

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2010 年 9 月 30 日(30.09.2010)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 2010/109736 A1**

(51) 国際特許分類:

*C08B 37/00* (2006.01) *A61P 19/04* (2006.01)  
*A61K 31/726* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)  
*A61P 19/02* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/071613

(22) 国際出願日: 2009 年 12 月 25 日(25.12.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2009-073856 2009 年 3 月 25 日(25.03.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人鳥取大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南 4 丁目 1 0 1 番地 Tottori (JP). 株式会社海産物のきむらや(MARINE PRODUCTS KIMURAYA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒6840072 鳥取県境港市渡町 3 3 0 7 番地 Tottori (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 南 三郎(MINAMI, Saburo) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南 4 丁目 1 0 1 番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP). 岡本 芳晴(OKAMOTO, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南 4 丁目 1 0 1 番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP). 三木 康成(MIKI, Yasunari)

[JP/JP]; 〒6840072 鳥取県境港市渡町 3 3 0 7 番地 株式会社海産物のきむらや内 Tottori (JP).

(74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: CARTILAGE PRODUCTION PROMOTER AND PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASES ASSOCIATED WITH CARTILAGE DAMAGE

(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) Abstract: Disclosed is a therapy which is for preventing or treating cartilage damage and diseases associated with cartilage damage, such as arthritides and osteoarthritis, and utilizes a more effective and more safe medicinal agent. Specifically disclosed are a cartilage production promoter, a glucosaminoglycan and/or proteoglycan production promoter, and a prophylactic or therapeutic agent for diseases associated with cartilage damage, each of which comprises fucoidan as an active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、軟骨損傷および軟骨損傷に由来する疾病、例えば関節炎、変形性関節症など、の予防または治療のための、より有効でしかも安全な薬剤を用いた治療を提供する。詳細には、本発明はフコイタ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生成促進剤、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。



WO 2010/109736 A1

## 明 細 書

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

### 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、フコイダンを含む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。

[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生産、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る、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。

[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。

[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] 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、上記課題を解決する物質としてフコイタンを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0011] すなわち、本発明は、

- (1) フコイタンを有効成分として含有する軟骨生成促進剤、
- (2) 該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、(1)に記載の軟骨生成促進剤、
- (3) 該フコイタンの分子量が50,000～150,000である、(1)に記載の軟骨生成促進剤、
- (4) フコイタ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) 該フコイタンの分子量が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) 該フコイタンの分子量が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、
- (7) フコイタ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) 該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、(7)に記載の医薬または獣医薬組成物、
- (9) 該フコイタンの分子量が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タンの使用、

(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、

(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。

## 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、フコイタ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、フコイタ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、下段がフコイタン群を示す。

[図3] 図3は、コントロール群、フコイタ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、下段がフコイタン群を示す。

[図4] 図4は、コントロール群、フコイタン投与群の滑車溝近位をサフラニン

ー〇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ナー〇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ナー〇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ナー〇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癒程度を目視により評価し、比較したものである。

[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ナー〇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。

[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。

- [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。
- [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（ワカメの孢子葉）、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。

[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。

[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。

- [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。
- [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、8,000~5

0, 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る、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、ケタラール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 2 mm、深さ 4 mm 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 0.5 mg/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 1 g 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  $\mu$ 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Photograb ab-300 version 1.0（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。

[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。

[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。

- [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ーン O 染色を実施し、画像解析を行った。

- [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ーン 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] 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。

### 請求の範囲

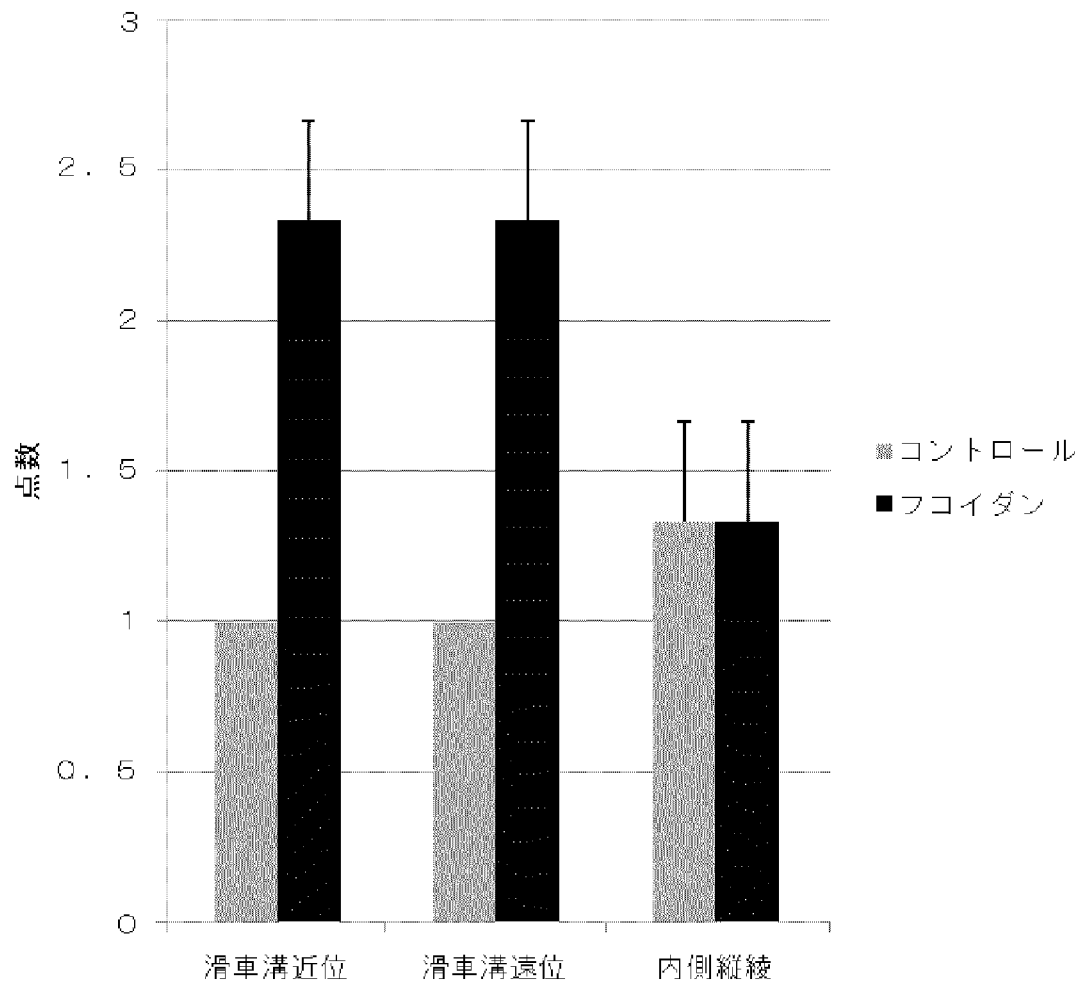
- [請求項1]            フコイタンを有効成分として含有する軟骨生成促進剤。
- [請求項2]            該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、請求項1に記載の軟骨生成促進剤。
- [請求項3]            該フコイタンの分子量が50,000～150,000である、請求項1に記載の軟骨生成促進剤。
- [請求項4]            フコイタンを有効成分として含有する、グルコサミノグリカンおよび／またはプロテオグリカン生成促進剤。
- [請求項5]            該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、請求項2に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。
- [請求項6]            該フコイタンの分子量が50,000～150,000である、請求項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。
- [請求項7]            フコイタ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。
- [請求項8]            該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、請求項7に記載の医薬または獣医薬組成物。
- [請求項9]            該フコイタンの分子量が50,000～150,000である、請求項7に記載の医薬または獣医薬組成物。
- [請求項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タンの使用。
- [請求項11]           該フコイタンの分子量が8,000～400,000である、請求項10に記載の使用。
- [請求項12]           該フコイタンの分子量が50,000～150,000である、請求項10に記載の使用。
- [請求項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タンを投与することを含む、方法。

[請求項14]       該フコイダンの分子量が8, 000～400, 000である、請求項13に記載の方法。

[請求項15]       該フコイダンの分子量が50, 000～150, 000である、請求項13に記載の方法。

## [図1]

図1. 関節損傷部位の肉眼的観察所見

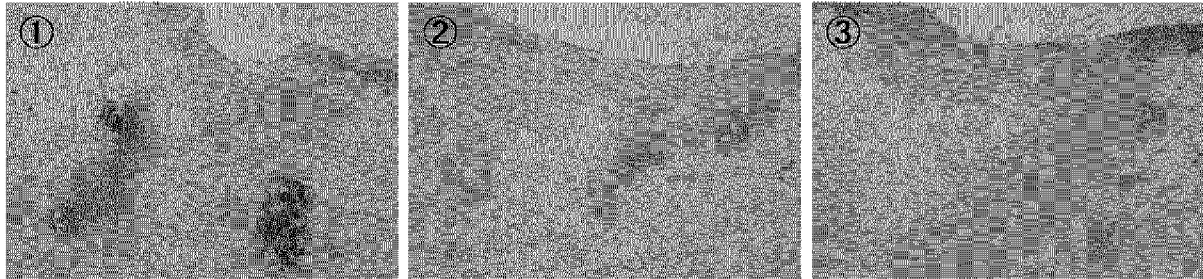


## [図2]

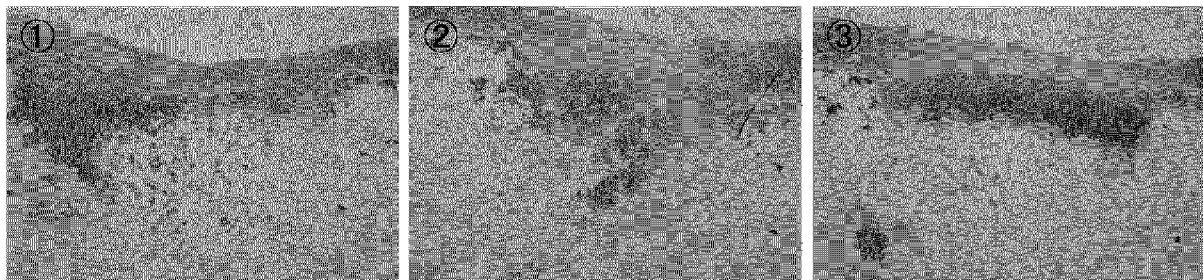
図2．関節損傷部位の組織学的所見（滑車溝近位損傷部）

### 滑車溝近位 AB染色

コントロール



フコイダン



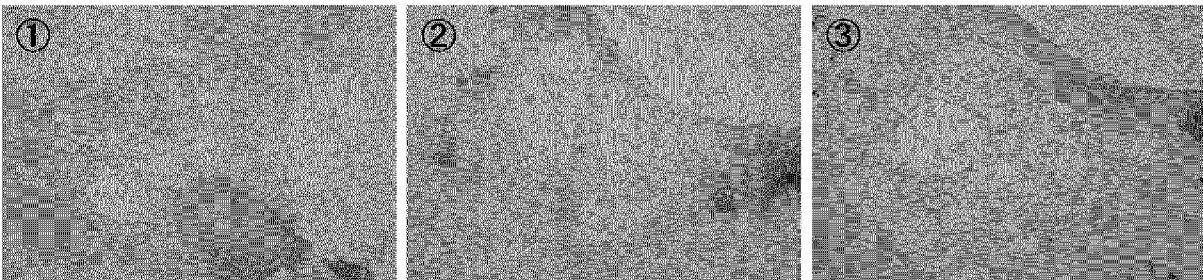
①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。  
。

## [図3]

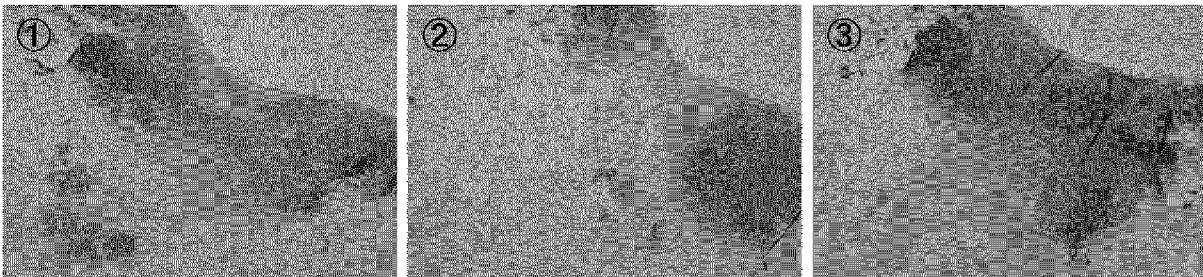
図3．関節損傷部位の組織学的所見（滑車溝遠位損傷部）

### 滑車溝遠位 AB染色

コントロール



フコイダン



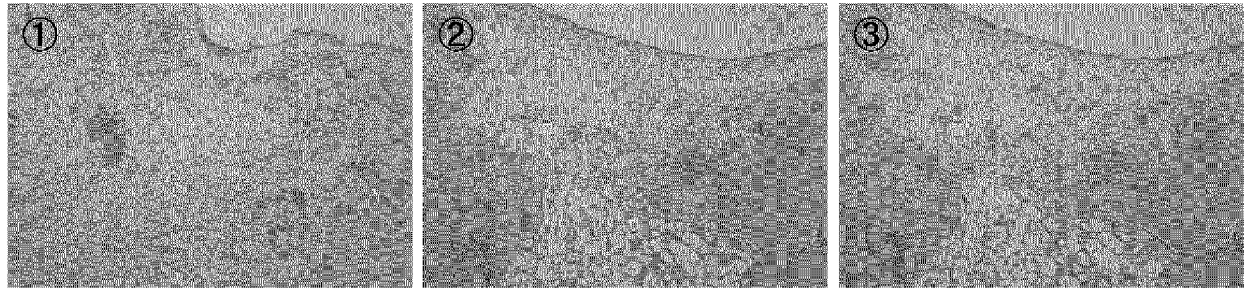
①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。  
。

## [図4]

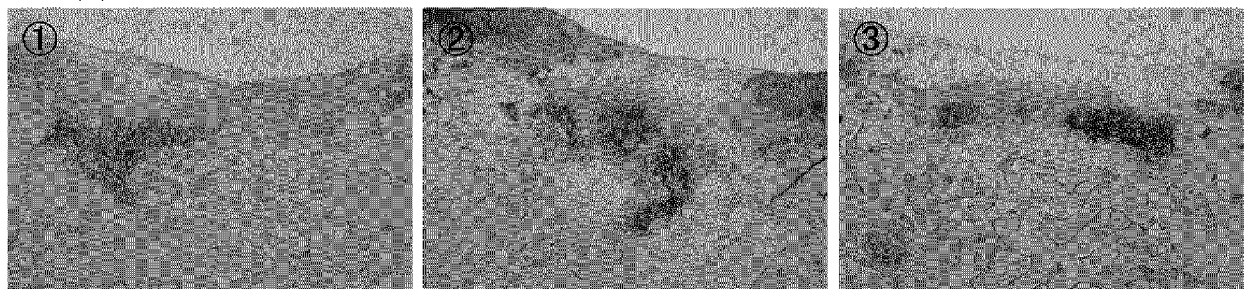
図4．関節損傷部位の組織学的所見（滑車溝近位損傷部）

## 滑車溝近位 SO染色

コントロール



フコイダン



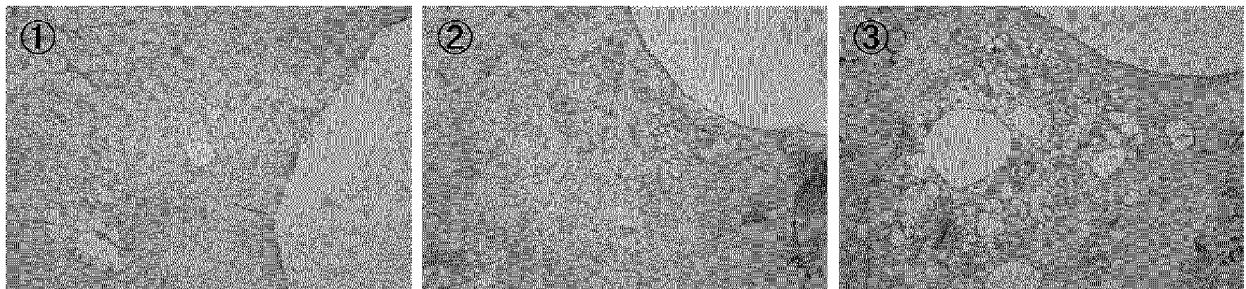
①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

## [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

コントロール



フコイダン

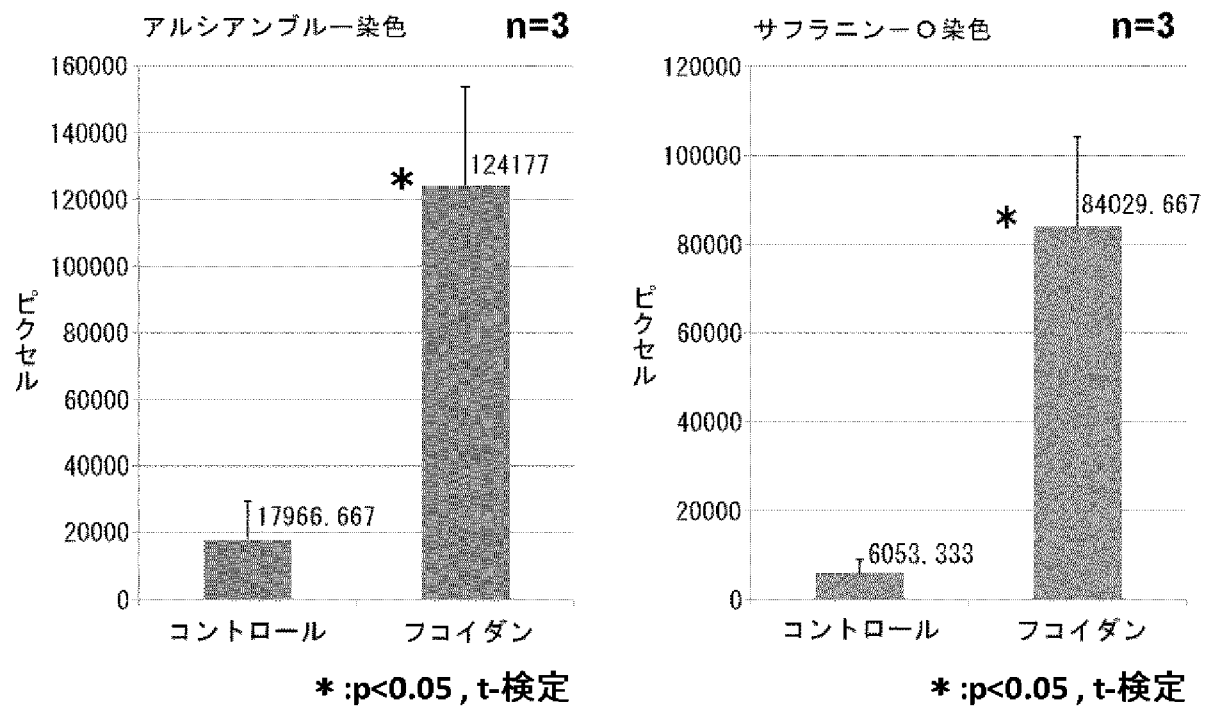


①、②、③は各群のウサギの個体。上段がコントロール群、下段がフコイダン群。

[図6]

図6. 損傷部位の画像解析結果

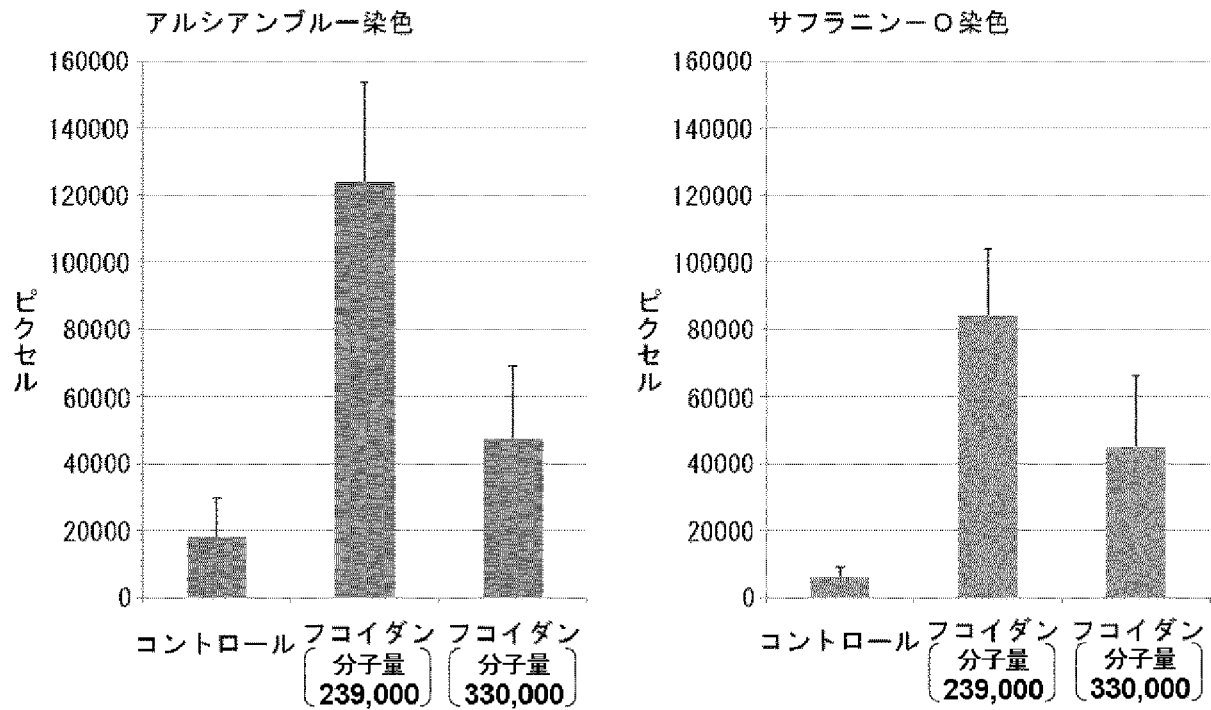
## 画像解析



[図7]

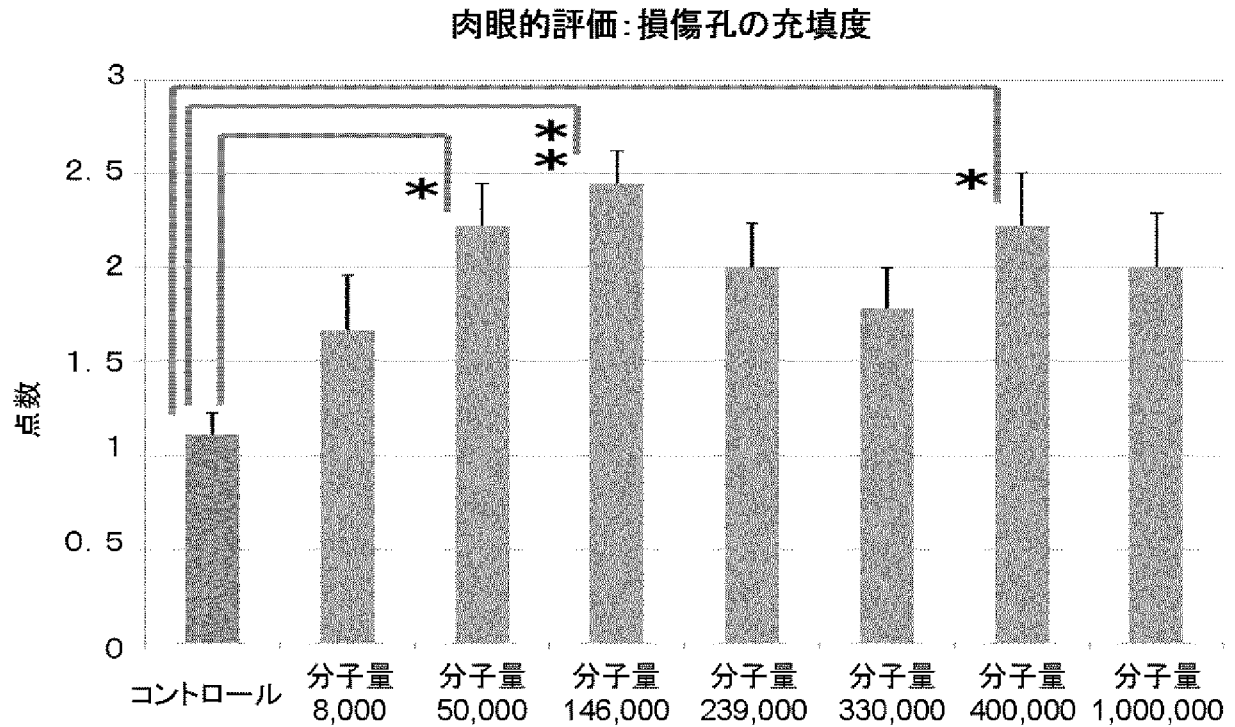
図7. フコイダンの分子量による修復程度の差

## フコイダン:分子量別の軟骨修復効果



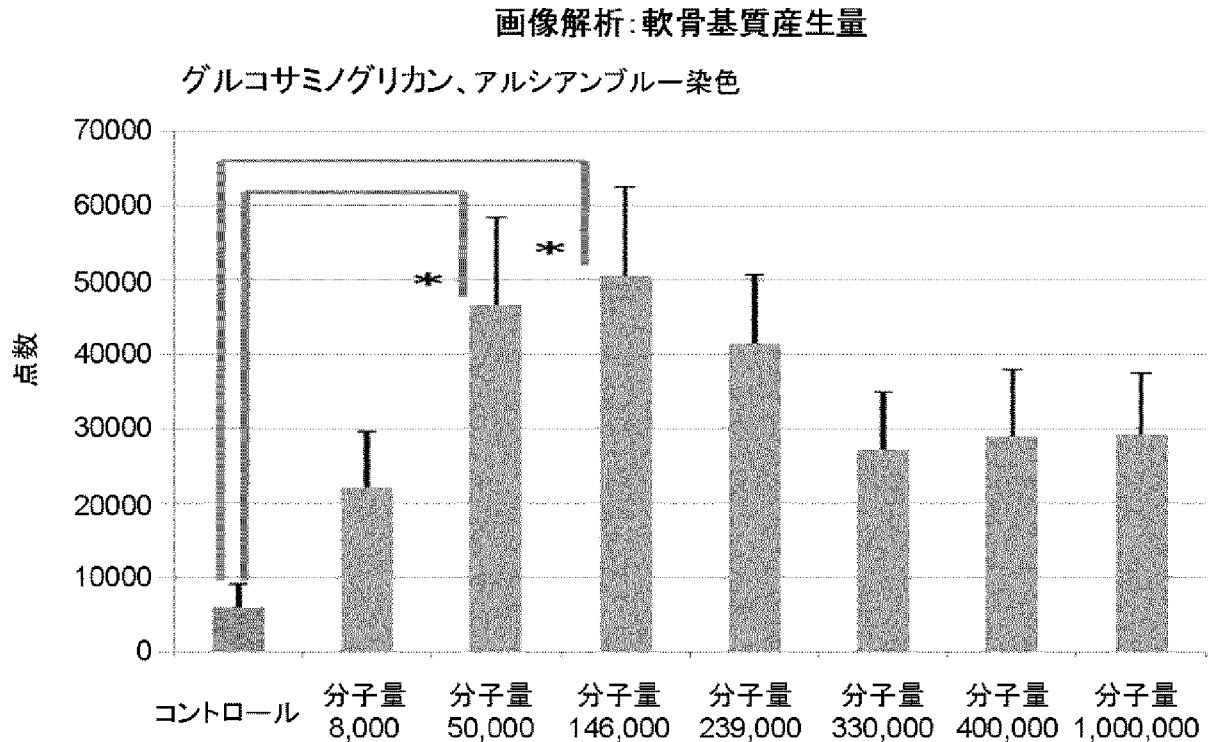
[図8]

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)

\*:  $p < 0.05$ , ターキークラマー法

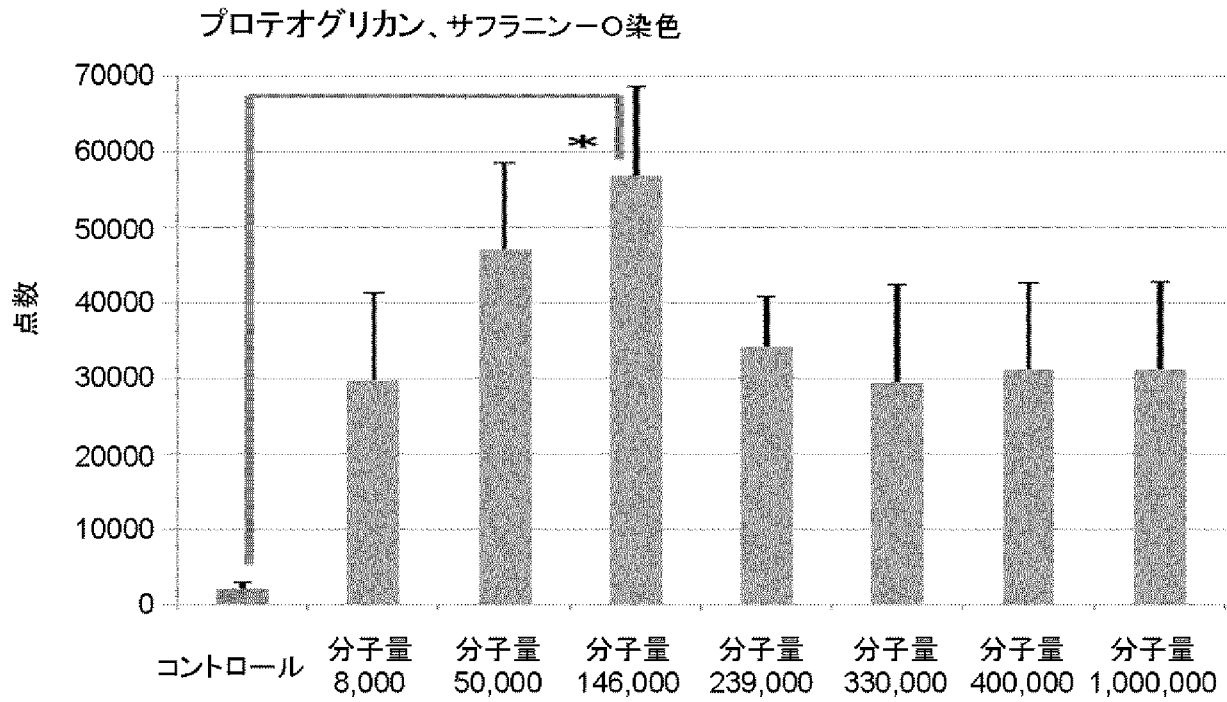
[図9]

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)

\*:  $p < 0.05$ , ターキークラマー法

[図10]

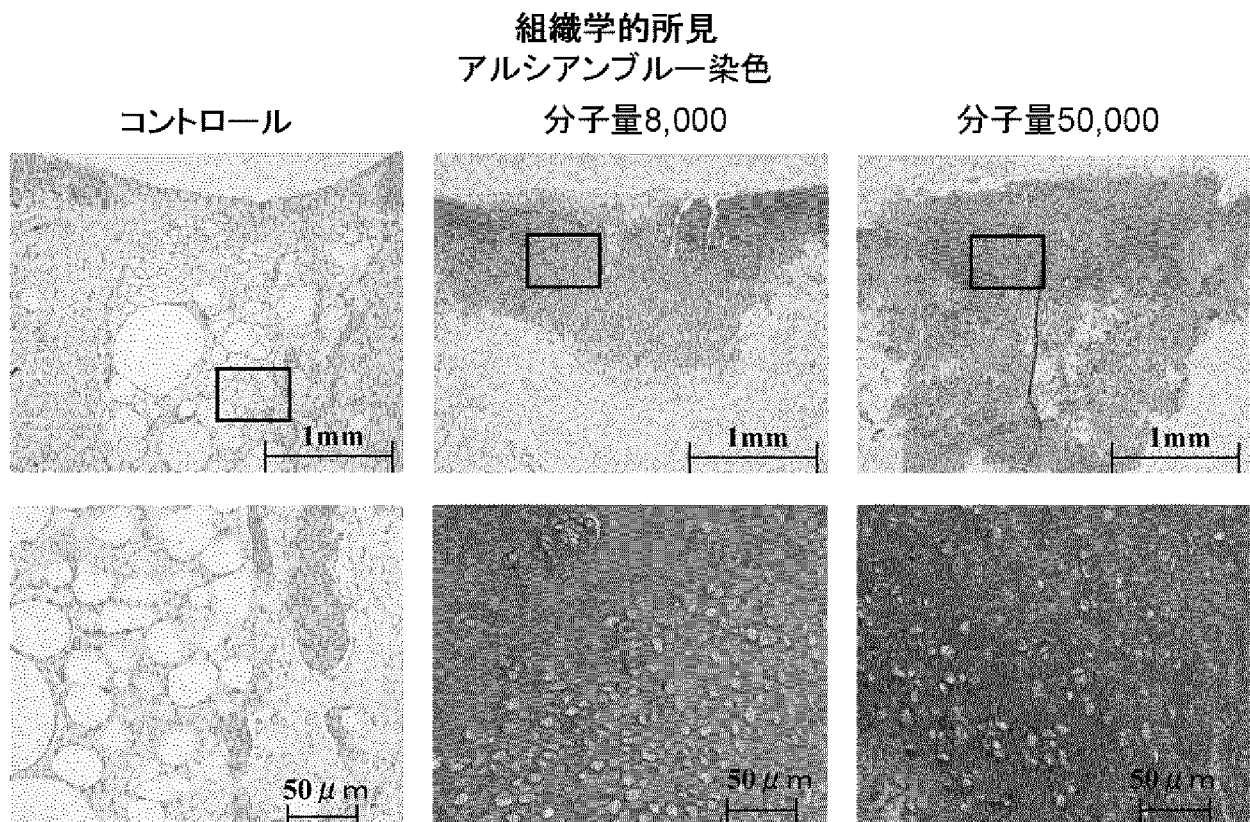
図10. フコイダンの分子量による修復程度の差（損傷部位の画像解析結果）  
画像解析：軟骨基質産生量



\*:  $p < 0.05$ , ターキー-クラマー法

## [図11]

図11. 損傷部位の組織学的所見



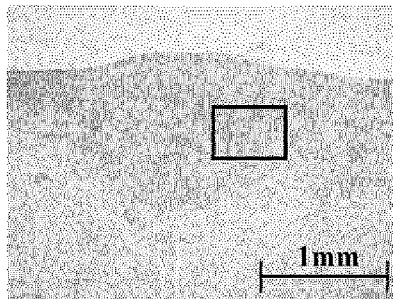
下段は上段四角部分の拡大画像

## [図12]

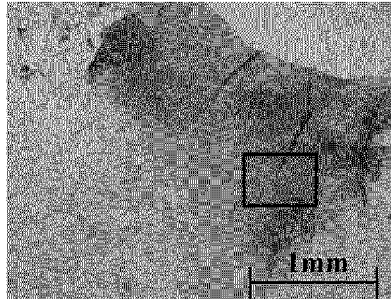
図12. 損傷部位の組織学的所見

組織学的所見  
アルシアンブルー染色

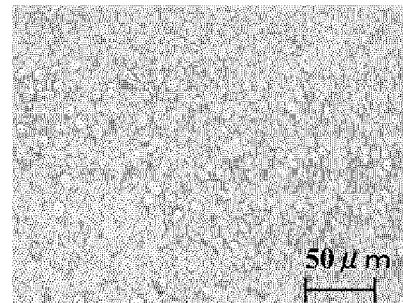
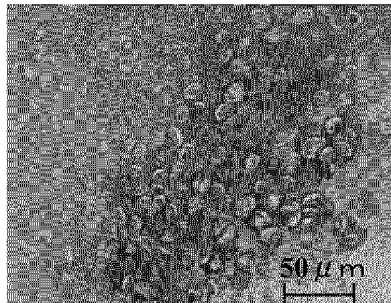
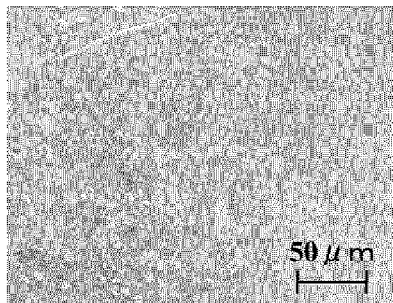
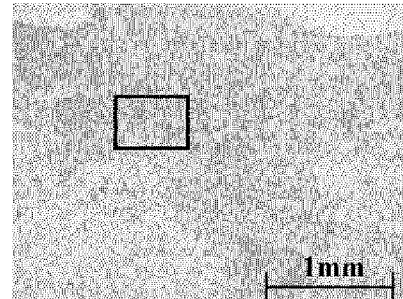
分子量146,000



分子量239,000



分子量330,000



下段は上段四角部分の拡大画像

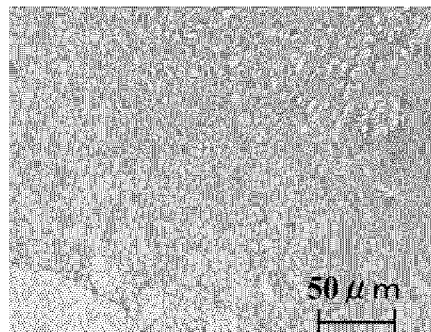
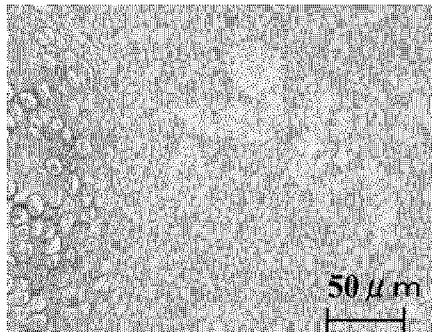
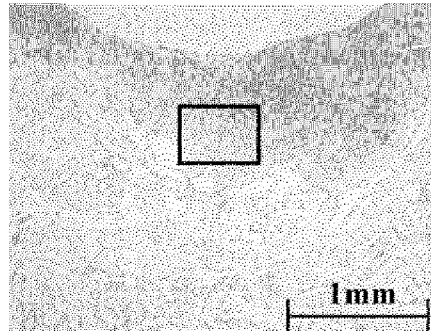
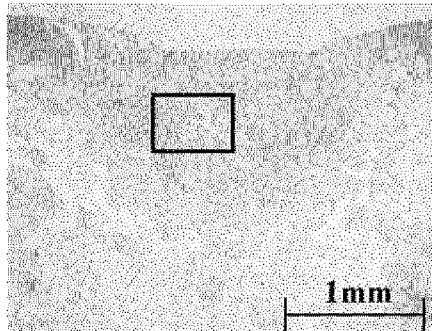
## [図13]

図13. 損傷部位の組織学的所見

**組織学的所見**  
**アルシアンブルー染色**

分子量400,000

分子量1,000,000



下段は上段四角部分の拡大画像

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/071613

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B37/00(2006.01)i, A61K31/726(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P19/04(2006.01)i, A61P43/00(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)

C08B37/00, A61K31/726, A61P19/02, A61P19/04, A61P43/00

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2001/082936 A1 (SAHLTECH I GOETEBORG AB.), 08 November 2001 (08.11.2001), entire text (Family: none)	1-12
X	JP 2005-508893 A (The University of British Columbia), 07 April 2005 (07.04.2005), entire text & US 2003/0064958 A1 & EP 1420801 A1 & CN 1547478 A & KR 2004032992 A	1-12

☒ 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  
20 January, 2010 (20.01.10)

Date of mailing of the international search report  
02 February, 2010 (02.02.10)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/071613

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/050078 A1 (Takara Bio Inc.), 17 June 2004 (17.06.2004), entire text & US 2006/0051316 A1 & EP 1570845 A1 & CA 2508309 A & KR 2005087817 A & CN 1720040 A	1-12
A	JP 2000-169322 A (Kao Corp.), 20 June 2000 (20.06.2000), paragraph [0005] (Family: none)	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/071613

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-15  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 13 to 15 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C08B37/00(2006.01)i, A61K31/726(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P19/04(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. C08B37/00, A61K31/726, A61P19/02, A61P19/04, A61P43/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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)

CA/REGISTRY (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## 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 請求項の番号
X	WO 2001/082936 A1 (SAHLTECH I GOETEBORG AB) 2001. 11. 08, 全文 (ファミリーなし)	1-12
X	JP 2005-508893 A (ザ・ユニバーシティ・オブ・ブリティッシュ・コロンビア) 2005. 04. 07, 全文 & US 2003/0064958 A1 & EP 1420801 A1 & CN 1547478 A & KR 2004032992 A	1-12

☒ 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

「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  
「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  
「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)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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  
「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  
「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  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 0 . 0 1 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

0 2 . 0 2 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

福井 悟

4 P

9 1 6 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 9 1

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 請求項の番号
X	WO 2004/050078 A1 (タカラバイオ株式会社) 2004. 06. 17, 全文 & US 2006/0051316 A1 & EP 1570845 A1 & CA 2508309 A & KR 2005087817 A & CN 1720040 A	1-12
A	JP 2000-169322 A (花王株式会社) 2000. 06. 20, 【0005】 (ファミリーなし)	1-12

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 3 - 1 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求項 1 3 - 1 5 は、治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。