

明 細 書

発明の名称： チーズ類及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規なチーズ類及びその製造方法に関する。本発明のチーズ類は、特定の乳成分を含有することにより、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用である。

背景技術

[0002] 近年、世界的規模で、高齢化等に伴い、骨粗鬆症や骨折あるいは腰痛などの種々の骨に関連する疾患が増加しており、大きな社会問題となっている。これは、カルシウムの摂取不足やカルシウム吸収能力の低下、閉経後のホルモンのアンバランスなどが原因であるとされている。骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患を予防するためには、若齢期から骨芽細胞による骨形成を促進して体内の骨量をできるだけ増加させ、最大骨量や骨強度（骨密度＋骨質）を高めることが有効であるとされている。なお、骨質とは、骨の微細構造や代謝回転、微小骨折、石灰化を指すものである。また、骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患を予防する方法としては、破骨細胞による骨吸収を抑制することも考えられる。骨はバランスのとれた吸収と形成を絶えず繰り返している（リモデリング）が、閉経後のホルモンバランスの変化等により、骨吸収が骨形成を上回り、これが骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患の原因となる。したがって、破骨細胞による骨吸収を抑制して骨強度を一定に保つことにより、結果的に骨を強化することが可能である。

[0003] このような現状から、骨を強化する目的で、炭酸カルシウムやリン酸カルシウム、乳酸カルシウムなどのカルシウム塩ならびに乳清カルシウムや牛骨粉、卵殻などの天然カルシウム剤を、それぞれ単独で医薬品や飲食品、飼料などに添加したものが摂取されている。又は、これらのカルシウム剤をカゼインホスホペプチドやオリゴ糖などのカルシウム吸収促進効果を有する物質と共に医薬品や飲食品、飼料などに添加したものが摂取されている。しかし

ながら、これらのカルシウム塩や天然カルシウム剤を飲食品に添加したものを摂取した場合のカルシウムの吸収率は50%以下であり、多くのカルシウムは吸収されずに体外に排出されてしまうといわれている。また、体内に吸収されたカルシウムであっても、その形態や同時に摂取される他の栄養成分の種類によって骨への親和性が異なるので、必ずしも骨代謝の改善や骨強化の作用を示さないこともある。その他、骨粗鬆症治療や骨強化のための医薬として、女性ホルモン製剤や活性型ビタミンD₃製剤、ビタミンK₂製剤、ビスフォスフォネート製剤、カルシトニン製剤などが知られており、抗RANKL抗体などの新薬開発が進められている。しかし、これらの医薬品を用いた場合、耳鳴り、頭痛、食欲不振などの副作用を伴うことがある。さらに、これらの物質は安全性及びコストなどの面から、現在のところ飲食品に添加することができない状況にある。一方、骨粗鬆症や骨折、腰痛などの種々の骨疾患の疾病の性質から、長期的に経口摂取することができ、骨形成促進的及び骨吸収抑制的に作用して骨強度を高め、その予防または治療効果が期待できるような飲食品の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開平8－151331号公報

特許文献2：特開平10－7585号公報

特許文献3：特開2000－281587号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用なチーズ類を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を含むし、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及

び／又はアンジオジェニン分解物に対して特定の範囲の質量比で含有するチーズ類を摂取することによって、効果的に骨密度を高める作用が得られることを見出し、本発明を完成させた。

[0007] すなわち本発明は、以下の構成からなるものである。

(1) アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を 6.5 mg ～ 160 mg / 100 g 含有し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して質量比が 0.02 ～ 1.6 の範囲で含有するチーズ類。

(2) (1) 記載のチーズ類を 20 g / 日以上摂取する骨疾患の予防方法。

(3) アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を原料及び／又はチーズカードに混合する工程を含む上記 (1) 記載のチーズ類の製造方法。

(4) 原料チーズと、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物とを混合し、乳化、冷却する工程を含む上記 (1) 記載のチーズ類の製造方法。

発明の効果

[0008] 本発明のチーズ類は、骨を強化する作用を有し、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療に有用である。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明のチーズ類の特徴は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定の範囲の量で含有し、かつ、特定の範囲の質量比でアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を含有することにある。

一般にチーズ類中には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物は 1.1 mg ～ 6.3 mg / 100 g 程度、シスタチン及び／又はシスタチン分解物は 2.1 mg ～ 9.3 mg / 100 g 程度含まれている。

これに対し、本発明のチーズ類は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を添加して、アン

ジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を6.5mg～160mg／100g含有し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が0.02～1.6の範囲で含有するものである。

[0010] 本発明のチーズ類に含有されるアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物やシスタチン及び／又はシスタチン分解物としては、ヒト、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ等の哺乳類の乳から調製されるアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を含む画分、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を含む画分や、遺伝子工学的手法により生産されるこれらの画分、血液や臓器から精製されたアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物、シスタチン及び／又はシスタチン分解物等が使用可能である。また、精製され、市販されているアンジオジェニンやシスタチンの試薬を用いることも可能である。

また、上述のアンジオジェニンを含む画分、アンジオジェニンの試薬やシスタチンを含む画分、シスタチンの試薬等をそれぞれ1種類以上のタンパク質分解酵素で分解したアンジオジェニン分解物やシスタチン分解物を含有させることも可能である。

[0011] 一方、乳、または脱脂乳や乳清などの乳由来の原料から直接、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を含む画分を抽出して調製したタンパク質素材を含有させることも可能である。このようなタンパク質素材は、例えば、乳又は乳原料を陽イオン交換樹脂と接触させた後、その樹脂に吸着した乳由来タンパク質を0.1～2.0Mの塩濃度で溶出して、逆浸透膜や電気透析膜、限外濾過膜、精密濾過膜などにより脱塩、濃縮した後、必要に応じて、トリプシン、パンクレアチン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、カリクレイン、カテプシン、サーモライシン、V8プロテアーゼ等のタンパク質分解酵素で分子量が8,000以下となるように分解することにより調製することができる。なお、タンパク質分解酵素で分解する場合は、分子量の下限は500以上とす

ることが好ましい。また、このようにして得られたタンパク質素材は、凍結乾燥や噴霧乾燥などにより乾燥することも可能であり、乾燥したものをチーズ類に含有させてもよい。

[0012] 本発明では、上述したアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物、シスタチン及び／又はシスタチン分解物、これらを含むタンパク質素材等を原料及び／又はチーズカード、原料チーズ等に混合し、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を6.5mg～160mg/100g含有させ、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対する質量比が0.02～1.6の範囲で含有させる。

後の試験例で示すが、上述のようにアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を含有させることにより、各々の成分を単独で摂取するよりも効果的に骨強化作用を得ることができる。

[0013] 本発明のチーズ類は、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物、シスタチン及び／又はシスタチン分解物を特定量で含有させること以外は特に制限はなく、一般的な方法に従って製造すればよい。本発明におけるチーズ類とは、ナチュラルチーズやCODEX STANDARDに定められるプロセスチーズ(processed cheese)、スプレッドブルプロセスチーズ(spreadable processed cheese)、チーズフード(processed cheese food)、乳等を主要原料とする食品であってチーズ様の食品(processed cheese preparation)等、一般的にチーズまたはチーズ様食品と呼ばれるものを全て包含する。例えば、クリームチーズ、モッツァレラ、リコッタ、マスカルポーネ、フロマージュ・ブランなどのフレッシュチーズ、カマンベール、ブリーなどの白カビチーズ、ゴルゴンゾーラ、スチルトン、ロックフォールなどの青カビチーズ、リヴァロなどのウォッシュチーズ、プロボローネ、ゴダなどのセミハードチーズ、グラナ、エメンター

ル、チェダーなどのハードチーズなどのナチュラルチーズ、ナチュラルチーズを原料としたプロセスチーズ類、あるいは、油脂や多糖類等を用いて製造されるチーズ様食品を挙げることができる。

例えば、ゴータチーズであれば、脂肪含量を2.8%に調整した乳を原料として、これに、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定量の範囲となるように配合し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／またはアンジオジェニン分解物に対し特定の範囲の質量比となるように添加する。これを、77℃で15秒間殺菌して冷却し、スターターやレンネット等を添加して攪拌する。その後、30分間程度静置し、ホエイを排出してチーズカードを調製し、必要に応じて加塩した後、型詰めして製造することができる。

また、カッテージチーズであれば、クリーム等を原料として、これに、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定量の範囲となるように配合し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／またはアンジオジェニン分解物に対し特定の範囲の質量比となるように添加して、これをチーズカードに均一になるように加えることにより製造することができる。本発明のチーズ類の製造にあたり使用する原料としては、ウシ、水牛、ヤギ、ヒツジ等の哺乳類の乳やそれらの脂肪含量を調整したもの、それら哺乳類の乳から調製したクリーム等が挙げられる。

[0014] また、本発明のチーズ類は次のように製造することができる。チーズ類としてプロセスチーズ類を製造する場合には、例えば、原料チーズに対して溶融塩としてクエン酸ナトリウム、モノリン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム等を2%程度添加し、添加水10%程度を添加した後、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定量の範囲となるように配合し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／またはアンジオジェニン分解物に対し特定の範囲の質量比となるように添加して、乳化温度85℃で常法に従い乳化して乳化後カルトンに充填し、5℃まで冷却して製造することが可能である。

プロセスチーズ類にアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を特定量の範囲となるように配合し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／またはアンジオジェニン分解物に対し特定の範囲の質量比となるように添加する方法としては、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物をあらかじめ配合して製造したチーズ類を原料チーズとしてもよいし、あるいは、プロセスチーズ類の原料にアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を適量混合してもよい。

なお、本発明のチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物やシスタチン及び／又はシスタチン分解物以外に、上述した原料やチーズカード、原料チーズのほか、糖類や脂質、タンパク質、ビタミン類、ミネラル類、フレーバー等、飲食品に通常使用する原材料等も配合することが可能であり、他の骨強化作用を示す成分、例えばカルシウムやビタミンD、ビタミンK、イソフラボン等を配合することも可能である。

[0015] 本発明のチーズ類は、後述する実験動物での試験において、体重1kgあたり20g以上経口摂取させることにより、骨を強化することができる。この実験動物における摂取量は、血中薬物濃度において、成人一人あたりの摂取量に該当することから（中島 光好（1993）「第8巻 薬効評価」 廣川書店 2-18頁）、通常、成人一人一日あたり、本発明のチーズ類を20g以上摂取することにより骨を強化することができ、骨粗鬆症や骨折、リウマチ、関節炎などの種々の骨疾患の予防や治療の効果が特に期待できる。

[0016] 以下に、参考例、実施例及び試験例を示し、本発明についてより詳細に説明するが、これらは例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

[0017] [参考例1]

（アンジオジェニン画分の調製1）

陽イオン交換樹脂であるスルホン化キトパール（富士紡績社製）30kgを充填したカラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳1,000L（pH6.7）を通液した。次に、このカラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、0.1～2.0Mの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した。そして、アンジオジェニンを含む溶出画分をS-Sepharose陽イオン交換クロマトグラフィー（アマシャムバイオサイエンス社製）で分画し、得られたアンジオジェニン含有画分を90℃で10分間加熱処理し、遠心分離することにより沈澱を除去した。さらに、このアンジオジェニン含有画分をSuperose12ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した。この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してアンジオジェニンの純度が90%のアンジオジェニン画分16.5gを得た。これら一連の処理を30回繰り返した。

[0018] [参考例2]

（アンジオジェニン画分の調製2）

ヘパリンアフィニティセファロース（GEヘルスケア社製）10kgを充填したカラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳500L（pH6.7）を通液した。次に、このカラムを0.5Mの塩化ナトリウム溶液で十分に洗浄した後、1.5Mの塩化ナトリウム溶液で溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してアンジオジェニンの純度が5%のアンジオジェニン画分18gを得た。これら一連の処理を50回繰り返した。

[0019] [参考例3]

（シスタチン画分の調製）

5%乳清タンパク質溶液100,000Lを90℃で10分間加熱処理し、遠心分離することにより沈澱を除去した。さらに、カルボキシメチル化パピンをトレシルトヨパール（Tresyl-ToyopEARL、東ソー社製）に結合させた担体をカラムに充填後、0.5Mの塩化ナトリウム溶液で平衡化し、先の乳清タンパク質溶液を通液した。通液後、0.5Mの塩化

ナトリウム溶液と0.1%のTween 20を含む0.5Mの塩化ナトリウム溶液で順次カラムを洗浄した。次いで、20mM酢酸-0.5M塩化ナトリウム溶液でシスタチン含有画分を溶出させた。この溶出画分を直ちに1Mの水酸化ナトリウム溶液で中和した。この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥してシスタチンの純度が90%のシスタチン画分9.6gを得た。これら一連の処理を20回繰り返した。

[0020] (チーズ類に含まれるアンジオジェニン及びシスタチンの測定)

チーズ類に含まれるアンジオジェニンやアンジオジェニン分解物ならびにシスタチンやシスタチン分解物の測定は、特開2008-164511号公報の方法を改変して実施した。即ち、超純水65mlにチーズ類190mgを加え、これに1/1,000量のギ酸を添加し、試料溶液とした。この溶液10μlをドライアップした後、8M尿素および1mMトリス(カルボキシエチル)フォスフィン(TCEP)を含む0.1M重炭酸アンモニウム20μlに溶解し、56℃で30分間加温した。室温に戻した後、100mMヨードアセトアミド溶液5μlを添加して、遮光下で30分反応させた。これに、54μlの超純水を添加後、0.1μg/mlトリプシン10μlおよび0.1μg/mlリシルエンドペプチダーゼ10μlを添加して、37℃で16時間反応させた。その後、3μlのギ酸を添加して、反応を停止し、測定試料用ペプチド溶液とした。各試料溶液を10fmol/μlの内部標準ペプチド溶液(含0.1%ギ酸、0.02%トリフルオロ酢酸(TFA)、2%アセトニトリル)で6倍に希釈し、希釈した溶液2.5μlをLC/MS/MSにて分析を行った。

[0021] ペプチドの分離は、HPLCシステムを用いてグラジェント溶出した。すなわち、カラム5μlペプチドトラップつきMAG I C C18 0.2mm ID×50mmを用い、流速は2μl/minでMAG I C 2002のHPLCシステムを用いて行った。HPLCの溶媒には、A溶液:2%アセトニトリル-0.05%ギ酸とB溶液:90%アセトニトリル-0.05%ギ酸を用いた。溶出条件は、B溶液を2%から65%まで20分間かけてグラ

ジェント溶出させた。

シスタチンの測定対象イオンは、ペアレントイオンがNH₂-QVVSGMNYFLDVELGR-COOHでm/z 914.4、MS/MSターゲットイオンがNH₂-FLDVELGR-COOHでm/z 948.7、アンジオジェニンの測定対象イオンは、ペアレントイオンがNH₂-YIHFLTQHYDAK-COOHでm/z 768.8、MS/MSターゲットイオンがNH₂-FLTQHYDAK-COOHでm/z 1122.8で測定した。内部標準ペプチドは、ペアレントイオンがNH₂-ETTVFENLPEK-COOH（但し、Pの炭素はC13、窒素はN15で標識）でm/z 656.9であり、MS/MSのターゲットイオンは、NH₂-FENLPEK-COOH（但し、Pの炭素はC13、窒素はN15で標識）でm/z 882.4で行った。

MSにはLCQ Advantageを用いた。得られたクロマトグラムから各タンパク質のピーク面積を求め、内部標準ペプチドとの比から濃度を求めた。

実施例 1

[0022] ゴーダチーズ8.8gとチェダーチーズ8.8gを混合し、これに溶融塩としてクエン酸ナトリウム0.4g添加し、さらに、水2g及び参考例1のアンジオジェニン画分35mgと参考例3のシスタチン画分0.25mgを混合して、乳化温度85℃で常法に従い乳化した。そして、乳化後、カルトンに充填し、二昼夜5℃で冷却して、チーズ類（実施例品1）を製造した。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が160mg/100g含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は0.02であった。

実施例 2

[0023] ゴーダチーズ8.8gとチェダーチーズ8.8gを混合し、これに溶融塩としてポリリン酸ナトリウム0.4g添加し、さらに、水2g及び参考例2

のアンジオジェニン画分 20 mg と参考例 3 のシスタチン画分 1.4 mg を混合して、乳化温度 85℃ で常法に従い乳化した。そして、乳化後、カルトンに充填し、二昼夜 5℃ で冷却して、チーズ類（実施例品 2）を製造した。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が 6.5 mg / 100 g 含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は 1.6 であった。

実施例 3

[0024] ゴーダチーズ 8.8 g とチェダーチーズ 8.8 g を混合し、これに溶融塩としてクエン酸ナトリウム 0.4 g 添加し、さらに、水 2 g 及び参考例 1 のアンジオジェニン画分 20 mg と参考例 3 のシスタチン画分 1.4 mg を混合して、乳化温度 85℃ で常法に従い乳化した。そして、乳化後、カルトンに充填し、二昼夜 5℃ で冷却して、チーズ類（実施例品 3）を製造した。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が 90 mg / 100 g 含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は 0.11 であった。

[0025] [比較例 1]

ゴーダチーズ 8.8 g とチェダーチーズ 8.8 g を混合し、これに溶融塩としてポリリン酸ナトリウム 0.4 g 添加し、さらに、水 2 g 及び参考例 2 のアンジオジェニン画分 18 mg と参考例 3 のシスタチン画分 3.4 mg を混合して、乳化温度 85℃ で常法に従い乳化した。そして、乳化後、カルトンに充填し、二昼夜 5℃ で冷却して、チーズ類（比較例品 1）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が 5.8 mg / 100 g 含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は 3.3 であった。

[0026] [比較例 2]

ゴーダチーズ 8.8 g とチェダーチーズ 8.8 g を混合し、これに溶融塩としてクエン酸ナトリウム 0.4 g 添加し、さらに、水 2 g 及び参考例 1 のアンジオジェニン画分 35.2 mg と参考例 3 のシスタチン画分 0.05 mg を混合して、乳化温度 85℃ で常法に従い乳化した。そして、乳化後、カルトンに充填し、二昼夜 5℃ で冷却して、チーズ類（比較例品 2）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が 161 mg / 100 g 含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は 0.14 であった。

[0027] [試験例 1]

実施例品 1～3 および比較例品 1、2 の骨強化作用を動物実験により調べた。実験には 5 週齢の C3H/HeJ 系雄マウスを用いた。実施例品 1～3 および比較例品 1、2 のチーズ類を 60℃ の湯中に加え、均一に混合、攪拌して、チーズ類の割合が 20% になるように調製した。1 週間の予備飼育の後、マウスを 10 匹ずつ 6 群に分け、実施例品 1～3 と比較例品 1、2 をマウス体重 1 kg あたり、それぞれ 1 日当りチーズ類として 20 g になるよう 1 日 2 回ゾンデで経口投与して 2 週間飼育した。また、実施例品 1～3 および比較例品 1、2 を投与しないものを対照群とした。投与終了後（2 週目）に、マウスの右脛骨の骨密度をマイクロ CT（（株）リガク製）により測定した。その結果を表 1 に示す。表 1 に示したように、実施例品 1～3 を 2 週間経口投与した群では、対照群または比較例品 1、2 を投与した群に比較して、骨密度が有意に上昇した。

[0028]

[表1]

	骨密度 (mg / cm ³)
対照群	1 2 3 6 ± 9
実施例品 1	1 2 6 8 ± 1 3
実施例品 2	1 2 7 1 ± 1 1
実施例品 3	1 2 6 9 ± 1 0
比較例品 1	1 2 4 2 ± 7
比較例品 2	1 2 4 3 ± 5

[0029] [参考例 4]

陽イオン交換樹脂のスルホン化キトパール（富士紡績社製）400 g を充填したカラム（直径4 cm×高さ30 cm）を脱イオン水で十分洗浄した後、このカラムに未殺菌脱脂乳（pH 6.7）40 L を流速25 ml/min で通液した。通液後、このカラムを脱イオン水で十分洗浄し、0.78 M の塩化ナトリウムを含む0.02 M 炭酸緩衝液（pH 7.0）で樹脂に吸着したタンパク質を溶出した。そして、この溶出液を逆浸透膜により脱塩した後、凍結乾燥して粉末状のタンパク質素材18 g を得た（参考例品4）。

[0030] [参考例 5]

参考例品4のタンパク質素材4 g を水800 ml に溶解し、最終濃度が0.03 重量%となるようタンパク質分解酵素であるトリプシン（シグマ社製）を加え、37℃で8時間酵素処理した。そして、90℃で5分間加熱処理して酵素を失活させた後、凍結乾燥して粉末状のタンパク質素材3.0 g を得た（参考例品5）。

実施例 4

[0031] 30%クリーム3 g に参考例品4を40 mg 混合して、これをカッテージチーズのカード17 g に均一になるように加えて、チーズ類（実施例品4）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が11 mg / 100 g 含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物

の質量比は0.35であった。

実施例 5

- [0032] 30%クリーム3gに参考例品5を40mg混合し、これをカッテージチーズのカード17gに均一になるように加えて、チーズ類（実施例品5）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が11mg/100g含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は0.36であった。

実施例 6

- [0033] 脂肪含量を2.8%に調整した乳100mlに、参考例品4を40mg添加して、77℃で15秒間殺菌した。冷却後、スターターやレンネット等を添加して攪拌し、30分間静置した。その後、ホエイを排出してチーズカードを調製した後、加塩、型詰めして、チーズ類（実施例品6）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が16mg/100g含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は0.6であった。

[0034] [比較例 3]

30%クリーム3gに参考例品4を30mgと参考例3のシスタチン画分10mgを混合し、これをカッテージチーズのカード17gに均一になるように加えて、チーズ類（比較例品3）を得た。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が8.8mg/100g含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は5.6であった。

[0035] [試験例 2]

実施例品4～6および比較例品3の骨強化作用について動物実験により調べた。実験には51週齢のSD系雌ラット48匹を用いた。実施例品4～6および比較例品3のチーズ類を60℃の湯中に加え、均一に混合、攪拌して

、チーズ類の割合が20%になるように調製した。ラットを8匹ずつ6群に分け、5群は卵巣摘出手術を施し、残りの1群は疑似手術を施した。4週間の回復期間を設け、卵巣摘出手術を施したラットに実施例品4～6および比較例品3をラット体重1kgあたり、それぞれ1日当りチーズ類として20gになるよう1日6回ゾンデで経口投与して16週間飼育した。実施例品4～6および比較例品3を投与しないものを対照群とした。また、4週間の回復期間の後、疑似手術を施したラットも対照群と同様に16週間飼育した。投与終了後（16週目）に、ラットの右大腿骨の骨密度をマイクロCT（（株）リガク製）により測定した。その結果を表2に示す。表2に示したように、実施例品4～6を16週間経口投与した群では、対照群または比較例品3を投与した群に比べ、骨密度が有意に上昇し、その値は疑似手術群に近いレベルであった。

[0036] [表2]

	骨密度 (mg/cm ³)
対照群	550±10
疑似手術群	600±8
実施例品4	597±11
実施例品5	595±12
実施例品6	598±14
比較例品3	554±11

実施例 7

[0037] 脂肪含量を3.6%に調整した乳100mlに、参考例品4を50mg添加して、77℃で15秒間殺菌した。冷却後、スターターやレンネット等を添加して攪拌し、40分間静置した。その後、ホエイを排出してチーズカードを調製した後、カードに対し青カビ（*P. roqueforti*）を0.05%添加した後、カードをチーズフープに充填し、20℃、20時間静置させた。静置後、カードをフープから取り出し、チーズ表面に食塩を3日間すり込んだ。加塩終了後、チーズカードの上下面に穿孔処理をおこなった。

穿孔処理後、チーズ表面をフィルム包装し、8℃にて60日間熟成を行った。得られたチーズ類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が19mg／100g含まれており、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対するシスタチン及び／又はシスタチン分解物の質量比は0.5であった。

請求の範囲

- [請求項1] アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を6.5～160mg／100g含有し、かつ、シスタチン及び／又はシスタチン分解物をアンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物に対して質量比が0.02～1.6の範囲で含有するチーズ類。
- [請求項2] 請求項1記載のチーズ類を20g／日以上摂取する骨疾患の予防方法。
- [請求項3] アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物を原料及び／又はチーズカードに混合する工程を含む請求項1記載のチーズ類の製造方法。
- [請求項4] 原料チーズと、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物とシスタチン及び／又はシスタチン分解物とを混合し、乳化、冷却する工程を含む請求項1記載のチーズ類の製造方法。