

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2007-161689**(P2007-161689A)**(43) 公開日 **平成19年6月28日(2007.6.28)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/81 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 R	2 B 1 5 0
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30 B	4 B 0 1 8
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	4 C 0 8 8
A 6 1 K 31/718 (2006.01)	A 6 1 K 31/718	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2005-364083 (P2005-364083)	(71) 出願人	501203344
(22) 出願日	平成17年12月16日 (2005.12.16)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
			茨城県つくば市観音台3-1-1
		(71) 出願人	504300088
			国立大学法人帯広畜産大学
			北海道帯広市稲田町西2線11番地
		(71) 出願人	000111487
			ハウス食品株式会社
			大阪府東大阪市御厨栄町1丁目5番7号
		(74) 代理人	110000109
			特許業務法人特許事務所サイクス
		(72) 発明者	野田 高弘
			北海道河西郡芽室町東2条南5丁目1
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 生活習慣病予防剤およびこれを含む飲食品、飼料

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】安心感のある天然素材（抽出等をしていない）でかつ良好な風味を有し、脂質合成（中性脂肪）上昇抑制機能、肝臓過酸化脂質改善機能および血清遊離脂肪酸低減効果を有する、生活習慣病予防剤として有効な材料を提供する。

【解決手段】アントシアニン含有馬鈴薯を主成分とし、この馬鈴薯中の澱粉はα化したものであり、前記馬鈴薯には10mg/100g以上のアントシアニンが含有されている生活習慣病予防剤。この生活習慣病予防剤は、飲食品および飼料に含有させて利用することができる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アントシアニン含有馬鈴薯を主成分として含有する生活習慣病予防剤。

【請求項 2】

アントシアニン含有馬鈴薯は、10mg / 100g 以上のアントシアニンを含有する請求項 1 に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 3】

アントシアニン含有馬鈴薯は、澱粉のリン含量が760ppm以上である請求項 1 または 2 に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 4】

アントシアニン含有馬鈴薯が北海 9 1 号、北海 9 2 号、キタムラサキ、インカパープルおよびインカレッドから成る群から選ばれる少なくとも1種である請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 5】

アントシアニン含有馬鈴薯は、該馬鈴薯中の澱粉を α 化したものである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 6】

中性脂肪上昇抑制機能を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 7】

肝臓過酸化脂質改善機能を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 8】

血清遊離脂肪酸低減効果を有する請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤を含有する飲食品。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の生活習慣病予防剤を含有する飼料。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、生活習慣病予防剤に関する。特に、本発明は、アントシアニン含有馬鈴薯を主成分として含有し、中性脂肪上昇抑制機能、肝臓過酸化脂質改善機能を有する生活習慣病予防剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

日本人の生活環境は変化し、特に食生活において高カロリー、高脂肪化が進むとともに、運動不足なども加わり、体内エネルギー収支のアンバランスなどから肥満、高脂血症、高血圧や2型糖尿病など生活習慣病が増加している。

【0003】

また、食生活の高カロリー・高脂肪化に加えて、農薬、大気汚染、薬物、喫煙、金属、放射線等の生体異物やショック等のストレスにより脂肪酸合成が亢進されることが知られており、このような状態が継続されると中性脂肪が上昇し高脂血症や肥満等への影響が懸念される。生体異物やストレスなどには環境に起因するものも多く容易に排除することが難しい場合が多いと考えられ、これらによる脂肪酸合成の亢進を軽減できる食品を提示できれば健康に大きく寄与できる可能性がある。

【0004】

中性脂肪の上昇を抑制する方法として、「黒豆、大豆および小豆を配合し、120、60分間の条件でローストし、次いで、90~20分間の条件で水系溶媒により抽出した飲食用組成物（特開2000-189123号公報（特許文献1））」、「食用植物由来

10

20

30

40

50

の食物繊維源をアルカリ又は無機酸で処理し、中和、乾燥したもので、セルロースとリグニンの結合体が乾燥後の食物繊維中50重量%以上からなる食物繊維を有効成分とする血中中性脂肪の上昇抑制又は低減剤（特許第2814172号（特許文献2））」、「植物由来で、セルロースとリグニンを主構成成分とし、該セルロースとリグニンは植物体中の結合状態を維持している可食性食物繊維を有効成分とする血中脂質、更にはコレステロールおよび中性脂肪の上昇抑制又は低減剤（特開平6-340532号公報（特許文献3））」、「ホエイタンパクおよびリン脂質を組み合わせる脂質代謝改善組成物（特開2002-226394号公報（特許文献4））」および「フコイダン、その分解物又はそれらの塩を利用した、生体の恒常性維持作用を有する生体恒常性維持剤（WO2002/022140（特許文献5））」などが提案されている。

10

【特許文献1】特開2000-189123号公報

【特許文献2】特許第2814172号

【特許文献3】特開平6-340532号公報

【特許文献4】特開2002-226394号公報

【特許文献5】WO2002/022140

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1に記載の発明は、コーヒー様飲食用組成物であり、このコーヒー様飲食用組成物は、カフェインによる胃潰瘍の悪化等の問題点を解決できる他、積極的に中性脂肪上昇抑制、血圧上昇抑制を図ることができることと記載されている。しかし、コーヒー風味の嗜好品であること、ローストしたあとに抽出工程などの加工処理を施したものである等の点で、改善の余地がある。

20

【0006】

特許文献2に記載の発明は、食物繊維を有効成分とする血中中性脂肪の上昇抑制又は低減剤である。食物繊維を有効成分とするため、食物繊維はとりすぎると下痢をする場合があり、また、アルカリや酸で抽出するなどの化学的な加工処理を伴うという点で改善の余地がある。

【0007】

特許文献3に記載の発明は、可食性食物繊維を有効成分とする血中脂質、更にはコレステロールおよび中性脂肪の上昇抑制又は低減剤に関するものである。有効成分が食物繊維の一種であるため、とりすぎると下痢をする場合がある。また、アルカリや酸で抽出するなどの化学的な加工処理を伴うという点で上記と同様に改善の余地がある。

30

【0008】

特許文献4に記載の発明は、ホエイタンパクおよびリン脂質を組み合わせた脂質代謝改善組成物である。リン脂質は、溶媒抽出などの化学的な加工処理を伴うという点で上記と同様に改善の余地がある。

【0009】

特許文献5に記載の発明は、フコイダン、その分解物又はそれらの塩を利用した、生体の恒常性維持作用を有する生体の恒常性維持剤である。抽出成分で高価、苦味が残っているものと予想される。

40

【0010】

上記のように、従来の中性脂肪の上昇を抑制する方法として提案されているものは、溶媒による抽出など化学的な加工処理を施した人工的な物質である。特に、特許文献2および3に記載のものは、食物繊維の一種であり摂取量により下痢を起こす可能性が危惧され、また特許文献5に記載のものでは面苦味など風味面から使用の制限等が懸念される。

【0011】

そこで本発明の目的は、安心感のある天然素材（抽出等をしていない）でかつ良好な風味を有し、脂質合成（中性脂肪）上昇抑制機能、肝臓過酸化脂質改善機能および血清遊離脂肪酸低減効果を有する、生活習慣病予防剤として有効な材料を提供することにある。さ

50

らに本発明は、上記材料を利用した飲食品、飼料を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、アントシアニン含有する馬鈴薯を主成分として含有する材料が、血中中性脂肪の上昇抑制効果、肝臓過酸化脂質改善機能および血清遊離脂肪酸低減効果のような、生活習慣病予防効果を有することを見出して本発明を完成させた。

【0013】

本発明は、アントシアニン含有馬鈴薯を主成分として含有する生活習慣病予防剤に関する。

【0014】

上記の生活習慣病予防剤は、安心感のある天然素材（抽出等をしていない）であり、アントシアニン含有しているにもかかわらず馬鈴薯本来の良好な風味を有している。

【発明の効果】

【0015】

発明によれば、中性脂肪上昇抑制機能および肝臓過酸化脂質改善機能を有する、生活習慣病予防剤を提供できる。この生活習慣病予防剤は、下記特徴を有する。

a) 食経験のある天然素材である。

b) 加熱などの簡単な方法で調整でき、安全性に対する安心感が高い。

c) 良好な風味である。

したがって、日常的に安心して摂取することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明は、アントシアニン含有馬鈴薯を主成分として含有する生活習慣病予防剤である。

【0017】

アントシアニン含有馬鈴薯品種は、アントシアニン含有する馬鈴薯であれば、特に限定はない。ただし、優れた生活習慣病予防効果を得るという観点からは、 $10\text{ mg} / 100\text{ g}$ 以上のアントシアニン含有することが好ましい。さらに好ましくは $30 \sim 1000\text{ mg} / 100\text{ g}$ 、さらに好ましくは $50 \sim 250\text{ mg} / 100\text{ g}$ のアントシアニン含有する。

【0018】

馬鈴薯中のアントシアニン含有量は、実施例に記載の方法（pHの違いによる方法）により定量することができる。

【0019】

$10\text{ mg} / 100\text{ g}$ 以上のアントシアニン含有する馬鈴薯は、その多くが高リンタイプの澱粉を含むものであり、澱粉のリン含量が 760 ppm 以上であることで、他の澱粉と比較してアミラーゼによる分解が遅く、ゆっくり吸収されると予想されるため、肝臓で糖から脂肪の合成が抑制され中性脂肪を抑制させるという利点がある。澱粉のリン含量は、好ましくは 860 ppm 以上である。

【0020】

馬鈴薯澱粉中のリン含量は、次の手順に従い、澱粉を湿式灰化した後、リン・バナド・モリブデン酸法により測定することができる（生化学実験法第19巻、澱粉・関連糖質実験法、32頁、1986年、学会出版センター）。

【0021】

澱粉試料 0.2 g に硝酸 2.0 ml 加えて弱火で加熱すると、まず濃暗褐色の煙が出てくる。煙が薄くなれば加熱をやめ、放冷して、 60% 過塩素酸 1.5 ml 、硝酸 1.5 ml を加える。再び加熱し、白煙が生じれば加熱をやめ、放冷する。なお、白煙が生じる前に分解液が乾固すれば爆発の危険があるので、注意を要する。分解液が不足したら、 60% 過塩素酸 1.5 ml 、硝酸 1.5 ml を追加して、再び加熱し、白煙が生じるまで行う。灰化した無色透明の液はリン酸

10

20

30

40

50

の一部がピロリン酸になっているので、灰化液に蒸留水を3.0ml加えて沸騰するまで加熱し、ピロリン酸を正リン酸にする。放冷後、10mlに定容し、リン含量測定用の試料とする。

【0022】

灰化液中のリン含量は、リン・バナド・モリブデン酸法で求める。すなわち、リン含量測定用の試料（リンを5-25 $\mu\text{g/ml}$ 含む灰化液）1.0mlに、蒸留水1.5ml、60%過塩素酸0.25ml、0.02Mバナジン酸アンモニウム溶液0.75ml、3.53%モリブデン酸アンモニウム溶液1.5mlこの順序で十分攪拌しながら加える。室温で、30分放置後、420nmの吸光度を測定する。なお、リン標準溶液として、リン酸二水素カリウム溶液を用いる。

【0023】

10mg / 100g以上のアントシアニンを含有し、かつ澱粉のリン含量が760ppm以上である馬鈴薯は、上記の高リン澱粉とアントシアニンの作用によって中性脂肪の上昇をより効果的に抑制することができる。このような、馬鈴薯品種としては例えば、北海91号、北海92号、キタムラサキ、インカパープルおよびインカレッドから成る群から選ばれる少なくとも1種を挙げることができる。

【0024】

本発明の生活習慣病予防剤は、アントシアニン含有馬鈴薯が、該馬鈴薯中の澱粉を α 化したものであることが適当である。より具体的には、アントシアニン含有馬鈴薯を以下のように加工したものであることが適当である。

すなわち、アントシアニン含有馬鈴薯を剥皮して1cm程度の厚さに切断したものを、20分間蒸煮してからドラムドライヤー（ドラム表面温度120～140）で乾燥して得られる。

【0025】

本発明の生活習慣病予防剤は、後述の実施例において具体的に示すように、少なくとも中性脂肪上昇抑制機能、肝臓過酸化脂質改善機能および血清遊離脂肪酸低減効果を有する。

ここで、中性脂肪上昇抑制機能とは、食事の高カロリー・高脂肪化や農薬、大気汚染、薬物、喫煙、金属、放射線等の生体異物およびショック等のストレスにより脂肪酸の合成が亢進される状態において、通常より血中中性脂肪が上昇することを抑制する機能を意味する。

また、肝臓過酸化脂質改善機能とは、肝細胞の酸化を軽減することなどにより、肝臓の過酸化脂質含量が低減することを意味する。

また、血清遊離脂肪酸低減効果とは、血液中に存在する遊離の脂肪酸量が通常より低下することを意味する。

【0026】

本発明は、上記本発明の生活習慣病予防剤を含有する飲食品を包含する。

そのような飲食品としては、例えば、

（1）アントシアニン含有馬鈴薯の乾燥品（フレーク等）を主に使用する下記食品〔例えば、麺類、パン、ケーキ、スナック、タブレット、練り製品、餅〕、（2）アントシアニン含有馬鈴薯（生、加熱あるいは冷凍）を主に使用する食品〔例えば、フライ製品（フライドポテト、ポテトチップス、コロッケなど）、スープ（ビシソワーズ、野菜スープ、シチュー、カレーなど）、具材（シチュー、カレー、ピザなど）、煮物（肉じゃがなど）、サラダ、グラタン〕を挙げることができる。

【0027】

これら飲食品における生活習慣病予防剤の含有量は、飲食品の種類や目的等を考慮して適宜決定できるが、例えば、5～95質量%の範囲とすることができる。

【0028】

本発明の生活習慣病予防剤は、澱粉として、成人の場合、一日当たり、10～300g、好ましくは50～300gを摂取することが、良好な中性脂肪上昇抑制、肝臓過酸化脂質改善効果および血清遊離脂肪酸低減効果を得るという観点から適当である。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

本発明は、上記本発明の生活習慣病予防剤を含有する飼料を包含する。そのような飼料としては、例えば、家畜用、家禽用あるいは養魚用の飼料、ペットフード等を挙げることができる。

【 0 0 3 0 】

本発明の生活習慣病予防剤は、動物の種類によって異なるが、澱粉として、体重 1 k g 当たり、一日当たり、4 ~ 4 0 g、好ましくは 4 ~ 2 4 g の生活習慣病予防剤を摂取することが、良好な中性脂肪上昇抑制、肝臓過酸化脂質改善効果および血清遊離脂肪酸低減効果を得るという観点から適当である。

【実施例】

10

【 0 0 3 1 】

以下本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【 0 0 3 2 】

a) 一般成分（食物繊維含む）の分析方法

水分は常圧加熱乾燥法、タンパク質はケルダール法（窒素・タンパク質換算係数 6.25）、脂質は酸分解法、灰分は直接灰化法、食物繊維は水溶性食物繊維、不溶性食物繊維共に酵素-重量法（プロスキー変法）を用いた。

炭水化物は 100 - (水分 + タンパク質 + 脂質 + 灰分) の計算式で算出した。エネルギーは栄養表示基準（平成 15 年度厚生労働省告示第 176 号）によるエネルギー換算係数：タンパク質、4；脂質、9；炭水化物、4 を用いて算出した。

20

（ポテトフレークの成分）

【 0 0 3 3 】

【表 1】

ポテトフレーク一般成分 (%)

	ホッカイガネ フレーク	キムラサキ フレーク	北海91号 フレーク	北海92号 フレーク
水分	6.5	5.2	4.0	5.7
タンパク質	4.6	5.8	8.7	7.6
脂質	0.5	0.4	0.5	0.5
灰分	3.7	4.0	4.4	4.2
炭水化物	84.7	84.6	82.4	82.0
（総食物繊維）	(6.4)	(5.8)	(6.1)	(5.8)
（水溶性食物繊維）	(2.8)	(2.6)	(2.5)	(2.3)
（不溶性食物繊維）	(3.6)	(3.2)	(3.6)	(3.5)
エネルギー（kcal/100g）	362	365	369	363

ポテトフレークは、生馬鈴薯をブランチングしてからマッシュしたものを、ドラムドライヤー（ドラム表面温度 1 3 0 ）で乾燥粉碎したもの。

【 0 0 3 4 】

b) 下記、ポリフェノール、アントシアニン、フラボノイドの分析方法

ポリフェノール量は Folin-Ciocalteu の方法を用いて、750nm の吸光度で gallic acid（没食子酸当量）として求めた。

参考文献：Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-

50

Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299, 152-158.

【 0 0 3 5 】

アントシアニン量はpHの違いによる測定法で定量した。pH1.0とpH4.5でそれぞれ510nm、700nmの吸光度で測定し、以下の式を用いてシアニジン3-グルコシド (cyanidin 3-glucoside (26900 l cm-1mg-1)) の吸光度係数を用いて算出した。 Anthocyanin contents were calculated using the molar extinction coefficient of cyanidin 3-glucoside (26900 l cm-1mg-1) and absorbance $A = [(A_{510} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH4.5}]$ 。

【 0 0 3 6 】

参考文献 : Giusti MM and Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanin by UV-visible spectroscopy, pp. F1.2.1-1.2.13. In Wrolstad RE(ed). Current protocols in food analytical Chemistry (2001). Wiley, New York .

10

【 0 0 3 7 】

フラボノイド量は510nmの吸光度でカテキン当量として算出した。

参考文献 : Jia Z, Tang M and Wu J (1998) The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects on superoxides radicals. Food Chemistry, 64, 555-559.

【 0 0 3 8 】

【 表 2 】

アントシアニン含有馬鈴薯フレーク中の色素含量

	キタムラサキフレーク	北海91号フレーク	北海92号フレーク
ポリフェノール (gallic acid mg/ 100g)	241.7	460.1	505.4
アントシアニン (mg/ 100g)	55.5	92.0	213.8
フラボノイド (catechin mg/ 100g)	65.7	91.9	131.4

【 0 0 3 9 】

c) 飼育方法

30

1 . 実験動物および飼育条件

実験動物は7週齢F344/DuCrj雄ラットを日本チャールズ・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入し、1週間の馴化を行った後に投与を開始した。室温を23±1、湿度を60±5%とし、明暗周期を12時間 (明07:00、暗19:00) とした。ラットはプラスチックケージを用いて個別に飼育し、ラットの取り扱いについてはGuide for the Care and Use of Laboratory Animalsに従って行った。

【 0 0 4 0 】

2 . 実験食

AIN93G配合、20%カゼイン及び5%大豆オイル添加食を基本飼料とし、本実験の正常食とした。また、0.5%アセトアミノフェン (AAP) を添加した正常食をAAP食とした。試験食は25%ホッカイゴガネフレーク (AAP食ホッカイゴガネ)、25%キタムラサキフレーク (AAP食キタムラサキ)、25%北海91号フレーク (AAP食北海91号)、25%北海92号フレーク (AAP食北海92号) をそれぞれのα化コーン澱粉の25%に置き換えて用いた。実験食はオリエンタル酵母株式会社 (Tokyo, Japan) にて調整し、酸化防止のため-30℃で保存した。

40

【 0 0 4 1 】

投与サンプル

1) 正常食 :

2) AAP食 : AAPを添加

3) AAP食ホッカイゴガネ : AAPを添加、α化コーンスターチの一部をホッカイゴガネフレークに置き換え

50

4) AAP食キタムラサキ : AAPを添加、 α 化コーンスターチの一部をキタムラサキフレークに置き換え

5) AAP食北海91号 : AAPを添加、 α 化コーンスターチの一部を北海91号フレークに置き換え

6) AAP食北海92号 : AAPを添加、 α 化コーンスターチの一部を北海92号フレークに置き換え

【 0 0 4 2 】

【 表 3 】

実験食餌成分 (%)

	1)正常食	2)AAP食	3)AAP食 ホッカイカンネ	4)AAP食 キタムラサキ	5)AAP食 北海91号	6)AAP食 北海92号
カゼイン	20	20	20	20	20	20
大豆油	5	5	5	5	5	5
セルロースパウダー	5	5	5	5	5	5
シュークロース	10	10	10	10	10	10
ミネラル類	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン類	1	1	1	1	1	1
L-シスチン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
第3ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
アセトアミノフェン	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ポテトフレーク	-	-	25	25	25	25
α 化コーンスターチ to	100	100	100	100	100	100

ミネラル類、ビタミン類はAIN93Gに準じる。
投与期間は4週間、上記の餌を各群それぞれ自由摂取させた。

【 0 0 4 3 】

3. 採血および肝臓摘出方法

実験は7週齢のラットを1週間、市販の粉末飼料を与えて馴化を行い、各投与区間で体重に有意差がないように各投与区5匹になるように区画分けを行った。1匹のラットに1日20gの給餌を行い、食餌と水は任意に摂取させた。実験期間は4週間とし、7日毎に体重及び摂食量の計測を行った。摂食量は給与量と残量の差から算出した。各週に計測した摂食量を7日分に換算した和を実験期間中の総摂食量とした。頸静脈採血は実験期間の0、1、2、3、4週目の9:00から11:00の間に行い、血中成分のばらつきを低くするために、採血前の12時間はラットに絶食させた。採取した血清は凝固阻害剤の入っていない1.5mlの遠心チューブに移し、室温で2時間放置した後に1500×gで20分間の遠心分離を行った上澄みを血清とした。得られた血清は生化学的成分の分析に用いるまで-30℃で保存した。

実験期間の最終日にネンブタール麻酔下で心臓採血を行い放血し、肝臓の摘出を行った。摘出した臓器は冷食塩水(0.85% NaCl)で洗浄し、乾燥したろ紙で水分を除去した後、重量を測定した。分析に用いるまで肝臓は-80℃で保存した。

【 0 0 4 4 】

4. 分析方法

中性脂肪は酵素法(第一化学薬品のクリニメイトTG-2試薬キット)により分析した。遊離脂肪酸は、和光純薬工業株式会社製のNEFA-HR試薬キットを用いたACS・ACOD(アシル-CoAシンターゼ・アシル-CoAオキシダーゼ)法により定量を行った。総コレステロールはコレステロールオキシダーゼ・DAO法により測定した。肝臓の過酸化脂質のチオバルビツール酸法の定法により分析した。

【 0 0 4 5 】

30

40

50

d) 結果

(血清脂質への影響)

正常食、AAP食、コガネAAP食、キタムラサキAAP食、北海91号AAP食、北海92号AAP食における4週間目の血清脂質データとして中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロールのデータを表4に示す。

【0046】

【表4】

食餌グループ	中性脂肪	遊離脂肪酸	総 コレステロール
	(mmol/L)		
正常食	1.59±0.24 ^{bc}	2.09±0.28 ^a	1.91±0.15 ^b
AAP食	1.98±0.27 ^a	2.01±0.31 ^a	2.93±0.29 ^a
ホッカイコガネ AAP食	1.70±0.42 ^{ab}	1.83±0.27 ^{ab}	2.85±0.35 ^a
キタムラサキ AAP食	1.28±0.19 ^c	1.36±0.09 ^c	2.66±0.17 ^a
北海91号 AAP食	1.42±0.50 ^{bc}	1.55±0.38 ^{bc}	2.86±0.25 ^a
北海92号 AAP食	1.40±0.22 ^{bc}	1.63±0.12 ^{bc}	2.75±0.29 ^a

※危険率:5%

【0047】

アセトアミノフェンにより血清中のコレステロールと中性脂肪が有意に上昇したが、アントシアニンを含む馬鈴薯のフレークを添加すると、中性脂肪が有意に抑制されるとともに正常食以下まで低下した。

また、血清中の遊離脂肪酸含量はアセトアミノフェンにより影響されなかったが、アントシアニンを含む馬鈴薯のフレークを添加すると、正常食と比較して有意に低下した。

【0048】

(肝臓過酸化脂質への影響)

中性脂肪の合成抑制効果の見られた、アントシアニンを含む馬鈴薯のフレークを添加した場合(正常食、AAP食、キタムラサキAAP食、北海91号AAP食、北海92号AAP食)の肝臓の過酸化脂質データを表5に示す。

【0049】

【表 5】

食餌グループ	肝臓過酸化脂質
	(nmol/100mg wet liver)
正常食	86.1±13.9 ^a
AAP食	88.6±17.4 ^a
キタムラサキ AAP食	71.6± 8.2 ^b
北海91号 AAP食	72.4±10.3 ^b
北海92号 AAP食	70.4±11.0 ^b

※危険率:5%

【0050】

アントシアニン含有する馬鈴薯のフレークを添加した場合（キタムラサキAAP食、北海91号AAP食、北海92号AAP食）は、正常食やアセトアミノフェン添加食を与えた場合と比較して肝臓の過酸化脂質が有意に低下した。

【0051】

(肝臓におけるカタラーゼmRNAの発現量の決定)

1) 肝臓組織からのRNAの抽出

Acid guanidium-phenol-chiriform抽出法に従って行った。約100mgの肝臓にISOGEN(Nippon Gene,Tokyo,Japan)を1ml加え, 1000rpmで氷中にて冷却しながらホモジナイズした。ホモジネートは1.5mlの遠心チューブに移し, 200μlのクロロホルムを加えて, 約15秒間激しく混合してRNAの抽出を行った。これを4, 17,000×gで15分間遠心分離し, 水層を別のチューブに移し取った。移し取ったRNA溶液に500μlのイソプロパノールを加えて混合した後, 4, 17,000×gで15分間遠心分離することでRNAの沈殿を得た。上澄みはアスピレーターにより除去し, チューブの壁面を洗浄するために80%エタノールを加えて再び4, 17,000×gで15分間の遠心分離を行った。同様に上澄みを除去し, 50μlの滅菌超純水を加えて常温で約20分間放置することで抽出したRNAを膨潤させ, ピペッティングにより完全に溶解して-80℃にて保存した。以上の操作に用いた器具はすべて滅菌処理したものを

30

40

【0052】

2) RNA溶液中の核酸およびタンパク質濃度の決定

50μlの滅菌超純水に溶解したRNA溶液の4μlを1.5mlの遠心チューブに移し取り, これに滅菌蒸留水を1ml加えて混合した。この全量を石英セルに移し, 分光光度計(UV-1600; Shimadzu)を用いて260nmにて核酸, 280nmにてタンパク質の吸光度を測定した。ブランクには滅菌蒸留水を用いた。核酸およびタンパク質の濃度は吸光度が1.0で40mg/mlとして算出した。また, 260nmと280nmにおける吸光度の比をとり, この値が1.6-1.8の範囲であることを確認してから以下の実験に用いた。

【0053】

50

3) RNA試料中のDNA分解

抽出したRNAの20 μ gを0.5mlの遠心チューブに移し取り, 60mM $MgCl_2$, 100mM DTT, 200mM Tris-HCl (pH7.5) のDNase bufferを5 μ l, RNase inhibitor (TaKaRa) を20UおよびRQ1 Dnase (Promega, WI) を1U加え, 滅菌超純水により50 μ lにメスアップした。これを37 で45分間酵素反応させることでDNAを分解した。反応後, 滅菌超純水50 μ lおよびフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) 100 μ lを加え, 15分間激しく混合し, 4 で17,000 $\times$ gの遠心分離を行った。上層を別のチューブに移し, 再びフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール (25:24:1, v/v/v) を100 μ l加えて抽出および洗浄操作を繰り返した。移し取った水層に3M NaOAcを10 μ l, 99.5%エタノールを300 μ lおよびペレットペイントを1 μ l加え, 良く混合した後に4 で17,000 $\times$ gの遠心分離を行った。上澄みをアスピレーターにより除去し, 80%エタノールを加えて4 で17,000 $\times$ gの遠心分離を行い, 上澄みをアスピレーターにより除去してチューブの壁を洗浄した。得られたRNAに28 μ lの滅菌超純水を加え, ピペッティングにより溶解した。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

【0054】

4) mRNAの逆転写 (RT)

DNAを分解, 除去し, 滅菌超純水に溶解したRNA試料の7 μ lを0.5mlの遠心チューブに移した。これにoligo(DT)primer (GIBCO, Gaithersburg, MD) を0.5 μ l加えて滅菌超純水で8 μ lにメスアップし, 70 で10分間培養した後に氷中にて1分間急冷しRNAを直鎖状にした。その後に, 375mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 250mM Tris-HCl (pH8.3)のstrand bufferを4 μ l, 2.5 mM dATP, 2.5mM dGTP, 2.5mM dCTPのdNTP mixture (TaKaRa) を4 μ l, 0.1M DTTを2 μ lおよびRNase inhibitorを10U加え, 42 で5分間の前培養を行うことでRNAとプライマーをアニーリングさせた。その後にMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M MLV-Rtase; GIBCO) を200U加え, 滅菌超純水で20 μ lにメスアップし, 42 で50分間培養することでRTを行い, cDNAを合成した。続いて70 で15分間培養し, 氷中にて1分間急冷することでMLV-Rtaseの失活およびRNAとcDNAの解離を行った。これにRNase H (GIBCO) を2.2U加えて全量21 μ lとし, 37 で20分間培養してRNAを分解した。得られたcDNAはPCRに供するまで-20 で保存した。以上の操作は全て滅菌処理した器具を用いて行った。

【0055】

5) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

合成したcDNA溶液の1 μ lを0.5mlのPCRチューブに移し取り, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$, 100mM Tris-HCl (pH 8.3) のPCR bufferを5 μ l, dNTP mixtureを4 μ l, EX-Taq polymerase (TaKaRa) を1.25Uと0.1mMのUpper primer, およびLower primerを0.25 μ lずつ加え, 滅菌蒸留水で50 μ lにメスアップした。プライマ-は、カタラ-ゼプライマ- (Upper primer, 5'-CTGGTTAATGCGAATGGAGAG-3' (配列番号1); Lower primer, 5'-TGGGGTAGTAGTTGGGAGCAC-3' (配列番号2))を用いた。サ-マルサイクラ- (PTC-100; MJ Research INC., Watertown, MA) の温度条件は、最初のサイクルが94 で3分間DNAの解離、60 で1分間プライマ-とのアニーリング、72 で2分間DNA鎖の伸長を行った。2サイクル目以降は、DNAの解離を94 で1分間とし、最後のサイクルはDNA鎖の伸長を72 で10分間行った。カタラ-ゼの増幅は25サイクル、増幅後に-20 で保存した。増幅したDNA断片の塩基配列をシ-ケンサ- (373A DNA sequencing system; PE Biosystem, Foster City, CA) により解読して相同性を確認した。また、増幅したDNA断片の塩基数はカタラ-ゼが556bpであった。

【0056】

6) 増幅したDNA断片のアガロ-スゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色

電気泳動には40mM Tris, 33mM NaOAc, 2mM EDTA, 0.17% AcOHとした1 $\times$ TAEの2% アガロ-ス (Seaken ME agarose, FMC Bio products, Rockland ME) ゲルを用いた。PCR産物の10 μ lを0.5mlの遠心チューブに移し, これにdye solutionを2 μ l加え, ピペッティングにより混合した後に電気泳動に供した。泳動槽 (Mupid-2, Cosmobio, Tokyo, Japan) は1 $\times$ TAEで満たし, 1レ-ンに10 μ lの試料を供した。また, 分子量マ-カ-として100bp ladder (SIGMA genosis) も同様に泳動した。電圧は100Vとし, BPBがゲルの3分の2の位置に達するま

で泳動した。電気泳動終了後に、暗所にてゲルをエチジウムブロマイド溶液に浸して30分間静置することで染色を行った。続いて滅菌超純水中で15分間振とうすることで余分なエチジウムブロマイドを除去した。これに256nmの紫外線を照射して、分子量マ-カ-の移動度から増幅したDNA断片を確認した。その後、ゲルを0.5M NaOH, 1.5M NaClのdenaturing buffer中で30分間振とうし、続いて3M NaCl, 0.5M Tris-HCL (pH 7.5) のneutralization buffer中で30分間振とうしてエチジウムブロマイドを洗浄した。

【 0 0 5 7 】

7) 増幅したDNA断片のナイロンメンブランへの転写

洗浄したゲルを3M NaCl, 0.3M Sodium citrateの20×SSC中で30分間振とうした。ナイロンメンブラン (Biodine B, Pall Bio-support, East Hills, NY) は滅菌超純水中で30分間振とうした後、20×SSC中で30分間振とうしたものを使用した。ナイロンメンブランへの転写は20×SSCによる毛細管現象を用いた12時間のUpward transfer methodにより行った。転写終了後に、膜の電気泳動した原点に印を付け、室温に約20分間放置することで膜を乾燥させた。その後、UV cross linker (Funakoshi, Tokyo, Japan) を用いて膜上のcDNAを紫外線固定した。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

【 0 0 5 8 】

8) ハイブリダイゼ-ション

プロ-ブには、DIGにより3'-tailing labelしたカタラ-ゼプロ-ブ (5'-AGTTGGCCACGCGAG GCACGGTAGGGAACAGTTTCACAGGTATCTGCAGATAGTTTG-3'(配列番号3))、を用いた。

プロ-ブにはDIGにより3'-tailing labelした。

紫外線固定した膜を2×SSC中にて約5分間振とう、20×SSCを洗い落としハイブリダイゼ-ションオ-ブン(MICRO-4HYBRIDIZATION

OVEN;Hybaid,Teddington,U.K.)中にて42℃に暖めた50% Formamide, 5×SSC, 2% Blocking reagent (Boehringer), 0.1% Sarkosyl, 0.02% SDSのhybridization buffer中に膜を移し、42℃で約2時間のプレハイブリダイゼ-ションを行った。その後、ハイブリダイゼ-ションボトルにそれぞれのプロ-ブを10pmol加え、よく混合してハイブリダイゼ-ションを開始した。42℃で16-20時間のハイブリダイゼ-ションを行った。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

【 0 0 5 9 】

9) 抗体の結合と発光検出

ハイブリダイゼ-ションした膜を常温で2×SSC, 0.1% SDS中にて10分間の振とうを2回、あらかじめ暖めておいた0.1×SSC, 0.1% SDS中にて50℃、15分間の振とうによる洗浄操作を3回繰り返し行うことにより、膜に結合しなかったプロ-ブを除去した。その後、9.1% blocking reagent, 92mM Maleic acid, 137mM NaCl のblocking buffer中に膜を移し、常温で30分間振とうすることで膜のブロッキングを行った。ブロッキング、anti-DIGとの結合並びにCSPDとの酵素反応を行った。反応後、膜を5-60分間常温にてX線フィルムに露光し現像した。現像したX線フィルムは、スキャナ-で取り込み、NIH-imageによるデンストメトリ-で発光の強さを測定した。以上の操作はすべて滅菌処理した器具を用いて行った。

肝臓カタラ-ゼのmRNA発現量は、正常食の発光量を100とした場合の相対値で表6に示した。

【 0 0 6 0 】

【表 6】

食餌グループ	カタラーゼ(m-RNA)
	(相対値)
正常食	100±25 ^b
AAP食	99±11 ^b
キタムラサキAAP食	133±27 ^a
北海91号AAP食	142±31 ^a
北海92号AAP食	142±22 ^a

※危険率:5%

【0061】

本発明の生活習慣病予防剤である有色フレ-クを食べさせた場合、正常食およびアセトアミノフェン食と比較して、カタラ-ゼの遺伝子発現量が有意に増加した。カタラ-ゼは、過酸化水素を水と酸素に分解する酵素であり、過酸化水素は過酸化脂質の原因の一つであるので、本発明の生活習慣病予防剤が過酸化脂質に対する低下効果を有するという上記結果と整合性のある結果となった。尚、カタラ-ゼ遺伝子の発現は、アセトアミノフェンの投与による上昇は見られなかった。

【産業上の利用可能性】

【0062】

本発明は、健康食品等の飲食品や飼料の製造産業等において有用である。

【配列表】

2007161689000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 2 3 K 1/16 (2006.01) A 2 3 K 1/16 3 0 4 C

- (72)発明者 橋本 直人
北海道河西郡芽室町東 2 条南 5 丁目 1
- (72)発明者 福島 道広
北海道帯広市西 1 8 条南 3 7 丁目 3 - 5
- (72)発明者 島田 謙一郎
北海道帯広市稲田町西 2 線 1 5 番地 2 5 - 2 号
- (72)発明者 橋本 誠
北海道帯広市西 2 2 条南 3 丁目 1 9 - 1 6
- (72)発明者 韓 圭鎬
北海道帯広市西 1 0 条南 4 0 丁目 4 - 1 1 プリスベン館 1 0 3
- (72)発明者 田中 寿
大阪府東大阪市御厨栄町 1 - 5 - 7 ハウス食品株式会社内
- (72)発明者 澤田 博
大阪府東大阪市御厨栄町 1 - 5 - 7 ハウス食品株式会社内
- (72)発明者 中村 正輝
大阪府東大阪市御厨栄町 1 - 5 - 7 ハウス食品株式会社内
- (72)発明者 木下 暁子
大阪府東大阪市御厨栄町 1 - 5 - 7 ハウス食品株式会社内

F ターム(参考) 2B150 AB10 DD31
4B018 MD53 ME04
4C086 AA01 EA11 EA20 MA52 NA14 ZC33
4C088 AB48 AC12 BA12 BA13 BA14 MA52 NA14 ZC33