

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6203724号
(P6203724)

(45) 発行日 平成29年9月27日 (2017. 9. 27)

(24) 登録日 平成29年9月8日 (2017. 9. 8)

(51) Int. Cl.

F 1

A 2 3 L	33/17	(2016. 01)	A 2 3 L	33/17
A 6 1 K	38/00	(2006. 01)	A 6 1 K	38/00
A 6 1 K	38/01	(2006. 01)	A 6 1 K	38/01
A 6 1 K	38/44	(2006. 01)	A 6 1 K	38/44
A 6 1 P	19/10	(2006. 01)	A 6 1 P	19/10

請求項の数 3 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-527849 (P2014-527849)
 (86) (22) 出願日 平成24年7月31日 (2012. 7. 31)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/069392
 (87) 国際公開番号 W02014/020676
 (87) 国際公開日 平成26年2月6日 (2014. 2. 6)
 審査請求日 平成27年7月8日 (2015. 7. 8)

前置審査

(73) 特許権者 711002926
 雪印メグミルク株式会社
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
 (74) 代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所
 (72) 発明者 大町 愛子
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
 雪印メグミルク株式会社内
 (72) 発明者 松山 博昭
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
 雪印メグミルク株式会社内
 (72) 発明者 森田 如一
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
 雪印メグミルク株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材及びその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1) 精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物を調製する工程と、

2) 精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物を調製する工程と、

3) 上記 2) の工程で調製した精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物を、上記 1) の工程で調製した精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物に対して、質量比が 0. 3 ～ 2. 0 となるように配合する工程と、を含む、

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 ～ 15 mg / 100 mg 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 ～ 2. 0 の範囲で含有する骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

【請求項 2】

乳及び／又は乳原料から、精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物の精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物に対する質量比が 0. 3 ～ 2. 0 となるように、精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物と精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はその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 記載の骨疾患の予

防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

【請求項3】

さらに、精製されたアンジオジェニンと精製されたラクトパーオキシダーゼを含む画分中の精製されたアンジオジェニン及び／又は精製された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2記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材及びその製造方法に関する。より詳しくは、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。

10

【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。

20

【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D₃製剤、ビタミンK₂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。

30

40

【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）。

50

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

10

【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】

20

【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) 1) 精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物を調製する工程と、 2) 精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物を調製する工程と、 3) 上記2)の工程で調製した精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物を、 上記1)の工程で調製した精製されたアンジオジェニン及び／又はその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と、を含む、

30

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の範囲で含有する骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

(2) 乳及び／又は乳原料から、精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はそのラクトパーオキシダーゼ分解物の精製されたアンジオジェニン及び／又はその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、 精製されたアンジオジェニン及び／又はそのアンジオジェニン分解物と精製されたラクトパーオキシダーゼ及び／又はその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)記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

40

(3) さらに、精製されたアンジオジェニンと精製されたラクトパーオキシダーゼを含む画分中の精製されたアンジオジェニン及び／又は精製されたラクトパーオキシダーゼを酵素分解する工程を含む、 (2)記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材の製造方法。

なお、本明細書において「骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材」を「新規タンパク

50

質素材」と記載することもある。

【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、 α s1カゼイン、 α s2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0.3～2.0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0.3～2.0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2.0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3.0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、攪拌混合して用いる。攪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、ウルトラディスペーサーやTKホモミキサー等を使用して攪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に洗浄した後、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む溶出画分を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に洗浄した後、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に洗浄し、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む溶出画分をS-SepharoseFFカラム（アマシャムバイオサイエンス社製）に吸着させ、脱イオン水で十分に洗浄し、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HiLoad16/60 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25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

10

20

30

40

50

． 58 mg と参考例 3 のラクトパーオキシダーゼ画分 0.83 mg 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 2.5 mg / 100 mg、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 0.73 mg と参考例 2 のアンジオジェニン画分 92.33 mg と参考例 3 のラクトパーオキシダーゼ画分 6.94 mg 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 2.5 mg / 100 mg、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。

10

【実施例 3】

【0024】

参考例 1 のアンジオジェニン画分 1.83 mg と参考例 2 のアンジオジェニン画分 42.61 mg と参考例 3 のラクトパーオキシダーゼ画分 55.56 mg 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 2.5 mg / 100 mg、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 2.0 であるタンパク質素材（実施例品 3）を調製した。

20

【0025】

[比較例 1]

参考例 1 のアンジオジェニン画分 0.57 mg と参考例 2 のアンジオジェニン画分 99.15 mg 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 2.5 mg / 100 mg、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 2.08 mg と参考例 2 のアンジオジェニン画分 31.25 mg と参考例 3 のラクトパーオキシダーゼ画分 66.67 mg 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 2.5 mg / 100 mg、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 2.4 であるタンパク質素材（比較例品 2）を調製した。

30

【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。

40

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 90 μ l 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 10 μ l 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）付属のプ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、450 nm 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

50

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180 μ l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20 μ l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、25 ng/ml M-CSFを含有した10%FBS含有 α -MEM培地（GIBCO社製）200 μ lで37℃、5%CO₂の条件で培養した。培養2日後に培養液を除去し、5 ng/ml RANKL及び25 ng/ml M-CSFを含有した10%FBS含有 α -MEM培地を180 μ l/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20 μ lずつ添加して、37℃、5%CO₂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、1.5 mg/mlのp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム-20 mM酒石酸ナトリウム-50 mMクエン酸緩衝液（pH4.5）を100 μ l/well添加し、室温で30分間反応させた。1 M水酸化ナトリウム溶液を50 μ l/well添加して反応を停止した後、405 nm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405 nm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）600 gを充填したカラム（直径5 cm×高さ30 cm）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（pH 6.7）40 Lを流速25 ml/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、0.78 Mの塩化ナトリウムを含む0.02 M炭酸緩衝液（pH 7.0）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18 g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2 mg/100 mg、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。

10

【実施例5】

【0033】

陽イオン交換樹脂のSPトローパール（東ソー株式会社製）30 kgを充填したカラム（直径20 cm×高さ100 cm）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3 t（pH 6.2）を流速10 L/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、0.68 Mの塩化ナトリウムを含む0.1 Mクエン酸緩衝液（pH 5.7）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3.3 kg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15 mg/100 mg、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。

20

【実施例6】

【0034】

実施例品4のタンパク質素材4 gを水800 ml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3.2 g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2.0 mg/100 mg、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。

30

【実施例7】

【0035】

実施例品5のタンパク質素材4 gを水800 ml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3.0 g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14 mg/100 mg、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。

40

【0036】

[比較例3]

参考例3のラクトパーオキシダーゼ画分10 mgと実施例品4のタンパク質素材100

50

mg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 1 kg あたり、それぞれ 5 mg 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。

10

【0043】

【表 3】

	骨密度 (mg/cm ³)
対照群	551±10
疑似手術群	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

20

【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）

30

実施例品 4 のタンパク質素材 5 g を 4995 g の脱イオン水に溶解し、TK ホモミキサー（TK ROBO MICS；特殊機化工業社製）にて、6000 rpm で 30 分間攪拌混合して実施例品 4 を 100 mg/100 g 含有する溶液を得た。この溶液 5.0 kg に、カゼイン 4.0 kg、大豆タンパク質 5.0 kg、魚油 1.0 kg、シソ油 3.0 kg、デキストリン 18.0 kg、ミネラル混合物 6.0 kg、ビタミン混合物 1.95 kg、乳化剤 2.0 kg、安定剤 4.0 kg、香料 0.05 kg を配合し、200 ml 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-4 CRT GN、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 50 kg 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。

40

【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 2 g を 708 g 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、9500 rpm で 30 分間攪拌混合した。この溶液に、ソルビトール 40 g、酸味料 2 g、香料 2 g、ペクチン 5 g、乳清タンパク質濃縮物 5 g、乳酸カルシウム 1 g、脱イオン水 235 g を添加して、攪拌混合した後、200 ml 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（200 g 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。

50

【実施例 10】

【0047】

(骨強化用飲料の調製)

酸味料 2 g を 706 g 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 4 g を溶解し、ウルトラディスペンサー (ULTRA-TURRAX T-25; IKA ジャパン社製) にて、9500 rpm で 30 分間攪拌混合した。マルチトール 100 g、還元水飴 20 g、香料 2 g、脱イオン水 166 g を添加した後、100 ml 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 (100 ml 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。

10

【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 2 kg を 98 kg の脱イオン水に溶解し、TK ホモミクサー (MARK II 160 型; 特殊機化工業社製) にて、3600 rpm で 40 分間攪拌混合して実施例品 7 のタンパク質素材を 2 g / 100 g 含有する溶液を得た。この溶液 10 kg に大豆粕 12 kg、脱脂粉乳 14 kg、大豆油 4 kg、コーン油 2 kg、パーム油 23.2 kg、トウモロコシ澱粉 14 kg、小麦粉 9 kg、ふすま 2 kg、ビタミン混合物 5 kg、セルロース 2.8 kg、ミネラル混合物 2 kg を配合し、120℃、4 分間殺菌して、骨強化用イヌ飼育飼料 100 kg を製造した。

20

【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 1 g 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%

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 2 3 K 20/147 (2016.01) A 2 3 K 20/147

(72)発明者 石田 祐子
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内
 (72)発明者 奈良 貴幸
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内
 (72)発明者 加藤 健
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内
 (72)発明者 芹澤 篤
 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 雪印メグミルク株式会社内

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 特開平10-007585 (JP, A)
 特表2011-519960 (JP, A)
 特開2005-060321 (JP, A)
 特開2004-238320 (JP, A)
 米国特許出願公開第2007/0253941 (US, A1)
 国際公開第2007/142542 (WO, A2)
 J. Dairy Sci., 米国, 2011年 5月, Vol. 94, No. 5, p.2270-2279
 第3回食品薬学シンポジウム講演要旨集, 日本, 2009年10月, p.33-36

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 2 3 L
 A 6 1 K
 A 2 3 K
 A 6 1 P
 JSTPlus/JST7580 (JDreamIII)
 CA/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)