

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年9月7日(07.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/118193 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/728 (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 8/27 (2006.01) *A61P 9/02* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/055426
- (22) 国際出願日: 2012年3月2日(02.03.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-045772 2011年3月2日(02.03.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 電気化学工業株式会社(DENKI KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1038338 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 能見 健司(NOHMI, Kenji) [JP/JP]; 〒1948560 東京都町田市旭町3-5-1 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 島田 賢太郎(SHIMADA, Kentaro) [JP/JP]; 〒1948560 東京都町田市旭町3-5-1 電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP). 守川 忠志(MORIKAWA, Tadashi) [JP/JP]; 〒1948560 東京都町田市旭町3-5-1

電気化学工業株式会社 中央研究所内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: S K特許業務法人, 外(SK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM et al.); 〒1508512 東京都渋谷区桜丘町2-6-1 セルリアンタワー15階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[続葉有]

(54) Title: AQUEOUS SOLUTION CONTAINING HYALURONIC ACID OR SALT THEREOF

(54) 発明の名称: ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液

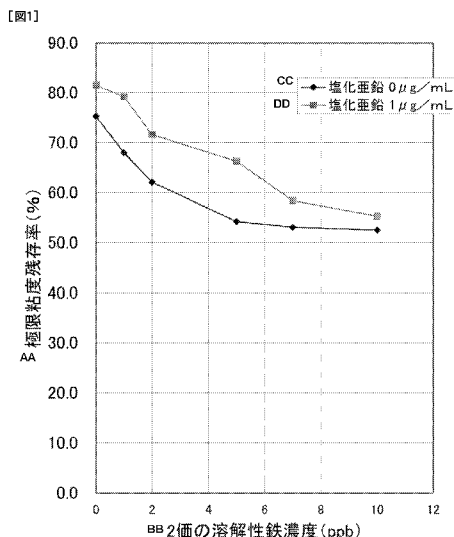


Fig. 1:
AA Limiting viscosity residual rate (%)
BB Divalent soluble iron concentration (ppb)
CC Zinc chloride 0 μg/mL
DD Zinc chloride 1 μg/mL

(57) Abstract: The present invention reveals a highly stable aqueous solution containing hyaluronic acid or a salt thereof. Provided is an aqueous solution containing hyaluronic acid or a salt thereof and containing a zinc compound, the divalent soluble iron content being no greater than 5 ppb. Alternatively, provided is an aqueous solution containing hyaluronic acid or a salt thereof, the concentration of hyaluronic acid or a salt thereof being 5-15 mg/mL.

(57) 要約: 安定性が高いヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を明らかにする。2価の溶解性鉄の含有率が5 ppb以下であり、亜鉛化合物を含有する、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を提供する。または、上記ヒアルロン酸またはその塩の濃度が、5~15 mg/mLである、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を提供する。

WO 2012/118193 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液

技術分野

[0001] 本発明は、2価の溶解性鉄の含有率が低く、亜鉛化合物を含有する、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に関する。

背景技術

[0002] ヒアルロン酸とは、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位が連結して構成されている多糖として知られている。ヒアルロン酸は、一般的に医薬品・化粧品・食品等の原材料として使用されている。ヒアルロン酸の生産方法としては、鶏の鶏冠等からの抽出物により製造する方法や、微生物を用いた発酵法により生産する方法がある。

[0003] 例えば、特許文献1にはストレプトコッカスズーエピデミカスを用いて、発酵法によりヒアルロン酸を生産したことが記載されている。この特許文献1には、培養中に硫酸第一鉄を3倍の濃度になるように添加した場合（実施例3）、添加しない場合（実施例1）よりもヒアルロン酸の収率および分子量が増加したことが記載されている。

[0004] また、特許文献2にはストレプトコッカス・エクイ（ATCC9527）を用いて、発酵法によりヒアルロン酸粉末を生産したことが記載されている。特許文献3には、特許文献2の方法に基づいて生産したヒアルロン酸ナトリウム結晶には、カルシウム、マグネシウム、および鉄が多く含有されていることを表す実験データが記載されている。また特許文献3には、特許文献2の方法に基づいて得たヒアルロン酸含有液にさらにキレート樹脂を接触させることで、カルシウム、マグネシウム、および鉄の含有率が10ppm未満に減少したヒアルロン酸ナトリウム結晶を得たことが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平9-56394

特許文献2：特公平7-2117

特許文献3：特開2008-280430

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、上記文献記載の従来技術は以下の点で改善の余地を有していた。

第一に特許文献1の生産方法では、硫酸第一鉄（硫酸鉄（II）、 FeSO_4 ）を大量に培地に添加しているため、精製後のヒアルロン酸含有溶液に鉄が混入しやすいと考えられる。また、硫酸第一鉄を大量に含む培地から鉄を取り除くには、通常よりも多くのコストが必要になる。

[0007] 第二に特許文献2の生産方法では、ヒアルロン酸粉末にカルシウム、マグネシウム、および鉄が多く含まれており、ヒアルロン酸ナトリウムの純度が低かった。

[0008] 第三に特許文献3の生産方法では、ヒアルロン酸ナトリウム結晶中のカルシウム、マグネシウム、および鉄の含有率を10ppm未満に減少させたことが記載されているが、具体的に含有率がいくつであったかは不明である。またその分析結果はppmオーダーであり、精密性に欠けている。さらに、カルシウム、マグネシウム、および鉄の含有率を減少させたことによって、具体的にどのような効果が得られるのかは記載されていない。

[0009] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下であり、亜鉛化合物を含むために、安定性が高いヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含まれる不純物に関する研究を行った結果、ヒアルロン酸塩水溶液中に混入している2価の溶解性鉄の含有率が高いほどヒアルロン酸分子の安定性が減少することを初めて見出した。また、本発明者らは、驚くべきことに、3価の溶解性鉄の含有率が大きくてもヒアルロン酸分子の安定性は減少せず、2価の溶解性鉄の

含有率が大きい場合に限ってヒアルロン酸分子の安定性の減少が起こっていることも見出した。

[0011] そこで、本発明者らは、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液中に混入している2価の溶解性鉄の含有率を低減させるとともに、2価の溶解性鉄によるヒアルロン酸分子の安定性の減少を抑制する添加物を探し求めたところ、亜鉛化合物を添加することによって、2価の溶解性鉄によるヒアルロン酸分子の安定性の減少を抑制することができることを初めて見出した。また、本発明者らは、驚くべきことに、グリシン、L-アスパラギン酸Na、臭化Na、亜硫酸水素Na、硫化Na、チオグリコール酸Na、ブドウ糖、精製白糖、またはアスコルビン酸を添加した場合には、2価の溶解性鉄によるヒアルロン酸分子の安定性の減少が抑制されず、かえって添加したことによって安定性が減少することも多いことを見出し、本発明を完成した。

[0012] 即ち、本発明によれば、2価の溶解性鉄の含有率が5 p p b以下であり、亜鉛化合物を含有する、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液が提供される。このヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、保存後の極限粘度残存率が良好であることが、後述する実施例で実証されている。そのため、医薬品・化粧品・食品等の原材料に好適である。

[0013] また、本発明によれば、上記ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、医薬組成物が提供される。この医薬組成物は、保存後の極限粘度残存率が良好なヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む。そのため、時間経過とともに生じる粘度の低下、または品質の低下が生じにくい。

[0014] また、本発明によれば、上記ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、関節症治療用注射剤が提供される。この関節症治療用注射剤は、保存後の極限粘度残存率が良好なヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む。そのため、関節内またはその周辺に投与した場合に、良好な滞留性が得られる。

[0015] また、本発明によれば、上記ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、化粧料組成物が提供される。この化粧料組成物は、保存後の極限粘度残

存率が良好なヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む。そのため、時間経過とともに生じる粘度の低下、または品質の低下が生じにくい。

[0016] また、本発明によれば、ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、亜鉛化合物と、を水溶液に溶解させる工程を含み、上記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下である、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の生産方法が提供される。この生産方法によれば、保存後の極限粘度残存率が良好なヒアルロン酸またはその塩を生産できる。

[0017] また、本発明によれば、ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、亜鉛化合物と、を水溶液に溶解させる工程を含み、上記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下である、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定化促進方法が提供される。亜鉛化合物を、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含有させれば、保存後の極限粘度残存率が顕著に向上することが、後述する実施例で実証されている。そのため、この安定化促進方法によれば、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定化を顕著に促進することができる。

[0018] また、本発明によれば、亜鉛化合物を含む、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を安定化するための、安定化剤が提供される。亜鉛化合物を、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含有させれば、保存後の極限粘度残存率が顕著に向上することが、後述する実施例で実証されている。そのため、この安定化剤を、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に添加すれば、顕著に安定化させることができる。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、2 価の溶解性鉄の含有率が 5 p p b 以下であり、亜鉛化合物を含むために、安定性が高いヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液が得られる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図 1 は、2 価の溶解性鉄および塩化亜鉛を含有する水溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム粉末を添加したときの、極限粘度残存率の変化を表したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、同様な内容については繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

[0022] <ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液>

本発明の一実施形態は、2 価の溶解性鉄の含有率が 5 p p b 以下であり、亜鉛化合物を含む、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液である。このような組成からなるヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、後述する実施例で実証されているように、保存後の極限粘度残存率が高く、物理的な安定性に優れている。また、長期保存後または長期時間経過後にも粘度や品質の低下が生じにくく、例えば医薬品・化粧品・食品等の原材料に好適である。

[0023] 上記の亜鉛化合物は、例えばサリチル酸亜鉛、リン酸亜鉛、硫酸亜鉛、硝酸亜鉛、ヨウ化亜鉛、フッ化亜鉛、塩化亜鉛、臭化亜鉛、炭酸亜鉛、p-t-ブチル安息香酸亜鉛、チオシアン酸亜鉛、乳酸亜鉛、酢酸亜鉛、または酸化亜鉛等であってもよい。また、亜鉛酸イオンの塩等のように錯体としても用いることができる。医薬組成物の原材料として使用する場合には、酢酸亜鉛、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、または酸化亜鉛が好ましい。注射剤の原材料として用いる場合には、酢酸亜鉛または塩化亜鉛が好ましい。また、好ましくは、エンドトキシン濃度を低減したものをを用いる。

[0024] 上記の 5 p p b 以下は、例えば 0.001、0.01、0.1、0.5、1、2、4、または 5 p p b であってもよい。またこの含有率は、ここで例示した値以下、またはいずれか 2 つの値の範囲内であってもよい。この含有率は、ヒアルロン酸

またはその塩を含む水溶液の安定性を向上させるという観点からは、より少ない方が好ましい。

[0025] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含まれる、上記の亜鉛化合物の含有率は、例えば0.005、0.01、0.1、0.5、0.8、1、1.5、2、5、10、50、または100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であってもよい。またこの含有率は、ここで例示したいずれか2つの値の範囲内であってもよい。またこの含有率は、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定性をより向上させるという観点からは、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上が好ましく、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上がより好ましい。またこの含有率は、生産コスト低減、または操作性向上の観点からは10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下が好ましく、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下がより好ましい。

[0026] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含まれる、ヒアルロン酸ナトリウムまたはその塩の平均分子量は、例えば50万、80万、100万、150万、180万、200万、250万、300万、500万、または800万であってもよい。この平均分子量は、ここで例示したいずれか2つの値の範囲内であってもよい。ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の粘性をより向上させるという観点からは、100万以上が好ましく、150万以上がより好ましい。粘性の高いヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、関節症治療用の注射剤として使用した場合、患部での滞留性に優れている。ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含まれるヒアルロン酸またはその塩の平均分子量は、極限粘度を測定した後、L a u r e n t の式 (LAURENT et al., Biochim Biophys Acta, 1960 Aug 26;42:476-485.) を用いて算出することができる。

[0027] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液に含まれる、ヒアルロン酸またはその塩の含有量は、例えば、0.1、1、5、8、9、10、11、12、15、または20 mg/mL であってもよい。この含有率は、ここで例示したいずれか2つの値の範囲内であってもよい。治療効果、または注射剤等に使用する際の操作性の観点からは、5と15 mg/mL の値の範囲内が好ましく、8と12 mg/mL の値の範囲内がより好ましい。

[0028] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液のpHは、例えば5.5

、6、6.5、6.8、7、7.8、8、8.5、または9であってもよい。このpHは、ここで例示したいずれか2つの値の範囲内であってもよい。またこのpHは、安定性の観点からは、6.5と8の値の範囲内が好ましく、6.8と7.8の値の範囲内がより好ましい。

[0029] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、例えば、ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、亜鉛化合物と、を水溶液に溶解させる工程を含み、上記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下である、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の生産方法によって得ることができる。この生産方法は複雑な工程を必ずしも必要とせず、生産性またはコスト面で優れている。

[0030] 本明細書において「ヒアルロン酸の塩」とは、例えばヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸亜鉛、ヒアルロン酸カルシウム、ヒアルロン酸マグネシウム、またはヒアルロン酸アンモニウムであってもよい。この中でも、所望の粘性、または関節症への治療効果が期待できるという観点からは、ヒアルロン酸ナトリウムが好ましい。ヒアルロン酸ナトリウムの化学名は、例えば[→3)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-sodium glucopyranosyluronate-(1→]n(IUPAC)で表すことができる。

[0031] 本明細書において「2価の溶解性鉄」とは、溶解性の状態にある鉄で2価のものである。Fe²⁺や2価鉄と表記することもできる。

[0032] <医薬組成物等>

本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、医薬組成物の原材料として使用できる。この場合、上記医薬組成物は安定性に優れたヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含むため、長期保存後にも粘度や品質の低下が生じにくい。また、例えば関節内またはその周辺に投与した場合に、患部に長時間または所望の時間滞留することができる。この医薬組成物の剤形は特に限定されないが、関節等の患部へ直接投与することができるという

観点からは注射剤が好ましい。注射剤の容器としては、例えばシリンジ、バイアル、またはアンプルを使用できる。投与に際しては、単独で投与することも可能ではあるが、薬理学的に許容される1つまたはそれ以上の担体もしくは賦形剤と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供することが好ましい。この医薬組成物は投与形態に合わせて、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸リドカイン、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。またこの医薬組成物は、添加剤としてリン酸水素ナトリウム、結晶リン酸二水素ナトリウム、塩化ナトリウムを含んでいてもよい。調整された医薬組成物は、例えばヒトや哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギ、イヌ、サル、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコなど）に対して投与することができる。なお医薬組成物には、予防を目的として使用される組成物を含む。

[0033] この医薬組成物の投与方法は被験者の年齢、症状、患部等により適宜選択することができる。変形性膝関節症の治療に使用する場合には、例えば、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回膝関節腔内に投与することができる。または、症状の維持を目的とする場合は、2~4週間隔で投与することができる。また肩関節周囲炎の治療に使用する場合には、例えば、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回肩関節（肩関節腔、肩峰下滑液包、または上腕二頭筋長頭腱腱鞘）内に投与することができる。また関節リウマチにおける膝関節痛の治療に使用する場合には、例えば、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回膝関節腔内に投与することができる。また、適切な化学療法薬と併用で投与してもよい。

[0034] この医薬組成物の薬理作用としては、例えば、a)ヒアルロン酸塩が軟骨組織に結合し表面を被覆することによる粘弾性もしくは潤滑作用、b)軟骨基質の安定化による関節軟骨保護作用(変性抑制作用、修復作用等)、c)炎症性細

胞及び滑膜細胞の表面を被覆することによる、もしくは発痛増強物質の産生抑制等による鎮痛作用、またはd)滑膜及び軟骨変性を伴う関節炎と密接な関わりをもつ滑膜細胞、軟骨細胞、もしくは好中球やマクロファージといった炎症性細胞に影響を及ぼして発現される炎症作用、を挙げることができる。これら作用により、例えば疼痛の軽減、または日常生活活動や関節可動域の改善が期待される。

[0035] 本実施形態のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液は、化粧品組成物の原材料として使用できる。この場合、上記化粧品組成物は、安定性に優れたヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含むため、長期保存後にも粘度や品質の低下が生じにくい。また、保湿用の化粧品組成物として使用する場合、保湿効果が持続しやすい。

[0036] <安定化方法等>

他の実施形態は、ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、亜鉛化合物と、を水溶液に溶解させる工程を含み、上記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下である、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定化促進方法である。この方法によれば、物理的な安定性が高い、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を得ることができる。またこの方法は、複雑な工程を必ずしも必要とせず、利便性に優れている。

[0037] また、亜鉛化合物はヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定化剤の原材料として使用できる。この安定化剤を用いれば、2価の溶解性鉄の含有率が5ppb以下の、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の、物理的な安定性を向上させることができる。この安定化剤は、粉末状または液状であってもよい。また液状の場合には緩衝剤を含んでいてもよい。

[0038] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。また、上記実施形態に記載の構成を組み合わせることもできる。

実施例

[0039] 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0040] <実施例 1>

以下の手順で、ヒアルロン酸Na水溶液を調整した。まず、グルコース5%、リン酸第1カリウム0.2%、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%からなる培地1リットルを加熱殺菌後、ストレプトコッカス・エキF M-100（微工研条寄第9027号）を接種した。空気を1vvmで通気しながら、攪拌200回転/分、温度33℃、pH8.5（20%水酸化ナトリウムの自動滴下によるコントロール）で20時間培養した。この液を菌体ろ過装置によりろ過し、水に対して12時間透析して透析膜内のヒアルロン酸溶液を回収した。回収容器は、鉄の混入を防ぐため、内表面がガラス製のものを用いた。ここに塩化ナトリウムを2.5%となるように添加し、エタノールをヒアルロン酸溶液の2倍量加えてヒアルロン酸Naを沈殿させた。沈殿をエタノールで5回洗浄し、不純物を十分に洗い流してから40℃で10時間風乾し、ヒアルロン酸Naの粉末を得た。

[0041] 次に、得られたヒアルロン酸Na粉末を、2mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に溶解し、ヒアルロン酸Naをそれぞれ5、8、10、12、15mg/mL含むヒアルロン酸Na水溶液を得た。さらに、極限粘度を測定し、Laurentの式を用いてヒアルロン酸Naの分子量を求めた結果、253万であった。

[0042] <比較例 1>

実施例1に記載の手順でストレプトコッカス・エキF M-100を培養し、特許文献3（特開2008-280430）の実施例1に記載の手順と同様の手順で、ヒアルロン酸Na水溶液を精製した。具体的には、まず、グルコース5%、リン酸第1カリウム0.2%、ポリペプトン1.0%、酵母エキス0.5%からなる培地1リットルを加熱殺菌後、ストレプトコッカス・エキF M-100を接種した。空気を1vvmで通気しながら、攪拌200回転/分、温

度 33℃、pH 8.5（20%水酸化ナトリウムの自動滴下によるコントロール）で20時間培養した。培養液を、イオン交換水を用いて10倍に希釈し、その2.5L水溶液に活性炭（武田薬品社製の白鷺RW50-T）を5g、パーライト（三井金属鉱業株式会社のロカヘルプ#409）を30g添加して1時間処理し、ヌッチェを用いて濾過した。この操作を2回繰り返して培地中の有機成分を除去し、ヒアルロン酸Na含有液を調整した。次に、内径15mm、高さ300mmのクロマトカラムに三菱化学社製ダイヤイオンCR11を68mL充填し、樹脂を再生した。このクロマトカラムに上記ヒアルロン酸Na含有液2.5Lを、SV=18（1200mL/h）で通液した。クロマトカラム通過液1Lに食塩2gを溶解し、pH7に調整後、2-プロパノールで析出を行い、40℃で真空乾燥し、ヒアルロン酸Naの粉末を得た。

[0043] 次に、得られたヒアルロン酸Na粉末を、2mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に溶解し、ヒアルロン酸Naをそれぞれ5、8、10、12、15mg/mL含むヒアルロン酸Na水溶液を得た。さらに、極限粘度を測定し、Laurentの式を用いてヒアルロン酸Naの分子量を求めた結果、240万であった。

[0044] <評価例1>

（1）溶解性鉄の分析

実施例1および比較例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を、2mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に溶解し、ヒアルロン酸Naを5、8、10、12、または15mg/mL含有するヒアルロン酸Na水溶液をそれぞれ調製した（No.1~10）。次に、それぞれの水溶液について、鉄量2価の溶解性鉄量、2価および3価の溶解性鉄量、および全鉄量を下記（1-1）~（1-3）の手順で測定した。全鉄量には溶解性および不溶解性の鉄量を含む。鉄量2価の溶解性鉄量、2価および3価の溶解性鉄量、および全鉄量の検出限界は、5ppbであった。

[0045] （1-1）2価の溶解性鉄の分析方法

- a) ヒアルロン酸Na水溶液2.75gをサンプル瓶に分取する。
- b) チオシアン酸カリウム溶液0.1mL、1,10-フェナントロリン溶液0.05mLを添加して混合する。
- c) 約10mLに希釈した後、約10分間放置する。
- d) クロロホルム5mLを加えた後、密栓する。5分間振り混ぜ、抽出する。
- e) 静置後、クロロホルム相を4mL分取し、別のサンプル瓶に移す。
- f) ホットプレート上で蒸発乾固した後、濃硝酸0.5mLを加え酸分解する。
- g) 希硝酸(1+100)2mLを加え、残分を溶解する。
- h) ICP発光分析でFeを定量する。

[0046] (1-2) 2価および3価の溶解性鉄の分析方法

- a) ヒアルロン酸Na水溶液2.75gをサンプル瓶に分取する。
- b) 塩酸ヒドロキシルアミン溶液0.2mLを添加する。
- c) 1,10-フェナントロリン溶液0.2mL、チオシアン酸カリウム溶液0.5mLを添加する。
- d) 約10mLに希釈した後、約10分間放置する。
- e) 4-メチル-2-ペンタノン5mLを加えた後、密栓する。1分間振り混ぜ、抽出する。
- f) 静置後、4-メチル-2-ペンタノン相を4mL分取し、別のサンプル瓶に移す。
- g) ホットプレート上で蒸発乾固した後、濃硝酸0.5mLを加え酸分解する。
- h) 希硝酸(1+100)2mLを加え、残分を溶解する。
- i) ICP発光分析でFeを定量する。

[0047] (1-3) 全鉄の分析方法

- a) ヒアルロン酸Na水溶液2.75gをサンプル瓶に分取する。
- b) HCl(1+1)0.1mLを加えホットプレートで加熱する。

c) 上記(1-2) 2価および3価の溶解性鉄の分析方法溶解性鉄の分析のb)以降の操作を行う。

[0048] (1-4) 鉄量の分析結果

上記(1-1)～(1-3)の分析結果を表1に示す。

[0049] [表1]

No.	ヒアルロン酸Na 濃度 (mg/mL)	2価の溶解性鉄量 (ppb)	溶解性鉄量 (2価+3価) (ppb)	全鉄量 (ppb)
1	実施例1	5	検出されず	検出されず
2		8	検出されず	検出されず
3		10	検出されず	検出されず
4		12	検出されず	検出されず
5		15	検出されず	検出されず
6	比較例1	5	6	20
7		8	9	29
8		10	11	35
9		12	15	43
10		15	17	53

[0050] (2) 極限粘度測定

2 mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、実施例1または比較例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を、ヒアルロン酸Na濃度が10 mg/mLとなるようにそれぞれ溶解した (No. 11～12)。さらに、80°Cで24時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率(%)を測定した結果を表2に示す。なお極限粘度は第十五改正日本薬局方第二追補「精製ヒアルロン酸ナトリウム」の粘度の項の記載に従い測定した。その結果を表2に示す。

[0051] [表2]

No.		保存前極限粘度 (dL/g)	保存後極限粘度 (dL/g)	極限粘度残存率(%)
11	実施例1	35.6	26.8	75.3
12	比較例1	34.1	18.2	53.4

[0052] 2 mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、表3に示すように塩化鉄(II) (FeCl₂)を溶解した (No.13～19)。次

に、それぞれの水溶液に実施例 1 で調製したヒアルロン酸 N a の粉末を、ヒアルロン酸 N a 濃度が 1 0 m g / m L となるように溶解した。さらに、8 0 ° C で 2 4 時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率 (%) を測定した。その結果を表 3 に示す。

[0053] [表3]

No.	塩化鉄(II) 添加濃度 (ppb)	塩化鉄(II)に含まれる 2価の溶解性鉄濃度 (ppb)	保存前 極限粘度 (dL/g)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度 残存率(%)
13	0	0	35.6	26.8	75.3
14	2.3	1	35.6	24.2	68.0
15	4.5	2	35.6	22.1	62.1
16	11.3	5	35.6	19.3	54.2
17	15.9	7	35.6	18.9	53.1
18	22.7	10	35.6	18.7	52.5
19	113	50	35.6	17.0	47.8

[0054] 2 m M リン酸バッファーおよび 0 . 9 % 塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、表 4 に示すように塩化鉄 (III) (FeCl_3) を溶解した (No. 20~22) 。次に、それぞれの水溶液に実施例 1 で調製したヒアルロン酸 N a の粉末を、ヒアルロン酸 N a 濃度が 1 0 m g / m L となるように溶解した。さらに、8 0 ° C で 2 4 時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率 (%) を測定した。その結果を表 4 に示す。

[0055] [表4]

No.	塩化鉄(III) 添加濃度 (ppb)	塩化鉄(III)に含まれる 3価の溶解性鉄濃度 (ppb)	保存前 極限粘度 (dL/g)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度残存 率(%)
20	0	0	35.6	26.8	75.3
21	29.0	10	35.6	26.2	73.6
22	290	100	35.6	26.9	75.6

[0056] 以上の結果から、1) 実施例 1 に記載の方法を用いれば、2 価の溶解性鉄の混入量が 5 p p b 以下のヒアルロン酸 N a 水溶液を調整できること、2) 2 価の溶解性鉄によって、ヒアルロン酸 N a 水溶液の保存後の極限粘度が低下すること、3) 3 価の溶解性鉄は、ヒアルロン酸 N a 水溶液の保存後の極

限粘度に影響を与えないこと、がわかった。

[0057] <評価例 2>

2 mM リン酸バッファーおよび 0.9% 塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、表 5 に示すように各種添加物を溶解した (No. 23~36)。次に、それぞれの水溶液に実施例 1 で調製したヒアルロン酸 Na の粉末を、濃度が 10 mg/mL となるように溶解した。さらに、80°C で 24 時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率 (%) を測定した。添加物としては、塩化亜鉛、サリチル酸亜鉛、ヨウ化亜鉛、酢酸亜鉛、グリシン、L-アスパラギン酸 Na、臭化 Na、亜硫酸水素 Na、硫化 Na、チオグリコール酸 Na、ブドウ糖、精製白糖、およびアスコルビン酸を使用した。

[0058] [表 5]

No.	添加物	添加物濃度 (μ g/mL)	保存前 極限粘度 (dL/g)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度残存 率 (%)
23	なし	0	35.6	26.7	75.0
24	塩化亜鉛	1	35.6	29.0	81.5
25	サリチル酸亜鉛	1	35.6	28.6	80.3
26	ヨウ化亜鉛	1	35.6	28.9	81.2
27	酢酸亜鉛	1	35.6	29.0	81.5
28	グリシン	1000	35.6	26.6	74.7
29	L-アスパラギン酸 Na	1000	35.6	26.6	74.7
30	臭化 Na	1000	35.6	25.7	72.2
31	亜硫酸水素 Na	1000	35.6	14.6	41.0
32	硫化 Na	1000	35.6	9.0	25.3
33	チオグリコール酸 Na	1000	35.6	9.7	27.2
34	ブドウ糖	1000	35.6	14.6	41.0
35	精製白糖 (ショ糖)	1000	35.6	26.5	74.4
36	アスコルビン酸 Na	1	35.6	24.0	67.4

・添加剤

塩化亜鉛：和光純薬社、263-00271

サリチル酸亜鉛：和光純薬社、269-00692

ヨウ化亜鉛：和光純薬社、268-01061

酢酸亜鉛：和光純薬社、263-00232

グリシン：和光純薬社、036435

L-アスパラギン酸Na：和光純薬社、193-01262

臭化Na：和光純薬社、193-01505

亜硫酸水素Na：和光純薬社、190-01375

硫化Na：和光純薬社、197-03362

チオグリコール酸Na：和光純薬社、590-11762

ブドウ糖：和光純薬社、076-05705

精製白糖（ショ糖）：和光純薬社、196-13705

アスコルビン酸Na：和光純薬社、196-01252

[0059] 以上の結果、実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を溶解させた水溶液は、塩化亜鉛、サリチル酸亜鉛、ヨウ化亜鉛、または酢酸亜鉛を含有させると、ヒアルロン酸Na水溶液の安定性が向上することがわかった。また、臭化Na、亜硫酸水素Na、硫化Na、チオグリコール酸Na、ブドウ糖、またはアスコルビン酸を添加した場合には、かえって安定性が低下していた。

[0060] <評価例3>

2 mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、表6に示すように各種添加物を溶解した（No. 37～43）。さらに、それぞれの水溶液に塩化鉄（II）を11.3 ppb（2価の溶解性鉄として5 ppb）添加した。次に、それぞれの水溶液に実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を、濃度が10 mg/mLとなるように溶解した。その後、80°Cで24時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率（%）を測定した。

[0061]

[表6]

No.	添加物	添加物濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	保存前 極限粘度 (dL/g)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度残 存率(%)
37	なし	0	35.6	19.3	54.2
38	塩化亜鉛	1	35.6	23.6	66.3
39	酢酸亜鉛	1	35.6	23.5	66.0
40	グリシン	1000	35.6	19.4	54.5
41	L-アスパラギン酸 Na	1000	35.6	19.8	55.6
42	臭化 Na	1000	35.6	18.7	52.5
43	亜硫酸水素 Na	1000	35.6	8.5	23.9

[0062] 以上の結果、実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を溶解させた水溶液は、2価の溶解性鉄を5ppb含有させると、ヒアルロン酸Na水溶液の安定性が低下することが示された。さらには、その安定性の低下は、塩化亜鉛または酢酸亜鉛によって顕著に抑制されることがわかった。

[0063] <評価例3>

2mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、表7に示す濃度で塩化亜鉛を溶解した(No.44~50)。次に、それぞれの水溶液に実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を、濃度が10mg/mLとなるように溶解した。さらに、80°Cで24時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率(%)を測定した。

[0064] [表7]

No.	塩化亜鉛 濃度($\mu\text{g/mL}$)	保存前 極限粘度 (dL/g)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度残存率 (%)
44	0	35.6	26.9	75.6
45	0.01	35.6	27.5	77.2
46	0.1	35.6	28.3	79.5
47	0.5	35.6	28.7	80.6
48	1	35.6	29.0	81.5
49	5	35.6	29.1	81.7
50	10	35.6	28.9	81.2

[0065] 以上の結果から、実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を溶解させた水溶液は、塩化亜鉛を0.01 $\mu\text{g/mL}$ 以上含有させると、ヒアルロン酸

Na水溶液の安定性が向上することがわかった。また、その安定性の向上は、塩化亜鉛を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有したあたりで緩やかになった。

[0066] <評価例4>

2 mMリン酸バッファーおよび0.9%塩化ナトリウムを含む水溶液に対して、塩化亜鉛を、濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように溶解した。さらに、それぞれの水溶液に表8に示す濃度の塩化鉄(II)を添加した(No.51~56)。次に、それぞれの水溶液に実施例1で調製したヒアルロン酸Naの粉末を、濃度が $10 \text{ mg}/\text{mL}$ となるように溶解した。その後、 80°C で24時間保存した後、極限粘度および極限粘度残存率(%)を測定した。

[0067] [表8]

No.	塩化鉄(II) 添加濃度 (ppb)	塩化鉄(II)に含まれる 2価の溶解性鉄濃度 (ppb)	塩化亜鉛 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	保存後 極限粘度 (dL/g)	極限粘度 残存率(%)
51	0	0	1	29.0	81.5
52	2.3	1	1	28.2	79.2
53	4.5	2	1	25.5	71.6
54	11.3	5	1	23.6	66.3
55	15.8	7	1	20.8	58.4
56	22.6	10	1	19.7	55.3

[0068] 表8の結果と、表3の結果をグラフにすると、図1の通りである。この図1から、2価の溶解性鉄濃度が低濃度含まれているヒアルロン溶液に、塩化亜鉛を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 含有させると、ヒアルロン酸Na水溶液の安定性が向上することがわかる。この安定化効果は、特に2価の溶解性鉄濃度が5 ppb以下のときに顕著であった。

[0069] 以上のように、2価の溶解性鉄の含有率が低いヒアルロン酸Na水溶液は、保存後の極限粘度残存率が向上していた。さらには、そのヒアルロン酸Na水溶液に塩化亜鉛を含有させると、より一層極限粘度残存率が向上した。このヒアルロン酸Na水溶液は安定性が高く、長期保存後にも粘度や品質の低下が生じにくいため、例えば医薬組成物等の原材料として優れている。また、長期保存に適しているためコストも抑えられる。

[0070] 以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

請求の範囲

- [請求項1] 2価の溶解性鉄の含有率が5 p p b以下であり、亜鉛化合物を含有する、ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項2] 前記ヒアルロン酸またはその塩の濃度が、5～15 m g / m Lである、請求項1に記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項3] 前記亜鉛化合物が、サリチル酸亜鉛、リン酸亜鉛、硫酸亜鉛、硝酸亜鉛、ヨウ化亜鉛、フッ化亜鉛、塩化亜鉛、臭化亜鉛、炭酸亜鉛、p - t - ブチル安息香酸亜鉛、チオシアン酸亜鉛、乳酸亜鉛、酢酸亜鉛、および酸化亜鉛からなる群から選ばれる1種以上の亜鉛化合物である、請求項1または2に記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項4] 前記亜鉛化合物の含有量が0.01～100 μ g / m Lである、請求項1～3いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項5] 前記ヒアルロン酸またはその塩の平均分子量が100万以上である、請求項1～4いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項6] 前記ヒアルロン酸の前記塩が、ヒアルロン酸ナトリウムである、請求項1～5いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液。
- [請求項7] 請求項1～6いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、医薬組成物。
- [請求項8] 請求項1～6いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、関節症治療用注射剤。
- [請求項9] 請求項1～6いずれかに記載のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を含む、化粧品組成物。
- [請求項10] ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、

亜鉛化合物と、

を水溶液に溶解させる工程を含み、

前記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10 mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5 ppb以下である、

ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の生産方法。

[請求項11]

ヒアルロン酸またはその塩、および2価の溶解性鉄を含有する組成物と、

亜鉛化合物と、

を水溶液に溶解させる工程を含み、

前記組成物は、ヒアルロン酸またはその塩の濃度が10 mg/mLとなるように水溶液に溶解した時の、水溶液中の2価の溶解性鉄の含有率が5 ppb以下である、

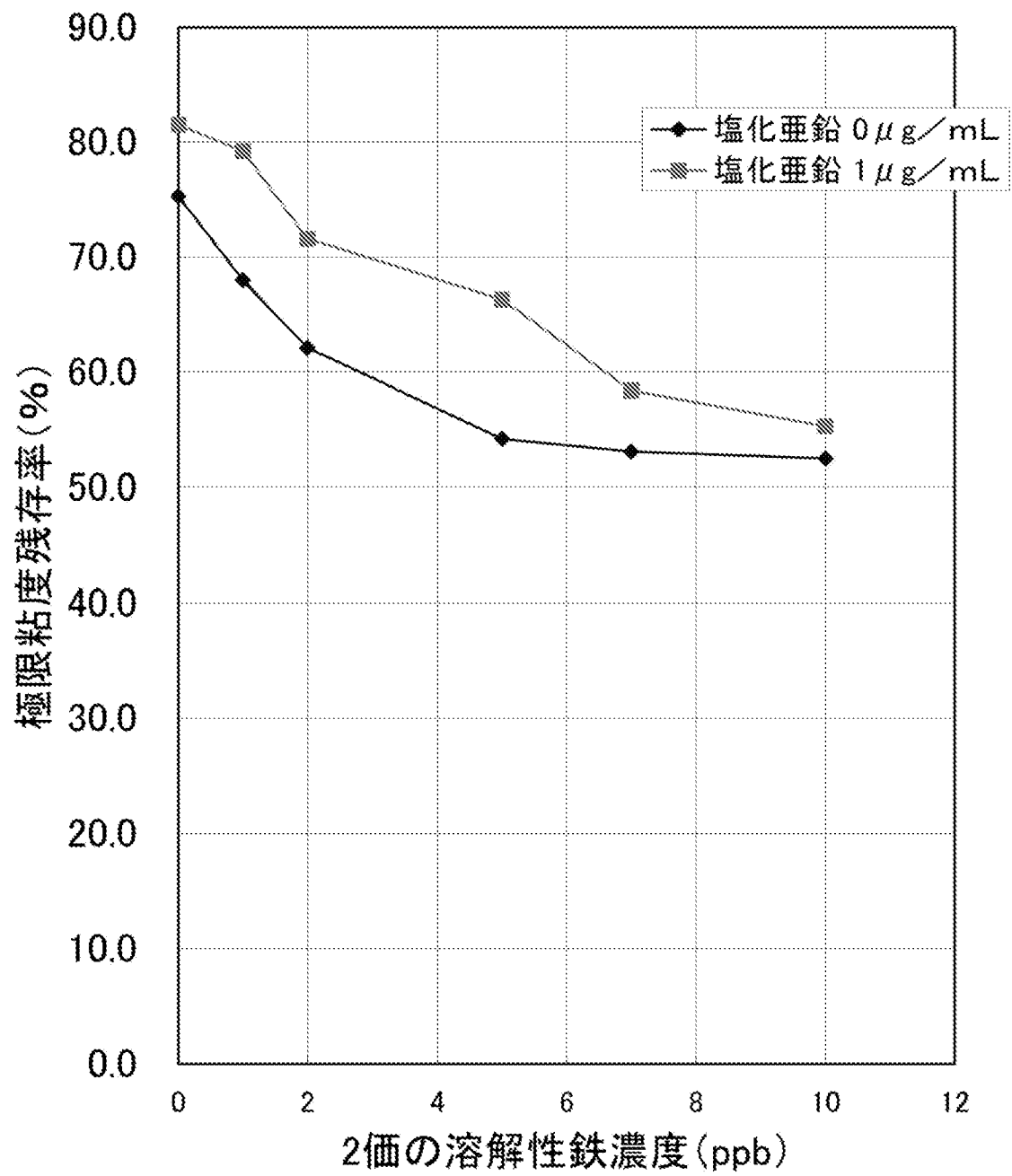
ヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液の安定化促進方法。

[請求項12]

亜鉛化合物を含む、

2価の溶解性鉄の含有率が5 ppb以下のヒアルロン酸またはその塩を含む水溶液を安定化するための、安定化剤。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/728(2006.01)i, A61K8/27(2006.01)i, A61K8/73(2006.01)i, A61K47/02
(2006.01)i, A61P9/02(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/00-31/80, A61K8/27, A61K8/73, A61K47/00-47/48, A61P9/00-9/72,
A61Q19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-160464 A (Denki Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha), 03 June 2003 (03.06.2003), claim 1; paragraph [0013]; Effects of the Invention; examples 1 to 5 (Family: none)	1-12
Y	PIGMAN, W. et al, Depolymerization of hyaluronic acid by the ORD reaction, Arthritis & Rheumatism, 1961, Vol.4, No.3, p.240-252, the summary portion in the beginning, fig.1, 2, 7, summary	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 March, 2012 (26.03.12)

Date of mailing of the international search report
10 April, 2012 (10.04.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/055426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HERP,A. et al, Correlation between the autoxidation of ferrous ions or of L-ascorbic acid and the depolymerization of hyaluronate, Carbohydrate Research, 1971, Vol.16, No.2, p.395-407, page 396, the last paragraph to page 399, 2nd paragraph, tables I, II	1-12
Y	WONG,S.F. et al, The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid, Journal of inorganic biochemistry, 1981, Vol.14, No.2, p.127-34, ABSTRACT, page 129, the last paragraph to page 130, 1st paragraph, fig. 1, 2	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/728(2006.01)i, A61K8/27(2006.01)i, A61K8/73(2006.01)i, A61K47/02(2006.01)i,
A61P9/02(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/00-31/80, A61K8/27, A61K8/73, A61K47/00-47/48, A61P9/00-9/72, A61Q19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2003-160464 A (電気化学工業株式会社) 2003. 06. 03, 請求項 1, 【0013】, 【発明の効果】, 実施例 1-5 (ファミリーなし)	1-12
Y	PIGMAN, W. et al, Depolymerization of hyaluronic acid by the ORD reaction, Arthritis & Rheumatism, 1961, Vol.4, No.3, p.240-252, 冒頭要旨, Fig.1, Fig.2, Fig.7, SUMMARY	1-12

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 6 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 4 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒巻 真介

4 C

4 7 6 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	HERP, A. et al, Correlation between the autoxidation of ferrous ions or of L-ascorbic acid and the depolymerization of hyaluronate, Carbohydrate Research, 1971, Vol. 16, No. 2, p. 395-407, 第 396 頁最終段落-第 399 頁第 2 段落, TABLE I, TABLE II	1-12
Y	WONG, S.F. et al, The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and by ascorbic acid, Journal of inorganic biochemistry, 1981, Vol. 14, No. 2, p. 127-34, ABSTRACT, 第 129 頁最終段落-第 130 頁第 1 段落, FIGURE 1, FIGURE 2	1-12