

ジク チオ テール 由来の抽出物

(書誌+要約+請求の範囲)

【発行国】 日本国特許庁 (J P)

【公報種別】 公表特許公報 (A)

【公表番号】 特許公表平 1 1 - 5 0 2 2 3 5

【公表日】 平成 1 1 年 (1 9 9 9) 2 月 2 3 日

【発明の名称】 ジク チオ テール 由来の抽出物、その調製方法および該抽出物を含む組成物

【国際特許分類第 6 版】

A61K 35/80 AED

A23L 1/30

A61K 7/00 ADS

C07G 17/00

【 F I 】

A61K 35/80 AED Z

A23L 1/30 B

A61K 7/00 ADS K

C07G 17/00 Z

【審査請求】 未請求

【予備審査請求】 未請求

【全頁数】 2 9

【出願番号】 特許出願平 9 - 5 2 5 7 5 7

【出願日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 1 月 2 0 日

【翻訳文提出日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 9 月 1 8 日

【国際出願番号】 P C T / F R 9 7 / 0 0 1 0 6

【国際公開番号】 W O 9 7 / 2 5 9 9 8

【国際公開日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 7 月 2 4 日

【優先権主張番号】 9 6 / 0 0 5 2 2

【優先日】 1 9 9 6 年 1 月 1 8 日

【優先権主張国】 フランス (F R)

【指定国】 E P (A T , B E , C H , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (K E , L S , M W , S D , S Z , U G) , A U , B G , B R , C A , C N , C Z , E E , H U , I L , J P , K R , L T , L V , M X , N O , N Z , P L , R U ,

SG, SK, TR, US, VN

【出願人】

【氏名又は名称】 テクサンファン ソシエテ アノニム

【住所又は居所】 フランス国 69466 リヨン セデックス 06 ボワ
ト ポスタール 6114 リユ ドウグスクラン 60

【出願人】

【氏名又は名称】 ラボラトワール ラファル

【住所又は居所】 フランス国 13190 アローシユ セデックス ボワト
ポスタール 09 アヴニユ ドゥ プロヴァンス (番地な
し)

【発明者】

【氏名】 グチエレ, ジル

【住所又は居所】 フランス国 69006 リヨン リユ リユートウナン
コロネループレヴォス 39

【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】 越場 隆 (外1名)

【要約】

生物学分野、特に海洋由来の生物活性物質。ジクチオテール科の植物から抽出される特徴的な分析特性を有する新規な生物活性物質と、この新規物質の調製方法と、この物質を含む医薬品、化粧品および/または**食品**組成物。この生物活性物質は動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化要素の合成を良くするための医薬品/化粧品および**食品**組成物の製造で利用される。

【特許請求の範囲】

1. 動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の合成を良くするジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質。
2. 4~10個の炭素原子を有し且つ2つの二重結合を有する直鎖または分岐鎖を有する多環式構造である請求項1に記載の生物活性物質。
3. 下記a)~e)の分析データを示す請求項1または2に記載の生物活性物質:
a) グラフトシリカジオールを担体としてヘキサン/イソプロパノール(92/8)溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が20~25分および35~40分であり、b) グラフトシリカC₁₈を担体としてアセトニトリル/水(85/15)溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が15~17分であり、c) グラフトシリカC₁₈を担体としてアセトニトリル/水/酢酸(85/15/0.05)溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が17~20分および30~40分であり、d) ノルマルシリカのカラムを用いてヘプタン/エーテル(90/10)を溶出液として行った**高圧**クロマトグラフィーにおける保持時間が6.9~8.5分であり、e) グラフトシリカC₁₈カラムを備えた高速液体クロマトグラフ

イーでメタノール / 水(80/20)を溶出液として用いた場合の保持時間が 16～18 分である。

4. 下記a)およびb)を特徴とする請求項 1～3 のいずれか一項に記載の生物活性物質: a) メタノール中における UV スペクトルが 202 nm(228nm に肩を有する)、260～270nm、400～460nm および 630nm に複数の吸収バンドを有し、b) 化学的検出 (スルフリツクアニスアルデヒド、スルフリツクバニリン、ホスホモリブデート、エタノール硫酸) 後、薄層クロマトグラフィー (CCM) で示される先端の保持時間が 0.15、0.90 および 0.95 である。

5. 不活性な無機あるいは有機材料に吸着後、溶媒を除去して得られる請求項 1～4 のいずれか一項に記載の生物活性物質。

6. ジクチオテール科の植物を乾燥および / または凍結乾燥し、粉碎した後、低級アルカノール、脂肪族ケトン、アルカン、シクロアルカン、ハロゲンを含む溶媒、芳香族溶媒、エステル、エーテルおよび類似物で構成される群の中から選択される有機溶媒を用いて植物材料を 1 回以上抽出することによって植物の有機抽出物を調製し、溶媒を蒸発して有機抽出物を乾燥し、乾燥した有機抽出物を液 / 液抽出、**高圧**または低圧カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーを順次行う一つ以上の精製段階で精製してジクチオテール科の植物の活性成分を得ることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか一項に記載の生物活性物質の調製方法。

7. 有機溶媒としてエタノールまたはアセトンを使用する請求項 6 に記載の方法。

8. 植物材料と有機溶媒とを植物材料 1 g に対して溶媒 5 ml の割合で使用し、植物材料と有機溶媒との接触時間を 12 時間～5 日間にする請求項 6 または 7 に記載の方法。

9. 動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の合成を良くする医薬、美容および / または**食品**組成物であつて、活性成分として請求項 1～5 のいずれか一項に記載の生物活性成分を、目的用途に適した不活性で無毒性の賦形剤またはベヒクルと組み合わせるか、混合した状態で含み、必要に応じて相補的活性を有する活性成分をさらに含むことを特徴とする医薬、美容および / または**食品**用組成物。

10. 不活性な賦形剤またはベヒクルが経口、非経口、経皮、局所または直腸投与用に適したものである請求項 9 に記載の組成物。

11. 動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の合成を良くする組成物の製造での請求項 1～5 のいずれか一項に記載の生物活性物質の利用。

12. 動物および人間の細胞間マトリクスのグリコサミノグリカン (GAG) およびプロテオグリカンの合成を刺激する組成物の製造での請求項 1～5 のいずれか一項に記載の生物活性物質の利用。

13. 細胞間マトリクスのグリコサミノグリカンのゴルジ体および膜における合成と、細胞間マトリクスのプロテオグリカンのゴルジ体における合成を刺激するための組成物の製造での請求項 1～5 のいずれか一項に記載の生物活性物質の利用。

14. 動物および人間の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の関与する疾患の予防および / または治療用組成物の製造での請求項 1～5 のいずれか一項に

記載の生物活性物質の利用。

詳細な説明

【発明の詳細な説明】

ジクチオテール由来の抽出物、その調製方法および該抽出物を含む組成物 本発明は生物学分野、特に海洋由来の生物活性物質に関するものである。

本発明は、ジクチオテール(Dictyotales)科の植物から抽出される新規な生物活性物質と、その抽出方法と、該抽出物を含む組成物とに関するものである。本発明の組成物は、動物および人間の組織の細胞間マトリクス(細胞外間充織)(MEC)のグリコシル化成分(elementsglycosyles)の合成を良くするために使用できる。

ジクチオテール科という用語は、炭酸カルシウムを固定、濃縮、析出し、あるいは葉状体上にアラゴナイト(霰石)とよばれる炭酸カルシウム結晶を生成するものを意味する。

植物という用語は乾燥状態、生の状態、粉碎状態あるいは自然の状態のものを意味する。

本発明の生物活性物質が抽出される植物は、褐藻類、フコフィシー(Fucophyceae)綱、ジクチオテール目、ジクチオタシー(Dictyotaceae)科のものである。ジクチオテール科に属する属はわずかに数種類すなわちパディナ(Padina)、ゾナリア(Zonaria)またはジクチオタ(Dictyota)である。パディナ属には最もよく見られる種がまとめられている。例えば、地中海沿岸にはパボニカ(pavonica)、ボヤナ(boryana)(*P. tenuis*)、ブルゲセニ(boergesenii)などの種が見られ、太平洋沿岸には(すでに挙げたものは除いて)アルボレセンス(arborescens)、オストラリス(australis)、ボヤナ(boyana)、コーレンス(caulens)、コメルソニ(commersonii)、コンクレセンス(concrescens)、クラセ(crasse)、ドルビレイ(durvellei)、エレガンス(elegans)、フェルナンデジアナ(fernandeziana)、フレスリ(freseri)、ジムノスポラ(gymnospora)などの種が見られ、同様に大西洋沿岸では、グラブラ(glabra)、ヘテンシス(haitensis)、デイストロマテイカ(distromatic)、ドウビア(dubia)などの種が見られる。インド洋には特有の種が見られる。以上の植物の特徴の1つは葉状体上にアラゴナイト型の炭酸カルシウム層を固定し、葉状体表面に斜方晶系の炭酸カルシウム層を固定することである。この特徴は植物と一諸に得られる粉末をX線回折試験することで見られる。X線の回折ではこれら植物の粉末は 2θ : $-3,393^\circ$ 、 $-3,268^\circ$ 、 $-2,699^\circ$ 、 $-2,682^\circ$ 、 $-2,371^\circ$ 、 $-2,336^\circ$ (ダブルット)、 $-1,976^\circ$ 、 $-1,877^\circ$ (ダブルット)に強いピークを有する。これらの回折角度はアラゴナイトに特徴的なものである。

本発明の対象は、動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の合成を良くする新規な生物活性物質であるジクチオテール科の植物の抽出物にある。

この新規な生物活性物質は4~10個の炭素原子を有し且つ2つの二重結合を有する直鎖または分岐鎖を有する多環構造によって特徴付けられる。

この新規物質は詳細な分析データによっても特徴付けられる。

本発明はさらに、ジクチオテール科の植物から抽出される生物活性成分の抽出

方法に関するものである。

その第1段階では、ジクチオテール科の植物を採種後に、薬学的特性を損なわないように、できれば遮光した状態で乾燥させる。強い光にあてて長時間乾燥すると、活性の低い不安定な物質が生じる。従って、活性物質を得るのにより適した方法で乾燥するのが好ましい。

そのためには、粉碎された植物または自然のままの植物を熱を加えずに通気乾燥させる。それによつて暗い栗色の上に炭酸カルシウムが鮮明な白い縞模様が際立って見える植物材料が得られる。

経済的にはより安価で同様に満足な結果を与えるもう一つの方法は、強力に植物の水を切った後に真空乾燥させる方法である。粉碎した(またはしていない)植物を凍結乾燥させることによつて無水の生成物を得ることができ、有利である。

上記2つの方法では濃い茶色がかつた緑色の材料が得られ、この材料は非常に脆く、容易に粉末化するため、溶媒を用いて生物活性成分を抽出する操作が容易になる。

強力に乾燥させた植物の利点は保存性の良い(水分のない状態で)植物材料が得られ、この植物材料から極性溶媒の存在に邪魔されることなく活性物質(安定化されたもの、またはされていないもの)を抽出することができる点にある。さらに、完全に乾燥された植物は粉末化が容易である。

生物活性物質を得る方法は、ジクチオテール科の植物を乾燥および/または凍結乾燥し、粉碎し、その後、低級アルカノール(エタノール等)、脂肪族ケトン(アセトン等)、アルカン(ペンタン、ヘキサン、ヘプタン等)、シクロアルカン(シクロヘキサン等)、ハロゲンを含む溶媒(クロロホルム、ジクロロメタン)、芳香族溶媒、エステル(ジエチル酢酸等)、エーテルおよび類似物で構成される群から選択される有機溶媒を用いて植物材料を1回以上抽出することによつて植物の有機抽出物を調製し、溶媒を蒸発させて有機抽出物を乾燥させ、乾燥した有機抽出物を液/液抽出、**高圧**または低圧カラムクロマトグラフィ、高速液体クロマトグラフィを順次行う精製段階を一回以上行つて精製し、ジクチオテール科の植物の活性成分を得るものである。

有機溶媒は単独または組み合わせて使用することができる。一般には水と混和する有機溶媒、さらに植物の葉状体から活性成分を抽出可能な任意の溶媒を使用することができる。

活性生物物質は溶媒を除去した状態で得られるのが好ましいので、溶媒は揮発性のものから選択される。実際には、生物活性物質を溶解する揮発性溶媒はセルロールまたはその誘導體、コロイドシリカ、高分子量アルカン(例えばパラフィン)、両親媒性溶媒(例えばポリエチレングリコール(PEG)、プロピレングリコール)あるいはグリセロールなどの支持体から蒸発させることができる。有機溶媒としてはアセトンまたはエタノールを使用するのが好ましい。使用する割合は、植物材料1gに対して溶媒5mlにするのが好ましく、植物材料と有機溶媒との接触時間は4~5日間にするのが好ましい。

浸漬時に溶媒に対する乾燥材料の比率を種々変えて行つて良い結果が得られている。同じ量の乾燥材料に対する使用量は1~50の間で変化する。同様に有機溶媒と植物材料の接触時間も12時間~5日間の間で変化する。

さらに、操作はより難しくなるが、アンモニア性媒質を用いた水性抽出でも満

足な結果が得られる。

生物活性物質の抽出では選択した溶媒に植物材料を浸漬する必要はなく、溶媒を粉末上を連続的に通過させる(パーコレーション)ことで行うことができる。流速を調節して所定の活性溶液を得られるまで抽出物を濃縮するだけでよい。本発明では、乾燥および/または凍結乾燥させたジクチオテール科の植物を粉碎し、材料1 gあたり5 mlのアセトンを用いて4~5日間アセトンと接触させることによつて1回以上の抽出を行う。

得られたアセトン抽出物からアセトンを蒸発させて抽出物を乾燥し、下記精製段階で精製する。

精製の第1段階は液/液抽出で行う。残留物すなわち乾燥したアセトン抽出物に再びメタノール/水混合物を加え、この溶液をヘキサンで抽出する。続いて、水メタノール相を濃縮して水で稀釈し、さらにエーテルで抽出する。このようにして得られるエーテル相に生物活性物質が含まれる。

精製の第2段階は低圧カラムを用いたクロマトグラフィーで行う。担体はセファデックス (Sephadex LH20 登録商標) 型のゲルを使用する。濃度勾配をつけたクロロホルム/メタノールを用いて溶出する。クロロホルム/メタノール比率が 97/3(v/v)の画分に生物活性物質が溶出する。クロロホルム/メタノール 70/30 を用いてカラムをリンスすると、第2の残留活性画分が溶出する。

次の精製段階は半調製用高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で行う。カラム寸法は 250 mm(長さ)×10mm(直径)である。使用する担体は: グラフトシリカC₁₈と、グラフトシリカジオールである。流速は8 ml/分にする。

グラフトシリカジオールの担体を用い、溶出液がヘキサン/イソプロパノール 92/8の場合、活性画分は20~25分と35~40分で溶出する。グラフトシリカC₁₈を担体として使用した場合、アセトニトリル/水 85/15の溶出液では15~17分に活性成分が溶出し、アセトニトリル/水/酢酸 85/15/0.05の溶出液では、活性成分は17~20分と30~40分に溶出する。

以上の精製段階で黄緑色の生物活性物質が得られる。

ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性成分の特性は各種の分析(UVスペクトル、IRスペクトル、NMR、薄層クロマトグラフィー)で決定する。

最終的に得られる活性画分のメタノール中でのUVスペクトルは 202nm(228nmに肩あり)、260~270nm、400~460nmおよび630nmにある複数の吸収バンドで特徴付けられる。

精製段階終了後、化学試薬を用いて薄層クロマトグラフィー(CCM)を行う(使用する検出試薬はスルフリツクアニスアルデヒド、スルフリツクバニリン、ホフホモリブデート、エタノール硫酸)。検出後、複数のスポットが確認される。先端保持時間は以下の通り: Rf値は0.15、0.90および0.95であり、これは同様の条件で行った調製用CCMすなわちグラフトシリカジオールを用いてヘキサン/イソプロパノール 85/15で溶出させたCCMプレートで得られる生物活性領域に相当する。

質量分析スペクトル、IRスペクトルおよびプロトンNMRまたはC¹³NMRスペクトルでも同様にジクチオテール科の植物から抽出された本発明の新規な生物活性物質の構造に関する情報が補完された。

C¹³NMRスペクトル分析の結果、4~10個の炭素原子を有し且つ2つの二重

結合を含む直鎖または分岐鎖を有する多環構造に結合した状態で存在することが示された。

本発明のジクチオテール科の植物から抽出される生物活性物質は、乾燥させた植物材料 1 g を 5 ml のエタノールを用いて 12 時間浸漬または浸出することによっても得られる。

エタノールは細胞に受入れられ易い溶媒であり、しかも、細胞が浸漬されている栄養分の豊富な水性溶液に対して完全に混和性である。その後、下記の精製段階を行う。

通常のシリカカラムを用いた**高圧**クロマトグラフィーに通し、**高圧**クロマトグラフィー用装置に 20 μ l の生物活性画分を添加し、ヘプタン / エーテル (90 / 10) 混合物を用いて流速 2 mm / 分で溶出させる。ジクチオテール科の植物から抽出された活性は全て 6.9 分～8.5 分の間に溶出した画分中に見られる。同様に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で操作することもできる。HPLC カラムにグラフトシリカ C₁₈ を充填し、溶出液はメタノール / 水 (80 / 20) とし、流速は 4 ml / 分にする。抽出された物質の活性は全て保持時間 16～18 分で溶出する画分中に濃縮される。

光の拡散を利用した検出器を用いたクロマトグラムから、減圧下で操作すれば (従って、移動相の蒸発によって活性画分が随伴されることはないという条件で)、この保持時間に植物の活性画分を構成するかなりの量の物質が確認される。

従って、ジクチオテール科の植物から抽出される新規生物活性物質は、アセトンを用いて抽出を行った場合、精製段階の下記分析データで特徴付けられる:

a) グラフトシリカジオールを担体としてヘキサン / イソプロパノール (92/8) 溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が 20～25 分および 35～40 分である。

b) グラフトシリカ C₁₈ を担体としてアセトニトリル / 水 (85/15) 溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が 15～17 分である。

c) グラフトシリカ C₁₈ を担体としてアセトニトリル / 水 / 酢酸 (85/15/0.05) 溶出液を用いて行った半調製用高速液体クロマトグラフィーにおける保持時間が 17～20 および 30～40 分である。

エタノールで抽出を行った場合の精製段階における分析データは以下のとおりである: a) ノルマルシリカのカラムを用いてヘプタン / エーテル (90/10) を溶出液として行った**高圧**クロマトグラフィーにおける保持時間が 6.9 ～ 8.5 分である。

b) グラフトシリカ C₁₈ カラムを備えた高速液体クロマトグラフィーでメタノール / 水 (80/20) を溶出液として用いた場合の保持時間が 16～18 分である。

本発明の生物活性物質は、アセトンで抽出を行った場合、精製段階の後で以下の分析データで特徴付けられる: a) メタノール中における UV スペクトルが 202 nm (228nm に肩あり)、260nm ～270nm、400～460nm および 630nm に複数の吸収バンドを示す。

b) 化学的検出 (スルフリツクアニスアルデヒド、スルフリツクバニリン、ホスホモリブデート、エタノール硫酸) 後、薄層クロマトグラフィー (CCM) で示される先端の保持時間は 0.15、0.90、および 0.95 である。

有機溶媒を用いて抽出される物質は取扱いが難しいことが多い（揮発、水和、爆発の危険等）ので、固体支持体、例えばセルロース等の吸収性有機ポリマー、吸収性または吸着性の無機物または無機組成物（コロイドシリカ）、不活性物質、例えばパラフィン、ポリエチレングリコール（PEG）、プロピレングリコール、ポリビニルピロリドン等に固定するのが望ましい。ほとんど酸素を含まない不活性支持体は全て適している。

固定された物質の特性は、ジクチオテール科植物の抽出条件、固定用材料、安定化条件および抽出溶媒の固定材料によって大きく変化する。従って、粘稠度は可変であり、色は純粋な緑色から栗色まで様々である。

本発明はさらに、無機または有機材料に吸着後、溶媒を除去した生物活性物質に関するものである。

ジクチオテール科の植物から抽出される本発明の生物活性物質は非常に有効な薬学的特性を示すので、治療、美容、**食品**、人間および動物の栄養学、移植学および整形外科（骨または関節に関する外科）で利用される。

この物質は医薬、美容および / または **食品** 組成物あるいはインプラントとして使用される。

ジクチオテール科の植物より抽出された本発明の生物活性物質は動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化成分の合成を改変し、この物質はヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸等のグリコサミノグリカン（GAG）類の合成、アグレカン、デコリン、ビグリカン、ベルシカン、フィブロモジエリン、フィブログリカン、シンデカン、ベタグリカン、グリピカン等のプロテオグリカン類の合成を刺激する。

従って、本発明の生物活性物質は動物や人間の組織の細胞間マトリクス（MEC）のグリコシル化成分の合成を改変し、特に動物および人間の組織の細胞間マトリクス（MEC）のグリコサミノグリカン（GAG）およびプロテオグリカンの合成を刺激する組成物の製造で使用される。

本発明物質は皮膚におけるグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンのグリコシル化合成を良くするために美容または皮膚科学での組成物の製造で使用される。

本発明物質は、結合組織または間充組織細胞の蛋白質合成および配糖体合成を刺激する。本発明物質は上皮組織に直接作用することによって結合または間充組織細胞の活性を間接的に改変するための局所用組成物の製造で使用される。ジクチオテール科の植物から抽出される物質は、MECのグリコサミノグリカンのゴルジ体および膜の合成およびMECのプロテオグリカンのゴルジ体の合成を刺激する。

さらに、この物質は例えばコラーゲン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸の合成を良くする。

この物質はMECのグリコサミノグリカンのゴルジ体および膜の合成およびMECのプロテオグリカンのゴルジ体の合成を刺激するための組成物の製造で使用できる。

本発明の物質は皮膚細胞（繊維芽細胞、角質細胞）、骨細胞（骨芽細胞、軟骨細胞）および骨以外の関節組織の細胞（滑膜細胞）に対して活性である。

人間では、ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質を摂取するこ

とによって、乾燥状態の植物と全く同様に、間充組織、特に肌（真皮および表皮）、骨（軟骨、篩骨、柱骨(os trabeculaire)、軟骨層）の組織のMECのグリコシル化成分の合成が良くなる。

従って、ジクチオテール科の植物から抽出された物質は皮膚、骨および軟骨の組織損傷（病変）の予防および / または治療のための医薬品組成物の製造で使用できる。

一般に、この物質は、動物および人間の細胞間マトリクスのグリコシル化成分に関する疾患の予防および / または治療用組成物の製造で使用される。

本出願人の研究の結果、この活性はエステラジオールおよびビタミンD₃（1-25(OH)₂D₃）、ビタミンCなどの賦活作用のある多くの物質によって誘導される活性とは異なることを確認した。本発明の植物に含まれる活性物質は、インターロイキン（例えばIL-1）等の有害物質の存在下でもその活性を発現し、従って、生物活性なこの物質は回復活性(active reparatrice)を有する。

この生物活性物質はさらに、細胞に対して間接的な活性を有する。すなわち、植物から抽出された活性物質が第1の細胞群に到達し、この細胞群から標的細胞に向かってサイトカイン、成長因子またはホルモンなどのメツセンジャーが分泌されることによって、活性物質はメツセンジャーを介して標的細胞に作用する。

ジクチオテール科の植物から抽出された物質の活性は、環形動物、ホヤ類（原索動物の総称）、節足動物門、軟体動物類、二枚貝（貝殻を有するもの）、輔皮動物門、鳥類および哺乳類等の各種の門に属する動物種に対して発現が認められる。

ジクチオテール科の植物から抽出される生物活性物質はさらに、節足動物（エビやカニ類）や貝類の養殖、並びに卵の殻の品質を向上させるための**食品**組成物を製造する目的で使用される。

ジクチオテール科の植物から抽出される物質はさらに、整形外科（骨に関する外科）でも非常に有利であり、この物質は、組織移植の際に骨芽細胞の表現型を保存し、骨や関節表面を再生させるために関節の近くに生体材料と共に挿入することができる。

従って、この物質はさらに、関節疾患の予防および / または治療用組成物の製造で使用される。

本発明の物質はさらに、細胞間マトリクスのグリコシル化成分の関与する局所的疾患の予防および / または治療のための局所施用組成物の製造で使用される。

生物活性物質はさらに、細胞間マトリクス変性症に関連する疾患の予防および / または治療と、軟骨組織の再生または**食品**の補完用組成物の製造で使用できる。

本発明はさらに、動物および人間の組織の細胞間マトリクスのグリコシル化要素の合成を良くする医薬、美容および / または**食品**組成物であって、活性成分としてジクチオテール科の植物から抽出される生物活性成分を、目的の用途に適した不活性で無毒性の賦形剤またはベヒクルと組み合わせた状態または混合した状態で含み、必要に応じて相補的活性成分を含むことを特徴とする組成物に関するものである。

本発明の医薬、美容および / または**食品**組成物は、経口、非経口、経皮的、局

所的または直腸経路で投与できる。従って、この組成物は糖衣錠または無糖衣錠、カプセル、ゼラチンカプセル、ピル（丸剤）、タブレット、（オブラートに包んだ）薬包、シロップ、経口摂取用または外用粉末、術後の瘢痕形成、火傷、外傷用の補助組成物、座薬、アンプル注射溶液または懸濁液、クリーム、ジェルまたはポマード、浸透性極性溶媒に入った経皮投与用溶液の状態を提供される。

皮膚投与用で全身性の効果を示す組成物は特にユニークである。すなわち、この条件では角質細胞（皮膚の表皮）に塗布したジクチオテール科植物由来の生物活性物質が軟骨細胞、滑液細胞、骨芽細胞、さらにおそらくは他の間充組織細胞に作用して因子(facteur)の分泌を刺激する。

本発明の他の対象は、活性成分としてジクチオテール科の植物から抽出される生物活性物質を、不活性で無毒且つ所望用途に適した賦形剤またはベヒクルと組み合わせ、あるいは混合した状態で含み、必要に応じて相補的な効果を有する他の活性成分を含むことを特徴とするインプラントにある。

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明が下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1 ジクチオテール科植物の抽出物の活性の研究1) 活性の研究 得られる効果が植物の特殊な生物活性物質に起因することを示すために、高速液体クロマトグラフィーまたは**高圧**クロマトグラフィー分析時に単離可能な全ての画分に対して活性の研究を行った。

この植物の活性を研究するために2つの半定量的評価方法を用いた。

細胞または組織の培養物から細胞間マトリックス成分を特殊抗体によって固定された細胞を免疫標識することによって検出するか、細胞の破壊後、特殊抗体によって物質の検出および識別を用いたゲルクロマトグラフィーまたは電気泳動（電界クロマトグラフィー）で検出する。

上記2つの方法では、特殊抗体は蛍光分子と連結した第2抗体あるいは基質の発色団を発現させるような活性を有する酵素と結合した第2抗体によって検出される。

相対的定量化は画像分析（免疫蛍光法）または着色基質（ウエスタンブロット法）の使用時は単純な分光光度分析で行うことができる。画像分析が必要な時は、検光子BICOM 200 を用いて複数の細胞培養物について得られた複数のネガから結果を定量化する。いずれの場合でも、値は対照に対する相対値および/または合成蛋白質の総量に対する相対値（半定量的評価）で示される。半定量的評価によって結果同士を比較することができる。しかし、抗体の親和性が（抗体は特異的であるにもかかわらず）2つの抗原-抗体結合について同じではないために、他の細胞の化合物の合成とは比較することはできない。

外科的処置の際に採取された組織の断片から単離した細胞のマトリックス合成を研究した。培養物は第1単層培養物に作り、結果を3次元細胞培養物によって確認した。組織断片の培養物、皮膚、関節、骨は同様な結果であった。

2) 結果 結果は知覚した信号値に対応する数で示される。

表中の文字“SBA”はジクチオテール科植物から抽出された生物活性物質を表している。

1) 第1単層培養物でヒトの線維芽細胞によって合成されたデルマタン硫酸:

	平均	標準偏差
対照媒体中の線維芽細胞	32	0.54
SBAを添加した媒体を有する線維芽細胞	625	21.87

2) 第1単層培養物中でヒトの線維芽細胞によって合成されたヒアルロン酸

	平均	標準偏差
対照媒体中の線維芽細胞	75	0.67
SBAを添加した媒体を有する線維芽細胞	428	52.10

3) 第1単層培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたコンドロイチン硫酸:

	平均	標準偏差
軟骨細胞 (対照)	56	0.85
SBAを有する軟骨細胞	445	19.45

4) 第1単層培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたヒアルロン酸:

	平均	標準偏差
軟骨細胞媒体	58	17
SBAを有する軟骨細胞	108	21

3) 活性の制御 この制御は文献に従って3次元培養物に行った。ここでは、アルギン酸のゲルを用いた。

1) 3次元培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたコンドロイチン硫酸

酸:

	平均	標準偏差
軟骨細胞媒体	37	7
S B A を有する軟骨細胞	94	8

4) 3次元培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたヒアルロン酸:

	平均	標準偏差
軟骨細胞媒体	48	36
S B A を有する軟骨細胞	151	50

全く同じ結果が各種哺乳類の骨から採取した骨芽細胞の内容物を用いて得られた。

この結果を確認するために、ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質を多数の傷付いた軟骨の組織培養物に加えた。傷ついた軟骨はコンドロイチン硫酸およびヒアルロン酸型のグリコサミノグリカンの貯蔵時に合成不良であるということが確認されている。ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質で処理した傷付いた軟骨は、活性物質で処理していない健康な媒体より優れた合成率を示した。

4) 生物活性物質の薬学作用 ジクチオテール科の植物から抽出される生物活性物質の薬学的作用を下記a)、b)によって客観化した: a) 回復作用: 細胞間マトリクスの有害な抑止剤の存在下での物質の回復作用。

b) 間接作用: 成長因子またはホルモンであるcytokine等のメッセンジャーを介する物質の間接作用。

今日では関節現象の大部分は関節表面の退化が原因であるということで文献の意見は一致している。

a) 回復作用 物質の回復作用は病理学的過程に参与する生物学的介入による有害作用に対する反応性で見られる。主要な生理学的介入剤はインターロイキン(interleukine 1 (IL-1)である。

従って、IL-1 の存在下で培養された間充織細胞によって生成されたグリコサミノグリカンに対するジクチオテール科植物から抽出される生物活性物質の活性を評価する。

1. IL-1 の存在下での培養結果 1) 単層培養物中でヒトの線維芽細胞によって合成されたヒアルロン酸:

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された線維芽細胞	36	9
SBA と IL-1 との存在下で培養された線維芽細胞	451	50

2) 単層培養物中でヒトの線維芽細胞によって合成されたデルマタン硫酸またはコンドロイチン硫酸 :

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された線維芽細胞	14	9
SBA と IL-1 との存在下で培養された線維芽細胞	632	17

3) 単層培養物中でヒトの骨芽細胞によって合成されたヒアルロン酸:

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された骨芽細胞	38	1
SBA と IL-1 との存在下で培養された骨芽細胞	232	5

4) 単層培養物中でヒトの骨芽細胞によって合成されたコンドロイチン硫酸:

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された骨芽細胞	28	5
SBA と IL-1 との存在下で培養された骨芽細胞	280	12

5) 3次元培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたヒアルロン酸:

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された軟骨細胞	78	16
SBA と IL-1 との存在下で培養された軟骨細胞	125	17

6) 3次元培養物中でヒトの軟骨細胞によって合成されたコンドロイチン硫酸:

	平均	標準偏差
IL-1 の存在下で培養された軟骨細胞	25	3
SBA と IL-1 との存在下で培養された軟骨細胞	470	21

別の型の細胞および抽出物の培養物を用いた場合にも同じ種類の結果を得た。外植を用いた半定量的評価では断面図を考慮しなければならないので難しい。

b) 間接作用 本出願人は、驚くべきことに、ジクチオテール科の植物から抽出される生物活性物質 (SBA) を用いて培養した細胞は他の細胞の信号を伝達でき、その信号は生物活性物質と接触する時に知覚されるということを見出した。従って、この生物活性物質は第2メッセンジャーの分泌を刺激できる。このメッセンジャーは別の型の細胞に作用し、プロテオグリカンの合成を刺激する。

この現象を証明するために下記の方法で試験を行った: ケラチノサイト (ヒトの表皮細胞) の培養中に、生物活性物質を添加する。数時間培養後、細胞を

数回洗浄し、生物活性物質（SBA）の残部を留去する。次いで、胎児の子牛および動物の血清を用いない新しい媒体（例えばK.E.M.またはMac Coy）を添加する。新たな培養後、媒体を採取する。こうして得られた条件化された媒体を凍結乾燥する。凍結乾燥したものを再び取り、次いで、中で第2培養が行われる特殊な媒体（例えば、線維芽細胞にはDMEM、骨芽細胞にはMac Coy）で1/4 または1/10 に希釈する。ケラチノサイトから生じた条件化された媒体によって処理された細胞の培養物は、培養物が生物活性物質によって直接処理された培養物自体である場合と同じ比率で、プロテグリカンの合成率を向上させる。しかし、ケラチノサイトによって条件化された媒体の存在下で培養し、生物活性物質では培養していない培養物はその合成が改良しない。

さらに、条件化された媒体への反応は希釈前に凍結乾燥したものをアルコールで取るか、水性媒体か取るかによって変化する。

ある種の経験的条件では、骨芽細胞はケラチノサイトによって条件化された媒体をアルコールで取った時に良く反応する。同じ処理であるのに、線維芽細胞と骨芽細胞との間では、凍結乾燥したものを直接媒体によって取った時により良い反応があった。このことから細胞から浸出したメッセンジャーと、同じ集団に同じ信号を与えるメッセンジャーは異なるものであると考えられる。この試験から、皮膚のケラチノサイト上または上皮組織上での活性成分を含む組成物を使用することによって皮膚下の組織のプロテオグリカンの合成を改良できると考えられる。

実施例2組成物1) 例としては、下記抽出物（生物活性物質を含む）の1種を調製することができると：

乾燥植物	200 g
シクロヘキサン	1000 g

また

乾燥植物	200 g
エタノール	1000 g

生物活性物質（SBA）を含む抽出物の担体への固定：

有機溶液	200 g
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	1000 g

有機溶液はセルロース誘導体の担体から蒸発させる。

また

有機溶液	20 g
ポリエチレングリコール (P. E. G) 4000または6000	1000 g

有機溶液は液体または固体のPEG中で蒸留する。有機溶液 / 担体の比率は大きく変化でき、求められる効果（質量効果、遅延配合物、insitu 作用、一般系の作用等）に関連する。

2) 組成物の一般的利用 生物活性物質をエタノールで抽出し、不活性担体に固定したものを含むカプセルおよび錠剤の配合物は、非常に単純であることが分かっている。そのためには、エタノールで抽出された生物活性物質を微結晶セルロースと、タルク等の潤滑剤と、グリセロールベヘン酸塩等の圧縮補助剤と混合する。

エタノールで抽出された生物活性物質の吸着剤を利用し、ポリエチレングリコール4000または6000に固定し、次いでコロイド型シリカ、登録商標Aerosil または登録商標Sippernal で希釈してカプセルを製造する。

経皮 (transcutanee) 法は従来の方法で配合し、貯蔵容器は用いても用いなくてもよく、従来型の登録商標Transcutolの付形剤を用いる。

注入可能な方法は溶液または懸濁液に注入するのに適した液体で溶液状に精製された生物活性物質を用いることができる。

配合物の実施例a) カプセル: ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質 (S B A) を主成分とする。

ポリエチレングリコール6000 に固定されたカプセル	95%
シリカ	5%

カプセルの充填は従来の方法で行う。

b) 錠剤 ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質 (S B A) を主成分とする。

セルロースに固定されたSBA	25 %
セルロース	65 %
タルク	1.5 %
グリセロールのベヘン酸塩	8.5 %

調剤に好ましい組成物は経口投与、例えば錠剤、糖衣錠、カプセル(gelule)、カプセル(capsule)の形である。これらは活性成分として少なくとも1つのジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質または不活性担体に活性物質を吸着する吸着剤を含み、無毒で、適合性の調剤である希釈剤または不活性付形剤とを組み合わせるか、または混合する。場合によっては、1種または複数の補足的な作用を有する活性成分を含む。

食餌利用ではジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質を小麦粉等の栄養食支持体、またはセルロースまたはセルロース中に豊富な調合物等の不活性支持体に希釈する。

この組成物は特に甲殻類、例えば子エビの飼育に求められる。

実 施 例 : こ え び

SBA	12.1
Dulectin	23.9
炭酸カルシウム	5.0
とくさ(Prele)	1.0
小麦胚芽の粉末	54.05
Sippernat	3.95

この配合物は、養魚池の180 000匹のこえびに1.5 kgの量で1回投与され、解化生存率を30%向上することができ、成熟したこえびの重量は10%±2%増量した。

従って、生物活性物質は動物の平均重量を向上させ、および/または成熟期間を短くする。

よく卵を産む雌鳥に対する同じ体験で、割れた卵の数が第2周期の産卵では2%減少したことが示された。

3) 組成物の局所的利用 移植片(ペレット: 皮膚下に入れた小さな錠剤)の利用は既に一般的である。代用ホルモン治療で広く利用され、治療を延長することができる。ジクチオテール科の植物から抽出された生物活性物質を与える活性成分を含浸した生物材料、例えば合成ポリマー(ポリ乳酸、ポリアクリル酸)、無機物: ヒドロキシルアパタイトリン酸カルシウム、生物材料: 真珠層、珊瑚

等の外科的方法で配置ができ、細胞間マトリックスのプロテオグリカンの合成の再開について興味深い結果が得られた。

4) 適当な組成物の皮膚用または化粧用の一般的な利用 皮膚用および化粧用で利用するためには、クリームまたはジェルを使用するのが好ましい。この分野での組成物の利用は、非常に便利で効果的である。この配合物は水中油または油中水型のエマルジョンを使用するが、これに限定されるものではない。このエマルジョンは化粧分野での特定利用では乳液、デイクリームまたはナイトクリームとよばれ、皮膚学利用では、軟膏、ジェル、ジェルクリーム混合配合物とよばれる。

例として、エマルジョン配合物を挙げることができる。この配合物は少なくとも3つの成分：水、脂肪体、エマルジョンまたは界面活性剤を全て有している。もちろん、他の物質、例えば、着色剤、組織化剤、活性成分（組み合わせてもよい）、保存剤、pH安定化剤、酸化剤は、最終配合物に介入することができる。

軟膏は親油性付形剤しか統合しない配合物である。ジェルはジアフェンアスペクトを有する組成物である。ジアフェンアスペクトでは水または時に親油性成分（またはシリコン）はコロイド状態であるか、コロイド懸濁液中にある。

生物活性物質（SBA）の濃度は広範囲、エマルジョン質量の0.01%~20%、0.01%は限界量で変えることができる。生物活性物質（リボソーム、ナノ球体、ナノカプセル）は、活性を向上できるので、封入した形で使用することも可能である。20%の活性成分を用いる場合は、配合物を大幅に改質する必要があり、活性はおそらく高平状態である。

配合物の最新形状はジェルとも呼ばれる。多数のジェルがカルボマーと呼ばれるアクリル酸の誘導体ポリマーを介して配合されている。他の型の分子はジェルをセルロースおよびその誘導体、コロイドシリカ、ウロン酸のポリマー、マンナン、ガラクトマンナン、キサントランゴム等に行うことができる。

実施例：予備乾燥したエタノールで抽出された生物活性物質を含む水中油クリ

Tefose 2000 登録商標	11
ラノリンのシール	3.5
Gelcol 登録商標	3.5
水	76.7
保存剤	十分量
S B A (水溶性)	5.0
香料	0.3
小囊状の S B A (リポソーム)	0.5
カルボマー	0.5
NaOH(10%) 溶液	p H 6.5 の必要量
水	Q S P 100 ml の必要量
保存剤、着色剤	

ーム

調剤用、化粧用の適当な利用での他の配合物、例えば、スポンジ、局所に有効なシール、粉末、小さな棒（ステイックおよび口紅）にすることができるということとは明らかである。