

氏 名(本籍) つち た ひろし
土 田 博

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 5 3 9 号

学位授与年月日 平 成 8 年 1 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 乳中のカルシウムの利用性に関する栄養
学的研究

論文審査委員(主 査) 教 授 藤 本 健四郎

教 授 古 川 勇 次

教 授 須 山 享 三

論文内容要旨

平成3年度に行われた国民栄養調査報告において、カルシウムは摂取量が所要量を下回る唯一の栄養素であり、所要量を満たす必要のあることが強く指摘されている。さらに、高齢者人口の急激な増加が予想されることから、骨粗鬆症を予防する上で、すべての年齢層においてカルシウム摂取の一層の増大が必要とされている。カルシウム総摂取量の24%は牛乳・乳製品を供給源としているが、乳糖不耐症や嗜好の違いなどの理由から牛乳・乳製品の摂取増加には限界があるのが実態である。一方、乳の処理・加工技術の発展によって、様々な成分組成、物理化学的特性を有する食品素材の提供が可能になってきている。本研究でとりあげた乳清ミネラル複合物およびカゼインホスホペプチドはこのような素材の代表的なものであり、その栄養学的特性の解明は、急務である日本人のカルシウム栄養の改善に寄与するところが大きいと考えられる。

チーズなどの製造時の副産物である乳清ミネラル複合物 (Whey mineral complex, 以下WMC) は、そのカルシウムや亜鉛の利用性が高いことが、ラットを用いた試験により報告されていることから、カルシウム補給用素材として注目されている。しかし、その作用機序に関しては解明されていない。WMCは調製方法によりミネラル組成が変動し、さらに乳清の様々な成分の移行も量的、質的に変動するため、製法によりその生物学的効果が変化することが予想される。そこで本研究第一部ではWMCの成分組成がミネラルの生体利用性に及ぼす影響、およびその作用機序の解明を行った。

牛乳カゼインのトリブシン分解物から調製した、ホスホセリンを多く含むペプチド混合物であるカゼインホスホペプチド (以下CPP) は、小腸管腔内においてカルシウムの吸収を促進することがin vitroやin situ試験により明らかにされている。その促進効果はカルシウムの不溶化を阻止することによって生じると考えられているが、in vivo試験におけるCPPの効果に関しては、一致した見解が得られていない。このような見地から本研究第二部ではカルシウム補給のための機能性食品素材としての可能性を検討することを目的として、食餌性CPPがカルシウムの吸収、利用性に及ぼす影響についてin vivoモデルを用いて解析した。

第1部 乳清ミネラル (WMC)

第一章 成長期雄ラットにおけるWMC中のミネラル利用性

工業的製品として品質が安定しているWMC1を対象に、飼料カルシウム水準が低い場合の成長期雄ラットにおけるミネラルの利用性を焼成牛骨粉および炭酸カルシウムを対照として検討した。それぞれのカルシウム源により飼料のカルシウム水準を0.1、0.2、0.3%とし、リンを0.4%とした試験食を調製し、ラットに自由摂取させ4週間飼育した。

その結果、WMC1を与えた群の大腿骨破断強度と上腕骨骨密度、大腿骨カルシウムおよびリン量は焼成牛骨粉を与えた群より高値であった。また、炭酸カルシウムを与えたラットの値に比較しても高値傾向を示したことから、ミネラル源としてのWMCの有用性が確認された。カルシウムの出納試験においては顕著な差が認められなかったものの、WMC1摂取群ではリンの代謝に他群との差が認められ、これが骨形成に反映した可能性が示唆された。また、X線回折分析により示されたWMCのリン酸カルシウムの物理化学的特性及び存在形態、あるいはWMC中の乳糖以外の乳成分がミネラルの利用性に関与している可能性も示唆された。

第二章 成分の異なる2種類のWMCの成長期雄ラットへの投与が骨代謝に及ぼす影響

ミネラル利用性に関わる因子をさらに明らかにするため、調製法と成分組成の異なる2種類のWMC (WMC1、WMC2)を用い、その生物試験結果及び成分分析結果を比較検討することにより解析を行った。Fig. 1に示すように、WMC1にはナトリウム、カリウム、塩素および乳糖が多く、WMC2ではカルシウム、リンおよび含窒素成分が多く含まれていた。

WMC1またはWMC2をカルシウム源とする試験飼料を成長期雄ラットに4週間与えた結果、飼料カルシウム水準0.3%においてWMC1を与えた動物の結果は第一章の結果とよく一致し、リンの代謝はWMC2と共通していた。飼料カルシウム水準が0.6%のときWMC2を与えた群の大腿骨カルシウム量 (Fig. 2) と上腕骨骨密度 (Fig. 3) は炭酸カルシウムを与えた対照群よりも高値を示し、WMC1群の値はWMC2群の値よりやや劣った。

WMC1に由来するナトリウムはナトリウム摂取量を高め、飼料カルシウム水準0.3%の群においてカルシウム代謝に若干の影響を与えた点を除き、WMC1とWMC2のミネラル利用性の差に関してそれぞれのミネラル成分組成の差が反映した可能性は少なかった。WMC2に多く含まれる蛋白質はミネラルとの複合物を作ることによりその利用性を向上させていること、あるいは比較的多く存在しているペプチドが骨代謝に関与している可能性が考えられた。脂質の含量はWMC1とWMC2においてほぼ同水準であったが、その組成には差が認められ、いずれも牛乳脂質とは異なっていた。以上の比較から、WMCのミネラル利用性は脂質成分、あるいは含窒素成分により影響を受けている可能性が推察された。

第三章 WMC中の脂質がミネラル利用性に与える影響

脱脂処理したWMC1とWMC2を卵巣摘除 (Ovariectomized, OVX)ラットに与えたところ、大腿骨カルシウムやリン量、破断強度は未処理品を与えた動物の値に比較して低値を示した。また、WMCの脂質中に極微量のエストラジオール、プロゲステロン、 $1\alpha,25$ -ジヒドロキシコレカルシフェロール (以下、 $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$) などのステロイドホルモンを検出した (Table 1)。

そこで、WMC1とWMC2から抽出した脂質(L1、L2)を成長期OVXラットに経口投与しながら通常食を自由摂取させ4週間飼育した(L1群、L2群)。対照群には賦形剤として大豆油のみを投与した。また、エストラジオールとプロゲステロンの影響を確認するため、L2とほぼ同水準のこれらの標品を投与した群も導入した(PE群)。

その結果、L2群のカルシウム吸収率は他の群に比較して有意に高値を示した (Fig. 4)。リンの代謝に関してはL1およびL2の影響は認められなかった。L2群の大腿骨カルシウム、上腕骨骨密度は対照群よりも有意に高く、PE群よりも高い傾向を示した (Table 2)。L1のカルシウム吸収及び骨特性に対する影響はL2ほど明確ではなかった。さらに、L2群の血清プロゲステロンは低値を示し、血清カルシトニンと血清 $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ は高値を示した。従って、L2に含まれる $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ によるカルシウム吸収促進に加えエストラジオールおよび $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ の骨吸収抑制と骨形成に対する効果が発揮されたものと考えられた。一方、L1はエストラジオールや $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ の含量がL2より低く、逆にプロゲステロンは相対的に多いことが骨塩形成に影響を与えなかった理由であろうと考えられた。

以上のことから、WMCのミネラル利用性に対するホルモンの寄与が明らかとなり、さらには検討したホルモン類以外の脂質成分の影響も示唆された。

第2部 カゼインホスホペプチド(CPP)

第四章 成長期卵巣摘除ラットにおけるカルシウム利用性に対するCPPの効果

CPPの生物学的影響を明確にするため、分画した β -カゼインから精製度の高いCPPを調製した(β CPP)。カルシウム要求度を高めた動物、即ち低カルシウム食にて4週間飼育した成長期OVXラットを用い、 β CPPを0.15%含む試験飼料を4週間与えた。

その結果、カルシウム水準0.5%の試験飼料給餌直後においてのみ、 β CPPを与えた群においてカルシウム吸収量が有意に高値を示し (Fig. 5)、飼育終了後の大腿骨カルシウム量は高値傾向を示した (Table 3)。これに対し、より低いカルシウム水準の飼料を与えたとき、および他の期間に実施した出納試験においては β CPPの効果は明確ではなかった。

以上のことから、CPPの栄養学的効果はカルシウム吸収増強という指標だけでなく、生体利用性即ち骨形成や骨代謝という面からも評価する必要があることが示唆された。また、消化管内におけるCPPの作用発現は動物のカルシウム要求度や飼料のカルシウム水準及びCPP水準によって影響を受けることが推察された。これらは精製度の高いCPPを低水準で与えた結果、初めて明らかになったことであり、CPPの栄養学的価値をさらに追求する意義を示したと考える。

第五章 成長期雄ラットの骨代謝に及ぼすCPPの影響

in vivoにおけるCPPの作用発現に及ぼす種々の要因の中で、CPPとカルシウムイオンの消化管内における相互作用が大きく影響すると予想される。そこで、予めカルシウムを結合させたCPP (CaCPP) を調製し (Table 4)、これを飼料カルシウム源として用いることにより、CPPとカルシウムの相互作用を一定にすることができるのではないかと考えた。また、CPPによりリンも同時に供給されるのでその利用性についても着目し、比較としてカルシウムが結合していないCPP(Ca-free CPP)を対照に用いた。CaCPPを唯一のカルシウムとリン源とした飼料およびCa-free CPPを唯一のリン源とした飼料を調製し、成長期雄ラットに与え4週間飼育した。対照食のカルシウムとリン源には炭酸カルシウムとリン酸二水素カリウムを用いた。

その結果、CaCPP食群とCa-free CPP食群の各ミネラル吸収量と保持量については対照群の値に比較して有意な差は認められなかった。CaCPP群とCa-free CPP群の腎尿細管リン再吸収率は高値を示し、大腿骨リン量の高値との関連が示された (Table 5)。CaCPP群の大腿骨 (Fig. 6) および上腕骨骨幹部の骨密度は対照群に比べ有意に高値を示したが、Ca-free CPP群の骨密度は対照群とほぼ同等の値であった。さらに、CaCPP群では血清オステオカルシンが高値を示し、PTHの指標である尿cAMPが低値を維持したことから骨形成の増強と骨吸収の抑制があったことが示唆された。

以上のことから、CaCPP中のカルシウムとリンの利用性は良好であり、特にリンの利用性は高く、これが骨形成に反映したことが明らかになった。しかし、Ca-free CPPに関してはリン代謝への影響がCaCPPと共通していたものの骨密度に対する影響には差が認められた。CPPに結合したカルシウムの利用性あるいは食餌性CPPの骨に対する効果を明確に示した例は他に認められないことから、その再現性の確認、および作用機序についてさらに検討が必要と考えた。

第六章 閉経後骨粗鬆症モデルラットの骨塩減少に及ぼすCPPの影響

CPPの長期摂取が骨に及ぼす影響を解明するため、閉経後骨粗鬆症モデル動物として老齢OVXラットを作製し、CaCPP食あるいはCa-free CPP食を給与して17週間飼育し、骨密度の変化を経時的に観察した。CaCPP食ではCaCPPが唯一のカルシウム源であり、食餌性リンの62.5%を供給し、一方、Ca-free CPP食では食餌性リンのすべてをCa-free CPPにより供給した。また、対照食には炭酸カルシウムとリン酸二水素カリウムを用い、OVXラット及びSHAMラットに与えて対照とした。

その結果、CaCPP群およびCa-free CPP群の大腿骨骨密度の試験期間中の減少はSHAM群と同様にわずかであったが、OVX対照群では飼育に伴い漸減し、飼育終了時には約20%低下した (Fig. 7)。また、CaCPP群の摘出大腿骨骨密度はOVX対照群に比べ有意に高値を示した (Fig. 8)。Ca-free CPP群ではCaCPP群と同等の大腿骨骨密度低下に対する抑制効果が認められたのに対し、摘出大腿骨の骨密度はCaCPPを与えた群より明らかに低値であった。これはCa-free CPP群の試験期間中の体重減少により骨の成長が劣り、骨量の低下が摘出大腿骨骨密度の低値に反映した結果と考えられる。Ca-free CPPは酸性において不溶性であり、他の陽イオンと結合しやすいというような特性があることから、窒素源としての利用性、あるいは動物の嗜好性に影響があり、体重減少をもたらしたものと推察した。血清カルシウム値の結果からもCaCPP群、Ca-free CPP群における骨吸収の抑制が示された。CaCPP群のオステオカルシンは高値傾向を示し、骨形成促進効果が示された。飼育期間中、CaCPP群の尿中リン排泄は対照OVX群とSHAM群に比較して低値傾向を示し (Fig. 9)、カルシウム排泄はわずかに増加傾向を示し、CaCPPがカルシウムとリンの代謝を介して骨代謝に影響を与えたことが確認できた。

以上の結果は、成長期雄ラットにおいて確認したCaCPPのカルシウムとリンの利用性の良さと一致しただけでなく、骨粗鬆症モデルにおける骨塩減少抑制効果という、新たな生理的機能を示したものとして意義あるものと考えられる。

第七章 総括

本研究はWMC中のミネラルの利用性の評価とその作用機序の解明、並びにCPPがカルシウム利用性に与える影響の解明を目的として行ったものである。

成長期雄ラットを用いて飼料カルシウム水準が低いときのWMCのミネラル利用性を確認し、さらに十分な飼料カルシウム水準においてもミネラル利用性、特にリンの利用性が良好であることを明らかにした。2種類のWMCの成分組成及び生物試験結果の比較から、WMC中のミネラルの存在形態およびミネラル以外の成分が良好なミネラル利用性に寄与している可能性を示した。そこで脂質に着目し、WMCから抽出した脂質を卵巣摘除ラットに投与して骨代謝に与える影響を検討し、抽出脂質中の極微量エストラジオールやプロゲステロン、あるいは $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ がカルシウム吸収及び骨形成に影響を与えていることを明らかにした。これらのホルモンは、乳脂肪を含む牛乳・乳製品中に広く存在しているが、非常に低水準であるため従来は生体に及ぼす影響について注目されていなかった。しかし、本研究により脂質中の微量ホルモンがWMCのミネラル利用性に大きく寄与していることが明らかになったことにより、他の乳素材であってもこれらの濃度や組成によっては、骨代謝に影響を与える可能性があることが示された。

食餌性CPPによるカルシウム吸収促進効果は、カルシウム要求度の高い動物において十分量のカルシウムを補給した直後のみ確認された。即ち、消化管内におけるCPPの作用発現は動物のカルシウム要求度や飼

料のCPP水準及びカルシウム水準、さらにはCPP自身とカルシウム源の物理化学的特性に基づく相互作用によって影響を受けることを明らかにした。この時、骨ミネラル化に対する影響も示唆されたので、CPP自身に由来するリンとカルシウムの利用性に着目して骨に対する影響を追求した。その結果、CPPに結合したカルシウムの利用性は高く、CPPに由来するリンの利用性も良好であった。さらに長期のCaCPP摂取による閉経後骨粗鬆症モデルラットの骨塩減少抑制というCPPの新たな生理学的効果を確認し、CaCPPに由来するカルシウムとリンの利用性を介した骨塩形成の促進と骨吸収抑制であることを解明した。

本論文における一連の研究により、カルシウム吸収と骨形成に対するWMC中の微量ホルモンの寄与、あるいはカルシウム・リン源としてのCPPの骨代謝への関与が明らかになった。その成果は、カルシウム補給食品としてのWMCおよびCPPの有用性を評価したにとどまらず、牛乳・乳製品の栄養学的意義を深めたと考える。

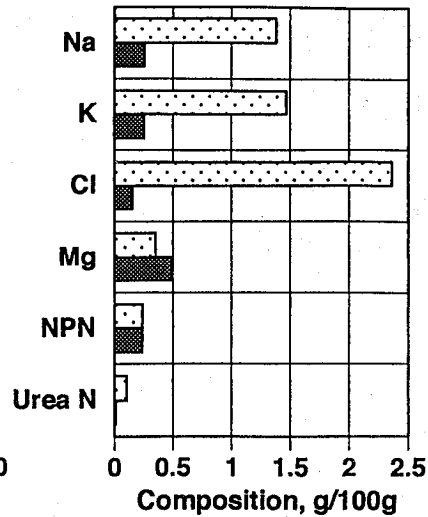
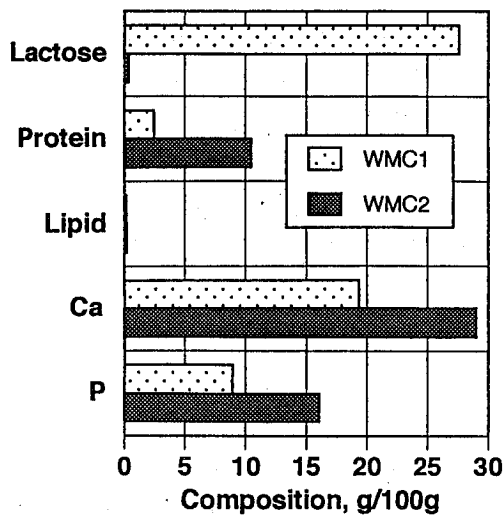


Fig. 1 乳清ミネラルの成分組成比較
 蛋白質はKjeldahl N×6.38、非蛋白態窒素(NPN)は
 12%トリクロロ酢酸可溶性画分のKjeldahl Nで示す。

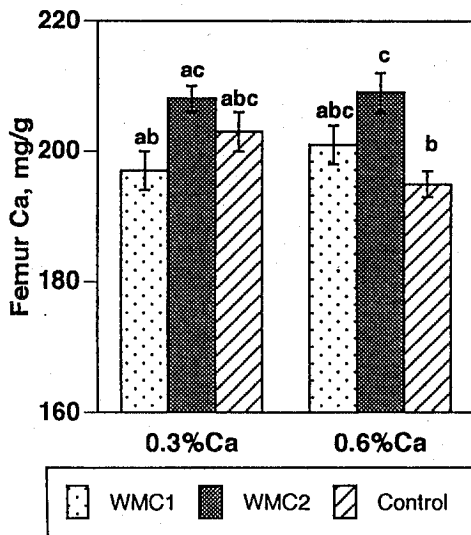


Fig. 2 大腿骨カルシウム量に対する飼料カルシウム源及びカルシウム水準の影響
 値は平均値±標準誤差で示す。共通するアルファベット文字を持たない値の間には有意差がある (P<0.05)。

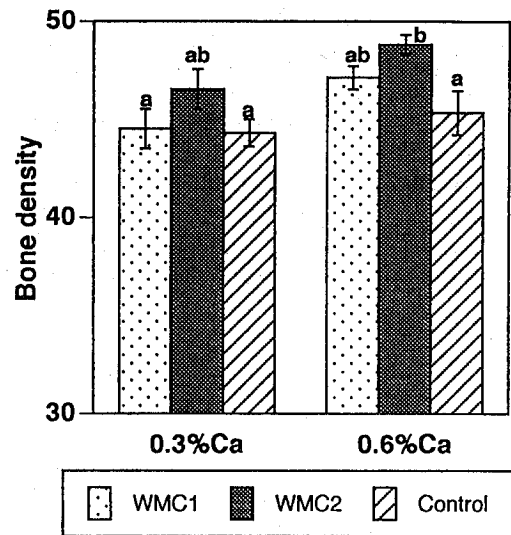


Fig. 3 上腕骨骨密度 に対する飼料カルシウム源及びカルシウム水準の影響
 値は平均値±標準誤差で示す。共通するアルファベット文字を持たない値の間には有意差がある (P<0.05)。

Table 1 Hormones in whey mineral complex.

	WMC1	WMC2
β -Estradiol (pg/g)	18.3	38.5
Progesterone (ng/g)	0.18	0.23
Androstenedione (ng/g)	0.2	0.2
Dehydroepiandrosterone (ng/g)	0.19	0.31
1 α ,25-Dihydroxy vitamin D (pg/g)	1.1	3.8

Table 2. Effects of extracted lipid on body weight, femur mineral analyses, and bone density of the humerus and ulna.¹

Treatment	Animal				
	OVX				SHAM
	L1	L2	PE	Control	Control
Body weight (g)	290.6 \pm 3.7 ^a	289.9 \pm 4.2 ^a	292.3 \pm 4.9 ^a	288.9 \pm 6.5 ^a	233.8 \pm 5.4 ^b
Femur					
Dry weight (mg)	420.4 \pm 3.8 ^{ab}	448.3 \pm 6.8 ^a	445.0 \pm 8.2 ^a	435.5 \pm 9.1 ^{ab}	399.6 \pm 12.4 ^b
Ca (mg)	76.9 \pm 2.1 ^{abc(ab)}	79.5 \pm 1.0 ^{a(a)}	77.6 \pm 1.2 ^{ab(a)}	71.6 \pm 1.4 ^{bc(b)}	69.6 \pm 3.0 ^c
P (mg)	30.6 \pm 0.9	32.7 \pm 0.8	33.6 \pm 0.6	32.9 \pm 0.7	33.3 \pm 1.9
Mg (mg)	15.5 \pm 0.4	15.9 \pm 0.4	16.2 \pm 0.4	16.0 \pm 0.3	15.8 \pm 0.7
Ca/P	2.5 \pm 0.0 ^{a(a)}	2.4 \pm 0.1 ^{ab(ab)}	2.3 \pm 0.0 ^{abc(bc)}	2.2 \pm 0.1 ^{b(c)}	2.1 \pm 0.1 ^c
Bone density					
Humerus	55.9 \pm 2.0 ^{a(a)}	66.0 \pm 2.2 ^{b(b)}	60.3 \pm 2.1 ^{ab(ab)}	57.3 \pm 1.4 ^{a(a)}	56.3 \pm 1.8 ^a
Ulna	51.4 \pm 0.8 ^{a(a)}	57.4 \pm 1.2 ^{b(b)}	54.9 \pm 1.0 ^{ab(ab)}	53.3 \pm 1.0 ^{ab(a)}	51.8 \pm 1.8 ^a

¹ Values are M \pm SE. Means in the same row not sharing a common superscript letter are significantly different by the Bonferroni test (P<0.05). A superscript letter in the parentheses shows the comparison among the groups of OVX rats.

Table 3. Effect of β CPP supplementation on femur mineral concentration.¹

	0.1%Ca		0.3%Ca		0.5%Ca	
	Control	β CPP	Control	β CPP	Control	β CPP
Dry weight (mg)	325.3 \pm 16.6 ^a	317.1 \pm 13.2 ^a	415.6 \pm 10.0 ^b	412.6 \pm 10.1 ^b	410.9 \pm 13.0 ^b	437.6 \pm 7.8 ^b
Ca (mg/g)	156.5 \pm 3.7 ^a	159.5 \pm 2.6 ^a	180.5 \pm 2.8 ^b	189.2 \pm 4.2 ^{bc}	189.2 \pm 3.6 ^{bc}	200.8 \pm 7.6 ^c
P (mg/g)	74.6 \pm 2.1 ^a	81.0 \pm 2.1 ^{ab}	87.5 \pm 1.8 ^{bc}	92.6 \pm 1.4 ^c	92.8 \pm 2.1 ^c	93.1 \pm 2.3 ^c

Two way ANOVA²

	Main effect	
	Dietary Ca level	β CPP supplementation
Dry weight	**	NS
Ca	*	*
P	**	*

¹ Values are means \pm S. E. Means in the same row not sharing a common superscript letter are significantly different by Tukey's q-test ($p < 0.05$).

² **and *, significant effect ($p < 0.01$ and $p < 0.05$); NS, not significant ($p < 0.05$).

Table 4. Composition of casein phosphopeptides.

	Ca-free CPP	CaCPP
	g/100g	
Kjeldahl N	12.1	12.0
Moisture	7.4	4.7
Ca	0.00	6.24
P	3.34	2.89

Table 5. Effect of dietary CPP on femoral mineral concentration.¹

	Diet		
	CaCPP	Ca-free CPP	Control
Femur	mg		
Wet weight	856.9 \pm 16.3 ^a	865.8 \pm 13.0 ^a	803.9 \pm 12.2 ^b
Ash	336.9 \pm 5.8	328.6 \pm 4.1	326.0 \pm 4.3
Ca	117.2 \pm 2.4	110.5 \pm 2.0	114.7 \pm 3.1
P	60.9 \pm 1.5 ^a	59.5 \pm 1.1 ^{ab}	55.9 \pm 1.2 ^b
Mg	2.2 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1

¹ Values are M \pm SE. Means in the same row not sharing a common superscript letter are significantly different by the Bonferroni test ($p < 0.05$).

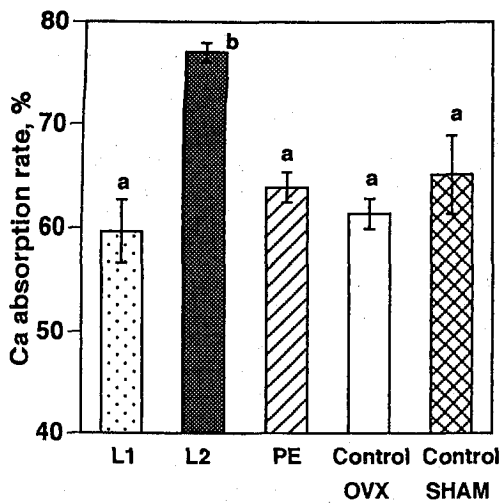


Fig.4 乳清ミネラルから抽出した脂質の投与がカルシウム吸収率に与える影響
値は平均値±標準誤差で示す。共通するアルファベット文字を持たない値の間には有意な差がある ($P<0.05$)。

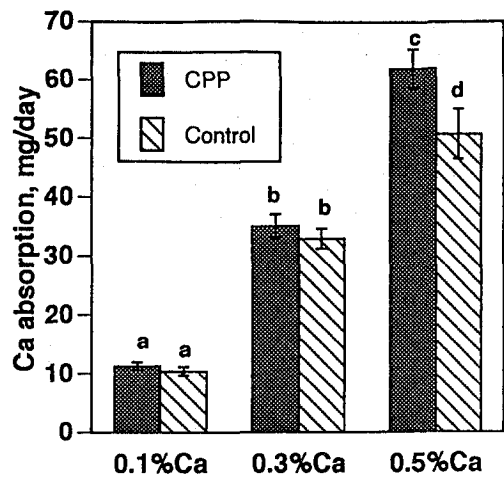


Fig.5 カルシウム補給直後におけるカルシウム吸収量に対する β CPPの影響
値は平均値±標準誤差で示す。共通するアルファベット文字を持たない値の間には有意差がある ($P<0.05$)。

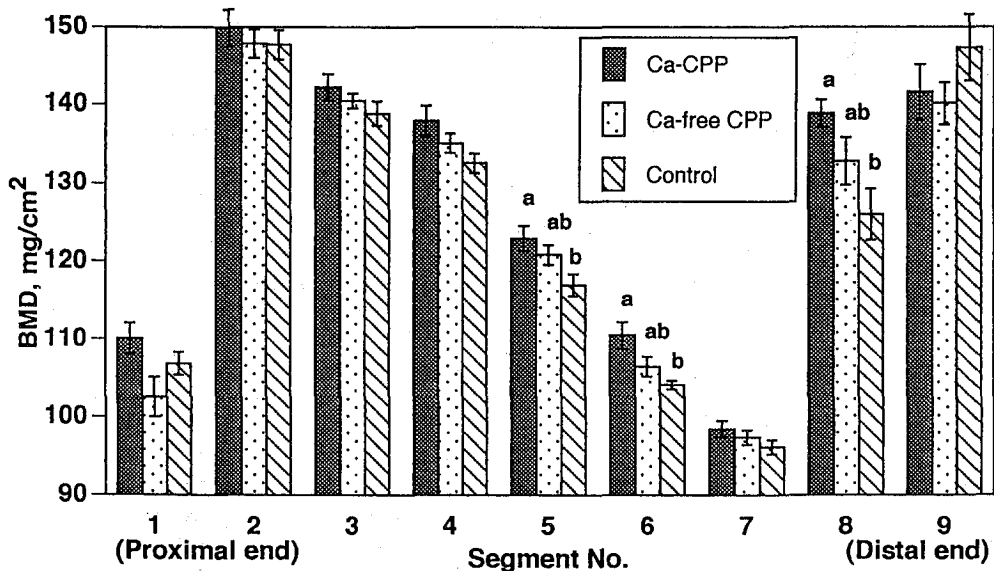


Fig. 6 Comparison of the effects of feeding to rats the CaCPP diet, Ca-free CPP diet and control diet on segmental BMD values for the femur. Values are means with their standard errors represented by vertical bars. Means in the same bone segment not sharing a common superscript letter are significantly different by the Bonferroni test ($P<0.05$).

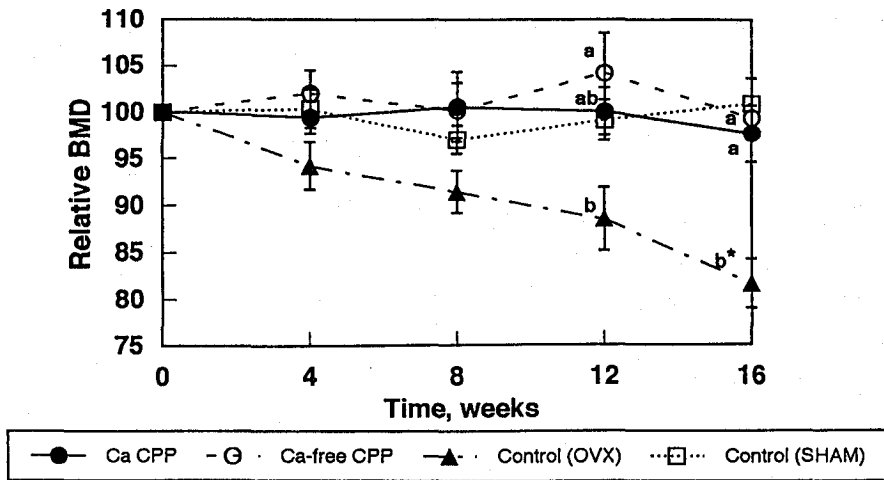


Fig. 7 老齢卵巣摘除(OVX)ラットの左大腿骨骨密度 (BMD)の経時的変化に対する CPPの長期給与の影響

BMD値は試験飼育開始時の値を100とする相対値で示す (平均値±標準誤差)。各測定時において共通するアルファベット文字を持たないOVX群の値の間には有意な差がある($P<0.05$)。

*は対照SHAM群との間に有意な差があることを示す($P<0.05$)。

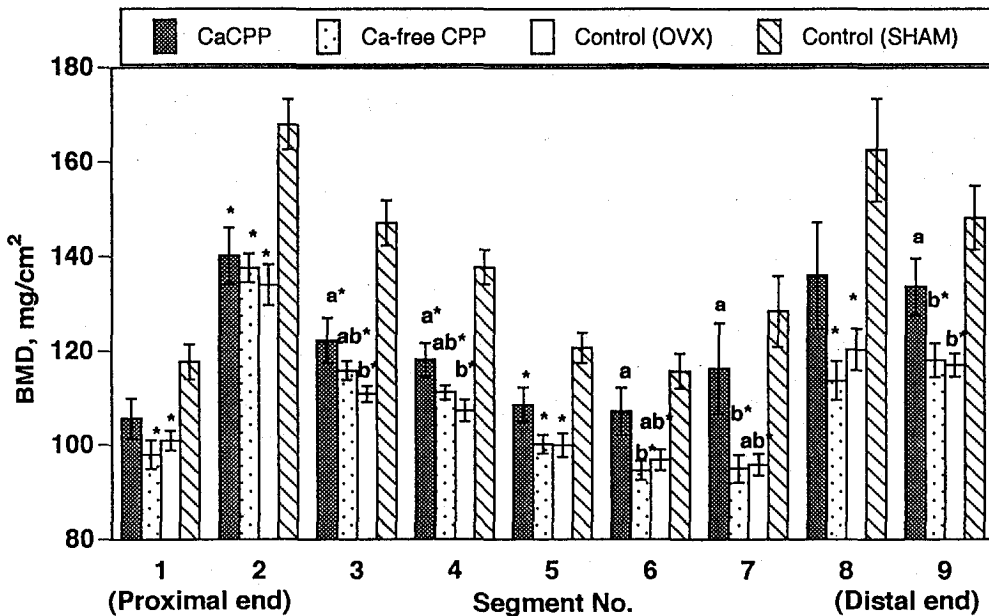


Fig. 8 老齢卵巣摘除(OVX)ラットの摘出左大腿骨骨密度(BMD)に対する CPPの長期給与の影響

値は平均値±標準誤差で示す。各セグメントにおいて共通するアルファベット文字を持たないOVX群の値の間には有意な差がある($P<0.05$)。*は対照SHAM群との間に有意な差があることを示す($P<0.05$)。

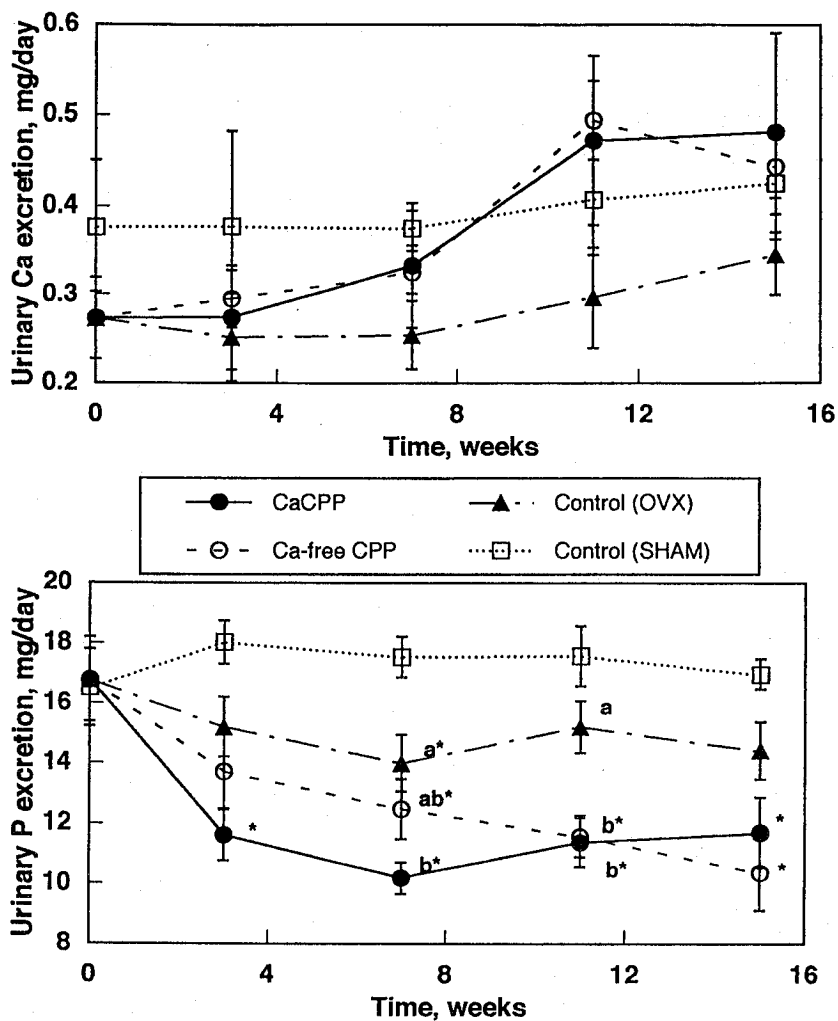


Fig. 9 卵巣摘除(OVX)ラットの尿中CaおよびP排泄量の経時的变化に対するCPPの長期給与の影響

尿Ca量(上図)およびP量(下図)を平均値±標準誤差で示す。OVX群の試験開始時の値は21匹の平均値である。各測定時において共通するアルファベット文字を持たないOVX群の値の間には有意な差がある($P < 0.05$)。*は対照SHAM群との間に有意な差があることを示す($P < 0.05$)。

論文審査の要旨

日本の最近の国民栄養調査において、摂取量が所要量を下回っている唯一の栄養素はカルシウムである。牛乳・乳製品は最も重要なカルシウムの供給源であるが、乳の処理・加工技術の発展によって様々な成分組成、物理化学的特性を有する食品素材が利用できるようになった。

本研究ではチーズ製造の際の副産物である乳清ミネラル複合物およびカゼインのトリプシン分解物中のカゼインホスホペプチドについて、カルシウム源としての利用性について *in vivo* モデルを用いて検討した。

第1部においては、乳清ミネラル中のカルシウムの利用性について検討した。すなわち、乳清ミネラルを与えると牛骨粉や炭酸カルシウムより大腿骨破断強度と上腕骨密度、大腿骨カルシウム含量が高いことを認めた。乳清ミネラルのカルシウム源としての有効性は、乳清ミネラル中のリン酸カルシウムの存在形態とともに、微量に含まれる脂溶性成分、すなわちエストラジオールや、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロコレカルシフェロールなどのステロイドホルモンが関与していることが示された。

第2部においては、カルシウムの要求性の高いモデルを用いてカゼインホスホペプチド(CPP)の効果を検討した。CPP β -カゼインからトリプシン分解により高精度の標品を調製して使用した。あらかじめ低カルシウム食で飼育した成長期の卵巣摘除ラットを用いた実験においては、CPPのカルシウムの吸収率が対照(炭酸カルシウム)より有意に高く、飼育後の大腿骨カルシウム量も多かった。また、リンの保持率もCa結合CPP群で有意に高かった。さらに、Caを結合したCPPを与えた群では、大腿骨および上腕骨密度が高く、血清オステオカルシンや尿サイクリックAMPのレベルから骨形成の増強とともに骨吸収の抑制が示唆された。閉経後の骨粗鬆症モデルラットとして作成した老齢卵巣摘出ラットにおいては、Caを結合したCPPを与えた群は、大腿骨密度が17週間の飼育期間後もよく維持されたが、対照群では骨密度の低下が著しく、血中カルシウム濃度やオステオカルシンレベルからCa結合CPP群では骨形成促進とともにリンの利用性の向上が示唆された。

以上の結果から、乳清ミネラルとカゼインホスホペプチドがいずれも優れたカルシウムの利用性を示す食品素材であることが *in vivo* の実験において明らかにされた。本研究は現在、栄養学的見地からもっとも急務とされているカルシウムの不足を解決するために重要な知見を与えるものであり、博士(農学)の学位を授与するに値すると判定した。