

# 牛乳乳清タンパク質・ペプチドとカルシウムによる

## メタボリックシンドローム予防改善作用

岐阜大学応用生物科学部 長岡 利

### 要 約

1. 高脂肪食摂取の C57BL6J マウスにおいて、高カルシウム (Ca) 含有乳清タンパク質摂取群は高 Ca 含有カゼイン摂取群と比べて、血清トリグリセリド値 と血清 LDL+VLDL コレステロール値を有意に低下させた。つまり、乳清タンパク質はメタボリックシンドロームの指標である LDL-コレステロールや トリグリセリド代謝改善作用を発揮することを明らかにした。さらに、高 Ca 含有乳清タンパク質摂取群は高 Ca 含有カゼイン摂取群と比べて体脂肪は減少傾向を示した。高 Ca と乳清タンパク質の同時摂取は肥満モデルマウスの 脂質代謝に対し、統計学的に有意な好ましい変化を与えることを明らかにした。
2. 牛乳乳清タンパク質からのコレステロール代謝改善ペプチドの効率的探索・評価のためのラクトスタチンの標的分子を特定した結果、HNF4 が標的分子である可能性が示唆された。
3. コレステロール代謝改善作用を有するラクトスタチン (IIAEK) は細胞間隙経路 を介して、腸で吸収される可能性があることを明らかにした。

キーワード：メタボリックシンドローム、肥満、高脂血症、コレステロール、トリグリセリド、乳清タンパク質、ラクトスタチン、カルシウム

### 結 論

日本の人口は戦後爆発的に増加し、2007 年を境に人口の増加から減少に転じている。人口の内訳も 65 歳以上の高齢者が 5 人に 1 人を占めるという先進諸国の中でも特に著しい高齢化社会を迎えている (1)。高齢者が健康に生きていくためには若年層からの生活習慣の蓄積によって起因する疾病である「生活習慣病 (life-style related disease)」の予防が不可欠である。生活習慣病は食生活、運動、ストレス、喫煙、飲酒といった生活習慣の蓄積によって生じるものであるが、生活習慣病と一口に言ってもその病態は極めて多様であり、その中でも近年問題となっているのが肥満症である。肥満症の定義とは「BMI (Body Mass Index) が 25 以上のもののなかで、肥満に起因ないしは関連する健康障害 (2 型糖尿病、脂質代謝異常、高血圧を含む 10 項目) を合併するか、その合併が予測され、医学的に減量を必要とする病態、ならびに BMI25 以上のもののなかで上半身肥満

が疑われ、臍部 CT 検査によって確定診断された内蔵型脂肪型肥満となっているもの」である (2)。定義にもある通り、肥満症は糖尿病、高脂血症、高血圧などの疾病を併発しやすく、これらを併発した状態は「死の四重奏」と呼ばれ、心筋梗塞、脳卒中を誘発する可能性が 10 倍以上に膨らむとされている。

細胞レベルにおける肥満とは中性脂肪 (トリグリセリド) が細胞内に異常に蓄積した結果、脂肪細胞の肥大した状態であり、肥大脂肪細胞はインスリン抵抗性を惹起する。一口に脂肪細胞といってもその存在部位や機能に違いがあり、脂肪細胞が実は数多くのサイトカインやホルモンを発現し分泌する内分泌臓器であることが過去の研究によって明らかにされてきた。現在では、レプチン、アディポネクチン、TNF- $\alpha$ 、レジスチンをはじめとするアディポサイトカインと病態との関連が明らかにされ、その中でも TNF- $\alpha$ 、レジスチンはインスリン抵抗性惹起性のサイトカインや生理活性分子を過剰分泌することが示されている。インスリン抵抗性の状態では脂肪細胞からの脂肪動員抑制作用も低下するので脂肪組織からの脂肪酸放出が高まる (3)。また、リポタンパク質の加水分解を担う酵素であるリポタンパク質リパーゼの活性も低下するため、動脈硬化惹起性の強いトリグリセリド高含有リポタンパク質が血中に停滞して高脂血症を遷延する。一方、高インスリン血症は肝臓における脂肪酸合成の鍵を担う転写因子、SREBP1-c を活性化して肝臓でのトリグリセリド合成や VLDL の放出を促進し、高脂血症を増悪させるのである。これらより、インスリン抵抗性を誘発する肥満の予防が重要であることは明らかである (4)。

肥満症の減少のために、厚生労働省は平成 12 年に「21 世紀における国民健康づくり運動 (健康日本 21)」という、従来にも増して健康を増進して、発病を予防する「一次予防」に重点を置いた対策を推進している (5)。肥満症が、「一次予防」の第一に挙げられる栄養・食生活に大きく依存していることは疑いのないことであり、以前にもまして食品が持つ生体の防御や恒常性を保つ上での種々の新しい機能 (三次機能) に関心が集められている。

そのような背景から、現在までに様々な食品の抗肥満作用に対する研究がされてきた。脂肪細胞へのトリグリセリドの蓄積を予防する食品として近年、脚光を浴びているのがカルシウムである。1988 年から 1994 年に米国保健省の機関である National Center for Health Statistics (NCH) が実施した第三回米国全国健康・栄養調査 (National Health and Nutrition Examination Survey III ; NHANESIII) からのデータで、以下のことが示された。調査した女性の 380 人の年齢、エネルギーレベル、活動レベル、人種および民族性を調整した後、体脂肪が高い人の割合は、カルシウム摂取量の最も少ないグループ (平均 255mg/日) を 1.0 とすると、カルシウム摂取量の最も多いグループ (平均 1346 mg/日) では 0.16 という割合であった。カルシウム摂取量に依存して高い体脂肪の人の割合は減少しており、男性においても同様な逆相関は認められている (6)。また、Maruques らは Portuguese Health Interview Survey 1998-1999 を用いて、18 歳以上の計 37513 人の男女の乳製品の摂取量と BMI について調査した<sup>7)</sup>。その結果、男性と 55 歳以下の女性で乳製品を多く摂取した人の肥満や過体重の人の割合は普通の体重の人の割合よりも低下しており、これより、カルシウ

ム摂取量の増加が BMI と負の相関があることを提案している。

これらの疫学調査により、カルシウム摂取量が体脂肪を減少させる可能性があることが示唆され、この結果を支持する研究が *in vitro*、*in vivo* の両方で報告されている。2000 年に Zemel らはヒトの細胞とマウスの研究から、カルシウムの重要性を提案している (7)。彼らはヒトの皮下脂肪組織から採取した脂肪細胞において、甲状腺ホルモンと 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、それに伴い脂肪分解の抑制を刺激していることを明らかにし、aP2-agouti トランスジェニックマウスを用いて、Ca による抗肥満作用を報告している。aP2 とは細胞内脂肪酸結合タンパク質 (FABPs) ファミリーに属し (8)、白色及び褐色脂肪細胞のサイトゾルに発現する脂肪酸結合タンパク質である (9)。aP2-agouti トランスジェニックマウスは aP2 プロモーターのコントロール下で脂肪組織における agouti 遺伝子を発現するマウスである。この特別なマウスは通常の固形飼料を与えているときには肥満になることはなく、高脂肪・高炭水化物食を与えたときに脂肪組織が著しく発達し食事性肥満を引き起こすのである。高カルシウム濃度である 1.2 % の食餌を 6 週間与えたとき、マウスの体重の減少、体温の上昇、脂肪組織重量の減少、インスリン抵抗性の改善、脂肪酸合成酵素の減少、グリセロール放出量の増加がなされたのである。

しかし、全ての研究でカルシウムの抗肥満作用が示されているわけではなく、Zhang らは食事性カルシウムとラットの体重増加量には影響がないことを報告している (10)。彼らの研究では CaCO<sub>3</sub> を単一のカルシウム源としてカルシウムだけの抗肥満作用を評価したものである。Sprague-Dawley ラットに低濃度、通常濃度、高濃度のカルシウム食をそれぞれ 10 週間飼育したときに肥満にさせたラットでは食餌摂取量、体重増加量、屠体中の脂肪の割合には影響しないという結果を報告した。

またカルシウムの抗肥満作用を評価する際にカルシウムの供給源として乳製品が用いられているケースが多くあり、それらの研究の中ではカルシウムを単一で与えるよりも優れた抗肥満作用を示している (11-15)。これらの結果は、乳製品の中にも肥満を抑制させるような生理活性物質が含まれているか、または、カルシウムの抗肥満作用を増強させる物質の存在が示唆されている。

乳製品のタンパク質の中で特に注目をされているのは乳清タンパク質である。乳中のタンパク質のおおよそ 80 % はカゼインが占め、20 % は乳清タンパク質が占めている。乳清タンパク質は栄養面で優れたタンパク質であり、そのタンパク質および分解物（ペプチド）には鎮静・鎮痛作用、コレステロール低下作用、血圧上昇抑制作用、免疫調節作用など様々な生理機能が報告されている (16-18)。Belobrajdic らは Wistar ラットで赤肉を摂取させた群と比較して乳清タンパク質を摂取させた群では体重増加を抑制し、体脂肪量を減少させたという報告をした (19)。

ところで乳清タンパク質の研究は単にその生理活性の発現機構を解明するためだけに行われているのではなく、以下に述べるような状況から、乳清タンパク質の高度有効利用という意味においても、非常に価値のある研究であるといえる。乳清は、チーズ及びカゼイン製造の副産物として、用いた牛乳の 70 ~ 85 % 産生される（1987 年において世界の乳清生産量は約 1 億 1 千万トンにも達している）が、従来その大半はそのまま捨てられたり、あるいは飼料となっており、食糧

として用いられているのはごくわずかでしかなかった。チーズ製造量の多い欧米では、乳清の利用は経済的にも重要な問題であったが、固形分が6%程度と少なく、固形分中、乳糖が約70%、無機成分も約9%以上と高い難点があり、しかも保存性が悪く、用途、使用量が制限されるため活発な利用はされていなかった。しかし、乳清中の各成分の栄養・生理的意義、物理的性質などの研究が進み、多くの分野で工業化、利用されるようになってきた。特に最近では、乳清の廃棄による水質汚濁、環境汚染、さらに食料資源不足問題から、積極的に乳清から資源を回収して利用しようという気運が世界的に高まっている。加えて、最近の技術の進歩、たとえば、イオン交換樹脂などによる脱塩、限外濾過法、逆浸透法、ゲル濾過法などによる各成分の分画、濃縮などが可能になってきたため、乳清成分の利用を促進させている。しかしながら、まだその利用は十分であるとは言いがたい。

以上のような背景から、カルシウム濃度（高濃度、通常濃度）とタンパク質源（乳清タンパク質、カゼイン）の異なる計4つの食餌から、カルシウムと乳清タンパク質の脂質代謝に与える相互作用を、高脂肪食の摂取によって肥満を引き起こす C57BL/6J 系マウスを用いて検討した。C57BL/6J マウスは肥満遺伝子である ob 遺伝子の 105 番目のアミノ酸（アルギニン）が停止コドンに変換するナンセンス変異（Arg 105 Stop）により、正常に機能する成熟型レプチンが脂肪組織において生合成・分泌されないために“もう食べなくてもよい”というシグナルが視床下部に伝達されず、顕著な肥満に至るのである (20)。

ところで、メタボリックシンドローム（metabolic syndrome、代謝症候群）とは、内臓脂肪型肥満（内臓肥満・腹部肥満）に高血糖・高血圧・高脂血症のうち2つ以上を合併した状態をいうわけであり、上述のような肥満改善作用だけではなく、動脈硬化症の最大の危険因子である高コレステロール血症などの高脂血症の予防改善作用の研究も極めて重要である。

高コレステロール血症、動脈硬化症予防・改善のための多くの医薬品・食品の登場、社会的関心とは裏腹に、現在でも WHO の統計では、世界の死因の第1位は、依然として心臓血管疾患であり、決定的な動脈硬化症の解決策は残念ながら現在もない、というのも厳然とした事実である。高コレステロール血症制圧は動脈硬化症制圧に繋がります。このような背景から、食物繊維、大豆タンパク質などが研究されてきた (21)。しかし満足できる成分が発見されていないことは、上記の事実からも明白である。つまり、従来から世界中で研究されてきた大豆タンパク質や食物繊維などの従来の食品や医薬品では、体内に余分に蓄積したコレステロールや摂取したコレステロールを超効率的に体外排出させることや、高コレステロール血症の予防治療は実現困難である。また、そのための理論・技術も未成熟である。したがって、コレステロール代謝を改善するための革新的な理論・技術が切望されている。

血清コレステロールを低下させるタンパク質に関する研究は、90年以上前から行われてきた。90年以上の長い間誰も発見できなかったコレステロール代謝改善ペプチド（ラクトスタチン：IIAEK、私はIIAEKを牛乳から発見したので、ラクトスタチン（lactostatin）と命名しました）を

長岡らは世界で初めて、乳清タンパク質から発見した (17)。しかも、驚くべき事に、その作用は医薬品の $\beta$ -シトステロール (植物ステロール) よりも強力である。

ところで、体内のコレステロール分解は、肝臓のコレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素 (CYP7A1) を律速酵素とする経路にのみ依存している。したがって、CYP7A1 のマウスでの過剰発現により、動脈硬化症や高コレステロール血症が改善されることが知られている (22)。つまり、CYP7A1 の活性化により、動脈硬化症や高コレステロール血症が改善可能である。CYP7A1 の活性化物質 (天然物を含む) は動脈硬化症や高コレステロール血症改善のための機能性食品素材・医薬品となる可能性が高いわけである。しかし、従来は、CYP7A1 の活性化剤は、転写因子 LXR のリガンドである 22-ヒドロキシコレステロールなどの酸化コレステロールや合成薬剤 LG268 であり、副作用でトリグリセリドを増加させるため活用不可能である (23)。つまり、残念ながら有用な CYP7A1 活性化剤は未発見である。

特筆すべきことに、ラクトスタチンの標的遺伝子が CYP7A1 であることをマウスで特定した (24)。これまでのところオリゴペプチドの媒介するコレステロール分解調節系に関する報告はない。長岡らはラクトスタチンがヒト肝臓由来培養細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子を転写活性化し、コレステロール分解を促進することを発見した (18)。この CYP7A1 活性化は MAP キナーゼ、カルシウム (Ca) チャンネル、Ca カルモジュリンキナーゼなどの阻害剤で完全に防止されました。ERK のリン酸化や細胞内 Ca の上昇も発見した。よって、人間の肝臓には Ca チャンネルに関連した MAP キナーゼ依存型の新しいコレステロール分解調節系が存在すると考えられる (18)。また前述のように、CYP7A1 遺伝子 (コレステロール分解調節系) とコレステロール代謝改善作用はたいへん密接に関連することから、ラクトスタチンと CYP7A1 遺伝子 (コレステロール分解調節系) との関連性を解明することは、乳清ペプチドなどのペプチド混合物から新しいコレステロール代謝改善作用を発揮するペプチドを効率的に探索・評価する方法の創成に繋がるため、たいへん興味深いと考えた。そこで、本研究では CYP7A1 遺伝子の転写活性を指標にして、ラクトスタチンに応答する標的分子を特定することを試みた。

さらに、乳タンパク質・ペプチドのメタボリックシンドローム予防改善作用がどのような活性成分により発揮されるのかを考える時に、ペプチドの腸管での吸収機構解明は重要である。つまり、腸管から血液中にどんなペプチドがどの程度移行するのかは、活性成分の特定や機構解明に必須である。そこで、コレステロール代謝改善ペプチドであるラクトスタチン (IIAEK) が腸管でそのままの形で吸収されるのかどうか、もしも吸収されるとすればどのような吸収経路を介して吸収されるのかを、腸のモデルであるヒト培養細胞である Caco-2 で検討した。

これまで述べてきたように、本研究の遂行による乳清タンパク質・ペプチドのメタボリックシンドローム予防改善作用の作用機構、活性評価法、活性成分などが解明できれば、牛乳はもちろん、乳タンパク質・ペプチドなどを含んだ種々の乳製品の新たな需要の開発を促進することにも繋がるものと確信している。

## 実験方法

### [1] 実験 1

乳清タンパク質とカゼインのメタボリックシンドローム改善作用について、食餌中 Ca 含量が高い場合と低い場合で比較研究した。

初体重 21 ~ 25 g 前後 (8 週齢) の C57BL/6J 系雄マウス (日本エスエルシー株式会社) に市販の固形飼料 (MF; オリエンタル酵母工業株式会社) を 3 日間与え、体重に有意な差が生じないように 8 匹ずつ 4 群に分けた。実験群として以下のように分けた。

- ①HC 群 (High-Ca Casein) : 高 Ca (1.5 %) でカゼインをタンパク質源とした食餌
- ②HW 群 (High-Ca WPI) : 高 Ca (1.5 %) で乳清タンパク質分離物 (WPI) をタンパク質源とした食餌
- ③NC 群 (Normal-Ca Casein) : 通常 Ca (0.5 %) でカゼインをタンパク質源とした食餌
- ④NW 群 (Normal-Ca WPI) : 通常 Ca (0.5 %) で乳清タンパク質分離物 (WPI) をタンパク質源とした食餌

食餌組成は別紙 1 に示した。また、実験 1 では、カゼイン (タンパク質純度 87.5 %) と WPI (タンパク質純度 94.3 %) を使用した。カゼインまたは乳清タンパク質分離物 (WPI) を食餌性タンパク質とする高脂肪食をマウスに自由摂取させ、70 日間飼育した。食餌摂取量の測定は毎日行った。解剖前の絶食は 15 時 ~ 翌 9 時までの 18 時間行い、飼育 70 日目にマウスをエーテル麻酔下で心臓採血により屠殺して血液を採取し、肝臓、脂肪組織を摘出した。

血清は血液を遠心分離 (3000rpm、15 分間) する事により得て、血糖値、脂質の分析まで -30°C で凍結保存した。得られた血清より血糖値を測定した。血清脂質は総コレステロール値と HDL - コレステロール値、血清トリグリセリド値を測定し、総コレステロール値から HDL - コレステロール値を引いたものを LDL+VLDL コレステロール値として算出し、総コレステロール値から HDL - コレステロール値を引いた値を HDL - コレステロール値で割ったものを動脈硬化指数 (Atherogenic index) として算出した。

肝臓は 0.9 % NaCl 溶液で洗浄後、湿重量を測定し、肝臓脂質分析用に各々 0.7 g を秤量して脂質の分析まで -30°C で凍結保存した。肝臓の残りは -30°C に凍結保存した。肝臓脂質は抽出した脂質から肝臓総脂質と肝臓コレステロール値、肝臓トリグリセリド値を測定した。

精巢上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腹膜脂肪組織は 0.9 % NaCl 溶液で洗浄後、湿重量を測定した。

なお、結果の統計学的分析には、ダンカン多重範囲検定と、HC 群をコントロールとしたスチューデントの t 検定を併用した。

### [2] 実験 2

コレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素 (CYP7A1) 遺伝子の転写活性を指標にして、ラクトスタチンに



ゼ活性を測定した。また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を $\beta$ -Gal ELISA kit (Promega) を用いて測定した。ルシフェラーゼ活性を Relative Light Units (RLU) として表し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で標準化した。

### [3] 実験3

コレステロール代謝改善作用を有するラクトスタチン (IIAEK) の吸収機構を腸モデルである Caco-2 細胞で検討した。今回は細胞間隙輸送による経路について検討した。

具体的には、タイトジャンクションを開く物質である Cytochalasin D を用いて、透過性膜上に培養した Caco-2 細胞における IIAEK 吸収量を検討し、細胞間隙輸送による経路を IIAEK が介しているかどうかを調べた。なお、図1に腸管上皮細胞層におけるオリゴペプチドの吸収経路を示した。

具体的には、下記のような方法で実験した。

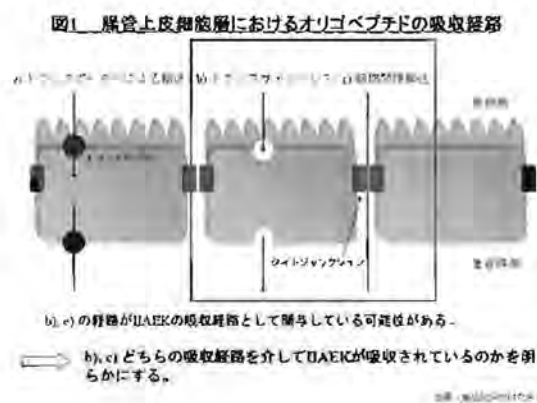
第1日目、10% FBS 含有 DMEM を用いて 6-well transwell plate の upper chamber に Caco-2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/well の条件でまき、lower chamber には 10% FBS 含有 DMEM を加え、CO<sub>2</sub> インキュベータの中で 15 日間培養して分化 Caco-2 細胞とした。第3、5、7、9、11、13 日目に培地交換を行った。

第15日目、培地を吸引除去して、Hank's balanced salt solution (HBSS) (pH 7.4) を upper chamber と、lower chamber にそれぞれ加え well を洗い、upper chamber に HBSS を、lower chamber に HBSS を加え、CO<sub>2</sub> インキュベータの中で 30 分インキュベートした。30 分後、0.1% DMSO、0.5 $\mu$ g/ml Cytochalasin D working solution を各 upper chamber、lower chamber に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータの中で 30 分インキュベートした。30 分後、0.1% DMSO (2mM IIAEK 含有)、0.5 $\mu$ g/ml Cytochalasin D working solution (2mM IIAEK 含有) を各 upper chamber、lower chamber に添加し、CO<sub>2</sub> インキュベータの中で 60 分インキュベートした。IIAEK 添加から 60 分後、upper chamber 内の溶液を吸引除去して、lower chamber 内の溶液 (basolateral 溶液) を 15ml チューブに回収して氷中保存した。各チューブから 0.5ml を 1.5ml エッペンドルフチューブに分注し、-80 $^{\circ}$ C で凍結し保存した。basolateral 溶液中に含まれる IIAEK 量を LC/MS/MS で測定した。

## [結果]

### [1] 実験1

結果は別紙2~4に示した。70日間の飼育期間を通じ食事摂取量、体重増加量には群間で有意な変化は観察されなかった。解剖時に摘出した肝臓重量はどの群においても有意な差はなかつ





た。脂肪組織重量 (精巣上体脂肪組織、腎周囲脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腹膜脂肪組織) においては HC (高 Ca カゼイン) 群と比べ HW (高 Ca 乳清タンパク質) 群で低下傾向を示したが、NC (低 Ca カゼイン) 群と比べた NW (低 Ca 乳清タンパク質) 群では上昇傾向を示した。

飼育 70 日目の血清コレステロール値は HC 群と比べて HW 群で低下傾向を示した。NC 群、NW 群間では有意な変化はなかった。血清 LDL + VLDL-コレステロールは HC 群と比べて HW 群で有意に低下した。血清トリグリセリド値は HC 群と比べて HW 群で有意に低下した。HC 群、NC 群間では変化はなかったが、NC 群と比較して NW 群で低下傾向を示した。血糖値は HC 群と比較して HW 群で上昇傾向を示し、NC 群と比較して NW 群でも上昇傾向を示した。

## [2] 実験 2

実験結果は図示し、結果①に示した。CYP7A1 遺伝子プロモーターの-144~-126 の領域の 19 base の除去した変異体 4 (m4) を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、肝臓特異的転写因子 HNF4 が結合する領域である M4 の欠損により、CYP7A1 遺伝子転写活性は顕著に低下し、ラクトスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性の上昇も消失した。よって、ラクトスタチンによるコレステロール代謝改善作用は、HNF4 が重要な役割を担っていることが明らかにされた。

牛乳乳清タンパク質からのコレステロール代謝改善ペプチドの効率的探索・評価のためのラクトスタチンの標的分子をコレステロール7 $\alpha$ -水酸化酵素(CYP7A1) 遺伝子の転写活性を指標にして特定した結果、HNF4 が標的分子であることを明らかにした。

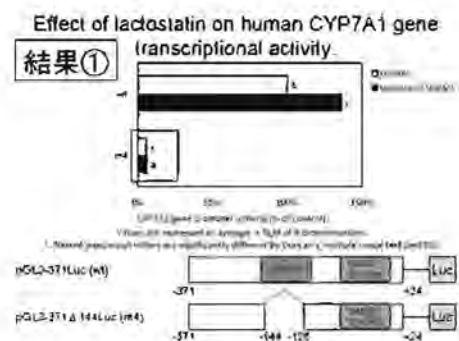
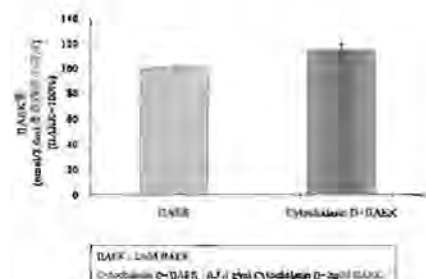


図2 基底膜側の溶液に含まれるIIAEEK



## [3] 実験 3

実験結果は、図 2 に示した。すべての basolateral 溶液から IIAEK を検出した。IIAEEK 吸収量は、IIAEEK のみと比較して、タイトジャンクションを開く物質である Cytochalasin D の添加により、約 15% 上昇し、上昇傾向を示した。なお、IIAEEK のみを処理した群での IIAEK の吸収率は、13.3% と求められた。

コレステロール代謝改善作用を有するラクトスタチン (IIAEEK) の吸収機構を腸モデルである Caco-2 細胞で検討した。その結果、ラクトスタチン (IIAEEK) は細胞間隙経路を介して、腸で吸収される可能性があることを明らかにした。

## [考 察]

今回の研究では、カルシウムと乳清タンパク質（WPI）を肥満マウスに摂取させた場合の脂質代謝改善作用について検討した。WPIを高カルシウム濃度（1.5%）の食餌と通常のカルシウム濃度（0.5%）の食餌のタンパク質源とし、マウスに70日間自由摂取させたところ、カゼインをタンパク質源としたそれぞれのカルシウム濃度の対照と比較して、総食餌摂取量と体重増加量では群間で有意な差は見られなかったが、WPIをタンパク質源とした高カルシウム食の摂取で血清トリグリセリド値、血清LDL + VLDL コレステロール値は有意に低下した。肝臓中のトリグリセリド値は有意な差はないが、体脂肪組織重量では有意ではないが低下傾向を示した。これらの結果より、WPIと高カルシウム食の摂取の相互作用により、マウスの脂質代謝へ影響を与えることが明らかになったが、既報（6、25）のような乳製品とカルシウムの抗肥満作用はないことが示唆された。

Pilviらは、WPIをタンパク質源とした1.8%の高カルシウム食を肥満モデルマウスに21週間与えたときに、総食餌摂取量に有意な差はなく、体重増加量、体脂肪、血清総コレステロール値を有意に減少させたと報告している（25）。これらの有意な減少は、今回の我々の行った結果からは得られず、逆に我々の実験結果から得られた血清トリグリセリド値の有意な低下はPilviらの結果からは得られていなかった。これらの異なった結果の原因としては、食餌中のカルシウム濃度と飼育期間の違いが関係している可能性がある。カルシウム濃度は本研究では1.5%のカルシウム濃度であるが、Pilviらの研究では1.8%であり、飼育期間も彼らが行った期間の半分ほどである。これら実験条件の違いにより、同様の結果が得られなかった可能性が考えられ、今後詳細な検討が必要である。

これまで乳製品に含まれるカルシウム摂取量とBMIについての疫学調査はすでに様々な地域で行われており、その中には乳製品の摂取量とBMIに負の相関があるという報告はされている。しかし、行われた疫学調査の全てで同様な負の相関が得られたわけではない。Murakamiらの行った調査のようにカルシウムまたは乳製品とBMIに何の相関関係も持たない報告も出されているのである（26）。彼らの行った研究では日本の18歳から20歳の女子学生1905人の乳製品またはカルシウム摂取量とBMIについて調査した結果、これまで報告されてきたカルシウムや乳製品の摂取量が多い人ほどBMIが低いという負の相関を支持しないことが明らかにされた。

Zemelらは乳製品とカルシウムの抗肥満作用をaP2-agoutiトランスジェニックマウスを用いて報告している（6）。彼らの研究では1.2%のカルシウム濃度の食餌を6週間与えたときにおけるマウスの体重増加量や体脂肪の有意な減少といった肥満抑制作用を示しているが、トランスジェニック動物でない他のげっ歯類でも確認できるかどうかは疑問である。aP2-agoutiトランスジェニックマウスはカルシウム代謝に影響する遺伝子の欠損があるため、カルシウム濃度を変化させるといった操作に非常に敏感な動物である。また、彼らは食事性カルシウムの脂肪合成を調節するメカニズムを次のように説明している。食事性カルシウムの増加は、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモ

ン、1,25- (OH) <sub>2</sub>D<sub>3</sub> が脂肪細胞内でのカルシウム濃度を上昇させて脂肪分解の活性化と遊離脂肪酸合成酵素の発現の抑制をし、また、脂肪組織の脱共役タンパク質 (UCP2) の発現の増加と熱産成増加を引き起こす、という機序である。しかし、Pilvi らの行った研究結果が示すように、副甲状腺ホルモンと 1,25- (OH) <sub>2</sub>D<sub>3</sub> の有意な低下は必ず体脂肪の低下に繋がるわけではないことが明らかになっており、Zemel らの示す機序が確かであると考えすることはできない。

ここで興味深い報告がある。Zhang らは高濃度のカルシウム食を 10 週間飼育したときに通常ラットでは体重増加量の抑制作用がみられるが、肥満にさせたラットでは肥満抑制作用はないことを示している (10)。彼らの考察によると、体重増加量では有意な減少を示したものの、最終体重においては有意な差はなく、また同様に行ったマウスを用いた実験では同じ結果にならなかったこと、カルシウムの濃度に依存していない点、肥満にさせたラットではなく通常ラットで体重増加量が抑制されたこと、またラット体内の組成中におけるタンパク質の比率が減少していることを挙げ、カルシウムの抗肥満作用を疑問視した見解を示している。彼らの結果は高カルシウム食では脂肪蓄積に特異的に働いているわけではなく、動物の体の成長を遅らせることで体重増加量を減少させているという考えを提案している。これらの報告により、カルシウムと乳清タンパク質を含んだ乳製品の摂取量の増加は肥満抑制作用を持つ可能性はあるが、抗肥満作用を確認するためには特殊な条件が必要であることが示唆された。

今回の研究から、たいへん興味深いことに、カルシウムと乳清タンパク質 (WPI) の相互作用は肥満モデルマウスの脂質代謝、特に血清トリグリセリド濃度や LDL-コレステロールなどのメタボリックシンドロームの指標に統計学的に有意な好ましい影響を与えることを明らかにした。しかし、その作用機序については不明であり、既報 (25) に報告されている顕著な体重増加量減少や体脂肪減少などの抗肥満作用を示すには至らなかった。その理由として、動物の飼育期間の違いはあるものの、文献 (25) の食餌組成において、重要な食餌中 Ca 含有量の計算根拠の記述がなく、再現性困難な調製法であり、問題があると考えられる。今後の詳細な再検証が望まれる。

また、今回の研究において、牛乳乳清タンパク質からのコレステロール代謝改善ペプチドの効率的探索・評価のためのラクトスタチン (IIAEK) の標的分子をコレステロール 7 $\alpha$ -水酸化酵素 (CYP7A1) 遺伝子の転写活性を指標にして特定した結果、HNF4 が標的分子である可能性が示唆された。これまで長岡らは、ラクトスタチンがヒト肝臓由来培養細胞 HepG2 において、CYP7A1 遺伝子を転写活性化し、コレステロール分解を促進することを発見した (18)。この CYP7A1 活性化は MAP キナーゼ、カルシウム (Ca) チャンネル、Ca カルモジュリンキナーゼなどの阻害剤で完全に防止されました。ERK のリン酸化や細胞内 Ca の上昇も発見した。したがって、ラクトスタチンの情報が肝臓特異的転写因子である HNF4 に、Ca チャンネルによる細胞内への Ca 流入、Ca カルモジュリンキナーゼによるリン酸化、ERK のリン酸化により情報が伝達され、CYP7A1 遺伝子転写活性化をもたらし、最終的にコレステロール分解を促進することにより、コレステロール低下作用を発揮するという新しい機構が存在することが示唆された。今後さらなる分子遺伝子レ

ベルでの解明が必要である。さらに、これらの新しい情報伝達機構の解明により、乳清ペプチドなどから、コレステロール代謝改善ペプチドを探索・評価する新規評価系を構築できるものと期待する。

さらに、今回の研究において、コレステロール代謝改善作用を有するラクタスタチン (IIAEK) の吸収機構を腸モデルである Caco-2 細胞で検討した。その結果、ラクタスタチン (IIAEK) は細胞間隙経路を介して、腸で吸収される可能性があることを明らかにした。従来、オリゴペプチドは3残基のトリペプチドまでが腸管吸収の限界であるというのが常識であるが、今回の成果から、IIAEK のようなペントペプチドがそのままの形で吸収される点を明らかにした点は注目に値する。今後、より詳細な IIAEK の吸収機構を培養細胞だけではなく、動物実験などの *in vivo* で検討する必要があると考える。

## [参考文献]

1. 国立社会保障・人口問題研究所「日本の将来推計人口（平成18年12月推計）中位推計」
2. 片岡邦三：肥満研究, 9, 3 (2003)
3. 益崎裕章, Jeffrey S. Flier : 実験医学, 20, 1754-1761 (2002)
4. Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S. and Goldstein, J. L. : Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell* 6, 77-86 (2000)
5. 厚生労働省：21世紀における国民健康づくり運動（健康日本21）
6. Zemel, M. B., Shi, H., Greer, B., Dirienzo, D. and Zemel, P. C. : Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J.* 14, 1132-1138 (2000)
7. Marques-Vidal, P., Goncalves, A. and Dias, C. M., : Milk intake is inversely related to obesity in men and young women: data from the Portuguese Health Interview Survey 1998-1999. *Int. J. Obes.* 30, 88-93 (2006)
8. Bernlohr, D. A., Simpson, M. A., Hertzler, A. V. and Banaszak, L. J. : Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 277-303 (1997)
9. Bernlohr, D. A., Doering, T. L., Kelly, T. J. and Lane, M. D. : Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 850-855 (1985)
10. Zhang, Q. and Tordoff, M. G. : No effect of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R669-R677 (2004)
11. Parra, P., Bruni, G., Palou, A. and Sera, F. : Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J. Nutr. Biochem.* 19, 109-117 (2008)

12. Zemel, M. B. and Sun, X. : Dietary calcium and dairy products modulate oxidative and inflammatory stress in mice and humans. *J. Nutr.* 138, 1047-1052 (2008)
13. Sun, X. and Zemel, M. B. : Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in ap2-agouti transgenic mice. *J. Nutr.* 134, 3054-3060 (2004)
14. Shi, H., Dirienzo, D. and Zemel, M. B. : Effect of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted ap2-agouti transgenic mice. *FASEB. J.* 15, 291-293 (2001)
15. Papakonstantinou, E., Flatt, W. P., Huth, P. J. and Harris, R. B. : High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes. Res.* 11, 387-394 (2003)
16. 桑久枝, : 乳清タンパク質および乳清タンパク質トリプシン分解ペプチドの ConA 誘発肝炎発症抑制作用－DNA マイクロアレイによる解析－. *ILSI*, 83, 9-17 (2005)
17. Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K. and Kuwata, T. : Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 11-17 (2001)
18. Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y. and Nagaoka, S. : A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 697-702 (2007)
19. Belobrajdic, D. P., McIntosh, G. H. and Owens, J. A. : A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in Wistar rats. *J. Nutr.* 134, 1454-1458 (2004)
20. 益崎裕章, 小川佳宏, 中尾一和 : 医学のあゆみ, 184, 567-571 (1998)
21. Kerckhoffs, D. A. J. M., Brouns, F., Hornstra, G. and Mensink, R. P. : Effects of the Human Serum Lipoprotein Profile of  $\beta$ -Glucan, Soy Protein and Isoflavones, Plant Sterols and Stanols, Garlic and Tocotrienols. *J. Nutr.* 132, 2494-2505 (2002)
22. Spady, D. K., Cuthbert, J. A., Willard, M. N. and Meidell, R. S. : Adenovirus-mediated Transfer of a Gene Encoding Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase into Hamsters Increases Hepatic Enzyme Activity and Reduces Plasma Total and Low Density Lipoprotein Cholesterol. *J. Clin. Invest.* 96, 700-709 (1995)
23. Koishi, R., Ando, Y., Ono, M., Shimamura, M., Yasumo, H., Fujiwara, T., Horikoshi, H. and Furukawa, H. : Angptl 3 Regulates Lipid Metabolism in Mice. *Nat. Genet.* 30, 151-157 (2002)
24. Nagaoka, S., Fujimura, W., Morikawa, K., Nakamura, A., Kanamaru, Y., Hori, G., Yamamoto, K., Takamura, M., Oda, M. and Shin, K. : Lactostatin (IIA EK) and SPHP : New Cholesterol-Lowering Peptides Derived from Food Proteins. In "Dietary Fat and Risk of Common Di-

- seases” edited by Huang, Y. -S., American Oil Chemist’ s Society (AOCS) Press, pp. 168-185 (2006)
25. Pilvi, T. K., Korpela, R., Huttunen, M., Vapaatalo, H. and Mervaala, E. M. : High-calcium diet with whey protein attenuates body-weight gain in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Br. J. Nutr.* 98, 900-907 (2007)
26. Murakami, K., Okubo, H. and Sasaki, S. : Norelation between intakes of calcium and dairy products and body mass index in Japanese women aged 18 to 20 y. *Nutrition* 22, 490-495 (2006)

別添1 食料組成表

実験群	HC	HW	NC	NW
カゼイン	260.0	0.0	265.0	0.0
乳清タンパク質分離物(WPI)	0.0	244.0	0.0	249.0
コーンスターチ	160.0	160.0	160.0	160.0
スクロース	88.2	103.2	105.0	122.7
セルロース	65.0	65.0	65.0	65.0
大豆油	40.0	40.0	40.0	40.0
ラード	300.0	300.0	300.0	300.0
炭酸カルシウム	24.5	24.5	0.0	0.0
リン酸二水素カリウム	10.5	18.3	10.5	18.3
クエン酸三カリウム水和物	6.5	0.0	6.5	0.0
ミネラル混合(AIN-93G)	35.0	35.0	35.0	35.0
ビタミン混合(AIN-93G)	10.0	10.0	10.0	10.0
合計	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0
エネルギー (Kcal/g dry weight)	21.2	21.4	21.6	21.8
タンパク質 (% エネルギー)	18.0%	18.0%	18.0%	18.0%
炭水化物 (% エネルギー)	21.0%	22.0%	22.2%	23.1%
脂肪 (% エネルギー)	61.0%	60.0%	59.8%	58.9%
Ca (%)	1.50%	1.50%	0.51%	0.51%
P (%)	0.59%	0.59%	0.59%	0.59%
K (%)	0.90%	0.90%	0.90%	0.90%

エネルギー組成 (Kcal / 100g)

成分組成	カゼイン	乳清タンパク質分離物(WPI)	コーンスターチ
タンパク質 dry	98.3%	98.00%	
as is	87.5%	94.30%	
ラクトース	-0.1%	0.10%	
脂肪	1.0%	0.30%	
水分	9.7%	3.80%	
ミネラル	1.8%	1.50%	
合計	100.0%	100.00%	
Na	< 5mg / 100g	489mg / 100g	
K	1.6mg / 100g	57mg / 100g	6.5mg / 100g
Cl		28mg / 100g	
Ca	30.2mg / 100g	66mg / 100g	2.3mg / 100g
P	730mg / 100g	23mg / 100g	15.7mg / 100g

$$\text{総エネルギー (Kcal/g)} = \frac{(\text{タンパク質}^* \times 4) + (\text{脂肪}^{**} \times 9) + (\text{炭水化物}^{***} \times 4)}{\text{全体量}}$$

$$\text{タンパク質 (% エネルギー)} = \frac{\text{タンパク質}^* \times 4}{\text{総エネルギー}} \times 100$$

$$\text{脂肪 (% エネルギー)} = \frac{\text{脂肪}^{**} \times 9}{\text{総エネルギー}} \times 100$$

$$\text{炭水化物 (% エネルギー)} = \frac{\text{炭水化物}^{***} \times 4}{\text{総エネルギー}} \times 100$$

\*タンパク質 (4 Kcal/g)

カゼインまたは乳清タンパク質分離物(WPI)中のタンパク質

\*\*脂肪 (9 Kcal/g)

カゼインまたは乳清タンパク質分離物(WPI)中の脂肪 + 大豆油 + ラード

\*\*\*炭水化物 (4 Kcal/g)

カゼインまたは乳清タンパク質分離物(WPI)中のラクトース + コーンスターチ + スクロース + ミネラル混合中のシロ糖 + ビタミン混合中のシロ糖

$$\text{Ca (%) w/wt)} = \frac{(\text{カゼイン または乳清タンパク質分離物(WPI)中のCa}) + (\text{炭酸カルシウム中のCa}) + (\text{ミネラル混合中のCa}) + (\text{ビタミン混合中のCa})}{\text{全体量}} \times 100$$

$$\text{P (%) w/wt)} = \frac{(\text{乳清タンパク質分離物(WPI)中のP}) + (\text{リン酸二水素カリウム(KH}_2\text{PO}_4\text{)中のP}) + (\text{ミネラル混合中のP})}{\text{全体量}} \times 100$$

$$\text{K (%) w/wt)} = \frac{(\text{乳清タンパク質分離物(WPI)中のK}) + (\text{リン酸二水素カリウム(KH}_2\text{PO}_4\text{)中のK}) + (\text{クエン酸三カリウム(K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O)中のK}) + (\text{ミネラル混合中のK})}{\text{全体量}} \times 100$$

別紙2 8週齢CS7BL/6J系雄マウスにおけるカルシウムと乳清タンパク質分画物(WP)の体重増加量、総食餌摂取量、肝臓重量、血清総コレステロール、血清HDLコレステロール、血清LDL+VLDLコレステロール、動脈硬化指数、血清トリグリセリドおよび血糖値に与える影響

	実験群			
	HC	HW	NC	NW
体重増加量 (g / 70日)	3.86 ± 1.11 a	3.70 ± 1.75 a	2.60 ± 1.08 a	3.02 ± 1.08 a
総食餌摂取量 (g / 0-70, g)	172.7 ± 7.1 a	172.8 ± 5.8 a	172.5 ± 10.2 a	172.6 ± 10.1 a
肝臓重量 (g / 100g 体重) (% of HC) (% of NC)	3.90 ± 0.16 a 100.00%	4.23 ± 0.23 a 108.46%	4.28 ± 0.16 a 109.74%	4.31 ± 0.24 a 110.51%
血清総コレステロール (A) (mg / dl) (% of HC) (% of NC)	122.96 ± 7.50 a 100.00%	110.19 ± 8.92 a 89.61%	100.75 ± 9.91 a 81.94%	110.19 ± 7.57 a 89.61%
血清HDLコレステロール (B) (mg / dl) (% of HC) (% of NC)	72.14 ± 8.07 a 100.00%	67.77 ± 7.83 a 93.94%	56.62 ± 8.58 a 78.49%	66.09 ± 6.19 a 91.61%
血清LDL+VLDLコレステロール (mg / dl) (% of HC) (% of NC)	50.82 ± 2.67 a 100.00%	42.42 ± 2.38 a* 83.47%	44.13 ± 4.20 a 86.84%	44.11 ± 3.50 a 86.80%
動脈硬化指数 (A - B) / B	0.81 ± 0.14 a	0.70 ± 0.09 a	0.91 ± 0.14 a	0.70 ± 0.07 a
血清トリグリセリド (mg / dl) (% of HC) (% of NC)	65.72 ± 3.51 a 100.00%	51.33 ± 4.24 a* 78.10%	60.45 ± 8.13 a 91.98%	56.13 ± 3.03 a 85.41%
血糖値 (mg / dl) (% of HC) (% of NC)	119.54 ± 11.74 a 100.00%	129.92 ± 14.54 a 108.68%	102.62 ± 9.27 b 85.85%	122.49 ± 7.63 a 102.47%

HC, HWの食餌は1.5%のCaを含み、NC, NWの食餌は0.5%のCaを含んでいる。  
HC, NCの食餌中のタンパク質源はカゼインである。  
HW, NWの食餌中のタンパク質源は乳清タンパク質である。

1. 8週齢CS7BL/6J系雄マウス25-27g
2. 飼育期間は70日間で、絶食時間は解飼前の18時間
3. データはマウス8匹の平均値±標準誤差
4. \*はHCに対するスチューデントt検定による統計学的有意差を表す (\*\*: P<0.05)
5. 列内の異なる英字はダンカン多重範囲検定による統計学的有意差を表す (P<0.05)



別添6 8週齢C57BL/6j系統マウスにおけるカルシウムと乳清タンパク質分画( whey protein )の非飽和脂肪酸、肝臓トリグリセリド、肝臓リン脂質および肝臓総コレステロールに関する実験値

	実験群			
	HC	IHW	NC	NW
(mg/g 肝臓)				
総脂質	97.08±13.49	94.23±11.67	71.49±8.50	79.17±11.25
(vs HC)	100.00%	97.06%	73.64%	81.55%
(vs NC)	a	a	100.00%	110.74%
	a	a	a	a
トリグリセリド	44.49±8.16	45.52±6.16	32.85±6.18	37.30±7.89
(vs HC)	100.00%	102.32%	73.84%	83.84%
(vs NC)	a	a	100.00%	113.55%
	a	a	a	a
リン脂質	46.42±5.60	42.02±7.81	33.76±2.79	36.64±5.62
(vs HC)	100.00%	90.50%	72.73%	78.93%
(vs NC)	a	a	100.00%	108.53%
	a	a	a	a
総コレステロール	6.18±0.65	6.69±0.95	4.88±0.71	5.22±0.83
(vs HC)	100.00%	108.25%	78.96%	84.47%
(vs NC)	a	a	100.00%	106.97%
	a	a	a	a
(mg/100g 体重)				
総脂質	369.30±45.91	387.76±42.55	297.45±25.61	324.36±31.73
(vs HC)	100.00%	105.00%	80.54%	87.83%
(vs NC)	a	a	100.00%	109.05%
	a	a	a	a
トリグリセリド	168.41±29.90	189.98±30.15	134.85±22.08	148.40±27.33
(vs HC)	100.00%	112.27%	80.07%	88.12%
(vs NC)	a	a	100.00%	110.05%
	a	a	a	a
リン脂質	177.18±17.96	169.32±26.45	142.32±9.22	154.47±19.67
(vs HC)	100.00%	95.44%	80.22%	87.07%
(vs NC)	a	a	100.00%	108.54%
	a	a	a	a
総コレステロール	23.70±2.22	28.46±5.23	20.38±2.38	21.48±2.49
(vs HC)	100.00%	120.08%	85.99%	90.63%
(vs NC)	a	a	100.00%	105.40%
	a	a	a	a

HC, IHWの食餌は1.5%のCaを含み、NC, NWの食餌は0.5%のCaを含んでいる。  
 HC, NCの食餌中のタンパク質源はカゼインである。  
 IHW, NWの食餌中のタンパク質源は乳清タンパク質である。

1. 8週齢C57BL/6j系統マウス25-27g
2. 飼育期間は70日間で、絶食時間は解剖前の18時間
3. データはマウス8匹の平均値±標準偏差
4. \*はHCに対するステューデントt検定による統計学的有意差を表す (\*: P<0.05).
5. 列内の異なる英字はダンカン多重範囲検定による統計学的有意差を表す (P<0.05)

別紙4 8週齢CS7BL/6J系雄マウスにおけるカルシウムと乳清タンパク質分離物(WPI)の精巢上体脂肪組織、腸間膜脂肪組織、腹膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織および総脂肪組織重量に与える

	実験群			
	HC	HW	NC	NW
精巢上体脂肪組織 (g / 100g 体重)	2.71 ± 0.56 a	2.49 ± 0.53 a	1.75 ± 0.38 a	2.08 ± 0.45 a
腸間膜脂肪組織 (g / 100g 体重)	0.61 ± 0.18 a	0.60 ± 0.16 a	0.48 ± 0.13 a	0.41 ± 0.12 a
腹膜脂肪組織 (g / 100g 体重)	1.55 ± 0.24 a	1.32 ± 0.23 a	0.98 ± 0.22 a	1.10 ± 0.15 a
腎周囲脂肪組織 (g / 100g 体重)	0.88 ± 0.22 a	0.72 ± 0.23 a	0.53 ± 0.15 a	0.57 ± 0.17 a
総脂肪組織 (g / 100g 体重)	1.44 ± 0.30 a	1.28 ± 0.28 a	0.93 ± 0.22 a	1.04 ± 0.22 a
(% of HC)	100.00%	88.89%	64.58%	72.22%
(% of NC)			100.00%	111.83%

HC, HWの食餌は1.5%のCaを含み、NC, NWの食餌は0.5%のCaを含んでいる。  
 HC, NCの食餌中のタンパク質源はカゼインである。  
 HW, NWの食餌中のタンパク質源は乳清タンパク質である。

1. 8週齢CS7BL/6J系雄マウス25-27g
2. 飼育期間は70日間で、絶食時間は解剖前の18時間
3. データはマウス8匹の平均値±標準誤差
4. \*はHC)に対するステューデントt検定による統計学的有意差を表す (\*: P<0.05).
5. 列内の異なる英字はダンカン多重範囲検定による統計学的有意差を表す (P<0.05).