(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3914284号
(P3914284)
(45)発行日　平成19年5月16日(2007.5.16)　(24)登録日　平成19年2月9日(2007.2.9)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48
A61K 36/02	(2006.01)	A61K	35/80
A61K 38/22	(2006.01)	A61K	37/24
A61P 17/02	(2006.01)	A61P	17/02
C07K 14/50	(2006.01)	C07K	14/50

請求項の数 1　(全 6 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-171019
(22)出願日　平成8年7月1日(1996.7.1)
(65)公開番号　特開平10-17498
(43)公開日　平成10年1月20日(1998.1.20)
審査請求日　平成14年8月23日(2002.8.23)

(73)特許権者　000006884
株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋１丁目１番１９号
(74)代理人　110000084
特許業務法人アルガ特許事務所
(74)代理人　100068700
弁理士　有賀　三幸
(74)代理人　100077562
弁理士　高野　登志雄
(74)代理人　100096736
弁理士　中嶋　俊夫
(74)代理人　100101317
弁理士　的場　ひろみ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】線維芽細胞増殖因子複合体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
線維芽細胞増殖因子とフコイダンとの複合体を有効成分とする線維芽細胞増殖促進剤。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、創傷治癒促進剤等の細胞増殖促進剤として有効な線維芽細胞増殖因子（以下、ＦＧＦと称す）複合体、その製造法およびこの複合体を有効成分とする線維芽細胞増殖促進剤に関する。
【０００２】
【従来の技術】
ＦＧＦは、線維芽細胞や血管内皮細胞などの増殖因子として古くから注目されている一連の蛋白質群であり、その等電点に基づいて塩基性ＦＧＦ（ｂＦＧＦ）と酸性ＦＧＦ（ａＦＧＦ）とに大別される。これらのうちｂＦＧＦは、細胞増殖促進活性が強く、また強力な血管新生作用を有することが知られている。これらの作用は組織障害の修復に必須であり、損傷部位の治癒促進においてｂＦＧＦは重要な役割を果たしていると考えられている。
【０００３】
ｂＦＧＦは、ヘパリン結合部位を有しており、ヘパリン様多糖と複合体を形成することが知られている。また、ｂＦＧＦはグリコサミノグリカンと複合体を形成し、これにより標的細胞の膜受容体に結合して細胞増殖活性を発現するとの報告がある〔クラグスバーン、

セル（Cell）：６７巻、２２９頁（１９９１年）〕。さらに、グリコサミノグリカンと複合体を形成することにより、ｂＦＧＦの溶液中での安定性が向上することが報告されている（特開平２－４０３９９号公報参照）。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

このように、ｂＦＧＦとグリコサミノグリカンとの複合体は、優れた特性を有するものであるが、グリコサミノグリカンはｂＦＧＦの細胞増殖活性自体を増強する作用を有しておらず、また、グリコサミノグリカンは高価であるため、ｂＦＧＦとの複合体を低コストで大量に供給することが困難であるという問題点を有する。

従って、本発明は、安価で大量供給が可能なＦＧＦ活性増強物質とＦＧＦとの複合体、その製造法およびこの複合体を有効成分とし、創傷治癒促進剤等として有効な線維芽細胞増殖促進剤を提供することにある。

【０００５】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、褐藻または紅藻類、特にモズクの抽出物であるフコイダンに、胃潰瘍に対する優れた治癒促進効果を見出している（特開平７－１３８１６６号公報参照）。その後の検討で、フコイダンが水性媒体中でＦＧＦと結合し複合体を形成すること、さらに得られた複合体が優れた細胞増殖促進作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【０００６】

すなわち、本発明は、線維芽細胞増殖因子とフコイダンとの複合体を有効成分とする線維芽細胞増殖促進剤を提供するものである。

【０００７】

【発明の実施の形態】

本発明で用いるＦＧＦとしては、ｂＦＧＦでもａＦＧＦでもよいが、フコイダンとの結合効率の点からｂＦＧＦが好ましい。

【０００８】

ＦＧＦとして具体的には哺乳動物由来のもの、すなわち、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ等の脳下垂体などの各種臓器から抽出されるものなどが挙げられる。

【０００９】

本発明で用いるフコイダンとしては、市販の試薬や精製品を用いてもよく、これを豊富に含有する紅藻類または褐藻類から熱水または希塩酸水溶液により抽出される抽出物またはその精製物を用いてもよい。褐藻類としてはモズク、ウミウチワ、ワカメ、ヒバマタ、ヒマンスリア、ビフカリア、フカス・ベシクロサス等が挙げられる。

紅藻類や褐藻類から抽出されたフコイダンは、通常、１０万前後の分子量を有し、約５０～６０％またはそれ以上がフコースからなり、若干のウロン酸を含む。構成糖の一部は硫酸エステル化されている。本発明においてはモズクから抽出されるフコイダンを用いることが好ましい。

【００１０】

紅藻類や褐藻類からフコイダンを抽出するには、特開平７－１３８１６６号公報に記載の熱水抽出法または酸抽出法に従って行えばよく、必要に応じて同公報記載の方法により精製し、精製物とすることができる。

【００１１】

ＦＧＦとフコイダンとの複合体は、ＦＧＦとフコイダンとを水性媒体中で単に混合することにより製造することができる。ＦＧＦとフコイダンの使用量は、ＦＧＦ１モルに対してフコイダン２～２０モルが好ましく、５～１０モルが特に好ましい。

【００１２】

水性媒体中におけるＦＧＦの濃度は０．０００１～０．１Ｗ／Ｖ％が好ましく、０．００１Ｗ／Ｖ％付近が特に好ましい。

また、水性媒体中におけるフコイダンの濃度は０．００１～１Ｗ／Ｖ％が好ましく、０．０１Ｗ／Ｖ％付近が特に好ましい。

【００１３】
ＦＧＦとフコイダンとを水性媒体中で混合するには、それぞれの水性媒体溶液を混合するか、一方を水性媒体に溶解し、次いで他方を投入するなどの方法により行うことができる。ＦＧＦとフコイダンとの混合はpH３～１０において行うことが好ましく、pH５～９が特に好ましい。水性媒体として水（好ましくは注射用蒸留水）を用いる場合はトリス－塩酸あるいはリン酸２ナトリウム－リン酸１カリウム等を用いてpHを調整する。また、ＰＢＳ（生理的リン酸緩衝液）（pH７．５）等のあらかじめpHが調整されたものを水性媒体として用いてもよい。
【００１４】
混合の際の温度は２～４０℃が好ましく、２５～３５℃付近が特に好ましい。複合体形成に要する時間は２～２４時間程度であり、例えば混合温度が約３７℃では約２時間、混合温度が約４℃では約２４時間で複合体が形成される。
【００１５】
このようにして得られる複合体は、線維芽細胞の増殖を促進させる作用を有し、安全性も高いので、これを有効成分とする線維芽細胞増殖促進剤は、創傷治癒促進剤、火傷の治療剤として用いることができる。これらの医薬等とする場合の剤形や投与量は任意に選定することができる。一般的には、前記複合体に許容できる液状または固体状の担体を配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等に製剤して使用するのが適当である。
【００１６】
前記複合体の成人１日当たりの好適投与量は、体重１kgあたり約１～５００mg、好ましくは５～５０mgであり、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。
【００１７】
【実施例】
以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。
【００１８】
試験例１
ｂＦＧＦとフコイダンの結合性を検討するにあたり、まずフコイダンの固相化を行った。フコイダンは疎水基を持たない化合物であるため、蛋白などを固相化する通常の方法では、プラスチックプレートに固相化することはできない。そこで、フコイダンの還元末端をアミノ化して活性化プレートに結合させる以下の形式でＥＬＩＳＡ用固相化プレートを作製した。
【００１９】
５０mg／mlフコイダン水溶液５mlに１０mg／ml $NaBH_4$溶液１００μｌを加え、３時間室温で放置し、還元末端フコース残基を開環した。透析にて脱塩後、０．２M過ヨウ素酸溶液２００μｌ、５０mMイミダゾール塩酸１mlを加え、氷上で１時間遮光放置することにより末端をアルデヒド基とした。透析後、２０mg／mlジアミノプロパノール１mlを加え、６０℃で１時間反応しシッフ塩基を形成させた。この後、１０mg／ml $NaBH_3CN$ ２０μｌを加え、６０℃で１８時間反応させた。反応溶液をCovaLink(Nunk Inter Med社製；活性化型９６穴プレート）に５０μｌずつ分注し、室温で１８時間放置してフコイダンをプレートにカップリングさせた。その後、５％ＢＳＡ溶液にてブロッキングし、乾燥させて保存した。
【００２０】
上記の方法にて作製したフコイダン固相化プレートを用い、ｂＦＧＦに対するフコイダンの結合性の検討をＥＬＩＳＡ（酵素免疫測定法）にて行った。対照として、ヘパリン結合部位を持たないＥＧＦに対するフコイダンの結合性についても同時に検討した。
【００２１】
まず、フコイダン固相化プレートに、ｂＦＧＦ（ヒト由来遺伝子組換え；Sigma Immuno C

hemicals社製）およびＥＧＦ（ヒト由来遺伝子組換え；Sigma Immuno Chemicals社製）の溶液（０～１μｇ／ml in ＰＢＳ）を１００μｌ分注した。３７℃で１時間放置した後３回洗浄し、２，０００倍希釈した一次抗体溶液（抗ウシｂＦＧＦウサギＩｇＧ；Ｒ＆Ｄ systems社製および抗ヒトEGF マウスＩｇＧ；Becton Dickinson社製）を１００μｌ分注し、３７℃で９０分間放置した。洗浄後、２，０００倍希釈した二次抗体溶液（パーオキシダーゼ結合抗ウサギＩｇＧ ヤギＩｇＧ；Cappel社製およびパーオキシダーゼ結合抗マウスＩｇＧヤギＩｇＧ；Cappel社製）を１００μｌ分注し、３７℃で６０分間放置した。洗浄後、発色基質を添加し、反応後１％ＳＤＳ溶液を加えて反応を停止させ、波長４０５nmにおける吸光度を測定した。結果より、ｂＦＧＦ添加群では用量依存的に吸光度が上昇することから、フコイダンとのｂＦＧＦとの結合が確認できる（図１）。

【００２２】

製造実施例１

上記試験にて、フコイダンがｂＦＧＦとの親和製を有することが判明した。そこで、以下の方法にてモズクフコイダン－ｂＦＧＦ複合体を調製した。ｂＦＧＦの１０mM燐酸緩衝液溶液（pH７．５）に、モル比５倍等量のフコイダンを添加し、３７℃で２時間反応させたところ、溶液中のほとんどのｂＦＧＦがフコイダンとの複合体を形成した。

【００２３】

試験例２

製造実施例１で得られたモズクフコイダン－ｂＦＧＦ複合体について、細胞増殖活性をｂＦＧＦのそれと比較した。本実験には、ｂＦＧＦの力価測定に使用されている３Ｔ３－ＳＶ－４０（３Ｔ３ Swiss albino SV40 transformed;マウス由来線維芽細胞cell line）を使用した。細胞増殖活性は、チトクローム系由来の還元活性にて評価した（ＷＳＴ１法）。具体的方法は次のとおりである。

【００２４】

３日間、ＳＦＭ １０１培地（日水製薬社製；１％ＦＣＳを含む）にて前培養した３Ｔ３細胞を、1×10^{4}cells／mlに調整し、２４穴プレートに１mlづつ分注した。そこに、ｂＦＧＦまたは５倍等量のフコイダンとプレインキュベートしたｂＦＧＦを、ｂＦＧＦ換算量で０、１、５、１０ng／wellとなるよう添加し、CO_2インキュベーターで培養した。３日後に上清を吸引し、ＷＳＴ１溶液を１ml加えて１時間CO_2インキュベーターで培養した。ＷＳＴ１溶液とは、１６．７mgのＷＳＴ１（Dojindo社製）を含むEagle ＭＥＭ培地（日水製薬社製；１０％ＦＣＳ）４．５mlに、０．５mlの０．７mg／ml １－メトキシメチルフェナジニウムメチル硫酸（Dojindo社製）溶液を混合したものをいう。インキュベート後、測定波長４５０nm、対照波長６２０nmにて吸光度を測定して細胞数の指標とした。ｔ検定の結果、ｂＦＧＦ添加群に比較して、フコイダン－ｂＦＧＦ複合体添加群では有意に細胞増殖が促進されていることがわかる（図２）。

【００２５】

【発明の効果】

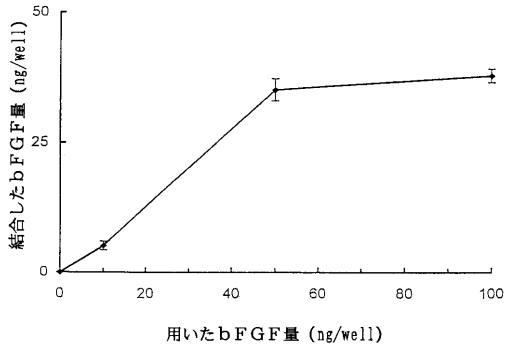
本発明のＦＧＦ複合体は強力な細胞増殖促進作用を有し、創傷治癒促進剤等として有効である。

【図面の簡単な説明】

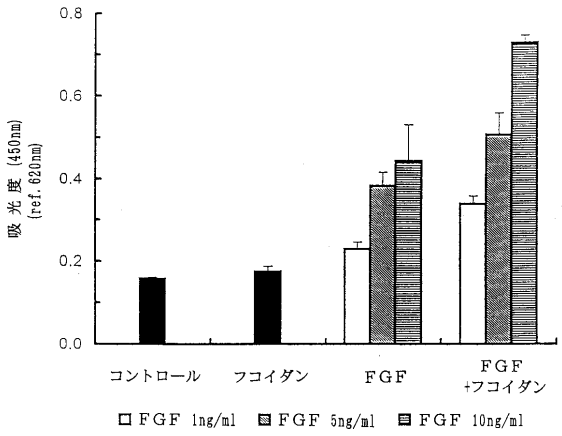
【図１】フコイダン固相化プレートに対するｂＦＧＦの結合性を示すグラフである。

【図２】ｂＦＧＦ細胞増殖活性に及ぼすフコイダンの影響を示すグラフである。

【図１】


結合したｂＦＧＦ量 (ng/well)
50
25
0
0
20
40
60
80
100
用いたｂＦＧＦ量 (ng/well)

【図２】


吸光度 (450nm)
(ref. 620nm)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
コントロール
フコイダン
FGF
FGF
+フコイダン
FGF 1ng/ml
FGF 5ng/ml
FGF 10ng/ml

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ＦＩ
Ｃ０８Ｂ 37/00 (2006.01) Ｃ０８Ｂ 37/00 Ｚ

(72)発明者 柴田 英之
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内
(72)発明者 長岡 正人
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内
(72)発明者 木村 逸子
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内
(72)発明者 澤田 治司
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内
(72)発明者 橋本 秀介
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内
(72)発明者 横倉 輝男
東京都港区東新橋１－１－１９ 株式会社ヤクルト本社内

審査官 原田 隆興

(56)参考文献 特開平０２－１３８２２３（ＪＰ，Ａ）
特開平０５－２１３７６８（ＪＰ，Ａ）
特開平０８－０９２１０３（ＪＰ，Ａ）
特表平０２－５０２００６（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 47/48
A61K 36/02
A61K 38/22
A61P 17/02
C07K 14/50
C08B 37/00