

(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2017-205111

(P2017-205111A)

(43) 公開日 平成29年11月24日(2017.11.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 2 3 L 33/19 (2016.01)	A 2 3 L 33/19	2 B 1 5 0
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	4 B 0 1 8
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	4 H 0 4 5
A 2 3 K 20/147 (2016.01)	A 2 3 K 20/147	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-112166 (P2017-112166)	(71) 出願人	711002926 雪印メグミルク株式会社
(22) 出願日	平成29年6月7日 (2017.6.7)		北海道札幌市東区苗穂町六丁目1番1号
(62) 分割の表示	特願2014-527848 (P2014-527848) の分割	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
原出願日	平成24年7月31日 (2012.7.31)	(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

(57) 【要約】

【課題】安全で、日常的に摂取することにより、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飲食品又は飼料を提供することを課題とする。

【解決手段】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、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を、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0.003～0.6の範囲で含有するタンパク質素材。このようなタンパク質素材を摂取することにより、骨を強化、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を予防ならびに治療することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【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 ～ 1 5 m g ／ 1 0 0 m g 含有し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン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 . 0 0 3 ～ 0 . 6 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。

【請求項 2】

請求項 1 記載のタンパク質素材を含有する骨疾患の予防又は治療用飲食品又は飼料。

【請求項 3】

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を有効成分として含有する骨強化剤。 10

【請求項 4】

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を 5 m g ／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 記載の骨疾患の予防又は治療用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) シスタチン及び／又はシスタチン分解物を調製する工程。

3) 上記 2) の工程で調製したシスタチン及び／又はシスタチン分解物を、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 . 0 0 3 ～ 0 . 6 となるように配合する工程。 20

【請求項 6】

乳及び／又は乳原料から、シスタチン及び／又はシスタチン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 . 0 0 3 ～ 0 . 6 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シスタチン及び／又はシスタチン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 7】

さらに、アンジオジェニンとシスタチンを含む画分中のアンジオジェニン及び／又はシスタチンを酵素分解する工程を含む、請求項 6 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。 30

【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。 40

【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 50

。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品として、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。

【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シスタチンには、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）。

【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2000-281587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、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を、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、シスタチン及び／又はシスタチン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0.003～0.6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。

(2) (1) 記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材を含有する飲食品又は飼料。

(3) (1) 記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材を有効成分とする骨強化剤。

(4) (1) 記載の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材を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)記載の骨疾患の予防又は治療用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) シスタチン及び／又はシスタチン分解物を調製する工程。

3) 上記2)の工程で調製したシスタチン及び／又はシスタチン分解物を、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0.003～0.6となるように配合する工程。

(6) 乳及び／又は乳原料から、シスタチン及び／又はシスタチン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0.003～0.6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シスタチン及び／又はシスタチン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。

(7) さらに、アンジオジェニンとシスタチンを含む画分中のアンジオジェニン及び／又はシスタチンを酵素分解する工程を含む、(6)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。

【発明の効果】

【0009】

本発明の骨疾患の予防又は治療用タンパク質素材は、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、本発明の骨疾患の予防又は治療用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、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を、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シスタチン及び／又はシスタチン分解物を含む画分を、特定の範囲の質量比と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シスタチン及び／又はシスタチン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／又はシスタチンを分解した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シスタチン及び／又はシスタチン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シスタチン及び／又はシスタチ

ン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シスタチン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シスタチン及び／又はシスタチン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シスタチンを含む画分、シスタチン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シスタチン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シスタチン及び／又はシスタチン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、パパイニン、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シスタチン及び／又はシスタチン分解物以外に、 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、シスタチン及び／又はシスタチン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0.003～0.6の範囲で含有する。

後の試験例で示すが、シスタチン及び／又はシスタチン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0.003～0.6の範囲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、シスタチン及び／又はシスタチン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、シスタチン及び／又はシスタチン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

10

20

30

40

50

、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、ウルトラディスパーサーや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。

【実施例】

【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500L（pH6.7）を通液した。次に、このカラムを0.5Mの塩化ナトリウム溶液で十分に洗浄した後、1.5

10

20

30

40

50

M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5%のアンジオジェニン画分18gを得た。これら一連の処理を50回繰り返した。

【0021】

[参考例3]

(シスタチン画分の調製)

5%乳清タンパク質溶液100,000L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、カルボキシメチル化パパインをトレシルトヨパール(Tresyl-ToyopEARL、東ソー社製)に結合させた担体をカラムに充填後、0.5Mの塩化ナトリウム溶液で平衡化し、先の乳清タンパク質溶液を通液した。通液後、0.5Mの塩化ナトリウム溶液と0.1%のTween20を含む0.5Mの塩化ナトリウム溶液で順次カラムを洗浄した。次いで、20mM酢酸-0.5M塩化ナトリウム溶液でシスタチン含有画分を溶出させた。この溶出画分を直ちに1Mの水酸化ナトリウム溶液で中和した。この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してシスタチンの純度が90%のシスタチン画分9.6gを得た。これら一連の処理を20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5.30mgと参考例2のアンジオジェニン画分84.67mgと参考例3のシスタチン画分0.03mg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10mg/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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.003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5.35mgと参考例2のアンジオジェニン画分83.65mgと参考例3のシスタチン画分1.00mg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10mg/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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.1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5.65mgと参考例2のアンジオジェニン画分78.35mgと参考例3のシスタチン画分6.00mg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10mg/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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.6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5.30mgと参考例2のアンジオジェニン画分84.68mgと参考例3のシスタチン画分0.02mg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10mg/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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.002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5.68mgと参考例2のアンジオジェニン画分77.82mgと参考例3のシスタチン画分6.50mg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10mg/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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.65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、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。

10

【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髓細胞を 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(Corning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。

20

30

【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。ddymouse(7又は8週齢、雄性)の大腿骨から採取した骨髓細胞を 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)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、5ng/ml RANKL及び25ng/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、1.5mg/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100 μ l/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50 μ l/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。

40

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	陰性	陽性	陽性
比較例2	陽性	陽性	陰性

【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）400gを充填したカラム（直径4cm×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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.5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トローパーパール（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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が0.01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シスタチン分解物の質量比が0.45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。

10

20

30

40

50

〔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シスタチン分解物の質量比が 0.015 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、 α s1 カゼインと κ カゼインの分解物が含まれていた。

10

【0036】

〔比較例 3〕

参考例 3 のシスタチン画分 10 mg と実施例品 4 のタンパク質素材 100 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 1.8 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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が 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 1 g と実施例品 5 のタンパク質素材 2 g を混合して、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 2.8 g 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 39 mg / 100 mg、かつアンジオジェニン分解物に対するシスタチン分解物の質量比が 0.0025 であった。

20

【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）100 g を充填したカラム（直径 5 cm × 高さ 5 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 40 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、0.98 M の塩化ナトリウムを含む 0.02 M 炭酸緩衝液（pH 6.8）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 20 g 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 1.5 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シスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比が 0.001 であった。

30

【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 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 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。

40

【0040】

【表 2】

	骨密度 (mg / cm ³)
対照群	1 2 9 9 ± 1 0
実施例品 4	1 3 2 8 ± 1 1
実施例品 5	1 3 3 1 ± 1 2
比較例品 3	1 3 0 2 ± 1 0
比較例品 5	1 3 0 3 ± 9

10

【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]

20

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 系雄ラット 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。

【0043】

30

【表 3】

	骨密度 (mg / cm ³)
対照群	5 5 0 ± 1 0
疑似手術群	6 0 0 ± 9
実施例品 6	5 9 7 ± 1 1
実施例品 7	5 9 5 ± 1 2
比較例品 4	5 5 6 ± 1 3
比較例品 5	5 5 4 ± 1 1

40

【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]

50

【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、TKホモミクサー(TK ROBO MICS; 特殊機化工業社製)にて、6000rpmで30分間攪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-4CR TGN、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。

10

[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、ウルトラディスペーサー(ULTRA-TURRAX T-25; IKAジャパン社製)にて、9500rpmで30分間攪拌混合した。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、攪拌混合した後、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。

20

[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、ウルトラディスペーサー(ULTRA-TURRAX T-25; IKAジャパン社製)にて、9500rpmで30分間攪拌混合した。マルチトール100g、還元水飴20g、香料2g、脱イオン水166g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。

30

[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(MARK II 160型; 特殊機化工業社製)にて、3600rpmで40分間攪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。

40

[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%

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 L 33/18 (2016.01)	A 2 3 L 33/18	
C 0 7 K 1/14 (2006.01)	C 0 7 K 1/14	
C 0 7 K 14/51 (2006.01)	C 0 7 K 14/51	

(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

F ターム (参考) 2B150 AB10 AE13 BA01 BB03 BB04 BD06 CB06 CC11 CJ07 CJ08
DC14 DC23 DE01 DH35
4B018 LB08 LB10 MD20 MD71 ME05 MF12
4C084 AA02 AA03 BA01 BA21 BA43 BA44 CA17 CA38 MA52 NA06
NA10 NA14 ZA961 ZA962 ZA971 ZA972
4H045 AA30 BA10 CA43 DA56 DA89 EA20