文献1参照）、グルクロン酸（特許文献1参照）等多数の有効成分が知られている。

【0005】

フコイダンは、海藻（例えばもずく、マコンブ等）に含有される多糖類であり、これらの海藻類を喫食することにより、古くから摂取されてきたものである。フコイダンは、免疫賦活作用、癒着防止作用および抗炎症作用等多数の生理活性機能を有する（特許文献2、特許文献3等参照）ものである。

10

【0006】

また、特許文献4には、フコイダンが骨や軟骨の形成作用を促すとの記載がされている。しかしながら、特許文献4はあくまで骨形成促進剤の開示にとどまるものである。骨を誘導するには骨芽細胞が必要であり、軟骨を誘導するには軟骨芽細胞が必要である。骨芽細胞も軟骨芽細胞も未分化の細胞から異なった系で分化・誘導されるが、骨芽細胞と軟骨芽細胞は全く異なる細胞で性質、役割も異なる。骨芽細胞はI型コラーゲンを産生し、アルカリフォスファターゼ活性により石灰化を行い骨化する。軟骨芽細胞は軟骨細胞の前駆細胞でII型コラーゲンやグリコサミノグリカンを産生、軟骨細胞に分化・誘導される。この軟骨細胞は細胞周辺にプロテオグリカンを合成することにより骨芽細胞による石灰化・骨形成を阻止し、軟骨を形成する。軟骨の形成には骨化を阻止する必要があり、軟骨形成は軟骨細胞のプロテオグリカンの合成促進で骨の形成とは全く相違する生態現象である。すなわち、特許文献4には、フコイダンが軟骨形成促進を行うことと逆の作用が開示されている。

20

【0007】

特許文献4の実施例には、セルライン化した細胞に直接フコイダン等を投与した結果が示されている。しかしながら、経口摂取等の通常の投与形態では、フコイダンが直接骨芽細胞に接触することはあり得ない。すなわち、特許文献4には、実際の生体でフコイダンを投与した場合にどのような作用が得られるかは全く開示されていない。

30

【0008】

以上のように、フコイダン自体に軟骨生成促進作用があるとの知見は存在しない。

【特許文献1】特開2004-10533号公報

【特許文献2】特開2005-82806号公報

【特許文献3】特開2005-508893号公報

【特許文献4】特開2004-10533号公報

【非特許文献1】TAMAIら、Carbohydrate polymers、2002、vol. 48、p. 369～378

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

40

関節症は患者数が多く、さらに日本では高齢化により、老人性関節症の患者数が今後さらに増加することが予想される。このような中で、軟骨損傷を修復できるより有用な治療剤への要望がいまだ存在している。また、このような治療剤は、安全で副作用がなく、日常的な摂取で疾病を予防できるものであればなお好ましい。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決せんと鋭意研究を重ね、上記課題を解決しうる物質としてフコイダンを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、

50

- (1) フコイダンを有効成分として含有する軟骨生成促進剤、
- (2) 該フコイダンの分子量が8,000～400,000である、(1)に記載の軟骨生成促進剤、
- (3) 該フコイダンの分子量が50,000～150,000である、(1)に記載の軟骨生成促進剤、
- (4) フコイダンを有効成分として含有する、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤、
- (5) 該フコイダンの分子量が8,000～400,000である、(2)に記載のグルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤、
- (6) 該フコイダンの分子量が50,000～150,000である、(2)に記載のグルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤、 10
- (7) フコイダンを有効成分として含有する、軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病を予防または治療するための医薬または獣医薬組成物、
- (8) 該フコイダンの分子量が8,000～400,000である、(7)に記載の医薬または獣医薬組成物、
- (9) 該フコイダンの分子量が50,000～150,000である、(7)に記載の医薬または獣医薬組成物、
- (10) 軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病を予防または治療するための医薬または獣医薬組成物の製造におけるフコイダンの使用、
- (11) 該フコイダンの分子量が8,000～400,000である、(10)に記載の使用、 20
- (12) 該フコイダンの分子量が50,000～150,000である、(10)に記載の使用、
- (13) 軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病を予防または治療するために、動物対象に有効量のフコイダンを投与することを含む、方法、
- (14) 該フコイダンの分子量が8,000～400,000である、(13)に記載の方法、
- (15) 該フコイダンの分子量が50,000～150,000である、(13)に記載の方法、
- を提供するものである。 30

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、フコイダンを有効成分として含有する軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤が提供される。これらは、例えば、変形性関節症、老人性関節症、関節リウマチなどの予防および治療に有効である。さらにこれらは海藻に含まれる天然物質であるフコイダンを有効成分とするので、安全性が高く、副作用も見られない。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、コントロール群、フコイダン投与群における損傷の治癒程度を目視により評価し、比較したものである。

【図2】図2は、コントロール群、フコイダン投与群の滑車溝近位をアルシアンブルー染色した結果を表す図である。1、2、3は各群のウサギの個体、上段がコントロール群、下段がフコイダン群を示す。

【図3】図3は、コントロール群、フコイダン投与群の滑車溝遠位をアルシアンブルー染色した結果を表す図である。1、2、3は各群のウサギの個体、上段がコントロール群、下段がフコイダン群を示す。

【図4】図4は、コントロール群、フコイダン投与群の滑車溝近位をサフラニン-O染色した結果を表す図である。1、2、3は各群のウサギの個体、上段がコントロール群、下 50

段がフコイダン群を示す。

【図5】図5は、コントロール群、フコイダン投与群の滑車溝遠位をサフラニン-O染色した結果を表す図である。1、2、3は各群のウサギの個体、上段がコントロール群、下段がフコイダン群を示す。

【図6】図6は、損傷部位標本のアルシアンブルー染色画像およびサフラニン-O染色画像を解析した結果を表す図である。

【図7】図7は、コントロール群および分子量239,000、330,000のフコイダンを投与した損傷部位標本について、アルシアンブルー染色画像およびサフラニン-O染色画像を解析した結果を表す図である。

【図8】図8は、コントロール群、分子量の異なる各フコイダン投与群における損傷の治療程度を目視により評価し、比較したものである。

10

【図9】図9は、コントロール群、分子量の異なる各フコイダン投与群における損傷部位標本のアルシアンブルー染色画像を解析した結果を表す図である。

【図10】図10は、コントロール群、分子量の異なる各フコイダン投与群における損傷部位標本のサフラニン-O染色画像を解析した結果を表す図である。

【図11】図11は、コントロール群、分子量8,000および50,000の群の損傷部位をアルシアンブルー染色した結果を表す図である。下段は上段四角部分の拡大画像を示す。

【図12】図12は、分子量146,000、239,000および330,000の群の損傷部位をアルシアンブルー染色した結果を表す図である。下段は上段四角部分の拡大画像を示す。

20

【図13】図13は、分子量400,000および1,000,000の群の損傷部位をアルシアンブルー染色した結果を表す図である。下段は上段四角部分の拡大画像を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明者らは、フコイダンが軟骨生成を促進し、軟骨の損傷を回復する機能を有することを見出した。さらに、フコイダンが軟骨基質中のグルコサミノグリカンおよびプロテオグリカンの生成を促進することを見出した。フコイダンは、海藻（例えばもずく、マコンブ等）に含有される多糖類であり、これらの海藻類を喫食することにより、古くから摂取されてきたものである。フコイダンは、免疫賦活作用、癒着防止作用および抗炎症作用等多数の生理活性機能を有するものであるが、フコイダン自体に軟骨生成促進作用があるとの知見は存在していない。

30

【0015】

本発明は第一の態様において、フコイダンを有効成分として含有する軟骨生成促進剤を提供する。

【0016】

本発明は第二の態様において、フコイダンを有効成分として含有するグルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤を提供する。

【0017】

本発明は第三の態様において、フコイダンを有効成分として含有する、軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤を提供する。

40

【0018】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤は、軟骨損傷に関連する症状、例えば変形関節症、老人性関節症、関節リウマチ、変形性脊椎症、関節捻挫および靱帯損傷などの予防または治療に有用である。

【0019】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤において有効成分として用いられるフコイダンは、精製品であってもよく、粗精製品、例えばもず

50

くなどの海藻からの抽出物であってもよい。海藻などのフコイダン含有素材からのフコイダンの抽出方法および手段は公知である。本発明に使用されるフコイダンは固体（例えば、粉末、顆粒など）、液体（例えば、フコイダン水溶液、フコイダン懸濁液、海藻からの抽出液など）、半固体（例えば、ペーストなど）のいずれであってもよい。本発明において、フコイダン含有素材が有効成分として含まれていてもよい。好ましいフコイダン含有素材の例としては、海藻類、とくに褐藻類が挙げられる。フコイダン含有褐藻類としては、もずく（例えば、沖縄もずく、糸もずくなど）、ワカメ、メカブ（ワカメの胞子葉）、アラメ、ガゴメ、マコンブ、クロメ、カジメ、ミツイシコンブ、ヨレモク、ヒジキ、ホンダワラ、ヤツマタモク、アカモク、ヒバマタ、ウミトラノオなどが例示されるが、これらに限定されない。

10

【0020】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤は医薬組成物の形態であってもよい。その投与方法は特に限定されず、経口、注射、経皮等いずれの方法であってもよいが、経口投与が好ましい。経口投与剤の場合、濃縮液、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤などの様々な経口用剤形に処方することができる。これらの剤形の製法は公知であり、混合、溶解、粉碎、打錠、乾燥等のプロセスを適宜用いることができ、目的に応じた担体や賦形剤を使用することができる。本発明の経口投与剤に香料、甘味料、着色料などを適宜添加してもよい。本発明の経口投与剤はそのまま投与することもできるが、有効成分であるフコイダンはそれ自体無味無臭であるので、飲食物、例えば、みそ汁、茶、その他の食べ物または飲料に本発明の経口投与剤を随意に添加して投与することもできる。

20

【0021】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤は飲食物の形態であってもよい。フコイダンはそれ自体無味無臭であるので、風味に影響することなく様々な飲食物を製造することができる。例えば、フコイダン粉末あるいはもずくなどからのフコイダン抽出物を添加したみそ汁やスープを製造することができる。また例えば、もずくなどからのフコイダン抽出物を濃縮してパックに詰める、あるいは凍結乾燥等の処理をして粉末あるいは顆粒などの形態にして適当な包装や容器に入れる等の処理加工を施して、利用者が自ら任意の飲食物に添加して摂取する形態としてもよい。

30

【0022】

さらに、本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤は、フコイダンまたはフコイダン含有素材を含むサプリメントであってもよい。サプリメントは当業者に公知の方法にて、錠剤、カプセル剤、顆粒、粉末などの形態にすることができる。このように、本発明の飲食物を用いれば、利用者または患者は抵抗なく日常的に長期間にわたりフコイダンを摂取することができ、上記疾病の予防および治療に資することができる。本発明の飲食物は機能性食品としても有用である。

40

【0023】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤の投与量は当業者が容易に決定することができる。例えば、変形性関節症、老人性関節症、関節リウマチなどの、目的とする疾病の予防または治療効果を観察しながら、投与されるフコイダンの量を決定することができる。本発明の剤により投与されるフコイダンの量（乾燥重量）は、成人の場合、通常1日に約0.3 gまたはそれ以上、好ましくは約1 gまたはそれ以上である。

【0024】

本発明の軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤には、フ

50

コイダンのみならず、1種またはそれ以上の他の有効成分が含まれていてもよい。他の有効成分の例としては、公知の抗炎症薬、その他軟骨損傷に由来する疾病の治療剤（例えばグルコサミンなど）、などが挙げられる。

【0025】

さらに本発明は、軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤、ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤の製造におけるフコイダンの使用を提供する。

【0026】

本発明は他の態様において、フコイダンを有効成分として含有する軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病を予防または治療するための獣医薬を提供する。当該獣医薬は獣医薬組成物の形態であってもよい。その投与方法は特に限定されず、経口、注射、経皮等いずれの方法であってもよいが、経口投与が好ましい。経口投与剤の場合、濃縮液、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤などの様々な経口用剤形に処方することができる。これらの剤形の製法は公知であり、混合、溶解、粉碎、打錠、乾燥等のプロセスを適宜用いることができ、獣医薬上許容される担体や賦形剤を使用することができる。本発明の経口投与剤に香料、甘味料、着色料などを適宜添加してもよい。当該獣医薬には、フコイダンのみならず、1種またはそれ以上の他の有効成分が含まれていてもよい。他の有効成分の例としては、公知の抗炎症薬、その他軟骨損傷に由来する疾病の治療剤（例えばグルコサミンなど）、などが挙げられる。

【0027】

さらに本発明は、軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病を予防または治療するための獣医薬の製造におけるフコイダンの使用を提供する。

【0028】

さらに本発明は、ヒトを含むまたは含まない動物対象における軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療のための方法であって、該動物に有効量のフコイダンを投与することを含む方法を提供する。

【0029】

本発明の有効成分としてのフコイダンの好ましい分子量範囲は8,000～1,000,000であり、例えば8,000～250,000、250,000～500,000、500,000～750,000、750,000～1,000,000、8,000～350,000、350,000～1,000,000、50,000～1,000,000、150,000～1,000,000、250,000～1,000,000、400,000～1,000,000などである。より好ましい分子量範囲は8,000～400,000であり、例えば、8,000～150,000、150,000～250,000、250,000～350,000、350,000～400,000、50,000～350,000、50,000～400,000、150,000～350,000、150,000～400,000、250,000～400,000などである。さらに好ましい分子量範囲は8,000～250,000であり、例えば、8,000～50,000、50,000～100,000、100,000～200,000、8,000～150,000、150,000～250,000、50,000～250,000などである。そのうえさらに好ましい分子量範囲は50,000～150,000であり、例えば50,000～100,000、100,000～150,000などである。最も好ましい分子量は、150,000である。

【0030】

フコイダンの分子量は公知の方法、例えばゲルろ過クロマトグラフィーを用いて測定することができる。通常は、分子量測定の際に既知分子量を有するプルランをマーカーとして用いる。高分子化合物の分子量は平均分子量、数平均分子量あるいは重量平均分子量で表されることが一般的であるが、本明細書において、特に断らないかぎり、分子量というときは重量平均分子量を意味する。重量平均分子量は、公知の手段・方法により計算することができ、例えばゲルろ過クロマトグラフィーのパターンから計算することができる。

【0031】

本明細書において、分子量を数値で表す場合、その数値の約±20%の幅を含むものとする。例えば、分子量50,000という場合には、約40,000～約60,000の分子量が含まれる。

【0032】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

【実施例1】

【0033】

実施例1：損傷モデル作製

供試動物として、白色ウサギ（体重約2.0kg）の雌を各群につき3羽用いた。入手後1週間環境に慣らせ、その後、メデトミジン0.1mg/kgを皮下注射し、ケタラル25mg/kgを筋肉内注射した。このような注射麻酔下の供試ウサギの左側膝関節部を剪毛、消毒後、膝関節外側からアプローチし、関節包をあけて、膝蓋骨を内側に移動させることによって膝関節部を完全に露出した。そして、Tama iらの実験（Carbohydrate polymers、2002、vol. 48、p. 369～378）を参考に、滑車溝近位、滑車溝遠位および内側滑車陵の計3箇所直径2mm、深さ4mmの孔をハンドドリルによってあけた。その後、よく洗浄し、関節包を3-0 PDS（ポリジオキサノン）を用いて縫合した。また、皮下組織と皮膚は一緒にステンレスワイヤーで縫合した。術後はアチパメゾール0.5mg/kgを一日2回希釈し皮下に注射し覚醒させた。

【0034】

手術日から、フコイダン投与群のウサギには毎日フコイダン1gを溶かした水（50ミリリットル）を最初自然摂取させ、その後は水を自由摂取させた。これを3週間続けた。また、コントロール群には水のみを与えた。この間フコイダン投与群に副作用等の兆候を示すものは全く見あたらなかった。

【0035】

3週間の投与期間終了後にフコイダン投与群およびコントロール群それぞれの供試ウサギを安楽死させ、手術部を露出させた。

【実施例2】

【0036】

実施例2：肉眼による治癒程度の観察

実施例1の損傷モデルにおける左大腿骨の手術部を肉眼でよく観察した。3週間後の治癒程度を見ると、フコイダン投与群では良好に治療しているものが多く、コントロール群では治癒していないものが多く見受けられた。損傷の治癒程度を表1に基づき点数化して評価した。

【表1】

肉眼的所見	点数
治癒率50%未満	0
治癒率50%以上60%未満	1
治癒率60%以上80%未満	2
治癒率80%以上	3

【0037】

結果は図1の通りとなった。この結果によると、滑車溝近位および遠位においてフコイダン投与群が良好な治癒結果を示した。コントロール群の損傷部位は膠原線維、線維芽細胞などで充填されていたのに対し、フコイダン投与群の損傷部位は軟骨芽細胞、軟骨組織に置換されていた。

【実施例3】

【0038】

実施例3：組織学的観察

実施例1の損傷モデルにおける左側大腿骨を採材し、10%中性緩衝ホルマリン水溶液（ホルムアルデヒド液）で固定した後、5%ギ酸溶液によって振とう下で脱灰した。脱灰終了後、5%硫酸ナトリウム溶液で中和し、水洗した後脱水した。脱灰の完了した組織片を修復部位が縦断面になるように切り出しを行った。その後定法にしたがってパラフィン包埋を実施し、ミクロトームにて5 μ mに薄切した。得られた組織片を用いて、アルシアンブルー（AB）染色およびサフラニン-O（SO）染色を実施し、組織学的観察のための標本とした。標本について顕微鏡観察、および画像解析を実施した。画像解析は、修復部位の200倍画像をPhotograph-ab-300 version1.0（マッキントッシュソフトウェア、アドビシステム、東京）を用いてデジタル化し、画素数として20,000ピクセルを無作為に6ヶ所設定し、その中の目的とする色調の占めるピクセル数を測定した。求めた数値について統計処理（t-検定）を実施した。

10

【0039】

(a) アルシアンブルー染色観察結果

図2および図3は、それぞれ滑車溝近位および遠位のアルシアンブルー染色標本の顕微鏡観察結果である。フコイダン投与群においては修復部分がブルーに染色（図の濃色部分）されており、グルコサミノグリカンが多く含まれていることが示された。一方、コントロール群においてはほとんど染色されなかった。

20

【0040】

(b) サフラニン-O染色観察結果

図4および図5は、それぞれ滑車溝近位および遠位のサフラニン-O染色標本の顕微鏡観察結果である。フコイダン投与群においては修復部分が染色（図の濃色部分）されており、プロテオグリカンが多く含まれていることが示された。一方、コントロール群においてはほとんど染色されなかった。

【0041】

(c) 画像解析結果

図6は、アルシアンブルー染色画像およびサフラニン-O染色画像を上記方法で解析した結果である。この結果によれば、フコイダン投与群はどちらもコントロール群に比較して有意に高い値を示し、グルコサミノグリカンおよびプロテオグリカンがフコイダン投与群において有意に多く存在していることが示された。

30

【0042】

以上の実施例2、3の結果より、フコイダン投与群においては、軟骨組織におけるグルコサミノグリカンおよびプロテオグリカンの生成が促進され、軟骨組織の修復が促進されたものと考えられる。

【実施例4】

【0043】

実施例4：分子量239,000、330,000のフコイダンでの効果の比較

実施例1の損傷モデル作製において、フコイダン投与群として、分子量239,000および330,000のフコイダンをそれぞれ投与した。各々の投与群、およびコントロール群について、実施例3の方法に従ってアルシアンブルー染色およびサフラニン-O染色を実施し、画像解析を行った。

40

【0044】

図7は、分子量の異なるフコイダンを投与した群、およびコントロール群について、アルシアンブルー染色画像およびサフラニン-O染色画像を上記方法で解析した結果である。この結果によれば、フコイダン投与群はどちらもグルコサミノグリカンおよびプロテオグリカンの生成が促進されているが、分子量の小さい分子量239,000のフコイダンを投与した群がより高いグルコサミノグリカンおよびプロテオグリカン生成を示した。

【実施例5】

【0045】

50

実施例 5：分子量の異なるフコイダンにおける効果の比較 1－損傷モデル作製

実施例 1 の損傷モデル作製において、フコイダン投与群として、分子量 8, 000、50, 000、146, 000、239, 000、330, 000、400, 000 および 1, 000, 000 のフコイダンをそれぞれ投与した損傷モデル群を作製した。

【実施例 6】

【0046】

実施例 6：分子量の異なるフコイダンにおける効果の比較 2－肉眼による治癒程度の観察

実施例 5 の各損傷モデル群における左大腿骨の手術部を、肉眼でよく観察した。各損傷モデル群について、実施例 2 の基準に基づいて治癒程度を評価した。求めた数値について、ターキークラマー（Turkey-Kramer）法による多重比較検定を実施した。結果は図 8 の通りとなった。この結果によると、全てのフコイダン投与群がコントロール群に比べて良好な治癒結果を示した。特に、分子量 50, 000、146, 000 および 400, 000 の群がより良好な結果を示した。

【実施例 7】

【0047】

実施例 7：分子量の異なるフコイダンにおける効果の比較 3－組織学的観察

実施例 5 の各損傷モデル群の組織学的観察を、実施例 3 の方法に従って行った。ターキークラマー法による多重比較検定を実施した。画像解析結果を図 9 および 10 に示す。この結果が示す通り、全てのフコイダン投与群がコントロール群に比べて良好な治癒結果を示した。特に、分子量 50, 000、146, 000 および 239, 000 の群がより良好な結果を示した。最も良好な結果を示したのは分子量 146, 000 の群であった。

【0048】

図 11～13 にコントロール群、各損傷モデル群のアルシアンブルー染色標本の顕微鏡観察結果を示す。フコイダン投与群に観察される白く抜けた点は軟骨芽細胞を現している。下段の拡大画像が示すとおり、各損傷モデルにおいて、軟骨芽細胞が活性化されていることが観察できた。最も良好な結果を示した分子量 146, 000 の群では、軟骨芽細胞がより活性化されていることが観察できた。

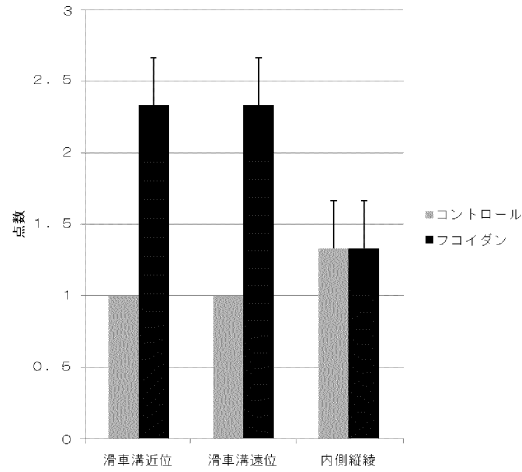
【産業上の利用可能性】

【0049】

本発明は、フコイダンを有効成分として含む軟骨生成促進剤、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカンの生成促進剤ならびに軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病の予防または治療剤である。例えば医薬組成物や飲食物を提供するものなので、医薬品や飲食物等の分野において利用できる。

【図 1】

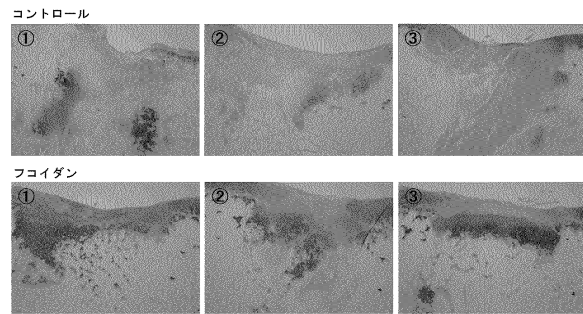
図 1. 関節損傷部位の内眼的観察所見



【図 2】

図 2. 関節損傷部位の組織学的所見 (滑車溝近位損傷部)

滑車溝近位 AB染色

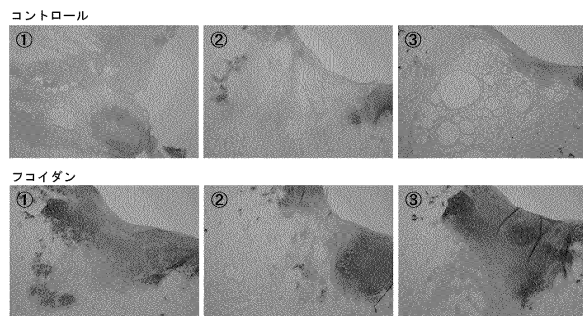


①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

【図 3】

図 3. 関節損傷部位の組織学的所見 (滑車溝遠位損傷部)

滑車溝遠位 AB染色

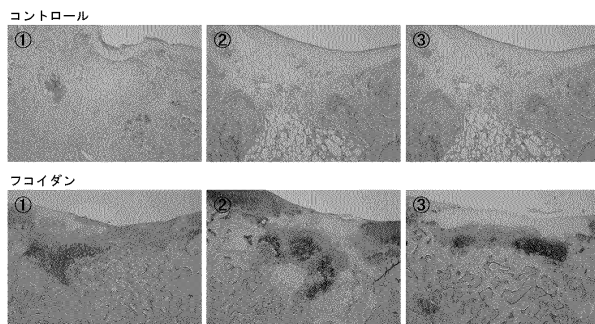


①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

【図 4】

図 4. 関節損傷部位の組織学的所見 (滑車溝近位損傷部)

滑車溝近位 SO染色

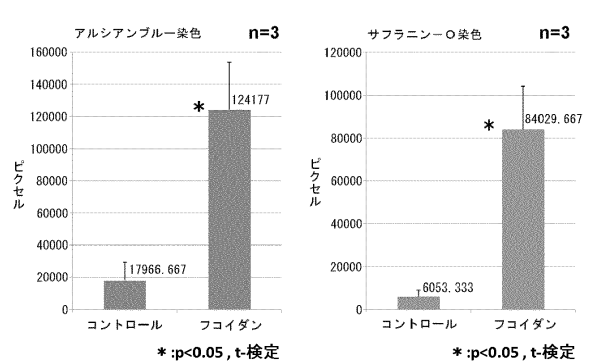


①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

【図 6】

図 6. 損傷部位の画像解析結果

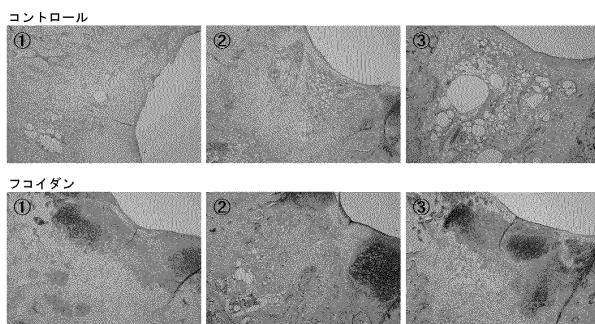
画像解析



【図 5】

図 5. 関節損傷部位の組織学的所見 (滑車溝遠位損傷部)

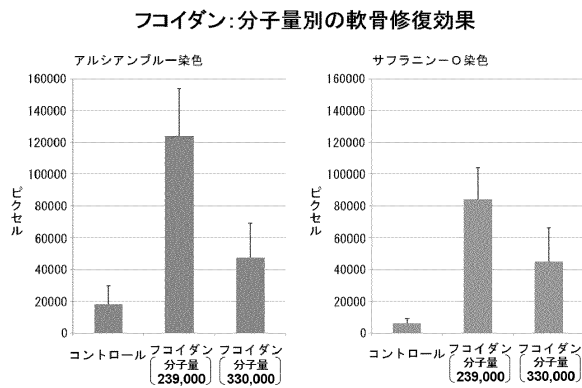
滑車溝遠位 SO染色



①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

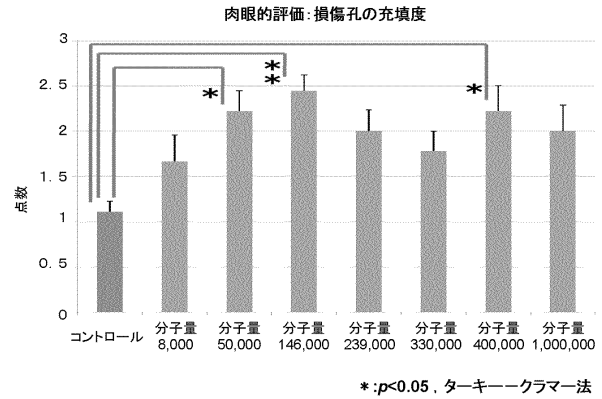
【図 7】

図 7. フコイダンの分子量による修復程度の差



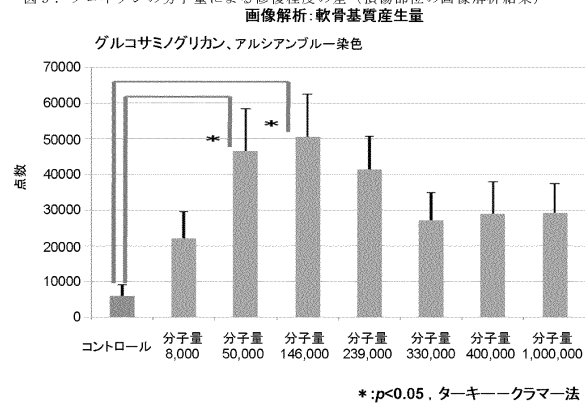
【図 8】

図 8. フコイダンの分子量による修復程度の差 (肉眼的観察)



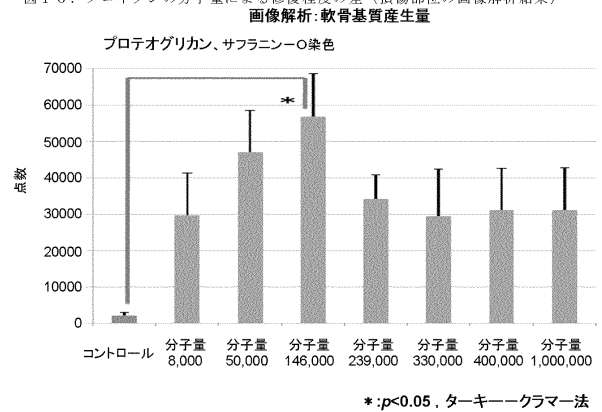
【図 9】

図 9. フコイダンの分子量による修復程度の差 (損傷部位の画像解析結果)



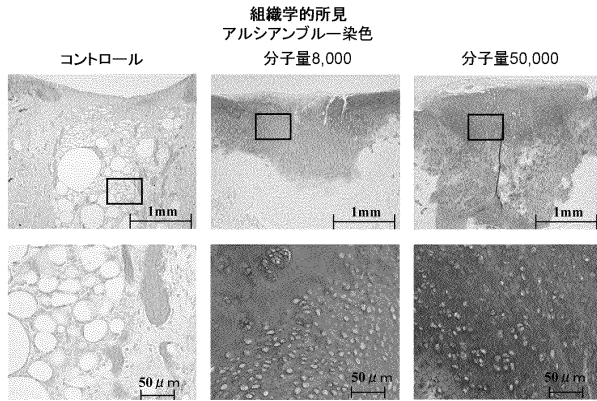
【図 10】

図 10. フコイダンの分子量による修復程度の差 (損傷部位の画像解析結果)



【図 1 1】

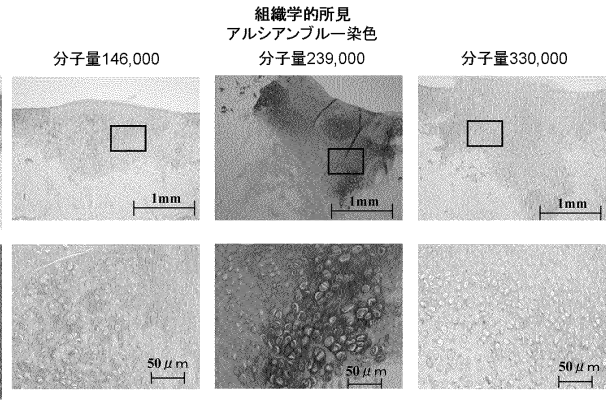
図 1 1. 損傷部位の組織学的所見



下段は上段四角部分の拡大画像

【図 1 2】

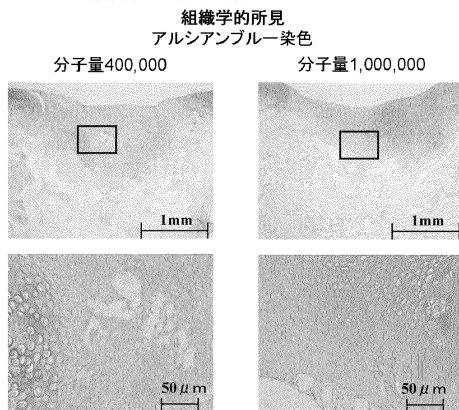
図 1 2. 損傷部位の組織学的所見



下段は上段四角部分の拡大画像

【図 1 3】

図 1 3. 損傷部位の組織学的所見



下段は上段四角部分の拡大画像

フロントページの続き

- (72)発明者 岡本 芳晴
鳥取県鳥取市湖山町南4丁目101番地 国立大学法人鳥取大学内
- (72)発明者 三木 康成
鳥取県境港市渡町3307番地 株式会社海産物のきむらや内

審査官 井上 明子

- (56)参考文献 国際公開第2004/050078 (WO, A1)
国際公開第2006/128100 (WO, A1)
特表2005-508893 (JP, A)
国際公開第2001/082936 (WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C08B 37/00
A61K 31/00 - 33/44
CAplus/REGISTRY (STN)