明　細　書

発明の名称 ： ＧＬＰ－１分泌促進用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含有する、ＧＬＰ－１分泌促進用組成物などに関する。

背景技術

[0002] ＧＬＰ－１［グルカゴン様ペプチド－１（Ｇｌｕｃａｇｏｎ－ｌｉｋｅ ｐｅｐｔｉｄｅ－１）］は、消化管粘膜上皮などから分泌されるホルモンである。ＧＬＰ－１の作用として、インスリン合成や分泌の刺激、グルカゴン分泌の阻害、食物摂取阻害、高血糖症の低減などが知られている。ＧＬＰ－１の分泌を活性化することで、これらの作用の向上が期待できる。

[0003] 特許文献１には、新規なＧＬＰ－１分泌促進成分としてゴーヤに含まれる１１種類のクルビタン型トリテルペン類が記載されている。また、特許文献２には、ステビオシド、レバウジオシドＡ、レバウジオシドＢ、レバウジオシドＤにＧＬＰ－１の分泌を促進させる性質がある旨が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０１７／１５９７２５号

特許文献2：国際公開第２０１７／０１８４０４号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] より優れたＧＬＰ－１分泌促進成分の開発が期待されている。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の一態様は、以下を提供する。

［１］両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含む組成物であって、

前記乳化剤が、水中油型乳化剤であり、

前記乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている、ＧＬＰ－１分泌促進用組成物。

［２］前記ＧＬＰ－１分泌促進成分がレバウジオシドＡである、上記［１］に記載の組成物。

［３］前記乳化剤のＨＬＢ値が７～１８である、上記［１］または［２］に記載の組成物。

［４］前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルおよび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種を含む、上記［１］～［３］のいずれか一項に記載の組成物。

［５］前記乳化剤の親水基が、甘味成分由来である、上記［１］～［４］のいずれか一項に記載の組成物。

［６］前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステルおよびショ糖脂肪酸エステルからなる群から選択される少なくとも１つの乳化剤を含む、上記［１］～［５］のいずれか一項に記載の組成物。

［７］前記乳化剤の親水基が、リン酸基を含む、上記［１］～［６］のいずれか一項に記載の組成物。

［８］前記ＧＬＰ－１分泌促進成分に対する前記乳化剤の割合が、０．０２～５０質量％である、上記［１］～［７］のいずれか一項に記載の組成物。

［９］前記乳化剤を０．１～５質量％の割合で含有する、上記［１］～［８］のいずれか一項に記載の組成物。

［１０］前記ＧＬＰ－１分泌促進成分を１～２０質量％の割合で含有する、上記［１］～［９］のいずれか一項に記載の組成物。

［１１］糖代謝改善用、食欲抑制用または糖尿病もしくは肥満症の予防もしくは改善用である、上記［１］～［１０］のいずれか一項に記載の組成物。

［１２］上記［１］～［１１］のいずれか一項に記載の組成物を含有する、飲料。

［１３］上記［１］～［１１］のいずれか一項に記載の組成物を含有する、

食品。

［１４］上記［１］～［１１］のいずれか一項に記載の組成物を含有する、医薬組成物。

［１５］水中油型の乳化剤と、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と、水性媒体とを混合して混合物を調製する工程、および、該混合物に油脂を加えて攪拌する工程を含む、ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれた乳化粒子の製造方法。

［１６］レバウジオシドＡと水中油型の乳化剤とを含む乳化粒子を含有し、

前記乳化粒子に前記レバウジオシドＡが組み込まれている、組成物。

発明の効果

[0007] 本発明においては、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と水中油型の乳化剤を使用し、乳化粒子にＧＬＰ－１分泌促進成分を組み込むことで、ＧＬＰ－１分泌促進成分のＧＬＰ－１分泌促進効果を高めることができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実験例１における各種甘味料のＧＬＰ－１分泌量を示すグラフである。

[図2]実験例２で得られたレバウジオシドＣ（以下、レバウジオシドをＲｅｂと略称することがある。）含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図3]実験例３で得られたステビオシド含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図4]実験例４で得られたレバウジオシドＡ含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図5]実験例５で得られたＲｅｂＡ乳化物含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図6]実験例６における、各種甘味料の有する表面張力を示すグラフである。

[図7]実験例７における、ＲｅｂＡの香味特性を示すグラフである。

[図8]実験例８～１３で得られた各種試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図9]実験例８で得られたＲｅｂＡ含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図10]実験例９で得られたＲｅｂＡ乳化物含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図11]実験例１０で得られた乳化粒子含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図12]実験例１１で得られた、ＲｅｂＡ含有試料と乳化粒子含有試料の混合液の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図13]実験例１２で得られたグリセリン含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図14]実験例１３で得られたＭＣＴオイル含有試料の濃度とＧＬＰ－１分泌量の関係を示すグラフである。

[図15]実験例１５～２０で得られた各種試料の細胞毒性（死細胞を指標）を示すグラフである。ａは投与から２時間後、ｂは２４時間後の結果である。

[図16]実験例２１～３１で得られた各種試料のＧＬＰ－１分泌量を示すグラフである。ａは投与から２時間後、ｂは２４時間後の結果である。

[図17]実験例３２で得られた各ステビオール配糖体の分配比率と、試験中の様子を示す写真である。

[図18]実験例３２において、試験後のＲｅｂＡ含有溶液の状態を示す写真である。

[図19]実験例３３における、保管温度の香味特性への影響を示す図である。

[図20]実験例３３における、振動環境下での安定性を示す図である。

[図21]実験例３３における、乳化による甘味強度の低下度合いを示す図である。

[図22]実験例３４における、ＧＬＰ－１分泌量を示す図である。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明者の研究により、ＲｅｂＡ等のＧＬＰ－１分泌促進成分をミセル等の乳化粒子に組み込むことで、より優れたＧＬＰ－１分泌促進能が実現でき

ることがわかった。

[0010] また、ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている乳化粒子を含む組成物は、保管後、特に高温条件、酸性条件、振動環境などの過酷な環境下で保管した後も、乳化状態が維持されており、また、高温保管後の味の劣化が少なく、保管安定性に優れる傾向にあることがわかった。

[0011] ＜ＧＬＰ－１分泌促進成分＞

ＧＬＰ－１分泌促進成分とは、それ自体がヒトまたはＧＬＰ－１分泌能を有する非ヒト動物の細胞に作用してＧＬＰ－１の分泌量を増加させる性質（以下、ＧＬＰ－１分泌促進能と呼ぶ。）を有する物質または組成物を意味する。

[0012] ＧＬＰ－１分泌促進能を有する物質または組成物をＧＬＰ－１分泌細胞に与えると、ＧＬＰ－１分泌量が多くなる。ＧＬＰ－１分泌量の多少は、実験例と同様の方法により確認される。即ち、被験物質または組成物を含んでいるサンプルと、被験物質または組成物を含んでいない点以外は同じ組成の無刺激陰性対照サンプルを用意し、同じ条件下で両サンプルを、ＧＬＰ－１分泌能を有するヒト結腸由来細胞（例えばH716）に与え、無刺激陰性対照サンプルと比べてＧＬＰ－１分泌量の多い/少ないを確認する。なお、本明細書において、陰性対照を「陰性コントロール」と呼ぶことがある。

[0013] 本発明で使用するＧＬＰ－１分泌促進成分は、両親媒性である。「両親媒性」は、「分子および原子団で、水との親和性が大きい部分（親水基）と親和性が小さい部分（疎水基）の両方をもち合わせていること」という意味である（参照：デジタル大辞泉）。

[0014] 両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分は、水よりも小さな表面張力を有する傾向にある。

[0015] 両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分は、ＧＬＰ－１分泌促進能を有する配糖体甘味料を含むことが好ましい。配糖体甘味料は、好適にはＧＬＰ－１分泌促進能を有するステビオール配糖体またはモグロシド（以下、モグロシドをＭｏｇと略称することがある。）を含み、より好適には、レバウジオシド

Ａ、レバウジオシドＢ、ステビア抽出物、ラムノースが結合した構造を有するステビオール配糖体、ステビオシドおよびモグロシドＶを含み、さらに好適には、レバウジオシドＡ、レバウジオシドＢ、レバウジオシドＣ、ステビオシドおよびモグロシドＶを含む。

[0016] 上記した配糖体甘味料は、好適には、以下のいずれかの表面張力Ｑ（ｍＮ／ｍ）を有する。

Ｑ＝４０～７０、４５～６５、４０～６０、５０～７０、５８～６３、５９～６２、６０～６１、５０～６３、５１～６３、５２～６３、５３～６３、５４～６３、５５～６３、５６～６３、５７～６３、５９～６３、６０～６３、５８～６２、５８～６１、５８～６０

[0017] 表面張力Ｑは、プレート法により測定される。例えば、被験物質である配糖体甘味料を、ショ糖換算でＢｒｉｘ１０となるような量で配合し、水溶液を調製する。調製した水溶液の表面張力を、自動表面張力計（ＣＢＶＰ－Ｚ型、協和界面科学社製）を用いたプレート法によって測定する。

[0018] 飲食品への適用などの観点から、ＧＬＰ－１分泌促進能を有する配糖体甘味料としては、ステビオール配糖体が好ましい。

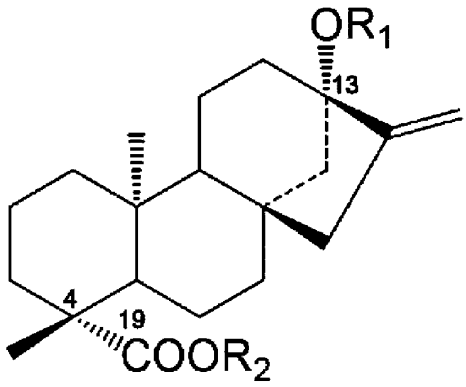
[0019] 配当体甘味料以外の両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分として、タンパク質や糖タンパク質があげられる。例えば、カゼイン、カゼイン塩もしくはホエータンパク質を含む乳タンパク質、卵黄タンパク質、卵白タンパク質、大豆タンパク質、小麦タンパク質、エンドウ豆タンパク質、ムチン、プロテオグリカンまたはこれらの加工品などをあげることができる。

[0020] 本発明において、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分としては、レバウジオシドＡが最も好適である。レバウジオシドＡ自身が持つＧＬＰ－１分泌促進能を、乳化粒子への組込により、効果的に向上させることができるためである。その理由は定かではないが、本発明者らは次のように推測している。

[0021] レバウジオシドＡは、アグリコンであるステビオールに４つのグルコースが結合した構造を有している。ステビオール配糖体としては、レバウジオシドＡ以外にも様々な種類が存在する。ここに、一例として、後述の実験例３

２（分配比率について）で使用したステビオール配糖体の構造を示す。

[化1]



化合物名	R_1	R_2
レバウジオシドA (rebA)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1-
ステビオシド (stv)	Glcβ1, 2Glcβ1-	Glcβ1-
レバウジオシドD (rebD)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2Glcβ1-
レバウジオシドM (rebM)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-

[0022] 本発明者らが、レバウジオシドＡと他のステビオール配糖体の分配比率を測定したところ、レバウジオシドＡと他のステビオール配糖体とは、グルコースの結合位置と数がわずかに違うだけであるにも関わらず、驚くべきことに、レバウジオシドＡを使用した系においてのみ、水性媒体中に有機溶媒が分散する乳化現象が起こり、有機層と水層を分離することができないという結果が得られた。即ち、レバウジオシドＡは、単に両親媒性を示すにとどまらず、他のステビオール配糖体よりもはるかに優れた乳化能を示すのである。

[0023] また、表面張力に関する研究も行ったところ、ＲｅｂＡの界面活性作用が他の配糖体よりも高いことがわかった。このＲｅｂＡの表面張力の低さと、ステビオール骨格の１３位と１９位にグルコースが付加しているという構造上の特徴とに起因して、ＲｅｂＡは、相対的に疎水性部分と親水性部分をもつ両親媒性的になりやすいと考えられる。したがって、レバウジオシドＡは、乳化粒子のコアの外側に存在するシェルに組み込まれる傾向にあり、これによってＧＬＰ－１分泌促進能の素晴らしい向上が実現されるものと推察さ

れる。

[0024] ＜乳化剤＞

本発明で使用する乳化剤は、水中油型乳化剤である。

[0025] 水中油型乳化剤においては、ＨＬＢ値が７～１８、９～１８、１１～１８、１３～１８、１５～１８、７～１７、７～１５、７～１３、７～１１、７～９、９～１６、１１～１４のいずれかであることが好ましい。

[0026] 本発明において、ＨＬＢ値は、グリフィン法で算出される。

[0027] 本発明においては、限定されずに、既知の水中油型乳化剤を使用することができる。例えば、水中油型乳化剤としては、ＨＬＢ値が上記のいずれかの値であるという条件の下、モノグリセリド、有機酸モノグリセリド、ポリグリセリン脂肪酸エステル等のグリセリン脂肪酸エステル；ソルビタン脂肪酸エステル；ショ糖脂肪酸エステル；プロピレングリコール脂肪酸エステル；ステアロイル乳酸塩；ポリソルベート；植物レシチン、卵黄レシチン、分別レシチン、酵素処理レシチン等のレシチン類；キラヤ抽出物、ユッカフォーム抽出物；植物性ステロール；スフィンゴ脂質；胆汁末；動物性ステロール等があげられる。

[0028] 好適には、水中油型乳化剤は、ＨＬＢ値が上記のいずれかの値であるという条件の下、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルおよび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種を含む。

[0029] あるいは、使用する乳化剤が、ＨＬＢ値が上記のいずれかの値であるという条件の下、親水基が甘味成分由来である乳化剤を含むことが好ましく、特に、ポリグリセリン脂肪酸エステルおよびショ糖脂肪酸エステルからなる群から選択される少なくとも１つの乳化剤を含むことが好ましい。

[0030] さらにまた、乳化剤が、ＨＬＢ値が上記のいずれかの値であるという条件の下、親水基がリン酸基を含む乳化剤を含むことが好ましく、特に、レシチン類を含むことが好ましい。

[0031] ＜組成物＞

本発明の組成物においては、ＧＬＰ－１分泌促進成分が乳化粒子に組み込まれている。

[0032] 本発明において「乳化粒子」とは、乳化剤由来の分子またはイオンが集まってつくるコロイド粒子を意味する。乳化剤の分野においては、コロイド粒子は、大きさによってミセル、ナノエマルション、エマルション等と呼び分けることがあるが（参照：Toshiyuki Suzuki, J.Soc.Cosmet.Jpn., Vol.44, No.2, 2010）、本発明における「乳化粒子」はこれら全てを含む。

[0033] 「ＧＬＰ－１分泌促進成分が乳化粒子に組み込まれている」とは、組成物に含まれる少なくとも一部の乳化粒子に、少なくとも一部のＧＬＰ－１分泌促進成分由来の分子またはイオンが組み込まれていることを意味する。「組み込まれている」とは、乳化粒子の内部にＧＬＰ－１分泌促進成分由来の分子またはイオンの少なくとも一部分が存在し、あるいは、乳化粒子に接触していることを意味する。「乳化粒子の内部」は、乳化粒子のコアまたはコアの外側に位置し、主に乳化剤の親水基から疎水基にかけての部分により構成されているシェルを意味する。ＧＬＰ－１分泌促進成分が両親媒性であることなどを考慮すると、ＧＬＰ－１分泌促進成分は、主に、乳化粒子のシェルに存在し、または接触する傾向にあると推察される。ＧＬＰ－１分泌促進成分が乳化粒子に組み込まれているとき、乳化粒子と水性媒体とを分画すると、乳化粒子側の画分にＧＬＰ－１分泌促進成分も含まれる傾向にある。

[0034] 好適には、ＧＬＰ－１分泌促進成分の乳化粒子への組み込み率は、１０～９０％である。組込率は、下記式で表される。

組み込み率（％）＝（乳化粒子に組み込まれたＧＬＰ－１分泌促進成分の量／組成物中の全ＧＬＰ－１分泌促進成分の量）×１００

組込率の算出にあたっては、乳化組成物から乳化粒子に組み込まれたＧＬＰ－１分泌促進成分と組み込まれていないＧＬＰ－１分泌促進成分を分離すればよく、具体的には乳化組成物に対しフィルター濾過、遠心濾過、カラム分離等の分離操作を行う。

[0035] 分離操作として、好適には、フィルターろ過を行う。

[0036] 乳化粒子の平均粒子径は、好適には、保管する前（例えば製造から半日以内）の段階において、0.05～0.5、0.07～0.5、0.05～0.4、0.05～0.3、0.05～0.2、0.05～0.1、0.1～0.4、0.2～0.3、0.07～0.15、0.07～0.12または0.07～0.09μｍである。

[0037] 乳化粒子の平均粒子径は、長期保管後でもあまり変化しない傾向にある。例えば、本発明のＧＬＰ－１分泌促進組成物を調整後４℃で２か月保管する場合、保管前後での平均粒子径の変化率Ｒ（Ｒ＝保管後の平均粒子径／保管前の平均粒子径×１００－１００）は、マイナス４０％～プラス４０％、マイナス３７％～プラス３７％、マイナス３５％～プラス３５％、マイナス２０％～プラス２０％またはマイナス１２％～プラス１２％である。

[0038] 乳化粒子の平均粒子径は、レーザー回折散乱法で測定することができる。例えば、後述の実施例に示すように、サンプルを、レーザー散乱強度が１％程度になるようにイオン交換水で適宜希釈し、希釈したサンプルをレーザー回折散乱式粒度分布測定器（スペクトリス株式会社 マルバーン・パナリティカル事業部）で測定し、乳化粒子の平均粒子径を求めることができる。

[0039] ＧＬＰ－１分泌促進成分に対する乳化剤の割合（質量％）は、好適には、０．０２～５０、０．０７～５０、０．１～５０、０．４～５０、０．７～５０、１～５０、５～５０、１０～５０、２０～５０、３０～５０、４０～５０、０．０２～４０、０．０２～３０、０．０２～２０、０．０２～１０、０．０２～５、０．０２～１、０．０７～４０、０．１～３０、０．４～２０、０．７～１０、１～５、１～１００、５～１００、９～１００、１～１００、１～９０、１～８０、１～７０、１～６０、１～５０、１～４０、１～３０、１～２０、１～１０、５～９９、５～９０、５～８０、５～７０、５～６０、５～５０、５～４０、５～３０、５～２０、５～１０、１０～５０、２０～５０、３０～５０、４０～５０、５～４０または１０～３０質量％である。

[0040] あるいは、ＧＬＰ－１分泌促進成分に対する乳化剤の割合（質量％）は、好適には、5～200、7～200、9～200、10～200、30～200、50～200、70～200

、90～200、110～200、130～200、150～200、170～200、5～180、5～160、5～140、5～120、5～100、5～80、5～60、5～40、5～30、5～20、7～180、9～160、10～140、30～120、50～100、10.0～180、10.0～160、10.0～140、10.0～120、10.0～100、10.0～80または10.0～60質量％である。

[0041] 本発明の組成物における乳化剤の含有割合（質量％）は、好適には、質量基準で、０．１～５、０．１～４、０．１～３、０．１～２、０．１～１、０．３～５、０．５～５、０．７～５、０．９～５、１．１～５、２．１～５、３．１～５、４．１～５、０．３～４、０．５～３、０．７～２、０．９～１、０．３～５、０．５～５．０、０．７～５．０、０．９～５．０、１～５．０、１．５～５．０、２～５．０、２．５～５．０、３～５．０、３．５～５．０、４～５．０、４．５～５．０、０．１～４、０．１～３、０．１～２、０．１～１、０．１～０．８、０．１～０．６、０．１～０．４、０．１～０．２、０．２～４．５、０．３～４．０、０．４～３．５、０．５～３．０、０．６～２．５、０．７～２．０、０．８～１．５または０．９～１．０質量％である。

[0042] あるいは、本発明の組成物における乳化剤の含有割合（質量％）は、好適には、質量基準で、0.001～1、0.001～0.5、0.001～0.25、0.001～0.2、0.01～1、0.01～0.5、0.01～0.25、0.01～0.2、0.1～1、0.1～10、0.4～10、0.7～10、1～10、3～10、5～10、7～10、0.1～8、0.1～6、0.1～4、0.1～2、1～8、1～7、1～6、3～10、3～7、3～6または5～7％である。

[0043] 本発明の組成物におけるＧＬＰ－１分泌促進成分の含有割合（質量％）は、好適には、０．１～５０、１～２０、０．１～４０、０．１～３０、０．１～２０、０．１～１０、０．１～５、０．１～１、０．４～５０、０．７～５０、１～５０、５～５０、１０～５０、２０～５０、３０～５０、４０～５０、０．４～４０、０．７～３０、１～２０、５～１０、２～１５、２～１０、２～５、５～２０、８～２０、１１～２０、１４～２０、１７～２０、５～１５または８～１０質量％である。

[0044] または、本発明の組成物におけるＧＬＰ－１分泌促進成分の含有割合は、

好適には、質量基準で、1～500,000、1～400,000、1～300,000、1～200,000、1～100,000、1～80,000、1～60,000、1～40,000、1～20,000、1～10,000、1～8,000、1～6,000、1～4,000、1～2,000、1～1,000、1～500、50～500,000、100～500,000、500～500,000、1,000～500,000、1,500～500,000、3,000～500,000、4,500～500,000、6,000～500,000、7,500～500,000、9,000～500,000、10,000～500,000、50,000～500,000、100,000～500,000、200,000～500,000、300,000～500,000、400,000～500,000、50～400,000、100～300,000、500～200,000、1,000～100,000、1,500～80,000、3,000～60,000、4,500～40,000、6,000～20,000または7,500～10,000ｐｐｍである。あるいは、好適には、質量基準で、25～550、30～550、35～550、40～550、45～550、50～550、55～550、20～540、25～540、30～540、35～540、40～540、45～540、50～540、55～540、20～530、25～530、30～530、35～530、40～530、45～530、50～530、55～530、20～520、25～520、30～520、35～520、40～520、45～520、50～520、55～520、20～510、25～510、30～510、35～510、40～510、45～510、50～510、55～510、20～505、25～505、30～505、35～505、40～505、45～505、50～505、55～505、20～500、25～500、30～500、35～500、40～500、45～500、50～500、55～500、20～495、25～495、30～495、35～495、40～495、45～495、50～495、55～495、20～490、25～490、30～490、35～490、40～490、45～490、50～490または55～490ｐｐｍである。あるいは、好適には、質量基準で、1～1500、1～1200、5～1200、1～1000、5～1000、10～1000、1～900、5～900、10～900、15～900、20～900、25～900、30～900、35～900、40～900、45～900、50～900、55～900、1～800、5～800、10～800、15～800、20～800、25～800、30～800、35～800、40～800、45～800、50～800、55～800、1～700、5～700、10～700、15～700、20～700、25～700、30～700、35～700、40～700、45～700、50～700、55～700、1～600、5～600、10～600、15～600、20～600、25～600、30～600、35～600、40～600、45～600、50～600、55～600、1～550、1～540、1～530、1～520、1～510、1～505、1～500、1～495、1～490、5～550、5～540、5～530、5～520、5～510、5～505、5～500

、5～495、5～490、10～550、10～540、10～530、10～520、10～510、10～505、10～500、10～495、10～490、15～550、15～540、15～530、15～520、15～510、15～505、15～500、15～495または15～490ｐｐｍである。

[0045] または、本発明の組成物におけるＧＬＰ－１分泌促進成分の含有割合は、好適には、質量基準で、0.1～25,000、1～25000、10～25000、0.1～2500、1～2500または10～2500ppmである。

[0046] 本発明の組成物のＧＬＰ－１分泌促進能は、ＧＬＰ－１分泌促進成分単体に比べて増加している。本発明の組成物のＧＬＰ－１分泌促進能がＧＬＰ－１分泌促進成分単体に比べて増加しているか否かは、次の方法で確認される。即ち、本発明の組成物と、有効成分としてＧＬＰ－１分泌促進成分しか配合していない点以外は同じである比較対象組成物を調製する。本発明の組成物と比較対象組成物とをＧＬＰ－１分泌能を有する細胞に与え、ＧＬＰ－１分泌量を測定する。本発明の組成物を与えたときのＧＬＰ－１分泌量のほうが比較対象組成物を与えたときよりも多い場合には、ＧＬＰ－１分泌促進能が向上したと判断する。好適には、ＧＬＰ－１分泌促進能は、ＧＬＰ－１分泌促進成分単体に比べて１．０５倍以上、より好適には１．１倍以上、特に好適には１．２～１００倍、最も好適には２～５０倍に増加している。

[0047] 本発明の組成物は、ＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤以外の他の成分を含んでよい。

[0048] 他の成分は、本発明の組成物の用途などに応じて適宜決定されるが、例えば甘味料、賦形剤、結合剤、崩壊剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、吸収促進剤、ｐＨ調製剤、防腐剤、抗酸化剤、香料、ビタミン類、微量金属成分等などがあげられる。

[0049] 他の甘味料は、天然甘味料、糖アルコール、人工甘味料等であってよい。例えば、グルコース；フルクトース；マルトース；スクロース；ラクトース；希少糖；アスパルテーム、ネオテーム、アリテームなどのペプチド系甘味料；スクラロースなどのショ糖誘導体；アセスルファムＫ、サッカリン、アドバンテーム、チクロ、ズルチン等の合成甘味料；モネリン、クルクリン、

ブラゼイン、ソーマチンなどの植物性のタンパク質系甘味料；タウマリン；ネオヘスペリジンジヒドロカルコン；エリスリトール、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、マンニトール等の糖アルコール；高果糖液糖；果糖ブドウ糖液糖；ブドウ糖果糖液糖；オリゴ糖；はちみつ；サトウキビ搾汁液（黒糖蜜）；砂糖（白糖、三温糖、黒糖、和三盆等）；メープルシロップ；モラセス（糖蜜）；水飴などがあげられる。

[0050] また、他の成分としては、油脂等の乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分が好適に使用される。油脂としては、Ｃ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイルが好ましい。

[0051] 乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分は、ＧＬＰ－１分泌促進成分に対して０．５～５００質量％の量で含まれることが好ましい。

[0052] あるいは、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分は、ＧＬＰ－１分泌促進成分に対して100～400、150～400、200～400、250～400、300～400、350～400、100～350、100～300、100～250、150～250、100～200、100～150、190～300または240～300質量％の量で含まれることが好ましい。

[0053] さらにまた、他の成分として、グリセリン等の水性基剤を使用することが好ましい。

[0054] 水性基剤は、ＧＬＰ－１分泌促進成分に対して２～６００質量％の量で含まれることが好ましい。

[0055] あるいは、水性基剤は、ＧＬＰ－１分泌促進成分に対して2～2100、100～2100、200～2100、300～2100、400～2100、500～2100、600～2100、700～2100、800～2100、900～2100、1000～2100、100～2000、100～1800、100～1600、100～1400、100～1200、100～1000、100～800、100～700、100～600、100～500、200～1800、300～1600、400～1400、500～1200、600～1000、490～2100、490～1900、490～1700、490～1500、490～1300、490～1100、490～900、490～700、490～600、490～560、490～550、490～540または490～530質量％の量で含まれることが好ましい。

[0056] 後で詳述するが、本発明の組成物を飲食品とする場合、他の成分として食

品添加剤を含んでよい。食品添加剤としては、例えば、賦形剤（例えば、コムギデンプン、トウモロコシデンプン、セルロース、乳糖、ショ糖、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、アルファー化デンプン、カゼイン、ケイ酸アルミン酸マグネシウム、ケイ酸カルシウムなど）、結合剤（例えば、アルファー化デンプン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど）、崩壊剤（例えば、セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、トウモロコシデンプンなど）、流動化剤（例えば、軽質無水ケイ酸など）、油脂（例えば、大豆油、ゴマ油、オリーブ油、亜麻仁油、エゴマ油、ナタネ油、ココナッツ油、トウモロコシ油などの植物油または動物・魚由来の油）、栄養素（例えば、各種ミネラル、各種ビタミン、アミノ酸）、香料、甘味料、矯味剤、着色料、溶媒（例えば、エタノール）、塩類、ｐＨ調節剤、緩衝剤、抗酸化剤、安定化剤、ゲル化剤、増粘剤、滑沢剤、カプセル化剤、懸濁剤、コーティング剤、防腐剤、乳化剤などがあげられる。食品添加剤は、単独でまたは２種以上組み合わせて含んでもよい。

[0057] 本発明の組成物の一例としては、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルおよび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水性媒体、特に水を含むものがあげられる。特に、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水を含むものがあげられる。

[0058] さらに、本発明の組成物の一例としては、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルお

よび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水性媒体、特に水を含み、水中油型乳化剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の０．０２～５０質量％であり、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の０．５～５００質量％であり、水性基剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の２～６００質量％であるものがあげられる。特に、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水を含み、水中油型乳化剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の０．０２～５０質量％であり、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の２～６００質量％であり、水性基剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の２～６００質量％であるものがあげられる。

[0059] 本発明の組成物の別の一例としては、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルおよび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水性媒体、特に水を含み、水中油型乳化剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の５～２００質量％であり、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の１００～４００質量％であり、水性基剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の２～２，１００質量％であるものがあげられる。特に、ＧＬＰ－１分泌促進成分としてＲｅｂＡ、水中油型乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル、乳化

粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分としてＣ６～Ｃ１２の脂肪酸により構成されるＭＣＴオイル、水性基剤としてグリセリン、および、分散媒として水を含み、水中油型乳化剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の５～２００質量％であり、乳化粒子の中心部（コア）に選択的に存在しうる成分の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の１００～４００質量％であり、水性基剤の含有割合が、ＧＬＰ－１分泌促進成分の２～２，１００質量％であるものがあげられる。

[0060] 本発明の組成物は、任意の形状であってよく、例えば、固体状（例えば、粉末状）、ゲル状または液状であってもよい。

[0061] 本発明の組成物は、ＧＬＰ－１分泌促進の用途に適用することができる。

[0062] 例えば、本発明の組成物は、血糖値上昇抑制用、食欲抑制用、過食抑制用、糖代謝の改善用、糖尿病の予防または治療用、肥満症の予防または治療用、体重の低減用、及び体脂肪率の低減用から選択される少なくとも１つの用途に使用することができる。好適には、糖代謝改善用、食欲抑制用および糖尿病もしくは肥満症の予防もしくは改善用から選択される少なくとも１つの用途に使用することができる。

[0063] また、胃内容排出の促進、胃酸分泌の抑制、肝糖放出抑制、心筋保護、学習記憶能向上、食後高血糖（隠れ糖尿病）の予防または治療、潰瘍性大腸炎の予防または治療等の目的で使用することもできる。

[0064] また、アテローム性動脈硬化などの血管性疾患、神経変性疾患、非アルコール性肝炎、かんぱん、喘息の予防または治療用に使用することもできる（参照：Young-Sun Lee et al., "Anti-Inflammatory Effects of GLP-1-Based Therapies beyond Glucose Control", Mediators of Inflammation Volume 2016, Article ID 3094642, 11 pages）。

[0065] あるいは、本発明の組成物は、苦味低減用または甘味倍率低減用の組成物とすることもできる。例えばＧＬＰ－１分泌促進成分が配糖体甘味料を含んでいる場合に、当該配糖体甘味料の持つ苦みや甘味倍率を、乳化粒子への組み込みにより低減するという目的に使用することもできる。

[0066] 本発明の組成物は、それ自体を直接ヒトまたはＧＬＰ－１分泌能を有する非ヒト動物に使用（摂取、服用または投与）することができる。

[0067] 直接ヒトまたは非ヒト動物に使用する場合の本発明の組成物の態様としては、血糖値上昇抑制用、食欲抑制用、過食抑制用、糖代謝改善用、糖尿病の予防もしくは治療用、肥満症の予防もしくは治療用、体重低減用、体脂肪率低減用、胃内容物排出促進用、胃酸分泌抑制用、肝糖放出抑制用、心筋保護用、学習記憶能向上用、血管性疾患の予防もしくは治療用、神経変性疾患の予防もしくは治療用、非アルコール性肝炎の予防もしくは治療用、かんぱんの予防もしくは治療用、または喘息の予防もしくは治療用の食品、例えば麺類（そば、うどん、中華麺、即席麺など）、豆腐、菓子類（飴、ガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、クッキー、グミなど）、パン類、水産または畜産加工食品（かまぼこ、ハム、ソーセージなど）、乳製品（発酵乳など）、油脂および油脂加工食品（サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング、ファットスプレッドなど）、調味料（ソース、たれなど）、調理品または半調理品（チャンプルなど）、レトルト食品（カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊など）、冷菓（アイスクリーム、シャーベット、かき氷など）、粉末食品（粉末飲料、粉末スープ等）、経腸流動食などがあげられる。また、上述した用途の食品には、いわゆる健康食品の他、特定保健用食品、栄養機能食品などの保健機能食品、サプリメント（栄養補助食品）、飼料も含まれる。

また、血糖値上昇抑制用、食欲抑制用、過食抑制用、糖代謝改善用、糖尿病の予防もしくは治療用、肥満症の予防もしくは治療用、体重低減用、体脂肪率低減用、胃内容物排出促進用、胃酸分泌抑制用、肝糖放出抑制用、心筋保護用、学習記憶能向上用、血管性疾患の予防もしくは治療用、神経変性疾患の予防もしくは治療用、非アルコール性肝炎の予防もしくは治療用、かんぱんの予防もしくは治療用、または喘息の予防もしくは治療用の飲料、例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料（ノンアルコールビールを含む）、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料、ジュース、ドリンク剤、アルコール飲料、加工乳、

調製豆乳などがあげられる。

[0068] 本発明の組成物を製剤化して使用する場合、剤形としては、例えば、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、ドライシロップ剤、被覆錠剤、口腔内崩壊錠、チュアブル錠、カプセル剤、ソフトカプセル剤、シロップ剤、経腸栄養剤などがあげられる。

[0069] ＜製造方法＞

本発明の組成物は、その用途、組成等に応じた既知の方法により製造される。

[0070] 好適には、水中油型の乳化剤と、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と、水性媒体とを混合して混合物を調製する工程、および、得られた混合物に油脂などの乳化粒子のコアに包含されうる成分を加えて攪拌する工程を経て製造される。撹拌は、ホモミキサー等を使用し、油脂などが乳化粒子のコアに包含されるように、混合よりも激しい条件で高速攪拌することが好ましい。

[0071] 混合よりも激しい条件で高速攪拌するにあたって、攪拌速度は、好適には、5,000～10,000、5,000～8,000または8,000～10,000rpmである。

[0072] したがって、本発明の一側面は、水中油型の乳化剤と、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と、水性媒体とを混合して混合物を調製する工程、および、得られた混合物に油脂を加えて攪拌する工程を含むＧＬＰ－１分泌促進用組成物の製造方法、および、前記方法により製造される、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と水中油型乳化剤とを含む乳化粒子を含み、該乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている組成物に関する。

[0073] 別の態様として、本発明の組成物は、水中油型の乳化剤と、水性媒体とを混合して混合物を調製する工程、および、得られた混合物に、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と、油脂などの乳化粒子のコアに包含されうる成分を加えて攪拌する工程を経て製造することも可能である。撹拌は、ホモミキサー等を使用し、油脂などが乳化粒子のコアに包含されるように、混合よりも激しい条件で高速攪拌することが好ましい。混合よりも激しい条件で高速攪拌するにあたって、攪拌速度は、好適には、5,000～10,000、5,000～8,000ま

たは8,000～10,000rpmである。

[0074] ＜応用＞

本発明の組成物は、飲料、食品、医薬組成物等に含有させた状態で、経口、経鼻、経腸等の経路または経管による経路にて使用することもできる。

[0075] 本発明の組成物を飲食品に添加して（または含有させて）用いる場合、飲食品の種類は、特に限定されない。食品としては、例えば、麺類（そば、うどん、中華麺、即席麺など）、豆腐、菓子類（飴、ガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、クッキー、グミなど）、パン類、水産または畜産加工食品（かまぼこ、ハム、ソーセージなど）、乳製品（発酵乳など）、油脂および油脂加工食品（サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング、ファットスプレッドなど）、調味料（ソース、たれなど）、調理品または半調理品（チャンプルなど）、レトルト食品（カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊など）、冷菓（アイスクリーム、シャーベット、かき氷など）、粉末食品（粉末飲料、粉末スープ等）、経腸流動食などがあげられる。また、いわゆる健康食品の他、特定保健用食品、栄養機能食品などの保健機能食品、サプリメント（栄養補助食品）、飼料なども含まれる。

飲料としては、例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料（ノンアルコールビールを含む）、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料、ジュース、ドリンク剤、アルコール飲料、加工乳、調製豆乳などがあげられる。

[0076] 飲食品は、本発明の組成物を含んでいる限り、他の成分を含んでいてもよい。この場合の他の成分の例としては、＜組成物＞の項で示した他の成分の例と同じものをあげることができる。

[0077] 本発明において、ＧＬＰ－１分泌促進成分の摂取量（服用量、投与量）は特に限定されず、対象年齢、体重、健康状態などに応じて適宜選択できる。

[0078] 本発明は、治療的用途（医療用途）または非治療用途のいずれにも使用または適用できる。具体的には、医薬品、医薬部外品、化粧品などに分類されるか否かによらず、ＧＬＰ－１の分泌を促進する機能やＧＬＰ－１の分泌促

進に起因する機能を明示的にまたは暗示的に訴求するあらゆる組成物または飲食品として使用または適用できる。また、本発明を使用した製品には、ＧＬＰ－１の分泌を促進する機能やＧＬＰ－１の分泌促進に起因する機能を表示してもよい。このような表示としては、特に限定されないが、ＧＬＰ－１の分泌促進機能や、ＧＬＰ－１の分泌促進に起因する機能、例えば、血糖値上昇抑制機能、食欲抑制機能、過食抑制機能、糖代謝の改善機能、糖尿病の予防または治療機能、肥満症の予防または治療機能、体重の低減機能、体脂肪率の低減機能、胃内容排出促進機能、胃酸分泌抑制機能、肝糖放出抑制機能、心筋保護機能、学習記憶能向上機能、血管性疾患の予防または治療機能、神経変性疾患予防または治療機能、非アルコール性肝炎の予防または治療機能、かんぱんの予防または治療機能、喘息の予防または治療機能、あるいはこれらと同視できる表示などがあげられる。

[0079] 本発明の組成物の使用のタイミングは、特に限定されるものではなく、例えば、食前、食中、食間、食後、就寝前などであってよい。

[0080] 本発明の一側面は、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含む組成物であって、前記乳化剤が水中油型乳化剤であり、前記乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれており、ＧＬＰ－１分泌の促進により改善しうる疾患の処置に使用される組成物に関する。また、本発明の一側面は、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含む組成物であって、前記乳化剤が水中油型乳化剤であり、前記乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象においてＧＬＰ－１の分泌を促進する、または、対象においてＧＬＰ－１の分泌促進により改善しうる疾患を治療する方法に関する。さらにまた、本発明の一側面は、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含む組成物であって、前記乳化剤が水中油型乳化剤であり、前記乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている組成物の、ＧＬＰ－１分泌の促進により改善しうる疾患を治療するための医薬の製造への使用に関する。なお、上記した各側面は

、本明細書に記載の様々な特徴を有してよい。

[0081] 疾患には、高血糖症、過食症、胃酸過多症、糖尿病、肥満症、血管性疾患、神経変性疾患、非アルコール性肝炎、かんぱん、喘息などが含まれる。

[0082] 本明細書において、用語「対象」は、ＧＬＰ－１分泌能を有する任意の生物個体、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体を意味する。対象は健常（例えば、特定の又は任意の疾患を有しない）であっても、何らかの疾患に罹患していてもよいものとするが、ＧＬＰ－１の分泌促進により改善しうる疾患の処置等が企図される場合には、典型的には当該疾患に罹患しているか、罹患するリスクを有する対象を意味する。

本明細書において、用語「処置」は、疾患の治癒、一時的寛解又は予防などを目的とする医学的に許容される全ての種類の予防的及び／又は治療的介入を包含するものとする。例えば、「処置」は、疾患の進行の遅延又は停止、病変の退縮又は消失、当該疾患発症の予防又は再発の防止などを含む、種々の目的の医学的に許容される介入を包含する。したがって、本発明の組成物は、疾患の治療及び／又は予防に用いることができる。

[0083] また、本発明の一側面は、ＧＬＰ－１分泌促進成分を乳化粒子に取り込む（乳化する）ことを含む、ＧＬＰ－１分泌促進成分のＧＬＰ－１分泌促進能の増加方法に関する。

実施例

[0084] 以下に実施例により本発明を更に具体的に説明する。なお、実験例１４は欠番である。

＜実験例１＞

ＲｅｂＡ、ＲｅｂＢ、ＲｅｂＭ、ＲｅｂＮ、ＲｅｂＤ、ＲｅｂＣ、ＭｏｇＶおよびステビオシドがＧＬＰ－１分泌促進効果を有するかを検討した。具体的には、以下の手順により、ＧＬＰ－１分泌量を測定し、コントロールであるｎｏ　ｓａｍｐｌｅよりも分泌量の多かったものをＧＬＰ－１分泌促進効果ありと判定した。

[0085]（各被験物質の調整）

各被験物質（Ｂ，Ｃ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｉ，Ｊ）を、ＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（Ｃａｔ．Ｎｏ．１４１９０２５０）を用いて溶解し、ストック液を得た。ストック液の濃度を以下に示す。

Ｂ（ＲｅｂＡ）；５ｍＭ，Ｃ（ＲｅｂＢ）；１Ｍ，Ｄ（ＲｅｂＭ）；２．５ｍＭ，

Ｅ（ＲｅｂＮ）；１Ｍ，Ｆ（ＲｅｂＤ）；２．５ｍＭ，Ｇ（ＲｅｂＣ）；２．５ｍＭ，

Ｉ（ＭｏｇＶ）；１Ｍ，Ｊ（ステビオシド）；１Ｍ

[0086]（ＧＬＰ－１の定量）

Ｈ７１６（ＡＴＣＣ）（Ｃａｔ．Ｎｏ．ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＣＬ－２５１）をＲＰＭＩ１６４０（１０％ＦＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）（Ｃａｔ．Ｎｏ．１０４３９０２４），１ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で、３７℃、５％CO_2のインキュベーター中で培養した。

前培養を２週間行い、細胞を十分に起眠した後、細胞のストックを作製した。

細胞を９６ｗｅｌｌのプレートに１ｗｅｌｌ当たり２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬ（ｈｉｇｈ）で播種した（Ｎ＝４）。このとき培地に含まれるＦＢＳを０．５％に下げ、細胞の増殖を抑制した。

２４時間後、最高濃度のサンプル（即ち、ストック液）を１０μＬずつ加えた。

さらに２４時間後にＧＬＰ－１の定量を行った。具体的手順は、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社提供のＨｕｍａｎ ＧＬＰ－１（７－３６ ａｍｉｄｅ）Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｋｉｔ（Ｃａｔ．Ｎｏ．ＡＬ３５９）（Ｌｏｔ ｎｕｍｂｅｒ ２３６１１１５）ユーザーガイドに従った。なお、陰性コントロール（ｎｏ ｓａｍｐｌｅ）としてはＰＢＳを使用した。

[0087] 結果を図１に示した。図１によれば、ｎｏ　ｓａｍｐｌｅよりもＧＬＰ－１分泌量が有意に多かったのは、ＲｅｂＡ、ＲｅｂＢ、ＲｅｂＣ、ＭｏｇＶ、ステビオシドであった。

[0088] ＜実験例２＞

ＲｅｂＣ２０ｍｇに対し、２１μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、ボルテックスにより攪拌し、数時間静置してＲｅｂＣ濃度１，０００ｍＭのストック液を得た。得られたストック液とＰＢＳを用い、１０ｍＭ溶液を作製した。

１０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｇ－１ｍＭ～試料Ｇ－１０ｍＭを得た。表１には、ＲｅｂＣの濃度を記載した。

[0089] ＜実験例３＞

ステビオシド１５ｍｇに対し、１２．４μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、ボルテックスにより攪拌し、ステビオシド濃度１５０ｍＭのストック液を得た。得られたストック液とＰＢＳを用い、１５ｍＭ溶液を作製した。

１５ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｊ－０．１ｍＭ～試料Ｊ－１５ｍＭを得た。表１には、ステビオシドの濃度を記載した。

[0090] ＜実験例４＞

ＲｅｂＡ２０ｍｇに対し、８．２７μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、７４．５μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度２５０ｍＭのストック液を得た。得られたストック液とＰＢＳを用い、２５ｍＭ溶液を作製した。

２５ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｂ－１ｍＭ～試料Ｂ－２５ｍＭを得た。表１には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0091] ＜実験例５＞

グリセリン４９０ｇ、ＲｅｂＡ１００ｇ、及びポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇを混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴオイル３００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて、ＲｅｂＡ加工液を得た。

得られたＲｅｂＡ加工液２４１．８μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び７４８．２μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度２５ｍＭのストック液を得た。

ストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｂ加工－０．２５ｍＭ～試料Ｂ加工－２５ｍＭを得た。表１には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0092] ＜ＧＬＰ－１分泌量の測定＞

表１に示す条件の下、実験例２～５で得られた試料を培地に添加し、得られた培地にて細胞を培養し、２時間後のＧＬＰ－１分泌量を測定した。具体的な手順は次の通りである。

Ｈ７１６（ヒト結腸由来細胞）をＲＰＭＩ１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、型番：６１８７０－０３６）（１０％ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ製、型番：ＳＨ３０３９６．０３），１ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で、３７℃、５％CO_2のインキュベーター中で培養した。

前培養を２週間行い、細胞を十分に起眠した後、細胞のストックを作製した。

細胞を９６ｗｅｌｌプレートに１ｗｅｌｌ当たり２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬで播種した。このとき培地に含まれるＦＢＳを０．５％に下げ、細胞の増殖を抑制した。

２４時間後、各試料を１０μＬずつ加えた（試料Ｂはｎ＝３～４、試料Ｂ加工、試料Ｇ、試料Ｊはｎ＝４）。培地中の最終濃度は、表１の「サンプル

Ｆ．Ｃ．（ｍＭ）」の欄に示した。

添加から所定の時間（２時間）経過後、９６ｗｅｌｌプレートを回収した。

回収した９６ｗｅｌｌプレートを３００ｇ×５分遠心し、上清を回収した。

Ｈｕｍａｎ　ＧＬＰ－１（７－３６ａｍｉｄｅ）　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　ｋｉｔ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製、型番：ＡＬ３５９Ｃ）を用いて回収した上清中のＧＬＰ－１を定量し、結果を図２～５に示した。図２～５には、無刺激性コントロール（陰性対照）として１％ＤＭＳＯ含有溶液のＧＬＰ－１分泌量と、陽性コントロールとしてＰＭＡ（富士フイルム和光純薬社製、型番：１６２－２３５９１）の水系溶液のＧＬＰ－１分泌量も載せた。ＰＭＡの水系溶液は、ＰＭＡ１ｍｇに対し１６．２１μＬのＤＭＳＯを加えてストック液を調製し、該ストック液にＰＢＳを添加して１ｍＭ溶液を作製し、これを１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳで希釈することで得られた。

[0093] 以下に表１を示す。表１における陽性対照は、陽性コントロールとも呼ばれる。陰性対照は、陰性コントロールとも呼ばれる。

[表1]

	#	試料	添加濃度 (mM)	ppm換算	添加量 (μL)	培地 (μL)	Total (μL)	サンプル F.C. (mM)	ppm換算
無刺激陰性対照	1	1%DMSO含有PBS	—	—	10	90	100	—	—
陽性対照	2	PMA	0.01	6.2	10	90	100	0.001	0.6
	3	1%DMSO	1	616.8	10	90	100	0.1	61.7
被験物質	4	B 1%DMSO	1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	5		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	6		5	4835.1	10	90	100	0.5	483.5
	7		10	9670.1	10	90	100	1	967.0
	8		15	14505.2	10	90	100	1.5	1450.5
	9		20	19340.2	10	90	100	2	1934.0
	10		25	24175.3	10	90	100	2.5	2417.5
	11	B加工 1%DMSO	0.25	241.8	10	90	100	0.025	24.2
	12		0.5	483.5	10	90	100	0.05	48.4
	13		1	967.0	10	90	100	0.1	96.7
	14		2.5	2417.5	10	90	100	0.25	241.8
	15		5	4835.0	10	90	100	0.5	483.5
	16		10	9670.0	10	90	100	1	967.0
	17		15	14505.0	10	90	100	1.5	1450.5
	18		20	19340.0	10	90	100	2	1934.0
	19		25	24175.0	10	90	100	2.5	2417.5
	20	G 1%DMSO	1	951.01	10	90	100	0.1	95.1
	21		2.5	2377.5	10	90	100	0.25	237.8
	22		5	4755.1	10	90	100	0.5	475.5
	23		10	9510.1	10	90	100	1	951.0
	25	J 1%DMSO	0.1	80.5	10	90	100	0.01	8.0
	26		1	804.9	10	90	100	0.1	80.5
	27		2.5	2012.2	10	90	100	0.25	201.2
	28		5	4024.4	10	90	100	0.5	402.4
	29		10	8048.7	10	90	100	1	804.9
	30		15	12073.1	10	90	100	1.5	1207.3

- 試料B加工に関して、最終濃度0.025 mM (#11) 及び0.05 mM (#12) を試験予定濃度 (0.1～2.5 mM) に追加した。
- 試料Gに関して、最終濃度1.5 mM (#24) となるように溶解することが不可だったため、最終濃度1 mM以下で評価した。

[0094] ＜実験例６：表面張力の測定＞

ＧＬＰ－１分泌促進効果と乳化剤の表面張力との間に相関関係があるか否かを調べるべく、次の手順で実験を行った。

ＲｅｂＡ、ＲｅｂＤ、及びＲｅｂＭ（市販品）それぞれを配合した水溶液を調製した。ＲｅｂＡ、ＲｅｂＤ、及びＲｅｂＭの配合量は、ショ糖換算でＢｒｉｘ１０に揃えた。即ち、ＲｅｂＡ　３３３ｐｐｍ、ＲｅｂＤ　３５１ｐｐｍ、ＲｅｂＭ　３５１ｐｐｍとした。得られた水溶液の表面張力を、自動表面張力計（ＣＢＶＰ－Ｚ型、協和界面科学株式会社製）を用いたプレート法によって測定した。水を対照として、同様に試験した。結果を図６に示した。

[0095] ＜実験例７：香味特性の評価＞

ＲｅｂＡの乳化組成物の香味特性を、次の手順により評価した。

ＲｅｂＡを純水に溶解し、１００ｐｐｍ及び３００ｐｐｍの水溶液を作成し、コントロールとした。次に実験例５で作製したＲｅｂＡ加工液を純水に添加し、同様に１００ｐｐｍおよび３００ｐｐｍの水溶液を作製した。よく訓練された官能パネラー７人により、コントロールを３点として、０．５点刻みにてＲｅｂＡ加工液添加水溶液の香味評価を実施し、平均値として図に示した。なお、香味評価は、甘味強度、甘味後引き、苦味強度で評価を行った。

結果を図７に示した。

[0096] ＜実験例８＞

ＲｅｂＡ２０ｍｇに対し、８．２７μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、７４．４３μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度２５０ｍＭのストック液を得た。得られたストック液とＰＢＳを用い、５０ｍＭ溶液を作製した。

５０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｂ－１ｍＭ～試料Ｂ－２５ｍＭを得た。表２には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0097] ＜実験例９＞

グリセリン４９０ｇ、ＲｅｂＡ１００ｇ、及びポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇを混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴオイル３００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて、ＲｅｂＡ加工液を得た。

得られたＲｅｂＡ加工液２４１．８μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び７４８．２μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度２５ｍＭのストック液を得た。

ストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試

料Ｂ加工－１ｍＭ～試料Ｂ加工－２５ｍＭを得た。表２には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0098] ＜実験例１０＞

ＲｅｂＡ１００ｇを使用せず、グリセリン４９０ｇ、ポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇ、ＭＣＴオイル３００ｇおよび水２００ｇを使用した点以外は、実験例９のＲｅｂＡ加工液の調整と同様にして、Ｃ溶液を得た。

得られたＣ溶液４８３．５μＬに対し、ＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）１０μＬ及びＰＢＳ　５０６．５μＬを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ相当濃度５０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｃ－１ｍＭ～試料Ｃ－２５ｍＭを得た。表２には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｃ中のグリセリン、ポリグリセリン脂肪酸エステル及びＭＣＴオイルの濃度と、実験例９のある試料Ｂ加工中のグリセリン、ポリグリセリン脂肪酸エステル及びＭＣＴオイルの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0099] ＜実験例１１＞

実験例８と同様にして、試料Ｂ＋Ｃの２倍の濃度のＲｅｂＡを含む試料Ｂを得た。即ち、試料Ｂ－２ｍＭ、試料Ｂ－５ｍＭ、試料Ｂ－１０ｍＭ、試料Ｂ－２０ｍＭ、試料Ｂ－３０ｍＭ、試料Ｂ－４０ｍＭ、試料Ｂ－５０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡの濃度を示す。

実験例１０と同様にして、試料Ｂ＋Ｃの２倍の濃度のポリグリセリン脂肪酸エステルなどを含む試料Ｃを得た。即ち、試料Ｃ－２ｍＭ、試料Ｃ－５ｍＭ、試料Ｃ－１０ｍＭ、試料Ｃ－２０ｍＭ、試料Ｃ－３０ｍＭ、試料Ｃ－４０ｍＭ、試料Ｃ－５０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡ相当濃度を示す。

同じ濃度の試料Ｂと試料Ｃ（例えば試料Ｂ－２ｍＭと試料Ｃ－２ｍＭ）を等量ずつ混和し、試料Ｂ＋Ｃ－１ｍＭ～試料Ｂ＋Ｃ－２５ｍＭを得た。表２

には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0100] ＜実験例１２＞

グリセリン１１８．５μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び８７１．５μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ相当濃度２５ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｄ－１ｍＭ～試料Ｄ－２５ｍＭを得た。表２には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｄ中のグリセリン濃度と、実験例９のある試料Ｂ加工中のグリセリン濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0101] ＜実験例１３＞

ＭＣＴオイル７２．５μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び９１７．５μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ相当濃度２５ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｅ－１ｍＭ～試料Ｅ－２５ｍＭを得た。表２には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｅ中のＭＣＴオイルの濃度と、実験例９のある試料Ｂ加工中のＭＣＴオイルの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0102] ＜ＧＬＰ－１分泌量の測定＞

表２に示す条件の下、上記実験例８～１３で得られた試料を培地に添加し、得られた培地にて細胞を培養し、２時間後のＧＬＰ－１分泌量を測定した。具体的な手順は次の通りである。

Ｈ７１６（ヒト結腸由来細胞）をＲＰＭＩ１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、型番：６１８７０－０３６）（１０％ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ製、型番：ＳＨ３０３９６．０３），１ｍＭ Ｓ

ｏｄｉｕｍ　Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で、３７℃、５％CO_2のインキュベーター中で培養した。

前培養を２週間行い、細胞を十分に起眠した後、細胞のストックを作製した。

細胞を９６ｗｅｌｌプレートに１ｗｅｌｌ当たり２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬで播種した。このとき培地に含まれるＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ社製、型番：ＳＨ３０３９６．０３）を０．５％に下げ、細胞の増殖を抑制した。

２４時間後、各試料を１０μＬずつ加えた（ｎ＝３～４）。培地中の最終濃度は、表２の「サンプルＦ．Ｃ．」の欄に示した。

添加から所定の時間（２時間）経過後、９６ｗｅｌｌプレートを回収した。

回収した９６ｗｅｌｌプレートを３００ｇ×５分遠心し、上清を回収した。

ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製Ｈｕｍａｎ　ＧＬＰ－１（７－３６ａｍｉｄｅ）　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　ｋｉｔを用いて、回収した上清中のＧＬＰ－１を定量した。このとき、検量線のスタンダードの範囲は３０～１００，０００ｐｇ／ｍＬであり、１００，０００ｐｇ／ｍＬより大きい値でエラーとなるものがあったため、１００，０００ｐｇ／ｍＬ以上と考えられる値を１００，０００ｐｇ／ｍＬとして算出した。

スミルノフ・グラブス検定により外れ値（ｐ＜０．０１）を除外した。

結果を図８に示した。図８には、無刺激性コントロールとして１％ＤＭＳＯ含有溶液のＧＬＰ－１分泌量と、陽性コントロールとしてＰＭＡ（富士フイルム和光純薬社製、型番：１６２－２３５９１）の水系溶液のＧＬＰ－１分泌量も載せた。ＰＭＡの水系溶液は、ＰＭＡ１ｍｇに対し１６．２１μＬのＤＭＳＯを加えてストック液を調製し、該ストック液にＰＢＳを添加して１ｍＭ溶液を作製し、これを１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳで希釈することで得られた。

[0103] 次に、確認のために、別のプレートでもＧＬＰ－１分泌量の測定を行った

。具体的には、図８と同じ培養上清を用い、試料Ｂ～Ｄを１枚のアッセイプレートで、試料Ｅをもう１枚のアッセイプレートでＧＬＰ－１量の測定を行った。２時間後の培養上清を同一アッセイプレートで測定した結果を図９～１４に示す。用いた各試料の濃度は、図９～１４中に記載する。なお、図１１、１３、１４記載のＣ、Ｄ、Ｅの濃度は、ＲｅｂＡ相当濃度である。

検量線の範囲は３０～１００，０００ｐｇ／ｍＬであったが、今回は１００，０００ｐｇ／ｍＬより大きい値でエラーとなる数値がなかったため、１００，０００ｐｇ／ｍＬより大きい値については理論値として算出した。

[0104] 以下に表２を示す。表２における陽性対照は、陽性コントロールとも呼ばれる。陰性対照は、陰性コントロールとも呼ばれる。

[表2]

	#		添加濃度		ppm換算	添加量(ul)	PBS	溶媒(ul)	Total(ul)	サンプルFC		ppm換算
無刺激陰性対照	1	1%DMSO含有溶液	-		-	10	0	90	100	-		-
陽性対照	2	PMA	0.01	mM	-	10	0	90	100	0.001	mM	-
	3	1%DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.1	mM	-
被験物質	4	B 1%DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	5		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	6		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	7		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	8		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	9		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	10		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	11	B加工 1%DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	12		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	13		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	14		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	15		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	16		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	17		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	18	C 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	19		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	20		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	21		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	22		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	23		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	24		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	25	B+C 1% DMSO	1	mM	10.0	10	0	90	100	0.10	mM	1.0
	26		2.5	mM	25.0	10	0	90	100	0.25	mM	2.5
	27		5	mM	50.0	10	0	90	100	0.50	mM	5.0
	28		10	mM	100.0	10	0	90	100	1.00	mM	10.0
	29		15	mM	150.0	10	0	90	100	1.50	mM	15.0
	30		20	mM	200.0	10	0	90	100	2.00	mM	20.0
	31		25	mM	250.0	10	0	90	100	2.50	mM	25.0
	32	D 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	33		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	34		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	35		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	36		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	37		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	38		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-
	39	E 1% DMSO	1	mM	-	10	0	90	100	0.10	mM	-
	40		2.5	mM	-	10	0	90	100	0.25	mM	-
	41		5	mM	-	10	0	90	100	0.50	mM	-
	42		10	mM	-	10	0	90	100	1.00	mM	-
	43		15	mM	-	10	0	90	100	1.50	mM	-
	44		20	mM	-	10	0	90	100	2.00	mM	-
	45		25	mM	-	10	0	90	100	2.50	mM	-

[0105] ＜実験例１５＞

ＲｅｂＡ３６．３ｍｇに対し、９．４μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、９２９．０μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度４０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液とＰＢＳを、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｂ－０．３１ｍＭ～試料Ｂ－２０ｍＭを得た。表３には、ＲｅｂＡの

濃度を記載した。

[0106] ＜実験例１６＞

グリセリン４９０ｇ、ＲｅｂＡ１００ｇ、及びポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇを混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴオイル３００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。撹拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて、ＲｅｂＡ加工液を得た。

得られたＲｅｂＡ加工液１９３．４μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び７９６．６μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより撹拌し、ＲｅｂＡ濃度２０ｍＭのストック液を得た。

ストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｂ加工－０．３１ｍＭ～試料Ｂ加工－２０ｍＭを得た。表３には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0107] ＜実験例１７＞

ＲｅｂＡ１００ｇを使用せず、グリセリン４９０ｇ、ポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇ、ＭＣＴオイル３００ｇおよび水２００ｇを使用した点以外は、実験例１６のＲｅｂＡ加工液の調整と同様にして、Ｃ溶液を得た。

Ｃ溶液３８６．８μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び６０３．２μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより撹拌し、ＲｅｂＡ相当濃度４０ｍＭのストック液を得た。

ストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｃ－０．３１ｍＭ～試料Ｃ－２０ｍＭを得た。表３には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｃ中のポリグリセリン脂肪酸エステルの濃度と、実験例１６のある試料Ｂ加工中のポリグリセリン脂肪酸エステルの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0108] ＜実験例１８＞

実験例１５と同様にして、試料Ｂ＋Ｃの２倍の濃度のＲｅｂＡを含む試料Ｂを得た。即ち、試料Ｂ－０．６２ｍＭ、試料Ｂ－２．５ｍＭ、試料Ｂ－１０ｍＭ、試料Ｂ－４０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡの濃度を示す。

実験例１７と同様にして、試料Ｂ＋Ｃの２倍の濃度のポリグリセリン脂肪酸エステルを含む試料Ｃを得た。即ち、試料Ｃ－０．６２ｍＭ、試料Ｃ－２．５ｍＭ、試料Ｃ－１０ｍＭ、試料Ｃ－４０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡ相当濃度を示す。

同じ濃度の試料Ｂと試料Ｃ（例えば試料Ｂ－０．６２ｍＭと試料Ｃ－０．６２ｍＭ）を等量ずつ混和し、試料Ｂ＋Ｃ－０．３１ｍＭ～試料Ｂ＋Ｃ－２０ｍＭを得た。表３には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0109] ＜実験例１９＞

グリセリン９４．８μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び８９５．２μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ相当濃度２０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｄ－０．３１ｍＭ～試料Ｄ－２０ｍＭを得た。表３には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｄ中のグリセリンの濃度と、実験例１６のある試料Ｂ加工中のグリセリンの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0110] ＜実験例２０＞

ＭＣＴオイル５８．０μＬに対し、１０μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び９３２．０μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ相当濃度２０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｅ－０．３１ｍＭ～試料Ｅ－２０ｍＭを得た。表３には、Ｒｅｂ

Ａ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｅ中のＭＣＴオイルの濃度と、実験例１６のある試料Ｂ加工中のＭＣＴオイルの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ加工中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0111] ＜細胞毒性＞

表３に示す条件の下、上記実験例１５～２０で得られた試料を培地に添加し、得られた培地にて細胞を培養し、２時間後と２４時間後の細胞毒性を測定した。具体的な手順は次の通りである。

Ｈ７１６細胞をＲＰＭＩ１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、型番：６１８７０－０３６）（１０％ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製、型番：ＳＨ１０２７７０），１ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で３７℃、５％CO_2下でインキュベーター内にて培養した。Ｈ７１６細胞は９６ｗｅｌｌプレートに２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬ／ｗｅｌｌ（死細胞評価用）及び４８ｗｅｌｌプレートに４×10^5ｃｅｌｌｓ／１８０μＬ／ｗｅｌｌ（形態観察用）で播種した。プレートに播種した際の培地中ＦＢＳは０．５％とした。細胞播種２４時間後、各濃度の試料を１０μＬ／ｗｅｌｌ（９６ｗｅｌｌプレート）または２０μＬ／ｗｅｌｌ（４８ｗｅｌｌプレート）加えた。培地中の最終濃度は、表３の「サンプルＦ．Ｃ．」の欄に示した。試料添加２時間後では各試料の最も高い濃度（表３記載の＃１、＃６、＃１０、＃１４、＃１８、＃２２、＃２６、＃３０）について評価した。

[0112] （死細胞を指標とした評価）

試料添加２時間後及び２４時間後、細胞を１００×ｇで５分間遠心し上清を除去した。Ｐｒｏｐｉｄｉｕｍ ｉｏｄｉｄｅ溶液（０．６６μｇ／ｍＬ，ＰＢＳにて１：１５００希釈）を５０μＬ／ｗｅｌｌずつ添加し、室温で１５分間静置して死細胞の染色を行った。ピペッティングにより細胞を懸濁した後、顕微鏡下で位相差画像及び蛍光画像を撮影した。ＩｍａｇｅＪにて位相差画像を基に細胞総数を、蛍光画像を基に死細胞数を計測した。計測した細胞数を用いて死細胞率を算出した。

死細胞率（％）＝死細胞数／細胞総数×１００

各試料添加時の死細胞率は、細胞播種２４時間後の未添加時における死細胞率を０％、７０％エタノールを添加し氷上で３０分以上静置した際の死細胞率を１００％として補正した。結果を図１５に示す。図１５ａは、２時間後の結果を示し、図１５ｂは２４時間後の結果を示す。

[0113] ２時間後の結果を示す図１５ａから、全ての試料において細胞死は誘導されていなかったことがわかる。

[0114] また、２４時間後の結果を示す図１５ｂから理解されるとおり、試料Ｂ＋Ｃ（ＲｅｂＡ濃度２ｍＭ）を添加したときの死細胞率が最も高かったが、ＰＭＡの最も低濃度と同等の死細胞率であった。試料Ｂ＋Ｃ以外については、陰性対照(-)（陰性コントロールとも呼ぶ。）と同等か陰性対照よりも低い死細胞率であった。よって、試料Ｂ＋Ｃで細胞死が誘導された可能性は低く、他の試料において細胞死は誘導されていなかった。

[0115]（細胞形態を指標とした評価）

試料添加２時間後及び２４時間後、細胞を顕微鏡下で撮影し、形態変化の有無を確認した。試料Ｂ加工、Ｃ及びＢ＋Ｃは白濁しているため０．５ｍＭ及び２ｍＭ添加時の顕微鏡下での判定が難しいが、その他の試料についてはＨ７１６細胞に添加しても、細胞の収縮や破裂などの形態変化は見られなかった。

[0116] 以下に表３を示す。表３における陽性対照は、陽性コントロールとも呼ばれる。陰性対照は、陰性コントロールとも呼ばれる。

[表3]

	#	被験物質	添加濃度		ppm換算	サンプルF.C		ppm換算
無刺激陰性対照	1	1%DMSO含有溶液	-		-	-		-
陽性対照	2	PMA (1%DMSO)	0.004	mM	-	0.0004	mM	-
	3		0.016	mM	-	0.0016	mM	-
	4		0.063	mM	-	0.0063	mM	-
	5		0.25	mM	-	0.025	mM	-
	6		1	mM	-	0.1	mM	-
被験物質	7	B 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	8		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	9		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	10		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	11	B加工 1%DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	12		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	13		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	14		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	15	C 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	16		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	17		5	mM	-	0.50	mM	-
	18		20	mM	-	2.00	mM	-
	19	B+C 1% DMSO	0.31	mM	3.1	0.03	mM	0.3
	20		1.25	mM	12.5	0.13	mM	1.3
	21		5	mM	50.0	0.50	mM	5.0
	22		20	mM	200.0	2.00	mM	20.0
	23	D 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	24		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	25		5	mM	-	0.50	mM	-
	26		20	mM	-	2.00	mM	-
	27	E 1% DMSO	0.31	mM	-	0.03	mM	-
	28		1.25	mM	-	0.13	mM	-
	29		5	mM	-	0.50	mM	-
	30		20	mM	-	2.00	mM	-

[0117] ＜実験例２１＞

ＲｅｂＡ１３４．３ｍｇに対し、３４．７μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、３４３８μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより攪拌し、ＲｅｂＡ濃度４０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｂ

－１ｍＭ～試料Ｂ－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0118] ＜実験例２２＞

ＲｅｂＡ１００ｇを水１００ｇに代替した点、並びに、乳化剤としてポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇに代えてショ糖脂肪酸エステル１０ｇを使用した点以外は、実験例１６のＲｅｂＡ加工液の調整と同様にしてＣ－１溶液を得た。具体的には、グリセリン４９０ｇ、ショ糖脂肪酸エステル１０ｇ（三菱ケミカルフーズ製　ＨＬＢ＝１６）を混合し７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴオイル３００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。撹拌終了後４０℃まで冷却し、水２００ｇを加えて、Ｃ－１溶液を得た。

得られたＣ－１溶液５８０．２μＬに対し、１５μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）及び９０４．８μＬのＰＢＳを加えてボルテックスにより撹拌し、ＲｅｂＡ相当濃度４０ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液を１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて希釈し、試料Ｃ－１－１ｍＭ～試料Ｃ－１－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｃ－１中のグリセリンおよび乳化剤の濃度と、実験例２５のある試料Ｂ＋Ｃ－１中のグリセリンおよび乳化剤の濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－１中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0119] ＜実験例２３＞

ショ糖脂肪酸エステル（三菱ケミカルフーズ製　ＨＬＢ＝１６）１０ｇに代えて酵素分解レシチン（太陽化学製　ＨＬＢ＝１２．０）１０ｇを用いた点以外は実験例２２と同様にして、試料Ｃ－２－１ｍＭ～試料Ｃ－２－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｃ－２中のグリセリンおよび乳化剤の濃度と、実験例２６のあ

る試料Ｂ＋Ｃ－２中のグリセリンおよび乳化剤の濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－２中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0120] ＜実験例２４＞

ショ糖脂肪酸エステル（三菱ケミカルフーズ製　ＨＬＢ＝１６）１０ｇに代えて有機酸モノグリセリド（太陽化学製　ＨＬＢ＝９．０）１０ｇを用いた点以外は実験例２２と同様にして、試料Ｃ－３－１ｍＭ～試料Ｃ－３－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｃ－３中のグリセリンおよび乳化剤の濃度と、実験例２７のある試料Ｂ＋Ｃ－３中のグリセリンおよび乳化剤の濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－３中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0121] ＜実験例２５＞

実験例２１と同様にして、試料Ｂ＋Ｃ－１の２倍の濃度のＲｅｂＡを含む試料Ｂを得た。即ち、試料Ｂ－２ｍＭ、試料Ｂ－５ｍＭ、試料Ｂ－１０ｍＭ、試料Ｂ－２０ｍＭ、試料Ｂ－３０ｍＭ、試料Ｂ－４０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡの濃度を示す。

実験例２２と同様にして、試料Ｂ＋Ｃ－１の２倍の濃度のショ糖脂肪酸エステルを含むＣ－１試料を得た。即ち、試料Ｃ－１－２ｍＭ、試料Ｃ－１－５ｍＭ、試料Ｃ－１－１０ｍＭ、試料Ｃ－１－２０ｍＭ、試料Ｃ－１－３０ｍＭ、試料Ｃ－１－４０ｍＭを得た。ハイフンの後ろの濃度は、ＲｅｂＡ相当濃度を示す。

同じ濃度の試料Ｂと試料Ｃ（例えば試料Ｂ－１－２ｍＭと試料Ｃ－１－２ｍＭ）を等量ずつ混和し、試料Ｂ＋Ｃ－１－１ｍＭ～試料Ｂ＋Ｃ－１－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0122] ＜実験例２６＞

ショ糖脂肪酸エステル（三菱ケミカルフーズ製　ＨＬＢ＝１６）１０ｇに代えて酵素分解レシチン（太陽化学製　ＨＬＢ＝１２．０）１０ｇを用いた点以外は実験例２５と同様にして、試料Ｂ＋Ｃ－２－１ｍＭ～試料Ｂ＋Ｃ－２－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0123] ＜実験例２７＞

ショ糖脂肪酸エステル（三菱ケミカルフーズ製　ＨＬＢ＝１６）１０ｇに代えて有機酸モノグリセリド（太陽化学製　ＨＬＢ＝９．０）１０ｇを用いた点以外は実験例２５と同様にして、試料Ｂ＋Ｃ－３－１ｍＭ～試料Ｂ＋Ｃ－３－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡの濃度を記載した。

[0124] ＜実験例２８＞

ショ糖脂肪酸エステル１３．１ｍｇに対し３３９μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えてボルテックスし、さらにＤＭＳＯで２０倍希釈して、ＲｅｂＡ相当濃度２，０００ｍＭのストック液を得た。得られたストック液にＰＢＳを配合し、２０ｍＭ溶液を得た。

得られた２０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｇ－１－１ｍＭ～試料Ｇ－１－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｇ－１中のショ糖脂肪酸エステルの濃度と、実験例２５のある試料Ｂ＋Ｃ－１中のショ糖脂肪酸エステルの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－１中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0125] ＜実験例２９＞

酵素分解レシチン２０．９ｍｇに対して５４０μＬのＰＢＳを加えてボルテックスし、さらにＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）で２０倍希釈して、ＲｅｂＡ相当濃度２，０００ｍＭのストック液を得た。ストック液にＰＢＳとＤＭＳＯを配合し、２０ｍＭ溶液（１％ＤＭＳＯ）を作製した。

得られた２０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｇ－２－１ｍＭ～試料Ｇ－２－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｇ－２中の酵素分解レシチンの濃度と、実験例２６のある試料Ｂ＋Ｃ－２中の酵素分解レシチンの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－２中のＲｅｂＡの濃度を意味

する。

[0126] ＜実験例３０＞

有機酸モノグリセリドを６０℃で溶解し、３５．０ｍｇに対し９０５μＬのＤＭＳＯを加えてボルテックスし、さらにＤＭＳＯで２０倍希釈し、ＲｅｂＡ相当濃度２，０００ｍＭのストック液を得た。ストック液にＰＢＳを配合して２０ｍＭ溶液を得た。

得られた２０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｇ－３－１ｍＭ～試料Ｇ－３－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｇ－３中の有機酸モノグリセリドの濃度と、実験例２７のある試料Ｂ＋Ｃ－３中の有機酸モノグリセリドの濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ－３中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0127] ＜実験例３１＞

ポリグリセリン脂肪酸エステルを６０℃で溶解し、５０μＬに対し２５９μＬのＤＭＳＯ（富士フイルム和光純薬社製、型番：０３７－２４０５３）を加えた後、９８４μＬのＰＢＳを加えてボルテックスし、ＲｅｂＡ相当濃度４００ｍＭのストック液を得た。

得られたストック液とＰＢＳを用いて、２０ｍＭ溶液を調製した。得られた２０ｍＭ溶液を、１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳを用いて必要に応じて希釈し、試料Ｇ－４－１ｍＭ～試料Ｇ－４－２０ｍＭを得た。表４には、ＲｅｂＡ相当濃度を記載した。ＲｅｂＡ相当濃度とは、ある試料Ｇ－４中のポリグリセリン脂肪酸エステルの濃度と、実験例２５～２７のある試料Ｂ＋Ｃ中の乳化剤の濃度が同じ場合の、当該試料Ｂ＋Ｃ中のＲｅｂＡの濃度を意味する。

[0128] ＜ＧＬＰ－１分泌量＞

上記実験例２１～３１で得られた試料を細胞に与えて２時間後と２４時間後のＧＬＰ－１分泌量を測定した。具体的な手順は次の通りである。

Ｈ７１６細胞をＲＰＭＩ１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、型番：６１８７０－０３６）（１０％ＦＢＳ（Ｇｉｂ

ｃｏ製、型番：ＳＨ１０２７７０），１ｍＭ　Ｓｏｄｉｕｍ　Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で３７℃、５％CO_2下でインキュベーター内にて培養した。Ｈ７１６細胞は９６ｗｅｌｌプレートに２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬ／ｗｅｌｌ播種した。プレートに播種した際の培地中ＦＢＳは０．５％とした。

細胞播種２４時間後、表４に示すとおり、実験例２１～３１で得られた試料を培地に１０μＬ／ｗｅｌｌ加えた。培地中の最終濃度は、表４の「サンプルＦ．Ｃ．」の欄に示した。

試料の添加から２時間後及び２４時間後、９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅを３００×ｇで５分間遠心し、培養上清を回収した。

Ｈｕｍａｎ　ＧＬＰ－１（７－３６ａｍｉｄｅ）Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　ｋｉｔ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ社製、型番：ＡＬ３５９Ｃ）を用いて回収した培養上清中のＧＬＰ－１を定量した。定量値について、検量線の範囲を超えてエラーとなった値は除外した。また、統計解析ソフトＲを用いてＢｏｘ　ｐｌｏｔを作成し、第一四分位より小さいまたは第三四分位より大きい値が１．５四分位範囲以上の場合を外れ値として除外した。

結果を図１６に示した。図１６には、無刺激性コントロールとして１％ＤＭＳＯ含有溶液のＧＬＰ－１分泌量と、陽性コントロールとしてＰＭＡ（富士フイルム和光純薬社製、１６２－２３５９１）の水系溶液のＧＬＰ－１分泌量も載せた。ＰＭＡの水系溶液は、ＰＭＡ１ｍｇに対し１６．２１μＬのＤＭＳＯを加えてストック液を調製し、該ストック液にＰＢＳを添加して１ｍＭ溶液を作製し、これを１％ＤＭＳＯ含有ＰＢＳで希釈することで得られた。

[0129] 以下に表４を示す。表４における陽性対照は、陽性コントロールとも呼ばれる。陰性対照は、陰性コントロールとも呼ばれる。

[表4]

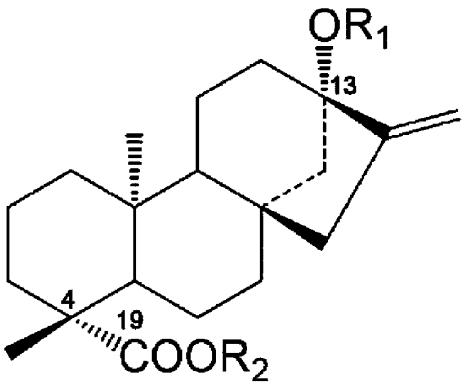
	#	添加濃度			ppm換算	添加量(ul)	培地(ul)	Total(ul)	サンプルF.C	
無刺激陰性対照	1	1%DMSO含有PBS	-		-	10	90	100	-	
陽性対照	2	PMA	0.01	mM	-	10	90	100	0.001	mM
	3	(1%DMSO)	1	mM	-	10	90	100	0.1	mM
被験物質	4		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	5		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	6	B	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	7	(1%DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	8		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	9		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	10		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	11		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	12	C-1	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	13	(1%DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	14		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	15		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	16		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	17		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	18	C-2	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	19	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	20		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	21		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	22		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	23		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	24	C-3	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	25	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	26		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	27		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	28		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	29		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	30	B + C-1	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	31	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	32		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	33		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	34		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	35		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	36	B + C-2	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	37	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	38		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	39		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	40		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	41		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	42	B + C-3	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	43	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	44		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	45		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	46		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	47		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	48	G-1	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	49	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	50		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	51		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	52		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	53		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	54	G-2	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	55	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	56		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	57		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	58		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	59		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	60	G-3	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	61	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	62		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	63		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM
	64		1	mM	967.0	10	90	100	0.10	mM
	65		2.5	mM	2417.5	10	90	100	0.25	mM
	66	G-4	5	mM	4835.1	10	90	100	0.50	mM
	67	(1% DMSO)	10	mM	9670.1	10	90	100	1.00	mM
	68		15	mM	14505.2	10	90	100	1.50	mM
	69		20	mM	19340.2	10	90	100	2.00	mM

※#10 ～ 69 についてはB加工濃度として記載

[0130] ＜実験例３２＞

ステビオシド、ＲｅｂＡ、ＲｅｂＤ、ＲｅｂＭの分配比率を測定した。参考のために、ステビオシド、ＲｅｂＡ、ＲｅｂＤ、ＲｅｂＭの構造式を以下に示す。

[化2]



化合物名	R_1	R_2
レバウジオシドA (rebA)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1-
ステビオシド (stv)	Glcβ1, 2Glcβ1-	Glcβ1-
レバウジオシドD (rebD)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2Glcβ1-
レバウジオシドM (rebM)	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-	Glcβ1, 2(Glcβ1, 3)Glcβ1-

具体的には、以下の操作を行った。

純水とトルエンを約１００ｍＬずつ分液ロートに入れた後、各ステビオール配糖体を３０ｍｇ添加した。液が漏れないように密閉し、振とう機により約３０分振とう攪拌後分液ロートを静置した。分配比率は、液層が２層に分離した場合、それぞれの層からサンプリングを実施し、ＬＣＭＳにて測定を行った。

測定結果と試験中の写真を図１７に示す。試験後のＲｅｂＡ含有液の写真を図１８に示す。

[0131] ＜実験例３３＞

１．サンプル調製

以下の手順でサンプルＳＡ－７０Ａ、ＳＡ－７０Ｂ、ＳＡ－２００Ａ、ＳＡ－２００Ｂ、ＳＡ－２０６Ａ、ＳＡ－２０６Ｂ、ＳＡ－２０７Ａ、ＳＡ－２０７Ｂを用意した。なお、末尾がＡであるサンプルは、水系にＲｅｂＡを

溶解させた調製したサンプルである。末尾がＢであるサンプルは、油系にＲｅｂＡを分散させて調製したサンプルである。

[0132] （ＳＡ－７０Ａ）

グリセリン４８７ｇ、ＲｅｂＡ１０３ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液を得た。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴ３００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加え乳化組成物ＳＡ－７０Ａを得た。

[0133] （ＳＡ－７０Ｂ）

グリセリン４８７ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル１０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液を得た。また、ＭＣＴ３００ｇおよびＲｅｂＡ１０３ｇを室温で混合し油系混合溶液を得た。水系混合溶液に油系混合溶液を添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加え乳化組成物ＳＡ－７０Ｂを得た。

[0134] （ＳＡ－２００Ａ）

グリセリン５６７ｇ、ＲｅｂＡ１０３ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル３０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴ２００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加え乳化組成物ＳＡ－２００Ａを得た。

[0135] （ＳＡ－２００Ｂ）

グリセリン５６７ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル３０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。また、ＭＣＴ２００ｇおよびＲｅｂＡ１０３ｇを室温で混合し油系混合溶液を得た。水系混合溶液に油系混合溶液を添加し、ホモミキサ

ー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加え乳化組成物ＳＡ－２００Ｂを得た。

[0136] （ＳＡ－２０６Ａ）

グリセリン５３７ｇ、ＲｅｂＡ１０３ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル６０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴ２００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて予備乳化組成物を得た後、更に湿式微粒化装置にて圧力１５０ＭＰａで微細乳化を加えて乳化組成物ＳＡ－２０６Ａを得た。

[0137] （ＳＡ－２０６Ｂ）

グリセリン５７８ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル５５ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。また、ＭＣＴ１８２ｇおよびＲｅｂＡ９４ｇを室温で混合し油系混合溶液を得た。水系混合溶液に油系混合溶液を添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水９１ｇを加えて予備乳化組成物を得た後、更に湿式微粒化装置にて圧力１５０ＭＰａで微細乳化を加えて乳化組成物ＳＡ－２０６Ｂを得た。

[0138] （ＳＡ－２０７Ａ）

グリセリン７０６ｇ、ＲｅｂＡ３４ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル６０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。この水系混合溶液に油脂としてＭＣＴ１００ｇを添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて予備乳化組成物を得た後、更に湿式微粒化装置にて圧力１５０ＭＰａで微細乳化を加えて乳化組成物ＳＡ－２０７Ａを得た。

[0139] （ＳＡ－２０７Ｂ）

グリセリン７０６ｇおよびポリグリセリン脂肪酸エステル６０ｇ（太陽化学株式会社製、ＨＬＢ＝１６．７）を混合し、７０℃で昇温溶解して水系混合溶液とした。また、ＭＣＴ１００ｇおよびＲｅｂＡ３４ｇを室温で混合し油系混合溶液を得た。水系混合溶液に油系混合溶液を添加し、ホモミキサー（特殊機化工業（株）製）にて回転数８０００ｒｐｍで乳化した。攪拌終了後４０℃まで冷却し、水１００ｇを加えて予備乳化組成物を得た後、更に湿式微粒化装置にて圧力１５０ＭＰａで微細乳化を加えて乳化組成物ＳＡ－２０７Ｂを得た。

[0140] ２．乳化安定性の評価

上述の１．で調整されたサンプルを用いて、安定性の評価を行った。具体的な手順は次のとおりである。

[0141] ２．１調整直後の乳化粒子径の測定

調製直後の各サンプル中の乳化粒子の平均粒子径を測定した。具体的には、調製直後の各サンプルを、レーザー散乱強度が１％程度になるようにイオン交換水で適宜希釈し、その後、レーザー回折散乱式粒度分布測定器（スペクトリス株式会社 マルバーン・パナリティカル事業部）で測定した。

[0142] ２．２冷蔵保管後の乳化粒子径の測定

各サンプルを、冷蔵庫（４℃）内で2カ月間静置した。その後、２．１と同様にして、乳化粒子径を測定した。

[0143] 結果を下記表に示す。

[表5]

(%)	SA-70		SA-200		SA-206		SA-207	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Reb A	10.3		10.3		10.3	9.4	3.4	
MCT	30.0		20.0		20.0	18.2	10.0	
乳化剤	1.0		3.0		6.0	5.5	6.0	
グリセリン	48.7		56.7		53.7	57.8	70.6	
水	10.0		10.0		10.0	9.1	10.0	
合計	100.0		100.0		100.0	100.0	100.0	
乳化粒子径(μm) 調製時	0.40	0.27	0.20	0.17	0.07	0.08	0.06	0.06
乳化粒子径(μm) 冷蔵2ヶ月保管時	0.36	0.29	0.20	0.18	0.11	0.10	0.09	0.10

[0144] ３．香味特性の評価

上述の１．で調整されたサンプルを用いて、香味特性を評価した。具体的には、以下の手順で評価をおこなった。

ＲｅｂＡを純水に溶解し、ＲｅｂＡ濃度が４６７ｐｐｍである水溶液を作成し、コントロールとした。次に、１．で調整された各サンプルに純水を添加し、ＲｅｂＡ濃度が４６７ｐｐｍの水溶液を作製した。よく訓練された官能パネラー７人により、コントロールを３点として、０．５点刻みにて各水溶液の香味評価を実施し、平均値を算出した後、順位付けを行った。香味評価は、甘味強度、甘味後引き、苦味強度で評価を行った。同じ点数のものは同じ順位とした。順位を下記表の各評価項目の欄に示した。下記表のtotalの欄には、順位の和を示した。

[表6]

	70A	200A	206A	207A
甘味強度	2	3	1	3
後引き	3	1	2	1
苦み	1	4	2	3
total	6	8	5	7

	70B	200B	206B	207B
甘味強度	4	2	3	1
後引き	3	2	1	2
苦み	4	2	1	3
total	11	6	5	6

[0145] ４．保管後の各種特性の評価

１．で調整されたサンプルを用いて、保管後の乳化安定性、香味特性、振動安定性を評価した。具体的には、以下の手順で評価をおこなった。

１６９９０．３ｍｇのサンプルＳＡ－７０Ａに、純水を３，４８３ｍｌ添加し、評価用液７０Ａを得た。サンプルＳＡ－７０Ａに替えてサンプルＳＡ－２０６Ａを用いた点以外は、同様にして、評価用液２０６Ａを得た。各評価用液の組成は以下のとおりである。

[表7]

	70A	206A
サンプル量 (mg)	16,990.3	16,990.3
サンプル中のRebA率 (%)	10.3	10.3
RebA換算 (mg)	1,750.0	1,750.0
純水添加量 (ml)	3,483.0	3,483.0
総量 (ml)	3,500	3,500
RebA濃度 (ppm)	500.0	500.0

得られた評価用液７０Ａと評価用液２０６Ａを、庫内温度５℃の冷蔵庫に４週間静置した。また、別の評価用液７０Ａと評価用液２０６Ａを５５℃の恒温保管庫で４週間静置した。

また、無水クエン酸を用いて、評価用液７０Ａと評価用液２０６ＡのｐＨを２．５に調整し、庫内温度５℃の冷蔵庫に４週間静置した。無水クエン酸を用いて、別の評価用液７０Ａと評価用液２０６ＡのｐＨを２．５に調製し、５５℃の恒温保管庫で４週間静置した。

[0146] ４－１．保管後の乳化安定性

４週間静置後の評価用液の液面の外観を観察した。結果を下記表に示した。

[表8]

		静置温度	
		5℃	55℃
pH調製なし	70A	オイル浮き無し	オイル浮き無し
	206A	オイル浮き無し	オイル浮き無し
pH2.5	70A	オイル浮き有り	オイル浮き有り
	206A	オイル浮き無し	オイル浮き無し

[0147] ４－２．保管温度の香味特性への影響

また、静置温度の香味への影響を確認した。具体的には以下の手順で確認した。

ｐＨ調製なし・静置温度５℃の評価用液７０Ａをコントロールとした。コントロールの評価を５点と定めた場合の、ｐＨ調製なし・静置温度５５℃の評価用液７０Ａの香味を、０．５点刻みで評価した。パネラーは、よく訓練された官能パネラー４人であった。各パネラーの評価の平均値を算出した。

同様にして、ｐＨ調製なし・静置温度５℃の評価用液２０６Ａをコントロールとし、ｐＨ調製なし・静置温度５５℃の評価用液２０６Ａの香味を、０

．５点刻みで評価した。

同様にして、ｐＨ２．５・静置温度５℃の評価用液７０Ａをコントロールとし、ｐＨ２．５・静置温度５５℃の評価用液７０Ａの香味を、０．５点刻みで評価した。

同様にして、ｐＨ２．５・静置温度５℃の評価用液２０６Ａをコントロールとし、ｐＨ２．５・静置温度５５℃の評価用液２０６Ａの香味を、０．５点刻みで評価した。

[0148] 結果を図１９に示す。また、パネラーのコメントを以下に記載する。

７０Ａ、ｐＨ調製なし；

苦みの角が取れてまろやか、ミルキー、ややクリア。まろやかになって苦みが減った。ミルキーさが増した。飲みやすくなっている。少しフレッシュな感が少ないが、クリティカルな劣化はない。

２０６Ａ、ｐＨ調製なし；

苦みの角が取れてまろやか、ミルキー、ややクリア。まろやかになって苦みが減った。ミルキーさが増した。甘さ変わらず。変化なし。少しフレッシュな感が少ないが、クリティカルな劣化はない。

７０Ａ、ｐＨ２．５；

酸味が抑えられる。酸味が増した。とげがある。まろやかな酸味になった。良い。ややまろやかになり、酸味のとげが減る。

２０６Ａ、ｐＨ２．５；

酸味が抑えられる。酸味が増した。でも飲みやすくなった。変化なし。若干苦みが減っている。良い。ややまろやかになり、酸味のとげが減る。

[0149] ４－３．振動加速試験

５℃で４週間静置後の評価用液について、分光光度計（島津社製 UV1800 UV spectrophotometer）により波長６８０ｎｍにおける吸光度を測定した。

次に、評価用液を３０００ｒｐｍで３０分遠心した。遠心後の評価用液について、波長６８０ｎｍにおける吸光度を測定した。遠心前後の吸光度の差Δａｂｓを算出し、Δａｂｓが０．０２以下のものは、振動時の乳化安定性

に優れているとして、「良好」と評価した。

結果を図２０に示す。

[0150] ５．甘味強度の低下度合い

上述の１．で調整されたサンプルＳＡ－７０ＡおよびＳＡ－２０６Ａを用いて、乳化による甘味強度の低下度合いを評価した。具体的には、以下の手順で評価をおこなった。

ＲｅｂＡを純水に溶解して４６７ｐｐｍの水溶液を作成し、コントロールとした。次に、１．で調整された各サンプルを純水に添加し、ＲｅｂＡ濃度が４６７ｐｐｍの水溶液を作製した。よく訓練された官能パネラー４人に、各水溶液が、ショ糖水溶液のＢｒｉｘ２，５，８，１１，１４のどの甘味強度に近いかを選択させた。各パネラーの評価結果の平均値を算出した。結果を図２１に示す。

[0151] ＜実験例３４＞

実験例３３の「４．保管後の各種特性の評価」と同様にして、評価用液７０Ａおよび評価用液２０６Ａを得た。

得られた評価用液７０Ａと評価用液２０６ＡをDMSO含有PBSで希釈し、下記表の添加濃度の欄に示すＲｅｂＡ濃度の希釈液を調整した。

また、別の評価用液７０Ａと評価用液２０６Ａを５５℃の恒温保管庫で４週間静置した。静置後の評価用液７０Ａと評価用液２０６ＡをDMSO含有PBSで希釈し、下記表の添加濃度の欄に示すＲｅｂＡ濃度の希釈液を調整した。

なお、無刺激性コントロール（陰性対照）として１％ＤＭＳＯ含有溶液を調製した。また、陽性コントロールとしてＰＭＡ（富士フイルム和光純薬社製、型番：１６２－２３５９１）を、下記表の添加濃度の欄に示す濃度となるように１％ＤＭＳＯで希釈したものを調整した。

[表9]

各被験物質の添加量と最終濃度

#		添加濃度 (mM)	添加量 (ul)	培地 (ul)	Total(ul)	Final conc. (mM)
1	1%DMSO含有溶液	-	10	90	100	-
2	PMA (1%DMSO)	0.01	10	90	100	0.001
3		1	10	90	100	0.100
4	70A	0.25	10	90	100	0.025
5		0.5	10	90	100	0.050
6		1	10	90	100	0.100
7		2.5	10	90	100	0.250
8		5	10	90	100	0.500
9		10	10	90	100	1.000
10	70A4W	0.25	10	90	100	0.025
11		0.5	10	90	100	0.050
12		1	10	90	100	0.100
13		2.5	10	90	100	0.250
14		5	10	90	100	0.500
15		10	10	90	100	1.000
16	205A	0.25	10	90	100	0.025
17		0.5	10	90	100	0.050
18		1	10	90	100	0.100
19		2.5	10	90	100	0.250
20		5	10	90	100	0.500
21		10	10	90	100	1.000
22	205A4W	0.25	10	90	100	0.025
23		0.5	10	90	100	0.050
24		1	10	90	100	0.100
25		2.5	10	90	100	0.250
26		5	10	90	100	0.500
27		10	10	90	100	1.000

[0152] 上記表に示す条件の下、希釈液Ｎｏ．１～２７を培地に添加し、得られた培地にて細胞を培養した。具体的な手順は次の通りである。

Ｈ７１６細胞をＲＰＭＩ１６４０（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製、型番：６１８７０－０３６）（１０％ＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製、型番：ＳＨ１０２７７０），１ｍＭ Ｓｏｄｉｕｍ Ｐｙｒｕｖａｔｅ）で３７℃、５％CO_2下でインキュベーター内にて培養した。Ｈ７１６細胞は９６ｗｅｌｌプレートに２×10^5ｃｅｌｌｓ／９０μＬ／ｗｅｌｌで播種した。プレートに播種した際の培地中ＦＢＳは０．５％とした。細胞播種から２４時間経過後、希釈液Ｎｏ．１～２７を１０μＬ／ｗｅｌｌの量でウェルに加えた。希釈液添加後の培地中のＲｅｂＡ最終濃度（Ｎｏ．２，３の場合はＰＭＡ濃度）は、上記表の「Ｆｉｎａｌ ｃｏｎｃ（ｍＭ）」の欄に示した。

[0153] 希釈液添加から２時間後と２４時間後の細胞生存率を確認した。いずれのサンプルでも問題なかった。

[0154] 希釈液の添加から２時間後及び２４時間後、９６ｗｅｌｌ ｐｌａｔｅを３００×ｇで５分間遠心し、培養上清を回収した。

Ｈｕｍａｎ　ＧＬＰ－１（７－３６ａｍｉｄｅ）Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ　ｋｉｔ（ＰｅｒｋｉｎＥＩｍｅｒ社製、型番：ＡＬ３５９Ｃ）を用いて、回収した培養上清中のＧＬＰ－１を定量した。定量値について、検量線の範囲を超えてエラーとなった値は除外した。また、統計解析ソフトＲを用いてＢｏｘ　ｐｌｏｔを作成し、第一四分位より小さいまたは第三四分位より大きい値が１．５四分位範囲以上の場合を外れ値として除外した。

結果を図２２に示した。

請求の範囲

[請求項1] 両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と乳化剤とを含む乳化粒子を含む組成物であって、

前記乳化剤が、水中油型乳化剤であり、

前記乳化粒子に前記ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれている、ＧＬＰ－１分泌促進用組成物。

[請求項2] 前記ＧＬＰ－１分泌促進成分がレバウジオシドＡである、請求項１に記載の組成物。

[請求項3] 前記乳化剤のＨＬＢ値が７～１８である、請求項１または２に記載の組成物。

[請求項4] 前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステル、酵素処理レシチン、ショ糖脂肪酸エステルおよび有機酸モノグリセリドからなる群から選択される少なくとも１種を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項5] 前記乳化剤の親水基が、甘味成分由来である、請求項１～４のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項6] 前記乳化剤が、ポリグリセリン脂肪酸エステルおよびショ糖脂肪酸エステルからなる群から選択される少なくとも１つの乳化剤を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項7] 前記乳化剤の親水基が、リン酸基を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項8] 前記ＧＬＰ－１分泌促進成分に対する前記乳化剤の割合が、０．０２～５０質量％である、請求項１～７のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項9] 前記乳化剤を０．１～５質量％の割合で含有する、請求項１～８のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項10] 前記ＧＬＰ－１分泌促進成分を１～２０質量％の割合で含有する、請求項１～９のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項11] 糖代謝改善用、食欲抑制用または糖尿病もしくは肥満症の予防もしくは改善用である、請求項１～１０のいずれか一項に記載の組成物。

[請求項12] 請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物を含有する、飲料。

[請求項13] 請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物を含有する、食品。

[請求項14] 請求項１～１１のいずれか一項に記載の組成物を含有する、医薬組成物。

[請求項15] 水中油型の乳化剤と、両親媒性のＧＬＰ－１分泌促進成分と、水性媒体とを混合して混合物を調製する工程、および、該混合物に油脂を加えて攪拌する工程を含む、ＧＬＰ－１分泌促進成分が組み込まれた乳化粒子の製造方法。

[請求項16] レバウジオシドＡと水中油型の乳化剤とを含む乳化粒子を含有し、

前記乳化粒子に前記レバウジオシドＡが組み込まれている、組成物。