明　細　書

発明の名称 ： 発酵乳類及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、新規な発酵乳類及びその製造方法に関する。本発明の発酵乳類は、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D_3製剤、ビタミンK_2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発酵乳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特定の範囲の質量比で含有する発酵乳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０．９ｍｇ～１５０ｍｇ／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０．００６～１．７の範囲で含有する発酵乳類。

（２）（１）記載の発酵乳類を１００ｇ／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乳原料に添加し、殺菌した後、発酵させる工程を含む上記（１）記載の発酵乳類の製造方法。

（４）殺菌した乳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添加して、発酵させる工程を含む上記（１）記載の発酵乳類の製造方法。

発明の効果

[0008] 本発明の発酵乳類は、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] 本発明の発酵乳類の特徴は、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。

一般に発酵乳類中には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物は０．２～０．８ｍｇ／１００ｇ程度、シスタチン及び／又はシスタチン分解物は０．４～１．１ｍｇ／１００ｇ程度含まれている。

これに対し、本発明の発酵乳類は、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０．９ｍｇ～１５０ｍｇ／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０．００６～１．７の範囲で含有するものである。

[0010] 本発明の発酵乳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、乾燥したものを発酵乳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乳原料に添加し、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物を０．９ｍｇ～１５０ｍｇ／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０．００６～１．７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] 本発明の発酵乳類は、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。本発明によって製造される発酵乳類は、発酵乳や乳製品乳酸菌飲料、乳酸菌飲料等のすべての発酵乳類である。例えば、乳原料を必要に応じて混合し、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／又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調製する。ここで、乳原料には、牛乳、脱脂濃縮乳、脱脂粉乳、ホエイ、バター、クリーム等に加え、これらを必要に応じて混合した乳飲料、加工乳、成分調整牛乳、低脂肪牛乳、無脂肪牛乳等が含まれる。その後、ラクトバチルス・ブルガリクス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ）やストレプトコッカス・サーモフィラス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）、ラクトバチルス・ヘルベティカス（Ｌ

ａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｈｅｌｖｅｔｉｃｕｓ）、ラクトバチルス・アシドフィルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｃｉｄｏｐｈｉｌｕｓ）、ラクトバチルス・ケフィリ（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ　ｋｅｆｉｒｉ）等の乳酸菌類やクルイベロミセス・マルキアヌス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ　ｍａｒｘｉａｎｕｓ）やサッカロマイセス・ユニスポラス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｕｎｉｓｐｏｒｕｓ）等の酵母類を接種して発酵させて調製したスターターカルチャーをこれに適量接種した後、常法に従って発酵させることで、本発明の発酵乳類を調製することができる。また、発酵させた後に殺菌することができる。

[0014] 乳原料に添加する場合、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は、未殺菌の乳原料に添加しても、殺菌した乳原料に添加しても良い。未殺菌の乳原料に添加する場合には、添加後殺菌を行う。殺菌は加熱殺菌により行うことが好ましい。但し、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を乳原料に添加した後に加熱殺菌を行う場合には、１３０℃で２秒間以下とすることが好ましい。

なお、本発明の発酵乳類には、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、上述した乳原料のほか、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] 本発明の発酵乳類は、後述する実験動物での試験において、体重１ｋｇあたり１００ｇ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、本発明の発酵乳類を１００ｇ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有する溶出画分を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パイ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Ｔｗｅｅｎ２０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] （発酵乳類に含まれるアンジオジェニン及びシスタチンの測定）

発酵乳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５ｍｌに発酵乳類８６μｌ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／Ｍ

Ｓ／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ＭＡＧＩＣ Ｃ１８ ０．２ｍｍＩＤ×５０ｍｍを用い、流速は２μｌ／ｍｉｎでＭＡＧＩＣ２００２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] １００℃にて１０分間加熱殺菌した１０％の還元脱脂粉乳にスターターカルチャーを添加したもの１００ｇに参考例１のアンジオジェニン画分１６６ｍｇと参考例３のシスタチン画分０．５ｍｇを混合し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（実施例品１）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が１５０ｍｇ／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０．００６であった。

実施例 2

[0023] １００℃にて１０分間加熱殺菌した１０％の還元脱脂粉乳にスターターカルチャーを添加したもの１００ｇに参考例２のアンジオジェニン画分１３．５ｍｇと参考例３のシスタチン画分１．２ｍｇを混合し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（実施例品２）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が０．９ｍｇ／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１．７であった。

実施例 3

[0024] １００℃にて１０分間加熱殺菌した１０％の還元脱脂粉乳にスターターカルチャーを添加したもの１００ｇに参考例１のアンジオジェニン画分１３．５ｍｇと参考例３のシスタチン画分１．２ｍｇを混合し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（実施例品３）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が１２．４ｍｇ／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０．１２であった。

[0025] ［比較例１］

１００℃にて１０分間加熱殺菌した１０％の還元脱脂粉乳にスターターカルチャーを添加したもの１００ｇに参考例２のアンジオジェニン画分１２ｍｇと参考例３のシスタチン画分２．７ｍｇを混合し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（比較例品１）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が０．９ｍｇ／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３．２であった。

[0026] ［比較例２］

１００℃にて１０分間加熱殺菌した１０％の還元脱脂粉乳にスターターカ

ルチャーを添加したもの１００ｇに参考例１のアンジオジェニン画分１６６ｍｇと参考例３のシスタチン画分０．２５ｍｇを混合し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（比較例品２）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が１５０ｍｇ／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０．００４５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。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１ｋｇあたり、それぞれ１日当り１００ｇ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	１２３５±９
実施例品１	１２６８±１２
実施例品２	１２７３±１３
実施例品３	１２６７±１１
比較例品１	１２４１±７
比較例品２	１２４０±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）４００ｇを充填したカラム（直径４ｃｍ×高さ３０ｃｍ）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（ｐＨ６．７）４０Ｌを流速２５ｍｌ／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、０．７８Ｍの塩化ナトリウムを含む０．０２Ｍ炭酸緩衝液（ｐＨ７．０）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１８ｇ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４ｇを水８００ｍｌ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３．０ｇを得た（参考例品５）。

実施例 4

[0031] １０％の還元脱脂粉乳９７ｇに参考例品４を４０ｍｇ混合し、９３℃にて６分間加熱殺菌した後、スターターカルチャー３ｇを添加し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（実施例品４）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が２．４ｍｇ／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０．３９であった。

実施例 5

[0032] １０％の還元脱脂粉乳９７ｇに参考例品５を４０ｍｇ混合し、９３℃にて６分間加熱殺菌した後、スターターカルチャー３ｇを添加し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（実施例品５）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が２．３ｍｇ／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０．４であった。

[0033] ［比較例３］

１０％の還元脱脂粉乳９７ｇに参考例品４を３０ｍｇと参考例３のシスタチン画分を１０ｍｇ混合し、９３℃にて６分間加熱殺菌した後、スターター

カルチャー３ｇを添加し、常法に従って発酵させて、発酵乳類（比較例品３）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が１．９ｍｇ／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５．２であった。

[0034] ［試験例２］

実施例品４、５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４０匹を用いた。ラットを８匹ずつ５群に分け、４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、５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１００ｇ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、５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、５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。

[0035] [表2]

	骨密度（ｍｇ／ｃｍ^3）
対照群	５５１±９
擬似手術群	６０２±１０
実施例品４	５９６±１１
実施例品５	５９８±１３
比較例品３	５５６±１２

実施例 6

[0036] １００℃にて１０分間加熱殺菌した２．５％の還元脱脂粉乳９８ｇに参考

例品４を５０ｍｇ混合し、スターターカルチャー２ｇを添加し、常法に従って発酵させ、１３０℃で２秒間、加熱殺菌した後、１０℃まで冷却し、発酵乳類（実施例品６）を得た。得られた発酵乳類には、アンジオジェニン及び／又はアンジオジェニン分解物が２．９ｍｇ／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０．３２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０．９～１５０ｍｇ／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０．００６～１．７の範囲で含有する発酵乳類。

［請求項2］ 請求項１記載の発酵乳類を１００ｇ／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乳原料に添加し、殺菌した後、発酵させる工程を含む請求項１記載の発酵乳類の製造方法。

［請求項4］ 殺菌した乳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添加して、発酵させる工程を含む請求項１記載の発酵乳類の製造方法。