

牛乳脂肪球膜物質によるカルシウムの生体における吸収促進作用

宇都宮大学・農学部 菅野長右門

要約

ラクトフォリン (LP) は1.17 mg/g protein のカルシウム結合力を有しており、これは乳脂肪球膜 (MFGM)、カゼインホスホペプチド (CPP) と同程度であることが明らかになった。MFGM に関しては、CPP を指標に、ラットを用いた *in vivo* におけるカルシウム取り込み実験を行った。標準飼料を投与した場合に比べ、CPP、MFGM 食群で血漿カルシウム濃度の増加の時間が少し早くなるとともに、その増加割合も CPP では標準食の20倍、MFGM では標準食の10倍程度の増加を示した。4週間飼育では、各群の骨破断力、破断エネルギー値に有意な差は認められなかったが、8週間飼育においては、MFGM 食群は骨破断力、破断エネルギー値ともに標準食群より有意に高い値を示した。それに対して CPP 食群は標準食群より高い値を示したが、有意な差は認められなかった。摂取カルシウム量に対する骨強度増加の割合を求めた結果、摂取カルシウム量の差により、骨強度差が認められた可能性が示唆された。

調査・研究の目的

試験管内実験においてラクトフォリン (LP) がカルシウムを結合すること及び消化試験においても LP にカルシウムが結合していることを明らかにし、乳脂肪球膜 (MFGM) を含む飼料で飼養したラットの骨強度および骨形態を測定することによって、MFGM が生体へのカルシウム吸収促進効果をもつことを明らかにすることを目的とする。

材料と方法

本年度は、まず、LP がカルシウムを可溶化状態に保てるかどうかを昨年、MFGM で試みたのと同様の手法で検討し、さらにラットを用いて、生体へのカルシウム取り込み実験を行う。CPP のカルシウム取り込みを指標に、今回は MFGM から取りかかった。

1. LP のカルシウムの結合能

1-1. LP の調製

よつば乳業から分与された粗 LP を Kanno の方法 (1) に従い硫酸分画した。まず、粗 LP 10g を蒸留水 1 L に分散し、これを 1 晩攪拌して分散させた。この分散液を 97°C で 20 分間加熱し、流水中で 30 °C

まで冷却の後、pHを4.6に調整し、この時生じたカゼインなどの沈澱物を遠心分離で取り除いた。pHを6.0に調整した後、35%飽和硫酸を加え1時間放置し、4℃、17,760×g、20分間遠心分離を行った。上清を採取し、55%飽和硫酸を加え、1時間放置した後、17,760×g、20分間遠心分離を行った。沈澱画分(粗LP)を採取し、微量の蒸留水に分散し、pH7.0に調整後、透析、凍結乾燥した。

1-2. LPのカルシウムの結合力測定

LPおよび消化LPのin vivoにおけるカルシウム結合力は、昨年報告したMFGMのカルシウム結合力と同様に測定した。

簡単に記すと、LPあるいはCPP(蛋白質含量 20 mg protein/ml) 1 ml、20 mM NaHPO₄ 2 ml、5 mM CaCO₃ 1 mlを混合した試験液(A)、20 mM NaHPO₄ 2 ml、5 mM CaCO₃ 1 ml、に、タンパク質分散液の代わりに超純水 1 ml加えた溶液(B)及びタンパク質分散液 1 mlに超純水 3 mlを加えた試験液(C)を調製し、これらの試験液を37℃で2時間インキュベート後、3000×gで5分間遠心分離を行い、それぞれの上清から1 mlを採取して湿式分解を行なった。また、試験液A、BおよびCを、酵素に応じてpHを調整した後、ペプシン及び/あるいはパンクレアチンで37℃で1時間消化し、上と同様に処理した。分解後、カルシウム及びリンをICP(誘導結合プラズマ)発光分光分析装置を用いて測定し、カルシウム可溶化量、カルシウム結合力及びLPリン含量を算出した。

2. ラットの骨強度および骨形態

2-1. 門脈カテーテル装着ラットの作成

体重210~220 g Wister系7週齢雄のラットを(株)ドーケンより購入した。個別ゲージにて室温22±2℃、湿度60±5%、明暗周期12時間(明暗は5:00 am~5:00 pm)で飼育した。購入後、固形飼料(Certified diet/MF)(オリエンタル酵母工業(株))と蒸留水を自由摂取させた。固形飼料の組成を表1に示してある。また手術前日は絶食日とし、手術時胃や腸に餌や糞の残存を最小限にしておいた。

表1 予備飼育用固形飼料の組成

(100 g 中の含量)		※ 飼料中のビタミン及びミネラル組成 (飼料100 g中)	
粗蛋白質(大豆蛋白質)	24.6	ビタミンA	1,810 IU
粗脂肪	5.6	ビタミンD ₃	80 IU
粗灰分	6.3	ビタミンE	10.4 mg
粗繊維	3.1	ビタミンK ₃	0.04 mg
可溶性無窒素物	52.8	ビタミンB ₁	2.04 mg
水分	7.5	ビタミンB ₂	1.21 mg
		ビタミンB ₆	0.92 mg
		ナイアシン	9.68 mg
		パントテン酸	3.05 mg
		ビオチン	25.9 μg
		葉酸	0.15 mg
		イノシトール	433 mg
		コリン	0.23 g
		ビタミンB ₁₂	6.0 μg
		ビタミンC	4 mg
		Ca	1.16 g
		P	0.88 g
		Mg	0.25 g
		Na	0.26 g
		K	0.89 g
		Fe	12.3 mg
		Al	3.7 mg
		Cu	0.83 mg
		Zn	6.52 mg
		Co	0.09 mg
		Mn	5.56 mg

2-2. カテーテルの作成

手術前に、まずカテーテルを岡 (2) の方法により作成した。サーフローIVHカテーテル ((株) テルモ) を用い、採血口側から約15 cmほどのところでチューブを切断した。切断したチューブの先にマイクロラインチューブ (井内盛栄堂) をさし込み、絹糸で縛り、瞬間接着剤で固定した。カテーテルをラットに固定するために、採血口とチューブの境に硬質絹糸 (夏目製作所) で作成したミッヘル縫合錠固定用の輪を取り付けた。

2-3. 門脈カテーテル装着ラットの作成

手術は、アミノ酸吸収についての実験を行っている島岡ら (3) の方法を改変した岡 (2) の方法によって行った。手術に使用した器具は事前に70%エタノール溶液に浸しておいた。塩化ナトリウム、塩化カリウムに蒸留水を加えリンゲル液 (生理食塩水) を作製し、脱脂綿はオートクレーブで滅菌をしておいた。

- 1) ネンプタール注射液 (大日本製薬 (株)) を体重100 gあたり0.7 μ lを腹部に注射し麻酔をかけ、手術台にラットを固定し、エタノールを染み込ませた脱脂綿で腹部を拭き、腹部の毛を毛刈りバサミを用いて刈り取った。
- 2) メスを使用し正中線に沿って胸骨下の皮膚を1 cmほど切開した。そこから真鍮棒を差し込み頸背部まで貫通させ、用意しておいたカテーテルを真鍮棒のなかに通し、カテーテルの先を切開した腹部へ導きだした。そして真鍮棒を腹部方向から取り出すと、カテーテルだけを残すことができる。カテーテルに取り付けた固定用の絹糸で縫合錠をラットの肩付近の皮に取り付け、カテーテルを固定した。この時カテーテルには生理食塩水を充填しておいた。
- 3) 皮膚をメスで2~3 cmほど切り、片鋭片鈍ハサミで4 cmほどに切開部を広げ、同程度腹筋も切開し、皮膚と腹筋を止血鉗子で挟んで両側に開き、腹腔内が見やすくなるようにした後、肝臓をリンゲルで湿らせた脱脂綿で上に押し上げ、小腸を向かって右によけ、門脈をあらわにした。
- 4) 門脈を結紮鉤ですくい取り、門脈分岐に注意して脂肪などの結合組織を綿棒または脱脂綿で軽くこすり取り、すくい取った門脈のすぐ上 (肝臓側) を先が細い注射針で穴を開け、カテーテル挿入部とした (このとき結紮鉤で門脈を持ち上げ、門脈血の流出を抑えた)。
- 5) この穴にカテーテルの血管注入側先端を挿入し採血できることを確認して脱脂綿で血をふき取り瞬間接着剤で固定したら、鉗子を抜き取り、肝臓と小腸を押さえていた脱脂綿を取り出しカテーテルをねじれないように腹腔内へしまい込んだ。カテーテル挿入部、創部にサルファ剤 (スルファメトキサゾール) を振りかけた。
- 6) 腹筋を縫合針、縫合錠を使用し硬質縫合糸で縫合した。その後、カテーテルを縫合糸で皮膚に固定し皮膚を縫合した。ラットから再度採血できることを確認して、傷口を70%エタノールをしみこませた脱脂綿で消毒してゲージに戻し、麻酔が覚めれば完成とした (図1)。

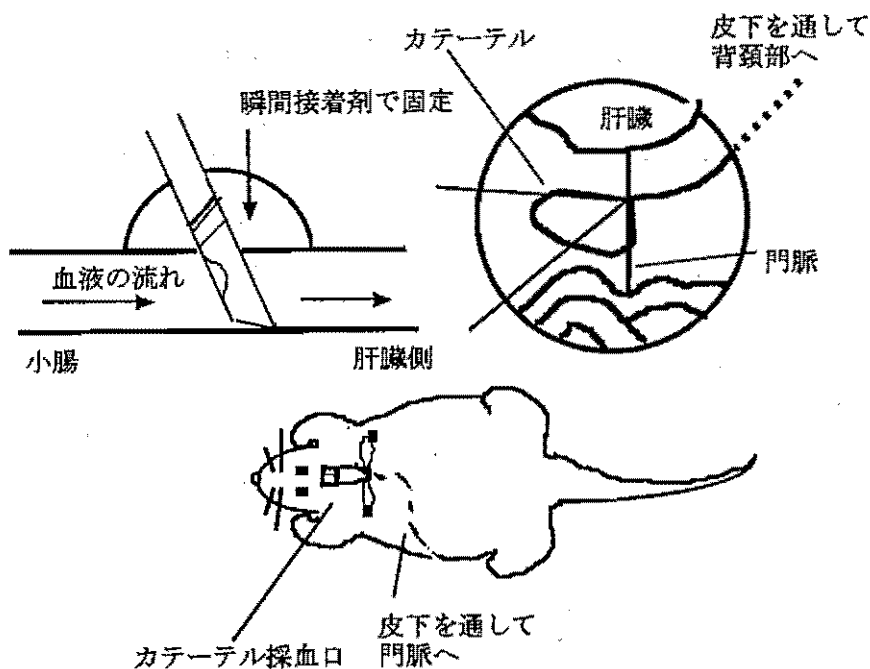


図1 ラット門脈カテーテル装着（上）および完成図

3. 栄養試験

門脈カテーテルを装着させたラットは手術後、個別ゲージに戻し、回復期として1日間飼育した。手術前と同様に固形飼料を与え、蒸留水は自由摂取とした。1日目の夜から餌を取り出し一晩絶食（18時間）させ、手術から2日目に栄養試験を行った。

3-1. 液体飼料作成

液体飼料は標準食群、LP群、MFGM群と、これらの比較のため、カルシウム吸収を促進する効果を持つCPP（森永乳業）を使用した飼料群、4群を用意した。乳由来のタンパク質群はそのタンパク質含量から組成を算出した。

MFGMのタンパク含量は35.2%であった。これにより全タンパク質含量に対してMFGMあるいはCPPのタンパクが15%を占めるように調製した。またMFGMの脂質含量は54.8%であり、増加した分量の脂質をオリーブオイルから除いた。

またICP-AESによるCa含量の測定の結果、各乳成分のCa含量はMFGM 0.45 mg/g protein及びCPP 0.12 mg/g proteinであり、各飼料群のカルシウム含量を一定にするためにCaCO₃の量を調整した。また対照群として標準タンパク質飼料を用意した。この液体飼料の組成を表2に示す。

表2 カルシウム吸収試験用液体飼料組成

(mg / ml)	標準飼料	MFGM飼料	CPP飼料
大豆蛋白質	20.7	17.5	17.6
コーンオイル	1.06	0.07	1.06
オリーブオイル	3.94	0.00	3.94
● ミネラル混合	2.5	2.5	2.5
※ ビタミン混合	2.5	2.5	2.5
ショ糖	57.95	57.95	57.95
L-シスチン	0.25	0.25	0.25
DL-メチオニン	0.15	0.15	0.15
リノール酸エチル	1.35	1.35	1.35
κ-カラギーナン	1.25	1.25	1.25
(±)-α-トコフェロール酢酸塩	0.015	0.015	0.015
CaCO ₃	0.525	0.52	0.525
LP	-	-	-
MFGM	-	9.00	-
CPP	-	-	3.11
Ca 含量 *	0.61	0.62	0.61
P含量 *	0.395	0.412	0.415

Ca 含量はこの飼料を調製後飼料を灰化し、カルシウム濃度を測定して算出した値である。

※ ハーパービタミン配合 (100g中の組成)

ビタミンA・アセテート	93.2 mg
ビタミンD ₃	0.5825 mg
ビタミンE・アセテート	1,200.0 mg
ビタミンK ₃	6.0 mg
ビタミンB ₁ ・塩酸塩	59.0 mg
ビタミンB ₂	59.0 mg
ビタミンB ₆ ・塩酸塩	29.0 mg
ビタミンB ₁₂	0.2 mg
ビタミンC	588.0 mg
D-ビオチン	1.0 mg
葉酸	2.0 mg
パントテン酸カルシウム	235.0 mg
ニコチン酸	294.0 mg
イノシトール	1,176.0 mg
ショ糖	96,257.0175 mg
総量	100.00 g

● ハーパーミネラル配合 (100g中の組成)

但し、硫酸マグネシウムは水分含量が高くガスが発生するため、無水塩を使用した。

第2リン酸カルシウム2水塩	0.43 g
炭酸カルシウム	29.29 g
塩化ナトリウム	25.06 g
リン酸第2水素カリウム	34.31 g
硫酸マグネシウム	4.88 g
硫酸マンガン・4~6水塩	0.121 g
クエン酸鉄	0.623 g
塩化亜鉛	0.02 g
硫酸銅・5水塩	0.156 g
ヨウ化カリウム	0.0005 g
モリブデン酸アンモン・4水塩	0.0025 g
ショ糖	5.11 g
総量	100.00 g

3-2. 栄養吸収試験

一晩絶食させたラットを無麻酔、無拘束状態で、液体飼料（標準飼料・各蛋白質添加飼料）を経口注入器を用いて1.0 mlを胃内投与した。

頸背部に固定したカテーテルの採血口から滅菌済み1.0 mlシリンジを使用し、門脈血を0.15 ml採血した。採血は液体飼料を与えてから0 min, 90 min 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min後に行っ

た。なお0 min時の採血は飼料投与直前に行った。

1.0 ml容シリンジで採血された血液はただちに1ml容エッペンドールチューブに移し、4℃、2,500 rpm、10分間遠心分離にかけて上澄みの血漿のみ0.05 mlを採取し、硝酸洗浄を行った試験管に移しかえた。これに、硝酸0.3 mlを加えてTaiyo Dry Thermo Unit TAH-2 を使用して120℃で2時間加熱して灰化し、さらに過塩素酸0.3 mlを加えて120℃、2時間加熱した後、230℃まで温度を上げて湿式灰化し、1 Nの硝酸を1 ml加えた。このあと少し放置し、温度を下げてから超純水を加え20 ml容メスフラスコで定容した。(このとき試験管を何度か洗うようにして定容した)。

3-3. 微量元素の測定

微量元素の濃度測定は、誘導結合型プラズマ発光分析装置 (ICP - AES/Seiko) を用いて測定した。分析法としてS分析法を用い、0 ppmと1 ppmの標準溶液の2点法 (検量線法) により作成した検量線を用いた。そして測定された値より血漿1 mlに含まれる微量元素を算出した。

3-4. 門脈血中カルシウム濃度増加量の面積による比較

門脈血中のカルシウム濃度は、各々の測定値から0分時の測定値を減じた値を用いて、濃度曲線を描き、濃度曲線とX軸で囲まれる面積を測定し、吸収量の指標とした。面積の測定は同条件で作成した図を電気泳動画像解析ソフト (Quantity One, PDI社, U.S.A) を使用して算出した。

3-5. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準誤差で表し、各群間における有意差の検定は、Student-t 検定を用いて処理した。危険率は5%とした。

4. 骨強度測定

長管骨での骨の形成は、長軸方向の成長と、横軸方向の成長とが、モデリングと呼ばれる調節機構に従い、骨の基本的な形状をあまり変化させることなく大きさを増大させる。長軸成長には骨幹端の成長板に内在する軟骨細胞の機能 (軟骨内骨化) が起こる。一方、横軸成長には骨膜での骨芽細胞による骨形成および石灰化と、骨内膜側での破骨細胞による骨吸収が一定のバランスを保ちながら起こる。このため皮質骨厚はあまり変化しないで、骨幹部の肥厚を生じる (4, 5)。

この骨の形成を測定する方法として、X線撮影、骨音波電動などがあるが、これは密度の測定による骨の健全さを判別する方法である。本研究では骨を破断することにより骨の力学的強度を測定し、骨の耐久性から骨代謝への影響を検討した。

4-1. 骨強度測定ラット飼育条件及び飼育飼料の調製

3週齢Wistar系雄ラット25匹を5群に分け、個別のワイヤーゲージにて温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ 、明暗周期12時間 (明期5.00 am~5.00 pm) で飼育した。また、各々のタンパク含量を考慮し (CPP (明治乳業 (株) 85%、MFGMは3-1で示したものと同組成)、総タンパク含量が3%となるように調整した。また各飼料のCa含量を均一にするため乳タンパク質のCa含量を測定し (MFGMでは 0.45 mg/g protein 、CPPは 0.12 mg/g protein)、これにより CaCO_3 の量を調整し、Ca含量を均一にした。またMFGMの脂質含量は53.5%であったから、この量をコーンオイルを減ずることにより、脂

質量を調整した。そして低カルシウム食 (0.1%Ca), 標準食 (0.5%Ca) を加えた5群を、4週もしくは8週間自由摂取にて飼育した。すべてのラットには脱イオン水を任意に与えた。表3に、この試験で用いた飼料の組成を示す。

表3 骨強度測定試験用個体飼料組成

(飼料100g中)	低カルシウム飼料	標準飼料	MFGM飼料	CPP飼料
大豆蛋白質	20.7	20.7	17.5	17.9
コーンオイル	5.0	5.0	0.07	5.0
コーンスターチ	10.0	10.0	10.0	10.0
● ミネラル混合	3.5	3.5	3.5	3.5
※ ビタミン混合	1.0	1.0	1.0	1.0
シヨ糖	52.95	52.95	52.95	52.95
セルロースパウダー	5.0	5.0	5.0	5.0
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25
CaCO ₃	0.26	1.03	1.03	1.02
Na ₂ HPO ₄	0.0038	0.015	0.013	0.013
LP	-	-	-	-
MFGM	-	-	9.0	-
CPP	-	-	-	2.32
Ca 含量 (%) *	0.136	0.512	0.511	0.514
P 含量 (%) *	0.395	0.395	0.413	0.403

* Ca及びP含量はこの飼料を調製後飼料を灰化し、カルシウム濃度を測定して算出した値である。

※ ハーバービタミン配合 (100g中の割合)

ビタミンA・アセテート	93.2 mg
ビタミンD ₃	0.5825 mg
ビタミンE・アセテート	1,200.0 mg
ビタミンK ₃	6.0 mg
ビタミンB ₁ ・塩酸塩	59.0 mg
ビタミンB ₂	59.0 mg
ビタミンB ₆ ・塩酸塩	29.0 mg
ビタミンB ₁₂	0.2 mg
ビタミンC	588.0 mg
D-ビオチン	1.0 mg
葉酸	2.0 mg
パントテン酸カルシウム	235.0 mg
ニコチン酸	294.0 mg
イノシトール	1,176.0 mg
シヨ糖	96,257.0175 mg
総量	100.00 g

● ハーバーミネラル配合 (100g中の割合)

ミネラル混合中のカルシウムを除き、セルロースパウダーに変えたものを使用した

塩化ナトリウム	25.06 g
リン酸第2水素カリウム	34.31 g
硫酸マグネシウム	4.86 g
硫酸マンガン・4~6水塩	0.121 g
クエン酸鉄	0.623 g
塩化亜鉛	0.02 g
硫酸銅・5水塩	0.156 g
ヨウ化カリウム	0.0005 g
モリブデン酸アンモン・4水塩	0.0025 g
セルロースパウダー	34.827 g
総量	100.00 g

4-2. 骨強度測定用試料の作成

試験試料を与えてから4週間後、もしくは8週間後にラットを断頭屠殺し、筋と結合組織をきれいに取り除いた大腿骨を採取した。その後、大腿骨の内側顆、外側顆と大転子との距離を大腿骨全長として、またその中間部の長径及び短径をノギスを用いて計測した。この計測方法を図2に示す。

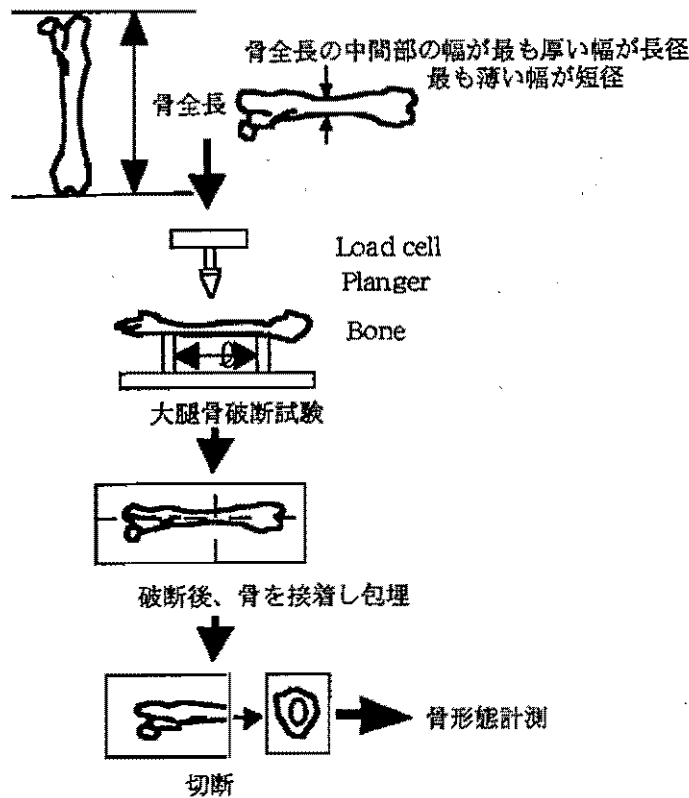
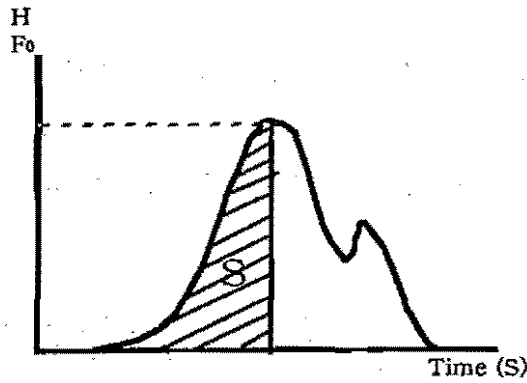


図2. 骨破断試験及び骨形態計測方法の概要

4-3. 骨強度測定

図2の手順で破断試験から形態計測した。大腿骨は生理食塩水で湿らしたガーゼで覆い乾燥しないように4℃で20時間保存しながら、すべての骨を採取した後、直ちに破断試験を行った。破断力と大腿骨骨幹の破壊エネルギーはEzawaらのthree-point bending rheolometer (RX 1600, Aitechno, Japan)により決定した(6)。測定条件は、支点間距離(スパン): 20 mm, 破断速度: 10 mm/min., 負荷重量: 40 kgとした。この計算方法を図3に示す。破断力は、チャート上のピークの高さにチャートの高さに比例する負荷重量を乗算した値である。破断エネルギーは、骨の破断にかかった総合の力を表すチャート上の面積に破断速度とチャートの高さに比例する負荷重量を乗算した値である。



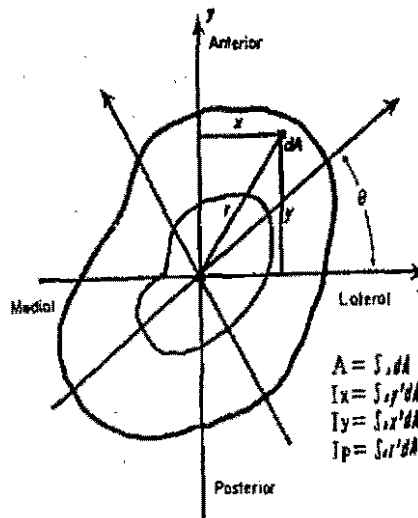
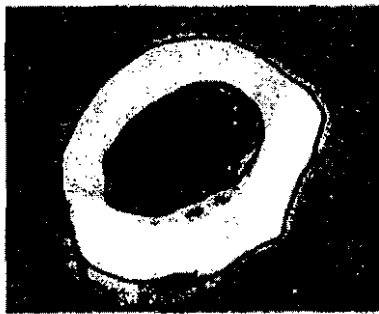
F_{max} ; Full scale of load cell= 40kg (プランジャーによる圧力)
 F_0 ; Chart Length (cm) (チャートの長さ)
 H ; Chart Full Length (cm) = x cm (チャートの最大の長さ)
 S ; チャートにおけるある時間における面積 (cm²)
 C_c ; α / β (チャート上における破断速度)
 α ; Chart speed α cm/min (チャートのスピード)
 β ; Plunger speed β cm/min (プランジャーのスピード)

$CL = 1/H \times F_{max} \times 10^3$ (チャートの高さ按比例する
 (1/cm) (kg) 負荷重量)

Breaking Strength = $F_0 \times 980 \times CL$
 (dyn) (cm) (cm/s²) (kg/cm)

Breaking Energy = $S \times C_c \times CL \times 980$
 (erg) (cm²) (kg/cm)

図3 レオメーターによる破断力及び破断エネルギーの測定法



曲げ強さ (bending stress) $\sigma = \frac{M}{I_x} \cdot e_1$

曲げモーメント (bending moment) $M = P \cdot \frac{L}{4}$

$A = \int dA$
 $I_x = \int x^2 dA$
 $I_y = \int y^2 dA$
 $I_p = \int r^2 dA$

図4 骨断面写真(左)と断面形態特性値の定義

4-4. 骨形態計測

破断試験に用いた大腿骨をクロロホルム・メタノール (2:1, v/v) 混合液に3日間浸し、脱脂乾燥後の重量を測定した。さらに、その骨の破断部を正確にセメダインで接着復元した後、大腿骨後面にある内側顆、外側顆および大転子の3点を含む平面を基準面とし、3点支持の状態を保ちながら、アクリル樹脂で作製した容器に接着した。その中にリゴラック2004 (昭和分子 (株)) を流し込み包埋

した。乾固した樹脂中の大腿骨を、平面性を保ち、中央部を長軸に垂直にダイヤモンドカッターを用いて切断し、切断面をサンドペーパー (No.400, No.1000) を用いて研磨した。その後、顕微鏡下 (×20倍) で切断面の写真撮影を行った。撮影した写真から座標読取装置 (Gradhtec Digitizer KD9060) を用いて骨断面形態を測定した (7, 8, 9)。測定値は高橋のプログラムより計算し (10)、断面形態測定値を算出した。下記に示した 5 項目が算出した測定値である。また大腿骨断面写真を図 4 (左) に、断面形態特性値の定義を図 4 (右) に示してある。X軸周りの断面 2 次モーメント (I_x) は、破断時における骨の水平方向の長さ (x) の積分値である。Y軸周りの断面 2 次モーメント (I_y) は、破断時における骨の垂直面の長さ (y) の積分値である。 (x) 及び (y) は $x+y$ が最大となりうる値をとった。断面極モーメント (I_p) は I_x と I_y を加算した値である。

1. 皮質部断面積 (Cortical area)

2. 周径 (断面外周径: Length of outer wall)

3. X軸周りの断面 2 次モーメント (I_x)

左右方向の曲げに対する構造的な強度を表すもの

$$I_x = \int y^2 dA$$

4. Y軸周りの断面 2 次モーメント (I_y)

左右方向の曲げに対する構造的な強度を表すもの

$$I_y = \int x^2 dA$$

5. 断面極モーメント (I_p)

ねじりに対する構造的な強度を表すもの

$$I_{xy} = \int x^2 dA + \int y^2 dA$$

4-5. 統計処理

測定値はすべて平均値±標準誤差で表し、各群間における有意差の検定は、Student-t検定を用いて処理した。危険率は1%もしくは5%とした。

結果および考察

1. LPの精製

粗LPの硫酸沈殿法から精製されたLPのSDS-PAGEのパターンを図5に示す。LPの主要なポリペプチドである分子量17,000、27,000のバンドをはっきりと確認できた。この粗LPのカルシウム含量は0.644 mg/g protein, リン含量が6.108 mg/g proteinであった。

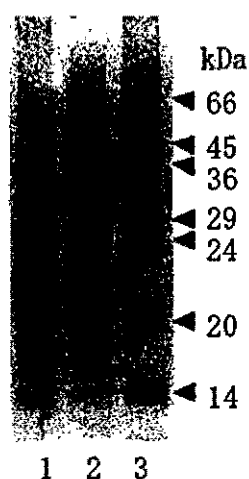


図5 粗LPの硫酸分画画分のSDS-PAGE

1：粗LP、2：硫酸分画後のLP、3：低分子量マーカー

2. カルシウム結合能

LP及びCPPのin vivoでのカルシウム結合能の結果を表4に示した。各乳タンパク質のカルシウム結合量はLP 1.17 mg/g protein、CPP 1.49 mg/g proteinであった。この値からLPはMFGMと同様、CPPと同程度のカルシウム結合力をもつことが推測された。しかし、消化管内の消化時の条件モデルとして検討した、パンクレアチンによる消化後のカルシウム可溶化量は、MFGMとは異なり大幅に減少した。これは、in vitroにおける消化実験は、実際の生体内の消化を必ずしも反映しないからであると推測される。そのためにもまず、前年度でパンクレアチン処理後もカルシウム結合能を保持していたMFGMについて、CPPを指標にin vivoでのカルシウム吸収試験を行い、生体内での正確なカルシウム吸収性を門脈血のカルシウム濃度を測定することにより検討した。

表4 LP、MFGM及びCPPのカルシウム結合力

消化酵素		A液平均 ($\mu\text{g/ml}$)	C液平均 ($\mu\text{g/ml}$)	Ca可溶化量 ($\mu\text{g/ml}$)	Ca結合力 (mg/g protein)
LP	なし	0.610 ± 0.013	0.097 ± 0.005	0.290 ± 0.013	1.170 ± 0.054
	パンクレアチン	0.522 ± 0.019	0.266 ± 0.023	-0.061 ± 0.015	---
	ペプシン+ パンクレアチン	1.08 ± 0.033	0.12 ± 0.007	-0.073 ± 0.07	---
CPP	なし	0.636 ± 0.043	0.042 ± 0.016	0.370 ± 0.020	1.490 ± 0.080
	パンクレアチン	1.034 ± 0.024	0.238 ± 0.005	0.343 ± 0.011	1.373 ± 0.065
	ペプシン+ パンクレアチン	0.998 ± 0.006	0.042 ± 0.001	0.0397 ± 0.025	0.159 ± 0.07

± 標準誤差 n = 4

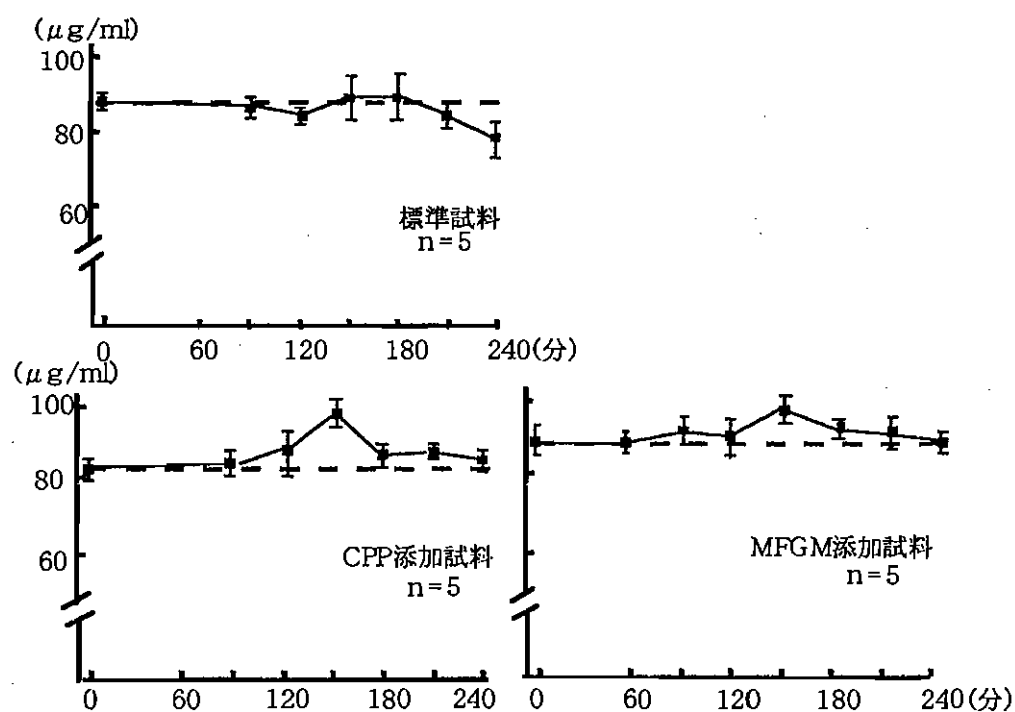


図6 門脈血漿中のカルシウム濃度

3. 栄養試験における門脈血カルシウム濃度の変化

標準液体飼料、MFGM 添加液体試料、CPP 添加液体試料を与えたラットの門脈血中のカルシウム濃度変化を図6に示してある。標準食群では150分時、180分時に高い値がみられたが0分時（通常時のカルシウム濃度）と比較して、門脈血中におけるカルシウム吸収は増加しなかった。MFGM群、CPP群では150分時付近で高いピークがみられ、門脈血中カルシウム濃度は標準食群と比較して増加した。

また、画像解析ソフトを用いて算出した、各群間のカルシウム濃度変化曲線下の面積を表5に示してある。標準食群と比較して、MFGM、CPP群に有意に高い値が認められた。ここで示した数値は、実際に吸収されたカルシウムの値を示しているのではなく、あくまで指標であるが、MFGM及びCPP摂取によりカルシウム吸収量が有意に増加したことは明らかである。

表5 血漿カルシウム濃度変化曲線下の面積1)

	標準飼料群	MFGM飼料群	CPP飼料群
面積	55.38 ± 5.70	529.84 ± 18.29	1111.76 ± 27.11

1) 図6のカルシウム濃度曲線と0分時の値からX軸に平行な直線をひき、その2つの線に囲まれた範囲の面積で示してある。

± 標準誤差

※ p < 0.05 また、範囲に指定が無い場合は他の全ての群に対して有意差が認められた。

カゼイン食を摂取—消化したラットの小腸下部に少量のマクロペプチドが見いだされており、他のタンパク質からも同様な生成がみとめられ、その一つにCPPに類似したペプチド断片が生成していることが確認されている報告がある (11)。

このように、通常の食餌摂取条件下においてもプロテアーゼの加水分解を免れるペプチド部分の存在が確認されている。前の試験において各乳タンパク質はカルシウム結合力を有し、可溶性カルシウム量を増加させた。しかし、その効果がペプシン及びパンクレアチン共存下で失われたという結果を得た。前回の結果と同様であれば、消化酵素による消化で乳タンパク質によるカルシウム吸収の増大は見られないと推測される。しかし、今回の結果では明らかに小腸でのカルシウムの吸収を増加させた。そのため、小腸内部で不特定の要因により各乳タンパク質が完全に分解されず、完全に消化されないマクロペプチドが存在する可能性があり、そのペプチド部分にカルシウム結合部位が存在し、可溶性カルシウムの量を増加させているものと推測される。また、門脈でのカルシウム濃度の増加から、小腸内での可溶性カルシウムの増加が推測され、通常の生理状態におけるカルシウム吸収では、ビタミンDに必ずしも依存しない細胞間隙ルートによる単純拡散の効果が大きいという報告 (12) を支持するものと考えられる。従って、MFGMが管腔内での門脈血への移動を促進する効果を持つのではないかと推測される。

4. 骨強度に及ぼすMFGMの変化

4-1. 飼料摂取量の変化

表3に示した試料を与え、4週間、8週間飼育したラットの食餌摂取量の変化を図7に、飼育試験開始から飼育試験終了まで総食餌摂取量を表6、7に示す。

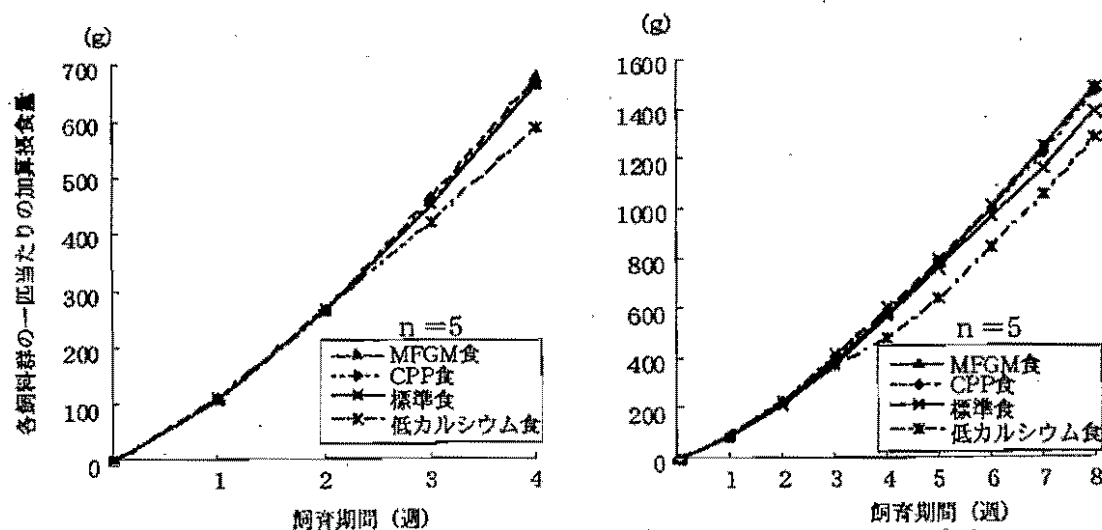


図7 4週間 (左)、8週間 (右) 飼育ラットにおける摂食量の変化

4週間飼育ラット群では、2週目までは各飼料群間で同程度の値 (270±4g) を示していた。しかし3週間目の摂食量において、低カルシウム群は405 gの摂食量であるのに対して、他の3群は450 g

程度の摂食量を示し、摂食量に約50 gの差が生じ始めた。4週間目の飼育終了時の摂食量はMFGM群676 g, CPP群660 g, 標準食群では685 g, 低カルシウム食では574 gであった。低カルシウム群と標準食群間の差は110 gとさらに大きいものとなった。また、各乳タンパク飼料群とも100 g近い差が生じた。

表6 4週間飼育ラット食餌摂取量と体重の変化

	1週から4週までの 総食餌量 (g/4週)	4週飼育後 最終体重 (g)	1週から4週までの 体重増加 (g)
低カルシウム食	574.5 ± 31.9	187.4 ± 17.4 ^a	138.1 ± 16.9
標準食	685.8 ± 28.6	233.3 ± 4.1 ^b	178.4 ± 3.7
MFGM食	676.5 ± 2.4	210.6 ± 9.1 ^c	160.3 ± 10.6
CPP食	660.5 ± 6.9	213.1 ± 2.3 ^c	160.2 ± 4.1

n=5 (但し低カルシウムはn=4) ± 標準誤差 ※ p < 0.05

表7 8週間飼育ラット食餌摂取量と体重の変化

	1週から8週までの 総食餌量 (g/8週)	8週飼育後 最終体重 (g)	1週から8週までの 体重増加 (g)
低カルシウム食	1251.3 ± 22.2	283.2 ± 11.7	257.7 ± 7.5
標準食	1382.9 ± 4.6	345.9 ± 5.0	296.7 ± 4.9
MFGM食	1488.8 ± 3.1	378.4 ± 9.7	328.7 ± 9.9
CPP食	1464.4 ± 29.2	356.3 ± 12.9	306.8 ± 12.4

n=5 ± 標準誤差 ※ p < 0.05

4-2. 体重増加

4週間もしくは8週間飼育したラットの体重の変化を図8、飼育試験終了時の最終体重及び飼育試験開始から飼育試験終了までの体重増加量を表6及び7に示す。

4週間飼育ラット群において、飼育開始から2週目では体重の上限と下限の差が15 g程度であったが、3週において体重の上限と下限の差が30 gと大きく開いた。4週の飼育終了時においてもこの差が縮まらず標準食が233 gで最大値を示し、低カルシウム食が200 gと最低値を示した。乳タンパク質群は4週間の間、体重の変化がほぼ同じ値を示しており、4週の飼育終了時の体重はMFGM群210 g、

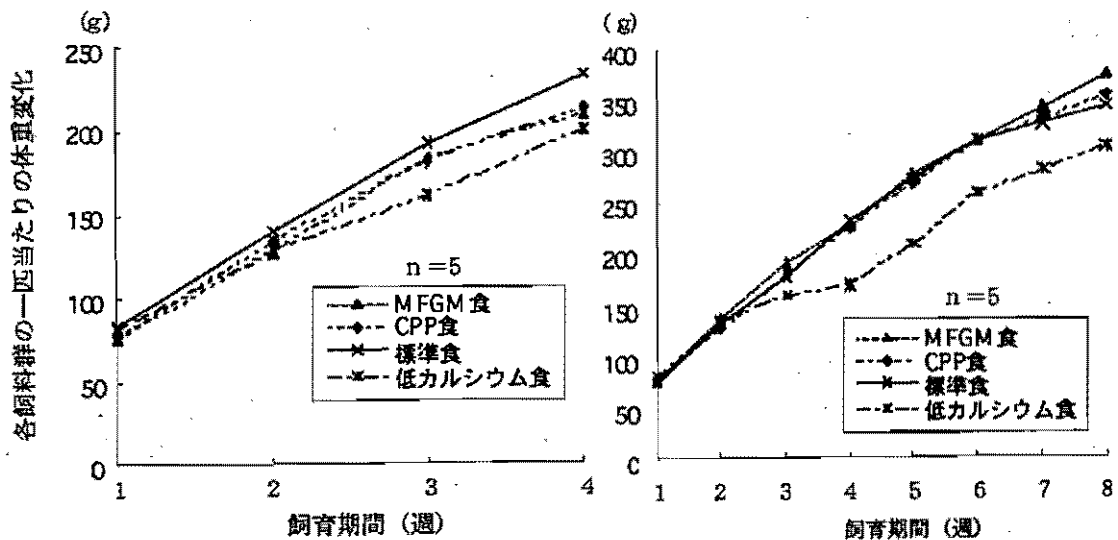


図8. 各食餌群4週間(左)、8週間(右)飼育ラットの成長曲線

CPP群213 gであった。8週間飼育ラット群の、低カルシウム食群において、3週目から体重増加量の減少がみられ、4週間の時点では他の3群と60 gほどの体重差が生じた。その後、差は縮まらなかったものの各飼料群とほぼ平行して体重が増加した。他の3群において6週目まで、体重に有意差は認められず、ほぼ同程度の体重増加を示した。しかし7週目の体重は、MFGM食群345 g、CPP食群333 g、標準食群329 gであり、MFGM食群とCPP食群及び標準食群との間に15 g程度の体重差が見られた。8週の飼育終了時の体重はMFGM食群378 g、CPP食群356 g、標準食群345 gであった。標準食とMFGM食群に30 gの差が見られた。

2週から3週までに生じた低カルシウム食群の体重増加量の減少は、ちょうど同時期に生じた、食餌摂取量の減少に起因するものであると推測される。

4-3. 骨強度測定

破断試験により求めた4週間飼育ラット群と8週間飼育ラット群の大腿骨骨強度、大腿骨骨エネルギーを図9、10に示す。破断力は骨を折るための瞬間の力であり、骨エネルギーは骨を折るために要した総合的な力である。

4週間飼育ラット群での大腿骨は弾力において、低カルシウム群と比較して、他の3群は有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。また、標準食群とMFGM群、CPP群の間には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。8週間飼育ラット群において、低カルシウム群と比較して、他の3群は有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。標準食群と比較して、MFGM群は有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。しかし、CPP群においては標準食群よりも高い値を示したが有意な差ではなかった。また4週間飼育における乳タンパク質飼料群よりも8週間飼育における乳タンパク質飼料群が有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。8週間飼育標準食群は4週間飼育標準食群より高い値を示したが有意な差ではなかった。低カルシウム群においては、8週間飼育群が4週間飼育群よりも有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

4週間飼育ラット群の大腿骨エネルギーは、低カルシウム群と比較して、他の3群は有意に高い値を

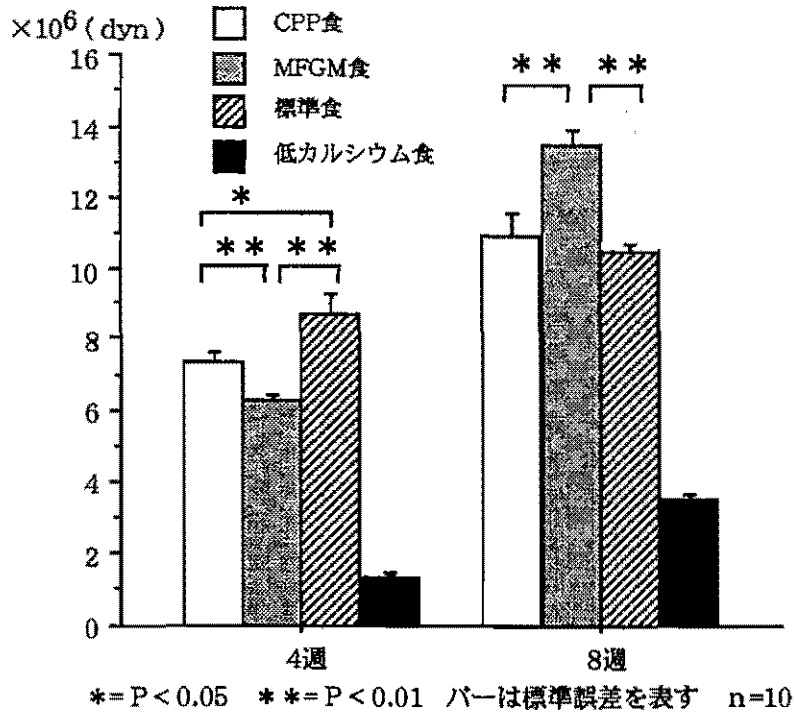


図9 大腿骨破断力 (4週間 (左), 8週間 (右) 飼育)

示した ($p < 0.01$)。また、標準食群はMFGM食群より有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。8週間飼育ラット群においても、低カルシウム食群と比較して、他の3群は有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。標準食群との比較でも、MFGM食群は有意に高い値を示し ($p < 0.01$)、CPP食群との比較でも有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。8週間飼育乳タンパク質飼料群は、4週間飼料群よりも有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。

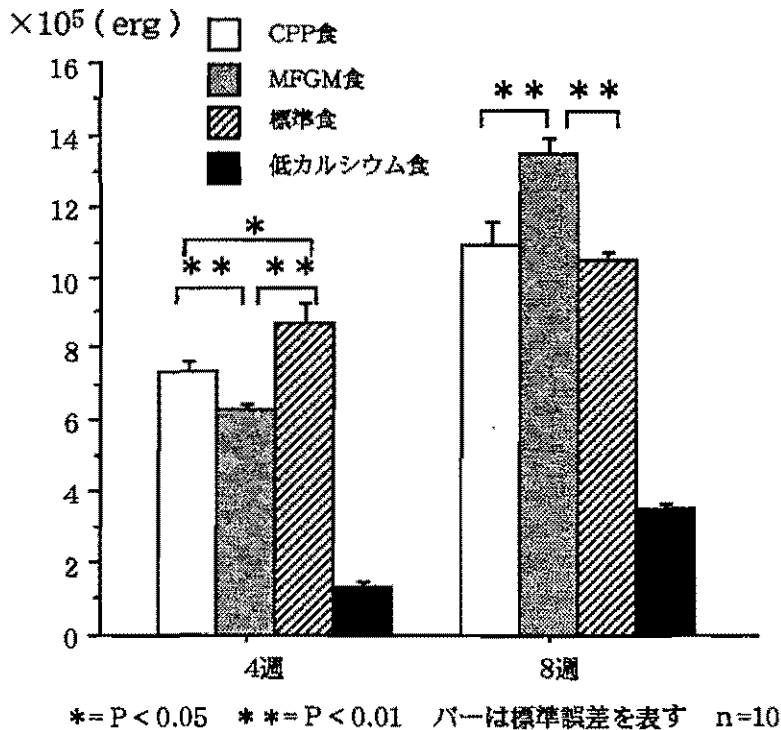


図10 大腿骨破断エネルギー (4週間 (左), 8週間 (右) 飼育)

季ら (13) は、3週齢のラットに、CPPを飼料とした食餌を4週間与えて、大腿骨の破断力を測定し、標準食群の破断力が $8.02 (\times 10^6 \text{ dyn})$ 、1.5%CPP食 (CPP/飼料全体の重量) が $9.243 (\times 10^6 \text{ dyn})$ 、3.0%CPP食 (CPP/飼料全体の重量) は $10.826 (\times 10^6 \text{ dyn})$ であったと報告している (文献中の値は最大曲げ荷重量/大腿骨の湿重量 (kg/g wet wt.) で示してあるため骨破断力 ($\times 10^6 \text{ dyn}$) に換算した)。この値と本実験の4週間飼育ラットは共に7週齢のラットを使用しているため、骨破断力の比較をした。文献中の値が平均値のため有意差の検定は行うことはできないが、標準食群においては同程度の値を示したが、CPP群においては約 $3.0 (\times 10^6 \text{ dyn})$ の値の差が見られた。また、Takadaら (14) や江澤ら (15) は4週間の低カルシウム飼育を施したラットに、4週間の追加飼育 (標準カルシウム食飼育) を行い、14週齢の時点で破断試験による測定を行っている。それによる破断力の値は約 $10.0 \times 10^6 \text{ dyn}$ 、破断エネルギー値は約 $1.25 \times 10^5 \text{ erg}$ であった。本実験の8週間飼育群の破断力値は $10.51 \times 10^6 \text{ dyn}$ 、破断エネルギーは $1.41 \times 10^5 \text{ erg}$ であり、本試験と類似の値であった。破断力の研究において様々な飼育条件、飼料組成及び骨破断測定法で試験を行っているため、ある程度の誤差は生じるものと思われるが、Takadaらとの比較において週齢こそ違うものの飼育期間、破断測定法、類似した食餌組成など、試験条件が本試験と類似していたため、本試験の標準飼料群の骨強度の値は有効であったと考えられる。

4-4. 骨強度、骨重量のCa比

本実験でのラットの飼育は各飼料群とも自由摂取で行った。そのため飼料の摂取量の相違によりカルシウムの摂取量も群間により異なっていることから、骨強度とカルシウム量を相対的な比で表し、各群間の骨強度がカルシウム摂取量によって生じたものかを検定した (表8及び9)。

表8 4週間飼育ラット群の骨強度と骨重量に対する摂取Caの関係

	4週間の総摂取 Ca量 (g/4週)	骨破断力 ($\times 10^6 \text{ dyn}$)	骨破断力/Ca	骨エネルギー ($\times 10^6 \text{ erg}$)	骨エネルギー/Ca	骨重量 (g)	骨重量/Ca
低カルシウム食	$0.56 \pm 0.03^*$	$1.88 \pm 0.66^*$	$1.48 \pm 0.63^{\downarrow}$	$0.42 \pm 0.17^*$	0.47 ± 0.27	$0.25 \pm 0.02^*$	$0.16 \pm 0.10^*$
標準食	2.84 ± 0.12	$8.73 \pm 0.54^{\uparrow}$	$3.09 \pm 0.38^{\uparrow}$	$1.57 \pm 0.08^{\uparrow}$	0.55 ± 0.05	0.37 ± 0.02	0.13 ± 0.02
MFGM食	2.80 ± 0.01	$6.25 \pm 0.18^{\uparrow}$	$2.23 \pm 0.06^{\uparrow}$	$1.20 \pm 0.09^{\uparrow}$	0.43 ± 0.032	0.37 ± 0.01	0.13 ± 0.005
CPP食	2.72 ± 0.03	$7.34 \pm 0.32^{\uparrow}$	$2.70 \pm 0.06^{\uparrow}$	1.27 ± 0.10	0.47 ± 0.06	0.38 ± 0.01	0.14 ± 0.01

± 標準誤差

* $p < 0.05$ また、低カルシウム群のみの印は、標準食群、乳タンパク質群に対して低カルシウム群が有意に低い値を示した。

表9 8週間飼育ラット群の骨強度と骨重量に対する摂取Caの関係

	8週間の総摂取 Ca量 (g/8週)	骨破断力 ($\times 10^6 \text{ dyn}$)	骨破断力/Ca	骨エネルギー ($\times 10^6 \text{ erg}$)	骨エネルギー/Ca	骨重量 (g)	骨重量/Ca
低カルシウム食	$1.30 \pm 0.62^*$	$3.46 \pm 0.15^*$	$2.67 \pm 0.15^{\downarrow}$	$0.70 \pm 0.05^*$	$0.55 \pm 0.05^{\downarrow}$	$0.33 \pm 0.005^*$	$0.26 \pm 0.003^*$
標準食	5.99 ± 0.12	$10.51 \pm 0.15^{\uparrow}$	$1.70 \pm 0.021^{\uparrow}$	$1.41 \pm 0.11^{\uparrow}$	$0.29 \pm 0.003^{\uparrow}$	0.65 ± 0.01	0.11 ± 0.003
MFGM食	6.16 ± 0.01	$13.43 \pm 0.50^{\uparrow}$	$2.18 \pm 0.12^{\uparrow}$	$2.22 \pm 0.26^{\uparrow}$	$0.31 \pm 0.02^{\uparrow}$	0.67 ± 0.02	0.11 ± 0.007
CPP食	6.03 ± 0.12	$10.93 \pm 0.55^{\uparrow}$	$1.81 \pm 0.12^{\uparrow}$	$1.85 \pm 0.14^{\uparrow}$	$0.36 \pm 0.05^{\uparrow}$	0.58 ± 0.04	0.097 ± 0.007

± 標準誤差

* $p < 0.05$ また、低カルシウム群のみの印は、標準食群、乳タンパク質群に対して低カルシウム群が有意に低い値を示した。

摂取カルシウム量は各飼料群の総食餌摂取量と各飼料に含まれるカルシウム含量により求めた。4週間飼育低カルシウム群の摂取カルシウムは0.56 gであり、他の3群よりも有意に低い値を示した。標準食群と各タンパク質群間には有意差は見られず、低カルシウム食群を除いた各飼料群のラットは4週間で約2.8 gのカルシウムを摂取した。8週間飼育群においても、低カルシウム食群が唯一低い値を示しており、他の3群は約6.0 gのカルシウムを摂取した。この値を用いてカルシウム量に対する骨強度比、骨重量比を導き出した。

4週間飼育の破断力/CaにおいてMFGM (2.23 ± 0.06) に有意な差が認められた。骨エネルギーにおいては各群間に有意な差は認められなかった。骨重量/Caでは低カルシウム群 (0.16 ± 0.10) が有意に高い値を示した。

8週間飼育ラットの破断力/Ca、骨エネルギー/Caでは低カルシウム群が有意に高い値を示した。他の飼料群間では有意な差はみられなかったが、MFGM群が高い値を示した。骨重量/Caでも低カルシウム食群が有意に高い値を示した。

これらの結果から、低カルシウム食群を除いた3群の間に有意な差は認められなかった。このカルシウム比は摂取したカルシウム量に比例する骨強度と骨重量の増加量を表しており、一定量のカルシウム摂取において、この値が高値を示すほど高い骨強度を示す。また、このカルシウム比が低い場合には、一定量のカルシウム摂取に対し、低い骨強度を示す。

低カルシウム食群は摂取したカルシウムが他の群と比較して少量であるが、高いカルシウム利用率を示した。これは、低カルシウム食で飼育したラットは腸管でのアルカリ性ホスファターゼ活性 (ALP) が高まり、腸管からのカルシウム吸収率が上昇すること (16) に起因するものであると考えられる。また4週間飼育の標準食群と乳タンパク質群において骨強度のカルシウム比に有意な差は認められず、その結果摂取カルシウム量の差が骨強度に影響を及ぼしたと考えられる。8週間飼育群においても、各飼料群に有意差が認められなかったため、MFGM食群の骨強度における高い値は摂取カルシウム量によるものであったと推測される。

Sinhaらは相対的骨密度を測定するためには大抵長期間の飼育が必要であると提案しており (17)、加えて今回の試験では開始時に低カルシウム食による飼育を行っておらず、カルシウムに対する要求がそれほど高まっていないと考えられ、4週間飼育群では有意差の有無に関係なく乳タンパク質群に骨強度の増加が認められなかったと推測される。しかし8週間飼育群には有意差が認められなかったが標準食群より高い骨強度の増加が認められた。ここに示したカルシウムの摂取量は摂取した飼料量から算出した値であり、ラットが真に吸収したカルシウムの値ではない。また、本実験におけるカルシウム可溶化試験、栄養試験では、MFGMがカルシウム吸収を促進したとの結果から、カルシウム摂取量のみによる骨強度の増加とは特定できず、カルシウムの可溶化などによるカルシウム吸収の増加が骨強度を強化させているとの報告もあり (18)、摂取カルシウムの吸収量と骨強度、骨重量費により算出した値は参考値として扱うにとどめた。そのため推測ではあるが、通常カルシウム要求状態においても乳タンパク質のカルシウム可溶化力により骨強度増加に効果が期待できると考えられた。

表10 4週間飼育ラット群における大腿骨の断面形態特性の変化

	Bending stress (kg / mm ²)	骨周径 (mm)	皮質断面積 (mm ²)	I _x (mm ⁴)	I _y (mm ⁴)	I _p (mm ⁴)
低カルシウム群	6.03 ± 2.92 ※	10.04 ± 0.44	2.58 ± 0.20 ※	3.06 ± 0.26 ※	1.81 ± 0.26 ※	4.87 ± 0.73 ※
標準群	11.08 ± 0.85	10.74 ± 0.69	5.02 ± 0.56	5.85 ± 1.34	3.64 ± 0.69	9.49 ± 2.02
MFGM群	10.12 ± 0.79	10.43 ± 0.22	4.58 ± 0.16	4.95 ± 0.28	3.06 ± 0.16 _↓	8.01 ± 0.43 _↓
CPP群	10.48 ± 0.71	10.81 ± 0.11	5.05 ± 0.34	5.55 ± 0.40	4.06 ± 0.10 _↓ ※	9.61 ± 0.49 _↓ ※

± 標準誤差

※ p < 0.05 また、低カルシウム群のみの印は、標準食群、乳タンパク質群に対して低カルシウム群が有意に低い値を示した。

4-5. 骨形態

座標読取装置（デジタイザー）により、外周径、皮質骨面積、I_x、I_y、I_pを求めた。またこの値をもとに単位面積あたりの骨強度を示す曲げ強度（Bending stress）を算出した。これらの値を表10及び11に示す。4週間飼育において、低カルシウム食群はほぼすべての項目で低い値を示した。唯一骨周径だけが、他の群と同等の値を示した。8週間飼育群において、低カルシウム群は周径以外の全ての項目において、他の3群より有意に低い値を示した。MFGM群は他の群と比較して、ほぼ全ての計測値で高い値を示したが有意な差ではなかった。4週間飼育群と8週間飼育群の曲げ強度に有意な差は認められなかった。低カルシウム群の4週飼育群と8週飼育群において全ての項目において有意差は認められなかった。乳タンパク質飼料群の4週間飼育群と8週間飼育群において全ての値に増加傾向が認められた。

表11 8週間飼育ラット群における大腿骨の断面形態特性の変化

	Bending stress (kg / mm ²)	骨周径 (mm)	皮質断面積 (mm ²)	I _x (mm ⁴)	I _y (mm ⁴)	I _p (mm ⁴)
低カルシウム群	6.45 ± 0.75 ※	10.76 ± 0.40	2.65 ± 0.17 ※	3.75 ± 0.50 ※	2.18 ± 0.27 ※	5.93 ± 0.74 ※
標準群	10.33 ± 1.00	11.79 ± 0.52	6.69 ± 0.23	8.55 ± 1.33	5.69 ± 0.69	13.59 ± 2.49
MFGM群	15.62 ± 3.73	12.21 ± 0.32	6.53 ± 0.72	8.66 ± 0.96	6.29 ± 0.93 _↓	14.78 ± 0.54 _↓
CPP群	12.85 ± 0.43	11.14 ± 0.32	5.78 ± 0.35	6.93 ± 0.75	4.58 ± 0.61 _↓ ※	11.52 ± 1.35 _↓ ※

± 標準誤差

※ p < 0.05 また、低カルシウム群のみの印は、標準食群、乳タンパク質群に対して低カルシウム群が有意に低い値を示した。

この断面形態特性値は骨断面の形態とそれに付随する骨の強度を示している。骨の周径において低カルシウム食群と他の3群との間に差異が認められないが、皮質骨の面積値が低い値をとっている。4群ともに同程度の周径を示しながらも、皮質断面積値が低いことから、骨の厚みがないと考えられ、低カルシウム食群の他の群との強度の比較における低値は、この皮質骨の面積の低値に起因するものといえる。骨の強度を決定する要因の約9割は、その密度であるといわれており (15)、この試験にお

ける形態特性値に有意差が見られないことから、骨破断力と骨エネルギーが皮質密度に起因する骨の強度であると推測された。

参考文献

1. 菅野 長右門, 牛乳のラクトフォリン: その発見、特性および機能、日畜会報 61, 965-977 (1990)
2. 岡 進、宇都宮大学大学院修士論文 (1997)
3. 島岡 巖, 栢下 淳, 中条 巳佐男, 森 繁弘, 糸川 喜則, 門脈カテーテル留置ラットによるカルシウムカゼインペプチドの腸管吸収について、日本栄養・食糧学会誌 45, 339-345 (1992)
4. Forst, H. M., Bone modeling and skeletal modeling errors, *Illious*, 3-118, 1793
5. 須田 立雄, 小澤 英浩, 高橋 秀明, 骨の科学, 医歯薬出版, 11-287, 1985
6. Ezawa I, Okada R, Nozaki Y, Ogata E., Breaking-properties and ash contents of femur of growing rats fed a low calcium diet. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 32, 329-335 (1979)
7. 生野 邦彦, 小動物の体肢長骨の曲げ強度に関する研究, 京都府医大雑, 68, 1275-1299 (1960)
8. 松村 秋芳, 岡田 守彦, 高橋 彬, 木村 賛, 強制走行運動がラット大腿骨の断面形態に及ぼす影響について, 人類学雑誌, 91, 465-474 (1983)
9. Matsumura, A., and Okada, M., Bending strength of rat femur as influenced by running exercise and diet program, *J. Anthropol. Soc. Nippon*, 97, 341-351 (1989)
10. 高橋 秀雄, 足立 和隆, デジタイザーによる次元図解析プログラム, インターフェース, 59, 200-214 (1982)
11. 内藤 博, 腸管内におけるタンパク質の分解性. 化学と生物, 18, 551-558 (1980)
12. Brommage, R., Juillerat, M. A. and Lost, R., *Lait*, 71, 173 (1991)
13. 李連 淑, 朴 眞我, 内藤 博, 栄養誌, 45, 333 (1992)
14. Takada Y, Kobayashi N, Kato K, Matsuyama H, Yahiro M., effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 43, 199-210 (1997)
15. 江澤 郁子, カルシウム代謝および骨粗鬆症の予防の基礎および応用に関する研究、日本栄養・食糧学会誌、49, 247-257 (1996)
16. Krawitt, E. L., Stubbart, P. A. and Ennis, P. H., *Am. J. Physiol.*, 224, 548 (1973)
17. Sinha, R., Smith, J. C., and Sorares, J. H., Calcium and vitamin D in bone metabolism-Analyses of their effects with a short-term in vivo bone model in rat, 118, 99-106 (1988)
18. Lee, Y. S., Park, G., and Naito H., Supplemental effect of casein phosphopeptides on the calcium balance of growing rat. 日本栄養食糧学会誌, 45, 333-338 (1992)