高脂肪食投与ラットにおける 牛乳・乳製品摂取による骨代謝へ及ぼす影響

田辺 里枝子¹, 祓 川 摩 有¹, 曾我部 夏子², 木ノ内 俊³
高 杉 諭³, 星 清 子^{3,4}, 五関-曾根 正江^{*1}

(2012年9月19日受付; 2012年12月18日受理)

要旨: 高脂肪食に牛乳・乳製品を添加し、骨代謝へ及ぼす影響について検討を行った。12週齢SD系雄ラット40匹を標準食(Normal)群, 高脂肪食(Fat)群, 高脂肪食+脱脂粉乳(Fat+Milk)群, 高脂肪食+発酵脱脂粉乳(Fat+Yogurt)群, 高脂肪食+ホエイ(Fat+Whey)群の5群に分けた。84日間の実験食投与の結果, Fat+Yogurt群はFat群に比べ、腰椎の全骨体積, 「断面2次極モーメント」(ねじれに対する強さ)においてそれぞれ有意な高値を示した。Fat+Whey群ではFat群に比べ、腰椎の海綿骨密度において有意な高値を示した。さらに血清 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度では, Fat+Milk群, Fat+Whey群がFat群に比べてそれぞれ有意な低値を示した。今後はさらに、骨粗鬆症予防のために牛乳・乳製品中の成分による骨代謝へ及ぼす詳しい作用メカニズムについて検討していく必要がある。

キーワード: 牛乳・乳製品, 骨密度, 高脂肪食, ラット, 血清 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

骨粗鬆症は骨密度の低下と骨質の劣化により骨強度が低下する疾患である¹⁾。わが国においては、人口の急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の患者が年々増加しつつあり、その数は1,280万人(男性300万人, 女性980万人)と推察されている²⁾。Yoshimura *et al.*³⁾は、40-79歳の住民の腰椎骨密度調査結果から骨粗鬆症の発生率を推計した結果、男性においては1年間に約0.6%, 女性では2.3%が新たに骨粗鬆症に罹患すると報告している。平成19年国民生活基礎調査⁴⁾によると、介護が必要となった主な原因の第5位が「骨折・転倒」であることが示されており、骨粗鬆症に起因する骨折は、寝たきりなどQOL(Quality of Life)の低下につながり、死亡リスクも高めることから、骨粗鬆症の予防が重要であると考えられる。

カルシウムは、骨の健康を保つ上で重要な栄養素の一つである。平成22年国民健康・栄養調査結果⁵⁾における成人のカルシウム摂取量は、男女ともに全ての年代で日本人の食事摂取基準2010年版⁶⁾に示されている推奨量に達していない。Nakamura *et al.*⁷⁾は日本人中高年女性を対象とした研究において、カルシウム摂取量が1日350mg未満群は1日750mg以上群に比べて、腰椎骨折のリスクが約2倍であったことを報告しており、カルシ

ウム摂取が骨折予防につながることを示されている。「骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2011年版」²⁾において、骨粗鬆症の治療のためにはカルシウムを食品から1日700-800mg摂取することが勧められている。カルシウムの主要な供給源となっているのが、牛乳・乳製品である。牛乳・乳製品は日常生活に不足しがちなカルシウムを豊富に含む食品であり、その吸収率も優れている⁸⁾⁹⁾。一方、カルシウムに関して、Bolland *et al.*¹⁰⁾やLi *et al.*¹¹⁾は薬やサプリメントの過剰摂取により心血管疾患のリスクが高まる可能性があることを報告しており、食品からカルシウムを摂取することの重要性を示した。

現代の日本の食生活は、欧米化が進み、脂肪からのエネルギー摂取比率が増加傾向にある。近年では、牛乳・乳製品が抗肥満効果も供えている可能性が示唆されている。これらの効果については主に、カルシウム成分の観点から研究が進められてきた¹²⁻¹⁴⁾。我々は既報において、7週齢雌ラットを用いた*in vivo*系で高脂肪食摂取時においてラクトースによる抗肥満作用および血清トリグリセリドならびに血糖値低下作用を明らかにした¹⁵⁾。

ヨーグルトは牛乳を乳酸菌等で発酵させた発酵乳であり、整腸作用¹⁶⁾や血清コレステロール調節機能¹⁷⁾、免疫

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ 日本女子大学家政学部食物学科栄養学研究室 (112-8681 東京都文京区目白台2-8-1)

² 駒沢女子大学人間健康学部健康栄養学科 (206-8511 東京都稲城市坂浜238)

³ 株式会社明治研究本部食機能科学研究所 (250-0862 神奈川県小田原市成田540)

⁴ 尚絅学院大学総合人間科学部健康栄養学科 (981-1295 宮城県名取市ゆりが丘4-10-1)

機能調節作用¹⁸⁾などの機能性が報告されている。ヨーグルト摂取による骨代謝への影響について、Heaney *et al.*¹⁹⁾はカルシウム摂取量が少ない閉経後女性がヨーグルト3杯を摂取したところ、骨吸収マーカーである尿中I型コラーゲン架橋N-テロペプチドが有意に減少したことを報告している。ホエイ(乳清)は牛乳からカゼインと乳脂肪を取り除いたもので、様々な機能性成分を含有している。特にホエイタンパク質は骨の健康に関わっていることが報告されている²⁰⁻²²⁾。

そこで本研究では、高脂肪食投与ラットにおいて牛乳・乳製品摂取が骨代謝へ及ぼす影響を検討することを目的とした。

実験方法

1. 飼育条件

実験動物には11週齢Sprague Dawley系の雄ラットを40匹、日本チャールズリバー(株)より購入して用いた。7日間の予備飼育の後、AIN-93M²³⁾を与える標準食(Normal)群、標準食のコーンスターチの一部をラードに置き換え、脂質エネルギー比を約40%に調製した高脂肪食(Fat)群、高脂肪食の飼料の一部に脱脂粉乳を加えた高脂肪食+脱脂粉乳(Fat+Milk)群、高脂肪食+発酵脱脂粉乳(Fat+Yogurt)群、高脂肪食+ホエイ(Fat+Whey)群の計5群とした。これらの飼料組成をTable 1

に示した。Fat+Milk群、Fat+Yogurt群、Fat+Whey群のタンパク質量および脂質量は、Fat群と等しくなるように調整した。また、5群ともカルシウム(Ca)は0.5%、リン(P)は0.3%に調製した。本実験に用いた脱脂粉乳、発酵脱脂粉乳、ホエイパウダーは(株)明治が作製した。ホエイタンパク質濃縮物は、フォンテラ社(ニュージーランド)より購入した。動物は、室温23±1℃、湿度50±5%、12時間ごとの明暗サイクル(明期7:00 a.m.-7:00 p.m.)の環境下で代謝ケージを用いて84日間、個別飼育した。動物の世話は午前9-12時の間に毎日行い、飼料摂取量と体重を測定した。なお、Normal群は自由摂食とし、高脂肪食の4群は、飼料摂取量が低いFat+Yogurt群と同等の総摂取量になるように、Fat群、Fat+Milk群、Fat+Whey群の給餌量を調節するペアフィードィングを行った。

なお、本実験は日本女子大学動物実験委員会の承認を受けた研究である。

2. 尿中カルシウム量測定

飼育期間中、実験動物を個別に代謝ケージに入れ、24時間尿を毎週採取し、カルシウムを測定した。この際、尿は腐敗およびカルシウムの沈殿を防ぐため、あらかじめ6N HClを2 mL入れた蓄尿用三角フラスコにて採取した。遠心分離し、その上清を試料として尿サンプルは冷蔵保存した。その後、尿中カルシウム量はOCPC法

Table 1 Composition of the experimental diets.

Variable	Normal AIN-93M	Fat	Fat+Milk	Fat+Yogurt	Fat+Whey
Ingredient (g/kg)					
Corn starch	446.9	286.9	197.2	203.8	185.8
Gelatinized corn starch	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Cellulose powder	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Casein	140.0	140.0	65.5	65.5	65.3
Skimmed milk powder	0.0	0.0	177.0	0.0	0.0
Powdered fermented milk	0.0	0.0	0.0	172.2	0.0
Whey powder	0.0	0.0	0.0	0.0	119.9
Whey protein concentrate	0.0	0.0	0.0	0.0	64.4
Soybean oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Lard	0.0	160.0	158.7	156.9	155.8
AIN-93M mineral mix without calcium and phosphorus	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Calcium carbonate	12.5	12.5	6.7	6.6	10.2
Potassium phosphate	8.8	8.8	3.1	3.2	6.8
AIN-93-vitamin mix with choline bitartrate	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Nutrient (g/kg)					
Protein	119.5	119.5	119.5	119.5	119.5
Fat	40.3	200.3	200.3	200.3	200.3
Lactose	0.0	0.0	100.0	57.0	100.0
Calcium	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Phosphorus	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0

により測定した²⁴⁾。

3. 実験動物用 X 線 CT 装置による骨強度測定

解剖直前に、実験動物用 X 線 CT 測定装置²⁵⁾ (LaTheta LCT-100, 日立アロカメディカル(株)) を用いて腰椎骨強度測定を行った。本装置は X 線断層撮影法により断層撮影を行い、動物を非侵襲的に計測することが可能である。動物を麻酔下で第 4・5 番目の腰椎における断層画像を撮影し、全骨密度・皮質骨密度・海綿骨密度 (mg/cm³)、全骨体積 (cm³)、最小断面 2 次モーメント (mg・cm)、断面 2 次極モーメント (mg・cm) を測定した。なお、全骨密度とは全骨 (皮質骨と海綿骨) の骨密度を示しており、最小断面 2 次モーメントは曲げに対する強さ、断面 2 次極モーメントはねじれに対する強さを表す力学的指標である。

4. 血清生化学検査

実験食開始後 84 日目にジエチルエーテル麻酔下で各群 8 匹を解剖した。採取した血液を遠心分離し (2,500 rpm, 10 min), 上清を血清サンプルとした。血清サンプルは測定までフリーザー内 (-80℃) に冷凍保存した。その後 1 α ,25(OH)₂D₃ は RIA 法²⁶⁾, 25(OH)D₃ は EIA 法²⁷⁾にて測定した。

また、解剖時に腸間膜脂肪、腎周囲脂肪、精巣周囲脂肪を採取し、重量を測定した。

5. 統計処理

本研究で得られたデータの統計解析には IBM SPSS Statistics 20 (日本アイ・ビー・エム(株)) を使用し、一元配置分散分析を行った。さらに Fat 群を対照値として、Normal 群、Fat+Milk 群、Fat+Yogurt 群、Fat+Whey 群との Dunnett による多重比較検定を行った。データは平均±標準誤差 (mean±S.E.) で表示し、有意差の基準は $p<0.05$ とした。

実験結果

1. 飼料摂取量および体重

Table 2 に示した通り、最終体重、1 日あたりの体重増加量、エネルギー摂取量、エネルギー効率において、Fat 群は Normal 群と比べていずれも高値傾向を示したが、有意な差は認められなかった。また、Fat+Milk 群、Fat+Yogurt 群および Fat+Whey 群の最終体重、1 日あたりの体重増加量、エネルギー摂取量およびエネルギー

効率において Fat 群と比べて有意な差は認められなかった。

2. 体内脂肪量

腸間膜脂肪量、腎周囲脂肪量、精巣周囲脂肪量については、Table 3 に示した通り、Fat 群は Normal 群に比べてそれぞれ有意な高値を示した ($p<0.01$, $p<0.001$, $p<0.05$)。一方、Fat+Milk 群、Fat+Yogurt 群、Fat+Whey 群は Fat 群に比べて、腸間膜脂肪量、腎周囲脂肪

Figure 1 Bone mineral density (BMD) of the lumbar vertebrae measured by X-ray CT scanning 84 days after starting the experimental diets.

Results are the mean ± S.E. of 8 animals. *Significant difference between the Fat and Fat+Whey groups (* $p<0.05$).

A : Total BMD, B : Cortical BMD, C : Cancellous BMD.

Table 2 Final body weight, body weight gain, energy intake and energy efficiency.

Groups	<i>n</i>	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Energy intake (kcal/day)	Energy efficiency (body weight gain/energy intake)
Normal	8	612.3 ± 16.0	3.17 ± 0.18	91.5 ± 2.5	0.035 ± 0.001
Fat	8	643.0 ± 7.9	3.55 ± 0.10	94.8 ± 1.1	0.037 ± 0.001
Fat + Milk	8	634.3 ± 11.5	3.44 ± 0.15	95.6 ± 1.6	0.036 ± 0.001
Fat + Yogurt	8	658.3 ± 6.8	3.67 ± 0.09	96.8 ± 0.8	0.038 ± 0.001
Fat + Whey	8	647.5 ± 12.1	3.58 ± 0.12	94.1 ± 2.0	0.038 ± 0.001

Each value represents the mean ± S.E.

Figure 2 Bone strength parameters of the lumbar vertebrae measured by X-ray CT scanning 84 days after starting the experimental diets.

Results are the mean ± S.E. of 8 animals. * Significant difference compared the Fat and Fat + Yogurt groups (* $p < 0.05$).

A : Total volume, B : Minimum cross-sectional moment of inertia, C : Polar moment of inertia of cross-sectional areas.

量, 精巣周囲脂肪量において, いずれも有意な差はなかったが, 腎周囲脂肪量でやや減少傾向を示した。

3. 実験動物用 X 線 CT 装置による骨強度測定

腰椎の全骨密度, 皮質骨密度, 海綿骨密度の結果について Figure 1 に示した。腰椎の全骨密度において, Fat + Whey 群が Fat 群に比べて高値傾向を示し (Figure 1A) ($p = 0.086$), 腰椎の海綿骨密度においては, Fat + Whey 群が Fat 群に比べて有意な高値を示した ($p < 0.05$) (Figure 1C)。なお, 腰椎骨密度において, Fat 群と Normal 群間では有意な差は認められなかった。

さらに, Figure 2A に示した通り, 腰椎の全骨体積においては, Fat + Yogurt 群が Fat 群に比べて有意な高値を示した ($p < 0.05$)。また, 曲げに対する強さを表す指標である最小断面 2 次モーメントにおいて, Fat + Yogurt 群が Fat 群に比べて高値傾向を示し ($p = 0.055$) (Figure 2B), ねじれに対する強さを表す断面 2 次極モーメントにおいては, Fat + Yogurt 群が Fat 群に比べて有意な高値を示した ($p < 0.05$) (Figure 2C)。なお, 全骨体積, 最小断面 2 次モーメントおよび断面 2 次極モーメントにおいて, Fat 群と Normal 群間では有意な差は認められなかった。

4. 尿中カルシウム排泄量

実験食開始 82 日目の尿中カルシウム排泄量において, Fat + Yogurt 群と Fat + Whey 群が Fat 群に比べて, それぞれ有意な高値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Figure 3)。また, 有意な差は認められなかったが, Fat 群に比べて Fat + Milk 群で高値傾向を示した。なお, 尿中カルシウム排泄量において Fat 群と Normal 群間では有意な差は認められなかった。

5. 血清生化学検査

血清 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を測定したところ, Figure 4A に示した通り, Fat + Yogurt 群が Fat 群に比べて低値傾向を示し ($p = 0.057$), Fat + Milk 群, Fat + Whey 群が Fat 群に比べてそれぞれ有意な低値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.001$)。なお, 血清 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に Fat 群と Normal 群間では有意な差は認められなかった。

また, Figure 4B に示した通り, 血清 $25(\text{OH})\text{D}_3$ は各群間で有意な差は認められなかった。

Table 3 Weight of body fat pad.

Groups	<i>n</i>	Mesenteric fat (g)	Perirenal fat (g)	Epididymal fat (g)
Normal	8	11.9 ± 1.0	18.7 ± 1.3	15.2 ± 1.0
Fat	8	17.3 ± 1.1	30.1 ± 1.8	19.4 ± 0.7
Fat + Milk	8	15.5 ± 0.7	27.2 ± 1.3	19.7 ± 1.2
Fat + Yogurt	8	17.0 ± 1.3	26.4 ± 1.2	19.8 ± 1.3
Fat + Whey	8	17.4 ± 0.6	29.9 ± 1.4	19.4 ± 0.8

Each value represents the mean ± S.E.

Significant difference between the Normal and Fat groups: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$.

Figure 3 Urinary calcium excretion 82 days after starting the experimental diets.

Results are the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. *Significant difference between the Fat and Fat + Yogurt groups (** $p < 0.01$). *Significant difference between the Fat and Fat + Whey groups (** $p < 0.001$).

Figure 4 Levels of serum 1,25(OH)₂D₃ (A) and serum 25(OH)D₃ (B) 84 days after starting the experimental diets.

Results are the mean $\pm$ S.E. of 8 animals. *Significant difference between the Fat and Fat + Milk or Fat + Whey groups (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

考 察

今回の研究は、高脂肪食下において牛乳・乳製品（発酵乳、ホエイ）の添加が骨代謝に及ぼす影響を、雄ラットを用いた *in vivo* 系で検討することを目的とした。牛乳・乳製品として、乳脂肪以外の全乳成分を含む脱脂粉乳、脱脂乳を乳酸菌で発酵させたためにラクトース濃度が減り、発酵によって生成した乳酸を含有する発酵乳、脱脂乳からカゼインを除き、ホエイタンパク質含有量が高いホエイを用いた。なお、以前の我々の研究では、牛乳・乳製品の添加による骨代謝への影響について12週齢の雌ラットを用いたため、今回も同じ週齢の雄ラット

を用いて検討を行った²⁸⁾。

最終体重、体重増加量、エネルギー摂取量およびエネルギー効率において、Normal群とFat群との間に有意な差は認められなかったが（Table 2）、腸間膜脂肪量、腎周囲脂肪量、精巣周囲脂肪量において、Fat群がNormal群に比べてそれぞれ有意に高値を示した（Table 3）。高脂肪食では摂取エネルギーを制限しても体脂肪量が増加したことが報告されており²⁹⁾、本研究においても同様の傾向が示された。一方、Fat群と牛乳・乳製品添加群（Fat + Milk群、Fat + Yogurt群、Fat + Whey群）の間では、腎周囲脂肪量でやや減少傾向が示されたが、最終体重および内臓脂肪量（腸間膜脂肪量、腎周囲脂肪量、精巣周囲脂肪量）に有意な差はみられず、牛乳・乳製品摂取による影響はみられなかった。今回はFat群、Fat + Milk群、Fat + Yogurt群、Fat + Whey群で飼料摂取量が一定となるよう制限給餌をしているため、有意な差が認められなかったことが推察された。

腰椎骨密度、最小断面2次モーメントおよび断面2次極モーメントにおいて、Fat群とNormal群間に有意な差は認められなかった（Figure 1, 2）。高脂肪食摂取が骨代謝に及ぼす影響について、Lac *et al.*³⁰⁾は、雄ラットに10週間高脂肪食を与えたところ、通常食を与えたラットに比べて、体重増加は認められなかったが、全身の骨密度および骨塩量が有意に低値を示したことを報告している。Cao *et al.*³¹⁾は、マウスに14週間高脂肪食を与えたところ、脛骨海綿骨密度の減少がみられたが、皮質骨密度には影響がなかったことを示している。一方、Lau *et al.*³²⁾は、65日間の高脂肪食投与により、体重・体脂肪の増加に加え、大腿骨強度が有意に上昇したことを報告しており、高脂肪食摂取による骨代謝に及ぼす影響については一定の見解が得られていない。骨密度は体重と深く関連しており、本研究においてFat群とNormal群間で体脂肪の増加は認められたものの、最終体重では有意差が認められなかったことが、Fat群とNormal群間に腰椎骨密度で有意な差が認められなかった理由の一つとして考えられた（Table 2）。一方、Fat + Milk群、Fat + Yogurt群およびFat + Whey群の最終体重はFat群と有意な差がなかったが、高脂肪食への発酵乳の添加では腰椎骨強度（断面2次極モーメント）が、ホエイの添加では腰椎骨密度の増加が認められた（Figure 1, 2）。ヒトの場合と異なり、ラットでは尿中カルシウム排泄量の増加は腸管からのカルシウム吸収量の増加を反映していると考えられている³³⁻³⁵⁾。本研究において、Fat + Yogurt群とFat + Whey群の尿中カルシウム排泄量はFat群に比べて有意な高値を示したことから、高脂肪食下において、発酵乳およびホエイはカルシウム吸収を促進する可能性が示唆された。我々は既報において、雌ラットで飼料のカルシウム量が同一（0.5%）の高脂肪食投与でのラクトース添加により、尿中カルシウム排泄量や腰椎の骨密度が有意に増加したことを報告しており¹⁵⁾、今

回のホエイ添加の効果においても同様の傾向が示された。Fat 群, Fat+Milk 群, Fat+Yogurt 群および Fat+Whey 群で飼料中のカルシウム量だけでなく、タンパク質量、脂質量、リン量は等しくなるように調整しており、発酵乳添加食では、ホエイ添加食に比べ、発酵により飼料中のラクトースが分解されてラクトース含量が少なくなっている (Table 1)。一方、ホエイ添加食では脱脂粉乳添加食とラクトース含量は同じであったが、Fat+Whey 群でのみ有意な骨密度の増加が認められた。これらの結果は、発酵乳およびホエイでは、ラクトース以外の成分もカルシウム吸収や骨代謝に寄与している可能性を示唆している。ラクトース以外の成分として、発酵乳では、カゼインホスホペプチド³⁶⁾や乳酸³⁷⁾などの発酵産物、ホエイではホエイたんぱく質³⁸⁾がカルシウム吸収や骨代謝に寄与している可能性が考えられるが、これらの成分の寄与については今後さらなる検討が必要である。

ビタミン D₃ の代謝産物である 1 α ,25(OH)₂D₃ は小腸でのカルシウム吸収をもっとも効率よく促進するため³⁹⁾、血中 1 α ,25(OH)₂D₃ 濃度はカルシウム代謝の臨床的指標として用いられている。本研究においても血清 1 α ,25(OH)₂D₃ 濃度を測定したところ、Fat+Yogurt 群が Fat 群に比べて低値傾向を示し、Fat+Milk 群, Fat+Whey 群が Fat 群に比べてそれぞれ有意な低値を示した (Figure 4A)。Papakonstantinou *et al.*⁴⁰⁾ や Pilvi *et al.*⁴¹⁾ は、ラットに高カルシウム食を 85 日間与えると、通常食を与えたラットに比べて、血清 1 α ,25(OH)₂D₃ が著しく減少したことを報告している。また、Omdahl *et al.*⁴²⁾ は血清カルシウムレベルが正常値以上になると、腎臓における 25(OH)D₃ の 1 α 位の水酸化が抑制されることを示唆した。これらの報告は血中カルシウム濃度恒常性維持のため、1 α ,25(OH)₂D₃ の生成量が調節されている可能性を示している。本研究では飼料中のカルシウム含量は各群とも Normal 群と同じ (0.5%) であったが、脱脂粉乳やホエイを添加することにより、血清 1 α ,25(OH)₂D₃ の低下が確認された。我々は既報¹⁵⁾でもラクトース投与により、血清 1 α ,25(OH)₂D₃ 濃度の有意な減少を確認しており、脱脂粉乳や発酵乳、ホエイ添加により腸管でのカルシウム吸収が促進されていることが示唆された。一方、ビタミン D の栄養指標として有用であると考えられている血中 25(OH)D₃ 濃度を測定したところ、各群間に有意な差はなく、ビタミン D の摂取量に差がなかったことが確認された。

本研究より、高脂肪食下で発酵乳添加により骨強度が増強し、ホエイ添加により骨密度の増加が示された。今回は 12 週齢雄ラットを用いたことで、週齢の高いライフステージにおいても、高脂肪食下で牛乳・乳製品、特にヨーグルトやホエイの摂取が骨密度や骨強度の増加に効果があるという結果を得ることができた。今後はさらに牛乳・乳製品摂取による骨代謝への詳しい作用メカニズムについて検討していく必要がある。

本研究をすすめるにあたり飼料の調製および動物の剖検にご協力いただきました株式会社明治・食機能科学研究所の村上大輔氏、山本直子氏、山崎久美子氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy (2001) Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* **285**: 785-95.
- 2) 折茂 肇 (2011) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版 (骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会編), p 2-5. ライフサイエンス出版, 東京.
- 3) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Kinoshita H, Yoshida M, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T (2009) Epidemiology of lumbar osteoporosis and osteoarthritis and their causal relationship—is osteoarthritis a predictor for osteoporosis or vice versa?: the Miyama study. *Osteoporos Int* **20**: 999-1008.
- 4) 厚生労働省大臣官房統計情報部・社会統計課国民生活基礎調査室. (2012 年 8 月 12 日取得) 平成 19 年国民生活基礎調査の概況 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa07/4-2.html>
- 5) 厚生労働省 (2012 年 8 月 12 日取得) 平成 22 年国民健康・栄養調査結果の概要 <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r98520000020qbb.html>
- 6) 厚生労働省策定 (2009) 日本人の食事摂取基準 (2010 年版). 第一出版, 東京.
- 7) Nakamura K, Kuraishi N, Ishihara J, Inoue M, Tsugane S; Japan Public Health Centre-based Prospective Study Group (2009) Calcium intake and the 10-year incidence of self-reported vertebral fractures in women and men: the Japan Public Health Centre-based Prospective Study. *Br J Nutr* **101**: 285-94.
- 8) Recker RR, Bammi A, Barger-Lux MJ, Heaney RP (1988) Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. *Am J Clin Nutr* **47**: 93-5.
- 9) Smith TM, Kolars JC, Savaiano DA, Levitt MD (1985) Absorption of calcium from milk and yogurt. *Am J Clin Nutr* **42**: 1197-200.
- 10) Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, Reid IR (2010) Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ* **341**: c3691.
- 11) Li K, Kaaks R, Linseisen J, Rohrmann S (2012) Associations of dietary calcium intake and calcium supplementation with myocardial infarction and stroke risk and overall cardiovascular mortality in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study (EPIC-Heidelberg). *Heart* **98**: 920-5.
- 12) Shapses SA, Heshka S, Heymsfield SB (2004) Effect of calcium supplementation on weight and fat loss in women. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 632-7.
- 13) Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K, Henders S (2000) Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4635-8.

- 14) Sun X, Zemel MB (2004) Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *J Nutr* **134**: 3054-60.
- 15) Goseki-Sone M, Maruyama R, Sogabe N, Hosoi T (2007) Effects of dietary lactose on long-term high-fat-diet-induced obesity in rats. *Obesity* **15**: 2605-13.
- 16) 山本昌志, 折居直樹, 大津俊広, 飯野久和 (1998) ヨーグルト摂取が女子学生の排便回数および便性に及ぼす影響 第3報. *健康・栄養食品研究* **1**, 47-55.
- 17) Kiessling G, Schneider J, Jahreis G (2002) Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur J Clin Nutr* **56**: 843-9.
- 18) 蕪木智子, 吉野美香, 林 瞳, 平澤玲子, 三戸夏子, 佐藤和人 (2008) 実験的 PEM モデルマウスの栄養状態および免疫機能に対する *Lactobacillus johnsonii* La1 乳酸菌摂取の影響. *日本病態栄養学会誌* **11**, 45-51.
- 19) Heaney RP, Rafferty K, Dowell MS (2002) Effect of yogurt on a urinary marker of bone resorption in postmenopausal women. *J Am Diet Assoc* **102**: 1672-4.
- 20) Uenishi K, Ishida H, Toba Y, Aoe S, Itabashi A, Takada Y (2007) Milk basic protein increases bone mineral density and improves bone metabolism in healthy young women. *Osteoporos Int* **18**: 385-90.
- 21) Takada Y, Kobayashi N, Kato K, Matsuyama H, Yahiro M, Aoe S (1997) Effects of whey protein on calcium and bone metabolism in ovariectomized rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **43**: 199-210.
- 22) Kelly O, Cusack S, Cashman KD (2003) The effect of bovine whey protein on ectopic bone formation in young growing rats. *Br J Nutr* **90**: 557-64.
- 23) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**: 1939-51.
- 24) Gitelman HJ (1967) An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* **18**: 521-31.
- 25) Sogabe N, Maruyama R, Baba O, Hosoi T, Goseki-Sone M (2011) Effects of long-term vitamin K₁ (phylloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* **48**: 1036-42.
- 26) 鈴木正司, 高江洲義滋, 平澤由平 (1998) Radioimmunoassay を用いた 1,25(OH)₂D 測定キットの臨床的検討. *臨床透析* **14**, 371-6.
- 27) Reichel H, Koeffler HP, Norman AW (1989) The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* **320**: 980-91.
- 28) Tanabe R, Haraikawa M, Sogabe N, Sugimoto A, Kawamura Y, Takasugi S, Nagata M, Nakane A, Yamaguchi A, Iimura T, Goseki-Sone M (2013) Retention of bone strength by feeding of milk and dairy products in ovariectomized rats; involvement of changes in serum levels of 1 alpha,25(OH)₂D₃ and FGF23. *J Nutr Biochem*: in press.
- 29) 山下洵子, 林 伸一 (1988) 摂食と肥満 食事性肥満の成因. *代謝* **25**, 73-9.
- 30) Lac G, Cavalie H, Ebal E, Michaux O (2008) Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. *Lipids Health Dis* **28**: 7-16.
- 31) Cao JJ, Gregoire BR, Gao H (2009) High-fat diet decreases cancellous bone mass but has no effect on cortical bone mass in the tibia in mice. *Bone* **44**: 1097-104.
- 32) Lau BY, Fajardo VA, McMeekin L, Sacco SM, Ward WE, Roy BD, Peters SJ, Leblanc PJ (2010) Influence of high-fat diet from differential dietary sources on bone mineral density, bone strength, and bone fatty acid composition in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* **35**: 598-606.
- 33) Schaafsma G, Visser R (1980) Nutritional Interrelationships between calcium, phosphorus and lactose in rats. *J Nutr* **110**: 1101-11.
- 34) Cashman KD, Flynn A (1996) Effect of dietary calcium intake and meal calcium content on calcium absorption in the rat. *Br J Nutr* **76**: 463-70.
- 35) Creedon A, Cashman KD (2001) The effect of calcium intake on bone composition and bone resorption in the young growing rat. *Br J Nutr* **86**: 453-9.
- 36) Tsuchita H, Suzuki T, Kuwata T (2001) The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium-fortified milk in growing rats. *Br J Nutr* **85**: 5-10.
- 37) Tang AL, Shah NP, Wilcox G, Walker KZ, Stojanovska L (2007) Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids. *J Food Sci* **72**: M431-6.
- 38) Zhao Y, Martin BR, Wastney ME, Schollum L, Weaver CM (2005) Acute versus chronic effects of whey proteins on calcium absorption in growing rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**: 536-42.
- 39) 尾形悦郎 (1976) カルシウム・リン代謝の調節機構. *代謝* **13**, 831-49.
- 40) Papakonstantinou E, Flatt WP, Huth PJ, Harris RB (2003) High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes Res* **11**: 387-94.
- 41) Pilvi TK, Korpela R, Huttunen M, Vapaatalo H, Mervaala EM (2007) High-calcium diet with whey protein attenuates body-weight gain in high-fat-fed C57Bl/6J mice. *Br J Nutr* **98**: 900-7.
- 42) Omdahl J, Holick M, Suda T, Tanaka Y, DeLuca HF (1971) Biological activity of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochemistry* **10**: 2935-40.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **66**: 87–94 (2013)

Original Paper

Effects of Milk and Dairy Products on Bone Metabolism in Rats Fed a High-fat Diet

Rieko Tanabe,¹ Mayu Haraikawa,¹ Natsuko Sogabe,²
Toshi Kinouchi,³ Satoshi Takasugi,³ Seiko Hoshi,^{3,4}
and Masae Goseki-Sone^{*,1}

(Received September 19, 2012; Accepted December 18, 2012)

Summary: This study investigated the effects of milk and dairy products on bone metabolism in rats fed a high-fat diet. A total of 40 Sprague-Dawley male rats (12 weeks old) were divided into five groups: a basal control diet group (Normal), a high-fat diet group (Fat), a high-fat with skimmed milk powder diet group (Fat + Milk), a high-fat with powdered fermented milk diet group (Fat + Yogurt), and a high-fat with whey powder and whey protein concentrate diet group (Fat + Whey). Eighty-four days after the start of diet feeding, the total volume and polar moment of inertia of cross-sectional areas of the lumbar spine were significantly higher in the Fat + Yogurt group than in the Fat group. Also, the cancellous BMD of the lumbar vertebrae was significantly higher in the Fat + Whey group than in the Fat group. Interestingly, the level of serum $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was significantly lower in the Fat + Milk and Fat + Whey groups than in the Fat group. Further analysis of the components in milk and dairy products and their effects on bone metabolism are necessary for the prevention and treatment of osteoporosis.

Key words: milk and dairy products, bone mineral density, high-fat diet, rats, serum $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$]

* Corresponding author (E-mail: goseki@fc.jwu.ac.jp)

¹ Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Sciences and Design, Japan Women's University, 2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8681, Japan

² Department of Health and Nutrition Sciences, Faculty of Human Health, Komazawa Women's University, 238 Sakahama, Inagi, Tokyo 206-8511, Japan

³ Food Science Institute, Division of Research and Development, Meiji Co., Ltd., 540 Narita, Odawara, Kanagawa 250-0862, Japan

⁴ Department of Human Health and Nutrition, Faculty of Comprehensive Human Science, Shokei Gakuin University, 4-10-1 Yurigaoka, Natori, Miyagi 981-1295, Japan