



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년03월09일
 (11) 등록번호 10-0946822
 (24) 등록일자 2010년03월03일

(51) Int. Cl.
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/343* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2004-7017557
 (22) 출원일자 2002년05월02일
 심사청구일자 2007년04월25일
 (85) 번역문제출일자 2004년11월01일
 (65) 공개번호 10-2004-0101576
 (43) 공개일자 2004년12월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/JP2002/004407
 (87) 국제공개번호 WO 2003/092666
 국제공개일자 2003년11월13일
 (30) 우선권주장
 JP-P-2002-00130154 2002년05월01일 일본(JP)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP01903330 B
 JP01903331 B
 JP13114675 A
 EP1127572 A2

(73) 특허권자
 가부시끼가이샤 하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조
 일본국 오카야마켄 오카야마시 기타구 시모이시이 1쥬메 2-3
 (72) 발명자
 미야케 마사키
 일본국 오카야마켄 오카야마시 시모이시 1쥬메 2-3, 가부시끼가이샤하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조 내
 우시오 심페이
 일본국 오카야마켄 오카야마시 시모이시 1쥬메 2-3, 가부시끼가이샤하야시바라 세이부쓰 가가꾸 겐꾸조 내
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 김기중, 서장찬, 최재철

전체 청구항 수 : 총 1 항

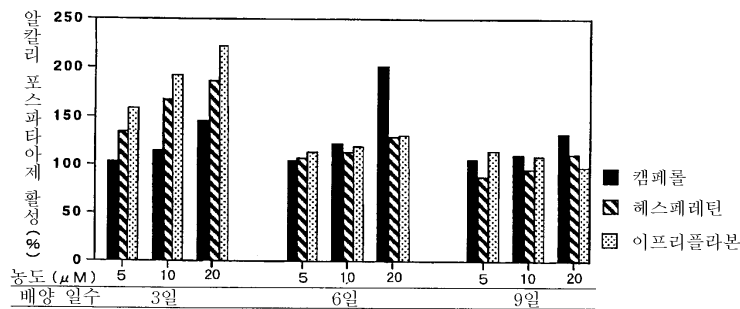
심사관 : 김성길

(54) 칼슘 함유 조직 강화제 및 그 용도

(57) 요약

칼슘 함유 조직을 강화하는 작용을 가지고, 안전하게 사용할 수 있는 제(劑)와 그 용도를 제공하는 것을 과제로 하고, 플라본류, 플라보놀류, 플라바논류, 플라바노놀류, 안토시아닌류, 플라바놀류, 칼콘류 또는 오론(aurone)류를 1종 또는 2종 이상을 함유하는 것을 특징으로 하는 칼슘 함유 조직 강화제를 제공함으로써 상기 과제를 해결한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이와키간소

일본국 오카야마켄 오카야마시 시모이시 1쵸메
2-3, 가부시끼가이샤하야시바라 세이부쓰 가가꾸
켄꾸조 내

구리모토마사시

일본국 오카야마켄 오카야마시 시모이시 1쵸메
2-3, 가부시끼가이샤하야시바라 세이부쓰 가가꾸
켄꾸조 내

특허청구의 범위

청구항 1

유효성분으로서, 퀘페롤, 케르세틴, 루틴, α-글리코실루틴, 헤스페레틴, 헤스페리딘 또는 α-글리코실헤스페리딘으로부터 선택되는 플라보노이드와 함께, 이프리플라본을 각각 20 μM 이상의 유효량 병용하는 것을 특징으로 하는, 전골아세포로부터 골아세포로의 분화 유도를 촉진하는, 골다공증 및 골절의 치료, 예방 및 회복을 위한 촉진제.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 뼈 또는 이의 조직 등의 칼슘 함유 조직에 있어서의 칼슘량을 증가시키는 데에 사용할 수 있는 칼슘 함유 조직 강화제 및 그 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 고령화에 따라, 뼈나 이 등의 칼슘 함유 조직의 취약화가 일어난다. 뼈조직에 있어서는 끊임없이 뼈형성과 뼈흡수가 이루어지고 있어, 통상, 젊을 때에는 뼈형성과 뼈흡수의 밸런스가 잡혀 있다. 그러나, 극단적인 다이어트나 나이 먹음에 따른 호르몬의 언밸런스 등, 여러 가지의 원인에 의해 뼈형성과 뼈흡수의 밸런스가 무너져서 뼈흡수로 기울어져 간다. 이 상태가 오래 계속되면, 뼈나 이 등의 칼슘 함유 조직으로부터 중요한 구성 성분인 칼슘이 감소하여 골다공증, 골절, 요통 등의 뼈질환, 혹은 충치, 치주병 등의 이(齒) 질환을 발생하기 쉬워진다.

[0003] 생체 내의 칼슘은, 칼슘 함유 조직에 있어서는, 히드록시아파타이트 등의 인산 칼슘염의 형태로 고체상태로 존재하여 뼈 및 이를 형성하고, 그것들의 조직을 강화하는 역할을 할 뿐만 아니라, 신체에 있어서 필요한 칼슘 이온의 공급원이 되어 있다. 일본국의 칼슘 섭취량은 부족 기미가 있어, 칼슘을 강화한 각종 건강 음식물이 시판되고 있다. 그러나, 단순히 칼슘을 섭취한 것만으로는, 흡수효율의 점에서 좋은 효과는 바랄 수 없고, 또한, 지나치게 섭취했을 경우에는 고칼슘 혈장에 빠질 위험성도 있어, 칼슘의 섭취 방법에는 신중을 요한다. 따라서, 뼈나 이 등의 칼슘 함유 조직에 칼슘을 침착시키기 위해서, 영양소로서 적당한 칼슘을 섭취하고, 흡수·대사를 더욱 좋게 하기 위해서 마그네슘 등의 기타 미네랄의 섭취가 권장되고 있으나 그 효과는 충분하지 않다. 또한, 상기 미네랄에 더하여 비타민 D, 칼시토닌 제제, 에스트로젠 제제, 단백질 동화 호르몬 제제, 비스포스포네이트 등의 유성 비타민이나 호르몬제를 투여하는 것도 실시되고 있다. 이 방법은, 간단히 미네랄을 섭취하는 것보다는 효과적이지만, 유용성(油溶性) 비타민제나 호르몬제를 사용할 경우, 그 투여 스케줄이 번잡해서 과잉투여 등에 의한 부작용의 우려도 있어, 반드시 만족스러운 방법이라고는 할 수 없는 상황이다.

[0004] 본 발명은, 무독하고, 안전하며 또한 작용 효과가 높은 칼슘 함유 조직 강화제와 이것을 배합해서 되는 음식물, 화장품 및 의약품 등의 용도를 제공하는 것을 과제로 한다.

발명의 상세한 설명

[0005] 본 발명자들이 식물성분에 착안하여서 예의 검색한 결과, 의외로, 다음에 설명하는 일반식 1 내지 5 중에서 어느 하나의 식으로 나타내어지는 기본구조를 가진 물질 또는 그 전구체(이후, 본 명세서에서는 일반식 1 내지 5의 물질이라 기술할 경우도 있음.)는 동물의 칼슘 대사를 칼슘 침착(沈着) 방향으로 유도하여, 칼슘 함유 조직에 칼슘을 침착시켜 조직을 강화하고, 그 결과, 뼈중량을 증가시키는 것을 발견하였다. 더욱이, 이소플라본류를, 일반식 1 내지 5의 물질과 함께 사용하면, 동물의 칼슘 대사를 칼슘 침착 방향으로 유도하고, 칼슘 함유 조직에 칼슘을 침착시켜 조직을 강화하여, 그 결과 뼈중량을 증가시키는 것을 발견하여 본 발명에 이르렀다.

[0006] 즉, 본 발명은, 유효성분으로서, 일반식 1 내지 5의 물질, 예를 들면, 플라본류, 플라보놀류, 플라바논류, 플라바노놀류, 안토시아닌류, 플라바놀류, 칼콘류 또는 오론(aurone)류, 또는 그 전구체를 1종 또는 2종 이상을 함유하는 칼슘 함유 조직 강화제를 제공하는 것이다.

[0007] 더욱이 본 발명은, 상기 물질과 함께 이소플라본류를 함유하는 칼슘 함유 조직 강화제를 제공하는 것이다.

[0008] 더욱이 본 발명은, 상기 칼슘 함유 조직 강화제를 배합해서 되는 음식물, 화장품, 의약품 등에 대한 용도를 제

공하는 것이다.

산업상 이용 가능성

[0149] 일반식 1 내지 5의 물질 또는 그 전구체(前驅體)를 함유하는 칼슘 함유 조직 강화제는, 전골아세포 혹은 골아세포에 있어서 강한 칼슘 침착활성을 나타내고, 더욱이 그 작용은 이소플라본류를 첨가함으로써 상승적으로 현저하게 증강되므로, 뼈성장 및 뼈형성 촉진 효과 및 뼈의 양 증가 효과를 가지고, 건강보조 식품, 보건기능 식품 등의 건강식품에 함유시켜서 섭취할 수 있을 뿐만 아니라, 일상적으로 먹는 음식물로서도 위화감 없이 용이하게 섭취할 수 있다. 본 발명의 칼슘 조직 강화제는, 특히 고령자의 뼈나 이(齒)의 약체화를 막는 동시에, 골다공증의 치료 및 예방에도 유용하다. 또한, 젊은층에 있어서도, 식생활의 변조에 의해 나타나는 뼈성장이나 뼈형성의 지연을 예방하는 데도 높은 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 알칼리 포스파타아제 활성증강 작용에 있어서의 캠페롤, 헤스페레틴 또는 이프리플라본의 각 농도에서의 경일(經日) 변화를 나타내는 그래프.

[0010] 도 2는 칼슘 침착 증강 작용에 있어서의 캠페롤 또는 이프리플라본의 각 농도에서의 경일 변화를 나타내는 그래프.

[0011] 도 3은 칼슘 침착증강 작용에 있어서의 캠페롤과 이프리플라본의 각 농도에서의 병용효과에 대해서 나타내는 그래프.

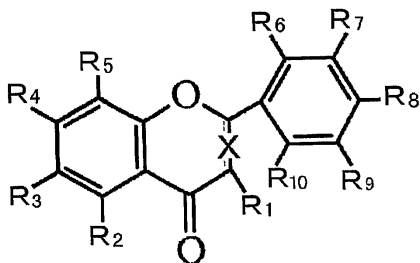
[0012] 도 4는 칼슘 침착증강 작용에 있어서의 헤스페레틴과 이프리플라본의 각 농도에서의 병용효과에 대해서 나타내는 그래프.

[0013] [발명을 실시하기 위한 최선의 형태]

[0014] 본 발명의 실시의 형태에 대해서 설명하면, 본 발명에 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질은, 원래, 식물성분으로서 널리 분포해 있는 플라보노이드에 속하는 물질이다. 일반식 1의 기본구조를 가진 물질은, 플라본류, 플라보놀류, 플라바논류, 플라바노놀류로 호칭되는 것이며, 예를 들면, R₁이 수소원자이고, 또한 X가 2중 결합인 것을 특징으로 하는 플라본류, R₁이 히드록시기(혹은 어떠한 당류에 의해 배당화(配糖化)되어 있는 것도 포함한다)이고, 또한 X가 2중 결합인 것을 특징으로 하는 플라보놀류, R₁이 수소원자이고, 또한 X가 단결합인 것을 특징으로 하는 플라바논류, R₁이 히드록시기(혹은 어떠한 당류에 의해 배당화되어 있는 것도 포함한다)이고, 또한 X가 단결합인 것을 특징으로 하는 플라바노놀류로 호칭된다.

[0015] 본 발명에서는, 일반식 1의 기본구조를 가진 물질로서 표 1에 나온 물질을 사용할 수 있다. 또한 표 1 중에서, H는 수소원자, OH는 히드록시기, OCH₃은 메톡시기, OGlu는 배당화된 글루코오스, ORha는 배당화된 람노오스, ORut는 배당화된 루티노오스를 나타낸다.

[0016] 일반식 1:



[0017]

[0018] (식 중에서, X는 단결합 또는 2중 결합을 나타내고, R₁ 내지 R₁₀은 임의의 치환기를 나타낸다.)

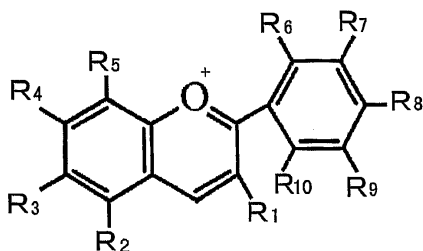
[0019] [표 1]

	명칭	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	X
플라보논	플라보논	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	2중결합
	글리신	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H	2중결합
	아피게닌	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	2중결합
	루테올린	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	2중결합
	아카세틴	H	OH	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H	H	2중결합
	리나린	H	OH	H	ORut	H	H	H	OCH ₃	H	H	2중결합
플라피롤	플라보놀	OH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	2중결합
	캄페롤	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	2중결합
	케르세틴	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	2중결합
	모린	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H	2중결합
	미리세틴	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	2중결합
	케르세타게틴	OH	OH	OH	OH	H	H	OH	OH	H	H	2중결합
	이소람네틴	OH	OH	H	OH	H	H	OCH ₃	OH	H	H	2중결합
	아스트라갈린	OGlu	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	2중결합
	케르시트린	ORha	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	2중결합
	루틴	ORut	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	2중결합
마리시트린	ORha	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H	2중결합	
플라바피	플라바논	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	단결합
	나린게닌	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	단결합
	사쿠라네틴	H	OH	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H	단결합
	헤스페레틴	H	OH	H	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	H	단결합
	에리오딕티올	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	단결합
	사쿠라닌	H	OGlu	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H	단결합
	나린진	H	OH	H	ORha	H	H	H	OH	H	H	단결합
	헤스페리딘	H	OH	H	ORut	H	H	OH	OCH ₃	H	H	단결합
플라바놀	푸스틴	OH	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	단결합
	택시폴린	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H	단결합

[0020]

[0021] 일반식 2의 기본구조를 가진 물질은, 안토시아닌류로 호칭되는 물질이며, 본 발명에 있어서는, 예를 들면, 표 2에 나온 화합물이 사용된다. 또한 표 2 중에서, H는 수소원자, OH는 히드록시기, OCH₃은 메톡시기, OGlu는 배당화된 글루코오스를 나타낸다.

[0022] 일반식 2:



[0023]

[0024] (식 중에서, R₁ 내지 R₁₀은 임의의 치환기를 나타낸다.)

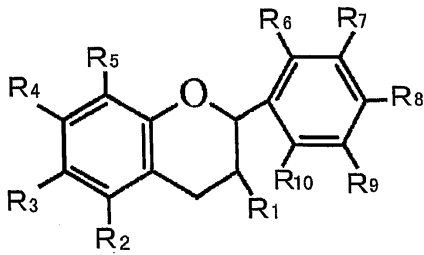
[0025] [표 2]

명 칭	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
시아니딘	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
페라르고니딘	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
델피니딘	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H
페오니딘	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	OCH3	H
말비딘	OH	OH	H	OH	H	H	OCH3	OH	OCH3	H
말비딘-3-글루코시드	Oβlu	OH	H	OH	H	H	OCH3	OH	OCH3	H

[0026]

[0027] 일반식 3의 기본구조를 가진 물질은 플라바놀류로 호칭되는 물질이며, 본 발명에 있어서는, 예를 들면, 표 3에 나온 화합물이 사용된다. 또한 표 3 중에서, H는 수소원자, OH는 히드록시기를 나타낸다.

[0028] 일반식 3:



[0029]

[0030] (식 중에서, R₁ 내지 R₁₀은 임의의 치환기를 나타낸다.)

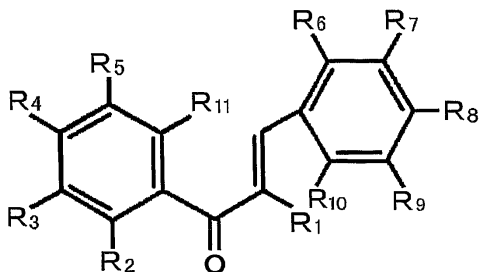
[0031] [표 3]

명 칭	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
카테킨	OH	OH	H	OH	H	H	H	OH	OH	H
에피카테킨	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
에피갈로카테킨	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H

[0032]

[0033] 일반식 4의 기본구조를 가진 물질은 칼콘류로 호칭되는 물질이며, 본 발명에 있어서는, 예를 들면, 표 4에 나온 화합물이 사용된다. 또한 표 4 중에서, H는 수소원자, OH는 히드록시기를 나타낸다.

[0034] 일반식 4:



[0035]

[0036] (식 중에서, R₁ 내지 R₁₁은 임의의 치환기를 나타낸다.)

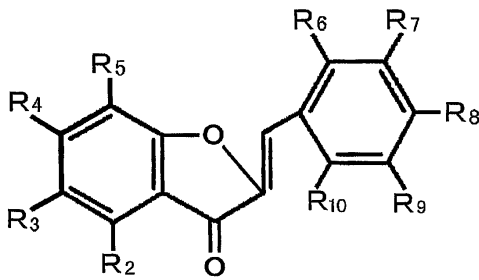
[0037] [표 4]

명 칭	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
칼콘	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
플로레틴	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H	OH

[0038]

[0039] 일반식 5의 기본구조를 가진 물질은 오론류로 호칭되는 물질이며, 본 발명에 있어서는, 예를 들면, 표 5에 나온 화합물이 사용된다. 또한 표 5 중에서, H는 수소원자, OH는 히드록시기, OCH₃은 메톡시기를 나타낸다.

[0040] 일반식 5:



[0041]

[0042] (식 중에서, R₂ 내지 R₁₀은 임의의 치환기를 나타낸다.)

[0043] [표 5]

명 칭	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
솔푸레틴	H	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
렘토시딘	H	H	OH	OCH ₃	H	OH	OH	H	H

[0044]

[0045] 본 발명에서 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질, 즉, 플라본류, 플라보놀류, 플라바논류, 플라바노놀류, 안토시아닌류, 플라바놀류, 칼콘류 및 오론류, 또는 그 전구체는, 통상은, 아글리콘 혹은 배당체의 형태의 것이 사용된다. 또한, 그것들의 중합체 등의 천연에 존재하는 유도체이어도 좋고, 또한, 일반식 1 내지 5로 나타내어지는 기본구조를 가지지 않더라도 섭취 후에 생체 내의 대사에 의해 구조가 변화되어서 일반식 1 내지 5로 나타내어지는 기본구조를 가진 물질로 변화하는 물질, 소위 유도체이어도 좋은데, 칼슘 함유 조직의 칼슘을 증강할 수 있는 것이면 좋다. 이러한 것으로는 안토시아닌류의 일종인 시아닌의 전구체인 프로안토시아닌이나, 프로안토시아닌의 중합체인 프로안토시아닌 폴리머(감의 탄닌) 등이 있다.

[0046]

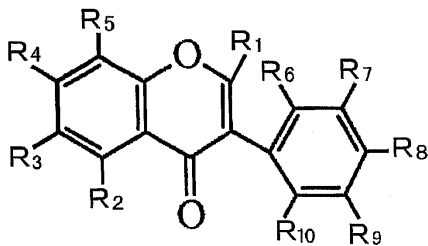
일반식 1 내지 5의 물질 또는 그 유도체는, 그 유래나 순도는 묻지 않으며, 필요에 따라서, 예를 들면, 비교적 다량으로 함유되는 식물재료를 적당한 용매로 추출하고, 얻어진 추출액을 그대로 사용하거나, 더욱 정제해서 순도를 높여서 사용할 수 있다. 또한, 인공적으로 합성되어서 얻어진 것이어도 되고, 시판품도 적절하게 사용할 수 있다. 또한, 필요에 따라서, 적당한 화학적 또는 생화학적인 수법에 의해, 메틸화, 에틸화, 메톡시화, 에톡시화, 황산화, 배당화 등의 유도체화나, 폴리에틸렌글리콜 등의 수용성 고분자를 결합시켜 수용성 및/또는 안정성을 향상시킨 유도체로 하여 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 이러한 예로서, α-글루코실 루틴(상품명 『αG 루틴』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매), α-글루코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매), 메틸화 헤스페리딘(알프스 약품공업 판매), α-글리코실케르세틴, α-글리코실나린진 등이 있다. 물에 용해하기 어려운 물질을 사용할 경우에는, 필요에 따라서, 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 디메틸술폭시드, 에탄올 등의 용매에 의해 용해하거나, 트레할로오스 등의 당질과 함께 용해해서 사용하는 것도, 현탁 상태로 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다.

[0047]

또한, 본 발명에서 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질은, 골다공증 치료 또는 예방 작용이 알려져 있는 이소플라본류와 병용했을 경우, 칼슘 함유 조직을 강화하는 작용이 상승적으로 현저하게 증강된다고 하는 특징을 가지고 있다. 이소플라본류는, 일반식 6으로 나타내어지는 구조를 가진 물질의 총칭이며, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강

화제에 배합되는 물질로서는, 그 아글리콘 및/또는 그 배당체가 사용된다. 예를 들면, 본 발명에 있어서는, 표 6에 나온 물질을 들 수 있고, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에 적절하게 배합된다. 이소플라본류는, 본 발명에서 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질이 발휘하는 칼슘 함유 조직에의 칼슘 침착 작용을 더욱 증강할 수 있는 것이면 좋고, 그 유래나 순도는 묻지 않으며, 필요에 따라서, 예를 들면, 비교적 다량으로 함유되어 있는 식물 재료를 적당한 용매로 추출하고, 얻어진 추출액을 그대로 사용하거나, 더욱 정제해서 순도를 높여서 사용할 수 있다. 이 예로서는 대두 이소플라본이 있다. 또한, 인공적으로 합성되어서 얻어진 것이어도 좋고, 더욱이는, 시판품도 적절하게 사용할 수 있다. 물에 용해하기 어려운 물질을 사용할 경우, 필요에 따라서, 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 디메틸설폭사이드, 에탄올 등의 용매를 사용해서 용해해서 사용하는 것도, α, α -트레할로오스 등의 당질과 함께 용해시키거나, 또한, 현탁 상태로 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 또한, 필요에 따라서, 적당한 화학적 또는 생화학적 수법에 의해 더욱 수식(修飾)하는데, 예를 들면, 메틸화, 에틸화, 메톡시화, 에톡시화, 황산화, 배당화 등의 처리를 하여 수용성 및/또는 안정성을 향상시킨 유도체로 하여 사용하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 이러한 예로서, α -글리코실이소플라본이 있다.

[0048] 일반식 6:



[0049] (식 중에서, R₁ 내지 R₁₀은 임의의 치환기를 나타낸다.)

[0050] [표 6]

명 칭	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
이프리플라본	H	H	H	OC ₃ H ₇	H	H	H	H	H	H
게니스테인	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
다이제인	H	H	H	OH	H	H	H	OH	H	H
게니스틴	H	OH	H	OGlu	H	H	H	OH	H	H
다이진	H	H	H	OGlu	H	H	H	OH	H	H

[0051] 본 발명에서 말하는 칼슘 함유 조직이라 함은, 고체 결정상의 칼슘, 예를 들면, 히드록시아파타이트 등의 인산 칼슘염이 비교적 다량으로 존재하는 조직이며, 이러한 조직으로서, 뼈조직, 특히 경골(硬骨)조직, 및 이(齒)의 조직을 들 수 있고, 이들 조직에 있어서 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제가 가진 효과가 발휘된다.

[0052] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제는, 유효성분인 일반식 1 내지 5의 물질, 또는, 일반식 1 내지 5의 물질 및 이소플라본류 이외에, 필요에 따라서, 예를 들면, 무수 규산, 합성 규산 알루미늄, 락토오스, α, α -트레할로오스, α, β -트레할로오스, 아라비아 고무, 콘 스타치, 결정 셀룰로오스 등의 부형제, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제, 스테아르산 마그네슘, 탈크 등의 활택제, 전분, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘 등의 붕괴제, 물, 에탄올 등의 용매 등을 함유시킬 수 있다. 또한, 이들에 의해, 분말, 과립, 정제, 과(顆), 액상, 페이스트상, 현탁상 등의 적당한 형태로 할 수 있다. 특히, α, α -트레할로오스에 대해서는, 일본국 특개 2000-38343호 공보 및 일본국 특개 2000-198736호 공보에 개시되어 있는 바와 같이 골다공증 예방, 치료약으로서 유리하게 이용할 수 있으므로, 유리하게 이용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 유효성분으로서 함유되는 일반식 1 내지 5의 물질, 또는, 일반식 1 내지 5의 물질 및 이소플라본류는, 유효성분만의 배합, 또는, 유효성분과 제제상 허용할 수 있는 담체 또는 희석제와의 혼합물 중의 어느 것이라도 제제로서 사용할 수 있다. 제제중의 유효성분의 양은, 무수물 환산으로, 0.0001 중량% 이상, 바람직하게는 0.001 중량% 이상이다. 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제는 경구, 비경구 어느 경로

라도 투여할 수 있다. 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 투여량은, 투여 형태, 투여 대상자에게 따라 본 발명의 효과를 발휘하는데 충분한 양을 투여해야 하므로, 투여량을 한정하는 것은 무의미하지만, 일반적인 기준으로 표기하면, 인간을 대상으로 할 경우, 통상은, 1회 또는 수회로 나누어서 투여하고, 1일당 유효 성분량으로서 0.1 ~ 500mg/kg 체중, 바람직하게는 0.5 ~ 200mg/kg 체중이다.

[0056] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 유효성분으로서 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질, 또는 일반식 1 내지 5의 물질 및 이소플라본류는, 식품 첨가물, 화장품 원료, 의약품 원료 등으로서 이미 그 대다수가 안전성이 확인되어 있어, 칼슘 함유 조직 강화제로서는 물론이고, 이것을 배합해서 되는 음식물, 화장품 또는 의약품으로서도 극히 안전하게 투여, 섭취 혹은 사용할 수 있다.

[0057] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 적용 대상으로서, 고체상의 칼슘을 주성분으로 한 뼈조직이나 이(齒)조직을 가진 동물, 즉, 사람 혹은 사람 이외의 포유류를 포함하는 척추동물 전반에 대하여 적용할 수 있다.

[0058] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제는, 골다공증, 골절 등의 뼈에 관한 질환, 충치 및 치주병에 따르는 치조골(齒槽骨)의 약체화 등의 이(齒)에 관한 질환의 치료, 회복 촉진, 또는 그것들의 예방에 효과를 발휘한다. 더욱이, 기타 질환의 치료 등에 투여된 호르몬제, 사이토카인제 등의 약제의 부작용에 의한 뼈흡수나 탈회(脫灰)에 의한 뼈의 양(骨量) 저하의 방지, 천연 뼈 또는 인공 뼈의 이식시의 정착 촉진에도 사용된다. 또한, 건강한 사람에게 있어서도, 다양한 뼈의 양의 저하를 방지하는 것에 사용할 수 있고, 예를 들면, 폐경후 또는 출산전 산후의 여성에 있어서의 호르몬 분비 이상에 의한 뼈의 양의 저하, 과도한 다이어트나 영양실조 등에서 기인하는 호르몬 분비 이상에 의한 뼈의 양의 저하, 병들거나 노쇠하여 즉 누워 있는 고령자의 병, 상하지의 마비나 장기입원 등에 의해 자리에 누워 일어나지 못하여 생긴 운동부족에 의한 뼈의 양의 저하, 우주나 수중 생활에 의한 무중력 혹은 저중력에 의한 뼈의 양의 저하, 과도한 운동, 훈련 등에서 기인하는 뼈의 양의 저하를 회복시키거나, 뼈의 양 저하를 사전에 방지하는 효과를 발휘한다. 또한, 젖먹이 혹은 어린 아이의 성장시의 뼈 형성 촉진, 고령자의 뼈의 양 유지에도 효과적이다. 더욱이, 혈장 중의 칼슘을 칼슘 함유 조직에 침착(沈着)시키므로, 사용 방법에 따라서는 고칼슘 혈장을 개선하는 효과도 기대할 수 있다. 이상의 효과는, 사람에게만 한정되는 것은 아니고, 예를 들면, 개, 고양이, 소, 돼지, 말, 사슴, 코뿔소, 코끼리, 멧돼지 등을 포함하는 척추동물 전반에 대하여도 유리하게 적용할 수 있다.

[0059] 의약품에 배합하는 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제는, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 유효량과 함께, 필요에 따라서, 종래 알려져 있는 골다공증 치료약을 병용함으로써, 보다 높은 효과를 기대할 수 있다. 골다공증 치료약으로서, 예를 들면, 칼시토닌 제제, 에스트로겐 제제, 비스포스포네이트 제제, 비타민 D 제제, 비타민 K 제제 등을 들 수 있다. 또한, 이 외에 의약품에 보통 사용되는, 예를 들면, 마취제, 최면 진통제, 항불안제, 항간질제, 해열 진통 소염제, 흥분제, 각성제, 항파킨슨제, 정신 신경용제, 중추 신경용제, 골격근 이완제, 자율 신경용제, 진경제, 안과용제, 이비과용제, 진혼제, 강심제, 부정맥용제, 이노제, 혈압강화제, 혈관수축제, 관혈관 확장제, 말초혈관 확장제, 고지혈증제, 호흡 촉진제, 진해 거담제, 기관지 확장제, 알레르기용제, 지사제, 성장제, 소화성 궤양 치료제, 건위 소화제, 제산제, 이담제, 뇌하수체 호르몬제, 타액선 호르몬제, 갑상선 호르몬제, 항갑상선 호르몬제, 단백동화 스테로이드제, 부신피질 호르몬제, 남성 호르몬제, 난포 호르몬제, 황체 호르몬제, 혼합 호르몬제, 비뇨 생식기제, 항문제, 외과용 살균 소독제, 창상 보호제, 화농성 질환용 외용제, 진통제, 진양제, 수렴제, 소염제, 기생충 피부질환 외용제, 피부연화제, 부식제, 치과·구강용제, 비타민제, 무기질 제제, 보액제, 지혈제, 혈액응고 저지제, 간장질환용제, 해독제, 습관성 중독용제, 통풍 치료제, 효소 제제, 당뇨병용제, 항악성 종양제, 항히스타민제, 자극 요법제, 항생 물질, 화학요법제, 생물학적 제제, 구충제, 항원충제, 조제용제, X선 조영제 및 진단용 약 등의 약제, 또한, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 섭취를 용이하게 하는, 예를 들면, 보조제, 증량제, 희석제, 부형제, 안정제, 방부제, 착색제, 착향제 등의 한 가지 또는 복수를 적당히 배합하고, 사용 형태에 따라, 예를 들면, 액기스제, 엘릭시르제, 캡슐제, 과립제, 환제, 안연고제, 현탁제, 에멀전, 경고제, 좌제, 가루약, 주정제, 정제, 시럽제, 침제, 전제, 주사제, 용액제, 점안제, 트로치제, 연고제, 퍼프제, 방향수제, 리니먼트제, 리모나테제, 유(流)액기스제, 로션제, 드링크제, 또, 필요에 따라서, 점비제, 코 분무제, 하기도용 흡입제, 안과용 서방제, 구강점막 첩부제, 관장제 등으로 조제할 수 있다.

[0060] 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제는, 그 조제가 완료할 때까지의 공정에 있어서, 예를 들면, 혼화, 혼날(混捏), 용해, 침지, 살포, 도포, 분무, 주입 등의 방법에 의해 소정량의 유효성분을 함유시키면 좋다.

[0061] 또한, 본 발명에 사용되는 일반식 1 내지 5의 물질, 또는, 일반식 1 내지 5의 물질 및 이소플라본은, 그것들이 가진 작용 효과, 즉 칼슘 함유 조직에 칼슘을 침착시키는 작용을 충분히 발휘시키기 위해서, 미네랄, 특히 칼슘

화합물과 같이 섭취시키는 것이 바람직하고, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에 함유시키는 것이 바람직하다. 또한, 이 칼슘 함유 조직 강화제를 배합시킨 음식물, 화장품 또는 의약품에 추가로 배합하는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 칼슘 화합물로서는, 염화 칼슘, 글리세로 인산 칼슘, 글루콘산 칼슘, 락트산 칼슘, 탄산 칼슘, 인산수소 칼슘, 인산 2수소 칼슘, 호판텐산 칼슘, 판토텐산 칼슘, 플루오르화 칼슘, 티오글리콜산 칼슘, 황산 칼슘, 규산 칼슘, 아세트산 칼슘, L-아스파라긴산 칼슘, 시트르산 칼슘, 말산 칼슘, 숙신산 칼슘 등을 들 수 있고, 이것들의 1종 또는 2종 이상을 조합해서 사용할 수 있다.

[0062] 더욱이, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 작용 효과를 더욱 발휘시키기 위해서는, 위에 나온 칼슘 화합물과 함께, 칼슘 이외의 미네랄, 예를 들면, 칼륨, 나트륨, 마그네슘, 망간, 인, 철, 아연 등을 밸런스 좋게 배합하는 것이 바람직하다. 특히, 마그네슘 화합물은 고칼슘 혈장 등을 방지하는데도 칼슘과 동시에 섭취하는 것이 바람직하고, 마그네슘 화합물의 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에의 배합량은, 칼슘 화합물에 대하여 등(等) 이하, 바람직하게는, 칼슘 화합물 1몰에 대하여 0.5몰 내지 0.05몰의 범위에서 배합된다. 마그네슘 화합물로서는, 산화마그네슘, 염화 마그네슘, 탄산 마그네슘, 황산 마그네슘 등을 들 수 있고, 이것들의 1종 또는 2종 이상을 적당히 조합해서 사용할 수 있다.

[0063] 또한, 미네랄은 장내에 있어서 불용화하기 쉽고, 이로 인하여 흡수효율이 저하하기 쉬우므로, 장관흡수를 돕고, 생체에의 이용성을 높이는 미네랄 흡수촉진 작용을 가진 물질을 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에 함유시키는 것도 유리하게 실시할 수 있다. 예를 들면, 카제인 포스포펩티드 등의 단백질 혹은 올리고펩티드, 이소말토올리고당, 프룩토올리고당, 크실로올리고당, 락토수크로오스, 대두 올리고당, α , α -트레할로오스, α , β -트레할로오스, 락토오스 등의 올리고당, 락트산, 아세트산, 시트르산, 글루콘산, 숙신산 등의 유기산을 들 수 있고, 유리하게 사용할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제의 작용 효과를 더욱 발휘시키기 위해서 비타민류를 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에 함유시키는 것이 바람직하다. 비타민류로서는 활성형 비타민 D, 비타민 K, L-아스코르브산, 또는 그것들의 유도체 등을 들 수 있다.

[0065] 이하, 실험에 의해 본 발명을 설명한다.

[0066] 실험 1: 알칼리 포스파타아제 활성을 지표로 하는 각종 유기 화합물의 검색

[0067] 칼슘 침착작용을 가진 골아세포(骨芽細胞)를 수적(數的)으로 증가시키는 것이 뼈의 양의 증가에 있어서 중요하기 때문에, 마우스 전골아세포주(前骨芽細胞株) MC3T3-E1 세포(RCB1126, 理研 진 뱅크)를 골아세포로 분화시키는 물질을, 식물성분으로서 알려져 있는 유기 화합물에 대해서 검색하였다. 그 지표로서, 전골아세포에서는 활성이 낮고, 전골아세포가 분화한 골아세포에서는 활성이 높은 것이 알려져 있는 알칼리 포스파타아제 활성의 측정을 채용하였다.

[0068] 마우스 전골아세포의 배양

[0069] 마우스 전골아세포주 MC3T3-E1을 10mM HEPES, 10 (v/v)% 소테아 혈청(기브코 비알엘사 판매)을 함유하는 표 7에 나온 조성의 α -MEM 배지 pH 6.8에 의해, 세포농도 5×10^4 개/ml로 조제하고, 24 구멍 플레이트(팔콘 백톤 디킨슨사 판매)에 1 구멍당 1ml씩 5×10^4 개의 세포를 파종하고, 세포가 플레이트 저면에 부착할 때까지, 37°C, 5% 탄산 가스 분위기 중에서 배양하였다. 배지 제거 후, 에탄올에 용해한 유기 화합물, 즉, 인도메타신(후나코시 주식회사 판매)(양성 대조), 캄페롤(후나코시 주식회사 판매), 갈산(gallic acid; 나카라이테스크 주식회사 판매), 카페산(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매), 4-메틸움벨리페론(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매), 카페인(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매), β -카로틴(시그마사 판매), 글리시리진(일본국의 片山화학공업 주식회사 판매), 멘톨(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매), 테오필린(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매), 토코페롤(시그마사 판매), 바닐린(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매)을 각각 20 μ M의 농도로 함유하는 α -MEM 배지[10% (v/v) 소테아 혈청, 10mM β -글리세로포스페이트를 함유함]를 1ml씩 첨가하였다. 그리고 배지 중에는 최종농도 0.2% (v/v) 에탄올을 함유하므로, 음성 대조로서는, 0.2% (v/v) 에탄올을 함유하는 α -MEM 배지로 하였다. 3일 간격으로 신선한 각 시료를 함유한 배지, 또는 함유하지 않은 배지로 교환하면서 8일간 연속 배양하였다.

[0070] [표 7]

[0071]

성분	mg/l	성분	mg/l
L-알라닌	25	L-아스코르브산	50
L-아르기닌	105	비오틴	0.1
L-아스파라긴	25	콜린	1
L-아스파라긴산	30	시아노코발라민	1.36
L-시스테인	100	엽산	1
L-시스틴	24	이노시톨	2
L-글루탐산	75	니코틴 아마이드	1
L-글루타민	292	판토텐산	1
글리신	50	페리독살	1
L-히스티딘	31	리보플라빈	0.1
L-이소로이신	52	티아민	1
L-로이신	52	엽화 칼슘	200
L-리신	58	엽화 칼륨	400
L-메티오닌	15	엽화 마그네슘	200
L-페닐알라닌	32	엽화 나트륨	6,800
L-프롤린	40	탄산수소 나트륨	2,000
L-세린	25	인산 2수소 나트륨	150
L-트레오닌	47.6	글루코오스	1,000
L-트립토판	10	리포산	0.2
L-티로신	36	페놀술폰프탈레인	10
L-발린	46	피루브산 나트륨	110

[0072] 알칼리 포스파타아제 활성의 측정

[0073] 알칼리 포스파타아제 활성의 측정은, 알칼리 포스파 B-테스트 와코(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매)를 사용하여 카지이 등의 방법에 준하여 하였다 [Archives of Oral Biology, 제44권, 233 내지 241 페이지(1999)]. 즉, 상기 마우스 전골아세포로부터 배지를 제거하고, 0.25M 수크로오스 용액 1ml로 3회 세정하여, 1mM 엽화 마그네슘, 50mM 수크로오스를 함유하는 50mM 탄산염 완충액 pH 9.8을 0.45ml, 3.4mM p-니트로페닐 인산 2나트륨을 0.05ml 순차로 첨가하고, 25℃에서 5 분간 방치한 후, 0.6N 수산화나트륨 1.5ml을 첨가함으로써 반응을 정지시켰다. 상기 반응액 중에 있어서, 알칼리 포스파타아제의 작용에 의해 생성한 p-니트로페놀의 양을 파장 405nm의 흡광도를 측정하고, 그 값을 알칼리 포스파타아제 활성으로 하였다. 표 8에는, 각 시료에 있어서의 알칼리 포스파타아제 활성과 0.2% (v/v) 에탄올을 함유한 배지만 첨가한 음성 대조의 활성의 비를 나타낸 상대활성을 정리하였다.

[0074] [표 8]

[0075]

유기 화합물	상대 알칼리 포스파타아제 활성(%)
0.2% (v/v) 에탄올	100
인도메타신	142
캬페롤	162
갈산	79
카페인	97
4-메틸움벨리페론	96
카페인	100
β-카로틴	81
글리시르리진산	97
멘톨	95
테오필린	92
토코페롤	100
바닐린	89

[0076] 표 8의 결과로부터, 캬페롤은, 양성(陽性) 대상인 인도메타신보다도 마우스 전골아세포주(MC3T3-E1)의 알칼리

포스파타아제 활성을 증가시켰다. 이 결과로부터, 캠페롤은 마우스 전골아세포의 알칼리 포스파타아제 활성을 증가시키므로, 전골아세포를 골아세포로 분화시키는 작용을 가진 것이 판명되었다.

[0077] 실험 2: 칼슘 침착작용을 지표로 한 각종 유기 화합물의 검색

[0078] 실험 1에서는, 각종 유기 화합물을 함유하는 피험(被驗) 시료가 가진 전골아세포로부터 골아세포로의 분화 유도 촉진 작용을 조사하였다. 이어서, 실제로 칼슘 침착작용을 증가시키고 있는가를 조사하였다. 유기 화합물로서, 인도메타신(후나코시 주식회사 판매)(양성 대조), 캠페롤(후나코시 주식회사 판매), 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매), 갈산(나카라이테스크 주식회사 판매), 카페산(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매)을 사용하였다.

[0079] 이들을 각각 20 μM의 농도로 함유하는 α-MEM 배지 [10% (v/v) 소태아 혈청, 10mM β-글리세로포스페이트를 함유함]를 1ml씩 마우스 MC3T3-E1 세포주에 첨가하였다. 그리고 배지 중에는 최종농도 0.2% (v/v) 에탄올을 함유하므로, 음성 대조로서는, 0.2% (v/v) 에탄올을 함유하는 α-MEM 배지로 하였다. 3일 간격으로 신선한 각 시료를 함유한 배지, 또는 함유하지 않은 배지로 교환하면서 8일간 연속 배양하였다. 이들을 통상적인 방법에 따라, 알리자린 레드-S 염색법을 실시하여, 칼슘 침착량을 측정하였다.

[0080] 즉, 배양 플레이트로부터 배지를 제거한 후, 둘베코-인산 완충 생리 식염수 1ml로써 2회 세정하고, 50 (v/v) % 에탄올 수용액을 1ml 첨가해서 10분간 실온에서 방치하였다. 첨가한 50 (v/v) % 에탄올 수용액을 제거한 후, 증류수 1ml을 첨가해서 다시 10분간 실온에서 방치하였다. 첨가한 증류수를 제거한 후, 1%(w/v) 알리자린 레드-S(일본국의 和光純藥공업 주식회사 판매) 용액 1ml을 첨가해서 10분간 방치한 후, 알리자린 레드-S 용액을 제거하고, 증류수 1ml로써 3회 세정하였다. 상기의 처리에 의해, 침착한 칼슘은 배양 플레이트 저면에서 적색으로 염색되므로, 칼슘 침착량을 적색화의 정도에 의해 육안 판정하였다. 판정기준은 음성 대조[0.2% (v/v) 에탄올을 함유한 배지만]와 동일한 정도의 염색을 +, 양성 대조(인도메타신)과 동일한 정도의 염색을 +++로 하고, 양성 대조의 염색의 5할 정도의 염색의 정도를 ++로 하였다. 그 결과를 표 9에 나타낸다.

[0081] [표 9]

[0082]

유기 화합물	칼슘 침착량
0.2% (v/v) 에탄올 (음성 대조)	+
인도메타신	+++
캠페롤	+++
헤스페레틴	+++
갈산	+
카페산	+

[0083] 표 9의 결과로부터, 캠페롤과 헤스페레틴은 양성 대조로서 채용한 인도메타신과 거의 동등한 칼슘 침착량이라고 판정되었다. 이 결과로부터, 캠페롤과 헤스페레틴은 전골아세포의 칼슘 침착을 증가하는 작용이 있는 것이 판명되었다.

[0084] 실험 1 및 2의 결과로부터, 캠페롤은, 전골아세포의 알칼리 포스파타아제 활성을 증가시키는 작용, 즉, 전골아세포를 골아세포로 분화시키는 작용을 가진 것, 또한, 캠페롤이나 헤스페레틴은 칼슘 침착을 증가시키는 작용을 가진 것이 판명되었다.

[0085] 실험 3: 각종 플라보노이드에서의 비교

[0086] 캠페롤이나 헤스페레틴 이외의 다른 플라보노이드에 속하는 화합물에 대해서도 마찬가지로의 효과를 가진 것인가 아닌가를 조사하였다. 플라본(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 아피게닌(후나코시 주식회사 판매), 플라보놀(일본국의 東京化成공업 주식회사 판매), 케르세틴(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 캠페롤(후나코시 주식회사 판매), 루틴(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 플라바논(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 나린게닌(알드리치 판매), 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매), 헤스페리딘(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 칼콘(베르크사 판매), 플로레틴(시그마사 판매), 카테킨(시그마사 판매), 이프리플라본(다이토 주식회사 판매), 택시폴린(후나코시 주식회사 판매), 스푸레틴(후나코시 주식회사 판매), 시아니딘(후나코시 주식회사 판매)을 피험 시료로서 채용하였다. 알칼리 포스파타아제 활성은 실험 1의 방법으로 측정하였다. 한편, 칼슘 침착량의 측정은, 칼슘 C 테스트 와코(일본국의 和光純藥사제)를 사용해서 통상적인 방법에 따라서 하였다.

[0087] 즉, 배양 세포로부터 배지를 제거하고, 둘베코-인산 완충 생리 식염수 1ml로써 3회 세정한 후, 침착한 칼슘을 용해시키기 위해서, 2N 염산 0.5ml을 첨가하였다. 이 용해액으로부터 5 μ l을 채취하고, 0.88M 모노에탄올아민 완충액(pH 11)을 0.5ml, 69mM 8-퀴놀리놀을 함유하는 0.63mM 오르토크레졸 프탈레인 콤플렉스(칼슘 이온과 킬레이트 복합체를 형성한다.) 0.05ml을 첨가·혼합하였다. 이것을, 파장 570nm의 흡광도를 측정하고, 표준 칼슘 용액을 동일한 파장에서 측정한 값과 비교하고, 플레이트 1구멍당의 칼슘량을 산출하였다. 평가 방법은, 각 시료에 있어서의 알칼리 포스파타아제 활성 및 칼슘 침착량에 대해서, 각각, 0.2% (v/v) 에탄올을 함유한 배지만을 첨가한 음성 대조 알칼리 포스파타아제 활성 및 칼슘 침착량에 대한 상대활성 및 상대량으로써 비교함으로써 실시하였다. 그 결과를 표 10에 나타낸다.

[0088] [표 10]

[0089]

	상대 알칼리 포스파타아제 활성(%)	상대 칼슘 침착량(%)
0.2% (v/v) 에탄올	100	100
플라본	103	158
아피게닌	128	247
플라보놀	139	295
케르세틴	120	118
캠페롤	162	305
루틴	109	74
플라바논	109	311
나린게닌	110	271
헤스페레틴	116	289
헤스페리딘	107	118
칼콘	105	104
플로레틴	109	238
카테킨	118	247
이프리플라본	114	263
택시폴린	98	234
솔푸레틴	126	157
시아니딘	115	216

[0090] 표 10의 결과로부터, 본 발명의 유효성분으로 하는 플라보노이드에는 칼슘 침착량의 증가가 나타났다. 이 결과로부터, 전골아세포를 골아세포로 분화시켜, 칼슘의 침착을 증가하는 작용 효과는, 플라본류, 플라보놀류, 플라바논류, 플라바노놀류, 안토시아니딘류, 플라바놀류, 칼콘류 또는 오론류에 공통되는 것이 판명되었다.

[0091] 실험 4: 알칼리 포스파타아제 활성증강에 있어서의 캠페롤, 헤스페레틴 또는 이프리플라본의 작용 효과의 비교

[0092] 캠페롤 또는 헤스페레틴과, 이미 골다공증의 치료약으로서 알려진 이프리플라본을 피험 시료로서 사용하고, 전골아세포를 골아세포로 분화 유도시키는 작용의 강도를 비교하였다. 각 피험 시료를 함유한 배지 중에서의 배양 일수를 3일, 6일 및 9일, 배지 중의 피험 시료 농도를 5, 10, 20 μ M으로 한 이외는 실험 1의 방법에 준해서 하였다. 배지의 에탄올 농도는, 각 피험 시료 농도가 5 μ M일 때에 0.05% (v/v), 10 μ M일 때에 0.1% (v/v), 20 μ M일 때에 0.2% (v/v)가 된다. 이들 에탄올 농도와 동일한 배지이며 피험 시료를 함유하지 않은 것을 대조로 하여서 구성하고, 대조의 활성에 대한 상대활성을 구하였다. 그 결과를 도 1에 나타낸다.

[0093] 도 1의 결과로부터, 피험 시료가 캠페롤에서는, 농도 20 μ M의 경우에서 다소 늦어서 배양 6일에서 현저한 알칼리 포스파타아제 활성의 증강이 나타나고, 또한, 피험 시료가 헤스페레틴에서는, 이프리플라본에 비해서 다소 활성은 뒤지지만, 배양 3일에서 현저한 알칼리 포스파타아제 활성의 증강이 나타났다. 이 결과로부터, 캠페롤 및 헤스페레틴이 마우스 전골아세포주(MC3T3-E1)의 알칼리 포스파타아제 활성을 증강시키는 효과는, 골다공증제로서의 이프리플라본의 효과에 필적하는 것으로 판명되었다.

[0094] 실험 5: 칼슘 침착 증강에 있어서의 캠페롤과 이프리플라본의 작용 효과의 비교

[0095] 칼슘 침착량 증강 작용에 대하여 캠페롤과 이프리플라본을 비교하였다. 피험 시료 및 피험 시료의 첨가 방법은 실험 4와 마찬가지로 하였다. 칼슘 침착량의 측정은, 칼슘 C 테스트 와코(일본국의 和光純藥사제)를 사용해서 통상적인 방법에 따라서 하였다. 즉, 배양 세포로부터 배지를 제거하고, 둘베코-인산 완충 생리 식염수 1ml로써 3회 세정한 후, 침착한 칼슘을 용해시키기 위해서 2N 염산 0.5ml을 첨가하였다. 이 용해액으로부터 5 μ l을 채취

하고, 0.88M 모노에탄올아민 완충액(pH 11)을 0.5ml, 69mM 8-퀴놀리놀을 함유하는 0.63mM 오르토크레졸 프탈레인 콤플렉스(칼슘 이온과 킬레이트 복합체를 형성한다.) 0.05ml를 첨가·혼합하였다. 이것을, 파장 570nm의 흡광도를 측정하고, 표준 칼슘 용액을 동일한 파장에서 측정한 값과 비교하여, 플레이트 1구명당의 칼슘량을 산출하였다. 캠페롤과 이프리플라본을 비교한 것을 도 2에 나타낸다. 또한 이 도면에는, 대조인 에탄올만으로 처리한 것도 나타내고 있다.

[0096] 도 2의 결과로부터, 캠페롤은 이프리플라본보다도 우수한 칼슘 침착증강 작용을 나타내었다.

[0097] 실험 4 및 5로부터, 캠페롤 및 헤스페레틴은, 마우스 전골아세포에 대하여, 종래의 항(抗) 골다공증 약으로서 알려져 있는 이프리플라본과 마찬가지로의 알칼리 포스파타아제 활성의 상승 및 칼슘 침착증강 작용을 가지고 있어, 칼슘 함유 조직을 강화하는 작용을 가진 것이 나타났다.

[0098] 실험 6: 칼슘 침착증강에 있어서의 캠페롤과 이프리플라본, 또는 헤스페레틴과 이프리플라본의 병용효과

[0099] 캠페롤 또는 헤스페레틴을 사용하여 이소플라본류인 이프리플라본과의 병용에 의한 칼슘 침착의 증강 작용을 조사하였다. 시료의 조제 방법 및 세포의 배양 방법은, 각 시험 시료를 함유한 배지 중에서의 배양 일수를 5일간으로만 한 이외는 실험 1에 준하고, 칼슘의 측정 방법은 실험 3 및 실험 5에 준해서 하였다. 또한 각 시험 시료를 함유한 배지에 함유되는 에탄올 농도는 동일하게 하였다. 시험 시료로서, 캠페롤 5µM, 10µM, 20µM 단독, 이프리플라본 5µM, 10µM, 20µM 단독, 또는 캠페롤과 함께 이프리플라본을 각각 5µM, 10µM, 20µM 병용한 것을 도 3에, 헤스페레틴 5µM, 10µM, 20µM 단독, 이프리플라본 5µM, 10µM, 20µM 단독, 또는 헤스페레틴과 함께 이프리플라본을 각각 5µM, 10µM, 20µM 병용한 것을 도 4에 나타내었다.

[0100] 도 3 및 도 4의 결과로부터, 전골아세포에 대하여, 캠페롤 및 헤스페레틴은 이프리플라본과 병용하면 단독의 경우보다 현저하게 칼슘 침착이 증강되어, 병용에 의한 상승 효과가 나타났다.

[0101] 실험 7: 래트 대퇴골 및 경골(脛骨)에 있어서의 칼슘 침착증강 효과

[0102] 3주령의 암컷 위스타게 래트 6마리를 1군으로 하여 사용하였다. 각 시험 시료, 즉, 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매), 케르세틴(주식회사 東京化成 판매), α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 P』, 일본의 주식회사 林原상사 판매), α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본의 주식회사 林原상사 판매), 이프리플라본(다이토 주식회사 판매)(양성 대조) 각 1 중량부를, 표 11에 나온 배합 비율의 고(高)수크로오스 첨가 사료(표 11에 있어서의 각 수치는 중량%를 나타냄)에 배합하고, 그것을 먹이로 하여 래트에 투여하였다. 시험 시료 대신에 수크로오스 1 중량부를 첨가한 먹이를 투여한 래트를 대조로 하였다. 물은 자유섭취하도록 하였다. 시험 개시 8주간 후에 래트를 도살하고, 대퇴골 및 경골을 적출하였다. 적출한 대퇴골 및 경골은 100℃에서 약 6시간 건조시킨 후, 고정밀도 분석용 접시형 전자천평(상품명 『HA180M/12QM』, 주식회사 에이 앤드 디 판매)로써 건조 중량을 측정하였다. 이어서, 대퇴골 및 경골을 도가니에 넣고, 회화로(灰化爐)에서 950℃에서 6시간 처리하여 충분히 회화한 후에 염산액에 용해시켜, 이것을 시료액으로 하여 칼슘량을 원자흡광 광도계로써 정량하였다. 칼슘량은, 건조뼈 1개당의 칼슘량을 산출하여 대조와 비교하였다. 그 결과를 표 12에 나타낸다.

[0103] [표 11]

[0104]

먹이성분 (중량 %)	시험군					없음 (대조군)
	헤스페레틴	케르세틴	α-글리코실 루틴	α-글리코실헤스페리딘	이프리플라본	
플라보노이드류 (시료)	0.5	0.5	1.25	1.25	0.5	0
콘 스타치	14.5	14.5	13.75	13.75	14.5	15
수크로오스	50					
카제인	20					
셀룰로오스	5					
파우더						
콘 오일	5					
미네랄류	3.5					
비타민류	1.2					
메티오닌	0.3					

[0105] [표 12]

[0106]

시 료		건조뼈 중량 (g)	건조뼈 1개당의 칼슘중량 (mg)	비 고
헤스페레틴	대퇴골	0.463	125.1	본 발명
	경골	0.357	109.0	
케르세틴	대퇴골	0.456	120.3	본 발명
	경골	0.352	108.7	
α-글리코실 루틴	대퇴골	0.439	119.9	본 발명
	경골	0.343	107.7	
α-글리코실헤스페리딘	대퇴골	0.454	126.9	본 발명
	경골	0.349	109.5	
이프리플라본	대퇴골	0.428	120.0	양성 대조
	경골	0.338	106.0	
없음	대퇴골	0.427	116.4	음성 대조
	경골	0.331	105.9	

[0107] 표 12의 결과로부터, 대퇴골 및 경골의 칼슘 침착량은 각 피험 시료의 어느쪽의 경우도 음성 대조에 비해서 증강하고, 양성 대조의 이프리플라본과 동등 또는 동등 이상이였다. 또한, 헤스페리딘, α-글리코실헤스페리딘 및 α-글리코실 루틴으로 한 배당체에 있어서도 칼슘 침착량의 증가가 나타났다. 또한 이들의 배당체를 사용하여 인 비트로의 알칼리 포스파타아제 활성 및 칼슘 침착증강 작용을 조사한 결과, 유의한 증강 작용은 나타나지 않았다.

[0108] 따라서, 이들의 효과를 발휘하기 위해서는, 각 플라보노이드가 아글리콘의 형태를 취하고 있을 필요가 있고, 인 비보투어에서는, 장관 내 혹은 생체 내의 효소에 의하여 당의 부분이 분해되어, 아글리콘이 되어서 작용하고 있는 것으로 추측된다.

[0109] 실험 8: 급성독성 시험

[0110] 4주령의 위스타게 암컷 래트를 1군 5마리 사용하였다. 피험 시료로서, 실험 3에서 사용한 각 유기 화합물, 즉, 플라본(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 아피게닌(후나코시 주식회사 판매), 플라보놀(일본국의 東京化成공업 주식회사 판매), 케르세틴(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 캠페롤(후나코시 주식회사 판매), 루틴(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 플라바논(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 나린게닌(알드리치 판매), 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매), 헤스페리딘(일본국의 關東화학 주식회사 판매), 칼콘(메르크사 판매), 플로레틴(시그마사 판매), 카테킨(시그마사 판매), 이프리플라본(다이토 주식회사 판매), 택시폴린(후나코시 주식회사 판매), 술푸레틴(후나코시 주식회사 판매) 또는 시아니딘(후나코시 주식회사 판매)을 각 1 중량부를 5(w/v)% 아라비아 고무 용액 25 중량부에 용해 혹은 현탁하고, 18시간 절식(絶食)한 래트에, 위(胃) 존대를 사용해서 10ml/kg 래트 체중의 용량으로 강제 경구투여 하였다. 이후, 래트는 항온 항습의 조건에서 사육하고, 먹이와 물은 자유롭게 부여하였다. 투여일을 0일로 하고, 각 개체의 체중을 측정하면서, 14일간 일반 증상 및 생사의 상태를 관찰하였다.

[0111] 2주간 사육한 후, 어떠한 피험 시료에 있어서도 사망 예는 없고, 또한, 체중감소도 없으며, 외관은 양호해서, 일반 증상으로서 현저한 것은 나타나지 않았다. 따라서, 본 발명의 칼슘 함유 조직 강화제에서 유효성분으로서 사용하는 일반식 1 내지 5의 물질은 극히 안전성이 높은 것이라고 판단된다.

[0112] 이하, 본 발명의 실시예를 설명한다.

[0113] 실시예 1: 액제

[0114] α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부 및 케르세틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 에탄올 50 중량부에 용해시킨 후, 또한, 물 5,000 중량부, α, α-트레할로오스(상품명 『Trehal』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 50 중량부, 락트산 칼슘 3 중량부, 염화 마그네슘 1.5 중량부 및 카제인 포스포펩티드 10 중량부를 첨가하고 혼합용해하여 액상의 칼슘 함유 조직 강화제를 얻었다.

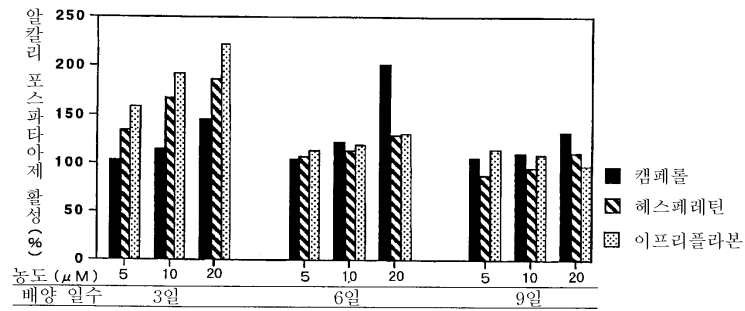
[0115] 손쉽게 복용할 수 있고, 흡수효율이 우수한 칼슘이 배합되어 있는 이 제품은, 칼슘 함유 조직을 유지·증강하는 효과가 있기 때문에, 골다공증, 골절 등의 치료·예방 또는 회복 촉진 등에 유리하게 이용할 수 있다.

- [0116] 실시예 2: 액제
- [0117] α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 PA』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부 및 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 에탄올 50 중량부에 용해시킨 후, 또한, 물 5,000 중량부, α, α-트레할로오스(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 20 중량부, 염화 칼슘 5 중량부, 염화 마그네슘 2.5 중량부 및 락토수크로오스 10 중량부를 첨가하고, 혼합용해하여 액상의 칼슘 함유 조직 강화제를 얻었다.
- [0118] 손쉽게 복용할 수 있고, 흡수효율이 우수한 칼슘이 배합되어 있는 이 제품은, 칼슘 함유 조직을 유지·증강하는 효과가 있기 때문에, 골다공증, 골절 등의 치료·예방 또는 회복 촉진 등에 유리하게 이용할 수 있다.
- [0119] 실시예 3: 액제
- [0120] 염화 나트륨 6 중량부, 염화 칼륨 0.3 중량부, 염화 칼슘 0.2 중량부, 락트산 나트륨 3.1 중량부, α, β-트레할로오스 45 중량부 및 일본국 특개평 5-32690 공보의 실시예 A-2의 방법으로 얻은 분말상 α-글루코실케르세틴 1 중량부를 물 1,000 중량부에 용해하고, 통상적인 방법에 따라, 정제 여과해서 파이로젠 프리로 해서, 이 용액을 멸균한 25ml 앰플에 충전하여 주사용의 칼슘 함유 조직 강화제를 얻었다.
- [0121] 이 제품은, 주사제로서, 칼슘 조직을 유지·증강하는 효과가 있기 때문에, 골다공증, 골절 등을 치료·예방 또는 회복 촉진 등에 유리하게 이용할 수 있다.
- [0122] 실시예 4: 분제(粉劑)
- [0123] α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 H』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부, 대두 이소플라본(일본국의 不二製油 주식회사 판매) 5 중량부, α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1000 중량부, 락트산 칼슘 1 중량부, 황산 마그네슘 0.5 중량부를 균일히 혼합한 뒤, 건조하여 분말상의 칼슘 함유 조직 강화제를 제조하였다.
- [0124] 안정한 이 제품은, 물에 대하여 쉽게 용해하고, 칼슘 및 마그네슘도 함유하기 때문에, 칼슘 함유 조직을 강화하는 우수한 효과를 가진다. 골다공증, 골절 등을 치료·예방하기 위한 칼슘 함유 조직 강화제로서, 또는 건강보조 식품, 보건기능 식품 등의 건강식품으로서 유용하다.
- [0125] 실시예 5: 분제
- [0126] α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 H』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부, α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1000 중량부, 락트산 칼슘 1 중량부, 황산 마그네슘 0.5 중량부, L-아스코르브산-2-글루코시드(상품명 『AA2G』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 3 중량부를 균일히 혼합한 후, 건조하여 분말상의 칼슘 함유 조직 강화제를 제조하였다.
- [0127] 안정한 이 제품은, 물에 대하여 쉽게 용해하고, 칼슘 및 마그네슘도 함유하기 때문에, 칼슘 함유 조직을 강화하는 우수한 효과를 가진다. 골다공증, 골절 등을 치료·예방하기 위한 칼슘 함유 조직 강화제로서, 또는 건강보조 식품, 보건기능 식품 등의 건강식품으로서 유용하다.
- [0128] 실시예 6: 트로치제
- [0129] α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 PA』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부 및 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 에탄올 1 중량부에 용해하고, 락트산 칼슘 2 중량부, 아라비아 고무 10 중량부, α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 10 중량부, 스쿠알로오스(일본국의 三榮源 에프·에프·아이 주식회사 판매) 5 중량부, 물 3 중량부를 잘 혼합하고, 통상적인 방법에 의해 성형하여 트로치제를 얻었다.
- [0130] 안정한 이 제품은, 치조골(齒槽骨) 및 이(齒)의 칼슘량을 유지·증강하는 트로치제로서 유용하다.
- [0131] 실시예 7: 트로치제
- [0132] α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부 및 케르세틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 에탄올 1 중량부에 용해하고, 여기에 락트산 칼슘 2 중량부, 아라비아 고무 10 중량부, α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 10 중량부, 당전이 스테비아 2 중량부, 물 3 중량부를 잘 혼합하고, 통상적인 방법에 의해 성형하여 트로치제를 얻었다.

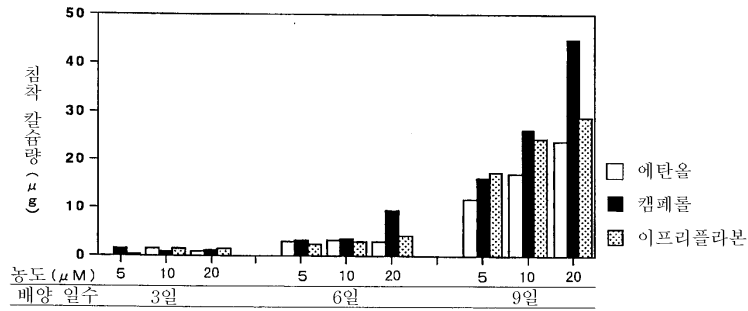
- [0133] 안정한 이 제품은, 치조골(齒槽骨) 및 이(齒)의 칼슘량을 유지·증강하는 트로치제로서 유용하다.
- [0134] 실시예 8: 건강보조 식품
- [0135] α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 52 중량부, 콘 스타치 40 중량부, α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 0.5 중량부, α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 PA』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 0.5 중량부, L-아스코르브산-2-글루코시드(상품명 『AA2G』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 염화 칼슘 0.1 중량부 및 결정 셀룰로오스 2.5 중량부를 혼합하고, 통상적인 방법에 따라, 적당량의 물을 분무 적하하면서 혼련하고, 유동층 조립(造粒)한 후, 분쇄하고, 정립(整粒)해서 타정용(打錠用) 분체를 얻었다. 여기에 활택제로서 수크로오스 지방산 에스테르 2 중량부를 균일히 혼합한 후, 지름 11mm의 펀치를 장착한 타정기에 의해 타정하여 정제(錠劑)(약 300mg/錠)를 얻었다.
- [0136] 섭취하기 쉽고, 소화관에 있어서의 붕괴성이 우수한 이 제품은, 뼈의 양을 유지·증강하는 건강보조 식품, 보건 기능 식품 등의 건강식품으로서 유용하다.
- [0137] 실시예 9: 드링크제
- [0138] α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부, 일본국 특개평 4-13691 호 공보 실시예 A-2에 기재된 방법에 준해서 제조한 α-글리코실나린진 1 중량부, 그레이프 후루츠 과즙 20 중량부, α, α-트레할로오스 분말(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 2 중량부, 시트르산 2 중량부, L-아스코르브산-2-글루코시드(상품명 『AA2G』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부, 이성화당 5 중량부, 바닷물 6 중량부, 염화 칼슘 2 중량부 및 물 160 중량부를 혼합하고, 유리병에 100ml씩 충전한 후, 마개로 밀봉해서 드링크제를 얻었다.
- [0139] 이 제품은, 풍미가 양호한 외에, 칼슘 함유 조직을 강화하는 작용이 있어서, 골다공증, 골절 등을 치료·예방하기 위한 드링크제로서 유용하다.
- [0140] 실시예 10: 드링크제
- [0141] α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 PA』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 1 중량부, 사과 과즙 50 중량부, 이성화당 5 중량부, L-아스코르브산 2 중량부, α, α-트레할로오스(상품명 『Treha』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매) 3 중량부, L-아스파라긴산 나트륨 2 중량부, 물 35 중량부를 혼합하고, 유리병에 100ml씩 충전한 후, 마개로 밀봉해서 드링크제를 얻었다.
- [0142] 이 제품은, 풍미가 양호한 외에, 칼슘 함유 조직을 강화하는 작용이 있어서, 골다공증, 골절 등을 치료·예방하기 위한 드링크제로서 유용하다.
- [0143] 실시예 11: 페이스트제
- [0144] 통상적인 방법에 따라, 제2인산 칼슘 45 중량부, 폴룰란 3 중량부, 라우릴 황산 나트륨 1.5 중량부, 글리세린 20 중량부, 폴리옥시에틸렌소르비탄라우레이트 0.5 중량부, 소르비톨 10 중량부, 말티톨 7 중량부 및 정제수 12 중량부에 α-글리코실헤스페리딘(상품명 『αG 헤스페리딘 PA』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매)을 0.4 중량부 및 헤스페레틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 함유하는 에탄올 용액 1 중량부를 배합해서 페이스트제를 얻었다.
- [0145] 안정한 이 제품은, 치조골(齒槽骨) 및 이(齒)의 칼슘량을 유지·증강하는 치약으로서 유용하다.
- [0146] 실시예 12: 페이스트제
- [0147] 통상적인 방법에 따라, 제2인산 칼슘 45 중량부, 폴룰란 3 중량부, 라우릴 황산 나트륨 1.5 중량부, 글리세린 20 중량부, 폴리옥시에틸렌소르비탄라우레이트 0.5 중량부, 소르비톨 10 중량부, 말티톨 7 중량부 및 정제수 12 중량부에 α-글리코실 루틴(상품명 『αG 루틴 P』, 일본국의 주식회사 林原상사 판매)을 0.4 중량부 및 케르세틴(후나코시 주식회사 판매) 0.1 중량부를 함유하는 에탄올 용액 1 중량부를 배합해서 치약을 얻었다.
- [0148] 안정한 이 제품은, 치조골(齒槽骨) 및 이(齒)의 칼슘량을 유지·증강하는 치약으로서 유용하다.

도면

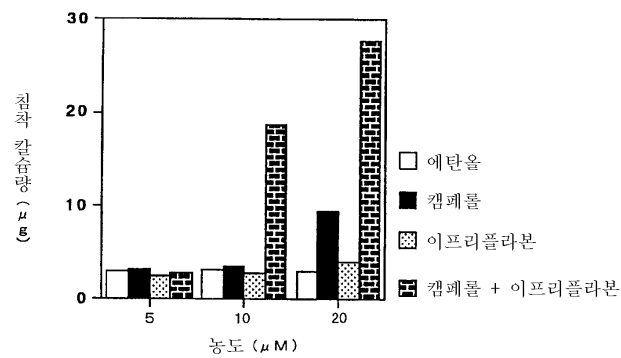
도면1



도면2



도면3



도면4

