202333660

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202333660 A

(43)公開日： 中華民國 112 (2023) 年 09 月 01 日

(21)申請案號：111141412 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 10 月 31 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/194 (2006.01)* *A61K31/365 (2006.01)*
A61K36/185 (2006.01) *A61K36/38 (2006.01)*
A61P19/00 (2006.01)

(30)優先權：2021/11/01 日本 2021-179081

(71)申請人：日商小林製藥股份有限公司 (日本) KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO., LTD. (JP)
日本
國立大學法人京都大學 (日本) KYOTO UNIVERSITY (JP)
日本

(72)發明人：水品善之 MIZUSHINA, YOSHIYUKI (JP) ；田中公輔 TANAKA, KOUSUKE (JP) ；戶口田淳也 TOGUCHIDA, JUNYA (JP) ；吉富啓之 YOSHITOMI, HIROYUKI (JP) ；金永輝 JIN, YONGHUI (JP)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：13 共 43 頁

(54)名稱

軟骨再生促進劑

(57)摘要

本發明之目的係提供一種具有軟骨再生促進作用之新穎成分。含有羥基檸檬酸及/或其鹽之軟骨再生促進劑可促進軟骨再生。

202333660
202333660

【發明摘要】

【中文發明名稱】

軟骨再生促進劑

【中文】

本發明之目的係提供一種具有軟骨再生促進作用之新穎成分。含有羥基檸檬酸及/或其鹽之軟骨再生促進劑可促進軟骨再生。

【指定代表圖】　無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

軟骨再生促進劑

【技術領域】

【0001】 本發明係有關於一種軟骨再生促進劑。

【先前技術】

【0002】 背景技術

因軟骨之退化性變性而產生的變形性關節症、因外傷所造成之軟骨損傷等軟骨損傷所引起的關節痛等係限制日常生活活動之很大的主要原因，在高齡社會中，其對應係越來越重要的課題。目前並不存在有針對軟骨損傷的根本性保守治療，而作為針對疼痛之對症療法，現已有採用非類固醇性消炎劑(NSAID)之口服投予、類固醇之關節內注入。又，現亦有廣泛地進行軟骨之重要成分醣胺聚醣(GAG)之一--玻尿酸之關節內注入，雖確認到其對於疼痛有一定的效果，但對於軟骨再生之效果則並不確定。

【0003】 葡萄糖胺係構成GAG的胺基糖之一。葡萄糖胺係包含於蝦/蟹等甲殼類、獨角仙等昆蟲類、真菌類之細胞壁等，係作為幾丁質之構成單位而廣泛存在於自然界的單醣類之1種。又，至今研究到其在生物體內作為黏多醣之構成醣存在等在生物體內的重要角色。葡萄糖胺不僅是可成為軟骨、結締組織之成分，亦有報告指出其以嗜中性球為中介之抗炎症作用，且有報告指出其可作為對關節炎有效的成分(專利文獻1)。

【0004】 雖然並不清楚經口服攝取的葡萄糖胺可參與關節軟骨代謝至何種程度，但目前以軟骨損傷之治療或預防效果為目的，已有積極地嘗試將葡萄糖胺利用在食品、準醫藥品或醫藥品中。舉例而言，現已有提案將包含膠原蛋白、甲基磺醯基甲烷、葡萄糖胺及軟骨素之關節痛改善用組成物之包含每日2000mg以

上攝取量膠原蛋白的組成物，作為可減輕/治療/預防關節炎等關節痛症狀之關節痛改善用組成物、關節痛改善劑或食品(專利文獻2)。

【0005】 另一方面，已知藤黃屬之果皮所含有的羥基檸檬酸可抑制過剩攝取的醣質作為體脂肪儲存，且可促進脂肪之消費。又，有報告指出藉由作成在藤黃屬萃取液中組合咖啡因而成的組成物，可更有效地促進脂肪代謝(專利文獻3)。

習知技術文獻

專利文獻

【0006】 [專利文獻1]日本專利特表2004-529860號公報

[專利文獻2]日本專利特開2009-051833號公報

[專利文獻3]日本專利特開2001-258506號公報

【發明內容】

【0007】 發明概要

發明欲解決之課題

葡萄糖胺在軟骨損傷之治療或預防中的效果係廣受矚目，而已有研究各種含有葡萄糖胺之組成物，但其效果仍難謂有充分的水準。因此，本發明人認為，若作為具有促進軟骨再生作用的成分，可期待其在軟骨損傷之治療或預防上有進一步的效果。

【0008】 本發明之目的在於提供一種具有優異的軟骨再生促進作用之軟骨再生促進劑。

用以解決課題之手段

【0009】 本發明人在藉由軟骨分化誘導實驗來探索具有軟骨再生促進作用的新穎成分之後，發現到於羥基檸檬酸及/或其鹽具有優異的軟骨再生促進作用。本發明係基於如此的見解並藉由進一步反覆研究而完成者。

【0010】 亦即，本發明提供下述所揭態樣之發明。

項1. 一種軟骨再生促進劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

項2. 如項1所記載之軟骨再生促進劑，其中前述羥基檸檬酸為(-)羥基檸檬酸及/或(+)別(allo)-羥基檸檬酸。

項3. 如項1或2所記載之軟骨再生促進劑，其中前述羥基檸檬酸為非內酯體及/或內酯體。

項4. 如項1~3中任一項所記載之軟骨再生促進劑，係用於軟骨之合成促進。

項5. 如項1~4中任一項所記載之軟骨再生促進劑，含有包含前述羥基檸檬酸及/或其鹽之植物萃取物。

項6. 如項5所記載之軟骨再生促進劑，其中前述植物萃取物為藤黃屬萃取物。

項7. 如項5所記載之軟骨再生促進劑，其中前述植物萃取物為木槿屬萃取物。

項8. 如項1~7中任一項所記載之軟骨再生促進劑，係用於軟骨損傷之治療或預防。

項9. 如項1~8中任一項所記載之軟骨再生促進劑，其對人類之用量，以羥基檸檬酸換算量計為0.3g~1.5g/日/60kg。

項10. 一種軟骨細胞分化促進劑，其促進自未分化細胞往軟骨細胞的分化，且含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

項11. 如項10所記載之軟骨細胞分化促進劑，其中前述羥基檸檬酸為(-)羥基檸檬酸及/或(+)別(allo)-羥基檸檬酸。

項12. 如項10或11所記載之軟骨細胞分化促進劑，其中前述羥基檸檬酸為非內酯體及/或內酯體。

項13. 如項10~12中任一項所記載之軟骨細胞分化促進劑，含有包含前述羥基檸檬酸及/或其鹽之植物萃取物。

項14. 如項13所記載之軟骨細胞分化促進劑，其中前述植物萃取物為藤黃屬萃取物。

項15. 如項13所記載之軟骨細胞分化促進劑，其中前述植物萃取物為木槿屬萃取物。

項16. 如項10~15中任一項所記載之軟骨細胞分化促進劑，其使細胞暴露於以羥基檸檬酸換算量計0.08~0.4mM之濃度下。

項17. 一種軟骨之分解抑制劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

項18. 一種用於維持軟骨厚度之保護劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

項19. 一種關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

發明效果

【0011】若依據本發明，可提供一種具有優異的軟骨再生促進作用之軟骨再生促進劑。

【圖式簡單說明】

【0012】[圖1A]顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中由羥基檸檬酸類引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生之結果。

[圖1B]顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中由羥基檸檬酸類引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨細胞增殖之結果。

[圖1C]顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中由各種濃度之羥基檸檬酸引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生及軟骨細胞增殖之結果。

[圖2]顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養中由羥基檸檬酸類所造成的軟骨細胞分化誘導之結果。

[圖3A]顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中由藤黃屬萃取

物引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生之結果。

[圖3B]顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中由藤黃屬萃取物引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨細胞增殖之結果。

[圖3C]顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養中由藤黃屬萃取物引起的軟骨細胞分化誘導之結果。

[圖4A]顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養中由羥基檸檬酸類與藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物引起的軟骨細胞分化誘導之結果。

[圖4B]顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養中由羥基檸檬酸類與藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生之結果。

[圖4C]顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養中由羥基檸檬酸類與藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物引起的往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨細胞增殖之結果。

[圖5]顯示經投予藤黃屬萃取物之軟骨損傷大鼠之體重變化。

[圖6]顯示大鼠之軟骨損傷手術當日及藤黃屬萃取物投予後(手術後16日後)之中的膝大腿骨滑車部之軟骨表面的手術部分之照片。

[圖7]顯示將經投予藤黃屬萃取物之軟骨損傷大鼠的膝軟骨之鑽孔橫截之截面標本的染色影像(a)及鑽孔深度之計測結果(b)。

[圖8]顯示經投予藤黃屬萃取物之軟骨損傷大鼠的血中之軟骨合成標記(CPII)量及軟骨分解標記(C2C)量之測量結果。

[圖9]顯示由經投予藤黃屬萃取物之大鼠變形性膝關節症誘發模式製作的膝大腿骨之軟骨之截面標本的染色影像。

[圖10]顯示由經投予藤黃屬萃取物之小鼠膝關節軟骨變性模式製作的膝大腿骨之軟骨之截面標本的染色影像。

[圖11]顯示經投予藤黃屬萃取物之小鼠膝關節軟骨變性模式之軟骨變性計分。

[圖12]顯示經投予藤黃屬萃取物之小鼠膝關節軟骨變性模式的血中之軟骨合成標記(CPII)量及軟骨分解標記(C2C)量之測量結果。

[圖13]顯示經投予藤黃屬萃取物之小鼠膝關節軟骨變性模式的，軟骨變性計分及血中之軟骨合成標記(CPII)量與羥基檸檬酸之人類等價用量之關係。

【實施方式】

【0013】 用以實施發明之形態

1.軟骨再生促進劑

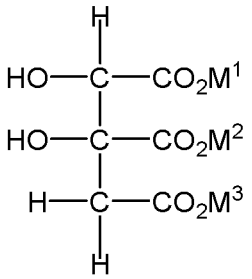
本發明之軟骨再生促進劑含有羥基檸檬酸、其衍生物及/或其等之鹽(於以下亦記載為「羥基檸檬酸類」)。羥基檸檬酸類已眾所皆知可作為促進脂肪代謝之成分。在本發明之軟骨再生促進劑中，羥基檸檬酸類係作為促進軟骨再生的有效成分來發揮作用。

【0014】 羥基檸檬酸類

羥基檸檬酸係具有2個不對稱中心之α-羥基三元酸(1,2-二羥基丙烷-1,2,3-三羧酸)，且形成2對之非鏡像異構物或4個不同的異構物。具體而言，作為羥基檸檬酸，可列舉(-)羥基檸檬酸、(+)羥基檸檬酸、(-)別(allo)-羥基檸檬酸及(+)別(allo)-羥基檸檬酸。該等異構物可單獨使用1種，又亦可組合2種以上使用。於該等異構物之中，從獲得進一步更佳的軟骨再生促進效果的觀點來看，較佳為(-)羥基檸檬酸及(+)別(allo)-羥基檸檬酸。

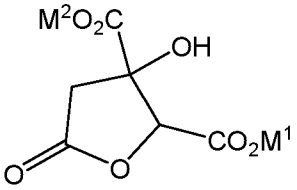
【0015】 羥基檸檬酸及其鹽，具體而言，係以下述通式(I)及(II)表示。

【0016】 [化1]



(I)

【0017】 [化2]



(II)

【0018】 於本發明中，羥基檸檬酸及其鹽之中亦將前述式(I)所表示的化合物記載為「非內酯體」或「自由體(free form)」，且將式(II)所表示的化合物(亦即，自由體之脫水縮合環化物)記載為「內酯體(lactone form)」。

【0019】 當前述式(I)及(II)中所示化合物為羥基檸檬酸時，前述式(I)及(II)中，M^1、M^2及M^3皆為氫原子。

【0020】 當前述式(I)及(II)中所示化合物為羥基檸檬酸之鹽時，前述式(I)中的M^1、M^2及M^3不同時成為氫原子，且前述式(II)中的M^1及M^2不同時成為氫原子。又，作為羥基檸檬酸之鹽，只要是藥學上或香妝學上容許之物即無特別限制。

【0021】 具體而言，當前述式(I)及(II)中所示化合物為羥基檸檬酸之鹽時在前述式(I)中的M^1、M^2及M^3，以及前述式(II)中的M^1及M^2，係分別獨立表示鹼金屬或鹼土金屬或有機鹼。作為鹼金屬，可列舉鉀、鈉。作為鹼土金屬，可列舉鈣。作為有機鹼，可列舉單乙醇胺基、二乙醇胺基、三乙醇胺基、胺基甲基丙醇基、胺基甲基丙烷二醇基。該等鹽可單獨使用1種，又亦可組合2種以上使用。

【0022】 在本發明之軟骨再生促進劑中，作為羥基檸檬酸及其鹽，可使用自由體及內酯體之中任一者，亦可組合兩者來使用，又，可自前述自由體及內酯體之中選擇1種使用，亦可組合2種以上使用。於該等羥基檸檬酸及其鹽之自由體

及內酯體之中，從要得到更加優異的軟骨再生促進效果的觀點來看，較佳可舉內酯體。

羥基檸檬酸衍生物係指將羥基檸檬酸作為母體，進行了官能基之導入、氧化、還原、原子之置換等之物。作為羥基檸檬酸衍生物之更具體的範例，可列舉羥基檸檬酸-2-辛酸酯、羥基檸檬酸-2-癸酸酯、羥基檸檬酸-2-月桂酯、羥基檸檬酸-2-肉豆蔻酸酯、羥基檸檬酸-2-棕櫚酸酯、羥基檸檬酸-2-硬脂酸酯、羥基檸檬酸-2-俞樹酸酯、羥基檸檬酸-2-異棕櫚酸酯、羥基檸檬酸-2-異硬脂酸酯、羥基檸檬酸-2-己基癸酸酯、羥基檸檬酸-2-亞麻油酸酯、羥基檸檬酸單甲酯-2-肉豆蔻酸酯、羥基檸檬酸單甲酯-2-棕櫚酸酯、羥基檸檬酸單甲酯-2-硬脂酸酯等。

作為羥基檸檬酸衍生物之鹽，可列舉前述羥基檸檬酸衍生物之鹼金屬或鹼土金屬鹽或有機鹼鹽。

【0023】 又，在本發明之軟骨再生促進劑中，作為羥基檸檬酸類，在羥基檸檬酸、羥基檸檬酸之鹽、羥基檸檬酸衍生物、羥基檸檬酸衍生物之鹽之4種之中，可使用1種，亦可組合2種以上使用，又，可從前述分別包含羥基檸檬酸、羥基檸檬酸之鹽、羥基檸檬酸衍生物、羥基檸檬酸衍生物之鹽的化合物之中選擇1化合物來使用，亦可組合2以上的化合物來使用。於該等羥基檸檬酸類之中，從要得到更加優異的軟骨再生促進效果的觀點來看，較佳可舉羥基檸檬酸之鹽，更佳可舉羥基檸檬酸之鹼金屬鹽及鹼土金屬鹽，又更佳可舉羥基檸檬酸之鹼土金屬鹽，特佳可舉羥基檸檬酸之鈣鹽。

【0024】 在本發明之軟骨再生促進劑中，羥基檸檬酸類可為從天然物取得者，亦可為經化學合成者。作為天然物，可列舉金絲桃科藤黃屬之藤黃種(作為具體例可列舉藤黃果(*Garcinia cambogia*)、印度藤黃(*Garcinia indica*)、酸黃果(*Garcinia atroviridis*)、山竹(*Garcinia mangostana*)、菲島福木(*Garcinia subelliptica*)等。)、錦葵科木槿屬之木槿(*Hibiscus* L.)等植物，較佳可列舉藤黃屬，又更佳可

列舉藤黃果(*Garcinia cambogia*)。植物可為藉由栽培而生產者，亦可為自天然採取者。所使用的植物之部位，雖只要是包含羥基檸檬酸類之部位即無限制，但較佳可舉果皮。從植物取得羥基檸檬酸類之方法係迄今眾所皆知。本發明之軟骨再生促進劑可包含來自天然物之羥基檸檬酸類的分離純化物，亦可包含來自天然物之羥基檸檬酸類的粗純化物。

【0025】 作為羥基檸檬酸類的粗純化物之範例，可舉植物之加工處理物，更佳可舉果皮之加工處理物。作為植物之加工處理物的具體態樣，可列舉植物乾燥物、植物粉碎物(包含新鮮及乾燥物)、植物萃取物。作為植物之加工處理物，可使用來自於單一植物者，亦可組合2種以上來自於不同的植物者來使用。在該等植物之加工處理物之中，較佳可舉植物萃取物。又，植物萃取物之具體態樣可列舉非濃縮萃取物(未經濃縮處理者)、軟萃取物(即液狀濃縮物)及萃取物粉末(即乾燥物)。

【0026】 上述植物之加工處理物之粗純化物之中，從要得到更加優異的軟骨再生促進效果的觀點來看，較佳可舉植物萃取物，更佳可列舉自藤黃屬得到的萃取物(藤黃屬萃取物)(特佳為自藤黃果(*Garcinia cambogia*)得到的萃取物)及自錦葵科木槿屬得到的木槿屬萃取物。植物萃取物只要是搾汁、溶劑萃取物、溶劑萃取物之包含羥基檸檬酸類的分餾物即可。得到植物萃取物之方法雖未特別限定，但例如可如以下般進行來得到。植物萃取物，例如，可將藤黃種等植物之果皮或木槿屬之花瓣等在原樣新鮮狀態下準備，或是以藤黃種等植物之果皮或木槿屬之花瓣等之乾燥物的狀態下來準備，可以原樣的大小或進一步因應需要裁斷或粉碎後，遵循溶劑萃取、超臨界萃取等慣用的萃取方法來製備。作為萃取溶劑，可列舉水(包含溫水及熱水)、有機溶劑(甲醇、乙醇、正丙醇、異丙醇、正丁醇等碳數1~4之低級醇；丙二醇、1,3-丁二醇等多元醇；丙酮等酮類；二乙基醚、二噁烷、乙腈、乙酸乙酯等酯類；二甲苯、苯、氯仿等)、其等之混合物，較佳

可列舉水、低級醇、其等之混合物，更佳可列舉溫水、熱水等之加熱水，更佳可舉熱水。該等溶劑可單獨使用1種，亦可組合2種以上使用。

【0027】 再者，作為使用包含羥基檸檬酸之原料植物來得到包含羥基檸檬酸鹽之植物萃取物的方法，可列舉在鹼金屬鹽及/或鹼土金屬鹽(例如，在擬得到包含羥基檸檬酸鈣鹽之植物萃取物的情況下，可列舉碳酸鈣、乳酸鈣、蛋殼鈣等鈣鹽)之存在下進行萃取操作的方法，以及在得到包含羥基檸檬酸之植物萃取物之後，以鹼金屬及/或鹼土金屬之鹼性化合物處理植物萃取物，藉此使萃取物中的羥基檸檬酸變化成鹽的方法。

【0028】 在使所得到的植物萃取物(搾汁、溶劑萃取物、溶劑萃取物之包含羥基檸檬酸類的分餾物等)包含於軟骨再生促進劑時，該植物萃取物可為原樣的未經濃縮之非濃縮萃取物的態樣，亦可為經濃縮的液狀軟萃取物的態樣，且亦可為將非濃縮萃取物或軟萃取物進一步乾燥處理而得到的萃取物粉末。作為乾燥處理，可列舉噴霧乾燥處理及凍結乾燥處理。

【0029】 作為前述羥基檸檬酸類之粗純化物(較佳為植物之加工處理物，更佳為植物萃取物)之乾燥重量換算量100重量%中的羥基檸檬酸類之量，可舉例如10重量%以上，較佳為30重量%以上，更佳為50重量%以上，又更佳為55重量%以上。作為乾燥重量換算量100重量%中的羥基檸檬酸類之量的上限雖未特別限定，但可舉例如80重量%以下或70重量%以下。

【0030】 作為得到羥基檸檬酸類的分離純化物之方法雖未特別限定，但可舉將上述萃取物之包含羥基檸檬酸類之分餾物進一步進行純化處理的方法。純化處理，只要是可分離羥基檸檬酸類而更為提高純化度的方法即可，而可遵循一般方法來進行。例如，可列舉層析法等分離處理、再結晶處理等。

【0031】 關於本發明之軟骨再生促進劑中的羥基檸檬酸類之摻合量，雖無特別限制而可因應該軟骨再生促進劑之製劑型態、用途等來適當地設定，但可舉

例如40~100重量%，且較佳為60~90重量%。

【0032】 本發明之軟骨再生促進劑中所含有的羥基檸檬酸類具有於葡萄糖胺未確認到的促進軟骨合成之作用。不僅如此，本發明之軟骨再生促進劑中所含有的羥基檸檬酸類，於抑制軟骨分解之作用上亦優異。因此，本發明之軟骨再生促進劑可藉由促進軟骨合成及抑制分化之兩方面的作用，來再生受到損傷(缺損或變性)之軟骨。

【0033】 其他成分

本發明之軟骨再生促進劑，除了羥基檸檬酸類以外，於不損及本發明效果的範圍內，可因應適用形態含有其他成分，亦可不含有其他成分。作為如此的其他成分，例如可列舉生理活性物質及添加物等。

【0034】 作為生理活性物質，較佳可列舉對軟骨、關節之改善有效的成分，具體而言，例如可列舉膠原蛋白、II型膠原蛋白、非變性活性2型膠原蛋白、膠原蛋白胜肽、甲基磺醯基甲烷(MSM)、葡萄糖胺、葡萄糖胺鹽酸鹽、N-乙醯基葡萄糖胺、N-乙醯基葡萄糖胺硫酸、軟骨素、硫酸軟骨素、半乳糖胺、N-乙醯基半乳糖胺、葡萄糖醛酸、糖醛酸(uronic acid)、蛋白聚醣、非變性蛋白聚醣、肝素、硫酸乙醯肝素、艾杜糖醛酸、硫酸角質素(keratan sulfate)、硫酸皮膚素、S-腺苷基甲硫胺酸、肌酸、茶胺酸、胡椒鹼、山楂酸、5-胺基乙醯丙酸磷酸鹽、鉤藤、黑薑、齒葉乳香樹(*Boswellia serrata*)、朝鮮薊、胺基酸、維生素A、維生素B1、維生素B2、維生素B6、維生素B12、維生素C、維生素D2、維生素D3、維生素E、維生素K、葉酸、玻尿酸、來自於鰹魚的彈性蛋白胜肽、咪唑二胜肽、槲皮素配醣體、來自於磷蝦油的EPA・DHA、來自於辣木種子的辣木芥子油苷(glucomoringin)、虎杖、魔鬼爪(devil's claw)、來自於雞腳的玻尿酸產生促進劑(HAS-II)、大豆異黃酮、β-隱黃素、蛋黃多肽(bonepep)、濃縮乳清活性蛋白質(CBP)、3-羥基-3-甲基丁酸鹽(HMB)、雙-3-羥基-3-甲基丁酸鈣單水合物(HMB鈣)、

麥芽糖酸鈣、鈣、鎂、鋅、鐵、硒、鉀、雌激素、降鈣素、阿斯匹靈、類固醇性消炎劑、非類固醇性消炎劑等。該等生理活性物質可選擇1種使用，亦可組合2種以上使用。

【0035】 作為添加物，可列舉藥學上或食品學上容許的賦形劑、崩解劑、稀釋劑、潤滑劑、香味劑、著色劑、甘味劑、調味劑、懸浮劑、濕潤劑、乳化劑、分散劑、輔助劑、防腐劑、緩衝劑、結合劑、穩定劑、增量劑、增黏劑、pH調整劑、界面活性劑、塗布劑、營養成分等。該等添加物可選擇1種使用，亦可組合2種以上使用。

【0036】 製劑型態

本發明之軟骨再生促進劑只要是包含上述羥基檸檬酸類，其形態及性狀即未特別限定。

【0037】 作為本發明之軟骨再生促進劑之投予形態，包含口服投予形態及非口服投予形態之任一者。因此，本發明之軟骨再生促進劑可作為口服劑、注射劑、點滴劑、點鼻劑、經皮吸收劑(外用劑)等來製備。本發明之軟骨再生促進劑，由於是以使軟骨再生之目的來使用，因此較佳為易於日常性及/或持續性投予(攝取)的口服劑。

【0038】 又，本發明之軟骨再生促進劑之性狀可為液狀，亦可為固狀。作為液狀之範例，可列舉包含液劑、飲料劑、乳劑、懸浮劑、酒精劑、糖漿劑、酏劑、包含軟萃取物劑等)等，作為固狀之範例，可列舉錠劑、丸劑、散劑、細粒劑、顆粒劑、錠劑、膠囊劑(包含硬膠囊及軟膠囊)、口含劑(troche)、咀嚼劑、乾燥萃取物劑等。當本發明之軟骨再生促進劑為固狀時，亦可作成持續性或緩釋性之劑型，亦可作成使其在投予(攝取)時與水等混合。

【0039】 本發明之軟骨再生促進劑可作為一般飲食品、保健機能食品(包含特定保健用食品、營養機能食品、機能性表示食品、補充劑等)、病患用食品、

醫藥品、準醫藥品來使用，又，亦可作為對食品、醫藥品、準醫藥品等之添加劑等來使用。特別是，從使其日常性及/或持續性隨意地攝取的觀點來看，係以作為包含羥基檸檬酸類之補充劑，或包含含有羥基檸檬酸類之植物萃取物之補充劑，更佳為包含藤黃屬萃取物之補充劑來使用為佳。

【0040】 製造方法

本發明之軟骨再生促進劑之製造方法係使用前述羥基檸檬酸類以及因應需要摻合的其他成分，因應各種形態及性狀以及使用目的，遵循迄今眾所皆知的通常製劑手續即可。

【0041】 用途

本發明之軟骨再生促進劑，藉由投予(攝取)來促進軟骨之再生。軟骨之再生係指，藉由合成軟骨，亦即藉由使未分化細胞往軟骨細胞分化並使其增殖而合成軟骨基質，來將缺損或變性的軟骨組織於正常軟骨組織(透明軟骨)上進行重建之意。軟骨之再生的促進係指，促進前述軟骨之再生，且抑制軟骨組織之進一步分解，而促進軟骨組織之重建之意。

【0042】 因此，本發明之軟骨再生促進劑，可使用於以下目的：藉由抑制及/或再生軟骨之磨損、提高軟骨製造力、促進軟骨成分(具體而言為軟骨基質)之產生來對須有軟骨再生力的對象進行幫助，及/或維持健康的軟骨狀態等。

作為本發明之軟骨再生促進劑之前述目的之更具體的範例，可列舉有助於(即進行幫助)步行時(特別是，於一定時間步行長距離時)、上下階梯時、穿脫襪子時、站立時、坐下時、蹲下時、撿拾落在地板上之物時及/或一般時候的活動中膝關節之彎曲伸展(即膝關節動作的順暢度)、柔軟性、可動性及/或狀況不佳之緩和。

【0043】 作為須有軟骨再生力之對象，較佳可舉哺乳類，更具體而言，可列舉人類；犬、貓等寵物動物；馬、牛等經家畜化的動物。

【0044】由於本發明之軟骨再生促進劑的有效成分羥基檸檬酸類不僅具有軟骨合成促進作用，亦具有軟骨分解抑制作用，故有鑑於如此的本發明效果，作為本發明之軟骨再生促進劑之較佳適應之一態樣，可舉對具有軟骨損傷的對象(須有軟骨再生力之對象之範例)於軟骨損傷之治療目的上進行適用。於軟骨損傷之治療中，不僅包含軟骨損傷之完全治癒亦包含軟骨損傷之減低。作為軟骨損傷，只要是因軟骨之缺損或變性而產生的病態即未特別限定，可列舉變形性關節症、外傷性軟骨損傷、因各種原因造成的關節炎等。作為成為對象的軟骨部位雖未特別限定，但可舉例如膝關節、髖關節、肘關節、肩關節、手腕關節、腳踝關節、顳顎關節之體內各種關節部位。

【0045】又，由於本發明之軟骨再生促進劑的有效成分羥基檸檬酸類具有優異的軟骨合成促進作用及軟骨分解抑制作用，故有鑑於如此的本發明效果，作為本發明之軟骨再生促進劑之較佳適應之一態樣，可舉對具有軟骨損傷風險的對象(須有軟骨再生力之對象之範例)於軟骨損傷之預防目的上進行適用。作為具有軟骨損傷風險之對象，在人類的情況中，可列舉具有50歲以上(特別是65歲以上)中多數確認到的變形性關節症之風險的高齡者、具有在運動性傷害中確認到的軟骨損傷之風險之運動愛好者或職業運動選手、其他在日常中過度使用關節的人或產生隨著年齡增長之軟骨自然磨損的人，較佳可舉產生隨著年齡增長之軟骨自然磨損的人。在對產生隨著年齡增長之軟骨自然磨損的人適用本發明之軟骨再生促進劑時，可基於以下目的來使用：利用本發明之軟骨再生促進劑所造成的軟骨組織之分解抑制作用及重建促進作用，較佳來維持隨著年齡增長而變薄膝軟骨之厚度，並減輕日常生活中膝蓋之疼痛、不協調感及/或不適感之目的。

本發明之軟骨再生促進劑的有效成分羥基檸檬酸類亦具有自未分化細胞往軟骨細胞分化之作用。有鑑於如此的本發明效果，作為本發明之軟骨再生促進劑之較佳適應之一態樣，可舉對如被認定為軟骨本身的缺損(即軟骨缺損症)般的具

有重度軟骨損傷的對象(須有軟骨再生力之對象之範例)於再生軟骨本身之治療目的上進行適用。重度之軟骨損傷的治療中，不僅包含軟骨損傷之完全治癒亦包含軟骨損傷之減低。作為重度之軟骨損傷之具體例，可列舉因運動或交通事故等產生的外傷性軟骨缺損症。

【0046】 用量

作為本發明之軟骨再生促進劑之用量，作為對人類之用量，以羥基檸檬酸換算量計，可舉例如0.1g/日/60kg以上，較佳為0.2g/日/60kg以上，更佳為0.3g/日/60kg以上，又更佳為0.4g/日/60kg以上，進一步更佳為0.5g/日/60kg以上。作為該用量的上限雖未特別限定，但可舉例如18g/日/60kg以下，較佳為10g/日/60kg以下，更佳為2g/日/60kg以下，又更佳為1.5g/日/60kg以下，進一步更佳為1.2g/日/60kg以下，又進一步更佳為0.9g/日/60kg以下，且特佳為0.7g/日/60kg以下。在含有藤黃屬萃取物的軟骨再生促進劑之情況下，作為對人類之用量，藤黃屬萃取物以乾燥萃取物換算量計，可舉例如0.16g/日/60kg以上，較佳為0.3g/日/60kg以上，更佳為0.5g/日/60kg以上，又更佳為0.6g/日/60kg以上，進一步更佳為0.8g/日/60kg以上。作為該用量的上限雖未特別限定，但可舉例如30g/日/60kg以下，較佳為17g/日/60kg以下，更佳為3.3g/日/60kg以下，又更佳為2.5g/日/60kg以下，進一步更佳為2g/日/60kg以下，又進一步更佳為1.5g/日/60kg以下，且特佳為1.2g/日/60kg以下。

【0047】 本發明之軟骨再生促進劑之投予(攝取)方法雖未特別限定，但例如可以口服或非口服的方式1日進行1次或複數次，較佳為以口服的方式1日進行1次或2~3次。

【0048】 2.軟骨細胞分化促進劑、軟骨之分解抑制劑、用於維持軟骨厚度之保護劑，以及關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑

如上所述，羥基檸檬酸、其衍生物及其等之鹽，由於具有促進自未分化細胞往軟骨細胞分化的分化促進作用、軟骨合成促進作用及軟骨分解抑制作用，因此

作為軟骨細胞之分化促進劑、軟骨之分解抑制劑、用於維持軟骨厚度之保護劑及關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑的有效成分亦是有用的。因此，本發明亦提供含有羥基檸檬酸、其衍生物及/或其等之鹽的軟骨細胞之分化促進劑、軟骨之分解抑制劑、用於維持軟骨厚度之保護劑，以及關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑。

【0049】 在軟骨細胞分化促進劑、軟骨之分解抑制劑、用於維持軟骨厚度之保護劑以及關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑中，有效成分羥基檸檬酸、其衍生物及/或其等之鹽之細節、含有與否都無所謂的其他成分、製劑型態、製造方法、用途及用量之細節，皆與前述「1.軟骨再生促進劑」相同。

【0050】 此外，軟骨細胞分化促進劑亦可用於在活體外藉由使其直接暴露於未分化細胞而促進軟骨細胞之分化之目的。於此情況中，關於軟骨細胞分化促進劑對未分化細胞暴露時之濃度雖未特別限定，但以羥基檸檬酸換算量計，可舉例如0.08~0.4mM，較佳為0.1~0.3mM，更佳為0.1~0.32mM，又更佳為0.15~0.25mM，進一步更佳為0.18~0.22mM之濃度。

實施例

【0051】 以下雖例示出實施例來更具體地說明本發明，但本發明當不受其等所限定。

【0052】 試驗例1：羥基檸檬酸類之軟骨細胞分化誘導活性、軟骨基質產生活性及軟骨細胞增殖活性(活體外(in vitro))

1.一次篩選法

・培養細胞

遵循PLoS ONE, (US), 2014, 9(12), e112291. DOI:10.1371/journal.pone.0112291(於以下記載為「文獻A」。)，自人類正常iPS細胞經由神經脊細胞誘導間葉系幹細胞，等量添加細胞凍害保護液CP-1(極東製藥工業製)而進行凍結保

存。

【0053】 ・2維培養之軟骨細胞分化及軟骨基質產生

對96孔盤(Corning製)，以1×10^{5}個/每孔的方式播種經解凍並增殖的來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞。24小時後去除培養上清液，取代成以文獻A為準的軟骨細胞分化誘導培養基。在軟骨細胞分化誘導培養基中，以最終濃度成為60μg/mL的方式添加(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)(ChromaDex, Inc.製)；羥基檸檬酸之鹽的(-)羥基檸檬酸-3鉀(HCA・K)(Sigma-Aldrich製)或(-)羥基檸檬酸-3鈣(HCA・Ca)(Sigma-Aldrich製)；(-)羥基檸檬酸之內酯體的(-)羥基檸檬酸內酯(HCA-內酯，即藤黃酸)(Sigma-Aldrich製)作為被驗物質。陽性對照組中添加身為骨形成因子之BMP-7(R&D Systems製)10ng/mL。於控制組中，並未添加被驗物質及骨形成因子任一者。在進行培養10日左右之後，以4%三聚甲醛-磷酸緩衝液(富士軟片和光純藥製)進行細胞固定。固定後，以愛爾新藍液(武藤化學製)進行染色1小時，再使用6M胍鹽酸溶液(東京化成工業製)，進行色素之溶出。將溶出液移至96孔盤，以微量盤測讀儀測量各孔在620nm之OD值，藉此測量經分化誘導的軟骨細胞所產生的基質之量。具體而言，將令控制組中的OD值平均為1時的各組中的OD值平均，作為軟骨基質產生比率而導出。

【0054】 於圖1A中，表示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生之結果。如圖1A所示，相較於無素材(控制組)，藉由200μM(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)係使軟骨基質產生比率提升(控制組之1.25倍以上)。此亦顯示，在軟骨基質再生之前，200μM(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)已將來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞分化誘導成產生軟骨基質的軟骨細胞。又，200μM(-)羥基檸檬酸之鉀鹽及鈣鹽分別比自由體更提升了1.05倍及1.08倍軟骨基質產生比率。此亦顯示，羥基檸檬酸之鹽比自由體(HCA)更能使軟骨細胞分化誘導活性及軟骨基質產生活性升高。相同地，從內酯體

(HCA-內酯)亦比自由體更能使軟骨基質產生比率提升來看，顯示軟骨細胞分化誘導活性及軟骨基質產生活性係更高。

再者，即便在使用羥基檸檬酸-2-棕櫚酸酯來代替羥基檸檬酸及其鹽時，亦確認到軟骨細胞分化誘導活性及軟骨基質產生活性。

【0055】・2維培養之軟骨細胞分化及軟骨細胞數

對96孔盤(Corning製)，以1×10^5個/每孔的方式播種經解凍並增殖的來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞。24小時後去除培養上清液，取代成以文獻A為準的軟骨細胞分化誘導培養基。以最終濃度成為60μg/mL的方式將(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)(ChromaDex, Inc.製)；羥基檸檬酸之鹽之(-)羥基檸檬酸-3鉀(HCA・K)(Sigma-Aldrich製)或(-)羥基檸檬酸-3鈣(HCA・Ca)(Sigma-Aldrich製)；(-)羥基檸檬酸之內酯體之(-)羥基檸檬酸內酯(HCA-內酯，即藤黃酸)(Sigma-Aldrich製)作為被驗物質添加至軟骨細胞分化誘導培養基。陽性對照組中係添加骨形成因子之BMP-7(R&D Systems製)10ng/mL。控制組中並未添加被驗物質及骨形成因子之任一者。在進行培養10日左右之後，添加於10%之細胞計數套組-8(Cell Counting Kit-8)(同人化學研究所製)製備的軟骨細胞分化誘導培養基，培養1小時。其後，藉由以微量盤測讀儀測量此96孔盤之各孔的450nm中的OD值，測量經分化誘導的軟骨細胞之增殖後之數目。具體而言，將令控制組中的OD值平均為1時的各組中的OD值平均，作為軟骨細胞增殖比率而導出。

【0056】於圖1B中顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨細胞增殖之結果。於圖1B中亦確認到與圖1A相同的傾向。具體而言，相較於無素材(控制組)，藉由200μM(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)會使軟骨細胞增殖比率提升。此亦顯示，200μM(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)，在軟骨細胞之增殖之前，已將來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞分化誘導成軟骨細胞。又，於200μM(-)羥基檸檬酸之鉀鹽及鈣鹽係確認到比自由體更

優異的軟骨細胞增殖比率之提升效果，其中於鈣鹽係確認到更加優異的軟骨細胞增殖比率之提升效果。此亦顯示，羥基檸檬酸之鹽比自由體(HCA)更能使軟骨細胞分化誘導活性及軟骨細胞增殖活性升高。相同地，從內酯體(HCA-內酯)亦比自由體更能使軟骨細胞增殖活性提升來看，顯使軟骨細胞增殖活性係更高。

再者，即便在使用羥基檸檬酸-2-棕櫚酸酯來代替羥基檸檬酸及其鹽時，亦確認到軟骨細胞增殖活性。

【0057】・羥基檸檬酸之軟骨細胞分化誘導活性等濃度依賴性

除了將羥基檸檬酸(HCA)之濃度設為0mM、0.05mM、0.1mM、0.2mM或0.4mM之外，與前述相同地進行藉由2維培養之軟骨細胞分化之軟骨基質產生及軟骨細胞數的測量。將結果示於圖1C。

【0058】如圖1C所示，在0.1~0.4mM，較佳為0.1~0.3mM，且特佳為0.2mM的情況下確認到優異的軟骨基質產生比率及軟骨細胞增殖比率。亦即表示，顯現軟骨細胞分化誘導活性、軟骨基質產生活性及軟骨細胞增殖活性的羥基檸檬酸濃度為0.1~0.4mM，較佳為0.1~0.3mM，且特佳為0.2mM(53μg/ml)。

【0059】2.二次篩選法(3維培養)

・培養細胞

遵循Tissue Engineering, (US), 2010, 16(1), p81-91. DOI:10.1089=ten.tec.2008.0693，以專用培養基自人類正常骨髓分離間葉系幹細胞之後，使細胞增殖。回收經增殖的細胞，等量添加細胞凍害保護液CP-1(極東製藥工業)而進行凍結保存。

【0060】・藉由3維培養之軟骨細胞分化誘導

已知以2維培養軟骨細胞會引起去分化。作為更接近自然的軟骨細胞之培養系，已有採用所謂3維培養之手法。將經解凍並增殖的來自於人類骨髓間葉系幹細胞，以每2.5×10^5個分注至15mL管(TPP製)中，於室溫以1000rpm進行離心3分

鐘。去除上清液，以文獻A為準交換成骨細胞分化誘導培養基0.5mL。同時，以100μM(0.1mM)之濃度添加(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)及其鹽(HCA・K及HCA・Ca)作為被驗物質。進行21日培養之後，以4%三聚甲醛-磷酸緩衝液固定12小時之後，以70%乙醇進行脫水並進行石蠟包埋後，製作標本。經製作的標本係進行藉由番紅O之蛋白聚醣染色，之後使用光學顯微鏡(倍率為10倍)，觀察經分化的軟骨細胞之形態。再者，使用影像解析軟體ImageJ，亦針對藉由番紅O進行的蛋白聚醣染色而呈現紅色之面積，導出令於控制組之該面積為1時的相對面積(紅色面積比)。

【0061】 圖2顯示藉由來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養之經分化的軟骨細胞之形態及紅色面積比。如圖2所示，100μM(-)羥基檸檬酸(HCA・自由體)及其鹽(HCA・K及HCA・Ca)中，及(-)羥基檸檬酸之內酯體100μM HCA-內酯，相較於無素材(控制組)，確認到藉由番紅O之蛋白聚醣染色，而觀察到經分化的軟骨細胞。

【0062】 從以上之結果顯示，於羥基檸檬酸及其鹽具有優異的軟骨細胞分化誘導活性。又，確認到於羥基檸檬酸衍生物亦具有軟骨細胞分化誘導活性。

【0063】 試驗例2：藤黃屬萃取物之軟骨細胞分化誘導活性、軟骨基質產生活性及軟骨細胞增殖活性(in vitro)

(藤黃屬萃取物之製備)

使藤黃果(*Garcinia cambogia*)之果皮乾燥，添加10倍量的水及蛋殼鈣並進行熱水萃取。在過濾所得到的萃取液之後，以旋轉蒸發器進行減壓濃縮，使所得到的濃縮液進一步進行噴霧乾燥。粉碎經乾燥的萃取物，而得到粉末狀的藤黃屬萃取物。以下，於全部試驗例中使用此藤黃屬萃取物(藤黃果之萃取物)。再者，於此藤黃屬萃取物中，藤黃果之果皮所含有的羥基檸檬酸((-)羥基檸檬酸)係以藉由在萃取時使用蛋殼鈣而形成鈣鹽之形態被包含。此藤黃屬萃取物中的有效成分

之含量以羥基檸檬酸換算量計係60重量%。

【0064】 (in vitro試驗)

1.一次篩選法

除了將被驗物質變更成藤黃屬萃取物(萃取物以乾燥重量換算量計最終濃度60μg/mL。於以下藤黃屬萃取物之量表示為萃取物之乾燥重量換算量。)之外，與試驗例1相同地進行，來試驗伴隨著軟骨細胞分化誘導之軟骨基質產生效果及軟骨細胞增殖效果。

【0065】 ・2維培養之軟骨細胞分化及軟骨基質產生

於圖3A中顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之2維培養中往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨基質產生之結果。於陽性對照之10ng/mL BMP7及60μg/mL 藤黃屬萃取物中，相較於無素材(控制組)，軟骨基質產生比率係提升(具體而言為控制組之1.25倍以上)。此係表示，在軟骨基質之產生之前，10ng/mL BMP7及60μg/mL藤黃屬萃取物已將來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞分化誘導成產生軟骨基質之軟骨細胞。

【0066】 於圖3A中一併顯示，以相同濃度(具體而言係60μg/mL)使用羥基檸檬酸鈣(HCA・Ca)來作為被驗物質，並與上述相同地進行伴隨著軟骨細胞分化誘導之軟骨基質產生之測量的結果。相同濃度的藤黃屬萃取物及羥基檸檬酸，在對比羥基檸檬酸量時雖然在藤黃屬萃取物的情況下較少，但藤黃屬萃取物的情況相較於HCA・Ca在軟骨基質產生比率係顯著地($p<0.01$)提升。亦即，顯示藤黃屬萃取物相較於HCA・Ca係使往軟骨細胞之分化誘導活性及軟骨基質產生活性增強。

【0067】 ・2維培養之軟骨細胞分化及軟骨細胞數

圖3B顯示來自於人類iPS細胞的間葉系幹細胞之藉由2維培養中藤黃屬萃取物之往軟骨細胞之分化誘導所造成的軟骨細胞增殖之結果。於圖3B亦確認到與

圖3A相同的傾向。具體而言，從於陽性對照之10ng/mL BMP7及60μg/mL藤黃屬萃取物相較於無素材(控制組)能使軟骨細胞增殖比率提升一事來看，係顯示了往軟骨細胞之分化誘導活性及增殖活性。

【0068】 於圖3B中一併顯示，以相同濃度(具體而言係60μg/mL)使用藤黃屬萃取物或羥基檸檬酸鈣(HCA・Ca)來作為被驗物質，並與上述相同地進行軟骨細胞數之測量的結果。相同濃度的藤黃屬萃取物及羥基檸檬酸，在對比羥基檸檬酸量時雖然在藤黃屬萃取物的情況下較少，但藤黃屬萃取物的情況相較於HCA・Ca在軟骨細胞增殖比率係顯著地($p<0.05$)提升。亦即，顯示藤黃屬萃取物相較於HCA・Ca係使往軟骨細胞之分化誘導活性及軟骨細胞增殖活性增強。

【0069】 2.二次篩選法(3維培養)

又，除了以30μg/mL之濃度添加藤黃屬萃取物作為被驗物質之外，與試驗例1相同地進行來自於人類骨髓間葉系幹細胞之藉由3維培養的軟骨細胞分化誘導，並進行標本的染色及細胞之形態觀察及紅色面積比之導出。

【0070】 於圖3C中，顯示來自於人類骨髓間葉系幹細胞之藉由3維培養之使用藤黃屬萃取物或羥基檸檬酸鈣(HCA・Ca)的軟骨細胞之形態及紅色面積比。藉由30μg/mL藤黃屬萃取物，與陽性對照之100ng/mL BMP7相同地確認到藉由番紅O之蛋白聚醣染色，而觀察到經分化的軟骨細胞。再者，藉由藤黃屬萃取物，相較於30μg/mL HCA・Ca，蛋白聚醣染色更濃，而觀察到更優異的軟骨細胞分化。

【0071】 試驗例3：由各種羥基檸檬酸類及植物萃取物所引起的軟骨細胞分化誘導活性、軟骨基質產生活性及軟骨細胞增殖活性(in vitro)

【0072】 (木槿屬萃取物之製備)

使木槿屬(洛神花，林奈命名，ruber變種(*Hibiscus sabdariffa* L. var *ruber*) (錦葵科(Malvaceae)))之花瓣乾燥，添加10倍量之含水乙醇。在過濾所得到的萃取液

之後，以旋轉蒸發器進行減壓濃縮，使所得到的濃縮液進一步進行噴霧乾燥。粉碎經乾燥的萃取物，而得到粉末狀的木槿屬萃取物。木槿屬萃取物中的(+)HCA・自由體(亦即(+)別(allo)-羥基檸檬酸自由體)之含量係小於60重量%。

【0073】 (藤黃屬萃取物)

藤黃屬萃取物係使用於試驗例2製備者。

【0074】 (各種羥基檸檬酸類之製備)

(-)HCA・自由體及(-)HCA內酯係以HPLC自藤黃屬萃取物純化。(+)HCA・自由體，亦即(+)別(allo)-羥基檸檬酸自由體，及(+)HCA內酯，亦即(+)別(allo)-羥基檸檬酸內酯體，係遵循日本專利特開2006-306863號公報所記載的方法以管柱層析法自木槿屬萃取物純化。

【0075】 在0.05mM(約10μg/mL之各種HCA類、10μg/mL之藤黃屬萃取物或10μg/mL之木槿屬萃取物的存在下，與試驗例2相同地進行來自於人類骨髓間葉系幹細胞之3維培養。

【0076】 (結果1-軟骨細胞分化誘導活性)

與試驗例1相同地進行經分化的軟骨細胞塊(小粒)之染色結果，導出紅色面積比。將結果示於圖4A。

【0077】 如圖4A所示，在(+)體、(-)體、自由體及內酯體之全部HCA類，以及藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物中，誘導軟骨細胞之分化。

【0078】 (結果2-軟骨基質產生活性)

以100μL之消化酵素木瓜蛋白酶溶液(以100mM磷酸緩衝液pH7.4、5mM L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物(L-cystein hydrochloride monohydrate)、10mM EDTA將Sigma-Aldrich製的木瓜蛋白酶進行可溶化)分解1個軟骨細胞塊(小粒)後，使用GAG定量套組(Blyscan製)針對GAG(醣胺聚醣)量進行測量。成為GAG量越多則軟骨基質產生量越多的指標。將結果示於圖4B。

【0079】 如圖4B所示，(+)體、(-)體、自由體及內酯體之全部HCA類，以及藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物中，相較於控制組確認到GAG量之增加，由此確認到可促進軟骨基質產生。

【0080】 (結果3-軟骨細胞增殖活性)

以消化酵素木瓜蛋白酶分解軟骨細胞塊(小粒)之後，使用Pico Green ds DNA Assay Kit(Invitrogen製)來針對dsDNA(雙股DNA)量進行測量。成為dsDNA越多則軟骨細胞越多量增殖的指標。將結果示於圖4C。

【0081】 如圖4C所示，於藤黃屬萃取物及木槿屬萃取物中，相較於控制組dsDNA量有增加，由此確認到可促進軟骨細胞增殖。

【0082】 試驗例4：藉由藤黃屬萃取物之大鼠膝關節軟骨再生試驗(in vivo)

對大鼠之大腿骨滑車部關節軟骨施以鑽孔(軟骨損傷)後投予藤黃屬萃取物，調查軟骨再生。

【0083】 (試驗對象)

準備10隻8週齡之雌性SD大鼠(日本SLC公司)，在一週間的馴化之後，在左膝關節之大腿骨滑車部之軟骨表面上，使用微鑽頭進行施以1個1.0mm徑的鑽孔及1個1.5mm徑的鑽孔之手術。

【0084】 (試驗日程及試驗法)

對控制組之5隻大鼠投予水，而對試驗組之5隻大鼠以成為2000mg/kg/日(此用量係換算成藤黃屬萃取物之人類等價用量(使用對大鼠之除數6.2，令人類每1人60kg)為19.4g/日)的方式1日1次每日口服投予試驗例1所使用的藤黃屬萃取物。於0日(手術日)、4日、16日進行大鼠之體重測量。自投予開始16日後，解剖全部大鼠，在攝影手術部分之左膝關節軟骨表面之照片後，摘出大腿骨。以4%三聚甲醛-磷酸緩衝液固定後，以70%乙醇脫水後進行石蠟包埋而製作標本。對經製作的標本進行HE染色、愛爾新藍染色及番紅O染色。又，在解剖時自大鼠進行採

血而製備血清後，使用軟骨分解標記C2C及軟骨合成標記CPII市售套組(IBEX公司)來進行定量。

【0085】 (結果1-體重)

於圖5顯示大鼠之體重變化。如圖5所示，於16日間投予水的大鼠及投予藤黃屬萃取物的大鼠觀察體重增加。雖已知藤黃屬萃取物有脂肪燃燒效果、減重(體重減少)效果等，但在本試驗例之條件下，於投予水的大鼠及投予藤黃屬萃取物的大鼠之間的體重變化並未觀察到顯著差異。

【0086】 (結果2-手術部分)

於圖6顯示手術當日(第0日)及手術後16日後(第16日)中的大腿骨滑車部之軟骨表面的手術部分之照片。於圖6中，箭頭所示的部位係穿設有鑽孔之部位。於手術當日的手術部分之照片中，上方孔為1.5mm徑之鑽孔、下方孔為1.0mm徑之鑽孔。在手術後16日後，於投予水的大鼠中，2個孔皆明確確認到開口部，但於投予藤黃屬萃取物的大鼠中，確認到2個孔的開口部已回復成接近於周邊軟骨表面的狀態。

【0087】 (結果3-組織標本解析)

製作橫截滑車部軟骨之2個鑽孔兩者之截面標本。將截面標本的染色影像示於圖7(a)。於圖7(a)中，箭頭所示的部位係穿設有鑽孔的部位。如圖7所示，於投予水的大鼠及投予藤黃屬萃取物的大鼠中缺損部雖皆有被填充，但於投予藤黃屬萃取物的大鼠中表層已被軟骨組織所被覆，而確認到透明軟骨之形成。

【0088】 更具體而言，於HE染色中可視認到細胞核為濃紫色的小點時，於投予藤黃屬萃取物的大鼠可在經填充的鑽孔之表層部顯示細胞核的點，亦即，可確認到有細胞存在。又，由於投予藤黃屬萃取物的大鼠中在表層部形成的組織，在愛爾新藍會被染色成藍色、在番紅O則會被染色成紅色，而可判定其係藉由經分化/增殖的軟骨細胞構成的軟骨組織，但在投予水的大鼠中於鑽孔之穿設部分

並未確認到顯示軟骨組織之染色。

【0089】 又，將計測鑽孔之殘存深度之結果示於圖7(b)。如圖7(b)所示，5隻投予水之大鼠中的平均值為105μm，相對於此，5隻投予藤黃屬萃取物之大鼠中的平均值則為32μm(有$p<0.01$之顯著差異)。

【0090】 從以上結果可確認到，藉由投予藤黃屬萃取物，可促進軟骨組織之再生，而可治療軟骨損傷。藉由投予藤黃屬萃取物所得促進軟骨再生之機制雖並不確定，但可思考是骨髓中的間葉系幹細胞(MSC)自鑽孔集積到缺損部位，且其藉由藤黃屬萃取物而被分化誘導成軟骨細胞，而顯示軟骨組織之再生的可能性。

【0091】 (結果4-血中軟骨代謝標記測量)

將血中之軟骨合成標記(CPII)量及軟骨分解標記(C2C)量之測量結果示於圖8。如圖8所示，藉由投予藤黃屬萃取物，相較於投予水，可確認到軟骨合成標記量之顯著增加及軟骨分解標記之顯著減少(有$p<0.05$之顯著差異)。亦即，於藤黃屬萃取物確認到軟骨合成作用及軟骨分解抑制作用兩者。

【0092】 試驗例5：藉由藤黃屬萃取物對大鼠變形性膝關節症誘發模式之發病預防試驗(in vivo)

調查對藉由切斷大鼠膝關節之內側副韌帶而誘發因關節不穩定性所引起的關節軟骨變性的模式，投予藤黃屬萃取物或葡萄糖胺時之軟骨再生。

【0093】 (試驗對象)

準備14隻8週齡之雌性SD大鼠(日本SLC公司)，在一週之馴化後，切開左膝關節內側，以名古屋學院大學論集, (日本), 2018, 6, p1-9.為準，進行施以內側副韌帶之切斷的手術(OA手術)。

【0094】 (試驗日程及試驗法)

對2隻大鼠不進行投予而投予水(控制組)；以成為258mg/kg/日(此用量係換算

成藤黃屬萃取物之人類等價用量(使用對大鼠之除數6.2，令人類每1人60kg)為2.5g/日)的方式，從OA手術隔日開始對6隻大鼠1日1次、每日口服投予試驗例1所使用的藤黃屬萃取物；以成為258mg/kg/日的方式對其他6隻大鼠1日1次、每日口服投予葡萄糖胺。從投予開始28日後進行解剖而摘出左大腿骨而進行組織標本解析。

【0095】(結果-組織標本解析)

製作左大腿骨的膝關節軟骨之截面標本。將截面標本的番紅O染色影像示於圖9。如圖9所示，2隻投予水的大鼠之應會以番紅O染色成紅色的關節軟骨皆已消失。另一方面，投予藤黃屬萃取物的大鼠，有4隻確認到以番紅O染色成紅色的關節軟骨，因此確認到軟骨變性被抑制。又，投予葡萄糖胺的大鼠則僅有2隻保有關節軟骨。

【0096】由以上結果顯示，在由關節不穩定性所造成的軟骨變性之抑制，藤黃屬萃取物側比葡萄糖胺更為有效。此結果顯示藤黃屬萃取物之軟骨分解抑制作用，且認為是與軟骨合成促進作用一起維持關節軟骨。

【0097】試驗例6：藉由藤黃屬萃取物對於小鼠膝軟骨變性促進模式之軟骨再生試驗(in vivo)

調查對小鼠膝軟骨變性促進模式投予相同用量的羥基檸檬酸(HCA)及藤黃屬萃取物的情況之軟骨再生。

【0098】(試驗對象)

遵循Osteoarthritis Cartilage, 2012, 20(8), 887-895. DOI:10.1016/j.joca.2012.04.012，使用跑步機裝置(帶式運送機，室町機械製)，在20m/分、20分/日的條件下，使小鼠強制步行傾斜15度的上坡2週，而促進膝關節軟骨之變性。藉此，構築模擬接近於人類隨著年齡增長的軟骨變性(亦即膝軟骨磨損症狀)之無外科手術的動物實驗模式。

【0099】 (試驗日程及試驗法)

以512mg/kg/日之用量(此用量換算成羥基檸檬酸或藤黃屬萃取物之人類等價用量(使用對小鼠之除數12.3，令人類每1人60kg)皆為2.5g/日)口服投予羥基檸檬酸或藤黃屬萃取物8週。8週之投予結束後進行解剖並採血，對右大腿骨之關節軟骨組織製作番紅O染色標本。將組織標本解析之結果示於圖10。

【0100】 又，觀察圖10之膝關節截面標本，針對(1)番紅O(紅色)之染色強度、(2)糜爛之形成程度、(3)龜裂之形成(粗糙化)程度、(4)表層之消失量、(5)細胞排列(柱)之不整齊程度、(6)軟骨細胞之消失量及(7)軟骨下骨之暴露量，以0~4分之5階段來計分化。無軟骨變性之正常狀態的情況為0分，軟骨完全消失之疾病狀態的情況為28分。將計分化之結果示於圖11。

【0101】 再者，與前述試驗例3及4相同地進行，測量小鼠的血中之軟骨合成標記(CPII)量及軟骨分解標記(C2C)量。將結果示圖12。

【0102】 (結果)

如從圖10可清楚瞭解到，在羥基檸檬酸投予及藤黃屬萃取物投予之任一情況下，亦可確認到透明軟骨之形成及關節軟骨組織之再生。

【0103】 又，如從圖11可清楚瞭解到，相較於水投予，於羥基檸檬酸及藤黃屬萃取物投予，從軟骨變性計分較小來看，確認到軟骨組織再生。特別是藤黃屬萃取物投予之軟骨變性計分，相較於羥基檸檬酸投予的情況係顯著更小($p<0.05$)，由此可確認有更加優異的軟骨組織再生。

【0104】 此外，如從圖12可清楚瞭解到，在羥基檸檬酸投予及藤黃屬萃取物投予之任一情況下，亦可確認到軟骨合成標記量之增加及軟骨分解標記之減少。特別是，藉由藤黃屬萃取物投予，相較於羥基檸檬酸投予，確認到軟骨合成標記量之更進一步的增加及軟骨分解標記之更進一步的減少。亦即，在相同用量下，在對比羥基檸檬酸用量時在藤黃屬萃取物的情況下雖較少，但確認到藤黃屬

萃取物的情況有比羥基檸檬酸更強的軟骨合成作用及軟骨分解抑制作用。

【0105】依據Stem Cells International, 2017, Article ID 9312329, DOI: 10.1155/2017/9312329，已證明人類之膝關節及髖關節之滑膜及關節液中存在有間葉系幹細胞(MSC)。認為在無外科的手術之藉由小鼠強制步行之膝關節軟骨變性促進模式中，依據藉由投予藤黃屬萃取物而使滑膜及關節液中的MSC分化成軟骨細胞，有呈現軟骨組織再生的可能性。由以上可認為，即便在人類之年齡增長性的自然軟骨磨損中，藉由攝取藤黃屬萃取物可促進軟骨組織再生。

【0106】試驗例7：藉由藤黃屬萃取物對小鼠膝軟骨變性促進模式之軟骨再生的羥基檸檬酸用量依賴性(in vivo)

除了將藤黃屬萃取物(羥基檸檬酸含量為60重量%)之用量設為0mg/kg/日、103mg/kg/日、206mg/kg/日或512mg/kg/日之外，與試驗例6相同地進行對小鼠膝軟骨變性促進模式之軟骨再生試驗，並進行軟骨變性計分之導出及血中之軟骨合成標記(CPII)之測量。

【0107】再者，於本試驗例中對小鼠投予的藤黃屬萃取物之用量0mg/kg/日、103mg/kg/日、206mg/kg/日及512mg/kg/日，以羥基檸檬酸換算量計，分別為0mg/kg/日、62mg/kg/日、124mg/kg/日及307mg/kg/日。其等之用量，換算成藤黃屬萃取物之人類等價用量(使用對小鼠之除數12.3，令人類每1人60kg)分別為0g/日、0.5g/日、1g/日及2.5g/日，且換算成羥基檸檬酸之人類等價用量(使用對小鼠之除數12.3，令人類每1人60kg)分別會成為0g/日、0.3g/日、0.6g/日及1.5g/日。將軟骨變性計分及血中之軟骨合成標記(CPII)濃度與羥基檸檬酸之人類等價用量之關係示於圖13。

【0108】如從圖13可清楚瞭解到，於羥基檸檬酸用量與軟骨合成效果及軟骨組織再生效果的程度之關係，確認到相同於圖1C所示的對細胞暴露的羥基檸檬酸濃度與軟骨基質產生效果及細胞增殖效果之關係的傾向。具體而言，從圖13

之結果可確認到，用於軟骨合成及軟骨組織再生之較佳藤黃屬萃取物的羥基檸檬酸人類等價用量之範圍為0.3g~1.5g/日，特別是在0.6g/日的情況下可確認到最高的軟骨合成效果及軟骨組織再生效果。

【符號說明】

無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種軟骨再生促進劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

【請求項2】 如請求項1之軟骨再生促進劑，其中前述羥基檸檬酸為(-)羥基檸檬酸及/或(+)別(allo)-羥基檸檬酸。

【請求項3】 如請求項1之軟骨再生促進劑，其中前述羥基檸檬酸為非內酯體及/或內酯體。

【請求項4】 如請求項1之軟骨再生促進劑，係用於軟骨之合成促進。

【請求項5】 如請求項1至4中任一項之軟骨再生促進劑，含有：包含前述羥基檸檬酸及/或其鹽之植物萃取物。

【請求項6】 如請求項5之軟骨再生促進劑，其中前述植物萃取物為藤黃屬萃取物。

【請求項7】 如請求項5之軟骨再生促進劑，其中前述植物萃取物為木槿屬萃取物。

【請求項8】 如請求項1之軟骨再生促進劑，係用於軟骨損傷之治療或預防。

【請求項9】 如請求項1之軟骨再生促進劑，其對人類之用量，以羥基檸檬酸換算量計為0.3g~1.5g/日/60kg。

【請求項10】一種軟骨細胞分化促進劑，其促進自未分化細胞往軟骨細胞的分化，且含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

【請求項11】如請求項10之軟骨細胞分化促進劑，其中前述羥基檸檬酸為(-)羥基檸檬酸及/或(+)別(allo)-羥基檸檬酸。

【請求項12】如請求項10或11之軟骨細胞分化促進劑，其中前述羥基檸檬酸為非內酯體及/或內酯體。

【請求項13】如請求項10之軟骨細胞分化促進劑，含有：包含前述羥基檸檬

酸及/或其鹽之植物萃取物。

【請求項14】如請求項13之軟骨細胞分化促進劑，其中前述植物萃取物為藤黃屬萃取物。

【請求項15】如請求項13之軟骨細胞分化促進劑，其中前述植物萃取物為木槿屬萃取物。

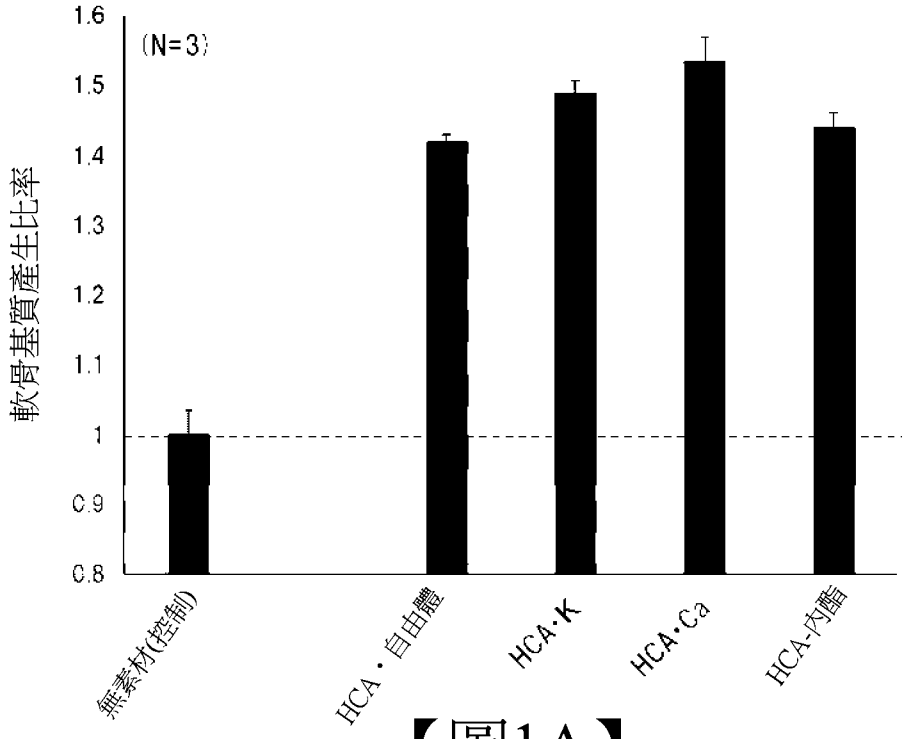
【請求項16】如請求項10至15中任一項之軟骨細胞分化促進劑，其使細胞暴露於以羥基檸檬酸換算量計0.08~0.4mM之濃度下。

【請求項17】一種軟骨之分解抑制劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

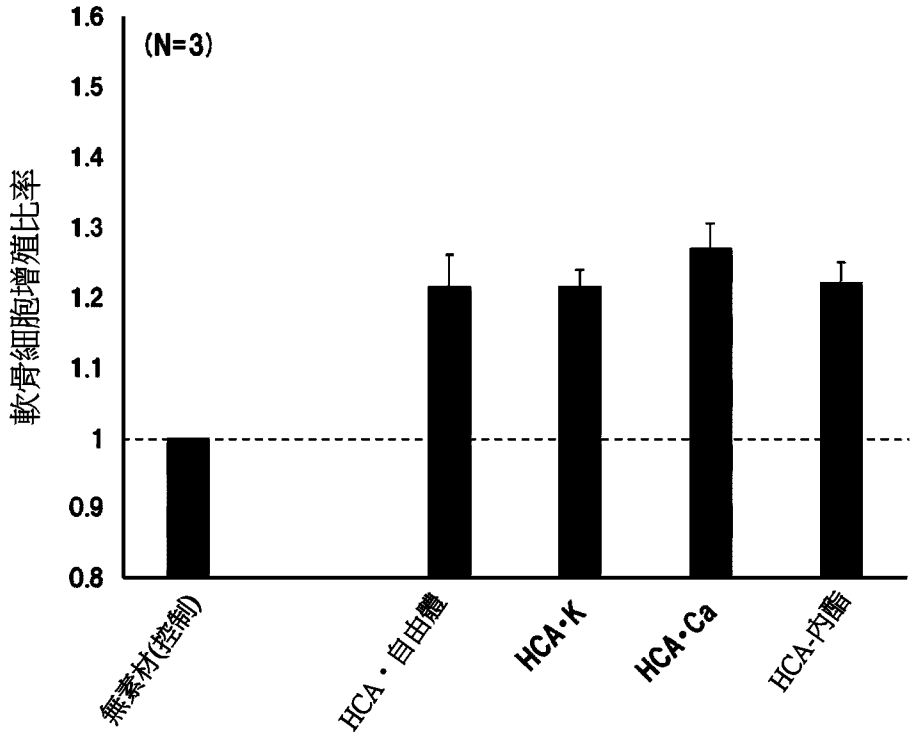
【請求項18】一種用於維持軟骨厚度之保護劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

【請求項19】一種關節之疼痛、不協調感及/或不適感之緩和劑，含有羥基檸檬酸及/或其鹽。

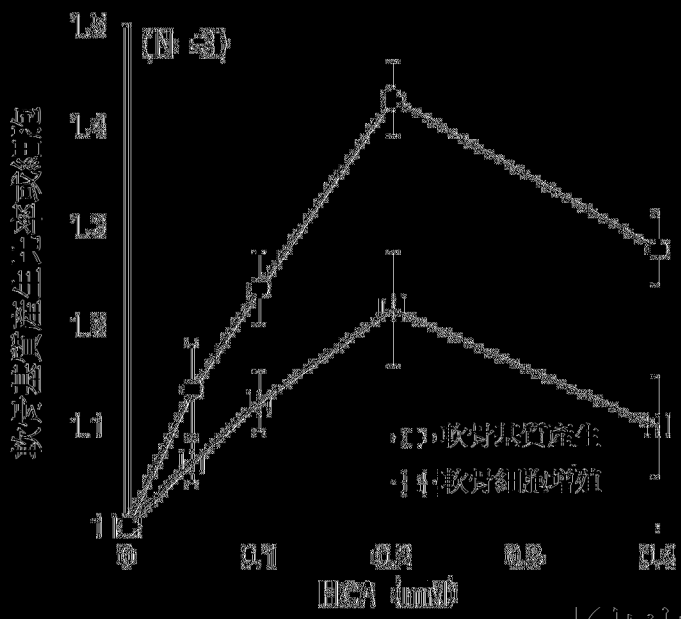
【發明圖式】


(N=3)
軟骨基質產生比率
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
無素材(控制)
HCA・自由體
HCA・K
HCA・Ca
HCA-內酯

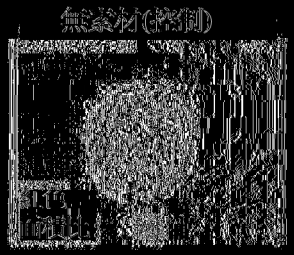
【圖1A】

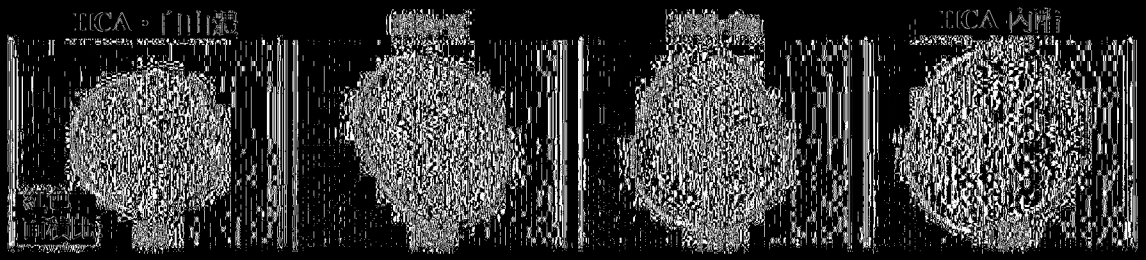

(N=3)
軟骨細胞增殖比率
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1
0.9
0.8
無素材(控制)
HCA・自由體
HCA-K
HCA-Ca
HCA-內酯

【圖1B】

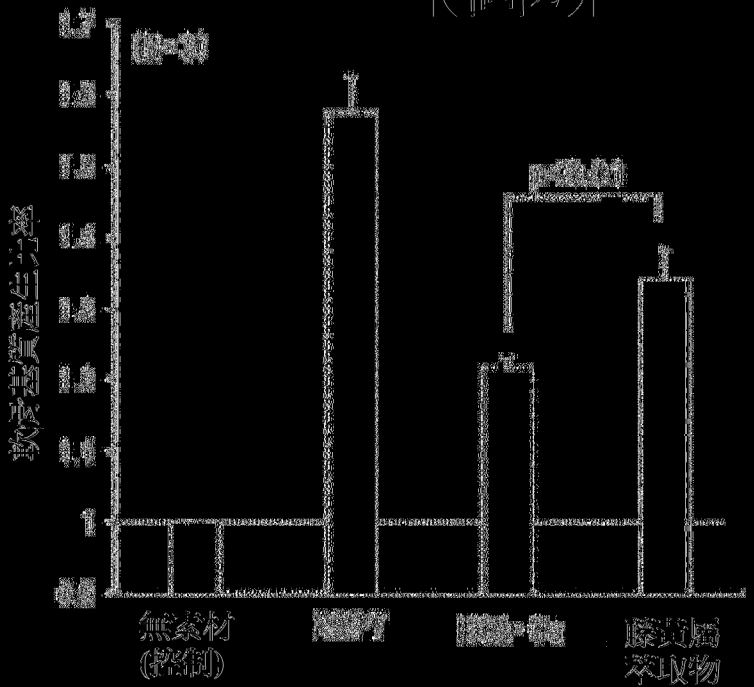

(倍率)
1.8
1.4
1.2
1.3
1.1
1
0
0.1
0.2
0.3
0.4
HCA (mM)
・□・軟骨基質産生
・■・軟骨細胞増殖

(図1C)

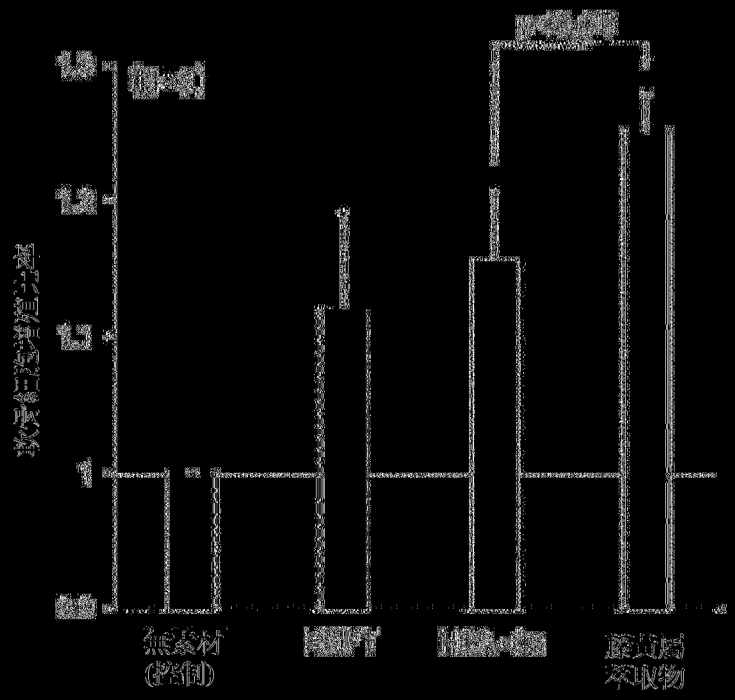

無添加(陰性)


HCA・低濃度
HCA・高濃度

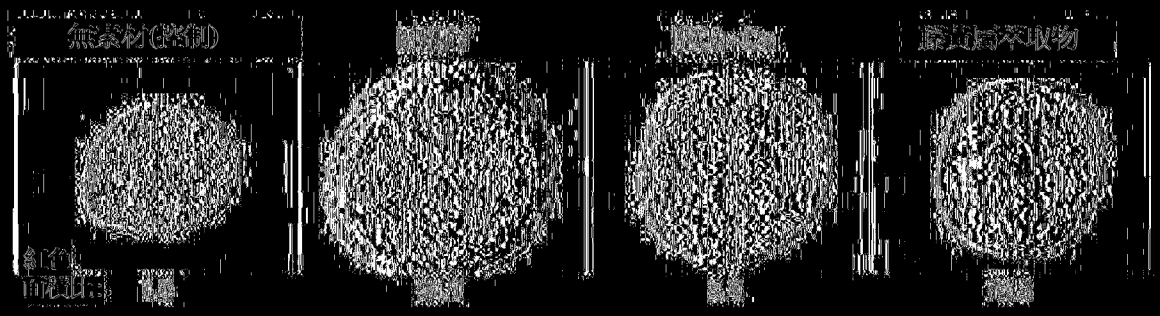
(図2)


(倍率)
1.2
1.1
1.3
1.6
1.5
1.4
1
0.9
無添加
(陰性)
HCA
ヒト胎盤
抽出物

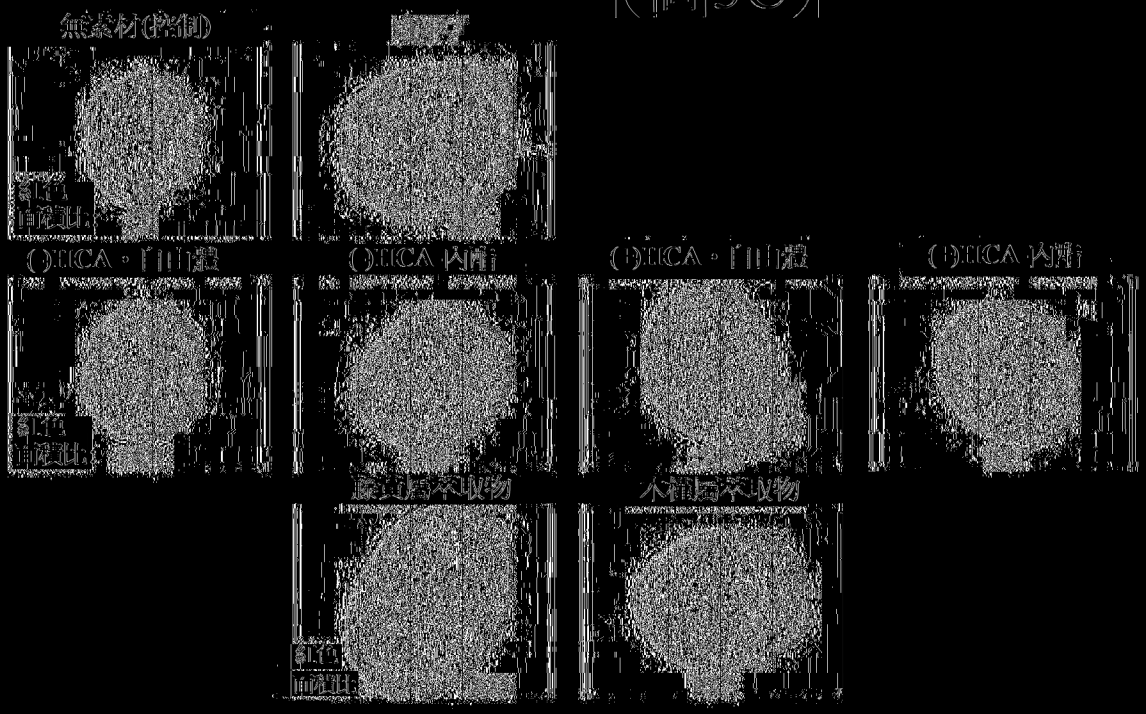
(図3A)


無素材
(控制)
酸黃酮萃取物

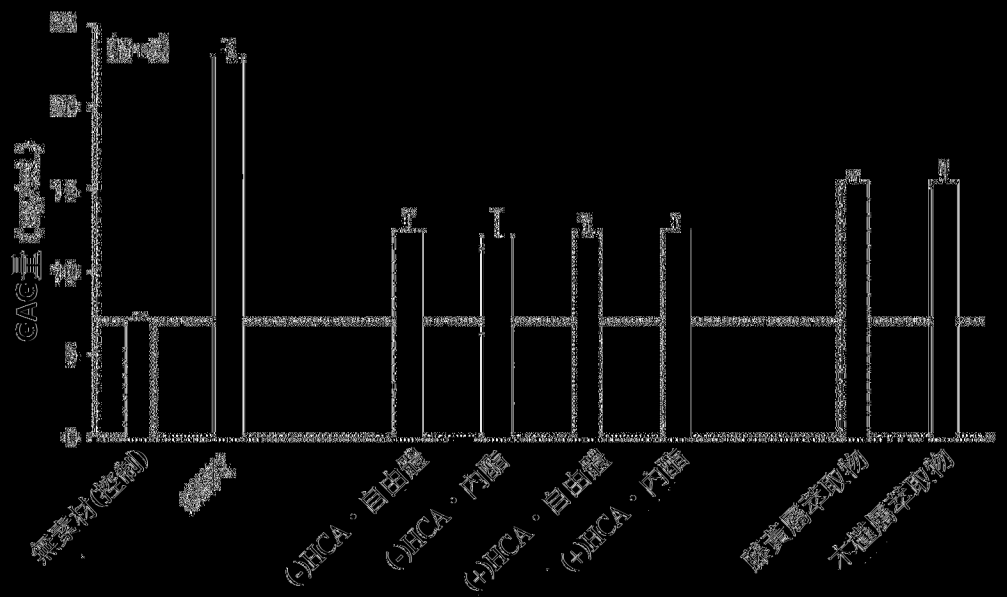
圖(3B)


無素材(控制)
酸黃酮萃取物

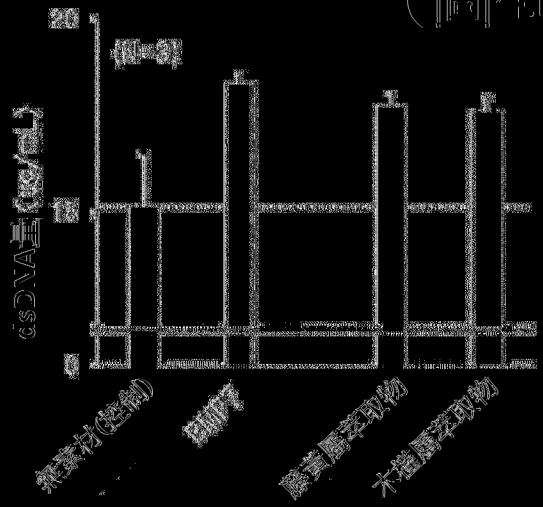
圖(3C)


無素材(控制)
(3)ICA・門冬素
(3)ICA 內酯
(3)ICA・門冬素
(3)ICA 內酯
酸黃酮萃取物
木質素萃取物

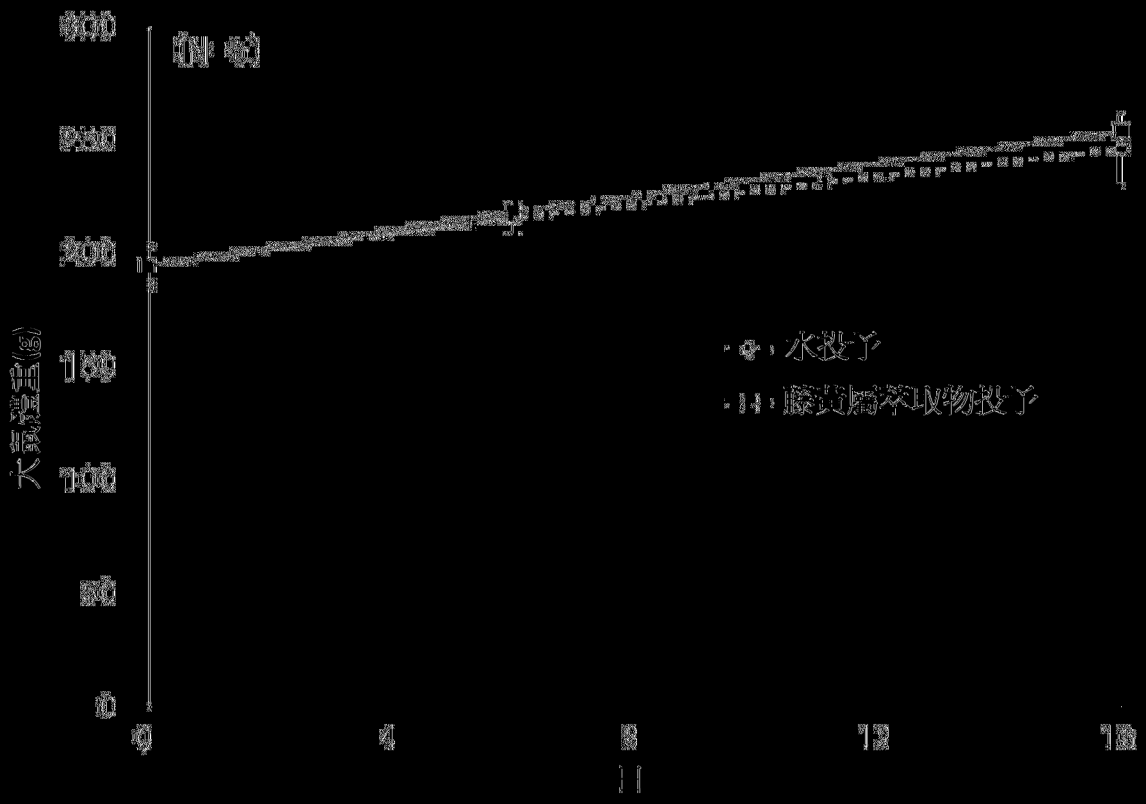
圖(4A)


GAGE量
(ng/mL)
無菌対(空制)
(-)HCA，自由態
(-)HCA，内酯
(+)HCA，自由態
(+)HCA，内酯
豚黄属茎取物
木蓮属茎取物

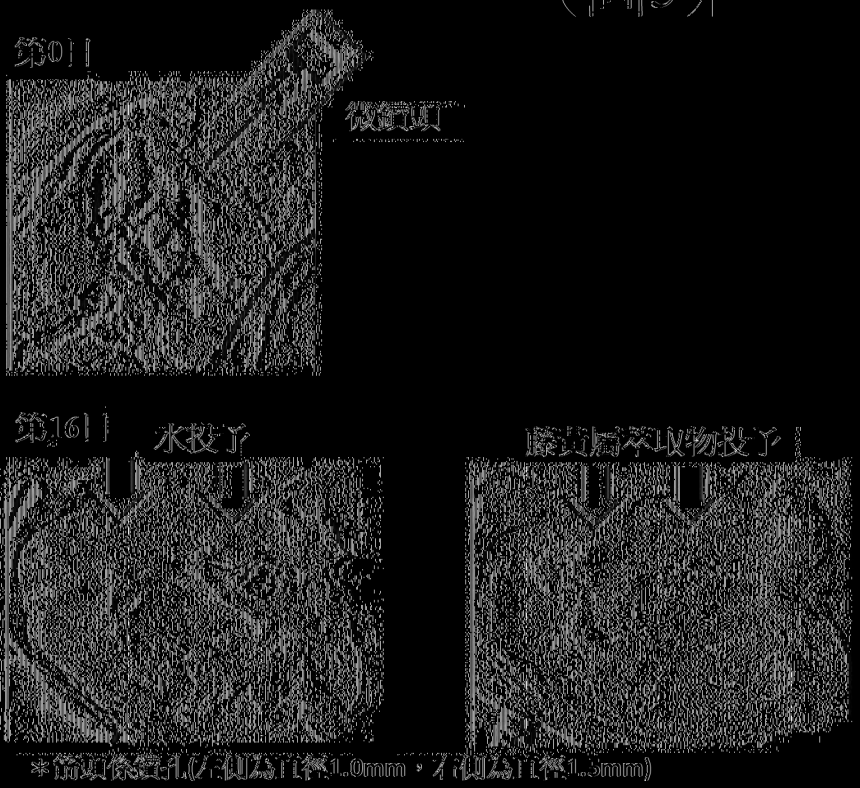
(図4B)


GSVA量
無菌対(空制)
豚黄属茎取物
木蓮属茎取物

(図4C)



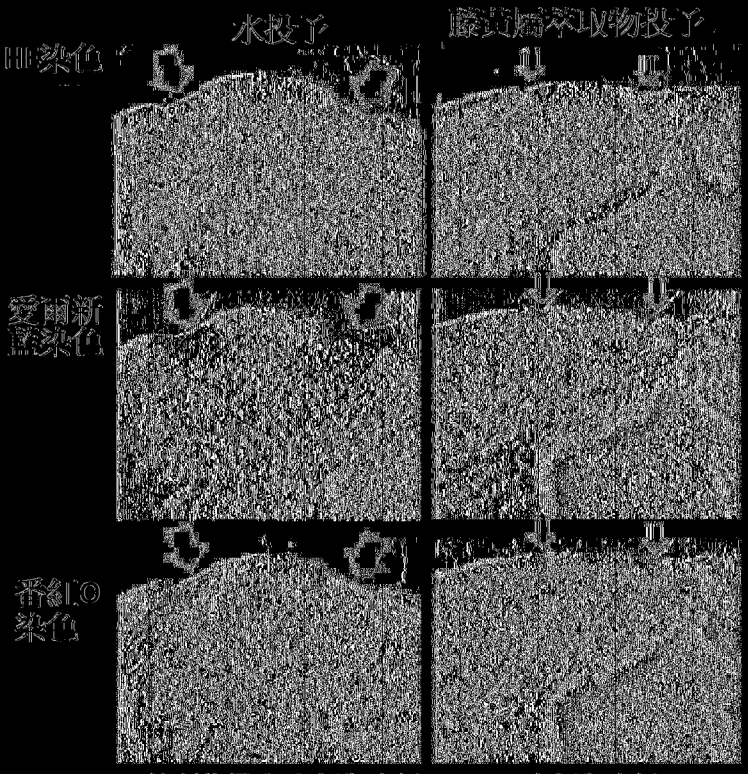
(図5)



*添付条件(左山芯TE幅1.0mm・右山芯TE幅1.3mm)

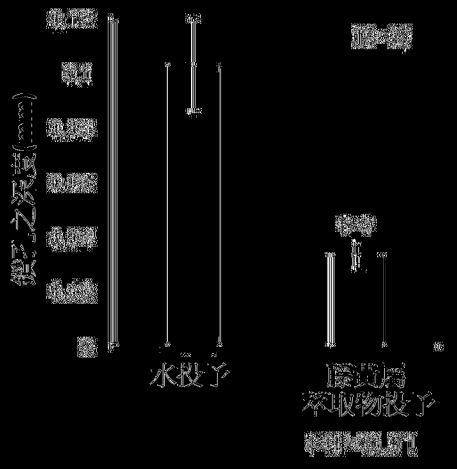
(図6)

(a)

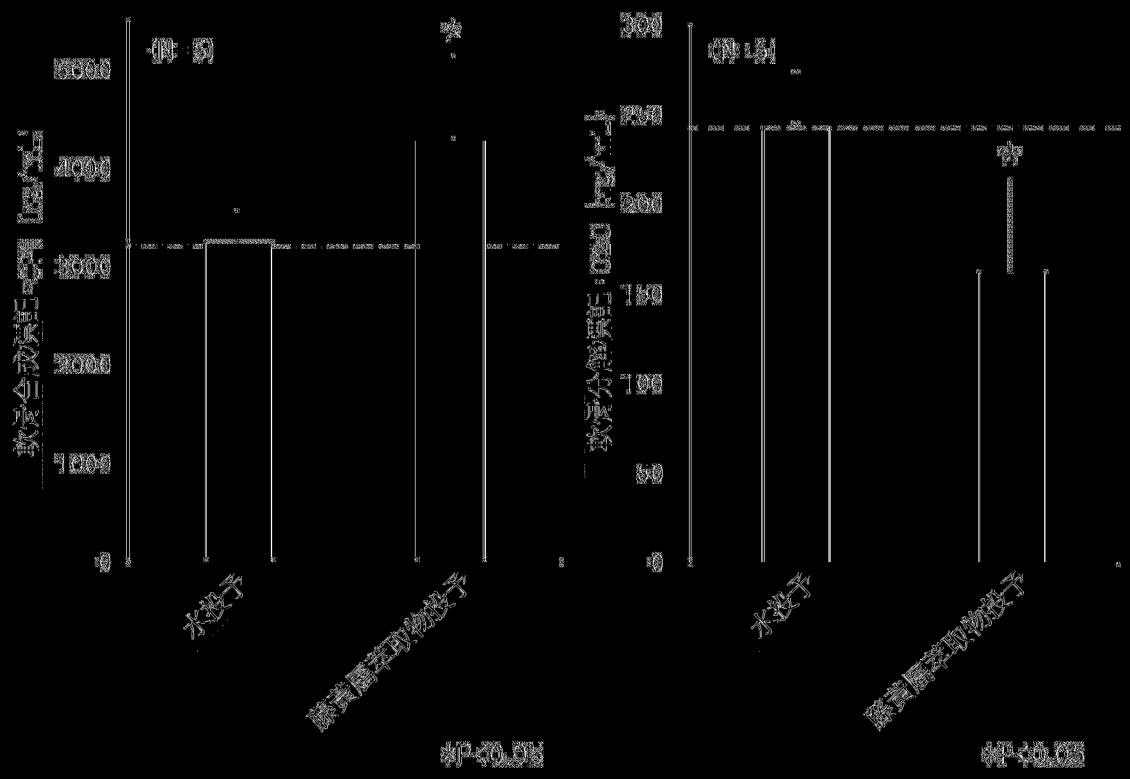


＊筒頂係濾孔(左側為直徑1.0mm，右側為直徑1.3mm)

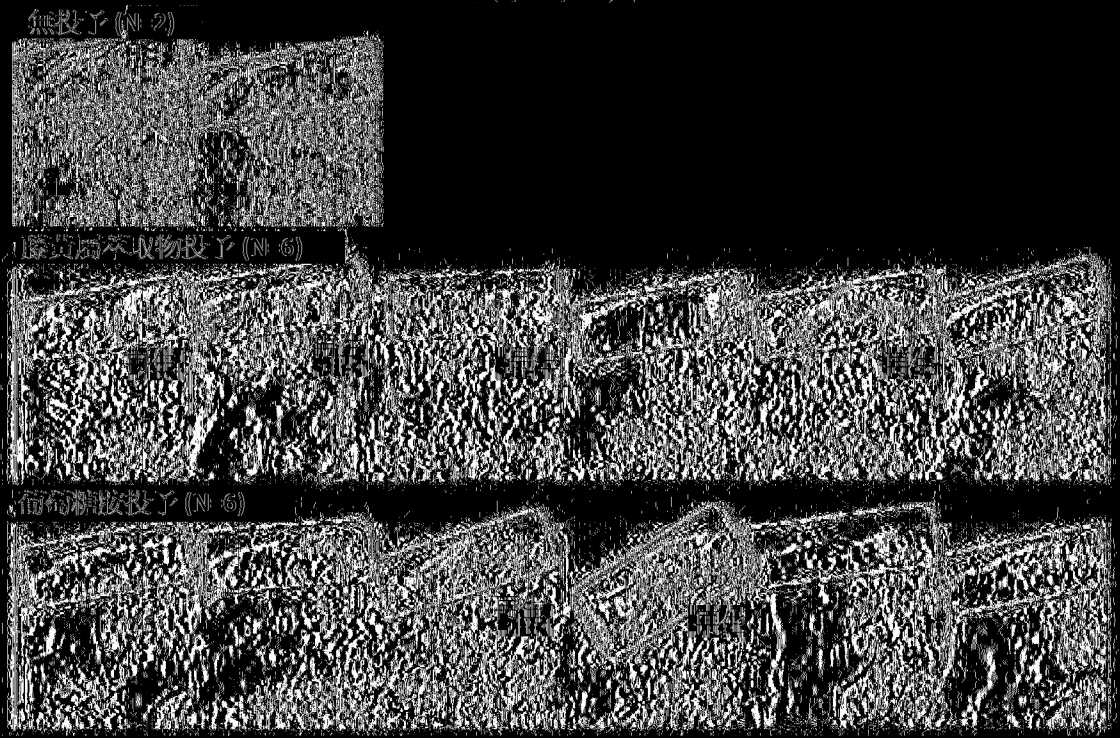
(b)



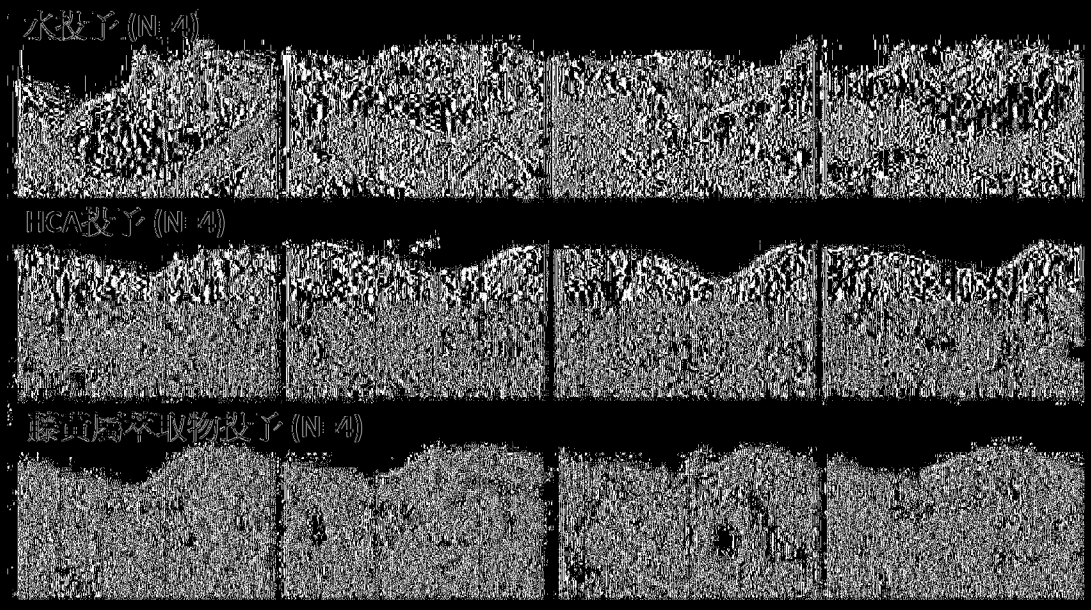
(圖7)


(N= 5)
(N= 5)
水投予
膵臓腫瘍担癌物投予
水投予
膵臓腫瘍担癌物投予

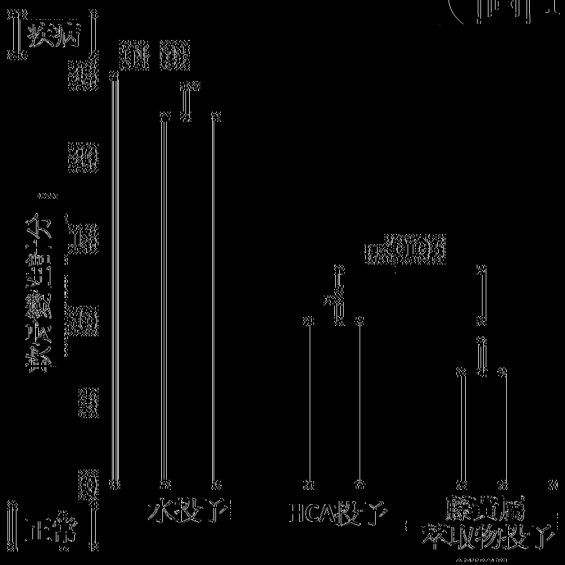
(図8)


無投予(N= 2)
膵臓腫瘍担癌物投予(N= 6)
前肢潰瘍投予(N= 6)

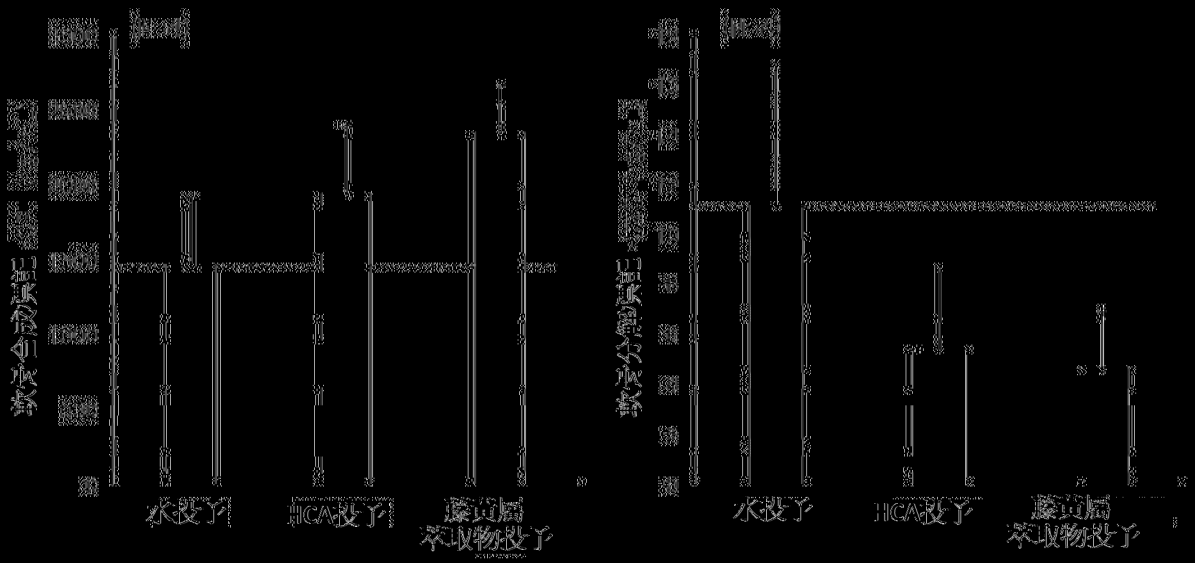
(図9)


水投予 (N=4)
HCA投予 (N=4)
膵臓局所抽出物投予 (N=4)

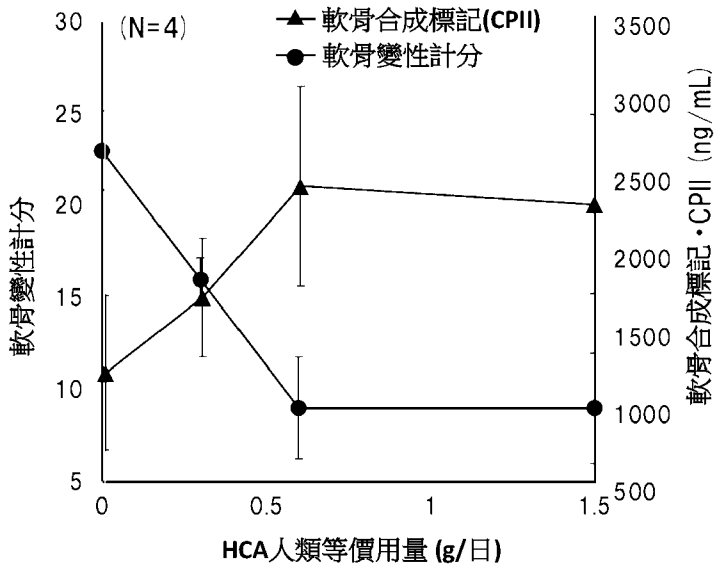
(図10)


水投予
HCA投予
膵臓局
所抽出物投予

(図11)


水投予
HCA投予
膵臓局
所抽出物投予
水投予
HCA投予
膵臓局
所抽出物投予

(図12)


(N=4)
軟骨合成標記(CPII)
軟骨變性計分
軟骨變性計分
軟骨合成標記・CPII（ng/mL）
HCA人類等價用量 (g/日)
30
25
20
15
10
5
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0.5
1
1.5

【圖13】