

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-257014

(P2006-257014A)

(43) 公開日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C O 7 K 14/78 (2006.01)		C O 7 K	14/78	4 B O 6 4
A 6 1 K 8/72 (2006.01)		A 6 1 K	7/00	J 4 C O 8 1
A 6 1 L 27/00 (2006.01)		A 6 1 L	27/00	V 4 C O 8 3
C O 7 K 1/12 (2006.01)		C O 7 K	1/12	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/06 (2006.01)		C 1 2 P	21/06	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 頁)				

(21) 出願番号 特願2005-76052 (P2005-76052)
 (22) 出願日 平成17年3月16日 (2005.3.16)

(71) 出願人 301023238
 独立行政法人物質・材料研究機構
 茨城県つくば市千現一丁目2番1号
 (72) 発明者 生駒 俊之
 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立
 行政法人物質・材料研究機構内
 (72) 発明者 柚木 俊二
 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立
 行政法人物質・材料研究機構内
 (72) 発明者 田中 順三
 茨城県つくば市千現一丁目2番1号 独立
 行政法人物質・材料研究機構内
 Fターム(参考) 4B064 AG01 CA21 CB06 CC06 DA01
 DA20

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 魚鱗由来コラーゲンおよびその取得方法

(57) 【要約】

【課題】

化粧品および医療用材料として幅広く使用し得る、高い変成温度を有する魚鱗由来コラーゲンおよびその取得方法の提供。

【解決手段】

魚鱗を以下のステップ(1)～(3)により処理することを特徴とする魚鱗由来コラーゲンの取得方法：

(1) 洗浄および脱灰を行い魚鱗の夾雑物を除去する工程、
 (2) 15℃～35℃の温度範囲の酸性水溶液中でプロテアーゼ処理を行い、コラーゲンを可溶化する工程、および

(3) 可溶化されたコラーゲンを回収する工程。
 および、該取得方法により取得された魚鱗由来コラーゲン。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

魚鱗を以下のステップ（１）（２）（３）により処理することを特徴とする魚鱗由来コラーゲンの取得方法：

（１）アルカリ洗浄を行い魚鱗の夾雑物を除去する工程、

（２）１５℃～３５℃の温度範囲の酸性水溶液中でプロテアーゼ処理を行い、コラーゲンを可溶化する工程、および

（３）可溶化されたコラーゲンを回収する工程。

【請求項 2】

プロテアーゼとしてペプシンを用いることを特徴とする請求項 1 記載の魚鱗由来コラーゲンの取得方法。 10

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の魚鱗由来コラーゲンの取得方法により取得された魚鱗由来コラーゲン。

【請求項 4】

変成温度が 30℃以上であることを特徴とする請求項 3 記載の魚鱗由来コラーゲン

【請求項 5】

魚鱗原料としてオレオクロミス属由来の魚鱗が使用されていることを特徴とする請求項 3 または 4 記載の魚鱗由来コラーゲン

【請求項 6】

請求項 3 ないし 5 記載の魚鱗由来コラーゲンをを用いた化粧品。 20

【請求項 7】

請求項 3 ないし 5 記載の魚鱗由来コラーゲンをを用いた医用材料。

【発明の詳細な説明】 30

【技術分野】

【0001】

この出願の発明は魚鱗由来コラーゲンおよびその取得方法に関する。さらに詳しくは、魚鱗を脱灰し、酸溶液中でプロテアーゼ処理し、可溶化したコラーゲンを回収する魚鱗由来コラーゲンの取得方法に関する。

【背景技術】

【0002】

コラーゲンは、少なくとも部分的に螺旋構造（コラーゲン螺旋）を有するタンパク質または糖タンパク質として定義される。これは、3本のポリペプチド鎖から形成される3重螺旋で、分子量10万程度の各ポリペプチド鎖にはグリシン残基が3個目ごとに、またその他のアミノ酸残基としてプロリン残基、ヒドロキシプロリン残基が高頻度に現れる。コラーゲンは無脊椎動物あるいは脊椎動物の組織、特に皮膚から多く抽出することができる。コラーゲン分子には構造の違いによって19種類の型の存在が報告されており、さらに同じ型に分類されるコラーゲンにも数種類の異なる分子種が存在する場合がある。 40

【0003】

中でも、I、II、III型及びIV型コラーゲンが主にバイオマテリアルの原料として用いられている。I型はほとんどの結合組織に存在し、生体内に最も多量に存在するコラーゲン型である。哺乳類では特に腱、真皮及び骨に多く、魚類ではこれらの組織の他に鱗にも多量に含まれる。工業的にはコラーゲンはこれらの部位から抽出される場合が多い。本明細書において、以下コラーゲンという呼称はI型コラーゲンを示すこととする。 50

【0004】

コラーゲン線維は上記コラーゲン分子の自己集合体であり、コラーゲン分子が直列かつ並列にパッキングされた特異的な線維構造を有する。工業的には酸、アルカリ、あるいはプロテアーゼを用いて組織内コラーゲン線維から可溶化されたコラーゲンが取得される。

【0005】

コラーゲンに熱を加えるとコラーゲンの三重螺旋構造がほぐれ、それぞれのポリペプチド鎖がランダムコイル状の熱変成物を与える。そのような構造変化を起こす温度は変成温度と呼ばれ、熱変成物はゼラチンと呼ばれる。ゼラチンはコラーゲンに比べ水溶液としての粘度が大幅に低い他に、生体内プロテアーゼに対する感受性が高いことが知られている。溶媒の条件によってはゼラチンがコラーゲン螺旋構造を部分的に回復することが知られている。ゼラチンはコラーゲン線維形成能を失っているが、部分的にコラーゲン螺旋構造を回復させることでコラーゲン線維形成能を回復できることが知られている。

10

【0006】

コラーゲンの変成温度は溶液状態の時に最も低くなる。また、コラーゲンは一般に生物原料から得られるが、生物から得たコラーゲンの変成温度はその生物の生活環境温度と密接に関係していると言われる。水溶液でのコラーゲンの変成温度は、哺乳類では38℃前後であるが、魚類はおおむね哺乳類よりも低く、特に鮭等の寒流系の魚類では20℃を下回る場合もある。

【0007】

コラーゲンは優れた保湿性を有し、ヒアルロン酸などの他の生体由来保湿剤に比べ収量が多く安価であるために、化粧品原料として有効に用いられている。また、細胞の接着や増殖を促す、抗原性が低い、生体親和性が高い、生分解性である、などの多くの優れた性質から、化粧品および医療用材料など様々な用途に有効に使用されている。コラーゲンがこれらの目的で使用される場合、水溶液、綿状物、フィルム、スポンジ、ゲルなど用途に応じて種々の形態で使用される。

20

【0008】

従来上記の用途で用いられるコラーゲンは、そのほとんどが牛皮など家畜の組織から採取されているが、近年、BSE（牛海綿状脳症）問題が顕在化し、牛皮由来を含む家畜由来の原料を用いたコラーゲン製品により、人間に対して病原体が感染する危険性を潜在的に指摘されるに至った。そこで安全性と資源量等の観点から、魚類由来コラーゲンが化粧品材料及び食品材料として俄に脚光を浴び、変成温度の低い魚類由来コラーゲンをを用いることが重要になりつつある。

30

【0009】

魚類由来コラーゲンの原料としては皮および鱗が好ましく用いられる。特に魚鱗はコラーゲン収量の点で魚皮に劣るものの、脂質が比較的少ないために魚臭が生じにくく、高付加価値用途のコラーゲンの原料として好ましく用いられてきた。例えば、魚鱗をペプシン処理することでコラーゲンを可溶化させる方法（特許文献1）、および、魚鱗を機械的に破碎してプロテアーゼ処理を多段階に分けて行うコラーゲンの製造方法（特許文献2）が開示されている。

【0010】

しかし、上記魚鱗コラーゲンの取得方法は変成温度の低いコラーゲンを含有する魚鱗を用いているため、コラーゲンの変成を極力抑えるために取得工程の温度を低く保つ必要がある。プロテアーゼ活性は一般的に温度が下がるにつれて低下する。イワシの鱗からペプシンを用いてコラーゲンを可溶化する場合、温度が高くなるほどコラーゲン収率が向上することが報告されている（非特許文献1）。すなわち、上記魚鱗コラーゲンの取得方法ではプロテアーゼ活性が低くなるために、コラーゲンの可溶化が十分に達成されない場合があった。

40

【0011】

また、上記の取得方法から得られた魚鱗コラーゲンは変成温度が低く加工時に変成を起こしやすい。コラーゲンが変成すると水溶液粘度が低くなり化粧水としての使用感が悪化

50

する場合や、スポンジやシート等に加工した際に柔軟性を失う場合があった。更に、変成したコラーゲンは生体内において各種プロテアーゼの消化を受けて速やかに吸収されてしまう（非特許文献2）。この低い生体内安定性は医療用材料として不利になる場合が多い。

【0012】

以上に述べた従来の魚鱗コラーゲンおよびその取得方法におけるプロテアーゼ活性の低下および生体吸収性などの問題点は、魚鱗コラーゲンの化粧品および医療用材料への幅広い応用を制限してきた。

【特許文献1】特開平5-125100号公報

【特許文献2】特開2003-327599号公報

【非特許文献1】Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 60(12), 2092 (1996).

【非特許文献2】Journal of Biomedical Materials Research, 27, 79 (1993).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

従来の魚鱗コラーゲンの取得方法は低温で行われるためプロテアーゼの活性が抑制され、コラーゲンの可溶化が十分に達成されない場合がある。また、得られるコラーゲンの変成温度が低く、化粧品原料および医療用材料として使用が困難になる場合がある。

【0014】

従って、この出願の発明は、化粧品および医療用材料として幅広く使用し得る、高い変成温度を有する魚鱗コラーゲンおよびその取得方法の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

この出願の発明者らは、前記問題点を改善すべく鋭意研究を重ねた結果、変成温度の高いコラーゲンを含有する魚鱗を原料として、従来の取得方法よりも高い温度でプロテアーゼ処理することにより、従来の方法では困難であったコラーゲン収率向上と変成温度の高いコラーゲンの取得を同時に達成でき、化粧品原料および医療用材料として極めて有用なコラーゲンが得られることを見出し、この出願の発明に到達した。

すなわち、この出願の発明は、第1に、魚鱗を以下のステップ(1)(2)(3)により処理することを特徴とする魚鱗由来コラーゲンの取得方法：

(1) アルカリ洗浄を行い魚鱗の夾雑物を除去する工程、

(2) 15℃～35℃の温度範囲の酸性水溶液中でプロテアーゼ処理を行い、コラーゲンを可溶化する工程、および

(3) 可溶化されたコラーゲンを回収する工程。

を提供する。また、この出願の発明は、第2にはプロテアーゼとしてペプシンを用いることを特徴とする前記の魚鱗由来コラーゲンの取得方法を提供する。さらに、この出願の発明は、第3には前記の魚鱗由来コラーゲンの取得方法により取得された魚鱗由来コラーゲンを、第4には変成温度が30℃以上であることを特徴とする前記の魚鱗由来コラーゲンを、第5には魚鱗原料としてオレオクロミス属由来の魚鱗が使用されていることを特徴とする前記いずれかの魚鱗由来コラーゲンを、それぞれ提供する。加えて、この出願の発明は第6には前記いずれかの魚鱗由来コラーゲンをを用いた化粧品を、第7には前記いずれかの魚鱗由来コラーゲンをを用いた医用材料を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

この出願の発明の魚鱗由来コラーゲンの取得方法は、従来の取得方法では困難であったコラーゲン収率向上と変成温度の高いコラーゲンの取得を同時に達成でき、化粧品原料および医療用材料として極めて有用なコラーゲンを得ることができる。得られた魚鱗コラーゲンは熱安定性および生体内安定性に優れ、化粧品および医療用材料に好適に用いられる。

以下にこの出願の発明の実施の形態を説明する。

10

20

30

40

50

【0017】

この出願の発明において、コラーゲンの変成温度とは、この出願の発明の方法で取得されたコラーゲンの酸性水溶液を、円偏光二色性（CD）分光計を使用してコラーゲン水溶液の温度を段階的に上昇させることによって求められる。具体的にはThe Journal of Biological Chemistry, 275(33), 25870 (2000)やInternational Journal of Biological Macromolecules, 32, 199 (2003)に記載の方法によって求められた、CDから求められる螺旋率（Helicity; %）が50%になるときの温度である。

【0018】

この出願の発明において、原料とする魚鱗は、含有されるコラーゲンの変成温度が30℃以上であれば特に制限されるものではないが、変成温度の高いコラーゲンを含有するオレオクロミス属の鱗が好ましく用いられる。中でも、中国や日本国内で食用として養殖されており入手が容易であるニルテラピア（*Oreochromis niloticus*）の鱗が特に好ましく用いられる。 10

【0019】

この出願の発明の魚鱗由来コラーゲンの取得方法は、魚鱗を脱灰する工程、脱灰された魚鱗に対して15℃～35℃の温度範囲の酸性水溶液中でプロテアーゼを作用させる工程、および可溶化されたコラーゲンを回収する工程からなる。原料とする魚鱗は、腐敗を防ぐために採取後に冷蔵保存もしくは冷凍保存しておくことが好ましい。採取された魚鱗にはかなりの夾雑物、例えば背鰭、尾鰭等が付着・混入していたり、その表面に余剰タンパク質が付着している。そこで、保存前にこれらを取り除く目的で、原料とする魚鱗は採取された後に前処理として洗浄しておくことが好ましい。具体的には、夾雑物は水洗することにより除去すればよく、表面に付着した余剰タンパク質は、例えば、1～15重量%、好ましくは5～10重量%の塩化ナトリウム水溶液、あるいは0.01～0.5M、好ましくは0.05～0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液で、10～72時間、好ましくは24～48時間洗浄することにより除去すればよい。洗浄は、洗浄液を交換して繰り返し洗浄することが好ましく、特に、表面に付着した余剰タンパク質を除去する際には、洗浄後の廃液が濁らない程度まで、好ましくは3～5回程度まで、洗浄液を交換して繰り返し洗浄するのが良い。また、鱗には少量であるが脂質が含まれている。脂質は脂肪酸に分解され、経時での臭気発生を引き起こす場合があるので、魚鱗をメタノール、エタノールあるいはアセトンなどの安価な有機溶媒で洗浄してもよい。 20 30

【0020】

更に、魚鱗にはリン酸カルシウム等の無機物が含有されているため、あらかじめこれらを取り除く目的で、原料とする魚鱗はプロテアーゼ処理の前に脱灰処理を必要に応じて行う。これにより、抽出効率を向上させることができる。脱灰に用いる処理液としては、例えば、塩酸、酢酸、リン酸、エチレンジアミン4酢酸、エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム、およびエチレンジアミン4酢酸4ナトリウム等の水溶液を用いることができるが、経済性の観点からは塩酸水溶液を用いることがより好ましい。魚鱗に対する前記処理液の使用量は、適宜設定すればよく、特に制限はない。脱灰処理の方法は、通常の方法により行えばよく、特に制限されるものではない。例えば、魚鱗を前記処理液中で24～48時間、攪拌羽根を用いて攪拌するなどの方法が挙げられる。なお、脱灰処理は必要に応じて複数回行ってよいし、必要に応じて脱灰後水洗しておいてもよい。 40

【0021】

この出願の発明の魚鱗由来コラーゲンの取得方法においては、脱灰された魚鱗に対して酸性水溶液中でプロテアーゼ処理を行う。用いるプロテアーゼは特に制限されないが、酸性条件で高い活性を有するペプシン、プロクターゼ、パパインが好ましく用いられる。これらプロテアーゼの使用量は、特に制限されないが、プロテアーゼ処理する魚鱗の乾燥重量に対して1～15重量%とすることが好ましい。

【0022】

前記プロテアーゼ処理に用いるプロテアーゼ水溶液の溶媒としては、pHが2～5の範囲であれば特に限定されないが、安価で取り扱いが容易な塩酸、酢酸、およびリン酸が好 50

ましく用いられる。酸の濃度は前記 pH によって規定される。

【0023】

この出願の発明の方法においては、プロテアーゼ処理を15℃～35℃の温度範囲の酸性水溶液中で行う。これにより、コラーゲンの変成を起こさずにコラーゲンの抽出効率を向上させ、高収率を実現することができる。温度が15℃未満の場合、プロテアーゼ活性が低くなりコラーゲンの抽出効率が低下する場合が考えられ、好ましくない。温度が35℃以上の場合、プロテアーゼ活性は高くなるものの、コラーゲンの変成が起こる場合が考えられ、好ましくない。従って、プロテアーゼ処理は15℃～35℃の温度範囲で、より好ましくは20～30℃の温度範囲で行う。

【0024】

この出願の発明の取得方法においては、プロテアーゼ処理はプロテアーゼ失活に伴うコラーゲン可溶化能の低下とともに終了すれば良く、例えば、処理時間を12～48時間程度とすればよい。また、抽出効率を高める目的で攪拌羽根などを用いて前記処理液を攪拌してもよい。

【0025】

酸性水溶液に溶解したコラーゲンは、例えば従来から哺乳動物由来のコラーゲンの取得で行われている通常の物理的分離手段によって回収すればよく、その方法は特に限定されない。例えば、プロテアーゼ処理後に、遠心分離や濾過等の手段で魚鱗残渣と分離したコラーゲン水溶液に塩化ナトリウム等を加えて塩濃度を上昇させるか、もしくは水酸化ナトリウム等を加えてpHを中性付近に調整することにより、コラーゲンを線維化し、該線維化したコラーゲンを例えば遠心分離法等により分離回収すればよい。その後、さらに必要に応じて、例えば精製水に再度溶解し、前記のような方法で線維化一回回収操作を一回あるいは複数回繰り返して行うことにより、精製を行ってもよい。なお、この出願の発明の取得方法においては、コラーゲンの変成を抑制するため、前記各前処理、回収、精製等の各工程を、可能な限り室温以下で実施することが好ましい。

【0026】

この出願の発明の取得方法によって、変成温度の高い魚鱗コラーゲンが高収率で得られ、該コラーゲンは化粧品および医療用材料の用途において好適に用いることができる。

【実施例】

【0027】

以下、この出願の発明を実施例を挙げてより具体的に説明するが、この出願の発明は下記の記載範囲に限定されるものではない。

【0028】

はじめに各種測定方法を示す。

1. 変成温度

コラーゲンの変成温度は、International Journal of Biological Macromolecules, 32 199 (2003)に記載の方法に従って、CD分光計(Jasco model725 spectrometer)を使用してコラーゲン水溶液の温度を段階的に上昇させることによって求めた。凍結乾燥したコラーゲン水溶液(0.04 g)をpH 3の希塩酸100 mlに溶解し、光路長1 mmの石英セルに入れた。セルの温度を1℃/minで上昇させ、221 nmにおける旋光度を0.2℃ごとに測定した。各温度における旋光度を温度に対してプロットすると、旋光度の値がコラーゲン螺旋の値からランダムコイルの値へと急激に変化する変成曲線が得られる。それらの旋光度値の中間値を与える温度、すなわち、螺旋率(Helicity; %)が50%になるときの温度を変成温度とした。この測定は3回行い、平均値を使用した。

2. アミノ酸組成分析

コラーゲンのアミノ酸組成は、アミノ酸分析装置(HITACHI L8800)を用いて常法に従って測定した。凍結乾燥コラーゲン5 mgを6 mol/lの塩酸水溶液に溶解し、110℃で22時間加水分解した。その後、溶媒をエバポレーターによって除去した。残渣に対して0.02 mol/lの希塩酸を加え、溶解した後、ポアサイズ0.45 μmのメンブランフィルターを通過させ、アミノ酸分析用試料溶液とした。

10

20

30

40

50

3. コラーゲン収率

水で十分に洗浄し、鰭等の夾雑物を除去した後風乾した魚鱗の重量に対する、精製後のコラーゲン凍結乾燥物の重量からコラーゲン収率(%)を求めた。

〔実施例1〕魚鱗からの可溶性コラーゲンの取得

(1) 魚鱗のアルカリ処理

ナイルテラピアの鱗を水で十分に洗浄し、鰭等の夾雑物を除去した後風乾した後、冷凍庫で保管したものをコラーゲン取得に供した。乾燥魚鱗50 gを500 mlの0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌羽根を用いて24時間穏やかに攪拌した。金網で魚鱗をろ過し、1000 mlの0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液に加えて同様の操作を行った。魚鱗を水でpHが中性を示すまで繰り返し洗浄した。

10

(2) 魚鱗のペプシン処理

上記魚鱗を1000 mlの0.5 M 酢酸水溶液に加え、攪拌羽根を用いて $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (以下、単に室温と表記する)で3日間穏やかに攪拌した。この水溶液を遠心(10000×g, 20分)し、魚鱗を沈殿させた。5 gのペプシン(和光純薬、ペプシン1:100)を含む1000 mlの0.5 M 酢酸水溶液に前記魚鱗を加え、攪拌羽根を用いて室温で3日間穏やかに攪拌した。この水溶液を遠心(10000×g, 20分)し、魚鱗を沈殿させた。上清を回収し、ガラスフィルター(SHIBATA, 151G P16)を用いて吸引ろ過した。ろ液に0.5 g/lになるようにペプシンを加え、室温で24時間攪拌した。魚鱗残渣を上記と同様のペプシン含有酢酸水溶液に加え、同様に攪拌した。この操作を4回繰り返し、4バッチの上清を得た。

(3) コラーゲンの精製

20

ペプシン処理を終えた上清に対し、終濃度が0.9 Mになるように塩化ナトリウム水溶液を加え、ガラス棒で混合した後、 4°C で24時間静置して塩析した。これを遠心(10000×g, 20分)し、沈殿物を300 mlの0.5 M 酢酸水溶液に溶解した。この塩析工程を3回繰り返し、コラーゲンの酢酸水溶液をセルロースチューブに入れて蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した。コラーゲンの合計収率は1.70(%)であった。

〔実施例2〕魚鱗由来コラーゲンの分析

(1) 変成温度

測定した魚鱗由来コラーゲンの変成曲線より、コラーゲンの変成温度は 35.6°C と決定された。

30

(2) アミノ酸組成分析

測定した魚鱗由来コラーゲンのアミノ酸組成分析結果を、市販の豚皮由来コラーゲン(新田ゼラチン製)と比較して示した。アミノ酸組成は1000残基あたりのそのアミノ酸残基の出現数として表記した。

【0029】

【表 1】

コラーゲンのアミノ酸組成		
	テラピア鱗由来 コラーゲン	豚皮由来 コラーゲン
ハイドロキシプロリン	83	97
アスパラギン酸	47	44
トレオニン	24	16
セリン	36	33
グルタミン酸	72	72
プロリン	110	123
グリシン	336	341
アラニン	126	115
システイン/2	0	0
バリン	20	22
メチオニン	12	6
イソロイシン	11	10
ロイシン	21	22
チロシン	3	1
フェニルアラニン	13	12
ハイドロキシリシン	7	7
シリン	25	27
ヒスチジン	5	5
アルギニン	49	48
合計	1000	1000

10

20

【0030】

30

これらの結果は、この出願の発明の取得方法が従来取得方法よりも高い温度で行われるため、ペプシンの活性が十分に高まり、魚鱗から高い収率でコラーゲンを取得できることを示す。更に、得られる魚鱗由来コラーゲンの変成温度は高く、アミノ酸組成も従来から細胞担体として使用されている豚皮由来コラーゲンに類似している。このため、この出願の発明の魚鱗由来コラーゲンが細胞担体、さらには医療用材料の基材として好適に用いられることを示す。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C081 AB00 BB01 BB08 CD121 CD122 CD34 DA04 DB01 EA01
4C083 AD431 AD432 CC01 CC03 EE01 EE07 EE12 FF01
4H045 AA10 AA20 AA30 CA52 EA15 EA34 FA70