

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4870355号
(P4870355)

(45) 発行日 平成24年2月8日 (2012.2.8)

(24) 登録日 平成23年11月25日 (2011.11.25)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/17 (2006.01)

A 6 1 K 37/16

A 6 1 K 35/20 (2006.01)

A 6 1 K 35/20

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 1 O 1

請求項の数 5 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2004-541349 (P2004-541349)
 (86) (22) 出願日 平成15年10月3日 (2003.10.3)
 (65) 公表番号 特表2006-501299 (P2006-501299A)
 (43) 公表日 平成18年1月12日 (2006.1.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/NZ2003/000222
 (87) 国際公開番号 W02004/030690
 (87) 国際公開日 平成16年4月15日 (2004.4.15)
 審査請求日 平成18年9月22日 (2006.9.22)
 (31) 優先権主張番号 521955
 (32) 優先日 平成14年10月4日 (2002.10.4)
 (33) 優先権主張国 ニュージーランド (NZ)

(73) 特許権者 504434028
 エイツー・コーポレーション・リミテッド
 ニュージーランド国オークランド、ニュー
 マーケット、ブロードウェイ 235、レ
 ベル 5
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠次
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男
 (74) 代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 β -カゼインA2、および β -カゼインA2を含有する栄養補助食品の治療での使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の項目：

- a) コレステロール；
- b) 高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールに相対しての低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロール；
- c) 低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロール；
- d) 超低密度リポタンパク質 (VLDL) コレステロール；
- e) アポリポタンパク質 B；および
- f) トリグリセリド；

のいずれか1つまたはそれより多くの、哺乳類の血清レベルを低減するための組成物であって、該組成物は β -カゼインを含有し、ここで β -カゼインは少なくとも95%の β -カゼインA²を含む、前記組成物。

【請求項2】

 β -カゼインが β -カゼインA²のみから成る、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

哺乳類の高コレステロール血症、高脂血症、およびアテローム硬化症からなる群より選択される疾患または障害を治療するための組成物であって、該組成物は β -カゼインを含有し、ここで β -カゼインは少なくとも95%の β -カゼインA²を含む、前記組成物。

【請求項4】

β -カゼイン A² をウシの生乳から、またはヤク、バッファロー、ヒツジ、もしくはヤギの生乳から得る、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

以下の項目：

- a) コレステロール；
- b) 高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールに相対しての低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロール；
- c) 低密度リポタンパク質 (LDL) コレステロール；
- d) 超低密度リポタンパク質 (VLDL) コレステロール；
- e) アポリポタンパク質 B；および
- f) トリグリセリド

10

のいずれか 1 つまたはそれより多くの、哺乳類の血清レベルを低減するための組成物の製造における β -カゼイン A² の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

ある種の疾患のリスク因子、例えばコレステロールレベル、脂質レベルおよびトリグリセリドレベル、ならびに LDL : HDL 比を低減するための β -カゼイン A² の使用に関する。特に本発明は、このようなリスク因子のレベルの上昇に伴う疾患または障害の予防または治療に関する。本発明はさらに、 β -カゼイン A² を含有する栄養補助食品に関する。

20

【背景技術】

【0002】

背景

心血管疾患は、今日西欧諸国において広く高頻度で見られる。この疾患の予防および治療、ならびに同疾患に伴うリスク因子に関する研究が果敢に進められている。

【0003】

高コレステロール血症は、動脈硬化症、アテローム硬化症および黄色腫症を含む心血管疾患の 1 つの高リスク因子として関係があるとされる。高コレステロール血症は、食事、遺伝、環境、ライフスタイル、その他の疾患およびストレスにより影響を受け、若年齢での心臓発作および脳卒中をきたす。

30

【0004】

高コレステロール血症は、血中総コレステロール、(低密度リポタンパク質) LDL - コレステロール、および(超低密度リポタンパク質) VLDL - コレステロールの上昇したレベルを伴う状態である。特に高レベルの LDL および VLDL はポジティブに冠動脈のアテローム硬化症に関与し、一方高レベルの HDL はネガティブなリスク因子である。LDL 酸化の役割が文献で非常に注目されている。修飾された LDL、すなわちより具体的には酸化 LDL は、内皮および平滑筋の細胞壁への結合能力が増加するため、動脈管腔内での持続的な酸化によりさらに傷害を促進させることが、詳細に報告されている。

40

【0005】

さらに酸化 LDL は、アテローム硬化症の過程に直接関与する一定範囲の生理学的応答を惹起することが知られている。これらの応答には、内皮下層スペース内の酸化 LDL を認識してこれらを積極的に取り込み、結果的に泡沫細胞に変換するマクロファージの化学的誘引物質である、炎症性応答の仲介物質(例えばインターロイキン - 1、インターロイキン - 6、腫瘍壊死因子アルファ、およびマクロファージコロニー刺激因子)の分泌の刺激を含む。その後泡沫細胞は凝集して脂肪線条を形成する。このような脂肪線条が、進行型のアテローム硬化症の最初の同定可能な特徴的病変である。

【0006】

高脂血症があると、冠動脈心疾患、ならびに癌および肥満にもかかりやすくなる。高脂

50

血症は、これらの生命を脅かす疾患の早期診断における有用な高リスク因子の1つである。

【0007】

高脂血症は血液の脂質パラメータが上昇した状態である。循環血液中の脂質分画は、総コレステロール、LDL、VLDL、およびトリグリセリドである。American Heart Association（米国心臓協会）のガイドラインによるこれらの安全なレベルを以下に示す。レベルが異常な場合には致死リスクを低減するため、食事の調節および薬剤による積極的な治療が必要である。

【0008】

総コレステロール (TC) > 240 mg/dL

LDL - コレステロール > 160 mg/dL - Apo(B) アテローム発生性因子

HDL - コレステロール < 35 mg/dL Lp(a) アテローム発生性因子

トリグリセリド > 150 mg/dL

10

【0009】

高コレステロール血症と同様に、高脂血症も食事、遺伝、ライフスタイル、環境、家族性疾患、またはストレスに起因する。この状態は遺伝性のこともあるし、または別の疾患、例えば全身性紅斑性狼瘡(SLE)、甲状腺機能低下症、ネフローゼ症候群、クッシング病、糖尿病、肥満、アルコール依存症、コルチコステロイド治療、またはエストロゲン治療から二次的に発症することもある。

【0010】

20

高コレステロール血症および高脂血症はまた、アテローム硬化症の主要な原因である。アテローム硬化症は他のいかなる単一の状態より、米国ではより多くの死亡に関与している。冠動脈を巻き込むアテローム硬化症の心疾患は、死亡の最も一般的な単一原因であり、全死亡の1/3に当たる。アテローム硬化症による脳への血液の供給の妨害（脳卒中の原因となる）は、（癌に次いで）第3位の最も一般的な死亡原因である。アテローム硬化症はまた、その他の主要な動脈、例えば腎臓、脚および腸への動脈の血流を低減させることにより、多数の重篤な病気の原因にもなる。

【0011】

アテローム硬化症は、動脈壁の狭小化、すなわち狭窄の結果として起こる心血管の状態である。狭小化は動脈の内側におけるプラーク（隆起した小片）または線条の形成による。これらのプラークは、酸化LDL、単球、マクロファージ、泡沫細胞、損傷した筋細胞、繊維組織、血小板の凝集塊、コレステロール、および時にはカルシウムからなる。これらは、血流の乱された領域に形成される傾向があり、血流中のコレステロールが高濃度の人に最も高頻度に認められる。プラークの数および厚さは年齢と共に増加し、血管の滑らかな内側を損なう原因となり、血栓（血塊）の形成を加速することになる。血栓の破片ははがれて塞栓を形成する、すなわち血栓の破片が血流を通して運ばれてより小さな血管（例えば冠動脈）を遮断し、組織の虚血性損傷または虚血性心疾患をきたすことは、稀ではない。

30

【0012】

薬物療法は虚血性心疾患の満足できる治療とはいえない、というのは動脈壁への多量の損傷が既に起こってしまっているからである。抗凝固薬は第二の血塊および塞栓の形成を最小限とする試みのために使用されているが、これらは疾患の進行にはほとんどまたは全く効果はない。血管拡張薬は、症状の緩解を提供するために使用されるが、治癒力としての価値はない。

40

【0013】

外科的治療は、ある種の高リスクの状態に利用することができる。バルーンによる血管形成術は狭くなった血管を押し広げ、滞った血液の供給を促進することができる。冠動脈の遮断または損傷後の心筋への血液の供給はまた、血管バイパス移植術により回復させることができる。大きなアテロームおよび固まった動脈の障害物は動脈内膜切除により摘出し、傷害された末梢血管の断片全体をプラスチックで織ったチューブの移植片で置き換え

50

ることができる。

【 0 0 1 4 】

一部の場合には高コレステロール血症の軽減は、食事の調節および/または薬剤の使用により達成することができ、それにより疾患に由来する致死リスクを最小限にすることができる。食事の植物繊維および食物のその他の有効成分を消費することにより、ヒトにおける血清コレステロールの低減が達成されてきた。しかし上記の状態に関する安全で有効な治療は依然として必要とされている。

【 0 0 1 5 】

上記のその他のリスク因子に加えて、生乳、特にBos Taurus メスウシ（家畜用メスウシ）の生乳の消費と、疾患、例えば糖尿病、アテローム硬化症および冠動脈心疾患とを関連付けるかなりの証拠が現在挙げられている。

10

【 0 0 1 6 】

このため世界中のウシの群れから得た生乳のカゼインの組成が、ある程度詳細に、特に異なるカゼインと疾患、例えば糖尿病および冠動脈心疾患間の原因となる特定の関連付けについて研究が行われてきた。ウシの生乳に見出される β -カゼイン群が注目されている。

【 0 0 1 7 】

β -カゼインタンパク質の8つの変異型が知られている。これらは β -カゼインA¹、A²、A³、B、C、D、E、およびFとして同定される。世界のウシの母集団の生乳中の主な変異型は β -カゼインA¹および β -カゼインA²である。1次構造、すなわちアミノ酸配列のレベルでのこれらの識別は、 β -カゼインA¹が67番の位置にアミノ酸のヒスチジンを有するのに対して、 β -カゼインA²は67番の位置にアミノ酸のプロリンを有することによる。他の β -カゼイン変異型はこれ以外のアミノ酸の位置に差異があるかもしれないが、これらの変異型をまた、67番の位置がヒスチジンかまたはプロリンかに基づいて区別することができる。例えば β -カゼインB、CおよびFは67番の位置にヒスチジンを有し、 β -カゼインA³、DおよびEは67番の位置にプロリンを有する。

20

【 0 0 1 8 】

疫学的証拠は、食事の β -カゼインA¹がヒトの健康に有害であることを強く示唆する。例えばWO 96/14577は、I型糖尿病における β -カゼインA¹の強い影響について記載している。疫学的証拠は、 β -カゼインA¹がヒトにおける糖尿病誘発性の活性を刺激すると示唆する。さらにWO 96/14577は、非肥満型糖尿病（NOD）マウスモデルにおける β -カゼインA¹の消費による自己免疫性糖尿病、すなわちI型糖尿病の誘導について記載している。同発明は、I型糖尿病にかかりやすい個体の生乳または乳製品の摂取を、糖尿病非誘導性の β -カゼイン変異型のみを含有する生乳に制限することにより、同個体のI型糖尿病になるリスクを低減することに焦点を当てて記載している。

30

【 0 0 1 9 】

WO 96/36239は、ヒトの食事における β -カゼインA¹の回避を主張している。疫学的証拠は、多様な母集団における β -カゼインA¹の消費と、冠動脈心疾患の発症との間の相関を確証している。同文献に記載された発明は、様々な β -カゼインをコードするDNAについて遺伝子材料を検査して乳牛を選別することによる、 β -カゼインA¹の回避に焦点を当てている。

40

【 0 0 2 0 】

このように β -カゼインA¹および糖尿病の間の関連付け、ならびに β -カゼインA¹および冠動脈心疾患の間の関連付けの双方について、詳細に報告されている。加えて β -カゼインA¹の有害な影響が今度は神経学的障害にまで拡大したことが、最近示された。WO 02/19832は、いかなる“ヒスチジン変異型”も含有しない生乳を提供することによる、神経学的障害または精神的障害の誘発または悪化の回避について記載している。ヒスチジン変異型は、同文献では67番の位置にヒスチジンを有する β -カゼイン変異型として定義されている。 β -カゼインA¹はこのようなヒスチジン変異型である。

50

【0021】

最近の文献は、 β -カゼインA¹が健康に有害であり、したがって β -カゼインA¹はヒトの母集団の食事から排除すべきである、という所見に焦点を当てている。メスウシのほとんどの集団は、主として β -カゼインA¹および β -カゼインA²を含有し、他の β -カゼイン変異型は（存在するとしても）わずかしかな含有しない生乳を産生する。したがってある母集団の食事の摂取から β -カゼインA¹を排除するという所望は、起こり得る β -カゼイン変異型のうちの β -カゼインA²のみを含有するヒトの消費用の生乳を提供することにより、達成することが可能となる。換言すれば β -カゼインA²のみを含有する生乳（およびその生乳から加工された食品）への推進力は、 β -カゼインA¹の回避、およびその結果として糖尿病、冠動脈心疾患、および神経学的障害に伴うリスクを最小限とするという趣旨に動機づけられたものであった。

10

【0022】

WO 01/00047は、 β -カゼインの主としてA²変異型を含有する乳製品を含んでなり、さらにヒトの血漿ホモシステイン（ホモシスチン）レベルを低下させる1つ（または複数）の化合物で強化した栄養補助食品を開示している。このような化合物として、ペタイン、コバラミン、葉酸、またはピリドキシンを含んでよい。これについて2つの可能な利点が記載されている。第1にサプリメント中の β -カゼインA¹を β -カゼインA²で置き換えることで、糖尿病のリスクを低下させることになる。第2にホモシステイン（ホモシスチン）レベルは冠動脈心疾患に非常に相関しており、ホモシステイン（ホモシスチン）はまたアテローム硬化症の1つのリスク因子と認識されていることから、ホモシステイン（ホモシスチン）レベルを低下させることは望ましい。したがって糖尿病の治療戦略と併せてホモシステイン（ホモシスチン）の治療戦略を用いる、血管の疾患をコントロールするための併用アプローチがある。

20

【0023】

WO 01/00047はさらに、 β -カゼインA²の推定消化産生物である β -カソモルフィン-9が、糖尿病に対する免疫を提供する可能性があることを開示している。実験結果は、 β -カゼインA²を与えたラットはコントロールの動物より糖尿病の発症率が低いことを示した。 β -カソモルフィン-9は免疫機能の調節因子、したがって糖尿病の進行を減弱する可能性のある物質として記載されている。

【0024】

しかし、 β -カソモルフィン-9による免疫調節に付随するデータは、糖尿病のNODマウスモデルにおいて抗原を、腸管への経路ではなく注射して使用した実験に基づいていることに注目しなければならない。さらに β -カソモルフィン-9が β -カゼインA²の消化により産生される単一の活性化化合物であることは、また確証されていない。したがって β -カソモルフィン-9に基づいたデータを外挿し、 β -カゼインA²が同じ生物学的活性を有するかどうかを正確に予想することは困難である。

30

【0025】

WO 01/00047において、糖尿病および冠動脈疾患間に原因となる結びつきがあることに言及している。しかし β -カソモルフィン-9の糖尿病を減弱する特性が、 β -カゼインA²が少なくとも間接的には冠動脈心疾患に対して防御的效果を有する可能性があることを意味するという示唆は、全体にあいまいな関連付けに基づいており、実施された実験が与えた驚くべき示唆と考えられる。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0026】

本発明では今回初めて、 β -カゼインA²の消費が血清コレステロールレベルを低減し、血中トリグリセリドレベルを低減し、LDL濃度したがってLDL:HDL比を低減し、アポリタンパク質Bの血清レベルを低減し、そして抗アテローム作用があることを、驚くべきことに発見した。

【0027】

50

したがって本発明の目的は哺乳類の血清コレステロールレベル、LDLコレステロールレベル、またはトリグリセリドレベルに伴う様々な疾患を、このような疾患に対する予防効果または治療効果を持つための、または少なくとも有用な代用物を提供するための、十分量の β -カゼインA²を含有する組成物を摂取することにより、予防または治療する方法を提供する。

【0028】

発明の記述

本発明の第1の側面において、 β -カゼインを含有する組成物を摂取することにより、以下の項目：

- a) コレステロール；
- b) 高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールに相対しての低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール；
- c) 低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール；
- d) 超低密度リポタンパク質(VLDL)コレステロール；
- e) アポリポタンパク質B；および
- f) トリグリセリド

のいずれか1つまたはそれより多くの、哺乳類の血清レベルを低減する方法を提供する、ここで、 β -カゼインは少なくとも95%の β -カゼインA²から成る。好ましくは、 β -カゼインは β -カゼインA²のみから成る。

【0029】

本発明はまた、哺乳類の血清総コレステロールレベル、LDLコレステロールレベル、アポリポタンパク質Bレベル、またはトリグリセリドレベルに伴ういずれかの疾患または障害を、 β -カゼインを含有する組成物を摂取することにより治療するための方法を提供する、ここで、 β -カゼインは少なくとも95%の β -カゼインA²から成る。

【0030】

該疾患または障害として、高コレステロール血症、高脂血症およびアテローム硬化症を含む。

該組成物は食物または食品、例えば生乳、または生乳を含有する製品もしくは生乳からの加工品であることが好ましい。

【0031】

本発明の好ましい態様において該組成物は、運動時のパフォーマンス、体重減少、体重増加、筋肉増強、および筋肉修復からなる群のいずれか1つまたはそれより多くを最適化するために摂取する、栄養補助食品、好ましくは栄養補給食品である。

【0032】

該組成物は、ヒトの血清コレステロールレベルおよび/または血清トリグリセリドレベルを変えるための十分な一定量の β -カゼインA²を添加することにより形成されていることがさらに好ましい。

【0033】

好ましくは β -カゼインA²はウシ(bovine cattle)の生乳から、またはヤク、バッファロー、ヒツジ、もしくはヤギの生乳から得る。

本発明のもう1つの側面において、 β -カゼインをヒトの消費用の食物または飲料に添加することにより形成される栄養補助食品を提供する、ここで、 β -カゼインは少なくとも95%の β -カゼインA²、好ましくは β -カゼインA²のみから成る。

【0034】

本発明のさらなる態様において、以下の項目：

- a) コレステロール；
- b) 高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールに相対しての低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール；
- c) 低密度リポタンパク質(LDL)コレステロール；
- d) 超低密度リポタンパク質(VLDL)コレステロール；

e) アポリポタンパク質 B ; および

f) トリグリセリド

のいずれか 1 つまたはそれより多くの、哺乳類の血清レベルを低減するための組成物の製造における β - カゼイン A² の使用を提供する。

【 0 0 3 5 】

詳細な説明

本明細書で使用する場合 “ L D L ” という用語は低密度リポタンパク質を意味し、“ H D L ” は高密度リポタンパク質を意味し、“ V L D L ” は超低密度リポタンパク質を意味する。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する場合 “ トリグリセリド ” という用語は、3 個の脂肪酸分子と結合したグリセロールから成る脂質または中性脂肪を意味する。

本明細書で使用する場合 “ 心血管疾患 ” という用語は、血管内の異常な高濃度の脂質に関連付けられることに起因する、促進される、または示される循環系の血管のあらゆる疾患である。

【 0 0 3 7 】

本明細書で使用する場合 “ 動脈硬化症 ” という用語は、動脈を狭める泡沫細胞および大動脈の線条の形成による、動脈壁の変性である。これは血液循環を制限し、そして個体を血栓症に罹りやすくする。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する場合 “ アテローム硬化症 ” という用語は、脂肪のプラークが内壁上に発生し、その結果血流の障害を伴う動脈の疾患である。

本明細書で使用する場合 “ アポリポタンパク質 B ” または “ アポタンパク質 B ” または “ A p o B ” という用語は、L D L コレステロール輸送タンパク質のタンパク質成分をいう。新規に (de novo) 合成されるコレステロールは、肝臓および腸から末梢組織にリポタンパク質の形で輸送される。アポリポタンパク質 B のほとんどは、V L D L として循環系内に分泌される。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合 “ 高コレステロール血症 ” という用語は、Expert Panel Report of the National Cholesterol Educational Program (NCEP) of Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol in Adults (Arch. Int. Med. (1988) 148, 36-39) のガイドラインによる、血中総コレステロール、L D L コレステロール、および V L D L コレステロールの上昇したレベルを意味する。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合 “ 高脂血症 (hyperlipidemia または hyperlipemia) ” は、血液脂質パラメータが血液中で上昇している状態である。この状態は脂肪の異常な高濃度を明示する。循環血の脂質分画は、総コレステロール、L D L、V L D L、およびトリグリセリドである。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する場合、例えば V L D L、L D L、および H D L における “ リポタンパク質 ” という用語は、脂質の輸送に重要な血清、血漿およびリンパ液に見出されるタンパク質の一群をいう。各リポタンパク質の化学的組成は、H D L がより高いタンパク質 - 対 - 脂質比率を有するのに対して、V L D L はより低いタンパク質 - 対 - 脂質比率を有するという点で異なる。

【 0 0 4 2 】

本明細書で使用する場合 “ 黄色腫症 ” という用語は、脂肪の沈着に起因する皮膚の黄みがかった腫脹またはプラークによる疾患の証拠である。黄色腫症の存在は通常、増加した血液コレステロールレベルを伴う。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用する場合 “ G R A S ” という用語は、食品添加物に関して “ 一般に安全

10

20

30

40

50

と認められている”ことを意味する。

本発明において、 β -カゼインA²の消費が以下の項目：

- 1．血清コレステロールレベルの低下
- 2．血中トリグリセリドレベルの低減、および
- 3．LDL濃度およびLDL：HDL比の低減

を含むポジティブな有益な効果を有するという興味深いそして驚くべき結果を、初めて示した。

【0044】

本発明によって観察されたこれらの効果は、以下の：

- 1．高コレステロール血症、
- 2．高脂血症、および
- 3．アテローム硬化症

を含む様々な疾患または障害の予防または治療に、 β -カゼインA²の消費が有益であることを意味する。

【0045】

この重要な所見は、単に β -カゼインA¹がある種の疾患、例えば糖尿病および冠動脈心疾患に寄与するという理由で、 β -カゼインA²が有益であるとする現行の考察を変えるものである。本発明の所見は、 β -カゼインA²はそれ自身でポジティブな有益な効果を有することを意味する。

【0046】

この所見は、10群のNZシロウサギに自由給餌でコントロールされた餌を与えた実験的試験により支持される。動物を屠殺後、血清コレステロールレベル、LDL：HDL比およびトリグリセリドレベルを測定した。

【0047】

第3-8群のウサギにおいて、食餌中の β -カゼインA¹およびA²の3種類の濃度（5%、10%および20%）を、合計20%の乳タンパク質が各食餌中に存在するように乳清タンパク質を加えて（すなわち各々15%、10%、0%の乳清タンパク質を添加して）検査した。コレステロール（0.5%）もまたこれらの食餌に添加し、確実に病変を測定できるようにした。コントロールとして第1群のウサギには20%の乳清タンパク質を、第2群のウサギには20%の乳清タンパク質+0.5%のコレステロールを与えた。第9群および10群には10%の β -カゼインA¹（またはA²）+10%の乳清のみを与えた。特別に調製された食餌で飼育されたウサギは、1日当たり平均30.05±0.97グラムしか食べなかった。

【0048】

驚くことではないもののほとんどのすべてのウサギは、6週の実験期間にわたり平均5.62%の体重減少を伴う、体重の減少を示した。このことはウサギの総合的な健康には影響を与えず、ウサギは機敏、敏感であり、身体的不調の兆候は示さなかった。この結果は、カゼインを含有する半合成の食餌を与えたウサギについて、食餌を容易に受け入れられなかった際に餌の摂取および体重増加が半分にまで低減したがウサギはまだ健康な様子だったことが認められた、早期の試験と一致する。食餌中の高レベルのカゼインで飼育されたウサギ（50%）は、同試験の経過中には体重増加はなかった。

【0049】

コレステロール非添加の10% β -カゼインA²（第10群）は、乳清のみ（第1群）および10% β -カゼインA¹（第9群）を含む他のすべての群に比して、t=6週時に有意に低い血清コレステロールレベルをもたらした。 β -カゼインA¹群は、乳清のみの群より高い血清コレステロールレベルを有していた。この結果は β -カゼインの混合物よりむしろ特定の β -カゼインの効果を精査する必要性を強調するものであり、血清コレステロールレベルにおいて β -カゼイン変異型によって効果が異なることを記載した初めての報告である。

【0050】

20%β-カゼインA¹のみ(第9群)を与えたウサギの平均血清コレステロールレベルは、第1群(乳清のみ)の動物より高かった。したがってβ-カゼインA¹は乳清タンパク質よりわずかにアテローム発生性であると思われる。すべての食餌への0.5%コレステロールの添加は、少なくとも3倍血清コレステロールレベルを増加させ、この効果は乳清のみと比較したA¹β-カゼインの効果よりずっと大きかった。食餌中に添加したコレステロールの存在下において、β-カゼインA¹またはA²を与えたウサギの血清コレステロールレベル間に有意差はなかった。

【0051】

食餌中のコレステロールを含まない場合では、第10群(β-カゼインA²)の血清LDLレベルは、第9群(β-カゼインA¹)または1群(乳清のみ)の値より有意に低かった。第9群のLDLレベルは第1群の値より高かったが、有意ではなかった。食餌中に添加したコレステロールの存在下においては、血清LDLはすべての群(2-8)で有意に上昇したが、群間での有意差はなかった。血清HDLにおいても、第10群が第1群より有意に低くなかったことを除き、同様のパターンが認められた。

【0052】

β-カゼインA²の抗アテローム発生性の潜在性は、LDL-対-HDL比によりさらに強調された。第9群(β-カゼインA¹)および第10群(β-カゼインA²)間の血清LDLレベルは、血清HDLレベルよりずっと大きな差があった。したがってLDL-対-HDL比は、β-カゼインA²を与えた動物ではβ-カゼインA¹を与えた動物より有意に低かった。実際、第10群のLDL-対-HDL比は、第1群(20%乳清のみ)を含む他のすべての群より有意に低かった。トリグリセリドまたはホモシステインに関してはすべての群間に有意差はなかった。

【0053】

このように食餌中のβ-カゼインA²は、コレステロールを強化した食餌の非存在下において、β-カゼインA¹および乳清の双方より低い血清コレステロールレベル(総コレステロール、LDLおよびHDLコレステロール)を生じさせる。

【0054】

β-カゼインA¹およびA²の双方とも、20%乳清に比して脂肪線条を生じさせたが、β-カゼインA²はβ-カゼインA¹より小さな範囲の病変をもたらすことが発見された。実際、食餌中のコレステロールを含まない10%β-カゼインA¹は、食餌中のコレステロールを添加した10%β-カゼインA²と、ほぼ同量の病変をもたらした。β-カゼインA²を与えたウサギの大動脈弓における脂肪線条の厚さは、食餌中のコレステロールを含むか含まないかのいずれかの場合、ゼロさもなければ非常にゼロに近い値であった。反対にβ-カゼインA¹を与えたウサギの大動脈弓の脂肪線条の厚さは、有意により高かった。したがってβ-カゼインA¹は、乳清およびA²カゼイン変異型の双方に比してよりアテローム発生性である。

【0055】

0.5%食餌中のコレステロールの存在下において、20%β-カゼインA²のみが20%乳清より小さな表面領域の脂肪線条に覆われた大動脈をもたらした。しかし大動脈弓の脂肪線条の厚さは乳清と比較して、20%および5%β-カゼインA²を与えた動物の双方とも有意に小さく(0.03±0.015)、10%β-カゼインA²を与えた動物では(有意ではないが)低い値を示した(0.01±0.008)。

【0056】

コレステロールを強化した食餌と組み合わせたバルーンによる動脈の傷害は、進行したヒトのアテロームと酷似する病変をラビットにもたらすことが知られている。

食餌中のコレステロールを含むか含まないかのいずれか場合の、β-カゼインA¹またはA²を与えたウサギのバルーンで傷害した右頸動脈の内膜-対-中膜比には、有意差はなかった。しかし(コレステロール添加および非添加双方の)β-カゼインA²を与えた群は、β-カゼインA¹を与えた対応する群に比して、新生内膜の肥厚がより少なかった。β-カゼインA²を与えた動物は一般に、(食餌中のコレステロールを含むおよび含ま

10

20

30

40

50

ない双方の場合の)乳清を与えた動物より、わずかに薄い血管内膜を有していた。

【0057】

これらの結果は、コレステロール非添加の10%A²は、乳清のみおよび10%β-カゼインA¹を含む他のすべての群より、有意により低い血清コレステロールレベルをもたらすという事実と合わせて、β-カゼインA²がアテローム防護性(atheroprotective)の効果を有するのに対して、β-カゼインA¹はアテローム発生性であることを初めて示すものである。

【0058】

これらの結果は、心血管疾患による致死率およびβ-カゼインA¹の消費との強い関連性を示唆する疫学試験とも一致する。

本発明の組成物は、1つもしくはそれより多くの物質と混合したβ-カゼインA²の形としてよく、水性の溶液もしくは懸濁液もしくはエマルジョンの形としてよく、または固体、例えば顆粒もしくは粉末の形としてもよい。本発明のある種の組成物は、それらの自然のままの形、特に生乳または生乳から誘導された製品もしくは加工品としてよい。本発明の他の組成物はβ-カゼインA²の添加により補給された物質としてよいが、その場合β-カゼインA²は、生乳もしくは生乳の加工品から精製するもしくは分画として得たものとする、またはβ-カゼインA²は生乳中またはその生乳からの加工品中に存在するものとする。

【0059】

本発明の組成物または食品として、生乳または乳製品、栄養サプリメント 例えば体重増加用製剤、食品添加物、アイスクリームまたはその他の乳製品に基づいた冷凍菓子、発酵乳製品 例えばヨーグルトまたはクオーク(quark)、全脂肪、低脂肪および脱脂肪のプロセスチーズを含むチーズ、乳清、乳製品の添加により強化された食品 例えばスープ、アレルギー性分子を除去した牛乳、菓子 例えばチョコレート、リン酸塩および/またはクエン酸塩を添加した製品を含む炭酸乳製品、全脂肪、低脂肪または脱脂肪の牛乳を含有してよい乳児用製剤、液体または粉末の飲用混合物、バターミルク、ならびにバターミルク粉末を含んでよいがこれに限定されないことは、当業者には明らかであろう。

【0060】

本発明の組成物を投与する好ましい方法は、経口摂取による。しかし他の手段、例えば静注により本組成物を投与することも適当としてよい。本発明の組成物は、コレステロール、LDL、およびトリグリセリドのレベルをコントロールするために適するいかなる投与レベルおよび投与頻度で、摂取またはそれ以外の方法で投与してもよい。典型的には組成物の一定量をヒトが毎日または毎週摂取するものとする。

【0061】

摂取するまたは他の方法で投与するβ-カゼインA²の量は被験者間で多様となることもまた、当業者には明らかであろう。

本発明を以下の実施例を参照としてさらに記載する。しかし、本発明がこれらの実施例に限定されないことは認識されなければならない。

【実施例】

【0062】

実施例

(材料および方法)

雌雄双方(16-24週齢)の60羽のNew Zealand White/Lop 交配種のウサギを、University of Queensland Central Animal Breeding House より入手した。

【0063】

(プロトコルの概要)

時間=0に、すべてのウサギの右頸動脈をバルーンにより内膜除去した。次にウサギを無作為に10群に分け、6週間特定の食餌を与えた。血液サンプルは血清成分分析用にt=0, 3および6週時に採取した。t=6週時にすべての動物を屠殺し、組織サンプルを採取した。試験のプロトコルの概要を表1に示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

【表 1】

表1：プロトコールの概要

週	0	1	2	3	4	5	6
手術	X						
食餌	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
採血	X			X			X
体重	X	X	X	X	X	X	X
屠殺							X

10

手術 $t = 0$ 時； 試験用ペレットの分配 毎日； 血液採取 $t = 0, 3, 6$ 週時；
 体重の記録 毎週； 屠殺 $t = 6$ 週時

【 0 0 6 5 】

(手術)

時間 = 0 に、60羽すべてのウサギをケタミン (30 mg/kg) およびキシラジン (7 mg/kg) の混合液にて筋注麻酔し、ハロタン(Laser Animal Health, Qld, Australia)で維持した。皮膚および筋膜に切開を加え、茎突舌骨筋を鈍的に切開し、右総頸動脈の上部を露出させた。左側の傷害されていない総頸動脈は、対側性のコントロールとした。側枝を一時的に5/0絹糸(Davis & Geck, Danbury, CT, USA)で結紮し、2フレンチ(2 F)のFogarty 塞栓摘出カテーテル(Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA)を、外頸動脈の枝である上甲状腺動脈に行った動脈切開から導入した(図2.2)。カテーテルを10cm(大動脈弓に向かって)前進させ、バルーンを0.2mlの生理食塩水で膨らませて、動脈の内膜除去を行うためカテーテルを引き抜いた。

20

【 0 0 6 6 】

傷害処置は、内膜の完全な除去を確実にするため、各動物に付き3回行った。傷害後、カテーテルを取り出し、上甲状腺動脈を5/0絹糸で結紮し、傷口を2/0Dexon 縫合糸(Sherwood Medical, St Louis, MO, USA)を用いて閉じた。50 mg/ml エンロフロキサシンを含有する広域スペクトルの抗生剤(5 mg/kg Baytril, Bayer Australia Ltd, Pymble, Australia)を、処置の完了時に皮下投与した。ウサギは手術後モニターし、完全に意識が回復した後ケージに戻した。術後3日間、各動物には約170 mgのパラセタモール(SmithKline Beecham International, Ermington, Australia)と共に胃管栄養し、抗生剤の皮下投与を継続した。

30

【 0 0 6 7 】

(ウサギの食餌)

試験は、その組成を表2に示す10通りの食餌について行った。本質的に各食餌は合計20%の総乳タンパク質を含有するが、カゼインタンパク質 - 対 - 乳清タンパク質の比率が異なるようにした。第1、9および10群の食餌はさらなる添加物を含有しなかったが、第2、3、4、5、6、7および8群の食餌は0.5%コレステロールを補給した。各群6羽のウサギとし、この食餌を6週間継続した。

40

【 0 0 6 8 】

【表 2】

表 2 6週間ウサギに与えた試験用食餌の組成

食餌群	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	成分 (グラム/kg)									
β-カゼインA ¹	0	0	50	100	200	0	0	0	100	0
β-カゼインA ²	0	0	0	0	0	50	100	200	0	100
乳清タンパク質	228	228	171	113.8	0	171	113.8	0	113.8	113.8
コレステロール	0	5	5	5	5	5	5	5	0	0
D L-メチオニン	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
スクロース	426.372	421.372	428.53	435.886	449.865	428.496	435.818	449.865	440.886	440.886
コーン油	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ココナツ油	130	130	130	130	130	130	130	130	130	130
セルロース、繊維	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
塩分(Salt Mix #200951)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
ビタミンミックス#320005	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
亜鉛(Zinc premix) (5mg/g)	0.628	0.628	0.47	0.314	0.135	0.504	0.382	0.135	0.314	0.314
計	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

ウサギの新しい食餌は、ウサギの通常のペレットとは色、におい、舌ざわりおよび重さが異なるため、ウサギが新しい食餌に慣れるのに、数日を要することがわかった。通常のペレットは褐色だが、新しい食餌で与えるペレットは白色だった。このため手術前5日間、通常のウサギ用ペレットに新しいペレットを増加しながら(25%、50%、75%、100%)混入する(合計200グラムとする)ことにより、すべてのウサギを各々の食餌に慣れさせた。t = 0時には、新しいペレットのみ(1日当たり200グラム)を以後6週間与え(例外は下記参照)、水は自由飲水とした。ウサギは1日当たり90 - 130グラムのペレットを食べることが知られている。しかし動物が餌に届くことができるようにホッパーを満たすために200グラムが必要であった。200グラムの新しいペレットを毎日与え、各ウサギが食べずに残したペレットの量を毎日秤量して決定した。

10

【0070】

ウサギが新しい食餌を食べるのを促すために、いくつかの方法を用いた。第1にウサギの食欲を刺激するために、餌用ホッパーの後ろに少量のアニス種油を滴下した。第2にウサギがまだ新しい食事を食べないか、または体重減少が始めの体重の約10%に達した場合には、通常の餌を25、50または75%食餌に混入した。この場合には白色の食餌ペレットを褐色の通常のペレットから注意深く分離し、実験用食餌を実際に消費した量を決定するため毎日秤量した。最後に、体重減少が続く場合には、体重が増加するまで1日当たり200グラムの通常の餌をウサギに与えた。

【0071】

(ウサギの体重)

20

すべてのウサギは体重測定を手術当日に開始し、屠殺する週まで毎週行った。

(血液採取)

血液は、各ウサギから術前、食餌の開始時、ならびにt = 3および6週時に採取した。各ウサギをしっかりと包み、中心耳動脈を覆う毛を剃った。24ゲージカテーテル(Becton Dickinson Pty Ltd, NSW, Australia)を挿入し、5 mLの血液を無菌試験管に採取した。血液は凝固するまで放置し、4500 rpmで10分間遠心した。血清の上清を抽出し、総血清コレステロール、トリグリセリド、HDL、LDLおよびホモシステインについて分析した。

【0072】

(ウサギの屠殺)

30

傷害後6週目に、1 mLの生理食塩水中の1000 IUヘパリン(David Bull Laboratories, Mulgrave, Victoria)を各ウサギの耳静脈に注入した。5分後ウサギは過剰量のペントバルビトン(325 mg/mL Lethobarb, (Virbac Australia Pty Ltd, Victoria))で安楽死させた。顎から骨盤まで切開を加え、後肢および前肢に切開を延長した。その後腹膜腔を注意深く切開して内部の臓器を露出させ、胸郭を切除して心臓を露出させた。灌流装置に接続したチューブに付けた太いゲージの針で、左心室にカニューレ挿入した。下大静脈の小さな部分を清浄にし切開した。循環系を1リットルのダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水(DPBS)で洗い流した後、1リットルのDPBS中の4%ホルムアルデヒド(Asia Pacific Speciality Chemicals Ltd, NSW, Australia)で100 mmHgにて動脈灌流固定を行った。

40

【0073】

(組織の採取)

大動脈全体、すなわち腸骨分岐から大動脈弓までを露出させて切り取った。右側(傷害)および左側(コントロール)の総頸動脈を完全に露出させて切り取った。すべての血管は脂肪および付着する結合組織を除去した後、DPBS中の4%ホルムアルデヒドを含む試験管に入れた。

【0074】

(組織の分析)

(管腔病変に関する開いた形での(en face)Oil-Red-O染色)

固定および組織学的切片作成用に大動脈弓を切り取った。大動脈の残りの部分(約16

50

cm) を縦方向に開き、4つの断片に切断した。各断片を小さな透明プラスチック片上に(管腔側を上にして)縫い付け、確実に平らに維持できるようにした。次にこの断片を脂肪親和性の染色剤、Oil-Red-O の飽和溶液中で開いた形で(en face)染色し、脂肪線条に覆われた管腔表面領域を決定できるようにした。

【0075】

(脂肪線条で覆われた管腔表面領域の分析)

各大動脈断片の画像はDesk Scan II (version 2.31a, Hewlett-Packard, U.S.A.)を用いてスキャンし、Image J 画像ソフトウェア(version 1.23y、国立衛生研究所、U.S.A.)を用いて病変の総領域を測定した。このプログラムは動脈表面の残りの部分(白色から淡いピンク色)に対して、病変(明るい赤に染色される)の強度を比較する。結果を病変で覆われた表面領域のパーセントで表した。

10

【0076】

(大動脈弓)

長さ約3 - 4 mmの3つの断片を各大動脈弓から切断し、DPBSに浸漬し30分ずつ2回洗浄した。次にこの断片をエタノール濃度を増加しながら、すなわち70%エタノールで30分間、次に95%エタノールで30分間、最後に100%エタノールで30分間ずつ3回洗浄して脱水した。その後これらの断片を2つの浸透樹脂溶液(Technovit 7100, Heraeus, Germany)の第一の溶液に浸漬し回転装置上で一晩放置した。その後この断片を第二の樹脂溶液に移し、回転装置上で再度一晩放置した。各断片を包埋型の中に注意深く立てて置き、包埋型の底部に最小量のスーパーグルーでその位置のままとめた。浸透用に用いたものと同じ樹脂混合液を硬化剤と混合し、この溶液を、断片全体が完全にカバーされるまで型にピペットで注入した。合成樹脂がポリマー化するまで室温で2時間放置した後、37 °Cのオープンに一晩入れた。次に合成樹脂のブロックを型からそっと外し、接着剤としてTechnovit 3040 (Heraeus, Germany)を用いてHistoblock 上に乗せた。各ブロックをミクロトーム(LKB Bromma, Germany)にしっかり固定し、各10 μmの約60 - 70切片を切り取って形を調整した。これらを廃棄し、ミクロトームを5 μmの切片を切断するように設定した。これらの切片は鉗子で集め、室温で保持しておいた蒸留水中で広げた。次にこれらをスライドガラスの上に取り、約15分間60 °Cで乾燥させた。次に切片を10分間Toluidine Blueで染色した後、水道水で4回洗浄し、空気乾燥させた。

20

【0077】

30

(右側および左側頸動脈)

長さ約3 - 4 mmの4個および5個の各断片を、左側(コントロール)および右側(バルーン処置)の頸動脈から各々切り出した。コントロールおよび実験用の容器中では、異なる数の切片を使用し、包埋および切片作成中に組織間で混同しないようにした。この断片を、大動脈弓断片について先に記載した方法を用いて、脱水、包埋、切片作成および染色を行った。

【0078】

(内膜 - 対 - 中膜比)

バルーン処置およびコントロールの頸動脈および大動脈弓の内膜 - 対 - 中膜比(I : M)に関するすべての形態計測分析は、Mocha Image Analysis system (version 1.1, Jandel Scientific, Ca., U.S.A.)を用いて行った。測定を行い、各動脈のすべての断片の内膜層および中膜層双方のサイズ(ピクセルにて)を決定した。Excel (Microsoft Corporation, N.Y., U.S.A.)のスプレッドシートを用いて、1羽のウサギ当たり3つの大動脈弓断片、4つのコントロール頸動脈断片、および5つのバルーン処置頸動脈断片の各々について、内膜 - 対 - 中膜比を算出し、記録した。

40

【0079】

(統計)

すべての統計分析は、SigmaStat (Jandel Scientific, Ca., U.S.A.)統計ソフトウェアパッケージを用いて行った。形態計測分析のデータの比較は、順位検定における“クラスカル・ワリス”分散分析(“Kruskal-Wallis” Analysis of Variance on Ranks test)を

50

用いて一元配置多重比較分散分析 (One-Way Multiple ANOVAs) にて行った。極端な外れ値はテューキー棄却検定 (Tukey's Outlier Test) を用いて同定した。すべての統計分析において、0.05未満のP値を有意とみなした。情報を Microsoft Excel (Microsoft Corporation, N.Y., U.S.A.) を用いて図示した。すべてのデータは平均±平均の標準偏差として報告した。

【0080】

(結果)

(ウサギの食餌)

ウサギはt = 0 時前の数日間にウサギの各々の新しい食餌に慣らしたが、体重減少が10%に達した一部の動物には、通常のペレットを補給した食餌を数日間与えた。したがって、重さの分かっている(200グラム)新しいペレットを毎朝与え、翌朝200グラムの新しいペレットを与える直前に食べ残した分量を秤量することにより、1日当たりの各動物の食べた新しいペレットの量を測定することを必ず行うこととした。新しいペレット(白色)と通常のペレット(褐色)の混合物を与えた場合は、2種類を分けて秤量した。

【0081】

各ウサギの食べた白色のペレットの重さはウサギ間でばらつきがあった。群の平均では、消費されたペレットの重さは、6週の実験期間にわたり1日当たり12gまでのばらつきしかなく、1日当たり23.2グラムから35.3グラムまでの範囲であった(平均30.48±0.97グラム)。いずれの群間においても食べた食餌ペレットの量に有意差はなかった。第2-8群の食餌への0.5%コレステロールの添加は、食べた量にも、カゼインのタイプまたは量にも影響はなかった。このようにウサギの消費した餌の量は相対的に少なく(白色ペレット 1日当たり平均30.48グラム、褐色ペレット 1日当たり10.22グラム、合計 1日当たり平均40.72グラム)、多少の体重減少という結果に至ったが、各群で消費された新しい食餌の量は相対的に一定しており、したがって群間の結果の比較は可能である。

【0082】

(ウサギの体重)

第9群(10%A¹、コレステロール非添加)のみが平均体重増加2.15±1.2%を記録したにとどまり、ほとんどすべてのウサギは6週にわたり体重が減少した。第10群のウサギ(10%A²、コレステロール非添加)は少量の体重減少-0.92±0.97%しか示さなかった。20%乳清のみ(コレステロール非添加)の第1群のウサギは、6週の試験にわたり始めの体重の4.5±6%減少したが、残りの第2-8群(すべてコレステロール添加)は始めの体重の平均7.57±4.72%減少した。

【0083】

最大の平均体重減少は、第6群によるものであった。しかしこの結果は完全に、開始時3.81kgと重い体重だった1羽のウサギ(K6)によるものである。このウサギは1日当たり平均21.58グラムのペレットを食べ、すべてのウサギの平均(30.05)より1日当たり約9グラム少なかった。K6は病気の兆候は示しておらず、屠殺時にも正常な色の非常に小さな肝臓だったことを除いて、すべての臓器は正常に見受けられた。この群の残りの5羽のウサギは始めの体重の5%未満の減少だった。体重変化においてカゼインの比率またはタイプ間に明らかな関連性はなかった。

【0084】

(コレステロールについての食餌の効果)

6週時に、ほぼすべての群のコレステロールレベルは第1群(20%乳清のみ)と有意に異なっていた。興味深いことに第9群(A¹)のコレステロールレベルは第1群より高かったが、この差は有意ではなかった。また第8群(20%A²、コレステロールを含む)のコレステロールレベルは、コレステロールを添加した20%乳清(第2群)から得られた値の約1/2であったが、この差も有意ではなかった。第9群の血清コレステロールは、食餌中のコレステロールを与えたすべての群(第2-8群)より有意に低かった。第10群(A²)の血清コレステロールは第1群より有意に低く、事実、第9群を含むすべ

ての群より有意に低かった。

【 0 0 8 5 】

この結果は、食餌への 0 . 5 % のコレステロール添加が、食餌中の乳清の量ならびにカゼインの量およびタイプの双方にかかわりなく、血清コレステロールレベルの増加の原因となったことを示す。また食餌中のコレステロール非存在下において、 A^2 は、 A^1 および乳清の双方より低い血清コレステロールレベルをもたらした。

【 0 0 8 6 】

(トリグリセリドについての食餌の効果)

6 週までに、第 5 群 (2 0 % A^1) および 9 群 (1 0 % A^1 、コレステロール非添加) のトリグリセリドレベルは 0 週から増加しており、第 4 群 (1 0 % A^1) および 1 0 群 (1 0 % A^2 、コレステロール非添加) は変化していなかった。他のすべての群の血清トリグリセリドは、0 週時のレベルから減少した。

10

【 0 0 8 7 】

(L D L についての食餌の効果)

食餌中のコレステロールを添加したすべての群において、血清 L D L は、食餌中のコレステロールを含まない第 1 群 (乳清のみ) または 9 群 (A^1) および 1 0 群 (A^2) より有意に高かった。第 9 群 (A^1 、食餌中のコレステロールを含まない) は第 1 群と有意差はなかったが、第 1 0 群 (A^2 、食餌中のコレステロールを含まない) は有意に低かった。第 1 0 群の L D L レベルはまた、第 9 群の値より有意に低かった。食餌中のコレステロールを添加したすべての群 (第 2 - 8 群) は、互いの有意差はなかった。

20

【 0 0 8 8 】

このように血清 L D L は血清コレステロールと同じパターンをとり、食餌中のコレステロールの添加がすべての相応する群の血清 L D L レベルを増加させ、一方で食餌中のコレステロール非存在下の A^2 カゼイン変異型は、 A^1 または乳清のみのいずれかより低い血清 L D L をもたらすことを示した。

【 0 0 8 9 】

(H D L についての食餌の効果)

血清 H D L は血清 L D L と同じパターンをとり、食餌中のコレステロールの添加 (第 2 - 8 群) が、コレステロールを添加しなかった場合 (第 1 、 9 および 1 0 群) より有意なレベル上昇の原因となった。第 9 群は第 1 群と有意差はなかったが、第 1 0 群より有意に高く、第 1 0 群は同様に第 1 群を除くすべての群より有意に低かった。食餌中のコレステロールを含まない β - カゼイン A^2 は、 A^1 より低い血清 H D L レベルをもたらした。

30

【 0 0 9 0 】

(L D L - 対 - H D L 比についての食餌の効果)

L D L - 対 - H D L 比は、個々のウサギの血清 L D L レベルを同じウサギの H D L レベルで割ることにより決定した。その後各群の平均 L D L : H D L を決定した。第 1 0 群 (1 0 % β - カゼイン A^2 のみ) の L D L : H D L は、乳清のみおよび β - カゼイン A^1 のみを含む他のすべての群より有意に低かった。食餌中のコレステロールを含むすべての群 (第 2 - 8 群) の L D L - 対 - H D L 比は、互いの有意差はなかった。血清 L D L および H D L のレベルの場合と同様に、 β - カゼイン A^1 の用量が多いほど値が高くなり、 β - カゼイン A^2 の用量が多いほど値が低くなる傾向があった。

40

【 0 0 9 1 】

(ホモシステインについての食餌の効果)

6 週までに血清ホモシステインレベルは 0 週時の値からわずかしき変化しておらず、実験群間での有意差は示さなかった。

【 0 0 9 2 】

(アテローム硬化症についての食餌の効果)

2 0 % 乳清を与えた第 1 群のウサギは、プラークで覆われた大動脈表面領域は 0 % であった。他のすべての群は第 1 0 群を含めて、多少のプラークを有していたが、これは第 1 群に比して有意に高くはなかった。第 1 群および 1 0 群のみが第 3 群より有意に低く、第

50

3 群はまた第 2 - 9 群よりかなり高かった。しかしこの群内ではウサギ間のばらつきが大きく、2.8%および18.4%の間の範囲であった。3羽のウサギは極端な外れ値と思われたため、これらの計算からこの3羽を除外した。

【0093】

第1群の胸部大動脈は、脂肪線条で覆われた表面領域は0%であった。他のすべての群は、食餌中のコレステロールを含まない第9群(A^1)および10群(A^2)を含めて、多少の病変を有していた。第9群および10群は互いの有意差はなかった。食餌中のコレステロールを含む A^1 および A^2 の双方とも、カゼイン変異型の濃度の増加に伴って病変の比率が低下する傾向があったが、これは有意ではなかった。第3群は他のすべてよりかなり高かったが、有意差はなかった。この群の6羽のウサギの内、3羽はブラックで覆われた表面領域の高い比率を、そして3羽は低い比率を有していた。

10

【0094】

食餌中のコレステロール非存在下で A^2 を与えた動物(第10群)から単離した腹部大動脈は、ブラックで覆われた微小の表面領域のみしか有しておらず、ブラックで覆われた領域が0%であった第1群(乳清のみ)と有意差はなかった。第10群は、第9群(A^1 、食餌中のコレステロールなし)を含む他のすべての群より有意に低かった。第3群(5% A^1 、食餌中のコレステロールを含む)は、20%乳清および食餌中のコレステロールを含む第2群より有意に高かった。

【0095】

このように食餌中のコレステロールを含まない双方のカゼイン変異型とも、乳清のみより広範囲の脂肪線条をもたらしたが、 A^2 は A^1 よりアテローム発生性が低かった。加えて A^1 は、食餌中のコレステロール存在下においても A^2 よりアテローム発生性が高かった。

20

【0096】

(内膜 - 対 - 中膜比)

20%乳清のみ(第1群)では、大動脈弓の内膜の肥厚は認められなかった。同様に食餌中のコレステロールを含まない10% A^2 (第10群)、または食餌中のコレステロールを含む5% A^2 または20% A^2 (第6群および8群)の存在下においても、内膜 - 対 - 中膜比の平均は0であった。第7群(10% A^2 、食餌中のコレステロールを含む)は内膜 - 対 - 中膜比が0.01のみに過ぎず、6羽のウサギの内4羽は0%であった。すべての A^1 群(食餌中のコレステロールを含むおよび含まない双方の場合)は、 A^2 カゼインを与えた群により高い内膜 - 対 - 中膜比を有していたが、第2群(20%乳清、0.5%コレステロールを含む)との内膜 - 対 - 中膜比の有意差はなかった。事実、食餌中のコレステロール非存在下の10% A^1 は、0.5%食餌中のコレステロールを含む20%乳清と等しい内膜 - 対 - 中膜比をもたらした(0.03)。

30

【0097】

このように大動脈弓の脂肪線条の厚さに関して、 A^1 カゼインは食餌中のコレステロール非存在下でさえも、0.5%コレステロールでもたらされる病変と類似する病変をもたらす。反対に A^2 は食餌中のコレステロールの存在下および非存在下の双方において、高いアテローム防護性があるように見受けられる。

40

【0098】

バルーンカテーテルによる $t = 0$ 時の右頸動脈への傷害は、6週までにすべてのウサギに過形成性新生内膜肥厚を誘発した。内膜 - 対 - 中膜比の測定は、第1群(20%乳清のみ)と比較して、第2群のウサギ(20%乳清、0.5%コレステロールを含む)の新生内膜肥厚に有意ではないがわずかな増加があることを示した。同様に5、10および20% A^1 プラス0.5%コレステロールを与えた群は、第1群に比してより厚い新生内膜であったが、有意差はなかった。5、10および20% A^2 プラス0.5%コレステロールを与えた群はすべて、それらの A^1 の対応する群より薄い新生内膜を有していたが、やはりこの値も有意ではなかった。同様に食餌中のコレステロール非存在下において、 A^2 を与えた動物(第10群)の内膜 - 対 - 中膜比は、 A^1 を与えた第9群より低かった。

50

【 0 0 9 9 】

すべてのコントロールの血管には新生内膜の肥厚は観察されなかった。

本発明は実施例により記載したが、変更および修飾は本請求項の範疇から離れずに行ってもよいことは、認識されるべきであろう。さらに、特定の特徴に対する公知の均等物が存在する場合には、このような均等物を本明細書において具体的に参照したものとして援用する。

【 0 1 0 0 】

産業上の利用可能性

β -カゼイン A² の消費は、血清コレステロールレベル、血中トリグリセリドレベル、LDL 濃度したがって LDL : HDL 比、ならびにアポリポタンパク質 B の血清レベルを低減するために有用である。したがって本発明の方法は、哺乳類の血清コレステロールレベル、LDL コレステロールレベルおよびトリグリセリドレベルに伴う、多様な疾患を予防または治療するために有用である。このような疾患として、高コレステロール血症、高脂血症、およびアテローム硬化症を含む。本発明はまた、 β -カゼイン A² を含有する栄養補助食品を提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 1 0 1 】

【図 1】図 1 は、 β -カゼイン A²、 β -カゼイン A¹、および乳清を与えた NZ シロウサギに関する、大動脈の内膜 - 対 - 中膜比（動脈の肥厚を表示する）の平均を示す。

【図 2】図 2 は、内膜除去した右頸動脈の新生内膜肥厚の程度（動脈壁傷害後の動脈の疾患の進行を表示する）を示す。A：第 1 群の実施例は、新生内膜の肥厚がないことを示す、B：第 2 群の実施例は、内膜層の多少の病変の形成を示す、そして C：第 5 群の実施例は重篤な内膜の肥厚を示す。

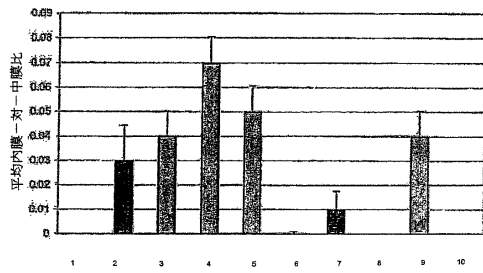
20

【図 3】図 3 は、 β -カゼイン A² を与えた、 β -カゼイン A¹ を与えた、および乳清を与えた NZ シロウサギに関する、血清コレステロールレベルを示す。

【図 4】図 4 は、 β -カゼイン A² を与えた、 β -カゼイン A¹ を与えた、および乳清を与えた NZ シロウサギに関する、血清 LDL - 対 - HDL 比を示す。

【図 1】

A.



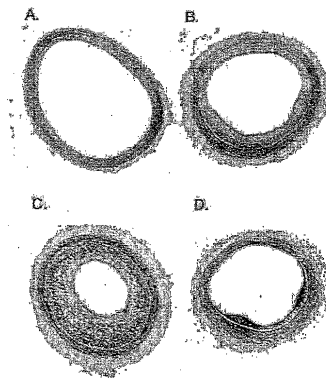
- 1 : 20%血清
 2 : 20%血清+0.5%コレステロール
 3 : 5%A¹+0.5%コレステロール
 4 : 10%A¹+0.5%コレステロール
 5 : 20%A¹+0.5%コレステロール
 6 : 5%A²+0.5%コレステロール
 7 : 10%A²+0.5%コレステロール
 8 : 20%A²+0.5%コレステロール
 9 : 10%A¹
 10 : 10%A²

有意性に関する表 (P<0.05)

群	有意差のある群
1	2, 4, 5, 7, 10
2	1, 9, 10
3	1, 9, 10
4	1, 9, 10
5	1, 9, 10
6	3, 4, 8
7	3, 4, 8
8	3, 4, 8
9	1, 2, 3, 4, 5, 7, 10
10	3, 4, 8

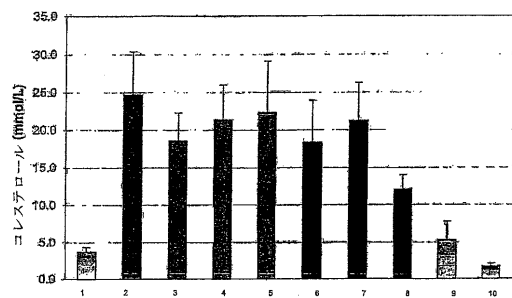
【図 2】

Figure 2



【図 3】

A.



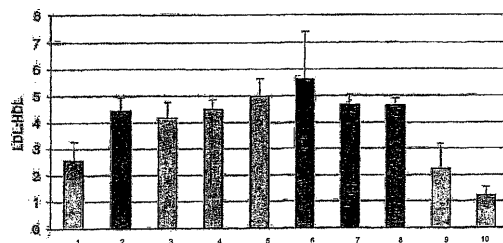
- 1 : 20%血清
 2 : 20%血清+0.5%コレステロール
 3 : 5%A¹+0.5%コレステロール
 4 : 10%A¹+0.5%コレステロール
 5 : 20%A¹+0.5%コレステロール
 6 : 5%A²+0.5%コレステロール
 7 : 10%A²+0.5%コレステロール
 8 : 20%A²+0.5%コレステロール
 9 : 10%A¹
 10 : 10%A²

有意性に関する表 (P<0.05)

群	有意差のある群
1	2, 4, 5, 7, 10
2	1, 9, 10
3	1, 9, 10
4	1, 9, 10
5	1, 9, 10
6	1, 9, 10
7	1, 9, 10
8	1, 9, 10
9	2, 4, 5, 7, 10
10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

【図 4】

A.



- 1 : 20%血清
 2 : 20%血清+0.5%コレステロール
 3 : 5%A¹+0.5%コレステロール
 4 : 10%A¹+0.5%コレステロール
 5 : 20%A¹+0.5%コレステロール
 6 : 5%A²+0.5%コレステロール
 7 : 10%A²+0.5%コレステロール
 8 : 20%A²+0.5%コレステロール
 9 : 10%A¹
 10 : 10%A²

有意性に関する表 (P<0.05)

群	有意差のある群
1	10
2	10
3	10
4	10
5	10
6	10
7	10
8	10
9	10
10	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

フロントページの続き

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 マクラチュラン, コーラン・ノーマン・スチュアート

ニュージーランド国オークランド, デボンポート, サマー・ストリート 29

(72)発明者 キャンベル, ジュリー・ヘイゼル

オーストラリア国クイーンズランド 4069, ブルックフィールド, サヴェージズ・ロード 181

(72)発明者 テイルフォード, クリスティ・アン

オーストラリア国クイーンズランド 4034, カーセルダイン, ダルウッド・ストリート 15

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 国際公開第01/000047(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/17

A61K 35/20

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)