明　細　書

発明の名称 ： 新規タンパク質素材

技術分野

[0001] 本発明は、新規タンパク質素材及びこのタンパク質素材を配合した骨疾患の予防や治療に有用な医薬品又は飲食品、飼料に関する。該素材は骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の分化ならびに破骨細胞による骨吸収を抑制する作用を有するので、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用である。

背景技術

[0002] 近年、世界的規模で、高齢化等に伴い、骨粗鬆症や骨折あるいは腰痛などの種々の骨に関連する疾患が増加しており、大きな社会問題となっている。これは、カルシウムの摂取不足やカルシウム吸収能力の低下、閉経後のホルモンのアンバランスなどが原因であるとされている。骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患を予防するためには、若齢期から骨芽細胞による骨形成を促進して体内の骨量をできるだけ増加させ、最大骨量や骨強度（骨密度＋骨質）を高めることが有効であるとされている。なお、骨質とは、骨の微細構造や代謝回転、微小骨折、石灰化を指すものである。また、骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患を予防する方法としては、破骨細胞による骨吸収を抑制することも考えられる。骨はバランスのとれた吸収と形成を絶えず繰り返している（リモデリング）が、閉経後のホルモンバランスの変化等により、骨吸収が骨形成を上回り、これが骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患の原因となる。したがって、破骨細胞による骨吸収を抑制して骨強度を一定に保つことにより、結果的に骨を強化することが可能である。

[0003] このような現状から、骨を強化する目的で、炭酸カルシウムやリン酸カルシウム、乳酸カルシウムなどのカルシウム塩ならびに乳清カルシウムや牛骨粉、卵殻などの天然カルシウム剤を、それぞれ単独で医薬品や飲食品、飼料などに添加したものが摂取されている。又は、これらのカルシウム剤をカゼ

インホスホペプチドやオリゴ糖などのカルシウム吸収促進効果を有する物質と共に医薬品や飲食品、飼料などに添加したものが摂取されている。しかしながら、これらのカルシウム塩や天然カルシウム剤を飲食品に添加したものを摂取した場合のカルシウムの吸収率は５０％以下であり、多くのカルシウムは吸収されずに体外に排出されてしまうといわれている。また、体内に吸収されたカルシウムであっても、その形態や同時に摂取される他の栄養成分の種類によって骨への親和性が異なるので、必ずしも骨代謝の改善や骨強化の作用を示さないこともある。その他、骨粗鬆症治療や骨強化のための医薬として、女性ホルモン製剤や活性型ビタミンD_3製剤、ビタミンK_2製剤、ビスフォスフォネート製剤、カルシトニン製剤などが知られており、抗ＲＡＮＫＬ抗体などの新薬開発が進められている。しかし、これらの医薬品を用いた場合、耳鳴り、頭痛、食欲不振などの副作用を伴うことがある。さらに、これらの物質は安全性及びコストなどの面から、現在のところ飲食品に添加することができない状況にある。一方、骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患の疾病の性質から、長期的に経口摂取することができ、骨形成促進的及び骨吸収抑制的に作用して骨強度を高め、その予防または治療効果が期待できるような骨強化剤又は飲食品、飼料の開発が望まれている。

[0004] 骨強度を高めることを目的とした食品素材としては、例えば、乳由来の塩基性タンパク質やその酵素分解物であるペプチド画分に骨芽細胞の増殖活性や破骨細胞の骨吸収抑制活性、ならびに、それらを介する骨強化作用があることが報告されている（特許文献１）。また、乳由来の塩基性タンパク質画分中に含まれるアンジオジェニンやラクトパーオキシダーゼには、それぞれ単独で骨代謝を改善する作用があることが報告されている（特許文献２、３、４）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開平８－１５１３３１号公報

特許文献2：特開平１０－７５８５号公報

特許文献3：特開２００４－２３８３２０号公報

特許文献4：特開２００５－６０３２１号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、安全で、日常的に摂取することより、骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の分化ならびに破骨細胞による骨吸収を抑制する作用があり、骨を強化することができる新規タンパク質素材を提供することを課題とする。

また、本発明は、経口摂取により骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用である骨強化用医薬品又は飲食品、飼料を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定の範囲の量で含有し、かつ、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して特定の範囲の質量比で含有するタンパク質素材を摂取することによって、効果的に骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の分化ならびに破骨細胞による骨吸収を抑制する作用が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち本発明は、以下の構成からなるものである。

（１）アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を２～１５ｍｇ／１００ｍｇ含有し、かつ、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して質量比０．３～２０の範囲で含有するタンパク質素材。

（２）（１）記載のタンパク質素材を含有する飲食品又は飼料。

（３）（１）記載のタンパク質素材を有効成分とする骨強化剤。

（４）（１）記載のタンパク質素材を５ｍｇ／日以上摂取する骨強化方法。

（５）次の１）～３）の工程を含む（１）記載のタンパク質素材の製造方法。

１）アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を調製する工程。

２）ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を調製する工程。

３）上記２）の工程で調製したラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を、上記１）の工程で調製したアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して、質量比が０．３～２０となるように配合する工程。

（６）乳及び／又は乳原料から、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が０．３～２０となるように、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を含む画分を抽出する工程を含む、（１）記載のタンパク質素材の製造方法。

（７）さらに、アンジオジェニンとラクトパーオキシダーゼを含む画分中のアンジオジェニン及び／又はラクトパーオキシダーゼを酵素分解する工程を含む、（６）記載のタンパク質素材の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明のタンパク質素材は、骨芽細胞の増殖を促進し、破骨細胞の分化ならびに破骨細胞による骨吸収を抑制する作用を介した骨強化作用が顕著である。また、本発明のタンパク質素材を配合した医薬品又は飲食品、飼料は、骨を強化して、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用である。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明のタンパク質素材の特徴は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定の範囲の量で含有し、かつ、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して特定の範囲の質量比で含有することにある。

したがって本発明のタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を含む画分とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を含む画分を、特定の範囲の質量比になるように混合したものや、乳、または脱脂乳や乳清などの乳由来の乳原料から直接、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を特定の範囲の質量比で含む画分を抽出して調製したもの等が挙げられる。また、これらに酵素等を作用させ、アンジオジェニン及び／又はラクトパーオキシダーゼを分解したものも本発明のタンパク質素材に包含される。

[0011] アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を含む画分とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を含む画分を混合して本発明のタンパク質素材とする場合、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を含む画分やラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を含む画分としては、ヒト、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ等の哺乳類の乳から調製される画分や遺伝子工学的手法により生産される画分、血液や臓器から精製された画分等が使用可能である。また、精製され、市販されているアンジオジェニンやラクトパーオキシダーゼの試薬を使用することもでき、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比を調整することで、本発明のタンパク質素材とすることも可能である。

また、上述のアンジオジェニンを含む画分、アンジオジェニンの試薬やラクトパーオキシダーゼを含む画分、ラクトパーオキシダーゼの試薬等をそれぞれ１種類以上のタンパク質分解酵素で分解したものをアンジオジェニン分解物やラクトパーオキシダーゼ分解物として使用することが可能である。

[0012] 一方、乳、または脱脂乳や乳清などの乳由来の原料から直接、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を特定の範囲の質量比で含む画分を抽出して調製する場合には、例えば、乳または乳原料を陽イオン交換樹脂と接触

させた後、その樹脂に吸着した乳由来タンパク質を０．１～２．０Ｍの塩濃度で溶出して、逆浸透膜や電気透析膜、限外濾過膜、精密濾過膜などにより脱塩、濃縮した後、必要に応じて、トリプシン、パンクレアチン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カリクレイン、カテプシン、サーモライシン、Ｖ８プロテアーゼ等のタンパク質分解酵素で分子量が８，０００以下となるように限定分解することにより調製することができる。なお、タンパク質分解酵素で限定分解する場合は、分子量の下限は５００以上とすることが好ましい。また、このようにして得られたタンパク質素材は、凍結乾燥や噴霧乾燥などにより乾燥することも可能である。

なお、本発明のタンパク質素材のプロテオーム解析をするために、常法に則り変性及び還元下で消化酵素による限定分解を行った後、ＬＣ／ＭＳ／ＭＳにより分析したところ、本発明のタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物以外に、αｓ１カゼイン、αｓ２カゼイン、βカゼイン、あるいは、κカゼインのいずれかのタンパク質及び／又はそれらのタンパク質の分解物を少なくとも１つ含有していた。

[0013] 本発明のタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を２～１５ｍｇ／１００ｍｇ含有し、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が０．３～２０の範囲で含有する。

後の試験例で示すが、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が０．３～２０であることによって、各々を単独で摂取するよりも効果的に骨強化作用を得ることができる。

[0014] なお、参考ではあるが、牛乳中のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物は約０．００１％であり、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比は２０程度である。また、ホエイタンパク質濃縮

物（ＷＰＣ）中には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が約０．１％含まれ、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比は３０程度である。

[0015] 本発明のタンパク質素材は、これを有効成分として適宜配合して骨強化剤として製剤化することが可能である。また、本発明のタンパク質素材をそのまま骨強化剤とすることも可能である。なお、骨強化剤として製剤化する場合には、有効成分である本発明のタンパク質素材の他に、糖類や脂質、タンパク質、ビタミン類、ミネラル類、フレーバー等、他の医薬品や飲食品、飼料に通常使用する原材料等と混合することや、さらに常法に従い粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤などに製剤化することも可能である。また、本発明のタンパク質素材と他の骨強化作用を示す成分、例えばカルシウムやビタミンＤ、ビタミンＫ、イソフラボン等を共に使用することも可能である。

本発明のタンパク質素材は、後述する実験動物での試験において、体重１ｋｇあたり５ｍｇ以上経口摂取させることにより、骨を強化することができる。この実験動物における摂取量は、血中薬物濃度において、成人一人あたりの摂取量に該当することから（中島　光好　（１９９３）　「第８巻　薬効評価」　廣川書店　２－１８頁）、通常、成人一人一日あたり、本発明のタンパク質素材を５ｍｇ以上摂取することにより骨強化、特に、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療の効果が期待できる。したがって、骨強化剤等へ配合する場合には、この必要量を確保できるようにすればよい。

[0016] 本発明のタンパク質素材は、通常の飲食品、例えばヨーグルト、飲料、ウエハース、デザート等に配合することも可能である。この場合、飲食品の形態にもよるが飲食品１００ｇあたり本発明のタンパク質素材を０．２５～１０００ｍｇ配合することが好ましく、この配合量とすることで骨強化作用が期待できる。また、飼料、例えば家畜用飼料やペットフード等に配合して、

骨強化用飼料とすることも可能である。この場合、本発明のタンパク質素材を、飼料１００ｇあたり０．２５～１０００ｍｇ配合することが好ましい。

[0017] 本発明のタンパク質素材を医薬品や飲食品、飼料の形態に調製して使用する場合は、脱イオン水に本発明のタンパク質素材を懸濁あるいは溶解し、撹拌混合して用いる。撹拌混合の条件としては、本発明のタンパク質素材が均一に混合されればよく、ウルトラディスパーサーやＴＫホモミクサー等を使用して撹拌混合することも可能である。

また、該素材の溶液は、医薬品や飲食品、飼料に使用しやすいように、必要に応じて、逆浸透膜等での脱塩、濃縮や、凍結乾燥して使用することができる。なお、本発明のタンパク質素材は、医薬品や飲食品、飼料の製造に通常使用される殺菌処理を行っても骨強化に関する活性が維持されることが確認されている。該素材を粉末状とした場合には乾熱殺菌も行うことができる。本発明のタンパク質素材は、液状、ゲル状、粉末状、顆粒状等様々な形態の医薬品や飲食品、飼料に用いることができる。

[0018] 以下に、参考例、実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明するが、これらは例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[0019] ［参考例１］

（アンジオジェニン画分の調製１）

陽イオン交換樹脂であるスルホン化キトパール（富士紡績社製）３０ｋｇを充填したカラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳１，０００Ｌ（ｐＨ６．７）を通液した。次に、このカラムを脱イオン水で十分洗浄した後、０．１～２．０Ｍの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した。そして、アンジオジェニンを含有する溶出画分をＳ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ陽イオン交換クロマトグラフィー（アマシャムバイオサイエンス社製）で分画し、得られたアンジオジェニン含有画分を９０℃で１０分間加熱処理し、遠心分離することにより沈澱を除去した。さらに、このアンジオジェニン含有画分をＳｕｐｅｒｏｓｅ１２ゲル濾過クロマトグラフィーで処理

した。この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してアンジオジェニンの純度が９０％のアンジオジェニン画分１６．５ｇを得た。これら一連の処理を３０回繰り返した。

[0020] ［参考例２］

（アンジオジェニン画分の調製２）

ヘパリンアフィニティセファロース（ＧＥヘルスケア社製）１０ｋｇを充填したカラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳１０００Ｌ（ｐＨ６．７）を通液した。次に、このカラムを０．６Ｍの塩化ナトリウム溶液で十分洗浄した後、１．５Ｍの塩化ナトリウム溶液で溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してアンジオジェニンの純度が２％のアンジオジェニン画分３２ｇを得た。これら一連の処理を５０回繰り返した。

[0021] ［参考例３］

（ラクトパーオキシダーゼ画分の調製）

陽イオン交換樹脂であるスルホン化キトパール（富士紡績社製）６００ｇを充填したカラム（直径５ｃｍ×高さ３０ｃｍ）を脱イオン水で十分に洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳３６０Ｌ（ｐＨ６．７）を流速２５ｍｌ／ｍｉｎで通液した。通液後、カラムを脱イオン水で十分洗浄し、２．０Ｍの塩化ナトリウムを含む０．０２Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ７．０）で溶出した。そしてラクトパーオキシダーゼを含有する溶出画分をＳ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ ＦＦカラム（アマシャムバイオサイエンス社製）に吸着させ、脱イオン水で十分洗浄し、１０ｍＭのリン酸緩衝液（ｐＨ７．０）で平衡化した後、０～２．０Ｍの塩化ナトリウムのリニアグラジエントで吸着した画分を溶出し、ラクトパーオキシダーゼを含む画分を回収した。そしてその画分をＨｉＬｏａｄ １６／６０ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ｐｇ（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで処理した。この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してラクトパーオキシダーゼの純度が９０％のラクトパーオキシダーゼ画分２７ｇを得た。これら一連の処理を２

５回繰り返した。

実施例 1

[0022] 参考例１のアンジオジェニン画分０．５９ｍｇと参考例２のアンジオジェニン画分９８．５８ｍｇと参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分０．８３ｍｇを混合して、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が２．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が０．３であるタンパク質素材（実施例品１）を調製した。

実施例 2

[0023] 参考例１のアンジオジェニン画分０．７３ｍｇと参考例２のアンジオジェニン画分９２．３３ｍｇと参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分６．９４ｍｇを混合して、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が２．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が２．５であるタンパク質素材（実施例品２）を調製した。

実施例 3

[0024] 参考例１のアンジオジェニン画分１．８３ｍｇと参考例２のアンジオジェニン画分４２．６１ｍｇと参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分５５．５６ｍｇを混合して、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が２．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が２０であるタンパク質素材（実施例品３）を調製した。

[0025] ［比較例１］

参考例１のアンジオジェニン画分０．５７ｍｇと参考例２のアンジオジェニン画分９９．１５ｍｇと参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分０．２８

ｍｇを混合して、アンジオジェニン含量及び／又はアンジオジェニン分解物が２．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が０．１であるタンパク質素材（比較例品１）を調製した。

[0026] ［比較例２］

参考例１のアンジオジェニン画分２．０８ｍｇと参考例２のアンジオジェニン画分３１．２５ｍｇと参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分６６．６７ｍｇを混合して、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が２．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が２４であるタンパク質素材（比較例品２）を調製した。

[0027] ［試験例１］

実施例品１～３および比較例品１、２について、骨芽細胞増殖効果、破骨細胞による骨吸収を抑制する効果ならびに破骨細胞の分化を抑制する効果を調べた。

骨芽細胞増殖効果については、次のように調べた。株化骨芽細胞（ＭＣ３Ｔ３－Ｅ１）を９６穴の平板細胞培養プレートに２×１０^{3}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌになるように播種し、１０％ウシ胎児血清を含むα－ＭＥＭ培地で２４時間培養した。培地を全て除いた後、ウシ胎児血清を含まないα－ＭＥＭ培地を９０μｌずつ添加し、実施例品１～３および比較例品１、２を溶解した溶液を１０μｌずつ添加して、さらに２４時間培養を続けた。Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ　ｋｉｔ（ＧＥヘルスケア社製）付属のブロモデオキリウリジン（ＢｒｄＵ）を添加し２時間培養後、ペルオキシダーゼ標識抗ＢｒｄＵ抗体と反応させ、基質である３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジンを添加し、４５０ｎｍにおける吸光度を測定することで、細胞内に取り込まれたＢｒｄＵ量を測定することにより骨芽細胞増殖活性を求めた

。培地に実施例品１～３及び比較例品１、２を添加しなかった群（対照）の４５０ｎｍにおける吸光度に対して、添加した群の吸光度が有意に高かった場合に、骨芽細胞増殖活性陽性とした。

[0028] 破骨細胞による骨吸収を抑制する効果については、次のように調べた。５日齢のウサギの脛骨及び大腿骨を摘出し、軟組織を除去した後、５％ＦＢＳを含むα－ＭＥＭ培地中で機械的に細切した破骨細胞を含む全骨髄細胞を１×１０^{6}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌになるように結晶性リン酸カルシウムプレート（Ｃｏｒｎｉｇ社製）のウェル上に撒き込み、培養した。培養２時間後に、培地を全て除いた後、５％ＦＢＳを含むα－ＭＥＭ培地を１８０μｌずつ添加し、実施例品１～３および比較例品１、２を溶解した溶液を２０μｌずつ添加して７２時間培養した。そして、５％次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加することで細胞を取り除いた後、リン酸カルシウムプレートのウェル上にできた骨吸収窩（ピット）を実体顕微鏡下で撮影し、画像解析によってその面積を測定することにより破骨細胞による骨吸収を抑制する効果を調べた（瀬野悍二ら，研究テーマ別動物培養細胞マニュアル，ｐｐ．１９９－２００，１９９３）。培地に実施例品１～３及び比較例品１、２を添加しなかった群（対照）のピット面積に対して、添加した群のピット面積が有意に低かった場合に、破骨細胞骨吸収抑制活性陽性とした。

[0029] 破骨細胞の分化を抑制する効果については、次のように調べた。ｄｄｙマウス（７又は８週齢、雄性）の大腿骨から採取した骨髄細胞を４×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌとなるように、９６ｗｅｌｌプレートに播種し、２５ｎｇ／ｍｌ　Ｍ－ＣＳＦを含有した１０％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地（ＧＩＢＣＯ社製）２００μｌで３７℃、５％CO_2の条件で培養した。培養２日後に培養液を除去し、５ｎｇ／ｍｌＲＡＮＫＬ及び２５ｎｇ／ｍｌＭ－ＣＳＦを含有した１０％ＦＢＳ含有α－ＭＥＭ培地を１８０μｌ／ｗｅｌｌ添加し、実施例品１～３および比較例品１、２を溶解した溶液を２０μｌずつ添加して、３７℃、５％CO_2の条件で２日間培養した後、培地を交換してさらに１日間培養した。培養終了後、培養液を除去して、ＰＢＳで洗浄し、アセトン－

エタノール（１：１）溶液で１分間処理して固定した後、１．５ｍｇ／ｍｌのｐ－ニトロフェニルリン酸二ナトリウム－２０ｍＭ酒石酸ナトリウム－５０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ４．５）を１００μｌ／ｗｅｌｌ添加し、室温で３０分間反応させた。１Ｍ水酸化ナトリウム溶液を５０μｌ／ｗｅｌｌ添加して反応を停止した後、４０５ｎｍの吸光度を測定し、破骨細胞分化成熟の指標とした。培地に実施例品１～３及び比較例品１、２を添加しなかった群（対照）の４０５ｎｍにおける吸光度に対して、添加した群の吸光度が有意に低かった場合に、破骨細胞分化抑制活性陽性とした。

これらの結果を表１に示す。

[0030] [表1]

	骨芽細胞増殖	破骨細胞骨吸収抑制	破骨細胞分化抑制
実施例1	陽性	陽性	陽性
実施例2	陽性	陽性	陽性
実施例3	陽性	陽性	陽性
比較例1	陽性	陽性	陰性
比較例2	陽性	陰性	陽性

[0031] 表１の結果より、本発明のタンパク質素材である実施例品１～３は、全ての細胞アッセイの活性が陽性であった。それに対して、比較例品１、２では、一部の細胞アッセイの活性が陽性であったが、陰性の細胞アッセイも存在した。

実施例 4

[0032] 陽イオン交換樹脂のスルホン化キトパール（富士紡績社製）６００ｇを充填したカラム（直径５ｃｍ×高さ３０ｃｍ）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳（ｐＨ６．７）４０Ｌを流速２５ｍｌ／ｍｉｎで通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、０．７８Ｍの塩化ナトリウムを含む０．０２Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ７．０）で樹脂に吸着したタンパク質を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥して粉末状のタンパク質素材１８ｇを得た（実施例品４）。このタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が２ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェ

ニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が１８であり、そのまま骨強化剤、または骨強化剤の有効成分として使用可能である。また、プロテオーム解析の結果、このタンパク質素材には、βカゼインとκカゼインの分解物が含まれていた。

実施例 5

[0033] 陽イオン交換樹脂のＳＰトーヨーパール（東ソー株式会社製）３０ｋｇを充填したカラム（直径２０ｃｍ×高さ１００ｃｍ）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに７５℃で１５秒間加熱殺菌した乳清３ｔ（ｐＨ６．２）を流速１０Ｌ／ｍｉｎで通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、０．６８Ｍの塩化ナトリウムを含む０．１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ５．７）で樹脂に吸着したタンパク質を溶出した。そして、この溶出液を電気透析膜により脱塩した後、凍結乾燥した。この一連の操作を２０回繰り返して、粉末状のタンパク質素材３．３ｋｇを得た（実施例品５）。このタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が１５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が０．８であり、そのまま骨強化剤、または骨強化剤の有効成分として使用可能である。また、プロテオーム解析の結果、このタンパク質素材には、αｓ１カゼインとκカゼインの分解物が含まれていた。

実施例 6

[0034] 実施例品４のタンパク質素材４ｇを水８００ｍｌに溶解し、最終濃度が０．０２重量%となるようタンパク質分解酵素であるパンクレアチン（シグマ社製）を加え、３７℃で８時間酵素処理した。そして、９０℃で５分間加熱処理して酵素を失活させた後、凍結乾燥してタンパク質素材３．２ｇを得た（実施例品６）。なお、このようにして得られたタンパク質素材は、アンジオジェニン分解物含量が２．０ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が１６であり、分子量が８，０００以下であったことから、そのまま骨強化剤、または骨強化剤の

有効成分として使用可能である。また、プロテオーム解析の結果、このタンパク質素材には、βカゼインとκカゼインの分解物が含まれていた。

実施例 7

[0035] 実施例品５のタンパク質素材４ｇを水８００ｍｌに溶解し、最終濃度が０．０３重量%となるようタンパク質分解酵素であるトリプシン（シグマ社製）を加え、３７℃で８時間酵素処理した。そして、９０℃で５分間加熱処理して酵素を失活させた後、凍結乾燥してタンパク質素材３．０ｇを得た（実施例品７）。なお、このようにして得られたタンパク質素材は、アンジオジェニン分解物含量が１４ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が０．７であり、分子量が８，０００以下であったことから、そのまま骨強化剤、または骨強化剤の有効成分として使用可能である。また、プロテオーム解析の結果、このタンパク質素材には、αｓ１カゼインとκカゼインの分解物が含まれていた。

[0036] ［比較例３］

参考例３のラクトパーオキシダーゼ画分１０ｍｇと実施例品４のタンパク質素材１００ｍｇを混合して、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が１．８ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が２２．５であるタンパク質素材（比較例品３）を調製した。

[0037] ［比較例４］

参考例１のアンジオジェニン画分１ｇと実施例品５のタンパク質素材２ｇを混合して、水８００ｍｌに溶解し、最終濃度が０．０２重量%となるようタンパク質分解酵素であるトリプシン（シグマ社製）を加え、３７℃で１２時間酵素処理した。そして、９０℃で５分間加熱処理して酵素を失活させた後、凍結乾燥してタンパク質素材２．８ｇを得た（比較例品４）。このようにして得られたタンパク質素材は、アンジオジェニン分解物含量が３９ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダー

ゼ分解物の質量比が０．２であった。

[0038] ［比較例５］

陽イオン交換樹脂のＣＭセファロースＦＦ（ＧＥヘルスケア社製）１００ｇを充填したカラム（直径５ｃｍ×高さ５ｃｍ）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳（ｐＨ６．７）４０Ｌを流速４０ｍｌ／ｍｉｎで通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、０．９８Ｍの塩化ナトリウムを含む０．０２Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ６．８）で樹脂に吸着したタンパク質を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥して粉末状のタンパク質素材２０ｇを得た（比較例品５）。このタンパク質素材は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物の含量が１．５ｍｇ／１００ｍｇ、かつアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物の質量比が３０であった。

[0039] ［試験例２］

実施例品４、５および比較例品３、５の骨強化作用について動物実験により調べた。実験には５週齢のＣ３Ｈ／ＨｅＪ系雄マウスを用いた。１週間の予備飼育の後、マウスを６匹ずつ５群に分け、実施例品４、５および比較例品３、５をマウス体重１ｋｇあたり、それぞれ５ｍｇになるよう１日１回ゾンデで経口投与して４週間飼育した。また、実施例品４、５および比較例品３、５を投与しないものを対照群とした。投与終了後（４週目）に、マウスの右脛骨の骨密度をマイクロＣＴ（（株）リガク製）により測定した。その結果を表２に示す。

[0040] [表2]

	骨密度（ｍｇ／ｃｍ^3）
対照群	１３００±１０
実施例品４	１３２７±１１
実施例品５	１３３２±１２
比較例品３	１３０１±１０
比較例品５	１３０４±９

[0041] 表２に示したように、本発明のタンパク質素材である実施例品４、５を４週間経口投与した群では、対照群または比較例品３、５を投与した群に比べ、有意に骨密度が上昇した。

[0042] [試験例３]

実施例品６、７および比較例品４、５の骨強化作用について動物実験により調べた。実験には５１週齢のＳＤ系雌ラット４８匹を用いた。ラットを８匹ずつ６群に分け、５群は卵巣摘出手術を施し、残りの１群は疑似手術を施した。４週間の回復期間を設け、卵巣摘出手術を施したラットに実施例品６、７および比較例品４、５をラット体重１ｋｇあたり、それぞれ５ｍｇになるよう１日１回ゾンデで経口投与して１６週間飼育した。実施例品６、７および比較例品４、５を投与しないものを対照群とした。また、４週間の回復期間の後、疑似手術を施したラットも対照群と同様に１６週間飼育した。投与終了後（１６週目）に、ラットの右大腿骨の骨密度をマイクロＣＴ（（株）リガク製）により測定した。その結果を表３に示す。

[0043] [表3]

	骨密度（ｍｇ／ｃｍ^3）
対照群	５５１±１０
擬似手術群	６０２±９
実施例品６	５９８±１１
実施例品７	５９４±１２
比較例品４	５５７±１３
比較例品５	５５５±１１

[0044] 表３に示したように、本発明のタンパク質素材である実施例品６、７を１６週間経口投与した群では、対照群または比較例品４、５を投与した群に比べ、有意に骨密度が上昇し、その値は疑似手術群に近いレベルであった。

実施例 8

[0045] （骨強化用液状栄養組成物の調製）

実施例品４のタンパク質素材５ｇを４９９５ｇの脱イオン水に溶解し、Ｔ

Ｋホモミクサー（ＴＫ　ＲＯＢＯ　ＭＩＣＳ；特殊機化工業社製）にて、６０００ｒｐｍで３０分間撹拌混合して実施例品４を１００ｍｇ／１００ｇ含有する溶液を得た。この溶液５．０ｋｇに、カゼイン４．０ｋｇ、大豆タンパク質５．０ｋｇ、魚油１．０ｋｇ、シソ油３．０ｋｇ、デキストリン１８．０ｋｇ、ミネラル混合物６．０ｋｇ、ビタミン混合物１．９５ｋｇ、乳化剤２．０ｋｇ、安定剤４．０ｋｇ、香料０．０５ｋｇを配合し、２００ｍｌのレトルトパウチに充填し、レトルト殺菌機（第１種圧力容器、ＴＹＰＥ：ＲＣＳ－４ＣＲＴＧＮ、日阪製作所社製）で１２１℃、２０分間殺菌して、骨強化用液状栄養組成物５０ｋｇを製造した。このようにして得られた骨強化用液状栄養組成物には、沈殿等は認められず、風味に異常は感じられなかった。

実施例 9

[0046]（骨強化用ゲル状食品の調製）

実施例品５のタンパク質素材２ｇを７０８ｇの脱イオン水に溶解し、ウルトラディスパーサー（ＵＬＴＲＡ－ＴＵＲＲＡＸ　Ｔ－２５；ＩＫＡジャパン社製）にて、９５００ｒｐｍで３０分間撹拌混合した。この溶液に、ソルビトール４０ｇ、酸味料２ｇ、香料２ｇ、ペクチン５ｇ、乳清タンパク質濃縮物５ｇ、乳酸カルシウム１ｇ、脱イオン水２３５ｇを添加して、撹拌混合した後、２００ｍｌのチアパックに充填し、８５℃、２０分間殺菌後、密栓し、骨強化用ゲル状食品５袋（２００ｇ入り）を調製した。このようにして得られた骨強化用ゲル状食品には、沈殿等は認められず、風味に異常は感じられなかった。

実施例 10

[0047]（骨強化用飲料の調製）

酸味料２ｇを７０６ｇの脱イオン水に溶解した後、実施例品６のタンパク質素材４ｇを溶解し、ウルトラディスパーサー（ＵＬＴＲＡ－ＴＵＲＲＡＸ　Ｔ－２５；ＩＫＡジャパン社製）にて、９５００ｒｐｍで３０分間撹拌混合した。マルチトール１００ｇ、還元水飴２０ｇ、香料２ｇ、脱イオン水１

６６ｇを添加した後、１００ｍｌのガラス瓶に充填し、９５℃、１５秒間殺菌後、密栓し、骨強化用飲料１０本（１００ｍｌ入り）を調製した。このようにして得られた骨強化用飲料には、沈殿等は認められず、風味に異常は感じられなかった。

実施例 11

[0048]（骨強化用飼料の調製）

実施例品７のタンパク質素材２ｋｇを９８ｋｇの脱イオン水に溶解し、ＴＫホモミクサー（ＭＡＲＫＩＩ　１６０型；特殊機化工業社製）にて、３６００ｒｐｍで４０分間撹拌混合して実施例品７のタンパク質素材を２ｇ／１００ｇ含有する溶液を得た。この溶液１０ｋｇに大豆粕１２ｋｇ、脱脂粉乳１４ｋｇ、大豆油４ｋｇ、コーン油２ｋｇ、パーム油２３．２ｋｇ、トウモロコシ澱粉１４ｋｇ、小麦粉９ｋｇ、ふすま２ｋｇ、ビタミン混合物５ｋｇ、セルロース２．８ｋｇ、ミネラル混合物２ｋｇを配合し、１２０℃、４分間殺菌して、骨強化用イヌ飼育飼料１００ｋｇを製造した。

実施例 12

[0049]（骨強化剤（錠剤）の調製）

表４に示す配合で原料を混合後、常法にしたがって１ｇに成型、打錠して骨強化剤を製造した。

[0050][表4]

含水結晶ぶどう糖	９２．５％（重量%）
タンパク質素材（実施例品１）	１．０％
ミネラル混合	５．０％
シュガーエステル	１．０％
香料	０．５％

請求の範囲

［請求項1］ アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を２～１５ｍｇ／１００ｍｇ含有し、かつ、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して質量比０．３～２０の範囲で含有するタンパク質素材。

［請求項2］ 請求項１記載のタンパク質素材を含有する飲食品又は飼料。

［請求項3］ 請求項１記載のタンパク質素材を有効成分として含有する骨強化剤。

［請求項4］ 請求項１記載のタンパク質素材を５ｍｇ／日以上摂取する骨強化方法。

［請求項5］ 次の１）～３）の工程を含む請求項１記載のタンパク質素材の製造方法。

１）アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を調製する工程。

２）ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を調製する工程。

３）上記２）の工程で調製したラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を、上記１）の工程で調製したアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して、質量比が０．３～２０となるように配合する工程。

［請求項6］ 乳及び／又は乳原料から、ラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物のアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が０．３～２０となるように、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とラクトパーオキシダーゼ及び／又はラクトパーオキシダーゼ分解物を含む画分を抽出する工程を含む、請求項１記載のタンパク質素材の製造方法。

［請求項7］ さらに、アンジオジェニンとラクトパーオキシダーゼを含む画分中のアンジオジェニン及び／又はラクトパーオキシダーゼを酵素分解する

工程を含む、請求項６記載のタンパク質素材の製造方法。