

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-231025

(P2013-231025A)

(43) 公開日 平成25年11月14日(2013.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/737 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/737	2 B 0 0 5
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/04	2 B 1 5 0
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 7 1	4 B 0 1 8
<b>A 2 3 K 1/18 (2006.01)</b>	A 2 3 K 1/18 A	4 C 0 8 6
<b>A 2 3 K 1/16 (2006.01)</b>	A 2 3 K 1/16 3 0 3 D	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-68438 (P2013-68438)	(71) 出願人	304019399 国立大学法人岐阜大学
(22) 出願日	平成25年3月28日 (2013. 3. 28)		岐阜県岐阜市柳戸1番1
(31) 優先権主張番号	特願2012-83750 (P2012-83750)	(71) 出願人	390016953 株式会社海産物のきむらや
(32) 優先日	平成24年4月2日 (2012. 4. 2)		鳥取県境港市渡町3307番地
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	鬼頭 克也 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 フコイダン含有する止血促進剤

(57) 【要約】

【課題】安全、簡便、安価、かつインヒビターの発生の心配がなく、しかも人、あるいは動物の飼い主が日常的に行うことのできる、止血促進のための手段を開発する。

【解決手段】フコイダン含有有効成分として含む止血促進剤、血小板凝集促進剤。

【選択図】なし

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】  
フコイダンを有効成分とする止血促進剤。
- 【請求項 2】  
フコイダンがモズク由来である請求項 1 記載の止血促進剤。
- 【請求項 3】  
イヌ用である請求項 1 または 2 記載の止血促進剤。
- 【請求項 4】  
フコイダンの分子量が 30 万以上である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の止血促進剤。
- 【請求項 5】 10  
フコイダンを有効成分とする血小板凝集促進剤。
- 【請求項 6】  
フコイダンがモズク由来である請求項 5 記載の血小板凝集促進剤。
- 【請求項 7】  
イヌ用である請求項 5 または 6 記載の血小板凝集促進剤。
- 【請求項 8】  
フコイダンの分子量が 11 万以上である請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の血小板凝集促進剤。
- 【請求項 9】 20  
フコイダンを含有する哺乳動物用飼料。
- 【請求項 10】  
フコイダンがモズク由来である請求項 7 記載の飼料。
- 【請求項 11】  
イヌ用である請求項 9 または 10 記載の飼料。
- 【請求項 12】  
フコイダンの分子量が 11 万以上である請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の飼料。
- 【請求項 13】  
フコイダンを添加することを特徴とする、止血促進作用および / または血小板凝集促進作用を有する飲食物または哺乳動物用飼料の製造方法。
- 【請求項 14】 30  
フコイダンがモズク由来である請求項 13 記載の方法。
- 【請求項 15】  
フコイダンの分子量が 11 万以上である請求項 13 または 14 に記載の方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】  
本発明は止血促進剤等に関するものである。詳細には、本発明は、フコイダンを有効成分として含む止血促進剤ならびに血小板凝集促進剤等に関するものである。
- 【背景技術】
- 【0002】 40  
ヒトや動物において、日常生活における外傷や手術などの場合に、あるいは血友病患者などの出血性疾患において出血が生じると、止血が奏功しないときには失血死の危険性が高くなる。そのため、出血を防止するために、圧迫法や止血帯法などによる物理的方法、トラネキサム酸、 $\alpha$ -アミノカプロン酸、トロンビンなどの止血剤、第VIII因子、第IX因子あるいは組み換え型第VII因子などの血液凝固因子製剤の投与（非特許文献 1 等参照）、濃厚血小板の輸注、接着性高分子による傷口の被覆、レーザーメスの使用などの外科的処置法等、様々な方策が採られている。
- 【0003】  
しかし、これらの薬剤の投与は原則的に医師、あるいは獣医師が行うものである。第VIII因子などの血液凝固因子製剤は、輸注を繰り返すことで抗体（インヒビター）が発生し 50

、効果が消失してしまう。しかも血液凝固因子製剤は高価である。また、止血帯などによる物理的方法、外科的処置法は対症療法に過ぎない。すなわち、止血が必要な場合に備えて、人、あるいは動物の飼い主が日常的かつ簡便に行うことができる根治療法は存在しないといっても過言ではない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】齋藤 英彦:抗凝固薬の歴史と展望,血栓止血誌 19: 284-291, 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0005】

安全、簡便、安価、かつインヒビターの発生の心配がなく、しかも人、あるいは動物の飼い主が日常的に行うことのできる、止血促進のための根治療法を見出すことが本発明の解決課題であった。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決せんと鋭意研究を重ねた結果、フコイダン、とりわけオキナワモズク由来のフコイダンが止血促進作用を有すること、ならびに該止血作用が血小板凝集能に起因すること、フコイダンに対するインヒビターの発生がないことを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【0007】

すなわち本発明は下記を提供する：

(1) フコイダンを有効成分とする止血促進剤。

(2) フコイダンがモズク由来である(1)記載の止血促進剤。

(3) イヌ用である(1)または(2)記載の止血促進剤。

(4) フコイダンの分子量が30万以上である(1)~(3)のいずれかに記載の止血促進剤。

(5) フコイダンを有効成分とする血小板凝集促進剤。

(6) フコイダンがモズク由来である(5)記載の血小板凝集促進剤。

(7) イヌ用である(5)または(6)記載の血小板凝集促進剤。

30

(8) フコイダンの分子量が11万以上である(5)~(7)のいずれかに記載の血小板凝集促進剤。

(9) フコイダンを含有する哺乳動物用飼料。

(10) フコイダンがモズク由来である(7)記載の飼料。

(11) イヌ用である(9)または(10)記載の飼料。

(12) フコイダンの分子量が11万以上である(9)~(11)のいずれかに記載の飼料。

(13) フコイダンを添加することを特徴とする、止血促進作用および/または血小板凝集促進作用を有する飲食物または哺乳動物用飼料の製造方法。

(14) フコイダンがモズク由来である(13)記載の方法。

40

(15) フコイダンの分子量が11万以上である(13)または(14)に記載の方法。

(16) フコイダンを哺乳動物(ヒトを除く)に投与することを特徴とする、哺乳動物の止血促進方法。

(17) フコイダンがモズク由来である(16)記載の方法。

(18) 哺乳動物がイヌである(16)または(17)記載の方法。

(19) フコイダンを哺乳動物(ヒトを除く)に投与することを特徴とする、哺乳動物の血小板凝集促進方法。

(20) フコイダンがモズク由来である(19)記載の方法。

(21) 哺乳動物がイヌである(19)または(20)記載の方法。

50

## 【発明の効果】

## 【0008】

本発明によれば、安全、簡便、かつ安価安全、簡便、安価、かつインヒビターの発生の心配がなく、しかも人、あるいは動物の飼い主が日常的に行うことのできる止血促進のための根治療法が提供される。本発明の止血促進剤の有効成分であるフコイダンは天然由来であるので安全であり、モズクなどの海藻に多く含まれ、抽出も容易なので安価である。また、フコイダンによってインヒビターは発生しない。日常生活において本発明の止血促進剤を服用しておくことにより、不意の出血に備えることができるとともに、患者のQOLを向上させることができる。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【0009】

【図1】上段は、フコイダン投与前の血友病罹患犬の全血の止血機能をトロンボエラストグラフィー(TEG)により調べた結果を示す図である。(a)は、クエン酸全血に遺伝子組み換え型ヒト組織因子(rhTF)と塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。(b)は、クエン酸全血に塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。下段は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬の全血の止血機能をTEGにより調べた結果を示す図である。(c)は、血友病罹患犬のクエン酸全血に遺伝子組み換え型ヒト組織因子(rhTF)と塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。(d)は、血友病罹患犬のクエン酸全血に塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。図の縦軸はclot firmness(血餅の堅固度、単位mm)、横軸は反応時間(min)を示す。図中、EXTEMは組織因子と塩化カルシウムによって開始する止血反応検査項目、NATEMは塩化カルシウムだけによって開始する止血反応検査項目、CT(凝固時間)は測定からフィブリン形成が開始するまで(振幅が2mmになるまで)の時間、CFT(凝固形成時間)は振幅(縦)が2mmから20mmに達するまでの時間、(角度)は振幅が2mmとなった点を通るクロッティング曲線の接線、MCF(凝固の最大堅固度)は最大の振幅、A10は測定開始10分後の血餅の堅固度(振幅)、A15は測定開始15分後の血餅の堅固度(振幅)を示す。

20

【図2】(a)は、フコイダン投与前の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示し、(b)は、フコイダン投与前の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示し、(c)は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示し、(d)は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。図の縦軸および横軸、ならびに図中の略号は図1と同じである。(e)は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $5\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。(f)は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $10\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。(g)は、フコイダン30日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸全血にフコイダンを最終濃度が $15\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。(h)は、フコイダン10日間投与後の血友病罹患犬のクエン酸血漿にフコイダンを最終濃度が $15\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう添加し、10分間静置した後、塩化カルシウムを添加した試料のTEGを示す。図の縦軸および横軸、ならびに図中の略号は図1と同じである。

30

40

【図3】図3は、フコイダンの分子量が止血機能に与える影響を調べた結果を示す図である。血友病罹患犬のクエン酸全血に各分子量のフコイダンをそれぞれ最終濃度が $15\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加した。フコイダン分子量は上から30万、11万、0.54万で

50

ある。止血反応検査項目はNATEMである。

【図4】図4は、インピーダンス法血小板凝集計を用いて、健康犬のトロンピン阻害全血にフコイダンを添加して濃度依存性に血小板凝集を引き起こすことを確認した結果を示す図である。健康犬から採取したトロンピン阻害全血にフコイダンを最終濃度が100 $\mu$ g/ml (a)、50 $\mu$ g/ml (b)、10 $\mu$ g/ml (c)、5 $\mu$ g/ml (d)、1 $\mu$ g/ml (e)となるように添加した試料の血小板凝集能を示す。(f)は、同じ健康犬から採取したトロンピン阻害全血に、ADP(アデノシン2リン酸、最終濃度10 $\mu$ M)を添加した試料の血小板凝集能を示す(陽性コントロール)。(g)は、同じ健康犬から採取したトロンピン阻害全血に、コラーゲン(最終濃度5 $\mu$ g/ml)を添加した試料の血小板凝集能を示す(陽性コントロール)。(h)は、同じ健康犬から採取したトロンピン阻害全血に、生理食塩水(20 $\mu$ l)を添加した試料の血小板凝集能を示す(陰性コントロール)。図の横軸は時間(min)を表す。12分間測定を行った(1目盛りは80秒)。図の縦軸はこの装置による血小板凝集度合いを示す任意のaggregation units(AU)である。図中の2つの曲線は、1つの測定キュベットで二重(duplicate)測定した結果を示す。

10

【図5】図5は、インピーダンス法血小板凝集計を用いてフコイタン投与濃度が血小板凝集能に及ぼす影響について調べた結果を示す図である。血友病罹患犬にフコイダンを90日間投与した。上段は、血友病罹患犬から採取したトロンピン阻害全血にフコイダンを最終濃度が100 $\mu$ g/ml (a)、50 $\mu$ g/ml (b)、10 $\mu$ g/ml (c)となるように添加した試料の血小板凝集能を示す。中段は、血友病罹患犬血友病罹病犬から採取したトロンピン阻害全血にフコイダンを最終濃度が5 $\mu$ g/ml (d)、1 $\mu$ g/ml (e)となるように添加した試料の血小板凝集能を示す。下段は、同じ血友病罹患犬血友病罹病犬から採取したトロンピン阻害全血に、ADP(アデノシン2リン酸、最終濃度10 $\mu$ M)(f-陽性コントロール)、コラーゲン(最終濃度5 $\mu$ g/ml)(g-陽性コントロール)、生理食塩水(20 $\mu$ l)(h-陰性コントロール)を添加した試料の血小板凝集能を示す。図の横軸、縦軸および図中の2つの曲線は、図4と同じである。

20

【図6】図6は、インピーダンス法血小板凝集計を用いてフコイタン分子量が血小板凝集能に及ぼす影響について調べた結果を示す図である。健康犬のトロンピン阻害全血に各分子量のフコイダンを最終濃度50 $\mu$ g/mlになるよう添加した。(a)は分子量30万、(b)は分子量17万、(c)は分子量11万、(d)は分子4万、(e)は分子量0.54万である。測定条件ならびに図の縦軸および横軸は図4と同じである。

30

【図7】図7は、健康犬に分子量30万のフコイダンを40mg/kg体重/日として投与し、14日後および30日後に血小板凝集能が亢進されるか否かを、コラーゲン添加によって調べた結果を示す図である。上段、中段、下段とも、左図はフコイタン投与前、中図はフコイタン投与開始から14日後、右図はフコイタン投与開始から30日後の結果を示す。コラーゲンを最終濃度が5 $\mu$ g/ml(上段)、2.5 $\mu$ g/ml(中段)、および1.25 $\mu$ g/ml(下段)になるように添加した。測定条件ならびに図の縦軸および横軸は図4と同じである。

【図8】図8は、図7の場合と同様の試験系にて、ADPを添加してフコイダンの血小板凝集能亢進効果を調べた結果を示す図である。上段、中段、下段とも、左図はフコイタン投与前、中図はフコイタン投与開始から14日後、右図はフコイタン投与開始から30日後の結果を示す。上段はADPを最終濃度10 $\mu$ M、中段はADPを最終濃度5 $\mu$ M、下段はADPを最終濃度2.5 $\mu$ Mになるように添加した。測定条件ならびに図の縦軸および横軸は図4と同じである。

40

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明は、第1の態様において、フコイダンを有効成分とする止血促進剤を提供する。なお、「止血」とは、医学的には出血を生じたときに生理的に生じる反応を意味するものであり、将来的に起こり得る出血事象を予防することは「止血機能の亢進による出血予防」というが、本明細書においての「止血」は、現に対象から生じている出血を抑制するこ

50

とだけでなく、将来的に対象において起こり得る出血事象を予防あるいは抑制することを包含する。

【0011】

本発明の止血促進剤の有効成分として用いられるフコイダンは、自然界に見出される含硫多糖で、モズク、ワカメなどの海藻類に多く含まれている。近年、フコイダンが組織再生促進、免疫バランスの調整、癌細胞の自殺、高血圧の抑制等に役立つことが発見されている。しかしながら、フコイダンが優れた止血促進作用ならびに血小板凝集促進作用を有することは実証されていなかった。今回の発明は、フコイダンが優れた止血促進作用ならびに血小板凝集促進作用を有することを見出したことによるものである。

【0012】

本発明の止血促進剤の有効成分たるフコイダンは精製品であってもよく、粗精製品、例えばモズクなどの海藻類からの抽出物であってもよい。フコイダンは海藻類、とくに褐藻類に多く含まれる天然多糖である。フコイダン含有褐藻類としては、モズク（オキナワモズク、イトモズク、フトモズク等）、ワカメ、アラメ、ガゴメ、マコンブ、クロメ、カジメ、ミツイシコンブ、ヨレモク、ヒジキ、ホンダワラ、ヤツマタモク、アカモク、ヒバマタ、ウミトラノオなどが例示されるが、これらに限定されない。本発明の止血促進剤の有効成分として好ましいフコイダンは、オキナワモズク由来のフコイダンである。

【0013】

本発明では、フコイダンの抽出物または精製物を使用することができる。また、抽出物の処理物、例えば、濃縮物、ペースト、乾燥物、乳化物、液状物、希釈物等も使用可能である。

【0014】

海藻類からのフコイダンの抽出ならびに精製方法は公知である。典型的には、海藻を熱水抽出し、抽出液を遠心分離、ろ過、脱塩等の工程に付すことによって精製フコイダンを得ることができる。得られた精製フコイダンをさらにアルコール沈殿、凍結乾燥、スプレードライ等の工程に付してもよい。

【0015】

本発明の止血促進剤の有効成分たるフコイダンは高分子であるほど好ましい。フコイダンの分子量は約12万以上、例えば約15万以上、約17万以上などであるのが好ましく、より好ましくは分子量約20万以上、例えば約25万以上、約30万以上などである。なお、本明細書において、フコイダンの分子量は重量平均分子量であり、単位はダルトンである。一般的に、フコイダンの分子量は大きくても数十万ないし数百万である。

【0016】

本発明の止血促進剤の投与対象は哺乳動物であり、好ましくはヒト、イヌ、ネコ、サル、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ等である。本発明の止血促進剤の特に好ましい投与対象はヒト、イヌおよびネコである。投与経路はいずれの経路であってもよいが、経口投与が好ましい。経口投与の場合には食事や飲料水あるいはエサにフコイダンを混合する等の方法で対象に摂取させることができるので、好都合である。

【0017】

本発明の止血促進剤の剤形もいずれの剤形であってもよい。例えば、経口投与用には、濃縮液、粉末、顆粒、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤などの様々な経口用剤形に処方することができる。これらの剤形の製法は公知であり、混合、溶解、粉碎、打錠、乾燥等のプロセスを適宜用いることができ、目的に応じた担体や賦形剤を使用することができる。本発明の経口投与剤に香料、甘味料、着色料などを適宜添加してもよい。本発明の経口投与剤はそのまま投与することもできるが、有効成分であるフコイダンはそれ自体無味無臭であるので経口摂取し易く、飲食物、例えば、みそ汁、茶、その他の食べ物または飲料に、あるいは動物用飼料に本発明の経口投与剤を随意に添加して投与することもできる。このように、本発明の止血促進剤は対象にとって摂取し易いものであるので、投与対象への負担が極めて小さい。

【0018】

本発明の止血促進剤は予防的および治療的に用いることができる。例えば、不意の外傷等による出血に備えて本発明の止血促進剤を継続的に投与してもよい。体質的に出血傾向にある対象に本発明の止血促進剤を継続的に投与してもよい。このような投与により、ヒトや動物のQOLの向上を図ることができる。あるいは外傷時や外科手術時等の出血事象に備えて本発明の止血促進剤を投与してもよい。

【0019】

本発明の止血促進剤を経口投与する場合、有効成分たるフコイダンの投与量は、一般的には成人1日当たり約10mg～約10,000mgであってもよく、医師が対象の症状、健康状態、年齢、体重、対象が受けている他の治療等を勘案して、投与量を適宜増減し、決定することができる。ヒト以外の動物への経口投与量も上記成人への経口投与量に準じて獣医師が決定することができる。本発明の止血促進剤の投与回数は1日1回～数回であってもよく、あるいは数日に1回～数回であってもよい。

10

【0020】

本発明の止血促進剤を他の止血剤や血液凝固剤等と併用してもよい。また、血液凝固第IX因子等の血液凝固や止血に関連する他の成分が本発明の止血促進剤中に含まれていてもよい。

【0021】

本発明者らは、本発明の止血促進剤の作用が、血小板凝集を促進することにより発現されることを初めて解明した。したがって本発明は、第2の態様において、フコイダンを有効成分とする血小板凝集促進剤を提供する。本発明の血小板凝集促進剤に関し、有効成分たるフコイダンに関すること、ならびに投与経路および投与量その他の説明は、上記の本発明の止血促進剤に関する説明があてはまる。

20

【0022】

本発明の血小板凝集促進剤の有効成分たるフコイダンは高分子であるほど好ましい。フコイダンの分子量は約2万以上、例えば約4万以上、約7万以上、約11万以上などであるのが好ましく、より好ましくは約17万以上、例えば約20万以上、約25万以上、約30万以上などである。

【0023】

本発明は、さらなる態様において以下のものを提供する。

- ・止血促進を必要とする哺乳動物にフコイダンを投与することを特徴とする、哺乳動物の止血促進方法、
- ・血小板凝集促進を必要とする哺乳動物にフコイダンを投与することを特徴とする、哺乳動物の血小板凝集促進方法、
- ・哺乳動物における止血促進剤の製造のためのフコイダンの使用、
- ・哺乳動物における血小板凝集促進剤の製造のためのフコイダンの使用、
- ・フコイダンを含有する止血促進作用または血小板凝集促進作用を有する哺乳動物用飼料ならびにヒト用の飲食物、ならびに

30

フコイダンを添加することを特徴とする、止血促進作用または血小板凝集促進作用を有する飲食物の製造方法。

これらの発明において好ましい哺乳動物は、イヌ、ネコ、サル、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ等が挙げられ、イヌおよびネコが特に好ましい。これらの方法および使用における対象としてヒトが含まれてもよく、含まれなくてもよい。これらの方法および使用において用いる好ましいフコイダンはオキナワモズク由来のフコイダンである。これらの方法および使用におけるフコイダンならびにその投与経路、投与量などに関しては、上記の本発明の止血促進剤に関する説明を参照することができる。

40

【0024】

上述のごとく、フコイダンはそれ自体無味無臭であるので経口摂取し易いので、フコイダンを配合した飲食物や動物用飼料は抵抗なく対象に受け入れられると考えられる。

【0025】

フコイダンの添加は、原材料に添加してもよく、製造工程において添加してもよく、あ

50

るいは出来上がった製品に添加してもよい。

【0026】

以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

【実施例1】

【0027】

実施例1 血友病罹患犬の全血の止血機能に対するフコイダンの効果

この実験および以下に述べる実験において、TEG測定装置はRotation thromboelastometry, ROTEM (登録商標) system, Pentapharm GmbH, Germanyを用いた。測定試料は、3.8%クエン酸溶液と全血を1:9で混和して得られたクエン酸全血に、遺伝子組み換え型ヒト組織因子 (rhTF プロトロンビン時間測定キット・デイドイノビン シスメックス(株))あるいは塩化カルシウム(0.2M CaCl<sub>2</sub> star-TEM フィンガルリンク(株))を添加して、止血機能をTEGにて60分間記録した。

【0028】

実験に使用したフコイダンは以下のようにして調製した株式会社海産物のきむらや製の高分子モズクフコイダンをを用いた。

モズク由来のフコイダンは、例えば60以上、好ましくは80以上の熱水または酸性の熱水を用いて、30分~3時間モズク(オキナワモズク)を処理し、得られた抽出液を電気透析により脱塩することにより得ることができる。その後、第4級アンモニウム塩処理、アルコール沈澱、イオン交換樹脂クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、限外ろ過、超精密ろ過等により精製してもよい。以上のようにしてモズク由来フコイダン含有液を得た。

得られたモズク由来フコイダンの分子量は、HPLCによるゲルろ過カラムクロマトグラフィー(GPC)にて分析した。分析条件は以下のとおり。カラム:Shodex Asahipak GS520+GS320+GS220、溶出液:0.1M NaNO<sub>3</sub>、流速:1.0ml/分、検出:RID、カラム温度:40、検量線標品:プルランスタンダード。プルラン分子量を標準とした分子量として約30万、硫酸基含有量は14%であった。

【0029】

フコイダン投与前に、血友病罹患犬(犬種:トイ・プードル、年齢:4歳、性別:雄)の前腕橈側皮静脈から血液(2ml)を採取し、クエン酸を添加してクエン酸全血とした。得られたクエン酸全血に遺伝子組み換え型ヒト組織因子(rhTF)と塩化カルシウムを添加した試料のTEGを図1(a)に示す。得られたクエン酸全血に塩化カルシウムを添加した試料のTEGを図1(b)に示す。血友病に罹患した犬の血液では、正常血と比較して、rhTF添加系ではCT(凝固時間)およびCFT(凝固形成時間)が延長し(各々、654秒、465秒)、MCF(凝固の最大堅固度)は小さく(55mm)、止血機能が低下していることが確認できた。また、カルシウム添加系ではCTが著しく延長し(2089秒)、血液はほとんど凝固しなかった。なお、正常なクエン酸全血のTEGにおいては、rhTF添加系ではCT 103秒、CFT 79秒、MCF 62mm、カルシウム添加系ではCT 238秒、CFT 82秒、MCF 63mmであった。

【0030】

上記血友病罹患犬にフコイダンを30日間摂取(体重1kgあたり20mgのフコイダンをカプセルに充填して食後、経口投与)させた後に、上記と同じ試験を行ったところ、rhTF添加系ではCTおよびCFTが短縮した(図1(c))。また、カルシウム添加系でもCTおよびCFTが著しく短縮し、MCFは拡大した(図1(d))。以上、参照。これらの結果から、フコイダン添加によって、血友病罹患犬の血液の止血機能が著しく改善されたことが確認された。

【0031】

上記の血友病罹患犬における30日間のフコイダン投与前後でのPT(プロトロンビン

10

20

30

40

50



時間)、活性化部分トロンボプラスチン時間 ( A P T T ) およびフィブリノゲン濃度を表 1 にまとめた。

【表 1】

項目	基準範囲 (正常)	投与前	投与後
P T (秒)	6.8-8.6	7.2	7.4
A P T T (秒)	13.1-26.9	37.1	41.0
フィブリノゲン (mg/dl)	88-336	252.0	186.0

【 0 0 3 2 】

血友病では活性化部分トロンボプラスチン時間 ( A P T T ) が延長していたが、30 のフコイダンの投与では、この値は変化しなかった。この結果から、フコイダンによる止血機能改善効果は、一般的な血液凝固検査項目である A P T T では評価できないことが明らかになった。したがって、フコイダンによる止血促進効果は、A P T T という、試験管内で血液凝固因子が連鎖的に活性化してフィブリンを析出する検出系では評価できない機序を介していると考えられた。

10

【 0 0 3 3 】

なお、上記実験において、30 日間のフコイダン投与後に自発性出血ならびにその他の有害反応は観察されなかった。

【実施例 2】

20

【 0 0 3 4 】

実施例 2 インビトロでのフコイダン添加試験 - 濃度依存性効果の検討

実施例 1 と同様に、上記血友病罹患犬において、フコイダンを 30 日間与える前および後で採血し、クエン酸全血を調製し、得られたクエン酸全血にフコイダンを最終濃度は  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  または  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるように添加し、10 分間静置した後、塩化カルシウムを添加して、T E G にて止血機能を評価した。フコイダンは実施例 1 に記載の方法で得たものを用いた。

【 0 0 3 5 】

フコイダン投与前のクエン酸全血試料にフコイダンを添加した場合には僅かな止血機能の改善が見られた ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  添加系)。しかし、30 日間フコイダンを投与した後のクエン酸全血試料にフコイダン ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  または  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加すると、フコイダンの添加量に応じて止血機能が改善されることがわかった。 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  のフコイダンを添加した場合の止血機能改善は顕著であった。図 2 ( a ) ~ ( d ) 参照。

30

【 0 0 3 6 】

30 日間フコイダンを投与した後のクエン酸全血試料にフコイダン ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  または  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加すると、フコイダンの添加量に応じて止血機能が改善されることがわかった。図 2 ( e ) ~ ( g ) 参照。しかし、30 日間フコイダンを投与した後のクエン酸血漿にフコイダンを  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう添加した場合には、止血機能改善は見られなかった。図 2 ( h ) 参照。

【 0 0 3 7 】

40

これらの結果から、血小板を含む全血では、フコイダンの添加濃度に依存して止血機能が改善されたが、血小板を含まない血漿では止血機能に変化はなかったと結論づけられた。したがって、フコイダンが血小板に作用することにより止血機能が改善されると考えられた。

【実施例 3】

【 0 0 3 8 】

実施例 3 インビトロでの止血機能に及ぼすフコイダンの分子量の検討

上記血友病罹患犬血友病罹病犬のクエン酸全血に分子量 0.54 万、1.1 万または 3.0 万のフコイダンをそれぞれ  $15 \mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう添加した場合の N A T E M (塩化カルシウムだけによって開始する止血反応検査項目) を調べた。

50

## 【0039】

各分子量のフコイダンを以下のようにして調製した。

分子量30万のフコイダンは実施例1で調製した株式会社海産物のきむらや製の高分子モズクフコイダンをを用いた。分子量0.54万、11万のフコイダンは特開2008-266299に記載の水熱処理により調整した。分子量30万のフコイダン800mgを水80mlに溶解してフコイダン水溶液を調製し(pH無調整、pH5.2であった)、処理温度を120、140、160、180として、各温度に20分保持した。水熱処理装置としてHTP-50/250(日阪製作所製)を用いた。

## 【0040】

フコイダンの分子量が大きいほど、止血機能が亢進することがわかった。図3参照。

10

## 【実施例4】

## 【0041】

実施例4 フコイダンの血小板凝集能に及ぼす影響 - 濃度依存性の検討

フコイダンが血小板に作用することにより止血が促進されることを証明するために、インピーダンス法血小板凝集計(Multiplate(登録商標), Dynabyte GmbH, Germany)を用いて、フコイダンが血小板凝集能に及ぼす影響を評価した。フコイダンは実施例1に記載の方法で得たものを用いた。

## 【0042】

健康な犬から採取したトロンビン阻害全血に1 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml(いずれも最終濃度)のフコイダンを添加した場合の血小板凝集能を調べた。フコイダンは実施例1に記載の方法で得た分子量30万のものを用いた。その結果、健康犬の試料においてフコイダンは濃度依存的に血小板を凝集させ、5 $\mu$ g/mlの濃度でも若干の血小板凝集能が示された(図4(d))。健康犬の試料において、フコイダンを10 $\mu$ g/ml以上添加した系(図4(a)~(c))では、血小板凝集能は、ADPおよびコラーゲンと同等またはそれ以上であった。

20

## 【0043】

血友病罹患犬(犬種:チワワ、年齢:1歳、性別:雄)にフコイダンを90日間投与(体重1kgあたり20mgのフコイダンをカプセルに充填して1日2回、食後、経口投与)した後、トロンビン阻害全血に1 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、100 $\mu$ g/ml(いずれも最終濃度)のフコイダンを添加した場合の血小板凝集能を調べた。フコイダンは実施例1に記載の方法で得た分子量30万のものを用いた。その結果、血友病罹患犬の試料においてもフコイダンは濃度依存的に血小板を凝集させ、5 $\mu$ g/mlの濃度でも十分な血小板凝集能が示された(図5(d))。血友病罹患犬の試料において、フコイダンを10 $\mu$ g/ml以上添加した系(図5(a)~(c))では、血小板凝集能は、ADPおよびコラーゲンと同等またはそれ以上であった。なお、図4に示した健康犬の試料よりも、図5の血友病罹患犬の試料の方がフコイダンによる血小板凝集が強いのは、フコイダンを90日間投与したことによると考えられる。

30

## 【実施例5】

## 【0044】

実施例5 フコイダンの血小板凝集能に及ぼす影響 - フコイダン分子量の検討

40

健康犬のトロンビン阻害全血に分子量0.54万、4万、11万、17万、30万のフコイダンを最終濃度50 $\mu$ g/mlとなるよう添加した場合の血小板凝集能を調べた。実験はインピーダンス法血小板凝集計(上述)を用いて行った。各分子量のフコイダンは実施例3で述べたのと同様の方法で調整した。

## 【0045】

高分子のフコイダンほど血小板を凝集させることがわかった。分子量4万および11万のフコイダンでは軽度の血小板凝集能が得られた。分子量17万以上のフコイダンでは十分な血小板凝集能が得られた。図6参照。

## 【実施例6】

## 【0046】

50

実施例 6 フコイダンの血小板機能亢進効果

健康犬に分子量 30 万のモズク由来フコイダンを投与し ( 40 mg / kg 体重 / 日 )、14 日後および 30 日後に血小板機能が亢進されるかを、評価した。投与前、投与 14 日後および 30 日後に採取したトロンビン阻害全血に、コラーゲンを最終濃度 5 μg / ml、2.5 μg / ml、1.25 μg / ml になるよう添加したときの血小板凝集能を、インピーダンス血小板凝集計 ( 上述 ) を用いて調べた結果を図 7 に示す。フコイダン投与 14 日で血小板凝集能が亢進され、30 日後にも血小板凝集能が亢進されることが確認された。

【 0 0 4 7 】

コラーゲンに代えて ADP を最終濃度 10 μM、5 μM、2.5 μM になるよう添加することにより同様の実験を行った。その結果、フコイダン投与 14 日後に血小板凝集能が亢進され、30 日後にも血小板凝集能が亢進されることが確認された。図 8 参照。

【 0 0 4 8 】

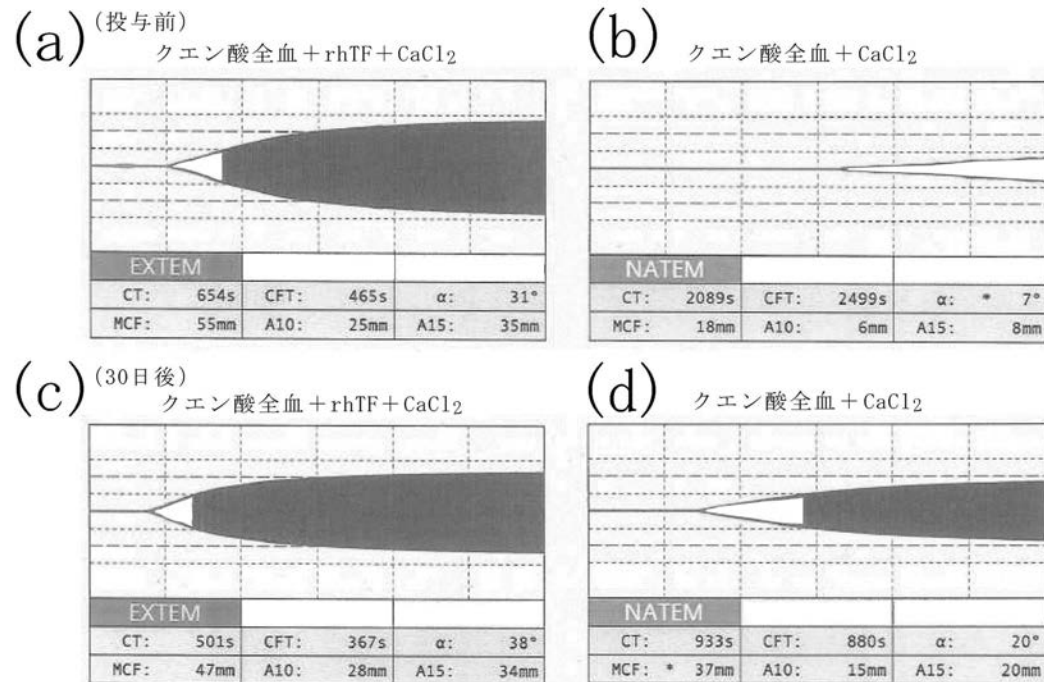
以上の実施例で示したように、健康な犬がフコイダンを摂取すると血小板機能の亢進が認められることから、フコイダンは血友病のみならず、血友病とは異なる止血異常における止血機能の促進に役立つことが示唆された。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 4 9 】

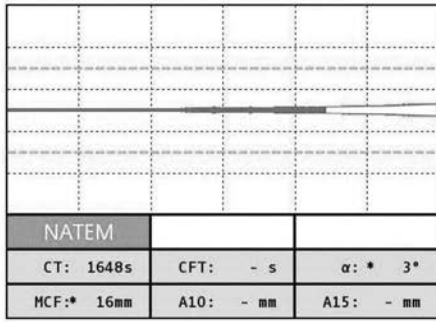
本発明は、医薬品、食品、飼料、研究用試薬などの分野において利用可能である。

【 図 1 】

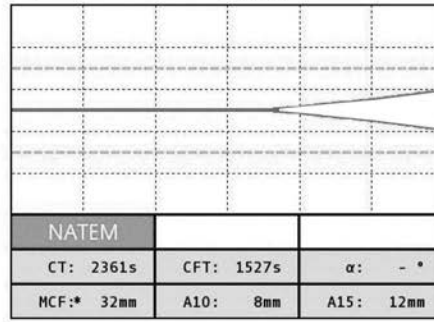


【 図 2 】

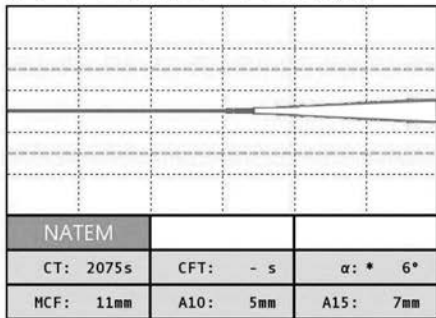
(a) (投与前)  
クエン酸全血+フコイダン5 $\mu$ g/ml



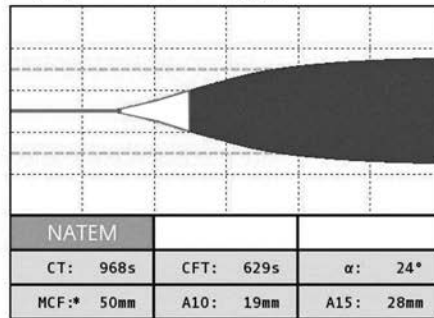
(b) (投与前)  
同+フコイダン10 $\mu$ g/ml



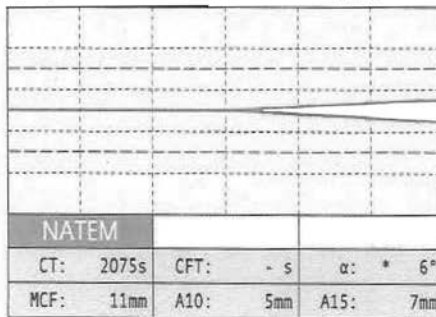
(c) (30日後)  
クエン酸全血+フコイダン5 $\mu$ g/ml



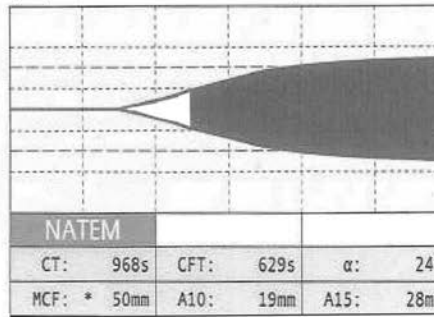
(d) (30日後)  
同+フコイダン10 $\mu$ g/ml



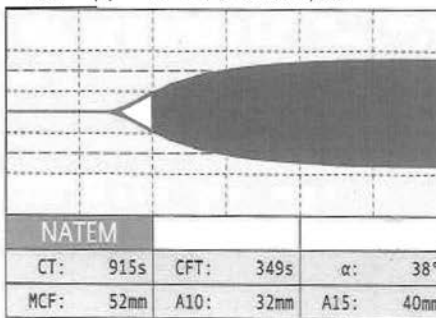
(e) (30日後)  
クエン酸全血+フコイダン5 $\mu$ g/ml



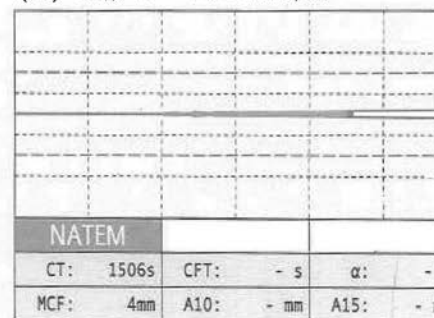
(f) (30日後)  
同 +フコイダン10 $\mu$ g/ml



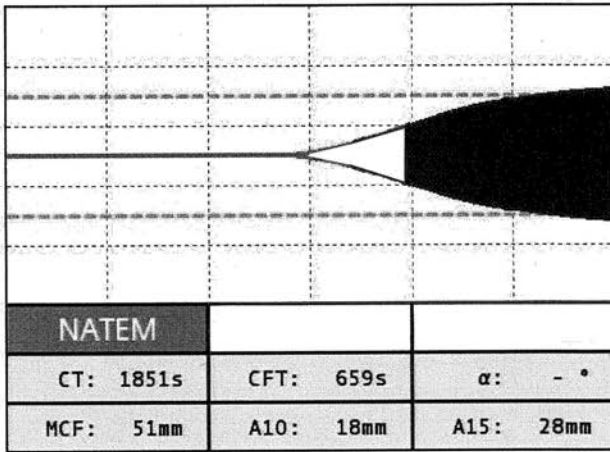
(g) (30日後)  
同 +フコイダン15 $\mu$ g/ml



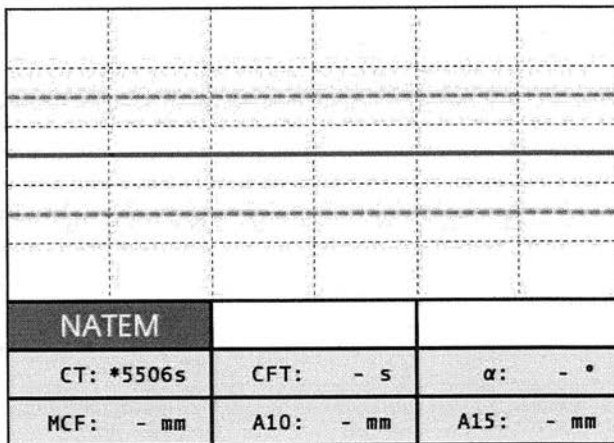
(h) (30日後)  
血漿+フコイダン15 $\mu$ g/ml



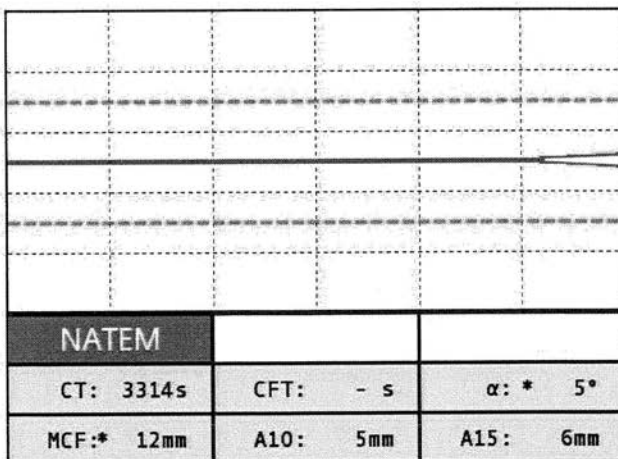
【 図 3 】



分子量 30万のフコイダン

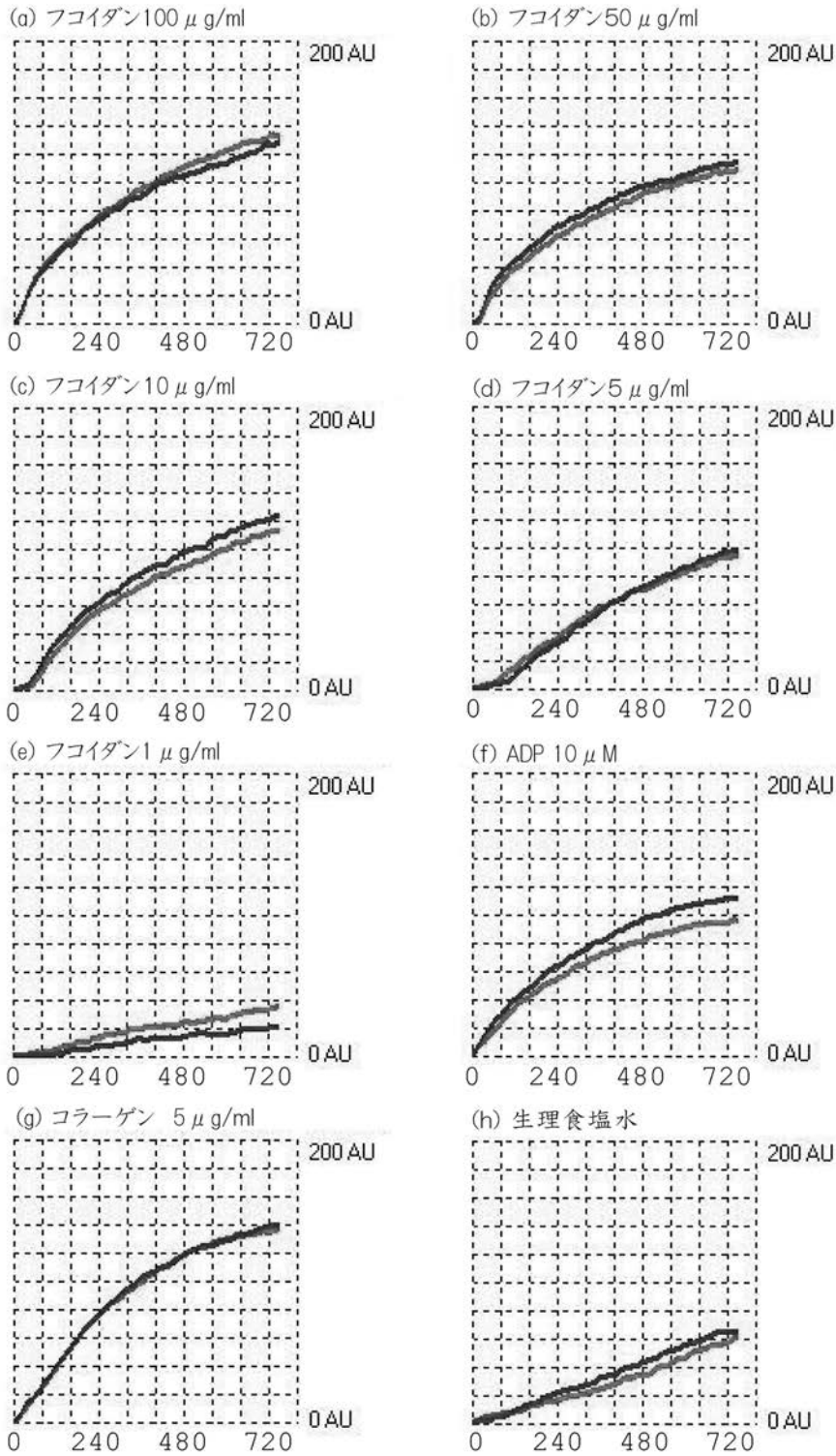


分子量 11万のフコイダン



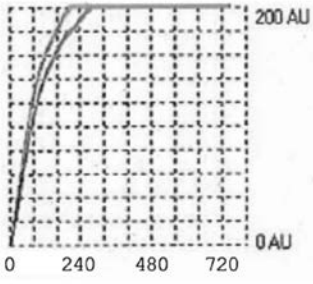
分子量 0.54万のフコイダン

【 図 4 】

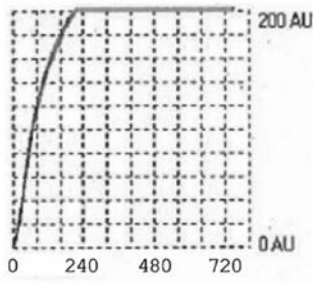


【 図 5 】

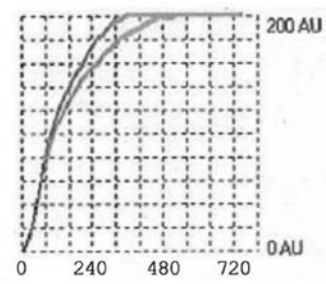
(a) フコイタン100  $\mu$ g/ml



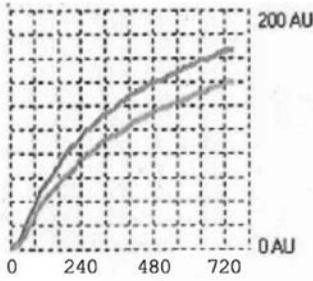
(b) フコイタン50  $\mu$ g/ml



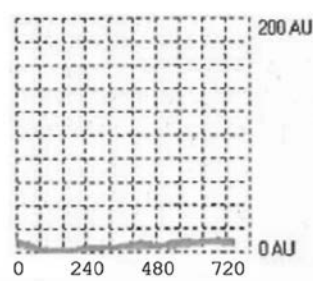
(c) フコイタン10  $\mu$ g/ml



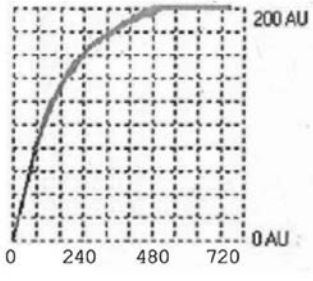
(d) フコイタン5  $\mu$ g/ml



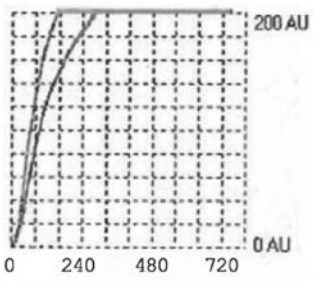
(e) フコイタン1  $\mu$ g/ml



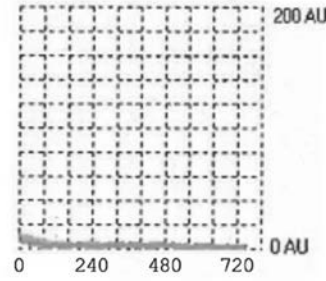
(f) ADP 10  $\mu$ M



(g) コラーゲン 5  $\mu$ g/ml

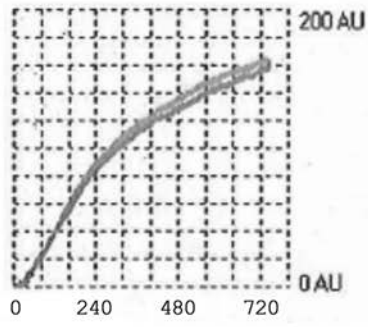


(h) 生理食塩水

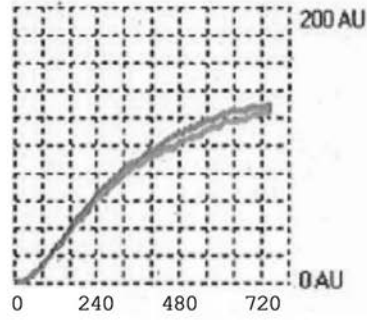


【 図 6 】

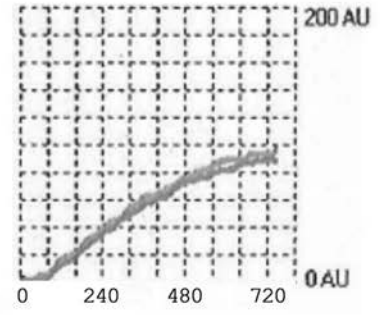
(a) フォイタン分子量 (30万)



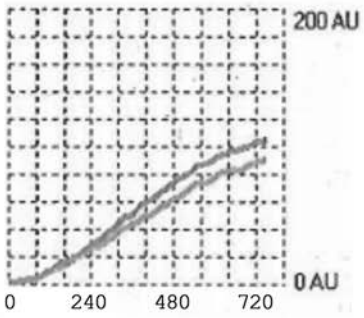
(b) フォイタン分子量 (17万)



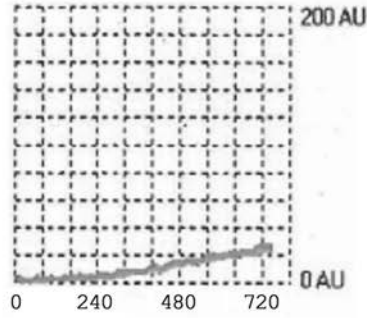
(c) フォイタン分子量 (11万)



(d) フォイタン分子量 (4万)

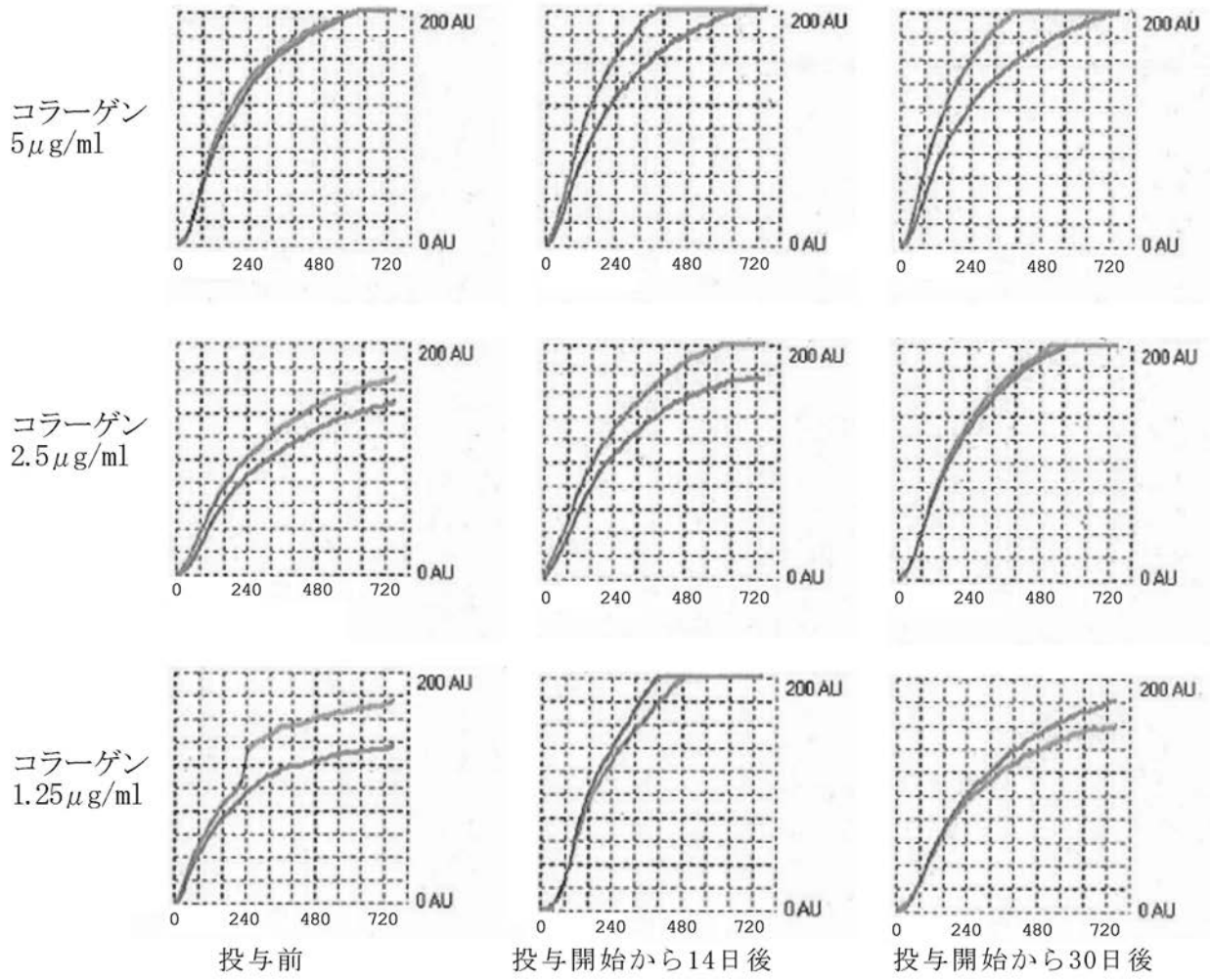


(e) フォイタン分子量 (0.54万)

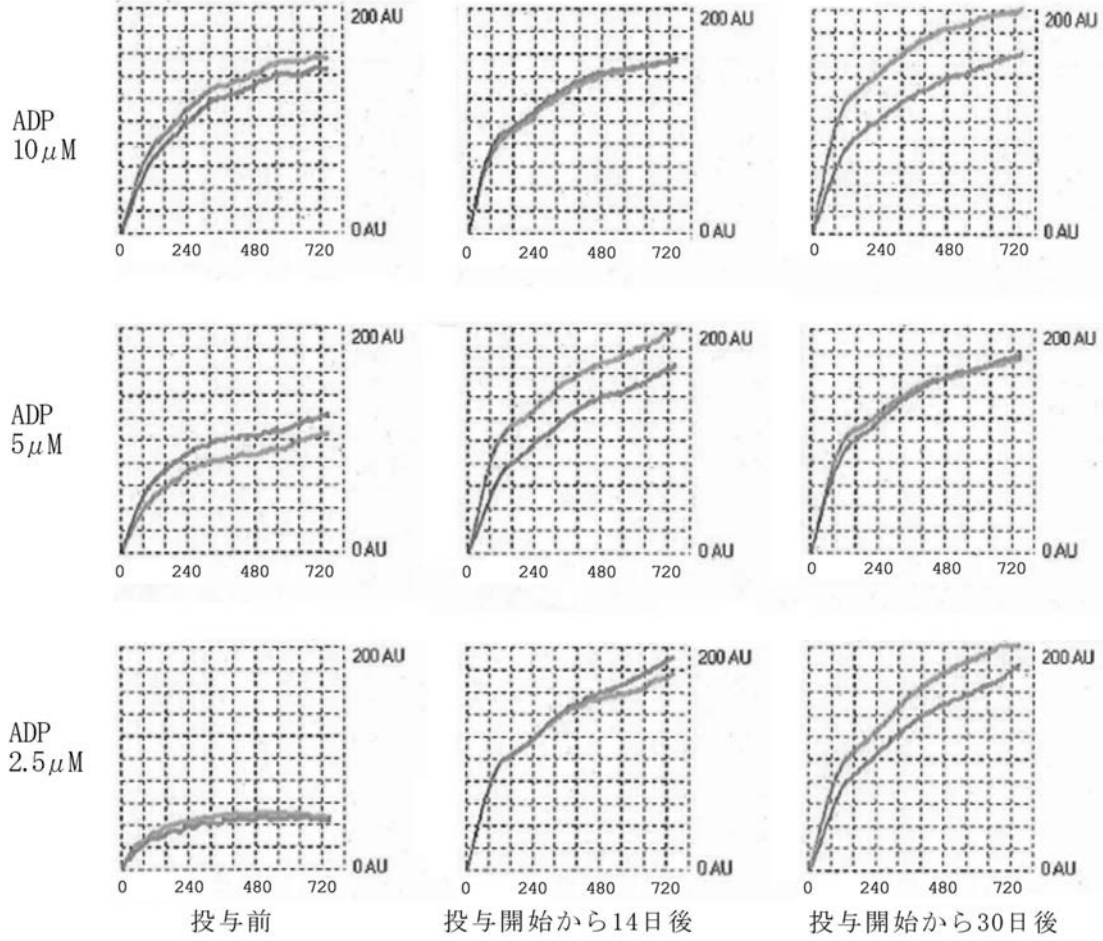




【図7】



【 図 8 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 2 3 L 1/30 (2006.01)</b>	A 2 3 K 1/16 3 0 4 C	
A 6 1 K 36/02 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 B	
	A 2 3 L 1/30 Z	
	A 6 1 K 35/80 Z	

(72)発明者 川本 仁志

鳥取県境港市渡町3307番地 株式会社海産物のきむらや内

Fターム(参考) 2B005 AA05

2B150 AA01 AA06 AB10 DC14 DD48

4B018 LB10 MD07 MD67 ME14 MF01

4C086 AA01 AA02 EA26 GA17 MA01 MA04 NA14 ZA53 ZC61

4C088 AA13 BA08 BA12 CA03 NA14 ZA53 ZC61