

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年9月12日(12.09.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/133326 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/056157
- (22) 国際出願日: 2013年3月6日(06.03.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-053825 2012年3月9日(09.03.2012) JP
- (71) 出願人: 雪印メグミルク株式会社 (MEGMILK SNOW BRAND CO., LTD.) [JP/JP]; 〒0650043 北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: 松山 博昭 (MATSUYAMA, Hiroaki); 〒0650043 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 Hokkaido (JP). 森田 如一 (MORITA, Yoshikazu); 〒0650043 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 Hokkaido (JP). 石田 祐子 (ISHIDA, Yuko); 〒0650043 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 Hokkaido (JP). 大町 愛子 (OHMACHI, Aiko); 〒0650043 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 Hokkaido (JP). 小林 敏也 (KOBAYASHI, Toshiya); 〒0650043 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 Hokkaido (JP). 高野 義彦 (TAKANO, Yoshihiko); 〒0650043 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 Hokkaido (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所 (MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: BONE-STRENGTHENING AGENT

(54) 発明の名称: 骨強化剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a bone-strengthening agent which is useful for the prevention or treatment of various bone diseases such as osteoporosis, bone fracture, rheumatism and arthritis; a bone-strengthening product such as a food, a beverage, a feed and a medicine, which contains the bone-strengthening agent. A bone-strengthening agent, which is characterized by comprising a milk-derived basic protein fraction and/or a decomposition product of a milk-derived basic protein fraction and a hydrolysate of a whey protein as active ingredients, is useful for the prevention or treatment of various bone diseases such as osteoporosis, bone fracture, rheumatism and arthritis.

(57) 要約: 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剤、及び該骨強化剤を含有する飲食品、飼料、医薬等の骨強化剤を提供することを課題とする。乳由来塩基性タンパク質画分及び/又は乳由来塩基性タンパク質画分解物とホエイタンパク質加水分解物を有効成分として含有することを特徴とする骨強化剤は、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。



WO 2013/133326 A1

明 細 書

発明の名称：骨強化剤

技術分野

[0001] 本発明は、塩基性タンパク質画分及び／又は塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を有効成分とする、骨強化作用に優れ、骨芽細胞を増殖させ、また、破骨細胞の分化や該細胞による骨吸収を抑制する作用を有し、骨粗鬆症や骨折治療、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有効で、安定性及び安全性に優れた骨強化剤に関する。本発明は、さらに該骨強化剤を含有する、骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料又は骨強化用医薬品に関する。

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、閉経後のホルモンのバランス変化等により、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、飼料などに添加して摂取する、あるいは、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、飼料などに添加して摂取している。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て摂取した場合、カルシウムの吸収率は50%以下であり、半分以上のカルシウムが吸収されず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作用を示さないこともある。

[0004] 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 やビタミン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。したがって、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／又は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や該骨強化剤を含有する飲食品、飼料の開発が望まれている。

[0005] 上記のような骨強化剤としては、例えば特許文献1に記載されているような乳由来の塩基性タンパク質画分（以下、「乳由来塩基性タンパク質画分」という。）や、乳由来塩基性タンパク質画分をタンパク質分解酵素で分解して得られる塩基性タンパク質画分分解物（以下、「乳由来塩基性タンパク質画分分解物」という。）が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平8-151331

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、安全性が高く、骨を強化することができ、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剤を提供することを課題とする。また、骨強化剤を配合した骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料又は骨強化用医薬品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

[0008] 本発明者らは、上記の課題を解決するため鋭意検討を進めたところ、従来骨強化作用を有することが報告されている乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物と、ホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取することにより、より高い骨強化作用を示すことを見出した。すなわち本発明は、以下の様態を含むものである。

(1) 乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物と、ホエイタンパク質加水分解物を有効成分とする骨強化剤。

(2) 前記乳由来塩基性タンパク質画分分解物が、乳由来塩基性タンパク質画分を、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン及びパンクレアチンよりなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質分解酵素を用いて分解したものである(1)に記載の骨強化剤。

(3) 前記乳由来塩基性タンパク質画分が、そのアミノ酸組成中に塩基性アミノ酸を15重量%以上含有している画分である(1)又は(2)に記載の骨強化剤。

(4) 前記乳由来塩基性タンパク質画分が、乳または乳由来の原料を陽イオン交換樹脂に接触させて塩基性タンパク質を吸着させ、この樹脂に吸着した画分を塩濃度0.1M~1.0Mの溶出液で溶出して得られる画分である(1)又は(2)に記載の骨強化剤。

(5) 前記ホエイタンパク質加水分解物が分解率25%以上であることを特徴とする(1)に記載の骨強化剤。

(6) 前記ホエイタンパク質加水分解物が、以下の特徴を有するもの

である（１）に記載の骨強化剤。

（Ａ）分子量が１０ｋＤａ以下、メインピークが２００Ｄａ～３ｋＤａである。

（Ｂ）ＡＰＬ（平均ペプチド鎖長）は２～８である。

（Ｃ）遊離アミノ酸含量が２０％以下である。

（Ｄ）抗原性がβ-ラクトグロブリンの抗原性の１／１０，００以下である。

（７）前記ホエイタンパク質加水分解物が、ホエイタンパク質をｐＨ６～１０、５０～７０℃において耐熱性のタンパク質加水分解酵素を用いて熱変性させながら酵素分解し、加熱して酵素を失活させて得られるものであることを特徴とする（１）に記載の骨強化剤。（８）前記ホエイタンパク質加水分解物が、ホエイタンパク質をｐＨ６～１０、２０～５５℃においてタンパク質加水分解酵素を用いて酵素分解し、これを５０～７０℃に昇温させ、ｐＨ６～１０、５０～７０℃において耐熱性のタンパク質加水分解酵素を用いて未分解のホエイタンパク質を熱変性させながら酵素分解し、加熱して酵素を失活させて得られるものであることを特徴とする（１）に記載の骨強化剤。

（９）（１）乃至（８）のいずれかに記載の骨強化剤を含むことを特徴とする骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料又は骨強化用医薬品。

（１０）乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物と、ホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取することによる骨強化方法。

発明の効果

[0009] 本発明の骨強化剤は、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] 本発明の特徴は、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タ

ンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を有効成分とすることにある。本発明で用いる乳由来塩基性タンパク質画分は、牛乳、人乳、山羊乳、羊乳など哺乳類の乳から得られるものであり、また、本発明で用いる乳由来塩基性タンパク質画分分解物は、乳由来塩基性タンパク質画分にタンパク質分解酵素を作用させて得ることができるものである。

[0011] この乳由来塩基性タンパク質画分は、次の性質を有している。

- 1) ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によると分子量 3,000~80,000 の範囲の数種のタンパク質よりなる。
- 2) 95重量%以上がタンパク質であって、その他少量の脂肪、灰分を含む。
- 3) タンパク質は主としてラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼよりなる。
- 4) タンパク質のアミノ酸組成は、リジン、ヒスチジン、アルギニン等の塩基性アミノ酸を15重量%以上含有する。

[0012] このような乳由来塩基性タンパク質画分は、例えば、脱脂乳や乳清などの乳原料を陽イオン交換樹脂と接触させて塩基性タンパク質を吸着させ、この樹脂に吸着した塩基性タンパク質画分を0.1M~1Mの塩濃度の溶出液で溶出し、この溶出画分を回収して、逆浸透 (RO) 膜や電気透析 (ED) 法などにより脱塩及び濃縮し、必要に応じて乾燥することにより得ることができる。

また、本発明の乳由来塩基性タンパク質画分を得る方法としては、乳または乳由来の原料を陽イオン交換体に接触させて塩基性タンパク質を吸着させた後、この陽イオン交換体に吸着した塩基性タンパク質画分を、pH5を越え、イオン強度0.5を越える溶出液で溶出して得る方法 (特開平5-202098号公報)、アルギン酸ゲルを用いて得る方法 (特開昭61-246198号公報)、無機の多孔性粒子を用いて乳清から得る方法 (特開平1-86839号公報)、硫酸化エステル化合物を用いて乳から得る方法 (特開

昭63-255300号公報)などが知られており、本発明では、このような方法で得られた乳由来塩基性タンパク質画分を用いることができる。

さらに、乳由来塩基性タンパク質画分分解物は、乳由来塩基性タンパク質画分と同様のアミノ酸組成を有しており、例えば、上記の方法で得られた乳由来塩基性タンパク質画分にペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどのタンパク質分解酵素を作用させ、さらに必要に応じ、パンクレアチンなどのタンパク質分解酵素を作用させることにより、平均分子量4,000以下のペプチド組成物として得ることができる。

[0013] 本発明で用いるホエイタンパク質加水分解物は、例えば特開平4-112753に記載の方法によって得ることができる。この方法では、ホエイタンパク質をpH6~10、50~70℃とし、これに耐熱性のタンパク質加水分解酵素を加えて熱変性させながら酵素分解し、これを加熱して酵素を失活させることによって得られる。なお、上記酵素分解を行う前に、ホエイタンパク質をpH6~10、20~55℃においてタンパク質加水分解酵素を用いて酵素分解し、これを冷却することなく直ちに上記条件で酵素分解すると収率を一層高めることができる。

また、上記のように調製したホエイタンパク質加水分解物を、分画分子量1kDa~20kDa、好ましくは、2kDa~10kDaの限外濾過(UF)膜及び/又は分画分子量100Da~500Da、好ましくは150Da~300Daの精密濾過(MF)膜から選ばれる方法で濃縮することも可能である。このような膜処理により、ホエイタンパク質加水分解物の平均分子量を300~500Daとすることによって、さらに苦味を軽減し、透明性を向上させることが可能である。

[0014] 特開平4-112753に記載の方法によってホエイタンパク質加水分解物を調製する場合、前述の溶液をpH6~10に調整するが、通常ホエイタンパク質はこの範囲のpHになっているので格別pHの調整を行う必要はないが、必要な場合は、塩酸、クエン酸及び乳酸等の酸溶液あるいは苛性ソー

ダ、水酸化カルシウム及び燐酸ソーダ等のアルカリ溶液を用いてpH6~10とする。加熱は50~70℃で行うが、耐熱性のタンパク質加水分解酵素は、この温度で添加するよりも、むしろ加熱前から加え酵素分解を行った方が収率の面から好ましい。

[0015] また、一般的なプロテアーゼの至適温度は40℃以下であるが、耐熱性のタンパク質加水分解酵素の至適温度は45℃以上であり、耐熱性のタンパク質加水分解酵素としては、従来このような至適温度を有する耐熱性のタンパク質加水分解酵素として知られているものであれば特に制限なく使用できる。このような耐熱性のタンパク質加水分解酵素としては、パパイン、プロテアーゼS(商品名)、プロレザー(商品名)、サモアーゼ(商品名)、アルカラーゼ(商品名)、プロチンA(商品名)等を例示することができる。耐熱性のタンパク質加水分解酵素は、80℃で30分加熱して残存活性が約10%あるいはそれ以上になるものが望ましい。また、単独よりも複数の酵素を併用する方が効果的である。反応は、30分~10時間程度行うことが好ましい。

最後に、反応液を加熱して酵素を失活させる。酵素の失活は、反応液を100℃以上で10秒間以上加熱することにより行うことができる。

[0016] そして反応液を遠心分離して上清を回収し、上清を乾燥して粉末製品とする。なお、遠心分離した時に生ずる沈殿物は上清に比べ低アレルギー化の程度が小さいので、これを除去した方が好ましいが、勿論反応液をそのまま乾燥して使用しても差し支えない。得られたホエイタンパク質加水分解物のAPL(平均ペプチド鎖長)は、TNBS(2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸)法等の方法によって測定することができる。また、ホエイタンパク質加水分解物の分子量分布は、High performance size exclusion chromatography(HPSEC)等の方法で測定することができ、その遊離アミノ酸含量は、75%エタノール等で遊離アミノ酸を抽出して、アミノ酸分析装置等で測定することができる。さらに、ホエイタンパク質加水分解物の分解率は、遊離のアミノ基を修飾して測定するオルトフタルアルデヒド(OPA)法等で測定することができる。

。

[0017] なお、本発明におけるホエイタンパク質は、牛乳、人乳、山羊乳、羊乳など哺乳類の乳から調製したホエイ、その凝集物、粉末、あるいは精製タンパク質をいい、これを酵素反応させる時は水溶液の状態を使用する。

[0018] 本発明の乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物は、併せて摂取することによりそのまま骨強化剤として使用してもよいが、必要に応じて、常法に従い、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、ドリンク剤等に製剤化して用いることも出来る。

[0019] 本発明では、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を配合する方法に特に制限はないが、例えば、溶液中で添加、配合するには、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を脱イオン水に懸濁あるいは溶解し、攪拌混合した後、医薬品、飲食品や飼料の形態に調製して使用する。攪拌混合の条件としては、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物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ホモミクサー等を使用して攪拌混合することも可能である。また、当該組成物の溶液は、医薬品、飲食品や飼料に使用しやすいように、必要に応じて、RO膜等での濃縮や、凍結乾燥して使用することができる。本発明では、医薬品、飲食品や飼料の製造に通常使用される殺菌処理が可能であり、粉末状であっては乾熱殺菌も可能である。従って、本発明の乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を含有する液状、ゲル状、粉末状、顆粒状等様々な形態の医薬品、飲食品や飼料を製造することができる

さらに、これらを製剤化した後に、これを栄養剤やヨーグルト、乳飲料、ウエハース等の飲食品、栄養組成物、飼料及び医薬品に配合することも可能である。

[0020] 本発明の骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料及び骨強化用医薬品とは、この乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物のみを含む場合の他に、安定剤や糖類、脂質、フレーバー、ビタミン、ミネラル、フラボノイド、ポリフェノール等、他の飲食品、飼料及び医薬に通常含まれる原材料等を含有することができる。また、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物に加えて、他の骨強化作用を示す成分、例えば、ビタミンDやビタミンK、大豆イソフラボン等とともに使用することも可能である。また、そのような骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料又は骨強化用医薬品を原材料として、他の飲食品等に通常含まれる原材料等を配合して調製することも可能である。

[0021] 骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料及び骨強化用医薬品における乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物の配合量に特に制限はないが、成人一人一日あたり、乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物を1mg以上、ホエイタンパク質加水分解物を2mg以上摂取させることが好ましく、このため、飲食品、飼料及び医薬の形態にもよるが、100gあたり乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物を0.05～200mg、ホエイタンパク質加水分解物を全質量に対して0.001～10%（重量/重量）、好ましくは0.1～5%（重量/重量）含有していることが好ましい。

[0022] 本発明の骨強化剤は、上記の有効成分に適当な助剤を添加して任意の形態に製剤化して、経口投与が可能な骨強化組成物とすることができる。製剤化に際して、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤等の希釈剤又は賦形剤を用いることができる。賦形剤としては、例えばショ糖、乳糖、デンプン、結晶性セルロース、マンニト、軽質無水珪酸、アルミン酸マグネシウム、合成珪酸アルミニウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウム、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、リン酸水素カルシウム

、カルボキシルメチルセルロースカルシウム等の1種又は2種以上を組み合わせて加えることができる。

[0023] 以下に実施例及び試験例を示し、本発明について詳細に説明するが、これらは単に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。

実施例 1

[0024] 陽イオン交換樹脂のスルホン化キトパール（富士紡績株式会社製）400g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40リットル（pH6.7）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、0.98M塩化ナトリウムを含む0.02M炭酸緩衝液（pH7.0）で樹脂に吸着した塩基性タンパク質画分を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透（RO）膜により脱塩して、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状の乳由来塩基性タンパク質画分21gを得た（実施例品1）。得られた乳由来塩基性タンパク質画分について、ソジウムドデシルサルフェートポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により測定したところ、分子量は3,000～80,000の範囲に分布しており、成分組成は表1に示すとおりであった。また、6N塩酸で110℃、24時間加水分解した後、アミノ酸分析装置（L-8500型、日立製作所製）でそのアミノ酸組成を分析した結果を表2に示した。さらに、ELISA法により、そのタンパク質組成を分析したところ、表3に示すように、40%以上のラクトフェリン及びラクトパーオキシダーゼが含まれていた。

[0025] [表1]

水分	1.06	(重量%)
タンパク質	96.50	
脂質	0.56	
灰分	0.27	
その他	1.61	

[0026] [表2]

アスパラギン酸	10.1 (重量%)
セリン	5.3
グルタミン酸	12.3
プロリン	4.7
アラニン	5.7
ロイシン	10.2
リジン	8.4
ヒスチジン	2.5
アルギニン	7.2
その他	33.6

[0027] [表3]

ラクトフェリン	42.5 (重量%)
ラクトパーオキシダーゼ	45.6
インスリン様増殖因子-1	0.005
その他	11.895

実施例 2

[0028] 陽イオン交換樹脂のSPトローヨーパール（東ソー株式会社製）30kgを充填したカラム（直径100cm×高さ10cm）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに121℃で30秒間加熱殺菌したチーズホエー3t（pH6.2）を流速10リットル／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、0.9M塩化ナトリウムを含む0.1Mクエン酸緩衝液（pH5.7）で樹脂に吸着した塩基性タンパク質画分を溶出した。そして、この溶出液を電気透析（ED）法により脱塩し、濃縮した後、凍結乾燥して粉末状の乳由来塩基性タンパク質画分183gを得た（実施例品2）。

実施例 3

[0029] 実施例1で得られた乳由来塩基性タンパク質画分50gを蒸留水10リットルに溶解した後、1%パンクレアチン(シグマ社製)を添加し、37℃で2時間反応させた。反応後、80℃で10分間加熱処理して酵素を失活させた後、乳由来塩基性タンパク質画分分解物48.3gを得た(実施例品3)。

実施例 4

[0030] ホエイタンパク質10%水溶液1Lに、パパイン50U/g・ホエイタンパク質及びプロレザー(天野エンザイム社製)150U/g・ホエイタンパク質を加え、pH8に調整し、55℃において6時間ホエイタンパク質を変性させながら酵素分解を行った。反応液を100℃で15秒間以上加熱して酵素を失活させ、遠心分離して上清を回収し、これを乾燥してホエイタンパク質加水分解物(実施例品4)を得た。得られたホエイタンパク質加水分解物の分子量分布は10kDa以下、メインピークは1.3kDa、APLは7.2、すべての構成成分に対する遊離アミノ酸含量は18.9%であった。InhibitionELISA法によってβ-ラクトグロブリンに対する抗原性の低下を測定したところ1/10,000以下で、分解率は28%、収率(酵素反応液を遠心分離し、仕込み量の乾燥重量に対する上清の乾燥重量の比率(%))は80.3%、苦味度は2であった。

実施例 5

[0031] ホエイタンパク質10%水溶液1Lに、パパイン50U/g・ホエイタンパク質及びプロレザー(天野エンザイム社製)150U/g・ホエイタンパク質を加え、pH8、50℃で3時間酵素分解を行った。これを55℃に昇温させ、この温度で3時間維持し、タンパク質を変性させるとともに、タンパク質の酵素分解を行い、100℃で15秒間以上加熱して酵素を失活させた。この反応液を分画分子量10kDaのUF膜(STC社製)及び分画分子量300DaのMF膜(STC社製)で処理を行い、濃縮液画分を回収し、これを乾燥してホエイタンパク質加水分解物(実施例品5)を得た。得られたホエイタンパク質加水分解物の分子量分布は10kDa以下、メインピークは

500 Da、APLは3.0、すべての構成成分に対する遊離アミノ酸含量は15.2%であった。Inhibition ELISA法によってβ-ラクトグロブリンに対する抗原性の低下を測定したところ1/10,000以下で、分解率は32%、収率65.4%、苦味度は2であった。

実施例 6

[0032] 特開平4-69315号公報で報告されている方法により、ホエイタンパク質の加水分解物を調製した。ホエイタンパク質120gを精製水1,800mlに溶解し、1Mカセイソーダ溶液でpHを7.0に調整した。次いで、60℃で10分間加熱して殺菌し、45℃に保持してアマノA（天野エンザイム社製）20gを添加し、2時間反応させた。80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、凍結乾燥し、ホエイタンパク質加水分解物（実施例品6）を得た。得られたホエイタンパク質加水分解物の分子量分布は14kDa以下、メインピークは3.1kDa、APLは17.2、すべての構成成分に対する遊離アミノ酸含量は13.2%であった。Inhibition ELISA法によってβ-ラクトグロブリンに対する抗原性の低下を測定したところ1/5,000以下で、分解率は18%、収率は80.6%、苦味度は2であった。

実施例 7

[0033] 特開平4-69315号公報で報告されている方法により、ホエイタンパク質の加水分解物を調製した。ホエイタンパク質120gを精製水1,800mlに溶解し、1Mカセイソーダ溶液でpHを7.0に調整した。次いで、60℃で10分間加熱して殺菌し、45℃に保持してアマノA（天野エンザイム社製）20gを添加し、8時間反応させた。80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、凍結乾燥し、ホエイタンパク質加水分解物（実施例品7）を得た。得られたホエイタンパク質加水分解物の分子量分布は10kDa以下、メインピークは1.8kDa、APLは10.0、すべての構成成分に対する遊離アミノ酸含量は19.3%であった。Inhibition ELISA法によってβ-ラクトグロブリンに対する抗原性の低下を測定した

ところ1/10,000以下で、分解率は25%、収率は80.6%、苦味度は2であった。

[0034] [試験例1]

(動物実験)

実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分と実施例品4のホエイタンパク質加水分解物を使用して、骨強化作用について評価した。実験には6週齢のC3H/HeJマウスを使用した。マウスを、生理食塩水を投与する群(A群)、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分をマウス体重1kgあたり1mg投与する群(B群)、実施例品4のホエイタンパク質加水分解物をマウス体重1kgあたり2mg投与する群(C群)、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分をマウス体重1kgあたり3mg投与する群(D群)、実施例品4のホエイタンパク質加水分解物をマウス体重1kgあたり3mg投与する群(E群)、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分と実施例品4のホエイタンパク質加水分解物を、それぞれマウス体重1kgあたり1mgと2mg同時に投与する群(F群)の6試験群(各群10匹ずつ)にわけた。それぞれを毎日1回ゾンデで経口投与して2週間飼育した。実施例品1、4および実施例品1と4の混合物は、それぞれ生理食塩水に懸濁して、それぞれB~F群に経口投与した。試験終了時に、マウスの右足の脛骨の骨密度を3DマイクロX線CT((株)リガク)を用いて測定した。その結果を表4に示す。

[0035]

[表4]

群	脛骨の骨幹部皮質骨の骨密度 (mg/cm ³)
A群	1254.2 ± 2.7
B群	1273.9 ± 3.2 ※1
C群	1277.2 ± 4.1 ※1
D群	1296.9 ± 4.2 ※1
E群	1292.9 ± 3.9 ※1
F群	1325.3 ± 3.4 ※2

数値は、平均値±標準偏差 (n=10) を示す。

※1は対照群であるA群と比較して有意差があることを示す (p<0.05)。

※2は対照群であるA群およびB群、C群、D群、E群と比較して有意差があることを示す (p<0.05)。

[0036] この結果、2週間投与後の脛骨の骨密度は、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分をマウス体重1kgあたり1mgまたは3mg投与した群、実施例品4のホエイタンパク質加水分解物をマウス体重1kgあたり2mgまたは3mg投与した群、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分と実施例品4のホエイタンパク質加水分解物を、それぞれマウス体重1kgあたり1mgと2mg同時に摂取した群では、対照群に比べ、有意に骨密度が上昇した。また、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分と実施例品4のホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取することによって、それぞれ単独で摂取した群より、有意に骨密度が上昇した。この結果から、本発明の乳由来塩基性タンパク質画分とホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取させた場合には、それぞれ単独で摂取させた場合より、相乗的に骨密度を高める効果があることがわかった。また、この骨強化作用は、乳由来塩基性タンパク質画分とホエイタンパク質加水分解物を、マウス体重1kgあたり、それぞれ最低1mgと最低2mg同時に投与した場合に認められることが明らかとなった。

[0037] [試験例2]

(動物実験)

実施例品3の乳由来塩基性タンパク質画分分解物と実施例品5のホエイタ

ソパク質加水分解物を使用して、骨強化作用について評価した。実験には51週齢のSD系雌ラットを用いた。ラットを6匹ずつ5群に分け、4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3をラット体重1kgあたり1mg（A群）、実施例品5をラット体重1kgあたり2mg（B群）、実施例品3と実施例品5を同時にラット体重1kgあたり、それぞれ1mgと2mg（C群）になるよう1日1回ゾンデで経口投与する、あるいは、いずれの実施例品も含まない溶媒である生理食塩水のみを1日1回ゾンデで経口投与（対照群）して16週間飼育した。また、4週間の回復期間の後、疑似手術を施したラットには、対照群と同様に、生理食塩水のみを1日1回ゾンデで経口投与（疑似手術群）した。投与終了後（16週目）に、ラットの右大腿骨の骨強度を骨強度測定装置（RX-1600、アイテクノ）により測定した。その結果を表5に示す。

[0038] [表5]

	大腿骨の骨破断強度 ($\times 10^6$ dyn)
疑似手術群	24.2 \pm 4.5
対照群	18.4 \pm 3.8
A群	20.6 \pm 2.5 ※1
B群	20.1 \pm 2.2 ※1
C群	23.4 \pm 2.1 ※2

数値は、平均値 \pm 標準偏差（n=6）を示す。

※1は対照群と比較して有意差があることを示す（ $p < 0.05$ ）。

※2は対照群およびA群、B群と比較して有意差があることを示す（ $p < 0.05$ ）。

[0039] この結果、実施例品3の乳由来塩基性タンパク質画分分解物または実施例品5のホエイタンパク質加水分解物をラット体重1kgあたり、それぞれ1mg、2mg経口投与した群、実施例品3の乳由来塩基性タンパク質画分分解物と実施例品5のホエイタンパク質加水分解物を、それぞれラット体重1kg

あたり 1 m g と 2 m g 同時に摂取した群では、対照群に比べ、有意に骨破断強度が上昇した。また、実施例品 3 の乳由来塩基性タンパク質画分分解物と実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取した群では、それぞれ単独で摂取した群に比べ、骨破断強度が有意に高く、その値は疑似手術群と同レベルであった。この結果から、本発明の乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を同時に投与した場合には、それぞれ単独で摂取した場合に比べ、相乗的に骨破断強度を高める効果があることがわかった。また、この骨強化作用は、乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を、ラット体重 1 k g あたり、それぞれ最低 1 m g と最低 2 m g 同時に投与した場合に認められることが明らかとなった。

[0040] [試験例 3]

実施例品 2、3 の乳由来塩基性タンパク質画または乳由来塩基性タンパク質画分分解物と実施例品 6、7 のホエイタンパク質加水分解物について、骨芽細胞増殖効果を調べた。株化骨芽細胞 (MC 3 T 3 - E 1) を 9 6 穴の平板細胞培養プレートに播種し、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 2、3、6、7 及び実施例品 2 と 6 の混合物、実施例品 3 と 7 の混合物を 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 量を測定することにより骨芽細胞増殖活性を求めた。その結果を表 6 に示す。

[0041]

[表6]

	吸光度 (450 nm)
生理食塩水	0.219 ± 0.006
実施例品 2	0.456 ± 0.010 ※1
実施例品 3	0.461 ± 0.021 ※1
実施例品 6	0.423 ± 0.027 ※1
実施例品 7	0.465 ± 0.019 ※1
実施例品 2 + 実施例品 6	0.520 ± 0.009 ※2
実施例品 3 + 実施例品 7	0.525 ± 0.004 ※2

数値は、平均値±標準偏差 (n=5) を示す。

※1 は生理食塩水と比較して有意差があることを示す (p < 0.05)。

※2 は生理食塩水、実施例品 2、3、6、7 と比較して有意差があることを示す (p < 0.05)。

[0042] この結果、培地に実施例品 2、3 の乳由来塩基性タンパク質画または乳由来塩基性タンパク質画分分解物、実施例品 6、7 のホエイタンパク質加水分解物、実施例品 2 と実施例品 6 の混合物、実施例品 3 と実施例品 7 の混合物を添加した場合、生理食塩水を培地に添加した場合に比べ、有意に骨芽細胞の増殖が促進した。また、乳由来塩基性タンパク質画及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を同時に培地に添加した場合には、それぞれ単独で添加した場合より、有意に高い骨芽細胞増殖活性を示した。この結果から、本発明の乳由来塩基性タンパク質画及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物の混合物には、それぞれ単独に比較して、相乗的な骨芽細胞の増殖促進作用があることがわかった。

[0043] [試験例 4]

実施例品 1、3 の乳由来塩基性タンパク質画または乳由来塩基性タンパク質画分分解物と実施例品 4、5 のホエイタンパク質加水分解物について、破骨細胞による骨吸収を抑制する効果を調べた。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 DMEM/F12 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1000,000 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、新しい培地へと交換した後、実施例品1、3及び実施例品4、5、実施例品1と5の混合物、実施例品3と4の混合物を溶解した溶液を10%濃度となるように添加して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（瀬野惇二ら、研究テーマ別動物培養細胞マニュアル、pp. 199-200, 1993）。その結果を表7に示す。

[0044] [表7]

	ピットの面積 (mm ²)
生理食塩水	0.671 ± 0.139
実施例品1	0.400 ± 0.080 ※1
実施例品3	0.415 ± 0.091 ※1
実施例品4	0.425 ± 0.087 ※1
実施例品5	0.419 ± 0.099 ※1
実施例品1 + 実施例品5	0.333 ± 0.061 ※2
実施例品3 + 実施例品4	0.327 ± 0.088 ※2

数値は、平均値±標準偏差 (n=5) を示す。

※1は生理食塩水と比較して有意差があることを示す (p<0.05)。

※2は生理食塩水、実施例品1、3、4、5と比較して有意差があることを示す (p<0.05)。

[0045] この結果、培地に実施例品1、3の乳由来塩基性タンパク質画または乳由来塩基性タンパク質画分解物、実施例品4、5ホエイタンパク質加水分解物、実施例品1と実施例品5の混合物、実施例品3と実施例品4の混合物を添加した場合、生理食塩水を培地に添加した場合に比べ、有意にピット的面積が減少した。また、乳由来塩基性タンパク質画及び／又は乳由来塩基性タ

ンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物を同時に培地に添加した場合には、それぞれ単独で添加した場合より、有意にピット面積が減少した。この結果から、本発明の乳由来塩基性タンパク質画及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物とホエイタンパク質加水分解物の混合物には、それぞれ単独に比較して、相乗的な破骨細胞による骨吸収を抑制する作用があることがわかった。

実施例 8

[0046] (骨強化用錠剤の調製)

表 8 に示す配合で原材料を混合後、常法により 1 g に成型、打錠して本発明の骨強化用錠剤を製造した。なお、この錠剤 1 g 中には、実施例品 1 の乳由来塩基性タンパク質画分が 25 mg、実施例品 4 のホエイタンパク質加水分解物が 50 mg 含まれていた。

[0047] [表8]

含水結晶ブドウ糖	86.0 (重量%)
実施例品 1	2.5
実施例品 4	5.0
ミネラル混合	5.0
シュガーエステル	1.0
香料	0.5

実施例 9

[0048] (骨強化液状栄養組成物の調製)

実施例品 3 の乳由来塩基性タンパク質画分分解物 25 g と実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物 50 g を 4,925 g の脱イオン水に溶解し、50℃まで加熱後、TKホモミクサー (TKROBOMICS ; 特殊機化工業社製) にて、6,000 rpm で 30 分間攪拌混合して、実施例品 3 の乳由来塩基性タンパク質画分分解物を 25 g / 5 kg と実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物含量を 50 g / 5 kg を含有する溶液を得た。この溶液 5

、 0 k g に、カゼイン 5. 0 k g、大豆タンパク質 5. 0 k g、魚油 1. 0 k g、シソ油 3. 0 k g、デキストリン 17. 0 k g、ミネラル混合物 6. 0 k g、ビタミン混合物 1. 95 k g、乳化剤 2. 0 k g、安定剤 4. 0 k g、香料 0. 05 k g を配合し、200 m l 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 CRTGN、日阪製作所製）で 121℃、20 分間殺菌して、本発明の骨強化用液状栄養組成物 50 k g を製造した。なお、この骨強化用液状栄養組成物には、100 g あたり、実施例品 3 の乳由来塩基性タンパク質画分分解物が 50 m g、実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物が 100 m g 含まれていた。

実施例 10

[0049]（骨強化用飲料の調製）

脱脂粉乳 300 g を 408. 5 g の脱イオン水に溶解した後、実施例品 2 の乳由来塩基性タンパク質画分 0. 5 g と実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物 1g を溶解し、50℃まで加熱後、ウルトラディスペンサー（ULTRA-TURRAXT-25；IKA ジャパン社製）にて、9, 500 r p m で 30 分間攪拌混合した。マルチトール 100 g、酸味料 2 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 m l のガラス瓶に充填し、95℃、15 秒間殺菌後、密栓し、本発明の骨強化用飲料 10 本（100 m l 入り）を調製した。なお、この骨強化用飲料には、100 m l あたり実施例品 2 の乳由来塩基性タンパク質画分が 50 m g と実施例品 5 のホエイタンパク質加水分解物が 100 m g 含まれていた。

実施例 11

[0050]（イヌ用骨強化飼料の調製）

実施例品 1 の乳由来塩基性タンパク質画分 1 k g と実施例品 7 のホエイタンパク質加水分解物 2 k g を 97 k g の脱イオン水に溶解し、50℃まで加熱後、TK ホモミクサー（MARK II 160 型；特殊機化工業社製）にて、3, 600 r p m で 40 分間攪拌混合して、実施例品 1 の乳由来塩基性タンパク質画分を 1 g / 100 g と実施例品 7 のホエイタンパク質加水分解物

を2 g / 100 g含有する溶液を得た。このホエイタンパク質加水分解物溶液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、本発明のイヌ用骨強化飼料100 kgを製造した。なお、このイヌ用骨強化飼料には、100 gあたり、実施例品1の乳由来塩基性タンパク質画分が100 mgと実施例品7のホエイタンパク質加水分解物が200 mg含まれていた。

請求の範囲

- [請求項1] 乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物と、ホエイタンパク質加水分解物を有効成分とする骨強化剤。
- [請求項2] 前記乳由来塩基性タンパク質画分分解物が、乳由来塩基性タンパク質画分を、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン及びパンクレアチンよりなる群から選択される少なくとも1種のタンパク質分解酵素を用いて分解したものである請求項1に記載の骨強化剤。
- [請求項3] 前記乳由来塩基性タンパク質画分が、そのアミノ酸組成中に塩基性アミノ酸を15重量%以上含有している画分である請求項1又は2に記載の骨強化剤。
- [請求項4] 前記乳由来塩基性タンパク質画分が、乳または乳由来の原料を陽イオン交換樹脂に接触させて塩基性タンパク質を吸着させ、この樹脂に吸着した画分を塩濃度0.1M～1.0Mの溶出液で溶出して得られる画分である請求項1又は2に記載の骨強化剤。
- [請求項5] 前記ホエイタンパク質加水分解物が分解率25%以上であることを特徴とする請求項1に記載の骨強化剤。
- [請求項6] 前記ホエイタンパク質加水分解物が、以下の特徴を有するものである請求項1に記載の骨強化剤。
- (A) 分子量が10kDa以下、メインピークが200Da～3kDaである。
 - (B) APL（平均ペプチド鎖長）は2～8である。
 - (C) 遊離アミノ酸含量が20%以下である。
 - (D) 抗原性がβ-ラクトグロブリンの抗原性の1/10,000以下である。
- [請求項7] 前記ホエイタンパク質加水分解物が、ホエイタンパク質をpH6～10、50～70℃において耐熱性のタンパク質加水分解酵素を用いて熱変性させながら酵素分解し、加熱して酵素を失活させて得られる

ものであることを特徴とする請求項 1 に記載の骨強化剤。

[請求項8] 前記ホエイタンパク質加水分解物が、ホエイタンパク質を pH 6～10、20～55℃においてタンパク質加水分解酵素を用いて酵素分解し、これを50～70℃に昇温させ、pH 6～10、50～70℃において耐熱性のタンパク質加水分解酵素を用いて未分解のホエイタンパク質を熱変性させながら酵素分解し、加熱して酵素を失活させて得られるものであることを特徴とする請求項 1 に記載の骨強化剤。

[請求項9] 請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の骨強化剤を含むことを特徴とする骨強化用飲食品、骨強化用栄養組成物、骨強化用飼料又は骨強化用医薬品。

[請求項10] 乳由来塩基性タンパク質画分及び／又は乳由来塩基性タンパク質画分分解物と、ホエイタンパク質加水分解物を同時に摂取することによる骨強化方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P19/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/00, A61P19/08, A61P19/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RUI, X. U., Calcium binding of peptides derived from enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate, Int. J. Dairy Technology, 2009, Vol.62, No.2, pp.170-173, Abstract, page 170, right column, page 171, right column, 1st paragraph, page 172, right column to page 173, left column, fig. 1, 6	1-9
Y	JP 2005-139084 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 02 June 2005 (02.06.2005), claims; paragraphs [0014] to [0016] (Family: none)	1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 May, 2013 (13.05.13)Date of mailing of the international search report
21 May, 2013 (21.05.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056157

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-137804 A (Morinaga Milk Industry Co., Ltd.), 14 May 2003 (14.05.2003), claims; paragraph [0006]; example 1 & WO 2003/037364 A1 & US 2004/0063633 A1 & US 2007/0031506 A1 & EP 1344530 A1	1-9
Y	JP 05-176715 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 20 July 1993 (20.07.1993), claims; paragraphs [0001], [0006] & WO 1993/012807 A1 & US 5654019 A & EP 573668 A1	1-9
Y	WO 2009/057287 A1 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 07 May 2009 (07.05.2009), entire text & US 2010/0234296 A1 & EP 2208734 A1	1-9
Y	WO 2009/057282 A1 (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 07 May 2009 (07.05.2009), entire text & US 2010/0261883 A1 & EP 2208733 A1	1-9
Y	JP 09-191858 A (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), 29 July 1997 (29.07.1997), entire text & US 5976597 A & EP 786473 A2	1-9
Y	Ichiro NAKAJIMA et al., "Gyunyu Calcium no Seitai Riyosei Oyobi Kotsutaisha ni Oyobosu Eikyo", Japanese J. Daily and Food Science, 1996, vol.45, no.1, page A9-16, entire text	1-9
Y	Takayoshi AOKI, "Functionality of bovine milk proteins", Bulletin of Japan Dairy Technical Association, 2009, vol.59, pages 15 to 28, pages 23 to page 24, left column	1-9
Y	Yukitaka SHUKUNOBE et al., "Whey Tanpaku Kasui Bunkaibutsu no Chosei to sono Seishitsu", Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai Dai 40 Kai Taikai Koenshu, 1993, page 97, 3Bp9	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/056157

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention set forth in claim 10 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P19/08(2006.01)i, A61P19/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/00, A61P19/08, A61P19/10, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	RUI, X. U., Calcium binding of peptides derived from enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate, Int. J. Dairy Technology, 2009, Vol.62, No.2, pp.170-173 Abstract、第170頁右欄、第171頁右欄第1段落、第172頁右欄—第173頁左欄、図1、図6	1-9
Y	JP 2005-139084 A (森永乳業株式会社) 2005.06.02 (ファミリーなし) 特許請求の範囲、段落【0014】—段落【0016】	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.05.2013

国際調査報告の発送日

21.05.2013

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 大輔

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

3962

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2003-137804 A (森永乳業株式会社) 2003.05.14 & WO 2003/037364 A1 & US 2004/0063633 A1 & US 2007/0031506 A1 & EP 1344530 A1 特許請求の範囲、段落【0006】、実施例1	1-9
Y	JP 05-176715 A (雪印乳業株式会社) 1993.07.20 & WO 1993/012807 A1 & US 5654019 A & EP 573668 A1 特許請求の範囲、段落【0001】、段落【0006】	1-9
Y	WO 2009/057287 A1 (雪印乳業株式会社) 2009.05.07 & US 2010/0234296 A1 & EP 2208734 A1 文献全体	1-9
Y	WO 2009/057282 A1 (雪印乳業株式会社) 2009.05.07 & US 2010/0261883 A1 & EP 2208733 A1 文献全体	1-9
Y	JP 09-191858 A (雪印乳業株式会社) 1997.07.29 & US 5976597 A & EP 786473 A2 文献全体	1-9
Y	中島一郎 他, 牛乳カルシウムの生体利用性および骨代謝に及ぼす 影響, Japanese J. Daily and Food Science, 1996, Vol.45, No.1, pp. A9-16, 文献全体	1-9
Y	青木孝良, 牛乳タンパク質の機能性, 乳業技術, 2009, Vol.59, pp. 15-28, 第23頁-第24頁左欄	1-9
Y	宿野部幸孝 他, ホエータンパク加水分解物の調製とその性質, 日 本食品工業学会 第40回大会講演集, 1993, p.97, 3B p9	1-9

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求項10に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。