

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500661  
 研究課題名 (和文) 柿ポリフェノールオリゴマーの製造技術の確立と抗加齢機能性食品の  
 開発  
 研究課題名 (英文) Preparation of Oligomeric Proanthocyanidin from Persimmon  
 and Its Anti-Aging Characterization  
 研究代表者  
 横澤 隆子 (YOKOZAWA TAKAKO)  
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授  
 研究者番号：90019133

研究成果の概要：柿高分子ポリフェノール (タンニン) を原料とし、新しい低分子化技術によ  
 って柿ポリフェノールオリゴマーを製造し、抗加齢機能性素材としての可能性を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：和漢医薬学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：柿, ポリフェノール, オリゴマー, 加齢, 寿命, 記憶, VEGFR-2

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来と食習慣の欧米化に伴って増大している生活習慣病をいかに予防するかが、わが国の大きな社会・経済問題となっている。5大生活習慣病と言われている悪性腫瘍、糖尿病、脳血管疾患、心疾患、高血圧疾患は加齢に伴って増加する疾患であり、これらによる年間死亡者数は総死亡者数の半数を超え、また、患者数はなお上昇傾向にある。わが国のこのような社会的背景を考慮すると、5大生活習慣病の発症率を抑え健康寿命を伸ばすことは、世界一の長寿国となったわが国にとっても極めて重要で、またその健康食品素材の資源を未利用資源に求めることは資源拡大の観点からも意義深いことである。

本研究は、(財)富山県新世紀産業機構の助成制度である「平成 15 年さきがけ研究開発助成事業 (テーマ名：柿ポリフェノールの低分子化による健康食品素材の研究開発)」の成果を発展的に継承するものであり、高分子タンニン類の低分子化による有用ポリフェノールの生産という、他に例を見ない本研究グループ独自の新技术に基づいている。また、柿ポリフェノールの原料として、富山県及び石川県において干柿の生産工程で廃棄される柿皮を用いるところにも特徴がある。富山県は全国 5 位の干柿生産地であり、石川県と合わせると年間 200t を超える柿皮が廃棄されている。廃棄されている柿皮を原料とするポリフェノールの生産は未利用資源の有効活用でもある。柿皮タンニンを断片化して得

た柿プロアントシアニジンオリゴマー（柿ポリフェノールオリゴマー）は、市販されているブドウ種子や松樹皮由来のポリフェノール及びカロチノイドの中で抗酸化活性が最も強いアスタキサンチンと比較して、細胞レベルで 2~3 倍強力な抗酸化能を有することが判明している（原著論文投稿中）。

これまでにポリフェノール（プロアントシアニジン）オリゴマーはいくつか商品化され応用された実績があるが、資源的に限られた植物しか利用されていない。また低活性の高分子ポリフェノール含有率が高く、オリゴマーを分離精製したものは非常に高価であり利用が限られていた。本研究で開発する柿ポリフェノールオリゴマーは、資源的に豊富でありながら従来利用出来なかった柿高分子ポリフェノールを原料とし、新しい低分子化技術によってオリゴマーを製造するものである。開発する低分子化技術は、今後さまざまな条件の最適化が必要であるが、特殊な設備や有機溶媒を使用することのない簡易な方法であり、低価格化が実現可能である。得られたオリゴマーは、従来品に比べて化学構造の上で高ピロガロール環、高ガロイル化率という特徴を有し、高い抗酸化活性に加えて、糖分解酵素阻害作用などの作用も期待でき、多機能な機能性素材である。

さらに、従来法では抽出されない高分子ポリマーもオリゴマー化することで収量が向上し低コストとなり、同時にポリマー含有率の低下によって、活性はもとより製品化する上で重要な要素である溶解性や味覚の向上が期待出来る。このようなことから、今後さらに需要増加が見込まれる抗酸化・抗加齢機能性食品市場において柿ポリフェノールオリゴマーを用いた製品は、非常に高い市場価値を有するものと期待される。また、本研究で製造する柿ポリフェノールオリゴマーは地域資源の有効利用と地域産業活性化に直結させることが出来る点でも価値がある。

ポリフェノール類を含む食品の末端国内市場規模はすでに 1,000 億円に達しており、健康志向の高まりとともに、今後さらに需要は伸びると思われる。吸収性が良く、高い薬理活性を有する柿ポリフェノールオリゴマーがポリフェノール類の末端市場規模の 10%、100 億円程度の国内市場を占有することは充分可能であり、海外展開出来ればその市場規模は 300 億円程度まで期待出来ると推測している。

## 2. 研究の目的

(1) 柿タンニンの酸分解による柿ポリフェノールオリゴマーを安定化し、工業的な量産規模において、効率的に収率良く低コストで目的とする柿ポリフェノールオリゴマーを製造する。

(2) 疾患モデルを用いて加齢に関連する機能解析を行い、加齢性疾患や生活習慣病の予防と回復に有効な柿ポリフェノールオリゴマーを主成分とする抗加齢機能性食品を開発する。

## 3. 研究の方法

従来のポリフェノールの製造は、茶葉からカテキン類、ブドウ種子や松樹皮からプロアントシアニジンのように、それぞれの植物に含まれるポリフェノールをもとものの形のまま抽出精製する方法で行われてきた。本研究においては、エピガロカテキン二量体~四量体を、柿タンニンの低分子化（イノベーション）によって得ることを新たなシーズとしている。柿タンニンはエピガロカテキンの重合体であるため、そのままでは体内で有効利用されないが、低分子化する事によって薬理効果が高まる。本研究に先駆けて行われた「平成 15 年さきがけ研究開発助成事業」（富山県）において、富山県産の柿皮タンニンを断片化して得た柿ポリフェノールオリゴマーが強力な抗酸化活性を示すことが判明しており、本研究では柿皮タンニンの低分子化を効率化し、量産化のための製造技術の確立を行う。

得られた柿ポリフェノールオリゴマーについて、疾患モデルを用い加齢に関連する機能解析を行う。なお、動物実験は富山大学生命科学実験センターの動物使用指針、並びに実験動物倫理委員会の審査を経て行われる。

## 4. 研究成果

(1) 柿皮を原料とする製造における求核剤（カテキン）の添加率を 0.5~6.0%まで検討し、総ポリフェノール含量及びオリゴマー構成比より、1.5~2.5%が妥当な範囲であり、カテキンの添加率 2.0%が最適と考えられた。柿皮の破碎処理では、柿皮粉碎器の導入によって、柿皮を効率よく粉碎処理できた。低分子化反応工程では、柿皮をペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ処理により反応液粘度を下げる事が出来、量産製造技術の確立が可能となった。

(2) 柿ポリフェノールオリゴマーについて、疾患モデルを用い加齢に関連する機能解析を行なった。まず老化の危険因子の糖尿病について、2 型糖尿病モデルを用いて検討し、オリゴマーの肝組織に対する作用から抗老化作用への可能性が示唆された。そこで、細胞老化の指標の DNA と Sirt1 に及ぼす作用を検討し、オリゴマーによって改善作用を示した。次いで、SAMP8 を用い、寿命と老年性認知症に対する作用、さらにオリゴマーの作用機序を明らかにするために、抗老化に関連する分子の解明にとり組んだ。その結果、SAMP8 にオリゴマーを連日経口投与した場

合、寿命の延長効果が認められた。現在、寿命延長因子として知られている Sirt1 の活性化剤の resveratrol とオリゴマーは、いずれも SAMP8 の脳組織における Sirt1 を増加させ、寿命延長に Sirt1 が関与している可能性が示唆された。一方、18 週齢と 38 週齢の SAMP8 にオリゴマーを経口投与した場合、認知障害が改善され、海馬での axon, dendrite, synapse 密度が増加し、neurogenesis の可能性が示された。また、hypothalamus や choroid plexus で VEGFR-2 のリン酸化を認め、VEGFR-2 のリガンドとアンタゴニストを用いた実験から、オリゴマーによる記憶障害改善作用は、VEGFR-2 を介していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Kim Y.J., Yokozawa T., Modulation of Oxidative Stress and Melanogenesis by Proanthocyanidins, Biol. Pharm. Bull., in press, 査読有
- ② Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., Effects of Proanthocyanidin Preparations on Hyperlipidemia and Other Biomarkers in Mouse Model of Type 2 Diabetes, J. Agric. Food Chem., 56, 7781-7789, 2008, 査読有
- ③ Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., Protective Effect of Persimmon (*Diospyros Kaki*) Peel Proanthocyanidin against Oxidative Damage under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Cellular Senescence, Biol. Pharm. Bull., 31, 1265-1269, 2008, 査読有
- ④ Fujii H., Nakagawa T., Nishioka H., Sato E., Hirose A., Ueno Y., Sun B., Yokozawa T., Nonaka G., Preparation, Characterization, and Antioxidative Effects of Oligomeric Proanthocyanidin-L-Cysteine Complexes, J. Agric. Food Chem., 55, 1525-1531, 2007, 査読有
- ⑤ Lee Y.A, Cho E.J., Tanaka T., Yokozawa T., Inhibitory Activities of Proanthocyanidines from Persimmon against Oxidative Stress and Digestive Enzymes Related to Diabetes, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 53, 287-292, 2007, 査読有
- ⑥ Yokozawa T., Kim Y.A., Kim H.Y., Lee Y.A, Nonaka G., Protective effect of persimmon peel polyphenol against high glucose-induced oxidative stress in LLC-PK<sub>1</sub> cells, Food Chem. Toxicol., 45, 1979-1987, 2007, 査読有
- ⑦ Lee Y.A, Kim Y.J., Cho E.J., Yokozawa T., Ameliorative Effects of Proanthocyanidin on Oxidative Stress and Inflammation in

Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, J. Agric. Food Chem., 55, 9395-9400, 2007, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., Anti-Aging Effects of Oligomeric Proanthocyanidin Isolated from Persimmon Fruits, The 12th International Conference on Oriental Medicine of Dong-Eui & Daegu Haany University, 2008 年 8 月 21 日, Busan, Korea
- ② Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., Improved Effects and Its Mechanism of Oligomeric Proanthocyanidins Isolated from Persimmon against Memory Impairment, 2008 International Symposium and Annual Meeting "Chronic Disease and LOHAS Foods", 2008 年 10 月 13-15 日, Jeju Island, Korea
- ③ 李 英娥, 趙 恩珠, 田中 隆, 横澤隆子, 柿ポリフェノールの 2 型糖尿病モデルによる検討, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26-28 日, 横浜
- ④ 李 英娥, 趙 恩珠, 田中 隆, 東田千尋, 横澤隆子, 老化促進モデルマウスの記憶障害に対する柿ポリフェノールオリゴマーの影響, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26-28 日, 横浜
- ⑤ 李 英娥, 横澤隆子, 柿果実のプロアントシアニンオリゴマーによる抗老化作用, 第 20 回腎とフリーラジカル研究会, 2008 年 9 月 20 日, 大阪
- ⑥ Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., Protective Effects of Proanthocyanidin from Persimmon Peel on Oxidative Stress and Inflammation in Diabetic Rats, The Korean Nutrition Society International Conference in Commemoration of the 40th Anniversary, 2007 年 11 月 1-2 日, Seoul, Korea

[図書] (計 1 件)

- ① Lee Y.A, Cho E.J., Yokozawa T., 東京医学社, 腎とフリーラジカル—第 9 集, 2008 年, 198-205

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 柿ポリフェノールオリゴマー  
発明者: 横澤隆子, 田中 隆, 太田富久, 奥村文男, 布沢哲二  
権利者: 明治薬品株式会社  
種類: 特願 2007  
番号: 165247  
出願年月日: 2007 年 6 月 22 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横澤 隆子 (YOKOZAWA TAKAKO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：90019133