(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4369969号
(P4369969)

(45)発行日　平成21年11月25日(2009.11.25)　(24)登録日　平成21年9月4日(2009.9.4)

(51)Int.Cl.		F I	
A61K 33/42	(2006.01)	A61K	33/42
A61K 35/60	(2006.01)	A61K	35/60
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02
A61P 19/08	(2006.01)	A61P	19/08
A61P 19/10	(2006.01)	A61P	19/10

請求項の数 9　(全 27 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-278908 (P2007-278908)
(22)出願日　平成19年10月26日 (2007.10.26)
(65)公開番号　特開2009-107938 (P2009-107938A)
(43)公開日　平成21年5月21日 (2009.5.21)
審査請求日　平成20年8月7日 (2008.8.7)

早期審査対象出願

(73)特許権者　508137888
株式会社アールビーエス
島根県松江市古志原２－２－４１
(74)代理人　100076831
弁理士　伊藤　捷雄
(72)発明者　岡田　芳明
東京都練馬区桜台２－４７－１１　ライオンズシティ桜台２０６

審査官　佐々木　秀次

最終頁に続く

(54)【発明の名称】生体適合性材料並びにその製造方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの抽出液（含水率７０～７５重量％）と、同じく魚鱗由来のコラーゲンの抽出液(含水率４０～６０重量％)とを８対２の重量比で含む混合物を熱風乾燥させて作った複合体を主成分とすることを特徴とする、生体適合性材料。

【請求項２】

前記複合体が、１００ｇ中に、水分４．２ｇ、コラーゲン２０．４ｇ、ナトリウム３９０ｍｇ、リン１４．２ｇ、ハイドロキシアパタイト７０．２ｇ、マグネシウム３２３ｍｇを含んでいることを特徴とする、請求項１に記載の生体適合性材料。

【請求項３】

前記ハイドロキシアパタイトは、分子量１０００であることを特徴とする、請求項１又は請求項２のいずれかに記載の生体適合性材料。

【請求項４】

前記コラーゲンは、分子量５００～１０００であることを特徴とする、請求項１又は請求項２のいずれかに記載の生体適合性材料。

【請求項５】

前記ハイドロキシアパタイトは、１００ｇ中に、カルシウム３３．５ｇ、リン１７．２ｇ、マグネシウム３９０ｍｇ、ナトリウム９００ｍｇ、蛋白質０．１ｇ以下、水分３．４ｇを含んでいることを特徴とする、請求項１に記載の生体適合性材料。

【請求項６】

前記コラーゲンは、１００ｇ中に、水分４．５ｇ、脂質０．２ｇ、灰分０．２ｇ、ナトリウムは５２．６ｍｇを含んでいることを特徴とする、請求項１に記載の生体適合性材料。

【請求項７】

請求項１に記載の複合体を得るに当たり、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの抽出液（含水率７０～７５重量％）と魚鱗由来のコラーゲンの抽出液（含水率４０～６０重量％）を８対２の重量比で混合撹拌させた後、その混合物を熱風乾燥させ、さらに粉砕させた後メッシュパスさせることを特徴とする、生体適合性材料の製造方法。

【請求項８】

前記複合体は、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの製造工程の中に組み込まれて製造されることを特徴とする、請求項７に記載の生体適合性材料の製造方法。

【請求項９】

前記複合体は、魚鱗由来のコラーゲンの製造工程の中に組み込まれて製造されることを特徴とする、請求項７に記載の生体適合性材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、哺乳動物のような生体に消化吸収され易く成した魚鱗由来の生体適合性材料並びにその製造方法に関するものである。

【背景技術】

【０００２】

カルシウムは、人間の骨や歯を構成する重要な成分であり又、循環器系や神経伝達に於いても非常に重要であることが知られている。そして又、コラーゲンは人間の骨や軟骨、歯、皮膚、血管、臓器など、殆どの組織に存在する人体の構成に欠かすことのできない重要な成分であることも知られている。ところがこのカルシウムやコラーゲンが様々な要因により体内で減少することから、骨粗鬆症の発症や代謝機能の低下など、所謂、老化現象として顕在化することになる。

【０００３】

ハイドロキシアパタイト（Hydroxyapatite）は、カルシウムとリン酸からなる、無機化合物の総称であり、化学式$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$で表され、骨や歯の主要成分である。このハイドロキシアパタイトの製造方法としては、魚鱗を原料とするものが提案されている（特許文献１参照）。

【０００４】

他方、コラーゲンは、蛋白質の一種であり、牛や豚等の哺乳動物のコラーゲン組織から抽出されることが多いが、通常の滅菌や殺菌方法では除去が困難であるプリオンなどの病原体の感染の危険性が常に存在しているために、このような心配のない魚からコラーゲンを製造することが提案されている。この魚からのコラーゲンの製造は、魚の皮を原料とするものであったが、このような魚の皮を原料としたコラーゲンは、魚臭さを有し、しかも白濁を生じ透過率が低いといった問題があった。このため、魚特有の魚臭さを解決する手段として、魚鱗からコラーゲンを製造する方法がいくつか提案されている（例えば、特許文献２、３、４参照。）。

【特許文献１】特開２００１－２１１８９５号公報
【特許文献２】特開平０５－１５５９００号公報
【特許文献３】特開２００３－３２７５９９号公報
【特許文献４】特開２００３－２３８５９８号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

上述したようなハイドロキシアパタイトや、従来のカルシウムは人体に吸収されにくいが、生体適合性を有し、人体に吸収されることによって人体に不足するこれらの成分を補

うことができることが知られている。そこでこの発明者は、人体に消化吸収され易いように鋭意研究を重ねたところ、従来、吸収されにくいとされたカルシウムが、ハイドロキシアパタイトとコラーゲンを複合体とすることによって、コラーゲンが足場の役割となり、コラーゲンに吸着結合したハイドロキシアパタイトが人体に吸収され易くなることを知り、この知見に基づいてこの発明を完成するに至った。

【０００６】

本発明の目的は、人体に消化吸収され易いように成した、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトと魚鱗由来のコラーゲンから成る生体適合性材料を提供せんとするにある。

本発明の次の目的は、できる簡単な方法で人体に消化吸収され易い魚鱗由来のハイドロキシアパタイトと魚鱗由来のコラーゲン生体適合性材料の製造方法を提供せんとするにある。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

上述した目的を達成するために、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの抽出液（含水率７０～７５重量％）と、同じく魚鱗由来のコラーゲンの抽出液(含水率４０～６０重量％)とを８対２の重量比で含む混合物を熱風乾燥させて作った複合体を主成分とすることを特徴とする。

【０００８】

この発明はまた、前記複合体が、１００ｇ中に、水分４．２ｇ、コラーゲン２０．４ｇ、ナトリウム３９０ｍｇ、リン１４．２ｇ、ハイドロキシアパタイト７０．２ｇ。マグネシウム３２３ｍｇを含んでいることを特徴とする。

【０００９】

この発明はさらに、前記ハイドロキシアパタイトは、分子量１０００であることを特徴とする。

【００１０】

この発明はさらに、前記コラーゲンは、分子量５００～１０００であることを特徴とする。

【００１１】

この発明はさらに、前記ハイドロキシアパタイトは、１００ｇ中に、カルシウム３３．５ｇ、リン１７．２ｇ、マグネシウム３９０ｍｇ、ナトリウム９００ｍｇ、蛋白質０．１ｇ以下、水分３．４ｇを含んでいることを特徴とする。

【００１２】

この発明はまた、前記コラーゲンは、１００ｇ中に、水分４．５ｇ、脂質０．２ｇ、灰分０．２ｇ、ナトリウムは５２．６ｍｇを含んでいることを特徴とする。

【００１３】

この発明はまた、請求項１に記載の複合体を得るに当たり、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの抽出液（含水率７０～７５重量％）と魚鱗由来のコラーゲンの抽出液（含水率４０～６０重量％）を８対２の重量比で混合撹拌させた後、その混合物を熱風乾燥させ、さらに粉砕させた後メッシュパスさせることを特徴とする。

【００１４】

この発明はさらに、前記複合体は、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトの製造工程の中に組み込まれて製造されることを特徴とする。

【００１５】

この発明はさらに、前記複合体は、魚鱗由来のコラーゲンの製造工程の中に組み込まれて製造されることを特徴とする。

【発明の効果】

【００１６】

以上説明したように本発明に係る生体適合性材料によれば、その原料を魚鱗とするので安全であり、かつ、とくにハイドロキシアパタイトとコラーゲンの互いの抽出液を混合撹拌沈着させて複合体とすることにより、ハイドロキシアパタイトの結晶構造の隙間にコラ

ーゲンが吸着結合することとなり、複合体中のコラーゲンが足場の役割となり、コラーゲンに吸着結合したハイドロキシアパタイトが人体に吸収されやすくなるという特徴を有する。また、日本人のカルシウム摂取量は、栄養所要量を下回っており、食事によるカルシウムの摂取不足や、加齢に伴うカルシウム吸収能力の低下等により発症する骨粗鬆症患者は毎年増加しているのが現状であるが、これを解決するための１つの手段として有効である。また本願発明に係る製造方法によれば、本願発明に係る生体適合性材料は、魚鱗由来のハイドロキシアパタイト、又はコラーゲンの製造工程の中に組み込み製造できるため、製造が容易である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１７】

以下、本発明に係る生体適合性材料をハイドロキシアパタイトの製造工程の中に組み入れて製造する場合について説明するが、後述するコラーゲンの製造工程の中に組み入れて製造しても良い。

【実施例１】

【００１８】

図１は上述したように、ハイドロキシアパタイトの製造ラインをメインにして複合体を製造する製造方法の一例を示すフローチャート図である。図面に示すように、この実施例１に係る複合体の製造方法は、乾燥魚鱗を水に浸漬させる浸漬工程１と、この水に浸漬させて水切りをした魚鱗を１５～３５℃の酸性水液中に１０～３０分間浸漬して酸処理を行い、魚鱗に含まれるハイドロキシアパタイトを抽出させる酸処理工程２と、この酸処理工程２からの固形物が含まれるハイドロキシアパタイト抽出液を固液分離する第１固液分離工程３とを含んでいる。この第１固液分離工程３で分離された分離液はハイドロキシアパタイトの製造工程である第1濾過工程５へと進み、固形物（脱灰された魚鱗）は、この固形物からコラーゲンを製造すべくコラーゲン製造工程の第１洗浄工程２３へ移送される。

【００１９】

魚鱗としては、特に限定されず、海水魚、淡水魚などの魚種を問わないが、例えば、鯉、テラピア、すずき、鰯、鯛、鮭、鯵等が挙げられ、魚鱗のハイドロキシアパタイトやコラーゲン含有率及び入手のし易さ等の点から鯉、テラピア、すずき等が好ましい。しかし、実際に使用する魚鱗はさまざまな魚鱗の混合物である場合がある。また、魚鱗は、乾燥魚鱗でも未乾燥魚鱗でもよく、取り扱い易さの点から乾燥魚鱗であることが好ましい。乾燥魚鱗を用いる場合には、酸処理を行う前に乾燥魚鱗を水に浸漬させて水戻しする浸漬（水処理）工程を行う。この実施例では乾燥魚鱗を用いた。

【００２０】

浸漬工程１は、上記したように乾燥魚鱗を水に浸漬させて水戻しを行うものであり、この水戻しは、例えば、通液性のナイロンネットに乾燥魚鱗をいれ、このナイロンネットを乾燥魚鱗に対して２．５～４．０倍の水を入れたタンク内に入れて、１０～１４時間浸漬することによって行う。ナイロンネットの網目サイズは１ｍｍ以下のものを用いることが好ましい。この浸漬工程１を終えた魚鱗は水切りをして次の酸処理工程２へと進む。

【００２１】

この酸処理工程２は、魚鱗からハイドロキシアパタイトを主成分とする灰分を分離するものである。水切りをした魚鱗をナイロンネットより取り出し、酸性水溶液の中に入れて前記魚鱗から前記灰分を分離する。酸性水溶液としては、特に限定されず、有機酸の水溶液でも鉱酸の水溶液でもよいが、好ましくは塩酸水溶液である。この塩酸水溶液は、魚鱗の種類に応じて好ましい条件が変わるが、例えば、魚鱗に対して２．５～４．０倍の水に純度３５％の塩酸（魚鱗に対して６５重量％、塩酸濃度５．７％）を投入したものであることが好ましい。

【００２２】

魚鱗を酸性水溶液に浸漬させて酸処理する際の浸漬時間は、魚鱗の種類に応じて異なるが、例えば、前記の塩酸水溶液の塩酸濃度の条件では、例えば、１０～３０分であること

が好ましく、特に好ましくは１５分である。この間撹拌機を用いて撹拌する。この浸漬時間が１０分未満であると、十分に魚鱗が脱灰されず、かつ、ハイドロキシアパタイトの収率が低くなり、浸漬時間が３０分を超える必要性は少ない。また、酸性水溶液の温度は、特に限定されず、例えば、１５～３０℃であることが好ましく、特に好ましくは、２５℃（±５℃）である。前記の塩酸水溶液の塩酸濃度及び浸漬時間の条件では、この酸性溶液の温度が１５℃未満であると、十分に魚鱗が脱灰されず、かつ、ハイドロキシアパタイトの収率が低くなり、温度が３０℃を超えると、コラーゲンの収率が低くなる。この酸処理を行う場合、魚鱗を酸性水溶液に浸漬させつつ撹拌することが好ましい。撹拌手段としては特に限定されず、例えば、撹拌機以外にヘラ等を用いて行なってもよい。この酸処理工程２を終了すると、次の第１固液分離工程３に移される。

【００２３】

この第１固液分離工程３は、振動篩機などを用いて酸処理工程２を終了した処理抽出液から魚鱗等の固形物を分離するものであり、ここで分離された魚鱗等の固形物は、コラーゲン製造工程へ送られることになり、ハイドロキシアパタイト(灰分)を含んだ処理抽出液が第１濾過工程５へ送られここで濾過される。

【００２４】

この第１濾過工程５は、ハイドロキシアパタイト抽出液の中から、微粒異物を除去するためのものであり、例えば、金網等が用いられる。金網のメッシュは、特に限定されず、２０・２００のものを用いることが好ましい。この第１濾過工程５で濾過されたハイドロキシアパタイト抽出液は、次の脱臭工程６で脱臭処理される。

【００２５】

この脱臭工程６での脱臭処理は、特に限定されず、例えば、活性炭を用いて行うようにしてもよい。この活性炭を用いた場合には、ハイドロキシアパタイト抽出液の１．５パーセントに相当する量を用いることが好ましい。この脱臭処理は、例えば、木質系・ヤシガラ系の活性炭を使用して行うようにしてもよい。脱臭処理後のハイドロキシアパタイト抽出液をさらに第２濾過工程７で濾過する。

【００２６】

この第２濾過工程７での濾過方法はとくに限定されず、例えば、ハイドロキシアパタイト抽出液中に珪藻土をいれ、この液を撹拌しながら珪藻土をコーティングした濾布を通過させる濾過装置等を用いてもよい。この濾過後の酸処理液がアパタイト析出工程８でアパタイト析出処理される。

【００２７】

このアパタイト析出工程８での析出処理は、ハイドロキシアパタイト抽出液にアルカリを加えてハイドロキシアパタイトを析出させるものである。このアルカリとしては、特に限定されず、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等が挙げられる。アルカリの添加方法は特に限定されるものではない。アルカリをハイドロキシアパタイト抽出液に添加して液のｐＨを６～９になるまで撹拌すると、ハイドロキシアパタイトが析出する。この析出したハイドロキシアパタイトは第２固液分離工程９で液から分離される。なお、アルカリを添加してハイドロキシアパタイトを析出させるが、アルカリの代わりにアルカリ水溶液を入れてハイドロキシアパタイトを析出させるようにしてもよい。

【００２８】

この第２固液分離工程９は、析出されたハイドロキシアパタイトと残液とを分離するものであり、固液分離できれば特に限定されず、例えば、フィルタープレス、遠心分離機等を用いて行ってもよい。

【００２９】

上記第２固液分離工程９によって固液分離されたハイドロキシアパタイトをタンクに回収し、第１脱塩工程１０で脱塩させ、さらに第３固液分離工程１１で固液分離された後、水分調整し、コラーゲン抽出液と混合される。前記第１脱塩工程１０は特に限定されず、例えば、イオン交換装置等を用いて液中に含まれるナトリウムイオンを除去するものであるが、水を用いて洗浄を行うことによりこの脱塩を行っても良い。この洗浄工程を行って

脱塩すると、製造コストを下げることができる。

【００３０】

コラーゲン抽出液は上述したように、ハイドロキシアパタイトの製造ラインでの第１固液分離工程３で分離された酸処理後の魚鱗を用い、次に説明するような製造工程を経て製造されることが好ましい。

【００３１】

第１固液分離工程３を経て固液分離された魚鱗は、第１洗浄工程２３を介してｐＨ調整をしたものに水を加え、この水を加えたものを加熱処理して魚鱗に含まれるコラーゲンを抽出させる加熱処理工程２４と、この加熱処理工程２４からの固形物が含まれる加熱処理液を常温まで冷却する第１冷却工程２５と、この第１冷却工程２５で冷却されたコラーゲン抽出液と固形物を固液分離する第４固液分離工程２６と、この第４固液分離工程２６で分離されたコラーゲン抽出液を加熱して殺菌させる第１殺菌工程２７と、この第１殺菌工程２７で加熱殺菌されたコラーゲン抽出液を常温まで冷却する第２冷却工程２８と、この第２冷却工程２８で冷却されたコラーゲン抽出液をアルカリでｐＨ調整する第２洗浄工程２９と、この第２洗浄工程２９でｐＨ調整されたコラーゲン抽出液に酵素を加えて酵素的分解処理を行う酵素的分解処理工程３０とを含むことを特徴とする。尚、第４固液分離工程２６で分離された魚鱗は、再加熱処理工程４０で再度過熱処理され、コラーゲン抽出液を抽出させ、第３冷却工程４１を経てコラーゲン抽出液を第５固液分離工程４２で分離し、先の第４固液分離工程２６で分離したコラーゲン抽出液に加えることによって、無駄なく魚鱗を利用できることになる。

【００３２】

加熱処理後に冷却されて固液分離されたコラーゲン抽出液は第１殺菌工程２７で殺菌処理される。殺菌処理は、特に限定されず、例えば、加熱処理液を７０～８０℃、特に７５℃まで加温して行なう。この殺菌処理後の加熱処理液が後述する酵素を活性させ得る温度、例えば、６０℃まで第２冷却工程２８を経て冷却されてから、第２洗浄工程２９を経て加熱処理液のｐＨが５～８、特に６．５（±０．２）となるように調整される。このｐＨの調整は、特に限定されず、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリを添加して行うようにしてもよい。この第２洗浄工程２９でｐＨ調整されたコラーゲン抽出液は、次の酵素的分解処理工程３０よって処理される。

【００３３】

この酵素的分解処理工程３０は、第２洗浄工程２９でｐＨ処理されたコラーゲン抽出液に酵素を加えてコラーゲンの低分子化を図るものである。この酵素的分解処理は、例えば、平均分子量が好ましくは５００～３０００、特に好ましくは５００～２０００、最も好ましくは５００～１０００のコラーゲンを得るために行うものである。酵素としては、加熱処理液を酵素的分解処理できれば特に限定されないが、例えば、Bacillus licheniformis由来のアルカリ性酵素（ジェネンコア社製、商品名：Protex 6L）等が挙げられる。酵素の添加量は、特に限定されないが、例えば、基質の０．０１～０．１％であることが好ましく、特に０．０８％であることが好ましい。

【００３４】

酵素的分解処理の温度は、酵素に応じて異なるが、例えば、３０～７０℃であることが好ましく、特に６０℃であることが好ましい。酵素的分解処理時間は、酵素に応じて異なるが、例えば、３～１０時間であることが好ましく、６～８時間が特に好ましく、最も好ましくは８時間である。この分解処理時間が６時間未満であると、コラーゲンの所望の低分子化を十分に行えず、分解処理時間が１０時間を超えても分子量は変わらない。また、酵素的分解処理は撹拌して行うことが好ましい。この撹拌手段は、特に限定されず、例えば、撹拌機等を用いて行なってもよい。

【００３５】

酵素的分解処理工程３０で処理されたコラーゲン抽出液（酵素処理液ということがある）は、酵素失活工程３１で例えば８０～８５℃、特に８５℃で１５分間加熱して酵素が失活される。この酵素が失活された液は、第４冷却工程３２を経て、例えば、６０℃まで冷

却される。冷却後、酵素処理液中の固形物の除去が第３濾過工程３３で行われる。この第３濾過工程３３は、固形物の除去を行うものであれば特に限定されず、例えば、フィルタープレスで清澄濾過等を行うことが好ましい。清澄濾過としては、例えば、酵素処理液中に珪藻土をいれ、この液を撹拌しながら珪藻土をコーティングしたろ布を通過させる濾過装置等を用いてもよい。また、第３濾過工程３３において脱臭処理を行うようにすることが好ましい。この脱臭処理としては、例えば、木質系・ヤシガラ系の活性炭を使用して行うようにしてもよい。

【００３６】

清澄濾過された濾液（処理液ということがある。）は、第２脱塩工程３４を経て液中に含まれる塩が除去される。この脱塩処理は、特に限定されず、例えば、イオン交換装置等を用いて液中に含まれるナトリウムイオンを除去するものであるが、洗浄を行なうことによりこの脱塩を行っても良い。この洗浄工程を行って脱塩すると、製造コストを下げることができる。以上の脱塩工程により、無味・無臭のコラーゲンが得られる。脱塩処理された処理液は、第２殺菌工程３５で例えば、１２０℃で３秒間加熱して殺菌処理した後に第５冷却工程３６で例えば７５℃以下に冷却される。冷却後の処理液が濃縮工程３７で、例えば、蒸発温度６０～６５℃でブリックスが４０（±１．０）となるように濃縮処理される。これにより、コラーゲン抽出液が得られる。

【００３７】

このコラーゲン抽出液を水分調整したものに、上述したハイドロキシアパタイト抽出液を水分調整したものを、固形分計算でハイドロキシアパタイト約８０重量％対コラーゲン約２０重量％の重量比となるように加えて混合撹拌沈着工程４３で撹拌混合する。すると、ハイドロキシアパタイトにコラーゲンが沈着するので、この沈着結合物を乾燥工程４４で熱風乾燥させると、固形状のハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体ができ上がる。この複合体をさらに次の粉砕工程４５で粉砕させ、さらにメッシュパス（mesh-pass）工程４６を経てメッシュパスさせることにより、粉状のハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体を得ることができるものである。

【実施例２】

【００３８】

尚、以上の説明では、コラーゲン抽出液をハイドロキシアパタイトの製造工程から分岐して製造する場合について説明したが、乾燥魚鱗を水戻ししてから酸処理するところまではコラーゲンの製造方法でも同じであるので、両者同じ工程を経ることから、製造ラインの主体をコラーゲンの製造ラインとし、図２に示したように、乾燥魚鱗を浸漬工程２０で水戻しし、次いで酸処理工程２１で酸処理後、第１固液分離工程２２を経てハイドロキシアパタイト抽出液を分離してハイドロキシアパタイトの製造ラインへ分岐させるという製造方法も採ることができることは勿論である。この製造方法は図２に示してあるが、指示記号の同じものは図１に示してあるものと同じであるので、説明を省略する。

【００３９】

次に、上述したハイドロキシアパタイト抽出液から微粉状のハイドロキシアパタイトの単体を得る場合には、とくに図１に示したように、乾燥工程１２で乾燥処理される。この乾燥工程１２は、ハイドロキシアパタイト抽出液の乾燥を行えれば特に限定されず、例えば、熱風乾燥等でもよい。熱風の温度は、特に限定されないが、好ましくは６５℃～１００℃で、特に好ましくは７０℃である。乾燥時間は、特に限定されず、好ましくは１５～２４時間で、特に好ましくは１８時間である。これにより、乾燥した微粉状のハイドロキシアパタイトが得られるものである。

【００４０】

次に、上述したコラーゲン抽出液から微粉状の単体を得る場合には、とくに図２に示したように、濃縮されたコラーゲン抽出液を、例えば、凍結乾燥したり、スプレイドライ等の方法を用いて乾燥させる乾燥工程４８を経ることにより、粉体化した微粉状のコラーゲン粉末を得ることができるものである。

【００４１】

このようにして得られた微粉状のコラーゲンは、無味・無臭で分子量５００～１０００の高品質の低分子コラーゲンであった。コラーゲンは多くのアミノ酸を含み、このアミノ酸の組成によって性質が異なるものである。コラーゲンは、他の蛋白質に比べアミノ酸組成や配列が特異的で、ポリペプチド鎖３本が、右巻きのヘリックスを形成し安定した構造を保っている。そして、コラーゲン特有の安定したヘリックス構造は、ヒドロキシプロリンがなければ形成されないため、このヒドロキシプロリンの含有量が、コラーゲンの質を判断する目安となるものであると言える。つまり、ヒドロキシプロリンの含有量が多いと質がよいものと言えるものである。本発明に係るコラーゲンの製造方法によって得られたコラーゲンの中に含まれるアミノ酸の組成を、アミノ酸自動分析法により分析した結果を表１に示した。いずれもコラーゲン１００ｇ中の含有量である。尚、表１に示したように豚皮由来のコラーゲン、Ａ社のコラーゲン及びＢ社のコラーゲンについても同様にアミノ酸自動分析法によりアミノ酸の分析を行なっている。

【００４２】

【表１】

コラーゲン　アミノ酸組成			単位：g	
	実施例	豚皮 ｺﾗｰｹﾞﾝ	A社	B社
グリシン	28.5	33.34	36.4	33.48
アラニン	10.9	11.28	11.1	12.36
セリン	3.59	3.33	5	3.84
スレオニン	2.65	1.83	2.3	2.83
1/2 シスチン	0.03	0	0	0
メチオニン	1.55	0.47	1.5	1.52
バリン	2.48	2.18	1.7	2.06
ロイシン	2.66	2.49	2	2.14
イソロイシン	1.35	1.08	1.1	0.92
ﾌｪﾆﾙｱﾗﾆﾝ	1.84	1.26	1.2	1.32
チロシン	0.37	0.35	0	0.29
プロリン	13.8	12.18	11	11.59
ﾋﾄﾞﾛｷｼﾌﾟﾛﾘﾝ	11.4	10	6	8
リジン	3.78	2.59	2.6	2.57
ヒスチジン	0.58	0.5	0	0.5
アルギニン	8.58	4.7	5.1	5.16
ｱｽﾊﾟﾗｷﾞﾝ酸	6.15	4.32	5.5	4.14
ｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸	10.4	4.57	7.8	6.97
ﾄﾘﾌﾟﾄﾌｧﾝ	0	0	0	0

【００４３】

上記表１から解るように、本願発明にかかる製造方法で製造されたコラーゲンは、他の材料と製造方法で製造されたコラーゲンと比べてヒドロキシプロリンの含有量が多いことが解る。また、このコラーゲンは、酵素的分解処理により低分子化（分子量５００～１０００）が図られているので、生体の吸収率が高いものである。

【実施例３】
【００４４】
次に、本発明に係る生体適合性材料を構成する粉状のハイドロキシアパタイトとコラーゲン複合体を以下に説明するようにして製造した。まず、ハイドロキシアパタイト抽出液のほうから説明すると、鯉の乾燥魚鱗２ｋｇを網目サイズが１ｍｍ以下のナイロンネットに入れた。ＰＥ（ポリエチレン）タンクに乾燥魚鱗の３．３倍の水６．６ｋｇを入れ、このタンク内の水に乾燥魚鱗を入れたナイロンネットを１２時間完全に浸漬させて水戻しを行なった。
【００４５】
この浸漬工程の後、ＰＥ（ポリエチレン）タンク内の水を一旦抜いて、新たに６．６ｋｇの水を入れ、その水温を２０℃（±２℃）に保持しながら、純度３５％の塩酸１３００ｇを投入して塩酸水溶液を作った。この塩酸水溶液に、水戻しした魚鱗を２５分間浸漬させつつ撹拌して酸処理を行った。この魚鱗を酸処理することによって得たハイドロキシアパタイト抽出液を固液分離させ、濾過装置を用いて濾過した。この濾過後のハイドロキシアパタイト抽出液をヤシガラ系活性炭を用いて脱臭処理した。脱臭処理後、フィルタープレスを用いて清澄濾過して、処理液中の微細な固形物の除去を行った。
【００４６】
この濾過後のハイドロキシアパタイト抽出液に水酸化ナトリウム（４８重量％ＮａＯＨ）を添加しつつ液の撹拌機を用いて撹拌を行って液のｐＨを７にする処理を行なった。
【００４７】
この作業により、ハイドロキシアパタイトが溶出してハイドロキシアパタイトの粒子が析出した。析出後、フィルタープレスを用いて固液分離して、分離されたハイドロキシアパタイトをタンクに入れ、このタンクに処理液量の３～４倍の水３６～４８ｋｇを入れて撹拌して洗浄することにより脱塩処理した。続いて７０℃に加熱して殺菌処理を３０分間維持してから、フィルタープレスを用いて撹拌しつつ固液分離を行った。このようにして得られたハイドロキシアパタイト抽出液は、含水率が７５重量％のものであり、重量にして１，８００ｇであった。
【００４８】
次に、コラーゲン抽出液を以下に説明するようにして製造した。鯉の乾燥魚鱗１５０ｋｇを網目サイズが１ｍｍ以下のナイロンネットに入れた。このナイロンネットを乾燥魚鱗の３．３倍の水４９５キロリットルを溜めたＰＥ（ポリエチレン）タンクにナイロンネットごと入れ、１２時間完全に浸漬させて水戻しを行なった。
【００４９】
次いで、別のＰＥ（ポリエチレン）タンクに乾燥魚鱗の３．３倍の水４９５キロリットルを入れ、この水温を２０℃（±２℃）に保持しながら、純度３５％の塩酸９３キロリットルを投入して塩酸水溶液を作った。この塩酸水溶液に、水戻しした魚鱗をナイロンネットごと１５分間浸漬させつつ撹拌して、酸処理を行う。酸処理後の魚鱗が入ったナイロンネットを洗浄タンク内に広げ、魚鱗が流出しないように６００キロリットルの水で５分間洗浄を５回行い、魚鱗のｐＨを４．０（±０．２）に調整した。
【００５０】
洗浄後の魚鱗を、魚鱗に対する８倍の水を入れた釜に入れて、これを９８℃以上で３時間１次加熱処理した。この１次加熱処理は、液の最終濃度がブリックス１０～１２となるように行なった。加熱処理中に水分が蒸発して釜の中に水分が少なくなった場合には、水を補給する。この場合、釜に目盛り等などの印を設けて、基準の印の箇所に水面が来るように水を補給すると良い。
【００５１】
１次加熱処理後、７５℃以下に冷却してから２０・２００メッシュの振動篩２段の振動篩機で液である１次加熱処理液と固形物との固液分離を行なった。この固液分離で分離された固形物を、固形物すなわち魚鱗に対する４倍の水を入れて、これを９８℃以上で２時間、２次加熱処理した。この２次加熱処理は、液の最終濃度がブリックス１０～１２とな

るように行なった。加熱処理中に水分が蒸発して釜の中の水分が少なくなった場合には、水を補給すると良い。

【００５２】

２次加熱処理後、７５℃以下に冷却してから２０・２００メッシュの振動篩２段の振動篩機で液である２次加熱処理液と固形物との固液分離を行なった。この固液分離で分離された液である２次加熱処理液は、１次加熱処理液と共に７５℃で１５分間殺菌処理した。殺菌処理後、６０℃まで冷却してから酵素的分解処理を行なった。

【００５３】

この酵素的分解処理は、加熱処理液のｐＨを水酸化ナトリウムによって６．５（±０．２）に調整してからBacillus Licheniformis由来のアルカリ性酵素（ジェネンコア社製、商品名：Protex 6L）を基質の０．０８％加熱処理液に入れて、これを６０℃（±１℃）で８時間撹拌機を用いて撹拌するものであった。

【００５４】

酵素分解処理後、酵素分解処理した液（処理液）を８５℃で１０分間保持して酵素を失活させた後、６０℃まで冷却する。冷却後、処理液をヤシガラ系活性炭を用いて脱臭処理してからフィルタープレスを用いて清澄濾過して、処理液中の固形物の除去を行なった。尚、第３濾過工程３３において脱臭処理を行うようにすることが好ましい。この脱臭処理としては、例えば、木質系・ヤシガラ系の活性炭を使用して行うようにしてもよい。固形物を除去した後、処理液をイオン交換装置を用いて脱塩処理した。脱塩処理後、処理液を１２０℃、３秒、加熱して殺菌処理した後に７５℃以下に冷却した。冷却後の処理液を、濃縮タンクで蒸発温度６０～６５℃にしてブリックスが４０（±１．０）となるように濃縮処理してコラーゲン抽出液を得た。

【００５５】

次いで、上述したハイドロキシアパタイトの製造工程の第３固液分離工程１１で分離されたハイドロキシアパタイト抽出液の含水率７５重量パーセントのものを１，８００ｇ用意し、上述したコラーゲンの製造工程で得られた乾燥工程に移行する前の低分子のコラーゲン抽出液の含水率５０重量％のものを２２０ｇそれぞれ固形物計算で用意し、両抽出液を共に処理タンクへ入れて常温で、１０～２０分間混合撹拌させたところ、ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの沈着結合物が２，０２０ｇ析出した。この沈着結合物を７０℃の熱風雰囲気下で１８時間熱風乾燥させたところ、含水率５．８％のハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体が５２０．６ｇ得られた。また、その色は淡白黄色であり、わずかに微臭がするものであった。

【実施例４】

【００５６】

この実施例では、上述したコラーゲンの製造工程で得られた乾燥工程４８に移行する前の濃縮された低分子のコラーゲン抽出液を水分調整して含水率５０重量％としたものを２２０ｇ用意し、上述したハイドロキシアパタイトの製造工程の第３固液分離工程１１で分離されたハイドロキシアパタイトを水分調整して含水率７５重量パーセントとしたものを１，８００ｇ用意し、共に処理タンクへ入れて常温で、１０～２０分間混合撹拌させたところ、ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの沈着結合物が２，０２０ｇ析出した。この沈着結合物を次の乾燥工程で７０℃の熱風雰囲気下で１８時間熱風乾燥させたところ、含水率５．８％のハイドロキシアパタイトとコラーゲンの沈着結合物が５２０．６ｇ得られた。そして、その色は淡白黄色であり、わずかに微臭がするものであった。

【００５７】

以上のようにして得られた複合体を、走査型電子顕微鏡を用いて走査し、市販されている粉末状のアパタイトとコラーゲンの混合物を走査したものと比べたところ、図４に示したように、複合体Ａは不定形の物質１種類だけが確認でき、図３に示したように、市販品の混合物Ｂは球形の物質（コラーゲン）と、不定形の物質（ハイドロキシアパタイト）の２種類の物質が互いに付着しているだけの状態が確認できた。このことから解るように複合体Ａは、２つの物質が結合して１つになっているものと思われる。参考までにハドロキ

シアパタイト単独のものを走査したところ、図５に示したように、複合体Ａよりも細かな結晶が明瞭に観察できで、複合体Ａはこのハイドロキシアパタイトの結晶構造の隙間にコラーゲンが結合しているものと思われる。

【００５８】

さらに、上述した複合体を分析したところ、表２に示した分析結果が得られた。

【００５９】

【表２】

LOT：61201M			
分析試験項目	結　果	注	方　法
水分	４．２ｇ／１００ｇ		常圧加熱乾燥法
コラーゲン	２０．４ｇ／１００ｇ	1	ケルダール法
ナトリウム	３９０ｍｇ／１００ｇ		原子吸光光度法
リン	１４．２ｇ／１００ｇ		ＩＣＰ発光分析法
ハイドロキシアパタイト	７０．２ｇ／１００ｇ	2	ＩＣＰ発光分析法
マグネシウム	３２３ｍｇ／１００ｇ		ＩＣＰ発光分析法
ｐＨ	６．６	3	ガラス電極法
注１．窒素・蛋白質換算係数：６．２５ 注２．Ｃａからの換算係数：２．５０６７ 注３．１０％懸濁液について測定した。			

【００６０】

上記表２から解るように、複合体は、１００ｇに対して、水分が４．２ｇ（常圧加熱乾燥法により測定。）、コラーゲンが２０．４ｇ（ケルダール法（窒素・蛋白質換算係数：６．２５）により測定。）、リンが１４．２ｇ（ＩＣＰ発光分析法により測定。）、ハイドロキシアパタイトが７０．２ｇ（ＩＣＰ発光分析法（Ｃａからの換算係数：２．５０６７）により測定。）、ナトリウムが３９０ｍｇ（原子吸光光度法により測定。）、マグネシウムが３２３ｍｇ（ＩＣＰ発光分析法により測定。）それぞれ含有し、ｐＨが６．６（ガラス電極法（１０％懸濁液で測定）により測定。）であった。尚、ハイドロキシアパタイト７０．２ｇ中には、ＩＣＰ発光分析法を用いて２８．０ｇのカルシウムを確認できた。このカルシウム２８．０ｇを求める計算式は次のとおりである。

$Ca_5(PO_4)_3OH=5\times40.078+3\times(30.973762+4\times15.9994)+15.9994+1.00794$
$=502.311426$

Caからの換算係数

$Ca_5(PO_4)_3OH/(5\times Ca)=502.311426/(5\times40.078)$
$=2.506669125 \rightarrow 2.5067$

$70.2g\div2.5067 \quad 28.0g$

【００６１】

またこの複合体の商品規格としては、下記表３に示したものとすることが望ましい。表３によれば、水分が１０％以下（常圧加熱乾燥法により測定。）、コラーゲンが１５％以上（ケルダール法（窒素・蛋白質換算係数：5.55）により測定。）、リンが１０％以上（ＩＣＰ発光分析法により測定。）、ハイドロキシアパタイトが６５％以上（ＩＣＰ発光分析法（Caからの換算係数：2.5067）により測定。）、ナトリウムが０．５％以下（原子吸光光度法により測定。）、重金属（Ｐｂとして）が20ppm以下（硫化ナトリウム比色法により測定。）、ヒ素（As2O3として）が2ppm以下（原子吸光光度法により測定。）をそれぞれ含有し、ｐＨが６．０～８．０（ガラス電極法（１０％水溶液で測定）により測定。）

で、一般細菌数（生菌数）が3000個/g以下（標準寒天培養法により測定。）、大腸菌群が陰性（BGLB法により測定。）である。

【００６２】

【表３】

品質規格		
項　目	規格値	試験方法
水分	１０%以下	常圧加熱乾燥法
コラーゲン	１５%以上	ケルダール法（注１）
リン	１０%以上	ＩＣＰ発光分析法
ハイドロキシアパタイト	６５%以上	ＩＣＰ発光分析法（注２）
ナトリウム	０．５%以下	原子吸光光度法
ＰＨ	６．０～８．０	ガラス電極法（注３）
重金属（Ｐｂとして）	２０ｐｐｍ以下	硫化ナトリウム比色法
ヒ素（Ａｓ２Ｏ３として）	２ｐｐｍ以下	原子吸光光度法
一般細菌数（生菌数）	３０００個／ｇ以下	標準寒天培養法
大腸菌群	陰性	ＢＧＬＢ法
（注１）窒素・蛋白質換算係数：５．５５ （注２）Ｃａからの換算係数：２．５０６７ （注３）１０%水溶液について測定		

【００６３】

さらに、以上のようにして得た複合体を、骨粗鬆症モデルマウスへ投与して骨の改善効果について実験した。

【００６４】

実験にはＩＣＲ系マウス雌１０週齢（体重２０ｇ）モデルマウスを使用した。これらに卵巣摘出術（ＯＶＸ群）及び疑似手術（ｓｈａｍ群）を施し、２ヶ月間通常飼料にて飼育し、各群１０匹ずつ６群のグループに分けた。これらのうちＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群とｓｈａｍ群は炭酸カルシウムをカルシウム源とする１．５～１．８%カルシウム含有飼料で飼育した。さらに比較対象として、ＯＶＸマウスに対して明らかに骨密度の上昇を示す骨粗鬆症治療薬である、ビスフォスフォネート製剤（リセドロネート）投与群を設定した。他の３群は食品および食品添加剤を含有した特殊飼料にて飼育した。下記に今回の実験で使用した食品及び食品添加剤の配合状況を下記表４に示す。

【００６５】

【表４】

		薬剤含有量
1	ｓｈａｍ	無し
2	ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ	無し
3	リセドロネート	１回投与量：１０μｇ／１０μｌ／ｄａｙ
4	ビタミンＫ２（ＭＫ－４）	５００μｇ／１００ｇ飼料
5	ビタミンＫ２（ＭＫ－７）	５００μｇ／１００ｇ飼料
6	複合体	２ｇＣａ／１００ｇ飼料

【００６６】

これらの飼料にて２ヶ月間飼育した後、断頭切断により採血し、血清分離後カルシウム、リン、マグネシウム濃度およびアルカリフォスファターゼ値を測定した。更に大腿骨を摘出した後、骨梁構造の改善効果についてｐＱＣＴ（Ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　Ｃｏｍｐｕｔｄ　Ｔｏｍｏｇｒａｐｈｙ・抹消骨用定量的ＣＴ）、μＣＴ（マイクロフォーカスＸ線ＣＴ）を用いて大腿骨遠位骨端部および骨幹部を対象に３次元的骨密度測定および骨構造解析を行った。

【００６７】

この骨梁構造解析のため焦点８×８μｍのマイクロフォーカスエックス線管を有するエックス線マイクロＣＴ（ＭＣＴ－ＣＢ１３０Ｆ，Ｈｉｔａｃｈｉ　Ｍｅｄｉｃｏ社製）を使用し、大腿骨遠位骨端部の３次元立体画像情報を取得した。撮影条件は管電圧４０ｋＶ、管電流１００μＡ、Ｖｏｘｅｌ　ｓｉｚｅ１７．８×１７．８×１７．８μｍとし、各々５０枚のＶｏｌｕｍｅ　ｄａｔａを取得した。得られた５０枚の海綿骨と皮質骨の２次元画像を基にして画像の３次元構築を行った。これらの３Ｄ画像を対象に骨梁構造計測ソフト（ＴＲＩ／３Ｄ－ＢＯＮＥ：ラトックシステムエンジニアリング）を用いて３次元パラメータを測定した。測定した構造パラメータを下記表５に示す。

【００６８】

【表５】

BS/BV (1/mm)	骨表面積
BV/TV (%)	組織量（ＴＶ）当たりの骨量
Tb.Th (mcm)	骨梁幅
Tb.N (1/mm)	骨梁数
Tb.Sp (mcm)	骨梁間隙
Tb.Spac (mcm)	骨梁中心距離
D	複雑性
TBPf (1/mm)	骨梁間距離
SMI	骨梁形態
V*m.space	骨髄腔体積
V*tr	骨梁体積
N.Nd	Ｎｄ個数
N.Tm	Ｔｍ個数
N.Ct	Ｃｔ個数
N.Nd/TV (1/mm3)	組織量（ＴＶ）当たりのＮｄ数
N.Tm/TV (1/mm3)	組織量（ＴＶ）当たりのＴｍ数
N.Ct/TV	組織量（ＴＶ）当たりのＣｔ数
TSL	総骨格長
NdNd/TSL (%)	総長に対するＮｄＮｄ長の割合
CtNd/TSL (%)	総長に対するＣｔＮｄ長の割合
CtCt/TSL	総長に対するＣｔＣｔ長の割合
TmTm/TSL (%)	総長に対するＴｍＴｍ長の割合
TSL/TV (1/mm2)	組織量（ＴＶ）当たりの総骨格長
NdNd/TV (1/mm2)	組織量（ＴＶ）当たりのＮｄＮｄ長
CtNd/TV (1/mm2)	組織量（ＴＶ）当たりのＣｔＮｄ長
CtCt/TV	組織量（ＴＶ）当たりのＣｔＣｔ長
TmTm/TV (1/mm2)	組織量（ＴＶ）当たりのＴｍＴｍ長

【００６９】

各群間比較するための統計処理にはＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔを使用した。パラメータについてはＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群に有意の差があったもののみについて各５

群との比較を行った。

【００７０】

次いで、ｐＱＣＴを用いて摘出大腿骨骨端部および骨幹部の３次元的骨密度測定そしてｐＱＣＴにて得られた横断画像から海綿骨と皮質骨を区別して物理量である体積骨密度（ｍｇ／ｃｍ^3）を解析するとともに皮質骨幅・断面二次モーメント・断面係数等の形態的指標を元に骨強度指標を求めた。表６に解析パラメータを示す。各群間比較するための統計処理にはＳｔｕｄｅｎｔ’ｓ　ｔ－ｔｅｓｔを使用した。図６に解析の設定部位を示す。

【００７１】

【表６】

解析パラメータ

骨端部	全骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	海綿骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	皮質骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	皮質骨断面積	(ｍｍ2)
	皮質骨厚	(mm)
	骨膜周囲長	(mm)
	骨強度指標	(ｍｍ3)
骨幹部	全骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	海綿骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	皮質骨密度	(ｍｇ／ｃｍ3)
	皮質骨断面積	(ｍｍ2)
	皮質骨厚	(mm)
	骨膜周囲長	(mm)
	骨強度指標	(ｍｍ3)

【００７２】

次いで、各群の実験モデルマウスより血液を採取し、血清中のミネラル濃度とＡＬＰ活性について測定した。血液の採取は半麻酔下での断頭により行った。採取した血液は氷温で１時間放置後、１０分間、１０００ｒｐｍで血清を遠心分離した。カルシウムの測定はキレート発色法により行った。血清５０μｌをｐＨ＝１１に調整した０．８８Ｍモノエタノールアミン緩衝液５ｍｌに入れ、発色試薬としてオルトクレゾールフタレインコンプレクソンと８－キノリノールの混合液を加えた。よく撹拌し５分間放置後、分光光度計にて５７０ｎｍの吸光度を測定した。リンの測定はモリブデンブルー直接法により行った。血清０．２ｍｌを発色試薬５ｍｌに加え室温で１５分間放置後、分光光度計にて６９０ｎｍの吸光度を測定した。発色試薬としてはモリブデン酸アンモニウム、硫酸第一鉄アンモニウム、硫酸の混合液に界面活性剤を添加したものである。マグネシウムの測定はキシリジルブルー法により行った。血清２０μｌに発色試薬３ｍｌを加え、室温で１０分間放置後、分光光度計にて５２０ｎｍの吸光度を測定した。発色試薬としてキシリルアゾバイオレットＩとグリコールエーテルジアミン四酢酸の混合液に界面活性剤を添加したものである。

【００７３】

アルカリフォスファターゼの測定はフェニルリン酸基質法により行った。基質緩衝液２ｍｌに血清５０μｌを入れて３７℃で１５分間加温した後、発色試薬として３６ｍＭのフェリシアン化カリウム２ｍｌを加える。よく撹拌した後、分光光度計にて５７０ｎｍの吸光度を測定した。基質緩衝液はｐＨ＝１０．５に調整した５０ｍＭ炭酸塩緩衝液に４アミノアンチピリンとフェニルリン酸の混合液を加えたものである。

これらの測定はすべて和光純薬工業製の臨床生化学検査薬キットを使用した。

【００７４】

【表７】

マウス血清中のミネラル濃度とＡＬＰ活性

	Ca(mg/dl)	P(mg/dl)	Mg(mg/dl)	ALP(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.リセドロ	9.02±1.15	6.95±0.32	3.12±1.21	3.65±1.26
4. MK-4	9.60±0.51	6.96±0.44	2.67±0.28	3.52±1.82
5. MK-7	9.34±1.50	7.12±0.64	2.63±0.63	3.77±1.76
6. 複合体	9.80±1.64	7.06±0.76	2.71±0.92	3.44±1.59

【００７５】

上記表７は、モデルマウスの血清中のミネラル濃度とアルカリフォスファターゼ（ＡＬＰ）活性を示す。血中Ｃａ，Ｐ，Ｍｇはすべての実験群間において有意差を認めることは出来なかった。一方、ＡＬＰ活性は骨代謝異常があると高値を示すが、本実験結果ではすべての群においてＯＶＸよりも低い傾向がみられたが有意差は認められなかった。

【００７６】

下記する表８はｐＱＣＴにて測定した大腿骨遠位骨端部と骨幹部におけるＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群と実験群との有意差比較を示す。ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌとｓｈａｍ群で骨端部、骨幹部共に１１項目のパラメータについて有意差を示しており、ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌが明らかな骨粗鬆症モデルマウスである事を実証している。また、骨粗鬆症治療薬であるリセドロネート投与群は骨端部で全骨密度、海綿骨密度、皮質骨厚、皮質骨断面積、骨幹部で皮質骨厚、皮質骨断面積において有意にＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群よりも上昇していた。このように骨密度上昇を特徴とするリセドロネートの効果が示された事により、今回の実験が高い精度で実行された事を示すものである。そして、実験群の内、複合体群がリセドロネート投与群に最も近い効果を示した。一方、ＭＫ７群は大腿骨遠位骨端部の皮質骨厚、皮質骨断面積、骨膜周囲長、骨強度指標においてＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群よりも有意に上昇を示した。しかし、骨幹部においてはＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群との有意な差は認められなかった。また、ＭＫ４群は骨端部骨膜周囲長のみがＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群に対して有意に上昇した。

【００７７】

【表８】

			OVX	sham	リセドロ	プロテタイト	MK−4	MK7
骨端部	全骨密度	(mg／cm3)		P<0. 01	P<0. 01			
	海綿骨密度	(mg／cm3)		P<0. 05	P<0. 05			
	皮質骨密度	(mg／cm3)		P<0. 01		P<0. 01		
	皮質骨断面積	(mm2)		P<0. 01	P<0. 05	P<0. 05		P<0. 05
	皮質骨厚	(mm)		P<0. 01	P<0. 05	P<0. 05		P<0. 05
	骨膜周囲長	(mm)					P<0. 05	P<0. 01
	骨強度指標	(mm3)		P<0. 05		P<0. 01		P<0. 05
骨幹部	全骨密度	(mg／cm3)		P<0. 01				
	海綿骨密度	(mg／cm3)		P<0. 05		P<0. 05	P<0. 05	
	皮質骨密度	(mg／cm3)		P<0. 01		P<0. 05		
	皮質骨断面積	(mm2)		P<0. 01	P<0. 05			
	皮質骨厚	(mm)		P<0. 01	P<0. 05			
	骨膜周囲長	(mm)						
	骨強度指標	(mm3)						
有意差のある項目数				11	6	6	2	4

【００７８】

図７はモデルマウスの大腿骨の遠位骨端部（Ａ）・骨幹部（Ｂ）の代表的なＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌと複合体のｐＱＣＴ画像を示す。白い部分が皮質骨、この皮質骨の内側と外側にある部分が海綿骨を示す。複合体を投与したマウスの皮質骨が厚くなっており、骨密度が上昇していることを視覚的に確認できる。

【００７９】

下記する表９は、モデルマウスのμＣＴによる大腿骨遠位骨端部における骨内部構造の三次元構造解析結果を示す。太線で縁取りされた部分の各実験群のパラメータは、ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群より高い平均値をしめしており、骨内部構造の改善効果が高いことを意味する。一方、太線で縁取りされていない部分のパラメータはＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群より低い平均値を示しており、低い程、骨内部構造の改善効果を有していることを意味する。即ち、Ｔｂ．ＳＰ、ＴＢ　ｓｐａｃｅ、ＴＢＰｆ、Ｖｍ　Ｓｐａｃｅ、Ｎ．Ｔｍ、ＴｍＴｍ／ＴＳＬ、ＴｍＴｍ／ＴＶは、値が低いほど骨内部構造の高い改善効果を示す。ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群に対してｓｈａｍ群は１１パラメータ、リセドロネート群は１２パラメータについて有意な骨梁改善効果を示しており、今回の実験系が高い精度で実行された事を示している。そしてＭＫ７、複合体、ＭＫ４の各群順に骨梁改善効果を示した。

【００８０】

【表９】

計測項目		OVX	Sham	リセドロ	複合体	MK-4	MK-7
BS/BV	骨表面積						
BV/TV	組織量（TV）当たりの骨量		P<0.01	P<0.01			P<0.05
Tb.Th	骨梁幅						
Tb.N	骨梁数		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
Tb.Sp	骨梁間隙		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
Tb.Spac	骨梁中心距離		P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.05	P<0.01
D	複雑性			P<0.05			
TBPf	骨梁間距離				P<0.05		
SMI	骨梁形態					P<0.05	
V*m.space	骨髄腔体積		P<0.01	P<0.01			
V*tr	骨梁体積		P<0.05				
N.Nd	Nd個数						P<0.05
N.Tm	Tm個数						
N.Ct	Ct個数		P<0.05	P<0.01			P<0.01
N.Nd/TV	組織量（TV）当たりのNd数						
N.Tm/TV	組織量（TV）当たりのTm数						
N.Ct/TV	組織量（TV）当たりのCt数		P<0.05	P<0.01			P<0.01
TSL	総骨格長		P<0.05	P<0.01	P<0.05		P<0.01
NdNd/TSL	総長に対するNdNd長の割合						
CtNd/TSL	総長に対するCtNd長の割合						
CtCt/TSL	総長に対するCtCt長の割合						
TmTm/TSL	総長に対するTmTm長の割合				P<0.01		P<0.05
TSL/TV	組織量（TV）当たりの総骨格長		P<0.05	P<0.01	P<0.05		P<0.05
NdNd/TV	組織量（TV）当たりのNdNd長						
CtNd/TV	組織量（TV）当たりのCtNd長		P<0.01	P<0.01	P<0.05		P<0.01
CtCt/TV	組織量（TV）当たりのCtCt長						
TmTm/TV	組織量（TV）当たりのTmtm長			P<0.01			
有意差項目数			11	12	8	4	11

【００８１】

図８は、ＯＶＸ　Ｃｏｎｔｒｏｌ群とｓｈａｍ群の代表的な骨梁構造の横断面と縦断面の３次元構築画像を示す。図９は同じくリセドロネート、ＭＫ４、ＭＫ７、複合体の各群の代表的な横断面と縦断面の３次元構築画像を示す。

【００８２】

以上詳細に説明したように、複合体の骨密度および骨梁構造改善効果についてＯＶＸマウスを使用し、図８と図９に示した画像を基にして、大腿骨遠位骨端部および骨幹部を対象に３次元的画像解析を行った結果、下記の結論を得た。

１．複合体は骨密度上昇と骨内部構造改善効果の両者を示すが、むしろ骨密度上昇が主な効果として認められた。そして、骨幹部の皮質骨密度の上昇を示したのは、複合体だけであった。

２．ＭＫ－７は骨密度上昇と骨内部構造改善効果の両者を示すが、むしろ骨内部構造改善が主な効果として認められた。

３．ＭＫ－４は骨内部構造改善が主な効果として認められた。

【００８３】

以上の効果から、複合体は骨密度上昇に著明な効果を示し、かつ内部構造改善をも期待でき、骨粗鬆症の予防や骨構造劣化の改善に有効であることが明らかである。

【産業上の利用可能性】

【００８４】

以上説明したように本発明に係る生体適合性材料を構成するハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体は、ほとんど臭いは無く無味、かつ魚鱗を原料とするので安全であり、又、骨質改善効果に優れているため、これをそのまま摂取するか、他のさまざまな食べ物、お菓子、チューインガム、飲料水などに混ぜて摂取することによって、カルシウムの不足から来る、骨粗鬆症を始めとするさまざまな病気や症状の改善、予防に役立てることができることは明らかである。また、その製造方法は、魚鱗由来のハイドロキシアパタイトやコラーゲンの製造工程の中に組み入れることが可能なため、製造し易いことになる。

【図面の簡単な説明】

【００８５】

【図１】本発明に係るハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体の製造方法の一実施例を示すフローチャート図である。

【図２】本発明に係るハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体の製造方法の他の実施例を示すフローチャート図である。

【図３】市販されているハイドロキシアパタイトとコラーゲンの混合物を走査型電子顕微鏡で見た画像図である。

【図４】本発明に係る複合体を走査型電子顕微鏡で見た画像図である。

【図５】市販されているハイドロキシアパタイトを走査型電子顕微鏡で見た画像図である。

【図６】モデルマウスより摘出した大腿骨の解析設定部位を示す説明図である。

【図７】ＯＶＸ Control使用のモデルマウスと本発明に係る複合体を使用したモデルマウスの図６に示した解析設定部位でのｐＱＣＴ画像図である。

【図８】ＯＶＸ　ControlとShamを使用したモデルマウスの骨梁構造の横断面と縦断面の３次元画像図である。

【図９】リセドロネート、ＭＫ４、ＭＫ７、及び本発明に係る複合体それぞれ使用したモデルマウスの骨梁構造の横断面と縦断面の３次元画像図である。

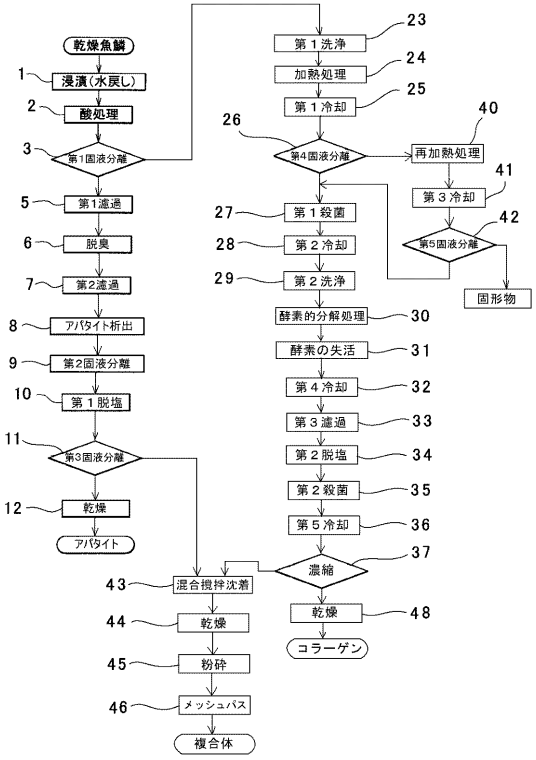
【符号の説明】

【００８６】

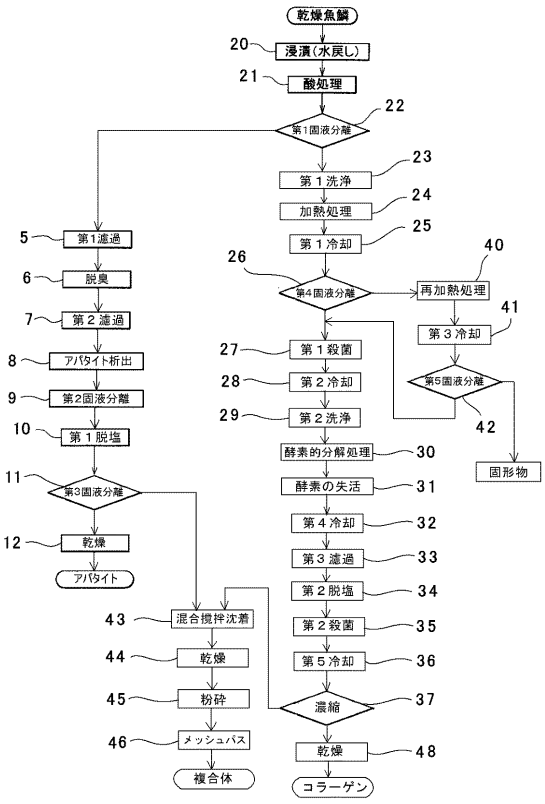
１　浸漬工程
２　酸処理工程
３　第１固液分離工程
５　第１濾過工程
６　脱臭工程
７　第２濾過工程
８　アパタイト析出工程
９　第２固液分離工程
１０　第１脱塩工程
１１　第３固液分離工程
１２　乾燥工程
２０　浸漬工程
２１　酸処理工程
２２　第１固液分離工程
２３　第１洗浄工程
２４　加熱処理工程
２５　第１冷却工程

２６　第４固液分離工程
２７　第１殺菌工程
２８　第２冷却工程
２９　第２洗浄工程
３０　酵素的分解処理工程
３１　酵素失活工程
３２　第４冷却工程
３３　第３濾過工程
３４　第２脱塩工程
３５　第２殺菌工程
３６　第５冷却工程
３７　濃縮工程
４０　再加熱処理工程
４１　第３冷却工程
４２　第５固液分離工程
４３　混合撹拌沈着工程
４４　乾燥工程
４５　粉砕工程
４６　メッシュパス工程
４８　乾燥工程

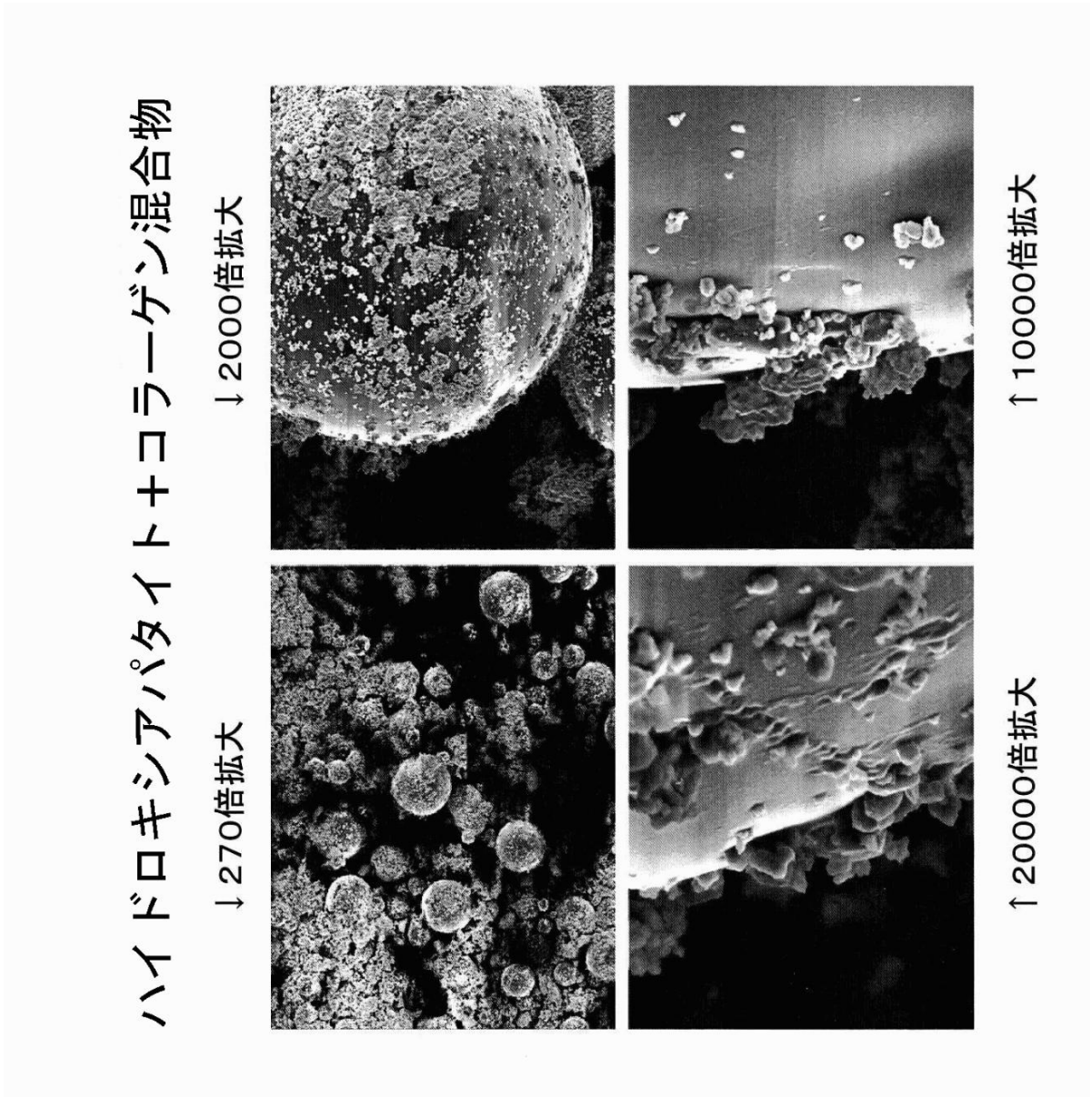
【図１】



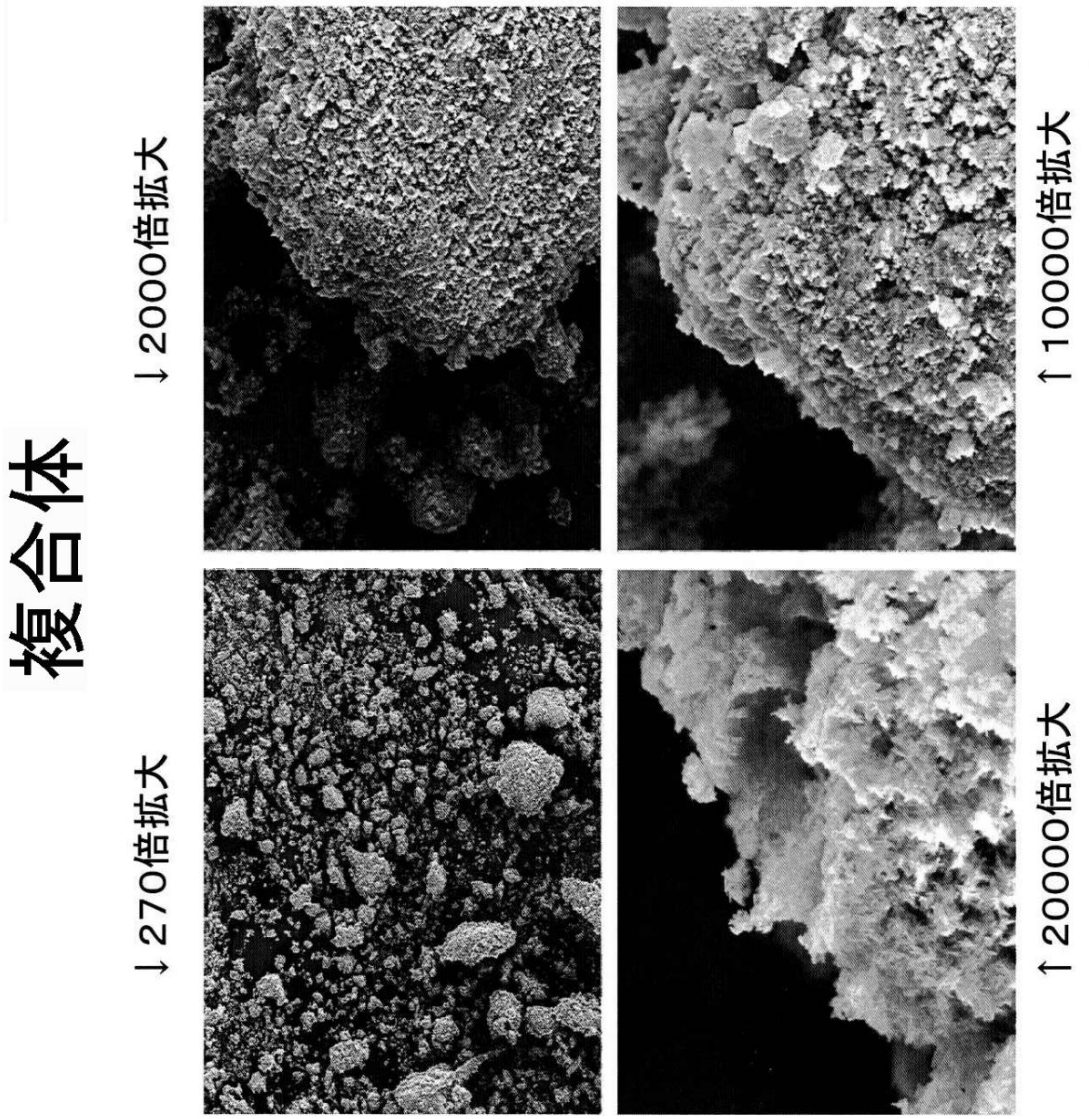
【図２】



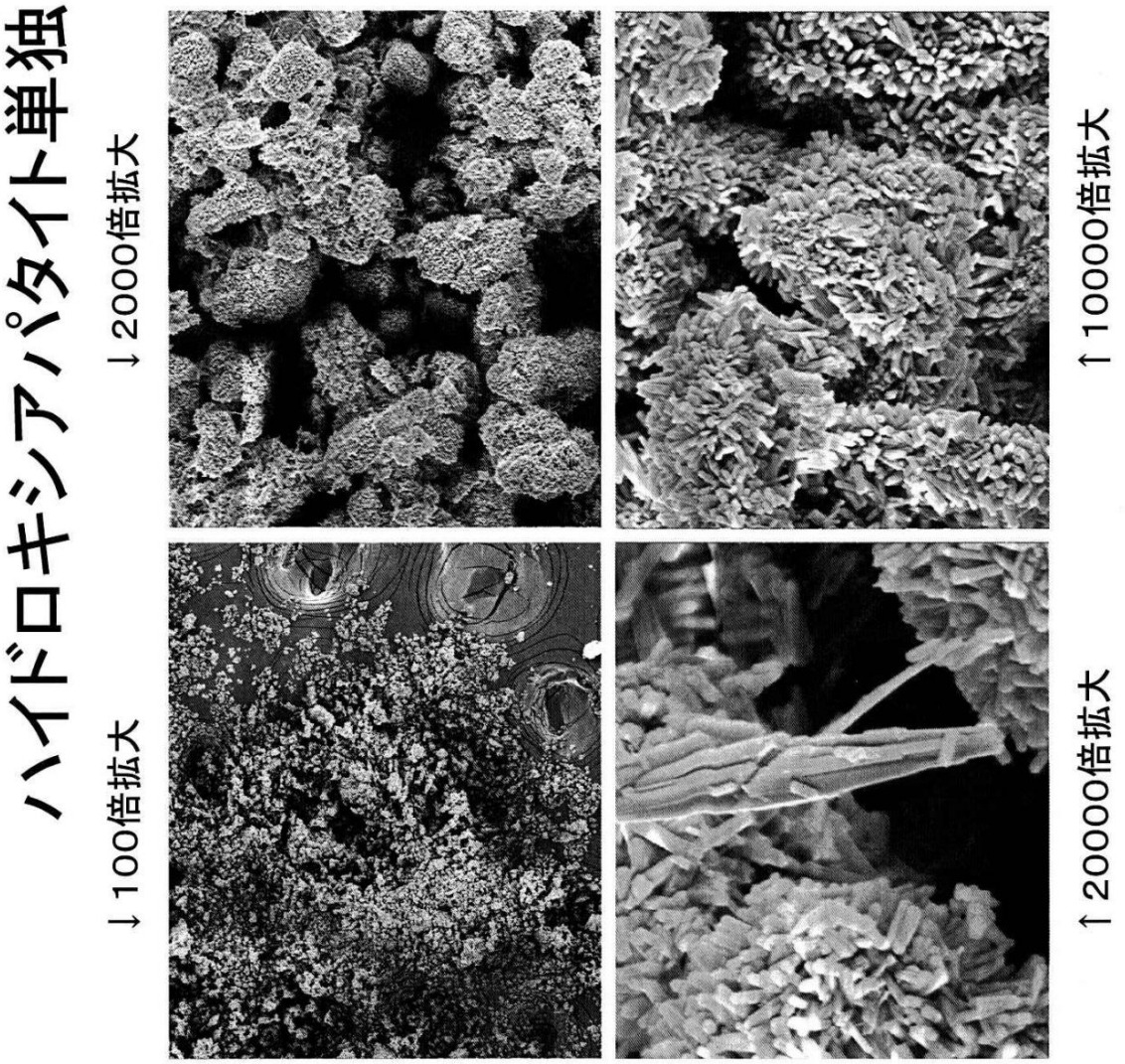
【図３】



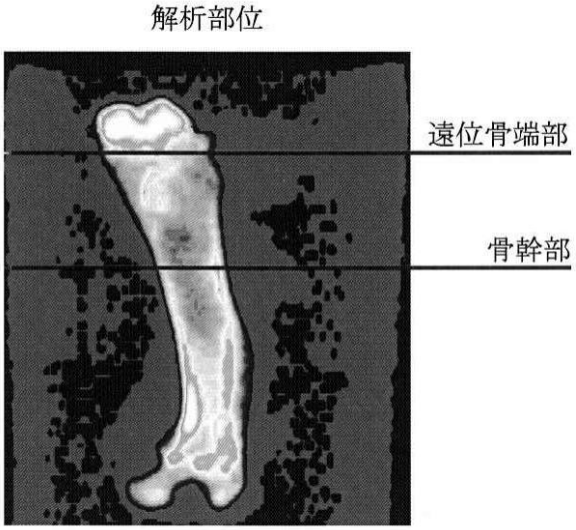
【図４】



【図５】

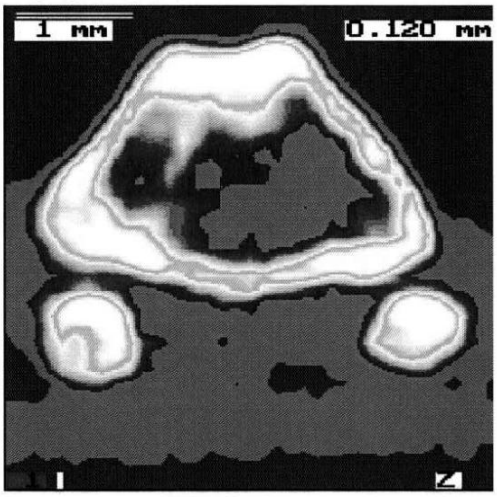

ハイドロキシアパタイト単独
↓2000倍拡大
↑10000倍拡大
↓100倍拡大
↑20000倍拡大

【図６】

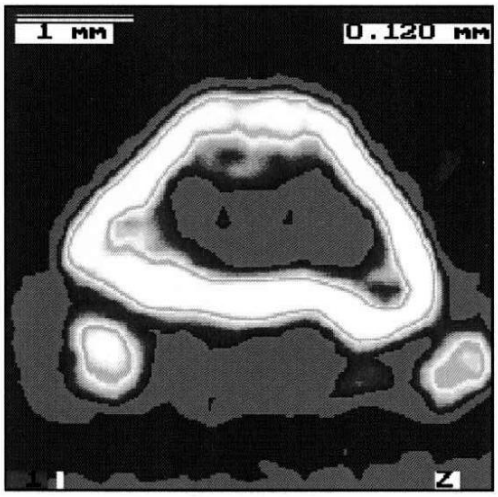

解析部位
遠位骨端部
骨幹部

【図７】

遠位骨端部(A)

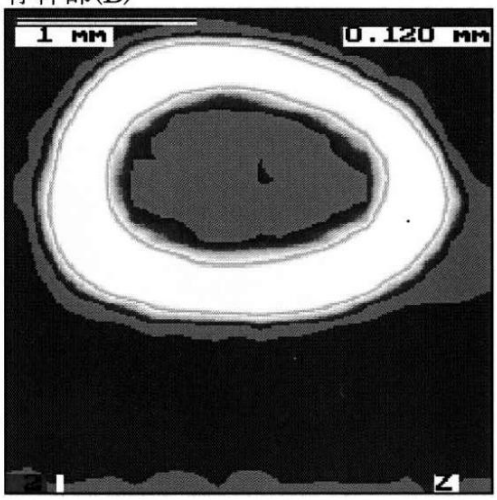


OVX Control

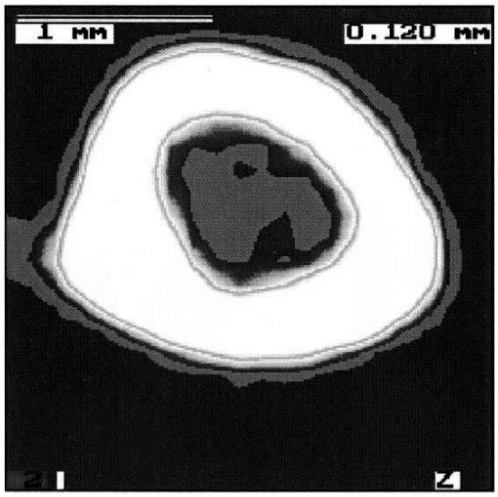


複合体

骨幹部(B)



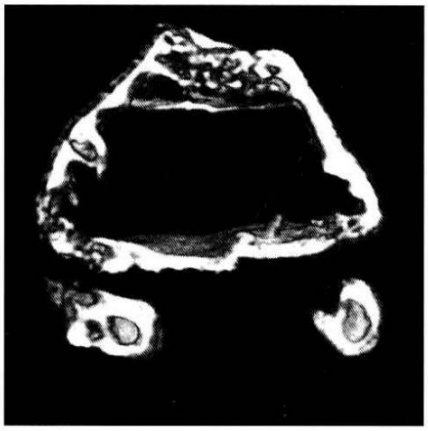
OVX Control



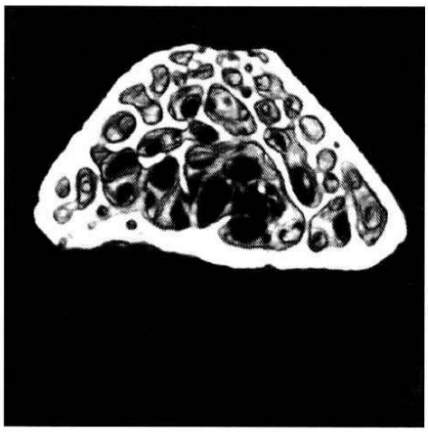
複合体

【図８】

横断像



OVX

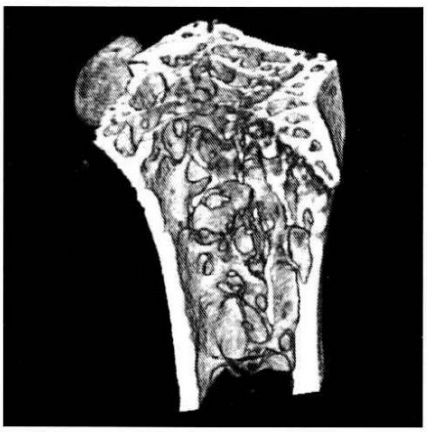


Sham

縦断像

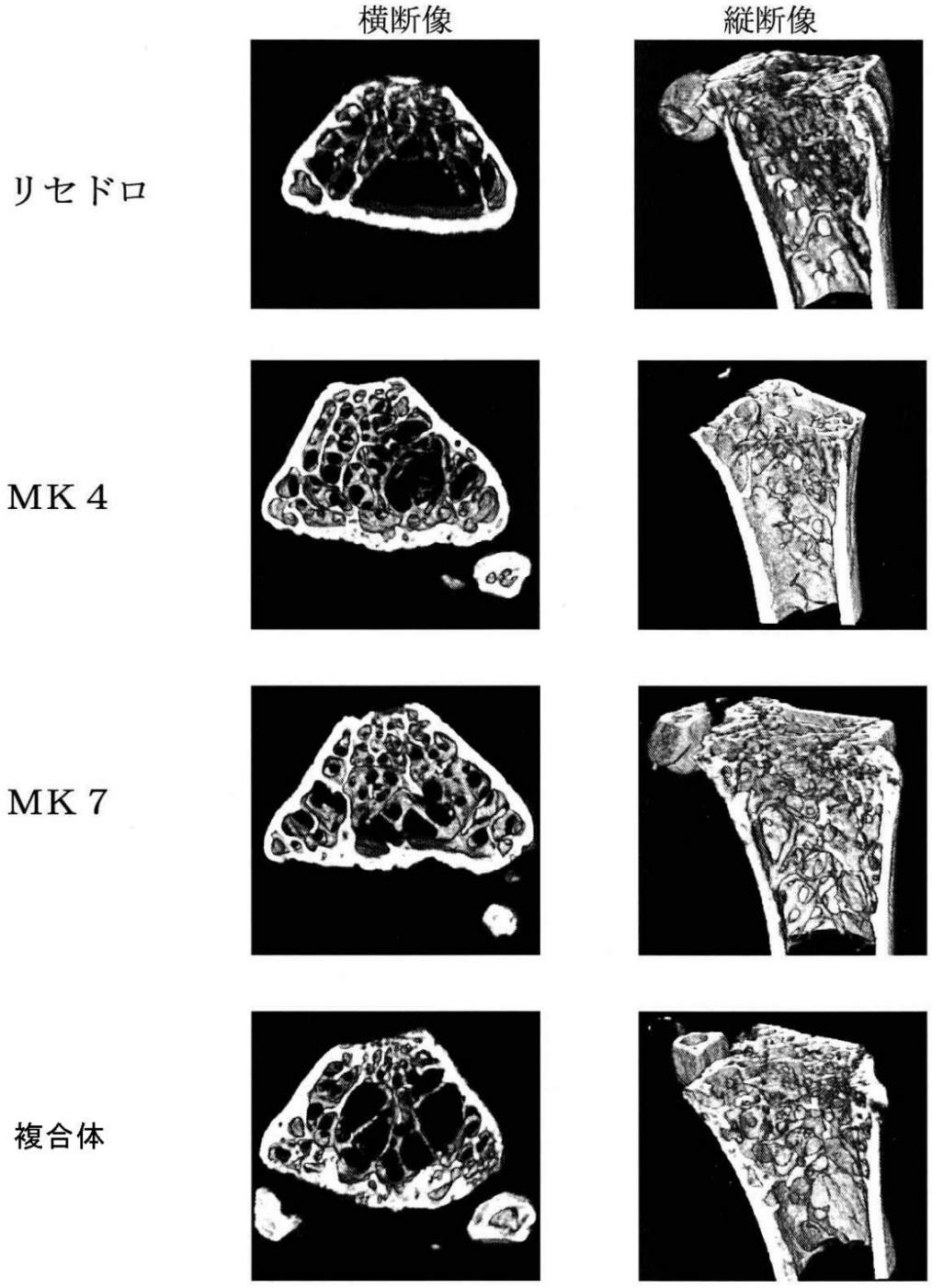


OVX



Sham

【図９】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
A61P 3/14 (2006.01) A61P 3/14

(56)参考文献 特開平１０－２１６２１４（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－３０６７６１（ＪＰ，Ａ）
特開２００６－０６７８０９（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５１５７３１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ３３／４２
Ａ６１Ｋ３５／６０
Ａ６１Ｋ３８／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）