(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월26일
(11) 등록번호 10-1299342
(24) 등록일자 2013년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/24 (2006.01) *A61K 38/39* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0104861
(22) 출원일자 2008년10월24일
심사청구일자 2010년10월22일
(65) 공개번호 10-2009-0042742
(43) 공개일자 2009년04월30일
(30) 우선권주장
JP-P-2007-278908 2007년10월26일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP10216214 A
EP0842670 A1
JP2007176909 A
JP2006067809 A
전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
가부시키가이샤 알비에스
일본국 시마네 마쓰에시 코시바라 2-2-41
(72) 발명자
요시아키 오카다
일본국 도쿄 네리마쿠 사쿠라다이 2-47-11 라이온스시티 사무라다이 206
(74) 대리인
신영두

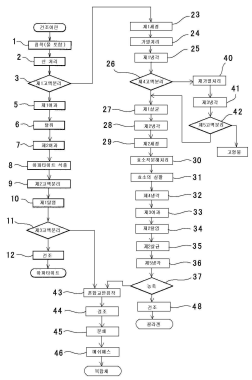
심사관 : 현승훈

(54) 발명의 명칭 **생체적합성 재료 및 그의 제조방법**

(57) 요 약

인체에 소화흡수 되기 쉽게 구성된 고기비늘, 즉 어린 유래의 하이드록시아파타이트와 어린 유래의 콜라겐으로 이루어진 생체 적합성 재료를 제공하기 위해서 어린 유래의 하이드록시아파타이트와 같이 어린 유래의 콜라겐을 주성분으로 하는 복합체를 포함한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

어린 유래의 하이드록시아파타이트의 유출액(함수율 70 ~ 75 중량%)과 동일한 어린 유래의 콜라겐의 추출액(함수율 40 ~ 60 중량%)을 8대 2의 중량비로 포함하는 혼합물을 나트륨, 인, 마그네슘이 소실하지 않은 온도로 열풍건조시켜 제조한 분상의 콜라겐, 나트륨, 인, 하이드록시아파타이트 및 마그네슘을 함유하는 복합체인 것을 특징으로 하는 생체적합성 재료.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기복합체는 100g중에 수분 4.2g, 콜라겐 20.4g, 나트륨 390mg, 인 14.2g, 하이드록시아파타이트 70.2g, 마그네슘 323mg을 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 생체 적합성재료.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 하이드록시아파타이트는 분자량 1000인 것을 특징으로 하는 생체적합성 재료.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 콜라겐은 분자량 500~1000인 것을 특징으로 하는 생체적합성 재료.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 하이드록시 테이트는 100g중에 칼슘 33.5g, 인 17.2g, 마그네슘 390mg, 나트륨 900mg, 단백질 0.1g 이하, 수분 3.4g를 포함하는 것을 특징으로 하는 생체 적합성재료.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 콜라겐은 100g 중에 수분 4.5g 지질 0.2g, 회분 0.2g, 나트륨은 52.6mg을 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 생체적합성 재료.

청구항 8

청구항 1에 기재의 복합체를 얻기 위하여, 어린 유래의 하이드록시아파타이트의 추출액(함수율 70 ~ 75 중량%)과 어린 유래의 콜라겐의 추출액(함수율 40 ~ 60 중량%)을 8대 2의 중량비로 혼합 교반시킨 후, 그의 혼합물을 나트륨, 인, 마그네슘이 소실하지 않은 온도로 열풍건조시켜, 그 위에 분쇄시킨 후, 메쉬패스(mesh-pass, 그물통과) 시킨 것을 특징으로 하는 생체 적합성 재료의 제조방법.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 포유동물과 같이 생체에 소화흡수가 쉽게 이루어지는 어린(魚鱗, 고기비늘)을 이용한 생체 적합성 재료 및 그의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 칼슘은 인간의 뼈와 치아를 구성하는 중요한 성분이며 또, 순환기계와 신경전달에 있어서도 대단히 중요한 것으로 알려져 있다. 그리고 또, 콜라겐은 인간의 골과 연골, 치아, 피부, 혈관, 장기 등 대부분의 조직에 존재하는 인체 구성에 빠뜨릴 수 없는 중요한 성분인 것도 알려져 있다.

[0003] 그러나 이 칼슘이나 콜라겐이 여러 가지 요인에 의해 체내에서 감소하는 것에서 골다공증의 발증이나 대사기능의 저하 등 소위 노화현상으로서 현재화하게 된다.

[0004] 하이드록시아파타이트(hydroxy apatite)는 칼슘과 인산으로 이루어진 무기화합물의 총칭이며, 화학식 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$로 표시되고, 뼈와 치아의 주요성분이다. 이 하이드록시아파타이트의 제조방법으로서는 어린을 원료로 하는 것이 제안되고 있다. 이와 같은 어린 유래를 기재한 공지문헌으로서 일본국특개 2001-211895호 공개특허 공보에 기재되어 있다.

[0005] 한편, 콜라겐은 단백질의 일종이고, 소나 돼지 등의 포유동물의 콜라겐 조직에서 추출된 것이 많으며, 통상의 멸균이나 살균 방법으로는 제거가 곤란한 프리온 (prion) 등의 병원체의 감염 위험성이 항상 존재하고 있기 때문에 이와 같은 염려가 없는 물고기 콜라겐을 제조하는 것이 제안되어 있다. 이 물고기에서의 콜라겐의 제조는 물고기의 껍질을 원료로 하는 것이 있으며, 이와 같은 물고기 껍질을 원료로 한 콜라겐은 물고기냄새를 갖고, 더구나 백탁(白濁)이 생겨 투과율이 낮다고 하는 문제가 있다. 이 때문에 물고기 특유의 고기냄새를 해결하는 수단으로 어린에서 콜라겐을 제조하는 방법이 몇 개 제안되고 있다. 이 어린에서 콜라겐을 제조하는 방법을 기재한 공지 문헌으로서 일본국특개 평05-155900호 공개특허공보, 일본국특개 2003-327599호 공개특허공보 및 일본국특개 2003-238598호 공개특허공보에 기재된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 상술한 것과 같이, 하이드록시아파타이트나 종래의 칼슘은 인체에 흡수되기 어려지만, 생체 적합성을 가져 인체에 흡수되는 것에 의해 인체에 부족한 이러한 성분을 보충하는 것이 가능한 것으로 알려져 있다. 그래서 본 발명자는 인체에 소화흡수 되기 쉽도록 열심히 연구를 거듭했는데, 종래에 흡수되기 어렵다고 여겨진 칼슘이 하이드록시아파타이트와 콜라겐을 복합체로 함으로써 콜라겐이 발판 역할을 하여, 콜라겐에 흡착결합한 하이드록시아파타이트가 인체에 흡수되기 쉽게 된다는 것을 알고, 이 지견에 근거하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0007] 본 발명의 목적은 인체에 소화흡수 되기 쉽게 구성된 어린 유래의 하이드록시아파타이트와 어린 유래의 콜라겐으로 이루어진 생체적합성 재료를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다음의 목적은 가능한한 간단한 방법으로 인체에 소화흡수 되기 쉬운 어린 유래의 하이드록시아파타이트와 어린 유래의 콜라겐 생체적합성 재료의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 상술한 목적을 달성하기 위해서 본 발명은 어린 유래의 하이드록시아파타이트의 유출액(함수율 70 ~ 75 중량%)과 같은 어린 유래의 콜라겐의 추출액(함수율 40 ~ 60 중량%)을 8대 2의 중량비로 포함하는 혼합물을 나트륨, 인, 마그네슘이 소실하지 않은 온도로 열풍건조시켜 제조한 분상의 콜라겐, 나트륨, 인, 하이드록시아파타이트 및 마그네슘을 함유하는 복합체를 주성분으로 하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명은 또, 상기 복합체가 어린 유래의 하이드록시아파타이트와 같은 어린 유래의 콜라겐을 8대 2의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명은 더욱이 상기 복합체가 100g 중에 수분 4.2g, 콜라겐 20.4g, 나트륨 390mg, 인 14.2g, 하이드록시아파

타이트 70.2g, 마그네슘 323mg을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 게다가, 본 발명은 상기 하이드록시아파타이트는 분자량 1000인 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명은 또, 상기 콜라겐은 분자량 500~1000인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명은 또, 상기 하이드록시아파타이트는 100g 중에 칼슘 33.5g, 인 17.2g, 마그네슘 390mg, 나트륨 900mg, 단백질 0.1g 이하, 수분 3.4g 을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명은 또, 상기 콜라겐은 100g 중에 수분 4.5g, 지질 0.2, 회분 0.2g, 나트륨은 52.6mg을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명은 게다가 상술한 복합체를 얻는 것에 해당 되어 어린 유래의 하이드록시아파타이트의 추출액(함수율 70 ~ 75 중량%)과 어린 유래의 콜라겐의 추출액(함수율 40~60중량%)을 8대 2 중량비로 혼합교반 시킨 후, 그의 혼합물을 나트륨, 인, 마그네슘이 소실하지 않은 온도로 열풍건조시켜 그 위에 더욱더 분쇄시킨 후 메쉬패스(mesh-pass, 그물통과) 시킨 것을 특징으로 한다.

[0017] 삭제

[0018] 삭제

효 과

[0019] 이상 설명한 것처럼, 본 발명과 관련된 생체적합성 재료에 의하면, 그 원료를 어린으로 하므로 안전함과 동시에, 특히, 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 서로의 추출액을 혼합교반 침착시켜 복합체로 하는 것으로, 하이드록시아파타이트의 결정구조의 틈새에 콜라겐이 흡착결합하게 되어 복합체 중의 콜라겐이 발판 역할을 하여 콜라겐에 흡착결합한 하이드록시아파타이트가 인체에 흡수되기 쉽게 된다는 특징을 갖는다. 또 일본인의 칼슘 섭취량은 영양 소요량을 밑돌고 있어 식사에 의한 칼슘의 섭취부족이나 나이를 먹음에 따라 수반하는 칼슘 흡수 능력 저하 등에 의해 발병하는 골다공증 환자는 매년 증가하고 있는 현상이며, 이것을 해결하기 위한 하나의 수단으로서 유효하다. 또 본 발명에 관한 제조방법에 의하면 본 발명과 관련된 생체적합성 재료는 어린 유래의 하이드록시아파타이트, 또는 콜라겐의 제조공정 중에 조입하여 제조할 수 있기 때문에 제조가 용이하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 본 발명에 관한 생체적합성 재료를 하이드록시아파타이트의 제조공정 중에 조입되어 제조하는 경우에 대해서 설명하였지만, 후술하는 콜라겐의 제조공정 중에 조입되어 제조하여도 좋다.

[0021] 도 1은 본 발명에 관한 하이드록시아파타이트의 제조라인을 메인으로 하여 복합체를 제조하는 제조방법의 일례를 표시하는 공정도(flow chart)이다.

[0022] 도 1에 나타낸 바와 같이, 이 실시예 1에 관한 복합체의 제조 방법은 건조 어린을 물에 침지시키는 침지척공정(1)과 이 물에 침지시키고 탈수를 한 어린을 15~35℃의 산성수액 중에 10~30분간 침지하여 산처리를 행하고, 어린에 포함된 하이드록시아파타이트를 추출한 산처리공정(2)과 이 산처리공정(2)에서의 고형물이 포함되는 하이드록시아파타이트 추출액을 고액분리하는 제1고액분리공정(3)을 포함하고 있다. 이 제1고액분리공정(3)으로 분리된 분리액은 하이드록시아파타이트의 제조공정인 제1여과공정(5)으로 진행되고 고형물(탈회된 어린)은 이 고형물에서 콜라겐을 제조하도록 콜라겐 제조공정의 제1세정공정(23)으로 이송된다.

[0023] 어린으로서는 특히 한정되지 않고, 해수어, 담수어의 어종을 묻지않으며, 예를 들면, 잉어, 틸라피아(tilapia), 농어, 정어리, 도미, 연어, 전갱이 등이 열거되며, 어린의 하이드록시아파타이트나 콜라겐 함유율 및 입수가 쉬움 등의 점에서 잉어, 틸라피아, 농어가 바람직하다. 그러나 실제 사용하는 어린은 여러 가지 어린의 혼합물인 경우가 있다.

[0024] 또 어린은 건조 어린이라도 미건조 어린이라도 좋고, 취급이 쉬운 점에서 건조 어린인 것이 바람직하다. 건조 어린을 사용하는 경우에는, 산처리를 행하기 전에 건조 어린을 물에서 침지시켜 물을 토하는 침지(물처리)공정을 행한다. 이 실시예에는 건조 어린을 사용했다.

[0025] 침지공정(1)은 상기한 것과 같이, 건조 어린을 물에 침지시켜 물 토함을 행하는 것이고, 이 물을 토함은 예를 들면, 통액성의 나일론 네트(nylon net)로 건조 어린을 넣어 이 나일론 네트를 건조 어린에 대하여 2.5~4.0 배의 물을 넣은 탱크 내에 넣어 10~14시간 침지하는 것으로 행한다. 나일론 네트의 그물코 사이즈는 1㎜ 이하의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 이 침지공정을 통과한 어린은 탈수를 하여 산처리공정(2)으로 진행한다.

[0026] 이 산처리공정(2)은 어린에서 하이드록시아파타이트를 주성분으로 하는 회분을 분리하는 것이다. 탈수를 한 어린을 나일론 네트에서 꺼내 산성수용액 안에 넣어 상기 어린에서 상기 회분을 분리한다. 산성수용액으로는 특히 한정되지 않고, 유기산의 수용액이라도 광산의 수용액이라도 좋으며, 바람직하게는 염산수용액이다. 이 염산수용액은 어린의 종류에 따라 바람직한 조건이 다르며, 예를 들면, 어린에 대하여 2.5~4.0배의 물에 순도 35%의 염산(어린에 대하여 65중량%, 염산농도 5.7%)을 투입하는 것이 바람직하다.

[0027] 어린을 산성수용액에 침지시켜 산처리 할 때의 침지시간은 어린의 종류에 따라 다르며, 예를 들면, 상기의 염산수용액의 염산농도의 조건으로는, 예를 들면, 10~30분인 것이 바람직하고, 특히 바람직하게는 15분이다. 이 사이 교반기를 사용하여 교반한다. 이 침지시간은 10분 미만이고, 충분히 어린이 탈회되지 않고 또한, 하이드록시아파타이트의 수율이 낮아져 침지시간이 30분을 초과하는 필요성은 적다. 또 산성수용액의 온도는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 15~30℃인 것이 바람직하고, 특히, 바람직하게는 25℃(±5℃)이다. 상기의 염산수용액의 염산농도 및 침지시간의 조건에는 이 산성용액의 온도가 15℃미만이고, 충분히 어린이 탈회되지 않고, 또한, 하이드록시아파타이트의 수율이 낮아져 온도가 30℃를 초과하면 콜라겐의 수율이 낮아진다. 이 산처리를 행하는 경우, 어린을 산성수용액에 침지시키면서 교반하는 것이 바람직하다. 교반수단으로는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 교반기 이외에 주걱을 이용하여 행하여도 좋다. 이 산처리공정(2)을 종료하면 다음의 제1고액분리공정(3)으로 옮겨진다.

[0028] 이 제1고액분리공정(3)은 진동기를 이용하여 산처리공정(2)을 종료한 처리추출액에서 어린 등의 고형물을 분리하는 것이고, 여기서 분리된 어린 등의 고형물은 콜라겐 제조공정으로 보내지게 되고, 하이드록시아파타이트(회분)를 포함한 처리추출액은 제1여과공정(5)으로 보내져 여기서 여과된다.

[0029] 이 제1 여과공정(5)은 하이드록시아파타이트 추출액 중에서 미립 이물을 제거하기 위한 것이며, 예를 들면, 금망이 사용된다. 금망의 메쉬는 특히 한정되지 않고, 20・200의 것을 사용하는 것이 바람직하다. 이 제1여과공정(5)으로 여과된 하이드록시 하이드록시아파타이트 추출액은 다음의 탈취공정(6)으로 탈취처리된다. 이 탈취공정(6)으로의 탈취처리는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 활성탄을 사용하여 행하여도 좋다. 이 활성탄을 사용하는 경우에는 하이드록시아파타이트 추출액의 1.5퍼센트에 상당하는 양을 사용하는 것이 바람직하다.

[0030] 이 탈취처리는 예를 들면, 목질계 야자무늬계의 활성탄을 사용하여 행하여도 좋다. 탈취처리 후의 하이드록시아파타이트 추출액을 또 한번 제2여과공정(7)으로 여과한다.

[0031] 이 제2여과공정(7)에서 여과방법은 특히 한정하지 않고, 예를 들면, 하이드록시아파타이트 추출액 중에 규조토를 넣어 이 액을 교반하면서 규조토를 코팅한 여포를 통과시켜 여과장치를 사용하여도 좋다. 이 여과후의 산처리액이 하이드록시아파타이트 석출공정(8)에서 아파타이트 석출처리 된다.

[0032] 이 아파타이트 석출공정(8)에서의 석출처리는 하이드록시아파타이트 추출액에 알칼리를 더해 하이드록시아파타이트를 석출하는 것이다. 이 알칼리는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼륨이 열거된다. 알칼리의 첨가방법은 특히 한정되는 것은 아니다. 알칼리를 하이드록시아파타이트 추출액에 첨가한 액의 pH를 6~9로 될 때까지 교반하고, 하이드록시아파타이트를 석출한다. 이 석출한 하이드록시아파타이트는 제2고액 분리공정(9)의 액에서 분리된다. 역시 알칼리를 첨가하여 하이드록시아파타이트를 석출시켜도 좋다. 알칼리 대신에 알칼리수용액을 넣어 하이드록시아파타이트를 석출시켜도 좋다. 이 제2고액 분리공정(9)은 석출된 하이드록시아파타이트와 잔액을 분리하는 것이고, 고액분리 가능하면은 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 필터프레스, 원심분리기를 사용하여도 좋다.

[0033] 상기 제2고액 분리공정(9)에 의해 고액분리된 하이드록시아파타이트를 탱크에 회수하고, 제1탈염공정(10)에서 탈염시켜 또 한번 제3고액분리공정(11)에서 고액분리된 후, 수분조정하고 콜라겐추출액과 혼합시킨다. 상기 제1탈염공정(10)은 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 이온교환장치를 이용하여 액 중에 포함된 나트륨이온을 제거하는 것이며, 물을 이용하여 세정을 하는 것에 의해 이 탈염을 하여도 좋다. 이 세정공정을 행하여 탈염하면 제조코스트를 낮추는 것이 가능하다.

[0034] 콜라겐추출액은 상술한 것과 같이, 하이드록시아파타이트의 제조라인으로 제1고액 분리공정(3)에서 분리시킨 산처리 후의 어린을 사용하고, 다음에 설명하기 위한 제조공정을 통과하여 제조되는 것이 바람직하다.

[0035] 제1고액분리공정(3)을 통과하여 고액분리된 어린은 제1세정공정(23)을 끼워 pH조정을 하는 것에 물을 더하고, 이 물을 더한 것을 가열처리하여 어린에 포함하는 콜라겐을 추출시킨 가열처리공정(24)과 이 가열처리공정(24)에서 고형물이 포함된 가열처리액을 상온까지 냉각하는 제1냉각공정(25)과 이 제1냉각공정(25)에 냉각된 콜라겐추출액과 고형물을 고액분리 하는 제4고액 분리공정(26)과 이 제4고액 분리공정(26)에서 분리된 콜라겐추출액을 가열하여 살균시킨 제1살균공정(27)과 이 제1살균공정(27)에서 가열살균된 콜라겐추출액을 상온까지 냉각하는 제2냉각공정(28)과 이 제2냉각공정(28)에 냉각된 콜라겐추출액을 알칼리로 pH조정하는 제2세정공정(29)과 이 제2세정공정(29)에서 pH조정된 콜라겐추출액에 효소를 더하여 효소적 분해처리를 하는 효소적 분해처리공정(30)을 포함하는 것을 특징으로 한다. 더욱이 제4고액처리공정(26)에서 분리된 어린은 재가열처리공정(49)에 재차 과열처리시켜 콜라겐추출액을 추출시키고, 제3냉각공정(41)을 통과하여 콜라겐추출액을 제5고액 분리공정(42)으로 분리하여 앞의 제4고액분리공정(26)에서 분리한 알칼리에 추가하는 것에 의해 낭비 없이 어린을 이용 가능할 수 있게 된다.

[0036] 가열처리 후에 냉각되어 고액분리 된 콜라겐추출액은 제1살균공정(27)에서 살균처리된다. 살균처리는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 가열처리액을 70~80℃, 특히 75℃까지 가열한다. 이 살균처리 후의 가열처리액은 후술한 효소를 활성시켜 얻은 온도, 예를 들면, 60℃까지 제2냉각공정(28)을 통과하여 냉각되고나서, 제2세정공정(29)을 거쳐 가열처리액의 pH는 5~8, 특히 6.5(±0.2)로 되기 위하여 조정된다. 이 pH의 조정은 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 수산화나트륨, 수산화칼륨의 알칼리를 첨가하여 이행하도록 하여도 좋다. 이 제2세정공정(29)에 pH조정된 콜라겐추출액은 다음의 효소적 분해처리공정(30)에 의해 처리된다.

[0037] 이 효소적 분해처리공정(30)은 제2세정공정(29)에 pH 처리된 콜라겐추출액에 효소를 가하여 콜라겐의 저분자화를 도모하는 것이다. 이 효소적 분해처리는 예를 들면, 평균분자량은 바람직하게는 500~3000, 특히 바람직하게는 500~2000, 가장 바람직하게는 500~1000의 콜라겐을 얻기 위하여 행하는 것이다. 효소로서는 가열처리액을 효소적 분해처리 할 수 있으면 특히 한정되지 않으며, 예를 들면, Bacillus licheniform 유래의 알칼리성 효소(제넨코아사제, 상품명 : Protex 6L)를 들 수 있다.

[0038] 효소 첨가량은 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 기질의 0.01~0.1%인 것이 바람직하고, 특히 0.08%인 것이 바람직하다.

[0039] 효소적 분해처리의 온도는 효소에 따라 다르게 되며, 예를 들면, 30~70℃인 것이 바람직하고, 특히 60℃인 것이 바람직하다. 효소적 분해처리시간은 효소에 따라 다르게 되며, 예를 들면, 3~10시간인 것이 바람직하고, 6~8시간이 특히 바람직하고, 가장 바람직하게는 8시간이다. 이 분해처리 시간은 6시간 미만이고, 콜라겐의 소망한 저분자화를 충분히 행하지 못하고, 분해처리시간이 10시간을 초과하여도 분자량은 변하지 않는다. 또 효소적 분해처리는 교반하는 것이 바람직하다. 이 교반수단은 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 교반기 등을 사용하여 행하게 되어도 좋다.

[0040] 효소적 분해처리공정(30)에서 처리된 콜라겐추출액(효소처리액이라고도 한다)은 효소실활공정(3)에서 예를 들면, 80~85℃, 특히 85℃에서 15분간 가열하면 효소가 실활된다. 이 효소가 실활된 액은 제4냉각공정(32)을 통과하고, 예를 들면, 60℃까지 냉각된다. 냉각 후, 효소처리액 중의 고형물의 제거는 제3여과공정(33)에서 행해진다. 이 제3여과공정(33)은 고형물의 제거를 행하는 것이면 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 필터프레스에서 청징여과(淸澄濾過)를 행하는 것이 바람직하다. 청징여과로는 예를 들면, 효소처리액 중에 규조토를 넣고 이 액을 교반하면서 규조토를 코팅한 포(布)를 통과시킨 여과장치 등을 사용하여도 좋다. 또 제3여과공정(33)에 있어 탈취처리를 행하도록 하는 것이 바람직하다. 이 탈취처리로는 예를 들면, 목질계 야자무늬계의 활성탄을 사용하여 행하여도 좋다.

[0041] 청징여과된 여액(처리액이라고도 한다)은 제2탈염공정(34)을 거쳐 통과액 중에 포함된 염이 제거된다. 이 탈염처리는 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 이온교환장치를 사용하여 액 중에 포함한 나트륨이온을 제거하는 것이지만 세정을 행하는 것으로 이 탈염을 이행해도 좋다. 이 세정공정을 실시해 탈염하면 제조코스트를 낮추는 것이 가능하다. 이상의 탈염공정에 의해 무미, 무취의 콜라겐이 얻어진다. 탈염처리 된 처리액은 제2살균공정(35)으로 예를 들면, 120℃에서 3초간 가열하여 살균처리한 후에 제5냉각공정(36)에 예를 들면, 75℃ 이하에서 냉각된다. 냉각 후의 처리액은 농축공정(37)으로 예를 들면, 증발온도 60~65℃에서 브릭스가 40(±1.0)이 되도록 농축처리된다. 이것에 의해 콜라겐추출액이 얻어진다.

[0042] 이 콜라겐추출액을 수분 조정한 것에, 상술한 하이드록시아파타이트 추출액을 수분 조정한 것을 고형분 계산으로 하이드록시아파타이트 약 80중량% 대 콜라겐 약 20중량%의 중량비가 되도록 가하여 혼합교반 침착공정(43)에서 교반혼합한다. 그러면 하이드록시아파타이트에 콜라겐이 침착하므로 이 침착결합물을 건조공정(44)에서 열풍

건조시키면 고형상의 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체가 이루어진다. 이 복합체를 한층 더욱 다음의 분쇄공정(45)에서 분쇄시키고, 또 더 메쉬패스(mesh-pass, 그물통과)공정(46)을 통과하여 메쉬패스 시킴으로써 분상(粉狀)의 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체를 얻는 것이 가능한 것이다.

[0043] 더구나 이상의 설명에는 콜라겐추출액을 하이드록시아파타이트의 제조공정으로부터 분기하여 제조하는 경우에 대해 설명하지만, 건조 어린을 물 토하게 하면서 산처리할 때까지는 콜라겐의 제조방법에서도 같으므로, 양자 같은 공정을 통과하는 것에서 제조라인의 주체를 콜라겐의 제조라인으로 하며, 도 2에 나타낸 바와 같이, 건조 어린을 침지공정(20)에서 물 토하게 하고, 그 다음에 산처리공정(21)에서 산처리 후, 제1고액분리공정(22)을 통과하여 하이드록시아파타이트 추출액을 분리해 하이드록시아파타이트의 제조라인으로 분기시킨다고 하는 제조방법도 채택할 수 있는 것은 물론이다. 이 제조방법은 도 2에 나타내고 있으며, 부재번호가 동일한 것은 도 1에 나타낸 바와 같으므로 설명을 생략한다.

[0044] 다음에 상술한 하이드록시아파타이트 추출액에서 미분상의 하이드록시아파타이트의 단체를 얻는 경우에, 특히, 도 1에 나타낸 바와 같이 건조공정(12)에서 건조처리된다. 이 건조공정(12)은 하이드록시아파타이트 추출액의 건조를 행할 수 있으면 특히 한정되지 않고, 예를 들면, 열풍건조라도 좋다. 열풍온도는 특히 한정되지 않으며, 바람직하게는 65℃~100℃이며, 특히 바람직하게는 70℃이다. 건조시간은 특히 한정되지 않고, 바람직하게는 15~24시간이며, 특히 바람직하게는 18시간이다. 이것에 의해 건조한 미분상의 하이드록시아파타이트가 얻어지는 것이다.

[0045] 다음에 상술한 콜라겐추출액에서 미분상의 단체(單體)를 얻는 경우에, 특히 도 2에 나타낸 바와 같이, 농축된 콜라겐추출액을 예를 들면, 동결건조하던가 스프레이드라이의 방법을 사용하여 건조시키는 건조공정(48)을 통과하는 것으로, 분체화한 미분상 콜라겐 분말을 얻는 것이 가능한 것이다.

[0046] 이와 같이하여 얻어지는 미분상의 콜라겐은 무미, 무취로 분자량 500~100의 고품질의 저분자 콜라겐이다. 콜라겐은 많은 아미노산을 포함하고 이 아미노산의 조성에 의해 성질이 다르게 되는 것이다. 콜라겐은 다른 단백질에 비하여 아미노산 조성이나 배열이 특이적이고, 폴리펩티드(polypeptide) 사슬 3본이 오른쪽으로 감겨있는 헬릭스(helix)를 형성하여 안정한 구조를 보유하고 있다. 그리고 콜라겐 특유의 안정한 헬릭스구조는 하이드록시프롤린이 없으면 형성되지 않기 때문에 이 하이드록시 프롤린의 함유량은 콜라겐의 질을 판단하는 기준이 되는 것이라고 말할 수 있다. 결국 하이드록시 프롤린의 함유량이 많으면 질이 좋은 것이라고 말할 수 있는 것이다. 본 발명과 관련된 콜라겐의 제조방법에 따라 얻어진 콜라겐 중에 함유된 아미노산의 조성은 아미노산 자동분석법에 의해 분석한 결과를 표 1에 나타낸다. 모두 콜라겐 100g 중의 함유량이다. 더욱이 표 1에 표시한 것과 같이, 돈피(豚皮)유래의 콜라겐, A사의 콜라겐 및 B사의 콜라겐에 있어서도 아미노산 자동분석법에 의해 아미노산의 분석을 행하고 있다.

[0047] 표1

[0048]

콜라겐 아미노산 조성	단위 : g			
	실시예	돈피콜라겐	A사	B사
글리신(glycine)	28.5	33.34	36.4	33.48
알라닌(alanine)	10.9	11.28	11.1	12.36
사린(sarin)	3.59	3.33	5	3.84
트레오닌(threonine)	2.65	1.83	2.3	2.83
1/2시스틴(cystine)	0.03	0	0	0
메티오닌(methionine)	1.55	0.47	1.5	1.52
발린(valine)	2.48	2.18	1.7	2.06
류신(leucine)	2.66	2.49	2	2.14
이소류신(Isoleucine)	1.35	1.08	1.1	0.92
페닐알라닌(phenylalanine)	1.84	1.26	1.2	1.32
타이로신(tyrosine)	0.37	0.35	0	0.29
프롤린(proline)	13.8	12.18	11	11.59
하이드록시프롤린	11.4	10	6	8
리신(lysine)	3.78	2.59	2.6	2.57
히스티딘(histidine)	0.58	0.5	0	0.5
아르기닌(arginine)	8.58	4.7	5.1	5.16
아스파라긴산(asparagic acid)	6.15	4.32	5.5	4.14
글루타민산(glutamic acid)	10.4	4.57	7.8	6.97
트립토판(tryptophan)	0	0	0	0

[0049] 상기 표 1에서 알 수 있는 것과 같이, 본 발명에 관한 제조방법으로 제조된 콜라겐은 다른 재료와 제조방법으로 제조된 콜라겐과 비교하여 하이드록시 프롤린의 함유량이 많은 것을 알 수 있다. 또 이 콜라겐은 효소적 분해처리에 의해 저분자화(분자량 500~1000)가 도모되고 있으며 생체의 흡수율이 높은 것이다.

[0050] 또한, 콜라겐 100g 중에는 수분 4.5g, 지질(脂質) 0.2g, 회분(灰分) 0.2g, 나트륨(natrium)은 52.6mg 이 함유되어 있다.

다음에 본 발명과 관련된 생체적합성 재료를 구성하는 분상의 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체를 이하에 설명하는 바와 같이 제조한다. 우선 하이드록시아파타이트 추출액부터 설명하면, 잉어의 건조 어린 2kg을 그물코 사이즈 1㎜ 이하의 나일론 네트에 넣는다. PE(폴리에틸렌) 탱크에 건조 어린의 3.3배의 물 6.6kg을 넣고 이 탱크 내의 물에 건조 어린을 넣은 나일론 네트를 12시간 완전히 침지시켜 물토함을 행하였다.

[0051] 이 침지공정 후, PE(폴리에틸렌) 탱크 내의 물을 일단 빼내고 새로운 6.6kg의 물을 넣고, 그의 수온을 20℃(±2℃)로 유지하면서 순도 35%의 염산 1300g을 투입하여 염산수용액을 만들었다. 이 염산수용액에 물을 토한 어린을 25분간 침지시키면서 교반하여 산처리를 행했다. 이 어린을 산처리 하는 것에 의해 얻은 하이드록시아파타이트 추출액을 고액분리시켜 여과장치를 사용하여 여과했다. 이 여과 후의 하이드록시아파타이트 추출액을 야자무늬계에 활성탄을 사용하여 탈취처리했다. 탈취처리 후, 필터프레스를 사용하여 청징여과하고, 처리액 중의 미세한 고형물의 제거를 행했다.

[0052] 이 여과 후의 하이드록시아파타이트 추출액에 수산화나트륨(48중량% NaoH)을 첨가하면서 액의 교반기를 사용하여 교반을 행하고, 액의 pH를 7로 하는 처리를 행했다.

[0053] 이 작업에 의해 하이드록시아파타이트는 용출하여 하이드록시아파타이트의 입자가 석출했다. 석출 후, 필터프레스를 사용하여 고액분리하고, 분리된 하이드록시아파타이트를 탱크에 넣어 이 탱크에 처리액량의 3~4배의 물 36~48kg을 넣고 교반하여 세정하는 것에 의해 탈염처리했다. 계속되어 70℃에 가열하여 살균처리를 30분간 유지하면서 필터프레스를 사용하여 교반하면서 고액분리를 행했다. 이와 같이 하여 얻어진 하이드록시아파타이트 추출액은 함수율이 75중량%의 것이고, 중량은 1800g이였다.

[0054] 다음에는 콜라겐추출액을 이하에 설명하기 위하여 제조하였다. 잉어의 건조 어린 150kg을 그물코 사이즈가 1㎜ 이하의 나일론 네트에 넣는다. 이 나일론 네트를 건조 어린의 3.3배의 물 495kℓ을 모은 PE(폴리에틸렌) 탱크에 나일론 네트마다 넣어 12시간 완전히 침지시켜 물토함을 행하게 했다.

[0055] 그 다음에, 다른 PE(폴리에틸렌) 탱크에 건조 어린의 3.3배의 물 495kℓ를 넣고 이 수온을 20℃(±2℃)로 유지하면서 순도 35%의 염산 13kℓ를 투입하여 염산수용액을 만들었다. 이 염산수용액에 물을 토한 어린을 나일론 네트마다 15분간 침지시키면서 교반하며 산처리를 행했다. 산처리 후의 어린을 넣은 나일론 네트를 세정 탱크 내에 넓혀 어린이 유출하지 않도록 600kℓ의 물에 5분간 세정을 5회 행하고, 어린의 pH를 4.0(±0.2)으로 조정했다.

[0056] 세정 후의 어린을, 어린에 대하여 8배의 물을 넣은 가마에 넣고 이것을 98℃이상에서 3시간 1차 가열처리했다. 이 1차 가열처리는 액의 최종농도가 브릭스 10~12가 되도록 행하였다. 가열처리 중에 수분이 증발하여 가마 안에 수분이 적게 되었을 경우에는 물을 보급한다. 이 경우 가마에 눈금 같은 것 등으로 표를 설치하고 기준 표의 개소에 수분이 오도록 물을 보급하면 좋다.

[0057] 1차 가열처리 후, 75℃ 이하에 냉각하고나서 20·200 메시의 진동사 2단의 진동사기에 액인 1차 가열처리액과 고형물과의 고액분리를 행했다. 이 고액분리로 분리된 고형물을, 고형물 즉, 어린에 대하여 4배의 물을 넣고, 이것을 98℃ 이상으로 2시간 2차 가열처리 했다. 이 2차 열처리는 액의 최종농도가 브릭스 10~12가 되도록 행했다. 가열처리 중에 수분이 증발하여 가마 안의 수분이 적게 되었을 경우에는 물을 보급하면 좋다.

[0058] 2차 가열처리 후, 75℃ 이하에 냉각하고나서 20·200 메쉬의 진동 2단의 진동기에 액인 2차 가열처리액과 고형물과의 고액분리를 행했다. 이 고액분리로 분리된 액인 2차 가열처리액은 1차 가열처리액과 75℃에서 15분간 살균처리 했다. 살균처리 후, 60℃까지 냉각하고나서 효소적 분해처리를 행했다.

[0059] 이 효소적 분해처리는 가열처리액의 pH를 수산화나트륨에 의해 6.5(±0.2)로 조정하고나서 바실러스 리첸니포르미스(Bacillus licheniformis) 유래의 알칼리성 효소(제넨코아사제 상품명: Protex 6L)를 기질의 0.08% 가열처리액에 넣어 이것을 60℃(±1℃)에서 8시간 교반기를 사용하여 교반하는 것이다.

[0060] 효소분해처리 후, 효소분해처리 한 액(처리액)을 85℃에서 10분간 보관 유지하여 효소를 실활시킨 후, 60℃까지 냉각한다. 냉각 후, 처리액을 야자무늬계 활성탄을 사용하여 탈취처리하고 필터프레스를 사용하여 청징여과 하여 처리액 중의 고형물의 제거를 행했다.

[0061] 또한 제3여과공정(33)에 있어, 탈취처리를 행하도록 하는 것이 바람직하다. 이 탈취처리로서는 예를 들면, 목질계 야자무늬계의 활성탄을 사용하여 행하여도 좋다. 고형물을 제거한 후, 처리액을 이온 교반장치를 사용하여 탈염처리 했다. 탈염처리 후, 처리액을 120℃, 3초 가열하여 살균처리한 후에, 75℃이하에서 냉각했다. 냉각 후의 처리액을 농축탱크에서 증발온도 60~65℃로 하여 브릭스가 40(±1.0)이 되도록 농축처리하여 콜라겐추출액을 얻었다.

[0062] 다음에 상술한 하이드록시아파타이트의 제조공정의 제3고액분리공정(11)에서 분리된 하이드록시아파타이트 추출액의 함수율 75중량 퍼센트의 것을 1800g 준비하고, 상술한 콜라겐의 제조공정에서 얻어진 건조공정으로 이행하기 전의 저분자의 콜라겐추출액의 함수율 50중량%의 것을 220g 각각 고형물 계산으로 준비하고, 양추출액을 동시에 처리 탱크에 넣어 상온에서 10~20분간 혼합 교반시켰는데 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 침착결합물이 2,020g 석출했다. 이 침착결합물을 70℃의 열풍 분위기하에서 18시간 열풍 건조시킨 결과, 함수율 5.8%의 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체 520.6g을 얻었다. 또 그 색은 담백황색이고 조금 적은 냄새가 나는 것이다.

[0063] 이 실시예에서는, 상술한 콜라겐의 제조 공정에서 얻었던 건조공정(48)으로 이행하기 전의 농축된 저분자의 콜라겐추출액을 수분 조정하여 함수율 50중량%으로 하는 것을 220g 준비하고, 상술한 하이드록시아파타이트의 제조공정의 제3고액분리공정(11)에서 분리시킨 하이드록시아파타이트를 수분 조정하여 함수율 75중량 퍼센트로 한 것을 1,800g 준비하고, 동시에 처리 탱크에 넣어 상온에서 10~20분간 혼합교반 시킨 결과, 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 침착결합물이 2,020g 석출했다. 이 침착결합물을 다음의 건조공정으로 70℃의 열풍분위기하에서 18시간 열풍건조시켰는데 함수율 5.8%의 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 침착결합물이 520.6g 얻어졌다. 그리고 그 색은 담백황색이고 조금 미취가 있었다.

[0064] 이상과 같이 하여 얻어진 복합체를 주사형 전자현미경을 사용하여 주사하고, 시판되고 있는 분말상의 아파타이트와 콜라겐의 혼합물을 주사하는 것과 비교한 바, 도 4에 나타낸 바와 같이, 복합체 A는 부정형의 물질 1종류만이 확인가능하고, 도 3에 나타낸 바와 같이, 시판품의 혼합물 B는 구형의 물질(콜라겐)과 부정형의 물질(하이드록시아파타이트)의 2종류의 물질이 서로 부착하고 있는 상태를 확인할 수 있다. 이것으로 부터 알 수 있는 바와 같이, 복합체 A는 2개의 물질이 결합하여 1개로 되어 있는 것으로 생각된다. 참고로 하이드록시아파타이트 단독의 것을 주사한 결과, 도 5에 나타낸 것과 같이, 복합체 A보다도 미세한 결정이 명료하게 관찰할 수 있어서 복합체 A는 이 하이드록시아파타이트의 결정구조의 극간에 콜라겐이 결합하고 있는 것으로 생각된다.

[0065] 게다가, 상술한 복합체를 분석한 바, 표 2에 나타낸 분석결과를 얻었다.

[0066] 표2

[0067]

LOT : 61201M			
분석 시험 항목	결과	주	방법
수분	4.2g / 100g		상압가열건조법
콜라겐	20.4g / 100g	1	케르다르법
나트륨	390mg / 100g		원자흡광광도법
인	14.2g / 100g		ICP 발광분석법
하이드록시아파타이트	70.2g / 100g	2	ICP 발광분석법
마그네슘	323mg / 100g		ICP 발광분석법
pH	6.6	3	글라스 전극법
주1. 요소·단백질 환산계수 : 6.25			
주2. Ca에서의 환산계수 : 2.5067			
주3. 10%현탁액에 대해서 측정했다			

[0068] 상기 표 2에서 알 수 있는 것과 같이, 복합체는 100g에 대하여 수분이 4.2g(상압 가열건조법에 의해 측정), 콜라겐이 20.4g(케르다르법(kjeldahl)(요소·단백질 환산계수 : 6.25)에 의해 측정), 인이 14.2g(ICP 발광분석법

에 의해 측정), 하이드록시아파타이트가 70.2g(ICP 발광분석법(Ca에서의 환산계수 : 2.5067)에 의해 측정), 나트륨이 390mg(원자흡광광도법에 의해 측정), 마그네슘이 323mg(ICP 발광분석법에 의해 측정), 각각 함유하고 pH가 6.6(글라스 전극법(10% 현탁액으로 측정)에 의해 측정)이다. 더구나 하이드록시아파타이트 70.2g 중에는 ICP 발광분석법을 사용하여 28.0g의 칼슘을 확인할 수 있다. 이 칼슘 28.0g을 구하는 계산식은 다음과 같다.

[0069] $Ca_5(PO_4)_3OH=5\times40.078+3\times(30.973762+4\times15.9994)+15.9994+1.00794$

[0070] $=502.311426$

[0071] Ca에서의 환산계수

[0072] $Ca_5(PO_4)_3OH/(5\times Ca)=502.311426/(5\times40.078)$

[0073] $=2.506669125 \rightarrow 2.5067$

[0074] $70.2g\div2.5067\fallingdotseq28.0g$

또 하이드록시아파타이트에, 칼슘, 인, 마그네슘, 나트륨 등이 함유되어 있고, 그 함유량은 하이드록시아파타이트 100g 중에, 칼슘 33.5g, 인 17.2g, 마그네슘 390mg, 나트륨 900mg, 단백질 0.1g 이하, 수분 3.4g의 비율이었다.

[0075] 또 이 복합체의 상품규격으로는 하기 표 3에 표시한 것으로 하는 것이 바람직하다. 표 3에 의하면, 수분이 10% 이하(상압가열건조법에 의해 측정), 콜라겐은 15% 이상(케르다르법(요소·단백질 환산계수 : 5.55)에 의해 측정), 인은 10% 이상(ICP 발광분석법에 의해 측정), 하이드록시아파타이트가 65% 이상(ICP 발광분석법(Ca에서의 환산계수 : 2.5067)에 의해 측정), 나트륨이 0.5% 이하(원자흡광광도법에 의해 측정) 중금속(Pb로 하여)이 20ppm 이하(유화나트륨 비색법에 의해 측정), 비소(As203으로 하여)가 2ppm 이하(원자흡광광도법에 의해 측정)를 각각 함유하고, pH가 6.0~8.0(글라스 전극법(10% 수용액으로 측정)에 의해 측정)으로 일반 세균수(생생수)는 3000개/g 이하(표준 한천배양법에 의해 측정), 대장균균이 음성(BGLB 법에 의해 측정)이다.

[0076] 표 3

[0077]

품질규격		
항목	규격치	시험방법
수분	10% 이하	상압가열건조법
콜라겐	15% 이상	케르다르법(주1)
인	10% 이상	ICP 발광분석법
하이드록시아파타이트	65% 이상	ICP 발광분석법(주2)
마그네슘	0.2% 이상	ICP 발광분석법
나트륨	0.5% 이하	원자흡광광도법
PH	6.0 ~ 8.0	글라스전극법(주3)
중금속(pb로하여)	20ppm 이하	유화나이트륨비색법
비소(As203로하여)	2ppm 이하	원자흡광광도법
일반 세균수(생균수)	3000개/g 이하	표준한천배양법
대장균군	음성	BGLB법
(주1) 질소 · 단백질 환산계수 : 5.55		
(주2) Ca에서의 환산계수 : 2.5067		
(주3) 10% 수용액에서 측정		

[0078] 게다가, 이상과 같이 하여 얻은 복합체를 골다공증 모델마우스에 투여하여 골의 개선 효과에 대해서 실험했다.

[0079] 실험에는 ICR계 마우스 암컷 10주차(체중20g) 모델마우스를 사용했다. 이것에 난소적출방법(OVX군) 및 유사수술

(sham군)을 시험하여 2개월간 통상 사료에서 사육하여 각 군 10 마리씩 6군의 그룹으로 나누었다. 이들 중에 대조군과 유사수술sham군은 탄산칼슘을 칼슘원으로 하는 1.5~1.8% 칼슘함유 사료로 사육했다. 또, 비교대상으로는 OVX 마우스에 대하여 명백하게 골밀도의 상승을 나타내는 골다공증 치료약인 비스포스포네이트(bisphosphonate)제제(리세드로네이트(risedronate)) 투여군을 설정했다.

[0080] 다른 3군은 식품 및 식품첨가제를 함유한 특수사료로 사육했다.

[0081] 아래와 같이, 이번 실험으로 사용한 식품 및 식품 첨가제의 배합상황을 하기 표4에 나타낸다.

[0082] 표 4

[0083]

		약제 함유량
1	sham군	없음
2	OVX 대조군	없음
3	리세드로네dl트	1회 투여량 : 10㎍/10㎕/day
4	비타민K2 (MK-4)	500㎍/100g사료
5	비타민K2 (MK-7)	500㎍/100g사료
6	복합체	2g Ca/100g사료

[0084] 이러한 사료에서 2개월간 사육한 후, 단두절단에 의해 채혈하여 혈청분리 후, 칼슘, 인, 마그네슘 농도 및 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 수치를 측정했다. 더욱이, 대퇴골을 적출한 후, 골량구조의 개선효과에 대해서 pQCT(Peripheral Quantitative computd Tomography ·말초골용정량적 CT), μCT(마이크로 포커스 X선CT)를 사용하여 대퇴골원위골단부 및 골간부를 대상으로 3차원적 골밀도 측정 및 골구조 해석을 행했다.

[0085] 이 골량구조 해석을 위해 초점 8 × 8 μm의 마이크로 포커스 X선관을 갖는 X선 마이크로 CT(MCT-CB130F, Hitachi medico사제)를 사용하여 대퇴골원위골단부의 3차원 입체화상정보를 취득한다. 촬영조건은 관전 값 40kv, 관전류 100μA, Voxel size 17.8×17.8×17.8㎛으로 하여 각각 50매의 Volume data를 취득했다. 얻어진 50매의 해면골과 2차원 화상을 기초로 하여 화상의 3차원 구축을 행했다.

[0086] 이러한 3D화상을 대상으로 골량구조계측 소프트(TRI/3D-BONE; 라특크시스템엔지니어링)를 사용하여 3차원 파라미터(parameter)를 측정했다. 측정한 구조 파라미터를 하기 표 5에 나타낸다.

[0087] 표 5

[0088]

BS/BV (1/mm)	골표면적
BV/TV (%)	조직량(TV)당의 골량
Tb.Th (mcm)	골양폭
Tb.N (1/mm)	골양수
Tb.Sp (mcm)	골양간격
Tb.spac(mcm)	골증심거리
D	복잡성
TBPf (1/mm)	골양간거리
SMI	골양형태
$V^*m.space$	골수층체적
V^*tr	골양체적
N.Nd	ND계수
N.Tm	TM계수
N.Ct	CT계수
N.Nd/TV (1/mm3)	조직량(TV)당의 Nd수
N.Tm/TV (1/mm3)	조직량(TV)당의 Tm수
N.Ct/TV	조직량(TV)당의 Ct수
TSL	총골격장
NdNd/TSL (%)	총길이에 대한 NdNd 길이의 비
CtNd/TSL (%)	총길이에 대한 CtNd 길이의 비

CtCt/TSL	총길이에 대한 CtCt 길이의 비
TmTm/TSL (%)	총길이에 대한 TmTm 길이의 비
TSL/TV (1/mm2)	조직량(TV)당 총골격 길이
NdNd/TV (1/mm2)	조직량(TV)당의 NdNd 길이
CtNd/TV (1/mm2)	조직량(TV)당의 CtNd 길이
CtCt/TV	조직량(TV)당의 CtCt 길이
TmTm (1/mm2)	조직량(TV)당의 TmTm 길이

[0089] 각 군간 비교하기 위한 통계처리에는 Student's t-test를 사용한다.

[0090] 파라미터에 있어서는 OVX 대조군에 유의의 차가 있는 것에 있어서, 각 5군과의 비교를 행했다.

[0091] 그 다음에, pQCT를 사용하여 적출대퇴골 골단부 및 골간부의 3차원적 골밀도측정, 그리고 pQCT에서 얻어진 횡단화상에서 해면골과 피질골을 구별하여 물리량인 체적골밀도(㎎/㎤)를 해석함과 동시에 피질골폭 단면 2차모멘트 단면계수 등의 형태적 지표를 바탕으로 골강도 지표를 구한다. 표 6에 해석파라미터를 표시한다. 각 군간 비교하기 위한 통계처리에는 Student's t-test를 사용했다. 도 6에 해석의 설정부위를 표시한다.

[0092] <표 6>

[0093] 해석 파라미터

[0094]

골단부	전골밀도	(mg/cm3)
	해면골밀도	(mg/cm3)
	피질골밀도	(mg/cm3)
	피질골단면적	(mm2)
	피질골두께	(mm)
	골막주위길이	(mm)
	골강도지표	(mm3)
골간부	전골밀도	(mg/cm3)
	해면골밀도	(mg/cm3)
	피질골밀도	(mg/cm3)
	피질골단면적	(mm2)
	피질골두께	(mm)
	골막주위길이	(mm)
	골강도지표	(mm3)

[0095] 그 다음에, 각군의 실험 모델마우스에서 혈액을 채취하고 혈청 중의 미네랄 농도와 ALP활성에 의해 측정했다. 혈액의 채취는 반마취하에서 단두에 의해 행하였다. 채취한 혈액은 빙온에서 1시간 방치 후, 10분간 1000rpm으로 혈청을 원심분리했다. 칼슘측정은 킬레이트(chelate) 발색법에 의해 행했다. 혈청 50㎕을 pH=11로 조정한 0.88M 모노에탄올아민 완충액 5㎖에 넣고 발색시약으로 하는 오르토크레졸프탈레인콘프레크손(O-Cersolphthalein Complexone)과 8-퀴놀리온(quinolinol)의 혼합액을 추가했다.

[0096] 잘 교반하여 5분간 방치 후, 분광광도계로 570㎚의 흡광도를 측정했다. 인의 측정은 몰리브덴블루(molybdenum blue) 직접법에 의해 행했다. 혈청 0.2㎖를 발생시약 5㎖에 추가해 실온에서 15분간 방치 후, 분광광도계로 690㎚의 흡광도를 측정했다. 발생시약으로는 몰리브덴산암모늄, 황산제1철암모늄, 황산의 혼합액에 계면활성제를 첨가하는 것이다. 마그네슘 측정은 크실리딜블루법(xylidyl blue)에 의해 행했다. 혈청 20㎖에 발생시약 3㎖를 추가하여 실온에서에 10분간 방치 후, 분광광도계에 520㎚의 흡광도를 측정했다. 발생시약으로 키실아조바이오렛트 I(xylylazoviolet I)와 글리콜에테르디아민(glycoletherdiamine)4초산의 혼합액에 계면활성제를 첨가한 것이다.

[0097] 알칼라인포스파타제의 측정은 페닐인산 기질법에 의해 행했다. 기질완충액 2㎖에 혈청 50㎕를 넣어 37℃에서 15분간 가온한 후, 발색시약으로서 36㎜M의 페리시안(ferricyanide)화 칼륨 2㎖를 더한다. 잘 교반한 후, 분광광도

계로 570m의 흡광도를 측정했다. 기질완충액은 pH=10.5로 조정한 50mM 탄산염완충액에 4아미노안티피린(aminoantipyrine)과 페닐인산의 혼합액을 더하는 것이다.

[0098] 표7

[0099]

마우스 혈청 중의 미네랄 농도와 AIP 활성				
	Ca(mg/dl)	P(mg/dl)	Mg(mg/dl)	AIP(BLunit)
1.sham	9.13±1.02	7.02±0.72	3.10±1.05	3.88±1.54
2.OVX	9.00±0.32	7.01±0.78	2.72±0.72	4.26±1.98
3.리세드로	9.02±1.15	6.95±0.32	3.12±1.21	3.65±1.26
4.VK-4	9.60±0.51	6.96±0.44	2.67±0.28	3.52±1.82
5.VK-7	9.34±1.50	7.12±0.64	2.63±0.63	3.77±1.76
6.복합체	9.80±1.64	7.06±0.76	2.71±0.92	3.44±1.59

[0100] 상기 표7은 모델 마우스의 혈청 중의 미네랄 농도와 알칼라인포스파타제(ALP) 활성을 나타낸다. 혈중 Ca, P, Mg는 전체 실험군 간에 있어 유의차를 인정하는 것은 할 수 없었다. 또한, ALP활성은 골 대사에 이상이 있으면 고가를 표시하지만, 본 실험결과에서는 전체 군에 있어 OVX보다도 낮은 경향을 보이지만 유의차는 인정받지 못했다.

[0101] 하기의 표 8은 pQCT에서 측정한 대퇴골 원위골단부와 골간부에 있어서의 OVX Control군과 실험군과의 유의차 비교를 표시한다. OVX 대조군과 유사수술sham군에 골단부, 골간부 모두 11항목의 파라미터에 대해 유의차를 표시하고 있고, OVX Control이 명확한 골다공증 모델마우스인 일을 실정하고 있다. 또 골다공증 치료약인 리세드로네이트 투여군은 골단부에 전골밀도, 해면골밀도, 피질골두께, 피질골단면적, 골간부에 피질골 두께, 피질골 단면적에 있어 OVX 대조군보다도 상승하고 있다는 점이 의미가 있다. 이와 같이 골밀도 상승을 특징으로 하는 리세드로네이트의 효과가 나타남으로써, 금회의 실험이 높은 정도로 실행되었다는 것을 나타낸 것이다. 그리고 실험군 중 복합체군이 리세트로네이트 투여군에 가장 가까운 효과를 나타내었다. 한편 MK7군은 대퇴골 원위골단부의 피질골 두께, 피질골단면적, 골막주위길이, 골강도 지표에 있어, OVX 대조군 보다도 상승을 나타낸 점은 중요하다.

[0102] 그러나, 골간부에 있어서는 OVX 대조군과의 유의한 차는 나타내지 않았다. 또 MK4군은 골단부 골막주위길이만이 OVX 대조군에 대하여 상승했다.

[0103] 표8

[0104]

		OVX	sham	리세틀	복합체	MK-4	MK7
골단부	전골밀도 (mg/cm3)		P<0.01	P<0.01			
	해면골밀도(mg/cm3)		P<0.05	P<0.05			
	피질골밀도(mg/cm3)		P<0.01		P<0.01		
	피질골단면적(mm2)		P<0.01	P<0.05	P<0.05		P<0.05
	피질골두께(mm2)		P<0.01	P<0.05	P<0.05		P<0.05
	골말주위길이(mm2)					P<0.05	P<0.01
	골보강도지표(mm3)		P<0.05		P<0.01		P<0.05
골간부	전골밀도 (mg/cm3)		P<0.01				
	해면골밀도(mg/cm3)		P<0.05		P<0.05	P<0.05	
	피질골밀도(mg/cm3)		P<0.01		P<0.05		
	피질골단면적(mm2)		P<0.01	P<0.05			
	피질골두께(mm2)		P<0.01	P<0.05			
	골말주위길이(mm2)						
	골보강도지표(mm3)						
유의차가 있는 항목수			11	6	6	2	4

[0105] 도 7은 모델마우스의 대퇴골의 원위골단부(A), 골간부(B)의 대표적인 OVX 대조군과 복합체의 pQCT 화상을 표시한다. 흰부분이 피질골, 피질골의 내측과 외측에 있는 부분은 해면골을 표시한다. 복합체를 투여한 마우스의 피질골이 두껍게 되어있어 골밀도가 상승하고 있는 것을 시각적으로 확인 가능하다.

[0106] 하기의 표 9는 모델마우스의 μCT에 의한 대퇴골 원위골단부에 있어 골내부구조의 3차원구조 해석결과를 나타낸다. 굵은 선으로 취득된 부분의 각 실험군의 파라미터는 OVX 대조군보다 높은 평균치를 두고있어 골 내부구조의 개선효과가 높은 것을 의미한다. 한편 굵은 선으로 취득이 되지 않는 부분의 파라미터는 OVX 대조군보다 낮은 평균치를 표시하고 있어 낮을수록 골 내부구조의 개선효과를 갖고 있는 것을 의미한다. 즉 Tb, SP, TB, space TBPf, Vm space , N . Tm , TmTm / TSL , TmTm/TV 는 단가가 낮을수록 골 내부구조의 높은 개선효과를 나타낸다.

[0107] OVX 대조군에 대하여 유사수술sham군은 11파라미터, 리세트로네이트군은 12파라미터에 있어 골량 개선효과를 나타내고 있어 금회 실험계가 높은 정도로 실행되었다는 것을 나타내고 있다. 그리고 MK7, 복합체, MK4의 각군 순서대로 골량개선효과를 나타낸다.

[0108] 표 9

계측항목		OVX	Sham	リセドコ	複合体	MK-4	MK-7
BS / BV	골표면적						
BV / TV	조직량 (TV당의 골량		P<0.01	P<0.01			P<0.05
Tb.Th	골량폭						
Tb.N	골량수		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
Tb.Sp	골량간격		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
Tb.Spac	골량중심거리		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
D	복잡성			P<0.05			
TBPf	골량간거리				P<0.05		
SMI	골량형태					P<0.05	
V*m.space	골수강분직		P<0.01	P<0.01			
V*tr	골량분적		P<0.05				
N.Nd	Nd개수						P<0.05
N.Tm	Tm개수						
N.Ct	Ct개수		P<0.05	P<0.01			P<0.01
N.Nd / TV	조직량 (TV당의 Nd수						
N.Tm / TV	조직량 (TV당의Tm수						
N.Ct / TV	조직량 (TV당의ŧCt수		P<0.05	P<0.01			P<0.01
TSL	총골격길이		P<0.05	P<0.01	P<0.05		P<0.01
NdNd / TSL	총길이에 대한 NdNd길이의 비						
CtNd / TSL	총길이에 대한 CtNd길이의 비						
CtCt / TSL	총길이에 대한 CtCt길이의 비						
TmTm / TSL	총길이에 대한 TmTm길이의 비				P<0.01		P<0.05
TSL / TV	조직량 (TV) 당의 총골격길이		P<0.05	P<0.01	P<0.05		P<0.05
NdNd / TV	조직량 (TV) 당의 NdNd길이						
CtNd / TV	조직량 (TV) 당의CtNd길이		P<0.01	P<0.01	P<0.05		P<0.01
CtCt / TV	조직량 (TV) 당의CtCt길이						
TmTm / TV	조직량 (TV) 당의Tmtm길이			P<0.01			
유의차항목수			11	12	8	4	11

[0109]

[0110] 도 8은 OVX 대조군과 유사수술sham군의 대표적인 골량구조의 횡단면과 종단면의 3차 원구축 화상을 표시한다. 도 9는 같은 리세트로네이트 MK4, MK7, 복합체의 각군의 대표적인 횡단면과 종단면의 3차원 구축 화상을 나타낸다.

[0111] 이상에서 상세히 설명한 것처럼, 복합체의 골밀도 및 골량구조 개선효과에 있어 OVX 마우스를 사용하여 도 8과 도 9에 나타낸 화상을 기초로 하여 대퇴골원위골단부 및 골간부를 대상으로 3차원적 화상해석을 행한 결과, 하기의 결론을 얻는다.

[0112] 1. 복합체는 골밀도 상승과 골 내부구조 개선효과의 양자를 나타내지만, 오히려 골밀도 상승이 주된 효과로 하여 인정되었다. 그리고 골간부의 피질골밀도의 상승을 표시하는 것은 복합체뿐이었다.

[0113] 2. MK-7은 골밀도 상승과 골 내부구조 개선효과의 양자를 나타내지만 오히려 골 내부구조 개선이 주요 효과로서 인정되었다.

[0114] 3. MK-4는 골 내부구조개선이 주된 효과로서 인정되었다.

[0115] 이상의 효과에서 복합체는 골밀도 상승에 매우 분명한 효과를 나타내고, 동시에 내부구조개선도 기대할 수 있어 골다공증의 예방과 골구조 열화의 개선에 유효한 것이 분명하다.

[0116] 이상 설명한 것처럼, 본 발명에 관한 생체적합성 재료를 구성하는 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체는 거의 냄새가 없는 무맛, 동시에 어린을 원료로 하므로 안전하며, 또, 골질개선효과에 우수하기 위해 이것을 그대로 섭취해야지 다른 여러 가지 음식, 과자, 츄잉껌, 음료수 중에 혼합하여, 섭취하는 것에 의해 칼슘의 부족으로 온다. 골다공증을 시작으로 하여 다양한 병이나 증상의 개선, 예방에 도움이 되는 것이 가능한 것은 명백하다. 또, 그의 제조방법은 어린 유래의 하이드록시아파타이트나 콜라겐의 제조공정의 중에 조립되는 것이 가능하기 때문에 제조하기 쉽게 된다.

도면의 간단한 설명

[0117] 도 1은 본 발명에 관한 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 복합체의 제조방법의 일실시예를 표시하는 공정도이다.

[0118] 도 2는 본 발명에 관한 하이드록시아파타이트와 콜라겐이 복합체의 제조방법의 다른 실시예를 표시하는 공정도이다.

[0119] 도 3은 시판되고 있는 하이드록시아파타이트와 콜라겐의 혼합물을 주사형 전자현미경으로 본 화상도 이다.

[0120] 도 4는 본 발명에 관한 복합체를 주사형 전자현미경으로 본 화상도이다.

[0121] 도 5는 시판되고 있는 하이드록시아파타이트를 주사형 전자현미경으로 본 화상도 이다.

[0122] 도 6은 모델 마우스에 의해 적출한 대퇴골의 해석설정부위를 표시한 설명도이다.

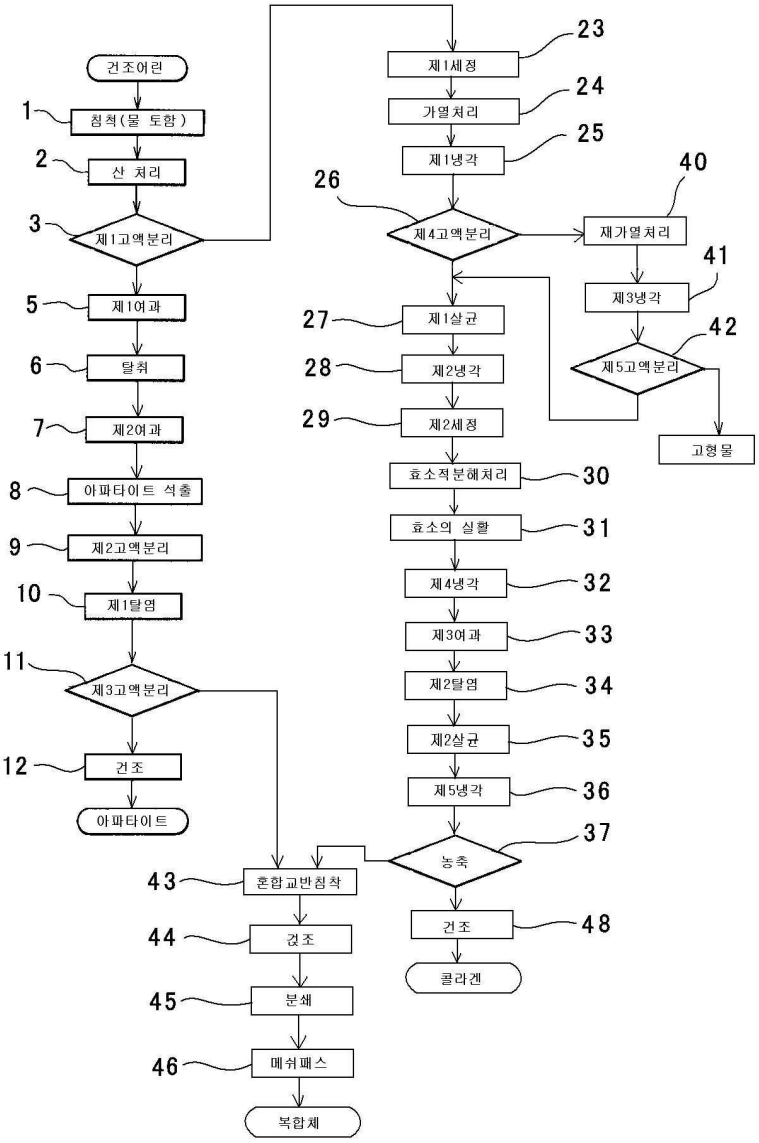
[0123] 도 7은 OVX 대조군 사용의 모델 마우스와 본 발명에 관한 복합체를 사용한 모델 마우스의 도 6에 표시한 해석설정부위에서의 pQCT 화상도이다.

[0124] 도 8은 OVX 대조군과 유사수술sham군을 사용한 모델 마우스의 골량구조의 횡단면과 종단면의 3차원 화상도이다.

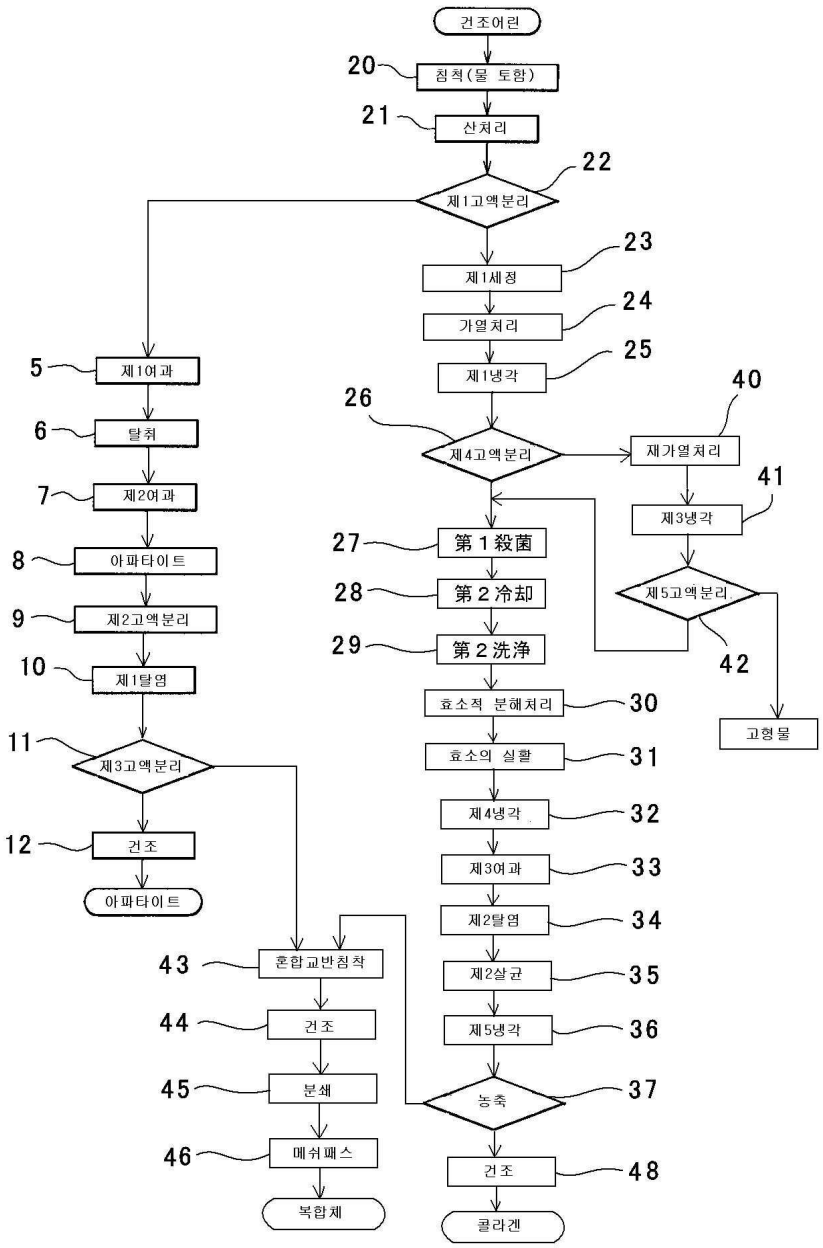
[0125] 도 9은 리세드로네이트, MK4, MK7 및 본 발명에 관한 복합체 각각 사용한 모델 마우스의 골량구조의 횡단면과 종단면의 3차원 화상도이다.

도면

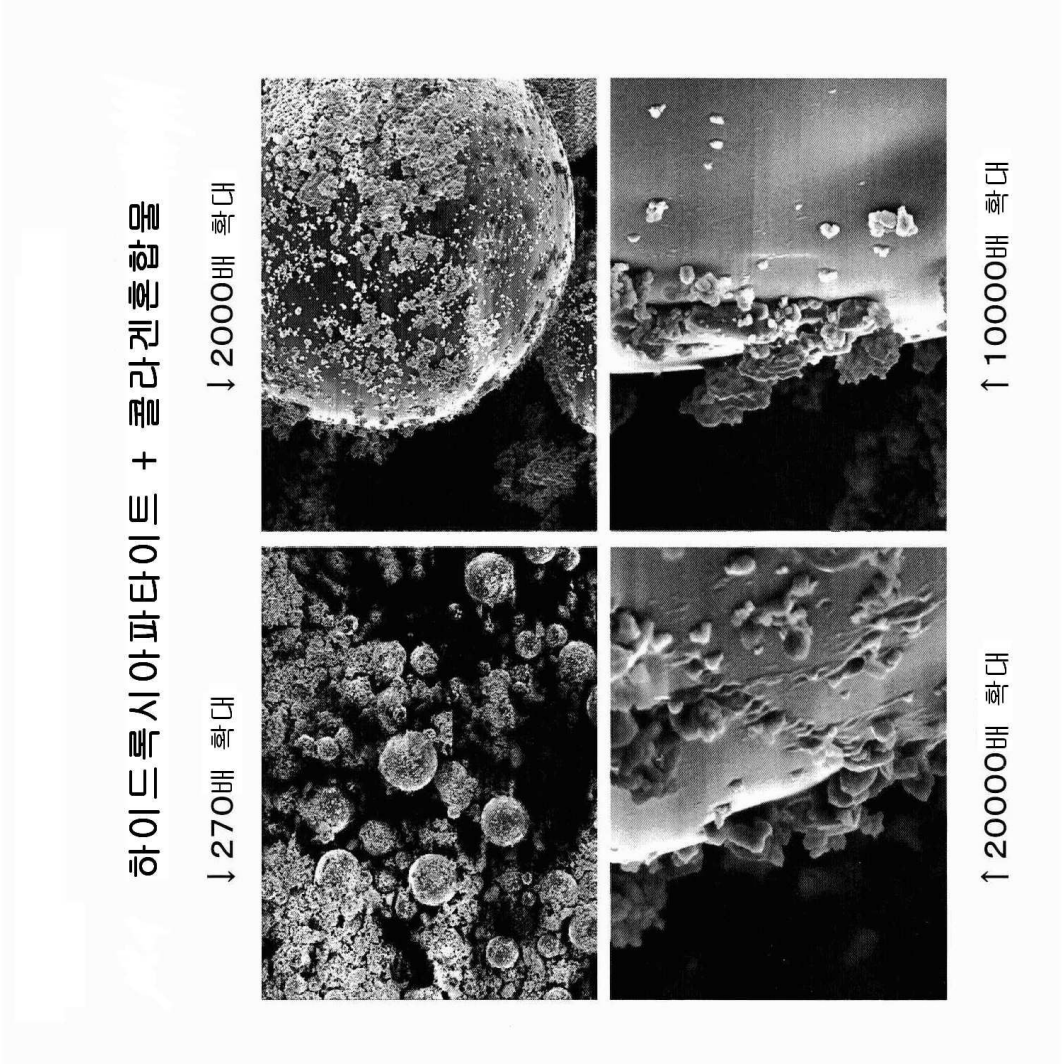
도면1


건조어린
1
침적(물 토함)
2
산 처리
3
제1고액분리
5
제1여과
6
탈취
7
제2여과
8
아파타이트 석출
9
제2고액분리
10
제1탈염
11
제3고액분리
12
건조
아파타이트
23
제1세정
24
가열처리
25
제1냉각
26
제4고액분리
40
재가열처리
41
제3냉각
42
제5고액분리
고형물
27
제1살균
28
제2냉각
29
제2세정
30
효소적분해처리
31
효소의 실활
32
제4냉각
33
제3여과
34
제2탈염
35
제2살균
36
제5냉각
37
농축
48
건조
콜라겐
43
혼합교반침착
44
겉조
45
분쇄
46
메쉬패스
복합체

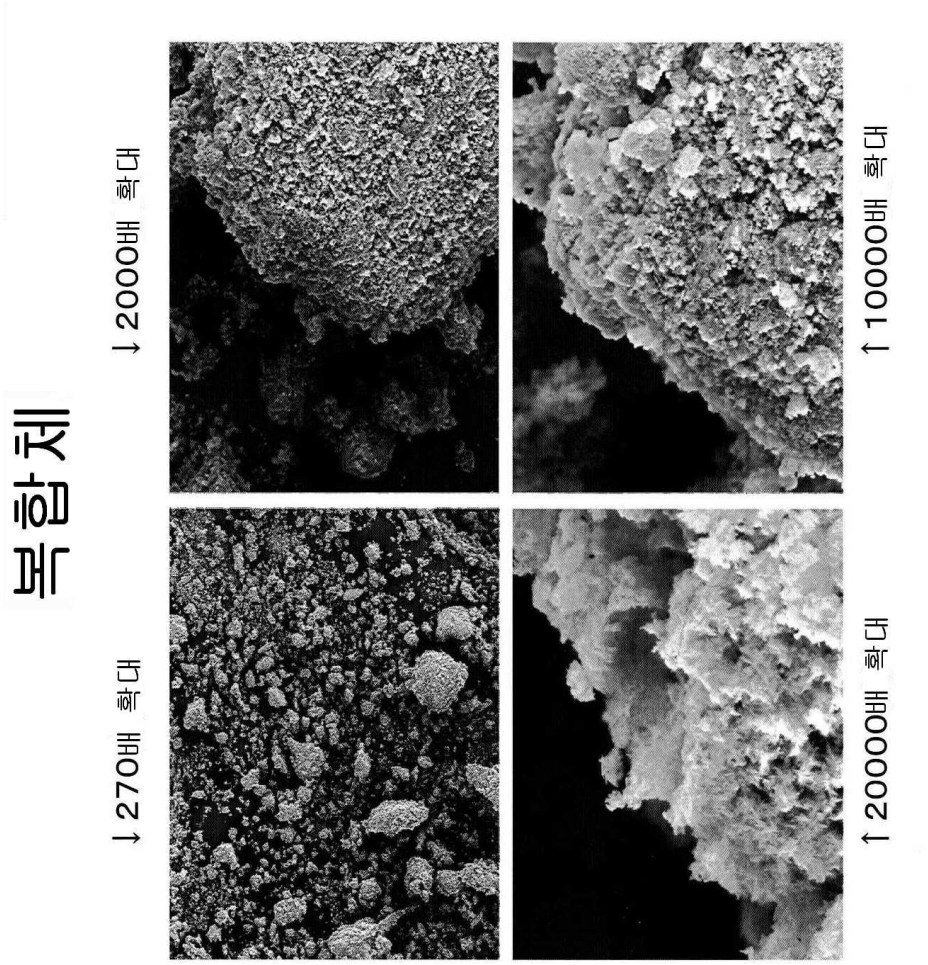
도면2


건조어린
20
침적(물 토함)
21
산처리
22
제1고액분리
23
제1세정
24
가열처리
25
제1냉각
26
제4고액분리
40
재가열처리
41
제3냉각
제5고액분리
42
고형물
27
第1殺菌
28
第2冷却
29
第2洗浄
30
효소적 분해처리
31
효소의 실활
32
제4냉각
33
제3여과
34
제2탈염
35
제2살균
36
제5냉각
37
농축
48
건조
콜라겐
5
제1여과
6
탈취
7
제2여과
8
아파타이트
9
제2고액분리
10
제1탈염
11
제3고액분리
12
건조
아파타이트
43
혼합교반침착
44
건조
45
분쇄
46
메쉬패스
복합체

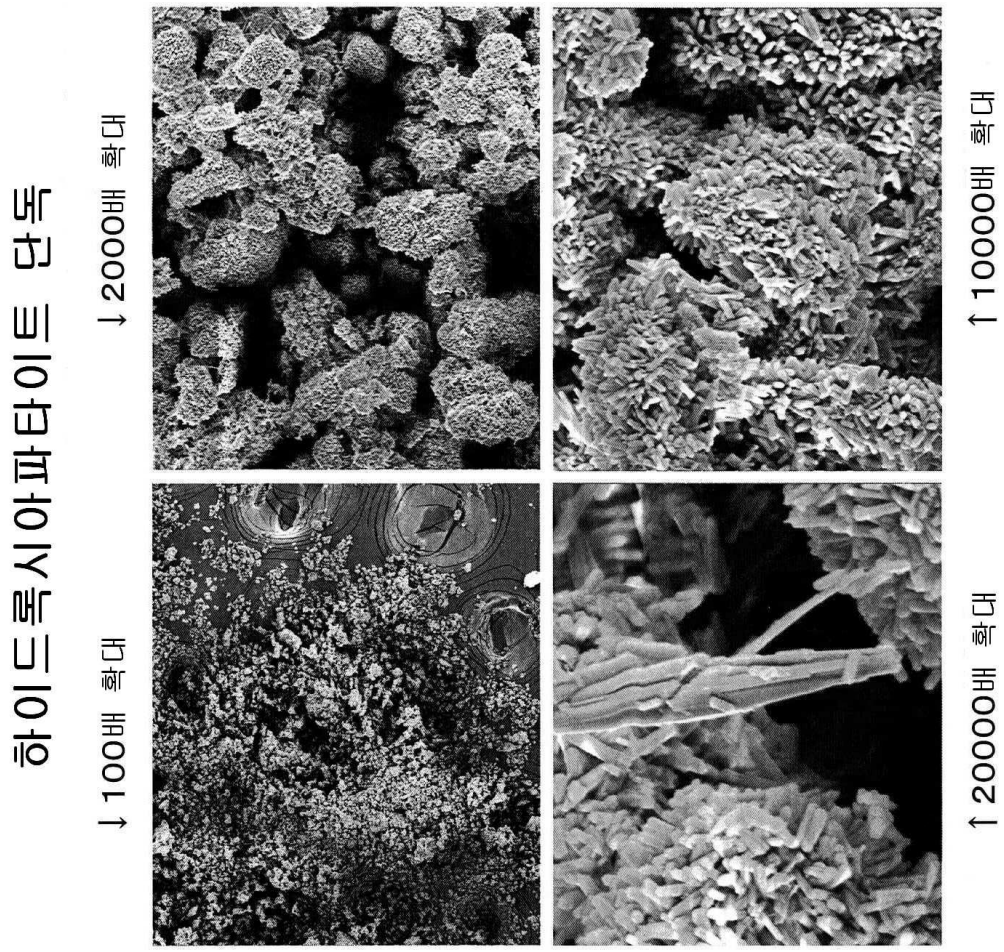
도면3



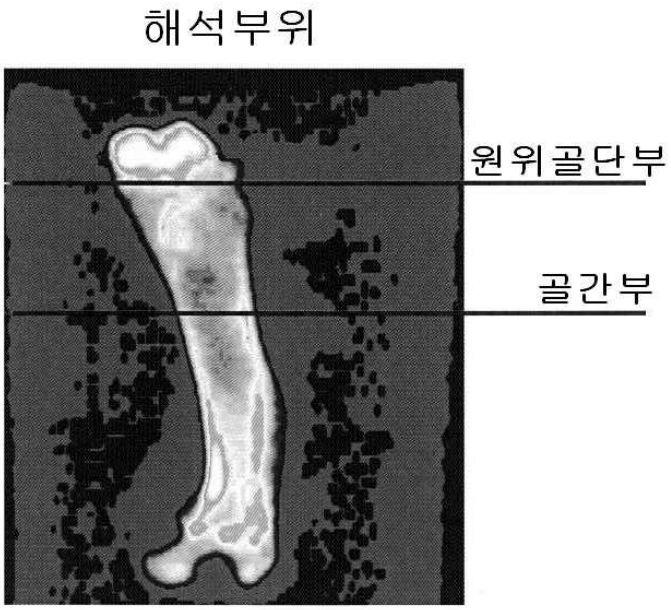
도면4



도면5

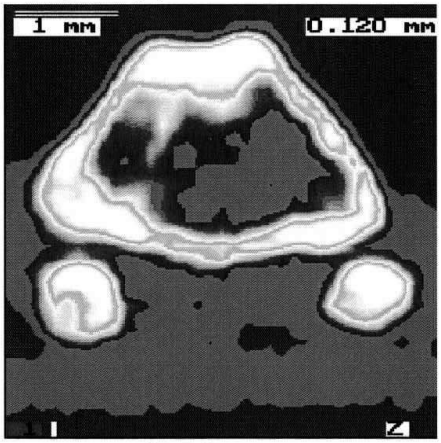


도면6

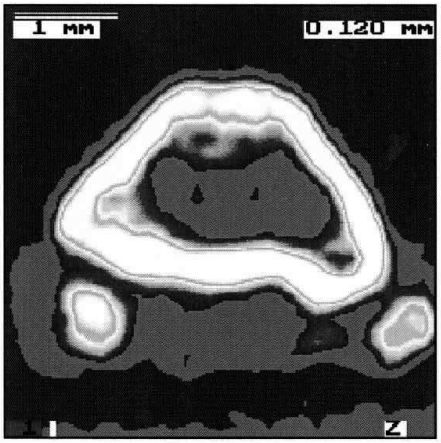


도면7

원위골단부(A)

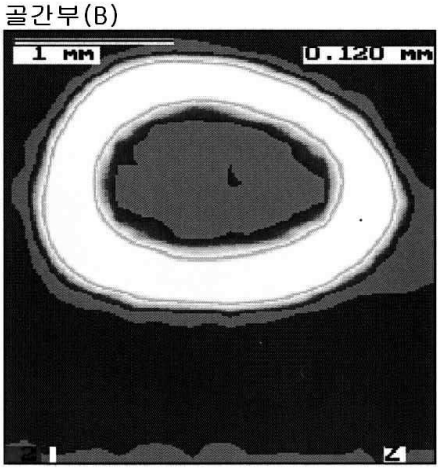


OVX Control

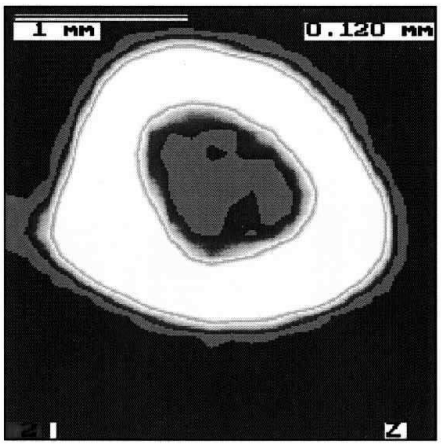


복합체

골간부(B)



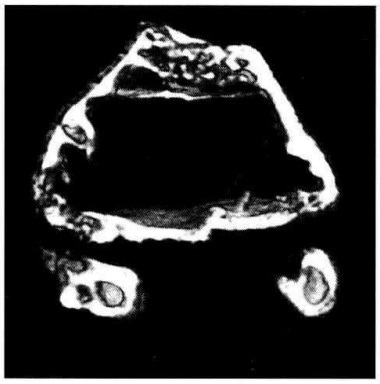
OVX Control



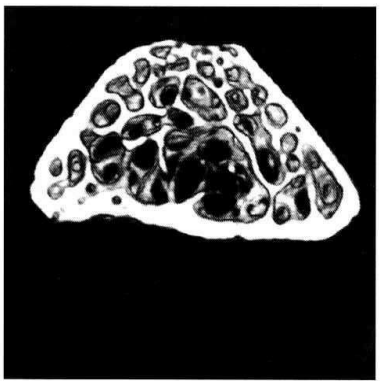
복합체

도면8

횡단상



OVX

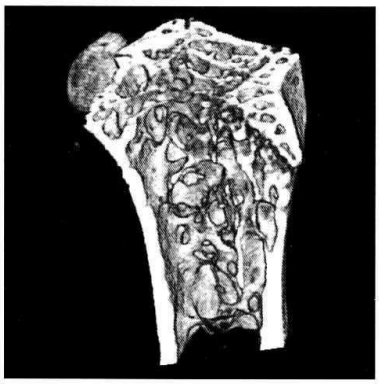


Sham

종단상



OVX



Sham

도면9

