

日本統合医療学会誌

THE SOCIETY FOR INTEGRATIVE MEDICINE JAPAN (IMJ)

Vol.2 No.2
2009年9月



発行／一般社団法人
日本統合医療学会



原 著

乳清活性タンパク質 (Concentrated-Bovine Protein; CBP) の骨密度に対する上昇効果の検証

Concentrated-Bovine protein (CBP) increases Bone Mineral Density.

内藤 健太郎*・松多 邦雄**

Kentaro NAITO

Kunio MATSUTA

はじめに

日本は人口の急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の発症率が年々増加しつつある。骨粗鬆症は骨の脆弱性が増し、骨折の危険性が増加する疾患として位置付けられ、一般的には骨密度の減少として定義されている^[1]。骨粗鬆症に対する適切な対策は、早期の成人期における骨量ピークを最大化させることであり、閉経後の女性にとっては急速な骨減少を防ぐことである。骨形成と骨吸収を繰り返す骨のターンオーバー過程は骨リモデリングと呼ばれ、長い年月をかけて進行する。したがって、エネルギーや各栄養素がバランスよく摂取できたうえで、骨の生理学的に有効な機能性栄養素を摂取することは骨の健康管理に役立つものと思われる。

歴史的に、牛のミルクは優良な栄養価値を持つことから幅広く消費され、カルシウムの優れた源として広く認知されている。一方で、ミルクに含まれているホエイタンパク質が骨リモデリングに機能的に働くことがいくつかの報告により示唆されている^[2,3]。特に、牛のミルク由来のホエイタンパク質は塩基性画分において骨生理学的に有用であることが証明されており、その主とする作用機序は破骨細胞の媒介する骨の吸収の阻害を通じたものと考えられている^[4]。また、同塩基性タンパク質は健康な高齢女性や健康な男性を対象とした臨床試験において、毎日摂取することで骨密度に有意な増加をもたらすことから、骨の機能性栄養素として注目されている^[5,6]。

最近になって、ホエイタンパク質の低分子画分(1-30 kDa)において骨形成の促進を担う活性成分が新たに乳清活性タンパク質 (Concentrated-Bovine

Protein; CBP) 画分として特定された^[5]。同報告において、卵巣摘出された若齢ラットのCBP摂取群において、対照群に比べ有意に大腿の骨強度を増加させたことが示している。非常に興味深い点として、検証においてCBPは動物のサイズおよび骨の縦方向の伸長が確認され、潜在的に成長を促進する活性を有する可能性が考えられている。一方で、人での臨床試験データが乏しいため、CBPが骨の代謝に関連した栄養素であることをヒト臨床試験による検証により進める必要があった。

対象と方法

対 象

15名の健康と思われる男女(平均[±標準偏差]年齢、43.7±8.8)は、弊社内において我々の研究所での本研究内容に関する趣旨の説明を受けた上で漸増された。署名されたインフォームド・コンセントは各対象から取得した。被験者はエストロゲン、グルココルチコイド、あるいはその他の骨の代謝に影響を及ぼすことで知られている医薬品を最近の3年間の間に服用していない者を対象とした。本試験はworld medical association (1964年のヘルシンキ宣言【2000年に改定】)の倫理協定に従って進めた。

本3か月の二重盲見の平行群間比較試験において、被験者はあらかじめDHCの遺伝子キット「骨力対策キット」を受診してもらい、体重、身長、Body Mass Index (BMI)、およびBone Mass Density (BMD)を元にプラセボ、あるいはCBP摂取群へと無作為に割り当てた。8名の被験者は試験食として60 mgのCBPを配合した打錠を受け、その他の7名はプラセボの打錠を受けた。200 mgの各打錠は有効成分の他には臍形剤のみをその含有成分とした。

CBPはSeperex, Ltd. (ニュージーランド)の所有する専売工程を用いて調製された。ここではその工程の概略を示す。高タンパクなCBP濃縮物を調製

* 株式会社ディーエイチシー

** 松多内科医院

するに当たり、牛由来の生乳を脱脂処理、低温殺菌、限外濾過、噴霧乾燥を行った。次に、そのCBP濃縮物を元に戻し、ディアフィルトレーション (30 kDa膜) によって主要な非ホエイタンパク質を取り除いた。浸透液は限外濾過/ディアフィルトレーション (1 kDa膜) により低分子領域を取り除かれ、混合された。そのCBPに含まれる主要なタンパク質は1~30 kDa以内である (データは示さない)。

各群の被験者は1日に1錠 (200 mg) ずつ摂取してもよいと指導を受けた。被験者は1.5か月の期間を通して、普段通りの食事を維持するよう勧告された。各被験者は測定のために摂取前と摂取後に施設にきてもらい、血液および骨密度の測定を受けた。

対象の状態、およびコンプライアンス

1.5か月の試験期間中において、15名の被験者で脱落する者はいなかった。腫脹、下痢、アレルギーの症例はいずれの群からも報告されなかった。全ての被験者はプロトコルに従い研究を完遂した。

解析方法

BMDの測定は両手のX線解析に基づく一重X線吸収光度法を採用し、中指の第2関節の骨塩量により値を算出した。すなわち、東芝メディカル社製のBEAM LIMITING DEVICE (IF-6, TL-6) にてX線照射し、東芝メディカル社製のROTANODE (DRX-1603B) にて撮影を行った。また、毎回の測定時に段階的な厚みを持たせたアルミブロックが備え付けてあるプラットホームをコントロールとして同時スキニングを行った。血液は午前9時から午前12時までの間に採取し、採取前の少なくとも8時間は絶食の状態を維持した。採取したサンプルは解析まで-20℃で冷凍保存した。血清中の骨特異的なアルカリホスファターゼ (BAP)、およびオステオカルシン (BGP) は免疫選択的な酵素アッセイにて測定した。全てのバイオケルミカルマーカーは三菱バイオクリニカル研究株式会社により解析された。

統計解析

プラセボ群およびCBP摂取群それぞれにおいて開始時のBMD値と1.5か月後のBMD値との間における相関係数は単回帰分析によって求められた。プラセボ群およびCBP摂取群それぞれにおいて開始時のBMD値と1.5か月後のBMD値との間における統計学的な差は対応のあるスチューデントの*t*検定によって確認した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であ

表1 1.5ヶ月間プラセボまたはCBP錠剤を摂取する被験者の臨床的ベースライン調査結果

	プラセボ群	CBP群
被験者数(うち、女性)	7(5)	8(7)
年齢(歳)	41.6±6.9	44.7±9.6
体重(kg)	58.1±9.5	56.8±16.0
身長(cm)	163.6±4.1	162.0±8.8
BMI値	21.5±2.8	21.5±4.5
BMD値(mmAL)	2.89±0.21	2.83±0.24

ると判断した。BMD値の増加率の結果については平均値±標準偏差であらわす。統計的な差はスチューデントの*t*検定によって確認した。 $P < 0.05$ を統計学的に有意であると判断した。

結果

対象のベースライン特性

被験者のベースライン臨床的特性は表1に示した。総括的にCBPおよびプラセボ群間において年齢、体重、身長、BMI、あるいはBMDのいかなる数値においても有意な差は見られなかった。

DHCの遺伝子キット『骨力対策キット』の結果と摂取前における血中マーカーとの相関性

DHCの遺伝子キット『骨力対策キット』は、カルシウムの骨への取り込みを制御するビタミンD受容体関連遺伝子 (VDR) と造骨を制御するオステオカルシン関連遺伝子 (BGLAP) との2つの遺伝子について検査を行い、潜在的な骨粗鬆症発症リスクを総合判定 (低、中、高の3段階判定) するキットである。今回の治験に参加した被験者の総リスク判定は、低リスク判定11名、中リスク判定5名、高リスク判定0名であった。また、2遺伝子の検査結果の内訳として、両遺伝子が“標準”な被験者が4名、VDR遺伝子が“やや低い”被験者が4名 (うち1名は“低い”被験者が1名)、BGLAP遺伝子が“やや低い”被験者が7名という結果であった。

血中マーカーであるBAPとBGPのそれぞれの結果と、遺伝子キットの検査結果を比較し、相関性の検証を行った。図1A,Bに示されたように、VDR遺伝子がやや低いと判定された治験者の群において、両遺伝子が“標準な”被験者の群においてほぼ差が見られないのに対し、BGLAP遺伝子が“やや低い”と判定された群との差において、BAPとBGPの双方の造骨マーカーにおいてやや低い傾向が見られた。

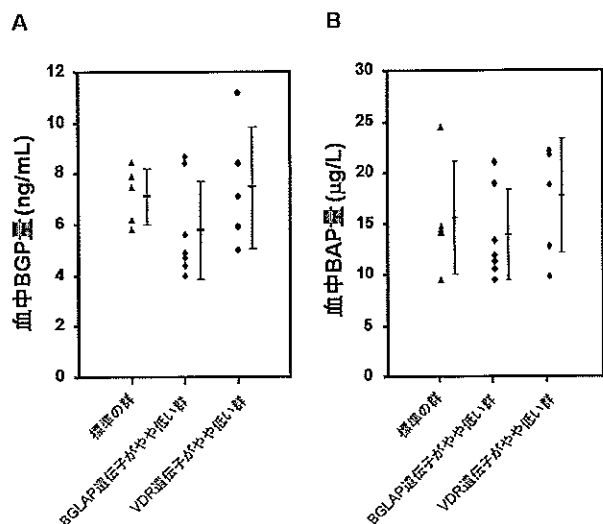


図1 DHCの遺伝子キット『骨力対策キット』による遺伝子レベル判定により振り分けた3群の血中BGP量レベル(A)と、血中BAP量レベル(B)

Bone mineral density (BMD)

中指の第2関節における試験開始時の平均BMD値は2つの群間において類似していた(表1)。試験期間中における中指の第2関節のBMD値の変化は図2Aに示した。有意差は見られなかったが、CBP摂取群におけるBMD値は増加傾向にある一方で、プラセボ群におけるBMD値はやや減少する傾向が見られた。単回帰解析はプラセボ群とCBP摂取群とに分けて行った結果、それぞれの群において開始時のBMD値と1.5か月後のBMD値との間に強い相関性(プラセボ群: $r = 0.988$, CBP摂取群: $r = 0.913$)があることが明らかとなり、CBPのBMDに対する効果は1.5か月の処置後におけるBMD値の増加の割合として評価された。図2Bに示されるように、中指の第2関節のBMD値の平均増加(±標準偏差)はプラセボ群におけるものに比べCBP摂取群において有意差はつかないが、十分に傾向が見られる結果であった。一方、血中マーカーであるBAPとBGPの双方の造骨マーカーについては、双方においてCBP摂取群において一部の被験者において強い増加の傾向が認められたが、総合的にバラつきが大きいことから有意とされる結果は得られなかった(データは示さない)。

DHCの遺伝子キット『骨力対策キット』の結果とBMDとの相関性

BGLAP遺伝子が“やや低い”と判定された群におけるプラセボ群とCBP摂取群の内訳は、プラセ

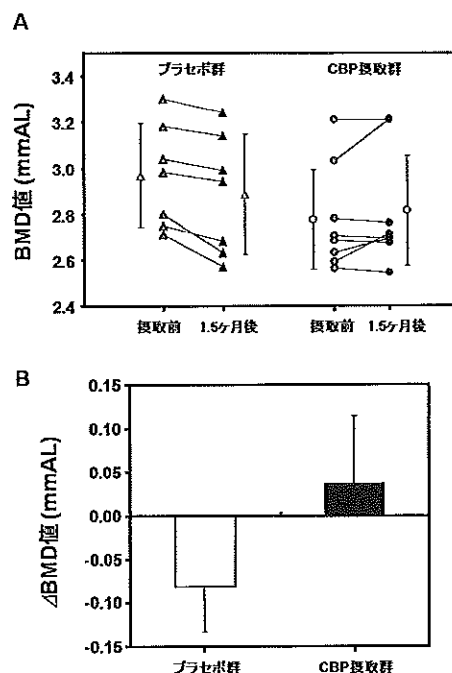


図2 1.5ヶ月間プラセボまたはCBP錠剤を摂取する各被験者のBMD値の摂取前(△、○)と摂取後(▲、●)における変化(A)と、被験者の増加したBMD値

ボ群4名、CBP摂取群3名であり、VDR遺伝子がやや低いと判定された治験者の群の内訳は、プラセボ群2名、CBP摂取群3名であった。

BGLAP遺伝子が“やや低い”と判定された群において、CBP摂取群はプラセボ群に比べBMDが増加している傾向が見られ、VDR遺伝子がやや低いと判定された治験者の群においても同様の傾向が見られた(データは示さない)。

考察

CBPは牛の生乳から得られるホエイタンパク質の低分子画分(1-30 kDa)を独特の抽出工程を経て調製された新規な乳清の栄養素である¹⁰⁾。これまでの研究において、細胞レベルおよび動物レベルにおいて骨密度を増加させる効果があることが明らかとされているが、これまでに人での検証について評価されていない。したがって、我々は本研究において人においてCBPを摂取することでBMD値にどのような変化が得られるか検証を行った。

CBPは、1.5か月という比較的短い試験期間にもかかわらず、対照群に比べBMD値を増加させる傾向を有していることが本研究のデータにより明らかとなった。一方、血中マーカーであるBAPおよびBGPにおいては、対照群に比べてCBP摂取群の一

部被験者において強い増加の傾向が認められたが、総合的にバラつきが大きいことから有意とされる結果は得られなかった。この要因として、今回の治験に参加した被験者の年齢層が、30代～60代までの幅広い層から構成されていることから、年齢による差異が造骨マーカーの基底レベルの差異に反映されたため、総合的な判定を困難にしていたことが推察された。

また今回、我々は新たな試みとして、DHCの遺伝子キット『骨力対策キット』による遺伝子レベルでの潜在的な骨粗鬆症発症リスクを併用したCBPの有効性検証を進めた。CBPまたはプラセボ錠剤を摂取する前に測定した血中マーカーの測定結果と、本遺伝子キットで得られた結果を比較した。その結果、BGLAP遺伝子と血中の造骨マーカーと相関性を示し、VDR遺伝子との相関性は見られなかった。また、BGLAP遺伝子はBGPの発現を制御する遺伝子であるとされており、当初の予想ではBGPのみに相関性を示すものと考えていた。しかしながら、我々の予想に反し、BAPを含めた双方の血中マーカーと相関性を示したことから、BGLAP遺伝子における脆弱性は骨形成全体に対する脆弱性に繋がる可能性が示唆された。一方、これら2つの遺伝子に若干の脆弱性が見られた被験者においても、CBPは有効的に働く可能性がBMD値での結果から明らかとなった。但し、今回の検証においては、被験者の人数や1.5カ月という短い期間における検証のため、今後、さらに被験者を増やしながら、年単位での長期の検証を進めていく必要があるものと思われる。

現在の骨粗鬆症リスクを判定する遺伝子キットの多くはVDR遺伝子のみによる診断判定が多い一方で、BGLAP遺伝子に関してはVDR遺伝子に比べ診断の上では重要視されていない。こうした要因として、BGLAP遺伝子が近年に特定された遺伝子であり、同遺伝子に関する報告や知見がVDR遺伝子に比べて少ないことに起因しているものと思われる。しかしながら、我々の示す結果は、VDR遺伝子と比べても骨粗鬆症のリスク検出をより高感度に検出できる重要な遺伝子であることが示唆されることから、今後、本遺伝子に関する検証を含めてCBPとした骨粗鬆症の予防医学的見地を含めた検証を重ねることは非常に重要であると思われる。

まとめ

本研究において示された結果は、CBPが骨の生理

学的に有効な機能成分の有力な素材の一つであり、日常の食生活に併せてCBPを摂取することは骨の健康管理に大いに役立つものと思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、測定機関のご紹介や様々なご助言を賜りました株式会社アオテアロアの髙橋社長に御礼申し上げます。松多内科医院での測定に際しまして、治験者の適切な誘導や様々なご助言を頂きました株式会社アオテアロアの和田祐紀様および看護師の皆様にご礼申し上げます。

文献

- [1] 折茂肇：骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2006年版。ライフサイエンス出版，東京，2006：2-8.
- [2] Rao PU, et al.: Protein fractions in human milk. II. Isolation & characterization of basic protein from human milk & the lytic activity of milk samples. *Indian J Biochem Biophys.* 1973; 10: 87-90.
- [3] Donovan SM, et al.: Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu Rev Nutr.* 1994; 14: 147-67.
- [4] Aoe S, et al.: Controlled trial of the effects of milk basic protein (MBP) supplementation on bone metabolism in healthy adult women. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65: 913-8.
- [5] Toba Y, et al.: Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001; 65: 1353-7.
- [6] Lee J, et al.: Effect of a Growth Protein-Colostrum Fraction on bone development in juvenile rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72: 1-6.
- [7] Raymond MH, et al.: Osteocalcin: genetic and physical mapping of the human gene BGLAP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics.* 1999; 60: 210-7.

▶著者略歴◀

専門 分析化学、分子細胞生物学
 経歴 2000年 名古屋大学農学部卒業
 2002年 名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻 修士課程修了
 2004年 名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻 博士課程中退
 2004年 株式会社ディー・エイチ・シー入社 DHC第2研究所総合基礎研究室配属、現在に至る